



Title	園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究 : (第7報) 無菌培養によるブルーベリーのシュートの増殖と発根
Author(s)	鈴木, 卓; SUZUKI, Takashi; 神田, 啓臣 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 16(2), 221-229
Issue Date	1988-10-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/12097
Type	departmental bulletin paper
File Information	16(2)_p221-229.pdf



園芸植物の栄養繁殖に関する基礎的研究

(第7報) 無菌培養によるブルーベリーのシュートの増殖と発根*

鈴木 卓・神田啓臣・八鍬利郎

(北海道大学農学部果樹蔬菜園芸学教室)

今 河 茂

(北海道大学農学部附属農場)

(昭和63年6月14日受理)

Basic Studies on the Vegetative Propagation of Horticultural Plants

VII. *In vitro* multiplication and rooting of blueberry shoots

Takashi SUZUKI, Hiro-omi KANDA and Toshiro YAKUWA

(Department of Horticulture, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Shigeru IMAKAWA

(Experiment Farms, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

緒 言

茎頂培養法を利用して果樹種苗の大量増殖を行う場合、1) 培養確立(茎頂からのシュートの形成)、2) シュートの増殖、3) シュートからの発根及び4) 順化(1個体として独立させる)の四つの過程に分けて考える必要があるといわれている⁶⁾。ブルーベリーについてもこの方法を利用して種苗を増殖しようとする試みはかなり報告されているが^{2,5,7,8,11,12,14,16,17,18)}、その多くは培養確立に関するものであり、増殖から順化に至る過程についての詳細な報告は少ない。しかし、組織培養法を用いて大量増殖の実用化を図る場合、初代培養で確立された培養体の、効率的でしかも経済性の高い増殖及び発根の技術を開発することは特に重要な課題である。筆者らは、数年来ハイブッシュ・ブルーベリーの茎頂培養について検討を行ってきたが、初代培養の比較的難しい‘ランコカス’から得られた1個の培養体を増殖させ、均一な培養系を確立することができた。本研究はこれを用いて、シュートの効率的な増殖及び発根を促す要因について検討を行ったものである。

材料及び方法

北海道大学農学部附属農場に栽植されているハイブッシュ・ブルーベリー‘ランコカス’(*Vaccinium corymbosum* L. cv. Rancocas)の新梢又は休眠枝を季節ごとに採取し、腋芽から茎頂(横径約1mm、葉原基4個程度を有するもの)を無菌的に取り出し、種々の培養条件の下で、約1千個を培養した。その結果、シュートを形成したものが1個だけ認められた。これは1985年3月に休眠枝から取り出した茎頂を、WPM培地¹⁰⁾に6-benzylamino purine (BA) 10^{-5} M, gibberellin A₃ (GA₃) 10^{-5} M及びショ糖30g/lを添加しpH5.7に調整した後、寒天7g/lを添加した培養基を用いて、25°C、1日16時間照明の条件下で培養したものであった。そこで、このシュートから節部切片(長さ約5mm、2節程度を有する)を調製し、増殖用の培養基に植え継ぎ、多数のシュートを得た。この場合の培養基は、1/2濃度のMURASHIGEとSKOOGの無機塩類(このうちKNO₃を570mg/lとし、CaCl₂·2H₂Oは除き、Ca(NO₃)₂·4H₂Oを278mg/l添加)にLINSMAYERとSKOOGのビタミン類を通常の濃度で添加したものを基本培地とし、これに

* 文部省科学研究費補助金(一般A)、課題番号61440010による研究成果

6-(7,7-dimethylallylamino)-purine (2iP) 10^{-5} M, GA₃ 10^{-6} M及びショ糖 30 g/ℓを添加し pH 5.7に調整した後、寒天 7 g/ℓを添加したものをを用いた。また、培養条件は初代培養と同様とした。この方法を用い2~3か月おきに移植を繰り返すことにより、シュート増殖能の極めて高い培養系統を確立・維持することができたため、これを用いて以下のような実験を行った。

I. シュートの増殖

1. 材料の調製 上記の培養系で、初代培養から数えて10回余り移植を繰り返したものをを用い、移植後2か月経過した培養体から、次の3種の植え込み材料を調製して、それぞれの方法で植え込んだ。

① 縦植え区：約3 cmに伸長したシュートの先端部5 mm及び葉を取り除いた後、5節を含む長さ約15 mmの茎切片を作り、縦植えとした。この場合、茎切片の基部に近いほうから5 mmを培養基中に差し込んだ。

② 横植え区：同上の培養茎から、3節を含む長さ約10 mmの茎切片を作り、培養基上に横に置床した。

③ 茎盤区：培養体から伸長したシュートをすべて5 mm以下に刈り込んだ、横幅約9 mmの茎盤部を培養基上に置床した。この材料は上記2区の材料を切り取った残りの部分で、茎盤上には多数の不定芽が形成されていた。

2. 培養基の作製 培養基中の無機塩類及びビタミン類の濃度や組成は、前記の茎の継代培養に用いた培養基と同じとし、これにGA₃ 10^{-6} Mを加えたほか、2iPとショ糖を Fig. 1に示す濃度で組み合わせて添加し、pH 5.7に調整し、寒天 7 g/ℓを加えた。培養基は、100 ml容三角フラスコに25 mlずつ分注した後、アルミホイルで封をし、120°C、1.1 kg/cm²で約10分間加圧滅菌を行った。

3. 培養と調査 培養は、25°C、1日16時間照明(白

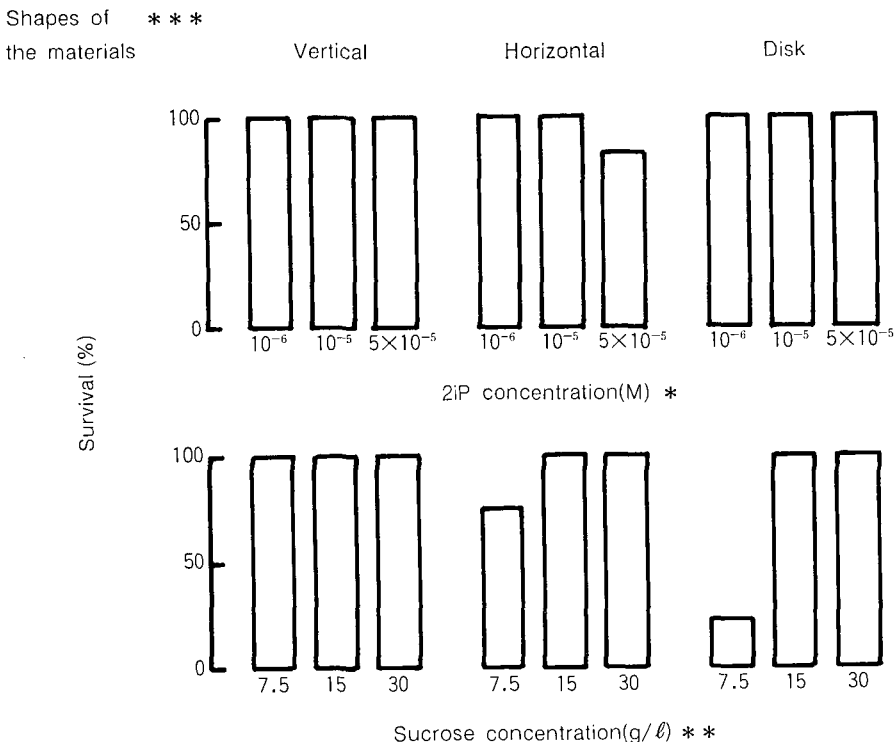


Fig. 1. Effect of 2iP and sucrose on survive of the cultures subcultured *in vitro*. Data were obtained after 8 weeks of culture.

* In combination with sucrose (15 g/ℓ).

** In combination with 2iP (10^{-5} M).

*** Vertical: Shoot tips were placed vertically on the media.

Horizontal: Shoot tips were placed horizontally on the media.

Disk: Stem disks formed from shoot tips were cultured.

色蛍光灯、約4,000 lx)の条件下で行い、1区当たりの培養体数は12とした。この場合、1フラスコ当たりの培養体数は、節部切片が6、莖盤が4であった。植え込みから8週間後に、生存個体数、培養体当たりシュート数、最大シュート長(一培養体中の最長シュートの長さ)及び培養体の最大横幅の各項目について調査を行った。この場合、長さ10 mm以上に伸長した莖をシュートとして扱った。

II. シュートからの発根

Iの実験で用いた材料と同様の方法で形成されたシュート(長さ25~30 mm)を基部から切り取り、非無菌的な環境下で基部の葉2~3枚を取り除いた後、基部から10 mm程度が挿し床に埋まるように挿し木を行った。挿し床には、パーミキュライト、パーミキュライトと鹿沼

土及びパーミキュライトとピートモスをそれぞれ1対1の体積比で混ぜたものの3種類を用い、使用前に120°C、1.1 kg/cm²で30分間加圧滅菌を行った後、播種箱に深さ7 cmとなるように詰め込んだ。挿し木後は水を充分に与え、播種箱全体を透明なプラスチックカバーで覆い、内部を湿潤状態に保った。なお、挿し木に先立ち、半数のシュートの基部を3-indolebutyric acid (IBA) 100 ppmの溶液に20分間浸漬した。培養は、1区当たり10個体とし、25°C 1日16時間照明(白色蛍光灯、約4,000 lx)の条件下で行い、5週間後にシュートからの発根について調査した。この場合、発根した根には非常によく分枝しているものから全く分枝の見られないものまで様々な程度のもがあり、シュートからの発根数のみでは発根状態を正確に表すことは困難であったので、発根の調査

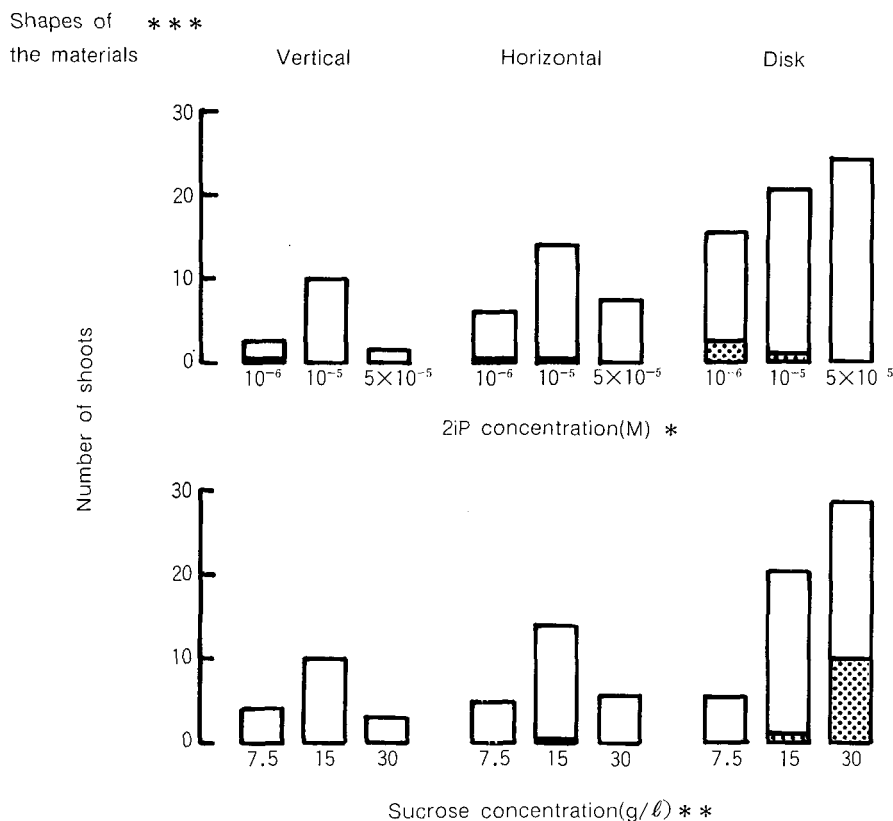


Fig. 2. Effect of 2iP and sucrose on the number of shoots developed in the *in vitro* subculture. Data were obtained after 8 weeks of culture. Stained zone represents the number of shoots elongated over 30 mm.

* } Refer to Fig. 1.
 ** }
 *** }

にはシュートからの発根数と発根量の2項目を採用した。発根量を表す指標としては、0: 無発根, 1: わずかに発根, 2: 貧弱, 3: 普通, 4: 良好の5つの基準値を設けて表示した。

結 果

I. シュートの増殖

Fig. 1 に培養体の生存に及ぼす2iP及びショ糖濃度の影響について示した。生存率は全体に高い値を示したが、横植えの2iP 5×10^{-5} Mとショ糖7.5 g/lの2区及び莖盤植えのショ糖7.5 g/lの区で枯死個体が認められた。このうち、横植えの2区は、移植した節部切片からシュートが全く生長せず枯死してしまったもののであるのに対し、莖盤の場合は、当初ある程度の生長を示した後、8週目まで培養を続ける間に基部から枯れ上がってしまったことによるものである。したがって、莖盤のような比較的大きな培養体を維持増殖させるには、7.5 g/lのショ糖濃度は低くすぎたものと考えられる。

次に、シュート数の比較は Fig. 2 のとおりで、2iPの濃度については縦植え・横植えの場合、いずれも 10^{-5} Mの区が最大であったのに対し、莖盤部では 5×10^{-5} Mの区が最大であった。また、ショ糖濃度の影響についても、縦植え・横植えと莖盤部とで2iPの場合と同様至適濃度に違いがみられ、莖盤部のみ30 g/lの高濃度で最大となった。

シュート長についての結果は Fig. 3 のとおりで、2iPの濃度別では植え込み形態にかかわらず 5×10^{-5} Mの区が最も小さな値を示し、最も長いシュートが得られたのは2iP 10^{-6} Mを含む培地で莖盤を培養した区であった。また、ショ糖濃度についてはシュート数の場合と同様の傾向がみられた。

以上の結果を総括すると、生存率、シュート数、シュート長のすべての面から最もシュートの増殖に適していたのは、莖盤植えのショ糖30 g/lの区(この区の2iP濃度は 10^{-5} M)で、この区では長さ10 mm以上のシュートを1株平均30本近く形成し、このうち、長さ30 mm

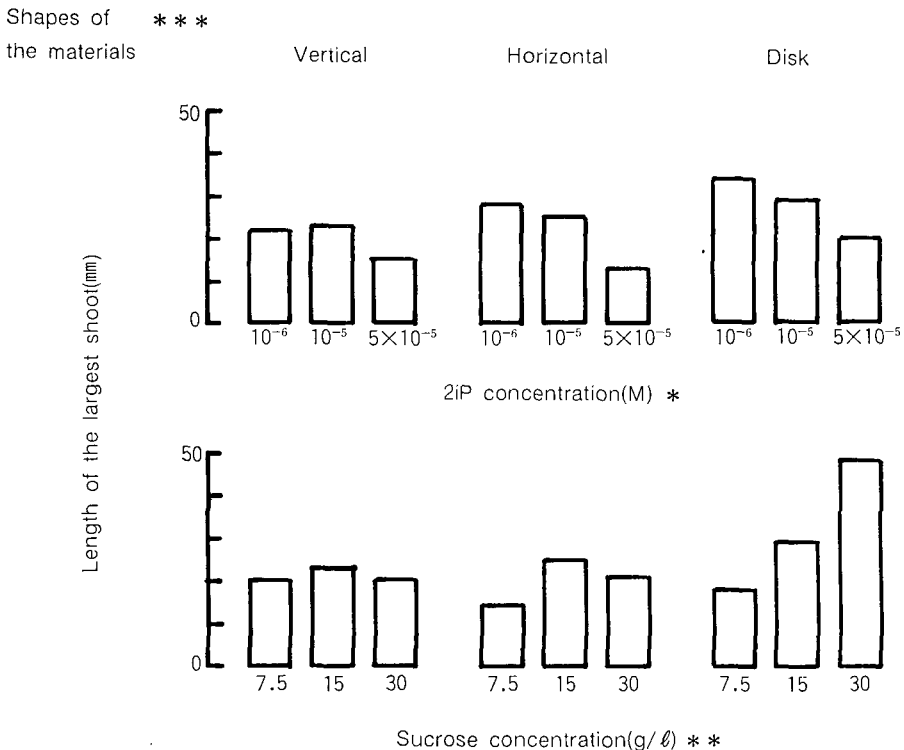


Fig. 3. Effect of 2iP and sucrose on the length of shoots developed in the *in vitro* subculture. Data were obtained after 8 weeks of culture.

*) Refer to Fig. 1.
 **) Refer to Fig. 1.
 ***) Refer to Fig. 1.



Fig. 4. Multiple shoot development from a stem disk after 5 weeks of subculture. Culture media contained 2iP (10^{-5} M) and sucrose (30 g/l).

以上のシュートが平均 10 本程度認められた (Fig. 2)。Fig. 4 は、この区のシュート発生状況を示したものである。

Fig. 5 は、茎盤部の形成・肥大に及ぼす 2iP 及びショ糖濃度の影響を示したもので、縦植えと横植えを比較すると、2iP 及びショ糖のいずれの濃度区についても、横植えが優れていた。また、移植した茎盤の肥大量は、2iP 及びショ糖の低濃度区でやや小さい値であった。

以上のことから、節部切片からの効率的なシュート増殖を図る場合、節部は 2iP 10^{-5} M 及びショ糖 15 g/l 程度を添加した培養基に横植えて茎盤を形成させ、次に茎盤部はショ糖濃度を高めた培養基へ移植し、さらにシュートを切り取った茎盤部は分割移植を繰り返すことにより、短期間に大量のシュートを連続的に得ることができるものと考えられる。

II. シュートからの発根

Table 1 に、シュートからの発根に及ぼす挿し床の種類及び IBA 処理の影響を示した。発根個体率は、挿し床の種類にかかわらず、IBA で処理した区ではいずれも 100% であったが、IBA 処理を行わなかった対照区でも

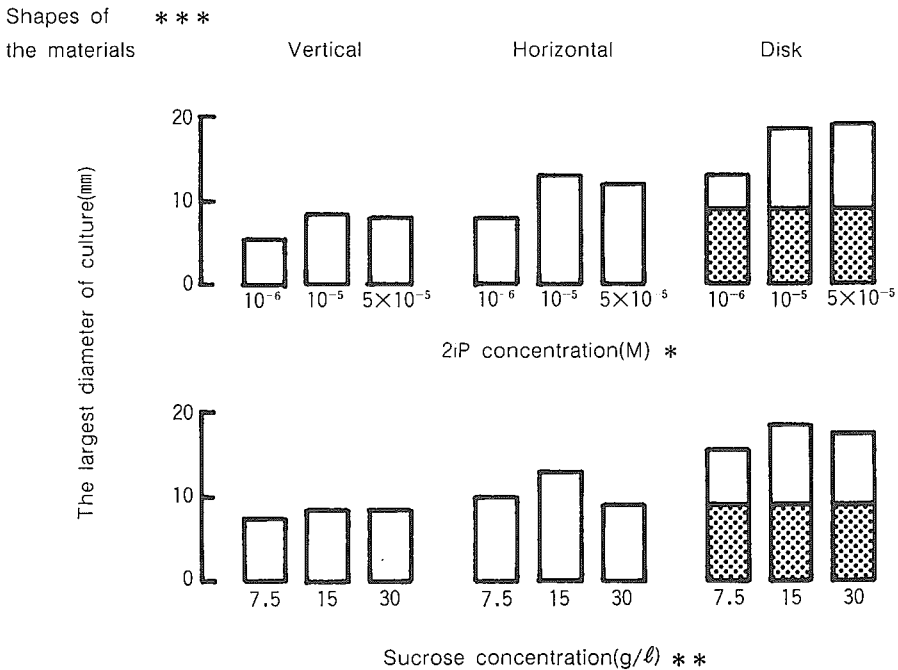


Fig. 5. Effect of 2iP and sucrose on enlargement of the cultures subcultured *in vitro*. Data were obtained after 8 weeks of culture. Stained zone represents the diameter of materials.

* } Refer to Fig. 1.
 ** }
 *** }

Table 1. Effect of IBA and the type of propagation beds on rooting from shoots cultured *in vitro*

Kind of beds	IBA	Total No. of plantlets	Rooting score (a)					Rooting ^x indicator	% of rooting plantlets	No. of roots	Length of the largest root (mm)
			0	1	2	3	4				
vermiculite	treated	10	0 ^b	0	4	4	2	2.8	100	7.2	28.5
vermiculite	non.	10	2	2	5	1	0	1.5	80	1.8	14.9
vermiculite + Kanumatsuchi ^Y	treated	10	0	0	2	4	4	3.2	100	5.0	27.6
vermiculite + Kanumatsuchi	non.	10	3	1	2	3	1	1.8	70	1.9	17.8
vermiculite + peat-moss	treated	10	0	0	5	5	0	2.5	100	6.4	19.4
vermiculite + peat-moss	non.	10	2	0	5	3	0	1.9	80	1.7	19.6

X: $\sum ab/10$ (b: No. of plantlets)

Y: a kind of pumice

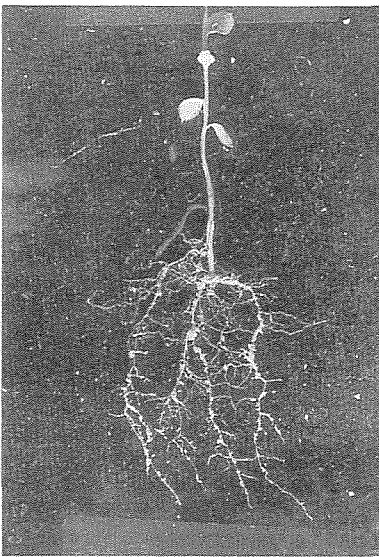


Fig. 6. Root differentiation on a cutting inserted in the mixture of vermiculite+Kanumatsuchi (1:1) after 5 weeks of culture. The bottom of the cutting obtained in the *in vitro* subculture were treated with IBA (100 ppm) for 20 minutes before insertion.

70%以上の高い値を示した。この場合、発根しなかったシュートの基部はすべてカルス化した。また、シュートからの発根数は、対照区が1個体当たり1.7~1.9本であったのに対し、IBA処理区では5.0~7.2本と大きな差を示した。また、発根量を5段階の基準で評価し、これを

平均値化した発根指数で比較した結果は、いずれの挿し床についてもIBA処理区が無処理区に比べ優れていた。この中でも、特にバーミキュライト+鹿沼土の区における発根の状態が良好であった (Fig. 6)。

以上のことから、IBAは発根にとって不可欠ではないものの、処理を行うことにより発根量が著しく増加するものと考えられる。また、培養植物体の発根から順化に至る過程を結び付けて考えることのできる、培養シュートの用土への直接挿しは、組織培養による大量増殖を実用化する上で、有効な手段になるものと考えられる。

考 察

ブルーベリーの大量増殖を目的とした組織培養の研究はかなり報告されているが^{2,5,7,8,11,12,14,16,17,18}、種・品種あるいは用いられた培養基の組成の違いなどにより結果は様ではなく、多くの品種に対して適用されるものとは考えにくい点が多い。すなわち、ある品種について極めて効率的な大量増殖法が確立されたという報告があっても、他の品種についてそれと全く同様の方法を試してみるとほとんど利用価値が認められないことも多く、場合によっては同一品種であっても再現性の低いことがある。これは、ブルーベリーの組織培養適性の品種間差が大きいためと考えられ、特に経済品種の中には組織培養による大量増殖の難しいものが多く、まだ検討すべき問題が多分に残されている。この問題を解決するには、あらゆる品種に対して適用できる増殖法が確立されるか、あるいは、品種ごとに確実な増殖法が確立されるのが理想的であるの言うまでもないが、極めて増殖困難

な品種については、その品種の中から組織培養適性が高く、効率的に増殖可能な株（系統）を1個体でも選抜することができれば、その株を増殖することにより問題は解決できることになる。

本報告はその実例を示したものであり、ブルーベリーの中でも初代培養の比較的難しい‘ランコカス’からたまたま得られた一培養系を用い、培養シュートの効率的な増殖法と発根を促す要因について検討を行った結果、種苗の経済的生産に十分な大量増殖が可能と云い得る成績が得られた。

次に各項目について考察を加える。本研究の場合、緒言に述べた大量増殖の4つの過程のうち1)の培養の確立、すなわち茎頂からのシュートの形成の過程については問題は存在しない。したがって、問題は2)のシュートの増殖以降の過程となる。

WOLFEら¹⁷⁾は、ブルーベリーの組織培養には培地成分から塩素を除いたZIMMERMANのZ-2培地が適していると述べ、石原ら^{7,8)}も、シュートを増殖させる際に1/2濃度のMS培地から塩素を除くことにより良好な結果を得ている。本実験でも、これらの報告を参考にしてシュート増殖用培地の成分から塩素を除いた結果、高いシュート増殖率が得られたことから、ブルーベリーの培養（特にシュートの増殖を目的とした場合）には塩素を除去した培地が有効なのではないかと考えられる。

*In vitro*における種苗の大量増殖を目指す場合、一定時間当たりに形成されるシュートの数を増加させることが甚だ重要となるが³⁾、本実験の結果から、ブルーベリーでは、節部を横植えて茎盤を形成させることと、茎盤を分割してシロ糖濃度の高い培養基で繰り返し継代することの併用が有効であることが明らかになった。しかし、本実験では30 g/lよりも高いシロ糖濃度について検討しなかったため、茎盤部を植え込む場合の適濃度を明らかにすることはできなかった。節部を増殖させる場合2 iP濃度は 10^{-5} M程度が至適で、これより濃度が高いとシュート数は減少する傾向が認められたが、これは石原^{7,8)}の報告と一致した。塚原ら¹⁴⁾は、ハイブッシュ・ブルーベリー‘デクシー’を用いて同様の実験を行い、シュートの増殖には本実験同様横植えが縦植えより優れていることのほかに、苔様の塊から大量のシュートが得られたことを報告している。この苔様の塊は、本実験で用いた茎盤部とは異なるものと考えられるが、苔様の塊がカルスと異質のものか否か検討する余地も残されており、遺伝的安定性を調べることも今後の課題であろう。

次に、シュートからの発根と馴化についてであるが、

本研究では*in vitro*で増殖したシュートをフラスコから取り出し非無菌的操作で挿し木を試みた。片岡ら⁹⁾は、パパイヤの培養シュートを非無菌的な条件下で用土へ直接挿し木することにより、良好な発根が得られたことを報告している。また、ZIMMERMAN¹⁸⁾はブルーベリーのシュートの基部に0.1% IBA処理を施した後、水苔粉碎物に挿し木し、ミスト状態を保つことにより、72~90%の発根率が得られたことを報告し、LYRENE¹¹⁾も同様のことを報告している。さらに、石原^{7,8)}も‘ランコカス’を用いて、本実験同様IBA 100 ppm溶液にシュートの基部を15分間浸漬した後、ピート+パーライト(1:1)に挿し木することにより70~80%の発根率が得られたことを報告している。一般に、培養シュートの発根には、通気性などの点から寒天よりもパーミキュライトなどの方が優れていると言われているが⁴⁾、本実験の結果から、ブルーベリーにはパーミキュライトと鹿沼土を混ぜたものが適していることがわかった。また、シュートからの発根を良好にする上で、IBA高濃度液への短時間浸漬処理は有効な手段であると考えられる。同時に、非無菌的な条件下での用土への直接挿しは、*in vitro*操作に要する手間を省くと共に、4)の過程である順化の操作も省くことができ、一度に大量の植物体を扱うことを可能にするため、組織培養苗の大量増殖を実現する上で、極めて実用性の高い方法であると考えられる。

以上述べたように、本研究で使用した材料は、条件さえ良ければ種苗生産の実用化に充分なだけの、シュートの増殖と発根を示した。すなわち、組織培養法で増殖が難しい品種であっても、シュート形成能が高くしかも発根しやすい培養系を選抜できれば、大量増殖も容易になることの一例を示すことができたことになる。

LYRENE¹¹⁾は、ラビットアイ・ブルーベリーの初代培養で、成木相よりも幼木相から材料を採取したほうがシュートを獲得しやすいこと、並びに成木相から得られたものであっても、rejuvenationを引き起こした培養体は継代培養すると、極めて高いシュート増殖能力を示したことを報告している。また、継代培養を数回繰り返した後にrejuvenationが起こることは、多くの果樹の茎頂培養で指摘されている点である^{1,13,15)}。これらのことから、本実験に用いた系統は、初代培養時あるいは継代培養を数回繰り返した後にrejuvenationを引き起こし、その結果植物体再生能が著しく高まった系統である可能性が考えられる。

一方、初代培養において多くの供試材料の中からたまたま得られた一系統ということは、突然変異などにより

in vitro での培養に適した植物体が作出され、これを選抜できた可能性も考えられるので、今後遺伝的変異性について親品種と比較する必要があるものと考えられる。遺伝的変異が起きていたとすれば、本系統は培養に適したブルーベリーを作出するための育種母本として重要であると共に、この系統自体収量性や品質に優れていれば新たな品種として期待できるので、今後これらの点について検討したいと考えている。

摘 要

ハイブッシュ・ブルーベリーの中でも初代培養の比較的難しい‘ランコカス’の、茎頂培養によりたまたま得られた一培養系を用い、効率的なシュートの増殖及び発根について検討した。結果の概要は以下のとおりである。

1. シュートの増殖に最も適していたのは茎盤植えの $2 \text{ iP } 10^{-5} \text{ M}$ 及びショ糖 30 g/l の区で、この区では培養8週間で長さ 10 mm 以上のシュートを1株平均30本近く形成し、このうち長さ 30 mm 以上のシュートを平均10本程度形成した。

2. 縦・横植えの節部切片から形成されるシュート数は、 $2 \text{ iP } 10^{-5} \text{ M}$ 及びショ糖 15 g/l の区で最大であった。

3. 節部切片からの茎盤の形成を促す場合、 2 iP 及びショ糖濃度にかかわらず、横植えが縦植えより優れていた。

4. 挿し木したシュート(長さ $25 \sim 30 \text{ mm}$) の発根率は、 $70 \sim 80\%$ と高い値を示した。また、挿し木に先立ち IBA 処理を施したシュートの発根率は、いずれも 100% であった。IBA 処理により、発根率だけでなく発根数も増加した。

5. 3種類の挿し床のうち、パーミキュライト+鹿沼土 (1:1) が発根に最も適していた。

6. 以上から、組織培養法で増殖が難しい品種であっても、シュート形成能が高く、しかも発根しやすい培養系を選抜できれば、大量増殖も容易になるものと考えられる。

引用文献

- 伴野 潔・山下 聡・森本 賢・田辺賢二・林 真二：組織培養によるナン台木の特性と Rejuvenation. 園学要旨昭 63 春：76-77. 1988
- 福井博一・村上保之・原田 隆・田村 勉：ハイブッシュブルーベリーの茎頂の生長に及ぼす生長調節物質の影響とその季節的变化. 北大農邦文紀, 15 (1): 1-6. 1986
- FREGMANN, A. W. and WAINWRIGHT, H.:

Shoot doubling time: a quantitative parameter for characterizing shoot cultures *in vitro*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 1: 85-92. 1981

- 羽生田忠敬：ウイルスフリー株、無病苗の育成、園芸学会シンポジウム講演要旨昭 60 秋：21-27. 1985
- HARADA, T. and YAKUWA, T.: Basic studies on the vegetative propagation of Horticultural plants IV. Callus formation in the *in vitro* culture of current shoot segments of highbush blueberry, *J. Fac. Agric. Hokkaido Univ.*, Vol. 61, Pt. 4: 419-425. 1984
- 石原愛也：果樹の茎頂培養と繁殖への利用 (I) (II), 農業および園芸, 55: 1090-1094, 1216-1222. 1980
- 石原愛也：植物の茎頂培養とマスプロダクション、ブルーベリー。凍結保存—動物・植物・微生物, p. 236-238, 朝倉書店. 1987
- 石原愛也・伊藤吉晴・森沢 敏・伊藤美穂子・鎌田 徹：ハイブッシュ・ブルーベリー cv. コンコードのミクロ繁殖法. 園学要旨昭 60 春, 70-71. 1985
- 片岡郁雄・井上 宏：組織培養によるパパイアの大量繁殖. 園学要旨昭 62 秋: 168-169. 1987
- LLOYD, G. and MCCOWN, B.: Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture, *Proc. Intern. Plant Prop. Soc.*, 30: 421-427. 1980
- LYRENE, P. M.: Micropropagation of rabbit-eye blueberries, *HortSci.*, 15 (1): 80-81. 1980
- NICKERSON, N. L.: *In vitro* shoot formation in lowbush blueberry seedling explants, *HortSci.*, 13 (6): 1978
- PIERIK, R. L. M.: Vegetative propagation, p. 183-230 In: *In vitro* culture of higher plants, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 1987
- 塚原一幸・小池洋男・羽生田忠敬：組織培養によるブルーベリー‘デクシー’の効率的なシュート増殖方法について. 第10回植物組織培養シンポジウム要旨, 85. 1987
- WAINWRIGHT, H. and FLEGMANN, A. W.: The micropropagation of gooseberry (*Ribes uvacrispa* L.): II. *In vitro* proliferation and *in vitro* establishment, *J. Hort. Sci.*, 60 (4): 485-491. 1985
- WOLFE, D., CHIN, C. and ECK, P.: Relation-ship of the pH of medium to growth of ‘Blue-crop’ highbush blueberry *in vitro*, *HortSci.*, 21 (2): 296-298. 1986
- WOLFE, D., ECK, P. and CHIN, C.: Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry, *HortSci.*, 18 (5): 703-705. 1983

18. ZIMMERMAN, R. H. and BROOM, O. C.: Blueberry micropropagation, p. 44-52. In: Proc. of the Conf. on Nursery Production of Fruit Plants through tissue culture —Applications and Feasibility. USDA-SEA, Agr. Res. Results AAR-NE-11. 1980

Summary

Shoot multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Rancocas) with an *in vitro* culture strain obtained by chance from a shoot apex and maintained by subculture was investigated on agar-solidified media containing modified MURASHIGE and SKOOG's half-strength inorganic salts (KNO_3 570 mg/l and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 278 mg/l added, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ eliminated), LINSMAYER and SKOOG's vitamins, agar 7 g/l, GA_3 10^{-6} M, 2 iP and sucrose. The pH value of the media was adjusted to 5.7. The shapes of the materials were prepared as follows: shoot tips (approximately 15 mm in length) for vertical inoculation into the media; shoot tips (approximately 10 mm in length) for horizontal inoculation on the media; stem disks formed from cultured shoot tips.

Proliferated shoots (approximately 25-30 mm in length) were inserted for rooting into the three kinds of propagation beds (vermiculite; vermiculite + Kanumatsuchi (a kind of pumice) (1:1); vermiculite + peat-moss (1:1)) under non-sterile mist condition.

All the cultures were maintained at 25°C under 16-hour daily illumination (4,000 lx). The results obtained are summarized as follows:

1. The best growth and the largest number of shoots of 10 mm or longer were obtained by the culture of stem disks on media containing 2 iP 10^{-5} M and sucrose 30 g/l.

2. The number of shoots developed from vertical and horizontal shoot tips was largest at 2 iP 10^{-5} M and sucrose 15 g/l.

3. Horizontal inoculation of shoot tips was more effective in the formation of stem disks than the vertical inoculation regardless of the concentrations of 2 iP and sucrose.

4. Microcuttings with or without IBA (100 ppm) treatment exhibited high rooting percentages (70-100%) under non-sterile conditions in closed containers in three kinds of propagation beds. IBA treatment on the base of shoots before insertion raised the percentages of rooting and increased the number of roots.

5. The mixture of vermiculite + Kanumatsuchi (1:1) seemed to be the most suitable propagation bed for rooting of blueberry shoots.

6. As described above it will be more easy to propagate some cultivars which have not been able to proliferate their clones by tissue culture, when the strains with a high ability of shoot formation and rooting can be selected *in vitro*.