

キクの in vitro 保存

深井誠一・森井正弘・大江正温

大阪府農林技術センター
(〒583 羽曳野市尺度 442)

(1987年 9月 1日受付)

(1987年 11月 24日受理)

キクの in vitro での短・中期的保存法を確立するため、培養温度、培地のシヨ糖濃度および浸透圧条件および生長抑制剤の利用を検討した。培養温度を 10℃ に下げると、25℃ 条件下に比べてキクの生長および培地からの N, P, K の吸収はゆるやかとなった。10℃ 下で培養したキクは節間のつまった草姿となり欠刻のある成形の葉を有していた。培地中のシヨ糖濃度を下げるに従い、またマンニトールを加えて浸透圧を上げるに従いキクの生長は有意に抑制された。生長抑制剤はキクの生長抑制に有効であり、中でもウニコナゾール 100ppm 処理が最も効果が高かった。以上より培養温度を 10℃ に下げ、シヨ糖を含まない培地を用いることにより、1 年以上継代の必要はなかった。

1. 緒 言

キクは栄養繁殖性の花きであり、品種の保存は通常親株を圃場で維持することによってなされている。この方法は、労力、面積ともにばう大なものを必要とし、かつ植物体もウイルス等の病害汚染、不慮の事故による遺失の危険にさらされている。

これらのことを解決するため、茎頂培養によって得た無病の植物体を in vitro で維持保存する技術の開発が望まれる。in vitro で植物体を保存する方法は、base collection にあたる生殖質の凍結保存と active collection にあたる生長抑制条件下での保存に大別できる¹⁾。

後者の中には、光を伴わずに 0℃ 付近の温度で冷蔵する方法と、明条件下で培養温度、培地等の条件により生長を抑制する方法がある²⁾。

本報では、キクを材料として明条件下で培養温度を下げることによる生長抑制を検討するとともに、培地中の糖濃度と浸透圧の調節、植物体への生長抑制剤処理等による生長抑制を検討した。

2. 材料および方法

(1) 培養方法

茎頂培養を行って得たキク品種“秀芳の力”の幼植物を、ハイポネックス（ハイポネックスジャパン社、6.5-6-19）3g/l、シヨ糖 20g/l、寒天 8g/l を含む培地（以下基本培地）で生育させた。この無菌植物から葉 2 枚を有

するさし穂（約 0.03 g）を採り外植体とした。各試験は 50 ml の培地を入れた 6.5×6.5×8.5 cm のプラスチックボックスに 3 本ずつさし木の要領でキクを置床し、1 試験区 2~4 ボックス用いた。置床後、1,500 lux、24 時間照明の各温度下で培養した。

(2) 調査方法

所定の日数を経た後、草丈、分枝数、葉数、地上部および地下部生体重を計測した。また一部の試験区については、植物体を取り去った後の寒天を一度凍結、解凍しその濾液について、N、P₂O₅、K₂O 濃度を測定した。N は水蒸気蒸留法により全窒素を、P₂O₅ はバナドモリブデン酸法で、K₂O は原子吸光測光法により測定した。

(3) 試験の構成

試験Ⅰ。培養温度がキクの生長に及ぼす影響、基本培地に置床後 30~10℃ の様々な温度下で培養した予備試験の結果では、10℃ 下で最も生長が抑制された。このため通常培養に用いる 25℃ 下および 10℃ 下で 20、40、60、90、120、150 日間培養後上記の調査を行った。

試験Ⅱ。培地のシヨ糖濃度およびマンニトール濃度がキクの生長におよぼす影響。基本培地のシヨ糖濃度を 0、1、5、20、80、120、160 g/l に増減した培地で 25℃ 下、60 日間培養した。また基本培地のシヨ糖濃度はそのままにして、マンニトールを 0、20、40、80 g/l 添加して浸透圧を高めた培地で 25℃ 下、60 日間培養した。

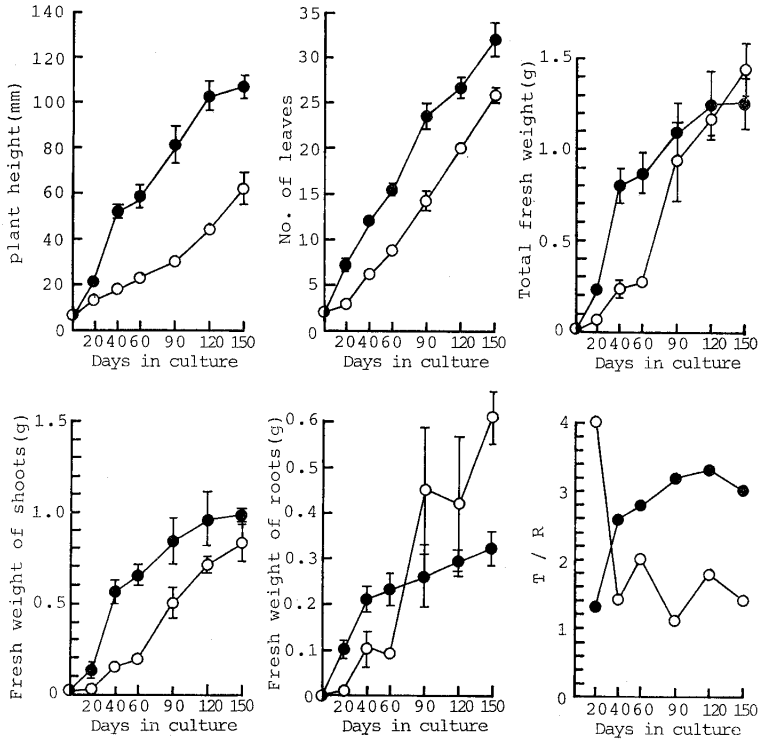


Fig. 1. Effect of temperature on growth of chrysanthemum in vitro.

The cultures were incubated at 25°C (filled symbol) or 10°C (open symbol). The medium contained 0.3% Hyponex and 2% sucrose.

T/R = Fresh weight of shoot/fresh weight of roots.

試験Ⅲ. 生長抑制剤の浸漬処理がキクの生長におよぼす影響。ウニコナゾール (スミセブン, 山本農薬) 50, 100 ppm, ダミノジット (B-9, 日本曹達) 2000, 4000 ppm, ABA (和光純薬工業) 50, 100 ppm の各薬剤を, 0.45 μ m のメンブランフィルターにより除菌し, その液中へ外植体を30分間浸漬の後, 基本培地に置床し 25°C 下, 60日間培養した。

試験Ⅳ. 温度と他のストレスの相互作用。試験Ⅰ～Ⅳの結果より, 培養温度を 10°C として④ショ糖無添加培地, ⑤基本培地にマンニトール 40 g/l 添加培地, ⑥ウニコナゾール 100 ppm 処理の3方法で150日間培養した。

3. 結 果

(1) 温度の制限による生長抑制

10°C 下で培養したキクは, 節間のつまった草姿となり, 培養150日後では25°C 下に比べて草丈 58.3%, 葉数 80.6% に抑制された。全生体重は, 25°C 下で培養40日後までに急速に増加したが, 150日後では培養温度による差はなくなった。地下部生体重は, 25°C 下では

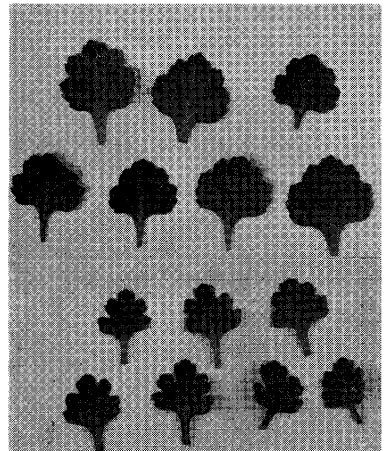


Fig. 2. Temperature effect on leaf shape.

Upper : from plant grown at 25°C,
lower : from plant grown at 10°C.

培養40日以降増加が鈍ったのに対し10°C 下では増加を続けた。結果として25°C 下では T/R 率 (地上部生体重÷地下部生体重) が高くなり, 10°C 下では低くなった

(Fig. 1). また 25℃ 下では培養 90 日頃から下葉の白化が認められ、さらに培養日数を経るに従い形成された葉は徐々に小さくなった. なお 10℃ 下では培養 40 日頃より欠刻のある成形の葉を展開したが、25℃ 下では欠刻のない幼形の葉を展開し続けた (Fig. 2).

培養期間中の培地の N, P₂O₅, K₂O の減少過程を Fig. 3 に示した. 25℃ 下では培養 40 日後までに培地中の N が急速に減少したのに対し、10℃ 下ではゆるやかに減少した. 一方 P₂O₅ と K₂O は、25℃ 下では培養 40 日以降減少が見られず、10℃ 下ではゆるやかに減少を続けた.

(2) 培地中のショ糖およびマンニトール濃度による生長抑制

基本培地のショ糖濃度を 0, 1, 5 g/l に減ずると、ショ糖濃度が低いほど草丈は低く、葉色はうすくなり葉数も減って全体として地上部の生長は抑制された. さらに根の生長は著しく抑制され、T/R 率の高い植物体となった. 一方、ショ糖濃度を 80, 120, 160 g/l に増すと、葉色は濃くなり葉はやや小型化し、120 g/l 以上では草丈が低くなった. 全体として地上部の生長は抑制されたが、根の生長は影響されなかった (Table 1).

基本培地にマンニトールを 20, 40, 80 g/l 添加して浸透圧を上げると、マンニトールの添加量が多いほど草丈は低く節間がつまった植物体となった. また葉色は濃くなり葉数も減り地上部の生長は抑制された. マンニトール 40 g/l 以上では根の生長も抑制された. マンニトール 80 g/l 区では頂芽が座止してえき芽が発達し植物体全体が硬化し、発根も見られなかった (Table 2).

(3) 生長抑制剤による生長抑制

ウニコナゾール, ダミノジット, ABA の順でさらに処理濃度が高いほど草丈が低く葉数も減った. しかし地

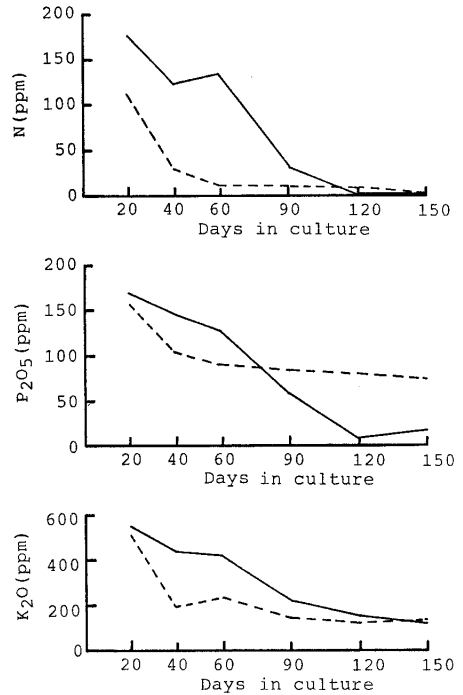


Fig. 3. Effect of temperature on the N, P₂O₅ and K₂O absorption of chrysanthemum in vitro.

Each value indicates nutrient remain in the medium at 25°C (dotted line) or 10°C (solid line) after various day-culture.

上部生体重量は薬剤処理による有意な差は認められず、根の生長はウニコナゾール 100 ppm 区でのみ抑制された (Table 3). ウニコナゾール処理したキクは、葉が厚くやや内側にまき葉色が濃くなり、さらに支根の発達の少

Table 1 Effects of sucrose on growth of chrysanthemum in vitro.

Sucrose (g/l)	No. shoots	Plant height (mm)	No. leaves	Fresh weight (g)		T/R
				Shoots	Roots	
0	1.0±0.0 a	21.7±5.2 e	7.5±1.0 d	0.18±0.04 c	0.04±0.01 b	4.5
1	1.0±0.0 a	27.5±3.3 de	10.6±0.9 cd	0.28±0.05 bc	0.06±0.01 b	4.7
5	1.0±0.0 a	34.5±2.6 d	10.9±0.5 c	0.33±0.05 bc	0.06±0.01 b	5.5
20	1.0±0.0 a	56.8±2.0 ab	16.8±0.7 a	0.63±0.10 a	0.29±0.03 a	2.2
80	1.0±0.0 a	63.8±3.1 a	14.8±0.8 b	0.46±0.03 b	0.24±0.02 a	1.9
120	1.0±0.0 a	47.2±4.5 bc	14.7±1.4 b	0.36±0.07 bc	0.21±0.05 a	1.7
160	1.2±0.2 a	37.7±4.8 cd	13.0±1.7 bc	0.30±0.04 bc	0.25±0.05 a	1.2

Means with standard error and indicating the significance of difference by a, b, c and d by Duncan's multiple range test, $p=5\%$

The medium contained 0.3% Hyponex and various concentration sucrose.

The cultures were incubated at 25°C for 60 days.

T/R=Fresh weight of shoots/fresh weight of roots.

Table 2. Effect of mannitol on growth of chrysanthemum in vitro.

Mannitol (g/l)	No. shoots	Plant height (mm)	No. leaves	Fresh weight (g)		T/R
				Shoots	Roots	
0	1.2±0.2 b	57.5±2.7 a	15.2±0.9 a	0.70±0.07 a	0.26±0.04 a	2.7
20	1.2±0.2 b	34.8±3.3 b	12.0±1.3 b	0.35±0.09 b	0.15±0.05 ab	2.3
40	1.3±0.2 b	26.8±1.7 c	12.7±1.2 ab	0.24±0.04 b	0.12±0.02 b	2.0
80	2.8±0.4 a	10.5±1.3 d	4.0±0.0 c	0.36±0.10 b	0 c	0

Means with standard error and indicating the significance of difference by a, b, c and d by Duncan's multiple range test, $p=5\%$.

The medium contained 0.3% Hyponex, 2% sucrose and various concentration mannitol.

The cultures were incubated at 25°C for 60 days.

Table 3. Effect of plant growth retardants by dipping treatment on growth of chrysanthemum in vitro.

Chemicals	Conc. (ppm)	No. shoots	Plant height (mm)	No. leaves	Fresh weight (g)		T/R
					Shoot	Roots	
Uniconazole	50	1.0±0.0 a	28.2±3.4 cd	11.7±0.5 de	0.59±0.10 a	0.12±0.03 ab	4.9
	100	1.0±0.0 a	24.8±1.7 d	10.0±0.5 e	0.48±0.07 a	0.09±0.02 b	5.3
Daminozide	2000	1.0±0.0 a	47.7±2.1 b	14.8±0.7 ab	0.76±0.04 a	0.26±0.01 a	2.9
	4000	1.2±0.2 a	35.3±1.8 c	12.8±0.4 cd	0.63±0.05 a	0.20±0.02 ab	3.2
ABA	50	1.0±0.0 a	62.0±5.1 a	13.8±0.6 bc	0.59±0.07 a	0.26±0.05 a	2.3
	100	1.0±0.0 a	48.0±2.0 b	13.5±0.4 bcd	0.47±0.07 a	0.20±0.03 ab	2.4
Control	—	1.0±0.0 a	56.8±2.3 ab	15.8±1.1 a	0.62±0.07 a	0.27±0.06 a	2.3

Means with standard error and indicating the significance of difference by a, b, c and d by Duncan's multiple range test, $p=5\%$

The medium contained 0.3% Hyponex and 2% sucrose. The cultures were incubated at 25°C for 60 days.

Plantlets were dipped in each chemical solution sterilized by 0.20 μm filter for 30 min before placing on the medium.

Table 4. Growth of chrysanthemum under minimal growth conditions.

Treatment	Plant height (mm)	No leaves	Fresh weight (g)		T/R
			Shoot	Root	
A	25.8±2.8 c	12.4±0.5 c	0.27±0.04 d	0.05±0.01 c	5.4
B	45.0±2.1 b	19.5±1.0 b	0.45±0.03 c	0.19±0.02 c	2.3
C	23.8±1.4 c	10.4±0.4 c	0.72±0.07 b	0.47±0.04 b	1.5
Control	64.8±4.0 a	23.3±0.9 a	0.95±0.07 a	0.60±0.07 a	2.0

Means with standard error and indicating the significance of difference by a, b, c and d by Duncan's multiple range test, $p=5\%$.

Treatment A: the medium contained 0.3% Hyponex only (see Table 1), B: the medium contained 0.3% Hyponex, 2% sucrose and 4% mannitol (see Table 2), C: plantlets were dipped in 100 ppm uniconazole for 30 min before placing on the medium (see Table 3).

The cultures were incubated at 10°C for 150 days.

ない太い根を形成した。ダミノジットと ABA では節間がつまった以外の形態的变化は見られなかった。

(4) 10°C 培養における各処理の比較

これまでで効果の高かった④基本培地からショ糖を除いた培地, ⑤基本培地にマンニトール 4% を加えた培

地, ⑥ウニコナゾール 100 ppm 浸漬処理と 10°C を組み合わせて 150 日間培養した結果, 25°C 下とはほぼ同様な生長抑制が認められた (Table 4). 特に基本培地からショ糖を除いた培地での生長抑制効果が高かった。

培養 150 日後の培地中の N, P₂O₅, K₂O は, 対照区

でそれぞれ 7.3 ppm, 9.0 ppm, 68.6 ppm であったのに対し, ④区 234 ppm, 62.7 ppm, 454 ppm, ⑤区 3.2 ppm, 4.7 ppm, 207 ppm, ⑥区 0.7 ppm, 7.7 ppm, 192.3 ppm であった (3 Box の平均値)。④区では特に養分の吸収が抑えられ, 培地の乾燥により N は初期より濃度が上がった。

4. 考 察

in vitro で植物体を保存するための培養温度は, 植物種と保存法によって異なる。すなわち暗黒または弱光下で 0°C 付近の温度で冷蔵する方法と明条件下で生育適温よりいく分低い温度下で培養し生長を抑制する方法である。暗黒または弱光下では, イチゴで 2°C³⁾, モモで -3 または 4°C⁴⁾, イタリアンライグラスで 2~4°C⁵⁾, シュガービートで 2~5°C⁶⁾, マメ科牧草で 4~6°C⁷⁾, キクで 2~3°C⁸⁾ または 4°C⁹⁾, ガーベラで 5°C¹⁰⁾, キウイで 8°C¹¹⁾, 明条件下ではバナナで 15°C¹²⁾, ブドウで 12°C¹³⁾ での保存例が報告されている。

本試験の結果では, 培養温度を 10°C に下げただけで明条件下でも 6 カ月以上継代の必要はなかった。また in vitro のキクの生長は, 25°C 下では培養初期より地上部の生長量が地下部を大きく上まわるが, 10°C 下では地上部, 地下部ともに漸増した。さらに 25°C 下での培地中の N は培養 40 日後までに急速に吸収され, その結果としてその後の P₂O₅, K₂O の吸収も行われなかった。一方 10°C 下では N の吸収はゆるやかで, P₂O₅, K₂O ともに漸減した。

培地中のショ糖濃度を減じるかまたはマンニトールを加えて浸透圧を上げるとキクの生長は著しく抑制された。培地中のショ糖を減じると生長が抑制されることは, カーネーションとトマトでも認められており¹⁴⁾, さらにニンジンの不定胚¹⁵⁾およびコーヒー¹⁶⁾ではショ糖を含まない培地で 2 年間生存させた報告もみられる。培地中のショ糖は浸透圧とは異なる作用性を持って特に発根に強く作用し, 培地中の窒素濃度との相互作用も認められている¹⁷⁾。本試験でも培地中のショ糖を減ざると根の発達が抑制された。またショ糖濃度を上げて根の発達は抑制されなかったが, マンニトールを加えて浸透圧を上げると根の発達は抑制された。

生長抑制剤の利用では, ウニコナゾールの浸漬処理が最も高い生長抑制効果があり, 培地中に同剤を添加しても同様の効果が認められている¹⁸⁾。しかしわい化状態の解除のためには GA 処理以外に有効な手段がなく, 保存から増殖へ移行する段階では問題が残ると考えられる。

培養温度を 10°C に下げ, 試験Ⅱ, Ⅲで効果の高かつ

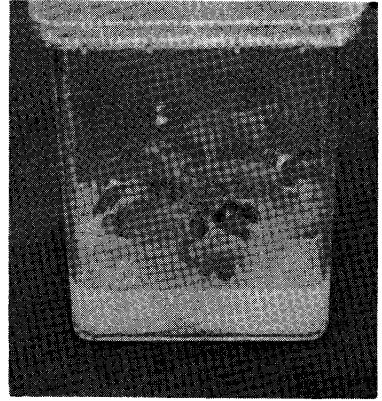


Fig. 4. Chrysanthemum plantlets maintained for one year at 10°C on sucrose free 0.3% Hyponex medium.

た方法を比較すると, ショ糖を含まない培地が最も効果的であった。この方法は簡便でしかし 1 年以上継代の必要もなく, さらにすぐに増殖の系へ移行できる点より, キクの active collection として有効な方法であると考えられた。

文 献

- 1) Withers, L. A., 1985. In "Plant Cell Culture" (ed. by Dixon, R. A.), p. 169-191, IRL Press, Washington, DC.
- 2) Kartha, K. K., 1985. In "Cryopreservation of Plant Cells and Organs" (ed. by Kartha, K. K.), p. 115-134, CRC Press, Boca Raton.
- 3) Mullin, R. H., D. E. Schlegel, 1976. HortScience, **11**: 100-101.
- 4) Marino, G., P. Rosati, F. Sagrati, 1985. Plant Cell, Tissue Organ Cult., **5**: 73-78.
- 5) Dale, P. J., 1980. Ann. Bot., **45**: 497-502.
- 6) Miedema, P., 1982. Euphytica, **31**: 635-643.
- 7) Cheyne, V. A., P. J. Dale, 1980. Plant Sci. Lett., **19**: 303-309.
- 8) Preil, W., M. Hoffmann, 1985. In "In vitro Techniques" (ed. by Schäfer-Mennhr, A.), p. 161-165, Martinus Nijhoff, Dordrecht.
- 9) Bajaj, Y. S. P., 1986. In "Nuclear Techniques and in vitro Culture for Plant Improvement," p. 43-57, IAEA, Vienna.
- 10) Pierik, R. L. M., 1979. Vakblad voor de Bloemisterij, **34** (25): 36-37.
- 11) Monette, P. L., 1986. HortScience, **21**: 1203-1205.
- 12) Banerjee, N., E. deLanghe, 1985. Plant Cell Rep., **4**: 351-354.
- 13) Galzy, R., 1985. Bulletin del'OIV, **58** (650/651): 377-390.
- 14) Schnapp, S. R., and J. E. Preece, 1986. Plant

- Cell, Tissue Organ Cult., 6 (1) : 3-8.
- 15) Jones, L. H., 1974. Plant Sci. Lett., 2 : 221-224.
- 16) Kartha, K. K., L. A. Mroghinski, K. Pahl, N. L. Leung, 1981. Plant Sci. Lett., 22 : 301-307.
- 17) Hyndman, S. E., P. M. Hasegawa, R. A. Bres-san, 1982. Plant Cell, Tissue Organ Cult., 1 : 229-238.
- 18) 天野正之, 柴田道夫, 武内和俊, 浜田正博, 1986. 園学要旨. 昭 61 春 : 390-391.

Summary

Storage of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (RAMAT.)
KITAMURA) Plantlets in vitro

Seiichi FUKAI, Masahiro MORII and Masaharu OE

Osaka Agricultural Research Center, Habikino, Osaka 583

Plant tissues or plantlets can be stored in vitro by the two methods; show growth or cryopreservation. The former is known as a useful method for short or medium term storage of shoot cultures.

In this study, the slow growth of chrysanthemum was studied in several ways: (1) by maintaining the cultures at 10°C, that is a temperature much lower than the optimal culture temperature, (2) by supplying carbon source at levels either above or below those generally considered to be optimal, (3) by inducing osmotic stress by the addition of osmotica, (4) by the use of plant growth retardants. The cultures were incubated on a medium containing 0.3% Hyponex (6.5-6-19) and 2% sucrose at 25 or 10°C at a constant 1,500 lux.

The growth of chrysanthemum plantlets and the absorption of N, P and K at 10°C was slower than that at 25°C. The plant cultured at 10°C showed short internodes and lobated mature type leaves. When sucrose was reduced or mannitol was added at the level of 2-8% in the medium, the growth of chrysanthemum plantlets was significantly reduced. The plant growth retardants were also effective in the reduction of growth.

These experiments have shown that chrysanthemum can be successfully maintained in vitro for one year or more without transfer to fresh culture medium by culturing on the sucrose free medium at 10°C.