

キク茎頂の低温保存

深井誠一・大江正温

大阪府農林技術センター
(〒583 羽曳野市尺度 442)

(1988年6月6日受付)

(1989年1月17日受理)

キク茎頂の低温保存を検討した。29カ月間毎月茎頂培養を行い、置床直後から5°Cで30日間貯蔵すると、生存率は夏半期に低く、冬半期に高い傾向が認められた。貯蔵前に25°Cで15日間前培養すれば、夏半期に採取した茎頂でも5°Cで210日以上貯蔵が可能であった。前培養は2日間から有効であり、10日以上行うことがより好適であった。貯蔵中の茎頂の生長を抑制するには、貯蔵温度を5°Cから2°Cに下げることが有効であった。貯蔵中の茎頂は、10日間の高温遭遇により著しく生存率が低下した。

1. 緒言

前報¹⁾で茎頂培養由来でキクの無菌植物が一度確立した後、*in vitro*でこれを保存する際、培地から糖を除き、10°C下で培養することが有効であることを明らかにした。本報では、茎頂培養において茎頂が植物体に再生する以前の段階で、光を伴わずに長期に低温保存する方法を検討した。

2. 材料および方法

(1) 供試植物

キク品種‘秀芳の力’を用い、母株を無加温ガラス室内で深夜4時間の光中断を行って栽培した。栽培期間中は適宜ピンチを行って、若いシュートの発生を促した。

(2) 培養方法

培地はムランゲ・スクーグ修正培地²⁾にBA 0.1 mg/l, NAA 1.0 mg/l, ショ糖 20 g/l 加えたものを容積 30 ml の管ビンに 10 ml ずつ分注して用いた。管ビンの口はアルミホイルで3重に被った。

茎頂は、葉原基2枚以上を含む高さ0.7 mm程度とし、一区あたり12~15個を置床した。置床後は、25°C, 1,500 lx, 24時間照明下(以下25°C下)で培養または、5±1°Cおよび2±1°C暗黒下(以下5°C下, 2°C下)で貯蔵した。

(3) 試験方法

試験Ⅰ. 茎頂の採取時期の影響。1985年7月より29カ月間毎月キクの茎頂を置床し、半数はただちに、残り半数は5°C下に30日間貯蔵した後に、25°C下で60

日間培養し茎頂の生存率(再生した茎頂の数÷供試茎頂数×100, 以下同じ)およびシュート形成率(シュートを再生した茎頂数÷供試茎頂数×100, 以下同じ)を調査した。

試験Ⅱ. 25°C下での前培養が貯蔵後の茎頂の生存におよぼす影響。6月初旬に茎頂培養を行い、一方はただちに、他方は25°C下で15日間前培養した後に5°C下に搬入し、30, 60, 90, 150, 210日後にとり出し、25°C下で60日間培養し茎頂の生存率およびシュート形成率を調査した。さらに5月下旬に茎頂培養を行い、25°C下で0, 2, 5, 10, 15日間前培養の後5°C下に30日間貯蔵し、再び25°C下で60日間培養し茎頂の生存率、シュート形成率および草丈を調査した。

試験Ⅲ. 貯蔵温度の影響。3月初旬に茎頂培養を行い、25°C下で15日間前培養の後2°Cおよび5°C下で、60, 90日間貯蔵の後再び25°C下で60日間培養し、試験Ⅱと同様の調査を行った。

試験Ⅳ. 高温による低温貯蔵中断の影響。4月中旬に茎頂培養を行い、25°C下で15日間前培養の後2°C下へ搬入した。2°C貯蔵30日後に、35°C暗黒下へ0, 1, 5, 10日間置き、再び2°C下で30日貯蔵した後25°C下で60日間培養し、試験Ⅱと同様の調査を行った。

3. 結果と考察

(1) 茎頂の採取時期の影響

茎頂を切り出し置床後ただちに25°C下で培養したも

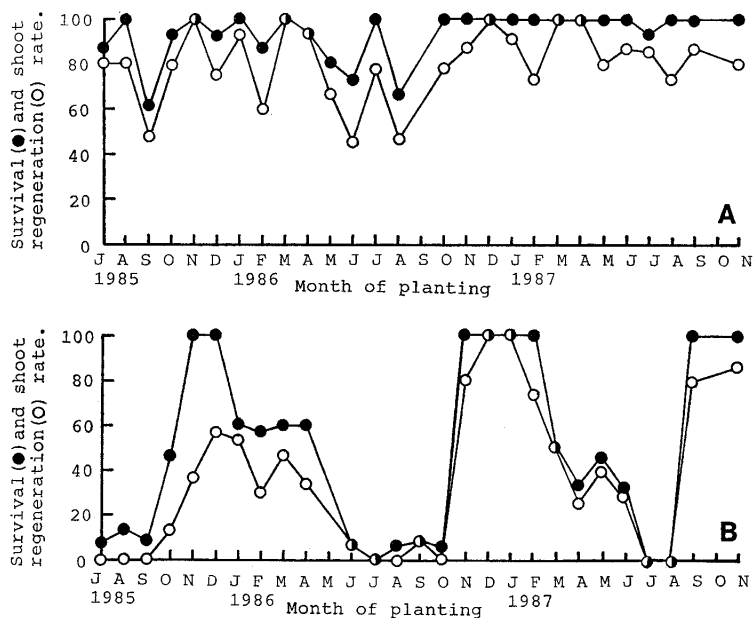


Fig. 1. Seasonal change of survival rate of shoot tips with or without cold storage. A; The shoot tips were incubated at 25°C under constant light of 1,500 lx. B; After 30 days cold storage at 5°C, the shoot tips were incubated as same as upper conditions.

のは、茎頂の生存率およびシュート形成率に季節的变化は認められなかった (Fig. 1)。期間中の平均生存率は 90.2%、シュート形成率は 76.5% であった。また 25°C 下で 60 日間培養後は、基部カルス 9.7±0.3 mm、草丈 12.1±1.2 mm に生長した。通常の茎頂培養では生存率に季節的な変化が認められた例もあるが^{3,4)}、本試験では母株が光中断により常に栄養生長状態に維持されており、また度々ピンチを行って常に齢の若い穂を供試したため、年間を通して茎頂の生存率、シュート形成率が安定したものと考えられる。

一方置床直後に 5°C 下 30 日貯蔵した後に 25°C 下で培養したものは、夏半期に比べて冬半期の方が茎頂の生存率、シュート形成率共に高く、季節的な変化が認められた。植物の耐低温性、耐凍性に季節変化があることは広く認められており⁵⁾、茎頂自体の耐凍性が季節により変化することも報告されている⁶⁾。本試験の場合、母株を無加温室で栽培したため、外気温の変化に伴ないキク茎頂の生理的な状態が変化し、このことが夏半期における低温貯蔵時の茎頂の生存率低下をもたらしたと考えられる。

(2) 25°C 前培養の効果

6月に茎頂培養を行い置床直後に 5°C 下に搬入すると生存率は低いが、25°C 前培養を 15 日間行った後に

5°C 下で貯蔵すると、貯蔵日数が 30~210 日の間で高い生存率、シュート形成率を示し、貯蔵中の生存率の低下も認められなかった (Fig. 2)。ただし貯蔵日数が 90 日以上では、貯蔵中にシュートが徐々に伸長し、一部は黄化したシュートを形成した。黄化したシュートは、25°C 下へ移した後に先端より枯れ込み、基部のえき芽が伸長することが多かった。また 25°C 前培養の日数は 2 日間でも有効であり、10 日以上行うと貯蔵後の培養時のキクの生長も良好であった (Table 1)。

Table 1. Effect of pre-culture on survival rate of shoot tips after 30 days storage.

Duration of pre-culture (days)	After 60 days culture at 25°C		
	Survival rate (%)	Shoot regeneration rate (%)	Plant height (mm)
0	23.1	23.1	6.2±1.0
2	100	100	7.5±1.3
5	100	92.3	7.2±1.8
10	100	92.3	19.6±3.2
15	100	100	16.1±3.0

Shoot tips were stored at 5°C for 30 days after various duration of pre-culture at 25°C. After the storage shoot tips were incubated at 25°C for 60 days. Planting date: 31h, May.

Table 2. Effect of storage temperature on survival and growth of shoot tips after the storage.

Duration of storage (days)	Storage temp. (°C)	After the storage		After 60 days culture at 25°C		
		Survival rate (%)	Etiolation rate (%)	Survival rate (%)	Shoot regeneration rate (%)	Plant height (mm)
60	2	100	0	100	100	22.5±3.5
	5	100	25.0	100	100	24.8±5.9
90	2	100	16.7	100	91.6	19.4±3.3
	5	100	58.3	100	100	55.8±6.5

Shoot tips were pre-cultured at 25°C for 15 days before the storage. Etiolation rate: percentage of shoot tips with etiolate shoot. Planting date: 3rd, March.

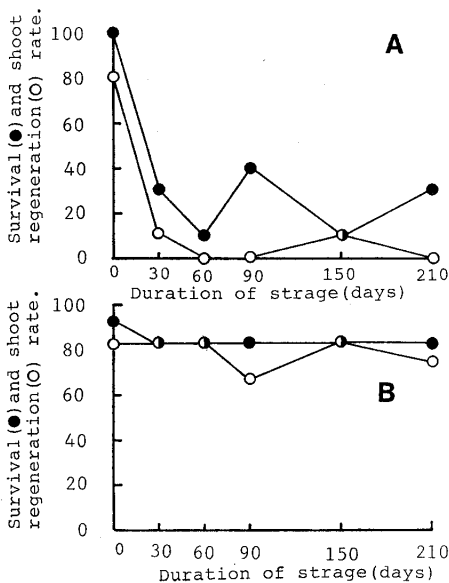


Fig. 2. Survived shoot tips after various days cold storage with or without pre-culture.

A; The shoot tips were stored at 5°C without pre-culture.

B; The shoot tips were stored at 5°C after 15 days pre-culture at 25°C. After the storage the shoot tips were incubated at 25°C under constant light of 1500 lx for 60 days.

この結果から、置床直後の急激な温度変化が茎頂の生存率を低下させるものであり、夏半期でも 25°C、15 日間の前培養を行えば、かなり長期の冷蔵が可能であることが明らかとなった。同様な前培養の効果として、ジャガイモの茎頂の凍結保存の際、特に凍害防御剤を加えない培地で前培養をするだけで、凍結・融解後の生存率が高まること知られている⁷⁾。これらの原因は明らかではないが、切り出された直後の茎頂は、傷口の治癒組織

が形成されておらず、環境の変化に対して弱いものと考えられる。

4. 貯蔵温度の影響

貯蔵温度を 2°C に下げると、5°C に比べて貯蔵 60、90 日出庫時の基部カルスも小さく、黄化したシュートの割合も低かった。25°C 下 60 日間培養後も、2°C 貯蔵の方が 5°C に比べて再生したシュートは健全であった (Table 2)。

植物を *in vitro* で光を伴わずに低温貯蔵する場合、設定温度が高いと貯蔵中に植物はわずかながら生長を続け黄化葉を形成してしまう。キクでは花柄組織を 2°C で 9 カ月間⁸⁾、節組織を 0~-2°C で 12 カ月間⁹⁾、無菌植物を 4~5°C、暗黒下で 6 年間¹⁰⁾、2~3°C、10~50 lx の弱光下で 5 年間保存した例¹¹⁾が報告されている。本試験で用いた茎頂の場合もさらに貯蔵温度を下げ、より長期に保存可能と考えられる。

5. 高温遭遇の影響

In vitro 保存の問題点は、不慮の事故による貯蔵条件の変化、特に高温遭遇による植物の失活である。本試験

Table 3. Effect of high temperature interruption during cold storage on survival of shoot tips.

Duration of interruption (days)	After 60 days culture at 25°C		
	Survival rate (%)	Shoot regeneration rate (%)	Plant height (mm)
0	83.3	83.3	15.0±7.4
1	66.7	66.7	7.1±2.6
5	75.0	66.7	6.1±2.3
10	41.7	33.3	12.0±5.5

Shoot tips were stored for 30 days at 2°C after 15 days pre-culture. Then they were transferred to 35°C in various days and then were restored at 2°C for 30 days. After the storage shoot tips were incubated at 25°C. Planting date: 10 th, April.

は冷蔵庫の故障を想定したものであるが、高温遭遇日数が増すに従い茎頂の生存率、シュート形成率は低下し、特に 10 日間の高温遭遇により著しく生存率が低下した (Table 3).

以上の結果、キクの茎頂を採取後 25°C 下で 15 日間の前培養の後 2°C 下で貯蔵することにより、品種保存が可能である。なお品種や系統によっては低温貯蔵中に失活するものが見られることが報告されている^{11,12)} ので、今後実用化にあたっては適応範囲を明らかにする必要がある。

文 献

- 1) 深井誠一, 森井正弘, 大江正温, 1988. 植物組織培養, 5: 20-25.
- 2) 深井誠一, 大江正温, 1986. 大阪農技セ研報, 23, 25-31.
- 3) 木村喜久夫, 1974. 施設ギクの周年切花生産, 誠文堂新光社, p. 105-122, 東京.
- 4) Kodýtek, K., 1985. Sbornik UVTIZ, Zaharadnictvi., 12(2): 149-153.

- 5) 酒井 昭, 1982. 植物の耐凍性と寒冷適応, 学会出版センター, p. 81-126, 東京.
- 6) Katano, M., 1986. Proc. Fac. Agric. Kyushu Tokai Univ., 5: 1-5.
- 7) Grout, B.W.W. and G.G. Henshaw, 1978. Ann. Bot., 42: 1227-1229.
- 8) Roest, S. and G.S. Bokelmann, 1975. Vakblad voor de Bloemisterij., 30(32): 29.
- 9) 細木高志, 浅平 端, 1987. 園学要旨. 昭 53 秋. p. 370-371.
- 10) Bajaj, Y.P.S., 1986. In vitro preservation of genetic resources. In "Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement," p. 43-57, IAEA, Vienna.
- 11) Preil, W. and M. Hoffmann, 1985. In vitro storage in chrysanthemum breeding and propagation. In "In vitro techniques," (ed. by Schäfer-Menuer, A.), p. 161-165. Nijhoff/Junk, Dordrecht.
- 12) Mix, G., 1985. Preservation of old potato varieties. In "In vitro techniques," (ed. by Schäfer-Menuer, A.) p. 149-153, Nijhoff/Junk, Dordrecht.

Summary

Cold Storage of Shoot Tips of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (RAMART.) KITAMURA)

Seiichi FUKAI and Masaharu OE

Osaka Agricultural Research Center, Habikino, Osaka 583

Chrysanthemum shoot tips were placed on a modified MS medium containing 0.1 mg/l BA and 1.0 mg/l NAA and then stored at 5°C for 30 days. After such storage the shoot tips were incubated at 25°C under constant light of 1,500 lx for 60 days. Survival rate of the shoot tips after the storage in summer was low but that in winter was high. When the shoot tips were pre-cultured at 25°C for 15 days, more than 80% shoot tips were survived after 210 days of storage at 5°C even though the shoot tips were taken in summer. The lower temperature (2°C) was more suitable than 5°C for long term cold storage because the most of the shoot tips had grown gradually at 5°C. High temperature interruption for 10 days during cold storage caused serious damage to the shoot tips.

According to the results, shoot tips of chrysanthemum can be stored at 2°C in the dark after pre-culture at 25°C under constant light of 1,500 lx for 15 days.