

カーネーションの組織培養における液体培地の 無機成分濃度及び培養中の濃度変化の影響*

三 浦 泰 昌

Influence of the Concentration of Mineral Elements in
Liquid Medium and the Change of the Concentration during
Cultivation on the Carnation Tip Cultures *In Vitro*.

Yasumasa MIURA

結 言

カーネーションの切り花品種はさし芽によって維持、増殖するために、栽培年数の経過とともに各種病害の汚染と被害が拡大する。中でもウイルス病についてはこれまでの確な防除法がなく、これが品種の寿命(営利栽培可能な年数)を短くする一因ともなっていた。

しかし1960年代にHOLLEYら⁴⁾によってウイルスフリー化のための茎頂培養法が開発され、また我国では武田ら⁸⁾がこれをさらに発展させて、ウイルスフリー化の実用技術を確立した。最近ではDAVISら¹⁾、藤野ら³⁾、EARLEら²⁾により、マイクロプロパゲーション法が開発され、増殖率は飛躍的に高まった。

ただしカーネーション用培地の組成については、これまで主としてHolleyやMurashige & Skoog(MS)の培地を基本に、オーキシンやサイトカイニンの好適濃度が検討されてきた。しかし、これら基本培地の中で濃度に大きな差のある窒素、リン酸、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどの主要な無機成分については、十分な検討がなされておらず、茎頂の生育に及ぼす影響やその相互作用、さらに培養中の培地の化学性変化についても不明な点が多い⁷⁾。

また培地の形状ではこれまで主として固型培地が用いられてきたが、本培地では植物体の生育に伴って生じる養分やホルモンの変化に対応するために、数回の植え

替えが必要である。さらに培養から順化へと進む段階では、根に付着した培地を慎重に除去する必要があることなど、自動化による規模拡大をはかる上で多くの難点がある。

一方、カーネーションの品種は消費の多様性に伴って多様化し、スプレー系やエンゼル系の小輪品種とシム系を中心とした大輪品種のほかに、昭和40年代まで我国の主要品種で、その後栽培が全く無くなった中輪系品種も再び栽培され始めている。

このような品種の多様化あるいは激しい変化に速やかに対応するためにも、組織培養技術をより合理化する必要があり、それには液体培地による培養システムの開発が最も有効と考えられる。

そこでまず液体培地における窒素、リン酸、カリウム、カルシウム、マグネシウムの濃度及び、培養中のこれらの成分の濃度変化と茎頂の生育の関係について調査した。その結果2、3の知見が得られたので、取りまとめて報告する。

材料及び方法

1. 培地の無機成分濃度がカーネーション茎頂の生育に及ぼす影響

培地の主要な無機成分で、かつ現行培地の種類によって濃度の大きく異なる6種類について、第1表に示す各々3水準の濃度を設定し、これをL²⁷直交表に割りつけた27区を作った。微量要素その他の成分はMS培地に準じ、ショ糖を20g/l加えた。なお植物生長調節物質は一

* 本報告の一部は昭和63年度園芸学会秋季大会において発表した。

切加えなかった。培地のpHを5.70に調節した後、内径18mm×長さ110mmの試験管に9mlを分注した。さらにToyo濾紙No.2を幅15mmの短冊状に切って、ペーパーブリッジ状⁶⁾にして試験管に入れ、上部をアルミホイルで二重に密栓した。次に1.5atm、20分間オートクレーブで滅菌した。

カーネーション“粧”の頂芽を含む茎を取り、葉身を除去した後、茎の長さ1cm程度を取って70%エタノール液に10秒間、1%次亜塩素酸ナトリウム液に15分間浸漬し、滅菌水で洗浄した。

茎頂はドームと第1葉原基を含む長さ約0.3mmを切り

第1表 培地の無機成分の種類と水準別の濃度 (ppm)

無機成分	直交表 の列	水 準		
		1	2	3
(A) KNO ₃	1	90	900	2700
(B) NH ₄ NO ₃	2	100	1000	3375
(C) KH ₂ PO ₄	5	12	120	390
(D) CaCl ₂ ·2H ₂ O	14	16	160	550
(E) MgSO ₄ ·7H ₂ O	17	14	140	470
(F) MnSO ₄ ·4H ₂ O	20	0.7	7.0	23.3
上記のイオン 濃度				
NH ₄ ⁺		22.5	225	760
Ca ⁺⁺		4.4	43.5	150
Mg ⁺⁺		1.4	13.8	46
Mn ⁺⁺		0.17	1.70	5.70
PO ₄ ⁻⁻⁻		8.40	84	272
Cl ⁻		7.70	77.3	266

第2表 培地中のK⁺, NO₃⁻, SO₄⁻⁻⁻の水準別の濃度 (ppm)

イオン	水 準								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
K ⁺	38	69	182	354	383	460	1048	1080	1157
NO ₃ ⁻	133	630	830	1327	1733	2430	2671	3168	4271
SO ₄ ⁻⁻⁻	6	9	16	55	58	66	184	186	193

出して、上記の濾紙上に置床した。なおこれら一連の植付け作業はすべてクリーンベンチ内で行った。

移植した外植体は、87年4月27日から6月28日まで、気温25±1℃、明期14時間-暗期10時間、光照度5000lx（試験管上部）の条件下で培養した。供試数は1区10本とした。

培養中の各区の生育状態は5月23日、6月1日、6月21日に平均的な生育のものを選び、さらに6月28日には残り7個体について生体重と発根状態を調査した。

2. 滅菌及び培養過程における培地の化学性変化

培地の化学性変化については、(1)オートクレーブによる滅菌過程、(2)培養期間中、の2段階が考えられる。そこでオートクレーブ処理直後と定期的な生育調査に合せて、化学性を調査した。

化学性ではpHの他にNH₄⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Na⁺, NO₃⁻, PO₄⁻⁻⁻, Cl⁻, SO₄⁻⁻⁻の濃度を測定した。測定はイオンクロマトアナライザー(Y OKOGAWA ; IC-500)により、陽イオンはプレカラムPCX1-035と分離カラムSCX1-205カラムを用い、陰イオンカラムはSCS5-252を用いた。検出は導電率検出器により、サンプルの注入量は100μとした。

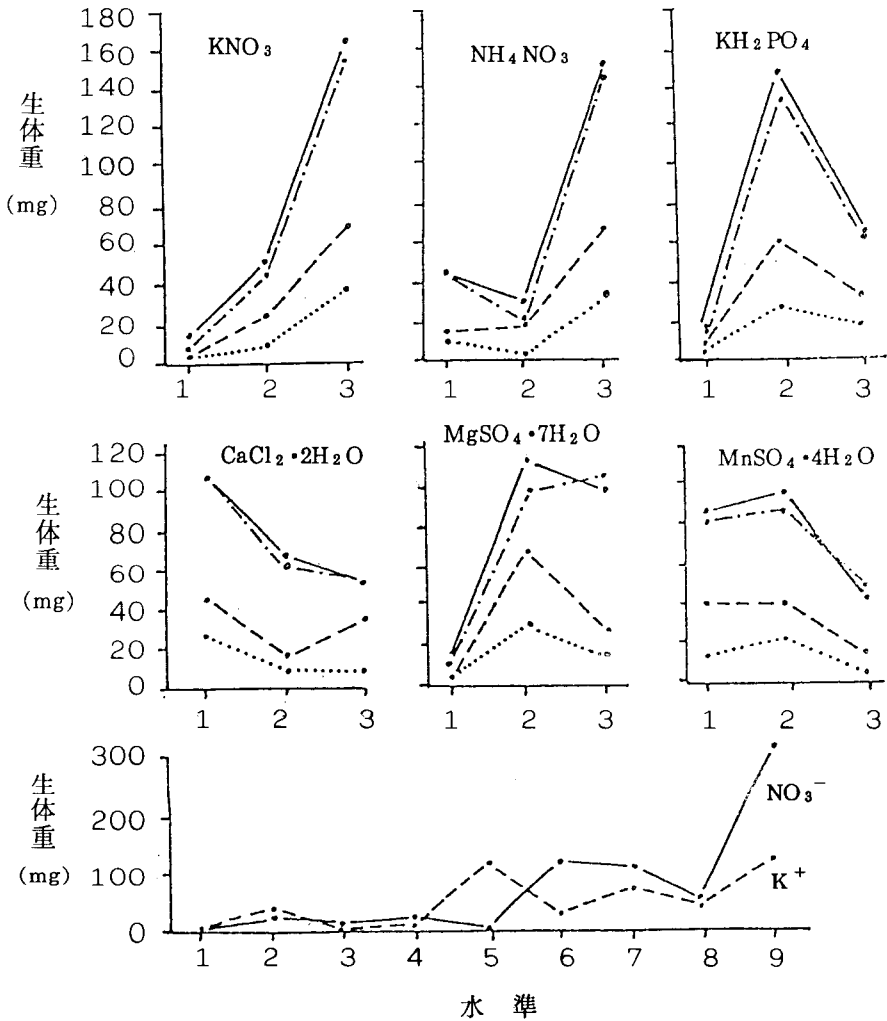
結 果

1. 培地の無機成分濃度がカーネーション茎頂の生育に及ぼす影響

5月23日、6月1日、6月21日及び6月28日に測定した生体重と、無機成分の濃度との関係を第1図に示した。KNO₃では全期間を通じて高濃度区ほど生体重が増加し、また6月1日の段階では高濃度区ではMultiple shoots（茎頂から多数のシュートが形成される）¹⁾化した。NH₄NO₃では100ppmと1000ppmでは生体重が小さかったが、3375ppmでは著しく増大した。KH₂PO₄では120ppm

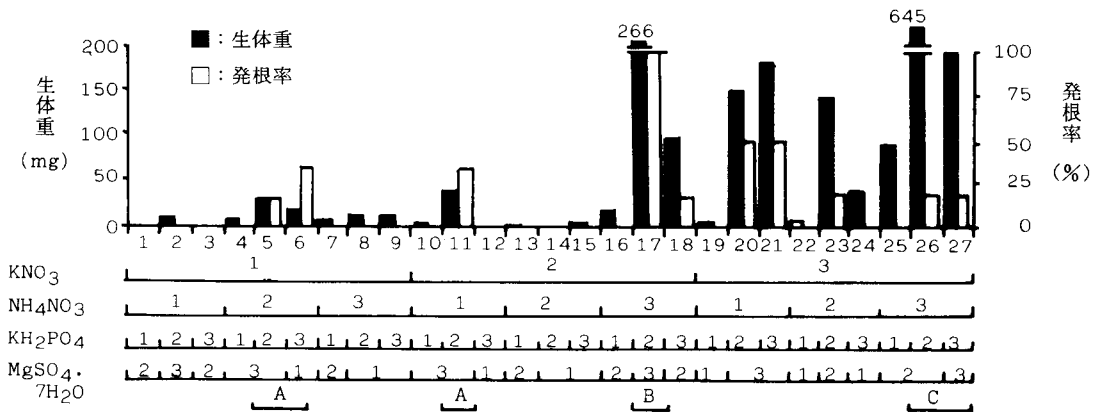
で最大の生体重となり、12ppmの低濃度と390ppmの高濃度では明らかに小さかった。CaCl₂・2H₂Oでは濃度間に大きな差は認められなかったが、高濃度区ほど生体重の増加は小さかった。MgSO₄・7H₂Oの場合は14ppmの低濃度では生体重が著しく小さかったが、140ppmで急激に増加した。しかし470ppmの高濃度では初期にやや劣ったが、6月21、28日の調査では140ppmとの間には大きな差が認められなかった。

各成分の中で硝酸態窒素はKNO₃とNH₄NO₃、カリウムはKNO₃とKH₂PO₄から供給されたので、それぞれ3×3=9水準の濃度になった。そこで硝酸態窒素及びカリウムと生体重の関係を6月28日の調査結果からみると、硝酸態窒素は133ppmから1733ppmの範囲では生体重の増加は小さかったが、2430ppm以上で増加し、特に4271ppmで顕著に増加した。ただしこの濃度では、全個体にvitrification(ガラス質化)が認められた。一方



第1図 無機成分別の濃度水準と生体重の関係

注) 5月30日, - - - - - 6月1日,
 - · - · - · 6月21日, · - - · 6月28日



第2図 無機成分濃度の水準別組合せが生育と発根におよぼす影響 (6月28日, 7株の平均)

注) A : 個体化, B : multiple shoots 形成, C : 顕著なvitrification

カリウムでは38ppmから182ppm区までの生体重は小さかったが、383ppm以上で顕著に増大した。またこれ以上1157ppm区までの生体重はほぼ一定した値を示した。

6月21日の各区の生育状況を付図1に示し、6月28日の調査での全区の生体重と発根率を第2図に示した。両図で明らかのように、第1から16区までの生体重に比較して第17~27区の生体重に著しく大きいものが多かった。また第26, 27区では全個体にvitrificationが認められた。第5, 6及び11区では生体重の増加はゆるやかであったが個体化したのに対して、第17区以上ではMultiple shoots 化した。発根についてみると、第17区では全個体で発根したが、第20, 21区の発根率は50%, その他の区の発根率は30%以下できわめて低かった。

無機成分別生体重の分散分析の結果、 KNO_3 の濃度間に1%, NH_4NO_3 , KH_2PO_4 及び $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ の濃度間に5%水準の有意があった。一方 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ と $MgSO_4 \cdot 4H_2O$ の濃度間には明らかな有意性が認められなかった。また KNO_3 と NH_4NO_3 , KH_2PO_4 の相互間及び KNO_3 と $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 及び $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 間には明らかな交互作用が認められなかった。

2. 滅菌過程及び培養過程における培地の化学性変化

全培地のpHを5.70に調節後オートクレーブ処理し、その直後と培養中のpH変化(全区の平均値)を第3図に示した。オートクレーブ直後に培地pHは4.80に低下したが、培養中の低下はゆるやかで6月28日の段階では4.45であった。したがって培地の化学性変化に対して、

第3表 無機成分別の生体重の分散分析表

要因	自由度	平方和	分散比	寄与率(%)
A	2	55190.1	9.30**	20.7
B	2	39556.9	6.67*	14.1
C	2	38759.5	6.53*	13.8
A × B	4	13087.6	2.20	
A × C	4	14229.8	2.40	
D	2	6350.7	1.07	
E	2	27260.3	4.60*	9.0
F	2	7927.8	1.34	
A × D	4	19088.3	3.22	
A × E	4	19252.2	3.25	
A × F	4	15167.5	2.56	
K ⁺	8	30602.3	5.16*	
NO ₃	8	30201.3	5.09*	
Se	8	5932.1		

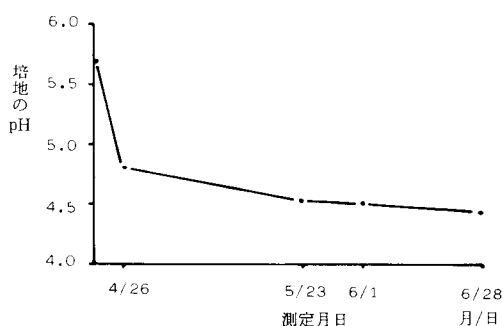
注) A ; KNO_3 , B ; NH_4NO_3 , C ; KH_2PO_4 , D ; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, E ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, F ; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$.

** ; 1%, * ; 5%水準で有意

オートクレーブの影響が極めて大きいことが明らかになった。

そこで処理直後と6月28日の培養終了時の培地の陽イオンと陰イオン濃度の調査結果を第2, 3表に示した。オートクレーブ処理直後では NH_4^+ と PO_4^{3-} の濃度低下と、反対に Ca^{++} の上昇が顕著であった。また K^+ は特に高濃度区での上昇が顕著であった。

培養中の培地の化学性変化をみるために、オートクレーブ処理直後と、6月28日の濃度を比較すると、成分ごとにかかなり異なった変化を示し、 NH_4^+ 、 PO_4^{3-} 、 NO_3^- 及び Ca^{++} の濃度が低下し、 Mg^{++} 、 Cl^- 、 K^+ 、 SO_4^{2-} が上昇した。



第3図 オートクレーブ処理直後及び培養中の培地のpH変化(全区の平均値)

第4表 オートクレーブ前と後および培養中のイオンの濃度変化(1)

イオン	調査時期	濃度の水準		
		1	2	3
NH_4^+	A	22.5ppm	225.0ppm	760.0ppm
	B	21.2	189.7	595.6
	C	20.5	178.6	573.2
Ca^{++}	A	4.4	44.0	150.0
	B	9.3	72.0	215.1
	C	8.1	70.8	188.2
Mg^{++}	A	1.4	14.0	46.0
	B	2.1	14.4	49.3
	C	2.8	15.3	51.4
Cl^-	A	8.0	77.0	266.0
	B	11.2	77.9	292.4
	C	13.6	95.8	266.5
PO_4^{3-}	A	8.4	84.0	272.0
	B	5.0	68.5	232.7
	C	2.0	62.5	214.0

注) A:オートクレーブ前, B:オートクレーブ直後, C:培養2か月後

第5表 オートクレーブ前と後および培養中のイオンの濃度変化(2)

成分	調査時期	濃度の水準								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
K^+	A	38.0ppm	70.0ppm	146.0ppm	351.0ppm	382.0ppm	459.0ppm	1047.0ppm	1078.0ppm	1155.0ppm
	B	55.2	70.8	128.4	363.6	365.4	415.8	1255.8	1261.8	1365.0
	C	72.8	97.9	166.6	441.7	436.1	538.2	1477.8	1402.1	1500.9
NO_3^-	A	133.0	630.0	830.0	1327.0	1734.0	2431.0	2671.0	3168.0	4272.0
	B	111.7	583.9	761.8	1163.2	1767.6	2429.1	2221.4	2739.8	4192.6
	C	109.2	527.5	707.8	1236.2	1724.8	2321.8	2398.6	2647.1	4239.2
SO_4	A	6.0	9.0	16.0	55.0	58.0	66.0	184.0	186.0	193.0
	B	16.1	17.8	24.6	61.9	58.0	72.2	191.5	193.7	197.1
	C	17.5	19.0	26.8	61.1	65.4	79.5	222.7	221.7	231.4

注) A:オートクレーブ前, B:オートクレーブ直後, C:培養2か月後

考 察

本試験から培地の無機成分濃度は茎頂の生育に大きく影響することが明らかになり、中でも KNO_3 、 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 及び $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の影響が大きかった。一連の試験区の中で各成分濃度の比較的低いNo.5, 6, 11区の生育はきわめてゆるやかであったが個体化したのに対して、成分濃度の高いNo.17区以上ではMultiple shoots化した。また武田ら⁸⁾、HOLLEYら⁴⁾の培地でも個体化しているが、これらの培地は本試験のNo.5に近似し、Multiple shootsを形成したNo.17区はMS培地の組成に類似している。

これらの結果から無機成分の濃度とバランスを調節することによって、生育の方向が制御可能と考えられ、今後は培養の目的に合せた培地の選定あるいは調整が必要であろう。

本結果からMultiple shoots誘導のための好適無機成分濃度は KNO_3 ;900, NH_4NO_3 ;3,375, KH_2PO_4 ;120, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;470ppmが適値と考えられ、個体誘導の培地としては KNO_3 ;100, NH_4NO_3 ;100, KH_2PO_4 ;120, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;470ppmが適値と推定された。

今後これらの結果を基にさらに植物ホルモン添加の影響や、ホルモンと無機成分の相互関係を明らかにして、培養目的に合致した培地を作成する必要がある。

培地の化学性変化では、オートクレーブ処理によってpHが急激に低下し、一方培養中は比較的ゆるやかに低下した。このことはオートクレーブ処理による影響がきわめて大きいことを示している。処理直後の各イオンの濃度変化では、 NH_4^+ と PO_4^{--} が低下し、 Ca^{++} が増加し、さらに K^+ は高濃度区で上昇した。このことから、高温による NH_4^+ の蒸発がpH低下の要因と考えられる。ただし濃度の低下するものと上昇するものがあることは、成分の蒸発による減少と培地の水分蒸発による濃縮が同時に進行したことを示すものと考えられる。

ただし SO_4^{--} の低濃度区ではその上昇が顕著であったが、これは微量元素として加えられた $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ と $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ に由来するものであろう。

培地調節時の化学性を安定的に保持するためには、培養容器と培地の量の関係や、栓の種類、さらにオートクレーブの内容積と培地量の関係などについても、さらに検討する必要がある。

一方培養中の化学性変化についてみると、各成分ごと

にかなり異なる変動を示し、 NH_4^+ 、 PO_4^{--} 、 NO_3^- 及び Ca^{++} が低下し、 Mg^{++} 、 Cl^- 、 K^+ 、 PO_4^{--} が上昇した。ただしこれら変動の程度は必ずしも一定していないことからみて、この過程ではゆるやかな水分の蒸発と、植物体の生育に伴う養分の吸収が、変動の大きな原因と考えられる。

本試験の結果のみでは、培地の化学性変化と生育との関係を明らかにすることは困難であるが、成分の濃度が培養中に上昇することはvitrification発生の危険性を高める可能性があり、液体培地の使用にあたっては注意を要しよう。

今後液体培地を用いてカーネーションの組織培養技術を合理化し、さらに自動化による大量増殖システムを確立するためには、培養液中の成分のモニタリングと制御のシステムを確立する必要がある。

摘 要

カーネーションの茎頂培養における液体培地の主要な無機成分が、生育に及ぼす影響を明らかにするために本試験を行った。試験では KNO_3 ;90, 900, 2700ppm, NH_4NO_3 ;100, 1000, 3,375ppm, KH_2PO_4 ;12, 120, 390ppm, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;16, 160, 550ppm, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;14, 140, 470ppm, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;0.7, 7.0, 23.3ppmの各々3水準をL'27直交表に割りつけた27種類の培地を作った。

カーネーション“粧”の茎頂を約0.3mmの長さに切り出し、無菌条件下で濾紙のペーパーウィックの上に置床した。培養は気温 25 ± 1 ℃、光照度5000lx、明期14時間—暗期10時間の条件下で2か月間行った。

1. KNO_3 は1000ppm以下では生体重の増加は小さかったが、3375ppmで著しく増大した。 KH_2PO_4 では120ppmで最大になり、12ppmと390ppmではともに小さかった。一方 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ では16ppmが最も大きく、濃度が上昇するほど生体重の増加が抑えられた。 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ では14ppmから140ppmまでに著しく増大し、140ppmと470ppmの間には差が認められなかった。 NO_3^- 濃度についてみると、2430ppm以上で生体重が顕著に増大したが、4271ppmでは全個体に明らかなvitrificationが認められた。
2. 各成分濃度別の生体重による分散分析の結果、 KNO_3 の濃度間に1%水準の有意性があり、 NH_4NO_3 、 KH_2PO_4 及び $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の濃度間には5%水準の有意性が認められた。

3. 培地のpHはオートクレーブ処理前に5.70に調節したが、処理直後には4.80に低下し、培養中もゆるやかに低下して2か月後には4.45を示した。また培地の NH_4^+ と PO_4^{--} 濃度はオートクレーブ処理によって顕著に低下し、培養中にも低下したが、 Mg^{++} 、 Cl^- 、 K^+ 及び SO_4^{--} の濃度はこの間に上昇した。
4. 茎頂をゆるやかに生長させて個体化させるための培地の無機成分濃度は、 KNO_3 ；900ppm + KH_2PO_4 ；120ppm + $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；470ppmが適値であり、Multiple shootsの形成には KNO_3 ；900ppm + NH_4NO_3 ；3375ppm + KH_2PO_4 ；120ppm + $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ；470ppmが適値と推定された。

引用文献

- 1) DAVIS, M. J., R. BAKER and I. J. HANAN (1977) : J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102(1), 48-53.
- 2) EARLE, E. D. and R. W. LANGHANS (1975) : Hort. Sci. 10(6), 608-610.
- 3) 藤野守弘・藤村 良・浜田国彦(1971) : 園芸学会昭和46年春発表要旨, 302-303.
- 4) HOLLEY, W. D. and R. BAKER (1963) : Carnation production. W. M. C. Broun Co. Inc. 142.
- 5) PASQUALETTO, P. L., R. H. ZIMMERMAN and I. FORDHAM (1988) : Plant Cell and Organ Culture. 14, 31-40.
- 6) PHILLIPS, D. J. and L. DANIELSON (1961) : Colo. Flowers Assoc. Bul. 133, 2-3.
- 7) SKIRVIN, R. M., M. L. MANN, H. YOUNG, J. SULLIVAN and T. FERMANIAN (1986) : Plant Cell Reports. 5, 292-294.
- 8) 武田恭明(1974) : 茎頂培養によるカーネーション無病苗の育成と実用化に関する研究, 滋賀農試特別報告, 11.

SUMMARY

The influence of various concentration levels of mineral elements on the carnation shoot tip cultures was examined in vitro by the method of factorial experimental design which was applied to the L'27 orthogonal arrays. Three concentrations of each element, 90, 900 and 2700 ppm of KNO_3 , 100, 1000 and 3375 ppm NH_4NO_3 , 12, 120 and 390 ppm KH_2PO_4 , 16, 160 and 550 ppm $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14, 140 and 470 ppm $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0, 7, 7.0 and 23.3 ppm $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ were tested.

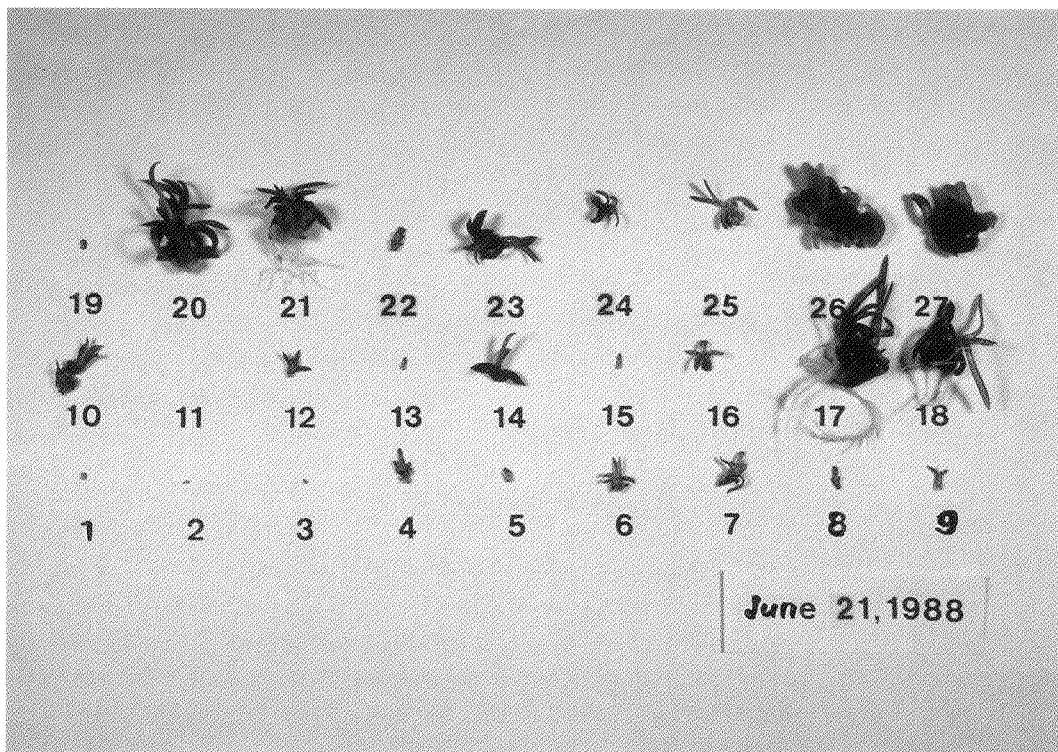
Shoot tips about 0.3 mm long of carnation cultivar "Yosooi" were taken out and then each of the tips was set on a wick of filter paper which was dipped in the liquid in a test tube. The tips were cultivated for two months in a growth chamber controlled at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 5000lx light intensity and 14 h-light and 10 h-dark.

1. The fresh weight of elongated shoots was increased with rising KNO_3 concentration levels of 90 to 2700 ppm. In the levels of NH_4NO_3 it was increased slowly at 100 and 1000 ppm, and rapidly at 3375 ppm. At 4271 ppm NO_3 all shoots were vitrified. In the KH_2PO_4 the weight was maximum at 120 ppm and was decreased at 12 or 390 ppm. On the other hand the weight was decreased straightly by rising $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ levels of 16 to 550 ppm, and in the $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ it was increased with rising from 14 to 140 and 470 ppm.

2. The differences in the means of the weights were significant at 0.01 level among KNO_3 , and 0.05 among NH_4NO_3 and 0.05 among NH_4NO_3 and KH_2PO_4 respectively.

3. Although the pH value of all liquid mediums was previously adjusted to 5.70, it was drifted to acid range of about 4.80 by autoclaving and afterwards gradually to 4.50 during the cultivation period. The concentrations of NH_4 and PO_4 in the medium were decreased slightly by autoclaving and afterwards gradually during the cultivation. On the other hand those of K, Mg, Cl and SO_4 were increased slightly throughout autoclaving and cultivation.

4. The optimum salt concentration in the medium to make usable shoots with root was found to be 900 ppm KNO_3 plus 100 ppm NH_4NO_3 plus 120 ppm KH_2PO_4 plus 470 ppm $MgSO_4 \cdot 2H_2O$, and that to make multiple shoots was to be 900 ppm KNO_3 plus 3375 ppm NH_4NO_3 plus 120 ppm KH_2PO_4 plus 470 ppm $MgSO_4 \cdot 2H_2O$.



附図1. 無機成分濃度の水準別組合せが生育と発根におよぼす影響
(1988. 6. 21 撮影)

注) 図内数字は区の数。