培養器・支持材の種類がカーネーション培養小植物体の 生長に及ぼす影響

高澤 明子・古在 豊樹

千葉大学園芸学部

Effect of Types of Culture Vessels with Supporting Materials on the Growth of Carnation Plantlets *in vitro*

Akiko TAKAZAWA and Toyoki KOZAI

Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo 271, Japan

Effect of types of culture vessels with supporting materials on the growth of carnation plantlets *in vitro* has been investigated. The experiment was carried out using Sorbarod System (plastic vessel) with Sorbarod (fibrous cellulose plug); called SS hereafter, Star Pac (gas permeable plastic bag) with agar; called SP, test tubes with agar capped with gas permeable plastic film; called TF and test tubes with agar capped with aluminum foil; called TA. The numbers of air changes per hour of SS, SP, TF, and TA vessels were, respectively, 9.6, 0.23, 5.3, and 0.32. The experiment was carried out at a photosynthetic photon flux of $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ (ca. 4.5 klx) for 16 hr per day and a room air temperature of 25°C.

On day 40, the greatest average fresh weight of plantlets, the largest percent dry matter, the smallest top/root fresh weight ratio and the shortest shoot were observed in Treatment SS. The percent dry matter, top/root fresh weight ratio and shoot length in Treatment TF were similar to those in Treatment SS. Some multiple shoots were observed in Treatment SP. Some plantlets were vitrified in Treatments SP and TA.

The results indicate that the combination of the culture vessels with a high number of air changes per hour and the fibrous supporting materials promotes the growth of carnation plantlets *in vitro*.

(Received November 19, 1991)

1991年11月19日受付

緒 言

植物組織培養において、培養小植物体（以下、小植物体）が光合成能力を有し、小植物体の生長が培養器内の CO_2 濃度、光強度などを高めることにより促進されることが数種の植物において報告されている¹⁻³⁾。培養器内の CO_2 濃度および光強度は培養器の材質、形状、閉栓方法などを変えることにより改善しうる。最近、通気性のある培養器を用いると、密閉に近い状態にある従来の培養器を用いるよりも小植物体の生長が促進されることが報告されている^{4,5)}。さらに培養器とあわせて支持材についても検討されており、従来の寒天などのゲル化剤

にくらべ、繊維性の支持材を用いた場合に、小植物体の生長が促進されることが報告されている⁶⁾。

しかしながらこれまでの報告では、最近開発された1種類の培養器・支持材を従来法と比較したものが多く、複数の種類の培養器・支持材を直接比較した報告はほとんど見あたらない。それらを直接比較し、それぞれの培養器・支持材の長所、短所をしることは、さらに改良された培養器・支持材を開発するうえで必要であろう。本実験では最近開発された材質、形状、閉栓方法などが異なる3種類の培養器・支持材と、従来のそれらを供試し、それらを用いて培養したカーネーション小植物体の生長量および培養器内 CO_2 濃度などを測定した。

Table 1 General description of culture conditions.

Plant material	Carnation (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.) 'Silvery Pink'
Medium	
Basal composition	Half strength Murashige and Skoog (1962) ⁷⁾
Sucrose concentration	20 g·l ⁻¹
Growth regulator	None
pH	5.8 before autoclaving
Culture room	
CO ₂ concentration	400–500 μmol·mol ⁻¹
Photosynthetic photon flux density on the empty shelf	60 μmol·m ⁻² ·sec ⁻¹
Air temperature	25 °C
Relative humidity	50%
Photoperiod	16 hr·d ⁻¹
Light source	Cool-white fluorescent lamps

Table 2 Description of the treatments.

Treat. symbol	Culture vessel	Number of air changes of the empty vessel (hr ⁻¹)	PPFD**	Supporting material	Number of explants per vessel	Amount of medium (ml·vessel ⁻¹)
SS	Sorbarod System	9.62	52 (87)	Sorbarod	21	210
SP	Star Pac	0.23	50 (84)	Agar	1	10
TF	Test tube capped with Film with gas filter*	5.31	46 (76)	Agar	1	10
TA	Test tube capped with Aluminum foil	0.32	43 (71)	Agar	1	10

* Polypropylene film attached with a microporous polypropylene filter.

** Photosynthetic photon flux density (μmol·m⁻²·sec⁻¹) in each type of empty vessels.
Values in parentheses are the light transmissivity (%) of the vessels.

材料および方法

1. 培養条件および試験区

全試験区に共通な培養条件を Table 1 に示す。供試植物には組織培養で比較的広く用いられ、かつ同一環境条件下で比較的成長がそろったカーネーションを用いた。増殖培養ステージ後期のカーネーション小植物体を生体重がそろい、かつ2枚の葉を含むように節ごとに切り分けたものを外植体とし、各培養器に植え付けた。外植体を植え付けた日を試験開始0日目（以下0日目）とし、試験期間は40日間とした。

各試験区の概要を Table 2 に示す。試験区は培養器・支持材の種類により計四つ設けた。本実験で供試した培養器・支持材の写真を Fig. 1 に示す。SS 区のソーバロッドシステム⁸⁾ (Baumgartner Papiers SA 製) はガンマ線滅菌された 190×145×81 mm の透明なプラスチック製容器 (容積 1,480 cm³) で、高さ 81 mm 中の蓋の高さ

は 60 mm である。蓋の両側面には計 10 個の円形 (直径 20 mm) の穴があいており、その部分にフィルターがついている。このソーバロッドシステムには支持材として、ガンマ線滅菌された、土中で分解可能な、セルロースの繊維性円柱形 (φ18×20 mm) プラグ (商品名: ソーバロッド, Baumgartner Papiers SA 製) が培養器当たり 60 個入っている。本実験ではそのうちの 21 個に外植体を各 1 本ずつ植え付けた。これは外植体当りの培地量を他の試験区と等しくするため、かつ外植体間の距離を培養器内ではほぼ等しくするためである。

SP 区のスターバック (Agristar Inc. 製) は、蒸気加圧滅菌可能な 36×128 mm の半透明な (光拡散性) プラスチックフィルムの封筒状の袋である。袋の開口部は外植体植え付け後、熱接着した。袋内外のガス交換は袋の面全体で行われるとされる。支持材には濃度 8 g·l⁻¹ の寒天 (関東化学(株)製) を用いた。

TF 区の培養器は、ガラス製平底試験管 (容積 48 cm³)

Fig. 1 Culture vessels with supporting materials used in Treatments SS, SP, TF, and TA.
For details, see Table 2 and the text.

(三恵理化器機(株)製)を通気フィルタ(マイクロポラス・ポリプロピレンフィルタ)のついた正方形(1辺80 mm)の透明なポリプロピレンフィルム⁹⁾(商品名:サンキャップシート, 三富産業(株)製)で閉栓したものである。支持材には濃度 $8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ の寒天(関東化学(株)製)を用いた。

TA 区の培養器は, TF 区で用いたのと同様の試験管を正方形(1辺80 mm)のアルミフォイルを2枚重ねたもので閉栓したものである。支持材には濃度 $8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ の寒天(関東化学(株)製)を用いた。TA 区は従来法に相当する。

2. 測定および算定方法

0 日目に, 供試するすべての外植体の生体重を測定した。0 日目の外植体の乾物重は別に用意した10本の外植体の乾物率($=100 \times (\text{全乾物重}/\text{全生体重})(\%)$)から算定した。20 および 40 日目に SS 区は 42 本, SP 区, TF 区および TA 区は 10 本の小植物体を任意に選び, 生体重, 乾物重, シュート長および展開葉数を測定した。またこれらの測定値から乾物率および茎葉部生体重と根部生体重の比(top-to-root fresh weight ratio, 以下 T/R 比)を算定した。

30 日目に SS 区は一つ, SP 区, TF 区および TA 区については三つの培養器を選び, それらの明期定常状態における培養器内外 CO_2 濃度を測定した。ここで定常状態とは, 培養器内外 CO_2 濃度が時間的に一定とみなせる状態をいう。 CO_2 濃度の測定はガスクロマトグラフ

(島津製作所(株)製 GC-12A)を用い, 富士原ら⁹⁾の方法と同様に行った。なお CO_2 濃度の測定が終了した時点で, 測定対象とした培養器内の小植物体の生長量を測定した。

明期定常状態における培養器内の小植物体当りの純光合成速度 P_p ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{plantlet}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)は, SS 区, TF 区および TA 区については(1)式, SP 区については(2)式を用い算定した¹⁰⁾。

$$P_p = k \cdot V \cdot N \cdot (C_{\text{out}} - C_{\text{in}}) / n \quad (1)$$

$$P_p = k \cdot q_a \cdot A \cdot (C_{\text{out}} - C_{\text{in}}) / n \quad (2)$$

ここで, k は変換係数 (25°C , 1 気圧下で, $4.1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$), V は培養器内空気容積 (cm^3), N は培養器内空気容積が $V \text{ cm}^3$ であるときの培養器の換気回数 (hr^{-1}), C_{out} は明期定常状態における培養器外 CO_2 濃度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), C_{in} は明期定常状態における培養器内 CO_2 濃度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), n は培養器当りの小植物体数, q_a は面 CO_2 変換係数 ($\text{m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$), A は培養器表面積のうち培地と接していない部分で, 63 cm^2 である。小植物体の葉部乾物重当りの純光合成速度 P_d ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg DW}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)は P_p を小植物体の葉部乾物重で除して求めた。

なお, 換気回数¹¹⁾とは単位時間当りの換気量を培養器内空気容積で除したものをいう。本実験では換気回数は CO_2 をトレーサーガスとして求めた。面 CO_2 交換係数¹¹⁾とは通気性のある閉栓容器内外間における, 単位時間, 閉栓容器内外の単位 CO_2 濃度差および閉栓容器の単位

Fig. 2 Time courses of fresh (A) and dry (B) weights of the carnation plantlets *in vitro*.

In fresh and dry weights on day 40, there are no significant differences at the 5% level among the treatments followed by same letters. Description of the treatments is given in Table 2.

表面積当りの、CO₂の交換量をいう。SP区の面CO₂交換係数は $7 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{hr}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。

結果および考察

1. 生体重、乾物重および乾物率

小植物体当りの全生体重(W_f)および全乾物重(W_d)の経日変化を、それぞれ Fig. 2(A), Fig. 2(B)に示す。40日目の W_f , W_d はともにSS区で最大であり、それぞれTA区の約4倍、5倍であった。40日目の W_f および W_d について、SS区は他のすべての試験区と有意差(ダンカンの範囲検定(危険率5%))による、以下同様)があったが、SP区、TF区およびTA区の間には有意差はなかった。SS区は換気回数が大で、支持材が繊維製であることから、 W_f および W_d の増大には、培養器の換気回数が大であることと支持材が繊維製であることが寄与したと考えられる。 W_f および W_d が、培養器の換気回数が大であること¹²⁾、支持材が繊維製であること⁶⁾により増大したということは、他の植物について報告されている。

繊維製の支持材を用いたSS区の40日目の小植物体の根部生体重は $37.5 \text{ mg} \cdot \text{plantlet}^{-1}$ であり、TA区の約10倍であった。寒天培地ではゼロであるとみなされる根圏の気相率が、繊維性の支持材を用いたことにより高められたことが、根部の重量が増大した主因であると推察される。根部の生長が大となったことで、根部の培地からの養分および水分の吸収が大となり、それにより W_f および W_d が増大した可能性がある。

40日目の小植物体の乾物率はSS区が17%で最大であり、ついでTF区が14%、TA区、SP区が11%であった。つまり乾物率は培養器の換気回数が大であるほど大であった。換気回数が小さいSP区およびTA区は培養器内に結露がみられ、それらの培養器内相対湿度はSS区、TF区のそれより高かったと考えられる。培養器内相対湿度の低下が乾物率の増大に寄与した可能性が考えられる。またSP区、TA区の小植物体にはビトリフィケーションがみられたものもあった。これは培養器内の高相対湿度が要因の一つと考えられている¹³⁾。

2. T/R比、シュート長および展開葉数

20および40日目におけるT/R比、シュート長および展開葉数をTable 3に示す。すべての試験区において40日目のT/R比は20日目のT/R比より小であった。20日目のT/R比はSS区で最小、SP区で最大であった。20日目のT/R比がSP区で大となったのは、20日目におけるSP区の根部生体重が小であったことによる。40日目のT/R比は20日目同様、SS区で最小であった。このことは先に述べたように、SS区でとくに根部の重量が大であったことによる。他の試験区間の40日目のT/R比はTF区<SP区<TA区であり、換気回数の大きいTF区のT/R比が他の2試験区よりやや小であった。

20日目のシュート長はSS区、TF区が他の試験区にくらべやや小であった。40日目のシュート長はすべての試験区間に有意差はなかったが、TA区が最大であり、ついでTF区>SS区=SP区であった。SP区を除けば、

Table 3 Top/root fresh weight ratio, shoot length and number of leaves on days 20 and 40.

Treat. symbol	Days after treat.	Top/root FW ratio	Shoot length (mm)	Number of leaves (plantlet ⁻¹)
SS	20	14	13	5.4
	40	6	32 a	13.3 a
SP	20	57	16	6.6
	40	17	32 a	14.8 a
TF	20	25	13	6.6
	40	12	35 a	12.4 a
TA	20	26	16	6.3
	40	19	41 a	14.1 a

Means within a column followed by same letters are not significantly different at the 5% level.

換気回数が大であるほど小植物体のシュート長は小となった。換気回数の相違に伴う培養器内相対湿度の相違がシュート長に影響を及ぼしたと考えられる。SP区において40日目のシュート長が小となったのは多芽体となった小植物体が存在したためである。多芽体の発生要因についてはさらに詳細に研究する必要がある。茎部乾物重当りのシュート長は、SS区が $3.4 \text{ m} \cdot \text{g}^{-1}$ 、SP区が $65 \text{ m} \cdot \text{g}^{-1}$ 、TF区が $6.8 \text{ m} \cdot \text{g}^{-1}$ 、TA区が $12.4 \text{ m} \cdot \text{g}^{-1}$ であった。TA区の小植物体は他の試験区のそれらより徒長している傾向にあった。

40日目の展開葉数はSP区>TA区>SS区>TF区の順であったが、有意差はなかった。換気回数が小であると、展開葉数が大となる傾向がみられた。

3. 明期培養器内外CO₂濃度および純光合成速度

30日目の明期定常状態における培養器内外CO₂濃度(C_{in} , C_{out}), 小植物体当りの純光合成速度(P_p)および葉部乾物重当りの純光合成速度(P_d)をTable 4に示す。換気回数が多いSS区、TF区の C_{in} は約 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ であった。これに対し、換気回数が小さいSP区およびTA区の C_{in} は $200 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ 前後と低かった。SP区およびTA区の低い C_{in} が、これらの試験区の P_p , P_d を抑制した一因であると考えられる。 C_{out} は $470 \sim 490 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ であったので、すべての試験区で P_p , P_d は正であった。

P_p および P_d は SS 区で最大であり、ついで TF 区>TA 区>SP 区であった。これらの大小関係は、小植物体当りの培養器の換気量の大小関係と一致した。SS 区の P_d は SP 区のその約 17 倍であった。

Table 4 CO₂ concentrations inside (C_{in} ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)) and outside (C_{out} ($\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$)) the vessel during the photoperiod under steady state conditions, and the net photosynthetic rate per plantlet (P_p ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{plantlet}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)) and per leaf dry weight (P_d ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{mg DW}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$)) on day 30.

Treat. symbol	C_{in}	C_{out}	P_p	P_d
SS	405	488	2.30	0.17
SP	258	488	0.04	0.01
TF	409	472	0.66	0.07
TA	190	472	0.18	0.04

摘 要

本実験では、培養器の換気回数が大きく、支持材が繊維製である SS 区において、 W_f , W_d , 乾物率および純光合成速度が大きい小植物体が得られ、その小植物体は T/R 比が小さく、シュート、節間が短い傾向にあり、移植用苗として有利であると考えられた。TF 区の小植物体は W_f , W_d ともに SS 区のそれより小であったが、乾物率、T/R 比およびシュート長などについては SS 区と同傾向にあった。SP 区の小植物体はシュートが伸長するものと多芽体となるものの二つに大別できる。また SP 区、TA 区の小植物体にはビトリフィケーションがみられたものがあつた。

これらのことから、培養器・支持材の種類は小植物体の生長に影響を及ぼしていることが明らかになった。これは培養器・支持材の種類が異なると、おもに、培養器内の空気流動、CO₂濃度、相対湿度および根圏の気相率などが異なるからであると考えられた。本実験では培養室内の環境条件を従来法に近いものにしたが、用いる培養器・支持材の特性を考慮し、培養室内の環境条件を変えれば、さらに小植物体の生長は促進されるであろう。

文 献

- 1) 古在豊樹・岩浪好恵・富士原和宏. 1987. 炭酸ガス施用が増殖培養時におけるスターチス (*Limonium Hybrid*) の小植物体の生長に及ぼす影響. 植物組織培養 4(1): 22-26.
- 2) 古在豊樹・関本克宏. 1988. 培養器の換気回数と光合成有効光量子束の大小が培養器内二酸化炭素濃度とイチゴ培養小植物体の生長に及ぼす影響. 生物環境調節 26: 21-29.
- 3) 古在豊樹・高澤明子・渡部一郎・杉 二郎. 1990. タバコ培養実生および培養小植物体の生長に及ぼす培養器内環境の影響. 生物環境調節 28: 31-39.
- 4) HERMAN, E. B. (Ed). 1990. Semipermeable mem-

- brane tissue culture systems for plants. *Agricell Rep.* **15** (1): 1-2.
- 5) 古在豊樹・李 慧津・林真紀夫・渡部一郎・木下敏明. 1989. 培養器の栓の種類, 培養室内 CO₂ 濃度および培地中の糖の有無がミント培養小植物体の生長におよぼす影響. 園学雑 **58** (別冊 2): 508-509.
 - 6) ANDREW, R. V. and E. F. SMITH. 1990. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **21**: 129-132.
 - 7) MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
 - 8) SMITH, E. F., A. V. ROBERTS, and J. MOTTLEY. 1990. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **21**: 141-145.
 - 9) 富士原和宏・古在豊樹・渡部一郎. 1987. 植物組織培養内環境の基礎的研究 (3). 農業気象 **43**: 21-30.
 - 10) 富士原和宏. 1988. 培養器内 CO₂ 濃度が一定である場合の培養小植物体の CO₂ 交換速度の算定法. 植物組織培養 **5**: 104-106.
 - 11) 古在豊樹・富士原和宏・渡部一郎. 1986. 植物組織培養器内環境の基礎的研究 (2). 農業気象 **42**: 119-127.
 - 12) 古在豊樹・大出尚美・久保田智恵利. 1989. 培養環境がツケナの小植物体および実生の生長に及ぼす影響. 園学雑 **58** (別冊 1): 236-237.
 - 13) Ziv, M. 1991. Vitrification: Morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In "Micropropagation: Technology and Application" (Ed. by Debergh and Zimmerman) 45-69, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.