

植物組織培養におけるガラス質化の原因と防止法

神奈川県農業総合研究所 生物資源部

部 長 三 浦 泰 昌

1. はじめに

組織培養はウイルスフリー株の育成や優良株の大量増殖技術として、さらに、遺伝子組換えなど高度なバイオテクノロジーの基本技術として発展し、多くの作物で実用化されている。イチゴ、カーネーション、サツマイモなどではウイルスフリー苗の利用が、またランでは大量増殖苗の利用が常識となっている。

しかし、実用化された組織培養技術をさらに検討すると、その中に成功率を大きく左右する未解決な問題が数多く残されている。例えば植物体内に生息する内生菌が培養中に繁殖して組織が枯死する、品種や系統によって培養に難易がある、さらにこれから紹介するガラス質化個体の発生などである。

ここでは、これらの中からカーネーションの組織培養におけるガラス質化の問題を例に、その実態と防止法について紹介する。

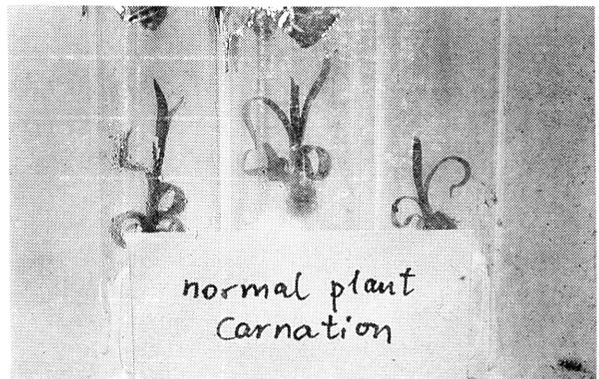
2. ガラス質化とは

写真1-A, Bはカーネーションの生長点培養（一般的には茎頂培養という）中にガラス質化した個体で、その発生率は20~50%に達することも

写真1-A ガラス質化した個体



写真1-B 正常に生育した個体



本 号 の 内 容

§ 植物組織培養におけるガラス質化の原因と防止法.....	1
神奈川県農業総合研究所 生物資源部 部 長 三 浦 泰 昌	
§ 養液栽培での被覆肥料の利用.....	5
明治大学 農学部 講 師 中 林 和 重 学 生 戸 田 哲 也 学 生 太 田 一 美	
§ '95年本誌既刊総目次	8

ある。特徴は、葉や茎が多肉植物のように肥大化して淡緑色のガラス細工のような状態になり、表皮が硬く脆くて折れやすい。走査型電子顕微鏡で観察すると表皮細胞が硬化し、特に気孔が硬化して開閉機能を失っていることがわかる。

植物の種類によっては、培養条件を変えることによってガラス質化した個体が正常に戻る場合もある（例えばカンキツ）が、多くの場合どのような処理を行っても枯死する。カーネーションでは根が発達しているにもかかわらず、鉢植えすると100%枯死する。

3. ガラス質化の発生原因

発生原因については寒天など培地の固化物質の種類や濃度、無機成分特に塩素やアンモニア態窒素の濃度、植物ホルモンの種類と濃度、試験管内の相対湿度、培地の浸透圧など、これまでに多くの報告があるが、いずれも定説とはなっておらず、確実な防止技術は確立されていない。

ただし、これらの報告の中で発生防止効果の高かった事例について共通点を探してみると、固形培地の硬さを増す、培地の浸透圧を高める、培地の無機成分や植物ホルモンの濃度を下げる、試験管内の相対湿度の低下を図るなど、植物体に何らかのストレスを与えて、急速な生育を抑えている場合が多い。

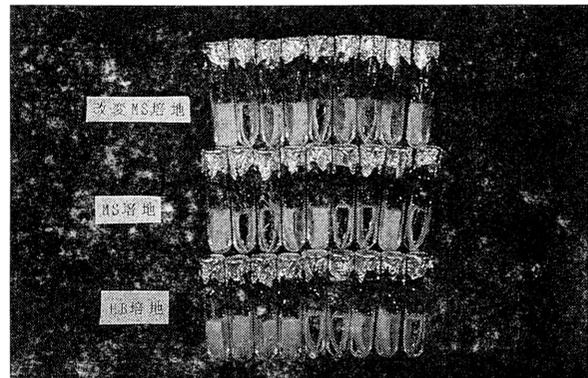
ちなみに、従来の培養温度は全期間25℃一定とし、培地にはMS培地を用いるのが一般的であり、このことがガラス質化の発生と密接な関係にあると推測された。そこで、培養条件とガラス質化との関係解明ならびに防止法について、一連の試験を行った。

4. ガラス質化の発生原因

究明

まず培養温度を10℃から25℃まで5℃段階に設定して、カーネーションの大輪品種“ノラ”の生長点（茎頂）を液体培地を用いたペーパーブリッジ法（写真2参照）で2か月間培養した。次に、この段階で茎葉の分化した個体をさらに10

写真2 ペーパーブリッジによる茎頂培養（培地の種類や濃度によって生育は大きく異なる）



～25℃の4段階に分けて培養した。

その結果、10℃では著しく生育が劣り、温度が高い区ほど旺盛に生育したが、培養前期又は後期及び全期間を25℃で培養した区ではガラス質化の個体が多く発生した。また、試験終了時における液体培地内の無機成分の減少量（すなわち吸収量）は表1のように、生育の旺盛な個体ほど減少量が多かったが、特にガラス質化した個体での減少が顕著であった。すなわち、培養中に過剰な養分吸収が起こったことが明らかになった。

これらのことから、ガラス質化の防止には培養温度や養分供給量の調節などにより、生育速度を制御することが重要と考えられた。そこで、生育速度に関係する要因として表2に示す①液体培地の濃度、②植物ホルモン濃度、③ペーパーブリッジの高さ、④培養温度、⑤品種について、2段階及び2品種を設定し、これらがガラス質化に対して単独であるいは相互にどのように影響するかを統計的手法を用いて試験した。なお培養チャンバ

表1 カーネーション茎頂の生育と液体培地の水分及び

無機成分の減少率（%）

生育状況*	水分	無機成分の減少率（%）								
		Cl	NO ₃	SO ₄	PO ₄	NH ₄	K	Ca	Mg	
0	22.0	24.6	57.0	60.4	60.9	65.9	38.1	29.3	40.0	
1	38.4	45.0	78.8	49.7	81.9	80.9	52.8	50.8	54.5	
2	39.5	51.2	86.1	50.3	100	86.4	59.3	49.5	57.3	
3	52.8	73.0	95.7	72.1	100	98.4	81.3	70.8	77.0	
4	56.0	79.9	99.6	78.3	100	99.6	86.0	76.1	82.0	
原液量**	10ml	1.8mg	11.7mg	7.1mg	0.9mg	2.3mg	7.7mg	1.05mg	0.24mg	

* 生育状況 0：葉数1-4、1：5-10、2：11-15、3：16枚以上

4：ガラス質化

** 原液量：試験開始時の培地の成分含量

表2 培養試験区の構成

No.	要 因	水 準	
		1	2
1.	培地濃度* (リッター当たり含有量)	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 840mg KNO ₃ : 1,900mg CaCl ₂ · 2H ₂ O: 440mg MgSO ₄ · 7H ₂ O: 250mg KH ₂ PO ₄ : 200mg	左の1/2
2.	植物ホルモン濃度	アデニン10mg NAA 1mg	左の1/2
3.	ペーパーブリッジの高さ	10cm	1 cm
4.	培養温度	照明時25℃ - 暗黒時15℃	25℃一定
5.	品 種	ヨソオイ	ノラ

*その他の成分はMS基本培地に同じ

表3 培養条件がガラス質化個体の発生に及ぼす影響

要 因	水 準	草丈 (cm)	葉 数	根の発達度*	ガラス質化個体数
培地濃度	1	1.05	5.6	1.5	14**
	2	1.25	5.3	1.5	7
植物ホルモン	1	1.22	4.9	1.5	8**
	2	1.11	6.0	1.5	13
ペーパーブリッジの高さ	1	0.36**	2.2**	0.4**	5**
	2	1.96	8.7	2.6	16
培養温度	1	1.50**	5.4	1.6	7**
	2	0.83	5.5	1.4	14
品 種	1	1.15	6.0	1.7	11
	2	1.18	4.9	1.3	10

*: 発根0から最大根量5の6段階で評価した平均値

**: 統計処理の結果、水準1と2の間に1%水準で差があることを示す

一の照明時間は12時間で、変温区では照明中を25℃、暗黒中を15℃に、定温区は全期間を25℃に設定した。

2か月間の培養によって発生したガラス質化個体数は表3のように、培地の無機成分では1/2濃度区が標準濃度に比較して明らかに少なく、また培養温度では変温区で、植物ホルモンでは標準区で少なかった。ペーパーブリッジの高さでは10cm区で少なかったが生育が著しく劣ったことから、実用的でなかった。なお、2品種間の発生率はほぼ同程度で差は認められなかった。

この結果、培地の無機成分濃度を1/2程度、植物ホルモン濃度を標準にして、培養温度を照明時25℃-暗黒時15℃の変温で管理することにより、ガラス質化の防止が可能と考えられた。

5. ガラス質化の防止法

そこで、培地の無機成分濃度を1/2、植物ホルモン濃度を標準、ペーパーブリッジの高さを1cmに固定し、培養温度のみを25℃定温と25℃-15℃変温の2段階に設定して、ガラス質化の発生を比較した。その結果は表4のように、大輪品種の“ノラ”、スプレー品種の“パラダイソ”とも

表4 明・暗黒時の変温培養によるガラス質化の発現抑制 (供試本数: 1区25本)

温度 (°C)	品 種	分 化 個体数	ガラス 質化数	カルス 形成数	分 化 個 体 の 平 均 値				鉢移 植数	活着 数
					生体重(g)	葉数	草丈(mm)	根発達度*		
25	ノ ラ	12	5	6	0.60	14.6	23.9	4.4	12	5
	パラダイソ	15	7	0	0.35	14.5	21.8	3.0	15	3
25 -15	ノ ラ	15	0	4	0.20	9.5	23.7	2.4	15	15
	パラダイソ	17	0	4	0.18	10.8	20.7	2.7	17	16

*根発達度: 調査法は表3に同じ

表5 変温培養条件における茎頂生育の品種間差 (供試本数: 各品種20本)

品 種 名	分 化 数	ガラス 質化数	カルス 形成数	分 化 個 体 の 平 均 値				鉢移 植数	活着 数
				生体重(g)	葉数	草丈(mm)	根発達度		
ノ ラ	19	0	1	0.28	8.7	25.5	3.4	18	16
バ ガ テ ル	19	0	1	0.23	12.6	27.4	3.5	15	15
ピンクローランド	18	0	1	0.56	12.0	43.9	2.8	17	16
バ ー バ ラ	8	0	4	0.29	17.9	18.0	3.6	7	7

25°Cでは再分化した個体の中で半数近くがガラス質化したが、25°C—15°Cでは発生が全く認められなかった。

さらに、カーネーションの他品種への適応性を検討するために、表5の4品種を用いて、培養温度を25°C—15°Cの変温に設定し、培地の各成分を前回と同一として試験した。

その結果、4品種ともガラス質化の発生は全く認められなかった。ただし、カルス形成には品種間差が認められた。

6. おわりに

以上のように、培養中の植物体の生育を制御することによってガラス質化は防止できることが明らかになった。これまでの組織培養技術開発では、生育速度を早めて培養効率を高めることに主眼が置かれてきた。そのために、温度、湿度、水分、養分等の条件が生育へのストレスを最小限にするように設定されており、自然の生育環境や栽

培環境とは大きく異なったものとなっている。

自然の環境条件下でも頂芽は側芽より旺盛に生育する(頂芽優性)が、個体内で頂芽や生長点が生育する過程では常に側芽や他の生育中の組織と競争する関係にある。すなわち、養分や水分供給のストレスを受けながら生育していると考えられる。

一方、組織培養に用いられる茎頂はこのような個体内のバランスが突然断ち切れ、ストレスの極めて小さな状態に置かれるが、このことが異常な生育の大きな要因と推測される。今後の組織培養においては生育の速度を早めることだけでなく、健全な植物体を育成するためにどのように生育を制御するかを考える必要がある。例えば培養温度については25°Cの決められた条件だけではなく、自然の生育条件や栽培条件等を参考にしながら、検討を進める必要がある。