

# 植物組織培養によるシンビジウムPLB増殖へのCO<sub>2</sub>濃度,光強度および液体培地組成の影響

誌名	農業氣象
ISSN	00218588
著者	本條, 毅 高倉, 直
巻/号	43巻3号
掲載ページ	p. 223-227
発行年月	1987年12月

## 植物組織培養によるシンビジウムPLB増殖への CO<sub>2</sub>濃度、光強度および液体培地組成の影響

本 條 毅・高 倉 直

(東京大学農学部)

Effects of CO<sub>2</sub> Concentration, Light Intensity and  
Liquid Medium Composition for the Growth of *Cymbidium* PLB  
*in vitro*

Tsuyoshi HONJO and Tadashi TAKAKURA

( Faculty of Agriculture, University of Tokyo, )  
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan )

### 1. はじめに

植物の葉、茎、根などの組織を培地上で無菌的に増殖する植物組織培養により、ウィルスフリー株の育成や、従来より行われている挿し木、接木、株分けなどの方法に比べ、大量の種苗を生産することが可能になった。ラン等の市場価値の高い花卉は、その実用化がかなり進んでいる代表例である。しかし、本格的な種苗大量生産システムのためにはさまざまな問題がある。本研究ではこのようなシステム開発の基礎実験として、培養された植物に環境条件がどのような影響を及ぼすかについて検討した。

Murashige (1974) は、植物組織培養の操作を、(1) 外植体(花器・茎頂・根等)の初期培養、(2) 形成された器官、組織などの増殖、(3) 移植のための強健な幼苗を育成するための順化という3つのステージに分けている。組織培養により種苗の大量生産を行うための問題点の一つとして、初期培養、増殖ステージでの培養をいかに効率的に行うかがある。現在実用化されている器官、組織などの培養法は、主に寒天培地を使用しているため、大量に培養を行うためには培養容器の数を増し人手をかける必要がある。

この問題の解決策としては、寒天を使用しない液体振

とう培養、ジャー・ファーメンター培養(以下、振とう培養、ジャー培養と呼ぶ)などが考えられる。これらは、一般的に、より効率的な大量培養法であることが知られている。これらの培養法は、まだ試験段階でいくつかの未解決な問題を含んでいるが、いくつかの例では養分の吸収効率が良い、培地成分の制御が容易等の長所があることが立証されている(高山, 1984)。

また、光独立的な培養が行えるかどうか、重要な課題である。初期培養、増殖のステージでは、植物の炭素源として培地に糖分を添加して従属栄養的に培養を行うのが一般的である。したがって、培養後に光合成能力を発揮させることが、順化の重要な目的の一つである。培養器から移植した順化ステージの苗にCO<sub>2</sub>施肥を行うことにより生長が増進されることが Lakso *et al.* (1986) により報告されている。

このようなことから、もし一段階前の増殖ステージの後期においても、十分なCO<sub>2</sub>、光強度を与えて光独立栄養的に増殖が可能であれば、順化も一層効率的に行える可能性が高いと考えられる。光独立栄養的な植物組織の増殖は、カルス等の細胞培養では、いくつかの作物で成功している(山田, 1984)。また、強光、CO<sub>2</sub>施用と生長促進との関係を見た例には、古在ら(1987)、富士原ら(1987)の小植物体の例や、土井ら(1986)のラン(ファレノプシス)のプロトコムの増殖の例などがある。

シンビジウム等ラン科の植物の生長点を切り出して培

養すると、プロトコーム様体 (protocorm like body, 以下 PLB と略記する) が形成される。PLB を分割して培養を繰り返し、増殖することが可能であり、実用的にもこの方法が用いられている。シンビジウム PLB については、培地成分、生長調節物質などによる増殖の差について研究が行われている (Fonnesbech, 1972, 楠元, 1980, 金および加古, 1982)。しかし、CO<sub>2</sub>、光強度等の環境条件とシンビジウム PLB の増殖との関係についての研究は少ない。

以上のような問題点を踏まえ、本研究では生長点培養での増殖ステージにおける光独立栄養的培養の可能性を探ることを目的とした。そのため、シンビジウム PLB を試料として培地のショ糖濃度、光の強度、CO<sub>2</sub>濃度、 $\alpha$ -ナフトレン酢酸 (以下 NAA と略記) 濃度等の環境条件を変えて植物組織培養を行い、生長の度合を調べた。培養法は、振とう培養、ジャー培養とした。

## 2. 実験方法

### 2.1 試料および培地

試料に用いたシンビジウムの品種名は、O'halloran hill 'war paint' である。MS (Murashige-Skoog) 培地 (ショ糖 20 g/l 含)、温度 25℃、照度 3,000 lx の培養条件の下で、約 4 年間継代培養したものを使用した。

PLB は、1% オスバン液に 5 分間、20% ピューラックス液に 5 分間、70% エチルアルコールに 2、3 秒間浸して滅菌した。滅菌、植え継ぎはクリーンベンチ (日立製作所、PCV-750 AG (G)) 内で行った。

本実験では、MS 基本培地を標準濃度の 1/2 に薄めたものを使用した。これに植物生長調節物質として、サイトカイニン (カイネチン) を 1 mg/l 加え、オーキシン (NAA)、ショ糖も Table 1 のような濃度で加えた。培養液は、水酸化ナトリウムを加えることにより pH 5.6~5.8 に調製した。この培養液を、オートクレーブ (トミー精工、SS-320) で 120℃、2 気圧の下で 20 分間滅菌した後使用した。

Table 1. Conditions of the experiments.

Factor \ Method	Shake Culture	Jar Fermenter
Photon Flux Density ( $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ )	63, 129	81, 121, 199
CO <sub>2</sub> Concentration (ppm)	350, 3000	350, 3000
Sucrose Concentration (g/l)	0, 15, 30	0, 30
NAA Concentration (mg/l)	0, 0.01	0.01

### 2.2 実験装置

実験システムの概要を Fig. 1 に示す。振とう培養とジャー培養が同時に行え、通気する空気中の CO<sub>2</sub>濃度、光強度等が設定できるようにした。実験システムは、気温 21℃、相対湿度 40% に制御された恒温室内に設置した。

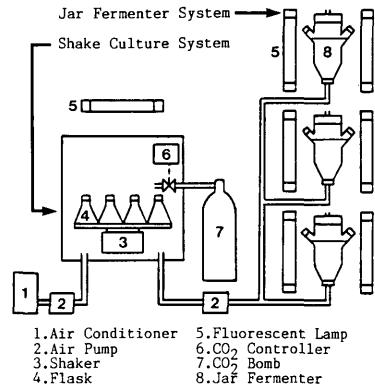


Fig. 1. Diagram of experimental systems.

振とう培養は、CO<sub>2</sub>濃度を一定に保ったアクリル製のボックスの中で、振とう器 (柴田ハリオ硝子) で 60 rpm に振とうさせて行った。培養容器には、容量 500 ml の三角フラスコを用い、光透過率の良いオーバーキャップを使用した。このキャップをしたときの三角フラスコの換気率は、60 rpm で振とうした場合、0.592 (l/hr) であった。気温は、空調した空気を空調装置から 13 l/min の割合で、振とう培養用ボックスへ直接送り込むことにより調節した。CO<sub>2</sub>濃度は、ボンベからの CO<sub>2</sub> (濃度 100%) の供給を、CO<sub>2</sub>コントローラ (富士電機、ZFP) でオンオフすることにより、ほぼ一定値に制御した。

光強度の調節は、20 W 白色蛍光灯 5 本を上下することにより行った。振とう培養用ボックスの側面および振とう器上にアルミ箔を張り、光の損失を防いだ。振とう器上の三角フラスコは、各々の底面での光量子束密度 (波長: 400-700 nm) が一定となるように配置した。

ジャー・ファーメンターには、振とう培養用ボックスからエアポンプにより、100 ml/min の割合で、CO<sub>2</sub>濃度一定の空気を送り込んだ。したがって、ジャー培養、振とう培養法とも、同時におこなった実験での CO<sub>2</sub>濃度は同じである。空気の入口と出口には、ろ過滅菌ユニットを取り付けた。空気は、ジャーの底面から送り込み、気泡の移動により培養液の攪拌を行った。

ジャー培養での光強度は、蛍光灯を直径 280 mm の円周上に、強光の場合 10 本、中の場合 6 本、弱の場合 4 本配置して調節した。ジャー内の光強度は床から 15 cm、20 cm、25 cm、30 cm、35 cm の高さで、ジャーの中

心部において光量子計を水平方向に向けて、45度毎に8方向測定しその平均光量子束密度を求めて調整した。

### 2.3 培養条件および方法

振とう培養、ジャー培養の実験条件を、Table 1に示す。これらの環境条件を掛け合わせた条件数は、振とう培養は24通り、ジャー培養は12通りである。

0日目の乾物重は、培養した PLB とは別に生体重約5gの PLB を、乾燥炉内で100℃で15時間乾燥させた後、その重量を測り求めた。

振とう培養では、生体重約2gの PLB を30mlの培養液中で培養した。各条件とも各々2つの三角フラスコで培養し、一方のフラスコで培養した PLB は7日目に CO<sub>2</sub> 濃度、生体重、乾物重の測定に用い、もう一方は14日目に同様の測定を行った。

ジャー培養は、生体重約3.5gの PLB を2lの培養液中に入れて行った。14日間培養させた後、その生体重および乾物重を測定した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 環境条件と PLB の増殖

振とう培養、ジャー培養ともに、環境条件と増殖の関係にはほぼ同じ傾向が見られたが、振とう培養の方が、PLB 増殖のばらつきがやや大きかった。ここでは、ジャー培養の結果について主に述べる。

培養を開始した日の重量を1とした相対比を、増加比と定義する。ジャー培養における14日目の乾物重の増

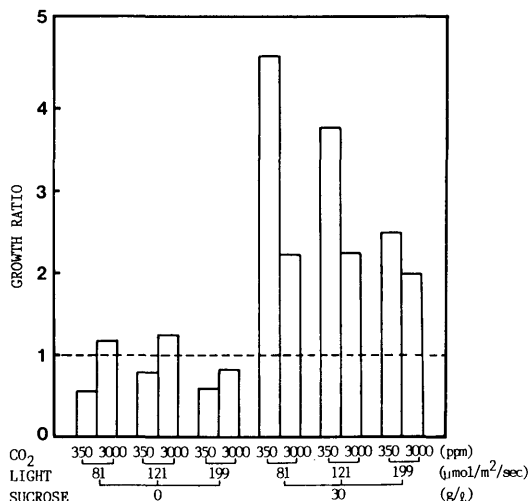


Fig. 2. Effects of sucrose concentration, light intensity, and CO<sub>2</sub> concentration on dry weight of PLB cultured in fermenter system. Growth ratio is the ratio of dry weight after 14 days of culture to that of the first day.

加比を Fig. 2 に示す。図より明らかなように、ショ糖の濃度が30 g/l の場合の方が、光強度、CO<sub>2</sub> 濃度にかかわらずショ糖を添加しない場合に比べ乾重量の増加が数倍大きい。乾物重の増加比を指標とした時には、培地中のショ糖の役割が極めて大きいことが分かる。

ショ糖無添加の下でも、高 CO<sub>2</sub> 濃度下では増加比が1を上回っている場合もある。この場合、同じ光強度であれば高 CO<sub>2</sub> 濃度の方が低 CO<sub>2</sub> 濃度よりも増加比が大きい。予備実験として、明所と暗所に PLB を入れた三角フラスコを放置した後フラスコ内の CO<sub>2</sub> 濃度を比較したところ、暗所に置いた場合の CO<sub>2</sub> 濃度が明所の数倍であったことや、PLB は緑色でクロロフィルを含んでいることから、PLB には光合成能力があると考えられ、高 CO<sub>2</sub> 濃度の方が光合成が盛んでよく増殖した可能性が高い。光強度については、ショ糖濃度ゼロの場合では、中程度の時に増殖が最大になっている。

ショ糖濃度の高い場合では、逆に CO<sub>2</sub> 濃度が高い場合の方が、増加比が低くなっている。また、光強度が高くなる程増加比が低くなっている。土井ら(1986)がファレノプシスの寒天培地での培養で60日間の CO<sub>2</sub> 施肥を行った例では、ショ糖添加時においても高 CO<sub>2</sub> 濃度であるほど生長が大きいことが報告されている。今回は培養期間も短く、ショ糖濃度が高い場合 PLB は従属栄養状態であると考えられ、高 CO<sub>2</sub> 濃度や強光が、増殖を阻害する要因となりうることを示している。また、培養液温度は、制御しなかったため、光強度が弱、中のときには、約25℃であったのに対し、強のときには約27℃と適温よりも高めであり、増加比が低いのはこの影響もあったと思われる。

生体重は乾物重に比べて変化が小さく、ショ糖を添加しない場合に増加比0.9、ショ糖を添加して最も増殖した場合でも増加比1.5程度であった。したがって、増殖した PLB は比重が大きくなっている。

カルス培養においても、光独立栄養培養は従属栄養培養に比べ低い増加比しか示さないことが多い(Horn *et al.*, 1983)。しかし、カルス培養で高い光独立栄養生長を行うことに成功した例では、光合成能力の高いカルスを選抜し継代培養しており(Yasuda *et al.*, 1980)、PLB の場合も、より長期間にわたり独立栄養下で培養、選抜を行うことにより光合成能力の高いものが育成できる可能性もある。

### 3.2 環境条件と形態

振とう培養でショ糖濃度を变化させたときの、典型的な形態の変化を Fig. 3 に示す。写真は、CO<sub>2</sub> 濃度350 ppm、光量子束密度63 μmol/m<sup>2</sup>/sec の場合の14日目の PLB である。ショ糖を30 g/l 入れた場合にはシュ

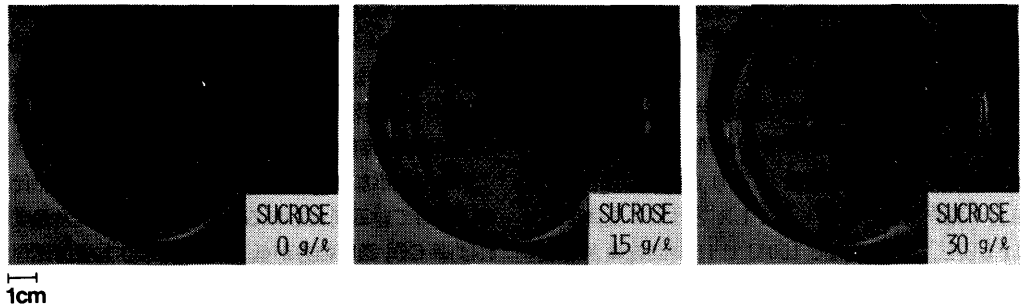


Fig. 3. Effect of sucrose concentration on the growth of shoots.

ートはほとんど生長していないが、ショ糖が無添加の場合にはシュートが3 cm程度にまで生長しているPLBもある。

今回の実験では、各実験間でのばらつきが大きいため、CO<sub>2</sub>濃度、光強度が大きい程シュートが生長するかどうかは今後の課題である。また、すべてのPLBにシュートが見られるわけではなく、PLBを一様に増殖させることを考えた場合、シュートの生長は必ずしも好ましいこととはいえない。

従来、発根促進や鉢への植え出しの時には、培地の糖分を減らしたり全く加えないということも行われている。ショ糖濃度が低いものは高いものよりシュートがよく生長する傾向は、むしろ順化のステージにおいて、芽出しの制御などに利用できると考えられる。

植物ホルモンは振とう培養においてNAAの濃度のみを変化させた。NAAを添加した場合、無添加の場合とも、生体重、乾物重の増加量にはほとんど差が見られなかった。しかし、形態的には添加しない方がより多くのシュートが見られた。

#### 4. おわりに

本研究では、振とう培養、ジャー培養により、培地のショ糖濃度、NAA濃度、光強度、CO<sub>2</sub>濃度等の環境条件を変えてシンビジウムPLBの組織培養を行い、各要素と増殖との関係や光独立栄養的培養の可能性を検討した。

シンビジウムPLBの生体重、乾重量に関しては、ショ糖を添加する方が増加が大きいことが分かった。しかし、ショ糖無添加での光独立栄養でも、条件によっては、増加が可能であった。また、シュートの生長に関しては、ショ糖濃度が低いほど良く生長し、生長調節物質によっても異なった生長を示した。

以上のようなことから、完全な光独立栄養培養は難しいが、ショ糖添加量のある程度減らしCO<sub>2</sub>濃度、光強度を調節することにより、生長点培養においても光独立栄養

プロセスの導入の可能性はあると考えられる。今回は実験条件の設定が各環境要素につき2、3通り程度と粗いため最適な条件を示すことはできなかった。より多くのデータを蓄積し、最適な条件を探ることが今後の課題である。また、振とう培養やジャー培養等の液体培地を使用してCO<sub>2</sub>施用を行う場合、培養液中でのCO<sub>2</sub>の状態や、高CO<sub>2</sub>濃度が培養液の組成に与える影響等についても分析する必要がある。

今回の実験は培養期間が14日間と比較的短く、また増殖のステージのみを対象とした。最終的な評価は、成苗を育成するまでのプロセス全体のシステムの効率により行うべきであろう。

最後に、試料を提供していただいた柴田ハリオ硝子株式会社、実験にあたり協力を得た稲木幹也氏（現：味の素AGF）に、記して謝意を表する。

#### 引用文献

- 土井元章, 野口宝司, 浅平 端, 1986: *Phalaenopsis* の *in vitro* 培養におけるCO<sub>2</sub>施肥の影響. 日本生物環境調節学会第24回大会講演要旨, p.64-65.
- Fonnesbech, M., 1972: Growth Hormones and Propagation of *Cymbidium in vitro*. *Physiol. Plant*, **27**, 310-316.
- 富士原和宏, 古在豊樹, 渡部一郎, 1987: 植物組織培養器内環境の基礎的研究(3) 培養小植物体を含む閉栓容器内の炭酸ガス濃度測定と培養小植物体の純光合成速度の推定. *農業気象*, **43**, 21-31.
- Horn, M.E., Sherrard J.H. and Widholm J.M., 1983: Photoautotrophic Growth of Soybean Cells in Suspension Culture. *Plant Physiol.*, **72**, 426-429.
- 金 奎元, 加古舜治, 1982: シンビジウム茎頂外植物体の器官形成に及ぼす植物生長調節物質の影響. *園芸学会雑誌*, **51**, 106-114.
- 楠元 守, 1980: 器内培養された *Cymbidium protocorm* の増殖と器官形成における品種間差異と生長調節物質の影響. *園芸学会雑誌*, **48**, 510-518.
- Lakso, A.N., Reisch, B.I., Mortensen, J. and

- Roberts M.H., 1986: Carbon Dioxide Enrichment for Stimulation of Growth of in Vitro-propagated Grape-vines After Transfer from Culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **111**, 634–638.
- 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 Hybrida*) の小植物体の生長に及ぼす影響。植物組織培養，**4**，22–26.
- Murashige, T., 1974: Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**, 135–166.
- 高山眞策，1984：液体振とう培養による種苗生産の効率化。植物組織培養，**1**，8–13.
- 山田康之，1984：植物細胞培養マニュアル。講談社サイエンティフィック，29–35.
- Yasuda, T., Hashimoto, T., Sato, F., Yamada, Y., 1980: An Efficient Method of Selecting Photoautotrophic Cells from Cultured Heterogeneous Cells. *Plant and Cell Physiol.*, **21**, 929–932.

### Summary

In order to examine the possibility of photoautotrophic growth on the multiplication stage of tissue culture, *Cymbidium* PLB (protocorm like body) is propagated in various conditions. CO<sub>2</sub> (carbon dioxide) concentration, light intensity and liquid medium composition are changed as shown in Table 1. By using shake culture and fermenter system, PLB is grown in MS (Murashige-Skoog) medium.

Both shake culture and fermenter system showed similar results. Growth ratio of the dry weight after 14 days of culture in fermenter system to that of the first day is shown in Fig. 2. In cases of no sucrose condition with high CO<sub>2</sub> concentration and high light intensity, the growth ratio was more than unity. This clearly indicates the photoautotrophic growth of the PLB because there is no other source of carbon except CO<sub>2</sub>.

As for the amount of the growth, the role of sucrose was remarkable. The PLB grown in the medium with 30 g/l sucrose showed 2–5 times higher ratio than the PLB grown under no sucrose condition. In the cases with sucrose, however, higher CO<sub>2</sub> concentration and higher light intensity inhibited the growth.

Shoots grew actively under low concentration of sucrose even though the growth ratio was low (Fig. 3).