

CO₂施用下におけるミズメの継代培養

宮崎県林業総合センター 三樹陽一郎

1. はじめに

ミズメの継代培養中の培養植物体から腋芽を用いて試験管内挿し木による増殖（以下、腋芽増殖）および継代培養期間の短縮等を図る場合、シュートの生長促進とそれに伴う腋芽の発生量を高める培養条件が重要となる。一方、明期における培養植物は光合成能力を有し、CO₂を吸収していることが知られている¹⁾。ミズメの組織培養においてもCO₂施用は培養植物体の生長に影響を与えることが確認されているが、培養器の通気生やCO₂濃度等の培養環境調節について十分な解明までには至っていない²⁾。そこで、CO₂施用下においてCO₂濃度、培養器の栓の種類および培地濃度がシュートの生長と腋芽発生に与える影響を調べたので報告する。

2. 材料および方法

実験には実生個体の新梢腋芽を外植体とする継代培養中のシュートから腋芽を含む小片（10mm前後）を材料とし、下記の(1)~(3)の要因および水準で実験を試みた。

基本培地はWPM³⁾で、BAPを1.0mg/l、Sucroseを20g/lとし、培地支持剤にはゲランガム2g/lを添加した。培養に使用した容器はφ30×200mmの試験管で、(2)による実験を除いてはすべてシリコセンT型で栓をした。インキュベータ（日本医化器械製作所製）のプログラム設定値は、CO₂濃度は(1)による実験を除いては明期で2,500±100ppm、暗期で無施用（気網条件はなりゆき）になるようにし、温度25℃、湿度50%以上、照度10klux、明期16時間、暗期8時間の設定とした。また、インキュベータの照明は横からの照射型で、どの処理区とも光条件が同じになるように培養器を配置した。そして、下記の3つ条件で56日間培養した後、シュート長と腋芽数の調査を行った。なお、ここでのシュート長とは実験材料から最初に発生したシュート（以下、一次シュート）の長さを、腋芽数とは一次シュートおよびそれから発生したシュート（以下、二次シュート）も含めて目視により継代可能と判別し

た腋芽の数をさすことにする。

(1) CO₂濃度の影響

インキュベータのCO₂濃度が無施用、1,500±100ppm、2,500±100ppm（いずれも明期のみ施用）の3水準で培養を試みた。

(2) 培養器の栓の種類による影響

今回の実験に使用した培養器の栓の形状および仕様を図-1に示した。栓の種類は2枚重ねのアルミホイルを80×80mmにカットしたもの（以後、A₁）、同様に120×120mmにカットしたもの（以後、A₂）、シリコセンのT型（以後、S_T）、シリコセンのC型（以後、S_C）の4種とした。

(3) 培地濃度の影響

培地濃度はWPM基本培地に対して0.5,1.0,1.5,2.0倍の4水準とした。なお、Sucroseはすべて20g/l添加した。

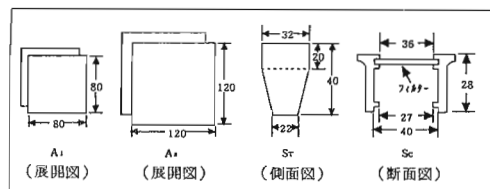


図-1 培養器の栓の種類と仕様（数値：mm）

A₁:アルミホイル(80×80mm), A₂:アルミホイル(120×120mm),
S_T:シリコセンT型(信越シリマ, T-32, 通気量50~100ml/min),
S_C:シリコセンC型(信越シリマ, C-40, 通気量200~300ml/min)

3. 結果と考察

すべての処理区において、供試材料の腋芽から一次シュートが主軸状に生長した。これに対して二次シュートは発生しても伸長は小さく、一次シュート長を上回った植物体はなかった。

(1) CO₂濃度の影響

CO₂濃度別施用によるシュート長および腋芽数の調査結果を表-1に示す。平均シュート長については、CO₂を施用した1,500ppm区および2,500ppm区は無施用

区に対して平均値が高く、その間には有意差が認められた。1,500ppm区と2,500ppm区では有意差はなかったが、2,500ppm区のほうが伸長する傾向を示した。平均腋芽数については、2,500ppm区が他の試験区に対して多く確認することができ、有意差も認められた。

林木の継代培養に関しては炭素源を主に培地中の糖類に依存した生長（以下、従属栄養生長）によるものが多く、糖の添加量は10~20g/l程度である⁹⁾。本試験では培地にSucroseを20g/l添加していたが、インキュベータ内のCO₂濃度を高めていくほどシュートの伸長および腋芽数は増加傾向を示したことから、培養植物体は培地のSucroseのほかに光合成の作用により気層中のCO₂も炭素源として要求していたと推測され、継代培養でのCO₂施用は培養植物体の生長の制御を可能とし、増殖率の向上や培養期間の調整が図れるものと考えられる。

(2) 培養器の栓の種類による影響

培養器の栓の種類による影響についての調査結果を表-2に示す。平均シュート長については、A₁、A₂、S_Tとも49mm前後の伸長値であるのに対しS_Cは有意差が認められる程低い値を示した。平均腋芽数についてはS_Tで最も多く確認でき、有意差が認められた。

腋芽増殖の面から評価した場合、腋芽数において高い値を示したシリコセンT型が他種より継代培養に適した栓と考えられる。一方、シリコセンC型はT型より通気量が高いためCO₂施用の効果が期待されたが、シュートの伸長は他の処理区より小さかった。これは、栓の通気性の良さが逆に培養器内の水蒸気の過剰な流出を招き、結果として培養器内の気層環境に著しい変化が生じたことがシュートの伸長に影響をおよぼしたと推測される。今後、栓の種類によって培養器内の湿度、光量等の変化および培養植物体への影響を調べる必要がある。

(3) 培地濃度の影響

培地濃度の影響について表-3に示した。シュート長の平均値はWPM基準量である1.0倍区に対して1.5倍区とでは有意差がなかったが、0.5倍区、2.0倍区で有意差が認められ、特に2.0倍区は不良であった。腋芽数においても有意差の傾向は同じで1.0倍区および1.5倍区がほぼ同数の腋芽が確認できた。

従来の培地組成は従属栄養生長に重点を置いた成分および濃度に調整されている。しかし、CO₂施用により培養植物体は光合成を行う結果、培地への養分要求度が変化することが予想される。本試験ではWPM培地濃度が

基準量の1.0~1.5倍が継代培養に有効と考えられるが、今後は各々の成分ごとに検討する必要がある。

4. おわりに

CO₂施用は植物生長調節物質の使用を最小にして培養植物体の生長が制御できる可能性を持つほか、培養時における培養植物体の生理学的・形態学的な異常および変異の減少、コンタミネーションによる損失の減少等にも期待ができる¹⁰⁾ため、今後も培養器内のガス濃度および湿度の制御法、培地成分、光条件等について検討を進める必要がある。

引用文献

- (1) 富士原和宏ほか：農業気象，43(1)，21~30，1987
- (2) 古在豊樹ほか：遺伝，46(4)，32~36，1992
- (3) LLOYD, G. et al: Comb. Proc. Int. Plant.Soc., 30, 421~427, 1980
- (4) 三樹陽一郎：日林九支研論，47，97~98，1994
- (5) 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編：木本植物の増殖と育種，農業図書，東京，1989

表-1 CO₂濃度がシュート長および腋芽数におよぼす影響

CO ₂ 濃度 (ppm)	供試数 (本)	シュート長				腋芽数			
		最小値 (mm)	最大値 (mm)	平均値 (mm/本)	標準偏差	最小値 (個)	最大値 (個)	平均値 (個/本)	標準偏差
無施用	10	13	37	25.3a	8.5	3	8	5.8a	1.9
1,500	10	20	50	35.3b	8.8	5	9	6.5a	1.4
2,500	12	35	60	44.1b	21.1	8	15	10.9b	5.0

注) 平均値間の有意差検定：同文字では5%以下の水準で有意差がなく、異文字間では5%以下の水準で有意差があることを示す(以下の表も同じ)

表-2 培養器の栓の種類がシュート長および腋芽数におよぼす影響

栓の種類	供試数 (本)	シュート長				腋芽数			
		最小値 (mm)	最大値 (mm)	平均値 (mm/本)	標準偏差	最小値 (個)	最大値 (個)	平均値 (個/本)	標準偏差
A ₁	12	38	60	49.3a	5.9	6	14	10.2a	2.0
A ₂	12	34	57	48.8a	6.9	4	14	9.8a	2.6
S _T	13	37	60	49.5a	8.6	9	17	12.0b	2.3
S _C	15	31	56	40.3b	7.0	7	14	10.1a	2.3

注) A₁: アルミホイル8×8cm, A₂: アルミホイル12×12cm, S_T: シリコセンT型, S_C: シリコセンC型

表-3 培地濃度がシュート長および腋芽数におよぼす影響

培地濃度 (倍)	供試数 (本)	シュート長				腋芽数			
		最小値 (mm)	最大値 (mm)	平均値 (mm/本)	標準偏差	最小値 (個)	最大値 (個)	平均値 (個/本)	標準偏差
0.5	14	22	48	34.6a	8.4	4	9	6.8a	1.4
1.0	15	37	63	48.6b	7.7	6	13	9.7b	2.1
1.5	15	31	58	44.5b	6.9	7	12	9.9b	1.5
2.0	15	13	39	21.7c	7.2	4	8	5.4c	1.2