空気組成制御および培養液添加が可能な 強制通気植物培養容器システムの開発

青木正敏・堀口郁夫・伊藤千春・楊 桂清*・原田 隆・八鍬利郎

(北海道大学農学部)

Development of an Aseptic Plant Tissue Culture Vessel System Enabling Ventilation, Air Composition Control, and Addition of Nutrient Solutions

Masatoshi AOKI, Ikuo HORIGUCHI, Chiharu ITOH,
Gui-Qing YANG*, Takashi HARADA and Toshiro YAKUWA

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

The authors developed an aseptic plant tissue culture vessel system which enabled ventilation, air composition control, and the addition of nutrient solutions (see Fig. 1). One feature of the system is that two kinds of germ filters are attached directly to the culture vessel (see Fig. 1, Fig. 2, and Fig. 3). One filter is for forced ventilation and the other is for the addition of nutrient solutions.

The merits of the system we developed are as follows: (1) Number of air changes is maintained at a desired value without sterilization of the ventilated air and without risk of contamination. It is therefore possible to increase the number of air changes much more than in present aseptic culture vessels wherein ventilation is induced by diffusion. (2) Accordingly, air composition control is very easily achieved. For example, air humidity in vessels is easily kept at the desired value by regulating the water temperature in the bottle of humidity regulator, as shown in Fig. 1. Furthermore, CO₂ enrichment is easily practicable. (3) The addition of nutrient solutions during cultivation is achieved easily and quickly (about one minute for addition of 5 cm³ solution into a vessel) without opening the vessel cap, and no sterilization of the solution is needed. (4) No advance autoclave procedure is needed except for the culture vessel unit (see Fig. 1). No contamination was observed for 10 weeks even if the cultivation was conducted in an un-clean room. (5) When open air (CO₂ concentration: ca. 400 ppm) was introduced into the developed vessels, the growth of edible lily plantlets was better than those of two controlled plots (Control-P and Control-T plots) (see Table 2). When the CO₂ concentration in developed vessels was maintained at 5,000 ppm, the growth of plantlets was about 20 times greater than those of Control-P and Control-T plots (see Table 2).

Key words: Culture vessel, Environmental control, Forced ventilation, Germ filters, Growth enhancement.

キーワード: 環境制御, 強制換気, 除菌フィルター, 生長促進, 培養容器

1. 緒 言

従来の、無菌的に植物組織培養を行うために用いられる培養容器は、アルミニウムホイルや発泡シリコンゴム

プラグなどを栓に用いてほぼ密栓状態とされる（以下において、このような培養容器を密栓培養容器と称する）。密栓培養容器では、主にガス拡散によって容器内外の空気が交換されるためにガス交換が緩慢であり、容器内が外部環境からほぼ閉鎖された空間となる。このような特殊な環境条件が原因で、培養組織の生育が悪かったり、

1989年7月25日 全国大会にて口頭発表

1991年9月10日 受付, 1992年3月6日 受理

*現在: 寧夏農学院農学系, 中国寧夏, 銀川

Present address: Department of Agronomy, Ningxia Agriculture College, Yinchuan, Ningxia, China

軟弱徒長気味に生長するために培養苗の鉢上げ後の生育が思わしくないという報告がある(Wardle *et al.*, 1983; Ziv *et al.*, 1983)。培養苗の生育促進と健苗化を図るためには、培養容器内の環境を改善し、培養苗の生育にとって好ましい環境を作り出すことが必要である。そのため、近年、培養容器内の環境を改善することによって培養植物の生育促進・健苗化を図ることを目的とした研究が多くなされている(安藤, 1978; 土井ら, 1986; 古在ら, 1986; Lakso *et al.*, 1986; 富士原ら, 1987; 本條・高倉, 1987; Aitken-Christie and Davies, 1988; Kozai *et al.*, 1988a; Kozai *et al.*, 1988b; Fujiwara *et al.*, 1988; Desjardins *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1988; Weathers *et al.*, 1988; 土井ら, 1989)。

著者らは、無菌的な培養を行うための培養容器の中の環境改善を図る目的で、培養容器内の空気組成の制御ならびに容器への培養液添加が容易にできる強制通気方式の培養容器システム(強制通気培養容器システム)を考案したので報告する。

2. システムの構成, 特徴および使用方法

2.1 システムの概要

強制通気培養容器システムの構成の概念図をFig.1に、その培養容器の部分(培養容器系)の概念図をFig.2に示す。このシステムは、培養容器自体に2種類の除菌フィルターを装着させた点に、従来の培養容器と異なる特徴をもつ。第1の除菌フィルターは培養容器内へ強制通気する空気を除菌するためのもの(強制通気用除菌フィル

ター)であり、第2の除菌フィルターは培養容器内へ添加する培養液の除菌を行うためのもの(培養液添加用除菌フィルター)である。なお、第2の除菌フィルターは通気も可能なので、この除菌フィルターを排気口のフィルターとしても利用することとした。このシステムでは、強制通気用除菌フィルターを通じて、雑菌を混入させることなく、任意の流量で任意の組成を持った空気を強制的に容器内に通気することが可能である。さらに、培養液添加用除菌フィルターを通じて、雑菌を混入させることなく容易に容器内への培養液添加ができるようになっている。

2.2 システムの構成

強制通気培養容器システムは、Fig.1に示すように、空気組成制御系、配管系、および培養容器系から成っている。空気組成制御系については、後述するように、本システムの使用目的に応じて各系の構成内容を変更して使用できるようになっている。なお、空気組成制御系および配管系に対する滅菌処理は一切不要である。本論文で試験に供した強制通気培養容器システムの構成を以下に示す(Fig.1 参照)。

2.2.1 空気組成制御系

今回の試験に供したシステムの空気組成制御系は、CO₂濃度と空気湿度を制御する装置だけから成っている。CO₂濃度の制御は、ポンペ入りの高純度液化CO₂(CO₂ 100%)と外気との混合比を調節し、分配器内のCO₂濃度が設定値になるようにすることによって行った。混合比の調節は流量計(ロータメータ)とニードルバルブを用

Fig. 1. Schematic diagram of the aseptic plant tissue culture vessel system enabling ventilation, air composition control, and addition of nutrient solutions. Arrows show the direction of air flow. Humidity regulator needs water temperature control.

いて行った。なお、ソーダ石灰とNaCl水溶液を用いて外気中のCO₂は除去した。混合状態をよくするため、容積約10 lの空気混合箱を使用した。なお、CO₂濃度を高める必要がない時には、電磁弁によりCO₂（100%）の流入を止められるようにした。

供試システムでは、空気湿度の制御は水中で気泡を発生させることによって行った。約800 cm³（水深が約12 cm）の水が入った容積約1,000 cm³のガラスビンの底部にエアーストーンを置き、これに通気して細かい多数の気泡を発生させた。ガラスビンの空気出口の空気が水蒸気飽和の状態になるよう保ち、水温を調節することによって、培養容器内の空気湿度の制御ができる。

今回の供試システムではCO₂濃度と空気湿度を制御する簡便な装置だけを空気組成制御系に組み入れることとしたが、これよりも高い制御精度をもつ装置を組入れることが容易にできるようなシステムとなっている。さらに、使用目的に応じて、酸素などの濃度を制御する装置を付加すれば、培養容器内の空気組成を任意に制御することが可能である。

2.2.2 配管系

供試システムの配管系は、空気を培養容器へ圧送するための小型のエアポンプ（100 V AC, 3.5 W, 流量1 l・min⁻¹）、空気中の塵を除くための除塵フィルター、多数個の培養容器に空気を分配するための分配器、および各培養容器に一定流量の空気を送入するための通気用のシリコンチューブ（通気用シリコンチューブ：外径5 mm, 内径3 mm, 長さ約1 m）から成っている。

除塵フィルターは、硬質塩化ビニール製の管（外径3.8 cm, 内径3.0 cm, 長さ約15 cm）の両端をゴム栓で密栓した筒に脱脂綿を詰めたものである。この除塵フィルターの使用目的は強制通気用除菌フィルターの目づまりを防止するためである。分配器には除塵フィルターの筒と同じ硬質塩化ビニール管を使用した。なお、除塵を完全に行うため、分配器にも脱脂綿を詰めた。除塵フィルターと分配器はシリコンチューブ（外径9 mm, 内径5 mm, 長さ約20 cm）で接続した。分配器には多数の穴を

開け、それぞれの穴に通気用シリコンチューブ（外径5 mm, 内径3 mm, 長さ約1 m）を一本ずつ接続した。これら通気用シリコンチューブの他方の端が培養容器の強制通気用除菌フィルターに接続される。強制通気用除菌フィルターの通気抵抗が大きいために、配管系内の圧力が高く保たれる。このため、1つの分配器から多数の培養容器に対して、比較的均一に一定流量の空気を同時に送ることができる。なお、培養容器一個当りの通気空気流量を任意に調節できるようにするため、肉厚のシリコンチューブ製の空気排出口を設け、これにピンチコック（ホフマン式）を取り付けた。このピンチコックの開度を調節することによって、通気流量の調節ができる。なお、使用する培養容器の個数に応じて、エアポンプの個数やその性能および除塵フィルター・分配器・通気用シリコンチューブの個数を容易に変えることが可能である。

2.2.3 培養容器系

培養容器系は、Fig. 2に示すように、容器本体と2種類の除菌用フィルターとから成っている。これらはオートクレーブ（120℃, 15分）滅菌を繰り返して行うことが可能なものである。

容器本体には、組織培養容器として市販されている透明なプラスチック製の箱型の容器（Magenta製GA-7型；箱型容器；蓋部75 mm×75 mm, 容器本体底部65 mm×65 mm, 高さ100 mm, 容積約380 cm³）を用いた。こ

Fig. 2. Schematic diagram of the culture vessel unit (see Fig. 1).

A : side view

B : horizontal section of a-b line in figure A. α and β show germ filters for air and for liquid, respectively. The germ filter of β is also used as air filter of air outlet.

C : germ filters of α and β

の容器の外観を Fig. 3 に示す。なお、この容器の本来の使用方法としては、側面に穴を開けたりフィルターを付けたりにして使用するものではなく、寒天培地などを入れて、蓋をしたままの状態を除菌された培養室内に置き、培養に供されるものである。今回は、容器内に雑菌が流入する危険性を回避するため、蓋と容器本体との接続部にはオートクレープテープ(住友スリーエム(株), #1222)を1重だけ巻き付け、本体と蓋の間の隙間を封じた(Fig. 3 参照)。

2種類の除菌用のフィルターのうち、1つは疎水性の小さな除菌フィルター(アドバンテック東洋(株)製, 13JP020AN; フィルター直径18mm, 高さ21mm, フィルター孔径 $0.2\mu\text{m}$)である。このフィルターを強制通気用除菌フィルターとして(Fig. 2の α)利用した。なお、強制通気に利用するフィルターは1つであるが、長期間の強制通気によってフィルターが目づまりを起した時のことを考え、予備の目的で、今回は、同一の強制通気用除菌フィルターを1つ余分にに取り付けておいた(Fig. 2 および Fig. 3 参照)。他の1種は親水性の除菌フィルター(アドバンテック東洋(株)製, 13CP020AS; フィルター直径18mm, 高さ21mm, フィルター孔径 $0.2\mu\text{m}$)である。このフィルターの注入口は市販の注射器の注射口(注射針を取り付ける部分)を接続できる構造になっているため、注射器を利用して容器内に無菌的に培養液を容易に添加できる。これを培養液添加用除菌フィルター(Fig. 2の β)として利用した。なお、前述のように、このフィルターを排気口の除菌フィルターとしても利用している。

2.3 システムの使用方法

密栓培養容器を用いた培養の場合、培養容器は、空調され、しかも雑菌による汚染を避けるために除菌処理された培養室の培養棚上に置かれる。本システムを用いた場合は、培養容器を培養棚上に置き、前述のシリコンチューブの先端を個々の容器の強制通気用除菌フィルターに接続して、強制的に通気しながら培養を続けることになる。なお、培養容器内の温度の調節のために温度制御された部屋を必要とするが、部屋の除菌処理は必要でない。これらの点が密栓培養容器を用いた培養法と異なっている。本システムを用いた培養の状況を Fig. 3 に示す。

なお、本システムの場合でも、培養容器内に培地を作る方法、培地を入れた培養容器をオートクレープで滅菌する方法、クリーンベンチで組織を無菌的に培地上に接種する方法、およびその培養容器を培養室へ運ぶ手順などは、密栓培養容器を用いた培養法の場合と同様である。

Fig. 3. A state of cultivation of carnation plantlets.

3. 培養容器内の環境条件および特性試験

3.1 測定方法および試験方法

培養容器内の温度状態を知るために、1個の培養容器当りに3本の熱電対温度計(0.1mm直径の素線)を挿入した培養容器(50 cm³で、約1.2 cm厚さの寒天培地を含む)を光強度約25,000 lx (25,000 lx 区)、約9,000 lx (9,000 lx 区)、および約6,000 lx (6,000 lx 区)の3つの条件下に1個ずつ配置した。なお、どの場合も、通気流量は約17 cm³・min⁻¹、相対湿度は約85%とした。培養室内の気温を約25℃に設定し、それぞれの光強度下における培地上、培地表面、および培地中の3箇所の温度を、前述の熱電対温度計で測定した。

今回の供試システムでは、前述のように、培養容器内の空気湿度を調節するために、約800 cm³(水深が約12 cm)の水が入った容積約1,000 cm³のガラスビンに毎分約600 cm³の空気を送り込むこととした。室内気温が約25℃、照度が約9,000 lxにおいて、上記の条件では、ガラスビン内の水温を約23℃に調節すると培養容器内の相対湿度が約85%になった。そこで、このような条件において、照射照度を変えた際の培養容器内の相対湿度の差異を調べようとした。寒天培地50 cm³を含んだ培養容器を上記の3段階の光強度下に5個ずつ配置し、約17 cm³・min⁻¹の通気流量で通気しながら、各容器について1回ずつ相対湿度を測定した。測定には、センサに高分子薄膜(活性ポリマー誘導体)素子を用い、直径が12 mmの棒状の感部となっているクリモマスター(日本科学工業(株)製, MODEL 6511)を使用した。なお、あらかじめ容器の側面に直径が13 mmの円形の穴を開け、その穴をビニールテープで塞いでおいた。容器内の湿度が十分に安定した時に、ビニールテープを取り、容器内に感部をすばやく挿入し、容器外の空気が入らないよう

にして相対湿度を測定した。

培養容器内が従来の密栓培養容器と比べてやや低湿であり、かつ強制通気するために、培地の乾燥（すなわち水分の蒸発速度）がかなり大きいことが予想された。そこで、水分蒸発量を測定するために、寒天培地 50 cm³ を含んだ培養容器を上述の 3 段階の光強度下に 14 個ずつ配置し、約 17 cm³・min⁻¹ の通気流量で 10 週間通気し続けた。蒸発量は培養容器全体の重量を測定することによって算出した。この場合、培養容器内の気温は約 25℃、相対湿度は約 85% に保ち、植物組織は植込まなかった。

強制通気用除菌フィルターの通気性（目づまりの程度）の検討には、20 個の強制通気用除菌フィルターを供試した。これを培養容器に取り付け、試験した。培養直前の通気流量は約 17 cm³・min⁻¹ に設定した。もし、使用後に流量が低下していたとすれば、通気性が低下し、目づまりを起こしたものと考えられる。そこで、培養 10 週間後において、通気圧などの条件を培養直前と同一の条件にして、個々のフィルターの通気流量をロータメータで測定した。

3.2 測定・試験結果および考察

3.2.1 培養容器の換気回数

今回の供試システムでは一個の培養容器当りの通気量を約 17 cm³・min⁻¹ とした。培養容器の培地を除いた空間の容積は約 330 cm³ なので、換気回数にすると約 3.1 回・h⁻¹ となる。古在ら (1986) は、各種の密栓培養容器の換気回数を測定している。検討した容器は、形状の異なる 6 種類の容器（試験管およびフラスコがそれぞれ 3 種類ずつ）と 3 種類の栓（アルミニウムホイルキャップ、プラスチックキャップ、発泡シリコンゴムプラグ）を組合せることによって得た、合計 14 種類の密栓培養容器である。その測定結果によると、換気回数はアルミニウムホイルキャップを用いた場合が 0.042～0.201 回・h⁻¹、発泡シリコンゴムプラグを用いた場合が 0.130～0.689 回・h⁻¹、プラスチックキャップを用いた場合が 1.371～1.495 回・h⁻¹ である。今回の供試システムの方が、い

ずれの場合と比較しても、2 倍以上の換気回数である。

なお、今回の供試システムでは通気流量を約 17 cm³・min⁻¹ としたが、強制通気用除菌フィルターの性能からは、通気量を数倍に増加しても除菌上の問題はないと考えられる。しかし、どの程度の通気流量が培養植物の生育にとって適当であるかについては、今後検討する必要がある。

3.2.2 培養容器内の温度

培養容器内の温度の測定結果を Table 1 に示す。光照射しない暗期においては、どの光強度区の場合でも培養容器内気温は 24～25℃であり、室内気温に近かった。明期では、6,000 lx 区の場合には 25～26℃、9,000 lx 区の場合には 26～27℃、25,000 lx 区の場合には 31～32℃であり、光が強い場合ほど容器内の気温が高かった。同一容器内の 3 箇所の温度差を調べた結果、どの光強度区の場合も 1 日を通して、1℃以内であった。

以上の結果から、実験した光強度の範囲では容器内の培地と気温の温度差は比較的小さいこと、および約 9,000 lx 以下の場合には光照射による培養容器内の温度上昇（容器外の気温と比べて）は 2℃以下であることが判明した。しかし、約 25,000 lx の場合には培養室内の設定温度より 6～7℃も高いため、培養苗の生育に悪影響を及ぼすことが予想される。従って、空調設備によって光強度が増しても容器内の温度が上昇しないようにする必要がある。なお、この問題点については、従来の密栓培養容器にも共通することであると考えられる。

3.2.3 培養容器内の空気湿度および培地の乾燥

3.1 節に述べた条件のもとで空気湿度を測定した結果、容器内の相対湿度は、25,000 lx 区の場合には平均 84±2%、9,000 lx 区の場合には平均 85±2%、6,000 lx 区の場合には平均 86±2% であった（Table 1 参照）。全容器の平均では 85±2% であった。25,000 lx の場合には、他の光強度区の場合よりも平均値は小さい値であった。しかし、5% の危険率で各光強度間での相対湿度の差の有意性を検定したところ、有意な差があるとは言えな

Table 1 Environment in the culture vessel.
The number of air changes of vessels is 3.1 h⁻¹

plot (light intensity)	25,000 lx	9,000 lx	6,000 lx	note
air temperature (°C)	31～32	26～27	25～26	(dark period: 24～25*)
relative humidity (%)	84±2**	85±2**	86±2**	mean for all plots: 85±2
evaporation rate from the surface of medium (g/vessel/10 week)	15.4±2.1***	12.8±1.8***	13.4±2.2***	mean for all plots: 13.9±2.3

*: difference was not found among plots in the case of dark period.

** : significant difference was not found among plots (significant level: 5%).

***: significant difference was not found among plots (significant level: 5%).

った。

1 個の培養容器当りの 10 週間の平均蒸発量は 25,000 lx 区の場合には 15.4 ± 2.1 g, 9,000 lx 区の場合には 12.8 ± 1.8 g, 6,000 lx 区の場合には 13.4 ± 2.2 g であった (Table 1 参照)。全容器の平均値は 13.9 ± 2.3 g であった。25,000 lx 区の場合には他の光強度の場合よりも平均蒸発量は多い値であった。しかし、5% の危険率で各光強度区間での蒸発量の差の有意性を検定したところ、有意な差があるとは言えなかった。

以上の結果から、試験した通気流量の条件および照射光強度の範囲では、光照射強度は容器内の相対湿度および蒸発量の大きさに影響を及ぼさないと考えられた。

密栓培養容器では、容器内はほぼ飽和湿度の状態である。しかも、空気湿度を調節することは不可能に近かった。本システムによれば、Fig. 1 に示すような簡便な湿度制御器を利用することによって、容易に空気湿度の制御が可能である。

3.2.4 強制通気用除菌フィルターの通気性

当初の予想では、長期間の通気によって強制通気用除菌フィルターが目づまりを起こし、通気性が悪化するために、このフィルターを繰り返して使用することができないのではないかと懸念があった。しかし、20 個のフィルターを供試して、培養直前 (約 $17 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ の通気流量とした) と培養 10 週間後の通気流量を測定したところ、10 週間後の流量が平均値で約 0.2% 増加していた。この流量の増加は流量計の誤差の範囲にあると考えられ、10 週間後でも流量の減少は生じていなかったものと解釈できる。

以上の測定結果から、上述したような (Fig. 1 参照) 脱脂綿を詰めた簡易な除塵フィルターを取り付ければ、強制通気用除菌フィルターが目づまりは生じないと考えてよいと判断される。従って、この程度の通気流量と通気期間では、長期間の繰り返し使用を行っても、強制通気用除菌フィルターの目づまりの問題はないと考えられた。このことから、供試システムに強制通気用除菌フィルターを予備のものも含めて 2 個付けておいたが、1 個で十分であることが判明した。

3.2.5 CO₂ 濃度の制御および必要 CO₂ 供給量

ニードルバルブと流量計を用い、CO₂ 100% のガスと外気との混合比を調節することによって、容器内を任意の濃度に制御できた。仮に、外気の CO₂ 濃度を 300 ppm、通気流量を $17 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ とし、1,000 個の培養容器内の CO₂ 濃度を 5,000 ppm に設定して 1 日 16 時間をこの濃度に保つ場合 (容器内温度は 25℃ とする)、1 日当り約 0.135 kg の液化 CO₂ の供給が必要である。従って、30 kg 入り液化 CO₂ ボンベ 1 本で約 217 日間を賄えると

計算される。密栓培養容器では、CO₂ 施用を実施するには培養室全体の CO₂ 濃度を高めなければならない。上記と同じ培養容器が 1,000 個入った培養室 (8m³ の室内容積 (床面積: 4m², 高さ: 2m) をもち、1 回・h⁻¹ の換気回数をもつと仮定) 全体を 5,000 ppm に保つ場合には、上記と同じ条件では、1 日当り約 1.05 kg が必要であると計算される (青木, 1986)。この室内容積および換気回数は、実際に利用されるような培養室の値より小さめに想定しているが、この必要 CO₂ 量は本システムのガス量の約 7.6 倍である。以上のことから、本システムでは、CO₂ 施用の際の CO₂ 必要供給量を著しく軽減できると考えられる。

なお、本節では CO₂ について述べたが、他のガス成分の濃度制御の際の必要ガス供給量についても、CO₂ の場合と同様である。

4. 培養試験

4.1 試験方法

4.1.1 培養容器内の除菌状態の試験方法

培養容器内が無菌状態となっているか否かを明らかにするため、供試システムの培養容器内への雑菌混入率を調べた。この調査のために、アスパラガスの組織を 72 個の培養容器に無菌的に接種し、除菌処理が施されていない部屋内で 10 週間にわたって培養試験を行った。植物材料および培養条件については 4.1.2 節の場合と同様である。この試験に用いる植物組織としては、接種時の植物組織自体が雑菌によって汚染されていないことが必要と考え、無菌的に継代培養して得られたシュートの節部組織を使用した。

4.1.2 食用ユリの培養方法

食用ユリ (品種: 白銀) の茎頂部 (植込組織の大きさが約 0.3~0.5 mm) を用いて、10 週間にわたる培養試験を行った。試験に際しては、上述の供試システムを使用した実験区と、通常の組織培養でよく用いられる培養容器を使用した対照区を設けた。対照区には、試験管 (リム付; 25 mm ϕ $\times$ 135 mm) にアルミニウムホイルキャップを付けたものを培養容器として使用した対照 T 区と、箱型容器 (前述の Magenta 社製 GA-7 型) を通常の使用方法で使用した対照 P 区の 2 区を設けた。

実験区には、明期に CO₂ 濃度を約 5,000 ppm に設定した区 (以下 5,000 ppm 区とする) と、明期・暗期とも屋外の空気 (外気) を培養容器に導入した区 (実際にその導入空気の CO₂ 濃度を測定したところ、平均して約 400 ppm であったので、これを 400 ppm 区とする) の 2 区を設けた。なお、5,000 ppm 区の場合、暗期には外気を導入することとした。対照区は、CO₂ 施用を行わない培養室内

においたままの状態とした。

実験区の強制通気流量は約 $17 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ ，培養容器内の気温は約 25°C ，相対湿度は約 85% とした。対照区の培養容器内気温は約 25°C であった。実験区および対照区とも，光強度を約 $9,000 \text{ lx}$ に，明期 16 時間・暗期 8 時間の光周期に設定した。培地としては，通常よく用いられている MS 寒天培地を使用した。培養容器 1 個当りの培地量は，実験区と対照 P 区では 50 cm^3 ，対照 T 区では 15 cm^3 とした。容器 1 個当りの植え込み組織数は，実験区と対照 P 区が 4 個，対照 T 区が 1 個である。なお，全ての区について，糖を 2% ，IBA を 10^{-6} M 培地中に添加し，寒天濃度を 0.7% ，pH を 5.5 に調節した。

4.1.3 培養液添加実験の方法

未滅菌の培養液添加によって雑菌の混入が無いかな否か等について検討するため，36 個の培養容器を用い，4.1.2 節に述べた培養条件でアスパラガス（品種：メリーワシントン 500 W）の節部組織の培養を約 10 週間続けた後に，当初と異なった植物生長調節物質を含んだ培養液を添加する実験を行った。この時，添加する培養液および使用する注射器の事前の滅菌処理などは行わず，しかも添加作業はクリーンベンチではなく，全く除菌していない部屋において，培養を続けている状態のままで行った。

4.2 試験結果および考察

4.2.1 培養容器内の除菌状態

培養試験の結果，培養中に雑菌が培養容器内に混入した例は皆無であり，培養容器内の除菌状態は良好であった。なお，比較のため，本試験に供したものと同一の 40 個の箱型容器（Magenta 社製 GA-7 型）を用い，強制通気などの処理を一切施さずに，除菌処理を施していない部屋において，本来の容器の使用方法に従って培養した。この場合，10 週間後には 9 個の容器に雑菌が混入

した。

以上の結果から，試験に使用した密栓培養容器では長期間の培養の場合にはクリーンルームを培養室として使用しないと容器内へ雑菌が混入する危険性が高いが，本システムを利用すればクリーンルームを使用しなくとも無菌的に培養できることが確認された。クリーンルームの除菌設備およびその維持費はかなり高額である。除菌設備を必要としないことによる経済効果は著しいと考えられる。

4.2.2 食用ユリの生長

培養結果を Table 2 に示す。野外の空気を導入しただけの 400 ppm 区の場合には，生体重は両対照区の約 3 倍であった。目視観察によると，両対照区と比べて葉の幅が広く，かつ葉厚も厚い傾向にあった。植込組織から発生した植物体の子球の直径を測定したところ，400 ppm 区の方が子球の発達が著しかった。他方，1 本当りの平均茎葉長（延ばして測った草丈の平均値を示す）は 3.4 cm で，対照 P 区の 3.2 cm ，対照 T 区の 3.3 cm と大差なかった。以上のことと，茎葉生長生体重比（1 本当りの平均茎葉長を 1 個体当りの生体重で除した値）が小さかったことから判断すると，両対照区よりも培養苗が健苗として育ったものと考えられる。5,000 ppm 区の場合には，両対照区と比較して茎葉長が 2 倍強の 6.8 cm ，1 個体当りの生体重は約 20 倍の 223.4 mg であり，生育が著しく優れた。

以上の試験結果から，本システムを用いると野外の空気を導入しただけの場合でも生育増大と健苗育成の効果のあること，および CO_2 施用によって培養苗の生長がさらに促進されることが明らかとなった。これらの原因としては，第 1 に，野外の空気を導入しただけの場合でも，ガス交換量が多いために，従来の密栓培養容器と比べて光照射時における容器内の CO_2 濃度が高く維持されたこ

Table 2 Growth of edible lily plantlets after 10 weeks of culture.

The both aseptic culture vessels of controlled plots are popularly used ones for present tissue culture, wherein ventilation is induced by gas diffusion. Where, Control-P plot is the plot cultured by the same vessels shown in Fig. 3 without forced ventilation, and Control-T plot cultured by glass tubes ($25 \text{ mm} \phi \times 135 \text{ mm}$) with aluminium foil cap. The vessels of control plots were placed in no CO_2 -enriched room. Other conditions for controlled plots are the same with experiment plots shown below. Sugar content in culture medium (the MS medium) is 2% . Air temperature is 25°C , air humidity is about 85% , and light intensity above the vessel is $9,000 \text{ lx}$

	plot			
	5,000 ppm	400 ppm	Control-P	Control-T
fresh weight per plant (mg/plant)	223.4	35.7	12.0	9.9
ratio of mean shoot length to fresh weight per plant (cm/(g/plant))	30.7	96.3	105.3	152.7

とが考えられる。第2に、培養容器内の空気湿度が約85%であり、従来の密栓培養容器よりもやや低湿に保持されたことが影響したものと考えられる。

なお、本システムを用いた場合と密栓培養容器を用いた場合の培養植物の生育比較の詳細については、別報で報告する予定である。

4.2.3 培養液添加に関する検討

従来の培養法では、長期間培養を続けると培地中の養分が不足し、植物組織の生育に悪影響を及ぼすようになる。従って、一定期間培養した後に、さらに培養を続けるためには新鮮な培地へ植物組織を移植する必要があるが、この作業には多大な労力を要する。また、移植時に雑菌が混入したり、植物組織を傷める危険性もある。培養途中でも、培養液等の添加ができれば移植する必要があるのでも有利である。

36個の培養容器を用いて検討したが、培養液の添加によって培養容器内に雑菌が混入した例は全く無かった。約5cm³の培養液の添加に要する時間は、1個の容器当たり約1分であった。添加後のアスパラガスの生育はそれ以前と同様に順調であった。上記の添加実験後からさらに14週間ほど経過した後は、培地中の無機養分や生長調節物質が不足したためか、シュートの黄化が進行するなど、生育の停滞が認められるようになった。そこで、無機養分および生長調節物質を含んだ培養液の添加を再度行ったところ、培養苗から新しい緑色のシュートが形成されるようになり、その後も健全に生育を続けた。

Aitken-Christie and Davies(1988)および Weathers *et al.* (1988)は、同一培養容器内で長期間培養を続行できるような培養システムを開発している。その培養システムでは、培養液貯留槽に溜められた滅菌済の培養液をポンプにより培養容器内に圧送するシステムである。本システムでは、それらシステムと比べてシステム構成および構造が極めて単純である。さらに、①添加する培養液の滅菌処理は必要でなく、培養中途でも任意の培養液または水を容器内に添加することが可能であること、および、②添加に要する時間が極めて少なく、かつ添加が容易であることなど、本システムは従来の培養容器または培養システムにはない優れた特徴を有していると考えられる。

5. ま と め

本システムのもつ特徴を要約すると、以下のようである。①従来の密栓培養容器に比べてガス交換速度を大きくすることが可能なため、容器内のCO₂などの空気組成を任意かつ容易に制御することが可能である。②密栓培養容器内は高湿であり、しかも空気湿度の制御は不可能

に近かった。これに対して、本システムでは容器内の湿度を任意に制御することが可能である。③CO₂施用の際には、容器に通気する少量の空気のCO₂濃度を高めればよいので、CO₂施用に必要なCO₂量を著しく軽減できる。④培養中途でもクリーンベンチを用いることなく、また容器の蓋を開けることなく、しかも除菌していない培養液でも容易にかつ短時間で容器内に添加することが可能である。⑤培養容器系と空気組成制御系とが別系統になっているので、種々の空気組成制御装置を容易にこれに組み込むことが可能である。⑥1 l・min⁻¹程度の小さな容量のエアーポンプでも多数(50個程度)の培養容器に通気することができ、しかもエアーポンプ、分配器および通気用シリコンチューブの個数を増減することによって、培養容器の個数を容易に増減させることが可能である。⑦培養容器系を除けば、システム全体を使用前にオートクレーブなどで滅菌する必要は全く無いので、システムの取り扱いおよび空気組成制御装置の製作などが極めて容易である。⑧除菌しない部屋を培養室とし使用しても、雑菌の混入による汚染の心配は無く、無菌的な培養が可能である。⑨食用ユリの茎頂培養の場合、本システムを用いると、野外の空気を導入しただけの場合でも生育増大と健苗育成の効果が有り、CO₂施用によって培養苗の生長が著しく促進された。

問題点として、第一に、培地の乾燥が激しかったことが挙げられる。しかし、問題が生じた時には、培地に水分補給を行うことが容易なので、これに対処できる。第二に、今回使用した容器や除菌フィルターの価格がやや高い(Magenta社製GA-7型角型容器が1個約500円、除菌フィルターが1個約165~200円)ことが挙げられる。しかし、強制通気用除菌フィルターおよび培養液添加用除菌フィルターは、今回用いたような、安価で簡単な除塵フィルターを使用すれば、長期間使用しても目づまりを起こす危険性が無く、繰り返し使用できることが確認されたので、従来の密栓培養容器と比べて経済的に著しく劣ることはないと考えられる。容器はオートクレーブ滅菌処理に耐えるものであれば、必ずしも今回使用したものでなくてもよく、安価な容器を使うことも可能である。さらに、クリーンルームを必要としない点からも、本システムを利用することによる経済効果は大きいと考えられる。

なお、本研究の一部は昭和63年度文部省科学研究費補助金(一般研究C; 研究代表者: 青木正敏; 課題番号: 63560246)によるものである。

引用文献

- Aitken-Christie, J. and Davies, H. E., 1988: Development of a semi-automated micropropagation system. *Acta Horticulturae*, **230**, 81–87.
- 青木正敏, 1986: CO₂施肥, 農業環境調節工学 (矢吹万寿ら著), 朝倉書店, 118–129.
- 安藤敏夫, 1978: 培養容器中のガス環境に関する研究 (第1報)密閉フラスコ内で生育中のランのガス環境. 昭和53年度園芸学会秋季大会研究発表要旨, 368–369.
- Desjardins, Y., Laforge, F., Lussier, C. and Gosselin, A., 1988: Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue-cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Horticulturae*, **230**, 45–53.
- 土井元章・野口宝司・浅平 端, 1986: *Phalaenopsis* の *in vitro* 培養におけるCO₂施肥の影響. 日本生物環境調節学会第24回大会要旨, 64–65.
- 土井元章・小田 尚・浅平 端, 1989: C₃およびCAM植物の培養器内気相環境と日長の関係. 生物環境調節, **27** (1), 9–13.
- 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** (1), 21–30.
- Fujiwara, K., Kozai, T. and Watanabe, I., 1988: Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Horticulturae*, **230**, 153–158.
- 本條 毅・高倉 直, 1987: 植物組織培養におけるシンビジウムPLB増殖へのCO₂濃度, 光強度および液体培地組成の影響. 農業気象, **43** (3), 223–227.
- 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)栓および容器が閉栓容器内外間のガス交換速度に及ぼす影響. 農業気象, **42** (2), 119–127.
- Kozai, T., Koyama, Y. and Watanabe, I., 1988a: Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Horticulturae*, **230**, 121–127.
- Kozai, T., Kubota, C. and Watanabe, I., 1988b: Effects of basal medium composition on the growth of carnation plantlets in auto- and mixotrophic tissue culture. *Acta Horticulturae*, **230**, 159–166.
- Lakso, A. N., Reisch, B. I., Mortensen, J. and Roberts, M. H., 1986: Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro*-propagated grapevines after transfer from culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **111** (4), 634–638.
- Tanaka, M., Jinno, K., Goi, M. and Higashiura, T., 1988: The use of disposable fluorocarbon polymer film culture vessel in micropropagation. *Acta Horticulturae*, **230**, 73–80.
- Wardle, K., Dobbs, E. B. and Short, K. C., 1983: *In vitro* Acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **108** (3), 386–389.
- Weathers, P. J., Cheetham, R. D. and Giles, K. L., 1988: Dramatic increases in shoot number and lengths for *Musa*, *Cordyline*, and *Nephrolepis* using nutrient mists. *Acta Horticulturae*, **230**, 39–44.
- Ziv, M., Meir, G. and Halevy, A. H., 1983: Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **2**, 55–65.