ジャガイモのシュート培養における容器内ガス組成の変化と形態形成との関係

高山真策・山口ゆかり・米良信昭

東海大学開発工学部生物工学科 410-0395 静岡県沼津市西野 317

Relationship Between Changes of Gas Composition and Morphogenesis in Shoot Culture of Potato

Shinsaku TAKAYAMA, Yukari YAMAGUCHI and Nobuaki MERA

Department of Biological Science and Technology, Tokai University,
317 Nishino, Numazu, Shizuoka, 410-0395, Japan.

Abstract

Potato shoots were cultured *in vitro* under both natural ventilation and airtight vessels. In airtight vessels, ethylene and carbon dioxide accumulated to $0.43 \mu\text{mol mol}^{-1}$ and 6.4%, respectively. Emission of ethylene from shoot cultures was almost no difference between airtight and natural ventilation vessels. It was made clear that ethylene accumulated in airtight vessels without any physiological effects of airtight condition on ethylene production. The cultured shoots were short inter-nodal length, many axillary shoots and small undeveloped leaves. The change of morphogenetic characteristics was considered the effects of gas composition in airtight vessel.

Keywords: airtight, ethylene production rate, gaseous composition, morphogenesis, potato tissue culture

緒 言

植物組織培養は自然拡散通気が可能な容器を用いて行われる場合が多い。このとき培養容器の内部を無菌状態に維持することは重要であるため、培養容器の栓を強く締めることになるが、これは培養容器内外のガス交換を妨げることになり、容器内植物の形態形成に影響を及ぼす原因となっている。ガス交換の不十分な培養容器を使用することの問題点として、エチレンの蓄積が知られている¹⁻⁷⁾。すなわち植物体の生育遅延¹⁾、葉身の未発達^{1,2)}、毛状の細い茎の形成²⁾、水浸状化³⁾、枯死促進⁸⁾などを生じる。一方、エチレンは大部

分の植物組織で生成され、内的な要因として植物の発芽から老化に至る正常な生育過程の維持や、外的な要因として過酷な環境条件に対応する自己防衛機能が発揮される過程などで主に誘導される⁹⁾。しかしながら、ガス交換を遮断した密閉容器でのエチレンの蓄積については、密閉ストレスによる培養組織のエチレンの過剰生成なのか、あるいは密閉によりエチレンの生成は影響を受けることはなく、単に生成したエチレンが蓄積した結果であるのかは、明らかにされていない。

そこで本研究では、密閉容器でのエチレン蓄積の原因を明らかにすると共に密閉環境が培養組織の形態形成に及ぼす影響に関する基礎的知見を得ることを最終目的とし、培養容器を完全密閉（ガス交換を遮断）した条件におけるジャガイモのシュート培養を試みた。このとき、培養容器内のガス組成の変化および生育したシュートによるエチレン生成能を測定した。さらに、シュートの形態形成の変化について観察した。

2011 年 7 月 13 日受付

2011 年 10 月 5 日受理

Corresponding author: Shinsaku Takayama

(takayama@wing.ncc.u-tokai.ac.jp)

材料および方法

1. 植物材料

ジャガイモ (品種: メイクイーン, *Solanum tuberosum* L. cv. Mayqueen) を実験材料とし, 次項 2 に記載した方法で増殖したシュートを使用した。

2. 組織培養

培養には MS 培地¹⁰⁾ (ホルモンフリー, シュークロース 30 g L^{-1} , 寒天 8 g L^{-1}) を使用し, 内容積 300 mL のガラス製培養容器当り培地 50 mL を入れてパッキング付きのねじ式スチールキャップで栓をした。スチールキャップの中央部分に穴を開けてウレタンスポンジで栓をして自然拡散通気がある通気区と, 全く通気がない密閉区を設けた。培養は容器当り節切片 5 個を移植し, 24°C , 40 W 蛍光灯 (東芝 FL40SW) による連続光照射下, 光強度 $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ で行った。

3. ガス分析, エチレン生成能および生育測定

N_2 , O_2 , CO_2 の分析はガスクロマトグラフ (GC) 装置 263-50 型 (日立製作所) に TCD 検出器および WG-100 カラム (長さ $1.8 \text{ m} \times$ 外径 7 mm ; GL サイエンス) を用いた。エチレンの分析には GC-7AG 型 (島津製作所) に FID 検出器および Unibeads 1S カラム (長さ $2.5 \text{ m} \times$ 外径 5 mm ; GL サイエンス) を使用した。

生育したシュートによるエチレン生成能は初速度を比較するため, 新たに培地を含まない 5 mL 容のバイアルにシュート 0.5 g (FW) を入れて上記の組織培養条件 (温度: 24°C , 光強度: $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) で 1 時間静置した後, 生成したエチレンを測定した。シュートは通気区および密閉区で 30 日間培養したものを使用した。

シュートの形態形成の変化としてシュート長, 側枝数および葉数をそれぞれ測定した。

結果および考察

1. 培養容器内部のガス組成の変化

ジャガイモのシュート培養における培養容器内のガス組成の変化を Fig. 1 に示す。通気区において, ガス組成は培養期間を通じて大気レベルと大きな差はなかった (Fig. 1)。一方, 密閉区ではエチレンが蓄積し, 培養 31 日目には約 $0.43 \mu\text{mol mol}^{-1}$ に達した (Fig. 1A)。 CO_2 も蓄積し, 培養 27 日目には約 6.4% に達した (Fig. 1B)。これは大気レベル (約 0.04%) の約 160 倍に相当した。 O_2 は培養 15 日目まで大気レベルと差がなかったが, その後は緩やかに低下して培養 27 日目には約 15.9% を示した (Fig. 1C)。 N_2 は培養期間を通じて大気レベルと差がなかった (Fig. 1D)。

Fig. 1 The changes in gas composition in culture vessels. ○ : natural ventilation vessel, ● : airtight vessel, A: ethylene, B: CO_2 , C: O_2 , D: N_2 . Values represent means $\pm$ SE of ten replicates.

密閉した培養容器内のガス組成の変化について, 培養植物の種類や量, 培養容器やシール素材の物質特性, 培地成分や培養条件が重要な要因であり, その結果エチレン, CO_2 および他の炭化水素が蓄積することが知られている⁴⁾。本結果において, 通気区のガス組成は大気レベルとほぼ同等であったのに対し, 密閉区ではエチレンおよび CO_2 が高濃度に蓄積しており, ガス組成は大きく変化していた。これまでに, ジャガイモのシュート培養による容器内のエチレンの蓄積¹²⁾, サラサモクレンの組織培養によるエチレンおよび CO_2 の蓄積⁵⁾ が示されており, 本結果は上記報告と一致した。さらに, セイヨウミザクラのシュート培養ではエチレンおよび CO_2 がそれぞれ約 $5 \mu\text{mol mol}^{-1}$ および 30% 以上に達し, 蓄積した CO_2 は呼吸 (好氣的や嫌氣的) およびエチレン生成の様な異化過程に帰すると考察されている⁶⁾。本結果でも CO_2 の蓄積は, 好氣的呼吸および異化過程 (例えばエチレン生成を含む) が原因かもしれない。また, 植物の好氣的呼吸により O_2 は減少する。本結果においても, 密閉区の O_2 は緩やかに低下したものの, 培養期間を通じて 16% 以下になることはなかった。低い O_2 (5% 以下) の影響として, タバコ葯培養における幼植物生産の促進やモモ苗木での枯死抑制が知られている⁴⁾。本研究では好氣状態が維持されており, 低 O_2 の影響は生じなかったと予想された。

2. シュートの形態形成への影響

培養1ヵ月目におけるシュートの生育の違いをFig. 2に示す。通気区においてシュートは正常に生育し、節間は伸長して側枝数は少なく葉は十分に展開した。一方、密閉区ではシュート長は通気区と大きな差はなかったが、節間は短く側枝が増加し、痕跡状の葉が形成された。シュートによるエチレン生成の初速度をFig. 3に示す。通気区および密閉区は、それぞれ約 $53.6 \text{ pmol g FW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ および約 $52.6 \text{ pmol g FW}^{-1} \text{ h}^{-1}$ と同等であり有意差はなかった（有意水準：0.05）。このことより、密閉区における高濃度のエチレンの存在は、植物自体が密閉により影響されたのではなく、単に培養容器内にエチレンが蓄積した結果であることが明らかとなった。また、シュートの長さは、通気区および密閉区への移植時は約30 mmであったのに対し、培養29日目にはそれぞれ約49 mm および53 mmに達した。伸長率は約 0.70 mm d^{-1} および約 0.75 mm d^{-1} であり（データ未掲載）、両区で大きな差はなかった（Fig. 4A）。側枝数は、通気区および密閉区への移植時は約0.14本であったが、培養29日目にはそれぞれ約3.49本および約6.16本に達した。側枝の形成率は約 0.12 本 d^{-1} および約 0.21 本 d^{-1} と計算され（データ未掲載）、密閉区で促進された（Fig. 4B）。葉数は、通気区および密閉区への移植時の約6枚であったが、培養29日目にはそれぞれ約28枚および約34枚になった。葉の形成率は約 0.77 枚 d^{-1} および約 0.96 枚 d^{-1} と計算され（データ未掲載）、密閉区で促進された（Fig. 4C）。

本研究の結果、密閉区のシュートによるエチレン生成能は通気区と差がなく、高濃度のエチレンは単に培養容器内に蓄積した結果であることが明らかになった。これまでに密閉した培養容器内のガス組成が培養組織に及ぼす影響について、ジャガイモのシュート培養では、短く膨れた形態の茎とウロコ状の葉を形成したがエチレン吸着剤である過塩素酸水銀溶

Fig. 2 Morphological features of shoots in airtight vessel and natural ventilation vessel. Left: airtight, Right: natural ventilation.

Fig. 3 Specific ethylene production rate of cultured shoots in airtight vessel and natural ventilation vessel.

Values represent means $\pm$ SE of five replicates. Quantitative data were analyzed by ANOVA at a level of $\alpha = 0.05$.

液を作用させるとその影響を除去できること¹⁾、同じくジャガイモのシュート培養で、細く毛状のシュートと殆ど展開しない葉の形成がエチレン作用阻害剤であるチオ硫酸銀を用いた結果、エチレンの蓄積が抑えられシュートは正常に生育したと報告されている²⁾。ニオイヒバの組織培養では、蓄積したエチレンおよび CO_2 が発芽と腋生シュートの発達や伸長を促進させ、さらにエチレンと CO_2 の両方または一方を除去した検討から両ガスの相乗作用が示された⁷⁾。本結果で示された密閉区におけるシュートの形態の変化は、上記報告と同様に高濃度に蓄積したエチレンおよび CO_2 の両方または一方の及ぼす影響であると推定される。また、サラサモクレンの培養組織では蓄積したエチレンおよび CO_2 によるクロロフィル a の低下が示されている⁵⁾。本結果でもエチレンおよび CO_2 の蓄積、形成した葉が痕跡状であることから、シュートの光合成能は低下していたと考えられる。さらに密閉区と通気区とでエチレン生成能に差が認められないことから、シュートは密閉処理そのものおよびガス組成の変化に対してエチレン生成を増加する様なストレスを受けていないことが示唆された。もしシュートが密閉区で最適に生存するためのガス組成に積極的に変えていたならば興味深い。これまでに、蓄積した CO_2 による有益な効果として光合成の促進、エチレン作用の抑制、順化力の向上が示唆されている⁴⁾。これら生理的影響を含む密閉条件下の生育、形態形成やガス組成の自立的制御等について、更に検討を進める予定である。

摘 要

自然通気および密閉条件下でジャガイモのシュート培養を試

Fig. 4 Time courses of the growths of cultured shoots in airtight vessel and natural ventilation vessel.
○ : natural ventilation vessel, ● : airtight vessel,
A: shoot length, B: number of lateral shoots, C:
number of leaves (including the traces of leaves
in the airtight vessel). Values represent means $\pm$
SE of ten replicates.

みた。その結果、密閉条件では培養容器内のガス組成はエチレンおよび CO_2 が高濃度に蓄積し、 O_2 は緩やかに減少した。シュートのエチレン生成能は自然通気区と差がなかった。高濃度のエチレンは密閉によって生成に影響を受けることなく、単に培養容器内に蓄積した結果であった。生育したシュートは節間が短く、側枝および葉が増加し、痕跡状の葉を形成した。これら変化はガス組成の影響であると考えられる。

引用文献

- 1) Hussey G, Stacey NJ. *In vitro* propagation of Potato (*Solanum tuberosum* L.). Ann. Bot. 48: 787–796. 1981.
- 2) Perl A, Aviv D, Galun E. Ethylene and in vitro culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. Plant Cell Reports 7: 403–406. 1988.
- 3) Park SW, Jeon JH, Kim HS, Park YM, Aswath C, Joung H. Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots in vitro. Scientia Horticulturae 99: 199–205. 2004.
- 4) Buddendorf-Joosten JMC, Woltering EJ. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. Plant Growth Regulation 15: 1–16. 1994.
- 5) De Proft MP, Maene LJ, Debergh PC. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured in vitro. Physiol. Plant. 65: 375–379. 1985.
- 6) Righetti B, Magnanini E, Infante R, Predieri S. Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. Physiologia Plantarum 78: 507–510. 1990.
- 7) Nour KA, Thorpe TA. The effect of gaseous state on bud induction and shoot multiplication in vitro in eastern white cedar. Physiologia Plantarum 90: 163–172. 1994.
- 8) Grbic V, Bleecker AB. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. The Plant Journal 8: 595–602. 1995.
- 9) Kimmerer TW, Kozlowski TT. Ethylene, ethane, acetaldehyde, and ethanol production by plants under stress. Plant Physiol. 69: 840–847. 1982.
- 10) Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473–497. 1962.