

DB
1005
1005
1005

植物組織培養技術を利用したジャガイモマイクロチューバーの
大量供給法に関する研究

秋 田 求

寄 贈	
秋	平成
田	年
求	月
氏	日

96095023

目次

1章 緒論

1-1	ジャガイモ種苗供給の現状と課題	1
1-2	培養槽を用いた植物器官の大量培養技術	3
1-3	組織培養技術を用いたジャガイモ塊茎生産技術	5
1-4	本研究の目的	8

2章 基本培養条件の確立

2-1	はじめに	9
2-2	実験材料および方法	11
2-2-1	実験材料	11
2-2-2	培地	11
2-2-3	培養条件	12
2-2-3-1	継代培養における増殖の安定性	12
2-2-3-2	植物体の大量培養条件	12
2-2-3-3	塊茎の形成・肥大条件	12
2-2-4	培地成分の分析法	12
2-2-5	萌芽試験	13
2-2-6	乾物率の測定	13
2-3	実験結果ならびに考察	15
2-3-1	継代培養における増殖の安定性	15
2-3-1-1	継代培地上における植物体の生育	15
2-3-1-2	節部位による生育および分化能の差	15
2-3-2	植物体の大量培養条件 (Step 1条件)	21
2-3-2-1	MS培地組成とシュクロース濃度が植物体生育に及ぼす影響	21
2-3-2-2	生育の経時変化	22
2-3-3	塊茎の形成・肥大条件 (Step 2条件)	31
2-3-3-1	培養条件	31
2-3-3-2	培養由来の塊茎の性状	32
2-3-3-3	塊茎形成の経時変化	34
2-4	まとめ	53

第3章 小型培養槽を用いたジャガイモ塊茎の増殖法

3-1	はじめに	5 5
3-2	実験材料および方法	5 6
3-2-1	実験材料	5 6
3-2-2	培養槽	5 6
3-2-3	基本培養条件	5 6
3-3	実験結果ならびに考察	6 0
3-3-1	小型培養槽内における塊茎形成	6 0
3-3-2	培地液面の位置が塊茎形成に及ぼす影響	6 2
3-3-3	小型培養槽内における塊茎形成の経時変化	7 0
3-3-4	小型培養槽内における塊茎形成促進法	7 3
3-3-4-1	低温の影響	7 3
3-3-4-2	間欠的培地液面変動効果	7 6
3-4	まとめ	8 2

第4章 小型培養槽由来塊茎の性状

4-1	はじめに	8 3
4-2	実験材料および方法	8 4
4-2-1	実験材料	8 4
4-2-2	乾物率の測定	8 4
4-2-3	萌芽試験	8 4
4-3	実験結果ならびに考察	8 5
4-3-1	塊茎の乾物率と培養槽内形成位置との関係	8 5
4-3-2	塊茎の保存性と萌芽性	8 7
4-3-3	培養法による影響	9 0
4-4	まとめ	9 3

第5章 小型培養槽由来塊茎の圃場栽培特性

5-1	はじめに	9 4
5-2	実験材料および方法	9 6
5-2-1	実験材料	9 6
5-2-2	植物体の増殖（馴化苗利用栽培試験）	9 6
5-2-3	栽培法	9 6
5-2-3-1	圃場	9 6
5-2-3-2	栽植密度等	9 7
5-2-3-3	栽培期間等	9 7

5-3 実験結果ならびに考察	98
5-3-1 地上部の生育	98
5-3-2 収量	105
5-4 まとめ	116
第6章 総合考察	117
第7章 総括	119
謝辞	123
引用文献	124

第1章 緒論

1-1. ジャガイモ種苗供給の現状と課題

ジャガイモは、世界で約2000万haに栽培され、生産量約3億トンに達する主要作物である。南アメリカ原産とされ、単位面積あたりのエネルギーおよび蛋白質の生産量が高い。また、各種のビタミンやミネラルが調理後も比較的失われにくい形態に含まれているなど、食品としてきわめて優れた性質を有している。古くから主食として重要な役割を持ち、例えば、ヨーロッパにおける産業革命時に都市部へ急激に集中した人口を支えたのがこのジャガイモであった。現在でこそ先進国においては主食の座を追われているが、C I P (Centro Internacional de la Papa、国際ジャガイモ研究所) による栽培の普及のための努力などもあって、開発途上国で生産量が伸びているほか、チップス用など加工用品種の生産が先進国においても増大している¹⁾。

ジャガイモは、食用となる塊茎の生産性を少しでも高める目的で育種がなされてきた。そのため、現在の主要な品種は、種子形成能を失い、あるいは、未熟な種子しか形成されないものとなっている。このため、栽培は、主として栄養繁殖、すなわち、地下部貯蔵組織である塊茎を植付けることによって行われる。このような栄養繁殖される作物においては、ウイルス等に汚染されることによって、種苗の品質が低下しやすい。劣化した種苗を用いると、収量が減少し、特にジャガイモのような基幹作物においては、国家的な問題にまで発展しかねない。従って、しばしば国家的な事業として種苗の品質保持が行われている。例えば、日本においては、国(原原種)→道県(原種)→団体(採取)という体系が組織されており、品質保証された種薯のみが流通されるようになっている。しかし、このような体制を作り維持するためには、多大な人手と費用を要し、特に、開発途上国においては大きな経済的負担となることが容易に予想される。従って、品質の高いジャガイモ種苗をより安価に安定して大量に供給するための技術の開発が、強く求められている。東南アジアなどには、種薯の保存が困難で、ヨーロッパなどからの輸入に頼っているような地域もあり、そのような地域では特に、ジャガイモ種苗生産技術の開発は非常に重要である。また、ジャガイモの種薯はかさばるために大量に運搬できず、従って、例えば中国やロシアのように広大な面積を有する国家の場合には、優良な品種の輸送、配布や保存が特に困難になるといった問題が指摘されている。輸送や保存中の品質の劣化も無視できない問題である。

このような問題を解決するために、これまで様々な試みが行われてきた。その主な方法としては、(1) 真性種子(True Potato Seed, TPS)栽培法、(2) 組織培養苗を用いた栽培法、(3) 塊茎(マイクロチューバー)を用いた栽培法、の3つがある。

うち、(1)の真性種子による栽培は、ジャガイモに種子を形成させ、これを一般的には苗床に播種して、ある程度まで生育させ苗とした後、圃場に移植して栽培する方法である²⁾。種子繁殖では、ウイルスが伝播されない。また、種子は保存と輸送がきわめて容易である。栽培は、次年度以降の種薯を生産する目的で行なわれる場合が多く、その有用性が報告されているが^{3,4)}、さらに進んで、直接に食用の塊茎を生産することも試みられている。実際、栽培条件によっては、収量も他の方法と比べて遜色のあるものでは

ないとされる。このような特長がある反面、この方法では、種子形成能の高い品種を選抜し育種するか、あるいは、種子形成しやすいように組み合わせた品種間で交配させて種子を得なければならないという大きな問題がある。すなわち、利用できる品種が限られる。さらに、ジャガイモ種子からの初期生育は一般にさほど旺盛でなく、従って、この時期の栽培管理に技術を要する。これらの欠点のため、TPS栽培法はまだ普及していない。とはいえ、CIPを中心として、TPS栽培法に関する研究と栽培技術普及のための努力がなされてきており、すでにTPS栽培用に確立された品種もある。ロシア、中国などで栽培の成功例も報告されている⁵⁾。

(2) 組織培養苗を用いた栽培の場合には、茎頂培養等によってウイルスフリー化した植物体を組織培養技術を用いて大量培養し、これを順化して栽培する^{6,7,8)}。通常は、順化後に苗を適当な圃場や温室に移植、栽培し、次年度の栽培に用いる種薯を生産する。この方法は、現在のジャガイモ種薯生産の中心的方法である。茎頂培養によるジャガイモウイルスフリー培養系の作出の試みは早くから行われ、少なくとも1950年代には、ウイルスフリー系が得られていた⁹⁾。ジャガイモ植物体の培養法はよく研究されており、品種によらず比較的容易に大量培養することが可能となっている^{10,11,12)}。ジャガイモ植物体を節ごとに切断して挿し木増殖することもできるため、これを繰返せば、苗生産効率を著しく高めることも可能である¹³⁾。しかし、この組織培養苗を用いる方法では、順化苗を圃場へ移植した直後と栽培初期における生育が一般にあまり旺盛でないという問題や、増殖や順化に技術と人手と大面積を要するという問題がある。順化後1作で種薯をとることはできるが、現実的には、培養や順化に要した費用が種薯価格に大きく反映しないように、また、大量の種薯需要に応えるために、何年間かの圃場栽培を繰返さなければならない。例えば日本では、ウイルスフリーの培養株から一般の農家が使う種薯まで6年以上を要していると言われる。栽培を繰返せば、ウイルスに感染する可能性が増大し、種薯の品質の低下が懸念される。従って、培養から農家までの期間を短縮するための検討が必要であるが、今後、これが飛躍的に短縮化できるとは考えにくい。

(3) マイクロチューバー (microtuber) とは、培養容器内で形成された小型の塊茎であり、その大きさからこの名称がある。ウイルスフリー化した植物体上にマイクロチューバーを形成させて、種苗として利用する。マイクロチューバーは、小型ながら通常の種薯と同様の性質を有しており、圃場や苗床に植付けて栽培することができる。収量も高く、次年度栽培用の種薯生産に用いることができる¹⁴⁾。マイクロチューバーを用いた栽培法には次のような特長があり、世界的に注目されている。(a) 培養後に順化する必要がなく直接に圃場に植付けることができる。(b) 栽培初期の環境適応性が他の方法に比べて大きいため栽培しやすく、生育も旺盛である。(c) 貯蔵が容易であり、小型であるために小さなスペースに多数の種苗を長期間保存することができ、かつ、優良品種や系統を輸送し、配付することが容易に行える¹⁵⁾。(d) 塊茎を切断することなく植付けできるので、植付け時の病原菌の感染の危険性を少なくすることができ、かつ、植付け時の労力が低減される。(e) 貯蔵できるため、一時に大量に培養する必要がない。すなわち、培養を繰返して種苗を蓄えておき、植付け時期に大量に供給するような体制をとることが可能である。このことは、小規模から大規模にいたるまで、栽培規模に応じた培養施設で種苗を工業的に供給してゆくことが可能であることを意味している。(f)

品種も制限されない。

このように、非常に優れた特長を持ちながら、現状では、マイクロチューバーの利用がさほど普及しているとは言えない。これは、主として、培養のコストの問題に起因する。培養によって塊茎を得る場合には、シュート自体を得る場合に比較して、培養期間あたりの種苗生産数が減少する。すなわち、塊茎をカルスから直接誘導する方法は知られておらず、従って、植物体を前もってある程度まで生育させたのち、培養条件を変更するなどして塊茎を形成させることが必要であり、培養期間が長びく。そのうえ、培養中の植物体のすべての原基（頂芽および脇芽部分）に塊茎が形成されるわけではなく、培養容器あたり生産される種苗数は、植物体そのものを得る場合よりも明らかに少ない。このことから、培養のコストが増大し、マイクロチューバーの利用にとって大きな障害となっている。現在、マイクロチューバーを商業的に供給している企業も知られているが、比較的小規模の生産にとどまっているのは、この問題によるものと思われる。逆に、このコストの問題が解決できれば、マイクロチューバーを利用したジャガイモ栽培技術が普及し、世界のジャガイモ生産性の向上に大きく貢献できるものと考えられる。本研究は、このマイクロチューバー生産に関わる問題の解決を目指すものである。

1-2. 培養槽を用いた植物の大量培養技術

1-1 に述べたマイクロチューバー生産に関する課題は、培養槽を用いた種苗の大量増殖技術をマイクロチューバー生産に応用することで解決できるものと考えられる。この培養槽を用いた大量培養技術は、組織培養法による種苗生産の実用化の鍵となる技術として期待されている。

組織培養法による種苗生産は、現在、試験管や小型の培養容器に1個体ずつ材料を移植しこれを培養室内に積み上げる形で、多くの人手を使って比較的小規模に行われるのがほとんどである。この体制をとる限り、増殖にかかるコストを減らすには限界があり、一方で、種苗は一般に安価であるので、生産規模も対象植物も限られてしまう。コストの問題が解決されない限り、種苗を工業的に大量に増殖させるための大規模な投資が行われることもない。培養槽による種苗増殖技術は、このコストの問題の解決のための有力な方法とされている¹⁶⁾。その理由として、(a) 立体的に種苗の増殖を行わせることができるため、培養スペースあたりの種苗生産数を増大させることができる、(b) 培養槽では、液体培地が用いられ空気が強制的に供給されるので、増殖の促進が期待でき、かつ、培地使用量あたりの種苗生産数も増大できる可能性が高い、(c) スケールアップによって、小人数で、かつ、少ない操作で大量の種苗を得ることができるようになるので、培養に必要なコストの中で最大である人件費を低減できる、などの点があげられている。また、機械化できる可能性が高く、より経済的な種苗生産体制へと発展することが期待できる。このように、培養槽を用いて種苗を工業的に大量に増殖させるための培養技術の開発ができれば、その社会的意義は大きい。

培養槽を用いた種苗生産技術は、不定胚大量培養技術も含めると、現在までいくつかの植物で検討が行われており、試験的なものではあるが成功例も報告されている。以下に、その研究の流れと現状について概説する。

培養をスケールアップし効率化するための研究は、培養物を試験管や小型の容器内に静置して培養する方法をやめ、液体振盪培養を用いた培養方法が試みられるようになって、大きく進展したと考えられる。Takayama and Misawaは、ベゴニアを材料として、液体振盪培養によって、そのまま種苗として利用可能な植物体を効率良く増殖することができることを示した¹⁷⁾。同様の報告は、ユリ、キク、セントポーリア、イチゴ、アスパラガス、ブドウなど、草本、木本を問わず多くの植物についてなされている。液体培地を用いることによる増殖の促進の原因は、次のように説明されている。(1) 静置培養に比べ培地中への酸素供給が良好である。(2) 培地と接触する面積が広いので、養分の吸収効率がよい。(3) 極性が消失し、頂芽優勢現象に支配されることなく、分化した多数の芽を一斉に生育させることができる¹⁸⁾。また、液体培地を用いた増殖は、単に増殖効率がよいだけでなく、増殖後の培地の除去を容易にし、培養後の種苗の取り扱いをより簡便化するものでもあった。このように、植物の分化組織や器官が、液体培地中で良好に増殖されることや、液体培地を用いることのメリットが確かめられると、微生物と同様に小型培養槽を用いた通気培養が試みられるようになった。

小型培養槽を用いた植物器官の大量培養は、Takayama and Misawaにより、ベゴニアの植物体の増殖に関して初めて報告された¹⁷⁾。適当な材料および培養方法を確立できれば、微生物用の培養槽を用いてもスケールアップは可能であり、現在まで、植物の細胞や器官の大量培養技術や培養装置開発のための研究が行なわれてきている^{19, 20, 21, 22)}。例えば、細胞培養に関しては、回転ドラム型培養槽による細胞増殖の促進²³⁾、培養槽内の培地量を間欠的に上下させながら培養することによる有用二次代謝物生産性の向上^{24, 25)}などが報告されている。植物細胞の中には、攪拌などによるストレスに敏感なものがあり、そのような細胞の培養に適した培養槽や培養方法は、同じく物理的ストレスに敏感な分化組織の培養に適用できる可能性が高いものと考えられる。一方、茎葉部や毛状根など器官の培養法に関しては、培地を霧状に供給しながら培養する方法^{26, 27, 28)}、適当な担体に培養物を立体的に保持し、これに培地を連続的に滴下しながら培養する方法²⁹⁾などが報告され、増殖の促進、培養物が水浸状となることの防止、あるいは、二次代謝物の生産促進などが認められている。これらの実験の結果は、さらに大型の培養槽へのスケールアップの可能性を強く示唆すると同時に、植物細胞や器官培養では、多くの微生物培養と異なった培養法が必要とされる場合があることを示している。

さらに、大型の培養槽へのスケールアップも試みられ、成功例が知られるようになった。細胞培養に関しては、ムラサキの細胞培養によるシコニンの生産が、植物組織培養技術を用いた有用物質の工業生産の最初の成功例として紹介されたが³⁰⁾、その他にも、試験的な生産を含めいくつかのスケールアップの成功例が報告されている。そのうち、器官培養については、例えば、培地を滴下しながら培養するシステムを構築することによって、毛状根を大量培養することに成功した例が知られている³¹⁾。種苗として利用可能な植物体の大量培養に関しては、著者らが、甘味成分を生産することで知られるステビアをモデル植物として用い、500-Lスケールの培養槽までのスケールアップに成功した例を報告した³²⁾。この大型培養槽へのスケールアップにおいては、苗状原基の組織塊を移植して培養する方法を用いた。順化可能な植物体を得るためには培養途中に培地中の糖濃度を高めてやる必要があったが³³⁾、この研究によって、大型の培養槽を用いた種苗の大量

供給の可能性を確かめることに成功した。また、イネの不定胚を大型培養槽を用いて大量培養し、これを種苗生産に利用しようとする研究も行なわれている^{34, 35)}。

一方、植物の貯蔵器官（塊茎、球茎など）の大量培養に関しては、ユリ、グラジオラス、里芋などで小型培養槽での成功例が報告されている。いずれの例でも、培養槽内で細胞から直接に貯蔵器官を誘導することは行なわれず、すでに分化した器官を培養の出発材料として用いている。例えば、ユリでは、鱗片250個を2-Lの培養槽に移植して2か月間培養した結果、約630個の球根が得られた^{20, 21)}。グラジオラスの例では、著者らのグループが、2-Lの培養槽を用いて、約330個の球茎を得ることに成功している^{36, 37)}。また、サトイモ球茎の培養では、高い通気量を保ちながら培養することによって培地の蒸発を促進し、徐々に培地量を減少させながら培養した結果、球茎形成数を著しく増大させることができた³⁸⁾。固形培地上ではあるが、カルスから直接に貯蔵根を得た例も報告されているので³⁹⁾、今後、培養技術の検討によって、さらに効率的な貯蔵器官の大量培養が実現する可能性があるものと考ええる。

大型培養槽を用いた貯蔵器官の大量培養例は、ユリについて知られているのみであるが^{40, 41)}、将来、他の植物にも応用されるようになれば、種苗生産の工業化に大きく貢献するであろう。すなわち、貯蔵器官は比較的容易に保存できるので、培養を繰り返すことによって種苗を蓄えておき、必要な時期にこれらをまとめて圃場に植付けするといった生産体制をとることが可能である。特に、ジャガイモのように栽培面積の大きな作物では、一時に大量の種苗が必要とされるので、このような体制をとることができれば非常に有利である。また、苗が要求される時期にはそれに合わせて順化用の苗を培養し、それ以外の時期には、球根のように貯蔵できる種苗を生産するといった体制をとることも可能であり、これによって大型培養槽の周年稼働が可能になることも期待できる。

上述のように、培養槽を用いて大量培養可能とされる植物は着実に増え、培養技術も改良されてきている。しかし、この分野の研究の歴史はまだ浅く、多くの基本的な課題が残されている。例えば、培養槽の形状を決定し、培養の制御技術を確立するうえで欠かせないものであるにもかかわらず、植物器官を培養液中に浮遊させて培養することの適・不適について意見が分かれており、培養槽内における植物器官の生育に関する最適な指標も明らかになっていない。従って、本研究はまた、培養槽による種苗、特に貯蔵器官の効率的な生産技術の事例としても意義深いものになると考える。

1-3. 組織培養技術によるジャガイモ塊茎生産技術

本研究の遂行には、ジャガイモの培養条件下における塊茎形成に関する知見を、培養槽による大量培養技術に応用することが必須である。以下には、ジャガイモの塊茎形成に関する既往の研究について概説する。

ジャガイモ塊茎の形成や肥大に関しては、農学および植物生理学において長い研究の歴史がある^{42, 43)}。しかし、塊茎形成が始まる際に、どのように生理学的な変化が起っているのかなどについて、未だ不明な点も多い。ジャガイモ塊茎は、通常、地下茎（ストロン）の芽の部分肥大することによって形成されるが、ある種の病気に感染すると地上部にも形成されることや、人為的に条件を整えてやれば、地上部の腋芽部分にも容易

に誘導されることが知られている⁴⁴⁾。組織培養技術を利用したジャガイモ塊茎形成法においても、主として脇芽部分に塊茎を誘導することが行なわれる。この技術は、塊茎形成に関する生理学的、分子生物学的な解析を行う上でも有用な実験系として期待されている⁴⁵⁾。

*in vitro*における塊茎の形成は、1950年代の初めにすでに報告されている⁴⁶⁾。その後、組織培養技術を応用し、塊茎形成の促進される条件を検討する、塊茎形成を誘導する物質を探索する、などの試みが行なわれてきた。これらと同時に、組織培養で得られた塊茎を実際の農業生産に利用するための試みもなされてきた。

まず、塊茎形成促進条件を解明し、効率よく塊茎を形成させることを目的として、培地組成、糖濃度、温度、日長、ホルモンをはじめとする生理活性物質の影響、などについて検討が行われてきた^{47,48)}。例えば、塊茎形成は、一般に、短日、低温、低窒素などの影響で、体内のC/N比が高まり、炭水化物過剰な状態となることによって誘引されると言われる⁴⁹⁾が、*in vitro*条件下でも、塊茎形成のためには、培地に高濃度の糖を存在させる必要があるとされる。糖としては、一般に、シュクロースが適当とされている。この高糖濃度条件における塊茎の誘導は、唯一、研究者の間で意見の一致するところである。その他の要因については、しばしば異なった観察結果が報告されている。例えば、日長について、Hussey and Stacey は、16時間以上の長日条件で最もよく塊茎が形成されるとした⁵⁰⁾。他にも、この長日処理による塊茎形成促進効果を支持する報告は見られるが、その反対に、短日条件が必要であるとする報告もある。例えば、日本の品種である農林1号については、日長8時間で好結果が報告されている⁵¹⁾。さらに、完全に暗条件で培養する方法が選択されても塊茎はよく形成される⁵²⁾。ポット栽培ではあるが、暗期の途中の赤色光照射による塊茎形成阻害が観察されているので⁵³⁾、塊茎の形成にフィトクローム系がなんらかの形で関与しうることは明らかであるが、*in vitro*条件では、品種や材料の齢、日長など培養条件が総合されて、圃場栽培と必ずしも類似しない結果となる場合もあるものと考えられる。

塊茎形成に対するホルモンなど生理活性物質の影響についても、よく調べられている。Palmer and Smith は、培養した地下茎にサイトカイニン処理することによって、有意に塊茎を誘導できることを示した^{54,55)}。これにより、かつてGregory がその存在を予見した塊茎形成物質⁴²⁾ (Tuber Inducing Substance, TIS) の実体はサイトカイニンではないかと考えられるようになった。実際、圃場栽培された植物体では、内生のサイトカイニン(ゼアチン、ゼアチンリボサイド)が、塊茎形成、肥大時には明らかに高まり、従って、サイトカイニンが塊茎形成になんらかの形で関与していることが確かめられた^{56,57)}。一方、ジベレリンの体内濃度が塊茎形成時には明らかに減少することが観察され、また、*in vitro*条件でも、ジベレリンが塊茎形成を強く阻害すること、さらに、その生合成阻害剤(クロロコリンクロライド(CCC)など)を処理すると塊茎形成が促進される場合があること^{58,59)}から、塊茎の誘導をサイトカイニン単独や、サイトカイニンとジベレリンなど他のホルモンとのバランスによって説明することが試みられた⁶⁰⁾。その他、各植物ホルモンの及ぼす影響については、多くの報告がなされている。例えば、アブシジン酸が塊茎形成を阻害するとの報告⁶¹⁾や、オーキシンはサイトカイニンとの組合せで塊茎形成を促進するとの報告⁶²⁾も見られる。しかし、その後の検討の結果、これらのホルモンは直接

的な塊茎形成の引き金になっているのではなく、茎葉部で生成された別の物質が塊茎形成を誘導すること、サイトカイニンや他のホルモンのバランスなどは、塊茎における細胞分裂や塊茎への物質の蓄積を促進する形で塊茎形成に関係しているとの見方がされている⁶³⁾。近年、このTISはジャスモン酸関連物質であることが報告されている^{64, 65, 66, 67)}。ただし、ジャスモン酸やその関連物質は傷害などによっても生成される物質であるにかかわらず、傷害を受けた個体で必ずしも塊茎が形成されるわけでないこと、外部からジャスモン酸を噴霧しても塊茎形成が見られない場合があることなどが指摘され、このジャスモン酸関連物質の作用については、さらに検討が求められている⁶⁸⁾。

このほかに、カルシウムによる塊茎形成の促進⁶⁹⁾、エチレンによる塊茎形成阻害と二酸化炭素による促進^{70, 71)}などが報告されている。このような様々な知見に基づき、*in vitro*条件での塊茎形成の効率化が図られてきており、目的とする品種に応じ、基本培養条件や生理活性物質の処理法などについて検討し、適当な培養条件を決定することが現在も行なわれている。

一方、組織培養技術を利用して生産したジャガイモ塊茎を栽培に利用する可能性は、Wang and Huによって確かめられたと言える⁷²⁾。彼らは、ウイルスフリーのジャガイモ培養株を用い、一旦生育させた植物体を塊茎形成用の培地へ移す方法によって効率よく塊茎を誘導できたとした。培養には、液体培地を浅く満たした容器を使い、静置培養を行った。塊茎誘導のための最適培地として、高シュークロース濃度（8%）としたMurashige and Skoog培地⁷³⁾を用いた。高濃度（10 mg/l）のベンジルアデニンの添加、培養温度20℃、日長8時間という条件が最適であり、4か月間という長期間の培養ではあるが、アズキ豆大の塊茎を効率良く誘導できた。さらに、これを圃場に植付けして栽培し、一般農家が使用するような種薯を得ることができた。彼らの試算では、培養室10 m²あたり36000個以上のマイクロチューバーを生産（500 mlの培養容器1210個を使用、容器あたり約30個の塊茎を形成）でき、さらに、これを3回圃場栽培することによって、耕地2000 ha分に相当する種薯を生産できるとしている。彼らによれば、台湾では、1975年以降、この方法による種薯生産が実用化されているという。このWang and Huによる研究は、現在の組織培養技術によるマイクロチューバー生産技術をほぼ体系付けたものと考えられる。

さらに増殖速度を高め、培養効率を増大させようとする試みが、C I Pのグループによって報告されている。Estrada et al. は、液体振盪培養によるジャガイモ塊茎の大量増殖法を明らかにした⁵²⁾。彼らの方法は、三つの段階からなる。第一の段階は、固形培地上におけるジャガイモ植物体の増殖段階であり、これは、継代培養を兼ねている。次の段階は、液体振盪培養による植物体の急速増殖段階であり、固形培地上で生育させた植物体の両端部を切断し、低濃度のジベレリン、ベンジルアデニンおよびナフタレン酢酸を含みシュークロース濃度を2%としたMS培地中で明条件下（16時間日長）で振盪培養する。2~3週間で植物体がフラスコを満たすまでに増殖する。次いで、第三の段階では塊茎の誘導と肥大が行われる。ベンジルアデニン（5 mg/l）およびCCC（500 mg/l）を含みシュークロースを8%としたMS培地に変更し、22℃、暗条件下で静置培養すると、約40日間で、種苗として使用可能な塊茎が得られるという。この方法によって、50種以上の品種について塊茎を誘導することが可能であった。

Estrada et.al はまた、同じ報告で、得られた塊茎は圃場栽培によって得られた塊茎と同様に扱うことが可能であり、かつ栽培試験した結果、変異は認められなかったとしている。このほか、幾つかのグループによって、組織培養技術を利用して得たジャガイモ塊茎を圃場に植付けて生育や生産性を確かめた例が報告されている¹⁴⁾。培養条件がその後の植物体の生育や収量に影響する場合もあることが報告されているので^{74,75)}注意を要するが、少なくとも変異が認められたとの報告は見当らない。

このように、組織培養を利用してジャガイモ塊茎を生産し、これを種苗として利用する可能性はきわめて高いことが明らかとなった。実際に、組織培養技術を利用して塊茎を供給している会社も存在することは、前述の通りである。しかし、培養をスケールアップする試みは、ほとんどなされてこなかった。これまで、いくつかの日本の企業により行われた検討が特許の形で開示されているが、培養のスケールアップの過程や得られた塊茎の品質などは明らかにされていない。

1-4. 本研究の目的

本研究の目的は、以上に述べた研究の進展を背景に、培養槽を用いた大量培養技術を応用することによるジャガイモマイクロチューバー生産のスケールアップと効率化の可能性を明らかにすることである。これによって、特にマイクロチューバー利用の最大の課題である生産コストの低減が期待される。ただし、ジャガイモの栽培規模や種薯の価格からみて、培養で得たマイクロチューバーを全ての農家に行き渡らせようとするのは現実的でなく、原種圃や採種圃へ供給することを前提とすべきである。前項に述べた Wang and Hu の試みにおいても、マイクロチューバーを用いて3年間栽培を繰り返してから種薯として農家に供給している。現在は、農家が種薯を手にするまでにこの倍以上の年数の圃場栽培が繰り返されていることを考えれば、たとえ培養後数回栽培してから供給したとしても、種薯の品質は従来法に比べ大きく向上するであろう。

本研究においては、培養槽による大量培養を試みる前に、液体振盪培養により基本培養条件を決定した。過去に、スケールアップすることを前提に、一貫して液体振盪培養を行って塊茎形成を行わせた例は報告されていなかった。従って、液体振盪培養によって得られた塊茎が栽培に利用できるような状態であるか否かについても確認する必要がある。次いで、培養槽による培養を試みたが、過去に培養槽内におけるジャガイモ植物体の増殖や塊茎形成の特徴についての報告はなく、培養槽内における塊茎形成を促進する方法を独自に決定する必要がある。特に、塊茎が培養槽内の一部分に偏って形成される現象が明らかとなり、従来行われてきたような培地条件等の検討では解決できない問題が培養槽による培養では存在し、その解決には特別の操作を必要とすることがわかった。次いで、小型培養槽を用いて得られた塊茎が栽培に利用可能であるか、また、利用可能な塊茎が培養槽由来の塊茎の何割を占めるのかを明らかにするため、保存性や萌芽性について観察した。さらに、塊茎を直接圃場に植付けて生育と収量を明らかにした。これら、培養槽由来の塊茎の性状や収量に関する評価が具体的に行われるのは、当然のことながら初めてであり、今後、品種や栽培地が異なった場合などについて、事例を積み重ねて行く必要があるが、少なくとも、本研究の結果から、培養槽を用いたジャガイモマイクロチューバー供給の実用化の可能性を示すことができたものと考えられる。

第2章 基本培養条件の確立

2-1 はじめに

小型培養槽を用いたジャガイモ塊茎の大量増殖を行うに先立って、基本培養条件の確立を試みた。ジャガイモの未分化組織からの直接的な塊茎形成条件は知られていないこと、および、一般に、腋芽など分化した組織を出発材料とし分化状態を保ったまま増殖させていく方法をとると変異が少ないとされることから、一貫して分化組織を培養して塊茎を得る方法を用いるべきであると考えた。このような分化組織の培養では、特に、培養効率を高めるための工夫が強く要求される。すなわち、分化組織は、脱分化細胞より一般に生育速度が低く、生産の効率化という点では不利と言わざるをえない。しかし、脱分化の過程を経ると変異がおこる危険性が高まり、特に、生産量の大きなジャガイモのような作物の場合、甚大な被害をもたらされる恐れがある。従って、変異を防止する有効策が確立されていない現状では、分化状態での培養を行い、かつ、2,4-Dのように変異を生じさせやすいと言われる物質を可能な限り使用しない方法を用いるべきであると考えた。

本研究に用いる培養系はスケールアップ可能であることが必須であり、そのためには、継代培養系を除いた培養の全てを少なくとも液体振盪培養条件下で実施できることが確かめられなければならない。第1章に述べたように、*in vitro*条件で塊茎形成を行わせる方法についてはよく研究が行われているが、そのいずれも、静置培養によって塊茎を形成させたものであり、液体培地中における塊茎形成の例は知られていなかった。そこで、予備実験として、過去の報告を参考に、高糖濃度、サイトカイニンの存在等、塊茎形成促進が認められると報告されてきたいくつかの条件の液体培地に、固形培地上で生育させたジャガイモ植物体を直接に移植して振盪培養を試みた。結果、塊茎は形成されないか、あるいは形成されてもごく小型でかつ数が少なかった。この場合、塊茎形成に必須とされる高糖濃度条件下では、植物体の生育が阻害されるのみで塊茎はほとんど形成されず、むしろ比較的低い糖濃度の培地を用い暗条件で培養することによって、植物体の伸長とともに塊茎を得ることができた。しかし、最も多い場合でも、平均約0.1gの塊茎が植物体あたり約6個しか形成されなかった。塊茎の乾物率は低く、得られた塊茎が水分を失ってしおれやすいなど、保存上も大きな問題があった。

この予備実験の結果は、液体振盪培養でも塊茎は形成され得るものの、移植した植物体に直ちに塊茎を形成させようとしても、効率が悪いということを示唆していた。すなわち、圃場栽培時と同様に、培養条件下でも、塊茎は植物体の増殖条件とは逆の条件で形成されやすく、従って、移植した植物体を生育させながら同時に効率よく塊茎を形成させて行くことは困難と考えた。そこで、図2-1に示したような培養系を用いて塊茎を大量に形成させる方法を試みることにした。すなわち、植物体を増殖させて塊茎誘導可能な部分（頂芽および腋芽）を大量に確保しておき、次いで塊茎形成に対し好適な条件へと変更してさらに培養することで、効率よく塊茎を得ることができると考えた。このような培養系を確立するためには、（1）材料の継代培養条件、（2）塊茎を誘導する前の植物体の大量増殖条件、（3）塊茎の誘導と肥大条件、の3つの条件を明らかにし

なければならぬ。本章では、この検討結果について、順に述べる。なお、便宜的に、塊茎形成前の植物体の増殖段階をステップ (Step) 1、塊茎形成段階をステップ (Step) 2と呼ぶものとする。さらに、得られた塊茎の萌芽性等を室内条件で観察し、液体振盪培養条件下で得られた塊茎の利用可能性を評価した。そして、塊茎形成効率と塊茎の萌芽性等の観察結果とを総合して、基本培養条件を決定した。

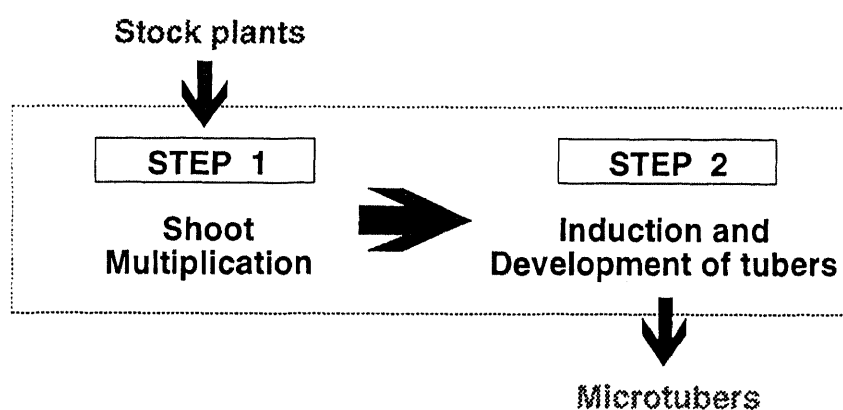


Fig. 2-1 Diagram of mass propagation of potato tubers using tissue culture techniques.

2-2 実験材料および方法

2-2-1 実験材料

材料として日本産のジャガイモ (*Solanum tuberosum* L., 品種名ユキジロ) を用いた。なお、ユキジロは、加工用品種であり、チップスなどに用いられている。品種としては、中晩生種に分類される。

本実験では、無菌培養系を、表面殺菌によって得た。塊茎の表面を、中性洗剤でよく洗浄したのち水洗した。この塊茎をクリーンベンチ内で70%エタノール中に投入して緩やかに攪拌しながら15分間おき、滅菌したろ紙を入れたシャーレに取り出したのち、そのまま放置して十分に乾燥させた。これとは別に、適量の海砂 (A号、15-25mesh) とこの海砂が湿る程度の脱イオン水とを入れ、アルミホイルと硫酸紙各2枚重ねで封じたのち、120℃で30分間滅菌した1000ml容コニカルビーカーを用意した。コニカルビーカー内にアルコールで表面処理した塊茎を静置し、25℃下に保って萌芽させ、植物体を得た。このようにして得たジャガイモ植物体の一部は無菌化されており、その節を切断し、10mlの固形培地 (2-2-2) を入れたカルス試験管に置床し継代することを繰り返して無菌培養系を確立した。

無菌化した植物体は、節ごとに切断したのち、同じ組成の固形培地に置床することによって継代した。1~1カ月半毎に継代を繰り返した。

各実験には、継代後約1カ月間培養したものを用いた。このとき、芽数は約15個であり、植物体上に塊茎形成は観察されなかった。

2-2-2 培地

MurashigeとSkoogの培地⁷³⁾に有機物を添加した培地 (以下MS培地と略す) を基本培地として用いた。表2-1に、このMS培地の培地組成を示した。MS培地組成の変更は、表2-1に示したA (窒素、カリウムおよびカルシウム)、B (リン酸およびマグネシウム)、C (鉄およびEDTA)、D (微量元素類)、E (ビタミン等) の5グループを単位として行なった。これらMS培地成分、シュークロースなどを添加した後、1NのNaOHを用いてpHを6.2に合せ、120℃、20分間のオートクレーブ殺菌を行なって使用した。

固形培地には、ゲルライト0.2%(w/v)を加え、長さ125mm、外径24mmの丸底の植物用試験管あたり培地10mlを分注し、シリコ栓で封じ、オートクレーブ殺菌した。液体振盪培養用の培地は、300ml容洋ラン用三角フラスコに100mlまたは200mlの培地を入れ、アルミホイルと薬包紙各2枚重ねで封じたのち、オートクレーブ殺菌した。

2-2-3 培養条件

2-2-3-1 継代培養における増殖の安定性 (2-3-1)

継代培養に関する検討は、2-2-2に示したカルス試験管を用い約2500ルクス、25℃、連続照明下で行なった。培養は、各区10連制で行い、結果はその平均値で示した。

2-2-3-2 植物体の大量培養条件 (2-3-2)

培地量は100mlとした。MS培地組成とシュクロース濃度に関する検討(2-3-2-1)では、固形のMS培地で継代培養した植物体をそのままフラスコあたり1本移植して、25℃、連続明条件下(照度はフラスコ上面で約5600ルクス)で40日間液体振盪培養した。振盪培養は、旋回型の振盪培養機を用い、振盪速度125rpmで行った。実験は2連制または3連制で行い、結果はその平均値で示した。生育の経時的測定(2-3-2-2)は、固形のMS培地を用いて生育させた植物体を節毎に切断し、その切片をフラスコあたり3個移植したのち、上と同じ条件下で培養して行なった。測定は5連制で行い、結果はその平均値で示した。

2-2-3-3 塊茎の形成・肥大条件 (2-3-3)

2-2-3-2で決定された条件で1か月間液体振盪培養した植物体を材料とした。フラスコから古い培地を全て除いた後、新たな培地200mlを添加して再び培養を行った。培養は、25℃、連続明条件下(照度はフラスコ上面で約5600ルクス)または連続暗条件下で行なった。振盪は2-2-3-2と同じ条件で行った。培養期間は1か月間とした。実験は5連制で行ない、結果はその平均値で示した。

2-2-4 培地成分の分析法

培養液中の無機態窒素濃度の測定は、東亜電波工業(株)製硝酸イオン電極(N-135型)、および、アンモニア電極(AE-235型)を用いて測定した。なお、アンモニア電極による測定では、遊離剤として検液10容に対し0.5容の2NのNaOH溶液を添加した。この操作によって試料のpHを12以上に保つことができた。培地中の糖濃度の定量は、高速液体クロマトグラフを用いて行なった。(ポンプ:LC-5A型(島津)、検出器:ERC-7510型RI検出器(エルマ社))。カラムには、Licrosorb NH₂(5 μ m)(Mreck社)を用い、移動相に、アセトニトリル:水=80:20を用いた。

2-2-5 萌芽試験 (2-3-4)

材料として、液体振盪培養によって得た塊茎をStep2終了後1か月間冷蔵庫内(4℃)に保存したものをを用いた。上面の直径65mm、底面の直径30mm、深さ20mmのすりばち型の穴を有するプラスチック製の板を用いて測定を行った。各穴に2~4枚重ねにしたガーゼ、または、適当な大きさに切ったろ紙2枚をしき、イオン交換水により適当な水分を与えたのち、測定しようとする塊茎を1個ずつ入れてサランラップで軽く覆い塊茎の乾燥を防止した。暗条件下、25℃に静置し、萌芽の有無を経時的に観察した。なお、培養終了時に塊茎にすでに芽が形成されていたものについては、それが明らかに伸長を開始したとき、また、芽が形成されていなかったものについては、長さ約2mmの芽が観察されたときをもって萌芽日とした。測定は、1週間~10日毎におこなった。

2-2-6 乾物率の測定

材料の形態にかかわらず、80℃とした通風乾燥機に2ないし3昼夜おいて恒量に達した時点で重量を測定し、乾物率を算出した。

Table 1. Composition of modified Murashige & Skoog's medium salts

Element	Compound	Concentration in the media (mg/l)
A	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
B	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	KH_2PO_4	170
C	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
	$\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	27.8
D	H_3BO_3	6.2
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	KI	0.83
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
E	Thiamine-HCl	0.4
	Myo-inositol	100
	Pyridoxin-HCl	0.5
	Nicotinic acid	0.5
	Glycine	2.0

2-3 実験結果ならびに考察

2-3-1 継代培養における増殖の安定性

2-3-1-1 継代培地上における植物体の生育

ユキジロの植物体は、節間で切断して単節の茎切片としたのち継代培養用の培地に移植すると、この節部分から新たな植物体が伸長し生育した。この方法で培養した場合、ホルモン要求性は認められなかった。シュークロス3%（以下w/vを示す）を含むホルモンフリーのMS培地に単節の茎切片を移植し、明条件下、25℃で培養したときの生育を、図2-2（茎および根の最大長）、図2-3（頂芽および節数）に示した。また、継代培養における植物体の様子を図2-4に示した。本品種は、少なくとも2週間程度で茎長約7cm、節を10節程度有する植物体にまで生育することがわかった。

2-3-1-2 節位による生育の差

植物体を節毎に切断し移植した際の、節位による生育の差を観察した。培養は10日間行った。結果を、図2-5（茎および根の最大長）、図2-6（芽数）に示した。図の横軸の数字は節位を表わし、1は頂芽を、以下、数字が大きくなるほど基部に近い節であることを意味している。少なくとも、すべての節から植物体が伸長した。この測定時期においては、茎および根の最大長は植物体の中間部（5～6節目）で、また、芽数については基部に近い側で、それぞれ大きな値となる傾向があった。しかし、培養期間が長くなれば、この差は明瞭でなくなった。植物によっては、培養に用いる節位によって生育に大きな差が生じる場合もあると言われているが、少なくとも本品種では、いずれの節を用いても安定して継代培養が可能であることがわかった。

以上の結果から、本品種は、植物体を節毎に切断したのちホルモンフリーのMS培地に移植し培養することによって安定して増殖できることがわかった。節位による差も顕著ではないため、2週間の継代間隔で、個体数を約10倍に増やし得るということがわかった。また、継代を重ねても、変異や増殖の低下は観察されなかった。これらは、継代培養系の要件、すなわち、増殖の安定性という条件を満たしている。従って、これを継代培養条件として決定し、以降の実験では、この条件で培養した植物体を用いることとした。

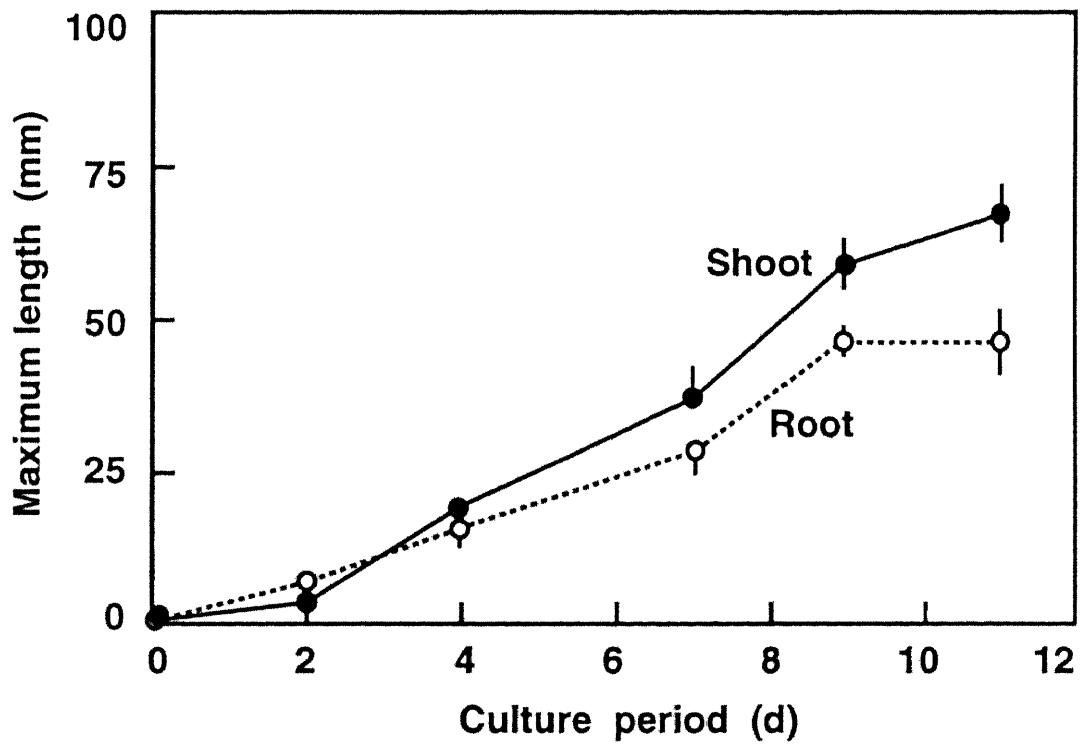


Fig. 2- 2 Time course of the maximum length of shoot and root of potato plantlet on solid medium for maintenance culture .

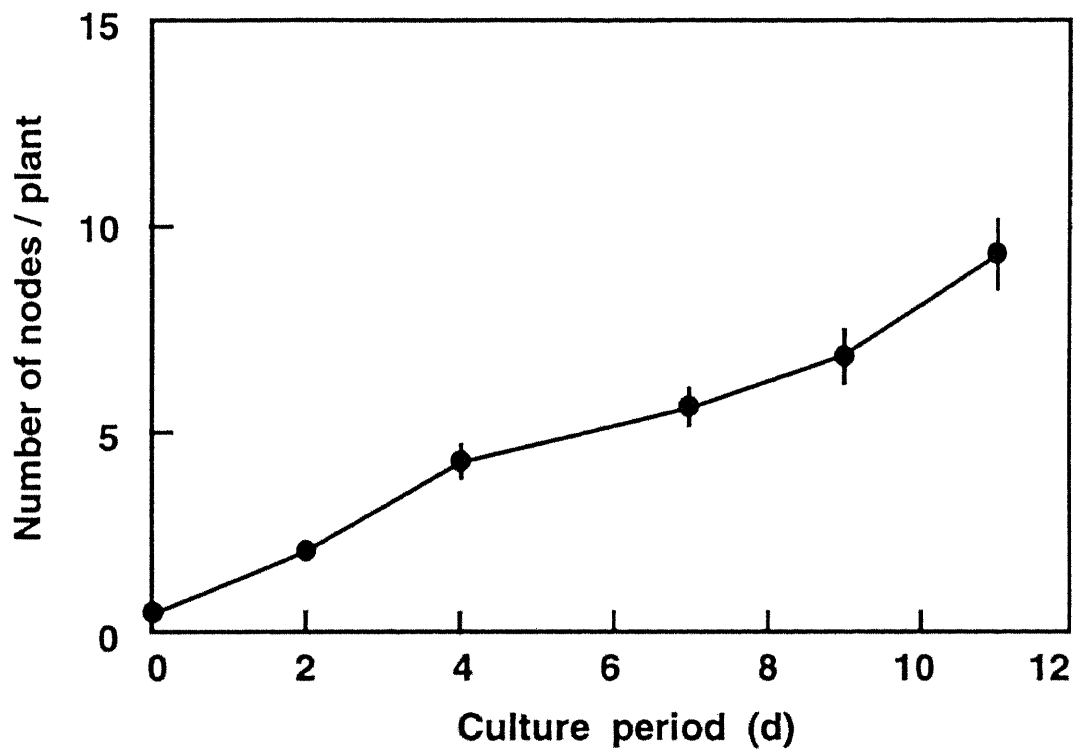
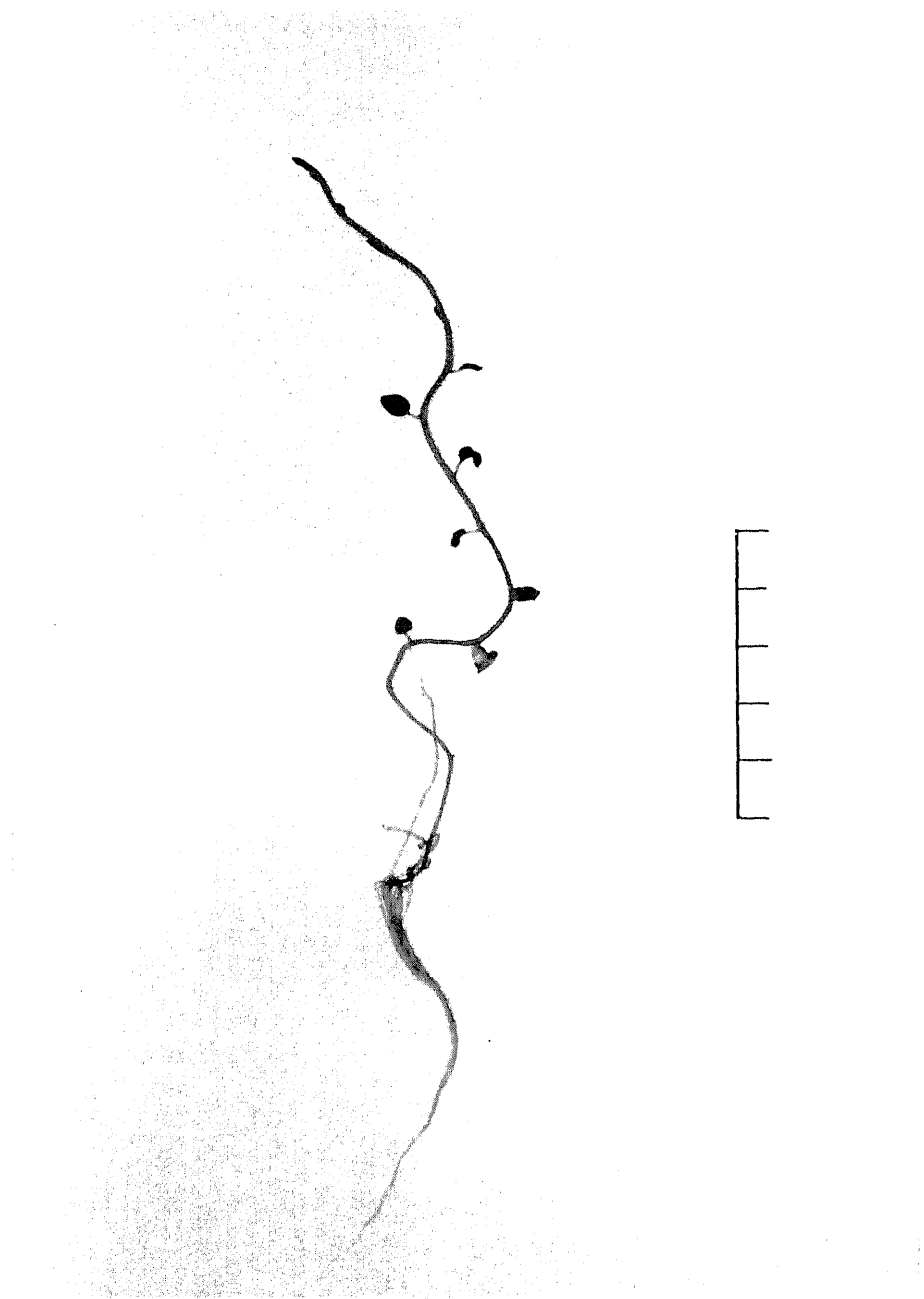


Fig. 2-3 Time course of number of nodes on potato shoot on solid medium for maintenance culture.



**Fig. 2-4 Plantlet of potato in maintenance culture.
Scale indicates 5 cm.**

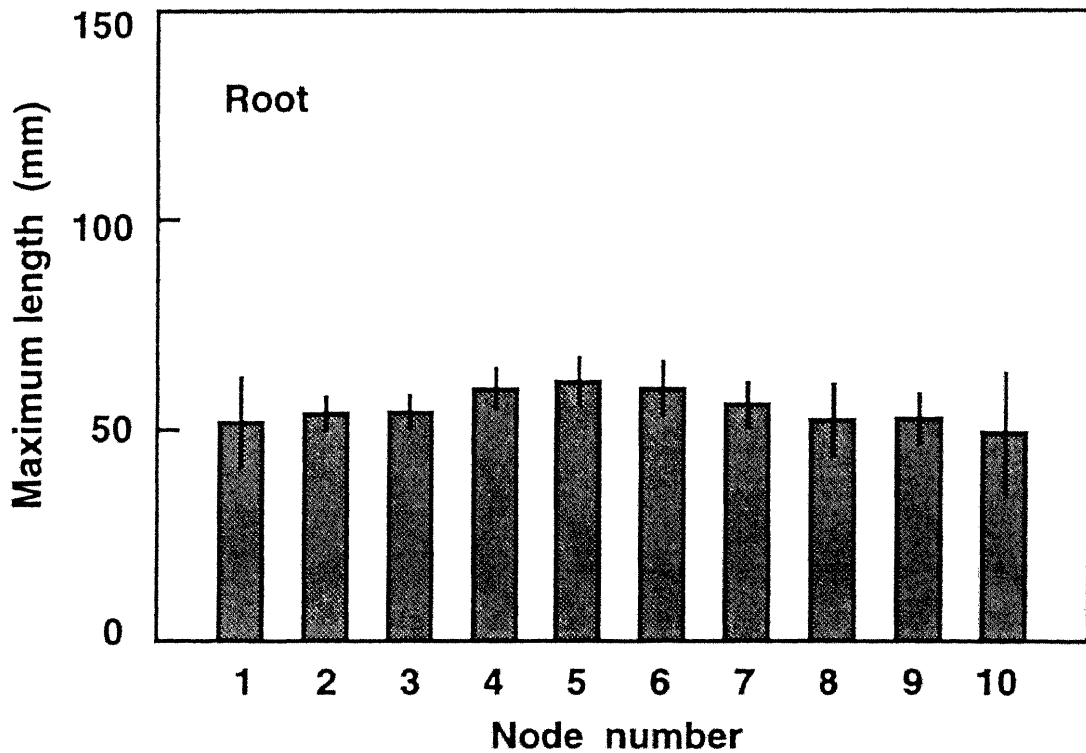
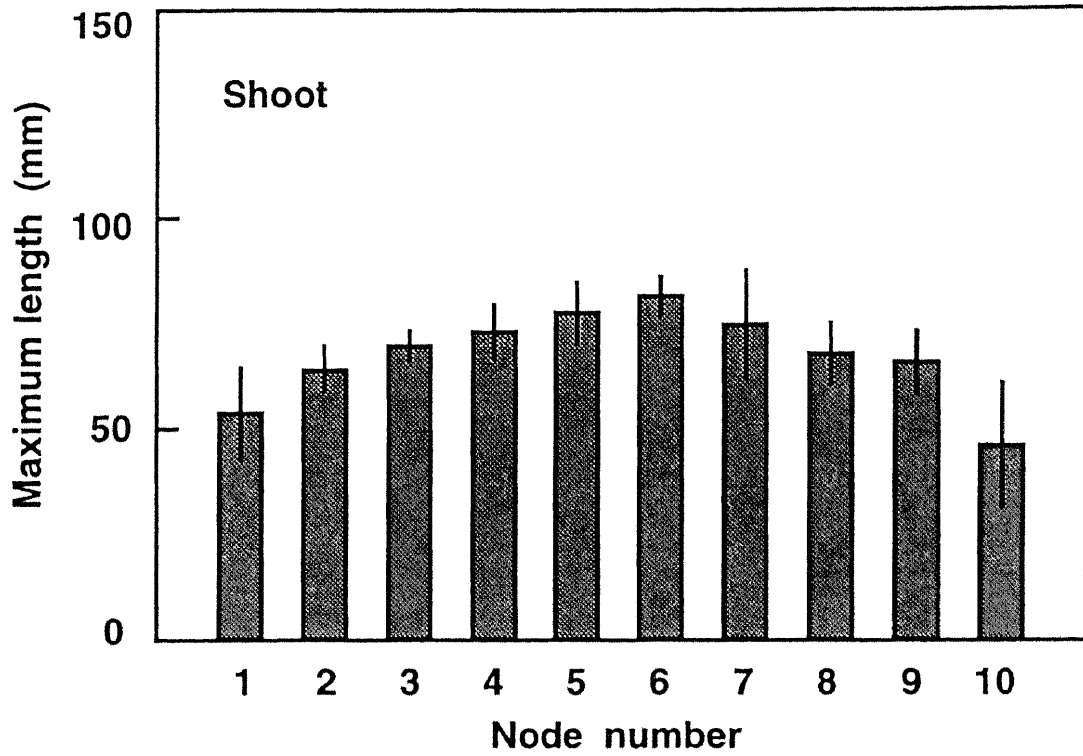


Fig. 2-5 Growth increment of subcultured potato plant during 10 days from different position of node on the shoot used for maintenance culture.

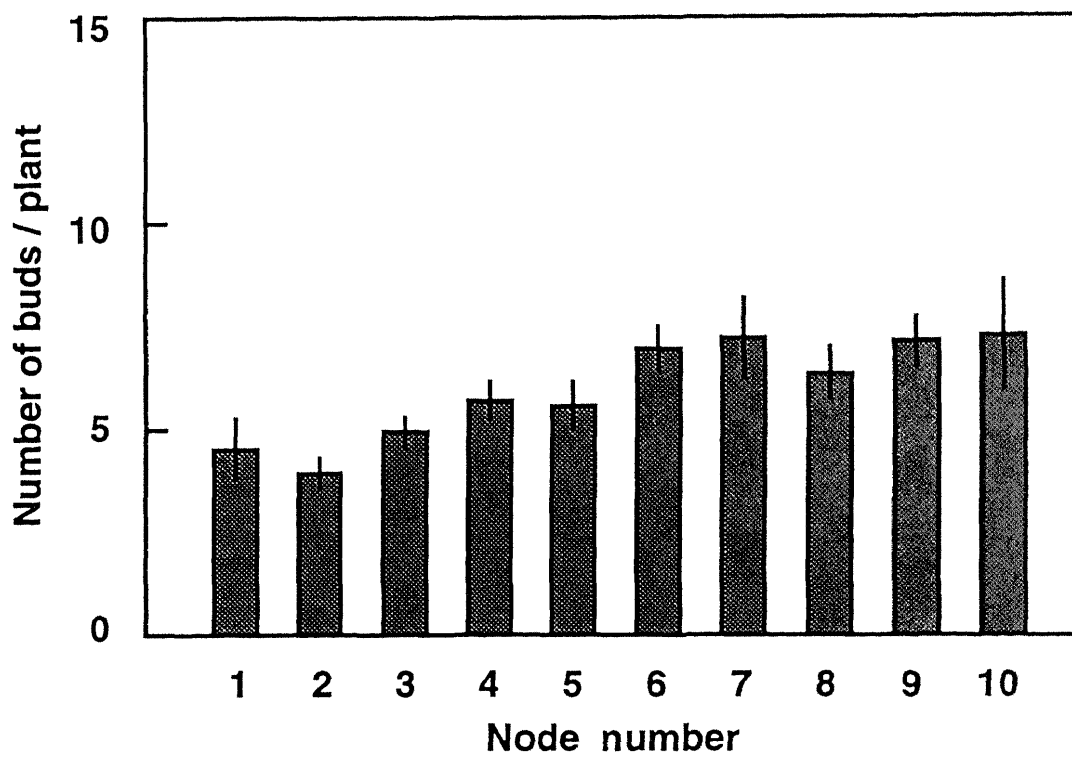


Fig. 2-6 Number of buds formed on subcultured potato shoot during 10 days from different position of node on the shoot used for maintenance culture.

2-3-2 植物体の大量培養条件 (Step 1条件)

2-3-2-1 MS培地組成とシュークロース濃度が植物体生育に及ぼす影響

Step 1は、塊茎形成前に塊茎の原基となる部分を確保する段階である。従って、この段階には塊茎形成に関係なく、単に生育量や芽数のみに注目して好適な条件を決定すべきと考え、液体振盪培養法によって条件検討を行った。前項の継代培養法の検討結果から、本品種はホルモンフリーのMS培地上でよく生育することが明らかとなっていたので、ここでもMS培地を基本とし、その組成等を改変することによって検討を行った。

最初に、MS培地成分中の塩類強度を、通常の1/2倍または1倍とし、シュークロース濃度を変更したときの生育の差を観察した。図2-7には、MS培地塩類強度とシュークロース濃度がジャガイモ植物体の生体重に及ぼす影響を、また、図2-8には、同じく芽（頂芽および腋芽）の形成数に及ぼす影響を示した。なお、植物体の節部から新たに腋芽が誘導されることは、継代培養時の観察から明らかだったので、ここでは、節数も腋芽数として数えている。生育量は、培地塩類強度1倍、すなわち、通常のMS培地を使用し、シュークロース濃度を3%とした場合で最大となった。このとき、分枝も多数見られた。なお、いずれの条件下でも、塊茎の形成は認められなかった。また、シュークロースが高濃度存在すると、生育が著しく阻害された。芽数についても、シュークロース3%のMS培地で最大となった。

次いで、シュークロース濃度を3%に固定し、MS培地のA～Eの各成分の濃度を、MS培地（対照）に対して1/2倍あるいは2倍に変更して培養を行った。図2-9には、このときの生育を、また、図2-10には芽数を示した。いずれの場合も、対照区、すなわちMS培地と比較して、有意に増大することはなかった。なお、いずれの条件下でも、塊茎の形成は認められなかった。

以上の結果より、液体振盪培養によりジャガイモ植物体を良好に生育させ得ること、培地として、シュークロース3%としたMS培地が適当であることがわかった。そこで、この条件をStep 1の培地とすることにした。特に、芽はStep 2で塊茎の形成が始まる部分であり、これを数多く確保することが、Step 1においてきわめて重要と予想される。本実験の測定結果から、ここに決定した条件ではフラスコあたり200個以上の芽が形成されていることがわかった。

2-3-2-2 生育の経時変化

2-3-2-1で決定した培地（シュークロース3%としたMS培地）を用いジャガイモ植物体を液体振盪培養した場合の生育等を経時的に観察し、Step1における生育の特徴について観察した。

図2-11には、このときの植物体の生体重および乾物重の経時変化を、図2-12には、芽数および分枝数の経時変化を、各々示した。培養開始後1週間程度は生育が緩やかであったが、それ以降は直線的に重量が増大した。培養期間を通して、分枝数、芽数ともにその増加は生体重の増加とよく対応した。培養中特別な操作を行わなくとも、生育に伴って次々に芽が形成され、かつ分枝が進むこと、すなわち、芽は特定の時期に限られずに形成され続けることがわかった。図2-13には植物体の乾物率を示した。乾物率は培養開始時には7%近くであったが、植物体の増殖とともに緩やかに減少し、培養終了時には6%を下回った。また、培地成分の消費を無機態窒素成分について調べた結果を、図2-14に示した。無機態窒素は培養初期から良く消費されたが、特に総無機態窒素量の減少は、生体重の増加とよく対応した。培養4週間で、硝酸態窒素は1/4に、アンモニア態窒素は1/6に、総無機態窒素は約1/4に、各々減少した。低窒素濃度条件下に植物がおかれることは、塊茎の誘導に適していると言われている⁹⁾ので、このような培地中無機態窒素量の減少は、少なくとも、続くStep2での塊茎形成にとって不利な条件にはならないものと考えられる。また、窒素のみでなく培地中の糖など他の基質も、同様に減少しているものと予想される。このことは、Step2開始時に植物体が急激な基質濃度や培地浸透圧の変化にさらされることを示唆している。

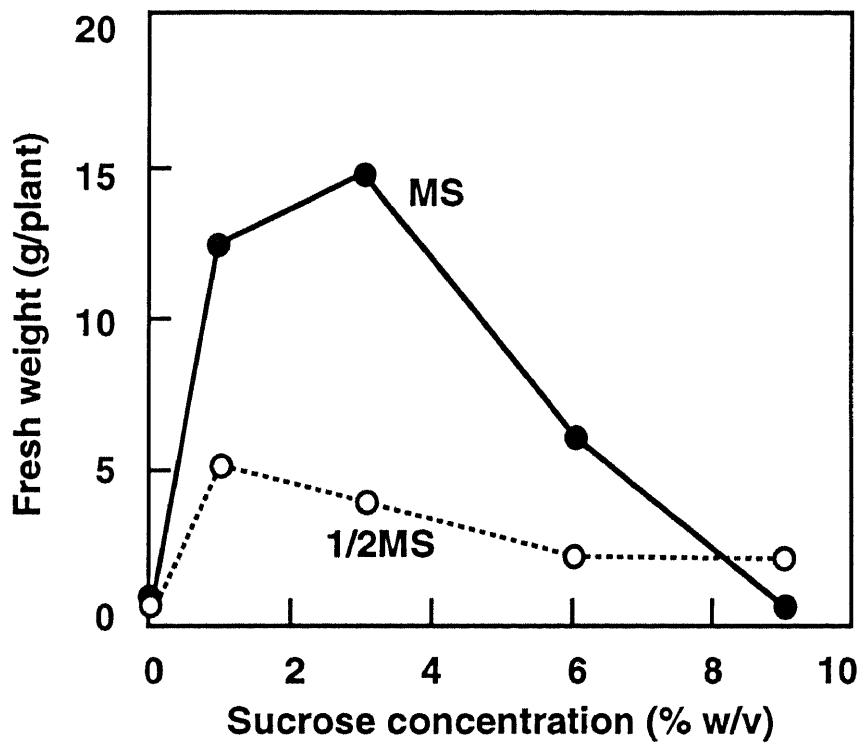


Fig. 2-7 Effect of sucrose concentration and MS salts strength on growth of potato plant in liquid shake culture.

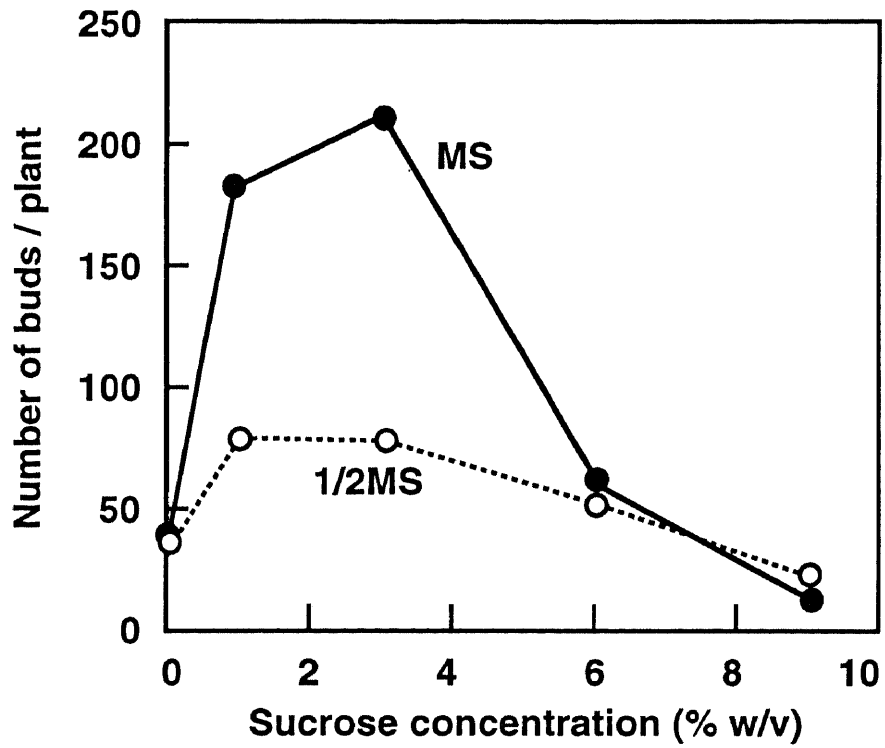


Fig. 2-8 Effect of sucrose concentration and MS salts strength on buds formation on potato shoot in liquid shake culture.

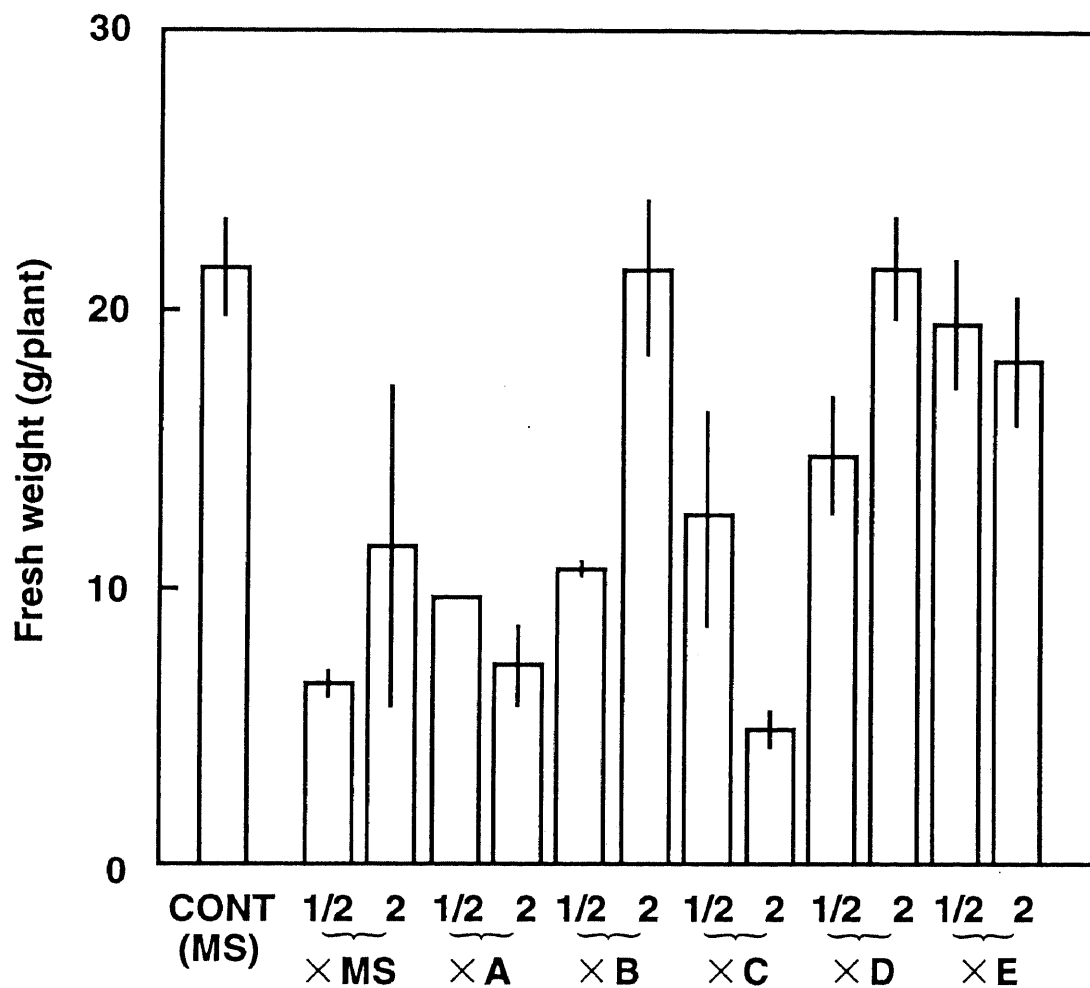


Fig. 2-9 Effect of medium salt composition on growth of potato shoot in liquid shake culture.

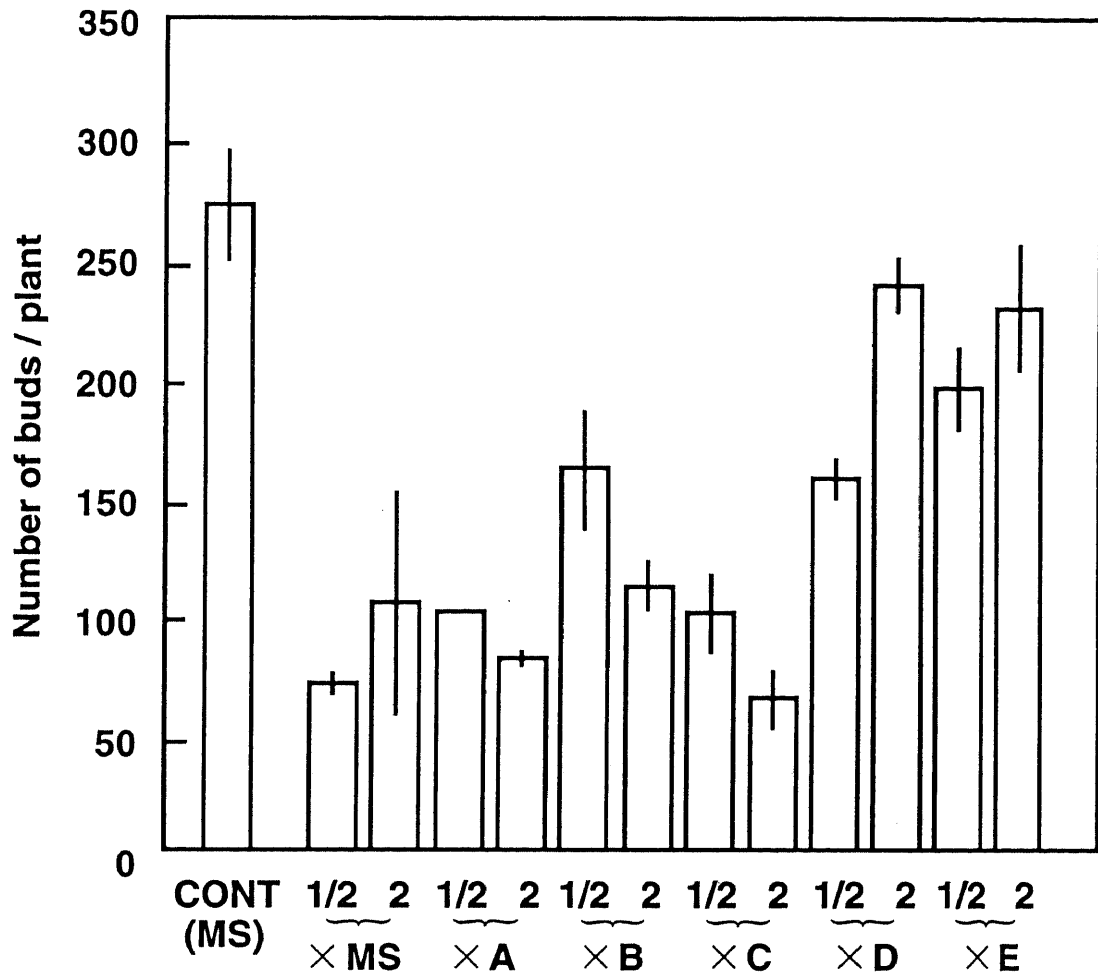


Fig. 2-10 Effect of medium salt composition on buds formation on potato shoot in liquid shake culture.

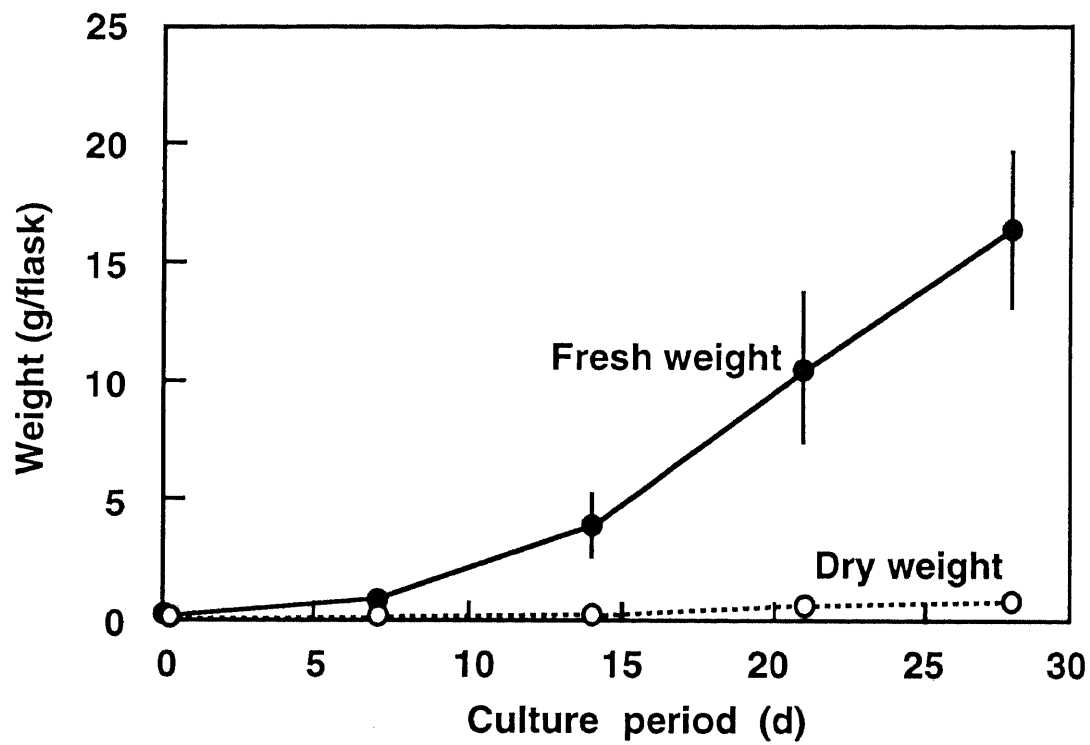


Fig. 2-11 Time course of growth of potato shoot in liquid shake culture (Step 1).

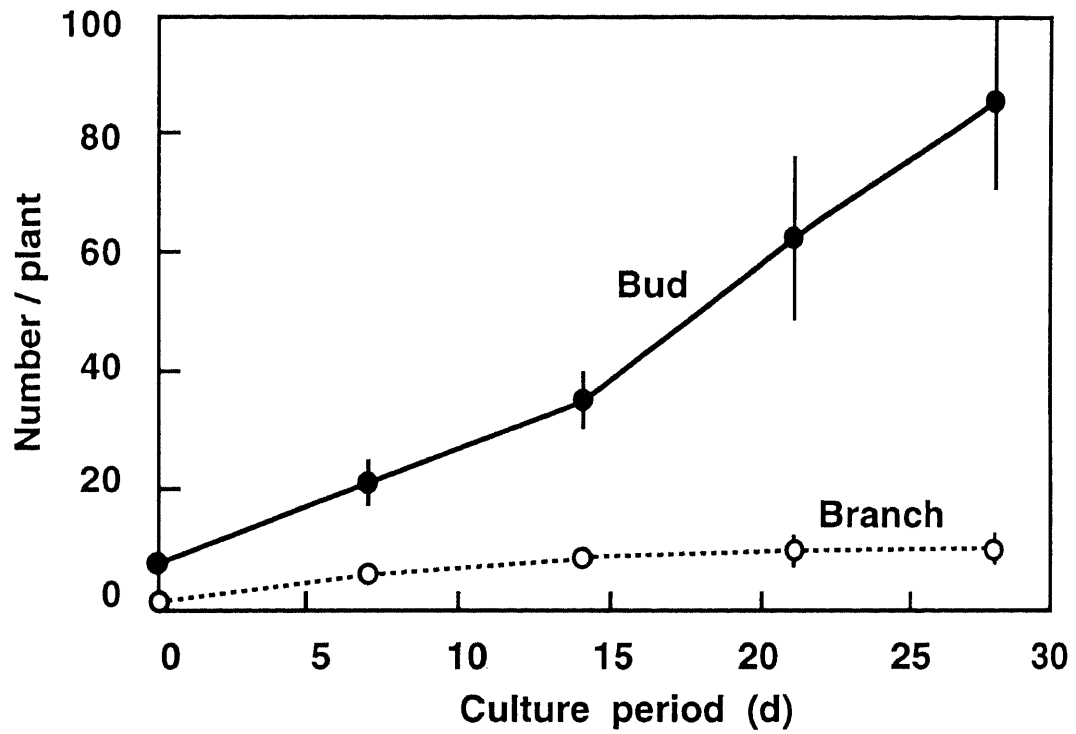


Fig. 2-12 Time course of number of buds and branches formed on potato shoot in liquid shake culture (Step 1).

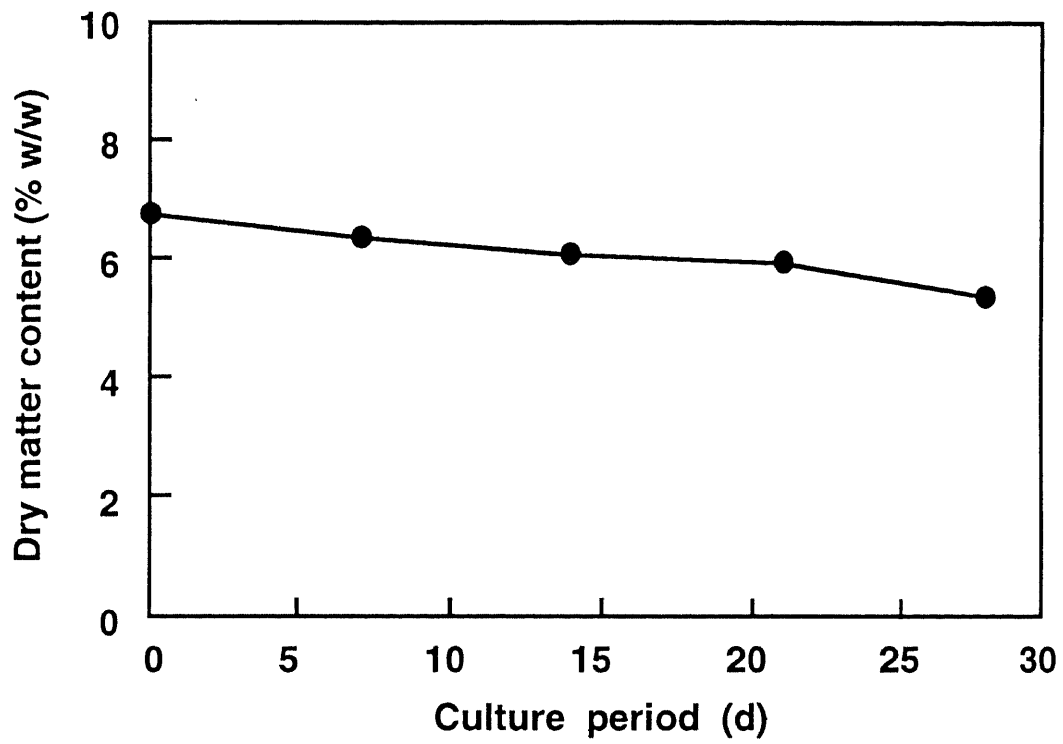


Fig. 2-13 Time course of dry matter content of potato shoot in liquid shake culture (Step 1) .

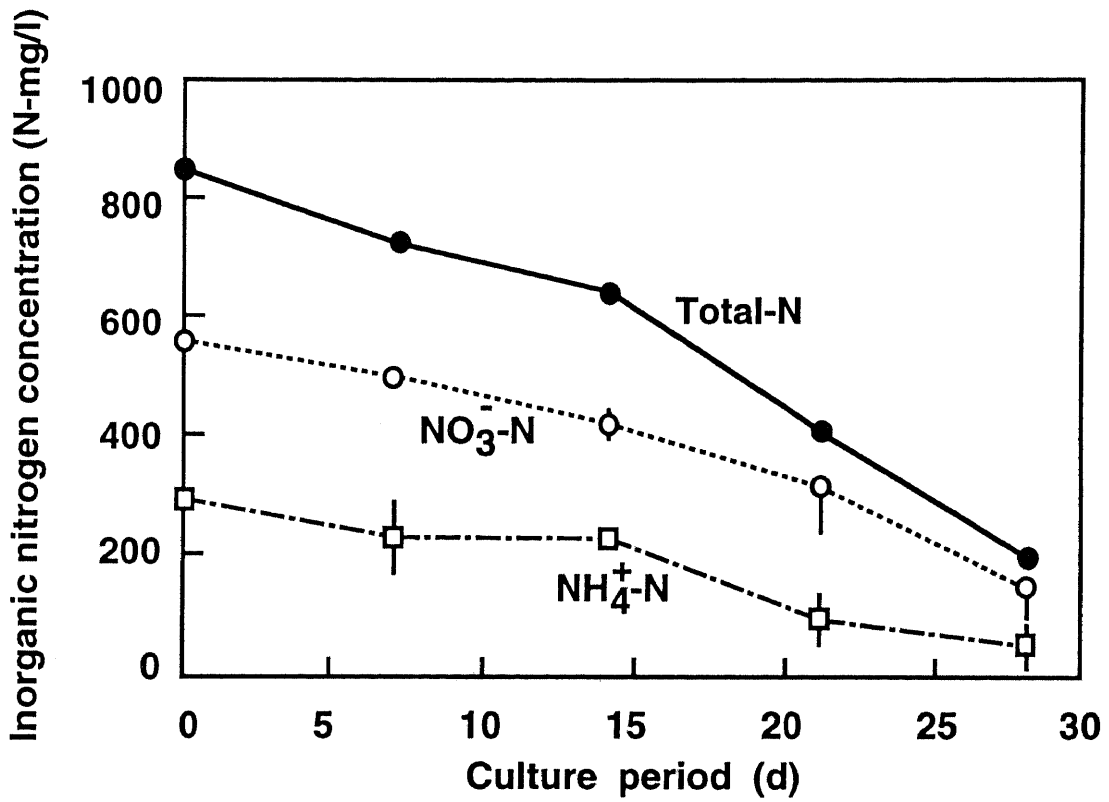


Fig. 2-14 Time course of inorganic nitrogen concentration of liquid medium during Step 1.

2-3-3 塊茎の形成・肥大条件 (Step 2条件)

2-3-3-1 培養条件

2-3-2で決定された培養条件でStep 1の培養を行えば、芽が数多く確保され、またStep 2で不利になるような現象も見られなかったので、次いで、このStep 1の条件下で1か月間液体振盪培養して得た植物体を出発材料とした場合の、塊茎形成と肥大に適した条件を明らかにすることにした。

まず基本培養条件を決定するため、過去に報告された事例を参考に、(1)光条件、(2)シュクロース濃度、(3)塩類強度、(4)アンモニア態窒素濃度の諸条件に着目して検討を行った。(1)光条件としては、連続明または連続暗の2条件について、(2)シュクロース濃度としては、3%または9%の2条件について、各々比較した。また、高濃度のアンモニア態窒素の存在下で塊茎形成が抑制される場合も知られていることなどから、MS培地を対照として、(3)1/2強度のMS培地(以降1/2-MS培地区)と(4)MS培地成分のうちアンモニア態窒素濃度を1/2とした培地(以降1/2NH₄⁺-MS区)の各々を用いた場合について比較した。

各条件下で約1か月間培養した時の茎葉部の生体重を、図2-15に示した。塊茎は、一般に植物体の生育にとって抑制的な条件で形成されやすいとされている。実験の結果、暗条件下では明らかに生育が抑制され、Step 2開始時とほとんど変わらない値であったのに対し、明条件下では、生育を抑制するためにはシュクロース濃度を高くすることが必要であった。生育量が最も大きくなったのは、Step 1と同じ条件(シュクロース濃度3%のMS培地使用、明条件下)で培養した場合であった。

塊茎の多くは、Step 1で伸長した茎の上に直接に形成され、ストロンのような茎を伸ばしてから形成されるような塊茎はなかった。塊茎形成は、検討に用いたすべての種類の培地で、暗条件下で明らかに促進された。また、暗条件下では植物体の生育が見られないにかかわらず塊茎が形成されることから、塊茎の肥大に他の部分の生育が同時に必要とされるわけではないことがわかった。図2-16には、塊茎形成数を示した。シュクロース濃度9%の条件では、すべての培地でシュクロース濃度3%の場合よりも塊茎形成が促進された。一方、MS培地の塩類強度およびアンモニア態窒素量を減少させても影響はなかった。明条件下でも、シュクロース濃度を9%とした場合、明らかに塊茎形成が認められたが、いずれの培地でも、暗条件下で培養した場合より形成が促進されることはなかった。この結果から、塊茎形成は、高シュクロース濃度のMS培地を用い、暗条件下で培養した時に最もよく起こることがわかった。一方、Step 1で形成された芽数(図2-8参照)のうち塊茎が誘導されたのは、最大でも全体の10~15%にすぎなかった。塊茎は、フラスコ内の気相部分に多く見られたが、Step 1で植物体の大部分が気相中に伸長していたために結果的に塊茎が気相中に多く分布するよう見えるのか、あるいは、フラスコ内や植物体上の相対的な位置や節位の違いなどによって塊茎形成されやすい部分が存在するのか、いずれとも判断できなかった。また、塊茎の誘導される芽と誘導されない芽との差も不明であった。

図2-17には、各培養条件におけるフラスコあたりの総塊茎重を示した。塊茎数と同

様に、暗条件下と高シュクロース濃度で塊茎重が増大した。なかでも、MS培地を用いた場合に、最も塊茎重が増大した。また、図2-18には、シュクロース9%の条件下で得られた塊茎の重量分布を示した。液体振盪培養によって、最大で約4gの塊茎が得られたが、培養条件によらず大部分は0.5gに満たないものであった。MS培地を用いた場合には、0.5g以下の塊茎の割合が他よりも少なかった。

以上の結果から、Step2の培養を、シュクロース濃度9%のMS培地を用いて暗条件下で行えば、塊茎数、総塊茎重ともに大きくなることがわかった。この条件に従って培養された植物体を、写真によって示す。ここで、図2-19は、Step1終了時（Step2開始時）の状態を示し、また、図2-20は、Step2終了時の塊茎形成状況を示している。

なお、ホルモンとしてサイトカイニン（ベンジルアデニン）をStep2の培地に添加する効果についても検討したが、塊茎数や総塊茎重を増大させる効果は見られなかった。さらにStep1の培地のみ、サイトカイニンとジベレリンを添加して影響を調べたが、塊茎形成や肥大を大きく促進するような効果は見い出せなかった（結果省略）。従って、本品種については、一貫してホルモンフリーで培養するものとした。

2-3-3-2 培養由来の塊茎の性状

前項で、液体振盪培養によってジャガイモ塊茎を大量培養するための基本条件を明らかにした。しかし、実用化のためには、さらに、得られた塊茎が利用できる状態にあるかを評価し、その結果を総合して判断しなければならない。そこで、液体振盪培養由来の塊茎の状態と萌芽能について観察した。

液体振盪培養によって得た塊茎のうち、シュクロース濃度を3%とした培地で培養されたものは、いずれの場合でも乾物率が低く（図2-27参照）、プラスチックから取り出した後に急速に水分を失ってしおれやすかったため、取り扱いに注意を要した。また、培地条件によらず、明条件下で形成させた塊茎では、すでに芽が伸長を開始していたり、芽の部分に葉が展開しているものが多く、そのため明らかに保存に適さないとされるものも多かった。その傾向は、やはりシュクロースを3%とした培地を用いた場合に顕著であった。

図2-21には、各培養条件により得た塊茎のうち、室温に移してから4か月以内に萌芽した塊茎の割合を示した。また、図2-22には、測定開始日から萌芽が観察されるまでの日数を示した。ただし、シュクロース濃度を3%とし、MS培地およびアンモニア態窒素を1/2にしたMS培地を用い、明条件下で培養した場合については、得られた塊茎数が非常に少なかったことに加えて、乾燥に弱く、培養容器から取り出した後すみやかに萎れてしまい、測定は不可能であった。なお、シュクロース濃度を3%とし明条件下で培養した処理区のうち、1/2強度のMS培地を使用した場合のみで測定可能であったが、この場合にも、培養容器外に移した際の傷害や乾燥に敏感であり、その結果、明条件下で形成された塊茎の中でも例外的に長期間萌芽しなかった可能性がある（4-3-2参照）。培養条件に関係なく、測定した塊茎のうちの少なくとも50%以上で萌芽した。茎数は、多くの場合、1個の塊茎あたり1本であった。また、シュクロース濃度9%のMS培地を用いた場合を除き、明条件下で得た塊茎よりも暗条件下で得られた塊茎で萌

芽率が高くなった。ただし、明条件下で得られた塊茎には、培養終了時にすでに芽が伸長していた塊茎が混在し、そのような塊茎はプラスチックから取り出す際などに傷を受けやすく、これが測定値に影響した可能性がある。

明条件下で形成された塊茎の中には、一旦肥大した後にそこから再び茎が伸長したと思われる形態の塊茎も混在していた。また、萌芽までの平均日数が短くなる傾向にあり、概して休眠が浅いか破れやすかった。ジャガイモ塊茎の休眠の調節については十分に解明されているわけでないが、これをホルモンのバランスによって説明しようとするのが試みられており、一般に、ABAが休眠に促進的に作用するのに対しジベレリンやサイトカイニンが萌芽に促進的に作用すると言われている。光照射は塊茎のジベレリン濃度を高めることが知られており⁷⁶⁾、明条件下で萌芽までの平均日数が短くなる現象はこのことによって説明できるであろう。一方、シュークロース3%のMS培地を用いた場合を除き、暗条件下で形成された塊茎は、培養条件によらず、平均50日前後で萌芽した。ユリ球根の形成では、培地シュークロース濃度が休眠期間に大きく影響すると報告されているが⁷⁷⁾、ジャガイモの場合は必ずしもシュークロース濃度が塊茎の休眠に影響するわけでないことがわかった。なお、シュークロース3%のMS培地を用い暗条件下で形成された塊茎で最も休眠が長くなった理由は不明であるが、この処理区では、他のシュークロース3%の培地を用いた場合に比べて、全塊茎重が少ないにもかかわらず数的には最も多くの塊茎が得られた(図2-16、図2-17参照)ことから、小型で、充実していない塊茎が多く、そのため、特に培養後の乾燥の影響(4-3-3参照)を強く受けた可能性が高いものと考えられる。個々の塊茎の萌芽までの日数は著しくばらついた。例として、図2-23に、シュークロース濃度9%のMS培地を使用し、明条件または暗条件下で形成された塊茎の重量とその萌芽までの日数の関係を示した。両条件とも、萌芽までの日数は大きくばらつき、塊茎重が減少するに従ってこのばらつきは大きくなる傾向にあった。しかし、塊茎重と萌芽までの日数との間には相関性はみられなかった。これまで、組織培養由来の塊茎の萌芽の不揃いがしばしば指摘されているが、本実験で得られた塊茎でもこのことは同様であった。また、塊茎形成時の培養条件が、次の圃場栽培の結果に影響を及ぼすことがあると報告されているが⁷⁵⁾、本実験の結果、萌芽時期が培養条件によって変化することがわかった。萌芽時期は後の生育に影響し、さらに収量に影響する恐れがあるものと考えられる。

また、明条件下において形成された塊茎には、割合には差があるものの、二次生長(ここでは、培養終了後に一旦萌芽して茎が伸長し始めたのち、その茎の先端に再び塊茎を形成して休眠に入る現象をさすものとする)が発生した(図2-24)。明条件下で形成された塊茎では二次生長発生率が高く、特にシュークロース9%を含む培地を使用した場合には培地の種類にかかわらず30%以上の塊茎で観察された。二次生長が生じると、萌芽までの日数にさらに大きなばらつきがもたらされるばかりでなく、塊茎のエネルギー効率を著しく低下させる。従って、明条件下での培養は避けるべきであると考えられる。

以上の結果は、液体培地由来の塊茎も、ある休眠期間を持って萌芽し生育する能力を有していることを示している。実際に、得られた塊茎の一部をポット栽培した場合、特別な順化作業を行なわなくとも生育し、塊茎を形成した(結果省略)。また、シュークロース3%濃度や明条件下で得られた塊茎では、その取り扱いに注意を要するなど問題があ

るものの、それ以外の条件で得られた塊茎については、萌芽性などは同様であった。従って、前項で塊茎形成数などに基づいて決定された条件（シュクロース9%のMS培地を用いた暗条件での培養）が、最も適当であると結論した。

2-3-3-3 塊茎形成の経時変化

次に、液体振盪培養条件下での塊茎形成について経時的に観察し、本方法における塊茎の形成とその肥大の特色について調べた。実験では、シュクロース濃度を3%または9%としたMS培地を用いてStep2の培養を行った場合の塊茎形成を、培地中の無機態窒素および糖の消長とともに経時的に観察した。

図2-25には、培地を交換した時点をも0日目とした場合の塊茎数の経時変化を示した。塊茎は、シュクロース濃度にかかわらず、Step2の培養開始後のわずか数日間から1週間以内に形成され、以降は数がほとんど増加しなかった。すなわち、塊茎数はStep2のごく初期にほぼ決まっていた。このことは、光条件、培地シュクロース濃度⁷⁸⁾、培地浸透圧⁷⁹⁾などが最終的に形成数を決定するものの、培地中の無機態窒素量の減少といったStep1終了時の培養環境や植物体の生理的条件が潜在的に大きな影響を与えていることを示唆している。同時に、Step2の培養期間のほとんどは塊茎の肥大に関係していることがわかった。このことは、同一植物体上で同一時期に形成された塊茎の間でも、なんらかの原因で、肥大に大きな差が生じていることを示している。すなわち、塊茎の形成自体は培養の初期に始まっているにもかかわらず、培養終了時の塊茎の大きさは著しくばらついている（図2-18参照）ことから、各塊茎の肥大は同調的かつ均一には進行しないことがわかった。

フラスコあたりの総塊茎生体重の経時変化を図2-26に示した。塊茎重は、Step2の初期にはシュクロース濃度に関係なく増大したが、2週間目以降、シュクロース3%の培地では、その増大速度が減少した。これに対して、シュクロース9%の培地では、培養期間を通じて直線的に塊茎重が増大した。このことは、塊茎の肥大速度は培地中のシュクロース量によって規定されることを示している。図2-27に示した総塊茎乾物重の経時変化も、生体重の経時変化によく対応していた。また、塊茎の乾物率の変化を図2-28に示した。塊茎乾物率は、培地中のシュクロース濃度に強く依存した。シュクロース9%の培地では培養期間を通じて塊茎の乾物率が徐々に高くなり、培養終了時には約19%に達したのに対し、シュクロース3%の培地では、乾物率はむしろ培養後期に減少し、培養終了時にはシュクロース9%の場合の約1/2の値であった。通常、圃場で得られる塊茎の乾物率は20%前後であるから、シュクロース9%のMS培地をStep2に使用すれば、圃場栽培して得られる塊茎とほぼ同じ乾物を含む塊茎が培養によって得られることになる。

図2-29には、培地中全糖量（シュクロース、フラクトース、グルコースの合計量）を、図2-30には培地中の個々の糖量の経時変化を示した。また、図2-31には、培地中の無機態窒素量の経時変化を示した。培地中の全糖量は、いずれの培地でも培養期間を通じて減少したが、シュクロース濃度を9%とした場合に、より減少量が大きかった。培地中の各糖の消費量をみると、シュクロース濃度を3%とした場合には、2

週間でシュクロースはほぼ完全にフラクトースとグルコースに分解されていた。これは、総塊茎重の増加が鈍化する時期に一致する（図 2-2 6 参照）。全糖量はこの時期にあまり急激に変化してはいないので、糖の消長だけに注目すれば、塊茎の肥大はこの 2 つの単糖の量や全糖量ではなくシュクロース濃度に依存しているように見える。培地中の糖量は培地の浸透圧に大きく影響するためシュクロースの分解で浸透圧が大きく変化していると予想されること、単糖の組成や他の培地成分の量、さらに、植物体の生理的条件の変化なども塊茎形成に影響する可能性があること、などを考えると、本実験の結果のみでシュクロース量が塊茎の肥大速度を規定していると結論することはできないが、培養途中の塊茎の肥大をシュクロースの残存量によって予測できる可能性があるものとする。各無機態窒素についても、シュクロース濃度 9% とした場合により多く植物に吸収されており、この場合、培養終了時の無機態窒素量は培養開始時の約 1/4 であった。このような培地中の基質の減少にかかわらず、Step 2 において茎葉部の重量がほとんど増加しない（図 2-1 5 参照）ことは、これら吸収された基質の多くが塊茎の肥大に用いられたことを意味している。

以上の観察の結果、本実験法における塊茎形成には、（1）Step 2 の培養初期の少なくとも 1 週間以内に一齐に塊茎が誘導され、この時期に塊茎数が決定される、（2）Step 1 で形成されていた芽のうち、大部分では塊茎が誘導されない、（3）塊茎の肥大は不均一で、肥大の早い塊茎と遅い塊茎とが混在する、（4）Step 2 の期間のほとんどは塊茎の肥大に関係する、という特徴があることがわかった。

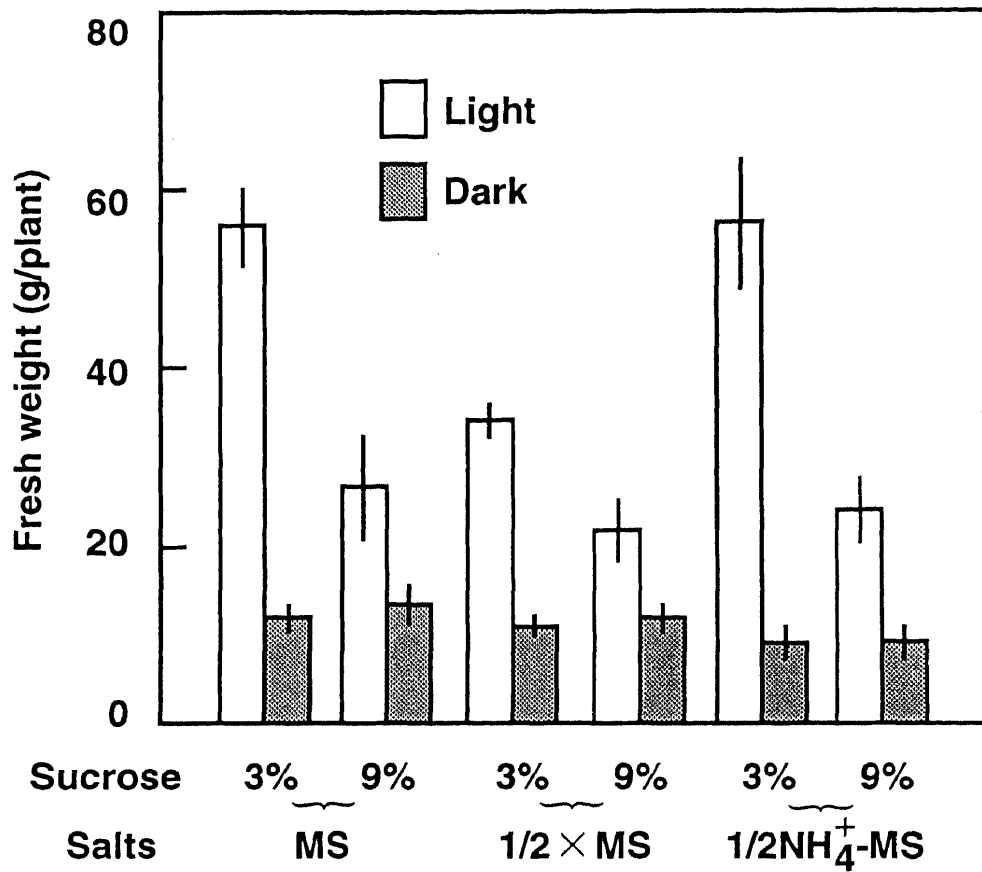


Fig. 2-15 Effect of medium composition and light condition on growth of potato shoot in liquid shake culture (Step 2).

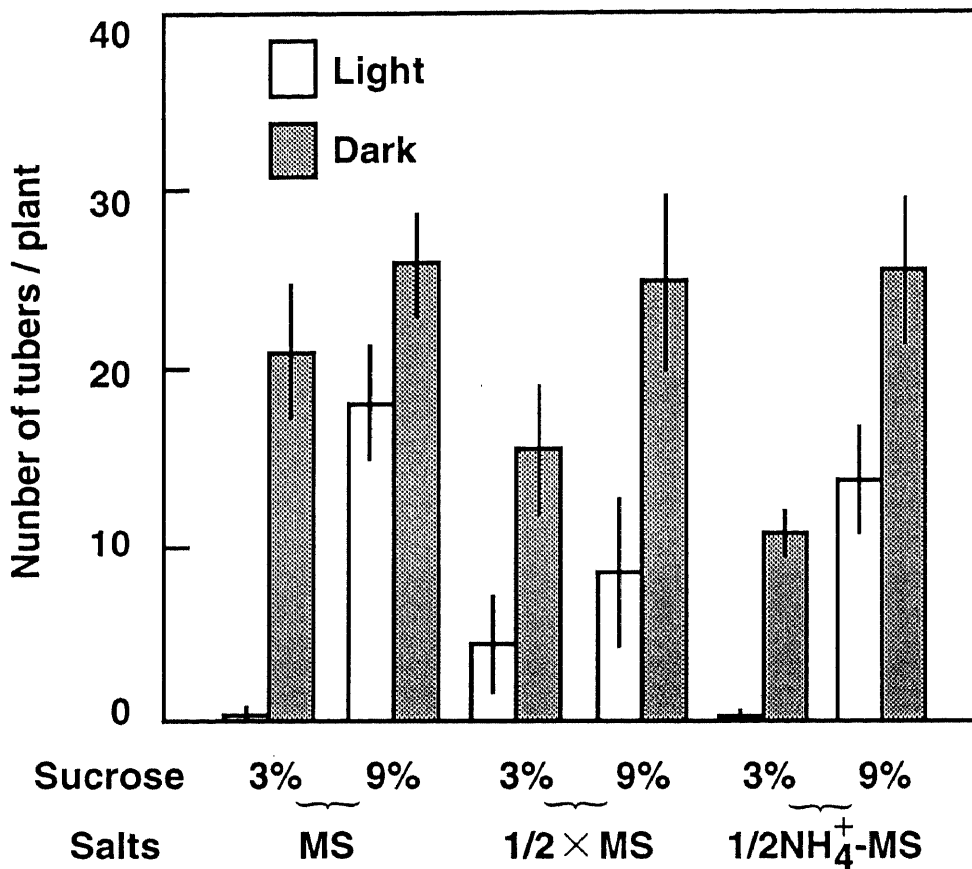


Fig. 2-16 Effect of medium composition and light condition on potato tuber formation in liquid shake culture (Step 2).

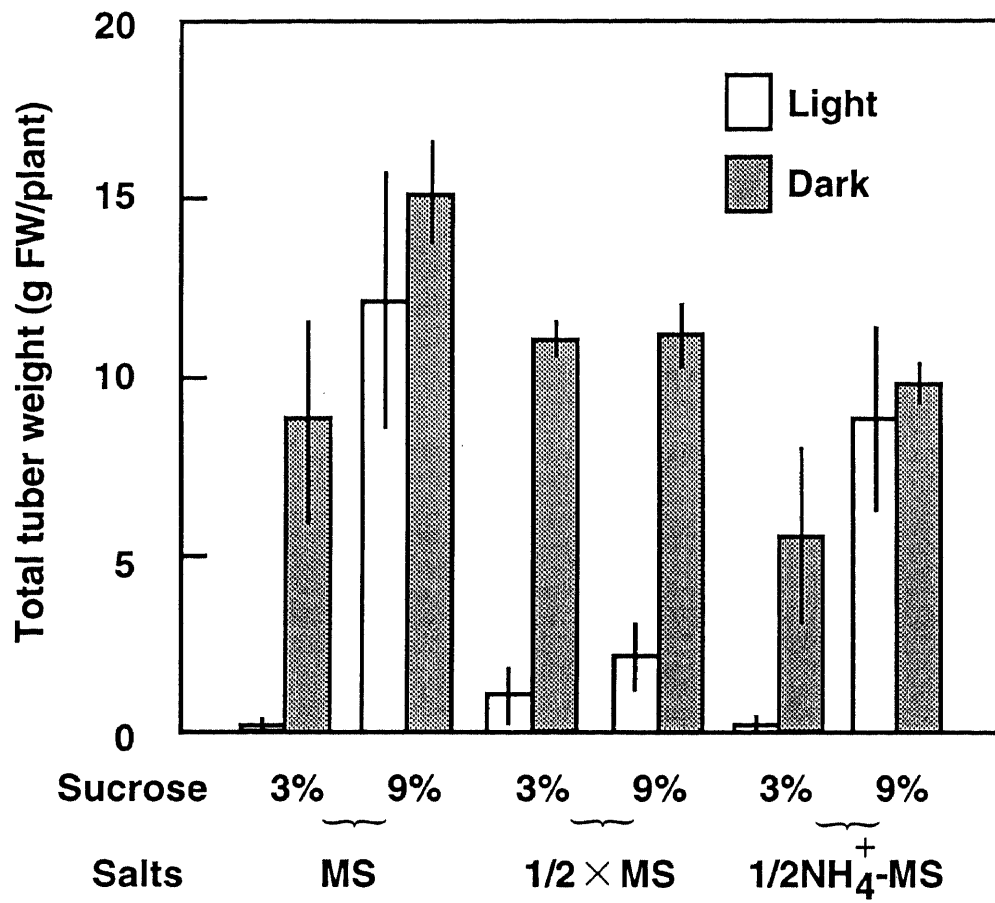


Fig. 2-17 Effect of medium composition and light condition on development of potato tubers in liquid shake culture (Step 2).

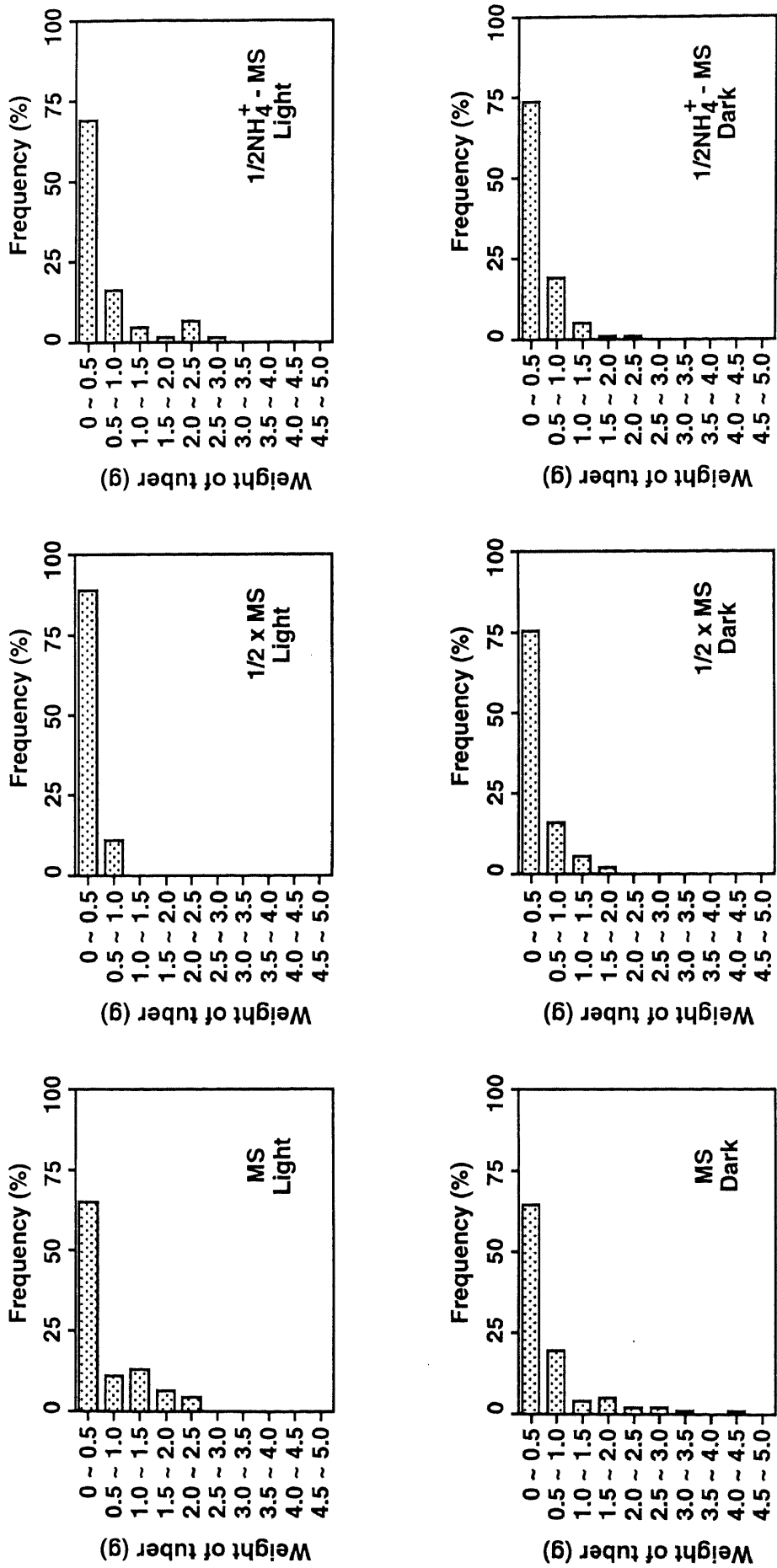
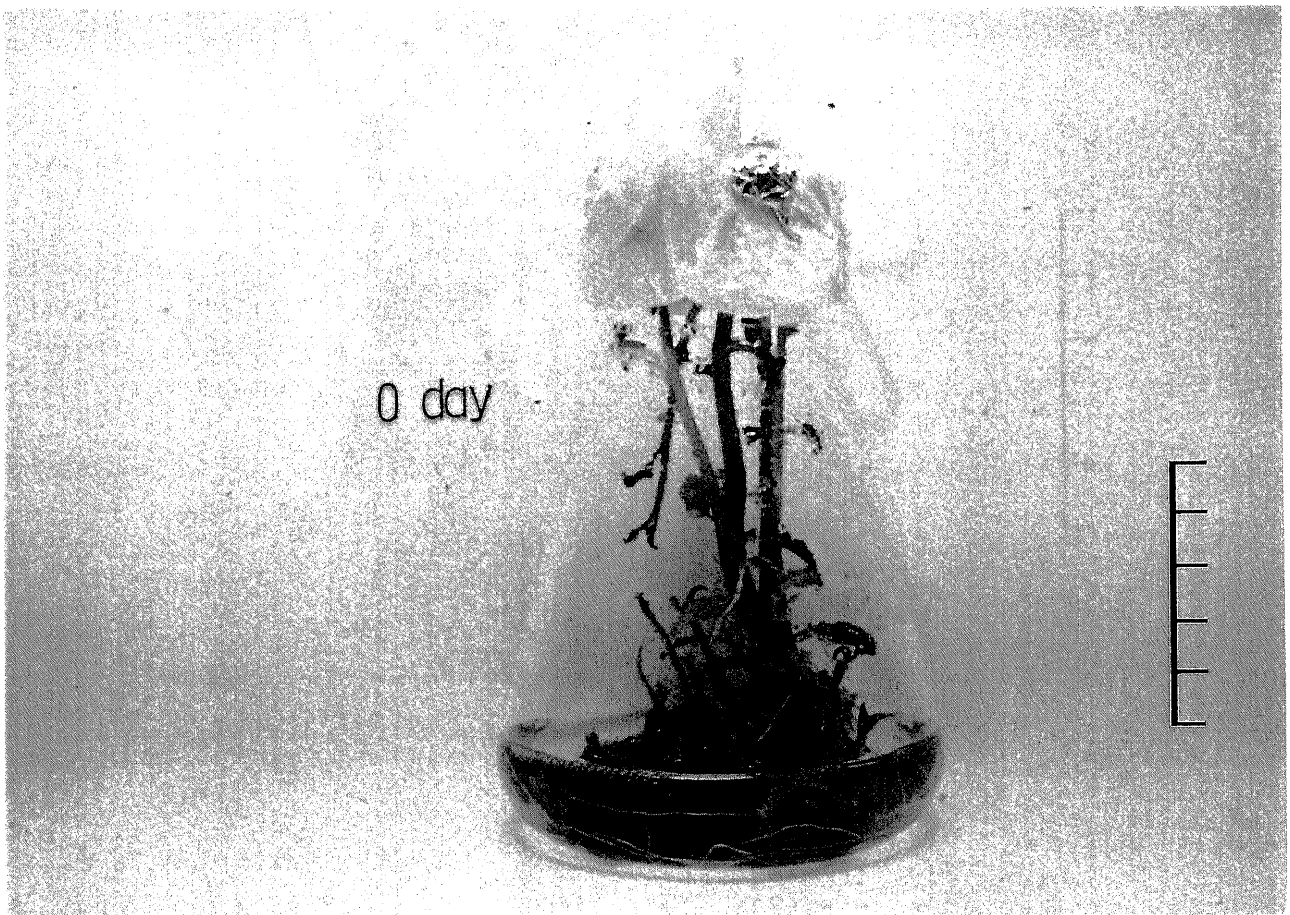


Fig. 2-18 Effect of medium composition and light condition on weight distribution of potato tubers propagated in liquid shake culture.



**Fig. 2-19 Potato plantlet cultured in liquid shake culture.
(End of Step 1)**

Scale indicates 5 cm.



MS SUCROSE 9%

**Fig. 2-20 Formation of potato tubers in liquid shake culture.
(End of Step 2)**

Scale indicates 5 cm.

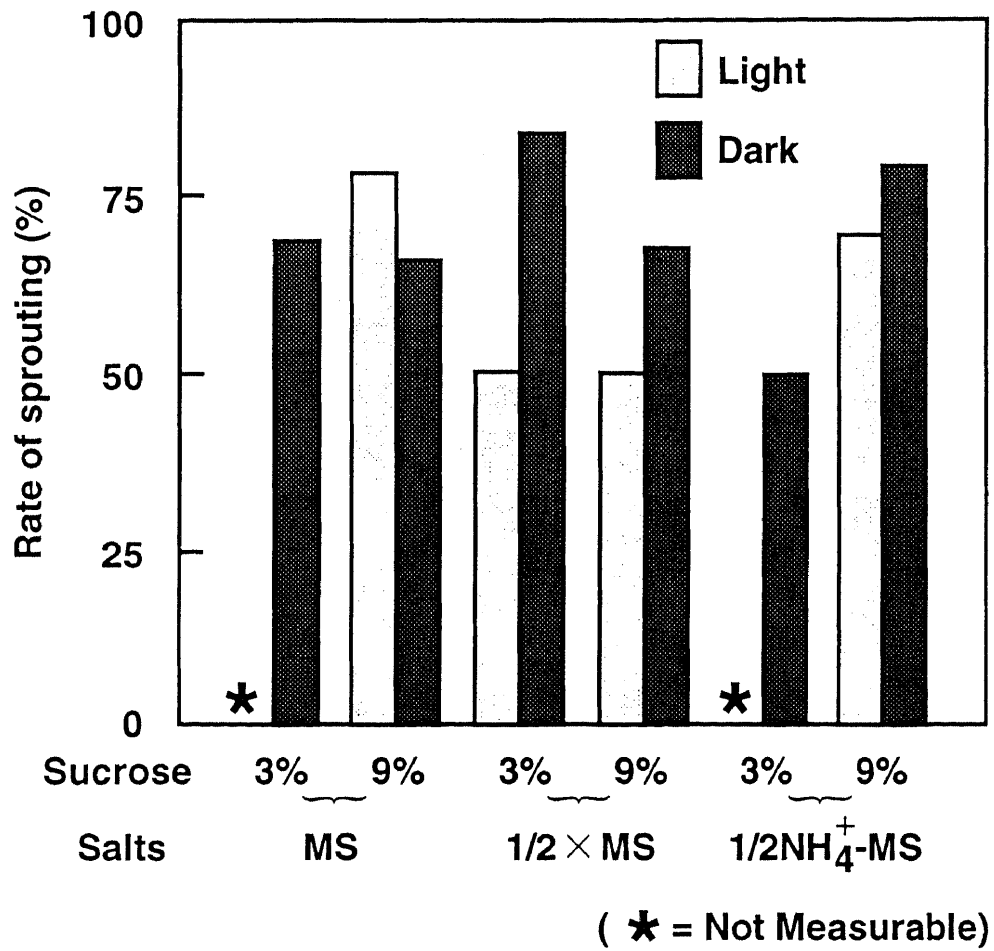


Fig. 2-21 Effect of medium composition and light condition on rate of sprouting of potato tubers propagated in liquid shake culture.

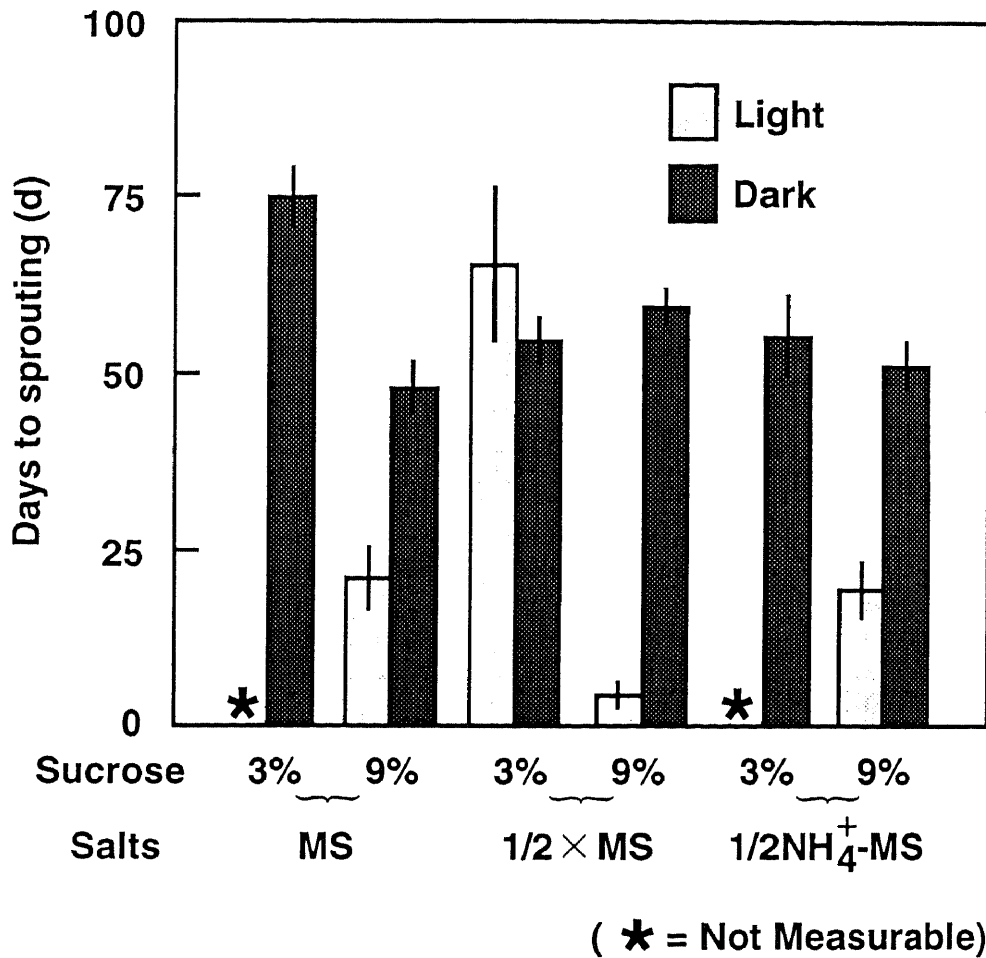


Fig. 2-22 Effect of medium composition and light condition on length for days to sprouting of potato tubers propagated in liquid shake culture.

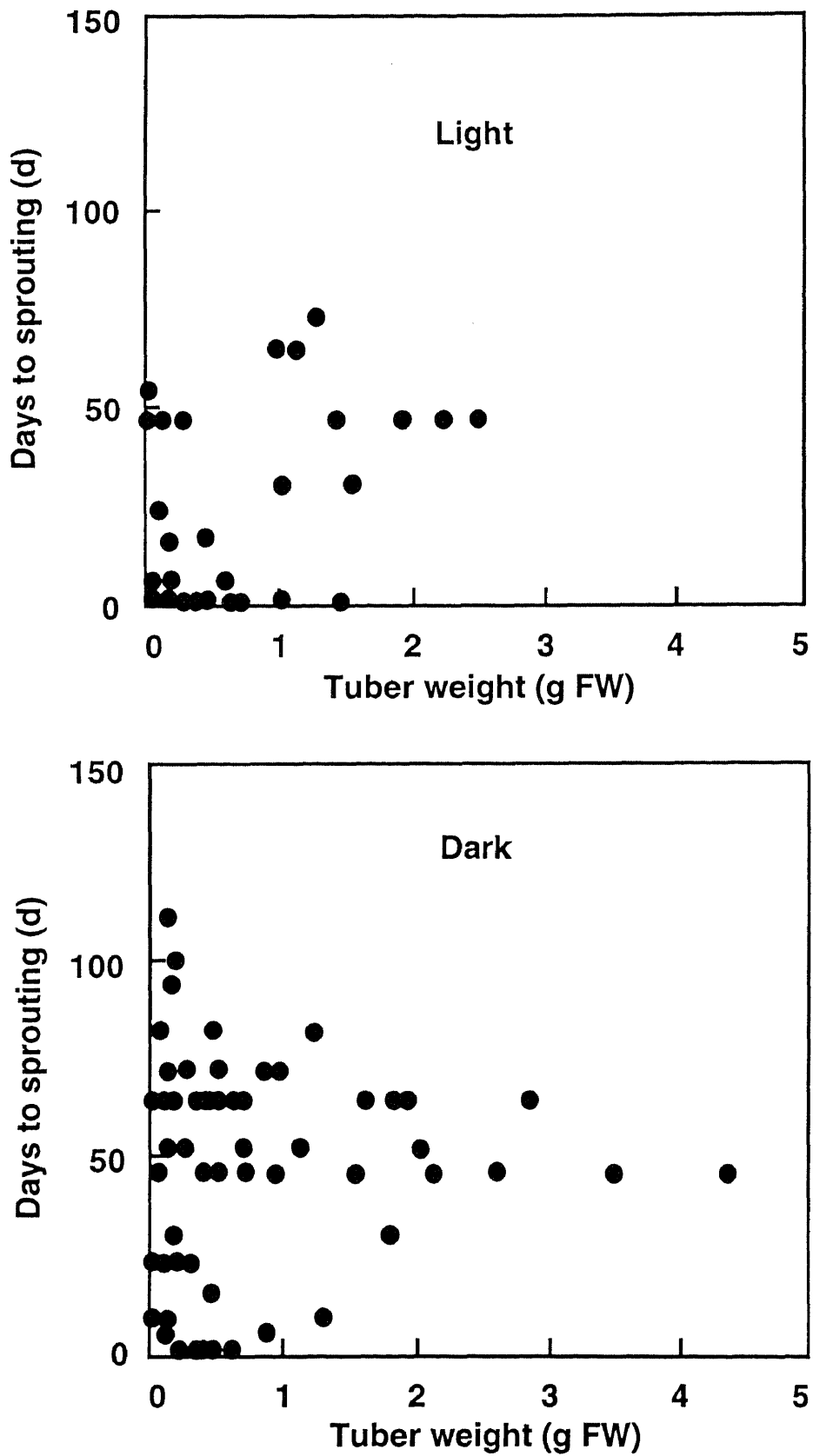


Fig. 2-23 Effect of light condition during Step 2 on relationships between tuber weight and length for days to sprouting.

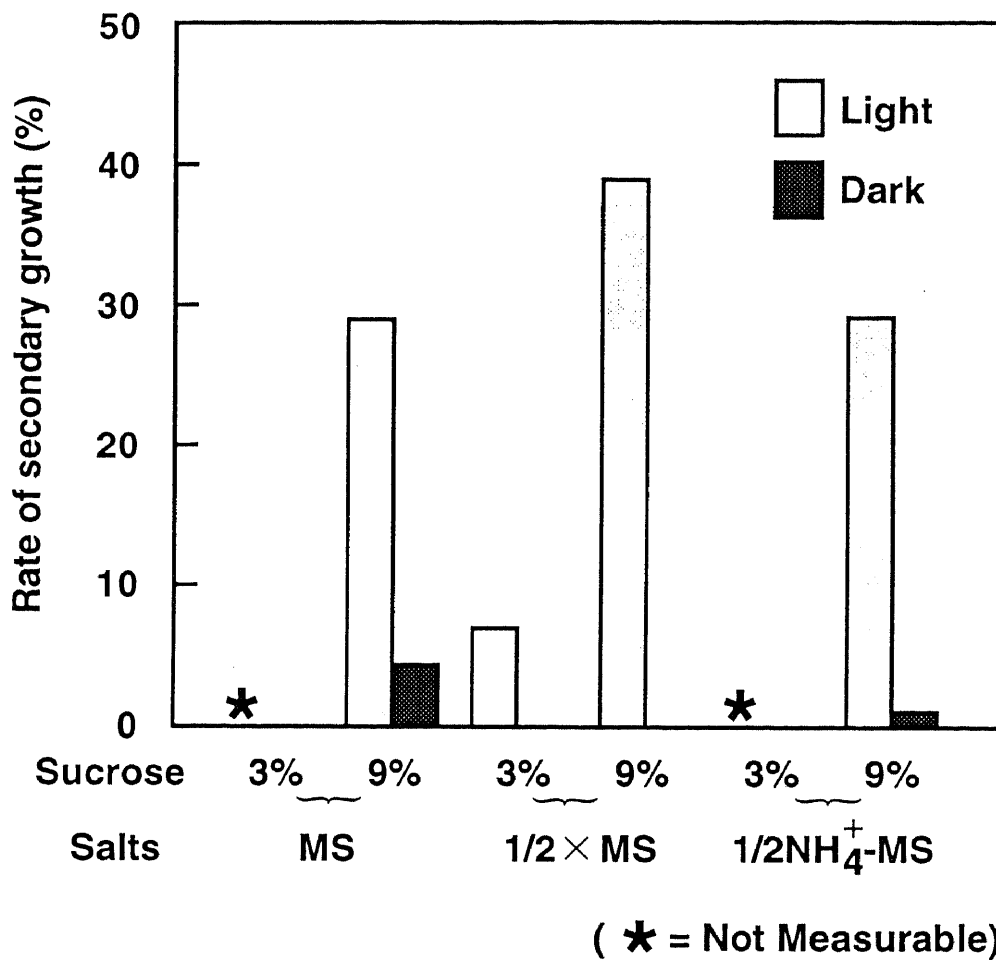


Fig. 2-24 Effect of medium composition and light condition on secondary growth of potato tubers propagated in liquid shake culture.

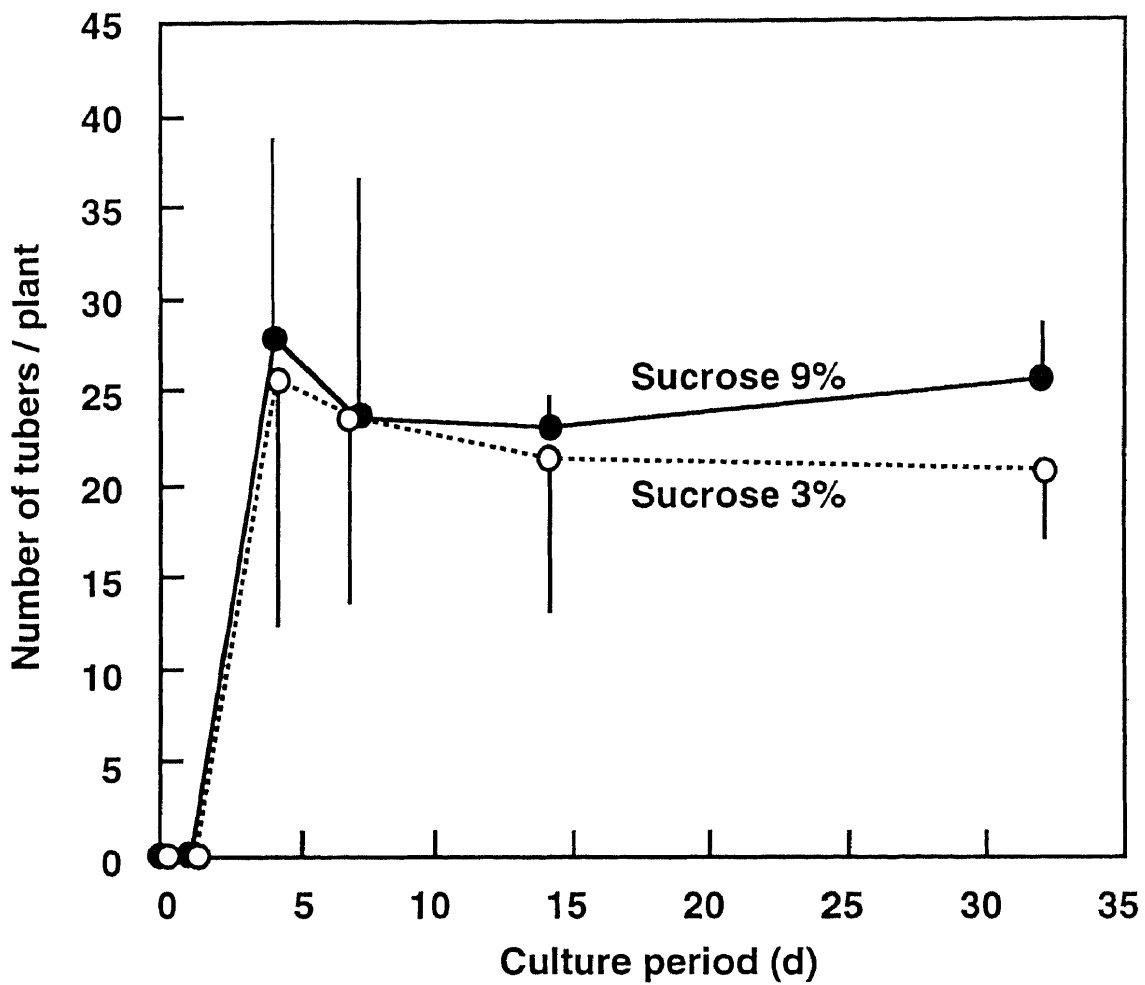


Fig. 2-25 Time course of number of tubers formed on potato shoot in liquid shake culture (Step 2).

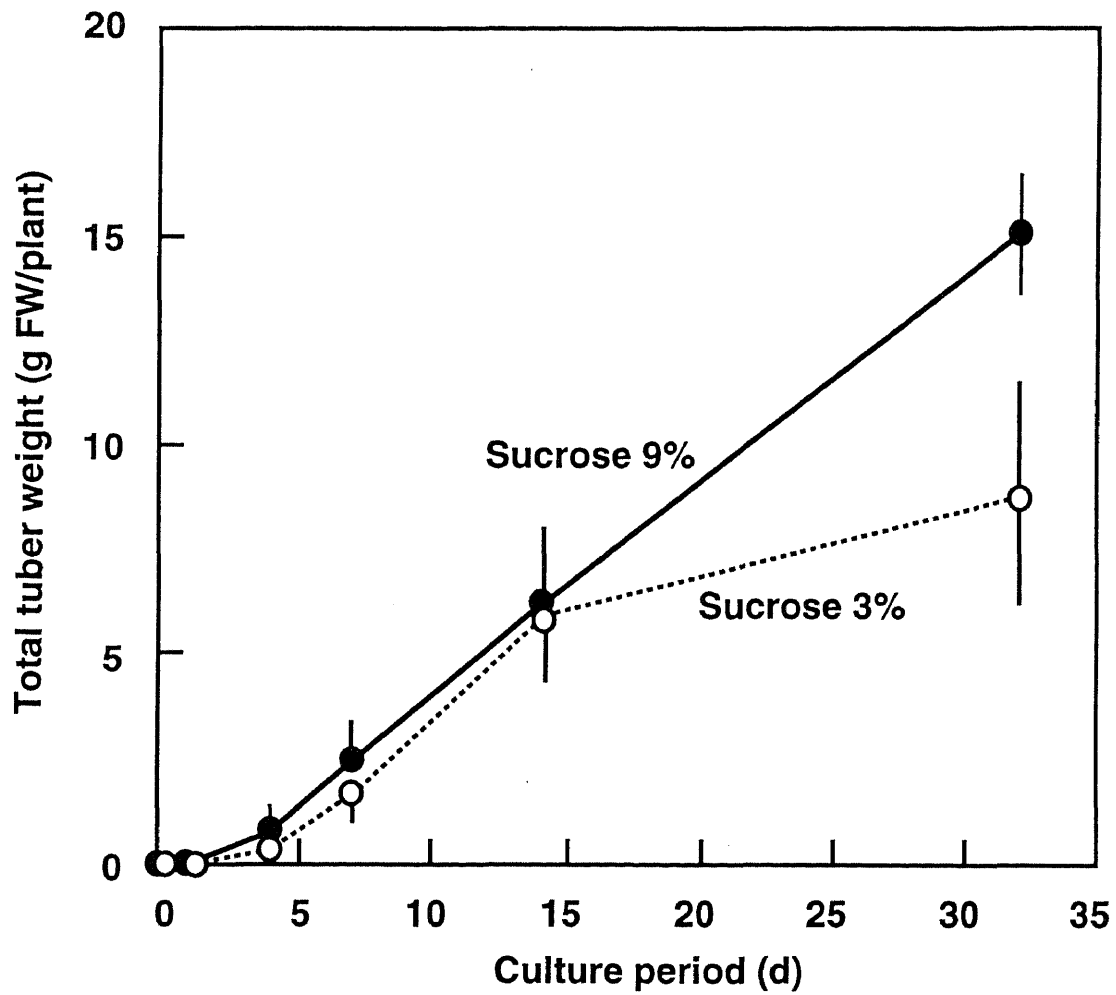


Fig. 2-26 Time course of development of potato tubers in liquid shake culture (Step 2).

(1) Total fresh weight of tubers

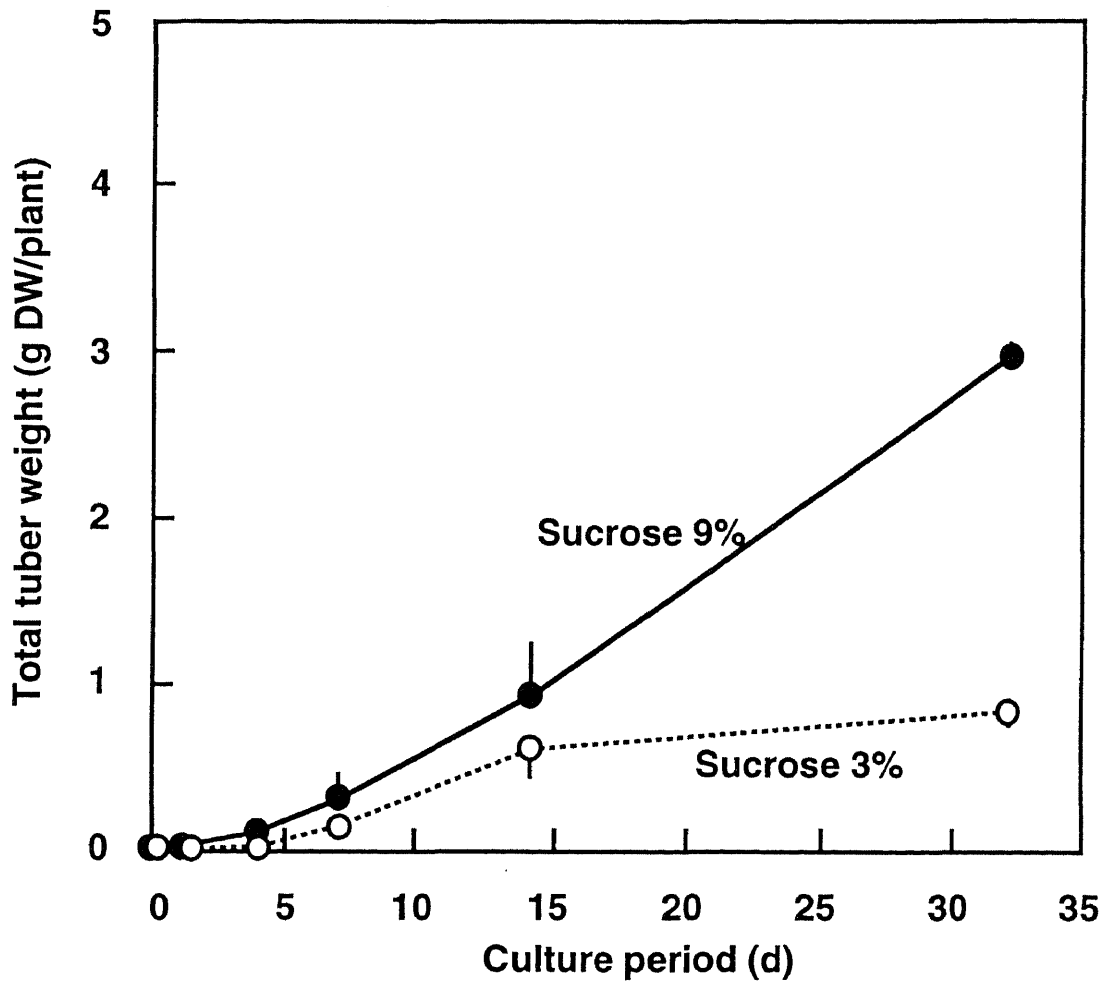


Fig. 2-27 Time course of development of potato tubers in liquid shake culture (Step 2).

(2) Total dry weight of tubers

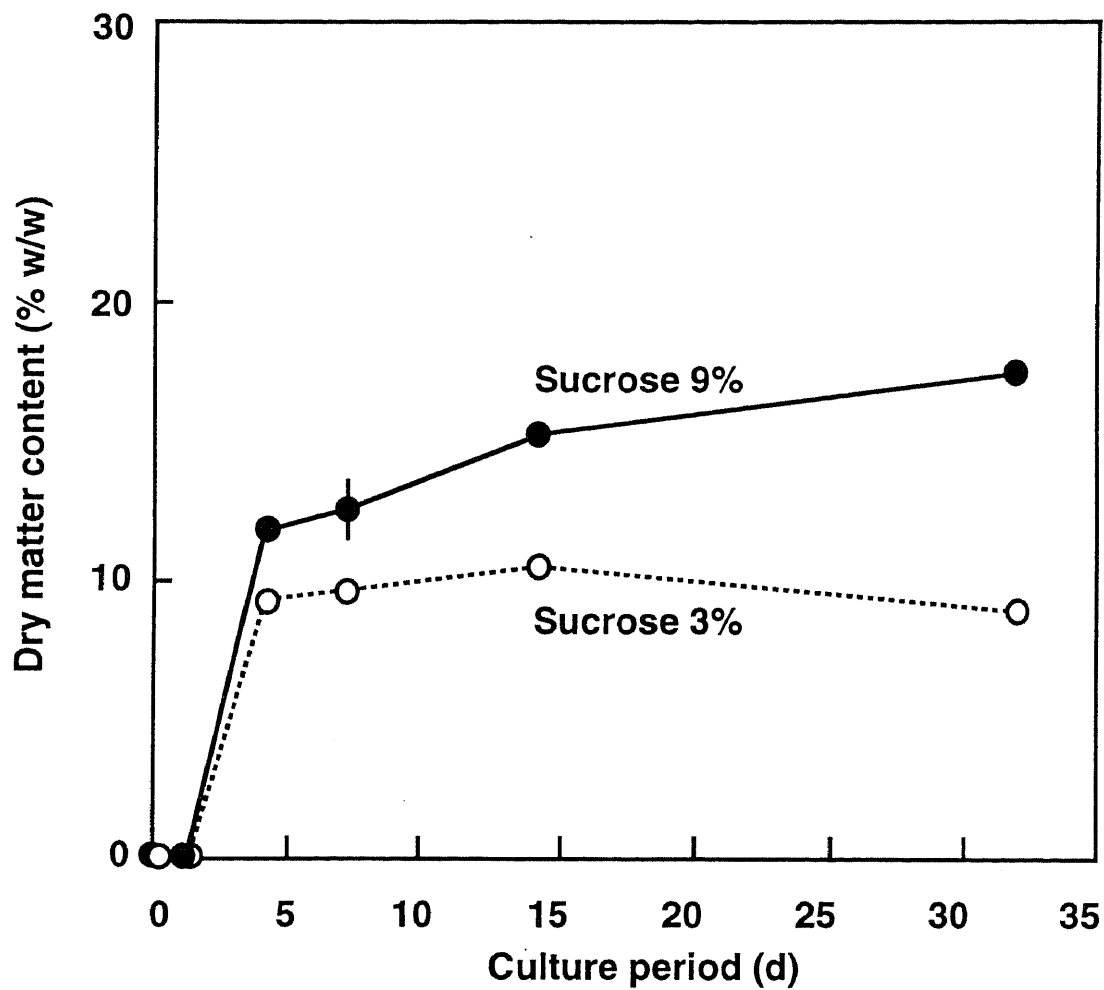


Fig. 2-28 Time course of dry matter content of potato tubers propagated in liquid shake culture (Step 2).

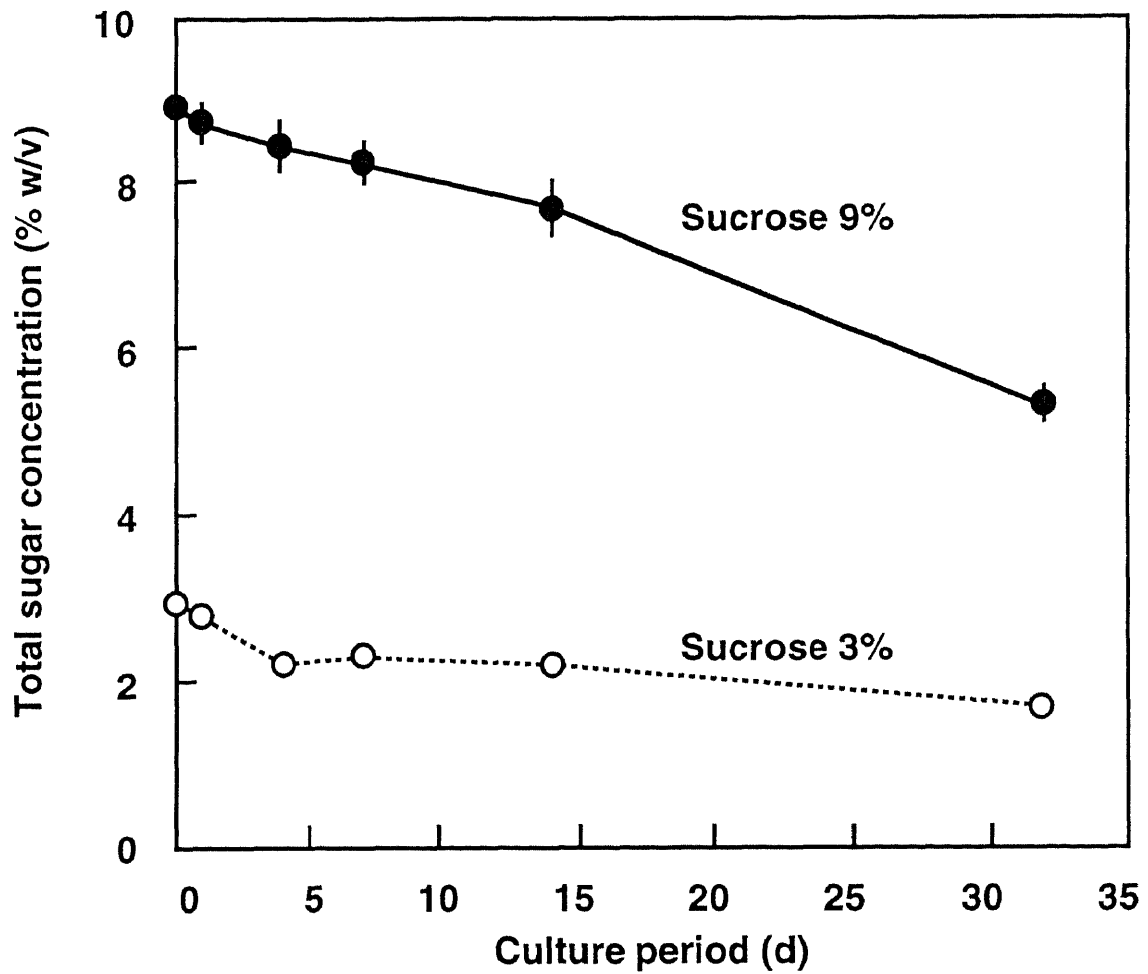


Fig. 2-29 Time course of total sugar concentration (sucrose + glucose + fructose) of liquid medium during Step 2.

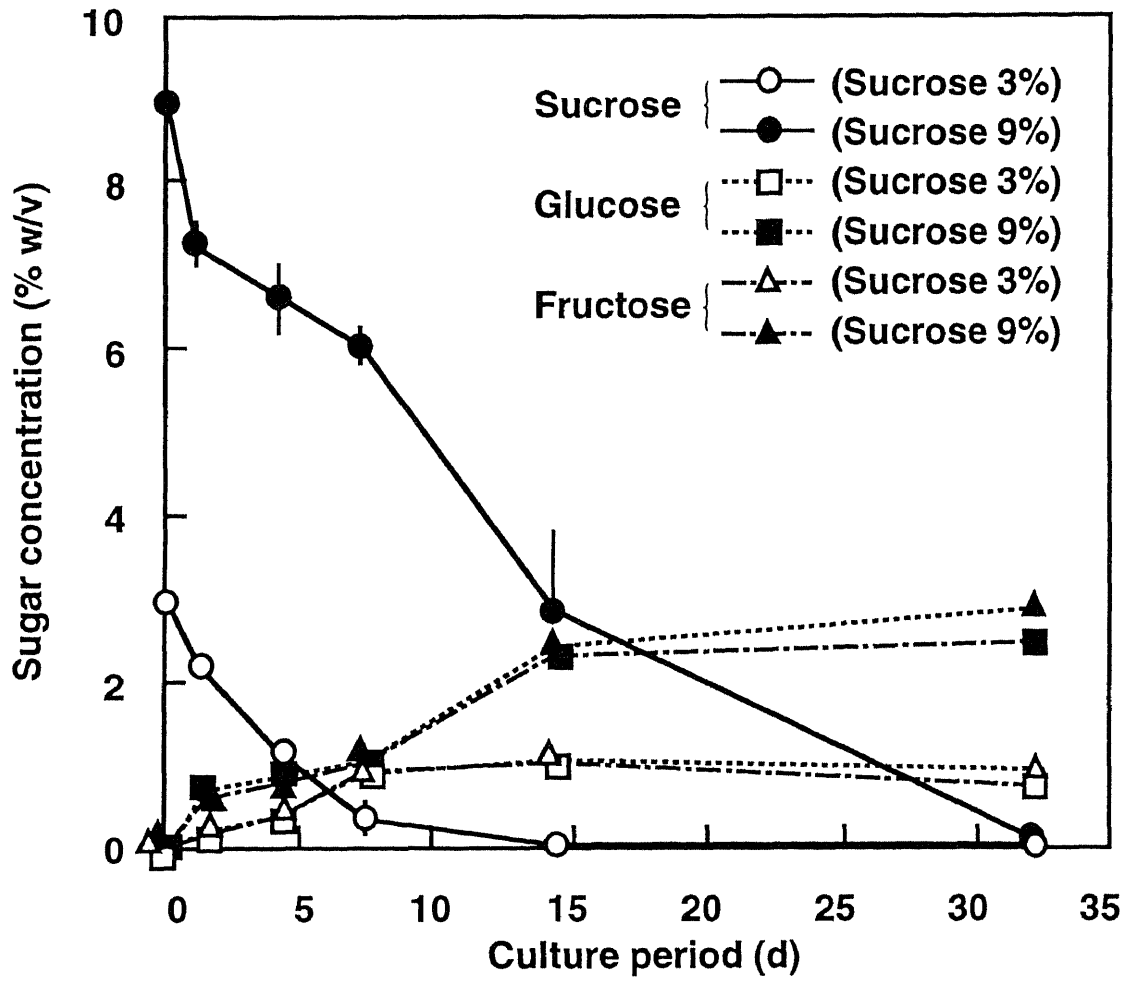


Fig. 2-30 Time course of sugar concentration (sucrose, glucose, fructose) of liquid medium during Step 2.

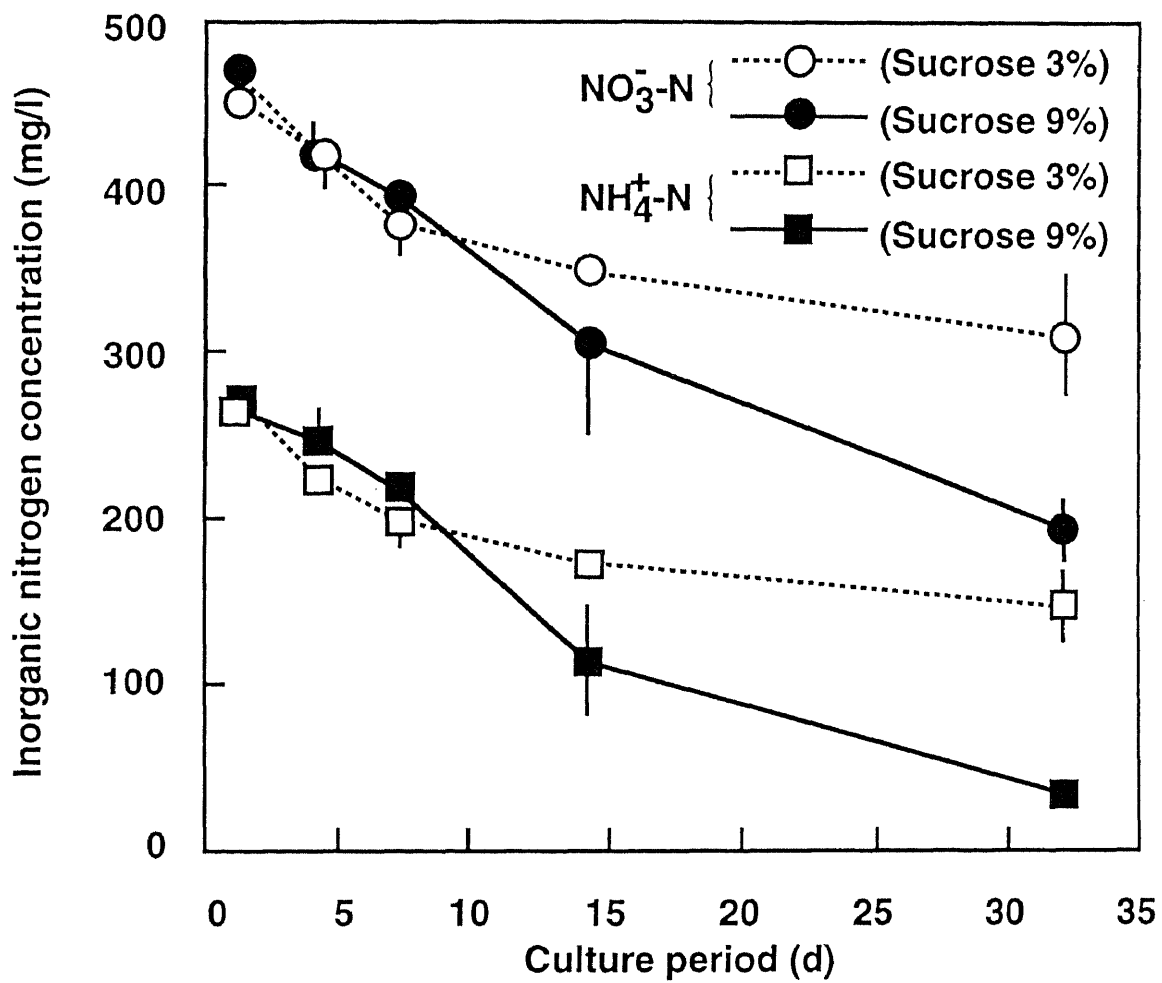


Fig. 2-31 Time course of inorganic nitrogen concentration of liquid medium during Step 2.

2-4 まとめ

継代培養に続くStep 1、Step 2という2段階の液体振盪培養法によって、ジャガイモの塊茎を大量増殖する可能性が明らかになった。一連の検討結果から、図2-3 2に示す培養スキームを決定した。

培養系を確立するためには、第一に、安定した継代培養系を確立することが重要である。継代培養系では、継代を重ねるに従って生育が低下したり、変異が起ったりしてはならない。このうち、変異については、節を移植する方法をとり、かつ、変異の原因となりやすいとされる2,4-Dなどを利用しないことによって、本培養法では問題となりにくい。増殖の安定性に関しては、植物体上の節位による生育の差が見られないことにより確かめることができた。

続くStep 1では、塊茎を形成させるための原基を数多く確保するため、生育や芽の形成が阻害されないような条件を選択する必要がある。また、Step 1で形成された芽のうちの1割程度にしか塊茎は形成されないので、Step 1でより多くの芽を得ておくことはきわめて重要である。検討の結果、継代培養と同じ組成の液体培地がStep 1の培養に適していることがわかった。高シュークロース濃度など塊茎形成に適した条件は、むしろ生育を阻害するので、この段階には用いるべきでなかった。塊茎形成を経時的に観察した結果、塊茎はStep 2開始後のごく短期間に全て誘導されること、従って、Step 1終了時の植物体の状態は塊茎形成に極めて大きく影響することがわかった。

Step 2では、培養初期を除いて、主として塊茎の肥大が行なわれた。このとき、塊茎の肥大に他の部分の生育が同時に必要とされるわけではなかった。従って、Step 2では、植物体の増殖を阻害するような条件（暗条件、高シュークロース濃度など）が選択されてよいことがわかった。少なくともシュークロース濃度は塊茎の肥大を左右し、その減少は、塊茎の肥大速度を低下させた。Step 2の培地中の糖濃度は塊茎の乾物率にも影響した。高い糖濃度は乾物率を高め、シュークロース9%条件では、圃場由来の塊茎とほぼ同程度の乾物率を有する塊茎が得られた。

また、種々の条件下で形成させた塊茎の性状を比較し、培養由来の塊茎の多くは保存可能で、かつ萌芽能を有していることを確かめた。しかし、低糖濃度で培養した塊茎は乾燥に弱いこと、また、明条件下で得られた塊茎では、培養後の塊茎の取り扱いや保存に注意が必要であるうえに二次生長しやすいことがわかった。これらの結果から、高糖濃度の培地中で暗条件下で形成させた塊茎を用いるのが適当と考えた。

決定された培養スキームは、本実験に用いた品種に適したものであり、実用のためには、目的とする品種に応じて条件を最適化する必要がある。しかし、塊茎誘導前に植物体をよく増殖させ、次いで、高糖濃度の培地を用いて暗条件下で塊茎を形成させるという方法は、静置培養と液体振盪培養という差があるもののEstrada et al.の報告⁵²⁾と同様であり、基本的には他の品種にも適用できるものと考えられる。

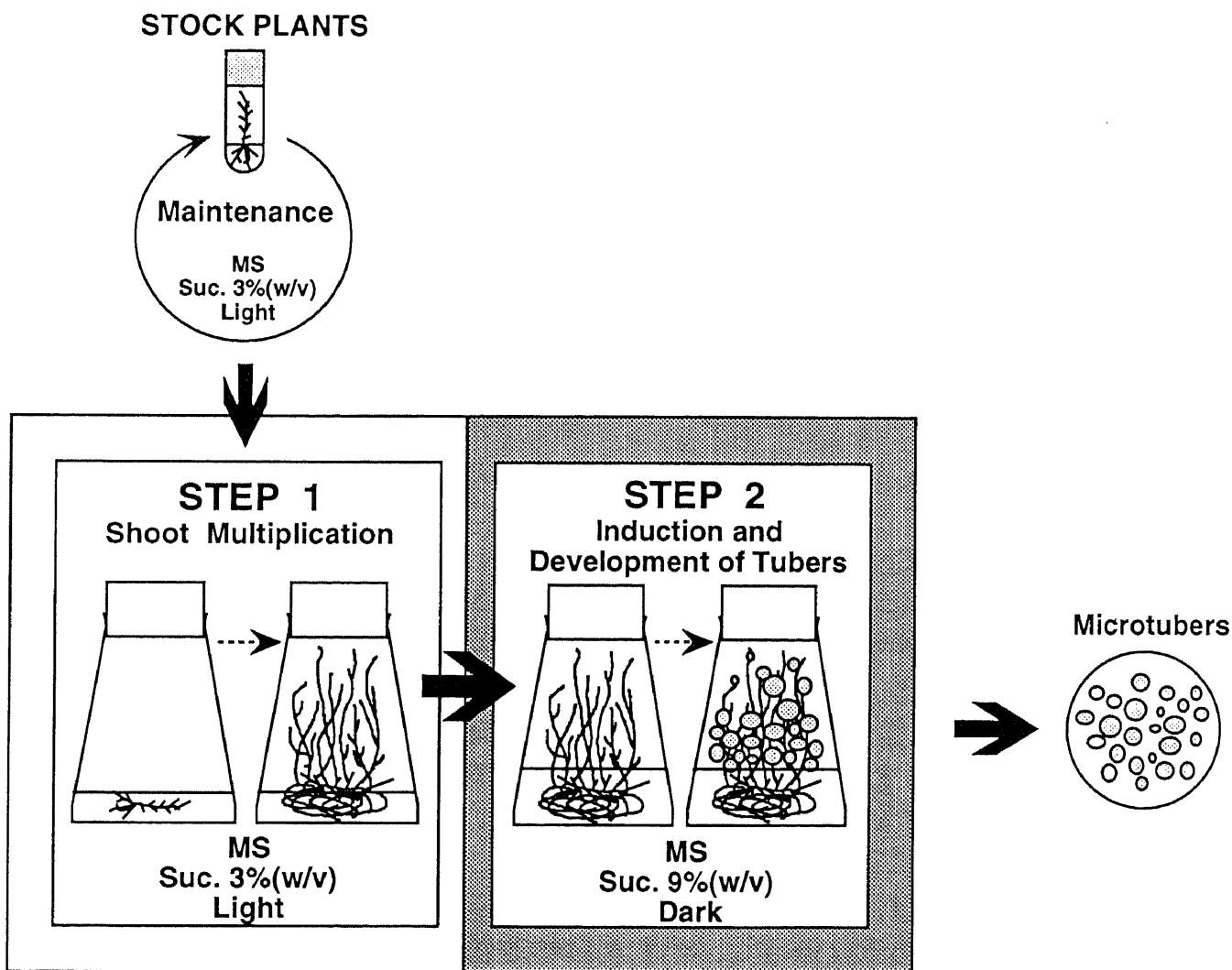


Fig. 2-32 Schematic diagram of rapid mass propagation of potato tubers by liquid shake culture.

第3章 小型培養槽を用いたジャガイモ塊茎の増殖法

3-1 はじめに

第2章の結果から、スケールアップの可能性の高い培養法が明らかになった。そこで、次に、この培養法を利用して培養槽へのスケールアップを試みた。培養では、保存が可能で、かつ、順化を必要とせずそのまま栽培に利用できる塊茎を、可能な限り多数生産することが望ましく、従って、必要最小限の大きさの塊茎を、培養容器内全体にわたって、数多く形成させることを目標として一連の検討を行った。

本培養法では、塊茎生産のために植物体をあらかじめ必ず存在させなければならないので、培養中の全植物体重に占める目的物（ここでは塊茎）の割合はどうしても低くなる。また、液体振盪培養における塊茎形成状況の観察から、Step 1で形成されていた芽の大部分では塊茎が誘導されないこと、および、塊茎の肥大は不均一で肥大の早い塊茎と遅い塊茎とが混在することがわかった。培養をスケールアップすると、植物体がより大きく生育するうえ、大量の基質が供給されることになるので、塊茎の分布や肥大の不均一性がより顕著に現れる可能性がある。また、培養槽内では、通常、培養中の植物の一部または全部が液体培地中に浸漬され続けることになり、このことが、液体振盪培養では見られないような現象を生じさせる可能性もある。当然のことながら、培養液中に浸漬された状態で塊茎を形成させた例はなかった。例えば、圃場栽培では、土壤中酸素濃度が20%、すなわち、大気中とほぼ同じ酸素濃度を下回るような条件では、塊茎の形成肥大が不良になるとされている。これに対し、培養液中という状態が塊茎形成にどのような影響を及ぼすのか、全く知られていなかった。

実験では、最初に、小型培養槽を使って塊茎形成状況を観察した。その結果、小型培養槽内における塊茎形成の不均一性が明らかとなった。これを解決しない限り、スケールアップは不可能であった。このとき、培養液面位置と塊茎形成との間になんらかの関係があることが明らかであったので、培地量を調節する効果について検討を行なった。その結果から、小型培養槽を用いた場合の培養条件を決定することに成功した。また、培養槽内における塊茎形成状況を経時的に観察し、その特徴を明らかにすることができた。さらに、培養効率を高めるための条件について考え、次いでそのための装置を試作し、その効果を確かめた。

3-2 実験材料および方法

3-2-1 実験材料

実験材料として、茎頂培養由来のジャガイモ無菌植物体を用いた。品種として、前章と同じユキジロを用いた。この植物体は、電子顕微鏡観察および免疫学的な検査によって、ウイルスフリーであることが確かめられている。継代時の培養条件は、前章と同じである。植物体は節ごとに切断し、これを培養槽に移植して培養を開始した。

3-2-2 培養槽

培養に用いた小型培養槽の概略を、図3-1に示した。特に断らない限り、ガラス製の小型培養槽（直径約20cm、高さ約35cm、全容積約8000ml）を用いた。培養槽には、多孔質のスパージャー（長さ約15cm）を用いて通気した。通気の無菌化は、孔径0.2 μ mの膜フィルターを通すことによって行なった。

一方、間欠的に培地液面を変化させた場合の影響を調べる目的（3-3-4-2）には、図3-2に示すシステムを試作し、培養を行なった。培養槽としては、直径約18cm、高さ約39cm、全容量約10000mlのガラス製のものを用いた。培養槽には、リングスパージャーを用いて通気した。培養槽は、ガラス製の培地貯留槽（容量約10000ml）とシリコンゴムチューブによって連結され、タイマーと連動したペリスタポンプによって、培養槽と培地貯留槽間で培地を移動させられるようにした。Step2では、このシステムを用い、培養液の全量を6時間おきに培養槽に送り、1時間後にすべて培地貯留槽に回収することを繰り返した。図3-3には、装置の写真を示した。Step2の培地（8000ml）のすべてを移動させるのに、このシステムでは約15分を要した。

3-2-3 基本培養条件

使用した培地、培養方法および培養条件は、すべて前章に示したものと同様にした。植物体の増殖（Step1）は、シュクロース3%としたホルモンフリーのMS培地を用いて行ない、塊茎の誘導および肥大（Step2）は、シュクロース9%としたホルモンフリーのMS培地を用いて行なった。

培養は、固形培地由来の植物体を節毎に切断し、その60節または100節を培養槽に無菌的に移植して開始した。Step1の培養は、明条件下で1ヵ月間行ない、次いで培地の全量を捨て、新たに調整したStep2用の培地を小型培養槽に入れ、さらに連続暗条件下で培養を続けた。培養中、通気量は、約0.1vvmとした。ただし、3-3-4-2の実験では、Step2の培養時は、培地量の変動に関わらず通気量を約800ml/minとした。

明条件下の培養は、蛍光管による約2.5W/m²の連続照明下で行なった。3-3-4-2の実験では、Step2の培養時は薄明（約0.9W/m²）条件であったが、他の実験では、暗条件下で培養を行なった。培養温度は、特に断らない限り、全ての培養期間を通じて25℃とした。

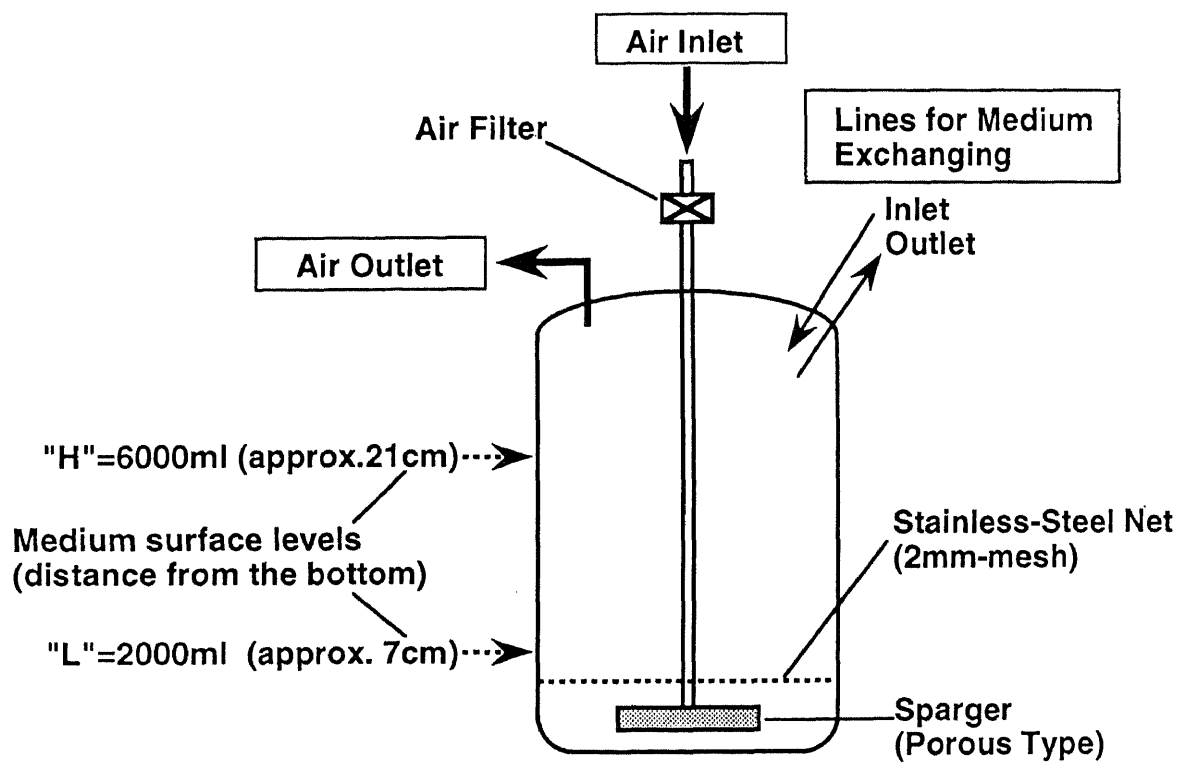


Fig. 3-1 Diagram of a jar fermentor used for mass propagation of potato tubers.

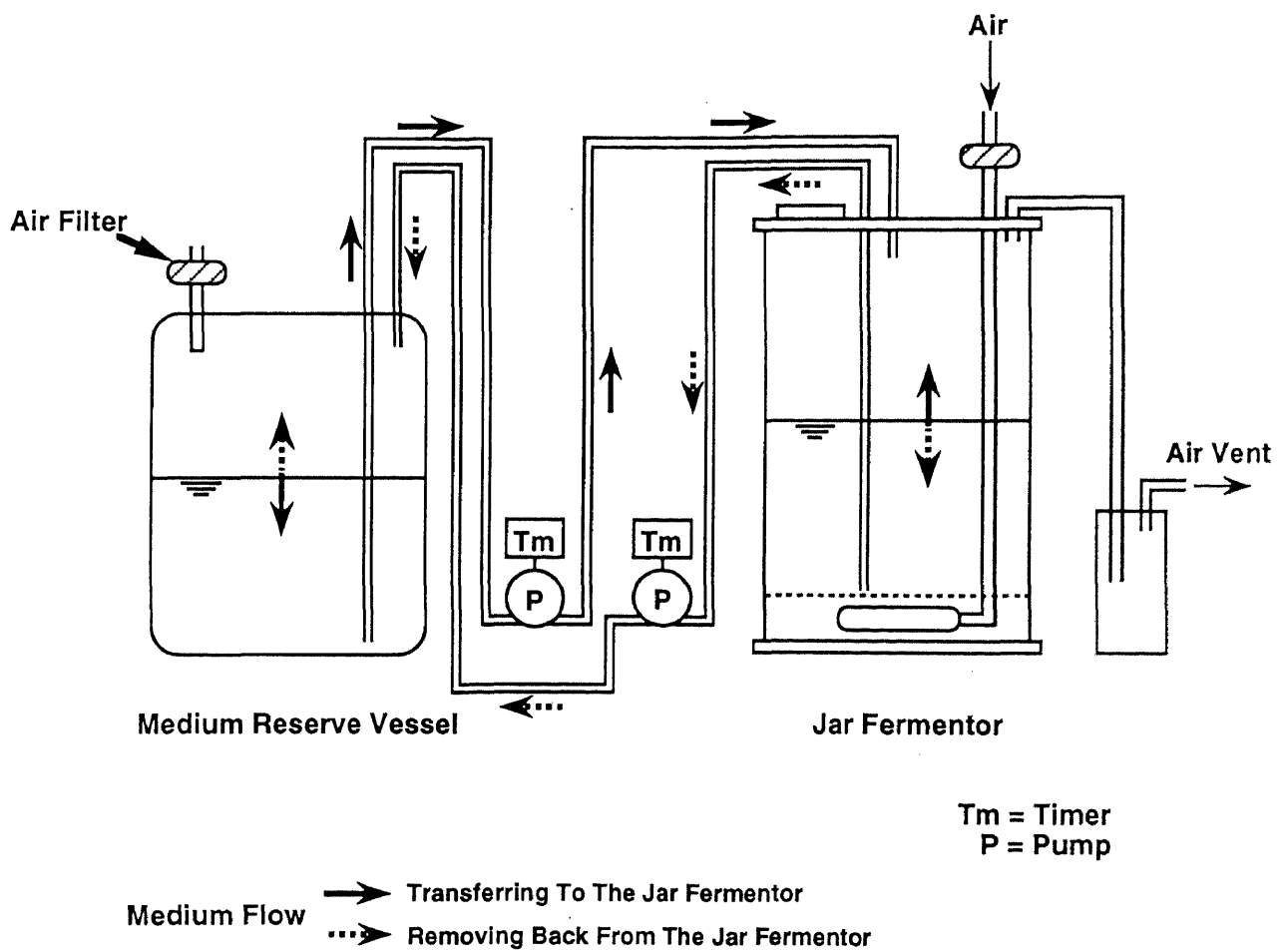


Fig. 3-2 Diagram of the system for the semi-continuous medium surface level control culture.

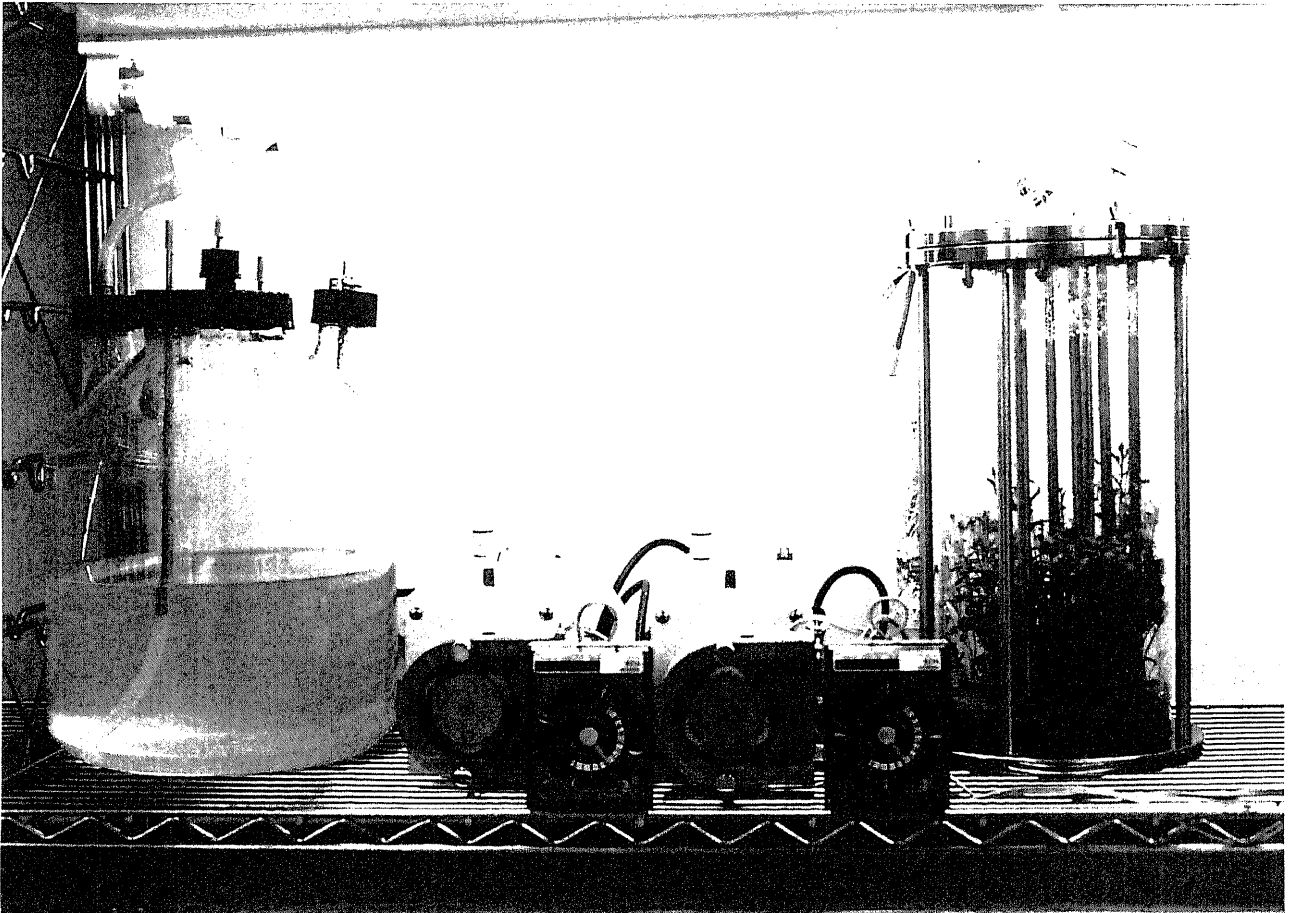


Fig. 3-3 System for the semi-continuous medium surface level control culture.

3-3 実験結果ならびに考察

3-3-1 小型培養槽内における塊茎形成

本研究が行われるまで、ジャガイモ塊茎の大量培養を小型培養槽へスケールアップする方法について報告はなかった。従って、まず、小型培養槽を用いて、以下に示す方法で培養を行ない、培養槽内における塊茎形成状況や塊茎形成能について観察した。条件は第2章で決定した通りとした。

節を含む切片60個を移植し、Step 1の培養を4週間行なった結果、節から植物体が伸長しかつ分枝して、液体振盪培養のStep 1と同様に培養槽を満たした。植物体の長さはStep 1終了時に15~20cmに達した。多くの頂芽および腋芽の形成が観察された。また、培地が褐変することもなかった。この培養期間中に塊茎が形成されることはなかった。

次いで、Step 2の培養を6週間行なった。結果、小型培養槽内でも塊茎が誘導され、肥大することが確認できた。培養終了時の塊茎形成状況を図3-4に示した。塊茎形成は、培地液面付近かそれよりも上部に存在した茎上のみ見られ、特に、培地液面付近にほとんどの塊茎が存在した。また、培地液面付近にのみ大型の塊茎が分布した。培養槽内に形成された塊茎は、比較的大型のものでも重さが2~3gものが多かったが、10g以上の塊茎も混在していた。すなわち、塊茎重のばらつきが著しかった。一方、培地中の植物体の多くは茎が太く葉も大きくなったが、水浸状になった。特に、根が顕著に発達した。なお、このように植物体が大きく生長しても、培養槽内に通気が滞ったりさらには植物の生育が阻害されているような部分は観察されなかった。これは、茎が下から上へと互いに平行してまっすぐに伸び、また、互いに密に絡み合うことがないため、培養槽下部で生じた気泡がそのまま移動でき、かつ、茎の間を比較的自由に培養液が流動できるためと考える。

塊茎の形成状況から、塊茎形成と肥大がともに培養液中で阻害される傾向にあることは明らかであった。仮に植物体の下部で塊茎がより多く誘導され肥大化する傾向があるとすれば、培養液中でこれらが阻害される結果、相対的に、培地液面付近に最も多くの塊茎が形成され、かつ肥大も進みやすいことになる。培養槽内における塊茎の不均一な分布はこのように説明できるものと考え、培養効率を高めるためには、この問題を解決することが不可欠であった。

以上の結果から、液体振盪培養と同様の培養条件下で、小型培養槽内でもジャガイモ塊茎が大量増殖される可能性を認めることができた。しかし、塊茎の形成、肥大ともにきわめて不均一におこることがわかった。これは、培養槽による培養では、液体振盪培養時に見られた問題(3-1参照)がさらに助長されることを意味している。このように、塊茎形成がむしろ物理的に制限される現象を、ホルモン添加や培地組成の変更など従来の組織培養法研究に用いられる手法で解決することは難しいと考えた。そこで、まず、各培養段階(Step 1、Step 2)で培地液面位置を変更して培養し、その影響を観察することにした。



Fig. 3-4 Tuberization in a jar fermenter after the medium was discarded.

**Arrow indicates the medium surface level.
Scale indicates 5 cm.**

3-3-2 培地液面の位置が塊茎形成に及ぼす影響

前項に示したように、培養槽内における塊茎形成と、培養液面との間に何らかの関係があることは明らかであった。そこで、各培養段階（Step 1、Step 2）で培地液面位置を変更して培養し、その影響を観察することにした。仮に、培養液中に塊茎を形成させることが不可能であるならば、スケールアップには独自の培養装置の開発が不可欠となる。

実験では、培地液面位置を、培地量によって変動させた。培養液量を6000mlとした場合、Step 1終了時（Step 2開始時）には茎の先端を除く大部分が培養液中に没し、その後植物体の伸長に伴って、気相中に存在する部分が増大した。一方、培地量を2000mlとした場合には、植物体の下部から約5cmを除く大部分を気相中に存在させて培養することができた。そこで、各Stepの培地量を2000mlまたは6000mlとして培養した場合の植物体の生育状況と塊茎形成の様子を観察した。

節を含む茎切片60個を移植し、Step 1の培地量を6000mlとして培養した場合（以下 [1-H] と示す）には2000mlとした場合（以下 [1-L] と示す）と比較して、より太い茎と大型の葉が得られた。しかし、培地中では、茎および葉の表面がわずかに水浸状となった。一方、いずれの場合にも、この培養段階では塊茎は形成されなかった。次いで、Step 2の培養条件に移したところ、少なくとも1週間以内に塊茎形成が培養槽外部からも観察された。5週間後に培養槽から植物体ごと取り出して塊茎形成と重量を測定した。その結果を図3-5に示した。

塊茎形成には、Step 1の培養条件が大きく影響を与えた。Step 1で培地中に浸漬させ続けた植物体をStep 2で気相中に移した場合（[1-H, 2-L] と略す）、明らかに生育が阻害された。塊茎は、Step 2の培地液面付近の気相中に偏って形成されたが、他の処理区と比較して塊茎数が少なかった。一方、[1-H] で培養した植物体をStep 2においても液相中で培養した場合（[1-H, 2-H] と略す）には、植物体の総重量は大きかった。しかし、塊茎は、やはりStep 2の培地液面付近に偏って存在し、塊茎数自体は[1-H, 2-L] とあまり変らなかった。少数ながら比較的大型の塊茎も形成されたため、総塊茎重は明らかに[1-H, 2-L] よりも増加したが、Step 1で植物体を気相中で培養しStep 2では液相中で培養した場合（[1-L, 2-H] と略す）に比較して、塊茎重は少なかった。すなわち、Step 1で培養液中に植物体を浸漬し続けた場合には、植物体自体はよく生育しても、以降の塊茎形成が比較的に起こりにくい状態になることがわかった。ただし、[1-H] の条件で培養した場合にも、液相中に存在した腋芽における塊茎形成能が完全に失われるわけではなかった。これに比較して、Step 1で植物体を気相中で培養し続けた場合には、塊茎形成が良好であった。特に、[1-L, 2-H] で最も塊茎形成が促進され、培養槽あたりの塊茎数が最大となった。この[1-L, 2-H] の条件では他と比較して約2倍の数の塊茎を形成した。これは、Step 1で気相中に植物体を存在させることによって、塊茎形成の起こりやすい芽が多くなることを意味している。

総塊茎重についても、[1-L, 2-H] の条件で最も大きく、[1-L, 2-L] の条件、すなわち、用いた培地量が最も少なかった場合と比較して約2倍であった。これは、Step 2開始時の状態が同じであるなら、培地に浸漬され続けていても、その植物体がより多くの基

質を利用できる条件でより塊茎の肥大がすすむことを示唆しているものとする。しかし、培養槽を用いて培養した場合、液体振盪培養の場合と違い、全く同じ培養液を用いたにかかわらず茎葉部や根の生育は比較的によく進んだ。本実験の場合、Step 1で気相中に植物体を増殖させた2つの処理区について全植物体重に対する塊茎重の割合（乾燥重あたり）を比較すると、Step 2で培地量を変更しても、[1-L,2-L]で約50.1%、[1-L,2-H]で約54.1%と顕著な差はなかった。すなわち、塊茎とその他の部分の重量の増加が同時に起っていた。これは、植物体に吸収された基質の一部が塊茎に蓄積されずにその他の部分の生育に費やされたことを意味する。液体振盪培養において観察されたように、塊茎の肥大は他の部位の生育とは独立に進行するので、今後、塊茎への物質の蓄積を促進し、より総塊茎重を増大させる余地があるものとする。

図3-6には、塊茎の形成位置と培地液面位置の関係を示した。培養槽内における塊茎の分布を観察した結果、いずれの処理区でも、培地液面付近でのみ塊茎形成と肥大が促進され、特に培地液面付近の気相中には、いずれの処理区でも培養槽内で最も大型の塊茎が形成されていた。一方、培地液面からの距離が増すと塊茎数は急激に減少した。塊茎重も距離とともに減少し、培地液面から遠ざかると、特に培地中では、小型の塊茎しか形成されなかった。特に、[1-H,2-H]においては、培地液面付近を除いて培地中には全く塊茎が形成されなかった。これに対して、[1-L,2-H]においては培地中にも塊茎が形成され、この処理区における大幅な塊茎数の増大の一因は、培養液中における塊茎形成が可能になったことによるものであることがわかった。

図3-7には、各処理区における塊茎の重量分布を示した。得られた塊茎の重量は、大型のものでは10gを超えたが、2g以上の比較的大型の塊茎は、いずれの処理区でも培地液面付近、特に液面の直上に形成されたものであった。また、いずれの処理区でも、塊茎の重量は大きくばらついた。例として、図3-8に[1-H,2-H]で形成された塊茎を示した。このようなばらつきは、前述のように、同じ培養条件下にあっても個々の塊茎の肥大速度は均一にならないということに加え、塊茎の肥大が培地液面付近の狭い空間でしか促進されないことによるものとする。塊茎数が最大であった[1-L,2-H]においても、そのほとんどは0.2g以下のものであり、塊茎数の増大は、このような小型の塊茎が多く形成されたことによるものであった。

液体培地中に塊茎を形成させ得ることは、本実験によって、初めて確認できた。小型培養槽を用いた培養では、塊茎形成が液体培地液面位置によって変動し、さらに、塊茎誘導前の植物体の状態がのちの塊茎形成に大きな影響を与えた。すなわち、気相中に茎を伸長させることによって、塊茎形成されやすい状態の芽が得られ、そのような芽では、Step 2で液相中に移しても塊茎が誘導された。従って、培養槽を用いてジャガイモ塊茎を大量増殖するには、培養段階に応じた培養液面の制御が不可欠であり、この制御によって、塊茎生産性を向上できることがわかった。一連の結果より、小型培養槽を用いたジャガイモ塊茎の大量培養法を図3-9のように決定した。

小型培養槽を用いたジャガイモ塊茎の生産には、液体振盪培養の場合と同様に、Step 1の培養諸条件を最適化しなければならないということがわかったが、しかし、培養において塊茎誘導前のどのような培養条件が後の塊茎形成に重大な影響を与えるのかという問題については、これまでに報告がなく、また、本実験においても、この問題について

明らかにすることはできなかつた。また、培養条件によって改善されるとはいえ、培養液中で塊茎形成が抑制され、同時に塊茎肥大も低下するという理由について、不明のままであり、これらの問題について今後さらに検討が必要である。

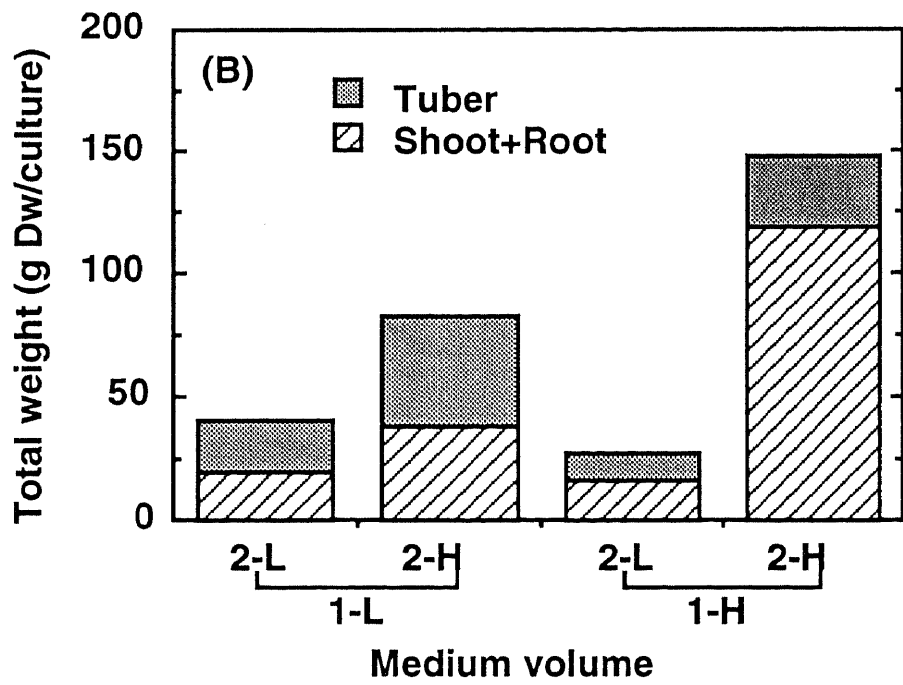
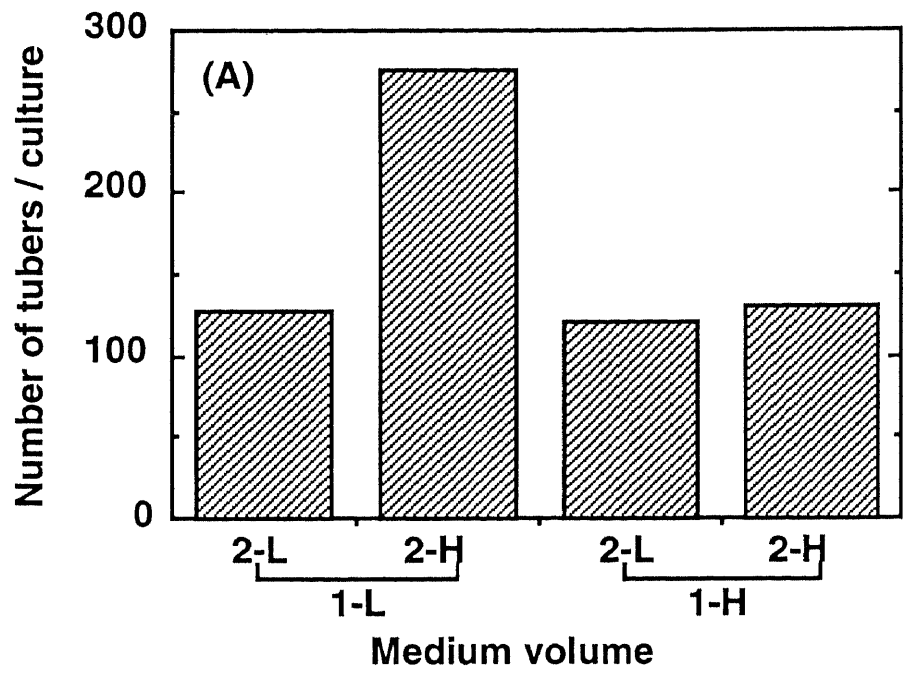


Fig. 3-5 Effects of medium surface level control on the number and total weight of tubers propagated in a jar fermentor.

(A) Number of tubers , (B) Total dry weight

L*, H* = Medium surface level at the end of the step 2

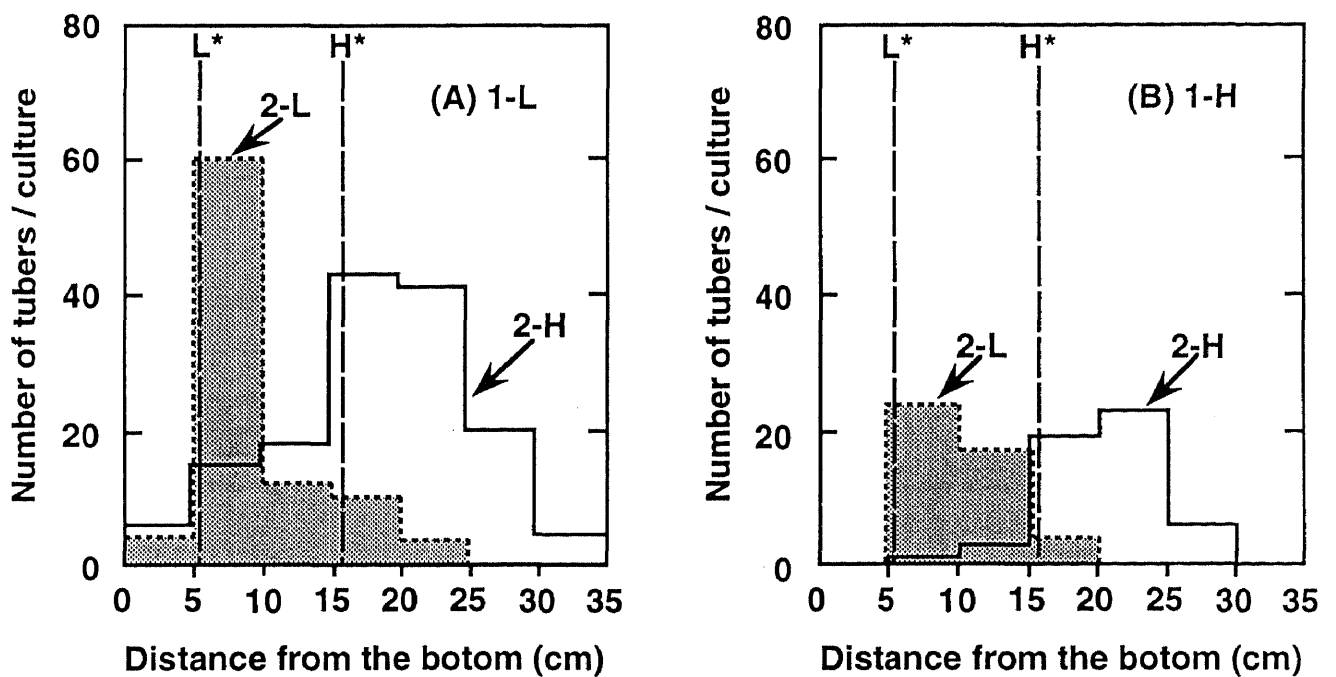


Fig. 3-6 Effect of medium surface level on vertical distribution of tubers in the jar fermentor.

The medium surface level at the end of Step 2 are shown by broken lines. The number of tubers in a vertical range of every 5 cm was counted.

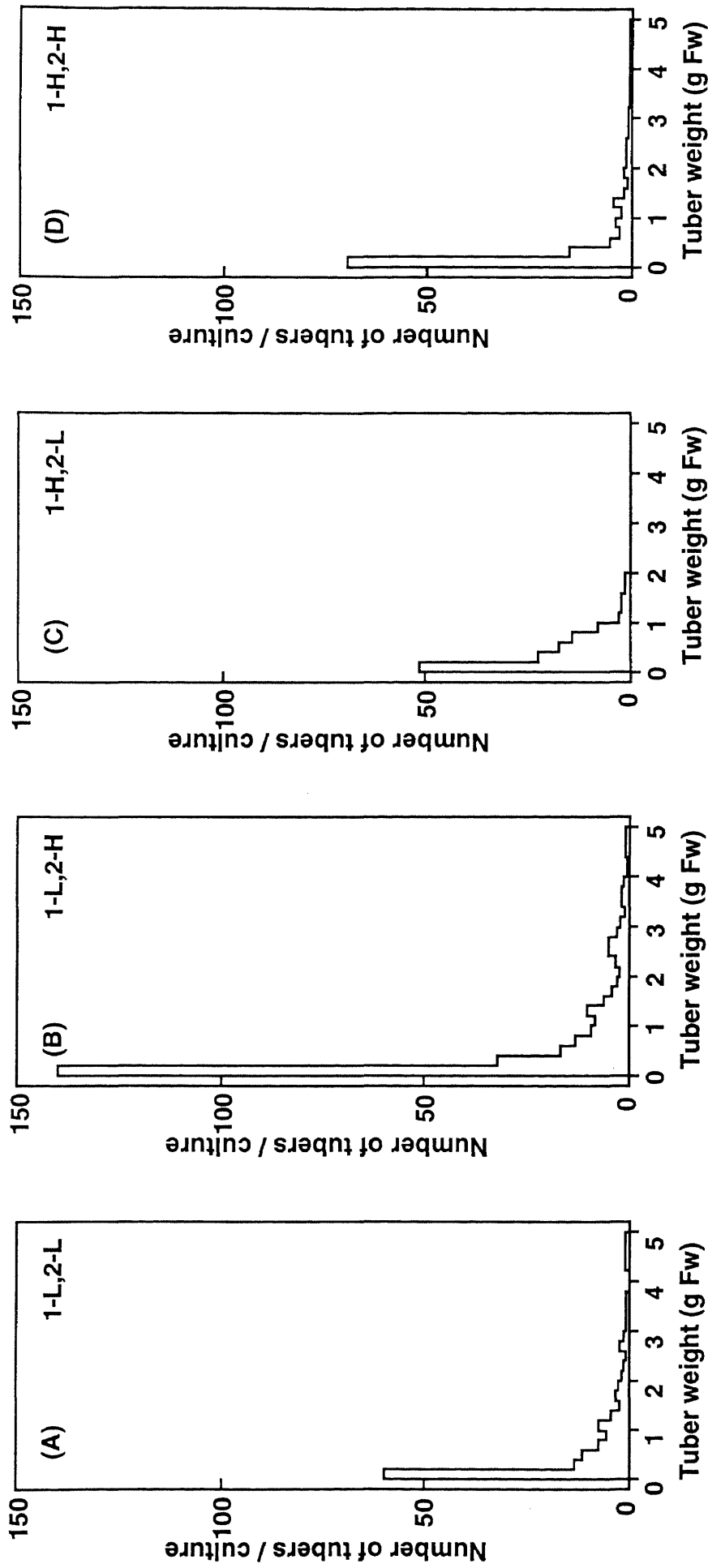


Fig. 3-7 Effect of medium surface level control on weight distribution of tubers propagated in the jar fermentor.

Tubers weighing less than 5 g (FW) are shown.

Bars indicate mean number of tubers at every 0.2 g (FW).

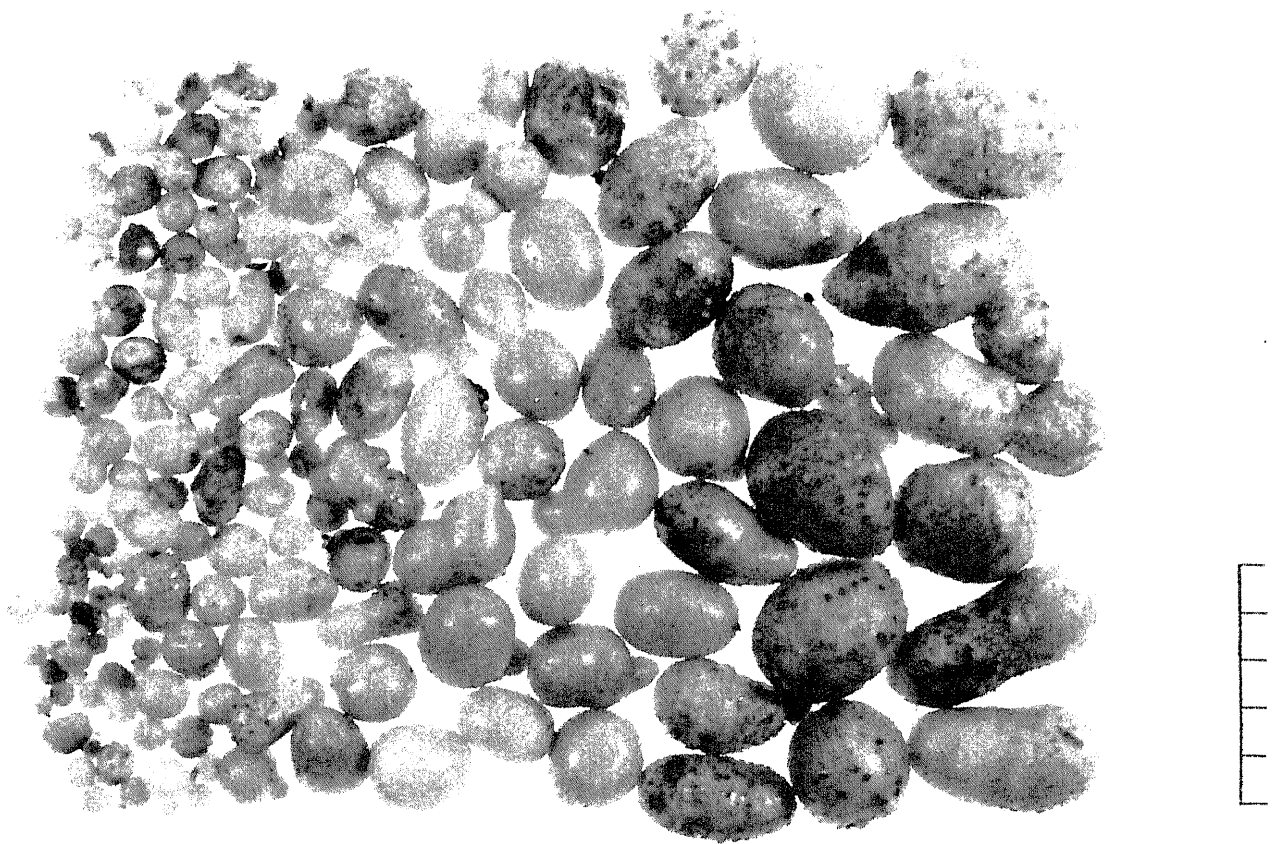


Fig. 3-8 Tubers propagated in a jar fermentor.

**Tubers propagated in [1-H,2-H] jar fermentor are shown.
Scale indicates 5 cm.**

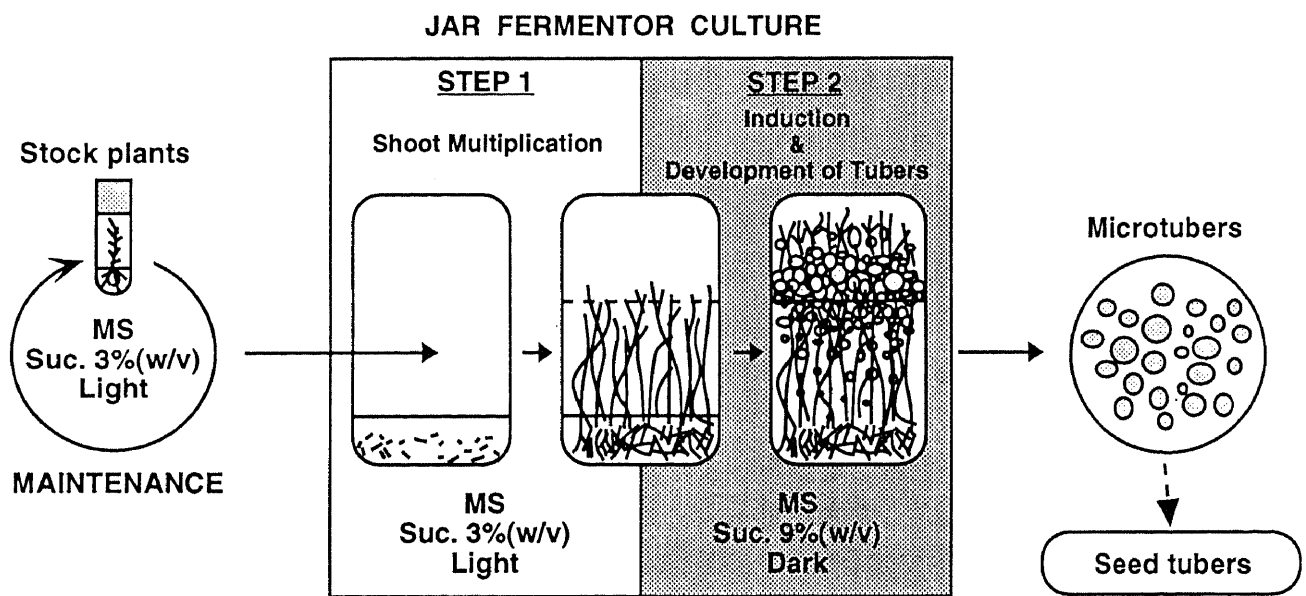


Fig. 3-9 Diagram of the culture scheme for the mass propagation of potato tubers in a jar fermentor.

3-3-3 小型培養槽内における塊茎形成の経時変化

前項で決定した条件による、小型培養槽における塊茎形成の様子を経時的に観察した。ただし、Step 1の培養は2000mlの培地を用い、節を含む茎切片100個を移植してから4週間行ない、Step 2の培養は6000mlの培地を用いて10週間まで行なった。以下は、Step 2を開始した時点をもととし、以降、2、6、10週間目に各2基ずつ培養を中止し、培養物を取り出して塊茎形成状況等を観察した結果を示している。

Step 2の培養開始時に、植物体の大きさは、15~20 cmであった。培養開始後、少なくとも1週間以内に、塊茎の形成が観察できた。植物体自体が生育するとともに、塊茎も肥大した。このときの塊茎数および総塊茎重、植物体重の経時変化を図3-10に示した。塊茎は、Step 2の培養開始後少なくとも2週間以内にすべて誘導され、その後は数の増加はなかった。この培養開始後の比較的早い時期に塊茎数が決定される現象は、液体振盪培養の場合と同様であり(2-3-3-3参照)、このことから、培養槽でもStep 1終了時における植物体の状態がきわめて重要であることが確認できた。なお、別に繰り返した培養の結果、培養槽あたり形成される塊茎数は 223 ± 29 ($n=16$)個であり、一方、培養槽あたりの芽の数は 1670 ± 216 ($n=3$)個であった。すなわち、液体振盪培養の場合よりも全芽数に対する塊茎数の割合は大きいものの、やはり大多数の芽で塊茎が形成されなかった。一方、総塊茎重は、培養期間を通じてほぼ一定の速度で増加することがわかった。これに対して、茎葉部の重量は、培養6週間までは緩やかに増加したのにかかわらず、その後急増した。すなわち、培養が長期化すると、全植物体重に占める塊茎重の割合が低下した。

塊茎の大きさは、培養期間を通じて大きくばらついたままであった。図3-11には、各培養期間における塊茎の重量分布を示した。10週間の培養で最大12 gの塊茎が得られ、また、培養が長期化するにつれて小型の塊茎の占める割合が減少し、徐々にではあるが、全体として肥大が進んでいることがわかる。しかし、塊茎のうちの半数近くが、10週間の培養を行なっても、0.5 gに満たない小型のままであった。すなわち、塊茎の肥大はきわめて不均一に起っていた。この肥大の不均一さには、明らかに、培地液面のみで肥大が促進され逆に培地中で肥大が進みにくいという現象が関係している。しかし、長期間培養すると、培地中に形成された塊茎でも少数ながら数gにまで肥大するものが認められ(図3-12参照)、従って、培養液中に形成された塊茎も、やはり不均一に肥大していることがわかった。

以上のことから、培養槽を用いた塊茎の大量増殖は、液体振盪培養の場合と類似した形でおこることがわかった。しかし、液体振盪培養の場合に比較して植物体の生育がすすむことから、植物に吸収された基質の塊茎への分配率を高められれば、さらに塊茎の肥大を高められるものと考えられる。

本実験系では、塊茎の形成されない芽、形成初期の塊茎、塊茎が形成されない芽、肥大が進む塊茎、肥大の進まない塊茎、などが、1回の培養で大量に得られるという利点があり、塊茎形成に関する植物生理学的研究にとってもきわめて有用であると考えられる。

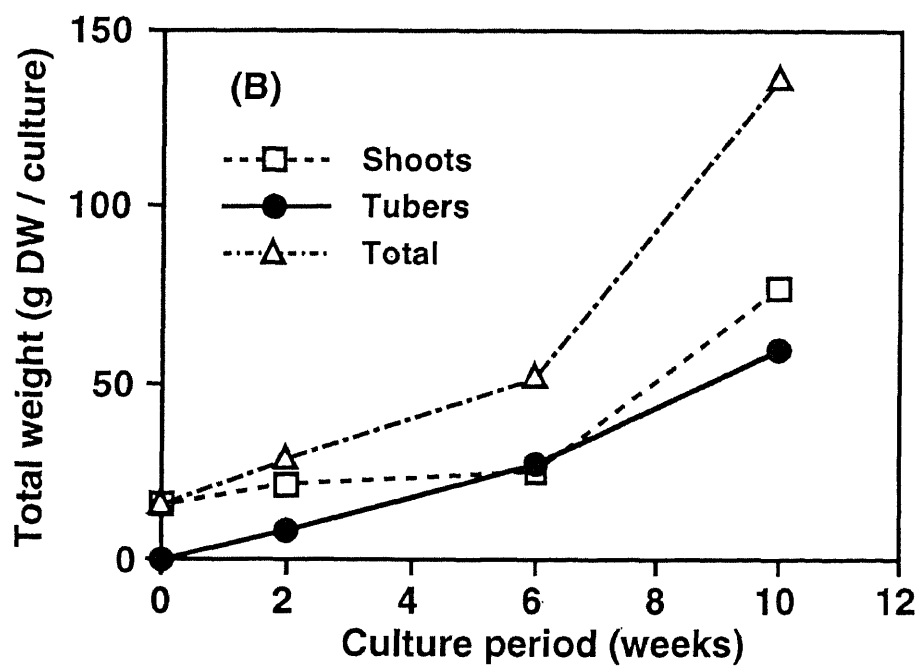
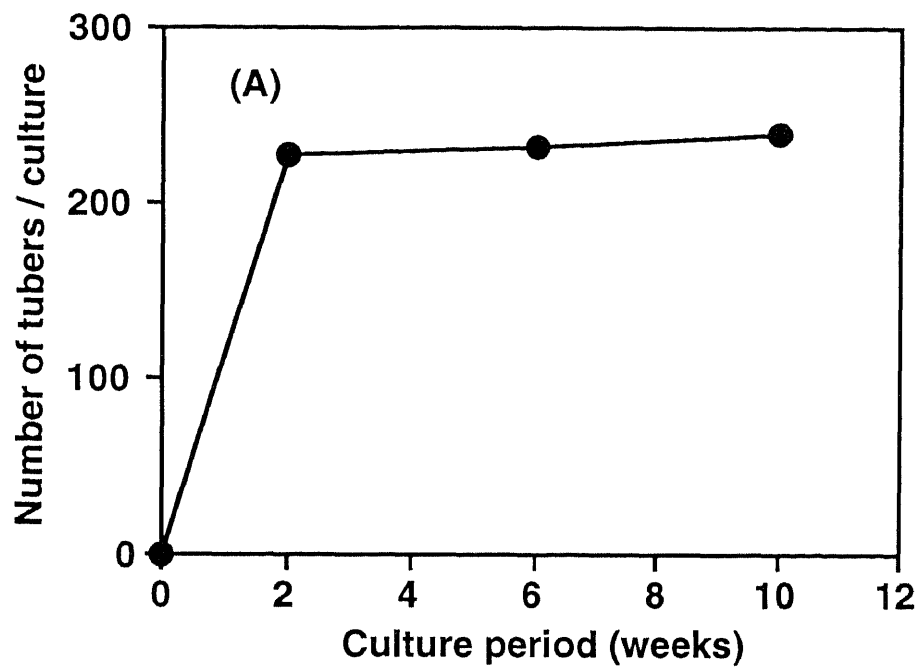


Fig. 3-10 Time course of tuberization of potatoes in the jar fermentor.

(A) Number of tubers, (B) Total dry weight

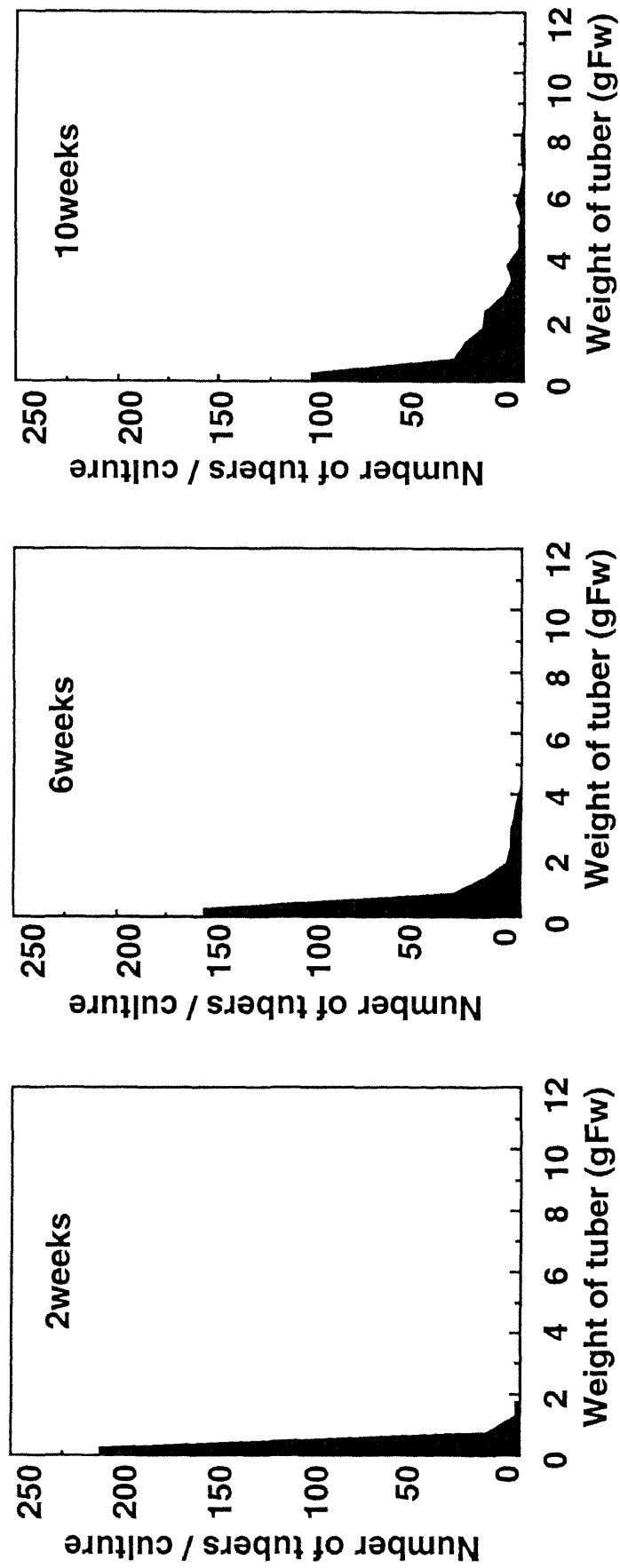


Fig. 3-11 Time course of the weight distribution of tubers in the jar fermentor.

Each figure represents the weight distribution of every 4 weeks of Step 2. The average number of every 0.5 g (FW) of tubers is indicated by the black area of each figure.

3-3-4 小型培養槽内における塊茎形成促進法

ジャガイモ塊茎を小型培養槽を用いて大量培養することは可能であったが、培養効率を高めるためには、必要最小限の大きさの塊茎を、培養槽内全体にわたって、数多く形成させることが必要である。また、培養液面位置を調節しても、培養液面付近を中心として不均一に塊茎形成と肥大が促進される問題を解決することはできず、また、塊茎の肥大をさらに促進する余地も残っていた。そこで、さらにStep 2の培養条件を変更して塊茎形成の変化を観察した。

3-3-4-1 低温の影響

一般に、塊茎形成は、短日、低温（一般に15~16℃以上）、低窒素などの条件によって体内のC/N比が増大し、これにより促進されると言われる。このうち、本研究では、塊茎の生産性や得られた塊茎の性状について検討した結果、連続暗+高糖濃度条件を選択した。低温については、むしろ塊茎形成数を減少させる場合も指摘されているうえ、組織培養法を用いたジャガイモ塊茎形成の報告では意見が分れている⁴⁸⁾。そこで、本実験では、まず、塊茎生産性への低温の影響について検討した。

実験では、Step 2の培養温度を17℃または25℃とした。処理区として、Step 2の最初から一貫して17℃で培養した場合、最初の2週間のみ17℃で培養し以降は25℃とした場合、および、一貫して25℃で培養した場合（対照区）の3つを設けた。

前項と同様に、節を含む茎切片100個を移植してStep 1の培養を開始し、次いでStep 2の培養を6週間行なった結果、一貫して17℃で培養した場合には、塊茎数は、対照区の約70%に減少した。この処理区における総塊茎重の減少はさらに著しく、対照区の約23%（乾燥重あたり）であった。培養開始後2週間のみ17℃で培養した場合には、塊茎数は一貫して17℃で培養した場合と変らなかったが、総塊茎重は対照区の約44%にまで回復した。この結果から、低温が塊茎形成と肥大のいずれをも阻害することがわかった。同時に、本培養系では、塊茎の誘導と肥大とを別々に調整できることが明かとなった。

17℃で培養し続けた場合、得られた塊茎の中には大型のものは見られなかった。また、培養槽内における塊茎の分布が大きく変化した。図3-1 2には、培養終了時の対照区の塊茎形成状況を、図3-1 3には、連続して17℃で培養した場合の塊茎形成状況を示した。対照区では、培養液面付近の気相中に大型の塊茎のほとんどが形成され、一方、培養液中に観察された塊茎は、ほとんどが小型であった。これに対し、17℃で培養した場合には、培養液中における肥大が対照区に比べ全体的に促進された。塊茎形成が最も促進されたのはやはり培養液面付近であったが、対照区に比べ、大型の塊茎は形成されなかった。結果、対照区と比較して、小型で均一な大きさの塊茎を得ることができた。

以上の結果から、低温条件は、塊茎数や総塊茎重を減少させるため、塊茎生産上は不利であることがわかった。しかし、小型ではあるが均一な大きさの塊茎が得られるという興味深い現象が認められた。この原因は不明であるが、今後、より均一な形質の塊茎を効率良く生産する技術を構築するうえで重要な糸口になるものと考えられる。

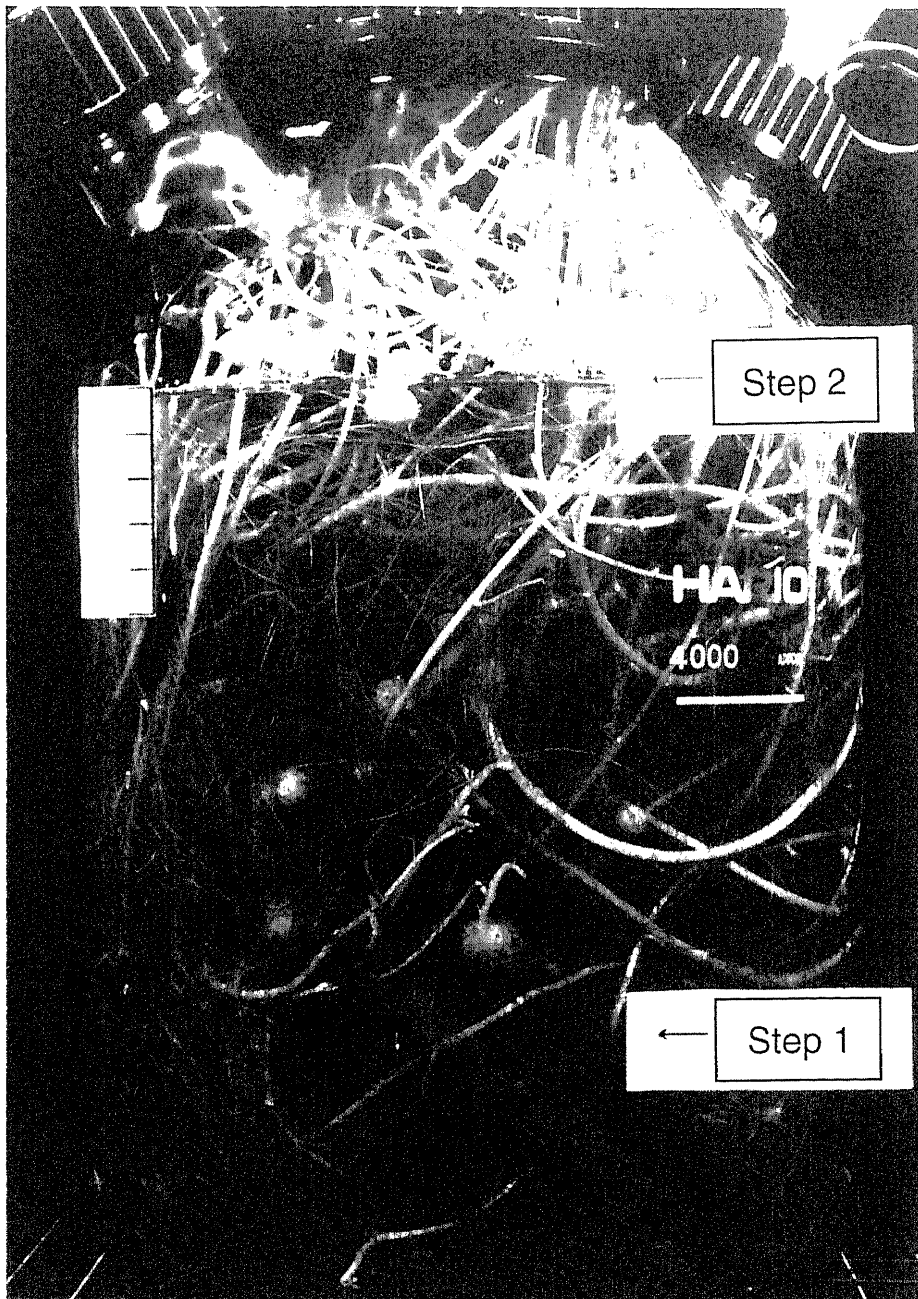


Fig. 3-12 Tuberization in a jar fermentor that was maintained under continuous 25 °C for 6 weeks.

Medium surface level of the each culture step is also indicated. Thick arrow indicates the most stimulated area of tuberization. Scale indicates 5 cm.



Fig. 3-13 The submerged area of the jar fermentor that was maintained at 17 °C for 6 weeks.

Thick arrow indicates the medium surface level of Step 2.

3-3-4-2 間欠的培地液面変動効果

前項までの実験では、培養液面位置を、Step 1とStep 2で変更することによって塊茎形成数を増大させた。しかし、培養液面付近の気相のみで塊茎形成と肥大が促進される一方で、培養液中では逆にこれらが阻害されるという問題を解決するには至らなかった。培養液を減らし、培養槽中の気相をより多く確保すれば、塊茎形成や肥大の起こりにくい部分を減らすことができるはずである。しかし、それによって基質が減少すると、塊茎生産性が低下する可能性が高い。そこで、培養物が培養槽内で培地中に浸漬されないか、または、浸漬される部分や時間が最小限である、という条件を満たし、かつ、培養物に対して十分に基質を供給できるような培養方法を採用すれば、塊茎生産性や塊茎重の均一性を高める可能性があるものと考えた。このような形で培養する方法として、培養中に培養液面を常に移動させながら培養する方法^{24, 25)}や、霧状に培地を供給する方法^{26, 27, 28)}が知られているが、ジャガイモ塊茎生産に利用された例はない。そこで、本実験では、間欠的に植物体を培地中に浸漬させることを繰り返しながら培養するような装置(図3-2)を試作して培養を行ない、塊茎形成への影響を調べた。

節を含む茎切片100個を移植し、培地量1000mlとしてStep 1の培養を行なった結果、培養槽底部に設置した金網によって、根を除くほとんど全ての部分を気相中に存在させることができた。4週間の培養で、植物体はよく増殖して培養槽の下部から約15cmの部分を満たした。この時の状況を図3-1 4に示した。根は培養槽底部の金網に絡み付き、培養槽内に大量の培地を注ぎ込んでも培地中に浮遊する恐れがない状態になっていた。

次いで、培地の全量を捨てたのち、培地8000mlを用いてStep 2の培養を行なった。ただし、培地量を変動させなかった場合を対照区とした。この場合、8000mlの培地を全て培養槽に入れると、植物体はその全てが完全に培地中に没した。これは、前項までの培養では植物体の頂芽付近が気相中に存在していたという点で異なる。処理区は、装置を作動させ、培地の全量を一定時間おきに培地貯留槽と培養槽間で移動することを繰り返した場合とした。なお、このシステムでは、培地を全量移動するのに約15分を要したので、結果、上部に位置した植物体は培地に浸漬される時間が短く、反対に、下部はこの時間が長くなるといった、培養槽内位置による培地への浸漬時間の不均一性が存在した。

6週間培養後の状態を、図3-1 5に示した。対照区では、培地中に完全に没することによって明らかに生育が阻害され、かつ、植物体表面が水浸状となった。塊茎は全く形成されなかった。このことは、前項までの実験において、植物体の一部が気相中に存在したことが、塊茎形成にとって重要であったことを示唆している。これに対して、処理区では、Step 2開始後1週間程度で塊茎の形成が培養槽外部から観察された。植物体の伸長は明らかに促進され、培養終了時には、培養槽内全体が植物体で満たされた。塊茎形成は、培養槽内の全体で認められ、植物体基部付近でやや塊茎数が多くなる傾向が認められたが、少なくとも、塊茎形成が阻害されているとみなされる部分は存在しなかった。培養槽あたりの塊茎形成数には著しいばらつきが認められたが、少ない場合でも、一回の培養槽あたり502個の塊茎が形成された。3-3-2項で決定した培養条件で得た塊茎は、平均で約230個であるから、培養液を間欠的に変動させることによって塊茎数を増大させられることがわかった。

この502個の塊茎が形成された培養槽では、全体で888.8 g（生体重）の植物体が得られたが、そのうち、塊茎は298.5 gを占めた。一方、対照区の生体重は、約480 gであった。形成された塊茎の中で最大のもは約4 gであり、前項までのように10 g以上の塊茎も混在していた結果と異なり、極端に肥大した塊茎はみられなかった（図3-16）。従って、塊茎重のばらつきは減少する傾向を示した。ただし、0.2 g以下の小型の塊茎が最も多いという現象は変らなかった。また、前項までの実験条件と比較して、本実験条件では、明らかに植物体の生育が促進されていた。すなわち、シュクロース9%という高糖濃度でも植物体の生育阻害が比較的起こらなかった。このときの培地中の基質の利用を、培養終了時に培地中に残存した糖濃度によって測定した結果、処理区では、培養終了時にはシュクロースが完全にグルコースとフラクトースに分解され消失していた。しかし、全糖量について見ると、約12%が消費されていたのみであった。シュクロースの2つの単糖への分解は、培地浸透圧を著しく高めることになり、このこともまた塊茎の肥大に影響しているものと考え⁷⁹⁾。一方、対照区では、添加したシュクロースのうちの30%が培地中に残存していたが、全糖量について比較すると、処理区とほぼ同じであった。すなわち、培地へ間欠的に接触させる培養法では、植物体に吸収される基質の総量は変わらないものの、植物体の生育と塊茎の肥大が同時に促進されることがわかった。

以上の結果は、塊茎形成と肥大は液体培地中で阻害されるが、この問題を解決すれば、塊茎数が増大するばかりでなく、培養槽内での塊茎形成位置と肥大のばらつきを防止でき、培養あたりの塊茎の生産性を向上できることを示唆している。

本実験条件では、培地に浸漬され続けられない場合には、塊茎以外の部分の生育も促進された。塊茎の肥大には、その他の部分の生育が必要ではないので、植物に取込まれた基質の塊茎への分配をさらに促進するための培養条件や培養方法の改良が今後必要である。また、本実験で用いた培養方法では特殊な装置が必要とされ、1回の培養に培養槽を2基（うち一つは培地貯留槽）使用するなど効率が悪く、加えてメンテナンスも繁雑である。従って実用的とは考えられず、今後、さらに簡便で、本実験と同様の効果を期待できる装置や培養方法を構築することが必要である。

なお、本実験では、6時間毎に1時間培地に浸漬するという条件で培養を行った。これは、浸漬時間を短くし気相中に植物体をできるだけ長く置く条件のほうがより顕著に効果が現れると考えたことに加え、装置の構造と材質上の制限から培養液の急速な移動を繰り返すことは不可能であったこと、および、過去の培養例などに基づいて選択されたものである。従って、さらに検討を加え、より培養効率を増大させる条件を決定することが必要と考える。

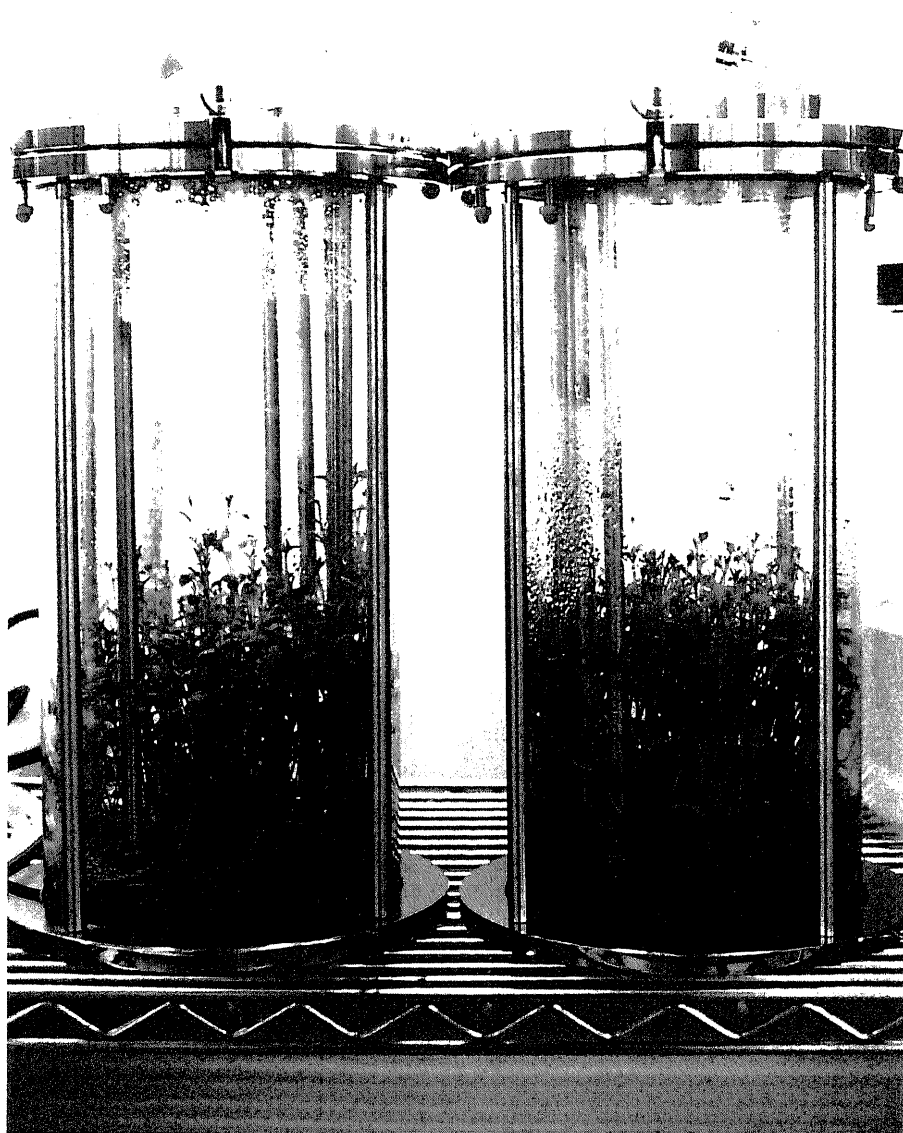


Fig. 3-14 Growth of potato shoots in Step 1 for the semi-continuous medium surface level control culture.

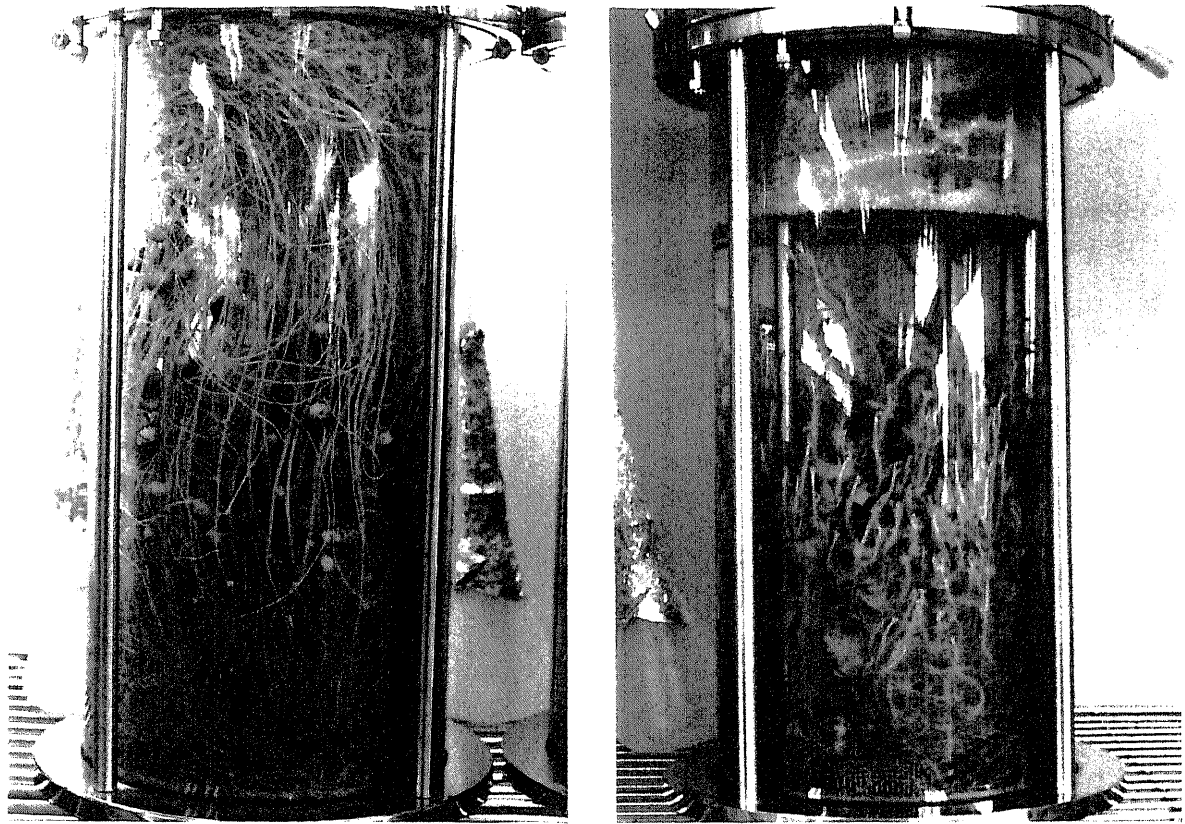


Fig. 3-15(a) Tuberization in the semi-continuous medium surface level control culture method.

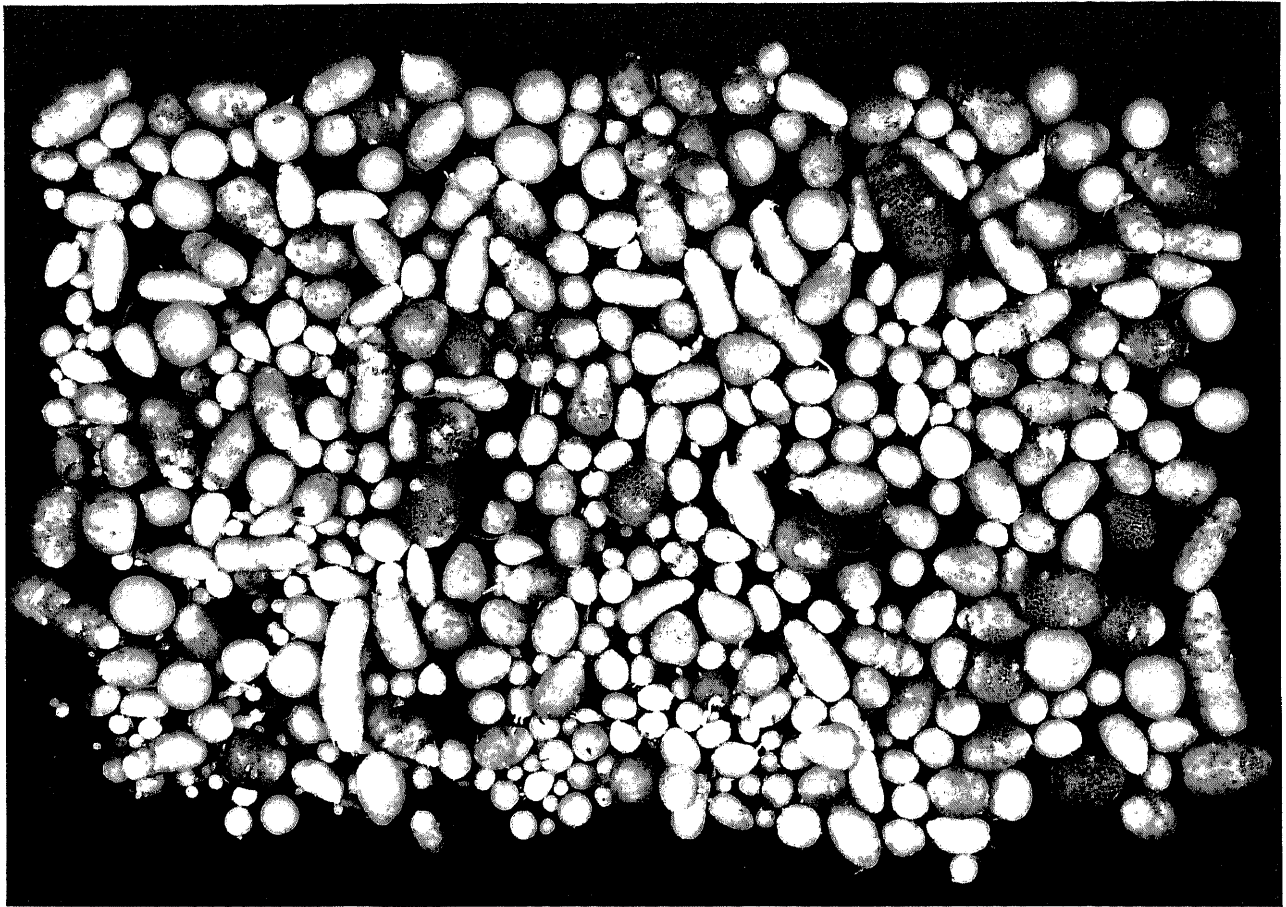
Comparison with the semi-continuous medium surface level control culture (left) and the control culture (right).



—
10 mm

Fig. 3-15 (b) Tuberculation in the semi-continuous medium surface level control culture method.

Tuberculation in the jar fermentor. (Bar indicates 10 mm).



—
10 mm

Fig. 3-16 Tubers propagated by the semi-continuous medium surface level control culture method.

Bar indicates 10 mm

3-4 まとめ

本研究において、小型培養槽を用いたジャガイモ塊茎の大量生産が可能であることを初めて明らかにすることができた。

本実験では、最初に、小型培養槽レベルでの塊茎形成状況を観察した。小型培養槽を用いた場合も、液体振盪培養と同じ方法により塊茎を形成させることができたが、同時に、小型培養槽内では、塊茎形成が培地液面位置に関係して不均一に起こることがわかった。すなわち、液体培地中に植物体を浸漬させ続けると塊茎生産効率が著しく低下することなど、液体振盪培養では観察できなかった現象が顕著に現れた。そこで、培養槽内に生じる塊茎分布の不均一性を解決する方法について、特に培養液量の調節による制御法に着目して検討を行なった。その結果、Step 1、すなわち塊茎形成前の培養条件がきわめて重要であり、あらかじめ気相中に植物体を生育させるという簡単な方法によって、培養液中に塊茎を形成させ得ることを初めて明らかにすることが出来た。塊茎形成の経時変化は、液体振盪培養のそれと類似していた。さらに検討を行った結果、培養槽を用いて効率良く塊茎を生産するためには、Step 1の培養を気相中で行うことに加え、Step 2についても、培養装置の改良などによって、十分に基質を供給しつつも培地中への連続的な浸漬を避けるなどの工夫が必要であることがわかった。このように、培養効率を高めるための基本要件を明らかにすることが出来たので、今後は、より簡便で実用的な培養装置の開発が必要である。このことに加えて、塊茎以外の部分の生育も液体振盪培養の場合と比較して促進される傾向にあったので、これをできるだけ抑制し、より塊茎の肥大を促進する方法の開発が必要と考える。

液体培地による塊茎形成阻害の原因は現在まで全く不明である。例えば、3-3-4-2の対照区で観察したように、培地中に植物体を完全に浸漬した状態では塊茎が形成されず、一方、植物体の一部が気相中に存在すると塊茎が形成されるようになるという現象は、酸素濃度の影響を予想させるものである。しかし、低温条件下で培養液中で塊茎形成が促進される効果(3-3-4-1)を酸素濃度のみで説明することは不可能と考える。さらに、予備的に、Step 2で酸素富化装置を使って酸素濃度を高めた空気を供給する他は全く同じ条件で培養した場合も、培養液中に塊茎を誘導することはできず、このことから、培養液中における塊茎形成阻害には溶存酸素濃度以外の要因が関係していると考えた。もちろん、この実験のみでは、培養液中での塊茎形成に対する酸素要求性が極端に高いために実験時の通気による酸素供給では不足であったという可能性も否定できない。しかし、通気量を高めて培養すると、物理的ストレスにより茎がしばしば褐変し、特に気泡が強く当たる部分では塊茎形成がむしろ阻害される場合もあった。あるいは、通気培養を行なうと、液体中の二酸化炭素濃度が減少して代謝に影響し⁸⁰⁾、また、二酸化炭素には塊茎形成を促進する作用が報告されている^{70,71)}ので、二酸化炭素濃度が培養液中の塊茎形成の問題に関係している可能性もある。これら気相成分の影響に関する検討には、気泡による物理的ストレスが少なくかつ培地中の溶存酸素や二酸化炭素を制御できるような培養装置を用いなければならず、そのような装置の開発も含めた検討がさらに必要である。同時に、塊茎形成位置周辺組織と他との差に関する生理学的な解析、例えば、通導組織の発達状態や物質の移動速度に関する測定などにより、さらに効率のよい実用的なジャガイモ塊茎生産技術を開発する必要があると考える。

第4章 小型培養槽由来塊茎の性状

4-1 はじめに

前章で、小型培養槽を用いてジャガイモ塊茎を大量培養する可能性を明らかにした。小型培養槽を用いて得られる塊茎は、その大きさがきわめて不揃いであった。この原因の一つには、液体培地による塊茎肥大の阻害が関係している。このようにして得た塊茎が実際に栽培に利用できるか、また、どの程度の大きさの塊茎までが実用に供し得るか、さらに、その生産性はどの程度なのかについては、実際に圃場栽培を行って確認することが不可欠である。しかし、その前に、これらの塊茎を保存できるのか、また、保存後に正常に萌芽するかを確かめておく必要がある。本研究では、培養槽由来の塊茎の性状について、特に萌芽性を中心に、室内条件で観察した。

小型培養槽内で形成させた場合、塊茎がどのような性状になるのかについては、当然のことながら全くわかっていない。例えば、圃場栽培において、水分過多の場合に皮目 (lenticel) の異常な発達が見られることが知られているが、液体培地を用いて静置培養し形成させた塊茎でも同様に皮目が発達しやすく、これが保存性や萌芽性、初期生育に悪影響を及ぼすことがあると言われている。小型培養槽を用いた培養では、液体培地中に完全に沈んだ状態で形成・肥大する塊茎が存在し、そのようにして得られた塊茎では、仮に上記のような液体培地を用いたことによる悪影響があるとすれば、それがより強く現れ、あるいは使用できない可能性がある。実際に、培養によって得た塊茎の中には、芽の部分が異常に肥大していたり、周皮の形態が悪く、たくさんの亀裂が生じていたりするものが混在していた。

また、本実験では、同時に、液面を間欠的に変動させて培養液への連続的な浸漬を行なわないようにして培養した塊茎について比較し、このような培養方法の変更が及ぼす影響についても検討した。

4-2 実験材料および方法

4-2-1 実験材料

実験には、前章（3-3-2および3-3-4-2。ただし、3-3-4-2の場合は塊茎形成数が502個であった場合）に示した方法によって、小型培養槽由来のジャガイモ塊茎を用いた。ただし、Step 1の培養期間は4週間とし、Step 2の培養期間は6週間とした。塊茎は培養槽から取り出し、塊茎以外の部分を取除いた後、脱イオン水でよく洗浄して用いた。

4-2-2 乾物率の測定

材料の形態にかかわらず、80℃とした通風乾燥機に2ないし3昼夜おいて恒量に達した時点で重量を測定し、乾物率を算出した。

4-2-3 萌芽試験

上面の直径65mm、底面の直径30mm、深さ20mmのすりばち型の穴を有するプラスチック製の板を用意し、この各穴に、2~4枚重ねにしたガーゼ、または、適当な大きさに切ったろ紙2枚をしき、Step 2終了直後の塊茎を各穴に入れた。その後、ボックスに入れ、暗条件下、25℃に静置し、萌芽の有無を経時的に観察した。このとき、塊茎の静置されたボックス内の湿度は、約60%（RH）であった。なお、長さ約2mmの芽が形成されたときをもって萌芽日とした。萌芽の有無の観察は、3か月間行なった。

4-3 実験結果ならびに考察

4-3-1 塊茎の乾物率と培養槽内形成位置との関係

培養槽より得た塊茎の乾物率を測定した結果、塊茎重にかかわらず乾物率はほとんど一定であった（約20%）。この値は、液体振盪培養法で形成させた塊茎（3-3-3-2参照）や圃場由来の塊茎の乾物率にほぼ一致する。培養槽中による培養では、植物体の乾物率は、培養液中の糖濃度によって影響されるので³³⁾、本研究で用いた糖濃度（シュクロース9%）が、このような高い乾物率を有する塊茎を得るのに適当であったことがわかる。図4-1には、小型培養槽由来の塊茎の生体重と乾物重との関係を示した。培養液中に完全に沈んだ状態で形成された塊茎でも、気相中に形成された塊茎と同程度の乾物率を示すことがわかった。

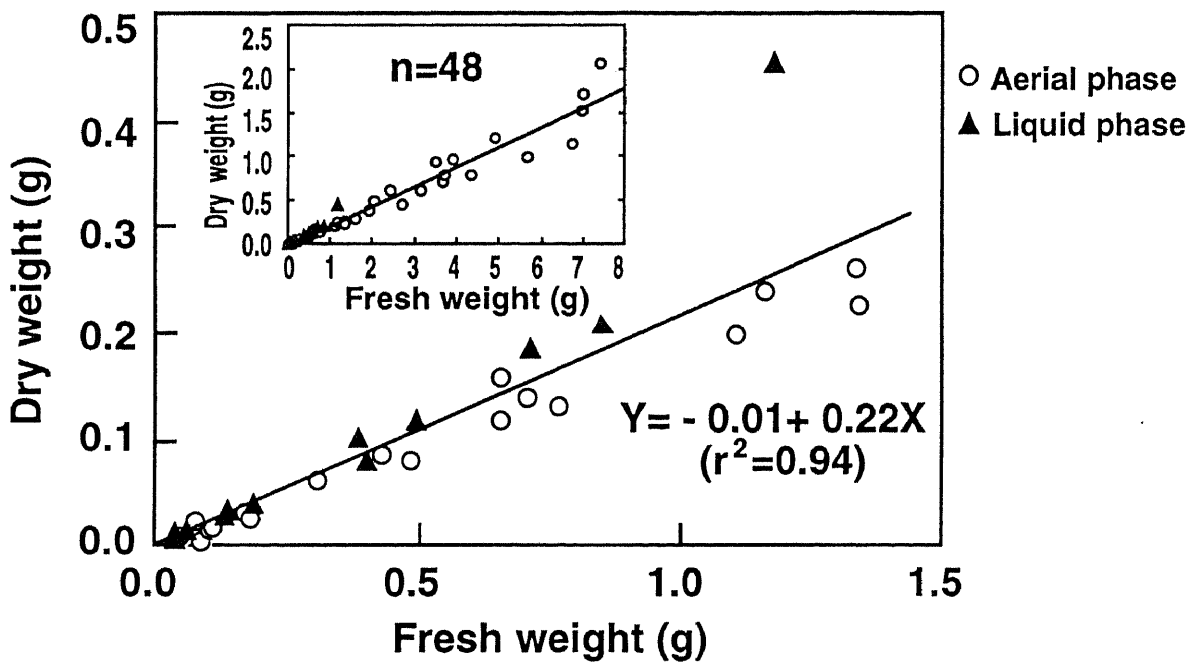


Fig. 4-1 Relationship between dry weight and fresh weight of tubers

Tubers derived from [1-L, 2-H] jar fermentors were randomly selected and used.

4-3-2 塊茎の保存性と萌芽性

培養槽由来の塊茎には、周皮に異常の認められるものが多かった。中でも、周皮が局部的に肥大してコルク状になったり変色したもの、小さな開裂が生じたものが多かった。特に培養液中に形成された塊茎では、その表面にカルス様に細胞の層が生じる場合があり、これを培養槽から取り出し乾燥すると、不規則な凹凸となり、結果、表面形態の悪い塊茎となった。

培養槽から取り出した塊茎の中には、室温に放置した場合、比較的すみやかに水分を失い、萎縮するものが混在した。そこで、保湿処理を行わずに培養室内に暗条件下で1週間放置して、その重量の変化を測定した。結果、室温に放置した場合、いずれの塊茎にも、水分を失うことを主因とするものと思われる重量の減少を認め、中には、1週間で70~80%まで重量が減少したものも存在した（全体の約17%）。しかし、重量減少率の大きな塊茎と他の塊茎との間に、培養槽内における形成位置や周皮の状態、その他外見上の差は観察できなかった。

さらに、これらの塊茎の萌芽性について観察した。結果を、図4-2および図4-3に示した。培養槽由来の塊茎のうち半数以上は、液体振盪培養由来の塊茎同様に、培養槽から取り出し室温に放置しても萌芽能を失わなかった。しかし、図4-2に示すように、培養後1週間の重量減少率が60%を超えた塊茎については、萌芽する割合が低かった。そのような塊茎は、全体の約40%を占めた。ただし、この差が塊茎周皮の外見的な差に関係するとは判断できなかった。また、図4-3は、3か月以内に萌芽した塊茎と萌芽しなかった塊茎では、培養終了直後の塊茎生体重と1週間後の重量との関係が明らかに異なっていることを示している。すなわち、1週間でより大きく重量が減少した塊茎では、塊茎の大きさに関係なく、その多くで3か月以内に萌芽しなかった。一方、0.2g以下のごく小型の塊茎でも、萌芽能を有するものが存在した。

以上の結果から、培養槽由来の塊茎も、おおむね、順化することなく圃場に直接に植付けできるものと判断した。しかし、無視できない割合で萌芽しない塊茎が混在し、それらは外見的には区別できないことがわかった。これまで、組織培養由来の塊茎では萌芽時期にばらつきが生じやすいとの指摘がなされており、また、実際に液体振盪培養由来の塊茎についてもその萌芽日の大きなばらつきは明らかであるが（2-3-3-2参照）、本実験の結果から、少なくとも本研究で用いた培養法では、萌芽の遅れる可能性の高い塊茎を、その培養1週間の重量減少率によって選別できることが判明した。

ただし、重量減少率の大きな塊茎が必ずしも完全に萌芽能を失っているわけではなかった。塊茎の休眠に関する知見⁸¹⁾に基づき、培養終了後に適当な保存法や催芽処理（浴光、ジベレリン処理など）を行えば、そのような塊茎も有効に利用できるようになる可能性は高いものと考えられる。

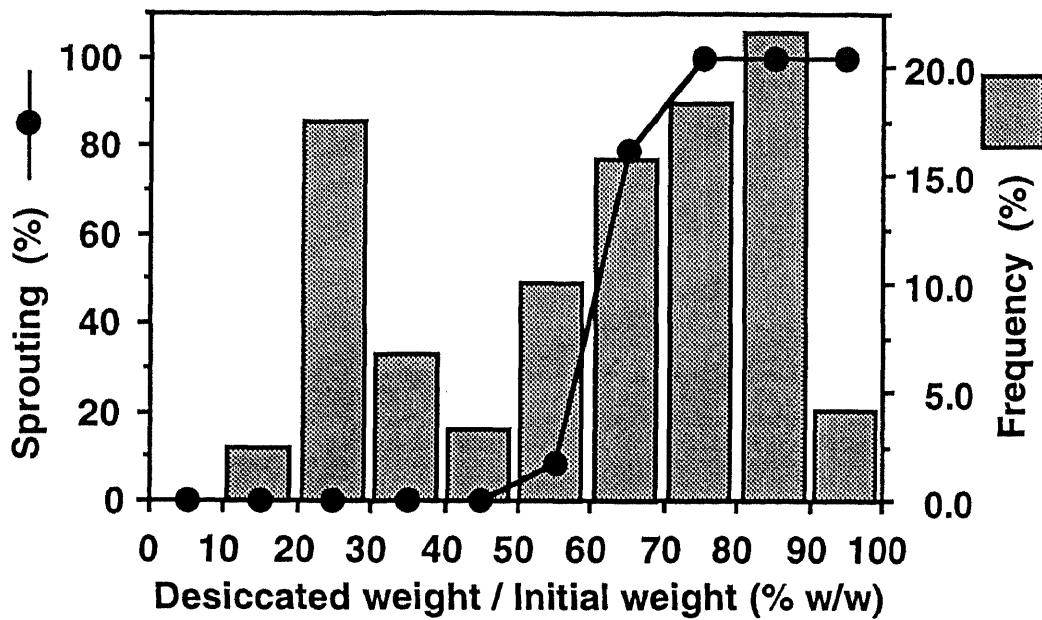


Fig. 4-2 Relationship between the percentage of desiccated weight to the initial weight of tubers propagated in a jar fermentor and the percentage of sprouting.

The percentage of sprouting was measured after 3 months.

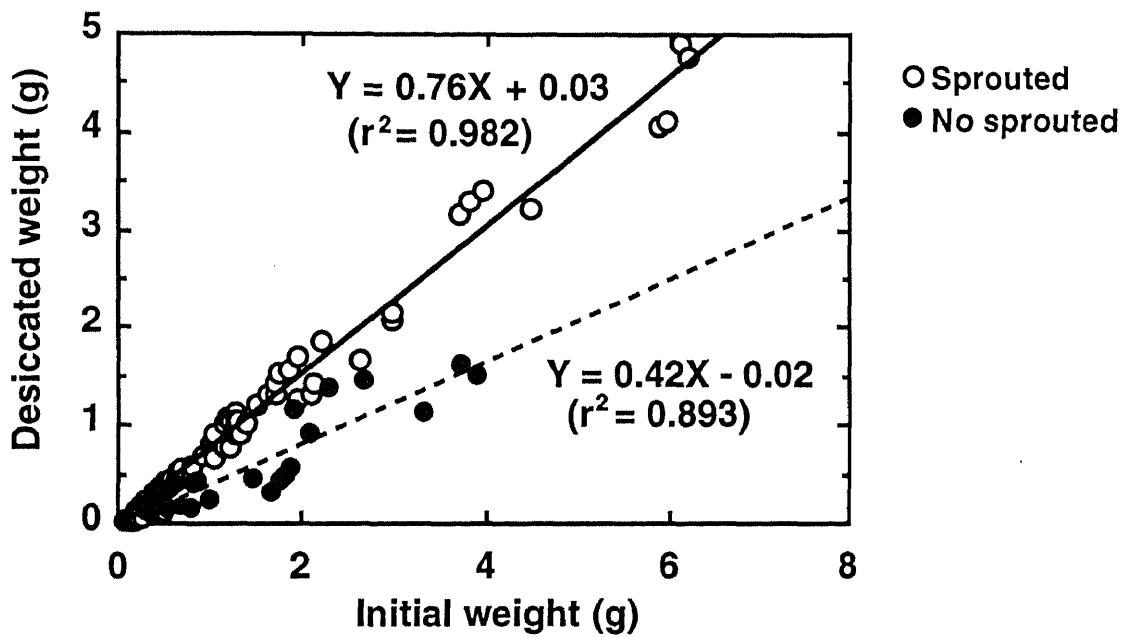


Fig. 4-3 Relationship between the initial weight of tubers propagated in a jar fermentor and the desiccated weight.

4-3-3 培養法による影響

間欠的に培地液面位置を変動して培養する方法（3-3-4-2）を使って得た塊茎について、4-3-1および4-3-2と同様の観察を行ない、培養液に連続して浸漬しない状態で培養した場合の影響について観察した。

塊茎の生体重と乾物重の関係を図4-4に示した。間欠的に培地液面位置を変動させて培養した場合、塊茎の乾物率は約18%であり、液面位置を一定にした場合（図4-1）よりもやや少ないことがわかった。本培養法では、高濃度の糖を含む培養液に接触する時間が他に比較して短いために、このような乾物率の低下が生じたものと考えられる。

一方、前項と同様に、塊茎を培養室内に保湿処理を行わずに1週間放置して重量の変化を観察した結果、やはり、塊茎を重量の減少率によって2つのグループ、すなわち、60%以下に生体重が減少してしまうグループと、それ以上の生体重を維持できるグループとに大別することができた。このことは、連続的に培養液に浸漬させないようにして培養しても、重量減少率の大きな塊茎の形成を防止できないということを示している。この重量減少率の大きな塊茎は全体の約30%を占めたが、特に、小型の塊茎（おおむね0.2g程度以下）に多かった。

図4-5には、培養後1週間の重量減少率と萌芽性（3か月以内の萌芽の有無）との関係を示した。前項と同様に、1週間で60%以上の重量減少が観察された塊茎では、3か月以内に萌芽しない塊茎の割合が多かった。一方、0.2g以上の塊茎では、その95%は3か月以内に萌芽した。従って、本培養装置を用いて培養した場合には、重量によって、萌芽の遅れる確率の高い塊茎を選別できる可能性が明らかになった。ただし、前項で述べた通り、これら小型の塊茎も完全に萌芽能を失っているわけではなかった。

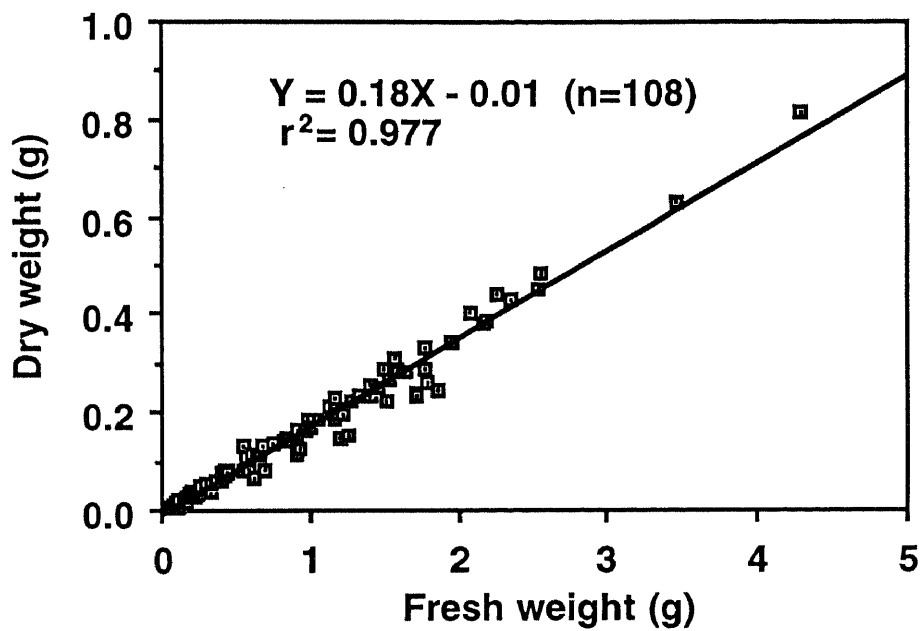


Fig. 4-4. Relationship between the fresh weight and dry weight of tubers propagated by semi-continuous medium surface level control culture method.

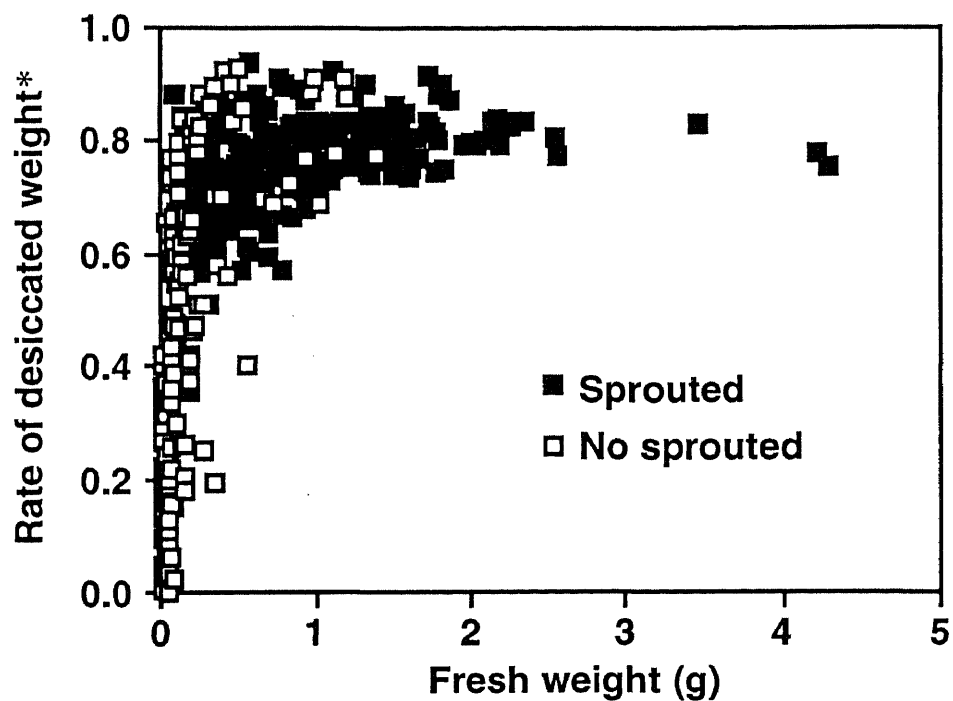


Fig. 4-5 Relationship between the initial weight of tubers and decreased weight during 1 week storage.

*** Rate of desiccated weight = tuber weight after 1 week desiccation / initial tuber weight**

Closed squares indicate tubers which sprouted within 3 months after the end of the culture.

4-4 まとめ

本実験の結果、本培養法を用いて小型培養槽で形成させた塊茎も、液体振盪培養由来の塊茎と同様に、圃場由来の塊茎とほぼ同じ乾物率を有すること、および、乾物率は塊茎の大きさや培養槽内の相対的な位置、気相中や液相中といった条件の違いによらずほぼ一定であることがわかった。

一方、培養終了直後から、すみやかに重量が減少し萎凋する塊茎が、無視できない割合で存在した。このような塊茎は、圃場での萌芽が遅れる可能性が高く、従って、保存や休眠打破に特別の処理が必要と考える。小型培養槽由来の塊茎は、しばしば周皮の状態が悪かったが、そのことは、重量の減少しやすさとは関係がなかった。また、間欠的に培養液量を変動させ、培養液中への連続的な浸漬が起らないようにして形成させた塊茎の中にも、このような重量の減少しやすい塊茎が混在することから、培養液中に連続して浸漬させたことと、塊茎の重量減少率が大きくなることとは、直接的には関係しないことが明らかになった。重量減少率が大きい塊茎の形成を防止する方法は不明であるが、より小型の塊茎に比較的高い割合でこのような塊茎が存在することから、間接的ではあるが、一定以上の大きさの塊茎のみを利用すれば、萌芽時期を揃えることが可能と考える。この方法をとる場合、選別の基準となる重量は、培養液量の間欠的に変動させて培養した場合で0.2 g程度である。

本実験は、保湿のための処理を行わずに萌芽を観察したものであり、実際の圃場では、少なくとも乾燥の問題に対し、本実験よりもむしろ萌芽しやすい条件下にあると推定できる。さらに、保存方法について検討すれば、圃場栽培時の萌芽率を、本実験の結果よりも高めることができるものと考えられる。

以上の結果から、本培養法の大きな利点として、比較的に厳しい保存条件下でも萌芽能を失わないような種苗を培養で直接に生産できるという点を確認することができた。

第5章 小型培養槽由来塊茎の圃場栽培特性

5-1 はじめに

前章までの研究によって、ジャガイモ塊茎を小型培養槽を用いて大量培養し、種苗として供給する可能性が明らかとなった。培養由来の塊茎の一部は、培養直後にすみやかに重量を失い、利用できなくなったが、それ以外の塊茎は、ごく小型の塊茎でも特別な処理を行なうことなく保存でき、かつ、そのまま圃場に植付けすることが可能と予想できた。本実験では、小型培養槽を用いて形成させた塊茎を圃場に直接に植付け、その生育と収量について観察した。

これまで、組織培養由来の塊茎も圃場に植付けすれば良好に生育し、直接に大型の塊茎を生産できることが、多くの研究者によって報告されてきた。培養に用いた培地が固体、液体のいずれであっても、このことは変らない。しかし、一方で、組織培養由来の塊茎では栽培初期の生育が極端に悪く、いったん苗床で苗化してから移植しなければならないという意見もある。仮に苗化が必要だとしたら、培養で塊茎を形成させる利点がほとんど失われることになる。培養条件が次代に影響するという報告も見られる⁷⁵⁾。これに対して、これまで培養槽由来の塊茎を栽培した際の生育や収量について具体的に報告された例はなく、また、本研究で決定した培養法では一部の塊茎を液体培地中に完全に沈んだ状態で形成させるという点でも、過去に報告されてきた事例と大きく異なっている。従って、本実験で決定した培養法が実用化できるか否かを確かめるためには、培養で得た塊茎が実際に圃場栽培に利用できるものであることを確かめ、かつ、その生育や収量を明らかにする必要がある。

日本におけるジャガイモ種薯の供給体制から考えると、培養で得られる塊茎のようなウイルスフリーの保証されている種苗は、農家が栽培に使う種薯のさらにおおもとになるべき種苗である。以下、日本におけるジャガイモ種薯供給体制と其中で予想される培養由来の塊茎の位置について考えてみる。ジャガイモ種薯に関しては、国が供給体制を整備し法律的な規制も行なって、農家に不良な種薯が渡らないよう対策が取られている。まず、国が、保有しているウイルスフリー植物体を順化し、以降、数代にわたって栽培する。ここで得られた種薯が原原種である。次にこれを採種用の圃場で、さらに数代にわたって栽培する。この間、→各道府県→農協と、次々に別の管理者の圃場で栽培されてゆくが、この期間中は、専門の管理官が検査を行うなど、種薯の品質を落とさないよう注意がはらわれている。そして、国の保有するウイルスフリー植物体から実に6年以上の期間を経て種薯が生産農家の手元に届くことになる。この期間中、完全にウイルスフリーを保てるはずはなく、実際には、大きな減収にはならない程度にわずかに汚染された塊茎を、最終の農家が手にすることになる。本実験で形成させた塊茎は、この現在の種薯供給体制を補い、培養から生産農家までの期間を短縮してより良好な種薯を供給するのに役立つものとする。いずれにしても、本実験で得られた塊茎を必ずしも最終の生産者が利用しなくともよいし、培養では生産にコストがかかりすぎることで、ジャガイモは栽培面積が極めて大きく、その全てに直接植付ける種苗を培養で得るには多大な設備を要すること、などの理由から、培養で塊茎を得た後数回圃場栽培し、数を増や

した上で農家に供給する体制をとったほうが日本では現実的と考える。すなわち、原種圃やその次の段階である採取圃で栽培に利用できる塊茎を培養によって生産することを目標とするべきと考える。以上の観点から、本実験では、小型培養槽由来の塊茎を用いて栽培すると、どの程度の数の塊茎が得られ、そのうち次年度栽培用の種薯として利用できる塊茎がどの程度の割合を占めるかに着目して考察した。従って、通常は利用されない小型の塊茎についても、生産性の評価の対象とした。ちなみに、通常栽培では、大型の塊茎を数個に切断して植付けることが多いが、小型の塊茎（20～30 g程度の大きさのものを指す場合が多い）はミニチューバーと呼ばれ、そのまま植付けできるために、塊茎を切断する手間がかからない、切断による病原菌の感染の恐れがない、初期生育が旺盛である、などの長所があり、その使用が近年検討されている。

5-2 実験材料および方法

5-2-1 実験材料

実験には、第3章(3-3-2)に示した方法によって、小型培養槽から得られたジャガイモ塊茎(品種名ユキジロ)約500個を用いた。ただし、Step 1の培養期間は4週間とし、Step 2の培養期間は6週間とした。塊茎は、培養槽から取り出し、塊茎以外の部分を取除いた後、脱イオン水でよく洗浄して用いた。塊茎は、軽く表面を乾燥させた後、おがくずに入れた状態で4℃の冷室に3か月間保管した。植付け前には、一般的な催芽法として、10ppmのジベレリン水溶液に1晩浸漬したのち、弱光下で1週間浴光処理した。なお、対照として、小型培養槽で増殖させた植物体を順化したもの(5-2-2参照)、および、通常作通り、100g以上の塊茎(圃場由来)を数個に切断したもの(約50~70g/個)を用意した。また、これとは別に、圃場栽培によって得られたユキジロの塊茎(100g以下の様々な大きさのもの)を用意し、種薯として用い、比較した。

5-2-2 植物体の増殖(順化苗利用栽培試験)

対照区に用いた順化苗は、8000mlガラス製小型培養槽を用いて増殖した。培養槽には2000mlのStep 1用培地を入れて殺菌した。継代培養条件(第2章参照)で培養した植物体を節ごとに切断し、その約100切片をこの小型培養槽に移植し、植物体のほとんどの部分が気相中に存在するようにして生育させた。その他培養条件は、第4章に示したStep 1の条件と同じとした。培養期間は3週間とした。増殖した植物体は、小型培養槽から取り出し、水洗したのち、バーミキュライトを入れたジフィーポット(5cm角)に一株ずつ移植し、温室内で弱光下で順化して苗とした。

5-2-3 栽培法

栽培管理は、北海道網走市郊外の農家に依頼し、この地方の、一般的なジャガイモ栽培法に準じて行なった。圃場管理(土寄せ、農薬散布等)も、この地域の一般的な農作業暦に合わせるものとし、特別な管理は行わなかった。

5-2-3-1 圃場

圃場として、網走市郊外の普通作用の農家圃場(網走市字喜多山)を用いた。土壌は、湿性火山灰土(黒ボク土)である。圃場へは、この地域の栽培条件に合せ、肥料としてS-804(N:8%、P:20%、K:14%、Mg:5%)を100Kg/10a施用した。

5-2-3-2 栽植密度等

塊茎および順化苗の栽植密度は、株間27cm、うね幅75cmとした。培養由来の塊茎は、各々重量を測定し、ナンバリングした後、圃場に直接植付けした。植付け深さは、2～5cmとした。また、順化苗は、ジフィーポットごと圃場に移植した。通常作と同様に大型の塊茎を切断して植付けた対照区では、約5cmの深さに、切断した塊茎を植えつけた。

5-2-3-3 栽培期間等

塊茎を用いた栽培は、栽培地の栽培期間に合わせて、5月初旬から10月中旬にかけて行った。一方、順化苗については、霜の恐れがなくなる時期に合わせて、6月上旬に圃場に移植し、塊茎を植付けて栽培した場合と同時期に収穫した。培養槽由来の塊茎を植付けた場合の一部の株（68株）は開花期直後（8月初旬）に掘り取り、収量を測定した。これは、この地域で開花期を過ぎるとアブラムシが大発生することがあり、そのため、採種用の圃場では、この時期以降、薬剤を散布して地上部を枯死させることが行なわれるのに対応させるために行なった。収穫の際は、一株毎掘り取って持ち帰り、各々の収量を測定した。

5-3 実験結果ならびに考察

5-3-1 地上部の生育

小型培養槽由来の塊茎を直接に圃場に植付け栽培した場合も、地上部は良く生育した。少なくとも、一旦苗床で苗化する必要はないと判断できた。0.1 g程度の小型の塊茎を植付けた場合にも、最終的に数gの塊茎を植付けた場合とあまり変らない生育を示すものが多く存在した。萌芽時期にはばらつきが見られた。植付け後1か月の段階で調査した結果、全体の18.7%で欠株となり、また、より小型の塊茎を使用した場合に欠株の生じる割合が高かった。その後、遅くなって萌芽してくる株もあり、最終的には、植付けた株の約11%が欠株となった。

植物体は8月初旬には一斉に開花し、収穫時（10月初旬）には、一部の個体が枯死していた。図5-1、図5-2には、開花期直後までの地上部の生育の経時変化を示した。栽培初期には、植付けた塊茎の重さが大きいほど草丈（ここでは最長の茎の長さを測定）も大きくなる傾向を示したものの、その後、より小型の塊茎を植付けた場合の植物体も順調に生育した結果、8月初旬までには、その傾向は見られなくなることがわかった。分枝数についても同様の傾向があったが、草丈よりも早い時期に、植付けた塊茎重との関係は見られなくなった。図5-3には、圃場における生育状況を示した。外見上、変異していると考えられる株は全く存在しなかった。

萌芽の遅れは、生育後期にまで影響を残した。図5-4には、8月初旬（開花期直後）に調査した結果をもとに、植付けた塊茎の重さと草丈との関係を示した。ただし、植付けた塊茎のうち、2gを超えるものは少なかったため、この図では、2gまでの塊茎を用いた場合のみについて示した。萌芽の遅れた株では、他の株と比較して生育が開花期やそれ以降も遅れ、草丈もほとんどが20cmに満たなかった。ただし、ここで言う萌芽の遅れた株とは、植付け後約1か月間萌芽が認められなかったものの、その後に生育を開始したものをさす。なお、他の株においては、植付け後約1か月では、約10cmまで茎が伸長していた。植付けた塊茎の重さは、この萌芽の遅れとは関係がなかった。

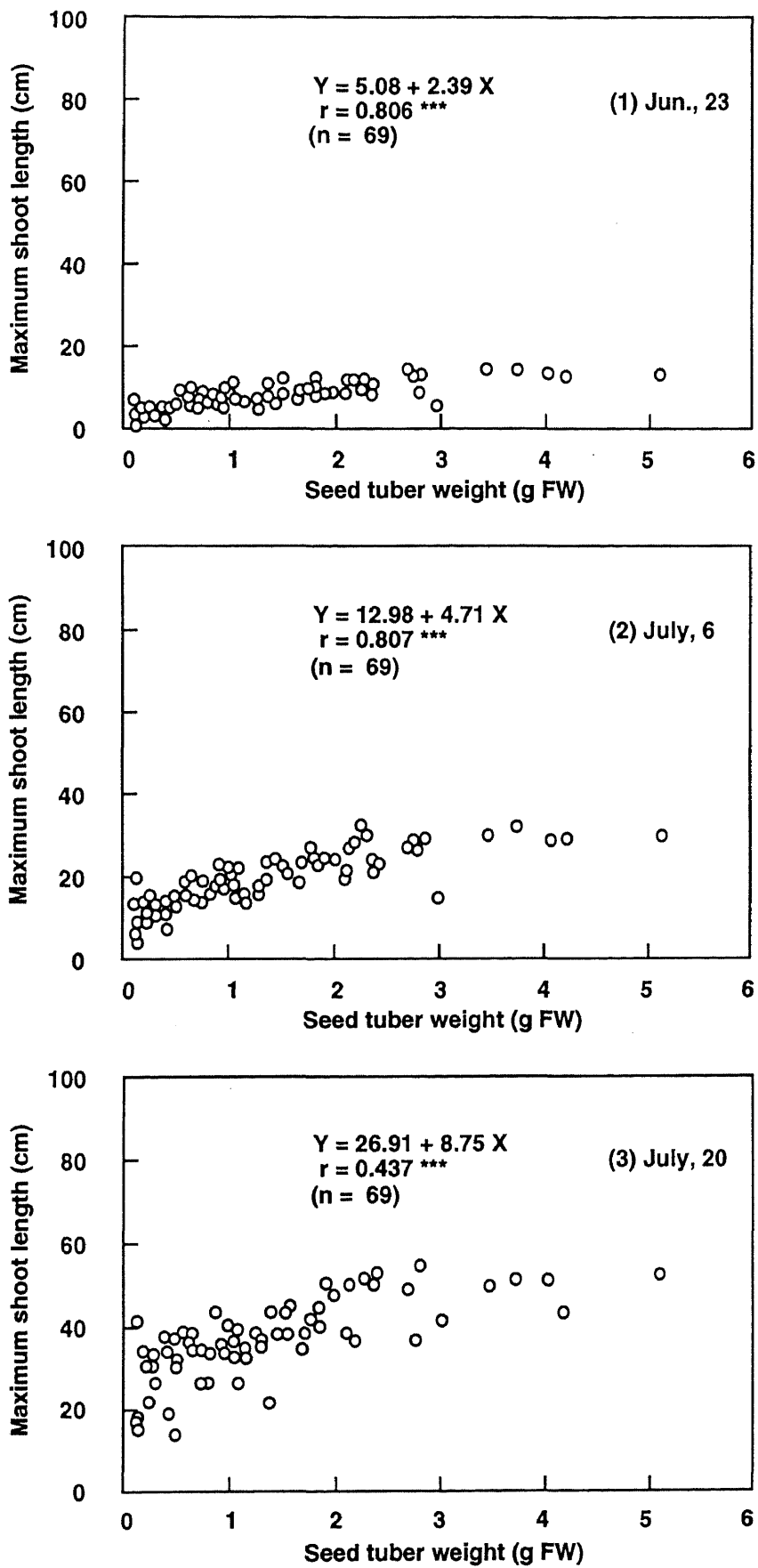


Fig. 5-1 (1) - (5) Time course of relationship between seed tuber weight and the maximum shoot length in field cultivation.

(1) ~ (3) June to July.

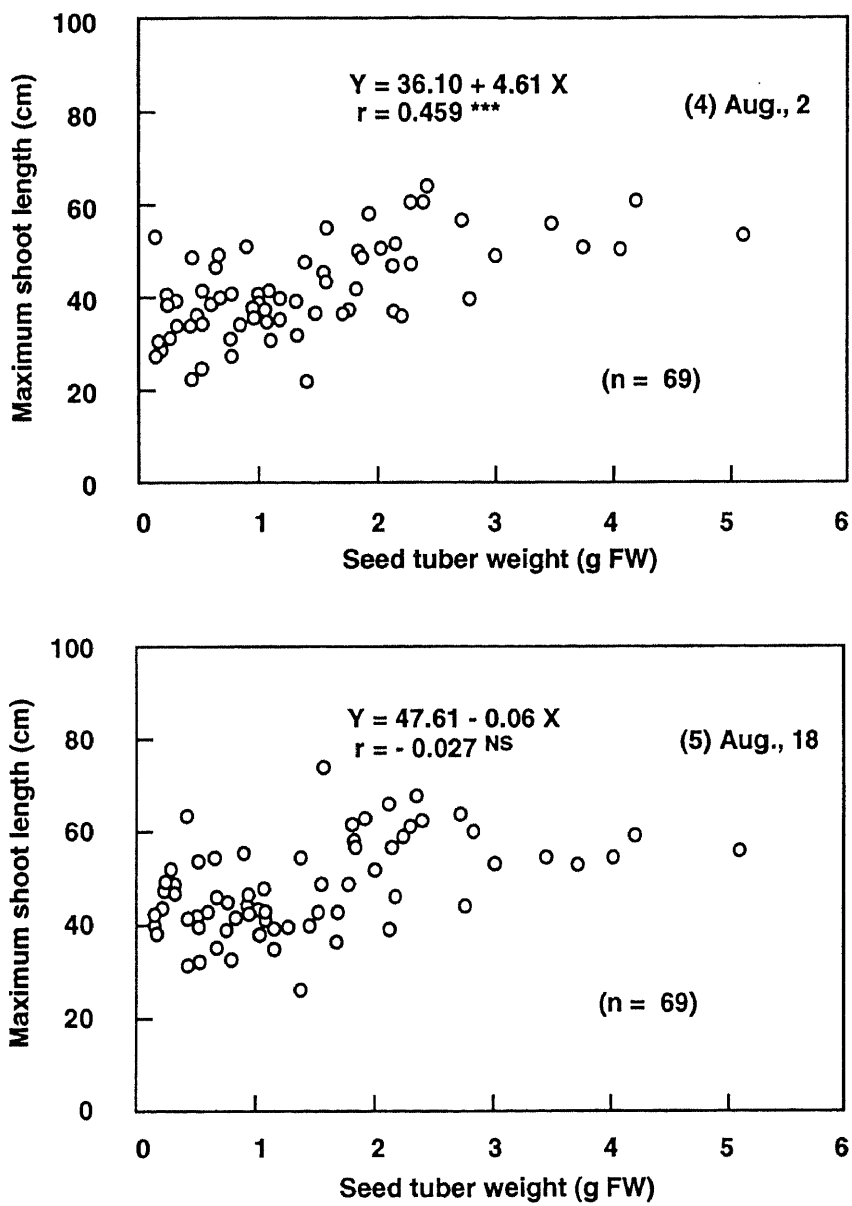


Fig. 5-1 (1) - (5) Time course of relationship between seed tuber weight and the maximum shoot length in field cultivation.

(4), (5) August

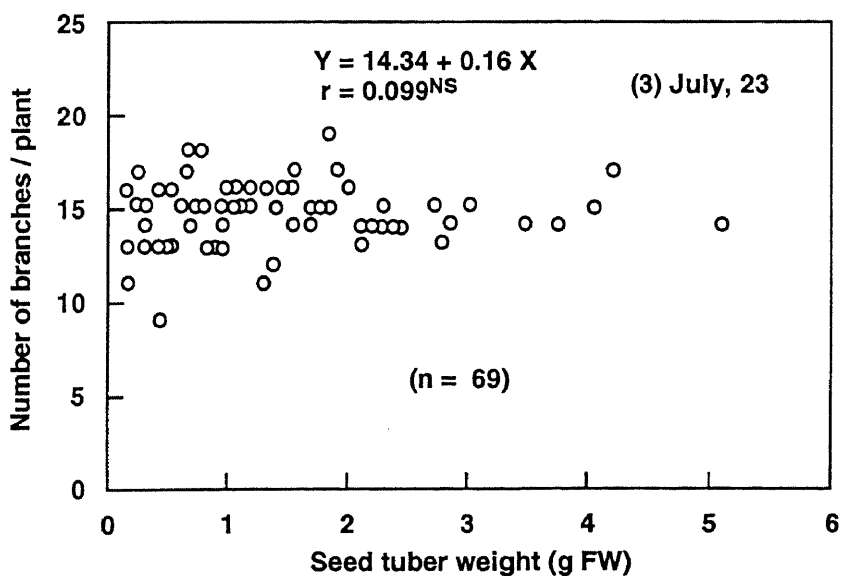
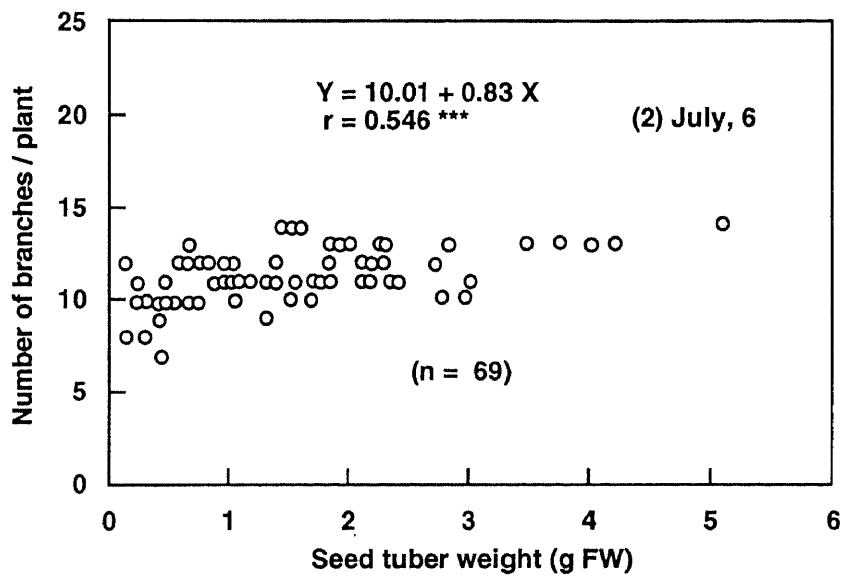
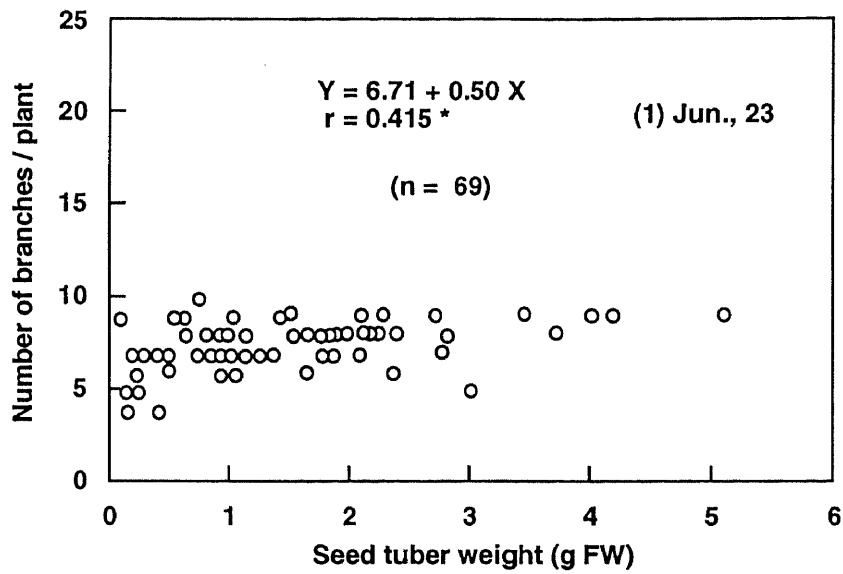


Fig. 5-2 (1) - (5) Time course of relationship between the seed tuber weight and number of branches for a plant in field cultivation.

(1) ~ (3) June to July.

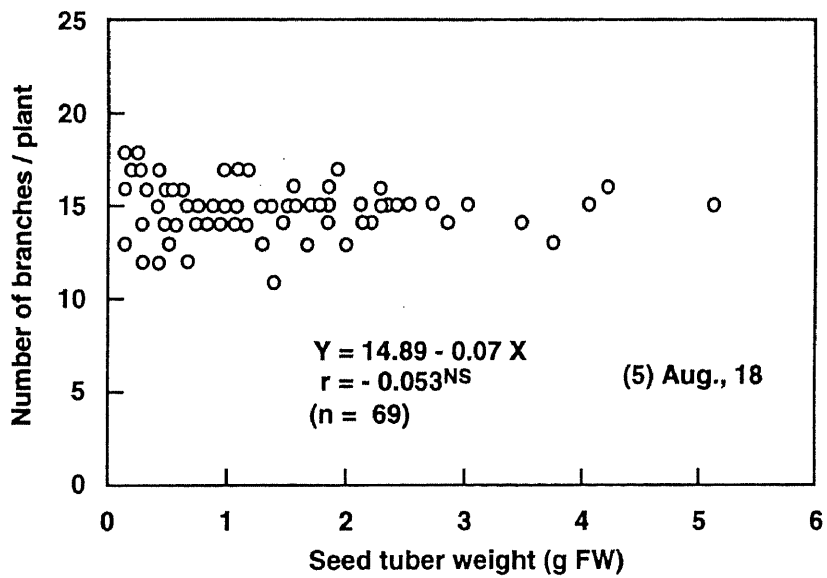
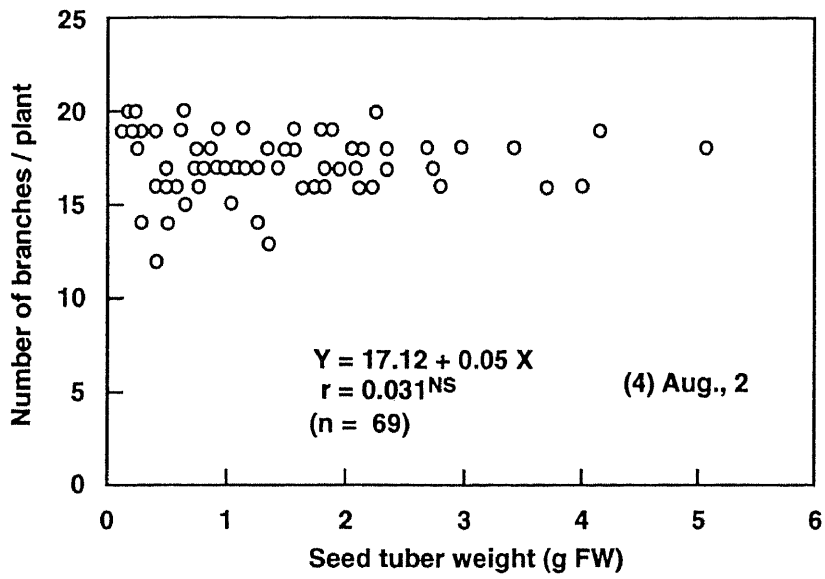


Fig. 5-2 (1) - (5) Time course of relationship between seed tuber weight and number of branches for a plant in field cultivation.

(4), (5) August



Fig. 5-3 Growth of potato plants cultivated under field conditions.

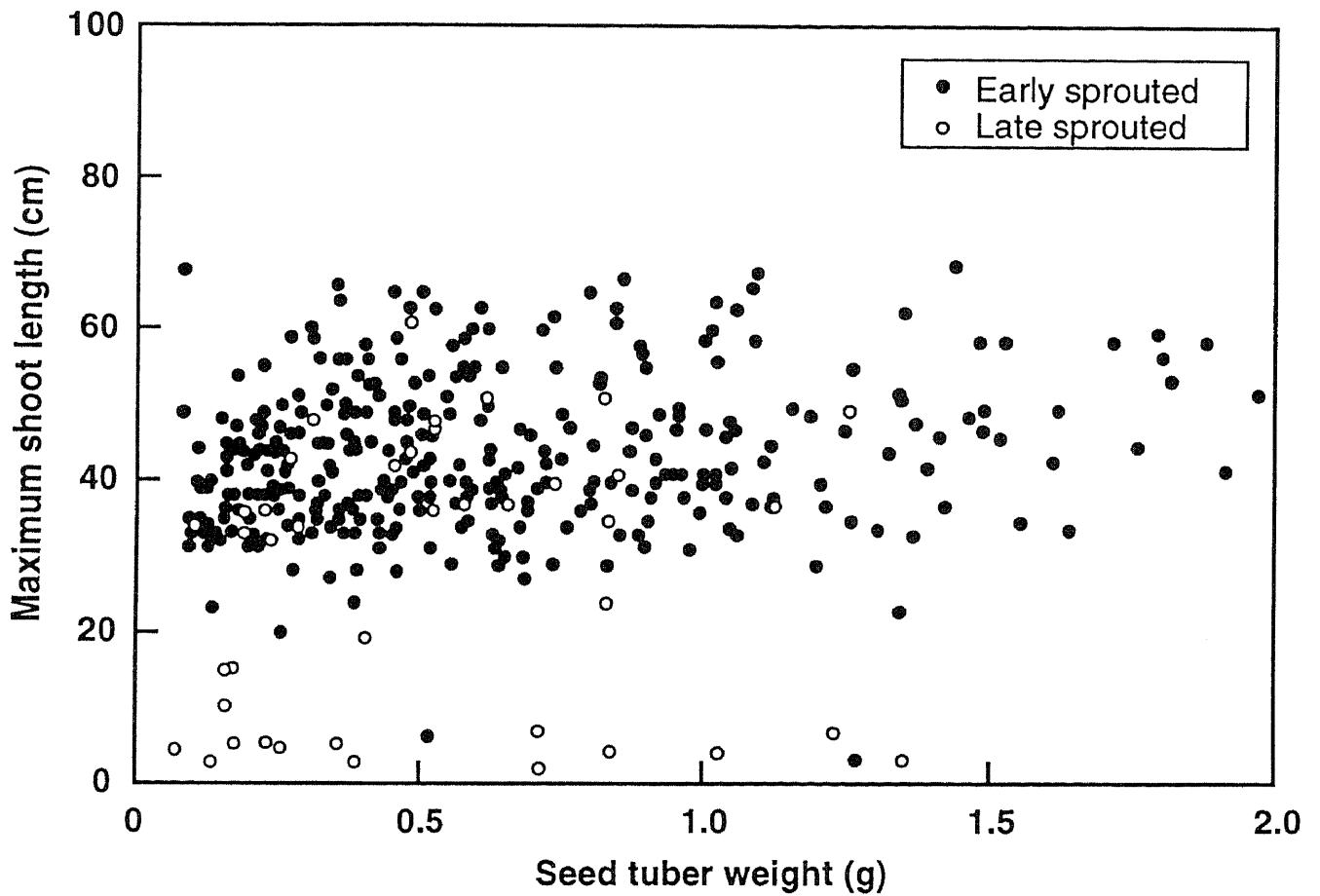


Fig. 5-4 Relationship between seed tuber weight and the maximum shoot length at the end of flowering season in field cultivation.

The open circles indicate plants which did not sprout during 1 month of field cultivation.

5-3-2 収量

塊茎由来の個体では、0.1 g程度のごく小型の塊茎を植付けた場合でも、100 gを超える塊茎を形成しうることがわかった。図5-5は、8月初旬に掘り取った株の塊茎形成状況を示した。培養槽由来の塊茎は小型であるが、直接に圃場に植付けて栽培した場合でも、植付けた塊茎の状態と栽培の条件が適当であるなら、栽培当年でも、種薯として利用可能な大型の塊茎を生産することが可能と判断できた。

図5-6、図5-7には、8月初旬（開花期直後）に無作為に採取した株の収量（株あたり総塊重、株あたり総塊茎数）を示した。ただし、前項同様に、植付けた塊茎のうち2 gを超えるものは少なかったため、この図では2 gまでの塊茎を用いた場合について示した。収量と植付けた塊茎重との間にはごく低い相関が認められたが、例えば0.1 g程度の塊茎でも、ポテンシャルとして見れば、数グラムの塊茎と同様の生産性を有していることが明らかとなった。圃場栽培において、塊茎数は、生育の初期の短期間に決定されることが知られている⁴⁹⁾。植付けた塊茎の重さが、収穫された塊茎数とあまり関係しないという本栽培試験の結果は、少なくとも本実験に用いた重量範囲では、植付けた塊茎の重さに関係なく、同程度の数の塊茎が栽培初期に誘導されることを示唆している。従って、地上部の生育が良好であれば、小型培養槽由来の塊茎を植付けて栽培しても、相当の収量が期待できるものと考えられる。

図5-8には、このとき採取した全株（68株）について、収穫された各塊茎重の分布を示した。全体で約1300個の塊茎が得られたが、そのうち、5 g以下の塊茎が約600個を占めた。図では、この5 g以下の塊茎を除いて示している。収穫時に機械掘りが可能で（あまり小型の塊茎は、小石として選別されてしまう可能性がある）、かつ、一般的に受入れられているミニチューバーの大きさは30 g程度なので、この時期に、すでに種薯として用いるのに十分な大きさの塊茎が形成されていたことがわかる。仮に、この時期に得られた塊茎のうち、小型の塊茎はそのままの形で、大型の塊茎は約30 gに切断して、各々次年度の栽培に種薯として用いるとすると、株あたりの種薯生産効率は、単純平均すると、約10倍、すなわち、1つの培養由来の塊茎から約10株分の種薯が得られる計算になる。

10月初旬に測定した収量を、図5-9および図5-10に示した。10月の時点には、8月（開花期直後）の時点と異なり、植付けた塊茎重と収量との間に相関関係はなかった。株あたり平均の総塊茎重は、約1000 gであった。収量には相当のばらつきがあるが、これは、地上部の生育のばらつきを反映しているものと考えられる。特に、栽培初期の生育の遅れの影響は、10月時点でも収量に現れた。例えば、塊茎形成数の少ない株の多くは、萌芽の遅れが観察された株であった。生育の結果（5-3-1）と総合すると、培養槽由来の小型の塊茎を植付け栽培した場合、萌芽期の不揃いや栽培初期の地上部生育の遅れが最大の問題であり、これを防止し地上部を良好に生育させられれば、小型培養槽由来の塊茎を用いても、相当の収量を期待できることがわかった。図5-11および図5-12には、圃場栽培によって得たユキジロ塊茎を同じ圃場に同じ条件で植付け栽培した結果を示した。少なくとも本実験の栽培条件においては、種薯として、ある一定以上の大型のものを利用しても、収量が顕著に増加することはないことがわかる。また、培養槽由来

のごく小型の塊茎を植付けた場合でも、条件によっては、数十g以上の塊茎を植付けた場合と同程度の収量を期待できることがわかった。

10月の収穫時における測定結果をもとに、1株あたり得られた塊茎数とその内の30g以上の塊茎数とを、植付けた塊茎の重量別に示したのが図5-13である。また、順化苗を用いた場合、および、大型の塊茎を切断して植付けた場合（対照区）とも比較した。小型培養槽由来の塊茎を植付けて栽培した場合、収穫できた塊茎の中で30g以上のものが40%~50%を占め、また、この割合は、植付け時の塊茎重が0.2g程度より大きいと、あまり変らなかった。株あたり塊茎形成数は、1g以上の塊茎を植付けた場合で大きくなったので、1g以上の塊茎を植付けて栽培すると、30g以上の塊茎の数が増大することがわかった。これに比較して、順化苗を用いた場合には、30g以上の塊茎が形成される割合が低かった。しかし、塊茎数についてみると、小型培養槽由来の1g以下の塊茎を植付けた場合とほぼ変わらず、また、得られた塊茎の中には、100gを超えるような大型の塊茎も見られたことから、地上部の生育が順調であれば、塊茎を利用した場合と遜色ない収量が期待できるものと推察できた。順化苗を利用する場合、温室から圃場に移植された際のストレスなどによって、圃場における初期生育の低下が避けられず、これが、萌芽の遅れた塊茎の場合と同様に、結果的に収量の低下をもたらしたものと考えられる。これに対して、塊茎は、たとえ培養槽由来のごく小型のものであっても、栽培初期の生育が順化苗よりも良好であるために、本実験における収量（この場合30g以上の塊茎形成数）の差が生じたと推察できる。従来から、塊茎を栽培に利用する利点の一つとして、順化苗に比べ生育初期の環境条件に対して高い適応性を有する植物体が得られるため、初期生育が比較的安定しているという点があげられているが、本研究の結果は、このことを裏付けるものである。

なお、同じ圃場で、通常作と同様に、100g以上の大型の塊茎を切断して植付けた場合には、1株あたり30個程度の塊茎が収穫でき、その約50%は30g以上であった。しかし、1株あたり総塊茎重は1000~1500g程度であり、培養槽由来の塊茎に比較して、大きな差はないことがわかった。このことは、大型の塊茎を切断して植付けた場合には、培養槽由来の小型の塊茎を植付けた場合に比べて、個々の塊茎の肥大が比較的に小さい、使用に適さないような小型の塊茎の混じる割合がより少なくなることを意味している。すなわち、収量がより安定していることがわかり、この差が何に起因するものかについて検討することが、今後、マイクロチューバーを利用した種薯生産を目指すうえで重要と考える。



Fig. 5-5 Formation of potato tubers on plants cultivated under field conditions.

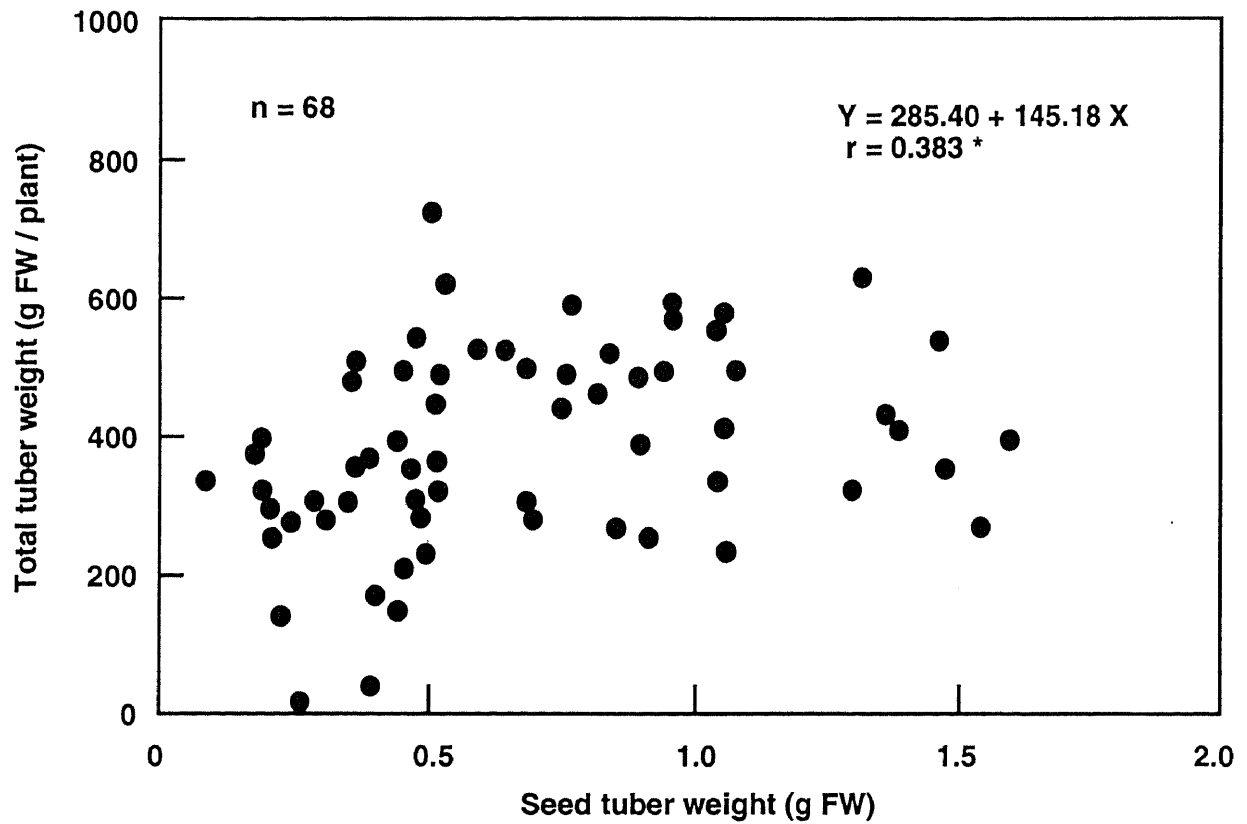


Fig. 5-6 Relationship between seed tuber weight and total harvested tuber weight at the end of flowering season in field cultivation.

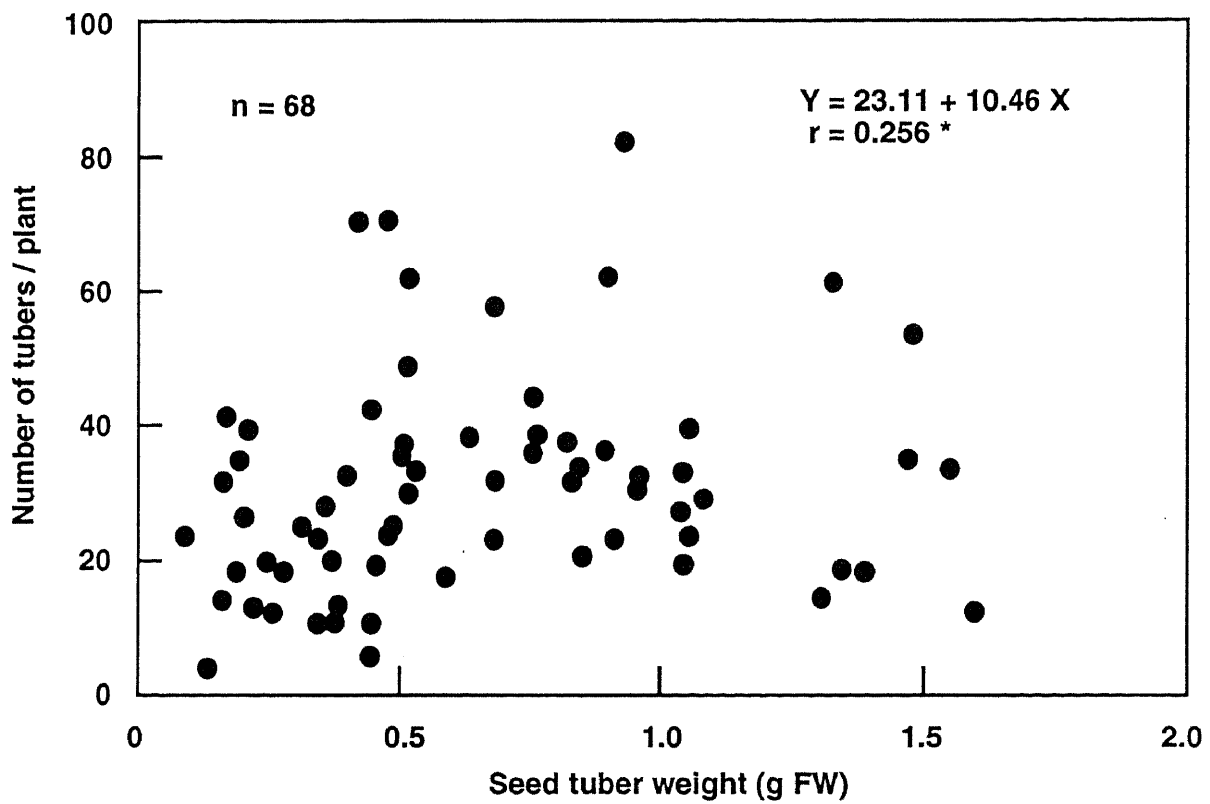


Fig. 5-7 Relationship between seed tuber weight and number of harvested tubers at the end of flowering season in field cultivation.

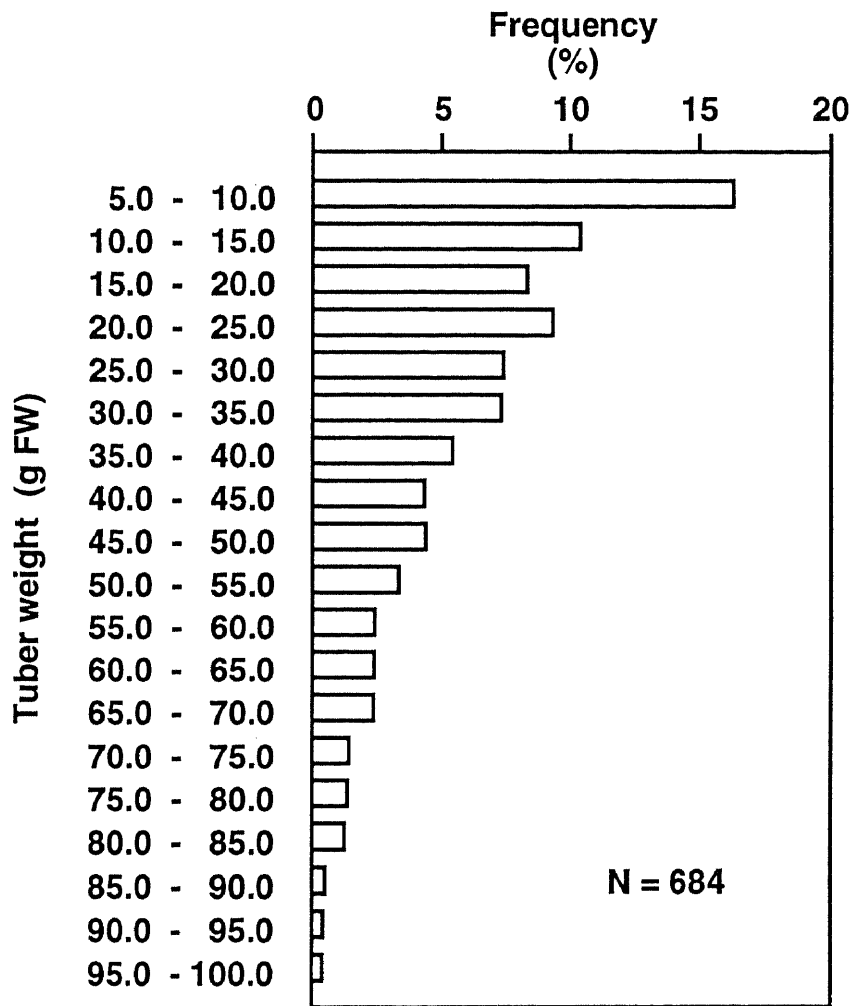


Fig. 5-8 Weight distribution of harvested tubers at the end of flowering season in field cultivation.

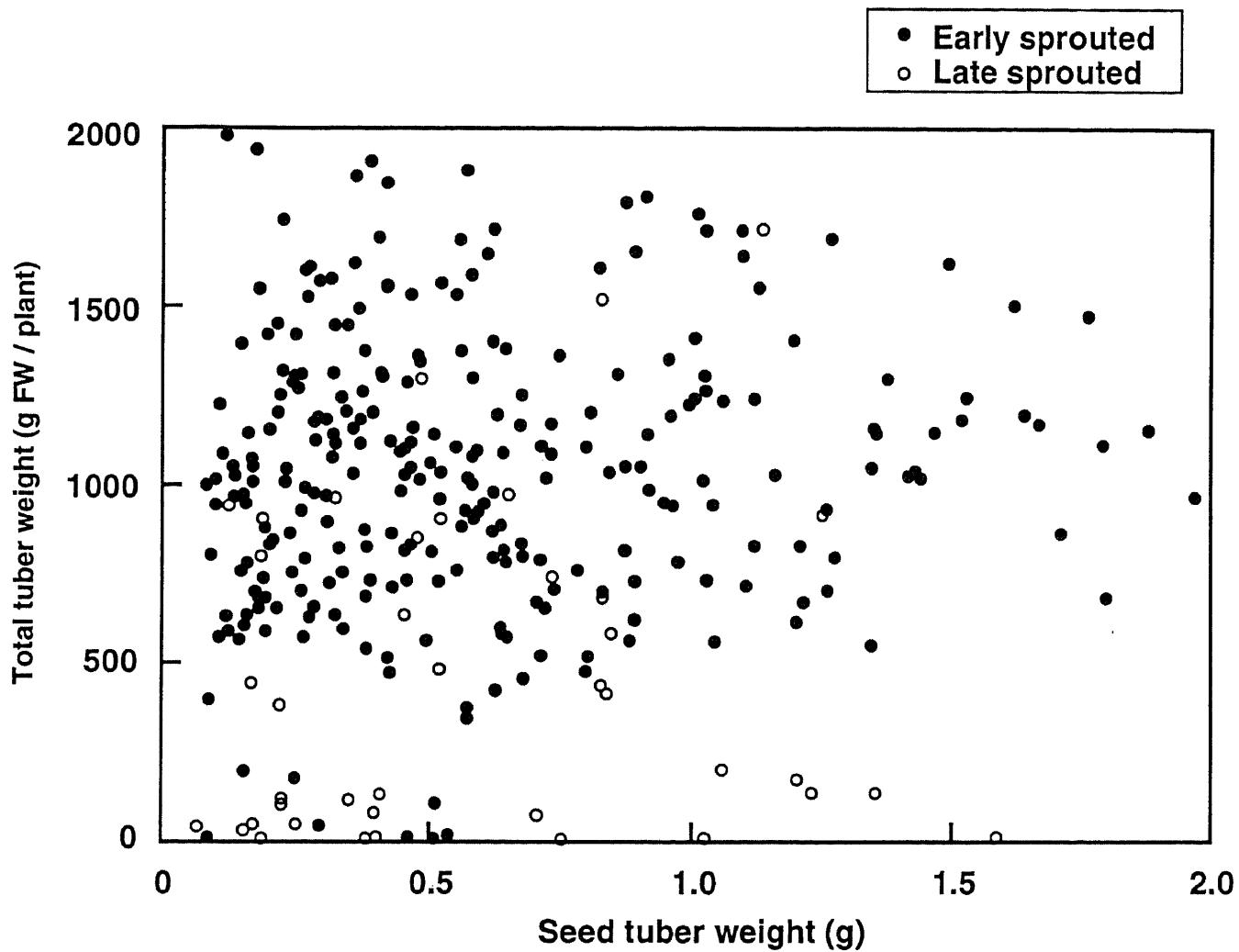


Fig. 5-9 Relationship between seed tuber weight and total harvested tuber weight at the end of cultivation under field conditions.

The open circles indicate plants which did not sprout during 1 month of field cultivation.

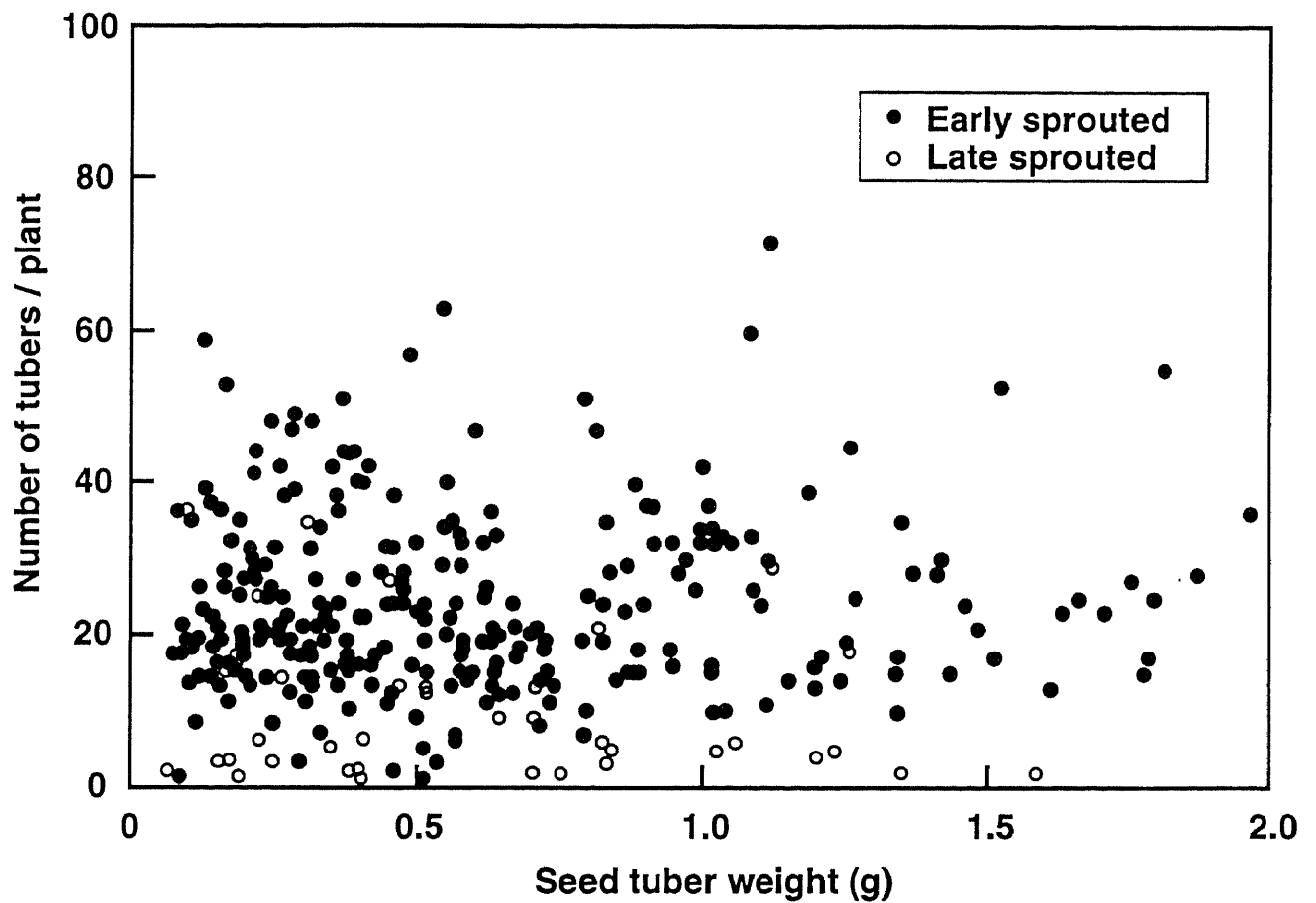


Fig. 5-10 Relationship between seed tuber weight and number of harvested tubers at the end of cultivation under field conditions.

The open circles indicates plants which did not sprout during 1 month of field cultivation.

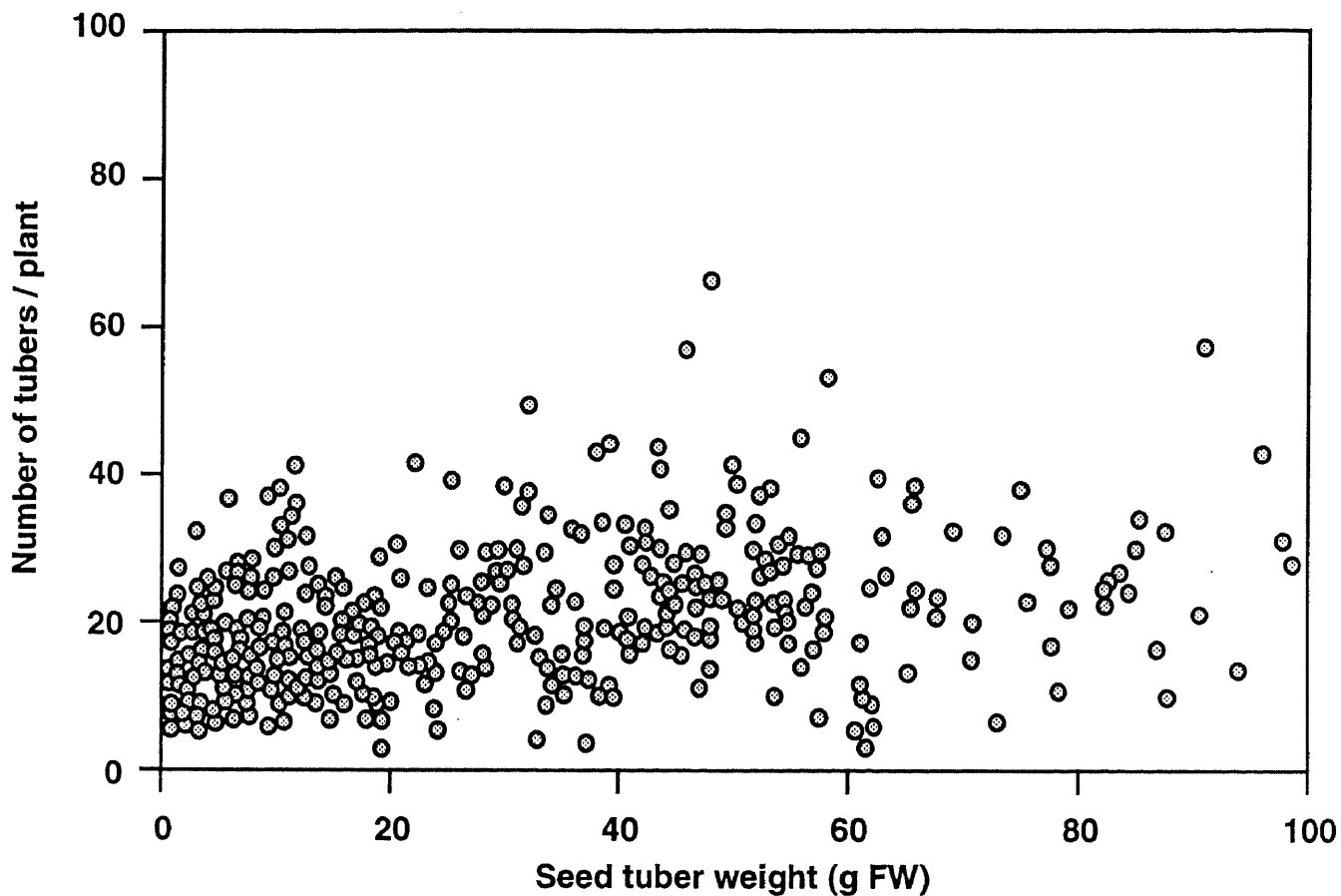


Fig. 5-11 Relationship between seed tuber weight and number of harvested tubers at the end of cultivation under field conditions.

The field derived whole tubers were used.

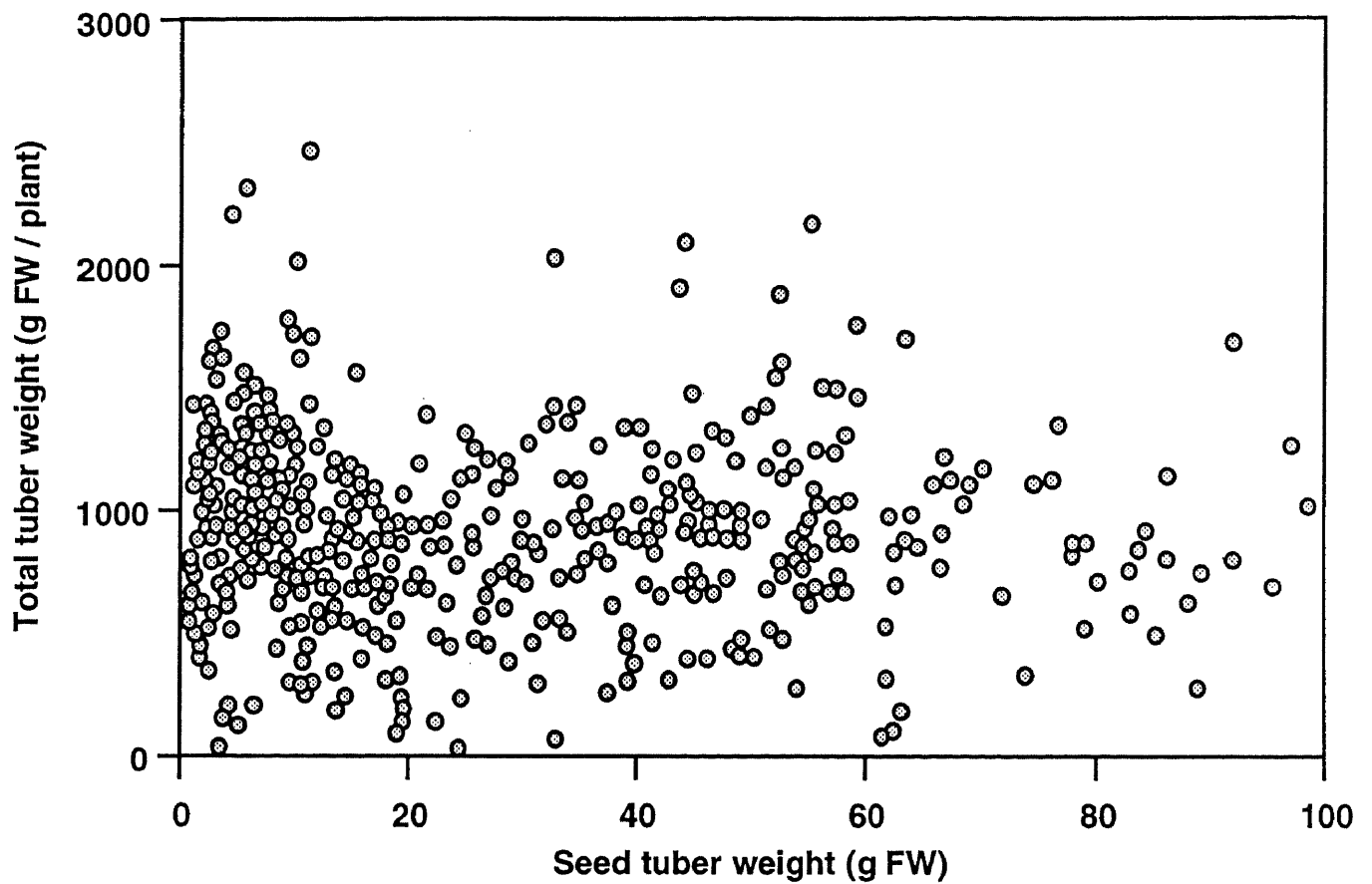


Fig. 5-12 Relationship between seed tuber weight and total harvested tuber weight at the end of cultivation under field conditions.

The field derived whole tubers were used.

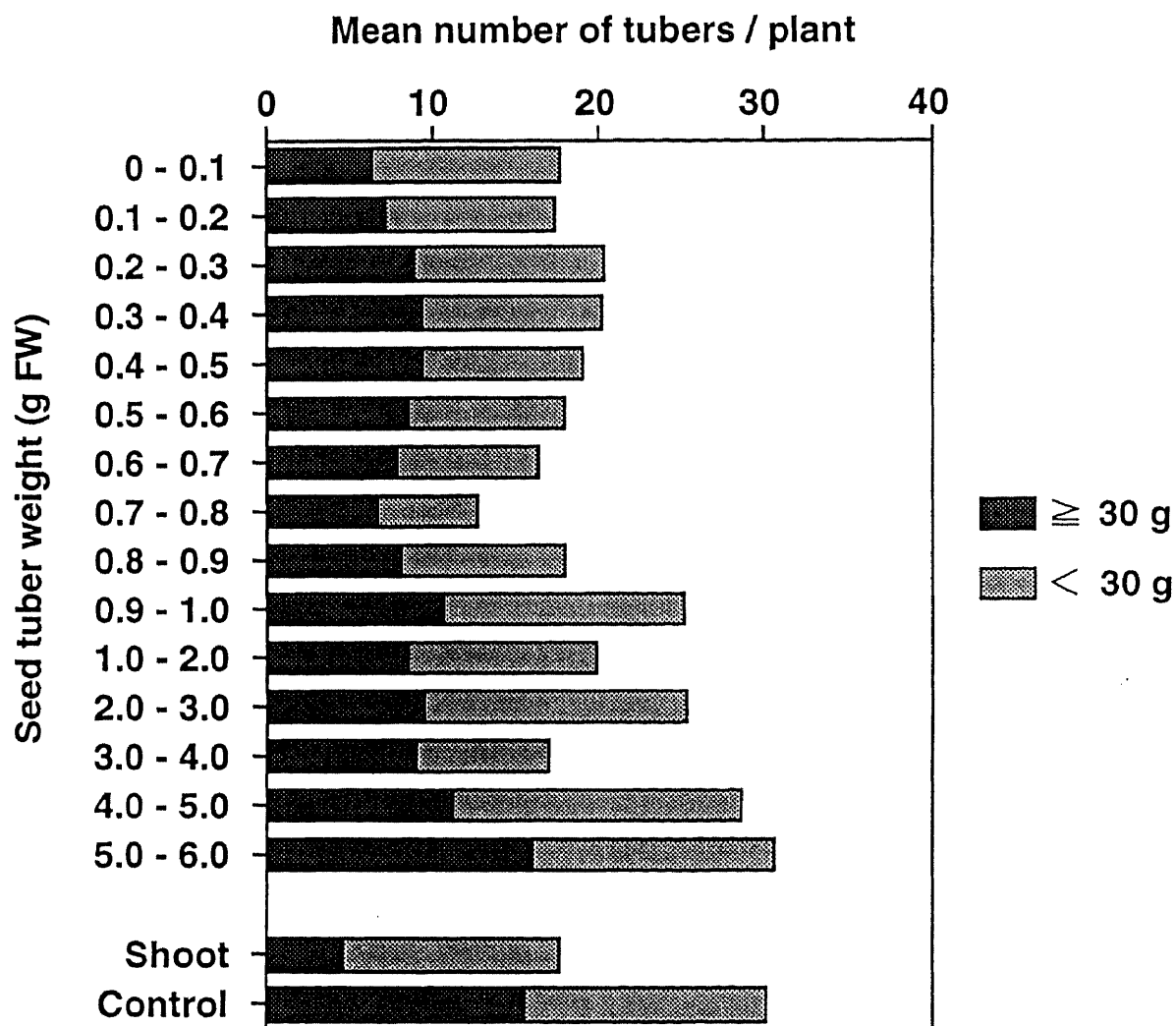


Fig. 5-13 Relationship between seed tuber weight and mean number of harvested tubers at the end of cultivation under field conditions.

Mean number of harvested tubers weighing more than 30 g (FW) are also shown.

"Shoot" indicates mean number of harvested tubers when the acclimatized potato shoots were transplanted and cultivated. "Control" indicates number of harvested tubers when large size tubers derived field cultivation were cut to 50 - 70 g (FW) and used.

5-4 まとめ

本実験によって、小型培養槽由来の塊茎を苗化など特別の操作なしで直接に圃場に植付けても、良好に生育し、塊茎を形成することを証明できた。用いる塊茎の大きさに関わりなく栽培が可能であり、また、1株あたり収穫された塊茎の40%以上は、次年度栽培用の種薯として利用可能なものであった。従って、小型培養槽由来の塊茎を種薯生産に利用可能であることが確認できた。

一連の結果から、収量に大きく影響するのは、種苗の生産方法や培養条件、植付ける塊茎の大きさではなく、地上部の発達程度、生育期間の長さなど、萌芽した後の植物体の状況や栽培条件であることがわかった。従って、組織培養由来のごく小型の塊茎を使用しても、地上部生育が問題なく進みかつ栽培の条件が整っていれば、大型の塊茎を植付けた場合と同程度の収量を期待できるものと考えられる。

小型培養槽由来の塊茎を植付けた場合に生じた収量ばらつきは、主として、地上部生育のばらつきに起因しており、このような地上部生育のばらつきは、塊茎の萌芽時期のばらつき、および、初期生育のばらつきによるところが大きいものと考えられる。例えば、前章で観察された通り、培養槽由来の塊茎をそのまま植付けると、萌芽の遅れる株が混在することになり、その結果、全体の収量が減少することになる。さらに、小型培養槽由来の塊茎では、栽培初期に欠株となる割合が約19%と高く、これが、圃場面積あたりの生産性の低下をまねくことは明らかであった。従って、萌芽しなかったり萌芽の遅れる塊茎をあらかじめ選別するか、適当な催芽処理等により萌芽を揃えることが必要と考えられる。

従来から、培養由来の塊茎では一般の種薯を使用するより初期生育が劣るという現象が指摘されてきたが、培養槽由来の塊茎でも、このことは改善できなかった。しかし、本実験では同時に、従来言われてきたように、順化苗を移植するよりも塊茎を栽培に利用する方が有利であるということを確認することができた。

本実験の結果は、組織培養由来の塊茎を、現在の日本の一般的な方法に従って栽培した場合の生産性を示しており、ただ1回の試験結果とはいえ、現在の栽培方法を変えなくても10倍、あるいは収穫時期によってはそれ以上の倍率で種薯を増殖し得ることを示すものである。培養槽由来の塊茎を使って栽培した場合に、定常的にどの程度の倍率を見込めるかについては、栽培試験を繰り返して確かめる必要があるが、少なくとも10倍程度の倍率で次年度用の種薯を生産する能力を持っていることが明らかになったと考えられる。さらに、今後、栽培技術の改良等によって、この倍率をさらに高める余地があると考えられる。そのためには、前章および本章の結果から、さらに、(1) 保存性や萌芽性において均質な塊茎を得るための培養技術の改良、(2) 欠株や萌芽の不揃いを減少させる方法の開発、(3) 初期生育を促進する栽培条件の検討、を行う必要がある。このうち、(3)については、現在でもマイクロチューバーを利用して種薯を生産している企業等があり、また、初期生育が旺盛でないとされるTPSのための栽培技術も開発されているのであるから、これらを応用することによって解決できる可能性がある。これらの問題を解決することは、日本のみならず、種薯を次年度まで保存することが困難な国々において、種薯生産を組織培養を利用して行なう可能性を探る上でも、きわめて重要である。

第6章 総合考察

培養槽を用い通気培養することによって種苗を大量増殖する技術は、現在、最も新しい種苗生産法の一つである。本研究では、この技術を利用して、種苗として利用可能なジャガイモ塊茎を大量培養できることを初めて具体的に明らかにした。また、本研究では、植物生理学的に見て興味深い現象を観察することができた。例えば、これまで、ジャガイモの塊茎形成が培養液中で阻害されるという現象は、明瞭な形で示されたことがなかった。従って、本研究で用いた種々の培養法は、ジャガイモ塊茎形成に関する生理学的解析にとっても、有用な材料となりうるものと考ええる。なお、この培養液中における塊茎形成阻害は、効率的な種苗生産にとって重大な問題であり、本研究では、間欠的に培養液量を変動させることによってこの問題が避けられることを明らかにできたものの、その原因は依然として不明である。今後、さらに培養をスケールアップするためには、この問題の解決が不可欠であり、原因解明のため、新たな視点からの研究が必要と考える。

本研究では、液体培養由来の塊茎も、圃場由来の貯蔵器官と同様に容易に保存でき、かつ、順化行程を経ずに直接に圃場に植付けし、栽培可能であることを明らかにすることができた。ただし、栽培初期（栽培1か月目）の調査で約19%、栽培後期になっても約11%が欠株となり今後課題を残した。圃場由来の塊茎を植付けても、ある程度の欠株が生じるのは避けられないであろうが、特に栽培初期の生育の遅れは収量に大きな影響を及ぼすことから、この時期に一斉に萌芽し生育させられるように、何らかの対策が必要である。そのためには、培養条件や培養方法に関する検討がさらに必要であるが、その他の対策としては、培養後に、順化やそれに準じた操作を行うことで、欠株率を減少させる方法が考えられるであろう。第1章で述べたように、培養によって貯蔵器官を得る方法の利点の一つに、基本的に順化が必要でないということがあり、本研究の結果からも、そのことは明らかであった。しかし、欠株を皆無に近づけるためには、制御された環境下で植物を一旦生育させてから圃場に移すことが、有効な方法の一つと考える。このような操作が加われば、それだけ手間がかかることになるが、一方、これによって、収量に大きな影響を及ぼす初期生育を良好に行わせることができるため、収量の安定化も期待できる。また、塊茎は非常に扱いやすいため、培養由来の苗と異なり、順化に高度なノウハウは必要でないという利点がある。従って、このような順化行程を経る方法を採用することも非現実的ではなく、栽培地の状況等から判断して、より柔軟に種薯生産体制を決定するべきと考える。さらに、この欠株の生じる問題に関しては、第4章で明らかにしたように、培養容器外に取り出した際に急激に水分を失うような塊茎が混在していることが大きく関係しているものと思われ、従って、その原因を究明し、そのような塊茎の形成を防止する培養方法を開発する必要がある。そのためには、第一に、塊茎のどのような性状がこの差を生じさせているのかを今後明らかにしなければならぬと考える。

本研究で用いたような、一貫して分化器官を用いる培養方法では、変異はほとんど生じないとされている。実際、本研究における圃場栽培試験時にも、変異したと考えられる個体は見られなかった。従って、罹病性なども、普通の個体と変わらないはずであ

る。一般に、ウイルスフリー化した個体も、栽培を繰り返せば再びウイルスに汚染され、ついには種苗としての使用に適さなくなる可能性がある。一方、現在の日本のジャガイモ種薯の供給体制では、ウイルスフリーの植物体から最終の農家まで、6年以上の圃場栽培が繰り返されている。従って、最終的に農家の手に渡っているのは、おそらく軽度ウイルスに汚染された種薯と考えられるが、それでも大きな被害が見られないのは、すでに、栽培中のウイルスの感染量を一定以下に抑えるための技術や体制が確立されていることを意味している。本研究の成果は、少なくとも日本においては、現在の種薯生産体制を補い、培養から農家までの期間を短縮することによって、より高品質の種薯を安定して農家に供給するとともに、種薯生産にかかる手数や費用を低減するのに役立つものと考えられる。従って、今後、培養槽由来のマイクロチューバーを、現在の管理技術のもとで栽培し、問題点等を明らかにし改良してゆくことが必要であろう。

本研究に用いた培養装置は、培養槽としては最も単純なものであり、このような装置を用いても効率よくマイクロチューバーを生産しうることが明らかになったことから、将来、さらに装置を簡略化し、コストのかからない実用的な形にすることも可能と考える。また、実用化を考えた場合には、培養のスケールアップの可能性が問題となるであろう。装置を大型化し、一回の培養操作によって得られるマイクロチューバーの数を増やせば、生産に要するコストは低下するものと思われる。しかし、本研究で明らかとなったように、ジャガイモは培養液中に浮遊させ続けて培養することが不適當であるため、培養装置の大きさは植物体の大きさに制限されることになる。すなわち、培養装置の深さは1本の植物体の高さが基準になるため、容量を大きくするためには底面積を大きくすることが必要ということになるが、そのような装置では、スケールアップに限界がある。このことから、現状では、比較的小規模の培養装置を多数用いる生産体制が最も実用的と言わざるを得ない。従って、今後、さらに培養装置に関する検討をすすめ、より簡略化され操作も簡単な装置やそれを用いた培養方法の開発が必要であろう。また、このような装置の簡略化や操作の簡便化に関する検討は、世界的に見ても、現在ジャガイモの種薯を購入せざるを得ないような地域やウイルスフリー種苗の利用が切望されている地域に対し、優良な種薯の供給を図るうえで、きわめて有用と考える。

第7章 総括

植物組織培養技術を用いて種苗を大量に増殖できることが明らかとなって以来、その応用が様々な植物に対して試みられている。これまで、試験的に、あるいは商業的に組織培養を利用した種苗供給が試みられた植物は数多く^{82,20)}、比較的増殖が困難と言われてきた木本植物までも、種苗大量生産の対象にできるようになっている。クローン増殖可能と報告される植物種は、現在でもその数を着実に増やしており、近年の遺伝子操作技術をはじめとする各種の品種改良技術の進歩もあいまって、優良で、遺伝的に均質な個体を比較的短期間に大量に得るための技術は、今後ますます社会的に重要な役割を果たすと考えられている。本研究は、この植物組織培養技術による種苗大量増殖技術を応用し、これまで試験管やフラスコといった小スケールで行なわれてきたジャガイモ塊茎（マイクロチューバー）の大量増殖を、培養槽にスケールアップして行なう可能性を明らかにするとともに、培養槽で生産したマイクロチューバーの実用性を確かめ、これによって、将来のジャガイモ種薯生産の効率化の可能性を示すことを目的とする。研究では、スケールアップに適した培養方法の確立、確立された培養方法を培養槽に適用する可能性、培養槽における培養効率の観察とそれを高めるための方法、および培養槽内で形成させた塊茎を圃場栽培に利用する可能性と収量について各々検討した。

第1章では、本研究の背景、目的、意義を明らかにした。ジャガイモの種薯生産は、ウイルスなどによる品質の劣化を防ぐために、特別の体制で行われている。まず、その現状を概説した。種薯生産にマイクロチューバーを利用することの有用性は確かめられてきたのにもかかわらず、培養コストの高さのために、マイクロチューバー技術の普及が妨げられている。この培養コストの低減には培養のスケールアップが有効であり、もしスケールアップに成功すれば、その社会的意義は大きく、世界の食料生産に貢献できるはずである。しかし、小型培養槽以上の大きさの培養槽を用いた植物器官の培養技術は比較的新しく、スケールアップする際に留意されるべき点すら明らかとなっていない状態にあるのは、ジャガイモ塊茎生産に限ったことではない。従って、小型培養槽を用いて、ジャガイモ塊茎の大量培養のスケールアップの可能性等を明らかにし、さらに、培養槽由来の塊茎が、過去に静置培養などで得られた塊茎と同様、圃場栽培に供し得るものであるか否かを確かめる必要がある。ただし、培養のコストやジャガイモの栽培面積などから判断して、農家が使用する種薯を培養で直接に生産するのは現実的でなく、培養由来の塊茎を原種圃や採取圃に植付けて栽培し、一般農家が使うような種薯を生産する体制をとることを前提にした。

まず、スケールアップに適した培養方法を確立し、第2章に示した。ジャガイモ塊茎を未分化組織上に直接に誘導することは困難であり、かつ、培養中の変異の発生を防止しなければならないことから、植物体をあらかじめ増殖させ、原基となる頂芽および腋芽を大量に形成させた後に、培養条件を変更して塊茎を形成させる2段階の培養方法を用いることにした。この培養方法を確立するため、1) 継代培養、2) 茎葉部の急速大量増殖（この段階をStep 1と呼ぶ）、3) 塊茎誘導・肥大（この段階をStep 2と呼ぶ）、の3つの段階について条件検討し、かつ、これらを連続して実施した場合に効率良く塊茎が得られることを確かめた。実験には、モデル品種としてユキジロを用いた。まず継

代培養条件について検討し、ホルモンフリーのMS培地（シュークロース濃度3%）を用い、25℃、明条件下という培養条件を決定した。この条件における生育は安定しており、節ごとに切断した茎切片を移植した後約2週間で、茎長約7cm、節数10節程度の植物体にまで生育した。2)以降の培養段階については、スケールアップを前提としているため、液体振盪培養条件下で検討を行なった。2) Step 1の段階は、塊茎形成前に、塊茎が効率良く形成されるような植物体を得るのが目的であるから、塊茎形成でなく植物体の生育量と頂芽+腋芽数に着目して検討した。固形培地に継代培養された植物を材料とし、培地組成などについて検討した結果、継代培地と同じ培地を用い、明条件下で振盪培養することによってジャガイモ植物体が最も良好に生育することがわかった。この条件で培養した際の植物体の生育の経時変化などについて観察した結果、次の段階で塊茎を誘導するのに適当な状態にあるものと予測できた。これらの結果に基づき、Step 1の培養条件を決定した。3) Step 2の段階については、Step 1で培養した植物体を用いて検討した。検討の結果、シュークロース濃度を高めると、光条件や培地の組成によらず塊茎が形成されることがわかった。しかし、明条件下では、同じ培地を用いて暗条件下で培養した場合に比べて塊茎数や塊茎重が少なく、また、明条件下で得た塊茎には培養終了時に芽がすでに伸長していたり休眠が浅く、しかも、二次生長しやすいことがわかった。このため、培養後の取り扱いや保存上も不利であり、従って、Step 2では、シュークロース濃度を9%としたMS培地を用い、暗条件下で培養するのが最も望ましいと判断した。この条件で形成させた塊茎は、休眠後、萌芽する能力を持っていたが、その萌芽時期には大きなばらつきが認められた。培養中の塊茎形成を経時的に観察した結果、Step 2開始後少なくとも3日から1週間以内に塊茎数が決まること、従って、Step 1終了時の植物体の状態が、塊茎形成に大きな影響を与えることが明らかになった。また、塊茎重は、培養期間を通じて直線的に増大することがわかった。低シュークロース濃度の培地を使用した場合との比較から、培地中のシュークロース量が塊茎の肥大速度に大きく影響していることが判明した。以上の結果から、継代培養以外の培養期間の全てを液体振盪培養によって行なうジャガイモ塊茎大量培養法を確立するとともに、液体振盪培養時の塊茎形成の特徴を明らかにすることができた。

第2章で行った検討結果をもとに、第3章では、小型培養槽へのスケールアップを行った。基本的に、液体振盪培養法で決定した培養条件は、そのまま小型培養槽による培養でも利用できた。しかし、培養液中に常に浸漬される部分で塊茎形成が著しく阻害され、反対に、培養液面付近では塊茎形成と肥大が促進されることがわかった。このような塊茎形成の著しい不均一性は、培養効率を著しく低下させるばかりでなく、塊茎の大きさに著しいばらつきを生じさせる。培養液面と塊茎形成との間に何らかの関係があることは明らかだったので、培養液量を培養の各Stepで変化させてその影響を調べた結果、Step 1の培地量を減らして気相中に植物体を生育させるという簡単な操作によって塊茎誘導されやすい状態の植物体を大量に培養できること、Step 2では培地量を増やして培養すると塊茎数が著しく増えることがわかった。この操作では、培養液中でも塊茎が形成されるようになり、このことが1回の培養あたりの塊茎形成数を増やす一因となっていた。この結果は、Step 1における培養条件が後の塊茎形成に大きな影響を与えること、従って、この段階における培養条件の適正化が効率的な塊茎生産に不可欠であることを

示している。しかし、この方法でも、依然として塊茎の形成や肥大は培養液面付近のみで促進され、また、塊茎の大きさのばらつきを解消するには至らなかった。培養液中における塊茎形成の阻害の原因は不明であり、今後の大きな検討課題である。また、Step 2の培養温度を低くすると、培養液中での塊茎形成と肥大が促進される反面、培養液面での肥大が阻害され、結果、比較的均一な大きさの塊茎を培養槽内に全体わたって形成させることができた。塊茎数や総塊茎重は、低温によって明らかに減少したが、培養液中における塊茎形成阻害の防止や塊茎重の均一化の糸口になる可能性があるものと考えられる。さらに、間欠的に培養液量を増減させながら培養することによって植物体を培養液中に浸漬され続けることがないようにして培養した結果、培養槽内の全体に塊茎が形成され、塊茎数の顕著な増加と塊茎重の均一化を達成することができた。この培養方法を実用化するためには、簡便な培養装置を開発する必要があるが、この結果から、効率的な塊茎生産には、培養期間中の培養液面位置の制御が不可欠であることが明らかとなった。このほか、経時的な観察から、小型培養槽における塊茎形成の特徴が液体振盪培養と同様であることを確かめた。

この第2章と第3章の結果は、液体振盪培養から小型培養槽へのスケールアップの実例としても意義深いものである。これまで、完全に液体培地中でジャガイモ塊茎が形成された例はなく、また、塊茎誘導前の培養条件が非常に重要であることを証明したのも本実験が初めてである。また、培養槽による培養では、液体振盪培養では顕在化しなかった独特の問題が生じる場合があり、その解決は、単に培地条件の検討のみでは不可能であることもわかった。さらに、本培養法における塊茎形成の特徴から、この培養法が単に塊茎の大量培養に有効であるばかりでなく、塊茎の誘導や肥大に関する生理学的な解析を行なう上でも有用であることがわかった。

以上のように、小型培養槽を用いて、ジャガイモのマイクロチューバーを大量供給できる可能性が明らかになった。しかし、実用性を確かめるためには、この方法で生産した塊茎が、実際に栽培に利用できるかを確かめることが不可欠である。この問題に関して、第4章では、培養槽由来の塊茎の性状について、萌芽性を中心に観察した。続く第5章では、培養槽由来の塊茎を圃場に直接植付けて、収量を測定した。

培養槽内に形成させた塊茎には、変色やコルク化など周皮の形態の悪い塊茎が混在していた。塊茎の乾物率は、大きさや周皮の状態にかかわらず、圃場由来の塊茎とほぼ同じ約20%であった。培養液中に形成された塊茎でも、この値は変らなかった。一方、塊茎の中には、室内に加湿せずに放置した場合、速やかに萎れ、比較的短期間に重量が減少するものが混在していた。室内における重量減少率と培養終了後3か月以内の萌芽率との関係を調べた結果、1週間で重量の60%が失われるような塊茎では、萌芽が認められないか、3か月以内における萌芽率が低かった。重量減少率の大きい塊茎が、培養槽内の特定の位置に形成されていることはなく、また、外見上もその他の塊茎と変わらなかった。塊茎が培地に浸漬され続けないようにして培養しても、このような重量減少率の大きな塊茎の形成は防止できなかった。ただし、この方法で培養した場合には、0.2 g以下のごく小型の塊茎に重量減少率の大きなものが目立った。萌芽の遅れは、圃場栽培時の生育や収量に悪影響を及ぼす。重量減少率の大きい塊茎は、培養法にもよるが、全体の30~40%を占め、また、その全てが萌芽能を持たない塊茎とは限らないので、培養

後の塊茎の保存方法について検討し、加えて、萌芽の遅れる危険性の高い塊茎を選別し、適当な催芽処理を行なうなどの対策を講じることが必要である。

次いで、小型培養槽由来の塊茎を圃場に直接に植付けて栽培し、収量を測定した。第5章には、その結果を記した。試験は、北海道網走市郊外の一般農家の圃場を利用して行った。栽培管理等は、現地の一般的なジャガイモ栽培法に従った。小型培養槽由来のごく小型の塊茎を用いても、苗化など特別な処理を必要とすることなく栽培ができ、1年で次年度用の種薯として使用可能な塊茎を生産することができた。栽培中、変異したと判断される株はなかった。しかし、植付けた株の約19%が移植後1か月しても萌芽しなかった。その一部は遅れて萌芽したので、最終的に欠株率は約11%となったが、比較的小型の塊茎で欠株が多く生じた。初期生育は、塊茎の大きさが増すにつれて大きくなったが、開花期には、少なくとも地上部生育には大きな差は認められなくなった。ただし、萌芽の遅れた株では、他の株に比べ地上部生育が劣る傾向にあった。収量は、植付けた塊茎の大きさよりも地上部の生育を反映し、ごく小型の塊茎でも、地上部がよく生育した場合には、圃場由来の比較的大型の塊茎を植付けた場合と同様の収量（塊茎数、総塊茎重）をあげることができた。萌芽の遅れた株では、やはり収量も低かった。次代の種薯として利用可能な塊茎の大きさを30gと仮定し、その割合を比較した結果、小型培養槽由来の塊茎を植付けて栽培した場合には、100g以上の大型の塊茎を切断して植付けた場合には劣るものの、順化苗を使用した場合よりも勝れていることがわかった。一連の結果から、培養槽由来の塊茎も、種苗として利用可能であることが証明できた。次年度用の種薯生産の倍率は、小型培養槽由来の塊茎を栽培した場合でも約10倍と試算できた。小型培養槽由来の塊茎が特別の処理を必要とせず栽培できることは証明できたが、より種薯生産効率を高めるためには、第4章でも明らかとなったように、萌芽時期を均一化するための技術の開発が必要である。また、生育初期の管理がきわめて重要であることが明らかとなった。

本研究によって、培養槽を用いたジャガイモ塊茎の大量増殖法が明らかとなった。この方法で得た塊茎は、実用性が高く、直接に圃場に植付けして利用できる種苗であることが証明できた。ウイルスフリーで優良な品種のジャガイモ塊茎を大量に供給することができれば、世界のジャガイモ栽培体系が大きく変わり、ジャガイモの生産性を高め、あるいは、これまで優良な種苗の入手が困難であった地域での栽培が可能になることなどが期待できる。今後、より経済的に見合うスケールで、より実用的な大量培養技術を開発することが必要であるが、本研究の過程で明らかになった事実や様々な問題点は、将来のマイクロチューバー利用の普及にとって、きわめて有用な情報になるものと考えられる。

また、貯蔵器官の大量培養技術は、最終的に得られる培養物の保存性が高く、従って、周年にわたる工業的な生産体制へと発展する可能性がある。本実験の結果は、培養由来の貯蔵器官の保存性の高さを実証するものであり、かつ、貯蔵器官の培養のスケールアップ法の実例として、社会的にもきわめて意義深いものと考えられる。

謝 辞

本論文の作成にあたり、ご親切なご指導およびご校閲を賜りました筑波大学農林学系教授上田堯夫博士に深甚の謝意を表します。また、本論文を取りまとめるに当たり、有意義なご示唆をいただきかつご校閲の労を賜った応用生物化学系教授田中秀夫博士、農林学系教授遠藤織太郎博士、並びに農林学系高柳謙治博士に深く感謝の意を表します。

本研究論文は、協和発酵工業（株）生物研究所ならびに筑波研究所において行った研究をまとめたものであり、この間研究の遂行に格別のご理解とご高配を賜り、終始変わらぬ激励とご助言をいただきました生物研究所所長 川合正允博士（現・（株）白子研究開発センター・センター長）、筑波研究所所長 富田房男博士（現・北海道大学農学部教授）、同主任研究員 高山真策博士（現・東海大学開発工学部教授）、同主任研究員 有馬康氏に深謝いたします。特に、高山真策博士には、並々ならぬご指導、ご助言をいただきました。また、実験にご助力いただきました有馬みゆき氏、宮本久美子氏、山下さおり氏はじめ、かつて研究グループを同じにした皆様に心より感謝いたします。さらに、この間、たくさんのご助言とご協力をいただきました同研究所および関連部署の皆様に、深く感謝いたします。

栽培試験は、北海道網走市西網走農業協同組合のご協力のもとに実現できたものであり、佐竹真治氏はじめご助力下さいました皆様に、深く感謝の意を表します。網走市喜多山 佐々木武彦氏には、圃場をご提供いただいたうえ、栽培管理を行っていただきました。ここに、深謝の意を表します。さらに、栽培試験実施に際して（株）ホープ代表取締役 高橋巖氏にご助力賜りました。心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) D. Horton and R.L. Sawyer, The potato as a world food crop, with a special reference to developing areas, In: Potato physiology (P.H. Li ed.), Orlando, U.S.A: Academic Press, 1985, pp. 2 - 34.
- 2) P. Accatino, 真生種子を用いての馬鈴しょ生産－熱帯における実生苗移植法について－, 熱帯アジアの馬鈴しょ生産 (秋元喜弘編), 東京, (財)いも類振会, 1985, pp. 70 - 80.
- 3) S.G. Wiersema, A method of producing seed from true potato seed, Potato Research, 29, 225 - 237 (1986)
- 4) S.G. Wiersema and R. Cabello, Comparative performance of different-sized seed tubers derived from true potato seed, American Potato Journal, 63, 241 - 249 (1986)
- 5) 岩間和人, 欧州バレイシヨ研究会, ポテトサイエンス, 8, 100 - 101 (1988)
- 6) P.B. Goodwin, Y.C. Kim and T. Adisarwanto, Propagation of potato by shoot-tip culture. 1. Shoot multiplication, Potato research, 23, 9 - 18 (1980)
- 7) P.B. Goodwin, Y.C. Kim and T. Adisarwanto, Propagation of potato by shoot-tip culture. 2. Rooting of proliferated shoots, Potato research, 23, 19 - 24 (1980)
- 8) D. Levy, Propagation of potato by direct transfer of *in vitro* proliferated shoot cuttings into the field, Scientia Horticulturae, 26, 105 - 109 (1985)
- 9) B. Kassanis, The use of tissue cultures to produce virus-free clones from infected potato varieties, Annals of Applied Biology, 45, 422 - 427 (1957)
- 10) F. Marani and A. Pisi, Meristem-tip culture and vegetative propagation in potato, Acta Horticulturae, 78, 415 - 424 (1977)
- 11) W.M. Roca, N.O. Espinoza, M.R. Roca and J.E. Bryan, A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes, American Potato Journal, 55, 691 - 701 (1978)
- 12) S.A. Miller and L. Lipschuts, Potato, In: Handbook of cell culture, vol. 3, (D.A. Evans, W.R. Shart and Y. Yamada eds.), New York, U.S.A: Macmillan Publishing, 1984, pp. 419 - 459.
- 13) P.B. Goodwin, Rapid propagation of potato by single node cuttings, Field Crop Research, 4, 166 - 173 (1981)

- 14) G. Wattimena, B. McCown and G. Weis, Comparative field performance of potato from microculture, *American Potato Journal*, 60, 27 - 33 (1983)
- 15) S. Kwiatkowski, M.W. Martin, C.R. Brown and C.J. Sluis, Serial microtuber formation as a long-term conservation method for *in vitro* potato germplasm, *American Potato Journal*, 65, 369-375 (1988)
- 16) R. Levin and I.K. Vasil, Progress in reducing the cost of micropropagation, Newsletter international association for plant tissue culture, 59, 2 - 12 (1989)
- 17) S. Takayama and M. Misawa, Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture, *Plant Cell Physiology*, 22, 461 - 467 (1981)
- 18) 高山真策, 大量培養へのアプローチ, クローン増殖と人工種子(高山真策著), 東京, オーム社, 1989, 106 - 134
- 19) S. Takayama, Y. Arima and M. Akita, Mass propagation of plants by fermentor culture techniques, Abstracts of 6th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, 449 (1986)
- 20) S. Takayama, Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques, In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry* vol. 17 (Y.P.S. Bajaj ed.), Berlin, Germany: Springer Verlag, 1991, pp. 495 - 515.
- 21) S. Takayama, B. Swedlund and Y. Miwa, Automated propagation of microbulbs of lilies. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* vol. 8 (I.K. Vasil ed.), New York, U.S.A: Academic Press, 1991, pp. 111 - 131.
- 22) W. Preil, Application of bioreactor in plant propagation, In: *Micropropagation: Technology and Application* (P.C. Debergh and R.H. Zimmermann eds.), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991, pp. 425 - 446.
- 23) H. Tanaka, F. Nishijima, M. Suwa and T. Iwamoto, Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures, *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 2359-2370 (1983)
- 24) Y. Kobayashi, H. Fukui and M. Tabata, An immobilized cell culture system for berberine production by *Thalictrum minus* cell suspension cultures, *Plant Cell Reports*, 6, 185 - 186 (1987)
- 25) Y. Kobayashi, H. Fukui and M. Tabata, Berberine production by batch and semi-continuous cultures of immobilized *Thalictrum* cells in an improved bioreactor, *Plant Cell Reports*, 7, 249 - 252 (1988)

- 26) P.J. Weathers, R.D. Cheetham and K.L. Giles, Dramatic increases in shoot number and lengths for *Musa*, *Cordyline*, and *Nephrylepis* using nutrient mist, *Acta Horticulturae*, 230, 39 - 44 (1988)
- 27) P.J. Weathers and K.L. Giles, Regeneration of plants using nutrient mist culture, *In vitro Cellular & Developmental Biology*, 24, 727 - 732 (1988)
- 28) K. Kurata, Y. Ibaraki and E. Goto, Systems for micropropagation by mist nutrient supply, An ASAE Meeting Presentation Paper No. 905014 (1990)
- 29) H.E. Flores and W.R. Curtis, Approaches to understanding and manipulating the biosynthetic potential of plant roots, In: *Biochemical Engineering VII* (H. Pederson, H. Mutharsan, D. DiBiasio eds.), New York, U.S.A.: The New York Academy of Sciences, 1992, pp. 188 - 209.
- 30) M.E. Curtin, Harvesting profitable products from plant tissue culture, *Bio/technology*, 1, 649 - 657 (1983)
- 31) P.D.L. Wilson, M.G. Hilton, P.T.H. Meehan, C.R. Waspe and M.J.C. Rhodes, The cultivation of transformed roots from laboratory to pilot plant, In: *Progress in plant cellular and molecular biology* (H.J.J. Nijkamp, L.H.W van Der Plas and J. van Aartrijk eds.), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1990, pp. 700 - 705.
- 32) 秋田求, 重岡武雄, 小泉蓉子, 川村道生, 大型培養槽を用いた多芽体の大量増殖に関する研究, *植物工場学会誌*, 6, 113 - 121 (1994)
- 33) M. Akita, T. Shigeoka, Y. Koizumi and M. Kawamura, Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor, *Plant Cell Reports*, 13, 180 - 183 (1994)
- 34) 中園敦之, イネバイオ苗大量生産システムの開発, *組織培養*, 18, 489 - 493 (1992)
- 35) 中園敦之, タンク培養によるイネクローン苗工場生産システムの開発, 第3回SHTA シンポジウム講演予稿集(植物種苗の工場生産と利用), 71 - 78 (1992)
- 36) 高山真策, 天羽孝子, 深野真弓, 中沢久美子, 秋田求, 液体培養法によるグラジオラスの繁殖に関する研究, 第10回植物組織培養シンポジウム要旨, 88 (1987)
- 37) 秋田求, グラジオラスの大量増殖, *農耕と園芸*, 43, 189 - 191 (1988)
- 38) 高山真策, 石尾慎史, 秋田求, 大澤勝次, ジャーファーマンターによるサトイモ科植物の大量増殖に関する研究(第2報)サトイモ球形の大量増殖, *園芸学会雑誌*, 58別1, 234-235 (1989)

- 39) 索建政, 豊田秀吉, 細井好之, 大内成志, カイケイジオウ (*Rehmannia glutinosa* var. *hueichngensis*) 葉外植片カルスからの根茎形成と個体再生, 植物組織培養, 10, 95 - 97 (1993)
- 40) Takahashi, S., K. Matsubara, H. Yamagata and T. Morimoto, Micropropagation of virus free bulblets of *Lilium longiflorum* by tank culture, 1. Development of liquid culture method and large scale propagation, *Acta Horticulturae*, 319, 83 (1992)
- 41) 高橋滋, バイオリアクタ利用による環境調節とその効果, 農業環境工学研究連絡会シンポジウム(植物組織培養における環境調節とその効果)講演要旨集, 8 - 13 (1993)
- 42) L.E. Gregory, Some factors for tuberization in the potato plant, *American Journal of Botany*, 43, 281 - 288 (1956)
- 43) H.W. Chapman, Tuberization in potato plant, *Physiologia Plantarum*, 11, 215 - 224 (1958)
- 44) B. Sattelmacher and H. Marschner, A simple in vitro method to study tuber growth of *Solanum tuberosum* L., *Journal of Plant Physiology*, 121, 23 - 27 (1985)
- 45) J.E. Bourque, J.C. Miller and W.D. Park, Use of an in vitro tuberization system to study tuber protein gene expression, *In Vitro Cellular & Developmental Botany*, 23, 381 - 386 (1987)
- 46) W.G. Baker, A method for the in vitro culturing of potato tubers, *Science*, 118, 384 - 385 (1953)
- 47) R.Chandra, J.H. Dodds and P. Tover, In vitro tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.), *Newsletter International Association for Plant Tissue Culture*, 55, 10 - 20 (1988)
- 48) P.J. Wang and C.Y. Hu, Potato tissue culture and its application in agriculture, In: *Potato Physiology* (P.H. Li ed.), Orlando, U.S.A: Academic Press, 1985, pp. 503 - 577.
- 49) 渡辺和之, 地下貯蔵組織の形成・発育, 作物の生態生理(佐藤庚, 山崎耕宇, 庄子貞雄, 前忠彦, 秋田重誠, 中條博良, 玖村敦彦, 渡辺和之 共著), 東京, 文永堂, 1984, pp. 323 - 372.
- 50) G. Hussey and N.J. Stacey, In vitro propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Annals of Botany*, 48, 787 - 796 (1981)
- 51) 王博仁, ウイルスフリーのジャガイモのマイクロプロパゲーション, 組織培養, 11, 391 - 395 (1985)

- 52) R. Estrada, P. Tover and J.H. Dodds, Induction of in vitro tubers in a broad range of potato genotype, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 7, 3 - 10 (1986)
- 53) E.J. Batutis and E.E. Ewing, Far-red reversal of red light effect during long-night induction of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization, *Plant physiology*, 69, 672 - 674 (1982)
- 54) C.E. Palmer and O.E. Smith, Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L., *Nature*, 221, 279 - 280 (1969)
- 55) C.E. Palmer and O.E. Smith, Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. cultured in vitro, *Plant & Cell Physiology*, 11, 303 - 314 (1970)
- 56) C.R. Mauk and A.R. Langille, Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L., *Plant Physiology*, 62, 438 - 442 (1978)
- 57) P.E. Jameson, J.A. McWha and R.M. Haslemore, Changes in cytokinins during initiation and development of potato tubers, *Physiologia Plantarum*, 63, 53 - 57 (1985)
- 58) P.S. Hammes and P.C. Nel, Control mechanisms in the tuberization process, *Potato Research*, 18, 262-272 (1975)
- 59) G. Hussey and N.J. Starcey, Factors affecting the formation in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Annals of Botany*, 53, 565 - 578 (1984)
- 60) P.L. Forsline and A.R. Langille, An assessments of the modifying effect of kinetin on in vitro tuberization of induced and non-induced tissues of *Solanum tuberosum*, *Canadian Journal of Botany*, 53, 565 - 578 (1976)
- 61) C.E. Palmer and O.E. Smith, Effect of abscisic acid on elongation and kinetin-induced tuberization of isolated stolons of *Solanum tuberosum* L., *Plant & Cell Physiology*, 10, 657 - 664 (1969)
- 62) C.H.M.S. Ahmed and G.R. Sagar, Effects of a mixture of NAA + BA on numbers and growth rates of tubers of *Solanum tuberosum* L., *Potato Research*, 24, 267- 278 (1981)
- 63) 吉原照男, 幸田泰則, バレイシヨ塊茎形成物質の生理と化学, *化学と生物*, 27, 53 - 58 (1989)
- 64) Y. Koda and Y. Okazawa, Detection of potato tuber-inducing activity in potato leaves and old tubers, *Plant Cell Physiology*, 29, 969 - 974 (1988)

- 65) Y. Koda, E-S.A. Omer, T. Yoshihara, H. Shibata, S. Sakamura and Y. Okazawa, Isolation of a specific potato tuber-inducing substance from potato leaves, *Plant Cell Physiology*, 29, 1047 - 1052 (1988)
- 66) Y. Koda, Y. Kikuta, H. Takazaki, Y. Tsujino, S. Sakamura and T. Yoshihara, Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds, *Phytochemistry*, 30, 1435 - 1438 (1991)
- 67) T. Yoshihara, E-S.A. Omer, H. Koshino, S. Sakamura, Y. Kikuta and Y. Koda, Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.), *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2835 - 2838 (1989)
- 68) S.D. Jackson and L. Willmitzer, Jasmonic acid spraying does not induce tuberization in short-day-requiring potato species kept in non-inducing conditions, *Planta*, 194, 155-159 (1994)
- 69) V. Balamani, K. Veluthambi and B.W. Poovaiah, Effect of calcium on tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.), *Plant physiology*, 80, 856 - 858 (1986)
- 70) A.M. Mingo-Castel, F.B. Negan and O.E. Smith, Effect of carbondioxide and ethylene on tuberization of isolated potato stolons cultured in vitro, *Plant physiology*, 53, 798 - 801 (1974)
- 71) A.M. Mingo-Castel, F.B. Negan, O.E. Smith and J. Kumamoto, Studies on the carbondioxide promotion and ethylene inhibition of tuberization in potato explants cultured in vitro, *Plant physiology*, 57, 480 - 485 (1976)
- 72) P.J. Wang and C.Y. Hu, In vitro mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan. *American Potato Journal*, 59, 33 - 37 (1982)
- 73) T. Murashige and F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15, 473 - 497 (1963)
- 74) P.D.S. Caligari and W. Powell, Viability in response of potato cultivars to micropropagation, 1. In vitro performance, *Annals of Applied Biology*, 115, 115 - 121 (1989)
- 75) W. Powell, J. Brown and P.D.S. Caligari, Viability in response of potato cultivars to micropropagation, 2. Subsequent field performance, *Annals of Applied Biology*, 115, pp 123 - 128 (1989)
- 76) 岡沢養三, 馬鈴薯の塊茎形成と gibberellin との関係について, *日本作物学会紀事*, 29, 121-124 (1960)

- 77) S. Takayama, Induction and breaking of dormancy in bulblets produced in vitro, In: Mass propagation of lilies through in vitro culture with special reference to *Lilium auratum*, 京都大学博士論文, 1983, pp. 72-74.
- 78) B.T. Muller-Rober, J. Kobmann, L.C. Hannah, L. Willmitzer and U. Sonnewald, One of two different ADP-glucose pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose, *Molecular & General Genetics*, 224, 136 - 146 (1990)
- 79) K.J. Oparka and K.M. Wright, Osmotic regulation of starch synthesis in potato tubers ?, *Planta*, 174, 123 - 126 (1988)
- 80) Y. Kobayashi, H. Fukui and M. Tabata, Effect of carbon dioxide and ethylene on berberine production and cell browning in *Thalictrum minus* cell cultures. *Plant Cell Reports*, 9, 496 - 499 (1991)
- 81) T. Hemberg, Potato rest, In: *Potato physiology* (P.H. Li ed.) Orlando, U.S.A: Academic Press, 1985, pp. 354 - 388.
- 82) 秋田求, 高山真策, 液体培養法による花卉の急速増殖, *新花卉*, 139, 42 - 49 (1988)