

## ガス透過性フッ素樹脂フィルムを使用した簡易な高濃度炭酸ガス環境の創出と その利用

秋田 求<sup>1,2,3</sup>、栗本 聡宣<sup>1</sup>、小南 祐佑<sup>2</sup>

### 要旨

高いガス透過性を有するフッ素樹脂 (FEP) 製フィルムを利用して簡便に炭酸ガス濃度を高める方法を提案する。FEP フィルム (50  $\mu\text{m}$  厚) で作製したバック中に炭酸緩衝液を入れて封じると、フィルムを通して炭酸ガスを供給することができる。したがって、小型容器内に FEP 製フィルムバックを置くだけで、簡便に容器内の炭酸ガス濃度を高めることができる。培養後のイチゴ苗の順化時の発根を促進した例と、赤色光照明と併用してエゾスナゴケの芽の形成を促進した例を紹介する。

キーワード：炭酸ガス富化、フッ素樹脂フィルム、順化、イチゴ、エゾスナゴケ

### 1. 結論

炭酸ガス濃度は、植物の生育や生態に大きく影響する。人工的に炭酸ガスの濃度を高め、植物の変化を観察した研究は数多い (例えば、Yi ら<sup>(1)</sup>)。高濃度炭酸ガス環境に対する反応は植物によって異なるものの、光合成能力、窒素含量などをはじめ、様々な変化がみられることは、ここに説明するまでもないであろう (例えば、Hikosaka ら<sup>(2)</sup>)。しかし、それを実際に観察するためには、大気中の炭酸ガス濃度を制御する装置が特別に必要であるため、特に研究の立ち上げ時において、高濃度炭酸ガスに対する反応の手掛かりをとりあえず得たい場合などに、それが難しいという問題がある。それによって、対象植物の重要な性質を見逃してきた可能性もある。くわえて、小規模で植物を利用せざるを得ない場合、例えば、組換え株の作出作業等において、炭酸ガス高濃度化によって効率を高め、研究を加速することが期待できるかもしれない。

四フッ化エチレン・六フッ化プロピレン共重合体 (FEP) 製フィルムはガス透過性が高く、透明でほとんどの可視光を吸収せず、化学的に不活性で有機溶媒やオートクレーブ処理に耐え、防汚性が高いなどの優れた性質をもつ。農業用ハウスなどにも用いられ、強度も高い。これまで、田中ら<sup>(3)</sup>による一連の研究により、植物組織培養用容器として各種ガス透過性フィルムが有用であることは非常によく知られている。我々のグループでも、液体培地を満たした FEP 製フィルムを使用してヒメツリガネゴケを培養できることを報告している<sup>(4)</sup>。繰り返し使用が可能であることも確かめている。これらは、組織培養用容器として、材料植物を封じて無菌状態に保つための FEP 製フィルムの利用法であるが、我々のグループでは、このフィルムによって作成した容器に炭酸ガスバッファーを入れると、そこから徐々に炭酸ガスが放出されること、これを利用すると、手軽に高濃度炭酸ガス環境を小スペース単位に創出できることを報告してきた。ここでは、その方法によって実際に炭酸ガス供給が行われることを示し、次いで、

原稿受付 2020年1月20日

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 生物工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

その環境を植物生産に利用する例を示して、この簡便な方法が有用であることを紹介する。

## 2. 材料および方法

炭酸ガス供給には、ダイキン工業製 FEP 樹脂を、フィルム厚さ 50  $\mu\text{m}$ 、直径 55 mm の筒状にグンゼ(株)にて加工し、両端をクリップで閉じるようにして(以下、FEP フィルムバックと表す)、中に 2M 炭酸緩衝液 100 mL を満たしたものをを用いた。

イチゴ (*Fragaria x ananassa*、品種名あきひめ) 無菌培養系は、滅菌種子から誘導した。微量要素とビタミン類以外の塩類強度を 1/2 とした改変 MS 培地 (スクロース 30  $\text{g L}^{-1}$ 、寒天末 (01028-85、ナカライテスク) 1  $\text{g L}^{-1}$ ) を入れた UM サンプルビン (直径 55 mm、高さ 95 mm) を用い、23  $^{\circ}\text{C}$  に設定したインキュベーター内 (BIOTRON NC350、日本医科器械) にて連続明条件で 2 か月間培養した。次いで培地を流水中でよく除去し、バーミキュライト 20 g と 1,000 倍希釈したハイポネックス 40 mL を入れオートクレーブ処理した腰高シャーレ (直径 90 mm、高さ 60 mm) に移植した。フタをしてサージカルテープで封じ、206  $\times$  106  $\times$  64 mm の透明ポリスチレンケースに FEP フィルムバックとともに入れた。これを近畿大学先端技術総合研究所内の培養棚におき、光量 180  $\mu\text{mol cm}^{-2} \text{min}^{-1}$  の連続明条件下で 1 か月間容器内順化した。

エゾスナゴケ (*Racomitrium japonicum*) は、近畿大学生物理工学部屋上緑化に使用していたものを採取し、水道水中で十分に洗浄して用いた。直径 35 mm、高さ 40 mm のカップに 5 g のバーミキュライトと 1,000 倍希釈したハイポネックス 20 mL を入れ、エゾスナゴケ茎葉体をカップあたり 3 本移植して、白色および赤色 (660 nm) LED 光下で生育させた。これを 206  $\times$  106  $\times$  64 mm の透明ポリスチレンケースに FEP フィルムバックとともに入れた。23  $^{\circ}\text{C}$ 、連続明条件下に保ち、15 日目に炭酸緩衝液を交換して 30 日間生育させた。

## 3. 結果および考察

高炭酸ガス濃度の環境を人為的に作出することは、植物の生産性を高める目的ばかりでなく、炭酸ガスに対する植物の生理学的な変化を調べるうえでも重要である。手軽に、高炭酸ガス濃度環境を創出する方法は、そのような研究の手始めに有用である。まず、本方法によって、実際に高炭酸ガス濃度の環境が得られるのかを、図 1A に示すプラスチックボックスを用いて確かめた。透明プラスチック製ボックス (348 $\times$ 252 $\times$ 51 mm) 内に、2M 炭酸緩衝液 100 mL を満たした FEP フィルムバックを入れた場合の、ボックス内の炭酸ガス濃度を測定した結果を図 1B に示す。炭酸ガスは一定濃度で飽和し、かつ、20 日間以上にわたって高濃度を維持した。このときの炭酸ガス濃度は、ボックスの気密性を高めることによってさらに高くすることができることを確かめている(結果略)。つまり、容器の材質やその密閉度等によって、得られる二酸化炭素濃度が異なるので、このことについて各々の条件で確認してから利用することが必要である。しかしながら、このような簡便な方法によって、極めて手軽に高炭酸ガス濃度の環境を小スペースで用意できることは、植物分野に限らず他分野におけるスタートアップ研究において有用であろう。

FEP フィルムバックの利用によって簡便に炭酸ガス濃度を高められることが確認されたため、次に、この方法が実際に植物生産に影響することを、イチゴとエゾスナゴケを用いて確かめた。FEP フィルムバックを利用して炭酸ガス濃度を高めた環境とし、イチゴを順化した結果を図 2 に示した。FEP フィル

ムバックを使用した場合、葉柄が太く短い植物体となり、特に根が明らかに発達した。高濃度炭酸ガス下では発根が促進され、特に発根が悪く順化率が低い植物に対してはそれが有効であると報告されているが<sup>(5)</sup>、イチゴでも高濃度炭酸ガスの発根促進作用が確認された。

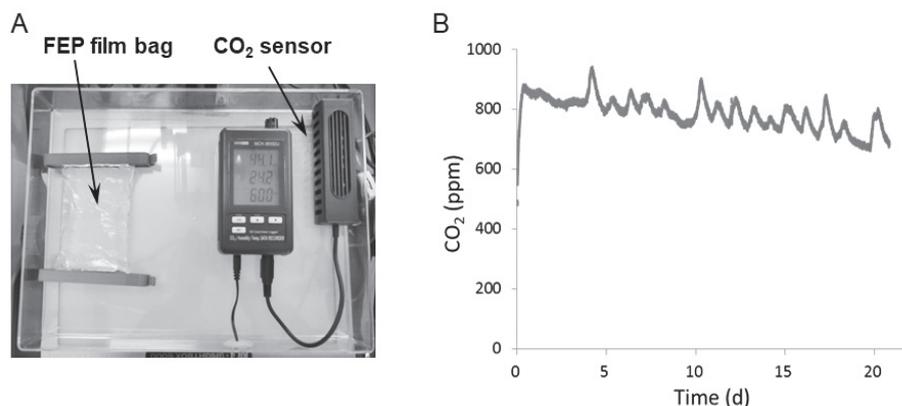


図1 炭酸ガス高濃度化への FEP フィルムバックの利用

A : 炭酸緩衝液を満した FEP フィルムバックをケース内に入れ炭酸ガス濃度を測定した。B : ケース内炭酸ガス濃度の経時変化。測定値の変動は装置ノイズと考えられる。したがって、この場合、約 800 ppm の炭酸ガス濃度を維持したと推定される。

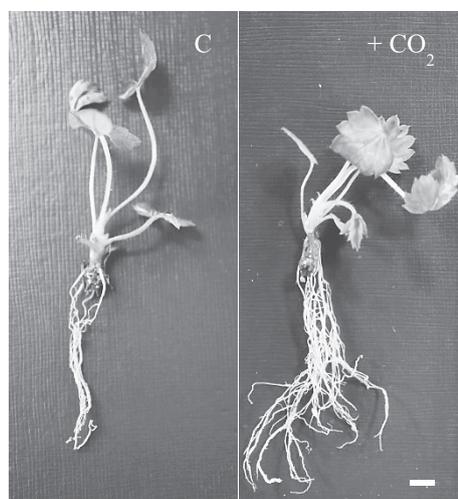


図2 炭酸緩衝液を満した FEP フィルムバックを入れたケース内で順化したイチゴ植物体  
C : 対照、+ CO<sub>2</sub> : 炭酸緩衝液を満した FEP フィルムバック使用。スケールは 1 cm。両区で順化されたなかでも生育の良好な個体を例として示した。(Bar=1 cm)

また、エゾスナゴケを同様に FEP フィルムバックの存在するボックス内で生育させた結果を図 3 に示した。炭酸ガス濃度を高めた透明なボックス内で、バーミキュライト上にエゾスナゴケを生育させたとき、特に芽数が赤色光下で相乗的に増えた。エゾスナゴケ生産の際には、いかにして個体数を効率よく増やすかが重要であるが、炭酸ガス濃度と赤色光を組み合わせる環境で、エゾスナゴケの増殖効率が高まることがわかった。

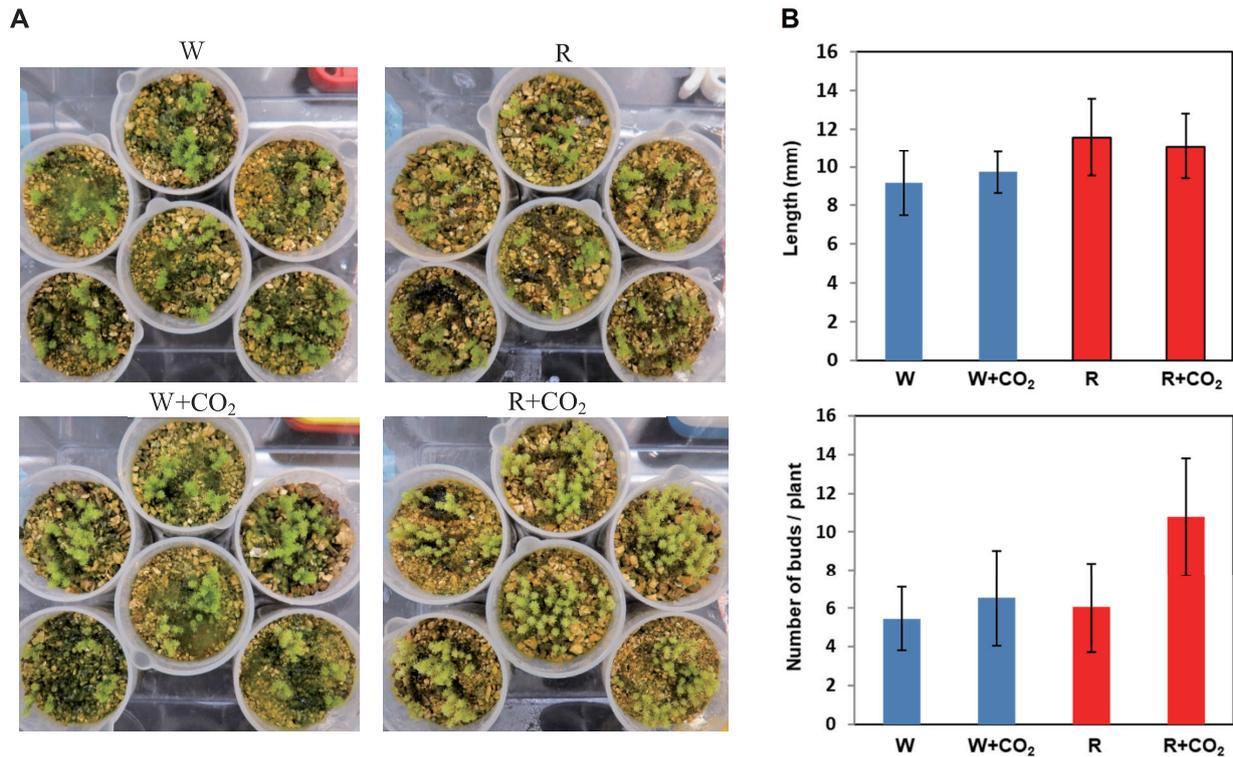


図3 炭酸緩衝液を満たしたFEPフィルムバックを入れたケース内でのエゾスナゴケの生育

FEP フィルムバックの影響とともに赤色光の影響を観察した。A：エゾスナゴケの生育状況。カップ直径は35 mm。W；白色LED、R；赤色（660 nm）LED、+CO<sub>2</sub>；FEPフィルムバック使用。B：エゾスナゴケ1本あたり最大長さ（左）および芽数（右）。平均値±SD（n=30）を示す。

以上のことから、FEP フィルムバックを用いて簡便に炭酸ガス濃度を高めた環境が用意できること、それが、組織培養苗の利用に対して有効である可能性が示された。炭酸ガス濃度は、本報告に示した現象以外に、例えばホルモン応答（例えば Mathooko ら<sup>(6)</sup>、Zhou ら<sup>(7)</sup>）、分化（例えば Niu ら<sup>(8)</sup>）、微生物生育（例えば Gill and Tan<sup>(9)</sup>）など様々に影響することが早くから報告されている。それらの研究の手がかりを得るうえでも、本報告に示した方法は役立つであろう。しかし、一方で、フィルム状の容器は取扱いにくく、また、FEPは加工性に乏しい素材でもあるので、目的に応じてより使用しやすい容器等を開発することが必要であろう。

#### 4. 結論

FEP フィルムで容器を作成し、炭酸緩衝液を入れて封じることによって、簡便に小型容器内の炭酸ガス濃度を高めることができる。この方法の有効性を2種類の植物を用いて確かめた。本方法は特に研究のスタートアップ時に有用であろう。

#### 5. 参考文献

- (1) Yi, Y., Sugiura, D., Yano, K. (2019) Quantifying Phosphorus and Water Demand to Attain Maximum Growth of *Solanum tuberosum* in a CO<sub>2</sub>-Enriched Environment. *Frontiers in Plant Science* 10, 1417.
- (2) Hikosaka, K., Kinugasa, T., Oikawa, S., Onoda, Y., Hirose, T. (2011) Effects of elevated CO<sub>2</sub> concentration on seed production in C3 annual plants. *Journal of Experimental Botany* 62, 1523–1530.

- 
- (3) Tanaka, M., Goi, M., Higashiura, T. (1988) A novel disposable film culture vessel. *Acta Horticulturae* 226, 663-670.
- (4) 谷垣悠介、濱中将人、西野祐輔、大和義幸、秋田求 (2014) ガス透過性フィルム製容器を用いたヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) の液体静置培養. *植物環境工学* 26, 160-162.
- (5) 井樋昭宏、巢山拓郎 (2018) 二酸化炭素施用が難発根性花木ギンヨウアカシア、オリーブ、フェイジョアの挿し木発根に及ぼす影響. *福岡県農林業総合試験場研究報* 4, 117-121.
- (6) Mathooko, F. M., Inaba, A., Nakamura, R. (1998) Characterization of carbon dioxide stress-induced ethylene biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. *Plant and Cell Physiology* 39, 285-293.
- (7) Zhou, Y. L., Van Leeuwen, S., K., Pieterse, C. M. J., Bakker, P. A. H. M., Van Wees, S. C. M. (2019) Effect of atmospheric CO<sub>2</sub> on plant defense against leaf and root pathogens of *Arabidopsis*. *European Journal of Plant Pathology* 154, 31-42.
- (8) Niu, Y. F., Jin, C. W., Jin, G. L., Zhou, Q. Y., Lin, X. Y., Tang, C. X., Zhang, Y. S. (2011) Auxin modulates the enhanced development of root hairs in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. under elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Cell and Environment* 34, 1304-1317.
- (9) Gill, C. O., Tan, K. H. (1979) Effect of Carbon Dioxide on Growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied And Environmental Microbiology* 38, 237-240.

## 英文抄録

## A simple method for making CO<sub>2</sub> enriched micro-environment by a fluorinated (FEP) film and its application

Motomu Akita<sup>1,2,3</sup>, Satoki Kurimoto<sup>1</sup> and Yusuke Kominami<sup>2</sup>

We used a fluorinated (FEP) film which has high gas permeability to enhance CO<sub>2</sub> concentration in air. When the FEP film (50 μm thickness) bag filled with carbonate/bicarbonate buffer was put in a container, CO<sub>2</sub> concentration was successfully increased. This simple method will be valuable for start-up researches. As an example, root development of *in vitro* derived strawberry plantlets was clearly stimulated during acclimatization by this method. Bud formation of *Racomitrium japonicum* was also clearly enhanced under the elevated CO<sub>2</sub> concentration in combination with the red light illumination.

**Key Words:** CO<sub>2</sub> enrichment, fluorinated film, acclimatization, strawberry, *Racomitrium japonicum*

- 
1. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan
  2. Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan
  3. Advanced Technology Research Institute, Kindai University, Wakayama 642-0017, Japan