

一般報文

培地中の糖の有無および培養器の換気方法が バレイショ外植体の CO₂ 濃度—純光合成速度 特性に及ぼす影響

中山 衛*・古在豊樹**・渡部桐絵**

*石川島播磨重工業株式会社技術研究所

(〒235 横浜市磯子区新中原町1)

**千葉大学園芸学部

(〒271 松戸市松戸648, 別刷請求先)

(1991年3月26日受付)

(1991年4月30日受理)

バレイショ (*Solanum tuberosum* L. cv. Benimaru) 外植体の培養初期における純光合成速度を、培養器を自然換気した条件下で種々の CO₂ 濃度について測定し、培地中の糖の有無がそれらに及ぼす影響を調べた。またそれら純光合成速度を、培養器を強制換気した状態でのそれらと比較した。糖を含む培地に植え付けられた外植体の純光合成速度は、いずれの CO₂ 濃度についても移植後数時間後には低下し始め、植え付け後3日目には移植直後のその20%程度に低下した。いずれの CO₂ 濃度についても培養器を強制換気した場合は自然換気した場合より外植体の純光合成速度が大きかった。外植体の初期乾物重増加は、ショ糖を含む培地において大であった。

1. はじめに

培養器内の培養緑色小植物体 (以下、培養植物) は、明期において光合成を行っているものの、培養器内の CO₂ 濃度が通常は低いためにその純光合成速度は小さいことが示されている¹⁾。また、培養室内で CO₂ 施用を行い、明期における培養器内の CO₂ 濃度を高めれば、培養植物の光合成ならびに生長が促進され、さらには培養植物が光独立栄養生長し得ることが数種の植物において報告されている^{2,3)}。CO₂ 施用をした場合、培地のショ糖濃度が低いほど生長が促進されとする報告もある⁴⁾。これらの報告は、培養植物の生長促進には炭素源としての糖の培地への供給が必須であるという従来の従属栄養的培養法に対して、クロロフィルを含む培養植物ではその光合成能力を十分に利用した光独立栄養培養法が有効であり得ることを示している。

植物組織培養において培養器内への CO₂ 施用を扱った報告としては、上記の他にも Walker *et al.*⁵⁾ Kozai *ら*⁶⁾ によるものがある。CO₂ 施用の効果にはそれぞれ差

異がみられるが、いずれも培養植物の生長を促進する方法のひとつとして培養植物の光合成の促進を検討している。以上のような背景から、最近、培養小植物体の光合成特性についての報告^{3,6)}が、2, 3見られるようになった。ところが、外植体そのものの光合成特性については、その測定が困難なこともあって、ほとんど見あたらない。

本研究では、外植体 (葉を含む節) の純光合成速度を測定する装置を作成し、それを用いてバレイショ外植体の純光合成速度を測定し、さらに初期乾物重増加に培地中の糖の有無が及ぼす影響を検討した。さらに、培養器が自然換気あるいは強制換気されている条件下における外植体の純光合成速度についても、培地中に糖がある場合と無い場合について検討した。

2. 材料および方法

(1) 供試植物、培地および培養条件

約1か月毎に継代培養されてきたバレイショ (*Solanum tuberosum* L. cv. Benimaru) の小植物体を供試し、1枚の葉を含む節に切り分けたものを外植体に用

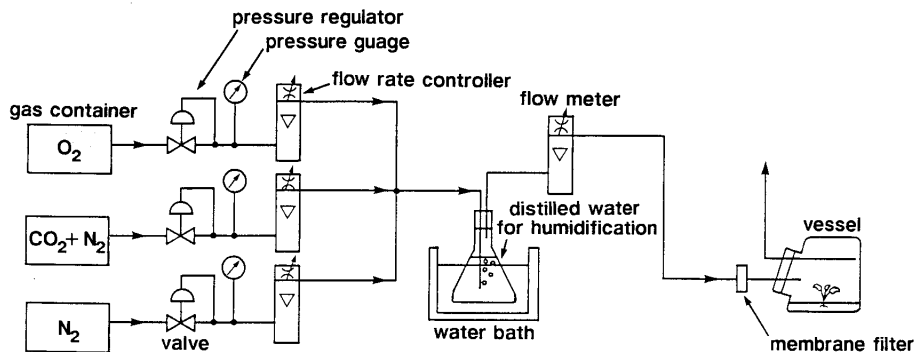


Fig. 1 Schematic diagram of the system for measuring net photosynthetic rates of explants/plantlets *in vitro* under forced ventilation conditions.

いた。標準濃度の MS (Murashige & Skoog, 1962) 培地⁷⁾を用い、寒天濃度は 8 g l^{-1} とした。ショ糖濃度は 30 g l^{-1} および 0 g l^{-1} の 2 種類とした。植物生長調節物質は無添加とした。ガラス製の平底試験管 (管長 125 mm, 内径 25 mm) 1 本あたり 10 ml の培地を分注し、そこに外植体を 1 本植え付け、プラスチックキャップ (松本医科機器⁸⁾製, M キャップ) で閉栓した。外植体を含む培養器を、気温 25°C および棚面の光合成有効量子束 (Photosynthetic photon flux, 以下, PPF) が $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ のグロースチャンバー (小糸工業⁹⁾製, コイトロン, モデル HML-250 DA) 内に置いた。光源としては、メタルハライドと蛍光灯を同時使用した。すべての測定は、上記と同一の気温および PPF 条件下で行われた。

(2) 自然換気条件下における純光合成速度の測定

純光合成速度の測定は、外植体の移植日 (0 日目) および移植 3 日後 (3 日目) に行った。0 日目と 3 日目に、培地ショ糖濃度別 (0 および 30 g l^{-1}) に 4 本ずつの培養器を任意に選び、自然換気条件下で純光合成速度の測定を行った。培養器の自然換気回数⁸⁾は約 1.4 h^{-1} であった。

測定時には、グロースチャンバー内にアクリル製の箱を設置し、その中に上記の培養器を置き、チャンバー内気温 25°C の条件下において、アクリル箱内の CO_2 濃度を変化させることにより培養器内の CO_2 濃度を間接的に変化させ、種々の培養器内 CO_2 濃度における純光合成速度を求めた。アクリル箱内の CO_2 濃度の調節には、赤外線 CO_2 分析計 (富士電気製造, モデル ZFP)、 CO_2 ガス濃度コントローラ、電磁弁および CO_2 ガスポンペを用いた。アクリル箱内空気の攪拌を小型のプロペラファンを用いて行い、箱内の CO_2 濃度の分布を均一にした。

上記の測定条件下では、培養器内の外植体の純光合成速度は、培養器内外の CO_2 濃度差と、培養器の自然換気速度 (培養器の換気回数 $\times$ 培養器の容積) の積として求められる¹⁾。0 日目における CO_2 濃度差の測定は、外植体を移植後、5-10 時間の範囲で行った。

(3) 強制換気条件下における純光合成速度

移植後 3 日目に培地ショ糖濃度別の外植体の純光合成速度測定を、培養器が自然換気された条件下で行い、その後、強制換気された条件下で行った。強制換気条件下での外植体の純光合成速度測定には Fig. 1 に示す装置を用いた。この装置は、外植体を含む培養器とそこに流入させるガスの調節を行う各種機器から成る。培養器 (ポリカーボネイト製, 容積 $1,000 \text{ ml}$) のキャップ部に流入ガスの出入口を設け、湿度調節および流量調節したガスを、除菌フィルタ (東洋濾紙¹⁰⁾ DISMIC-25 JP) を通して流入させた。流入空気速度は、約 12 l h^{-1} (強制換気回数 12 h^{-1}) とした。培養器内へ流入させるガス (以下, 流入ガス) は、ガスボンベ充填されている CO_2 、 O_2 および N_2 を、圧力調節器 (ヤマト産業¹¹⁾製モデル YR-90) および流量調節器 (小島製作所¹²⁾製ベローズ・ニードルバルブ付流量計・モデル RK 1300 V) により一定の比で混合したものを用いた。流入ガスの CO_2 濃度は、ガスの混合比を変更することにより調節した。 O_2 濃度は常に 21% とした。流入ガスは、恒温水槽内に蒸留水を入れたメスシリンダー (容積 200 ml) を置き、そこに流入ガスを通気して加湿し、湿度調節した。ガス流路の配管には、シリコンゴム製のチューブ (内径 5 mm, 外径 9 mm) を用いた。

測定用培養器には、培養開始時と同じショ糖濃度 (30 g l^{-1}) の MS 寒天培地を入れ、測定は、そこに外植体を移植して気温 25°C の条件下で行った。流入ガスの CO_2 濃度を低濃度から高濃度へと数段階に変化させ、

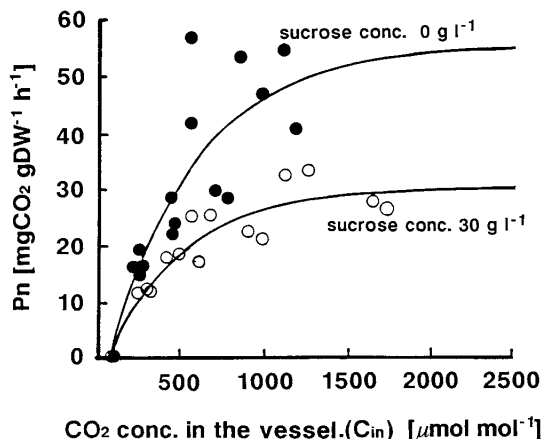


Fig. 2 Net photosynthetic rates per leaf dry weight (P_n) of potato explants *in vitro* on day 0 as influenced by CO_2 concentration in the vessel and the presence/absence of sucrose in the medium under natural ventilation conditions. (Photosynthetic photon flux: $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Air temperature: 25°C)

培養器のガスの出入口においてガスを採取しその CO_2 濃度を測定した。この場合、外植体の純光合成速度は定常時における培養器のガス出入口の CO_2 濃度差の測定値と流入ガスの流量の積として得られる。自然および強制換気条件下における外植体の純光合成速度算定のための CO_2 濃度の測定には、ガスクロマトグラフ (株式会社島津製作所製 GC-12 A) を用いた。ガスの採取方法等は富士原⁹⁾の方法に準じた。

(4) CO_2 濃度—純光合成速度曲線

外植体の純光合成速度と培養器内の CO_2 濃度の関係を示す CO_2 濃度—純光合成速度曲線は、両者の値を用いて以下の式のパラメーターを最小自乗法で算定することによって求めた。

$$P_n = P_{\max} (1 - \exp(-\frac{A_c}{P_{\max}} (C_{in} - C_c))) \quad (1)$$

ただし、

P_n : 外植体葉部乾物重当り純光合成速度 [$\text{mgCO}_2 \text{gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$],

$P_{\max}$: CO_2 飽和時における P_n [$\text{mgCO}_2 \text{gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$],

A_c : CO_2 補償点における CO_2 濃度—純光合成速度曲線の傾き,

C_{in} : 培養器内 CO_2 濃度 [$\mu\text{mol mol}^{-1}$],

C_c : CO_2 補償点 [$\mu\text{mol mol}^{-1}$].

である。なお、 C_{in} は自然換気条件下では、培養器内 CO_2 濃度の測定値、強制換気条件下では培養器から流

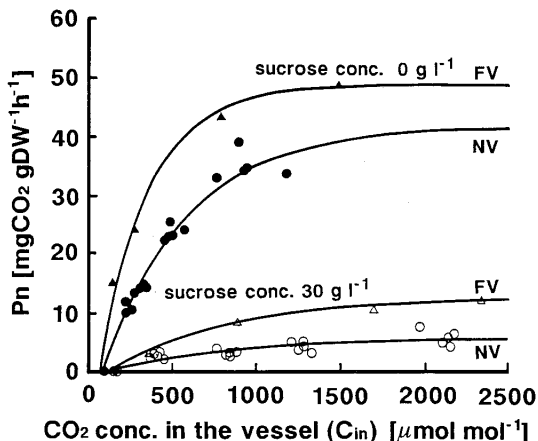


Fig. 3 Net photosynthetic rates per leaf dry weight (P_n) of potato explants *in vitro* on day 3 as influenced by CO_2 concentration in the vessel and the presence/absence of sucrose in the medium under natural (NV) and forced (FV) ventilation conditions. (Photosynthetic photon flux: $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Air temperature: 25°C)

出するガスの CO_2 濃度の測定値とした。

(5) 葉乾物重の測定

供試した外植体の乾物重を純光合成速度の測定後に、葉とその他にわけて電子天秤で測定した。

3. 結果および考察

Fig. 2 に、0 日目における外植体葉部乾物重当りの純光合成速度 (P_n) に及ぼす培養器内 CO_2 濃度 (C_{in}) と、培地シヨ糖の有無の影響を示す。Fig. 3 に、3 日目における C_{in} と P_n の関係およびその関係に及ぼす培地シヨ糖の有無および換気方法 (自然および強制) の違いの影響を示す。Table 1 に、 C_{in} と P_n の関係を表す曲線の式における $P_{\max}$, A_c および C_c の各パラメータ値とその時の外植体葉部乾物重 (W_d) および乾物率 (D) を測定条件別に示す。

(1) 培地シヨ糖の有無が純光合成速度に及ぼす影響

外植体の P_n は、0 日目および3 日目のいずれにおいても培地シヨ糖濃度が 0 g l^{-1} において 30 g l^{-1} においてよりも大であった。培地シヨ糖濃度 0 g l^{-1} の P_n は、0 日目では 30 g l^{-1} のその約 2 倍、3 日目では 8-10 倍であった。 P_n は培地シヨ糖濃度にかかわらず経時的に減少し、その減少程度は培地シヨ糖濃度が 30 g l^{-1} においての方が、 0 g l^{-1} においてより大であった。 CO_2 補償点 (C_c) は培地シヨ糖濃度 0 g l^{-1} , 30 g l^{-1} において、

Table 1. Parameter values of CO₂-Net photosynthesis curves, dry weight(W_d), %dry matter(D) of the explants under different measuring conditions

Treatments		Day ¹⁾	P _{max} ²⁾	C _c ³⁾	A _c ⁴⁾	W _d [mg explant ⁻¹]	D [%]
Suc. ⁵⁾	Vent. ⁶⁾						
30	NV ⁷⁾	0	32	60	0.054	6.5	20
0	NV	0	60	50	0.084	5.0	15
30	NV	3	6	98	0.0056	17.3	27
30	NV ⁸⁾	3	13	100	0.018	16.3	27
0	NV	3	42	86	0.084	6.9	14
0	FV	3	49	70	0.17	8.6	12

Notes: 1) Day; days after treatments, 2) P_{max}; Maximum net photosynthesis rate [mgCO₂ gDW⁻¹ h⁻¹], 3) C_c; CO₂ compensation concentration [μmol mol⁻¹], 4) A_c; CO₂ absorption efficiency at C_{in}=C_c [mgCO₂ gDW⁻¹ h⁻¹ mol μmol⁻¹], 5) Suc.; sucrose concentration in the medium, 6) Vent.; ventilation method of the vessel, 7) NV; natural ventilation method, 8) FV; forced ventilation condition.

0 日目にはそれぞれ 50, 60 μmol mol⁻¹ であったのに対し, 3 日目には 86, 98 μmol mol⁻¹ に上昇した.

一般に, 葉内の糖濃度が上昇すると, P_n は低下することが知られている^{9),10)}. 本測定において, 培地シヨ糖濃度 30 g l⁻¹ における 3 日目の P_n が培地シヨ糖濃度 0 g l⁻¹ におけるその数分の 1 以下であったのは, Neals and Incoll(1968), Herold(1980) らの知見に基づくと, 外植体が培地から吸収した糖が葉内に蓄積し, 葉内糖濃度が上昇したことにより, 光合成の抑制があったからであると解釈できる. 培地シヨ糖濃度を高めるにつれて, 培養植物の RuBPCase の活性と純光合成速度が共に低下することから¹²⁾, 両者には何らかの因果関係があると考えられる.

なお, 培地のシヨ糖濃度 30 g l⁻¹ の外植体では, 3 日目に葉色がやや赤紫に変化したことが目視により観察されたので, 葉内において糖が関与した色素生成が行われたとも考えられる.

(2) 培養器の換気方法が純光合成速度に及ぼす影響

3 日目における P_n は, 培地シヨ糖濃度 30 g l⁻¹ および 0 g l⁻¹ のいずれにおいても, 強制換気条件下において自然換気条件下よりも大であった. これは, 本測定条件下では, 培養器内におけるガス流動が自然換気よりも強制換気において大となったことによって, 外植体葉面の CO₂ 拡散抵抗¹¹⁾が減少したためであると考えられる. CO₂ 拡散抵抗理論¹¹⁾によれば, 植物体の純光合成速度は, 葉面における空気流速の増大 (CO₂ 拡散抵抗の減少) に伴い, ある一定値まで一次関数的に増大する.

本実験は, 強制換気速度約 12 l h⁻¹ の条件下で行ったが, この時の培養器内中央付近の最大空気流速は 3 cm s⁻¹ であった. また, 本装置を用いて本実験の後に

行われた補足実験によれば, 強制換気速度 130 l h⁻¹ (換気回数 130 h⁻¹), 460 l h⁻¹ (換気回数 460 h⁻¹) の時の上記最大空気流速はそれぞれ, 約 10 cm s⁻¹, 40 cm s⁻¹ であった. C_{in} が 1000 μmol mol⁻¹ の場合, 強制換気速度 460 l h⁻¹ の時の P_n は, それが 12, 130 l h⁻¹ の時の P_n の, それぞれ約 1.5, 2 倍であった. すなわち, 上記強制換気速度の範囲内で, 強制換気速度が大である程 P_n は大であった.

当然のことながら, 換気速度は外植体の純光合成速度だけでなく, 培地からの蒸発速度, 外植体からの蒸散速度, および外植体の葉の気孔抵抗, さらに C_{in}, 培養器内水蒸気飽差などにも影響を及ぼす. 換気速度のこれら因子に対する多面的影響を考慮した上での, 最適換気速度の関する研究は今後の課題である.

(3) 外植体の葉乾物重および乾物率

外植体の葉乾物重 (W_d) および乾物率 (D) については, 0 日目および 3 日目ともに, 培地シヨ糖濃度 30 g l⁻¹ の方が 0 g l⁻¹ よりも大であった. 0 日目から 3 日目までの外植体の乾物重増加量は, 培地シヨ糖濃度 30 g l⁻¹ において, 同 0 g l⁻¹ におけるその 5 倍以上となった. したがって, 外植体の初期乾物増加への影響は, 光合成よりも, 培地からの糖吸収の方が大であったといえる. 培地シヨ糖濃度 30 g l⁻¹ の試験区では, 3 日目の乾物率が換気方法によらず, 27% と高かったことが注目される. この高い乾物率が, その後の乾物重増加に及ぼす影響については今後究明する必要がある. また, 乾物重増加速度および純光合成速度が培地糖濃度と換気方法の組合せにどのように影響されるのかを炭素収支の側面から検討することは今後の課題となるであろう.

文 献

- 1) 富士原和宏, 古在豊樹, 渡部一郎, 1987. 植物組織培養器内環境の基礎的研究(3)培養小植物体を含む閉栓容器内の炭酸ガス濃度測定と培養小植物体の純光合成速度の推定. 農業気象, **43**: 21-30.
- 2) 古在豊樹, 岩浪好恵, 富士原和宏, 1987. 組織培養苗の大量生産のための環境調節(1)炭酸ガス施用が増殖培養時におけるスターチス (*Limonium* Hybrid) の小植物体の生長に及ぼす影響. 植物組織培養, **4**: 22-26.
- 3) Kozai, T., H. Oki, K. Fujiwara, 1990. Photosynthetic Characteristics of *Cymbidium* plantlet in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **22**: 205-211.
- 4) 土井元章, 野口宝司, 浅平 端, 1986. 日本生物環境調節学会第24回大会講演要旨, p. 64-65.
- 5) Walker, P., C. Heuser and P. Heinemann, 1988. Micro-propagation: Studies of gaseous environments. Acta Hort., **230**: 145-151.
- 6) Kozai, T. and Iwanami, Y. 1988. Effects of CO₂ Enrichment and Sucrose Concentration under High Photon Flux on Plantlet Growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) during the Preparation Stage. J. Jap. Soc. for Hort. Sci., **57**: 279-288.
- 7) Murashige, T. and F. Skoog, 1962, A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 8) 富士原和宏, 古在豊樹, 渡部一郎, 1987. 植物組織培養器内環境の基礎的研究(2)栓および容器が閉栓容器内外間のガス交換速度に及ぼす影響. 農業気象, **42**: 119-127.
- 9) Neals, T. F. and Incoll, L. D., 1968. The Control of Leaf Photosynthesis Rate by the Level of Assimilate Concentration in Leaf. A Review of the Hypothesis. Bot. Rev., **34**: 107-124.
- 10) Herold, A., 1980. Regulation of Photosynthesis by Sink Activity: The Missing Link. New Phytol., **86**: 131-144.
- 11) 矢吹万寿, 宮川秀夫, 1970: 風速と光合成に関する研究(第2報) 風速と光合成との関係. 農業気象, **26**: 137-141.
- 12) 渡辺浩一郎, 渡辺幸雄, 嶋田典司, 1991. 通気培養におけるスパティフィラム小植物体の生育, 見かけの光合成およびリブローズ-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼに及ぼす培地ショ糖濃度の影響について. 植物組織培養, **7**: 74-79.

Summary

Effect of the Presence/Absence of Sugar in the Medium and
Natural/Forced Ventilation on the Net Photosynthetic Rates of
Potato Explants *in vitro*

M. NAKAYAMA*, T. KOZAI** AND K. WATANABE**

*Research Institute, Ishikawajima-Harima Heavy Industries Co., Ltd., Yokohama 235 Japan

**Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271 Japan

Leafy single node stem cuttings of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Benimaru) were used as explants and cultured for 3 days on MS agar medium with 3% sucrose or without sugar. Net photosynthetic rates of the explants per leaf dry weight (NPR) were estimated under conditions of natural ventilation (in a glass test tube capped with a molded plastic cap) and forced ventilation (in a vessel fitted with a forced ventilation system). The NPR, 3 days after the start of culture, was 8-10 times greater in the sugar-free medium treatment than in the sugar-containing medium treatment when CO₂ concentration in the vessel was in a range between 500 and 1000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (or ppm). The increase in dry weight of the explants during the 3 days was 5 times greater in the sugar-containing medium treatment than in the sugar-free medium treatment. The NPR at 500 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ CO₂ was 1.5-2.0 times greater under the forced ventilation condition than under the natural ventilation condition.