

*in vitro* 培養を利用した園芸作物のクローン増殖苗の効率的生産システムの確立  
－ 培養時の光条件および炭素利用効率を中心に－

小笠原 宣好

*in vitro* 培養を利用した園芸作物のクローン増殖苗の効率的生産システムの確立  
—培養時の光条件および炭素利用効率を中心に—

小笠原 宣好

## 目次

緒言 .....	1
第1章 <i>in vitro</i> 培養によるクローン増殖苗の質を決定する要因.....	2
第1節 <i>in vitro</i> 培養によるクローン増殖法の概要.....	2
第2節 培養植物体の乾物生産における光合成の寄与.....	3
第3節 培養植物体の乾物生産と炭素交換.....	5
第4節 培養期間中の器内環境と培養植物体の植え出し後の生育.....	16
第5節 培養期間中の器内環境と植え出し後の植物体内の物質転流.....	18
第6節 総合考察.....	22
第7節 摘要.....	23
第2章 培養植物体の生長に対する明暗周期の短縮の効果.....	23
第1節 短縮された明暗周期下における培養植物体の生長と炭素収支.....	23
第2節 明暗周期が培養植物体の形態的および生理的特性に及ぼす影響.....	32
第3節 総合考察.....	36
第4節 摘要.....	36
第3章 培養時光環境の調節によるマイクロプロパゲーションシステムの効率化.....	36
第1節 短い明暗周期下の培養植物体の日二酸化炭素吸収量.....	37
第2節 明暗周期を短縮して培養した培養苗の植え出し後の生育.....	39
第3節 総合考察.....	42
第4節 摘要.....	44
第4章 総括.....	45
謝辞 .....	46
引用文献 .....	46

## 緒言

*in vitro* 培養を利用したクローン苗の大量増殖は、フランスのMorel (1960) のシンビジウムの茎頂培養に端を発して以来、観賞植物をはじめとする園芸作物を中心に実用化が進み、現在ではマイクロプロパゲーションと称して種苗生産において必要不可欠な技術となっている。わが国の園芸作物の中で組織培養苗の利用率の高い作物は、イチゴを除けばほとんどが花卉類であり、中でもラン (87.1%)、ガーベラ (91.9%) などは、その苗の供給がほとんど組織培養苗でまかなわれているほか、わが国で切り花生産が最も多い、カーネーション (70.5%)、キク (45.4%) でも組織培養苗の利用率が高い（括弧内は栽培面積に占める割合、1992年統計）。従来の、さし木や株分けといった伝統的な栄養繁殖法と比較した場合のマイクロプロパゲーションの利点としては、(1) 増殖率が著しく高い、(2) 気象条件に左右されず、安定して生産できる、(3) 病原菌やウイルスに犯されていない健全な苗を供給できる、などがあげられ、新品種の導入や生産の周年化が年々進む中で、組織培養苗の需要はますます増大していくことが予想される。

現在までに、1000種以上の植物がマイクロプロパゲーションにより増殖可能といわれているが、実用化されているのはこのなかのごく一部にすぎない。これは主として、技術的な理由よりもコスト的な理由による。マイクロプロパゲーション苗の生産費のうち、材料費と設備の占める割合はわずかで、半分以上は人件費で占められている (Chu, 1993)。マイクロプロパゲーションは通常、密閉度の高いガラスや耐熱プラスチック製の容器内の寒天培地に、分化したてのシート片または小植物体を植え付け、ある程度の大きさに生長したところで植物体を容器から取り出し、土壤に移植する、という手順をふむ。そしてこれらの操作は、ほとんど人手によって行われている。増殖しようとする植物の種類が多様なため、また苗が必要となる時期が種類により限られているため、工程の機械化はほとんどなされていない。したがって、マイクロプロパゲーションに投入される労力のほとんどは継代と順化時の植え出しに集中している。

このうち、現在最も改善の必要があると考えられるのは、順化における一連の過程である。具体的には、(1) 植え出し操作（培養瓶からの取り出し、寒天の流去）、

(2) 植え出し後の順化効率、の2つである。植え出し操作では、培養器を開栓して中の培養苗を取り出し、寒天などの培地を洗い落として、適当なコンテナに培土を用いて植えるので、必然的に植物体は機械的な損傷を受ける。加えて、培養器内の物理的および化学環境が、培養苗を移植する先のそれとは大きく異なっているために、培養苗の順化効率を高い水準で維持することが一般に困難なものとなっている。

培養苗の順化率を上げるには2通りの方向性がある。一つは、植え出しにともなう環境変化を最小限に抑える工

夫を施すことである。植え出しにともなう環境変化を最小限に抑える試みとしては、順化中の温度、湿度、光などをマイクロコンピュータにより制御する順化装置（古在・林ら、1987）があげられる。もう一つの方向性は、環境変化に対する耐性を培養期間中に培養苗に付与することである。環境変化に対する耐性を培養期間中に培養苗に付与することは、順化率を高める上で重要であるだけではなく、生産費のうちの大部分を占める人件費を削減する上からも重要である。なぜなら、耐性の強い苗であれば、植え出しに関わる一連の作業において、多少の粗雑性をもって培養苗を扱うことが可能になり、そのため植え出しの作業にかかる時間が節約されうるからである。また、人件費を削減するためにもう一つ重要なことは、培養苗の苗質を均一化することである。培養植物体の継代および植え出しの際には、正常な苗とそうでない苗、または苗の大きさ別に選別する必要があり、その労力も多大である。また、培養器内での苗の生育に均一性を持たせるためにも培養期間中の培養条件の改善が強く求められる。

植物組織培養の容器内の環境は従来、無機塩類や有機物、生長調節物質といった、培地組成に関する事項が重点的に検討されてきたが、1980年代後半以降、培養植物体を含む培養器内の物理的環境、特に気相環境が圃場条件下のそれと著しく異なること、およびそれが培養器内の生長や順化に大きく影響していることが明らかとなってきた。培養容器は気密性が高いために、容器内の二酸化炭素濃度は、初期には培養植物体の光合成活動によって二酸化炭素補償点近くまで低下する（安藤、1978；Fournioux・Bessis、1985；Fujiwaraら、1987；土井ら、1989）。このため、培養器内の植物体の生長は、光合成量の制限によって遅延されていると考えられている。一方、培養植物体は、培地の糖を炭素源とした光混合栄養生長をしており、植え出し時に光独立栄養生長への移行がスムーズに行われないことが、順化率を低下させているといわれている。また、培養器内では相対湿度が高く、空気の移動が少ないとことなどから、培養植物体の葉の表皮ワックスの形成や気孔開閉機能が不十分となり、特に水ストレスに対する耐性が低下している（Grout・Aston、1977）ことが順化効率を低下させる原因の一つと考えられている。

こうした培養植物体の生長抑制や順化効率を改善するために、培養器内への強制換気や、培養器外の二酸化炭素濃度を高めることによって、培養植物体の生長を促進させる方法が検討されている。さらに、培地に糖を加えず、強光下で二酸化炭素施用を行って植物体を生長させる光独立栄養培養によるマイクロプロパゲーションシステムも考案されている（Fujiwaraら、1988；Kozai、1991）。しかし、培養器外の二酸化炭素濃度を高めたり、光強度をあげたりするためには設備費や光熱費などの費用がかさむことになる。

一方、培養時の環境条件が、植物体の器内生長や植え

出し直後の順化効率に及ぼす影響についてはよく調べられているが、培養苗が成植物体に生長するまでの長期間にわたってその影響を調べた報告は見あたらない。培養器内の生長が順調に進み、無事順化が完了して立派な苗が生産されたとしても、それは植物生産の立場からは決して完成品ではない。マイクロプロパゲーションのシステムの効率化を検討する際には、培養苗が成植物体になるまでの期間を含めて検討を行るべきであろう。

本研究では、マイクロプロパゲーション苗の効率的生産を目的とし、培養終了時点で求められる順化に適した苗質とはどのようなものかを明らかにした上で、苗質を向上するための物理的環境、特に光環境に注目し、その改善を通じて増殖効率を高めうることを実証しようとするものである。研究にあたっては、成植物体に至るまでの長期的な視点からの検討を十分にふまえ、汎用性があり、既存の設備で容易に実現可能な環境調節法の確立をめざしました。

第1章ではまず、培養器内物理環境と培養器内植物体の生長との関係を、新規データおよび既知の知見に基づいたシミュレーションによって整理した。つづいて、順化効率の向上に焦点をあて、培養時における物理環境と植え出し後の生長との関係を、生態的および生理的両面から明らかにした。第2章では、第1章で明らかにした、苗質と物理的環境との関係をふまえ、特に光環境の改善を通じた苗質の向上を達成した。第3章では、第2章で明らかにした光環境の改善にもとづいた、マイクロプロパゲーションシステムを確立した。

なお、先に述べたように、1000種以上の植物がマイクロプロパゲーションにより増殖可能といわれているが、本研究で供試した植物は、特別な場合を除き、形態的に典型的な性質を示すと考えた2種の植物を選んで供試することにした。それは、カラジウムとペチュニアであり、前者は伝統的な分球法では増殖率が極めて低く、マイクロプロパゲーションによって種苗生産が行われている観葉植物である。後者は、最近特に遺伝子組換えなどのバイオテクノロジー手法による品種改良が盛んに行われている草本花卉で、培養器内環境の向上による苗質の向上が最も求められている植物の1つである。

## 第1章 *in vitro* 培養によるクローニング苗の 質を決定する要因

**第1節 *in vitro* 培養によるクローニング法の概要**  
*in vitro* 培養によるクローニング苗の大量増殖（マイクロプロパゲーション）の手順について、Murashige (1974) は以下の3つの段階にわけている (Fig. 1-1)。すなわち、

第I段階：無菌培養系の確立 (Establishment of the aseptic culture)

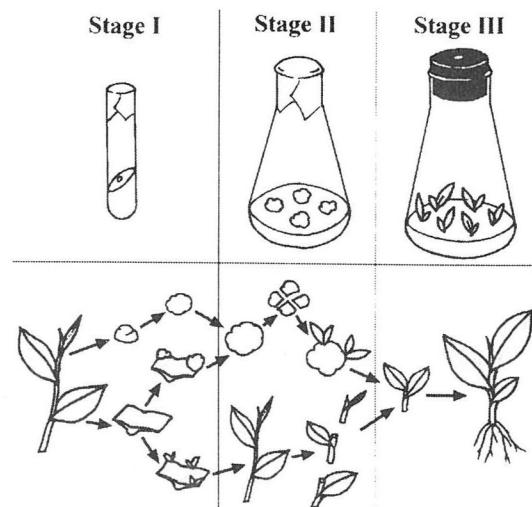


Fig. 1-1. Procedure of micropropagation (Murashige, 1974).  
 Stage I : Establishment of the aseptic culture.  
 Stage II: Multiplication of propagula.  
 Stage III: Preparation for reestablishment of plants in soil.

第II段階：繁殖体の増殖 (Multiplication of propagula)

第III段階：植物体を土壤へ活着させるための準備  
(Preparation for reestablishment of plants in soil)

である。第I段階では、単に無菌培養を達成することを目的とする。その結果、培養体は、肥大あるいは発根したショート先端、カルスなど種々の形態に変化する。第II段階では、最終的に植物体を生じさせることのできる器官や構造体を急速に増殖させることを目的とする。これらの器官や構造体には不定胚や不定芽、腋生ショート、カルスといったものがあげられる。第III段階は、第II段階で増殖させた繁殖体を、土壤へ移植するための準備過程で、ショートからの発根、水ストレスへの耐性や病原体への抵抗性の付与、植物体の栄養形式の混合栄養生長から独立栄養生長への転換、などが含まれる。そして、培地や培養条件は、第I段階と第II段階の間ではほとんど共通しているが、第III段階は、前の2つの段階のものと変えなければならないとしている。

Debergh · Maene (1981) はさらにマイクロプロパゲーションの手順を以下の5つの段階に細分している。

第0段階：正常な条件下で母植物を準備

第I段階：無菌培養系の確立

第II段階：分裂組織の誘導、芽への発達、およびその急速な増殖

第IIIa段階：芽からショートへの伸長と均一なショートを準備する

第IIIb段階：培養器外における発根および初期生長

MurashigeとDebergh · MaeneのI、II、IIIの各段階はそれぞれ対応しているが、Murashige の手順では、発根までを無菌条件下で行うのに対し、Debergh · Maene は、*in vitro*においては機能的な根系の発達は困難で、植え

出し時にダメージなどがあるとの理由で、培養器外での発根を提倡し、それを第IIIb段階に位置づけている。しかし、培養苗の発根を *in vitro* で行うか、それとも植え出し後に行うかは植物の種類によって異なることが考えられる。また、シート増殖を目的とする第IIa段階においても、発根をともない、それがシートの伸長に寄与する場合も考えられることから、第III段階を2つに細分しない方が、マイクロプロパゲーション過程を一般化するうえでも都合がよいと考えられる。そこで本論文中では、マイクロプロパゲーションの過程を Murashige の区分にしたがって記述することにする。以下に各段階の培養体と培養条件の特徴について簡単に述べる。

第I段階では、単に無菌培養を達成することを目的としている。外植体としては、茎頂、葉片、節切片、根などがあげられる。外植体からは、不定芽を形成させる方法、定芽を発達させる方法、いったん脱分化させてカルスを誘導させる方法、などがある。培地には液体と固形のいずれもが使われるが、培地に糖を添加して、暗黒条件か比較的弱光条件下で培養が行われる。第I段階の成否には主として、外植体の状態と、培地に添加される有機物と生長調節物質の処方が大きく関わる。

第II段階では、最終的に植物体を生じさせることのできる器官や構造体を急速に増殖させることを目的とするが、その器官や構造体によって培養形態は大きく異なってくる。代表的なものとしては、(1) カルスを増殖させ、必要量の増殖が完了した後にカルスから植物体を再分化させる、(2) 苗条原基やプロトコーム状球体などの組織を増殖させ、必要量の増殖が完了した後にこれらの組織から植物体を発生させる、(3) 不定芽を繰り返して発生させ、必要量の不定芽を得た後にそれを発達させる、(4) 定芽を繰り返して発生させ、必要量の定芽を得た後にそれを発達させる、などの方法があり、またこれらの方を組み合わせることも多い。いずれも培地に主としてサイトカイニン類などの生長調節物質を添加することが多い。液体培地、固形培地のいずれも用いられるが、培地には糖を添加する。液体培地の方が、養水分の吸収が速やかに行われ、繁殖速度が固形培地より高い。スケール的には、小さなフラスコから、大きな培養槽まで用いる場合がある。スケールの大きい培養槽では、培地中の溶存酸素、pH、培地成分などの調節を培養の進行に応じて調節できるものもある。培養体はカルスである場合を除いて、クロロフィルをもっており、光混合栄養生長をしていると考えられる。すなわち、その生長量は培地の糖濃度に大きく依存しているものの、培養には光を必要とする。ただし、強い光強度は必要でない。しかし、光合成による炭素固定が培養体の生長に寄与する割合は、培養体の種類や培養体のエージによって異なると考えられる。一般に、培養体を新培地に移植した直後しばらくの間は、糖の吸収を盛んに行い培養体のクロロフィル含量が低下する。この期間は培養体の呼吸速度が増加するとともに養体の乾物が急速に増加する。しばらく

して培地の糖がある程度消費されると、呼吸速度が低下し、培養体の乾物増加速度が緩やかになるが、クロロフィル含量は増加し、光合成による炭素固定が増加する。こうした培地の糖の消費と培養体の乾物増加、呼吸、緑化との関係は、特に液体培地中の培養細胞について詳細に調べられている。

第III段階では、第II段階で増殖した器官や構造体から発生した植物体あるいはシートを1つずつ分離して、土壤に活着させるための準備を行う。シートからの発根、水ストレスへの耐性や病原体への抵抗性の付与、栄養形式の混合栄養生長から独立栄養生長への転換、などが含まれる。培養体は、クロロフィルをもち、光合成を行っているが、その生長には培地への糖の添加を必要としており、光混合栄養生長を行っている。培地には、少数の例外を除き寒天などの固形培地や、ロックウールなどを支持体とした培地を用いる。200～1000 ml の比較的容量の大きい培養器に、10～50個のシートまたは植物体を植え付けることが多い。最終的には培養器外へ植え出さなければならないが、その際には相対湿度の低下ならびに光強度や温度の急激な変化など大きな環境変化に遭遇する。さらに、植え出し操作の際の植物体の機械的な損傷のために、活着率の低下をもたらすことが多い。したがって、第III段階では、単に培養植物体の生長量だけではなく、ストレスへの耐性といった培養苗の品質に充分留意した培養条件を設定しなくてはならない。

以上のように、マイクロプロパゲーションの苗質には、第III段階の培養条件が最も大きく影響する。本章では、培養苗の質を、第III段階における培養期間中の生長と、植え出し後の生長の両面から検討するが、まず第2節で、*in vitro* における培養植物体の炭素の流れについて検討する。第3節では培養期間中の生長に関わる要因を植物体の炭素交換との関係から検討する。第4節では、植え出し後の生長を、培養期間中の環境要因との関係から検討する。第5節では、培養期間中に同化された炭素の植え出し後の流れを同位体を用いることで明らかにし、培養期間中の環境条件の後作用について検討する。

## 第2節 培養植物体の乾物生産における光合成の寄与

慣行のマイクロプロパゲーションにおいては、第III段階の培養においても糖を添加した培地を用いる。そして、培養植物体の純光合成速度は、培養器の密閉度の高さに起因する二酸化炭素供給の制限により、低く見積もられることが多い（富士原ら、1987）。このような条件下では、培養植物体の炭素源はもっぱら培地の糖に依存し、光合成活動が培養植物体の乾物生産に寄与する割合は極めて低いと考えられてきた。一方、培養植物体の光合成が制限されない条件での光合成活動が乾物生産に寄与する割合は、Fujiwaraら（1995）が評価を行っており、培地の糖よりも光合成活動が寄与する割合が高いことを報告している。しかし、いずれの場合も、培地の糖は植物

体に吸収された後、そのまま植物体の構成成分として使われるのか、それとも呼吸によっていったん二酸化炭素として放出された後に光合成によって同化されて構成成分として使われるのかは不明である。

#### 材料および方法

ペチュニア *Petunia* ‘Haming Scarlet Star’ の種子を無菌発芽させ、節培養により増殖させたシートの先端を2~3葉つけて切り取り外植体とした。外植体の平均乾物重は2.3 mg であった。

培地はMS培地 (Murashige・Skoog, 1962) に寒天0.8%、ショ糖0、1、または2%を添加し、pHを5.8に調整したものを200mlエルレンマイヤーフラスコに50 mlずつ分注した。オートクレーブ滅菌後、外植体を培養器あたり5個体ずつ植え付けた。植え付け後、培養器を2本の曲管付きのシリコン栓で封じ、一方の管から外気(二酸化炭素350 ppm:350 ppm区)、または外気を水酸化ナトリウム水溶液に通して二酸化炭素を2 ppm以下にしたもの(0 ppm区)を通気した(5 l h<sup>-1</sup>)。いずれも、培養器内に通気する前の空気を脱塩水中に通じてバブリングさせ、培養器内湿度を保った。照明光源は昼光色蛍光灯とし、培養棚面における光合成有効光量子束密度(以下、PPFD)が34.2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>となるように調整した。培養室内温度25°C、連続照明下で20日間培養した後、培養植物体の乾物増加量と、培地の糖含量を測定した。

培地糖含量の測定は以下のようにして行った。培地に約100 mlの水を加えて乳鉢ですりつぶした後、吸引ろ過により培地から糖を抽出した。この操作を3回繰り返してろ液を合わせて500 mlに定容後、1 mlをバイアルびんにとり、減圧乾固した。乾燥試料に塩酸ヒドロキシルアミンのピリジン溶液(30 mg ml<sup>-1</sup>)を0.5 ml加え、70°Cで60分間加熱してオキシム化した後、シリル化剤(pyridine: trimethylchlorosilane: hexamethyldisilazane = 10: 1: 2)と反応させ、ガスクロマトグラフ(FID、カラム80/100-mesh Chromosorb W)により定量した。培地に添加したショ糖は、オートクレーブ加熱や培養体のインペルターゼ活性により一部グルコースとフルクトースに分解されているので、培地の糖含量は2モルのグルコースまたはフルクトースを1モルのショ糖として換算した。

植物体の乾物増加量と糖吸収量を、いずれも培養器あたりの量として以下の式で計算した。なお、糖吸収量は乾物増加量との比較のためセルロースに換算して表した。  
乾物増加量:  $\Delta DW$  (mg) = 培養終了時の乾物重 - 外植体の乾物重

糖吸収量:  $SA$  (mg) = (培養開始時の培地糖含量 - 培養終了時の培地糖含量) × 0.947

#### 結果および考察

20日の培養期間における培養植物体の乾物増加量は、二酸化炭素濃度の影響を大きく受けた(Table 1-1)。いずれの糖濃度の培地においても、0 ppm区の乾物増加量は350 ppm区のその7分の1以下であった。一方、培地糖濃度も乾物増加量に影響を与えたが、その影響は二酸

**Table 1-1.** Dry weight increase per vessel ( $\Delta DW$ ), sugar absorption per vessel (SA) and ratio of dry weight increase to sugar absorption ( $\Delta DW/SA$ ) of *Petunia* cuttings during 20 days culture.

Sucrose (%)	CO <sub>2</sub> concentration (ppm)	Dry weight increase (mg vessel <sup>-1</sup> )	Sugar absorption (mg vessel <sup>-1</sup> )	$\Delta DW/SA$
0	0	10	0	-
0	350	418	0	-
1	0	24	62	0.4
1	350	626	215	2.9
2	0	76	130	0.6
2	350	587	305	1.9
Analysis of variance P>F				
Sucrose		0.0372		0.0593
CO <sub>2</sub>		0.0001		0.0003
Sucrose x CO <sub>2</sub>		0.1088		0.0223

化炭素濃度ほど大きくはなく、350 ppm区では乾物増加量の最も大きかったショ糖1%区の増加量は増加量の最も小さかったショ糖0%区のその1.5倍にすぎなかった。

糖吸収量は、両二酸化炭素濃度区とも培地糖濃度が高い区で大きくなった。また、二酸化炭素濃度の高い区で大きかった。

糖吸収量に対する乾物増加量の比( $\Delta DW/SA$ )は、二酸化炭素濃度の影響を大きく受けた。350 ppm区では、ショ糖1%区、2%区とともに1を上回ったが、これは培地からの糖の他に、培養器外から供給される二酸化炭素も乾物増加に寄与していたことを示している。また、 $\Delta DW/SA$ は、ショ糖2%区よりも1%区の方が大きくなかった。これはショ糖1%区の方が、2%区よりも培養期間中の光合成量が大きかったことを示しているが、培養植物体の純光合成速度は、培地糖濃度が低くなるほど大きくなることが知られている(Langford・Wainwright, 1987; Capelladesら、1991; Hidder・Desjardins, 1994)。これに対し、0 ppm区では、 $\Delta DW/SA$ はショ糖1%区、2%区とともに1を下回り、いずれも乾物増加量は糖吸収量の約半分であった。このことは吸収された糖の約半分が植物体構成成分として利用されずに呼吸を通じて植物体外に放出されてしまったことを示している。Borkowska・Kubik (1990)は、<sup>14</sup>C-sucroseを使い、本実験の約半分の光強度と本実験の日長より短い16時間日長でオウトウの培養を行った結果、吸収された糖のうち約5分の1しか細胞の構成成分として植物体内に蓄積されず、大部分は呼吸によって植物体の外に放出されたことを示唆している。また、De Riekら(1991)は、吸収された糖のうち、生長に使われるのは32%以下で、残りは呼吸によって消費されることを示している。これらの報告は、培養条件や、供試品種によって数値に違いがあるものの、吸収された糖の大部分は直接植物体の構成成分に組み込まれることなく呼吸によって二酸化炭素として放出される点で本実験の結果と一致している。

光補償点以上の光強度による連続照明下では、培養器内に外気を強制通気せずに培養器をアルミホイルなどの

**Table 1-2.** Estimated values of parameters of the Fujiwara's CO<sub>2</sub> concentration-net photosynthesis model (1987) and dark respiration rate (R) of the *Caladium* plantlets. Pns is the saturated net photosynthetic rate for CO<sub>2</sub> concentration, G is the gradient of CO<sub>2</sub>-net photosynthesis curve at CO<sub>2</sub> compensation concentration, and C is the CO<sub>2</sub> compensation concentration.

Pns [μcm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> ·mgDW <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	G [μcm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> ·mgDW <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ·ppm <sup>-1</sup> ]	C [ppm]	R [μcm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> ·mgDW <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]
3880	9.9	78.0	1300

栓で封じた場合、培養器内二酸化炭素濃度はつねに外気のそれよりも低い（土井ら、1989）。そのため、呼吸を通じて植物体外に放出された二酸化炭素はすぐに光合成によって吸収されるので、△DW/SAは少なくとも1以上の値を取るはずである。本実験の、二酸化炭素0 ppm区では、呼吸によって発生した二酸化炭素のうち気孔を通じて植物体外に放出される前に光合成によって同化される割合も高いと予想される。これらのことから、光混合栄養培養において、吸収された糖のうちそのまま植物体の構成成分として利用される割合は半分以下と推定される。そして吸収された糖のうち半分以上は呼吸を通じていったん植物体外へ放出された後、光合成によって再吸収されて植物体の構成成分として利用されるものと考えられる。換言すれば、培地からの糖の供給と植物体の二酸化炭素の吸収の両立によってはじめて植物体の乾物増加が達成されることになる。

### 第3節 培養植物体の乾物生産と炭素交換

第2節の結果から、マイクロプロパゲーションの第III段階は光混合栄養培養であり、このような条件下では、培地からの糖の供給と培養植物体の二酸化炭素の吸収の両立によって初めて植物体の乾物増加が達成されることが示された。そこで第3節では第III段階における培養植物体の生長を制限する要因を、培地からの糖の供給と、植物体の二酸化炭素吸収の2点から把握することにする。

#### 第1項 培養植物体の二酸化炭素交換

培養植物体の二酸化炭素吸収量は当然培養器内の二酸化炭素濃度に大きく依存している。これまで植物体を含む培養器内の二酸化炭素濃度については、日長（土井ら、1989）、光強度（古在・関本、1988）、培養器の通気性（Fourniou & Bessis、1985；古在・関本、1988）との関係で調べた報告があるが、植物の種類や培養条件、培養器内の植物体の量など複数の要因がそれぞれの報告で異なっている。したがって、ある一つの要因が培養器内二酸化炭素にどのような影響を与えるかの判断はこれらの実測データからは難しい。一方、*in vitro* 培養においては、一般にそれが人工的に制御された環境下で行われるため、物理的環境条件の変動はほぼ完全に予測できる。そのため、培養植物体内外の二酸化炭素交換に関わる生理的特性と環境要因との関係を把握していれば、培養器内の二酸化炭素濃度の変動については比較的容易に正確なシミュレーションが可能である。また、培養器内の二酸化炭素濃度の変動をシミュレーションできれば、培養

植物体の二酸化炭素吸収量も計算できる。そこで、本節では、目的の要因以外をすべて統一した上で、その要因が培養器内の二酸化炭素濃度の経時変化および培養器内植物体の二酸化炭素吸収量に及ぼす影響をシミュレーションにより検討した。

培養器内植物体の二酸化炭素交換に関わる生理的活動には、明期における純光合成速度と暗期における暗呼吸速度がある。暗呼吸速度はこれまでの報告や予備実験により、時間的な変動はほとんどないことがわかっているが、純光合成速度は二酸化炭素濃度の影響を受ける。富士原ら（1987）は、純光合成速度を二酸化炭素濃度を変数とした飽和型の指數関数を用いた二酸化炭素濃度－純光合成モデルを与えて、培養器内の二酸化炭素濃度のシミュレーションを行っている。そこで本節でも富士原らの二酸化炭素濃度－純光合成モデルを採用して、カラジウム培養器内の二酸化炭素濃度変化のシミュレーションを行った。富士原ら（1987）の二酸化炭素濃度－純光合成モデルは次式で表される。

$$Pn = Pns - [1 - \exp \{ -G(Kc - C) / Pns \}]$$

ここで、Pn：純光合成速度 [μcm<sup>3</sup>CO<sub>2</sub>·mgDW<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>]

Pns：二酸化炭素飽和点における純光合成速度  
[μcm<sup>3</sup>CO<sub>2</sub>·mgDW<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>]

G：二酸化炭素－純光合成曲線の、

Kc=C における勾配 [μcm<sup>3</sup>CO<sub>2</sub>·mgDW<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>·ppm<sup>-1</sup>]

Kc：培養器内二酸化炭素濃度 [ppm]

C：二酸化炭素補償点 [ppm]

シミュレーションに先立ち、カラジウム培養器内二酸化炭素濃度の実測値から、カラジウム培養植物体の暗呼吸速度およびこれらの二酸化炭素濃度－純光合成モデルパラメータの近似値を算定した（Table 1-2）。これらの近似値に基づくカラジウム培養植物体の二酸化炭素-純光合成曲線を Fig. 1-2 に示す。

これらカラジウム培養植物体の二酸化炭素濃度－純光合成モデルと暗呼吸速度の算定値とを用いて、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化のシミュレーションを行った。培養器内二酸化炭素濃度の経時変化は次式で表される（富士原ら、1987）。

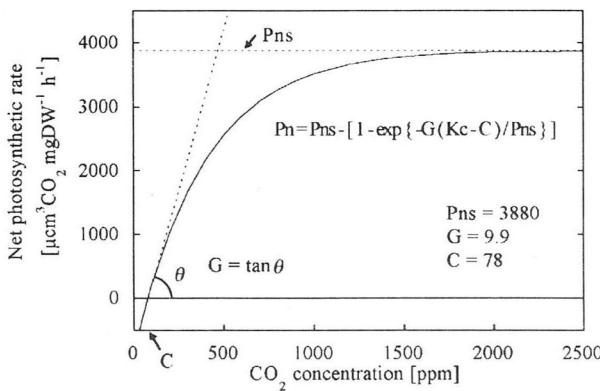
$$dKc / dt = E(Kcou - Kc) + M / V$$

ここで、t：時間 [h]

E：培養器の換気回数 [h<sup>-1</sup>]

Kcou：培養器外二酸化炭素濃度 [ppm]

M：培養器内植物体の二酸化炭素交換速度



**Fig. 1-2.**  $\text{CO}_2$  concentration-net photosynthesis model (Fujiwara et al., 1987) used for simulating  $\text{CO}_2$  concentration in culture vessel containing *Caladium* plantlets.  $P_n$  is the net photosynthetic rate [ $\mu\text{cm}^3\text{CO}_2\text{mgDW}^{-1}\text{h}^{-1}$ ],  $P_{ns}$  is the saturated net photosynthetic rate for  $\text{CO}_2$  concentration [ $\mu\text{cm}^3\text{CO}_2\text{mgDW}^{-1}\text{h}^{-1}$ ],  $G$  is the gradient of the  $\text{CO}_2$  concentration-net photosynthesis curve at  $\text{CO}_2$  compensation concentration [ $\mu\text{cm}^3\text{CO}_2\text{mgDW}^{-1}\text{h}^{-1}\text{ppm}$ ],  $K_c$  is the  $\text{CO}_2$  concentration in the vessel [ppm], and  $C$  is the  $\text{CO}_2$  compensation concentration [ppm]. Values of each parameters of the *Caladium* plantlets are shown in the figure.

$$[ \mu \text{cm}^3\text{CO}_2 \cdot \text{h}^{-1} ] \\ V : \text{培養器の空気容積 } [\text{cm}^3]$$

また、シミュレーションした培養器内二酸化炭素濃度の経時変化曲線から、培養器内植物体の二酸化炭素吸収量を次式によって求めた（富士原ら、1987）。

$$U = V \cdot E \int_{t1}^{t2} (K_{cou} - f(t)) dt + V(K_{c1} - K_{c2})$$

ここで、 $U$ ：時刻  $t_1$  から時刻  $t_2$  の間における二酸化炭素吸収量 [ $\mu\text{cm}^3\text{CO}_2$ ]

$f(t)$ ：培養器内の二酸化炭素濃度の経時変化を表す関数

$K_{c1}$ ：時刻  $t_1$  における培養器内二酸化炭素濃度 [ppm]

$K_{c2}$ ：時刻  $t_2$  における培養器内二酸化炭素濃度 [ppm]

本節における一連のシミュレーションにおいて、基本となる培養器および培養条件は次のように設定した。

培養器：200 ml のエルレンマイヤーフラスコ

栓：直径 5 mm の穴を空けそこに 100 mg の綿を詰めたゴム栓

培養器内空気容積 ( $V$ ) : 210 ml

培養器内バイオマス量：乾物重 100 mg

光源と光合成有効光量子束密度 (PPFD) :

昼光色蛍光灯  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

日長：16時間

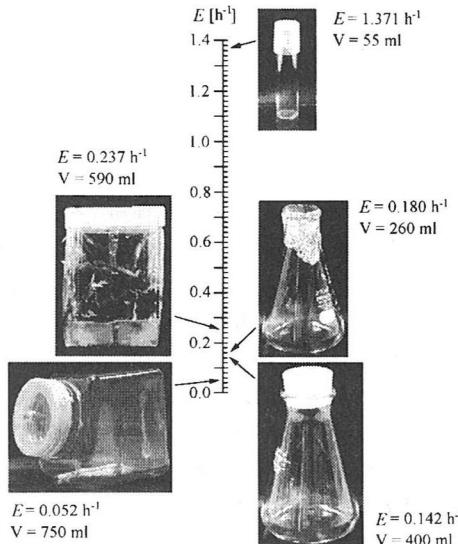
培養器外二酸化炭素濃度 ( $K_{cou}$ ) : 350 ppm

この基本設定から、(1) 培養器の通気性、(2) 日長、(3) 光強度、(4) 培養器内バイオマス量、の各要因を種々に変化させたときの、培養器内二酸化炭素濃度の変化と培養器内植物体の日二酸化炭素吸収量をシミュレートした。なお、特に断らない限り、日二酸化炭素吸収量は、培養器あたりの、すなわち乾物重 100 mg の植物体の二酸化炭素吸収量を示した。

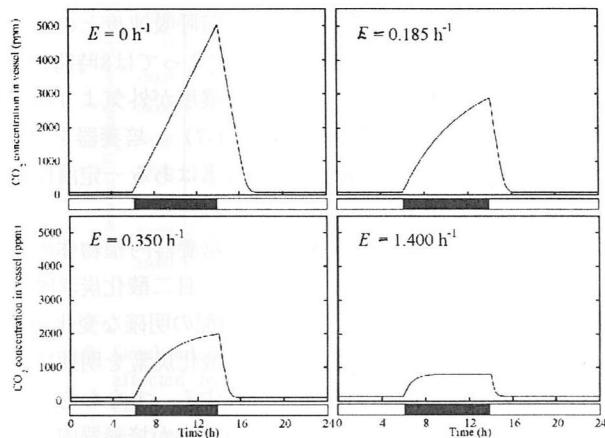
### 1. 培養器の通気性

培養器の通気性は、培養植物体の生長に大きく影響する。培養器の通気性を示す指標として、換気回数がある（古在ら、1986）。換気回数の概念は元来建築工学の分野において、オフィスや居住空間内の空気の交換率を評価するために導入されたもので、外部からある構造物内へ1時間に流入した空気容積を、その構造物内の空気容積で除した値として定義される（Fujiwara・Kozai, 1995）。すなわち 200 ml の空気容積を持つ培養器に1時間あたり 100 ml の空気が外部から流入した場合、その培養器の換気回数は  $0.5 \text{ h}^{-1}$  となる。本シミュレーションで基本設定とした培養器の換気回数は古在らの測定方法で  $0.185 \text{ h}^{-1}$  であった。この値は、以下に記すように、実際のマイクロプロパゲーションにおいて使用される培養器の中では比較的高い値である。

古在ら（1986）は、いくつかの培養用容器の換気回数について測定を行っているが、そのうち最も大容量の容器は 200 ml のエルレンマイヤーフラスコであり、通常のマイクロプロパゲーションに用いられる大容量の容器の換気回数については言及していない。そこで、Fig. 1-3 にマイクロプロパゲーションにおいて実際に使用されるおもな培養器の、空の状態における換気回数を示した。マイクロプロパゲーションにおいて実用される培養器の換気回数は、ガス透過性フィルムなど特殊な素材でできたものを除けば、おおむね  $0.2 \text{ h}^{-1}$  以下である。それに対し、試験管などの小容量の容器の換気回数は、プラスチ



**Fig. 1-3.** Number of air exchanges ( $E$ ) of culture vessels used for micropropagation.  $V$  is the air volume inside the vessel.

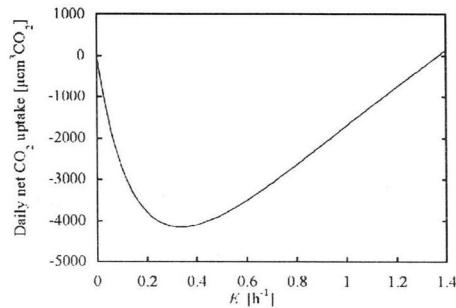


**Fig. 1-4.** Simulated diurnal changes in CO<sub>2</sub> concentration in culture vessels containing *Caladium* plantlets under various ventilation conditions. The ventilation conditions are expressed by the number of air exchanges,  $E$  (Kozai et al., 1986). Open and closed bars indicate light and dark periods, respectively. Conditions of culture: air volume of the vessel = 210 ml, biomass in the vessel = 100 mgDW, PPF = 34.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , photoperiod = 16 h day<sup>-1</sup>, CO<sub>2</sub> concentration outside the vessel = 350 ppm.

ック成型キャップなどの通気性の高い栓を用いた場合、換気回数は 1 h<sup>-1</sup> 以上に達することがある。同一形状の口部と同一の栓の組合せであれば、換気回数は、容器の容積に反比例するので、同じ栓をしても容量の大きい培養器の方が換気回数が小さくなる。言い換えれば、小さい容器と同等の通気性を大容量の容器に持たせるためには、栓の単位面積あたりのガス交換速度を高めるか、あるいは栓のガス交換可能領域の面積を大きくしなければならない。なお、200 ml エルレンマイヤーフラスコにアルミホイル2枚重ねの栓をしたときの換気回数は、古在ら (1986) 測定では、0.042 h<sup>-1</sup> であるが、今回の測定では、0.180 h<sup>-1</sup> であった (Fig. 1-3)。このことは、アルミホイルの栓の仕方の個人差が、培養器の通気性に大きく影響することを示している。

基本設定の培養器の換気回数のみを変化させたときの、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化を Fig. 1-4 に示す。換気回数が大きくなるほど暗期に培養器外へ流出する二酸化炭素量が大きい反面、明期に大気より低い濃度で平衡に達したときの二酸化炭素濃度は換気回数の大きい培養器の方が大きくなつた。これは、明期において単位時間あたりに培養器外から培養器内へ流入する二酸化炭素の量が、換気回数の大きい培養器ほど多くなるためである。実際に同一形状の培養器と同一種の植物材料を用いて、栓のみを変えたときの培養器内二酸化炭素の経時変化を調べた報告としては、Fournioux · Bessis (1985) と古在 · 関本 (1988) らの報告があり、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化は、シミュレーションと同様の傾向を示している。

換気回数を 0 h<sup>-1</sup> から 1.4 h<sup>-1</sup> に変化させたときの、培養器内植物体の日二酸化炭素吸収量を Fig. 1-5 に示す。換気回数が 0 h<sup>-1</sup> のときは培養器内外の二酸化炭素交換



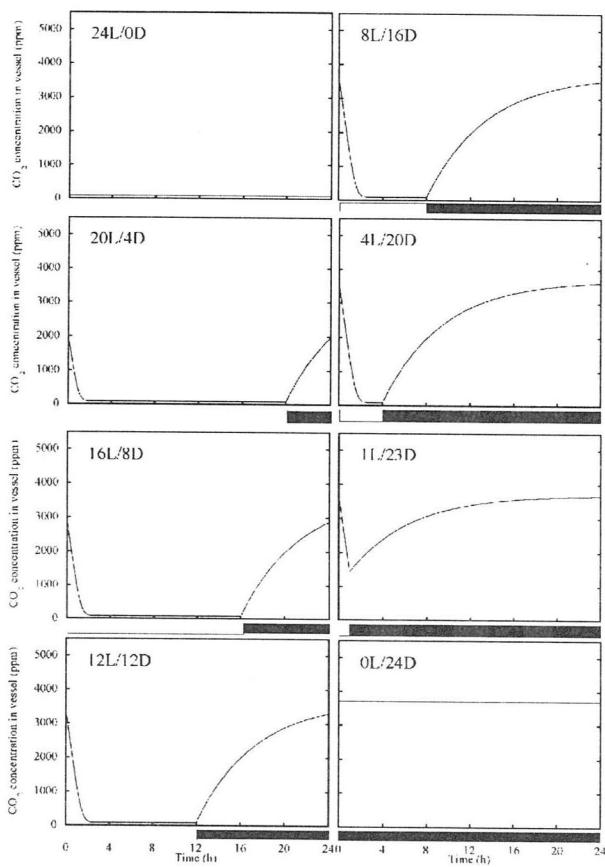
**Fig. 1-5.** Simulated daily CO<sub>2</sub> uptake of *Caladium* plantlets as affected by number of air exchanges of the culture vessels ( $E$ ). The daily CO<sub>2</sub> uptake was estimated from the simulated CO<sub>2</sub> curve as shown in Fig. 1-4. Conditions of culture: air volume of the vessel = 210 ml, biomass in the vessel = 100 mgDW, PPF = 34.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , photoperiod = 16 h day<sup>-1</sup>, CO<sub>2</sub> concentration outside the vessel = 350 ppm.

がないため、暗期に放出した二酸化炭素量は明期に吸収した二酸化炭素量と等しくなり、日二酸化炭素吸収量は 0 になる。換気回数が約 0.3 h<sup>-1</sup> まで小さくなるにしたがって日二酸化炭素吸収量が減少して極値に達し、換気回数がさらに大きくなると次第に増加する。しかし、培養植物体の日二酸化炭素吸収量が再び 0 になるようにするには、換気回数を約 1.4 h<sup>-1</sup> まで高めなければならない。

前述のように、マイクロプロパゲーションに使用されている培養器の換気回数はせいぜい 0.25 h<sup>-1</sup> 程度までの範囲にあり、この範囲では通気性の高い培養器ほど培養植物体の二酸化炭素吸収量は小さいということになる。古在 · 関本 (1988) は、ガス透過性のフィルターを装着した栓を用いることによって培養器の換気回数を 2.7 h<sup>-1</sup> まで高め、培養植物体の二酸化炭素吸収量を増加させているが、実験には内容積が 46 ml という小さい平底試験管を用いており、そのため比較的容易に換気回数を高めることが可能となったものである。実用に供される培養器は少なくとも 300 ml 程度の内容積があり、これらの培養器の換気回数を 1 h<sup>-1</sup> 以上に高めるためには、栓のガス交換速度を相当高めることが必要で、小容量の培養器の場合よりも、雑菌の混入の確率が高くなる。さらに、長期にわたる培養においては、換気回数を大きくすると、培地の乾燥などの問題も生ずるおそれがある。

## 2. 明期長

明期長を 24、20、16、12、8、4、1、0 時間としたときの培養器内二酸化炭素濃度の経時変化を Fig. 1-6 に示した。明期長が 0 時間という培養条件は植物体の培養においては現実的ではないが、ここでは長い明期条件で培養されてきた培養器を急に暗箱に入れた状況を想定することにする。24 時間の連続明期下では培養器内二酸化炭素は二酸化炭素補償点より少し高い 88 ppm で平衡状態になっている。したがって、常時培養外から培養器内へ二酸化炭素が流入しており、その結果培養器の炭素收支は正となる。暗期を設けると、暗期中の培養器内二酸化炭素濃度は時間とともに増加し、暗期終了時点で最大の値



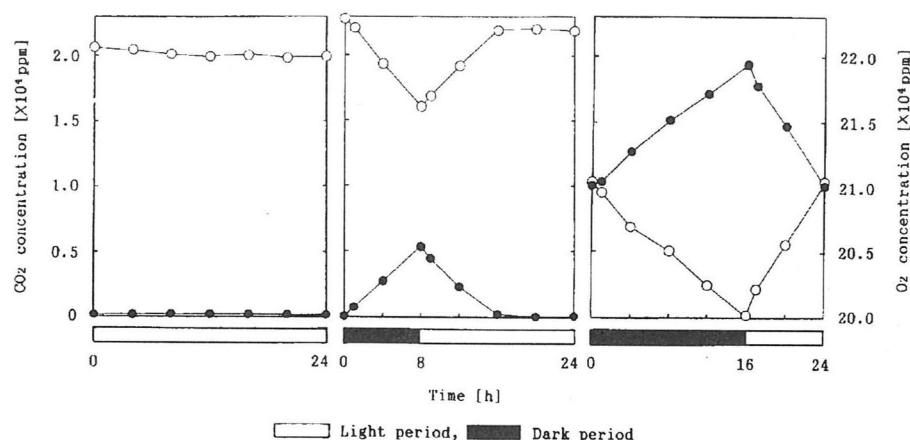
**Fig. 1-6.** Simulated diurnal changes in  $\text{CO}_2$  concentration in culture vessels containing *Caladium* plantlets under various daylengths. Open and closed bars indicate light and dark periods, respectively. Conditions of culture: air volume of the vessel = 210 ml, number of air exchanges of the vessel =  $0.185 \text{ h}^{-1}$ , biomass in the vessel = 100 mgDW, PPFD =  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessel = 350 ppm.

となる。暗期が長くなるほど暗期終了時の培養器内二酸化炭素濃度が高くなる一方、暗期に培養器内に蓄積された二酸化炭素を明期に吸収しきれなくなる。本シミュレーションでは、明期が2時間以下になると二酸化炭素を吸収しきれず常に外気より高い濃度になるが、その限界明

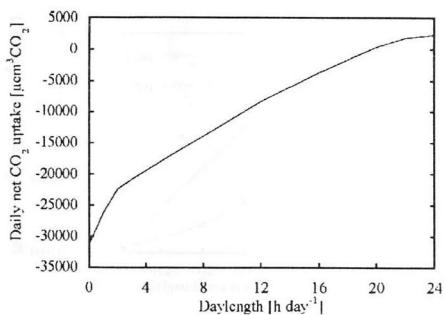
期長は、培養植物体の光合成速度と暗呼吸速度との比で決まる。培養植物の種類や培養条件によっては8時間程度の明期長でも培養器内の二酸化炭素濃度が外気より高い濃度で蓄積するケースもある (Fig. 1-7)。培養器を連続暗期下におくと、培養器内二酸化炭素はある一定濃度まで蓄積したあと平衡状態に達する。

明期長をさまざまに変えたときの培養器内植物体の日二酸化炭素吸収量を Fig. 1-8 に示す。日二酸化炭素吸収曲線は明期長が約2時間のところで勾配の明確な変化がみられるが、これは暗期に蓄積した二酸化炭素を明期に吸収し切れないなる限界明期長と一致する。すなわち、明期長が約2時間以下では、純光合成速度が培養器内二酸化炭素濃度に律速される時間帯が生じないが、明期長が約2時間以上になると純光合成速度が培養器内二酸化炭素に律速される時間帯が生ずるため、日二酸化炭素吸収量曲線の勾配に差が生じるのである。換言すれば、このシミュレーションでは、明期長が約2時間以上になると、投下された光量子量あたりの光合成効率が低下することを示している。なお、密封した培養器（換気回数  $0 \text{ h}^{-1}$ ）の培養器では、「1. 培養器の通気性」で考察したように、培養器内外の二酸化炭素の交換がないため、暗期に蓄積した二酸化炭素を明期に吸収し切れる明期長下では、培養植物体の日二酸化炭素吸収量は0となり、それより明期長が短くなると日二酸化炭素吸収量は減少する。

実際に異なる明期長下で培養した培養植物体の重量を Table 1-3 に示す。通気性のある培養器で培養した場合、明期長が短くなるほど植物体重量は小さくなるが、密封した培養器で培養した場合、24、16、8時間のいずれの明期長でも植物体重量は変わらない。これは、通気性のある培養器では、シミュレーションで示したように明期長が短くなるほど日二酸化炭素吸収量が小さくなつたのに対し、密封した培養器では24、16、8時間のいずれの明期長下でも日二酸化炭素吸収量が0であったためと考えられる。



**Fig. 1-7.** Diurnal changes of  $\text{CO}_2$  and  $\text{O}_2$  concentrations in the vessels containing sugarcane plantlets under various daylengths. Closed and open circles indicate  $\text{CO}_2$  and  $\text{O}_2$  concentrations, respectively. Number of air exchange of the vessel is  $0.0005 \text{ h}^{-1}$  and air volume of the vessels is 210 ml. Biomass in each vessel is approximately 145 mgDW.



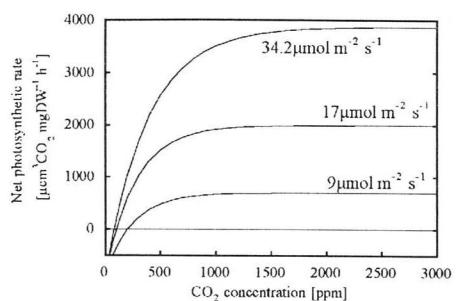
**Fig. 1-8.** Simulated daily  $\text{CO}_2$  uptake of *Caladium* plantlets as affected by daylength. The daily  $\text{CO}_2$  uptake was estimated from the simulated  $\text{CO}_2$  curve as shown in Fig. 1-6. Conditions of culture: air volume of the vessel = 210 ml, number of air exchanges of the vessel =  $0.185 \text{ h}^{-1}$ , biomass in the vessel = 100 mgDW, PPFD =  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessel = 350 ppm.

**Table 1-3.** Biomass of plants cultured under different photoperiods in airtight and ventilated vessels. Numbers of air changes of ventilated and airtight vessels were  $0.185 \text{ h}^{-1}$  and  $0.001 \text{ h}^{-1}$ , respectively. Nine plants were planted on 50 ml medium with 0.8% agar and 2% sucrose in a 200 ml erlenmeyer flask. *Caladium* plants were cultured for 20 (airtight) or 60 days (ventilated). Sugarcane plants were cultured for 30 days.

Ventilation condition of vessel	Photoperiod (h)	Fresh weight	
		<i>Caladium</i>	Sugarcane
Ventilated	24	4.8	1.1
	16	3.8	1.0
	8	2.4	0.5
Airtight	24	1.1	1.2
	16	1.0	1.3
	8	1.0	1.3

### 3. 光強度

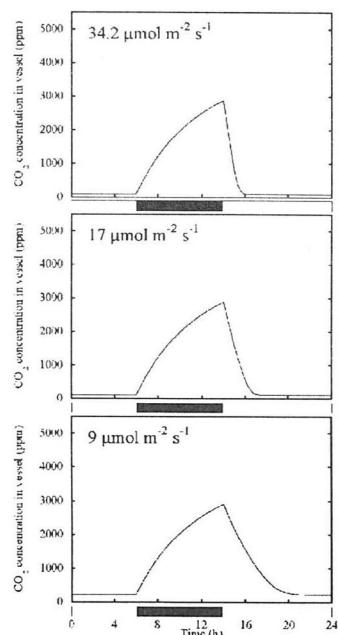
光合成速度は光強度の影響を受けるため、当然培養器内植物体の二酸化炭素交換も培養室の光強度に影響される。本シミュレーションにおいては、基本設定の二酸化炭素-純光合成モデルの他に、光強度が約2分の1 ( $17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) と約4分の1 ( $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) に低下した時の培養植物体に当てはまる予想される、2つの異なる二酸化炭素-純光合成モデルを仮定した (Fig. 1-9)。二酸化炭素-光合成曲線は、Singh · Lal (1935)、Hesketh (1963)、Brun · Cooper (1967)などの報告があるが、それによると光合成速度は、二酸化炭素濃度約0.10~0.15%で飽和する。光合成の二酸化炭素濃度の飽和点は光強度の影響を強く受け、その増加とともに上昇する (Singh · Lal, 1935; Brun · Cooper, 1967; Akitaら, 1969)。また、二酸化炭素濃度の補償点も光強度により変化し、弱光下では光強度の低下にともない低下する (Egle · Schenk, 1953; Whiteman · Koller, 1967)。本シミュレーションで仮定した二酸化炭素-純光合成モデルは、これらの報告をもとに、光量子束密度が  $17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  では、二酸化炭素飽和点における純光合成速度を  $2000 \mu\text{cm}^3 \text{CO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、二酸化炭素補償点を 100 ppm に仮定し、光量子束密度が  $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  では、二酸



**Fig. 1-9.**  $\text{CO}_2$  concentration-net photosynthesis curve used for simulating  $\text{CO}_2$  concentration in culture vessels under various photosynthetic photon flux density (PPFD). At  $17 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD, the saturated net photosynthetic rates for  $\text{CO}_2$  concentration is  $2000 \mu\text{cm}^3 \text{CO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  and the  $\text{CO}_2$  compensation concentration is 100 ppm. At  $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD, the saturated net photosynthetic rates for  $\text{CO}_2$  concentration is  $700 \mu\text{cm}^3 \text{CO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  and the  $\text{CO}_2$  compensation concentration is 200 ppm.

化炭素飽和点における純光合成速度を  $700 \mu\text{cm}^3 \text{CO}_2 \cdot \text{mgDW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 、二酸化炭素補償点を 200 ppm に仮定した。

Fig. 1-10 にそれぞれの光量子束密度下の培養器内二酸化炭素の経時変化のシミュレーション結果を示す。光量子束密度が低い環境ほど光合成速度は小さくなるので、明期開始後の培養器内二酸化炭素濃度の減少速度が小さくなっている。また、光量子束密度が低くなるほど光合成の二酸化炭素補償点も高くなるので、明期に平衡状態に達したときの培養器内二酸化炭素濃度は、光量子束密度が低くなるほど高くなる。



**Fig. 1-10.** Simulated diurnal changes in  $\text{CO}_2$  concentration in culture vessels containing *Caladium* plantlets under various photosynthetic photon flux density (PPFD). Open and closed bars indicate light and dark periods, respectively. Conditions of culture: air volume of the vessel = 210 ml, number of air exchanges of the vessel =  $0.185 \text{ h}^{-1}$ , biomass in the vessel = 100 mgDW, photoperiod =  $16 \text{ h} \cdot \text{day}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessel = 350 ppm.

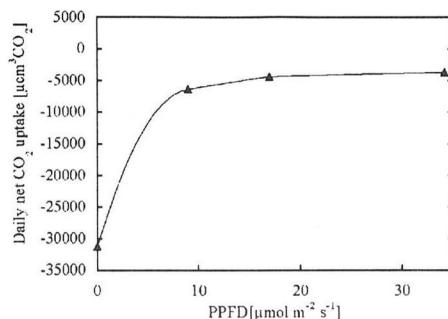


Fig. 1-11. Simulated daily  $\text{CO}_2$  uptake of *Caladium* plantlets as affected by PPFD. The daily  $\text{CO}_2$  uptake was estimated from the simulated  $\text{CO}_2$  curve shown in Fig. 1-10. Conditions of culture: air volume of the vessel = 210 ml, number of air exchanges of the vessel =  $0.185 \text{ h}^{-1}$ , biomass in the vessel = 100 mgDW, photoperiod =  $16 \text{ h} \cdot \text{day}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessel = 350 ppm.

光量子束密度と培養植物体の日二酸化炭素吸収量との関係を Fig. 1-11 に示す。明期の光量子束密度を基本設定の  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  から約4分の1の  $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に減少させても培養植物体の日二酸化炭素吸収量の違いは小さく、ごく弱光条件で急激に日二酸化炭素吸収量が減少することがわかる。明期の光量子束密度を基本設定の4分の1の  $9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  にしたときの日二酸化炭素吸収量 (Fig. 1-11) と、光量子束密度をそのままとし、明期長を基本設定の4分の1の4 時間としたときの日二酸化炭素吸収量 (Fig. 1-8) とを比較すると、前者の方がはるかに大きいことがわかる。このことから、培養器内バイオマス量が等しければ、明期長を短縮するよりも、明期長を変えずに光強度を弱めた方が、1日あたりに投下した光量子量が等しくても、日二酸化炭素吸収量の点ではエネルギー効率が高いことになる (Fig. 1-11)。

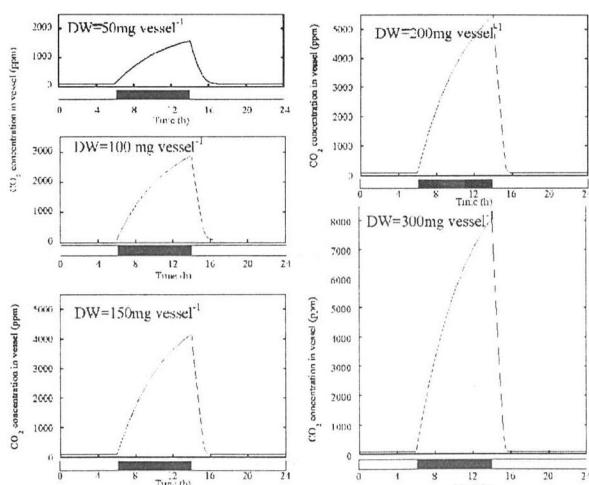


Fig. 1-12. Simulated diurnal changes in  $\text{CO}_2$  concentration in culture vessels containing various biomass of *Caladium* plantlets. Open and closed bars indicate light and dark periods, respectively. Conditions of culture: air volume of the vessel = 210 ml, number of air exchanges of the vessel =  $0.185 \text{ h}^{-1}$ , photoperiod =  $16 \text{ h} \cdot \text{day}^{-1}$ , PPFD =  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessel = 350 ppm.

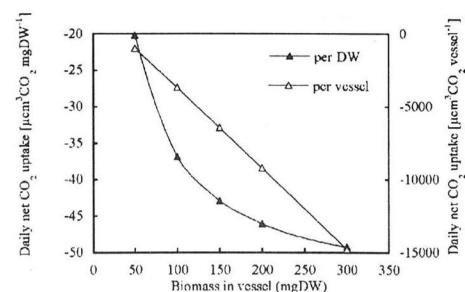


Fig. 1-13. Simulated daily  $\text{CO}_2$  uptake of *Caladium* plantlets as affected by biomass of *Caladium* plantlets in the vessel. The daily  $\text{CO}_2$  uptake was estimated from the simulated  $\text{CO}_2$  curve as shown in Fig. 1-12. Conditions of culture: air volume of the vessel = 210 ml, number of air exchanges of the vessel =  $0.185 \text{ h}^{-1}$ , photoperiod =  $16 \text{ h} \cdot \text{day}^{-1}$ , PPFD =  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessel = 350 ppm.

#### 4. 培養器内バイオマス量

培養器内の植物体の大きさや数が異なれば、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化も異なり、その結果、培養植物体の日二酸化炭素吸収量も異なってくる。培養器内バイオマス量を変化させたときの、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化と培養植物体の日二酸化炭素吸収量を Fig. 1-12 と Fig. 1-13 にそれぞれ示す。培養器内バイオマス量が大きくなるほど培養器内二酸化炭素濃度の変化が大きくなる。培養器あたりの培養植物体の日二酸化炭素吸収量は、培養器内バイオマス量が増加するにつれてほぼ直線的に減少し、単位乾物重あたりの二酸化炭素吸収量も減少する。これは、暗期の培養器内二酸化炭素の蓄積量が大きくなるのにともなって培養器外へ流出する二酸化炭素量が大きく増加するのに対し、明期に培養器外から流入する二酸化炭素量の増加が小さいためである。

#### 5. 容量の大きい培養器における培養植物体の二酸化炭素吸収量

これまでのシミュレーション結果から、培養器の通気性、明期長、光強度、培養器内バイオマス量のいずれもが、培養器内二酸化炭素の経時変化および培養植物体の日二酸化炭素吸収量に大きく影響することが示された。培養器の換気回数、日長、光強度を変化させたときの培養器内二酸化炭素経時変化および日二酸化炭素吸収量のシミュレーションは、Fujiwara・Kozai (1995b)、Niuら (1995) も行っているが、100 ml 以下の容量の小さい培養器をベースにしており、また、換気回数も  $1.0 \text{ h}^{-1}$  という通常のマイクロプロパゲーションに使用される培養器に比べてかなり高い換気回数の培養器を想定したものである。そこで、実際にマイクロプロパゲーションに用いられる培養器を想定したシミュレーションを行った。シミュレーションのモデルとした培養器は、メリクロン用フラスコ (旭テクノグラス、MER-FK300) である。

まず培養器に専用のシリコン栓をし、培養器内バイオマス量を変化させたときの培養植物体の日二酸化炭素吸

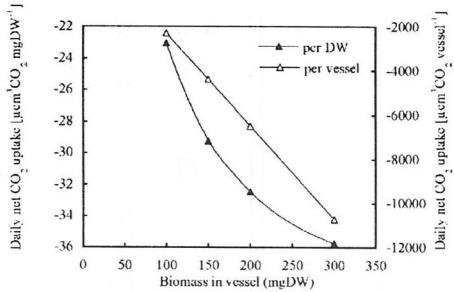


Fig. 1-14. Simulated daily CO<sub>2</sub> uptake of *Caladium* plantlets per mgDW and per vessel as affected by biomass of *Caladium* plantlets in the large vessel. Conditions of culture: air volume of the vessel = 330 ml, number of air exchanges of the vessel = 0.117 h<sup>-1</sup>, photoperiod = 16 h·day<sup>-1</sup>, PPFD = 34.2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, CO<sub>2</sub> concentration outside the vessel = 350 ppm.

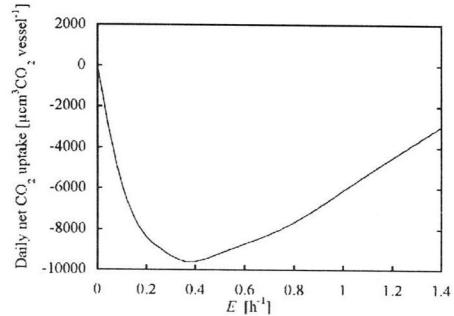


Fig. 1-15. Simulated daily CO<sub>2</sub> uptake of *Caladium* plantlets in the large vessel as affected by number of air exchanges of the culture vessels (E). Conditions of culture: air volume of the vessel = 330 ml, photoperiod = 16 h·day<sup>-1</sup>, biomass in the vessel = 200 mgDW, PPFD = 34.2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, CO<sub>2</sub> concentration outside the vessel = 350 ppm.

収量をシミュレートした (Fig. 1-14)。シリコン栓は、直径 6 mm の穴が空いており、そこに 100 mg の綿を詰めたもので、メリクロン用の培養器の栓の形態としてごく一般的なものである。穴につめる綿の量は 100 mg ~ 300 mg が一般的で、これより綿の量が少ないと、綿が抜けやすくなる。培地を 70 ml 分注した状態で培養器内の空気容積は 330 ml、培養器の換気回数は、0.117 h<sup>-1</sup> である。メリクロン用培養器を想定したシミュレーションにおいても、小容量の培養器の場合 (Fig. 1-13) と同様に、培養器内バイオマスの増加にしたがって日二酸化炭素吸収量が減少するという関係がみられた。

次に培養器内バイオマス量を 200 mg 一定にし、培養器の換気回数をさまざまに変えたときの培養植物体の日二酸化炭素吸収量をシミュレートした (Fig. 1-15)。その結果、換気回数と日二酸化炭素吸収量との関係は小容量の培養器の場合 (Fig. 1-5) と同様の曲線を描き、換気回数が約 0.38 h<sup>-1</sup> までは大きくなるにしたがって減少して極値をとり、換気回数がそれより大きくなると増加した。先述のように一般的にマイクロプロパゲーションに用いられる培養器の換気回数は 0.25 h<sup>-1</sup> までの範囲にあり、これらの培養器では通気性が高いものほど日二酸化炭素吸収量が小さくなることになる。一方、培養植物体の二酸化炭素吸収量が 0 以上になるには 1.8 h<sup>-1</sup> 以上の換気回数が必要である。小容量の培養器の場合は、換気回数が約 1.4 h<sup>-1</sup> で日二酸化炭素吸収量が 0 以上になっており (Fig. 1-5)、日二酸化炭素吸収量を大きくするために大容量の容器の場合は小容量の培養器の場合よりもさらに通気性の高い栓を用いる必要がある。しかし実際には、大容量の換気をまかうだけの通気性を栓に持たせるのは、培地の乾燥や微生物の混入の機会を増加することになり、小容量の培養器の換気回数を高める場合よりも困難になる。

## 第2項 培養植物体の糖吸収

第2節で示したように、培養植物体は、培地から糖を吸収し、一部は直接、その他の大部分は呼吸によりいった

ん植物体外に放出してから光合成により再吸収して細胞構成成分とする。一方、前項で、マイクロプロパゲーションに通常用いられる培養器においては、培養植物体の日二酸化炭素吸収量は負になることを示した。このことは、培養器全体の炭素収支を考えると、培養植物体の炭素源は、そのほとんどが培地の糖に由来していることを示している。換言すれば、培養植物体の生長量は、培地からの糖吸収量が大きく反映することを示している。

組織培養における、培養体の糖吸収量とバイオマス増加量との関係は、液体培養における懸濁細胞やカルス、プロトコーム状球体などの培養について良好く調べられているが、寒天培地上の植物体の糖吸収については、それが生長量に大きく影響するにも関わらず、ごくわずかの報告 (木下ら、1988; Kozai・Iwanami、1988; Ticháら、1998) があるにすぎない。ここでは、培地からの糖の吸収に大きく影響すると考えられる2つの要因、すなわち培地内の糖の移動と、植物体の根量について、その影響を検討した。

### 1. 寒天培地中の糖の濃度勾配

植物組織培養では支持体として寒天が使用されることが最も多い。培養体の生長量は、寒天濃度の違いによって異なること (Romeberger・Tabor、1971; Kusumoto、1980; Debergh、1983) から、培養体内外の糖交換速度あるいは寒天ゲル内の糖の移動速度が寒天濃度の影響を受けることが予想される。

寒天ゲルにおけるショ糖の拡散に関しては石田ら (2000) の報告がある。しかし、これらの報告では、通常の植物組織培養用の培地成分を溶質に用いておらず、ゲルの調製方法も培地作成のそれとは異なっている。寒天ゲルの強度は、培地成分、特にNH<sub>4</sub><sup>+</sup>とH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> が大きく影響し、またオートクレーブによても大きく変化する (上原・市橋、1987)。本実験では、実際に培養体を置床した培地ゲルにおける糖の濃度分布について調べ、寒天ゲルにおける糖の拡散が糖吸収の制限要因になるかについて検討した。

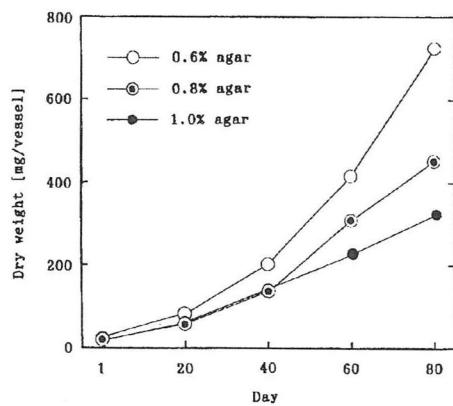


Fig. 1-16. Time courses of dry weight in *Cymbidium* protocorm-like bodies (PLB) cultured on the medium containing 2% sucrose and 0.6, 0.8 or 1.0% agar. Photosynthetic photon flux density:  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Air temperature:  $25^\circ\text{C}$ .

実験材料には、植物体ではなくシンビジウムのプロトコーム状球体（以下PLB）を用いた。これは、培養体が植物体の場合、生長にともなう根量の増加が糖吸収に大きく影響を与えることが予想され、それが、培地の糖の拡散による糖吸収の制限を打ち消してしまう可能性が考えられることと、培養体からの距離の異なる寒天ゲル中の糖濃度を測定する際に、培地に根が張りめぐらされていないほうが好都合であるためである。

#### 材料および方法

シンビジウム *Cymbidium Melody Fair 'Marilyn Monroe'* のPLBを供試した。

寒天0.8%、ショ糖2%を含む、pH5.8に調整されたMS培地上でPLBを継代培養して増殖させた後に、5 mm 角に切断して外植体とした ( $20 \text{ mg DW vessel}^{-1}$ )。培養器には 200 ml のエルレンマイヤーフラスコ（口内径 25 mm）を用いた。2%のショ糖と、0.6、0.8 または1.0%の寒天（植物組織培養用、和光純薬工業株式会社）を添加して、pH5.6に調整したMS培地を攪拌しながら  $100^\circ\text{C}$  で約10分間加熱してゾル化し、培養器あたり 50 ml ずつ分注した。分注後直ちに  $120^\circ\text{C}$ 、2気圧で15分間蒸気滅菌し、約15分間気圧と温度の低下を待った後、直ちに室温において培地をゲル化させた。ゲル化した培地の端の一か所に、外植体を培養器壁面に接着させて置床した。植え付け後、培養器を2枚重ねのアルミホイルで封じ、 $25^\circ\text{C}$ 、昼光色蛍光灯による連続光（棚面のPPFD:  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ）の下で培養した。

培養期間中、培養器内二酸化炭素濃度、PLBの純光合成および暗呼吸速度、培地の糖濃度の測定を行った。培養体の暗呼吸速度は培養器をアルミホイルとパラフィルムで密封し、暗黒下においていたときの培養器内二酸化炭素增加量を測定することにより行った。純光合成速度は同様に密封した培養器内二酸化炭素濃度初期値を約 5000 ppm に設定し、光照射下においていたときの二酸化炭素濃度の減少量を測定することにより行った。培地の糖濃度については、培地の数か所から 1 ml の培地ゲルをサンプリングし、粉碎後蒸留水で10倍に希釈して遠心分離した上

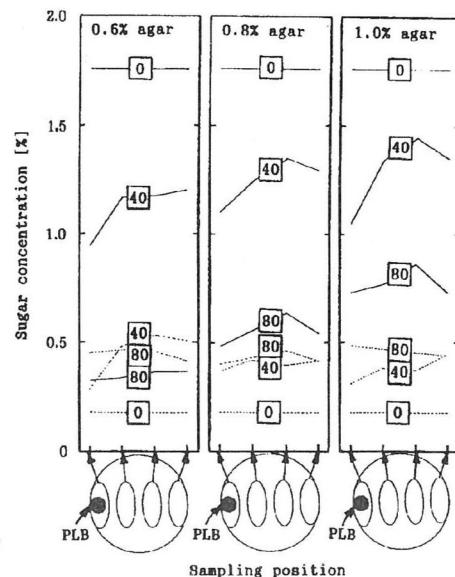


Fig. 1-17. Sugar concentration in different parts of the medium on which *Cymbidium* PLB were cultured. PLB were cultured under continuous light at  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PPFD and at  $25^\circ\text{C}$ . —: Sucrose. .....: Fructose + Glucose. Numbers in the squares represent days of culture.

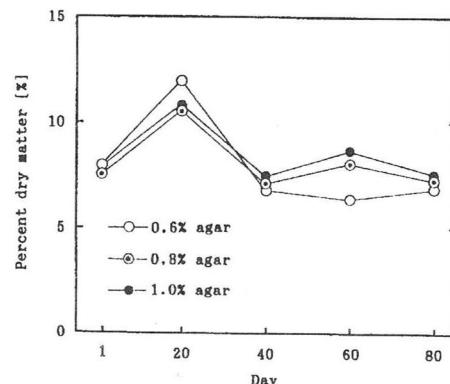


Fig. 1-18. Time courses of the percentage of dry matter in *Cymbidium* protocorm-like bodies (PLB) cultured on the medium containing 2% sucrose and 0.6, 0.8 or 1.0% agar. Photosynthetic photon flux density:  $22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Air temperature:  $25^\circ\text{C}$ .

澄液を減圧乾固させ、第2節の方法に準じて定量を行った。  
結果

PLBの乾物重は寒天濃度の小さい培地ほど早く増加した (Fig. 1-16)。培地の糖濃度は寒天濃度の低い培地ほど早く減少した (Fig. 1-17)。PLB付近の寒天ゲルは最も糖含量が小さかったが、PLBから最も離れた位置にある寒天ゲル（培地の端）も糖含量が比較的小さかった。PLBの乾物率は植え付け20日後に最大になり、以後減少して安定した (Fig. 1-18)。

培養器内二酸化炭素濃度は20日後に最大となり以後減少を続けた (Fig. 1-19)。また、植え付け40日後まではすべての処理区で培養器内の二酸化炭素濃度は培養器外のそれよりも高かった。暗呼吸速度は培養60日までの間減少を続け、処理区間の差は小さかった (Fig. 1-20)。

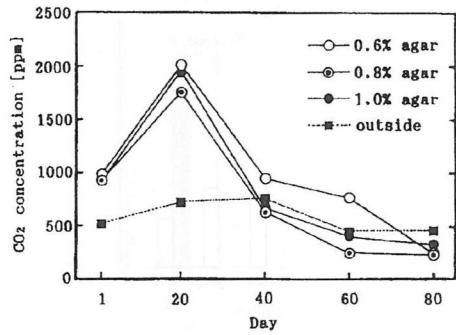


Fig. 1-19. Time courses of the CO<sub>2</sub> concentration inside the vessel containing *Cymbidium* protocorm-like bodies (PLB). PLB were cultured on the medium containing 2% sucrose and 0.6, 0.8 or 1.0% agar. Photosynthetic photon flux density: 22  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Air temperature: 25 °C.

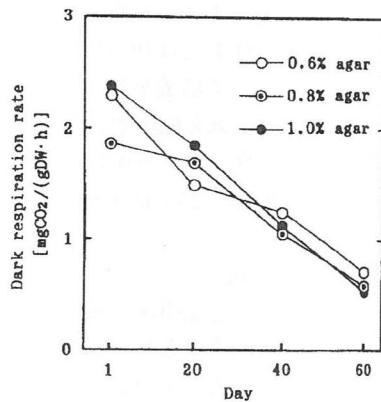


Fig. 1-20. Time courses of the dark respiration rate in *Cymbidium* protocorm-like bodies (PLB) cultured on the medium containing 2% sucrose and 0.6, 0.8 or 1.0% agar. Photosynthetic photon flux density: 22  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Air temperature: 25 °C.

純光合成速度は培養20日から60日の間増加した (Fig. 1-21)。

#### 考察

寒天濃度の低い培地ほど糖の減少が早かったこと (Fig. 1-17) は、寒天濃度の低い培地での急激な乾物増加は、急激な糖吸収の結果生じたことを示している。寒天ゲルの糖含量がPLB付近で少なかったことは、寒天は培地内の糖拡散を制限し、その結果培養体の糖吸収を遅らせる事を示唆している。寒天による生長制限は*Iris*の胚培養においても観察されていて、寒天と水が結合することによって水の利用効率が減少するものと考えられている (Stoltz, 1971)。PLBは液体培地でより急速に生長するが (Wimber, 1963)、おそらく糖の拡散が制限されないのと水の利用効率が高いためであろう。

PLBから最も離れた位置にある寒天ゲル（培地の端）の糖含量も小さかったが、これは培地と培養器壁面との間に生じたチャンネルの影響によるものと考えられる。寒天ゲルからゲル外へ拡散した糖はすぐにチャンネルを伝ってPLBに吸収されると考えられる。

乾物率は培養初期に高かったが、これは培地糖のモル

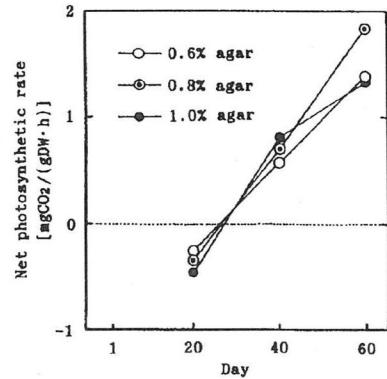


Fig. 1-21. Time courses of the net photosynthetic rate in *Cymbidium* protocorm-like bodies (PLB) cultured on the medium containing 2% sucrose and 0.6, 0.8 or 1.0% agar. Photosynthetic photon flux density: 22  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Air temperature: 25 °C.

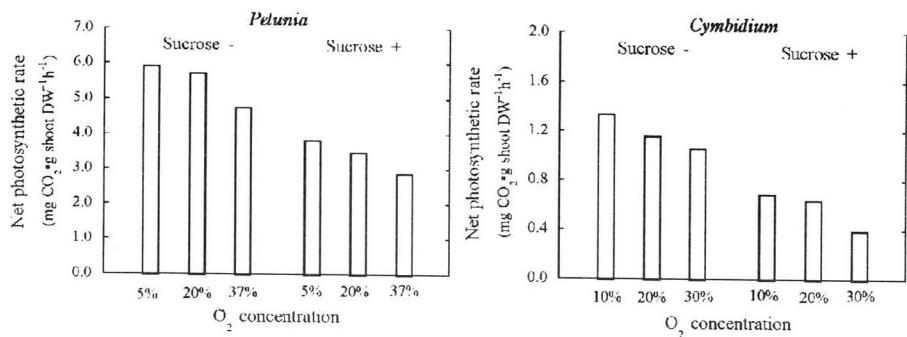
濃度の上昇とともに培地浸透ポテンシャルの低下によるものと考えられる。培地に添加されたショ糖は植物組織からのインペルターゼによりグルコースとフルクトースに加水分解され、しばしば、培地の糖の総モル濃度は培養開始時のそれよりも高くなることがある (木下ら、1988)。Pospíšilová (1988) は、培地のショ糖濃度を高めると培養植物体の水ポテンシャルが低下することを報告している。

培養初期に培養器内二酸化炭素濃度は外気よりも高い値を示したが、これはPLBは見かけ上二酸化炭素を放出していることを示している。これは、培養期間を通じて暗呼吸速度が低下し、純光合成速度は増加を続けたという結果 (Fig. 1-20, 21) と直接関係している。PLBに吸収された糖は呼吸ないしは細胞構成要素の材料に消費されるので、暗呼吸速度の低下は培地の糖の消耗にともなうものと考えられる。培養体が植物体である場合においても、同様に培養初期には初期の二酸化炭素交換量が負になることが報告されている (富士原ら、1992)。一方、処理間で培地の糖吸収量に違いがあったものの暗呼吸速度の差がほとんどなかった。このことは、過剰に吸収された糖は、暗呼吸量の増加よりも乾物の増加に利用されることを示唆している。百瀬・米田 (1989) は高濃度のショ糖で培養したPLBはより多くのデンプンを蓄積することを報告している。

以上の結果から、培地からの糖の吸収は、寒天濃度に大きく依存し、培地ゲル内の糖拡散が糖吸収の律速要因となっていることが示された。

#### 2. 根量との関係

植物体において、根は吸収器官であり、その量が養水分の吸収量を大きく左右する。培地の糖は培養植物体の重要な炭素源であるが、その吸収は主として培地に接觸している組織面から行われるものと考えられる。培養体が植物体の場合は、その根量は、培地の接觸面に直接関係するので、糖の吸収に大きく影響することが予想される。ここでは糖吸収量と根量との関係を明らかにするた



**Fig. 1-22.** Net photosynthetic rate of *Petunia* (left) and *Cymbidium* (right) plantlets cultured at different O<sub>2</sub> concentrations with or without sucrose. *Petunia* and *Cymbidium* plantlets were cultured under continuous light at 23 μmmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPFD for 22 and 100 days, respectively.

めに、酸素濃度を調節することにより根系の発達程度を変えてその糖吸収量を調べた。

なお、ここでは供試植物としてroot/shoot率の比較的小さいペチュニアを用いた。これは培地量に対する根量の割合が少ない方が培養体の根量の増加にともなう糖の吸収の制限を受けにくいと考えられること、また、外植体を根のない節切片とすることで培養中に発育する根量の調節が比較的均一に実現されると考えられるためである。同時に、気根と呼ばれる特殊な根を持つラン科植物のうちシンビジウムを供試し、根および糖吸収の反応を比較した。

#### 材料および方法

ペチュニア *Petunia* ‘Haming Scarlet Star’ の2~3葉を含むシート先端部（乾物重2.3 mg）とシンビジウム *Cymbidium Melody Fair* ‘Marilyn Monroe’ の2~3葉展開したシート（乾物重3.3 mg）を外植体とした。

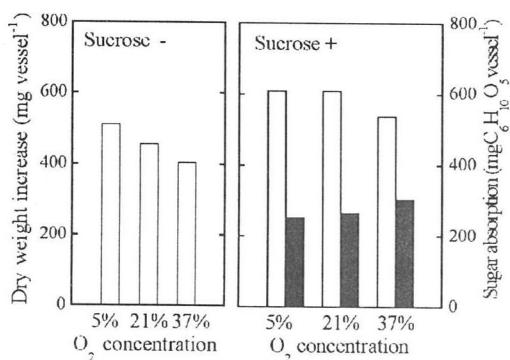
寒天0.8%、ショ糖0%または2%を添加したMS培地を200 ml エルレンマイヤーフラスコに 50 ml ずつ分注し、外植体をペチュニアでは5個体、シンビジウムは10個体

ずつ植え付けた。植え付け後、培養器を2本の曲管付きのシリコン栓で封じ、一方の管から二酸化炭素濃度を2000 ppm、酸素濃度をペチュニアでは5、21または37%、シンビジウムでは10、21または30%に調整した空気を連続送気 (5000 ml h<sup>-1</sup>) して培養を行った。いずれも、培養器内に通気する前の空気を脱塩水に通じてバブリングさせ、培養器内湿度を保った。照明は昼光色蛍光灯による連続照明（棚面のPPFD：23 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>）とし、温度は26℃に維持した。

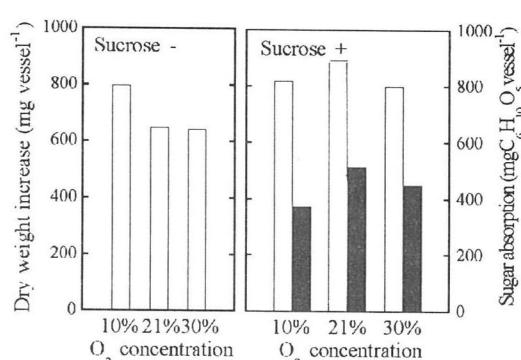
ペチュニアでは22日後に、シンビジウムでは100日後に、*in situ* における培養植物体の二酸化炭素交換速度、培地の糖含量、植物体乾物重を測定した。二酸化炭素交換速度は、培養器内に流入する空気と培養器外へ排出される空気の二酸化炭素濃度差に単位時間あたりの流入量を乗じて求めた。培地の糖含量は第2節に準じて測定し、植物体の培養期間中の糖吸収量を求めた。

#### 結果

ペチュニア、シンビジウムともに酸素濃度が低い区ほど純光合成速度が大きかった (Fig. 1-22)。いずれの酸



**Fig. 1-23.** Dry weight increase and sugar absorption of *Petunia* plantlets cultured at different O<sub>2</sub> concentrations with or without sucrose during 22 days of culture. Dry weight increase is the difference between the dry weight of explants at the beginning of the culture and the dry weight of cultured plantlets at the end of the culture. Sugar absorption is estimated from the difference in sugar content in the medium between the beginning and the end of culture, and is expressed as C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>. Open and closed bars indicate dry weight increase and sugar absorption, respectively.



**Fig. 1-24.** Dry weight increase and sugar absorption of *Cymbidium* plantlets cultured at different O<sub>2</sub> concentrations with or without sucrose during 100 days of culture. Dry weight increase is the difference between the dry weight of explants at the beginning of the culture and the dry weight of cultured plantlets at the end of the culture. Sugar absorption is estimated from the difference in sugar content in the medium between the beginning and the end of culture, and is expressed as C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>. Open and closed bars indicate dry weight increase and sugar absorption, respectively.

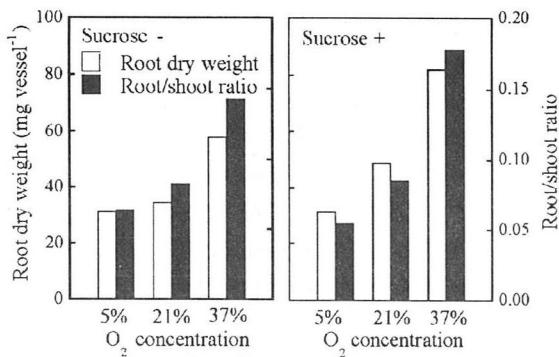


Fig. 1-25. Root dry weight and root/shoot ratio of *Petunia* plantlets cultured at different  $O_2$  concentrations with or without sucrose. *Petunia* plantlets were cultured for 22 days.

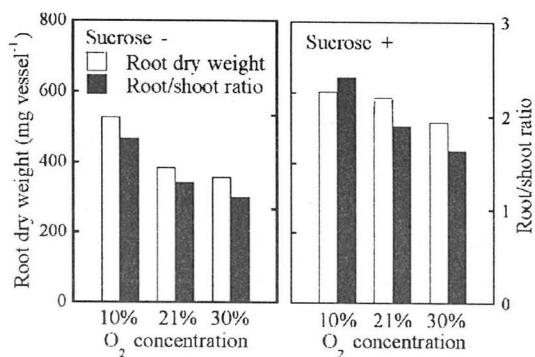


Fig. 1-26. Root dry weight and root/shoot ratio of *Cymbidium* plantlets cultured at different  $O_2$  concentrations with or without sucrose. *Cymbidium* plantlets were cultured for 100 days.

素濃度においても、純光合成速度はショ糖添加培地よりも無添加培地の方が大きかった。

糖吸収量は、ペチュニアでは酸素濃度が高い区ほど大きかったのに対し、シンビジウムでは酸素濃度21%の区で最も大きく、10%の区で最も小さかった (Fig. 1-23, 24)。

植物体の乾物増加量は、ショ糖無添加培地では、ペチュニア、シンビジウムとも酸素濃度が低い区ほど大きかったのに対し、ショ糖添加培地では、酸素濃度が最も低い区の乾物増加量は酸素濃度21%区と同様かそれより小さかった (Fig. 1-23, 24)。

根の乾物重は、ペチュニアでは酸素濃度が高い区ほど大きかった (Fig. 1-25)。シンビジウムでは逆に、酸素濃度が高い区ほど根乾物重が小さくなった (Fig. 1-26)。また、シンビジウムでは酸素濃度が低くなると、根が培地中に伸長せず、気相中に伸長した (Fig. 1-27)。ペチュニア、シンビジウムともショ糖無添加培地よりもショ糖添加培地の方が根乾物重が大きかった。

#### 考察

植物体の培養において、培養器内の二酸化炭素濃度を低めることによって、見かけの光合成速度が高まる (Shimadaら、1988；田中ら、1990)。本実験ではこうした酸素濃度を低めることによる高い光合成速度は長期間の培養の後も続いていた。田中ら (1991) もキク小植物体を低酸素で培養したところ、30日の培養後でも、見かけの光合成速度とリブロース1,5-二リン酸カルボキシラーゼ活性が高かったことを報告している。ショ糖無添加培地では、純光合成速度が大きかった区ほど乾物増加量が大きく、純光合成速度が直接生長量に反映するものと考えられた。一方、ショ糖添加培地では、純光合成速度が大きかった区で必ずしも乾物重が大きくはならず、純光合成速度の大小は乾物増加の大小に反映していなかった。これは光合成による二酸化炭素吸収の他に培地の糖も乾物増加に寄与していて、糖吸収量も酸素濃度の影響を受けたためと考えられる。ショ糖添加培地では、乾物増加量と培地糖吸収量の差の処理間の大小関係は、純光合成速度の大小関係と一致していた。もし、酸素濃度

によらず糖吸収量が一定であれば、ショ糖無添加培地の場合と同様乾物増加は酸素濃度の低い区ほど大きくなつたものと予想される。

酸素濃度に対する根の生長反応は、植物の種によって大きく異なった。ペチュニアでは酸素濃度が高い区ほど根の生長が促進されたが、これは気相中の酸素濃度の増加にともなう培地中の溶存酸素量の増加が根の生長に適していたためと思われる。培地の酸素の溶解度は小さく、またその拡散抵抗は小さいので、低酸素分圧下では根圏の酸素濃度が根の生長を大きく抑制すると考えられる。富士原ら (1993) は、MS培地において、ショ糖の添加と寒天の添加が培地の  $O_2$  拡散係数を低下させ、 $8 \text{ g l}^{-1}$  の寒天の添加によって  $O_2$  拡散係数が約半分に低下することを報告している。また、冠水によって嫌気的な条件に根がおかると、エタノール、アルデヒド、乳酸などの嫌気呼吸産物が根に蓄積することが知られており (Crawford、1967；Bolton・Erickson、1970；Francisら、1974)、培養植物体においてもそれが根の生育に障害となっていることが考えられる。Righettiら (1988；1990) は、嫌気呼吸によって生じたと考えられるエタノールやアセトアルデヒドがオウトウのシート培養器内に多量に蓄積することを報告している。

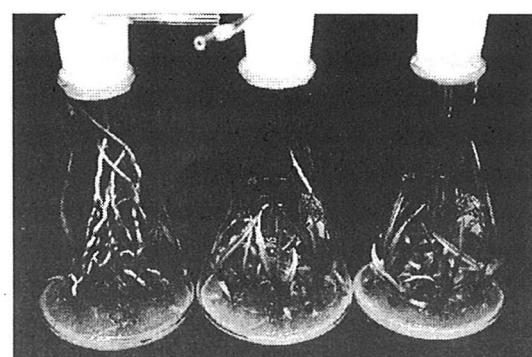


Fig. 1-27. *Cymbidium* plantlets cultured on sugar-free medium at 10% (left), 21% (center), and 30% (right)  $O_2$  concentrations for 100 days. Extension of roots into the aerial phase at low  $O_2$  concentration is common to sugar-free and sugar-containing medium.

これに対してシンビジウムでは、酸素濃度が低い区ほど根の生長量が大きかった。熱帶性シンビジウムを含む着生ランの気根は、呼吸器官としての役割が大きく（Hew, 1987）、低酸素条件におかれたシンビジウムは酸素をより多く取り込むためにこれらの呼吸器官を拡大させた可能性がある。また、酸素濃度が低い区では、根が培地中に伸長せず、気相中へ伸長したが、根が好気性のため、酸素が充分に供給されない培地では根が生長できなかったものと考えられる。なお、シンビジウムでは、root/shoot比が、糖無添加区よりも糖添加区で大きくなつたが、糖による根量の増加は他のラン科植物においても多く観察されている（Yates・Curtis, 1949）。

根の生長と糖の吸収量との関係は培地中に存在する根の量が糖の吸収に関わる大きな要因となっていることを示している。ペチュニアでは、根の生長量が大きくなつた高酸素濃度区で糖吸収量が大きくなった。これは、根が培地からの養水分吸収に大きな役割を果たしていることを示唆している。植物組織のショ糖吸収は、单糖類に分解されて吸収されることが多い（Harley・Smith, 1956；Rothstein, 1954；Street・Lowe, 1950）。植物体の培養においても培地のショ糖は培養期間中に一部または全部がフルクトースとグルコースに分解されることが観察されており（木下ら, 1988；Kozaiら, 1988）、根からの糖吸収もグルコースやフルクトースの形で吸収されていることが予想される。一方、シンビジウムでは、酸素濃度が低い区では根の生長量が最も大きかったにも関わらず、糖の吸収量が小さかつたが、これは培地中に根が伸長しなかつたためと考えられ、培地中に存在する植物組織の量が糖吸収に大きく関わることを裏付けている。寒天ゲルから溶液がしみだしてくる“離しよう”現象は、荷重圧が加わるにしたがって増加する（安納ら, 1999）。培地内に存在する植物組織の量が増加するにつれて、培地ゲルに対する荷重圧が増加し、離しよう量も増加するものと考えられる。Owens・Wozniak（1991）は、培養体の生長による離しよう量の増加が培養体の水利用に寄与する可能性を指摘している。

結論として、培地に糖を加えた培養においては、二酸化炭素吸収量とともに糖吸収量が生長量を決める大きい要因であるが、その糖吸収量は培地中に存在する根の量に大きく依存すること、そして培地内の根の生長は培地中の酸素濃度を高めることによって促進できることが示された。

#### 第4節 培養期間中の器内環境と培養植物体の植え出し後の生育

第3節では、培養器内の植物体の乾物增加に大きく影響する二酸化炭素吸収と糖吸収について考察を行った。特に日二酸化炭素吸収量については、その大小と培養器の通気条件、日長、光強度との関係を論じた。しかし、植物体の培養器内の生長量を大きくする環境条件が、植え

出し後の生長量を大きくするような環境条件と一致するとは限らない。たとえば、培養期間中の生長量が大きくても順化率が低ければ、その培養条件は不適当であるといえるし、培養時の生長量が小さくとも植え出し後の生長量が大きければ、それが培養の最適条件といえる。本節では、第3節で取り上げた二酸化炭素吸収に関する要因のうち、培養器の通気性と光強度が培養植物体の植え出し後の生長に及ぼす影響を検討した。

#### 第1項 通気性の異なる培養器で培養した植物体の植え出し後の生育

培養時の培養器の換気条件の違いによって、培養植物体の植え出し後の生育に差が生じるか調べた。処理区として設定した培養器の換気回数は、マイクロプロパレーションに実際に使用される培養器の換気回数の範囲を想定した。

##### 材料および方法

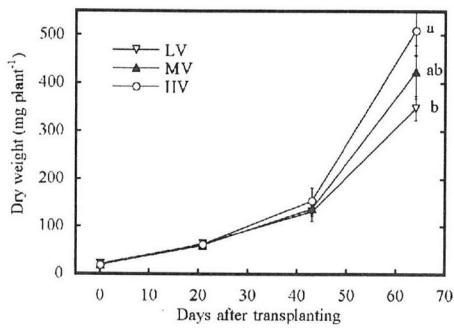
カラジウム *Caladium bicolor ‘Candidum’* の葉脈から誘導した苗条原基から小植物体を得て外植体とした。培養器は、メリクロン用フラスコ（旭テクノグラス、MER-FK300、容量 400 ml）を用い、寒天0.8%、ショ糖2%を添加し pHを5.8に調整したMS培地を培養器あたり70mlずつ分注した。オートクレーブ滅菌後培養器あたり小植物体を19個体植え付けた。培養器を封じる栓として直径 6 mm の穴を1つあけ、そこに 100 mg の綿を詰めたシリコン栓（低換気区）、直径 6 mm の穴を2つあけ、それぞれに 100 mg の綿を詰めたシリコン栓（中換気区）、直径 6 mm の穴を3つあけそれぞれに 100 mg の綿を詰めたシリコン栓（高換気区）を用いた。低換気区、中換気区、高換気区の換気回数は古在ら（1986）の測定方法でそれぞれ、0.117、0.273、0.395 h<sup>-1</sup> であった。棚面のPPFD が 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> となるように白色蛍光灯で照明し、16時間日長で培養した。

60日間の培養後、小植物体を培養器から取り出し、寒天培地を除いた後パーライト：バーミキュライト=1:1の用土を用いて50穴セルトレイに植え付けた。植え付け後、自然日長のビニルハウスにおいてた。植え出し時期のハウス内の最大PPFDは170 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>、最高気温は38℃であった。21日おきに生長量の測定を行ったが、植物体が大きくなつた42日目の測定後にピートモス：パーライト：バーミキュライト=2:1:1の用土を用いて直径 9 cm のビニルポットに移植した。

##### 結果および考察

培養終了時の低換気区、中換気区、高換気区の培養植物体1個体の乾物重はそれぞれ、21.1、19.1、19.3 mg であり、通気性の低い培養器で乾物重が大きくなつた。第3節で示した通り、本実験に用いた培養器の換気回数の範囲では、換気回数が大きい培養器ほど日二酸化炭素吸収量が小さくなり、このため中換気区と高換気区の乾物重が低換気区の乾物重より小さくなつたものと考えられる。

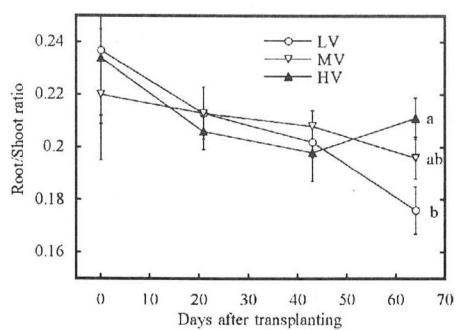
植え出し後の植物体の乾物重は、42日目までは処理区



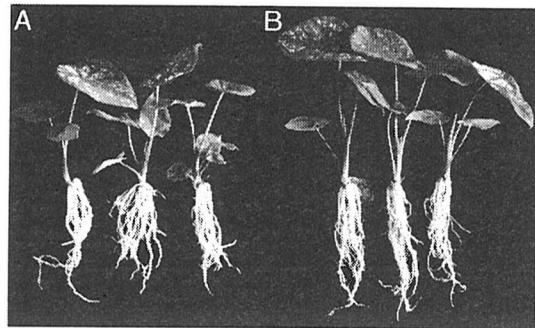
**Fig. 1-28.** Dry weights of *Caladium* plantlets after transfer to *ex vitro* environment. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium in low-ventilated (number of air changes =  $0.117 \text{ h}^{-1}$ , LV), medium-ventilated (number of air changes =  $0.273 \text{ h}^{-1}$ , MV) or high-ventilated (number of air changes =  $0.395 \text{ h}^{-1}$ , HV) vessels under high PPFD ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) for 60 days and then transferred to greenhouse where maximum PPFD and air temperature were  $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and  $38^\circ\text{C}$ , respectively. Vertical bars represent  $\pm\text{S.E.}$  ( $n = 10$ ). For final date, values with the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$  according to REGWQ's multiple range test.

間に差がなかったが、63日目には、培養時の培養器の換気回数が大きかった区ほど乾物重が大きくなつた（Fig. 1-28, 30）。root/shoot率は、植え出し時には個体間のばらつきが大きく、植え出し後42日目までは処理区間に差がなかったが、63日目には培養時の培養器の換気回数が小さかつた区ほど低くなつた（Fig. 1-29）。

培養器の通気性は、培養器内二酸化炭素濃度の他に、培養器内水蒸気圧飽差と培養器内エチレン濃度に影響を及ぼす。古在ら（1989）は、植物体を含む培養器について、ガス交換性の高い培養器内の相対湿度は、ガス交換性の低い培養器内の相対湿度よりも低く推移することを示している。培養器内の水蒸気圧飽差は表皮細胞や気孔（Brainerd・Fuchigami、1981；Donnellyら、1987；Capelladesら、1990）やクチクラワックスの発達（Sutter・Langhans、1982；Wardleら、1983；Zivら、



**Fig. 1-29.** Root/shoot ratio of *Caladium* plantlets after transfer to *ex vitro* environment. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium in low-ventilated (number of air changes =  $0.117 \text{ h}^{-1}$ , LV), medium-ventilated (number of air changes =  $0.273 \text{ h}^{-1}$ , MV) or high-ventilated (number of air changes =  $0.395 \text{ h}^{-1}$ , HV) vessels under high PPFD ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) for 60 days and then transferred to greenhouse. Vertical bars represent  $\pm\text{S.E.}$  ( $n = 10$ ). For final date, values with the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$  according to REGWQ's multiple range test.



**Fig. 1-30.** *Caladium* plants 63 days after transfer to *ex vitro* environment. The plants were cultured in low-ventilated (A) and high-ventilated (B) vessels under high PPFD ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) for 60 days and then transferred to greenhouse.

1983）に大きく影響する。また、相対湿度の低い条件で培養した植物体ほど、培養器外へ移したときのしおれが少ない（Smithら、1990）。一方、通気性の低い培養器では器内にエチレンが蓄積し、それが培養体の発育に影響する（Jacksonら、1991）。エチレンに対する植物体の反応は、植物の種類によって異なるが、葉の展開や、発根など順化に関わる形質に大きく影響することが知られている。

本実験において、換気回数の植え出し後の生育に及ぼす影響が長期にわたり、特に長期間栽培後に大きく現れてきたことは注目に値する。本実験では、植物体が培養器の換気回数の違いにともなう水分条件やエチレン環境の影響を受けていたことは考えられるが、それらが単に環境変化に対する耐性の違いといった短期的な影響ではなく、持続的な生理状態に関わるものであることを示している。

本実験の結果、通気性の低い培養器の方が培養期間中の生長量が大きくなつたが、植え出し後の生長は通気性が高い培養器で培養した植物体の方が大きくなり、植え出し後の生長を考えると培養器の通気性を高めることが重要であることが示された。

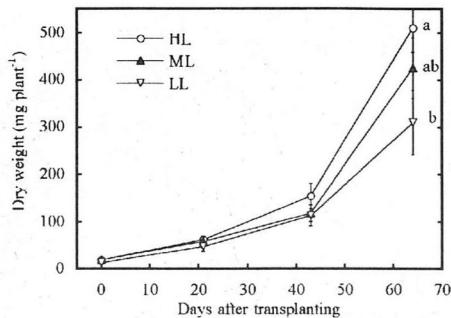
## 第2項 異なる光強度で培養した植物体の植え出し後の生育

培養時の光強度の違いによって、培養植物体の植え出し後の生育に差が生じるか調べた。培養器の換気条件は、前項の実験で、植え出し後の生長量の最も大きかつた高換気区の換気条件とした。

### 材料および方法

外植体と培地は前項に準じた。培養器は前項と同じものを用いたが、換気条件は前項の高換気区と同じにした。白色蛍光灯による棚面のPPFDについては、 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ （強光区）、 $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ （中光区）、 $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ （弱光区）の3区を設け、16時間日長で60日間培養した。

60日間の培養後、小植物体を培養器から取り出し、寒天培地を除いた後パーライト：バーミキュライト=1:1



**Fig. 1-31.** Dry weights of *Caladium* plantlets after transfer to *ex vitro* environment. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium in high-ventilated vessels (number of air changes =  $0.395 \text{ h}^{-1}$ ) under high ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , HL), medium ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , ML) and low ( $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , LL) PPFD for 60 days and then transferred to greenhouse where maximum PPFD and air temperature were  $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and  $38^\circ\text{C}$ , respectively. Vertical bars represent  $\pm\text{S.E.}$  ( $n = 10$ ). For final date, values with the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$  according to REGWQ's multiple range test.

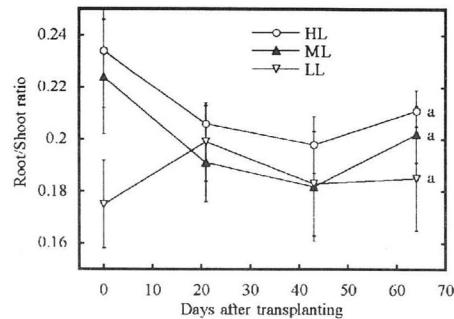
の用土を用いて50穴セルトレイに植え付けた。植え付け後、自然日長のビニルハウスにおいて。植え出し時期のハウス内の最大PPFDは $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、最高気温は $38^\circ\text{C}$ であった。21日おきに生長量の測定を行ったが、植物体が大きくなつた42日目の測定後にピートモス：パーライト：バーミキュライト=2:1:1の用土を用いて直径9cmのビニルポットに移植した。

#### 結果および考察

培養終了直後の強光区、中光区、弱光区の培養植物体1個体の乾物重はそれぞれ、19.3、18.9、13.5 mgであった。中光区と弱光区の1日あたりの投下光量子量は、強光区のそれぞれ2分の1と4分の1であったが、培養植物体の乾物重は強光区のそれぞれ98%と70%であった。第2節で、中期長を16時間から半分の8時間に短くした場合、植物体重量が約63%に減少したのに比べると(Table 1-3)、1日あたりの投下光量子量を同様に減らしたのにもかかわらず光強度を弱めることによる生長量の減少は小さい。この違いは、第3節で考察したように、中期長を短縮するよりも、中期長を変えずに光強度を弱めた方が、1日あたりに投下した光量子量が等しくても日二酸化炭素吸収量が大きいことによるものと考えられる。

植え出し後の乾物重は、42日目までは処理区間に差がなかったが、63日目には、培養時の光強度が大きかった区ほど乾物重が大きくなつた(Fig. 1-31)。root/shoot率は、植え出し時には、弱光区で小さかつたが、植え出し後21日目以降は処理区間に差がなくなつた(Fig. 1-32)。

強光条件では植物体の特に培養初期の生長が阻害されることがある。光混合栄養条件下では、植物体を長時間強光条件におくと光合成速度が低下する(Cournacら、1991)。また、二酸化炭素供給が制限される条件下では、光合成の光阻害を生じやすく、光合成を高めて生長を促進するにあたって、光強度を高めることは慎重に行う必要がある(Dubé・Vidaver、1992)。第3節第1項で考察



**Fig. 1-32.** Root/shoot ratio of *Caladium* plantlets after transfer to *ex vitro* environment. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium in high-ventilated vessels (number of air changes =  $0.395 \text{ h}^{-1}$ ) under high ( $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , HL), medium ( $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , ML) and low ( $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , LL) PPFD for 60 days and then transferred to greenhouse. Vertical bars represent  $\pm\text{S.E.}$  ( $n = 10$ ). For final date, values with the same letter are not significantly different at  $P = 0.05$  according to REGWQ's multiple range test.

したように、光強度はある一定レベル以上に強めても、培養植物体の生長が培養器内の二酸化炭素濃度に制限されるために、投下された光量子の利用効率が低下してしまう。同時に、光強度を強めることによって、培養室の冷房にかかる費用も増加することになる。これらのことから、植物体の培養は乾物生産量を考えるならば弱光条件で行うのが効率的と考えられる。しかし、本実験の結果は、培養時の光強度を強めても培養中の生長量はさほど増加しないが、植え出し後の生長は強光条件で培養した植物体の方がすぐれており、マイクロプロパゲーションの第III段階では強光条件で培養することの重要性を示している。

#### 第5節 培養期間中の器内環境と植え出し後の植物体内の物質転流

これまで、培養期間中の培養植物体の乾物增加には日二酸化炭素吸収量が関係しているが、日二酸化炭素吸収量が大きくなるような光および換気条件は植え出し後の生長を大きくする条件と必ずしも一致しないことを明らかにした。また、培養期間中の光および換気条件が、植え出し後長期にわたって、植物体の生長に影響を及ぼすことを明らかにした。

培養期間中の光および換気条件が、培養植物体の光合成能に及ぼす影響についてはいくつかの報告がある(Cournacら、1991；Leeら、1985)。光合成能力は、植物体の乾物生産に直接影響を与える要因であり、その大小がその後の生長を左右する。一方、第4節の実験結果から、培養期間中の光および換気条件が植物体の培養期間または植え出し後のroot/shoot率に影響することが示され、光合成速度の違いによる乾物生産の他に、植物体部位間の乾物分配が植え出し後の生長に関係していることが示唆された。

培養期間中に生産された乾物の一部は、順化過程において再転流されて新葉や新根などの新しい器官をつくる

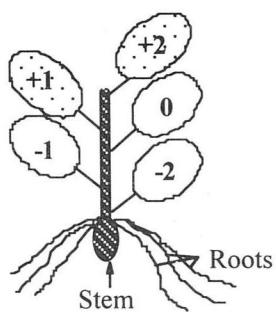


Fig. 1-33. Diagram showing a *Caladium* plant. The final expanded leaf at the end of culture is numbered zero and leaves emerged after transfer to *ex vitro* are numbered +1, +2, etc.

ために利用されると考えられる。したがって、培養期間中に生産された乾物の新器官への転流パターンが植え出し後の生長と深く影響しあっていることが考えられる。しかし、培養植物体について、培養期間中および順化過程以降における同化産物の植物体各部位への転流について調べた報告は見あたらない。

そこで本節では、異なる光および換気条件で培養した培養植物体の、培養期間中および植え出し後における光合成産物の転流を、安定同位体をトレーサーに使用することによって調べた。

#### 材料および方法

カラジウム ‘Candidum’ の小植物体を外植体とした。培養器は、200 ml エルレンマイヤーフラスコを用い、寒

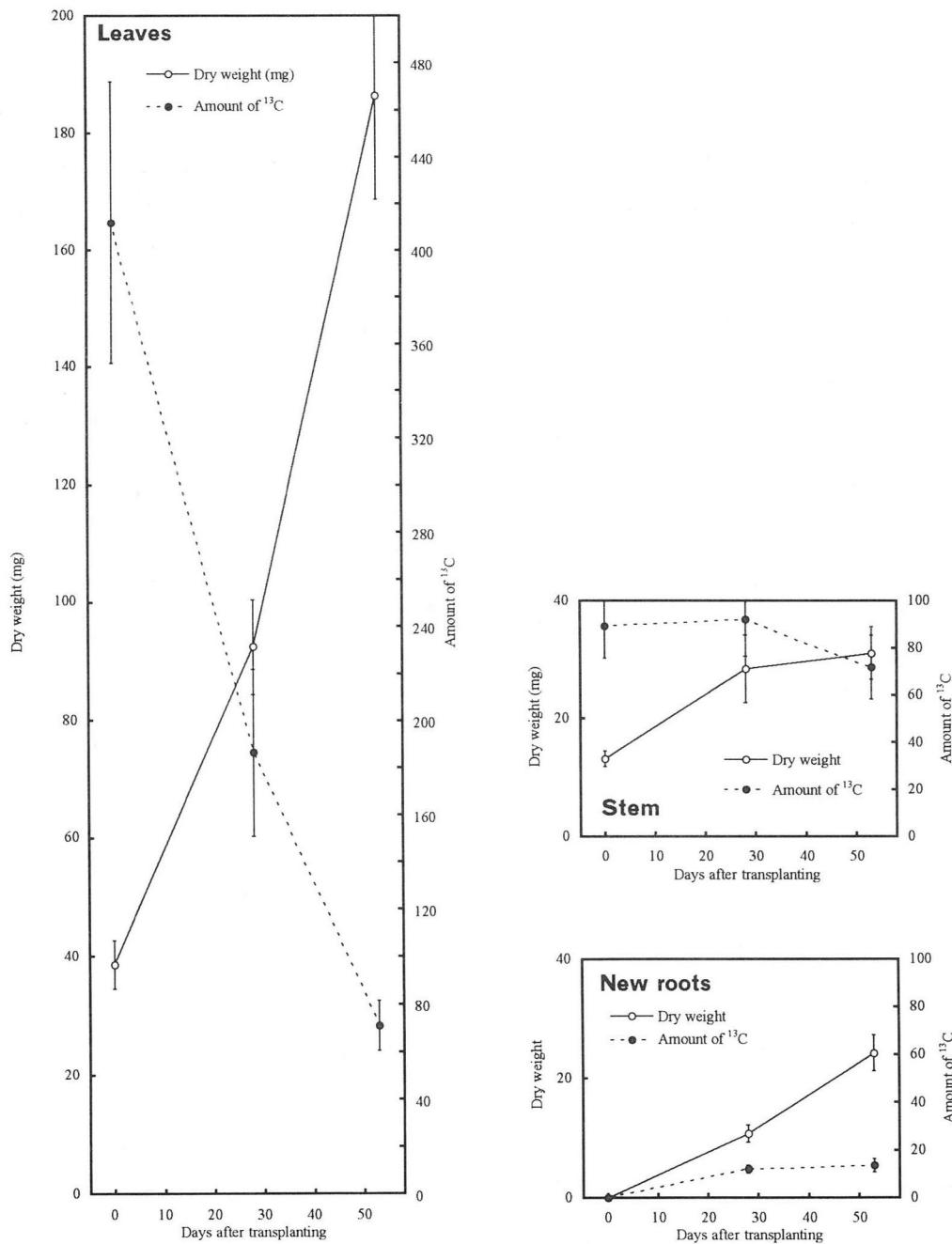


Fig. 1-34. Changes in dry weight and amount of  $^{13}\text{C}$  in parts of *Caladium* plants after transfer to *ex vitro*. The plants were cultured for 83 days and fed  $^{13}\text{CO}_2$  for the last 18 days of culture. Vertical bars indicate SE ( $n=15$ ).

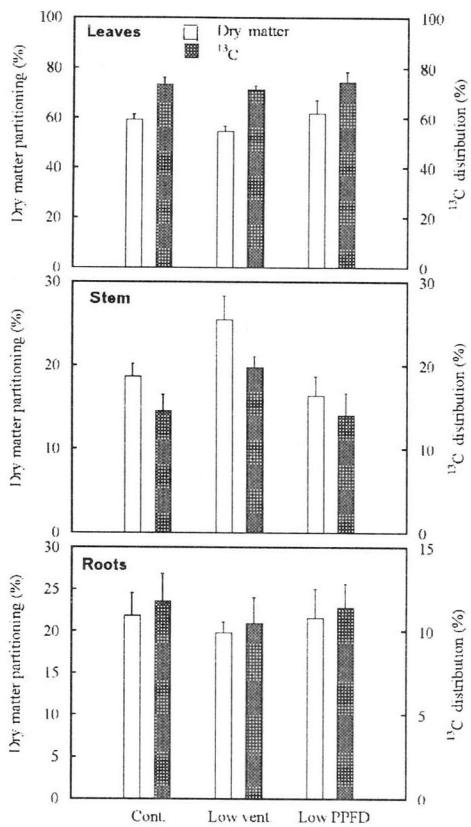


Fig. 1-35. Partitioning of dry matter and  $^{13}\text{C}$  distribution in *Caladium* plants cultured under low ventilation (Low vent.) or low PPFD conditions at the end of culture. Numbers of air exchanges of vessel in control and low ventilation were  $0.154 \text{ h}^{-1}$  and  $0.115 \text{ h}^{-1}$ , respectively. PPFD in control and low PPFD were  $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively. The plants fed  $^{13}\text{CO}_2$  for the last 18 days of culture. Vertical bars indicate SE ( $n=5$ ).

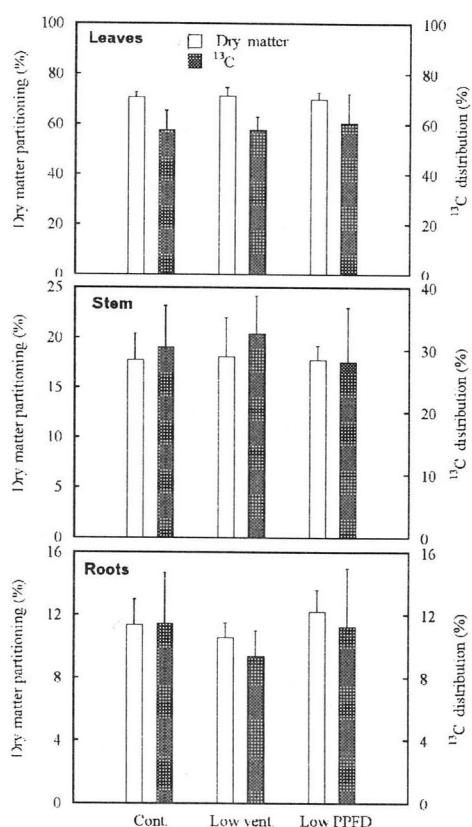


Fig. 1-36. Partitioning of dry matter and  $^{13}\text{C}$  distribution in *Caladium* plants cultured under low ventilation (Low vent.) or low PPFD conditions on the 28th day after transfer to *ex vitro*. Numbers of air exchanges of vessel in control and low ventilation were  $0.154 \text{ h}^{-1}$  and  $0.115 \text{ h}^{-1}$ , respectively. PPFD in control and low PPFD were  $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively. The plants fed  $^{13}\text{CO}_2$  for the last 18 days of culture. Vertical bars indicate SE ( $n=5$ ).

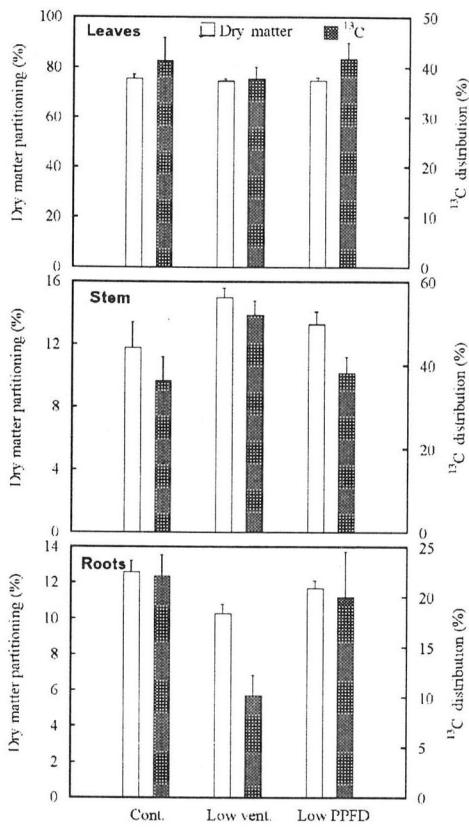
天0.5%、ショ糖2%を添加し、pHを5.8に調整したMS培地を培養器あたり50 mlずつ分注した。オートクレーブ滅菌後培養器あたり小植物体を5個体植え付けた。培養条件として、強光高換気条件の対照区（培養器換気回数： $0.154 \text{ h}^{-1}$ 、PPFD： $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ）、強光低換気条件の低換気区（培養器換気回数： $0.115 \text{ h}^{-1}$ 、PPFD： $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ）、弱光高換気条件の弱光区（換気回数： $0.154 \text{ h}^{-1}$ 、PPFD： $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ）の3つを設けた。なお照明は連続照明としたが、夜間の8時間の光強度は約3分の1の強度とした。培養開始65日目から、培養器を $^{13}\text{C}$  98 atom %以上のCO<sub>2</sub>濃度2000～5000 ppmに調節したチャンバー内に18日間おいて $^{13}\text{C}$ を取り込ませた。 $^{13}\text{C}$ 処理直後、培養植物体を培養器から取り出し、パーライト：バーミキュライト=1:1の用土を用いて50穴セルトレイに植え付けた。植え付け後、植物体を、昼温30℃夜温25℃に設定した自然光の人工気象室内で栽培した。培養終了直後と、培養器外へ植え出してから28日と53日後に、植物体を各部位に切り分けてサンプリングした。培養期間中に展開した葉は、最上位葉を0として以下-1、-2、とし、植え出し後に展葉した葉は下位から上位にしたがって+1、+2、とした（Fig. 1-33）。茎は、特に植え出し後53日目

には、基部が発達して小さな塊茎を生じたが、区別せず、すべてをあわせて茎とした。80℃で3日間乾燥させた後、粉碎して、 $^{13}\text{C}$ アライザ（日本分光、EX-130S）により、試料中の $^{13}\text{C}$  atom %を測定した。植物体各部位の $^{13}\text{C}$ 量は、各部位の乾物重に対する炭素率が一定と仮定して、各部位の乾物重と $^{13}\text{C}$  atom % excessとの積で評価した。

#### 結果および考察

$^{13}\text{C}$ 処理期間中および植え出し時から28日後までと植え出し時から53日後までの間の展葉数はそれぞれ、1.2、2.4、4.2で処理間の差は小さかった。また、いずれの時期も、植物体の展開生葉数は約4枚で、ほぼ一定していた。

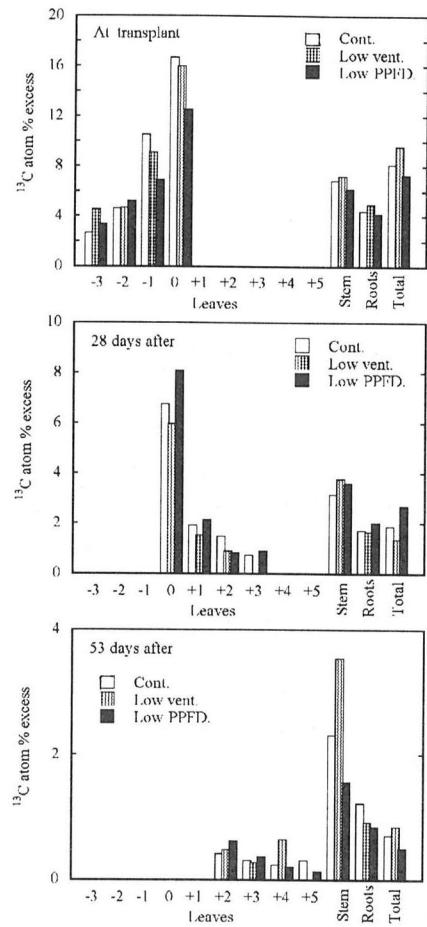
植物体の乾物重と $^{13}\text{C}$ 量は、個体間のばらつきが大きかったため、植え出し後の部位別の乾物増加と $^{13}\text{C}$ の消長を全処理区まとめてFig. 1-34に示す。葉の乾物重は、培養終了時には全乾物重の約3分の2を占めており、取り込まれた $^{13}\text{C}$ の70%が葉に分布していた。植え出し後、葉の乾物重は大きく増加し、植え出し後53日目には植え出し時の約4.5倍に増加したが、葉の $^{13}\text{C}$ 量は植え出し時の6分の1に減少した。一方、茎の乾物重は植え出し後28日目には植え出し時の約2倍に増加したが、53日目にかけては増加が少なくなった。茎の $^{13}\text{C}$ 量は植え出し28日後まで



**Fig. 1-37.** Partitioning of dry matter and <sup>13</sup>C distribution in *Caladium* plants cultured under low ventilation (Low vent.) or low PPFD conditions on the 53rd day after transfer to *ex vitro*. Numbers of air exchanges of vessel in control and low ventilation were  $0.154 \text{ h}^{-1}$  and  $0.115 \text{ h}^{-1}$ , respectively. PPFD in control and low PPFD were  $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively. The plants fed <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> for the last 18 days of culture. Vertical bars indicate SE ( $n=5$ ).

にはわずかに増加したが、植え出し後58日目までにかけては減少した。新根の乾物重は、植え出し後ほぼ直線的に増加したが、新根中の<sup>13</sup>C量は28日目までは増加したが、以降の増加は小さかった。葉の<sup>13</sup>Cの植え出し後の減少は、培養期間中に展葉した<sup>13</sup>Cを多く含む葉が枯死したためと考えられる。植え出し後26日目までの間に葉の<sup>13</sup>C量は226 減少したが、その間の茎と根の<sup>13</sup>C量の増加はあわせて15で、葉から他器官への炭素の再転流率はわずか7%程度であった。一方、植え出し後26日目までの間では、茎の単位あたり乾物増加量に対する<sup>13</sup>C増加量は0.18であったのに対し、根の単位あたり乾物増加量に対する<sup>13</sup>C増加量は茎のそれの6倍以上の1.1であった。このことはカラジウムにおいて培養期間中に同化された<sup>13</sup>Cは、貯蔵器官である茎よりも新根により多く再転流したことを示している。それに対し、植え出し後28日目から58日目の間は、茎の<sup>13</sup>C量が減少したのと同時に、新根の<sup>13</sup>C量の増加もわずかであり、この期間では、新根の構成成分には植え出し後に同化された炭素が使われたことを示している。植え出し後58日目には培養期間中に展開した葉がすべて失われ、すべて植え出し後に展葉した葉に入れ替わっていたが、葉の<sup>13</sup>C量は植え出し時の約17%であった。

培養終了時と植え出し後28日と53日後の植物体各部位



**Fig. 1-38.** <sup>13</sup>C atom % excess in parts of *Caladium* plants cultured under low ventilation (Low vent.) or low PPFD conditions at transplant and on the 28th and 53rd days after transfer to *ex vitro*. Numbers of air exchanges of vessel in control and low ventilation were  $0.154 \text{ h}^{-1}$  and  $0.115 \text{ h}^{-1}$ , respectively. PPFD in control and low PPFD were  $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , respectively. The plants fed <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> for the last 18 days of culture.

の乾物分配量、および<sup>13</sup>Cの各部位の分布をそれぞれFig. 1-35、36、37に示した。<sup>13</sup>Cの各部位の分布は、植物体中の全<sup>13</sup>C量に対する各部位の<sup>13</sup>C量の割合をパーセントで表示した。また、培養終了時と植え出し後28日と53日後の植物体各部位の<sup>13</sup>C atom % excess をFig. 1-38に示した。なお、葉の<sup>13</sup>C atom % excess は同じ処理区の同じ葉位でも、葉齢の違いによって差が生じたため、<sup>13</sup>C atom % excess は十分に展葉した葉のみを対照として図示した。

培養終了時の各部位への乾物分配は、培養条件によって違いがみられた。低換気条件で培養した植物体は、茎への乾物分配が大きかった。弱光条件で培養した植物体は、逆に茎への乾物分配がやや小さく、その分葉への分配が増加した。葉の<sup>13</sup>C atom % excess はいずれの処理区も若い葉ほど大きく、若い葉ほど光合成能力の高いことを示していた。 $-1$ 葉および $0$ 葉では、弱光区で<sup>13</sup>C atom % excess が最も小さかったが、これは光合成速度が光強度により制限を受けていたためと考えられる。また、低換気区でも対照区に比べて<sup>13</sup>C atom % excess がやや小

さかったが、これは培養器内への二酸化炭素供給量が換気回数により制限を受けていたためと考えられる。植物体各部位における<sup>13</sup>Cの分布は、対照区と弱光区との間に差は認められなかったが、低換気区では茎への分配が大きくなつた。カラジウムでは茎は短縮された形で地下部に存在し、養分を貯蔵して塊茎を形成する。本結果は、通気性の高い培養条件では、同化産物の貯蔵器官への転流が小さく、新根や新葉への転流が大きくなることを示している。

植え出し28日後の植物体各部位への乾物分配は、培養終了時にみられたような処理間の大きな差はみられなくなった。0葉の<sup>13</sup>C atom % excess は処理間に差が生じ、植え出し時に最も<sup>13</sup>C atom % excess が小さかつた弱光区で最も大きい値を示した。このことは、弱光条件下で葉に蓄積した同化産物は、植物体の他の部位に転流されにくくことを示唆している。

植え出し58日後には、植物体各部位の乾物分配量、<sup>13</sup>Cの分布、<sup>13</sup>C atom % excess に処理間の差が大きく現れた。低換気区では、茎への乾物分配が他の処理区に比べて大きくなり、その分、根への乾物分配が少なくなつた。葉の乾物分配は処理間に差がなかった。植物体全体の<sup>13</sup>C atom % excess は、いずれの処理区も培養終了時の10分の1まで低下したが、特に弱光区で最も低くなつた。このことは、弱光条件で培養した植物体に貯えられた同化産物は、新組織の構成成分としての利用率が低いことを示している。<sup>+2</sup>より上位の葉の<sup>13</sup>C atom % excess は、培養終了時の0葉のそれの15分の1以下であったが、茎の<sup>13</sup>C atom % excess は培養終了時からの低下は葉に比べて小さかつた。これはカラジウムでは茎は貯蔵器官としての機能を持ち、他の部位、特に葉の<sup>13</sup>Cが植え出し後に茎に転流してくるためと考えられる。しかし、その値は、処理間によって大きく異なり、低換気区で最も大きく、弱光区で最も小さくなつた。特に低換気区では、茎の総<sup>13</sup>C量が、培養終了時よりも増加し（データ略）、培養期間中に茎に貯蔵された炭水化物は、新葉と新根の材料としては利用されにくいことを示している。また、低換気区では根の乾物分配率に対する<sup>13</sup>Cの分布が他の処理区に比べて小さいことから、新根の構成成分となる炭水化物が茎の貯蔵炭水化物によってまかなければならぬために、低換気区では根の発達が遅れることを示している。

これらの結果から、培養期間中の換気条件や光条件は、培養期間中だけではなく培養後長期間にわたって同化産物の転流に大きく影響すること、高換気強光条件で培養すると、植物体内にとりこまれた同化産物が、培養期間と植え出し後の期間を通じて新葉や新根などの新器官に転流しやすい状態となることが示された。

## 第6節 総合考察

第1節では、培地に糖を添加した光混合栄養培養のマイクロプロパゲーションにおいて、培地から吸収された糖

はそのまま植物体の構成成分として利用されるのではなく、吸収された糖の大部分はいったん呼吸によって二酸化炭素として培養器中に放出され、これが光合成によって同化されることを示した。第2節では、植物体の乾物増加に重要な二酸化炭素吸収量に影響を及ぼす環境要因について明らかにした。シミュレーションで示したように、通常培養条件として設定されることの多い16時間の明期長下では、培養植物体の日二酸化炭素吸収量は0以下となる。厳密には培養器内外の空気の交換が行われているので、培養植物体は培地の糖に由来している二酸化炭素以外に培養器外から流入してくる二酸化炭素も吸収しているが、培養期間全体を通して考えると培養器の炭素吸支は負であることを示している。したがって、仮に培地の糖がすべて植物体に吸収されたとしても、培養植物体の重量はおおざっぱに見積もって、外植体の乾物重と培地の糖重量とを合計した重量以上には達しないことになる。それに加えて、培養器の通気性が高くなるほど培養器の炭素吸支は小さくなるので、培養植物体が獲得しうる重量はさらに小さくなる。

培養植物体による培地からの糖の吸収は、第3節第2項で考察したように、寒天ゲル中の糖の拡散速度により制限を受け、その吸収は培地中の根系の発達によって促進される。しかし、培養器内の植物体の生長速度が小さいために、根系の発達が遅れ、培地の糖は必ずしも有効に吸収されて乾物増加に利用されていない。これまで、培養植物体の培地からの糖吸収を調べた報告（木下ら、1988；Kozai・Iwanami、1988）によると、植物体に吸収された糖は培地に含まれる糖全体のわずか数%にすぎない。先に述べたように、一般的な培養条件における培養器の炭素吸支は負であるので、培地に添加された糖のうち培養植物体の乾物増加に実際に寄与する割合はさらに少なくなる。このことは逆に、何らかの手段によって、培地からの糖の吸収を増加させて培養植物体の生長を促進させる余地が大いに残されていることを意味している。

マイクロプロパゲーションのシステムでは、植物体の培養器内の生長量を高めることの他に、植え出し後の順化効率や生長速度を高めることが同時に要求される。そのため、第4節では、培養期間中の環境条件が、培養植物体の植え出し後の生育に及ぼす影響について長期的な視点から検討した。その結果、培養期間中の環境条件が、植え出し後かなり長期間にわたって影響することが明らかになった。植え出し後の生長率を高めるためには、通気性の高い培養器を用いて、強光条件で培養する必要がある。しかし、第3節で考察したように、通気性の高い培養器を用いると、培養植物体の日二酸化炭素吸収量は減少し、その結果、培養植物体の乾物増加量は小さくなる。また、強光条件で培養することは、明期における培養器内二酸化炭素濃度が低下するために、光量子の利用効率の低下を招く。このように、培養期間中の植物体の乾物増加を効率的に大きくする培養条件と、植え出し後の生長量を大きくするための培養条件は必ずしも一致しなか

った。そこで次章では、培養期間中の環境条件として高換気条件と強光条件を前提とし、日二酸化炭素吸収量の増加と培地糖の利用効率を高めるための環境調節法を検討する。

## 第7節 摘要

マイクロプロパゲーションの苗の質を決定する要因について、培養期間中の生長と、植え出し後の生長の両面から検討した。

まず、光混合栄養培養における、培養植物体の炭素の流れについて調べた。その結果、培地から吸収された糖のうち、そのまま植物体の構成成分として利用される割合は少なく、大部分はいったん呼吸を通じて植物体外へ放出された後、光合成によって再吸収されて利用されることが明らかとなり、光混合栄養培養においても光合成が乾物生産に大きく寄与していることが示された。

次に、光合成による二酸化炭素吸収と培地からの糖の供給の2点から、培養植物体の生長を制限する要因について明らかにした。光合成による二酸化炭素吸収の点からは、通気性の高い培養器ほど日二酸化炭素吸収量が小さくなることと、明期長を短縮するよりも光強度を弱めた方が、光量子の量に対する光合成の効率が高くなることが示された。培地からの糖の供給の点からは、培地からの糖の吸収は寒天濃度に大きく依存し、培地ゲル内の糖拡散が糖吸収の律速要因となっていることと、植物体の糖吸収は培地内の根量に大きく依存し、培養植物体の根系の早期の発達が、乾物增加の促進に重要であることが示された。

最後に、培養植物体の植え出し後の生長について、培養期間中の物理的環境との関係を検討した。その結果、通気性の高い培養器で培養した場合、培養期間中の植物体の生長量は、通気性の低い培養器で培養した植物体のそれに比べて小さかったが、植え出し後の生長量は通気性の低い培養器で培養した植物体のそれよりも大きかった。また、培養期間中の生長量は光強度による差が小さく、弱光条件で培養した方が光量子の効率が高いことが示されたが、植え出し後の生長量は強光で培養した方が大きかった。安定同位体をトレーサーに用い、異なる培養条件で培養した植物体の植え出し後の転流パターンを調べたところ、対照とする植物体と比較して、通気性の低い培養器で培養した植物体と弱光条件で培養した植物体のそれぞれが異なった転流パターンを示し、培養時の環境条件が、植え出し後も長期にわたって植物体の生理状態に影響を及ぼし続けることが明らかになった。

## 第2章 培養植物体の生長に対する明暗周期の短縮の効果

第1章では、組織培養苗の苗質を決める要因を、植え出

し後の生長との関係を含めて検討し、植え出し直後の環境変化に耐え、植え出し後の生長の早い培養苗を得るには、ある程度以上の通気性を培養器に持たせることと光強度のもとで培養することが必要であることを示した。しかし、現在慣行的に行われている有糖培養においては、明期に光合成のために吸収される二酸化炭素の大部分は、培地に添加された糖が呼吸によって利用された後に放出された二酸化炭素に由来する。そのため暗期を設けた上で培養器の換気回数を高めると、培養植物体の日二酸化炭素吸収量が減少し、培養植物体の乾物增加量が小さくなる。一方、暗期を設けずに連続明期下で培養した場合は、換気回数を高めるにしたがって植物体の日二酸化炭素吸収量が多くなり、乾物增加量は大きくなるが、光合成速度が培養器内二酸化炭素濃度に律速されるため、光量子あたりのエネルギー利用効率が低下する。また、光量子の利用効率をあげるために光強度を下げて培養すると、植え出し後の生長量が低下する。

投下される光量子の利用効率をあげるために培養器外の二酸化炭素濃度を高めたり（吉在・岩浪、1987）、植え出し直後の環境変化に耐えうる培養苗を得るために光独立栄養培養（Fujiwaraら、1988；Kozai、1991）などの方法が考えられているが、いずれも特殊な設備を要し、培養にかかるコストが増加する。そこで第2章では、慣行の培養器および培養設備の使用を前提条件とし、照明を断続的に与えることによって、通常の照明下での培養に比べて苗質を低下させずに培養植物体の乾物増加を高めることができかを検討した。

## 第1節 短縮された明暗周期下における培養植物体の生長と炭素収支

### 第1項 明暗周期が培養植物体の乾物増加と培養器内気相環境に及ぼす影響

ここでは、カラジウムをモデル植物として、明暗周期長が培養器内気相環境と培養植物体の乾物増加に及ぼす影響を明らかにした。

#### 材料および方法

カラジウム *Caladium bicolor* ‘Candidum’ の苗条原基から発達し、葉を2~3枚展開した植物体（高さ2cm）を外植体とした。

培地は、MS（Murashige・Skoog、1962）の主要塩類に、Fe-EDTA、Ringe・Nitsch（1968）の微量元素およびNitsch・Nitsch（1965）の有機物を加えたものに、2%のショ糖と0.8%の寒天を添加して、pH5.8に調整したものを使いた。培養器は200 mlのエルレンマイヤーフラスコ（内口径25 mm）を用い、培地を50 ml分注して滅菌後、植物体を培養器あたり5個体植え付けた。培養器に中央に直径5 mmの穴を開け、そこに10 mgの綿を詰めたゴム栓をした。ゴム栓と培養器の間隙はパラフィンで封じてゴム栓の穴を通して培養器内外の空気の交換が

**Table 2-1.** Dry weight of *Caladium* plantlets cultured under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark) for 60 days. Five plantlets were inoculated in each vessel.

Closure of vessel	Light/Dark	Dry weight ( $\text{mg} \cdot \text{plantlet}^{-1}$ )
Airtight	16 h / 8 h	23.8
	2 h / 1 h	24.2
Ventilated	16 h / 8 h	ns
	2 h / 1 h	49.1
<i>t</i> -test		*

ns, non significant; \*, significant at 0.05 % level.

行われるようとした（自然換気区）。また、密封区としてゴム栓の穴をビニールテープで塞いだ上にさらにパラフィンで封じた区を設けた。

植え付け後、培養器を24時間の明暗周期（16時間明期/8時間暗期：24時間周期区）または3時間の明暗周期（2時間明期/1時間暗期：3時間周期区）に静置して培養を行った。照明光源は昼光色蛍光灯を用い、培養棚面における光合成有効光量子束密度が $34.2 \mu \text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ となるように調整した。培養室の温度は明暗周期を通じて $26 \pm 1^\circ\text{C}$ とした。

60日間の培養後、培養器内の二酸化炭素濃度を1明暗周期の間、経時的に測定した。培養器内のガスをシリジを用いて、1 ml 採取し、土井ら（1989）の方法にしたがって二酸化炭素濃度をガスクロマトグラフィーにより測定した。その後培養植物体の乾物重を測定した。

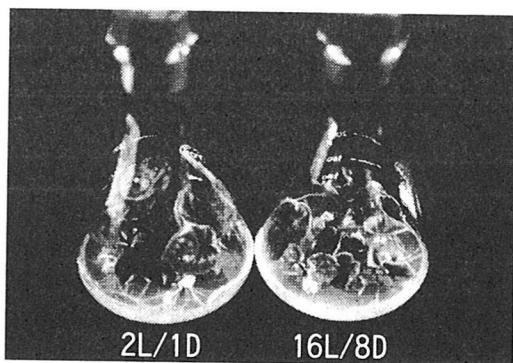
#### 結果および考察

培養後61日の培養植物体の乾物重は、自然換気区では24時間周期区よりも3時間周期区の方が大きかったが、密封区では周期長の違いによる乾物重の差はみられなかった（Table 2-1、Fig. 2-1）。

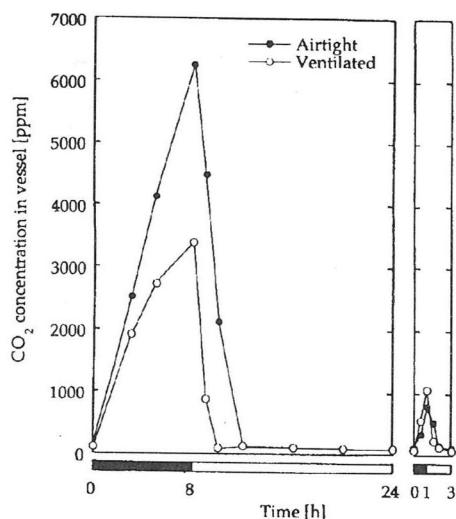
培養器内の二酸化炭素濃度は、いずれの処理区も、暗期に上昇したが、明期の開始とともに急激に低下し、明期開始2~4時間以降は低濃度で安定した（Fig. 2-2）。このパターンは、これまで報告された培養器内二酸化炭素濃度の推移パターンと一致していた（Fourniou & Bessis, 1986；富士原ら、1987；土井ら、1989；Solárová、1989）。

24時間周期区において、密封区では暗期を通じて培養器内二酸化炭素濃度はほぼ一定の割合で上昇した。密封区では培養器内外の気体の交換がほとんど行われないので、培養器内二酸化炭素が一定の割合で増加したことは、培養植物体からの二酸化炭素放出速度が一定であり、培養植物体の暗呼吸速度の日変化はほとんどないことを示している。一方、自然換気区では、暗期における培養器内二酸化炭素濃度の上昇率は暗期開始から時間が経過するにしたがって低下したが、これは培養器外への二酸化炭素の流出によると考えられる。

3時間周期区では、暗期の連続時間が短いために暗期における培養器内の二酸化炭素の蓄積が小さかった。培養器内に蓄積された二酸化炭素が培養器外へ拡散する量は



**Fig. 2-1.** *Caladium* plantlets cultured in ventilated vessels under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark, 16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark, 2L/1D) for 60 days. Each culture vessel contains 5 plantlets.



**Fig. 2-2.** Fluctuations in  $\text{CO}_2$  concentration in the airtight vessel and the ventilated vessel containing *Caladium* plantlets under the 24-hour lighting (16 h light/8 h dark, left) and the 3-hour lighting cycles (2 h light/1 h dark, right) after 60 days culture.

培養器内外の二酸化炭素濃度差に比例するので（古在ら、1986）、暗期中に培養器外へ失われる二酸化炭素の量は、明暗周期が短くなるほど小さくなると考えられる。結果として、暗期の後に引き続いて起こる明期に光合成で利用できる二酸化炭素の量は明暗周期の長さが短くなるほど多くなると考えられる。したがって、自然換気区では、明暗周期の短縮によって培養植物体は1日の二酸化炭素吸収量が増加したため、乾物重の増加が大きくなったと考えられる。一方密封区では、培養器外への二酸化炭素の流出がないため、明暗周期の違いによって培養植物体の日二酸化炭素吸収量に差がなく、そのため乾物重の違いが生じなかつたものと考えられる。

#### 第2項 異なる明暗周期における培養植物体の日二酸化炭素吸収量の算定

第1項の実験結果から、短い明暗周期では、暗期における培養器内の二酸化炭素の蓄積が小さいために、暗期中に培養器外へ失われる二酸化炭素量が比較的少なく、そ

Table 2-2. Estimated values of parameters of the Fujiwara's CO<sub>2</sub>-net photosynthesis model (1987) and dark respiration rate (R) of the *Caladium* plantlets. Pns = saturated net photosynthetic rate for CO<sub>2</sub> concentration, G = gradient of CO<sub>2</sub>-net photosynthesis curve at CO<sub>2</sub> compensation concentration, C = CO<sub>2</sub> compensation concentration.

Pns [μcm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> ·mgDW <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	G [μcm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> ·mgDW <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ·ppm <sup>-1</sup> ]	C [ppm]	R [μcm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub> ·mgDW <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]
3880	9.9	78.0	1300

のため培養植物体の日二酸化炭素吸収量が大きくなると推察された。しかし、培養植物体の日二酸化炭素吸収量は、暗期に培養器外へ流出する二酸化炭素の量だけではなく、明期に培養器内へ流入する二酸化炭素の量によっても影響されると考えられるので、培養植物体の1日の二酸化炭素吸収量の正確な算定は、両者の値の合計値で議論する必要がある。そこで、第1項の実験で得られた二酸化炭素濃度実測値を用いて、培養器内のバイオマスが等しいと仮定した場合の、明暗周期の違いによる培養植物体の1日の二酸化炭素吸収量の違いをシミュレートした。

#### 材料および方法

第1項の実験で得たカラジウム培養器内の二酸化炭素濃度の実測値を用いて、以下の手順で培養植物体の1日の二酸化炭素吸収量（日二酸化炭素吸収量）を算定した。

まず、富士原ら（1987）の方法に従い、培養器内二酸化炭素濃度の実測値から、培養植物体の暗呼吸速度および二酸化炭素-純光合成モデルパラメータの近似値を評価した。二酸化炭素-純光合成モデルは次式で表される（富士原ら、1987）。

$$Pn = Pns - [1 - \exp \{ -G(Kc - C) / Pns \}]$$

ここで、Pn：純光合成速度 [μcm<sup>3</sup>CO<sub>2</sub>·mgDW<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>]

Pns：二酸化炭素飽和点における純光合成速度  
[μcm<sup>3</sup>CO<sub>2</sub>·mgDW<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>]

G：二酸化炭素-純光合成曲線の、

Kc = C における勾配 [μcm<sup>3</sup>CO<sub>2</sub>·mgDW<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>·ppm<sup>-1</sup>]

Kc：培養器内二酸化炭素濃度 [ppm]

C：二酸化炭素補償点 [ppm]

これらの二酸化炭素-純光合成モデルパラメータ近似値と暗呼吸速度の評価値とを用いて、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化のシミュレーションを行った。培養器内二酸化炭素濃度の経時変化は次式で表される（富士原ら、1987）。

$$dKc / dt = E(Kcou - Kc) + M / V$$

ここで、t：時間 [h]

E：培養器の換気回数 [h<sup>-1</sup>]

Kcou：培養器外二酸化炭素濃度 [ppm]

M：培養器内植物体の二酸化炭素交換速度  
[μcm<sup>3</sup>CO<sub>2</sub>·h<sup>-1</sup>]

V：培養器の空気容積 [cm<sup>3</sup>]

上記のシミュレーションした二酸化炭素濃度の経時変

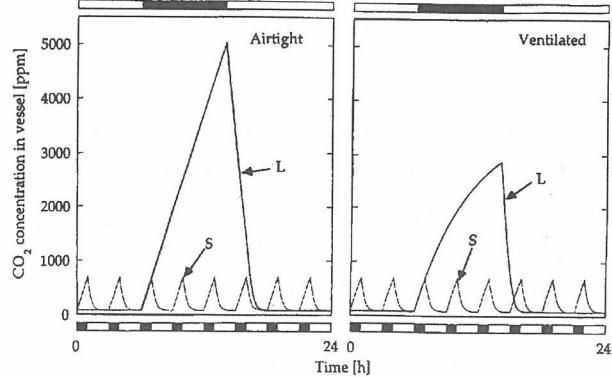


Fig. 2-3. Simulated diurnal changes in CO<sub>2</sub> concentration in an airtight vessel (left) and a ventilated vessel (right). L and S, respectively, represent the 24-hour (16 h light/8 h dark) and 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark). Each vessel contains 100-mgDW-*Caladium* plantlets that have photosynthetic and respiratory characteristics shown in Table 2-2.

化から、培養器内の植物体の二酸化炭素吸収量を次式によって求めた（富士原ら、1987）。

$$U = V \cdot E \int_{t1}^{t2} (Kcou - f(t)) dt + V(Kc1 - Kc2)$$

ここで、U：時刻t1から時刻t2の間における二酸化炭素吸収量 [μcm<sup>3</sup>CO<sub>2</sub>]

f(t)：培養器内の二酸化炭素濃度の経時変化を表す関数

Kc1：時刻t1における培養器内二酸化炭素濃度 [ppm]

Kc2：時刻t2における培養器内二酸化炭素濃度 [ppm]

なお、本実験では、培養植物体の暗呼吸速度と二酸化炭素-純光合成モデルパラメータの近似値の評価、培養器内二酸化炭素経時変化のシミュレーション、および二酸化炭素吸収量の算定は、Kcou = 350 ppm 一定と仮定して行った。

#### 結果および考察

第1項の実験で得られた培養器内二酸化炭素濃度実測値から近似したカラジウム培養植物体の二酸化炭素-純光合成モデルパラメータと暗呼吸速度は、Table 2-2 の通りであった。これらの数値を用いて、培養器内に乾物重にして 100 mg の植物体が含まれていると仮定した密封培養器（換気回数 0 h<sup>-1</sup>）内と自然換気の培養器（換気回数 0.185 h<sup>-1</sup>）内の二酸化炭素濃度の経時変化をシミュレー

**Table 2-3.** Simulated CO<sub>2</sub> exchanges of 100 mg-dry-weight *Caladium* plantlets in the airtight vessel ( $E = 0 \text{ h}^{-1}$ ) and the ventilated vessel ( $E = 0.185 \text{ h}^{-1}$ ). The values were calculated from the simulated time courses of CO<sub>2</sub> concentration in the vessel shown in Fig. 2-2.

Closure of vessel	Light/Dark	CO <sub>2</sub> released during dark period [10 <sup>3</sup> μcm <sup>3</sup> ]	CO <sub>2</sub> fixed during light period [10 <sup>3</sup> μcm <sup>3</sup> ]	Net CO <sub>2</sub> uptake [10 <sup>3</sup> μcm <sup>3</sup> ·day <sup>-1</sup> ]
Airtight ( $E=0 \text{ h}^{-1}$ )	16 h/8 h	10.42/8h	10.42/16h	0
	2 h/1 h	1.30/1h (10.42/8h)	1.30/2h (10.42/16h)	0
Ventilated ( $E=0.185 \text{ h}^{-1}$ )	16 h/8 h	10.42/8h	6.73/16h	-3.69
	2 h/1 h	1.30/1h (10.42/8h)	1.41/2h (11.28/8h)	0.89

トした (Fig. 2-3)。このシミュレートした二酸化炭素濃度の経時変化曲線から培養器内植物体の二酸化炭素交換量を計算した (Table 2-3)。培養器を密封した場合、明暗周期の長さに関わらず、培養植物体が暗期に放出した二酸化炭素量と明期に吸収した二酸化炭素量は等しく、培養植物体の日二酸化炭素吸収量は 0 になる。これは、培養器内外の空気の交換が行われないために、暗期に培養植物体が呼吸によって放出された二酸化炭素は培養器外に流出することなく、続く明期に放出した量と同量の二酸化炭素が吸収されるからである。第1項の実験において、培養器を密封した場合、培養植物体の生長量が明暗周期長の影響を受けなかった理由の1つとして、第1章で考察したように、日二酸化炭素吸収量が等しかったことが考えられる。一方、自然換気条件の培養器の場合、暗期に放出する二酸化炭素量に対する明期に吸収する二酸化炭素量の比は、長い明暗周期よりも短い明暗周期の方が大きくなり、日二酸化炭素吸収量は短い明暗周期の方が多くなった。

以上のシミュレーションの結果から、通気性のある培養器の場合、日二酸化炭素吸収量は長い明暗周期よりも短い明暗周期の方が多くなることが示された。しかし、第1項の実験の自然換気区の明暗周期の違いによる乾物重の差は、この日二酸化炭素吸収量から考えられる差以上に大きい。このことから、明暗周期は培養植物体の日二酸化炭素吸収量以外の要因にも影響を及ぼしていることが考えられる。

長い明暗周期において、自然換気条件の培養器よりも密封した培養器の方が日二酸化炭素吸収量が多かったにもかかわらず、培養植物体の乾物重が小さくなり、生長量の大小は日二酸化炭素吸収量の大小とは必ずしも一致しなかった。このことは、明暗周期は日二酸化炭素吸収量の他に培地の糖吸収にも影響を及ぼしていることを示唆している。また、密封条件の培養器では器内にエチレンをはじめとする揮発性物質が器内に蓄積していたと考えられ、それが培養植物体の生長に影響を及ぼした可能性もある。

### 第3項 明暗周期が糖吸収に及ぼす影響

第1項と第2項の実験結果から、自然換気条件下において、明暗周期を短くすることによって培養植物体の乾物增加が促進された原因の1つとして、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化による日二酸化炭素吸収量の増加

を考えた。しかし、明暗周期の違いによる二酸化炭素吸収量の差だけでは、実験結果で生じた程度の乾物重の差は生じ得ず、明暗周期は二酸化炭素吸収量以外の要因にも影響を及ぼしていることが考えられる。また、自然換気条件の培養器と密封した培養器とを比較した場合、培養植物体の生長量の大小は日純二酸化炭素吸収量の大小とは必ずしも一致せず、二酸化炭素吸収量以外の要因を明らかにする必要がある。

第1章で考察したように組織培養においては培養器外からの二酸化炭素の他に、培地に添加される糖が炭素源となっており、それが培養植物体の生長に寄与する割合は培養器外からの二酸化炭素のそれよりもかなり大きい。そして、明暗周期長は二酸化炭素吸収量だけではなく培地からの糖吸収にも影響を及ぼすことが考えられる。そこで本実験では、異なる明暗周期下での培養植物体の培地からの糖の吸収量を調べた。

一方、明暗周期の違いによる培養植物体の生長量の差が、第1項および第2項で考察したように、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化の違いのために生じたのならば、培養器内二酸化炭素の状態をいずれの明暗周期長の場合も同じにすれば、明暗周期長の違いによる培養植物体の生長差は生じないはずである。そこで、培養器内に外気を強制換気することによって、培養器内二酸化炭素濃度を外気レベルに一定に維持した場合の明暗周期長の影響を調べた。

なお、本項では、root/shoot率の比較的小さいペチュニアを材料に用いた。これは、培地量に対する根量の割合が少ない方が培養体の根量の増加にともなう糖の吸収の制限を受けにくく、培地中の根量と糖吸収量との関係が直線関係に近くなると予想されたためである。

### 材料および方法

ペチュニア *Petunia ‘Haming Scarlet Star’* の種子を無菌発芽させ、2%のショ糖と0.8%の寒天を添加したpH5.8のMS培地で節培養によりシートを増殖させた。葉を2~3枚つけたシートの先端を 200 ml のエルレンマイヤーフラスコ内の 48 ml の上記培地に5個ずつ植え付けた。外植体の平均乾物重は 2.3 mg であった。植え付け直後、培養器を次の異なる4つの換気条件に設定した。

強制換気区 (FV) : 培養器内に外気を連続通気 (8.2  $\text{l h}^{-1}$ ) することによって培養器内二酸化炭素濃度を約 350 ppm 一定に保った。

- 大換気区 (HV) : 直径 5 mm の穴を2つ空け、そこにそれぞれに 100 mg ずつの綿を詰めたゴム栓で培養器を封じた。
- 小換気区 (LV) : 直径 5 mm の穴を1つ空け、そこに 100 mg の綿を詰めたゴム栓で培養器を封じた。
- 密封区 (NV) : 穴の空いていないゴム栓で培養器を密封した。

大換気区、小換気区、密封区の培養器の換気回数はそれぞれ、0.22、0.12、0.01 h<sup>-1</sup> であった。

それぞれの換気条件の培養器は、24時間の明暗周期（16時間明期/8時間暗期：24時間周期区）または3時間の明暗周期（2時間明期/1時間暗期：3時間周期区）下で50日間培養を行った。照明光源は昼光色蛍光灯を用い、培養棚面における光合成有効光量子束密度が 34.2 μ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> になるように調整した。培養室の温度は明期暗期を通じて 25±1°C とした。

50日の培養後、大換気区、小換気区、および密封区の明期暗期を通じての培養器内二酸化炭素濃度を経時的に測定した。この二酸化炭素濃度の実測値から以下の式（富士原ら、1987）により培養器内植物体の日二酸化炭素吸収量 (UnT) [μ cm<sup>3</sup> CO<sub>2</sub> vessel<sup>-1</sup>] を算定した。

長い明暗周期について、

$$UnT = V \int_{t1}^{t2} (C_{out}(t) - C(t)) dt$$

短い明暗周期について、

$$UnT = 8V \int_{t1}^{t2} (C_{out}(t) - C(t)) dt$$

ここで、 $C_{out}(t)$  : 時刻 t における培養器外二酸化炭素濃度 [ppm]

$C(t)$  : 時刻 t における培養器内二酸化炭素濃度 [ppm]

$t1$  : 暗期開始時刻

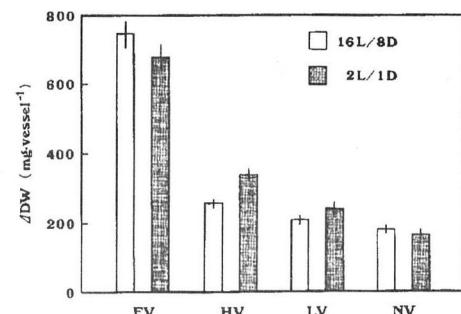


Fig. 2-4. Dry weight increase ( $\Delta DW$ ) of *Petunia* plantlets in force-ventilated vessel (FV) and three naturally ventilated vessels (high-ventilated, HV; low-ventilated, LV; and non-ventilated, NV) during 50 days of culture under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D). The numbers of gas changes (E) of the HV, LV, and NV are 0.22, 0.12 and 0.01 h<sup>-1</sup>, respectively. Vertical bars represent ±S.E (n = 3).

t2 : 明期終了時刻

V : 培養器内空気容積 [cm<sup>3</sup>]

E : 培養器の換気回数 [h<sup>-1</sup>]

培養器内二酸化炭素濃度の測定後、培養植物体の乾物重と培地の糖含量を測定した。培養期間中の植物体の乾物增加量 ( $\Delta DW$ ) を、培養終了時の乾物重と植え付け時の外植体の乾物重の差として求めた。培地の糖含量は、第1章の第2節に準じて測定した。培地に添加したショ糖は、オートクレーブ加熱や培養体のインベルターゼ活性により一部グルコースとフルクトースに分解されていたので、培地の糖含量はショ糖換算 (1 g グルコースまたはフルクトース = 0.95 g ショ糖) で示した。植え付け前と培養終了時の培地糖含量の差を培養植物体の糖吸収量とした。

#### 結果および考察

培養後51日目のペチュニア培養植物体の乾物增加量 ( $\Delta DW$ ) は、大換気区と小換気区では、3時間周期区の方が大きく、その差は大換気区の方が大きかった (Fig. 2-4)。しかし、強制換気区と密封区においては、3時間

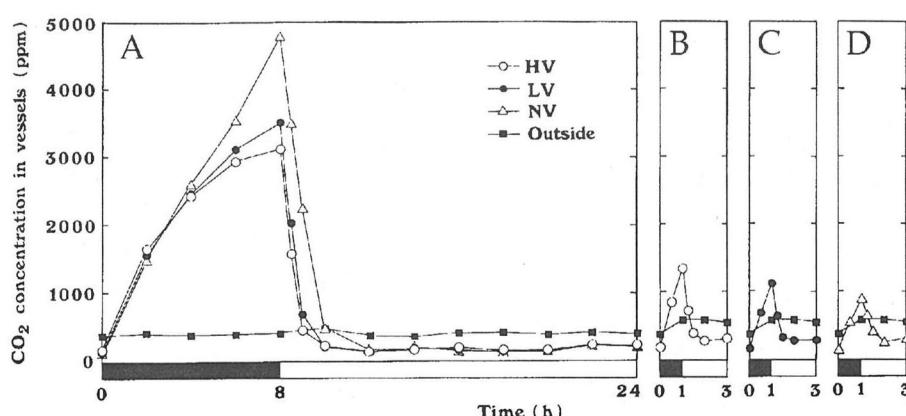
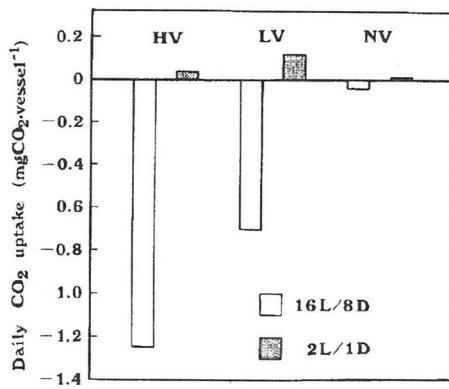


Fig. 2-5. Time courses of CO<sub>2</sub> concentration in high-ventilated (HV), low-ventilated (LV), and non-ventilated (NV) vessels containing *Petunia* plantlets under the 24-hour lighting cycle (A) and the 3-hour lighting cycle (B, C, D) after 50 days of culture.

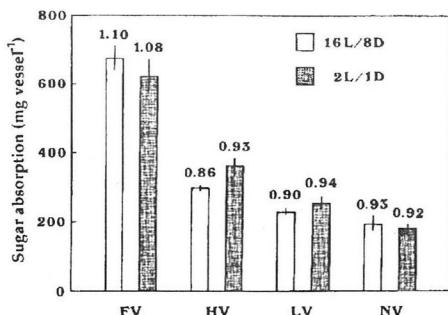


**Fig. 2-6.** Daily CO<sub>2</sub> uptake of *Petunia* plantlets in high-ventilated (HV), low-ventilated (LV), and non-ventilated (NV) vessels under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D) after 50 days of culture. The CO<sub>2</sub> uptakes are estimated from the time courses of CO<sub>2</sub> concentration shown in Figure 2-5.

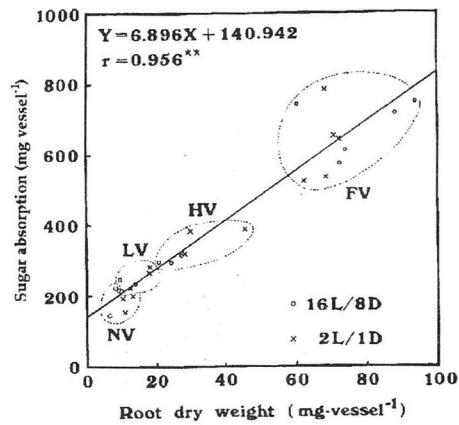
周期区の乾物増加量が24時間周期区のそれより大きくなることはなかった。培養器内二酸化炭素濃度が一定に維持された強制換気区において、3時間周期区の生長量が24時間周期区のそれを上回らなかつたことは、明暗周期の短縮それ自体は植物の生長を促進する効果を持っていないことを示している。

大換気区、小換気区、密封区の培養器内二酸化炭素濃度の経時変化を Fig. 2-5 に示す。24時間周期区では、暗期の培養器内二酸化炭素濃度の上昇率は時間の経過とともに減少し、その減少程度は換気回数の大きい培養器ほど大きくなつた。このことは、換気回数の大きい培養器ほど暗期間に培養器外へ流出する二酸化炭素の量が大きいことを示している。3時間周期区では、暗期の培養器内二酸化炭素濃度の上昇はわずかであった。なお、3時間周期区において、換気回数の大きい培養器ほど暗期の培養器内二酸化炭素の蓄積が大きかったのは、培養器内の植物体が大きかつたためと考えられる。

培養器内二酸化炭素濃度の実測値 (Fig. 2-5) から算定



**Fig. 2-7.** Sugar absorption (SA) from the medium of *Petunia* plantlets on 2% sucrose medium in force-ventilated vessel (FV) and three naturally ventilated vessels (high-ventilated, HV; low-ventilated, LV; and non-ventilated, NV) under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D) during 50 days of culture. Numbers above the bars are the ratio of dry weight increase to sugar absorption ( $\Delta DW/SA$ ). Vertical bars represent  $\pm S.E$  ( $n = 3$ ).



**Fig. 2-8.** Relationship between root dry weight and sugar absorption in *Petunia* plantlets. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium in force-ventilated vessel (FV) and three naturally ventilated vessels (high-ventilated, HV; low-ventilated, LV; and non-ventilated, NV) under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D) for 50 days.

した自然換気区の培養植物体の日二酸化炭素吸収量は、24時間周期区においてはいずれも 0 以下であった (Fig. 2-6)。24時間周期区においては、換気回数が大きい培養器ほど日二酸化炭素吸収量は小さくなつた。培養器外への二酸化炭素の流出量が小さかつたと考えられる3時間周期区では、培養植物体の日二酸化炭素吸収量は、いずれも 0 以上で、換気回数の違いによる差は小さかつた。したがつて、換気回数が大きい培養器ほど明暗周期の違いによる日二酸化炭素吸収量の差が大きく、これは換気回数が大きい培養器ほど明暗周期の違いによる生長量の差が大きくなるという結果 (Fig. 2-4) と一致する。

培養植物体の糖吸収量は、換気条件の影響を大きく受け、換気回数が大きい培養器ほど糖吸収量は大きくなつた (Fig. 2-7)。明暗周期も糖吸収量に影響を及ぼしたが、その影響は換気条件によって異なつた。すなわち、大換気区と小換気区では、3時間周期区の方が糖吸収量は大きかつたのに対し、強制換気区と密封区では3時間周期区の糖吸収量が24時間周期区のそれを上回ることはなかつた。大換気区、小換気区、密封区では、すべての処理区で糖吸収量に対する乾物増加量の比 ( $\Delta DW/SA$ ) が 1 以下であったが、これは初期の炭酸同化が制限されていたためである。大換気区、小換気区、密封区の  $\Delta DW/SA$  は、24時間周期区においては換気回数が大きい培養器ほど小さくなつたが、3時間周期区の  $\Delta DW/SA$  は長い明暗周期のそれよりも全体に大きく、換気回数の違いによる差もわずかであった。これらの  $\Delta DW/SA$  の結果は、24時間周期の照明下では、培養器の換気回数が大きくなるほど培養器外へ流出する炭素の量が大きくなるのに対し、明暗周期を短縮すると培養器の換気回数が大きくても培養器外へ流出する炭素の量はわずかになることを示している。 $\Delta DW/SA$  の大小関係 (Fig. 2-7) は日二酸化炭素吸収量の大小関係 (Fig. 2-6) と一致する。なお、強制換気区の  $\Delta DW/SA$  はいずれの明暗周期においても 1 を上回つたが、これは絶えず外気が送気されており二酸化炭素供給量に

**Table 2-4.** Ethylene concentration in high-ventilated (HV), low-ventilated (LV), and non-ventilated (NV) vessels containing *Petunia* plantlets after 50 days of culture under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D).

Vessel	Number of air exchanges [h <sup>-1</sup> ]	Ethylene concentration [ppm]	
		16L/8D	2L/1D
HV	0.22	0.38	0.33
LV	0.12	0.40	0.60
NV	0.01	7.36	8.23

より光合成の制限が小さかったためと考えられる。

全ての処理区をまとめて根乾物重と糖吸収量との関係を見てみると、両者の間に有意な相関がみられた (Fig. 2-8)。このことは、より発達した根はより多くの糖を吸収したこと、ないしは、より多くの糖を吸収したことにより植物体の生長が進み根がより発達したことを示している。強制換気区と密封区では明暗周期の短縮によって糖吸収量は増加しなかったことから、大換気区と小換気区における明暗周期の短縮による糖吸収量の増加は、日二酸化炭素吸収量が増加した結果生じた二次的な影響と考えられる。第1章で考察したように、培地からの糖吸収は、培地中に存在する組織の量に大きく依存するため、根の発達と糖吸収の増加は、同時並行して加速度的に進行するものと推察される。培養初期においては、根の生長量および糖の吸収量の明暗周期の違いによる差がわずかであったのが、培養日数が経過するにつれてその差が大きくなつたものと考えられる。

換気回数は糖の吸収に大きく影響したが、これは第2項で考察したように、培養器の中に蓄積したエチレンなどの揮発性物質の影響と考えられる。本実験においても換気回数の低い培養器ほど培養器内に多量のエチレンが検出された (Table 2-4)。培養器内に蓄積したエチレンは、根の生長 (Colemanら、1980; Prez-Bermudezら、1985; Chiら、1990; Grossmannら、1990) をはじめ、さまざまな影響を培養体に与える。これらエチレンの影響による植物体の形態の変化が糖の吸収に影響した可能性が考えられる。

#### 第4項 光合成様式との関係

第1項～第3項の実験結果から、培養植物体の生長は明暗周期を短縮することによって促進することが可能であること、そしてその効果は、培養器内二酸化炭素濃度の経時的变化が変わることが原因で起こることが明らかとなった。

ところで第1章で考察したように培養器内二酸化炭素濃度は、培養条件の他に培養する植物の性質、特に光合成様式によって大きく異なる。したがって、明暗周期の培養植物に及ぼす効果は、培養植物の光合成様式の違いによって異なることが予想される。これまで実験を行ったカラジウムとペチュニアはいずれもC<sub>3</sub>型光合成を行う植物であり、光合成様式の違う植物、つまりC<sub>4</sub>型光合成を行う植物とCAM型光合成を行う植物の器内生長に

及ぼす明暗周期の影響については不明である。本実験では、C<sub>4</sub>植物にサトウキビ、CAM植物にデンドロビウムとファレノプシスを供試し、光合成様式の異なる植物に対する明暗周期の効果を明らかにした。

#### 1. C<sub>4</sub>植物の培養器内生育に及ぼす明暗周期長の影響

##### 材料および方法

サトウキビ *Saccharum officinarum* L. 'NCO 310' の4～5葉展開した、草丈4～5 cmの植物体を供試した。植物体は、Chenら (1988) の方法に従い、若い葉片由来のカルスより再分化させることによって得た。培地は第1項1.の実験と同じものを用い、200 ml のエルレンマイヤーフラスコ (内口径 25 mm) に 50 ml 分注した。培養器あたり5個の植物体を植え付けた。中央に直径 5 mm の穴を開けそこに 100 mg の綿を詰めたゴム栓で培養器を封じた。培養器の換気回数は 0.185 h<sup>-1</sup> であった。植え付け後、培養器を24時間の明暗周期 (16時間明期/8時間暗期: 24時間周期区) または3時間の明暗周期 (2時間明期/1時間暗期: 3時間周期区) 下において培養を行った。照明光源として昼光色蛍光灯を用い、培養棚面における光合成有効光量子束密度が 34.2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> になるように調整した。培養室の温度は明期暗期を通じて 25 ± 1°C とした。40日の培養後、培養器内の二酸化炭素濃度の明期暗期を通じての経時変化と培養器外二酸化炭素濃度を測定した。また、これらの二酸化炭素濃度値を用いて植物体の日二酸化炭素吸収量を算定した。

##### 結果および考察

C<sub>4</sub>植物のサトウキビもC<sub>3</sub>植物のカラジウムやペチュニアと同様、24時間周期区よりも3時間周期区の方が乾物重が大きくなつた (Table 2-5)。

培養後40日の培養器内二酸化炭素濃度の経時変化を Fig. 2-9 に示した。培養器外二酸化炭素濃度は培養期間中約 380 ppm で一定に推移した。培養器内二酸化炭素濃度の経時変化は、明期の二酸化炭素濃度が極めて低い濃度まで低下したことを除けば、C<sub>3</sub>植物のそれと同様のパターンを示した。24時間周期区では、培養器内二酸化炭素濃度は暗期に上昇を続けたが、その上昇率は培養器内二酸化炭素濃度が高くなるにつれ減少し、二酸化炭素が培養器外へ流出していることが推測された。暗期終了時の培養器内二酸化炭素濃度は 1192 ppm であった。明期にはいると培養器内二酸化炭素濃度は急激に低下し、明期開始6時間後には二酸化炭素は検出不可能になった。3時間周期区では、暗期終了時の二酸化炭素濃度は 471 ppm であり、外気との濃度差は小さく、培養器外への二

**Table 2-5.** Daily net CO<sub>2</sub> uptake and dry weight of sugarcane plants cultured under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark) for 40 days. Five plantlets were inoculated in each vessel.

Light/Dark	Daily net CO <sub>2</sub> uptake [10 <sup>3</sup> μcm <sup>3</sup> vessel <sup>-1</sup> ]	Dry weight [mg vessel <sup>-1</sup> ]
16 h/8 h	71	51.9
2 h/1 h	238	65.8

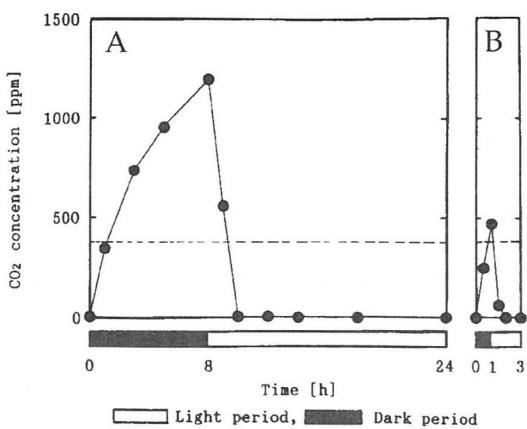


Fig. 2-9. Time courses of  $\text{CO}_2$  concentration in culture vessel containing sugarcane plants under the 24-hour lighting cycle (A) and the 3-hour lighting cycle (B) after 40 days of culture. Broken lines indicate the average  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessels.

酸化炭素流出量がわずかであると推察される。3時間周期区では、中期開始1時間後には培養器内気相中に二酸化炭素が検出されなくなった。サトウキビの光合成の二酸化炭素補償点は 10 ppm 以下であり (Moss, 1962) 、培養器内においてもこの光合成特性が現れることができた。他のC<sub>4</sub>植物については培養器内二酸化炭素濃度を調べた報告は見あたらないが、C<sub>4</sub>植物は光合成の二酸化炭素補償点が 0 ~ 10 ppm ときわめて低いことを特徴としており (Black, 1973) 、他のC<sub>4</sub>植物もサトウキビと同様に培養器内二酸化炭素はかなり低いレベルまで低下するものと考えられる。Fig. 2-9 に示した培養器内外の二酸化炭素濃度経時変化から求めたサトウキビ培養植物体の日二酸化炭素吸収量は、24時間周期区よりも3時間周期区の方が大きくなかった (Table 2-5)。なお、サトウキビの日二酸化炭素吸収量は、第1項のカラジウムや第3項のペチュニアのそれよりも大きな値となっているが、これは中期の培養器内二酸化炭素濃度がC<sub>3</sub>植物のそれに比べて著しく低くなるため、中期における培養器内への二酸化炭素流入量が大きくなつたためと考えられる。

以上の結果から、C<sub>4</sub>植物であるサトウキビ培養器内の中期—暗期の二酸化炭素濃度の変動パターンは、二酸化炭素補償点が低いことを除けばC<sub>3</sub>植物のそれと同様のパターンを示すため、明暗周期を短くすることによって培養期間中の生長量をより大きくすることが可能であることが示された。

## 2. CAM 植物の培養器内生育に及ぼす明暗周期長の影響

### 材料および方法

ファレノプシス系デンドロビウム *Dendrobium Asahi 'Red Queen'* の茎頂から増殖した植物体およびファレノプシス *Phalaenopsis Joseph Hampton × Phalaenopsis Winter Dawn* の自殖実生による植物体を供試した。いずれも展葉数2枚程度の発根直後の個体を選んで実験に用いた。

Table 2-6. Dry weight of *Dendrobium* and *Phalaenopsis* plants cultured under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark) for 60 days.

Light/Dark	Dry weight [mg·plant <sup>-1</sup> ]	
	<i>Dendrobium</i>	<i>Phalaenopsis</i>
16 h/8 h	14.8	16.2
2 h/1 h	12.9	13.3
t-test	NS	*

NS, nonsignificant; \*, significant at  $P = 0.05$ .

培地はThomale GD (Thomale, 1954) を主要塩類として Fe-EDTA、Ringe · Nitsch (1968) の微量元素、Nitsch · Nitsch (1965) の有機物、2 %のショ糖、0.8 %の寒天を加え、pHを5.6に調整したものを用いた。培養器と栓は第1項の実験と同様のものを用い、培養器あたりデンドロビウムは5個体を、ファレノプシスは9個体を植え付けた。処理区および培養条件は前のサトウキビの実験に準じた。60日の培養後、培養器内二酸化炭素濃度の経時変化と培養植物体の生長量を測定した。

### 結果および考察

CAM植物であるデンドロビウムとファレノプシスでは、C<sub>3</sub>植物やC<sub>4</sub>植物でみられたような明暗周期の短縮による生長促進効果はみられず、特にファレノプシスでは3時間周期区の方が24時間周期区よりも乾物重が小さくなつた (Table 2-6)。

24時間周期区では、培養器内二酸化炭素濃度は、暗期の開始とともに上昇を開始したが、デンドロビウムでは暗期開始3時間後以降、ファレノプシスでは暗期開始1時間~5時間後にかけて、二酸化炭素の濃度上昇率の低下や二酸化炭素濃度の低下がみられ、培養植物体による暗期の二酸化炭素吸収が観察された (Fig. 2-10, 11)。中期開始1時間後までは、培養器内二酸化炭素濃度が減少したが、その後増加に転じ、中期開始8時間以降は再び減少した。こうした暗期の途中の二酸化炭素の吸収と中期途中の二酸化炭素吸収の中止、中期後期における二酸化炭素の再吸収は、以前に報告された二酸化炭素濃度変化パターン (土井ら、1989) と同様であった。しかし、おおむねC<sub>3</sub>植物やC<sub>4</sub>植物の場合にみられたような大きな二酸化炭素

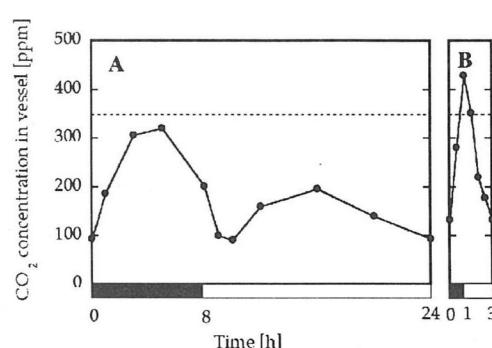
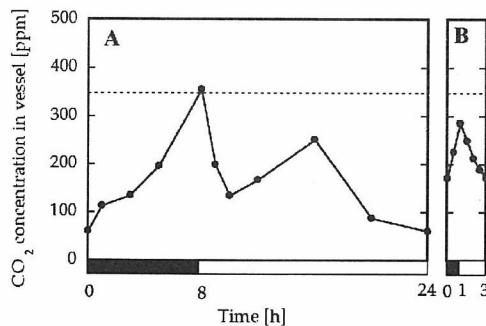


Fig. 2-10. Time courses of  $\text{CO}_2$  concentration in culture vessels containing *Dendrobium* plantlets under the 24-hour lighting cycle (A) and the 3-hour lighting cycle (B) after 60 days of culture.



**Fig. 2-11.** Time courses of  $\text{CO}_2$  concentration in culture vessels containing *Phalaenopsis* plantlets under the 24-hour lighting cycle (A) and the 3-hour lighting cycle (B) after 60 days of culture.

の濃度変化はみられず、ほぼ大気の二酸化炭素濃度以下のレベルで推移した。

一方、短い明暗周期における培養器内二酸化炭素濃度は暗期に上昇、明期に減少し、暗期または明期の連続時間が短かったためか、暗期途中の二酸化炭素吸収や明期途中の二酸化炭素吸収の中止はみられなかった。いずれも培養器内二酸化炭素濃度は、大気のレベル付近かそれ以下のレベルで推移した。

第1項～第3項で考察したように、明暗周期の短縮による培養植物の生長促進効果は、暗期における培養器内の二酸化炭素の過剰蓄積を避けることで培養器外への二酸化炭素の流出を減らすことによって現れると考えられる。したがって、本実験のように培養器内二酸化炭素濃度の変動が小さく、ほぼ大気レベルかそれ以下のレベルで推移する場合には、明暗周期が長くとも培養器外への二酸化炭素の流出が小さいために、 $C_3$ 植物や $C_4$ 植物でみられたような明暗周期の短縮による生長促進効果がみられなかったものと考えられる。

## 第5項 光独立栄養培養条件および光混合栄養培養条件下における明暗周期の短縮の効果

第3項の実験結果は、短い明暗周期による培養植物の生長促進効果は、培養植物体の日二酸化炭素吸収量の増加という一次的な効果と、その結果生ずる糖吸収量の増加という二次的な効果によって大きく現れることを示した。したがって、光独立栄養培養 (Kozai, 1991)においては培地に糖を添加しないため、明暗周期の短縮による生長促進効果は培地に糖を添加する光混合栄養培養の場合とは異なってくると考えられる。本実験では、培養器外二酸化炭素を高めた条件下で、培地に糖を加えた場合と糖を加えない場合の明暗周期長の効果を比較した。

### 材料および方法

カラジウム ‘Edith Made’ の植物体を供試した。植物体はこれまでの実験と同様にして得られたもので葉3～4枚展開したが草丈約3cmのものを用いた。培地は第1項と同様のものを用いたが、炭素源として培地に2%のショ糖を添加する区と、培地にショ糖を添加せず、代わりに浸透圧調節のため1.06%マンニトールを添加する区を設

**Table 2-7.** Dry weight of *Caladium* plantlets cultured under photomixotrophic (2% sucrose medium) and photoautotrophic (0% sucrose medium) conditions for 80 days.  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessels was 2000 ppm.

Medium	Light/Dark	Dry weight ( $\text{mg} \cdot \text{vessel}^{-1}$ )
Sucrose 2%	16 h/8 h	205.4
	2 h/1 h	476.8
Sucrose 0%	16 h/8 h	82.3
	2 h/1 h	107.5
Analysis of variance		
Lighting		
Sucrose x Lighting		

\*, \*\*, significant at  $P = 0.05$  and 0.01, respectively.

けた。培養器ならびに栓は第1項の自然換気区と同じとした（換気回数  $0.185 \text{ h}^{-1}$ ）。

植え付け後、培養器を二酸化炭素濃度を約 2000 ppm に設定したチャンバー内におき、80日間培養した。明暗周期は、24時間（16時間明期/8時間暗期：24時間周期区）または3時間（2時間明期/1時間暗期：時間周期区）とし、照明光源は昼光色蛍光灯を用い、培養棚面における光合成有効光量子束密度が  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  となるよう調整した。培養室の温度は明期暗期を通じて  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  とした。

### 結果および考察

ショ糖添加区、ショ糖無添加区とも、24時間周期区よりも3時間周期区の方が乾物重は大きくなったが、ショ糖添加区では、短い明暗周期の乾物重は長い明暗周期のそれの2.3倍であったのに対し、ショ糖無添加区では1.3倍であった (Table 2-7)。林らは、バレイショ培養植物について、光混合栄養培養条件 (林ら, 1993) および光独立栄養培養条件下 (Hayashiら, 1995) で、明暗周期の短縮の効果を調べているが、培養器の換気条件に差があるので、両者を比較すると光混合栄養培養条件下の方が、明暗周期の短縮による乾物重の増加率は大きく、カラジウムと同様の傾向を示している。

培養器内の二酸化炭素濃度は、いずれの明暗周期ともこれまでの実験と同様のパターンを示したが、暗期における二酸化炭素濃度の上昇速度が、ショ糖無添加区の方が小さかった。この上昇速度をもとに培養植物体の乾物重あたりの暗呼吸速度を求めたところ、ショ糖無添加区の方がショ糖添加区よりも小さかった (Table 2-8)。

ショ糖無添加区では、糖吸収量の増加という二次的な効果がなく、日二酸化炭素吸収量の増加という一次的な効果のみが現れるため、短い明暗周期の生長促進効果が、ショ糖添加区よりも小さく現れたものと考えられる。さ

**Table 2-8.** Dark respiration rate of the *Caladium* plantlets cultured under photomixotrophic (2% sucrose medium) and photoautotrophic (0% sucrose medium) conditions for 80 days.

Medium	Dark respiration rate [ $10^3 \mu\text{cm}^3 \text{CO}_2 \cdot \text{mg DW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]
Sucrose 2%	0.69
Sucrose 0%	0.36

**Table 2-9.** Root/shoot ratio of plants cultured under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark). *Caladium*, *Dendrobium* and *Phalaenopsis* were cultured for 60 days. *Petunia* and *Saccharum* were cultured for 50 and 40 days, respectively.

Light/Dark	Root/shoot ratio				
	<i>Caladium</i>	<i>Petunia</i>	<i>Saccharum</i>	<i>Dendrobium</i>	<i>Phalaenopsis</i>
16 h/8 h	0.37 ±0.03 <sup>z</sup>	0.045 ±0.004	0.18 ±0.03	0.82 ±0.06	1.65 ±0.12
2 h/1 h	0.46 ±0.03	0.060 ±0.006	0.30 ±0.04	0.99 ±0.10	1.84 ±0.16

<sup>z</sup> Means ± S.E. (n = 15)

らに、乾物重あたり暗呼吸速度が小さく、暗期における培養器内二酸化炭素のバイオマスあたりの蓄積量がショ糖添加区に比べて小さいため、日二酸化炭素吸収量の増加という一次的な効果も小さかったものと考えられる。しかし、培地にショ糖を添加する光混合栄養培養では、短い明暗周期と二酸化炭素施用を併用することによって、培養植物体の生長をさらに促進できる可能性が示された。

## 第2節 明暗周期が培養植物体の形態的および生理的特性に及ぼす影響

第1節では、培養期間中の植物体の乾物重は、明暗周期を短縮することによって増加させることができることを明らかにした。しかし、たとえ培養植物体の乾物重の増加が大きかったとしても、植え出し時の環境変化に対する耐性、あるいは植え出し後の生長速度が、通常の明暗周期で培養した植物体に比べて劣っていたならば、培養植物体の乾物增加のための明暗周期の短縮はマイクロプロパゲーションのシステムにおいては実用的ではない。本節では、植え出し時の環境変化に対する耐性に関わる形態的、生理的特性を、短い明暗周期で培養された植物体と、通常の24時間周期の明暗周期で培養された植物体の間で比較した。

### 第1項 形態的特性

植え出し時の環境変化に対する耐性に関わる形態的特性として、根/シート率、葉の表皮組織および内部形態を調べた。

#### 1 植物体の大きさと根/シート率

##### 材料および方法

第1節において明暗周期の短縮による生長促進効果が認められたカラジウム、ペチュニア、サトウキビについて、24時間の明暗周期で培養した植物体と3時間の明暗周期で培養した植物体との間でシート乾物重に対する根乾物重の比率を比較した。

##### 結果および考察

カラジウム、ペチュニア、サトウキビはいずれも24時間の明暗周期で培養した植物体よりも3時間の明暗周期で培養した植物体の方がシート乾物重に対する根乾物重の比率が高くなった (Table 2-9)。培養植物は一般に、発育にともない全体の乾物重に対する根乾物重の割合が大きくなってくる。しかし、植物体全体の重量が同じ個体間で比較すると、24時間の明暗周期よりも3時間の明

暗周期で培養した個体の方が根乾物重の比率が高かった (データ略)。このことは、明暗周期の短縮にともなう根/シート率の増加は、発育程度の違いによるもの他に、明暗周期が植物体内の乾物分配に影響を及ぼしたこと示唆している。培養植物体の根系の発達は培養植物体の吸水に大きく関わることから (Grout・Aston、1977)、明暗周期の短縮による根の発達促進は、植え出し直後の水ストレスへの耐性向上に寄与するものと考えられる。

## 2. 葉の表皮組織および内部形態

### 材料および方法

カラジウム ‘Candidum’ の草丈約 2 cm に発達した植物体を外植体とした。培養器は第1節第1項の実験の自然換気区と同じものを用い、2%のショ糖、0.8%の寒天を加えたMS培地を培養器あたり 50 ml ずつ分注し、外植体を6個体ずつ植え付けた。24時間の明暗周期 (16時間明期/8時間暗期 : 24時間周期区) または3時間の明暗周期 (2時間明期/1時間暗期 : 3時間周期区) で培養した後、発育段階の異なる個体の葉の形態を観察した。

<培養器内での発育にともなうカラジウム葉の外観変化>

カラジウムは培養期間中、個体の発育にともない出葉してくる葉の外観に変化がみられ、概ね次の3つの段階に分けることができる。

第1期：緑色が薄い。この時期の個体乾物增加は比較的緩慢である。

第2期：緑色が濃く、光沢が強まる。この時期に個体の乾物增加が急速に起こる。

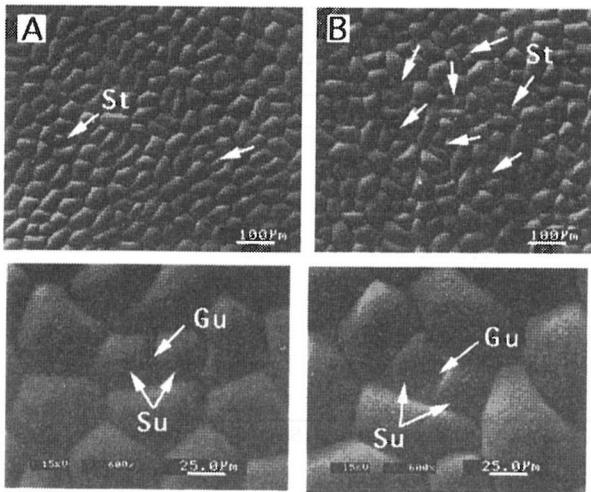
第3期：ワックスが形成され、光沢が弱まる。この時期には培地糖の大半が消費され、個体の乾物增加は徐々に緩やかになる。

<葉表面構造の観察>

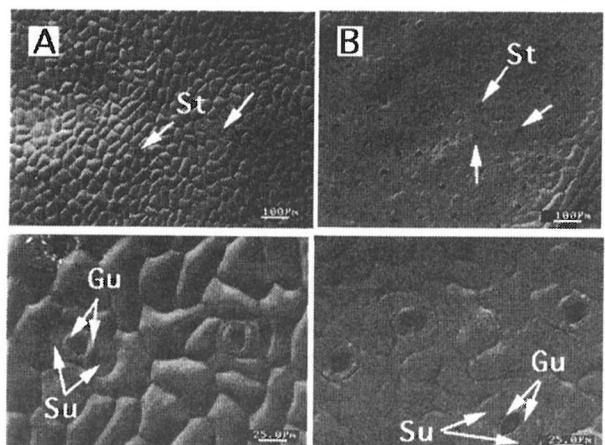
第1期と第2期の個体を選び、十分に展開した葉のうち最も若い葉を培養器から取り出して直ちにWET-SEM型の走査型顕微鏡 (トプコン、ABT-32) により観察を行った。

<気孔の数と大きさの測定>

培養開始から約60日経過した培養植物体のうち、生長量 (重量) が同等の個体を各明暗周期から2個体ずつ選び、十分に展開した葉のうち最も若い葉 (第3期) と、下位葉 (第2期) についてマニキュアを塗布することにより葉の表皮の型を取り、光学顕微鏡により気孔密度と気孔の大きさを測定した。なお培養60日後には第1期の葉はほとんど枯死していた。



**Fig. 2-12.** Scanning electron micrographs of leaf surface of *Caladium* plants grown in greenhouse. A. Adaxial surface. B. Abaxial surface. St, stoma; Gu, guard cell; Su, subsidiary cell. The stomata are closed and the guard cells are embedded in the subsidiary cells. Other epidermal cells are well raised and have structured wax on their surface.



**Fig. 2-13.** Scanning electron micrographs of leaf surface of *Caladium* plants cultured *in vitro* in Stage 2. A. Adaxial surface. B. Abaxial surface. St, stoma; Gu, guard cell; Su, subsidiary cell. The stomata remains open and the guard cells raised higher than the subsidiary cells. Epidermal cells are poorly raised and have no structured wax on their surface.

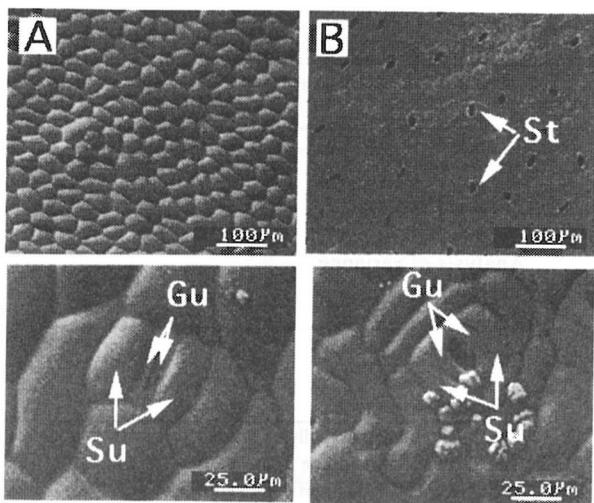
#### 〈葉の内部組織構造の観察〉

第2期の個体を選び、十分に展開した葉のうち最も若い葉の切片を、徒手切片を作製して光学顕微鏡で観察した。

#### 結果

##### 〈培養器内での発育とともに葉の外観変化〉

第1、第2、第3期の長さや、各期に到達するまでに要する期間は、培養条件に大きく左右されるが、本実験では、培養開始から約1か月間が第1期にあたり、24時間周期区では、培養開始後70日以降に葉の向軸面にワックスが認められるのに対して、3時間周期区では培養開始後50日頃からワックスが認められた。また、3時間周期区では緑色が濃く光沢の強い葉が発達したが、これは第2



**Fig. 2-14.** Scanning electron micrographs of leaf surface of *Caladium* plants cultured *in vitro* in Stage 3. A. Adaxial surface. B. Abaxial surface. St, stoma; Gu, guard cell; Su, subsidiary cell. The stomata on the adaxial surface close and the guard cells are lower than the subsidiary cells. Epidermal cells on the adaxial surface are raised and have structured wax on their surface. Congealed waxes are scattered near the stoma.

期で特に顕著であった。

#### 〈表皮系〉

圃場で栽培された個体の表皮細胞はよく発達し、向軸面、背軸面ともに同様の形状をしており、構造ワックスの形成が認められた (Fig. 2-12)。気孔も向軸面、背軸面とも同様の形状で、2つの助細胞に埋もれて存在しており、すべて閉じた状態で観察された。

培養植物体の表皮組織の形態は、明暗周期の違いよりも発育段階の違いによって大きく異なる。向軸面の表皮細胞は、第2期ではやや平板で縦長で薄かった (Fig. 2-13A)。また、気孔はほとんど閉じた状態で観察され、隣接する助細胞の発達も悪く孔辺細胞は助細胞よりも高い位置に存在していた。第3期では圃場で栽培された個体のそれに近い形態をしており表面に構造ワックスが観察された (Fig. 2-14A)。気孔は閉じた状態で観察され、隣接する助細胞も発達し、孔辺細胞は助細胞に半ば埋もれて存在していた。一方、背軸面の表皮系は圃場で栽培された個体のそれと著しく異なり、表皮細胞は平板であった (Fig. 2-13B)。気孔は、向軸面のそれよりも大きく開いていた。第3期には表皮細胞はやや立体的に発達したもの、向軸面に構造ワックスの形成がみられた第3期においても、背軸面の孔辺細胞はむき出し状態であり、気孔はすべて開いた状態で観察された (Fig. 2-14B)。

#### 〈気孔密度と気孔の大きさ〉

向軸面の気孔密度は明暗周期の影響を受けなかったが、発育段階の影響を受け、培養後期に減少した (Table 2-10)。背軸面の気孔密度は、明暗周期の影響を受け、3時間周期区の方が気孔密度が高くなり、特に第2期で多くなった。

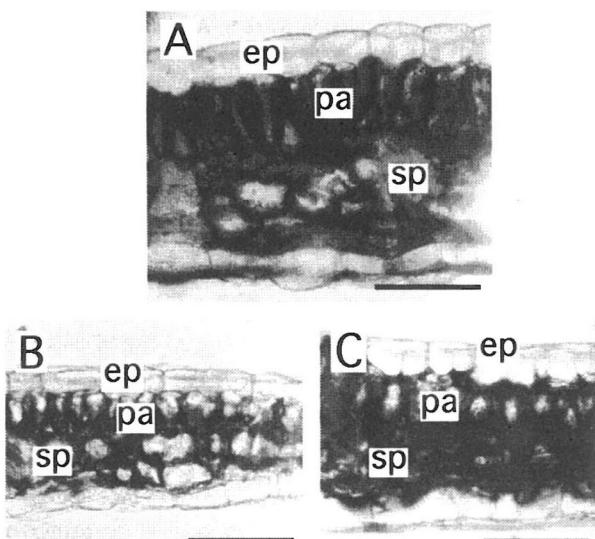
気孔の大きさは24時間周期区よりも3時間周期区の方が大きく、特に培養後期には圃場で栽培した植物体のそ

**Table 2-10.** Stomatal characteristics of *Caladium* plantlets cultured under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark).

Light/Dark	Developmental stage <sup>z</sup>	Stomatal density (no. mm <sup>-2</sup> )		Length of stoma (μm)	
		Adaxial	Abaxial	Adaxial	Abaxial
16 h/8 h	2	8	75	22.5	21.6
	3	3	79	21.7	24.4
2 h/1 h	2	5	111	22.2	23.7
	3	3	81	24.5	26.2
Analysis of variance					
Lighting		NS <sup>y</sup>	**	NS	**
Stage		**	*	NS	***
Lighting x Stage		NS	**	**	NS
Greenhouse grown		10	201	24.6	27.7

<sup>z</sup> *Caladium* plantlets initially expanded yellowish thin leaves (Stage 1), then glossy dark-green leaves (Stage 2) and finally glaucous leaves (Stage 3) as cultures were aged.

<sup>y</sup> NS, \*, \*\*, \*\*\*: Nonsignificant, significant at  $P = 0.05$ , 0.01, and 0.001, respectively.



**Fig. 2-15.** Photomicrographs of transverse sections of *Caladium* leaves. A. Plant grown in greenhouse. B. Plantlet cultured *in vitro* under the 24-hour lighting cycle. C. Plantlet cultured *in vitro* under the 3-hour lighting cycle. ep, epidermis; pa, palisade parenchyma; sp, spongy parenchyma. Bars indicate 100 μm.

れに近い大きさになった。

#### 〈葉の内部組織〉

圃場で栽培された個体の葉は発達した表皮細胞と1層の長い柵状組織をもっていた (Fig. 2-15A)。一方、24時間周期区の個体の第2期の葉は、圃場で栽培された個体の葉よりも薄く、表皮細胞が薄く、柵状組織も短かった (Fig. 2-15B)。しかし、3時間周期区の個体の葉は、24時間周期区のそれよりも厚く、より発達した表皮組織と柵状組織が観察された (Fig. 2-15C)。

#### 考察

培養器内で発育した植物体の葉は、圃場で栽培された植物体に比べて、表皮細胞が薄く、柵状組織の発達が不良であった。培養器内で生育した植物体に特徴的なこれらの形態は以前の報告 (Donnelly · Vidaver, 1984 ;

Smithら、1986；Leeら、1988；Capelladesら、1990) と同様であった。培養植物体の気孔形態も、圃場で栽培された植物体と異なり、助細胞の発達が悪く、孔辺細胞が表皮にむき出しになっていた。生育にともなう培養植物体の表皮組織の発達は、向軸面で比較的すぐれ、培養終期にはワックス層が発達し、表皮細胞や気孔も圃場で栽培した個体に類似していたが、背軸面では表皮組織の発達が不良で、培養初期の葉とあまり差がなかった。

培養条件が気孔密度に及ぼす影響は、種 (species) によって異なり、圃場条件下的個体よりも増加するという報告 (Wetzstein · Sommer, 1983；Leeら、1988) と減少するという報告 (Smith · McCown, 1983；Preece · Sutter, 1991) がある。本実験では培養されたカラジウムの気孔密度は、向軸面、背軸面とともに圃場条件下のそれよりも少なかった。培養後期においては、第3期の向軸面の気孔は圃場条件下の個体と同様な発達を見せたが、気孔密度は少なく、表皮組織の発達と気孔密度の関係に相関はみられなかった。

背軸面の気孔密度は、明暗周期を短くすることで増加した。Capellades ら (1990) は、バラ植物体の培養において、培養器内の相対湿度を下げるこによって気孔密度が高くなることを報告している。しかし、培養器内の相対湿度は、短い明暗周期ほど高い値で推移する (富士原ら、1994)。したがって、本実験のカラジウムにおける明暗周期の短縮による気孔数の増加は、湿度とは別の環境要因の変化に対する反応である可能性が考えられる。

第3期の葉の向軸面を除き、培養個体の気孔はSEM下ですべて開いた状態で観察されたのに対し、圃場で栽培された個体の葉と、第3期の葉の向軸面の気孔は閉じた状態で観察された。気孔の開閉は、光、二酸化炭素、水蒸気圧飽和などに影響されるが、同条件で観察した第2期の葉の向軸面の気孔や第3期の葉の背軸面の気孔は開いたままであったことから、培養条件下で発達しても、第3期の葉の向軸面の気孔は開閉能力を有していると推定される。

以上のことから、葉表面の構造ワックスや開閉機能を

**Table 2-11.** Net photosynthetic rates and chlorophyll contents of leaves of *Caladium* plantlets after 60 days culture under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark)

Light/Dark		Net photosynthetic rate [mgCO <sub>2</sub> ·dm <sup>-2</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	Chlorophyll content [mg·gFW <sup>-1</sup> ]
16 h/8 h	Young leaves <sup>z</sup>	6.8	2.4
	Aged leaves <sup>y</sup>	5.7	1.9
	t-test	*	**
2 h/1 h	Young leaves	6.6	3.0
	Aged leaves	6.1	2.9
	t-test	NS	NS

<sup>z</sup> The youngest leaf among fully expanded leaves in the plant.

<sup>y</sup> Leaves one-node-lower than the young leaves.

NS, \*, \*\*: Nonsignificant, significant at  $P = 0.05$ , and 0.01, respectively.

持つ気孔など、環境変化に耐えうると考えられる表皮構造の発達は、明暗周期の短縮によって促進されることが確認された。

## 第2項 生理的特徴

植え出し時の環境変化に対する耐性に関する生理的特性として、葉の光合成能力と蒸散量の評価を行った。

### 材料および方法

植物材料と培養方法は前項の実験に準じた。培養60日後に、いずれの明暗周期とも、第2期の終わりの個体を選び、十分に展開した葉のうち、最上位葉とその1つ下位の葉について光合成能力と蒸散量の評価を行った。

光合成の測定は閉鎖系によった。サンプリングした葉を、脱塩水の入った小瓶にさし、小瓶の口をパラフィルムで塞ぎ、その小瓶を100 ml のエルレンマイヤーフラスコ内に置いてシリコンゴム栓で塞いだ後、フラスコ内に二酸化炭素を注入してフラスコ内二酸化炭素濃度を約 1000 ppm にした。フラスコを、25°C、光合成有効放射束密度  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光条件下におき、フラスコ内の二酸化炭素濃度を8分間隔で測定した。得られたフラスコ内二酸化炭素濃度の変化曲線から、二酸化炭素濃度 350 ppm における光合成速度を評価した。光合成速度測定後、葉身から80%アセトンでクロロフィルを抽出し、葉のクロロフィル含量を定量した。

蒸散量の評価は次のようにして行った。葉を培養器から取り出し、直ちに葉柄を切除して葉身のみとし、25°C、光合成有効放射束密度  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光条件下において、経時的に重量を測定した。切除してから60分までの重量変化を測定した後、葉をオープンで乾燥させ乾物重を求めた。葉の相対含水量を以下の式によって求め、蒸散量の指標とした。

$$\text{相対含水量}(\%) = \frac{\text{一定時間後の葉の重量} - \text{葉の乾物重}}{\text{切除時の葉の重量} - \text{葉の乾物重}} \times 100$$

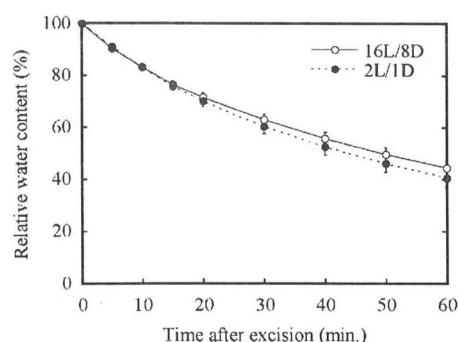
### 結果および考察

葉の光合成速度は、明暗周期の違いによる差が明白でなかった (Table 2-11)。しかし、3時間周期区では、加齢にともなう光合成速度の減少はみられなかったのに対

して、24時間周期区では、齢の進んだ葉では若い葉よりも光合成速度が減少した。葉のクロロフィル含量は、3時間周期区の方が24時間周期区よりも著しく多かった。24時間周期区では、加齢の進んだ葉ではクロロフィル含量が少なくなったのに対し、3時間周期区では、加齢にともなうクロロフィル含量の減少はみられなかった。

3時間周期区でクロロフィル含量が多かったにも関わらず、光合成速度が24時間周期区と変わらなかったのは、クロロフィル単位量あたりの光合成効率が24時間周期区より低いことを示している。一方、24時間周期区で加齢にともない葉の光合成能力が低下したのは、クロロフィル含量の低下と関係があるようである。これまで実験を行ってきたカラジウム、ペチュニア、サトウキビ、いずれにおいても24時間周期区の方が培養器内植物体量が小さかったにも関わらず、培養器内エチレン濃度が3時間周期区のそれよりも高かったが (データ略)、このことは24時間周期区において植物体が何らかのストレスを3時間周期区よりも多く受けていることを示唆している。そして高濃度のエチレンにより下位葉の老化が促進されることによって、光合成能力の低下が3時間周期区のそれよりも早まったのではないかと考えられる。

葉柄を切り離した葉身の相対含水量は、明暗周期の違いによる差はみられなかった (Fig. 2-16)。また、葉位



**Fig. 2-16.** Water loss from leaf blades of *Caladium* cultured under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark, 16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark, 2L/1D) after excision from culture vessels. Relative water content (%) = (weight after holding - dry weight) x 100 / (weight at excision - dry weight). Vertical bars represent S. E. (n=10).

の違いによる差もみられなかった（データ略）。前項の実験において、3時間周期区の第2期の背軸面の葉は、24時間周期区のそれよりも気孔密度が高く、また開閉能力が低いために葉の水分消失が大きいことが予想されたが、Fig. 2-16の結果は明暗周期を短縮して培養した苗も24時間の明暗周期期で培養した苗と同等の水ストレス耐性があることを示唆している。

### 第3節 総合考察

第2章の結果から、明暗周期を短縮することによって、培養植物体の乾物增加を高めることができることが可能であることが実証された。本章の実験で用いた培養器の換気回数は、強制換気区や密封区など実験のために特別に設定した培養器を除き、 $0.12 \sim 0.22 \text{ h}^{-1}$  の範囲にある。これは、第1章で述べたように通常のマイクロプロパゲーションに使用される培養器の換気回数の範囲内にあり、本章で明らかにした明暗周期の短縮による培養植物体の生長促進は、既存の培養設備で充分に実現可能であると考えられる。

本章の実験およびシミュレーションで示したように、培養植物体の明期における光合成特性および暗呼吸速度が明暗周期長に影響されないと仮定すれば、C<sub>3</sub>型およびC<sub>4</sub>型植物は、理論的には植物の種類に関係なく明暗周期の短縮によって培養植物体の日二酸化炭素吸収量が増加する。したがって、前述の仮定のもとでは、本章で供試したカラジウム、ペチュニア、サトウキビ以外にも多くの作物で明暗周期の短縮による生長促進効果が期待できる。培養器内の植物体の生長に対する明暗周期の影響を調べた報告としては、本研究に供試した種類以外にこれまで、*Prunus* (Moriniら、1990；1993)、ジャガイモ (林ら、1993；Hayashiら、1995) があり、いずれも程度の差はあるものの明暗周期の短縮による生長促進効果が認められている。しかし、圃場条件下における植物体の明暗周期に対する生育反応は、種 (species)、周期長、明期暗期の比率、光強度などの違いによってさまざまに変化し、それらの相互関係はかなり複雑である (Garner・Allard、1931；Allard・Garner、1941)。異常な明暗周期は、生長を促進する場合もあれば、生長を阻害する場合もある。第1節第3項のペチュニアの強制換気区において、短い明暗周期の乾物重が長い明暗周期のそれを上回らなかったことは、明暗周期の短縮が何らかの生理機構に障害を及ぼす可能性を示唆している。しかし、慣行的なマイクロプロパゲーションにおいては、器内二酸化炭素供給をはじめとする生長制限要因の方の影響が極めて大きく、明暗周期の短縮がたとえ培養植物の生理に負の影響を与えたとしても、炭素利用効率の向上という物理的な正の影響がそれを充分に補償した結果、明暗周期の短縮による生長促進効果が現れたのではないかと考えられる。

本章では、実験設備の制約から、明暗周期の短縮の効果を3時間の明暗周期長に限って検証した。しかし、前述

のように明暗周期長と植物体の生育との関係は大変複雑であるので、最適培養条件の設定のためには、植物の種ごとに、種々の明暗周期長に対する反応に関するデータを蓄積することがきわめて重要である。

短い明暗周期においては、培養器内エチレン濃度からも示唆されるように、長い明暗周期よりも培養植物が受けるストレスが小さいことが考えられる。このことは、培養植物の器内生長にとっては好都合である反面、ストレスに対する抵抗性が付与されにくいくことを意味する。しかし、第2節で形態的特性および生理的特徴を調べた結果からは、短い明暗周期で培養された植物体は長い明暗周期で培養された植物体に比べて、蒸散や光合成能力の点で順化に不都合と考えられる点は認められなかった。したがって、明暗周期の短縮によって培養植物の器内生長を促進させ、植え出し時の環境変化に耐えうる生育段階に早く到達させることができると考えられる。短い明暗周期で培養した植物体の、植え出し後の生長については第3章で検討することにする。

### 第4節 摘要

種々の植物体を24時間の明暗周期（16時間明期/8時間暗期）と3時間の明暗周期（2時間明期/1時間暗期）下で培養した。その結果、3時間周期の明暗周期で培養することによって、植物体の培養器内の生長が促進された。暗期における培養器内二酸化炭素濃度は24時間の明暗周期よりも3時間の明暗周期で低く推移し、培養器外への炭素の流出量は3時間の明暗周期の方が小さいと予想された。培養器内二酸化炭素濃度の経時変化から培養植物体の日二酸化炭素吸収量を求めたところ、24時間の明暗周期に比べて3時間の明暗周期の方が大きくなかった。糖の吸収量も24時間周期よりも3時間周期の方が大きくなかった。これは日二酸化炭素吸収量の増加にともなう植物体の生長量増加の結果生じた二次的な影響であり、明暗周期の短縮による生長促進効果は二酸化炭素吸収量と糖吸収量の両者の増加によって大きく現れるものと考えられた。3時間の明暗周期で培養した植物体では、葉の構造ワックスの形成や表皮組織の発達などが24時間の明暗周期で培養した植物体に比べて早く進み、植え出し時の環境変化に耐えうる生育段階に比較的早く到達できると考えられた。植物体の蒸散や光合成速度は、明暗周期の違いによる差はみられなかつたが、24時間の明暗周期では葉の加齢にともなう光合成速度の低下が3時間の明暗周期よりも大きかった。

## 第3章 培養時光環境の調節による マイクロプロパゲーションシステムの効率化

第1章では、培養植物体の生長を制限する要因について、二酸化炭素吸収に関わる要因と、培地からの糖吸収に関

わる要因について明らかにした。次いで、それらの要因と培養器外へ植物体を移植した後の生育との関係について明らかにした。その結果、培養器内での生長量を増加させる要因が、必ずしも培養器外に移した後の生長を増加させる要因とは一致しないことが示された。すなわち、植え出し後の生長速度は、通気性の高い培養器で培養した方が通気性の低い培養器で培養した場合に比べて大きく、その影響は植え出し後長期間持続した。しかし一方で、通常のマイクロプロパゲーションに使用される培養器の換気条件の範囲では、通気性の高い培養器ほどかえって培養植物体の日二酸化炭素吸収量が減少し、培養植物体の生長量が小さくなつた。第2章では、明暗周期を短縮した照明下で培養することによって、培養植物体の日二酸化炭素吸収量を増加させ、培養植物体の生長を促進させることができること、そしてその効果は通気性の高い培養器ほど大きくなることを示した。ここでは、マイクロプロパゲーションシステムへの適用を目標にして、実際のマイクロプロパゲーションのスケールをモデルとして、短縮された明暗周期下における培養植物体の日二酸化炭素吸収量をシミュレートし、培養植物体の生長にとって最適となる培養条件を検討した。次いで、実際のマイクロプロパゲーションのスケールで明暗周期を短縮して培養した植物体の植え出し後の生育を追跡した。さらにガス交換特性の異なる培養器における明暗周期の短縮の効果を調べ、その汎用性を検証した。

### 第1節 短い明暗周期下の培養植物体の日二酸化炭素吸収量

第2章では、明暗周期の短縮が、培養植物体の生長促進に有効であることを、培養植物体の炭素収支との関係から示したが、そのモデルとした培養器は、200 ml のエルレンマイヤーフラスコという小容量の培養器で、培養器内の植物体密度も培養器あたり5個体の低密度であった。そこで、本節では、実際にマイクロプロパゲーションに用いられる培養器と培養器内の植物体の密度とを想定して、短い明暗周期における培養器内カラジウム植物体の日二酸化炭素吸収量のシミュレーションを行つた。

シミュレーションは第1章で行った方法と同様に、まず培養植物体の光合成特性と暗呼吸速度を設定し、短い明暗周期における培養器内二酸化炭素濃度の経時変化をシミュレートした。次いで、その変化曲線から培養器内植物体の日二酸化炭素吸収量を計算した。培養植物体の光合成速度は、第1章と同様に富士原ら（1987）の二酸化炭素濃度-純光合成モデルで与え、そのパラメータおよび暗呼吸速度も第1章と同じとした。

シミュレーションのモデルとした培養器は、第1章と同じメリクリン用フラスコ（旭テクノグラス、MERFK300）とし、これに培地を70 ml 分注した状態を想定した。その他の培養条件は以下を基本として設定した。

栓：直径 5 mm の穴を3つ空けそこにそれぞれ 100

mg の綿を詰めたゴム栓

培養器内空気容積 (V) : 330 ml

培養器内バイオマス量：乾物重 200 mg

光源と光合成有効光量子束密度 (PPFD) : 昼光色蛍

光灯  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

明暗周期 : 3時間

明期と暗期の時間比率 : 2 : 1

培養器外二酸化炭素濃度 (Kcou) : 350 ppm

この基本設定から、(1) 培養器の通気性、(2) 培養器内バイオマス量、(3) 明暗周期長、の各要因を種々に変化させたときの、培養器内植物体の日二酸化炭素吸収量をシミュレートした。なお、特に断らない限り、日二酸化炭素吸収量は、培養器あたりの、すなわち乾物重 200 mg の植物体の二酸化炭素吸収量を示した。

#### 1. 培養器の通気性

24時間周期照明と3時間周期照明において培養器の換気回数をさまざまに変化させたときの培養植物体の日二酸化炭素吸収量のシミュレーション結果を Fig. 3-1 に示す。24時間周期照明においては、培養器換気回数が約  $0.38 \text{ h}^{-1}$  までは大きくなるほど減少して極値に達し、換気回数がそれ以上の値では大きくなるほど増加するが、二酸化炭素吸収量が再び 0 以上になるには  $1.8 \text{ h}^{-1}$  以上の換気回数が必要である。通常のマイクロプロパゲーションに用いられる培養器の換気回数は第1章で述べたように、せいぜい  $0.3 \text{ h}^{-1}$  程度であるので、それらの培養器の範囲では、通気性の高い培養器ほど培養器内の植物体の日二酸化炭素吸収量は小さくなるといえる。それに対し、3時間周期照明下では、換気回数が大きくなるほど培養植物体の日二酸化炭素吸収量が大きくなつた。このことは、日二酸化炭素吸収量の点からいえば、通常用いられる程度の換気回数の培養器を使用しても、3時間周期照明下で培養することによって、24時間周期照明で換気回数を  $1.8 \text{ h}^{-1}$  以上の非常に高い培養器を用いて培養した場合以上の効果が常に得られることを意味している。

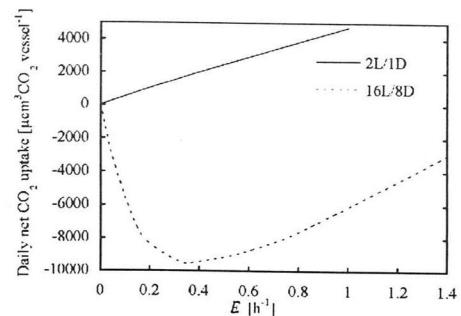
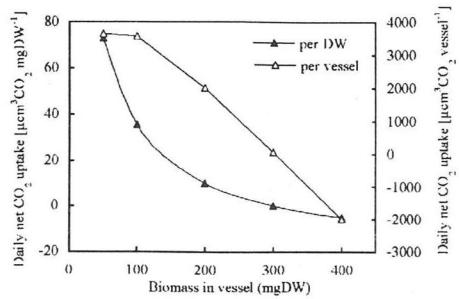


Fig. 3-1. Daily  $\text{CO}_2$  uptake of *Caladium* plantlets under the 3-hour lighting cycle (2 h light/ 1h dark, 2L/1D) and the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark, 16L/8D) as affected by number of air exchanges of the culture vessels ( $E$ ). Conditions of culture: air volume inside the vessel = 330 ml, biomass in the vessel = 200 mgDW, PPFD =  $34.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $\text{CO}_2$  concentration outside the vessel = 350 ppm.



**Fig. 3-2.** Daily CO<sub>2</sub> uptake of *Caladium* plantlets under the 3-hour lighting cycle (2 h light/ 1 h dark) per mgDW and per vessel as affected by biomass of *Caladium* plantlets in the vessel. Conditions of culture: air volume of the vessel = 330 ml, number of air exchanges of the vessel = 0.395 h<sup>-1</sup>, PPFD = 34.2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, CO<sub>2</sub> concentration outside the vessel = 350 ppm.

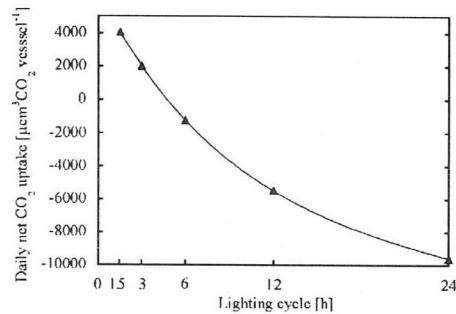
本シミュレーションにおいて、3時間周期照明下では培養器の換気回数が大きくなるほど培養植物体の日二酸化炭素吸収量が増加するという関係が明らかになった。したがって、最適培養条件は培養器の通気性をできるだけ高めることになるが、現実的には培養器内への雑菌の侵入や培地の乾燥なしに高める通気性の範囲には限度がある。そこで以下のシミュレーションでは、雑菌の侵入の危険をともなわずに比較的容易に達成しうる換気回数として、第1章の第4節で用いた高換気区の培養器の換気回数 0.395 h<sup>-1</sup> を設定してシミュレーションを行うことにした。

## 2. 培養器内バイオマス

3時間周期照明下における培養器内バイオマス量と日二酸化炭素吸収量との関係のシミュレーション結果をFig. 3-2に示す。24時間周期におけるそれと（第1章Fig. 1-13）同様に、培養器内のバイオマスが大きくなるほど日二酸化炭素吸収量が小さくなつた。しかし、3時間周期照明下では、培養器内に 400 mgDW のバイオマスがあった場合でも、24時間周期照明下で培養器内に 100 mgDW のバイオマスがあった場合（第1章Fig. 1-13）をはるかに上回る日二酸化炭素吸収量であった。また、培養器内バイオマスの増加に対する日二酸化炭素吸収量の低下率も24時間周期照明よりも3時間周期照明の方が小さくなつた。実際のマイクロプロパゲーションの場面では、コスト面などの点から培養器内の培養植物体の個体密度が高くなることが多い。しかし、本シミュレーションの結果は、個体密度の増加にともなう二酸化炭素吸収量の制限は短い明暗周期の方が小さいことを示しており、明暗周期を短縮することによって培養器内の植物体密度をさらに高めることができることを示している。

## 3. 明暗周期長

培養器内バイオマス量を 200 mgDW、培養器換気回数を 0.395 h<sup>-1</sup>、明暗長と暗期長の比率を 2:1 で一定とし、明暗周期長のみを変えたときの、培養器内植物体の日二酸化炭素吸収量を Fig. 3-3 に示す。明暗周期長が短くなる

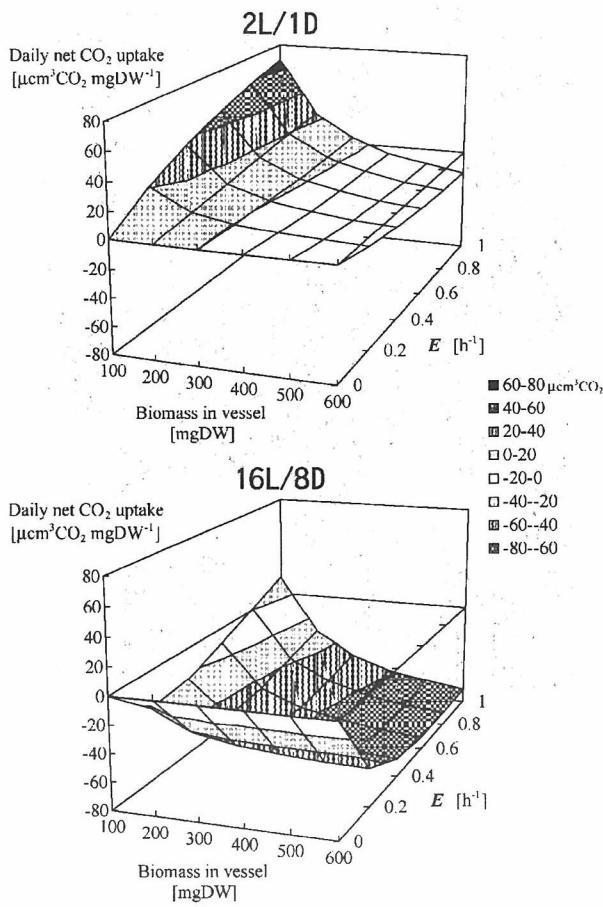


**Fig. 3-3.** Daily CO<sub>2</sub> uptake of *Caladium* plantlets as affected by the length of lighting cycle. Conditions of culture: air volume of the vessel = 330 ml, number of air exchanges of the vessel = 0.395 h<sup>-1</sup>, biomass in the vessel = 200 mgDW, PPFD = 34.2 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, CO<sub>2</sub> concentration outside the vessel = 350 ppm, ratio of photoperiod to dark period = 2 : 1.

ほど日二酸化炭素吸収量が大きくなっている。本シミュレーションは、培養植物体の暗期または明期の切り替わりと同時に暗呼吸および光合成反応がシミュレーションのために設定したパラメータ値に直ちに移行することを仮定して行ったものである。しかし実際には、暗期から明期に切り替わってから光合成速度は徐々に上昇し、平衡状態に達するまでには数分間を要する（Gaastra、1959）。また、明期から暗期に切り替わった直後は植物体からのCO<sub>2</sub>バーストがみられる。Fournioux・Bessis (1985) のデータは、ブドウの培養植物体において明期開始後光合成速度が安定するまでに少なくとも10分以上を要することを示しているし、また、カラジウムを用いた予備実験では光合成速度安定までには約5分程度の時間を要した。したがって、明暗周期が短くなるほど実際の日二酸化炭素吸収量はシミュレーション値よりもわずかに下方にずれるものと考えられる。また日周リズムの関係から、明暗周期長の違いにより暗呼吸および光合成反応に差が生じる可能性もあり、シミュレーション値と実際の二酸化炭素吸収量が一致しない可能性もある。しかし、バレイショを材料に明暗周期長を 24、6、1.5、0.375 時間に変化させて培養した実験では（林ら、1993）、短い明暗周期長ほど培養植物体の乾物重が大きくなつており、本シミュレーションで示した日二酸化炭素吸収量の大小関係と一致している。このことは、明暗周期をより短縮することによって培養植物体の生長をさらに促進できる可能性を示している。

## 4. 培養器の通気性と培養器内バイオマスとの相互作用

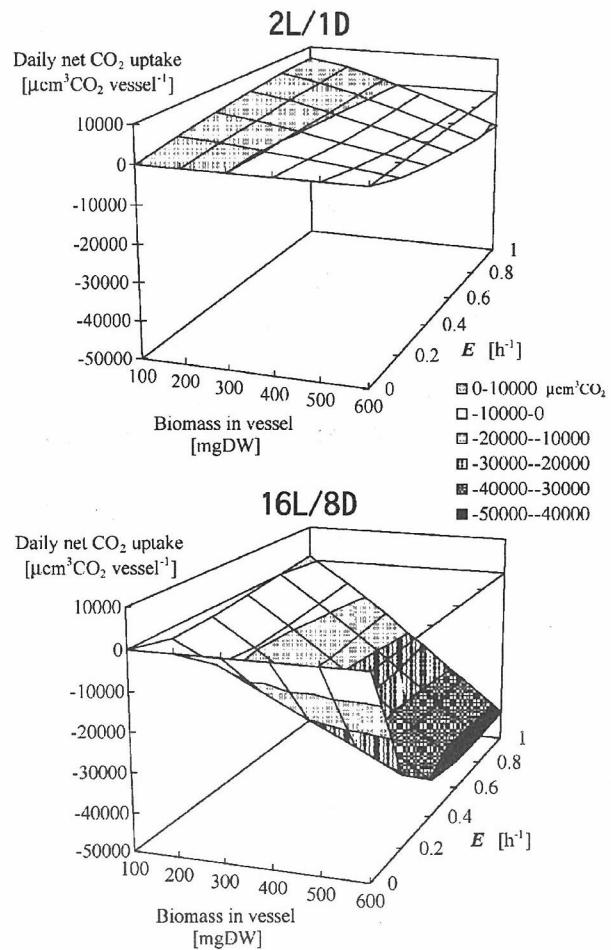
先のシミュレーションで、培養器の通気性と培養器内バイオマス量の両者が、培養植物体の日二酸化炭素吸収量に影響することを示した。培養器内のバイオマス量が少なくなると、単位乾物重あたりの日二酸化炭素吸収量は大きくなるが、培養器あたりの植え付け密度を減らすと、生産効率が低下する。逆に、培養器あたりの植え付け密度を高めると日二酸化炭素吸収量が小さくなり生長が大きく制限される。一方、培養日数がたつにつれて培養器内バイオマス量も変化する。そこで、培養器の通気性と



**Fig. 3-4.** Daily CO<sub>2</sub> uptake of *Caladium* plantlets per mgDW under the 3-hour lighting cycle (2 h light/ 1h dark, 2L/1D) and the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark, 16L/8D) as affected by number of air exchanges of the culture vessels (*E*) and biomass of plantlets in the vessel. Conditions of culture: air volume inside the vessel = 330 ml, PPFD = 34.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , CO<sub>2</sub> concentration outside the vessel = 350 ppm.

培養器内バイオマス量との組合せと二酸化炭素吸収量との関係をシミュレートした。

種々の培養器換気回数と培養器内バイオマス量の組合せにおける、培養植物体の単位乾物重あたりと培養器あたりの日二酸化炭素吸収量をFig. 3-4 とFig. 3-5 にそれぞれ示す。24時間周期と3時間周期いずれの照明下でも、換気回数が高い培養器ほど培養器バイオマス量の増加とともに日二酸化炭素吸収量の減少が大きい。特に、24時間周期照明下では、培養器内バイオマス量が 100 mg の場合は換気回数を 0.8 h<sup>-1</sup> 以上に高めることによって日二酸化炭素吸収量を 0 以上に高めることは可能であるが、培養器内バイオマス量が 400 mg 以上になると培養器の換気回数を高めても日二酸化炭素吸収量がほとんど増加しない。このことは、実際のマイクロプロパゲーションで行われているような植え付け密度では、換気回数を高めることによる日二酸化炭素吸収量増加の効果はほとんど期待できないことを示している。それぞれの換気回数の培養器における、培養器バイオマス量の増加にともなう日二酸化炭素吸収量の減少の程度は、単位乾物重あたりの吸収量でみると両照明間ともほぼ同じである (Fig.



**Fig. 3-5.** Daily CO<sub>2</sub> uptake of *Caladium* plantlets per vessel under the 3-hour lighting cycle (2 h light/ 1h dark, 2L/1D) and the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark, 16L/8D) as affected by number of air exchanges of the culture vessels (*E*) and biomass of plantlets in the vessel. Conditions of culture: air volume inside the vessel = 330 ml, PPFD = 34.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , CO<sub>2</sub> concentration outside the vessel = 350 ppm.

3-4) が、培養器あたりの吸収量でみると3時間周期照明下では24時間照明下よりもその減少率が小さくなっている (Fig. 3-5)。このことは、明暗周期を短縮することによって、植え付け密度を高めることによる生長量の制限が小さく、培養器あたりの植え付け密度をより高めることができ可能であることを示している。

## 第2節 明暗周期を短縮して培養した培養苗の植え出し後の生育

これまでの実験結果から、明暗周期を短縮して培養することにより、培養植物体の生長が促進されることが明らかとなった。また、第1節のシミュレーション結果から、実際のマイクロプロパゲーションのスケールにおいても、明暗周期の短縮による培養器内生長の促進が期待された。一方、培養植物体は培養終了後、培養器から取り出され、24時間周期の自然光下で栽培されることになる。したがって、これまでの *in vitro* 環境から *ex vitro* の環境への変化に加え、明暗周期の変化にさらされることになる。

明暗周期の変動は、生物体の日周リズムにさまざまな形で影響を及ぼす。たとえ、培養器内の生長が促進されても、こうした明暗周期の変化にともなって、植え出し後の生長に障害が生ずるならば、明暗周期の短縮による培養器内生長の促進は無意味である。そこで本節では、実際のマイクロプロパゲーションのスケールにおいて培養植物体の培養器内生長に対する明暗周期の短縮の効果を確認するとともに、短い明暗周期で培養した植物体が、植え出し後の生育を順調に行えるかを調べた。

### 第1項 実際のマイクロプロパゲーションのスケールにおける明暗周期の短縮の効果と植え出し後の生育

実際のマイクロプロパゲーションシステムを想定した培養器と植え付け密度条件で、培養器内および植え出し後の生長に対する明暗周期の短縮の効果を調べた。

#### 材料および方法

カラジウム ‘Candidum’ の小植物体を外植体とした。培養器は、メリクロン用フラスコ（旭テクノグラス、MER-FK300）を用い、寒天0.8%、ショ糖2%を添加し、pHを5.8に調整したMS培地を培養器あたり 70 ml ずつ分注した。オートクレーブ滅菌後培養器あたり小植物体を20個体植え付けつけた。培養器は、直径 6 mm の穴のそれぞれに 100 mg の綿を詰めたシリコン栓で封じた。培養器の換気回数は  $0.395 \text{ h}^{-1}$  であった。植え付け後、培養器を、明暗周期を24時間とした照明（16時間明期/8時間暗期：24時間周期区）または明暗周期を3時間とした照明（2時間明期/1時間暗期：3時間周期区）下に静置して培養を行った。照明光源は昼光色蛍光灯を用い、培養棚面における光合成有効光量子束密度は  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  に調整した。培養室の温度は明期暗期を通じて  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  とした。

60日間の培養後、植物体を培養器から取り出し寒天培地を除いた後、パーライト：バーミキュライト=1:1の用土を用いて50穴セルトレイに植え付けた。植え付け後、自然日長のビニルハウスにおいてた。植え出し時期のハウス内の最大PPFDは  $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、最高気温は  $38^\circ\text{C}$  であった。21日おきに各処理区15個体ずつをサンプリングし、生長量の測定を行ったが、植物体が大きくなつた42日目の測定後にピートモス：パーライト：バーミキュライト=2:1:1の用土を用いて直径 9 cm のビニルポットに移植した。

#### 結果および考察

培養期間中の生育は、培養30日目頃から生育の差が視覚的に認められ、培養40日から50日目付近では最もその差が大きくなつた。しかし、それ以降は3時間周期区の生育が緩和はじめ、60日後には24時間周期区と3時間周期区との生育差が小さくなつた（Fig. 3-6）。これは、3時間周期区では植物体の生育が24時間周期区に比べて早く、生育が培地の糖の量に早期に制限されはじめたためと思われる。培養終了時の培養器あたりの植物体乾物重

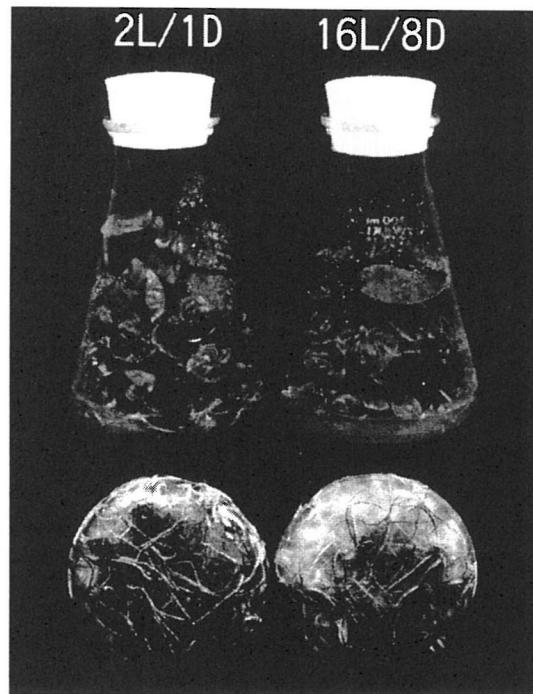


Fig. 3-6. *Caladium* plantlets cultured in high-ventilated vessels (number of air changes =  $0.395 \text{ h}^{-1}$ ) under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark, 16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark, 2L/1D) for 60 days. Air volume of the vessels are 330 ml. Each vessel contains 20 plantlets. The lower figure shows root growth for each vessel.

は、24時間周期区で 498 mg、3時間周期区で、660 mg であった。第2章第1節第1項の実験では、培地 50 ml あたり植物体を5個体の割合で植えたのに対し、本実験では培地 70 ml あたり20個体の密度で、培地の糖の枯渇がこれまでの実験に比べて早く進んだものと考えられる。これまでの実験結果やシミュレーションの結果から、第2章第1節第1項の実験では、短い明暗周期における培養器の炭素収支は正であると推測され、その場合、実験終了時

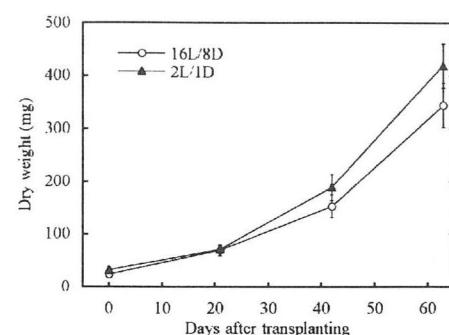
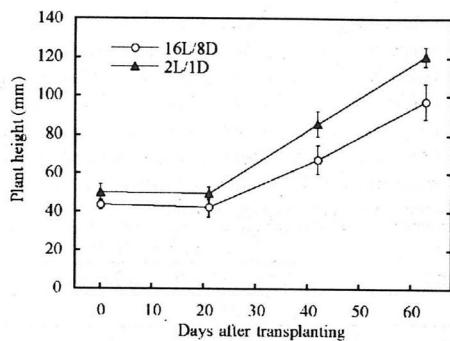


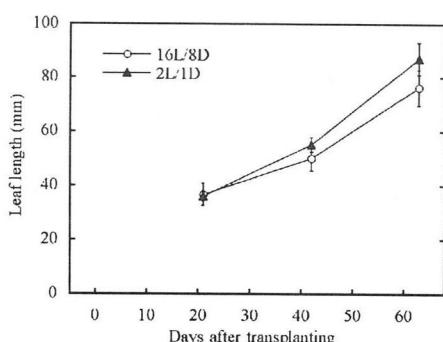
Fig. 3-7. Dry weights of *Caladium* plantlets cultured under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D) after transfer to *ex vitro* environment. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium in high-ventilated vessel (number of air exchanges =  $0.395 \text{ h}^{-1}$ ) under PPFD at  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  for 60 days and then transferred to greenhouse where maximum PPFD and air temperature were  $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and  $38^\circ\text{C}$ , respectively. Vertical bars represent  $\pm\text{S.E}$  ( $n = 15$ ).



**Fig. 3-8.** Plant height of *Caladium* plantlets cultured under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D) after transfer to *ex vitro* environment. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium in high-ventilated vessel (number of air exchanges =  $0.395\text{ h}^{-1}$ ) under PPFD at  $40\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  for 60 days and then transferred to greenhouse where maximum PPFD and air temperature were  $170\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  and  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. Vertical bars represent  $\pm\text{S.E.}$  ( $n = 15$ ).

の培地の糖濃度は約1.5%以上と見積もられる。一方、本実験では、仮に培養器の炭素収支が第2章第1節第1項の実験と等しかったと仮定しても実験終了時の培地の糖濃度は約1.0%程度と見積もられる。実際には、第1章および第3章でシミュレートしたように、培養器内バイオマス量が大きいほど培養器の炭素収支が小さくなるので、両者の培地の糖濃度の差は0.5%以上と考えられる。本実験の培養後期には培養植物体の生育が培地の糖に律速されると考えられたので、培地量を増やすか、倍地の糖濃度を増加させることによってさらに生育が早めができるものと考えられる。

植え出し後の生存率は、3時間周期区では100%であったのに対し、24時間周期区では96%であった。24時間周期区で生存率が低かった原因として、おもに植え出し時の植物体の大きさにばらつきが大きく、いくつかの個体がまだ環境変化に耐え得るだけの大きさに達していなか



**Fig. 3-9.** Leaf length of *Caladium* plantlets cultured under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D) after transfer to *ex vitro* environment. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium in high-ventilated vessel (number of air exchanges =  $0.395\text{ h}^{-1}$ ) under PPFD at  $40\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  for 60 days and then transferred to greenhouse where maximum PPFD and air temperature were  $170\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  and  $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectively. Vertical bars represent  $\pm\text{S.E.}$  ( $n = 15$ ).

ったことが考えられる。植物体の平均乾物重、草丈、葉長は、いずれも順化期間中24時間周期区よりも3時間周期区で大きな値で推移した (Fig. 3-7, 8, 9)。

このことから、3時間周期の照明で培養した苗は、24時間周期の照明で培養した苗に比べて、順化に耐えうる大きさに早く生長し、植え出し後の生育もスムーズに行われるものと考えられた。

## 第2項 ガス交換のメカニズムの異なる培養器における明暗周期の短縮の効果

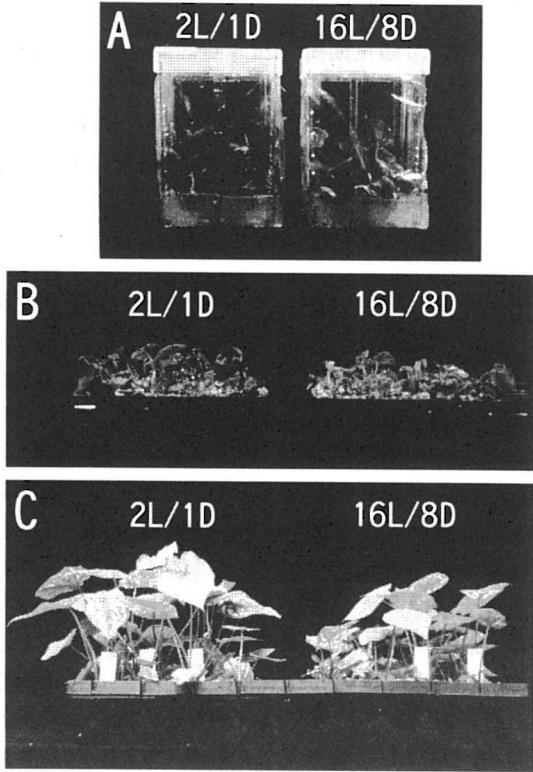
第1節でシミュレートしたように、換気回数の高い培養器ほど明暗周期短縮の効果が高いことが示された。ところで、換気回数を指標としてあらわされる培養器のガス交換のメカニズムには、対流、透過、拡散があり、培養器の形状によってそのメカニズムは異なる (Matthysら、1995)。実際に植物組織培養において多用されるアルミニウム栓やプラスチックキャップや発砲シリコンプラグ (古在ら、1986)、「サンキャップ」シート (Dillen・Buyseens、1989)、ランの培養によく用いられる綿栓などは、対流によって培養器内外のガス交換が行われるものである。しかし、実際のマイクロプロパゲーションに用いられるようなスケールの比較的大きな容量の培養器では、対流を増加させることによって培養器のガス交換性を高めることは、培地の乾燥や微生物の混入の機会を増加させることをともなうので困難である。一方、水蒸気を透過せず比較的分子量の低い気体の分子を選択的に透過させることは、培地の乾燥や微生物の混入の危険がない。したがって、そのような特性を持ったフィルムを培養器のガス交換性を高めるために使用することは非常に有効である。本実験では、水蒸気の透過性が低い一方、酸素や二酸化炭素の透過性が高いフィルムを用いた培養器 (Tanakaら、1988) を使用し、これまでの対流の増加によって通気性を高めた培養器と同様に、明暗周期短縮の効果があるかどうか調べた。

### 材料および方法

カラジウム ‘Candidum’ の小植物体を外植体とした。培養器には、ガス透過性のあるフッ素樹脂フィルム製培養器 (ダイキン工業、‘Culture Pack’ ) を用いた。培養器の換気回数は  $0.24\text{ h}^{-1}$  であった。寒天0.8%、ショ糖2%を添加し、pHを5.8に調整したMS培地を培養器あたり140 ml ずつ分注し、小植物体を培養器あたり9個体ずつ植え付け、明暗周期を24時間とした照明 (16時間明期/8時間暗期 : 24時間周期区) または明暗周期を3時間とした照明 (2時間明期/1時間暗期 : 3時間周期区) で培養した。70日間の培養後、培養植物体を培養器から取り出し、パーライト:バーミキュライト=1:1の用土を用いて50穴セルトレイに植え付けた。

### 結果および考察

培養終了時の植物体重量は、これまでの実験と同様に24時間周期区よりも3時間周期区の方が大きく、生体重はそれぞれ396 mgと492 mgであった。植え出し後の



**Fig. 3-10.** *Caladium* plantlets cultured in the gas permeable vessels ('Culture Pack', Tanaka et al., 1988) under the 24-hour lighting cycle (16 h light/8 h dark, 16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2 h light/1 h dark, 2L/1D). The plantlets were cultured for 60 days and then transferred into plug trays in the greenhouse. A. In vessels at the end of culture. B. 0 days after transfer into the plug tray. C. 60 days after the transfer.

植物体の大きさは、3時間周期区の方が大きく、その差は少なくとも植え出し60日後まで続いた (Table 3-1, Fig. 3-10)。

通気性を培養器内外の対流を速めることによって高めた培養器では、培養植物体の成長が進むにつれ個体あたりの蒸散量が増加するため、培養器内の水収支が培養植物体の大きさが大きい培養器ほど小さくなることが推測される。そしてそれが二次的に培養器内成長に影響を与えること、あるいは、植え出し後の環境変化に対する耐性を変化させる可能性がある。しかし、本実験で用いた培養器はほとんど水透過性がなく、長期的に見ると培養器内の水分条件は処理による差が生じないものと考えられ、明暗周期の違いによる培養植物体の生育差は、培養器内の水条件に起因するものではないと考えられる。

本実験の結果から、ガス交換のメカニズムの異なる培養器においても、明暗周期の短縮による成長促進効果の現れることが示された。

### 第3節 総合考察

本章のシミュレーションと実験の結果から、第2章で明らかにした明暗周期の短縮による培養器内植物体の成長促進効果は、実際のマイクロプロパゲーションの場面に

**Table 3-1.** Plant height of *Caladium* plantlets cultured in the gas permeable vessel, 'Culture Pack' (Tanaka et al., 1988) under the 24-hour lighting cycle (16L/8D) and the 3-hour lighting cycle (2L/1D) after transfer to *ex vitro* environment. The number of air exchanges of the 'Culture Pack' was 0.24 h<sup>-1</sup>. Plantlets were cultured on 2% sucrose medium under PPFD at 32.4 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for 60 days and then transferred to greenhouse.

Light/Dark	Plant height (mm)			
	Days after transplanting			
	0	20	40	60
16 h/8 h	45.0	52.4	59.0	93.8
2 h/1 h	59.3	74.3	80.0	130.1
<i>t</i> -test	* **	* *	* *	* *

\*: Significant at 0.01 % level.

おいても十分に実用的な効果であり、培養期間および植え出し後の成植物体に至るまでの期間を短縮することが可能であることが明らかとなった。

第1章から本章にかけて取り扱った環境要因の違いが、マイクロプロパゲーションによる植物生産システムに与える変化を、カラジウムを例にしてこれまでの実験結果をもとに、Fig. 3-11 に模式的に図示した。第III段階で投入する光量子量が同じでも、その投入方法と、培養器の通気性の組合わせによって、最終的な植物体の大きさは大きく違ってくる。

暗期を設けず光強度を3分の2に弱めて連続光で培養した場合、培養器内二酸化炭素はよほど弱光条件でない限り、外気よりも低い濃度で平衡に達するので、培養器の二酸化炭素吸支は正となる。そのため、培養器内での植物体の成長は、強光条件で暗期を設けた場合に比較して大きくなる。カラジウムでは、培養器内の二酸化炭素濃度が外気よりも高い濃度で平衡に達する光強度は、およそ 8 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PPFD以下である。しかし、弱光条件で培養した場合、植え出し後の成長速度が比較的遅く、その結果、成植物体に成長するまでに期間を要することになる。

強光条件で明期長を16時間とした場合、通気性の低い培養器ほど培養植物体の日二酸化炭素吸支量は大きくなり、培養器内の植物体の成長は大きくなる。しかし、植え出し後の成長速度は、通気性の高い培養器で培養した植物体の方が大きいので、結果的には、通気性の違いによる差がないか、あるいは、通気性が高い培養器で培養した植物体の方が早く大きくなる。

強光条件とし、明暗周期を短縮して1日あたり16時間の明期を数回に分割して与えた場合、通気性の低い培養器では、培養植物体の日二酸化炭素吸支量は24時間周期のそれと同じか、やや大きくなるものの、植え出し後の成長速度は低く、その結果、成植物体になるまでの期間は24時間周期で培養した場合と差はなくなる。一方、通気性の高い培養器の場合、他の光条件や換気条件に比べて培養器内の成長は大きくなり、かつ、植え出し後の成長速度も速いので、成植物体になるまでの期間が最も短くなる。

in vitro (Stage III)			After transfer to ex vitro		
Lighting	Ventilation of culture vessel	Daily CO <sub>2</sub> uptake	Plant size at the end of in vitro	Relative growth rate ex vitro	Final plant size
•Low PPFD •Continuous	•High 	Medium	Medium 	Low	Medium 
•High PPFD •16 hours/day •24 h light/dark cycle	•Low 	Medium	Medium 	Low	Medium 
	•High 	Small	Small 	High	Medium 
•High PPFD •16 hours/day •Short light/dark cycle	•Low 	Medium	Medium 	Low	Medium 
	•High 	Large	Large 	High	Very Large 

Fig. 3-11. Diagram showing *Caladium* plant production as influenced by culture conditions in stage III. The amount of photon put into the culture is the same in all the conditions. The culture in high ventilated vessel with high PPFD under short lighting cycle provides largest plants.

本研究で明らかになった培養環境とクローン増殖苗の生長との関係を総合し、カラジウムのマイクロプロパゲーションシステムの最適条件を Fig. 3-12 に図示した。第III段階の培養器の換気回数については、容易に実現可能な範囲で最も高い値とした。また、第III段階の培地量については、植え出し時の植物体の大きさを 40 mgDW と想定して 1 個体あたり 7 ml とした。第1章から第3章までの実験結果の具体的な数値をもとに、最適条件で培養した苗の生長量を、従来の培養条件、すなわち低換気の培養器を用いて24時間周期照明で培養した苗の生長量と比較すると、60日間の培養期間に少なくとも1.3倍、植え出し後の60日間で約1.5倍の差が生じ、合計120日間で最終的に従来の方法と比べて2倍以上の大きさの植物体を得ることができる。成植物体の乾物重量を 1000 mg としてカラジウムの生長曲線にあてはめて概算すれば、第III段階の開始から成植物体になるまでに従来140日要していたのが20日以上短縮できる計算になる。なお、第II段階の培養条件については、これまでに考察を加えてい

なかったが、培養体が苗条原基および発達途上のシュートであり、クロロフィルを含んでいて光合成を行っていることを考えると、通気性の高い培養器を用い、日二酸化炭素吸収量が大きくかつ光利用効率の高い連続弱光条件下で培養することが適していると考えられる。

カラジウムは、エチレンに対する感受性が比較的小さいと考えられ、植え出し後の生長に影響を及ぼしたもの、培養器の通気性の違いによる植物体の形態の差はほとんど現れなかった。しかし、エチレンに対する感受性の高い植物では、以上述べたような培養期間中の環境条件と植物体の大きさとの関係は変わってくると予想される。第2章で考察したように、ペチュニアでは、通気性の低い培養器ほど糖吸収量が小さく、その原因の一つとして、培養器内に蓄積した揮発性有機物質にペチュニアが敏感に反応したことが考えられる。エチレンは、根の生長 (Colemanら、1980；Préz-Bermúdezら、1985；Chiら、1990；Grossmann ら、1990) の他に、葉の展開 (Hussey・Stacey、1981；Jacksonら、1991) やクロロ

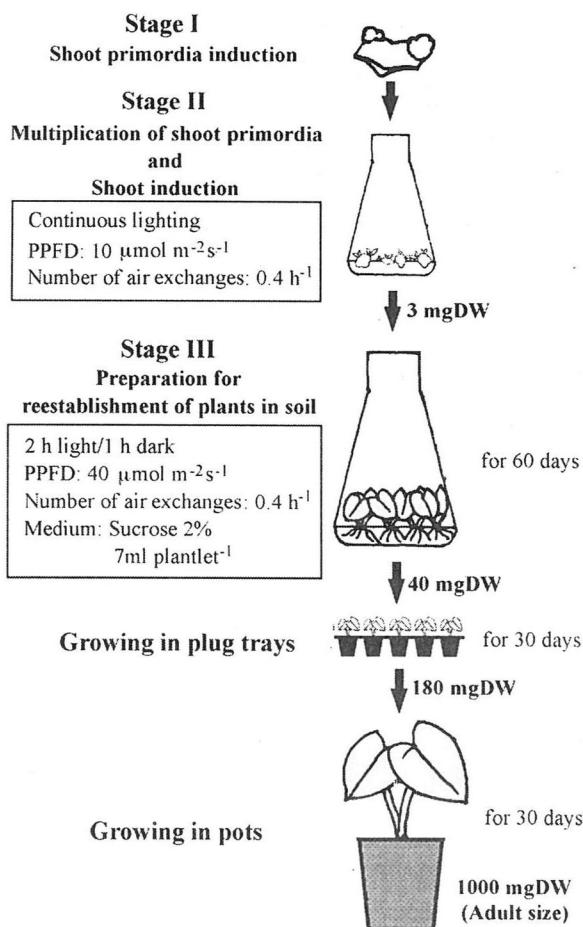


Fig. 3-12. Schematic diagram of mass-propagation of *Caladium* plants. Objects within the squares are optimal conditions in each stage. Values beside the arrows indicates plant size (dry weight per plant) at transition to next steps.

フィル含量 (Dalton・Street、1976; De Proftら、1985; Knee、1991; Righetti・Facini、1992) など形態的、生理的にさまざまな影響を及ぼし、それらの影響が複雑に相互に関連しあって、直接的あるいは間接的に糖吸収量に影響するものと考えられる。したがって、エチレン感受性の高い植物では、通気性の低い培養器では、通気性の高い培養器よりも植物体の生長量が小さくなる場合がある。しかし、これまで明らかにしたように、明暗周期の短縮による生長促進効果は通気性の高い培養器ほど大きく現れるので、そのような培養器を使用するときにはエチレンの影響は小さくなると考えられる。

マイクロプロパゲーションの第III段階において、培地に糖を添加せず、光強度と培養器内の二酸化炭素濃度を高めて、光独立栄養培養を行う試みの背景には、培地の糖が培養植物体の光合成速度を低下させ、植え出しにもなう独立栄養生長への移行を困難にするという考え方、残留培地に含まれる糖が微生物繁殖を促し、植え出し直後の植物体に悪影響を及ぼすという考えがある。光混合栄養条件、すなわち、糖を添加した培地で培養した植物体は、光独立栄養条件、すなわち糖を含まない培地で生育した植物体よりも光合成速度が低く (Evers、1982;

Langford・Wainwright、1987; 渡邊ら、1990; Capelladesら、1991; 中山ら、1991)、そのことが植え出し後の培養植物体の初期生育を抑制しているといわれている。その一方で逆に、培地に糖を添加した方が培養植物体の光合成能力が高くなるという報告 (Solárováら、1989; Ticháら、1998) や、変わらないという報告 (谷ら、1991)、植え出し時の光合成能力よりも培養植物体中にショ糖の形で栄養分を貯えている方が重要であるという報告 (Van Huylenbroeck・Debergh、1996) もある。いずれにしても、培地の糖濃度と培養植物体の光合成速度との関係を論じるには、培地の初期濃度よりも、培養終了時点、すなわち、植え出し直前の培地の糖含量との関係で論じた方がより実際的である。培地糖濃度と培養植物体の光合成速度との関係が報告によって異なるのは、植物の種間差の他に、光合成測定時点における培地中の糖の残留量がまちまちであったこともその原因として考えられる。培養終了時点の培地の糖含量は、植物体の乾物重から概算で推定可能であり、本章第2節で実際のマイクロプロパゲーションのスケールで行った実験では、培養終了時の培地の糖濃度は約1.0%以下と推定できた。それに対し、試験管などの小容量の培養器に培養植物体が1個体ずつ植わっているような状況では、個体あたりの培地量が多いため、培地の糖含量は初期値のわずか数%しか減少しない場合がある (Kozai・Iwanami、1988)。したがって、実際のマイクロプロパゲーションの場面では個体あたりの培地量がより小さく、培養終了時までに培地糖濃度はかなり低下してくるので、実際には植え出し時には光独立栄養的側面が強まっていると考えられる。同時に、培地糖含量がある程度低下してくると、植え出し直後の残留培地における微生物の繁殖もさして問題にはならないものと考えられる。予備実験において、生長が進んだ培養植物体を含む培養器の栓をはずしても、培地上の微生物の繁殖はごく緩慢にしか認められなかった。これまで述べたように、明暗周期の短縮による培養植物体の生長促進効果は、培養器外への炭素流出を減少させることで培地の糖を有效地に利用することによって発生する。このことは、明暗周期の短縮は、培養終了時の培地の糖含量をさらに減少させることを可能にするものであり、培養・育苗期間の短縮だけではなく、培養苗の光独立栄養への移行の促進や植え出し時の寒天の除去などに関わる一連の障害をも軽減することが可能と考えられる。

#### 第4節 摘要

第2章で明らかにした明暗周期の短縮が培養器内の植物体の生長を促進させる効果を、実際のマイクロプロパゲーションのスケールに当てはめて検証した。3時間の明暗周期下における培養植物体の日二酸化炭素吸収量をシミュレートしたところ、通気性の高い培養器ほど日二酸化炭素吸収量が大きくなった。また、培養器内のバイオマ

スの増加にともなう二酸化炭素吸収量の低下は24時間周期のそれに比べて小さくなつた。実際に使用されているマイクロプロパゲーション用培養器を用いて3時間の明暗周期で培養した植物体は、24時間の明暗周期で培養した植物体に比べて、順化に耐えうる大きさに早く生長し、植え出し後の生育もスムーズに行われた。また、対流によってガス交換が行われる通常の培養器と同様、透過によってガス交換の行われる培養器においても、明暗周期の短縮による生長促進効果が同様にみられた。以上の実験結果から、明暗周期の短縮をマイクロプロパゲーションシステムに適用することによって、培養苗の順化効率を上げ育苗器間を短縮することが可能となつた。

#### 第4章 総括

本研究は、マイクロプロパゲーション苗の効率的生産を目的として行ったもので、順化に適した苗を得るために物理的環境条件、特に培養時の光環境に注目し、その改善を通じて増殖効率を高めうることを実証した。以下にその概要を記す。

マイクロプロパゲーションの植え出し前の培養段階において、培養器内の植物体は、糖を添加した培地上においても光合成能力を持ち、それが乾物增加に大きく寄与していることを示した。しかし、その光合成活動の原料となる二酸化炭素の大部分は、培地の糖を基質とした植物体自身の呼吸活動によってまかなわれていることを明らかにした。換言すれば、培地からの糖の供給と植物体の光合成活動の両立によって初めて植物体の乾物増加が達成されることになる。

光合成活動については、投下される光量子の量に対するその効率を、純二酸化炭素吸収量を指標としてシミュレーションによって調べた。その結果、通気性の高い培養器ほど日二酸化炭素吸収量が小さくなること、ならびに、明期長を短縮することよりも光強度を弱めた方が、投下された光量子量に対する光合成の効率が高くなることを示した。

培地からの糖の供給については、培養植物体が糖を吸収する上で制限となる要因を、培地ゲルの特性面と、培養植物体の糖吸収能力の面から調べた。その結果、培地からの糖の吸収は寒天濃度に大きく依存し、培地ゲル内の糖拡散が糖吸収の律速要因となっていることと、培養植物体の糖吸収は培地内に存在する根量に大きく依存し、培養植物体の根系の早期の発達が、乾物増加の促進に重要であることが示された。

培養期間中の植物体の生長を制限する要因が以上のように明らかにされたので、次に培養植物体の植え出し後の生長について、培養時の物理的環境との関係を検討した。その結果、通気性の高い培養器で培養した場合、日二酸化炭素吸収量のシミュレーションによって予測されたとおり、培養期間中の植物体の生長量は通気性の低い

培養器で培養した植物体の生長量に比べて必ずしも大きくなかったが、植え出し後の生長量は通気性の低い培養器で培養した植物体より大きくなつた。また、光強度をさまざまに変えて培養した場合、培養期間中の植物体の生長量は光強度による差が小さく、日二酸化炭素吸収量のシミュレーションによって予測されたように、弱光条件で培養した方が光量子の利用効率が高いことが示された。しかし、植え出し後の生長量は弱光下で培養した植物体よりも強光下で培養した植物体の方が大きかった。これらの結果から、培養時の環境条件が、植え出し後も長期間にわたって植物体の生理状態に影響を及ぼし続けるものと予想されたので、安定同位体をトレーサーに用い、培養時環境の異なる植物体の植え出し後の転流パターンを調べた。その結果、対照とする植物と比較して、通気性の低い培養器で培養した植物体と弱光条件で培養した植物体のそれぞれが異なる転流パターンを示し、培養時の物理的環境条件の重要性が示された。

以上の結果から、植え出し後の生長率の高い培養苗は、通気性の高い培養器で強光下で培養した苗であることが示された。しかし、先に述べたように、これらの培養条件は培養期間中の培養植物体の生長量を必ずしも最大にするものではなく、また、投下される光量子の利用効率も低い。そこで、光強度および明期と暗期の時間比率を変えずに明暗周期長を短縮して、通常長時間連続して与えられる明期を分割して与えたところ、通気性の高い培養器で培養植物体の生長促進効果が認められた。暗期における培養器内二酸化炭素濃度は短い明暗周期下では低く推移し、培養器外への炭素の流出量は明暗周期の短縮によって減少するものと予想された。そこで明暗周期の違いによる培養植物体の日二酸化炭素吸収量をシミュレーションによって比較したところ、明暗周期の短縮によって日二酸化炭素吸収量が増加することが示された。培地からの糖の吸収量も短い明暗周期の方が大きくなつたが、これは日二酸化炭素吸収量の増加にともなう植物体の生長量の増加の結果生じた二次的な影響であり、二酸化炭素吸収量と糖吸収量の両者が同時に増加することによって明暗周期の短縮による生長促進効果が大きく現れるものと考えられた。

明暗周期を短縮して培養した植物体の形態を、通常の24時間の明暗周期で培養した植物体のそれと比較したところ、短い明暗周期で培養した植物体は、葉の構造ワックスの形成や表皮組織の発達などが24時間の明暗周期で培養した植物体に比べて早く進むことが明らかになり、植え出し時の環境変化に耐えうる生育段階に比較的早く到達できると考えられた。植物体の蒸散や光合成速度は、明暗周期の違いによる差がみられなかつたが、24時間の明暗周期では葉の加齢にともなう光合成速度の低下が短い明暗周期よりも大きくなつた。以上のことから、短い明暗周期で培養した植物体は、植え出し時の順化も支障なく行われることが予想された。

最後に、明暗周期の短縮が培養器内の植物体の生長を

促進させる効果を、実際のマイクロプロパゲーションのスケールに当てはめて検証した。実際に使用されているマイクロプロパゲーション用培養器を用いて明暗周期を短縮して培養した植物体は、24時間の明暗周期で培養した植物体に比べて、順化に耐えうる大きさに早く生長し、植え出し後の生育もスムーズに行われた。また、ガス交換特性の異なる培養器においても同様に、明暗周期の短縮による生長促進効果がみられ、植え出し後の生長も早かった。以上の実験結果から、明暗周期の短縮をマイクロプロパゲーションシステムに適用することによって、培養苗の順化効率を上げ育苗器間を短縮することが可能となり、クローン増殖苗の効率的生産が達成された。

花卉をはじめとする園芸作物は、生産される品目がさらに多様化しており、マイクロプロパゲーションの応用範囲もさらに拡大していくものと予想される。本研究で明らかにした光環境の調節によるクローン苗の効率的生産システムは、既存の設備で容易に実現可能であることが最大の特徴であり、マイクロプロパゲーションの応用範囲の拡大に寄与することが期待できよう。そのためには、本研究で供試した種以外の植物についても、光環境に対する植物体の反応に関するデータをさらに蓄積していくことが必要である。

#### 謝 辞

本研究をとりまとめるにあたり、始終懇切なご指導とご鞭撻を惜しまれなかつた京都大学大学院農学研究科教授 矢澤 進博士に謹んで感謝の意を表する。また、本論文をとりまとめるにあたり、適切なご指導とご校閲を賜った山形大学農学部教授 高樹英明博士、有益なご助言をいただいた大阪府立大学大学院農学生命科学研究科助教授 土井元章博士に感謝の意を表する。

研究の遂行にあたっては、宮崎大学農学部助教授 位田晴久博士の懇切なご指導をいただいた。また、山形大学農学部教授 山本隆儀博士には安定同位体の測定をおこなうにあたり懇切なご指導をいただいた。実際の実験の遂行にあたっては、山形大学農学部蔬菜園芸学研究室ならびに種苗生産学・観賞植物学の専攻生に多大のご協力をいただいた。深く感謝の意を表する。山形大学農学部助教授 鈴木 洋博士、同助手江頭宏昌博士には終始温かい励ましをいただいた。また、元山形大学農学部五十嵐幸子技術専門職員、山形大学農学部板垣りえ技術補佐員には、多大のご支援をいただいた。ここに記してお礼申し上げる。

#### 引用文献

- Akita, S., A. Miyasaka and Y. Murata. 1969. Studies on the differences of photosynthesis among species. I. Differences in the response of photosynthesis among species in normal oxygen concentration as influenced

by some environmental factors. Proceedings of the Crop Science Society of Japan. 38: 507-524.

- Allard, H. A. and W. W. Garner. 1941. Responses of some plants to equal and unequal ratios of light and darkness in cycles ranging from 1 hour to 72 hours. J. Agr. Res. 63: 305-330.

- 安藤敏夫. 1978. 培養容器中のガス環境に関する研究（第1報）密閉フラスコ内で生育中のランのガス環境. 園学要旨. 昭53秋. 368-369.

- 安納泰斗・石田朋靖・長野敏英. 1999. 植物組織培養用ゲルのマトリックポテンシャルと荷重ポテンシャル. 生物環境調節 37: 129-135.

- Black, C. C. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO<sub>2</sub> uptake. Ann. Rev. Plant Physiol. 24: 253-286.

- Bolton, F. E. and A. E. Erickson. 1970. Ethanol concentration in tomato plants during soil flooding. Agron. J. 62: 220-224.

- Borkowska, B. and M. Kubik. 1990. Utilization and accumulation of <sup>14</sup>C-sucrose in sour cherry shoots rooted *in vitro*. Scientia Hortic. 44: 261-267.

- Brainerd, K. E. and L. H. Fuchigami. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106: 515-518.

- Brun, W. A. and R. L. Cooper. 1967. Effects of light intensity and carbon dioxide concentration on photosynthetic rate of soybean. Crop Sci. 7: 451-454.

- Capellades, M., R. Fontarnau, C. Carulla and P. Debergh. 1990. Environmental influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue-cultured *Rosa multiflora*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 141-145.

- Capellades, M., R. Lemeur and P. Debergh. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25: 21-26.

- Chen, W. H., M. R. Davey, J. B. Power and E. C. Cocking. 1988. Control and maintenance of plant regeneration in sugarcane callus cultures. J. Exp. Bot. 39: 251-261.

- Chi, G.-L., D. G. Barfield, G.-E. Sim and E.-C. Pua. 1990. Effect of AgNO<sub>3</sub> and aminoethoxy-vinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedlings explants of recalcitrant *Brassica* genotypes. Plant Cell Rep. 9: 195-198.

- Chu, I. 1993. Globalization of the micropropagation industry. Summarized results from a Session-In-Depth of the Tissue Culture Association Congress, June 1993, San Diego, CA. *In vitro* Cellular and Developmental Biology 29A: 2A.

- Coleman, W. K., T. J. Huxter, D. M. Reid and T. A. Thorpe. 1980. Ethylene as an endogenous inhibitor of root regeneration in tomato leaf discs cultured *in vitro*. Physiol. Plant. 48: 519-525.

- Cournac, L., B. Dimon, P. Carrier, A. Lohou and P. Chagvardieff. 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* under different conditions of aeration, sucrose supply, and CO<sub>2</sub> enrichment. Plant Physiol. 97: 112-117.

- Crawford, R. M. M. 1967. Alcohol dehydrogenase activity in relation to flooding tolerance in roots. J. Exp. Bot. 18: 458-464.

- Dalton, C. C. and H. E. Street. 1976. The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell

- suspension cultures of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *In Vitro* 12: 485-494.
- Debergh, P. C. and L. J. Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hortic.* 14: 335-345.
- Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59: 270-276.
- De Proft, M. P., L. J. Maene and P. C. Debergh. 1985. Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of *Magnolia* cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 65: 375-379.
- De Riek, V., O. van Cleemput and P. C. Debergh. 1991. Carbon metabolism of micropropagated *Rosa multiflora* L. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P: 57-63.
- Dillen, W. and S. Buysens. 1989. A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 181-188.
- 土井元章・小田 尚・浅平 端. 1989. C<sub>3</sub>およびCAM植物の培養器内気相環境と日長との関係. *生物環境調節* 27: 9-13.
- Donnelly, D. J. and W. E. Vidaver. 1984. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 172-176.
- Donnelly, D. J., F. E. Skelton and J. E. Nelles. 1987. Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 566-569.
- Dubé, S. L. and W. Vidaver. 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. *Physiol. Plant.* 84: 409-416.
- Egle, K. and W. Schenk. 1953. Der Einfluß der Temperatur auf die Lage des CO<sub>2</sub>-Kompensationspunktes. *Planta* 43: 83-97.
- Evers, P. 1982. Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas fir *in vitro*. 3. Photosynthesis *in vitro*. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Tokyo. 263-264.
- Fournioux, J.-C. and R. Bessis. 1985. Influence de la teneur en gaz carbonique sur la morphogenèse de la vigne en culture *in vitro*. *Can. J. Bot.* 64: 2608-2616.
- Francis, C. M., A. C. Devitt and P. Steele. 1974. Influence of flooding on the alcohol dehydrogenase activity of roots of *Trifolium subterraneum* L. *Aust. J. Plant Physiol.* 1: 9-13.
- 富士原和宏・古在豊樹・渡部一郎. 1987. 植物組織培養器内環境の基礎的研究 (3) 培養小植物体を含む閉栓容器内の炭酸ガス濃度測定と培養小植物体の純光合成速度の推定. *農業気象* 43: 21-30.
- Fujiwara, K., T. Kozai and I. Watanabe. 1988. Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoot and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Hort.* 230: 153-158.
- 富士原和宏・吉良修司・古在豊樹. 1992. バレイショ培養体のCO<sub>2</sub>交換量の時間変化に及ぼす培地シヨ糖濃度の影響. *農業気象* 48: 49-56.
- 富士原和宏・山内千津子・古在豊樹. 1993. 植物組織培養培地中の酸素拡散係数に及ぼす培地成分の影響. 第13回植物組織培養学会大会ならびに国際植物分子生物学シンポジウム講演要旨集 40.
- 富士原和宏・小林玲子・古在豊樹. 1994. 明暗周期が培養器内湿度およびバレイショ培養小植物体の生長に及ぼす影響. 日本農業気象学会1994年度全国大会日本生物環境調節学会第32回集会合同大会講演要旨 206-207.
- Fujiwara, K., S. Kira and T. Kozai. 1995. Contribution of photosynthesis to dry weight increase of *in vitro* potato cultures under different CO<sub>2</sub> concentrations. *Acta Hort.* 393: 119-126.
- Fujiwara, K. and T. Kozai. 1995a. Physical micro-environment and its effects. p. 319-369. In: Aitken-Christie, J., T. Kozai and M. A. L. Smith (eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Fujiwara, K. and T. Kozai. 1995b. Control of environmental factors for plantlet production -with some mathematical simulation-. In: Carre, F. and P. Chagvardieff (eds.). *Proc. Intl. Symp. Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures*. CEA Cadarache, Cedex, France.
- Gaastra, P. 1959. Photosynthesis of crop plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature, and stomatal diffusion resistance. *Mededel. Landbouwhogesch. Wageningen* 59: 1-68.
- Garner, W. W., H. A. Allard. 1931. Effect of abnormally long and short alternations of light and darkness on growth and development of plants. *J. Agr. Res.* 42: 629-651.
- Grossmann, K., E. Sauerbrey and J. Jung. 1990. Influence of growth retardants and ethylene-generating compounds on culture response of leaf explants from wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.* 135: 725-731.
- Grout, B. W. W. and H. Aston. 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and xylem regeneration. *Hort. Res.* 19: 1-17.
- Harley, J. L. and D. C. Smith. 1956. Sugar absorption and surface carbohydrate activity of *Peltigera polydactyla*. *Ann. Bot.* 20: 513-543.
- 林 真紀夫・古在豊樹・館野 稔・富士原和宏・北宅善昭. 1993. 明暗周期が光混合栄養培養条件下におけるバレイショ小植物体の生長および形態に及ぼす影響. *生物環境調節* 31: 169-175.
- Hayashi, M., K. Fujiwara, T. Kozai, M. Tateno and Y. Kitaya. 1995. Effects of lighting cycle on daily CO<sub>2</sub> exchange and dry weight increase of potato plantlets cultured *in vitro* photoautotrophically. *Acta Hort.* 393: 213-218.
- Hesketh, J. D. 1963. Limitations to photosynthesis responsible for differences among species. *Crop Sci.* 3: 493-496.
- Hew, C. S. 1987. Respiration in orchids. p. 227-259. In : Arditti, J. (eds.). *Orchid biology IV*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Hidder, C. and Y. Desjardins. 1994. Effects of sucrose on photosynthesis and phospho-enolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 27-33.

- Hussey, G. and N. J. Stacey. 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 48: 787-796.
- 石田朋靖・安納泰斗・松川 進・長野敏英. 2000. 植物組織培養用ゲルの透水係数と拡散係数. *生物環境調節* 38: 165-171.
- Jackson, M. B., A. J. Abbot, A. R. Belcher, K. C. Hall, R. Butler and J. Cameron. 1991. Ventilation in plant tissue cultures and effects of poor aeration on ethylene and carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explant development. *Ann. Bot.* 67: 229-237.
- 木下敏明・古在豊樹・富士原和宏. 1988. 小植物体増殖培養における培地水ポテンシャルの経日変化. *園学要旨*. 昭63春. 234-235.
- Knee, M. 1991. Role of ethylene in chlorophyll degradation in radish cotyledons. *J. Plant Growth Reg.* 10: 157-162.
- 古在豊樹・富士原和宏・渡部一郎. 1986. 植物組織培養器内環境の基礎的研究(2)栓および容器が閉栓容器内外間のガス交換速度に及ぼす影響. *農業気象* 42: 119-127.
- 古在豊樹・林真紀夫・広沢祐二・児玉友孝・渡部一郎. 1987. 植物組織培養苗の順化のための環境調節(1)順化装置の開発と栽培試験. *農業気象* 42: 349-358.
- 古在豊樹・岩浪好恵・富士原和宏. 1987. 炭酸ガス施用が増殖培養時におけるスタークス(*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.
- Kozai, T. and Y. Iwanami. 1988. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 57: 279-288.
- 古在豊樹・関本克宏. 1988. 培養器の換気回数と光合成有効光量子の大小が培養器内二酸化炭素濃度とイチゴ培養小植物体の生長に及ぼす影響. *生物環境調節* 26: 21-29.
- 古在豊樹・田中幸治・渡部一郎・林真紀夫・富士原和宏. 1989. 植物組織培養器内湿度の計測および培養小植物体の蒸散特性. *農業気象学会1989年度全国大会講演要旨* 24-25.
- Kozai, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. p. 447-469. In: Debergh, P. C. and R. H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kusumoto, M. 1980. Effects of coconut milk, agar, and sucrose concentrations, and media pH on the proliferation of *Cymbidium* protocorm-like bodies cultured *in vitro*. *J. Japan. Hort. Sci.* 48: 503-509.
- Langford, P. J. and H. Wainwright. 1987. Effects of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.* 60: 633-640.
- Lee, N., Y. Wetzstein and H. E. Sommer. 1985. Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.* 78: 637-641.
- Lee, N., H. Y. Wetzstein and H. E. Sommer. 1988. Quantum flux density effects on the anatomy and surface morphology of *in vitro*- and *in vivo*-developed sweetgum leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 167-171.
- Matthys, D., J. Gielis and P. Debergh. 1995. Ethylene. p. 473-491. In: Aitken-Christie, J., T. Kozai and M. A. L. Smith (eds.). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 百瀬博文・米田和夫. 1989. 洋ラン類の組織化学的研究—I. 蔗糖濃度がシンビジウム増殖時の糖代謝に及ぼす影響. *日本大学農獣医学部学術研究報告* 46: 63-68.
- Morel, G. M. 1960. Producing virus-free *Cymbidium*. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 29: 495-497.
- Morini, S., P. Fortuna, R. Sciutti and R. Muleo. 1990. Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured *in vitro*. *Adv. Hortic. Sci.* 4: 163-166.
- Morini, S., R. Muleo, R. Sciutti and R. P. Fortuna. 1993. Relationship between evolution of CO<sub>2</sub> and growth of plum shoot tips cultured *in vitro* under different light/dark regimes. *Physiol. Plant.* 87: 286-290.
- Moss, D. N. 1962. The limiting carbon dioxide concentration for photosynthesis. *Nature* 192: 587.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- 中山 衛・古在豊樹・渡部桐絵. 1991. 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CO<sub>2</sub>濃度-純光合成速度特性に及ぼす影響. *植物組織培養* 8: 105-109.
- Nitsch, J. P. and C. Nitsch. 1965. Néoformation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts: *Plantago indica* L. *Ann. Physiol. Vég.* 6: 333-345.
- Niu, G., T. Kozai and Y. Kitaya. 1995. Simulation of the time courses of CO<sub>2</sub> concentration in the culture vessel and net photosynthetic rate of *Cymbidium* plantlets. *Intl. Ann. Meeting ASAE*, Chicago, Illinois. Paper No. 957199.
- Owens, L. D. and C. A. Wozniak. 1991. Measurement and effects of gel matric potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 26: 127-133.
- Pérez-Bermúdez, P., M. J. Cornejo and J. Segura. 1985. A morphogenetic role for ethylene in hypocotyl cultures of *Digitalis obscura* L. *Plant Cell Rep.* 4: 188-190.
- Pospíšilová, J. 1988. Osmic adjustment in tobacco plantlets. *Biologia Plantarum* 30: 393-396.
- Preece, J. E. and E. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. p. 71-91. In: Debergh, P. C. and R. H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Righetti, B., E. Magnanini and M. Maccaferri. 1988. Ethylene and other volatile substances produced by *in vitro* cultured *Prunus avium*. *Acta Hort.* 227: 402-404.

- Righeti, B., E. Magnanini, R. Infante and S. Predieri. 1990. Ethylene, ethanol, acetaldehyde and carbon dioxide released by *Prunus avium* shoot cultures. *Physiol. Plant.* 78: 507-510.
- Righetti, B. and O. Facini. 1992. Headspace gas composition in four *Prunus avium* cultivars with differing photosynthetic capabilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28P: 179-182.
- Ringe, F. and J. P. Nitsch. 1968. Conditions leading to flowers formation on excised *Begonia fragments* culture *in vitro*. *Plant and Cell Physiol.* 9: 639-652.
- Romberger, J. A. and C. A. Tabor. 1971. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. *Amer. J. Bot.* 58: 131-140.
- Rothstein, A. 1954. The enzymology of the cell surface. *Protoplasmatalogia* 2: 1-86.
- Shimada, N., F. Tanaka and T. Kozai. 1988. Effects of low O<sub>2</sub> concentration on net photosynthesis of C<sub>3</sub> plantlets *in vitro*. *Acta Hort.* 230: 171-175.
- Singh, B. N. and K. N. Lal. 1935. Limitations of Blackman's law of limiting factors and Harder's concept of relative minimum as applied to photosynthesis. *Plant Phisylol.* 10: 245-268.
- Smith, M. A. L. and B. H. McCown. 1983. A Comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. *Plant Science Letters* 28: 149-151.
- Smith, M. A., J. P. Palta and B. H. McCown. 1986. Comparative anatomy and physiology of microcultured, seedling, and greenhouse-grown asian white birch. *J. Amer. Hort. Sci.* 111: 437-442.
- Smith, E. F., A. V. Roberts and J. Mottley. 1990. The preparation *in vitro* of chrysanthemum for transplantation to soil. 3. Improved resistance to desiccation conferred by reduced humidity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 141-145.
- Solárová, J. 1989. Photosynthesis of plant regenerants. Diurnal variation in CO<sub>2</sub> concentration in cultivation vessels resulting from plantlets photosynthetic activity. *Photosynthetica* 23: 100-107.
- Solárová, J., J. Pospíšilová, J. Catsky and J. Santrucek. 1989. Photosynthesis and growth of tobacco plantlets in dependence on carbon supply. *Photosynthetica* 23: 629-637.
- Stoltz, L. P. 1971. Agar restriction of the growth of excised mature *Iris* embryos. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 96: 681-684.
- Street, H. E. and J. S. Lowe. 1950. The carbohydrate nutrition of tomato roots. II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. *Ann. Bot.* 14: 307-329.
- Sutter, E. and R. W. Langhans. 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.* 60: 2896-2902.
- 田中布佐子・渡邊幸雄・嶋田典司. 1990. キク組織培養小植物体の光呼吸に及ぼすO<sub>2</sub>濃度の影響. 植物組織培養 7: 85-91.
- 田中布佐子・渡邊幸雄・嶋田典司. 1991. 光独立栄養培養および混合栄養培養したキク小植物体の見かけの光合成、光呼吸および暗呼吸に及ぼすO<sub>2</sub>濃度の影響. 植物組織培養 8: 97-93.
- Tanaka, M., K. Jinno, M. Goi and T. Higashiura. 1988. The use of disposable fluorocarbon polymer film culture vesse in micropagation. *Acta Hort.* 230: 73-80.
- 谷 晃・清田 信・平 知明・相賀一郎. 1991. 光独立影響条件および光混合栄養条件で培養されたアルファルファ小植物体の生長および光合成速度. 生物環境調節 29: 127-132.
- Thomale, H. 1954. Vermehrung. p. 62-85. In: Die Orchideen. Euger Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Tichá, I., F. Cáp, D. Pacovská, P. Hofman, D. Haisel, V. Capková and C. Schäfer. 1998. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 102: 155-162.
- 上原康雄・市橋正一. 1987. 培地の物理・化学性に関する基礎的研究(第1報) 寒天のゲル強度に影響を及ぼす要因について. 園学要旨. 昭62秋. 526-527.
- Van Huylbroeck, J. M. and P. C. Debergh. 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol. Plant.* 96: 298-304.
- Wardle, K., E. B. Dobbs and K. C. Short. 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 386-389.
- 渡邊浩一郎・渡邊幸雄・嶋田典司. 1990. 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ス-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.
- Wetzstein, H. Y. and H. E. Sommer. 1983. Scanning electron microscopy of *in vitro*-cultured *Liquidambar styraciflua* plantlets during acclimatization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 475-480.
- Whiteman, P. C. and D. Koller. 1967. Interactions of carbon dioxide concentration, light intensity and temperature on plant resistances to water vapour and carbon dioxide diffusion. *New Phytol.* 66: 463-473.
- Wimber, D. E. 1963. Clonal multiplication of cymbidiums through tissue culture of the shoot meristem. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 32: 105-107.
- Yates, R. C. and J. T. Curtis. 1949. The effect of sucrose and other factors on the root-shoot ratio of orchid seedlings. *Amer. J. Bot.* 36: 390-396.
- Ziv, M., G. Meir and A. H. Halevy. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2: 55-65.