

明期長および明暗周期がサトウキビ培養器内気相環境に及ぼす影響

小笠原宣好*・位田晴久**・浅平 端***

*山形大学農学部農業生産学講座・**宮崎大学農学部・***京都大学名誉教授
(平成6年9月1日受理)

Gaseous Conditions in Sugarcane Culture *In Vitro*
as Influenced by
the Length of Lighting Period and Lighting Cycle.

Nobuyoshi OGASAWARA*, Haruhisa INDEN** and Tadashi ASAHIRA***

*Section of Agricultural Production, Faculty of
Agriculture, Yamagata University,
Tsuruoka 997, Japan

**Faculty of Agriculture, Miyazaki University,
Miyazaki 889-21, Japan

***Professor emeritus, Kyoto University
(Received September 1, 1994)

Summary

Changes in CO₂ and O₂ concentration in the vessels containing sugarcane plants (C₄ plants) were investigated. Under continuous lighting, the CO₂ and O₂ concentrations remained at constant levels. Under 16hr and 8hr lighting, the CO₂ concentration increased during the dark period and decreased during the light period, and the O₂ concentration changed in inverse to the CO₂ concentration. In the light period, the CO₂ concentration was lowered to undetectable level, which represents the low CO₂ compensation point of sugarcane. The CO₂ concentration during the dark period was lower under the normal lighting cycle (16h light/8h dark) than the short lighting cycle (2h light/1h dark). When a gas exchange between inside and outside the vessel was allowed, the short lighting cycle was suggested to promote the growth of plants due to greater dairy CO₂ uptake, resulted from less CO₂ diffusion out of the vessel than the normal lighting.

Key words : C₄ plant, CO₂ concentration, *in vitro*, lighting cycle, sugarcane

緒 言

植物組織培養に用いられる培養器は通常気密性が高いため、培養器内の気相環境は培養体の呼吸や光合成によるCO₂濃度の急激な増減、エチレンの高濃度の蓄積等、特殊な状態にあることが多い。培養体が緑色植物体の場合、光合成能力を持っており、培地中の糖と気相中の

CO₂を炭素源として通常混合栄養成長を行っている。この場合、培養器の気密性が高いために培養器外からのCO₂の供給が限られ、明期のかなり早い段階でCO₂不足状態になってしまうなど、光合成量はCO₂の供給量に律速されることが知られている(富士原ら, 1987; 土井ら, 1989)。したがって、照明条件と培養器内CO₂濃度との関係を把握することは、培養体の光合成、ひいては成長を高めるための適切な培養条件、特に照明条件を設定する上で重要と考えられる。C₃型およびCAM型光合成を行う植物体が含まれる培養器においては、それ

キーワード: C₄植物, CO₂濃度, *in vitro*, 明暗周期,
サトウキビ

ぞれの光合成様式に応じて培養器内の CO₂ 濃度変化のパターンが異なっていることが明らかにされている（土井ら, 1989）。

また, C₃ 植物については, 通常の24時間周期の照明に対し, 明暗周期を短縮した照明を行うことによって培養植物体の成長量がより大きくなることが報告されており（小笠原ら, 1989; Morini et al., 1990, 1991, 1993）, その理由として, 培養器内 CO₂ 濃度の経時変化の違いにともなう純 CO₂ 吸収量の違いが考えられている（小笠原ら, 1989, 1992; 林ら, 1993）. すなわち, 短い明暗周期下では暗期の連続時間が短く, 暗期中の培養器内の CO₂ 濃度が通常の24時間周期下のそれよりも低く推移するために, 培養器外への CO₂ の拡散量が小さく, 光合成に利用可能な CO₂ の量が多くなると考えられる. したがって, C₄ 植物においても培養器内 CO₂ 濃度変化パターンが C₃ 植物のそれに類似していれば, 明暗周期の短縮によってその成長量が増加することが予想される.

本研究では, C₄ 型光合成を行なう植物としてサトウキビを選び, 培養条件の設定を適切に行うための基礎資料を得るため, 明期長と培養器内 CO₂ ならびに O₂ 濃度の変動パターンを明らかにし, さらに明暗周期の短縮による成長量の増加の可能性について検討した.

材料および方法

サトウキビ *Saccharum officinarum* L. 'NCO 310' の葉片由来のカルスより分化した植物体を供試した.

培地には, MS 処方 (1962) の主要塩類に Fe-EDTA, Ringe & Nitsh (1968) の微量元素, Nitsch & Nitsch (1965) の有機物, 2% (w/v) のしょ糖, 0.8% (w/v) の寒天を加え, オートクレーブ前に pH を 5.8 に調整したものをを用いた. 培養器は 200ml のエルレンマイヤーフラスコを用い, 培地を培養器あたり 50ml 分注した.

実験 1. 培養器内 CO₂, O₂ 濃度の経時変化に及ぼす明期長の影響

5~6 葉展開した, 草丈約 6~10cm の植物体を培養器あたり 9 個置床した. 培養器の栓として, 中央に直径 5mm の穴をあけそこに 300mg の綿を詰めたゴム栓を使用し, フラスコとゴム栓の間はパラフィンにより封じ, ゴム栓にあけた穴の上面をビニールテープによりふさいだ. なお, 培養器の換気回数は, 古在ら (1986) の測定方法で $5.61 \times 10^{-4} \text{h}^{-1}$ であった. 培養は, 連続明期, 16時間明期 (8時間暗期), 8時間明期 (16時間暗期) の 3 つの

明期長の条件下で行なった. 培養器をおいたグロースチャンバーの気温は, 明期, 暗期とも 27℃ とした. 26 日間の培養の後, 培養器内の気体を採取し, ガスクロマトグラフ (TCD) で分析することによって, 各処理区における培養器内の CO₂ 濃度および O₂ 濃度の 1 日間の経時変化を測定した.

実験 2. 培養器内 CO₂, O₂ 濃度の経時変化に及ぼす明暗周期の影響

4~5 葉展開した, 草丈 4~5 cm の植物体を培養器あたり 5 個置床した. 培養器の栓には中央に直径 5 mm の穴をあけそこに 100mg の綿を詰めたゴム栓を用い, 実験 2 では穴の上面をビニールテープでふさがなかった. 培養器の換気は主としてゴム栓中央穴の綿を通して行なわれ, 換気回数は古在ら (1986) の測定方法で 0.185h^{-1} であった.

培養は 24 時間周期照明下 (明期 16 時間 - 暗期 8 時間) と 3 時間周期照明下 (明期 2 時間 - 暗期 1 時間) の 2 種の明暗周期下 (1 日あたりの照明時間はいずれも 16 時間) で行なった. グロースチャンバーの気温は明期暗期を通じて 25℃ とした. 40 日の培養後, 培養器内の CO₂ 濃度の 1 明暗周期中の経時変化と培養器外 CO₂ 濃度を測定した. また, これらの CO₂ 濃度測定値を用いて, 富士原ら (1987) の式により植物体の 1 日あたりの純 CO₂ 吸収量を算定した.

実験 1, 2 とも, 照明は昼光色蛍光灯により行ない, 棚面における光合成有効光量子束密度が $34.2 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ になるよう調節した.

結 果

実験 1.

連続明期下で培養した場合, 培養器内 CO₂ 濃度はほとんど変動なく, 230ppm 前後で推移した (Fig. 1, left). 培養器内 O₂ 濃度もほぼ一定で推移したが, その値は通常大気よりも高い $22 \times 10^4 \text{ppm}$ 前後であった.

16 時間明期区では, 培養器内 CO₂ 濃度は暗期の開始とともに上昇し, 暗期終了時には約 5000ppm まで上昇した (Fig. 1, middle). 明期開始とともに CO₂ 濃度は低下し, 明期開始 8 時間後には 221ppm, さらに明期終了時には 56ppm にまで低下した. 培養器内 O₂ 濃度は, CO₂ 濃度の暗期の上昇・明期の低下と対照的に, 暗期に低下, 明期に上昇したが, 明期開始 8 時間以降に培養器内 CO₂ 濃度が低い値で安定するようになってからは, O₂ 濃度の上昇は認められなかった. 暗期開始時の O₂

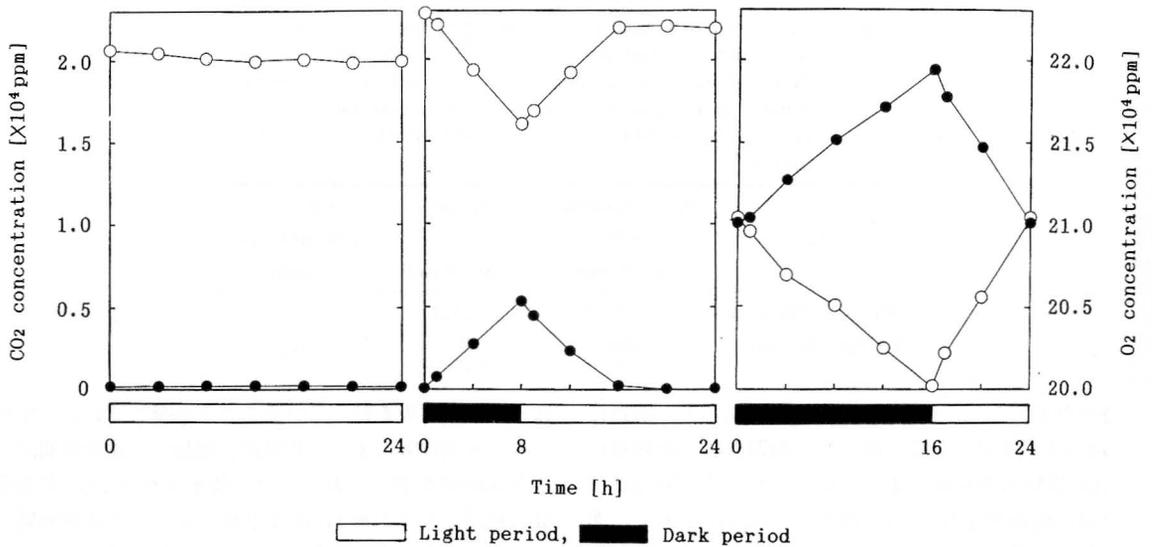


Fig. 1. Diurnal changes of CO₂ and O₂ concentrations in the vessel containing sugarcane plants under continuous lighting (left), 16hr lighting (middle), and 8hr lighting (right). ● and ○ indicate CO₂ concentration and O₂ concentration, respectively. The amounts of plants in each vessel are shown in Table 1.

濃度は、通常の大気よりも高い約 22.3×10^4 ppm であった。

8時間明期区では、培養器内 CO₂ 濃度は16時間明期と同様に、明期に低下、暗期に上昇したが、その範囲は $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ ppm で通常大気中の CO₂ 濃度よりかなり高い濃度で推移し、連続明期や16時間明期で見られるような CO₂ 飢餓状態は認められなかった (Fig. 1, right). O₂ 濃度は明期が終了するまで上昇を続け、暗期に低下したが、その範囲は $20 \times 10^4 \sim 21 \times 10^4$ ppm で、連続明期および16時間明期の培養器におけるそれよりも低い濃度であった。

Table 1. Dry weight of sugarcane plants cultured under continuous, 16hr lighting, and 8hr lighting. Nine plants were inoculated in each vessel. The number of gas changes of the vessels was $5.61 \times 10^{-4} \text{h}^{-1}$.

Treatment	Dry weight of plants (mg/vessel)
Continuous lighting	147.2
16hr lighting	143.8
8hr lighting	147.4

培養器内 CO₂, O₂ 濃度測定直後の培養器あたり植物体乾物重は、いずれの明期長区でもほぼ同じであった (Table 1).

実験 2.

培養40日後の培養器内 CO₂ 濃度の1明暗周期の経時変化を Fig. 2 に示した。24時間周期照明では、培養器内 CO₂ 濃度は暗期に上昇を続けたが、その上昇率は培養器内 CO₂ 濃度が高くなるにつれて減少した。暗期終

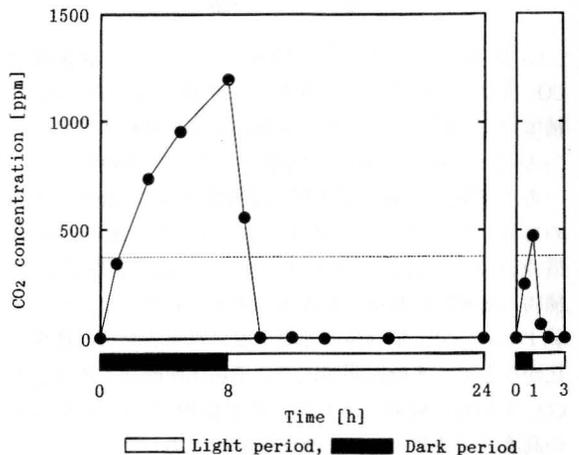


Fig. 2. Diurnal changes of CO₂ concentration in the vessel containing sugarcane plants under 24hr lighting cycle (left) and 3hr lighting cycle (right). Dotted line (.....) indicates the average concentration outside the vessels. The amounts of plants in each vessel are shown in Table 2.

Table 2. Dairy net CO₂ uptake and dry weight of sugarcane plants cultured under normal lighting cycle (16hr light/8hr dark) and short lighting cycle (2hr light/1hr dark), and ethylene concentrations in the vessels. Five plants were inoculated in each vessel. The number of gas changes of the vessels was 0.185h⁻¹.

Treatment	Net CO ₂ uptake ×10 ³ (μcm ³ /vessel·d)	Dry weight (mg/vessel)	Ethylene concentration (ppb)
16hr light/8hr dark	71	51.9	283
2hr light/1hr dark	238	65.8	12

了時の培養器内 CO₂ 濃度は 1192ppm であった。明期に入ると CO₂ 濃度は急激に低下し、明期開始 6 時間後には CO₂ は検出不可能なまでに低下した。3 時間周期照明では、暗期終了時の CO₂ 濃度は 471ppm であり、明期開始 1 時間後には CO₂ は検出されなくなった。培養器外 CO₂ 濃度はほぼ 380ppm で一定に推移した。これらの培養器内外の CO₂ 濃度差の経時変化から求めた培養器あたり植物体の 1 日の純 CO₂ 吸収量は、24 時間周期照明より 3 時間周期照明の方が大きくなった (Table 2)。培養器内 CO₂ 濃度測定直後の植物体乾物重も 3 時間周期照明の方が大きかった。一方、培養器内エチレン濃度は、3 時間周期照明の方が 24 時間周期照明に比べて著しく低かった。

考 察

C₄ 植物のサトウキビの培養においても、培養器内 CO₂ 濃度は、暗期に上昇を続け、明期にはいと低下、補償点まで低下するとその後低いままで推移するという C₃ 植物 (土井ら, 1989) と同様のパターンが観察された。一方、実験 2 において明期の培養器内 CO₂ 濃度がきわめて低くなったが、C₄ 植物においては光合成の CO₂ 補償点が 0~10ppm ときわめて低く (Black, 1973), C₄ 植物の培養器に特徴的な現象と考えられた。ただし、実験 1 において、植物体の呼吸速度に対する光合成速度の比が小さく、8 時間明期区では植物体が暗期に放出した CO₂ を明期に吸収しきれず、培養器内に CO₂ がかなりの高濃度で蓄積している点が特異的であった。

実験 1 において、連続明期区や 16 時間明期区における培養器内 O₂ 濃度、あるいは 8 時間明期区における培養器内 CO₂ 濃度が通常大気よりも 1% 程度高い水準にあり、培養器内の CO₂ あるいは O₂ 収支が正であったことが示されたが、これは培養器内の植物体が酸素呼吸の

ほかに無気呼吸を行っていることを示唆している。すなわち、無気呼吸によって呼吸商が増加し、連続明期区および 16 時間明期区においては、放出された CO₂ が光合成に利用されたため O₂ 濃度が高くなり、8 時間明期においては、光合成量が明期長による制限を受けたために CO₂ が蓄積したと考えられる。本実験では、培養器内のエタノールの分析は行わなかったが、アウトウシュートの密封培養器内においては、無気呼吸によって生じたと考えられる高濃度の CO₂ とエタノールの蓄積が報告されている (Righetti et al., 1990)。組織培養においては植物体の根が嫌気条件下におかれるため、無気呼吸が主として根において行われていることが推察される。

実験 1 において、培養器あたりの植物体乾物重は、いずれの明期長区でもほぼ同じであったが、これは培養器がほぼ完全に密封された状態にあったため培養器内外の CO₂ の交換がほとんどなく、光合成に利用された CO₂ はほぼすべて培地中のしょ糖を基質とした呼吸に由来していたためであろう。8 時間明期区においては培養器内外の CO₂ 濃度差が大きく、気体試料採取にともなう外気の培養器内への流入による測定誤差が大きいことが考えられたため、実験 1 では植物体の 1 日の純 CO₂ 吸収量の算定は行わなかったが、 $5.61 \times 10^{-4} \text{h}^{-1}$ という極めて低い培養器の換気回数を考えると、明期に吸収した CO₂ 量は暗期に放出した CO₂ 量とほぼ等しくなり 1 日の純 CO₂ 吸収量は 0 に近い値となることが推定される。また、本実験では培地からの糖の吸収量は測定しなかったが、8 時間明期区の培養器内に蓄積した CO₂ がすべて光合成に利用されたとしても、その量はデンプンに換算して 4 mg 以下であり、植物体の乾物重の明期長の違いによる差も小さいことから、培地からのしょ糖の吸収はいずれの明期長においてもほぼ同程度に行われていたと考えられる。ある程度の通気性を培養器に持たせた場合、

連続明期下では常に培養器外から培養器内へのCO₂の流入が起こるため、植物体の1日の純CO₂吸収量は増加することが予想される。

一方、実験2において明暗周期の違いにより植物体の成長量に差が生じたのは、培養器の換気回数が比較的大きく、培養器内外のCO₂の流出入が生じたことによるものと考えられる。24時間周期照明下では、暗期開始後時間が経つにつれて培養器内CO₂の上昇が緩やかになり、CO₂が培養器外へ拡散していることが推察されたが、3時間周期照明下では、培養器内CO₂濃度はC₃植物の場合(小笠原ら, 1989, 1992)と同様、暗期終了時で外気より少し上回る程度で、培養器外へのCO₂の拡散量がわずかであり、植物体の培養器あたり1日の純CO₂吸収量は24時間周期照明よりも3時間周期照明の方が大きくなった。なお、本実験の24時間周期照明における培養器あたり純CO₂吸収量は、同程度の換気回数の培養器を用いたC₃植物の場合(富士原ら, 1987; 小笠原ら, 1992)に比べて大きい値となっているが、これはC₄植物においては光合成のCO₂補償点が低いため、明期の培養器内CO₂濃度がC₃植物のそれにくらべて著しく低く、明期における培養器内へのCO₂流入量が大きくなったためと考えられる。なお、実験1の方が実験2に比べてCO₂補償点が高く、また暗期のCO₂濃度の上昇に対し明期のCO₂濃度の低下が緩慢であり、光合成速度に対する呼吸速度の比が大きいことが示されたが、その理由として、実験1では培養器をほぼ完全に密封したため培養器内にエチレンが多量に蓄積し、それが植物体の老化を促進したことなどが考えられる。

培養器内エチレン濃度は、3時間周期照明下よりも24時間周期照明下の方が高かったが、このことは24時間周期照明においてなんらかのストレスが3時間周期照明よりも多くかかっていることを示唆している。緑色植物が光照射下でCO₂の無存在下におかれると、光合成能力が低下し、また低照度でも強光下におかれたときと同様に葉にクロロシス症状を呈することが知られている(Powels, 1984)。C₄植物のトウモロコシにおいても、CO₂の無存在下におかれることにより、このような光合成の光阻害が観察され、その程度はCO₂の無存在下におかれる時間が3時間まで長くなると著しく増大することが報告されている(Powels et al., 1980)。24時間周期照明においては、検出不可能なほどの低CO₂濃度下におかれる連続時間が3時間周期照明下よりも長く、光合成の光阻害の程度が大きいことが推察される。

以上の結果から、C₄植物であるサトウキビ培養器内の明期-暗期のCO₂濃度の変動パターンは、CO₂補償点が低いことを除けばC₃植物のそれと同様のパターンを示し、明暗周期を短縮することによって、培養植物体の成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。

摘 要

サトウキビ(C₄植物)培養器内CO₂およびO₂濃度の経時変化を調べた。CO₂およびO₂濃度は、連続照明下では一定レベルで推移したのに対し、16時間明期および8時間明期下においては、CO₂濃度は暗期に上昇、明期に低下、O₂濃度は逆に暗期に低下、明期に上昇した。また、明期のCO₂濃度は検出不可能なまでに低下し、C₄植物に特徴的なきわめて低いCO₂補償点が認められた。暗期中の培養器内CO₂濃度は、通常の24時間周期の照明(16時間明期/8時間暗期)下に比べ、明暗周期を短くした照明(2時間明期/1時間暗期)下の方が低く推移した。通気性のある培養器を用いた場合、明暗周期が短い照明下では、暗期における培養器外へのCO₂拡散量が小さくなるため、植物体の純CO₂吸収量が大きくなり、植物体乾物重を増加させることができた。

引用文献

- Black, C. C. (1973) Photosynthetic carbon fixation in relation to net CO₂ uptake. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 253-286.
- 土井元章・小田尚・浅平端(1989)C₃およびCAM植物の培養器内気相環境と日長の関係. *生物環境調節*. 27: 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.
- 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.
- 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.
- 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. Sciutti, R. Muleo and P. Fortuna (1991) Growth patterns of *in vitro* cultured shoot tips as influenced by different light/dark regimes. *Acta Hortic.* 289 : 137-138.
- Morini, S., R. Muleo, R. Sciutti and P. Fortuna (1993) Relationship between evolution of CO₂ and growth of plum shoot tips cultured *in vitro* under different light/dark regimes. *Physiol. Plant.* 87 : 286-290.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15 : 473-497.
- Nitsch, J. P. and C. Nitsch (1965) Néof ormation de fleurs *in vitro* chez une espèce de jours courts : *Planta-go indica* L. *Ann. Physiol. Vég.* 6 : 333-345.
- 小笠原宣好・位田晴久・浅平端(1989)組織培養における間欠照明がカラジウム幼植物の生長に及ぼす影響. 園学雑誌58別2 : 518-519.
- 小笠原宣好・菊地学・高樹英明(1992)種々の換気条件の培養器において間欠照明がペチュニア小植物体の生育に及ぼす影響. 園学雑誌61別1 : 486-487.
- Righetti, 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.
- 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.
- Powles, S. B., K. S. R. Chapman and C. B. Osmond (1980) Photoinhibition of intact attached leaves of C₄ plants : dependence on CO₂ and O₂ partial pressures. *Aust. J. Plant Physiol.* 7 : 737-747.
- Powles, S. B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35 : 15-44.