

# 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

古在豊樹・富士原和宏・渡部一郎  
(千葉大学園芸学部園芸環境工学研究室)

Fundamental Studies on Environments in Plant Tissue Culture Vessels  
(2) Effects of Stoppers and Vessels on Gas Exchange Rates between  
Inside and Outside of Vessels Closed with Stoppers

Toyoki KOZAI, Kazuhiro FUJIWARA and Ichiro WATANABE

(Faculty of Horticulture, Chiba University,  
Matsudo, Chiba 271)

### 1. 序 論

近年、植物組織培養に関する研究が盛んに行われるようになってきたが、環境調節学的観点からの植物組織培養器内環境の計測や解析等について述べている報告は少ないようである。そこで、筆者らは、植物組織培養器内環境の計測と制御に関する一連の基礎的研究を環境調節学的観点から行うことにした。

前報では、液体培地の培地組成から、その液体培地の水ポテンシャルを容易に得るための表および式の提示を行った。

本報告では、(2)として閉栓容器内のガス環境に関して述べる。

ここで、閉栓容器 (A vessel closed with a stopper) とは、容器 (Vessel) に栓 (Stopper) をしたものをさす。

一般に、培養器という用語は栓の有無に拘わらず用いられているため、ここでは以後、培養器という用語は用いず、容器または閉栓容器という用語を用いることにする。

閉栓容器内のガス環境、すなわち、ガス組成またはガス濃度およびその時間的・空間的分布またはガスの流動状態等が、培養植物の生長に重要な影響を及ぼすことは容易に予想される。実際、培養植物の生育に、閉栓容器内のエチレンガス濃度 (Rijven, 1974; Tisserat & Murashige, 1977) や炭酸ガス濃度 (Rijven, 1974),

または相対湿度 (Grout & Aston, 1977; Wardle *et al.*, 1983; Ziv *et al.*, 1983) が影響を及ぼすことを述べた報告がある。

閉栓容器内のガス環境は、培養植物または培地のガスの放出・吸収速度、培養植物の生育ステージおよび閉栓容器外のそのガスの濃度だけでなく、その閉栓容器の換気回数にも大きく影響される。閉栓容器内のガス環境の解析には、これらの相互の関係の解明が必要であり、その解明のためには、まず栓および容器の種類がその閉栓容器内の換気回数に及ぼす影響を解析的かつ定量的に調べる必要がある。ここでいう種類とは、その材質および形状の両方を含めたものをさしている。

栓および容器の種類がその閉栓容器内のガス環境に及ぼす影響に関する報告としては、栓の種類が異なればその閉栓容器の換気量も異なるであろうと述べた Hakkaart & Versluis (1983) の報告、水分は通さないが他のガスは通すポリプロピレン栓を用いると培養植物のシュート数および長さに関して、炭酸ガスを閉栓容器内に与えたのと同様の効果が得られることを述べた Campbell & Tomes (1984) の報告、および閉栓容器内容積が大きくなると分芽増殖が促進されることを述べた Monette (1983) の報告等がある。また、ランを培養中の閉栓容器内の炭酸ガス濃度を測定した (安藤, 1978) 報告、ランの培養に用いられる栓の通気性を調査した (安藤, 1979) 報告もある。しかし、閉栓容器内のガス環境の成立機構を体系的に解明することを試みた報告は見当たらないようである。

そこで、本報告では、まず、栓および容器が閉栓容器

内のガス環境に及ぼす影響を調べる上での基礎データとなる、栓と容器の組合せが異なる閉栓容器の、換気回数 (Number of air changes per hour), および後述するガス交換係数 (Coefficient of gas exchange) の算定法を示した。次いで、本算定法に基づいて、炭酸ガスに関する上述の両値を実験的に求めた。炭酸ガスは、植物の光独立栄養期において、培養植物の生長に特に重要な影響を及ぼす。

炭酸ガスをトレーサガスとして求めた換気回数およびガス交換係数を、それぞれ炭酸ガス換気回数 (Number of gas changes per hour estimated by using carbon dioxide gas as tracer gas) および炭酸ガス交換係数 (Coefficient of carbon dioxide gas exchange) と呼ぶことにする。

## 2. 実験材料および方法

### 2.1 実験材料

供試した栓および容器を表す記号を Table 1 に示す。また、供試した栓の概形を Fig.1 に、供試した容器の諸元を Table 2 に、それぞれ示す。

アルミニウムフォイルキャップには、東海金属(株)製

Table 1. Symbols of stoppers and vessels used.

	Type	Symbol
Stopper	Aluminium foil cap	$C_A$
	Plastic formed cap	$C_P$
	Silicon foam rubber plug	$P_S$
Vessel	Glass flat bottom test tube	$T_G$ 35
	Glass round bottom test tube	$T_G$ 45
	Glass flat bottom test tube	$T_G$ 55
	Glass Erlenmeyer flask	$F_G$ 68
		$F_G$ 132
	$F_G$ 249	

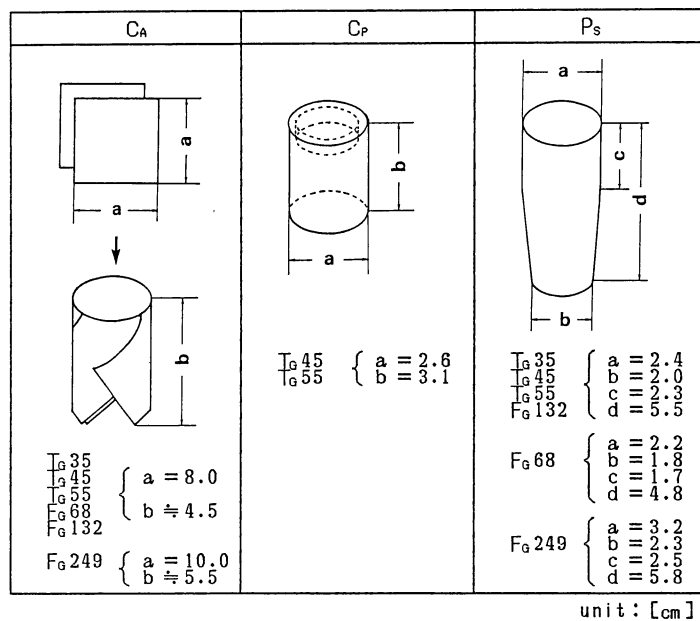


Fig. 1. Schematic diagram of the stoppers used.

Table 2. Dimensions of the vessels used.

Vessel	Inside Volume [cm <sup>3</sup> ]	Lip inside diameter [cm]	Lip inside circumference [cm]	Lip inside area [cm <sup>2</sup> ]
$T_G$ 35	34.90	2.090	6.57	3.43
$T_G$ 45	45.02	2.185	6.86	3.75
$T_G$ 55	54.50	2.120	6.66	3.53
$F_G$ 68	67.79	1.890	5.94	2.81
$F_G$ 132	132.31	2.085	6.55	3.41
$F_G$ 249	248.50	2.760	8.67	5.98

アルミニウム箔(厚さ: 15  $\mu\text{m}$ )を一辺 8.0 cm の正方形に切って2枚重ねにしたものを用いた。プラスチックキャップには、松本医科器械(株)製Mキャップ(内径: 2.5 cm)を、発泡シリコンゴムプラグには、信越化学(株)製シリコ栓 T22 (上径: 2.2 cm), T24 (上径: 2.4 cm) および T32 (上径: 3.2 cm)を、それぞれ用いた。また、試験管には、前田硝子(株)製平底試験管(外径: 2.4 cm, 長さ: 9.5 cm), 三恵理化学機(株)製丸底試験管(外径: 2.5 cm, 長さ: 12.0 cm)および同社製平底試験管(外径: 2.5 cm, 長さ: 15.0 cm)を用いた。三角フラスコには、柴田科学器械工業(株)製三角フラスコ(容量: 50 ml, 100 ml および 200 ml)を用いた。

本実験に供試した栓および容器は全て、植物組織培養において広く用いられているものである。

閉栓容器内の炭酸ガス濃度測定には、ガスクロマトグラフ(島津製作所(株)製GC-9A)にデータ処理装置(同社製C-R3A)を接続したものを用いた。ガスクロマトグラフのカラムにはステンレス製カラム(内径: 3 mm, 長さ: 2 m)に担体ポラパックQ(メッシュ: 80/100)を充填したものを、キャリアガスにはヘリウムガスを、そして検出器には熱伝導度検出器(Thermal conductivity detector)を、それぞれ用いた。カラム槽温度は50°C, キャリアガスの流量は50 ml/min, 検出器におけるブリッジ電流および温度は、それぞれ100 mA および 110°C であった。

閉栓容器内のガスの採取およびガスクロマトグラフへの採取ガスの注入には、ガスタイトシリンジ(伊藤製作所(株)製MS-GAN050)を用いた。また、ガスの1回の採取量は、0.25  $\text{cm}^3$  であった。

なお、本実験においては、閉栓容器内は空であり、培地や培養植物等は入れられていなかった。

## 2.2 実験方法

閉栓容器の炭酸ガス換気回数は、閉栓容器内の炭酸ガス濃度の経時変化を測定して求めた。栓と容器の組み合わせの異なる各閉栓容器内の炭酸ガス濃度の経時変化は、それぞれの組み合わせについて1回ずつ測定した。

閉栓容器内の炭酸ガス濃度変化は、閉栓容器内空気を高濃度の炭酸ガスで置換した後、気温を25°Cに保ったグロースチャンバー内に立てて静置し、測定開始から0, 2, 6 および 12 時間後の閉栓容器内炭酸ガス濃度を前述のガスクロマトグラフで測定して得た。閉栓容器内空気を高濃度の炭酸ガスで置換したのは、閉栓容器外の炭酸ガス濃度の変動が、閉栓容器内の炭酸ガス濃度変化へ及ぼす影響をできるだけ小さくするためである。

閉栓容器の炭酸ガス換気回数の算定には、プラスチックキャップをもつ閉栓容器においては、その閉栓容器内

炭酸ガス濃度の減少速度が大きいいため、測定開始後0および2時間後における炭酸ガス濃度を用いて算定し、その他の栓を有するものにおいては、測定開始後0および6時間後における炭酸ガス濃度を用いて算定した。

また、炭酸ガス交換係数は、この炭酸ガス換気回数を用いて、後述する算定式により算出した。

同種類の栓をもつ閉栓容器の閉栓に際しては、栓と容器口部の接触状態ができるだけ等しくなるよう注意した。アルミニウムフویلキャップは、Fig.1に示したような形状になるように栓をし、また、発泡シリコンゴムプラグは、その上部が容器口部から2 cm だけ容器外に残るように栓をした。

また、グロースチャンバー内では、水平方向に常時、約0.4~0.6 m/sec で空気が流動していたので、この風が直接、閉栓容器に当たらないように、閉栓容器の風上側に約5 cmの所に、幅約80 cm, 高さ約40 cmの防風板を置いた。

なお、本報告で用いる濃度とは、単位空気体積中に含まれる対象ガスの体積をその単位空気体積で除したものをさす。また、大気中および植物培養中の閉栓容器内における炭酸ガス濃度はともに低いので、その濃度を、 $1/10^6$  のオーダー、すなわち[vpm] (Volumetric parts per million)の単位で示すことにした。

## 3. ガス交換係数の算定

### 3.1 閉栓容器内におけるガス蓄積の一般式

想定される閉栓容器の内外において、気温および気圧がそれぞれ一定でかつ等しく、更にガスが十分に拡散されている状態では、その閉栓容器内におけるあるガスの濃度経時変化に関して、次式が成り立つ。

$$V dK = M dt + E \cdot V \cdot (K_{ou} - K) dt \quad (1)$$

ここで、 $K$ : 時刻  $t$  における閉栓容器内ガス濃度 [ $\text{cm}^3 / \text{cm}^3$ ],  $K_{ou}$ : 閉栓容器外ガス濃度 [ $\text{cm}^3 / \text{cm}^3$ ],  $t$ : 時刻 [hr],  $M$ : 閉栓容器内でのガス発生速度 [ $\text{cm}^3 / \text{hr}$ ],  $E$ : 閉栓容器の換気回数 [1/hr],  $V$ : 閉栓容器内容積 [ $\text{cm}^3$ ], である。換気回数とは、単位時間、構造物内容積当りの、構造物内外間でのトータルの空気交換量をさし、その構造物内の各ガスの濃度の経時変化や定常値に直接関係する値である。

この(1)式の辺々を  $V dt$  で除すと、

$$\frac{dK}{dt} = \frac{M}{V} + E \cdot (K_{ou} - K)$$

さらに、辺々を時刻  $t$  に関して積分すると、次に示すガス蓄積の一般式(佐藤, 1964)が得られる。

$$K = K_{ou} + \frac{M}{V \cdot E} \{1 - \exp(-E \cdot T)\} + (K_0 - K_{ou}) \cdot \exp(-E \cdot T) \quad (2)$$

ここで、 $K_0$ ：時刻0における閉栓容器内ガス濃度 [ $\text{cm}^3/\text{cm}^3$ ]、 $T$ ：時刻0から時刻  $t$  までの時間 [hr]、である。

本実験では、閉栓容器内におけるガス発生はないので、(2)式において  $M=0$  となる。この場合、(2)式は次式のように簡略化される。

$$K = K_{ou} + (K_0 - K_{ou}) \cdot \exp(-E \cdot T) \quad (2')$$

また、この場合、 $E$ は(2')式より、

$$E = -\frac{1}{T} \cdot \ln \frac{K - K_{ou}}{K_0 - K_{ou}} \quad (3)$$

となる。

### 3.2 ガス交換係数の算定

栓自身に通気性のない栓をもつ閉栓容器の内外間における、単位時間、閉栓容器内外間の単位ガス濃度差および容器の単位口内周長当りの、あるガスのトータルの交換量を線ガス交換係数 (Coefficient of line gas exchange) [ $\text{cm}^3/\text{cm}/\text{hr}/(\text{cm}^3/\text{cm}^3)$ ] と呼び、また、栓自身に通気性のある栓をもつ閉栓容器の内外間における、単位時間、閉栓容器内外の単位ガス濃度差および容器の単位口内面積当りの、あるガスのトータルの交換量を、面ガス交換係数 (Coefficient of area gas exchange) [ $\text{cm}^3/\text{cm}^2/\text{hr}/(\text{cm}^3/\text{cm}^3)$ ] と呼ぶことにする。前者を記号  $q_c$  で、後者を記号  $q_a$  で表し、この両係数をガス交換係数と呼ぶことにする。また、閉栓容器内外間における、単位時間当りのあるガスのトータルの交換量を、そのガスについてのガス交換速度 [ $\text{cm}^3/\text{hr}$ ] と呼び、記号  $Q_g$  で表すことにする。

ガス交換速度  $Q_g$ 、線ガス交換係数  $q_c$  および面ガス交換係数  $q_a$  は、以下に示すようにして導出した。

上述のガス蓄積の一般式導出の際に設定した条件下にある閉栓容器内において、ガス発生がないとき、その閉栓容器内のあるガスの濃度  $K$  の経時変化は(2')式で与えられる。このとき、 $K$  の変化速度  $dK/dt$  は、

$$\frac{dK}{dt} = -(K_0 - K_{ou}) \cdot E \cdot \exp(-E \cdot T) \quad (4)$$

であるから、(2')式と(4)式より、

$$\begin{aligned} \frac{dK}{dt} &= -(K_0 - K_{ou}) \cdot E \cdot \frac{K - K_{ou}}{K_0 - K_{ou}} \\ &= E \cdot (K_{ou} - K) \end{aligned}$$

となる。

ガス交換速度  $Q_g$  は、この時刻  $t$  における  $K$  の変化速度  $dK/dt$  に閉栓容器内容積  $V$  を乗じれば得られるから、

$$\begin{aligned} Q_g &= V \cdot \frac{dK}{dt} \\ \therefore Q_g &= V \cdot E \cdot (K_{ou} - K) \end{aligned} \quad (5)$$

となる。

$Q_g$  の値が正であれば  $K$  は増加している状態にあり、

負であれば  $K$  は減少している状態にあることになる。

線ガス交換係数  $q_c$  および面ガス交換係数  $q_a$  は、ガス交換速度  $Q_g$  を用いて次式のように与えられる。

$$q_c = \frac{Q_g}{C \cdot (K_{ou} - K)} \quad (6)$$

$$q_a = \frac{Q_g}{A \cdot (K_{ou} - K)} \quad (7)$$

ここで、 $C$ ：容器の口内周長 [cm]、 $A$ ：容器の口内面積 [ $\text{cm}^2$ ] である。

従って、(6)式および(7)式にそれぞれ(5)式を代入すると、線ガス交換係数  $q_c$  および面ガス交換係数  $q_a$  の算定式が得られる。

$$q_c = \frac{V \cdot E}{C} \quad (8)$$

$$q_a = \frac{V \cdot E}{A} \quad (9)$$

(8)、(9)式において、 $V$ 、 $C$  および  $A$  は定数であるから、 $E$  が分れば  $q_c$  と  $q_a$  が求まることになる。

本実験で得られた、線ガス交換係数および面ガス交換係数の値は、トレーサーガスとして炭酸ガスを用いて得られたものであるので、それぞれ、線炭酸ガス交換係数 (Coefficient of line carbon dioxide gas exchange) および面炭酸ガス交換係数 (Coefficient of area carbon dioxide gas exchange) と呼び、記号  $q_{cc}$  および  $q_{ac}$  で表すことにする。

炭酸ガス濃度は [vpm] の単位で示すことにしたので、線炭酸ガス交換係数  $q_{cc}$  および面炭酸ガス交換係数  $q_{ac}$  の単位は、それぞれ [ $\mu \text{cm}^3/\text{cm}/\text{hr}/\text{vpm}$ ] および [ $\mu \text{cm}^3/\text{cm}^2/\text{hr}/\text{vpm}$ ] となる。

なお、同じ容器をもつ閉栓容器でも、栓の種類、特にキャップ式かプラグ式かにより閉栓容器内容積は異なるが、便宜上、炭酸ガス換気回数および炭酸ガス交換係数の算定においては閉栓容器内容積はその閉栓容器のもつ容器の容器内容積に等しいとした。

## 4. 実験結果

栓と容器の組合せが異なる閉栓容器の炭酸ガス換気回数を Table 3 に示す。炭酸ガス換気回数は同一の容器をもつ閉栓容器においては、 $C_P$ 、 $P_S$ 、 $C_A$  の順に少なくなり、また、同一の栓をもつ閉栓容器においては、その閉栓容器内容積が大きくなるにつれて少なくなった。

栓および容器の相違が閉栓容器内外間の炭酸ガスの交換速度にどの程度影響するのかを示す例として、栓と容器の組合せが異なる閉栓容器内の炭酸ガス濃度の減少の様子を Fig. 2 および Fig. 3 に示す。Fig. 2 には、 $T_G$  55 に、それぞれ  $C_A$ 、 $C_P$  および  $P_S$  で栓をした場合の炭酸

Table 3. Number of gas changes per hour for six types of vessels closed with three kinds of stoppers. These values were obtained by using carbon dioxide gas as tracer gas. Meanings of the symbols  $C_A$ ,  $C_P$  and  $P_S$  are given in Table 1.

Vessel	Stopper		
	$C_A$	$C_P$	$P_S$
$T_G$ 35	0.201	—	0.689
$T_G$ 45	0.177	1.495	0.593
$T_G$ 55	0.117	1.371	0.452
$F_G$ 68	0.145	—	0.268
$F_G$ 132	0.075	—	0.143
$F_G$ 249	0.042	—	0.130

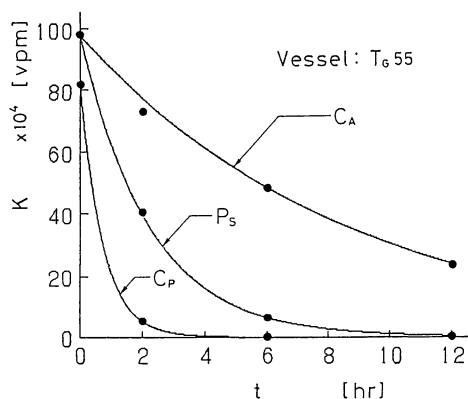


Fig. 2. Changes with passage of time ( $t$ ) in carbon dioxide gas concentration ( $K$ ) in the vessels  $T_G$  55 closed with one of the stoppers  $C_A$ ,  $C_P$  and  $P_S$ .

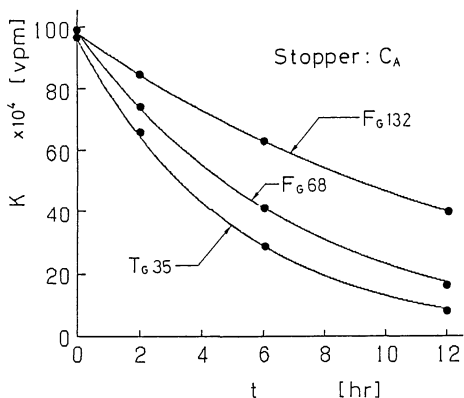


Fig. 3. Changes with passage of time ( $t$ ) in carbon dioxide gas concentration ( $K$ ) in the vessels  $T_G$  35,  $F_G$  68 and  $F_G$  132 closed with the stopper  $C_A$ .

ガス濃度の経時変化を, Fig.3 には,  $T_G$  35,  $F_G$  68 および  $F_G$  132 に, それぞれ  $C_A$  で栓をした場合の炭酸ガス濃度の経時変化を示す。図中の黒丸は測定値を示し, 曲線は(3)式で算定された炭酸ガス換気回数  $E$  を, (2')式に代入して求めたものである。

Fig.2 および Fig.3 より, 栓および容器が異なると, その閉栓容器内の炭酸ガス濃度の減少の様子は大きく異なることがわかる。

次に, 栓および容器がそれぞれ異なる閉栓容器の炭酸ガス交換係数を Table 4 に示す。栓自身に通気性のないアルミニウムフویلキャップおよびプラスチックキャップをもつ閉栓容器には線炭酸ガス交換係数を, 栓自身に通気性のある発泡シリコンゴムプラグをもつ閉栓容器には面炭酸ガス交換係数を, それぞれ示した。

Table 4. Coefficients of carbon dioxide gas exchange for six types of vessels closed with three kinds of stoppers. Meanings of the symbols  $C_A$ ,  $C_P$  and  $P_S$  are given in Table 1. The symbols  $q_{cc}$  and  $q_{ac}$  denote coefficient of line carbon dioxide gas exchange and coefficient of area carbon dioxide gas exchange, respectively.

Vessel	Stopper		
	$C_A$ $q_{cc}$ [ $\mu$ cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> /hr /vpm]	$C_P$ $q_{cc}$ [ $\mu$ cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> /hr /vpm]	$P_S$ $q_{ac}$ [ $\mu$ cm <sup>3</sup> /cm <sup>2</sup> /hr /vpm]
$T_G$ 35	1.07	—	7.01
$T_G$ 45	1.16	9.87	7.11
$T_G$ 55	0.96	11.25	6.98
$F_G$ 68	1.66	—	6.48
$F_G$ 132	1.51	—	5.54
$F_G$ 249	1.20	—	5.42

炭酸ガス交換係数は, 閉栓容器が栓自身に通気性のない栓 ( $C_A$  と  $C_P$ ) をもつ場合には, その栓の種類および容器の口内周長により決まり, また, 閉栓容器が栓自身に通気性のある栓 ( $P_S$ ) をもつ場合には, その栓の種類および容器の口内面積により決まり, 閉栓容器内容積によらないことがわかった。

## 5. 考 察

### 5.1 換気回数

本報告では, 炭酸ガスをトレーサーガスとして用いて求めた換気回数を, 炭酸ガス換気回数と呼んでいる。はじめに, その理由について述べる。

従来, 換気回数は, あるガスをトレーサーガスとして, 数分から数十分程度の時間間隔をおいて測定対象構造物内外のトレーサーガス濃度を測定し, そのトレーサーガ

ス濃度測定値とトレーサーガス濃度測定の時間間隔を、Seidelの式に代入することにより求められている(例えば、渡辺, 1976)。つまり、この方法では、どのガスをトレーサーガスとして用いても、得られる換気回数の値は等しくなると考えているのである。

しかし、そのようなことが成立するのは、構造物内外間のガス通過空間がガス分子の集団である空気の塊の移動を妨げないだけの十分な大きさをもち、かつガス分子の拡散エネルギーよりもはるかに大きなオーダーのエネルギーにより、そのガス分子の集団である空気の塊がそのガス通過空間を通して交換されて、その構造物の換気量が決定されるような場合である。

ところが、植物組織培養において一般に用いられている閉栓容器にはそのような大きなガス通過空間はなく、また、培養室の状態を考えると、温度差換気や風力換気等を生じさせるような、ガス分子の拡散エネルギーよりもはるかに大きなオーダーをもつエネルギーにより、ガス交換が促されているとは思われない。

このような考えから、閉栓容器のような構造物については、あるガスをトレーサーガスとして得られる換気回数は、他のガスをトレーサーガスとして得られる換気回数とは等しくないであろうと考えた。

実際、予備実験において、炭酸ガス、メタンガス、エタンガスおよび水蒸気を、それぞれトレーサーガスとして同一の閉栓容器の換気回数を測定したところ、用いたトレーサーガスにより換気回数の値が異なっているという結果が得られた。

以上のようなことから、測定に用いたトレーサーガスの名称を換気回数の前に与え、用いたトレーサーガスにより、換気回数を区別することにしたのである。

また、本実験では、閉栓容器内の空気を高濃度のトレーサーガスで置換して測定しており、この場合、測定開始後数十分以内におけるトレーサーガス濃度変化から求めた換気回数と、測定開始後数時間以上経過してから求めた換気回数とは、厳密には異なるであろう。しかし、実際には、本実験結果のFig. 2およびFig. 3よりわかるように、算定した換気回数を(2')式に代入して求めた閉栓容器内炭酸ガス濃度減少曲線は、測定値に良く近似している。よって、そのようなことが原因となって、本実験方法および算定法に従い算定した換気回数の精度が実用上問題になることはないと考えられる。

続いて、栓および容器が閉栓容器の炭酸ガス換気回数および炭酸ガス交換係数に及ぼす影響について考察する。

前述のガス蓄積の一般式導出の際に設定した条件下においては、その閉栓容器の換気回数は、栓の種類、閉栓

容器内容積、容器の口内周長または口内面積、および栓と容器口部の接触状態により決まる。具体的には、栓の種類、容器の口内周長または口内面積、および栓と容器口部の接触状態が、その閉栓容器における換気量を決定する。そして、その換気量を閉栓容器内容積で除すと換気回数を得られることになる。よって、ガス蓄積の一般式導出の際に設定した条件が成立し、それぞれの閉栓容器における容器の口内周長または口内面積、および栓と容器口部の接触状態が等しければ、換気回数は栓の種類と閉栓容器内容積によって決まることになる。この場合、同種類の栓をもつ閉栓容器の換気回数は閉栓容器内容積に反比例することになる。

Table 3より、それぞれの栓をもつ閉栓容器の炭酸ガス換気回数は、閉栓容器のもつ容器の容積におよそ反比例する傾向を示していたことがわかる。これは、本実験で供試した各容器の口内周長または口内面積が、 $F_G 249$ を除いて互いに近似しており、また、実験に際してはそれぞれの閉栓容器の、栓と容器口部の接触状態ができるだけ等しくなるように、その組合せの決定および閉栓に注意を払ったことによると考える。

$C_A$ をもつ閉栓容器において、 $F_G 68$ をもつ閉栓容器の値が $T_G 55$ をもつ閉栓容器の値より大きくなっているのと、それらの炭酸ガス換気回数と容器の容積との関係が反比例から多少ずれているのは、各容器の口部形状が多少異なるために、 $C_A$ と各容器口部の接触状態にばらつきが生じたためである。

また、 $P_S$ をもつ閉栓容器において、その炭酸ガス換気回数と容器の容積との関係が反比例からずれているのは、容器内に挿入された $P_S$ の体積の、閉栓容器内容積に占める割合が、その閉栓容器内容積の小さいものほど大きくなり、その分だけ炭酸ガス換気回数算定において閉栓容器内容積が過大評価されたためである。

## 5.2 ガス交換係数

線ガス交換係数 $q_c$ および面ガス交換係数 $q_a$ は、(8)式および(9)式からわかるように、閉栓容器内容積 $V$ に換気回数 $E$ を乗じたもの、すなわち換気量を、容器の口内周長 $C$ または口内面積 $A$ で除すことにより得られる。換気量は、栓の種類、容器の口内周長または容器の口内面積、および栓と容器口部の接触状態により決定されるので、それらが同一であれば、ガス交換係数は閉栓容器内容積によらず一定の値をとることになる。

Table 4において、それぞれの栓をもつ閉栓容器における炭酸ガス交換係数の値が一定とならないのは、炭酸ガス換気回数と容器の容積とが正確に反比例しないことの原因と、同様の原因によるものである。この原因が取り除かれれば、栓がそれぞれ、 $C_A$ 、 $C_P$ および $P_S$ の閉

栓容器の炭酸ガス交換係数の値は、閉栓容器内容積によらず、およそ  $1.1 [\mu \text{ cm}^3 / \text{cm} / \text{hr} / \text{vpm}]$ ,  $10.0 [\mu \text{ cm}^3 / \text{cm} / \text{hr} / \text{vpm}]$  および  $5.3 [\mu \text{ cm}^3 / \text{cm}^2 / \text{hr} / \text{vpm}]$  程度になるであろうと推定される。

Table 3, Fig. 2, Fig. 3 および Table 4 より、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は、換気回数および本報告で定義したガス交換係数をもって評価できることがわかる。また、ガス交換係数は、各種栓の通気性を論じる場合、特に透過ガスに対する選択性を有するフィルター等のそれを論じる場合や、閉栓容器内のあるガスの濃度調節等を行う場合に有用となると考える。

なお、本実験方法を用いれば、その実験系の温度範囲において相変化を行わないガスについては、そのガスをトレーサーガスとした場合の換気回数やガス交換係数もまた同様に求めることができる。

また、ここで示したガス交換速度およびガス交換係数の算定方法は、閉栓容器内に、培地や培養植物が存在する場合においても、閉栓容器内容積を、閉栓容器内の培地や培養植物の容積を閉栓容器内容積から差し引いたところの閉栓容器内空気容積に置き換えることにより、適用できる。

## 6. 閉栓容器内ガス環境に関する今後の課題

本報告においては、閉栓容器内外における気温および気圧はそれぞれ一定でかつ等しく、更にガスが十分に拡散されているという条件の下で解析および考察を行った。通常の植物組織培養条件下においては、上述の仮定はほぼ近似的に成り立つと考えられるので、本報告での解析および考察が適用できると考える。しかし、特殊な培養条件下における閉栓容器内のガス環境に対しては、より一般的な解析および考察が必要となるであろう。

炭酸ガス以外で、植物組織培養中の閉栓容器内に存在し、培養植物の生長に重要な影響を及ぼすガスとしては、酸素ガス、エチレンガス、水蒸気等がある。これらのガスをトレーサーガスとした場合の、種々の閉栓容器の換気回数およびガス交換係数もまた求める必要がある。

特に、水蒸気をトレーサーガスとして得られる換気回数、すなわち水蒸気換気回数は、閉栓容器内からの水蒸気の放出速度や閉栓容器内空気湿度、更には、培地からの水の蒸発速度とも密接な関係にある。また、培地からの水の蒸発速度は、培地の水ポテンシャルの経時変化速度に直接影響を及ぼす。つまり、水蒸気換気回数は、前報(古在ら、1986)で扱った、培地の水ポテンシャルに直接関係するものであり、炭酸ガス換気回数と同様、培養植物の生育に特に重要な影響を及ぼすものである。

Monette (1983)は、内容積の異なる閉栓容器で培養した植物の分芽増殖に相違が現われたことを示し、そしてその原因は、閉栓容器の内容積の相違によりガスの流動パターンが異なっていたためであろうと述べている。閉栓容器内のガスの流動状態は、その閉栓容器内のガスの輸送、拡散に直接影響を及ぼすものであり、またそれは閉栓容器内容積と関係があることは十分に予想されるので、閉栓容器内容積とガスの流動状態との関係もまた調べる必要がある。

また、上記の課題に加えて、種々の植物組織培養中の閉栓容器内の、培養植物の各生育ステージにおける種々のガスの濃度経時変化を調べることは、植物組織培養中の閉栓容器内のガス環境の解析または調節等を行う上で必要不可欠なものである。そのような測定データの蓄積もまた急務である。更に、それらの測定値を基礎データとしての、種々の植物組織培養中の閉栓容器内の種々のガスの濃度経時変化シミュレーションモデルの作成等も、そのガス環境を解析する上で有用となると思われる。

## 7. 結 論

本報告では、まず、栓および容器が閉栓容器内のガス環境に及ぼす影響を調べる上での基礎データとなる、閉栓容器の換気回数、およびその内外間におけるあるガスのガス交換速度を求めるための、ガス交換係数の算定法を示した。次に、炭酸ガスをトレーサーガスとして測定したそれらの値、すなわち炭酸ガス換気回数および炭酸ガス交換係数を算定し、栓および容器がそれらの値に及ぼす影響について考察した。そして最後に、閉栓容器のガス環境に関する今後の課題について述べた。

本実験により、次のような結果が得られた。

- 1) 培養植物の生長に重要な影響を及ぼす閉栓容器内外間におけるガス交換速度は、その閉栓容器の栓および容器の種類により大きく異なることが明らかとなった。
- 2) 同一の容器に異なる種類の栓をした場合、炭酸ガス換気回数は、プラスチックキャップをもつ閉栓容器、発泡シリコンゴムプラグをもつ閉栓容器、アルミニウムフイルキャップをもつ閉栓容器、の順に小さくなった。
- 3) 口径径がほぼ等しく内容積の異なる容器に同種類の栓をした場合、炭酸ガス換気回数は閉栓容器内容積にはほぼ反比例した。
- 4) 同一の容器に異なる種類の栓をした場合、炭酸ガス交換速度は、プラスチックキャップをもつ閉栓容器、発泡シリコンゴムプラグをもつ閉栓容器、アルミニウムフイルキャップをもつ閉栓容器、の順に小さくなった。
- 5) 炭酸ガス交換係数は、その閉栓容器が同種類の栓

をもち、かつ栓自身に通気性のない(アルミニウムフイルキャップ、プラスチックキャップ)場合には容器の口内周長が、また、栓自身に通気性のある(発泡シリコンゴムプラグ)場合には容器の口内面積が等しければ、閉栓容器内容積によらずほぼ等しい値となった。

6) 栓および容器が閉栓容器内外間のガス交換に及ぼす影響は、換気回数およびガス交換係数をもって評価できる。

本研究で、定義したガス交換係数は、あるガスについての栓の通気性等を論じる場合や、閉栓容器内のあるガスの濃度調節等を行う場合に有用なものとなる。

また、本実験方法を用いれば種々の栓および容器をもつ閉栓容器における、任意のガスの換気回数およびガス交換係数を求めることができる。

今後は、炭酸ガスのみならず、培養植物の生長に重要な影響を及ぼす種々のガスをトレーサーガスとして、換気回数ならびにガス交換係数を求めるとともに、植物組織培養中の閉栓容器内の種々のガスの濃度経時変化を測定し、それらのガスの濃度経時変化シミュレーションモデルの作成等も行い、閉栓容器内のガス環境の解析を進める予定である。

謝 辞

容器を提供して下さった、千葉大学園芸学部花卉園芸学研究室の上田義弘助手、ならびに予備実験に当り御協力を頂いた、遠藤篤、洞田浩文両氏に深甚の謝意を表します。

引用文献

安藤敏夫, 1978: 培養容器内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58秋, 368-369.  
 安藤敏夫, 1979: 培養容器内のガス環境に関する研究(第2報)各種栓の通気性, 園学要旨, 昭59春, 326-

327.  
 Campbell, C. T. and Tomes, D. T., 1984: Establishment and multiplication of red clover plants by *in vitro* shoot tip culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3, 49-57.  
 Grout, B. W. W. and Aston, M. J., 1977: Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.*, 17, 1-7.  
 Hakkaart, F. A. and Versluijs, J. M. A., 1983: Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. *Neth. J. Pl. Path.*, 89, 47-53.  
 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(1)液体培地における培地組成と水ポテンシャルの関係, 農業気象, 42(1), 1-6.  
 Monette, P. L., 1983: Influence of size of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in a liquid medium. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2, 327-332.  
 Rijiven, A. H. G. C., 1974: Ethylene and carbon dioxide in the growth regulation of isolated cotyledons of fenugreek (*Torigonella foenum graecum* L.) in darkness. *Plant Sci. Lett.*, 2, 55-61.  
 佐藤 鑑, 1964: 建築学大系 22 室内環境計画(建築学大系編集委員会編), 彰国社, 399-401.  
 Tisserat, B. and Murashige, T., 1977: Effect of ethephon, ethylene, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis *in vitro*. *Plant Physiol.*, 60, 437-439.  
 Wardle, K., Dobbs, E. B. and Short, K. C., 1983: *In vitro* Acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108(3), 386-389.  
 渡辺 要, 1976: 建築計画原論Ⅲ, 丸善, 235-237.  
 Ziv, M., Meir, G. and Halevy, A. H., 1983: Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 2, 55-65.

Summary

The growth and development of a plantlet *in vitro* may be affected by the gas environment in a vessel. The gas micro-environment in the vessel may be in turn influenced not only by the generation and absorption of gas by the plantlet and the culture medium, but also by the gas exchange between the room air and the air in the vessel. The gas exchange rate between the room air and the inside air may be varied with the combination of a vessel and its stopper.

This paper describes a method for estimating the number of air changes per hour and the coefficient of gas exchange for various vessels closed with various stoppers. The measured values are also given for various vessels closed with various stoppers.

In the measurement, carbon dioxide gas was used as tracer gas. The gas concentration inside and outside the vessel was measured by using a gas chromatograph at a certain time interval.



Three kinds of stoppers were tested. Namely, aluminium foil cap  $C_A$ , plastic formed cap  $C_P$ , and silicon foam rubber plug  $P_S$ . Six kinds of vessels were tested. Three of them were glass test tubes and the rest were glass Erlenmeyer flasks (see Tables 1, 2 and Fig. 1).

The number of gas changes per hour estimated by using carbon dioxide gas as tracer gas,  $E_c$ , was estimated by the following equation:

$$E_c = -\frac{1}{T} \cdot \ln \frac{K - K_{ou}}{K_0 - K_{ou}}$$

where  $T$  is the time interval from time 0 to time  $t$ ,  $K$  the gas concentration at time  $t$ ,  $K_0$  the gas concentration at time 0,  $K_{ou}$  the gas concentration outside the vessel.

The coefficient of line carbon dioxide gas exchange,  $q_{cc}$ , and the coefficient of area carbon dioxide gas exchange,  $q_{ac}$  were, respectively, estimated by the following equations:

$$q_{cc} = \frac{V \cdot E_c}{C} \quad , \quad q_{ac} = \frac{V \cdot E_c}{A}$$

where  $V$  is the inside air volume of the vessel,  $C$  the inside circumference of the vessel, and  $A$  the inside area at the lip.

$q_{cc}$  is used for the vessel closed with the stopper with no gas permeability, such as aluminium foil cap and plastic formed cap.  $q_{ac}$  is used for the vessel closed with the stopper with a certain degree of gas permeability, such as silicon foam rubber plug.

The number of gas changes per hour estimated by using carbon dioxide gas as tracer gas,  $E_c$ , for various vessels closed with various stoppers is shown in Table 3. The variations of  $E_c$  for different vessel-stopper combinations were considerable. As for the vessels closed with the same material of stopper,  $E_c$  was inversely proportional to the inside air volume of the vessel. As for the same vessel closed with different caps,  $E_c$  was the largest for  $C_P$ , and the smallest for  $C_A$ .

The coefficients of carbon dioxide gas exchange for various vessels closed with various stoppers,  $q_{cc}$  and  $q_{ac}$ , are given in Table 4.  $q_{cc}$  and  $q_{ac}$  showed a rather constant value for different vessels closed with the same stopper, regardless of the large variations of the inside air volume of the vessels.  $q_{cc}$  of  $C_P$  was about 10 times larger than that of  $C_A$  for the same vessel.

It is shown that the number of gas changes per hour and the gas exchange rate between the room air and the inside air are considerably affected by the vessel-stopper combination. Therefore, the concentration of a gas, and hence the growth and development of a plantlet *in vitro* may be affected by the vessel-stopper combination.

The method proposed in this paper may be applied to any gas such as ethylene gas, water vapor, oxygen gas etc., in principle, if the corresponding gas is used as tracer gas.