

バレイシヨ培養体のCO₂交換量の時間変化 に及ぼす培地シヨ糖濃度の影響

富士原和宏・吉良修司・古在豊樹

(千葉大学園芸学部)

Time Course of CO₂ Exchange of Potato Cultures In Vitro
with Different Sucrose Concentrations in the Culture Medium

Kazuhiro FUJIWARA, Shuji KIRA and Toyoki KOZAI

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

Short single node cuttings of tissue-cultured potato plantlets (*Solanum tuberosum* L. cv. Benimaru) were placed onto the culture media with three different sucrose concentrations ($5\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (S₅), $15\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (S₁₅) and $25\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (S₂₅)) to follow the time course of CO₂ exchange of potato cultures for 30 days. Moreover, how the CO₂ balance of the cultures changes during the growth and development phases from short single node cuttings (length: 5 mm; dry weight: 1 mg) to plantlets (dry weight: >10 mg) large enough to transfer to *ex vitro* conditions was investigated. The CO₂ exchange was calculated from the time course of the difference (ΔC) between CO₂ concentrations of inflow and outflow air (flow rate: $2.1\text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$) through the culture vessel.

On day 3 ΔC for all sucrose concentrations showed tendencies to decrease by photosynthesis after the beginning of photoperiod. Cyclic changes in ΔC for all sucrose concentrations according to 8 hours-dark/16 hours-photoperiod cycles were clearly observed after day 5. The difference between maximum and minimum ΔC on the same day in each sucrose concentration increased as the day proceeded, and the difference on day 30 was in the order: S₁₅ > S₂₅ > S₅. The CO₂ exchange during photoperiod and daily CO₂ exchange for all sucrose concentrations continuously increased as the day proceeded. The daily CO₂ exchange was found to turn to positive values from negative ones around day 16 for S₅, and day 10 for S₁₅ and S₂₅: the cultures turned into positive CO₂ balances. These results indicate that the cultures have grown and developed dominantly depending on sucrose in the culture medium before the CO₂ balance turned to positive, even having contained chlorophyll and been under appropriate CO₂ ($880 \pm 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ for inflow air) and light ($120\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ during photoperiod) conditions for photosynthesis. The dry weight increase and net production by photosynthesis for 30 days were in the order: S₁₅ > S₂₅ > S₅.

Key words: CO₂ balance, CO₂ concentration, CO₂ exchange, In vitro culture, Sucrose concentration.

キーワード: CO₂ 交換量, CO₂ 収支, CO₂ 濃度, 植物組織培養, シヨ糖濃度

1. はじめに

近年, 銅金ら(1989)および Fujiwara *et al.* (1990) は, 組織培養中の植物体(以後, 培養体)の生育ステージの分類を培養体の炭素収支に基づいて行うことを提案し

た。また, Schripsema *et al.* (1990)は液体培地中の培養細胞の炭素収支を4–5日ごとに40日間調べ, また, De Riek *et al.* (1991)は, 培養体のCarbon flowの概念図を提示した。これらの報告は, 培養体の炭素収支, すなわちCO₂および糖の収支に関する解明の重要性を指摘している。

1991年4月7日 全国大会にて発表

1991年10月29日 受付, 1992年4月7日 受理

培養体の炭素収支の解明は, 培養体の炭素代謝・生育

過程の解明に貢献し得るという点でとくに重要である。また、培養体の炭素収支の解明に関する研究成果が蓄積されれば、培養体の炭素代謝・生育の制御を行うための培養環境調節法が開発され、その結果、植物組織培養を利用した物質生産の効率が向上すると期待される。そして、培養体の炭素代謝・生育過程の解明に寄与し得る、または物質生産効率の向上を可能とする効果的な培養環境調節法の開発に寄与し得る炭素収支データを得るには、長期間あるいはいくつかの生育ステージにわたる連続的な培養器内CO₂濃度測定が不可欠である。

富士原ら(1987)は、光合成を行っている培養体を含む培養器内のCO₂濃度は、暗期に2700-8700 μmol・mol⁻¹まで上昇し、他方、明期開始後1-2時間でCO₂補償点付近まで急激に低下すること、明期16時間でのCO₂交換量に占める明期開始2時間以内のCO₂交換量の割合は85%以上であることなどを報告した。この報告は、培養器内CO₂濃度が安定した時間帯における培養体のCO₂交換速度からでは、暗期、明期、1日のCO₂交換量などを精確には推定できないこと、さらには、培養器内CO₂濃度の測定を長期間、連続的に行うことによってのみ、暗期・明期の周期に伴う培養体のCO₂交換速度の時間変化、および培養体の生育に伴う暗期、明期および1日のCO₂交換量の経日変化を精確に調べ得ることを示している。

また、培養体の炭素収支は、培養器内CO₂濃度、培地糖濃度、光強度、培養器のガス交換性などの培養環境因子により影響を受けると推察される。しかしながら、このような培養環境因子が培養体の炭素収支に及ぼす影響を長期間、連続的に調べた報告は見あたらない。

本研究では、培養器へ流入する空気および培養器から流出する空気のCO₂濃度を長期間連続測定して、培養体のCO₂交換量の時間変化に、重要な培養環境因子の一つである培地シヨ糖濃度が及ぼす影響を調べることにした。さらに、培地シヨ糖濃度が培養体のCO₂収支に及ぼす影響、および培養体の生長速度を最大とするための培養環境調節法についても考察を行うことにした。

なお本報告では、交換速度とは1時間以下の時間内に交換された当該時間当りの量(次元:[量/時間])であり、また、交換量とは1時間を越える時間内に交換された量(次元:[量])であると定義する。

2. 材料および方法

2.1 供試植物

供試植物には、バレイシヨ‘紅丸’(*Solanum tuberosum* L. cv. Benimaru)を用いた。継代培養中のバレイシヨ小植物体より葉および根を切り除いた茎部を、長

さ約5mm、乾物重約1mgの単節へと切り分けた。この外植体を1培養器に9本植え付けた。なお、供試した小植物体は、シヨ糖濃度20g・l⁻¹、粉末寒天濃度8g・l⁻¹のMSゲル培地上で継代されていた。継代中の培養棚面上の光合成有効光量子束密度および培養室内気温は、それぞれ60 μmol・m⁻²・s⁻¹および25±1℃であった。

2.2 培養環境

培地シヨ糖濃度以外の培養条件は、全試験区共通とした。外植体植え付け時の培地シヨ糖濃度は、5、15および25g・l⁻¹の3種類とし、それぞれの培地シヨ糖濃度条件下の試験区をS₅区、S₁₅区およびS₂₅区と呼ぶことにした。それぞれの培地シヨ糖濃度を、培養期間を通して一定の値に維持するための処理などは行わなかった。基礎成分にはMS培地のそれを用いた。それに粉末寒天8g・l⁻¹を添加してMSゲル培地とした。pHはオートクレーブ前に5.7に調整した。培地分注量は培養器当たり0.100lとした。培養器には内容積0.933lのガラス製広口容器を用いた。培養器内の光合成有効光量子束密度および気温は、それぞれ120 μmol・m⁻²・s⁻¹、および22±1℃(暗期:8h)/25±1℃(明期:16h)に調節した。

各試験区の培養器は、培養器内の培養体のCO₂交換量を求めるために、自作の通気培養用CO₂交換量測定装置(Fig.1)にセットされた。培養期間は30日間とし、外植体植え付け日を0日目とした。

この装置は、CO₂濃度を調整した空気を各試験区の培養器へと送り込み、それぞれの培養器から流出する空気のCO₂濃度を測定することを目的とした構成になっている。培養器への通気流量は2.1l・h⁻¹とし、また流入空気のCO₂濃度は880±50 μmol・mol⁻¹となるよう調節した。培養器への流入空気および培養器からの流出空気のCO₂濃度の測定には、赤外線式CO₂分析計(富士電機(株)製ZFP型)を用いた。すべてのCO₂分析計について、CO₂濃度がそれぞれ52、370、822および1580 μmol・mol⁻¹である4本の標準ガスを用いて、供試前にあらかじめそれぞれ検定曲線を求めておいた。

2.3 測定項目

測定項目は、流出空気および流入空気のCO₂濃度、培養体の各部位別生体重および乾物重である。流出空気および流入空気のCO₂濃度測定は培養期間中連続して行った。また、流出空気および流入空気のCO₂濃度測定値から培養体1個体当りのCO₂交換量を算定した。CO₂交換量の算出は、培養体植え付け後1、3、5、10、15、19、24、27および30日目について行った。培養体の各部位別(茎、葉および根)生体重および乾物重はCO₂交換量測定期間終了日に測定した。

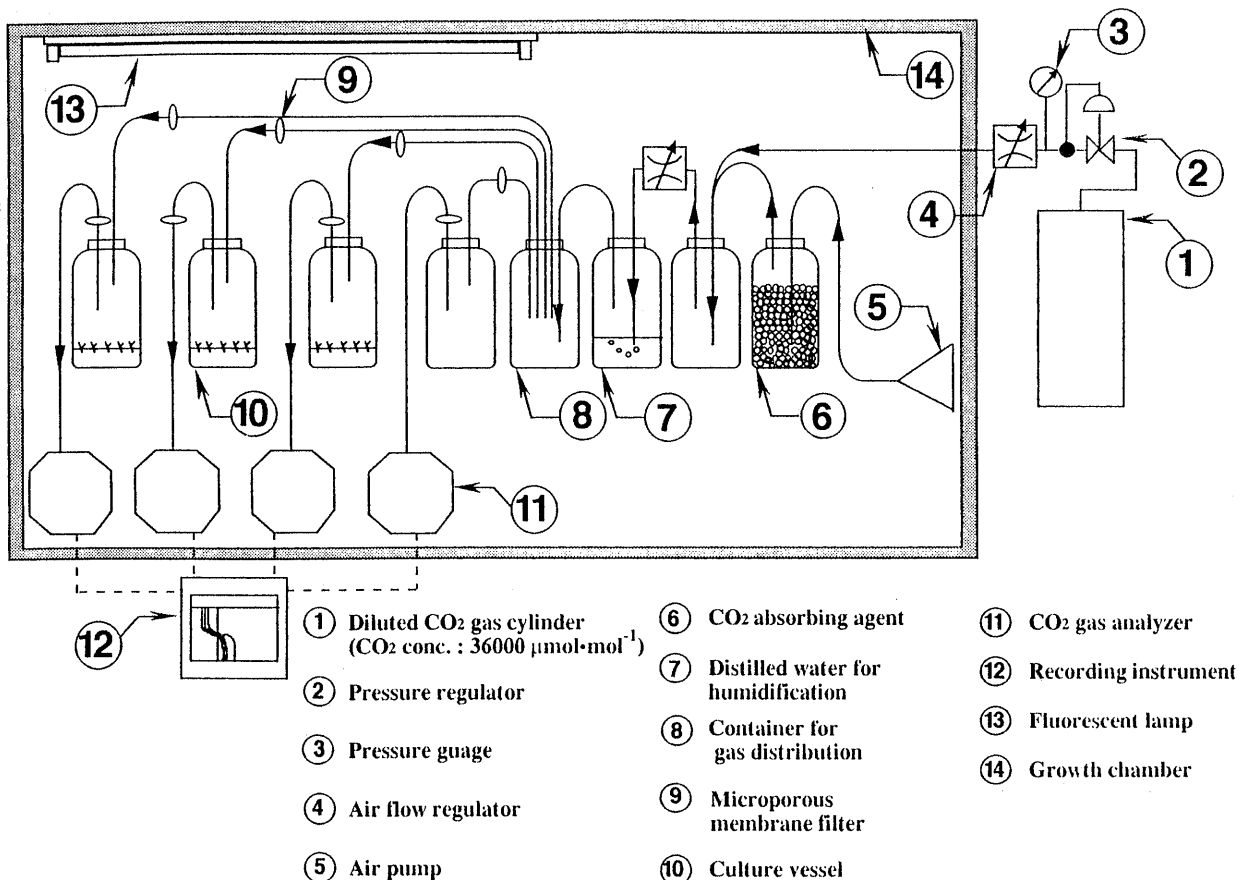


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental set up to measure CO₂ concentrations of inflow and outflow air for the culture vessels. Air with a CO₂ concentration of 880±50 μmol·mol⁻¹ was supplied to the vessels, and the photosynthetic photon flux density and air temperature in the vessels were 120 μmol·m⁻²·s⁻¹ and 22±1°C/25±1°C (dark period/photoperiod), respectively.

2.4 CO₂交換量の算定法

本報告では、培養体のCO₂交換量とは培養体が吸収するCO₂量から放出するCO₂量を差し引いた量であると定義する。培養体1個体当りのCO₂交換量は、次のようにして求めた。すなわち、培養器内空気と培地との間でのCO₂交換量の値は無視できるほど小さいと考えられるので、培養器への流入空気のCO₂濃度Cの時刻tにおける値がC=f(t)、流出空気のそれがC=g(t)で与えられるとすると、ある時刻t₁からt₂までの時間の、ある培養器内の培養体全体のCO₂交換量Q [μmol CO₂]は次式で求められる。

$$Q = k \cdot R \cdot \int_{t_1}^{t_2} \{f(t) - g(t)\} dt + k \cdot V \cdot \{g(t_1) - g(t_2)\} \quad (1)$$

ここで、kはCO₂量を25°Cにおける体積[l]からモル数[mol]へ変換するための係数[μmol·l⁻¹]、Rは通気流量[l·h⁻¹]、Vは培養器内の空気容積[l]である。本実験では、k=40.9×10³ μmol·l⁻¹、V=0.83 lである。22°Cにおける変換係数は、kより1.016%大きいだけであるので、計算には明期、暗期とも25°Cの係数を用

いることにした。(1)式は、富士原ら(1987)が提示したCO₂吸収量算定式と本質的に同じである。

また、(1)式の右辺第一項の値は、区分求積法を用いて次式により算定した。すなわち、右辺第一項の値をQ_cとおくと、Q_cは次式で算出できる。

$$Q_c = \frac{k \cdot R \cdot \Delta t}{2} \sum_{j=0}^{n-1} \{ \{ f(t_1 + j \cdot \Delta t) - g(t_1 + j \cdot \Delta t) \} + \{ f(t_1 + (j+1) \cdot \Delta t) - g(t_1 + (j+1) \cdot \Delta t) \} \} \quad (2)$$

ここで、

$$\Delta t = (t_2 - t_1) / n \quad (3)$$

である。nは時間t₂-t₁をいくつに分割するかを表す数であり、本実験では、Δt=0.25 hとした。

培養体1個体当りのCO₂交換量Q_p[μmol CO₂·culture⁻¹]は、Qを培養器内の培養体数p[culture]で除すことにより得られるので、

$$Q_p = Q / p \quad (4)$$

となる。本報告では、とくに断わらない限りCO₂交換量とは培養体1個体当りのCO₂交換量をさすものとする。なお、以上で述べたCO₂交換量は、実際には培養器の

CO₂交換量であるが、本報告においては、この量が培養体のCO₂交換量であると仮定した。

また、暗期および明期におけるCO₂交換量を、それぞれ暗期CO₂交換量および明期CO₂交換量と呼び、また同じ日の両値の和を日CO₂交換量と呼ぶことにした。

2.5 光合成による純生産算定法

培養体の光合成による純生産 P [$\mu\text{g CH}_2\text{O} \cdot \text{culture}^{-1}$] は、日CO₂交換量の積算値 Q_{pi} [$\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{culture}^{-1}$] から次式により求めた。

$$P = 30 \cdot Q_{pi} \quad (5)$$

ここで、30はmolCO₂をgCH₂Oへと変換するための係数である。また、日CO₂交換量の積算値は、日CO₂交換量の経日変化曲線から区分求積法によって求めた。

3. 結果および考察

3.1 30日目における生体重および乾物重

30日目における生体重および乾物重をTable 1に示す。生体重、乾物重ともにS₁₅区>S₂₅区>S₅区となった。通常、バレイショのシュートおよび小植物体の継代培養用培地のショ糖濃度は20–30g・l⁻¹である。本実験で、培地ショ糖濃度が15g・l⁻¹であるS₁₅区で生体重および乾物重が最大となったのは、このショ糖濃度が、小単節の外植体からの腋芽の伸長を遅らせない程度の炭素源としての濃度であり、かつ葉が展開した後の光合成を抑制しない程度の濃度であったためと推察される。この推察は、S₅区において腋芽の伸長開始時期の遅れが観察されたこと、および通常よりも低い糖濃度において茎葉が分化した培養体のCO₂吸収、生長がそれぞれ促進されることを示した次の2つの報告があることに基づいている。すなわち、Langford & Wainweight (1987)のバラのシュートを用いた実験結果によれば、糖濃度が20あるいは40g・l⁻¹の培地から10g・l⁻¹の培地へ植え代えるとCO₂吸収速度が高まるとしており、他方、

Table 1 Fresh and dry weights of potato cultures grown on a medium containing 5g・l⁻¹ (S₅), 15g・l⁻¹ (S₁₅) or 25g・l⁻¹ (S₂₅) sucrose. Environmental conditions are described in the caption of Fig. 1

Treatment	Fresh weight (mg・culture ⁻¹)				Total dry Weight (mg・culture ⁻¹)
	Stem	Leaf	Root	Total	
S ₅	38	65	14	117a*	13a*
S ₁₅	153	256	166	564b	69b
S ₂₅	96	177	70	343ab	37ab

*Means within a column followed by the same letter are not significantly different at the 1% level of Duncan's Multiple Range Test.

Kozai & Iwanami (1988)は、カーネーション小植物体を用いてCO₂施用を行ったところ、通常の培地ショ糖濃度である20g・l⁻¹よりも10g・l⁻¹の方が生体重、乾物重ともに大きくなったことを報告している。

S₁₅区で生体重および乾物重が最大となったことの詳細な説明には、培地ショ糖濃度、培養器内CO₂濃度、光強度などの培養環境因子が、培養体内糖含量、クロロフィル含量および活性、光合成関連酵素活性などに及ぼす影響の生化学的解析が必要となるであろう。

ところで、クロロフィルを有する培養体の生長速度を最大とするための培地糖濃度、培養器内CO₂濃度および光強度の組合せは、植物種および生育ステージごとに異なると考えられる。そのような組合せが策定されれば、通常の培養環境条件で得られる生長速度の2倍程度以上の生長速度が得られる可能性は高いであろう。Fujiwara *et al.* (1988)のCO₂補給、高光強度、無糖培養条件下での培養実験結果、および富士原ら(1987)が行ったCO₂濃度—純光合成モデルを用いてのシミュレーション結果は、この可能性の高いことを支持するものである。

3.2 培養器への流入空気と培養器からの流出空気のCO₂濃度差の時間変化

本報告では、培養器から流出する空気(以後、流出空気)のCO₂濃度と、培養器へ流入する空気(以後、流入空気)のCO₂濃度をそれぞれ示すのではなく、流出空気のCO₂濃度から流入空気のCO₂濃度を差し引いた値ΔCを示すことにした。

ΔCは、暗期・明期のサイクルに従い変化し、その1日の最大値と最小値の差の大きさは日数の経過とともに増大した(Fig.2)。また、すべての試験区において、日数の経過に伴い1日の最大値(多くの場合、暗期終了時のΔC)は徐々に上昇し、他方、最小値(多くの場合、明期終了時のΔC)は低下していった。1日のΔCの最大値と最小値の差が大きいことは、培養器当りの、すなわち培養体1個体当りの平均の暗期CO₂交換量の絶対値と明期CO₂交換量の和が大きいことを意味する。

10日目には、培地ショ糖濃度がΔCの経時変化に及ぼす影響が明確に現れはじめた。10日目以降では、ΔCの振幅はS₁₅区>S₂₅区>S₅区となった。このことから、培地ショ糖濃度が培養体のCO₂交換速度に影響を及ぼすことが示された。

De Proft *et al.* (1985)は、ニシキモクレンのシュートを含むいくつかの培養器内のCO₂濃度を暗期の終了時に60日間以上測定し、その多くの培養器内でCO₂濃度が徐々に低下していったことを報告している。この報告の結果は、明期における純光合成速度が増大していったことを示すものと解釈できる。本実験結果の流出空気の

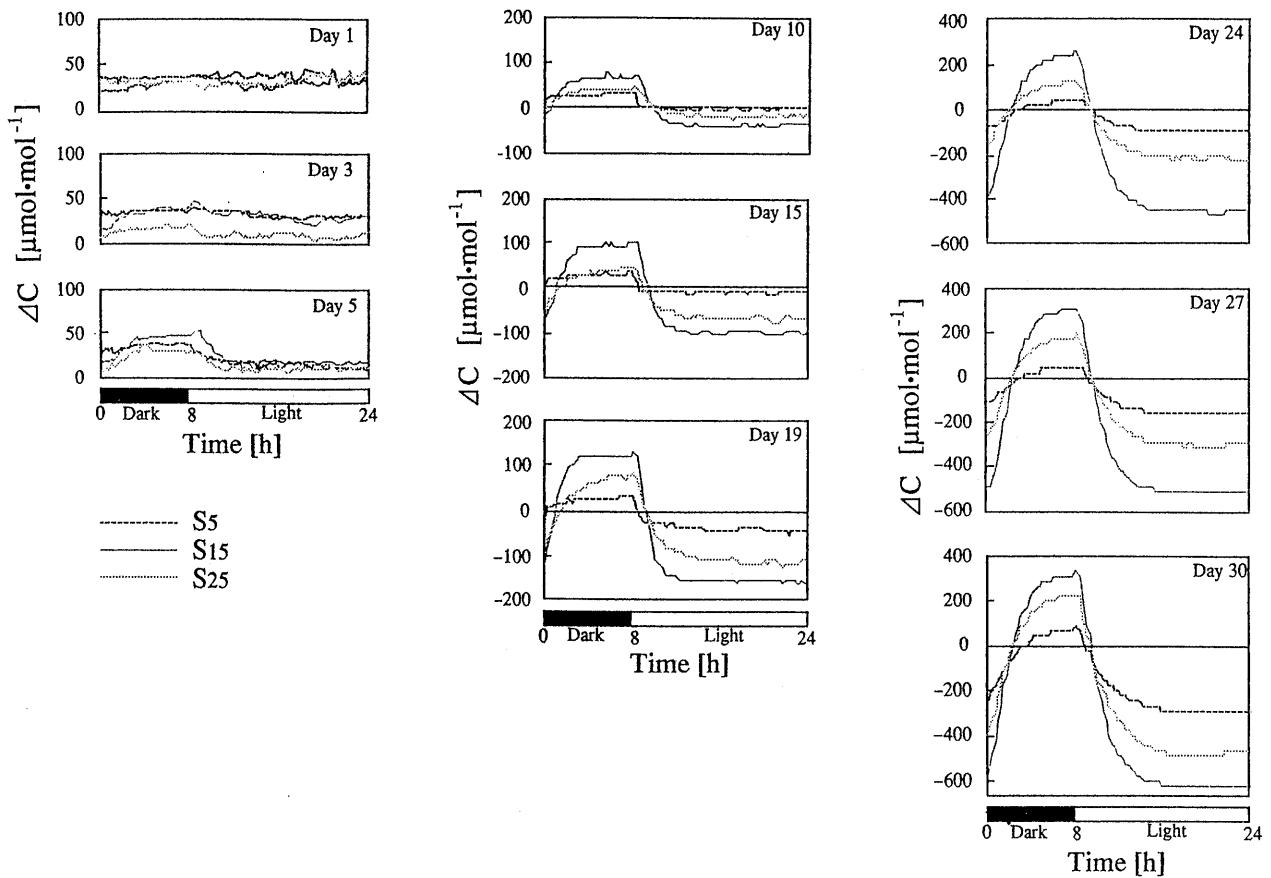


Fig. 2. Time course of the difference (ΔC) between CO₂ concentrations of inflow and outflow air for the culture vessel with 9 potato cultures on a medium containing 5 g·l⁻¹ (S₅), 15 g·l⁻¹ (S₁₅) or 25 g·l⁻¹ (S₂₅) sucrose. The value of ΔC is given by subtracting outflow air CO₂ concentration from inflow air CO₂ concentration. The axes of ordinate for three columnarized groups of graphs are marked on with different scales each other. Environmental conditions are described in the caption of Fig. 1.

CO₂濃度の経日変化と De Proft *et al.* (1985) の培養器内CO₂濃度の経日変化の相違は、次の原因によるものと考えられる。すなわち、本実験では培養体の光合成によって吸収されるCO₂を培養器外部から常時供給していたのに対し、彼らの実験ではガス交換性の低い培養器を用いていたために培養器外部からCO₂がほとんど供給されなかったことによるものと考えられる。

ΔC はすでに3日目には、明期開始後に低下する傾向を示している。このことは、葉を持たない長さ5mm程度の単節でも光合成を行っていたことを示している。また、1、3および5日目までは、 ΔC が暗期および明期とも正の値であったことから、少なくとも5日目までは培養体が1日中CO₂を放出していたことがわかる。この5日目までの間にも培養体の乾物重が増加していたと仮定すると、この間の乾物重増加はおもに培地中の糖に依存していたことになる。

30日目には、明期のS₁₅区の ΔC が $-630 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 程度まで低下した。流入空気CO₂濃度はおよそ880 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ であったので、このときの流出空気CO₂

濃度はおよそ250 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ であったことがわかる。他方、30日目における明期のS₅区およびS₂₅区の流出空気CO₂濃度は、それぞれおよそ600および400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ であったことになる。

日数の経過につれて明期における ΔC の値が低下したという結果は、スターチスの小植物体を含む培養器内の明期のCO₂濃度を10日ごとに測定した古在ら(1987)の結果に類似している。また、Kumar *et al.* (1987)は、ラディアータマツの子葉培養体を含むフラスコ内のCO₂濃度の経日変化を調べたところ、培養器内のCO₂濃度が徐々に上昇していったことを報告した。この結果は、子葉培養体が光合成能力を有していなかったこと、培養器の換気回数が小さかったことにより、呼吸によって放出されたCO₂が培養器内に蓄積していったためであると解釈できる。本実験では、既に光合成能力を有していたと思われる緑色の単節を用いていたので、彼らの結果とは異なる結果になったものと考えられる。

Infante *et al.* (1989)は、キウイフルーツのシュートをを用いた実験で培養器内のCO₂濃度の経日変化は光強度

によって異なるという結果を得ている。この報告では、低光強度 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) では培養器内の CO_2 濃度は日数の経過に伴い上昇し、他方、高光強度 (120 および $250 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) ではそれが低下している。あるレベル以上の光強度によって、培養体の日 CO_2 交換量を負の値から正の値へ移行させ得ることを示しているのかもしれない。また、培養器内の CO_2 濃度の暗期、明期を通しての1日の経時変化を測定したこれまでの例としては、Fournioux & Bessis (1986)、富士原ら (1987)、古在・関本 (1988) および土井ら (1989) の報告がある。これらの報告はすべて小植物体を測定対象としている。19日目以降の本実験結果は、これらの報告の結果と類似している。19日目にはすべての試験区で培養体は茎、葉および根を有しており、すでに小植物体の形態となっていた。

3.3 暗期および明期 CO_2 交換量の経日変化

暗期 CO_2 交換量 (Fig. 3) の絶対値は S_{15} 区および S_{25} 区で日数の経過に伴い増加したのに対し、 S_5 区ではほぼ一定であった。他方、明期 CO_2 交換量 (Fig. 3) は、日数の経過に伴い全試験区で単調増加した。もし培養器内の CO_2 濃度が培養期間を通して全試験区で一定となるように制御されていたならば、培養期間中の明期 CO_2 交換量の3試験区間の差は本実験結果よりも大きくなったものと推察される。

5日目までは、すべての区で明期 CO_2 交換量の値が負であり、明期でありながらも培養体がみかけ上は CO_2 を放出していた。このことは、培養体がクロロフィルを有

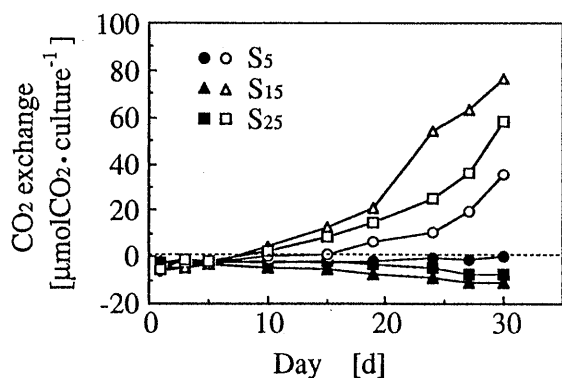


Fig. 3. Time course of CO_2 exchange per culture during dark period (solid symbols) and during photoperiod (open symbols) of potato cultures on a medium containing $5 \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (S_5), $15 \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (S_{15}) or $25 \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (S_{25}) sucrose. Dark period and photoperiod were 8 and 16 hours a day, respectively. CO_2 exchange takes a positive value when the cultures absorbing CO_2 . Environmental conditions are described in the caption of Fig. 1.

しており、かつ光合成に十分な CO_2 濃度と光強度が与えられても、培地中の糖に依存して生育する栄養相にある場合もあることを示している。

10日目以降では、暗期 CO_2 交換量の絶対値および明期 CO_2 交換量は S_{15} 区 $>$ S_{25} 区 $>$ S_5 区となった。このことより、培地シヨ糖濃度によらず暗期における CO_2 放出量が大きければ明期における CO_2 吸収量も大であることがわかる。また、30日目における乾物重量当りの暗期 CO_2 交換量の絶対値は S_{15} 区 $>$ S_{25} 区 $>$ S_5 区であり、他方、乾物重量当りの明期 CO_2 交換量は S_5 区 $>$ S_{25} 区 $>$ S_{15} 区であった。このことから、 S_5 区において乾物重量当りの暗期 CO_2 交換量の絶対値に対する明期 CO_2 交換量の比が最も高いことがわかる。この結果から、培地シヨ糖濃度がその比に影響を及ぼすことが示された。

3.4 日 CO_2 交換量の経日変化

本実験では、流入空気の CO_2 濃度を全試験区で一定となるように制御し、他方、流出空気の CO_2 濃度は制御しなかった。この結果、日数が経過するにつれて流出空気の CO_2 濃度に試験区間差が生じた (Fig. 2)。

暗期 CO_2 交換量と明期 CO_2 交換量の和である日 CO_2 交換量は、すべての区で日数の経過にともない単調増加した (Fig. 4)。10日目以降の値は、 S_{15} 区 $>$ S_{25} 区 $>$ S_5 区となった。この結果から、培地シヨ糖濃度が日 CO_2 交換量に影響を及ぼすことが示された。

もし流出空気の CO_2 濃度を明期において試験区間で同じになるように制御したならば、培養期間後期の S_{15} 区および S_{25} 区の日 CO_2 交換量はより高い値になったものと推察される。培養苗の急速大量生産を目的とした培養環境調節を行う場合には、培養器からの流出空気の CO_2 濃度、あるいは培養器内の CO_2 濃度を制御するようにす

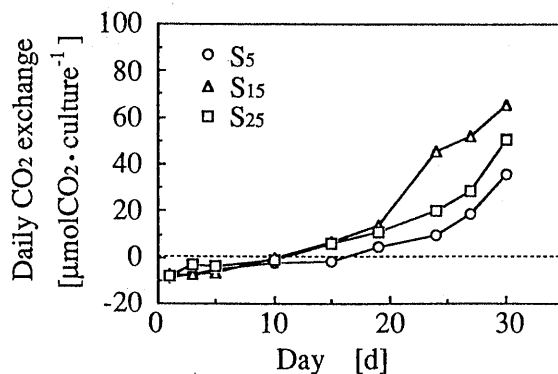


Fig. 4. Time course of daily CO_2 exchange per culture of potato cultures on a medium containing $5 \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (S_5), $15 \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (S_{15}) or $25 \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (S_{25}) sucrose. CO_2 exchange takes a positive value when the cultures absorbing CO_2 . Environmental conditions are described in the caption of Fig. 1.

るのが望ましい。

日CO₂交換量は植え付けの数日後には負の値から正の値へと移行した。すなわち、培養体のCO₂収支が負から正へと転じる時点が本実験の培養期間中に観察された。銅金ら(1990)は培養体の生育過程を整理するために「栄養相」という概念を提唱した報告の中で、CO₂交換速度が負の値から正の値へと転じる時点を「みかけの栄養法転換点」と名付けて、その時点(以後、「転換点」)が順化時期の決定に重要な意味を持つであろうと述べている。本実験結果においては、日CO₂交換量の値が負から正に移行した時点が「転移点」に相当する。「転移点」は、S₅区では16日目頃、S₁₅区およびS₂₅区では10日目頃に現れた。本実験結果のみからは明確にはいえないが、培地シヨ糖濃度は転換点の出現時期を左右する因子の一つであると考えられる。「転換点」の出現時期は、培地シヨ糖濃度の他に培養器内CO₂濃度、光強度などによっても影響されるものと考えられる。また、「転換点」の出現時期を早めるための培養環境調節法は、そのまま培養体の光合成速度を高めるための培養環境調節法であるかもしれない。

3.5 光合成による純生産

0日目から30日目までの間に増加した培養体の乾物重、および培養体の光合成による純生産(以後、純生産)は、S₁₅区>S₂₅区>S₅区となった(Fig.5)。この結果、培地シヨ糖濃度が乾物重増加と純生産の両方に影響を及ぼすことが明らかとなった。Capellades *et al.* (1991)がバラのシュートを用いて、またEvers (1982)がダグラスモミを用いて、それぞれ培地シヨ糖濃度が光合成特性および暗呼吸速度に影響を及ぼすことを示した報告、およびKozai *et al.* (1990)がシンビジウムのシュートの光合成特性を調べた報告は、培地シヨ糖濃度が培養体の純生産に影響を及ぼす可能性の高いことを示唆してい

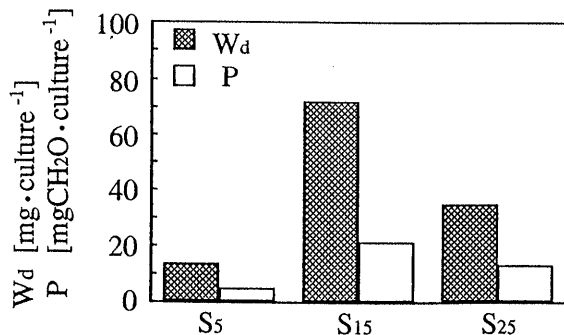


Fig. 5. Dry weight increase (W_d) and net production by photosynthesis (P_n) per culture for 30 days, of potato cultures on a medium containing 5 g·l⁻¹ (S₅), 15 g·l⁻¹ (S₁₅) or 25 g·l⁻¹ (S₂₅) sucrose. Environmental conditions are described in the caption of Fig. 1.

る。

乾物重増加に対する純生産の割合は、S₅区≒S₂₅区>S₁₅区となった。この結果に対しては十分な説明を与え得るだけの実験結果は、本実験からは得られていない。日CO₂交換量だけでなく、培養体の乾物重、培地シヨ糖濃度、さらには、培養体内糖含量などの経日変化をも調べなければ、この結果に対する十分な説明を与えることは困難であると考えられる。

純生産が最大であったS₁₅区で乾物重増加が最大であったことから推察すると、光合成能力を有する培養体の生長速度を最大とする培養環境条件とは、培養期間中におけるその培養体の純生産を最大とする培養環境条件であるのかもしれない。また、光合成による純生産を高めるには、明暗周期を制御する方法も有効であると思われる。種々の明暗周期下で培養体の生長速度を比較したMorini *et al.* (1990)の実験結果によると、通常の16時間明期-8時間暗期よりも短い周期である4時間明期-2時間暗期の周期で最も生長が促進されたとしている。4時間明期-2時間暗期の周期によってもたらされた培養器内CO₂濃度の経時変化パターンが、培養体の純生産増大にとって好適であったのかもしれない。培養体の純生産を高めるための新しい観点からの研究が望まれる。

5. おわりに

バレイショ培養体の生育に伴うCO₂交換量の時間変化を調べ、そのCO₂収支を明らかにするとともに、培地シヨ糖濃度がバレイショ培養体のCO₂交換量およびその経時・経日変化に影響を及ぼすことを明らかにした。今後は、光強度、培養器へ流入する空気中のCO₂濃度(あるいは培養器周囲のCO₂濃度)、培養器への通気量(あるいは培養器の換気回数)などの培養環境因子が、体細胞-胚様体-シュート-小植物体へと分化する過程を通しての炭素収支、あるいは培養体が光合成能力を獲得する過程の炭素収支に及ぼす影響の解明が望まれる。そのような研究の成果は、培養体の生長を最大とするための培養環境調節法の策定に寄与するものと考えられる。

引用文献

- Capellades, M., Lemeur, R. and P. Debergh, 1991: Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **25**, 21-26.
 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.
 銅金裕司・斉藤秀幸・安藤敏夫・中川雅博・三位正洋, 1989: 栄養相: 培養・順化における新概念の導入, 園

- 学雑, 58別2, p.510-511.
- De Proft, M. P., Maene, L. J. 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, J., van Cleemput, O. and P. C. Debergh, 1991: Carbon Metabolism of Micropropagated *Rosa Multiflora* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **27P**, 57-63.
- Evers, P. W., 1982: Growth and morphogenesis of shoot initials of Douglas fir *in vitro*. 3. Photosynthesis *in vitro*. In A. Fujiwara (ed.) *Plant Tissue Culture 1982*, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, Tokyo, p. 263-264.
- Fournioux, J.-C., and R. Bessis, 1986: Influence de la teneur en gaz carbonique sur la morphogenèse de la vigne en culture *in vitro*. *Can. J. Bot.*, **64**, 2608-2616.
- Fujiwara, K., Dogane, Y., Ando, T., Mii, M. and T. Kozai, 1990: A classification system of trophic phases of plant cultures *in vitro*. *Abstracts 7th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, Amsterdam, p. 100.
- 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., Kozai, T. and I. Watanabe, 1988: Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Hort.*, **230**, 153-158.
- Infante, R., Magnanini, E. and B. Righetti, 1989: The role of light and CO₂ in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa* in vitro. *Physiol. Plant.*, **77**, 191-195.
- 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チス (*Limonium Hybrid*) の小植物体の生長に及ぼす影響, *植物組織培養*, **4**(1), 22-26.
- Kozai, T. and Y. Iwanami, 1988: Effects of CO₂ 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**(2), 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束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.
- Kozai, T., Oki, H. and K. Fujiwara, 1990: Photosynthetic characteristics of Cymbidium plantlet in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **22**, 205-211.
- Kumar, P. P., Reid, D. M. and T. A. Thorpe, 1987: The role of ethylene and carbon dioxide in differentiation of shoot buds in excised cotyledons of *Pinus radiata* in vitro. *Physiol. Plant.*, **69**, 244-252.
- Langford, P. J. and H. Wainwright, 1987: Effect of sucrose concentration on the photosynthetic ability of rose shoots *in vitro*. *Ann. Bot.*, **60**, 633-640.
- Morini, S., Fortuna, P., Sciutti, R. and R. Muleo, 1990: Effect of different light-dark cycles on growth of fruit tree shoots cultured in vitro. *Adv. Hort. Sci.*, **4**, 163-166.
- Schripsema, J., Meijer, A. H., van Iren, F., ten Hoopen, H. J. G. and R. Verpoorte, 1990: Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **22**, 55-64.