

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*1

古在豊樹・岩浪好恵・富士原和宏

千葉大学園芸学部園芸環境工学研究室
(〒271 松戸市松戸648)

(1986年10月29日受付)

(1986年12月25日受理)

スターチス (*Limonium Hybrid*) の小植物体を、通常より高い炭酸ガス濃度および通常より高い光子束 ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, 400~700 nm) で増殖培養した。培養器内の明期における炭酸ガス濃度を高める目的で、明期の培養室内のそれを約 950 vpm に維持し、また培養器には、比較的通気性の高い、成形プラスチックキャップで閉栓したガラス製試験管 (換気回数: 1.5 回 hr^{-1}) を用いた。培養器内の炭酸ガス濃度は日ごとに低下し、実験開始後 50 日目には 200~400 vpm まで低下した。これは、小植物体が光混合栄養的に生長したことを示す。小植物体の生長は炭酸ガス施用と強光子束により促進された。

1. 緒言

一般に、植物組織培養のための培地には、ショ糖などの糖類が 1~5% 程度加えられている。これは、組織培養中の組織または小植物体は、一般に、光合成能力が低く¹⁾、光独立栄養的生長が困難であるので、従属栄養的生長のための炭素源として、糖類を必要とするからであると言われている。このようなことから、培養器内の炭酸ガス環境を小植物体の光合成との関連において検討した例は、数例²⁻⁴⁾を除いて、ほとんど見あたらない。

他方、組織培養苗を大量に生産するには、培養器内における小植物体の生長および増殖を急速かつ安定的に行う必要がある。しかし、現状では、この増殖(継代)培養に 2~6 カ月間を必要とし、この増殖培養期間の短縮は、培養苗の生産コストを低下させるための、重要な方策の1つと考えられている⁵⁾。

最近、茎葉が分化した、鉢上げ前の生育ステージにある小植物体が、通気性の低い(換気回数の小さい)培養器内で培養されている場合、明期における培養器内炭酸ガス濃度はしばしば 100 vpm (容積 ppm) 以下の低濃度となり、したがって、小植物体は光合成能力を有しているものの、実際の純光合成速度は小さいことが示された³⁾。また、ランの1種 *Phalenopsis* の培養期間中にお

ける炭酸ガス施用が生長促進に効果的であることが最近認められている⁶⁾。

本報告では、明期における培養室内(培養器外)の炭酸ガス濃度を人為的に高めた場合および大気中と同レベルとした場合における、小植物体の生長、培養器内炭酸ガス濃度などの経日変化を、培地の初期ショ糖濃度を変えて測定した結果を述べる。

2. 材料および方法

炭酸ガス施用区と炭酸ガス無施用区、および培地ショ糖濃度 0% 区と 3% 区を組合せ、4つの試験区を用意した。Table 1 に材料および方法の概要を示した。

(1) 供試小植物体、培養器および培地

継代(増殖)培養されていたスターチス (*Limonium Hybrid*, 品種 'Misty Blue', *L. bellidifolium* GOUAN と *L. latifolium* O. KUNTZE の雑種) の小植物体を供試した。試験開始当日に、後述の培養条件で増殖培養されていた供試小植物体を葉数 2~3 枚の小植物体に再分割し、Table 1 に示した培地に移植した。再分割された小植物体(外植体)の地下部には根がほとんど付いていない状態であった。

各培養器(試験管)への培地の分注量は約 10ml とした。このとき、各試験管中の培地の乾物重量は、ショ糖濃度 0% 区では約 270mg、ショ糖濃度 3% 区では約 430mg であった。

*1 組織培養苗の大量生産のための環境調節 (第1報)

Table 1. Description of the method and materials used.

Item	Description
Plantlet (explant)	Statice (<i>Limonium</i> Hybrid), 313 plantlets in total, 75 plantlets for each experimental plot and 13 plantlets for estimating the initial dry weight/fresh weight ratio
Medium	
1) Basal medium	Murashige and Skoog (1962)
2) Agar	0.8% (w/v)
3) Carbon source	3% (w/v) sucrose without sorbitol or no sucrose with 1.62% sorbitol
4) Osmotic pressure	4.47 bar (Initial value)
5) pH	5.6 (Initial value)
6) Growth regulator	none
Vessel	Glass flat bottom test tube with plastic formed cap (Inside volume: 46 ml, Number of air changes per hour: 1.5 hr ⁻¹)
Culture condition	
1) Temperature	25°C
2) Light period	16 hr per day (from 4 a. m. to 6 p. m.)
3) Photon flux density	150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ (400-700nm)
4) CO ₂ gas outside the vessel	950 vpm or 450 vpm during the light period and 450 vpm during the dark period

(2) 培養条件 培養室内に同型の透明アクリル板製の箱(高さ: 34 cm, 幅: 50 cm, 奥行: 83 cm)を2つ設置し, 一方を炭酸ガス施用区, 他方を炭酸ガス無施用区とした。明期におけるアクリル製箱内の炭酸ガス濃度は, 炭酸ガス施用区では約 950 vpm に, 炭酸ガス無施用区では約 450 vpm に制御された。暗期における両区の箱内炭酸ガス濃度は, ともに約 450 vpm とした。炭酸ガス濃度の制御には, 富士電機製造(株)製の CO₂ コントローラを用いた。

各試験区の棚面照度は約 10,000 lux (光量子束(波長: 400~700 nm): 約 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$) とした。この照度は通常の組織培養におけるそれ⁵⁾の数倍である。

なお, 供試小植物体を得るための継代(増殖)培養条件は以下の点を除いて, 上述の実験培養条件と同様である。すなわち, 培地シヨ糖濃度 2%, 棚面照度約 3,000 lux, 培養室内炭酸ガス濃度約 350 vpm とした。

(3) 測定 試験管のみの重量, およびオートクレーブを用いて滅菌した後の培地を含む試験管重量を, 精度 1mg の電子天秤を用いて測定し, 両者の差として, 滅菌後の培地重量を算定した。なお, 上記とは別に, 培地約 50ml の生体重と乾物量を測定し, 前者に対する後者の比率として, 培地の初期平均乾物率を算定した。

また, 試験開始日に試験管内に植え付ける前の小植物体 300本の生体重(地下部も含む)を上記電子天秤を用いて個別に測定した。さらに, このときそれら 300本の小植物体とは別に, 13本の小植物体の生体重と乾物量を測定し, 前者に対する後者の比率として, 試験開始日に

おける小植物体の平均乾物率を算定した。

試験開始以後, 4つの試験区から任意に試験管15本ずつを選んで, それぞれについて10日目ごとに計5回, 小植物体の生体重, 乾物重, 培地の新鮮重, 乾物重および明期における閉栓試験管内外の炭酸ガス濃度を測定した。

試験管内の炭酸ガス濃度測定には, ガスクロマトグラフ((株)島津製作所製, GC 9 A)を用いた。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, そして検出器には熱伝導度検出器(TCD)を, それぞれ用いた⁷⁾。ガスの採取にはガスタイトシリンジを用い, 1回のガス採取量は 0.25 ml とした。

3. 結果と考察

(1) 生体重および乾物重の経日変化

測定開始日における13本の供試小植物体の平均乾物率は 9.4% であった。Fig. 1 (a)に小植物体の平均生体重の経日変化を, また, Fig. 1 (b)に小植物体の平均乾物重の経日変化を示す。炭酸ガス施用区の生体重と乾物重は, 30日目以降, シヨ糖濃度 0% 区, 3% 区ともに, 炭酸ガス無施用区のそれらよりも大きかった。このことから, 明期における培養器内の低炭酸ガス濃度は, 小植物体の生長を制限している環境要因の1つであると言える。

また, 20日目以降, シヨ糖濃度 3% 区における小植物体の生体重および乾物量の増加速度は, 炭酸ガス施用の有無によらず, シヨ糖濃度 0% 区のそれよりも顕著に大であった。ただし, シヨ糖濃度 0% 区においても乾物重

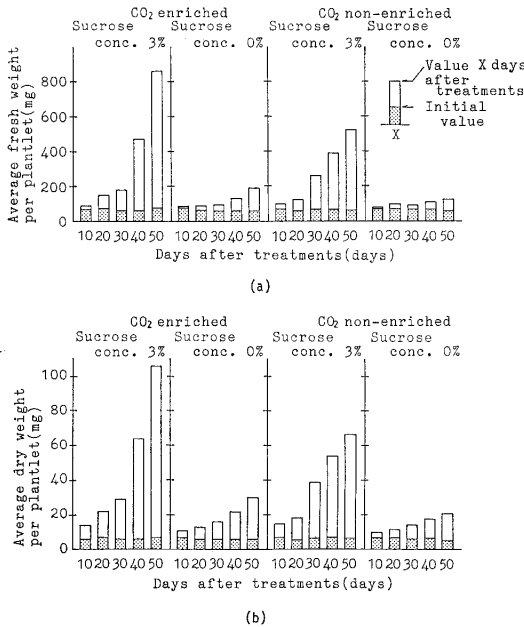


Fig. 1. Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration on the fresh and dry weight increases of the plantlets (*Limonium Hybrid*).

の増加が見られたことから、小植物体は培養中と言っても、光独立栄養的 (photoautotrophic) に生長し得ると言える。

本実験において、炭酸ガス施用が小植物体の生長を促進した要因としては、本実験における照度が通常の数倍であったことが考えられる。すなわち、従来のように培養器内の低炭酸ガス濃度が小植物体の光合成を律速している条件下では一定値以上の照度は光合成を促進しないが、炭酸ガス施用下では、低照度も光合成を律速し得る。

各試験区の小植物体の平均乾物率は、培養日数の経過とともにやや増大し、50日目においては、シヨ糖濃度 3% 区においては 12.3% (炭酸ガス施用, 無施用とも)、シヨ糖濃度 0% 区においては 14.4% (炭酸ガス施用区)、14.6% (炭酸ガス無施用区) となった。なお、シヨ糖濃度 0% 区では、シヨ糖濃度 3% 区に比べて、小植物体の地下部重量が比較的少ないことが観察された。

(2) 培地乾物重の経日変化

Fig. 2 に、シヨ糖濃度 3% 区における培地乾物重の経日変化を示す。測定日によって培地乾物重の初期値がやや異なるのは、各試験管への培地分注量 (全物重) に多少のバラツキが生じたためである。

50日目の測定値にもとづくと、炭酸ガス施用区の50日

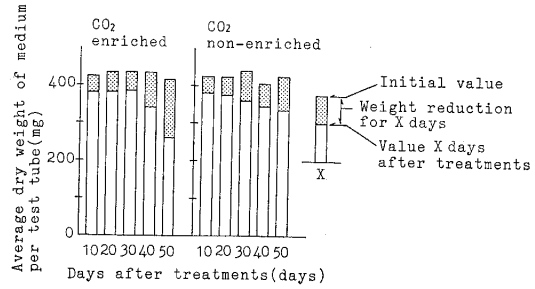


Fig. 2. Daily changes in the average dry weight of culture medium with the initial sucrose content of 3%.

当り培地乾物重減少量の方が炭酸ガス無施用区のそれよりもやや大きかったことが分かる。このことから、50日間当りで見ると、炭酸ガス施用区の方が、炭酸ガス無施用区よりも、培地からの糖および無機・有機塩類合計の吸収量が大きかったことがわかる。

(3) 培養器内炭酸ガス濃度と純光合成速度の経日変化

Fig. 3 に、明期における各試験区の培養器内外の炭酸ガス濃度の経日変化を示す。いずれの試験区においても、培養日数の増大とともに、明期の培養器内炭酸ガス濃度は減少している。

Fig. 3 に示されているように、明期における培養器内の炭酸ガス濃度が培養器外のそれより低くなる、すなわち、純光合成速度が正の値を示すのは、炭酸ガス施用区のシヨ糖濃度 0% 区が初日以降、炭酸ガス無施用区のシヨ糖濃度 0% 区が3日目で以降、炭酸ガス施用区のシヨ糖濃度 3% 区が6日目で以降、また、炭酸ガス無施用区のシヨ糖濃度 3% 区が12日目で以降であった。すなわち、上記の日以降では、小植物体は、シヨ糖濃度 0% 区においては光独立栄養的に、またシヨ糖濃度 3% 区においては光混合栄養的 (photomixotrophic) に生長したと考察される。

試験開始後30日頃までは、炭酸ガス施用区、無施用区のいずれにおいても、シヨ糖濃度 3% 区の方がシヨ糖濃度 0% 区よりも、明期の培養器内炭酸ガス濃度は高い。しかし、両者の関係は、その後、逆転する。これは、30日以降では、純光合成速度に関しては、シヨ糖濃度 3% 区のほうがシヨ糖濃度 0% 区におけるよりも大であることを意味している。ただし、これは、シヨ糖濃度 3% 区の小植物体の乾物重の方がシヨ糖濃度 0% 区のそれよりも大であるからであり、単位乾物重当りの純光合成速度は、シヨ糖濃度 0% 区の方が大である。

上述のことから、培地中のシヨ糖は、小植物体の生体

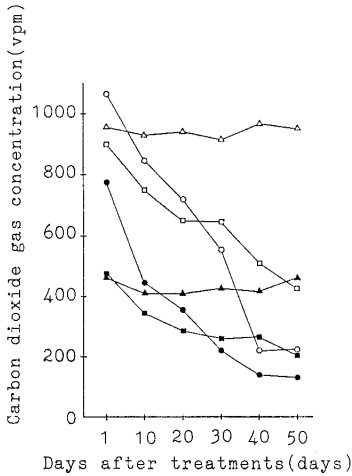


Fig. 3. Daily changes in CO₂ gas concentration inside and outside the vessel during the light period.

△: CO₂ enriched, outside air; ○: CO₂ enriched, sucrose 3%; □: CO₂ enriched, sucrose 0%; ▲: CO₂ non-enriched, outside air; ●: CO₂ non-enriched, sucrose 3%; ■: CO₂ non-enriched, sucrose 0%.

重および乾物重の増加を促進したが、他方、小植物体の単位乾物重当りの純光合成速度は促進しなかったと考えられる。

さらに、同図から、炭酸ガス施用区において、もし、培養器外の炭酸ガス濃度を日数の経過とともに次第に増大することによって、培養器内のそれを試験開始日のそれと同程度に維持したならば、炭酸ガス施用による小植物体の光合成促進効果は一層顕著となったであろうと考察される。一方、小植物体の生長に合わせて、培地ショ糖濃度を次第に低下させて、光独立栄養生長を促進する処理なども実用上は有効かも知れない。さらに、炭酸ガス濃度と温度が好適であれば、一般に、光合成は、光量子束(波長 400~700 nm) 200~300 μmol m⁻²sec⁻¹ 程度までは増大する⁹⁾と言われているので、上記炭酸ガス濃度条件下では、光量子束を本実験における光量子束(150 μmol m⁻²sec⁻¹)よりさらに増大した方が小植物体の光合成がより促進されるとも考えられる。

(4) 培地乾物重減少量に対する小植物体乾物重増加量の比

Fig. 4 に、ショ糖濃度 3% 区における培地乾物重減少量に対する小植物体乾物重増加量の比の経日変化を示した。試験開始後30日目以降では、炭酸ガス施用区におけるこの比が炭酸ガス無施用区におけるそれよりも大となった。このことから、炭酸ガス施用区の方が小植物体

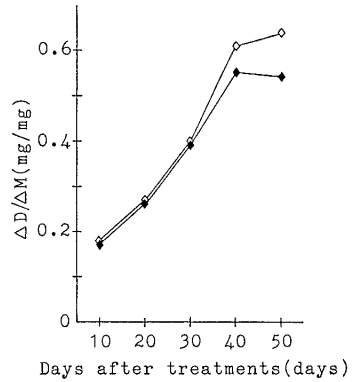


Fig. 4. Daily changes in the ratio of average dry weight increase of the plantlets to the average dry weight decrease of the culture medium with the initial sucrose content of 3%.

$\frac{\Delta D}{\Delta M} = \frac{\text{Dry weight increase of plantlet}}{\text{Dry weight decrease of medium}}$
○: CO₂ enriched, ◆: CO₂ non-enriched.

乾物重増加量に対する純光合成による寄与の割合が大きいたことが分かる。

(5) 供試個体数

Fig. 1~2 および **Fig. 4** に示した経日変化に関する測定値は、すべてサンプリングによるもので、同一の小植物体についての測定値ではない。これは、小植物体および培地の生体重と乾物重を分離して測定するための、やむを得ない方法であった。しかし、このために、測定値の経日変化にもとづく考察の範囲を限定せざるを得なかった。今後、小植物体の供試個体数を増やし、また、供試個体間の初期生体重、乾物重のバラツキを最小にし、統計的有意性をさらに明確にする必要がある。

(6) 物質収支

本実験においては、培養器内炭酸ガス濃度の暗期における経時変化を測定しなかったため、小植物体の暗呼吸速度が不明であり、そのために小植物体の乾物増加に関する、培地のショ糖の寄与と純光合成の寄与とを明確には分離できなかった。今後は、両者の寄与を分離して論じられるように、暗期における呼吸速度、培地中の糖類の増減なども測定し、物質収支、エネルギー収支をより明確にすべきである。

小植物体の生長促進に関する炭酸ガス施用効果について、より詳細な測定および解析は続報にゆずる。

文 献

- 1) Donnelly, D. J. and W. E. Vidaver, 1984. J.

- Am. Soc. Hort. Sci., **109**: 177-181.
- 2) 安藤敏夫, 1978. 園芸学会昭和53年度秋季大会研究発表要旨, p. 368-369.
 - 3) 富士原和宏, 古在豊樹, 渡部一郎, 1986. 園芸学会昭和61年度春季大会研究発表要旨, p. 412-413.
 - 4) 古在豊樹, 富士原和宏, 渡部一郎, 1985. 園芸学会昭和60年度秋季大会研究発表要旨, p. 388-389.
 - 5) 関谷次郎, 1986. 高等植物細胞培養の基本技術 (植物バイオテクノロジー, 山田康之, 岡田吉美編), p. 6-15, 東京化学同人, 東京.
 - 6) 土井元章, 野口宝司, 浅平 端, 1986. 日本生物環境調節学会第24回大会講演要旨, p. 64-65.
 - 7) 古在豊樹, 富士原和宏, 渡部一郎, 1986. 農業気象, **42**(2): 119-127.
 - 8) 古在豊樹, 富士原和宏, 渡部一郎, 1986. 農業気象, **42**(1): 1-6.
 - 9) Lee, N., H. V. Wetzstein, and H.E. Sommer, 1985. *Plant Physiol.*, **78**: 637-641.

Summary

Environment Control for Masspropagation of Tissue Cultured Plantlets (1) Effects of CO₂ Enrichment on the Plantlet Growth during the Multiplication Stage

Toyoki KOZAI, Yosie IWANAMI and Kazuhiro FUJIWARA

*Laboratory of Horticultural Engineering, Faculty of Horticulture,
Chiba University, Matsudo, Chiba 271, Japan*

Plantlets of *Statice* (*Limonium* Hybrid) were tissue-cultured in glass test tube with plastic-formed cap (the number of air changes per hour: 1.5 hr⁻¹) for multiplication under higher CO₂ gas concentration and higher photon flux (150 μmol m⁻²sec⁻¹, 400-700 nm) conditions than normal culture conditions. Concentration of CO₂ gas outside the vessel during the light period, containing the plantlet, was maintained at about 950 vpm to increase the inside concentration. The inside concentration during the light period decreased day by day to 200-400 vpm at 50 days after treatment, showing the photomixotrophic growth of the plantlets. The growth of the plantlets was promoted by CO₂ enrichment under higher photon flux.