

一般報文

通気培養におけるスペ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

渡邊浩一郎・渡邊幸雄・嶋田典司

千葉大学園芸学部
(〒271 松戸市松戸 648)

(1989年11月29日受付)
(1990年1月19日受理)

培養容器内に通気を行って培養したスペ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（以下、RuBPCase）に及ぼす培地ショ糖濃度の影響について検討した。通気を行い、40日間培養した小植物体の生育は、ショ糖濃度0%区で最も良好で、ショ糖濃度が高くなるにつれ低下した。培養20, 30および40日後のいずれの小植物体でも、見かけの光合成速度は培地にショ糖が含まれると低下し、30日後の3%区、40日後の2および3%区では、見かけの光合成はみられなかった。培地ショ糖濃度が高くなるにつれ、RuBPCase活性は低下し、その量も減少した。見かけの光合成がみられなかった小植物体でもRuBPCase活性を有していた。以上より、通気を行って培養した小植物体は、培地にショ糖が含まれない場合、見かけの光合成速度も著しく高かった。その結果、生育が促進されたものと思われる。

1. 緒 言

植物組織培養において、小植物体の生育を促進させるための方法のひとつとして、小植物体の光合成速度を高めることが考えられている。

見かけの光合成を行う小植物体を、炭素源として糖を添加した培地で、密閉した容器を用いて培養した場合、初期における培養容器内のCO₂濃度は、植物の平均的なCO₂補償点濃度よりわずかに高い程度であり、実際にはCO₂の補給がないため光合成をほとんど行うことができない¹⁾。そこで、培養容器内にCO₂施用を行い独立栄養生長の侧面を高め、小植物体の生育を促進させることができ試みられている。CO₂施用を行った場合、小植物体の生育は培地のショ糖濃度を3%より低くすると良好になることが^{2~4)}、また、光合成速度はCO₂施用を行わない場合より高くなることが^{3, 4)}、それぞれ報告されている。

一方、光合成に及ぼす内的支配因子を明らかにし、C₃植物の光合成効率促進のため、栽培されているイネおよびコムギでは、光合成速度と炭酸固定のkey enzymeであるRuBPCaseの関係について検討されている。そ

の結果、光合成速度とRuBPCaseの活性および量の間に正の相関関係がみられることがから、RuBPCase量が光合成の律速因子となることが報告されている^{5~7)}。

前報⁸⁾では、従属栄養生長下で生育しているカーネーション小植物体の光合成とRuBPCase活性について検討した。その結果、小植物体はRuBPCase活性を有しており、その活性は培地ショ糖濃度を1.5%として培養した小植物体の方が3%の場合よりも高かった。しかし、見かけの光合成速度には培地ショ糖濃度による影響はみられなかったことを報告した。

そこで、本研究では、培養容器内に通気を行い、組織培養における小植物体の見かけの光合成速度とRuBPCaseの関係を明らかにする目的で、スペティフィラムを供試し、小植物体の生育、見かけの光合成、RuBPCaseの活性および量に及ぼす培地ショ糖濃度の影響について検討した。

2. 材料および方法

(1) 供試小植物体、培地組成および培養条件

供試小植物体であるスペティフィラム (*Spathiphyllum* cv. 'Merry') は、約6週間ごとに挿し芽により継代

培養し、実験に必要な本数を得るまで増殖して用いた。実験に供した小植物体は、新鮮重が約40～60mgで、葉が約3～4枚、新しい芽を1個含むように調製した。培養開始時の小植物体の新鮮重は、実験に供した小植物体と同じくらいの大きさの小植物体を10～15本ほど別に調製し、その重量を測定することにより求めた。

培地は、Murashige-Skoog 培地⁹⁾にベンジルアデニンを1mg/l 添加した。培地ショ糖濃度は、0, 1, 2および3% (w/v) の4区を設けた。培地のpHは5.6に調整し、寒天は Difco Bacto Agar を用い、0.7% (w/v)とした。

培養容器としては200ml容ガラス製培養用三角フラスコを、また栓としてシリコンゴム栓を用い、培地を約50ml分注した。1フラスコ当たり5本の小植物体を培養した。

フラスコ内への通気は以下のように行った。シリコンゴム栓にガラス管を通すことにより、フラスコに給、排気口を設けた。エアーポンプを用いて、培養を行った恒温室内の空気を、脱イオン水を通じて湿潤にし、メンブランフィルター（マイレクス GS 0.22μm：(株)日本ミリポア工業製）を通して除菌した後、フラスコ内に送った。通気量は、毎分約140mlであった。

また、小植物体の生育に及ぼす通気の影響を検討するため、通気を行わない培養として、シリコンゴム栓で密栓したフラスコで小植物体の培養を行った。

培養は、温度条件が初期約25°C、暗期約21°Cの恒温室内で行った。照明は、白色蛍光灯を用い、初期14時間とした。なお、光条件は、培地面の光量子束が約26μmol/m²·secであった。

なお、供試小植物体の増殖培養は、培地のショ糖濃度は3% (w/v)とし、培養容器としてガラス製平底試験管（直径25mm×高さ120mm）とプラスチックキャップを用いたほかは、上述の培地組成および培養条件で行った。

(2) 生育測定

20, 30および40日間培養した小植物体の地上部の新鮮重を測定した。

(3) 見かけの光合成の測定

見かけの光合成の測定は、同化箱法閉鎖式測定法¹⁰⁾に準じて行った。すなわち、通気を行って培養した小植物体を、測定容器として用いたガラス製平底試験管（直径25mm×高さ120mm、実験に供した培地と同じショ糖濃度の培地を約7ml分注）に移した後、CO₂濃度が一定（約400ppm）の空気を十分入れ、二重ゴム栓で密栓した。直ちに、試験管内の気体を採取し、CO₂濃度をガ

スクロマトグラフで測定した（Q₁）。試験管は、初期培養条件下におき、一定時間後、試験管内の気体を採取し、CO₂濃度を測定した（Q₂）。Q₁−Q₂で得られたCO₂濃度差が、小植物体の見かけの光合成により生じたものと見なした。また、試験管を暗条件下におくことにより暗呼吸の測定を行った。

なお、ガスクロマトグラフ（263-50形：(株)日立製作所製）は、クロマトデータ処理装置（D-2500形：(株)日立製作所製）を接続して用いた。また、カラムは、活性炭（メッシュ：60/80）を充填したステンレス製カラム（内径：3mm、長さ：1m）を、キャリアガスはヘリウム（流量：60ml/min）を、検出器は熱伝導検出器をそれぞれ用いた。カラム温度および検出器温度はそれぞれ50°Cとした。

(4) クロロフィル含量、RuBPCase活性および量の測定

クロロフィル含量はArnonの方法¹¹⁾に、RuBPCase活性はRackerの方法¹²⁾に準じてそれぞれ測定した。酵素活性は、クロロフィル1mg・単位時間(hr)当たりに固定されるCO₂のモル数で表した。

RuBPCase量の定量は、以下のように行った。活性を測定した粗酵素液について、Makinoらの方法¹³⁾に準じてSDSポリアクリルアミド電気泳動を行った後、コマシーアリニアントブルーR-250によるRuBPCaseの染色バンドの吸光度をデンシティーメーター（デンシトマスターケミック-H：(株)アタゴ製）で測定した。なお、標準タンパク質としては、牛血清アルブミンを用いた。

3. 結 果

小植物体の生育は、20, 30および40日間培養した小植物体1本当たりの新鮮重の増重で示した。

通気を行って培養した小植物体の生育をFig. 1Aに示した。培養20日後では、増重に培地ショ糖濃度による区間差はみられなかった。30日後では、0%区で1, 2および3%区よりやや良好な生育を示した。40日後では、0%区で約128mgと最も増加し、増重はショ糖濃度が高くなるにつれ小さくなり、3%区では約73mgにとどまった。

通気を行わずに培養した小植物体の生育をFig. 1Bに示した。培養20, 30および40日後のいずれも、培地ショ糖濃度が低くなるに従い、増重も小さくなつた。40日後では、3%区で約79mg増加したのに対し、0%区では約30mgにとどまった。

次に、通気を行って培養した小植物体について、見かけの光合成、RuBPCase活性および量の測定を行った。小植物体の見かけの光合成速度をFig. 2に示した。

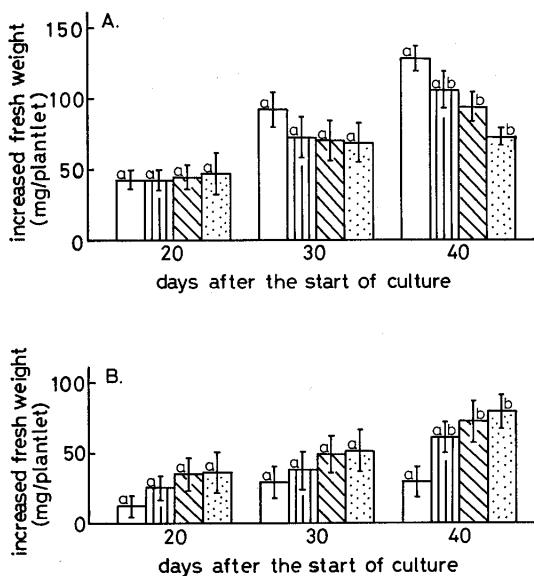


Fig. 1 Effect of sucrose concentration in the medium on growth of plantlet performing aeration (A) and non-aeration (B). Sucrose concentration 0% (□), 1% (▨), 2% (▨▨), 3% (▨▨▨). Data were represented by means with standard deviation of 10 replication. Standard deviation was indicated by vertical bars. Means with different letters were significantly different ($p < 0.05$) according to student's *t*-test.

見かけの光合成速度は、培養 20 日後では、培地シロ糖濃度 0% 区で 1, 2 および 3% 区より高かった。培養 30 および 40 日後では、培地シロ糖濃度 0 および 1% 区で 2 および 3% 区より高かった。また、培養日数が長くなるにつれ、見かけの光合成速度は低下する傾向にあった。

培地シロ糖濃度 3% で 30 および 40 日間、2% で 40 日間それぞれ培養した小植物体は、見かけの光合成を示さなかった。見かけの光合成速度が負の値の場合、測定時間中に試験管内 CO_2 濃度は上昇したことを見ている。

そこで、見かけの光合成を示さなかった小植物体は光合成を行っていなかったのか、あるいは光合成による CO_2 の取り込みより呼吸による CO_2 の放出が優っていたのかを検討するため、30 および 40 日間培養した小植物体の暗呼吸を測定した。その結果、小植物体の暗呼吸速度を見かけの光合成速度と同じ $\mu\text{mol CO}_2/\text{mgchl} \cdot \text{hr}$ で表したところ（測定時間中に試験管内の CO_2 濃度が

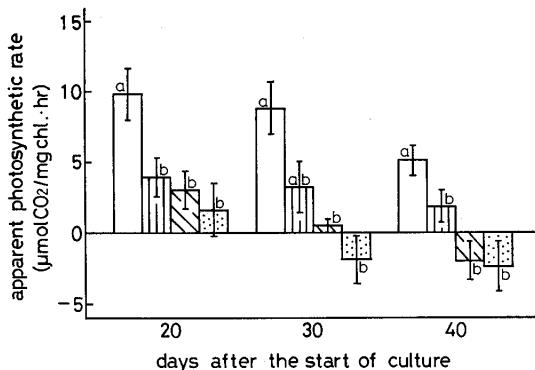


Fig. 2 Effect of sucrose concentration in the medium on apparent photosynthetic rate of plantlet performing aeration. Sucrose concentration 0% (□), 1% (▨▨), 2% (▨▨▨), 3% (▨▨▨▨). Data were represented by means with standard deviation of 5 replication. Standard deviation was indicated by vertical bars. Means with different letters were significantly different ($p < 0.05$) according to student's *t*-test.

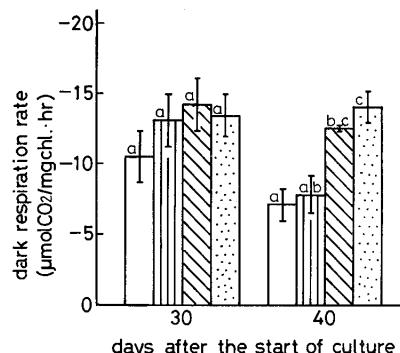


Fig. 3 Dark respiration rate of plantlet cultured in 0, 1, 2 and 3% sucrose concentration after 30 and 40 days performing aeration. Sucrose concentration 0% (□), 1% (▨▨), 2% (▨▨▨), 3% (▨▨▨▨). Data were represented by means with standard deviation of 5 replication. Standard deviation was indicated by vertical bars. Means with different letters were significantly different ($p < 0.05$) according to student's *t*-test.

上昇したことから負の値で示した）、30 および 40 日後のいずれも、培地シロ糖濃度が高い区で呼吸速度が高い傾向がみられた（Fig. 3）。

小植物体の RuBPCase 活性を Fig. 4 に示した。培

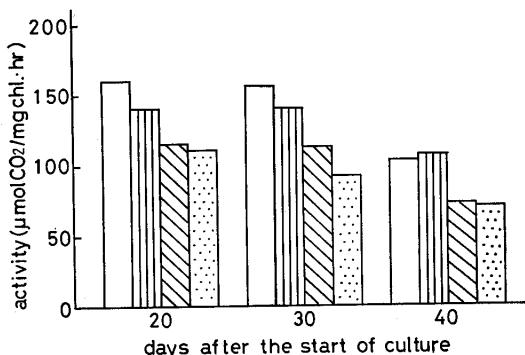


Fig. 4 Effect of sucrose concentration in the medium on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase activity in plantlet performing aeration. Sucrose concentration 0% (□), 1% (▨), 2% (▨▨), 3% (▨▨▨). Data were represented by means of 2 replication.

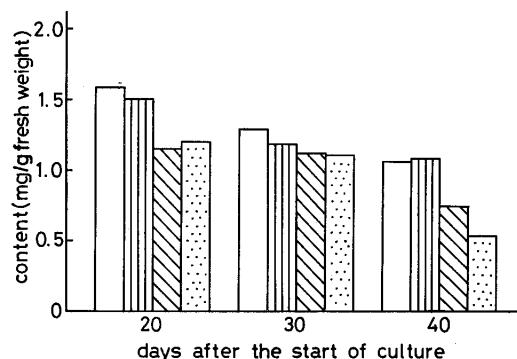


Fig. 5 Effect of sucrose concentration in the medium on ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase content in plantlet performing aeration. Sucrose concentration 0% (□), 1% (▨), 2% (▨▨), 3% (▨▨▨). Data were represented by means of 2 replication.

養 20 および 30 日後では、培地ショ糖濃度が高くなるにつれ、RuBPCCase 活性は低くなかった。40 日後では、0 および 1% 区で 2 および 3% 区より高かったが、0% 区と 1% 区の間、および 2% 区と 3% 区の間に区間差はほとんどみられなかった。また、活性は、いずれのショ糖濃度区においても、培養 20 日から 30 日ではほとんど低下しなかったが、30 日から 40 日で低下した。

小植物体の RuBPCCase 量を **Fig. 5** に示した。培養 20 日後では、RuBPCCase 量は培地ショ糖濃度 0 および % 区で 2 および 3% 区より多かった。30 日後では、

培地ショ糖濃度が高くなるにつれ、わずかに減少した。40 日後では、培地ショ糖濃度が高くなるにつれ減少したが、0% 区と 1% 区の間に区間差はみられなかった。RuBPCCase 量は、培養日数が長くなるにつれ減少した。

4. 考 察

培養容器内に通気を行って培養した小植物体の光合成と RuBPCCase の関係を明らかにするために、スペティフィラム小植物体の生育、見かけの光合成、RuBPCCase の活性および量に及ぼす培地ショ糖濃度の影響について検討を行った。

見かけの光合成能を有する小植物体を閉栓容器内で培養した場合、初期における培養容器内の CO₂ 濃度は、植物の平均的な CO₂ 补償点濃度よりも高くなるので、CO₂ 濃度が制限因子となり、実際には光合成をほとんど行うことができない¹⁾。したがって、小植物体の光合成と RuBPCCase の関係について検討する場合、小植物体が見かけの光合成を実際に行うことができるような条件下で小植物体を培養し、見かけの光合成、RuBPCCase の活性および量を測定することが望ましいのではないかと考えられた。そこで、本研究では、見かけの光合成、RuBPCCase の活性および量は、大気を通気して培養した小植物体について測定した。

培養小植物体の生育に及ぼす CO₂ 施用と培地ショ糖濃度の影響については、スターチス²⁾、シンビジウム³⁾ およびカーネーション⁴⁾で、また培養小植物体の光合成速度と培地ショ糖濃度の関係については、バラ¹⁴⁾、ダグラスモミ¹⁵⁾で、それぞれ報告されている。

本研究においても、これらの報告とほぼ一致した結果が得られた。すなわち、小植物体の生育は、培地ショ糖濃度 0, 1 および 2% では、通気を行って培養した場合で、通気を行わない場合より優っていた。通気を行って培養した場合、小植物体は、培地ショ糖濃度が 3% より低くなるにつれて、良好な生育を示し、0% で最も良好であった。また、小植物体の見かけの光合成速度は、いずれの培養日数においても培地ショ糖濃度 0% で最も高く、培地にショ糖が含まれると低下した。

したがって、通気を行って小植物体を培養する場合においては、培地ショ糖濃度を 3% から下げるにより、見かけの光合成速度を高めることができ、小植物体の良好な生育をもたらしたものと思われる。また、培地のショ糖濃度が高いと生育が低下することについて、培地のショ糖の利用率も低下するのかは、さらに検討を要すると思われる。

次に、栽培されているイネ^{5,6)} およびコムギ^{7,16,17)} で

は光合成速度と RuBPCase 活性および RuBPCase 量の間に、またインゲンマメ¹⁸⁾では光合成速度と RuBPCase 活性の間に、それぞれ正の相関関係がみられることが報告されている。そこで、通気を行って培養した小植物体において、培地のショ糖濃度が異なることにより生じた見かけの光合成速度の変化と、光合成の炭酸固定の key enzyme である RuBPCase の活性および酵素量の変化の間に同様な関係がみられるかどうか検討した。

培養 20, 30 および 40 日後において、見かけの光合成速度、RuBPCase の活性および量は、培地にショ糖が含まれると、いずれも低下する傾向にあった。また、培地ショ糖濃度 3% で 30 および 40 日間、2% で 40 日間それぞれ培養した小植物体は、見かけの光合成がみられなくなったが、RuBPCase 活性は、いずれも 0% で培養した小植物体の約 70% 程度有していた。

見かけの光合成がみられない小植物体が RuBPCase 活性を有することは、前報⁸⁾においても、カーネーション小植物体について報告した。RuBPCase 活性を有した小植物体で見かけの光合成がみられなかつたことについては、以下のように考えられる。

すなわち、見かけの光合成速度は、眞の光合成速度から暗呼吸速度を差し引いたものとみなすことができる。そこで、測定した見かけの光合成速度と暗呼吸速度から眞の光合成速度を求めた。その結果、眞の光合成速度は ($\mu\text{ mol CO}_2/\text{mgchl} \cdot \text{hr}$ で表した)、30 日後では、0% 区で約 20, 1, 2 および 3% 区では約 15~17 であり、40 日後では、いずれの培地ショ糖濃度においても約 11~12 であった。従って、見かけの光合成がみられなかつた小植物体は、眞の光合成速度が正の値を示したことから、光合成を行っていないのではなく、光合成による CO_2 の取り込みより呼吸による CO_2 の放出が大きかったものと思われる。

また、培養日数が長くなるにつれ、見かけの光合成速度、RuBPCase の活性および量は低下する傾向にあった。培養日数と小植物体の光合成速度については、カーネーションで、培養開始時で 10, 19 および 30 日後より光合成速度が高いことが報告されている⁴⁾。また、培養日数と小植物体の RuBPCase 活性について、前報⁸⁾では、カーネーションで、培養 10 日後で 20 および 30 日後より RuBPCase 活性が高かったことを報告した。さらに、栽培されているイネの葉の一生において、展開中の葉で光合成速度、RuBPCase 活性は高く、また RuBPCase 量が多く、その後老化に伴い低下することが報告されている^{5, 6, 19)}。したがって、組織培養における小植物体も、培養日数が長くなることにより老化するなら

ば、RuBPCase 量は減少し、RuBPCase 活性は低下し、見かけの光合成速度も低下するのではないかと思われる。

以上より、RuBPCase は培地のショ糖に大きく影響され、培地にショ糖が含まれると小植物体へのショ糖の供給が多くなり、生成される酵素量が減少し、その結果、炭酸固定能が低下し、見かけの光合成速度も低下するものと考えられる。

本研究を行うに当たり、スパティフィラム試験管苗を供与下さった、(有)大十園ならびに(株)プランテックに感謝いたします。

文 献

- 1) 富士原和宏、古在豊樹、渡部一郎, 1987. 農業気象, **43**: 21-30.
- 2) 古在豊樹、岩浪好恵、富士原知宏, 1987. 植物組織培養, **4**: 22-26.
- 3) 古在豊樹、大木 浩、富士原和宏, 1987. 園芸学会春期大会発表要旨, p. 366-367.
- 4) Kozai, T., Y. Iwanami, 1988. J. Jpn. Soc. Hotr. Sci., **57**: 279-288.
- 5) Makino, A., T. Mae, K. Ohira, 1985. Planta, **66**: 414-420.
- 6) Makino, A., T. Mae, K. Ohira, 1984. Plant Cell Physiol., **25**: 511-521.
- 7) Evans, J. R., 1986. Planta, **167**: 351-358.
- 8) 渡邊浩一郎、渡邊幸雄、鳴田典司, 1989. 植物組織培養, **6**: 73-79.
- 9) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**: 473-497.
- 10) 青木正敏著・編, 1986. 農業気象・環境学, p. 66-67, 朝倉書店、東京.
- 11) Arnon, D. I., 1949. Plant Physiol., **24**: 1-15.
- 12) Racker, E., 1962. In "Methods in Enzymology," Vol. 5 (ed. by S. P. Colowick, N.O. Kaplan), p. 266-270, Academic Press, New York.
- 13) Makino, A., T. Mae, K. Ohira, 1986. Agric. Biol. Chem., **50**: 1911-1912.
- 14) Langford, P. J., Wainwright, 1987. Ann. Bot., **60**: 633-640.
- 15) Evers, P.W., 1982. Plant Tissue Culture 1982, Proceeding 5th International Congress Plant Tissue and Cell Culture, p. 263-264.
- 16) Evans, J. R., 1983. Plant Physiol., **72**: 297-302.
- 17) Evans, J. R., J. R. Seemann, 1984. Plant Physiol., **74**: 759-765.
- 18) Von Caemmerer, S., G. D. Farquhar, 1981. Planta, **153**: 376-387.
- 19) Makino, A., T. Mae, K. Ohira, 1983. Plant Physiol., **79**: 1002-1007.

Summary

Effect of Sucrose Concentration in the Medium on Growth, Apparent Photosynthesis and Ribulose-1, 5-bisphosphate Carboxylase of Spathiphyllum Plantlets in Aeration Culture

Koichiro WATANABE, Yukio WATANABE and Noritsugu SHIMADA

Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271, Japan

Experiments were carried out to investigate an effect of sucrose concentration in the medium on growth, apparent photosynthesis, activity and content of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase (RuBPCase) of plantlets cultured in vessels performed aeration. Growth of plantlet after 40 days was the best in 0% sucrose concentration, decreasing as sucrose concentration increased. Apparent photosynthetic rate decreased after 20, 30 and 40 days as sucrose was contained in the medium. In 2% sucrose concentration after 20 days and 3% sucrose concentration after 30 and 40 days, apparent photosynthesis was not found. The higher sucrose concentration in the medium lowered activity and content of RuBPCase in plantlet. plantlets which did not show apparent photosynthesis had also RuBPCase activity. Therefore, it seemed that decreasing sucrose concentration in the medium was effective for increasing of RuBPCase activity. The apparent photosynthetic rate was higher, as the result, the growth of plantlets may be promoted.