



Title	気相型酸素電極法によるパインアップル培養植物体のCAM型光合成の評価
Author(s)	松川, 理恵; 川満, 芳信; 村山, 盛一
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(45): 17-28
Issue Date	1998-12-01
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3680
Rights	

気相型酸素電極法によるパイナップル培養植物体の CAM 型光合成の評価

松川理恵*・川満芳信*・村山盛一*

Rie MATSUKAWA, Yoshinobu KAWAMITSU and Seiichi MURAYAMA :
Estimation of CAM Ability *in vitro* Pineapple by means with Oxygen Electrode.

キーワード : 気相型酸素電極, パイナップル, 培養植物, CAM型光合成,
容器内CO₂濃度, 培地糖濃度

Key word : CAM, *In vitro*, Sugar content, O₂ evolution, Pineapple,
Tissue culture

Summary

To make clarify the photosynthetic mode *in vitro* pineapple plantlets, crown of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. cv. Smooth cayenne, N67-10) were cultured *in vitro* under photoautotrophic conditions on Murashige and Skoog medium. CO₂ dependent O₂ evolution were determined with the gas phase oxygen electrode system at 900 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ of PFD, 3 % of CO₂, 1 L $\cdot\text{min}^{-1}$ of flow rate, and 2.5cm² of disk area.

The photosynthetic ability of tissue cultured plantlets were induced at early stages of the culture. Sugar content in medium altered the leaf sugar content, resulting in influence the leaf photosynthetic rate. Malate contents in leaves were increased at dark period and decreased at light period, suggesting the performance of the CAM type photosynthesis. However, diurnal changes in CO₂ concentration in culture vessel were similar to the type of C₃ photosynthesis. Therefore, It was concluded that pineapple plantlets *in vivo* exhibiting the CAM cycling mode.

緒 言

パイナップルは、自家不和合性を有するため種子による増殖が極めて困難な植物で、その増殖は限られた数の吸芽やえい芽による栄養繁殖によって行われている。近年、組織培養による増殖法が有効な手段として行われるようになったが、CAM型光合成を有するパイナップルの培養期間は長く、効率的な増殖法として利用するためには培養期間の短縮化が課題となっている。培養植物は、一般の植物に比べ器官分化が不十分で、また、富栄養培地で生育させるため従属栄養的で光合成能力は低いと言われ

* 琉球大学農学部生物生産学科

琉球大学農学部学術報告 45 : 17~28 (1998)

ている³⁾。CAM型光合成の特徴として、夜間に外気からCO₂を吸収し葉肉細胞の液胞中にそれをリンゴ酸の形で蓄積する。昼間は気孔を閉じ夜間に蓄積したリンゴ酸から脱炭酸し、最終的にカルビン回路に取り込むという特異的なCO₂吸収の日変化特性を示す。この一日のCO₂吸収特性からみてCAM植物を4つのタイプに分類することができるが、パインアップルは全ての環境下でCAM型を崩さない obligate CAMとして知られ、器官分化が未発達な培養段階ではどのような光合成タイプを示すか個体発生の面からも興味深い。

培養期間の短縮化を図るためには、植物体の生長に対する培養環境の影響を把握し、それを制御することが重要である。培養段階は、通常の実環境とは大きく異なり、閉鎖系という特殊環境の下で栄養源を含んだ培地上で植物を生育させる。培養器の高い気密性のため、培養植物の光合成は器内のCO₂濃度に著しく律速されていると言われる^{2,4,6)}。培養器内の環境を改善することで、光合成および生長が著しく促進されるとの報告⁶⁾もある。パインアップルの場合、特異的なCAM型光合成を有することから、培養段階の光合成特性を評価し、その最適培養条件を明かにすることは極めて重要である。

本研究では、気相型酸素電極を用いて培養植物体の光合成速度の測定法を確立した。次に、培養植物がどのような光合成能力を示すかを調べ、特に、培地の糖含量が光合成の発現にどのように影響を与えるか検討した。

実験材料及び方法

パインアップルの培養方法

供試材料は *Ananas comosus* (L.) Merr. cv. N67-10を用いた。パインアップルの培養は以下の要領で行った。

材料の採取：培養に用いた冠芽は株の生育状況、病気、病虫害の有無を確認し健全な株から採取した。

殺菌：冠芽は枯葉を除き20～30分間水洗後、外側の葉を数枚除き、基部から10cmのところまで葉を切除した。続いて、冠芽の基部を2～3cm残して切り取り、中性洗剤で洗浄した。水洗後、70%エタノールに10分間浸漬し、その後、1%アンチホルミンに10分間浸漬した。これを滅菌水で2～3回すすぎ殺菌を行った。

外植体の摘出：外側の葉を直径5mmの淡黄色の中心部まで除去し、基部を薄く切除した後、生長点を含む茎葉を8等分にイチョウ切りして、各々の切片を1%アンチホルミンで2～3分滅菌した。殺菌水で2～3回濯ぎ、ろ紙で水気を吸い取った後、培地に植え付けた。

培養：培地はMS培地⁹⁾に3%のショ糖を添加し、pHを5.6～5.8に調整した。カルス形成用培地には、NAA(2ppm)とBA(2ppm)を添加した0.8%寒天培地とし、増殖用培地にはBA(1ppm)を添加した液体培地を用いた。発根用培地にはホルモンフリーの液体培地を用いた。培養には、200mlの丸型培養瓶を用い、培地を20ml分注して滅菌後、カルス形成用培地には瓶当たり1個体置床した。約2ヶ月後、カルスや多芽体、植物体を増殖用培地に継代し瓶当たり5個体置床して器官の分化および増殖を行なった。葉数が5枚、生重で1.2～1.5gの植物はホルモンフリー培地に移し発根を促進させた。置床後、植物は16時間および10時間日長下で培養した。明期の光強度は白色蛍光灯を利用し45 μmol · m⁻² · s⁻¹に、昼夜温度は26℃に設定した。

気相型酸素電極による光合成速度測定

測定には、気相型酸素電極(LD-S, CBI-D, Hanzatech)を用いて行い、CO₂依存の酸素放出速度を光合成速度とした。培養植物から葉のディスク(2.5cm²以上)打ち抜き測定容器(直径5cm)にセットし測定した。測定中の葉の乾燥を防ぐため、導入空気はチャンバーを循環している水温で飽和させ、また、チャンバー内には水を含ませたスポンジマットを敷いた。チャンバー内温度の制御は、葉片電極

ユニットの上下部の水ジャケット部と恒温水槽をポンプで循環させて行った。特に言及しない限り、測定時のチャンバー内温度は26℃、光強度は $900\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、 CO_2 濃度は3%、流量は $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ とした。

培養植物の光合成に対し測定時の光強度、チャンバー内へのガスの供給流量、 CO_2 濃度が与える影響を検討した。材料は、冠芽由来カルスより分化した幼植物を発根用培地（ホルモンフリー）に継代後、1ヶ月経過した展開葉5枚程度、生重1.2~1.5gの幼植物体を用いた。測定は午前9時に開始し、午後2時までには終了した。最適光強度は、ランプとチャンバーの間の遮光板を変え、暗黒から $1500\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ まで変化させて調べた。光強度は光量子センサー（LI-190、ライカー社）で測定した。暗呼吸はチャンバー全体をアルミホイルでカバーして測定した。チャンバー導入空気流量の最適値は、チャンバーへの流量を0.05、1、 $2\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ と変化させて調べた。最適 CO_2 濃度の決定は、導入空気濃度を0.03、1、3、5%と変化させ測定した。

培養植物の光合成速度は日変化する事が予想された。そこで、光合成速度に対する採取時間の影響と葉位の影響を検討した。植物は、MS基本培地に3%ショ糖を加え、pH5.6に調節し、ホルモンの添加は行わなかった。葉身採取時刻と光合成速度との関係を調べるために、完全展開した第2、3枚目の葉身を9:00、12:00、15:00、18:00、21:00に異なる瓶から採取し直ちに光合成速度を測定した。最適測定葉位の検討には採取葉位を第1展開葉から順に測定し、1枚の葉身の先端部と基部を切り離し葉ディスクを作成した。

植物体の大きさと光合成速度との関係は、莖葉が分化しかつ測定可能な葉片を持つ順化前を小とし、生重が約1.2g前後の順化可能な植物体の中、順化できるにも関わらず培養を続けた生重2.5g前後のものを大とし、各々の光合成を測定した。継代期間の長さが光合成速度に与える影響では、順化可能な植物体を用い、ホルモンフリー培地に移してから光合成速度を1週目と4週目で比較した。

葉緑素含量は、80%アセトンで抽出後、3000rpmで10分間遠心分離し、665と645nmの吸光度を分光光度計で測定し、求めた。リンゴ酸含量は、葉片を20分間煮沸後摩砕し、3000rpmで遠心し孔径0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過後HPLCで測定した。

培地の糖が光合成能力に及ぼす影響

炭素源でもある培地の糖がパインアップル培養植物の光合成速度にどのように影響を与えるかを調べた。測定には、生重約1.5gの培養植物を用いた。測定時間は、葉片の糖の蓄積が光合成速度に与える影響を少なくするために、11時まで完了し、また、葉片の糖含量の最も高い完全展開葉2~3枚目の葉を供試した。培地の糖含量の処理は、上述の培養植物体を標準糖含量（ $30\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ）の培地上で1週間培養した後、0、15、30、 $60\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ の培地に移した。光合成速度の測定は最適条件下で行った。

培地の糖が葉の糖含量に与える影響では、2~3枚目の完全展開葉を供試した。また、葉片の糖の蓄積が光合成に与える影響を少なくするために、午前11時まで光合成速度の測定は終了した。培地の糖含量は前述の方法で処理した。葉の糖含量は、有機酸と同様に煮沸摩砕した上澄液に $0.25\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ のアンバーライトをいれ30分放置後HPLCで定量した。

培養器内 CO_2 濃度の日変化

培養器内の CO_2 濃度は、培養瓶の蓋にガスの出入り口を取り付け CO_2 赤外線分析計（LI-6251、ライカー社）と連結し、閉鎖状態で測定した。また、循環ガスが CO_2 赤外線分析計のサンプルセルに入る直前に除湿部を設け培地および植物体から出る水を取り除いた。測定は、4日間連続して行った。

実験結果

葉身採取時刻と葉位が光合成速度に与える影響

最も光合成速度の高い午前9時の値を100%とし、葉片採取時間と光合成との関係を見た (Fig. 1). 午前9時の光合成速度は $16.93 \mu \text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ で、午後12時では $16.53 \mu \text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であった. しかし、時間の経過と共に光合成速度は低下し、午後6時では $8.58 \mu \text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ となった. 葉片の採取時間が経過するにつれ光合成速度が低くなる原因として、葉内に蓄積される光合成産物によるフィードバック阻害が考えられる. Pitman (1975) ら¹⁰⁾ のオオムギの例でも、酸素放出量は朝9時に最も高く、時刻が経過するにつれて低下している.

葉位別の光合成速度は、下位葉から上位葉になると高くなり、4葉位目で $15 \mu \text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ を示し、それ以降は定常値に達した (Fig. 2). このように完全展開葉から6枚目までは光合成速度が安定していることが明かとなった.

気相型酸素電極による最適光合成測定条件

次に、培養植物の光合成速度に及ぼす光強度、チャンパー内へのガスの供給流量、および CO_2 濃度の影響を検討した. まず、“光-光合成関係”を検討したところ、 CO_2 濃度3%条件ではあるが、 $750 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 付近に光飽和点がみられた (Fig. 3). これは、培養条件下の $45 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ に比べ14倍以上の光強度であり、培養環境は極めて弱い光であったと考えられる. 生重約3gの培養植物の光飽和点も同様に $750 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 付近にあり、器官分化が生じた段階でも光に対する反応はほぼ一定であるとえられる.

チャンパー内を流れる CO_2 ガスの流量と光合成速度との関係を見ると、 $0.5 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ で $2.1 \mu \text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であったが、 $1 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ では最大値の $4.62 \mu \text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ となった (Table 1). また、 $2 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 以上の流量では低下に転じた.

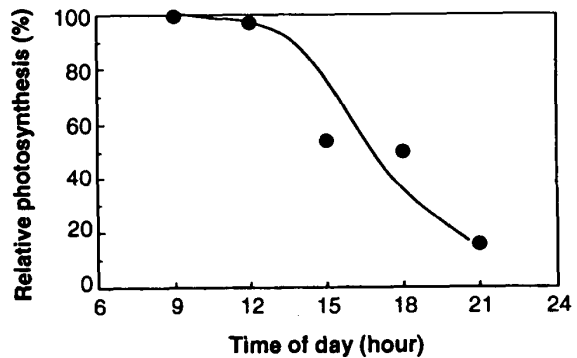


Fig. 1. Changes in photosynthesis with sampling time.

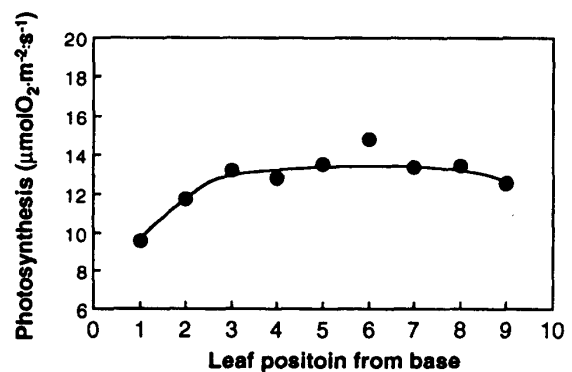


Fig. 2. Changes in photosynthesis with leaf position in tissue cultured pineapple plants.

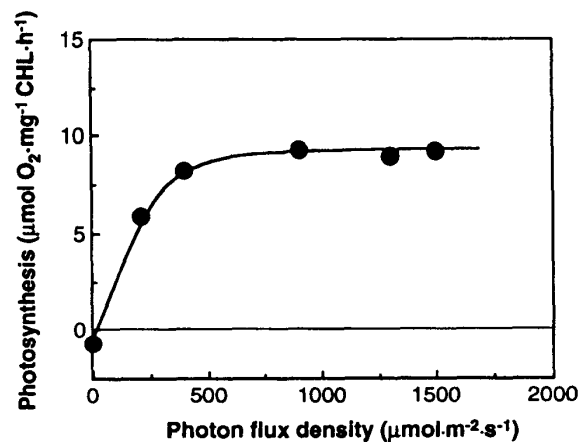


Fig. 3. Relationship between photon flux density and photosynthesis.

Table 1. Effect of flow rate flushing to the O₂ electrode chamber on photosynthesis.

Flow rate (L · min ⁻¹)	Photosynthesis	
	($\mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	($\mu\text{molO}_2 \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
0.5	2.10±0.45	2.13±0.37
1.0	4.62±1.03	3.59±0.71
2.0	2.36±1.46	1.80±1.11

Table 2. Effect of CO₂ concentration on photosynthesis.

CO ₂ (%)	Photosynthesis	
	($\mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	($\mu\text{molO}_2 \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
0.03	-0.17±0.26	-0.16±0.22
1.0	3.92±0.9	2.76±0.66
3.0	4.62±0.97	3.63±0.73
5.0	2.06±0.47	1.97±0.52

The conditions for the measurements of photosynthesis were as follows; 900 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of PFD, 26°C of temperature, 1L · min⁻¹ of flow rate. Leaf disks were incubated under growth chamber illuminating from 9:00 to 19:00 at 26°C and 45 $\mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

CO₂濃度の影響では0.03%で光合成速度が-0.17 $\mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。濃度が上昇すると増大し、3%で最大値の4.62 $\mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ に達し、逆に5%では減少した (Table 2)。

気相型酸素電極による光合成能力の評価

前項で明らかにした最適測定条件を用いて培養植物の光合成能力を評価した。培養植物は器官分化が不十分で、光合成能力は極めて低いとされている。茎葉の分化した植物は光合成能力をもつと言われるが、培養条件は閉鎖系であり、併せてCO₂濃度が低く、光合成に対する条件は不完全である。植物体の大きさの違いが光合成能力に与える影響では、成長に伴って光合成速度も増加した (Fig. 4)。特に、サイズの大きい植物体では、比例的に光合成速度が増大したことから、条件さえ整えば培養植物は十分に光合成を行うことができると考えられる。継代の期間と光合成能力との関係では、1週目の植物体では1.84 $\mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、4週目は4.62 $\mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ となり培地の栄養源の影響が考えられる (Table 3)。

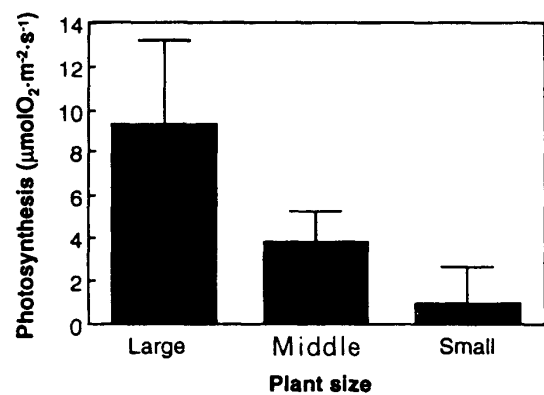


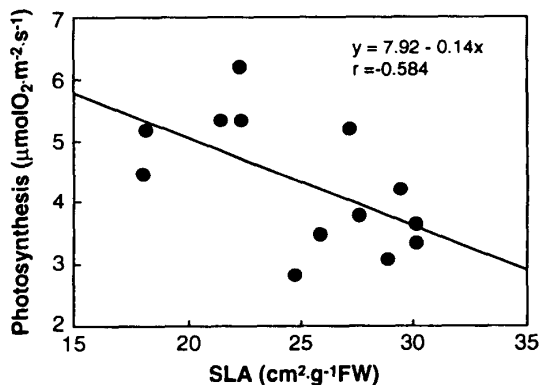
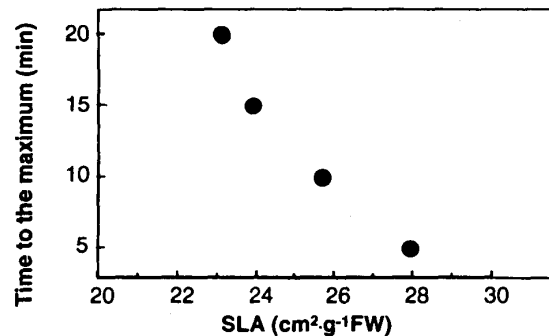
Fig. 4. Effect of plant size on photosynthesis in vitro pineapple. Bars in the figure indicate \pm SD

Table 3. Effect of duration of tissue culture on photosynthesis.

Duration Of Culture	Photosynthesis	
	($\mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	($\mu\text{molO}_2 \cdot \text{mgChl}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
1 week	1.84 \pm 1.20 (65.4)*	0.86 \pm 0.59 (67.8)
4 weeks	4.62 \pm 1.03 (22.2)	3.59 \pm 0.71 (19.9)

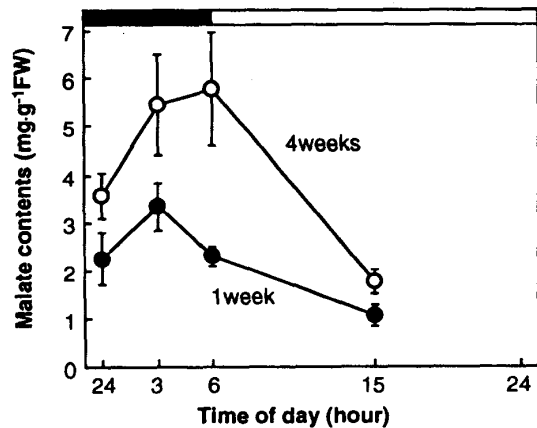
*() is CV (%)

また、変動係数も1週目の植物体では大きく、培養植物における器官分化の不十分さから生じる光合成速度の不安定性が窺える。比葉面積比 (SLA) と光合成との関係では、葉が厚くなれば光合成能力は高くなった (Fig. 5)。これは、葉の厚さが葉緑素含量の増加、および器官分化の発達と関連していると考えられる。また、葉の厚い培養植物は光合成速度が安定するまでに15~20分要した (Fig. 6)。一般に、酸素電極は高 CO_2 で測定するため、気孔による光合成速度の影響は少なく、葉の厚さによる影響は低いと考えられていた。しかし、培養植物は3%という高 CO_2 であるにも関わらず、葉の厚さと光合成速度との関係が顕著であったことから、葉の厚い培養植物の CO_2 飽和点は比較的高いと考えられる。

**Fig. 5. Relationship between SLA of flesh weight and photosynthesis in vitro pineapple plants.****Fig. 6. Relationship between SLA and time to achieve the maximum photosynthetic in tissue cultured pineapple plants.**

培養植物体のリンゴ酸含量の日変化

CAM型光合成の特徴として、夜間に CO_2 を吸収し、それを液胞内にリンゴ酸として蓄積する。その結果、夜間のリンゴ酸含量の急激な増加、昼間の減少が見られる。培養植物体の光合成型を決定する方法の一つとして、葉のリンゴ酸含量の日変化を調べる必要がある。長日条件下で培養したパイナップルのリンゴ酸の日変化を見ると (Fig. 7)、発根用培地に継代後、1週目と4週目の培養植物とも暗条件下でリンゴ酸含量は上昇し、明期に低下し、典型的なCAM型の日変化を示した。特に、4週目の夜間におけるリンゴ酸含量の増加が顕著であった。比

**Fig. 7. Time changes in malate content in tissue cultured pineapple plants. Bars in the figure indicate \pm SD.**

較に用いた野外で生育させたパイナップルのリンゴ酸含量の日変化 (Fig. 8) と短日条件下で培養を行った植物体とを比べると、培養植物体は夜間から明期への移行時のリンゴ酸含量の急激な変化は見られないが、明かに暗条件下での上昇と明期における減少がみられた。しかし、培養植物体のリンゴ酸含量の最大値は、パイナップルの成熟葉におけるその約20%程度であった。培養植物のリンゴ酸含量と大きさとの関係では、植物体が大きくなるとリンゴ酸含量は増加した (Fig. 9)。これは、葉齢が進んだ結果、液胞が発達しリンゴ酸の蓄積容量が増加したこと、若い葉においては、液胞が未発達でリンゴ酸含量は低かったと考えられる。培養植物において、生育に伴ってリンゴ酸含量が増加したことは、培養の初期の段階でリンゴ酸を蓄積する能力を持ち、その能力は液胞の発達と並行していると考えられる。

リンゴ酸からの脱炭酸能力が関与すると考えられる CO_2 -free 下で測定した成熟葉の光合成速度は12時に $10 \mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ を示し、リンゴ酸含量が $5 \text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 以下となる16時以降の光合成速度は見られなかった。一方、培養植物においては、 CO_2 -free 下の光合成速度は見られず、また、成熟葉が時間とともにリンゴ酸含量が減少したのに比べ、培養植物ではばらつきが大きく、減少する傾向はみられなかった。

以上より、CAM 植物であるパイナップルの培養植物は CO_2 をリンゴ酸として細胞の液胞内に蓄積するが、組織が未発達で液胞は小さく、そのため容量が少なく夜間のリンゴ酸含量の上昇が抑えられていたと考えられる。また、長日条件下で培養を行った4週目の植物体は、葉齢が進んでいたことから液胞が発達し、夜間のリンゴ酸含量が増加したと考えられる。

培地の糖が光合成能力に及ぼす影響

培養植物はその栄養源を培地に依存していることから従属栄養の側面が強く、それが培養植物の光合成発現を制限していると言われる⁶⁾。そこで、炭素源として最も重要視されている糖がパイナップル培養植物の光合成にどのように影響を与えるかを調べた。

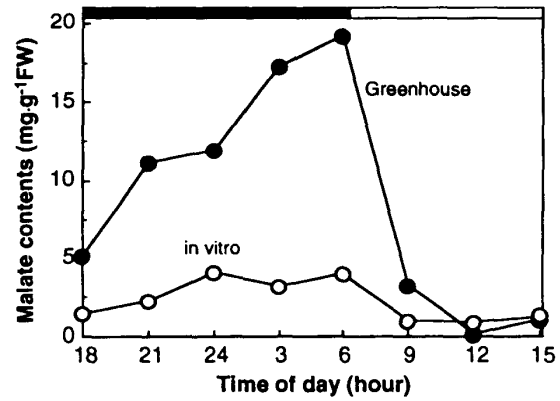


Fig. 8. Time changes in malate content in pineapple plants grown at greenhouse and in vitro conditions.

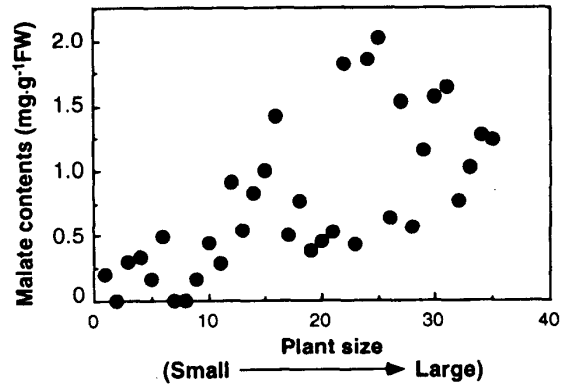


Fig. 9. Effects of plant size on malate content in tissue cultured pineapple plants.

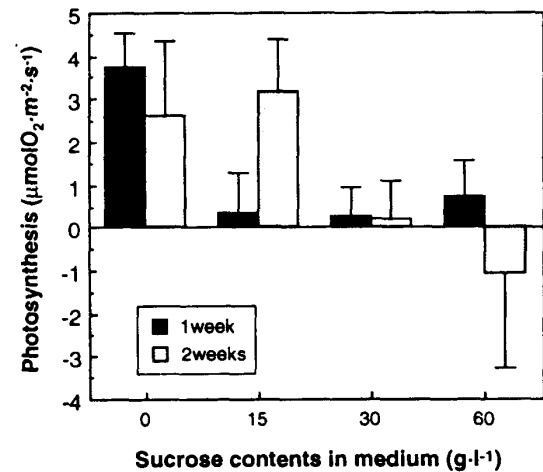


Fig.10. Effects of sucrose contents of medium on photosynthesis. The photosynthesis was measured at 26°C of temperature, $900 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ of PFD, 3% CO_2 , $1 \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ of flow rate. Leaf disks were incubated under growth chamber illuminating with $45 \mu\text{mol photon} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ from 9:00 to 17:00 at 26°C

処理後、1週目では0g区を除きほとんど光合成活性は見られなかった。0g区において2週目の段階で葉の黄化が観察され、植物体の生育が極端に悪化した。一方、培地に糖を含む15g、30g、60g区では正常に生育した。光合成能力は処理後1週目では、0gの区が高く ($3.73 \mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)、他の区では低かった (Fig. 10)。処理後2週目では、生育の悪化の見られた0g区では、光合成は $2.61 \mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ と低下したが、30g、60g区に比べ有意に高かった。また、15g区の光合成速度が最も高く、培地の糖含量の変化が光合成能力を増大させたと考えられる。葉緑素含量では処理区において大差はなく、0g区で葉緑素含量が著しく減少した。これは、基質不足によるクロロフィルの分解が促進されたことが要因の一つと考えられる。

培養植物は、容器内では主に培地に含まれる糖を炭素源として用いる。そのため、培地の糖が減少すると、培養植物は培養器内 CO_2 を積極的に取り込み光合成能力を高く維持したと考えられる。一方、培地の糖含量の増加は、光合成能力を低下させた。その理由として、培地の糖の増加は葉の糖含量を増加させ、その結果、光合成速度がフィードバック阻害を受け低下したと考えられる。

培地の糖含量の変化と葉の糖との関係

培地の糖が葉の糖含量にどのような影響を及ぼすのか調べた。0g区において、光合成速度は処理後1週目に $19 \mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 、2週目には $23 \mu\text{molO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ を示し、一方、培地の糖含量が増加するに伴い光合成能力は低した (Fig. 11A)。15g区においては、処理後1週目に比べ2週目の光合成がわずかに上昇したが、30g区では低くなり、60g区では更に低く1週目、2週目ともほぼ同様な値で推移した。Fig. 11Bに光合成の測定に用いた葉片の糖含量の経時変化をプロットした。培地の糖含量の増加に伴い、葉片の糖含量も増加した。培地の糖含量と葉の糖含量は高い相関関係にあることから、培地の糖が葉片の糖含量に直接影響を与えていると考えられる。Fig. 12に培養植物の葉片の糖含量と光合成速度との関係を示した。葉片の糖含量と

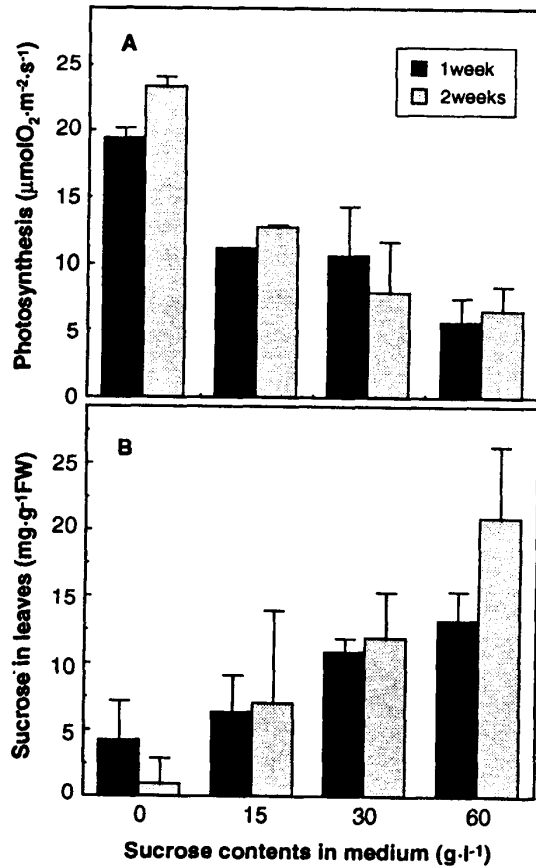


Fig.11. Effects of sucrose contents in medium on photosynthesis (A) and leaf sucrose contents (B) in tissue cultured pineapple plants. See Fig.10 for the measurement conditions.

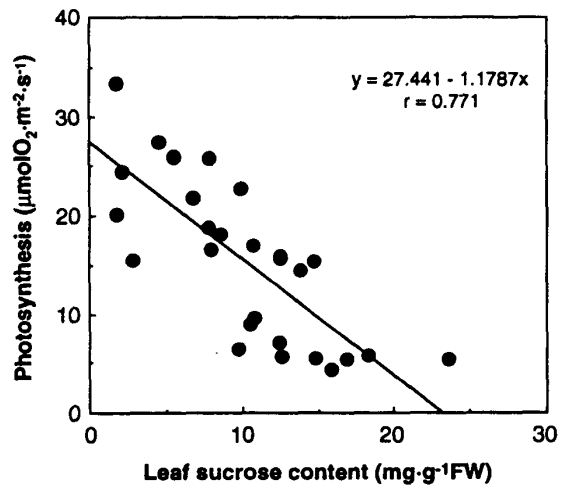


Fig.12. Relationship between leaf sucrose contents and photosynthesis in tissue cultured pineapple plants.

光合成速度とは高い相関関係にあり、葉片の糖含量の増加が光合成能力を著しく低下させた。

培養器内のCO₂濃度の日変化

CAM植物の光合成型は、CO₂濃度の日変化を測定すると明確になる。培養条件下は気密性が高く、古在ら⁶⁾によると249mlの三角フラスコのアルミホイルキャップを介したガスの換気回数は0.042 1・hr⁻¹であるという。このようにガスの出入りの少ない培養条件下で、培養植物がどのようなガス交換を行っているかはよく知られていない。従来、培養瓶にシリンジを差込みガスを測定した例はあるが、容器内を密閉の状態連続測定した例はない。

培養容器内のCO₂濃度の日変化をFig. 13に示した。明期のCO₂濃度は、長日条件下では150~200ppm、短日条件下では100ppmまで低下した。この濃度は、大気中のCO₂濃度350ppmよりも低く、また、C₃植物のCO₂補償点である50ppmよりは高い。このことは、莖葉の分化した培養植物体は、昼間、積極的にCO₂を吸収していると考えられる。富士原ら⁹⁾は、明期開始直後に培養器内のCO₂濃度が低下することから、培養植物は光合成能力を有すると述べ、また、Nishidaら⁹⁾はカルスの光独立栄養培養に成功し、その緑色培養細胞の光合成活性を測定したところ、通常の植物でみられる葉肉細胞の活性に近いと述べている。このように、培養植物の光合成はかなり初期の段階で発現していると考えられる。また、長日条件下においては、昼間にCO₂の増加と減少のピークがみられることから、培養植物の葉内に蓄えられた有機酸は脱炭酸により放出され、それを再び固定したとも考えられCAM型とC₃型光合成が同時に機能するものの、Phase3の気孔閉鎖が不十分で昼間に積極的なCO₂吸収を行うC₃型光合成のウエイトが高いと考えられる。暗期における培養器内のCO₂濃度の上昇は、呼吸による放出が関係している。長日条件下で1000ppm以上、短日条件下で4000ppm以上となり、極めて高いCO₂濃度を示した。これは培養器内の気密性からくるものと思われ、予想以上に培養器内は濃度が高いことが明らかとなった。しかし、明期の始めに急激なCO₂吸収がみられ、また明期の後半はCO₂飢餓状態にあった。

次に、短日条件下で培養を行ったカルスのCO₂濃度の日変化は、高い濃度が昼夜を問わず認められ、日変化は見られなかった。莖葉の分化していない培養植物体は、通常、培地のみ栄養に依存して生育している。そのため、高いCO₂濃度で推移し、その原因としては呼吸活性の高さに求められる。Yasudaら¹⁷⁾は、ヒヨスとタバコのカスルを用いて光独立の栄養培養に成功した。この緑色培養細胞

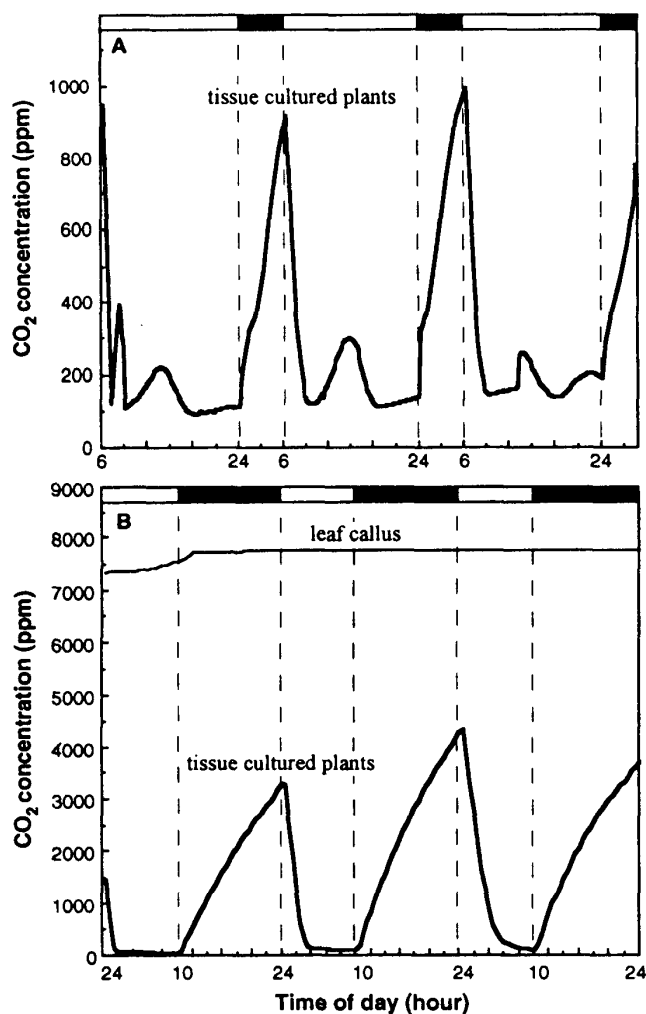


Fig.13. The diurnal changes in CO₂ concentration in vesel1 for tissue cultured plants and leaf callus. Light period was 18 hrs (A) and 10 hrs(B) with 900 $\mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

においては、光合成の CO_2 補償点が約0.1% (1000ppm) と高く、その原因として暗呼吸活性が高いことを述べている。この様に、莖葉の未分化の状態では、光合成能力を有するカルスを用いても、培養細胞の容積が大きいことによる高い CO_2 濃度がカルスの生育に有効と考えられる。

考 察

培養植物は葉面積が小さく、赤外線 CO_2 分析計を組み込んだ通気式同化箱法では精度の高い測定は困難な場合が多い。しかし、気相型酸素電極はサンプルが小さい場合の光合成速度の測定に有効で、また、短時間に多量のサンプル葉を測定し比較することもできる。一方、光合成能力を酸素電極を用いて測定する場合に困難な点もある。サンプルの脱水を抑えるために飽和状態で測定し、その結果、電極部分に水滴が付着し計測が不安定な場合が見られた。その解決策として、チャンバー内温度を培養条件と同じ 26°C に維持することで安定的に測定することができた。

酸素電極へのガス流量はチャンバーの容積が小さいため、 $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 以上は上げられない。また、光強度を上昇させるとチャンバー内の温度変化が生じ、電極部が結露することが観察された。その結果、強光下の測定では反応が不安定で、かつ光合成速度が過大評価される恐れがみられた。気相型酸素電極にセットできるサンプルの面積は、最大 12cm^2 が限度である。培養植物は、一枚の葉の面積が小さく平均で 2cm^2 以上を確保するのは困難な場合が多い。そこで、完全展開している葉を数枚用いれば推奨されている葉面積を確保できた。坂ら¹²⁾ は葉片の面積と光合成との関係を検討し、面積が 2.5cm^2 以下で酸素放出量は直線的に増加すると報告している。そのため、培養植物を用いた実験では葉片の面積が 2.5cm^2 以下の場合、光合成能力を過大評価していると考えられ、気相型酸素電極法による光合成の測定には、葉片をチャンバー内に2～3枚おき葉面積を 2.5cm^2 以上になるよう工夫する必要がある。

次に、パインアップル培養植物の光独立栄養について考察する。莖葉の分化した培養植物体は光合成能力を有しており、このことは、酸素電極を用いた光合成速度の評価、培養器内における明期開始直後の CO_2 濃度の急激な低下およびその後の低い CO_2 濃度の推移から裏づけられる。しかし、培養器内の CO_2 濃度が低いため、培養植物の光合成能力は CO_2 濃度によって著しく抑制されていると考えられる。培地の糖は、成長のためのエネルギー源となるが、培養植物は従属栄養の側面が強く、光独立栄養の側面は弱い、いわゆる混合栄養成長を示すと言われる⁶⁾。人為的に培養器内の CO_2 濃度を高めることで培養植物の光合成能力を増大させ、光独立栄養的側面を強化し生育を促進される方法も考えられている。併せて、光独立栄養的側面を強化すれば、順化における培養苗の生存率の増大、培地の糖含量を低下させることも可能で、コンタミネーションの低下にも寄与する。従来、培地中に糖が含まれていることから、培養植物は従属栄養的に成長していると考えられてきたが、更に効率的な生育を促すためにも、培養植物に積極的に光合成を行わさせる条件を設定することは重要である。

培地の糖含量の増加は、光合成産物の蓄積と同様の動きを示し、培養植物の葉身の糖含量を高め、その結果、光合成速度を低下させたと考えられる。特に、生重 1.2g の培養植物体を用いて培地の糖含量を変化させた場合、培養植物体全体がシンクとなり、また、根や莖の分化が不十分なためシンクリミット状態となり光合成速度が低くなったと考えられる。一方、生重が 2.5g の場合、器官分化が十分発達していたと考えられ、光合成産物の転流が比較的スムーズに行われたと推察される。谷ら¹³⁾ は、培地の糖含量の高い区において、培養植物体の発根率が促進されることを述べており、ソース部分における光合成産物の過剰な増加がシンク能の増加を招き、根の発根率が促進されたと推察される。

また、培地の糖含量の増加にともなう光合成の低下は、培地の水ポテンシャルに影響される。Brown et al.¹⁾ は、最適糖濃度の一部は浸透圧調節の役割をしていると述べ、また、Pospisilova¹¹⁾ は、培地の糖濃度を高めると培養植物体の水ポテンシャルが低下することを報告している。培養植物は比較的浸透圧の高い培地で生育する。このような高溶質濃度を要求するのは、培養植物体の蒸散速度が

小さく、また、細胞浸透ポテンシャルと同程度か、それよりも高い値に設定しなければならないためだと言われる⁷⁾。

培養器内における外植体の光合成能力はきわめて低いと言われる⁵⁾。しかし、葉緑素をもつ培養植物の光合成速度の低さは、主として明期における培養器内のCO₂濃度が低いこと⁴⁾と、光合成能力が低い¹¹⁾とされ、主として培養環境の低さが原因と考えられている。

本研究の培養に用いたパインアップルの光合成様式についてみると、培養器内におけるCO₂濃度は夜間に増加した。この結果は、土井ら³⁾の結果と一致し、培養条件下ではCAM植物にみられる明確なCO₂の吸収、放出はみられない。自然条件のパインアップルは、夜間に気孔を開きCO₂を吸収するが、培養段階の培養植物体は、夜間に呼吸によるCO₂の増加がみられ昼間に減少するという典型的なC₃型光合成のパターンを示した。リンゴ酸含量の日変化においては、暗期のリンゴ酸含量の増加、明期の減少がみられ、典型的なCAM植物の動きと同様な結果がえられた。Ting and Burk¹⁴⁾によって提唱されたCAM型光合成の特徴づけに従うと、ガス交換の型はC₃、C₄型光合成と同様に明期にCO₂を吸収し、暗条件ではCO₂の放出を示しながら、葉内のリンゴ酸含量が日変化するCAM cycling型の光合成を行っているものと考えられる。このように、培養植物は、未成熟で葉齢の進んでいないにも関わらず、CAM型光合成を示し、パインアップルの培養植物体においても、茎葉の分化した段階では、すでにCAM型光合成能力を持つと考えられる。しかし、葉齢が若いために、その動きが明確でない。そこで、いつCAM型光合成が発現するのかという議論に対しては、茎葉の分化の生じていないパインアップルの未分化状態のカルスを調べる必要があると考えられる。また、未分化の状態ではどの程度carbonic anhydrase活性¹⁵⁾が機能しているのか、Rubisco¹⁷⁾は正常に機能しているのか等、CAM型光合成の発現をあらゆる角度から検討することが今後の課題であろう。

摘 要

本研究は、培養条件下での環境制御を通して光合成能力を高め、培養期間の短縮化を図るための基礎資料を得ることを目的として実施した。特に、パインアップル培養植物の光合成能力の違いを明らかにするために培地の糖含量との関係を調べた。得られた結果の要約は以下の通りである。

1. 培養植物の光合成は午前中で最大値を示し、その後は低下した。
2. 気相型酸素電極を用いた培養植物の測定条件は、流量1 L・min⁻¹、CO₂濃度3%、光強度900 μmol・m⁻²・s⁻¹、葉ディスク面積は2.5 cm²以上が最適であった。
3. パインアップル培養植物は、培養の初期段階で光合成能力を有し、成長と共に高まった。
4. パインアップル培養植物体のリンゴ酸含量は昼夜変化を示し、成長に伴ってリンゴ酸含量のピーク値が増加した。
5. 培養条件下では、培地の糖含量が光合成能力の抑制因子であった。
6. 培養条件下では、パインアップルの培養植物はC₃型光合成的ガス交換とCAM植物に特異的なリンゴ酸の日変化がみられ、CAM cycling状態であることが明らかとなった。

引用文献

1. Brown, D. C. W., D. W. M. Leung and T. A. Thorpe 1979. Osmotic requirement for shoot formation in Tobacco callus. *Physiol. Plant.* 46:36-41.
2. 土井元章, 小田 尚, 小笠原宣好, 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.
3. 土井元章, 小田 尚, 小笠原宣好, 浅平端 1992. *In vitro* 培養における培養器内への CO₂施用が培養植物の生育に及ぼす影響. *園学雑* 60:963-970.
4. 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 CO₂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* 43:21-23.
5. Grout, B. W. W. and M. J. Aston 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.
6. 古在豊樹, 富士原和宏, 渡部一郎 1987. 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のガス交換速度に及ぼす影響. *農業気象* 42:119-127.
7. Kozai, T., B. B. Jeong, C. Kubota and Y. Murai 1995. Effects of volume and initial strength on medium on growth, photosynthesis and ion uptake of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlet in vitro. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64:63-71.
8. Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
9. Nishida, K., F. Sato and Y. Yamada 1980. Photosynthetic carbon metabolism in photomixotrophically cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 21:47-55.
10. Pitman, M. G., U. Luttge, A. Lauchli and E. Ball 1975. Diurnal changes in photosynthetic capacity of barley leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 2:101-103.
11. Pospisilova, J. 1988. Osmotic adjustment in tobacco plantlets. *Biol. Plant.* 30:393-396.
12. 坂 齊, 千坂英雄 1981. 酸素電極による光合成・呼吸測定法の検討とその除草剤作用検定への利用. *雑草研究* 26:34-40.
13. 谷 晃, 清田 信, 平知明, 相賀一郎 1991. 光独立栄養条件および光混合栄養条件下で培養されたアルファルファ小植物体の生長および光合成速度. *生物環境調節* 29:127-132.
14. Ting, I. P. and J. H. Burk 1983. Aspects of carbon metabolism in *Welwitschia*. *Plant Sci. Lett.* 32:279-285.
15. Tsuzuki, M., S. Miyachi, F. Sato and Y. Yamada 1981. Photosynthetic characteristics and carbonic anhydrase activity in cells cultured photoautotrophically and mixotrophically and cells isolated from leaves. *Plant Cell Physiol.* 22:51-57.
16. 山田康之, 佐藤文彦 1981. 緑色細胞の培養. *組織培養* 7:315-321.
17. Yasuda, T., T. Hashimoto, F. Sato and Y. Yamada 1980. An efficient method of selecting photoautotrophic cells from cultured heterogeneous cells. *Plant Cell Physiol.* 21:929-932.