植物組織培養器内の光強度に及ぼす 栓および容器の影響

富士原和宏*・古在豊樹*・中條愉利子**・渡部一郎*

(* 千葉大学園芸学部園芸環境工学研究室
** 森産業(株)中央研究所)

Effects of Closures and Vessels on Light Intensities in Plant Tissue Culture Vessels

Kazuhiro FUJIWARA*, Toyoki KOZAI*, Yuriko NAKAJO**
and Ichiro WATANABE*

(* Faculty of Horticulture, Chiba University,
648 Matsudo, Matsudo, Chiba 271, Japan
** Central Research Institute, Mori & Company, Ltd.,
8-1 Hirai-cho, Kiryu, Gunma 376, Japan)

The effects have been investigated of closures and vessels on light intensities inside closed vessels. Four kinds of closures (aluminum foil cap (C_A), translucent polypropylene formed cap (C_P), silicon foam rubber plug (P_S) and transparent polycarbonate formed lid (L_P)) and three kinds of vessels (47 ml glass flat bottom test tube, 132 ml glass Erlenmeyer flask and 370 ml polycarbonate box type vessel) were used. One straight fluorescent tube (cool white) was employed as a light source. Light intensities were measured using an illuminometer with a small photoreceptor. The measured illuminance [lx] was converted into the photon flux of 400–700 nm wave lengths [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]. The results can be summarized as follows:

(1) The percentage of the photon flux reduction due to the closures to the photon flux on the shelf surface was 41 % for C_A , 8 % for C_P , and 49 % for P_S in case the test tubes were used as a vessel, and was 17 % for C_A and 24 % for P_S in case the flasks were used as a vessel.

(2) The percentage of the photon flux reduction due to the test tubes including stainless wire frame stands, and the flasks, to the photon flux on the shelf surface was 36 % and 7 %, respectively.

(3) Mean photon flux inside the closed vessels was in the order:

C_A – flask (45) > P_S – flask (41) > L_P – box type vessel (38)
> C_P – test tube (33) > C_A – test tube (14) > P_S – test tube (9)

Values in the parentheses indicate the mean photon flux [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]. The mean photon flux on the shelf surface was 59 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

(4) The photon flux inside each closed vessel was dependent on each position of the closed vessel on the culture shelf, and the distribution of the photon flux varied markedly with the closure–vessel combination.

Key words: Closure, Light intensity, Plant tissue culture, Vessel.

キーワード: 植物組織培養, 栓, 光強度, 容器

1. 序 論

培養器内の光強度は、培養体の生長・発育などに影響を及ぼすことが報告されており(例えば, Hasegawa *et al.*, 1973; Seibert *et al.*, 1975; Hammerschlag, 1978; Hunter *et al.*, 1983; Schneider-Moldrickx, 1983; Lee *et al.*, 1985 など), 重要な培養器内物理環境要因の一つに挙げられているにもかかわらず, 諸因子が培養器内の光強度に及ぼす影響を調べた報告は見あたらない。また最近, シュートまたは培養小植物体の光独立栄養培養法の研究(例えば, 富士原ら, 1987; Kozai *et al.*, 1988a, b; Fujiwara *et al.*, 1988)により, それらを強光条件下で培養することの有効性が示されたことから, 培養器内の光強度に関する研究の重要性が一層増している。

照明を必要とする植物組織培養では, 一般に培養器は培養棚(以後, 棚)面上に直接, または試験管立を用いて設置され, 直管形蛍光灯により照明される。このとき培養器内の光強度は, 直管形蛍光灯の設置本数・位置, 直管形蛍光灯の分光出力, 培養器の栓・容器, 培養器の設置本数・位置, および棚面・培養室内壁面の反射率などの影響を受ける。

本報告では, これらの光環境因子のうちの栓および容器が, 培養器内の光強度に及ぼす影響を調べた結果について述べる。

2. 材料および方法

2.1 実験装置

本実験には, Fig.1に示すような実験装置(以後, 装置)を作成して用いた。装置は, 構造材であるスチール製の置棚, 棚面上の空間(600 mm×1200 mm×410 mm)を包囲する白色布(反射率: 約72%), 直管形白色蛍光灯((株)日立製作所, FL-40SSW/37-G, 管径28 mm, 管長1198 mm, 消費電力37 W)および蛍光灯器具(同社, PM4101S□)から成る。

棚面上空間を白色布で覆ったのは, その外部の光学的環境の影響を受けずに, 栓および容器のみが培養器内の光強度に及ぼす影響を調べられるようにするためである。一般の植物組織培養では, 棚面上空間を何等かの材料で被覆することはない。

直管形白色蛍光灯(以後, 蛍光灯)は, 装置の天井面の中央に1本設置した。棚面から蛍光灯の中心までの距離は325 cmであった。蛍光灯への供給電力は, 摺動式交流自動電圧調整器((株)東京理工学, ASA-10)を用いて 100 ± 2 Vとした。

Fig. 1. Schematic diagram of an experimental device for measuring light intensities inside vessels with or without closures.

① fluorescent lighting fixtures, ② fluorescent lamp, ③ white cloth for preventing unexpected light from the surroundings. Light intensities inside the vessels were measured in the area ABCD. Vessels were set up on the area EFGH.

2.2 供試容器および栓

容器には, ガラス製平底試験管(三恵理化機械(株), $\phi 25$ mm×120 mm, 光透過率: 約96%), ガラス製三角フラスコ(柴田化学機器工業(株), 100 ml, 光透過率: 約95%)およびポリカーボネート製角型容器(ベルディー(株), プラントボックス, 口部: 70×70 mm, 底部: 60×60 mm, 高さ: 95 mm, 容積: 約450 ml, 光透過率: 約92%)を用いた。試験管用の栓には, アルミニウムフویلキャップ(光透過率: 0%), 成型ポリプロピレンキャップ(松本医科器械(株), Mキャップ, 乳白色半透明, 光透過率: 約85%)および発泡シリコンゴムプラグ(信越ポリマー(株), シリコ栓T24, 淡紅色, 光透過率: 0%)の3種類(Fig.2)を用い, 三角フラスコ用には, アルミニウムフویلキャップおよび発泡シリコンゴムプラグの2種類を用いた。アルミニウムフویلキャップは, 7 cm角に切ったアルミニウム箔(東海金属(株), 厚さ: 15 μ m)を2枚重ねにしたものを容器にか

Fig. 2. Schematic diagram of the closures used in the experiment.

C_A: aluminum foil cap, C_P: polypropylene formed cap, P_S: silicon foam rubber plug, L_P: polycarbonate formed lid.

ふせて作成した。ポリカーボネート製角型容器には、専用の成型ポリカーボネートリッド (Fig.2, 光透過率: 約 95%) を用いた。

通常、培養は容器に栓をした状態で行われるが、本実験では、栓および容器のそれぞれが培養器内の光強度に及ぼす影響を調べることを目的としているために、容器に栓をしない状態でも光強度の測定を行った。そこで本論文では、古在ら (1986) の報告と同様に、容器に栓をしたものは閉栓容器、栓をしていないものは単に容器と呼ぶことにした。また培養器という用語は、一般的な用法と同様に、容器、閉栓容器のいずれかをさす場合にも用いることにする。

2.3 培養器の棚面上への設置方法

培養器は、Fig.1のE, F, G, Hで囲まれた範囲 (465×925mm) 内に設置した。設置本数は、試験管の場合、縦方向 (Fig.1のEF方向) 15本、横方向 (Fig.1のEH方向) 30本の計450本、三角フラスコでは縦方向7個、横方向14個の計98個、角型容器では縦方向6個、横方向12個の計72個であった。試験管は、ステンレスワイヤー製試験管立 (三和化研工業 (株), SS型, 5×10本掛け) を用いて設置し、その他の容器は棚面上に直接設置した。

2.4 光強度の測定法

2.4.1 光強度の単位

植物組織培養に関する報告では、光強度を照度 [lx] や放射照度 [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$] で表示しているものが多い。しかしながら、植物と光強度の関係は、植物体中の1個の光受容体が1個の光量子を吸収して開始される光化学反応を介するものであるから、光強度を表す単位には、単位時間当たり単位面積に入射する光量子の数を表す単位である光量子束 [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] を用いるのが適当である。そこで本実験では、光合成に影響を及ぼす波長範囲 (400–700 nm) 内の光量子を測定対象とすることにし、光強度をその波長範囲の光量子束で表示することにした。

2.4.2 培養器内および棚面上光強度の測定法

培養器内および棚面上の光強度は、小型の受光部 (円柱形, $\phi 16.5\text{mm} \times 12\text{mm}$) をもつ照度計 (ミノルタカメラ (株), T-1M) を用いて測定した。その後、その測定値に、供試した蛍光灯についてあらかじめ求めておいた、照度 [lx] から光量子束 (波長: 400–700 nm) [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$] への換算係数を乗じて、照度を光量子束へ変換した。換算係数は、供試したすべての培養器の種類について $12.9 \times 10^{-3} \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{lx}^{-1}$ であった。光量子束は、光量子計 (ライカー社, LI-190SA) を用いて測定した。

培養器内の光強度は、容器が試験管の場合には、試験

管の底部を切り落として、その試験管内の底部に照度計の小型受光部を固定したものを、順次測定位置に移動して測定した。容器が三角フラスコまたは角型容器の場合には、小型受光部を容器内底部中央に接着したものを順次移動して測定した。

培養器内の光強度は、Fig.1のA, B, C, Dで囲まれた範囲 (300×600mm) 内に設置されている培養器についてのみ測定した。これは、ABを含む直線およびADを含む直線についてそれぞれ線対称な位置に設置されている培養器内の光強度は、それぞれ理論上等しいからである。

棚面の光強度は、供試した各種培養器内の光強度測定位置と同位置で測定した。

3. 結果および考察

3.1 栓が培養器内の光強度に及ぼす影響

3.1.1 容器が試験管の場合

アルミニウムフویلキャップ (以後、 C_A)、成型ポリプロピレンキャップ (以後、 C_P) または発泡シリコンゴムプラグ (以後、 P_S) で栓をした試験管内の光量子束を Fig.3 に示す。また、そのときの棚面上の光量子束を Fig.4 に示す。図中の黒丸は、培養器の底部中央の位置とその培養器内の光量子束の値を示している。黒丸を結ぶ破線が切れている部分は、そこが試験管立どうしの隣接部分であることを示している。図の右下に示されている数値は、最高値 (MAX)、最小値 (MIN)、平均値 (MEAN) および標準偏差 (S.D.) である。

閉栓試験管内光量子束は、栓が C_P の場合が最も高く、次いで、 C_A 、 P_S の順であった。栓が C_P である場合の平均値は、 C_A および P_S である場合のその、それぞれ 2.4 および 3.3 倍であった。

C_P で栓をした試験管内の光量子束は、蛍光灯鉛直下 (AD上) に設置された列から線分 BC 側に設置された列に向かうにつれてほぼ一定の割合で低くなった。一方、栓が C_A および P_S の場合は、ADに平行で試験管立が隣接している部分に面した位置、および周辺部で高くなり、蛍光灯の鉛直下の列で低くなった。栓に C_A と P_S を用いた場合に、培養器の設置位置による光強度の分布がこのようなになったのは、栓に光透過性がないことが原因であると考えられる。

培養棚面上光量子束は、Aの位置で最も高く、BC側およびCD側に行くにつれて徐々に低くなった。棚面上の位置による差は培養器内のそれと比較すると小さかった。

次に、試験管内の光量子束を Fig.5 に示す。

栓のみに起因する、すなわち栓の光透過率が 100% で

Fig. 3. Photon fluxes (400–700 nm) inside the glass flat bottom test tubes closed with either C_A (a), C_P (b) or P_S (c), which were set up on the area of ABCD shown in Fig. 1. TG: glass flat bottom test tube, MAX: maximum, MIN: minimum, S.D.: standard deviation. Symbols of closures are denoted in the caption of Fig. 2.

ないことが原因となって生じる閉栓試験管内光量子束の低下量は、この試験管内光量子束の値から閉栓試験管内の値を差し引くことにより得られる。栓のみに起因する低下量の、棚面上光量子束に対する率は、栓が C_A である

Fig. 4. Photon fluxes (400–700 nm) on the shelf surface. Abbreviations are denoted in the caption of Fig. 3.

Fig. 5. Photon fluxes (400–700 nm) inside the glass flat bottom test tubes without closure. TG: glass flat bottom test tube. Abbreviations are denoted in the caption of Fig. 3.

場合は、41%, C_P では8%, P_S では49%であった。このことは、C_A または P_S を用いると、照射光の半分近くが無効となることを示している。

これらの結果から、栓として C_A または P_S の代わりに C_P を用いれば、あるレベルの閉栓試験管内光量子束を得るのに必要な蛍光灯の出力は、栓として C_A または P_S を用いる場合の半分以下でよいことがわかる。

3.1.2 容器が三角フラスコの場合

C_A または P_S で栓をした三角フラスコ内の光量子束を Fig. 6 に示す。このときの棚面上光量子束は Fig. 4 と同様である。閉栓三角フラスコ内光量子束は、C_A の場合が P_S の場合よりわずかに大であった。閉栓三角フラスコ内光量子束は、いずれの栓の場合でも蛍光灯鉛直下と BC 側に設置された列で低くなり、BC 側の列から一列内側の列で高くなった。

Fig. 6. Photon fluxes (400–700 nm) inside the glass Erlenmeyer flasks closed with C_A (a) or P_S (b).

FG: glass Erlenmeyer flask.

Symbols of closures and abbreviations are denoted in the caption of Fig. 2 and Fig. 3, respectively.

Fig. 7. Photon fluxes (400–700 nm) inside the glass Erlenmeyer flasks without closure. FG: glass Erlenmeyer flask.

Abbreviations are denoted in the caption of Fig. 3.

次に、三角フラスコ内の光量子束を Fig. 7 に示す。栓のみに起因する光量子束の低下量の、棚面上光量子束に対する率は、栓が C_A である場合は 17%， P_S である場合は 24% であり、両者に大きな差はなかった。容器が試験管の場合と比較して両値が小さいのは、設置された閉栓三角フラスコの栓と栓の間の距離が閉栓試験管の場合よりも大きいために、栓による遮光の程度の差が明確に表れなかったためであると考えられる。

3.2 容器が培養器内の光強度に及ぼす影響

試験管内光量子束 (Fig. 5) の平均値は、 $38 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、三角フラスコ内光量子束 (Fig. 6) のそれは $55 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であった。棚面上光量子束の平均値 ($59 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) から両者の値を差し引いた値は、容器に起因する低下量であるといえる。両者の棚面上に対する低下量の率は、前者が 36%，後者が 7% となり、容器に試験管を用いた場合の低下率が高い結果となった。

しかしながら、本実験では、容器として試験管を用いる場合に、通常の培養の場合と同様に試験管立を用いているので、試験管内光量子束の測定結果は、試験管自身の影響だけでなく試験管立の遮光の影響も受けていることになる。したがって、試験管自身に起因する光量子束の低下率は、上記の 36% よりも低いことになる。光透過性の高いフレームで作成された試験管立などを用いれば、閉栓試験管内の光強度は多少増大すると期待される。

3.3 ポリカーボネート製閉栓角型容器内の光強度

ポリカーボネート製閉栓角型容器内の光量子束を Fig. 8 に示す。閉栓角型容器内の光量子束は、AD 側から BC 側へ、また AB 側から CD 側へと行くにつれてほぼ一定の割合で低下することがわかる。

Fig. 8. Photon fluxes (400–700 nm) inside the closed polycarbonate box type vessels. LP: polycarbonate formed cap, BP: polycarbonate box type vessel.

Abbreviations are denoted in the caption of Fig. 3.

また、閉栓角型容器は、栓および容器が光透過性の高い透明なポリカーボネート製であるにもかかわらず、光量子束は、光透過性のない C_A や P_S を栓にもつ閉栓三角フラスコ内のそれ (Fig.6) よりも低かった。これは、閉栓角型容器の場合、蛍光灯から直接閉栓容器に到達する光 (以後、直接光) のすべては栓の上面に入射し、そこでの反射光は上方へ向い、反射光が周囲の閉栓容器内に直接到達することはないのに対して、閉栓三角フラスコの場合、直接光の大部分は三角フラスコの側面に到達し、そこでの反射光の一部が周囲の閉栓三角フラスコ内へ到達するためであると考えられる。

このことから、培養器内の光強度は栓および容器の光透過率だけでなく、両者の形状によっても大きく左右されることがわかる。

3.4 種々の培養器内の光強度の比較

本実験で供試した各種閉栓容器内光量子束の平均値の高い順から、その栓と容器の組合せを並べると、 C_A - 三角フラスコ (76%), P_S - 三角フラスコ (69%), 成型ポリカーボネートリッド (L_P) - ポリカーボネート製角型容器 (64%), C_P - 試験管 (56%), C_A - 試験管 (24%), P_S - 試験管 (15%) の順となった。カッポ内の数値は、棚面上光量子束の平均値 ($59 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) に対するそれぞれの閉栓容器内のその百分率である。

以上の実験結果は、栓と容器の組合せの選択には、蛍光灯の出力および設置本数の選択と同等以上の注意が必要であることを示している。

3.5 本実験条件下と実際の培養条件下での培養器内の光強度の相違

本実験では、棚面上空間を白色布で被覆し、また培養器を空の状態でも供試している。これらの点は、実際の培養条件とは異なっている。そこで、本実験条件下と実際の培養条件下での培養器内の光強度の相違について触れておくことにする。

通常、培養室内には 3-4 段の棚をもつ培養棚が複数設置されており、また培養室の内壁面の色は白色または淡黄色であることが多い。このような場合、培養室の壁に面していない、すなわち他の培養棚に挟まれた位置にある培養棚には、周囲の培養棚に設置されている光源からの照射光がかなり到達する。一方、壁に面している培養棚では、培養室の内壁面からの反射光がかなり到達する。このため、通常の培養条件下の培養器内の光強度は、棚面上の空間をある程度反射率の高い材料で被覆した場合に近いと思われる。

上述したような点から推察すると、通常の培養条件下の培養器内の光強度は、本実験結果よりも若干低いと思われる。

また、培養体が存在する培養器内の光強度は、培養器が空の場合よりも当然低いであろう。特に、茎葉が分化した小植物体を含む培養器内の光強度は、本実験結果よりも 2 割程度以上低くなると推察される。

3.6 培養器内の光環境に関する今後の課題

培養体の生育は、光の量である光強度だけでなく光の質である分光組成によっても影響を受ける (例えば、Seibert *et al.*, 1975)。今後は、栓や容器などの光環境因子が培養器内の分光組成に及ぼす影響をも調べる必要がある。また、照明用消費電力および培養室内の冷房用消費電力の節減、さらには棚面上に設置された多数の培養器内の光環境の均一化を可能とするような照明システムの開発に関する研究も重要であろう。

謝 辞

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金 (課題番号 61480073) (代表者 渡部一郎) によるものであることを記して関係各位に謝意を表す。また、測定結果の出力プログラムの作成にあたり御協力頂いた、千葉大学園芸環境工学研究室卒業生の井上功、向川原稔の両氏に感謝する。

引用文献

- 富士原和宏・古在豊樹・渡部一郎, 1987: 培養小植物体苗化システムの開発に関する基礎的研究 (1) 試験装置の試作. 昭和 62 年度日本農業気象学会全国大会講演要旨, 202-203.
- Fujiwara, K., Kozai, T. and Watanabe, I., 1988: Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and acclimatization stages. *Acta Hort.*, 230, 153-158.
- Hammerschlag, F. A., 1978: Influence of light intensity and date of explantation on growth of geranium callus. *HortScience*, 13(2), 153-154.
- Hasegawa, P. M., Murashige, T. and Takatori, F. H., 1973: Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light and temperature requirements, transplantability of plants, and cyto-histological characteristics. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 98(2), 143-148.
- Hunter, S. A., Foxe, M. J. and Hennerty, M. J., 1983: The influence of temperature and light intensity on the *in vitro* propagation of the strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Cambridge Favourite. *Acta Hort.*, 131, 153-161.
- 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 (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. 農業気象, 42(2), 119-127.

- Kozai, T., Koyama, Y. and Watanabe, I., 1988a: Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Hort.*, **230**, 121–127.
- Kozai, T., Kubota, C. and Watanabe, I., 1988b: Effects of basal medium composition on the growth of carnation plantlets in auto- and mixotrophic tissue culture. *Acta Hort.*, **230**, 159–166.
- Lee, N., Wetzstein, H. Y. and Sommer, H. E., 1985: Effects of quantum flux density on photosynthesis and chloroplast ultrastructure in tissue-cultured plantlets and seedlings of *Liquidambar styraciflua* L. towards improved acclimatization and field survival. *Plant Physiol.*, **78**, 637–641.
- Schneider-Moldrickx, R., 1983: The influence of light quality and light intensity on regeneration of *Kalanchoe-Blossfeldiana*-hybrids *in vitro*. *Acta Hort.*, **131**, 163–170.
- Seibert, M., Wetherbee, P. J. and Job., D. D., 1975: The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiol.*, **56**, 130–139.