カワラケツメイ (*Cassia nomame*) の生育に対する明暗周期の影響

佐藤 浩二・高原 美規・山元 皓二

長岡技術科学大学工学部

The Effect of Light-Dark Cycles on Growth of *Cassia nomame*

Kouji SATOH, Yoshinori TAKAHARA and Koji YAMAMOTO

Department of BioEngineering, Nagaoka University of Technology, Nagaoka, Niigata 940-21, Japan

In order to investigate the effect of light-dark cycles on growth of *Cassia nomame*, plants were grown under 5 different light-dark cycles for 288 h that were 12 h cycle (6L-6D), 18 h cycle (9L-9D), 24 h cycle (12L-12D), 36 h cycle (18L-18D) and 48 h cycle (24L-24D). The growth of plants under 24 h cycle was the best of all, those under 36 h cycle and 48 h cycle were the worst and those under 12 h cycle and 18 h cycle were medium. The leaves of *C. nomame* move under natural light-dark cycle, then we examined the leaf movement under the same light-dark cycles described above. The plants grown under 24 h cycle kept their regular and steady leaf movement, but ones under other cycles could not keep their regularity. It is natural to think that leaves moved under the control of endogenous rhythm and plants under light-dark cycles except 24 h had unsteady endogenous rhythms. These results suggest that the best condition of light-dark cycle for growth is one that helps plants keep their own endogenous rhythms.

(Received May 17, 1996)

1996年5月17日受付

緒 言

植物の生育は、光、温度および湿度など様々な環境因子の影響を受ける。中でも光合成を行い自身を維持している植物体にとって、光環境はその生育に大きな影響を与える因子となる。これまでにも、日長(Erwin *et al.*, 1993; Wallace *et al.*, 1993) や光強度(Karlsson *et al.*, 1989) 光源(Bula *et al.*, 1991) などの影響に関する報告がある。これらに加えて、現在では人工的に制御された環境下での植物の栽培が可能になってきており、明暗周期の影響について調査することが重要であると思われる。これまでに明暗周期が植物体に与える影響として、内生周期について重点的に研究されてきた。その結果、内生周期の特徴として以下の3つが明らかになっている。①明暗周期条件下から定常環境下に移されたときに一定の周期長を維持する(Kondo, 1982)。②光刺激により内生周期の位相は変

化する(Engelmann *et al.*, 1973)。③周期は温度に影響されない。これらの特徴を持つ現象は、葉の運動をはじめ(Fondeville *et al.*, 1966; Halaban, 1969; Millet *et al.*, 1989)、酵素活性(Carter *et al.*, 1991) や転写、翻訳(Nakashima, 1993)に至るまで広く知られている。

明暗周期は地球上では24時間周期であるが、それ以外の明暗周期が生育に与える影響についても研究がなされている。トマトでは24時間周期以外の周期条件下では、生育が著しく悪化することが知られている(Highkin and Hanson, 1960)。また内生周期に支配される葉の運動も連続暗条件のような条件下では、数日は維持されるが徐々に運動を失うことや、呼吸の周期性も連続暗条件下では失われることが知られている(Wilkins and Thomas, 1993)。しかし、それらの実験において生育と内生周期について同時に計測を行った実験はなかった。そこで生育と内生周期を同時に測定し、内生周期の生育への影響について実験を行うことにした。

材料および方法

1. 植物体

実験には、マメ科のカワラケツメイ (*Cassia nomame*) を用いた。この種子は、種皮を傷つけることで発芽を揃えることができ、発芽も早く、発芽率も90%以上でその後の生育が速いなどの点で生育や実験の管理がしやすい。しかも葉の運動が大きいことから、内生周期の実験を行う上でも有用な植物である。種皮に傷をつけてから、湿らせた濾紙を敷いたシャーレ内に播種し、暗条件下に2日間置き発芽させた。それを湿らせたスポンジブロック1個に1粒ずつ置床し、14時間日長条件下(6:00~20:00, 3 000 lx, 25°C)で5日間生育させた。5日後、子葉が展開し草丈23 mm, 生重量35 mg, 乾燥重量5 mgほどに成長した幼植物体を材料として用いた。

2. 光条件

本実験では、植物体の生育に対する明暗周期の影響を見るため、12日間の実験期間の全光照射時間を144時間とし、明暗周期を変えた条件で生育をさせた。明暗周期は以下のように設定した。

明期 12時間-暗期 12時間 (24時間周期と呼ぶ)

明期 6時間-暗期 6時間 (12時間周期)

明期 9時間-暗期 9時間 (18時間周期)

明期 18時間-暗期 18時間 (36時間周期)

明期 24時間-暗期 24時間 (48時間周期)

光源には、昼光色の蛍光灯 (FL15E-D, 松下電器産業(株)) を4本用い、莖頂部分の照度を13 000 lxに調整した。また各々の周期は、タイムスイッチ (TB172, 松下電器産業(株)) を用いて制御した。

3. 実験装置と方法

実験装置の概要を Fig. 1 に示す。本実験では、水耕栽培を用いることで、地下部(根系)の温度や栄養状態を一定に保ち、明暗周期以外の環境変化の影響を少なくした。培養液は、家庭園芸用複合肥料(ハイポネックス液 5-10-5, 村上物産(株))の1 000倍希釈溶液を用い、培養液の温度は20°Cに設定した。実験には、カワラケツメイの幼植物体を24本用いた。これを各光条件に調節したチャンバー内で、12日間生育させた。チャンバー内の温度は、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ と $28 \pm 2^\circ\text{C}$ の2条件に設定した。植物体の伸長により莖頂が光源に近づき照度が増えるので、ジャッキで光源からの距離を調節し莖頂部の照度を一定に保った。チャンバー内で所定の時期に葉の運動を記録し、12日後植物体をチャンバー

Fig. 1 The outline of experimental system.

1: Nutrient tank, 2: Tube pump, 3: Fluorescence tube, 4: Time switch, 5: Video camera, 6: Jack, →: Flow of nutrient solution.

内から出し、草丈、本葉数、重量などを測定した。

4. 葉の運動の記録

葉の運動は、ビデオカメラ (Handycam TR-3, SONY) とコントローラー (RMR-155, SONY) を用い175秒間隔で5秒間撮影した。暗期の撮影時の光源として Simon *et al.* (1976) の報告に基づき、影響が少ない緑色光を用いた。録画は実験開始1, 6, 11日目の3日間行った。録画期間は実験の各条件の1周期分(12時間周期は1.5周期分)とした。録画した画像はコンピュータ (Macintosh II vx, アップルコンピュータ(株)) を用いてデジタル画像として保存した。

5. 測定項目

各々の光条件で12日間生育後、草丈、地上部の生重量を1個体ずつ24検体測定し、その平均値を処理区の値とした。また地上部の乾燥重量は値が小さく1個体ずつ計測すると誤差が大きくなるため個々の重量は測定せずに、全試料を80°Cで3時間乾燥させ、その重量を測定し検体数で除することで処理区の値とした。本葉数は1個体ごとに葉身長が10 mm以上の本葉を数えた。葉の運動は、保存した画像から6分間隔で、複葉中の対となっている単葉の先端間の距離の変化を測定した。ただし実験開始1日目では本葉が形成されていないため、子葉の先端間の距離を測定した。

結 果

1. 生育に与える明暗周期の影響

本実験では、植物の生育状態について草丈、重量(生、乾)および10 mm以上の本葉数を測定した。結果は、Table 1, Fig. 2 に示した。Table 1の数値は、24時間周期で生育させた植物体の各測定項目の測定値を100

としたときの値を示した。Fig. 2 は、実験開始 12 日目の本葉数の頻度分布を表している。

Table 1a より、 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件で 24 時間周期が最も生育が良好であり、12, 48 時間周期の順で値が小さくなり生育が悪いくことが分かった。Table 1b より $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件でも、24, 12, 48 時間周期の順で生育が悪くなっていたことから、生育に対する明暗周期の影響は実験に用いた範囲内では温度に依存しないことが分かった。Table 1a, c からすべての明暗周期条件で比較すると、24, 18, 12, 36, 48 時間周期の順で値が小さくなり、24 時間周期を基準とすると周期長が 24 時間より短い条件下の方が、周期長が 24 時間より長い条件下より生育が良好であった。このことから草丈や重量に対する明暗周期の影響は、周期長により変化することが分かった。

Fig. 2a に示すように温度 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件で育てた植物体について本葉数を比較したところ、草丈や重量の場合と同様に 24 時間周期が最も多く、12, 48 時間周期の順で少なくなった。Fig. 2b より $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の条件で同じ周期条件でも、本葉数は 24, 12, 48 時間周期の順で少なくなっていたことから、本葉数についても明暗周期の影響は温度に依存しないことが分かった。また、Fig. 2a, c よりすべての明暗周期において本葉数を比較したところ、24, 12, 18, 36, 48 時間周期の順で葉の展開が遅れており草丈や重量の結果とは明暗周期による影響の度合いが異なっているが、周期長が 24 時間より短い条件の方が長い条件より本葉数が多いことが分かった。

Table 1 Effect of light-dark cycles on growth.

	Cycle length (h)	Height (%)	Fresh weight (%)	Dry weight (%)
a)	24	100.0	100.0	100.0
	12	87.7	91.1	80.7
	48	72.9	70.8	60.7
b)	24	100.0	100.0	100.0
	12	100.8	95.6	85.7
	48	84.7	69.6	67.9
c)	24	100.0	100.0	100.0
	18	83.1	96.1	87.1
	36	75.4	69.3	71.0

Plant were grown under a), c): $28 \pm 2^\circ\text{C}$, b): $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 12 d.

Values indicate percentages to those under 24 h cycle.

以上の結果から明暗周期が生育に与える影響は、周期長に依存し、その程度が変化することが明らかになった。

2. 葉の運動に対する明暗周期の影響

24 時間周期条件下で生育させた際の 1, 6, 11 日目の葉の運動を、Fig. 3 に示した。実験は、14 時間日長条件の 5 日目の 18:00 に実験 1 日目の暗期を開始した。1 日目は、暗期開始により葉が閉じ、その状態を暗期開始 10 時間後まで維持した。そして暗条件開始 10 時間後には葉が開き始め、明期開始時には葉はすでに開いた状態であった。6 日目には、暗期開始により葉が閉じ、その後 8 時間その状態を維持した。その後は開き始めて明期開始時には葉は開いていた。11 日目の葉

Fig. 2 Effect of light-dark cycles on growth.

a), c): Plants were grown under $28 \pm 2^\circ\text{C}$ for 288 h. b): Plants were grown under $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 288 h. Number of leaves: No. of leaves that grew to 10 mm and over. Relative frequency: Plants of each numbers of leaf/total plants.

の運動は6日目と全く同じであった。この結果から、葉の運動は、24時間周期条件下では明期と暗期の長さの比が異なる条件でも、明期では葉が開き、暗期では葉が閉じるという規則的で安定な運動をすることが示唆された。

24時間以外の明暗周期条件下で6日間生育させたときの葉の運動を Fig. 4 に示した。24時間周期以外の条件下で生育させたものの葉の開閉運動は、実験開始1日目においては光条件に関係なく、24時間周期条件下での葉の開閉運動と同じ運動を示した（データ省略）。しかし6時間周期条件下では、明期開始時間が24時間周期での葉の展開する時間より早かったため、葉の展開が2時間ほど早まった。異なる明暗周期で共通に見られる葉の運動は、光照射により葉が開き、光が消えることで葉が閉じることであった。しかし光が消えることにより葉が閉じるが、12時間周期の6:00と36, 48時間周期の18:00では、その状態を維持できず直後に開いてしまった。この現象は、葉の開閉状態は明から暗または暗から明に変わるときの刺激以外の要因にも制御されていることを示している。24時間周期の葉の運動のように、明期では葉が開き、暗期では閉じているという規則的で安定な開閉運動が見られるためには、明暗周期と光刺激以外の要因が同期することが必要であると思われる。さらに24時間周期より短い12, 18時間周期での葉の開閉運動は、18:00で葉が閉じしばらくはその状態を維持しており、24時間周期の葉の開閉運動と同期している部分があるが、36, 48時

Fig. 3 Leaf movement under 24 h cycle.

○: starting point of light period. ●: starting point of dark period. O: leaves open. C: leaves close.

間周期では葉の開閉運動は全く同期していなかった。このような葉の開閉運動は11日目においても同様に見られた（データ省略）。

考 察

1. 生育に対する明暗周期の影響

12, 18, 24, 36, 48時間周期の5つの条件下で生育させた結果、24時間周期条件で草丈、重量、本葉数は最も大きい値を示し、さらに周期長が24時間周期より長い条件下では短い条件下に置かれたものよりそれぞれの値が小さく、実験期間中の光照射時間が一定であっても、明暗周期が異なると生育に違いが生じることが分かった。Highkin and Hanson (1960) はトマトを用い同様の実験を行い、24時間周期で最も生育が良好であると報告している。しかし彼らの実験では、24時間周期より短い条件では生育が極端に悪くなり、我々の実験結果とは異なる結果を得ていることから、生育に対する明暗周期の影響は植物種により異なることが考えられる。

このように光照射時間が同じであっても生育に違いが生じる原因として、光合成効率に違いが生じていることが考えられる。このことは乾燥重量での違いが大

Fig. 4 Leaf movement under each light-dark cycle on 6th-7th day.

○: starting point of light period. ●: starting point of dark period. O: leaves open. C: leaves close. In order to compare movement of 36 h and 48 h cycle with that of 24 h cycle, data of 24 h cycle on 7th day copied from those on 6th day.

きいことから推察される。本実験では明期の長さが全処理区で同じになるよう設定しており、また Fig. 4 に示すように明期にはすべての処理区で葉は十分に開いていることから、葉の受光時間と量は同じであると推測される。つまり植物体の光合成効率は24時間周期条件下でよく、それ以外の条件下では悪かったと考えられる。また、生育に対する影響がそれぞれの明暗周期に特異的であることを考慮すると、光合成効率は明暗周期の長さにより大きく影響されると考えられる。

2. 生育と運動の関係

実験期間を通して24時間周期条件下での葉の開閉運動は、子葉、本葉に関係なく暗期に入ると閉じた状態を維持し、そして暗期の終わる前に開き、その状態を明期終了時まで維持した (Fig. 3)。24時間周期条件下以外で生育させたものでは、実験開始1日目においては、すべての条件において24時間周期条件下のものと同じ葉の開閉運動を示した。それに対し6日目で葉の開閉運動は24時間周期条件下のものとは異なり規則性は見られず (Fig. 4)、これは特に36, 48時間周期条件下で顕著に見られ、11日目でも同様な結果が得られた。しかし12, 18時間周期条件下での葉の開閉運動は明暗周期ではなく、24時間周期条件下で生育させた植物体の葉の開閉運動に類似していた。

この結果から葉の開閉運動の規則性と生育を比較すると、葉の運動が規則的で明暗周期に同期している24時間周期が最も生育が良好であり、葉の運動が明暗周期に同期せず、24時間周期条件に同期しているように見える12, 18時間周期がその次によく、明暗周期にも24時間周期条件にも同期していない36, 48時間周期条件下のものが最も悪いという関係が示された。葉の運動は内生周期に依存することが多くの植物において知られていることから、内生周期の維持と明暗周期の内生周期との同調が生育に強く影響していることを、この関係は示唆している。

3. 生育と内生周期の関係

そこで内生周期が生育にどのような機構で関与しているかが問題になる。Highkin and Hanson (1960) は、明暗周期の違いにより生育に違いが生じる原因として、内生周期には2つの位相があるというモデルを用いて説明した。そこでは内生周期の位相は変化せず、光照射により同化が活発に行われる位相 (Photophile) と、光照射されても同化が起きない、もしくは阻害される位相 (Scotophile) の2つがあり、そのような内生周期と明暗周期が同期している場合に生育が最も良い

としている。この仮説に基づくとサラダナの生育に関して、連続明期下と18時間日長 (明期18時間、暗期6時間) での植物体の生体重を比較すると、明期間の延長に見合うだけの増加が見られない (Ikeda *et al.*, 1988) という結果も説明ができる。

上のモデルは内生周期には2つの位相があると説明されているが、その位相が植物体内においてどのように制御されているかについては不明である。植物細胞の内生周期の決定モデルの1つとして、膜タンパク質の膜への結合や解離によってもたらされる細胞内の環境変化が細胞内の内生周期を決定しているという、Translation-Membrane model がある。近年このモデルを実証するような結果が Walla *et al.* (1994) により得られたことや、内生周期の3つの特徴をこのモデルで説明できることから、内生周期の制御系に近似したモデルであると考えられる。

上の2つのモデルは、内生周期には2つの位相が存在する点で共通しており、Photophile と Scotophile の位相変化が、細胞内の結合タンパク質により制御されているとみなすことができる。

本実験結果によると、24時間周期条件下で生育させたものでは、24時間 (明期12時間、暗期12時間) に同期して内生周期が形成し維持されているため (Fig. 3)、Photophile と Scotophile の位相が明暗周期にあわせて交替していると考えられる。そして細胞内では明期において光合成に関与する反応系の活性が上昇しており、暗期においては活性が低下もしくは失活していると説明できる。このような酵素活性の内生周期は protein kinase (Carter *et al.*, 1991) や PEP-carboxylase (Kusumi *et al.*, 1994) などでも報告されており、光合成に関与する chlorophyll binding protein 遺伝子の転写や蓄積 (Miller and Kay, 1991) 等の報告があることから説明できる。

しかしこの説明では、他の条件下での生育と明暗周期と葉の運動の場合にはうまくできない。特に36, 48時間周期条件下では葉が開いた状態が続き、そこに光が照射される時間は24時間周期と同じ程度と見ることができる。そこで考えられることは、36, 48時間周期条件下では内生周期を失ってしまった。つまり明暗周期が内生周期を誘導できなかったということが、生育に悪い影響を与えていると考えられる。

そこで、内生周期の消失による細胞への影響を考えてみる。明暗周期によって誘導される内生周期は先に述べたように細胞内の代謝系が変化することで維持さ

れていると考えられる。つまり内生周期が維持されていない条件とは細胞内の代謝系のリズムが失われた状態であり、内生周期を生じるように制御されてきた酵素活性の失活もしくは活性化が持続してリズムを失っていると考えられる。酵素活性が失活することで光合成などの同化や代謝活性が失われる。さらに生体内の反応系の制御は代謝産物の濃度によるフィードバックのネットワークで制御がなされているため、制御を失い酵素活性が持続することは結果的に生体内の反応を止めてしまう。さらに活性の持続により無駄な反応が生じるためそれによるエネルギー消費が多くなったり、生体内に供給蓄積されるエネルギー量のバランスが崩れてしまう。このような点からも内生周期の消失が細胞内の代謝系に悪影響を与え、このことが生育へ影響を与えることが容易に考えられる。

本研究では、生育と葉の運動に対する明暗周期の影響を調査すると同時に、葉の運動から内生周期を推定した。そのため内生周期が規則的で安定な条件下では、生育が良好であるという生育と内生周期の関係を確認することができた。さらに生育と内生周期の制御系との関係から、内生周期の存在が細胞内の反応系の効果的な制御をしていると推定した。以上のことは生育を良好に保つには、内生周期が安定して維持できる外部環境を設定することが重要であることを示している。

文 献

- Bula, R. J., Morrow, R. C., Tibbitts, T. W., Barta, D. J., Ignatius, R. W., Martin, T. S. 1991. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience* **26** : 203-205.
- Carter, P. J., Nimmo, H. G., Fewson, C. A., Wilkins, M. B. 1991. Circadian rhythms in the activity of a plant protein kinase. *EMBO J.* **10** : 2063-2068.
- Engelmann, W., Karlsson, H. G., Johnsson, A. 1973. Phase shifts in the kalanchoe petal rhythm, caused by light pulses of different duration. *Int. J. Chronobiol.* **1** : 147-156.
- Erwin, J. E., Heins, R. D., Faust, J. E. 1993. Thermomorphogenic and photoperiodic responses of *Nephrolepis exaltata* "Dallas Jewel." *HortScience* **28** : 182-184.
- Fondeville, J. C., Borthwick, H. A., Hendricks, S. B. 1966. Leaflet movement of *Mimosa pudica* L. indicative of phytochrome action. *Planta* **69** : 357-364.
- Halaban, R. 1969. Effects of light quality on the circadian rhythm of leaf movement of short-day-plant. *Plant Physiol.* **44** : 973-977.
- Highkin, H. R., Hanson, J. B. 1960. Possible interaction between light-dark cycles and endogenous daily rhythms on the growth of tomato plants. *Plant Physiol.* **29** : 301-302.
- Ikeda, A., Nakayama, S., Kitaya, Y., Yabuki, K. 1988. Basic study on material production in plant factory (I). Effect of photoperiod, light intensity, and CO₂ concentration on photosynthesis of lettuce. *Environ. Control in Biol.* **28** : 107-112.
- Karlsson, M. G., Heins, R. H., Erwin, J. E., Berghage, R. D., Carlsson, W. H., Biernbaum, J. A. 1989. Temperature and photosynthetic photon flux influence chrysanthemum shoot development and flower initiation under short-day condition. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **114** : 158-163.
- Kondo, T. 1982. Phase control of the potassium uptake rhythm by light signals in *Lemna gibba* G3. *Z. Pflanzphysiol.* **107** : 395-407.
- Kusumi, K., Arata, H., Iwasaki, I., Nishikawa, M. 1994. Regulation of PEP-carboxylase by biological clock in a CAM plant. *Plant Cell Physiol.* **35** : 233-242.
- Miller, A. J., Kay, S. A. 1991. Circadian control of *cab* gene transcription and mRNA accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1** : 541-550.
- Millet, B., Coillat, L., Agosti, R. D. 1989. The rhythmic leaf movements after regeneration of partially excised pulvinus in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Physiol.* **30** : 643-648.
- Nakashima, H. 1993. Circadian rhythms in plants : Strategies for analysis. *J. Plant. Res.* **106** : 283-288.
- Simon, E., Satter, R. L., Galston, A. W. 1976. Circadian rhythmicity in excised *Samanea pulvini*. *Plant Physiol.* **58** : 417-420.
- Walla, O. J., Groot, E. J., Schweiger, M. 1994. On the molecular mechanism of the circadian clock. The 41,000 Mr. clock protein of *chlorella* was identified as 3-phosphoglycerate kinase. *J. Cell Sci.* **107** : 719-726.
- Wallace, D. H., Zorel, R. W., Yourstone, K. S. 1993. A whole system reconsideration of paradigms about photoperiod and temperature control of crop yield. *Theor. Appl. Genet.* **86** : 17-26.
- Wilkins, M. B., Thomas, S. L. 1993. The damping and reinitiation of the circadian rhythm of CO₂ output in *Bryophyllum* leaves in relation to their malate content. *J. Exp. Bot.* **44** : 901-906.