明期と暗期の気温差および光合成有効光量子束がバレイショ培養小植物体のシュート長および生長に及ぼす影響

古在豊樹・串橋 直・久保田智恵利・富士原和宏

千葉大学園芸学部 271 千葉県松戸市松戸 648

Effect of the Difference between Photoperiod and Dark Period Temperatures, and Photosynthetic Photon Flux Density on the Shoot Length and Growth of Potato Plantlets In Vitro

Toyoki Kozai, Sunao Kushihashi, Chieri Kubota and Kazuhiro Fujiwara

Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271

Summary

Potato plantlets (*Solanum tuberosum* L. cv. Benimaru) under CO₂ enriched and photoautotrophic culture conditions were subjected to three different photo-/dark period temperature combinations (25°/15°C, 20°/20°C and 15°/25°C) and two levels of photosynthetic photon flux densities (74 and 147 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$). The shoot length of the plantlets under the same photosynthetic photon flux density (PPF) was reduced with decreasing the difference between photoperiod and dark period temperatures (it is named DIF, photoperiod temperature minus dark period temperature). No marked differences in the fresh and dry weights per plantlet were observed among the three DIF treatments in each PPF treatment. The higher PPF led to a decrease in the shoot length, an increase in the fresh weight, dry weight and leaf area per plantlet in each DIF treatment. It is suggested that shoot length of plantlets in vitro under CO₂ enriched and photoautotrophic culture conditions can be controlled without reducing the weight increments and leaf area per plantlet by regulating the difference between photoperiod and dark period temperatures.

緒 言

一般に、良質な苗の必要条件として、草丈（シュート長）が短い（徒長していない）こと、根部生体重量に対する茎葉部生体重量の比が小さいこと、葉面積が大きいこと、環境ストレスに強いことなどが挙げられる。

最近、組織培養苗（以下、培養苗）の利用が増大しつつあり、培養苗においても上記必要条件を満たすことが要求されている。しかしながら従来の培養環境条件下では、そのような必要条件を満たす培養苗の生産は困難であるのが実状である。そこで、個々の必要条件を満たすために培養環境を調節することの必要性が認識されはじめてきたので本報告では、培養期間中に培養小植物体のシュート長を制御するための環境調節法について検討した。

一般に、草丈に影響を及ぼす環境要因としては、光質（Murakamiら, 1991）、光強度（Lockhart, 1961）、空気流（Grace, 1977）などが知られている。しかし、培養器内のこれら環境要因を調節するのは、一般的な培養室の設備状況から考えて比較的困難な場合が多い。他方、明期気温から暗期気温を差し引いた値（DIFと名付けられている）を小さくするほど、温室栽培中の花き植物の草丈が低くなることが最近報告されている（Heinsら, 1988; Karlssonら, 1989; Erwin・Heins, 1990）。人工光を用いる組織培養においては、明期・暗期の気温は比較的容易に調節することができ、また明期気温より暗期気温を高く維持するのに必要な費用はわずかである。Heinsら（1988）の研究成果が培養小植物体のシュート長の制御にも適用できるとすれば、その技術は培養苗生産における重要技術として広く普及する可能性は高いと考える。

そこで本実験では、明期と暗期の気温差および光合

1992年1月10日 受理。本報告の概要は園芸学会平成2年度春季大会で発表した。

成有効光量子束（波長 400～700 nm）がバレイショ培養小植物体のシュート長および生長に及ぼす影響を調査した。なお、本実験は、CO₂施用・光独立栄養培養環境条件下において行われた。

材料および方法

1. 培養環境条件および試験区

全試験区共通の培養環境条件を第1表に示す。培養器のCO₂換気回数は古在ら（1986）の方法で測定した。

Table 1. Description of the experimental conditions common to all the treatments.

Plant Material	
Species:	Potato (<i>Solanum tuberosum</i> L. cv. Benimaru)
Explant:	Single node cuttings each with a leaf
Fresh weight:	30±5 mg/explant
% dry matter:	7.2% (estimated)
Number of explants:	1 explant/vessel
	100 explants per treatment
Medium	
Basal medium:	Murashige and Skoog (1962)
Amount:	10 ml/vessel
Agar:	8 g·liter ⁻¹
pH:	5.8 before autoclaving
Growth regulator:	None
Sucrose:	None
Vessel	
Type:	Glass test tubes with plastic molded caps
Volume:	47 ml
Number of air changes:	1.5 hr ⁻¹
Culture room	
Photoperiod:	12 hr·day ⁻¹
Daily mean air temperature:	20°C
Relative humidity:	70% during the photoperiod
CO ₂ :	1300–1500 μmol mol ⁻¹ during the photoperiod
	350–450 μmol mol ⁻¹ during the dark period
Duration of experiment:	28 days

本実験で設定した試験区の概要を第2表に示す。6試験区中、PPF (photosynthetic photon flux density, 光合成有効光量子束) が 147 μmol·m⁻²·sec⁻¹ の3試験区をHF (High PPF) 区, PPFが 74 μmol·m⁻²·sec⁻¹ の3試験区をLF (Low PPF) 区と呼ぶ。また、明期気温から暗期気温を差し引いた値 (DIFと呼ぶ, differenceの省略形) は, 10, 0, -10°Cのいずれかとし, それぞれを, PD (Positive DIF) 区, ZD (Zero DIF) 区およびND (Negative DIF) 区と呼ぶ。なお、通常の有糖培養条件下のPPFは, 50 μmol·m⁻²·sec⁻¹ 程度である。

2. 測定および算定

生体重および葉数を調整した外植体を培養器に植え付けた日を0日目とした。0日目に、植え付けた外植体とは別に、10本の外植体の生体重および乾物重を測定し、乾物率を算定した。

7日目に10本、14日、21日および28日目に、20本の小植物体を各試験区から任意に取り出し、シュート長、生体重、乾物重、茎径、葉数および葉面積を測定した。生体重および乾物重は、葉部、茎部および根部にそれぞれ分けて測定し、それらの和を小植物体当たりの全生体重、全乾物重とした。得られた測定値から小植物体の乾物率、根部生体重に対する茎葉部生体重の比（以下、生体重S/R比）および葉1枚当たりの生体重を算定した。

また、21日および28日目に、明期および暗期の培養器内外のCO₂濃度を、ガスクロマトグラフ（株式会社島津製作所、型式GC-12 A）を用いて測定した。測定は明期および暗期ともに、培養器内外のCO₂濃度に時間変動が少ない時間帯に、それぞれ3回ずつ行った。培養器内外のCO₂濃度差、培養器CO₂換気回数、および培養器容

Table 2. Description of the treatments.

Treatment ^x	Air temperatures in culture room (°C)		DIF ^y (°C)	PPF ^z (μmol·m ⁻² ·sec ⁻¹)
	Photoperiod	Dark period		
PD-HF	25	15	10	147
ZD-HF	20	20	0	147
ND-HF	15	25	-10	147
PD-LF	25	15	10	74
ZD-LF	20	20	0	74
ND-LF	15	25	-10	74

^x PD: Positive DIF, ZD: Zero DIF, ND: Negative DIF, HF: High PPF, LF: Low PPF.

^y DIF is defined as the difference between photoperiod and dark period temperatures (Heins et al., 1988).

^z PPF: Photosynthetic photon flux density on the empty culture shelf.

積より, 富士原 (1988) の式を用いて, 小植物体当たりの純光合成速度および暗呼吸速度を算定した。

結果および考察

1. シュート長

第1図に, 7日, 14日, 21日および28日目における小植物体のシュート長を示す。21日および28日目には, シュート長にDIFおよびPPFの影響が明確に現れた。28日目のシュート長は, PD・LF区で最大, ND・HF区で最小であった。21日目, 28日目ともに, PPFが同じ試験区において, DIFが小であるほどシュート長は短くなり, ダンカンの範囲検定により危険率1%で統計的有意差 (以下, 有意差) が認められた。この傾向は, 温室栽培された花き植物の草丈がDIFを小にするに従い小となるという, Heinsら (1988) の結果と一致する。すなわち, バレイショ培養小植物体を対象としてもDIF調節によるシュート長制御が可能であることが明らかとなった。

ところで, 増殖培養ステージにおいて, 1本の小植物体から複数の外植体を得る必要がある場合には, 植え替え時に節間で切り分ける必要があるため, ある程度以上の節間長が要求される。そのような場合においても, DIF調節により小植物体のシュート長 (節間長) を制御できることを上記の実験結果は示している。

28日目のシュート長は, DIFが同じ試験区では, PPFが高い試験区の方が短くなる傾向がみられた。ZD区およびND区において, PPFの異なる2試験区の間にはそれぞれ有意差が認められた。他方, PD区においてはPPFの違いによる有意差は認められなかった。

PD・LF区の小植物体の頂部は, 21日目ですでに培養器の栓に到達していたので, シュートの伸長が妨げられたと考える。もし, このことがなければ, PD・LF区とPD・HF区間にも有意差が生じる程度の差がみられたものと推察される。

ところで, Heinsのグループの研究は, 気温が昼と夜とで周期的に変動するときに生長が促進されるという温度周期性 (Thermoperiodicity) について調べた Wentの一連の研究 (例えば, 1944) を押し進めたものとして捉えることができる。しかしながら, Heinsのグループの研究には, 高品質の温室作物生産のための草丈制御を目的として温度周期性を利用している点に高い独創性があるといえる。

2. 生体重, 乾物重および乾物率

第2図に, 7日, 14日, 21日および28日目における小植物体当たりの全生体重を示す。DIFが同じ試験区では, 28日目の全生体重は, PPFが高い試験区の方が大となり, PD区, ZD区, ND区のそれぞれにおいて有意差が認められた。CO₂施用・光独立栄養培養環境条件下におけるバレイショ小植物体の高PPFによる生長促進については, Kozaiら (1988) による報告がある。

PPFが同じ試験区で28日目の全生体重に有意差が認められたのは, PD・LF区とZD・LF区間のみであった。このことから, DIFの相違による小植物体の全生体重の差異は明確ではなかったといえる。

第3表に, 21日および28日目における小植物体当たりの全乾物重, 乾物率, 茎径, 葉数, 生体重S/R

Fig. 1. Shoot length of potato plantlets in vitro 7, 14, 21, and 28 days after treatment. For detail of the treatments, see Table 2. Vertical bars represent S.D. from the mean of duplicate.

Fig. 2. Fresh weight of potato plantlets in vitro 7, 14, 21, and 28 days after treatment. For detail of the treatments, see Table 2. Vertical bars represent S.D. from the mean of duplicate.

Table 3. Dry weight per plantlet, percent dry matter, stem diameter, number of unfolded leaves, shoot/root fresh weight ratio, fresh weight per leaf, leaf area per plantlet of potato plantlet in vitro 21 and 28 days after treatment. For description of the treatments, see Table 2.

Treatment	Days after treat.	Dry weight (mg)	% dry matter (%)	Stem diameter (mm)	No. of leaves	Shoot/root FW ratio	FW per leaf (mg)	Leaf area (cm ²)
PD-HF	21	19.6	7.2	1.20	8.6	5.7	9.3	2.6
	28	27.5 c ²	5.9	1.40 c	8.7 a	4.1	17.8 e	5.5 b
ZD-HF	21	15.4	6.9	1.16	7.8	6.8	10.6	3.6
	28	23.7 bc	5.9	1.38 c	9.6 cd	4.8	16.2 de	6.8 c
ND-HF	21	16.3	6.3	1.28	9.1	4.2	10.5	4.1
	28	24.2 bc	6.1	1.44 c	11.0 e	4.7	14.5 cd	6.9 c
PD-LF	21	14.4	6.7	1.09	8.3	9.0	7.7	2.3
	28	23.1 b	5.6	1.36 bc	8.9 ab	6.4	13.0 bc	4.3 ab
ZD-LF	21	11.6	6.9	1.07	8.1	11.9	6.0	2.2
	28	17.1 a	6.1	1.24 a	9.4 bc	8.8	8.3 a	3.7 a
ND-LF	21	10.7	6.2	1.05	8.8	5.9	6.1	2.3
	28	17.5 a	5.4	1.25 ab	10.1 d	4.8	10.7 ab	5.2 b

² Different letters in each column indicate significantly different means at the 1% level of Duncan's multiple range test.

比、葉1枚当たりの生体重および小植物体当たりの葉面積を示す。DIFが同じ試験区では、28日目の全乾物重は、PPFが高い試験区の方が大となり、有意差が認められた。PPFが低い試験区では、28日目の全乾物重はPD・LF区で最大となり、ZD・LF区およびND・LF区の両区との間にそれぞれ、有意差が認められた。これに対しPPFが高い試験区では、28日目の全乾物重についてDIFの相違による有意差は認められなかった。乾物率については、いずれの試験区においてもほぼ同様であり、PPFおよびDIFの相違による差異はみられなかった。

3. 茎径、葉数、生体重S/R比、葉1枚当たりの生体重および葉面積

28日目の茎径は、ZD区およびND区では、PPFが高い試験区で大きくなり、PPFが低い試験区との間に有意差が認められた。PPFが同じで、DIFの異なる試験区では有意差が認められたのはPD・LF区とZD・LF区との間のみであった。

28日目の葉数は、PPFが同じ試験区では、DIFが小になるに従い大となる傾向がみられた。ただし、小植物体の葉数に及ぼすDIFの影響は、シュート長に及ぼす影響ほどには明確ではなかった。このことは、DIFを小とすることによりシュート長が短くなっても、葉数は減少せずに節間長が短くなったことを示している。DIFが同じ試験区では、葉数はPPFの高低によらず、ほぼ同じ値を示した。PPFは葉数にあまり影響を及ぼさないことが示された。

全試験区において、生体重S/R比は日数の経過とともに減少する傾向がみられた。PPFが高い試験区では、生体重S/R比はDIFによらずほぼ等しく、他方、PPFが低い試験区では、ND・LF区<PD・LF区<ZD・LF区となった。DIFが小であっても根部の生長は抑制されないという結果となった。DIFが同じ試験区では、PPFが高い試験区において生体重S/R比は小となったことから、根部の生長はPPFを高めることにより促進されることが明らかとなった。

28日目の葉1枚当たりの生体重は、DIFが同じ試験区では、PPFが高い試験区で大きくなり、PPFが低い試験区との間に有意差が認められた。PPFが高い試験区では、DIFが小になるに従い28日目の葉1枚当たりの生体重は小となる傾向がみられた。これは、葉部生体重は、PPFが高い3試験区間には互いに大差がなく(155~160 mg/plantlet)、他方、葉数はDIFが小になるに従い大となったためである。

28日目の小植物体当たりの葉面積は、DIFが同じ試験区では、PPFが高い試験区で大となる傾向がみられ、ZD・LF区とZD・HF区の間、およびND・LF区とND・HF区の間それぞれ有意差が認められた。PPFの高低による葉数の差異はみられなかったことから、PPFを大にすることにより、葉1枚当たりの葉面積が大となるものと考えられる。PPFが同じ試験区間では、DIFが葉面積に与える明確な影響はみられなかった。

4. 培養器内外のCO₂濃度, 純光合成速度および暗呼吸速度

第4表に, 21日, 28日目における明期培養器内外のCO₂濃度差 (C_p), 小植物体当たりの純光合成速度 (P_n), 暗期培養器内外のCO₂濃度差 (C_d) および小植物体当たりの暗呼吸速度 (R) を示す.

C_p は, 全試験区とも経日的に増大した. PPFの高い試験区の C_p はPPFが低い試験区よりも常に大であった. PPFが高い試験区の21日目の明期培養器内CO₂濃度は, 明期培養器外(培養室内)CO₂濃度が1,300~1,400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ であったにもかかわらず, DIFによらず約150 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ であった. これは大気中のCO₂濃度(約350 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$)より約200 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 低い値である. 28日目では, すべての試験区においても大気中のCO₂濃度よりも低い値となった.

21日目の P_n は, DIFが同じ試験区では, PPFの高い試験区で大であった. これに対し, 28日目にはPPFの高低による P_n の差はほとんどなかった. これは, PPFの高い試験区の培養器内のCO₂濃度が低下していたため P_n が低く抑えられたことによるものと考ええる. また, PPFが同じ試験区では, 21日, 28日目ともDIFの相違による P_n の顕著な差は認められなかった.

28日目の暗呼吸速度は, PPFが等しい試験区において, 暗期の気温が最も低いPD・LF区およびPD・HF区においてそれぞれ最低となり, ZD区およびND区の

それぞれ約1/2の値を示した. このことは, PPFが等しい試験区間においてPD区の生体重および乾物重が大となる傾向を示した原因の一つと考えられる.

5. DIFの再定義の必要性

本実験においては, 明期, 暗期をともに12時間とし, DIFを変えても1日の平均気温は不変であるとした. Heinsら(1988)によれば, 日平均気温が異なれば, 生育速度は異なるのに対して, DIFが最終的な草丈に及ぼす影響は日平均気温が異なっても同様であるとしている. しかし, 明期と暗期の時間およびその周期が異なる場合であっても, 日平均気温が同じであればDIFが草丈に及ぼす影響が同様であるか否かについては明らかにされていない. その場合には, DIFを次式のように再定義する必要があるのかもしれない.

$$\text{DIF} = (\text{PP} \cdot \text{PT} - \text{DP} \cdot \text{DT}) / (\text{PP} + \text{DP})$$

ここで, PP, DP, PTおよびDTは, それぞれ, 明期時間, 暗期時間, 明期気温および暗期気温である. この式で定義されるDIFの有効性については, 今後の検討課題となろう. このとき, 明期時間, 暗期時間とは単に光周性のみ関与する環境因子であるのか否かについての論議が必要かも知れない. 明期と暗期の切り替えに伴い変化する他の環境要因(例えば, 相対湿度)が実際には培養小植物体のシュート長に直接影響を及ぼしている可能性もあるからである. また, DIFが草丈に及ぼす影響についての生理学的機構については, 未

Table 4. Difference in CO₂ concentration between inside and outside the vessel during the photoperiod C_p ($C_p = C_{\text{ou}} - C_{\text{in}}$, $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), net photosynthetic rate per plantlet P_n ($\mu\text{molCO}_2\cdot\text{plantlet}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$), difference in CO₂ concentration between inside and outside the vessel during the dark period C_d ($C_d = C_{\text{in}} - C_{\text{ou}}$, $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$), and dark respiration rate per plantlet R ($\mu\text{molCO}_2\cdot\text{plantlet}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$) of potato plantlet in vitro 21 and 28 days after treatment. For description of the treatments, see Table 2.

Treatment	Days after treat.	C_p	P_n	C_d	R
PD·HF	21	1158	3.34	248	0.74
	28	1212	3.49	217	0.64
ZD·HF	21	1255	3.68	435	1.28
	28	1290	3.78	468	1.37
ND·HF	21	1157	3.45	385	1.11
	28	1344	4.01	390	1.12
PD·LF	21	900	2.59	151	0.44
	28	1071	3.09	167	0.49
ZD·LF	21	1107	2.76	288	0.84
	28	1207	3.54	336	0.99
ND·LF	21	1103	3.29	269	0.78
	28	1302	3.88	320	0.92

だ解明されていない。この機構を内生ホルモンや体内水ポテンシャル場などの面から検討することは今後の課題となろう。

摘 要

CO₂施用・光独立栄養培養条件下のバレイショ培養小植物体に関し、明期と暗期の気温差DIF (DIF=明期気温-暗期気温) を小 (明期気温<暗期気温) とすることにより小植物体の全生体重および全乾物重をほとんど減少させずにシュート長を短くし、また葉数をやや増大させ得ることを明らかにした。同一DIF条件下では、PPF (光合成有効光量子束) を高くすることにより、シュート長は短く、他方、全生体重、全乾物重および葉面積は大となった。これらの結果から、培養環境調節による培養小植物体のシュート長制御技術の一つとして、DIFが利用可能であることが示された。

引用文献

- Erwin, J. and R. Heins. 1990. Temperature effects on lily development rate and morphology from the visible bud stage until anthesis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 : 664-646.
- 富士原和宏. 1988. 培養器内CO₂濃度が一定である場合の培養小植物体のCO₂交換速度の算定法. 植物組織培養 5 : 104-106.
- Grace, J. 1977. Plant response to wind. p.76-78. Academic Press.
- Heins, R., J. Erwin, R. Berghage, M. Karlsson, J. Biernbaum and W. Carlson. 1988. Use temperature to control plant height. Greenhouse Grower 6 : 32-34.
- Karlsson, M., R. Heins, J. Erwin, R. Berghage, W. Carlson and J. Biernbaum. 1989. Temperature and photosynthetic photon flux influence chrysanthemum shoot development and flower initiation under short-day conditions. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114 : 158-163.
- 古在豊樹・富士原和宏・渡部一郎. 1986. 植物組織培養器内の基礎的研究. (2). 栓および容器が閉栓容器の換気回数に及ぼす影響. 農業気象 42 : 119-127.
- Kozai, T., Y. Koyama and I. Watanabe. 1988. Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. Acta Horticulturae 230 : 121-127.
- Lockhart, J. A. 1961. Photoinhibition of stem elongation by full solar radiation. Amer. J. Bot. 48 : 387-392.
- Murakami, K., K. Horaguchi, M. Morita and I. Aiga. 1991. An examination of artificial lighting conditions in a plant factory in special reference to far-red (FR) irradiation. p. 9 - 12. In : Y. Hashimoto and W. Day (eds.). Mathematical and control applications in agriculture and horticulture. Pergamon press, Oxford (Supplement).
- Went, F. W. 1944. Plant growth under controlled conditions. II. Thermoperiodicity in growth and fruiting of the tomato. Amer. J. Bot. 31 : 135-150.