

チャの光独立栄養培養法を活用した培養植物体の発根・順化

誌名	静岡県農林技術研究所研究報告 = Bulletin of the Shizuoka Research Institute of Agriculture and Forestry
ISSN	18828264
著者名	西川,博
発行元	静岡県農林技術研究所
巻/号	1号
掲載ページ	p. 35-43
発行年月	2008年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



チャの光独立栄養培養法を活用した培養植物体の発根・順化

西川 博¹⁾

¹⁾ 農林技術研究所茶業研究センター

Rooting and Hardening of Tea Plantlet *in vitro* Cultured by Using a Photoautotrophic Micropropagation Technique

Hiroshi Nishikawa¹⁾

¹⁾ Tea Research Center/Shizuoka Res. Inst. of Agric. and For.

Abstract

In vitro propagation of tea plants have been established by subculture of the shoot in a vessel. In general, *in vitro* rooting of tea shoots was easily induced either by culturing on media containing low auxin for a long time or by dipping in high concentration auxin for a short time, followed by the transfer to an auxin-free medium.

But like in any other plants, *in vitro* propagated tea plants have little tolerance for sudden changes in environmental conditions by transition to an *ex vitro* environment.

To transplant *in vitro* propagated tea plants to an *ex vitro* environment smoothly the author applied a photoautotrophic micropropagation technique. Simply stated, photoautotrophic micropropagation is a micropropagation method using a sugar-free medium, in which the growth or accumulation of carbohydrates of cultures is dependant upon the photosynthesis and inorganic nutrient uptake of cultures.

By using this technique 85% of *in vitro* propagated tea plants were able to initiate their roots without organic substances such as plant growth regulators, vitamins or amino acids. More than 90% of *in vitro* propagated tea plants survived after transition to an *ex vitro* environment.

キーワード：順化，組織培養，チャ，発根，光独立栄養培養

I 緒 言

チャは他殖性の木本性作物であり，増殖は通常挿し木を利用して栄養繁殖する．この挿し木による増殖は季節依存性があること，育苗期間が長いこと，採穂用母樹の育成に数年を要し，広い採穂園が必要なことから短期間に大量に増殖することは難しい^{8),13~14)}．そのため，狭いスペースで短期間に大量増殖を目指す方法として組織培養を利用した増殖法の研究が進められ，一貫した増殖のプロセスが確立された^{10~14)} (図1)．この方法は母樹か

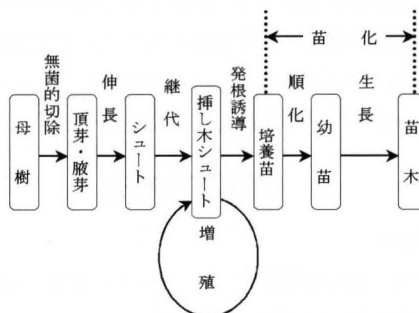


図1 組織培養を利用したチャの苗木生産プロセスの模式図 (1988古在記述を改変して作成)

ら茎頂や腋芽を無菌的に試験管内の培地へ移植し、これを伸長させ、繰り返し継代する。その継代された挿し木シュートは発根及び順化過程を経て定植に供する苗木へと育成される。また、この方法はカルスなどを経由しないことから、挿し木と同様に遺伝的な特性を維持したまま増殖が可能である。

これまで、組織培養されたチャの挿し木シュートから発根を誘導するため、発根に適した植物生長調節物質の濃度やその処理方法、支持体の種類や培養時の環境条件について多くの検討がなされてきた^{1,7-16)}。しかし、これらの方法はいずれも培地に植物生長調節物質、糖、ビタミンなどの有機物を含む条件を制御し根を誘導する方法(以下、従来法)であり、低濃度のオーキシンを含む培地を用いて培養する方法か、高濃度のオーキシンを処理してからオーキシンを含まない培地へ移植する方法が採用されている。この従来法により誘導された根は、通常の挿し木苗にみられるようなしなやかで柔軟性のある根とは形態的に異なり、硬く折れやすい。また、培地に寒天等を用いた場合においては移植後に微生物の繁殖源になりうる糖などの有機物を多く含む培地を完全に取り去る必要がある。さらに、組織培養された苗は環境の変化に弱いことから順化時に周到な管理が必要となる。

このため、本報では環境ストレスに強い培養苗生産等を目的として、最近培養苗生産に応用され始めている光独立栄養培養法のチャへの適用を試みた。この方法は培地に糖、植物生長調節物質などの有機物を一切含まず、炭酸ガス濃度や光合成有効量子束(植物の光合成に有効な波長範囲の光量子数、以下PPF)などの培養環境を制御することによって植物体の持つ光合成能力を活用して自立的に生長させる培養法である。この方法を用いることによって発根及び順化を同時に行うことができ、培地に糖を含む寒天を用いないため雑菌汚染による損失がなくなり、移植作業が容易となる。また、順化率が高まるなど多くの利点があることが示されている⁵⁾。

今回は組織培養されたチャの挿し木シュートが無菌的条件下で自立的に生長するために必要な環境条件のうち明期の炭酸ガス濃度、PPFが挿し木シュートに及ぼす影響を明らかにするとともに、この方法から得られた培養苗の仮植方法について検討したので報告する。

II 材料及び方法

1. 供試材料

‘やぶきた’自然交雑種子の子葉から分化し、MSを基本としてインドール酪酸(IBA)0.01mg/L、ベンジルアデニン(BA)1mg/L、ジベレリン(GA₃)10mg/L、シュークロー

ス0.09M及びゲランガム0.3%を添加した培地を用い2ヶ月間隔で継代培養(27℃, 16時間日長条件下)している挿し木シュートの茎切片を4~7mmの長さに切断し、上記培地のジベレリンを5mg/Lとした培地で2ヶ月間程度培養した挿し木シュートを葉数3~4枚、長さ20mm程度に基部を切断して用いた。

2. 試験方法

(1) 培養容器外の明期の炭酸ガス濃度とPPFの検討

培養条件は各処理共通の条件を表1に、処理区により異なる条件を表2に示す。1, 3, 5区については挿し木シュートを植え付け30日後にPPFを $4\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ から $38\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ に変更した。供試個体数は原則として各区5セット40個体とし、1つの容器に対し8個体ずつ植え付けた。ただし、2区に限り4セット32個体とし、合計232個体を用いた。調査項目はシュート及び根の生体重、シュート長、発根率、葉数、発根した個体の最大根長とした。培養に用いた機器は日本医科器械製作所のNC-350SC(3, 4, 5, 6区)及び三洋のMLR-350HT(1, 2区)である。培養に用いた容器はベルギー・コンビネス社製で、透明性の高いポリプロピレン樹脂製の無菌的に換気可能なフィルターを有するものを用いた(写真1)。

表1 共通の培養条件

培地	1/2MS(ただし、ビタミン類を除く。)
支持体	ピートモス：パーミキュライト(容積比1:1) 18.6g
植物生長調節物質	なし
pH	5.8 (滅菌処理前)
培地量	100mL
培養容器	550mL (無菌的に換気可能なフィルター付き)
気温 (明期：16時間)	26℃
(暗期：8時間)	24℃
相対湿度	85%
光源	蛍光灯
培養期間	60日

表2 処理条件

処理区	PPF ¹⁾ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	明期の 炭酸ガス濃度 ²⁾ (ppm)
1	4→38	380
2	38	380
3	4→38	1500
4	38	1500
5	4→38	2500
6	38	2500

1)処理区1,3,5のPPFの設定は培養開始から30日後に培養容器を4から $38\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の棚面上に移動した。

2)処理区1~2の炭酸ガスは無施用で、装置内の測定値(明和商事社製の携帯用光合成蒸発散装置：LI-6400Pにて計測)を示し、処理区3~6の炭酸ガス濃度は装置の設定値を示す。



写真1 培養に用いた容器

(2) 仮植方法の検討

仮植方法については、順化前の培養法が異なる培養苗(従来法と光独立栄養培養法)を用い、育苗用ガラスハウス内(以下、ハウス内)で表3に示すように遮光の有無及び仮植床が異なる条件下(写真3)で37日間育苗し、生育程度(達観による評価)及び生存率を調査した。また、仮植方法として設定した条件の効果を確認するため、順化時のハウス内の環境要因として、気温、相対湿度についてはティアンドディ社製の温湿度データロガー (TR-72U)を用いて測定し、PPFについてはアズワン社製のライトメーター (LM-331)を用いて測定した照度から換算した。

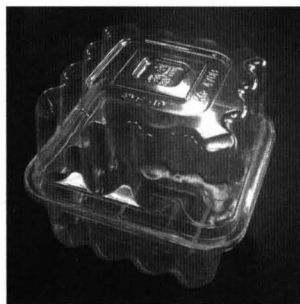


写真2 仮植床の検討に用いたバック



写真3 仮植方法の検討の様子
(光独立栄養培養法の処理区の例)

表3 仮植条件の設定

順化前培養法	仮植方法	
	遮光 ¹⁾	仮植床 ²⁾
従来法	有り	バック
従来法	無し	ポット
光独立栄養培養法	有り	ポット
光独立栄養培養法	無し	ポット
光独立栄養培養法	有り	バック
光独立栄養培養法	無し	バック

1)遮光には遮光率 50%の黒色遮光ネットを使用した。
 2)仮植床のバックは透明性の高いポリエチレン製の容器を上下に重ね、換気のために5個程度の小穴を開けたものを使用した(写真2)。この容器の内部の相対湿度は99%程度に高く維持される。
 ポットは黒色のポリポットで相対湿度は日中の気温の変化によって99%から35%の範囲で変動する。
 3)ピートモスとパーミキュライトを容積比1:1で混合したものを育苗土として使用した。

従来法は1/2MSを基本としてインドール酪酸(IBA)10mg/lを含む培地で2ヶ月間培養して発根を誘導した培養苗を用いた。従来法の培養苗は写真4に示すように太く、短い根が多数分化した培養苗で、培地を丁寧に流水下で除去したシュート長が20～30mm程度のものを使用した。光独立栄養培養した培養苗は、写真5に示すように根数が従来法に比べ少なく、根が細くしなやかな培養苗であり、シュート長は20～30mm程度のものを使用した。供試個体数は1つの処理区につき11～12個体とした。

III 結 果

1. 培養容器外の明期の炭酸ガス濃度とPPFが挿し木シュートの生育に及ぼす影響

シュートの生体重に及ぼす明期の炭酸ガス濃度とPPFの影響については一定の傾向は認められなかったが、根の生体重は炭酸ガス濃度を1500ppm以上とした区で大きくなる傾向が見られた(図2)。シュート長はPPFを4から38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ に移動した区において明期の炭酸ガス濃度を高めることによりやや長くなる傾向が認められたが、PPFを60日間38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ とした処理区では明期の炭酸ガス濃度の影響が明確でなかった(図3)。葉数のPPFの影響については明確な差が認められなかったが、明期の炭酸ガス濃度1500ppmまたは2500ppmとした区で差は小さいものの段階的に高くなった(図4)。発根率については明期の炭酸ガス濃度を1500ppmとした区で高くなり、最大で85.0%となった。しかしながら、2500ppmとした区においてはやや根の分化が抑制される傾向が認められた。また、明期の炭酸ガス濃度を2500ppmとした場合でPPFを38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ に維持した区では根の分化がさらに抑制される傾向が見られた(図5)。最大根長については炭酸ガス濃度を高めPPFを60日間38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

$2 \cdot s^{-1}$ とした処理区で長くなる傾向が認められ、PPFを $4 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ から $38 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ に移動した区においては明期の炭酸ガス濃度をさらに高めることにより最大根長が長くなる可能性が示唆された(図6)。これらのことから、継代後にオーキシシンを使用しないで発根を誘導するには培養容器外の炭酸ガス濃度を1500ppmとし、培養開始から30日間のPPFを $4 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ にすることが今

回の試みた条件では最も有効であり、発根した個体の根の伸長は明期の炭酸ガス濃度を1500ppmまたは2500ppmとし、PPFを $38 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ に維持することで促進された。

光独立栄養培養法を用いて根を誘導した培養苗は写真5に示すとおり従来法に比べ根数が少ないものの、柔軟で細く、挿し木苗の根に似た特徴が認められた。

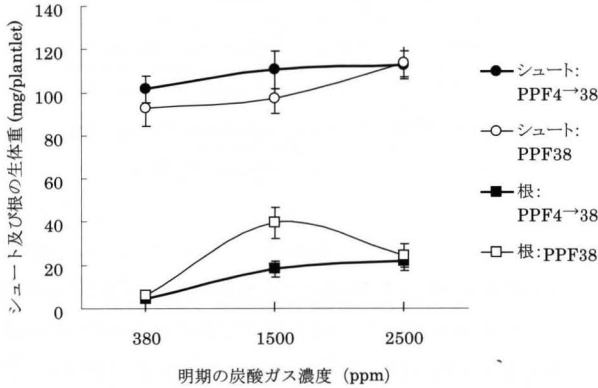


図2 培養容器外の明期の炭酸ガス濃度及びPPFがシュート及び根の生体重に及ぼす影響
1) 図中のPPFは光合成有効量子束を意味し、光源が蛍光灯の場合 $1000Lx=12.5 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ である(以下、同様)
2) 図中のバーは、標準誤差(S.E.)を表す(以下、同様)

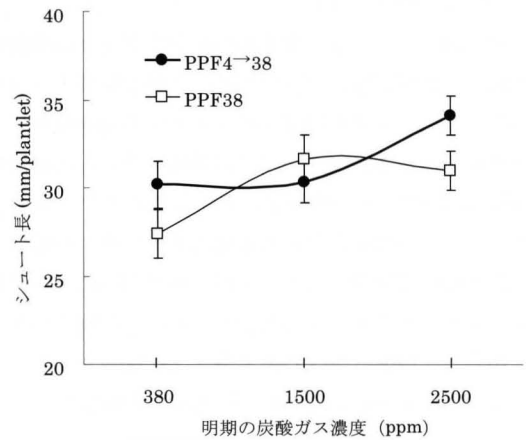


図3 培養容器外の明期の炭酸ガス濃度及びPPFがシュート長に及ぼす影響

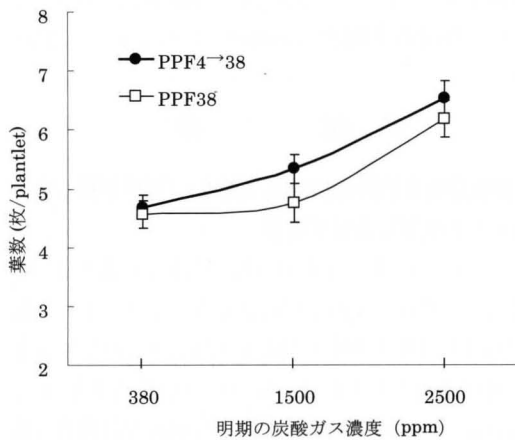


図4 培養容器外の明期の炭酸ガス濃度及びPPFが葉数に及ぼす影響

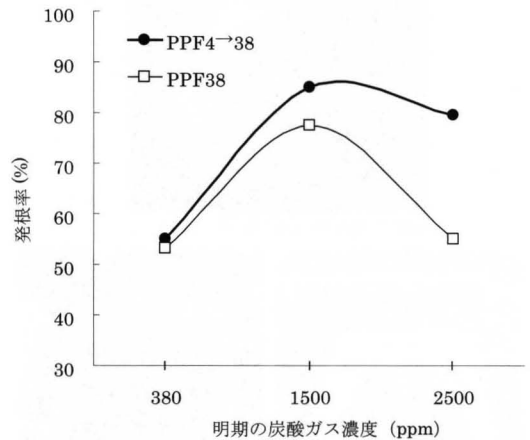


図5 培養容器外の明期の炭酸ガス濃度及びPPFが発根率に及ぼす影響

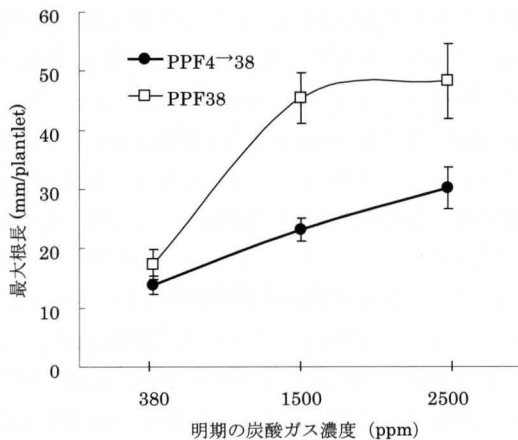


図6 培養容器外の明期の炭酸ガス濃度及びPPFが発根した個体の最大根長に及ぼす影響

2. 仮植方法が順化後の培養苗の生育程度及び生存率に及ぼす影響

順化時のハウス内の気温、湿度及びパック内相対湿度の推移を図7に示した。パック内の相対湿度は気温の変化に関わらず99%一定で推移し、ハウス内の相対湿度は日中の気温の上昇に伴い、35%程度まで低下した。また、順化時のパック内外の遮光の有無による気温の推移を図8に示した。晴天時においては、遮光を行わないパック内の気温は遮光したパック外の気温に比べ、日中の3~4時間程度気温が高く、最大10℃程度の気温差が認められた。日照時間が短い場合には気温差がほとんどなかっ

た。順化時のハウス内における気温の推移を図9に示した。遮光した場合は日中の最高気温が最大で6～8℃程度低下する傾向がみられた。順化時のハウス内におけるPPFの推移を図10に示した。遮光した場合に低く、遮光とパックを組み合わせた場合に最も低くなった。

以上のことから、仮植条件として設定した遮光処理は晴天時における日中の最高気温及びPPFを低下させ、パック内の相対湿度は気温に関わらず常にほぼ100%に維持されることが明らかになった。

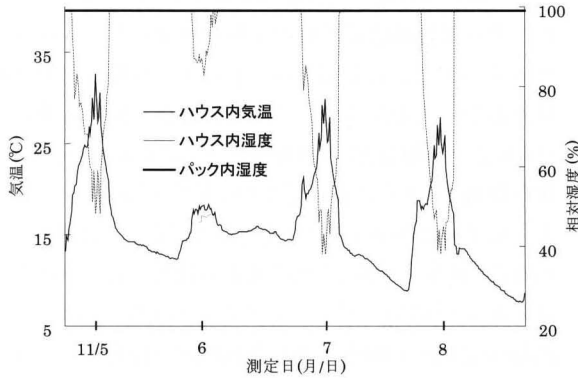


図7 順化時のハウス内の気温、湿度及びパック内湿度の推移

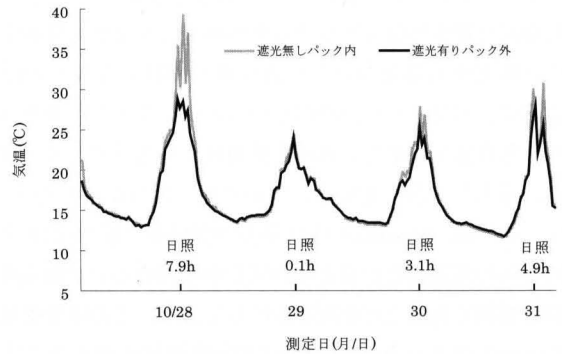


図8 順化時のパック内外の遮光の有無による気温の推移
1) 日照時間は気象庁アメダスデータより引用

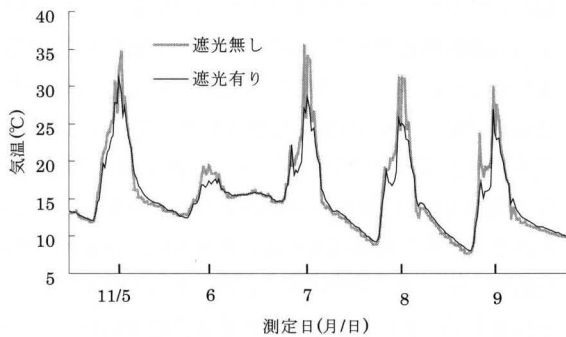


図9 順化時のハウス内における気温の推移

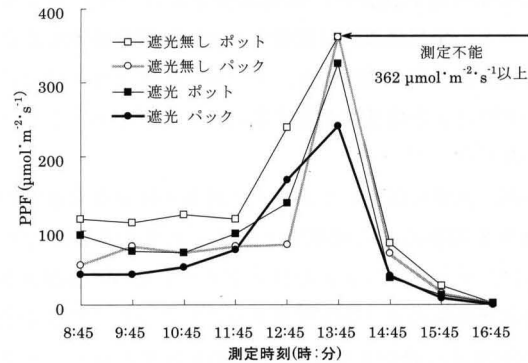


図10 順化時のハウス内におけるPPFの推移
1) PPFは全天日射の指数(1 klx=18.1 μmol·m⁻²·s⁻¹)から算出した。

仮植方法が順化後の培養苗の生育程度及び生存率に及ぼす影響を表4に示した。光独立栄養培養した培養苗は、従来法に比べ生育程度が良好で、遮光処理することによりさらに優れる傾向が認められた。また、個体の生存率は従来法で劣り、遮光を行わなかった場合に特に低下した。なお、順化時に雑菌汚染により枯死した個体は認められなかった。

表4 仮植方法が培養苗の順化後の生育程度及び生存率に及ぼす影響

順化前培養法	仮植方法		生育程度 ¹⁾	生存率 (%)
	遮光	仮植床		
従来法	有り	パック	1	66.7
従来法	無し	ポット	1	16.7
光独立栄養培養法	有り	ポット	3	90.1
光独立栄養培養法	無し	ポット	2	100.0
光独立栄養培養法	有り	パック	4	90.1
光独立栄養培養法	無し	パック	2	90.1

1) 生育程度は遠観により評価した。
落葉や葉焼けの程度、葉色の総合的な評価(1=不良, 2=やや不良, 3=やや良, 4=良)

IV 考 察

一般に、組織培養によりチャの苗木を育成する場合、不定胚を除き、シュートから発根用培地で根を誘導した後に順化を行う。中村は発根に適したMS培地や植物生長調節物質の濃度を検討し、MS培地の濃度を1/2とし、オーキシン(IBA)を0.5～1mg/L添加することが最適であることを明らかにした¹⁰⁻¹⁴⁾。また、松元らはシュートの基部にIBAを浸漬処理し、植物生長調節物質フリー培地へ移植することを含めて16週間培養することにより、順化中の枯死が防止できることを報告している⁷⁾。さらに、Sharmaらも同様に、オーキシンに浸漬処理することにより71.6%の発根率が得られることを明らかにし、それらの個体を18週間かけて発根・順化し野外に出すことにより73%の生存率を得ている¹⁶⁾。その後、倉貫はオーキシン(IBA)濃度と照明の有無が発根率と根の生育および根数に及ぼす影響について調査し、IBAを10mg/L添

加した培地を用い照明下で培養することが、発根に最も効果的な条件であることを明らかにした。しかし、IBAを用いて発根誘導した個体は順化後の生育が劣ることから、発根率では劣るもののIBAを用いないことが適切な方法であると結論づけている¹⁾。

また、これらの培養法に伴う不利点(培養期間が長い、移植後の雑菌汚染を防止するため培地に含まれる糖を完全に除去する必要があるため作業が煩雑であること)を克服する方法として、中村はペーパーブリッジ法を用いた液体培地を使用して移植を簡便化するだけでなく、順化に適した気温、光強度、明暗周期を明らかにした^{11)~14)}。この他、Sharmaらは培養苗の移植先土壌のpHと炭酸ガスの高濃度化が順化後の生存率を高める上で最も重要な要因であることを明らかにしており、その際発根は500mg/Lのオーキシン(IBA)に30分間浸漬処理することによって誘導している^{8,16)}。

このような状況から、組織培養されたチャの挿し木シュートの発根誘導には植物生長調節物質を処理することで容易に発根を誘導でき、その後に培養を伴う場合は糖やビタミンを培地に添加することが必要であるとされている。

一方、古在らはシンビジウムの培養小植物体は通常の植物体と同等の光合成速度を示すことを明らかにし⁴⁾、さらに、カーネーションやジャガイモを用いて培養容器内の小植物体の光合成を促進することにより、光独立栄養培養(培地に糖類を加えない培養)が可能となることを示している^{2,3)}。また、古在らは光独立栄養培養における小植物体の生長に与える炭酸ガス濃度、PPFを始めとして容器内の気流速度や無機成分の量など、様々な要因の影響を明らかにしている⁵⁾。この光独立栄養培養は現在では多くの植物で試みられ、培養苗以外の苗生産にも応用されている⁶⁾。

今回、チャの挿し木シュートを材料として植物生長調節物質や糖、ビタミンを一切加えない改変MS培地を用いて明期の炭酸ガス濃度とPPFの違いが挿し木シュートの生育に及ぼす影響を調査した。その結果、明期の炭酸ガス濃度を1500ppm、培養開始から30日間のPPFを $4\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ にすることが根の誘導を促進し最大で85.0%の発根率が得られた。

なお、本報の培養に用いた容器は無菌的に換気可能なフィルター付きの容器を用いており、メーカーはフィルター付きの蓋をした状態と蓋が無い状態における容器内部の炭酸ガス濃度差がほとんどないことを実験的に示している。また、古在は通気性のフィルターを付けた培養容器は1時間当たり3~4回、容器内外の空気が入れ替わ

ることを示し、キャップが成型プラスチックの栓をした試験管と比較すると約6倍程度の換気速度を有することを示している⁵⁾。これらのことから、培養容器内外の炭酸ガス濃度差は考慮しなくて良いと考えられる。

チャは挿し木により栄養繁殖可能な植物であることから、本来発根は比較的容易であると考えられる。このため、中村は組織培養された未発根の挿し木シュートをオーキシンによる発根誘導を行わず、直接仮植床に移植するケースを試みている。この場合、仮植条件として80%以上の相対湿度で3週間以上保持することが適し、順化開始から2ヶ月後の発根率は最大で57%を示している。松元らは今回の実験で使用した個体とほぼ同等とみられる‘さやまかおり’の子葉から誘導した多芽体からオーキシン(IBA)、ベンジルアデニン(BA)、ジベレリン(GA₃)を添加した糖を含む1/2MS培地で伸長させて得た葉数2~3枚、長さ20~30mmのシュートを材料として用い、オーキシン(IBA)により発根誘導させた⁷⁾。この試験の中で対照として水処理が行われているが、水処理による10週間後の発根率は40%に留まり、順化後の発根率も52%となっている。同様に、永谷も本実験と同じ材料を用いてオーキシン(IBA)を浸漬処理することによって発根誘導を行っており、オーキシン(IBA)濃度を0mg/lとした条件下では8週間後の発根率が48%であった。これらのことから、組織培養されたチャを8~10週間程度の短期間にオーキシンを処理しないで高い発根率を得ることは難しい。これまで順化時を除き、組織培養中のチャに炭酸ガス施用を試みた例は無く、炭酸ガスを施用することが根の誘導にどのように関与しているかは、今後さらに検討が必要であるが、光独立栄養培養法は根の誘導にオーキシンを利用した従来法とは異なる方法として有効であることが示唆された。

永谷はPPFがオーキシン(IBA)を浸漬処理したシュートの発根に及ぼす影響について $12.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ から $87.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ の範囲で調査しており、PPFを $12.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ とした場合に発根率と根長の両方において優れたことを示した⁹⁾。本報で設定した明期の炭酸ガス濃度を1500ppm、2500ppmと高めた区においてもPPFを $38\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ に維持した場合に根の分化が抑制されたことから、PPFについても根の誘導に関与していることが示唆された。

光独立栄養培養法により得られた培養苗の根の形態は写真5に示すとおり従来法に比べ根数が少ないが、挿し木苗の根に似かよっており、細くしなやかで柔軟性に富む根が分化した。従来法による発根は写真4にみられるように硬く、太く、やや短い根が多数分化する状態であ

り、前者とは明らかに異なっている。中村や倉貫はオーキシン(IBA)を用いた根の分化において発根率が高い条件が必ずしも順化しやすい条件とはならないと述べており、従来法により発根した根は本来の挿し木苗の根や光独立栄養培養法により分化した根と比較して根の機能または能力が異なっている、またはオーキシン(IBA)処理が順化率に何らかの抑制的な影響を与えるのではないかと推察された^{1,2)}。

仮植方法を検討するために設定した条件の効果を確認するため、気温、相対湿度及びPPFを測定した結果から、遮光は日中の気温及びPPFを低下させる効果が認められ、培養苗をバック内におくことにより湿度が高く維持された。このため、遮光とバックを組み合わせた条件が簡便で、最も環境ストレスの少ない条件であると推定された。一方、遮光をせずバックに入れた場合は、晴天時の日中に40℃近くまで気温が上昇するケースがあること、遮光をせずバックにも入れない場合では、日中の湿度が35%程度まで低下するケースがあることが明らかになり、培養時の環境に比べ、ストレスの強い条件であると推定された。

仮植方法については、中村が遮光率35～58%とした場合に他の処理と比較して高い順化率(100%)を得ており¹⁴⁾、本報においても従来法では同じ傾向の結果が得られた。一方、光独立栄養培養では遮光の影響は少なく環境ストレスに強いことが明らかとなった。また、培地にオーキシンを加えて発根させた培養苗と光独立栄養培養した培養苗では仮植時における生育程度や生存率について明らかに後者が優れ、本方法は発根と順化をほぼ同時に与える方法であることが示唆された。これは前述のとおり、光独立栄養培養法により分化した根の形態が挿し木苗に近いだけでなく、順化時にも本来の正常な根としての機能を発揮したからであると考えられた。

さらに、本培養法では培地に糖類を含まないこと、支持体にピートモスとバーミキュライトを使用していることから雑菌汚染により培養苗が枯死する恐れがほとんどなく、支持体は水で簡単に洗い流せることから移植が容易で順化作業が行い易い。なお、本実験で支持体の種類をピートモスとバーミキュライトを容積比1:1として使用したのは、永谷がピートモス、バーミキュライト、パーライト、赤玉などその混合を含め7種類の支持体を用いた場合、ピートモスとバーミキュライトを容積比1:1で使用した場合に発根率が優れ、根長も大となったことを踏まえ選択したものである⁹⁾。

今後は今回検討を行わなかったPPFの設定、培養期間、明暗周期などの培養条件やアグロバクテリウム法など培

養系を用いることが必要な形質転換技術においても、本方法の適用の可能性について調査し、より良質な苗木生産と実用性に結びつけることが必要である。

V 摘 要

チャの組織培養を利用した苗木生産のための発根及び順化法として試みた光独立栄養培養法(植物生長調節物質、糖、ビタミンを加えない改変1/2MS培地を利用した培養法)について、培養容器外の明期の炭酸ガス濃度、PPFが生育に及ぼす影響を明らかにするとともに、仮植方法を検討した。

その結果、培養条件のうち明期の炭酸ガス濃度は1500ppm、PPFを培養開始から30日後に4から $38 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とした場合に高い発根率(85%)が得られた。

また、この方法により得られた培養苗は遮光率50%の黒色遮光ネットで被覆することにより、順化後の生育程度が更に優れた。

謝 辞

本研究の遂行にあたっては、平成15年度先端技術研修の研修生として派遣された千葉大学園芸学部環境調節工学研究室において光独立栄養培養についての理論、手法について懇切丁寧に御指導賜りました古在豊樹教授(現：千葉大学長)並びに研究室の皆様へ深く感謝の意を表します。

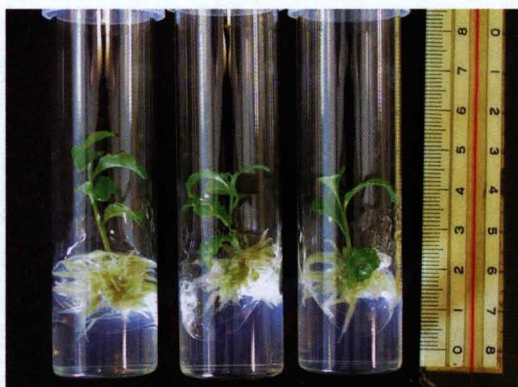


写真4 従来法(培地にインドール酪酸を10mg/l添加して2ヵ月間培養)により発根させたチャの培養苗。左が培養中を示し、右は培地を除去した培養苗を示す。



炭酸ガス濃度 1500 ppm
PPF 4.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$



炭酸ガス濃度 1500 ppm
PPF 38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$



炭酸ガス濃度 380 ppm
PPF 4.38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$



炭酸ガス濃度 380 ppm
PPF 38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

写真5 光独立栄養培養により発根した培養苗の例



写真6 光独立栄養培養により60日間培養し、発根させポリポットへ移植した培養苗



写真7 光独立栄養培養により発根させ、1年間ハウス内で育苗し、定植可能となった苗木

引用文献

- 1) 倉貫幸一 (2006) : チャ遺伝資源の超低温保存技術の開発, 静岡県茶業試験場特別報告第3号, 6 ~ 26.
- 2) Kozai, T., Y. Koyama, and I. Watanabe (1988) : Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar-free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Hort.* 230, 121 ~ 127.
- 3) Kozai, T., Y. Iwanami (1988) : Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 57(2), 279 ~ 288.
- 4) 古在豊樹・大木浩・富士原和宏(1989) : 培養器内シンビジウム小植物体の光合成特性, 園学雑58(別冊2), 538 ~ 539.
- 5) 古在豊樹(1998) : 植物組織培養の新段階 - 培養器環境から地球環境へ -, 社団法人農村漁村文化協会
- 6) 古在豊樹(2004) : 閉鎖型苗生産システムの実用化が始まった, 農業電化 57巻2号, 2 ~ 9.
- 7) 松元哲(1993) : チャ組織培養体の順化のための発根方法について, 野菜・茶業試験場研究報告 B(茶業)6, 1 ~ 10.
- 8) Mondal, T.K., A. Bhattacharya, M. Laxmikumaran and P.S. Ahuja (2004) : Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76, 195 ~ 254.
- 9) 永谷隆行(1994) : チャ組織培養植物体の発根 - 順化プロセスの簡略化, 茶研報 79(別), 88 ~ 89.
- 10) 中村順行(1988) : チャの茎切片培養における4種類のオーキシンがカルス化及び不定根分化に及ぼす影響, 茶研報68, 1 ~ 7.
- 11) Nakamura, Y. (1991) : *In Vitro* Propagation Techniques of Tea Plants, *JARQ* 25(3), 185 ~ 194.
- 12) 中村順行(1991) : チャの組織培養を利用した種苗大量増殖法, 茶業研究報告第74号, 31 ~ 38.
- 13) 中村順行(1992) : 組織培養技術を利用したチャ種苗の大量増殖法, 平成4年度版農林水産関係試験研究成果情報, 118 ~ 119.
- 14) 中村順行(2007) : チャの組織培養による大量増殖法とポット育苗技術に関する研究, 静岡県茶業試験場特別報告 4, 3 ~ 27.
- 15) Niladri Bag (2001) : Efficient rooting and biological hardening of tissue culture raised tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) plants, *Proceedings of 2001 International conference on O-CHA(tea)Culture and Science*, 132 ~ 135.
- 16) Sharma, M., A. Sood, P.K. Nagar, O. Parkash and P.S. Ahuja (1999) : Direct rooting and hardening of tea microshoots in the field. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 58, 111 ~ 118.