

学会賞受賞講演要旨

植物の光独立栄養培養における環境調節

古在豊樹

千葉大学園芸学部

Environmental Control in Photoautotrophic Plant Tissue Culture

Toyoki KOZAI

Faculty of Horticulture, Chiba University, Matsudo 271, Japan

1992年8月11日受付

はじめに

良質で安価な苗を安定的に生産することは、従来から「苗半作」といわれるように、農林業における基幹技術の一つである。最近では、砂漠緑化、熱帯林再生、食糧確保、都市緑化、生活環境改善の推進などのために、良質、安全かつ安価な苗の需要が地球規模で一段と高まっている。

他方、農林業従事者の不足や高齢化あるいは人件費の高騰などの理由により、苗生産システムの省力化、自動化などの要求が高まっている。さらには農林業における植物バイオテクノロジーの利用は組織培養苗生産にこそあるとの認識が高まりつつある。

このような背景から、良質、安全かつ安価な苗の急速大量安定生産システムの開発が求められている。組織培養による苗生産は上記の諸要求を満たし得るものとして多くの研究開発者により検討が加えられている。本研究は、組織培養苗（以下、培養苗）の急速大量安定生産において重要な役割を演じる、「環境調節」に関して、光独立栄養培養の側面から検討したものである。

従来法による培養苗の直接生産コストが高い理由

従来のマイクロ繁殖法 (micropropagation) または植物組織培養法 (plant tissue culture method) を一言でいえば、従属栄養培養法 (heterotrophic culture method) あるいは混合栄養培養法 (photomixotrophic culture method), すなわち培地中の糖を培養体の生長の主たる炭素源とする方法である。この方法では、培地組成(糖、

無機成分、植物生長調節物質、ビタミン類、ゲル化剤など) および温度などの要因が、他の環境要因と比較して、培養体の分化・再生・生長などに決定的に影響する。従属栄養培養される理由は、培養体(細胞、組織、器官、植物体)は、光合成能力は低いので、光独立栄養(photoautotrophic) 生長すなわち光合成による生長は困難であるという前提に由来する。

従来法による培養苗の直接生産コストが高い理由を表1に示した。従来法における植物培養器内の環境は、弱光、高湿度、明期低二酸化炭素濃度などの特徴を本来的に有し、その結果として増殖培養された植物体は環境ストレスに弱い。

環境ストレスに弱い培養苗を温室または屋外に定植する前には、注意深い順化を必要とする。順化の第一目標は、順化時に高い生存率を得ることであり、順化期間の短縮あるいは順化期間における生長促進は2次的な目標となる。この状況を打破するには、従来の増殖培養方法を改善して、増殖培養の段階で環境ストレスに強く、光合成能力が高く、根量も十分な小植物体を作り出すほかない。

以上の議論から、従来法による培養苗生産システムの生産コストに関する問題点をまとめると表2のようになる。表2で注目すべきは、小さな培養器の使用が環境調節と自動化を阻む重大要因になっていることである。小さな培養器を用いるのは、コンタミネーション(雑菌による培地の汚染)による培養植物の短期間の大量損失を抑制するためである。コンタミネーションによる培養植物の損失は培地に糖が含まれている場合に起こりやすく、それを最小限にとどめることが従来法においてはた

表 1 ミクロ繁殖苗の直接生産コストが高くなる理由

1)	単純手作業が多く、直接生産コストの 60% 以上を人件費が占める
2)	増殖培養時における小植物体の生長速度が低く、増殖周期に 5~6 週間以上を要する場合が多い。また生長速度に個体差が大きい
3)	増殖培養時に、生理障害 (ビトリフィケーションなど)、コンタミネーションなどによる小植物体の損失が多少ともある
4)	順化段階における培養苗の死亡率が高い。順化に数週間を要する
5)	需要予測、生産予測が不十分などのために、生産過剰、供給不足が起こりやすい
6)	照明、冷房、滅菌、乾燥、洗浄、運搬のための光熱費、エネルギーコストが高い
7)	基本培地、植物生長調節物質、ショ糖、培養器、その他の消耗品費がかさむ

表 2 従属栄養培養によるミクロ繁殖にもとづく培養苗生産の問題点

1)	培地中の糖がコンタミネーションの誘引となる
2)	コンタミネーションによる培養植物の損失を抑制するため、密閉度の高い、小さな培養器を使わなければならない
3)	すると、培養器内の相対湿度、エチレン濃度、暗期の二酸化炭素濃度が高くなり、明期の二酸化炭素濃度が低くなる
4)	上記異常環境が培養植物の生理学的/形態学的異常を引き起こす
5)	上記異常が生長の抑制や不均一性、順化時の高死亡率を引き起こす
6)	順化時に、糖を含む培地を根から除去した後に培養植物を移植しなければならない (順化中のコンタミネーションを抑制するため)。すると、根が損傷を受ける
7)	培養器が小さいと、環境調節と作業の自動化が困難になる。培養植物が異常でも作業の自動化、ロボット化が困難になる
8)	上記異常環境、植物生長調節物質の多量使用、カルス經由の植物体再生などが各種変異を誘発する可能性がある

きな問題となる。

では培地に糖が含まれていないと、培養植物は本当に生長しないのであろうか。培養植物の光合成能力はそんなに低いのだろうか。培養植物の生長速度は、屋外の植物、たとえば実生の生長速度と比較してどうして低いのであろうか。培養器内植物の生長抑制は、培養植物の生理的特性、培養生態系の特長、培養器内環境のいずれに、またどのように関係しているのであろうか。本研究の骨子は、以上の疑問に対して、培養植物の増殖は、光独立栄養培養下で十分可能であり、そのさいには物理環境の調節が重要であることを実験によって示した点にある。

培養器内二酸化炭素濃度と培養植物の光合成特性、純光合成速度

富士原・古在・渡部 (1987) は、密閉度の高い培養器内に増殖段階の緑色植物が培養されている場合、明期開始数時間後の二酸化炭素濃度は 100 ppm 以下にまで低下することを見いだした。これは、植物の二酸化炭素補償濃度 (50~80 ppm) に近い。ただし、暗期におけるそれは、培養植物の呼吸作用により数千 ppm 以上にまで上昇する、この二酸化炭素濃度日変化から次のことがいえる。

① 明期開始直後に培養器内二酸化炭素濃度が低下することから、培養植物は明期開始直後には光合成している、すなわち、光合成能力を有している。

② 明期開始後間もなくの二酸化炭素濃度の低下にとともに、培養植物の純光合成速度は著しく抑制される。このような条件下での純光合成速度は、低二酸化炭素濃度に律速され、光照射強度を増加しても増加しない。この条件下では、光合成能力を有する緑色植物であっても、生長は、従属栄養的にならざるを得ない。

古在・関本 (1988) は、培養器の換気回数と光照射強度によって、培養器内二酸化炭素濃度、培養植物の一日当たり純光合成速度および培養植物の生長が異なることを明らかにし、培養植物当たりの二酸化炭素の正味の交換速度の経日変化の重要性を指摘した。また Kozai ら (1990) は増殖培養段階のシンビジウム (ランの一種) の光合成特性が、温室内の遮光下で栽培されたシンビジウムのそれと大差ないことを示し、培養器内培養植物の純光合成速度がゼロに近いのは、培養植物の光合成能力が失われているからでなく、物理環境条件に起因することを明らかにした。従来、培養植物は光合成能力がほぼ失われているので、その生長には培地中の糖が必須であるといわれてきた背景の一つには、培養植物の光合成特性、培養器内二酸化炭素濃度、培養器内植物の純光合成速度などの測定が比較的困難であり、さらには炭素収支、物質収支の考え方に欠けていたことなどがあろう。

強光下二酸化炭素施用による培養植物の生長促進

強光下における二酸化炭素施用条件では、節 (node) および葉を含む茎 (生体重 30 mg 程度) を外植体とすれば、その生長速度は、光独立栄養培養において、従属栄養培養におけるそれと同等以上 (多くの場合は 2 倍以上) であることが、カーネーション (Kozai and Iwanami, 1988)、パレイショ (Kozai, Koyama and Watanabe, 1988)、イチゴ (古在・関本, 1988) などについて

て示された。最近では筆者ら以外の研究グループによっても同様な報告が数多くなされている。この場合、光合成器官たる葉が外植体に含まれていることが重要で、葉を除去したものを外植体とすれば結果は異なる。

ここで、強光とは、従来法における光照射照度 (PPFD で $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$) の 2 ~ 3 倍程度であり、一般作物栽培における光強度の基準に照らせば、強光とはいえない。二酸化炭素施用方法は自然換気と強制換気の二方法に大別でき、それぞれ能動法、受動法に細分できる。強制換気より自然換気のほうが簡便であり、能動法より受動法のほうが簡便である。いずれの施用法によっても、明期二酸化炭素濃度の上昇だけでなく、培養器内の空気流動の促進、相対湿度、エチレン濃度の低下がある程度もたらされるので、それら付随現象を適切に制御すれば、光合成促進だけでなく、蒸散促進、養分吸収促進、ビトリフィケーション（莖葉が水浸状になり、水ストレスに極端に弱くなる状態）抑制などの付随的効果も得ることができる。

光独立栄養培養（無糖培養）による ミクロ繁殖の長所と短所

前述のことから、培養器内環境が光合成に好適であり、また緑色の葉を含んだ節を外植体として用いれば、多くの場合、光独立栄養培養（無糖培養）に基づくミクロ繁殖が可能であるといえる。従来法と比較した場合の、光独立栄養培養の長所のいくつかを表 3 に示す。これら長所のいくつかはミクロ繁殖だけでなく培養育種においても重要となろう。

従来法と光独立栄養培養法とを比較してしばしば指摘される短所として、二酸化炭素施用コストと照明・冷房

表 3 光独立栄養培養の長所

1) 生長および発育が促進され均一化される
2) 生理学的／形態学的な異常および各種変異が減少する
3) 順化期間と発根期間が不要になるか、あるいは短縮される。移植定植後の苗の生長が促進され、順化時の苗の死亡率が低下する
4) コンタミネーションおよびそれに関連する損失が減少する
5) より大きな培養器の使用が、コンタミネーションによる損失を増大させずに、可能になる
6) 培養器内の莖葉部および根部の環境調節とその自動化が容易になる
7) 環境調節による生長制御がより容易になる
8) 増殖作業と移植作業の自動化およびロボット化がより容易になる
9) 植物生長調節物質、ビタミンなどの有機物の使用量を最小にできる

用電力コストの増大がある。しかし、二酸化炭素施用のコストは実際には高くない。二酸化炭素施用は施設園芸においてすでに広く普及している技術であり、そのコストが低いことはよく知られている。培養室は、商業的な温室と比較して、室容積、壁の隙間ともはるかに小さいことから、培養におけるそのコストはさらに低くなる。

従来法では、電力コストの全生産コストに占める比率が 5 ~ 10% 程度であることもあって、効果的照明法、冷房法に関する設計、開発努力はほとんどなされてきていない。しかし、光独立栄養培養法においては照明法は、電力コストの軽減という観点からだけでなく、光合成の促進、均一な大きさの外植体の取得、高品質苗の育成などの観点からも重要になる。現在、照明コストを増大せずに培養植物の受光量を増大させる新しい照明法が、筆者らにより検討されており、従来法とは異なった照明法が将来普及する可能性がある。

苗の生長・発育に及ぼす環境要因の影響

光独立栄養培養下では、培養苗の生長・発育は、表 4 に示したような要因に影響される。培養苗の生長・発育におよぼすこれら要因の影響は、種子系苗の生長・発育におよぼすそれら要因の影響と同様であることが、最近、明らかになりつつある（古在ら, 1989）。実験的証明はまだ十分なされていないが、光独立栄養生長条件下では、培養苗、種子系苗、接ぎ木苗、挿し木苗の生長・発育におよぼす環境要因の影響は、それら苗の光合成能力、光合成面積、乾物重などが同等であれば、同様であるとの仮説は、合理的であると考えられる。

上記の仮説が成立すれば、その苗の由来が種子、組織、器官、単一細胞のいずれであろうが、ある時点での苗の植物学的特徴が同様であれば、苗の生長・発育におよぼす環境要因の影響は同様と考えられることになる。たとえば、側芽を用いた挿し芽繁殖一般と側芽を用いた

表 4 光独立栄養培養において培養植物の生長および発育に影響をおよぼす重要要因

1. 光量および光質、それらの時間的、空間的分布
2. 空気二酸化炭素濃度
3. 明期および暗期の温度
4. 空気湿度および培地の水ポテンシャル
5. 空気酸素濃度および培地溶存酸素濃度
6. 培地の無機イオン成分組成および pH
7. 空気および培地の流動速度
8. 外植体の光合成能力、光合成面積、乾物重など
9. 支持材の物理的および化学的性質
10. エチレングス濃度

培養による繁殖は、培地および植物体（苗）における特定の微生物の繁殖状態がやや異なるだけということになる。したがって、この仮説が成立すれば、将来の苗生産システム、苗生産研究は大きな広がりを持つことになる。また、苗生産に関しては、再生、発根、休眠、順化、カルス化、変異などの環境生理学的問題が数多く残されているが、それら問題の培養苗、接ぎ木苗、挿し木苗、実生苗における共通点と相違点を環境工学的に検討することも興味ある課題である。いずれにせよ、苗生産における環境調節の重要性は増大するばかりであろう。上記環境要因の培養植物の光合成、生長および発育におよぼす影響については、ここで述べる紙面の余裕がないので、Kozai (1990, 1991, 1992) などの総説を参照されたい。

謝 辞

このたび筆者らの研究グループのささやかな研究に対し、栄えある日本生物環境調節学会賞が、グループ代表者としての筆者に与えられることになり感激に耐えない。この研究の遂行にあたっては、多くの方々のご指導とご協力をいただいた。これを機会に、関係者の皆様方に心から謝意を表するとともに、若干の回顧と反省をして、今後のさらなる努力の礎の一つとした。

1982年ごろ、施設園芸の環境調節に関する研究に一区切りをつけていた筆者は、当時話題になっていた植物バイオテクノロジーの中心技術であった植物組織培養研究において、環境工学的観点に欠けていることに気がついた。また植物組織培養の応用としての培養苗生産が今後重要視され、環境工学の研究が必須であろうと推察した。そこで、筆者の施設園芸における環境調節研究に関する従来の経験を、培養苗生産における環境調節研究に活かしてみたいとの気持ちが強まった。

1983年から研究準備を開始し、1984年から研究を開始した。筆者には組織培養の経験は皆無であるので、先達、同僚、企業の培養実務経験者を訪ねて教えを願った。1985年に「植物のバイオテクノロジーにおける環境調節」、「植物のバイオテクノロジーにおける農業環境工学の役割」などと題した総説を発表し、植物バイオテクノロジー分野における環境工学の役割の重要性を論じた。当時、筆者には何も研究実績がなかったが、当学会現名誉会長杉 二郎先生、当学会現会長 矢吹萬壽先生、当時の所属研究室の教授 渡部一郎先生および西 貞夫先生（日本施設園芸協会会長）などからは、面白い課題だから研究を進めるようにとの激励をいただいた。

1985年には同僚林真紀夫氏（現東海大学助教授）と培

養苗の順化装置についてのアイデアを公表し、1986年には大学院生富士原和宏氏（現千葉大学助手）らと植物組織培養器の環境特性についての初歩的研究成果を公表した。また杉先生と共著で「種苗工場の開発と研究課題」についての総説を発表した。1987年ごろから、研究室の専攻学生による植物組織培養環境に関連する研究の成果をもとにして、培養器内のCO₂濃度日変化（富士原氏らと共著）、CO₂施用による培養植物の生長促進（岩浪氏と共著）、培養苗の順化のための環境調節（林氏らと共著）に関する論文を公表した。このころ、農林水産省野菜・茶業試験場の高柳謙治先生（現生物資源研究所）、故安井秀夫先生、西村繁夫先生らを研究リーダーとするプロジェクト研究「バイオナーサリー」が企画され、培養環境調節・培養苗生産に関する研究が、企業などでも開始された。

この年の夏に同僚林真紀夫氏とともに、ベルギーで行われた培養苗大量生産に関する国際シンポジウムに参加し、培養苗の順化装置とCO₂施用に関する研究発表をした。この発表は比較的好評で、その場で同年9月にモナコで行われる国際シンポジウムの招待を受け、この研究課題は国際的共通性を有するとの認識を得た。これらのシンポジウムにおいて、この分野で世界的に著名な研究者らと知り合えたことはその後の研究展開に有益であった。

同年、国内の学会シンポジウムなどでも「植物組織培養における環境調節」について話題提供の機会を数回与えられた。本研究の基礎はこの年に固められたといえよう。ここにいたるまでには、国内では高倉 直先生（東京大学）、橋本 康先生（愛媛大学）、高山真策先生（現東海大学）などのご指導、ご助言がたいへん有益であった。蔵田憲次先生（東京大学）ら、千葉大学植物栄養学研究室の嶋田典司先生ら、浅平 端先生（京都大学名誉教授）、土井元章先生（現大阪府立大学）らの研究も参考にさせていただいた。高辻正基先生（現東海大学）には高い評価をいただいた。

1988年の5月に静岡県浜松市において開催された国際シンポジウム「施設園芸における先端技術」（組織委員長 高倉 直）には100人を越える外国人参加者があった。筆者らの培養環境に関する研究に興味をもたれた外国人参加者に、その年の秋には、バンコックとジャカルタでの国際シンポジウムで講演に招待され、翌2月にはカナダのケベックでのシンポジウムでの講演に招待された。またこの年にニュージーランドの国立林業研究所と筆者らの研究室員との研究交流がはじまった。このころ杉 二郎先生の発案で、タイと日本の間の学術研究交

流プログラムの課題の一部として「組織培養における環境調節」が選ばれ、それ以後この件で杉 二郎先生、高倉 直先生らとタイを毎年訪問することとなった。

1989年3月から9月まで、米国ラトガース大学に留学する機会が与えられ、ここでの時間を利用して、数編の原著論文と総説を英語で書いた。また十数カ所の大学、企業を訪問し、セミナーを開いてもらって討論を深めた。また米国園芸学会で研究発表、米国組織培養学会で講演と研究発表をする機会を得た。このころ同僚安藤敏夫先生らの培養環境に関する研究も参考になった。当時、光独立栄養による培養苗の生産技術の多くは、実生苗、接ぎ木苗、挿し木苗の生産技術と共通性があるとの認識を得るようになった。とくに苗生産の環境調節、自動化、ロボット化に関しては共通性が大きいと感じ、将来これに関する国際シンポジウムを日本で開催したいとの着想を得た。

1990年6月にはアムステルダムでの国際植物組織培養学会に大学院生らとともに数編のポスター発表を行った。同年8月イタリアでの国際園芸学会でも研究発表を行った。1991年には国際植物組織培養学会ニュージーランド支部、米国組織培養学会、米国農業工学会などの招きでシンポジウムで講演をする機会が与えられ、植物組織培養における環境調節に関する関心が世界的に高まってきていることを感じた。

1992年7月下旬には、本学会が他学会と共同主催で神奈川県横浜市で国際シンポジウム「苗生産システム」(組織委員長:高倉 直)が開催される予定である。このシンポジウムには、筆者が過去数年間に種々の教えを受けた外国人研究者の多くが参加する予定である。1994年には京都で開催される国際園芸学会において「植物組織培養における環境調節とその効果」に関するシンポジウムが予定されている。現在では、日本でのこの課題に

関する研究は、農水省関連の研究機関、民間会社以外に、多くの大学の先生方によってもなされていることは筆者にとってはうれしかぎりである。

省みると本研究は恩師杉 二郎先生のご指導と激励が研究の大きな支えになった。また植物組織培養におけるCO₂施用などの試みは、筆者が十数年前恩師矢吹萬壽先生の下で助手として教えを受けた影響の現れである。筆者の最初の恩師である三原義秋先生にも心から感謝したい。この他数多くの方にご指導と多大のご援助をいただいたことに心から感謝したい。最後に、学会誌「生物環境調節」に掲載され、本学会賞の直接の対象となった論文の共著者である、杉 二郎、渡部一郎、林真紀夫、久保田智恵利、高沢明子、渡辺一成らの皆様方に心から感謝したい。他の学会誌での関連論文の共著者であり、研究室の元専攻学生である富士原和宏氏らすべての皆様にも心から謝意を表したい。

文 献

(「生物環境調節」誌に掲載された原著論文および著者による) 総説のいくつかのみを引用し、それ以外の引用は省略した。

- 古在豊樹. 1985. 植物のバイオテクノロジーにおける農業環境工学の役割. 農業および園芸 **60**: 1347-1350.
- 古在豊樹・杉 二郎. 1986. 育苗工場の開発と研究課題 (1). 農業および園芸 **61**: 1005-1009.
- 古在豊樹・関本克広. 1988. 培養器の換気回数と光合成有効放射束の大小が培養器内二酸化炭素濃度とイチゴ培養小植物体の生長におよぼす影響. 生物環境調節 **26**: 21-29.
- 古在豊樹・久保田智恵利. 1990. 異なる培地基礎成分を用いて光独立栄養培養および混合栄養培養したカーネーション小植物体の生長. 生物環境調節 **28**: 21-27.
- 古在豊樹・高沢明子・渡部一郎・杉 二郎. 1990. タバコ実生および培養小植物体の生長に及ぼす培養器内環境の影響. 生物環境調節 **28**: 31-39.
- 林真紀夫・古在豊樹・渡辺一成・渡部一郎. 1990. 培養器外直接発根法においてCO₂施用および高日射量がパレイショ小植物体の生長に及ぼす効果. 生物環境調節 **28**: 147-154.