

組織培養における培地 pH の影響

— 炭酸カルシウム添加による pH 緩衝機能の効果 —

千 木 容

要旨：組織培養を行うときのウッディプラントメEDIUM (WP 培地) pH 調整の常法は、水酸化カリウム (KOH) を添加し pH 5.6 に調整する方法であるが、炭酸カルシウム (CaCO_3) 100mg/l を添加する方法を試みてシュートの成長を比較した。その結果、ケヤキは、 CaCO_3 で調整した方が良好な成育を示したが、サクラは、ほとんど差が認められなかった。培養中に CaCO_3 で調整した方は、 CaCO_3 の粒子が見られる間、pH の低下はほとんど認められなかったが、KOH で調整した方は、pH が低下し、ケヤキの成長が著しく低下した。pH 低下の原因は、培養植物体からのアニオンの放出が原因と推察された。発根培養については、同一個体ではシュートの成長が良好なものほど発根率が高い傾向が見られた。

I はじめに

森林は遺伝資源の宝庫であり、優良な遺伝子は後世に残していかなければならない。ケヤキの銘木は、市場価値の高いものがあるが、通常は伐採されて材が利用されることでその遺伝子は失われる。サクラは、石川県産の能登菊桜が天然記念物等の花木として貴重なものであるが、後継樹の育成を怠ると枯損して失われることもある。組織培養法は、樹木の僅かな組織から植物体を再生することが可能な技術であり、伐採後の伐り株や衰弱した樹木の胴吹きした萌芽枝などの組織から、植物体の再生が可能である (原口 1998、千木 1994)。特に、ケヤキはかなり難しい樹種で、効率化を行う必要がある。前報では (千木・坂井 1999)、6-[2-(N-メトキシ-N-メチルアミノ)エチル]アミノプリン (TG-19) という、新しいサイトカニン様物質と炭酸カルシウム 100mg/l を添加する方法による pH 調整で植物体を再生しているが、炭酸カルシウムの効果については、不明な点が多い。そこで、本報では培養に用いた後の培地の成分分析を行って、不明な点を明らかにし培養の効率化を試みた。

II 実験材料及び方法

1 サンプルの採取、殺菌供試材料

供試した樹種はケヤキとサクラで、ケヤキは石川県下などから高齢木由来のもので、心材色が赤色で玉杓等を有していると思われるものを選んだ。外植体すなわち殺菌し培養に用いる組織は、冬芽が膨らみかけたものを、室内で 3% - サッカロー

スに水さしし新芽が伸長してきたところで採取し、ツーン 80 を添加した 0.1% 次亜塩素酸ナトリウムで 30 秒間程度殺菌した。

2 培地の調整

基本培地は、樹木用の WP 培地 (LLOYD, G. and MC COWN, B. 1980) を用いた。pH 調整は、常法の KOH を添加し pH 5.6 に調整する方法と CaCO_3 100mg/l を添加する方法の 2 種類で行った。シュートの伸長培養には、サイトカイニンの TG-19 を $1.0 \mu\text{M}$ 添加した WP 培地を用いた。シュートの発根培養には、オーキシンの α -ナフチル酢酸 (NAA) を添加した無機塩 1/2 の CaCO_3 で調整した WP 培地を用い、濃度は、ケヤキ $0.25 \mu\text{M}$ 、サクラ $0.05 \mu\text{M}$ とした。WP 培地には組織培養用寒天を 6.0g/l、1/2 WP 培地にも同量の 6.0g/l を添加した。

3 培養の手順

ケヤキのシュート伸長培養は、シュートが 5~50mm 程度の成長すると基部から切り離し、シュートを切り分けて、培養を繰り返した。培地との接触部位で形成されたカルスは、2 週間程度で大きさが数 mm になり、シュートの伸長が低下するのでこれを除去した。シュートは、20mm 程度以上の長さに成長すると発根培養に供した。培地の交換は、シュートの成長が停止したり、著しく成長が低下したときに行ったが、 CaCO_3 を添加した培地については、著しく成長が低下しなくても CaCO_3 の粒子が肉眼で見えなくなったときにも培地を交換した。発根培養は、7 日間暗所に置いた後、明所に置いた。合計 30 日間経過して発根しないで生存しているものは、(千木・坂井 1999) の結果

を考慮して、バーミキュライトを支持体とした無機塩1/2のWP培地にホルモンフリーの条件でダイレクトルーティングを行った。

サクラのシュート伸長培養は、シュートが0.5~30mm程度の成長し、葉が5枚程度以上見られるいわゆるロゼット体を形成すると、状態の良いシュートは発根培養に供した。それ以外のものは、シュート伸長培養を繰り返し、培地交換は、ケヤキと同じ方法で実施した。

ケヤキ、サクラとも発根した幼植物体は、バーミキュライトの入った試験管に移し、数週間経過後湿度調整のため透明のカバーをした鉢などに移して環境順化を行った。一連の試験を通じて、さしつけた試験管などは、1日16時間約8,000~10,000lxの蛍光灯照明下で、25℃明期+3℃、暗期-3℃の恒温室内で培養した。

4 培地の分析

分析に供試する試料は、組織培養に用いた寒天基質とした培地である。分析は、イオンクロマトグラフィーで行ったが、ゲル基質は、イオンクロマト用のカラムを通すとカラムを使用不能にするので除去する必要がある。そこで、試料を凍結させてゲル構造を変化させてキセロゲル化した。再び25℃以下の水で溶解させ溶液をキセロゲルと分離させる過を行った。ここでpHを測定し、5.0以下のものについては少量の炭酸カルシウムを加えてpHを上げ、再びろ過を行い、残っている可能性のあるゲルを除去した。粗調整した試料は、イオンクロマトアナライザーが見知できる濃度にそれぞれ調整した。方法は重量法によってMQ水で200倍に希釈した。希釈した試料は20μmメッシュのミリポアフィルターでろ過した。通常雨水などの試料の場合、個体の夾雑物が含まれており、10回程度のろ過でフィルターが詰まって使用できなくなるが、本試料は30回以上のろ過が可能で、粗調整によって夾雑物が除去されていたことが示唆された。

調整した試料は、イオンクロマトアナライザーのセルにカチオン、アニオンそれぞれ1ml程度ずつ分注し分析に供した。分析項目は、 NH_4^+ 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 、 K^+ 、 SO_4^{2-} である。

調整を終えた試料は、(財)林業科学技術振興所 佐藤久男主任研究員にイオンクロマト法による分析を依頼した。

III 結果及び考察

1 培地のpH調整法の違いによるシュートの成長の状況(表1)

ケヤキのシュート長は、供試した5個体とも CaCO_3 でpH調整した方(以下、 CaCO_3 で調整)は、 KOH でpH調整した方(以下、 KOH で調整)より平均で3倍以上に伸長した。ケヤキ1、2については、図1に示すとおり差が見られた。ケヤキの展葉枚数も、5個体とも CaCO_3 で調整の方が平均で2倍以上に展葉した。ケヤキは、 KOH で調整した方は培養後10日~14日経過すると成長が著しく低下するのに対し、 CaCO_3 で調整した方は、30日ぐらい成長が持続した。

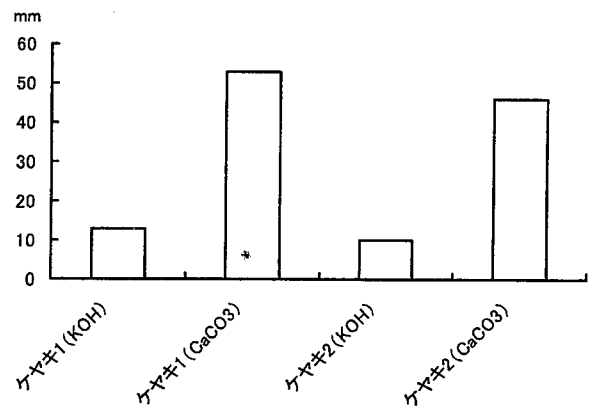


図1 ケヤキのシュート長

サクラは、ヤマザクラ系統の2個体のシュート長は、 CaCO_3 でpH調整した方が長く伸長していたが、ケヤキと比べるとその差は極めて僅かであった。サクラ1、4について、図2に示すとおりほとんど差が見られなかった。展葉枚数も、 CaCO_3 で調整の方が展葉数は多かったが、同

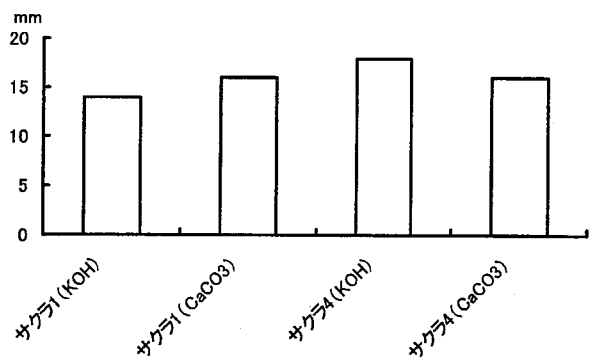


図2 サクラのシュート長

表1 培地のpH調整法の違いによるシュートの成長の状況

樹種	個体名	系統 (サクラ)	pH調整法	シュート長 mm	展葉数 枚
ケヤキ1	3K		KOH	13	2.1
ケヤキ1	3K		CaCO ₃	53	5.6
ケヤキ2	SM		KOH	10	1.6
ケヤキ2	SM		CaCO ₃	46	4.4
ケヤキ3	FM		KOH	8	1.1
ケヤキ3	FM		CaCO ₃	38	3.8
ケヤキ4	11		KOH	9	1.3
ケヤキ4	11		CaCO ₃	31	3.2
ケヤキ5	KHJ		KOH	13	1.8
ケヤキ5	KHJ		CaCO ₃	49	5.2
サクラ1	HK	ヤマザクラ	KOH	14	12.8
サクラ1	HK	ヤマザクラ	CaCO ₃	16	14.2
サクラ2	ZK	ヤマザクラ	KOH	15	13.6
サクラ2	ZK	ヤマザクラ	CaCO ₃	23	14.2
サクラ3	MH	マメザクラ	KOH	15	15.6
サクラ3	MH	マメザクラ	CaCO ₃	12	13.2
サクラ4	AY	マメザクラ	KOH	18	13.6
サクラ4	AY	マメザクラ	CaCO ₃	16	13.3

表2 pH調整法による培養後の培地の状況

樹種	個体名	pH調整法	培養後の 培地pH	NO ₃ ⁻ ppm	PO ₄ ²⁻ ppm	NH ₄ ⁺ ppm	K ⁺ ppm
ケヤキ1	3K	KOH	4.25	515	78	69	456
ケヤキ1	3K	CaCO ₃	5.43	353	58	46	324
ケヤキ2	SM	KOH	4.34	515	77	82	492
ケヤキ2	SM	CaCO ₃	5.44	450	64	66	432
ケヤキ3	FM	KOH	4.45	535	78	89	490
ケヤキ3	FM	CaCO ₃	5.46	493	66	71	408
ケヤキ4	11	KOH	4.52	545	77	85	466
ケヤキ4	11	CaCO ₃	5.45	534	79	81	430
ケヤキ5	KHJ	KOH	4.23	525	73	76	466
ケヤキ5	KHJ	CaCO ₃	5.61	435	65	54	410
サクラ1	HK	KOH	3.46	135	47	16	490
サクラ1	HK	CaCO ₃	4.01	93	36	18	460
サクラ2	ZK	KOH	3.56	163	54	16	451
サクラ2	ZK	CaCO ₃	3.85	162	30	26	430
サクラ3	MH	KOH	3.06	17	4	7	321
サクラ3	MH	CaCO ₃	3.30	26	23	16	374
サクラ4	AY	KOH	3.25	117	24	27	372
サクラ4	AY	CaCO ₃	3.83	129	3	22	401
未使用WP培地		KOH	4.68	573	90	91	598
未使用WP培地		CaCO ₃	5.31	556	84	94	529

様に、ケヤキと比べるとその差は極めて僅かであった。マメザクラ系統の2個体のシュート長は、KOHで調整の方が僅かであるが長く伸長しており、ケヤキとは異なる結果となった。展葉枚数も、KOHで調整の方が僅かであるが展葉数は多くなっていた。サクラは、KOHで調整の方も、CaCO₃で調整と比べて、ケヤキほど短期間で著しい成長低下は認められなかった。

2 シュート伸長培養後の培地状況 (表2)

ケヤキの培養後のpHは、KOHで調整が4.23~4.52であったのに対し、CaCO₃で調整は5.43~5.61であった。また、KOHで調整が未使用の培地でも、pH4.68と低下していたが、CaCO₃で調整は未使用の培地で、pH5.31とほぼ低下していなかった。このことは、CaCO₃の緩衝機能によるものと考えられる。これらのことから、ケヤキは、培地のpHが5.0程度以下に低下するとシュートの成長が低下することが示唆された。また、CaCO₃を添加することによる緩衝効果で、培地のpH低下を抑えれば、成長を続けることが示唆された。サクラの培養後のpHは、KOHで調整が3.06~3.56であったのに対し、CaCO₃で調整は3.30~4.01であった。特に、マメザクラ系統のサクラはpH3.0以下の試料も多数見られ、酸性条件に対する高い耐性が認められた。また、サクラの培地は、肉眼でCaCO₃の粒子が消失した後ほぼ7日以内のできるだけ速やかに培地交換を行ったが、pHは低下しており、CaCO₃の緩衝機能がなくなると急速にpHが低下したことが示唆された。ケヤキ1、サクラ3、および未使用の培地のpHを図3に示すと、特に、サクラのpHが低下していた。

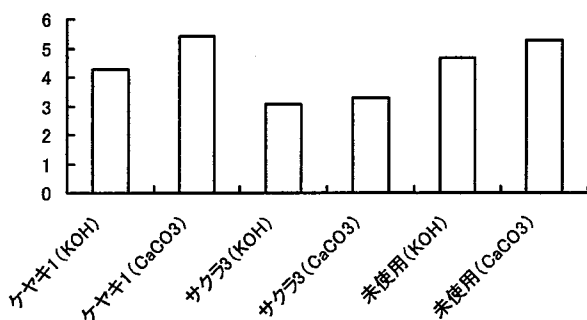


図3 培地pHの比較

培地中に溶存しているイオンの量を見ると、アニオン (NO₃⁻、PO₄³⁻、SO₄²⁻) のNO₃⁻、PO₄³⁻、およびカチオン (NH₄⁺、K⁺) のN

H₄⁺、K⁺の減少量が多いことが認められる。これらは植物が成長するのに必要な多量要素の養分であるから妥当な結果と考えられる。また、今回の培養樹種についてすべてで、アニオンのNO₃⁻、PO₄³⁻の方が、カチオンのNH₄⁺、K⁺より、その当量を見ると減少量が多いことが読みとれる。ケヤキ1、サクラ3、および未使用培地のNO₃⁻含有量を図4に示すと、サクラがケヤキより大きくNO₃⁻が減少していることがわかる。培地のpHについて考察すると、NH₄⁺、K⁺以外に大きく減少するカチオンは考えられないので、アニオンの方がカチオンより減少量が多い。そうすると、pHはアルカリ側に推移するはずである。それにもかかわらず、pHが低下したのは、培地中にアニオンの供給が行われたと考えられる。閉鎖された培養試験管という環境を考慮すれば、培養植物体が放出した有機酸と考えられるアニオンが原因であることが示唆される。

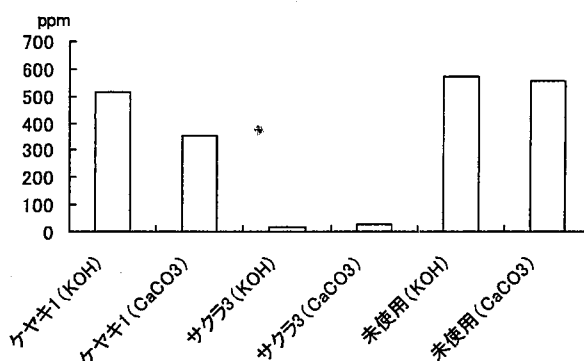


図4 使用後の培地の硝酸イオン濃度

3 シュート長および展葉数と発根の状況 (表3)

ケヤキは、5個体ともCaCO₃で調整の方が、発根率が高くなった。シュートの状況が、シュート長、展葉数とも良好な結果が得られたので、高い発根率を得る結果になったと考えられる。特に、ケヤキ1、3、5は、発根率70%を超える高い値が得られた。

サクラについては、ヤマザクラは2個体ともCaCO₃で調整の方が、発根率が高くなったが、ケヤキのような明らかな差は見られなかった。マメザクラは、2個体ともすべての試料が発根した。サクラのシュートの状況は、ケヤキとは異なり、2つの調整方法の間にシュート長、展葉数ともほとんど結果に差が見られなかったので、発根率においてもケヤキほどの差が見られなかったものと考えられる。

表3 シュート長および展葉数と発根の状況

樹種	個体名	シュート長 mm	展葉数 枚	シュート数 本	シュート 発根数	ダイレクトルー ティング発根数	シュート 発根率
ケヤキ1	3K	13	2.1	20	6	3	45
ケヤキ1	3K	53	5.6	136	66	43	80
ケヤキ2	SM	10	1.6	20	1	0	5
ケヤキ2	SM	46	4.4	56	16	4	36
ケヤキ3	FM	8	1.1	15	6	1	47
ケヤキ3	FM	38	3.8	68	36	13	72
ケヤキ4	11	9	1.3	2	0	0	0
ケヤキ4	11	31	3.2	20	8	0	40
ケヤキ5	KHJ	13	1.8	20	7	0	35
ケヤキ5	KHJ	49	5.2	52	33	6	75
サクラ1	HK	14	12.8	10	5	0	50
サクラ1	HK	16	14.2	10	6	0	60
サクラ2	ZK	15	13.6	10	7	0	70
サクラ2	ZK	23	14.2	10	8	0	80
サクラ3	MH	15	15.6	10	10	0	100
サクラ3	MH	12	13.2	10	10	0	100
サクラ4	AY	18	13.6	10	10	0	100
サクラ4	AY	16	13.3	10	10	0	100

IV 摘要

WP培地のpH調整を常法のKOH添加しpH 5.6に調整する方法とCaCO₃100mg/lを添加する方法の2種類で行い、シュートの成長を比較した。ケヤキは、CaCO₃で調整した方が良好な成育を示したが、サクラは、ケヤキとは異なりほとんど差が見られなかった。培地を培養に用いることによって、KOHで調整した方は、pHが低下していったが、CaCO₃で調整した方は、CaCO₃の粒子が見られる間は、緩衝作用によってpHの低下はほとんど認められなかった。この結果から、ケヤキは、pHが低下すると成長が著しく低下することが明らかとなった。pH低下の原因は、培地に添加したアニオンの方が、カチオンより当量から見ると多く減少していたので、培養植物体からのアニオンの放出が原因と推察された。発根培養については、個体差があるが、同一個体ではシュートの成長が良好なものほど発根率が高い傾向が見られた。

V 謝辞

研究を進めるに当って、森林総合研究所の石井克明形質転換研究室長、他研究官の方に多くの助言をいただいた。また、TG-19は三菱ガス化学

(株)新潟研究所丸山岳人氏より提供いただいた。なお、本研究は地域バイオテクノロジー研究開発促進事業「有用林木遺伝資源植物のバイオテクによる保存と増殖技術の開発」で実施したものである。研究に協力頂いた諸氏に厚く御礼申し上げる。

VI 引用文献

- 1) 原口雅人(1998) ケヤキ選抜木の腋芽培養によるクローン大量増殖. 日林誌80: 283-292.
- 2) LLOYD,G.and MC COWN,B.(1980) Commercially-feasible micropropagation mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture, Combined Proc. Int. Plant Propagator's Soc. 30: 421-427
- 3) 千木 容(1994) ヤマザクラ高齢木の組織培養による増殖—外植体採取部位による培養の難易—. 105日林論: 343-344.
- 4) 千木 容・坂井秀樹(1999) ケヤキ伐株の萌芽枝からの組織培養. 日林学術講. 110: 245-246.