

植物組織培養における培地固型化剤の役割

下村講一郎*・鎌田 博**

新しい材料で組織培養を始める時にしばしば問題となるのは培地の選択である。たしかに、無機塩組成、植物成長調節物質、糖源などの種類や濃度は実験結果に大きな影響をおよぼす要因であり組織培養における研究の主要な課題となっている。しかし、一般的にあまり顧みられないのは培地固型化剤の選択である。茎や葉の切片等を外植片として用い、カルス、不定芽、不定胚等を誘導する際には寒天で固めた固型培地を用いるのが普通であり、寒天の種類についてはその精製度に若干の注意を払う程度であり重要視されることはなかった。しかし、使用する固型化剤の種類により、細胞の分裂・増殖やプロトプラストの分裂頻度¹⁾、不定芽・不定胚の分化^{2,3)}、細胞分化⁴⁾、二次代謝物の生産⁵⁾等が影響を受けることが報告されている。たとえば、タバコの葯培養では精製度の低い寒天を用いると半数体を得にくく、精製を進めるにつれ半数体形成率が増大する⁶⁾。この原因は寒天中に含まれる阻害因子のためと考えられ、精製度の低い寒天を用いても活性炭を添加すれば半数体形成率は高くなる⁶⁾。一方、物理化学的ダメージを受けやすいプロトプラストの培養に際し、プレーティングに用いる培地固型化剤はその影響が大きく、bead type culture では Sea Plaque Agarose や Low Melting Type Agarose が最も有効である¹⁾。

このような報告をもとに考えると、精製度の高い寒天やアガロースを用いると、良好な結果が得られることは予想できるが、こうした試薬は価格が高く、使用濃度も通常の寒天とはほとんど同じなのでコストが高くなり実用

的ではない。このため、著者らも多少の劣悪効果を覚悟して寒天を用いていたが、茎頂培養や毛状根 (Ri プラスミドにより形質転換したもので活発に分枝しながら伸長する根) 培養に際し、茎頂から増殖した茎葉からの発根や毛状根の増殖が芳しくなく新たな工夫を必要とする状況にあった。そこで思い出したのがゲルライト (Gelrite) である。ゲルライトは著者の一人が米国カリフォルニア大学の Murashige 教授の研究室を訪れた時に分けて頂いたもので、新しい培地固型化剤でその効果を試験中とのことであった。そこで早速ゲルライトを用いて培地を作成し、茎頂培養や毛状根の培養を行ったところ、良好な結果が得られたので、数種植物について寒天との比較実験を行った。

ここでゲルライトの使用法と性質について述べておこう。ゲルライトは正式には Gellan Gum と呼ばれ、水草に付着する菌 (*Pseudomonas elodea*) が生産し菌体外に放出する多糖類を脱アセチル処理した後、精製して乾燥粉末としたもので、グルコース・ラムノース・ウロン酸などから構成されている。ゲルライトの使用法は通常の寒天と同じで、pH 調整をした培地に秤量した粉末を加えて煮沸融解後分注し、オートクレーブすればよい。もちろん、オートクレーブ後に分注してもよい。使用濃度は、1%寒天と同等のゲル強度を得るためには0.2% (重量/培地容量) でよいが、ゲルライトの場合、ゲル強度は培地中の可溶性金属塩 (Mg^{2+} や Ca^{2+} 等) の濃度に比例するので、Murashige-Skoog 培地のようにイオン濃度の高い培地では0.2%でよいが、White 培地や Knop 液のような低いイオン培地では高濃度 (0.4~0.6%) にする必要があり、金属イオンを含まない水を固型化することはできない。イオン濃度によりゲル強度が変化する性質は組織培養に際し有利に働くことがある。たとえば、培養物が増殖し培地中のイオンを吸収するとゲル強度が低下し液化するので、栄養分が不足したよいマーカーとなり、また、試験管内で増殖した植物体を鉗等に移植する際、水道水で洗うだけで培地がきれいに洗い流され、カビ等による汚染がおきにくい等の特性につながっている。また、融解した寒天培地は温度の降下ととも

* Koichiro SHIMOMURA and **Hiroshi KAMADA : Roles of Gelling Agents in Plant Tissue Culture

* 国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場 (〒305 茨城県筑波郡谷田部町八幡台1) Tsukuba Medicinal Research Station, National Institute of Hygienic Sciences (1 Hachimandai, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki-ken, 305 Japan)

** 筑波大学生物科学系遺伝子実験センター (〒305 茨城県新治郡桜村) Gene Experiment Center, Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba (Sakura-mura, Niihari-gun, Ibaraki-ken, 305 Japan)

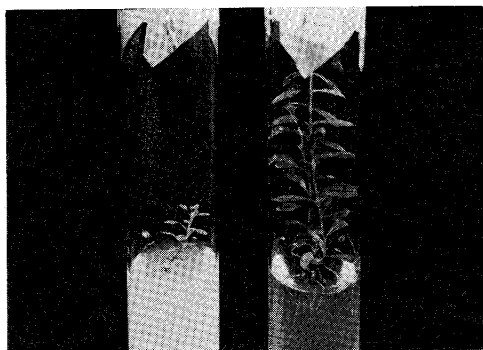


写真1 ウスユキクチナグサの発根に対する寒天とゲルライトの効果
左: 1%寒天培地, 右: 0.2%ゲルライト培地。培養条件は第1表と同じ。

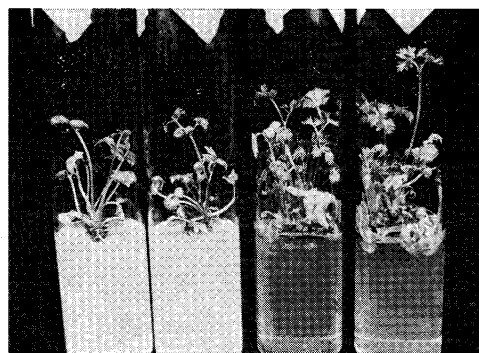


写真2 センキュウのマルチプルシュート形成に対する寒天とゲルライトの効果
左2つ: 1%寒天培地, 右2つ: 0.2%ゲルライト培地。培養条件は第2表と同じ。

第1表 ウスユキクチナグサの不定根形成と茎葉部の成長に対する寒天とゲルライトの効果

	外植片当 たりの芽 数	植物体当 たりの不 定根数	植物体当 たりの節 数
1%寒天	1.7	3.8	9.4
0.2% ゲルライト	2.7	9.9	10.8

ホルモン無添加の Murashige-Skoog 培地を寒天 (1%) とゲルライト (0.2%) で固め約 1 cm の茎葉を移植した。培養は 16 時間明/8 時間暗, 25°C の条件下で行い, 移植後 9 週目に測定した。

にゆっくりと固化するが, ゲルライトでは狭い温度範囲で急速に固化するためオートクレーブ後の分注には注意を要する。しかし, 寒天培地は融解・固化を数度繰り返すと固まらなくなるのに反し, ゲルライト培地は融解・固化を繰り返してもゲル強度が少しずつ低下するが固化する。また, ゲルライトの優良な特性の一つはその透明感である。培養管を用いて寒天培地を作成すると培地が不透明となり培地内部の様相がよく見えないのに対し, ゲルライト培地は透明で, 水が入っているように見える。このため, 外植片の辺りに小さなコンタミが出現したのも容易に検出できるし, 根の様子や培地に接した面での外植片の反応の様子などがよく観察できて, 培養棚に並べた際にもきれいだ。ゲルライトの示すこの透明度の高さを活かし, 免疫沈降反応におけるオクタローン (Ouchterlony) 分析⁷⁾ や染色液を用いた微生物の化学的性質決定⁸⁾ 等にも利用されている。ゲルライトの示す他の一つの特性は高温でもゲル強度を高く維持できることである。微生物の培養に際し, プレーティング効率が通常の寒天と同等あるいは高いことはいうまでもないが, 60°C~70°C を生育適温とする高熱性細菌の培養に

有利である⁹⁾。

これらの例のように微生物の培養にはゲルライトがすでに利用されているが, 植物の組織培養におけるゲルライトの使用は報告がなくどんな効果を生むかは不明であった。そこで数種植物を材料として用い, 分化や増殖, 成長への効果を試してみた。ウスユキクチナグサ (*Monochasma savatieri*) では無菌苗の維持を目的として無菌苗の上部を数節着いた状態で切り出し, ホルモン無添加の Murashige-Skoog 培地に移植しているが, 1%寒天で固めた培地を用いると, 分化した不定根の伸長や茎葉部の伸長が思わしくなかった (写真1)。しかし, 0.2%ゲルライトで固めた培地を用いると, 分化してくる不定根の数が増大し, 伸長も良好となり, また, 茎葉部全体の成長が著しくよくなり伸長する腋芽の数, 節の数が増大した (写真1, 第1表)。ウスユキクチナグサの場合, 茎や葉の断片を外植片として培養すると, 特定のオーキシン・サイトカイニンを組み合わせで添加した Murashige-Skoog 培地上で不定芽の分化が起こるが, この場合もゲルライトを用いた培地の方が良好な結果が得られ, 不定芽数も増大する。一方, センキュウ (*Cnidium officinale*) の茎頂培養より得られた個体からの試験管内での増殖を行う際, NAA (0.01 mg/l) と Kinetin (5 mg/l) を含む Murashige-Skoog 培地を用い, 寒天 (1%) とゲルライト (0.2%) の効果を比較すると, ゲルライトを用いることにより, 一外植片当たりを得られる芽数や不定根数が増大し, 植物体の成長 (センキュウでは茎は伸長しないので出現した葉の数で測定) も著しく促進された (第2表, 写真2)。

この二つの例では, ゲルライト使用による分化, 成長の促進が見られるが, どんな植物種を用いた場合にも一

第2表 センキュウのマルチプルシュート形成に対する寒天とゲルライトの効果

	培養数	調査した培養物の数	培養物当たりの芽数	不定根数 ()内は培養物当たりの不定根数	培養物当たりの葉数
1% 寒天	10	7	1.7	3 (1.3)	5.9
0.2% ゲルライト	10	9	3.0	4 (2.3)	12.0

NAA(0.01 mg/l)と kinetin (5 mg/l) を含む Murashige-Skoog 培地を寒天(1%)とゲルライト(0.2%)で固め小さな不定芽を移植した。培養は16時間明/8時間暗、25°Cの条件下で行い、移植後9週目に測定した。

般的に見られることであるかどうかはいまだ不明の点も多い。実際、タバコの不定芽分化やカルスの増殖、ニンジン⁹の不定胚形成では寒天とゲルライトではほとんど差が見られない。寒天培地との直接的比較は行っていないが数多くの植物種を用いてゲルライト培地で培養を行った際に一般的に見られたことは、根の分化、伸長が良好なことであろう。たとえば、ニンジン、ペラドンナ、シロイヌナズナ等の毛状根を培養する際、寒天培地を用いると毛状根は培地表面で伸長し、培地内での伸長はあまり認められないが、ゲルライト培地では培地表面ばかりでなく培地内部でも良く伸長し活発に増殖する。

植物組織培養におけるゲルライトのこのような効果に関する報文は見当たらないが、Texas A & M 大学の T. W. Zimmerman は、トマトのカルスやセントポーリアの葉柄からの不定芽分化、ワタヤトマトの胚軸からのカルス形成にはゲルライトが促進的であり、コムギやメキシコトチノキのカルス増殖や不定芽分化には寒天の方が有効であると述べている¹⁰⁾。また、Purdue 大学の D. A. Bailey らは *Hydrangea macrophylla* の成長点培養による不定芽分化についてゲルライトと寒天の効果を比較し、不定芽形成率には両者で差がないが、不定芽の成長はゲルライトを用いた方が良好であると述べている¹⁰⁾。

これらの例に見られるようにどんな植物種においてもゲルライトが寒天より良好な結果をもたらすとは限らず、今後さらに多くの植物種を用いた実験の結果が待たれるところである。

次にゲルライトの問題点について述べてみよう。寒天は大部分の酵素に対する耐性に優れており、外植片から分泌される酵素によって分解されることはない。しかし、ゲルライトはある種の酵素により分解されると考えられる。すなわち、オレンジ等数種植物の葉片を外植片としてゲルライト培地で培養すると葉片の形どおりにへこみができて培地に穴があいたり、外植片の周辺から液化してしまうことがある。このことは、特定の植物種ではゲルライトは使用できないことを示しており、ゲルラ

イトの使用に当たって予備調査が必要である。一方、ゲルライトは何度でも融解・固化を繰り返すことができると述べたが、一度固化した培地を電子レンジ等で再融解しようすると高温・長時間の処理が必要となり、大量の固型化培地を用意しておいて必要に応じて必要量ずつを再融解して使用する際には大変不便である。また、ゲルライト培地上で増殖した細胞にはゲルライトが付着してべとべとした状態になることと固化後培地表面に残る水分量が寒天に比較して若干多いことも気になることである。次に価格の問題であるが、米国での販売価格が1 kg 当たり 15,000~20,000 円であるのに対しわが国では1 kg 当たり 40,000 円と高く、使用量が通常の寒天の1/4~1/5であることを考慮してもわが国では精製度を問題にしなければ寒天を使用した場合の方がコスト的には安価になる場合もある。価格がもう少し低下すればと願う次第である。

新しい培地固型化剤であるゲルライトは今後の研究によりさらに有効な利用法が開発されるものと思われるが、最近では価格も安く精製度の高い伊那寒天や若干透明感のある Phytagar、寒天とは化学組成のまったく異なるアルギン酸、カラギーナン等様々な培地固型化剤が次々に市販されている。各々の特性を明確にすることにより、植物組織培養の多くの目標の各々についてより有益な結果をもたらす培地固型化剤の選択が可能になるものと思われる。

(1985年11月25日受理)

文 献

- 1) Shillito, R.D., J. Paszkowski, I. Potrykus, 1983. Plant Cell Rep., 2 : 244-247.
- 2) Wernicke, W., H.W. Kohlenbach, 1976. Z. Pflanzenphysiol., 79 : 189-198.
- 3) Tyagi, A.K., A. Rashid, S.C. Maheshwari, 1980. Physiol. Plant., 49 : 296-298.
- 4) Roberts, L.W., C.M. Stiff, S. Baba, 1984. Plant Tissue Cult. Lett., 1 : 22-24.
- 5) Bredelius, P., K. Nilsson, FEBS Lett., 122 : 312-316.

- 6) Kohlenbach, H.W., W. Wernicke, 1982. Z. Pflanzenphysiol., **86** : 463-472.
- 7) Milinaro, G.A., W.C. Eby, 1984. Mol. Immunol., **21** : 181-184.
- 8) Lin, C.C., L.E. Casida, Jr., 1984. Appl. Environ. Microbiol., **47** : 427-429.
- 9) Shingu, D., M. Valicant, V. Tutlane, E. Weinberg, B. Weissberger, L. Koupal, H. Gadabusch, E. Stapley, 1983. Appl. Environ. Microbiol., **46** : 840-845.
- 10) Agicell Report, August, 1985. p. 11.