

## 技術ノート

## 植物組織培養のゲル化剤選択のために

浅井以和夫\*・大本俊郎\*\*・義平邦利\*

植物培養用の固形培地を調製する際には、通常、寒天が用いられており、ゲル化剤の比較・検討はあまり行われていない。*Monochasma savatieri* の発根及び茎葉部の成長、さらに、*Cnidium officinale* のマルチブルシュート形成に対する寒天と Gelrite の比較検討の報告<sup>1)</sup>が、また、*Nicotiana tabacum* や *Cucumis sativus* 等についても各種ゲル化剤が検討されており<sup>2)</sup>、寒天培地においては、他の培地用ゲル化剤、例えば Gelrite と比較して生育が抑制されることが報告されている。また、寒天培地における *Lithospermum erythrorhizon* 培養細胞におけるシコニン生産の誘導において、寒天濃度や寒天中の酸性糖等の影響の報告<sup>3)</sup>がある。そこで、各種ゲル化剤の培養植物の生育への影響とその組成について調べた。

実験に使用したゲル化剤(添加濃度は、Table 1 参照)は、Gelrite, Gellan gum, Agarose, Ina agar, Taito agar, Difco agar, Wako agar であり、これらを用いて培地を調製した。材料植物として、当研究室で培養系を持っており、ホルモンフリーで培養可能である代表的な 3 種の植物、*Mentha arvensis*(シソ科), *Anthemis nobilis*(キク科), *Scopolia tangutica*(ナス科)を選択した。多くの実験で使用されているタバコは、外的要因にあまり左右されず良好に生育するので、今回の実験においては、使用しなかった。上記 3 種の植物の頂芽(約 1 cm)を植え付け切片とし、ホルモンフリー Murashige-Skoog(MS)培地<sup>4)</sup>を基本培地(pH 5.8, 3% ショ糖)として用い、25°C, 16 時間照明下で *M. arvensis* と *A.*

*nobilis* は 3 週間、*S. tangutica* は生育が遅いため 6 週間培養した。培養後、すみやかに新鮮重量、シュートの長さ、葉数、根数、根長を測定した。

*M. arvensis* の新鮮重量は、Gelrite 及び Gellan gum を使用すると良好に増加し、Difco agar 及び Ina agar の約 2 倍であった(Fig. 1)。シュートの長さにおいても同様で、Difco agar 及び Ina agar に比較して、Gelrite 及び Gellan gum が良好であった。葉数、根数、根長は、大きな違いは認められなかったが、Gelrite 及び Gellan gum, Agarose を使用すると根が非常に太くなった。しかし、他のゲル化剤では、根は細かった。

*A. nobilis* においては(Fig. 2)，新鮮重量に関して、ほとんど差がみられなかったが、Ina agar については、他のゲル化剤使用の培地と比較して、僅かに生育が劣った。Gelrite では、根数の増加ではなく、太く長く伸長したが、寒天類では細く短い根が多数形成された。

*S. tangutica* においては、MS 培地(pH 5.8, 3% ショ糖)を用いて培養すると、植え付け切片にカルスが形成され発根に影響を与えたので、1/2 MS(マクロエレメントを 1/2)培地(pH 5.8, 2% ショ糖)を使用した。データは示していないが、Wako agar 及び Ina agar を使用したホルモンフリー 1/2 MS 固形培地では生育が悪かった。Gelrite 及び Taito agar では、新鮮重量が増加し、前 2 者の約 1.5 倍であった。また、シュートの長さにおいても、Wako agar では Gelrite に比べて 3 分の 2 程度しか伸長せず、細く弱々しかった。さらに、発根にかかる時間にも差が認められ、Gelrite や Taito agar を用いると 3~4 週間でほとんどのシュートが発根し、幼植物体が得られた。しかし、Wako agar の場合、6 週間経過しても発根率は約 70% であった。

以上のように、実験に用いた *M. arvensis*, *A. nobilis*, *S. tangutica* で良好に生育したゲル化剤は Gelrite であった。これに比べて生育が劣ったゲル化剤は、植物種によって異なっていたため、特に断定はできないが、寒天類は植物の生育を抑制する傾向があるようである。この原因是、寒天中に生育抑制物質が存在するためと考えら

Iwao ASAI\*, Toshiro OOMOTO\*\* and Kunitoshi YOSHIHIRA\*  
Influence of Gelling Agents on Growth of Plant Tissue Culture.

\* 東亜大学 大学院 総合学術研究 応用生命化学  
(〒 751 山口県下関市一の宮学園町 2 番 1 号)

\*\* 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社  
(〒 561 大阪府豊中市三和町 1 丁目 1 番 11 号)

\* Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Integrated Science and Art, University of East Asia, 2-1 Ichinomiya-Gakuen, Shimonoseki, 751 Japan.

\*\* San-Ei Gen F.F.I. Inc., 1-1-1 Sanwa, Toyonaka, 561 Japan.

Table 1. Analyses of various gelling agents.

	Ina agar BA-30	Taito agar HAA	Difco agar	Wako agar	Agarose	Gellan gum	Gelrite
Loss on drying (%)	5.27	19.3	18.1	5.22	17.6	11.3	12.9
Ash(%)	1.99	1.81	4.06	1.27	0.48	8.79	6.65
pH	6.15	6.68	6.81	6.15	6.16	6.94	6.50
Gel strength (g/cm <sup>2</sup> )	146.6 (1.0%)* <sup>1</sup>	145.2 (1.0%)	105.2 (1.0%)	146.8 (1.0%)	59.8 (0.8%)	89.8 (0.2%)	95.6 (0.2%)
Protein(%)	1.13	0.11	1.44	0.00	0.00	0.78	0.53
Lipid(%)	0.06	0.04	0.18	0.11	0.04	0.06	0.07
Carbohydrate (%)	91.0	79.5	76.2	93.4	82.0	78.6	79.7
Pyruvic acid (%)	0.80	0.26	1.09	0.17	0.18	0.16	0.13
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (%)	0.01↓* <sup>2</sup>	0.02	0.02	0.01↓	0.01	0.01↓	0.01↓
Total SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (%)	1.23	0.69	3.04	1.07	0.31	0.71	0.13
Free SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (%)	0.06	0.05	0.17	0.23	0.02	0.84	0.12
F <sup>-</sup> (%)	0.005↓* <sup>2</sup>	0.005↓	0.005↓	0.005↓	0.005↓	0.005↓	0.005↓
Cl <sup>-</sup> (%)	0.08	0.19	0.49	0.04	0.03	0.02	0.01
Total N(%)	0.12	0.02	0.24	0.00	0.00	0.13	0.09
Total S(%)	0.38	0.19	0.84	0.33	0.086	0.21	0.029
Na(%)	0.4300	0.1700	1.0400	0.0469	0.1400	0.4900	0.6500
K(%)	0.0150	0.0160	0.0989	0.0140	0.0007	3.2800	1.7400
Ca(%)	0.1200	0.2300	0.1800	0.2300	0.0007	0.4600	0.6500
Mg(%)	0.1000	0.0410	0.1200	0.0910	0.0007	0.1800	0.2400
Si(%)	0.0215	0.0784	0.0293	0.0267	0.0013	0.0141	0.0076
B(%)	0.0057	0.0052	0.0093	0.0079	0.0003	0.0004	0.0003
P(%)	0.0009	0.0124	0.0020	0.0033	Trace	0.0439	0.0294
Fe(%)	0.0036	0.0158	0.0028	0.0073	0.0042	0.0141	0.0089
Mn(%)	0.0008	0.0028	0.0002	0.0012	Trace	0.0023	0.0021
Zn(%)	0.0010	0.0014	0.0002	0.0003	Trace	0.0007	0.0005
Cr(%)	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace
Ti(%)	Trace	0.0009	Trace	0.0003	Trace	0.0003	Trace
Cd(%)	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace

Co, Mo, W, Ni, Cu, Sn, Sb, Pb, Bi were detected in trace amounts.

\*<sup>1</sup> Numbers in parentheses show gel concentration(w/v).

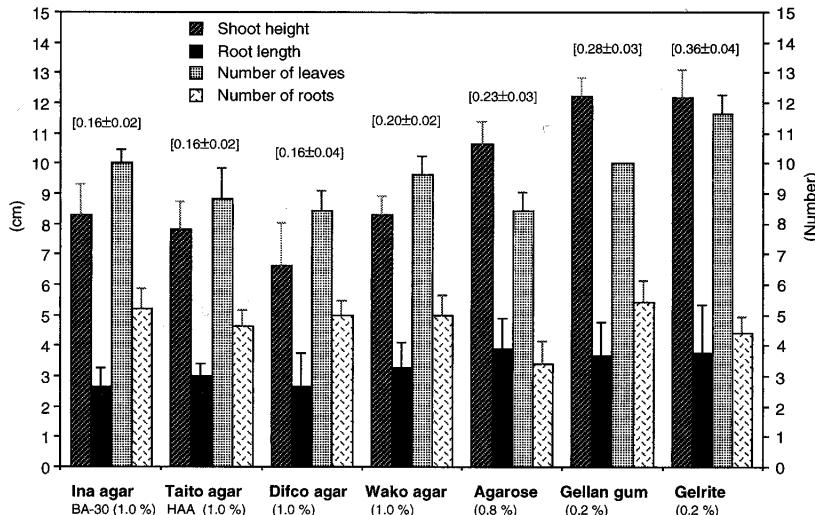
\*<sup>2</sup> ↓ shows below detection level.

れた。そこで、3種の植物の内、特に *M. arvensis* の生育に関して顕著な差が認められたので、*M. arvensis* を用いてその原因を調べた。

生育を抑制した Difco agar と Ina agar について、透析または洗浄により生育抑制物質を除去する処理を行い、生育の良好であった Gelrite と生育特性を比較した。

透析は、Difco agar と Ina agar の各々 5 g を蒸留水 100 ml にて膨潤させ、分子量 10000 の透析膜に詰め、1500 ml の蒸留水にて 4°C、スターラーで攪拌しながら 24 時間透析した。途中 2 回蒸留水を交換した。得られた透析内液と外液を凍結乾燥した。外液は、Difco agar と Ina agar それぞれ 0.046, 0.040 g/寒天 1 g の樹脂様

物質が得られた。培養は、頂芽(約 1 cm)を植え付け切片として、ホルモンフリー MS 培地を基本培地(pH 5.8, 3% ショ糖)とし、ゲル化剤として、Gelriteのみ、透析未処理の Difco agar あるいは Ina agar のみ、Difco agar と Ina agar の透析内液のみ、あるいは、その外液を最終濃度 4.6, 4.0% になるように Gelriteと共に用いた計 7 区について 3 週間培養(25°C, 16 時間照明下)した。培養後、すみやかに新鮮重量、シートの長さ、葉数、根数、根長を測定した。Fig. 3 に示すように、生育を抑制した透析未処理の Difco agar と Ina agar をそれらの透析内液と比較すると、新鮮重量やシートの長さにあまり差は認められず、生育は改善されなかった。

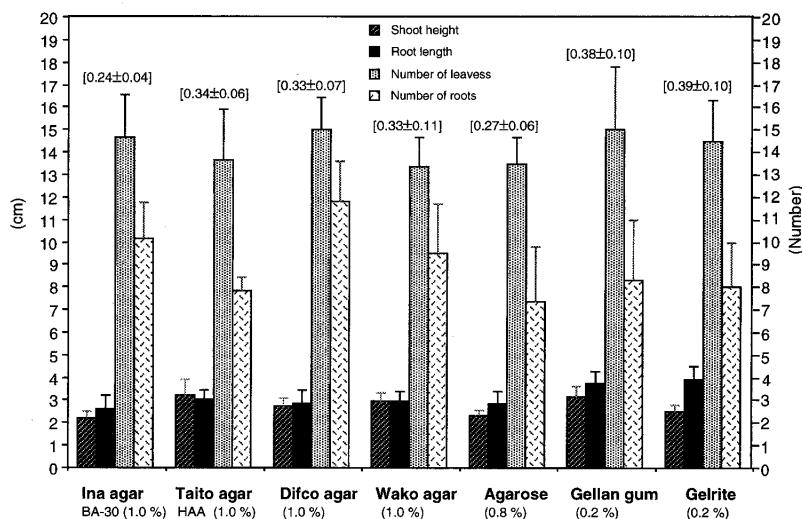


**Fig. 1** Growth of *Mentha arvensis* shoots cultured on hormone-free MS medium solidified with various gelling agents.

Shoots were cultured in 16 h/day light at 25°C for 3 weeks.

Numbers in brackets show fresh weight(g). Vertical bars indicate standard deviation ( $n=7$ ).

Numbers in parentheses shows gel concentration(w/v).



**Fig. 2** Growth of *Anthemis nobilis* shoots cultured on hormone-free 1/2 MS medium solidified with various gelling agents.

Shoots were cultured in 16 h/day light at 25°C for 3 weeks.

Numbers in brackets show fresh weight(g). Vertical bars indicate standard deviation ( $n=7$ ).

Numbers in parentheses show gel concentration(w/v).

一方、Difco agar と Ina agar の透析外液を Gelrite に添加した場合は、新鮮重量がそれぞれ、0.15, 0.16 g であり、Gelrite のみで培養した場合の 0.23 g と比較するとかなり生育が抑制されていた。また、シートの長さにおいても新鮮重量と同様の傾向を示した。根長や根数に関しては、透析外液の添加、未添加の Gelrite では

差が認められなかった。これらの結果により、寒天中の生育抑制物質は、透析によって完全に取り除くことはできないと考えられた。

そこで、ゲル化剤を直接 70% Methanol あるいは蒸留水でそれぞれ洗浄することにより、生育を抑制する物質を取り除くことを試みた。Difco agar と Ina agar

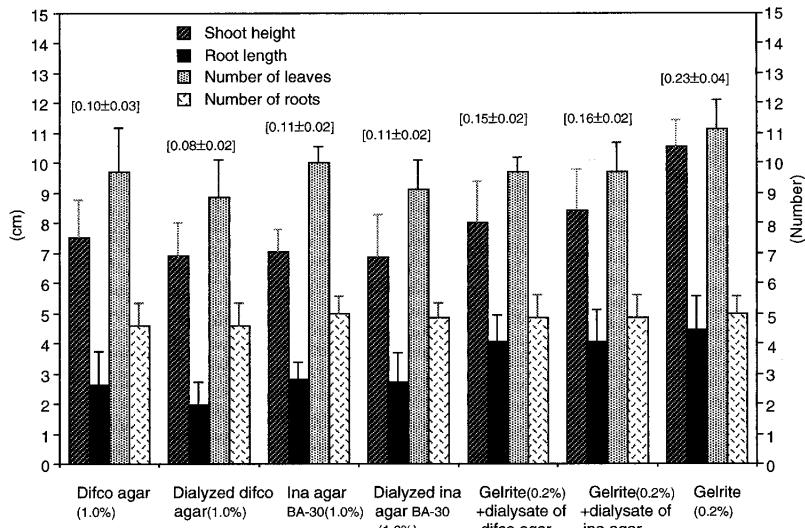


Fig. 3 Growth of *Mentha arvensis* shoots cultured on hormone-free MS medium solidified with dialyzed gelling agents.

Shoots were cultured in 16 h/day light at 25°C for 3 weeks.

Numbers in brackets show fresh weight(g). Vertical bars indicate standard deviation ( $n=7$ ).

Numbers in parentheses show gel concentration(w/v).

各々 5 g を 1000 ml の 70% Methanol あるいは蒸留水で洗浄し、得られた洗浄溶出液を濃縮して凍結乾燥すると、70% Methanol 洗浄ではそれぞれ 0.032, 0.042 g/寒天 1 g、蒸留水洗浄ではそれぞれ 0.060, 0.064 g/寒天 1 g の茶褐色の固形物が得られた。培養は、頂芽(約 1 cm)を植え付け切片としてホルモンフリー MS 培地を基本培地(pH 5.8, 3% ショ糖)とし、ゲル化剤として、Gelriteのみ、洗浄未処理の Difco agar あるいは Ina agar のみ、Difco agar と Ina agar の洗浄残渣のみ、洗浄溶出液を 70% Methanol では、最終濃度 3.2, 4.2% になるように、蒸留水洗浄では、最終濃度 6.0, 6.4% になるように Gelriteと共に用いた計 11 区について 3 週間培養(25°C, 16 時間照明下)した。培養後、すみやかに新鮮重量、シュートの長さ、葉数、根数、根長を測定した。Difco agar に関して、生育を抑制した洗浄未処理の Difco agar とその 70% Methanol あるいは蒸留水の洗浄残渣を比較すると、あまり新鮮重量やシュートの長さに差は認められず、生育は改善されなかった。一方、70% Methanol あるいは蒸留水の洗浄溶出液を Gelrite に添加して培養した場合、Gelriteのみで培養した時と比較して、両方とも新鮮重量において約 4 割の生育抑制が認められた。また、シュートの長さに関しても、新鮮重量のように顕著ではないが同様に抑制された。さらに、Ina agar に関しても Difco agar の場合と同じ傾向を示した。

上記の実験により、Difco agar と Ina agar の中には、*M. arvensis* の生育を抑制する物質の存在が推定され、使用するゲル化剤によって生育が異なることが確認されたので、各種ゲル化剤の成分分析(ICP-AES: Inductively Coupled Argon Plasma Emission Spectrophotometer, イオンクロマトグラフ法:DIONEX Ionpac NSI, ケルダール法:デジタル・ケルダール分析装置 KN-03C C型)を行った。**Table 1** に示すように、生育を抑制した Difco agar と Ina agar の成分中に、生育の良かった Gelrite と比較して硫酸イオンやピルビン酸残基、塩素、ホウ素が多く存在しており、カリウムやカルシウム等は、少量しか含有されていなかった。また、Difco agar と Ina agar の透析外液及び洗浄溶出液の分析を行ったところ、アミノ酸としてグリシン、糖類としてグルコースやマルトース、分子量の大きい多糖類の存在が示唆され、さらに、硫酸イオンやピルビン酸残基がかなり含有されていることが確認されたが、現段階においては抑制物質を断定できず、これから研究が必要であると考えられた。

Gelrite は、今回実験に用いた *M. arvensis*, *A. nobilis*, *S. tangutica* のシュートの生育においてかなり良好な結果を与えたことから、植物組織培養において有用と考えられた。しかし、どんな植物においても良好な結果を示すとは限らず、植物種によっては、Gelrite を使用するとビトリフィケーションが起こる事<sup>1)</sup>も知られ

ており、今後、多くの植物種を用いた実験が必要であろう。

本研究において、各種の植物にそれぞれ適したゲル化剤、生育を抑制するようなゲル化剤があることが明らかとなった。培養植物の生育が芳しくない場合には、基本培地や植物ホルモンの組み合わせや濃度のみならず、ゲル化剤の変更も一つの有益な手段になると考えられる。

(1994年12月28日受理)

## 文 献

- 1) 下村講一郎, 鎌田 博, 1986. 植物組織培養, **3**(1), 38-41.
- 2) Ichi, T., T. Koda, I. Asai, A. Hatanaka, J. Sekiya, 1986. Agric. Biol. Chem., **50**(9), 2397-2399.
- 3) Fukui, H., N. Yoshikawa, M. Tabata, 1983. Phytochemistry., **22**(11), 2451-2453.
- 4) Murashige, T., F. Skoog, 1962. Physiol. Plant., **15**, 473-497.