

ブドウの組織培養培地への糖添加とpH変化

誌名	福岡県農業総合試験場研究報告. B, 園芸 = Bulletin of the Fukuoka Agricultural Research Center. Series B, Horticulture
ISSN	02863030
巻/号	9
掲載ページ	p. 65-68
発行年月	1989年11月

ブドウの組織培養培地への糖添加と pH 変化

能塚一徳・平川信之・角 利昭
(園芸研究所果樹部)

組織培養に用いる培地への糖の添加が、高压滅菌後の物理・化学性、特に pH 変化に及ぼす影響について検討した。

培地の硬度は高压滅菌によって極度に低下したが、特に果糖の添加の影響が大きかった。培地の着色は、供試したすべての糖で濃度と比例したが、果糖が最も着色した。高压滅菌前に pH は 5.8 に調整したが、滅菌後には糖濃度に反比例して低下した。

糖の添加による pH の低下の程度は、基本培地間の差は非常に小さく、糖の低濃度域では変化が大きいのに対し、高濃度域では小さかった。

高压滅菌前に 2 段階の pH 調整を行い、糖濃度毎の高压滅菌後の pH 変化を明らかにし、pH が一定で糖濃度が異なる培地を作成することができた。

[Keywords : tissue culture, medium, carbonate source, pH, autoclaving]

緒 言

近年では、バイオテクノロジー関連の研究分野の拡大と急速な進歩にともなって、植物関係においても、この技術の実用化例が急増した。これらの研究において、対象とする植物の種類、部位、研究目的に応じた種々の培地作成は極めて重要である。

著者ら¹⁾は、ブドウの大量増殖のための適性培地を検討し、添加する糖の種類及び濃度が生育に大きな影響を及ぼすことを明らかにした。この中で、用いた培地が、高压滅菌後の寒天の硬さと着色度に差を生じることを観察し、この原因は、高压滅菌後の pH 低下の程度が、添加した糖の種類と濃度によって異なることによるものと推察した。

培養に用いる適性培地を検索する場合、添加する植物ホルモンの種類と濃度の組み合わせについては多くの検討がなされており、糖²⁻⁹⁾及び pH⁵⁾についての検討例も少なくない。

一方、高压滅菌によって殺菌前に調整した pH が低下することは、一般に知られている¹⁾。しかし、高压滅菌後の pH 変化についての詳細な報告、特に糖添加との関係で論じられた例はほとんど見当たらない⁶⁾。そこで、培地に添加する糖の種類及び濃度を変えて、高压滅菌による培地の硬度、着色度、pH の変化について実験を行い、新しい知見を得たので報告する。

材料及び方法

1 糖の種類、濃度と培地の硬度変化

高压滅菌後の硬度調査用の培地は、基本培地を MS 培地³⁾とし、ベンジルアデニン (以後 BA と記す) を 5 μ M 及び寒天を 8g/l で添加した固体培地を用いた。糖は、ショ糖、ブドウ糖、果糖及びガラクトースをそれぞれ 0, 10, 30, 50, 70g/l 添加した。培地は寒天の添加前に pH を 5.8 に調整し、寒天添加後に湯煎器で溶解して、それぞれ 100ml の培養容器に 30ml 分注した。殺菌前後にダイナグラフを用い、1cm²当たりの最大抵抗値を測定し、培地の硬度を表示した。

2 MS 培地への糖添加と着色度及び pH 変化

着色度及び pH 変化の調査は、前記の培地で寒天を添加しない液体培地を用いた。着色度は、高压滅菌後に分光光度計によって 370nm における吸光度を測定した。pH の測定は pH メーターを用いた。

3 基本培地の種類及び糖添加と pH 変化

pH の変化は、ブドウで増殖に用いる MS 培地、発根に用いる 1/4 MS 培地、不定胚誘導に用いる NN 培地、プロトプラスト培養に用いる B-5 培地、及び胚珠培養に用いる Nitsch ('69) の培地 (以後 N-69 と記す) の 5 種類の基本培地を用いた。糖はショ糖、ブドウ糖及び果糖を用い、それぞれ 0, 10, 30, 60, 90, 120g/l を添加した。滅菌前に pH を 5.8 に調整し、高压滅菌後の pH の変化を調査した。

4 高压滅菌前の pH 調整法の検討

胚珠培養用の培地に添加する糖の種類と濃度が異なり、しかも pH が同一の培地を作成するための実

験を行った。胚珠培養に用いるN-69培地に、ショ糖またはブドウ糖を50, 100, 200, 300, 400mM添加した。高压滅菌前にpHを5.8および6.8に調整した前実験の結果(第2表)をグラフにプロットし、高压滅菌後の培地のpHをすべて5.00とするためのpH調査値を推定した。pH調整値の推定は、pH5.8及び6.8に調整した培地の高压滅菌後のpHと、目標値の5.00の3点の位置から、pH5.8と6.8の間の内分比または外分比によって算定した。それぞれの濃度に応じたpH調整区を設定し、高压滅菌後にpHの変化を調査した。

全実験を通じ、高压滅菌は121℃, 15分とし、各区3反復とした。

結果及び考察

1 糖の種類、濃度と培地の硬度変化

培地の硬度は、分注後は約400~450g/cm²であったが、糖を70g/l添加した区では若干の硬度低下が認められたものの、糖の種類や濃度による一定の傾向は認められなかった。しかし、高压滅菌後は、いずれの区においても著しい硬度低下が認められ、ブドウ糖、果糖及びガラクトースでは、添加した糖の濃度に反比例して低くなった。特に果糖を30g/l以上添加した区ではほぼ液状であり、最大値の判定が困難であった。一方、ショ糖では、濃度に比例して硬度が高くなった(第1表)。

2 MS培地への糖添加と着色度及びpH変化

培地の着色度はすべての糖で濃度に比例して増加したが、ショ糖では最も着色が少なく、70g/l区においても、370nmにおける吸光度は0.115にすぎなかった。ブドウ糖及びガラクトース添加区の着色度は、ショ糖添加区に比べると僅かに高い程度であったが、果糖添加区は著しく高く、70g/l区はショ糖添加の場合の約7倍の0.735に達し、肉眼による観察でもその差が明らかになった。(第1表)。

培地作成時にpHを5.8に調整後、高压滅菌を行うと、すべての糖で濃度に反比例してpHが低下した。pH低下の程度はショ糖が最も少なく、30g/l区で4.94、70g/l区においても4.75であった。ブドウ糖とガラクトースは同程度であり、30g/l区では約4.5であった。果糖添加区におけるpH低下の程度は著しく、10g/lの添加によって4.30まで低下し、70g/l区では3.77であった(第1表)。

以上のことから、培地に添加する糖は、ショ糖が最も安定しており、果糖が最も不安定であることが明らかになった。本実験で認められたような、高压滅菌後の培地の物理・化学的变化は、培地に含まれる多くの無機物や有機物が、高温高压条件下で加水分解などの化学反応を起こすことによるものと推察されるが、この場合、培地中の最も多い要素である糖の影響が大きいものと予想される。

植物の組織培養に用いる糖は、ショ糖が最も多く、場合によってはブドウ糖が用いられて好結果を示す

第1表 糖添加と高压滅菌が培地の硬度、着色度及びpHに及ぼす影響

測定項目	糖の種類	糖濃度 (g / l)				
		0	10	30	50	70
硬度 (g/cm ²)	ショ糖	19.8 (427)	21.2 (422)	27.8 (427)	31.6 (431)	32.7 (402)
	ブドウ糖	19.8 (427)	17.3 (455)	16.2 (454)	8.6 (452)	2.8 (382)
	果糖	19.8 (427)	5.6 (401)	2.3 (438)	1.4 (424)	0.7 (368)
	ガラクトース	19.8 (427)	30.7 (431)	12.8 (436)	16.6 (462)	4.8 (411)
吸光度 (370nm)	ショ糖	0.036	0.048	0.070	0.090	0.115
	ブドウ糖	0.036	0.053	0.092	0.130	0.159
	果糖	0.036	0.160	0.379	0.560	0.735
	ガラクトース	0.036	0.068	0.084	0.099	0.119
pH	ショ糖	5.50	5.22	4.94	4.80	4.75
	ブドウ糖	5.50	4.87	4.51	4.39	4.16
	果糖	5.50	4.30	4.01	3.86	3.77
	ガラクトース	5.50	4.80	4.50	4.40	4.31

注): ()は高压滅菌前の硬度

第2表 各種基本培地における、糖の添加と高圧滅菌後の pH 変化

基本培地	糖の種類	糖濃度 (g / ℓ)					
		1	10	30	60	90	120
MS	シ ョ 糖	5.42	5.17	4.82	4.62	4.60	4.60
	ブドウ糖	5.42	4.81	4.50	4.40	4.30	4.25
	果 糖	5.42	4.36	4.00	3.89	3.76	3.66
1/4MS	シ ョ 糖	5.62	5.44	5.10	4.69	4.60	4.53
	ブドウ糖	5.62	4.47	4.23	4.10	4.08	4.09
	果 糖	5.62	4.20	4.00	3.89	3.75	3.70
NN	シ ョ 糖	5.30	5.21	4.99	4.82	4.64	4.62
	ブドウ糖	5.30	4.67	4.40	4.32	4.25	4.25
	果 糖	5.30	4.20	4.01	3.98	3.80	3.76
B-5	シ ョ 糖	5.57	5.20	5.01	4.77	4.79	4.68
	ブドウ糖	5.57	4.51	4.37	4.29	4.26	4.25
	果 糖	5.57	4.30	4.05	3.90	3.81	3.72
N-69	シ ョ 糖	5.38 (6.35)	5.24 (6.19)	4.84 (5.89)	4.66 (5.68)	4.56 (5.56)	4.50 (5.45)
	ブドウ糖	5.38 (6.35)	4.57 (5.34)	4.35 (4.90)	4.30 (4.71)	4.35 (4.64)	4.31 (4.57)
	果 糖	5.38 (6.35)	4.21 (4.58)	4.11 (4.31)	4.09 (4.14)	4.00 (4.05)	3.92 (3.99)

注):高圧滅菌前に pH5.8 に調整
ただし、() 内高圧滅菌前に pH6.8 に調整したもの

こともある⁹⁾。この場合、pH 調整は高圧滅菌前に行われているので、高圧滅菌後に pH が低下し、その植物組織の生育適性域に達したことも考えられ、純粋にブドウ糖添加の是非を判定することはできない。果糖が通常の培養で用いられない原因は、高圧滅菌前に行う pH 調整を通常の 5.5~6.0 にしても、高圧滅菌後は pH が大幅に低下するために、ほとんどの植物の生育適性範囲を超えることによるものと思われる (第1表)。

ガラクトースは一般の組織培養で用いられることは極めて少ないが、カンキツにおいて、珠心由来カルス誘導の培地に用いると、引き続いて起こる不定胚形成に効果的であった²⁾。したがって、種々の植物で不定胚形成に関する実験を行う場合、通常用いるシ ョ 糖の代わりにガラクトースを用いて検討することも必要である。ガラクトースを用いた培地では、高圧滅菌後の pH 低下の程度がシ ョ 糖よりも大きく、ブドウ糖を添加した培地と同程度であることを考慮して、高圧滅菌前の pH 調整を行う必要がある。

3 基本培地の種類及び糖添加と pH 変化

ブドウの組織培養に用いる 5 種類の基本培地に、3 種類の糖を 120g/ℓ までの濃度範囲で添加し、高圧滅菌前に pH 5.8 に調整後、高圧滅菌後の pH 変化を調査した (第2表)。

基本培地の違いは、添加する糖の種類及び濃度の

第3表 胚珠培養における培地中の糖濃度と pH 調整

糖の種類	糖の濃度 (mM)	高圧滅菌前の pH 調整	高圧滅菌後の pH
シ ョ 糖	50	5.60	5.24
	100	5.89	5.09
	200	6.07	5.07
	300	6.18	5.07
	400	6.30	5.02
ブドウ糖	50	6.21	5.07
	100	6.50	5.02
	200	6.88	4.89
	300	7.14	4.81
	400	7.41	4.79

要因と比較すると、pH 変化への影響は小さかった。したがって 1 種類の基本培地の pH 調整法を確定すれば、他の基本培地への適用が可能であると思われる。また、糖の種類の影響は、用いたすべての基本培地において、前実験と全く同じ傾向が認められた。澤ら⁹⁾のハイボネックス培地での結果と同様に、いずれの糖においても、10g/ℓ の糖添加によって大きく pH が低下するが、高濃度域の pH 低下は添加量に比べて極めて少なかった。

4 高圧滅菌前の pH 調整法

ブドウの胚珠培養には基本培地として N-69 が用いられている⁹⁾。胚発育に対する pH の影響を排除し、純粋な糖の影響を調査するために、N-69 培地を用いて高圧滅菌前の pH 調整法を検討した。内分比、外分比による pH 調整の推定値は、シ ョ 糖の 50mM

の場合の5.60から、ブドウ糖の400mMの7.41にいたる広範囲であったが、高圧滅菌後は、試験に供した10区のすべてが目標の5.00に近付いた(第3表)。

実験結果のpH値は、 5.015 ± 0.225 の範囲であり、若干の誤差を生じたが、その原因は内・外分比による推定が必ずしも正当ではなかったことによるものと思われる。正確な推定値を算定するためには、pH低下の程度を推定するデータを追加し、回帰式を作成すれば、さらに精度が向上するものと思われる。

引用文献

- 1) 原田 宏・駒嶺 穆：植物細胞組織培養(1979). 15~25.
- 2) 小林省蔵・池田 勇・中谷宗一(1984)：オレンジ (*Citrus sinensis* Osb.) 胚珠からの珠心カールの誘導と再分化植物体の均一性について. 果樹試験場報告E-5, 43~54.
- 3) Murashige, T. and F. Skoog (1962) : A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 437~497.
- 4) 能塚一徳・角 利昭・平川信之(1987)：組織培養によるブドウウイルス無病苗の大量増殖(第1報) 増殖培地中の糖が無病苗の増殖に及ぼす影響. 福岡農総試研報B-6, 23~28.
- 5) Reeves, D. W., B. D. Horton, and G. A. Couvillon (1983) : Effect of media and media pH on *in vitro* propagation of "Nemaguard" peach rootstock. *Scientia Hort.* 21, 353~357.
- 6) 澤 完・辻 伊智郎(1987)：高圧蒸気滅菌による培養液のpH変化について. 園学要旨(中・四国支部). 昭62秋, 722.
- 7) Spiegel-Roy, P., Sahar, N, Baron, J, and Lavi, U (1985) : *in vitro* culture and plant formation from grape cultivars with abortive ovules and seeds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(1), 109~112.
- 8) 高山真策・深野真弓・天羽孝子(1986)：組織培養によるユリの繁殖に関する研究(第8報) 各種ユリ属植物の球根形成：シュークロース濃度の影響. 園学要旨. 昭61春, 398~399
- 9) 寺分元一・古川康徳・稲垣 昇・前川 進(1986)：ニンニクの器官培養によるりん茎形成. 園学要旨. 昭61秋, 214~215.

Influences of Sugars on the Medium pH after Autoclaving.

NOTSUKA Kazunori, Nobuyuki HIRAKAWA and Toshiaki SUMI

Summary

Influences of the sugar addition to the tissue culture medium on the physical and chemical changes after autoclaving especially, were investigated on the pH change.

The medium solidity was fallen after autoclaving, and the fructose addition enhanced it more than another sugars. The medium coloring was proportional to the concentration of all sugars used, and the medium added by fructose was most colored. The pH of the mediums adjusted to the pH of 5.8 were lowered inverse proportion ally to the sugar concentrations after autoclaving.

Among the basal mediums, the difference in the degree of the pH lowering in medium added by sugars was very slight. In the low concentration of the sugars, the degree of the pH lowering was very great.

The mediums of same pH and different sugar concentration were attained by adjusting pH twice before autoclaving and the investigation of the pH changes in several sugar concentrations after autoclaving.