

# 組織培養によるブルーベリーの耐酸性機構の解明

(課題番号 06660024)

平成6, 7年度科学研究費補助金  
(一般研究C) 研究成果報告書

平成8年3月

研究代表者 壽松木 章  
(岩手大学農学部)

## はしがき

本研究は平成6，7年度科学研究費補助金（一般研究C）の援助を受けて行われたものである。

本研究の遂行にあたって，青葉幸二教授（果樹園芸学）には有益なご指導とご助言を賜った。田鎖 寿技官には材料植物の培養等にご協力頂いた。また，学部学生の前澤美樹さんと三浦哲人君にはアルミニウム，ポリフェノール等の分析の一部を分担して頂いた。さらに三浦哲人君には修士課程の研究の一部として根の蛍光染色観察法を分担して頂いた。これらの方々に対し，深謝致します。

## 研究組織

研究代表者：壽松木 章（岩手大学農学部助教授）

研究分担者：なし

## 研究経費

平成6年度：1100千円

平成7年度：600千円

## 研究発表（口頭発表）

1. 壽松木 章・三浦哲人・前澤美樹・青葉幸二（1995）ブルーベリーの好酸性に関する研究（第1報）樹体中のAl，Fe，Mn及びポリフェノール含量との関係 園芸学会雑誌64別2：198-199.

# 研究成果

## 1. 緒 言

ブルーベリー (*Vaccinium* spp.) はツツジ科スノキ属に属するアメリカ原産の小果樹で、日本に導入されたのは1950年代である(岩垣ら, 1984)。農家に普及してからはまだ20年足らずで、農林統計による全国栽培面積も約140 haの小規模果樹である。しかし、近年、食生活の多様化に伴いその消費量は増加しており、今後も需用の拡大が予想されている。そのためには我が国に適したブルーベリー栽培法の確立が求められているが、栽培技術の確立には至っていない。

その理由の一つとして、ブルーベリーの土壌酸度に対する特異的反応がある。すなわち果樹は一般に土壌pH 6.0~6.5で生育が良好であるのに対し、ブルーベリーはpH 4~5の酸性土壌でないと良好な生育ができない(Eck, 1988)といわれている。日本の土壌は未墾地では酸性土壌が多いが、既墾地は土壌改良によりpH 6.0を超えていることが多く、そのような既墾地に植栽する場合には、土壌pHが障害となり栽培に失敗する事例がある。そのためブルーベリーの耐酸性機構を解明することはブルーベリーの栽培法の確立において重要な事項となっている。一方では、近い将来予想される世界的な食糧不足に対応するため、未開発地の酸性土壌に適応できる耐酸性作物の育成が重要な課題となっている。

一般に、植物が酸性土壌で生育不良になる主な原因は、土壌の酸性化に伴い可溶化する $Al^{3+}$ の過剰障害である。酸性を好む植物はこの $Al^{3+}$ を無毒化する機構が働いていると考えられ、多くの仮説が提唱されている(日土肥学会編, 1994)。好酸性のブルーベリーについてもなんらかの耐性機構が関与していると思われるが、その報告は見当たらない。

耐酸性機構を研究するに当たって、ほ場試験では土壌条件や気象条件などの変動により要因解析が複雑になるため、本研究では、耐酸性機構を解析する材料として組織培養植物体に着目した。小島ら(1991)はニンジンの細胞培養系を利用して、低リン酸植物体の作出に成功しており、培養植物体の利用は有効な手段である。

本研究は(1)ほ場でのブルーベリーの $Al$ 吸収の実態、(2)培養シュートを用いた $Al$ 耐性の解析及び(3)ブルーベリーの細胞培養系の確立と培養細胞の $Al$ 耐性の解析について実施した。

## II. ほ場におけるブルーベリーのアルミニウム吸収の実態

ブルーベリーは酸性土壌で生育が良好になることが知られているが、Alの吸収との関係については記述されていない。水耕栽培でAlが少量存在すると生育が良好になった(玉田, 1991)とする報告もあるが、好酸性との関連では論じられていない。同じ好酸性植物である茶樹は葉中のポリフェノール含量が高く、耐酸性機構に関与していることが示唆されている(小西・宮木, 1984)。そこで、まず、ほ場におけるブルーベリー樹体中のAl含量及びFe, Mn, ポリフェノール含量との関連について検討した。

### 材料及び方法

本学果樹園に植栽している成木のハイブッシュ・ブルーベリーの中から‘Rancocas’, ‘Weymouth’, ‘Blueray’, ‘Pemberton’, ‘Coville’及び‘Darrow’の6品種を供試樹とした。各供試樹の新梢中央葉を5月から10月までの間に5回採取し、分析に供した。採取した葉は洗浄後、一部を70℃で通風乾燥し、粉碎した後、その0.5gを磁性の蒸発皿にとり、500℃の電気炉で灰化した。灰化した試料を1N塩酸5mlで溶解した後、純水で50mlに定量し、Al, Fe, Mnの測定に用いた。Alはアルミノン法で、Fe, Mnは原子吸光法で測定した。

全ポリフェノール含量は、洗浄した葉2g新鮮重を細断し、80%エタノールで抽出、摩細後、同エタノールで100mlに定量した液について、Folin-Dennis法でクロロゲン酸を標準物として測定した。またポリフェノール組成は、80%エタノール抽出液20mlを減圧濃縮後、少量の純水で溶解し、分液ロートに流しこみ、酢酸で酸性にした後、酢酸エチルで2回抽出した。分取した酢酸エチル層を減圧濃縮後、1mlのメタノールで溶解した液について高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。HPLCの測定条件は、カラム; ODS-C18, カラム温度; 40℃, 移動層; アセトニトリル: 酢酸: 水 = 12: 0.5: 87.5, 流量; 1ml/min, 検出器; U.V 280nm, で行った。ポリフェノール組成は7月の試料についてのみ測定した。

次に同じ果樹園から、‘Jersey’の幼樹1樹を落葉直前(10月中旬)に掘り取り、地下部の土壌を十分水洗いした後、新梢、葉、細根に分け、それぞれの部位について同様の成分を測定した。

### 結果及び考察

葉中のAl, Fe, Mnおよび全ポリフェノール含量の変化を表1に示し

た。A l 含量は生育後半から落葉期に高まる傾向がみられたが、品種間差が大きく判然としなかった。品種間差は5月の新葉で最も大きく‘Rancocas’の46.6ppmから‘Coville’の158.3ppmまで3倍の差があったのに対し、7月では78.2~118.4ppm(1.5倍)、10月では83.3~157.9ppm(1.9倍)と生育後半に小さくなった。A l 含量が90~120ppmで、新葉よりも古い葉で高かった今回の調査結果は、Korcak(1988)のA l 水準を変えた砂耕試験結果の、A l 含量が新葉で66~92ppm、古葉で103~190ppmと同様の傾向であった。なお、本学果樹園の可溶性A l 含量は40mg/100g乾土である。

表1 葉中のA l, F e, M n 及びポリフェノール含量の経時変化

品 種	A l 含有率 (ppm)					F e 含有率 (ppm)				
	5/19	6/28	7/19	9/12	10/18	5/19	6/28	7/19	9/12	10/18
Rancocas	46.6	78.1	117.2	82.3	109.5	62.2	73.2	97.6	47.0	56.2
Weymouth	62.1	110.9	108.0	126.4	83.3	61.3	70.8	85.2	65.0	53.0
Blueray	148.7	75.1	87.3	96.6	157.5	67.4	83.8	94.4	46.1	51.0
Pemberton	91.2	108.1	118.4	76.4	157.9	68.9	89.0	107.6	46.6	64.3
Coville	158.3	82.8	78.2	113.5	122.8	77.9	95.1	95.7	54.0	63.6
Darrow	90.7	81.5	79.4	118.6	143.7	75.8	82.0	97.4	48.8	60.8
平均	99.6	89.4	98.1	102.3	129.1	68.9	82.3	96.3	51.3	58.2

品 種	M n 含有率 (ppm)					ポリフェノール含量 (mg/gdw)				
	5/19	6/28	7/19	9/12	10/18	5/19	6/28	7/19	9/12	10/18
Rancocas	136.6	120.9	166.4	187.7	211.8	145.5	142.9	181.3	141.7	118.6
Weymouth	139.4	180.5	211.2	189.2	180.8	144.2	132.3	109.4	143.2	146.7
Blueray	257.5	162.9	189.4	219.8	229.8	131.9	97.8	118.0	103.3	108.8
Pemberton	157.6	170.8	177.0	197.4	230.7	120.0	111.4	132.9	105.7	113.6
Coville	122.0	176.6	189.8	219.7	281.7	110.6	117.0	118.2	98.7	119.5
Darrow	96.4	174.6	166.9	168.0	195.5	130.3	134.4	168.7	159.4	132.5
平均	151.6	164.4	183.5	197.0	221.7	130.4	122.6	138.1	125.3	123.3

A l 以外の成分では、M n は A l と同様、生育後半に高まる傾向がみられたのに対し、F e はそれらとは逆の傾向がうかがえた。また、品種間差も小さかった。

全ポリフェノール含量は7月にやや高かったものの、生育期間中の変動は

比較的小さかった。ポリフェノール組成については図1に代表的なクロマトグラフを示したが、全期間を通じてカテキンが最も多かった。その全ポリフェノールにおける割合は表2の通りで、47.3~89.4%であった。

次に 'Jersey' の部位別含量の測定結果を表3に示した。A1は新梢葉中で75.8ppm、新梢茎中で43.5ppmであるのに対し、細根中には1,048.5ppmと高濃度に蓄積していた。好酸性の茶は地上部にA1を蓄積する(小西・宮木, 1984)が、同じ好酸性といわれるブルーベリーは地下部に蓄積し、地上部にはそれほど移行しないことが認められた。FeはA1と同じく細根中の含量が高かったが、Mnは地上部よりは低かった。ポリフェノール含量は新梢葉には179.8mg/gdwと多かったが、細根中には32.0mg/gdwと少なく、A1とは逆の傾向であった。

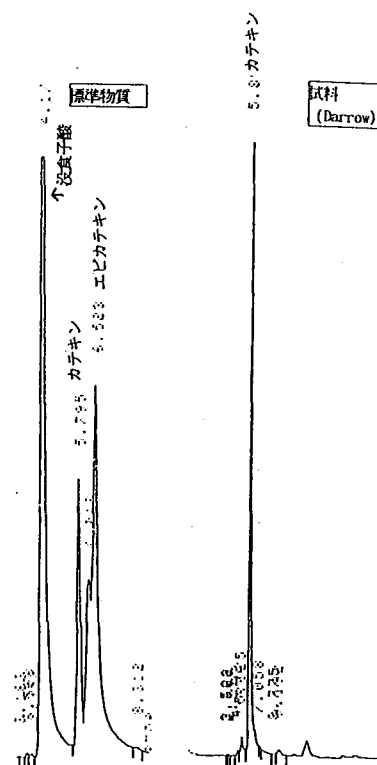
表2 葉中の全ポリフェノール含量に占めるカテキン含量の割合

品 種	全ポリフェノール(A) mg/gfw	カテキン(B) mg/gfw	(B)/(A)*100 (%)
Rancocas	64.76	30.52	47.13
Weymouth	39.07	34.94	89.44
Blueray	38.20	31.03	81.33
Pemberton	51.50	38.21	74.19
Coville	39.28	30.59	77.86
Darrow	61.80	36.45	58.97
平 均	49.10	33.62	71.49

一般に酸性土壌中のA1障害は根に現われるが、耐酸性の強い植物はクエン酸などキレート物質の放出(Miyakasa et al., 1991), などの機構により根の成長を防御しているが、その統一的な機構はいまだ未解明である。ブルーベリーの細根にもかなりのA1が集積していることから、なんらかの防御機構が存在するものと思われ、それらの解明が必要である。

表3 'Jersey' の部位別 Al, Fe, Mn 及び  
ポリフェノール含量 (10月17日)

部 位	Al ppm	Fe ppm	Mn ppm	ポリフェノール mg/gdw
新梢葉	75.8	53.7	339.7	179.8
新梢莖	43.5	47.0	194.1	69.5
細 根	1048.5	934.3	185.6	32.0



第1図 葉中ポリフェノールのHPLCによる  
クロマトグラフ

### III. In vitro 培養シュートの成長に対する培地中 Al 濃度および pH の影響

当研究室では、以前からブルーベリーのミクロ繁殖法を手掛けており、いくつかの品種で茎頂培養に成功し(石原ら, 1992), 現在も培養シュートを継代している。前記の様に, Al による酸性障害は根に現われるが, 実際のは場で根を採取して検討することは土壌の付着, 土壌微生物の影響, サンプルリング誤差等の問題が大きく, これまでの多くの研究は水耕栽培や幼植物で行われている。筆者らは実験材料として, 培養シュートを用いることを考えた。その理由は, 無菌的に実験できること, 発根させずにシュートのみでも, また発根させてインタクトな植物体としても実験できることで根の存在機能をより検討しやすいためである。

#### 1. 培地 pH の影響

##### 材料および方法

当研究室で継代培養しているハイブッシュブルーベリー 'Berkeley' のシ

シュートを供試材料とした。シュートの継代培養は石原ら(1992)がブルーベリー用に確立したVa-3培地で連続明条件(38 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )下で行っており、本実験には継代5代目以降のシュートを使用した。なお、Va-3培地にはA1は含まれていない。

処理は、培地組成をそのままにpHのみを5段階に変化させた。すなわち、オートクレーブ前のpHを3.5, 4.2, 5.0, 5.5, 6.5に調整した。pHはオートクレーブにより変化するが、3.5, 4.2はほぼそのまま、5.0以上の培地はいずれも0.5程度低下した。調整した培地に、継代培養しているシュートを2~3節に切断し、1管びんに2片ずつ移植した。各処理1回目の処理は7管びんで行ったが、2回目は各処理区の生存シュートを継代したので、管びん数は2~5と少なくなった。培養期間は、1回目が103日、2回目が55日である。各培養終了後、10mm以上に再生したシュートの数と伸長量を測定した。さらに、1回目の培養シュートについてポリフェノール含量を測定した。

### 結果および考察

シュートの成長は表4に示した。1回目のシュートの再生はpH3.5から5.5までみられたが、5.0で再生率が悪かった。pH5.0は通常の継代を行っているpHでありこの生育不良はpH以外の影響と考えられる。pH6.5はシュートが再生しなかった。低pH培地の再生シュートは分化数が多く、茎長の短いシュートが多い傾向がみられた。これはpHの影響により植物ホルモン活性が

表4 In vitro 培養シュートの成長に対する培地pHの影響

処理区 (pH)	シュート再生管数 (本)		再生シュートの 本数(本/管) シュート長(mm)			
	継代回数	①	②	①	②	①
3.5	4/7	3/5	25.0	7.3	11.1	16.7
4.2	5/7	3/3	18.0	3.0	10.4	17.1
5.0	1/7	2/2	-	5.0	-	17.6
5.5	5/7	0/2	11.0	-	15.8	-
6.5	0/7	-	-	-	-	-

異なっていたことが考えられる。2回目の培養ではpH3.5から5.0まで再生がみら



れたが、処理間差は認められなかった。ただし、1回目の培養と比較すると分化本数が少なくシュート長が長い傾向がみられた。シュート中のポリフェノール含量は、低pHのシュートよりもpH5.5のシュートで高かった(表5)が、これはpH5.5のシュートの成長量が多いことが影響しているものと思われる。

本実験結果から、培養シュートの成長に対しては低pHの影響は認められず、耐酸性の高いことが示された。高pH側はpH6.5の培地で再成長ができなかったことから、なんらかの生育阻害が作用していると思われる。

表5 シュート中のポリフェノール含量

処理区	全ポリフェノール (mg/gfw)	分画組成 (mg/gfw)		
		ガリク酸	カテキン	エピカテキン
3.5	9.72	0.05	0.65	1.54
4.2	8.09	0.03	0.53	1.00
5.5	23.63	0.09	1.47	3.46

## 2. 培地中のAl濃度の影響

### 材料および方法

材料は1.と同じ‘Berkeley’の継代シュートを用いた。培地は、Alとの結合を抑えるためにリン酸濃度を2mMから0.1mMに減量したVa-3培地(pH5.0)に、Al濃度が0.5mM, 1.0mM, 2.0mMになるように100mMAl<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>をオートクレーブ後に加えて調整した。培地を管びんに10mlずつ分注し、各処理10管びん作製した。各管びんに2~3節を含む長さに切断した‘Berkeley’のシュートを2片ずつ移植し、培養室で2ヶ月間培養した。培養収集後、成長量を測定するとともにシュート中のAl含量を測定した。Alの測定はI.の方法と同様に行った。

### 結果および考察

シュートの再生がみられた管数は、0.5mM区は6本であったが、他は3, 4

本と少なく、A1添加濃度が高くなるにつれ生育が抑制された（表6）。平均シュート数は3処理区とも約2本と少なく、シュート長も11~12mmと短かった。A1無添加区を設定していないため正確な比較ができないが、本実験時の生育が全体的に不良であったことも生育に影響していた可能性がある。しかし、新鮮重や乾物重はA1濃度が高くなるにつれて低下していることから、生育不良は処理の影響によるところも大きいと思われる。シュート中のA1含量率は処理とともに増加し、その濃度はほ場植栽樹の新梢葉中の濃度に比べて2~4倍高まっていた。この結果は根が存在しないと茎葉中に蓄積することを示すとともに根が地上部へのA1転流を抑制していることを示唆している。好酸性植物の茶樹は地下部と同様地上部にもかなりの量のA1を蓄積するが、ブルーベリーのA1蓄積はそれとは異なっており、耐性機構が異なるものと考えられた。

表6 in vitro 培養シュートの成長およびA1吸収に対する  
添加A1濃度の影響

添加A1 濃度 mM	シュート再生管数 本	平均再生シュート		全シュート		A1含有 率 ppm
		数 本/管	長 mm	新鮮重 mg	乾燥重 mg	
0.5	6/10	1.8	12.0	630	110	110
1.0	3/10	2.0	12.8	300	60	290
2.0	4/10	1.8	11.1	170	50	470

#### IV. FDA-P1染色法による根細胞の活性測定とpHおよびA1 ストレスの判定

酸性土壌における植物の生育障害は、直接土壌と接する根の養分吸収阻害や成長阻害として現われる。根の活性測定度を測定する方法には、TTC法、 $\alpha$ -ナフチルアミン法、などがあるが、測定部位やサンプリングにより結果が異なり信頼度に欠ける。何よりも根端の分裂組織や伸長組織の活性を直接測定していないおそれがある。本実験では根端組織細胞を直接顕微鏡で観察する方法として、FDA-P1染色法を利用した。

本法の原理の概略は以下の通りである。FDA (Fluorescein diacetate) は脂溶性化合物で、細胞膜を透過して細胞質に到達することができる。これが細胞内の種々のエステラーゼにより酢酸部分が切断されてFluoresceinを生成し、強い蛍光(緑色)を発する。エステラーゼ活性の有無を細胞の生死と定義すると蛍光を発する細胞は生きているということができる。また生成したFluoresceinは、FDAに比較して細胞膜を透過しにくいいため、その細胞内保持性は細胞膜の損傷の程度を大まかに示す。PI (Propidium iodide) は、正常な生体膜を透過しにくい、膜が損傷していると容易に透過する。細胞内に入ったPIは、核のDNAやRNAの高次構造中に取り込まれ、はじめて蛍光(赤色)を示すようになる。またFluoresceinとPIはともに490nm付近で励起でき、Fluoresceinは緑色、PIは赤色と発光が異なるため、同時に染色、観察が可能である。すなわち、緑色が強く発光している細胞は活力が強く、赤色が強い細胞は損傷の大きい細胞といえる。

## 材料および方法

観察する根の調整は次の様にして行った。当研究室で継代培養しているブルーベリー 'Berkeley' のシュートを1cm以上の長さで切り取り、IBA溶液に数分間浸漬した後、蒸留水と中央に小孔を開けたろ紙床(石原ら, 1988)を入れた管びんのろ紙上に挿した。以上の操作は無菌的に行った。約2週間後、蒸留水培地中のシュート末端から発根がみられるので、適当に伸長した根を処理に供した。処理後の根を先端から適当な長さで切り取り、10ppm FDAと12 ppm PI混合液に5分間浸漬し、蒸留水で洗浄した後、蛍光顕微鏡で観察した。観察は励起波長490nm、発光波長520nm以上で行った。

処理は、①pHの変化、②Al濃度の変化の2処理を行った。pH処理は酢酸緩衝液でpH3.5、4.5及び6.0の3区を設け、処理時間を2、4、6時間とした。Al処理はpH4.5の酢酸緩衝液に100mM  $Al_2(SO_4)_3$ 溶液を1、10mM濃度になるように加えた。Al無添加を対照区とした。

## 結果および考察

結果は表7、8及び写真で示した(写真1~8)。pH処理で、写真撮影した根の本数を染色状態から緑色のものを健全、赤色のものを損傷大、僅かに赤色のものを損傷小とした。pH処理では処理前の根の観察でも損傷大の根が見られたことは、発根培地中もしくは取り出す時に損傷したものと思われる。各pH処理とも、こうした最初から損傷している根の混入が考えられたが、それでも6時間後でも緑色の活性のある根が半数以上見られたことか

ら、3.5から6.0まではそれほど大きな違いがないことを示すものである。一般的にはpH3.5では根細胞が影響を受けると考えられるが、ブルーベリー根では活性を有していたことから、耐酸性が強いことが認められた。しかし、pH6.0でも活性が見られたことはそれほど培地pHに影響されないことも示しているものと思われる。

表7 FDA-PI染色法による根細胞活性の判定  
-培地pHが根端細胞の生死に及ぼす影響-

処理pH	処理時間 (時間)	根端の損傷程度(本数)		
		健全	損傷大	損傷小
無処理	0	5	1	0
3.5	2	4	1	1
	4	5	1	0
	6	4	2	1
4.5	2	2	4	0
	4	3	4	0
	6	4	2	1
6.0	2	6	2	0
	4	6	0	0
	6	3	1	2

A1処理(表8)では、活性の強い根が最も多くみられた処理区はA11mM区で、0mM区は観察した半数以上の根が損傷を示す赤色であった。またA110mM区の根は何れも赤色で、観察した全ての根が損傷を受けていた。無処理区で損傷を受けている根が多く見られたことは、処理の影響よりは最初から損傷を受けていたと考える方が妥当であるが、この区に使用した根のみが損傷を多く受けていたことも考えがたく、なお検討を要する。ただし普通の植物では十分障害を受ける濃度のA11mM処理でも活性のある根が多かったことは、ブルーベリー根がA1耐性を持つことを示すものである。A110mM区では2時間でも全ての観察根が損傷を受けており、A1の濃度障害とみられた。本実験のA11mM区はⅢ-2.の培養シュートでの実験や後述する

細胞培養での実験結果から考察すると十分生育阻害を生じるA1濃度と思われるが、それにもかかわらず根細胞は健全な活性を示していた。この理由は今後検討しなければならないが、アルミニウムストレスを受けたアルファルファの根は、ストレスによって伸長を停止した根端部分の細胞にも強い生存活性が認められ、生存しながら伸長できない状態である（横田、未発表）という仮説を支持するような結果であった。

以上の結果は、A1の好酸性性質はpH耐性とA1耐性の両機構が関与していることを示唆するが、この根細胞活性の観察と耐性機構との関連をさらに検討する必要がある。

**表 8 FDA-P1染色法による根細胞活性の判定  
- 培地A1濃度が根端細胞の生死に及ぼす影響**

処理 pH	処理時間 (時間)	根端の損傷程度 (本数)		
		健全	損傷大	損傷小
無処理	0	6	0	0
0	2	2	5	1
	4	3	3	2
	6	0	6	0
1	2	5	0	1
	4	5	0	1
	6	4	1	1
10	2	0	4	2
	4	0	6	0
	6	0	6	0

## V. ブルーベリーの培養細胞の増殖に対する培地 pH および A1 濃度の影響

ほ場の植物体および培養植物における耐酸性を検討したが、細胞レベルでの耐酸性を検討するには培養細胞を利用することが有効な手法である。しかし、ブルーベリーの細胞培養系は確立されておらず、本研究室でも行っていない。そこでまず、カルスの振とう培養から細胞培養系を確立することを検討し、次いで、その培養細胞を用いて培地の pH および A1 濃度の影響を検討した。

### 1. 細胞培養系の確立

#### 培養細胞の調整

本学果樹園に植栽しているハイブッシュブルーベリー 'Rancocas' の幼果を1994年6月に採取し、滅菌後、2～3mmの厚さに輪切りして Va-3 培地（カルス誘導用, 2ip 12mg/l）に置床した。暗条件で約1ヶ月間培養し、カルスが誘導されていた果肉を Va-3 の液体培地に移植し、100rpmで振とう培養した。約2ヶ月間培養した後、カルスが増殖していることを確認したので、増殖したカルス細胞のみを液体培地に移植し、これを培養初代とした。以後、1～1.5ヶ月ごとに継代を行い実験に供した。

#### (実験1) 増殖培地の検討

##### 材料および方法

Va-3 はブルーベリーの茎頂培養用に確立された培地で、イオン濃度が20mg当量と比較的薄い濃度の培地である。そこで細胞培養により適した培地を検討するため、Va-3 培地とそれよりイオン濃度の高い Va-2 培地（イオン濃度35mg当量）を用いて細胞増殖量を比較検討した。100mlの三角フラスコに培地40mlを入れオートクレーブした後、継代培養している培養細胞を培養液とともに懸濁状態で5ml移植し、45日間培養後細胞量を測定した。各区4反復で行った。

##### 結果および考察

表9に結果を示した。Va-2 培地の細胞増殖量は、Va-3 培地の36%増で明らかに Va-2 培地が適していた。培養終了後の培地 pH は5.0と5.1で両培地に大差ないことから、増殖量の違いは培地のイオン濃度の違いによるものと思われた。

## (実験2) 成長曲線の測定

### 材料および方法

実験1で増殖量の優れたVa-2培地を供試して、成長曲線を測定した。Va-2培地50mlを入れた100ml容の三角フラスコを16個作製し、オートクレーブした後、継代培養している培養細胞懸濁液を5ml移植し、1.5ヶ月間培養した。約1週間ごとに2個ずつ増殖量と培地のpHを測定した。

表9 培養細胞の成長に対する培地組成の影響

培地	細胞量(ml)	培養後の培地pH
Va-3	0.97±0.13	5.01±0.05
Va-2	1.27±0.12	5.14±0.04

### 結果および考察

成長曲線の結果を図2に、培地pHの変化を図3に示した。細胞の増殖は1週間の誘導期間を経過した後、増殖し始め7週目まで増加し続けた。まだ定常期には達していないようであったが、予備実験の結果では2ヶ月目には細胞増殖がみられなかったことから、まもなく定常期になるものと思われる。タバコやダイズの細胞培養では10日間程度で定常期に至るが、それらに比較するとブルーベリーでは細胞増殖が遅いことが認められた。培地のpHは培養開始から収量時まで漸減傾向であったが、大きな変化はみられなかった。培地中の窒素源がNH<sub>4</sub>-NとNO<sub>3</sub>-Nの場合、NH<sub>4</sub>-Nが最初に吸収されるため、一度急激に低下しその後次第に高くなり一定になる(Wink, 1994)が、本実験ではその現象がみられなかった。ブルーベリーの細胞増殖がそれほど急激でないことがその一因として考えられるが、詳細は今後検討する必要がある。

以上の実験1, 2の結果から、以後の実験は基本培地をVa-2培地とし、培養期間は1~1.5ヶ月間で行うことにした。

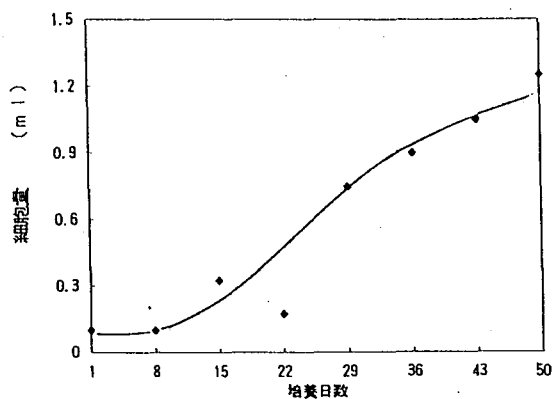


図2 細胞成長曲線

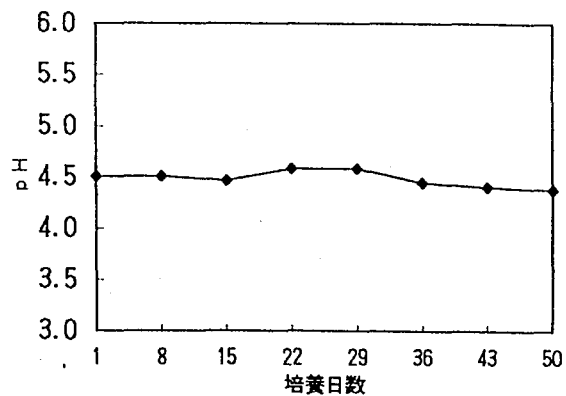


図3 培地 pH の変化

## 2. 培地 pH の影響

### 材料および方法

‘Rancocas’ の10継代め以降の培養細胞を供試材料とし、pHを変えた Va-2 培地で実験した。pHの調整は酢酸ナトリウムで行ったが、pH6.5区はやや沈澱が生じた。3週間培養後、細胞量と培地 pH を測定した。

### 結果および考察

結果を表10に示した。最も増殖の良かったのはオートクレーブ前 pH 5.24 で、それより低い pH でも、高い pH でも増殖が悪かった。pH 5.24 は通常継代培養している時の pH であり、それ以外の pH で増殖は悪かったことは、細胞の環境変化によることも考えられるが、耐酸性がそれほど強くないことを示唆するものであろう。

表 10 培地 pH が細胞増殖量に及ぼす影響

処 理	pH	細胞量	培地 pH
A. C. 前	後	(ml)	
3.70	3.67	0.20 <sup>a</sup>	4.24 <sup>a</sup>
5.24	4.69	0.52 <sup>b</sup>	4.26 <sup>a</sup>
6.44	5.91	0.31 <sup>a</sup>	6.31 <sup>b</sup>

注) 培養期間は3週間  
異符号間に有意差あり。



### 3. 培地 A 1 濃度の影響

#### 材料および方法

‘Rancocas’ の10継代め以降の培養細胞を供試材料とし、V a - 2 培地を基本培地としたが、リン酸と A 1 の結合による A 1 の不溶化を抑えるため培地のリン酸濃度を 5 mM から 0.5 mM に減量した培地を作製し、以下の実験を行った。

(実験 1) 100  $\mu$ M 濃度の A 1 の有無が細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。A 1 は、基本培地 50 ml を入れオートクレーブで滅菌した 100 ml の三角フラスコに、別に滅菌した 10 mM の  $Al_2(SO_4)_3$  を 0.5 ml 添加し、直に継代細胞を懸濁状態で 5 ml を移植した。A 1 無添加を対照区とし、各区 5 フラスコで行った。実験は 2 回繰り返した。培養は 2 ~ 3 週間行い、培養後の細胞量と培地 pH を測定した。

(実験 2) 低濃度の A 1 の影響を検討するために、1  $\mu$ M A 1, 10  $\mu$ M A 1 および無処理の 3 処理区を設けた。A 1 は 1 mM の  $Al_2(SO_4)_3$  を使用し、添加方法は実験 1 と同様の方法で行った。

#### 結果および考察

実験 1 の結果は表 11 に、実験 2 の結果は表 12 に示した。実験 1, 2 を通じて、A 1 無添加の培地では継代培養と同様の増殖をしていた。ただし、継代の齢によって増殖量に差がみられた。特に、実験 2 の 2 回目の実験は増殖が

表 1 1 培地への A 1 添加が細胞増殖量および培地 pH に及ぼす影響

処理区 実験	細胞量 (ml)		培地 pH	
	①	②	①	②
- A 1	1.48 $\pm$ 0.68	1.53 $\pm$ 0.20	5.39 $\pm$ 0.11	4.48 $\pm$ 0.07
+ A 1	0.18 $\pm$ 0.08	0.10 $\pm$ 0.00	3.61 $\pm$ 0.06	4.72 $\pm$ 0.16
t 検定	**	**	**	**

注) 実験①は30日間培養, ②は21日間培養.  
A 1 濃度は0.1 mM.

悪く、齢を経るにつれて分裂能力が低下する傾向がみられた。A 1 の添加は、 $100\mu\text{M}$ では2回の実験ともほとんど増殖せず、細胞の活性も弱かった（写真9, 10）。しかし、 $10\mu\text{M}$ と $1\mu\text{M}$ では無処理区と有意差があったのは $10\mu\text{M}$ の1回のみで、他は有意差がなかった。 $10\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ とも細胞の外観や活性には異常はみられなかった。このことは、ブルーベリーの細胞レベルでのA 1耐性は $10\mu\text{M}\sim 100\mu\text{M}$ の間にあることを示している。この値は、一般にA 1耐性を検討する濃度と大きく変わらないことから、細胞レベルではブルーベリーは特にA 1耐性が強いとはいえないようである。

表 1 2 培地へのA 1添加が細胞増殖量および培地p Hに及ぼす影響

処理区 A 1濃度 ( $\mu\text{M}$ )	細胞量 (ml)		培地 p H	
	①	②	①	②
0	1.05 <sup>b</sup>	0.40 <sup>a</sup>	4.53 <sup>a</sup>	4.34 <sup>a</sup>
1.0	1.00 <sup>b</sup>	0.35 <sup>a</sup>	4.48 <sup>a</sup>	4.39 <sup>a</sup>
10.0	0.93 <sup>a</sup>	0.45 <sup>a</sup>	4.48 <sup>a</sup>	4.34 <sup>a</sup>

注) 異符号間に有意差あり。

## VI. 摘要

ブルーベリーは好酸性植物として知られるが、その耐酸性機構は明らかでない。本研究は、*in vitro*培養植物体を中心に、pHおよび酸性土壌で活性化するアルミニウム(A1)の影響について検討した。得られた結果は以下の通りである。

1. ほ場におけるブルーベリー樹のA1含量は茎葉部よりも根部で多く、地下部に集積されていた。ポリフェノール含量は、逆に茎葉中に多くA1の結合体とは考え難かった。

2. 培養シュートの成長に対する培地pHの影響は、2継代にわたり培養したが、オートクレーブ前pHが3.5から6.5の範囲では、pH6.5以外のいずれの培地でも成長量に大差なかった。ただし、pH6.5の培地では生育が抑制された。一方、培地中のA1は添加濃度が高くなるにつれて生育を抑制し、シュート中のA1含量も高まった。このことは、根がないと茎葉中にA1が吸収され生育を抑制することを示し、根が地上部へのA1の移動を抑制していることを示唆している。

3. 発根培養シュートの根端細胞の活性に対するpHおよびA1濃度の影響をFDA-PI染色により検討した結果、pH3.5の酸性緩衝液に6時間浸漬しても細胞活性は高かった。しかし、pH6.0でも同様に活性は高く、シュートのみの生育反応とは異なった。A1濃度に対する反応は、1mM処理では根端細胞は健全に生きており、耐性がみられたものの、10mMでは全て損傷していた。

4. 培養細胞の成長に対しては、pH3.5の培地では生育が抑制され、細胞レベルでは耐酸性は見られなかった。A1に対しては100 $\mu$ Mでは生育が抑制されたが、10 $\mu$ M以下では正常な成長を示したことから、A1耐性の濃度は10~100 $\mu$ Mの間にあると思われた。

## 引用文献

- Eck, P. Blueberry science. 1988. p. 91-119. Rutgers Univ. Press. New Brunswick and London.
- 石原愛也・田鎖 寿・小林俊仁・横山順一・鈴木雅子・大沼欣生・佐藤美智雄・佐藤修. 1992. ハイブッシュブルーベリーのマイクロ繁殖における茎頂の培養確立について. 園学雑. 61(別2): 100-101.
- 岩垣駛夫・石川駿二. 1984. ブルーベリーの栽培. p. 2-3. 誠文堂新光社. 東京.
- 小島邦彦・小山博之・山谷知行. 1991. 細胞工学的手法による低リン酸耐性植物の育成と形質発現. 日産科学振興財団研究報告書. 14: 301-307.
- 小西茂毅・宮本倉文. 1984. 茶樹の生育に対するアルミニウムの促進効果とそのリン酸吸収特性. 日土肥誌. 55: 29-35.
- Korcak, R. F. 1988. Response of blueberry species to excessive manganese. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113:189-193.
- Miyasaka, S. C., J. G. Buta, R. K. Howell and C. D. Foy. 1991. Mechanism of Aluminum Tolerance in Snapbeans Root Exudation of Citric Acid. Plant Physiol. 737-743.
- 日本土壤肥料学会編. 1994. 低pH土壌と植物. p99-121. 博友社. 東京.
- Rowland, L. J. and E. L. Ogden. 1992. Use of cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf section of highbush blueberry. Hort-Science. 27:1127-1129.
- 玉田孝人. 1991. 水耕における鉄, マンガン, アルミニウム施用量の差異がラビットアイブルーベリーの生長及び葉中無機成分に及ぼす影響. 園学雑. 60(別2). 94-95.

FDA-PI 蛍光染色法による根端細胞および培養細胞の活性判定写真

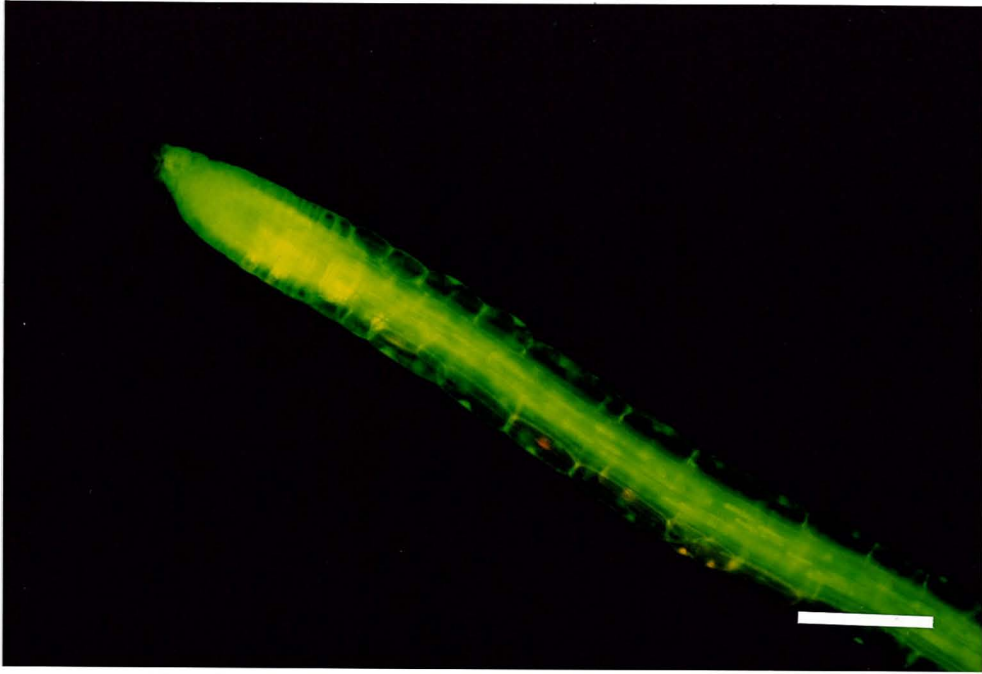


写真-1 in vitro 培養発根シュートの根の先端部分 (バー: 100  $\mu\text{m}$ )  
全体が緑色で、活性ある根.

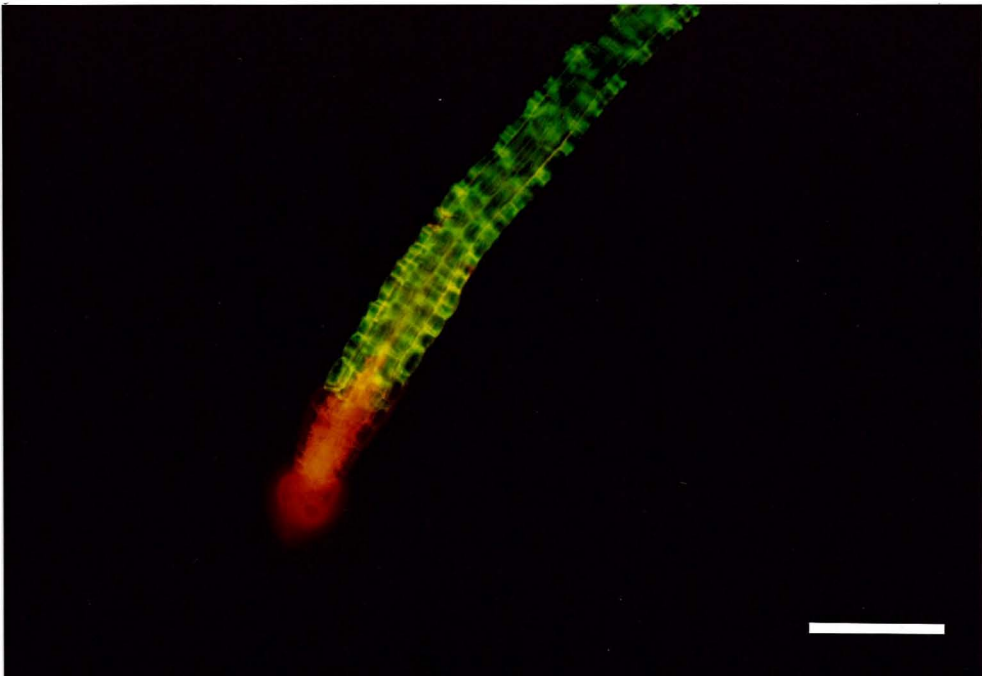


写真-2 in vitro 培養発根シュートの根の先端部分 (バー: 100  $\mu\text{m}$ )  
先端部分が赤色で、損傷している根.

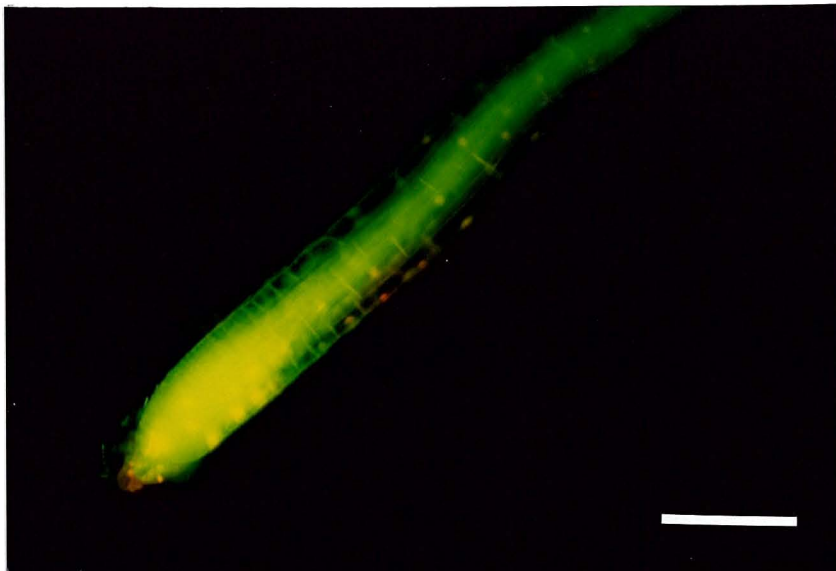


写真3 pH 3.5

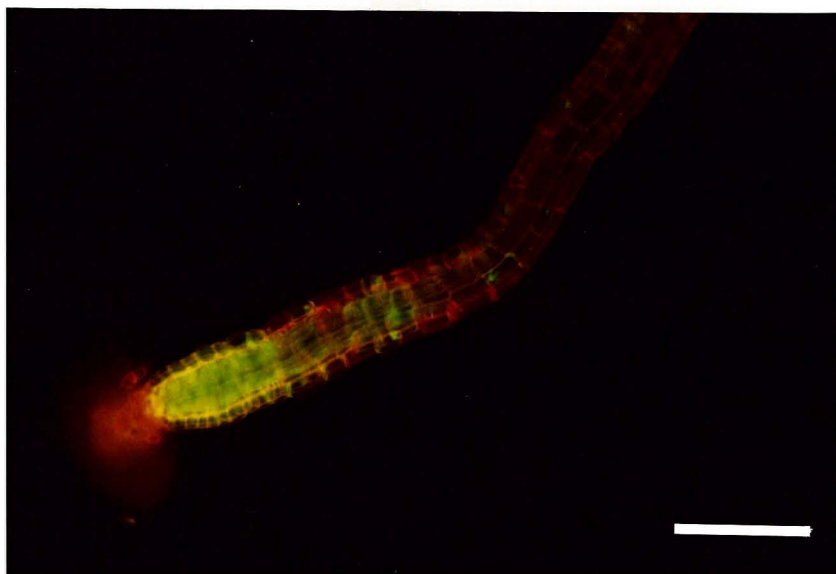


写真4 pH 4.5

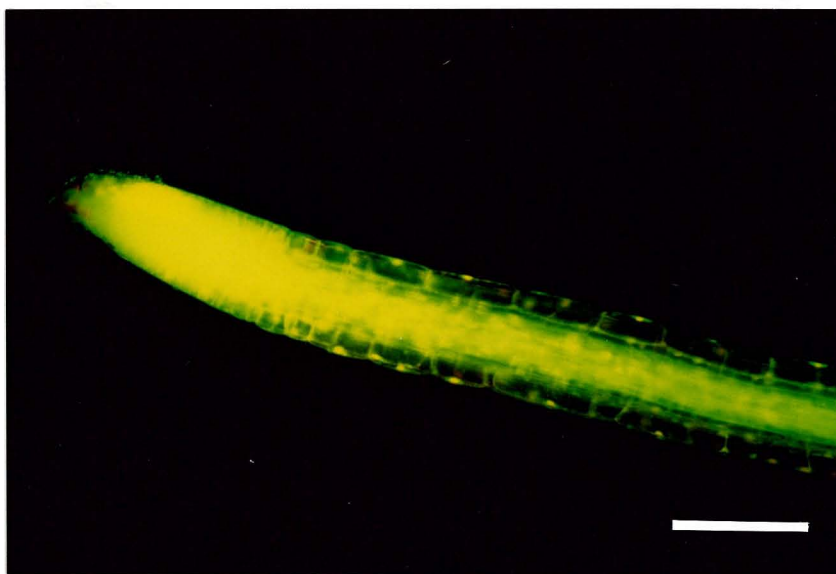


写真5 pH 6.0

写真3～5 根細胞の活性に対する培地pHの影響  
(処理4時間後の根端部分, バー: 100 $\mu$ m)

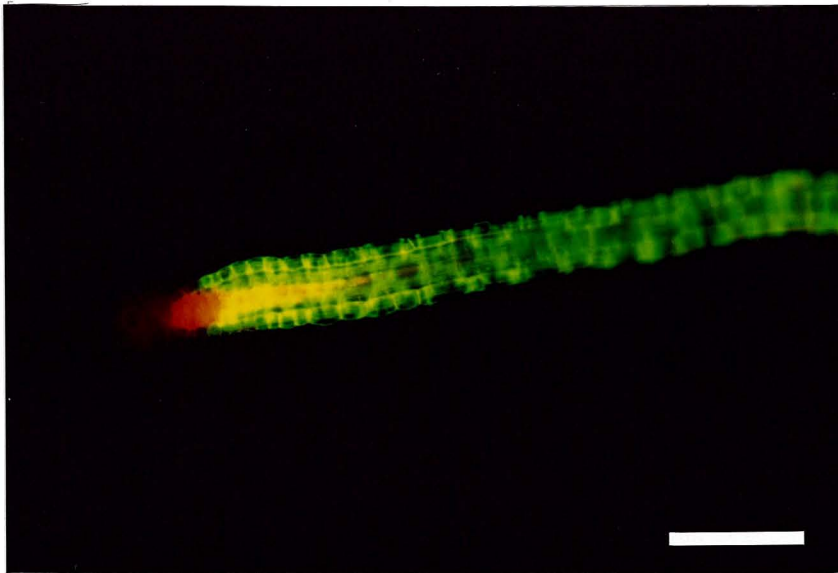


写真6 A I 0 mM

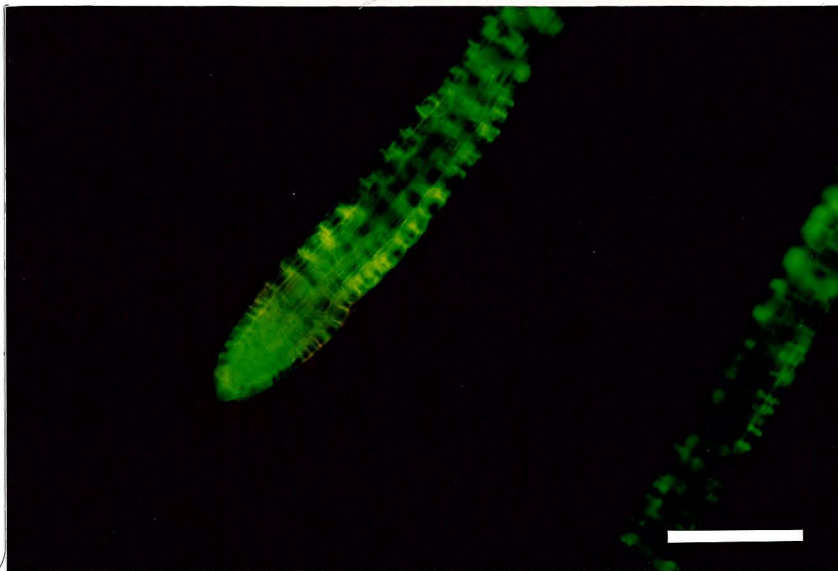


写真7 A I 1 mM

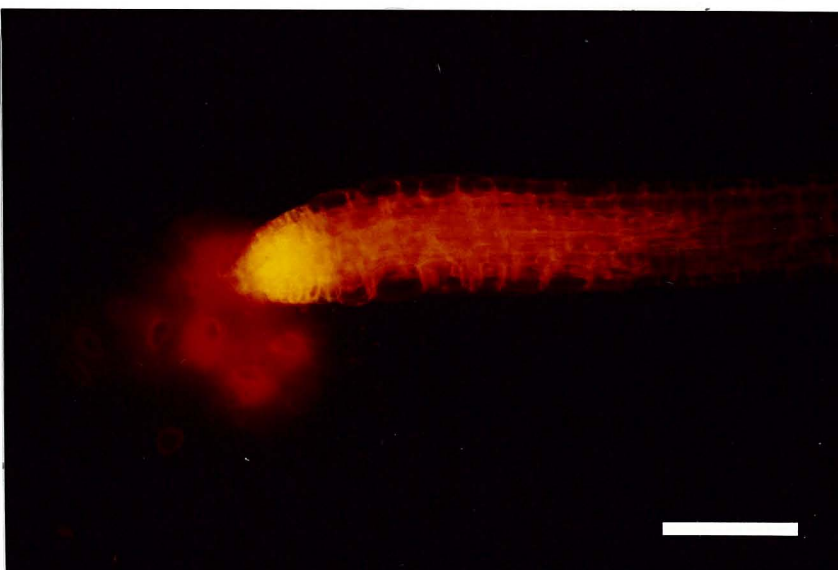


写真8 A I 10 mM

写真6～8 根細胞の活性に対する培地A I濃度の影響  
(処理4時間後の根端部分, バー:100 $\mu$ m)



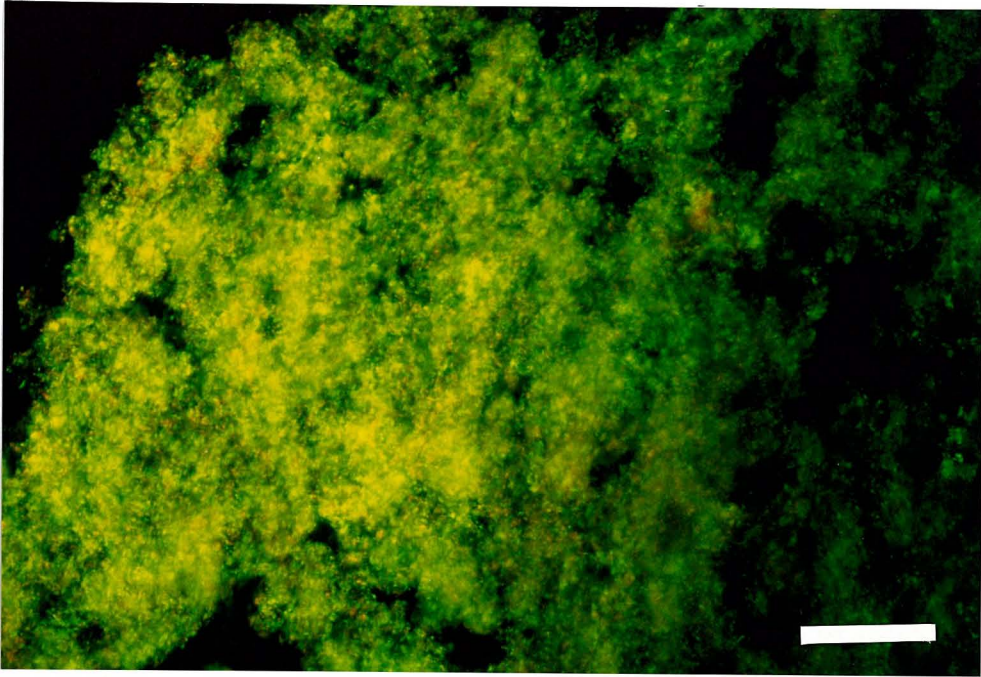


写真-9 培養細胞の活性に対するA I濃度の影響  
A I 無添加 (バー: 100  $\mu$ m)

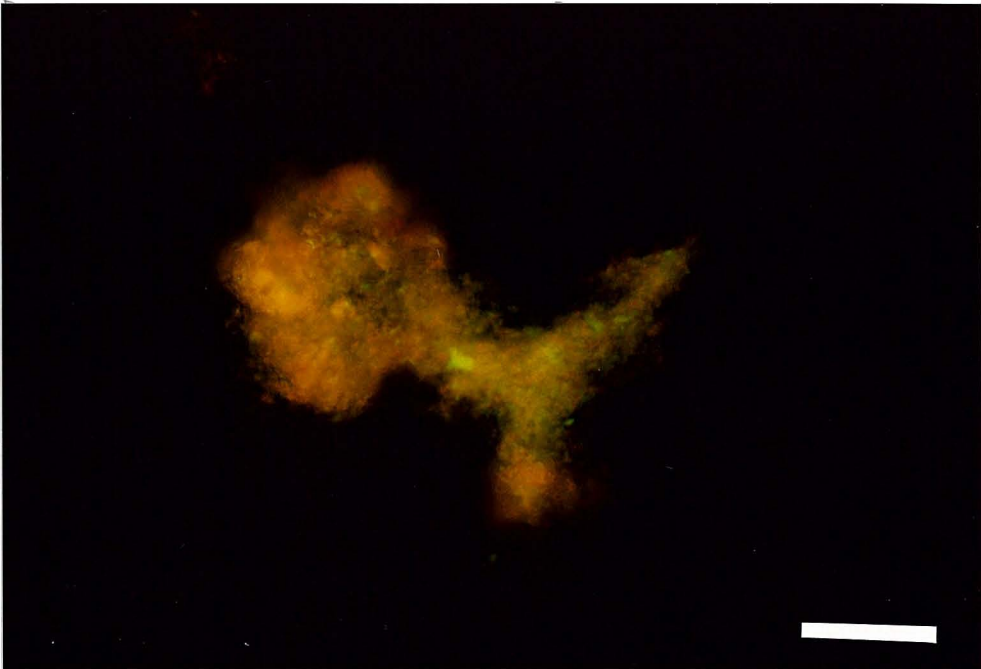


写真-10 培養細胞の活性に対するA I濃度の影響  
A I 0.1 mM 添加 (バー: 100  $\mu$ m)