

リゾメーターによる「根の生長生理学」学生実験

谷本英一¹⁾・渡邊 準¹⁾・井上忠男²⁾・高橋勝機³⁾・山本良一⁴⁾

1) 名古屋市立大学・2) 太陽精機(株)・3) 内田洋行(株)・4) 帝塚山短期大学

I はじめに

植物の生長を継続的に測定し、記録する作業は長時間にわたることが多く、かなりの労力を必要とする。このため、生長を自動的に測定・記録する各種の方法が開発されてきた¹⁾。近年、我々はコンピュータの普及に合わせて、マイクロプロセッサを活用した新しい原理による生長測定方法を開発し、根の生長生理学の研究に活用してきた^{2) - 5)}。この装置は、16本の根の生長を5分間隔で長時間にわたって記録でき、この間、根は水に接触するだけで、根の先端部への機械的な接触がないため、測定を繰り返すことによる根への傷害はほとんどない。このような装置の機能を活用できれば、植物材料の取り扱いに習熟していない学生でも、限られた時間内に生長生理学の実験を行える可能性が考えられた。

一方、バイオテクノロジーや環境教育の重要性が高まる中で、植物ホルモンや植物の生長調節に関する教育の重要性も増してきている。しかし、植物ホルモンや環境要因による植物の生長制御に関する学生実験のメニューは比較的少なく、伸長生長を肉眼で計測する実験⁶⁾など古くからあるものに限られている。植物の生長を肉眼で計測する方法ではゆっくりとした植物の生長を長時間にわたって測定することが必要であり、限られた時間内に生長現象を観察することは困難であった。また、短時間内に微小な生長を顕微鏡で観察する方法が古くから用いられてきたが、茎や根の切片を繰り返し顕微鏡で観察すると、植物材料をピンセットなどで痛めることが多く、安定した結果を得るにはある程度の習熟を必要とした。そこで我々は、近年のマイクロコンピュータの普及と教育現場への導入にあわせ、マイクロプロセッサを内蔵した植物の伸長生長測定装置¹⁻³⁾を製作し、学生実験に応用することを試みた。今回、学生実験用に開発した生長測定装置・リゾメーター(TRZ-8)は、8本の根の伸長生長を同時に計測できる。

本稿では、この装置を用いて「根の生長に対する植物ホルモン・オーキシンや水素イオン濃度(pH)の影響を調べる学生実験」の実施例を紹介する。尚この装置による根の生長の測定方法については「根ハンドブック」⁷⁾にも簡単に紹介されている。

II 材料と方法

1. 根の伸長測定用の材料：よくそろった均一な根を短時間に得るため、アラスカエンドウやアズキを用いる。アズキまたはエンドウの種子を水洗・殺菌の後流水中で吸水させ、濡れた脱脂綿上で発根させる。アズキは種皮の色が溶出してしまうまで十分に水洗した後に脱脂綿上にひろげる。2日後、まっすぐな根を選び実験に用いる。

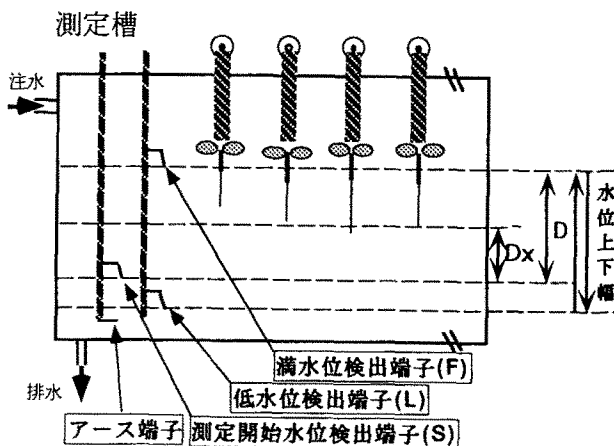
特製のフレームを用いて湿室容器中で垂直に発根させると、まっすぐな根を効率よく発生させることができる4)。トウモロコシの種子根も同様に用いることができる。また、レタスの種子を垂直に立てた濾紙に付着させて細い根を垂直に育てると精度の高い実験材料が得られる2-3)。

2. 根を処理する溶液: 1mM程度のリン酸緩衝液 (pH 6.0) または、これに $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , KCl を加えたもの(それぞれ最終濃度1mM)を基礎培養液とする。基礎培養液は、1mM程度以上の電解質を含む水耕栽培液であればよいので市販の水耕栽培液を用いてもよい。

オーキシン溶液とpH調節用塩酸溶液: 1mMのインドール酢酸(IAA)を最終濃度が1-10 μM になるように基礎培養液に加える。pH変化の影響を見る実験では、約1Nの塩酸をpH3-4になるように基礎培養液に加える。

3. 測定の原理(図1): 水平断面積が一定の測定槽に、処理液を一定の速度で注入すると水面は一定速度で上昇する。水面が検出端子(L, S, F)および8つの植物試料の下端と接触した瞬間をマイクロプロセッサが電気的に検出する。あらかじめ底面にあるL端子の位置まで培養液を入れておき、測定をスタートさせると、水面がSに達した瞬間から経過時間をミリ秒単位で計り始め、各試料の下端に接触した時間を順次自動的に記録し、最後にFに達した時間を記録して注水は止まる。Sから各試料までの垂直距離は図1式(1)によって算出できる。これは、水面が一定速度で上昇するとき、各試料の先端とSとの垂直距離が各試料の先端が水面と接触するまでの時間と滴水までの時間との比例配分式によって算

出できるという単純な原理を利用したものである。一定時間(通常約10分)試料を処理液中に保った後、排水して水面をLまで下げ、再び計測を繰り返す。注水始める位置(L)と計時測定を始める位置(S)を離してあるのは、注水ポンプが運転を開始後しばらくしてから運転速度が一定になった後に測定を開始するためである。試料の伸長は各測定回毎の D_x の減少として図1式(2)で表される。学生実習用モデル(TRZ-8)では、各測定回毎に T_{Dx} と T_D をボタン操作で読み出して集計表に記録しておき、測定間隔の待ち時間を利用して計算する。研究者用モデル(TRZ-16)ではこれらの計算やグラフ化はすべてパソコンで操作できる。



$$D_x = D \cdot (T_{Dx} / T_D) \text{ ----- (1)}$$

D_x =測定開始端子から各根の先端までの垂直距離
 D =測定開始端子から満水位検出端子までの垂直距離
 T_{Dx} =水位が D_x だけ上昇するのに要した時間
 T_D =水位が D だけ上昇するのに要した時間

$D_x(t_0), D_x(t_1), D_x(t_2), \dots$ を計測すると
 時刻 t_0 から t_1 までの伸長生長 $\cdot L(t_0 - t_1)$ は
 $L(t_0 - t_1) = D_x(t_0) - D_x(t_1) \text{ ---- (2)}$

図1 TRZ-8による伸長計測の原理

4. 生長計測 植物生長測定装置 (リゾメータ TRZ-8・内田洋行) の貯水容器に処理液を入れ、注水排水を繰り返してポンプの注水速度を調整する。根または根の切片の基部を濾紙を介して試料クリップで挟み、8本の測定試料を処理液を満たした測定槽内に垂直に固定する。TRZ-8の運転マニュアルに従って10分間隔で計測を繰り返す。初めの処理液で7-8回計測した後、処理液にIAAまたはHCl液を加え、さらに5-6回計測を続ける。毎回各試料の値をボタン操作で読み出し、前項の原理に基づいて、電卓またはパソコンで計算して伸長生長のグラフを描く。10分毎の計算はかなり忙しい作業であるが、2、3人のグループ実験で、共同作業をすれば電卓の計算で伸長生長を確認しながら実験を進めることができる。ノート型のパソコンを使い表計算処理すると作業は楽になる。

III 実験結果と考察

学生が計測した実験データの一例を図2と図3に示す。この例では、エンドウの根の伸長に対するIAAの抑制効果 (図2) とpH低下による酸成長現象 (図3) が示されている。グラフの各点は8本の根の平均値と標準誤差を示している。平均値の上下動や標準誤差は大きい。IAA添加後の根の伸長阻害とpH低下後の根の伸長の一過的促進の過程を短時間で見る事ができる。この装置は、「植物試料を最初にセットすれば、植物に触れることなく10分以内の間隔で繰り返し計測することができるので、植物試料の取り扱いに習熟を必要としない」という特徴がある。しかし、実際に学生に計測させたデータを見ると、計測値のばらつきが大きく、伸長生長の時間経過がグラフに書き表せない場合もあった。主な原因は、植物材料の取り扱い方と装置の注水速度の制御方法に問題があったと思われる。教養課程1年生の学生実験では、ほとんどの学生は初めて根を扱うため、根端部を損傷したり乾燥してしまった根をそのまま使った例が多くみられた。現在、全ての班でもっと誤差の少ないグラフが得られる様これらの点の指導方法を改善中である。

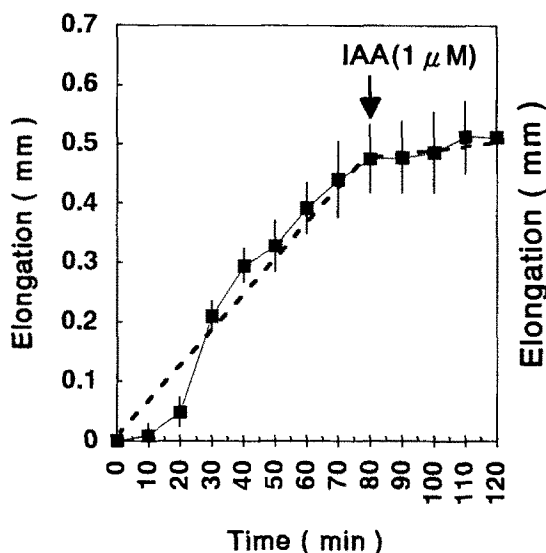


図2 Effect of IAA on the elongation of intact pea roots. (Means of 8 roots with SE)

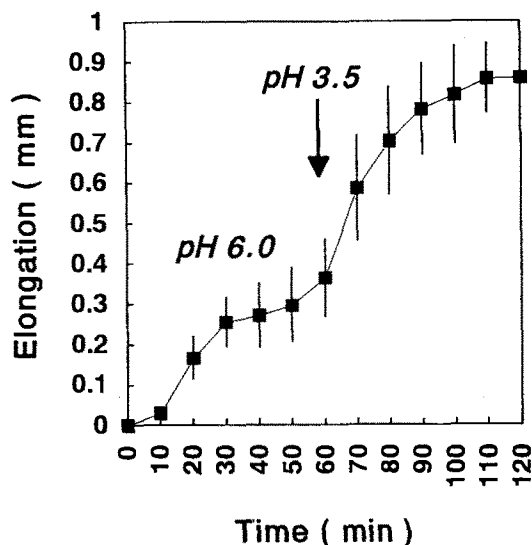


図3 Effect of pH on the elongation of apical 10mm segments of pea roots. (Means of 8 segments with SE)

本学の学生実習では、根以外に茎の伸長実験も行った。エンドウやアズキの胚軸の切片を使って、IAAによる伸長生長の促進作用を観察する実験を実施したが、図4に示すようにIAAの伸長促進効果を短時間に観察することができた。同じ濃度のIAAが茎と根でそれぞれ促進と抑制の効果を示すという対比は、根の屈曲などの成長生理現象の理解にも役立つので、生長生理学の基礎実験としては面白いテーマであると思われる。また、IAA以外の植物ホルモンや生長調節物質、あるいは光や培養液組成などの変化に対する根の生長反応を、この装置を利用して観察することもできるので、これ以外の新しい実験テーマも検討中である。

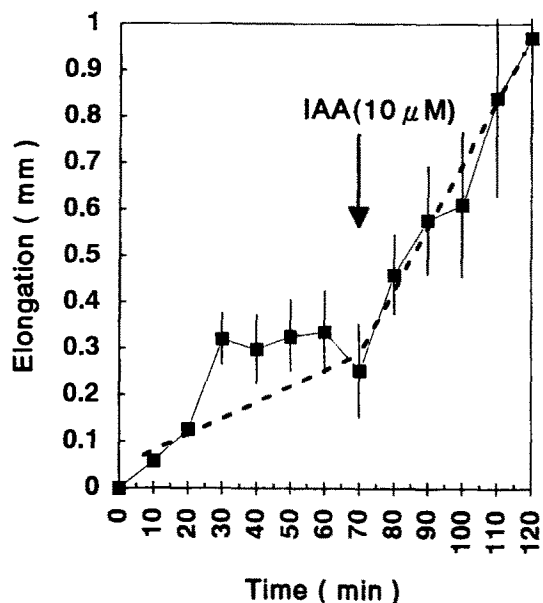


図4 Effect of IAA on the elongation of pea stem segments. Stem segments, 10-15 mm long, were excised from the elongation zone of etiolated 3rd internode and vertically held in the rhizometer up-side down. (Means of 8 segments with SE)

文献

- 1) 谷本英一：『生長測定法：細胞，茎，幼葉鞘（子葉鞘）および根の伸長生長測定法』実験生物学講座15 植物生理学 [I]，237-252頁，丸善株式会社（1983）。
- 2) Tanimoto, E. and Watanabe, J. (1986) Automated recording of lettuce root elongation as affected by auxin and acid pH in a new rhizometer with minimum mechanical contact to roots. *Plant Cell Physiol.* 27, 1475-1487.
- 3) Tanimoto, E. (1987) Gibberellin-dependent root elongation in *Lactuca sativa*: Recovery from growth retardant-suppressed elongation with thickening by low concentration of GA₃. *Plant Cell Physiol.* 28, 963-973.
- 4) Tanimoto, E. (1988) Gibberellin regulation of root growth with change in galactose content of cell walls in *Pisum sativum*.. *Plant Cell Physiol.* 29, 269-280.
- 5) Tanimoto, E., Scott, T. and Masuda, Y. (1989) Inhibition of acid-enhanced elongation of *Zea mays* root segments by galactose. *Plant Physiol.* 90, 440-444.
- 6) 福田重夫，新津恒良，佐藤やす子，田口茂敏，渡辺宗孝（1982） 生物科学実験法，p46-47，東京教学社，東京
- 7) 谷本英一：「生長の連続記録」根ハンドブック，205-206頁，根研究会（1994）。