

クヌギ種子の胚培養による幼植物体の増殖

宮崎県林業試験場 深江 伸男

1. はじめに

クヌギはサシキによる栄養繁殖が困難であり、また接木不親和性により、優良個体の増殖ができない。一方、採種園造成に際しては、結実不良、受粉様式の未解明といった問題がある。そこで、本試験では、優良種苗の安定的供給を図るため、胚の培養からの大量増殖法を検討したので、その結果を報告する。

本試験を行うにあたり、ご指導いただいた林業試験場造林部遺伝育種科長斉藤明博士、同造林部組織培養研究室主任研究官佐藤享氏に対し厚くお礼申し上げる。なお、本報告は、地域バイオテクノロジー研究開発促進事業「組織培養による優良個体の増殖技術の開発」で実施したものをとりまとめたものである。

2. 材料と方法

1986年10月下旬に林業試験場内のクヌギ林から落下種子を採取し、ポリ袋に入れ密封し5℃で貯蔵した。

11月上旬に、胚の培養に供するため、貯蔵した種子を取り出し水洗いした後、70%アルコールに20分間浸漬して表面殺菌し、クリーンベンチ内の滅菌濾紙上で風乾した。種子はせん定鉄で下半分を除去した後、果皮と種皮を取り除き、さらに上胚軸、胚軸および幼根を含んだ子葉を径4~6mmの方形に切断し、芽の出る部分を横にして、あらかじめ用意した試験管内の培養用寒天培地に置床した。置床は、各培地に20個ずつ行った。

培養2か月後、1個の胚から1~10数個伸びて来た上胚軸を15~25mmの長さに切断し、試験管内の上胚軸培養用寒天培地に、約5mm深さに無菌的にさしつけた。上胚軸のさしつけは、各培地に10本ずつ行った。

また、同様の胚培養で伸びて来た上胚軸を20~25mmの長さに切断し、試験管内の発根用寒天培地に約5mm深さに無菌的にさしつけた。上胚軸のさしつけは、各培地に10~16本行った。

本試験で用いた培地は表-1に示すとおりである。胚培養には、WS¹⁾の修正培地を基本培地に、一定量

表-1 培養に用いた培地組成

成分	培地	修正WSM (mg/ℓ)	修正WPM (mg/ℓ)
NH ₄ NO ₃		680*	800*
KNO ₃		170	
KCl		140	
K ₂ SO ₄			990
CaCl ₂ ·2H ₂ O			96
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O		611.6	1,112*
MgSO ₄ ·7H ₂ O		1,564.5	740*
KH ₂ PO ₄			170
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O		45	
FeSO ₄ ·7H ₂ O			27.8
Na ₂ -EDTA			37.3
Na·Fe-EDTA		5.5	
MnSO ₄ ·4H ₂ O		14	29.4
Na ₂ SO ₄		425	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		5.7	8.6
CuSO ₄ ·5H ₂ O			0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O			0.25
KI		1.6	
H ₃ BO ₃		3.2	6.2
ニコチン酸			0.5
ピリドキシン HCl		0.1	0.5
チアミン HCl			1
ミオイノシトール		10	100
グリシン			2
麦芽糖		20,000	20,000
寒天		8,000	6,500

注) *印は標準培地の修正点

のα-ナフチル酢酸(NAA)と濃度を変えたベンジルアミノプリン(BAP)を加えた4種の培地(表-2)を用いた。また、上胚軸の増殖培養と発根培養は、WPMの修正培地²⁾を基本培地に、前者はNAAとB

Nobuo FUKAE (Miyazaki Pref. Forest Exp. Stn., Miyazaki 880-21)

In vitro plantlet propagation from embryo culture of kunugi (*Quercus acutissima*) seed

APの添加濃度の組合せで4種の培地(表-3)を用い、後者はβ-インドール酪酸(IBA)の添加濃度を変えた4種の培地(表-4)を用いた。

培地はすべてpH5.8に調整し、それぞれ18×180mmの試験管に約20mlずつ分注し、121℃で20分間高圧滅菌した。

材料は、1日16時間約5,000luxの蛍光灯照明下、温度約25℃の恒温条件下で培養した。

3. 結果と考察

1) 胚の培養による無菌芽ばえの増殖

落下種子のためか、雑菌により39%が汚染された。また、採取直後で種子の成熟期間が短いことに原因しているのか、培養60日目でも未発芽が37%みられた。表-2はBAPの濃度の違いによる平均芽ばえ数と芽の伸長を示したものである。芽ばえ数の最も多かったのは、2.0mg/l添加した培地で最高18個であったが、BAPを添加したいずれの培地でも、種子により芽ばえ数の著しく少ないものがあり、また発芽が不揃いで、したがって濃度の違いによる芽ばえ数の差は明確でなかった。芽の伸長は2.0, 4.0mg/lの培地が良く、逆に根は伸長が抑制され、肥大化現象がみられた。

表-2 クヌギ種子の胚の培養による芽ばえ数と芽の伸長(培養60日)

NAA (mg/l)	0.2	0.2	0.2	0.2
BAP (mg/l)	0	1.0	2.0	4.0
芽ばえ数(本)	1	9	9	8
芽の伸長(mm)	70	8	13	12

2) 上胚軸培養によるシュートの増殖

胚培養により伸びて来た上胚軸をNAAとBAPの濃度別に50日間培養した結果は表-3のとおりである。

表-3 クヌギ芽ばえの上胚軸培養によるシュート数とシュート長(培養50日)

NAA (mg/l)	0	0	0.05	0.05
BAP (mg/l)	0	0.1	0.1	1.0
シュート数(本)	1	4	4	10
シュート長(mm)	5	20	20	10

シュート数はNAA 0.05mg/lとBAP 1.0mg/lを添加した培地で、最高15本、平均10本と最も多く発生したが、BAP 0.1mg/lの培地に比べシュートの伸びは悪く、したがって、BAPは添加濃度が高いほどシュートの増加に有効で、逆にシュートの伸長は抑制される傾向がみられた。また、ホルモン欠の培地で、全体の80%が発根した。

3) 無菌芽ばえの発根培養による幼植物体の増殖
胚の培養により伸びて来た上胚軸をIBAの濃度別に35日間培養した結果は表-4に示したとおりである。

表-4 クヌギ芽ばえの上胚軸の培養による発根率、芽の伸長、根数および根長(培養35日)

IBA (mg/l)	0	0.5	1.0	3.0
発根率(%)	40	58	80	89
芽の伸長(mm)	2	3	2	2
根数(本)	1.2	2.6	1.9	4.4
根長(mm)	25	25	25	13

発根はIBAを添加しない培地でも認められたが、IBAの添加により発根率はさらに高められ、3.0mg/l添加した培地は89%の最も高い発根率を示した。また、この培地は根数も平均4.4本と最も多かったが、根の伸長は他の培地に比べ悪かった。さしつけ後の芽の伸びは、いずれの培地でも不良で、ほとんど上長生長はみられなかった。この幼植物体は継続して培養した結果、約3か月目頃から徐々に枯死していった。

4. おわりに

今回、クヌギ種子の胚の培養により多数の無菌芽ばえが得られ、さらに、その上胚軸を培養することにより多数のシュートを発生させることができた。また、発根培養により、根の出た幼植物体を作り出すことができ、胚培養からの大量増殖の手がかりが得られた。

胚の培養については、今後、種子の殺虫、貯蔵法、雑菌類の除去法、芽の分化と生長促進法、順化苗に適した幼植物体の増殖法など、さらに検討が必要である。

引用文献

- (1) WOLTER, K. and SKOOG, F. : Nutritional requirements of Fraxinus callus cultures. Am. J. Bot. 53 : 263~269, 1966
- (2) 図解バイオテクノロジー, pp. 153~154, 農業図書, 東京, 1986