

材木の組織培養に関する研究 (II)

クヌギの不定胚増殖における各種添加物質の影響一

大分県林業試験場 佐々木義則
九州大学薬学部 正山 征洋

1. はじめに

クヌギを含めたコナラ属の組織培養研究においては、腋芽、頂芽、種子胚などの器官を外植体に用い、直接植物体を得る方法が大部分である^{1~6)}。一方、不特定の組織を用い、不定胚や不定芽を誘導し、これらを経由して植物体を得る方法もある⁷⁾。筆者らはクヌギ種子胚の初代培養の過程で不定胚を誘導することに成功した⁵⁾。これらの不定胚を用い、増殖、分化、植物体再生などの条件を検討し、その結果の一部はすでに報告した⁵⁾。今回は、不定胚をさらに効率よく大量に増やすための培地条件を究明する目的で、各種添加物質の影響を調べた。

本研究を遂行するにあたり、有益な御助言をいたがいた森林総合研究所・遺伝科長の齊藤明博士に謝意を表す。なお、本研究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」の一環として実施したものである。

2. 材料および方法

実験に用いた不定胚は、種子胚の初代培養時(1986年に、2個体(A, B)から発生したもので、継代培養中の二次不定胚を使用した(詳細は筆者らの報告⁵⁾を参照)。

基本培地はWPM⁴⁾で、支持剤にはゼラライト(3g/ℓ)を用いた。シュークロース濃度は、実験-Iの他はすべて40g/ℓとした。BAPはいずれの実験においても0.5mg/ℓとした。培養条件は25±0.5°C, 4,000ルクス, 明期16時間, 暗期8時間とした。培養用容器には、実験-I, IVは40×130mmの試験管, 実験-II, IIIは100mlの三角フラスコを使用した。各実験とも、1区あたりの容器数は10本とし、容器あたりの不定胚の置床数は、試験管では3個, 三角フラスコでは5個とした。1988年3月~7月に実験を行った。

(I) シュークロース濃度の影響(実験-I)

培養期間は10週間であり、シュークロース濃度は、

10, 20, 40, 80g/ℓの4区とした。

(2) L-アスパラギン酸およびL-グルタミン酸の影響(実験-II)

培養期間は7週間であり、L-アスパラギン酸(0, 10mg/ℓの2区)とL-グルタミン酸(0, 10mg/ℓの2区)を組み合わせた4区の添加培地に置床した。

(3) L-プロリンおよびウラシルの影響(実験-III)

培養期間は10週間とした。L-プロリン(0, 10mg/ℓの2区)とウラシル(0, 10mg/ℓの2区)を組み合わせた4区の添加培地に置床した。

(4) クロレラエキス濃度の影響(実験-IV)

培養期間は10週間であった。クロレラエキス(商品名:クロレラエキス20)の濃度は、0, 1, 2ml/ℓの3区とした。

3. 結果

クヌギ不定胚増殖において、シュークロース濃度の影響を調べた結果が表-1である。不定胚の増殖は両個体とも高濃度区で促進される傾向が認められた。しかし、80g/ℓ区では不定胚に形態異常が観察され、重量も低下する傾向が認められた。一方、10g/ℓの低濃度区においては分化したものが多数みられた(写真-1)。

アスパラギン酸およびグルタミン酸を添加した結果を表-2に示す。個体Aでは無添加区より促進されるようであったが、処理間差はほとんどなかった。個体Bにおいても効果が判然としなかったが、両物質の併用処理区ではやや効果的である傾向が認められた。

プロリンおよびウラシルの影響を調べた結果が表-3である。個体Aではウラシルがやや有効である傾向が認められたが、個体Bにおいてはプロリン、ウラシルともに効果がなかった。

クロレラエキス濃度別の試験管あたりの平均不定胚重量は、無添加区が0.678g, 1ml/ℓ区が0.677g, 2ml/ℓ区が0.988gであり、1ml/ℓの低濃度区ではほとんど効果が認められなかったが、2ml/ℓ区においては不定胚増殖がかなり促進されることが明らかとなった。

表一1 クヌギ不定胚増殖における
シュクロース濃度の影響

個体	糖濃度 (g/l)	不定胚の重量 (g/試験管)			
		Max.	Min.	M.V.	S.D.
A	10	1.011	0.120	0.480	0.233
	20	2.193	0.362	1.124	0.629
	40	3.321	0.300	1.586	0.953
	80	3.490	0.228	1.645	1.011
B	10	0.871	0.142	0.476	0.289
	20	1.985	0.320	1.002	0.564
	40	2.010	0.390	1.221	0.508
	80	2.628	0.328	0.860	0.699

表一2 クヌギ不定胚増殖におけるアスパラギン酸
およびグルタミン酸の影響

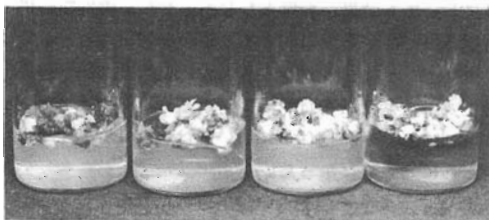
個体	濃度 (mg/l)		不定胚の重量 (g/試験管)			
	A	G	Max.	Min.	M.V.	S.D.
A	0	0	4.019	0.800	1.898	1.030
	0	10	4.085	0.437	2.102	1.212
	10	0	3.585	0.360	2.335	1.104
	10	10	4.398	0.238	2.219	1.275
B	0	0	4.722	1.245	2.866	1.130
	0	10	5.169	0.073	2.986	1.609
	10	0	4.777	0.766	2.745	1.292
	10	10	4.753	0.700	3.491	1.242

注) A: アスパラギン酸 G: グルタミン酸

表一3 クヌギ不定胚増殖におけるプロリン
およびウラシルの影響

個体	濃度 (mg/l)		不定胚の重量 (g/試験管)			
	P	U	Max.	Min.	M.V.	S.D.
A	0	0	4.997	0.297	2.751	1.605
	0	10	5.332	1.747	3.256	1.114
	10	0	4.995	0.901	2.891	1.388
	10	10	5.682	1.600	3.234	1.181
B	0	0	4.456	0.630	2.355	1.184
	0	10	3.199	0.962	2.172	0.833
	10	0	3.600	1.889	2.694	0.574
	10	10	4.195	0.754	2.217	0.985

注) P: プロリン U: ウラシル



写真一1 不定胚増殖におけるシュクロース濃度の
影響 (個体B)

(左より, 10g/l, 20g/l, 40g/l,
80g/l)

4. 考察

クヌギを含めたブナ科の種においては、不定胚に関する報告はきわめて少ない^{6,8)}。GONZALEZ et al.²⁾は Chestnut の子葉培養において不定胚を得ているが植物体再生までには至っていない。原口³⁾はクヌギの子葉を外植体とした培養により不定胚を誘導し、その不定胚から植物体を得ている。筆者ら⁵⁾はクヌギの胚培養において得られた不定胚について、増殖、分化、再生植物体の染色体観察など一連の研究を行ってきたが、これらの研究結果を実用に資するためには、不定胚の誘導、増殖、分化などについてのより詳細な条件設定が必要と考えられる。

筆者らはこれらの問題点のうち、「増殖」をとりあげ、炭水化物 (シュクロース)、アミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン)、核酸構成物質 (ウラシル)、天然抽出物 (クロレラエキス) などの各種化合物の影響を検討した。その結果、シュクロースおよびクロレラエキスが不定胚の増殖に効果的であることが明らかとなった。中でも、シュクロース濃度の影響が著しく、高濃度区 (40 g/l) では不定胚の増殖が促進され、一方、低濃度区 (10 g/l) においては増殖よりも分化のほうが促進されることがわかった。また、クロレラエキスの 2 ml/l 添加においても不定胚の増殖がかなり促進されたことから、今後さらに高濃度添加区で再検討する必要がある。アミノ酸およびウラシルの影響は、個体によっても発現が異なっており、今回の実験では判然としなかった。

不定胚は人工種子を作る際に必要であることから、今後、さらに詳細な検討を計画している。

引用文献

- (1) CHALUPA, V.: Cell and tissue culture in forestry, Vol. 3, 224~246, 1987
- (2) GONZALEZ, M. L. et al.: Sci. Hortic., 27, 97~103, 1987
- (3) 原口雅人: 日林誌, 70 (9), 411~416, 1988
- (4) LLOYD, G. et al.: Comb. Proc. Int. Plant. Soc., 30, 421~427, 1980
- (5) SASAKI, Y. et al.: J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 33 (1-2), 95~101, 1988
- (6) SCHWARZ, O. J.: Plant Growth Regulation, 6, 113~135, 1987
- (7) 竹内正幸ら (編): 新植物組織培養, 411 pp, 朝倉書店, 東京, 1979
- (8) TULECKE, W.: Cell and tissue culture in forestry, Vol. 2, 61~91, 1987