

林木の組織培養に関する研究 (Ⅲ)

— クヌギの継代培養における個体、培地組成および培養環境の影響 —

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

クヌギは挿し木などの栄養繁殖が困難であり、このことが精英樹などを増殖する際の大きな障害となっている。このため、組織培養による増殖技術の開発が急務となっており、近年、研究も活発に行われるようになってきた²⁾。従来の組織培養研究においては、培地組成が中心であり、個体および培養環境を加味した例は少ないようである³⁾。今回、筆者らは継代培養過程において、個体、培地組成、培養環境の3要因を同時にとりあげて検討した。

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。また、試薬、光質ランプなどを提供していただいた関係各位に謝意を表する。

2. 材料および方法

実験材料には、種子胚および新梢腋芽を外植体とし、継代培養中の個体別シュートを用いた。

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10g/ℓ、BAPは0.1mg/ℓとした。培養環境条件は、特定の実験を

表-1 継代培養試験における実験要因および水準

実験	要因	水 準
I	個体(A)	A ₁ , A ₂ (2個体)
	培地(B)	β-NAD (mg/ℓ), B ₁ :O, B ₂ :I, B ₃ :10, B ₄ :100
	温度(C)	C ₁ :定温 (25℃), C ₂ :変温 (27-21℃)
II	個体(A)	A ₁ , A ₂ (2個体)
	培地(B)	リフレッシュ (g/ℓ), B ₁ :O, B ₂ :0.5, B ₃ :1, B ₄ :2
	照度(C)	C ₁ :弱光 (2,000lux), C ₂ :強光 (8,000lux)
III	培地(A)	クヌギ種子抽出物(ml/ℓ), A ₁ :O, A ₂ :5, A ₃ :10, A ₄ :20
	光質(B)	B ₁ :FL40SSD, B ₂ :FL40SPG, B ₃ :FL40SN-EDL, B ₄ :FL40SSEX-N
IV	個体(A)	A ₁ , A ₂ , A ₃ (3個体)
	培地(B)	ライフライト(mg/ℓ), B ₁ :O, B ₂ :200, B ₃ :500, B ₄ :1000
	日長(C)	C ₁ :長日長 (明期16時間), C ₂ :短日長 (明期12時間)

(注) β-NAD: β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
リフレッシュ: 秋田県産の珪酸塩白土の微粉末 (天然物)
光質ランプ一般名 B₁:ハイライト, B₂:ホモルクス, B₃:リアルルクス, B₄:パルック
ライフライト: ケイ酸、微量元素を含む天然物の微粉末 (別名: 白焼土)

除いては25±1℃, 4,000ルクス, 明期16時間, 暗期8時間とした。各実験とも1区あたりの試験管数は10本前後とし、1試験管あたり2~3本の切片を置床した。培養期間は6~8週間とした。

実験要因および水準は表-1に示した。実験-Iの変温は27℃16時間, 21℃8時間とした。クヌギ種子抽出物は子葉切片200g(生重)にイオン交換水1ℓを加えて熱水抽出した。実験-IIIで使用した光質ランプはいずれも市販品である(分光特性などはNationalランプ総合カタログ'88-11を参照)。

各処理区について、シュート数、シュート長などの平均値を算出し、これらの値を用いて分散分析、水準間の検定などを行った。

3. 結果

実験-Iにおける統計分析結果を表-2に示した。A要因(個体)はいずれの項目においても有意であり個体差が著しかった。B要因(β-NAD)はシュート数のみで有意であり、その効果はB₂区(1mg/ℓ)でも顕著であった。相互作用を調べたところ、シュート数におけるA×B(個体×培地)では、A₁個体はB₂およびB₃培地、A₂個体はB₂培地のみピークが観察された。また、平均シュート長のA×C(個体×温度)においては、A₁個体は変温区、A₂個体は定温区のほうが伸長が旺盛であった。

実験-IIでの結果を表-3に示した。有意であったものはシュート数でのC要因(照度)のみであり、弱光が増加することが判明した。シュート数のA×C(個体×照度)では、A₁個体は強光で減少傾向を示すのに対し、A₂個体には照度に対する反応が認められなかった。平均シュート長のA×CではA₁個体は強光で、A₂個体は弱光で伸長が促進される傾向が認められた。

実験-IIIにおける結果を表-4に示した。A要因(培地)、B要因(光質)ともに有意でなく、効果は認めら

Yoshinori SASAKI (Ooita Pref. Forest Exp. Stn., Hita, Ooita 877-13) and Yukihiro SHOYAMA (Fac. of Pharm. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812)

Studies on tissue culture of forest trees (Ⅲ) Effects of stocks, media and environments on subculture of *Quercus acutissima*

れなかった。

実験Ⅳでの結果を表-5に示した。A要因(個体)は平均シュート長及び平均最大シュート長で有意であり、A₂個体の伸長が最も旺盛であった。B要因(培地)はいずれも有意性がなく、効果はなかった。C要因(日長)は平均シュート長および平均最大シュート長において有意であり、いずれも長日区で伸長が促進された。

4. 考察

草本類などにおいては、温度、光などの培養環境条件が増殖および分化に大きな影響を与える場合があることが報告されている⁹⁾。筆者ら³⁾もクヌギについて個体と温度、個体と糖濃度、個体とBAP濃度の関係を検討し、培地のみでなく個体及び培養環境も増殖上の重要な要因になりうることを示唆した。

今回、個体、培地および培養環境の3要因を組み合わせた実験を行い、要因および要因間の相互作用などを検討した。「個体」については、3種類の実験において要因単独または他の要因との相互作用が認められたことから、個体の影響は著しいものと考えられる。「培地」に関しては、β-NADのみに効果が認められ、全般的には影響は小さかった。「培養環境」の温度(定温、変温)では個体との相互作用が認められた。照度はシュ-

ト数に影響をおよぼしており、本数の増加には弱光が有効と考えられる。また、シュート数および平均シュート長においては照度と個体の間に相互作用が認められた。これらのことから、温度及び照度に対する要求性は個体によってかなり異なるものと推察される。光質ランプによる差異は発現しなかったことから、継代増殖培養においては光質はあまり重要ではないものと考えられる。日長はシュートの伸長に大きな影響をおよぼしており、長日長のほうが効果的であることが判明した。

以上のことから、増殖の効率化を図るためには、培地組成のみでなく、個体および培養環境も考慮する必要があると考えられる。

引用文献

- (1) LLOYD, G. et al. : Comb. Proc. Int. Plant. Soc., 30, 421~427, 1980
- (2) 最新バイオテクノロジー全書編集委員会(編): 木本植物の増殖と育種, pp.269, 農業図書, 東京, 1989
- (3) 佐々木義則ら: 日林九支研論, 41, 63~64, 1988
- (4) 竹内正幸ら(編): 新植物組織培養, pp.411, 朝倉書店, 東京, 1979

表-2 個体、培地、温度別継代培養における分散分析及び水準間の検定(実験-I)

項目	要因	有意性(F)	水準別の平均値	水準間の検定(5%水準)
平均シュート数(本/株)	A	24.93 [*]	A ₁ =1.91, A ₂ =1.57	A ₁ <A ₂
	B	20.94 [*]	B ₁ =1.45, B ₂ =2.14, B ₃ =1.81, B ₄ =1.56	B ₁ ≠B ₂ <B ₃ <B ₄
	C	3.57 ^{ns}	C ₁ =1.68, C ₂ =1.80	-
平均シュート長(cm/本)	A	37.01 [*]	A ₁ =1.31, A ₂ =1.98	A ₁ <A ₂
	B	1.15 ^{ns}	B ₁ =1.72, B ₂ =1.51, B ₃ =1.59, B ₄ =1.77	-
	C	0.45 ^{ns}	C ₁ =1.31, C ₂ =1.98	-
平均最大シュート長(cm/本)	A	22.54 [*]	A ₁ =1.74, A ₂ =2.60	A ₁ <A ₂
	B	0.39 ^{ns}	B ₁ =2.10, B ₂ =2.22, B ₃ =2.06, B ₄ =2.31	-
	C	0.24 ^{ns}	C ₁ =2.13, C ₂ =2.22	-

注) 平均シュート数のA×B, 平均シュート長のA×Cのみ5%水準で有意
* : 5%水準で有意, ** : 1%水準で有意, N.S. : 有意性なし
≠ : 有意差なし, < : 5%水準で有意差あり(以下同様)

表-3 個体、培地、照度別継代培養における分散分析及び水準間の検定(実験-II)

項目	要因	有意性(F)	水準別の平均値	水準間の検定(5%水準)
平均シュート数(本/株)	A	0.16 ^{ns}	A ₁ =1.35, A ₂ =1.33	-
	B	2.76 ^{ns}	B ₁ =1.44, B ₂ =1.23, B ₃ =1.32, B ₄ =1.39	-
	C	26.68 [*]	C ₁ =1.49, C ₂ =1.20	C ₁ <C ₂
平均シュート長(cm/本)	A	5.05 ^{ns}	A ₁ =1.30, A ₂ =1.46	-
	B	2.91 ^{ns}	B ₁ =1.20, B ₂ =1.44, B ₃ =1.46, B ₄ =1.42	-
	C	0.40 ^{ns}	C ₁ =1.40, C ₂ =1.36	-
平均最大シュート長(cm/本)	A	6.62 ^{ns}	A ₁ =1.40, A ₂ =1.60	-
	B	0.78 ^{ns}	B ₁ =1.41, B ₂ =1.49, B ₃ =1.56, B ₄ =1.52	-
	C	4.66 ^{ns}	C ₁ =1.59, C ₂ =1.42	-

注) 平均シュート数および平均シュート長のA×Cのみ5%水準で有意

表-4 培地、光質別継代培養における分散分析及び水準間の平均値(実験-III)

項目	要因	有意性(F)	水準別の平均値	水準間の検定(5%水準)
平均シュート数(本/株)	A	2.44 ^{ns}	A ₁ =2.16, A ₂ =2.25, A ₃ =2.44, A ₄ =2.67	-
	B	2.55 ^{ns}	B ₁ =2.50, B ₂ =2.65, B ₃ =2.21, B ₄ =2.17	-
平均シュート長(cm/本)	A	0.13 ^{ns}	A ₁ =1.84, A ₂ =1.84, A ₃ =1.94, A ₄ =1.85	-
	B	1.64 ^{ns}	A ₁ =1.82, B ₁ =1.64, B ₂ =2.06, B ₃ =1.95	-
平均最大シュート長(cm/本)	A	0.63 ^{ns}	A ₁ =2.57, A ₂ =2.69, A ₃ =2.93, A ₄ =2.81	-
	B	1.61 ^{ns}	B ₁ =2.73, B ₂ =2.41, B ₃ =2.94, B ₄ =2.92	-

表-5 個体、培地、日長別継代培養における分散分析及び水準間の検定(実験-IV)

項目	要因	有意性(F)	水準別の平均値	水準間の検定(5%水準)
平均シュート数(本/株)	A	0.02 ^{ns}	A ₁ =1.63, A ₂ =1.61, A ₃ =1.60	-
	B	2.52 ^{ns}	B ₁ =1.72, B ₂ =1.76, B ₃ =1.65, B ₄ =1.32	-
	C	4.20 ^{ns}	C ₁ =1.48, C ₂ =1.72	-
平均シュート長(cm/本)	A	7.13 [*]	A ₁ =1.61, A ₂ =2.05, A ₃ =1.65	A ₁ ≠A ₂ <A ₃
	B	0.07 ^{ns}	B ₁ =1.77, B ₂ =1.79, B ₃ =1.73, B ₄ =1.79	-
	C	20.21 [*]	C ₁ =2.01, C ₂ =1.53	C ₁ <C ₂
平均最大シュート長(cm/本)	A	30.61 [*]	A ₁ =1.91, A ₂ =2.65, A ₃ =2.01	A ₁ ≠A ₂ <A ₃
	B	2.81 ^{ns}	B ₁ =2.22, B ₂ =2.32, B ₃ =2.24, B ₄ =1.99	-
	C	24.43 [*]	C ₁ =2.40, C ₂ =1.99	C ₁ <C ₂

注) A×B, A×C, B×CはすべてN.S.