

林木の組織培養に関する研究 (V)

— クヌギの不定胚増殖における個体および培地組成の影響 —

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

クヌギの組織培養研究においては、種子胚、腋芽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。一方、組織、カルスなどを用い、不定胚や不定芽を誘導し、これらを経由して植物体を再生させる方法もある。筆者らは、種子胚の初代培養時に不定胚を得ることができた。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^{4,5)}。今回は、不定胚の大量増殖条件を究明する目的で、個体および培地組成について検討を行った。

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。

2. 材料および方法

種子胚の初代培養、およびシュートの継代培養時に得られた不定胚を個体別に継代培養中であり、これらの二次不定胚を実験に用いた。

表-1 不定胚増殖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 ₅ (5個体)
	無 機 塩 (B)	B ₁ :WPM, B ₂ :1/2MS, B ₃ :MS, B ₄ :B5
II	個 体 (A)	A ₁ ~A ₅ (8個体)
	天 然 物 (B)	B ₁ :無添加, B ₂ :CA1g/ℓ, B ₃ :ME1g/ℓ, B ₄ :YE1g/ℓ
III	個 体 (A)	A ₁ ~A ₄ (4個体)
	二塩酸プトレッシン(B)	B ₁ :0, B ₂ :0.1, B ₃ :1, B ₄ :10mg/ℓ
IV	個 体 (A)	A ₁ ~A ₄ (4個体)
	塩化アセチルコリン(B)	B ₁ :0, B ₂ :0.1, B ₃ :1, B ₄ :10mg/ℓ
V	個 体 (A)	A ₁ ~A ₂ (2個体)
	クロレラエキス粉末(B)	B ₁ :0, B ₂ :10, B ₃ :50, B ₄ :100mg/ℓ

注) CA:カゼイン加水分解物, ME:麦芽抽出物, YE:酵母抽出物

基本培地はWPM[®]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40g/ℓ, BAPは1mg/ℓとした。培養環境条件は25±1℃, 4,000ルクス, 明期16時間, 暗期8時間とした。培養期間は6~8週間とした。

不定胚増殖試験における実験要因および水準は表-1に示した。実験-IIIで使用したプトレッシンはポリアミンの一種で多様な生理活性を有する物質である⁶⁾。また、実験-IVで使用したアセチルコリンは、神経伝達物質の一種で、レタスなどの植物の子葉中に存在してジベレリン作用を助けるといった子葉因子様の活性を持つとされている⁷⁾。

各処理区について、平均不定胚重を求め、これらを用いて分散分析を行い、各要因の有意性検定、および水準間の検定(5%水準)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。両要因ともに有意性がなく、個体および無機塩の影響は認められなかった。

実験-IIにおける統計分析結果を表-3に示した。両要因ともに有意でなく、個体および天然抽出物の影響は認められなかった。天然抽出物の中ではカゼイン加水分解物がやや効果的である傾向が認められた。

実験-IIIにおける結果を表-4に示す。「個体」要因のみ有意であり、個体間の比較ではA₁個体が最も劣った。プトレッシンは1mg/ℓ区でやや効果的である傾向が認められる。

実験-IVにおける結果を表-5に示した。両要因ともに有意であり、個体間の比較ではA₁個体が最も増殖能力が大きかった。アセチルコリンは高濃度添加では不定胚増殖が抑制される傾向が認められ、効果はなかった。

実験-Vにおける結果を表-6に示した。両要因ともに有意性が認められず、影響はなかった。クロレラエ

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 (V) Effects of stocks and media on somatic embryo propagation of *Quercus acutissima*

キス粉末は、A₁ 個体では 50mg/ℓ 区、A₂ 個体では 10mg/ℓ 区が有効である傾向が認められた。

4. 考 察

クヌギの不定胚利用による増殖は研究の緒についたばかりであり、報告は比較的少ない。原口¹⁾は種子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^{4,5)}は種子胚の初代培養時に発生した不定胚を用い、二次不定胚の増殖、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。しかしながら、不定胚の誘導から植物体再生までの過程においては、解明しなければならない点が多い。

今回は、二次不定胚の増殖条件をさらに詳細に検討するため、「個体」および「培地」の2要因を組み合わせ、5種類の実験を行った。その結果、個体の影響は2種類の実験で認められ、このことは不定胚の増殖能力も個体の違いによる差異があることを示しているといえる。今回使用した培地成分は効果が判然としなかったが、カゼイン加水分解物(1g/ℓ)、二塩酸ブトレッシン(1mg/ℓ)、クロレラエキス粉末(10~50mg/ℓ)がやや有効である傾向が認められた。

前報⁶⁾のシュークロース濃度別実験において、高濃度(40g/ℓ)では二次不定胚の増殖、一方、低濃度(10g/ℓ)では増殖よりも分化が促進されることを報告した。また、二次不定胚の増殖には1/2MS、分化には

WPMが効果的と報告した⁴⁾が、この実験におけるシュークロース濃度は前者が30g/ℓ、後者は20g/ℓであった。これら二つの実験および今回の結果を総合してみると、二次不定胚の増殖は、無機塩類よりも糖濃度などの影響を強く受けるものと推察される。

引用文献

- (1) 原口雅人：日林誌，70 (9)，411~416，1988
- (2) 神阪盛一郎：化学と生物，21 (11)，703~704，1983
- (3) LLOYD, G. et al. : Comb. Proc. Int. Plant. Soc., 30, 421~427, 1980
- (4) SASAKI, Y. et al. : J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 33 (1~2), 95~101, 1988
- (5) 佐々木義則ら：日林九支研論，42, 81~82, 1989
- (6) 趙 秀采：植物の化学調節，19 (1)，25~33, 1984

表-2 個体、無機塩別不定胚増殖における分散分析および水準別平均値(実験-I)

要因	有意性 (F)	水準別の平均値 (g/試験管)
A	2.63 ^{ns}	A ₁ =2.35, A ₂ =2.11, A ₃ =1.55, A ₄ =1.31, A ₅ =2.26
B	0.40 ^{ns}	B ₁ =2.13, B ₂ =1.76, B ₃ =1.83, B ₄ =1.95

(注) *5%水準で有意, ** : 1%水準で有意, N.S. : 有意性なし
 ns : 有意差なし, < : 5%水準で有意差あり, (以下同様)

表-3 個体、天然抽出物濃度別の不定胚増殖における分散分析および水準別平均値(実験-II)

要因	有意性 (F)	水準別の平均値 (g/試験管)
A	1.69 ^{ns}	A ₁ =1.53, A ₂ =1.78, A ₃ =2.59, A ₄ =1.92, A ₅ =1.47, A ₆ =1.84, A ₇ =1.85, A ₈ =1.78
B	2.09 ^{ns}	B ₁ =1.63, B ₂ =2.18, B ₃ =1.62, B ₄ =1.98

表-4 個体、ブトレッシン濃度別の不定胚増殖における分散分析および水準間の検定(実験-III)

要因	有意性 (F)	水準別の平均値 (g/試験管)	水準間の検定 (5%水準)
A	3.93 [*]	A ₁ =1.53, A ₂ =2.15, A ₃ =1.93, A ₄ =0.64	A ₁ <A ₂ ≠A ₃ ≠A ₄
B	0.61 ^{ns}	B ₁ =1.48, B ₂ =1.65, B ₃ =1.87, B ₄ =1.25	—

表-5 個体、塩化アセチルコリン濃度別の不定胚増殖における分散分析および水準間の検定(実験-IV)

要因	有意性 (F)	水準別の平均値 (g/試験管)	水準間の検定 (5%水準)
A	11.89 ^{**}	A ₁ =1.84, A ₂ =1.08, A ₃ =1.17, A ₄ =0.98	A ₁ ≠A ₂ ≠A ₃ <A ₄
B	4.37 [*]	B ₁ =1.50, B ₂ =1.28, B ₃ =1.36, B ₄ =0.94	B ₁ <B ₂ ≠B ₃ ≠B ₄

表-6 個体、クロレラエキス濃度別の不定胚増殖における分散分析および水準別平均値(実験-V)

要因	有意性 (F)	水準別の平均値 (g/試験管)
A	3.86 ^{ns}	A ₁ =1.69, A ₂ =2.10
B	0.60 ^{ns}	B ₁ =1.83, B ₂ =2.05, B ₃ =2.01, B ₄ =1.71