

林木の組織培養に関する研究 (VI)

— クヌギ継代培養における各種無機塩濃度の影響 —

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

種子胚、新梢腋芽などを外植体とした初代培養によって無菌シュートを得た後、多数の幼植物体を再生するためには、その前提条件として、継代培養によりシュートを大量に増やしておく必要がある。このためには培地などについて詳細な条件設定が重要となる。昭和61年度からは全国的な規模でクヌギ、コナラ、ミズナラなどについて組織培養の研究が開始され、これらの中で使用されている基本培地はWPM⁹⁾、BTM¹⁾などが多い⁹⁾。筆者らはクヌギについて主にWPMを使用し培養実験を行っている。今回、クヌギに適した無機塩濃度を検討するため、WPMの構成無機塩について濃度の影響を調べてみた。

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

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WPM⁹⁾で、培地支持剤にはゼラライト(3g/l)を用い、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10~20本のシュート(長さ20~30mm)を置床し、培養期間は6~8週間とした。

実験計画は表-1に示した。実験にはWPMの構成無機塩のうち10種類をとりあげ、各無機塩ともに4種類の濃度区を設定した。特定の無機塩濃度を調べる実験においては、他の無機塩濃度はWPM基本培地と同様とした。各実験ともに3~6個体のシュートを用いた。

無機塩濃度および個体別に、平均シュート数(本/株)、平均シュート長(cm/本)を算出し、これらの値を用いて統計分析などを行った。

3. 結果

A~J(略称)の無機塩について、濃度別および個体別の平均値を用い、二元配置の分散分析を行った結果は表-2に示した。「濃度」で有意性の認められた無機塩は、シュート数ではG塩、シュート長においてはAおよびJ塩のみであった。「個体」については、シュー

表-1 実験計画

無機塩	略称	WPM (mg/l)	実験濃度 (倍)	使用個体数 (個体)
NH ₄ NO ₃	A	400	A ₁ 0.25, A ₂ 0.5, A ₃ 1, A ₄ 2	5
KH ₂ PO ₄	B	170	B ₁ 0.5, B ₂ 1, B ₃ 2, B ₄ 4	6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	C	370	C ₁ 0.25, C ₂ 0.5, C ₃ 1, C ₄ 2	4
H ₃ BO ₃	D	6.2	D ₁ 0.25, D ₂ 0.5, D ₃ 1, D ₄ 2	6
MnSO ₄ · 4H ₂ O	E	22.3	E ₁ 0.25, E ₂ 0.5, E ₃ 1, E ₄ 2	4
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	F	8.6	F ₁ 0.25, F ₂ 0.5, F ₃ 1, F ₄ 2	3
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	G	556	G ₁ 0.5, G ₂ 1, G ₃ 2, G ₄ 4	5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	H	96	H ₁ 0.5, H ₂ 1, H ₃ 2, H ₄ 4	5
K ₂ SO ₄	I	990	I ₁ 0.25, I ₂ 0.5, I ₃ 1, I ₄ 2	3
FeSO ₄ · 7H ₂ O (Na ₂ -EDTA)	J	27.8 (37.3)	J ₁ 0.25, J ₂ 0.5, J ₃ 1, J ₄ 2	5

注) 実験濃度はWPM基本培地の濃度に対する倍率

表-2 分散分析結果 (分散比)

無機塩 (略称)	シュート数		シュート長	
	濃度	個体	濃度	個体
A	1.96 ^{ks}	2.99 ^{ks}	13.78**	6.57**
B	0.56 ^{ks}	6.51**	1.96 ^{ks}	10.43**
C	0.48 ^{ks}	17.50**	1.15 ^{ks}	47.03**
D	2.46 ^{ks}	22.37**	2.38 ^{ks}	13.54**
E	0.86 ^{ks}	1.29 ^{ks}	0.96 ^{ks}	2.52 ^{ks}
F	0.11 ^{ks}	13.10**	0.37 ^{ks}	1.54 ^{ks}
G	4.90*	9.00**	2.49 ^{ks}	45.52**
H	0.22 ^{ks}	4.89*	2.80 ^{ks}	6.75**
I	0.41 ^{ks}	8.01*	1.05 ^{ks}	2.76 ^{ks}
J	2.89 ^{ks}	2.23 ^{ks}	8.55**	11.07**

注) **: 1%水準で有意, *: 5%水準で有意, N.S.: 有意性なし

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

Studies on tissue culture of forest trees (VI) Effects of inorganic component-concentration in WPM on subculture of *Quercus acutissima*

ト数およびシュート長的一方または両方ともに有意性が認められる場合が多く、両方ともに有意でなかったのはE塩を使用した実験のみであった。

有意性の認められた無機塩について、濃度間の有意差検定を行ったところ、G塩のシュート数では $G_1 \approx G_3 \approx G_4 < G_2$ 、A塩のシュート長は $A_1 \approx A_2 < A_3 < A_4$ 、J塩のシュート長では $J_1 \approx J_2 < J_3 \approx J_4$ となった (\approx : 5% 水準で有意差なし、 $<$: 5% 以上の水準で有意差あり)。

各無機塩の濃度別平均シュート数および基準量区を100とした場合の比数を表-3に示した。D, G, I, Jの4種類の塩では基準量区付近、またA塩は半量区でそれぞれシュート数が増える傾向が認められた。他の無機塩では濃度の影響が判然としなかった。

各無機塩の濃度別平均シュート長および基準量区を100とした場合の比数を表-4に示した。A塩は二倍量区のシュート伸長が最も旺盛であった。B, F, H, Jの4種類の塩では基準量区付近、またD塩においては半量区でそれぞれシュート伸長が促進される傾向が認められた。他の無機塩ではシュート長におよぼす影響が判然としなかった。

4. 考 察

クヌギの組織培養における無機塩の影響については、WPM, BTM, MSなどのような基本培地間の比較、特定の無機塩の濃度変更などに関する報告はあるが^{2, 4, 5)}、多数の構成無機塩について個々の濃度効果を調べた例はみあたらない。

筆者らはクヌギ継代培養の基本培地としてWPMを用い、構成無機塩のうち10種類をとりあげ、濃度は1/4量, 1/2量, 基準量, 二倍量の4区, または1/2量, 基準量, 二倍量, 四倍量の4区を設け、シュート数およびシュート長におよぼす影響を調べた。その結果、一般的には基準量区付近で効果が認められるもの、あるいは濃度の影響が判然としないものが多かったが、シュート数では硝酸アンモニアの半量区で増加傾向が、またシュート長においては硝酸アンモニアの二倍量区およびホウ酸の半量区で伸長促進傾向がそれぞれ認められた。これらのことから、クヌギの培地にWPMを使用する場合、硝酸アンモニアおよびホウ酸の濃度を再検討する必要があると考えられる。大部分の実験において個体差が認められたが、このことは増殖の効率化を図るためには培地組成のみでなく、材料(個体)の選択も重要であることを示唆するものと考えられる。

引用文献

- (1) CHALUPA, V. : *Biologia Plantarum*, 26, 374~377, 1984
- (2) LEE, B. C. et al. : *Res. Rep. Inst. For. Gen. Korea*, 21, 104~108, 1985
- (3) LLOYD, G. et al. : *Comb. Proc. Int. Plant Propagator's Soc.*, 30, 421~427, 1980
- (4) 中澤慶久ほか: *日林九支研論*, 40, 87~88, 1987
- (5) 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, 269pp., 農業図書, 東京, 1989

表-3 無機塩濃度別平均シュート数および比数

無機塩(略称)	濃度別平均値(本/株)	比数(%)
A	2.07, 2.38, 2.02, 1.59	102, 118, 100, 79
B	1.59, 1.42, 1.52, 1.51	112, 100, 107, 106
C	1.73, 1.84, 1.70, 1.92	102, 108, 100, 113
D	1.70, 1.79, 1.98, 1.66	86, 90, 100, 84
E	1.73, 1.54, 1.67, 1.59	104, 92, 100, 95
F	1.81, 1.74, 1.72, 1.69	105, 101, 100, 98
G	1.51, 1.70, 1.52, 1.30	89, 100, 89, 76
H	1.36, 1.31, 1.37, 1.39	104, 100, 105, 106
I	1.85, 1.94, 2.01, 1.76	92, 97, 100, 88
J	1.12, 1.27, 1.46, 1.26	77, 87, 100, 86

注) 数値は左から右に順次高濃度区に移した区のもの

表-4 無機塩濃度別平均シュート長および比数

無機塩(略称)	濃度別平均値(cm/本)	比数(%)
A	1.43, 1.50, 2.03, 2.23	70, 74, 100, 110
B	1.73, 2.13, 2.09, 1.80	81, 100, 98, 85
C	1.47, 1.88, 1.83, 1.77	80, 103, 100, 97
D	1.27, 1.58, 1.25, 1.16	102, 126, 100, 93
E	2.11, 2.46, 2.34, 2.35	90, 105, 100, 100
F	1.78, 1.72, 2.03, 1.69	88, 85, 100, 83
G	1.98, 1.95, 1.68, 1.81	102, 100, 86, 93
H	2.22, 2.33, 2.16, 1.99	95, 100, 93, 85
I	1.32, 1.16, 1.21, 1.08	109, 96, 100, 89
J	1.20, 1.44, 1.91, 1.87	63, 75, 100, 98

注) 数値は左から右に順次高濃度区に移した区のもの