

林木の組織培養に関する研究 (XII)

— クヌギ組織培養におけるキトサンの影響 —

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

カニ、エビなど甲殻類の甲ら、チョウ、蚕などの昆虫の表皮、キノコや *MUCOR* 属の菌類の細胞壁などの主成分はキチン質と総称する生体高分子(多糖)である。キチン質において N-アセチル-D-グルコサミンが(1→4)結合したものがキチン、その N-脱アセチル化物(キチンから酢酸分子を除去したもの)がキトサンである。それらの化学構造は木材などの構成成分であるセルロースと良く似ている。近年、医学、薬学、農学などの分野においてキチン、キトサンを使用した研究が実施されており、幅広い作用を示す生理活性物質あるいは新素材であることが報告されている¹⁻³⁾。

今回、クヌギのシュート増殖および発根苗の順化において低分子キトサンを使用したところ、若干の興味ある結果が得られたので報告する。本研究を実施するにあたり、低分子キトサンを提供していただいた日本化薬(株)上尾研究所の志田篤彦氏および岡山応用化学の井上唯師氏に感謝の意を表す。

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木からの種苗増殖技術の開発」の一環として実施したものである。

2. 材料および方法

実験材料は精英樹種子胚を外植体として継代培養中のシュートであり、20~30mmの長さに調製した切片を用いた。

シュート増殖用の基本培地は WPM⁴⁾ で、培地支持剤にはゼライト(3g/l)を用い、シュークロース濃度は 10g/l、BAP濃度は 0.1mg/l とした。順化試験用の発根苗(苗高: 5~7cm)は、1/2WPMに 0.1mg/l の IBA を添加し、8週間培養して得られたものである。

培養および順化の環境条件は 25 ± 1℃、4,000ルクス、明期 16時間、暗期 8時間とし、培養期間は 8週間、順化(密閉処理)期間は 4週間であった。

実験に用いた低分子キトサンは化学的処理により作

られたもので、平均分子量(M.W.)および分子量の範囲が、M.W. = 4,500、1,000~8,000(日本化薬)、M.W. = 7,000、800~28,000(岡山応用化学)の2種類であり、いずれも水溶性の白色粉末であった。シュート増殖試験におけるキトサンの添加濃度は2種類ともに 0、25、50、100mg/l の4区とした。順化試験では M.W. = 7,000 のキトサンを用い、0、25、50、100mg/l の4種類の溶液中に苗全体を1時間浸漬した後、パーミキュライトを詰めた透明のプラスチック容器に植えつけ、密閉処理を行った。移植直後および2週間後の2回にわたり、それぞれの処理区と等濃度のキトサンを苗全体およびパーミキュライト全面に噴霧処理を行った。

測定値については一元配置の分散分析を行い、処理間に有意性が認められた場合は平均値間の有意差検定(5%水準)を行った。

3. 結果

M.W. = 4,500 のキトサンがシュート増殖に及ぼす影響は表-1に示した。シュート数およびシュート長について分散分析を行った結果、シュート長のみ1%水準で有意であった。キトサンの添加濃度の影響はシュート数ではほとんど認められなかったが、シュート長においては高濃度区ほど伸長が良好である傾向が認められた。

M.W. = 7,000 のキトサンがシュート増殖に及ぼす影響は表-2に示した。シュート数およびシュート長について分散分析を行った結果、シュート長のみ5%水準で有意であった。キトサンの添加濃度の影響はシュート数ではほとんど認められなかったが、シュート長は 50~100mg/l 区で伸長が促進される傾向が認められた。

M.W. = 7,000 のキトサンが発根苗の順化時の生存率に及ぼす影響は表-3に示した。4週間後の生存率は高濃度区ほど高くなる傾向が認められた。苗木およびパーミキュライトからの雑菌などの発生は低濃度区ほど多く観察された。

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

Studies on tissue culture of forest trees(XII) Effects of chitosan on tissue culture of *Quercus acutissima*

4. 考察

高等植物はキチン、キトサンを構成成分としていないにも拘わらず、それらの分解酵素であるキチナーゼやキトサナーゼを持っている。これらの酵素の植物における機能はまだ十分に解明されていないが、病虫害に対する自己防護機能に関与しているとされている。またキトサンにより細胞の活性化機構が働くことによって植物の成長やカルスの形成などが促進されることが報告されている¹⁻³⁾。

クヌギのシュート増殖において、分子量が4,500と7,000の2種類の低分子キトサンを0~100mg/l添加したところ、いずれのキトサンもシュート数にはほとんど影響がなかったが、シュート長においては50~100mg/l区で伸長促進効果が認められた。前報³⁾の発根培養でキトサン (M.W.=4,500) の影響を検討した結果では25~50mg/l区で発根促進効果が発現したが、シュート増殖の場合これよりやや高濃度区で促進効果が出やすいものと考えられる。発根苗の順化においてもキトサンの高濃度区で高い生存率が得られたが、これはキトサン処理による防護機能の向上や雑菌類の抑制効果などが関与しているものと推察される。前報³⁾

表-2 低分子キトサン (M.W.=7,000) がシュート増殖に及ぼす影響

濃度 (mg/l)	シュート数			シュート長		
	N. (株)	M.V. (本/株)	S.D.	N. (本)	M.V. (cm/本)	S.D.
0	15	2.47a	1.30	37	1.81a	0.71
25	24	2.13a	0.19	51	1.87a	0.82
50	16	2.19a	1.18	35	2.31b	1.27
100	19	2.00a	1.21	38	2.26b	0.83

(注) N:測定数, M.V.:平均値, S.D.:標準偏差
平均値間の検定:同一のアルファベットの付いた平均値間では、5%水準で有意差が無いことを示す。

および今回の実験から低分子キトサンはクヌギの組織培養、順化においても効果的であり、今後はその適正濃度、他の樹種での効果などを検討する必要がある。

引用文献

- (1) 微生物処理キトサン研究会編:農業新素材バイオキトサン, pp.124, 大成出版社, 東京, 1991
- (2) キチン・キトサン研究会編:最後のバイオマス, キチン・キトサン, pp.268, 技報堂出版, 東京, 1988
- (3) —:キチン, キトサンの応用, pp.321, 技報堂出版, 東京, 1990
- (4) LLOYD, G. et al.: Comb. Proc. Int. Plant Propagator's Soc., 30,421~427,1980
- (5) 佐々木義則ほか:日林九支研論, 44,87~88, 1991

表-1 低分子キトサン (M.W.=4,500) がシュート増殖に及ぼす影響

濃度 (mg/l)	シュート数			シュート長		
	N. (株)	M.V. (本/株)	S.D.	N. (本)	M.V. (cm/本)	S.D.
0	26	2.15a	1.33	56	1.27a	0.49
25	23	2.04a	1.24	47	1.49ab	0.74
50	25	1.92a	1.41	48	1.75bc	1.03
100	21	1.90a	1.03	40	2.05c	1.34

(注) N:測定数, M.V.:平均値, S.D.:標準偏差
平均値間の検定:同一のアルファベットの付いた平均値間では、5%水準で有意差が無いことを示す。

表-3 試験管内発根苗の順化における低分子キトサン (M.W.=7,000) の影響

濃度 (mg/l)	移植本数 (本)	生存本数 (本)	生存率 (%)
0	40	13	32.5
25	40	21	52.5
50	40	30	75.0
100	40	33	82.5