

ハナアカシア(*Robinia hispida* L.)の形成層由来のカルスから誘導した多芽体や根の培養による幼植物体の増殖

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者名	出口,美和 玉泉,幸一郎 齋藤,明
発行元	日本林學會
巻/号	76巻4号
巻号補足	
掲載ページ	p. 346-354
発行年月	1994年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



論 文

ハナアカシア (*Robinia hispida* L.) の形成層由来の カルスから誘導した多芽体や根の培養による 幼植物体の増殖

出口 美和*・玉泉幸一郎**・齋藤 明**

出口美和・玉泉幸一郎・齋藤 明：ハナアカシア (*Robinia hispida* L.) の形成層由来のカルスから誘導した多芽体や根の培養による幼植物体の増殖 日林誌 76：346~354, 1994 ハナアカシア (*Robinia hispida* L.) 成木の形成層由来のカルスから誘導した多芽体や根の培養で幼植物体を再生し、増殖を図るための培養系の確立を試みた。形成層からのカルス誘導は、1/2 MS 培養地に 2,4-D (1.0 mg/l) を添加した培地で容易であった。得られたカルスを、1/2 MS 培地に IAA (1.0 mg/l) または BAP (0.1 mg/l) を添加した液体培地に移植し、振盪培養に付したところ不定芽を分化した。このカルスから分化した不定芽は、1/2 MS 培地に BAP を 0.1 mg/l 添加した固形培地で培養を継続したところ、多芽体を形成し、シュートの伸長を観察できた。この伸長したシュートの発根を試みた結果、蒸留水で湿らしたパーミキュライト上で容易に発根した。一方、形成層由来のカルス塊は、継代培養で不定根を分化した。この不定根は、1/2 MS 培地に IAA (1.0 mg/l) を添加した液体培地を用いて暗黒条件下で振盪培養することで根を増殖し続けた。また、これらの不定根からカルス形成を経由することで不定芽や幼植物体を誘導できた。

DEGUCHI, M., GYOKUSEN, K. and SAITO, A.: Propagation of plantlets by the culture of multiple shoots and roots induced from callus originating in the cambium of *Robinia hispida* L. J. Jpn. For. Soc. 76: 346~354, 1994 A culture system suitable for the regeneration of plantlets by the culture of multiple shoots and roots induced from callus originating in branch cambium of a two-year-old graft of a rose acacia (*Robinia hispida* L.) mature tree was tested and established. Inducement of callus from the cambium was very easy using medium supplemented with 1.0 mg/l of 2, 4-D. Adventitious buds were differentiated from the callus as a result of the culture by liquid 1/2 MS (MURASHIGE-SKOOG) medium supplemented with 1.0 mg/l of IAA (indole-3-acetic acid) of 0.1 mg/l BAP (6-benzylaminopurine) in a reciprocal shaking shaker. These buds induced multiple shoots and shoot growth by culture on solid 1/2 MS medium supplemented with 0.1 mg/l of BAP. Rooting from these shoots was observed on vermiculite moistened with sterile distilled water. On the other hand, adventitious roots were differentiated from calli originating in the cambium. The roots were kept propagating by culture with a reciprocal shaking shaker in a dark condition on liquid 1/2 MS medium supplemented with 1.0 mg/l of IAA. Adventitious buds and plantlets were induced through callus formation from these roots.

I. は じ め に

植物を対象にして細胞選抜や細胞融合などの技術を生かして品種改良を行うには、カルス経由で植物体を再生するための培養系の確立が不可欠である。たとえば、窒素固定菌が共生しているマメ科植物では、この培養系の確立を図ることができれば植物組織からのプロトプラストの分離による細胞融合で、窒素固定菌が共生しえない樹種に窒素固定能を付与する手段を提供

できる。

筆者らの1人出口は、これまでにマメ科の本本性植物 12 種を用いて、そのカルス形成の難易についての検索を行ったところ、この 12 種の中では、ニセアカシア属 (*Robinia*) のニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) とハナアカシア (*Robinia hispida* L.) (5) でカルス形成が極めて容易で、さらにカルスからの植物体の再生も容易であることを明らかにした経緯がある。ニセアカシアについては、BROWN (1) や DAVIS (3)

* 中村学園大学大学院栄養形態学部門 Dept. of Nutr. Morphol., Grad. Sch. of Nutr. Sci., Nakamura Gakuen Col., Fukuoka 814

** 九州大学農学部 Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812

によって芽生えの茎端や腋芽から幼植物体を誘導できたという研究がすでに報告されている。しかし、ハナアカシア (*R. hispida* L.) についての報告はまだ見当たらない。

そこで、本研究では、ハナアカシアを材料として、その形成層由来のカルスから幼植物体を誘導するための培養系を確立することを試みた。その結果、形成層由来のカルス塊から多芽体や不定根を誘導できることを観察した。しかも、得られた不定根はその後の液体培地による継代培養で、さらに伸長し続けることをも観察した。したがって、これらの不定根を増殖し、これを外植体として、芽の分化、さらには植物体の再生が可能であり、大量増殖の1方法としても有用な方法であることを実証できたので報告する。

II. 材料と方法

1. カルス誘導とカルスから不定芽の分化

ハナアカシアの2年生接木苗の当年枝から外植体を採取した。小枝や葉を切り落とした当年枝をクリーンベンチ内に持ち込み、70%エタノール液を噴霧して表面殺菌し、風乾後滅菌メスで外皮を剥がし、形成層を露出し、内皮や木部の一部を含んだ状態の形成層の切片を約1 cm 四方の切片になるように切り取って、これを外植体とした。

基本培地として、MURASHIGE-SKOOG培地 (MS培地) (7) に含まれている無機および有機成分の濃度を1/2に落とした培地 (1/2 MS培地) にサッカロースを20 g/l 加えた培地を用いた。カルス誘導用培地には、この基本培地に2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を1.0 mg/l、ゲルライトを2.4 g/l 添加した固形培地を用いた。また、誘導されたカルスからの不定芽の分化に用いた培地は、基本培地に1.0 mg/l の2,4-D、1.0 mg/l の3-インドール酢酸 (IAA)、0.1 mg/l の6-ベンジルアミノプリン (BAP) の3者のいずれか一つを添加した液体培地を用いた。

これらの各培地は、pH 値を5.6~5.8に調整したのち、25 mm×120 mm の試験管に約10 ml ずつ分注し、オートクレーブで加圧滅菌した。

培養条件は、すべて温度25°C、光量子束密度60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の蛍光灯照明下で、明期16時間/日とした。また、液体培地による培養には100回/分の往復式の振盪培養を行った。

2. 多芽体の増殖と植物体再生

1.0 mg/l の IAA または 0.1 mg/l の BAP を添加

した不定芽分化用培地で誘導できた多芽体を約0.1 g ずつ分取し、この分取組織を多芽体の増殖に用いた。

多芽体を増殖するために用いた培地には、上記の基本培地に1.0 mg/l の IAA、0.1 mg/l と1.0 mg/l の BAP のいずれか一つを添加した培地を用いた。なお、IAA を添加した培地は液体培地とし、BAP を添加した培地はゲルライトを2.4 g/l 加えた固形培地とした。

多芽体から得られたシュートの発根誘導には、固形培地での培養とパーミキュライトに無菌的にさし木するという2法を採用した。固形培地の場合には、基本培地にIAA またはインドール酪酸 (IBA) を1.0 mg/l または2.0 mg/l 加え、これにゲルライトを2.4 g/l 添加し、pH 値を5.6~5.8に調整してから加圧滅菌した。パーミキュライトの場合には、パーミキュライトを蒸留水で湿らせてから直径8 cm の蓋付きプラスチックポットに厚さ約2 cm になるように入れ、加圧滅菌した。多芽体から伸長したシュートは、4 cm 以上のシュートだけを切り取り、移植した。パーミキュライトにさし付ける場合には、シュートの切り口に0.5% のオキシベロン (塩野義製薬) を粉衣してさし木した。IAA を1.0 mg/l 添加した固形培地とIBA を1.0 mg/l 添加した培地の一部には、10°C、24時間暗期のもとで最初の1週間を培養に付す低温処理区をも設定した。シュートのさし付け供試体数は、容器当りのシュート本数を1本とし、固形培地では各10本、パーミキュライトでは15本とした。培養条件は、低温処理区以外は前項と同様であった。

固形培地で発根した個体は、次の手順で馴化を行った。発根した幼植物体から附着している培地を水道水で洗い流してから、蒸留水で湿らせたパーミキュライトを2 cm の深さに挿入した蓋付きプラスチックポット (6 cm 角または内径8 cm) に移植した。移植後の1週間は上記の培養条件と同じ条件で培養し、そののち温度25°C、湿度70%、自然光下でのファイトトロンかまたは温度25°C、湿度70%、250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の蛍光灯照明下で明期12時間/日、暗期12時間/日の人工照明室に移した。ファイトトロンまたは人工照明室に移して1週間ほど培養してから、蓋を無色透明のポリ塩化ビニル製フィルムに替え、直径0.5 cm の穴を1個開けた。そののち、2週間ごとに穴を2個ずつ増やし、ようすをみながら赤玉土を入れた鉢に順次移植した。

パーミキュライトにさし木して発根を確認できた個体については、順次人工照明室へ移し、3週間後に蓋を

無色透明のポリ塩化ビニル製フィルムに替え、その後は上記と同様の手順で馴化を行った。

3. 根の増殖と根からの不定芽の分化

カルスからの不定芽分化用培地で培養している過程で分化した不定根をカルスから切り離し、約1 cm 長に切り分けて、25 mm×120 mm の試験管に1.0 mg/l の IAA を加えた基本培地を約10 ml ずつ分注し、加圧滅菌した液体培地に1本ずつ移植した。これらの試験管を25°C、往復振盪式の振盪器で、100 回/分の往復振盪によって根の増殖を行った。光条件は、60 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の蛍光灯照明下での16時間/日の明期、8時間/日の暗期による光照射区と、試験管をアルミホイルで覆って遮光し、24時間/日の暗期による遮光区の2区を設定し、供試数はそれぞれ10本とした。

根から不定芽を誘導するためには、上述したようにカルスを不定芽分化用培地(1/2 MS+1.0 mg/l の IAA)で培養している過程で得られた不定根、ならびにその不定根を増殖し続けている過程で得られた不定根を用いた。根からのカルス形成用培地には、0.1 mg/l、1.0 mg/l、2.0 mg/l の BAP 単独、あるいは1.0 mg/l の BAP に0.01 mg/l、0.1 mg/l、1.0 mg/l の IAA、ナフタレン酢酸(NAA)あるいは2,4-Dなどを組み合わせた22とおりの培地(表-5)を用いた。供試数は、各処理区10本とした。

培養で得られた根由来のカルスからの不定芽の分化の誘導には、基本培地にゲルライトを2.4 g/l、BAPを1.0 mg/l 加え、pH 値を5.6~5.8に調整し、加圧滅菌した固形培地を用いた。

培養条件は、25°C、16時間/日の明期とし、液体培地の場合には往復振盪式の振盪器を用いて、100 回/分で培養を行った。また、低温処理区では、置床後1週間は、温度10°C、24時間/日の暗期で培養し、その後上述の培養条件に移した。

III. 結果と考察

1. カルスの誘導とカルスからの不定芽の分化

形成層からのカルス誘導の結果を表-1に示した。供試した外植体33個体のうち、88%に相当する29個体でカルスを形成した。培養開始後3日目から外植体上に薄い緑色のカルスの形成がみられ、その後緑色のカルス部分が増えはじめた。また、その周囲に半透明の白色カルスができた個体も認められた。このときのカルスの平均生重量は0.33 gで、このうち1個体からは不定根の分化を観察した。

表-1. 形成層からのカルス誘導の状況
Initiation of callus from stem cambium

Culture periods	Explant	Calluses	Contami- nation	Death	Calluses with roots
No. (Rate : %)					
6 weeks	33	29 (88)	3 (9)	1 (3)	1 (3)
10 weeks*	29				22 (76)

The value in parentheses are the rates of callus-formation samples. * They were subcultured on the same medium after 6 weeks.

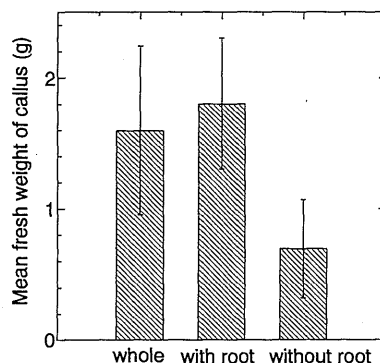


図-1. 培養10週間後の形成層由来のカルスの生重量
Mean fresh weights of calluses originating from cambiums

縦線は標準偏差を示す。

Note: Vertical bars represent standard deviations of the means.

表-2. 培養7週間後におけるカルスからの不定芽の分化

Differentiation of buds from calluses subcultured for 7 weeks

Hormones	Concentrations (mg/l)	No. of calluses	No. of calluses which differentiated buds (Differentiation rate : %)
2,4-D	1.0	2	0 (0)
BAP	0.1	3	3 (100)
IAA	1.0	3	3 (100)

これらのカルスを培養開始後6週間目に同一組成の培地に継代培養した。このときのカルスの平均生重量は1.60 gで、継代した29個体のうち76%に相当する22個体で不定根が分化した。不定根が分化しているカルスと分化していないカルスを比較すると、不定根が分化したカルスは薄緑色の部分と半透明な白色の部分があり、分化していないカルスは薄緑色部分で覆われていた。また、カルスの生重で比較すると(図-1)、不定根が分化していないカルス(平均0.70 g)より、分

化したカルス (平均 1.80 g) の方が大きかった。

継代培養を行ってから 4 週間後に、不定根を有するカルスだけを不定芽分化用培地 (液体培地) に移植した。その不定芽の分化の状況を表-2 に示した。1.0 mg/l の 2,4-D を添加した培地では、不定芽の分化は認められず、不定根もカルス化した。0.1 mg/l の BAP と 1.0 mg/l の IAA を添加した培地での培養では、培養 3 週間目で不定芽の分化を観察でき、7 週間後にはすべてのカルスで不定芽の分化が観察された。また、IAA を添加した培地では、不定芽の分化と同時に不定根の伸長も認められた (図-2 a)。この不定芽の分化は、カルスの周囲から発生し、カルスから分化したものと考えられる。ただし、この際カルスに潜伏芽が含まれていたかどうかを確認していない。培養を継続するうちにカルスは培養液に拡散し次第に小さくなり、分化した不定芽は多芽体を形成した (図-2 b)。

NOGUCHI and YAMAKAWA (8) は、*Ginger* の節を含んだ茎を液体培地で培養し、2,4-D を添加した培地でカルス化し、BAP を単独で添加した場合には多芽体が形成されることを報告している。これと同様に、不定芽の分化および多芽体の形成には BAP が効果的に作用したことが考えられる。

BAP などのサイトカイニン類は、芽の形成に有効であり、IAA などのオーキシニン類は発根を促進すると一般にいわれている。この著者らの行ったカルスの液体培養に関する結果では、IAA を添加した培地で根の伸長と同時に不定芽の分化が生じた。BAP 添加区と IAA 添加区で発生した不定芽の量的な比較をみると、IAA を添加した培地の方が、BAP を添加した培地より芽の分化が早く、多芽体の増加量は BAP と差はなかった。したがって、ハナアカシアでは、IAA は BAP と同様に、不定芽の分化には有効であると考えられる。

2. 多芽体の増殖と植物体の再生

多芽体の増殖、維持ならびに発根培地に移植可能なシュートを得るために、前項で得られた多芽体を多芽体増殖用培地に移植した。その培養 5 週間後のシュート増殖の結果を図-3 に示した。多芽体の生重を比較すると、BAP を高濃度の 1.0 mg/l 加えた処理区で最も大きい。しかし、シュート量では 0.1 mg/l の BAP を加えた処理区で最も大きい。しかし、シュート量では 0.1 mg/l の BAP を加えた処理区で大きかった (図-2 c)。BAP 1.0 mg/l 処理区での生重量が最大であったのは、培地との接触面にできたカルスの量が大きかったことに起因していた。発根に使えるシュ

ト (4 cm 以上) の平均数では、BAP を 0.1 mg/l 添加した培地で 1 外植体当たり 1.5 本と最も多い傾向を示した (図-3)。IAA 1.0 mg/l 処理区 (液体培養) での培養では、多芽体はその中の芽が伸長せず、芽の数的な増加が認められただけであった。したがって、多芽体の増殖、維持と発根培地に移植可能なシュートを得るという目的には、0.1 mg/l の BAP 区が適しているといえる。

BAP はシュート形成には効果的であるが、シュートの継続的な成長を抑制するため、伸長促進のための継代培養には BAP 濃度を 5~10 倍程度低くするのが望ましいことが報告されている (2)。この実験では、初

表-3. 発根に対するホルモンの種類と濃度の影響、および固形培地とバーミキュライトへのさし木の結果

The effects of the kinds and concentrations of hormones and the results of cuttage to solid medium and vermiculite

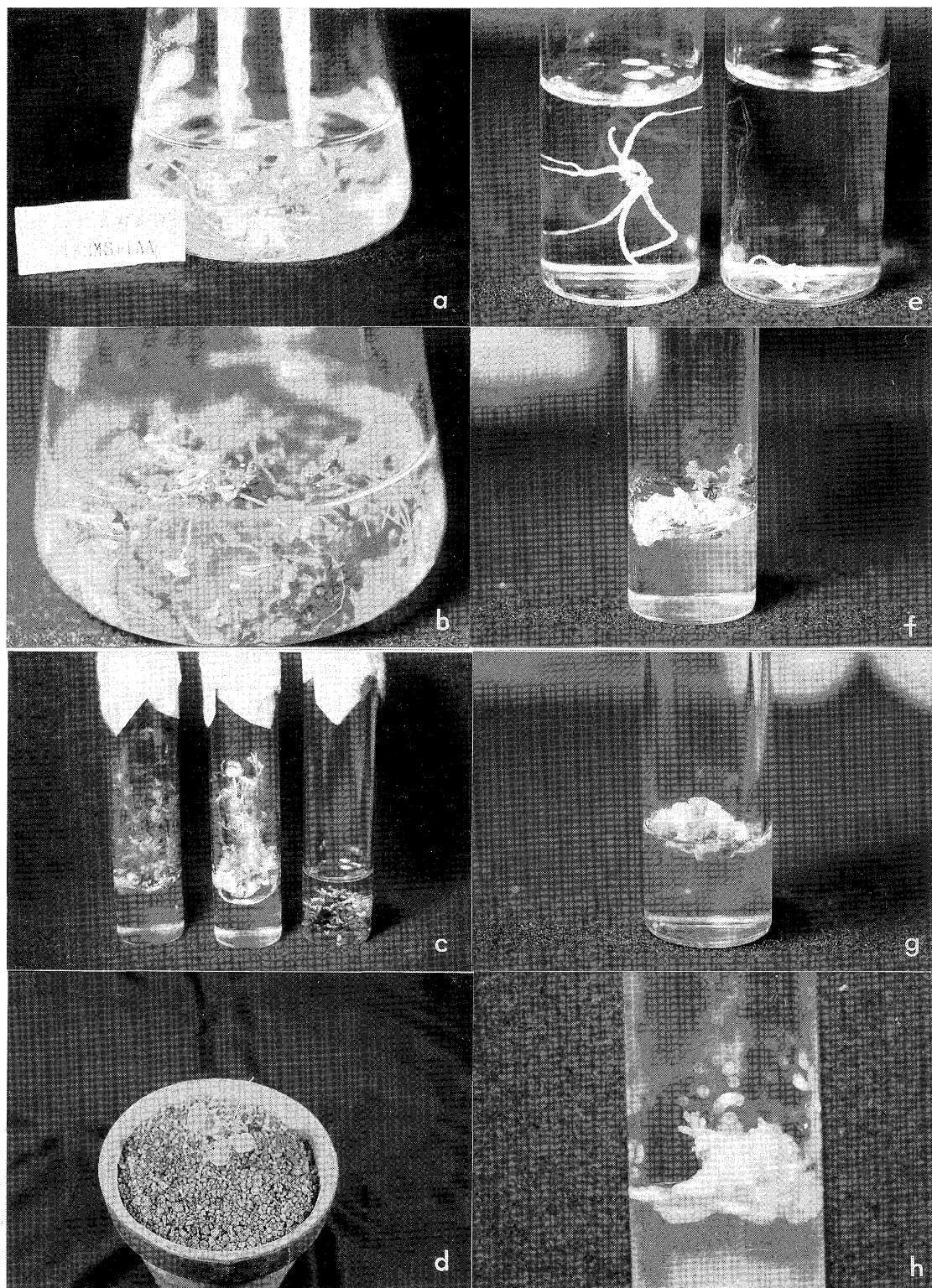
Hormones	Concentrations (mg/l)	Low temperature* treatment	Nos. of shoots cultured	Nos. of rooted shoots	Rates of rooted shoots (%)
Cuttage for 8 weeks on solid medium					
IAA	1.0	○	10	1	10
IAA	1.0		10	1	10
IAA	2.0		10	2	20
IBA	1.0	○	10	0	0
IBA	1.0		5	2	40
IBA	2.0		10	2	20
Cuttage for 4 weeks on vermiculite			15	13	87

* Translated to normal culture conditions after 1 week of culture at 10°C and darkness of 24 h/day.

表-4. 馴化および鉢上げの状況

Results of transplanting of plantlets to pots for acclimation

Media used for rooting	Nos. of plantlets transplanted to pots	Nos. of plantlets used for acclimation	Nos. of plantlets completing acclimation
Nos. of survivals			
Solid medium			
IAA (1.0 mg/l)	1	1	1
IAA (2.0 mg/l)	2	2	2
IBA (1.0 mg/l)	1	0	—
IBA (2.0 mg/l)	1	1	1
Vermiculite	10	10	5



代培養よりも低いBAPの濃度を用意しなかったが、やはり濃度の低い方が成長が良いという傾向を得た。したがって、0.1 mg/l よりもさらに低い濃度範囲でBAPの最適濃度の検索を行う必要がある。

このように、IAAを添加した液体培地での多芽体の増殖は、他の固形培地での増殖と異なる傾向を示したので、液体培地での他のホルモンや濃度で多芽体の増殖を試みる必要があると考えられる。

シュートを発根用の固形培地またはパーミキュライトに移植して得られた結果を表-3に示した。発根用培地では、幼植物体の再生を観察できたが、いずれも発根率が10~40%と低く、発根は別途用意した低温処理区でも有効ではなかった。

パーミキュライトにさし木したシュートは、培養1週間後にはプラスチック製ポットの底からの発根を確認できた個体があった。さし木後17日目には、5個体で発根が確認できた。さらに、最終的には87%に相当するシュートで発根を誘導できた。これは、ゲルライトを使った発根用の固形培地の発根率と比較すると非常に高い発根率を示した。

発根用の固形培地に移植したシュートの葉は、移植時にすでにガラス化を起こしていた。しかし、移植後1週間で頂芽が展開しはじめ、新しく展開した葉はガラス化を起こしていない正常な葉であった。

組織培養で増殖したシュートを直接非無菌的にさし木して、発根効率を高める方法がリングやユーカリなどで報告されている(9)。本研究のパーミキュライトへのさし木の結果は、無菌状態ではあるが同様に発根率を高めることができた。この方法は、培養の簡易化という点からも有効な方法であり、ハナアカシアでも今後非無菌状態でのさし木発根を試してみる価値がある。

馴化および鉢上げの結果を表-4に示した。発根用の固形培地で発根が認められた8個体のうち、その中から5個体を用いて馴化を試みた。このうち、1.0 mg/lのIBAで発根した1個体はファイトロンで馴化を行い、他の4個体は人工照明室の中で馴化を行った。ファイトロンで馴化した個体は、プラスチックポットに移植後順調に根を伸長し地上部も新しい葉を順次展開した。しかし、7週間目で地上部が枯れはじめ、8週間後には完全に枯死した。これは、馴化の時期が5月末から7月であったので、7月に入って急に日差しが強くなり、馴化途中の再生植物体が外界の光条件などの変化について行けなかったためだと考えられる。これに対して、人工照明室の中で馴化を行った個体は、順調に成長した。これを7週間目に鉢上げした。パーミキュライトへのさし木で発根した個体は、馴化は順

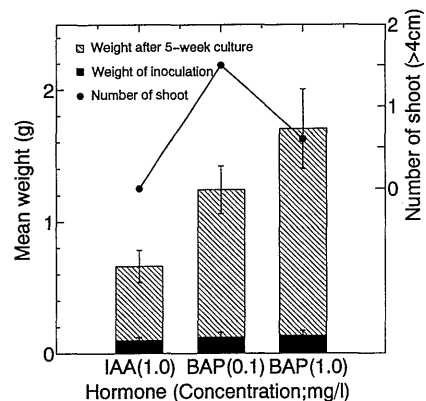


図-3. 増殖培地における平均増殖量とシュート発生数

Mean fresh weights and shoot numbers of multiple shoots by cultures on propagation medium

縦線は標準偏差を示す。

Note: Vertical bars represent standard deviations of the means.

図-2

(a), 1.0 mg/l の IAA を添加した液体培地による培養で分化が観察されたカルス。(b), 1.0 mg/l の IAA を添加した液体培地による培養でカルスから形成した多芽体。(c), 多芽体の増殖用培地 (BAP 含有) で増殖した多芽体。左 (Left): BAP (0.10 mg/l), 中央 (Middle): BAP (1.0 mg/l), 右 (Right): IAA (1.0 mg/l)。(d), 2.0 mg/l の IBA を添加した固形培地で発根した幼植物体。(e), 根の増殖用液体培地で培養した根の増殖に対する光環境の影響。(f), 1.0 mg/l の BAP と IAA を添加した固形培地で誘導された根由来のカルスと分化した芽。(g), 1.0 mg/l の BAP と 0.1 mg/l の 2,4-D を添加した固形培地で誘導された根由来のカルス。(h), 1.0 mg/l の BAP を添加した固形培地で培養して得られた根由来のカルスからの芽の分化。
(a), Callus cultured on liquid 1/2 MS medium supplemented with IAA of 1.0 mg/l. Note: Adventitious buds were differentiated. (b), Callus cultured on liquid 1/2 MS medium supplemented with IAA of 1.0 mg/l. Note: Multiple shoots were formed. (c), Multiple shoots propagated on liquid medium supplemented with BAP for propagation of multiple shoots. (d), Rooting plantlet on solid medium supplemented with IBA of 2.0 mg/l. (e), Influence of light conditions on root growth cultured in liquid medium for propagation of roots. Left: cultured in 24 h/day dark. Right: cultured in 16 h/day light. (f), Callus and differentiated buds originating from roots induced by culture on solid medium supplemented with BAP and IAA of 1.0 mg/l. (g), Callus originated from roots induced by culture on solid medium supplemented with BAP of 1.0 mg/l and 2,4-D of 0.1 mg/l. (h), Differentiated buds from callus originating from roots induced on solid medium supplemented with BAP of 1.0 mg/l.

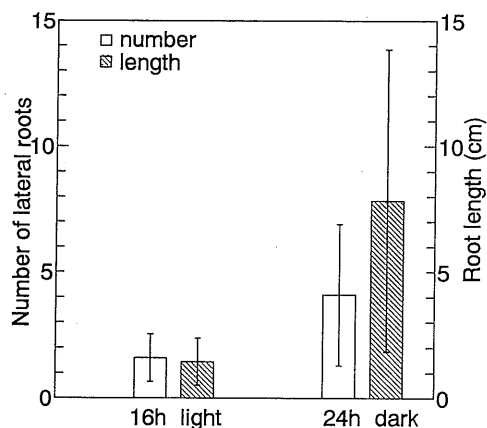


図-4. 光照射時間と根長および側根数との関係
The relationships between light irradiation time and root lengths and lateral root numbers

縦線は標準偏差を示す。

Note: Vertical bars represent standard deviations of the means.

調に進み、10 個体すべてを鉢上げすることができた。

鉢上げした個体は、移植の翌日から葉が落ちはじめ、1 週間後には全個体ですべての葉が落ちた。しかし、3 週間目には新しい葉を展開しはじめる個体があり、新しい葉を展開した個体は順調に成長した (図-2d)。バーミキュライトにさし木して発根させた個体の内 5 個体は、新しい葉を出さずに枯死した。これらの個体は、活着した 5 個体よりも小さく、発根の時期が遅れた。

3. 根の増殖と根からの不定芽の分化

カルスからの不定根を 1 cm 長に切り取って、根の増殖用液体培地で根の増殖を試みた結果について、培養開始 8 週間後に調査を行った。外植片 1 切片当りの平均側根数と側根長を調査したところ、図-4 に示したような結果を得た。また、培養 8 週間後のようすを図-2 e に示した。側根数、伸長量のいずれも遮光条件下で培養した方が照射条件下で培養したものより、それぞれ 2.6 倍、5.4 倍ほど高かった。したがって、分根や根の

表-5. 根からのカルスおよび不定芽の分化に対するホルモンの影響

The effects of hormones on calluses and adventitious buds induced from roots after 7 weeks of culture

Hormones (Concentrations: mg/l)	Nos. of explants	Nos. of explant which did not form calluses and buds	Nos. of explants which formed calluses	Nos. of calluses with differentiated buds
BAP (0.1)	10	10	—	0
BAP (1.0)	10	10	—	0
BAP (2.0)	10	10	—	0
BAP (1.0)*	15	10	—	0
BAP(1.0)+IAA (0.01)	10	10	—	0
IAA (0.01)**	10	8	2	0
IAA (0.01)*	10	10	—	0
IAA (0.1)	10	4	6	0
IAA (0.1)*	10	4	6	0
IAA (1.0)	10	2	8	2
BAP(1.0)+NAA (0.01)	10	4	6	0
NAA (0.01)**	10	7	3	0
NAA (0.01)*	10	2	8	0
NAA (0.1)	10	2	8	1
NAA (0.1)**	10	1	9	0
NAA (1.0)	10	0	10	0
BAP(1.0)+2,4-D (0.01)	10	10	—	0
2,4-D (0.01)**	10	10	—	0
2,4-D (0.01)*	10	9	1	0
2,4-D (0.1)	10	4	6	0
2,4-D (0.1)**	10	6	4	0
2,4-D (1.0)	10	0	10	0

* Liquid medium without gelrite. ** Low temperature treatment.

伸長には暗黒の方が適していることが明らかである。藤原と小島(4)は、小麦と水稻の培養根の伸長における光条件の影響について調べ、本研究と同様に遮光下のものが側根の長さ、数において著しく多かったことを報告している。また、ソラマメ、シロハウチワマメ、コショウソウの水耕栽培でも、根は暗所が最もよく成長することが報告されている。ただし、短期間の実験では光は根の成長に影響を及ぼさないという報告もある(6)ので、光と根の伸長の関係は一概には結論できないかもしれない。

根からのカルス形成用培地での培養の結果を表-5に示した。BAPの単独処理区では、濃度、低温処理あるいは培地には関係なく、いずれもまったく変化はみられなかった。1.0 mg/l の BAP に IAA を 0.1 mg/l 添加した区では、ほとんど変化がみられず、2 個体で外植根の切断面、または表面上の 1 カ所からわずかに白色のカルスが分化しただけであった。IAA を 0.1 mg/l 添加した区では、10 本中 6 本がカルス化し、IAA の 0.1 mg/l 区と同様にカルスは外植根の切断面あるいは表面上の 1 カ所から分化した。しかし、分化したカルスはそのほとんどが増殖せず、幅 5 mm 以上に増殖したのは、通常区(低温処理をしていない区)で 1 個、低温処理区で 2 個だけであった。また、通常区の 2 個、低温処理区の 3 個で、白色のカルス上に薄い緑点が認められた。IAA を 1.0 mg/l 添加した区は、カルス化した 8 個のうちの 4 個は 1 カ所から白いカルスがわずかに出ているだけで、他の 4 個は白色の部分と濃い緑色部分があり、その中の 1 本から培養 10 週間目に不定芽が分化した(図-2 f)。さらに、1 週間後にもう 1 本から不定芽の分化が認められた。

NAA を添加した区では、低濃度でもカルスの形成が認められた。しかし、0.1 mg/l 添加区では、幅 5 mm 以上にまで増殖したのは通常区の 1 個だけで、これは緑色の部分を有していた。他は IAA 0.01 mg/l 添加区と同様に、カルスの成長量は小さく、外植根の断面または表面の 1 カ所からわずかに白色のカルスが分化し、薄い緑点ができたのは通常区で 2 個、低温処理区で 2 個であった。また、NAA を 0.01 mg/l 添加した液体培地でも、8 本で白い小さなカルスが根の断面から分化した。NAA 0.1 mg/l 添加区では、通常区、低温処理区ともにカルス化したすべての個体に緑点があり、その緑点から通常区で 1 個不定芽が分化した。NAA 1.0 mg/l 添加区では、カルス化した白色のカルス上に緑色の部分が存在する大きなカルスであった

表-6. 培養 8 週間後における根由来のカルスからの不定芽の分化

Bud differentiations from calluses originating from roots after 8 weeks of culture

Hormones (Conc. : mg/l) in callus formation media	Nos. of transferred calluses	Nos. of calluses with differentiated buds	Rates of calluses with differentiated buds (%)
BAP+IAA (0.1)	2	0	0
BAP+IAA (0.1) (LT)*	1	0	0
BAP+NAA (0.1)	11	7	64
BAP+NAA (0.1) (LT)	6	2	33
BAP+NAA (0.01)	2	2	100
BAP+2,4-D (0.1)	4	0	0
BAP+2,4-D (0.1) (LT)	4	1	25

* Low temperature treatment.

が、不定芽は分化しなかった。

2,4-D の 0.01 mg/l 添加区では、固形培地では変化が認められず、液体培地で 1 個だけ外植根の切断面からわずかに白色のカルスが分化した。2,4-D の 0.1 mg/l ならびに 1.0 mg/l 添加区では、カルス化したものはすべて緑色の大きなカルスになった(図-2 g)。

IAA 1.0 mg/l 添加区で 2 個体、NAA 0.1 mg/l 添加区で 1 個体から不定芽が分化した。しかし、これらの不定芽は伸長しなかった。そこで、直径 5 mm 以上に増殖したカルスを、BAP 単独の培地に移植した。移植したカルスは、表-6 に示したように NAA を添加した区で培養したカルスから不定芽を分化できた(図-2 h)。分化した不定芽は、9 週間後に継代し、その 5 週間後には 5 cm にまで伸長した。

これらの結果から、根から再生植物体を得るためには、一度カルスを経由しなければならないことがわかった。また、本研究で用いたホルモンの種類では、BAP と NAA を組み合わせた培地でカルスを誘導し、その後このカルスを BAP 単独の培地へ移植して、不定芽の誘導を促すのが最もよい方法と考えられる。また、BAP と IAA を 1.0 mg/l ずつ添加した培地でも 2 個体から不定芽が分化したので、さらに高濃度の IAA を添加した培地で培養した場合には不定芽の分化がどのような結果を期待できるのかを把握する必要があるのかもしれない。

いずれにせよ、ハナアカシアの組織培養利用による幼植物体の再生には、カルスから直接不定芽を誘導することが最も有効であり、またカルスから誘導した根を経由することでも可能であり、さらに根からの再生

を試みる際には一度カルスを経由する必要があることが明らかになった。

引用文献

- (1) BROWN, D. L. (1980) Application of tissue culture technology to production of woody biomass. In Energy Agency Proc. Brighton England, Oct. 30-Nov. 1.
- (2) CHALUPA, V. (1984) *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* MILL.). Biol. Plant. **26**: 374~377.
- (3) DAVIS, J. M. (1987) Differential responses to *in vitro* bud culture in mature *Robinia pseudoacacia*. L. Plant Cell Rep. **6**: 431~434.
- (4) 藤原彰夫・小島邦彦 (1955) 植物根の生理化学的研究 (第1報)—水稻ならびに小麦の分離根の生育に及ぼす環境条件の影響について—。日土肥 **26**: 295~298.
- (5) 初島住彦 (1976) 日本の樹木. 879 pp, 講談社, 東京.
- (6) 倉石 晋・西成典子訳 (1973) 植物生理学入門 (下). 626 pp, 東大出版会, 東京.
- (7) MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. **15**: 473~497.
- (8) NOGUCHI, Y. and YAMAKAWA, O. (1988) Rapid clonal propagation of Ginger (*Zingiber officinale* ROSCOE). Jpn. J. Breed. **38**: 437~442.
- (9) 高山真策 (1990) クローン植物の大量増殖. 組織培養 **16** (12): 436~439.

(1994年1月10日受理)