

ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) の耐塩性カ ルスの選抜

陳, 任
九州大学農学部林学科

玉泉, 幸一郎
九州大学農学部林学科

齋藤, 明
九州大学農学部林学科

<https://doi.org/10.15017/10924>

出版情報 : 九州大学農学部演習林報告. 75, pp.15-26, 1996-12-26. 九州大学農学部附属演習林
バージョン :
権利関係 :

ニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) の耐塩性カルスの選抜*

陳 任**・玉 泉 幸一郎**・齋 藤 明**

抄 録

ニセアカシアの胚軸からのカルスの誘導, 誘導カルスからの不定芽の分化及び不定根の分化に適した培地の組成, ホルモン濃度及び培養環境を検討し, カルス培養系を確立した。すなわち, カルス誘導には MS (Murashige *et al.*, 1962) 培地が最も適しており, 2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) 1 μ M と BAP (6-ベンジルアミノプリン) 10 μ M を加えた培地で誘導されたカルスの不定芽分化率が高かった。カルスからの不定芽分化には, NAA (α -ナフトレン酢酸) 0.1 μ M と BAP 6 μ M から 10 μ M を組み合わせた培地が適しており, 不定根の分化には IAA (3-インドール酢酸) 単独で 6 μ M から 9 μ M 加えた培地が適していた。

この培養系に基づいて, 中国の3産地から採取された種子を類型(無縞, 有縞)別にカルスを誘導した。更に誘導されたカルスを, NaCl を 0.15M, 0.20M 及び 0.25M 添加した耐塩性選抜用培地で培養した。その結果, 産地間, 類型間で耐塩性に差があり, 懐仁産, 無縞類型のカルスで耐塩性が強かった。カルスで得られた耐塩性は, それぞれの実生苗の耐塩性と類似しており, カルスからの耐塩性選抜は有効な手法であると考えられた。

キーワード: 胚軸培養, 耐塩性カルス選抜, ニセアカシア

1. はじめに

地球の温暖化及び大気汚染等生活環境の劣悪化が危惧されてきた今日, 森林の保全や緑化は最も緊急を要する課題であると言われる。特に砂漠とその隣接する半乾燥地の塩類集積土壌が地球上の陸地のかかなり広大な面積を占めており(松本, 1993), 耐塩性を有する植物の創出によって緑化を推進することは今日の重要な課題になっている。耐塩性植物の創出については, 交配, 選抜, 固定という従来の手法は時間を要するので, 最近ではバイオテクノロジーの利用による研究が盛んに行われている(Lebrun, 1985; Rains, 1986; Davis, 1989; Han, 1993)。

本研究で扱ったニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) は根粒菌の共生による窒素固定能や耐塩性を有し, また葉面のガス吸収能が高いため各種劣悪環境での緑化や大気浄化用樹種として近年注目されてきた(鄒, 1994)。ニセアカシアはもともと北アメリカの原産で17世紀から世界各地に導入され, 広く栽培されている。ニセアカシアの組織培養に関する

* CHEN, R., GYOKUSEN, K. and SAITO, A. : Screening of NaCl-Tolerant *Robinia pseudoacacia* L. Callus through *in Vitro* Culture.

** 九州大学農学部林学科

Department of Forestry, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81

る研究は、芽 (Chalupa, 1987; Davis, 1987), 葉 (Hu, 1985; Chalupa, 1988; Arrillaga, 1993), 根 (Isikawa, 1987), 枝 (Davis, 1987), 節間 (Chalupa, 1983), 形成層 (Fukuda, 1986), 萌芽枝 (Chalupa, 1987; Cívínova, 1990), 腋芽 (Barghchi, 1987), 子葉 (Fukuda, 1986; Arrillaga, 1993) ならびに胚軸 (Fukuda, 1986) 等の器官培養に関する報告が多い。また一方では、胚軸 (鄒, 1994; 福田, 1994), 子葉 (鄒, 1994; 福田, 1994), 萌芽枝 (Han, 1990), 節間 (福田, 1994), 形成層 (Han, 1990; 福田, 1994) 等の組織由来のカルス培養に関する研究もある。更に、胚培養 (Merkle, 1989; Han, 1993; Arrillaga, 1994) 及びプロトプラストの分離と培養 (Han, 1988) を試みた報告もある。耐性個体の創出には、耐カナマイシン (kanamycin) の遺伝子導入についての報告 (Davis, 1989; Han, 1993) はあるが、培養細胞の変異の誘導と選抜による耐性個体の創出に関する報告は見当たらない。

本研究ではニセアカシアの胚軸を材料にして、胚軸からのカルスの誘導、カルスからの不定芽の分化、得られたシュートからの不定根の分化等における最適な培地の組成、ホルモンの濃度及び培養条件を検討し、カルス培養系を確立した。さらに、この培養系を基本として、カルスレベルでの耐塩性細胞の選抜に適した塩処理の濃度、期間等を種々検討し、耐塩性個体の創出を試みた。

2. 材料と方法

2.1. カルス培養による植物体の再生

2.1.1. カルスの誘導

中国懷仁産のニセアカシアの2個体(無縞, A1)から採種した種子を針刺した後クリーンベンチ内に持ち込み、3%の次亜塩素酸ソーダ液で20分間滅菌し、滅菌水で4回以上洗浄した後、滅菌した0.5%の蔗糖を含む寒天培地(寒天濃度は0.8%)に播種した。下胚軸の伸長を促進するため28°Cの暗黒下に5日間置いた後、25°C、光合成有効光量子束密度(PPFD) $50 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、明期16時間/日の照明下で10日間培養して、無菌の稚苗(下胚軸長5-8cm)を得た。次いで、その下胚軸を約2mmから3mmの長さに切断してカルス誘導培地に置床した。以下の実験においては、この2個体の下胚軸を別々に培養し、統計解析においては、2回の繰り返しとして処理した。

カルス誘導培地には、MS培地 (Murashige *et al.*, 1962), B5培地 (Gamborg *et al.*, 1968), WPM培地 (Lloyd *et al.*, 1981) のいずれかに2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) と6-ベンジルアミノプリン (BAP) の濃度を種々組み合わせさせた34種類(表1)を用いた。

培養4週間後のカルス形成の良好な培地は、MS培地のNo.1~16の培地(表1)であったので、これらのカルスを3週間ごとに同じ培地で継代培養した。

2.1.2. 不定芽の分化

誘導された培養12週間目のカルスを約0.3gずつに分割し、培地の種類ごとに不定芽分化培地に20個ずつ移植した。不定芽分化培地はMS培地に α -ナフトレン酢酸 (NAA) とBAPを各種組み合わせさせた12種類(表1)とした。

2.1.3. 不定根の分化

不定芽分化培地で誘導された不定芽を同じ組成の培地に移植して培養を続け、シュート

が2cm以上に伸長した時点でシュートを切り取り、カルス誘導と不定芽分化の前歴を無視して、ランダムに不定根の分化培地に10本ずつ移植した。不定根の分化培地には、1/2MS培地（MS培地の無機成分を1/2濃度とした培地）にNAAと3-インドール酢酸（IAA）を単独または各種組み合わせた14種類（表1）を用いた。

以上の各種類の培地は、全てpHを5.8に調整し、2.4g/lのゲルライト（gelrite）を加えた後25mm×120mmの試験管に10mlずつ分注し、加圧滅菌した。培養条件は、全て温度25°C、PPFD 50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ の蛍光灯照明下で明期16時間/日とした。

2.2. 耐塩性カルスの選抜方法及び耐塩性個体の創出

2.2.1. 産地間、類型間、個体間の耐塩性の差異

中国の3産地（P1：懐仁産，P2：朝陽産，P3：蘇家屯産）から産地毎に種子の有縞と無縞の2類型（A1：懐仁産，無縞，A1'：懐仁産，有縞，A2：朝陽産，無縞，A2'：朝陽産，有縞，A3：蘇家屯産，無縞，A3'：蘇家屯産，有縞）に分けて採種した。各類型から3個体（A1の2個体はカルス形成に用いた2個体と同じ）を選んで、これらの種子を上述の発芽処理と同じ方法で発芽させ、カルスを誘導した。カルスの誘導には、不定芽の分化率の高いカルス誘導培地No.13の培地を用いた。培地は滅菌した後、90mm×20mmのシャーレに20mlずつ分注した。培養4週間後から、3週間毎に同じ組成の培地に継代を続けた。10週間後に増殖した良好な緑色カルスのみを耐塩性選抜培地に移した。耐塩性選抜培地は、

表1 ニセアカシアの胚軸由来の培養に用いた各種基本培地とホルモンの組成
Table 1 Various basal media and hormone concentrations used in *Robinia pseudoacacia* hypocotyl culture.

Medium	Hormone concentration																																	Sucrose			
Media for callus inducement from hypocotyl																																					
	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
MS	2,4-D(μM)	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	0	0	0	0	0	0	0	2%
	BAP(μM)	1	1	1	1	3	3	3	3	6	6	6	6	10	10	10	10	15	15	15	15	20	20	20	20	0	0	0	0	1	3	6	10	15	20		
	No.	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68		
B5	2,4-D(μM)	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	0	0	0	0	0	0	2%	
	BAP(μM)	1	1	1	1	3	3	3	3	6	6	6	6	10	10	10	10	15	15	15	15	20	20	20	20	0	0	0	0	1	3	6	10	15	20		
	No.	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102		
WPM	2,4-D(μM)	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10	0	0	0	0	0	0	2%	
	BAP(μM)	1	1	1	1	3	3	3	3	6	6	6	6	10	10	10	10	15	15	15	15	20	20	20	20	0	0	0	0	1	3	6	10	15	20		
Media for adventitious shoot inducement from callus																																					
	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																								
MS	NAA(μM)				0.1	0.1	0.1	0.1	1	1	1	1	1																						2%		
	BAP(μM)	1	3	6	10	1	3	6	10	1	3	6	10																								
Media for adventitious root inducement from shoot																																					
	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14																						
1/2MS	NAA(μM)	1	3	6	9	12							3	6	9	3																				1%	
	IAA(μM)					1	3	6	9	12	3	6	9	6																							

カルスの誘導時に用いた培地に 0.15M (N1), 0.20M (N2), 0.25M (N3) の 3 濃度の NaCl を添加した培地を用いた。カルスは産地、類型、個体ごとにそれぞれ 10 個を供試した。培養条件は、カルス誘導と同じであった。NaCl 濃度別塩処理 7 日目のカルスの生存率 (7 日目におけるカルス全重に占める緑色カルス重の比率) を調査した。

実生苗の耐塩性は、各類型の種子を温度 25 °C、湿度 70%、自然光の下で水耕法で育て、1 カ月後に培養液にカルスの耐塩性選抜培地と同じ 3 濃度の NaCl を加えた。いずれの処理も 10 本ずつ供試した。NaCl 濃度別塩処理 7 日目の実生苗の生存率 (生存している実生苗の本数/供試実生苗の本数×100%) を調査した。

以上カルスと実生苗の耐塩性測定は全て 2 回繰り返した。

2.2.2. 耐塩性個体の創出

耐塩性が強いと認められた懐仁産、無縞のカルス (A1 の 3 個体) を材料として、前述と同じ培地に 0.20M の NaCl を添加した培地で 1 週間、2 週間及び 3 週間の塩処理を行ったカルスを不定芽の分化培地 No.7 に移植した。あるいは塩処理したカルスを NaCl を含まないカルス継代用培地 No.13 で 2 週間回復させた後不定芽分化培地 No.7 に移植した。培養条件は不定芽の分化と同じとした。

3. 結果と考察

3.1. カルス誘導に対する培地の組成及び 2,4-D, BAP の効果

培養後 1 週間目から外植体上に淡い緑色または白色のカルスの形成が始まった。培養 2 週間目になると、2,4-D フリーまたは BAP フリーの MS, B5, WPM の培地で誘導されたカルスは次第に白色となり、2,4-D と BAP を組み合わせた各培地ではカルスは増殖し続け、全て緑色のカルスになった。しかしその後、B5 と WPM の培地で培養したカルスの成長は次第に遅くなり、緑色も褪色した。また B5 培地で誘導されたカルスの一部では次第に褐変した。これらの結果から、MS 培地がカルスの誘導に適していると言える。

MS 培地を用いて 2,4-D と BAP 影響を調べるために、培地ごとに培養 4 週間のカルスの生重量を比較し、生長量を図 1 に、その分散分析を表 2 に示した。MS 培地では、2,4-D, BAP 及び両者の交互作用に全て 1%水準で有意差が認められた。2,4-D フリーの場合は、カルスの形成が非常に悪かった。2,4-D と BAP を各種組み合わせて添加した培地でも 2,4-D 濃度の増加とともにカルスの生重量が増加した。これは 2,4-D がオーキシンの一種であり、一定の濃度範囲で細胞の分裂と増殖に効果があったためと考えられる。

一方、BAP フリーの場合には、何れの 2,4-D 濃度で形成したカルスも全て白色になった。この結果から、緑色カルスの形成には BAP の添加が不可欠であることが示された。図 1 によると、2,4-D の濃度が低い場合 ($3\mu\text{M}$ 以下) には、BAP の濃度の増加とともにカルスの生重量が減少し、カルスの成長が抑制された。2,4-D の濃度が $3\mu\text{M}$ 以上の高い場合には、BAP の濃度が $3\mu\text{M}$ から $6\mu\text{M}$ まで増加するにつれて、カルスの成長が促進され、更に $15\mu\text{M}$ から $20\mu\text{M}$ と高くなるとカルスの成長が逆に抑制される傾向が見られた。従って、BAP の作用には単純に量的なものではなく、2,4-D との交互作用が存在すると考えられる。

Han (1990) は緑色カルスのみで器官の再生が可能であり、この緑色カルスを形成させ

表2 各培養段階の分散分析
Table 2 Analysis of variance on each culture stage.

Analysis item	SV	df	F
Effect of MS medium supplemented with different 2,4-D and BAP concentration on mean fresh weight(g) of callus	D(2,4-D level)	4	31.900 ***
	B(BAP level)	6	6.140 ***
	D×B	24	4.010 ***
# Influence of callus and adventitious shoot induction medium on adventitious shoot formation rate(%) from tested callus	S(Shoot medium)	11	1679.570 ***
	C(Callus medium)	15	432.250 ***
	S×C	165	309.080 ***
# Comparision of NaCl-tolerant varieties among provenances,seed types and individuals in callus culture stage	P(Provenance)	2	15.220 ***
	A(Seed type)	1	4.422 **
	I(Individual)	2	2.923
	N(NaCl level)	2	214.853 ***
	R(Repetitive error)	1	0.000
	P×N	4	3.822 ***
	A×N	2	4.015 ***
	I×N	4	1.391

Data were transformed to $X = \text{ARCSIN}(\text{SQR}(X))$.

, *Significant at $P \leq 0.05$ or 0.01 , respectively.

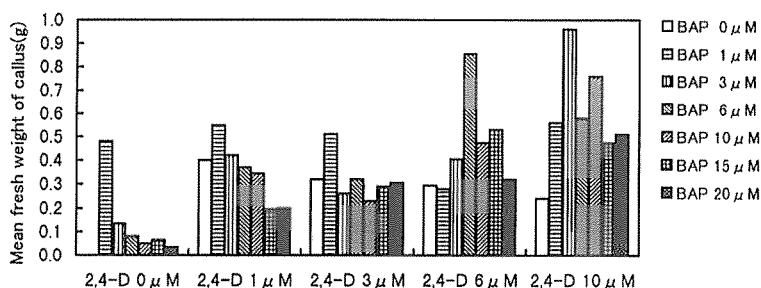


Fig. 1 Effect of MS medium supplemented with different 2,4-D and BAP concentrations on mean fresh weight of callus formed from hypocotyl.

図1 MS培地でカルスの成重量に及ぼす2,4-D, BAPの影響

るためには高濃度の BAP が必要であることを報告した。一般的に、緑色カルスの形成には光照射等外的環境因子のほか、窒素や糖等の養分濃度、特にサイトカイニン等のホルモンバランスが重要な役割を演じている(小島, 1993)。今回の実験では緑色カルスの形成は比較的容易で、BAP と 2,4-D を種々組み合わせて加えた MS 培地の全ての培地で緑色カルスを形成した。この結果は鄒(1994)の報告とも一致する。一方、出口ら(1992)が指摘したような 2,4-D 単独または IAA と NAA の組み合わせ等、BAP を添加しないもので良いという結果とは相反する結果となった。しかし、カルス誘導の目的は分化能を持っているカルスを得ることにあり、これはカルスの形成状態からは判断が非常に難しい。従って、カ

ニセアカシアの胚軸由来のカルスからの不定芽誘導は、Han (1989) や Davis (1985) によって難しいとされていたが、今回の実験では一番高い不定芽の分化率が 67.5% で、高い分化率を得ることができた。

3.3. 不定根分化に対する NAA, IAA の効果

不定根分化培地に移植後の 2 週間目から培地によっては相次いでシュートからの発根が見られた。4 週間目の各培地における発根の様子を図 2 に示した。

不定根分化培地に IAA を添加した場合には、濃度が $6\mu\text{M}$ から $9\mu\text{M}$ の範囲では正常根の発根率が高かった。濃度が $3\mu\text{M}$ 以下では基部が黒くなったシュートが多くなった。 $12\mu\text{M}$ では、シュートの基部がほとんどカルス化した。NAA を添加した場合は、シュートが全てカルス化または太い根になった。IAA+NAA の場合は、IAA $6\mu\text{M}$ +NAA $6\mu\text{M}$ の培地で正常根の発根率が 70% になったが、太い根が 30% 出現した。IAA $3\mu\text{M}$ +NAA $3\mu\text{M}$ の培地ではシュートの基部が全て黒くなり、IAA $9\mu\text{M}$ +NAA $9\mu\text{M}$ または NAA $3\mu\text{M}$ の培地ではシュートの基部がカルス化した。これらの結果から、培地に NAA を用いるとカルス化しやすいため、IAA を単独で $6\mu\text{M}$ から $9\mu\text{M}$ の濃度範囲内で用いると良好な発根が得られると言える。発根に対する IAA の効果は鄒 (1994) の報告と類似している。しかし、IAA の濃度は鄒が報告した半分の濃度であった。

得られた幼植物体は馴化の際に落葉が認められたが、その後新しい葉が展開し順調に成長した。

3.4. 産地間、類型間及び個体間のカルス耐塩性の差異

耐塩性選抜培地で培養すると、3 日目からカルスが褐変したり、固くなったり、あるいは枯死するものがあったが、7 日目から徐々に安定した成長を示した。7 日目の生存率（7 日目におけるカルス全重に占める緑色カルス重の比率）の分散分析では（表 2）、選抜培地の NaCl 濃度の増加と共に、カルスの生存率は著しく減少した（1%水準）。NaCl の濃度が生理的塩水の濃度（0.15M 8.7g/l）の場合には、カルスの表面が少し乾燥する現象が認められたが、成長は正常に維持された。NaCl の濃度が 0.25M の場合には、少数のカルスだけが生

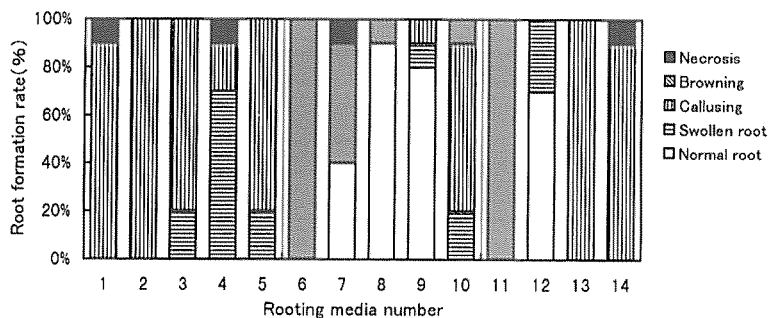


Fig. 2 Effect of adventitious root induction medium and hormone concentration on root formation from tested shoots.

図2 発根に与えるホルモンの種類と濃度の影響

きていたが、周辺の細胞はほとんど褐変し枯死した。このようにカルスが半枯死状態に達する NaCl の濃度は 0.20M 程度であることから、選抜後に耐塩性カルスを再分化させるためには、NaCl の濃度は 0.20M 程度が適していると考えられる。

産地間の耐塩性の差が最も大きく、1%の水準で有意であった。類型間(有縞と無縞)でも5%で有意差があったが、個体間には差がなかった。更に *q* 検定によると、耐塩性の差異は次のようになった：産地 P1 (懐仁産) > 産地 P2 (朝陽産) > 産地 P3 (蘇家屯産)，(産地内) 無縞 > 有縞，(類型内) 個体間の差異なし。

この結果から、今後耐塩性の選抜は主に耐塩性の強い産地、類型を基準とすることが重要と言える。

3.5. カルスと実生苗の耐塩性の相関関係

塩処理別にカルスと実生苗の耐塩性の関係を図3に示した。カルスでは密封されたシャーレで蒸散が少なく、しかも細胞集塊と培地を均一に接触させることができなかったのに対し、実生苗は水耕法で培養させ、塩分の吸収も速く、蒸散も大きかったので、塩害の程度がカルスより顕著に認められたが、被害の発現状況はカルスで見られた産地間、類型間の差に類似していた。そこで処理別にカルスと実生苗の生存率の相関関係 *r* 値 (図3) を調べると、全て1%で有意な相関関係が認められた。つまり、カルスレベルで行った耐塩性の選抜は実生苗の選抜とほぼ同じ結果が得られたことになり、カルスからの耐塩性選抜は信頼できる手法であると考えられる。カルスを用いて耐性の選抜を行う場合の最大の利点は、

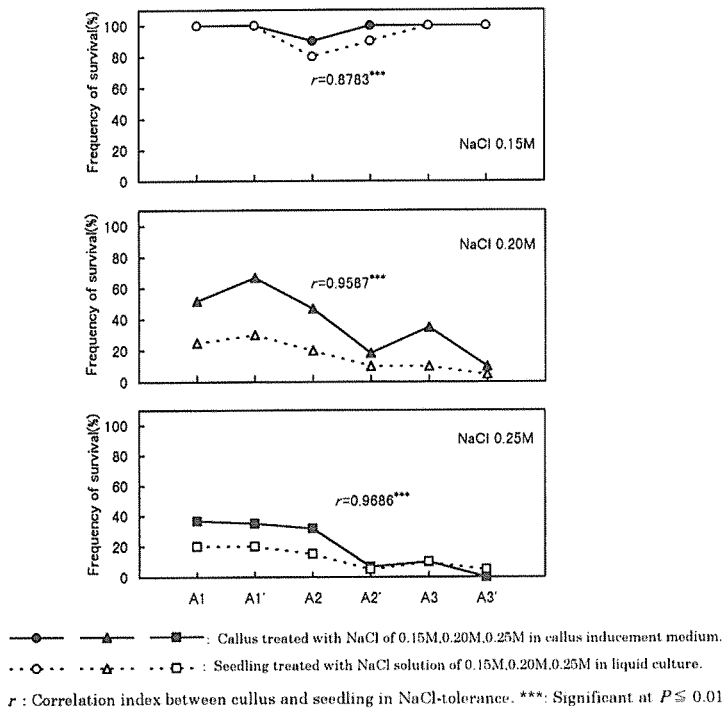


Fig. 3 Comparison of NaCl-tolerance varieties among callus and seedling.

図3 カルスと実生苗の耐塩性差異の比較

短い期間に多数の細胞を供試できることで、個体を対象にした選抜と比べてはるかに高い効率を期待できる。選抜された細胞は更に植物体を再生することが可能であるから、耐性個体の創出の一つ有効な手段となりうる。

3.6. 塩処理期間とカルの生存率の変化

耐塩性が強いとされた懐仁産、無縞のカルスを NaCl 0.20M 濃度で塩処理を続けると、2週間目から枯死が発生したが、枯死する数は顕著に減少し(図4)、その代わりに緑色が褪色したカルスが多くなった。また、塩処理の期間が長くなると一部のカルスが培地上で成長を回復することが観察された。塩処理のはじめに、耐塩性が弱いカルスはほとんど死滅したが、固形培地上で培養したカルスは一般に大きな細胞集塊となるため、同じように選抜培地で処理しても細胞を均一に塩分に接触させることが出来ないため、初回の選抜では、塩分と接触しないために生存している細胞と真の耐塩性を有する細胞が混在していたと思われる。また、カルの生化学的適応のため一部分の細胞が塩害を発現しないことも考えられる。これらの耐塩性を持っていない細胞は選抜回数の増加とともに次第に除去することができる。ところが細胞の再分化能は塩処理を続けると失われる場合が多く(福井, 1985)、選抜後に再分化させることが必須条件なので、選抜では耐性だけでなく再分化能をも選抜の指標としなければならない。そのために、ニセアカシアのカルスの選抜には NaCl 0.20M の濃度で塩処理の期間は2週間程度が最適と考えられる。

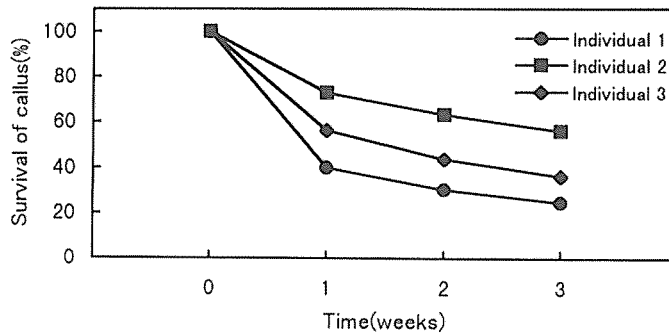


Fig. 4 Influence of NaCl treatment time on survival of callus.

図4 NaCl 処理期間とカルの耐塩性(生存率)の変化

3.7 耐塩性カルスからの幼植物体の再生

選抜されたカルスを直接不定芽分化培地に移植した場合には、カルの緑色が絶えず褪色し、不定芽の分化がみられなかった。一方、2週間無塩のカルス継代培地に回復させたカルスは緑色を維持でき、一部のカルスで緑色小突起が観察された。この中で塩処理2週間の二つのカルスのみから不定芽が分化したが、ほとんどのカルスは不定芽を形成できず、次第に固くなった。分化した不定芽は成長が非常に遅く、その中の1本は途中で枯死した。残った1本は2カ月の培養を経ても、シュートの長さは1cmを越えず、色と葉の形態も正常に培養したシュートと違うことが観察された。

選抜されたカルスからの不定芽の分化率が非常に低いのは、一般的にカルスを塩処理した後では分化能を失うことが多い、あるいは塩処理によってカルス自身が生化学的適応による内生ホルモンの変化等によって再分化の条件が変わるため（福井，1985）と言われる。今回分化した不定芽の成育が遅かったことの原因は、塩処理から得られた耐塩性カルスの再分化の条件が変わったためか、培養過程で遺伝子突然変異を起こしたためかどうかは明らかにされていない。今後、耐塩性カルスの再分化機構の検討を行う必要がある。

今回の実験では選抜した耐塩性カルスから幼植物体の再生はできなかったが、ニセアカシアの胚軸を外植体としてカルスからの幼植物体の再生方法及びカルスレベルでの耐塩性選抜方法等耐塩性個体の創出に向け必要な技術を検討した。今後はもっと多くの耐塩性カルスを選抜して、耐塩性カルスからの再生難点を克服すれば、耐塩性ニセアカシア個体を創出することが期待できる。

引用文献

- ARRILLAGA, I. (1984) : Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust. *Plant Cell Reports* 13 (3-4) : 171-175
- ARRILLAGA, I. (1993) : Regenerating plant from *in vitro* culture of black locust cotyledon and leaf explants. *Hort. Science* 28 (9) : 942-945
- BARGHCHI, M. (1987) : Mass clonal propagation of *Robinia pseudoacacia*. *Plant Science* 53 : 183-189
- CHALUPA, V. (1983) : *In vitro* propagation of willows (*Salix* spp.), European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Biologia Plantarum* 25 (4) : 305-307
- CHALUPA, V. (1987) : Vegetative propagation of broad-leaved woody species by cuttings and by an *in vitro* method. *Lesnictví* 33 (6) : 501-510
- CHALUPA, V. (1988) : *In vitro* propagation of small-leaved linden (*Tilia cordata*), black locust (*Robinia pseudoacacia*) and mountain ash (*Sorbus aucuparia*) and growth of trees cultivated *in vitro*. *Lesnictví* 34 (8) : 705-720
- CIVINOVA, B. (1990) : Stimulation of the regeneration capacity of tree shoot segment explants *in vitro*. *Biologia Plantarum* 32 (6) : 407-413
- DAVIS, J. M. (1985) : Regeneration of shoots from leaf disk explants of black locust, *Robinia pseudoacacia* L.. Proc. 4th North Central Tree Improvement Conf., East Lansing, Mich. pp. 29-34
- DAVIS, J. M. (1987) : Toward efficient clonal propagation of mature black locust trees using tissue culture. *Nitrogen Fixing Tree Research Reports* 5 : 57-58
- DAVIS, J. M. (1989) : Detection and analysis of T-DNA in crown gall tumors and kanamycin-resistant callus of *Robinia pseudoacacia*. *Can. J. For. Res.* 19 (9) : 1118-1123
- 出口美和 (1992) : マメ科木本植物におけるカルス形成. 日林九支研論集 45 : 51-52
- 福井三郎 (1985) : 植物培養細胞の変異と選抜. 講談社サイエンティフィック, 東京, pp. 101-106, 169-170
- FUKUTA, T. (1986) : Studies on tissue culture of tree-cambium X : Lignin-carbohydrate complex in suspension-cultured callus of *Robinia pseudoacacia*. *木材学会誌* 32 (101) : 827-832
- 福田忠徳 (1994) : 組織培養の epoch-making - ハリエングジュの組織培養. *植物細胞工学* 16 (1) : 61-65
- HAN, K. H. (1988) : Isolation and culture of protoplasts from tissue of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Nitrogen Fixing Tree Research Reports* 6 : 68-70

- HAN, K. H. (1990) : Differential responses persist in shoot explants regenerated from callus of two mature black locust trees. *Tree Physiology* 6 (2) : 235-240
- HAN, K. H. (1993) : Cambial tissue culture and subsequent shoot regeneration from mature black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell Reports* 12 : 185-188
- HAN, K. H. (1993) : Regeneration of a transgenic woody legume (*Robinia pseudoacacia* L., black locust) and morphological alterations induced by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Plant Science* 88 : 149-157
- HU, Q. J. (1985) : A study on induction of plantlets from mature leaves of *Robinia pseudoacacia*. *Hereditas, China* 7 (4) : 20-21
- ISIKAWA, H. (1987) : Generation of adventitious plant organs by tissue culture methods in forest trees. *Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute, Japan* 343 : 119-153
- 小島邦彦 (1993) : 植物組織培養の栄養学. 朝倉書店, 東京, pp. 87-97
- LEBRUN, L. (1985) : Selection *in vitro* for NaCl-tolerance in *Vitis rupestris* scheele. *Annals of Botany* 56 : 733-739
- LEE, B. S. (1986) : Variation in salt tolerance of hybrid poplars through *in vitro* culture. *Res. Rep. Inst. For. Korea* 22 : 139-144
- 松本 聡 (1993) : 土壌圏の拡大と土壌改良. *植物細胞工学* 5 (6) : 430-463
- MERKLE, S. A. (1989) : Regeneration of *Robinia pseudoacacia* via somatic embryogenesis. *Can. J. For. Res.* 19 (2) : 285-288
- MOEZEL, P. G. (1990) : Development of salt tolerant clonal trees in Australia. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society, Australia*, 40 : 73-78
- MORBITO, D. (1994) : Response of clones of *Eucalyptus microtheca* to NaCl *in vitro*. *Tree Physiology* 14 (2) : 201-210
- RAINS, D. W. (1986) : Isolation and characterization of mutant cell lines and plants salt tolerance. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 3, Academic Press Inc, pp. 537-547
- SAITO, A. (1980) : Effects of growth regulators on somatic callus culture in *Cryptomeria japonica*. *日林誌* 62 (1) : 17-18
- SAITO, A. (1980) : Effects of inorganic elements in the medium on shoot differentiation from *populus* callus. *日林誌* 62 (4) : 147-149
- 齋藤 明 (1991) : 林業用種苗生産の現状と将来の課題. *植物の化学調節* 26 (2) : 190-204
- 最新バイオテクノロジー全書編集委員会編 (1989) : 木本植物の増殖と育種. 農業図書, 東京, pp. 46-53, 184-196
- 鄒 徳本 (1994) : ニセアカシアのカルス培養による幼植物体の作出. *九大農芸誌* 49 (1.2) : 1-7

(1996年6月29日受付; 1996年9月18日受理)

Summary

The method for the regeneration of plantlets from callus culture obtained from the hypocotyl of *Robinia pseudoacacia* L. was established. It was found that MS (Murashige *et al.* 1962) medium was most suitable for callus culture. The callus induced on MS medium supplemented with 1 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in combination with 10 μ M benzylaminopurine (BAP) was considered highly efficient for shoot regeneration. Shoots differentiating from the callus were observed only on the MS medium containing 6-10 μ M BAP and 0.1 μ M naphthaleneacetic acid (NAA). The shoots produced roots on 1/2 strength MS medium containing 6-10 μ M 3-indoleacetic acid (IAA) alone.

Based on these findings, calli from dark and spotted seed types from 3 provenances were induced on the best suitable callus inducement medium (MS medium containing 1 μ M 2,4-D and 10 μ M BAP). The calli were then transplanted to the NaCl-tolerance screening media, the best suitable callus inducement medium supplemented with different concentrations of NaCl (0.15M, 0.20M and 0.25M), to investigate the difference in the NaCl-tolerance among provenances, between seed types of each provenance and among individuals of each seed type, and to determine the suitable NaCl concentration and exposure time for NaCl-tolerance screening. There were significant differences among provenances and between seed types but no significant difference among individuals. The dark seed type of Huai ren provenance had the strongest NaCl-tolerance in this testing. These results were very similar to the findings on the NaCl-tolerance test on seedlings. Therefore, this method was considered useful for NaCl-tolerant callus screening.

It seemed very difficult to regenerate plantlets from the NaCl-tolerant calli. The calli could not differentiate into shoots when they were transferred directly to the adventitious shoot inducement medium (MS medium containing 6-10 μ M BAP and 0.1 μ M NAA) and had to be transferred to the best suitable callus inducement medium for 2 weeks for refreshing after screening. However, the shoot growth was unhealthy and abnormal morphology was observed. This problem must be addressed in next experiment.

Key words : hypocotyl culture; NaCl-tolerant callus screening; *Robinia pseudoacacia* L.