

ニセアカシアのカルス培養による幼植物体の作出

鄒, 徳本
九州日中交易株式会社

玉泉, 幸一郎
九州大学農学部造林学講座

矢幡, 久
九州大学農学部造林学講座

<https://doi.org/10.15017/23526>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 49 (1/2), pp.1-7, 1994-11. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

ニセアカシアのカルス培養による幼植物体の作出

邹 德本*・玉泉 幸一郎・矢幡 久

九州大学農学部造林学講座
(1994年3月10日受理)

Regeneration of Plantlets by Callus Culture of *Robinia pseudoacacia* L.

De Ben ZOU, Koichiro GYOKUSEN and Hisashi YAHATA

Laboratory of Silviculture, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812

緒 言

最近では、炭酸ガスの蓄積の場としての森林の存在が重要視されてきた。ところが、地球規模での森林面積の減少、砂漠化の進行、ならびに荒廃地域の拡大などが危惧されている。そこで、気象害、塩害、病虫害、大気汚染の害など様々な粗悪環境に耐える優良種苗を何等かの手段で創出し、これを速やかに大量増殖して幅広く植林し、地球の緑化など生活環境の維持増進に努めることが今日的な課題になってきた。

こういった背景を踏まえて、著者等は、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大気浄化用植栽樹種としてもリストアップされ、さらには全国道路緑化樹木の上位にランクされているニセアカシアに着目し、各種の新たな耐性を有する個体の創出に向けての一連の研究を行っている。しかし、新しい耐性個体の創出には、細胞選抜などの技術をも活用する必要がある。但し、この場合には、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。この培養系の確立は、種苗の大量供給は勿論のこと、様々な変異体の作出に資するための手段を提供できるという可能性がある。本研究で扱ったニセアカシアの組織培養については、成木の枝や芽の培養によって誘導されたシュートの腋芽や節間部を利用して増殖できたという報告 (Barghchi, 1987; Chalupa, 1983, 1987; Davis *et al.*, 1987, 1988; Han *et al.*, 1990)、芽生えの葉片や胚軸、ある

いはこれらの組織から誘導されたカルスからシュートを増殖できたという報告 (Brown, 1980; Vavis *et al.*, 1985; Han *et al.*, 1989; Arrillage *et al.*, 1993; 福田ら, 1994)、また芽生え由来のカルスから増殖を試みた報告 (邹ら, 1989)、この芽生えから誘導したカルスで増殖に成功したという報告 (Merkle *et al.*, 1989)、また分離したプロトプラストの培養を試みたという報告 (Han *et al.*, 1987) など最近ではかなり多くの研究が行われている。このように、芽生えの組織から誘導されたカルス培養で幼植物体を得たという報告も比較的多い (Davis *et al.*, 1985; Merkle *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1989, 1990; Arrillaga *et al.*, 1993; 福田ら, 1994)。しかし、培養条件が著者によってそれぞれ異なり、一定の傾向を把握できない。

そこで、本研究ではニセアカシアを材料にして、芽生えからカルス塊を誘導し、その誘導されたカルス塊から再分化を図るための効果的な手法を検討したので報告する。

本研究を進めるに際し、九州大学農学部林学科農林生物物理学講座奥達雄教授及び九州大学附属演習林林木達郎教授より多大のご協力と有益なるご助言を戴いた。ここに心から感謝申し上げます。また、本論文を作成するにあたり、丁寧なご指導とご校閲を賜った九州大学農学部林学科第三 (造林学) 講座齋藤明教授に感謝申し上げます。

材料および方法

1. カルスの誘導

九州大学構内に生育しているニセアカシアの約20年

* 九州日中交易株式会社

生の個体から、1990年の秋に種子を採集し、低温貯蔵した。供試の都度、種子を取り出して、クリーンベンチ内に持ち込み、3%次亜塩素酸ソーダ液で10分間滅菌し、滅菌水で洗浄した。そののち、70°Cの滅菌水で20分間温湯処理を行い、滅菌シャーレ内に均等になるように播種し、発芽促進処理を行った。この発芽促進処理後24時間ののちに、膨張した健全な種子だけを選んで、20mm×120mmの試験管内に2%のサッカロースと0.8%の寒天を注入してオートクレーブで滅菌した寒天培地に播種した。播種後30日目には子葉が完全に展開したので、その芽生えを胚軸(上胚軸・下胚軸)・幼根・子葉の部分に滅菌したメスで分割した。

その中から上胚軸と下胚軸の各15個体、子葉の20個体を任意に選び出し、表1に示した5種類のカルス誘導用滅菌培地に置床し、培養した。用いた培地は、MS培地(Murashige *et al.*, 1962)、B5培地(Gamborg *et al.*, 1968)、WPM(Lloyd *et al.*, 1981)の3種類の培地に0.50mg/lと1.00mg/lの2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)、1.00mg/lのナフタレン酢酸(NAA)と6-ベンジルアミノプリン(BAP)を組み合わせた5種類の培地とした。各培地は、サッカロースを20g/l、寒天を8g/l添加後、pH値を5.8に調整

し、オートクレーブで滅菌した。培養条件は、温度25°C、照度33 μ Em⁻²s⁻¹であった。なお、カルス誘導に際しては、明期16時間のもとで培養を行った。

これらのカルス誘導用培地で45日間培養し、カルスを誘導した。誘導されたカルスの一部では、すでにシュートや根の分化を観察できた。そこで、培養物からカルスだけを取り出し、そのカルスを約50mgずつに分割し、上述と同一のカルス誘導用培地でさらに14日間の継代培養を行い、カルスの増殖を行った。

2. カルスからのシュートの分化

このようにして得られたカルスを再度約50mg/lに分割し、表1に示した7種類の不定芽分化用培地で各培地ごとに25本ずつの継代培養を行った。培地としては、MS、1/2 MS(MS培地の有機無機成分の濃度を1/2にした培地)、1/2 B5(B5培地の各成分の濃度を1/2にした培地)、1/2 WPM(WPM培地の各成分の濃度を1/2にした培地)の4種類の培地とし、これに0.20mg/lのNAAと3-インドール酢酸(IAA)、2.00mg/lと0.20mg/lのBAPを組み合わせた7種類の培地を用いた。培地調整の要領は、上述と同じであった。但し、明期16時間のもとで培養を行った。

表1 培養に用いた各種基本培地とホルモン組成
Table 1. Various basic media and hormone contents used in culture.

基本培地の種類	サッカロース濃度 (%)	ホルモン濃度 (mg/l)					
		2,4-D	BAP	NAA	IAA	IBA	GA ₃
カルス分化用培地	1 MS	2	0.50				
	2 MS	2	1.00				
	3 MS	2	1.00	1.00	1.00		
	4 B5	2	1.00				
	5 WPM	2	1.00				
不定芽分化用培地	1 MS	2		2.00			
	2 MS	2		2.00	0.20		
	3 MS	2		2.00		0.20	
	4 MS	2		0.20			
	5 1/2MS	2		2.00			
	6 1/2B5	1		2.00			
	7 1/2WPM	1		2.00			
不定根分化用培地	1 1/2MS	1				2.00	
	2 1/2MS	1				0.20	
	3 1/2MS	1				0.02	
	4 1/2MS	1				0.20	0.02
	5 1/2MS	1			2.00		
	6 1/2MS	1			0.20		
	7 1/2MS	1			0.02		
	8 1/2MS	1			0.20		0.02

3. シュートからの発根

不定芽が分化し、2cm以上に伸長したシュートを切りとり、表1の8種類の不定根形成用培地の各培地に均等に25本ずつ植え付けた。培地は、1/2 MS培地とし、これに0.02mg/l, 0.20mg/l, 2.00mg/lのIAAとインドール酢酸(IBA)、さらに0.02mg/lのGA₃を各種組み合わせた8種類の培地を用いた。培地調整の要領は、上述と同じであった。

培養は、最初の1週間は暗黒条件とし、そののち明期16時間のもとで行った。

結果および考察

1. カルスの誘導

培地に胚軸、下胚軸や子葉を置床後、8日目頃から培地によってはカルス形成を観察できるようになった。上胚軸、下胚軸や子葉をカルス誘導用培地に置床後、45日目における培地ごとのカルス形成率を表2に、また培地ごとのカルスの生重量を図1に示した。カルス形成率は、どの培地でも高く培地間での違いはあまり認められなかったが、外植体を用いた芽生えの組織間ではカルスの形状に相違が認められただけであった。即ち、上胚軸ではシュートの分化がかなり多く認められ、子葉では根の分化がかなり多く認められた。上胚軸でシュートの分化率が高いという傾向は、上胚軸自体に腋芽が含まれていた可能性が考えられるが確かではない。カルスの生重量では培地間で差が認められ、WPM培地以外のMS培地およびB5培地での分化が高かった。この結果は、Han *et al.* (1990)、Arrillage *et al.* (1993) や福田 (1993) が同様にMS培地を用いて効果的にカルスを誘導できたという結果とも一致す

る。但し、Han *et al.* (1990) が5~10μMと高い濃度のBAPを添加する必要があることを提起しているが、この報告では、そのように高い濃度のBAPを添加する必要はなく、彼らの約1/10~1/20の量でカルスを効果的に誘導できることがわかった。外植体として用いた芽生えの組織間では、どの培地でも子葉でのカルス形成が低い傾向にあり、子葉でのカルス形成が旺盛

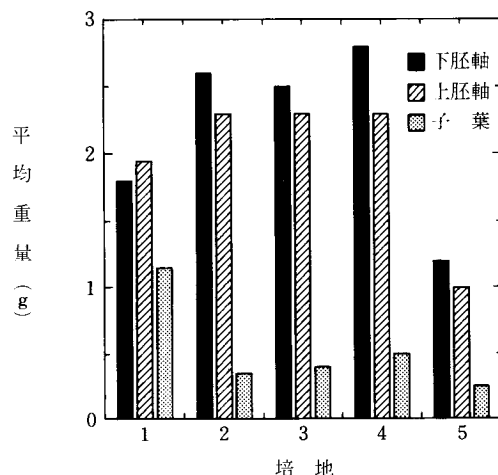


図1 芽生えの各組織から形成されたカルスの平均生重
Fig. 1. Mean fresh weight of callus formed from various organs of seedling.

培地 1 : MS+2, 4-D1.00mg/l, NAA1.00mg/l, BAP1.00mg/l
 2 : MS+2, 4-D0.50mg/l
 3 : MS+2, 4-D1.00mg/l
 4 : B5+2, 4-D1.00mg/l
 5 : WPM+2, 4-D1.00mg/l

表2 芽生えの供試各組織からのシュート、根、カルスの形成率 (%)

Table 2. Shoot, root and callus formation rate from various organs of seedling.

培地の種類	ホルモン組成と濃度(mg/l)	下胚軸			上胚軸			子葉		
		シュート	根	カルス	シュート	根	カルス	シュート	根	カルス
MS	2, 4-D 0.50	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	65.9	86.3
	2, 4-D 1.00	0.0	13.3	93.3	33.3	20.0	93.3	0.0	45.0	90.0
	2, 4-D 1.00									
	NAA 1.00	0.0	0.0	100.0	46.7	0.0	80.0	0.0	5.0	75.0
B5	BAP 1.00									
	2, 4-D 1.00	0.0	20.0	100.0	20.0	13.3	100.0	0.0	35.0	95.0
WPM	2, 4-D 1.00	0.0	13.3	86.7	6.7	20.0	93.3	0.0	40.0	85.0

であるという福田ら (1994) の研究結果とは相反した。このことは、この報告で用いた MS 培地に添加した BAP の濃度は 1.00mg/l であったが、この濃度は彼らが培地に添加した量と同じであることを考慮すると、芽生えの組織の違いによってオーキシンの質的量的要求が異なることを暗示している。一方、カルスの色は、培地によって違いが認められ、1.00mg/l の 2, 4-D, NAA, BAP を添加した MS 培地 (培地-1) では外植体の違いとは全く無関係に緑色を呈していたが、他の 0.50~1.00mg/l の 2, 4-D だけを添加した培地では全て白色であった。この結果から、緑色のカルスを効果的に誘導するには、培地に 1mg/l の BAP の存在が不可欠であることが考えられる。

2. 不定芽の分化

45日間のカルス誘導のための培養を行ったのち、さらに14日間継代培養を行った胚軸、幼根および子葉由来のカルスをそれぞれ不定芽分化用培地に移植し、その移植後14日目になって不定芽の分化が認められた。不定芽分化用培地に移植してから45日目における不定芽の分化の様子を表3に示した。その結果、カルス誘導時に用いた培地の種類によって不定芽の分化率が異なった。子葉由来のカルスの一部を除いて、上胚軸と下胚軸では 1.00mg/l の 2, 4-D, NAA ならびに BAP の 3 者を添加したカルス誘導用培地 (表1の3) で形成されたカルスが最も高い不定芽の分化率を示す傾向にあった。この結果は、Han *et al.* (1989) や Davis *et al.* (1985) によってすでに指摘されているように、

胚軸由来のカルスからはシュートを誘導しにくいという報告とは相反する。また、カルス誘導用培地で培養した結果、緑色カルスの形成をみたカルスで不定芽の分化能が高かったことになり、この傾向は Han *et al.* (1990) や福田 (1993) の研究とかなりよく一致している。従って、ニセアカシアのカルス培養によるシュート形成には、カルス誘導時に用いた培地組成が大きく影響することを示している。即ち、芽生えの胚軸などを外植体として、1.00mg/l の 2, 4-D ならびに BAP の両者を添加したカルス誘導用培地 (表1の3) で誘導された緑色カルスを用いる必要があることを意味する。また、不定芽分化用培地間でも不定芽の分化率に違いがあり、2.00mg/l の BAP を添加した 1/2 MS 培地や 1/2 B5 培地で高く、2.00mg/l の BAP を添加した 1/2 WPM 培地では低い傾向を示した。福田ら (1994) は 5.00mg/l, Arrillaga *et al.* (1993) は 4.4 μ M と高濃度の BAP を培地に添加することがシュートの誘導には不可欠であることを力説しているが、必ずしも高濃度の BAP の添加が必要ではなく、2mg/l 程度で充分であることがわかった。あるいは、この報告で用いた 1/2 MS 培地や 1/2 B5 培地という基本培地の各組成を半減した培地の使用が効果的に作用したとも考えられる。さらに、不定芽分化用培地に添加したホルモン間で不定芽の分化率に差が認められ、特に BAP を単独に添加した培地で高い結果を示した。

以上のことから、カルスから不定芽の分化を期待するには、1.00mg/l の 2, 4-D, NAA と BAP の 3 者を

表3 カルスからの不定芽の分化率 (%) に与えるカルス形成時の前歴の影響
Table 3. Influences of culture condition at callus formation on differentiation rate (%) of adventitious buds from tested callus.

基本培地の種類	ホルモンの組成 と濃度の違い (mg/l)		下胚軸由来のカルス 上胚軸由来のカルス 子葉由来のカルス								
			(カルス誘導時に用いた培地の種類)								
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
MS	BAP	2.00	24.0	16.7	33.3	16.0	15.4	28.6	0.0	33.3	0.0
	BAP	2.00									
	NAA	0.20		6.7	15.4			13.3	20.0	0.0	12.5
	BAP	2.00									
	IAA	0.20		0.0	6.7			7.1	15.4	0.0	11.1
	BAP	0.20		13.3	21.4			15.4	20.0	0.0	14.3
1/2MS	BAP	2.00		20.0	42.8			18.2	30.5	12.5	44.4
1/2B5	BAP	2.00		25.0	35.7			23.1	38.5	0.0	50.0
1/2WPM	BAP	2.00		15.4	21.4			10.0	20.0	0.0	22.2

添加した MS 培地で誘導された緑色のカルスを用いて、そのカルスを 2.00mg/l の BAP だけを添加した 1/2 MS 培地で培養することが効果的であると考えられる。

一方、不定芽が分化する過程を観察したところ、最初にカルスの上に散在的に緑色の小突起が形成され(図2)、その後緑色の小突起が次第に大きくなり半球状緑色突起に成長した。次いで、これらの半球状緑色突起は体細胞胚様の組織となり、その一部が生長点に

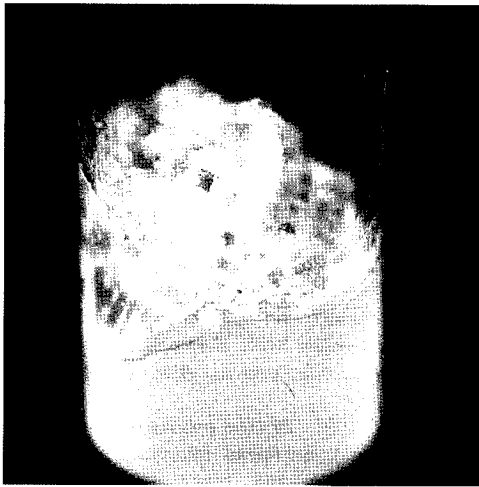


図2 カルス上に散在的に形成された緑色小突起
Fig. 2. Green small protuberances formed on callus.



図3 カルスから分化した不定芽
Fig. 3. Adventitious buds redifferentiated from callus.

なって成長を開始し、葉原基を伴った芽が形成され(図3)、シュートを形成した。

3. 不定根の分化

カルスから不定芽が分化し、2cm以上に伸長したシュートを切り取って、カルス誘導時に用いた培地の違い、あるいは誘導できたカルスからの不定芽の分化の際に用いた培地の違いとは無関係に、ランダムにシュートを用意し、そのシュートを発根用の培地に移植した。移植後14日目頃から培地によっては発根を観察できるようになった(図4)。移植後40日目における発根の様子を表4に示した。1/2 MS培地に2.00mg/lのIAAを添加した培地で最も発根率が80%と高かった。次いで、0.20mg/l、0.02mg/lのIAAの添加培地の順であった。この場合、2.00mg/lよりも高濃度のIAAを添加した培地を供試しなかったため、IAAの最適濃度を把握できなかったが、発根にはかなり高濃度のIAAを必要とすることが考えられる。これまでに、ニセアカシアのカルスから誘導されたシュートの発根にIAAを用いた例は全く無い。一般には、 $1\mu\text{M}$ か0.50mg/lのIBAが発根誘導に用いられている(Han *et al.*, 1990; 福田, 1993)。この報告では、0.02mg/lから2.00mg/lのIBAを単独に添加した1/2 MS培地、0.20mg/lのIBAと0.02mg/lのGA₃の両者を添加した1/2 MS培地では、発根率は極めて低かった。このように、2.00mg/lのIBAを添加した1/2 MS培地での発根率が極めて低く、2.00mg/lのIAAを添加した1/2 MS培地で高い結果を得たことは、他の報告と異なる(Han *et al.*, 1990; 福田,

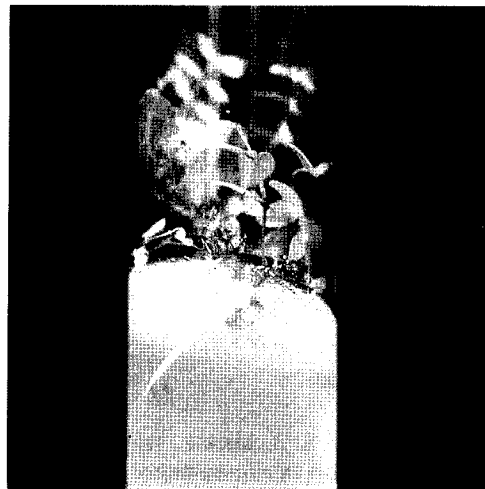


図4 シュートから分化した不定根
Fig. 4. Roots redifferentiated from shoot.

表4 発根に与えるホルモンの種類と濃度の影響
Table 4. A kind of hormone and concentration on rooting from shoot.

ホルモンの種類と濃度 (mg/l)	発根率 (%)
IBA 2.00	7.7
IBA 0.20	0.0
IBA 0.02	0.0
IBA 0.20+GA ₃ 0.02	6.7
IAA 2.00	80.0
IAA 0.20	40.0
IAA 0.02	114.3
IAA 0.20+GA ₃ 0.02	33.3



図5 訓化ののち鉢出しされた幼苗
Fig. 5. Seedlings planted in pot.

1993). 得られた幼植物体は、常法によって訓化したのち容易に鉢出しできた (図5)。

以上の結果から、ニセアカシアのカルス誘導、あるいはカルスからの幼植物体の再生は極めて容易であることが分かった。しかも、子葉ばかりでなく、むしろ上胚軸や下胚軸でも外植体として用いることができることを立証できた。これによって、カルス培養、細胞選抜や細胞融合などの技術を活用することで、各種の新たな耐性を有するニセアカシアの創出に向けた諸種の研究に明るい見通しを得ることができた。

文 献

Arrillaga, L. and S. A. Merkle 1993 Regenerating plants from *in vitro* culture of Black Locust Cotyledon and leaf explants, *HoetScience* 28: 942-945

- Barghchi, M. 1987 Mass clonal propagation *in vitro* of *Robinia pseudoacacia* L. (black locust) cv. Jaszkierei. *Plant Sci.*, 53: 183-189
- Brown, C. L. 1980 *Application of tissue culture technology to production of woody biomass*. In, Energy Agency Proc. Brighton England, Oct. 30 -Nov. 1
- Chalupa, V. 1987 Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. *Biol. Plant*, 29: 425-429
- Chalupa, V. 1983 *In vitro* propagation of willows (*Salix* spp.), European mountain-ash (*Sorbus aucuparia* L.) and black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Biol. Plant*, 25: 305-307
- Davis, J. M. and D. E. Keathley 1985 Regeneration of shoots from leaf disk explants of black locust, *Robinia pseudoacacia* L. *Proc. 4th North Central Tree Improvement Conf., East Lansing, Mich.* p. 29-34
- Davis, J. M. 1987 Differential responses to *in vitro* bud culture in mature *Robinia pseudoacacia* L. *Plant Cell Reports*, 6: 431-434
- Davis, J. M. and D. E. Keathley 1988 *In Vitro* propagation of a black locust tree with an unusual phenotype. *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports*, 6: 65-67
- Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Ojima 1968 Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158
- Han, K. -H., J. M. Davis and D. E. Keathley 1987 Isolation and culture of protoplasts from callus tissue of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports*, 6: 68-70
- Han, K. -H., J. M. Davis and D. E. Keathley 1989 Regeneration of whole plants from seedling-derived callus of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Nitrogen Fixing Tree Res. Reports*, 7: 129-131
- Han, K. -H., J. M. Davis and D. E. Keathley 1990

- Differential responses persist in shoot explants regenerated from callus of two mature black locust trees. *Tree Physiol.*, **6**: 235-240
- 福田忠徳 1994 組織培養の epoch-making ③—ハリエンジュの組織培養— 植物細胞工学 **6**: 61-65
- Lloyd, G. and B. H. McCown 1981 Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture, **30**: 421-427
- Merkle, S. A. and A. T. Wiecko 1989 Regeneration of *Robinia pseudoacacia* via somatic embryogenesis. *Can. J. For. Res.*, **19**: 285-288
- Murashige, T. and F. Skoog 1962 A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Phys. Plant.*, **15**: 437-497
- 邹 徳本, 須藤昭二, 玉泉幸一郎 1989 ニセアカシアのカルスからの芽の分化, 第100回日林論: 515-516

Summary

Establishment of culture system suitable for regeneration of plantlets by culture of callus originated from seedling of NISEAKASIA (*Robinia Pseudoacacia* L.) was tested. Callus from seedling were induced from sterilized seedling using solid 1/2 MS medium supplemented with 2, 4-D, NAA and BAP of 1.00mg/l. Adventitious buds were differentiated as a results of culture with callus transplanted to solid 1/2 MS medium supplemented with BAP of 2.00mg/l. The rooting of shoots cultured from adventitious buds was observed by transplanting to solid 1/2 MS supplemented with IAA of 2.00mg/l, and plantlets were propagated efficiently.