

ハナアカシアのカルス経由の植物体再生

九州大学農学部 出口 美和・玉泉幸一郎
矢幡 久

1.はじめに

植物の組織培養の目的は様々であり、カルス経由による植物体再生の培養系は細胞選抜・細胞融合などの技術を生かした品種改良に発展できる可能性がある。

ハナアカシア (*Robinia hispida* L.) は、紅色の美しい花をつけ、庭木や園芸に用いられる。しかし、現在市販されているものは増殖を接ぎ木に頼っている。

今回は、このハナアカシアを用いて、大量増殖の方法として利用でき、かつ将来育種利用に発展できる培養系として、形成層由来のカルスを経由した植物体再生の培養系の確立を試みた。

2.材料と方法

ハナアカシアの外植体は、購入した接ぎ木苗木の当年枝から採取した。これらは、小枝・葉を落とし、70%エタノールを噴霧して殺菌し、クリーンベンチ内に持ち込み、エタノールが蒸発してからメスで外皮をはがし、内皮・木部を含めて、形成層を約1cmの長さに切って置床した。

培地は基礎培地としてMURASHIGE-SKOOG (MS) 培地の成分をすべて1/2にした1/2MS培地を用い、これにショ糖20g/l, gelrite2.4g/lを加え、pH5.6~5.8に調整後、加圧殺菌したものを用いた。すべての不定芽分化培地と多芽体増殖培地の1つは、上記の基本培地にgelriteを加えない液体培地を用いた。植物ホルモンは、カルス誘導培地には、2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) (1.0mg/l), 不定芽分化培地には6-ベンジルアミノプリン (BAP) (0.1mg/l), 2, 4-D (1.0mg/l), 3-インドール酢酸 (IAA) (1.0mg/l) のいずれか1つを添加した。多芽体増殖培地にはIAA (1.0mg/l) (液体培地), BAP0.1mg/lまたは1.0mg/lのいずれか1つを加えた。また、発根培地にはインドール酪酸 (IBA) (1.0mg/l) を加えた。培養条件はすべて温度25℃, PPFD60molm⁻²S⁻¹ 明期16hr/day, 暗期8hr/dayとした。液体培地のものは、

往復振とう式の培養器を用い、100回/minで振とう培養した。

馴化方法は、²⁾の方法にならった。発根した個体の培地を水道水で洗い流した後、パーミキュライトを添加したプラスチックポット (6cm角) に移植した。培養は、グリーンハウスを使い、温度25℃, 湿度70%, 自然光とした。プラスチックポットで1週間培養した後、蓋を取り、食品用のラップをかけ、直径0.5cmの穴を1つ開けた。その後、2週間おきに穴を2つずつ増やし、約2ヵ月間培養した。

3.結果と考察

カルス形成の結果を表-1に示す。供試個体33個のうち29個でカルスが形成された。培養3日目ぐらいから外植体上に薄い緑色のカルスが出来はじめ、その後緑色のカルス部分が拡大した。また、その周囲に半透明の白色カルスが出来る個体もあった。培養6週間後に同じ組成の培地に継代した。このときのカルスの平均生重は0.33gであり、このうち1個体からは不定根が分化していた。継代培養4週間後に、不定芽分化培地 (液体培地) に移植した。このときのカルスの平均生重は1.60gで、継代した29個体のうち22個体から不定根が分化していた。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、不定根が分化しているカルスは緑色の部分と半透明な白色の部分の両方があり、分化していないカルスは緑色部分だけだった。また、カルスの生重で比較すると、不定根が分化していないカルス (平均0.70g) より、分化しているカルス (平均1.80g) の方が大きかった (図-1)。このことから、成長のよいカルスが白色部分を有し、そのカルスの白色部分から不定根が分化していると考えられる。

不定根を有するカルスを不定芽分化 (液体) 培地で培養した結果を表-2に示す。2, 4-Dを添加した培地では、不定芽の分化はみられず、出ている不定根もカルス化してきた。BAPとIAAを添加した培地では、培養3週目で不定芽の分化が起こり、7週間後にはすべて

の個体で不定芽の分化がみられた。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が観察された。この不定芽の由来は確認していないが、カルスの周囲から発生しており、おそらくカルスから分化したものと思われる。

これらの不定芽からはさらに芽が分化し、培養を続けるうちに不定芽の塊である多芽体となった。この多芽体は約0.1gづつに分けて増殖培地へ移植した。増殖培地での培養の結果を図-2に示す。生重で比較すると、BAPを1.0mg/ℓ加えたときがもっとも大きかった。これは培地との接触面にできるカルスの量が多かったためと思われる。また、発根に使えるシュート(4cm以上)数では、BAPを0.1mg/ℓ添加した培地で1個体あたり1.5本ともっとも多かった(図-2)。IAA(1.0mg/ℓ)では、多芽体は1つまたは複数の芽が伸長してシュートになるということはなく、量的な増加のみであった。増殖培地での培養の目的は、多芽体の増殖、維持と再生植物体となり得る、つまり発根培地へ移植可能なシュートを作ることである。したがって、ここで用いた中ではBAP(0.1mg/ℓ)が適していると思われる。

増殖培地(BAP(0.1mg/ℓ)またはBAP(1.0mg/ℓ))で7週間培養した後、長さが4cm以上になったシュート5本を発根培地へ移植した。このうち2個体が発根し(表-2)、再生植物体が得られた。発根培地に移植したシュートのすべての葉は、移植時ビトリフィケーションを起こしていた。しかし、移植後約1週間て頂芽が展開し始め、新しく展開した葉はビトリフィケーションしていない通常の葉であった。

発根培地で発根した2個体のうち1個体を用いて馴化を試みた。プラスチックポットに移植後、順調に根を伸ばし、地上部も新しい葉を展開した。しかし、7週目で地上部が枯れはじめ、8週間後には完全に枯れた。一般にビトリフィケーションを起こした個体は馴化しにくい¹⁾と言われており、これが今回の馴化の失敗の原因の一つと考えられる。また、馴化の時期が5月末から7月であり、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部の光条件または光条件の変化について行けなかったためではないかと考えられる。

4. おわりに

本研究で、ハナアカシアのカルス経由の植物体再生の培養系は一応確立できた。しかし、各分化及び増殖培地で用いた培地やホルモンの種類は少なく、今後培地およびホルモンの種類・濃度を検索する必要がある。馴化については供試数が少なく、今回の方法の良否を議論することはできないが、さらに光条件、ビトリフィケーションの問題についての検討が必要であろう。今回用いた多芽体は、現在も継代培養で維持、増殖中

であり、すでに1年以上培養を続けている。今後は、この材料を用いて、培養系をより確実に効率的なものとするために実験を続ける予定である。

引用文献

- (1) 半田 高・原田 宏：生物環境調節, 30(2), 53~58, 1992
- (2) 邹 徳本：ニセアカシアの変異と育種に関する研究, 77~78, 九大学位論文, 1992

表-1 カルス形成の状況

培養 日数	供試 個体数	カルス形成	汚染	枯死	不定根	平均生重 (g)
		個体数 (形成率:%)				
6週間	33	29(88)	3(9)	1(3)	1(3)*	0.33±0.15
10週間**	29				22(76)*	1.60±0.64

*カルスを形成した個体数に対する分化率(%)
**6週間後に同じ組成の培地に継代した

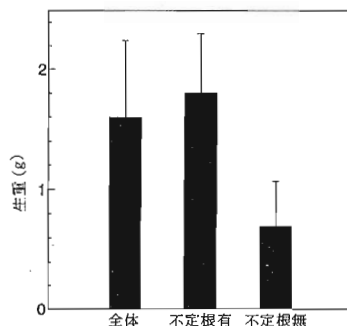


図-1 培養10週間後のカルスの平均生重

表-2 分化培地における器官形成

	ホルモン (mg/ℓ)	供試個体数	不定芽	発根
			個体数 (分化率:%)	
不定芽分化	2,4-D(1.0)	2	0(0)	-
	BAP(0.1)	3	3(100)	-
	IAA(1.0)	3	3(100)	-
発根	IBA(1.0)	5	-	2(60)

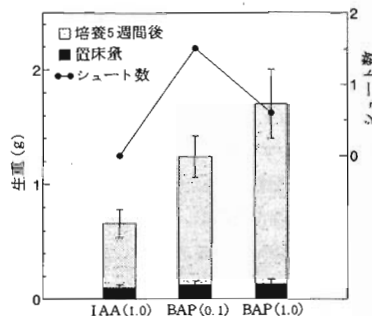


図-2 増殖培地での多芽体の平均増殖量と発生シュート(4cm以上)の平均数