

## ニセアカシアの耐塩性選抜用カルスの培養方法の検討

九州大学農学部 陳 任・玉泉幸一郎  
齋藤 明

## 1. はじめに

植物の組織または細胞を高濃度の塩分を添加した培地で培養することによって、耐塩性細胞を選抜でき、さらにこれを培養することによって、耐塩性の個体を得ることができることは既に知られている。しかし、選抜された耐塩性細胞が再分化能がないかあるいは再分化能が失われる場合が多いことが報告されている。従って、耐塩性の細胞を選抜する際には、再分化能の高い培養細胞を誘導するための供試材料、培地組成の選択が必要であると考えられる。

そこで、本研究ではニセアカシア (*Robinia pseudoacacia* L.) の幼植物体 (胚軸, 子葉) を材料として、耐塩性細胞の選抜に資するために再分化能があるカルスの培養方法を確立するための方法を検討した。ニセアカシアでは、緑色カルスが分化能が高いことが報告されているので、今回の報告では、主に緑色カルスの形成に焦点を絞ってまとめた。この研究は、ニセアカシアの耐塩性個体の創出に向けての一連の研究の一環として行ったものである。

## 2. 材料と方法

ニセアカシアの種子を中国の3産地から産地毎に収集し、この種子を無菌的に発芽させ、無菌の稚苗を得た。次いで、その稚苗の上胚軸, 下胚軸, 子葉を材料として、次のような組み合わせで培養を行った。

- A. 産地  
A1(懐仁, 無織) A2(蘇家屯, 無織) A3(朝陽, 有織)
- B. 器官  
B1(下胚軸) B2(上胚軸) B3(子葉)
- C. カルス分化培地  
C1(MS) C2(B5) C3(WPM)
- D. 2, 4-Dの濃度 (mg/ℓ)  
D1(0.1) D2(0.5) D3(1.0)
- E. BAPの濃度 (mg/ℓ)  
E1(1.0) E2(2.0) E3(10.0)

## F. NAAの濃度 (mg/ℓ)

F1(0.5) F2(2.0) F3(5.0)

これらの各培地には、すべて gelrite 2.4g/ℓ を加え、pH を 5.8 に調整した後、培地を 25mm × 120mm の試験管に 10ml ずつ分注し、加圧滅菌した。

実験の方法として、以上の6因子3水準で無作為化した実験を行うには、 $3^6 = 729$  の組み合わせが必要である。そこで、実験の規模を縮小するため、今回は直交計画法  $L_{81}(3^6)$  によって、81の組み合わせに盛り込むことにした。供試数は各組み合わせ毎に外植体10個とした。培養得られた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、12週目に各組み合わせ毎に緑色カルスを得た外植体10個で緑色カルスの形成率を%で計算した。

培養条件は、すべて温度 25°C, PPF60  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  の蛍光灯照明下で明期 16 時間/日とした。

## 3. 結果と考察

## (1) カルスの形成状態の観察

培養開始後1週間目から、MS, B5培地で培養した材料では、白色カルスの形成が始まった。2週間後、全て白色カルスまたは薄い緑色カルスになった。一方、WPM培地で培養した材料はカルスの分化が観察されなかった。培養3-4週間目から各組合せのカルスの大きさ、色に違いが認められるようになった。A2(蘇家屯, 無織)からのカルスが他の産地よりやや小さかった。子葉からのカルスの増大が他の器官からのカルスより速く、緑色カルスも早めに出た。E3(BAP10.0mg/ℓ)あるいはF3(NAA5.0mg/ℓ)を添加した培地で生じたカルスは中央または下部に褐変が生じ、次第に大きくなった。これは、BAP, NAAの濃度が高すぎたものと考えられた。継代した後、各組合せのカルスは急に増大して、大きさの差が少なくなった。緑色カルスの形成率はMS培地の方がB5培地より多い傾向があった。

12週間までの緑色カルスの形成率に及ぼす各因子の単純な影響を図-1に示した。

(2) 分散分析

6因子の分散分析の結果を表-1に示した。ニセアカシアの緑色カサの形成に最も影響が大きいのは1%水準で培地の種類と認められ、MS培地が最適培地と認められた。B5培地での緑色カサの形成率はMS培地の約半数であり、WPM培地でのカサの誘導は全く認められなかった。

ホルモンでは、BAP濃度の影響は5%水準で大きかった。更にq検定をして、E1, E2, E3二つずつの有意差は5%水準で認められ、BAP濃度2.0mg/lで一番効果があった。10.0mg/lと濃度が高すぎると、カサが褐変した。

2, 4-D, BAP, NAA間の交互作用はBAPとNAAに認められた。表-2に示したように、BAP2.0mg/lとNAA0.5mg/lの組み合わせが最も良い結果を得た。

産地間、器官の影響は認められなかった。この結果は、耐塩性選抜用のカサを作る際には、材料の起源、採取の部位を問わず、培地、ホルモンの濃度さえ考慮すればよいと考えられたが、今回用いた材料は中国東北地方の狭い範囲から収集したものであったので、産地間の差が少なく、もっと広い範囲で材料を採集する必要があると考えられた。

器官別の影響は有意差が認められなかったが、子葉は割合に緑色カサが出易く、ホルモンの濃度別の影響も少なかった。下胚軸の培養には、上胚軸、子葉よりBAP, NAA濃度は低い方が良く、2, 4-D濃度が少し高い方が良い傾向を示した(図2)。

以上の分析から、ニセアカシアの再分化能がある緑色カサの培養は子葉、MS培地、2, 4-D1.0mg/l、BAP2.0mg/l、NAA0.5mg/lの組み合わせが一番良いと推測された。

引用文献

- (1) 出口 美和, 玉泉幸一郎, 齋藤 明: 日本林学会誌4, 346-354, 1994
- (2) K. - H. HAN, J. M. DAVIS, D. E. KEATHLEY: Tree Physiology 6.235-240,1990
- (3) 出口 玄一: 直交表と線点図42-45

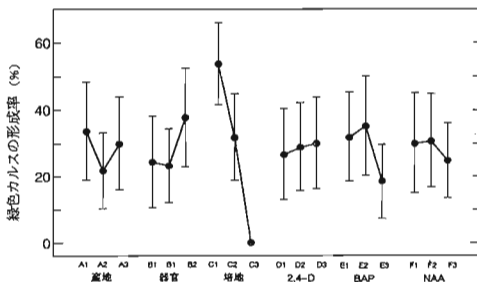


図-1 緑色カサの形成率に及ぼす各因子の影響

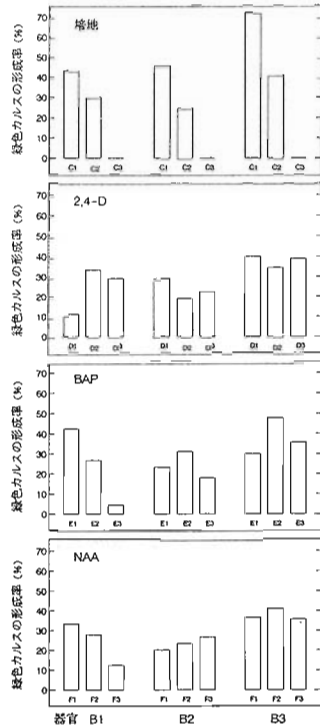


図-2 器官別の緑色カサの形成率に及ぼす培地、ホルモンの影響

表-1 分散分析表

要因	ss	df	ss
産地 A	1153.145	2	1.7229
器官 B	1653.930	2	2.4711
培地 C	30198.980	2	45.1203***
2,4-D濃度 D	200.441	2	0.2995
BAP濃度 E	2846.410	2	4.6166**
NAA濃度 F	468.395	2	0.6998
A × C	771.168	4	0.5761
A × D	1302.880	4	0.9733
A × E	2203.603	4	1.6462
A × F	1423.743	4	1.0636
B × C	1062.161	4	0.7935
B × D	2097.383	4	1.5669
B × E	2763.449	4	2.0644
B × F	1281.131	4	0.9571
D × F	1173.545	4	0.8767
D × E	1771.234	4	1.3232
E × F	3422.728	4	2.5570*
誤差 e	8031.584	24	334.6494
計	63825.910	80	

\*但し、データは  $X = \arcsin(\sqrt{SQRX})$  に変換された。

表-2 BAPとNAAの交互作用 (%)

BAP	NAA		
	F1 (0.5mg/l)	F2 (2.0mg/l)	F3 (5.0mg/l)
E1 (1.0mg/l)	32.22	32.22	30.99
E2 (2.0mg/l)	50.01*	31.11	24.45
E3 (10.0mg/l)	7.77	28.89	18.90