

温室内で育成した *Acacia auriculiformis* 一年生苗の えき芽の培養による植物体再生

渡邊良広*・井出雄二*・池田裕行*

Plant Regeneration from Axillary Bud Culture of One-year-old Seedling of *Acacia auriculiformis* Grown in Green House

Yoshihiro WATANABE*, Yuji IDE* and Hiroyuki IKEDA*

I. はじめに

Acacia auriculiformis は、オーストラリアのクイーンズランドのヨーク半島、ノーザンテリトリー北部、パプアニューギニア西部および南部、インドネシアの西イリアン、ケイ諸島に分布するマメ科樹木 (TURNBULL ed., 1986a) で、早生樹として原産地だけでなく、タイ、インド、スリランカ、マレーシア、中国など、熱帯の広い地域で造林に用いられている (TURNBULL ed, 1986 b, 1991)。

筆者らは、本種のクローン大量増殖法について検討し、これまでに、無菌的に発芽させた芽生えからの植物体再生法および継代培養法について明らかにした (井出ら, 1994)。

本種の組織培養による増殖については既にいくつかの報告があるが、必ずしも安定的な増殖が可能になっているわけではない (MITTAL *et al.*, 1989; SEMUSUNTUD and NITIWATTANACHAI, 1991)。そこで、本種の育種を進める上で、さまざまな齢の個体から安定的にクローン増殖を図る技術が求められている。

本研究では、筆者らの行なった芽生えの培養 (井出ら, 1994) の結果を参考に、温室内で育苗した苗木を材料として培養を試み、植物体を得ることができたので報告する。

II. 材料及び方法

インドネシアにおいて造林木から採取された *A. auriculiformis* の種子を、発芽促進のため紙やすりで傷をつけ、シャーレ中の水を含ませたろ紙上に置床した。発芽後芽生えを、直径 12 cm、高さ 15 cm のポットに、畑土、川砂、腐葉土等を用土として移植し、少量の化成肥料を与えて温室内で育成した。移植後 1 年を経過し約 50 cm に育った苗を供試した。

苗から、組織の比較的柔らかい新しいシュートを切り取り、葉柄の一部を残して葉を取り除いた後、えき芽を含む約 1 cm の小片に切り分け外植体とした。これを水道水で約 1 時間水洗した後、70% のエタノール中で 1 分間、Tween 20 を 1 滴添加した有効塩素量 1% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で 15 分間、表面殺菌した。外植体は、クリーンベンチ内で、滅菌水で 3 回洗浄

* 東京大学農学部附属演習林樹芸研究所

Arboricultural Research Institute in Izu, The University Forests, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo.

し、滅菌ろ紙上で風乾させた後、培地に植え付けた。培養開始時の外植体の平均長は、12.6 mmであった。また、各培地ごとの外植体の培養数は5個とした。

培養には、MS培地(MURASHIGE and SKOOG, 1962)の無機塩類濃度を1/2にした培地に、ショ糖2%を添加した0.8%寒天培地を用いた。BAP(N6-benzylaminopurine)の0 mg/l, 1.0 mg/l, 1.5 mg/l, 2.0 mg/l, NAA (α -naphthylacetic acid)の0 mg/l, 0.02 mg/l, GA₃ (Gibbereric acid)の0 mg/l, 5.0 mg/lをそれぞれ組み合わせた、全部で16種類のホルモン組成の異なった培地を用意した。

培養開始から約140日目に、誘導されたマルチプルシュートを1本ずつ切り分け、発根を期待する培地にさし付けた。切り分けたシュートの平均長は9.4 mmであった。また、各培地ごとに33本のシュートを供試した。

発根培地として、1/2 MS培地にショ糖2%を添加した0.8%寒天培地を用い、ホルモンフリーと、NAA 0.02 mg/lを添加した2種類を用意した。

すべての培地のpHを、オートクレーブ前に5.7~5.8に調整した。また培養は、25°C恒温、6,600 luxの蛍光灯照明下、16時間日長で行った。

III. 結果と考察

培養開始10日目には、外植体のえき芽からのシュートの伸長が認められた。培養期間中、雑菌の汚染が見られた外植体数は28で、全体の22.4%であった。しかし、それ以外は健全に成長したことから、用いた表面殺菌法は適当であったと考えられる。

その後、1外植体から、1本あるいは複数のシュートが伸長した(図-1)。培養開始後45日目の、えき芽からのシュートの伸長状況を表-1に示す。

GA₃およびNAAを含まない培地においては、BAP 2.0 mg/l添加区で100%の外植体で、複数のシュートの形成が見られたが、それ以下のBAP濃度では20~33%と低かった。発生したシュート数は、BAP 2.0 mg/l区では3.3本であり、他の1.2~1.7本に比べて多かった。一方、平均シュート長はBAP 2.0 mg/l区で最も短く、BAP 1.5 mg/l区で最長であった。BAPの添加効果として、1.5 mg/lまではシュートの伸長を促進するが、2.0 mg/lの添加ではマルチプルシュートの形成が起こるため、個々のシュートの長さは短くなると考えられる。

GA₃とBAPが添加されていない場合、NAA 0.02 mg/l添加区と無添加区とを比較すると、無添加区の4.2 mmに対して添加区では7.7 mmと明らかなシュートの伸長促進が認められた。一方、BAPと組み合わせて添加した場合には、BAP単独の場合には2.0 mg/lの添加で最大のマルチプルシュートの形成が見られたのに対して、より低い1.0 mg/lのBAP濃度でマルチプルシュートの形成を促進するとともに、シュートの伸長も促進した。このことから、より長いシュートを数多く得るためには、BAPとNAAを組み合わせて添加することが効果的であることがわかった。

また、GA₃を添加した場合のシュートの形成および伸長は、無添加の場合に比べややシュート数が増加した。また、最長シュートの伸長が無添加の場合に比べて促進されたが、芽生えの培養で見られたような、GA₃とNAAをあわせて添加した場合の、シュートの著しい伸長促進効果(井出ら, 1994)は認められなかった。

もっとも多数のシュートの形成が見られたのは、GA₃ 5.0 mg/lとBAP 2.0 mg/lを組み合わ

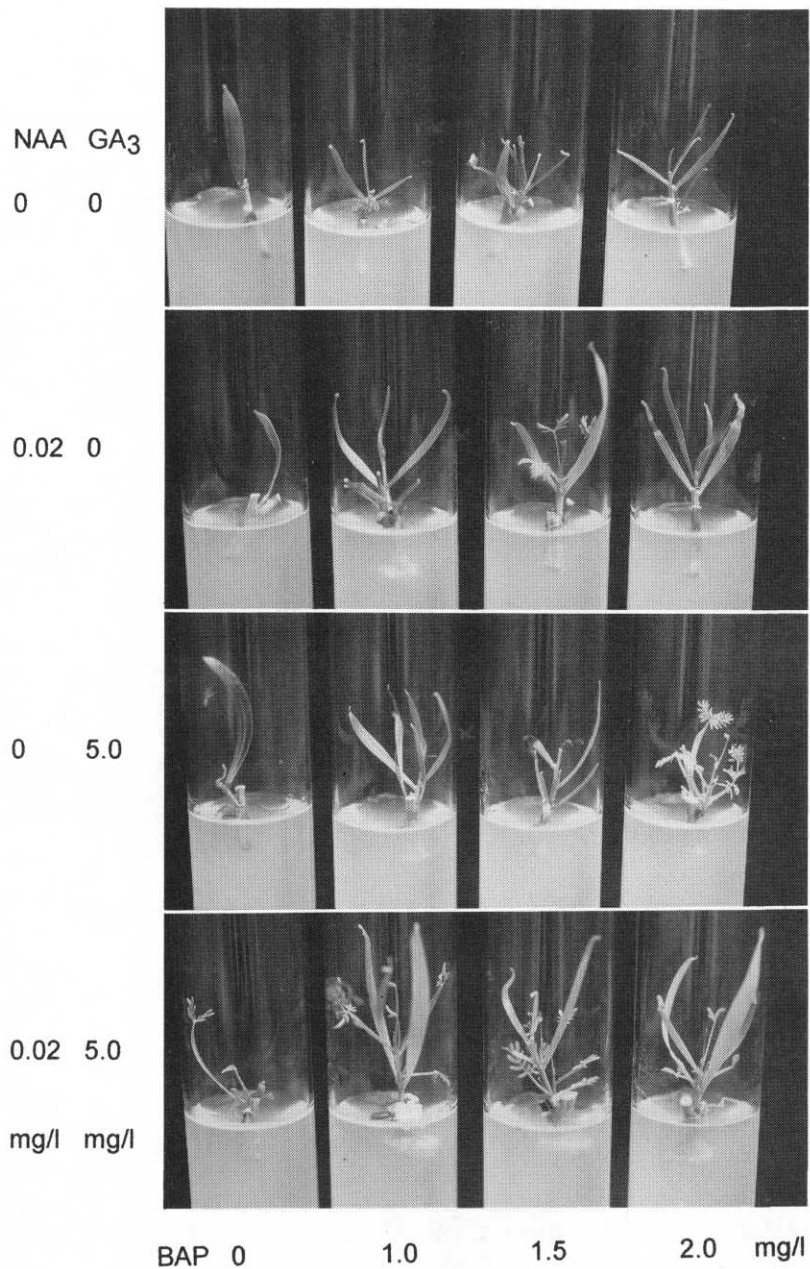


図-1 えき芽からのシュートの伸長.

Fig. 1. Shoot elongation from axillary buds of one-year-old *Acacia auriculiformis*.
 Note; Forty five days after the inoculation of explants.
 Diameter of test tubes was 25 mm.

表-1 *Acacia auriculiformis* の一年生苗木のえき芽からのシュートの伸長と増殖*Table 1. Shoot elongation and proliferation from axillary bud of one-year-old seedling of *Acacia auriculiformis*

GA ₃	NAA	BAP	Number of explants	Number of axillary shoots (no.±S. D.)	Proportion of explant formed multiple shoot (%)	Mean length of axillary shoot (mm±S. D.)	Mean length of the longest shoot (mm±S. D.)
0	0	0	5	1.2±0.4	20	4.2±2.5	4.8±2.2
		1	4	1.5±1.0	25	5.7±3.6	7.8±1.9
		1.5	3	1.7±1.2	33	6.4±6.8	9.7±6.4
		2	3	3.33±0.6	100	3.5±3.9	9.0±2.0
0	0.02	0	3	1.0±0	0	7.7±6.4	7.7±6.4
		1	3	4.0±1.0	100	6.8±8.2	18.7±6.8
		1.5	5	2.4±0.5	100	3.8±3.6	7.6±1.8
		2	2	1.5±0.7	50	6.7±5.5	9.5±3.5
5.0	0	0	5	1.8±1.8	40	4.6±2.7	6.6±0.5
		1	3	3.3±0.6	100	4.7±8.8	9.3±2.1
		1.5	4	2.5±1.0	75	4.8±5.4	10.3±4.4
		2	5	5.0±1.9	100	3.0±3.5	9.2±3.3
5.0	0.02	0	3	1.7±0.6	67	5.4±3.8	7.7±3.1
		1	2	2.5±2.1	60	5.2±6.0	11.5±3.5
		1.5	2	4.0±1.4	100	4.3±4.2	9.0±7.1
		2	5	3.8±1.6	80	3.4±3.8	8.8±3.9

* 45 days after inoculation.

せて添加した培地の 5.0 本であったが、個々のシュートはもっとも短かった。それに比べ、NAA 0.02 mg/l と BAP 1.0 mg/l を添加した培地では、シュート数は 4.0 本とやや少なかったが、平均 6.8 mm のシュートが得られた。得られたシュートを発根培地に移して発根させ植物体を再生させるためには、より長く充実したシュートを用いることが有効である。このことを考え合せると増殖のためにはこのホルモン組成が検討した中ではもっとも優れていると考えられた。

芽生えの培養において初代培養の増殖率が高かったのは、GA₃ 5.0 mg/l と BAP 2.0 mg/l を添加した場合の、外植体当たり 4.2 本であった (井出ら, 1994) が、苗木の組織を用いた場合、それに比べ増殖率にはほとんど差

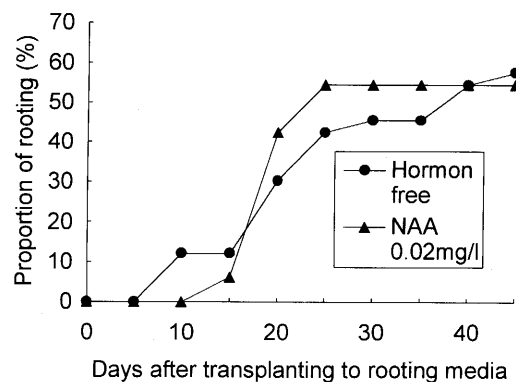
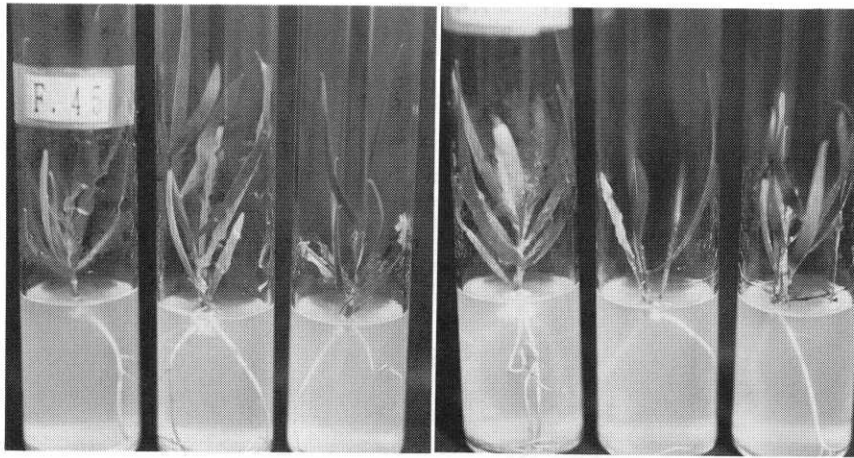


図-2 発根培地へ移植したシュートの発根経過。

Fig. 2. Rooting of *Acacia auriculiformis* shoot on two types of rooting-medium.



Hormon free

NAA 0.02 mg/l

図-3 発根培地に移植後 45 日目の再生植物体.

Fig. 3. Regenerated plantlets of *Acacia auriculiformis* after 45 days culture on rooting medium.
Note: Diameter of tubes was 25 mm.

表-2 えき芽から伸長したシュートの発根*

Table 2. Rooting of shoot elongated from axillary bud

NAA (mg/l)	Number of shoots transplanted to rooting medium	Proportion rooting (%)	Mean number of roots (no.±S.D.)	Mean length of root (mm±S.D.)	Mean length of shoot (mm±S.D.)
0	33	57.6	1.7±0.9	101±62	4.8±4.2
0.02	33	54.5	1.7±0.8	98±42	4.0±2.9

* 45 days after transplanting to rooting media.

が無い結果となった。

芽生えの培養では、外植体が直接発根して植物体が再生することがある (井出ら, 1994) が、苗木えき芽の培養では発根は認められなかった。これは、芽生えの組織が若いため、内生ホルモンの量などに違いがあることが関与しているものとおもわれる。

発根培地へ移植したシュートの発根状況を、図-2,3 および表-2 に示した、NAA を添加した場合には最大の発根率に達するまでの期間が、無添加に比べ早い、最終的な発根率や根の数、長さ、シュート長などについて差はほとんどなかった。このことから、NAA 0.02 mg/l の添加による発根促進効果はないことがわかる。どちらの培地でも最終的な発根率は 60% 未満であり、クローンの大量増殖のためには、より高い発根率が求められる。萌芽枝の芽の培養で得られたシュートでは、ホルモンフリーの培地で 100% の発根率が得られた例があり (SEMUSUNTUD and NITIWATTANACHAI, 1991), 苗木の培養においても培地の選択やホルモンの組み合わせを検討することにより高い発根率を得ることが可能とおもわれる。

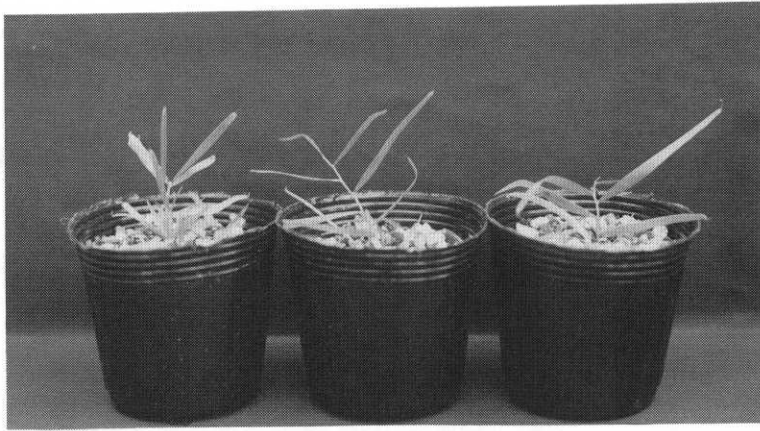


図-4 順化後の植物体。

Fig. 4. Successfully acclimated plantlets of *Acacia auriculiformis* after ten days of transplantation to potted soil.

Note: Diameter of plastic pots was 12 cm.

発根した植物体は、発根培地へ移植後約5か月後に、約4 cmに伸長した時点で、ポットへ移植し順化した(図-4)。

これまで、*A. auriculiformis*の安定的な増殖系は、発芽間もない芽生えの組織の培養によってしか得られていない(MITTAL *et al.*, 1989; 井出ら, 1994)。また、比較的高齢の植物体の組織からは、植物体の再生例(SEMUSUNTUD and NITIWATTANACHAI, 1991)はあるものの、安定的な増殖は困難である。本報告では、温室内で育成された一年生実生苗のえき芽の培養によって、マルチプルシュートの形成による安定的な植物体再生法を明らかにした。すなわち、プラス木のような、より高齢の個体の安定的増殖法の開発のための重要なステップを確立したといえる。今後、継代培養法の検討および発根培地の改良を通じて、クローン大量増殖法を確立したい。

要 旨

播種後1年生の*Acacia auriculiformis*の苗木のえき芽を培養し植物体を得た。えき芽をつけたシュート小片を、BAP, NAA およびGA₃を組み合わせて添加した1/2 MS培地上で培養し、マルチプルシュートを誘導した。シュートの増殖と伸長には、NAA 0.02 mg/lとBAP 1.0 mg/lを組み合わせて添加した培地が適していた。GA₃の添加は、シュートの伸長をやや促進したが、5.0 mg/lの添加では著しい効果はもたらさなかった。伸長したシュートを切り取ってホルモンフリーおよび0.02 mg/lのNAAを添加した発根培地に移植した。その結果、発根した植物体を得られた。発根培地へのNAA 0.02 mg/lの添加効果は認められなかった。再生した植物体は順化可能であった。

キーワード: *Acacia auriculiformis*, 植物体再生, 組織培養, 1年生苗, えき芽

引用文献

井出雄二・渡邊良広・池田裕行(1994) 無菌的に発芽させた芽生えの組織培養による *Acacia auriculiformis*

- の増殖. 日林誌, **76**, 576-583.
- MITTAL, A., AGARWAL, R. and GUPTA, S. C. (1989) *In vitro* development of plantlets from axillary buds of *Acacia auriculiformis*—a leguminous tree. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **19**, 65-70.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**, 473-497.
- SEMUSUNTUD, N. and NITIWATTANACHAI, W. (1991) Tissue culture of *Acacia auriculiformis*. In *Advances in tropical acacia research*. ACIAR* Proc., **35**, 39-42.
- TURNBULL, J. W. ed. (1986a) *Multipurpose Australina Trees and Shrubs*. 316 pp., ACIAR*, Canberra.
- TURNBULL, J. W. ed. (1986b) *Australian acacias in developing countries*. ACIAR* Proc., **16**, 196 pp.
- TURNBULL, J. W. ed. (1991) *Advances in tropical acacia research*. ACIAR* Proc., **35**, 235.

(1994年4月25日受付)

(1994年9月6日受理)

Summary

In vitro plant regeneration from axillary buds of one-year-old *Acacia auriculiformis* seedlings was established. Small pieces of shoot with axillary bud were cultured on 1/2 MS medium containing BAP, NAA and GA₃ with various concentrations and combinations. Combination of 0.02 mg/l of NAA and 1.0 mg/l of BAP was appropriate for proliferation and elongation of shoot. Addition of GA₃ promoted shoot elongation to some extent. However there wasn't observed remarkable effect for shoot elongation and proliferation. Elongated shoots were cut from explants and transplanted to rooting media. Two types of rooting medium were tested. One was hormone free and the other contained 0.02 mg/l of NAA. Rooting was observed on both medium. NAA concentration was not effective for the promotion of rooting. Regenerated plantlets were successfully acclimated.

Key words: *Acacia auriculiformis*, Plant regeneration, Tissue culture, One-year-old seedling, Axillary bud

* Australian Center for International Agricultural Research.