

熱帯性マメ科樹木 *Acacia crassicarpa* の無菌実生からの大量増殖

西川 浩己 清藤 城宏

In vitro Mass Propagation from Aseptically Germinated Seedlings of
Acacia crassicarpa, Tropical Legume Tree

Hiroki NISHIKAWA and Kunihiro SEIDO

Summary: *In vitro* mass propagation techniques of *Acacia crassicarpa* were studied. Shoots obtained from germinated seedlings were used as culture materials. They were cultured in MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with various concentrations and combinations of BAP, NAA and GA₃. The media supplemented with 1 mg/l BAP and 0.5 mg/l GA₃, 2 mg/l BAP and 1 mg/l GA₃, 0.5 mg/l BAP and 1 mg/l GA₃ and 1 mg/l BAP and 1 mg/l GA₃ were effective for multipleshoot formation. The shoots isolated from multipleshoot were subcultured in the four same media. Multipleshoot formation continuously occurred on the four subculture media. For rooting, elongated shoots obtained in sub-culture were transplanted to 1/2 MS medium supplemented with 2 mg/l IBA. They successfully rooted. Regenerated plantlets were acclimated by transplanting to pots filled with vermiculite.

要旨: *Acacia crassicarpa* の無菌実生からの組織培養による大量増殖方法を検討した。無菌的に発芽させた実生を培養して得られた幼植物体のシュートを BAP、NAA および GA₃ を様々な濃度で添加した MS 培地上で培養した。BAP 1 mg/l と GA₃ 0.5 mg/l、BAP 2mg/l と GA₃ 1mg/l、BAP 0.5 mg/l と GA₃ 1 mg/l、BAP 1 mg/l と GA₃ 1mg/l を添加した 4 処理区で、マルチプルシュートの誘導に効果があった。継代培養で得られたマルチプルシュートを分割して、得られたシュートを同様の培地で継代培養することにより、継続してマルチプルシュートが誘導された。増殖したシュートを 1/2MS 培地に IBA を 2mg/l 添加した培地に移植したところ、容易に発根した。再生した幼植物体は、パーミキュライトをつめたポットに移植し、順化することに成功した。

1. はじめに

近年、世界的な環境問題に関心が高まっており、地球環境の保全に果たす森林の役割は、非常に大きい。世界的な森林面積は、約 36 億 ha であり、そのうちの約 41% が熱帯林である (内村, 1992)。しかし、熱帯地域での森林開発により、熱帯林は急激に減少し、熱帯地域から産出される木材資源は枯渇している。このため、外貨獲得の手段としている国々だけでなく、熱帯木材を利用する我が国にとっても、熱帯林の保全・再生は、重要な課題である。熱帯林は一度破壊されるとその再生は、きわめて難しく、荒廃地が拡大している。荒廃地の造林にマメ科樹木を中心とした早生樹が、多く用いられている。

Acacia crassicarpa は、成長が旺盛で新しい造林樹種として期待されている (Kiratiprayoon and Willams, 1991)。

A. crassicarpa の造林を確実なものとするためには、育種的対応が、不可欠である。その基本技術としてクローン大量増殖法の確立が必要である。前報 (西川・清藤, 1997) では、*Acacia mangium*、*Paraserianthes falcataria* と比較して、初代培養、発根培養について検討した。本報では、より効率的な *A. crassicarpa* の増殖のため、継代培養での増殖の向上について検討した。

2. 材料および方法

実験には、インドネシアで採取された *A. crassicarpa* の種子を無菌播種して得られた実生から増殖した培養幼植物体のシュートを供試した。培養条件はすべての実験について 25±2℃、昼光蛍光灯で照度 5,000lux、16 時間日長とした。

1) 継代培養における添加した植物ホルモンの影響

上述のシュートからの伸長およびマルチプルシュート誘導のための培地条件について検討した。シュート上部を長さ約 1cm に切断して、培地に置床した。培地には、ショ糖 2% 添加した MS 培地 (Murashige and Skoog, 1992) にゲルライト 0.25% を加え、オートクレーブ前に pH を 5.7 に調整した培地を用いた。植物ホルモンとして BAP (6-benzylaminopurine) を 0、0.5、1、2mg/l、NAA (α -naphthylacetic acid) を 0、0.5、1mg/l、GA₃ (Gibberelic acid) を 0、0.5、1mg/l の濃度でそれぞれ組み合わせた、全部で 20 種類の処理区を用意した。各処理区ごとの培養数は、20 とした。培養開始から 60 日後にシュートの変化状況を調査した。このとき長さ 5mm 以上のシュートを切り取って収穫シュートとし、その本数と長さについて計測した。

2) 継代培養の安定性

継代培養で安定した増殖が可能か調査するために、初回の継代培養で増殖効率の高い 4 処理区を選抜し、継代培養を 5 回継続して実施した。継代培養で得られたシュートは葉を取り除いた後、芽をつけた長さ約 1cm の小片に切り分け、培地に置床した。各処理区ごとの培養数は、20 とした。それぞれの継代培養開始から 60 日後にマルチプルシュートを分割してシュートを収穫し、その本数について計測した。

3) 発根

培地に添加した植物ホルモンの影響を調査するために、上述の継代培養を 5 および 6 回実施して得られたシュートを発根培地に移植した。発根培地には MS 培地を 1/2 濃度にし、ショ糖 2%、IBA (3-indolebutyric acid) を 2mg/l 添加した 0.25% ゲルライト培地を用いた。発根培養開始から 60 日後に発根率を調査した。

3. 結果および考察

1) 継代培養における添加した植物ホルモンの影響

培地の植物ホルモン条件に応じて主軸シュートの伸長、

マルチプルシュートの誘導がそれぞれ観察された (図-1)。培養開始から 60 日後の継代培養におけるシュートの変化の調査結果を図-2、図-3 に示した。BAP を添加しない処理区では、ほとんどの主軸シュートがそのまま伸長した。BAP および BAP と NAA、GA₃ を組み合わせて添加した処理区では、主軸シュートが伸長し、主軸シュートの腋芽から二次的にシュートが伸長した。収穫シュート数は、BAP を添加しない処理区では、ほとんどの主軸シュートからそのまま伸長したため、1 本となった。BAP を添加した処理区では、GA₃ 1mg/l を組み合わせて添加した場合を除き、BAP 濃度が高くなるにつれて多くなる傾向が見られた。NAA を添加した場合、収穫シュート数は、いずれの濃度においても、BAP を単独で添加した場合に比べ減少した。GA₃ を添加した場合、収穫シュート数は、いずれの濃度においても、BAP を単独で添加した場合に比べ増加した。特に BAP 2mg/l + GA₃ 0.5mg/l 処理区では、平均 6.3 本と供試処理区中で最大の増殖促進効果が認められた。

シュートの長さについてみると、BAP を添加しない、NAA、GA₃ を単独で添加した処理区では、主軸シュートの伸長が促進され、なかでも NAA 0.5mg/l 処理区では、著しい伸長促進が見られた。BAP および BAP と NAA、GA₃ を組み合わせて添加した処理区では、BAP 濃度が高くなるにつれて短くなる傾向が見られた。

これらのことから、BAP を添加した場合、頂芽の伸長が抑制され、腋芽からのシュートの増殖、伸長を促進し、マルチプルシュート誘導が起こったものと考えられた。*Acacia auriculiformis*、*Acacia mangium* の培養例 (井出ら, 1994、Semsuntud and Nitiwattanachai, 1991、Saito et al., 1992)、においても、BAP の添加が腋芽からの伸長シュート数の増加に効果があり、その添加量としては 2mg/l 付近に至適値が存在していた。*A. crassicarpa* の初代培養では、BAP 0.5mg/l 添加した処理区で最大の増殖促進効果が認められたが、継代培養では他種と同様な BAP の至適値となった。

しかし、*A. auriculiformis* の初代培養、*A. mangium* の継代培養では、BAP と GA₃ を組み合わせて添加した場合、シュートの伸長効果は認められたが、形成シュート数の増加には有効ではなかった。*A. crassicarpa* の継代培養では、継代培養での腋芽からのシュートの発生および伸長のためには、BAP と GA₃ の組み合わせた添加が必須であった。これらのことから種間には、GA₃ への反応性には差異がみられた。また、NAA の添加は、

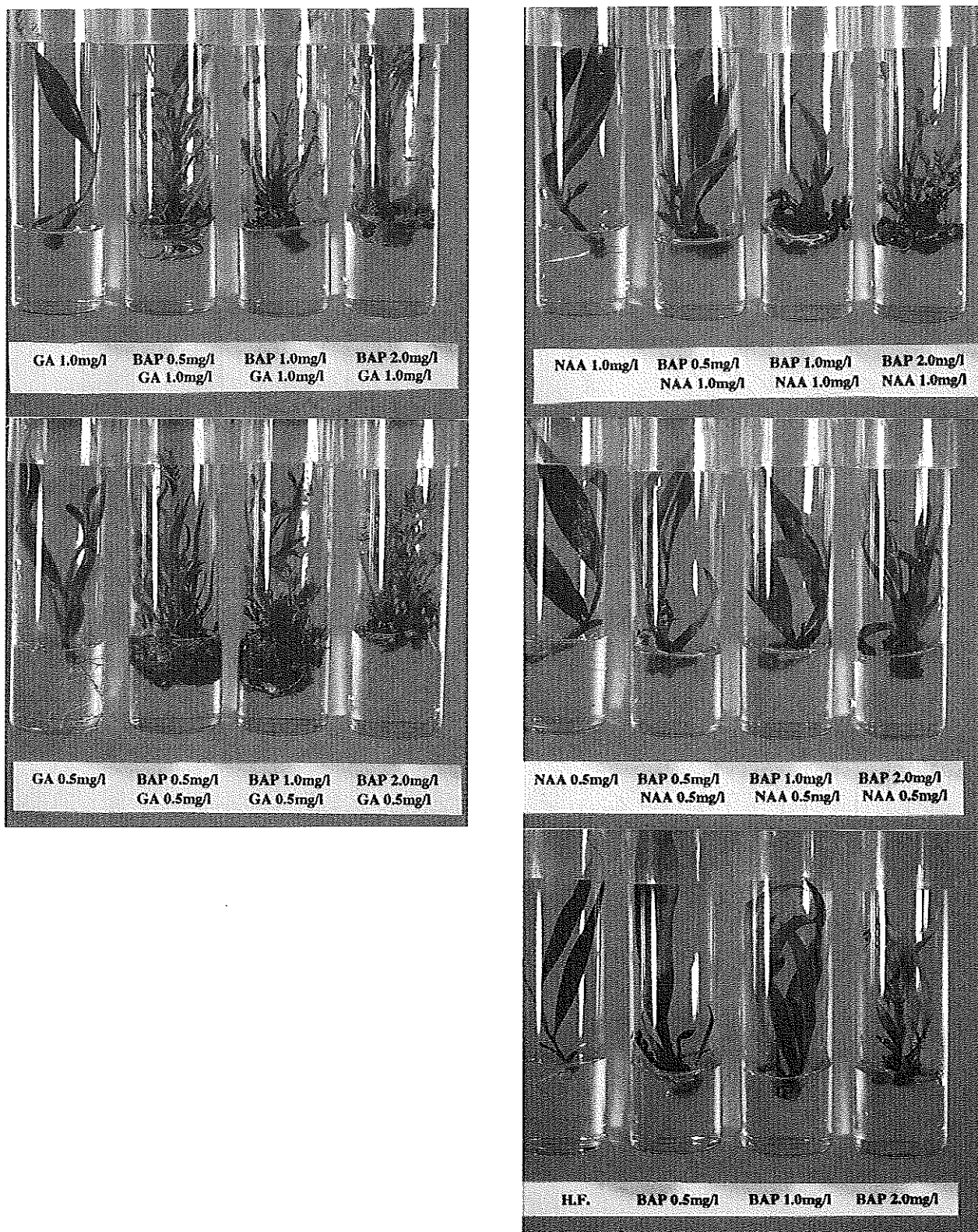


図1. 継代培養開始 60 日後におけるシュートの生育状況

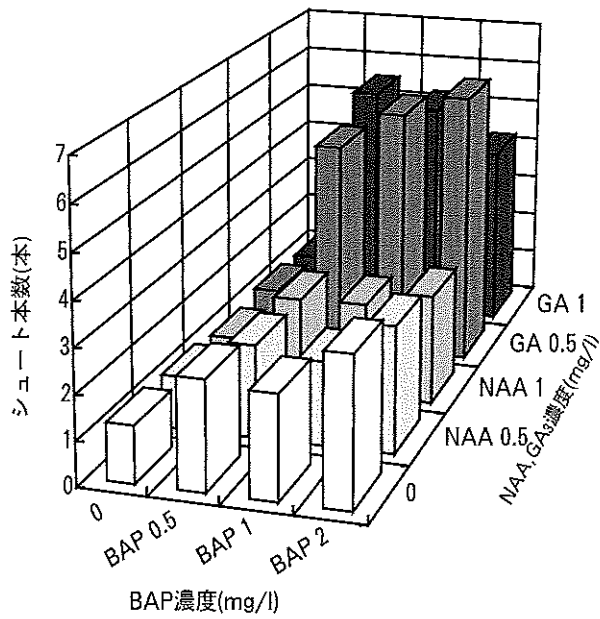


図2. 継代培養におけるシュート増殖に及ぼす培地に添加した植物ホルモンの影響

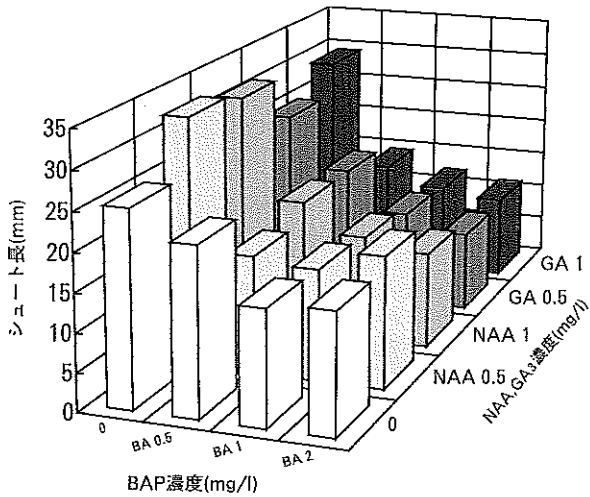


図3. 継代培養におけるシュートの伸長に及ぼす培地に添加した植物ホルモンの影響

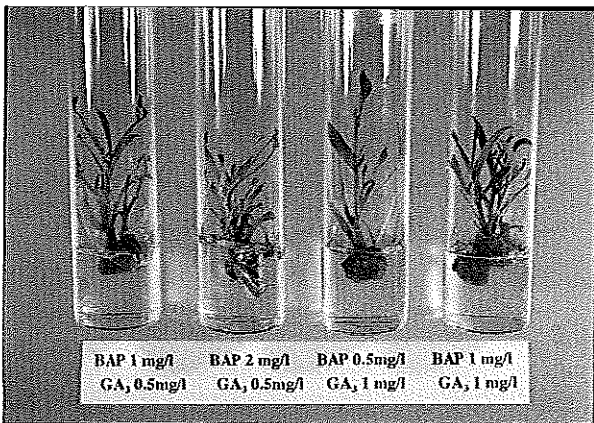


図4. 継代培養を5回繰り返して誘導されたマルチプルシュートの生育状況

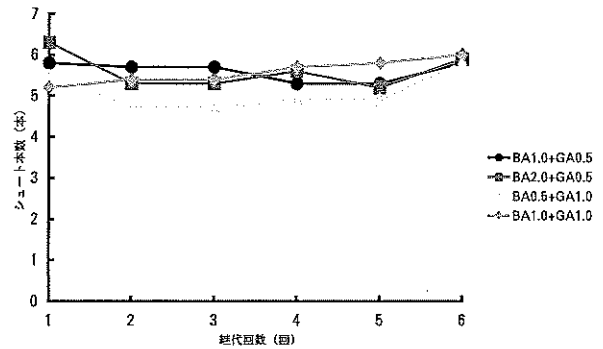


図5. 継代培養においてBAP, GA₃の濃度がシュートの増殖に及ぼす影響

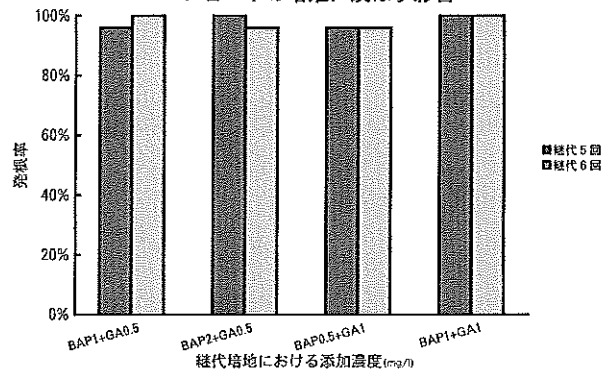


図6. 継代培養の回数が発根培地に移植したシュートの発根に及ぼす影響

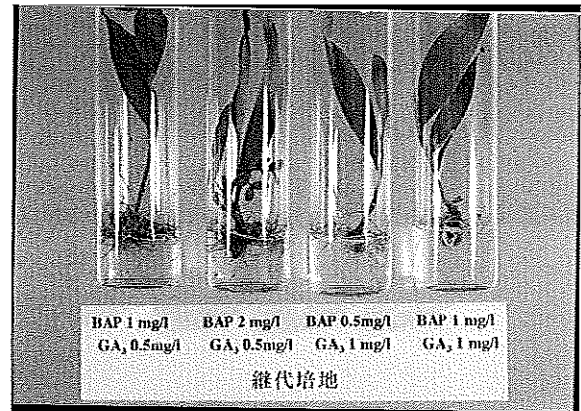


図7. 発根培地に移植50日後の継代培養で増殖したシュートからの発根状況

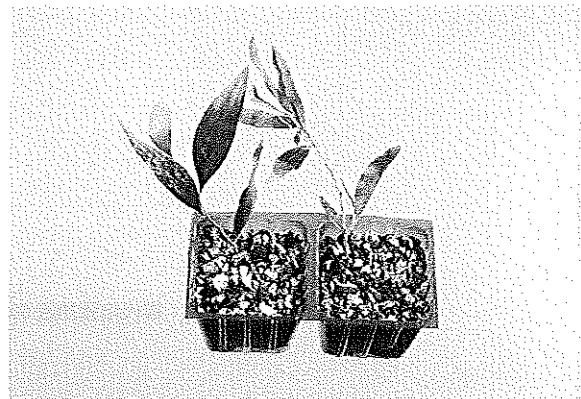


図8. 順化の過程を終了し、室内で生育中の幼植物体

A. auriculiformis の初代培養と同様に BAP を添加しない処理区で、シュート伸長促進効果が高かった。このため、BAP 添加の処理区で増殖されたシュートを移植して伸長させるための処理として用いることによって、増殖の効率化が図られるものと期待される。

本研究の範囲では、BAP 2mg/l +GA₃ 0.5mg/l、BAP 1mg/l +GA₃ 0.5mg/l、BAP 0.5mg/l +GA₃ 1mg/l、BAP 1mg/l +GA₃ 1mg/l の添加がシュートの増殖に対して有効であることが明らかとなり、これらの 4 処理区で継代培養を繰り返すことを選択した。

2) 継代培養の安定性

芽のついたシュートの小片の継代培養により、初回の継代培養と同様に、シュートの腋芽からシュートの伸長が見られた (図-4)。いずれの継代培養においても、選択した 4 処理区では、5~6 本のシュートが伸長し、処理区間で著しい差は認められなかった (図-5)。これまで本種において継代培養によるシュートの増殖数について検討した例はなく比較できないが、継代培養によって増殖するシュートの数が減少することはないように思われた。なお、データは示さないが、初回の継代培養と継代培養を繰り返した場合でのシュートの長さは、ほとんど変わらなかったことを確認している。*A. auriculiformis* の継代培養でも同様に継代培養による増殖効率の損失は認められておらず、増殖効率は、3.9 倍であった。*A. crassicarpa* の継代培養での増殖効率は、5.6 倍とそれほど高くなかったが、継続的な培養によって一定数の植物を得ることが可能であることが明らかとなった。

3) 発根

継代培養を 5 回および 6 回実施して得られたシュートを発根培地に移植して、シュートの発根率について調査した (図-6)。いずれの発根培養においても、選択した 4 処理区から得られたシュートは、培養開始 10 日頃から発根が観察され、培養開始 60 日後では、ほとんどのシュートが発根した (図-7)。また、データは示さないが、発根培養でのシュートの長さ、根数は、処理区間でほとんど変わらなかったことを確認している。

継代培養において選択した 4 処理区からの発根では、処理区間での差は認められなかった。また、継代培養 6 回目まで、この 4 処理区での増殖性での差も認められなかったため、いずれの処理区も選択可能である。しかし、一般に高濃度のサイトカニン添加した培地において、継代培養を繰り返した場合、シュートの発根が困難にな

ることが指摘されている。*A. auriculiformis* では、継代培養によって得られたシュートは、ホルモンフリー培地上でほぼ 100% 発根している。*A. crassicarpa* でも継代 5、6 回の時点では、継代培養によって得られたシュートは、ほぼ 100% 発根しており、シュートの発根が困難になるような現象は認められなかった。今後、継代培養によるシュートからの発根の低下については、継代培養を繰り返して確認していきたい。

培養で得られた幼植物体を培地から抜き取り、パーミキュライトを培養土として植え付け、水切りフードケースに入れて湿度を調節して順化を行ったところ、幼植物体のほとんどが順化可能であった (図-8)。

4. ま と め

以上の結果から、*A. crassicarpa* の実生からの培養において、子葉節から得られた幼植物体のシュートを継続的に継代培養し、発根させることにより 1 年間は、計画的な培養苗の生産が可能であることが示された。

A. crassicarpa では、BAP、NAA への反応性は、*A. auriculiformis*、*A. mangium* と類似していたが、GA₃ への反応性には差異がみられた。このため、これまで組織培養で増殖が検討されていない *Acacia* 類には GA₃ への反応性の調査を取り入れる必要性があると考えられた。

本研究により、*A. crassicarpa* の実生からの培養の基本的な方法が確立されたといえる。しかし、本研究では、作業の都合上、実生から増殖した培養幼植物体のシュートを供試したため、作業手順が複雑になってしまった。今後より効率的な増殖体系を検討していくとともに苗木や成木の培養技術を確立していく予定である。

引用文献

- 井出雄二・渡辺良広・池田裕行：無菌的に発芽させた *Acacia uriculiformis* の芽生えの組織培養，日林誌 76：576-583, 1994.
- Kiratiprayoon S. and Williams E. : Standing Above-ground Yields of Some Tropical Acacia, ACIAR Proceedings No.35, 48-51, 1991.
- Murashige T. and Skoog F. : A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assay with Tobacco Cultures, *Physiol. Plant.* 15 : 473-497, 1962.

西川浩己・清藤城宏：熱帯性マメ科樹木3種の無菌実生からの増殖，山梨県森林総合研究所研究報告 No.19, 9-14, 1997.

Saito Y., Kojima K., Ide Y., and Sasaki S. : In vitro Propagation from Axillary Buds *Acacia mangium*, a Legume Tree in the Tropics, Plant

Tissue Culture Letters 10(2), 163-168, 1994.

Semsuntud N. and Nitiwattanachai W. : Tissue Culture of *Acacia auriculiformis*, ACIAR Proceedings No.35, 39-42, 1991.

内村悦三：これからの熱帯林と木材利用，木材工業 Vol.47, No.6, 284-288, 1991.