

熱帯性マメ科樹木3種の無菌実生からの増殖

西川 浩己 清藤 城宏

In vitro Propagation of Three Tropical Leguminous Trees from
Aseptically Germinated Seedlings.

Hiroki NISHIKAWA and Kunihiro SEIDO

Summary: *In vitro* propagation techniques of *Acacia mangium*, *Paraserianthes falcataria* and *Acacia crassicarpa* were studied. Epicotyl segments and cotyledon nodes isolated from aseptically germinated seedlings were used as culture materials. They were cultured in MS (Murashige and Skoog) medium supplemented with 0.5 mg/l of BAP for primary culture. For rooting, elongated shoots obtained in primary culture were transplanted to the MS medium supplemented with 2 mg/l of IBA. Regenerated plantlet were acclimated by transplanting to pots filled with hydroball.

要旨: *Acacia mangium*, *Paraserianthes falcataria*, *Acacia crassicarpa* の組織培養による増殖方法の検討を行った。無菌播種して育成した実生から得られた上胚軸部分、子葉節を 0.5 mg/l BAP を含む MS 固形培地で培養した。初代培養で得られたシュートは、MS 培地に IBA 2 mg/l を含む培地で発根させた。再生した幼植物体は、ハイドロボールをつめたポットに移植し、順化した。

1. はじめに

熱帯林は、毎年 1,700 万 ha と急激に減少しており、世界的な問題になっており、その再生が求められている(林野庁海外林業協力室, 1992)。しかし、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用いられており、*Acacia mangium* や *Acacia auriculiformis* などが挙げられ、すでに組織培養による増殖が報告されている (Saito et al., 1993 ; 井出ら, 1994 ; Ahmad, 1992 ; Semsuntud and Nitiwattanachai, 1991)。

しかし、同一樹種、品種の大面积・一斉造林は、樹種や立地によっては大変危険であり、*A. mangium* では芯腐れなどの病害が見られている(林木育種センター, 1994)。

そこで、マメ科樹種の造林に多様性を持たせるために、すでに培養で増殖が検討されている *A. mangium* と *Paraserianthes falcataria* (Seido, 1994) と *Acacia crassicarpa* を比較して、できるだけシンプルで、3 種とも同様な増殖方法の確立を目的として、無菌発芽させた実生の組織を用いた組織培養について検討した。

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. mangium*、*P. falcataria* および *A. crassicarpa* の種子を用いた。種子の発芽促進のため、熱湯に浸漬し、4 時間放置した。この後、表面殺菌のため 70% エタノール中で 1 分間、ついで有効塩素量 1% の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で 15 分間、さらに、3% 過酸化水素水溶液中で 3 分間、それぞれマグネチックスターラーで攪拌した。表面殺菌した種子はクリーンベンチ内で風乾後、ショ糖無添加の MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) に寒天 0.8% を加え、pH を 5.7 に調整した培地上に置床した。培養条件はすべての実験について 25 ± 2 °C、昼光蛍光灯で照度 5,000 lux、16 時間日長とした。発芽した実生を 1 カ月間育成し、実験に供試した。

1 初代培養

上述の無菌実生(長さ 3 ~ 4 cm)を供試した。実生は、幼根を切除し、1 ~ 2 枚の葉を付けた上胚軸部分と子葉節とに切り分けた。上胚軸部分と子葉節を外植体とし、主軸および腋芽の伸長を期待する培地に植え付けた。培地には、ショ糖 3% 添加した MS 培地に寒天 0.8% 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6-benzylaminopurine (BAP) を0、0.1、0.5、1、5 mg/l 添加した計5種類の培地を用意した。培養により外植体からシュートが得られたが、切断および計測が容易にできる長さ5 mm以上のものについて測定した。

初代培養開始60日後に1外植体から得られたシュート本数、シュート長およびシュートの発根について調査した。

2 発根

初代培養で得られたシュートを発根培地に移植した。

発根に対するオーキシン添加の効果を調査するために3-indolebutyric acid (IBA) を0、1、2 mg/l 添加した計3種類の培地を用意し、発根率について調査した。

3. 結果および考察

1 初代培養

3種とも培地のBAP濃度に応じて、上胚軸部分、子葉節ともにシュートの形成と伸長および発根に違いが観

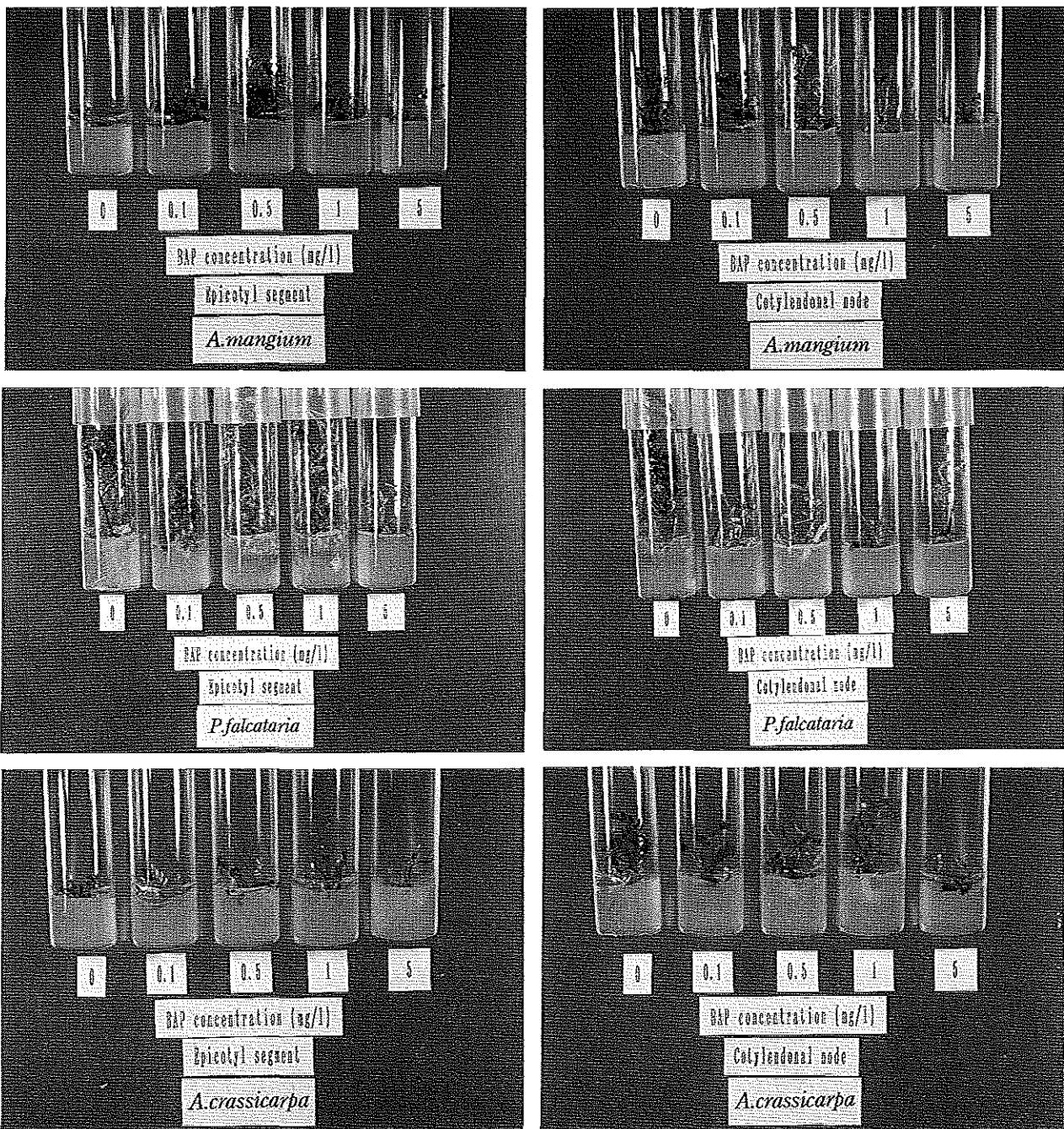


Fig.-1 Shoot formation from epicotyl segments and cotyledonal nodes of aseptic seedlings of *A. mangium*, *P. falcataria* and *A. crassicaarpa* 50 days after the beginning of primary culture.

Note : Diameter of culture tube was 25 mm.

Table-1 Effects of BAP Concentrations on primary culture of epicotyl segments and cotyledonal nodes of aseptic seedlings of *A. mangium*, *P. falcataria* and *A. crassicarpa*.

Species	Type of explant	BAP concentrations of primary culture media (mg/l)	Number of shoots* ¹	Shoot length (mm)* ²	Percent of rooted explant* ³
<i>A. mangium</i>	Epicotyl segment	0	1.0	7.6	40.0
		0.1	2.0	10.6	28.6
		0.5	7.0	13.9	0
		1	5.4	7.1	0
		5	5.7	5.4	0
	Cotyledonal node	0	1.0	15.0	83.3
		0.1	1.5	11.2	46.2
		0.5	4.0	12.1	0
		1	2.2	11.6	11.1
		5	3.9	7.2	0
<i>P. falcataria</i>	Epicotyl segment	0	1.0	22.1	61.5
		0.1	1.1	11.2	0
		0.5	1.8	12.1	0
		1	1.5	11.6	0
		5	1.6	7.2	0
	Cotyledonal node	0	1.8	14.4	40.0
		0.1	1.9	17.2	28.6
		0.5	2.3	15.1	0
		1	2.3	12.3	0
		5	2.1	13.8	0
<i>A. crassicarpa</i>	Epicotyl segment	0	1.0	6.9	77.8
		0.1	1.2	8.2	0
		0.5	1.7	6.7	0
		1	1.3	7.0	0
		5	1.5	8.7	0
	Cotyledonal node	0	1.2	13.4	70.0
		0.1	1.4	14.1	0
		0.5	3.5	10.0	0
		1	2.6	11.4	0
		5	2.7	10.2	0

*¹ Mean number of shoots over 5 mm in length.*² Mean length of shoots over 5 mm in length.*³ (Number of explants fromed plantlet/Number of explants inoculated) ×100

察された (Fig.-1、Table-1)。

① *Acacia mangium*

上胚軸部分

BAPを添加しない培地では、主軸シュートがそのまま伸長した。BAPを添加した培地では主軸シュートが伸長し、その基部の腋芽からさらにシュートが伸長した。シュート本数は、BAP 0.5 mg/lを添加した培地で平均7.0本と最大となり、0.5 mg/lまではBAPの濃度が上がるにつれて増加する傾向を示した。BAP 1、5 mg/lを添加した培地ではそれよりわずかに減少した。

シュートの長さでは、BAP 0.5 mg/lを添加した培地で平均13.9mmと最大となり、0.5 mg/lまではBAPの濃度が上がるにつれて長くなる傾向を示し、BAP 1、5 mg/lを添加した培地では、BAPの濃度が上がるにつれて短くなる傾向を示した。

子葉節

BAPを添加しない培地では子葉腋から1本のシュー

トが伸長した。BAPを添加した培地では、子葉腋から1～2本のシュートが伸長し、その基部の腋芽からさらにシュートが形成された。シュート本数は、BAPを0.5 mg/lを添加した培地で最大となり、平均4本のシュートの発生が認められた。

シュートの長さでは、BAPを添加しない培地で最大となり、BAPが0.5～1 mg/lの範囲では大きな差はなかったが、BAP 5 mg/lを添加した培地では、シュートの伸長が抑制された。

上胚軸部分、子葉節ともに、BAPを添加しない培地、BAP 0.1 mg/lを添加した培地で発根が認められ、子葉節を外植体とした場合に、より発根が促進された。

以上のことから、*A. mangium*の増殖では、上胚軸部分、子葉節ともにBAP 0.5 mg/lを添加した培地が、有効であった。

② *Paraserianthes falcataria*

上胚軸部分

BAPを添加しない培地、BAP 0.1mg/lを添加した培地で主軸シュートがそのまま伸長した。BAP 0.5～5 mg/lを添加した培地では、主軸シュートが伸長し、その基部の腋芽からさらにもう1本のシュートが伸長する個体が観察され、そのような個体は、BAP 0.5mg/lを添加した培地で多く認められた。

シュートの長さでは、BAPを添加しない培地で最大となり、BAPが0.5～1 mg/lの範囲では大きな差がなかったが、BAP 5 mg/lを添加した培地では、シュートの伸長が抑制された。

子葉節

いずれの培地においても、子葉腋から1本か2本のシュートが伸長し、大きな差は見られなかったが、BAP 0.5、1 mg/lを添加した培地では、伸長したシュートの基部の腋芽からシュートの伸長が見られる個体が認められた。

シュートの長さでは、BAP 0.1mg/lを添加した培地で平均17.2 mmと最大となり、BAP 1 mg/lを添加した培地で平均12.3 mmと最小となった。添加したBAPの濃度による傾向は見られなかった。

上胚軸部分、子葉節からの発根では、上胚軸部分ではBAPを添加しない培地のみで発根が認められ、子葉節では、BAPを添加しない培地、BAP 0.1mg/lを添加した培地で発根が認められた。

以上のことから *P. falcataria* の増殖では、上胚軸部分、子葉節ともに BAP 0.5mg/l を添加した培地が、有効であったが、上胚軸部分での増殖は、あまり効果ではなかった。

③ *Acacia crassicarpa*

上胚軸部分

BAPを添加しない培地では、主軸シュートがそのまま伸長した。BAPを添加した培地では主軸シュートが伸長し、その基部の腋芽からさらにシュートが伸長する個体が認められたが、2次的に伸長するシュートは、多く認められなかった。

子葉節

BAPを添加しない培地、BAP 0.1mg/lを添加した培地では、子葉腋から1～2本のシュートが伸長した。BAP 0.5～5 mg/lを添加した培地では子葉腋から1～2本のシュートが伸長し、その基部の腋芽からさらにシュートが形成された。シュート本数は、BAP 0.5mg/lを添加

した培地で最大となり、平均3.5本のシュートの発生が認められた。

シュートの長さでは、BAP 0.1mg/lを添加した培地で最大となり、BAPが0.5～5 mg/lの範囲では大きな差がなかった。

上胚軸部分、子葉節からの発根では、上胚軸部分、子葉節とも BAP を添加しない培地でのみ発根が認められた。

以上のことから *A. crassicarpa* の増殖では、上胚軸部分、子葉節ともに BAP 0.5mg/l を添加した培地が有効であったが、上胚軸部分での増殖効率は、あまり効果的ではなかった。

他の *A. mangium* の培養例 (Saito et al., 1993; Ahmad, 1992) と比較すると、6カ月生の実生の腋芽を材料とした Saito らの研究では、BAP 2.0mg/l を添加した培地で 2.3 本、同じ実生を材料とした Ahmad の研究では、BAP 0.5mg/l を添加した培地で 25.4 本のシュートが得られている。本研究では、BAP 0.5mg/l を添加した培地で 7.0 本のシュートが発生した。これらの増殖効率の違いは実験材料の個体差に起因するものと考えられる。

また、Seido の *P. falcataria* の培養例では、本研究と同様な増殖数であった。

A. auriculiformis の培養例 (井出ら, 1994; Semsuntud and Nitiwattanachai, 1991) 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、その量としては 2.0 mg/l 付近に添加量の至適値が存在していた。

これらのことからマメ科植物全てに BAP 0.5mg/l を添加した MS 培地が至適と推奨できないが、大量の種、個体を増殖する場合の初代培養には有効ではないかと考えられる。

Table-2 Effects of IBA concentrations of the rooting media on root formation of *A. mangium*, *P. falcataria* and *A. crassicarpa*.

species	root formation rate (%) *1		
	IBA concentrations (mg/l)		
	0	1	2
<i>A. mangium</i>	6.7	27.8	36.8
<i>P. falcataria</i>	18.2	18.2	20.5
<i>A. crassicarpa</i>	30.1	46.2	69.2

*1 (Number of shoots formed plantlet / Number of shoots inoculated) × 100

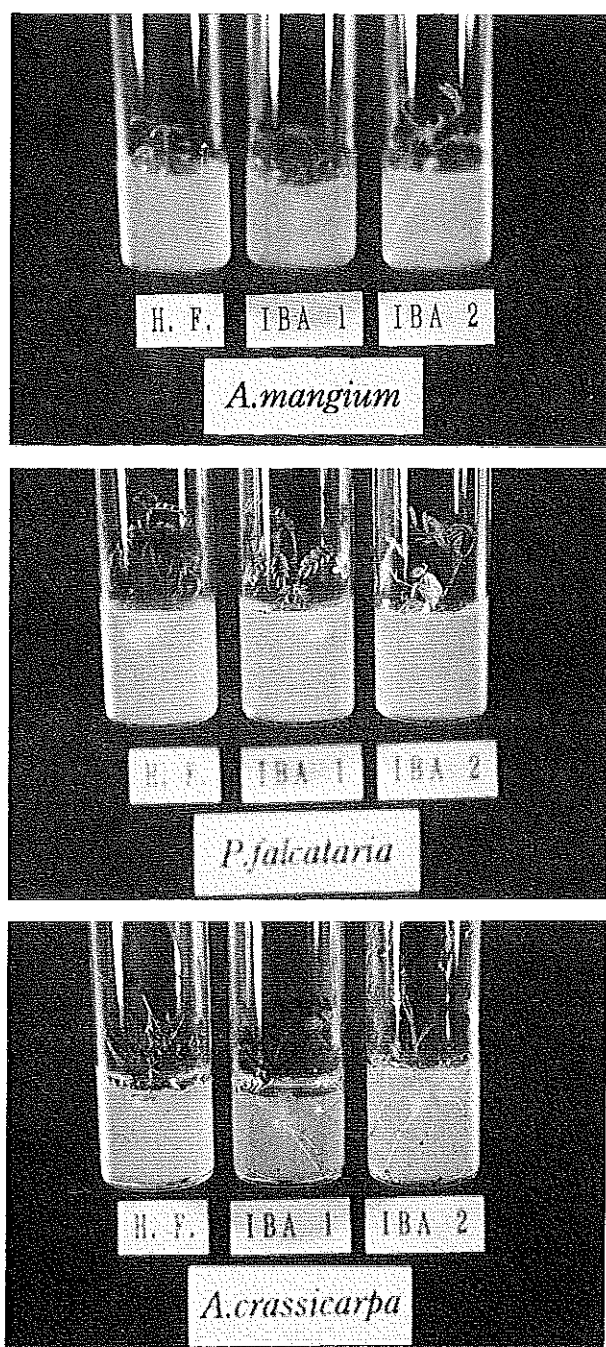


Fig. - 2 Root formation from shoots formed by primary culture 50 days after transplanting to rooting media.

Note : Diameter of culture tube was 25mm.

2 発 根

初代培養で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 (Table-2, Fig.-2)。3種とも IBA の濃度が高いほど、発根率が向上した。とくに *A. crassicarpa* では、69.2% と高い発根率を示した。しかし、*A. mangium* では 36.8%、*P. falcataria* では 20.5% と発根率は低かった。

他の *A. mangium* の培養例 (Saito et al., 1993 ; Ahmad, 1992 ; Seido, 1994) と比較すると、初代培養と同様に発根率に個体差によるものと考えられるばらつきがあった。

A. auriculiformis の培養例 (井出ら, 1994) においては、初代培養における BAP の添加が発根に対し、抑制的に働くとしている。

これらのことから種間だけでなく、個体間に内生オーキシンの量や外生オーキシンに対する反応性に差異があり、また、培養における BAP の添加が発根に対し影響があることから、発根培地、発根促進処理および BAP の添加については、種、個体間で細かい検索が必要だと思われる。

培養で得られた幼植物体を培地から抜き取り、ジフィーポットにハイドロボール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 (Fig.-3)。

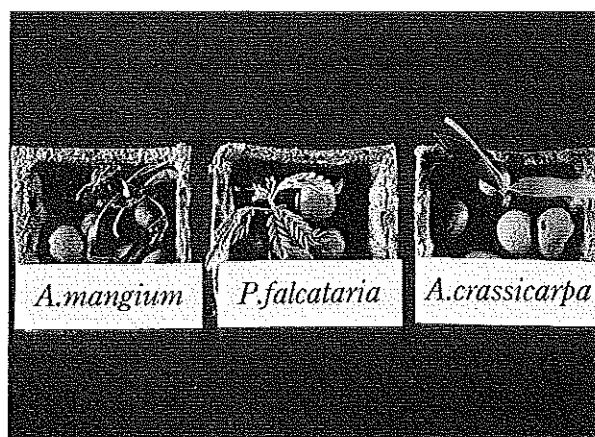


Fig.- 3 Plantlets could acclimated and continued growth.

4. ま と め

本研究における *A. mangium*、*P. falcataria* および *A. crassicarpa* の増殖では、3種とも初代培養では上胚軸部分、子葉節ともに BAP 0.5mg/l を添加した培地が最も有効であり、発根培地では IBA 2 mg/l を添加した培地が最も有効であった。

また、直接外植体から発根し、幼植物体を得ることが可能であることも示された。

これらのことから3種ともに無菌実生から初代培養では同じ培地で増殖できることが示された。しかし、増殖効率は、種、個体間に差異があり、優良個体の大量増殖にはさらに至適培地を検索する必要があると考えられる。また、*A. mangium*、*P. falcataria* では今回用いた発根

培地では、発根率が低く、初代培養よりさらに種、個体間に差異が見られた。*A. mangium* では、子葉付きの下胚軸片からの発根では容易であるが、上胚軸片から誘導したマルチプルシュートでは発根が困難であり、子葉付き胚軸片には発根を誘導する何らかの物質を含んでいることが考えられ、内生オーキシンの量などが関係していると予想している(井出ら、1994)。また、発根阻害物質についても、*P. falcataria* で活性炭の効果認められている(Seido, 1994)。今後、これらの点について検討し、発根率の向上を検討する予定である。

引用文献

- Ahmad D.H. : Multiplication of *Acacia mangium* by Stem Cuttings and Tissue Culture Techniques, ACIAR Proceedings No. 35, 32-35, 1991.
- 井出雄二・渡辺良広・池田裕行 : 無菌的に発芽させた *Acacia auriculiformis* の芽生えの組織培養
日林誌 76 : 576-583, 1994
- Murashige T. and Skoog F. : A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Cultures, *Physiol. Plant.*, 15 : 473-497, 1962.
- 林木育種センター : インフォメーション、熱帯樹 アカシア・マンギューム (*Acacia mangium*)、海外育種技術情報 VOL. 3 - No. 3 (7), 1-10, 1994.
- 林野庁海外協力室 : シニアフォレスター会議 全体報告 熱帯林業 No. 23, 39-58, 1992.
- 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, 1993.
- Seido K. : Intergrated Report for Seed Source Evaluation and Tissue Culture, FTIP No. 26, 43-89, 1994.
- Semsuntud N. and Nitiwattanachai W. : Tissue Culture of *Acacia auriculiformis*, ACIAR Proceedings No. 35, 39-42, 1991.