

ハリエンジュの子葉・胚軸からの植物体再生

谷口 亨*・福田忠徳

名古屋大学農学部

(〒464-01 名古屋市千種区不老町)

* 現在: 林木育種センター

(〒310 茨城県水戸市笠原町)

(1993年3月22日受付)

(1994年7月29日受理)

マメ科の木本植物であるハリエンジュ (*Robinia pseudoacacia* L.) の子葉および胚軸から植物体を再生させる方法を検討した。滅菌種子を発芽させ、子葉が展開した芽生えから子葉と胚軸を切り取り外植片とした。これら外植片の培養における植物ホルモンの濃度および種類の影響を調べた。その結果、シュート誘導に最適な植物ホルモン条件は、子葉では BAP 5.0 mg/l+2, 4-D 1.0 mg/l であり、胚軸では BAP 1.0 mg/l であった。シュートを分化させた外植片を BAP 0.25 または 1.0 mg/l を添加した培地に移植し、シュートを伸長させた。ある程度伸長したシュートを外植片から切り取り、IBA を添加した培地に移植し、シュートを発根させた。根が十分に伸長した幼植物体をパーミキュライト培地で培養し、順化させた。最後に鉢上げを行い、屋外で育成させて完全な植物体を得た。

1. 緒言

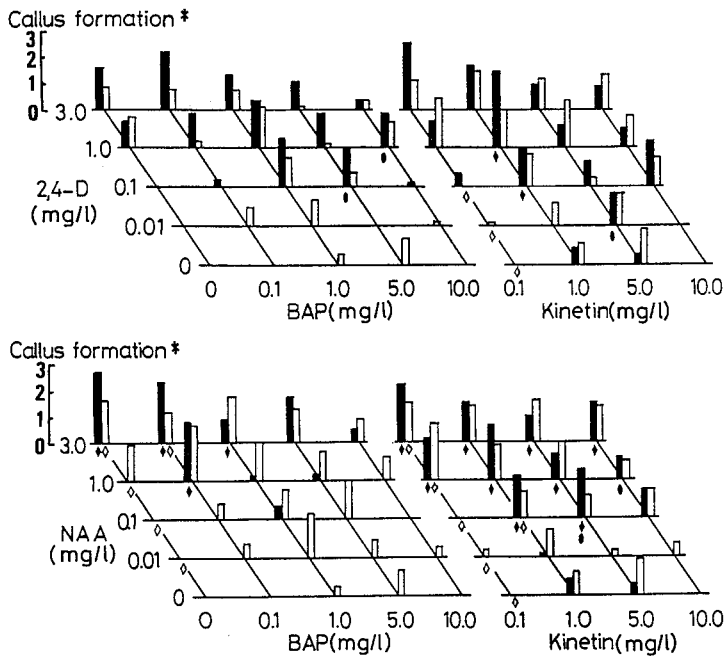
マメ科植物は根粒細菌を共生させて窒素固定を行い、その結果、成長が速く、痩せ地でも生育出来る。また、草本植物よりも木本植物の方がバイオマス資源として有利である。これらの2点からマメ科の木本植物は今後も土壌の改良、表土の保全、さらにバイオマス資源などに利用されるであろう。このように利用価値の高いマメ科の木本植物のマイクロプロパゲーションは非常に重要である。さらに、最近発展しつつある細胞工学や遺伝子工学の技術を利用して形質転換植物を作出するためには、植物体再生系の確立は必要不可欠である。マメ科の木本植物からの植物体の再生系は *Acacia koa*¹⁾, *Albizia lebbek*²⁾, *Sesbania bispinosa*³⁾ さらに *Albizia* spp.⁴⁾ などで報告されている。

マメ科の木本植物であるハリエンジュは初期成長が速く、大気汚染や貧栄養に比較的良好に耐えることから街路樹や緑化樹として利用されている。また、花は良質の蜜を分泌するため、養蜂での蜜源になっている。Barghchi⁵⁾ はハリエンジュの *in vitro* での腋芽の培養

について報告している。我々はハリエンジュの子葉および胚軸から不定芽を分化させ、さらに不定根を誘導して完全な植物体を再生させることに成功したので報告する。

2. 材料および方法

成熟したハリエンジュの種子を8月下旬に愛知県瀬戸市内で採取した。種子の滅菌処理は70%エタノールに1分間、引き続きTween 20を1滴添加した有効塩素1.2%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分間浸漬させて行った。クリーンベンチ内で種子をよく洗浄し、メスを用いて種皮の一部を切り取った。これらの滅菌種子をpH 5.8に調整したグリシン無添加のMS寒天培地⁶⁾に播種し、28°C・暗所で発芽させた。発芽後約4cmに伸長した芽生えを日長16時間の明条件で培養した。子葉が展開し緑色になった芽生えから子葉と胚軸を切り取り、それぞれ4分割、8分割して外植片とした。これらの外植片を各種植物ホルモン、すなわち、オーキシンとして2, 4-DまたはNAAを0, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0 mg/l, サイトカイニンとしてBAPまたはKinetinを0, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 mg/lの濃度で添加した81種類のMS寒天培



*Average values of 8 explants based on evaluated point as follows.

- 0.....No or slight callus formation.
- 1.....Callus expanded from the cut ends of explant.
- 2.....Fusion of callus grown from the cut ends of explant.
- 3.....Explant covered with callus grown from the cut ends of explant.

Fig. 1 Effects of plant growth regulators on callus formation and organogenesis after 15 days of culture.

Callus(■), root(◆)and shoot(●)formation from cotyledon explants. Callus(□) and root(◇)formation from hypocotyl explants.

地に置床し、28°C・暗所で培養した。なお、1種類の培地につき8外植片を45日間培養した。また、培養容器として直径60mmのプラスチックシャーレを用いた。シュートを分化した外植片をBAPを0.25または1.0 mg/lの濃度で添加したMS寒天培地に移植し、明所で30日間培養してシュートを伸長させた。ある程度まで伸長したシュートを外植片から切り取り、IBAを0.5、1.0または2.0 mg/lの濃度で添加したMS寒天培地に移植し、明所で培養して発根誘導を行った。発根したシュートを400倍に希釈したハイポネックスを添加したパーミキュライト培地に移植し、明所で培養した。この時、培養容器の蓋に少しずつ穴を開けて順化させた。最後に幼植物体をパーミキュライト培地から植木鉢に移し、室内で約1週間生育させた後、屋外で生育させた。

3. 結果

(1) カルス形成および器官形成に及ぼすホルモンの影響

暗所培養15日後の結果をFig. 1に示す。カルス形成量は、0点(カルスは全く形成されなかった、または、ほとんど形成されなかった)、1点(外植片の切り口か

ら盛り上がるようにカルスが形成された)、2点(切り口から形成されたカルスがかなり増殖したが外植片全体を覆うまでには至らなかった)、3点(外植片全体がカルスで覆われた)と4段階に指数化した。カルス形成に及ぼす植物ホルモンの明確な傾向は示されなかった。カルス形成量は、子葉の場合、Kinetinおよび2,4-Dとともに1.0 mg/l添加した培地で最も高かった。また胚軸の場合、NAA 1.0 mg/l、Kinetin 0.1 mg/lを添加した培地で最も高かった。子葉上に形成されたカルスは柔らかくて水っぽいカルスと硬くてコンパクトなカルスであった。サイトカイニンの濃度が高いほど硬いカルスが形成される傾向が見られた。暗所で形成された硬いカルスを明所に移すと数日後にクロロフィルを分化し、カルスは緑色に変化した。柔らかいカルスは緑色に変化しない場合が多かった。不定根の形成は、オーキシンとして2,4-Dを用いると、子葉の場合2組の植物ホルモン組成区(最高分化率は2,4-D 0.1 mg/l+Kinetin 1.0 mg/lで25.0%)で、胚軸の場合3組の植物ホルモン組成区(最高分化率は2,4-D 0.1 mg/l+Kinetin 0.1 mg/lで25.0%)で認められた。また、NAAを用いると、

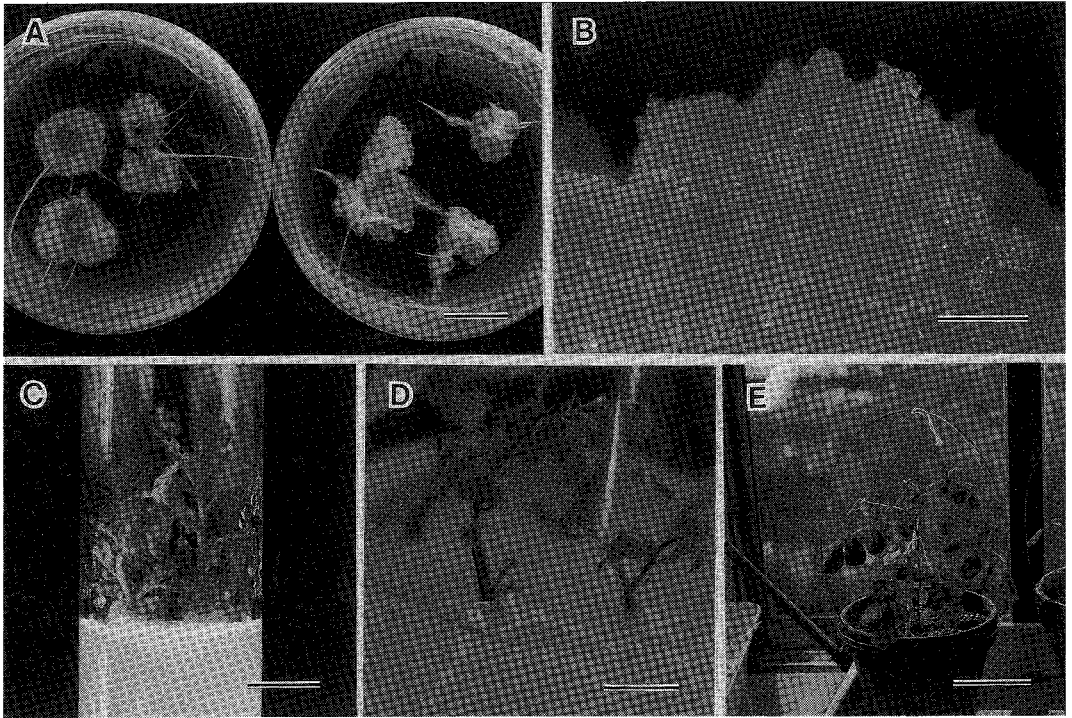


Fig. 2 A: Adventitious roots and calli formed cotyledon (left) and hypocotyl (right) segments on MS medium containing 3.0 mg/l NAA after 17 days of culture. Bar=1 cm.
 B: Adventitious buds formed from cotyledon segments on MS medium containing 5.0 mg/l BAP and 0.1 mg/l 2, 4-D after 15 days of culture. Bar=1 mm.
 C: Shoots formed from hypocotyl segments after 23 days of transplantation to shoot elongation medium. Bar=1 cm.
 D: Roots formed from shoots after 16 days of culture on rooting medium. Bar=1 cm.
 E: A regenerated plant after acclimatization. Bar=10 cm.

Table 1. Influence of plant growth regulators on shoot formation from cotyledon explants after 45 days of culture.

Plant growth regulators (mg/l)	Shoot formation (%)	Number of shoots per shoot forming explant
Kinetin 5.0+2, 4-D 0.01	62.5	2.0
*Kinetin 5.0+NAA 0.1	37.5	1.7
*Kinetin 10.0+2, 4-D 0.01	37.5	4.3
*Kinetin 10.0+NAA 0.1	25.0	5.0
Kinetin 10.0+NAA 1.0	25.0	1.5
BAP 1.0+NAA 0.1	25.0	2.5
*BAP 5.0+2, 4-D 0.1	50.0	ND
BAP 5.0+NAA 0.1	25.0	1.5
BAP 5.0+2, 4-D 1.0	37.5	6.3
BAP 10.0+2, 4-D 0.1	50.0	1.0
*BAP 10.0+2, 4-D 1.0	25.0	ND
BAP 10.0+NAA 1.0	37.5	1.7

* These growth regulators induced shoots after 15 days of culture.

ND; Not determined.

Data based on 8 explants.

Table 2. Influence of plant growth regulators on shoot formation from hypocotyl explants after 45 days of culture.

Plant growth regulators (mg/l)	Shoot formation (%)	Number of shoots per shoot forming explant
NAA 0.1	25.0	1.5
Kinetin 5.0+2, 4-D 0.01	37.5	1.3
Kinetin 5.0+2, 4-D 1.0	25.0	1.5
Kinetin 10.0+NAA 0.01	12.5	4.0
Kinetin 10.0+NAA 0.1	12.5	1.0
BAP 1.0	75.0	10.3
BAP 1.0+NAA 0.01	25.0	1.5
BAP 1.0+NAA 0.1	37.5	1.7
BAP 1.0+2, 4-D 1.0	12.5	1.0
BAP 5.0+NAA 0.01	37.5	3.7
BAP 5.0+2, 4-D 0.1	12.5	2.0

Data based on 8 explants.

Table 3. Effect of different IBA concentrations on root formation from shoots induced in cotyledon or hypocotyl explants.

Tissue	IBA (mg/l)	Root formation (%)	Number of roots per rooting shoot
Cotyledon	0.5	63.8(81.8)*	4.6(4.6)*
	1.0	10.0(14.3)	6.0(8.0)
	2.0	42.9(37.5)	4.3(4.0)
Hypocotyl	0.5	22.2(36.4)*	3.0(3.8)*
	1.0	9.5(9.5)	3.5(3.5)
	2.0	47.5(100)	3.6(3.8)

* Data for shoots over 15 mm in length.

子葉の場合 13 組の植物ホルモン組成区 (最高分化率は NAA 1.0 mg/l+Kinetin 1.0 mg/l で 87.5%) で、胚軸の場合 10 組の植物ホルモン組成区 (最高分化率は NAA 3.0 mg/l で 87.5%) で認められ、不定根の分化には 2, 4-D より NAA のほうが効果的であった。また、オーキシンを加えず、Kinetin のみを 0.1 mg/l 添加した培地でも胚軸からの不定根の形成が認められた。

NAA を 3.0 mg/l 添加した培地で分化した不定根を **Fig. 2-A** に示す。左が子葉由来、右が胚軸由来の不定根であり、いずれもカルスの形成を伴っていた。シュートの分化率は培養 15 日後では低く、子葉切片のみにシュートが形成され、しかもシュートを分化させる植物ホルモン組成は限定されていた。BAP 5.0 mg/l, 2, 4-D 0.1 mg/l を添加した培地で子葉から分化した不定芽を **Fig. 2-B** に示す (培養 15 日後)。培養 45 日後におけるシュートの分化率およびシュート数を **Table 1** および **2** に示す。培養期間が長くなるとシュートを分化させる植物ホルモン組成区は多くなったが、カルスや不定根は培

養 15 日後の結果と変わらなかった。子葉からのシュート形成率は Kinetin 5.0 mg/l, 2, 4-D 0.01 mg/l の組み合わせで 62.5% と最も良い結果を得た。また、シュート数は BAP 5.0 mg/l, 2, 4-D 1.0 mg/l の組み合わせで 6.3 本と最良の結果を得た (**Table 1**)。胚軸からのシュート形成率、シュート数はオーキシンを加えず、BAP のみを 1.0 mg/l 添加した場合に最も良い結果となり、それぞれ 75%、10.3 本であった (**Table 2**)。シュートを分化した子葉および胚軸外植片をシュート伸長培地に移植した。シュート伸長培地で 23 日間培養した胚軸由来のシュートを **Fig. 2-C** に示す。

(2) 発根誘導

BAP 0.25 または 1.0 mg/l を添加した MS 寒天培地で 30 日間培養したシュートを IBA 添加 MS 寒天培地に移植し、3 週間培養した後の発根率および発根したシュート当たりの不定根数を **Table 3** に示す。子葉から分化させたシュートと発根率は IBA 0.5 mg/l を添加した培地で 63.5% と最も良い結果を得た。胚軸由来のシュ

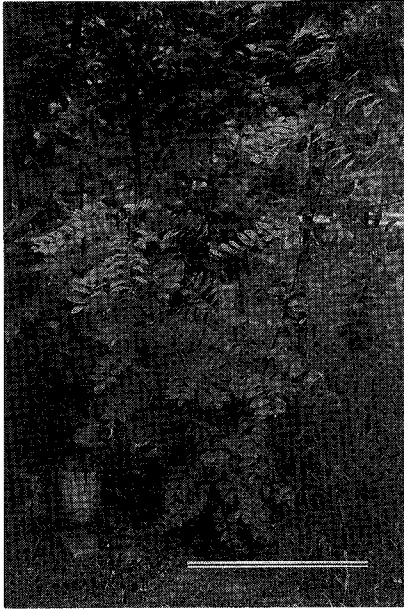


Fig. 3 Regenerated whole plant growing in soil after 5 months of acclimatization.
Bar=50 cm.

ートの発根率は IBA 2.0 mg/l で最も高く、47.5%であった。不定根数は3から8本であった。また、15 mm 以上に伸長したシュートのほうが発根しやすく、胚軸由来の 15 mm 以上のシュートを IBA 2.0 mg/l を添加した培地で培養すると 100% 発根した。発根培地で 16 日間培養した子葉由来のハリエンジュ幼植物体を **Fig. 2-D** に示す。シュートの基部で培地に接している部分や根の一部に白っぽいカルスが形成されていた。このようにシュートを発根培地で培養すると数日後にカルスが形成され、その後根が分化した。

(3) 順 化

発根培地で十分に根が伸長した幼植物体をパーミキュライト培地で順化させ、さらに2個体を4月上旬に植木鉢に移して屋内で生育させた (**Fig. 2-E**)。1週間後、室内から屋外に移したところ順調に生育し、約5ヵ月間で樹高 1.5 m の完全な植物体となった (**Fig. 3**)。

4. 考 察

本研究ではハリエンジュの子葉および胚軸から植物体を再生させることに成功したが、材料として用いた子葉と胚軸の培養中に異なった反応が認められた。子葉をサイトカイニン濃度の高い培地で培養すると硬くコンパクトなカルスが形成されたが、胚軸からは水っぽく柔らかいカルスのみが形成された。このような差異が生じた原因は両器官における内生植物ホルモン濃度や外生植物ホルモンの取り込み量の違いによると推測される。子葉か

ら形成されたコンパクトなカルスを誘導培地と同じ培地で継代培養すると暗所でもよく増殖し、明所で培養すると数日後には緑色になり、約1ヵ月後にはカルスの表面に不定芽を分化させた。これに対し、胚軸から形成された水っぽいカルスは明所でも暗所でも継代培養が困難で、ほとんど増殖せず、やがて褐変枯死した。これらのことより、カルスからの植物体再生系を確立するためには胚軸より子葉のほうが材料として適していると考えられる。不定根は外植片から直接分化した。一方、子葉由来の不定芽はコンパクトなカルスから、または、子葉から直接分化したのに対し、胚軸由来の不定芽は胚軸から直接分化した。このように不定芽分化の形式が子葉と胚軸で異なるのは上で述べたように子葉と胚軸から形成されたカルスの形態が異なるためと推測される。**Table 3** に示すように、シュートから発根誘導を行う際の最適 IBA 濃度が子葉由来シュートと胚軸由来シュートで異なっていた。このような結果が得られたのは出発材料の違いによるのかシュート誘導培地の植物ホルモン組成の違いによるのかあるいは別の原因によるのか明らかでない。

このように、我々はハリエンジュの子葉および胚軸から植物体を再生させることに成功した。樹木に遺伝子を導入する研究は草本類に比べて少なく、また、そのほとんどがポプラ⁷⁾を対象として行われている。ポプラは樹木の中でも植物体の再生系⁸⁾やプロトプラストの培養系⁹⁻¹¹⁾が確立されている種が最も多いことがその理由の一つと考えられる。マメ科の本木植物であるハリエンジュはバイオマス資源としてだけでなく、砂漠の緑化など環境保全にも役立ち、今後もその利用が期待される。我々は現在ハリエンジュのカルスからの植物体の再生系やプロトプラストの培養系の確立を目指している。

文 献

- 1) Skolmen, R. G., M. O. Mapes, 1976. *J. Hered.*, **67**: 114-115.
- 2) Upadhyaya, S., N. Chandra, 1983. *Annal. Bot.*, **52**: 421-424.
- 3) Kapoor, S., S. C. Gupta, 1986. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, **7**: 263-268.
- 4) Tomar, U. K., S. C. Gupta, 1988. *Plant Cell Rep.*, **7**: 385-388.
- 5) Barghchi, M., 1987. *Plant Sci.*, **53**: 183-189.
- 6) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 7) 三浦 進, 川合伸也, 片山義博, 諸星則幸, 秦 邦男, 1992. 第2回樹木分子・細胞生物学シンポジウム講演要旨集, p. 70.
- 8) 諸星紀幸, 柳田恒一郎, 早川敏雄, 片山義博, 1990. 東京農工大学農学部演習林報告, **27**: 39-46.

- 9) Russell, J. A., B. H. McCown, 1986. *Plant Sci.*, **46**: 133-142.
- 10) 笹本浜子, 細井佳久, 1991. *植物細胞工学*, **3**: 165-169.
- 11) 毛利 武, 三浦 清, 1992. 北海道大学農学部演習林報告, **49**: 261-275.

Summary

Plant Regeneration from Cotyledon and Hypocotyl Explants of *Kobinia pseudoacacia* L.

Toru TANIGUCHI* and Tadanori FUKUDA

School of Agricultural Science, Nagoya University, Nagoya 464-01, Japan

*Present address: *Forest Tree Breeding Institute, Kasahara, Mito, Ibaraki 310, Japan*

Whole plants were regenerated from cotyledon and hypocotyl explants of leguminous tree, black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). Seeds were sterilized and then germinated. The cotyledon and hypocotyl explants were excised from the seedlings and cultured on several media containing auxins and cytokinins. Shoots were induced in cotyledon and hypocotyl explants on media containing 5.0 mg/l BAP and 1.0 mg/l 2,4-D, and 1.0 mg/l BAP, respectively. Explants forming shoots were transferred to shoot elongation media containing 0.25 or 1.0 mg/l BAP. Elongated shoots were transferred to rooting media containing 0.5-2.0 mg/l IBA. Shoots differentiating roots grew normally in soil after acclimatization.