

カーネーション葉肉プロトプラストの培養と茎葉分化

園本忠正・柴田道夫 (大分県温泉熱利用花き園芸試験場・野菜・茶業試験場)

Tadamasa KUNIMOTO and Michio SHIBATA : Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.)

カーネーションの葉肉プロトプラストの培養については、すでに程ら (1982) の報告があるが、茎葉分化には至っていない。今回、カーネーション数品種の葉肉プロトプラストの培養を行い、コロニー形成効果に関するホルモン濃度に品種間差があることを認め、さらに 1 品種において茎葉の分化を認めたのでその概要を報告する。

1. 材料及び方法

品種は、“レナ”、“スケニア”、“ユーロー”を試した。プロトプラスト単離の材料としては、茎頂培養由来の無菌植物を、NAA 0.02mg/l を添加した MS 寒天培地に挿し芽し、25℃、1500 lux、16時間照明下で約 40 日間培養した植物体から採取した葉片を用い、幅約 1mm に細断して酵素処理を行った。酵素処理は、0.2%ペクトリアーゼ Y23、2.0%セルラーゼオノヅカ RS、1.0%ドリセララーゼ、0.5Mマンニトール、pH5.7の処方度25℃、3時間静置して行い、その後0.5Mマンニトール液で3回洗浄して、プロトプラストを調製した。培養密度は1×10⁶個/mlとし、20℃、暗黒条件下で培養を行った。培地は、1/4修正MSを基礎とし、1% Sucrose、0.5Mマンニトールを加え、pH5.7に調整した液体培地とした。添加ホルモンは、オーキシニンとして2,4-D (0.25~10.0 mg/l の6段階)、サイトカイニンとしては Zeatin (0.25~2.5mg/l の4段階)を用いた。形成されたコロニーのうち、“スケニア”と“ユーロー”については、

2, 4-D 1.0mg/l + Zeatin 0.5mg/l または NAA 1.0 mg/l + BA 0.5mg/l を含む MS 寒天培地に移植し、カルスを誘導させた。さらに、NAA, 2,4-D, BA, Zeatin, GAなどを含む再分化培地に移植して、茎葉などの分化を図った。なお、コロニー移植後は、20℃、約1500 lux、16時間照明下で培養した。

2. 結果及び考察

“レナ”では、2,4-D 0.5~2.5mg/l、Zeatin 0.25~2.5mg/l の範囲でコロニーが形成されたが、特に2,4-D 1.0mg/l + Zeatin 1.0mg/l の組合せで高い分裂を示した。“ユーロー”では、“レナ”よりもかなり高い2,4-D 濃度域でコロニーが形成され、2,4-Dの5.0~10.0mg/l の範囲で良好であった(第1表)。“スケニア”では、2,4-D 0.5~10.0mg/l、Zeatin 0.25~1.0mg/l とかなり広い濃度域でコロニーが形成されたが、“レナ”に比べると、高い2,4-D濃度が適しているようであった。

再分化用培地に移植されたカルスは、“スケニア”では、淡緑色を呈して肥大し、一部で不定根が分化したが、現在のところ茎葉の分化は認められていない。“ユーロー”では、2,4-D 2.5mg/l + Zeatin 1.0mg/l の液体培地でコロニーを形成させ、2,4-D 1.0mg/l + Zeatin 0.5 mg/l の寒天培地でカルス誘導後、Zeatin 1.0mg/l + GA 0.1 mg/l の再分化培地に移植したカルスの一部で、培養180日後に茎葉分化が認められた。

第1表 品種“ユーロー”のプロトプラストのコロニー形成に及ぼす2,4-D, Zeatin添加の効果

培地添加ホルモン	2,4-D (mg/l)					
	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0
Zeatin	+	+	++	-	++++	-
(mg/l)	0.25	+	+	-	++++	+++
	0.5	-	++	++	++++	+++
	1.0	-	++	++	++++	++++
	2.5	-	++	++	++++	++++

注) 培養54日後 +++++ (20~50細胞のゴロニー多), ++++ (20細胞だが少), +++ (5~10細胞), ++ (分裂有り), - (萎縮, 褐変)



写真1 品種“ユーロー”の茎葉分化(培養200日後)



写真2 分化カルスの移植後の shoot 発生