

キュウリプロトプラストの培養と器官誘導

杉山慶太・岩永喜裕・吉田建実 (野菜・茶業試験場久留米支場)

Keita SUGIYAMA, Yoshihiro IWANAGA, Tatemi YOSHIDA:
Induction of Organ from Protoplast of Cucumber

キュウリについては安定した培養系が確立されておらず、今後有用遺伝子を導入利用するにはプロトプラストからの培養系の確立が必須である。そこでキュウリプロトプラストの培養条件及び器官誘導についての検討を行った。

1. 試験方法

キュウリ品種は‘マーケッタ’を用いた。種子を無菌播種し、発芽後の子葉を供試した。0.1%ベクトリアーゼY-23, 1%セルラーゼRSと0.5Mマンニトールを加え、pHを5.8に調整した酵素液中に子葉を浸漬し25℃、4時間でプロトプラストを得た。培地に 1×10^5 /mlになるようにプロトプラストを植え込み暗黒条件下で培養した。培養1か月後に形成されたカルス塊を1/2MS (2g/lゲルライト添加)を基本培地としてオーキシシン類とサイトカニン類を組合せた培地に置床した。

2. 結果及び考察

1) プロトプラストの培養 初期分裂にはBA濃度が高い方が効果的であり、その後コロニー形成に至っては低濃度のオーキシシンとの組合せが良好であった (第1表)。オーキシシンとしては2,4-DよりもNAAを組合せた方が初期分裂を引き起こす効果が高く、コロニー形成にいたる割合も多い傾向にあった。初期分裂からコロニー形

成までの培地としては0.1mg/l NAA+0.5, 1.0mg/l BAの培地が最も適していた。

2) 器官誘導 コロニー移植後のカルス形成及び増殖は1.0mg/l BA及び0.1mg/l NAA+1.0mg/l BAの培地が良好であった (第2表)。カルスからの不定根の分化はカルス置床1週間後には観察され、0.5, 1.0mg/l NAA, 及び0.5mg/l NAA+0.1mg/l 2iP添加培地において高率で分化した。このようにNAA単独の培地でも不定根が誘導されたことから、不定根の直接的な分化誘導要因はオーキシシンの作用によるものと考えられ、サイトカニン濃度が高い条件下では分化できないことが明らかとなった。また不定芽の分化について試みたところ、NAA濃度よりもBA濃度の高い場合にカルスからグリーンスポットの出現する傾向がみられた。しかし、その後の莖葉分化には至らなかった。さらに子葉切片から不定胚が得られた4.0mg/l 2,4-D+0.1mg/l BA添加培地においても、プロトプラスト由来カルスからは不定胚形成は認められなかった。

第2表 子葉プロトプラスト由来カルスからの器官分化

ホルモン濃度 (mg/l)		カルス増殖程度 ^a	根 ^b	グリーンスポット ^c	莖葉 ^d
NAA	BA		%		%
0.0	0.1	1.3	0.0	-	0.0
0.0	0.5	2.0	0.0	+	0.0
0.0	1.0	2.7	0.0	-	0.0
0.01	0.1	2.0	0.0	+	0.0
0.01	0.5	2.0	0.0	+	0.0
0.1	0.1	1.5	0.0	-	0.0
0.1	0.5	1.8	0.0	-	0.0
0.1	1.0	3.0	0.0	+	0.0
0.5	0.0	1.5	66.7	-	0.0
1.0	0.0	2.0	88.9	-	0.0
1.0	1.0	2.0	0.0	-	0.0
NAA		2iP ^d			
0	1.0	2.0	0.0	-	0.0
0.1	1.0	2.0	0.0	-	0.0
0.5	0.1	1.5	68.3	-	0.0
0.5	1.0	1.8	0.0	-	0.0
2,4-D		BA			
4.0	0.1	1.0	0.0	-	0.0

第1表 キュウリ子葉プロトプラストの分裂に及ぼす2,4-D, NAAとBAの影響

2,4-D	NAA	BA	初期分裂率 ^a	コロニー形成程度 ^b
mg/l	mg/l	mg/l	%	
0.1		0.5	3.8	+
0.1		1.0	12.1	++
1.0		0.1	2.1	+
1.0		0.5	2.6	+
1.0		1.0	3.3	+
	0.1	0.1	5.2	++
	0.1	0.5	12.5	+++
	0.1	1.0	10.1	+++
	1.0	0.1	1.5	+
	1.0	0.5	4.3	+
	1.0	1.0	11.7	++

注) a: 分裂プロトプラスト/総プロトプラスト×100, 培養5日後調査

b: -(無), +(10個/ml未満), ++ (10-50個/ml), +++ (50個/ml以上), 培養14日後調査

注) a: 1(1mm<), 2(1-3mm), 3(<3mm) b: 分化カルス数/置床カルス数

c: グリーンスポット出現 有(+), 無(-) d: Isopentenyladenine