

キンカン珠心カルスからのプロトプラスト単離と植物体再生

長田龍太郎・菓子野利浩・轟 篤 (宮崎県総合農業試験場)

Ryutaro NAGATA, Toshihiro KASHINO and Atsushi TODOROKI: Isolation of Protoplasts and Regeneration of Plantlets from Kumquat's Nucellar Callus

現在、宮崎県のキンカン生産は全国シェアの約7割を占め、県の果樹に於て有望な品目となっている。しかし、その果実は種子が多く、キンカンの無核種が望まれているが、多胚のため交雑育種が困難である。そのため、細胞融合等による無核化を研究中である。今回、キンカン珠心カルスからのプロトプラスト単離並びに植物体再生に成功したので報告する。

1. 材料及び方法

1) キンカン珠心カルスからのプロトプラスト単離のための酵素処理は、マセロザイムR10 0.2, 0.3%, セルラーゼオノズカRS 0.2, 0.3%, ドリセラゼ 0.1, 0.2%の組合せについて検討した。この酵素を1/2MT培地、0.6Mマンニトールに添加し、25℃、暗条件で16時間処理した。処理法として、静置法及び回転振とう法(30rpm)の検討を行った。

2) プロトプラストの培養密度を 1.0×10^5 から 0.625×10^4 まで2倍希釈を行い、密度の検討を行った。培養条件は、1/2MT培地にショ糖0.15M, グルコース0.45M添加し、ジェランガム0.3%に封入後、25℃、暗培養、3週間、その後25℃、明培養した。また、コロニー移植培地として、糖源にショ糖0.15M, ラクトース0.1, 0.2Mを各々添加し、効果を調査した。

3) MT培地に麦芽抽出物500mg/l, ラクトース0.1M添加して、誘導した胚様体を用いて、NAA0.1mg/l, アデニン40mg/l, GA 1.0, 5.0mg/l, BA 0.1mg/lをそれぞれ組合せた植物育成用培地の検討を行った。

2. 結果及び考察

1) プロトプラストの単離には、静置法より振とう法が勝った。また、振とう法のドリセラゼ濃度が0.1%では、細胞壁が残っている細胞は15%存在し、濃度0.2%では、細胞壁残存細胞は0%となるものの、プロトプ

ラスト生存率が36%まで減少することから0.1~0.2%の間に適正濃度が存在すると考えられた。マセロザイムR10, セルラーゼオノズカRS両酵素とも、0.3%で効果が高かった。

2) 初期の生育コロニー数は、プロトプラストの培養密度が高まるにつれ多くなった。移植後の生育コロニー数は、いずれの初期プロトプラスト密度においてもラクトース0.2M添加で最もよかった。また、生育コロニー数はプロトプラスト密度 5×10^4 /mlで最も多かったが、plating efficiencyによると、効率の良い培養密度は 2.5×10^4 /mlであることが明らかとなった。

3) 胚様体からの植物体誘導では、本葉まで発生した個体は、NAA0.1mg/l単独添加区で20個体中8個体と最も多かった。本葉発生の初期までは、GA1.0mg/lにNAA及びアデニンを添加した培地で20個体中10個体と最も多かったが、生育が進むにつれ、枯死する個体が増加し、根の発生も上記培地 비해劣った。そのため、今後GA添加培地から無添加培地への移植時期等についての検討が必要であると考えられた。

現在、再生植物体をカラタチに接ぎ木して、育成している。今後、プロトプラスト由来植物体の変異について調査を行う予定である。

第1表 コロニー移植培地での生育コロニー数

培地添加糖類		初期プロトプラスト密度	生育コロニー数	P.E ^{b)}
ショ糖	ラクトース			
M	M	1×10^5	46	0.046
0.15	-	5×10^4	486	0.972
		2.5×10^4	429	1.716
		1×10^5	45	0.045
-	0.1	5×10^4	512	1.024
		2.5×10^4	174	0.696
		1×10^5	93	0.093
-	0.2	5×10^4	614	1.228
		2.5×10^4	480	1.920

注) a) 培養液 1 ml 当たり

b) plating efficiency = 生育コロニー数 / 総プロトプラスト数 × 100

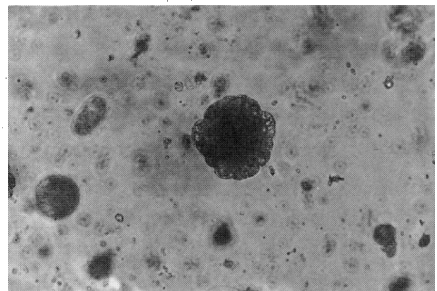


写真-1 キンカン珠心カルスのプロトプラストのコロニー形成

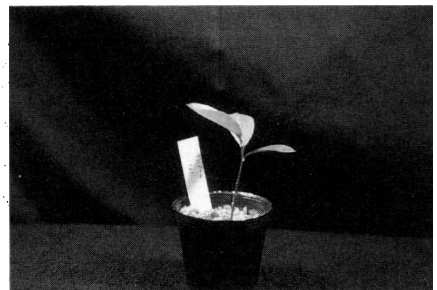


写真-2 再分化植物体