

アスパラガス主要品種におけるプロトプラストからの植物体再生

國武久登・*真子重房・中島寿亀・森 欣也・田中政信 (佐賀県農業試験研究センター・*佐賀農芸高)

Hisato KUNITAKE, Shigefusa MANOGO, Toshiki NAKASHIMA, Kinya MORI and Masanobu TANAKA : Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Protoplasts of Several Cultivars of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.)

アスパラガスにおいて、細胞融合や遺伝子組換えなどの細胞育種を行うには、プロトプラストからの効率的な植物体再生系を確立することが重要である。前報で‘メリーワシントン’のプロトプラストからの胚様体を経由した植物体再生系を確立した。本研究では、さらに効率的なプロトプラスト培養系を確立するために、培養条件や品種・系統間差異を検討するとともに、再生したプロトプラスト由来植物体の染色体数及び花粉稔性の調査を行った。

1. 材料及び方法

材料には、アスパラガス (*Asparagus officinalis* L. 品種‘ウェルカム’, ‘ハイデル’, ‘協和アスパラ’, ‘パイトル’, ‘ポールトム’を供試した。それらの種子または圃場株の茎頂・節間からカルスを誘導した。プロトプラスの単離にあたり、継代培養3-4週間後のカルスをホルモンフリーのMurashige and Skoog (MS) 液体培地で4日間前処理し、酵素処理を行った。カルス1gを10mlの酵素液 (2% Cellulase Onozuka RS, 0.5% Macerozyme R-10, 0.05% Pectolyase Y-23, 5mM CaCl₂・2H₂O, 10mM MES, 0.6M sorbitol, pH5.7) で6時間、25℃, 60rpm/minで処理することによりプロトプラストを単離した。培養は細胞密度を1×10⁶/mlに調整後、0.1%ゲルライトに包埋し、25℃, 暗黒条件下で培養を行った。プロトプラストからの効率的なコロニーの形成条件を確立するために生長調節物質とカザミノ酸の影響について検討を行った。

次に、この確立したプロトプラスト培養系を用いて、栽培品種と本センターで作出した倍数体系統 (半数体, 3倍体, 4倍体) のコロニー形成率を調査した。再生した植物体は順化後ポット育苗し、その根端の染色体をホルゲン・押しつぶし法により観察した。さらに酢酸カーミン染色による花粉稔性調査と花粉発芽試験を行った。

2. 結果及び考察

コロニー形成に及ぼすナフタレン酢酸 (NAA) とゼアチンの影響について調査を行った。供試した3系統のカルスとも1mg/l NAAと1mg/l ゼアチンを添加した培地で最も高いコロニー形成が得られた (第1表)。さらにグルタミンの影響について調査した結果、‘ハイデル’と4倍体‘ポールトム’の両系統とも無添加ではコロニー形成がほとんど認められず、1000mg/l で最も高いコロニー形成率を得られた。以上の結果、効率的なコロニー形成条件は、カルスの前処理後プロトプラストを単離し、1mg/l NAA, 1mg/l ゼアチン, 1000mg/l グルタミン, 0.6Mグルコースを添加した1/2MS培地であった。

この確立した培養系を用いて品種・系統間差異について調査した。その結果、半数体を除くすべての材料でコロニー形成が観察され、品種・系統間に顕著な差異が認められた。栽培品種では、‘ウェルカム’が40.8%で最も高く、‘ポールトム’が0.2%で最も低かった。2倍体‘ハイデル’と4倍体‘ポールトム’の交雑により作出した3倍体では5.0%のコロニー形成率が得られたが、半数体ではまったくコロニーは形成されなかった。國武ら (1992) は半数体由来のカルスの倍数性変異が2倍体由来カルスより高頻度で起こることを確認しており、プロトプラスの分裂反応と関係があるものと思われる。

形成されたコロニーは、2mg/l 2,4-Dを添加したMS培地で増殖させ、さらに1%ゲルライトを添加したホルモンフリーMS培地に移植することにより胚様体を形成させた。その胚様体を1/2MS培地に移植し、約1か月後幼植物体が再生した。‘ハイデル’の順化8か月後のプロトプラスト由来植物の染色体調査を行った結果、すべて2n=20の2倍体であった。この染色体数の安定性は、Bui Dang Ha et al. (1975), Kong and Chin (1988), Kunitake and Mii (1990) によっても報告されており、プロトプラスト培養による染色体変異はほとんど認められないものと思われる。

しかしながら、‘ハイデル’のプロトプラスト由来植物の花粉稔性は、実生や胚様体由来植物と比較して減少した。すなわち、実生や胚様体由来植物では、すべて85%以上の稔性が示されたのに対し、調査した12個体のプロトプラスト由来植物では、23.0~68.4%の低い稔性であった。花粉発芽の調査でもまた、同様な結果が得られた。この花粉稔性の減少の原因は、直接、胚様体を経由して得られた植物では稔性の減少が認められていないことから、プロトプラスト培養そのものが原因と考えられるが、今後、他の品種・系統についても調査する必要があるものと思われる。

第1表 プロトプラストからコロニー形成に及ぼす生長調節物質の影響

生長調節物質 (mg/l)		コロニー形成 (%±SE) a)			
NAA	zeatin	2X-ハイデルFb)	2X-ハイデルMc)	4X-No36d)	
1	0.5	1.6±0.3	0.2±0.09	5.1±1.10	
2	0.5	1.0±0.3	0	2.3±0.79	
5	0.5	-e)	0	0	
1	1	2.0±0.4	0.7±0.17	7.3±0.44	
2	1	0.6±0.2	0.3±0.14	4.8±0.38	
5	1	-	0	0	
1	2	1.7±0.4	0.3±0.12	2.6±0.57	
2	2	0.5±0.1	0.3±0.12	2.6±0.66	
5	2	-	0	0	
1	5	-	0.1±0.12	2.0±0.86	
2	5	-	0	4.5±0.50	
5	5	-	0	0	

注) a) 1試験区あたり3シャーレ・2反復行った。コロニー形成は培養40日後に調査した。 b) ハイデル雌株 c) ハイデル雄株 d) ポールトム4倍体選抜系統) 無試験