

トルコギキョウ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・中島寿亀・森 欣也・田中政信 (佐賀県農業試験研究センター)

Hisato KUNITAKE, Toshiki NAKASHIMA, Kinya MORI and Masanobu TANAKA :
Plant regeneration from protoplasts of several cultivars of Prairie Gentian
(*Eustoma grandiflorum* (Griseb.) Schinners)

花き園芸植物におけるプロトプラストからの植物体再生は、作物や野菜と比較すると報告例が少なく、そのために細胞融合やエレクトロポレーションへの応用例も極めて限定されている。本研究では、トルコギキョウを材料として、プロトプラストからの植物体再生系とその品種間差異について検討を行った。

1. 試験方法

材料には、無菌的に育成した実生の成葉(播種後40日)を供試した。プロトプラスト単離にあたり、1gの成葉を細断し、10mlの酵素液(2%セルラーゼオノズカRS, 0.5%マセロザイムオノズカR-10, 0.05%ペクトリアーゼY-23, 5 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 10mMMES, 0.6Mソルビトール, PH5.7)で3-4時間、25°C, 60rpm/minで処理することによりプロトプラストを単離した。さらに、細胞密度を $5 \times 10^4/ml$ に調整後、2mg/lナフトレン酢酸(NAA), 1mg/lベンジルアデニン(BAP), 3%ショ糖, 0.5Mマニトールを添加した修正MS(硝酸アンモニウムを除く)液体培地により25°C, 暗黒条件下で培養した。細胞の褐変を抑制するために、活性炭ブロック(MS+0.6Mグルコース+1%活性炭+0.2ゲルライト)を液体培地に添加した。効率的なコロニー形成を導くために、活性炭ブロックの重さと添加時期を検討した。また、この培養系を利用して9品種のコロニー形成の差異について調査した。次に、カルスからの分化条件を明らかにするために、不定芽形成に及ぼす生長調節物質(NAA, BAP)の影響について検討した。再生植物体は順化後ポット育苗し、開花・結実まで栽培し、形態調査と酢酸カーミンによる花粉粘性調査を行った。

2. 結果及び考察

プロトプラストは、7品種において高い収量が得られ、それらの収量は1gの成葉当たり 10^6 個以上であった(第1表)。培養したプロトプラストは、培養3-4日後に分

第1表 トルコギキョウにおけるプロトプラスト収量とコロニー形成の品種間差異

品種	プロトプラスト収量 ^{a)} ($\times 10^6$ 個 \pm SE)	コロニー形成数 ^{b)} (個 \pm SE/シャーレ)
源氏桜	14.9 \pm 4.4	17.3 \pm 14.6
F ₁ ホワイトスター	1.5 \pm 1.6	327.3 \pm 62.3
若紫	13.6 \pm 3.8	453.8 \pm 96.7
アフリバイカラーパープル	16.0 \pm 3.9	967.8 \pm 88.2
あずまの粧	4.6 \pm 3.0	683.2 \pm 72.3
あずまの朝	11.6 \pm 2.3	454.3 \pm 96.3
あずまの霧	11.9 \pm 3.3	0
ホーリスモールレディ	2.1 \pm 1.1	368.8 \pm 37.8
スカイフレンド	10.1 \pm 1.5	642.3 \pm 51.2

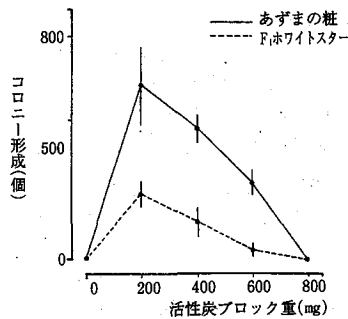
注) a) 1g葉肉当たりのプロトプラスト収量 b) 培養2か月後調査

第2表 トルコギキョウ‘あずまの朝’のプロトプラスト由来カルスからの不定芽分化に及ぼす生長調節物質の影響

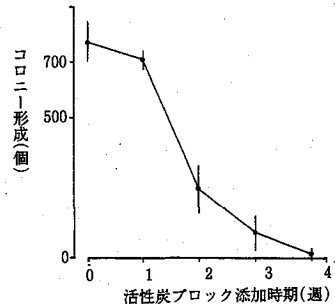
生長調節物質 (mg/l)	カルス新鮮量 (g \pm SE)		不定芽形成 ^{a)}	
	BAP	NAA	分化カルス数 ^{b)}	平均不定芽分化数 ^{c)} (No \pm SE)
0	0	1.41 \pm 0.41	0/20	0
1	0	1.61 \pm 1.13	6/20	12.6 \pm 39.6
2	0	1.36 \pm 0.61	14/20	4.3 \pm 6.0
0	0.5	1.62 \pm 0.67	10/20	0.1 \pm 0.2
1	0.5	1.88 \pm 0.92	0/20	0
2	0.5	2.27 \pm 0.96	0/20	0

注) a) 置床1か月後調査
b) 不定芽を分化したカルス数/供試したカルス数
c) 1カルス当たりの不定芽数

裂が観察されたが、その後細胞の褐変や肥大が観察され、コロニーは形成されなかった。また硝酸アンモニウムを添加した培地では分裂は認められなかった。そこで硝酸アンモニウムを除いたプロトプラスト培養液へ活性炭ブロックを添加した。その結果、細胞の褐変が抑制されコロニーが形成された。コロニー形成に及ぼす活性炭ブロックの量と添加時期について検討した。活性炭ブロックは200mgでコロニー形成に最も有効であった(第1図)。
‘あずまの粧’では約600個/シャーレ、‘F₁ホワイトスター’では約250個/シャーレのコロニーが形成された。添加時期は培養初期がコロニー形成に有効であり、培養直後から1週間後までに添加すると約700個のコロニーが形成された(第2図)。同上の培養系を用いて9品種のコロニー形成を調査した結果、明確な品種差異が観察された(第1表)。カルスからの不定芽分化は、2mg/l BAPを添加したMS培地で高く、70%のカルスから不定芽が形成され、1カルス当たりの不定芽分化数は4.3本であった(第2表)。さらに、0.5mg/lインドール酪酸(IBA)添加のMS培地に不定芽を移植することにより発根し植物体を再生した。順化後、‘若紫’の再生植物体は、対照区として栽培した実生と同じ時期に開花・結実し、葉、花などの形態の特徴や花粉粘性に異常は認められなかった。



第1図 トルコギキョウのプロトプラストからのコロニー形成に及ぼす活性炭ブロック重の影響



第2図 トルコギキョウのプロトプラストからのコロニー形成に及ぼす活性炭ブロック添加時期の影響 (材料: あずまの朝)