琉球大学学術リポジトリ

[報文]パパイヤの組織培養における内生バクテリアの除去とテトラサイクリンの効果

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 上原, 周夫, 濱井, 義則, UEHARA, Chikao, HAMAI, Yoshinori メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016562

南方資源利用技術研究会誌 Vol. 10 No 1 11～13 1994

パパイヤの組織培養における内生バクテリアの除去とテトラサイクリンの効果

上 原 周 夫・濱 井 義 則

(中部製糖株式会社)

Technigue of Tetoracycline in Papaya Using Plantlet from Meristem Cluture

Chikao UEHARA and Yoshinori HAMAI

Department of Biochemistry Chubu Sugar Manufacturing co, ltd., 117-2 Kadekaru Nishihara-Cho, Okinawa 903-01

緒 言

パパイヤはメキシコ，西インド諸島及びブラジルにまたがる熱帯アメリカ原産で，沖縄へは明治末期に導入されている．1988年の栽培面積は15.4haで，1983昭和58年以降，栽培面積の増減は認められないが，庭先果樹としてかなり定着しており，最も親しまれている果樹のひとつである．

現在は，自給的な野菜用，加工用，生果用としての栽培が主となっているが，最近の消費動向の変化に伴い，市場出荷を前提とした生果用，加工用，酵素原料としての需要が高まっている．特に，沖縄においては1991年11月にウリミバエが根絶され，植物防疫法の改正と共にパパイヤ生果の移出が解禁となり今後の経済果実としてかなり有望視されている．しかし，パパイヤの経済栽培は，実生繁殖による種苗によって営まれているため幼苗期の性判別が難しく，経済栽培上の大きなネックになっている．

性判別の方法は重要な課題となっているが，実用的には幼苗期に樹勢の強いものを雄と判断して除き，残りを定植したり，又，定植時に一ケ所に3本植え，性判別がなされた後に取り除いている．しかし，この方法では雄のみの除去であり，雌，両性の性判別，及び，同形質の雌，両性を選抜することは不可能である．

同質の種苗を得るためには，挿し木や接ぎ木等による方法が一般的である．パパイヤの栄養繁殖においても，挿し木や接ぎ木によるクローン苗確保も可能であるが[1]，パパイヤは，強い頂芽優勢を有するため挿し穂や接ぎ穂の量的確保が困難である．

組織培養によるクローン繁殖は，雌，両性の性タイプのクローン化した種苗の確保，異種交配での品質，収量の優れた系統，耐病性系統等の遺伝的に優れた系統の斉一な種苗の大量育成，及び遺伝資源の保存を可能にする重要な手法である．

パパイヤの組織培養によるクローン繁殖は，濱井らによって実用化されているが[2]茎頂の内生バクテリアによる汚染については，いまだ明確にされていない．このような背景から，本研究は，パパイヤの組織培養における培養段階の改善として内生バクテリア除去に関するテトラサイクリンの効果を明らかにしたものである．

材料及び方法

実験1．茎頂の内生バクテリア汚染の季節性について

1989年6月21日，ハウス内に播種し，育苗した83日苗の茎頂を1989年9月21日に切り取り，材料として供試した．材料はエタノール70

*沖縄県中頭郡西原町字嘉手苅117-2

%，次亜塩素酸ナトリウム0.75%で滅菌後，滅菌水で洗い，実体顕微鏡下で葉原基2－3枚をつけた成長点茎頂部を0.5～0.7㎜の長さで切り取り，ホルモンフリーのMurashige and Skoog（MS倍地）寒天培地に置床した．

置床30日後，切り口から倍地に侵出するバクテリアのコロニーを実体顕微鏡で検鏡し，内生バクテリア汚染と判定した．茎頂の採取時期は，1990年9月中旬，11月中旬に茎頂端部をそれぞれ採取した．野外での採取は1990年8月中旬，12月中旬に玉城村字親ケ原，山入端氏の圃場から行った．

実験2．初代定着培地における内生バクテリアの除去について

1990年8月12日に玉城村字親ケ原，山入端氏圃場より着果中の成木から発生した側枝を採取し，茎頂の大きさで4種類に分類し材料として用いた．材料の滅菌，水洗は実験1と同様に行った．滅菌後，葉原基2－3枚をつけた成長点茎頂部を0.5～0.7㎜の長さで切り，テトラサイクリンをそれぞれ1㎖当り10μg，20μg，50μg，100μgろ過滅菌（マイレックスGS　ミリポア0.22μm）で加えたMS寒天溶液を20㎖試験管に10㎖分注した培地に置床した．

テトラサイクリン培地の処理期間を10日間とし，その後無添加のMS培地に移植し，30日後切り口から侵出するバクテリアコロニーを実体顕微鏡で調べ，汚染の有無を確認した．

結　果

実験1の茎頂の採取時期は，8月中旬，9月中旬の成長旺盛期，11月中旬，12月中旬成長緩慢期に行った．茎頂の内生バクテリア汚染を調べた結果は，表1の通りである．8月中旬，9月中旬採取は，内生バクテリアの汚染が多く，野外区が74.4%，ハウス内区が50.7%と極めて高い汚染率となっている．11月中旬におけるハウス内採取区は3.6%，12月中旬採取は10.8%と低く，成長旺盛期よりむしろ成長緩慢期に内生バクテリアによる汚染は低くなることが確認された．

表1．内生バクテリアの季節性

項目 置床月	個体数	カビ及び外生バクテリア	内生バクテリア	内生バクテリア汚染率	備　考
8月中旬	86	11	64	74.4%	野　外
9月中旬	128	0	65	50.7	ハウス内
11月中旬	110	1	4	3.6	ハウス内
12月中旬	65	0	7	10.8	ハウス内
12月中旬	96	12	28	29.2	野　外

12月中旬に野外より採取した茎頂も内生バクテリアの汚染率は29.2%となっており8月中旬，9月中旬よりも低くなっている．

実験2においては，予備実験で茎頂の内生バクテリア汚染が確認された圃場から8月中旬に採取し，テトラサイクリンによる内生バクテリア除去について検討を行ったが，その結果は表2の通りである．

表2．テトラサイクリンの内性バクテリアに及ぼす影響

濃度　項目	個体数	内性バクテリア	汚染率
10μg	22	22	100 %
20μg	24	14	58.3% b
50μg	22	10	45.5% b
100μg	22	枯　死	－
control	18	18	100 % a

英小文字は異符号間で有意差のあることをしめす
（p＜0.05Mann-Whitneysの u test による）

汚染率は，無処理区100%に対して10μg区100%，20μg区58.3%，50μg区45.5%で，テトラサイクリン20μg以上の添加でバクテリア汚染を抑制することが確認された．100μg区はすべて褐変枯死しテトラサイクリンの濃度障害が認められた．

内生バクテリアの培地への浸出は，MS寒天培地移植後３日目から認められ，移植８日後と30日後に調査した結果，バクテリアの浸出した個体は同数であった．したがって，培地移植後３日～８日後に内生バクテリアは十分に確認できるものと判断された．

テトラサイクリン50μg区では，外植体の培地接着面に褐変がみられるが，10日後無添加MS寒天培地に移植すると回復し，２ip 0.5ppm MS寒天培地で再分化した．

８月中旬に野外から採取し分類した茎頂別の内生バクテリア汚染率は，茎頂の伸長したものは低く，伸長していない茎頂ほど汚染率が高くなることが確認された．

考　察

実験１においては，パパイヤの組織培養の大きな難点となっている内生バクテリアの発生消長についての調査を行った．

茎頂の内生バクテリア汚染によるIn vitroにおけるパパイヤの生存率の低下についてR. M. Pandyら[3]は成長旺盛期より冬期間の成長停止期に向かうにしたがって多発すると報告している．今回の実験では，沖縄におけるパパイヤの内生バクテリアによる汚染はその報告とは逆に成長緩慢期に比べて８月，９月の正長旺盛期である夏期間に多発することが確認された．

それらの差異は，茎頂に汚染した内生バクテリアの種類や生長サイクル等による検討が必要であるが，沖縄における内生バクテリアは，８月，９月の成長旺盛期に繁殖，移動に適応しているものと思われる．

したがって，クローン苗を目的として茎頂の採取時期を行う場合は，本結果からも明らかなように11月～12月が適当と判断される．

実験２においては，同じくパパイヤの大量増殖のネックとなっている内生バクテリアの除去についての検討を行った．茎頂の内生バクテリアを抗菌スペクトルが広く培養変異が起こり難しいとされる抗生物質テトラサイクリン（タンパク合成阻害による殺菌）を添加したＭＳ寒天倍地に置床して，除去の効果を調査した．

シュートの内生バクテリアの除去は，Hayashi, T. Hildebrandらが抗生物質テトラサイクリン，クロラムフェニコール，ネオマイシンを用いてヒマワリの組織の無菌化を報告している[4]．

本実験も，その結果を受けてパパイヤにおける効果について検討を行ったものであるが，パパイヤの内生バクテリアは，側枝の育成ステージによって大きく異なっており，伸長していない側枝は伸長した側枝に比べて内生バクテリアの密度が高く，無菌化が困難な傾向にあり，組織の採取に当たっては，特にその点に対する留意が必要である．伸長した側枝においては，テトラサイクリン50μgの10日間処理は内生バクテリアのタンパク合成を阻害し，茎頂の無菌化は約54.5％となっている．それらの結果は，これまでパパイヤの組織培養のネックとなっていた内生バクテリアを除去し，茎頂の無菌化を可能ならしめるものである．

参考文献

1．Libby, W, J, and Hood J, V (1976) Juvenility in heaged radiata pine, Acta Horticulture, 56：91－98

2．濱井　義則，上原 周夫，松田　義昭，福村 直樹，大仲 祐二（1993）組織培養苗を用いたパパイヤの栽培管理とその可能性について，南方資源利用技術研究会誌９(1)：１－４

3．R, M, Pandy, D, K, Kishoreand and K, Arumozh：(1986) Effect of seasons plant type and some preexcission treatment on in Vitro behaiviour of Carica papaya L, Indian Journal of Horticulture, 43 (３－４)：174－179

4．竹内　正幸・石原　愛也　植物組織培養 朝倉書店；64－65