

シンテッポウユリのプロトプラストの単離と培養

鈴木 誠一

(宮城県園芸試験場)

Isolation and Culture of Mesophyll Protoplasts in *Lilium* × *Formolongo* hort.

Seiichi SUZUKI

(Miyagi Prefectural Horticultural Experiment Station)

はじめに

ユリの品種改良は従来、交雑育種によって行われてきたが、今後は交雑不和合の組み合わせも試みる必要があると思われる。その手段の一つとして細胞融合による体細胞雑種の作出の可能性も考えられる。本報告は種子繁殖性で栽培が容易であるにもかかわらず花色が白色のみのシンテッポウユリをとりあげ、他種との細胞融合を前提として葉肉プロトプラストの単離と培養を試みたものである。

試験方法

1. プロトプラストの単離

品種は「白峰」, 「新雪」, 「F₁ 銀河1号」, 「今井」, 「晩生あづさ」の5品種を供試した。昭和59年11月27日に播種し, 25℃, 2,000lux, 16時間日長の培養室内で育成した無菌植物の葉肉を使用した。プロトプラストの単離方法は次のとおりである。

①葉裏の表皮をはぎ, 1ℓ中にKH₂PO₄ 27.2mg, KNO₃ 101mg, CaCl₂ · 2H₂O 1,480mg, MgSO₄ · 7H₂O 240mg, KI 0.16mg, CuSO₄ · 5H₂O 0.025mg (以下, cpw塩と略す) の入ったマンニトール0.5M溶液に1時間浸漬した。

②ペクトリアーゼY-23 0.1%, セルラーゼオノズカRS 0.5%, マンニトール 0.5M, pH 5.75のcpw塩入りの酵素液 (以下, C-4cpwと略す) に浸漬し, 27℃, 80回/分で30分間往振とうした (第1回目の振とう)。

③振とう終了後は孔隙が70μmのナイロン・メッシュで酵素液をろ過し, 残渣を再び新しいC-4cpwに浸漬して前回と同様に15分間振とうした (第2回目の振とう)。

④振とう終了後は第1回目と同様に酵素液をろ過した。

⑤第1回目及び第2回目にろ過した酵素液はそれぞれ100Gで2分間, 遠心分離してプロトプラストを沈澱させ, cpw塩添加マンニトール 0.5Mで洗浄した。この操作を2回繰り返してプロトプラストを精製した。

⑥精製したプロトプラストは培養時の密度が1 × 10⁵個/mlになるように調整して, マンニトール 0.5M + カンテン0.1%に懸濁した。

⑦このプロトプラスト懸濁液と培養液とを等量混合して培養した。

2. プロトプラストの培養

培養開始日は昭和60年2月9日, 3月2日, 3月14日, 3月23日とした。このうち3月2日, 3月14日, 3月23日は葉裏の表皮をはいだ後, 5℃, 暗黒下で24時間浸漬する前処理を行った。前処理はMurashige and Skoog (62, 以下, MSと略す) からNH₄NO₃を除いた1/2濃度の無機塩及び有機物に0.5Mのマンニトールを加えてpH 5.8に調整したものである。培養条件は25℃, 500luxとした。使用した培養液の組成は表1~4のとおりである。

表1 E培地の組成

BA (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)			
	0.5	2.0	5.0	10.0
0.5	○	—	○	—
1.0	—	○	—	—
2.0	—	—	○	○

注. 無機塩 MS 1/4, 有機物 MS 1/2, ショ糖 1%, マンニトール 0.5M, pH 5.75

表2 E培地の組成

BA (mg/ℓ)	NAA (mg/ℓ)			
	0.5	2.0	5.0	10.0
0.5	○	—	○	—
1.0	—	○	—	—
2.0	—	—	○	○

注. 無機塩 MS 1/4, 有機物 KM8P 1/1, ショ糖 1%, マンニトール 0.5M, pH 5.75

表3 PS培地の組成

BA (mg/ℓ)	2,4-D (mg/ℓ)	
	2.0	5.0
1.0	○	○

注. 無機塩 MS 1/4, 有機物 MS 1/2, ショ糖 1%, マンニトール 0.5M, pH 5.75

表4 PC培地の組成

BA (mg/ℓ)	2,4-D (mg/ℓ)	
	2.0	5.0
1.0	○	○

注. 無機塩 MS 1/4, 有機物 KM8P 1/1, ショ糖 1%, マンニトール 0.5M, pH 5.75

試験結果及び考察

1. プロトプラストの単離

シンテッポウユリ葉肉プロトプラストはC-4 cpwに30分間及び15分間、浸漬処理することによって単離することができた(図1)。単離されたプロトプラストの直径は約25~50 μ mであった。

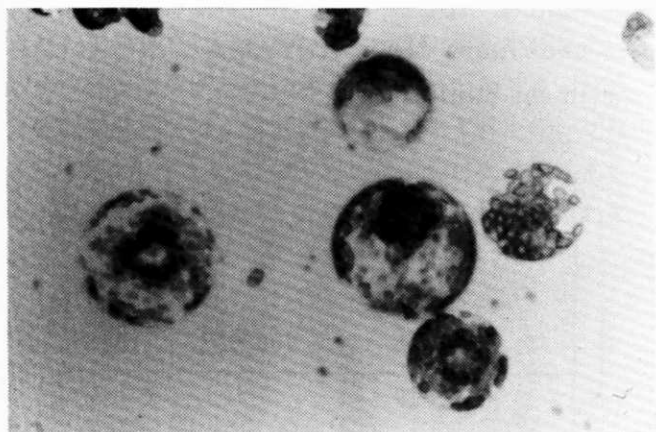


図1 シンテッポウユリ「新雪」葉肉
プロトプラスト

注. 2月9日単離, 撮影 $\times 400$

2. プロトプラストの培養

シンテッポウユリ葉肉プロトプラストは供試したすべての培地で肥大, 出芽した後, 褐変して枯死した(図2)。この傾向は基本培地の有機物がMSであってもKM8Pであっても同様にプロトプラストの分裂を誘起するには至らなかった。

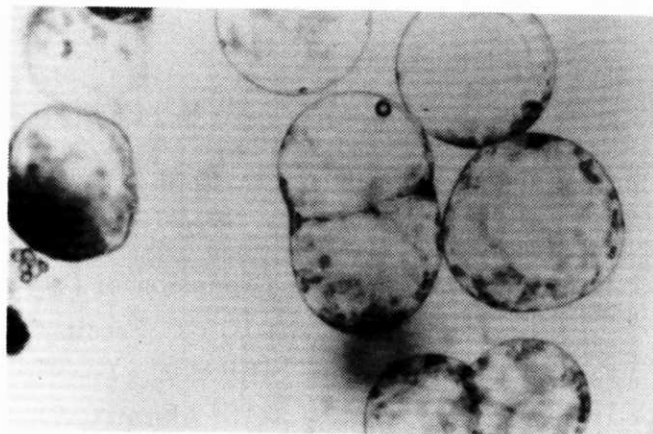


図2 シンテッポウユリ「新雪」葉肉
プロトプラストの出芽

注. 2月9日単離, 2月17日撮影 $\times 400$

た。オーキシンとしてNAA, 2,4-Dを含んだ培地を使用した, いずれも分裂しなかった。さらに5℃, 暗黒下での前処理も効果は認められなかった。

ま と め

シンテッポウユリ葉肉プロトプラストはペクトリアーゼY-23とセルラーゼオノズカRSとを組み合わせた酵素液を処理することによって単離することが可能であった。単離したプロトプラストはMS, を基本培地として有機物やオーキシンの種類及び濃度を変えて培養したが, 分裂を誘起するまでには至らなかった。しかし分裂の前兆となる出芽が認められているので, 今後培地, 培養条件などを検討することによって分裂を誘起できると考えられる。