

## りんどう葉肉プロトプラストの単離と再分化

農業研究センター 農産園芸研究所 生物資源部

### 研究のねらい

りんどうは夏期の切り花として欠かせない品目である。九州では標高400m以上の冷涼地で栽培されているが、気候的に温暖であるため、病害の発生により採花期間が短く栽培は不安定である。一方、他殖性のため個体間変異が大きく、品種改良が必要である。

そこで、暖地に適した品種を育成する手法としてプロトプラスト培養系の確立について検討した。

### 研究の成果

#### 1. 技術内容

無菌状態で細断した葉片にセルロース等を分解する酵素と細胞の浸透圧調整剤であるマンニトール等を混合した液で数時間処理すると裸の細胞であるプロトプラスト生成する。

酵素液を洗い流し、プロトプラスト密度を調整して、ホルモン等を調整した液体培地で培養して、細胞の分裂を促進する。数十細胞に分裂した細胞塊(コロニー)までは暗黒下、その後は明条件下で培養する。

その間、7~10日間隔で培地を更新して、老廃物の除去と栄養のバランスを好適条件に保つ必要がある。

3~4mmに達したカルスは再分化培地で不定芽、発根培地で根を再生させる。

- (1)プロトプラストの単離は、展開後30日以内の成熟葉を細断し、2%セルラーゼオノズカR10と0.2%マセロザイムR10に0.1%CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>O、0.9%マンニトールを含む酵素液で3.5~4時間振とうすることで葉片1g当たり10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>個と高いプロトプラスト収量が得られる。
- (2)洗浄液への0.1%CaCl<sub>2</sub>・2H<sub>2</sub>Oの添加は収量を安定させ、遠心は回転数を900rpm、時間を2分間の処理がプロトプラストの破壊が少ない。
- (3)培養は硝酸アンモニウムを400mg/lに減じ、1%ショ糖、9%マンニトール、NAA2mg/l、BA1mg/lを加え、pH5.75に調整した改変MS液体培地がよく、最終のプロトプラスト数を3×10<sup>4</sup>/ml個添加すると分裂、コロニー形成、カルス化は安定する。
- (4)再分化は、ホルクロルフェニユロン(4PU)2~3mg/lを添加したMS寒天培地に3~4mmのカルスを移植することで容易に不定芽の形成ができ、シュートをホルモンフリーMS培地に移植すると発根も可能である。

#### 2. 技術移転上の留意事項

りんどう(*Gentiana scabra*)以外の品種では培養条件の検討が必要である。

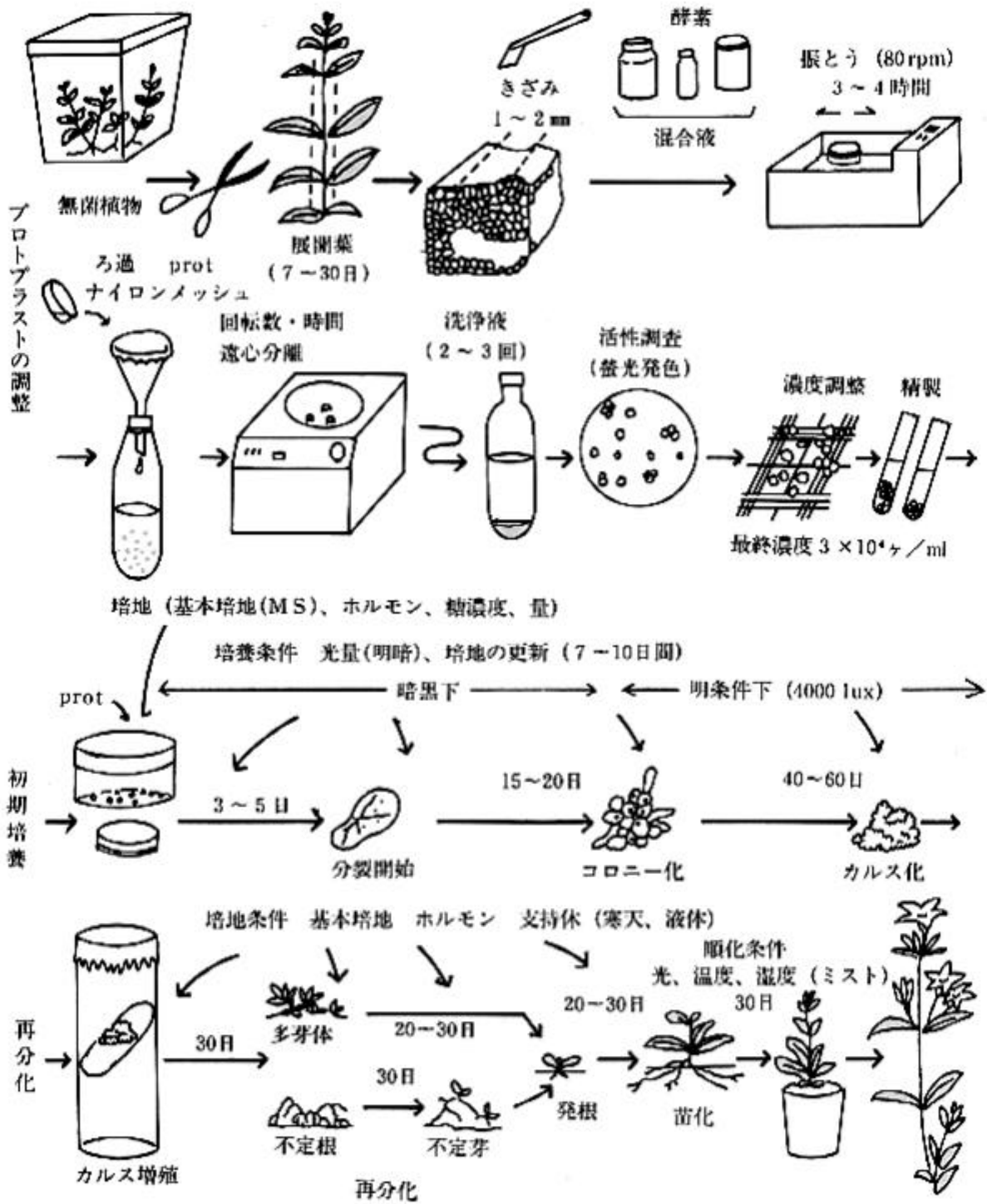


図1 プロトプラスト培養法の概要

表1 りんどう葉片プロトプラストの植物体再分化率

供試葉片重量 g	プロトプラスト収量 個	分裂細胞数 個	コロニー化数 個	加算化数 個	再分化加算数 個
1	$10^5 \sim 10^6$	$12 \times 10^3$	$46 \times 10^3$	$11 \times 10^3$	380

シュート数 本	発根個体数 本	苗化個体数 本	順化個体数 本	再分化率 プロトプラスト	%
450	360	300	270	$27 \times 10^{-2} \sim 10^{-3}$	24