

## カンキツのプロトプラスト培養に及ぼす各種添加物の影響

平賀祐史・\*小林省蔵 (宮崎県総合農業試験場・\*果樹試験場安芸津支場)

## Sukefumi HIRAGA and Shozou KOBAYASHI : The Effects of Addition of Several Chemicals on Protoplast Culture in Citrus

プロトプラストが分裂し、コロニーを形成するには活性のあるプロトプラストを単離することはもちろん重要であるが、培地の成分によっても大きく影響する。今回は、Murashige and Tucker (MT) の基本培地に各種の添加物を加え、プロトプラストの分裂割合が高まる結果を得たので報告する。

## 1. 試験方法

プロトプラストの単離には開花当日の胚珠培養により得られたトロピタオレンジ、大三島ネーブルオレンジの珠心組織由来のカルスを使用した。酵素液には $\frac{1}{2}$ 濃度のMT無機塩を含む0.7Mマニトール、マセロザイムR-10 0.3%、セルラーゼオノヅカR-10 0.3%、ドリセラゼ 0.1%を使用した。単離方法は小林らの方法に従った。培養はプロトプラストの密度をトロピタオレンジで  $6.3 \times 10^4$ 個/ml、大三島ネーブルで  $10 \times 10^4$ 個/mlに調整し、0.15Mショ糖、0.45Mマニトールを添加したMT液体培地に各種の添加物(グルタミン、BSA、麦芽抽出物、アデニン)を加えて行い、25℃弱光下(約100Lux)で培養した。プロトプラスト数は血球計算盤を用いて計算し、分裂割合は分裂細胞数/培養プロトプラスト数 $\times 100$ で表

し、培養後1か月日に調査した。

## 2. 結果及び考察

添加物の種類ではBSA(子牛血清)、グルタミンで効果があり、特にグルタミンでは顕著であった。麦芽抽出物(malt extract)、アデニンは効果がなく、逆に、無添加のMT培地よりもプロトプラストの分裂割合が低下した。なお、効果の認められるBSA、グルタミンに麦芽抽出物を添加するとプロトプラストの分裂が抑制された。BSAは20mg/lで効果が認められ、2mg/lでは効果がなかった。また、プロトプラストの分裂割合が最も高かったグルタミンについて、トロピタオレンジを用いて効果の再確認試験を行い、同濃度(60mg/l、120mg/l)で効果を認めた。さらに、大三島ネーブルを用いて30~1,920mg/lの範囲で最適濃度の検討をしたところ、プロトプラストの分裂割合はトロピタオレンジの分裂割合よりも低下する傾向にあるが、それぞれの濃度で効果は確認された。中でも、プロトプラストの分裂割合は120~1,920mg/lの範囲で高いことから、グルタミンの最適濃度は120mg/l前後であると考えられる。

第1表 トロピタオレンジのプロトプラスト培養に及ぼす各種添加物の影響

添加物	麦芽抽出物 500mg/l	アデニン 40mg/l	麦芽抽出物 + アデニン	BSA 2mg/l	BSA 20mg/l	麦芽抽出物 +BSA 2mg/l	麦芽抽出物 +BSA 20mg/l	グルタミン 60mg/l	グルタミン 120mg/l	麦芽抽出物+ グルタミン 60mg/l	麦芽抽出物+ グルタミン 120mg/l	
分裂割合(%)	4.9	0.3	0.1	3.3	1.4	8.2	1.9	5.3	12.9	14.6	8.9	7.6

第2表 トロピタオレンジのプロトプラスト培養に及ぼすグルタミンの影響

グルタミン濃度 (mg/l)	0	60	120
分裂割合 (%)	18.3	24.4	29.3

第3表 大三島ネーブルオレンジのプロトプラスト培養に及ぼすグルタミンの影響

グルタミン濃度 (mg/l)	0	30	60	120	240	480	960	1,920
分裂割合 (%)	1.5	2.7	3.4	4.5	4.9	5.3	4.4	5.1