

## 温州ミカンプロトプラストの電気融合条件

東 明弘・桑波田竜沢(鹿児島県果樹試験場)

Akihiro HIGASHI and Ryutaku KUWAHATA: Electro Fusion of Satsuma Mandarin Protoplast

鹿児島県の特産カンキツである極早生温州やポンカン、タンカンなどを育種母体として利用しようとする場合、多胚性や不稔性により雑種がなかなか得られない。そこで、細胞融合法をこれら特産カンキツの雑種育成に利用するため、極早生温州を材料に電気融合条件の検討を行ったので報告する。

## 1. 材料及び方法

徳森早生の珠心胚実生の胚軸付近から発生したカルスを10mg/l BAのMS培地で5年間継代培養したものと、森田ポンカンを無菌的に播種して育成した実生の葉を材料として用いた。

プロトプラスト単離は、10mg/l BAのMS液体培地で2週間毎に3回以上継代培養したカルスをガラクトース、ソルビトールを各0.1M含む液体培地に移し、2~3週間振とう培養した後プロトプラストを単離した。ポンカンは、フラスコ内で完全に展葉した葉を1~2mm角に細断し、酵素液に浸漬した。酵素液の組成は、1/2MSにカルス用が0.3%マセロザイムR-10、0.3%セルラーゼR-10、0.1%ドリセラゼとし、葉用が0.3%マセロザイムR-10、3.0%セルラーゼR-10、1mMMESとして、0.35Mマニトール、0.35Mソルビトールを添加した。いずれも材料約1gに酵素液40mlを加え、25℃、16時間処理を行った。

得られたプロトプラストはミラクロスでろ過後、0.25mM塩化カルシウム、0.35Mマニトール、0.35Mソルビトールの液で2回洗浄し、カルス由来のものは $3.0 \times 10^8$ 個/ml、葉由来のものは $4.0 \times 10^8$ 個/mlになるように密度を調整し、この液に懸濁して融合処理を行った。

最初に、パールチェーン形成のための交流電流の電圧と印加時間を検討した。1MHz、75~150V/cmで20、40、60秒後のパールチェーンの形成状況を調査した。次に、融合のための直流パルスの電圧を検討した。1MHz、

125V/cmの交流電流を30秒間印加した後、100 $\mu$ sec、750~1750V/cmの直流パルスを1回または1秒間隔で3回印加した。印加後5~10分後に融合状況を調査した。

融合処理したプロトプラストは、0.6Mショ糖、1%寒天のMS培地で $1 \times 10^8$ 個/mlの密度になるように調整して培養した。形成された胚様体は1.0mg/l GA<sub>3</sub>、1.25%ショ糖のMS培地に移植した。

## 2. 結果及び考察

パールチェーンの形成は、電圧が高く印加時間が長いほど、パールチェーンの形成数とパールチェーン当たりのプロトプラスト数が多くなった。細胞融合の効率を高めるためには、カルスと葉のプロトプラストが1個ずつ接着するのがよいと思われるが、2細胞の形成数が多いのは、75V/cmでは40~60秒後、100V/cmでは40秒後、125V/cm、150V/cmでは20秒後であった。これらの条件でパールチェーンを形成させた後、融合処理を行ったところ、交流電圧が高い区ほど融合率が高い傾向であった。したがって、パールチェーン形成条件としては125V/cmまたは150V/cmの交流電流を20秒間印加するのがよいと思われる。

融合のための直流パルスは、1250V/cmを3回印加した区が最も融合率が高かった。電圧が高い区ほど融合率が高く、1回印加した区より3回印加した区の方が融合率が高い傾向だったが、1750V/cmの3回区はプロトプラストの破壊が発生し、1250V/cm区より融合率は低下した。

培養後30日目に胚様体の形成が観察され、4ヵ月目には3~5mmの大きさとなった。8ヵ月後にはシュートが発生し、植物体となった。今後、形成された植物体の雑種性の確認を行うとともに、さらに他の品種を用いて種々の組合せを検討したい。

第1表 パールチェーン形成に対する交流電圧と印加時間の影響

交流電圧	印加時間	単細胞数		パールチェーン数					
		カルス	葉	2細胞(カルス+葉)	3~4細胞(カルス+葉)	5細胞~(カルス+葉)			
75V/cm	20秒	19	16	5	(2)	3	(3)	2	(2)
	40	13	15	8	(2)	5	(4)	2	(2)
	60	9	10	7	(2)	6	(5)	3	(3)
100	20	11	9	4	(2)	5	(4)	1	(1)
	40	11	10	6	(2)	4	(3)	2	(2)
	60	7	6	3	(2)	6	(4)	4	(4)
125	20	10	10	7	(3)	4	(4)	2	(2)
	40	4	6	5	(2)	4	(3)	4	(4)
	60	3	3	3	(1)	5	(5)	4	(4)
150	20	5	9	6	(4)	3	(2)	2	(2)
	40	3	6	3	(2)	4	(3)	4	(4)
	60	3	3	3	(1)	4	(3)	6	(6)