

## 3Aa-3

## 電気融合法によるニコチアナ属種間雑种植物の作成

森川弘道, 杉野克彦, 林泰行, 竹田淳子<sup>1)</sup>, 千田貢<sup>1)</sup>

山田康之(京大, 農, 細胞実験センター, 京大, 農, 農化)

我々は、微弱な電気刺激により細胞融合を誘導し得る事(電氣的細胞融合)を、報告してきた。今回は、本法により体細胞雑种植物作成を試みた結果について報告する。

実験材料として、*Nicotiana glauca*及び*N. langsdorffii*を用いた。温室にて1.5~2.5ヶ月間栽培したこれら植物の葉肉組織から酵素法によりプロトプラストを単離精製した。両プロトプラストを融合液(0.25Mマンニトール, 0.25Mソルビトール及び2.5mM  $\text{CaCl}_2$  を含む)で1回洗浄後、融合液に懸濁、等量ずつ混合、密度を $1 \times 10^6$  個/ml (各々 $5 \times 10^5$ /ml)に調整した。1対の白金板を平行に並べガラス板に固定した電極(平行電極, 電極間距離=2mm)間を前述のプロトプラスト懸濁液で満たし、5分間放置した。その後、放電パルス(放電初期電圧 $V = 200$  V, 電気容量 $C = 0.1 \mu\text{F}$ , 時定数 $CR = \tau = 50 \sim 100 \mu\text{sec.}$ )を1回与えて融合誘導した。融合処理したプロトプラストは次の様に培養した。

直径35mmのプラスチックシャーレに、4GMKM培地(Kao and Michayluk 8P培地を基本とし、 $6 \times 10^{-5}$  M NAA,  $4.4 \times 10^{-6}$  M BA, 0.4M グルコースを含む)に、0.6%寒天を含む培地(4GMKM寒天培地)を1ml入れ、凝固させたのち4GMKM培地に5%仔牛血清, 0.1% dimethyl  $\beta$ -cyclodextrine, 0.1% trimethyl  $\beta$ -cyclodextrine(東進ケミカル)を添加した培地を1ml重層した。この液体培地中に、 $3 \sim 6 \times 10^4$  個の融合処理したプロトプラストを懸濁した。更に8%活性炭を含む、4GMKM寒天培地の1片(約160mg)を添加、シールした後、26℃暗所下で2週間培養した。シャーレ内に形成されたコロニーを、ホルモンフリー培地(MS培地のビタミン組成を、B5培地のビタミン組成に変え、オーキシン、サイトカイニンを含まない培地)で3回洗浄したのち、0.6%寒天を含むホルモンフリー培地に移植、26℃, 16時間明、8時間暗所下で培養した。

融合処理したプロトプラスト培養の1例を以下に示す。前述の条件で融合処理した合計 $9 \times 10^4$  個のプロトプラスト( $3 \times 10^4$  個/シャーレ、のプロトプラストを含む3シャーレ)を前述のように血清, methyl cyclodextrine を含む4GMKM培地中、活性炭共存下で2週間培養すると、直径3mm以下のコロニーが多数( $> 10^3$  個/シャーレ)形成された。(血清, methyl cyclodextrine を含まない4GMKM培地中であつた活性炭を添加しない培養条件下ではコロニーはほとんど形成されなかった。)得られたコロニーをホルモンフリー培地で更に4週間培養したところ、合計116個の活発に増殖する緑色のコロニー(直径1~5mm)が得られた。更に、新鮮なホルモンフリー培地に移植し4週間培養すると96個以上が生き残りこれら雑種コロニーのほとんど全てにおいて茎葉分化が認められた。本例の場合、雑種コロニー形成率 $= 96/9 \times 10^4 \approx 1 \times 10^{-3}$ で、Cheupauら(M.G.G. 165, 239(1978))がPEG法で得た同形成率より約20倍大きい。以上の結果及び電気融合法の意義について報告する。