

## プロトプラスト培養を用いた CMS 系統早期作出手法の検討

生物資源科学専攻 作物生産生物学講座 作物生理学 松島 昂史

### 1. はじめに

細胞質雄性不稔 (CMS) は, ミトコンドリアが原因で生じる花粉の不稔現象である。CMS の植物は自殖種子をつけることができないが, 雌蕊は稔性を有するため種子をつけることができる。そのため, CMS は  $F_1$  ハイブリッド種子生産において重要な形質であり, 広く利用されている。 $F_1$  ハイブリッド種子生産では, CMS 系統, 維持系統, 稔性回復系統が必要とされ, CMS 系統の作出には戻し交配を繰り返すため長い期間を要する。非対称細胞融合は, 戻し交配を行わずに CMS 系統を得ることができる。その際, 細胞質親となる無核プロトプラスト (サイトプラスト) の調製は, 得られる非対称融合細胞の割合に影響を与える。放射線を用いたサイトプラストの調製法では, 核の不活化が不十分な場合に遺伝子の取り込みや異数体が生じることが報告されている。また, 超遠心を用いてサイトプラストを調製する方法が考案されている。しかし, 超遠心を行う手間のため, この方法を用いて非対称細胞融合を行った報告は少ない。そこで本研究では, より簡便なサイトプラストの調製法を検討した。

### 2. 方法

**サイトプラストの調製** 材料として, 暗所 5 日間培養したメキャベツ (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) の下胚軸を用いた。下胚軸を高張液処理し, 精製後のプロトプラストを観察した。回収したプロトプラストは, DAPI 染色により核の有無を確認した。脱核の誘導, サイトプラストの精製について検討を行った。脱核は, Cytochalasin B を含む sorbitol 液で処理した。サイトプラストは, 10% Percoll/sorbitol 密度勾配遠心または胚軸の高浸透圧酵素処理により精製した。

### 3. 結果と考察

下胚軸の高張液処理において, サイトプラストの占める割合は浸透圧の上昇と共に 45 から 80% に上昇した。前処理に高張液処理を行うことにより, 高い割合でサイトプラストを得た。Cytochalasin B による脱核処理では, サイトプラストの割合に処理前と変化は見られなかった。また, 10% Percoll/sorbitol 密度勾配遠心においても, 採取した分画のサイトプラストの割合は変化しなかった。下胚軸の高張液処理に引き続き, 酵素反応を高浸透圧下で行った場合, 1.5 M sorbitol 条件において, サイトプラストの割合は 91% まで上昇し, 先行研究の超遠心によって得られるサイトプラストの割合と近い値を示した。これらの結果から, 前処理から酵素処理まで高い浸透圧を維持することは, サイトプラストの精製に有効であることが考えられた。先行研究は, 1 度精製したプロトプラストからサイトプラストを調製するが, 本研究ではプロトプラストを精製する工程でサイトプラストを精製可能であり, 既存の手法より簡便なサイトプラストの調製法だと考える。