

ユリ・オリエンタルハイブリッドの花粉から単離したプロトプラストの核数同定

○森保祐仁¹⁾・馬場園覚²⁾・高取由佳³⁾・駒井史訓^{1)・2)}

(¹⁾ 佐賀大院農学研究科・²⁾ 佐賀大農フィールドセ・³⁾ 佐賀農試研セ)

【目的】

雄性不稔のオリエンタルハイブリッドを育成するために、半数性細胞(n)と体細胞(2n)に由来するプロトプラストとの細胞融合個体(3n)の作出を目的とし、現在、花粉から効率よくプロトプラストを単離する系を開発している。オリエンタルハイブリッドの花粉からのプロトプラスト単離は困難であることが知られ、粘性が強いために扱いはく、一つの花粉から複数個のプロトプラストが単離されるなど難点が多い。本研究では、粘性を除去した花粉からプロトプラストを単離して、それらの核数を同定することで、3n細胞作出の可能性について考察した。

【材料および方法】

花粉の粘性除去:オリエンタルハイブリッドの蕾をインキュベーター(25℃)で開葯させ、成熟花粉を供試した。花粉は、滅菌水、10%スクロース溶液(w/v)あるいは酢酸エチルで処理して粘性の除去を試みた。

花粉の活性検定:10%スクロース溶液に寒天0.1%(w/v)を加え、加熱融解後、直径6cmシャーレに5mlずつ分注し、培地を作製した。これらの培地に花粉を塗布し、インキュベーターで培養した。培養24時間後、光学顕微鏡下で花粉管の伸長を観察した。

プロトプラストの単離・精製:粘性を除去した花粉を酵素液(Cellulase Onozuka RS 1%, Macerozyme R-10 1%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10mM, MES 5mM, Sorbitol 0.5M, pH 5.8)と混合し、25℃で30分間培養を行った。その後、リンス液($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10mM, MES 5mM, Sorbitol 0.5M, pH 5.8)で洗浄した。また、スクロース溶液(Sucrose 0.6M, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10mM, MES 5mM)上にプロトプラスト懸濁液を上層し、遠心分離を行って精製した。

花粉及びプロトプラストの核染色・観察:70%エタノールで固定した花粉及び未固定のプロトプラストをDAPI(1 μ g/ml)で染色し、蛍光顕微鏡(オリンパスIX71)のUV励起によって観察した。

【結果および考察】

ユリの花粉を滅菌水に投入しても懸濁することは難しく、水中で塊状となった。花粉粘性は、糖質を含んだ水溶液で低減できることが定法となっていることから、スクロース溶液で花粉を処理したところ、粘性および内部の脂質が除去され、顕鏡すると、花粉が透きとおっていることが観察された。処理後の花粉は自然沈降したが、上清を除ききることができなかった。そこで、有機溶媒の一種である酢酸エチルで花粉を処理したところ、粘性および内部の脂質が除去され、処理後の花粉は速やかに沈降し、上清をある程度除去した数分後には溶媒が完全に揮発しており、乾燥花粉を非常に効率良く回収することができるようになった。これら花粉は速やかに発芽し、花粉管が伸長したことから、活性を有すると判断した。

上述の手法で粘性を除去した花粉からプロトプラストを単離したところ、一つの花粉から単離されるプロトプラストの数は様々であった。DAPI染色の結果、前報(園学研(2007)6別1:476)で示唆したようなサイトプラストの混在が確認された。さらに、成熟花粉(2核)から単離したプロトプラストには、核を二つ含有するものと、一つだけ有するものも存在することが認められた。このことから、体細胞を用いず、成熟花粉に由来するプロトプラストのみを活用して、3n細胞を作出することができるものと考えられた。