

各種ストレス処理によるユリの花粉由来プロトプラストの分裂の試み

木原康介¹⁾・中野裕一郎¹⁾・岡田佳奈子¹⁾・森保祐仁²⁾・駒井史訓^{1)・2)}

(¹⁾ 佐賀大農フィールドセンター・²⁾ 佐賀大院農学研究科)

【目的】

雄性不稔のオリエンタルハイブリッドを育成することを目的として、これまでに、2細胞性の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、非対称な細胞融合によって3n細胞の作出を行ってきた。しかし、オリエンタルハイブリッドの花粉に由来するプロトプラストが分裂した例はみられないことから、ここでは、他植物種のプロトプラストの分裂を誘起することで知られている各種ストレスによって、ユリの花粉由来プロトプラストを分裂させることを試みた。

【材料および方法】

プロトプラストの調製・培養：粘性を除去した成熟花粉を酵素液で処理し、プロトプラストを得た。それらを洗浄後、スクロース溶液に上層し、遠心分離を行って精製した。プロトプラストは低融点アガロースで包埋(1.0×10^5 個/ml)し、プロトプラスト培養培地へ投入した。培養は25℃の暗条件で行った。細胞分裂は毎週観察し、培養4週間目まで行った。

高浸透圧処理：Picloram (1mg/l)を添加したプロトプラスト培養培地に浸透圧調整剤として、グルコース、ソルビトール、または双方を使用し、プロトプラストを高浸透圧下(0.7, 0.9, 1.1M)で培養した。

高速遠心処理：精製したプロトプラストに高速遠心(30, 60, 120, 240, 480, 1000g X 1, 3, 10 分間)を施し、細胞密度が 1.0×10^5 個/mlで培養した。

電気パルス処理：精製したプロトプラスト(1.0×10^6 個/ml)を2mm ギャップのキュベットに400 μ l投入し、電気パルス(30, 60, 120V X 50, 75, 100 μ sec;放つパルスは1回)を与えた。処理後のプロトプラストの細胞密度を 1.0×10^5 個/mlに調整し、48 時間培養後にFDA染色で細胞活性を確認した。

【結果および考察】

ヒヨコマメではプロトプラスト培養時の浸透価をコントロールの2倍にするとプロトプラストが分裂すると共に胚形成数が増大することが知られている。そこで、2種類の浸透圧調整剤と3種類の浸透価を組合わせて培養を行ったが、分裂するものはなかった。ここで用いた浸透価では、他植物種のプロトプラスト分裂が認められることから、オリエンタルの花由来プロトプラストにストレスを与え得る浸透価はさらに大きいことが考えられる。また、ヒヨコマメでは高速遠心によってもプロトプラストの分裂が増大することが知られていることから、重力加速度と処理時間を組合わせて処理したが、いずれも分裂しなかった。プロトプラストを480~1000gで10分間遠心すると、栄養核と生殖核のうち片方の核が脱落していることが観察された。一般的に、2核の花由来よりも1核の小胞子の方が分裂能力の高いことが認められていることから、花粉由来プロトプラストを1核にする技術が安定すれば、分裂を誘起することができるとも考えられる。

桜の一種では体細胞に由来するプロトプラストに電気パルスを印加することで、プロトプラストの分裂とコロニー形成率が増すことが報告されている。電圧と時定数を組合わせて花粉由来プロトプラストを処理したところ、それらの分裂は認められなかった。ユリの体細胞由来プロトプラストは一度分裂が生じると、その後のコロニー形成から植物体再生までが高頻度に起こることから、花粉由来プロトプラストにおいても、初期分裂を誘導することが重要であると思われる。ここでは各因子の主効果を認めるに止まったが、現在、多因子・多水準による実験計画法に基づいて分裂条件を検索しており、今後、花粉由来プロトプラストからの植物体再生が期待される。