

(花粉学実験講座)

8 花粉培養法

8 花粉培養法

成熟花粉を用いた花粉の発芽と花粉管の伸長のための培養法については、すでに本実験講座の6花粉生理学実験法(2)に詳しく記載されているので、ここでは薬内の未成熟な花粉すなわち花粉形成過程の細胞を無菌的に取り出し、(1)薬内と同様の正常な発生過程を *in vitro* で再現させる培養法と(2)異常発生を誘導し半数体を作成する培養法について述べる。

(1) 正常発生のための培養法

被子植物の花粉発生過程については、やはり本実験講座の6花粉生理学実験法(1)に記載されているが、植物の有性生殖にとって重要なことは、(a)減数分裂によって半数性の細胞を形成すること、(b)不等細胞分裂によって雄性の配偶子細胞が分化すること、(c)花粉管の発芽・伸長が可能な配偶体へ分化することであり、これらの機能はいずれも薬内発生で獲得される。そこで、これらの重要な過程を *in vitro* で再現できる培養系の存在は、それぞれの機構を解明するうえで貴重なものとなっている。本稿では、これらの過程を再現できる(a)花粉母細胞、(b)花粉細

胞、(c)花粉プロトプラストの培養法を順に述べる。

(a) 花粉母細胞の培養^(1,2)

減数分裂を行う花粉母細胞は、花芽分化後の非常に小さい蕾中の薬内で薬壁組織と密接した集団として存在するため、一般には薬からの取り出しすら困難である。しかしながら、ユリのように比較的大型の蕾をつける植物では、薬の一端を切り他端から指で押し出すことによって花粉母細胞を無菌的に取り出すことが可能であるとともに、それらを培養することによって正常な減数分裂の諸過程を観察することができる。花粉母細胞の培養はユリやチューリップでも可能であるが、少し熟練を要するので、ここでは最も容易なオオバナノエンレイソウの場合を中心に紹介する。オオバナノエンレイソウは、北海道の原野に自生するユリ科の多年生草本で、秋から翌年の春にかけて低温下でゆっくりと減数分裂を進行・完了する。そこで、秋に採集した球根を材料として逐次培養実験を行うことができる。

(I) 培養液

花粉母細胞の培養に用いる培養液は、Whiteの無機塩とビタミン類を基本⁽³⁾とした表1の組成である。浸透圧調整には0.35Mのショ糖を用い、有機物として酵母抽出物が添加してある。pHは厳密に5.8に調整

表1 花粉母細胞の培養液 (mg/l) (pHは5.8に調整)

Ca (NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	300	KI	0.75
KNO ₃	80	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.01
KCl	65	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.0015
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	720	Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5
Na ₂ SO ₄	200	glycine	3
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	20	nicotinic acid	0.5
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	7	thiamine	0.1
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	3	pyridoxine	0.1
H ₃ BO ₃	1.5		
yeast extract	500	(sucrose	0.35M)

する必要がある。培養には、30mlの三角フラスコに上記培養液5mlを入れ、縮栓後高圧滅菌（1.2気圧、120℃）するが、ショ糖の分解を極力避けるため、滅菌時間は1分間以内とする方が望ましい。なお、ユリとチューリップではショ糖濃度を0.3Mに下げた培養液を使用する。

Ⅲ 培養法

貯蔵中の球根から花芽を切り出し、よく水洗後70%アルコールに1分間浸す。無菌蒸留水でゆすいだ後、クリーンベンチ内に敷いた無菌濾紙の上で花弁等をむき、6本の葯を裸出する。葯の先端部分を指でつまみ、あらかじめ乾熱滅菌（160℃、1時間）しておいた先の鋭利なピンセットで葯の基部側の一端を切り取り、指でゆっくりと内容物を切り口の方へ押し出す。内容物をピンセットの先端部分でうまくはさみ取り、三角フラスコ内の培養液に浸す。培養液中に移すと、減数分裂がまだ始まっていない前減数分裂期や減数第一分

裂前期の花粉母細胞はひも状に、一方減数第一分裂中期以降の花粉母細胞はひもがくずれ浮遊細胞となる。培養は、1個の蕾中の葯5本当たり1個の培養フラスコを使用し、オオバナノエンレイソウやチューリップでは15℃、ユリでは25℃でいずれも暗黒下で行う。培養後、各蕾の培養に供さなかった残りの1本の葯を用いて、培養開始時の花粉母細胞の発生時期を検定しておく（観察法は6花粉生理学実験法（1）を参照）。

Ⅳ 培養経過

培養中のフラスコから花粉母細胞の一部を無菌的に採取し、発生過程の進行を調査する。その際、培養物がひも状集団である場合は白金耳でひもの1本をひっかけて取り出し、浮遊細胞である場合はバスツールピペットで培養液を一部採取するとよい。オオバナノエンレイソウは減数分裂が長期間にわたってゆっくりと進行するので、サンプリングは逐次行う必要がある。しかし、培養期間が長くなるほど花粉母細胞の同調性

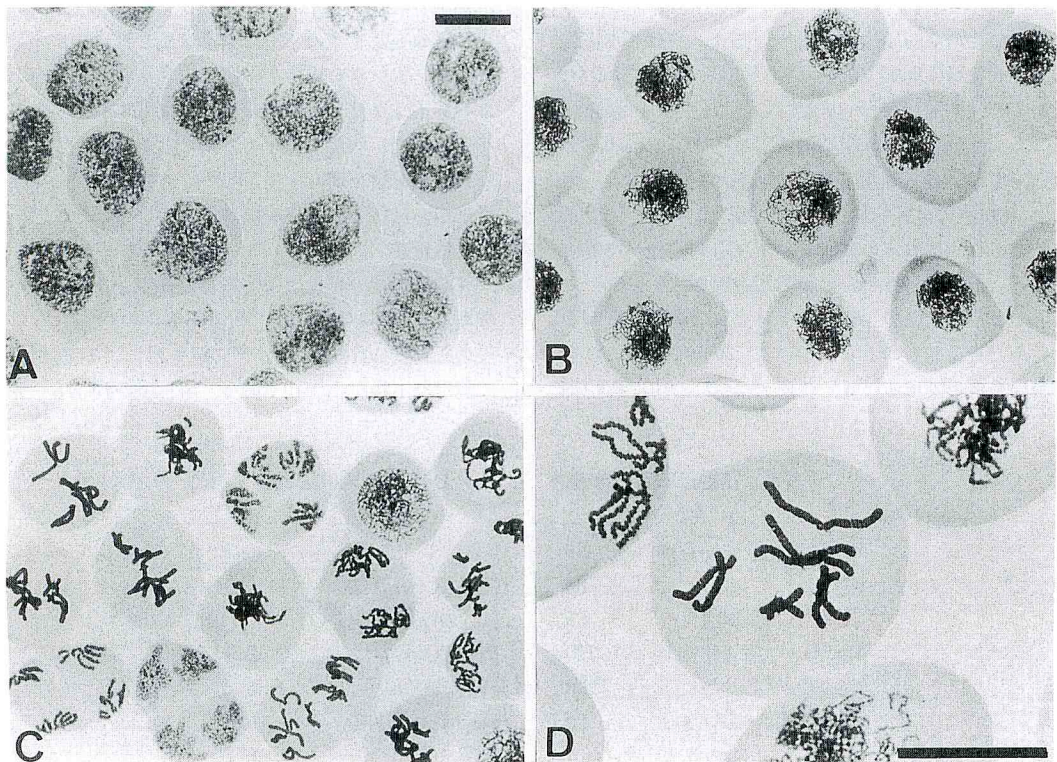


図1 オオバナノエンレイソウ花粉母細胞の培養 A, 培養開始時の前減数分裂期細胞; B, 培養1週間後の減数第一分裂前期細胞; C, D, 培養3週間後の減数第一・第二分裂中の細胞. Dは第一分裂中期. (スケールバー = 20 μ m)

は葯内の場合より乱れるので、減数分裂を終了した四分子が初めて出現した時には、それに逆のぼっているような時期の花粉母細胞を観察することができる。

図1は培養例で、10月中旬のまだ前減数分裂期のG₂期にある花粉母細胞(A)を培養した時の培養経過を示す。培養開始時すべて中間期にあった花粉母細胞は、培養約1週間で減数第一分裂前期に入り(B)、3週間後には減数分裂を完了した四分子が現れる(C)。オオバナノエンレイソウの染色体数は2n=10であるので、培養花粉母細胞の第一分裂中期では葯内と同じく5組の二価染色体が観察される(D)。ただし、前減数分裂期のより早期(G₁, S期)の花粉母細胞を培養した場合には、減数分裂は起こらず、通常の体細胞分裂がみられる。なお、培養過程での死滅は培養初期に起こることが多く、それらは異常に凝縮した核をもつことで容易に区別される。

ユリやチューリップの花粉母細胞培養系では、約1週間で減数分裂の全過程を再現させることができ、これらはラジオアイソトープの取り込みや各種阻害剤の添加実験などを通して減数分裂の機構解明に使用されている。

(b) 花粉細胞(小孢子)の培養^(4,5)

減数分裂終了後の四分子や四分子が遊離した一核性花粉細胞は被子植物の配偶世代(単相世代)の出発であり、シダやコケ植物の胞子に相当する。ところが、シダやコケ植物の胞子が単独で配偶体にまで発生できるのに対し、被子植物の花粉細胞は胞子体に寄生して発生する。その花粉細胞の発生は、分裂という観点からみれば比較的単純で、2度の半数性の体細胞分裂が起こるだけである。すなわち、1回目の不等細胞分裂によって生殖細胞と栄養細胞に分化し、続いて生殖細胞がもう1回分裂して2個の精細胞を形成する。しかしながら、この全過程を再現する培養はユリ、チューリップで成功しているにすぎず、タバコやハクサイでは部分的な成功が報告されている⁽⁶⁾。ここでは、チューリップの花粉細胞培養を紹介する。

(I) 培養液

花粉細胞の培養に用いる培養液は、花粉母細胞の培養と同様 White の無機塩とビタミン類を基本としショ糖と酵母抽出物を添加する(表1参照)が、pH調整後それに寒天を加えた固形培地とする必要がある。それは花粉細胞の発生が葯内で徐々に脱水化されながら進行するためで、培養でも乾燥条件が要求される。最適の寒天濃度はチューリップでは0.8%、ユリでは

4%と大きく異なるが、いずれも寒天表面上にさらに濾紙を置きその上で花粉細胞を培養する。ショ糖濃度も重要な要因で0.5Mが最適である。寒天培地の作成には、通常直径6cmのシャーレを用い、高圧滅菌(10分間)した上記培養液10mlを分注する。寒天が固まったら1cm四方の滅菌濾紙(No.2)を寒天表面に5枚置床する。

(II) 培養法

チューリップでは秋(関東地方では11月上旬)に球根内で減数分裂が起こり、春(4月上旬)開花の約10日程前に不等細胞分裂を行う。したがって、この間の球根からは一核性の花粉細胞が得られる。球根から花芽を傷つけないようにして切り出し、70%のアルコールに浸す。花粉母細胞の場合と同様、無菌蒸留水でゆすいだ後、クリーンベンチ内で6本の葯を取り出す。葯の先端1~2mmを滅菌済のカミソリで切った後、葯の基部をつまみ、徐々に力を加えることによって内容物を寒天培地の濾紙上に押し出す。この時期の花粉細胞は柔らかいクリーム状で出てくるので、濾紙上にクリームが山になるように盛ればよい。シャーレは密封せず、培養は暗黒下25°Cで行う。また、6本の葯のうち1本は培養開始時のステージを知るのに用いてもよい。

(III) 培養経過

培養中のシャーレから花粉細胞の一部を採取し発生過程の進行を調査することになるが、濾紙を一枚ピンセットで取り出せばよいので便利である。花粉母細胞の観察と同様、エタノール3:酢酸1の混合液で固定後プロピオン酸オルセインで染色する。図2は培養例で、四分子が解離直後の花粉細胞(A)を培養した時の培養経過を示す。培養開始時花粉細胞は楕円形で核は細胞のほぼ中央に位置しているが、培養後徐々に成長するとともに、核は細胞の一端に移動し、培養約6日後核分裂がみられるようになる(B, C)。その分裂は典型的な不等細胞分裂であり、紡錘体は細胞の一端に形成される(D)。核分裂後の終期核の一つは明らかに細胞膜に隣接し(E)、そこに生殖細胞が形成される(F)。生殖核と栄養核はその染色性の違いから容易に区別される。この培養によって作られた二細胞性花粉は、培養を続けると発芽し花粉管を伸長する。

タバコやハクサイでは、一核性花粉細胞期の後期から液体培地で成熟花粉が得られており、これらの培養系は花粉の正常な分化の機構を調べるうえで今後使用されると予想される。一方、応用的見地からは減数分裂期からの連続培養が望まれるが、まだ成功していな

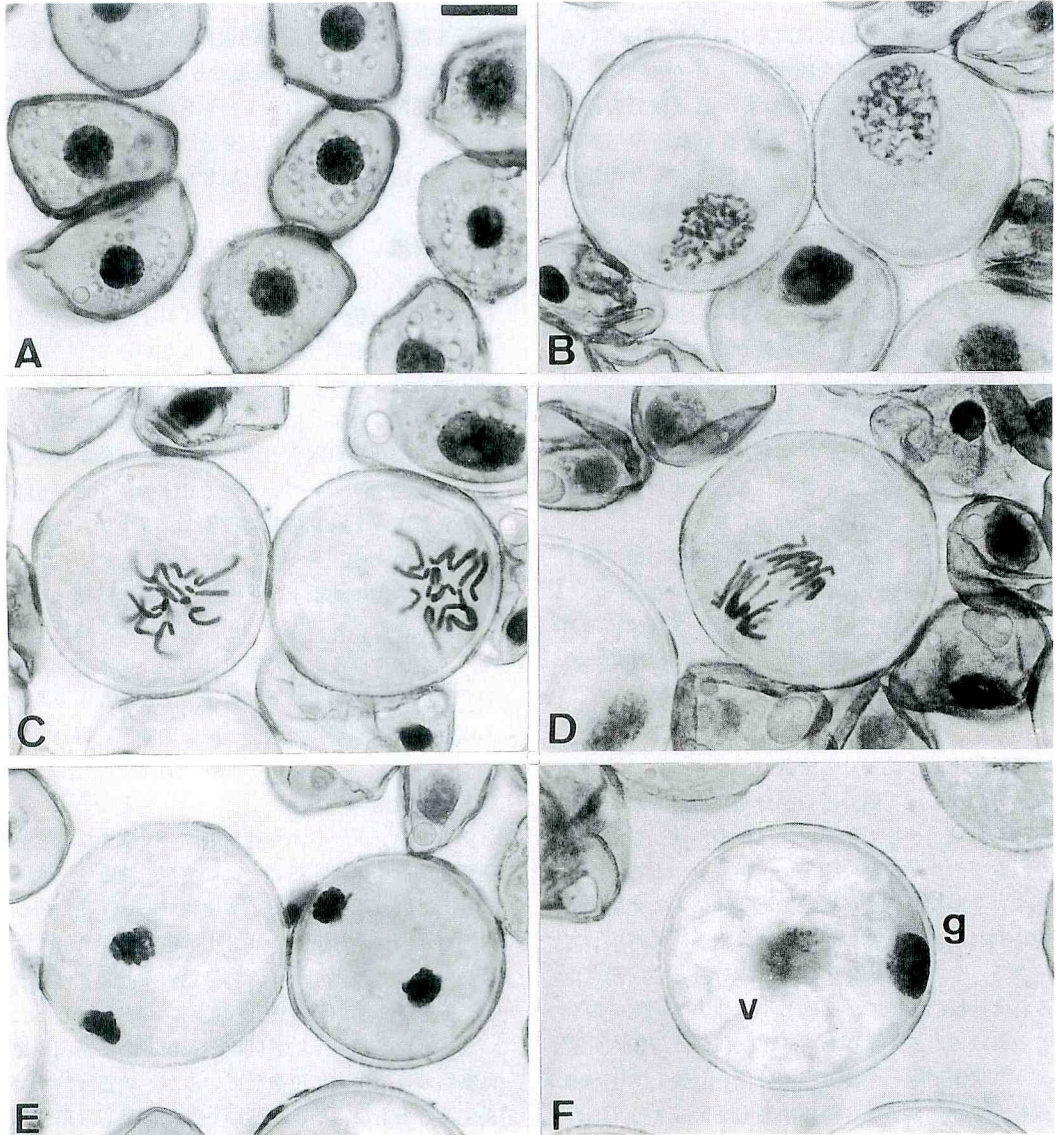


図2 チューリップ花粉細胞の培養 A, 培養開始時の一核性花粉細胞; B, C, D, E, 培養6日後の分裂期細胞 (B, 前期; C, 中期; D, 後期; E, 終期); F, 培養8日後の二細胞性花粉. g, 生殖核; v, 栄養核. (スケールバー = 20 μ m)

い.

(c) 花粉プロトプラストの培養^(7,8)

花粉母細胞や花粉から細胞壁を除去した原形質体, すなわちプロトプラストを得ることはすでにいくつかの種で可能になっている. まず, 花粉母細胞の母細胞

壁や減数分裂後の隔壁はいずれもカロース (β -1, 3-グルカン) を主成分とすることが知られているので, ユリでは上記花粉母細胞培養液にザイモリアーゼ (0.1%), マセロザイム (1%), セルラーゼ (1%) を含む酵素液で処理することによって短時間で容易にプロトプラストを得ることができる⁽²⁾. その際, 第一

分裂終了前の母細胞からは直径約 $50\mu\text{m}$ 、二分子からは約 $40\mu\text{m}$ 、四分子からは約 $30\mu\text{m}$ のプロトプラストが得られる。

一方、減数分裂後の花粉細胞や花粉は、種特有の外壁によって覆われている。この外壁の主成分であるスポロポレニン是非常に強固な物質であり、現存の酵素類によってはまったく溶解されることがない。しかしながら、花粉には外壁の存在しない発芽溝(孔)が存在するため、発芽溝を通してプロトプラストを遊離させることは可能で、ユリでは培養可能な生理活性の高いプロトプラストが大量に得られている。そこで、ここではテッポウユリの花粉プロトプラストの単離と培養を紹介する。

(I) 培養液

花粉プロトプラストの培養に用いる培養液は、花粉母細胞の培養液(表1)と同じであるが、浸透圧のみ 0.5M に変更する。

(II) 酵素液

花粉プロトプラスト単離用の酵素液は上記培養液にマセロザイム(1%)とセルラーゼ(1%)それにデキストラン硫酸カリウム(0.5%)を添加したものである。調整した酵素液はあらかじめ $10,000\text{g}$ で10分間遠心後、孔径 $0.45\mu\text{m}$ のミリポアフィルターで吸引濾過滅菌する。滅菌後の酵素液は無菌容器に少量(約 10ml)ずつ分注し、使用時まで冷凍保存する。

(III) 培養法

- (i) 開花前のテッポウユリの蕾(全長約 150mm)を採取し、70%アルコールに1分間浸した後、無菌蒸留水でゆすぐ。以下の操作は、滅菌済みの器具・溶液を用いて行う。
- (ii) クリーンベンチ内で、直径 9cm のシャーレに解凍した酵素液を 10ml 入れる。
- (iii) クリーンベンチ内で、滅菌した蕾を手で割り、中から6本の葯を取り出し、濾紙上に置く。
- (iv) 小型の葉さじを用いて、葯から花粉をかき出し、花粉を酵素液に浸す(葯が裂開する時の溝にそって花粉をかき出すと一度に大量の花粉を集めることができる)。
- (v) 6本の葯からできるだけ多くの花粉をかき出したら、葉さじで花粉の懸濁液を強く何度も攪拌し、花粉の色素や油分を葉さじにできるだけ付着させて取り除く。
- (vi) シャーレをパラフィルムで密封し、 30°C の恒温器に2時間置く。
- (vii) 酵素液をシャーレから 15ml 用の遠心管に駒込ピペッ

トを用いて移し、 $2,000\text{rpm}$ (600g)で5分間遠心分離する。

- (viii) 遠心分離後上清を捨て、沈殿に培養液約 10ml を加える。駒込ピペットで溶液が均一になるように軽く懸濁後、再び遠心分離を行う。この洗浄操作は2度繰り返す。最後の沈殿は 2ml の培養液に懸濁する。
- (ix) 別の遠心管に15%のパーコール溶液(体積比でパーコール15:培養液85)を 4ml 入れ、その上に上記懸濁液 2ml をゆっくりと加える(遠心管を少し傾け、懸濁液を駒込ピペットで遠心管の内壁を伝うようにして落とすとよい)。
- (x) 遠心分離後、15%のパーコールの上に見える白い不透明な層を取り、培養液で2度洗浄する(操作は上記viiiと同じ)。
- (xi) 最後の沈殿を 1ml の培養液で懸濁し、直径 3cm のシャーレに移す。
- (xii) シャーレをパラフィルムで密封し、 25°C 暗黒下で培養する。

IV 培養経過

花粉プロトプラストの単離過程は、上記viの期間中シャーレを倒立顕微鏡下に置くことで、容易に観察できる。テッポウユリの花粉は楕円形をしている(図3A)が、酵素処理によって球形のプロトプラストが遊離すると、網目状の外壁はより鮮明となる(B)。この遊離した花粉プロトプラストと抜け殻の外壁は比重が大きく異なるので、上記のパーコールを用いた密度勾配遠心で両者をほぼ完全に分離することができる(C, D)。

花粉プロトプラストの培養経過も逐次倒立顕微鏡を用いて観察できる。花粉プロトプラスト(E)は、培養約5日後球形から楕円形に変形し(F, G)、続いて急速に成長した後、培養7日目以降花粉管を発芽・伸長する(H)。この花粉プロトプラストから生じる花粉管は正常な花粉管と同様な花粉管壁を形成しており(I)、またこの培養過程で生殖細胞は2個の精細胞に分裂する。テッポウユリ以外の花粉プロトプラストもほぼ同様に単離・発生することが報告されている⁽⁹⁾が、その例はまだ少ない。

細胞壁や外壁をもたない花粉プロトプラストは、花粉に細胞融合や遺伝子導入の道を開けるのみならず、花粉の内部構造の観察や内部器官の単離において、非常に優れていることがすでに実証されている^(10,11)。

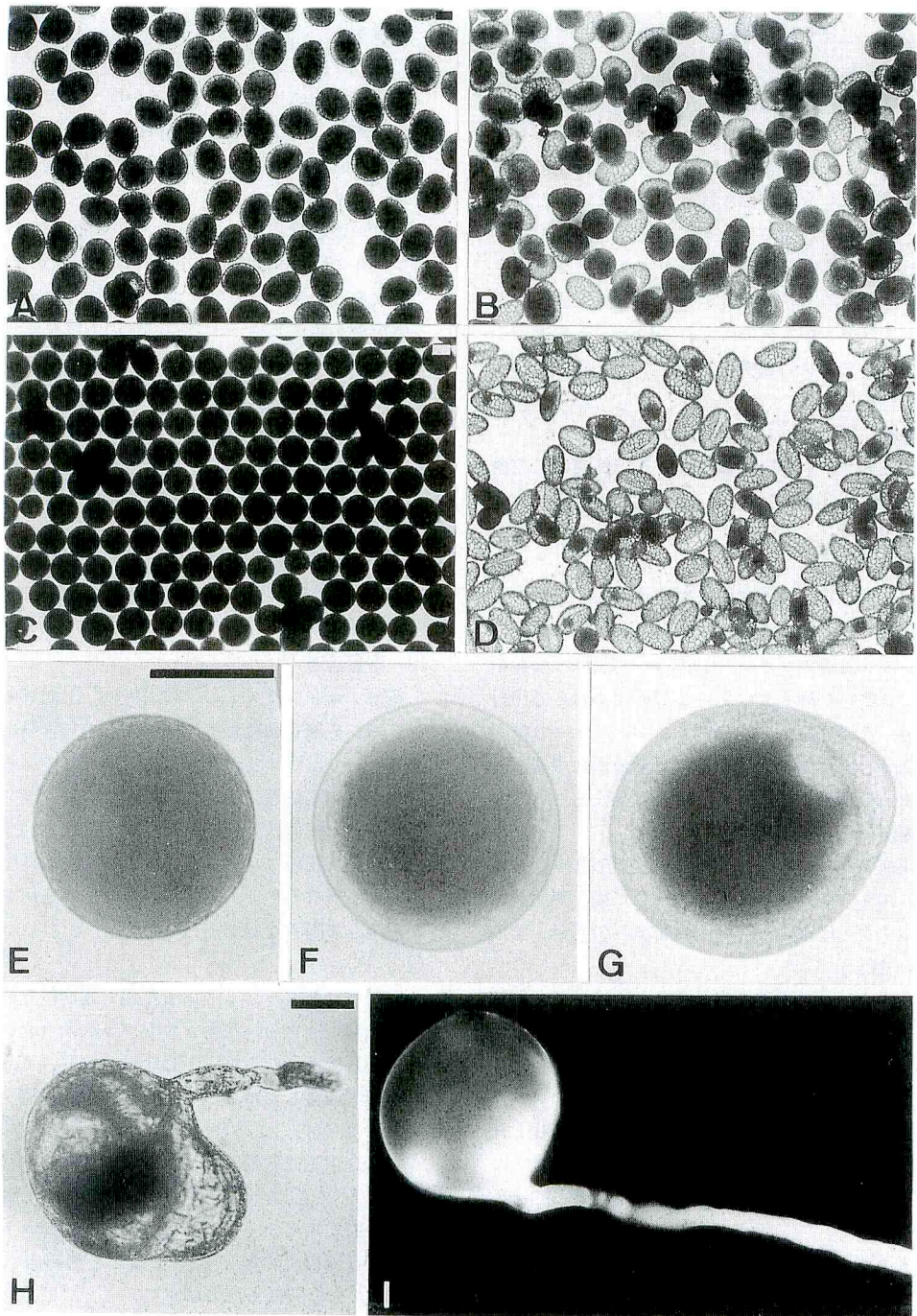


図3 テッポウユリ花粉プロトプラストの単離と培養 A, 蕾長15cm内の花粉; B, 酵素処理開始後1時間の花粉; C, D, パーコール密度勾配遠心分離後の花粉プロトプラスト (C) と外壁 (D); E, 培養開始時の花粉プロトプラスト; F, G, H, I, 培養4日後 (F), 5日後 (G), 8日後 (H, I) の花粉プロトプラスト. Iはカルコフルオールホワイト染色. (スケールバー = 50 μ m)

引用文献

- (1) Ito, M. and H. Stern: Studies of meiosis *in vitro* I. *In vitro* culture of meiotic cells. *Dev. Biol.* 16, 36-53 (1967).
- (2) 伊藤道夫・田中一郎: 花粉(母)細胞プロトプラストを用いる実験系. 蛋白質核酸酵素 別冊 30, 131-139 (1987).
- (3) 庄野邦彦: 培地の組成と作り方. 竹内正幸・石原愛也・古谷力編, 植物組織培養. 朝倉書店 pp. 44-45 (1972).
- (4) Tanaka, I. and M. Ito: Control of division patterns in explanted microspores of *Tulipa gesneriana*. *Protoplasma* 108, 329-340 (1981).
- (5) 田中一郎: 細胞分化と細胞周期—花粉の発生を例として—. 化学と生物 19, 489-496 (1981).
- (6) Tupy, J., L. Rihova and V. Zarsky: Production of fertile tobacco pollen from microspores in suspension culture and its storage for in situ pollination. *Sex. Plant Reprod.* 4, 284-287 (1991).
- (7) Tanaka, I., C. Kitazume and M. Ito: The isolation and culture of lily pollen protoplasts. *Plant Sci.* 50, 205-211 (1987).
- (8) 田中一郎: 花粉の発生生理—花粉プロトプラスト. 細胞 20, 89-94 (1988).
- (9) Zhou, C.: A study on isolation and culture of pollen protoplasts. *Plant Sci.* 59, 101-108 (1989).
- (10) Tanaka, I. and T. Wakabayashi: Organization of the actin and microtubule cytoskeleton preceding pollen germination: An analysis using cultured pollen protoplasts of *Lilium longiflorum*. *Planta* 186, 473-482 (1992).
- (11) Tanaka, I.: Isolation of generative cells and their protoplasts from pollen of *Lilium longiflorum*. *Protoplasma* 142, 68-73 (1988). (田中 一郎)

著者紹介

◇ 田中 一郎

昭和27年3月, 香川県生まれ. 名古屋大学大学院理学研究科生物学専攻博士課程修了. 日本学術振興会奨励研究員を経て, 昭和59年11月より横浜市立大学文理学部(生物学教室)助教授. 理学博士.

(2) 半数体作出のための培養法

Datura innoxia の花粉の分化を研究していた Guha と Maheshwari が花粉から植物体を偶然に作りだしたのは1964年⁽¹⁾のことである. それ以降この現象は花粉の分化を探る実験系としてよりは, 育種を目標とした半数体を作る技術として注目され38科85属240種以上の作物において, 花粉からの植物体誘導例が報告されている⁽²⁾. その成功例の大部分が, 薬培養であり, 薬から花粉を単離して培養する花粉培養の成功例はベチュニア⁽³⁾, タバコ^(4,5), トウモロコシ⁽⁶⁾, ブラシカ⁽⁷⁾, バレイショ⁽⁸⁾, オオムギ⁽⁹⁾, コムギ⁽¹⁰⁾, イネ⁽¹¹⁾などの極少数であり, また, 多くの品種多くの研究者で実施されている安定な実験系としては, タバコとブラシカに限られる. タバコについては, 今村⁽⁴⁾あるいは京⁽⁵⁾の報告を参照していただくこととして, ここではブラシカ属特にハクサイの花粉培養を中心に紹介したい.

ブラシカ属植物にはナタネ, ハクサイ, カブ, キャベツ, ブロッコリー, カラシナ等の野菜, 油料, 香辛

料として有用な作物が含まれている. 培養開始後1ないし数日間の高温で薬を培養するとカブの花粉由来の不定胚を誘導できることを Keller and Armstrong⁽¹²⁾ が報告して以来, 多くのブラシカ属で半数体が作出された. 単離花粉の培養による不定胚の誘導は, ナタネで Lichiter⁽⁷⁾ が, ハクサイで佐藤⁽¹³⁾ が報告している. ここで述べる方法は Lichiter の報告を基に著者らの研究室で改良したものである. なお, ここでは, 単離花粉を培養して不定胚を誘導する培養法という意味で花粉培養を用いている.

(a) 栽培法

ブラシカ属植物は低温(10℃以下, 5~7℃が最も効果的)に一定期間遭遇することが花粉誘導に必要である. 低温に感応する生育ステージは種により異なり, ハクサイなどの *B. campestris* 及びナタネなどの *B. napus* は発芽すれば, *B. oleracea* のうちキャベツは秋蒔系では本葉16~20枚程度, 野崎夏蒔系では本葉7~9枚, コペンハーゲン・マーケット系では本葉3~5枚で低温に感応するようになる. また, 同じ

oleracea に属するブロッコリーでは15°Cで感応する。いずれも低温処理の期間は30日を目安とするが、品種によって幅があるので使用する品種で予め調べておくこと。

1～3寸鉢で低温処理を行った後、尺鉢以上の大きさの鉢に移植し、20°C以下（25°Cを越えると極端に発生率が落ちるので注意すること）で栽培する。鉢の容量が小さいと採取できるつぼみ数が少なくなり、また発生率も低下する。

(b) 花粉ステージの決定

花粉培養では、1細胞期後期、2細胞期前期の花粉いずれもが不定胚形成に向かうことが多いが、ブラシカ属植物の場合は1細胞期後期の花粉に限られる。また、培養液中に異なるステージの花粉が混在すると不定胚発生頻度が低下するので、つぼみの大きさから花粉ステージを特定することが重要になってくる。酢酸カーミンあるいはプロピオン酸オルセインによる染色が常法であるが、ブラシカ属植物の場合、2細胞期以降の染色が困難であることが多い。蛍光顕微鏡が

手元があれば、DAP Iによる染色が簡単である。DAP I法の常法（pH7.4）でブラシカの花粉を染色すると感度は高いがバックも高くなり適さない。著者らは、低pH（pH4.4）で観察している。この方法ではミトコンドリアDNA検出出来ないが、核のDNA、プラスチッドDNAの検出は容易である。

(I) 固定

つぼみの長さ、幅及び葯長と花弁の比（つぼみが若いちは葯長の方が花弁長より長く、長ずるに従い花弁長が長くなる）を測定記録する。葯を固定液（エタノール：酢酸、3：1）中で、室温、1時間以上固定。MacLvaive 緩衝液（56mM クエン酸～88mM リン酸2ナトリウム、pH4.4）に葯を移し10分間放置する。

(II) 染色及び観察

葯をスライドガラス上に取り出し、DAP I染色液（同上緩衝液に0.25 μ g/ml溶解）を1滴落し、解剖針で葯をつつき花粉を染色液中に分散させる。残査を取り除いた後、カバーガラスをかけマニキュアで封緘。暗黒下に3時間放置後（冷蔵庫内に1晩放置可）、蛍光顕微鏡U励起で観察する。

表1 ハクサイ（品種つぼめ）つぼみの大きさと花粉のステージ

つぼみ長 (mm)	つぼみ幅 (mm)	花弁長/葯長	花粉ステージ
1.4	0.8	1 / 5	減数分裂期—4分子期
2.0	1.2	1 / 3	1細胞期（前期）
2.4	1.8	1 / 2	1細胞期（後期）
2.7	1.9	2 / 3	2細胞期（前期）
3.1	2.1	1 / 1	2細胞期
4.0	2.8	> 1 / 1	3細胞期

表2 修正B5培地組成

成分	濃度 (mg/l)	成分	濃度 (mg/l)
NaH ₂ PO ₄	150	MnSO ₄ · H ₂ O	10
KNO ₃	2500	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2
(NH ₃) ₂ SO ₄	134	CuSO ₄ · 7 H ₂ O	0.025
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	250	CoCl ₂ · 7 H ₂ O	0.025
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	750	H ₃ BO ₃	3
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27.8	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.25
NaEDTA	37.8	Sucrose	130 (g/l)

Keller & Armstrong (12) の培地に若干の修正を加えた。培地はpH5.8に調整

表3 花粉培養培地

成分	濃度 (mg/l)	成分	濃度 (mg/l)
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	125	MnSO ₄ · H ₂ O	25
KNO ₃	125	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	10
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	500	CuSO ₄ · 7 H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	125	CoCl ₂ · 7 H ₂ O	0.025
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27.8	H ₃ BO ₄	10
NaEDTA	37.8	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.25
myo-inositol	100	glycine	2
nicotinic acid	5	glutamine	800
pyridoxine · HCl	0.5	serine	100
thiamine HCl	0.5	glutathione	30
biotin	2	NAA	0.5
folic acid	0.5	BA	0.1
		sucrose	130 (g/l)

Lichiter (7) の培地に若干の修正を加えた。培地はpH6.0に調整後、濾過滅菌

表1につぼみの大きさ、葯長/花弁長の比と花粉ステージの関係の例を示した。葯長/花弁長が1/2、つぼみの大きさ(幅)が、1.8mm前後のものが1細胞期後期に匹敵する。品種、栽培条件により異なるので実験毎にチェックする必要がある。

(c) 花粉培養

(I) 次亜塩素酸カルシウム水溶液の作り方

CaClO₂を10% (w/v) になるように溶解。一晩放置した後、上澄みを用いる。密栓して冷蔵庫に保存すれば一月程度使用可。一度使用したものは、その都度廃棄する。

(II) つぼみの殺菌

2章の方法で選抜した約10個のつぼみをガーゼでくるんで0.01%オスパンに30秒、次亜塩素酸カルシウム水溶液に10~15分浸せき。以下の操作はクリーンベンチ内で行い、容器は全て滅菌済のものを用いる。滅菌水に30秒程度3回通して洗浄。つぼみの中は無菌であり、表面殺菌だけでよい。

(III) 花粉の単離

ガーゼ中よりつぼみを取り出し、ビーカーに移す。4 mlの液体修正B 5培養液(表2)を加え注射筒でつぼみを押しつぶし、花粉を遊離させる。45 μmのナイロンメッシュあるいはミラクロスで濾過。濾液を200 g, 2~3分遠心分離を行う。沈殿を修正B 5液体培

地に懸濁、再度遠心分離を行う。この操作を2度繰り返し、花粉を単離する。花粉培養用培地(表3)に懸濁。花粉密度を0.5~1.0 X 10⁵/mlにトーマ血球測定盤で測定調整する。6 cmシャーレに1.5 mlの花粉懸濁液を撒き、パラフィルムでシャーレを封じる。シャーレは親水処理したものを用いる。未処理のものを使用する時は、培養液を含んだ0.8%アガロースをシャーレ当り1 ml引き、その上に花粉懸濁液を重層する。

(IV) 培養

33~35°Cの暗所で24時間培養後、25°Cで約一月培養する。1細胞期の花粉(図1)は35°C培養中に均等分裂を行い均等2細胞(図2 a)となり、培養2日目に4細胞(図2 b)が、5日目16細胞以上の多細胞(図2 c, d)が、7日目に球状胚(図2 e)が、10日目に心臓型胚(図2-f)が現れる。約2週間の培養で不定胚が観察出来るようになる。35°Cでの培養をせずに25°Cでのみ培養を続けると、1細胞期の花粉は不均等な分裂をし、栄養細胞と生殖細胞から成る2細胞期花粉となる。培養6日目には精細胞2、栄養細胞1の3細胞期花粉となり、生体内と同じ花粉の分裂過程を辿る。この培養花粉は培地上で花粉管発芽能を有する。

振とう培養を行うと不定胚発生頻度が高まるとの報告⁽¹⁾があるが、著者のおこなった範囲では効果はない。



図1 ハクサイ1細胞期花粉
培養直前の花粉をDAPI染色

(d) 植物体の発生法

in vivo での種子の発生後期にABAが蓄積、水分含量の減少に伴い、種子タンパク質が蓄積胚が成熟する。花粉培養で得られる不定胚は、液体中に常時浮遊しているために乾燥過程がなく未成熟であり、薬培養由来胚の発生培地（B5培地）では胚の枯死、奇形の出現頻度が高くなり、正常植物体の出現頻度は20%程度である。不定胚の水分減少過程が正常植物体の発生には必要のようである。河名等⁽¹⁵⁾は、10 μ MのABA含有培地で25日間振とう培養し生理的に乾燥させた後、B5培地に移植すると80%程度の正常植物体得られることを報告している。

(e) 順化法

培養植物体の根についている寒天を水洗いしながら根を切らない様に丁寧に取り除き、パーミキュライトを入れた1寸鉢に移す。高湿度（相対湿度60~80%）、

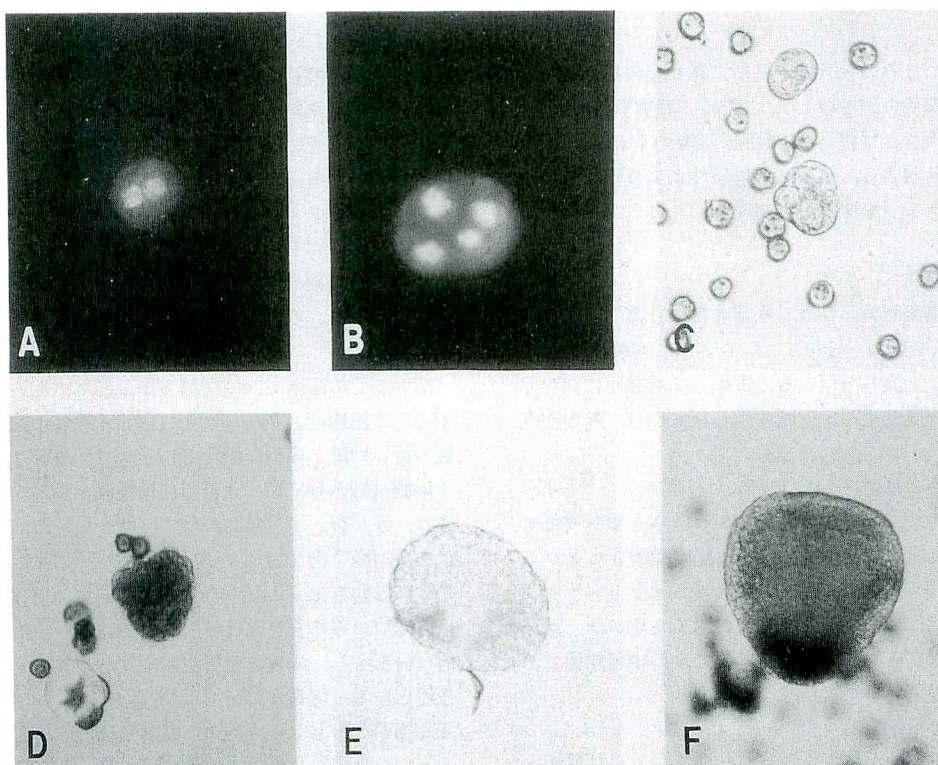


図2 ハクサイ花粉からの不定胚発生過程 花粉を35°Cで24時間培養後、25°Cに移し培養を続けた。a, b : DAPI染色, c~f : 実体顕微鏡観察, a : 35°C, 24時間培養, b : 35°C 1日~25°C 1日培養, c, d : 35°C 1日~25°C 4日培養, e : 35°C 1日~25°C 6日培養, f : 35°C 1日~25°C 10日培養

低照度下で約1月順化。

(f) 染色体数の決定

ブラシカの花粉由来植物は半数体と2倍体とがほぼ同数出現し、まれに4倍体も現れる。2倍体は半数体の自然倍加個体であることは確認されており育種素材としてはそのまま利用できるが、半数体は倍加しなければ種子を得ることは出来ないため、倍数性を決定することが必要となってくる。

(I) 染色体数

Nishibayashi⁽¹⁶⁾の方法を用いている。根端を0.02M 8-ヒドロキシキノリン溶液で約4時間処理した後、エタノール：酢酸(3:1)で固定する。固定根端を酵素溶液(4% Cellulase Onozuka RS, 1% Pectolyase Y-23, 75mMEDTA, pH4)で、37°C、4時間インキュベートする。根端をスライドグラス上に移し、固定液を1滴たらし解剖針を使って根端細胞を分散させる。(この操作で容易に分散できるまで酵素処理を行う。)2%酢酸オルセインで染色、検鏡。

(II) セルソーター⁽¹⁷⁾

DNA量を測定する方法でセルソーターがある研究室では最も確実簡便な方法である。若い小葉を6cmのシャーレに入れ氷冷した1mlのchopping buffer(45mM Na citrate, 20mM 4-morpholinepropane sulfonate, 1mg/ml Triton X-100, pH7.0)を注ぐ。カミソリで葉を叩き、細断し核を遊離させる。ミラクロスで濾過し1μg/mlのpropidium iodideを加えセルソーターで分析する。

(III) 孔辺細胞の葉緑体数⁽¹⁸⁾

染色体数は正確に倍数性を決定できるが染色体の検鏡はかなりの労力と熟練を要し、セルソーターは簡便正確ではあるが高価な機械が必要である。ここに述べる葉緑体数による倍数性の推定は比較的簡単で十分実用に耐える。まず、若い葉の裏表皮をはいでスライドグラス上に置き水でマウントしカバーグラスをつけ、

蛍光顕微鏡(B励起)で観察する。葉緑体は赤い自家蛍光を発する。葉肉細胞の葉緑体数も倍数性により異なるが、孔辺細胞の葉緑体数は少なく細胞による差も少ない。表4にその結果を示す。

(g) 染色体の倍加法

花粉培養由来植物体の約50%は自然倍加により生じた2倍体であるが残りは半数体であり、種子を得るためには倍加処理が必要となる。(僅かに3倍体と4倍体が存在する)。順化処理終了後、鉢に移植し数葉が展開した植物の成長点を露出し、0.2%(w/v)のコルヒチンを湿した脱脂綿を密着させる。48時間処理した後水でよく洗い、栽培を続ける。腋芽からでてくる新葉の孔辺細胞の葉緑体数を調べ、倍加したことを確認する。処理した植物の50%程度が倍加する。倍加していないものは更にコルヒチン処理する。植物は若い方が倍加しやすいが、コルヒチンによる葉害がでてくるので、植物のステージを選ぶことが大切である。生育条件によりかなり異なるので各自検討されたい。

引用文献

- (1) Guha, S. and S. C. Maheswari: *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204, 497 (1964)
- (2) Srivastava, P. S. and B. M. Johri: Pollen embryogenesis. *J. Palynology* 23-24, 83-89 (1988)
- (3) Sangwan, R. S. and B. S. Noreel: Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured *in vitro*. *Nature* 257, 222-224 (1975)
- (4) Imamura, J., E. Okabe, M. Kyo and H. Harada: Embryogenesis and plantlet formation through direct culture of isolated pollen of *Nicotiana tabacum* cv. Samsun

表4 染色体数と孔辺細胞及び葉肉細胞中の葉緑体数

染色体数	葉緑体数/孔辺細胞	葉緑体数/葉肉細胞
半数体	2.4±0.7	19.5±4.0
倍数体	6.4±2.0	33.3±14.6

ハクサイ品種つばめを使用。数値は平均値±標準偏差で示した。

- and *Nicotiana rustica* cv. *rustica*. *Plant & Cell Physiology* 23, 713-716 (1982)
- (5) Kyo, M. and H. Harada : Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. *Plant Physiol.* 79, 90-94 (1985)
- (6) Pescitelli, S. M., Mitchell, J. C., Jones, A.M., Pareddy, D. R. and Petolino, J. F. : High frequency androgenesis from isolated microspore of maize. *Plant Cell Reports* 7, 673-676 (1989)
- (7) Lichiter, R. : Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 105, 427-434 (1982)
- (8) Uhrig : Genetic selection and liquid medium conditions improve the yield of androgenetic plants from dihaploid potatoes. *Theor. Appl. Genet.* 71, 445-460 (1985)
- (9) Datta, S. K. and Wenzel, G. : Single microspore derived embryogenesis and plant formation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Arch. Zuchtungsforchung* 18, 125-131 (1988)
- (10) Datta, S. K. and Wenzel, G. : Isolated microspore derived plant formation via embryogenesis in *Triticum aestivum* L., *Plant Sci.* 48, 49-54 (1987)
- (11) Chen, Y., Wang, R., Tian, W., Zuo, Q., Zug, S. M. D., and Zhang, G. : Studies on pollen culture in vitro and induction of plantlets of *Oryzae sativa*. In "The Plant Genome", Eds Davies, D. R. and Hoppwood, D. A., John Innes Charety Norwich, pp 245-246 (1980)
- (12) Keller, W. A. and K. C. Armstrong : Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther culture elevated temperature treatments. *Theor. Appl. Genet.* 55, 65-67 (1979)
- (13) Sato, T., T. Nishio and M. Hirai : Plant regeneration from isolated microspore culture of chinese cabbage (*Brassica campestris* spp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports* 8, 486-488 (1989)
- (14) Swanson, E. B., M. P. Coumans, S. C. Wu, T. L. Barsby, and W. D. Beversdorf : Efficient isolation of microspores and the production of microspore-derived embryos from *Brassica napus*. *Plant Cell Reports* 6, 94-97 (1987)
- (15) 河名敬和・大川安信 : ナタネ花粉由来胚からの効率的再分化法. 育種学雑誌 42 (別1) 70-71 (1992)
- (16) Nishibayashi, S. and J. Kaeriyama : Structural stability of chromosomes in rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from somatic tissue culture. *Plant Tissue Culture Letters* 3, 31-34 (1984)
- (17) Galibraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P. and E. Firoozabady : Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220, 1049-1051 (1983)
- (18) Hamaoka, Y., Fujita, Y. and S. Iwai : Number of chloroplast in haploids and diploids produced via anther culture in *Brassica campestris*. *Plant Tissue Culture Letters* 8, 67-72 (1991)

(岩井純夫, 浜岡 陽)

著者紹介

◇ 岩井純夫

昭和23年10月, 福岡県生まれ。

九州大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了。昭和48年日本専売公社入社(現日本たばこ)。農学博士

◇ 浜岡 陽

昭和37年10月, 兵庫県生まれ。

京都大学大学院農学研究科農林生物専攻修士課程修了。昭和62年日本たばこ入社