

Medicago sativa と *M. minima* の 電氣的細胞融合の諸条件について

藤本ゆり・日詰 圭・小池正徳・嶋田 徹 (帯広畜産大学)

緒 言

1979年千田ら¹⁾が微小電極法によりプロトプラストの融合に成功して以来、電氣的細胞融合法は急速に発達している。現在電氣融合において、その融合率を高めることと、融合産物の培養・再生が重視されており、さまざまな報告がなされている。しかし、アルファルファについてはWalton²⁾や Gilmour³⁾など数例が報告されているに過ぎない。

そこで本実験ではアルファルファ栽培種 (*Medicago sativa*) の子葉由来プロトプラストとアルファルファ野生種 (*M. minima*) のカルス由来プロトプラストを用いて、融合率に及ぼすパルス電圧・プロトプラスト密度・ Ca^{2+} 濃度の影響について検討した。

材料及び方法

アルファルファ栽培種 (*Medicago sativa*, cv. キタワカバ) の種子は、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間表面殺菌した後、無菌水で数回洗浄し、0.1%ハイポネックス、2%サッカロースを含む寒天培地に20~30粒づつ無菌的に播種し、2週間後の緑色の子葉を実験に用いた。*M. minima* については、ガラス室にて2~3カ月生育させた苗の展開葉を切りとり、70%アルコールに数秒浸した後5%次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間殺菌し、無菌水で数回洗浄した植物片を、2.0 mg/l 2,4-D、0.2 mg/l カイネチンを含むSH寒天培地上に置床し、25℃、暗所にてカルス化し、それを用いた。

プロトプラスト単離酵素の濃度は*M. sativa* ではセルラーゼオノズカRS 1%、ドリセラゼ0.5%、ペクトリアーゼY₂₃ 0.05%とし、*M. minima* ではそれぞれを1.5%、1.0%、0.05%とした。また浸透圧の調整のためマンニトールを13%の濃度に加え、pHは5.8とした。それぞれの酵素液に*M. sativa* の子葉と、*M. minima* のカルスを浸漬し、30℃で6時間振とう(55回/min)し、その後常法によりプロトプラストを洗浄、単離精製した。

電氣融合装置は日本分光CET 200型を使用し、電極間距離0.5mm、周波数500kHz、パルス電圧幅0.05msec、高周波電圧8V(ピーク間)に設定し⁴⁾⁵⁾、融合を行った。開放電極を倒立顕微鏡のステージ上におき、電極間にプロトプラスト懸濁液を注入し、高周波電圧を1分印加してパールチェーンを形成後DCパルスを印加して融合させた。倒立顕微鏡により全プロトプラスト数に対する融合したプロトプラスト数(総融合率)及びヘテロ融合したプロトプラスト数(ヘテロ融合率)を測定した。

DCパルス

パルス電圧は日比ら⁴⁾がタバコ葉肉プロトプラストとニンジン根部プロトプラストで設定した条件を基に500~2,000V/cmの範囲で100V/cmごと、16段階とした。プロトプラスト密度は 10×10^4 個/mlとし、13%マンニトール液に懸濁して実験に供試した。

プロトプラスト密度

プロトプラスト密度は1、2.5、5、10、 20×10^4 個/mlの5段階とし、13%マンニトール液に懸濁させ、DCパルスは先の実験で得られた値を基に1,300 V/cmとした。

Ca²⁺ 濃度

プロトプラスト懸濁液にCaCl₂を0、1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 μMの6段階となるように添加し、他の実験と同様にプロトプラスト密度は 10×10^4 個/ml、DCパルスは1,300 V/cmとした。

結果及び考察

パルス電圧

最高融合率は1,300 V/cmで総融合率が20.6%、ヘテロ融合率が6.5%であったが、ヘテロ融合率については1,000~1,400 V/cm間でそれほど差は認められなかった。(図1) Gilmourら³⁾は、*M. sativa*と*M. borealis*の電気的細胞融合において800 V/cmで最高融合率を得たと報告しており、本実験の結果とは異なっている。これは彼らが用いたのは*M. borealis*の懸濁培養由来プロトプラストであり、品種ならびに材料の違いによるものと推測される。1,800 V/cm以上で総融合率の上昇がみられたのは、多重融合の増加によるものである。またパルス電圧が高くなるにつれて破裂するプロトプラストも増加した。

プロトプラスト密度

総融合率はプロトプラスト密度が高くなるにつれて上昇した(図2)。これは、密度が高くなるとプロトプラスト間の距離が縮まり、お互いに接し易くなるためと推測される。一方、ヘテロ融合率が 20×10^4 個/mlで減少したのは、パルス電圧の場合と同様に多重融合が増えたためである。

また、 1×10^4 個/mlで融合率が著しく低下したが、これはパールチェーンがほとんど形成されなかったためである。

Ca²⁺ 濃度

総融合率は 10^2 μMで最も高い23.2%を示したが、ヘテロ融合率の最高値は 10^3 μMでの9.4%であった(図3)。一般に、Ca²⁺の濃度が 10^2 μM以上になるとパールチェーン形成が阻害される⁴⁾⁶⁾⁷⁾。本実験においても 10^4 μMではほとんど融合が起こらなかった。しかし、 10^3 μMでは長いパールチェーンは形成されなかったが、数個ずつのパールチェーンが形成されたので、多重融合が起こりにくく、むしろヘテロ融合率は上昇した。一方、Ca²⁺を添加しない状態でも最高融合率に近い値を示しており、

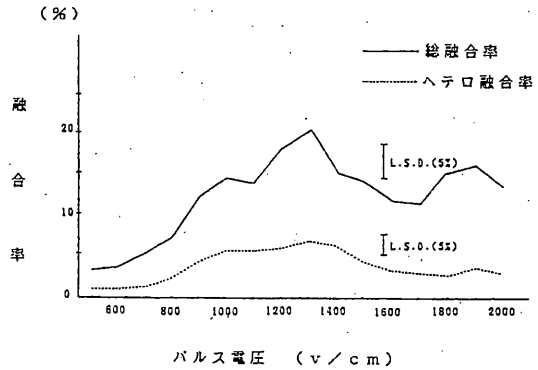


図1 *Medicago sativa*と*M. minima*の融合率に及ぼすパルス電圧の影響

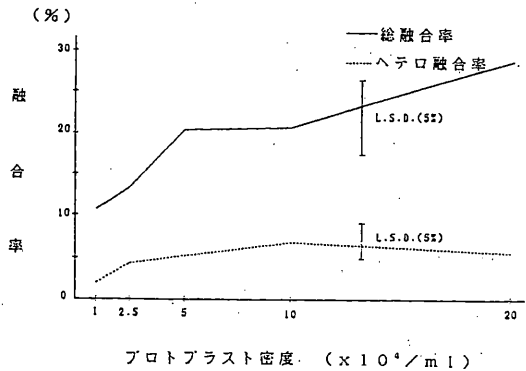


図2 *Medicago sativa*と*M. minima*の融合率に及ぼすプロトプラスト密度の影響

Ca^{2+} を添加することの効果はないと結論される。しかし、 Ca^{2+} を添加することにより、融合に必要なパルス電圧を減少させることができるという報告⁸⁾もあるので、更に Ca^{2+} 濃度とパルス電圧、プロトプラスト密度の組み合わせによる検討が望まれる。

摘 要

Medicago sativa と *M. minima* を電気的細胞融合するにあたり、その融合率に及ぼすパルス電圧・プロトプラスト密度・ Ca^{2+} 濃度の影響について検討した。それぞれの最適値はパルス電圧 1,300 V/cm、プロトプラスト密度 10×10^4 個/ml、 Ca^{2+} 濃度 $10^3 \mu M$ であった。

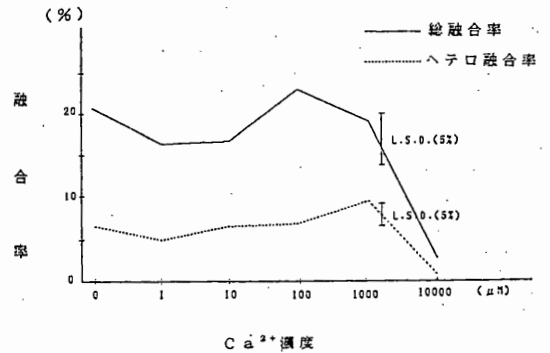


図3 *Medicago sativa* と *M. minima* の融合率に及ぼす Ca^{2+} の影響

引用文献

- 1) Senda M., J. Takeda, S. Abe, T. Nakamura (1979) Plant Cell Physiol. 20 : 1441-1443
- 2) P.D. Walton and D.C.W. Brown (1988) Plant Breeding 101 : 137-142
- 3) D.M. Gilmour, M.R. Davey, & E.C. Cocking (1989) Plant Cell Reports 8 : 29-32
- 4) 日比忠明 (1987) トキシコロジーフォーラム 10(4) : 418-431
- 5) G.W. Bates, J.J. Gaynor, & N.S. Shekhawat (1983) Plant Physiol. 72 : 1110-1113
- 6) 植物細胞工学編集部、十川好志 (1989) 植物細胞工学 1(1) : 63-70
- 7) 三浦靖高、十川好志、山田康之 (1988) 植物組織培養 5(2) : 101-103
- 8) A.M. Christov & S.G. Vaklinova (1987) Plant Physiol. 83 : 500-504