

3Dp-3

シダ胞子体からの2n前葉体の誘導とプロトプラストの培養

前田耕夫, 杉本洋子 (福井大・教育・生物)

シダ植物は植物の特に高等植物の発生生物学的研究を導く上において有利な点を多々保持している。それは多分に核相の交代とともに世代交代が明瞭に並行して進行することと、これらの世代が1つ1つが分離して存在していることによる。生物体の発生の始発が単細胞化されて始まることを考えるならばシダ植物を発生生物学的な研究材料として用いるためには、前葉体および胞子体段階の2種の細胞を利用できる状態にするため、培養可能で分裂することの系の確立がされている必要がある。これらの細胞は半数性(n)と倍數性(2n)の段階にある。

我々はシダ植物であるカニフサ (*Lygodium japonicum* Suartz) を用いてその前葉体からプロトプラストを得てこれらを培養し分裂・増殖し再生体として前葉体を得ることができた。その後、培養法の改良により半数性(n系)の細胞の分裂はもと容易に可能となっている。次は倍數性(2n系)の細胞を得て分裂させることが必要とされる。そこで胞子から前葉体を得る前に前葉体上に生じた若葉(幼葉(juvenile leaf))をプロトプラストの単離材料とした。下記の条件で比較的多量のプロトプラストを得ることができた。胞子体由来のプロトプラストに 0.5 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA

Protoplast Isolation

1. Enzyme solution

- 2 % Cellulase "Onozyca"RS
- 1 % Macerozyme R-10
- 1/5 strength White's medium
- 0.6 M Mannitol
- pH 5.8

2. treatment

- 12 hr preincubation
- 25 C, dark
- 7 hr shaking
- 35 C, 80 rpm

を含むWhiteの培地で培養したところ分裂に至らなかった。そこで、2日ごとに浸透圧を0.05Mずつ減少したところ、0.45Mに細胞壁を形成による形態的变化が生

(培養後8日に第1分裂を観察した。

次に、プロトプラストの培養条件の検討するために胞子体の幼葉由来の切片を種々のオーキシン、サイトカイニン類の組合せの培地で培養した。切片から次の3種類の再生体を得た。(1)前葉体様の再生体。(2)緑色のカルス様再生体。(3)カルス(黒色)。(1)および(2)の再生体はオーキシン数、サイトカイニン数を含まない培地で培養されると外見的には胞子由来の前葉体と異なる前葉体となった。(1)の再生体の誘導は2,4-D 0.5 mg/l + カイネチン 0.1 mg/l と NAA 0.1 mg/l + BAP 0.5 mg/l との組合せで高頻度で誘導された。この誘導された前葉体をフェイルゲン染色による顕微鏡観察によると2Cレベルであった。倍數性(2n)の前葉体を得ることができた。この前葉体は造卵器、造精器を形成し胞子体を生じた。

現在まだ胞子体由来のプロトプラストを高頻度に分裂誘導させることはできていない。今後、この胞子体由来の前葉体からプロトプラストの単離と試み分裂誘導を試みる予定である。また、半数性および倍數性のカルスも誘導されたので、これらのプロトプラスト単離も試み、系の確立を目指す予定である。