

マルチウエルディッシュを用いた花粉管培養

斎藤美和子*・上條明雄**

Cultivation of Pollen Tube using a Multi-well Dish.

Miwako SAITO* and Akio KAMIZYÔ**

*Department of Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko, Kanagawa 199-01.

**Department of Botany and Microbiology, School of Medicine, Teikyo University, Otsuka, Hatioji, Tokyo 192-03.

Cultivation of pollen tubes *in vitro* was simplified using a multi-well dish in the preparation of culture medium. Artificial cultures of pollen tubes became possible under 24 different conditions simultaneously, because a multi-well dish contained 24 wells of 15.5 mm in diameter and 17.8 mm in depth; for example, combinations of 6 different pH and 4 different sucrose concentrations in the culture medium.

はじめに

2核性花粉を寒天培地や液体培地で発芽させ、花粉管を培養する際、通常はスライドグラスやカバーグラスの上に培地を載せて温室中で培養する。また、研究目的によってはシャーレ⁽¹⁾⁽²⁾、試験管⁽³⁾⁽⁴⁾、遠心管⁽⁵⁾、その他のガラス器具⁽⁶⁾などを用いての大量培養も試みられている。これらの内、岩波⁽⁷⁾の「直線状散布法」はスライドグラス上の寒天培地に花粉を直線状に散布して培養するものであり、花粉管の伸長量を容易に測定することが出来るため、花粉管の発芽・伸長に対する阻害物質や促進物質の影響を調べる場合などには極めて有効な方法といえる。しかしながら、多数の試料を培養する場合、直線状散布法は培地の作製に多くの労力とスペースを要し、また、培地や花粉を多量に必要とするなどの難点がある。著者らは、省力・小スペース化をはかる目的で、微生物や培養細胞などの培養で多用されているマルチウエルディッシュ

(通称、マルチディッシュまたはマルチプレート)を花粉管の培養に使用することを試みたので紹介する。

マルチウエルディッシュには多くの製品があるが、ここではデンマーク Nunc 社製の「24 マルチウエルディッシュ」を用いた。縦88mm、横133mmのポリスチレン製のプレートに24個の培養槽(ウエル)が横6列×縦4列に配列されている(図2)。各ウエルには識別のためアルファベットと数字が配分・刻印されている(図3、矢印)。ウエルの底部内径は15.5mm、底面積は1.9cm²であり、深さは17.8mm、容量は3.5mlである。Nunc社の製品ではウエルの周囲に水を蓄えられるため、培地の乾燥が防げる。また、ガンマー線による滅菌がされており、蓋の部分は空気が流通するように作られているが、雑菌の混入を最小限に留めるように設計されている。

ここではヤエチウセンアサガオ(*Datura fastuosa* L.)の花粉管生長に対する培地のショ糖

* 〒199-01 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1901-1 帝京大学薬学部生物学教室

** 〒192-03 東京都八王子市大塚 359 帝京大学医学部植物学・微生物学教室

濃度と pH の影響について調べた。

材 料 と 方 法

試供植物は本学薬学部薬用植物園で栽植中の黄色系の花色を有するヤエチヨウセンアサガオで、裂開直後の花粉を採取して培養に供した。基本培地として Brewbaker と Kwack⁽⁸⁾ の培地を用い、ショ糖濃度を 10%、寒天濃度を 0.8% とした。横 6 列を pH の違い、縦 4 列をショ糖濃度の違いとして合計 24 種類の培地を各ウエル中で作製した (表 1 参照)。花粉を木製の“妻ようじ”の太い方の一端に付着させ、寒天の中心部に置床させた後、ウエルの周囲に水を満たし、蓋をして 22℃ で一晩培養した後、図 1 に示した判定基準に従って花粉管の相対伸長量を求めた。図 1 はパソコンを用いて 24 ドットのプリンターで作図したものである。半径 2 ドットの円に相当する花粉の分布状態を相対伸長量 = 1 と定め、以下、半径を 1 ドットずつ増やして、最も大きな円が底部直径に相当する円になるように作図したものである。従って、花粉管がウエル一杯に伸長した状態が最も大きな円、すなわち相対伸長量 = 20 に相当する。ただし、本実験では“妻ようじ”で花粉を置床したため、花粉管発芽が見られ

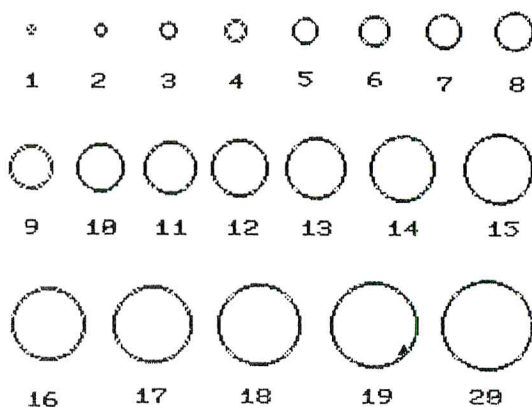


図 1 パソコンで作図した花粉管の相対伸長量の判定図。数字は相対伸長量の値。

相対伸長量 = 20 の円の直径がウエルの底部内径 (15.5 mm) にほぼ相当する。

なかった培地での未発芽花粉が占める面積は相対伸長量 = 3 に相当する。相対伸長量を判定した後、酢酸エタノール混液 (1 : 3) を滴下して固定し、風乾した後にコットンブルーで染色、1% 酢酸で分染して写真撮影に供した。

結 果 と 考 察

実験結果の 1 例を図 2 に示した。図 3 はその一部分

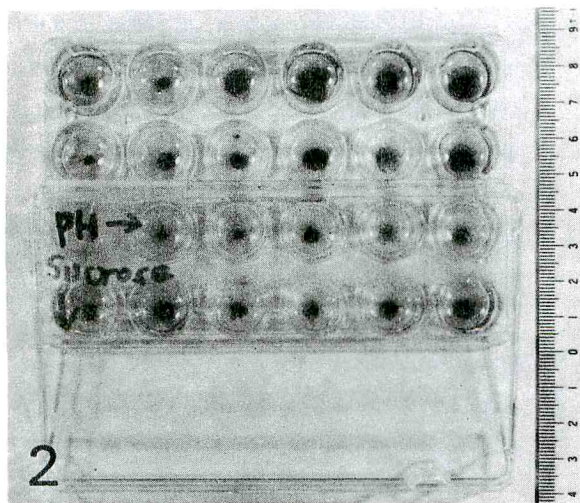


図 2 マルチウエルディッシュを用いたヤエチヨウセンアサガオ花粉の培養結果 (表 1 参照) の一例。本体の下半分の部分に蓋がかぶせてある。コットンブルー染色。

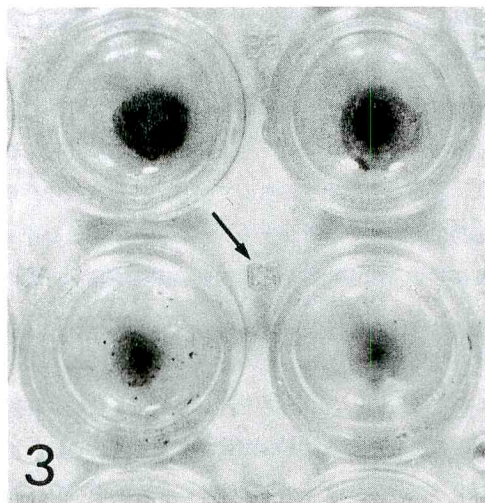


図 3 図 2 の一部分の拡大図。各ウエルには記号 (矢印) が刻印されている。

Sucrose (%)	pH					
	5.1	6.0	7.0	8.0	8.3	8.8
5	7.0	7.2	9.2	11.2	12.4	12.6
10	3.6	4.4	5.2	6.6	9.0	10.4
15	—	—	—	—	—	4.2
20	—	—	—	—	—	—

表1 ヤエチヨウセンアサガオの花粉管伸長におよぼす培地中のショ糖濃度およびpHの影響。花粉管の伸長量は相対伸長量(図1参照)で示し、4回の培養結果の平均値を示してある。—: 無発芽花粉(相対伸長量=3に相当)

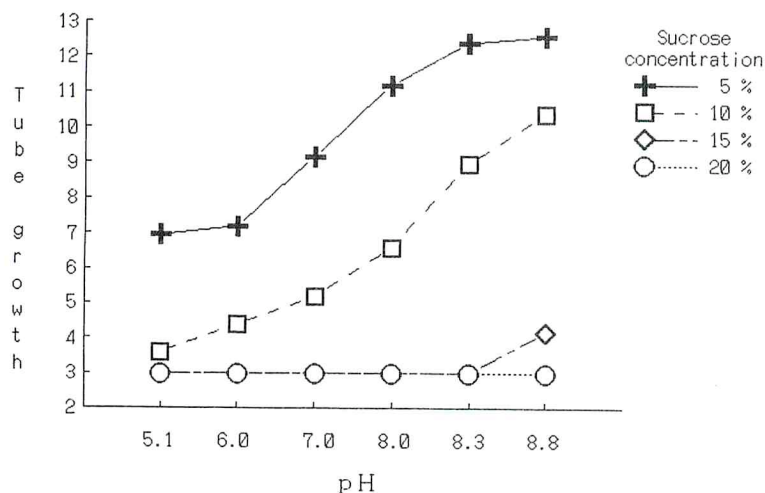


図4 表1をグラフ化したもの。
横軸: pH。縦軸: 相対伸長量。

を拡大したものである。また、実験を4回行って得た相対伸長量の平均値を表1に示した。表では分かりやすいように相対伸長量=3、すなわち花粉管の発芽がまったく見られなかったものを—で示してある。図4は表1をグラフ化したものである。表1と図4からチヨウセンアサガオの花粉管伸長に対する培地中のショ糖濃度とpHとの関係が明瞭に判定できる。

花粉管の培養にマルチウエルディッシュを用いた場合の最大の利点は省力化・省スペース化が計れる点である。特に、培地条件を変えて多数の試料を培養する場合には、①培地の作製に省力化が計れる点で極めて有効である。例えば、花粉管に対する阻害物質の影響を調べる場合には、最も濃い設定濃度の阻害物質を含む培地と、阻害物質を含まない培地とを用意してウェルの中で順次希釈すれば効率が良い。この時、培地の作製中に寒天が固まるのを防ぐため、マルチウエルディッシュをホットプレート上に置いて暖めておく。

②最高24試料を同一条件下で培養できる。また、直線状散布法に比べて、③多量のスライドガラスとそれらを入れる湿室も不用である。④花粉が少量で済み散布にも熟練を要しない。その他、⑤寒天培地、液体培地のいずれの培地でも使用が可能である。⑥倒立顕微鏡によって花粉管の伸長の様子を経時的に観察できる、などの利点がある。一方、本法の欠点は、①花粉管伸長量の測定精度が低くなる点にある。直線状散布法では花粉管が一定方向に伸長し、各々の花粉管が比較的直線状に伸長するため花粉管の伸長量を定量的に判定するのに適している。本法では花粉管が放射状に分布し、各々の花粉管は屈曲しながら伸長する傾向が強いいため、花粉管の伸長量を判定することは容易でない。そのため、ここでは一定の基準に従った相対伸長量(図1)を定めて花粉管の伸長量を測定した。②ウェルの底部直径が小さいため、相対伸長量が20を越えるような材料での花粉管の最大伸長量を測定できない。

このような場合には培養時間を定めて相対伸長量を測定せざるを得ない。③耐熱・耐薬性が弱い、などの欠点がある。ただし、60℃程度のホットプレートでは変形しないので寒天培地の作製には実用上問題はない。また、有機溶媒に対する耐薬性は弱い、酢酸では変性しないので酢酸アルコール固定などは可能である。

おわりに

以上のようにマルチウエルディッシュを用いた花粉管の培養は、いくつかの欠点もあるが、省力化を計れる点に最も大きな利点がある。実験結果の処理段階での省力化を計るため、今後ますますパソコンの導入が

進むと思われるが、その手始めとして図1および表1は「サイエンスグラフ（株式会社 ソフトサイエンス）」、図4は「オフィスグラフ（日本電気株式会社）」の各ソフトを用いて NEC 9801 シリーズ のパソコンで作図・作表を試みたものである。これらソフトは、作図や作表などの様式（フォーム）を記憶させておけば、実験データを入力するだけで実験結果の処理が簡単に出来るため、特にルーチンワークでの有用性が高いと思われる。

材料を供与下された本学薬学部生薬学教室の布万里子助教授に感謝します。

引用文献

- (1) Tano, S. and Takahashi, H. : J. Biochem. **56**. 578-580 (1964).
- (2) Reynolds, T. L. and Raghavan, V. : Protoplasma **111**. 177-188 (1982).
- (3) Shivanna, K. R., Jaiswal, V. S. and Ram, H. Y. M. : Planta(Berl.) **117**. 173-177 (1974).
- (4) Tupý, J., Hrabětová, E. and Balatková, V. : Plant Sci. Let. **9**. 285-290 (1977).
- (5) Kamizyô, A. and Tanaka, N. : Cytologia **43**. 679-688 (1978).
- (6) Mascarenhas, J. P., Terena, B., Mascarenhas, A.F. and Rueckert, L. : *In Fertilization in Higher Plants*, Ed. Linskens, H. F., North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 137-143 (1974).
- (7) Iwanami, Y. : J. Yokohama City Univ, **113**. 1-137 (1959).
- (8) Berbakker, J.L. and Kwack, B. H. : Amer. J. Bot. **50**. 59-865 (1963).

(受理日 1987年10月31日)