

カンショの交配不和合性検定用に開発した簡易蛍光染色法

中西 建夫・小林 仁

(九州農業試験場)

当研究室では、カンショの交配組合せを決定する資料として、一年を通して多数の組合せの花粉発芽の調査を行っており、より簡便で高精度の検定法が望まれている。

現在利用しているラクティック・フェノール・コットンブルー染色法は、スライドガラス上の授粉しためしべに染色液を滴下し、押しつぶすだけで検鏡が可能で非常に簡便である。しかし、染色が不鮮明なため、検定に困難な場合がある。

近年、蛍光染色法が開発され、染色の鮮明さから、より明確な検定が行なえるようになってきた。しかし通常の蛍光染色法は授粉しためしべを、①1規定の NaOH 液で約2時間軟化(室温)、②水洗、③染色液中に1時間以上染色、④スライドガラス上におき、グリセリンを2、3滴加え押しつぶす、の手順を必要とし、染色法としてはすぐれているが、多数材料の検定は実際上困難である。

このため、蛍光染色法の簡易化と改良を試みた。まず、通常の蛍光染色法ではプレパラートの液浸を1枚ごとに必要とするが、花粉発芽の検鏡には、乾燥コンデンサーの利用により、液浸をする必要のないことがわかった。

蛍光染色法の染色液は通常アニリンブルー濃度 0.1% 液を使用するが、染色液の滴下、押しつぶし処理では染色が悪く検鏡ができない。そこで、アニリンブルー濃度を0.5~2%に高めたところ、染色効果が幾分上昇した。しかし、完全に染色するにはプレパラート作成後、3~5日が必要で、その間に染色液が乾燥したり、蛍光発色が退色する。

乾燥防止のため、染色液に10~20%量のグリセリンを加えると、退色の防止にも効果がある。

蛍光染色をよくするために、NaOH を用いて組織を軟化した。組織軟化法として、染色液に直接 NaOH を加

える方法と、めしべを一たん NaOH 液に浸し染色する方法で行なった。

この結果、2法とも染色効果が上昇した。特にめしべを一たん NaOH 液に浸漬する方法が染色がよく実用性が高い。この場合、アニリンブルー濃度は0.1%から2%まで余り差はなかったが、0.5%前後が適当と思われた。NaOH 液は高濃度が軟化にはよいが、実用上は1規定液で十分である。

蛍光染色液は、酸性側で青く発色する傾向があり、NaOH を含まない場合は、押しつぶされためしべの滲出液で徐々に青色発色に変化する。NaOH はこの防止にも効果があり、染色液中のグリセリンの効果と相まって、プレパラート作成後3ヵ月を経ても蛍光発色は十分で、コットンブルー染色法よりも、検鏡可能期間の長いことが判明した。

以上、蛍光染色法の簡易化について行なった2、3の実験結果を述べたが、本研究によって開発した簡易蛍光染色法の手順を示せば、次のとおりである。授粉しためしべを採取後、

- 1) 1規定の NaOH 液に数秒浸漬する。
- 2) プレパラート上におき、染色液を滴下する。
- 3) カバーガラスをのせ、指先で押しつぶす。
- 4) 染色処理の翌日から3ヵ月に乾燥コンデンサー使用の蛍光顕微鏡で検鏡する。

なお、染色液100mlを作成するには次の要領で行なう。

- 1) 無蛍光グリセリン10mlに水90mlを加える。
- 2) 燐酸3カリウム710mgを加えかくはんする。
- 3) アニリンブルー500mgを加えかくはんする。

染色液は冷暗所で保存すれば、1年近く貯蔵が可能であるが、染色力が低下した時点で更新を行なうとよい。

使用するスライドガラスは、蛍光顕微鏡用を必ずしも用いる必要はなく、実用上、ミクロスライドガラスで十分である。