

コルヒチン処理によるカボス4倍体の作出

上曾山茂・佐保 学・國武久登¹⁾ (大分県農業技術センター ¹⁾九州東海大学農学部)

Shigeru KAMISOYAMA, Manabu SAHO and Hisato KUNITAKE:

Production of Tetraploid Kabosu (*Citrus sphaerocarpa Hort ex Tanaka*) Using Colchicine Treatment

香酸カンキツであるカボスは、そのほとんどが大分県内で栽培されている。カボスは多数の種子を有することから、数種の無核の枝変わり系統が選抜されているが、これらは貯蔵性や品質の面で劣るため、濃緑で貯蔵性の優れた‘豊のミドリ’由来の無核系品種の作出が求められている。そこで、交配親となる‘豊のミドリ’4倍体の作出およびその倍数性検定の手法としてフローサイトメトリーの有効性を検討した。

1. 材料および方法

貯蔵中の‘豊のミドリ’果実中の種子から無菌的に胚を分離抽出した。濾過滅菌したコルヒチン溶液 (0.2% Colchicine, 2% DMSO) で、胚を24時間および48時間浸漬処理後、滅菌水で2回洗浄し、MT培地 (Sucrose 30g/l, Malt Extract 400mg/l, Adenine 40mg/l, Gellan Gum 2.0g/l, pH5.8) に置床して得た植物体を順化鉢上げし、その展開葉をサンプルとした。

また、同様に貯蔵中の‘豊のミドリ’の胚を上記方法で分離抽出後、培養容器中の幼植物体の展開葉をサンプルとして、順化鉢上げした植物体との間で、検定結果に差異が生じるかを検定した。

倍数性の検定は、フローサイトメトリーシステム (EPICS-XL, BECKMAN COULTER) を用いた。サンプル (約1cm²) を、1mlのChopping Buffer (1.0% Triton X-100, 140mM 2-Mercapto Ethanol, 50mM Na₂SO₃, 50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.025mg/ml Propidium Iodide, 以下バッファー) 中でカミソリ刃を用いて細断することにより核を単離した。さらに1mlのバッファーを加え、濾過 (MIRACLOTH, CALBIOCHEM) した後、遠心分離して上清を除去、0.55mlのバッファーでペレットを再懸濁、0.05mlのPI溶液 (0.5mg/ml Propidium Iodide) を加えて、検定に供した。検定では10,000個の核の蛍光強度を測定した。

なお、対照として既知の2倍体および4倍体のカボス展開葉を用いた。

2. 結果および考察

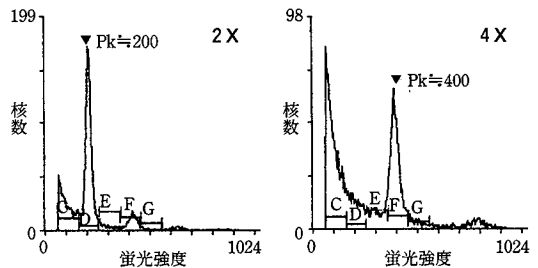
既知の2および4倍体を検定したところ、2倍体の蛍光強度の2倍の値に当たる位置に4倍体のピークが確認され、フローサイトメトリーシステムがカボスの倍数性検定に有効であることが明らかとなった (第1図)。

次に、コルヒチン処理を行ったサンプルを検定し、24時間処理区では55サンプル中、2倍体が20個体 (36.4%)、4倍体が25個体 (45.5%)、2倍体+4倍体のキメラが5個体 (9.1%) 得られた。また、48時間処理

区では37サンプル中、2倍体が17個体 (45.9%)、4倍体が8個体 (21.6%)、2倍体+4倍体のキメラが10個体 (27.0%) 得られた (第1表)。

このことから、カボスの4倍体作出にコルヒチン処理は有効で、またその発生率も高いことが明らかとなり、処理時間は4倍体およびキメラ発生率から24時間処理が優れていた。

また、培養容器中の幼植物体と順化鉢上げ後の植物体との間で、検定結果に差がないことから、より早期に倍数性個体の選別が可能であることが明らかとなった。



第1図 2倍体と4倍体の蛍光強度の違い

第1表 処理時間と倍数性個体出現率

処理時間 (個体)	検定数	倍数性検定結果									
		2x		3x		4x		2x+4x ^{a)}		ND ^{b)}	
		数	%	数	%	数	%	数	%		
24	55	20	36.4	1	1.8	25	45.5	5	9.1	4	7.3
48	37	17	45.9	0	0.0	8	21.6	10	27.0	2	5.4

注) a) 2x + 4x は2倍体と4倍体のキメラを示す

b) ND: 検定不能