

速報

トチュウ種子へのコルヒチン処理による倍数体の作出^{*1}中堂蘭陽子^{*2}・中澤慶久^{*2}・玉泉幸一郎^{*3}

キーワード：トチュウ, 倍数体, コルヒチン

I. はじめに

人工ゴムの工業原料としては石油や石炭などが使われている。しかし、これらの化石燃料は将来の枯渇が心配され、それに替わるものとして植物の産生するゴム成分が注目されている。

トチュウは中国中西部原産の1科1属1種の落葉性高木で、温帯域に生育し、樹皮等に繊維状のトランス型のイソプレングムを含有する植物である(1)。また、薬用として古くから服用され、樹皮や葉は生薬または飲用として利用されている(4)。

一般的に、倍数体は二倍体と比較して、細胞や器官の大型化、含有成分の増減、各種抵抗性の強化などの特性が認められる(2)。したがってトチュウにおいても倍加処理によってゴム成分が変化することが期待される。そこで本研究ではトチュウの人為四倍体を得ることを目的とした。

II. 材料と方法

1. 供試材料及び倍加処理

中国四川省成都市において2002年に採取された種子を用いた。種子は3%次亜塩素酸ナトリウムで20分滅菌した後、滅菌水で十分水洗し、ろ紙を敷いた9cmシャーレに無菌的に播種した。ろ紙には0.20 μ m ディスポーザルメンブレンフィルターでろ過滅菌した0.01%及び0.05%濃度コルヒチン溶液を10mlずつ染み込ませた。コルヒチンの処理時間は24時間、48時間及び72時間の3水準とし、それぞれの処理に100粒ずつ供試した。シャーレは温度25 $^{\circ}$ C、明期16時間/日、PPFD50 μ molm⁻²s⁻¹の条件下で培養した。

コルヒチン処理後、種子は滅菌水でよく洗浄し、MS培地(3)(シヨ糖20g, ゲルライト2.4g/l)20mlを分注したシャーレに植え替えた。さらに、発芽した種子はMS培地10mlを含む試験管に植え替え、同条件下で培養した。対照としてコルヒチン無処理の種子を50粒供試し同様に培養を行った。

2. フローサイトメトリー (FCM) による倍数性判定

播種40日目に発芽個体の本葉約0.7cm²を供試し、各個体の倍

数性をフローサイトメトリーにより判定した。抽出用バッファー(High Resolution DNA KitA, Partec)中で材料をカミソリで細断して核を単離させ、得られた抽出液をろ過した。そのろ液にDAPIを含む染色用バッファー(High Resolution DNA KitB, Partec)を4倍量加え核を染色した。5分後にフローサイトメーター(PA Ploidy Analyzer Partec)を用いて倍数性を判定した。その際、対照区の供試材料とコルヒチン処理の供試材料を混合し同時に測定する内部標準法を用いた。

3. キメラ判定

倍数性細胞が認められた個体について、さらに、対象個体だけをFCMにより分析した。この際、4 \times のみにピークの見られた個体を四倍体と推定し、2 \times と4 \times にピークのみみられたものをキメラとした。ただし、苗木のサイズが小さく試料の採取が難しかったのでキメラの判定は一部の個体についてのみ実施した。

4. 苗高

コルヒチン処理による倍数化の指標を得る目的で、播種後40日目の苗高を測定した。

III. 結果と考察

1. 倍数性細胞を有する個体の出現頻度

各処理とも100粒ずつを供試したが、処理時間が長いほど、また処理濃度が高いほど発育が悪く、FCMの分析に供試した材料は少なくなった(表-1)。FCMの分析結果を図-1に示した。対照区のヒストグラムでは2 \times のピークが1つであるのに対し、コルヒチン処理区では2 \times 及び2 \times と4 \times の2通りのピークが認められた。その出現頻度は8%から50%であり、特にコルヒチン濃度0.05%処理時間48時間の処理区において、50%と高い出現頻度が得られた(表-1)。出現率は処理時間が長く、処理濃度が高いほど高くなる傾向が認められた。

2. キメラ判定

図-2に示すように2 \times 及び4 \times の2つのピークを示す個体と4 \times のみのピークを示す個体の2種類が得られた。前者はキメラ、後者は四倍体であると推察された。

^{*1} Nakadozono, Y., Nakazawa, Y. and Gyokusen, K. : Induction of polyploid from seed of *Eucommia ulmoides* Oliver through colchicine treatment

^{*2} 日立造船株式会社 Hitachi Zosen Corp., Hiroshima 722-2393

^{*3} 九州大学大学院農学研究院 Fac. Agric., Grad. Sch., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

表-1. コルヒチンの濃度, 処理時間が倍数性細胞の出現に及ぼす影響

コルヒチン濃度 (%)	処理時間 (h)	測定個体数 (個体)	倍数性細胞が認められた個体	
			個体数 (個体)	割合 (%)
0.01	24	55	5	9
	48	48	4	8
	72	27	6	22.2
0.05	24	18	3	17
	48	18	9	50
	72	7	2	28.6

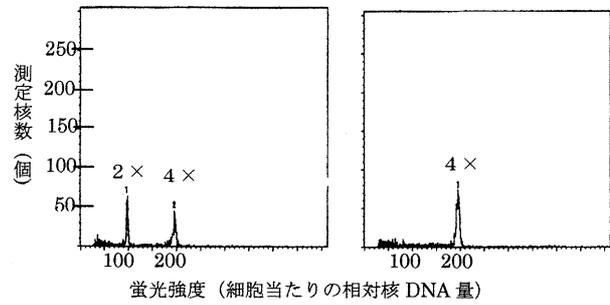


図-2. フローサイトメトリーによるキメラ判定の測定例
左図: キメラ個体, 右図: 四倍体

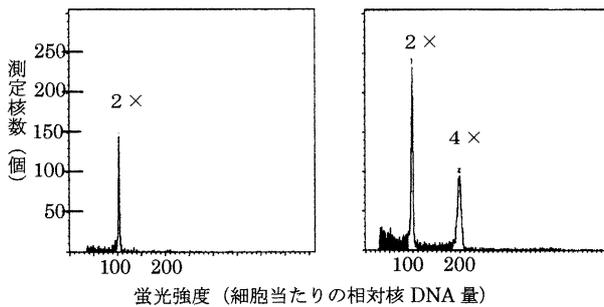


図-1. フローサイトメトリーによるヒストグラム
左図: 対照区, 右図: 対照区及び処理区

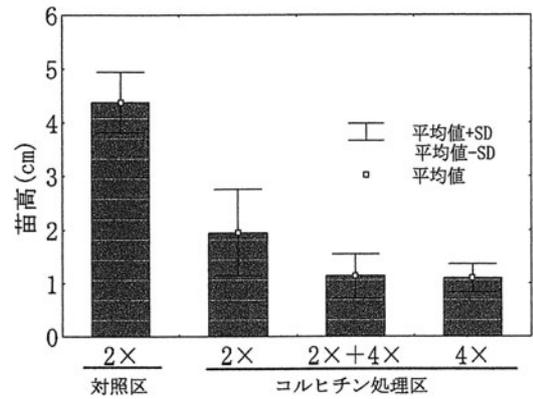


図-3. 処理別及び倍数性別による播種後40日目の苗高

対象13個体をFCM分析した結果, 11本のキメラ個体及び2本の四倍体と推察される個体が得られた。これらの四倍体と推察される個体はコルヒチン濃度0.05%48時間及び72時間処理によって得られた。

3. 成長量

対照区に比べコルヒチン処理区の個体は全て成長が悪かった(図-3)。対照区の苗高の平均が4.4cmであったのに対し, コルヒチン処理をした二倍体の苗高平均は1.9cm, 四倍体と推定される個体は1.1cmであった。しかし, コルヒチン処理したものでは二倍体と四倍体と推察される個体の間に有意な差は認められなかった。これは, コルヒチン処理が倍数化とは関係なく成長に影響した結果等が考えられる。このことから, 苗高はコルヒチン処理による倍数化の指標とはなりにくいと判断される。

IV. まとめ

トチュウ種子にコルヒチン処理をすることによって四倍体と推察される個体及び四倍体と二倍体のキメラ個体を得た。しかし, 今回の実験は *in vitro* で行っており, これらの苗が完全に倍数化しているかどうかは, さらに野外栽培によって確認する必要がある。

本研究は, 新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) の委託研究プログラム「植物利用エネルギー使用合理化工業原料生産技術開発」のもとで遂行したものである。

引用文献

- (1) 馬場健史ほか (2002) バイオサイエンスとインダストリー 60 (7) : 30-33.
- (2) 小林仁 (1987) 第2次増訂改版 農学大辞典, 養賢堂, 東京, 1194-1198.
- (3) Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15 : 473 - 497.
- (4) 中澤慶久ほか (1990) 日林九支研論 43 : 67-68.
(2003年10月31日 受付; 2003年12月22日 受理)