

## コルヒチンによる培養個体の倍数体の作出法

### 第1報 桑実生培養における染色体の変異

伊藤 聡子・鈴木 真雄\*

(山形県蚕業試験場・\*山形県繭検定所)

Induction of Polyploids on Cultivated Plants in vitro Using Colchichine

#### 1. Variation of somatic chromosome number on seedling culture of mulberry

Toshiko ITO and Masao SUZUKI\*

(Yamagata Sericultural Experiment Station・\*Yamagata Cocoon Testing Station)

#### 1 はじめに

現在、桑の組織培養に関しては、桑苗生産への応用として大量増殖法や馴化法が検討されているほか、冷凍保存技術による遺伝資源の保存、葯培養あるいは遺伝子導入等の育種関連の研究が行われている。また、試験管内における倍数体の作出法についての研究が桑についても二、三発表され、育種への応用が期待されている。

本県では、組織培養の手法を利用した桑苗生産について主に試験を進めているが、今回、倍数体の作出法として、桑種子をコルヒチン添加培地で培養し、培養個体の生育と染色体の変異について検討したので報告する。

本研究において、供試した交雑種子の提供にご協力、ご助言をいただいた福島県蚕業試験場小山朗夫主任研究員(現東北農試畑地利用部主任研究官)、藤田智博研究員に厚く御礼申し上げます。

#### 2 試験方法

(1) 供試種子 剣持の自然交雑種子  
ときゆたか×ゆきしのぎ の人為交雑種子  
剣持×はやてさかり の人為交雑種子

##### (2) 種子の滅菌方法

ガーゼに種子を包み、最初に中性洗剤で洗浄後、流水中に一昼夜おき、70%アルコールに10秒、2%次亜塩素酸ナトリウムに30分浸漬し、クリーンベンチ内で滅菌水で3回洗浄した後、供試した。

(3) 供試培地 ①濾過滅菌したコルヒチンとショ糖3%を添加したMS寒天培地

②継代用としてBA 1 mg/l, ショ糖3%を添加した1/2 MS寒天培地

##### (4) 試験区

培地中のコルヒチン濃度 0.025, 0.05, 0.1%

コルヒチン培地置床日数 15日, 30日

##### (5) 培養条件

照度 2,000lx, 16時間照明, 温度26±2℃

#### 3 試験結果及び考察

(1) コルヒチン培地における発芽と生育

コルヒチン培地置床後の発芽率は、コルヒチン添加培地から継代培地に移植する時点で調査し、表1に示した。発芽率は12~74%でおおむねコルヒチン濃度が高くなるほど低下する傾向にあったが、分散分析の結果では、ときゆたか×ゆきしのぎの交雑種子のみに危険率5%水準で有意差が認められた。このことは、コルヒチン濃度に対する各交雑種子の感受性が異なり、高濃度に耐えられるか否かの差異があるためと考えられる。15日置床と30日置床については、いずれの交雑種子においても有意差は認められなかった。今回の試験では、15日と30日の2段階の置床日数であったが、15日未満の短期間あるいは30日以上の特長期間の比較によっては置床日数に対しても各交雑種子の感受性が現われる可能性もあると考えられ、今後の検討が必要である。

発芽からシュートの形成にいたるまでの状況は、コルヒチン培地置床後5~10日の間に子葉が展開したが、継代培地に移植する時点では子葉のほとんどが褐変化した。継代培地への移植は褐変化にかかわらず、子葉が展開した個体すべてを移植した。移植後、継代培地上でシュートを形成した個体は少なくほとんどが枯死した。しかし、本試験においてシュートの発生がみられた個体は、褐色となった後枯死したかのように見えながら、子葉周囲に褐色のカルスが形成され、そのまま培養を続けたところ、継代培地移植後30~60日の間に緑色の芽状のものが発生し、それらが伸長し、シュート形成へという経過をたどった。

押金ら<sup>1)</sup>は、コルヒチン添加培地を用いて、ログワ系品種フィカスの4倍体の自然交雑種子を液体培地と寒天培地で培養しているが、寒天培養による処理種子では発芽が悪く、その肥厚芽生は置床後15日頃ほとんどが枯死したと述べている。これは筆者らの実験においても同様の結果であった。本試験における芽状のものが褐変化した子葉から形成されたものか、カルス由来のものなのかについては確認していない。

シュートの生育状況は、継代培地移植後82日目(コルヒチン培地置床日数を含む。)にシュート形成数、97日目(コルヒチン培地置床日数を含む。)にシュート長を調査し、表1に示した。シュートの形成がみられた試験区におけるシュート形成率は、1~11%とコルヒチン無添加の22%に比べると低く、置床日数でみると30日置床に比べると

15日置床の方がシュート形成数が多い傾向にあった。シュート長は、コルヒチン無添加区の63mmに対しコルヒチン添加区は5~24mmと低い値であった。これは、コルヒチン無添加の場合は発芽後すぐにシュートが生育していったのに対し、コルヒチン添加区では前述した経過をたどり、シュートの伸長開始が遅れたためと考えられる。また、コルヒチン添加区のシュートでは、葉が褐変もしくは縮れた状態の奇形葉がみられたほか、コルヒチン無添加区の葉と比べやや肥大しているものがあった。

表1 コルヒチン培地上における桑実生(交雑種子)発芽率と生育

	コルヒチン置床日数	コルヒチン濃度(%)	供試数	発芽率(%)	シュート形成数	シュート長(mm)	157日残存数
剣持の自然交雑	15日	0.025	140	36	7	6	7
		0.05	180	32	8	12	8
		0.1	200	28	8	—	8
	30日	0.025	180	21	0	—	0
		0.05	160	38	0	—	0
		0.1	180	32	0	—	0
剣持×はやりて	15日	0.025	180	61	19	13	21
		0.05	160	43	5	—	5
		0.1	200	46	2	5	2
	30日	0.025	140	74	1	15	2
		0.05	160	69	0	—	0
		0.1	180	61	0	—	0
0日	0	100	100	22	63	22	
ゆとたか×しゆき	15日	0.025	180	33	2	24	2
		0.05	200	31	4	—	4
		0.1	200	13	0	—	0
	30日	0.025	120	33	1	17	1
		0.05	200	23	1	—	1
		0.1	60	12	0	—	0

(2) 継代培養後の染色体の変異

97日目後に、継代培養したシュート59個体中25個体についてシュート先端の未展開葉部を採取し、ホルゲン押しつぶし法により標本を作製し、染色体の観察を行った。その結果は表2並びに図1に示したが、剣持の自然交雑種子・0.025%・15日置床区の1個体、剣持×はやりて・0.025%・15日置床区の5個体に染色体数が倍加した細胞が認められた。図1は、剣持の自然交雑種子・0.025%・15日置床区の鏡検写真であるが、染色体数56本と巨大染色体があり、染色体が倍加したものと考えられる。これらの試験区における供試種子数に対する倍加個体数の割合(倍加率)は、剣持の自然交雑種子・0.025%・15日置床区で0.7%、剣持×はやりて・0.025%・15日置床区で2.8%であった。

以上のことから、コルヒチンを添加した培地で培養を行って倍数体を得ることが可能であると考えられる。今後発芽後の生存率と倍加率を高めるコルヒチン濃度と置床日数の

表2 コルヒチン処理による染色体の変異

	置床日数	濃度(%)	調査数	倍加個体数	倍加率
剣持の自然交雑	15日	0.025	2	1	0.7
		0.05	8	0	0
		0.1	—	—	—
	30日	0.025	—	—	—
		0.05	—	—	—
		0.1	—	—	—
剣持×はやりて	15日	0.025	5	5	2.8
		0.05	1	0	0
		0.1	0	—	—
	30日	0.025	1	0	0
		0.05	1	0	0
		0.1	—	—	—
ゆとたか×しゆき	15日	0.025	2	0	0
		0.05	4	0	0
		0.1	—	—	—
	30日	0.025	1	0	0
		0.05	1	0	0
		0.1	—	—	—

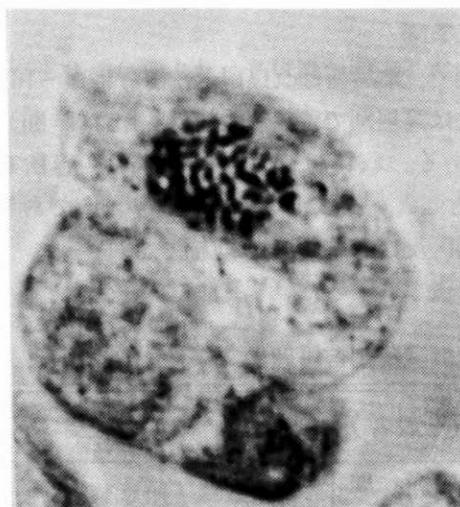


図1 剣持の自然交雑種子・コルヒチン0.025%添加・15日置床区の染色体×1,000倍

検討並びに継代中に発生したシュートがカルス由来のものか否かの確認が必要と考えられる。

4 ま と め

組織培養の手法を利用した倍数体の作出法について検討し、コルヒチン0.025%添加・MS培地で15日間培養した剣持の自然交雑種子で1個体、剣持×はやりての人為交雑種子で5個体に倍加した細胞が認められた。

引 用 文 献

1) 押金健吾, 池田佳子. 1990. 培養クワ種子におけるコルヒチン処理効果. 日蚕中部支部講演集 46: p. 48.