

桑培養シュートに対するコルヒチン処理の染色体倍加効果

小山 朗 夫

(東北農業試験場)

Effect of Colchicine-treatment on Chromosome Doubling in Mulberry Shoot Cultured in vitro

Akio KOYAMA

(Tohoku National Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

桑の倍数性育種に関する研究は古くから行われており、「しんけんもち」をはじめとするいくつかの3倍性桑品種が育成されている。人為育成3倍性品種に共通した特長として多収性があげられるが、今後さらに耐病性、耐倒伏性なども具備した3倍性品種の育成を進めるためには、新たな倍数性中間母本の作出が重要な課題であると考えられる。これまで桑の倍数性中間母本の育成は、専らコルヒチン処理によって行われてきた。さらに最近では培養技術を用いて、試験管内におけるコルヒチン処理法についても研究が行われており、種子または分離芽から倍加個体作出に成功した例も報告されている^{1, 3, 4)}。

ここでは倍数性中間母本作出をより効率化することをね

らって、試験管内で大量増殖された桑シュートに対するコルヒチン処理の染色体倍加効果について検討した。

2 試験方法

供試桑品種は萎縮病抵抗性とされ、しかも試験管内での増殖が容易な師走桑とした。夏季に野外で生育中の枝条から腋芽を採取し、常法により固形培地で培養してシュートを形成させ、その後数回継代して増殖を図った。植え継いだシュートが15~20mm程度に伸長した時点で、先端の未展開葉を含む頂芽部分とそれ以下の腋芽3芽を付けたシュート部分(葉は除去)に切り分けて試験に供した。試験区の設定は表1に示したとおりであるが、供試材料を頂芽部分とシュート部分の2種類に分けたため、合計48区となった。なお、1試験区につき9本の頂芽又はシュートを供試した。

表1 試験区の設定

処理方法 コルヒチン濃度	液体培地処理 ¹⁾				固形培地処理 ²⁾	
	前培養 ³⁾ なし		前培養あり		前培養なし	
	24hr処理	48hr処理	24hr処理	48hr処理	24hr処理	48hr処理
0 %	○	○	○	○	○	○
0.025%	○	○	○	○	—	—
0.05 %	○	○	○	○	○	○
0.1 %	○	○	○	○	○	○
0.2 %	—	—	—	—	○	○

- 注. 1) 液体培地処理: 所定濃度のコルヒチンを含む Murashige & Skoog 基本培地(MS) + ベンジルアデニン(BA) 0.2mg/ℓ + ショ糖 3% の液体培地を100ml三角フラスコに30ml入れ、25°C, 暗, 120rpmで振とう培養した。
 2) 固形培地処理: 所定濃度のコルヒチンを含むMS+BA 1 mg/ℓ + ショ糖 3% + ゲルライト0.2%の培地30mlを径90mmのプラスチックシャーレ内で固化させ、25°C, 暗で培養した。
 3) 前 培 養: 切り分けた材料をコルヒチン処理前にMS+BA0.1mg/ℓ + ショ糖 3% の液体培地を用い、25°C, 暗, 120rpmで48hr振とう培養した。

処理終了後は滅菌水で3回洗浄し、再び常法により培養して、生育状況の観察を行った。その後30~40日の間隔で別の培地に植え継いだ。3回継代した時点で、形態的に倍加の可能性があるかと判断されたものは、茎頂の未展開葉を採取し、酢酸オルセイン染色押しつぶし法により染色体数を調査した。倍加が確認されたシュートはさらに増殖してから鉢上げを行い、外部形態などについて観察した。

3 試験結果及び考察

液体培地を用いてコルヒチン処理を行った場合には、頂

芽部分及びシュート部分ともに比較的良好に新たなシュートが形成され、生育状況の試験区間の差は判然としなかった。固形培地による処理ではコルヒチン濃度が高くなるにしたがって、生育が阻害される傾向がみられた。また、48時間処理では24時間処理と比較して生育が劣った。すなわち、固形培地では液体培地よりコルヒチンの影響が強く発現することが認められた。この原因については今回の試験の範囲では明らかにできないが、種子を材料とした場合でも同様な傾向が見られたことが報告されている³⁾。

完全倍加した個体を得るためには、多くの場合コルヒチ

ン処理後に切り戻しを行い、キメラ構造を解消する操作を必要とする。ポット植えの株などにコルヒチン処理を行った際には、不着葉帯あるいは奇形葉などを基準に、適切な切り戻し部位を特定することが比較的容易である。ところが、培養条件下ではいずれの試験区においても不着葉帯は観察されず、葉の肥厚、奇形化などはみられたが、培地に添加しているサイトカイニン系植物ホルモン（ベンジルアデニン）の影響によっても同様な形態異常がおきるため、倍加部位の特定は不可能であった。

継代後はサイトカイニンフリーの培地を用いたが、試験管内では品種固有の形態を呈することが少ないため、葉の厚さ、色などで倍加しているか否かを判定することはここでも困難であった。そこで、確実な根拠とはなり得ないが、葉の大きさのみを基準として選定した9個体について、染色体数の調査を行った。その結果、シュート部分にコルヒチン0.2%を含む固形培地で48時間処理した試験区で2倍体・4倍体の混数体が1個体認められただけで、他はすべて2倍体であった。この混数体は増殖して鉢上げを行い、5株の再生個体を得ることができた。これらの個体は無処理の師走桑と比較して葉は濃緑色で大型であり、葉幅は広

く、鋸歯が粗く、倍数体特有の形態を呈していた。そこで、再度染色体数の調査を行ったところ、5個体とも多数の4倍性細胞と少数の2倍性細胞が混在しており、混数性が維持されていることが確認された（写真1）。また、混数体の気孔の大きさは原品種と差が認められなかったことから、葉の表皮には2倍性細胞が分布していると判断された（表2）。桑では生長円錐鞘層の最も外側にある第1層から葉の表皮が分化し、しかも第1層の細胞はその内側にある第2層以下の細胞とは通常入れ替えがおきないことが明らかにされている²⁾。今回得られた混数体は、葉の表皮細胞は2倍性であると考えられ、4倍性細胞の数が2倍性細胞と比較してかなり多く、混数性が安定的に維持されていることなどから、生長円錐鞘層の第1層のみが2倍体で、それ以下の内層が4倍体の周縁キメラであると推定された。桑の配偶子は第2層から分化することが知られており²⁾、この混数体は当初の目的であった倍数性中間母本として利用できるものと考えられる。

今回の試験では多くの試験区を設定したにもかかわらず、混数体が1個体得られたのみであり、倍加の効率はかなり低かった。今後この方法を桑の倍数体育成技術として定着させるためには、さらに高い確率で倍加個体が得られるような方向に研究を進める必要があると考えられる。その際、倍加がおきている部位を簡易に特定する手法の開発がポイントになると思われる。

4 ま と め

培養条件下で増殖された桑シュートに対するコルヒチン処理の染色体倍加効果について検討した。倍加個体が得られる確率はかなり低かったが、シュート部分にコルヒチン0.2%を含む固形培地で48時間処理した試験区で2倍体・4倍体の混数体が1個体が得られた。この混数体は倍数性中間母本として利用できるものと考えられた。

引用文献

- 1) 伊藤 聡子, 鈴木 真雄. 1991. 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. 東北農業研究 44: 343-344.
- 2) 片桐 幸逸. 1985. ガンマ線照射によるクワの突然変異誘発に関する組織学的並びに育種学的研究. 蚕試報 29: 371-498.
- 3) 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: 48.
- 4) ———, 庄 東紅. 1990. クワの芽の分離培養におけるコルヒチン処理効果. 日蚕雑 59: 187-195.

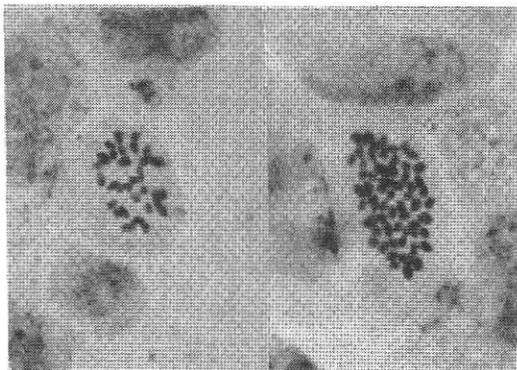


写真1 コルヒチン処理によって得られた混数体の茎頂末展開葉の染色体

左: 2倍性細胞 (2n=28), 右: 4倍性細胞 (2n=56)

表2 コルヒチン処理桑の気孔の大きさ

調査桑	気孔長径 (μm)
師走桑	19.7±2.4
師走桑コルヒチン処理混数体	20.3±2.7

注. ポット植えの株から完成葉を採取し、任意に選んだ40個の気孔の大きさを顕微鏡下で測定した平均値