



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物の細胞および組織培養に関する研究 : X I . 長期培養におけるニコチアナ属植物カルス染色体数変異の推移
Author(s)	新関, 稔; NIIZEKI, Minoru; 喜多, 富美冶 他
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 12(2), 77-82
Issue Date	1980-10-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/11940
Type	departmental bulletin paper
File Information	12(2)_p77-82.pdf



植物の細胞および組織培養に関する研究

XI. 長期培養におけるニコチアナ属植物カルスの 染色体数変異の推移

新 関 稔・喜多富美治

(北海道大学農学部附属農場)

(昭和55年2月8日受理)

Studies on Plant Cell and Tissue Culture

XI. Transition of chromosomal variation in calluses of *Nicotiana* species in a long term culture

Minoru NIIZEKI and Fumiji KITA

(Experimental Farm, Faculty of Agriculture,
Hokkaido University)

緒 言

植物のカルスあるいは細胞を長期に継代培養を重ねるにつれて細胞の染色体構成に変化を生じ倍数性や異数性細胞が広く出現してくることは多くの研究者によって報告されている^{1,13,15}。*Nicotiana tabacum* の半数性カルスに関する研究では1世代中の培養日数とともに染色体数変異が増大することも明らかにされている⁴。一方、SINGHら¹²は *Vicia hajastana* を液体振盪培養で1週間毎に継代培養を行うと、初期世代では倍数体や異数体の出現頻度が高く染色体数変異が大きい、約10カ月後には元の2倍性細胞にほとんど収斂してくることを報告している。

この研究は *Nicotiana tabacum* および *N. sylvestris* の2種を用い、3年間の継代培養を行った半数性および2倍性カルスがいかなる染色体構成を示すかを調査したので報告する。

材料および方法

Nicotiana tabacum ($2n=48$), var. Wisconsin 38 および *N. sylvestris* ($2n=24$) を NITSCH と NITSCH⁸ の基本培地に 0.1 mg/l の IAA (indole-3-acetic acid) とカイネチンを含む培地で薬培養を行い半数性幼植物を得た。また両種の2倍体種子を70%エタノールに15秒、次いで15%次亜塩素酸ナトリウムに15分殺菌処理を行い、無菌水で洗滌後寒天培地上で発芽させて幼植

物を得た。これ等両種の半数性、2倍性の2~3葉期の幼植物の胚軸を 2 mg/l の IAA とカイネチンを含む MILLER²⁾ の培地で脱分化させカルスを得ることが出来た。この実験では初期第2世代目と同上の脱分化培地で約1カ月毎に継代培養し、3年を経過したカルスの染色体変異について比較検討を行った。カルス細胞の染色体数の調査は前報で報告した方法に従った⁶⁾。

実験結果

N. tabacum の第2世代目における半数性カルスは $n=24$ および2倍性カルスでは $2n=48$ の染色体数を有する細胞がそれぞれ約70%存在し、比較的安定していることがわかった (Fig. 1)。しかし両カルスともに染色体数の倍加細胞あるいは異数性細胞も存在し、2倍性カルスでは $4n=96$ の細胞が20%近く、また150以上の染色体を有する高次倍数性細胞も観察された。一方、3年間継代培養を重ねた後の半数性カルスでは $2n=24$ および2倍性カルスでは $4n=96$ の細胞の出現頻度が高くともに60%近くを占め、両カルスの元の染色体数である n および $2n$ 細胞はともに20%以下に激減していた。従って半数性カルスでは n より $2n$ へ、また2倍性カルスでは $2n$ より $4n$ へ出現頻度のモードが移行したことになる。また300以上の染色体を有する高次倍数性細胞が両カルスともに10%以上も占めていた。

N. sylvestris では初期第2世代目から半数性および2倍性カルスともに染色体数の倍加現象が著しく、出現

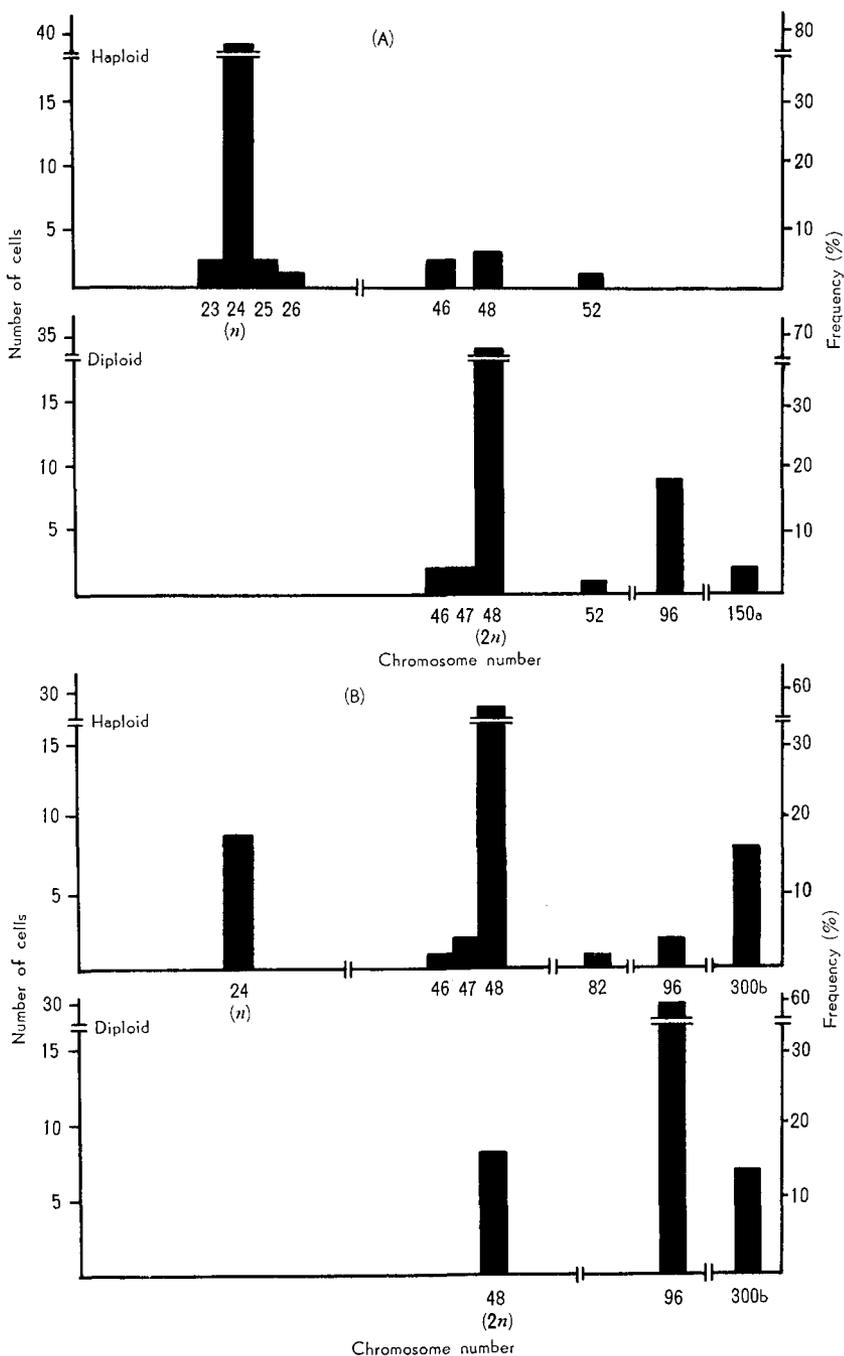


Fig. 1. Frequencies of the cell with various chromosome numbers in haploid and diploid calluses of *Nicotiana tabacum* ($2n=48$).
 (A), chromosome numbers of calluses at the first subculture.
 (B), chromosome numbers of calluses after three years.
 a, more than 150 chromosomes. b, more than 300 chromosomes.

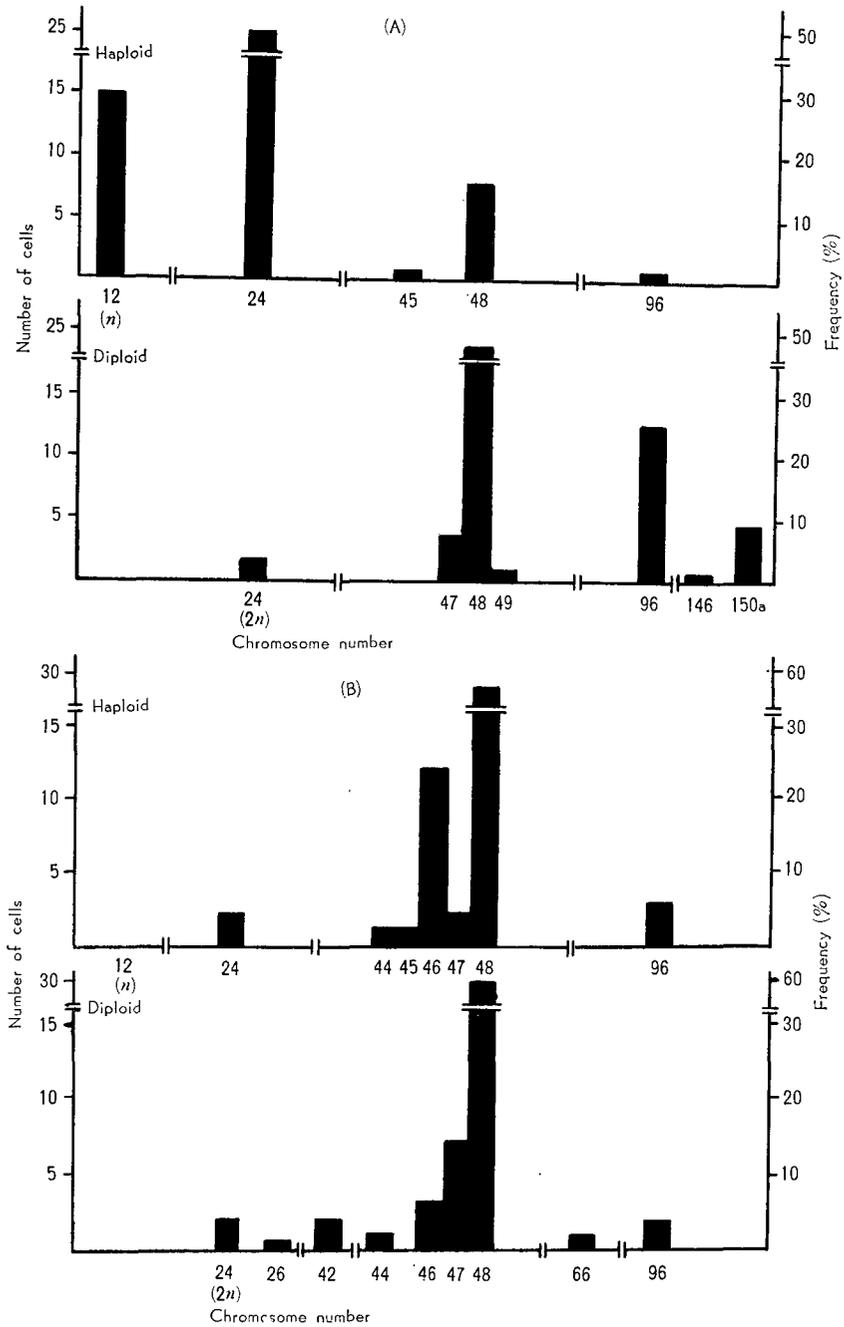


Fig. 2. Frequencies of the cells with various chromosome numbers in haploid and diploid calluses of *N. sylvestris* ($2n=24$).
 (A), chromosome numbers of calluses at the first subculture.
 (B), chromosome numbers of calluses after three years.
 a, more than 150 chromosomes.

頻度のモードは半数性カルスで $2n=24$ および2倍性カルスでは $4n=48$ の細胞であり、それぞれ50%近くを占め、2倍性カルスでは $8n=96$ および150以上の染色体を有する細胞の出現頻度もかなり高かった (Fig. 2)。このことは *N. sylvestris* の初期世代のカルス細胞の染色体数が非常に不安定であることを示すものである。しかし3年後のカルスでは半数性および2倍性カルスともに $4n=48$ の細胞の出現頻度が高く60%近くを占めていた。初期第2世代目の2倍性カルスでかなり出現していた $8n=96$ の細胞は減少し、また150以上の高次倍数性細胞は完全に消失していた。従って $4n=48$ の細胞をモードとして両カルスともに収斂して来ていると言える。しかし半数性カルスで染色体数46という異数性細胞がかなりの高頻度で出現したのは特異的であった。*N. glutinosa* の2倍性カルスにおいて、2つの染色体の接合により特定の異数性細胞が高頻度で出現した例⁶⁾を我々は観察しているが、今回の場合は核型の詳細な検討を行っていないので原因は不明である。

論 議

これまでの我々の研究によりタバコ属植物における培養カルスの細胞遺伝学的不安定性、特に染色体数の不安定性は、1、培地の条件特に植物生長調節物質の種類や組合せに左右されること³⁾、2、カルスの生長速度と関係があること⁴⁾、3、age すなわち培養日数と関係があること⁴⁾、4、種によって不安定性の程度が異なること^{5,7)}等を明らかにしてきた。小野⁹⁾が *Vicia faba* ($2n=12$) の根から誘導したカルスについて11世代にわたって調査した結果、世代が進むにつれて高次倍数体や異数体が増加することを報告している。今回の研究で *N. tabacum* は初期世代では出発材料の染色体数である程度安定しているが、3年間の継代培養後は倍加細胞すなわち半数性カルスでは $2n$ および2倍性カルスでは $4n$ 細胞の頻度が最も高く、それ以上の高次倍数体や異数体の出現もかなり見られるが、一方、*N. sylvestris* では初期世代で倍加や高次倍数化が起きやすいが、3年後には半数性および2倍性カルスともに $4n$ 細胞に収斂し、それ以下の低次倍数体あるいはそれ以上の高次倍数体はむしろ減少してくることが明らかとなった。このように継代培養を重ねるに従って変異が増大するばかりではなく、種によってはある特定の染色体数の細胞に安定してくるという事実は、前に述べた SINGH ら¹²⁾ の *Vicia hajastana* の結果と考え合せ、ある特定の倍数性細胞が分裂に適しており、そのために安定してくると思われる。

しかし詳細な原因説明は今後の研究に待たれる。

このように植物の培養カルスや液体振盪培養細胞は長期培養により染色体的に安定してくる場合もあるが、多くの場合培養系統内に多かれ少なかれ染色体的変異が生ずることが多くの種で認められていることは事実である。一方、初期世代より培養カルスや細胞の染色体の行動が非常に安定した植物もあることが数少ないが報告されている。例えば REINERT と KÜSTER¹⁰⁾ は *Crepis capillaris* で1年以上培養を続けても染色体的変異は認められなかったことを報告しているし、また SACRISTÁN¹¹⁾ は同種の半数性培養細胞において34.1% および2倍性培養細胞において78.5%の系統が1年以上出発材料の染色体数を維持していたと報告している。山辺と山田¹⁴⁾ は *Haworthia* 属植物のカルスについて研究を行い、14カ月の継代培養後、*H. stata* は若干の倍数性や異数性細胞が見られたが、*H. aristata* は全く染色体数変異を生じなかったと報告している。さらに *H. stata* は親植物の根端細胞にも染色体数変異が観察されることから、カルス細胞の安定性、不安定性は親植物に起因し *H. stata* のように親植物の不安定なものはカルス細胞も不安定なようであると結論している。

最後に、今回の実験あるいは多くの研究者の報告を総合してみると、植物の種類によって培養カルスあるいは液体振盪培養細胞の染色体行動が大きく異なるという事実は種々の研究に応用される時に注目されるべきである。特に生理学、遺伝学あるいは実際の植物育種等にカルスや培養細胞が利用される場合には上述の事実が十分考慮される必要があるものと思われる。

要 約

Nicotiana tabacum ($2n=48$) および *N. sylvestris* ($2n=24$) の半数性、2倍性カルスを2 mg/l の IAA とカイネチンを含む MILLER²⁾ の培地で約1カ月毎に継代培養を行い、第2世代目と3年経過後の染色体変異を比較検討した。

N. tabacum の第2世代目では半数性カルスで n および2倍性カルスで $2n$ 細胞の出現頻度が高く比較的稳定した状態であった。しかし3年継代培養後の半数性カルスでは $2n$ および2倍性カルスでは $4n$ 細胞の出現頻度が高く、両カルスともに長期培養により倍加細胞化し、染色体変異は増大し300以上の染色体を有する細胞もかなり出現した。一方、*N. sylvestris* では初期第2世代目で染色体数の倍加が著しく、半数性カルスでは $2n$, $4n$ および2倍性カルスでは $4n$, $8n$ 細胞の出現頻度が高か

った。しかし3年後のカルスでは半数性および2倍性カルスともに $4n$ 細胞の頻度が高く、これをモードとして両カルスともに収斂して来ていることが明らかとなった。従って継代培養を重ねた場合、種によって染色体数変異が拡大する場合と収斂する場合の双方が存在することが明らかとなった。

引用文献

- FOX, J. E.: Growth factor requirements and chromosome number in tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **16**: 793-802. 1963
- MILLER, C. O.: Kinetin and kinetin-like compounds, In *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Vol. 6. Edited by LINSKENS, H. F. and TRACEY, M. V., p. 192-202. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 1963
- NIIZEKI, M.: Studies on plant cell and tissue culture. II. Effect of different kinds of media on the variation of chromosome numbers in tobacco callus, *J. Fact. Agr. Hokkaido Univ.*, **57**: 179-191. 1973
- NIIZEKI, M.: Studies on plant cell and tissue culture. V. Effect of different kinds of media on the variation of chromosome number in tobacco callus and regenerated plant, *J. Fact. Agr. Hokkaido Univ.*, **57**: 357-367. 1974
- NIIZEKI, M.: Studies on plant cell and tissue culture. VI. Karyotypic changes in callus of haploid and diploid plants of *Nicotiana* species, *J. Fact. Agr. Hokkaido Univ.*, **58**: 214-224. 1975
- NIIZEKI, M.: Haploid, polyploid and aneuploid plants from cultured anthers and calluses in species of *Nicotiana* and forage crops, *J. Fact. Agr. Hokkaido Univ.*, **58**: 343-466. 1977
- NIIZEKI, M., KITA, F. and TAKAHASHI, M.: Environmental and genetical effect on the chromosomal variation in callus of *Nicotiana* species, *Japan. J. Breed.*, **28**: 304-310. 1978
- NITSCH, J. P. and NITSCH, C.: Haploid plants from pollen grains, *Science*, **163**: 85-87. 1969
- 小野 一: 染色体の変異, 新植物組織培養, 竹内正幸・中島哲夫・古谷力編集, p. 80-88, 朝倉書店, 1979
- REINERT, J. and KÜSTER, H. J.: Diploide, Chlorophyllhaltige Gewebekulturen aus Blättern von *Crepis capillaris* (L.) Wallr., *Z. Pflanzenphysiol.*, **54**: 213-222. 1966
- SACRISTÁN, M. D.: Karyotypic changes in callus from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr., *Chromosoma*, **33**: 273-283. 1971
- SINGH, B. D., HARVEY, B. L., KAO, K. N. and MILLER, R. A.: Selection pressure in cell populations of *Vicia hajastana* cultured in vitro, *Can. J. Genet. Cytol.*, **14**: 65-70. 1972
- TORREY, J. G.: Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **20**: 265-275. 1967
- 山辺仁子・山田卓三: 培養細胞の分化の研究, II. *Haworthia* のカルスおよび再分化個体の染色体, 染色体, **94**: 2923-2931. 1973
- YAZAWA, S.: Cytological and morphological observation on the callus tissue of *Crepis capillaris*, *Bot. Mag.*, Tokyo. **80**: 413-420. 1967

Summary

Haploid and diploid calluses of *Nicotiana tabacum* ($2n=48$) and *N. sylvestris* ($2n=24$) cultured on MILLER's basic medium supplemented 2 mg/l of IAA and kinetin were maintained for three years by transferring to fresh medium at intervals of about one month. Observation of chromosome numbers was carried out on the calluses at the first subculture and after long term cultures of three years.

In the calluses of *N. tabacum* of the first subculture, the cells with n and $2n$ chromosomes occurred in the highest frequency on haploid and diploid callus lines, respectively. The calluses cultured successively for three years, however, showed that the highest occurrences of cells were $2n$ and $4n$ chromosomes in haploid and diploid callus lines, respectively. Furthermore, wider chromosomal variations were observed in comparison with those of the first subculture and chromosome numbers exceeding 300 were counted in a considerable number of cells in both haploid and diploid callus lines. Therefore, it may be assumed that the high frequencies of chromosomal duplication in the cells of calluses are a conspicuous characteristic of this species in a long term culture. On the other hand, in *N. sylvestris* the multiplication of chromosome numbers occurred frequently and revealed wide chromosomal variations at the first subculture in both haploid and diploid callus

lines. However, the cells with $4n$ chromosomes were observed about 60% after three years and the lower and higher levels of polyploids than $4n$ were reduced in both haploid and diploid callus lines. Therefore, it is concluded that in *N. taba-*

cum the chromosomal variations are increased in a long term culture, while in *N. sylvestris* the chromosomal variations are reduced and led to the stable state at a certain chromosome number.