



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	植物の細胞および組織培養に関する研究 : VII. 葯培養法によるタバコのダイソーミック・ハプロイド (n+1) シリーズの育成
Author(s)	新関, 稔; NIIZEKI, Minoru; 喜多, 富美治 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 20, 16-22
Issue Date	1977-02-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13336
Type	departmental bulletin paper
File Information	20_p16-22.pdf



植物の細胞および組織培養に関する研究

Ⅶ. 薬培養法によるタバコのダイソーミック・

ハプロイド ($n+1$) シリーズの育成

新関 稔・喜多富美治

緒 言

高等植物の異数体は一般に2倍体や正倍数体とは異なることが多い。この現象を Bridges (1922) は遺伝子平衡説で説明している。この説では正常な2倍体では完全な植物としての発育や機能を与えられると推定し、また完全なゲノムの増加は遺伝子の平衡に影響を与えないか、あるいは与えたとしてもごく小さいとしている。一方一本あるいは数本の染色体が増加した場合には種によってはこの遺伝子平衡が大きく乱されるとしている。この不均衡は生理的・形態的そして発育的面に反映される。

しかしながらトリソーミック植物 ($2n+1$) はいかなる種においても正常2倍体と、あるいはトリソーミック個体がお互いに区別されるとは限らない。ある種のトリソーミック植物は正常2倍体とほとんど同程度に生育旺盛で稔性があり形態的にもお互いに区別されない場合が存在する。Khush (1973) はトリソーミック植物の形態に基いて次のように3群に分類した。

(1) 2倍体個体とそれぞれのトリソーミック個体が区別される。

(2) 2倍体個体とそれぞれのトリソーミック個体がほとんど区別されない。

(3) (1)と(2)が混在する。

(1)に属する種は一般に2倍体である。余剰染色体による遺伝子の不均衡は一般に異常な表現形、生育不良や稔性低下をひき起す。(2)に属するものは一般に多くの遺伝子を重複して持っている倍数体に起源する種である。1本の染色体の増加に

よって遺伝子の平衡が相対的にそれ程影響されず表現形、生育や稔性に大きな影響を与えない。タバコ (*Nicotiana tabacum*) は Clausen と Goodspeed (1924) によると3種のトリソーミック個体が2倍体と花器形態でわずかに異なる以外はほとんど区別されないとしている。その理由としてタバコは進化学的に *Nicotiana sylvestris* と *N. tomentosiformis* の異質倍数体であるためであろう (Gerstel 1960, Sheen 1972)。もしそうならば半数体レベルすなわち $n+1$ と n 植物で比較された時はどうなるであろうか。この研究はこの疑問を解明する目的で行われたものである。

実験材料および方法

Nicotiana tabacum (var. Wisconsin 38) のカルス培養からの再生によって4倍体 ($4n=96$) が得られた (Niizeki 1974)。この4倍体を薬培養することにより染色体数が43から49までの個体を得られた。これ等の個体をさらに薬培養することにより24, 25, 26の染色体数を有する個体やその倍加個体、染色体キメラ個体を得られた (Table 1)。従ってこれ等45~49の染色体数を有する個体はある染色体が他の相同染色体により置換された染色体置換型植物と推定された (Niizeki and Kita 1975)。また3倍体個体が4倍体と2倍体の交雑により得られた。得られた23 F_1 個体中5個体が3倍体で他は67から73の染色体数を示した。さらに3倍体と2倍体の交雑により54から63の染色体数を示す個体を得られ、これ等がまた薬培養に供された。これ等の薬培養によって得られたダイソーミック・ハプロイド ($n+1$) 個体を

Table 1. Chromosome numbers of progenies reinduced by anther culture of androgenetic progenies of tetraploid plants

Plant no.	chromosome number of parental plant	Number of androgenetic progenies													Total	
		24	25	26	45	46	47	Chromosome number			72	(24,48)	(25,50)	(26,52)		
I	45	66 (94.3)						2 (2.9)					2 (2.9)			70 (100)
II	45	1 (11.1)	3 (33.3)	3 (33.3)									1 (11.1)	1 (11.1)		9 (100)
III	46	1 (100)														1 (100)
IV	46	3 (42.9)	1 (14.3)	1 (14.3)		1 (14.3)				1 (14.3)						7 (100)
V	46	2 (11.1)	9 (50.0)			2 (11.1)		4 (22.2)					1 (5.6)			18 (100)
VI	46	60 (64.5)	32 (34.4)										1 (1.1)			93 (100)
VII	46	14 (38.9)	17 (47.2)		1 (2.8)	2 (5.6)		1 (2.8)	1 (2.8)							36 (100)
VIII	46		1 (50.0)	1 (50.0)												2 (100)
IX	47	27 (40.3)	28 (41.8)	1 (1.5)				4 (6.0)	6 (9.0)				1 (1.5)			67 (100)
X	47	24 (40.7)	26 (44.1)	2 (3.4)			2 (3.4)	1 (1.7)	2 (3.4)				1 (1.7)	1 (1.7)		59 (100)
XI	47	3 (100)														3 (100)
XII	47	5 (38.5)	8 (61.5)													13 (100)
XIII	48	42 (47.7)	41 (46.6)					1 (1.1)	1 (1.1)				2 (2.3)	1 (1.1)		88 (100)
XIV	48	3 (8.6)	29 (82.9)	2 (5.7)									1 (2.9)			35 (100)
XV	48	18 (25.7)	32 (45.7)	18 (25.7)				1 (1.4)							1 (1.4)	70 (100)
XVI	48	28 (35.9)	43 (55.1)	4 (5.1)				1 (1.3)	1 (1.3)				1 (1.3)			78 (100)
XVII	48	18 (28.6)	36 (57.1)	4 (6.3)				4 (6.3)	1 (1.6)							63 (100)
XVIII	48	2 (3.4)	50 (84.7)	2 (3.4)					2 (3.4)					3 (5.1)		59 (100)
XIX	49	3 (27.3)	5 (45.5)	3 (27.3)												11 (100)
XX	49	47 (52.8)	26 (29.2)	11 (12.4)				3 (3.4)	1 (1.1)				1 (1.1)			89 (100)

(24,48), (25,50) and (26,52) indicate chromosome chimera.

() indicates percentage.

収集し花器形態により 12 群に分類した。

薬培養に用いられた培地は 0.1–2.0mg/l の IAA と 0.1–2.0mg/l の カイネチン を含む Bourgin と Nitsch (1967) の基本培地である。全ての薬培養は光条件下で $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保たれた。

染色体数検定は根端細胞を用いカルノア液で 24 時間固定後 5% のペクチナーゼで 2 時間処理し塩酸カーミン (Snow 1963) で染色し検定に供した。

実験結果

グリーンハウスで育成されたタバコ植物の年間を通じての一般的観察によると栄養形質例えば草丈、葉数、葉形や葉の大きさは季節により非常に変異しやすいように見受けられた。さらに葉の大きさや形のような形質は同一季節でも茎の位置により異なるようであった。一般に茎の上部の未熟な葉は小さく葉巾が狭く下部の葉は大きく葉巾が広い傾向を持っていた。また葯培養によって得られた植物はそれぞれ試験管から鉢に移植する時期が異なるため同一生育時期の植物の栄養形質に関するデータを得ることは不可能であった。それ故異なる季節や条件下で栄養形質よりは安定していると考えられる花冠や萼の巾や長さあるいは花糸の長さのような花器の形質を形態分析に供した (Fig. 1)。しかし念のため半数体、2倍体およびダイソーミック・ハプロイドを用いて異なる季節すなわち冬期 (12月~1月) および春期 (4月~5月) でどの程度これ等形質が安定しているか試験した。その結果が Table 2 に示されている。それによると花冠長などは2季節間で変異を示さないが、その他の形質例えば萼や花柱の長さ、花冠巾あるいは花糸長等に有意な差が認められた。従ってこの結果は花器形態と云えども同一季節や条件下で調査されるべきであることを示唆している。従って4月から5月に開花したダイソーミック・ハプロイ

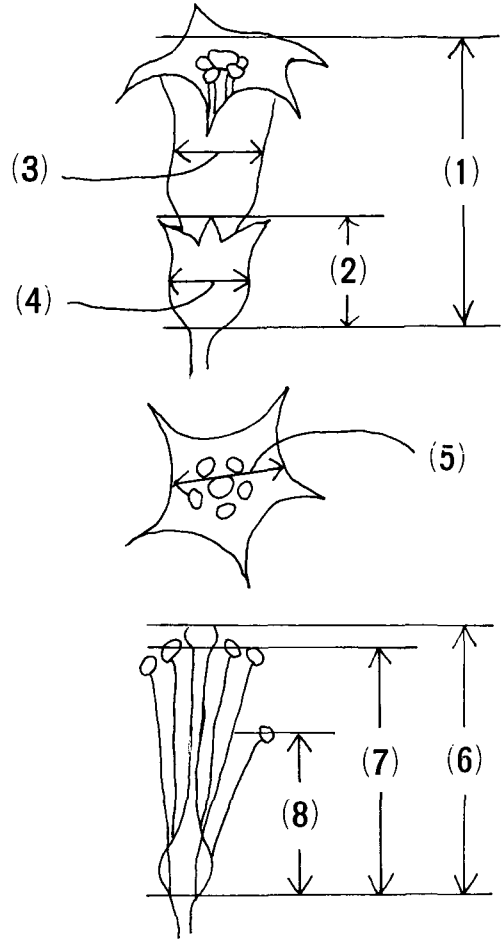


Fig. 1. Various parts of flower measured for morphological analysis.

(1) to (8) are corresponding to those in Table 2 and 3.

Table 2. Comparison of size in various parts of flower in different seasons

Material	Season	Character					
		(1) mm	(2) mm	(3) mm	(6) mm	(7) mm	(8) mm
2n	Dec. -Jan.	42.6	16.3	8.5*	39.9***	38.9	33.6
	Apr. -May	43.0	15.8	7.9	38.0	38.6	33.2
A(n+1)	Dec. -Jan.	46.9	19.6***	8.0***	45.5	38.4**	29.8**
	Apr. -May	48.2	17.0	7.2	46.3	41.3	32.6
E(n+1)	Dec. -Jan.	34.8	13.8***	7.1	31.7	24.0	19.9*
	Apr. -May	35.1	10.7	7.0	32.7	25.4	21.5
n	Dec. -Jan.	37.7	15.6*	7.4*	37.5	29.2	24.5
	Apr. -May	37.2	13.9	6.9	36.9	29.1	25.4

* ** and ***; exceeding significantly at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

(1), (2), (3), (6), (7) and (8) are corresponding to Fig. 1.

ド71個体について形質調査を実施した。その結果これ等71個体は12群に分類された (Fig. 2)。これ等全ての個体について5花を8形質の調査に供した。その結果がTable 3に示されている。全てのこれ等個体はある形質では有意な差異を示さないが他形質においてお互いに有意な差異を示した。例えば花冠長では有意な差異を示さないが萼長では有意な差異を示すという具合にである。ダイソーミック・ハプロイドのある個体すなわちタイプAおよびBは有意に花の大きさがハプロイドより大きく、特にタイプAは正常の2倍体より大きかった。他のダイソーミック・ハプロイドは一般にハプロイドと同程度の大きさかあるいは小であった。タイプEの出現が高頻度であり71個体中41個体がこのタイプに属していた。71個体の全ての起源についてはTable 4に示してある。これによると71個体中51個体のダイソーミック・ハプロイドは4倍体の葯培養によって得られ染色体置換型と考えられる異数体や2倍体由来していた。これ等染色体置換型個体は多くのタイプE個

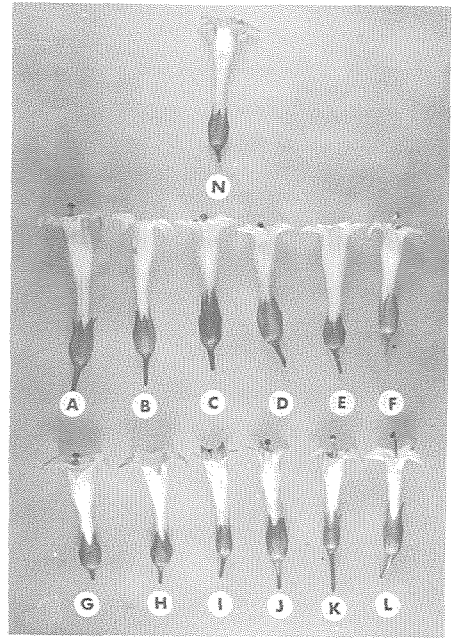


Fig. 2. Flowers of normal haploid and disomic haploid plants of *N. tabacum* (var. Wisconsin 38). N. A normal haploid plant. A~L. Disomic haploid plants.

Table 3. Disomic haploid ($n+1$) plants grouped into 12 types by comparison of size in various parts of flower

Type	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	Number of plant
	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	mm	
<i>n</i>	36.8 a	13.2 ef	7.0 b	7.0 bc	12.4cd	37.0bc	28.4 c	24.8 c	
A	48.2 b	16.6 ab	7.0 b	7.4 ab	13.0bc	45.4 a	41.2 a	32.4 a	8
B	42.6 c	16.0abc	6.8 b	7.0 bc	15.8 a	38.2 b	31.4 b	27.0 b	4
C	37.6cd	15.4bcd	7.0 b	7.0 bc	13.0bc	35.8cd	26.2 d	22.2de	3
D	36.4cd	17.2 a	6.6bc	7.8 a	12.4cd	36.0 c	27.0cd	24.0cd	1
E	36.0 d	11.2 gh	7.0 b	7.0 bc	12.8 c	33.2ef	26.0 d	22.4de	46
F	34.2 e	14.2 de	6.8 b	6.6 cd	12.0cd	35.8cd	24.0 e	20.4ef	1
G	34.0 e	11.8fgh	8.0 a	7.2abc	14.4ab	32.0 f	26.8cd	22.2de	1
H	34.0 e	10.8 h	7.0 b	6.0 de	12.4cd	29.8 g	23.8 e	21.2 e	1
I	34.0 e	11.2 gh	5.6de	5.6 ef	8.4 e	30.2 g	22.0 f	18.0gh	1
J	33.0ef	14.8 cd	6.0cd	6.0 de	9.4 e	34.2de	19.2 h	16.6 h	1
K	33.2 f	12.4 fg	6.0cd	5.2 f	9.4 e	32.2 f	21.0fg	18.8fg	1
L	31.8 f	16.2abc	5.0 e	7.0 bc	11.0 d	32.0 f	20.0gh	17.4gh	3
Total									71

Two values with different letters in the same column differ at 5% level after Duncan's multiple range test.

(1), (2), (3), (4), (5), (6), (7) and (8) are corresponding to Fig. 1.

Table 4. Origin of disomic haploid plants

Parent plant	Chromosome number	Number of disomic haploid												
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	Total
II*	45					1								1
V*	46					5								5
VI*	46			3		2								5
VII*	46				1	4								5
IX*	47					5								5
X*	47					3								3
XII*	47					5								5
XIII*	48					4								4
XIV*	48					5								5
XV*	48	4												4
XVI*	48					3				1				4
XVII*	48	4												4
XVIII*	48					4								4
XX*	49												3	3
XXI**	54		3			4	1	1				1		10
XXII**	54		1			1			1	1				4
Total		8	4	3	1	46	1	1	1	1	1	1	3	71

* The same plant number used in Table 1 and all of them are chromosome substituted type.

** The plant obtained triploids crossed with diploids.

体を作り出している。従って染色体置換型植物において4倍体の不規則な減数分裂に由来する置換染色体はある特定の染色体に限られていることを示唆している。

論 議

もし緒言で述べた遺伝子平衡説が正しいとするならばタバコのトリソームに対応するダイソーム・ハプロイドはお互いに区別され得るはずである。事実この研究は花器形態において12のダイソーム・ハプロイドが正半数体と区別されることを示した。この結果は明らかに倍数体種の遺伝子平衡説を支持するものである。今後の研究において24種の全ダイソーム・ハプロイドシリーズの完成も可能であろう。

これ等のダイソーム・ハプロイドの有用性はコルヒチン処理あるいはカルスからの再生によりダイソーム・ハプロイドを倍加しテトラソーム個体を得ることにある。このテトラ

ソーム植物は自殖によりトリソーム個体を与えるであろう。トリソームの薬培養はダイソーム・ハプロイドを作り出すのでダイソーム・ハプロイドの維持に役立つ。将来は同一染色体に関しテトラソーム、トリソームおよびダイソーム・ハプロイドが形態的、生理的に比較検討されることにより遺伝研究に有意義な結果を与えるであろう。

摘 要

多くの植物でトリソーム(2n+1)シリーズが報告されているが形態的変異の立場から3群に分類される。すなわち1. 2nとそれぞれの2n+1個体が区別される。2. 2nとそれぞれの2n+1個体がほとんど区別されない。3. 1と2が混在するものである。*Nicotiana tabacum*はClausenとGoodspeed(1924)によると3種の2n+1個体が2nと花器形態でわずかに異なる以外はほとんど区別されないとしている。その理由と

してタバコは進化的に異質倍数体で遺伝子の重複が存在するため余剰染色体によって遺伝子の均衡が相対的にそれほど影響されないためとしている。もしそうならば $n+1$ レベルで n 植物と比較された時はどうなるであろうか。 $3n \times 2n$ より得た異数性植物および $4n$ 植物の葯培養より得た染色体置換型と考えられる植物を葯培養し $n+1$ 個体を選抜し形態調査に供した。調査形質は環境変異に最も安定していると考えられる花器形態を中心としたが念のため異なる季節で変異があるかどうか調査したところ花器のある部分は季節により有意に変異することが認められたので調査時期は4月～5月に限った。その結果 $n+1$ 個体は12群に分類された。それを要約すると次のようになる。

1. $2n+1$ 個体が $2n$ とほとんど形態的に区別され得ないとされるのに対し $n+1$ 個体は n と明らかに区別された。 $2n+1$ 個体は n 植物より花器の各部が大となったり小となったりしあるものは $2n$ 植物のそれより大となる場合も存在した。今回の研究では12群分類されたが今後個体数を多く扱うことにより24群の全シリーズの完成の可能性は十分あると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Bourgin, J. P. and J. P. Nitsch. 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir D'etamines cultivées *in vitro*. Ann. Physiol. Vég. 9 : 377-382.
- 2) Bridges, C. B. 1922. The origin and variations in sexual and sexlimited character. Amer. Natur. 56 : 51-63.
- 3) Clausen, R. E. and T. H. Goodspeed. 1924. Inheritance in *Nicotiana tabacum*. IV. The trisomic character 'enlarged'. Genetics 9 : 181-197.
- 4) Gerstel, D. U. 1960. Segregation in new allopolyploids of *Nicotiana*. I. Comparison of $6x$ (*N. tabacum* x *tomentosiformis*) and $6x$ (*N. tabacum* x *otophora*). Genetics 45 : 1723-1734.
- 5) Khush, G. S. 1973. Cytogenetics of aneuploids. Academic Press, Inc. A Subsidiary of Harcourt Brace Javanovich, Publishers.
- 6) Niizeki, M. 1974. 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.
- 7) Niizeki, M. and F. Kita. 1975. Production of aneuploid plants by anther culture in *Nicotiana tabacum* L. Japan. J. Breed. 25 : 52-59.
- 8) Sheen, S. J. 1972. Isozymic evidence bearing on the origin of *Nicotiana tabacum* L. Evolution 26 : 143-154.
- 9) Snow, R. 1963. Alcoholic hydrochloric acid-carmin as a stain for chromosomes in squash preparations. Stain Technol. 38 : 9-13.

Studies on Plant Cell and Tissue Culture

VII Production Disomic Haploid Plants by Anther Culture in *Nicotiana tabacum*

Minoru Niizeki and Fumiji Kita

(Department of Agronomy, Faculty of Agriculture
Hokkaido University, Sapporo, Japan)

Summary

There are many instances of trisomic plant series ($2n+1$) reported in plant species. They are classified into three types, namely, the first, trisomic plants are distinguishable from each other and from normal diploids, the second, trisomic plants are not distinguishable from each other and from normal diploids and the third category are somewhere in between the extremes of the first and second category. *N. tabacum* comes under the second category. The interpretation of the second category in which each

trisomic plant is not distinguishable is that the species are polyploids which carry many gene duplications in their genome, thus further duplication by an addition of a single chromosome alters the genic balance but little and there is no effect on the phenotype. This interpretation by genic balance was proved by the production of 12 types of disomic haploid plants where gene duplications may be reduced and magnifying the effect of addition of a single chromosome on genic balance and the phenotype. It is an interesting fact that the flowers of some disomic haploids are larger than haploids and even larger than normal diploid plants. However, most of them were less vigorous in flower size than the normal haploid plants.