



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Nicotiana tabacum の能率的染色体倍加法
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, 22, 1-4
Issue Date	1981-03-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13362
Type	departmental bulletin paper
File Information	22_p1-4.pdf



Nicotiana tabacum の能率的染色体倍加法

新関 稔・喜多富美治

(北海道大学農学部附属農場)

緒 言

GUHA と MAHESHWARI^{1,2)}が *Datura innoxia* の薬培養によって半数性植物を得ることに成功して以来、この方法により多くの植物で半数性植物が得られるようになり、半数体育種法が広く実用化しつつある。このような今日実際育種の場面で半数体の能率的な倍加法を開発する必要にせまられている。植物の染色体数の倍加にはコルヒチンが広く使用されてきたが、その他の薬品をコルヒチンと併用することにより倍加効率を高め得るとい報告が数少ないがなされている。その主なものは DMSO(dimethyl sulfoxide)³⁾, GA₃(gibberellic acid)^{3,10)}, および界面活性剤である Tween 20⁴⁾ 等である。

この実験ではこれ等薬品の効果を検討してみたので報告する。

材料および方法

染色体倍加処理は、I, 0.1%コルヒチン;II, 0.1%コルヒチン+2%DMSO;III, 0.1%コルヒチン+2%DMSO+10 mg/lGA₃;IV, 0.1%コルヒチン+2%DMSO+10 mg/lGA₃+0.3 ml/l tween 20 の 4 処理を半数体、2 倍体タバコ(品種 Wisconsin 38)に 5 時間および 24 時間浸透処理を行った。半数体は NITSCH と NITSCH⁵⁾の基本培地に 0.1 mg/l の IAA(indole-3-acetic acid と カネチンを含む培地による薬培養によって得られたもの、および 2 倍体は種子由来のものをい、2~3 葉期の幼植物時に上記 4 処理を行った。処理後各個体は水洗いしパーミキュライトに移植し、日長 15 時間、昼間温度 25℃、夜間温度 15℃の条件下で養育した。半数体の倍加個体(2 倍体)は

種子稔性の有無によって判別した。すなわち半数体は完全種子不稔であるのに対し、2 倍体に倍加されることにより種子稔性は回復する。また 2 倍体の倍加個体(4 倍体)は花粉稔性の低下によって判別した。すなわち 2 倍体は、通常 95%以上の花粉稔性を示すが、4 倍体では、55~66%と稔性は低下する。

結 果

半数体および 2 倍体の各倍加処理の結果を Table 1 および 2 に示した。各処理は 40~60 個体について行った。半数体の各処理後における生存率についてみると、5 時間区では各処理区とも 70%以上で、処理区間に大きな差は認められなかった。一方 24 時間区では、生存率は 5 時間区に比し激減するが、処理 II 区(コルヒチン+DMSO)だけは 80%の高い生存率を示した。5 時間区、24 時間区ともに処理個体数に対する倍加率が明らかに高い値を示したのは処理 II 区で、5 時間区で約 23%、24 時間区で約 32%であった。その他の処理区では 5 時間区、24 時間区ともに大きな差は見られなかったが、一般に 24 時間区は 5 時間区に比較し低下する傾向を示した。

2 倍体の倍加処理の結果も半数体の場合と生存率、倍加率ともにほぼ同様の結果を示し、処理 II 区で倍加率が高まる傾向を示した。しかし半数体の場合より一般に倍加率は低い傾向であった。

論 議

THIEBAUT と KASHA⁶⁾はコルヒチンに DMSO, GA₃および Tween 20 を加えた場合、*Hordeum vulgare* の半数体の倍加に最も良い効果をもたらすことを報告している。我々のタバコ

Table 1 Chromosome doubling and plant survival of haploid tobacco

Method of treatment	Duration of treatment (hr.)	Number of plant treated	% of plant survival	% of chromosome doubling
I	5	60	98.33	15.00
II	5	60	93.33	23.33
III	5	60	73.33	8.33
IV	5	60	86.66	11.67
I	24	40	15.00	2.50
II	24	40	80.00	32.50
III	24	40	57.50	7.50
IV	24	40	7.50	5.00

I, 0.1% colchicine; II, 0.1% colchicine+2% DMSO; III, 0.1% colchicine+2% DMSO+10mg/l GA₃; IV, 0.1% colchicine+2% DMSO+10mg/l GA₃+0.3ml/l Tween 20.

Table 2 Chromosome doubling and plant survival of diploid tobacco

Method of treatment	Duration of treatment (hr.)	Number of plant treated	% of plant survival	% of chromosome doubling
I	5	60	75.00	13.33
II	5	60	91.66	20.00
III	5	60	80.00	11.67
IV	5	60	83.33	11.67
I	24	60	46.67	6.67
II	24	60	51.67	8.33
III	24	60	56.67	5.00
IV	24	60	20.00	1.67

I, 0.1% colchicine; II, 0.1% colchicine+2% DMSO; III, 0.1% colchicine+2% DMSO+10mg/l GA₃; IV, 0.1% colchicine+2% DMSO+10mg/l GA₃+0.3ml/l Tween 20.

の半数体および2倍体を用いた実験ではコルヒチン+DMSO処理が最も効果的であることが示された。半数体の24時間処理区では、DMSOのみの添加が明らかに生存率が高かったが、DMSOによる生存率向上が倍加率向上の直接の原因であると云えない。なぜなら5時間処理区では他の処理区と比較し生存率に大きな違いが認められないにもかかわらずDMSOのみの添加区で倍加率が高かったからである。DMSOの本来的作用は今のところ明らかでないが、染色体の倍加を促進する作用を有することは確かなようである。GA₃については、細胞分裂を促進させる作用があるので、コルヒチンの毒性によって弱められた倍加細胞に賦活作用を有すると考えられるが、この実験での

DMSOとの共存では生存率においても、また倍加率においても大きな影響はなく、そのような作用が働いたとは考えられない。Tween 20はコルヒチンの植物組織への取り組みを促進するものと考えられるが、特に24時間処理区では半数体、2倍体ともに個体生存率を低下させ染色体の倍加には好影響を与えない結果となった。結論するとタバコの半数体および2倍体の倍加にはコルヒチン+DMSOが良く、さらにGA₃やTween 20を加えた場合は効果がないか、あるいはむしろ悪影響を与える。

半数体の倍加率が2倍体の倍加率より一般に高い値を示しているが、これはコルヒチンによって倍加された2倍性細胞が4倍性細胞よりその後の

分裂に適しており、生存力が高いためこのような結果が得られたと考えるのが妥当であろう。

OKA *et al.*⁶⁾は半数体タバコの染色体倍加に2～3葉期の幼植物を0.1%コルヒチンで48時間処理することによって69.2%の高い倍加率を報告している。また大橋と中島⁷⁾はタバコの花粉体細胞分裂直前の花粉を含む葯をコルヒチン処理し、その後葯培養を行うことによって約30%の2倍体を得ることに成功している。この実験で行ったコルヒチン+DMSO処理で約30%の倍加率を示したが、上述の他者の実験とほぼ同様か、あるいは劣る倍加率である。しかしコルヒチン単独処理よりは明らかに高い値を示しているので、今後処理濃度や時間を検討することによってさらによりよい効果が期待されるものと考えられる。

要 約

タバコの半数体および2倍体の倍加法についてコルヒチンの他にDMSO、GA₃およびTween 20を添加した場合について検討した。

最も高頻度の倍加率を示したのは半数体、2倍体ともに0.1%コルヒチン+2% DMSO処理区であった。DMSOはコルヒチン処理による生存率に与える毒性を緩和する作用の他に倍加率そのものを高める作用があることが明らかとなった。DMSOの他にさらにGA₃やTween 20を加えた場合は倍加率向上に効果がないか、あるいはむしろ悪影響を与える結果となった。しかし*Hordeum vulgare*ではGA₃、Tween 20が倍加率を向上させるという報告があり⁹⁾、今後さらに深い検討が必要であると思われる。

引 用 文 献

1. GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204:497.
2. GUHA, S. and S. C. MAHESHWARI 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature 212:97-98.
3. IYER, C. P. A. and G. S. RANDHAWA 1965. Increasing colchicine effectiveness in woody plants with special reference to fruit crops. Euphytica. 14:293-295.
4. JENSEN, C. J. 1974. Chromosome-doubling technique in haploids. *In Haploids in Higher Plants, Advances and Potential. Edited by K. J. KASHA.* Univ. Guelph, Canada. pp. 153-190.
5. NITSCH, J. P. and C. NITSCH 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85-87.
6. OKA, M., A. NAKAMURA and T. YAMADA 1977. An efficient colchicine method for chromosome doubling of haploid tobacco plantlets. SABRAO J. 9: 108-110.
7. 大橋 透・中島哲夫 1979. タバコにおける培養葯のコルヒチン前処理による2倍体植物の作出、育種学雑誌 29 (別冊1):40-41.
8. SUBRAMANYAM, N. C. and K. J. KASHA 1975. Chromosome doubling of barley haploids by nitrousoxide and colchicine treatments. Can. J. Genet. Cytol. 17: 573-583.
9. THIEBAUT, J. and K. J. KASHA 1978. Modification of the colchicine technique for chromosome doubling of barley haploids. Can. J. Genet. Cytol. 20:513-521.
10. ZATYKÓ, J. M. and I. SIMON 1964. Possibilities in the use of gibberellic acid for increasing colchicine induced polyploidy ratio. Naturewissenschaften 51: 392-393.

Study on method of high frequent production of doubling chromosome plants in tobacco.

Minoru NIIZEKI and Fumiji KITA

Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Hokkaido
University, Sapporo, Japan

Summary

By using haploid and diploid tobacco seedlings, DMSO(dimethyl sulfoxide), GA₃ (gibberellic acid) and Tween 20 added to colchicine solution were examined their effects on the doubling chromosome of plants. Colchicin containing 2% DMSO was the most effective on the doubling chromosome of haploid and diploid plants. Addition of DMSO to colchicin solution sometimes reduced plant mortality. However, it was considered that the reduction of mortality is not all, but a part of explanation for the increasing chromosome doubling. The subsequent inclusion of GA₃ and Tween 20 to the above solution revealed no favourable effect on chromosome doubling and sometimes reduced the percent of chromosome doubling. However, in the case of *Hordeum vulgare*, it had been reported that the colchicin containing DMSO, GA₃ and Tween 20 in combination indicated the most frequent chromosome doubling⁹⁾. It must need further studies on arising controversial results on *Nicotiana tabacum* and *Hordeum vulgare*.