

## ニセアカシアの試験管内コルヒチン処理による倍数体の作出

鄒, 徳本  
九州日中交易株式会社

玉泉, 幸一郎  
九州大学農学部造林学講座

矢幡, 久  
九州大学農学部造林学講座

<https://doi.org/10.15017/23527>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 49 (1/2), pp.9-14, 1994-11. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：

## ニセアカシアの試験管内コルヒチン処理による倍数体の作出

邹 德 本\*・玉 泉 幸一郎・矢 幡 久

九州大学農学部造林学講座  
(1994年3月10日受理)

### Creation of Polyploid by Colchicine Treatment on Seedlings within Tube of *Robinia pseudoacacia* L.

De Ben ZOU, Koichiro GYOKUSEN and Hisashi YAHATA

Laboratory of Silviculture, Faculty  
of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812

#### 緒 言

植物にコルヒチンを処理することで染色体数を倍加する手法は、古く1937年に考案された (Blakeslee *et al.*, 1939)。それ以来多くの植物で倍数性育種が試みられ、育種の推進に大きく貢献したという経緯がある。倍数体の創出は、樹木でも多く試みられてきた(陣内・福原, 1954; 金沢, 1943; 金沢・大村, 1942a, 1942b, 1942c; 染郷, 1985)。しかし、この手法による染色体の倍数化は、コルヒチン処理による倍率化率がきわめて低く、また局部的変異に限定されるという難点があった。そこで、このような難点を克服するために組織培養の利用を試みた。

本研究では、ニセアカシアの種子を材料にして、無菌の芽生えを誘導し、その誘導された芽生えにコルヒチンを処理することによって倍数体を容易に作出することができたので報告する。

本研究を進めるに際し、九州大学農学部林学科農林生物物理学講座奥達雄教授及び九州大学附属演習林汰木達郎教授より多大のご協力と有益なるご助言を戴いた。ここに心から感謝申し上げる。また、本論文を作成するにあたり、丁寧なご指導とご校閲を賜った九州大学農学部林学科第三(造林学)講座齋藤明教授に深謝申し上げる。

\* 九州日中交易株式会社

#### 材料および方法

##### 1. 無菌種子の発芽

九州大学構内に生育しているニセアカシアの約20年生の個体から、1990年の秋に種子を採集し、低温貯蔵した。供試の都度、種子を取り出して、クリーンベンチ内に持ち込み、3%次亜塩素酸ソーダ液で10分間滅菌し、滅菌水で繰り返し5回の洗浄を行った。そのうち、70°Cの滅菌水で20分間温湯処理を行い、滅菌シャーレ内に均等になるように播種し、発芽促進処理を行った。この発芽促進処理後24時間ののち、膨張した健全な種子だけを選んで、20mm×120mmの試験管内に2%のサッカロースと0.8%の寒天を注入してオートクレーブで滅菌した寒天培地に播種した。播種後3日目には発芽し、無菌の芽生えを用意できた。

##### 2. コルヒチン処理

その発芽した芽生えの入っている試験管に0.4µmポアサイズのメンブランフィルターで濾過除菌した0.2~0.5%濃度のコルヒチン液を寒天の表面に滴下した。コルヒチン液の滴下を行ってから3日後に試験管内のコルヒチン液を除き、滅菌水で寒天の表面を3回ほど洗浄したのち、さらにこの状態で芽生えの培養を継続した。

##### 3. 培養によるカルス誘導

子葉が完全に展開したのちに、芽生えを上胚軸・下胚軸・子葉の部分に切り分け、その各々10~25個を任意に選び出して、カルス誘導用培地に置床した。

カルス誘導用培地には、表1に示したように、2%

表1 培養に用いた各種基本培地とホルモン組成  
Table 1. Various basic media and hormone contents used in culture.

基本培地の種類	サッカロース濃度 (%)	ホルモン濃度 (mg/l)			
		2, 4-D	BAP	NAA	IAA
カルス誘導用培地	1 MS	2	1.00		
	2 MS	2		2.00	
	3 MS	2	1.00	1.00	1.00
不定芽分化用培地	1 1/2 MS	1		2.00	
	2 1/2 B5	1		2.00	
	3 1/2 WPM	1		2.00	
不定根分化用培地	1 1/2 MS	1			2.00

のサッカロースの他に、1.00mg/lの2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D), 1.00mg/lまたは2.00mg/lの6-ベンジルアミノプリン (BAP) ならびに1.00mg/lの $\alpha$ -ナフトレン酢酸 (NAA) を種々組み合わせさせて添加したMS培地 (Murashige *et al.*, 1962) を用いた。培地は、pH値を5.8に調整して、オートクレーブで滅菌した。培養条件は、25°C, 33 $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 16時間日長下で行った。

#### 4. カルスからの不定芽の誘導

カルスからの不定芽誘導用培地は、表1に示したように、1%サッカロースの他に、2.00mg/lのBAPを添加した1/2 MS培地 (MS培地の各組成を1/2にした培地)、1/2 B5培地 (Gamborg *et al.* (1968) によって提唱されたB5培地の各組成を1/2にした培地)、1/2 WPM培地 (Lloyd *et al.* (1981) によって提唱されたWPM培地の各組成を1/2にした培地) を用いた。培養条件は、25°C, 33 $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 16時間日長とした。なお、1.00mg/lの2, 4-D, NAA, BAPを添加したカルス誘導用培地で芽生えの各部位を培養することによって得られたカルスは、カルスからの不定芽分化用培地に移植後10°Cの低温処理を7日間行った。

#### 5. シュートからの不定根の誘導

得られたシュートから発根を誘導するために、表1に示したように、1%のサッカロースの他に、2.00mg/lのIAAを添加した1/2 MS培地を用いた。培養条件は、最初の7日間は10°Cと25°Cという条件で24時間暗所とし、その後25°C, 33 $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, 16時間日長下で行った。その後、さらに同一培地に継代培養を行い、10°Cと25°Cで10日間の培養を継続した。

#### 6. 染色体数の観察

染色体の観察は、酵素-ギムザ染色法を採用した。



図1 コルヒチン処理された芽生え  
Fig. 1. Seedling treated by liquid colchicine.

## 結果および考察

### 1. コルヒチン処理の芽生え

0.2%, 0.5%のコルヒチン液で処理した芽生えは、無処理の芽生えよりも根が太く、子葉が厚く、著しい肥大が観察された (図1)。

### 2. カルス誘導

芽生えの組織をカルス誘導用培地に置床後14日間で、各培地ともカルスを誘導できた (図2)。外植体からのカルス誘導の様子を表2に、また各培地における外植体1個当たりのカルスの生重を図3に示した。カルス誘導は、培地による違いは認められなかった。なお、上胚軸を1.00mg/lの2, 4-D, NAA, BAPを添加した場合には、幾分シュートの分化が認められた。芽生えの各部位からのカルス誘導は、3種類のホルモンを

同時に添加した培地で、中でも上胚軸の培養によるカルス誘導が旺盛であった。

### 3. カルスからの不定芽の分化

不定芽誘導専用培地に上胚軸、下胚軸や子葉を置床後、低温処理を行わなかった場合には19日目頃からカルスからの不定芽の分化が認められた(図4)。一方、低温処理した場合には、32日目頃から上胚軸と下胚軸由来のカルスから不定芽の分化が観察された。芽生えの各部位から誘導されたカルスの不定芽の分化の結果を表3に示した。上胚軸と下胚軸カルスからの不定芽の分化はかなり観察されたが、子葉カルスからの不定芽の分化が極めて低い傾向を示した。

なお、カルスからの不定芽の誘導は、カルスの誘導に際して用いられた培地の種類で幾分影響を受けるような結果を得たが、明かではない。カルスからの不定芽分化用培地間では、明かに違いが認められ、MSと

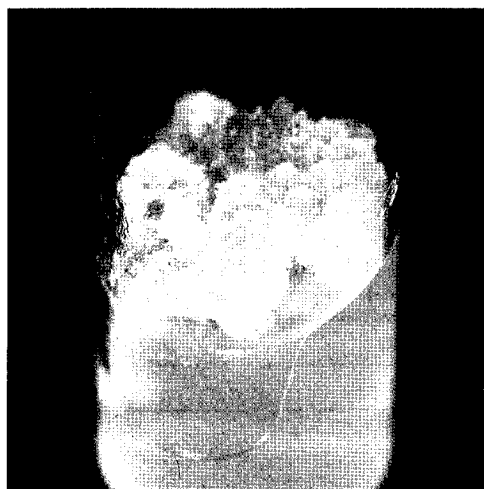


図2 芽生えの組織から誘導されたカルス  
Fig. 2. Callus induced from tissue of seedling.

B5の両培地で効果的に不定芽の分化が期待できることがわかった。

分化した不定芽の中には、外部形態に異常の認められる場合があった(図5)。茎と葉の色が濃緑色で、葉が厚く、しかも単葉状であった。表4に、このような異常個体の出現率を示した。下胚軸カルス由来の不定芽で最も高かった。そこで、茎軸を形成した個体を約1cm長に切り、それぞれ0.20mg/lのBAPを添加した1/2 MS培地に継代し、個体の増殖を行った。

### 4. シュートからの不定根の分化

2cm以上に伸長したシュートを切り取って、ランダムに発根誘導用の培地に移植した。

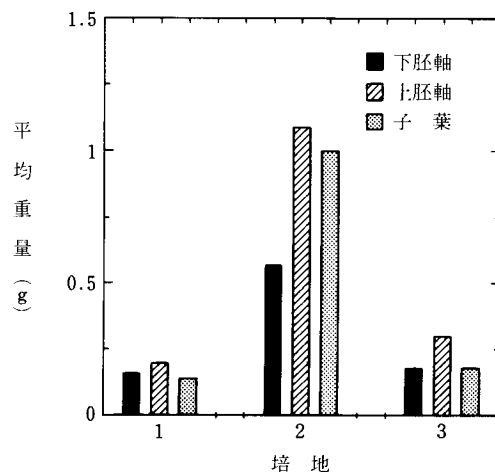


図3 芽生えの各組織から形成されたカルスの平均生重

Fig. 3. Mean fresh weight of callus formed from various organs of seedling.

培地 1 : MS+2, 4-D, 1.00mg/l

2 : MS+BAP, 2.00mg/l

3 : MS+各 1.00mg/lの 2, 4-D, NAA, BAP

表2 芽生えの供試各組織からのシュートとカルスの形成率 (%)

Table 2. Shoot, root and callus formation rate from various organs of seedling.

培地の種類	ホルモン組成と濃度 (mg/l)		上胚軸		下胚軸		子葉	
	シュート	カルス	シュート	カルス	シュート	カルス		
1	2, 4-D	1.00	0.0	95.8	0.0	86.9	0.0	97.2
2	BAP	2.00	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	100.0
3	2, 4-D	1.00	0.0	85.0	10.0	100.0	0.0	100.0
	NAA	1.00						
	BAP	1.00						

外部形態に何等の変化も観察されないシュートからは、移植後15日目頃から発根が観察された。しかし、外部形態に変化の認められたシュートからは全く発根しなかった。同一培地に移植し10日間の低温処理を行った。その結果、移植後17日目頃から発根を観察できるようになった(図6, 表5)。発根率は、外部形態に変化の認められないシュートで75.0%, 外部形態に変化の認められたシュートで42.8%を示した。この結果から、外部形態に変化の認められたシュートから誘導される不定根の分化は、低温処理で大きく促進されることがわかった。

この組織培養の利用によって、倍数体の誘導率は

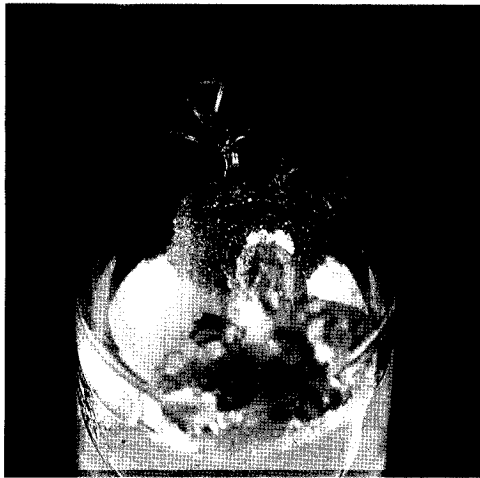


図4 カルスから誘導された不定芽  
Fig. 4. Adventitious buds induced from callus.

大きく高められた。また、1変異体から大量に増殖することも可能であることを立証できた。

#### 5. 幼植物体の馴化

発根した幼植物体を滅菌したパーミキュライトを入れた透明なプラスチック箱に移して馴化を行った。



図5 形態に異常が観察された幼植物体  
Fig. 5. Plantlet that morphological abnormality was observed.

表4 変異体の発生率 (%)  
Table 4. Inducing ratio (%) of mutant.

上胚軸	下胚軸	子葉
28.6	16.7	0.0

表3 カルスからの不定芽の分化率に与えるカルス形成時の前歴の影響

Table 3. Influences of culture condition at callus formation on differentiation rate of adventitious buds from tested callus.

基本培地の種類	ホルモン組成 (mg/l)		カルス誘導時に用いた培地の種類								
			下胚軸由来のカルス			上胚軸由来のカルス			子葉由来のカルス		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3
1/2 MS	BAP	2.00	13.0	5.9	17.6	9.1	11.1	11.8	4.3	0.0	7.7
					44.4*			33.3*			0.0*
1/2 B5	BAP	2.00			40.0*			37.5*			0.0*
1/2 WPM	BAP	2.00			25.0*			30.0*			0.0*

\*印: 10°Cでの低温処理区

カルス誘導時に用いた培地 1: 1.00mg/lの2, 4-D含有MS培地

2: 2.00mg/lのBAP含有MS培地

3: 1.00mg/lの2, 4-D, NAA, BAP含有MS培地

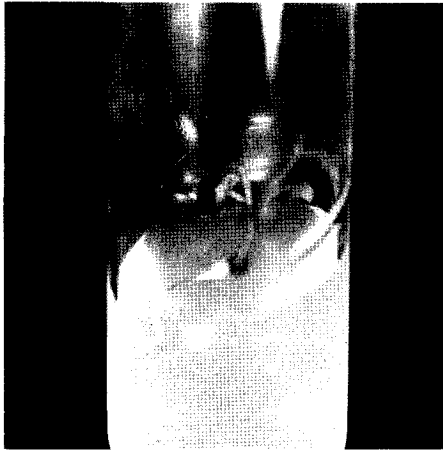


図6 シュートからの発根  
Fig. 6. Rooting from shoot.

表5 シュートからの発根率 (%)  
Table 5. Rooting ratio (%) from shoot.

培地	発根率 (%)	
	変異体	正常体
1/2 MS +2.00mg/lの IAA	42.8	75.0



図7 倍数化したニセアカシア幼植物体の染色体  
Fig. 7. Chromosome of diploidized plantlet.

## 6. 染色体異常の観察

外部形態に変化の認められた幼植物体の根を採取し、酵素-ギムザ法を用いて染色体数を調べた結果、 $2n=44$ で、倍数体であることを確認できた(図7)。

## 要 約

コルヒチン処理による染色体の倍数化は、コルヒチン処理による倍数化率がきわめて低く、また局部的変異に限定されるという難点があった。そこで、このような難点を克服するために組織培養の利用を試みた。その結果、コルヒチン処理をニセアカシアの無菌の芽生えに行い、その各組織からカルスを誘導し、カルス培養を行ったところ、4倍体の幼植物体を効果的に再生することができた。

## 文 献

- Blakeslek, A. F. and A. G. Avery 1939 Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *Heredity*, 28: 393-412
- 陣内 巖, 福原 樹勝 1954 人為四倍体のさし穂の発根性, 日林誌, 36: 232-233
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima 1968 Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158
- 金沢林助 1943 コルヒチン処理による林木育種の研究(総合抄録), 日林誌, 25: 126-174
- 金沢林助, 大村 章 1942a コルヒチン処理によって作成せるキリの四倍体, 植物及び動物, 10: 1123-1125
- 金沢林助, 大村 章 1942b コルヒチン処理によって作成せる合黒松のミキソプロイド, 植物及び動物, 10: 29-31
- 金沢林助, 大村 章 1942c コルヒチン処理によって作成せるキリの四倍体, 植物及び動物, 11: 829-832
- Lloyd, G. and B. H. McCown 1981 Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture, 30: 421-427
- Murashige, T. and F. Skoog 1962 A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15: 437-497
- 染郷正孝 1985 ハンノキ植物の細胞遺伝, 林木育種協会, pp. 71-73

## Summary

In the polyploidization of chromosome by colchicine treatment on seedlings, there was various

difficult points. Namely, the ratio of the polyploidization is generally very low and the inducement of polyploid is localized into only a few joints. And so, we tested the use of tissue culture technique to overcome all difficulties in relation to induce of polyploid. The tetraploid plantlets of Niseakasia (*Robinia Pseudoacacia* L.) were induced effectively by culture of callus originated from seedlings treated with colchicine.