



Crepis capillarisの葉片培養組織における染色体変異（第1報）：カルスにおける染色体の数的変異とそれに対する生長物質の影響(園芸農学)

蔭山, 節雄
松林, 元一

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 13(1):29-37

(Issue Date)

1978

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00228557>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00228557>



Crepis capillaris の葉片培養組織における染色体変異

第1報 カルスにおける染色体の数的変異とそれに対する生長物質の影響

蔭山節雄*・松林元一*

(昭和52年8月10日受理)

CHROMOSOME VARIATION IN LEAF-PIECE CULTURES OF CREPIS CAPILLARIS

I. Numerical Variation of Chromosomes in Calli as Affected by Growth Substances

Setsuo KAGEYAMA and Motokazu MATSUBAYASHI

Abstract

Leaf blade-pieces of *Crepis capillaris* ($2n=6$) were cultured on MURASHIGE and SKOOG's media containing kinetin and NAA in various concentrations, with the aim of assessing the effects of the above substances on numerical variations of chromosomes in callus cells derived from the leaf-pieces. Chromosome counting was made in the calli fixed on the 45th day after inoculation.

Numerical variations of chromosomes occurred in 9.6 % of the cells observed throughout all the treatment plots. Of these, euploid variations were found to comprise three levels of ploidy: tetraploidy, triploidy and haploidy, with the frequency of 3.2, 0.3 and 0.9 %, respectively, and aneuploid variations were of hyperploidy in the frequency of 2.3 % and hypoploidy in 2.9 %. Higher levels of ploidy than tetraploidy were not encountered in any callus cultures.

It is likely to suppose that an extremely high content of kinetin is the most effective to make variations in chromosome number of callus cells, although the examined number of cells was not sufficient to assess the effects of growth substances contained in culture media, that is as follows: the variations tend to occur widely with relatively high frequency (15-20 % of the cells observed) in the callus cells cultured on media containing NAA at either extremely high or low level in relation to kinetin, and to become of less frequent occurrence with getting nearer to the equivalent concentration of both the growth substances.

緒言

植物の培養組織が、その脱分化過程において、染色体の数的変異を起すことはすでに周知のことであるが^{3, 10, 22)}、最近はそのに加えて染色体の構造的変異も起ることが知られるようになった^{13, 14, 17)}。さらに、数種の植物では、このような変異カルスから再分化によって倍数性のみならず、異数性植物が得られたとの報告がある²⁴⁾。もし、培養組織における染色体構成の変異性と安定性が、かなりの確率をもって制御できれば、染色体工学的育種と生殖質保存の両面から、組織培養は極めて重要な意義

をもつことになる。それにはまず、脱分化及び再分化過程における染色体変異の実態と培養条件による変異の方向づけの可否が克明に検討されなければならない。

本研究は、このような観点から、*Crepis capillaris* を用い、葉片組織由来のカルスにおける染色体変異とそれに対する生長物質の効果を知らずに行なったものである。ここでは主に染色体の数的変異について報告する。

実験材料及び方法

本研究には、*Crepis capillaris* (L.) Wallr. ($2n=6$) の葉片を供試した。1974年東北大学教養部清水芳孝教授のご厚意により、同大学構内に自生の植物から得られた

* 作物育種学研究室

種子の分譲をうけ、以後、本研究室において系統維持されてきたものである。

供試植物はすべて試験管内で育成された。すなわち、種子を70%エタノールで2分間、さらに1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で5分間殺菌した後、生長物質を含まない MURASHIGE and SKOOG (1962)⁸⁾の培地に播種して実生を養成し、約40日後にそれらの葉身から外植体を取った。

供用培地は上記 MURASHIGE and SKOOG の処方基準とし、Table 1 に示すように、 α -ナフタレン酢酸と kinetin の添加濃度によって実験区を設定した。各区とも培地を pH 6.0 に調整後、20×120mm試験管に10mlあて分注し、オートクレーブ殺菌を経て約30°の斜面培地にした。これに約5mm角に切りとった葉身を置床し、30±

Table 1. Treatment plots designed based on the combinations of growth supplements in various concentrations

NAA (ppm)	kinetin (ppm)			
	0	0.5	1	10
0	1	5	9	13
1	2	6	10	14
5	3	7	11	15
10	4	8	12	16

The figure in each column denotes the plot number.

Table 2. Chromosome numbers of the callus cells cultured in media containing kinetin and NAA combined in various concentrations

Treatment ¹⁾ No.	concentration (ppm)		No. of cells observed	Frequency of cells with chromosome numbers of									
	K ²⁾	NAA ³⁾		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	0	1	48	1	—	—	40	—	—	—	—	1	6
3	0	5	12	—	—	—	12	—	—	—	—	—	—
6	0.5	1	13	—	—	—	13	—	—	—	—	—	—
7	0.5	5	22	—	—	3	18	1	—	—	—	—	—
10	1	1	56	—	—	2	54	—	—	—	—	—	—
11	1	5	23	—	—	—	23	—	—	—	—	—	—
12	1	10	18	—	—	—	17	—	—	1	—	—	—
14	10	1	52	1	1	—	42	3	1	—	—	—	4
15	10	5	49	—	—	—	47	—	—	—	1	—	1
16	10	10	52	1	3	1	46	—	1	—	—	—	—

1) From the table are excluded the Treatments, 4, 5, 8, 9 and 13, including the control designated as 1, because the growth of calli was not sufficient to make cytological analysis in these instances.

2) K: kinetin.

3) NAA: α -naphthalenacetic acid.

2°C, 13時間照明(約2000 Lux)のもとで培養した。

染色体の観察は、いずれの場合も、葉片置床後45日目のカルスについて行なった。観察にあたっては、0°C 24時間前処理後、エタノール+酢酸液(3:1)で24時間固定したカルスを FEULGEN 試薬で3時間染色し、水洗後、酢酸カーミンのなかで押しつぶして標本を作成した。染色体数の算定、特に減少したものについては、おしつぶしによる散逸の恐れがあるので、その点に留意し確信のえられたもののみにして行なった。

実験結果

各実験区とも葉片置床後45日目のカルスにつき染色体数を算定し、あわせて核型の検討を行なった。Table 2 はその結果の要約であり、各実験区における染色体の数的変異については Fig. 1 にグラフで示されている。また、Figs. 2~4 は観察された主な分裂像を示したものである。なお、カルスの形成がほとんどみられなかった対照区及びカルスの形成はみられてもその発達が不十分であったり、分裂像が十分に得られなかった区は表及びグラフから除外されている。

各区の観察細胞数にかなりの開きがあるので、この結果をもって直ちに染色体の数的変異についての区間比較を試みることは難があるが、一つの傾向を推知することは必ずしも不可能ではないであろう。

本研究供試の植物は、Fig. 2—a~d に示すように、長

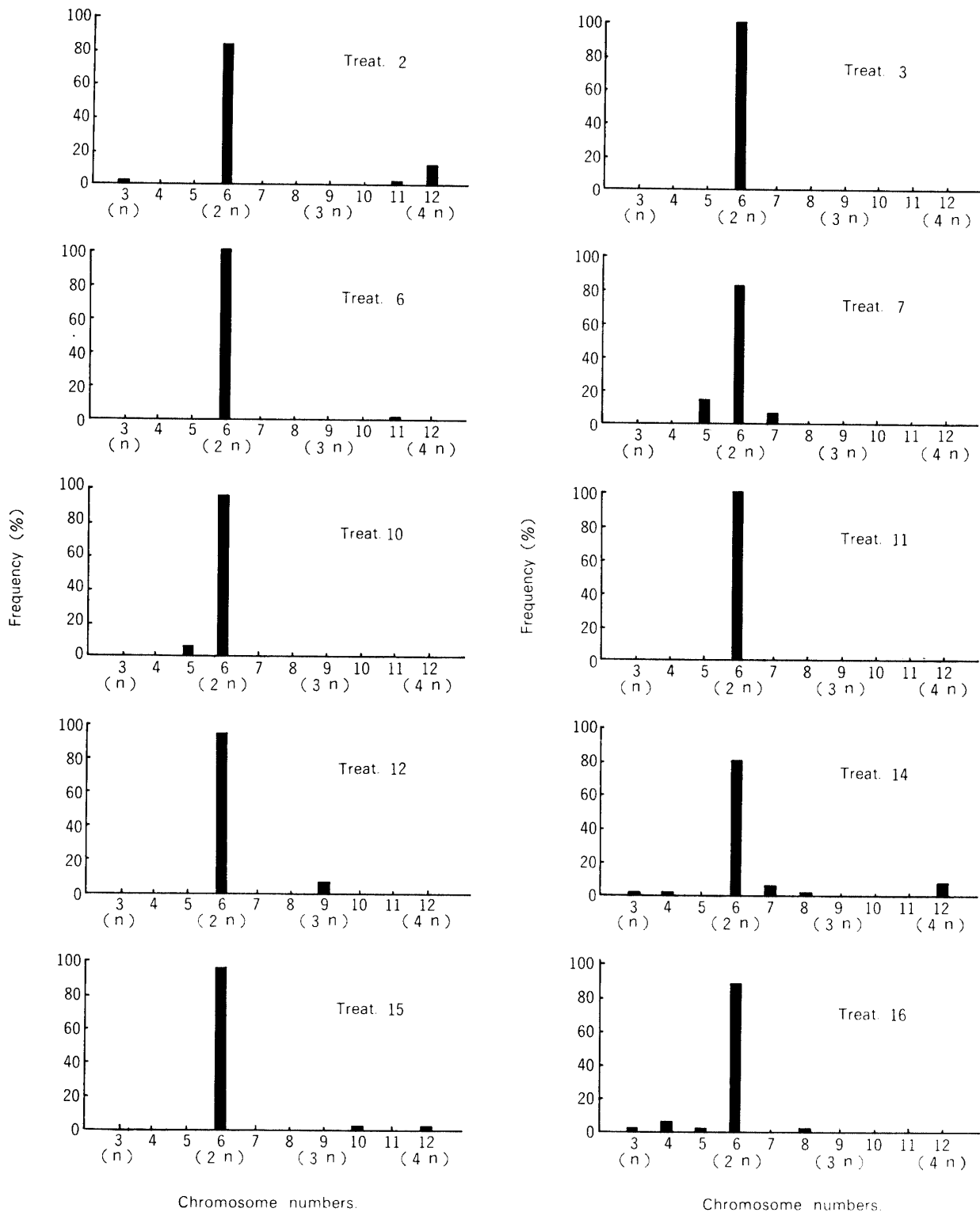


Fig. 1. Frequencies of callus cells with different chromosome numbers, as affected by various concentrations of kinetin and NAA. For explanation of each Treatment, see Table 1.

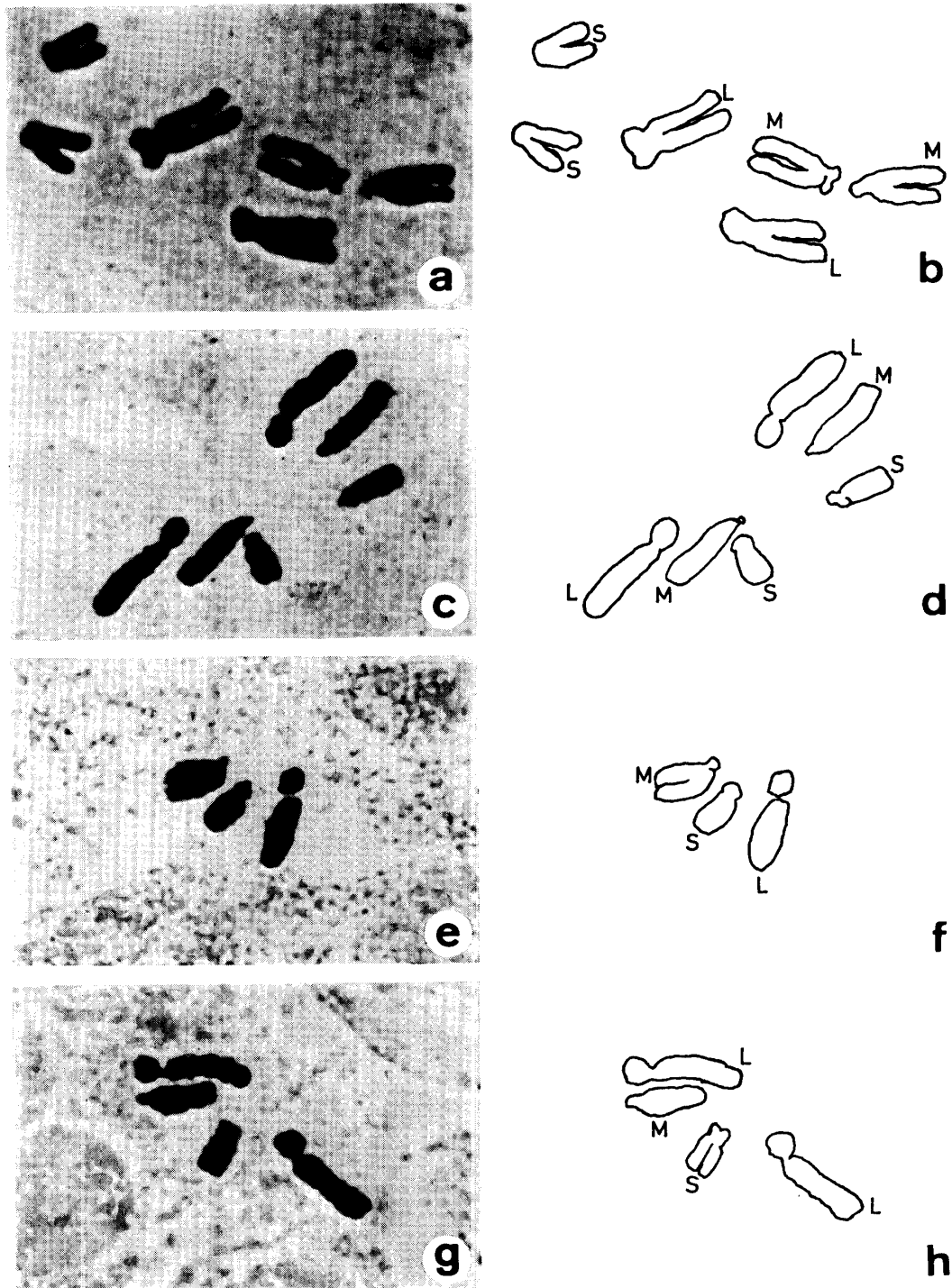


Fig. 2. Somatic metaphase configurations and their drawings in root-tip cells and leaf-derived callus cells of *Crepis capillaris* (ca. $\times 2000$).

a-b: Root-tip cell with $2n=6$, showing 2 long (L) + 2 medium-sized (M) + 2 short (S) chromosomes; c-d: callus cell in Treat. 16, $2n=6$, $2L+2M+2S$; e-f: Callus cell in Treat. 16, $2n=3$, $1L+1M+1S$; g-h: Callus cell in Treat. 16, $2n=4$, $2L+1M+1S$.

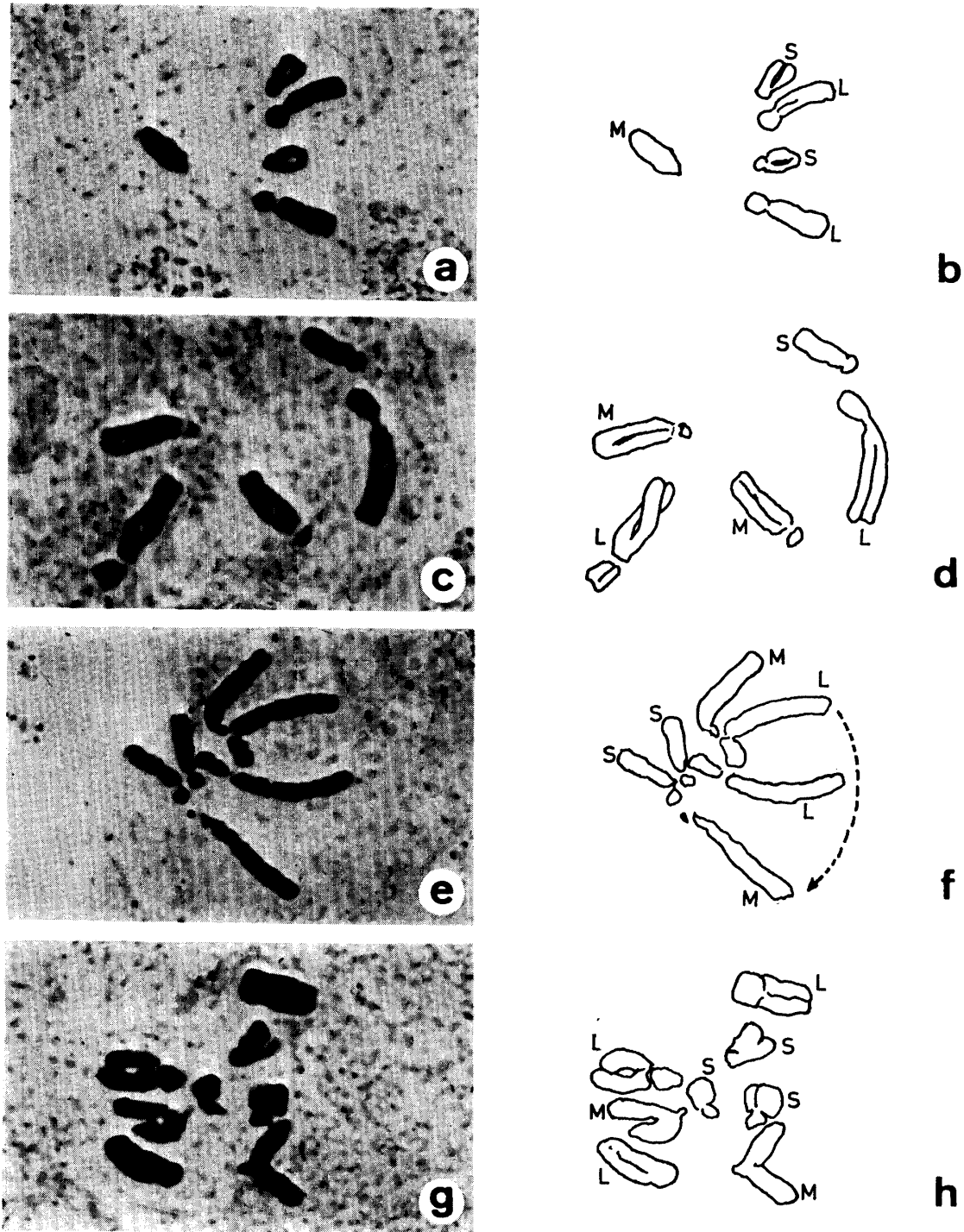


Fig. 3. Somatic metaphase configurations and their drawings in leaf-derived callus cells of *Crepis capillaris* (ca. $\times 2000$).

a-b: Callus cell with $2n=5$ in Treat. 16, showing 2 long (L)+1 medium-sized (M)+2 short (S) chromosomes; c-d: Callus cell in Treat. 7, $2n=5$, $2L+2M+1S$; e-f: Callus cell in Treat. 16, $2n=6$, $2L+2M+2S$ involving a translocation between L and M chromosomes as indicated by arrow; g-h: Callus cell in Treat. 16, $2n=8$, $3L+2M+3S$.

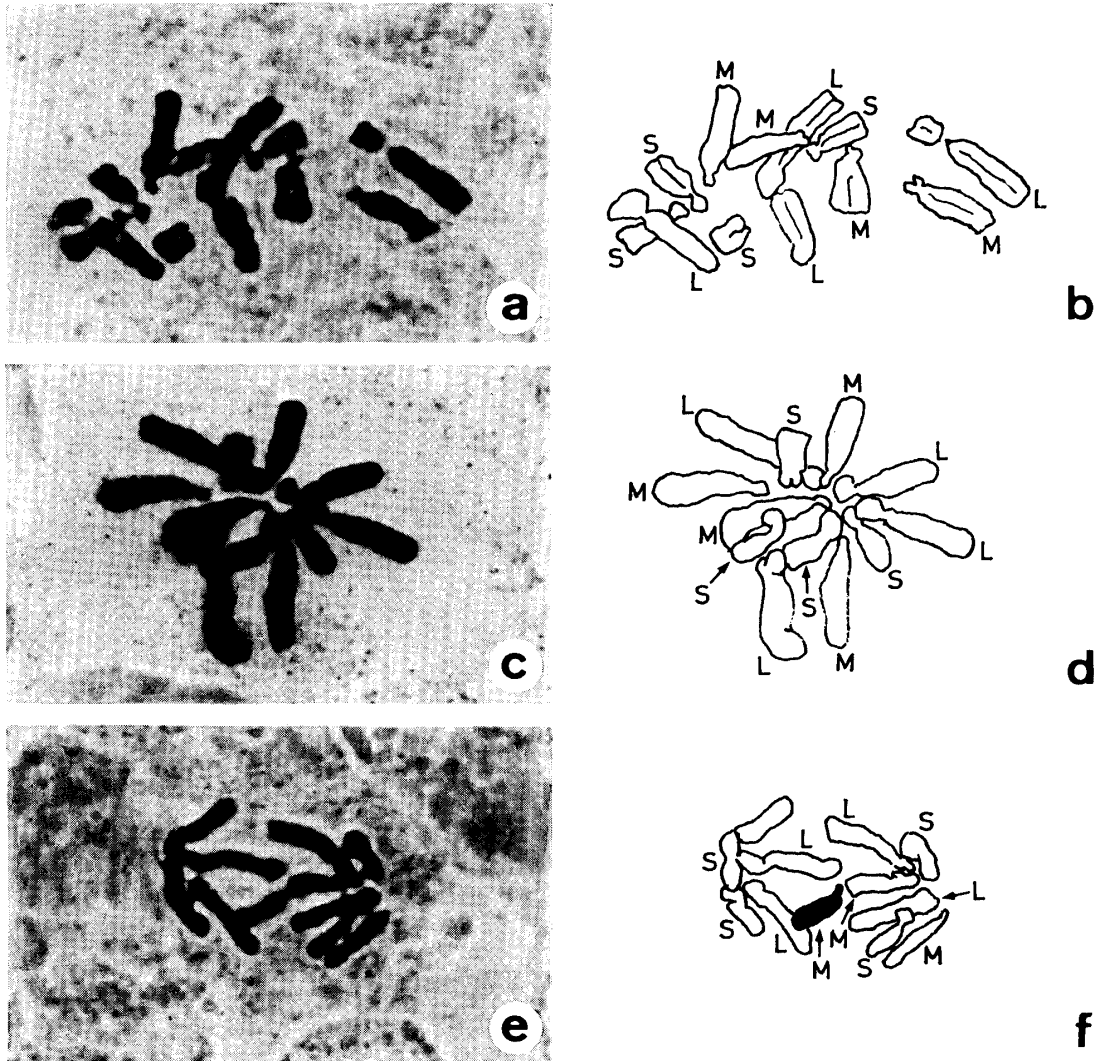


Fig. 4. Schematic metaphase and anaphase configurations and their drawings in leaf-derived callus cells of *Crepis capillaris* (ca. $\times 2000$).

a-b: Callus cell with $2n=12$ in Treat. 2, showing 4 long (L) + 4 medium-sized (M) + 4 short (S) chromosomes; c-d: Callus cell in Treat. 14, $2n=12$, 4L+4M+4S; e-f: Callus cell in Treat. 7, anaphase configuration showing non-disjunction of a M chromosome (indicated by black), resulting in unequal distribution, 5:7.

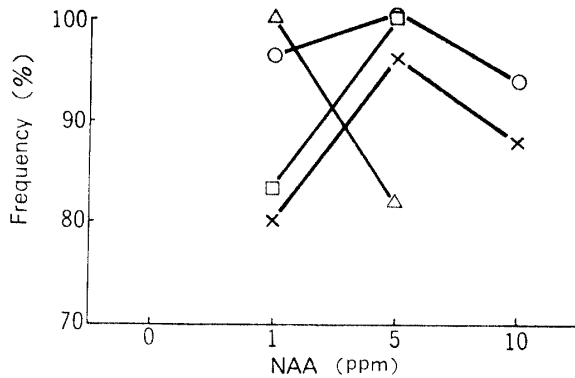


Fig. 5. Frequency distribution of cells with normal chromosome complement ($2n=6$) at each kinetin concentration combined with four different concentrations of NAA.
□—□: 0, △—△: 0.5, ○—○: 1 and ×—×: 10 in kinetin ppm concentration.

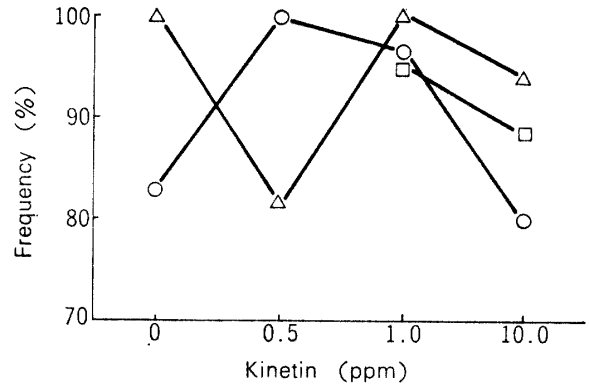


Fig. 6. Frequency distribution of cells with normal chromosome complement ($2n=6$) at each NAA concentration combined with four different concentrations of kinetin.
○—○: 1, △—△: 5 and □—□: 10 in NAA ppm concentrations.

さ、動原体の位置及び付随体の有無によって明らかに識別できる3対の染色体をもち、*in vivo* 及び *in vitro* のいずれにおいても、この点についての差異はみられなかった。これを標準とし、それより増減いずれかの方向に染色体数の変化した細胞を変異細胞とみなして、各区における変異の状態をみると次のとおりである。

調査細胞のすべてが6本の染色体数を示して全く変異がみられなかったのは、3、6及び11の3区で (Fig. 1)、kinetin に対する NAA の量比が比較的高い区であった。これらの区はいずれも調査細胞数が少なかったのも、もっと多数の細胞を調べれば若干の変異はみられたはずである。しかし同じく調査細胞数が少ない場合でも、変異を起している区が他にある事実をみれば、上記3区の変異性はその傾向として一般に低いとみてよいであろう。これらについて比較的変異の低かった区は、10及び12の両区で (Fig. 1)、調査細胞の95%前後が6本の染色体数を示して正常であり、残りの細胞に10区では5本、そして12区では9本の染色体がみられた。この場合のkinetin と NAA の量比は、10区が1:1であり、12区が1:10であったので、生長物質の量的関係がこのような染色体変異と特別なむすびつきをもっているようには考えられない。ただ、これら両区の染色体変異性は低く、変異細胞の出現率において前述の3区と大同小異の傾向を示しているとみることはできるであろう。

一方、変異が比較的多くみられたのは、2、7、14、15及び16の5区であって (Figs. 1~4)、いずれも調査細胞数の15%から20%近い細胞がいろいろの程度の染色体数の増減を示していた。これらの区のうち、7区における染色体数は 6 ± 1 本の範囲にとどまっていたが、これを

除いた他の区ではいずれも変異巾が大きく、特に2及び14の両区では半数性にあたる3本から4倍性にあたる12本までの大巾な変異が見いだされた (Fig. 4—a~d)。しかし本研究においては、他の植物で報告されているような4倍性を越えた高次倍数性は認められなかった⁹⁾。2区及び14区が、それぞれ調査細胞数の12.5%と7.7%の高率で、4倍性核を形成していたことは興味深い (Fig. 1)。これら5つの実験区の場合にも染色体変異に対するkinetin と NAA の量比の関係は必ずしも明らかではないが、一般的な傾向として、kinetin が含まれていないか、含まれていても極く微量で、しかも NAA をある程度含有する場合と、NAA に対するkinetin の量比がかなり高いか、あるいは両者ともかなり高濃度に存在する場合に、染色体の数的変異における率と巾が増大するようである。

次に、見方を変えて、カルス組織における染色体の数的安定性とそれに対するkinetin と NAA との量的関係を調べてみる。Fig. 5 は kinetin が 0、0.5、1 及び 10 ppm のとき、これに組合わせる NAA のどのような濃度がカルスの細胞学的安定性を保つのに有効であるかを示すために、Table 2 のデータに基づいてグラフ化したものである。この場合の安定性は正常な染色体数である6本をもった細胞の頻度で示されている。これによると、比較的高い安定性がみられたのは、kinetin 0.5 ppm の区を除いては、5 ppm の NAA を組合せた場合であることがわかる。また、NAA が 1、5 及び 10 ppm の場合には Fig. 6 に示すように kinetin が 1 ppm 組合わされたときに比較的高い安定性が得られている。kinetin 濃度が 0 及び 0.5 ppm のときに高い安定性を示しているのは、調査細胞数

の少なかった3区及び6区が関与しているため、安定性の検討にあたってはさして重視するには及ばないと考えられる。

考 察

植物組織が脱分化過程で染色体の倍数的ならびに異数の変異を起すことはすでに周知の事実である。このような変異が、植物の種類により、また同一植物でも組織や器官により、さらには組織器官の老若によってその様相と出現率を異にすることも従来の研究によって指摘されている^{9,10)}。したがって、この種の研究結果の比較にはきびしい条件設定を必要とする反面、培養条件のいかんによっては、染色体変異の率と方向づけもある程度までは人為的に制御できるのではないかと期待がもたれるわけである。すでに、変異細胞の出現頻度の向上については、生長物質や核酸類がその誘因としてあげられており^{5,19,23,24)}、この点についての実験結果もだされている。しかし変異の方向づけについては、現在まで明確な知見が得られていない。目下のところ最も可能な誘因と目される生長物質についてさえ、その有効性に賛否両論があるほどである^{2,7,11,13,15,19,20)}。

本研究はこの点に関する何らかの知見を得るために行なったものであるが、以後ここで得られた結果について検討する。Table 2 に示された結果を通覧すると、正常な6本の染色体から増減いずれかの方向に変化している細胞の頻度は、全実験区の観察細胞数345の9.6%にあたる。これを各変異型別に算定すると、倍数的変異を起している細胞の頻度は4倍性3.2%、3倍性0.3%及び半数性0.9%となり、異数的変異では高数性2.3%及び低数性2.9%となる。このような培養組織における染色体変異の起源については、タバコの髄にみられるようにすでに原植物の生体内に存在していた変異が培養によって現われたとす見解がある²¹⁾。しかし *Crepis capillaris* は、REINERT and KÜNSTER (1966)¹²⁾によると、*in vivo* では染色体変異をもたない植物の例としてあげられているので、本研究で観察された変異は少なくともその大部分が脱分化によって後成的に起ったものとみてよいであろう。

次に各実験区別に変異の型とその出現頻度をみると、kinetin と NAA の量比とそれらとの間にある関係が見いだされるようである。すなわち、本研究で調査の対象とされた実験区は、全く染色体変異がみられなかったか、みられても95%余の細胞が正常であった区と、倍数的ならびに異数的変異を20%近い高率で示した区とに類別できる。これらの染色体変異率と生長物質の量比との関係

は必ずしも明確とはいえないが、一つの傾向は見いだされようである。一般に、低い変異率は例外もあるが、kinetin 1ppm に NAA が1~10ppm 組合わさった区にみられており、多様な変異が比較的高率にみられるのは、kinetin が含まれていないか、含まれていても極く微量で、それに NAA が1~5ppm 組合わさった区と、kinetin 10 ppm に NAA が1~10 ppm 組合わさった区においてである。得られた結果が多様で、一概にはいえないまでも、NAA に対する kinetin の量比が極端に高いか、もしくは低い場合に染色体の数的変異が起り易い傾向があるといえるであろう。特にこの傾向は kinetin を10 ppm 含んだ区においてかなりはっきりと認められる。一方、カルスの細胞学的安定性は、kinetin と NAA の量的関係が均等に近いほど、より高まる傾向があるといえるかもしれない。この問題については、従来からいろいろな植物で研究されており、培地の生長物質の組成が各種倍数性核の形成に関与するという見解もあり^{2,7,11,15,20,24)}、反面それに対する否定的見解もだされている^{13,16)}。これは生長物質に対する反応性が植物の種類や組織器官によって異なるためとも考えられるが、少なくとも本研究に関する限り、培地の生長物質の組成がカルスの染色体変異に対して、その誘因として無視しえないかわりをもっているといえるようである。

脱分化過程における染色体変異の成因については、現象的には、後期分裂像の解析からそれを推知できるはずである。しかし本研究では、後期分裂像を得るのが困難であったために、この点についての明確な知見は得られていない。ただ、しばしば染色体の不分離現象が散見されているので、これが少くも異数的変異の一因であることは確かである。この点に関する従来の研究によると、上記不分離のほか、核内分裂 (endomitosis)、多極分裂、染色体遅滞、染色体橋、染色体切断などがカルスにおける染色体変異の成因としてあげられており、事実その観察結果も報告されている^{1,18)}。したがって、これらの分裂異常が本研究の場合にも関与しているものと推察されるが、確かなことは今後の研究をまつほかない。さらに、このような分裂異常に対して生長物質がどのような仕組みで作用するのかという問題もあわせて、今後の研究によって明らかにされるべきであろう。

摘 要

1) 植物培養組織の脱分化過程における染色体の数的変異とそれに対する生長物質の効果をj知るために、培地の kinetin と NAA の量比を変えて、*Crepis capillaris* ($2n=6$) の葉片を培養し、形成されたカルスの染色体数の算

定と生長物質の効果を検討した。

2) 染色体の数的変異は、全調査細胞数 345 の 9.6 % の細胞で観察され、そのうち倍数的変異は 4 倍性 3.2 %, 3 倍性 0.3 % 及び半数性 0.9 % であり、異数的変異は高数性 2.3 % 及び低数性 2.9 % であった。このような変異の成因については十分な知見がえられなかった。

3) 染色体変異と生長物質との関係は必ずしも明確ではなかったが、両者の間に次のような一般的な傾向はみいだされるようである。多様な変異が比較的高率（調査細胞数の 15~20%）に起るのは、kinetin に対する NAA の量比に極端な高低がある場合であり、変異が比較的低率（調査細胞数の 5 % 以下）にみられるのは、kinetin と NAA の量的関係が均等に近い場合である。

引用文献

- 1) BAYLISS, M.W.: *Nature*, **246**, 529-530, 1973.
- 2) BENNICI, A., M. BIATTI, F. D'AMATO and M. PAGLIAI: *Le cultures de tissus de plants*, Coll. Intern. C.N.R.S. **193**, 245-250, 1971.
- 3) D'AMATO, F.: *Caryologia*, **4**, 311-358, 1952.
- 4) —: *Crop Genet. Resources for Today and Tomorrow*, **12**, 333-348, 1975.
- 5) FOX, J.E.: *J. Heredity*, **63**, 113-118, 1963.
- 6) MARCHETTI, S., G. ANCORA and A. BRUNORI: *Z. Pflanzenphysiol.*, **78**, 307-313, 1976.
- 7) MATTHYSSE, A.G. and J.G. TORREY: *Bot. Gaz.*, **130**, 62-69, 1969.
- 8) MURASHIGE, T. and F. SKOOG: *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497, 1972.
- 9) NOVÁK, F.J. and B. VYSKOT: *Z. Pflanzenzuchtg.*, **75**, 62-70, 1975.
- 10) PARTANEN, C.R.: *Developmental Cytology* (ed. by D. RUDNICK), Ronald Press Co., New York, 1959.
- 11) PÄTAU, K. and N.K. DAS: *Chromosoma*, **11**, 553-572, 1961.
- 12) REINERT, J. and H.J. KÜNSTER: *Z. Pflanzenphysiol.*, **54**, 213-222, 1966.
- 13) SACRISTAN, M.D.: *Chromosoma*, **33**, 273-283, 1971.
- 14) — and M.F. WENDT-GALLITELLI: *Chromosoma*, **43**, 279-288, 1973.
- 15) SHAMINA, Z.B.: *Proc. Symp. on the Mutational Process: Mechanism of Mutation and Inducing Factors* (ed. by Z. Land), Academia, Prague, 1966.
- 16) SHIMADA, T.: *Jap. J. Genetics*, **46**, 235-241, 1971.
- 17) SINGH, B.D. and B.L. HARVEY: *Can. J. Genet. Cytol.*, **17**, 109-116, 1975.
- 18) SUNDERLAND, N.: *Plant Tissue and Cell Culture* (ed. by H.E. SHEET), Blackwell, 1973.
- 19) TORREY, J.G.: *Cell, Organism and Milieu* (ed. by D. RUDNICK), Ronald Press Co., New York, 1959.
- 20) —: *Experimental Cell Research*, **23**, 281-299, 1961.
- 21) —: *Proc. Internat. Conference on Tissue Culture* (ed. by P.R. WHITE and A.R. GROVE), McCutchan Publ. Co., Berkeley, 1965.
- 22) — and Y. SHIGEMURA: *American J. Bot.*, **4**, 334-344, 1957.
- 23) VENKETESWARAN, S. and E.B. SPIESS: *Cytologia*, **28**, 201-212, 1963.
- 24) 山辺仁子, 山田卓三: 染色体, **94**, 2923-2931, 1973.