四倍体稲の研究 第1報

稲のコレヒチン処理の方法

岡 彦 一

台湾省立農學院*

昭和 28 年 3 月 17 日 受領

UDC 582,542.1 : 576,312,33 :
575. 088. 1

稲品種の系統発生的分化研究の参考とすることを主要な目的として、1947 年から 51 年の間に台湾省立農學院において、筆者は東亜各地の多数の品種からそれぞれの四倍体を育成し、それらの品種内変異、品種間変異、 F_1 雑種の性質などを調査した。本報にはまづ、コレヒチン処理によつて四倍体品種を育成する方法を述べる。

従来河原²⁾、近藤³⁾、Beachell and Jones¹⁾ 等はそれぞれやや異なる種子浸漬法を試みたが、いずれも成功率は低く、稲の人為四倍体育成はかなり困難であると考えられてきた。最近田畑及び栗山⁶⁾ は発芽種子を倒立して、又 Cua¹⁰⁾ は幼芽鞘を縦裂して幼芽をコレヒチン液に浸漬することによつて、かなり良好な成績が得られたことを報告している。筆者の見出した方法は暗黒中で種子を発芽することによつて、第一節を穀殻の外に伸長させ、第一節部を処理する方法である。その他の処理法をも試みたが、それらの成績は以下に述べる如くであつた。

材 料

栽培稲の系統発生的分化についての筆者の従来の各種報告⁵⁾ にのべたのと同じの約 120 品種の稲を用いた。それらの原産地はインドシナ、台湾、ヒリッピン、インドネシア、印度、日本、中国等である。研究室に入手後数回の系統栽培を繰返して保存してきたものである。コレヒチン処理には、デシケーターに保存した充実良好で発芽力が完全な種子を用いた。現在まで四倍体を育成し得たものは、これらの中の 74 品種である。

方法と結果

(1) 種子浸漬法

1947 年 2 月から数回に亘つて穀種子或は脱稃した玄米、或はそれらの発芽を始めたものを用いて、種々の温度、濃度、及び処理時間の種子浸漬法を試みた。さらに発芽種子の Coleoptile の先端を除去した後処理すること、発根を促進するため Heteroxine を併用すること等も試みた。しかしいずれの方法によつても処理後の幼植物がやや顕著な肥厚を示す程度に処理すると、死亡率が著しく高く、残存植物の葉片中には、気孔細胞の大きさから四倍体と思われる組織がしばしば見出されるが、四倍体の特徴を示す穂は殆ど見出されなかつた。従つて種子浸漬法は四倍体稲を育成するためには役立たないと考えられた。なお死亡率は処理温度が高い場合に特に著しく、また品種によつて異なることを知つた。第 I 表はその一例を示す。その他の結果は発表を略く。

(2) 第一節処理法

種子浸漬法の成績がよくないのは、植物体全体が Colchicine の毒作用を受けるためであると考えられる。なるべく成長点の部分だけを処理するため、甘蔗等の場合^{8,9)} を参考として、以下に述べる方法で、第一節部の処理を試みた。

* Taiwan Provincial College of Agriculture, Taichung, Formosa.

Table I. Results of seed soaking in colchicine solution of different concentrations at different temperatures.

Concentration (%)	Temperature (C)	Num. of treated seeds	Degree of thickening	% of surviving	Num. of chimaera plants
0.2	Average of 20°, 30°, 40°	120	2.4	15.0	0
0.1		121	2.2	20.8	1
0.05		105	1.7	25.0	1
0.025		118	1.0	28.3	0
1.1	20°	73	1.7	30.5	0
"	30°	66	2.0	30.0	1 (?)
"	40°	55	2.4	5.0	0
(Variety)	Average of different concs. & temps.				
1		269	2.6	2.2	0
521		268	2.2	41.2	3

Remarks : 1) Seed was hulled and immersed in water for one day before the treatment. 2) After treating for 24 hours, seed was washed with water and cultured aseptically. 3) Varieties : 1 (70a som câu, Indochina) and 521 (Kisshin, Japan) 4) Degree of thickening : 0 No. visible change, 1...Plumule being twice as large as the normal in diameter, 2...Spindle shaped (more than three times in diameter), 3...Killed and rotted.

供試種子を水銀剤で消毒し、一昼夜室温で浸水後、飽和量の約30~40%の水分を含む砂中に胚が正しく上向になるように浅く埋め、30°Cの完全に暗黒の恒温器内に2~4日間放置する。その日数は別に調査した各品種の発芽速度と暗黒中における第一節間の伸長速度⁵⁾によつて、第一節間が5, 6ミリに伸長する様に定める。恒温器から試料を取出して、直ちに第一節を中心として、上下約1ミリの幅に Lanoline に Colchicine を混合したものを塗布するか、または少量の脱脂綿を巻いて Colchicine 水溶液を与える。

Table II. Results of the treatment with colchicine lanoline paste of different concentrations.

Days from water soaking of seed to treatment	Concentration (%)	Num. of seeds	Degree of thickening	% of surviving in thickened seedlings	Num. of chimaera plants
4	?	68	0.1	0	—
"	3	73	0.4	22	1
"	3a	70	0.4	50	2
"	4	73	0.6	28	1
3	3	55	0.5	27	1
4	"	73	0.4	22	0
5	"	61	0	—	—

Remarks : 1) Date of water soaking of seed : June 11, 1948. 2) Seedlings were cultured in a dark incubator at 30° C, and lanoline paste was applied on the first node drawn out of the hull. 3) After the treatment (3 days), sand culture for 10 days, and thickened plants were selected. 4) 3a : A bit of water was added to the 3% lanoline paste. 5) Varieties : 1 (70a som câu), 521 (Kisshin) and 647 (Padi ase banda, Celebes). 6) *Chimaera of tetraploid and diploid parts in a same plant.

この際第Ⅱ表に示すように、播種後処理までの日数は幼芽が処理可能の大きさに達する限り、短かいほどよい。これは恐らく Coleoptile が老熟するに従つて、組織中の薬品の浸透性が低下するためであろう。Coleoptile が老熟しその先端を破つて第一葉が出現した場合には、第一節部の片側の表皮を傷つけると処理の効果が顕著である。また品種によつては、第一節間と同時に第二節間が伸長するものがあるが、この場合成長点は第二節の内部にあるから、Coleoptile の一部を除去して第二節に処理せねばならない。Colchicine の濃度は3～4%が適当であり、Lanoline にあらかじめ少量の水を混合すると効果はやや改善される(第2表)。水溶液を用いる場合には、自然の乾燥、或は幼芽先端からの溢水等によつて、正確な濃度を保つことは困難であるが、0.1%液の一滴を6時間毎に与える程度が適当である。処理の期間は処理部の直径が正常の約2倍に肥厚する程度が適当と認められ、通常2～3日である。

処理後は処理部分が埋まる程度に砂を追加し、稀薄な春日井氏水稻培養液を与えて、室内で培養した。1週間経過後、肥厚した生存個体を選んで、消毒土壌に移植漸次日光直射の時間を増加しつつ、苗を培養し、本葉4～5枚に達した時水田に移植した。他の植物で常に経験されるのと同様に、肥厚個体は成長が遅く、処理後水田移植までの日数は通常の苗代日数の約2倍を要する。

Fig. 1 Chimaera of diploid part and tetraploid part in a panicle
○ Diploid grain
◇ Tetraploid grain
●◆ Sterile grain

Table III. Intervarietal variation of the degree of thickening and the percentage of surviving in thickened plants.

Variety group	Degree of thickening							% of surviving						Num. of vars.
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	0	20	40	60	80	100	
Continental														
Insular,														
tropical														
temperate														
Total														

Remarks: 1) Date of water soaking of seed: February, 1948. 2) Seedlings were cultured in a dark incubator, and a drop of 0.1% water solution of colchicine was applied on a piece of cotton winded round the first node. (4 times a day for 3 days).

またこの間に死亡する個体は少なくない。肥厚個体の生存率は品種によつて異なり、第Ⅲ表に示すように、概して大陸型品種⁵⁾には、死亡率が高いものが多かつた。また第Ⅳ表は1947年から50年の間に多数の品種について行われた処理試験の結果の合計である。第Ⅳ表を見ると大陸型品種は概して死亡率の高いことと共に、夏(室温27°～30°)には冬(17°～22°)より肥厚程度は稍低く、死亡率は稍高いことが認められた。

なお第V表のようにヘテロキシンの併用によつて肥厚個体の生存率はやや改善されるようであつた。

Table IV. The result of breeding of tetraploid plants by the first node treatment method in total.

Treatment			Variety group	Num. of vars.	Num. of seeds	Degree of thickening				Num. & % of survivals in thickened plants (1&2)		Num. & % of chimaeral plants		Rate of tetraploids in 2nd generation
Method	Season	No.				0	1	2	3					
Water solution 0.1 %	Winter	P, L	Conti.	43	843	234	77	389	143	101	16.6	25	24.8	111/260
			In. Tr.	28	450	106	39	229	78	114	33.2	15	13.2	43/98
			In. Tem.	20	385	129	45	168	43	96	37.5	24	25.0	46/75
			Total	91	1678	469	161	786	264	311	29.1	64	21.0	200/433
"	Summer	M	Conti.	14	355	228	70	45	12	72	49.6	9	12.5	0/57
			In. Tr.	10	231	52	66	66	47	52	35.2	0	0	—
			In. Tem.	8	155	89	33	27	6	35	51.5	2	5.7	1/30
			Total	32	741	369	169	138	65	159	45.4	11	6.1	1/87
Lanoline paste 3 %	Winter	S, T, V	Conti.	59	1910	1392	135	296	87	190	36.8	45	23.7	95/201
			In. Tr.	33	746	500	47	131	68	102	41.5	28	27.4	37/79
			In. Tem.	8	160	122	12	20	6	16	42.1	4	25.0	9/23
			Total	100	2816	2014	194	447	161	308	40.1	77	25.4	141/303
"	Summer	Q, R, U, W	Conti.	104	2481	1988	253	339	101	172	24.9	32	18.6	57/167
			In. Tr.	56	1101	763	90	168	80	88	26.0	23	26.1	71/83
			In. Tem.	36	859	625	54	144	36	73	31.2	16	21.9	9/20
			Total	196	4441	3376	397	651	217	333	27.4	24	22.2	137/270

Conti. : Continental, In. Tr. : Insular Tropical, In. Tem. : Insular Temperate.

Table V. Test of the effect of heteroxine used together with colchicine (3 %lanoline paste).

A : Mixed with colchicine. B : Used after the colchicine treatment.

Method to use heteroxine	Conc. of heteroxine (%) (in lanoline)	Num. of seeds	Degree of thickening	% of survivals	% of surviving in thickened plants	% of root formation in thickened plants	Num. of chimaeral plants
(Check)	0	79	1.2	49	14	54	0
A	0.33	74	1.5	39	13	67	1
A	1.0	66	1.6	35	19	61	2
A	3.0	75	1.8	35	32	73	0
B	0.33	60	1.3	43	17	63	0
B	1.0	77	1.2	56	26	58	1
B	3.0	73	1.1	52	15	53	0

Remarks : 1) Date of seed soaking : Aug. 2, 1948 2) Varieties : 437 (Pweabinni of mymensingh, India), 521 (Kisshin, Japan) and 564 (Nakamura, Japan). 3) Same to Table 2 in other respects.

3) 四倍体の選択

水田移植後の肥厚個体の生育は漸次に正常になる。出穂後その穂を検査すると、ほぼ 10~25% (第VI表) の個体には、粒の大きさ、芒の発達程度、護穎の大きさ、不稔性等の特徴から四倍体と思われる穂

が見出される。一穂の全体が四倍体と思われる場合が多いが、一穂の中に四倍体の部分と二倍体の部分とが混在する場合もかなり見出される。例えば 1949 年 2 月以後 5 回の処理試験では 256 穂中の 96 穂は明かにキメラであつた。組織の混合の状態は穂に依て異なり、一枝梗に附着する少数の粒だけ四倍体の場合、1 またはいくつかの枝梗が四倍体で、穂の上部、下部、或は左右の片側に集つている場合、不規則に混合する場合等が見出されるが、詳細に観察すると不規則の場合が多い様であつた。第 1 図はキメラの穂の一例を示す。

1 個体中の四倍体（或はキメラ）の特徴を示す穂の数は 1 の場合が最も多く、2 の場合がこれに次ぎ、最高 10 に達したが、一株中の穂の全部が四倍体のものは見出されなかつた。

四倍体の特徴を示す種子から、処理第二代個体を育成して、気孔の大きさ、その他の形態的特徴、一部については根端の染色体数を観察して、第二代が四倍体であるか否かを調査した。その結果によると、第二代にはキメラが出現しないことは言うまでもないが、四倍体と共に二倍体が見出された。外見上四倍体と認められる第一代種子から第二代に四倍体が得られる頻度は、第 IV 表に示すように多数の処理試験の結果を合計すると、ほぼ 40~50 % であつた。第一代の穂の中には四倍体の特徴を示すが、稔実率の高いものがしばしば見出されるが、このような穂から第二代に四倍体が得られる事は稀である。第 VI 表に示すように、第一代の四倍体と思われる穂（又はその一部分）の稔実率と第二代の四倍体出現率との間には負の相関が認められた。なお第一代の同一の穂の四倍体と思われるいくつかの粒は、全部が四倍体或は二倍体である場合が多く、両者が混合している場合は比較的少なかつた。従つて四倍体の特徴を示すと共に稔実率が低い第一代の穂をとると、第二代に四倍体を得る頻度が高い。

Table VI. Relation between the fertility of seemingly tetraploid panicles in the first generation and the percentage of occurrence of tetraploid plants in the second generation.

The 2nd generation	Fertility (%) in tetraploid panicles						Fertility (%) in chimaeral panicles*					
	0	20	40	60	80	Total	0	20	40	60	80	Total
All being tetraploid	7	46	22	7		82	1	12	6	2		21
Mixture	3	5	5	1	1	15		3	3			6
All being diploid	5	22	17	13	5	62		11	7	14	4	36
Total num. of cases (Num. of panicles)	15	73	44	21	6	159	1	26	16	16	4	63

* Fertility in seemingly tetraploid parts of a chimaeral panicle.

なお外見上四倍体と思われる第一代種子から四倍体が生じるか否かは、胚の大きさに依て推定出来ることが認められた。このように内外穎は四倍体の特徴を示すにかかわらず、胚は二倍体の種子が発生することから見ると、一個の花は発芽時にすでにいくつかに分裂した細胞群から発生すると考えられる。なおもし胚嚢または花粉の一方が四倍体の細胞から、他方が二倍体の細胞から生じた場合、三倍体が出来るはずであるが、実際には三倍体と思われる植物は見出されなかつた。これは別に報告するように稲では、 $4x \times 2x$ 及び $2x \times 4x$ の交配が極めて困難であることによるのであろう。

結 論

1) 稲では Colchicine 水溶液浸漬法によつて四倍体を育成することは困難であるが、種子を暗黒中で発芽し、第一節（第二節間が伸長する品種では第二節）が籾の外に出た後、第一節に約 3 % の Colchicine を含む Lanoline を塗布するか、或は脱脂綿を巻いて 0.1 % の水溶液を与えると、かなり

高率で四倍体が得られる。

2) Colchicine による肥厚個体の生存率は品種によつて異なり、大陸型品種には生存率が稍低いものが多い。成熟期に達した肥厚個体の約 10~25 % には、四倍体の特徴を示す穂または一穂中にキメラとして混在する四倍体の部分が見出される。四倍体の特徴を示す種子から得られる次代植物の 40~50% は四倍体であつた。第一代の四倍体と思われる穂（または部分）の稔実率が低い程、次代に四倍体が出る頻度が高い。

3) 東亜各地の約 120 品種を処理して、74 品種から、それぞれの四倍体を育成した。

文 献

- 1 Beachell, H. W. and Jones, J. W. 1945: Tetraploids induced in rice by temperature and colchicine treatment. *Jour. Amer. Soc. Agron.* 37 (3) 165-174.
- 2 河原栄治, 1941: 水稻のホルヒチン処理実験, 農及園 16 (8) 1392-1397.
- 3 近藤頼己, 1942: コルヒチン処理による稻ポリプロイドの誘発, 農及園 17, 209-211.
- 4 中村迎, 1939: コルヒチンと倍数植物の育成, 台湾蔗作研究会報, 17 (9) 405-415.
- 5 Oka, H., Lu, Y.C. and Tsai, K.H. Phylogenetic differentiation of the cultivated rice plant. I. Varietal variation of various characters. *Agr. Res. Taiwan Agr. Res. Inst.* 2 (3) 1-31.
- 6 田畑, 栗山, 1949: コルヒチンに依る稻の染色体倍加, 遺雜, 24 (3-4), 90-93.
- 7 Tang, D. S. and Loo, W. S. 1940: *Science* 91, 2357.
- 8 山崎守正, 中村迎, 1940: コルヒチン法に依て得たる倍数性高粱, 農及園, 15 (3), 641-647.
- 9 山崎守正, 中村迎, 1943: コルヒチン法に依る倍数性甘蔗の作成に就て, 植及動, 11 (1), 71-72.
- 10 Cua, L.D. 1951: A newly devised colchicine method for inducing polyploidy in rice. *Bot. Gazette*, 112(3).

Summary

OKA, H.: STUDIES ON TETRAPLOID RICE I. METHOD OF COLCHICINE TREATMENT IN RICE.

It seemed difficult to obtain tetraploid plants of rice by the soaking of seed into colchicine water solution. The following method was found to be good: to germinated seed on moistened sand in a dark incubator, and after the elongation of first internode out of the hull, to apply lanoline paste containing 3 % of colchicine on the first node, or a drop of 0.1% water solution on a small piece of absorbent cotton winded round the first node (4 times a day for 3 days). Thus, seedlings thickened by the effect of colchicine were selected after a week, and were cultured in pots with sterilized soil.

A half or more of them died during the seedling stage; the percentage of death was found to be different with the variety. Varieties of "Continental" group seemed somewhat higher in the percentage of death than "Insular" varieties.

After the heading, panicles (or chimaeral parts of a panicle) showing some characteristics of tetraploid are found in some 10% to 25% of the thickened plants. And the plants raised from the seemingly tetraploid seeds were found to be tetraploids in 40% to 50% of cases. The lower the fertility of seemingly tetraploid panicles, the higher the frequency to gain tetraploid plants in the second generation.

By the above mentioned method, 120 varieties of various districts of Eastern Asia were treated, and tetraploid strains were obtained from 74 varieties.