

栽培イネ実用品種のコルヒチンによる倍加個体の選抜法

稲崎 新・升水知佳¹⁾・井手一夫・児玉裕也・北ノ菌涼一・小川紹文

宮崎大学農学部植物生産科学講座, ¹⁾ 株式会社 ウチムラ

(2007年1月29日 受理)

Selection method of tetraploid plant induced by colchicine treatment in commercial rice variety

Arata INAZAKI, Chika MASUMIZU¹⁾, Kazuo IDE, Hiroya KODAMA,
Ryoichi KITANOSONO, Tsugufumi OGAWA

Division of Plant Production Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

¹⁾ UCHIMURA Corporation

Summary : To develop introgression lines with the chromosome segments of wild rice possessing different genome from cultivated rice in a conventional breeding program, the selection method of tetraploid plant induced with colchicine treatment in commercial rice varieties was investigated as the first step.

The frequency of plants having larger grains compared with those of diploid commercial varieties, Koshihikari, Nipponbare and Taichung 65 was 3.8 %, 9.5 % and 1.4 %, respectively, by the treatment of 0.1 % colchicine solution to the young seedling. In this process, no selection of the seedling was carried out after the colchicine treatment.

Tetraploid plants of Koshihikari, Nipponbare and Taichung 65 were obtained in about 20% plants grown up from the large grains.

From the result, it is suggested that tetraploid plant of commercial rice variety can be induced by the treatment of 0.1 % colchicine solution to a minimum of 100 grains with no selection at seedling stage.

Key words : Rice, Commercial variety, *O. sativa*, Tetraploid, Colchicine

緒言

通常の交配育種法を用いて、栽培イネと異なるゲノムを持つ野生イネの遺伝子(染色体断片)を栽培イネに導入するには多大の労力を要する。すなわち、栽培イネ (Aゲノム) と異種ゲノム野生イネとの交配で得られるF₁雑種は完全不稔でF₂種子を得ることは不可能である。また、両種のF₁雑種に栽培イネを戻交配して交配種子を得ることも困難である。しかし、栽培イネ実用品種の4倍体を作成して野生イネと交配し、この雑種に栽培

イネを戻交配することによって稔性がある雑種を得ることができ (Shin & Katayama 1979), 野生イネの染色体断片を栽培イネに導入することが可能となる。栽培イネを倍加する手法およびその結果については古い報告 (真島 1940, 1952, Oka *et al.* 1954, Bouharmont 1963a, b) が見られるが、それらは4倍体の特性を研究することが主な目的であり、通常の育種事業において野生イネの形質導入育種を意図して、最近の実用品種を倍加した報告は見られない。

この観点から、野生イネの形質を導入した後代系統の育成システムを確立するために、栽培イネの実用品種の4倍体を得る選抜方法を検討した。

材料および方法

栽培イネ実用品種として「コシヒカリ」、「日本晴」および「台中65号」を供試した。「コシヒカリ」は現在わが国で最大の栽培面積を示す品種であり、「日本晴」および「台中65号」はゲノム分析に最も広く用いられている品種である。「日本晴」および「台中65号」は九州大学農学部育種学研究室から、「コシヒカリ」は九州沖縄農業研究センター水田作研究部稲育種研究室(当時)から分譲を受けた。

各品種について、真島・内山田(1955)の方法に従いコルヒチン処理を行った。乾燥種子を2mm目の金網に胚が上になるように挿入し、シャーレ(内径8.5cm)内の蒸留水中に金網ごと浸し、20°C一定、暗黒下のインキュベーター(日本医化器械製作所, LH 200 RS)内で苗を養成した。

第一葉から第二葉が出た時期に幼芽の先端を切つて、4~5mmの高さに揃え、0.1%コルヒチン水溶液を入れたシャーレ(内径8.5cm)に、金網を逆転し幼芽だけが浸るようにした。この時、根の上には乾燥を防ぐために含水ろ紙をのせ、25°C一定で約24時間処理した。処理後、半日間水洗し、幼植物を金網から外して苗箱に移植した(「コシヒカリ」:4月25日、「日本晴」:5月2日、「台中65号」:4月26日)。移植後はガラス室内で育苗した。

コルヒチン処理苗は、2005年宮崎大学農学部附属自然共生フィールド科学教育研究センター・木花フィールド(農場)内東水田に、1株1本植え(行間30cm×株間15cm)で、生育状態によって2回に分けて移植した(6月15日, 30日)。

登熟期に各品種の粒大および粒の形状から、大粒を含む個体を選抜して収穫した。

2006年各品種において大粒で倍加していると推測された種子を同水田に1株1本植えて同様に移植した。四倍体は茎葉が粗剛な感があり、茎が太く、籾は大きく、太い短い芒をつける。また、3倍体(ほぼ完全不稔)に比べて若干草丈が低いが稔性はかなり高く、6%から38%の間を変異すると報告されている(盛永・栗山 1946)ことから倍加個体をこのような形態から識別した。

結 果

1. 一次選抜(2005年)

「コシヒカリ」、「日本晴」および「台中65号」について、約1,100粒のコルヒチン処理(0.1%溶液)によって、いずれの品種においても倍加したと推定される有意に大きな粒が出現した(Table 1, 2, 3)。

「コシヒカリ」においては、コルヒチン処理粒数1,125粒の内、本田に移植できた本数が630本であったことから、生存率は56.0%と算出された(Table 1)。登熟期に各個体の粒の大きさを観察し、同品種の2倍体の粒と比較して大きな粒を倍加粒とし、1粒でも大きな粒が見出された個体を倍加粒を持つ個体として算出した。なお、得られた大粒は、その形質によってAおよびBに分類した。具体的には、2倍体の粒よりも大きいうえに4倍体の特徴的な形質である芒がある、ふ毛が長いという特徴をもつ粒はAとし、芒やふ毛の形質は明確でないが粒は大きいという特徴をもつ粒はBとした(Table 2)。倍加したと推定した個体数は43個体であり、コルヒチン処理粒数(1,125粒)と倍加粒を持つ個体数(43個体)から、倍加比率は3.8%と算出された。また、倍加したと推定した粒の個体内における出現状況を調査することで、倍加がおきた部位を特定した。つまり、全ての穂の全粒が倍加粒であると推定されれば、倍加部位は「個体」とし、1穂の全粒が倍加粒であると推定されれば、倍加部位は「穂」とし、1穂に枝梗ごとで倍加粒が着いていれば「枝梗」とし、1穂に1粒でも大きな粒があれば「穎花」とし、
、
の出現部位が混合していた場合は穂/枝梗/穎花、穂/枝梗、穂/穎花および枝梗/穎花にそれぞれ分類した(Table 2)。また、得られた倍加したと判定した粒の粒大は、2倍体の粒と比較して有意な差があり、長さ×幅は7.1 mm²、厚さは0.2 mm増加していた(Table 3)。

Table 1. The frequency of plants with large grains in the panicle.

品 種	処理粒数	栽植本数	生存率(%)	大粒があった個体数	個体比率(%)
コシヒカリ	1125	630	56.0	43	3.8
日本晴	1029	573	55.7	98	9.5
台中65号	1175	998	84.9	17	1.4

Table 2. The part of plant obtained large grain.

品 種	大粒が得られた部位								獲得粒数	種 別	
	個体全体	穂	穂/枝梗/穎花	穂/枝梗	穂/穎花	枝梗	枝梗/穎花	穎花		A	B
コシヒカリ	0	4	11	4	7	4	12	1	2029	1105	924
日本晴	0	6	21	26	1	6	30	8	3496	1540	1956
台中65号	2	2	0	0	0	3	10	0	568	369	199

A: 典型的な倍加粒の形質をもつもの.

B: 粒が大きいもの.

Table 3. The grain shape of the diploid plant and the obtained large ones.

品 種	長さ (mm)	幅 (mm)	厚さ (mm)	長さ/幅	長さ×幅
コシヒカリ (2X)	7.2	3.3	2.3	2.2	24.2
コシヒカリ (L)	8.9**	3.5**	2.5**	2.6**	31.3**
日本晴	7.3	3.3	2.3	2.2	23.8
日本晴 (L)	8.9**	3.4**	2.5**	2.6**	30.4**
台中65号 (2X)	7.5	3.4	2.3	2.2	25.6
台中65号 (L)	8.3**	3.5	2.5**	2.4**	29.0**
農林29号 (2X)	7.2	3.2	2.2	2.2	23.3
農林29号 (4X)	10.3**	3.4**	2.5**	3.0**	35.2**

2X: 2倍体, L: 得られた大粒種子, 4X: 4倍体

**: 1%水準で有意差あり.

「日本晴」においては、コルヒチン処理粒数1,029粒の内、本田に移植できた本数が573本であったことから、生存率は55.7%と算出された (Table 1)。登熟期に、「コシヒカリ」と同様の基準で倍加粒を持つ個体を推定した。コルヒチン処理粒数1,029粒の内、生存して倍加粒を持つ個体と推定されたのは98個体であったため、倍加比率は9.5%となった (Table 1)。また、倍加したと判定した粒の粒大は、2倍体の粒と比較して有意な差があり、長さ×幅は6.6 mm²、厚さは0.2 mm増加していた (表 2)。

「台中65号」においては、処理粒数1,175粒の内、本田に移植できた本数が998本であったため、生存率は84.9%となった (Table 1)。コルヒチン処理粒数1,175粒の内、生存して倍加粒を持つ個体と推定されたのは17個体であったため、倍加比率は1.4%となった (Table 1)。また、倍加したと判定した粒の粒大は、2倍体の粒と比較すると、幅に関しては有意な差が認められなかったが、粒全体の大きさに関しては1%水準で有意な差があり、長さ×幅は3.4 mm²、厚さは0.2 mm増加し

ていた (Table 3)。

3品種の生存率を比較すると、「台中65号」が最も高く (84.9%)、「コシヒカリ」および「日本晴」 (それぞれ56.0%、55.7%) の約1.5倍の数値を示した。一方、倍加比率は「日本晴」が最も高く (9.5%)、「コシヒカリ」 (3.8%) の2.5倍の数値を示し、「台中65号」は最も低く (1.4%)、「コシヒカリ」の1/2、「日本晴」の1/6程度の数値を示した。また、倍加したと推定した個体は、ほとんどが部分的に倍加したキメラ個体であったため、その個体について倍加部位を特定した。得られた結果によると、3品種は共通して倍加部位が枝梗/穎花である個体が最も多かった (「コシヒカリ」: 12個体、「日本晴」: 30個体、「台中65号」: 10個体)。これらの個体は、1次枝梗および2次枝梗の粒全体が倍加している場合と、キメラ状に倍加している場合とが混合している状態であった。

また、「コシヒカリ」および「日本晴」では、穂/枝梗/穎花、穂/枝梗および穂/穎花に倍加粒が出現する個体が多い傾向にあった。一方、「台中65号」では穂と他の部位の両方に倍加粒が出現して

いる個体は見られなかった。また、「台中65号」では個体全体が倍加したと推定されるものが2個体存在したが、「コシヒカリ」および「日本晴」では存在しなかった。

品種全体で得られた倍加粒数は、「日本晴」が最も多く(3,496粒)、「台中65号」(568粒)の約6.2倍の数値を示した。次に多いのは「コシヒカリ」(2,029粒)で、「台中65号」の約3.6倍であった。得られた倍加粒の特徴に関しては、「コシヒカリ」では、Aは1,105粒(54%)、Bは924粒(46%)あり、典型的な倍加粒の形質(粒が大きい、芒がある、ふ毛が長い)をもつ傾向にあった。一方、「日本晴」では、Aは1,540粒(44%)、Bは1,956粒(56%)あり、芒やふ毛の形質は明確でないが粒は大きいという傾向にあった。「台中65号」では、Aは369粒(65%)、Bは199粒(35%)あり、典型的な倍加粒の形質をもつ傾向が3品種中で最も強かった(Table 2)。

供試した実用3品種の粒大の変化を自然に倍加した「農林29号」と比較すると、特に長さの変化が「農林29号」ほど顕著ではなかったものの、各品種の2倍体と4倍体(推定)の粒大には1%水準で有意な差が認められた(Table 3)。

2. 二次選抜(2006年)

2005年にコルヒチン処理して得られた大粒種子を播種した後、1株1本植で本田に移植した。本田栽植中に立毛および収穫期に植物体の形態および穂の形状から2倍体と4倍体を識別した。立毛観察では、コルヒチン処理当代のように、穂に大粒と小粒が混在するようなキメラ状個体の出現は見られなかった。従って、分けつ数が少なく、茎が太く、葉も大型となり、粒が明らかに大きくなっている個体を4倍体と判定した。

「コシヒカリ」の大粒から育成された個体では、1,105のA型粒から150の4倍体個体(13.6%)が出現し、924のB型粒からは212の4倍体個体(22.9%)が得られた。「コシヒカリ」の大粒の全体からは17.8%の4倍体の出現率であった(Table 4)。

「日本晴」の大粒から育成された個体では、1,540のA型粒から119の4倍体個体(7.7%)が出現し、1,956のB型粒からは754の4倍体個体(38.5%)が得られた。「日本晴」の大粒の全体からは

Table 4. The frequency of tetraploid plants obtained from the large seeds.

品 種	選抜種子 タイプ	播種粒数	倍加個体	倍加個体 出現率(%)
コシヒカリ	A型	1105	150	13.6
	B型	924	212	22.9
	計	2029	362	17.8
日本晴	A型	1540	119	7.7
	B型	1956	754	38.5
	計	3496	873	25.0
台中65号	A型	369	33	8.9
	B型	199	64	32.2
	計	568	97	17.1

A型: 典型的な倍加粒の形質を持っていた粒。
B型: 粒が大きかったもの。

Table 5. The grain shape of diploid and tetraploid plants.

品種名	播種した 種子タイプ	籾長(mm)	籾幅(mm)	籾厚(mm)
		平均	平均	平均
コシヒカリ	2X	7.2 ^b	3.1 ^b	2.3 ^b
	A型	8.7 ^a	3.6 ^a	2.5 ^a
	B型	8.8 ^a	3.6 ^a	2.5 ^a
日本晴	2X	7.0 ^b	3.1 ^b	2.2 ^b
	A型	8.8 ^a	3.4 ^a	2.6 ^a
	B型	9.0 ^a	3.3 ^a	2.6 ^a
台中65号	2X	7.4 ^b	3.4 ^b	2.3 ^b
	A型	8.6 ^a	3.6 ^a	2.5 ^a
	B型	8.5 ^a	3.6 ^a	2.6 ^a

2X: 2倍体。

A型: 典型的な倍加粒の形質を持っていた粒。

B型: 粒が大きかったもの。

25.0%の4倍体の出現率であった(Table 4)。

「台中65号」の大粒から育成された個体では、369のA型粒から33の4倍体個体(8.9%)が出現し、199のB型粒からは64の4倍体個体(32.2%)が得られた。「台中65号」の大粒の全体からは17.1%の4倍体が出現した(Table 4)。

供試したいずれの品種でも、A型粒よりもB型粒からのほうが4倍体の出現頻度は高かった。大粒全体からみると、4倍体の出現頻度は17.1~25.0%であった(Table 5)。

考 察

実用品種である「コシヒカリ」、「日本晴」および「台中65号」をコルヒチン処理して、4倍体が容易に得られるかどうかを実験した。イネの人為的4倍体は、これまでコルヒチン処理(真島

1940, 1952, Cua 1950, 岡 1953, Oka *et al.* 1954, Bouharmont 1963a,b) や温度衝撃 (Beachell and Jones 1945) またはX線照射 (Ichijima 1934, Katayama 1963) で誘起されている。その中でも、コルヒチン処理の手法については事例が多く、田畑・栗山 (1949) は発芽種子をコルヒチン液に倒立浸漬し、Cua (1950) は幼芽鞘を縦裂して処理し、岡 (1953) は暗所で発芽させた幼植物の第1節をラノリン法で処理し、また真島・内山田 (1955) は金網に挿入支持して発芽させた幼芽の上部を切断してコルヒチン液中に倒立浸漬し、それぞれの手法において比較的多数の倍加個体を得ている。根の成長を害せず、成長点に的確に処理でき、多数の倍加個体が得られることから、本報におけるコルヒチン処理は真島・内山田 (1955) の方法に準じておこなった。真島・内山田 (1955) は、日本イネ8品種に対し、各品種100粒程度かそれ以下の種子にコルヒチン処理を行い、倍加したと推定される個体を得た。8品種について4倍体となったと考えられる個体の出現率は平均14.5%であり、最高倍加率は「凱旋」の28.1%、最低倍加率は「神力糯」の2.9%であった。しかし、処理数が少なく(30粒前後)、処理の適否によっては比率が大きく変わる可能性が推測される。すなわち、報告されている大粒を含む個体はほとんどの品種で10個体以下である(真島・内山田1952)。大粒を持つ個体の頻度が高い理由は、苗の時期に肥厚幼芽を選抜したことに起因していると推定される。本実験では、「コシヒカリ」、「日本晴」および「台中65号」に1000粒以上のコルヒチン処理を行い、苗の時期に選抜を行わずに移植して、大粒の出現する個体を判別した。その結果、有意に大きな粒を持つ個体の出現頻度はそれぞれ3.8%、9.5%および1.4%となった。

このことは、コルヒチン処理により大粒を持つ個体を得るためには少なくとも100粒に対して処理することが望ましいと言える。また、個体全体が倍加することはほとんどなく、穂にキメラ状に大粒が分布していたことから、処理個体は本田に栽植し、穂の観察から大粒を選抜する必要がある。処理当代から得られた大粒種子を播種し、本田に移植して4倍体個体を選抜したところ、17.1~25.0%の頻度で4倍体を得た。A型大粒とB型大粒由来の個体を比較すると、概してB型大粒由来

の個体のほうが4倍体の出現頻度が高かった。このことは処理当代において、4倍体粒を選抜するには粒の大きさのみに着目するほうが効率的であると言える。

以上の結果から、実用栽培イネの4倍体を簡易に得るには、100粒以上の種子についてコルヒチン処理をし、処理当代で大きな粒を選抜すれば、次代で約20%前後の比率で4倍体が得られるものと推定される。

要 約

通常の交配育種法によって、野生イネの形質を栽培イネに導入するための最初の段階として、栽培イネ実用品種の人為4倍体を作成するためにコルヒチン処理による人為4倍体の出現頻度を再検討した。

栽培イネ実用品種である「コシヒカリ」、「日本晴」および「台中65号」にコルヒチン処理を行ったところ、倍加比率はそれぞれ3.8%、9.5%および1.4%となり、少なくとも100粒以上の幼芽に0.1%コルヒチンを25°Cで24時間処理すれば、大粒を持つ個体を得ることができた。また、この大粒から育成した個体の20%前後は4倍体であった。このことは、100粒以上のコルヒチン処理を通常の育苗ないし栽培をすれば、処理後肥厚苗の選抜などの特別な処理をしなくても、4倍体を選抜できることがわかった。

キーワード： *O.sativa* L. 栽培イネ、4倍体、コルヒチン処理

謝 辞

本研究を実施するに当たり、種子を分譲して頂いた九州大学農学部育種学研究室および九州沖縄農業研究センター水田作研究部稲育種研究室(分譲当時)に謝意を表す。また、圃場栽培において水田管理の労をとっていただいた農学部附属自然共生フィールド科学教育研究センター木花フィールド(農場) 蔭東清一技官に深く謝意を表す。さらに、材料の養成に当たり協力頂いた当講座作物学教育研究分野の教員、院生および専攻生諸氏に感謝を表す。

引用文献

- Beachell, H. M. & J. W. Jones (1945) Tetraploids induced in rice by temperature and colchicines treatments. *J. Amer. Soc. Agron.* **37**, 165-175.
- Bouharmont, J. (1963a) Etude quantitative de la meiose chez le riz autoteraploide. *Cellule* **64**, 29-59.
- Bouharmont, J. (1963b) Pseudo-quadrivalents in autotetraploid rice. *Nature* **197**, 410-411.
- Cua, L. D. (1950) Artificial polyploidy in the *Oryzae*. I. Cytogenetical studies on colchicines induced autotetraploid rice, *Oryza sativa* L. *Seiken Ziho* **4**, 43-53.
- Ichijima, K. (1934) On the artificially induced mutations and polyploid plants of rice occurring in subsequent generations. *Proc. Imp. Acad. Tokyo* **10**, 388-391.
- Katayama, T. (1963) X-ray induced chromosomal aberrations in rice plants. *Japan J. Genetics* **38**, 21-31.
- 真島勇雄 (1940) テトラプロイド稲に関する二三の観察. 遺雑 16, 190-191.
- 真島勇雄 (1952) 四倍体イネの不稔原因に関する考察. 育雑 1, 179-188.
- 真島勇雄・内山田博士 (1955) 高稔性4倍体稲の育成に関する研究. 農研報告 **D5**, 104-136.
- 盛永俊太郎・栗山英雄 (1946) 稲の同質四倍体の稔度向上に対する年次経過と雑種の効果. 遺雑 21, 81.
- 岡彦一 (1953) 稲のコルヒチン処理の方法. 四倍体稲の研究. 第1報. 遺雑 28, 227-232.
- Oka, H., S. C. Hsheh, T. S. Huang. (1954) Studies on tetraploid rice. V. The behaviour of chromosomes in the meiosis of tetraploid rice varieties and their hybrids. *Japan J. Genetics* **29** (5-6), 205-214.
- 田畑久雄・栗山英雄 (1949) コルヒチンによる稲の染色体倍加. 遺雑 24, 90-93.
- Shin, Y. B. & T. Katayama (1979) Studies on *Officinalis* chromosome addition lines to cultivated rice, *Oryza sativa* L. *Bull. Inst. Trop. Agric. Kyushu Univ.* **3**, 1-60.