

# 笑気ガス(N<sub>2</sub>O)処理によるアカクローバ(*Trifolium pratense*)倍数体の誘起

誌名	北海道農業試験場研究報告 = Research bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experiment Station
ISSN	03675955
著者	松浦, 正宏 真木, 芳助 早川, 力夫
巻/号	108号
掲載ページ	p. 99-105
発行年月	1974年3月

# 笑気ガス (N<sub>2</sub>O) 処理によるアカクローバ (*Trifolium pratense*) 倍数体の誘起†

松浦正宏\* 真木芳助\* 早川力夫\*

## Inducing Autopolyploids of Red Clover (*Trifolium pratense*) with Nitrous Oxide

Masahiro MATSU-URA, Yoshisuke MAKI, and Rikio HAYAKAWA

### 1. 緒 言

アカクローバの栽培品種はほとんどが2倍体で染色体数は  $2n=14$  である。近年、同質4倍体 ( $2n=28$ ) が耐病性、耐虫性、収量、永続性の点ですぐれていることが認識され、主としてヨーロッパ諸国で4倍体品種が育成されてきた。わが国にもいくつかの品種が導入され、そのうちの1品種「レッドヘッド」は北海道における奨励品種に決定された。すぐれた4倍体品種を育成するためには、染色体数を人為的に倍数化し遺伝的変異の大きい育種母材の集団を獲得することが前提条件になる。1937年に BLAKESLEE が成功して以来、倍数体の誘起にはコルヒチンが一般的に利用されてきた。アカクローバ4倍体品種の育成においても同様であった。しかし、コルヒチン処理ではキメラ個体の発生が非常に多いこと、大量の育種母材をえるには多くの労力と時間を必要とする等の難点があった。このため育種家は倍数体をつくるため、簡便でより効果的な方法を必要としていた。

1944年に、スウェーデンの ÄSTERGREN<sup>9)</sup> によってはじめて笑気ガス処理による倍数体の誘起が試みられた。彼はしろえんどう (*Pisum sativum*) とたまねぎ (*Allium cepa*) の幼植物を大気圧下 (1気圧) で笑気ガス処理を行なった。しろえんどうでは分裂中の根端細胞の100%がC-核分裂 (核分裂の中期にはいっても紡錘体が形成されず、染色体は細胞内に不規則に散在している。染色体にはやがて縦裂を生じるが両極に分かれることなくスキー状に並び、2倍の染色体数をもつ復旧核をつくる) を起こしたが、たまねぎでは全くC-核分裂が起こらなかった。また、対照として行なった水素ガス処理では、しろえんどうでもC-核分裂は起こらなかった。しかし、彼は笑気ガスの処理圧力をあげさえすればたまねぎでもC-核分裂を起こすると予測した。そして、彼の予測は後年 FERGUSON ら<sup>9)</sup> によって実証された。この方法は、生長中の幼植物の分裂組織あるいは受粉後一定時間が経過して受精が完了し、胚形成のための第1回目の細胞分裂が始まる時期の卵細胞に笑気ガスを作用させて、C-核分裂を起こさせるものである。したがって、受粉後処理の場合は、受粉から処理開始までの時間は植物の種類によって異なり、処理する植物が第1回目の細胞分裂を始める時期を知ることが必要である。笑気ガスは加圧下ですみやかに細胞内に浸透していき、圧力を除くと急速に消失するので、コルヒチン

† 本稿の要旨は昭和48年度日本草地学会秋季大会で発表した。

\* 草地開発第二部 牧草第1研究室

と異なり処理の継続時間を容易にコントロールすることができる。FERGUSON ら<sup>9)</sup> はたまねぎを6気圧で笑気ガス処理し、C-核分裂を誘起している。対照として行なった水素ガス処理でC-核分裂を起こさせるには20気圧が必要であった。このことから、C-核分裂の誘起は単なる圧力の効果ではなく、笑気ガスの効果によるものであることを確認した。

ÖSTERGREN<sup>9)</sup> はさらにオニタビラコ(キク科、フタマタタンポポ属 *Crepis capillaris*)の花を受粉後第1回目の細胞分裂が起こる時期(7時間後)と、第2回目の細胞分裂が起こる時期(21時間後)にわけて笑気ガス処理を行なった。この結果、多くの4倍体とともに3倍体、異数体が得られた。彼は報告の中で、受粉後第1回目の細胞分裂が起こる時期に処理を行なった場合に4倍体の出現率が高いこと、第2回目の細胞分裂が起こる時期に処理を行なうとキメラの植物ができる可能性があること、さらに無処理に比較して稔実率が著しく低下した点を指摘した。NYGREN<sup>9)</sup> はナデシコ科フシグロ属の4つの種(*Melandrium divaricatum*, *M. album*, *M. Boissieri*, *M. macrocarpum*)で複2倍体をつくる目的で、受粉後18~24時間経過してから笑気ガス処理を行なった。5気圧処理では86.1%以上の倍数体を得られ、3倍体が12個体、6倍体が7個体得られた。また、彼は、比較的低い気圧で長時間処理を行なうと、C-核分裂が2度起こり倍数性の高い個体が出現する可能性があることを報告している。ÖSTERGREN<sup>10)</sup> はカナリクサヨシ(*Phalaris canariensis*)と他の1つの種(*P. paradoxa*)の穂を最も若い花が開いた直後に、10気圧で4~12時間処理し、4つの4倍体と2つの異数体を得た。しかし、彼は、*Phalaris*のように開花日に巾があり、自殖性で、しかも受粉から第1回の細胞分裂が始まるまでの時間が一定でない場合には、コルヒチン処理の方がより効果的であろうと報告した。木原ら<sup>4)</sup> は笑気ガス処理によって小麦の染色体を倍数化することに成功した。MONTEZUMA-DE-CARVALHO<sup>5)</sup> は、ちょうせんあさがお(*Datura stramonium*)、ジャガイモ野生種(*Solanum tuberosum* × *S. phureja*)の半数体誘起のために笑気ガス処理を行なった。彼によれば、花粉管中の生殖細胞の核分裂前期に笑気ガス処理によってC-核分裂を起こさせると、倍数の染色体をもった1個の生殖細胞が形成される。これが極核と合体した場合には、その刺激によって卵細胞は単為生殖のように分裂を始めて半数体の胚が形成された。<sup>6)</sup> BERTHAUT<sup>1)</sup> は、笑気ガス処理によるアカクローバ倍数体の誘起に成功した。彼は、受粉後24時間経過して第1回目の細胞分裂が始まる時期に処理を開始し、処理圧力、処理継続時間を変えて、稔実率、倍数体の出現率について調査を行なった。彼は、6気圧で24時間処理した場合に最も良い結果が得られ、調査個体中ほとんど100%が倍数体であったと報告した。また、彼の報告によれば、高圧処理をすると稔実に悪い影響が現われ、7気圧以上では急激に稔実率が低下した。空気だけの高圧に比較して、笑気ガスによる高圧の場合とくにこの傾向が強かった。

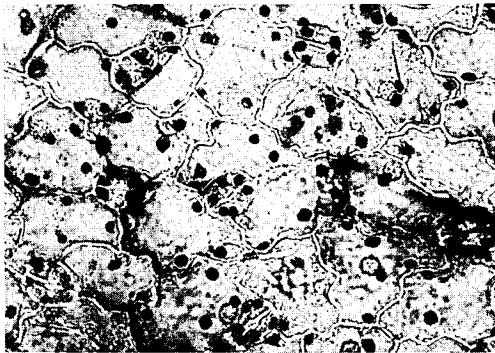
本試験は、アカクローバ4倍体品種の育成を効率的に進めるために、笑気ガスによる効果的な処理方法をみつけるために行なった。

本稿の校閲をいただいた北海道農業試験場草地開発第二部渡辺亀彦部長、本試験の遂行にあたり終始懇切なご指導をいただいた現農林水産技術会議副研究管理官佐藤博保氏に心から謝意を表す。さらに、本試験で使用した笑気ガスは昭和電工株式会社から実験用として供与されたものであり、ここに記して謝意を表す。

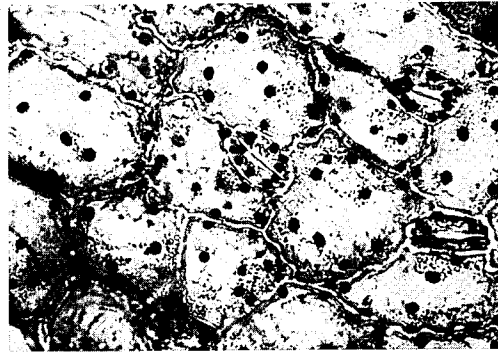
## 2. 試験材料および試験方法

北海道農業試験場で育成された2倍体品種「サッポロ」を1/2000 aポットに養成し、温度

を 20~25°C の範囲に保った温室内で開花期に達した時に人工交配を行なった。人工交配はできるだけ短時間のうちに行ない、受粉から処理開始までの経過時間が一定になるように努めた。受粉後 24 時間経過した時に処理を開始した。処理タンク内に 3 個体をいれて密封し、医療麻酔用の純粋な笑気ガス (N<sub>2</sub>O) を注入して徐々に圧力をあげた。処理気圧は、当初 5.0, 10.0 の 2 水準で行なったが、10.0 気圧処理では植物をタンクから取り出した後で細胞液の浸出、細胞の壊死が起こって全個体が枯死したので、以降は 0.5, 7.5 気圧の 2 水準とした。しがたって、気圧と時間の組合わせによって 6 処理を行なったことになる。1 処理当たり 3 個体、1 個体当たり 2 頭花、計 1 処理 6 頭花の処理を行なった。処理終了後、排気バルブを開いてタンク内の圧力を徐々に下げ、大気圧に戻った時に植物体をタンクから取出した。処理した頭花は温室内で約 1 か月間登熟させてから採種した。倍数化の同定は NÜESCH<sup>7)</sup> の方法によって、孔辺細胞中の葉緑粒の数によって行なった。(Phot. 1, Phot. 2)。各頭花毎に小花数、完熟種子数、未熟種子数の調査を行なった。[(完熟種子数+未熟種子数) ÷ 小花数] × 100 を受精率、(完熟種子数 ÷ 小花数) × 100 を稔実率とした。



Phot. 1. The number of chloroplast in the guard cell (2x).



Phot. 2. The number of chloroplast in the guard cell (4x).

3. 試験結果および考察

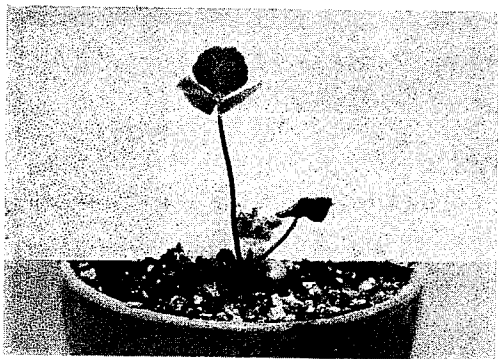
受精率 3 個体 6 頭花の処理別平均値と無処理 3 個体 6 頭花の平均値を Table 1. に示した。有意性検定では処理時間による差は有意ではなく、処理気圧による差は有意であった。7.5 気圧処理の平均受精率は 23% であり、5 気圧処理の平均 39% に比べて 16% 低かった。一方、無処理の平均は 36% で 5 気圧処理の平均値より若干低くなった。とくに、7.5 気圧 36 時間処

Table 1. Average fertility and seeds setting of the treated plants.

Duration hrs. Pressure atms.	12	24	36	Average	Non-Treated	Remarks
Fertility (%)						
5.0	50	26	40	39*	-	Duration x Pressure interaction* l. s. d. for pressure; 11
7.5	24	39	7	23	-	
Average N. S.	37	33	24	31	36	
Seeds setting (%)						
5.0	42	16	27	28*	-	Duration x Pressure interaction; N. S. l. s. d. for pressure; 11
7.5	21	23	5	16	-	
Average N. S.	32	20	16	22	35	

理の受精率はわずかに7%というきわめて低い値であるのに対し、5気圧12時間処理では50%と他の処理に比較してきわめて高い受精率を示し注目された。これが笑気ガス処理の影響によるものか、単に受精率の個体間差に起因するものかは明らかでない。また、処理気圧と処理時間の交互作用が有意であったが、これはTable 4.にみられるように、5気圧と7.5気圧では処理時間による受精率の推移のパターンが異なっていることを示唆している。無処理の平均36%に対し、全処理の平均は31%であった。受精率に関しては、5気圧12時間処理が最も良く、ついで5気圧36時間処理、7.5気圧24時間処理、5気圧時間処理、7.5気圧12時間処理の順に悪くなった。

**稔実率** 受精率同様、処理時間による有意差は認められなかったが、処理気圧間に有意差を示した(Table. 1)。5気圧処理の平均28%に対して7.5気圧処理の平均は16%であり、5気圧処理に比べて12%低かった。稔実率は5気圧12時間処理で最も高く42%であるのに対し、無処理の平均は35%であった。7.5気圧36時間処理の稔実率は受精率同様にわずかに5%ときわめて低い値を示した。全処理の平均は22%であった。他方、無処理では受精率が36%、稔実率が35%とほとんど差がなく、受精した小花はほとんど全部が稔実したことを示している。しかし、全処理の平均では受精率は31%に対し、稔実率は22%と9%低かった。受精率、稔実率の計算に際しては、採種種子中で小さくて扁平なものを未熟種子として取扱ったので、この差が明確になったものである。したがって、稔実率低下の一つの原因として笑気ガスあるいは高圧は受精後の種子の成熟過程に何んらかの悪影響を与え、とくに胚乳形成に障害を起こしたものと考えられる。しかし、未熟種子の発芽試験を行っていないので、胚形成そのものも障害を受けたかどうかは確認できなかった。胚乳形成が妨げられた原因としては次の二つの仮説が考えられる。1) 精核と極核の受精が完全に行われなかった。2) 受精後の細胞分裂の際に、核分裂に異常が起こった。笑気ガスの作用から考えると2)の仮説の可能性が強いと考えられるが、その確認は将来の研究にまたなければならない。



Phot. 3. An abnormal plant produced by nitrous oxide.

**倍数化個体の割合** 処理別の調査個体数、倍数化個体数および倍数化個体中で矮化、などの奇型が現われて、2~3葉期縮葉までに枯死した異常個体(Phet. 3)の数をTable 2.に示した。このような異常個体は、BERTHAUT<sup>2)</sup>もコルヒチン処理によって生じたことを報告した。7.5気圧36時間処理では稔実率がきわめて低かったために採種量が少なく、調査個体数が他の5処理に比べて非常に少なかった。調査個体中の倍数化個体の割合は処理気

Table 2. Number of plants examined, polyploids and abnormal ones.

Pressure atms.	5.0				7.5				Total
	12	24	36	Total	12	24	36	Total	
Number of plants	164	158	126	448	99	162	35	296	744
Polyploids	82	103	104	289	67	136	30	233	522
Abnormal plants	2	9	58	69	2	5	8	15	84

圧間, 処理時間ともに5%水準で有意差が認められた。7.5気圧処理の平均では調査個体中81%が倍数化し, これは5気圧処理の平均68%よりも13%高かった。処理時間による倍数化個体平均値の比較では, 12時間処理が60%で24, 36時間の2処理と比べて約20%低かったが, 24時間と36時間処理の比較ではほとんど差がなかった (Table. 3)。

Table 3. Percentage of polyploids including abnormal ones.

Duration hrs. Pressure atms.	12	24	36	Average	Remarks
5.0	50	78	77	68*	Duration x Pressure interaction; N. S. l. s. d. for pressure; 9 duration; 11
7.5	70	84	89	81	
Average	60	81	83	75	

次に, 倍数化した個体の中で矮化, 縮葉などの奇型を生じ2~3葉期までに枯死した異常個体の割合をみると, 処理気圧平均値間の差は有意でなかったが, 処理時間による差は1%水準で有意であった。12, 24時間の2処理では各3%, 6%と異常個体の割合は非常に低かったのに反し, 36時間処理では5気圧で53%, 7.5気圧では36%と半数近い個体が異常を起こして枯死した (第4表)。

Table 4. Abnormal plants in the polyploids and normal polyploids in the plants examined.

Duration hrs. Pressure atms.	12	24	36	Average	Remarks
Abnormal plants (%)					
5.0	3	8	53	21 N. S.	Duration x Pressure interaction; N. S. l. s. d. for duration; 13
7.5	3	4	36	14	
Average**	3	6	45	18	
Normal polyploids (%)					
5.0	49	72	35	52**	Duration x Pressure interaction; N. S. l. s. d. for pressure; 6 duration; 8
7.5	69	80	55	68	
Average**	59	76	45	60	

5気圧36時間処理という比較的低い気圧で長時間処理した場合に, とくに異常個体の発生が多く注目された。NYGREN<sup>9)</sup>の報告に基づいて考えると, これらの異常個体は長時間の笑気ガス処理によって2回のc-核分裂を行なった結果生じた8倍体であったのかもしれない。

最後に, 異常個体を除いた実際の育種上利用しうる倍数化個体の割合をみると, 処理気圧間, 処理時間ともに1%水準で有意差が認められた。7.5気圧処理の平均値は68%であり, 5気圧処理の52%よりも16%高かった。また処理時間平均値の比較では24時間が最も高く76%, ついで12時間の59%, 36時間の45%の順に低くなった (Table. 4)。

以上の点を総合してみると, 笑気ガス処理によってアカクロバ倍数体を誘起する場合には, 受粉24時間後に処理を開始した場合7.5気圧で24時間処理するのが最も効果的な方法であることが実証された。5気圧24時間処理では7.5気圧24時間処理よりもやや倍数化個体の割合が低くなるが大差はなく, 7.5気圧24時間処理につぐ効果的な方法である。5気圧, 7.5気圧ともに12時間処理では稔実率は高いが, 倍数化個体の割合が低かった。7.5気圧36時間処理では稔実率がきわめて低かった。また, 5気圧, 7.5気圧ともに36時間処理では倍数化個

体の割合は高いが、その中にきわめて高い割合で異常個体が発生するので、このような長時間処理は避けるべきであると考えられる。

#### 4. 摘 要

アカローバ (*Trifolium pratense*) の倍数体をつくるために、受粉24時間後に頭花を笑気ガス ( $N_2O$ ) で処理した。処理気圧は5.0, 7.5, 10.0, 処理時間は12, 24, 36時間であった。

- 1) はじめに試みた10気圧処理では全個体が枯死した。
- 2) 受精率、稔実率ともに低圧、短時間処理の方が高く、とくに7.5気圧36時間処理では極端に低くなった。
- 3) 倍数化個体の割合は5気圧処理よりも7.5気圧処理の方が13%高く、処理時間が長いほど高かった。
- 4) 異常個体の割合は36時間処理で極端に高く、5気圧で53%、7.5気圧では36%に達した。
- 5) 笑気ガス処理によってアカローバの倍数体を誘起するには、7.5気圧24時間処理が最も効果的であり、調査個体中84%が倍数化していた。これに次いで5気圧24時間、7.5気圧12時間処理で良い結果が得られた。
- 6) 36時間という長時間処理は稔実率を低下させるとともに異常個体(矮化、縮葉)の発生がきわめて多くなるので、処理気圧の高低にかかわらず避けるべきであると考えられた。

#### 引用文献

- 1) BERTHAUT, J. (1968): The use of nitrous oxide in the production of autotetraploid cultivars of red clover (*Trifolium pratense*). *Ann. Amélior. Plantes* 18 (4), 381-390.
- 2) BERTHAUT, J. (1965): The production of tetraploid red clover. Experiment on improving doubling techniques. *Ann. Amélior. Plantes* 15 (1), 37-51.
- 3) FERGUSON, G., HAWKINS, S. W. and DOXEY, D. (1950): C-mitotic action of some simple gases. *Nature* 165, 1021-1022.
- 4) KIHARA, H. and TSUNEWAKI, K. (1960): Production of polyploid wheat by nitrous oxide. *Proc. Japan Academy* 36, 658-663.
- 5) MONTEZUMA-DE-CARVALHO, J. (1966): The effect of  $N_2O$  on pollen tube mitosis in styles and its potential significance for inducing haploidy in potato. *Euphytica* 16, 190-198.
- 6) NYGREN, A. (1955): Polyploids in *Melandrium* produced by nitrous oxide. *Hereditas* 41, 287-290.
- 7) NÜESCH, B. (1966): The identification of tetraploids in red clover by the number of chloroplast in the stomata. *Proc. X International Grassl. Congress*, 661-663.
- 8) ÖSTERGREN, G. (1948): A brief note concerning polyploidization by laughing gas on p. 18 in "Contemporary Genetics in Sweden," a booklet issued by the organizing committee of the Eighth International Congress of Genetics Stockholm.
- 9) ÖSTERGREN, G. (1954): Polyploids and aneuploids of *Crepis capillaris* produced by treatment with nitrous oxide. *Genetica* xxII, 54-64.
- 10) ÖSTERGREN, G. (1957): Production of polyploids and aneuploids of *Phalaris* by means of nitrous oxide. *Hereditas* 43, 512-516.

### Summary

## Inducing Autopolyploids of Red Clover (*Trifolium pratense*) with Nitrous Oxide

Masahiro MATSU-URA, Yoshisuke MAKI, and Rikio HAYAKAWA

The purpose of the present experiment was to find the most effective method of inducing tetraploid plants of red clover (*T. pratense*).

The flower head, 24 hours after hand pollination, was treated with nitrous oxide for 12; 24 and 36 hours under three different pressures, 5.0, 7.5 and 10.0 atms.

The results can be summarized as follows:

1. All the plants treated under 10.0 atms. died soon after treatment.
2. Higher percentages of fertility and seed setting were obtained with the lower pressure and shorter hour treatment. These percentages were considerably low under the 7.5 atms.—36 hrs. treatment.
3. The percentage of the polyploids among the identified plants was 13% higher under the 7.5 atms. treatment than the 5.0 atms. This percentage became higher, as the duration of treatment became longer.
4. The percentage of abnormal plants among the polyploids was tremendously high in the 36 hrs. treatment, 53% under 5.0 atms. and 36% under 7.5 atms.
5. The 7.5 atms.—24 hrs. treatment was most effective in the production of polyploid red clover with nitrous oxide. 84% of the identified plants was polyploids in this treatment. This was followed by the 5.0 atms.—24 hrs. and 7.5 atms.—12 hrs. treatments.
6. The duration of treatment should not be 36 hours under both the 5.0 and 7.5 atms., as such a long time treatment reduces the fertility tremendously and produces quite a few abnormal plants which die in several weeks after germination.