

■テクニカルノート■

コルヒチンを用いたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 4倍体及び8倍体の効率的な作出方法

菊池涼夏¹ 岩元明敏^{1, 2, 3, 4}

An Efficient Method of Tetraploid and Octaploid Induction
in *Arabidopsis thaliana* Using Colchicine Treatment

Suzuka Kikuchi¹ and Akitoshi Iwamoto^{1, 2, 3, 4}

¹ Field of Biological Sciences, Course of Science, Graduate School of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Department of Biological Sciences, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

³ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: akitoshi@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Colchicine gel treatment is one of the major methods used to induce polyploid strains in plants. In this study, we examined several conditions of colchicine gel treatment in the diploid and tetraploid of *Arabidopsis thaliana* (ecotype: Columbia) to establish the most efficient method of tetraploid and octaploid induction, and compared the induction efficiency with that of one-drop colchicine solution treatment, which was previously reported. The shoot apex of diploid and tetraploid seedlings was treated with colchicine gel (0.5% or 1.0% colchicine dissolved in 1.0% agarose) for several days. Thus, 0.5% colchicine gel treatment of the diploid for two days induced tetraploid (7.5% of treated seedlings) most efficiently under all examined conditions, suggesting that one-drop colchicine solution treatment of the diploid is more efficient than colchicine gel treatment. 0.5% colchicine gel treatment of the tetraploid for two days induced octaploid (5.0% of treated seedlings) most efficiently, which is similar to the one-drop colchicine solution treatment of the diploid. The survival rate of colchicine gel-treated seedlings was much lower than that of one-drop colchicine-solution-treated seedlings. The survival rate difference resulted in a lower efficiency of polyploid induction by colchicine gel treatment. These results suggest that one-drop colchicine solution treatment of the tetraploid can most efficiently induce octaploid.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, tetraploid, octaploid, colchicine, flow cytometry

序論

ゲノム倍数化（全ゲノム重複）は、染色体のセット数が倍化する現象であり、生物の進化の過程で繰り返してきてきたと考えられている。特に、植物においてはこのゲノム倍数化が普遍的に起こり、倍数化に伴う環境適応能力の向上が植物の種分化の大きな推進力になってきたとされている¹⁾。また、ゲノム倍数化を経て4倍体化した植物は、根、花、葉などの各器官の成長が促進される傾向があり²⁻⁵⁾、このことを利用した倍数体育種も盛んに行われている⁶⁾。しかし、一方では人工的に作出した高次倍数体（6

倍体及び8倍体）において、成長が抑制される現象も報告されている^{7, 8)}。以上のことから、ゲノム倍数化は植物の成長に対して正負両面の影響を及ぼすと考えられる。しかし、高次倍数化による抑制を含めたゲノム倍数化にともなう成長変化の定量的な解析、及びその変化のメカニズムの解析は未だに行われていない。

ゲノム倍数化が成長に及ぼす影響の解析には、高次倍数体を含む人工同質倍数体系列を安定して作出するための手法の確立が必要不可欠である。同質倍

数体とは、雑種起源と考えられる複数のゲノムを含む異質倍数体ではなく、同質なゲノムの重複に由来する倍数体のことであり、近年その重要性が認識されつつある^{9, 10)}。人工同質倍数体の作出はこれまでに園芸品種や作物を中心に多く行われてきたものの¹¹⁻¹³⁾、その多くが4倍体の作出を目的としており、高次倍数体の作出について詳細に記述した例は少ない。倍数化が器官成長に及ぼす影響について解析が進められてきたモデル植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の同質倍数体の作出についても、細胞分裂阻害剤水溶液への植物体全体の浸漬^{14, 15)} (以下、浸漬法)、茎頂への細胞分裂阻害剤水溶液の滴下^{3, 15)} (以下、滴下法)、細胞分裂阻害剤を含んだゲルによる茎頂の被覆¹⁶⁾ (以下、ゲル法) などいくつかの手法が様々な処理条件で用いられてきた。しかし、どの手法をどのような条件で用いることが倍数体作出のために最適であるかについての比較は十分ではなく、特に高次倍数体の作出についてはほとんど検討がされていない。

そこで、本研究では主要な倍数体作出方法の1つであるゲル法を用いて、複数の条件で2倍体及び4倍体シロイヌナズナに対して倍数化処理を行い、4倍体及び高次倍数体である8倍体の作出に最適な処理条件の検討を行った。これまでに行われてきた倍数体の作出では、コルヒチン、オリザリン、トリフルレイン、笑気ガス (N_2O)、カフェインなど様々な細胞分裂阻害剤が用いられているが¹⁷⁾、本研究では最も一般的で幅広い植物種で利用されているコルヒチンを阻害剤として採用した。また、コルヒチンを用いた浸漬法及び滴下法によるシロイヌナズナ倍数体作出の結果¹⁵⁾ との比較も行い、どの手法が効率的であるかについての検討も行った。

材料と方法

使用した植物

植物材料には、神奈川県湘南ひらつかキャンパスの植物育成棟で育成した野生型シロイヌナズナ (Columbia 系統) 及び本研究室で作出したシロイヌナズナ4倍体 (野生型シロイヌナズナをコルヒチン処理により倍数化した系統) から採取した種子を用いた。

種子の滅菌・吸水・低温処理

培地に播種した際にカビ等が繁殖することを防ぐため、使用する種子は全て滅菌水 (次亜塩素酸ナトリウム 1% (w/v) 以上, Triton X-100 0.1% (v/v) を含む) に10分間浸漬し、表面を滅菌した。滅菌処理後の種子は逆浸透膜処理水 (RO 水) で5回 (1回5分)

洗浄し、RO 水に浸漬した状態で4°Cで3日間静置した。なお、この際に使用した RO 水は、オートクレーブ滅菌済みのものを使用した。

コルヒチンゲルの作成

1.0% (w/v) 低融点アガロース (NuSieve™ GTG™ Agarose, Lonza) にコルヒチン (Sigma) を0.5% または1.0% の濃度 (w/v) で溶かし込み、コルヒチンゲルを作成した。作成後は、使用まで4°Cで遮光保存した。

コルヒチン処理 (ゲル法) と倍数体の予備選抜

滅菌済み角型シャーレに入れた GMA 培地 (1.5% 寒天を含む 1/2 Murashige & Skoog 培地) 上に、滅菌・吸水・低温処理を行ったシロイヌナズナ2倍体及び4倍体の種子を無菌的に播種した。播種後、プレートの蓋を閉じ、蓋との間に生じた空隙をサージカルテープ (Micropore™ Surgical Tape, 3M) で覆った上で (周縁部を3周分サージカルテープで巻いて覆った)、LED インキュベータ (LH-241PFD-SS, 日本医化機械製作所) 内で温度一定 ($22 \pm 0.5^\circ\text{C}$)、連続光 ($90 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、湿度 $70 \pm 10\%$ の条件で育成した。

3枚目の本葉 (子葉を入れて5枚目の葉) が展開し始めた発達段階 (今回の育成条件では播種後9日目) で、無菌的に植物体の茎頂にコルヒチンゲルを

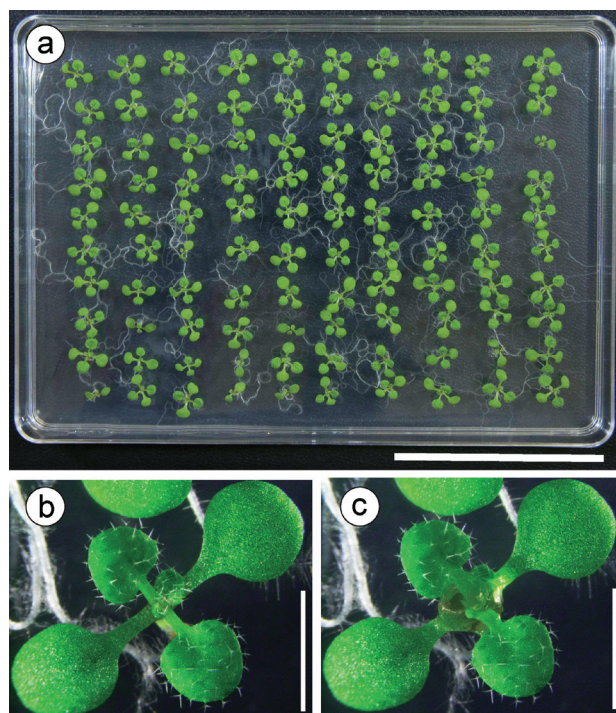


図1. コルヒチンゲルを用いた倍数化処理の様子. a. 角型プレート上で育成した播種後9日目のシロイヌナズナ. b. コルヒチンゲルをのせる前の植物体. c. コルヒチンゲルを茎頂にのせた様子. Scale bars = 5 cm (a), 3 mm (b, c).

5 μ L ずつのせた (図 1)。その後、プレートの蓋を閉じて再度サージカルテープで覆い、ゲルが脱落しないように注意しながら引き続き LED インキュベータ内で 1–4 日間静置した。

処理終了時には、茎頂を傷つけないように留意しながらピンセットでコルヒチンゲルを除去し、RO 水で茎頂を洗浄した。その後、それぞれの個体をロックウール (Grodan) に植え替え、20–30 日程度育成した。植え替え後の植物の育成条件は、温度一定 (22 \pm 0.5 $^{\circ}$ C)、16 時間明期、8 時間暗期 (90 \pm 5 μ mol $m^{-2} s^{-1}$)、湿度 70 \pm 10% とした。また、過去の研究において、倍数体シロイヌナズナは葉表面に存在するトライコームの分岐数が野生型と比較して増加する (野生型では主に 3 又分岐であるが、倍数体では 4 又以上に分岐したトライコームが多く見られる) ことが報告されている¹⁵⁾。このことから、実体顕微鏡 (SMZ745T, Nikon) を用いてコルヒチン処理後個体におけるロゼット葉表面のトライコームの形態を観察し、分岐数が増加したトライコームが多く見られる個体について予備的な選抜を行った (図 2)。続いて、選抜した個体についてフローサイトメトリーによる倍数性の確認を行った。

倍数性の確認 (フローサイトメトリー解析)

予備選抜後の個体について、チョッピング法¹⁸⁾により細胞核を遊離させ、フローサイトメーター (CyFlow SL/UV, Partec) を用いて倍数性の確認を行った。まず、各コルヒチン処理後個体の葉をそれぞれ 2–3

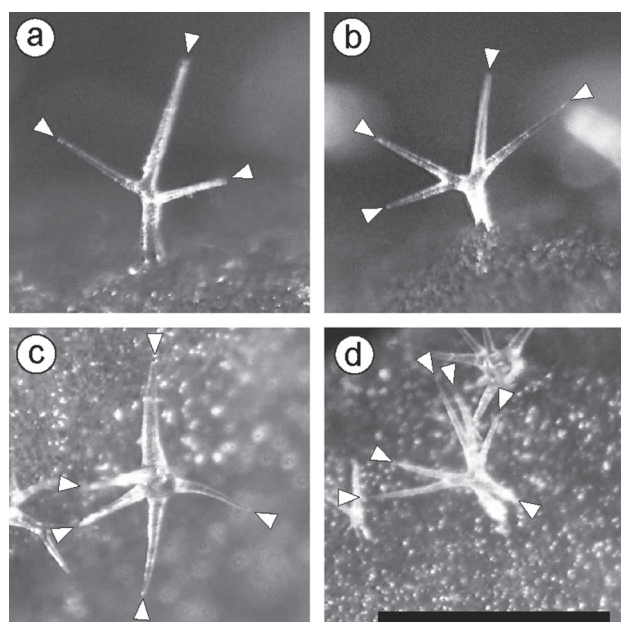


図 2. トライコームの分岐数と倍数性の関係. 倍数化すると、四又以上に分岐するトライコームの割合が増える. 8 倍体では、六又などに多分岐したトライコームも見られる. a. 三又分岐 (2 倍体), b. 四又分岐 (4 倍体), c. 五又分岐 (8 倍体), d. 六又分岐 (8 倍体). Scale bar = 1 mm.

枚ずつプラスチックシャーレに採取し、核抽出液 (Quantum Stain NA UV 2A 植物 DNA 分析試薬 A 液, サイトテックス) を 200 μ L 添加した後に、カミソリで葉一枚あたり約 10 回程度細かく刻んだ。続いて、刻んだ葉サンプルをプラスチックシャーレごと氷上に 1 分程度静置し、核の抽出を行った。その後、フィルター (Cell TricsTM 20 μ m, sysmex) でろ過を行い、プラスチック試験管にろ過後の細胞核懸濁液を入れた。測定直前に DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole Dihydrochloride) を含む核染色液 (Quantum Stain NA UV 2A 植物 DNA 分析試薬 B 液, サイトテックス) を 800 μ L 添加して核を蛍光染色し、フローサイトメーターで蛍光強度別に核の数を測定した。なお、対照として同じ条件で育成した 2 倍体についても倍数性を確認した (図 3)。

結果と討論

2 倍体のコルヒチン処理について

2 倍体を対象に行ったコルヒチン処理の結果、0.5% コルヒチンで 2 日間処理する条件において最も効率よく 4 倍体が作出できることが分かった (処理個体数の約 7.5%)。また、0.5% コルヒチンで 3 日間処理した条件においては、1 個体のみ (処理個体数の約

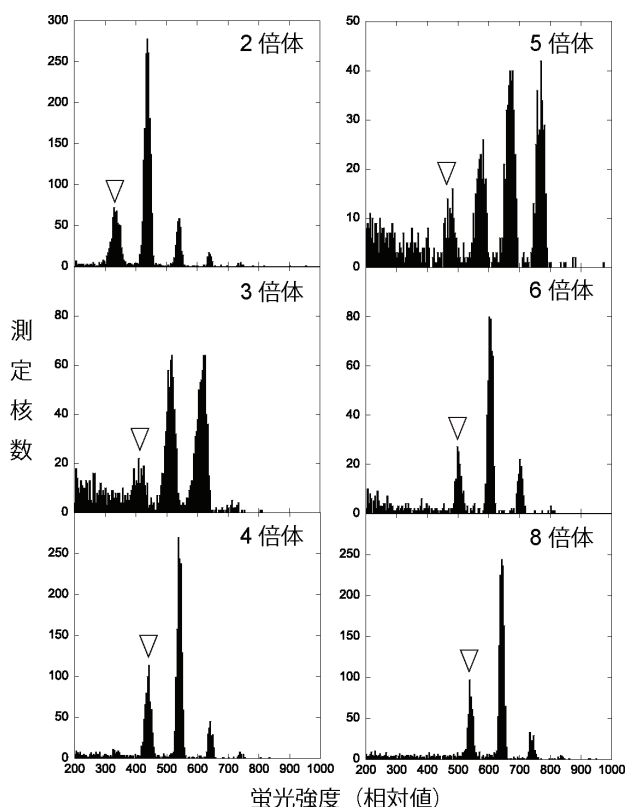


図 3. フローサイトメトリー解析の結果. 核内倍化により、複数の蛍光強度にピークが見られる. コルヒチン処理後個体について、基本ゲノムの DNA 量 (矢頭) を 2 倍体と比較し、倍数性の判定を行った。

表 1. コルヒチンゲルを用いた倍数化処理による倍数体作出効率

系統	コルヒチン濃度, 処理期間	処理個体数	生存個体数 (※1)	予備選抜個体数 (※2)	2倍体 (※2)	3倍体 (※2)	4倍体 (※2)	5倍体 (※2)	6倍体 (※2)	8倍体 (※2)
2倍体	0.5%, 2days	40	8 (20.0)	3 (37.5 / 7.5)	-	-	3 (37.5 / 7.5)	-	-	-
	0.5%, 3days	80	14 (17.5)	10 (71.4 / 12.5)	5 (35.7 / 6.3)	1 (7.1 / 1.3)	3 (21.4 / 3.8)	-	-	1 (7.5 / 1.3)
	0.5%, 4days	40	9 (22.5)	-	-	-	-	-	-	-
	1.0%, 2days	80	8 (10.0)	-	-	-	-	-	-	-
	1.0%, 3days	80	8 (10.0)	8 (100.0 / 10.0)	3 (37.5 / 3.8)	-	5 (62.5 / 6.3)	-	-	-
	1.0%, 4days	40	4 (10.0)	-	-	-	-	-	-	-
4倍体	0.5%, 1day	40	5 (12.5)	N/A	-	-	4 (80.0 / 10.0)	1 (20.0 / 2.5)	-	-
	0.5%, 2days	40	9 (22.5)	N/A	-	-	5 (55.6 / 12.5)	1 (11.1 / 2.5)	1 (11.1 / 2.5)	2 (22.2 / 5.0)
	1.0%, 1day	40	5 (12.5)	N/A	-	-	4 (80.0 / 10.0)	-	-	1 (20.0 / 2.5)
	1.0%, 2days	80	1(1.3)	N/A	-	-	1 (100.0 / 1.3)	-	-	-
	1.0%, 3days	80	3 (3.8)	N/A	-	-	3 (100.0 / 3.8)	-	-	-
	1.0%, 4days	40	4 (10.0)	N/A	-	-	4 (100.0 / 10.0)	-	-	-

※1 括弧内は処理個体数に対する割合 (%)。

※2 括弧内は処理個体数に対する割合 (%) / 生存個体数に対する割合 (%)。

1.3%)ではあるが8倍体を作出することができた(表1)。各処理条件における倍数体の作出効率の詳細を以下に示す。

0.5% コルヒチンでそれぞれ2, 3, 4日間倍数化処理を行なった結果、2日間及び3日間の処理条件下で4倍体の作出が確認された。このうち2日間処理では、トライコームの分岐数に基づいて予備選抜された3個体のうち、全てが4倍体であった。また、3日間処理の条件では、予備選抜された10個体のうち、1個体が3倍体、3個体が4倍体、1個体が8倍体であった。

次に、1.0% コルヒチンでそれぞれ2, 3, 4日間倍数化処理を行なった結果、いずれの条件下でも処理後の生存率が10%となり、0.5% コルヒチンで2, 3, 4日間処理をした場合の生存率(17.5 - 22.5%)と比較して低くなることが分かった。トライコームの分岐数から倍数化していると判断されたのは3日間処理の条件の8個体のみで、そのうちの5個体が4倍体であり、8倍体は作出されなかった。

なお、2倍体を倍数化処理した6条件の中では、0.5% コルヒチンで4日間処理した場合の生存率が最も高くなっている。しかし、この処理条件における生存個体を観察したところ、元々コルヒチンゲルが茎頂を適切に被覆できていなかったと結論づけられた。すなわち、通常コルヒチン処理が行われた(コルヒチンゲルによって適切に茎頂が被覆された)個体では、全体的な成長の遅れや色の濃いロゼット葉が密集して展開するなどの定性的な成長変化が見られる。しかし、上記の生存個体は成長速度及びロゼット葉の形状がコルヒチンゲル未処理の2倍体とほぼ同様であり、トライコームの分岐数に基づく予備選抜においても全て倍数化していないと判定されている。

また、今回の0.5% コルヒチンゲルで処理した個体の生存率を、Yuら(2009)¹⁵⁾が報告した他の手法

での0.5% コルヒチン処理後のColumbia系統2倍体の生存率と比較した。その結果、今回用いたゲル法はいずれの条件でも、浸漬法(0.5% コルヒチン溶液に4時間浸漬)の生存率12%は上回る一方、滴下法(0.5% コルヒチン溶液を茎頂に1回滴下)の生存率83.3%は大幅に下回っていた。生存個体に占める倍数化した個体の割合は、それぞれの手法の間に顕著な差がなかった。

以上のことから、シロイヌナズナColumbia系統の2倍体から倍数体を作出するためには、生存率の高い低濃度(0.5%)コルヒチン処理が適切であり、また比較した3つの手法の中で最も生存率が高い滴下法を用いることが効率的であると考えられる。

4倍体のコルヒチン処理について

高次倍数体をより効率よく作出することを目指し、シロイヌナズナ4倍体についても倍数化処理を行なった。なお、4倍体では既に2倍体と比較してトライコームの分岐数が増加している(4又以上のトライコームの割合が多い)ため予備選抜は行わず、処理後に生存していた全ての個体についてフローサイトメトリーを用いて倍数性を確認した。その結果、0.5% コルヒチンで2日間処理した条件及び1.0% コルヒチンで1日間処理の条件で8倍体が出産され、その作出効率は2倍体よりも高かった(表1)。各処理条件における高次倍数体の作出効率の詳細を以下に示す。

0.5% コルヒチンでそれぞれ1, 2日間の倍数化処理を行なった結果、1日間処理の条件では生存5個体中1個体が5倍体化していたのに対し、2日間処理の条件では生存9個体のうち1個体が5倍体、1個体が6倍体、2個体が8倍体と半数近くの個体で倍数化が確認できた。2倍体の倍数化処理では、0.5% コルヒチンで3日間処理した条件でのみ8倍体が1

個体作出されたが、4倍体ではそれよりも短い2日間で8倍体を作成することができた。このことは、8倍体化に要するゲノム倍数化の回数、すなわち2倍体では2回のゲノム倍数化が必要だが、4倍体では1回のみで十分であることと関連していると考えられる。

また、1.0% コルヒチンでそれぞれ1, 2, 3, 4日間処理した場合、1日間処理の条件でのみ8倍体が得られた(生存5個体中1個体)。2日間以上の処理条件では生存個体数が少なく、倍数化個体も確認されなかった。2倍体の場合と同様、4倍体においても1.0% コルヒチン処理での生存率が低いことから、低濃度(0.5%)のコルヒチン処理の方が適切であると考えられる。

4倍体及び8倍体の作出効率について

コルヒチンゲルを用いてシロイヌナズナ Columbia 系統2倍体を材料に4倍体を作成する場合、0.5% コルヒチンで2日間処理する条件が最も効率的であった(処理個体数の7.5%) (表1)。高次倍数体については、今回の倍数化処理では合計で6倍体を1個体、8倍体は3個体作成することができた。特に4倍体を0.5% コルヒチンで2日間処理した条件では、6倍体を1個体(処理個体数の2.5%)、8倍体を2個体(処理個体数の5.0%) 作成することができ、最も効率的であった(表1)。したがって、高次倍数体の作出効率は、2倍体よりも4倍体を処理した方が高い。

0.5% コルヒチンを用いた浸漬法、滴下法での2倍体の倍数化処理の結果¹⁵⁾との比較から、ゲル法は処理後の生存率が滴下法よりも低く、生存個体数における倍数体の占める割合に大きな違いがないことを考慮すると、コルヒチンを用いた4倍体及び8倍体の作出効率について以下のような結論が得られる。いずれの倍数体についても、低濃度(0.5%)のコルヒチンの方が処理後の生存率が高く、作出効率は高い。4倍体については、ゲル法よりも滴下法の方が作出効率が高い。8倍体についても同様にゲル法よりも滴下法の方が作出効率が高い。それに加えて、今回のゲル法による処理の結果、2倍体よりも4倍体を処理した場合の方が作出効率が高かったことから、高次倍数体を作成するためには4倍体を滴下法で処理することが最も効率的であると考えられる。

謝辞

本研究は、科学研究費研究(基盤研究C)「植物の高次倍数化による根端成長と染色体動態の変化の解析」(課題番号19K06718)の助成を受けて実施された。

文献

- 1) Otto SP and Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Ann. Rev. Genet.* **34**: 401-437.
- 2) Iwamoto A, Satoh D, Furutani M, Maruyama S, Ohba H and Sugiyama M (2006) Insight into the basis of root growth in *Arabidopsis thaliana* provided by a simple mathematical model. *J. Plant Res.* **119**: 85-93.
- 3) 岩元明敏, 杉山宗隆 (2013) 顕微鏡画像を用いた根端成長の数理モデル解析. *Plant Morphology* **25**: 67-71.
- 4) Robinson DO, Coate JE, Singh A, Hong L, Bush M, Doyle JJ and Roeder AH (2018) Ploidy and size at multiple scales in the *Arabidopsis* sepal. *The Plant Cell* **30**: 2308-2329.
- 5) Corneillie S, Storme NDe, Acker RVan, Fangel JU, Bruyne MDe, Rycke RDe, Geelen D, et al. (2019) Polyploidy affects plant growth and alters cell wall composition. *Plant Physiol.* **179**: 74-87.
- 6) Sattler MC, Carvalho CR and Clarindo WR (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* **243**: 281-296.
- 7) Tsukaya H (2008) Controlling size in multicellular organs: focus on the leaf. *PLoS Biology* **6**: e174.
- 8) Kikuchi S and Iwamoto A (2020) Quantitative analysis of chromosome polytenization in synthetic autopolyploids of *Arabidopsis thaliana*. *Cytologia* **85**: 189-195.
- 9) Barker MS, Arrigo N, Baniaga AE, Li Z and Levin DA (2016) On the relative abundance of autopolyploids and allopolyploids. *New Phytol.* **210**: 391-398.
- 10) Spoelhof JP, Soltis PS and Soltis DE (2017) Pure polyploidy: closing the gaps in autopolyploid research. *J. Syst and Evol.* **55**: 340-352.
- 11) Chavez DJ and Lyrene PM (2009) Production and identification of colchicine-derived tetraploid *Vaccinium darrowii* and its use in breeding. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **134**: 356-363.
- 12) Gantait S, Mandal N, Bhattacharyya S and Das PK (2011) Induction and identification of tetraploids using in vitro colchicine treatment of *Gerbera jamesonii* Bolus cv. *Sciella*. *Plant Cell Tiss. Org.* **106**: 485-493.
- 13) Limera C, Wang K, Xu L, Wang Y, Zhu X, Feng H, Sha Y et al. (2016) Induction of autotetraploidy using colchicine and its identification in radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Hortic. Sci. Biotech.* **91**: 63-70.
- 14) Storme ND and Geelen D (2011) The *Arabidopsis* mutant *jason* produces unreduced first division restitution male gametes through a parallel/fused spindle mechanism in meiosis II. *Plant Physiol.* **155**: 1403-1415.
- 15) Yu Z, Haage K, Streit VE, Gierl A and Ruiz RAT (2009) A large number of tetraploid *Arabidopsis thaliana* lines, generated by a rapid strategy, reveal high stability of neo-tetraploids during consecutive generations. *Theor. Appl. Genet.* **118**: 1107-1119.
- 16) Breuer C, Stacey NJ, West CE, Zhao Y, Chory J, Tsukaya H, Azumi Y, et al. (2007) BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **19**: 3655-3668.
- 17) Touchell DH, Palmer IE and Ranney TG (2020) *In vi-*

- tro* ploidy manipulation for crop improvement. *Front. Plant Sci.* **11**: 722.
- 18) Johnston JS, Bennett MD, Rayburn AL, Galbraith

DW and Price HJ (1999) Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *Am. J. Bot.* **86**: 609-613.