

# ガラス固化体から発生する放射線の 植物育種への適用に関する研究

(動力炉・核燃料開発事業団 委託研究成果報告書)

1988年3月

北海道大学農学部  
作物育種学講座

複製又はこの資料の入手については、下記にお問い合わせ下さい。

〒107 東京都港区赤坂1-9-13

動力炉・核燃料開発事業団

技術協力部 技術管理室

Inquiries about copyright and reproduction should be addressed to: Technical Evaluation and Patent Office, Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation 9-13, 1-chome, Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107, Japan

動力炉・核燃料開発事業団 (Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation)

## ガラス固化体から発生する放射線の 植物育種への適用に関する研究

木下俊郎\*・森 宏一\*  
三上哲夫\*・高牟禮逸朗\*

### 要 旨

高レベル放射性廃液のガラス固化体からは、長期間にわたって強い放射線が発生する。この放射線を有効に産業へ利用することは、高レベル廃棄物対策を推進する上で重要なことである。

本研究では、放射線照射を利用した生物工学の手法を植物育種へ導入して、放射線の有効利用に資することを目的とする。

- (1) テンサイの雄性不稔細胞質についての分子レベルにおける解析から、4種の異型性が解明され、さらに個体レベルでの交雑実験へ対応させて、SとS-2ならびにS-3とS-4の2種のグループに分け、reciprocal maintainer-restorerの関係が成立した。このような多型性は実際の一代雑種種子生産の利用へきわめて有用であり、かつ今後の変異体検出の効率化に役立つ所が大である。
- (2) テンサイ葉緑体ゲノムに関して制限酵素切断地図を完成して23種の遺伝子の座位を決定した。また、近縁種の構造変異や雄性不稔細胞質の変異域を特定することができた。
- (3) イネの薬培養へガンマー線照射を適用して変異体作出の効率化を計るための第一歩として、花粉とカルスの両レベルで3種の照射法を適用した。カルス形成率や緑色個体再分化率は照射線量の増大と共に低下し、カルスへの緩照射によっても個体再分化のやや低下することがわかった。
- (4) ガンマー線照射により誘発されたイネの低アミロース変異体を用いて、遺伝子分析を行った結果、*lam(t)*と*Ef(t)*の2種の新遺伝子の関与が明らかにされ、*lam(t)*と既知の*du*とを組合せると良食味米の育種に役立つことが示された。
- (5) ガンマー線照射を含む各種の変異源処理によって4種の少分けつ変異体が誘発され、各々には別々の単純劣性遺伝子が関与していた。それらのうち*rcn-2*は第II連鎖群に属していた。また、

---

本報告書は、北海道大学農学部作物育種学講座が動力炉・核燃料開発事業団の委託により実施した研究の成果である。

契約番号：610D117

事業団担当者：黒 優（環境資源部環境計画課）

\*：北海道大学農学部作物育種学講座

*rcn-1* の高温感受性や *rcn-3* や *rcn-4* の少分げつ性が TIBA (アンチオーキシン) の処理により  
顕著に増大するような生理作用が明らかにされた。

# Studies on the Application of Gamma Rays from Radioactive Glass Waste to Plant Breeding

T. Kinoshita, K. Mori, T. Mikami and I. Takamure

## Abstract

The purpose of this project was to apply gamma ray irradiations for the study of crop breeding involving tissue culture and gene manipulation.

The experimental results obtained in 1987 are summarized as follows;

1. Polymorphism of mitochondrial and chloroplast DNAs was detected in the male sterile cytoplasm of sugar beets. In the crossing experiments by using different cytoplasmic groups, a reciprocal maintainer-restorer relationship which is efficiently used for the recurrent selection, was detected between S or S-2 and S-3 or S-4 cytoplasm.
2. Restriction fragment map was established in sugar beet chloroplast DNA and the locations of 23 genes were known in the map. Structural changes and DNA variations were found in *Beta taxa* and the male sterile lines of sugar beets.
3. Gamma ray irradiations were applied for the induction of mutation prior to anther culture and after the callus formation by using several methods of acute or chronic irradiations. The callus induction and the rate of green plants regeneration were affected by the irradiation procedures.
4. Two mutant genes, *lam(t)* and *Ef(t)* were responsible for the reduction of amylose content in rice grains and they will be effectively used for the varietal improvement of eating quality in Hokkaido.
5. Several morphological mutants were induced by the mutagens involving gamma ray irradiations, and used for the studies on linkage analysis, physiological pathway of the genic actions and some basic problems of rice breeding.

---

Work performed by the Hokkaido University under contact with Power Reactor and Nuclear Fuel Development Corporation.

PNC Liaison: Masaru Sato (Technical Information Service).

\* : Plant Breeding Institute, Faculty of Agriculture, Hokkaido University.

# 目 次

第1章 まえがき .....	1
第2章 テンサイ雄性不稔細胞質遺伝子の形質発現 .....	2
第3章 テンサイおよび近縁種における葉緑体ゲノムの変異性 .....	6
第4章 イネの薬培養におけるガンマー線照射の効果ー2 .....	11
第5章 イネのガンマー線照射により誘発された胚乳澱粉の アミロース含量変異に関する遺伝学的研究 .....	15
第6章 イネの少分げつ性変異体に関する遺伝子分析ならびに生理特性 .....	27
第7章 あとがき .....	40

## 第1章 まえがき

ガンマー線を利用する放射線育種法は、世界各国において、その研究が活発に行なわれた結果として、品種改良への貢献が大きかった。特に我が国とアメリカ合衆国において、イネのガンマー線照射によって作出された半矮性遺伝子が優良品種の育成のために役立ったことは、着名な事例の一つである。

本研究ではかかる伝統的な放射線育種の手法と最近発展の著しい生物工学的手法をドッキングさせて、効率のよい突然変異利用の育種を試みることを目的としている。

本年度の研究としては(1)初年度(昭和59年)から続けているテンサイの雄性不稔細胞質に関する分子遺伝学的研究を集約し、分子レベルにおいて検出された多型性と実際の雑種種子生産への利用法との平行関係を調べて、分子レベルの情報の予見的な価値と予知の限界などを明らかにした。(2)テンサイの葉緑体(ct)ゲノムについては物理地図を作成し、さらに23種の遺伝子の位置を地図上に示した。さらに近縁種にみられる変異域を特定して変異体の検出のために役立てた。(3)組織培養による突然変異作出法の効率化を計るためのガンマー線利用についての研究の第1歩として、今年はずでに培養体系の確立しているイネの薬培養法について、薬とカルスの2種のステージに3種のガンマー線照射方法を組み合わせて、それらによりカルス誘導および個体再分化が如何なる影響を受けるかを明らかにした。(4)昨年度ガンマー線により作出した、米の食味にもっとも関係の深い低アミロース変異体を用いて遺伝子分析を行い、アミロースの低下に関する2種の新遺伝子を発見した。さらに既知のdull遺伝子との組合せにより、良食味米の育種の新計画を提言した。(5)イネの少分げつ変異体についての標識遺伝子を用いた連鎖分析、ならびに分げつ生成における各遺伝子の生理作用などを解析した。

## 第2章 テンサイ雄性不稔細胞質遺伝子の形質発現

木下俊郎・三上哲夫

### 1. 緒言

テンサイの一代雑種品種の実用採種においては自然突然変異由来のS型雄性不稔性ただ一種が使われているに過ぎない。したがって、トウモロコシのT型不稔細胞質における如く病虫害を引き起こすという遺伝的脆弱性の危険性を有していると言える。本研究では、まずテンサイでS型と異なる新型雄性不稔細胞質の探索を行ない、見出された雄性不稔細胞質の多型性に関して、分子遺伝学的手法を用いて細胞質オルガネラの遺伝解析を行った。また、それらと対応して個体レベルにおいて、細胞質と核遺伝子の相互作用に関する遺伝分析を行い、異型細胞質における花粉稔性回復の機構について検討を加えた。それらの知見を総合するならば、細胞質雄性不稔性に関する遺伝的制御機構の解析や育種的利用に貢献することとなる。

### 2. 方法ならびに成果

まず雄性不稔(S)型細胞質と正常(N)型細胞質からmtDNAを抽出し、電子顕微鏡観察によってDNA分子の形状とサイズ変異を調べた。一方米国から導入した野性ビート由来の細胞質型を有する7種のI-12CMSのシリーズを供試して、mt及びctDNAの制限酵素分析と小環状DNA種の検索を行なった。I-12CMSのシリーズは遺伝的背景が斉一なため個体と分子レベルの両面から細胞質の多型性を研究する材料として好適である。個体レベルではS型に対する維持花粉親(O)や赤ビート検定系統(SP 5161001-0)を用いた交雑実験により遺伝子分析を行った。

電顕観察の結果では、ctDNAは約 $45\mu\text{m}$ の均一な環状分子であるのに対し、mtDNAは著しく不均一な環状分子より成ることがわかった。そのサイズには $0.28\mu\text{m}$ から $51\mu\text{m}$ に至るまでの変異がみられた。 $1\mu\text{m}$ 以下の小環状DNAに関してはアガロース電気泳動によってもその存在を確かめた。N型mtDNAでは高分子(HMW)DNAバンドの外に1.5, 1.4, 1.3kbに相当する3本のバンドが検出され、他方S型mtDNAにおいては1.5と1.4kbの2バンドのみが識別された。電顕観察からは、S型mtDNA画分中には1.3kbに対応する分子種( $0.28\sim 0.4\mu\text{m}$ )の見当たらないことも判明した。



一方、HMWのmtDNA群に関しても分子構造がN型とS型やI-12 CMSの各不稔細胞質型間で顕著に異なっていた(表1)。Sma I分解物についてみれば、N型とS型mtDNAはS型が15本の

表1. テイサイのミトコンドリアおよび葉緑体ゲノム多型性

系 統	細胞質型	由 来	mtDNA								ctDNA				
			小環状 DNA <sup>1</sup>						Sma I 分解物		Hind III 分解物				
			a	b	c	d	e	j	g	h	T <sup>2</sup>	T <sup>3</sup>	T	U	
TK81-O	N	正常	日本品種	+	+	+						40	—	26	—
TK 81-MS	S	不稔	日本品種	+	+							38	15	25	0
I-12-61L	N	正常	米国品種	+	+	+						40	0	26	0
I-12 CMS(R)	S	不稔	米国品種	+	+							38	15	25	0
I-12 CMS(2)	S-2	不稔	トルコ産野生ビート		+		+	+	+			34	7	27	2
I-12 CMS(3)	S-3	不稔	パキスタン産野生ビート	+	+					+	+	37	11	27	2
I-12 CMS(4)	S	不稔	トルコ産野生ビート	+	+							38	15	25	0
I-12 CMS(5)	S	不稔	トルコ産野生ビート	+	+							38	15	25	0
I-12 CMS(7)	S-4	不稔	中国産野生ビート	+	+					+	+	36	8	27	2
I-12 CMS(8)	S	不稔	トルコ産野生ビート	+	+							38	15	25	0

\*1: a(1.5kb), b(1.45kb), c(1.4kb), d(1.35kb), e(1.3kb), f(1.25kb), g(1.2kb), h(1.1kb). \*2: 総バンド数. \*3: 細胞質型固有バンド数

固有バンドを有することによって区別された。また I-12 CMS シリーズの mtDNA では Sma I 切断パターンが I) S型と同一パターン [ I-12 CMS(R), (5), (8) ], II) S-2型 [ I-12 CMS(2) ], III) S-3型 [ I-12 CMS(3) ], IV) S-4型 [ I-12 CMS(7) ] の4型に類別できた。II) ~IV) の新異型細胞質の mtDNA では N型や S型には見出されていない小環状 DNA 分子 (b, d, j, g, h) の存在によっても特徴づけられた。しかもこれら3型においては ctDNA の Hind III 切断サイトが N型と比較した場合1箇所, S型 ctDNA とは2箇所異なっており, 物理地図上での変異域は大単一配列の左方末端部と小単一配列域にそれぞれ独立に生じていることが明らかになった。

mtDNA 中のどの遺伝子が雄性不稔性への係り合いをもつかは, 今後の研究課題の一つであるが, チトクロム酸化酵素サブユニットの I や II (Cox I, II) について細胞質型間における塩基配列の相異が見出されている。今後, 2種の細胞質オルガネラ (ct と mtDNA) に核ゲノムを加えて, 3種のゲノム間での相互作用や協調性などを検討することが重要であろう。

I-12 CMS (3) および (7) と赤ビート検定系統の交雑実験により, 稔性回復型: 半不稔型: 完全不稔型 = 9:3:4 の F<sub>2</sub> 分離比を得た(表2)。これは2種の Rf の一方が劣性上位に働く場合の理論比であり, S型における9:6:1型のF<sub>2</sub>比とは明らかに異っていた。また, S型細胞質に対するO型系統であるTK 81-0はI-12 CMS(2)や(3)に対してはO型とならず, 交配次代には多数の稔性回復型を生じた。さらに個体レベルで各異型不稔細胞質を正しく識別できる判別系統が見出された。すなわち図1に示す如くTA-2-0なる自殖系統を用いて交配すると, 同じO型系統のW162-6の場合と比べS型の次代では共に100%完全不稔となるが, S-2型TA-2-0を交配した次代では大部分(99%)が半不稔-b型に, S-4型の次代では97%が稔性回復(N+SSa)型となり,

表2. I-12 CMS(3)S-3またはI-12 CMS(7)S-4と SP 561001-0との間の交雑における各雄性不稔型のF<sub>2</sub>分離

Cross	Type of cross	Male sterile type			Total	Fitness(9 : 3 : 4)	
		N+S. S. a	S. S. b	C. S.		$\chi^2$	p
		<i>Rfa Rfb</i>	<i>Rfa +</i>	<i>+Rfb, ++</i>			
I-12 CMS(3) S-3 x SP 561001-0	NxN S. S. a x S. S. a	266 (273.9)*	67 (91.3)	154 (121.8)	487	15.25	<0.001
I-12 CMS(7) S-4 x SP 56001-0	NxN S. S. a x S. S. a	153 (159.8)	48 (53.3)	83 (71.0)	284	2.83	>0.3
		202 (209)	78 (70)	92 (93)	372	1.24	>0.5

\* Calculated number based on 9 : 3 : 4 ratio

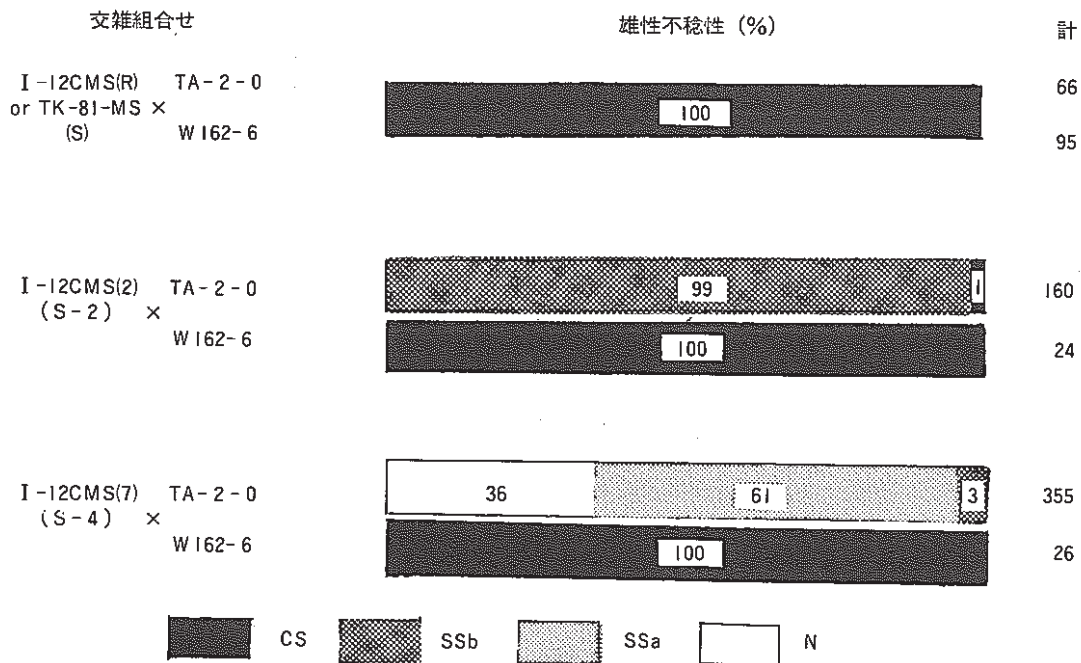


図1 判別系統, TA-2-0との交配による異型細胞質の分類

順次に花粉稔性の回復を生じることから細胞質型を明確に区別できた(図1)。因みにS型とは分子的特性の著しく異なるS-2型の方が、個体レベルではS型に近い特性を示した。さらにS-3型とS-4型の稔性回復は、基本的には両者共に9 : 3 : 4の分離型となるが、mtDNAの特性もS-3型とS-4型はきわめて類似していた。これらの結果から交雑実験によらずともmtDNAの分子的特性によって雄性不稔細胞質型を判定できるので、育種的利用価値がきわめて大きい。また今回発見された新型不稔細胞質の中で、S-3とS-4型はS型ならびにS-2型に対して、reciprocal

maintainer-restorer の関係となっている。この関係は雑種の組合せ能力を改良するために有用な相反循環選抜法へも効率的に利用できる。

今後、さらに細胞質オルガネラ DNA の構造と機能の解析を進め、雄性不稔性の形質発現に関する機構の解明にまで進めたい。

### 第3章 テンサイおよび近縁種における葉緑体ゲノムの変異性

三上哲夫・木下俊郎

#### 1. テンサイ ctDNA の制限酵素切断地図

制限酵素切断地図を作るため、各断片の相対的位置関係を明らかにした。まず一次分解で生じた全断片をゲルより電気的に溶出し、この溶出 DNA 標品を更に別種の酵素で二次分解し、アガーローズ電気泳動を行なって分画した。この手順に従って、*Sma* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Xho* I, および *Hind*

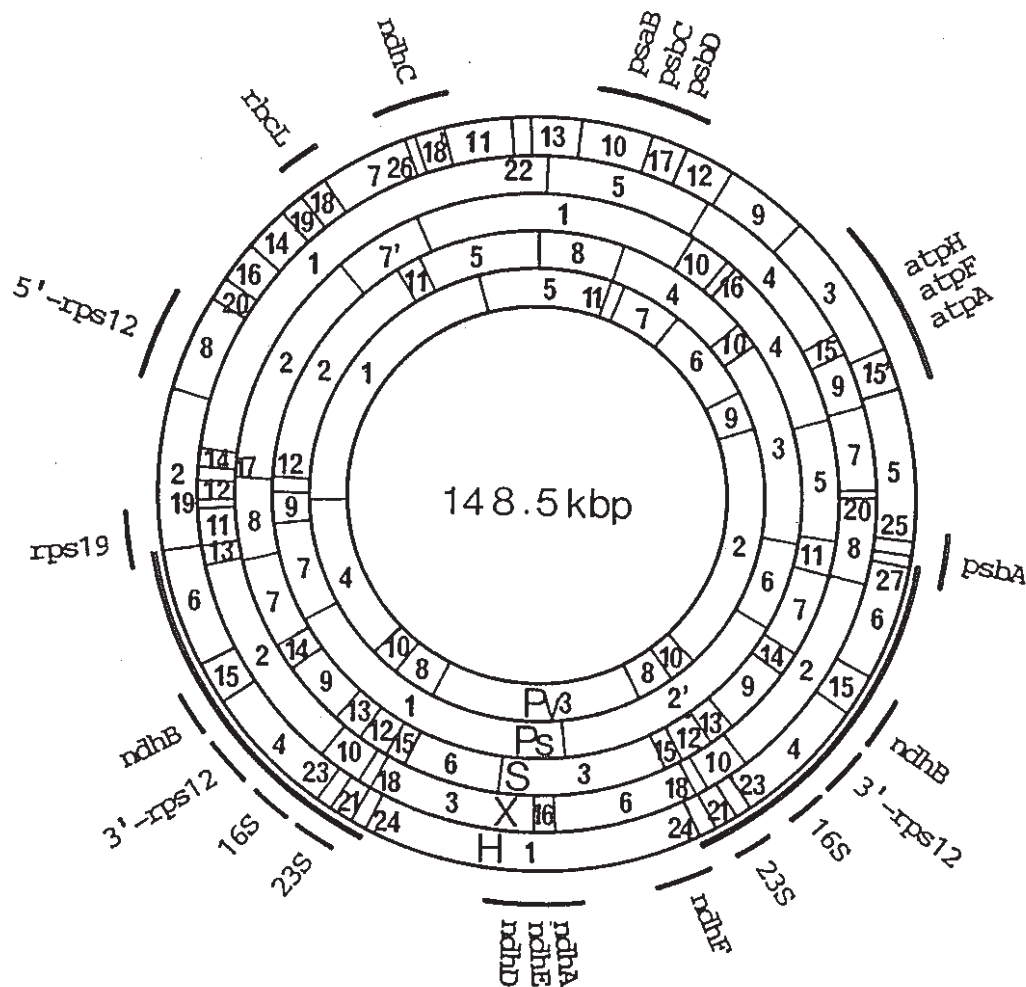


図1. テンサイ (*Beta vulgaris* L.) の葉緑体 DNA の物理地図

IIIの各酵素の断片についてその配列を決定し、環状の制限酵素切断地図を完成した(図1)。タバコ、トウモロコシなど多くの被子植物の場合と同様、テンサイの葉緑体ゲノムも1組の逆位反復配列(22 kbp)と大小2種の単一配列(それぞれ84.4, 23.1 kbp)から成っている。

テンサイ ctDNAの制限酵素切断地図上に葉緑体遺伝子をマッピングするためには、タバコ葉緑体遺伝子のコード域を含む DNA 断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果23Sおよび16S リボソーム RNA (rRNA), *ndhB* ならびに 3'-*rsp 12*の各遺伝子は逆位反復配列内に位置し、リブローズ1.5ニリン酸カルボキシラーゼ (RuBisCO) 大サブユニット (*rbcL*) など8種の光合成に直接関与する遺伝子は全て大単一配列内に座乗していた。この他2種のリボソーム蛋白遺伝子および NADH デヒドロゲナーゼのサブユニット遺伝子を加え合計18種類の遺伝子について座乗する断片を特定した。これらの遺伝子の位置関係は図1に示す如くで、タバコとの間に大きな差違は見出されなかった。

## 2. *Beta*属における葉緑体ゲノムの系統分化

*Bata*属植物 3節11種24系統を供試して、葉緑体ゲノムの分化機構を調べる目的で、フラクション

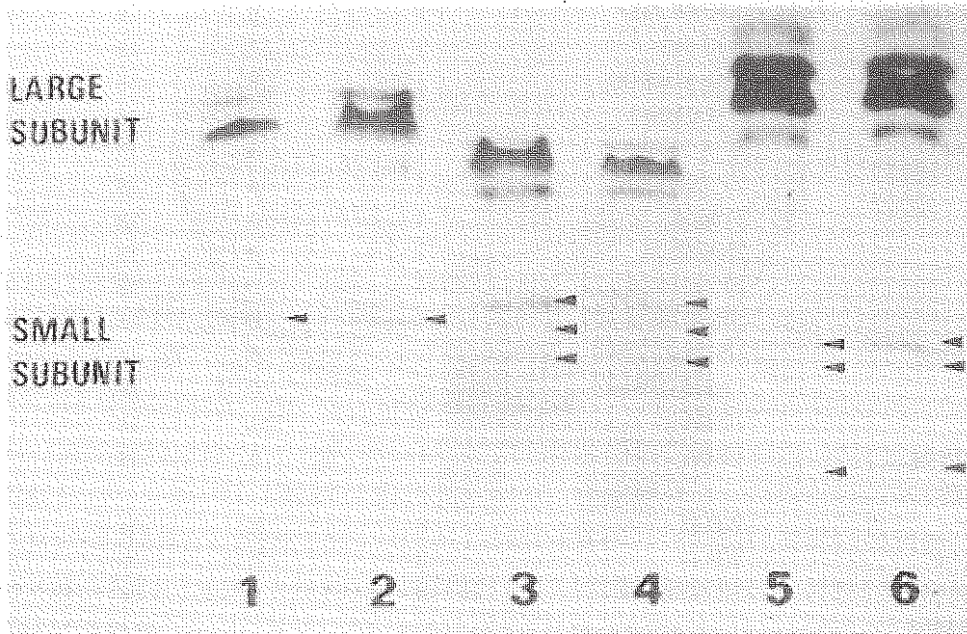


図2. *Beta*属6種のフラクションIタンパク質等電点電気泳動像

- (1) *B. vulgaris* (2) *B. maritima*  
 (3) *B. trigyna* (4) *B. lomatogona*  
 (5) *B. patellaris* (6) *B. procumbens*

大サブユニットはそれぞれ3本のbandから成る。  
 小サブユニットのbandを矢印で示す。

I タンパク質や ctDNA について比較解析を試みた。

a. フラクシオン I タンパク質

供試植物の葉から調製したフラクシオン I タンパク質の等電点電気泳動を行なった結果、LS タンパクは全ての種において 3 本のバンドから構成されていたが、節間で各バンドの等電点が異なっていた。すなわち、LS タンパク質は、テンサイの属する *Vulgares* 節と *Corollinae* 節および *Patellares* 節で互に相違し 3 型に分類できた。一方、SS タンパクは、*Vulgares* 節では 1 本、*Corollinae* 節ならびに *Patellares* 節においては互いに等電点の異なる 3 本のバンドから構成されていた (図 2)。

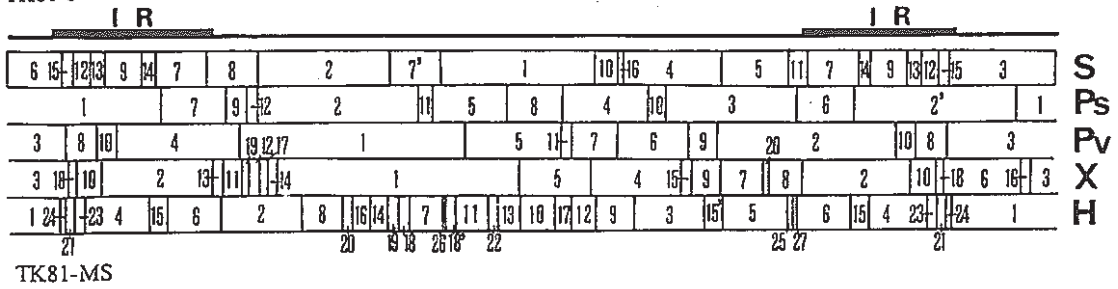
b. 葉緑体 DNA の制限酵素分析

供試材料から ctDNA を抽出し、7 種の制限酵素によって分解した後、電気泳動を行なった。*Vulgares* 節植物はテンサイ正常型と共通したパターンの観察される場合が多かったが、雄性不稔系統の中には正常型と異なる 2 型 (II と II') があつた。*B. maritima* の 2 系統と *B. macrocarpa* の 1 系統では *Sma* I および *Pvu* II の制限サイトにおいてそれぞれ 1 箇所ずつ変異を生じていた。また、

表 1. フラクシオン I タンパク質 (FIP) および ctDNA による *Beta* 属植物の分類

種	系 統	FIP 型	ctDNA 型	染色体数	分類型
Section <i>Vulgares</i>					
<i>B. vulgaris</i>	TK 81-0	I	A	18	I
	TK 81-MS	I	B	18	II
	NK 169-0	I	A	18	I
	NK 169-MS	I	B	18	II
	I-12-61 L	I	A	18	I
	I-12- CMS (R)	I	B	18	II
	I-12 CMS (2)	I	C	18	II'
<i>B. maritima</i>	SP 673000-0	I	A	18	I
	SP 733050-01	I	A	18	I
	France	I	A	18	I
	Helgoland	I	A	18	I
	SP 581103-0	I	D	18	III
	SP 581105-0	I	D	18	III
<i>B. macrocarpa</i>	USDA	I	A	18	I
	Canary Island	I	D	36	III
<i>B. patula</i>	USDA	I	A	18	I
<i>B. atriplicifolia</i>	USDA	I'	A	18	I
Section <i>Corollinae</i>					
<i>B. trigyna</i>	WB 47	II	E	54	IV
<i>B. corolliflora</i>	WB 48	II	E	36	IV
<i>B. lomatogona</i>	SP 7430007-0	II	F	36	V
Section <i>Patellares</i>					
<i>B. Patellaris</i>	WB 10	III	G	36	VI
	WB 14	III	G	36	VI
<i>B. procumbens</i>	327 a	III	H	18	VII
	SP 541205-03	III	H	36	VII
<i>B. webbiana</i>	USDA	III	H	36	VII

*B. vulgaris*  
TK81-0



TK81-MS

H  
☆

I-12CMS (2)

☆

*B. maritima*  
SP581103-0

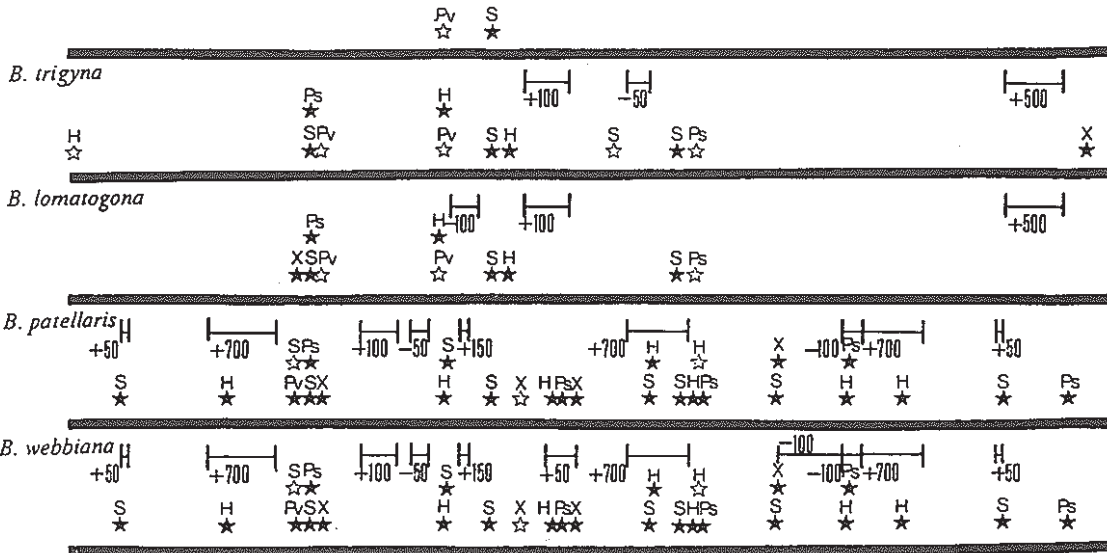


図3. *Beta* 属植物の葉緑体ゲノムにおける構造変異

テンサイ (*B. vulgaris*, TK 81-0) の制限酵素切断地図を基準として 7 型を比較し、変異の位置を示した。

白星印は制限サイトの獲得、黒印は制限サイトの欠落。

ハードル型印は挿入、欠失変異を表わし、数値はその長さ。

(S) *Sma* I, (Ps) *Pst* I, (R) *Pvu* II, (X) *Xho* I および (H) *Hind* III

*Corollinae* 節の 3 種では全ての酵素でテンサイとは異なる固有バンドが検出された。さらに *Patellares* 節植物の 3 種ではテンサイと異なるバンドの割合が著しく高かった。また、*B. patellaris* は他の 2 種と異なる *Xho* I 切断パターンを有していた。以上の結果とテンサイ細胞質雄性不稔系統の 2 型を合せると *Beta* 属植物の ctDNA は表 1 に示す如く少なくとも 7 ないし 8 型に分類できた。

### c. *Beta* 属 ctDNA の物理地図についての比較分析

ctDNA の構造変異をより詳細に調査するため、*Beta* 属各種の ctDNA の制限酵素切断地図を作成し、テンサイの地図と比較した(図 3)。*Vulgares* 節の野生種では 2 箇所に点突然変異による制限

サイト変異が見出され、Corollinae 節の構造変異では少なくとも 9 箇所の制限サイトの欠失や獲得に加えて、50 bp ~ 400 bp に亘る 4 種の欠失あるいは挿入を生じていた。Patellares 節とテンサイを比較すると、27 箇所の制限サイト変異の他に 11 領域において 50 bp ~ 700 bp の塩基配列の挿入や欠失が見出された。Beta 属植物における変異の多くは、Nicotiana 属等と同様、大単一配列内に集中していた。Beta 属葉緑体ゲノムの分化について系統樹を試作すると、図 4 の如く、Vulgares 節、Corollinae 節および Patellares 節への 3 つの基本群に明瞭に分岐しており、Patellares 節は他節と最も異なる葉緑体ゲノムを保有していた。

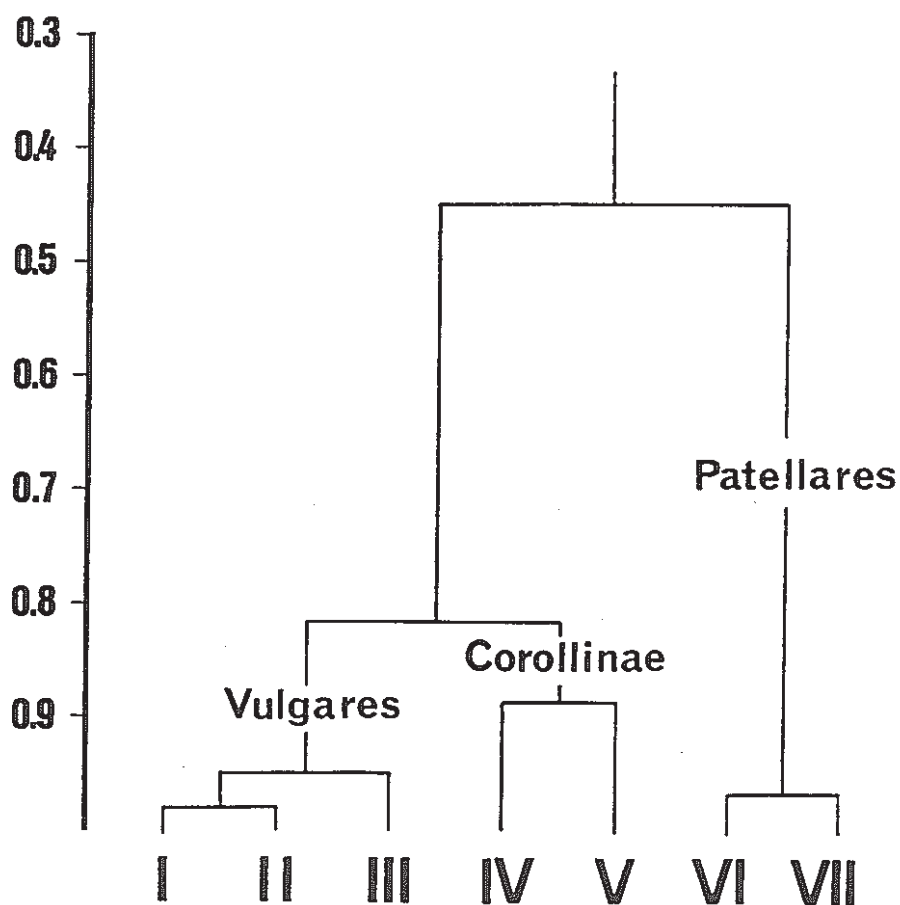


図 4. Beta 属植物の葉緑体がゲノムから推定した系統分化  
 Schmits Kowalik の方法(1986)により算出した類似相関値をたて軸に示す。  
 (I) ctDNA タイプ A, (II) B および C, (III) D, (IV) E, (V) F, (VI) G, (VII) H



## 第4章 イネの薬培養におけるガンマー線照射の効果—2

森 宏一・木下俊郎

### 1. 緒言

イネを用いてガンマー線の生体緩照射や種子照射を行って突然変異誘発を試みると同時に、同一系統から種子カルスや薬カルスを作成してガンマー線照射を行い、個体を再分化せしめて、突然変異の効率や得られた突然変異体についての遺伝的特性及び突然変異スペクトラムを異なる照射方法間で比較して、放射線育種の効率化について検討することを試みた。

1964年、Guha と Maheshwari により初めて薬培養に成功して以来、数多くの植物で試みられ、1968年になって Niizeki と Oono により、イネでの成功例が報告された。薬培養は半数体の作出にとって最も効果的な方法であり、また半数体レベルでは劣性突然変異は直ちに発現されることなどから、突然変異の研究にとっても大変重要である。しかし、タバコ等の一部の植物を除けば植物体の再分化率が低く、特にイネではアルビノ個体の再分化率の高さが育種に利用する上での問題点となっている(新橋・相川 1985)。今回は薬培養を用いて薬およびカルスにガンマー線照射を行ない、カルスの誘導や器官・個体の再分化に与えるガンマー線の影響について調べた。ガンマー線照射は急照射と緩照射の2種の処理方法を用いその差異を調べた。

### 2. 材料および方法

供試材料は北海道の主要品種である「キタアケ」で、この品種を用いて薬培養を行った。薬培養に用いた培地はN6基本培地に2, 4-D 2 mg/l, 寒天9 g/lを加えて熱融解し、直径18mmの試験管に5 ccずつ分注したものを用いた。薬は各試験管当たり平均8.3個ずつ置床し、25°Cの暗黒条件下でカルスの誘導を行った。ガンマー線の照射方法は薬置床直後に照射する場合と薬より誘導されたカルスに照射する場合の2種の処理方法を用い、またガンマー線照射線量としては200 R/hrの線量率で20 kRと30 kRの緩照射を行った区および0.5 kR/minと1 kR/minの線量率でそれぞれ0.5 kRと1 kRの急照射を行った区の4処理区を設け、これに無処理区を加えて計5処理区とした。薬カルスからの器官・個体再分化にはN6基本培地にNAA 0.2mg/l, KIN 1 mg, 蔗糖50 g/l, 寒天9 g/lを添加した培地を用いた。調査はまず薬からのカルス形成率を調べ、次いで器官・個体再分化に関して、不定根、アルビノ、グリーンスポット、緑色個体の出現割合について各照射

処理による効果を比較検討した。

### 3. 実験結果及び考察

#### 1) 葯カルスの誘導

ガンマー線照射した葯からのカルス形成については、Table 1 に示す。葯カルスの形成率は急照射、緩照射処理区共に照射総線量が高くなるにつれて減少し、無処理区の44.7%に対し、急照射1 kR 区では16.7%、緩照射30 kR 区では18.7%となった。一方、急照射処理と緩照射処理の効果についてみると、急照射処理の0.5 kR 区と緩照射処理20 kR 区及び急照射処理1 kR 区と緩照射処理30 kR 区とがほぼ同程度のカルス形成率を示し急照射・緩照射という処理方法による差異は見られなかった。

Table 1. Effect of gamma irradiation for the callus formation from anther of "Kitaake"

Treatment	Exposure rate	No. of anther plated	No. of callus induced	Callus formation ratio (%)
Control		1162	519	44.7
0.5 kR	0.5kR/min	1396	532	38.1
1 kR	1 kR/min	1283	214	16.7
20 kR	0.2kR/hr	1236	447	36.2
30 kR	0.2kR/hr	1371	256	18.7

#### 2) 器官・個体の再分化

葯にガンマー線を照射して生じたカルスからの器官・個体の再分化を調べた結果が Table 2 であ

Table 2. Effect of the regeneration from gamma irradiated anther of "Kitaake"

Treatment	Exposure rate	No. of callus plated	No. of regenerants			
			Root (%)	Albino (%)	Green spot (%)	Green plant (%)
Control		541	25 (4.6)	33 (6.1)	53 (9.8)	425 (78.6)
0.5kR	0.5kR/min	532	86(19.2)	72(13.5)	70(13.5)	292(54.9)
1 kR	1 kR/min	206	27(13.1)	42(20.4)	11 (5.3)	119(57.8)
20 kR	0.2kR/hr	431	63(14.6)	43(10.0)	76(17.6)	224(52.0)
30 kR	0.2kR/hr	256	56(21.9)	28(10.9)	26(10.2)	147(57.4)

る。また、葯由来カルスにガンマー線を照射して器官・個体の再分化を調べた結果が Table 3 である。いずれの処理時期からも緑色個体が得られたが、緑色個体の再分化率は照射時期により異なっていた。まず、葯にガンマー線照射した場合では、緑色個体の再分化は、急照射・緩照射のいずれ

Table 3. Effect of the regeneration from gamma irradiated anther of "Kitaake"

Treatment	Exposure rate	No. of callus plated	No. of regenerant			
			Root(%)	Albino(%)	Green spot (%)	Green plant (%)
Control		400	26( 6.5)	72(18.0)	32( 8.0)	260(65.0)
0.5kR	0.5kR/min	400	55(13.8)	42(10.5)	38( 9.5)	261(65.3)
1 kR	1 kR/min	400	80(20.0)	93(23.2)	47(11.8)	174(43.5)
20 kR	0.2kR/hr	400	104(26.0)	124(31.0)	18( 4.5)	144(36.0)
30 kR	0.2kR/hr	400	118(29.5)	151(37.8)	20( 5.0)	100(25.0)

の処理方法でも照射総線量の高い方が再分化率の高くなる結果となったが、無処理区の再分化率を越えることはなかった。またこの再分化率はカルス形成率の場合と同様に急照射の0.5 kR区と1 kR区のそれが緩照射の20 kR区と30 kR区のそれと同程度の率であった。一方、不定根、アルビノ、グリーンスポットの分化についてみると、無処理区に比較して高い分化率を示す場合が多く、不定根では緩照射30 kR区で無処理区の約5倍、アルビノは急照射1 kR区で無処理区の約3倍、グリーンスポットでは緩照射20 kR区で無処理区の約2倍の再分化率となった。一方、葯カルスにガンマー線を照射した場合の器官・個体の再分化では緑色個体の再分化率は急照射0.5 kR区で無処理区とほぼ同じ値となったが、一般に総線量が高くなると分化率が低くなる傾向がみられた。特に、緩照射30 kR区では無処理区の再分化率の約40%となった、また、不定根、アルビノ、グリーンスポットの分化については緑色個体の再分化の場合とは逆に総線量の増加により分化率が高くなった。不定根の分化ではすべての処理区で無処理区よりも高く、緩照射30kR区で無処理区の約4倍となった。アルビノの分化では急照射0.5 kR区で無処理区より低下したが、他の処理区では無処理区よりも高い値となり、緩照射30 kR区では無処理区の約2倍となった。グリーンスポットの分化では無処理区それより急照射処理区の方が高く緩照射処理区が低い値となったがそれぞれの処理区内では総線量の高い方が分化率が高くなった。このように葯に照射した場合とカルスに照射した場合との器官・個体再分化について比較すると、緑色個体の再分化率では葯照射の方が急照射、緩照射共に高く、特に葯照射ではカルス照射に見られたような照射線量による顕著な差異はほとんどみられなかった。また、不定根やアルビノの分化についても葯照射の再分化率が低い値となったが、グリーンスポットの分化では葯照射の方がカルス照射より高い値となった。これは緑色個体の再分化率と関連していると思われる。

以上の結果から、葯からのカルス形成にガンマー線照射の影響が見られ、さらに器官・個体の再分化に対しても照射時期や方法により異なる効果がみられた。本実験は葯培養を用いて放射線照射により有用な突然変異体の作出を計る目的で行われたもので、今後はM<sub>1</sub>およびM<sub>2</sub>世代での変異体

の誘発を調べ、半数性細胞へのガンマー線照射効果を検討するとともにより効率的な植物体再分化の条件についても検討する。また、イネの葯培養においてカルス形成率及び植物体再分化率の向上は育種的利用を計る上で解決されなければならないもっとも重要な課題である。個体再分化を計る際に脱分化と再分化の培地を異にする方法と同一の培地で行う方法がある。今後はこのような培養方法との関連も検討しなければならない。

#### 4. 摘 要

1) 「キタアケ」を用いてガンマー線照射葯の培養と葯カルスへの照射処理の双方を試み、その後のカルス形成率や器官・個体の再分化に及ぼす影響を調査した。

2) ガンマー線照射葯からの、カルスの形成について調べたところ、照射線量の増加に伴って形成率が低下した。照射方法による差異は見られなかった。

3) カルスからの器官・個体の再分化については、緑色個体の再分化率は葯照射の場合に照射方法による差異は見られなかったが、カルス照射の場合には照射線量の増加により低下し、また緩照射によっても低下した。

#### 引 用 文 献

Guha, S. and Maheshwari, S. C.: *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204 : 497. 1964

Niizeki, H. and Oono, K.: Introduction of haploid rice plants from anther culture. Proc. Japan Acad., 44 : 554-557. (1968)

新橋 登・相川宗巖：イネの葯培養と育種への応用。農及園 (1) 60 : 172-176. 1985

## 第5章 イネのガンマー線照射により誘発された胚乳澱粉の アミロース含量変異体に関する遺伝学的研究

木下俊郎・菊地治己

### 1. 緒 論

北海道の稲作は品種改良と栽培技術の発達により収量水準を大きく向上し、冷害年における減収率こそ低下したものの、収量の年次変動は他府県に比べて依然として高い水準にある。こうした不安定性の解消は北海道稲作の重要な課題となっている。また、産米の品質についても検査等級と食味の両面において北海道産米は府県産米に比べて大きく劣るため、食味の改良に対する社会的要請も極めて強い。

道産米の食味の不良原因については、これまで多くの研究がなされてきたが<sup>7,8,14,15)</sup>、その結果、道産米と府県産米とでは米の理化学的特性に大きな差異が存在し、特に道産米では胚乳澱粉に占めるアミロース成分の割合（アミロース含量）が府県産米に比べて高いことが明らかにされ<sup>7,8)</sup>、低アミロース化による良食味育種の方向性が示されて今日に至っている。今後、さらに道産米の食味を改良し、登熟温度などの環境条件による制約の少ない品種を効率的・計画的に育成するためには、米の食味に大きく影響する胚乳澱粉を始め、蛋白質などの米粒の化学的成分に関する遺伝解析のみならず、それらの生合成や蓄積さらには分解に対する遺伝的制御機構についての理解が必須である。

本研究は、登熟温度の低い北海道においても安定して食味の良好な品種を育成することを目的として、主に胚乳澱粉のアミロース含量に関する遺伝解析を行い、良食味への育種についての基礎知見として取りまとめたものである。

### 2. 材料および方法

イネの低アミロース性突然変異体については、これまでいくつか知られているが<sup>1,11,16,20)</sup>、本実験に用いられた SM-1 は、「しおかり」のガンマー線照射処理後代にさらに EMS 処理を行って誘発された低アミロース性突然変異体から由来している系統でアミロース含量が原品種の約80%まで減少している。

交雑実験に用いた A-5 赤室、H-59、H-69、H-143 および H-337 はいずれも北大検定系統であり、それぞれ花青素 (C, A)、赤米 (Rc, Rd)、着色性 (gh-1, I-Bf<sup>+</sup>)、葉緑素異常 (fs-1, st-1)、形態的奇型 (lg, d-2, nl-1, gl-1, Cl) の各標識遺伝子を含んでいる。

SM-1とこれらの系統との交雑組合せのF<sub>2</sub>集団を個体単位に栽植して、成熟期に個体毎に収穫し、アミロース含量や蛋白含量の分析に用いた。なお、必要に応じて、F<sub>3</sub>系統を用いて後代検定を実施した。

供試材料はいずれも札幌市の北海道大学農学部試験圃場または岩見沢市北海道立中央農業試験場稲作部圃場にそれぞれ栽植した。栽培法はそれぞれの慣行法によった。

調査形質は、アミロース含量、蛋白含量、千粒重、玄米の形態形質、玄米の着色等であった。玄米の調査、出穂日調査等は常法により行った。また、成分分析のための試料としては、個体単位で収穫した後、脱穀し、特殊な系統（小粒や粒厚のうすい系統）を除き、1.8ないし1.9mmのライスグレーダーで精選した玄米を用いた。

アミロース含量の測定は、テクニコン社製のオートアナライザーを用いる稲津の方法<sup>9)</sup>によった。すなわち、試料には90%程度に搗精された後50メッシュのナイロン篩を通した米粉を用い、1回分のサンプル量は100mgとし、これに0.05NのNaOH20mlを加え、5～12時間室温で放置後、オートアナライザーで測定した。

蛋白含量の測定には、同じくテクニコン社製のインフライザーを用いる新井の方法<sup>9)</sup>によった。

### 3. 実験結果

Table 1にはSM-1とその原品種である「しおかり」およびそれらのF<sub>1</sub>植物の特性とアミロース含量並びに蛋白含量を示した。SM-1は「しおかり」に比べて、1週間程度早生化しており、稈長、穂長も共に短かった。千粒重はほとんど同じか、わずかに小粒で、アミロース含量は原品種の70%までに低下した。蛋白含量は原品種より約19%多く、高蛋白性となった。これらのF<sub>1</sub>植物の出穂期はSM-1と同程度になり、「しおかり」より約1週間早かった。稈長、穂長などもSM-1に近い値であった。千粒重は両親より1～2g重かった。アミロース含量は「しおかり」よりやや低かったが、ほとんど差がみられなかった。蛋白含量は、「しおかり」よりも高く、SM-1と同程度の値となった。

Fig. 1には、しおかり(S)×SM-1のF<sub>2</sub>におけるアミロース含量の変異を示した。A、Bいずれの集団も連続分布を示したが、「しおかり」よりも低アミロース個体が多く分離しており、集団B

Table 1. Amylose and protein contents and five agronomic characters

Strain or population	Heading date	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	No. of panicles	1000-grain weight (g)	Amylose content (%)	Protein content (%)
SM-1	Aug. 1	47.4	14.2	24.0	19.1±1.04	13.9±0.45	12.7±0.26
Shiokari	Aug. 7	60.8	17.1	19.1	19.9±1.26	20.0±0.79	10.7±0.43
F <sub>1</sub> (SM-1×Shiokari)	Aug. 1	43.2	12.5	23.6	21.1±1.18	19.6±0.11	12.2±0.34

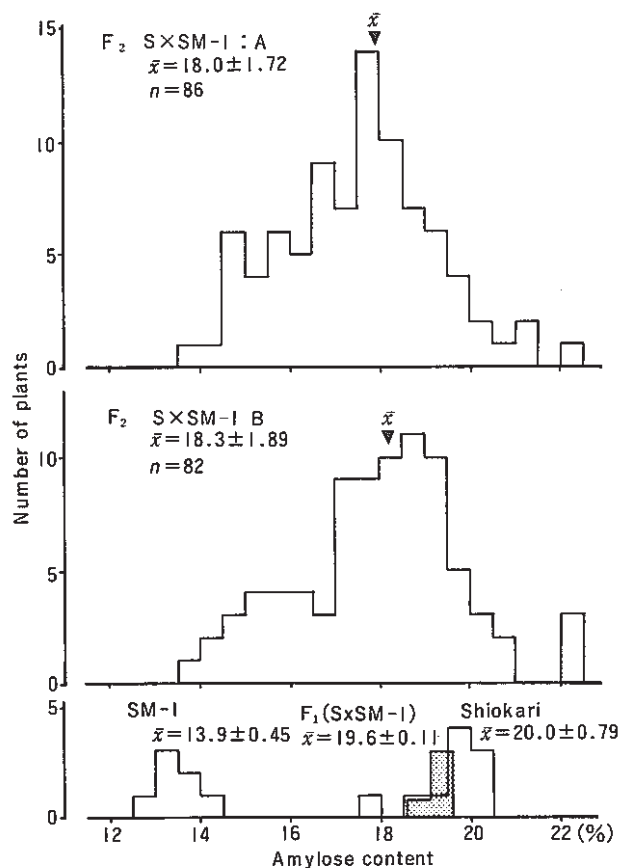


Fig. 1. Frequency distributions of amylose content in the  $F_1$  (dotted) and  $F_2$  populations of the cross, Shiohari (S)  $\times$  SM-1

Table 2. Relation between amylose content and heading date in  $F_2$  of the cross, Shiohari  $\times$  SM-1

Cross	Heading date in $F_2$	Amylose content in $F_2$		Total	Goodness of fit (3:1)	
		$\geq 17\%$	$< 17\%$		$\chi^2$	p
		+, +, + lam(t)	lam(t) lam(t)			
A	(1) July 31-Aug. 2	41	19	60	0.140	0.7-0.8
	(2) Aug 3- " 5	9	4	13		
	(3) " 6- " 8	9	0	9		
	(4) " 9- " 10	4	0	4		
	Total(A)	63	23	86		
B	(1) July 31-Aug. 2	35	13	48	0.797	0.3-0.5
	(2) Aug 3- " 5	14	4	18		
	(3) " 6- " 8	8	0	8		
	(4) " 9- " 10	7	0	7		
	(5) " 11- " 13	1	0	1		
Total(B)	65	17	82			
Table (A+B) Obs.		128	40	168	0.127	0.7-0.8
Cal.		126.0	42.0	168.0		
(3:1)		Homogeneity $\chi^2=0.809$ , d.f.=1, p=0.3-0.5				

では15~16%と、18~19%の2つの頂点を有する2頂分布となり17%を境に低アミロース群と正常群に分けられた。

また、F<sub>2</sub>個体の主程の出穂日についても不連続な分布が得られ、8月6日を境に、早生群と晩生群に分割可能となった。

出穂日区分毎にアミロース含量について17%を境に個体の群別を試みた結果をTable 2に示した。出穂日の区分が、(3)~(5)の晩生群ではアミロース含量17%未満の個体がみられなかった。また、A、Bいずれの集団においても、正常アミロース群と低アミロース群の個体数がほぼ単遺伝子仮説に基づく3:1の比に適合した。

SM-1由来の低アミロース性に係わる単純劣性遺伝子を*lam*(t) (low amylose endosperm) とする遺伝子仮説をたて、F<sub>3</sub>検定を行なった。F<sub>2</sub>の出穂日の分布からみて、SM-1は1個の優性早生遺伝子を有すると推定されたので、まずこれを確めるためにF<sub>3</sub>検定を行なった。F<sub>3</sub>系統はその出穂性から早生固定、早生~晩生分離、および晩生固定の3種に分類され、それら3型の出現頻度はほぼ1:2:1の比率に適合した(Table 3)。従って、SM-1は優性の早生遺伝子、*Ef*(t)を有することがまず明らかとなった。

次に、F<sub>3</sub>系統の中から、早生固定、分離、晩生固定の3種を層別にして合計20系統を抽出し、これらのアミロース含量を個体単位で測定した。その結果、アミロース含量についても低アミロース固定、高低の分離、正常固定の3種のあることが認められた(Fig. 2)。これらのF<sub>3</sub>について、アミロース性と出穂日の同時分離を調べたところ、Table 4に示す如く、それぞれ*lam*(t)、*Ef*(t)なる2種の遺伝子による独立分離に良く適合した。

Table 3. F<sub>3</sub> progeny tests for heading date in the cross of Shiokari × SM-1

Cross	Heading date in F <sub>2</sub>	Estimated genotype in F <sub>2</sub>	Segregation in F <sub>3</sub> line			Total	Goodness of fit (1:2:1)	
			Early fixed <i>Ef</i> (t) <i>Ef</i> (t)	Segregating <i>Ef</i> (t)+	Late fixed ++		$\chi^2$	p
A	(1) July 31-Aug. 2	<i>Ef</i> (t) <i>Ef</i> (t),	18	40	2	60	3.558	0.1-0.2
	(2) Aug. 3-Aug. 5		<i>Ef</i> (t) +	2	11	0		
	(3) Aug. 6-Aug. 8	+ +	0	0	9	9		
	(4) Aug. 9-Aug.10		0	0	4	4		
Total (A)			20	51	15	86		
B	(5) July 31-Aug. 2	<i>Ef</i> (t) <i>Ef</i> (t),	19	29	0	48	2.171	0.3-0.5
	(6) Aug. 3-Aug. 5		<i>Ef</i> (t) +	4	14	0		
	(7) Aug. 6-Aug. 8	+ +	0	0	8	8		
	(8) Aug. 9-Aug.10		0	0	7	7		
	(9) Aug.11-Aug.13		1	0	0	1		
Total (B)			24	43	15	82		
Total (A+B)			44	94	30	168	4.714	0.05-0.1
Cal.			42.0	84.0	42.0	168.0		

Homogeneity  $\chi^2 = 2.892$ , d.f. = 2, p = 0.2-0.3



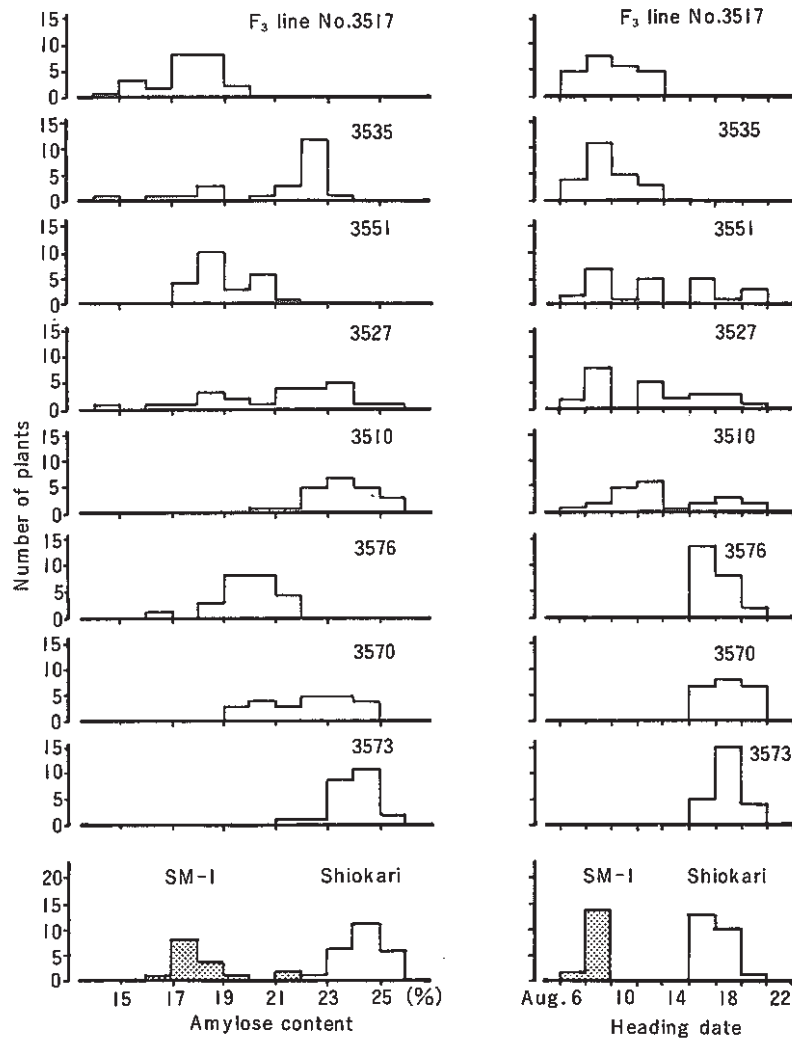


Fig. 2. Frequency distributions of amylose content and heading date in the  $F_3$  lines from the cross, Shiohari  $\times$  SM-1.

*lam(t)* と標識遺伝子との連鎖関係を明らかにするため、SM-1 と 4 種の検定系統の交雑  $F_2$  集団についてアミロース含量を調べた。

まず、H-59(*wx*)  $\times$  SM-1 では、*wx* に関して、++、+*wx*、*wx wx* をほぼ 1 : 2 : 1 の比に分離し、*wx*<sup>+</sup>ホモ群のアミロース含量は、SM-1 程度の階級を 5 個体、それより高いものが 17 個体あり、ほぼ 3 : 1 の比率に適合した (Fig. 3)。従って、*lam(t)* が *wx* とは独立であると推定された。

次に、Table 5 に示した 8 種の標識遺伝子について、それぞれ標識形質をもつ個体ともたない個体とに分けて、アミロース含量の平均値について分散の F 検定と平均値の差に関する t 検定を実施した。*Rd* (赤米分布)、*Rc* (赤米色原素)、*C* (色原素)、*fs-1* (かすり縞)、*gh-1* (黄色顯) および *st-2* では、両群の分散の異なる場合もあったが、いずれも平均値の差は有意でなかった。これに対して、*I-Bf*<sup>+</sup> (顯縦筋暗色) と *nl-1* (苞かむり性) では、それぞれ 1% 水準で有意差が求められた。

Table 4. Segregations of amylose content and heading date in the F<sub>3</sub> lines of the cross, Shiohari×SM-1

F <sub>3</sub> line	Early		Late		Total	Goodness of fit			Estimated F <sub>2</sub> genotype
	Normal	Low amylose	Normal	Low amylose		Ratio	$\chi^2$	p	
3525	13	10	0	0	23	3 : 1	4.19	0.02-0.05	<i>Ef</i> (t) <i>Ef</i> (t) + <i>lam</i> (t)
3535	17	6	0	0	23	do.	0.01	0.9-0.95	do.
3537	19	4	0	0	23	do.	0.71	0.3-0.5	do.
Total	49	20	0	0	69	do.	0.58	0.3-0.5	
3571	0	24	0	0	24	—			<i>Ef</i> (t) <i>Ef</i> (t) <i>lam</i> (t) <i>lam</i> (t)
3528	0	24	0	0	24	—			do.
3510	15	0	7	0	22	3 : 1	0.55	0.3-0.5	<i>Ef</i> (t) + + +
3522	0	16	0	8	24	3 : 1	0.89	0.3-0.5	<i>Ef</i> (t) + <i>lam</i> (t) <i>lam</i> (t)
3548	0	18	0	6	24	do.	0		do.
3551	0	15	0	9	24	do.	2.00	0.1-0.2	do.
Total	0	49	0	23	72	do.	1.85	0.1-0.2	
3505	15	4	3	1	23	9 : 3 : 3 : 1			<i>Ef</i> (t) + + <i>lam</i> (t)
3507	13	3	2	4	22	do.			do.
3514	14	2	5	2	23	do.			do.
3519	13	4	5	1	23	do.			do.
3520	12	5	5	0	22	do.			do.
3527	10	7	4	3	24	do.			do.
3538	7	7	5	3	22	do.			do.
Total	84	32	29	14	159	do.	2.17	0.5-0.7	
3573	0	0	24	0	24	—			+ + + +
3570	0	0	21	3	24	3 : 1	2.00	0.1-0.2	+ + + <i>lam</i> (t)
3571	0	0	0	22	22	—			+ + <i>lam</i> (t) <i>lam</i> (t)
3576	0	0	0	24	24	—			+ + <i>lam</i> (t) <i>lam</i> (t)

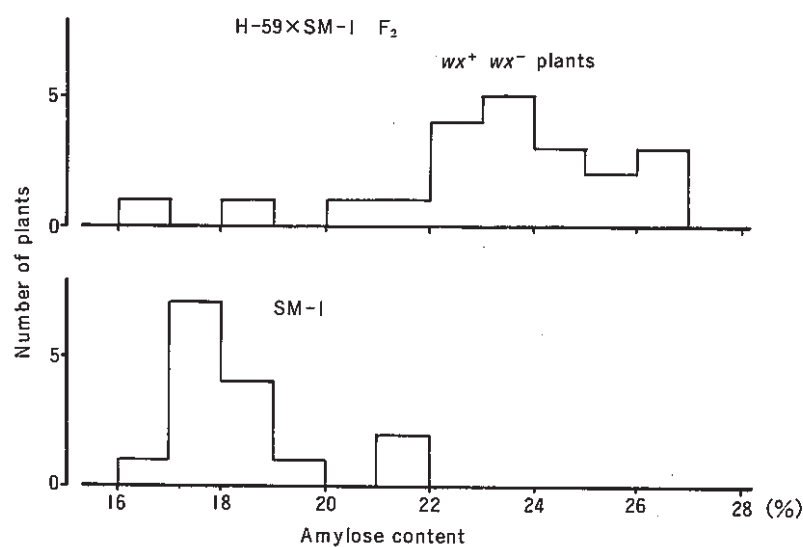


Fig. 3. Frequency distributions of amylose content in non-glutinous plants in the F<sub>2</sub> population of the cross, H-59×SM-1 and SM-1,

*nl-1*については、高アミロース系統が有していた *nl-1* をもつ個体群の方がむしろ低アミロース性となったのに対して、*I-Bf* については、Fig. 4 に示すように両親の場合と同様に *I-Bf*<sup>+</sup>を有する個体群には低アミロース個体が全く出現しなかった。供試個体数が少なく、かつ連鎖の相が相反ではあるが、*I-Bf* と *lam(t)* の間には連鎖関係が示唆された。

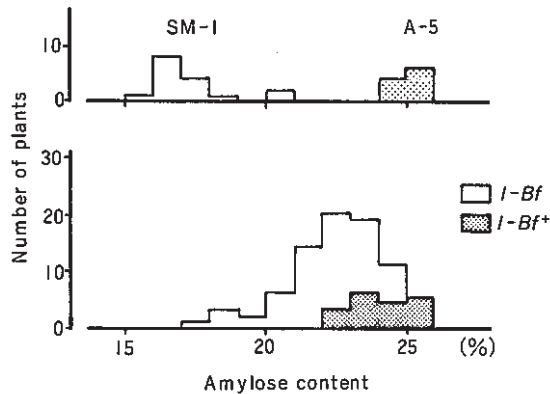


Fig. 4. Frequency distributions of amylose content in  $F_2$  population of the cross, SM-1  $\times$  A-5 Akamuro.

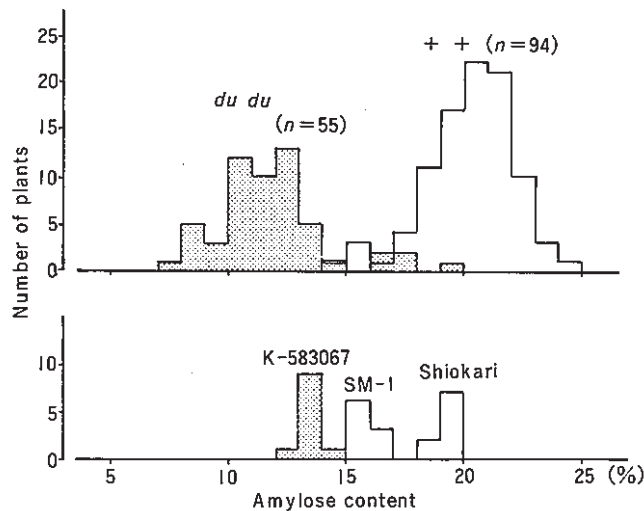


Fig. 5. Frequency distributions of amylose content in *dudu* and *++* of  $F_2$  plants in the cross, SM-1  $\times$  K-583067.

K-583067と永系84268(E-84268)は、それぞれ、「農林8号」と「ニホンマサリ」に由来する *dull* 胚乳に関する遺伝子をもつと推定され、それらの玄米は白色不透明ないし半透明のいわゆる *dull* 胚乳を呈する。そこで、まず、SM-1  $\times$  K-583067とSM-1  $\times$  E-84268の  $F_2$  集団について、 $F_2$  個体に稔った  $F_3$  代の玄米の表現型により、*dull* 固定群、*dull* 分離群と正常固定群の3群に分けて、*dull* 固定群と正常固定群について、アミロース含量の分布を見た (Figs. 5, 6)。いずれの組合せにおい

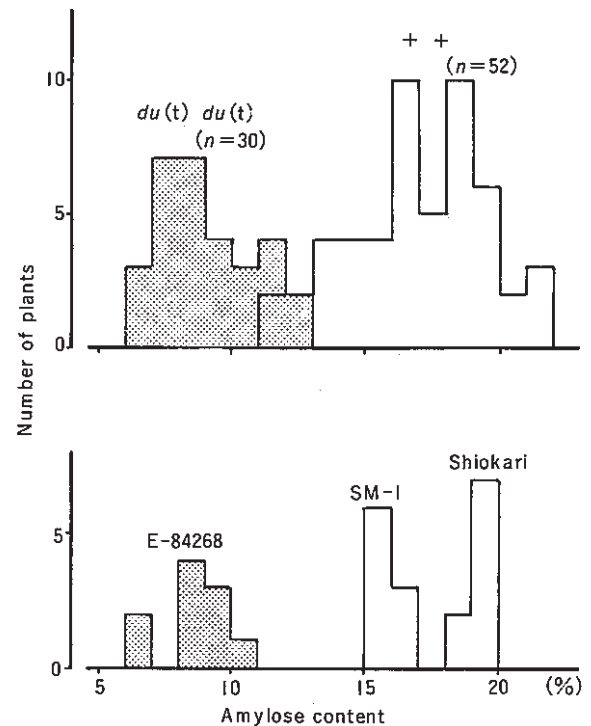


Fig. 6. Frequency distributions of amylose content in  $F_2$  population of the cross, SM-1  $\times$  E-84268.

Table 5. Relationship between amylose content and linkage markers in F<sub>2</sub> populations of the crosses involving SM-1

Cross combination	Marker gene	Number of F <sub>2</sub> plants			Amylose content (Mean±S.D.)		Difference A-a	F test	t test
		A	a	Total	A	a			
SM-1×A-5	<i>Rd</i> (III)	43	23	66	23.48±1.69	23.13±1.50	0.35	1.27	0.982
do.	<i>I-Bf</i> (V)	63	18	81	23.00±1.66	25.02±1.18	-2.02	1.99	4.807*
do.	<i>Rc</i> (IV)	66	15	81	23.36±1.62	23.85±2.37	-0.49	2.14*	0.963
H-69×SM-1	<i>C</i> (I)	119	42	161	24.06±1.88	23.68±1.83	0.38	1.05	1.134
do.	<i>fs-1</i> (VI+IX)	113	43	156	24.11±1.69	23.64±2.31	0.47	1.87**	1.403
do.	<i>nl-1</i> (VI+IX)	126	35	161	24.40±1.53	22.39±2.07	2.01	1.82**	6.332**
H-143×SM-1	<i>gh-1</i> (VI+IX)	97	27	124	24.88±1.21	25.21±0.72	-0.33	2.75**	1.348
do.	<i>st-2</i> (VI+IX)	100	23	123	25.07±1.03	24.42±1.41	0.65	1.88*	2.539*

\*, \*\*: Significant at the 5% and 1% levels, respectively.

ても、正常群にはSM-1より高アミロース含量は顕著に低かったが、SM-1×E-84268では6~13%で、SM-1×K-583067では、7~20%のアミロース含量の広い変異幅を示し、肉眼判定によるdull胚乳の発現程度と実際のアミロース含量の関係では、dull型が正常型に比べてアミロース含量が高くなるような逆転現象を生ずる場合があった。

なお、Table 5に示すように、SM-1はその原品種に比べて早生で高蛋白となった。SM-1は優性の早生遺伝子*Ef*(t)を有していたので、F<sub>2</sub>における胚乳の蛋白含量と早生遺伝子*Ef*(t)との関連を調べた。Fig. 7にはSM-1、「しおかり」、F<sub>2</sub>の蛋白含量の頻度分布を示した。F<sub>1</sub>はSM-1に近く、F<sub>2</sub>では両親の中間値付近を平均値とする単頂な連続分布と

なった。早生群の平均値は11.52%で晩生群の10.43%に比べて1.09%高く、その差は統計的に有意であった (F=1.08, t=48.884, p<0.001, d.f.=84)。なお、早生群には少数の低蛋白個体が、また、晩生群には少数の高蛋白個体が出現した。

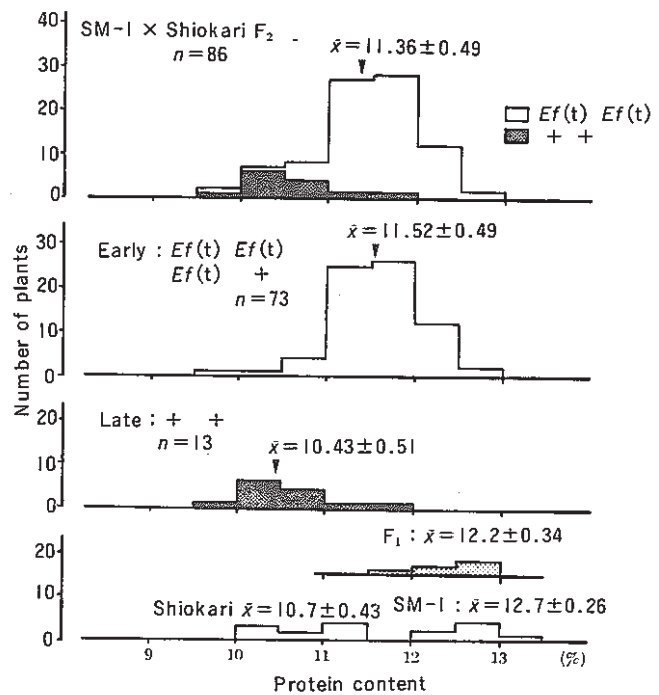


Fig. 7. Frequency distributions of protein content in Shiohari, SM-1, F<sub>1</sub>s and F<sub>2</sub> population of cross, SM-1×Shiohari.

#### 4. 考 察

ガンマー線処理により誘発された突然変異系統、SM-1のもつ低アミロース性遺伝子の解析を行なった。本形質は胚乳の澱粉に係わるからキセニア現象を生じているが、アミロース含量の測定は個体単位で行なわねばならなかったもので、実際はF<sub>3</sub>世代の玄米からF<sub>2</sub>個体の遺伝子型を推定した。SM-1とNM-39はそれぞれ *wx* 座とは独立の関係にある互いに異なった低アミロース性に関する遺伝子を持ち、かつ、それらは互いに独立であることが交雑実験から明らかになった。SM-1のもつ *lam*(*t*)による低アミロース性は、*dull*胚乳の低アミロース性遺伝子 *du*(*t*)による場合と異なり、そのアミロース含量の低下度は小さいが、外見は正常で透明な玄米になった。従って玄米の外見による遺伝子分析は不可能であり、さらに、F<sub>2</sub>におけるアミロース含量の変異も連続的となったので、同時に分離した早生型に関する遺伝子分析と共にF<sub>3</sub>の後代検定を行った。SM-1の早生化には優性の早生突然変異遺伝子 *Ef*(*t*)が関与しており、これとは独立に低アミロース性遺伝子 *lam*(*t*)を分析することができた。

一般に、アミロース含量は登熟温度の影響を強く受けるので<sup>8)</sup>、北海道の早生品種では登熟温度が高く、逆に晩生種では登熟温度が低くなりがちであり、アミロース含量の環境変動が大きいので、本実験でも、農林20号×イシカリのF<sub>2</sub>集団では、出穂日とアミロース含量の間に正の相関係数が得られた。従ってアミロース含量は出穂の早晩を通しての登熟温度の影響を強く受けると思われる。しかし、早生種のアミロース含量が低い理由としては、登熟温度効果の他に、他の低アミロース性遺伝子を早生種が有するためか、あるいは、早生遺伝子自体がアミロース含量に対して多面作用を有することによる可能性が考えられる。

本実験の結果からSM-1由来の早生遺伝子 *Ef*(*t*)は登熟温度とは独立に、単独でアミロース含量を低下させる作用を持ち、その作用は *lam*(*t*)に近いこと、また両遺伝子は累積的に作用することが同質遺伝子系統を育成し、作用性を調べて明らかとなった(Table 6)。また、SM-1の高蛋白性が、*Ef*(*t*)による早生化によって説明されることも明らかとなったが、これは、子実における貯蔵蛋白

Table 6. Effect of the genes for earliness *Ef*(*t*) and low amylose endosperm *lam*(*t*) on the amylose content in the genetic background of Shiokari

Strain	Genotype	Heading date	Temperature(°C)		Amylose content (%)	Relative values		
			T <sub>1</sub> <sup>1)</sup>	T <sub>2</sub> <sup>2)</sup>				
Shiokari	+ + + +	Aug. 8	24.8	21.1	20.8	100	—	—
A16*	+ + <i>lam</i> ( <i>t</i> ) <i>lam</i> ( <i>t</i> )	Aug. 7	24.8	21.3	17.3	83	100	—
A1*	<i>Ef</i> ( <i>t</i> ) <i>Ef</i> ( <i>t</i> ) + +	Aug. 3	25.0	22.4	18.9	91	—	100
A8*	<i>Ef</i> ( <i>t</i> ) <i>Ef</i> ( <i>t</i> ) <i>lam</i> ( <i>t</i> ) <i>lam</i> ( <i>t</i> )	Aug. 3	25.0	22.4	16.1	77	93	85

\* : Isogenic lines (F<sub>3</sub>) derived from the cross, Shiokari×SM-1.  
1), 2) : Mean temperature for 20 day and 40 days after heading, respectively.

の蓄積に対する endogeneous な要因を解析する上で興味深い。イネの蛋白含量は出穂早晚性によって大きく影響されるとする報告が多い<sup>6,19,22</sup>。早生化による子実の高蛋白化は、早生種の出穂時における体内窒素濃度が晩生種に比べて高いことがその理由と考えられており<sup>22</sup>、早生遺伝子と稲体の窒素吸収特性の関連を探る上でも、このような同質遺伝子系統は有用な素材となろう。

イネの胚乳澱粉のアミロース含量は、米の食味の調理特性に影響する最大の原因の一つである<sup>10</sup>。特にアミロース含量の少ないものは日本人の嗜好に合致し、いわゆる“粘りが強くておいしい”と言われている<sup>12</sup>。

アミロース含量の遺伝についても、インド型品種の高アミロース性には一個の優性または不完全優性遺伝子と少数の変異遺伝子が関与するとして報告が多いが<sup>3,4,5,13,21</sup>、最近、Sano<sup>17</sup>は、日印間のアミロース含量の差は、第 I 連鎖群の *wx* 座のアレーレの分化により説明され、高アミロース性のインド型品種は  $Wx^a$  を、また、低アミロース性の日本型品種は  $Wx^b$  を有することを報告した。

現在、低アミロース性に関する遺伝子としては、*wx* 座に生じた leaky 型の突然変異<sup>11</sup>と *wx* 座とは独立の *dull* 胚乳に関する遺伝子が複数個報告されている<sup>16,20</sup>。これらの *du* 遺伝子は *Wx* の生成する *Wx* 蛋白のレベルに影響を及ぼす一種の調節遺伝子であろうと推定されている<sup>18</sup>。

このように、胚乳澱粉のアミロース含量に関する遺伝的制御機構は、アミロース合成酵素の構造遺伝子である *wx* 座を中心に次第に明らかになってきたものの、未解明の部分が多い。

今回分析された *lam* (t) については、*Wx* 蛋白の生成を減少させることがすでに明らかとなっている<sup>18</sup>。したがって、これは、*Wx* 蛋白の形質発現の制御に係わる一種の調節遺伝子であろうと思われる。

なお、SM-1 は、早生型の突然変異遺伝子 *Ef* (t) も有することが明らかになったが、この *Ef* (t) 自体もアミロース含量に影響を及ぼしていた。また、*Ef* (t) による早生化に伴ない子実の蛋白含量が増加したが、これはイネにおける窒素吸収特性と出穂特性の関連を探る上で興味深い現象と思われる。

以上のように、アミロース含量や蛋白含量の遺伝的調節は、それらの合成系に関与する遺伝子群による場合と、発育のパターン（出穂の早晚性など）や器官の大きさの多面発現による場合のあることが示唆された。

これらの知見を活用して、今後イネの穀粒特性に関する遺伝解析や育種を進める必要があるだろう。

## 5. 摘 要

1. 北海道の栽培品種「しおかり」についてのガンマー線照射により誘発された低アミロース性突然変異系統を用いて、アミロース含量に関する遺伝子分析を行なった。

2. 低アミロース性突然変異系統である SM-1 では、外見は正常粒であったが、アミロース含量は原品種の80%までに減少していた。この低アミロース性には、単純劣性遺伝子 *lam(t)* の関与することが明らかとなった。
3. *lam(t)* は第 I 連鎖群に属する *wx* (胚乳糯性) や、農林 8 号ならびにニホンマサリより由来した 2 種の *dull* 胚乳遺伝子とはそれぞれ独立関係にあった。しかし、第 V 連鎖群の *I-Bf* との間には連鎖関係が示唆された。
4. *lam* 型 × *du* 型の交雑集団では、両遺伝子がおそらく独立遺伝をするために、外見から、正常型と *dull* 型に分けられても、アミロース含量の高低はそれと必ずしも一致しない場合が認められ変異幅は著しく拡大した。これは、低アミロース米の育種をすすめる上で興味深い結果として注目される。
5. SM-1 は優性の早生遺伝子 *Ef(t)* を有していたが、*Ef(t)* は出穂を約 1 週間早める作用をもち、低アミロース性遺伝子 *lam(t)* とは独立関係にあった。
6. *Ef(t)* による早生化に伴い、SM-1 では子実の蛋白含量が増加した。また、*Ef(t)* は、それ自身、アミロース含量を原品種の90%程度まで減少させる作用を有していた。

#### 引用文献

1. 天野悦夫：イネの EMS 誘発モチ変異体の形質表現，育雑，28 別 2：4-5. 1977
2. 新井利直：米の食味検定—インフラライザーの原理と測定，北海道立農業試験場資料，15：65-71. 1982
3. BOLLIICH, C. N. and B. D. WEBB : Inheritance of amylose in two hybrid population of rice. *Cereal Chem.*, 50 : 631-636. 1973
4. CHAUHAN, J. S. and J. S. NANDA : Inheritance of amylose content and its association with grain yield and yield contributing characters in rice. *Oryza*, 20 : 81-85. 1983
5. DWIVEDI, J. L. and J. S. NANDA : Inheritance of amylose content in three crosses of rice. *Indian J. agric. Sci.*, 49 : 753-755. 1979
6. 東 正昭・櫛淵欣也・伊藤隆二：高蛋白米品種の育種に関する基礎的研究 I 玄米蛋白含有率の品種間差異および諸形質とくに収量との関係について，育雑，24(2)：88-96. 1974
7. 稲津 脩・渡辺公吉・前田 巖・伊東恵子・長内俊一：北海道産米の品種改善に関する研究 (第 1 報) 米澱粉のアミロース含有率の差異，澱粉科学，2：115-119. 1979
8. 稲津 脩：北海道産米の品質改善に関する研究，澱粉科学，26：191-197. 1979
9. 稲津 脩：米の食味検定—食味の理化学的性—北海道立農業試験場資料，15：49-64. 1982

10. JULIANO, B. O. : The chemical basis of rice quality. Proc. of the workshop on chemical aspects of rice grain quality. *IRRI Symposium Report*. 1979
11. 菊地治己：水稲品種「しおかり」より誘発された低アルミロース突然変異体の育種的利用，北海道立農業試験場資料，15：103-108，1982
12. 倉沢文夫：コメの味II. コメの味と精白米の構成成分，遺伝，23：42-47，1969
13. MCKENZIE, K. S. and J. N. RUTGER : Genetic analysis of amylose content, alkali spreading score, and grain dimensions in rice. *Crop Sci.* 23 : 306-313. 1983
14. 南 松雄・土居晃郎：北海道産米の品質に関する物理化学的研究 第1報 米の食味特性と栽培環境要因との関係，道農試集報，24：43-55，1971
15. 南 松雄・土居晃郎：北海道産米の品質に関する物理化学的研究 第2報 米の食味特性と蛋白質含量との関係，道農試集報，26：49-58，1973
16. OKUNO, K, H. FUWA and M. YANO : A new mutant gene lowering amylose content in endosperm starch of rice, *Oryza sativa* L. *Japan J. Breed.* 33 : 387-394. 1983
17. SANO, Y. : Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 68 : 467-473. 1984
18. SANO, Y., M. MAEKAWA and H. KIKUCHI : Temperature effects on the *Wx* protein level and amylose content in the endosperm of rice. *J. Heredity* 76 : 221-222. 1985
19. 佐々木忠雄・長内俊一・稲津 脩・江部康成：北海道水稲品種の理化学的食味形質についての育種的一考察，道農試集報，37：1-10，1977
20. SATOH, H. and T. OMURA : New endosperm mutation induced by chemical mutagens in rice, *Oryza sativa* L. *Japan J. Breed.* 31 : 316-326. 1979
21. SOMRITH, B., T. T. Chang and B. R. JACKSON : Genetic analysis of traits related to grain characteristics and quality in two crosses of rice. *IRRI Research Paper Series* 35. 1979
22. 徐 錫元・茶村修吾：玄米蛋白質含有率の品種間差の発見，日作紀，48(1)：34-38，1979



## 第6章 イネの少分げつ性変異体に関する遺伝子分析 ならびに生理特性

高牟禮 逸 朗・木 下 俊 郎

### 1. 緒 言

イネの分げつ性は一般にポリジーンによって支配される量的形質であるが、主働遺伝子の関与する変異体も知られている。少分げつ性突然変異体としては、蓬原・山口 (1963) によりガンマー線照射によって誘発された最初の報告の他に変異源処理により誘発された2種の変異体 (N-133・N-174) が知られている。N-133には第I連鎖群に座乗する *rcn-1* が関与し、低温条件下でのみ著しい少分げつ矮性を示す低温感受性変異体であり (TAKAMURE and KINOSHITA 1985), N-174の少分げつ性には *rcn-1* とは異なる *rcn-2* の関与することが報告されている (高牟禮・木下 1987)。

本実験では、N-174の有する *rcn-2* の所属連鎖群を明らかにするために連鎖分析を行うとともに、*rcn* の作用とは逆に分げつ数を増大させる方向に作用する3種の分矮遺伝子 (*d-10*, *d-14*, *d-17*) との相互作用を検討した。また、新たな少分げつ変異体であるN-175とN-176について遺伝子分析を行った。さらに、少分げつ性変異体の形質発現に至る生理作用を調べる目的から、分げつ発生に関与するとされる温度条件やオーキシシン処理に対する反応について調査した。

### 2. 材料および方法

本実験に用いた突然変異体を Table 1 に示した。N-133はA-5赤室へガンマー線照射を行った後代から得られた少分げつ性突然変異体で、第I連鎖群に座乗する *rcn-1* が関与する。また、本変異体は低温条件下でのみ顕著な少分げつと短稈を示し、高温条件下ではほぼ正常型を示すことから低温感受性であることが明らかにされている。一方、N-174は「しおかり」のEMS処理後代から見出された温度反応性を示さない少分げつ性突然変異体で、*rcn-1* との対立性検定から *rcn-1* とは異なる *rcn-2* の関与することが報告されている。N-175およびN-176は新たに見出された少分げつ性突然変異体でそれぞれA-5赤室×H-120, H-59×H-120の交雑F<sub>1</sub>個体の約培養から作出された2倍体にガンマー線を生体緩照射して誘発された。両変異体は水田条件下では2~4本の少分げつ性を示すが、N-176に比べて稈が太く稈長もやや長いという互いに異なる特性を示す。

#### (1) 遺伝子分析

遺伝子分析に用いた交雑組合せを Table 1 に示した。N-174の有する *rcn-2* の連鎖分析には正常

Table 1. List of the mutants and the cross combinations used in the experiments  
(a) Mutants

Strain	Original strain	Source	Charactor
N-133	A-5 Akamuro	Gamma-ray	reduced culm number-1 ( <i>rcn-1</i> )
N-174	Shiokari	EMS	reduced culm number-2 ( <i>rcn-2</i> )
N-175	AC*-33 (A-5 × H-120)	Gamma-ray	reduced culm number
N-176	AC*-15 (H-59 × H-120)	Gamma-ray	reduced culm number
Fukei No.71	Fujiminori	Gamma-ray	dwarf ( <i>d-50(t)</i> )

\* ; Regenerant from F<sub>1</sub> hybrid by anther culture.

(b) Cross combinations

Cross combination	Generation	Cross combination	Generation
N-174 × A-58	F <sub>2</sub>	N-175 × N-133	F <sub>2</sub> , F <sub>3</sub>
do. × A-133	F <sub>2</sub>	N-176 × Shiokari	F <sub>2</sub>
H-491 × N-174	F <sub>2</sub>	do. × A-5	F <sub>2</sub>
ID-10 × do.	F <sub>2</sub>	do. × N-133	F <sub>2</sub>
ID-14 × do.	F <sub>2</sub>	N-133 × Fukei No.71	F <sub>2</sub>
ID-17 × do.	F <sub>2</sub>	Fukei No.71 × N-133	F <sub>2</sub>

な分げつ性を示す3種の標識遺伝子系統を交雑親に用い、分矮遺伝子との相互作用については「しおかり」を反復親とする3種の分矮型の準同質遺伝子系統を検定親として交雑F<sub>2</sub>集団を養成した。N-175については、*rcn-1*を有するN-133との交雑F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>を供試して対立性検定を行った。また、N-176については、2種の正常型ならびにN-133との交雑F<sub>2</sub>集団を用い遺伝子分析ならびに*rcn-1*との対立性検定を行った。

以上の供試材料は5月上旬に北海道大学農学部世代短縮温室内に播種し、ビニールハウス内で育苗後6月上旬に北大農場実験水田へ1株1本植えて移植し、栽培は慣行法に従った。稈長・茎数および標識形質については出穂後、水田において調査を行った。なお、遺伝子間の組換え価の算出はIMMERの乗積比法によった。

## (2) 温度反応

前述の4種の少分げつ変異体とそれぞれの原系統並びに「フジミノリ」と「フジミノリ」由来の矮性系統「ふ系71号」を供試した。ふ系71号は高温条件下で短稈化が著しくなる高温感受性の矮性変異体で(KITANO and FUTSUHARA 1981)、矮性遺伝子 *d-50(t)* が関与している。

以上の各系統並びにN-133と「ふ系71号」の相反交雑F<sub>1</sub>個体、F<sub>2</sub>集団を北大農場実験水田(低温区)とビニールハウス内でのポット植え(高温区)の2種の温度条件下において慣行法により栽培した。また、N-133とA-5、ふ系71号と「フジミノリ」の4系統については弘前大学農学部附属金木農場実験水田(中温区)でも栽培した。各系統はそれぞれの条件区で2回反復とし、1反復4個

体について出穂後の稈長、茎数等の形質調査を行った。

(3) オーキシンおよびアンチオーキシン処理に対する反応

供試材料にはN-174, 「しおかり」原系統, 「しおかり」を反復親とする各種の分矮型準同質遺伝子系統 (ID-3, ID-10, ID-14, ID-27) およびN-175, N-176を用いた。各系統は5月中旬に温室内で播種し, ビニールハウス内で育苗後, 6月中旬に2 lポットに個体植えし, ひき続きビニールハウス内で栽培した。N-174, 「しおかり」およびID系統については, 無処理区と3種の濃度 (10, 100, 1,000ppm) の合成オーキシン(NAA)およびアンチオーキシン(TIBA)処理区を設け, N-175とN-176については無処理区とTIBA 1,000ppm処理区を設けた。各処理は2回反復とし, 1反復5個体を供試した。移植以降の2カ月間に4回の葉面散布 (1回1個体あたり10cc) を行い, 草丈と茎数の推移を調べた。

3. 実験結果

(1) 遺伝子分析

a. *rcn-2* の連鎖分析ならびに分矮遺伝子との相互作用

N-174と正常型検定系統との交雑F<sub>1</sub>個体はすべて正常型を示し, F<sub>2</sub>集団においては, *rcn-2* の分離に基づき穂数が10~20本の正常型と約5本のN-174様少分けつ型を3:1の比に生じた。両表現型の稈長は, 少分けつ型がやや短稈を示したが変異幅は重複しており大きな差異は示されなかった。*rcn-2* と標識遺伝子との連鎖分析の結果, 第II連座群に所属する *Pr* (顕全面紫色) との間に相引で25.2%の組換え価で連鎖関係が見出された (Table 2)。したがって, *rcn-2* は *Pr* と同じ第II連鎖群に座乗することが示された。

Table 2. Linkage relationship between *rcn-2* and *Pr* (Purple hull) in F<sub>2</sub> population of the cross, N-174 × A-58

Linkage phase	R.C.V. (%)	F <sub>2</sub> segregation				Total	Goodness of fit		
		+		<i>rcn-2</i>			Ratio	$\chi^2$	p
		<i>Pr</i>	+	<i>Pr</i>	+				
Obs.		145	26	31	41	243	9:3:3:1	57.43	<0.001
Coup.	25.2±2.2	Cal.	155.49	26.76	26.76	33.99	243.00	2.85	0.5-0.4

*rcn-2* と3種の分矮遺伝子 (*d-10*, *d-14*, *d-17*) との相互作用を調べた。N-174と各分矮遺伝子についての準同質遺伝子系統 (ID-10, ID-14, ID-17) との交雑F<sub>1</sub>はすべて正常型を示した。F<sub>2</sub>集団の茎数と稈長はいずれの交雑組合せにおいても同様の変異を示したので, ID-10 × N-174のF<sub>2</sub>集団における茎数と稈長の散布図および茎数の頻度分布を Fig 1 に示した。3種のF<sub>2</sub>集団において

はいずれも原系統「しおかり」とF<sub>1</sub>を含む正常型、N-174様少分げつ型、分矮型の3種の個体群がほぼ9:3:4の比に分離した (Table 3)。したがって、2重劣性型は分矮型に含まれると推定された。また、分矮型個体群は短稈で固定したものの、茎数については幅広い連続的な変異を示したことから、分矮遺伝子の *d-10*, *d-14*, *d-17* はそれぞれ *rcn-2* に対して稈長については上位性を示すことが明らかにされた。

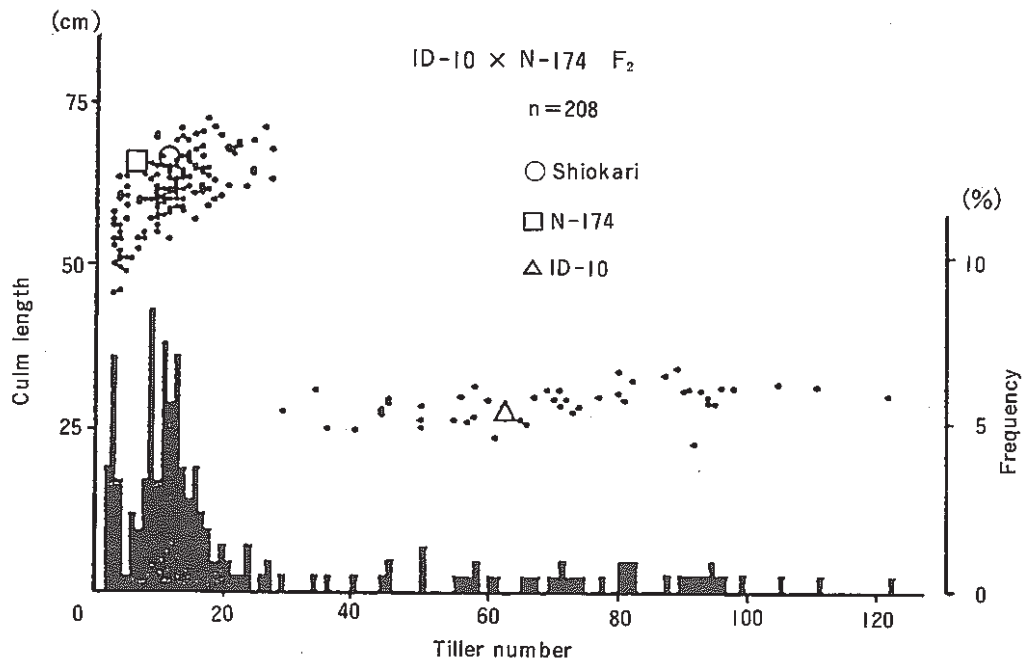


Fig. 1. Segregations of tiller number and culm length in F<sub>2</sub> population of the cross, ID-10 x N-174.

Table 3. Combined segregations between *rcn-2* and tillering-dwarf genes in F<sub>2</sub> populations

Cross combination	Tillering-dwarf gene	Obs.	F <sub>2</sub> segregation			Total	Goodness of fit (9:3:4)	
			+		<i>d</i>		$\chi^2$	p
			+	<i>rcn-2</i>	+ <i>rcn-2</i>			
ID-10 x N-174	<i>d-10</i>	Obs.	122	39	47	208	0.69	0.8-0.7
ID-14 x do.	<i>d-14</i>	Obs.	152	50	68	270	0.01	>0.99
ID-17 x do.	<i>d-17</i>	Obs.	75	30	37	142	0.79	0.7-0.6

b. N-175とN-176の遺伝子分析

N-175と *rcn-1* を有するN-133の交雑F<sub>1</sub>はすべて正常型で、F<sub>2</sub>集団では、正常型：N-175様少分げつ型：N-133様少分げつ型がほぼ9：3：4の分離比に適合した。

しかし、N-175型からN-133への分げつ数変異がやや連続的であったことから、前年度育成した同一F<sub>2</sub>のうち正常型を示した30個体についてF<sub>3</sub>後代検定（各系統約50個体）を行った。F<sub>3</sub>系統では遺伝的背景が斉一化したため、表現型の区別が容易となり、正常型固定系統、1因子分離型の系統、2因子分離型の系統が観察され、N-175の少分げつ性に *rcn-1* と異なる単純劣性遺伝子 *rcn-3* (t) が関与すると仮定した場合の理論比とよく適合した (Table 4)。また、*rcn-1* 型と *rcn-1*, *rcn-3* (t) の2重劣性型を区別することが困難であったことから、水田条件下では低温感受性の *rcn-1* が *rcn-3* (t) に対して上位性を示すと推定された。

Table 4. Segregations of *rcn-1* and *rcn-3* (t) in F<sub>3</sub> lines derived from normal type plants in F<sub>2</sub> population of the cross, N-175 × N-133

Estimated genotype (F <sub>2</sub> )	Phenotype in F <sub>3</sub> lines				No. of F <sub>3</sub> lines			
	+	+	<i>rcn-1</i> +	+ <i>rcn-3</i> (t)	<i>rcn-1</i>	<i>rcn-3</i> (t)	Obs.	Exp.
+ + + +	1						3	3.33
+ <i>rcn-1</i> + +	3	1					9	6.67
+ + + <i>rcn-3</i> (t)	3		1				5	6.67
+ <i>rcn-1</i> + <i>rcn-3</i> (t)	9	3	3		1		13	13.33
Total							30	30.00

Goodness of fit ;  $\chi^2$  (1:2:2:4)=1.27, 0.7 < p < 0.8.

N-176へ正常型の「しおかり」、A-5赤室および *rcn-1* を有するN-133をそれぞれ交雑したF<sub>1</sub>は、すべて正常型を示した。正常型との交雑F<sub>2</sub>集団においては、正常型とN-176様少分げつ型をほぼ3：1に分離し、N-176の少分げつ性には単純劣性遺伝子の関与することが示された。N-133との交雑F<sub>2</sub>集団においては正常型からN-133様の少分げつ型に至る連続的な変異が見られた。区別が困難であったN-176型とN-133型をプールして少分げつ型とするならば、正常型：少分げつ型は、ほぼ9：7の比に分離した (Table 5)。したがって、N-176には *rcn-1* とは異なる新たな劣性遺伝子 *rcn-4* (t) が関与していると推定された。

Table 5. Segregations of reduced culm number type in F<sub>2</sub> populations of the crosses between N-176 and tester strains

Cross combination		F <sub>2</sub> segregation			Goodness of fit		
		Normal	Reduced culm no.	Total	Ratio	$\chi^2$	p
N-176 × Shiokari	Obs.	273	89	362	3 : 1	0.03	0.9-0.8
do. × A-5	Obs.	266	75	341	3 : 1	1.64	0.2-0.1
do. × N-133	Obs.	86	62	148	9 : 7	0.21	0.7-0.6

(2) 温度反応

4種の少分げつ性変異体、ふ系71号ならびにそれらの原系統を供試し、それぞれの温度条件での稈長・穂数を調査し、変異体と原系統間の比較を行った (Table 6)。rcn-1を有するN-133は、す

Table 6. Character expression of mutants and original strains under two locations

Strain	Genotype	Paddy field				Vinyl house	
		Sapporo		Kanagi		Sapporo	
		CL <sup>1)</sup>	PN <sup>2)</sup>	CL	PN	CL	PN
A-5	+	75.4	8.4	84.6	13.6	79.2	9.6
N-133	<i>rcn-1</i>	36.2**	2.3**	60.4**	5.6*	73.4	10.0
Shiokari	+	72.1	15.6			66.8	13.8
N-174	<i>rcn-2</i>	61.8	6.7**			67.1	9.8**
AC-33	+	60.2	11.7			—	—
N-175	<i>rcn-3</i> (t)	44.9**	3.2**			74.8	13.6
AC-15	+	86.7	5.8			—	—
N-176	<i>rcn-4</i> (t)	72.5**	2.6**			94.9	7.6
Fujiminori	+	71.9	10.5	84.6	12.9	81.9	11.6
Fukei No.71	<i>d-50</i> (t)	57.7**	12.6	63.9**	17.1	56.0**	13.1

1) Culm length, 2) Panicle number.

\*,\*\* Significantly different from the original strain at the 5% and 1% levels, respectively.

で報告されているように、北大水田 (低温区) では顕著な短稈・少分げつ性を示し、ビニールハウスのポット植え (高温区) ではほとんど正常型に近いまで生育が回復し、原系統のA-5赤室との間に稈長・穂数ともに有意差は認められなかった。また、今回新しく設けた金木町の水田条件 (中温区) におけるN-133の稈長・穂数は、低温区と高温区の中間の値となり、明らかな温度反応が認められた。*rcn-2*を有するN-174の少分げつ性は、N-133のように顕著ではないが高温・低温両区で原系統「しおかり」に比べて有意な少分げつ性を示し、稈長では有意差はみられなかった。*rcn-3* (t)を有するN-175と*rcn-4* (t)を有するN-176の両系統は、低温区で各原系統に比べて有意差をもつ短稈・少分げつ性を示した。高温区では原系統とは比較できなかったが、両系統ともに低温区に比べて稈長・穂数共に増加し、ある程度の低温感受性が示された。*d-50* (t)を有する「ふ系71号」は3種の温度区すべてにおいてフジミノリより有意差をもつ短稈を示し、さらにフジミノリと比較した短稈の程度は、高温区ほど著しくなった。また両系統間の穂数については有意差は認められなかった。

さらにN-133と「ふ系71号」との相反交雑からのF<sub>2</sub>集団を北大水田 (低温区) とビニールハウスのポット植え (高温区) の2条件で栽培し、形質表現を調べた。Fig. 2と3には相反交雑F<sub>2</sub>集団の

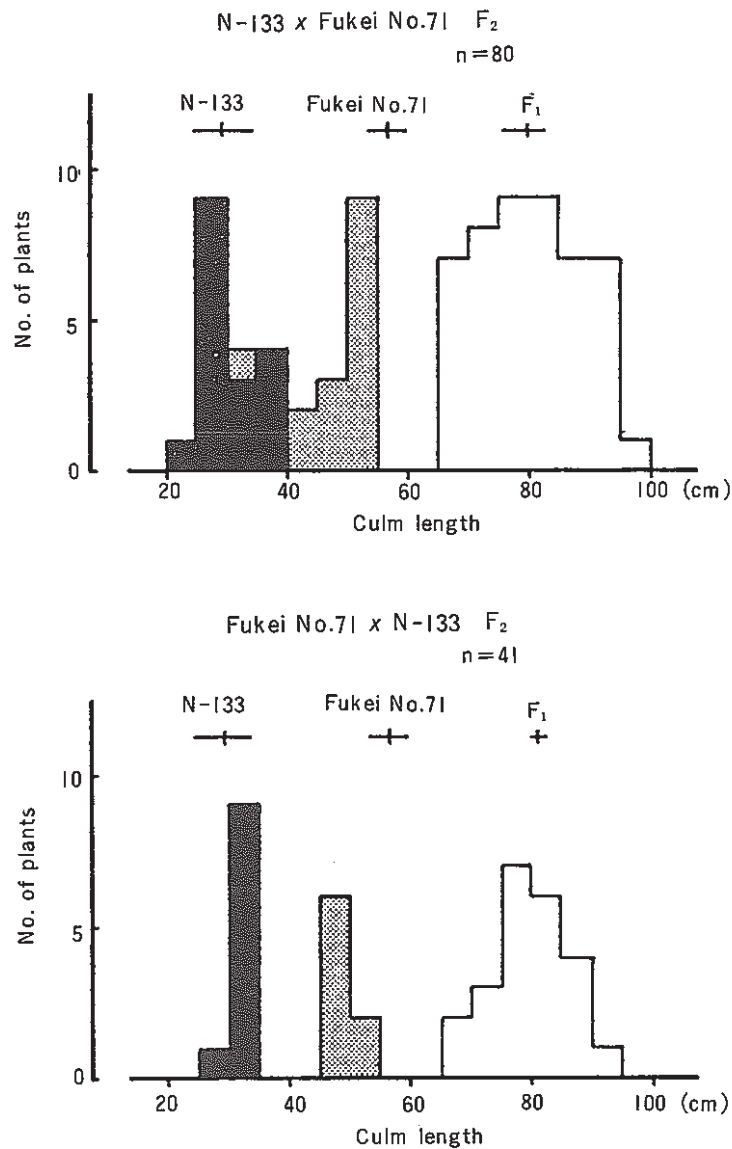


Fig. 2. Frequency distributions of culm length in F<sub>2</sub> populations of the reciprocal crosses between N-133 and Fukei No.71 under low temperature conditions of paddy field.

Note: □ Normal type,  
 □ Fukei No.71 dwarf type,  
 ■ N-133 *rcn-1* type.

両温度区における稈長の変異を示した。水田条件下ではN-133は *rcn-1* の作用により、ふ系71号より短稈の少分げつ矮性を示し、交雑F<sub>1</sub>は長稈の正常型であった。相反交雑の両F<sub>2</sub>集団ではF<sub>1</sub>同様の正常型、ふ系71号型矮性およびN-133型少分げつ矮性が明瞭に分離し、9 : 3 : 4の分離比に適合した (Table 7)。したがって、低温区では2重劣性型はN-133型に含まれ、低温感性の *rcn-1* が *d-50(t)* に対して上位的に作用することが示された。ビニールハウス条件ではふ系71号が最も短稈を示し、N-133とF<sub>1</sub>は正常型を示した。相反交雑のF<sub>2</sub>集団では、低温区のような明瞭な表現型の分

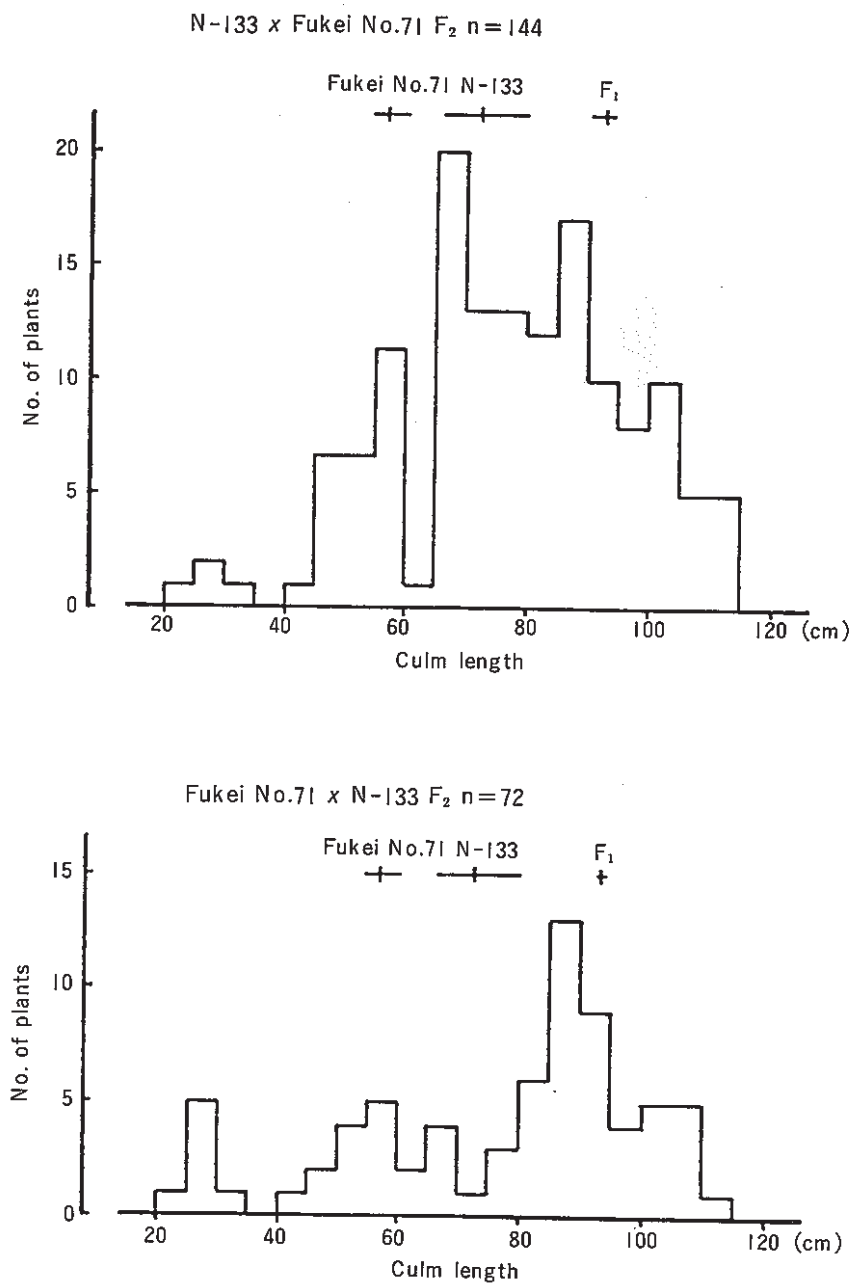


Fig. 3. Frequency distributions of culm length in F<sub>2</sub> populations of the reciprocal crosses between N-133 and Fukei No.71 under high temperature conditions of a plastic house.

離は見られず、稈長についても連続的な変異を示したが、正常型とふ系71号型矮性がほぼ3:1に分離した(Table 8)。よって、高温区では *rcn-1* の作用は見られず、*d-50(t)* のみの分離が認められた。



Table 7. Segregations of dwarf and reduced culm number types in F<sub>2</sub> populations under paddy field condition

Cross combination		F <sub>2</sub> segregation			Total	Goodness of fit	
		Normal	Dwarf	Reduced culm no.		$\chi^2$ (9:3:4)	p
N-33×F 71*	Obs.	48	15	17	80	0.650	0.8-0.7
F 71×N-133	Obs.	23	8	10	41	0.019	>0.99
Pooled data	Obs.	71	23	27	121	0.480	0.8-0.8

\*; Fukei No.71.

Table 8. Segregations of dwarf type in F<sub>2</sub> populations under plastic house condition

Cross combination		F <sub>2</sub> segregation			Total	Goodness of fit	
		Normal	Dwarf			$\chi^2$ (3:1)	p
N-133×F 71	Obs.	114	30		144	1.333	0.3-0.2
F 71×N-133	Obs.	53	19		72	0.074	0.8-0.7
Pooled data	Obs.	167	49		216	0.617	0.5-0.4

### (3) オキシシンおよびアンチオキシシンに対する反応

「しおかり」、N-174および分矮系統 (ID-3, ID-10, ID-14, ID-27) の移植時以降の草丈と茎数の推移を各処理区間で比較した。

草丈については、各処理区に対し全系統が同様な反応を示し、NAA10ppm では無処理区と差がなく、100ppm 区ではやや抑制がみられ、1,000ppm 区では明らかな矮化が認められた。TIBA 処理の効果は NAA に比べて小さく、各系統とも100ppm 区までは無処理区と差がなく、1,000ppm 区においてやや草丈の抑制がみられた。以上の如く草丈に対する処理効果は処理直後から現われ、最終的な草丈にまで影響がみられた。

茎数については、NAA 1,000ppm 処理区では全系統で明らかな分げつ抑制が認められ、分矮系統では「しおかり」、N-174に比べて反応が大きかった。「しおかり」、N-174, ID-3, ID-27では NAA 100ppm 区でもやや分げつの抑制がみられた。TIBA 処理については「しおかり」とN-174では各処理区と無処理との間に顕著な差異はみられなかった。分矮の ID 系統では TIBA 1,000ppm 区で、NAA 1,000ppm 区ほどではないが分げつ抑制が認められた。また、ID-3 では各処理区間の変異が最も顕著に現われた。このような茎数に対する各処理の効果は、処理直後から現われ、処理終了後にはやや回復する傾向がみられた。

N-175とN-176は TIBA 1,000ppm 処理区と無処理区間のみで草丈と茎数の移植時以降の推移を比較した。草丈については両系統とも TIBA 1,000ppm 区では無処理に対してやや抑制がみられたのに対し、茎数については両系統とも処理直後から分げつ発生の顕著な促進が認められた (Fig. 4)。

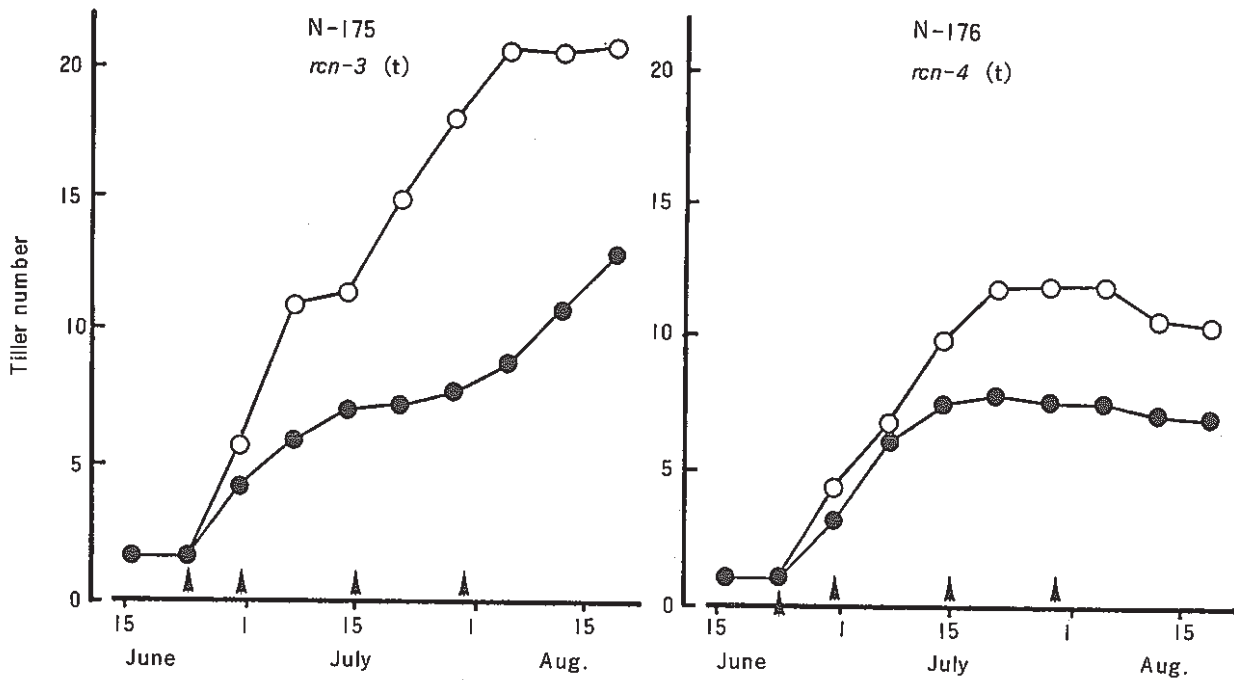


Fig. 4. Effects of TIBA application on tiller number.  
 Note : ● Control, ○ TIBA 1000ppm,  
 ▲ TIBA spray.

#### 4. 考 察

イネの少分げつ性に関与する遺伝子のうち、第I連鎖群に座乗する *rcn-1* は低温感受性を示し、低温条件では矮性ならびに分矮遺伝子の *d-2*, *d-3*, *4*, *5*, *d-10* に対して上位性を示すことが報告されている (TAKAMURE and KINOSHITA 1985)。また *rcn-1* より分げつ抑制程度の小さい *rcn-2* は顕著な温度反応を示さず、低温条件では *rcn-1* が *rcn-2* に対して上位的に作用することが知られているが、*rcn-2* の所属連鎖群は不明であった (高牟礼・木下 1987)。

本実験ではまず *rcn-2* が第II連鎖群に所属することを明らかにし、分矮遺伝子 (*d-10*, *d-14*, *d-17*) との相互作用では稈長について分矮遺伝子の上位性が示された。また、茎数については  $F_2$  集団において分矮型と2重劣性型が連続的な幅広い変異を示した。もし、 $F_3$  後代検定を行うならば茎数に関して遺伝子間の相互作用を調べることができよう。今回新たに2種の少分げつ変異体 (N-175, N-176) に *rcn-1* とは異なる単純劣性遺伝子である *rcn-3(t)* と *rcn-4(t)* の関与することが示された。今後、*rcn-2*, *rcn-3(t)*, *rcn-4(t)* の3種の遺伝子間の対立性検定が必要である。

一般にイネの分げつ数は  $18^{\circ}\text{C}$ — $28^{\circ}\text{C}$  の範囲においては温度が低い程増加することが知られている (岡 1955)。*rcn-1* を有する N-133 については、逆に低温ほど少分げつ性を示す温度反応が明らかとなり、低温感受性が追認された。また、N-133 と高温条件で短稈化が著しくなる矮性系統「ふ系

71号」(KITANO and FUTSUHARA 1981)との相反交雑実験より、低温区では *rcn-1* が「ふ系71号」の関与遺伝子 *d-50* (t) に対して上位性を示し、高温区ではかかる *rcn-1* の作用が見出せず、*d-50* (t) の分離のみが認められたことから、*rcn-1* の低温感受性が明らかになった。なお、新たな少分げつ変異体 N-175 と N-176 の温度反応については、原系統との比較等によってさらに検討する必要がある。

植物の分げつ矮性に関するオーキシンの作用については数多くの研究がなされており生長点で生成されたオーキシンが側芽の生長を抑制しているとする頂芽優性が一般に認められている。また、イネにおける分げつ発生についてもオーキシンあるいはアンチオーキシンによって支配されている (YAMADA et al. 1962)。

本実験では「しおかり」と「しおかり」の遺伝的背景を有する少分げつ性変異体 (N-174) および分矮系統を用いてオーキシンおよびアンチオーキシンの影響を調査した。その結果、全系統について NAA (合成オーキシン) 1,000ppm 処理区で草丈と特に分げつの顕著な抑制が認められ、分矮系統では「しおかり」、N-174 に比べて NAA に対する反応が大きかった。これまでに分矮系統の分げつ芽の発生とオーキシン代謝の間には密接な関係のあることが報告されており (続・永松 1972)、今回の実験結果も同様の関係を示すものと考えられる。TIBA (アンチオーキシン) に対する影響は NAA ほど顕著ではないが、分矮系統ではやや分げつ抑制がみられた。少分げつ変異体の N-175 と N-176 では TIBA 1,000ppm 処理で分げつ発生の顕著な促進が認められたことから、N-175 と N-176 の少分げつ性にはオーキシンの関与することが推定された。また、NAA および TIBA は比較的高濃度で作用が発現することから、これらの物質は水稻内に吸収されにくいと推定される。本実験では NAA および TIBA 処理を行ったが、サイトカイニンが頂芽優性で重要な働きをしていることがわかっており (WAREING and PHILLIPS 19831)、今後、NAA、TIBA に加えてサイトカイニンが分げつにどのような影響を及ぼすか検討を要する。

本実験に供試されたガンマー線や EMS 処理により誘発された少分げつ性に関する主動遺伝子は、標識遺伝子としてのみならず、分げつ性に関する生理遺伝学的解析においても有用な材料と考えられる。

## 5. 摘 要

1. N-174 の少分げつ性に関与する *rcn-2* と第 II 連鎖群に座乗する *Pr* との間には、25.2% (相引) なる組換え価で連鎖関係が示された。
2. 稈長について分矮遺伝子 (*d-10*, *d-14*, *d-17*) は、*rcn-2* に対して上位性を示すことが示されたが、分げつ性については後代検定により相互作用の検討を要する。

3. 新たな少分げつ性変異体であるN-175, N-176にはそれぞれ *rcn-1* とは異なる単純劣性遺伝子 (*rcn-3(t)* および *rcn-4(t)*) の関与することを明らかにした。また, 水田条件下では *rcn-1* は *rcn-3(t)* に対して上位性を示した。今後, *rcn-2*, *rcn-3(t)* および *rcn-4(t)* の3種の遺伝子について対立性検定を必要とする。
4. *rcn-1* を有するN-133は, 3種の温度条件において稈長・穂数に関して明らかな温度反応が認められ, 低温感受性が追認された。
5. *rcn-2* を有するN-174の少分げつ性は高・低温両区で原系統「しおかり」に比べて有意に少分げつとなる特性を示した。
6. *d-50(t)* を有する「ふ系71号」は原系統「フジミノリ」と比べて高温区ほど顕著な短稈を示し, 高温感受性 (KITANO and UTSUHARA 1981) が追認された。
7. N-133と「ふ系71号」の相反交雑実験より低温区では *rcn-1* が *d-50(t)* に対して上位的に作用し, 高温区では *rcn-1* による分離はみられず *d-50(t)* のみの分離が認められた。
8. 「しおかり」, N-174および4種の分矮系統 (ID-3, 10, 14, 27) は高濃度のNAA (合成オーキシン) 処理により草丈と, 特に茎数が抑制されることが示され, 分矮系統では「しおかり」, N-174に比べNAAに対する反応が大きく, 分げつ矮稲における分げつ発生とオーキシン代謝の関連が示唆された。
9. 少分げつ変異体N-175とN-176においては高濃度のTIBA (アンチオーキシン) 処理によって分げつ発生の顕著な促進が認められ, 両変異体の少分げつ性にはオーキシンの関与が示唆された。

#### 引用文献

- 蓬原雄三・山口彦之：少分げつ稲に関する遺伝子分析, 育雑, 13: 183-185. 1963
- KITANO, H. and Y. FUTSUHARA: Character expression of induced dwarf in rice. I. Effects of temperature on culm elongation in the dwarf mutant line, Fukei No. 71. *Jap. J. Breed.* 31: 9-18. 1981
- 岡彦一：稲の分げつ, 稈長等に於ける温度反応とその品種間変異—栽培稲の系統発生的分化 第7報—育雑, 4: 213-221. 1954
- WAREING, P. F. and I. D. J. PHILLIPS: 植物の成長と分化 (上) 学会出版センター, 東京, P.P. 266. 1985
- TAKAMURE, I. and T. KINOSHITA: Inheritance and character expression of reduced culm number character in rice. *Jap. J. Breed.* 35: 17-24. 1985
- 高牟禮逸朗・木下俊郎：イネの新たな少分げつ変異体に関する遺伝子同定, 育雑, 37(別1): 182-183.

1987

続 栄治・永松土巳：矮性稻の遺伝学的ならびに生理学的研究，II，矮性稻に対するオーキシンの影響，九大農芸雑誌 25：129-136. 1972

YAMADA, N., H. SUGE and H. NAKAMURA : Chemical control of plant growth and development  
(2) Effect of  $\alpha$ -naphthalenacetic acid and 2, 3, 5-triiodobenzoic acid on growth of rice plant.  
*Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 40 : 258-262. 1962

## 第7章 あとがき

生物工学の手法にガラス固化体などから発生する放射線照射法を加えることは新しい育種技術の開発に極めて重要なことは言うまでもない。

本研究ではまず細胞質オルガネラの DNA の構造の多型性を分子レベルで調べて、細胞質雄性不稔性や種の分化における変異機構と密接な関連を有することを明らかにした。今後ガンマー線照射法などにより変異体を作出した場合、まず葉緑体 (ct) およびミトコンドリア (mt) の各 DNA を調べて、その変異性から個体レベルでの利用性を予見できるようになったことは、突然変異により細胞質的人為的制御を計る上で、重要な知見と考えられる。またイネの培養では葯並びにそれから作成されるカルスへ放射線照射を加えることにより、まず半数体レベルで変異体作出が可能であり、さらにそれから 2 倍体の同型接合体を得るならば、劣性突然変異も検出できることから効率的な利用が期待できる。特に本年度試みた各種の照射法によって個体まで再分化できたことは、新育種技術の発展への重要な素地が出来たものと考えている。

個体レベルでの突然変異作出法については従来から育種利用が行われてきたが、ともすると最近の生物技術の発展の陰にかくれがちである。今回、北海道における米の食味改善の鍵を握る低アミロース性変異体を用いた遺伝子分析により、かかる方向へ作用する 2 種の新遺伝子 [*lam(t)* と *Ef(t)*] を発見し得たことは特筆に値すると言えよう。また、ガンマー線照射などで育成されたイネの少分げつ変異体を用いて染色体地図作成における標識遺伝子としての利用や分げつ発生に関係する遺伝子の生理作用の解析などを行なって、マーカーとしての利用の重要性を示した。