

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

昭和61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*

PNC TJ5600 86-006

森 宏 一*

1986年3月

三上哲夫*

高牟禮 逸 朗*

期 間：1985年4月～1986年3月

目 的： 使用済み核燃料の再処理によって発生する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利用して高レベル廃棄物の貯蔵に積極的な意義を見出すことは、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 γ 線源を用いた照射実験を通じて、放射線照射を利用した植物育種の研究を行うが、特に最近技術的進歩の著しい生物学の手法を効果的に導入して、将来ガラス固化体から発生する放射線の有効利用に資することを目的とする。

要 旨： 次のような項目について研究を行った。

- (1) 細胞質雄性不稔性における異型細胞質の同定ならびに検出に関する研究
- (2) 異型雄性不稔細胞質の分子遺伝的特性
- (3) イネカサの培養に及ぼすガンマー線照射の影響
- (4) ガンマー線誘発のイネ突然変異体に関する遺伝子分析

Studies on the Application of Gamma Rays from Radioactive Glass
Waste in Plant Breeding by the Use of Biotechnology*

T. Kinoshita, K. Mori, T. Mikami and I. Takamura**

Abstract

This project was intended to apply gamma ray irradiations for the study on the crop breeding by the aid of tissue culture and gene manipulation.

First a detective method of cytoplasmic variation in male sterility was studied in sugar beets. A series of male sterile lines, I-12-CMS which possess different sources of male sterile cytoplasm but the equivalent nuclear genotype, was used for the experiments.

From the test crossings with type-0 plants for S cytoplasm and a red beet, SP561001, new types of sterile cytoplasm, S-2, S-3 and S-4 were discriminated from S cytoplasm which is widely used for the breeding works. The S and S-3 cytoplasm lines are utilized effectively for the reciprocal recurrent selection and double crossings, for the maintainer-restorer relationship was found out between the both cytoplasm.

The same materials were used for the molecular analyses of cytoplasmic organelles such as chloroplast and mitochondria. It is noted that the above-mentioned classification of male sterile cytoplasm coincided with the polymorphism of mitochondrial DNA. In addition, the *Hind*III restriction endonuclease patterns of chloroplast DNA were classified into three types, N, S and the group of S-2, S-3 and S-4. It is possible to use the restriction patterns and the features of small circulars in mtDNA species for the discrimination of male sterile cytoplasm.

Following this, plant tissue culture techniques were used in the combination with gamma rays irradiation. Gamma irradiations were applied for the seed calli of rice with different dosages ranging from 10 to 30kR. Although the growth of calli were suppressed at the higher dosages, the rates of regenerated plants from calli increased in the treatment with 20kR in the near-isogenic dwarf lines having the genetic background of the cultivar 'Shiokari'. It is noted that the efficiency of the regeneration from the calli was improved by the use of gamma rays irradiation as a side effect of the mutation breeding.

Inheritance mode and physiological nature were examined in the mutant character "haploid-like dwarf" which was induced by the gamma irradiations to the plants regenerated from anther culture. A single gene showing a temperature sensitivity was responsible for this character.

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

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

目 次

第1章	序 論	1
第2章	テンサイの細胞質雄性不稔性に関する4種の異型細胞質の同定	2
第3章	4種のテンサイ異型不稔細胞質に関する分子遺伝学的研究	10
第4章	ガンマー線照射したイネカルの培養に関する研究	18
第5章	ガンマー線誘発による温度感受性のイネわい性突然変異体に関する遺伝子分析	26
第6章	結 論	33

第1章 序 論

放射線照射によって人為的に突然変異を誘発せしめ、有用変異を植物育種へ利用することは極めて重要である。日本ではじめてガンマーフィールドが創設されてから、20余年になるが、イネ品種「レイメイ」の育成を始めとする突然変異育種の輝かしい成果が得られている。しかし、それらの変異の作成には方向性がなく、しかも誘発変異源である放射線の種類や放射線の照射方法によっても効率が異なり、特に作物の種類によって突然変異誘起の頻度や作出される種類が異なってくるために、必ずしもその育種効率が高くなく、なお改善の余地が多く残されている。

そこで最近急速に発展して来た遺伝子操作や細胞培養の手法を用いるならば、突然変異の人為誘発を効率よく行ったり、細胞質突然変異の誘起や検出が可能となり、細胞選抜によって定方向的な変異の作出も期待できる。かかる放射線処理を含む生物工学の利用方向を考究して、既存品種の耐病性・耐冷性および薬剤耐性などの有用形質の改善を試みるのが本研究の目的である。

昭和59年度の研究から継続として昭和60年度では、(1)細胞質雄性不稔性についての変異体の質的改善を計るため、まず既存の遺伝変異について細胞質遺伝要因の異同を検討した。(2)テンサイのミトコンドリアやクロロプラストDNAの多型性について、制限酵素分析や小環状DNAの分子種に関する解析を行い、既存の変異を4種へ分類したが、交雑実験による(1)の検定方法との間の対比において、不稔細胞質型につき完全な一致をみた。今後ガンマー線照射などにより新型の不稔細胞質を作出した場合、細胞質型の異同を迅速に調べるためには分子的手法がきわめて有効であることを実証した。(3)細胞培養法をイネやコムギでも考究し、特にカルスを用いてガンマー線処理を行った時、照射量の相違によって生ずる放射線感受性や遺伝要因への影響を調べているが、今回は20ないし30kRのガンマー線照射によってカルスからの個体再分化率の上昇することが明らかになり、培養方法の効率化に寄与した。(4)蒴培養により作出した半数体へガンマー線照射を行い、半数体から2倍体化した種子の後代(M₂)において、新たに半数体様の不稔変異体の分離を見出した。遺伝子分析を行った結果、半数体様わい性には単純劣性遺伝子が関与していて、しかも高温条件下におくならば、部分不稔に変わり、生育も正常型に近いまでに復帰することがわかった。このような温度感受性の遺伝子マーカーは遺伝子分析のため有用である。

次章よりそれらの研究成果を記すこととする。

第2章 テンサイの細胞質雄性不稔性に関する 4種の異型細胞質の同定

木下俊郎・三上哲夫

1. 緒言

テンサイの一代雑種品種の種子生産のために用いられている細胞質雄性不稔性の起源は、OWEN (1942) の発見によるS型細胞質から由来する。このような単一の雄性不稔細胞質の利用はトウモロコシのT型細胞質におけるごま葉枯病 (*Helminthosporium maydis*) に対する罹病性の例からみて好ましくない。したがって、新型の細胞質を早急に補充する必要に迫られている (木下 1984)。

雄性不稔源としては自然界に存する変異型の利用と共に人為的な細胞質突然変異の誘発がある。既にガンマー線照射により、現在用いられているS型と異なる細胞質が実験的には誘発されているものの、それらの実用化のためにはS型と正反対の遺伝子作用、いわゆる maintainer-restorer 関係を示す型の誘発が望ましい。そこで、今回は各種の遺伝子型系統の種子にガンマー線照射を行うと共に、野生種由来の雄性不稔細胞質の中からもかかる関係についての探索を行った。

はじめに貴重な系統を心よくご譲渡いただいた R. K. Oldemeyer 博士と鈴木昭男博士に深く感謝の意を表す。

2. 材料および方法

交雑に用いた near-isoplasmic lines と検定系統を Table 1 に示した。TK76-MS と TK81-MS はいずれも S 型細胞質雄性不稔系統であり、TK76-O と TK81-O はそれらの維持花粉親系統 (O 型) である。また SP561001 は茎葉および根色が赤紫色の赤ビートで、N 型細胞質系統である。near-isoplasmic の I-12-CMS 系統は (R) を除いて、それらの雄性不稔起源がいずれも野生ビートであり、I-12-61L (反覆親) による 4~5 回の戻し交雑で核遺伝子型は I-12-61L に近い。また I-12-61L はいずれの near-isoplasmic lines にも維持花粉親になっている。

交雑次代の植物に世代短縮のため photothermal induction と 24 時間照明による長日処理を行い約 5 カ月で開花を誘発して採種した。なお、雄性不稔型の分類は、従来の標準によって、正常型、半不稔-a 型 (S.S.a)、半不稔-b 型 (S.S.b) および完全不稔型 (C.S.) の 4 種に分類した。

Table 1. List of the strains used

Strain	Type of cytoplasm	Genotype of fert. restor.	Germ type	Description
TK76-0	N	<i>rf₁rf₁ rf₂rf₂</i>	Monogerm	Type-0 line for TK76-MS
TK76-MS	S	"	"	Isogenic line of TK76-0
TK81-0	N	"	"	Typ-0 line for TK81-MS
TK81-MS	S	"	"	Isogenic line of TK81-0
I-12-61L	N	"	Multigerm	Type-0 line for I-12-CMS lines
I-12-CMS (2)	<i>wild beet</i>		"	Male sterile line having sterile cytoplasm derived from wild beet in Turkey
I-12-CMS (3)	"		"	ditto in Pakistan
I-12-CMS (4)	"		"	ditto in Turkey
I-12-CMS (5)	"		"	ditto in Turkey
I-12-CMS (7)	"		"	ditto in Manchuria
I-12-CMS (8)	"		"	ditto in Turkey
I-12-CMS (R)	S		"	Male sterile line having sterile cytoplasm derived from GW359 (sugar beet)
SP561001	N		"	Red beet for marker

3. 実験結果

(1) O型検定系統との交雑実験による細胞質型の同定

N型細胞質を有し、稔性回復核遺伝子について2重劣性型 (*rf₁rf₁ rf₂rf₂*) であるO型系統の一つTK76-Oを花粉親に用いて、I-12-CMS各系統の完全不稔型個体へ交配した。TK76-Oは *N rf₁rf₁ rf₂rf₂* の遺伝子型を有しているが、他の核遺伝子について完全にホモである保証はないので、個別別に交配に用いた。TK76-MSやTK81-MSの如き *S rf₁rf₁ rf₂rf₂* 型との交配では通常C.S.が大多数を占め、わずかにS.S.bを生ずることがある (Table 2a)。特にTK81-MSでは1984年と1985年の両年は共にS.S.b型を生じ、この点でTK-76MSと異なっていた。これは環境変異ならびに核ゲノム中の作用力の弱い変更遺伝子の影響によると考えられる。Table 2bに示す如くI-12-CMSの各系統との交配でもS.S.b型を生ずる場合があったが、いずれも頻度がかなり小さく、TK81-MSの場合と変わらなかったため、I-12-CMSの(R)、(4)および(5)系統のC.S.型の遺伝子構成はTK76-MSやTK-81MSの場合のように *S rf₁rf₁ rf₂rf₂* と推定した。

これに反して、I-12-CMS (2) ならびにI-12-CMS (3) とTK76-Oとの交配次代では、Table 3の如く稔性回復の方向への分離を生ずる傾向がみられた。まず、I-12-CMS (2) x TK76-O:2では、S.S.bとC.S.の分離が大部分を占め、花粉親を異にすると分離は不均一であった。一方、I-12-CMS (3) とTK76-Oの交配次代では、いずれも雄性不稔型についての分離を生じたが、花粉親を異にすることにより、分離は不均一であった。これらの分離はC.S.型を生じない場合とC.S.型の現

Table 2. Frequencies of male sterile types in the progenies of the crossings between S cytoplasm strain and TK76-O

a. Parental strains

Name	Year	Cytoplasm	Male sterile type				Total
			N	S.S.a	S.S.b	C.S.	
TK76-0	1984	N	13	7	0	0	20
	1985	N	26	3	0	0	29
TK76-MS	1984	S	0	0	0	18	18
	1985	S	0	0	0	33	33
TK81-0	1984	N	20	3	0	0	23
	1985	N	35	0	0	0	35
TK81-MS	1984	S	0	0	2	24	26
	1985	S	0	0	3	44	47

b. Progenies of test- crossings

Cross comb.			N	Male sterile type			Total	Estimated genotype
				S.S.a	S.S.b	C.S.		
I-12-CMS (R)	×	TK76-0:2	0	0	1	7	8	<i>S rfa₁ rfa₂</i>
"	×	" :3	0	0	0	47	47	"
"	×	" :10	0	0	0	65	65	"
"	×	" :12	0	0	0	8	8	"
"	×	" :15	0	0	6	65	71	"
"	×	" :50	0	0	0	25	25	"
"	×	" :60	0	0	0	15	15	"
Total			0	0	7	232	239	
I-12-CMS (4)	×	TK76-0:2	0	0	0	31	31	<i>S rfa₁ rfa₂</i>
"	×	" :3	0	0	6	30	36	"
"	×	" :10	0	0	0	10	10	"
"	×	" :12	0	0	0	47	47	"
"	×	" :15	0	0	2	43	45	"
Total			0	0	8	161	169	
I-12-CMS (5)	×	TK 76-0:2	0	0	0	20	20	<i>S rfa₁ rfa₂</i>
"	×	" :3	0	0	0	2	2	"
"	×	" :10	0	0	0	6	6	"
"	×	" :12	0	0	0	1	1	"
"	×	" :15	0	0	0	3	3	"
Total			0	0	0	32	32	

*Genotype of TK76-O : *N rfa₁ rfa₂*.

われる分離となる場合の2群に分れるような傾向がみられた。いずれにしろ、TK76-Oとの交配次代で雄性不稔各型の分離を生じたことは、TK76-O中にS型細胞質以外に働くような優性の稔性回復遺伝子が含まれていて、これらについての分離を生じたことになる。一般に異なる細胞質型には異なる稔性回復遺伝子の対応する関係が認められているので(木下 1984), I-12-CMS (2)とI-12-CMS (3)はいずれもS型とは異なる新しい雄性不稔細胞質を有していたことになる。さらに、TK76-Oはそれらの新細胞質に対応する優性の稔性回復核遺伝子を個体によってホモまたはヘテロに有していたことになる。I-12-CMS (2)とI-12-CMS (3)を比較するならば、稔性回復の程度はI-12-CMS (3)の方が明らかに強かった。したがって、両者の細胞質型は互いに異なると考えられる。

(2) SP561001 との交雑による細胞質型の同定

SP561001を花粉親として用いた一連の交雑実験の結果をTable 4に示した。SP561001は優性の着色形質を有し、次代中の交雑F₁以外の個体を完全に除去できる。SP561001の集団は稔性回復核遺伝子型についてヘテロであり、そのため、花粉親の個体別に分けて、雌性親に用いたI-12-CMS系統間における稔性回復遺伝子の構成の差異を調べた。もし次代の雄性不稔型の分離が不均一となれば、異なる稔性回復遺伝子が作用しており、したがって、細胞質型も異なると考えた。

Table 3. Frequencies of male sterile types in the progenies of the crosses between I-12-CMS (2) or (3) and TK-76-O

Cross comb.			Male sterile type				Total	Homo-geneity
			N	S.S.a	S.S.b	C.S.		
I-12CMS (2)	×	TK76-0:2	0	0	27	1	28	$\chi^2=20.748$ df=4 P<0.001
"	×	" :60	0	1	10	12	23	
"	×	" :71	0	0	8	9	17	
Total			0	1	45	22	68	
I-12CMS (3)	×	TK76-0:2	35	36	2	0	73	$\chi^2=4.295$ df=6 P=0.50-0.70
"	×	" :3	12	8	0	0	20	
"	×	" :10	8	10	2	0	20	
"	×	" :71	10	9	1	0	20	
Total			65	63	5	0	133	
I-12CMS (3)	×	TK76-0:12	1	2	0	8	11	$\chi^2=16.049$ df=6 P=0.01-0.02
"	×	" :15	13	27	6	14	60	
"	×	" :100	1	0	0	4	5	
Total			15	29	6	26	76	
Grand total			80	92	11	26	209	

Table 4. Segregation of male sterility in the progenies of testcrossings with SP561001 plants

Cross comb.	Male sterile type				Total	Homogeneity
	N	S.S.a	S.S.b	C.S.		
Cross Exp. A:						
I-12CMS (2) × SP 561001:a	1	1	87	8	97	$\chi^2=284.556$
" (3) × "	37	44	16	31	128	d.f.=9
" (7) × "	16	10	3	0	29	P<0.001
" (5)* × "	2	17	26	72	117	
Cross Exp. B:						
I-12CMS (2) × SP 561001:b	0	0	58	59	117	$\chi^2=355.81$
" (7) × "	23	36	14	3	76	d.f.=12
" (4)* × "	0	1	45	98	114	$P_2<0.001$ ($\chi^2=4.541$)*
" (5)* × "	0	0	35	49	84	(d.f.=4)
" (8)* × "	0	1	16	37	54	(P=0.3-0.2)
Cross Exp. C:						
I-12CMS (2) × SP 561001:c	0	4	58	34	96	$\chi^2=84.617$ ($\chi^2=0.504$)*
" (4)* × "	0	0	1	53	54	d.f.=4 (d.f.=1)
" (5)* × "	0	0	2	45	47	$P_2<0.001$ (P=0.3-0.5)
Cross Exp. D:						
I-12CMS (3) × SP 561001:d	51	59	4	0	114	$\chi^2=124.989$
" (7) × "	10	25	4	1	40	d.f.=6
" (4)* × "	0	3	8	16	27	P<0.01
Cross Exp. E:						
I-12CMS (3) × SP 561001:e	21	24	24	26	95	$\chi^2=36.361$
" (4)* × "	0	4	25	42	71	d.f.=3 P<0.001
Cross Exp. F:						
I-12CMS (3) × SP561001:f	9	16	0	24	49	$\chi^2=29.647$
" (5)* × "	3	13	29	49	94	d.f.=3 P<0.001
Cross Exp. G:						
I-12CMS (3) × SP 561001:g	34	17	2	3	56	$\chi^2=60.714$
" (5)* × "	1	8	24	15	48	d.f.=3 P<0.001
Cross Exp. H:						
I-12CMS (2) × SP 561001:h	0	1	50	15	66	$\chi^2=6.605$
" (4)* × "	0	0	45	32	77	d.f.=2 P=0.02-0.05
Cross Exp. I:						
I-12CMS (3) × SP 561001:i	10	12	2	16	40	$\chi^2=8.628$
" (7) × "	28	11	5	11	55	d.f.=3 P=0.02-0.05
Cross Exp. J:						
I-12CMS (4)* × SP 561001:j	0	3	39	36	78	$\chi^2=2.162$
" (5)* × "	0	4	34	20	58	d.f.=2 P=0.3-0.5

*S cytoplasm.

Table 4 に示す如く、10 種の花粉親との交雑に関して雄性不稔型の分離の均一性の χ^2 を算出したところ Exp. J. の場合を除いて、有意性がみられた。個々の試験 (Exp.) について交雑間差をみると、Exp. A では I-12 CMS の (2), (3), (7) および (5) との交雑間で不均一な分離様式であった。Exp. B では (4), (5) および (8) との交雑だけを抽出して分離の均一性をみると、分離様式は同一とみなされた。Table 2b. の結果を合わせると、細胞質はいずれも S 型と考えられる。同様に Exp. C の (4) と (5) も S 型であった。Exp. D では、(3) と (7) がいずれも (4) の S 型と異なり、(3) と (7) の間では細胞質型が異なっていた。Exp. E~J を通じて (3) と (4) および (3) と (5) の間の細胞質型がそれぞれ明らかに異なっていた。これらの結果を総合するならば、I-12-CMS (7) は I-12-CMS (2) や I-12-CMS (3) と異なる新雄性不稔細胞質を有し、いずれも S 型細胞質とは異なっていた。また、I-12-CMS (8) は I-12-CMS (4), (5) および (R) と同一の S 型であった。I-12-CMS (2), I-12-CMS (3) および I-12-CMS (7) の有する新しい細胞質型をそれぞれ S-2, S-3 および S-4 と命名する。なお、I-12-CMS (4), (5), (8) および (R) の細胞質はいずれも S 型であった。

4. 論 議

細胞質型と相互作用を有する稔性回復核遺伝子の種類が同一であるか否かによって雄性不稔細胞質の異型性を判定した。トウモロコシでもかかる手法がとられ、まず戻し交雑によって near-isoplasmic lines を作り、核遺伝子の遺伝的背景を斉一にしてそれらを 4 種の自殖系へ交配した。つぎに、 F_1 における稔性回復の有無により、T, S および C の 3 型を分類した (Gracen and Grogan 1974)。

著者らのテンサイの場合にも、戻し交雑で作った near-isoplasmic lines を用い、花粉親系統には $N\ rf_1rf_1\ rf_2rf_2$ なる遺伝子型を有する O 型検定系統とスタンダード型細胞質を有する SP561001 を遺伝子型が異なるものとして、個別に交雑実験に用いた。 F_1 における雄性不稔型の分離を検討した結果、I-12-CMS の 4 系統の細胞質は S 型、その他は I-12-CMS (2) が S-2 型、I-12-CMS (3) が、S-3 型、I-12-CMS (7) が S-4 型と判定した。S-2, S-3 および S-4 の 3 種の異型雄性不稔細胞質の中では、S-3 が O 型検定親との交配により、S とは著しく異なる特性を有していることが判明した。なお、TK76-O からの個体の中には S 型には維持花粉親となるのに対して、S-3 型については稔性回復親となり得るようないわゆる reciprocal maintainer-restorer relationship (Burton and Athwal 1966) を示すものが多いので、相反循環選抜法や複交雑に利用することができる。

5. 摘 要

野生ビートから見出された細胞質雄性不稔性についてテンサイ系統 I-12-61L への戻し交雑による細胞質置換法で雄性不稔細胞質に関する near-isoplasmic lines のシリーズが Oldemeyer 博士によって育成された。それらの系統を交雑実験に用いて、細胞質型と花粉稔性回復核遺伝子との相互作用によって生ずる雄性不稔性の分離様式を互いに比較して、細胞質型の異同を明らかにした。

まず、花粉親として S 型雄性不稔系統 TK76-MS に対する維持花粉親 (O 型) の TK76-O を用いた。もし雌性親が TK76-MS の如く $S\ rf_1rf_1\ rf_2rf_2$ なる遺伝子型であれば、次代ではほとんどが完全不稔型 (C.S.) で、半不稔-b 型 (S.S.b) を僅かに生ずることになる。かかる遺伝子型を有していたのは I-12-CMS (4), (5) および (R) であった。一方、I-12-CMS (2) × TK76-O : 2 の交配次代では大部分が S.S.b となり、I-12-CMS (3) × TK76-O の交配次代では正常型 (N) や半不稔-a 型 (S.S.a) も分離した。しかもこれらの場合には TK76-O の個体を異にすることにより次代の分離様式が異なっていた。故に TK76-O は S 型細胞質に作用する 2 種の核遺伝子、 rf_1 や rf_2 以外の優性の稔性回復核遺伝子をホモまたはヘテロに持っていたことになる。したがって、I-12-CMS (2) と I-12 CMS (3) はいずれも S 型とは異なる新細胞質型を有していることになる。

次に赤ビート系統 SP561001 から任意に選んだ 10 個体をそれぞれ花粉親に用いて交雑実験を行ったところ、次代における雄性不稔型の分離の不均一性が見出された。すなわち、I-12-CMS の (4), (5) および (8) との交配次代が同一の分離様式であったのに対して、I-12-CMS の (2), (3) および (7) との交配次代ではこれらとは異なっていた。細胞質型と稔性回復遺伝子の対応関係から、異なる稔性回復遺伝子は異なる細胞質型に作用していると仮定すれば、これらの分離様式の差異は雌性親の細胞質型が異なっていたことによる。かくして、I-12-CMS の (4), (5), (8) および (R) は S 型細胞質を有し、I-12-CMS (2), I-12-CMS (3) および I-12-CMS (7) は、それぞれ S とは異なる特有の細胞質型、S-2, S-3 および S-4 を有すると考えられる。

育種上からは S 型細胞質に O 型 (維持型) となる個体が S-3 のような細胞質には Rf 型 (稔性回復) となるようないわゆる reciprocal maintainer-restorer relationship が TK76-O の中に含まれていることから、相反循環選抜法や複交雑への利用が考えられる。さらに、S-2, S-3 および S-4 のような異型雄性不稔細胞質は、遺伝的脆弱性 (genetic vulnerability) を防ぐための multi-plasm 方式の育種に役立つであろう。

引用文献

- 1) Burton, G.W. and Athwal D.S. 1968. Reciprocal maintainer-restorer relationship between A_1 and A_2 sterile cytoplasm facilitates millet breeding. *Crop Sci.* 8 : 632-634.
- 2) Gracen, V.E. and Grogan, C.O. 1974. Diversity and suitability for hybrid production of different sources of cytoplasmic male sterility in maize. *Agron. J.* 66 : 654-657.
- 3) 木下俊郎・三上哲夫・貴島祐治 1984. てん菜の雄性不稔における復帰型細胞質突然変異の誘発. *てん菜研究会報* 26 :
- 4) 木下俊郎 1984. 2. 突然変異と細胞質置換による誘発, 山口彦之監修. *細胞質雄性不稔*. pp. 90 - 112, 東京シーエムシー社.

第3章 4種のテンサイ異型不稔細胞質に関する 分子遺伝学的研究

三上哲夫・木下俊郎

1. 緒言

テンサイ品種の大多数は細胞質雄性不稔性を利用した一代雑種によって占められている。雄性不稔性をコードする細胞質遺伝子は未だ単離されていないが、トウモロコシをはじめ数種の植物種ではミトコンドリアゲノムにその担荷体の存する可能性が示された (Leaver と Gray 1982)。著者らも先に、テンサイ育種に利用されている S 型雄性不稔細胞質が正常型 (N) 細胞質とは分子構造の著しく異なるミトコンドリア (mt) DNA を含むことを明らかにした (Mikami ら 1984)。

本研究では前章で用いた Oldemeyer 博士育成の異型細胞質雄性不稔系統について分子レベルでの細胞質多型性を明らかにするため、mt および葉緑体 (ct) DNA の比較分析を行なった。

2. 実験材料および方法

(1) 供試系統

供試材料は前章に示したものと同一である。TK81-MS, NK169-MS および I-12CMS (R) は S 型細胞質を有する雄性不稔系統である。N 細胞質型系統としては、これらに対する維持花粉親 (O 型) 系統 TK81-O, NK169-O および I-12-61L を用いた。他の不稔系統 (I-12CMS 系統) は原産地の異なる野生ビート由来の不稔細胞質を保有している。いずれも共通の O 型系統 I-12-61L を反復親とした near isoplasmic 系統である。

(2) DNA 分析法

DNA の調製、制限酵素分析および分子雑種形成実験は Sugiura と Kusuda (1979), Mikami ら (1984) の方法に従って行なった。また電子顕微鏡観察用の DNA の単離に当っては分子の剪断を回避するためフェノール抽出とエタノール沈澱操作を割愛し、塩化セシウム平衡密度勾配遠心によって精製 DNA 標品を得た。電顕観察法は Mikami ら (1986) のチトクローム展開法に従った。

3. 実験結果および考察

(1) オルガネラ DNA の電子顕微鏡観察

S 細胞質型雄性不稔系統 TK81-MS と N 細胞質型系統 TK81-O から mt および ctDNA を調製



Fig.1. Electron micrographs of relaxed circular mtDNA molecules. a $49.6\mu\text{m}$; b $26.1\mu\text{m}$; c $7.4\mu\text{m}$; d $3.0\mu\text{m}$; e $0.52\mu\text{m}$; f $0.46\mu\text{m}$; $0.43\mu\text{m}$; h $0.34\mu\text{m}$. The bars indicate $1.0\mu\text{m}$ (a-d) and $0.1\mu\text{m}$ (e-h), respectively.

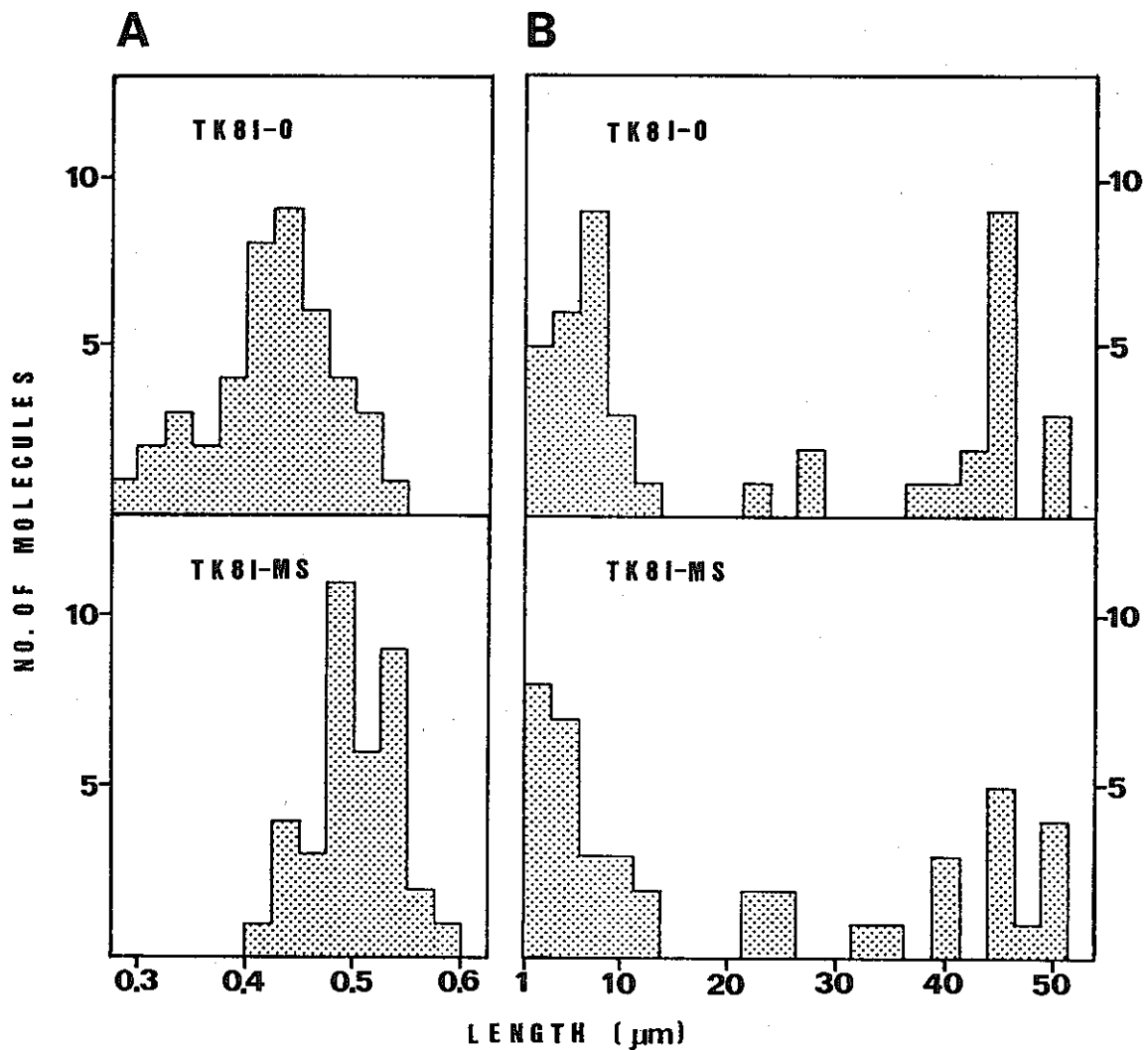


Fig.2. Frequency distribution of contour lengths of circular mtDNA molecules isolated from normal (TK81-O) and CMS (TK81-MS) lines. A minicircles (less than $1.0\mu\text{m}$); B molecules larger than $1.0\mu\text{m}$.

し、まず電子顕微鏡による比較観察を行った。ctDNA がいずれも $45\mu\text{m}$ (154 kb) の均一な環状分子であったのに対し、mtDNA は著しく不均一な分子種より構成されることがわかった。多くの mtDNA は線状分子として観察された。これらの線状分子が DNA 標品の調製中に起った剪断の産物か否かを区別することは難しかったので、環状形態を保持する分子 (Fig.1) についてのみ長さを測定し、 $1\mu\text{m}$ 以上の DNA 種に関するヒストグラムを画いてみた (Fig.2)。その結果、 $1\mu\text{m}$ (3.4 kb) ~ $51\mu\text{m}$ (173 kb) の範囲に 5~6 種のピークが認められた。したがって、テンサイにおいても mtDNA 分子集団の不均一性が実証されたことになる。しかし、ここに供試した N 型と S 型 mtDNA に関してはトウモロコシ (Sederoff 1984) で報告されているような細胞質型間での明確な分子構成の相違は見出されなかった。

いくつかの実験例 (Sederoff 1984) が示すように、mtDNA はサイズの多様な高分子量 (HMW)

Table 1. Presence of the mitochondrial plasmid-like DNAs in normal and different sources of CMS lines

Strain	Fertile/ Sterile	Cytoplasmic source	Plasmid-like DNAs (kb)								
			1.5	1.45	1.4	1.35	1.3	1.25	1.2	1.1	
TK81-0	F	Japanese sugar beet variety	+		+		+				
TK81-MS	S	Do	+		+						
NK169-0	F	Do	+		+		+				
NK169-MS	S	Do	+		+						
I-12-61L	F	American sugar beet variety	+		+			+			
I-12CMS (R)	S	Do	+		+						
I-12CMS (2)	S	Wild beet from Turkey		+		+			+	+	+
I-12CMS (3)	S	Wild beet from Pakistan	+		+					+	+
I-12CMS (4)	S	Wild beet from Turkey	+		+						
I-12CMS (5)	S	Wild beet from Turkey	+		+						
I-12CMS (7)	S	Wild beet from Manchuria	+		+					+	+
I-12CMS (8)	S	Wild beet from Turkey	+		+						

DNAに加えて、 $1\mu\text{m}$ 以下のいわゆる小環状DNA分子を含むことが特徴の1つといえる。事実、テンサイの場合にもN型およびS型細胞質より抽出したmtDNAを1.5%アガロース電気泳動で分画したところ、HMWバンドの外にN型mtDNAでは1.5、1.4および1.3 kb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1.4 kbの2本のバンドのみが識別された (Fig. 3, Table 1)。これらの低分子バンドはいずれもDNaseI処理によって消失したからDNAバンドと結論してよい。しかも電顕観察の結果、 $0.6\mu\text{m}$ 以下の環状分子のサイズ変異が細胞質型間で明らかに相違し、S型mtDNA画分中には1.3 kbバンドに対応する分子種 ($0.28\sim 0.4\mu\text{m}$)が見当たらないことも判明した (Fig. 2)。小環状DNAが雄性不稔現象と関連するか否かは今後の研究に俟たねばならないが、複製中間体と考えられる分子も観察されており (Fig. 1)、独立したレプリコンとして存在するのであろう。

(2) ミトコンドリアゲノムの多型性

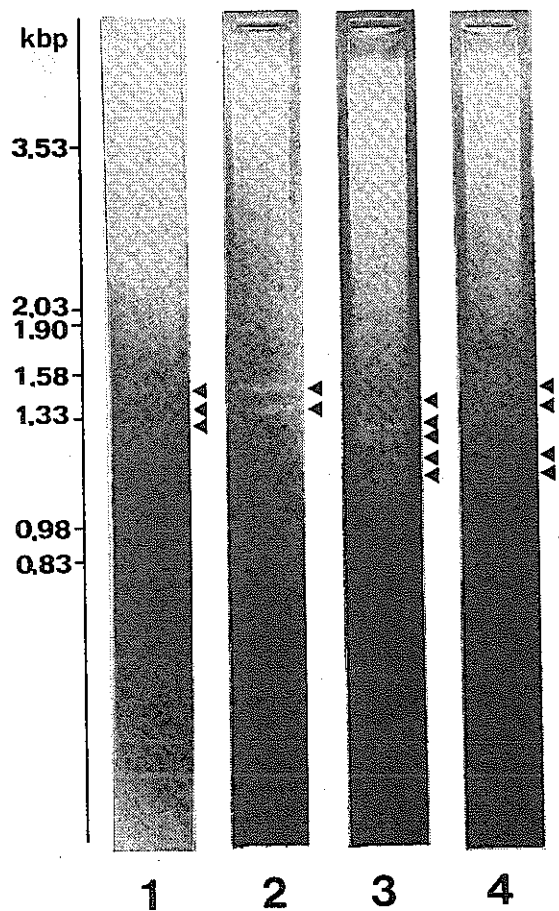


Fig. 3. Electrophoresis in 1.5% agarose gel of mtDNA preparations from normal and different sources of CMS lines. Lane 1 : TK81-O ; Lane 2 : TK81-MS ; Lane 3 : I-12CMS (2) ; Lane 4 : I-12CMS (3).

野生ビート起源の雄性不稔細胞質に関しては、先に6種の純系を花粉親に配した検定交配実験が行われ、稔性回復の遺伝機構が不稔細胞質間で互いに異なり、しかも既知のS細胞質型の場合とも相違することが判明している。今回、かかる不稔細胞質の多型性がmtDNAの制限酵素分析によっても裏付けられた。

Sma I による mtDNA 分解物の電気泳動像を Fig. 4 に示す。N型 mtDNA (TK81-O, NK169-O, I-12-61L) は40本の Sma I 断片 (分子量 > 1 kb) に切断される。一方、異型不稔細胞質から調製した mtDNA の Sma I 切断パターンは4種に分類された (Table 2)。I-12CMS (R), I-12CMS (4), I-12CMS (5) および I-12CMS (8) においては、い

ずれも15本の細胞質型固有バンドが検出され、そのパターンはS型 (TK81MS, NK169-MS) と同一であった。これに対してI-12CMS (2), I-12CMS (3) ならびにI-12CMS (7) の mtDNA はN型ともS型とも異なる切断像を示し、その上3株間でも固有バンドの種類と数が互いに相違していた。またこれら3種の異型細胞質雄性不稔株の mtDNA は正常株には見出されない2種 (I-12CMS (3), I-12CMS (7)) ないし5種 (I-12CMS (2)) の小環状 DNA 分子の存在によっても容易に特徴づけられた (Fig. 3, Table 1)。以上の結果は花粉稔性回復機構に関する遺伝解析のデータ (Suzuki ら 1974) とよく一致する。

(3) 葉緑体ゲノムの多型性

I-12CMS 系統から抽出した ctDNA の BamH I, EcoR I および Sma I 分解物については細胞質型間に差異は全く認められなかった (Table 2)。しかし Hind III で完全分解した場合には2種の

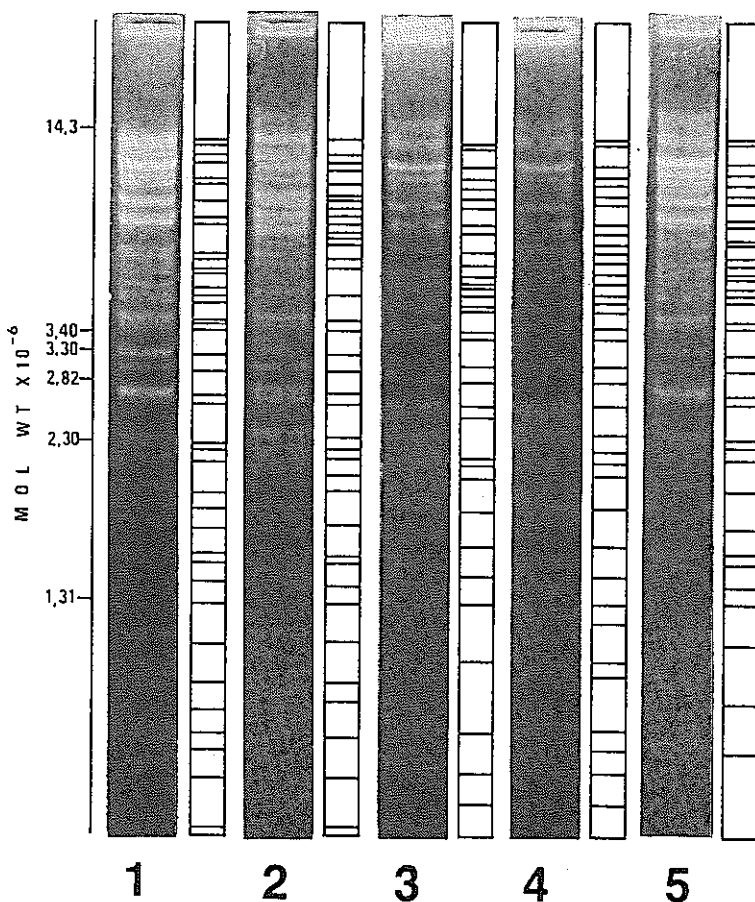


Fig.4. Sma I restriction fragment patterns of mtDNAs. The DNA fragments were separated by electrophoresis in 0.8% agarose slab gels. Lane 1 : TK81-O ; Lane 2 : TK81-MS ; Lane 3 : I-12CMS (2) ; Lane 4 : I-12CMS (3) ; Lane 5 : I-12CMS (7).

Table 2. Restriction enzyme analysis of mt and ctDNAs from normal and different sources of male sterile cytoplasms

Strain	Fertile / Sterile	Cytoplasmic source	mtDNA						ctDNA							
			EcoRI		HindIII		SmaI		BamHI		EcoRI		HindIII		SmaI	
			T ^a	S ^b	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
TK81-0	F	Japanese sugar beet variety	45	-	35	-	40	-	22	-	27	-	26	-	15	-
TK81-MS	S	do	41	10	36	14	38	15	22	0	27	0	25	0	15	0
I-12-61L	F	American sugar beet variety	45	0	35	0	40	0	22	0	27	0	26	0	15	0
I-12CMS (R)	S	do	41	10	36	14	38	15	22	0	27	0	25	0	15	0
I-12CMS (2)	S	Wild beet from Turkey	44	6	38	9	34	7	22	0	27	0	27	2	15	0
I-12CMS (3)	S	Wild beet from Pakistan	44	6	38	9	37	11	22	0	27	0	27	2	15	0
I-12CMS (4)	S	Wild beet from Turkey	41	10	36	14	38	15	22	0	27	0	25	0	15	0
I-12CMS (5)	S	Wild beet from Turkey	41	10	36	14	38	15	22	0	27	0	25	0	15	0
I-12CMS (7)	S	Wild beet from Manchuria	44	6	38	9	36	8	22	0	27	0	27	2	15	0
I-12CMS (8)	S	Wild beet from Turkey	41	10	36	14	38	15	22	0	27	0	25	0	15	0

a Total fragments

b Cytoplasm-specific fragments which are not common with TK81-0

電気泳動像が得られた。

Fig. 5 に示す如く, S 細胞質 (TK81-MS, NK169-MS, I-12CMS (R)) や I-12CMS (4), I-12CMS (5) あるいは I-12CMS (8) 由来の ctDNA においては N 型 ctDNA で検出される 5.3 kb 断片の missing が生じている。これは同断片中に起った突然変異に起因することが分子雑種形成実験を通じて明らかとなった (Mikami ら 1984, 1985)。一方, I-12CMS (2), I-12CMS (3) および I-12CMS (7) よりの ctDNA では 2 本の細胞質型固有バンド (17.5 および 4.6 kb) が見出された (Fig. 5)。その成因については分子雑種形成法に基づく確認が必要であるが, N 型 ctDNA の 21.8 kb 断片中に Hind III の認識部位が新たに 1 箇所生じたため, 同断片が上記 2 本の固有バンドに切断された可能性が高い。

著者らは最近テンサイ N 型 ctDNA の制限酵素 (Sma I, Pst I, および Pvu II) 切断地図を完成した (Kishima ら 1986)。現在この地図をもとに Hind III 切断点の変異域の同定と構造解析を進めているところである。ただタバコ ctDNA をプローブに用いた予備的な分子雑種形成実験によれば, S 型および異型不稔細胞質の ctDNA においては単一配列の左方末端域と小単一配列のそれぞれに構造変異が独立に生起したと考えられる。

また全検出断片に占める細胞質型固有バンドの割合は mtDNA の方が圧倒的に多く (Table 2),

ミトコンドリアゲノムの分化が葉緑体ゲノムに較べて、より著しいことを示していた。この様にテンサイにおいてもトウモロコシやソルガム (Leaver と Gray 1982) と同様に、起源の異なる雄性不稔細胞質についての異型性がオルガネラ DNA の分析からも確かめられたわけである。

一方、I-12CMS 系統は I-12-61L を花粉親として少なくとも 6~7 回戻し交配が重ねられてきた。もし I-12-61L のオルガネラ DNA が花粉からも伝達されるなら、不稔系統のオルガネラ DNA の制限酵素切断パターン中に N 細胞質型固有バンドも検出されてよいことになる。しかし実際には各不稔細胞質型はそれぞれに固有の DNA 切断像によって特徴づけられた。したがって、ここに得られた結果はテンサイの mt および ctDNA の母性遺伝を裏付ける証拠とみなしてよい。

4. 摘 要

(1) テンサイにおける細胞質雄性不稔性の機構を分子レベルで解明するため、S 細胞質型雄性不稔系統と正常細胞質 (N) 型系統

から mt および ctDNA を抽出し、電子顕微鏡による比較観察を行った。ctDNA が 45 μ m (154 kb) の均一な環状分子であったのに対し、mtDNA は著しく不均一な環状分子種 (0.28~51 μ m) より構成されることがわかった。しかも S 型と N 型細胞質間では 1 μ m 以下の小環状 mtDNA の組成が相違していた。

(2) 起源を異にする異型雄性不稔細胞質より mtDNA を調製し、制限酵素分析を行った。その結果、異型不稔細胞質の保有するミトコンドリアゲノムは既知の S 型も含めて 4 種に群別された。また、これらの異型不稔細胞質の mtDNA は N 型や S 型細胞質には見出されない 2 ないし 5 種の小環状 DNA 分子の存在によっても特徴づけられた。

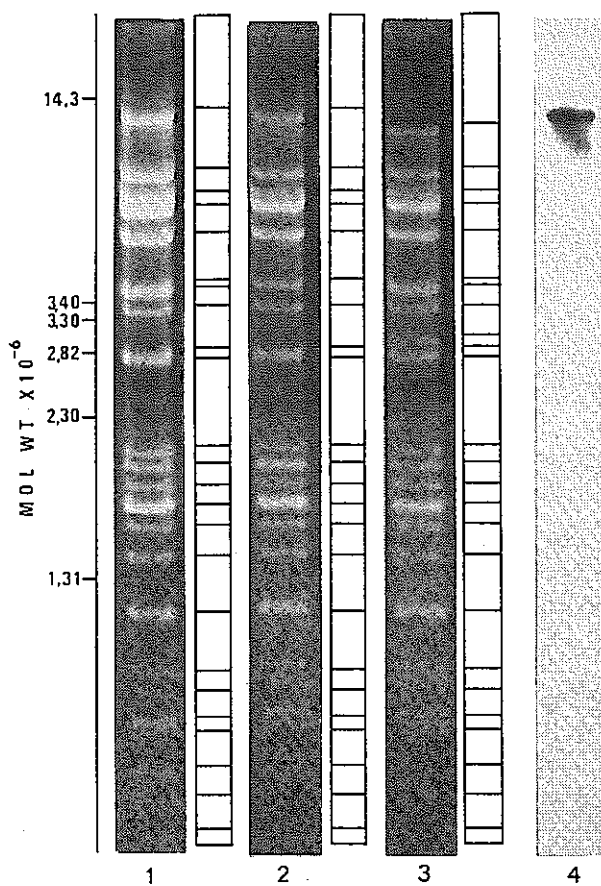


Fig.5. HindIII restriction fragment patterns (1-3) of ctDNAs and autoradiograph (4) of HindIII digests of I-12-61L ctDNA hybridized to ³²P-labeled tobacco ctDNA probe. The DNA fragments were separated by electrophoresis in 0.7% agarose slab gel. A tobacco probe contains most of the small single-copy region. Lane 1: I-12-61L; Lane 2: I-12CMS (R); Lane 3: I-12CMS (2).

- (3) 異型不稔細胞質よりの ctDNA は制限酵素分析を通じて 2 種に類別された。S および今回新たに同定された異型細胞質由来の ctDNA においては大単一配列の左方末端域と小単一配列のそれぞれに突然変異の生じている可能性が示された。また全制限酵素断片に占める細胞質型固有バンドの比率は mtDNA の方が圧倒的に高く、ミトコンドリアゲノムの分化は葉緑体ゲノムに較べて、より著しいと考えられる。

引用文献

- 1) Kishima, Y., Mikami, T., Harada, T., Shinozaki, K., Sugiura, M. and Kinoshita, T. 1986. Restriction fragment map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) chloroplast DNA. (submitted)
- 2) Leaver, C. J. and Gray, M. W. 1982. Mitochondrial genome organisation and expression in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:373-402.
- 3) Mikami, T., Sugiura, M. and Kinoshita, T. 1984. Molecular heterogeneity in mitochondrial and chloroplast DNAs from normal and male sterile cytoplasms in sugar beets. *Curr. Genet.* 8:319-322.
- 4) Mikami, T., Shinozaki, K., Sugiura, M. and Kinoshita, T. 1984. Characterization of chloroplast DNA from sugar beet with normal and male sterile cytoplasms. *Jpn. J. Genet.* 59:497-504.
- 5) Mikami, T., Kishima, Y., Sugiura, M. and Kinoshita, T. 1985. Organelle genome diversity in sugar beet with normal and different sources of male sterile cytoplasms. *Theor. Appl. Genet.* 71:166-171.
- 6) Mikami, T., Harada, T. and Kinoshita, T. 1986. Heterogeneity of circular mitochondrial DNA molecules from sugar beet with normal and male sterile cytoplasms. *Curr. Genet.* (in press)
- 7) Sederoff, R. R. 1984. Structural variation in mitochondrial DNA. *Adv. Genet.* 22:1-108.
- 8) Sugiura, M. and Kusuda, J. 1979. Molecular cloning of tobacco chloroplast ribosomal RNA genes. *Mol. Gen. Genet.* 172:137-141.
- 9) Suzuki, A., Oldemeyer, R. K. and Erichsen, A. W. 1974. Relative emasculation efficacy of various sources of male sterility cytoplasm in sugarbeets, the parents of which are genotypically the same. In: *Am. Soc. Sugar Beet Tech. 18th General Meeting.*

第4章 ガンマー線照射したイネカルスの 培養に関する研究

森 宏 一・木 下 俊 郎

1. 緒 言

近年バイオテクノロジーの発達により植物組織培養を育種的に利用する研究が展開されつつある。殊に培養細胞に放射線を照射して再分化個体を高頻度で作出するならば、変異体が高率で出現することが期待できる。さらに培養条件を制御して、いわゆるソマクローン選抜を行うならば、特定の形質を有する細胞を選抜でき、それらから個体を再分化させるならば変異の方向づけも可能であり、細胞の選抜効率を個体レベルにおけるよりも飛躍的に高めることが可能となろう。このような研究は現行育種の効率化を計る方途であるのみならず、もし細胞融合や組換えDNAなどの新技術を応用するならば、旧来の交雑によるよりも時間と労力を合理化した革新的な新育種技術を発展せしめることが期待できよう。これまで、培養細胞においては染色体変異が高頻度で出現すること、特別な操作を行わぬ培養でも再分化個体には形態や生理的形質について様々な変異の出現することが知られている (Oono 1978, Shepard ら 1980, Wakasa 1979)。また培養細胞に生ずる変異誘起の機作も究明されつつある (Larkin and Scowcroft 1981)。

本研究では培養細胞へガンマー線照射あるいは薬剤処理を行って突然変異を誘発したり、ソマクローン選抜によって耐塩性や薬剤耐性を選び出すこと、さらに、再分化個体において突然変異スペクトルを調べて、種子や生体にガンマー線を照射した場合と効率を比較するといった一連の育種技術の開発を目的としている。本年はイネ種子カルスへガンマー線を照射して、まずカルスの増殖並びに再分化への影響を中心に調査した。

2. 材料および方法

供試材料は「しおかり」を反復親とする9種の準同質遺伝子系統および「台中65号」を反復親とする9種の同質遺伝子系統である。これらを用いて、まず種子カルスを誘導し

Table 1. Dwarf isolines used in the experiment

Isoline	Gene symbol	Name of dwarf type
Shiokari		Normal type
ID-1	<i>d-1</i>	Daikoku dwarf
ID-6	<i>d-6</i>	Ebisumochi dwarf
ID-7	<i>d-7</i>	Cleistogamous dwarf
ID-10	<i>d-10</i>	Toyohikari-bunwai
ID-18h	<i>d-18^h</i>	Hosetsu dwarf
ID-19	<i>d-19</i>	Kamikawa dwarf
ID-30	<i>d-30</i>	Waisei-shirasasa dwarf
ID-35	<i>d-35</i>	Tanginbozu dwarf
ID-47	<i>sd-1</i>	Dee-geo-woo-gen dwarf

た。カルス誘導には、脱穎種子を70%エタノールに約30秒間浸漬した後、10%サラン粉の上澄液に約20~25分間浸漬して滅菌し、2~3回滅菌水で洗浄した後培地に置床した。培地はChuの基本培地に2,4-D 4.4 mg/l, 蔗糖 50 g/lを添加し、pH 5.9に調整後、寒天 10 g/lを加えて熱融解し、50 ccまたは100 ccの三角フラスコにそれぞれ20 ccと40 ccずつ分注した。培地はオートクレーブにより120°C、1.2 kg/cmで約20分間滅菌処理した。カルスの誘導および培養には、培地に滅菌種子をフラスコ1個当たり5粒ずつ胚を上にして着床した。1系統当たり10粒を反復とし、29°Cの暗黒条件下で培養を行った。種子置床後、10日後に誘導されたカルスを分離し、その後、10日毎に継代培養を行った。カルスへのガンマー線照射処理としては無処理区、10 kR区、20 kR区、30 kR区の4処理区を設定した。ガンマー線照射の影響を調べるため、継代培養時にカルスの増殖率(調査時のカルス重/前回調査時のカルス重)を算出した。

次いで、種子カルスからの器官・個体の再分化は、培地としてChuの基本培地にNAA 0.93 mg/l, BA 4 mg/l, 酵母抽出物 1 g/lおよび蔗糖 70 g/lを添加し、これにカルス 0.2 gを置床した。器官や個体の再分化についての調査は10日目毎に行い、不定根、グリーンスポット、緑色植物、アルビノ個体の再分化の有無を調べ、照射処理間や系統間で比較を行った。

3. 実験結果および考察

(1) カルスの増殖への影響

まず、ガンマー線の照射線量を変えた場合のカルス増殖の推移を調べた結果をFig.1およびFig.2に示した。ここでは供試系統をすべてプールしてある。「しおかり」、「台中65号」のいずれの同質遺伝子系統においてもカルスの増殖率は照射線量の増加に伴い、減少する傾向が認

Table 2. List of isolines of Taichung 65 for marker genes

Isoline	Gene symbol	Name
Taichung 65 (T65)		Normal type
T65 sd-1 ^{75*}	<i>sd-1</i>	Dee-geo-woo-gen dwarf
T65 wx	<i>wx</i>	glutinous endosperm
T65 Cl	<i>Cl</i>	Clustered spikelets
T65 g-1	<i>g-1</i>	long sterile lemmas
T65 gl-1	<i>gl-1</i>	glabrous leaf and hull
T65 Dn-1	<i>Dn-1</i>	Dense panicle
T65 dl	<i>dl</i>	drooping leaf
T65 pgl	<i>pgl</i>	pale green leaf
T65 fgl	<i>fgl</i>	faded green leaf

* This semi-dwarf gene derived from Taichung sen II.

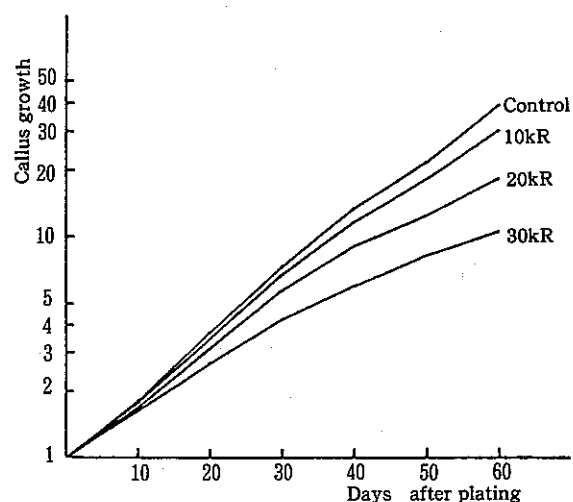


Fig.1. Relation between total exposure of gamma rays and callus growth in isolines of Shiokari.

められた。減少の傾向は 10 kR では小さく、20 kR 区および 30 kR 区において著しかった。次いで同質遺伝子系統別にカルスの増殖率を見たのが、Table 3 および Table 4 である。「しおかり」と「台中 65 号」のいずれの遺伝的背景においても照射 50 日後における各処理区の増殖率は 30 kR 区において明らかな減少が見られた。また、低下の割合は系統間で明らかに異なっていた。「しおかり」とその同質遺伝子系統中では無処理区においては ID-18h が最もよい生育を示し、次いで、ID-7、ID-47 の順となった。10 kR 区では ID

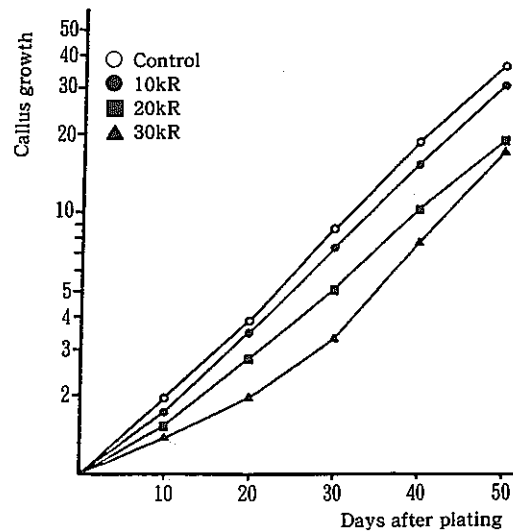


Fig.2. Relation between total exposure of gamma-rays and callus growth in isolines of Taichung 65

-10, ID-18h, ID-7 の順となり、20 kR 区では ID-47, ID-18h, 30 kR 区では ID-7, ID-40 の順であった。無処理区の増殖率を 100 とした指数でみるならば、増殖率の低下の著しかったのは ID-18h で 30 kR 区では無処理区の 69% にまで減少した。一方、ID-1 の低下は比較的少なく、30 kR 区でも 94% に止まった。またほとんどの系統において 20 kR 区では顕著な低下が見られた。これらはいずれも別種のわい性遺伝子を有する系統であり系統間の差はわい性の種類による違いを意味する。一方、「台中 65 号」の標識遺伝子に関する同質遺伝子系統では無処理で最もよい生育を示したのは T65fgl であり、次いで T65wx, T65g-1 の順となった。10 kR 区では T65g-1, T65dl となり、20 kR 区では T65sd-1, T65Dn-1, T65dl で、30 kR 区では T65g-1, T65wx の順であった。無処理区の増殖率を 100 とした場合、カルスの生長低下が最も著しかったのは T65fgl であり、

Table 3. Callus growth of the 9 isolines of Shiohari after the different gamma irradiations

Strain	Control			10kR			20kR			30kR	
	Relative growth	Mean growth	%	Relative growth	Mean growth	%	Relative growth	Mean growth	%	Relative growth	Mean growth
Shiohari	31.7	1.79	100	12.6	1.55	87	5.6	1.35	75	4.7	1.31
ID-1	4.2	1.27	100	3.2	1.22	96	2.7	1.18	93	2.8	1.19
ID-6	7.2	1.40	100	22.2	1.70	121	8.3	1.46	104	3.9	1.27
ID-7	66.3	2.02	100	52.0	1.94	96	39.1	1.86	92	26.3	1.73
ID-10	49.1	1.92	100	57.4	1.97	103	23.4	1.70	89	9.9	1.47
ID-18h	85.4	2.10	100	54.8	1.95	93	30.5	1.78	85	8.0	1.44
ID-19	46.3	1.90	100	26.9	1.74	92	11.7	1.52	80	8.1	1.43
ID-30	28.3	1.76	100	16.5	1.62	92	10.3	1.51	86	12.2	1.53
ID-35	14.2	1.58	100	8.5	1.45	92	10.0	1.48	94	4.6	1.30
ID-47	54.8	1.96	100	45.9	1.90	97	41.3	1.83	93	24.8	1.72

Table 4. Comparison of callus growth among three levels of total exposures of gamma-ray at 50 days after irradiation

Line	Treatment	0 (Control)			10kR			20kR			30kR		
		relative growth rate	mean growth rate	%	relative growth rate	mean growth rate	%	relative growth rate	mean growth rate	%	relative growth rate	mean growth rate	%
T65		30	1.9	100	18	1.8	96	10	1.6	86	11	1.6	87
T65 sd-1 TM		32	2.0	100	28	1.9	97	27	1.9	97	21	1.8	92
T65 wx		54	2.2	100	41	2.1	95	19	1.8	81	24	1.9	85
T65 Cl		22	1.9	100	24	1.9	102	16	1.7	94	16	1.7	94
T65 g-1		54	2.2	100	44	2.1	96	23	1.9	85	29	2.0	88
T65 gl-1		19	1.8	100	15	1.7	95	14	1.7	95	10	1.6	88
T65 Dn-1		42	2.1	100	36	2.0	97	26	1.9	90	18	1.8	84
T65 dl		34	2.0	100	43	2.1	105	25	1.9	94	21	1.8	91
T65 pgl		23	1.9	100	20	1.8	97	11	1.6	85	10	1.6	84
T65 fgl		62	2.3	100	41	2.1	92	17	1.8	77	12	1.6	72
Mean		36	2.1	100	31	2.0	98	19	1.8	88	17	1.8	86

% = (mean growth rate at each treatment/control growth) × 100.

30 kR 区では無処理区の 72% まで減退した。これに対して、T65Cl の低下はあまり大きくなく、無照射区の 94% にとどまった。因みに、*fgl* は葉緑素異常の 1 種に係わる遺伝子であり、*Cl* は類が 2 ~ 3 個ずつ叢性する形質に係わっている。標識遺伝子には形態的形質 (*sd-1*, *Cl*, *g-1*, *gl-1*, *Dn-1*, *dl*) と胚乳糯性 (*wx*) ならびに 2 種の葉緑素異常 (*pgl*, *fgl*) が含まれている。

(2) ガンマー線照射カルスからの器官・個体の再分化

ガンマー線の照射を受けたカルスからの器官や個体の再分化が無処理の場合と異なるか否かを調べた結果を Table 5 と 6 に示した。「しおかり」同質遺伝子系統は、いずれの処理区においても不定根や緑色個体あるいはアルビノ個体を分化した。まず 10 系統をプールすると、不定根では 30 kR 区、緑色個体とアルビノ個体では 20 kR 区において最高の再分化率を示した。しかし、個々の系統について見るならば ID-6 と ID-47 ではいずれの処理区も不定根のみを再分化したのに対して、「しおかり」、ID-18h, ID-19, ID-30 では緑色個体の再分化が多くみられた。また緑色個体の再分化は、「しおかり」、ID-19 および ID-30 の各系統では 20 kR 区、ID-18h では 30 kR 区においてそれぞれ最も多くなり、特に ID-18h, ID-19, ID-30 の各系統では無処理区との間で顕著な差が見られた。一方、「台中 65 号」同質遺伝子系統では、いずれの系統においても不定根のみの分化で、緑色個体やアルビノ個体の再分化は見られなかった。各系統をプールした場合、照射線量の増加により不定根の再分化率が低下したが、この傾向は個別の系統により異なっていた。

以上の結果から、カルス増殖量についてのガンマー線の影響には明らかに系統間差が見られた。使用した系統が同質遺伝子系統であるから、このようなガンマー線の感受性の差異は系統間で異なっている主働遺伝子の差に起因する可能性の大きいことがまず考えられる。また、カルスの生長

Table 5. Organ formation from the calli irradiated by gamma rays

Strain	Irrad. treat.	No. of callus	Regeneration		
			Root	Green pl.	Albino pl.
Shiokari	0 KR	45	20	9	0
	10	50	25	4	0
	20	45	17	21	0
	30	25	7	1	2
ID-1	0	45	9	7	2
	10	50	10	0	0
	20	45	20	6	2
	30	40	15	1	2
ID-6	0	50	5	0	0
	10	45	1	0	0
	20	50	1	0	0
	30	35	3	0	0
ID-7	0	40	5	1	0
	10	50	1	1	0
	20	50	9	3	0
	30	45	8	2	0
ID-10	0	50	13	0	2
	10	50	10	0	0
	20	50	15	5	1
	30	50	25	1	1
ID-18h	0	45	5	0	0
	10	50	13	2	0
	20	50	7	9	5
	30	45	28	13	2
ID-19	0	45	4	2	0
	10	50	10	3	0
	20	50	10	27	1
	30	40	14	22	2
ID-30	0	50	14	5	0
	10	50	15	10	1
	20	50	7	28	2
	30	30	10	12	0
ID-35	0	50	6	3	0
	10	50	7	3	0
	20	45	9	3	0
	30	50	8	6	0
ID-47	0	45	3	0	0
	10	50	3	0	0
	20	45	1	0	0
	30	50	11	0	0
Total	0	465	84	27	4
	10	495	95	23	1
	20	480	96	102	11
	30	410	119	58	9

Table 6. Regeneration from the irradiated callus in isolines of Taichung 65

Strain	Irradiation dose	No. of callus	No. of regeneration			
			Root (%)	Albino pl.	Green pl.	
T65	0 kR	10	7	(70)	0	0
	10 kR	10	6	(60)	0	0
	20 kR	10	7	(70)	0	0
	30 kR	9	6	(67)	0	0
T65 sd-1 ^{TS}	0 kR	10	7	(70)	0	0
	10 kR	10	6	(60)	0	0
	20 kR	10	5	(50)	0	0
	30 kR	10	5	(50)	0	0
T65 wx	0 kR	10	6	(60)	0	0
	10 kR	10	5	(50)	0	0
	20 kR	10	3	(30)	0	0
	30 kR	10	2	(20)	0	0
T65 Cl	0 kR	10	8	(80)	0	0
	10 kR	10	9	(90)	0	0
	20 kR	10	5	(50)	0	0
	30 kR	10	7	(70)	0	0
T65 g-1	0 kR	10	6	(60)	0	0
	10 kR	10	4	(40)	0	0
	20 kR	10	2	(20)	0	0
	30 kR	10	4	(40)	0	0
T65 gl-1	0 kR	10	8	(80)	0	0
	10 kR	10	6	(60)	0	0
	20 kR	10	5	(50)	0	0
	30 kR	10	3	(30)	0	0
T65 Dn-1	0 kR	10	9	(90)	0	0
	10 kR	10	8	(80)	0	0
	20 kR	10	6	(60)	0	0
	30 kR	10	7	(70)	0	0
T65 d1	0 kR	10	7	(70)	0	0
	10 kR	10	5	(50)	0	0
	20 kR	10	4	(40)	0	0
	30 kR	10	2	(20)	0	0
T65 pg1	0 kR	10	5	(50)	0	0
	10 kR	10	6	(60)	0	0
	20 kR	10	2	(20)	0	0
	30 kR	10	5	(50)	0	0
T65 fgl	0 kR	10	2	(20)	0	0
	10 kR	10	1	(10)	0	0
	20 kR	10	0	(0)	0	0
	30 kR	10	0	(0)	0	0
Total	0 kR	100	65	(65)	0	0
	10 kR	100	56	(56)	0	0
	20 kR	100	39	(39)	0	0
	30 kR	99	41	(41)	0	0

の早い系統ほどガンマー線の影響により生長が遅れた。Kinoshita and Mikami (1984) も小麦の異質細胞質系統よりのカルスでストレプトマイシン耐性とカルスの関連について同様な関係を報告している。両者の関連性はカルスの特性として注目に値する。培養はしばしば放射線照射の有無にかかわらず、新変異を生じたり、あるいは内生的な変化の現われることがあり、当然カルスの培養率にも影響が及ぶことであろう。従って、放射線による生理的な変化があたかも遺伝子型の差異として現れることになるかも知れない。そのようなことを考慮した上でも、なおわい性遺伝子の種類を異にすることによって放射線感受性に差の見られたことは、個体と細胞レベルでの形質表現の関係を調べる上で興味深い。一方、器官・個体の再分化への影響について検討を加えた結果では、2種の遺伝的背景、すなわち「しおかり」と「台中65号」の系統間で再分化について際立った差異が見られた。すなわち「台中65号」シリーズでは不定根のみの再分化に終わったのに対して、「しおかり」シリーズでは、不定根、緑色個体およびアルビノ個体の再分化が見られた。加えてガンマー線照射が再分化に与える影響について検討を加えたところ、「台中65号」シリーズでは照射線量の増加による不定根の再分化率の低下する傾向が見られたが、「しおかり」シリーズでは照射線量の増加により、むしろ再分化率は増加し、特に20 kR区や30 kR区では無処理区よりも顕著に増大した。このように、総線量の高い処理区でむしろ再分化率が高頻度となったのは、ガンマー線照射によって、まずカルス増殖に低下を来し、これがむしろ再分化の面ではプラスに作用したのではないかと考えられる。

放射線をバイオテクノロジーに利用する上で最も重要なのは再分化個体において有用な変異形質を見出すことである。幸い再分化率は高くなったので、今後は再生個体での突然変異誘発を調べる予定である。

4. 摘 要

- (1) 「しおかり」および「台中65号」シリーズの同質遺伝子系統を用いて種子カルスにガンマー線照射を行い、その後のカルス増殖や再分化率に及ぼす影響を調査した。
- (2) カルスではガンマー線照射総線量の増加に伴って増殖率が低下した。しかし、その低下程度は各シリーズ中の系統間で明らかな差異が見られた。
- (3) カルスの増殖について照射による影響の著しかった系統は、無処理区でもカルス増殖の早い系統であるという傾向が見られた。
- (4) ガンマー線照射したカルスより器官や個体の再分化を試みたところ、「台中65号」の同質遺伝子系統においては不定根のみの再分化に終わったのに対して、「しおかり」の同質遺伝子系統では不定根、緑色個体やアルビノ個体を再分化した。また系統により、不定根のみを生ずるものから

個体再分化に至るまでの系統間差がみられたが、一般に 20 kR 区では無照射区に比べて緑色個体の再分化が多かった。従って、組織培養とガンマ線照射を組合わせた場合に、少なくとも個体再分化については培養効率の向上に役立つことが明らかとなった。

引用文献

- 1) KINOSHITA, T. and MIKAMI, T. (1984) : Alloplasmic effects on callus proliferation and streptomycin resistance in common wheat. *Seiken Zihō* 32 : 31-38
- 2) LARKIN, P. J. and SCOWCROFT, W. R. (1981) : Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Geqet.* 60 : 197-214
- 3) OONO, K. (1978) : Test tube breeding of rice by tissue culture. *Trop. Agr. Res. Ser.* 11 : 109-124
- 4) SHEPARD, J. F., BIDNEY, D. and SHAHIN, E. (1980) : Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 208 : 17-24
- 5) WAKASA, K. (1979) : Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple. *Japan J. Breed.* 29 : 13-22

第5章 ガンマー線誘発による温度感受性のイネわい性 突然変異体に関する遺伝子分析

高牟禮 逸 朗・木 下 俊 郎

1. 緒 言

遺伝子の形質発現に際して、環境要因の中でも温度条件は重要な因子である。イネの葉緑素異常には、ある遺伝子型個体が温度条件の変化によって、正常型からクロロシス、極端な場合にはアルビノにまで変わるような場合が知られている (OMURA et al. 1977, CHUONG and OMURA 1980)。さらに温度条件に反応して形態変化を示す変異体として、ふ系71号わい性 (KITANO and FUTSUHARA 1981, 1982) や少分けつわい性 (TAKAMURE and KINOSHITA 1985) が報告されている。

本実験に供試した N-172 はガンマー線照射によって誘発したとみられる突然変異体で、水田条件では半数体様であり、わい性、小粒および完全不稔を示すが、温室条件のような高温条件下におくと、生育が回復して低稔性ながら自殖種子も採れる。今回は N-172 について遺伝子分析を行った。また、温度条件の異なる水田と温室内で栽培して、原系統 (AC-85) との形質表現を比較した。

2. 材料および方法

供試材料を Table 1 に示した。

N-172 は本教室の検定系統である H-59×H-120 の交雑 F₁ 個体から薬培養により作出した AC

Table 1. List of the lines used in the experiment

Original line	AC-85	derived from F ₁ hybrid, H-59×H-120 by anther culture <i>C^g, A, P, wx</i> whole plant was irradiated chronically with gamma rays (430 R/day)
Mutant line	N-172	haploid-like dwarf <i>C^g, A, P, wx</i>
Tester line	H-79	<i>d-2, Ig, 1a, bc-1</i>

-85 に由来する。AC-85 がカルスから個体分化した当時は半数体であった。この半数体にガンマー線の生体緩照射 (430 R/day) を行った途中で 2 倍体を生じたため種子繁殖が可能となった。次に M_3 代を水田栽培中に形態的には半数体に戻ったようなわい性、小粒および不稔を示す突然変異体 (N-172) を分離した。

(1) 遺伝子分析

検定交雑を行った 1980 年当時は、N-172 が高温条件下で稔性回復することが知られていなかったため、まず後代検定によって変異体の遺伝性を確認した、株保存していたヘテロ個体を母本に用い、H-79 を花粉親とする交雑を行って、 F_1 個体および F_2 集団をそれぞれ実験水田に 1 株 1 本植で栽培し、各標識形質について調査した。なお、標識遺伝子との組換え価の算出にあたっては IMMER の乗積比法を用いた。

(2) 変異体の特性

N-172 と原系統 (AC-85) の 2 系統を供試して、水田栽培、温室およびビニールハウス内でポット栽培を行い、それぞれの条件下における形質表現を比較した。水田栽培に用いた材料は 1985 年 5 月初旬に温室内に播種し、6 月上旬に実験水田へ 1 株 1 本植で移植した。1 系統につき、1 列 6 個体の 3 列植とし、調査は中央の 1 列について実施した。ポット栽培の材料は 1985 年 5 月中旬に播種し、6 月上旬に 2 ℓ ポットに 2 個体ずつ移植し、1 系統当たり 5 ポットずつを温室とビニールハウス内で栽培した。水田とビニールハウス内の材料については、移植以後、約 10 日おきに草丈と分けつ数を調査し、出穂後の諸形質については水田と温室からの収穫材料について測定した。

3. 結 果

(1) 遺伝子分析

N-172 の変異形質に関する遺伝子をヘテロで有していた正常型個体と H-79 の交雑 F_1 について 15 個体を水田で栽培したところ、 F_1 はすべてが正常型を示した。次に F_1 を個体別に採種し、翌年に F_2 集団を水田に栽培した。 F_2 15 集団中の 10 集団においては N-172 と同一のわい性・不稔個体を分離した。また、変異個体の一部はわい化の程度が著しく、枯死するものもあったため、 F_2 2 集団においては変異体がやや過少となったものの、おおむね、正常型：変異型が 3 : 1 の分離比に適合した (Table 2)。したがって、本変異体には 1 対の劣性遺伝子が関与していることがまず明らかになった。N-172 が真性の半数体でなく、2 倍体であることは、 F_1 がいずれも正常型で、 F_2 では変異体以外に半数体とみられる個体を生じなかったことによっても明らかである。さらに枯死個体の少なかった F_2 集団をプールし、変異型遺伝子と標識遺伝子 $d-2$, lg (第 II 連鎖群), A (III), la (VIII) $bc-1$ (XI) との間で組換え価を算出したところ、それぞれ独立であることが示された (Table 3)。

Table 2. F₂ segregations of haploid-like dwarf [*d (t)*] in the crosses, N-172 (hetero) x H-79

Cross No.	Phenotype	Normal	dwarf	Total	$\chi^2(3:1)$
1	Obs.	127	56	183	3.06
3	Obs.	129	39	168	0.29
4	Obs.	97	21	118	3.27
5	Obs.	88	27	115	0.14
7	Obs.	136	43	179	0.09
9	Obs.	165	33	198	7.33**
10	Obs.	109	40	149	0.27
11	Obs.	99	35	134	0.09
13	Obs.	120	25	145	4.66*
15	Obs.	129	46	175	0.15
Total	Obs.	1199	365	1564	2.31

Homogeneity : $\chi^2=17.86^*$

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

Table 3. Combined segregations between *d (t)* and marker genes in the F₂ population of the cross, N-172 (hetero) x H-79

Gene pair	Linkage phase	R.C.V. (%)	F ₂ segregation				Total	$\chi^2(9:3:3:1)$	
			<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>			
<i>d(t) : d-2</i>	Rep.	55.8	Obs.	636	181	162	70	1049	11.25*
" : <i>lg</i>	Rep.	50.2	Obs.	615	202	174	58	1049	4.68
" : <i>A</i>	Coup.	50.0	Obs.	595	222	169	63	1049	7.30
" : <i>la</i>	Rep.	48.0	Obs.	613	204	180	52	1049	5.38
" : <i>bc-1</i>	Rep.	43.3	Obs.	603	214	190	42	1049	10.50*

* Significant at the 5% level.

(2) 変異体の特性

N-172 と AC-85 の水田およびビニールハウス内での比較栽培における移植時以後の草丈と分けつ数の推移を Fig. 1 に示した。移植時の苗の状態では両系統間に差異は見出されなかった。水田栽培においては苗が活着し、生育が旺盛になる移植後 1 カ月以降に明らかな系統間差が現われた。N-172 は AC-85 に較べて生育が遅れ、草丈では生育が進むにつれて両者の差が広がり、最終的に N-172 の草丈は AC-85 の約 2 分の 1 にとどまった。分けつ発生についても N-172 は生育初期に遅れがみられたが、後期には盛んになり、最終的な分けつ数は AC-85 と同程度にまで達した。また、AC-85 が 8 月 22 日に出穂したのに対し、N-172 は 9 月上旬に出穂し、穂の抽出も不良であった。一方、ビニールハウス内のポット栽培では、両系統共に活着が早く、旺盛な生育を示し、草丈、分けつ数および出穂日に関して、系統間差は全く見出されなかった。

次に、水田栽培と温室内ポット栽培した両系統を10月上旬に収穫して、量的形質を比較した (Table 4)。水田条件において、N-172は短稈、小粒、完全不稔の各特徴を示し、稈長をはじめ、第5節間を除く各節間長、穂長、一穂穎花数、種子稔性、籾長および籾幅について、両系統間には1%水準で有意差がみられた。N-172の短稈化には上位節間の短縮が大きく影響していた。また、N-172は穎花の発達が不十分で小粒となり、生殖器官の発育不全もみられた。一方、温室内の高温条件下でポット栽培を行うと、N-172はAC-85と同程度の正常な生育を示し、稈長、各節間長、一穂穎花数、籾長については両系統間に有意差はみられなかった。しかし、穂長、種子稔性、籾幅については有意差がみられ、N-172の穎花はAC-85と同程度の大きさにまで発達したが、高不稔性を示した。なお、温室条件下で生じたAC-85の種子稔性低下は高温障害によるものと考えられる。

4. 考 察

N-172が水田条件で示す半数体様の変異形質には1対の劣性遺伝子の関与することが明らかになった。N-172は原系統 (AC-85) の半数体世代にガンマー線の生体照射を行って生じた2倍体 (M_1) から採種し、 M_2 代の集団栽培を経て、 M_3 代目に変異型個体として分離した。したがって、少なくとも M_2 代個体の中に変異遺伝子をヘテロに有する個体があったことになる。AC-85の半数体はガンマー線の照射時に2倍体をキメラ状に生じているので、N-172はおそらくその2倍体の種に起きた突然変異から由来すると考えられる。

N-172の表現型は環境条件によって大きく異なった。水田条件ではわい性、小粒および不稔といった著しい生育弱勢がみられたのに対して、温室内の高温条件下では種子稔性は低いものの原系統と同程度まで生育が回復した。したがって、N-172は低温によって著しい生育抑制を受ける突然変異体であると考えられる。このような温度感受性を示す変異体としては「ふ系71号」があり、高温

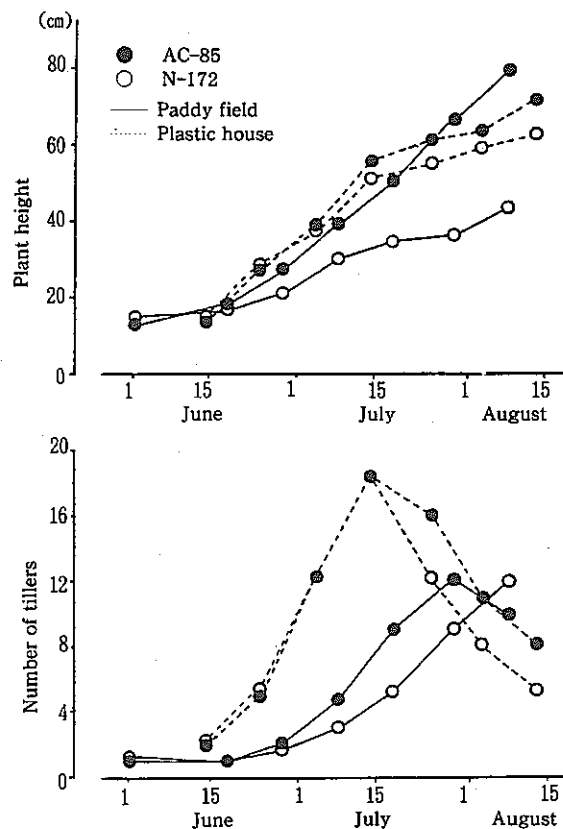


Fig.1. Growth patterns of plant height and number of tillers in AC-85 and N-172 under two different conditions.

条件下では短稈化する (KITANO and FUTSUHARA 1981, 1982)。また、反対に N-133 は低温条件下で少分げつ・わい性となる (TAKAMURE and KINOSHITA 1985)。今回の N-172 は、これら 2 種とは明らかに異なる温度感受性を示す突然変異体であった。

盛永ら (1942) は品種「出来山」の半数体から生じた 2 倍体の後代より不稔極わい性突然変異体を見出し、その分離様式から単純劣性遺伝子が関与すること、並びに変異体の形態的特徴について報告した。JONES (1952) はカリフォルニアの水稻品種「Caloro」から自然突然変異体によって生じたわい性・不稔・小穎花を示す突然変異体「Haploid 3」を見出し、これを温室内で栽培したところ、部分不稔を示す正常様の個体となったことを報告した。また、この変異体にも 1 対の劣性遺伝

Table 4. Comparison of some characters in AC-85 and N-172 grown under two different conditions

Character	Line	Paddy field	Greenhouse
Culm length (cm)	AC-85	89.6	68.0
	N-172	33.0**	62.5
1st internode length (cm)	AC-85	30.6	24.5
	N-172	7.3**	21.9
2nd internode length (cm)	AC-85	25.1	20.1
	N-172	11.1**	17.6
3rd internode length (cm)	AC-85	22.3	14.8
	N-172	7.7**	12.5
4th internode length (cm)	AC-85	10.1	7.7
	N-172	6.3**	7.9
5th internode length (cm)	AC-85	1.5	0.9
	N-172	0.6	2.6
Panicle length (cm)	AC-85	17.3	14.9
	N-172	8.3**	12.9*
No. of panicles	AC-85	7.3	4.3
	N-172	7.5	7.5
No. of spikelets	AC-85	157.8	97.8
	N-172	42.8**	89.8
Seed fertility (%)	AC-85	88.9	22.4
	N-172	0.0**	2.5**
Grain length (mm)	AC-85	5.73	5.49
	N-172	4.20**	5.29
Grain width (mm)	AC-85	3.72	3.69
	N-172	2.38**	3.31**

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

子が関与していた。以上2種の突然変異体は今回のN-172と形質発現が類似しており、遺伝子同定が必要であろう。

5. 摘 要

- (1) 交雑F₁ (H59×H-120) 個体から蒔培養で再生した系統 (AC-85) を用いてガンマー線による生体緩照射 (430 R/day) を行い、その後代 (M₃) の水田栽培中にわい性、小粒および不稔を示す突然変異体 (N-172) の分離することを見出した。N-172 の遺伝子分析を行うとともに、異なる環境条件下で栽培し、変異体の形質表現を調べた。
- (2) 交雑実験により、N-172 の変異形質には1対の劣性遺伝子の関与することが示された。
- (3) N-172 は水田条件で著しい生育抑制を受け、わい性、小粒、完全不稔を示すが、温室内の高温条件下では部分不稔を示すものの、原系統 (AC-85) と同程度まで生育が回復した。これらの形質発現より、N-172 は「ふ系71号わい性」 (KITANO and FUTSUHARA 1981, 1982), 「少分けつわい性」 (TAKAMURA and KINOSHITA 1985) の如く温度感受性を示す変異体であることが明らかになった。

引 用 文 献

- 1) CHUONG, P. V. and T. OMURA 1980. Studies on the chlorosis expressed under low temperature condition in rice, *Oryza sativa* L. II. Phenotypic expression behaviors. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 24:201-214.
- 2) JONES, J. W. 1952. Inheritance of natural and induced mutations in Caloro rice. J. Hered. 43:81-85.
- 3) KITANO, H. and Y. FUTSUHARA 1981. Character expression of induced dwarf mutants in rice. I. Effect of temperature on culm elongation in the dwarf mutant line Fukei No. 71. Jap. J. Breed. 31:9-18.
- 4) KITANO, H. and Y. FUTSUHARA 1982. Character expression of induced dwarf mutants in rice. II. Morphological and histological observations on the effect of temperature on culm elongation in the dwarf mutant, Fukei No. 71. Jap. J. Breed. 32:146-154.
- 5) 盛永俊太郎・栗山英雄・青木政春 1942. Haploid より生じたる diploid 稲に於ける不稔極矮性突然変異. 遺雜 18:297-304.
- 6) OMURA, T., H. SATHO, I. AIGA and N. NAGAO 1977. Studies on the character manifestation in chlorophyll mutations in rice I. Virescent mutants sensitive to low tempe-

ature. J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 21:129-140.

- 7) TAKAMURE, I. and T. KINOSHITA 1985. Inheritance and expression of reduced culm number character in rice. Jap. J. Breed. 35:17-24.

第6章 結 論

最近進展の著しい生物工学の手法に加えて、変異源として放射線を用い、突然変異の効率化・定方向化を試みることは、新しい育種技術を構築するためにきわめて重要である。特に細胞融合および遺伝子操作によると、これまでの植物育種の限界であった同種または近縁な植物種間の交配の壁を打ち破り、遠縁の異種、異属あるいは異科間であっても遺伝子の交換や組換えが可能となるであろう。さらに個体のみならず細胞やDNAレベルの研究へ放射線を利用して、突然変異の機作や変異体の選抜技術の改善に役立てようとするのが本研究の目的である。

本年度の研究によって得られた成果を以下に要約する。

1. テンサイの細胞質雄性不稔に関する異型細胞質の同定

細胞質雄性不稔性の質的改善を計るため、細胞質型の変異性を検出する方式を検討した。野生ビートから見出された細胞質雄性不稔性をテンサイ系統 I-12-61L へ戻し交雑をして、細胞質置換法により near-isoplasmic lines が作成されている。これらを交配実験に用いて、細胞質型と花粉稔性回復核遺伝子との相互作用によって生ずる雄性不稔型の分離様式を比較して、細胞質型の異同を検出した。

花粉親として S 型雄性不稔系統 TK76-MS に対する維持花粉親 (O 型) の TK76-0 を用い、もし雌性親が TK76-MS と同じ S 型であれば、次代ではほとんどが完全不稔型 (C. S.) になろうという仮定から、I-12-CMS(4), (5) および (R) と交雑実験を行い、いずれもが TK76-MS と同じ S 型であることを明らかにした。これに反して、I-12-CMS(2) × TK76-0:2 の交雑次代では大部分が半不稔-b 型 (S. S. b) となり、I-12-CMS(3) × TK76-0 の次代では正常型 (N) や半不稔-a 型 (S. S. a) を分離した、故に TK76-0 は S 型以外に作用する優性の稔性回復核遺伝子をホモまたはヘテロに持っていることが明らかになった。また、細胞質には特有の核遺伝子が作用する理論に基づき、これらの細胞質型は S と異なると考えた。次に、赤ビート系統 SP561001 との交雑実験からも、I-12-CMS の (2), (3) および (7) がそれぞれ S 型と異なる新細胞質型であることを確かめた。かくして、I-12-CMS の (4), (5), (8) および (R) は S 型細胞質を有し、I-12-CMS の (2), (3) および (7) は S とは異なり、それぞれ独自の細胞質型 S-2, S-3 および S-4 を有することが明らかとなった。

育種上からは S 型細胞質に O 型 (維持花粉親) となる個体が S-3 型のような細胞質には Rf 型 (稔性回復親) となる reciprocal maintainer-restorer relationship が相反循環選抜法や複交雑への利用に最も有用である。また、異型雄性不稔細胞質は遺伝的脆弱性 (genetic vulnerability) を

防ぐための multiplasm 方式の育種にも役立つ。

2. テンサイ異型雄性不稔細胞質の分子遺伝的特性

テンサイにおける細胞質雄性不稔性の変異機構を分子レベルで解明することを目的として、S型を含む各種の細胞質雄性不稔系統と正常型(N)細胞質系統から mt および ctDNA を抽出し、電子顕微鏡による比較観察を行った。ctDNA が $45\mu\text{m}$ (154kb) の均一な環状分子であったのに対し、mtDNA は著しく不均一な環状分子種 ($0.28\sim 51\mu\text{m}$) より構成されることがわかった。しかも、S型とN型細胞質間では $1\mu\text{m}$ 以下の小環状 mtDNA の組成が相違していた。そこで交雑実験に用いたのと同じ材料を用いて、各雄性不稔系統より mtDNA を調整し、制限酵素分析を行った。その結果、ミトコンドリアゲノムの分子種は既知のS型も含めると4種に群別された。また、3種の異型不稔細胞質の mtDNA にはN型やS型細胞質には見出されない2ないし5種の小環状 DNA 分子の存在によっても特徴づけられた。4種の異型不稔細胞質よりの ctDNA は制限酵素分析を通じて2種に群別された。Sおよび今回同定された異型不稔細胞質由来の ctDNA においては大単一配列の左方末端域と小単一配列のそれぞれに突然変異を生じていた。また全制限酵素断片に占める細胞質型固有バンドの比率は mtDNA の方が圧倒的に高く、ミトコンドリアゲノムの分化は葉緑体ゲノムに較べて、より著しいと考えられる。交雑実験から同定された4種の不稔細胞質型と今回の mtDNA 分子種による分類とは完全に一致をみた。したがって、時間と労力を要する交雑実験によらずとも、mtDNA の分子種を調べて、細胞質型の異同を検出することが可能である。しかし、前項の交雑実験で明らかにした maintainer-restorer 関係を知ることは、今の所、ct および mtDNA の分子種によっては出来ない。

3. イネカルスの培養に関するガンマー線照射の影響

イネの実用品種「しおかり」および「台中65号」を遺伝的背景とする同質遺伝子系統のシリーズを用いて、まず、種子カルスを誘導して、それらへガンマー線照射を行った。その後カルスの増殖と再分化率に及ぼすガンマー線の影響を調査した。

ガンマー線照射総線量の増加に伴ってカルスの増殖率が低下した。しかし、その低下程度は各シリーズの系統間で明らかな差異が見られた。なお、照射による影響の著しかった系統が、無処理区でもカルス増殖の早い系統である傾向が見られた。

ガンマー線照射したカルスより器官や個体の再分化を試みたところ、「台中65号」の同質遺伝子系統においては不定根のみの再分化に終わったのに対して、「しおかり」の同質遺伝子系統では不定根、緑色個体やアルビノ個体を再分化した。また、系統により不定根のみを生ずるものから個体再

分化に至るまでの系統間差がみられたが、一般に 20kR 区では無照射区に比べて緑色個体の再分化が多かった。したがって、組織培養とガンマー線照射を組合わせた場合に、少なくとも個体再分化については培養効率の向上に役立つことを明らかにした。

4. ガンマー線誘発のイネ突然変異体に関する遺伝子分析

イネの標識遺伝子型系統間の交雑 (H-59×H-120) の F₁ 個体から薬培養により育成した半数体株 (AC-85) を用いて、ガンマー線の生体緩照射 (430 R/day) を行った。照射中に半数体株の一部から二倍体への変異株を生じ、それからの採種種子について次代 (M₂) を育てた。さらにその後代 (M₃) の水田栽培中にわい性、小粒および不稔を示す半数体様の突然変異体 (N-172) の分離を見出した。

交雑実験により、N-172 の変異形質には 1 対の劣性遺伝子が関与していた。また、N-172 は水田条件では著しい生育抑制により、わい性、小粒、完全不稔を示したが、温室内の如き高温条件下では部分不稔を示すものの、原系統 (AC-85) と同程度まで生育が回復した。このような形質発現から、N-172 は前年度報告したガンマー線誘発の「少分げつわい性」の如く温度反応を有する突然変異体であることが明らかになった。故に、N-172 の関与遺伝子、*d (t)* は *rcn* (少分げつわい性) と同様に、標識遺伝子として遺伝および育種学的研究のために有用である。