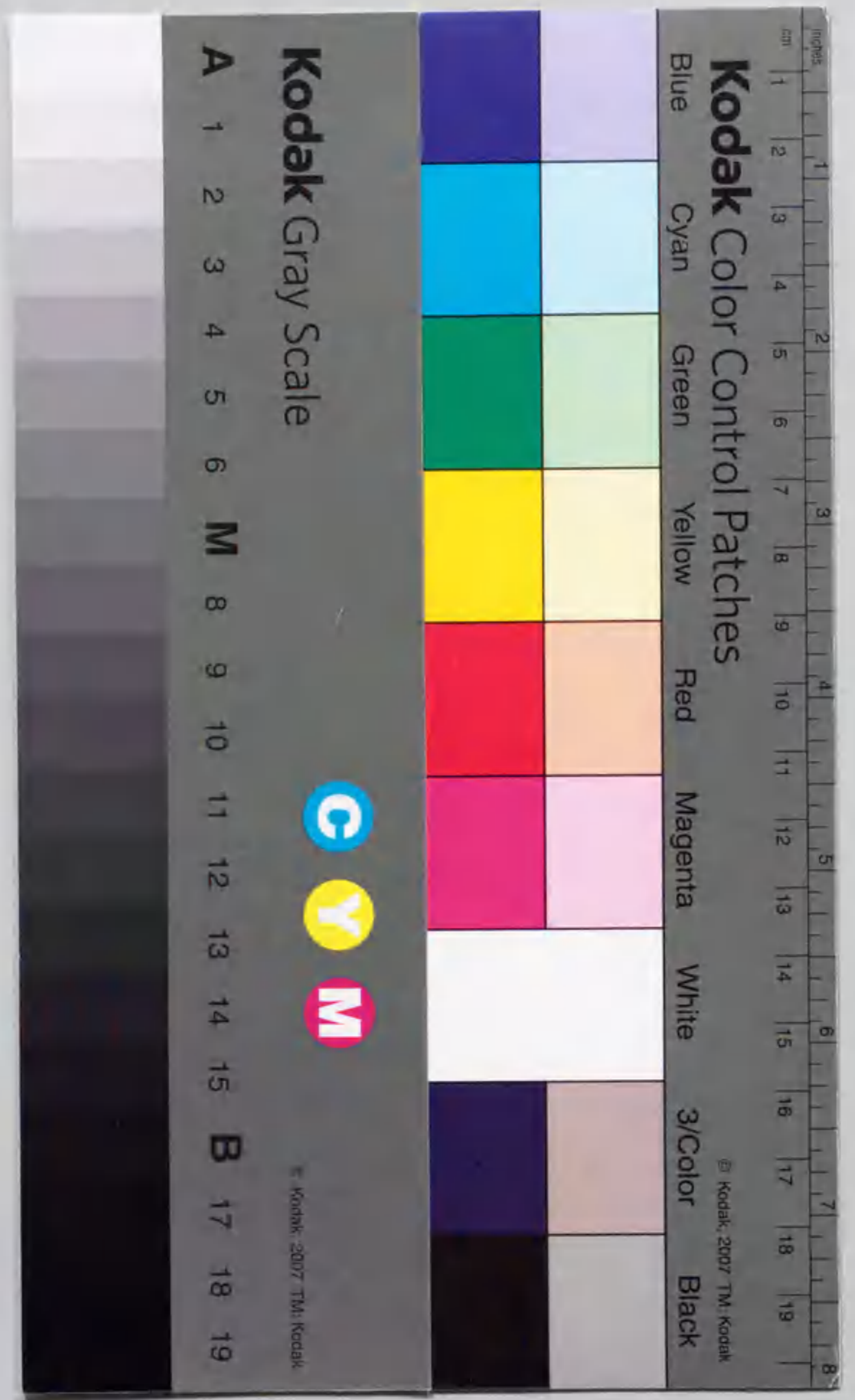


イネ培養系への放射線照射に関する
遺伝育種学的研究

中村和弘



報告番号 甲第 3102 号

①

イネ培養系への放射線照射に関する
遺伝育種学的研究

中村 和弘

1995年

目次

第1章 序論 ----- 1

第2章 イネ葍培養への放射線照射 ----- 9

第3章 イネ多芽体培養への放射線照射 ----- 24

第4章 同一葍由来の誘発変異体の形質と遺伝 ----- 33

第5章 総合考察 ----- 43

摘要 ----- 50

謝辞 ----- 54

引用文献 ----- 55

図および表 ----- 61

報文目録

人は遠い昔、山野に自生する野生植物の多くを食用として採集し、生活していた。しかし、このような採集生活では、思いがけない自然災害や動物たちとの植物の争奪のため、非常に不安定な生活であったであろう。そのうち食料の安定確保のために、人は植物を栽培することを覚え、栽培に適する性質をもつ植物を選択し、作物として確立させてきた。さらに人はそのなかからも、自らの欲する変異を選択し、育てる努力を払ってきた。これが育種における自然突然変異利用の第一歩である。

わが国の稲作において、この自然突然変異利用の典型的な例として、北海道におけるイネ品種の赤毛を挙げることができる。1866年北海道で唯一イネの栽培が行われていた函館地方が、冷害による大凶作に襲われたとき、その地で栽培されていた白髪という品種が全滅する中に、結実した突然変異株が発見された。この株は白髪よりも早生で、芒が赤かったことから赤毛と呼ばれ、白髪に代わって栽培されるようになった。この赤毛の導入により、北海道のイネの栽培面積は飛躍的に広がった。

1900年、メンデルの法則の再発見により、育種は新しい段階へと進んだ。遺伝子の組合せという概念から、交雑育種法が確立されたのである。交雑育種法とは、交雑によって2つの品種に別々に存在する遺伝子を1つの品種の中に組み合わせることで、新しい変異を作成し、その中から希望型のものを選抜、固定して品種に仕上げる育種法である。この交雑育種法により、突然変異個体は直接品種として用いる以上に、交配母本として用いられ、自然界に起こる突然

変異がより有効に利用されるようになった。

しかし、自然突然変異の頻度はきわめて低く、高等植物の場合、通常1遺伝子座当たり $10^{-5} \sim 10^{-6}$ にすぎない。したがって、育種がこのような低い頻度の自然突然変異だけにたよっていくのでは、急速に変化して行く社会的要請に十分に対処してゆくことは不可能である。

1927年、MullerはショウジョウバエのX線照射実験において、人為的に突然変異を誘発し得ることをはじめて明らかにした。その翌年にはStadlerが、トウモロコシではX線(1928a)、オオムギではX線とガンマ線(1928b)がそれぞれ人為的突然変異の誘発に有効であることを検証した。それ以来、放射線照射が育種効率を高める手段として期待され、放射線照射による突然変異誘発の研究がにわかに注目されるようになった。

我が国におけるイネの人為突然変異に関する研究は、Ichijima(1934)によるX線照射の研究が端緒となった。その後、1950年に放射性同位元素(RI)が海外から輸入できるようになったのを一つの契機として、放射線遺伝学の研究が松尾孝嶺、河合武氏らによって着手され、得られた基礎的情報にもとづいて突然変異育種法の体系化がはかられた。1956年、農業技術研究所(平塚市)にガンマ・ルームが、また1960年、農林省放射線育種場(茨城県大宮町)が設立され、翌年にはガンマ・フィールドが完成し、実用化に拍車がかかった。

1966年、 ^{60}Co ガンマ線20kRを照射して育成された短稈突然変異品種レイメイは、突然変異育種法によって育成された実用品種としては世界最初の事例である(Futsuhara 1968)。

放射線照射による誘発突然変異を利用した突然変異育種法には、以下の利点がある。(1) 既存優良品種の単一形質のおきかえが容易である。その目的で従来では戻し交雑法がとられていたが、それよりも短い年月で完成できる可能性がある。(2) 従来存在しなかった全く新しい遺伝子組成を創造する可能性がある。(3) 栄養繁殖作物、特に永年性作物では交雑育種法の効果が低く、しかも長い年月を必要とするが、放射線による枝変わりは容易に出現し、しかも短年月で成果が得られる。このような放射線照射の育種的観点から、イネについてその照射方法と照射効果についてこれまで多くの研究がなされてきた。Matsuo *et al.* (1958)は、浸漬種子(20°C、20時間)と乾燥種子の感受性を比較して、X線では浸漬種子のほうが約4倍高いが、中性子では差がないことを報告している。Kawai (1962)は、生育時期を18段階に分けてガンマ線の生体半緩照射を行った。稔実率は出穂前15~20日照射で最低になること、またM₃世代の結果から、幼穂形成期照射が分けつ期、減数分裂期、出穂期のいずれの時期の照射よりも葉緑素変異率が高いこと、減数分裂期から出穂期までの期間では、出穂6日前照射で葉緑素変異率が最高で20%に達することを報告した。山縣と赤藤(1963a, b)は、幼穂分化期から花粉完成までの5段階の時期にX線急照射を行い、種子稔性が最も低下するのは減数分裂期よりもむしろ、穎花始原体分化中期から花粉母細胞充実期であり、また、早晚性や形態変異の出現頻度およびそのスペクトルについては、照射時期の発育段階による差はなかったとしている。

育種上重要な遺伝変異の作出は、これまで、自然突然変異あるいは人為突然変異のいずれを利用するにしても、それは大地に植えられ自然環境下で育った植物体において進められてきた。しかし、

1902年、ドイツの植物学者Harberlandtがムラサキツユクサの葉肉細胞を用いて試験管内無菌培養を試みたのを発端に、その後多くの研究者の努力により植物組織培養の技術が確立され、植物体から得られた器官、組織、細胞を培養して、そこから再び植物体をよみがえらせることができるようになり、植物改良は圃場だけでなく、実験室の試験管の中でも行われるようになった。

1967年Murashige and Nakanoがタバコの組織培養における倍数性の変異を報告し、培養過程で形態的、遺伝的変異が誘発されることは、この時既に確認されていた。しかし1970年代の中ごろまで、組織培養は、遺伝的に均一なクローン個体を安定的に得ることに主眼がおかれており、変異誘発の現象は好まざる現象として、変異個体は廃棄されていた。その後、培養技術の発展とともに多くの植物種で、再分化個体の変異誘発についての報告がなされ、Larkin and Scowcroft (1981)によって総括された。彼らはその中で、体細胞由来の再分化個体を“Somaclone”とし、その中にみられる遺伝的変異性を“Somaclonal variation”とした。そして、このSomaclonal variationが、植物育種における新しい変異原となることを示唆した。

このLarkin and Scowcroftによる報告をきっかけに、Somaclonal variationの発生メカニズムの解明とその制御を目的に、様々な研究が行われた。最近になって、その成果がPeschke and Phillips (1992)によってまとめられ、報告された。その結果、Somaclonal variationの発現は、培養起源の組織（根、葉、茎など）、培養形態（不定芽誘導、不定胚誘導など）、培養期間、培養組織の遺伝子型（品種間差）など、さまざまな培養要因によって影響を受けることが示された。また、その変異発現形態も個体レベルの変異から、染

染色体レベルの変異、そして近年驚異的な発展をみせた分子生物学的手法を用い検出される、DNAレベルまでの変異が報告された。個体レベルでは、ポリジーン支配の量的形質や、その多くは単一劣性遺伝子支配の質的形質、染色体レベルでは倍数体や異数体のほか、染色体切断を含む組換えや構造異常、DNAレベルの変異としては、1塩基置換やメチル化そして反復配列のコピー数の増減などがあげられた。このほか、Transposable elementの活性化もそのうちのひとつであった。

これまで多くの研究者が、培養によって誘発される様々な変異を検出してきたが、これらの変異を互いに関連づけ、培養変異の発生起源あるいは発生メカニズムにまで言及する報告はなかった。しかし、Peschke and Phillips (1992)は以上の成果を総括するなかで、Somaclonal variationの発生メカニズムについてひとつの仮説を打ち立てた。それは、Fig. 1にまとめられるように、『培養によって引き起こされるまず最初の現象は、細胞周期障害で、これが引き金となってすべての変異が誘発される』とするものであり、この細胞周期障害は、培養に必要とされる外生ホルモンの影響や、DNAの構成単位となるヌクレオチドの貯蔵量のアンバランスによって引き起こされるとした。

組織培養が、農学的あるいは生物学的な目的で有用な変異創造に有効な手段となり、これまで使用されてきた、より容易に適用され得る突然変異誘発原にとって変わり得るものかどうかは、はっきりとした回答は得られていない。DNA代謝障害による細胞周期障害は、化学的突然変異誘発原や放射線照射によっても引き起こされ、培養による染色体異常などは、放射線照射や他の突然変異誘発原利

用でも確認される現象である。メチル化は、培養での誘発以外に報告の例はないが、培養細胞や再分化個体に対して行われたDNAレベルでの詳細な調査は、他の突然変異誘発原の処理が施された細胞や植物体で行われていない現実がある。しかし、同じ染色体異常であっても、放射線照射と化学的突然変異誘発原ではその作用性が異なり、変異スペクトルに差があることが既に報告されており (Favret 1960)、培養変異についてもその作用性が異なることが期待され得る。

イネにおいては、Nishi *et al.* (1968)やHenke *et al.* (1978)が、イネカルスから再分化した植物体の分けつ数や穂長、稔実率、止葉長などの形質について調査を行い、その形質変異を報告した。Oono (1978)は、半数体が自然倍加して得られたdoubled haploidを材料として用い、再分化第三世代までより広範な形質について調査を行った。調査を行った形質全てについて正常であったものは28.1%となり、これはX線やガンマ線照射によって誘発されたものに匹敵する高い誘発率であった。また、これらの変異形質のうち再分化個体の後代において分離、固定されるものもあった。以上のことより、イネにおいても、組織培養が育種における遺伝変異原として有効な手段となり得るとしている。Heszky *et al.* (1989)は、薬培養によって得られた半数体の組織をさらに培養し再分化させ、倍加個体を得ることにより、培養による突然変異を積極的に誘発し、その固定化をはかった。そして、この方法をPollen haploid somaclone method (PHS-method)と名付けた。このほかこれまでイネにおけるsomaclonal variationの報告は数多くある (Oono 1985, Ogura *et al.* 1987, George *et al.* 1989, Abdullah *et al.* 1989, Zheng *et*

al. 1989, Vajrabhaya *et al.* 1989, Adkins *et al.* 1990)。

しかし、培養中に自発的に発生する体細胞変異だけでは、必ずしも十分な変異幅を得ることはできず、変異幅を拡大し有用な変異を捕捉する確率をより高める為に、培養細胞に対する突然変異誘発原の処理が試みられてきた。また、この方法には以下の利点がある。(1) 個体あるいは種子に対して適用できない紫外線や一部の化学物質も、培養細胞系では有効な変異誘発原として利用できる。(2) 細胞レベルの突然変異誘発原利用は突然変異のキメラ性を解消する。(3) 1つのシャーレで数百万個の細胞に1度に変異原を処理し、スクリーニングを可能とする。(4) 半数体培養細胞において、突然変異を誘発した場合、それが劣性形質であっても処理当代で検出され、倍加により変異体の固定が容易である。

植物培養細胞で誘発原処理による突然変異誘発をはじめて報告したのはEriksson (1967)である。彼は、紫外線照射のハプロハプス培養細胞から核型が変化し、アントシアンを多く生産する安定な突然変異体を見いだした。その後、多くの研究者により培養系への突然変異誘発剤や放射線の利用がなされてきた(Weber and Lark 1980, Nielsen *et al.* 1985)。Wang *et al.* (1988)によると、トウモロコシ培養系を用いて、培養細胞にX線を10Gy照射することにより得られた再分化個体の86%が突然変異個体となった。イネについては、木下ら (1989)が培養中の葍およびカルスにガンマ線照射を行い、突然変異率を高める結果を得ている。

育種の見地からは、単に遺伝変異を拡大するだけでなく、実用的形質が有用な方向に変異することが最も重要である。しかし、これまでにSomaclonal variationについて、その突然変異誘発原との組

合せ利用による有用変異作出の報告はない。

培養系への突然変異誘発原の処理時期に関して、これまで置床前の植物組織、あるいは誘導したカルスおよび培養細胞について多く行われてきた。突然変異誘発原の処理時期の決定は、使用した突然変異誘発原の処理方法や、誘発後の突然変異選抜法によるところが大きい。しかし、培養細胞は脱分化から再分化という急激な変化をしており、その各段階で誘発原の処理効果に差があることが予想される。そのためSomaclonal variationとの組合せ効果も処理時期により異なったものとなることが期待できる。

したがって、本研究は突然変異誘発原のイネ培養系への処理時期と、その効果を明らかにすることを目的に、処理法が比較的簡便で、処理時期を制限されないガンマ線を突然変異誘発原とし、その処理が脱分化および再分化に与える影響と、再分化個体にみられる変異について調査を行った。そして、イネ培養系への放射線処理による突然変異の効率的な誘発法を確立するための基礎的情報を得ることを目的として、その効率的な照射時期や照射線量について検討を行った。

第1節 緒言

Bergonie and Tribondeau (1906)は動物の生殖組織にガンマ線を照射し、『放射線に対する細胞の感受性は、増殖能力の程度に比例し、分化の程度に反比例する』という仮説をたてた。これはすべての種類の組織に適用されるものとして、BergonieとTribondeauの法則として知られている。この法則の「分化」とは、細胞分裂と細胞分化とが順序をおって進んでいる組織についてのべたものであり、細胞の分裂と分化が必ずしも一致しない培養過程においては、この法則はあてはまらないであろう。

植物組織の培養過程においては、培養細胞はその分化の状態から、既分化細胞（培養前の組織）、脱分化細胞（カルス）、再分化細胞（再分化個体）の3つに分けられ、これらは、脱分化および再分化という急激な変化によりはっきりと区分される。しかし、培養細胞においても、分化の程度と増殖能力の程度が、放射線感受性に影響を与えることが報告されている。カルスの分裂活性はその生長率と相関するが (Devreux and Scaracia 1964)、Balito *et al.* (1989) はタバコのカルスの継代培養において、その生長率が低い時期（培養7日目）と高まり始める時期（培養10日目）にガンマ線照射を行い、10日目照射においてより感受性となった。長谷川 (1993)は、ペチュニアの同一遺伝子型を持つ茎切片とカルスにガンマ線を照射し、両者の放射線感受性を比較した結果、茎切片がカルスより感受性が高いことを認めた。

また、イネの種子照射において、乾燥種子と浸漬種子で放射線感

受性に差があることが示され (Matsuo *et al.* 1958)、組織レベルおよび細胞レベルでの生理的变化も、放射線感受性に影響を与える一因と考えられた。一方、培養系における脱分化と再分化が、急激な生理的变化を伴うことは既知のところであり、アイソザイム分析によっても示された (Li *et al.* 1992)。

以上のように、培養系における効率的放射線照射を検討するには、分化の程度、増殖能力および生理活性を考慮する必要がある、培養系におけるその照射時期が重要な検討事項としてあげられる。したがって、本実験は近年イネの品種育成のプログラムに組み込まれ、既に実用品種が数品種育成されている薬培養について、放射線照射の時期とその効果を明らかにすることを目的に、放射線照射が脱分化および再分化に与える影響と、再分化個体にみられる変異について調査を行った。

第2節 材料および方法

供試材料はイネ品種日本晴で、1/5000aのワグネルポットあたり4本植えとし屋外にて養成した。イネの薬培養には花粉の発育段階が1核期のものが最適であるので (大野 1975)、この時期の花粉を含む薬をもつ顕花を採取するため、その指標として葉耳間長を用いた (大野 1975)。止葉の葉耳間長約3cmの時期にあたる穂を、止葉の葉鞘に包まれたままの状態にて採取した。その後、乾燥を防ぐためサランラップで穂をくるみ、10℃の恒温室において下端部を蒸留水につけ、約10日の低温処理後薬培養を行った。カルス誘導培地としては、N₆培地 (Chu 1978) を基本とし、Sucrose 30g/l, 植物ホルモンとして2,4-Dを2mg/l加え、HClまたはKOHを用いてpH5.8に調節し

た後、培地固形剤として0.8%の寒天 (INA Agar BA-30) を加え、オートクレーブにより121°Cで20分間滅菌した。その後、6 cmプラスチック滅菌シャーレに、5mlずつ無菌的に分注し固形化させた。

薬培養の手順としては、採取した穂の止葉葉鞘表面を70%エタノールで消毒し、これらの葉鞘を取り除き、穎花を緩衝液として0.1Mの KH_2PO_4 を加えた有効塩素濃度0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で15分間滅菌した後、滅菌水で3回洗浄し、薬を穎花から静かにピンセットで取り出して、培地の入ったシャーレあたり36薬を置床し、パラフィルムで密封した。花粉の発育段階を揃えるため、培養には穂の中央部の一次枝梗上の上部2穎花を除く穎花から取り出した薬を用い、花糸はできるだけ取り除くよう注意した。その後試料は1990年度の実験では23°Cに、1994年度の実験では28°Cにそれぞれ保たれた終日照明 (白色蛍光灯2500lux) 条件下で培養した。

このようにして置床後約30日目に得られたカルスを、再分化培地へ移植した。再分化培地はMS培地 (Murashige and Skoog 1962) を基本とし、Sucrose 60g/l, 植物ホルモンとしてNAA 0.2mg/l, Kinetin 4mg/lを加え、カルス誘導培地と同様にpH5.8に調整した後、0.8%の寒天 (INA Agar BA-30) とともに培養ビンに40mlずつ分注し、アルミホイルで密閉後、オートクレーブにより121°Cで20分間滅菌した。滅菌終了後直ちに培養ビンの底に沈澱した寒天を攪伴し、その後静置して固形化させた。カルスの移植は、各培養ビンにそれぞれ5個ずつ置床し、あらかじめ滅菌した透明フィルムOP20 (大昭和製紙) でふたをし、パラフィルムで密封した。また置床に際し、1個の薬から生じたカルスを分離することなく、1個のカルスとした。その後培養ビンは28°Cに保たれた終日照明 (白色蛍光灯 2500lux)

条件下で培養した。

1990年度に行った約培養において得られた再分化個体は、順化、鉢上げを行い、ガラス室内での冬期栽培を経て、1991年度の春に屋外にて栽培を行った。以下にその手順を示す。

順化は、滅菌した土壌を用いて行った。まずパーミキュライトとピートモスを1:1に混合した用土を培養ビンに高さ約1/4まで詰め、その表面が浸る程度まで蒸留水を加えた後に、再分化培地と同様にアルミホイルで密閉し滅菌を行った。次に再分化培地上で草丈が6cmから8cmに生長した再分化個体を、この滅菌土壌に各培養ビンに1個体ずつ無菌的に移植しOP20でふたをした。この際、再分化個体に付着した寒天は、その後かびの発生の原因となるため、滅菌水でよく洗い流した。移植後培養ビンは、28℃に保たれた終日照明条件下に静置した。根が活着し草丈が伸びて、OP20のふたがその生長を妨げるようになる頃、ふたを取り外し、その約1週間後に鉢上げを行った。鉢上げは、30cm×60cm×15cmのバンケースに土を詰めて行った。各バンケースあたり縦12列横15列の計180個体植え出し、冬期最低温度が15℃に保たれたガラス室内で栽培した。

冬期栽培した再分化個体(R₁)は出穂したものについてのみ、その主稈の稈長、穂長および穎花長の測定を行った。穎花長は無作為にとった10個の穎花の平均であり、芒があるものについては芒を切除した。再分化個体は冬期栽培のため自然倍加したものでも不稔が多かった。そのため測定終了後、再分化個体は地上部約5cmを残して刈り取り、屋外にて養成した(1991年5月)。その後切株から発生してきた分けつを、1切株あたり2~4個体に株分けし、1/5000aワグネルポットに1ポットあたり3~4本植えて移植し、屋外栽培を行っ

た(1991年7月)。これら株分け個体について、種子が稔実したものであるについては再分化個体別系統ごとに採種し、名古屋大学附属農場の水田において、後代(R_2)に出現する変異体の調査を行った。

薬培養によるカルス誘導過程の観察のため、1994年度に行った薬培養について組織切片を作成した。まず、カルス誘導培地に置床した薬を、それぞれ置床後経時的にFAA(エタノール90%、酢酸5%、ホルマリン5%の混合液)で固定し、組織切片作成用の試料とした。組織切片作成の手順として、まず、FAAで固定した材料を、アセトンシリーズで脱水し、酸化プロピレンで置換することにより樹脂への置換を容易にした。次に、GMA(2-Hydroxyethyl Methacrylate)、BMA(n-Butyl Methacrylate)、BE(Ethylene Glycol Mono-n-butyl-ether)、PEG400(Polyethylene Glycol 400)をそれぞれ75:10:10:5の割合で作成した樹脂に、重合促進剤としてBPO(Benzoyl Peroxide)を0.7%加え、これに試料を誘導し、さらに重合開始剤としてn,n,-dimethylanilineを加え包埋した。ロータリーミクロトームで5 μ mの切片を作成し、トルイジンブルーで染色後、オイキットで封入し、光学顕微鏡下で観察を行った。

ガンマ線の照射は、名古屋大学工学部の ^{60}Co ガンマ線照射室にて行い、線量率は2 Gy/minとした。本研究において薬培養はその分化の状態から培養直前期、脱分化期および再分化期の3つのステージに分けることができ、それぞれカルス誘導培地置床直前の薬、カルス誘導培地置床薬および再分化培地に置床された誘導カルスに相当する。1990年度の薬培養においては、脱分化期および再分化期に当たるカルス誘導培地置床7日後の薬ならびに再分化培地置床1日後のカルスに、それぞれ20, 40, 80, 160Gy照射した。1994年度の薬培

養においては、培養直前期、脱分化期および再分化期にそれぞれ照射を行った。培養直前期照射は低温処理を行った薬と行わなかった薬の培養直前にそれぞれ5, 10, 15, 20Gy照射した。脱分化期照射はカルス誘導培地置床2日後の薬に20, 40, 60, 80Gy、置床7日後の薬に40, 80, 120, 160Gy照射した。再分化期照射は再分化培地置床2日後および7日後の置床カルスに、それぞれ10, 20, 40Gy照射した。培養直前期照射は薬を含む穎花を止葉の葉鞘越しに、脱分化期照射はプラスチック製シャーレ越しに、再分化期照射ではガラス製の培養ビン越しに行った。

カルス形成率の測定は、カルス誘導培地に薬を置床して30日後、再分化率の測定は、カルスを再分化培地に置床して30日後に行った。カルス形成率および再分化率は以下の式から求めた。

$$\text{カルス形成率(\%)} = (\text{カルスを誘導した薬数} / \text{全置床薬数}) \times 100$$

$$\text{再分化率(\%)} = (\text{再分化したカルス数} / \text{全置床カルス数}) \times 100$$

第3節 結果

1994年度に行った薬培養では、ガンマ線がカルス誘導や再分化に与える影響は、それぞれ照射時期により異なった (Table 1)。薬培養には低温前処理は不可欠で、低温前処理を行わなかった区では、カルス形成率は極端に低かった。カルス形成率 (Fig. 2) および緑色植物体再分化率 (Fig. 3) に与える影響を照射時期別に、無照射区の再分化率を100として示した。ガンマ線照射はカルス誘導を促進することなく、どの区も一様に線量の増加に伴ってカルス形成率は低下した。しかし、その放射線感受性は培養直前期照射と脱分化期2日目および7日目照射で異なり、カルス形成率半減線量 (RD₅₀)

はそれぞれ約10Gy、50Gy、および160Gy以上であった (Fig. 2)。再分化に関して、緑色植物体の再分化は、培養直前期照射と再分化期2日目および7日目照射で線量の増加に伴った低下が確認されたが、脱分化期2日目および7日目照射ではそのような効果は確認できなかった。緑色植物体再分化率半減線量 (RD₅₀) は、培養直前期照射で最も低く、その値は約8Gyであった。再分化期照射では2日目照射で約20Gy、7日目照射で約25Gyであった (Fig. 3)。アルビノの再分化率は、緑色植物体のそれにほぼ対応しており、緑色植物体の再分化率が高ければアルビノの再分化率も高く、低ければ低かった。しかし、根の再分化は全く異なった傾向を示し、脱分化期7日目照射と再分化期2日目照射で、根の再分化率の増加が確認された。

本実験においては、1つの葯から得られたカルスを、1つのカルスとしてまとめて再分化培地に置床した。そのため、カルス形成率に再分化率を乗じることで、置床葯あたりの緑色植物体獲得効率が求められた。この値を本論文ではPlating anther efficiency (PAE)と定義し、Fig. 4に各照射時期別のPAEを無照射区のそれを100として示した。尚この場合、脱分化期照射は再分化に影響を与えないものとして、また、再分化期照射はカルス形成率に影響を与えないものとしてPAEを算出した。PAEについて放射線感受性が高い時期から順に、培養直前期照射、再分化期照射そして脱分化期照射であった。再分化期照射においては7日目より2日目照射で、脱分化期照射においても7日目より2日目照射で感受性が高かった。

1990年度に行った葯培養についても、照射時期は少ないが、1994年度に行った葯培養とほぼ同様の結果を得た (Table 2)。ただ、脱分化期7日目の照射で、1994年度ではみられなかったカルス形成率

の低下が、1990年度において確認された。これは、脱分化期の培養温度が1994年度においては28℃だったのに対し、1990年度では23℃と低かったため、カルス誘導の培養ステージが遅れたためと思われる。Fig. 5に1990年度におけるPAEの値を無照射区を100として示した。再分化期照射と脱分化期照射で、その感受性の差は1994年度ほど顕著ではなかったが、再分化期照射で感受性がやや高かった。それぞれのPAE半減線量は、脱分化期照射で約60Gy、再分化期照射で約40Gyであった。

Fig. 6は、1990年度薬培養の無照射区と再分化期照射区において得られた再分化個体（以下、R₁）の、穎花長、稈長+穂長（以下、草丈）および穂長の頻度分布を示す。それぞれの個体数は無照射区で386個体、再分化期照射区で20Gy照射43個体、40Gy照射26個体、80Gy照射8個体の計77個体である。無照射区において、草丈および穂長では、明らかに半数体と二倍体からなると推定される二つの集団が形成されたが、互いの集団が重なり合い連続的分布を示したため、半数体と二倍体をはっきりと二分することはできなかった。しかし、穎花長の測定においては、最頻値を4.8~5.0mmと7.2~7.4mmにもつ大きな二つの集団と、その上方に小さな集団が形成された。それぞれの集団について、任意にとった個体の根端の染色体観察をSuzuki *et al.* (1991)の方法に従い行ったところ (Fig. 7)、それぞれの集団が半数体 ($2n=x=12$)、二倍体 ($2n=2x=24$)、三倍体 ($2n=3x=36$) からなることが確認できた。同様な実験を再分化培地置床1日後にガンマ線照射をして得られた77個体についても行った。草丈および穂長では、照射による生理障害を受け、その頻度分布にゆがみを生じた。また、その程度は二倍体より半数体で大きかった。しか

し穎花長においてはそのような影響はほとんどみられず、安定的な倍数性の同定が可能であった。以上のことより、イネ葯培養再分化個体当代の倍数性の同定法として、その簡便さと安定性から穎花長測定が有効であった。

以降の形質調査は穎花長により倍数性を判断し、半数体と二倍体の倍数性別に行った結果を示す。Fig. 8にR₁の脱分化期照射区および再分化期照射区の草丈の頻度分布を、各照射線量別に示す。また、その個体数、平均値、標準偏差を示し、無照射区に対する各照射区の平均値および分散の有意差検定を行った結果をTable 3にまとめた。最頻値および平均値の値は、半数体において明らかに下方へと移行しており、その線量効果も確認できた。この下方への移行は、再分化期照射区においてより顕著であり、脱分化期照射区においては80 Gy照射区においてのみ確認できた。しかし、二倍体においてはそのような下方への移行は認められなかった。分散については、脱分化期照射区において半数体、二倍体ともに、20 Gy照射によって標準偏差は小さくなったが、その後線量の増加にともなって大きくなった。

R₂世代における変異調査は、再分化個体別系統で行ったが、同一カルス由来の再分化個体は、同じ変異を示すことが多かったので、由来カルス別系統で調査結果をまとめた。由来カルス別系統数で、無照射区29系統、脱分化期照射区15系統（20 Gy-6系統、40 Gy-6系統、80 Gy-3系統）、再分化期照射6系統（20 Gy-5系統、40 Gy-1系統）について調査を行ない、半不稔、短稈、葉緑変異などの変異を示す系統が各照射区それぞれ3系統、6系統、4系統得られた。なかにはひとつの系統内に、由来が異なる複数の変異を保持した系統もあった。

カルス誘導過程についての顕微鏡観察結果をFig. 9にまとめた。

培養開始時の葯は1核期の小胞子を含んでおり、その中でも、液胞の形成により核が小胞子の縁に押し込まれた1核期中期のものが存在した (Fig. 9a)。培養2日目では、多くの小胞子で液胞がさらに発達していた。しかし一部の小胞子では、核分裂により既に2つの細胞を保持しており (Fig. 9b)、培養3日目においてさらに数個の細胞に分裂していた (Fig. 9c)。培養7日目ではさらに小胞子内部の多細胞化が進み (Fig. 9d)、13日目には、小胞子全体に多数の細胞が拡がり、小胞子は球形を保つものの、増殖する細胞に外壁が押しされ、直径が通常の約1.5倍にまでなった (Fig. 9e)。培養16日目には、ついに小胞子の外壁は破れ、増殖する細胞は葯胞内に飛び出した (Fig. 9f)。培養20日目、葯胞内に飛び出した細胞はその後、不定方向に増殖を続け、さらに葯胞内でそれ以上生育できなくなると、葯壁を突き破り葯外へと増殖を続けた。この時点で初めて肉眼でカルスの形成が確認できた (Fig. 9g)。

第4節 考察

組織培養系における放射線照射の効果については多くの報告があり (Krumbiegel 1979, Ukai 1988, Moustafa *et al.* 1989)、そのほとんどが放射線の増加にともなったカルス生長の抑制および再分化能の消失を報告している。このような再分化能消失における感受性は、カルス生長抑制における感受性に比べて大きいという結果が得られている (Tomaszewski *et al.* 1988)。一方、放射線の低線量照射がカルス生長を促進させることや (Bajaj *et al.* 1970)、再分化を誘起させること (Degani and Pickholz 1973, Spiegel-Roy and Kochba 1973, Hell *et al.* 1978) もまた報告されており、以上

のような放射線とカルス生長および再分化能との関係は、主にその形態形成過程における内生ホルモンや酵素の変異に原因があるとされている (Gorden *et al.* 1971, Degani 1975, Hell 1983)。

薬培養において、MacDonald *et al.* (1988)は低線量のガンマ線が培養効率向上のため利用できることを報告した。Ling *et al.* (1991)は小麦の薬培養において、低温前処理を行わなかった薬に低線量のガンマ線を照射することで、低温前処理以上の薬反応を誘起した。本実験におけるどのような照射も、薬反応を誘起し、カルス形成率を向上させるということはなかった。薬培養に関する上記2つの報告は、どちらもその薬培養は胚様体を誘導する培養系であったが、本実験の薬培養はカルスを誘導する培養系であり、薬反応に要求されるホルモン組成が異なることが予想された。このため、本実験において薬反応促進効果が得られなかったのかもしれない。

イネの薬培養によるカルス形成過程の観察は、1段階法では、Tsay *et al.* (1986)や渥美 (1989)によって、2段階法では大野 (1975)や岸川ら (1980)によって行われているが、本実験でも同様の結果を得ることができた。すなわち、培養2日目、小胞子内の核は既に分裂し、培養7日目においては多細胞化していた。培養開始時の薬は一核期の小胞子を含んでいた。培養直前期照射と脱分化期2日目および7日目照射で、その照射効果が異なるのは、照射された小胞子が含む核数の違いによるものと思われる。照射された核のうち、それほど障害を受けなかった核が生き残り、分裂をつづけカルス化するので、照射された小胞子が保持する核数が多ければ多いほど、その小胞子が照射の障害から逃れカルス化する確率が高くなる。それ故、培養直前期の薬が、カルス誘導に関して放射線感受性が最

も高く、次いで脱分化期2日目の莖、そして最後に小胞子が既に多細胞化した脱分化期7日目の莖となったものと思われる。このような補償効果は、カルス化だけでなく、カルスの再分化能に関しても適用され得るものであった。つまり、カルス化と同様に再分化に関しても、放射線障害をそれほど受けなかった細胞が再分化能を保持し、再分化するものと思われ、そのため、照射された小胞子が持つ核数が多ければ多いほど、再分化阻害効果から逃れる確率が高まり、結果的に再分化能を維持する確率が高くなると思われる。培養直前期照射でみられた再分化阻害効果が、脱分化期2日目および7日目照射において認められなかったのは、この補償効果によるものであろう。

Grandbastien *et al.* (1985)は、放射線照射効果を減じさせる機能について、障害が比較的少ない細胞による補償作用だけでなく、障害を受けた細胞自体の回復機能のようなものの存在を示唆した。しかし、本実験における結果から、そのような機能をはっきりと説明することは出来なかった。

再分化期における2日目および7日目照射で、再分化に与える影響に質的な差があり、その差は根の再分化にはっきりとみることができた。再分化期2日目照射は根の再分化を促進させた。この促進効果は、脱分化期7日目照射でもみられた現象であるが、これは主に、照射によって内生ホルモンバランスが影響を受けたためと思われる (Gorden *et al.* 1971, Miura *et al.* 1974, Ussuf and Nair 1974)。しかし、再分化期7日目照射は逆に、根の再分化に抑制的にはたらいだ。これらの結果および再分化の前兆とされるグリーンスポットの形成が、再分化培地置床7日目あたりから認められるこ

とから、以下の結論が導かれた。再分化期2日目照射では、カルスの再分化能（内生ホルモンバランスなど）に影響を与え、再分化期7日目照射では再分化過程に直接障害を与え、結果的に両照射区とも緑色植物体再分化阻害効果を示したものと思われた。

薬培養による再生個体には多くの自然倍加個体が得られるが、その倍数性の決定には穎花長が最適であった。一般にイネの倍数性の同定は、稔性、稈長、粒長、芒などの形態的特徴の総合評価で行われる（Nishi and Mitsuoka 1969）。しかし、カルスから再分化した植物体においては、この総合評価がSomaclonal variation（Larkin and Scowcroft 1981）や、Epigenetic variation（Binns 1981, Meins 1983）によって乱され、その同定を難しくしている。特に、本実験のように、放射線障害がみられる場合はなおさらのことである。

倍数性の同定に最も頻繁に用いられる稔性について、半数体、二倍体、三倍体はそれぞれ不稔性、完全稔性、半不稔性を示すが、本実験における再分化個体は、冬期温室栽培のせいもありほとんどの個体が不稔となり、稔性による同定は不可能であった。稈長や穂長では変異が大きく発現し、頻度分布が重なりあってしまい、倍数性の同定には適さなかった。

しかし、穎花長はこれらの変異の影響を受けにくく、半数体と二倍体のあいだで頻度分布が重なりあわず、穎花長による倍数性の同定が可能であった。これは穎花長が、その多くを‘Genotype’よりはむしろ‘Nucleotype’によっている形質であることを示している。‘Nucleotype’とは、Bennett（1971）により定義された用語であるが、DNAの情報的内容（Genotype）とは独立して、形質の発現に影響

を与える核の状態のことをいい、倍数性やDNA量などがそれに当たる。

De Klerk (1990)は、Somaclonal variationを研究していくうえで、変異の程度を再分化当代において容易に測定する方法が不可欠であり、その方法に再分化当代の量的形質の標準偏差の比較が適していると報告した。また、実験的にその適用性を示した (De Klerk *et al.* 1990)。これは、再分化当代には生理障害や環境変異が、Somaclonal variationに加えて発現されるが、それらはある方向性をもって発現される可能性が懸念されるからである。しかし、Somaclonal variationにはそのような方向性がなく、あらゆる方向に無作為に発現される。このため、標準偏差の大きさがSomaclonal variationの程度を表しているとするものである。本実験においても再分化当代においてSomaclonal variationの程度を比較するため、草丈の標準偏差および平均値の比較を、半数体と二倍体で別々に行った。平均値の比較は、De Klerk (1990)の理論からは、生理障害や環境変異を比較することになる。本実験の草丈による比較では、R₁において半数体においてのみ、照射線量にともなった下降が確認された。これは、放射線による生理障害が、放射線の照射量に比例し、二倍体よりも半数体が生理障害を受けやすいことを示している。培養細胞において、半数性細胞が二倍性細胞より放射線感受性が高いことについては多くの報告がある (Galun and Raveh 1975, Krumbiegel 1979, Nielsen *et al.* 1985)。

また、脱分化期照射と再分化期照射で、草丈の下降は再分化期照射で顕著であった。これは、PAE半減線量がそれぞれ約60Gyと約40Gyであることを考慮しても、脱分化期照射より再分化期照射で生理障害が大きいことを示すものである。

標準偏差の比較は分散を比較することで行った。脱分化期照射において、無照射区の標準偏差が大きく、低線量照射で小さくなり、その後再び照射線量に比例し大きくなっている。これは低線量の放射線照射が何らかの淘汰圧となって、標準偏差を小さくしている可能性がある。胚様体培養系からの再分化個体において、Somaclonal variationの発現程度が小さい理由の1つに、カルスから直接芽が形成される過程より、胚様体が形成される過程のほうがより複雑であり、そのため、培養細胞にみられる変異がその過程で淘汰されることがあげられている (Swedlund and Vasil 1985)。培養系における脱分化期低線量照射にも、同様の淘汰効果があり、Somaclonal variationの発現を抑えているのかもしれない。

R₂世代において選抜された変異体は、後代検定により安定した遺伝性を示した。調査系統数が少なく、線量も異なるので、照射時期による変異誘発効果を比較することはできないが、変異誘発効果は脱分化期照射および再分化期照射ともに、明らかに認められた。

本実験において、照射時期により、脱分化および再分化に与える影響が異なり、再分化個体に与える生理障害にも差があることが認められた。これらの結果は、突然変異誘発効果も照射時期によって異なることを、十分期待させるものであった。

第1節 緒言

植物の生体組織からカルスを経由せずに、直接多芽体を形成させることは、遺伝的に均一なクローンを素早く大量に生産することを可能にした。それ故、多芽体誘導培養は有用形質を持つが、生殖過程を通じてその遺伝的均一性が保てない材料（栄養繁殖植物、ハイブリッド品種など）の大量増殖を主な目的に、多くの植物種でその培養系が確立されてきた。

カルスを経由せず多芽体を誘導する培養系は大きく2つに分類することができる。既存の芽を持つ組織を培養し腋芽を誘導する系と、既存の芽を持たない組織を培養し不定芽を誘導する系で、前者の例として茎頂培養 (Murashige *et al.* 1972, Earle and Langhans 1974)、後者の例として葉および胚軸培養 (Agrawal *et al.* 1989) や葉柄培養 (Detrez *et al.* 1988) などがあげられる。また、これらカルスを経由せず得られた再分化個体が、カルスを経由する場合と比較して、遺伝的に安定であり、Somaclonal variationを発現しにくいことが既に報告されている (Rietveld *et al.* 1991, Arene *et al.* 1993, Ostry *et al.* 1994)。

イネについては坂 (1990) が、高サイトカイニン培地で容易に多芽体が誘導されることを報告している。その中で坂は多芽体の発生部位について、「多芽体は鞘葉節あるいはその上位節の基部より発生、分化する」とのみ報告し、多芽体が腋芽由来なのか不定芽由来なのか、その詳細な調査は行われていない。もし、カルスを経由せず不定芽が分化してくるのであれば、放射線照射について、同じ再

分化期照射でも、カルスからの不定芽再分化と放射線照射に対する反応性を異にすることが予想される。

したがって本実験は、再分化期照射のひとつとして、イネ多芽体培養への放射線照射の影響を検討する目的で、多芽体の誘導過程を組織学的観察により行ない、多芽体の由来組織の同定と分化時期を明らかにし、放射線照射時期および線量の検討を行った。

第2節 材料および方法

供試品種はイネ品種日本晴である。脱穎した種子を70%エタノールに60秒間浸漬し、さらに緩衝液として0.1Mの KH_2PO_4 を加えた有効塩素濃度0.5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液で20分間表面殺菌した後、滅菌水で3回洗浄した。滅菌した種子は、各培養ビンに40mlずつ分注した多芽体誘導培地に6粒ずつ置床した。多芽体誘導培地はMS培地 (Murashige and Skoog 1962) を基本培地とし、Sucrose 30g/l, 2,4-D 0.02mg/l, 6-benzylaminopurine (6BA) 40mg/lを加え、HClまたはKOHを用いてpH5.8に調節した後に、培地固形剤として2.5g/lのGelrite (Kelco Division of Merck & Co., Inc.) を加え固形化させた。培養は28°Cに保たれた終日照明 (白色蛍光灯2500lux) 条件のもとで行った。

置床した種子の培地上での発芽後の主茎基部を、培養後経時的にFAA (70%エタノール: 酢酸: ホルマリン=90:5:5) で固定し、組織切片作成用の試料とした。組織切片作成は常法に従い、固定した試料をアルコールシリーズで脱水し、酸化プロピレンに置換後、パラフィンに誘導、包埋した。ロータリーマイクロトームで5 μm の切片を作成し、Delafieldのヘマトキシリンで染色後、光学顕微鏡下で

多芽体誘導過程の観察を行った。またこの際、対照区としてホルモンフリー培地を用いた。

培養8週間後、誘導された多芽体を誘導培地から6BAを除いた発根培地に移植した。発根した多芽体は順化後、個々の芽に分割し、鉢上げを行った。順化、鉢上げは薬培養(第2章)と同じ手法を用いた。各々の鉢上げ個体(R_1)より採種し、後代(R_2)における葉緑素突然変異発生頻度の調査を行った。

ガンマ線の照射は、薬培養における照射(第2章)と同様の手法で行った。種子置床2日目にガラス製の培養ビン越しに30Gy, 40Gy, 50Gy, 60Gy照射した。多芽体形成の調査は、主稈以外の不規則な芽が1本でも確認されれば、多芽体を誘導したものとし、培養後日を追って調査し、以下の式から多芽体形成率を求めた。

$$\text{多芽体形成率(\%)} = (\text{多芽体誘導種子数} / \text{全置床種子数}) \times 100$$

第3節 結果

多芽体誘導培地に置床された種子は、その後発芽し芽を伸ばすが、種子根の発根は著しく抑制された。多芽体は、早いものでは置床7日後、遅いものでも約4週間後までに主稈の基部より分化した。培養初期に分化する多芽体について、約1週間後に最初の芽が主稈基部の第1葉側より分化し(Fig. 10a)、その後まもなくその周囲から複数の芽が分化した(Fig. 10b)。多芽体は培養4週間目ぐらいまでに形成され(Fig. 10c)、その後主稈は伸長を停止し枯死した。発根は培養期間中著しく抑制されたが、誘導培地より6BAを除いた発根培地に移植することにより、容易に発根させることができた。培養後6週間、多芽体は発根培地に移植するに十分な大きさにまで生

長した (Fig. 10d)。

培養 2 日目、置床された種子は発芽したが、その芽に組織学的変化は観察されなかった。培養 3 日目、最初の変化が観察された。第 1 葉の背軸側基部の表皮第 1 層および第 2 層に分裂活性の高い部位が認められた (Fig. 11a)。高い分裂活性を示す高染色性の細胞は細胞分裂を繰り返し、meristemoid 様突起構造 (Torrey 1966) を形成した (Fig. 11b)。培養 3 日目までにはその突起構造物は組織化され Meristematic dome となった (Fig. 11c)。その後、この Meristematic dome は葉原基をもつ芽原基へと発達していった (Fig. 11d)。

新しく誘導された芽原基は、第 1 葉節の分けつ原基が分化するのと同じ側に誘導されていた (Fig. 12)。また、この鞘葉節に誘導される芽原基の発生部位は常に決まっており、第 1 葉基部の背軸側に 2 カ所、ちょうどその 2 カ所で第 1 葉節の分けつ芽を挟む位置に分化した (Fig. 13)。しかし、必ずしもこの 2 カ所から同時に分化するというのではなく、どちらか一方のみあるいは全く分化しないという場合もあった。培養 5 日までの観察から、この部位にひとつでも芽を分化する頻度は、136 試料中 20 (14.7%) であった。

培養 8 日目、第 1 葉節の分けつ原基が著しく発達し、第 1 葉を圧迫していたが (Fig. 14a)、ホルモンフリーの対照区ではそれほど発達していなかった (Fig. 14b)。この著しく発達した第 1 葉節の分けつ芽は、その後も発達を続け、培養 2 週間後第 1 葉を打ち破り外に出てきていた (Fig. 15a)。またこのとき、同じ試料 (Fig. 15a) の下部において、別の芽が第 1 葉の基部より分化していた (Fig. 15b)。

培養10日目までに分化し外に現れ、その分化が培養ビンの外からでも確認できる芽は、そのほとんどが第1葉の基部より分化する芽であり、10日目以降に外に現れる芽は第1葉節あるいは稀にその上位節の分けつ芽（腋芽）であった。

培養後期、分けつ芽（腋芽）由来の芽において、茎頂は2つの葉原基に挟まれていたが、左の葉原基の基部に高い分裂活性を示す二次芽の原基が分化し、その多芽体化が進行していた（Fig. 16a）。また同様に、第1葉基部より分化する芽についても、培養後期においてはその葉原基の基部に二次芽を多数分化し、多芽体化が進行していた（Fig. 16b）。

多芽体はその後、順化、鉢上げが行なわれ、54種子より408個体（ R_1 世代）が得られた。この個体別に R_2 世代408系統を育成し、その葉緑素突然変異の調査を行ったが、変異系統は1系統も得られなかった。

ガンマ線の照射は培養2日目に行ない、日を追って多芽体の形成率を調査した（Fig. 18）。その結果、ガンマ線照射により、明らかに多芽体の形成が促進された。その効果は60Gy照射で最も大きく、培養初期に著しい促進効果を示した。培養18日目には、60Gy照射区でほぼ多芽体の形成は頭打ちとなった。また、主稈の成長がガンマ線により抑制されたものほど、多芽体の形成が促進されるようであった。主稈が発芽直後に枯死してしまうような場合でも、枯死芽の上部あるいは基部より、多芽体の形成が認められるものが多数あった（Fig. 19）。

第4節 考察

第1葉基部より新しく分化する芽原基は、形態的に分けつ原基と酷似していた (Fig. 11)。しかし、この新しく誘導された芽原基は、明らかに鞘葉節の分けつ原基とは異なっていた。

山崎 (1960) は、水稻の分けつ芽の発生過程の組織学的な観察を行い、イネの鞘葉節の分けつ原基は、第1葉節の分けつ原基の反対側に、種子の胚に既に分化しているが、発芽後消失してしまうことを認めた。また、分けつ芽が発生する際、まず内部の細胞がペリクリナルな分裂を繰り返し、放射状に配列し隆起してくることを観察し、この特有の内部細胞の配列によって、分けつの発生が容易に確認できるとした。

本実験で新しく誘導された芽原基は、第1葉節の分けつ原基と同じ側に分化していた (Fig. 12)。また、その発生初期において、分けつ芽に特有の放射状の内部細胞の配列は認められず、新しく誘導された芽原基は、表皮組織細胞第1層と第2層に由来しているものと思われた。これらの結果は、新しく誘導された芽原基が分けつ原基ではないことを示している。また、鞘葉節は第1葉基部背軸側に、それぞれ由来を別にする芽を誘導させる2つの固定部位を持っていた。イネについては、腋芽が葉腋に複数存在する副芽 (Accessory bud) の報告はない。

以上のことより、本実験で得られた第1葉基部より誘導される芽は、分けつ原基が由来となる腋芽ではなく、葉基部の表皮組織細胞層より誘導される不定芽であると同定した。培養後期に誘導される2次芽や3次芽が、腋芽なのか不定芽なのか断定することは出来なかったが、多芽体がこの2つのタイプの芽によって形成されることは明かであった。

高サイトカイニン濃度が頂芽優性を破り、腋芽の発生が促進されたことは明かであった。不定芽の発生について、その発生部位が葉基部にあることは、他の多くの多芽体形成系においても報告されている (Abdullah and Grace 1987, Detrez *et al.* 1988, McClean and Grafton 1989)。Abdullah *et al.* (1985)は、外植片の葉腋部位にある休眠芽が由来となり、芽が分化すると報告した。これらの報告は、葉基部周辺部位が芽分化のための高い分裂活性を、潜在的に持っていることを示唆した。またその能力は、培養外植片の組織の特定部位に制限されるようであり、不定芽分化の由来組織は、葉肉柔組織細胞 (Abdullah and Grace 1987)、表皮組織細胞 (Abdullah *et al.* 1985, Agrawal *et al.* 1989)、表皮下組織細胞 (Detrez *et al.* 1988, McClean and Grafton 1989) などに限られた。本実験における不定芽の由来も、2つの固定部位の表皮組織細胞層に限られていた。

針葉樹の葉から誘導される不定芽について、Lipucci di Paola *et al.* (1987)は、維管束周辺細胞と葉基部表皮下の増殖細胞との連結を報告した。一般にイネにおいて、5本の冠根が鞘葉節より規則的に発生するが、5本のうち3本が第1葉側、2本が鞘葉側より発生する (Fig. 17)。まず最初に第1葉側3本のうちの外側2本の冠根が、ほぼ同時に辺周部維管束環に外接する柔組織細胞より分化する。これら柔組織細胞は双子葉植物にみられる形成層に類似した高い分裂活性を示している (星川 1974)。鞘葉節において、最初に分化する2つの冠根の発生部位は、本実験において誘導された2本の不定芽の発生部位とほぼ同位置にあった。冠根と不定芽の由来組織が異なるのは明かであったが、冠根の由来細胞となる辺周部維管束

環に外接する柔組織細胞の高い分裂活性が、不定芽の由来細胞となる第1葉基部表皮組織細胞層の活性を高めているのかもしれない。しかし、それを証明するデータは本実験では得られていない。

ガンマ線の照射は、不定芽が分化する直前の培養2日目に行った。いずれの照射区も、無照射区と比較して、多芽体の形成が促進され、その効果は60Gy照射区で最も高かった。また、主稈の生長が抑制されたものほど、多芽体の形成が促進されるようであった。これはおそらく、ガンマ線照射により主稈の生長点が障害を受け、補償的に腋芽の発生が促進されたためと思われる。第1葉基部の腋芽の原基も種子の胚で既に分化しているため、主稈同様ガンマ線により障害を受けることが予想された。しかし、培養2日目においては、腋芽の原基はまだ休眠状態にあり、放射線感受性が主稈ほど高くなく、あまり障害を受けず発生が促進されたのかもしれない。同様な照射を培養4～6日後に行った場合に、このような促進効果が得られるかは疑問である。

不定芽について、その発生が促進されるのかあるいは抑制されるのか、外見から腋芽と不定芽の見分けが困難なため、判断することは出来なかった。一般に、第1葉基部より発生する不定芽は、腋芽の発生より比較的早く肉眼で確認され、またその発生部位が異なることから、容易に見分けることが可能であった。しかし、ガンマ線照射により、比較的腋芽の発生が早まり、また、第1葉が正常に発生しない個体もあり、その判断が困難であった。不定芽誘導に与えるガンマ線の影響については、さらなる調査が必要である。

多芽体培養によって得られた個体は、それが不定芽由来か腋芽由来かは区別することはできなかったが、その後代の調査により、他

のカルスを経由せず得られた再分化個体における報告と同様、遺伝的に安定であった。そのため、Somaclonal variationと放射線照射による組み合わせ効果は本実験において期待できなかった。また、ガンマ線照射によって得られた不定芽および腋芽は、その由来は単一細胞由来でないため、誘発変異がキメラ状に発現することが予想された。

しかし、多芽体培養への放射線照射では以下のような効果が期待できる。培養を続けることにより、変異部位より2次芽、3次芽が発生し、キメラが解消されるものと思われる。また同様に変異セクターを大きくすることで、変異獲得率を高め、一種の切り返し効果 (Cutting back; Bauer 1957) が得られるものと期待される。

第1節 緒言

培養細胞から再分化した植物体にみられる変異には、Somaclonal variationによるもの、遺伝外の変異 (Epigenetic variation: 環境変異や生理障害など) によるもの、およびこの2つが組合わされたものがある (Binns 1981, Meins 1983)。しかし、再分化当代におけるこの2つの変異の同定は、特にEpigenetic variationの発現機構が知られていないため、ほとんど不可能である。この2つの変異の最も大きな違いは、Somaclonal variationは減数分裂を経ても保持されるが、Epigenetic variationは消失してしまうところにある。そこで、Somaclonal variationの分析を行う上で、その再分化個体後代を調査することは不可欠である。

Carver and Johnson (1989)は、コムギの再分化個体群をそれぞれ、用いた親品種のgenotype、由来培養胚別系統、再分化個体別系統、再分化個体穂別系統別に量的形質を調査し、その分散分析による有意差検定を行うことで、培養過程のどの時期に変異が誘発されるかを調査した。その結果、変異は用いた親品種の影響を強く受け、また培養胚由来の変異は確認されなかった。Somaclonal variationを研究する上で、培養過程のどの時期に変異が誘発されるかを知るとは、その誘発機構を知る上で重要であり、ガンマ線照射の時期を検討する上でも重要である。Carver and Johnson (1989)は、系統別調査対象を量的形質とみなしたが、その分散分析を行うには多くの個体が必要であり、またその変異にはEpigenetic variationが含まれているなどの欠点がある。

Fukui (1983)は、同一カルス由来の再分化個体群について詳細な調査を行ない、同一カルス由来系統の質的形質にみられた複数の変異について、カルスが増殖するあいだに連続的に誘発される変異であることを示した。このように培養系における、置床切片、カルス、再分化個体の由来をはっきりさせ、変異を調査することは、変異の起源を探る上で、重要な情報を与えてくれるものと思われる。

本論文第2章にも記したが、本実験においても再分化個体後代(R₂)を育成し、圃場レベルでの変異調査を行った。またそれと並行して、アイソザイム分析もおこなった。アイソザイム分析は、高等生物の進化、分類、遺伝等の研究を行う上で系統、品種、遺伝子などの識別や標識となり得る有力な武器とされているが、近年、培養細胞や再分化個体の調査にしばしば用いられるようになった(Orton 1983, Kobayashi 1987)。それは、アイソザイム分析が遺伝子産物を対象とした分析であるため、再分化個体にみられる変異のうちEpigenetic variationを除いたSomaclonal variationのみを調査する上での有効な手段となり得るからである(Allicchio *et al.* 1987)。

本実験の調査から、薬培養の再分化期に20Gy照射したカルスより得られた再分化個体別系統で、複数の変異(酸性ホスファターゼ変異、短稈、濡れ葉、半不稔)を含む系統が1系統確認された。本章では、この1系統について、変異形質の調査を行ない、それぞれの変異の起源について考察を行った。

第2節 材料および方法

R₂世代の育成と、圃場での選抜については第2章第2節を参照さ

りたい。以下、並行して行ったアイソザイム分析、特に変異体が得られた酸性ホスホターゼの分析について記す。

薬培養により得られた再分化個体から採取した種子 (R_2 世代) を、再分化個体の鉢上げに用いた同様のパンケースに、縦12列横15列に播種し (1991年11月)、名古屋大学農学部の自然光育成装置 (長日条件、湿度60%、温度 明25°C 暗15°C) にて養成した。その後、葉齢6.2から6.8にまで生長した個体の第6葉を採集し、冷凍庫 (-20°C) に保存し、アイソザイム分析の為の試料とした。

葉の破碎および抽出に関しては、渡邊 (1990) の方法に準拠した。冷凍庫にて保存した葉を、個体別に約100mgずつエッペンドルフチューブに入れ、液体窒素温度 (-196°C) で葉を凍結させ、自製の破碎機 (シグナス5000) にて破碎した。破碎後、氷温に保った試料に、0.02% ポリビニルピロリドンおよび50% エチレングリコールを加えた Tris-HCl (pH6.8) 緩衝液を0.2mlと、直径4mmのガラスビーズを加え、震動機 (Microtube mixer MT-360) で強振した。破碎後は0°C、13,000rpm (1,500 xg) にて20分間遠心し、その上清を泳動のサンプルとした。

ゲルは、あらかじめ6種の保存溶液 (Table 4) を作成し、これを Table 5の組成 (渡邊 (1990) の変法) で混合し、重合させた。泳動は、Eの泳動用緩衝液を10倍希釈して用い、30mA定電流で行った。

染色は、Table 6の組成の溶液に約12時間緩やかに振盪させながら浸漬して行った。

第3節 結果

アイソザイム分析は、再分化個体由来系統数でそれぞれ無照射区

38系統、カルス誘導期照射区33系統、再分化期照射11系統について行った (Table 7)。酸性ホスファターゼのサイモグラムに明かな変異を示す系統が、1系統認められた (Fig. 20)。コントロールとして原品種の日本晴と比較して、変異体においては、第1と第2のバンドの活性が比較的高まり、第4と第5のバンドの活性が低下していた。さらにこの変異が確認できた個体と同一由来カルス (Callus No. 163) を持つ系統について調査したところ、同一カルス由来の再分化系統であっても、変異を示さない系統があった (Table 8)。また、このNo. 163系統は圃場での検定で、短稈、濡れ葉変異が分離していた。濡れ葉変異とは、通常のイネの場合葉面は水滴を弾くが、何らかの理由で葉面の親水性が大きくなり葉面が水滴を弾かなくなったものである (Fig. 21)。短稈と濡れ葉形質について、その発現が連鎖あるいは1遺伝子の多面発現かのように、2つの変異形質は常に同一個体に発現し、短稈のみ、あるいは濡れ葉のみが単独で発現する個体は、得られなかった。

アイソザイム変異については、日本晴との正逆交配により遺伝分析を行った。F₁個体は正逆どちらの組み合わせも、日本晴型のサイモグラムを示し (Fig. 20)、F₂世代では日本晴型と変異型が3:1に分離し (Table 9)、アイソザイム変異は単一劣性遺伝子支配の遺伝様式を示した。また、アイソザイム変異が他の形質に及ぼす影響を調査するため、アイソザイム変異個体No. 163-1-A-10の後代について、草丈、稈長、穂長、有効分けつ数、1穂粒数、稔実率の調査を行ない、原品種日本晴との平均値の比較 (t-検定) を行った (Table 10)。なお稔実率についてはアークサイン変換し比較を行った。その結果、稔実率についてのみ平均値の比較で5%レベルの

有意差が認められた。しかしこれは、稔実率の頻度分布 (Fig. 22) から、明らかに半不稔変異が分離しているためであった。75%を境界として稔実個体と半不稔個体を分けると、稔実 : 半不稔 = 36 : 12となり、これは、単一の劣性半不稔遺伝子をアイソザイム変異個体 No. 163-1-A-10が、ヘテロで保持していたとする期待値に一致した。

濡れ葉変異について、日本晴との正逆交配により得られた F_1 について、日本晴 × 濡れ葉、濡れ葉 × 日本晴のどちらの組み合わせも日本晴型の正常形質を示し、濡れ葉形質は正常型に対し劣性であった (Fig. 23)。また、 R_2 世代において、正常型と判断された個体の後代検定を行ったが、短稈濡れ葉変異体を分離する系統は 1 系統も得られなかった。

濡れ葉変異について、葉面が水滴を弾くか弾かないという問題は、その微細構造が深く関与しているものと考え、濡れ葉変異体の葉面構造の観察を、通常の走査型電子顕微鏡 (以下、SEM) と凍結走査型電子顕微鏡 (以下、Cryo-SEM) を用いて行った。Cryo-SEMは、SEMと異なり、試料を脱水や臨界点乾燥などの前処理をすることなしに、サンプリング直後の新鮮な試料を、液体窒素で凍結させ走査型電子顕微鏡観察を行うものである。最近、葉の表面構造などの観察においては、凍結処理の方が適しているという報告がなされた (松田ら 1994)。SEM用の試料は常法に従い、前処理 (FAA固定、アセトンシリーズ脱水、臨界点乾燥および金コーティング) を行なった。

原品種の日本晴と変異体の止葉葉身の向軸側の表面構造のSEM観察写真を Fig. 24に示す。大型乳頭状突起や小型乳頭状突起、気孔などがそれぞれ観察されたが、それら表面構造物に大きな差異は確認されなかった。ただ構造物の密度に多少差が認められたが、個々の葉

の大きさによる差異、あるいは変異体が濡れ葉形質と同時に短稈形質をも併せ持つため、その影響によるものと思われた。しかし、倍率を上げると、乳頭状突起構造上をも含めた葉面全体にわたり、原品種では細かいしわ状の構造が確認でき、ざらざらした感を受けるが、変異体においてはそのような構造は確認されず、すべすべした感があった。これは葉面のクチクラ層、特にエピクチクラワックスの構造差異によるものと思われた。

同様なことが、背軸側においても観察でき (Fig. 25)、エピクチクラワックスの構造差異が葉身の表裏全面にわたっていることが認められた。

Cryo-SEMによる観察は、第6葉葉身背軸側について行った。SEM観察と同様、突起構造に差異は認められなかった。しかし、表面全体にわたり、原品種では小さな凸凹構造が確認できる一方、変異体においては確認されなかった。倍率を高めると明らかに、この凸凹構造は通常のSEM観察においてみられたしわ状構造と同一のものであり、Cryo-SEM観察によってもエピクチクラワックスの構造に差異があることが、はっきりと認められた (Fig. 26)。また、同様の観察を、日本晴との正逆交配により得られたF₁についても行ない (Fig. 23)、日本晴×濡れ葉、濡れ葉×日本晴のどちらの組み合わせにおいても、日本晴型の表面構造を示した。また、短稈形質についても日本晴型の稈長を示した。

第4節 考察

Norman (1989)は、アイソザイム分析がSomaclonal variationに適用された場合、倍数性レベルや染色体レベルのように、多数の遺伝

子を含む変異であれば、新しいアイソザイムバンドの付加や欠失が期待できるが、1つの遺伝子だけに変異が起こったような場合は、それが直ちにバンドパターンの変異につながるとは限らないと報告した。

Orton (1983)はパセリの再分化個体において、アイソザイムパターンに変異を示した個体が核型異常個体であることを報告した。

Davies *et al.* (1986)は、同様に、アイソザイムパターンに変異を示した17個体のうち13個体が異数体で、残り4個体は染色体の一部が転座したものであることを報告した。また、Sanford *et al.* (1984)は、再分化個体について13種のアイソザイム分析を行い、変異は1つも確認されなかった。以上の報告は、Norman (1989)の報告を裏付けるものであり、アイソザイム分析で変異を検出しようとするときに直面する問題を示したものである。

本実験に用いたサンプルは、再分化個体から得られた種子由来の個体であり、穎花長の測定から二倍体であると判断した(第2章)。また、種子の稔実と、その発芽が正常なことから異数体は淘汰されていると考えてよい。

染色体の構造変異は、その変異が広範囲にわたるものであれば、複数の変異を生ずることが予想されるが、本実験で検出された酸性フォスファターゼ変異個体は、他の形質に影響を与えず、外観は正常個体と見分けがつかなかった。形態的変異とアイソザイムパターンの変異とに、相関がないことは多くの報告で述べられている(Sanford *et al.* 1984, Wang and Holl 1988, Jackson and Dale 1989)。本実験で得られたアイソザイム変異も、草丈、稈長、穂長、有効分けつ数、1穂粒数、稔実率などの農業経済上重要形質につい

て調査を行なったが、相関は得られなかった。

以上のことから、この変異体は、染色体のごく限られた部位における構造変異、あるいは遺伝子内のPoint mutation (Brettell *et al.* 1986, Ryan and Scowcroft 1987) により得られた変異体であると思われる。

アイソザイムの個々のバンドは、共優性を示すことは既知のところである。しかし、今回変異体に新しく認められたバンドパターンは、単一劣性遺伝子支配の遺伝様式を示した。これは、優性の抑制遺伝子のような、アイソザイムの発現を調節する機構（あるいは遺伝子）の存在を示唆し、変異体においてはそれが機能しなくなったものと思われる。

Allicchio *et al.* (1987)は、ジャガイモの再分化個体8個体のエステラーゼについてアイソザイム分析を行った。そのうち3個体について変異が生じ、いずれも全く同じ部位に新しいバンドが発現した。しかし、同じ突然変異が別々に3回起こるとは、考えにくいので、すべて同一の培養細胞由来の個体によるものか、あるいは環境変異などの後生的変化によるものとした。本実験の酸性フォスファターゼ変異は、変異系統とは別のカルス由来系統に認められないことから、この変異は後生的なものではないと推察される。

酸性フォスファターゼ変異個体を再分化させたカルスと同一のカルスから再分化した他の再分化個体には、変異が確認されなかった。同様な報告が、Brettell *et al.* (1986)やRyan and Scowcroft (1987)によって行われており、得られた変異が培養組織に潜在したものでないとしている。

以上のことから、この酸性フォスファターゼ変異は、脱分化期に

変異を起こし、カルス塊にキメラで変異が保持されたものか、あるいは再分化期に変異を起こし、再分化個体別に変異が保持されたものと思われた。いずれにせよ、この変異は培養あるいはガンマ線照射によって誘発されたものであることは明かであった。またこれは、短稈や濡れ葉変異にも当てはめることができるものと考えられた。

エピクチクラワックスの形成に関する変異体は、小麦などで得られ遺伝分析も行われ、多くの場合、野生種が光沢なしの優性に対し、変異体は光沢ありの劣性であり、またその場合の差異は、ワックスの量、化学組成および構造の差異に起因していることが報告された (Netting and Wettstein-Knowles 1973, Clarke *et al.* 1994)。イネの場合の濡れ葉変異体もこれらと同様、エピクチクラワックスの形成に関する変異体であることは、走査型電子顕微鏡観察から明かであった。ワックスがどう変化しているかについては、詳細な調査を待たなければならないが、水滴を弾かなくなることから、ワックスを全く形成することができない変異体であるものと推察された。

イネの濡れ葉変異体については、九州大学が多くの系統を誘発、保有しており、既に遺伝分析も行われ、その多くが単一劣性遺伝子支配であった (佐藤ら 1983)。また濡れ葉変異には、葉全面を濡らすもの、横縞状に濡らすもの、縦縞状に濡らすものの3タイプがあり、今回得られた変異体は葉全面を濡らすタイプのものであった。

イネのエピクチクラワックスの遺伝については、量的形質としてのポリジーン支配が報告された (Haque *et al.* 1992)。今回得られた変異体は、他の多くの濡れ葉変異体が単一劣性遺伝子支配であると同様に、原品種との交雑 F_1 において正常型を示した。今後の後代検定の結果を待たなければならないが、これはエピクチクラワッ

クスの質的形質としての遺伝子支配の側面を示す結果である。また、短稈形質についても交雑 F_1 において正常型を示し、濡れ葉変異と短稈変異が別々の遺伝子により支配されるのか、一遺伝子の多面発現によるものなのか、 F_2 集団の分離比の調査で明らかになるであろう。

短稈濡れ葉変異は R_3 世代の調査より、 R_2 世代において変異をヘテロで保持する系統は 1 系統もなかった。これは再分化個体 No. 163-1 が、この変異をホモでキメラ状に保持していたことを示すものか、あるいは何らかの理由でヘテロ個体が淘汰されたものと思われる。本実験においては、再分化当代の個体についての詳細な調査を欠くため、キメラ性の検定を行うことができず、その判断を下すことができなかった。イネの場合、キメラ性の検定を行うには、再分化個体 1 個体から、多くの穂別系統あるいは枝梗別系統などを育成、調査する必要がある。

もし、再分化個体 No. 163-1 が、短稈と濡れ葉の変異をホモでキメラ状に保持していたとするならば、半数性細胞のときに誘発された変異が、半数体から二倍体への倍加に伴ってホモ化されたと解釈するのが妥当であろう。またその場合、 R_3 世代に分離してきた半不稔変異は、ヘテロで保持されていたことから、倍加後に誘発された変異であると思われる。しかし、これらの変異が培養によるものなのか、あるいはガンマ線によるものなのか、情報が少なく、それを区別することはできなかった。