

本研究は、イネにおける突然変異の効率的な誘発法を確立することを目的として、イネの組織培養系への突然変異誘発原処理を試みた。組織培養過程に変異が誘発されることは既に知られており (Evans *et al.*, 1984)、これは、培養過程に突然変異誘発原を処理することで、変異の拡大を試み、その組み合わせ効果を期待したものである。突然変異誘発原としては、その処理が比較的簡便で、処理時期を制限されず、また研究蓄積が多い放射線 (^{60}Co ガンマ線) を用いた。

放射線については、その突然変異誘発効果が示されて以来、育種効率を高める手段として、主に種子照射および生体照射について、その照射法と照射効果について精力的に研究が行われた。その結果、放射線感受性が、照射対象の遺伝子型、生育相、組織部位、生理状態および環境要因によって異なることが示され、突然変異率や突然変異のスペクトラムにもこれらによる差が認められた。真島と河合 (1960) は、生育中のイネに ^{60}Co ガンマ線を、分けつ期、幼穂形成期、減数分裂期および出穂期においてそれぞれ照射し、生育時期によって突然変異の頻度および突然変異のスペクトラムに差異があることを示した。

上記のように、種子照射および生体照射において認められた、遺伝子型、生育相、組織部位、生理状態および環境要因による照射効果の差異が、培養系への照射にも認められるのだろうか？

培養環境は、培養系確立のため高度に制限されており、そのためか、培養環境が要因となる放射線感受性の差異については、まだそ

の報告の例はない。しかし、遺伝子型、組織部位および生理状態が要因となる放射線感受性の差異については、以下の報告がある。

イネの種子培養におけるインディカ品種とジャポニカ品種 (Mendoza 1992)、ペチュニアの同一遺伝子型を持つ茎切片とカルス (長谷川 1993) およびタバコカルスの継代培養における生長率の低い時期と高まり始める時期 (Balito *et al.* 1989) において、それぞれ放射線感受性が異なることが示された。これはそれぞれ培養系への放射線照射効果の遺伝子型、組織部位および生理状態による差異を示したものである。

生育相とは、一般に高等植物の場合、栄養生長期と生殖生長期の2つに分けることができるが、培養系において、これらに相当する生育相は存在しない。しかし、培養細胞の分化の状態から、培養直前期、脱分化期および再分化期の3つの培養時期に、区分することが可能である。本研究は、イネの薬培養において上記3培養時期にガンマ線を照射し、その照射効果の比較を行なった。その結果、培養時期によって明らかに放射線感受性が異なり、脱分化および再分化に与える影響に差が認められた (第2章)。これは種子照射や生体照射と同様に、培養系における放射線照射についても、その照射時期の検討が重要であり、照射時期の違いが変異誘発効果に影響を与えることを示唆するものであった。

また、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も行なった (第3章)。照射に先立ち、多芽体形成過程の組織学的観察を行ない、多芽体が腋芽である分けつ芽と、表皮組織細胞より直接分化する不定芽より形成されることを示した。腋芽の発生は、放射線照射により主稈の茎頂が障害を受け、その生長が抑制される

ことから、間接的に促進された。不定芽については、その放射線感受性を明らかにすることはできなかった。しかし、カルスからの不定芽形成と、組織細胞からの直接的な不定芽形成では、その過程に生理的差異があることは、その要求ホルモンバランスが異なることから明かであり、放射線に対する反応性も異なることが予想された。

実際の育種の場面では、変異の誘発率を高めることも重要であるが、変異の獲得率を高めることも重要である。突然変異誘発原処理に際し、変異の獲得率を低下させる要因に、正常細胞と変異細胞の競合があげられる。生体内に生じた体細胞突然変異は、突然変異細胞の発育に応じて組織細胞群を形成し、ヘテロのまま配偶子を形成して次代に突然変異個体を生じる。しかしその間、生体組織内において突然変異細胞と正常細胞との競争（個体内選択）、受精にさいしての配偶子競争（配偶子間選択）、さらに受精後の接合子の発芽、生育途中における競争（個体間選択）が行われ、突然変異獲得率を低下させている。

Bauer (1957)は、このような個体内選択を避ける1つの方法として、栄養繁殖作物における切り戻し法を提唱した。また、佐藤と大村 (1974)は、イネの胚発生初期に化学突然変異誘発原を処理することで、細胞間の競合が少なく変異セクターを大きくし、変異収率を高めることに成功した。これらの報告は、誘発突然変異の効率的な獲得のために、(1) 変異細胞の栄養繁殖的増殖による変異セクターの増加、(2) 小数始原細胞への突然変異誘発原処理による相対的変異セクターの増加、が有効であることを示しているが、培養系への放射線照射には、この2つの変異セクター増加効果が同時に期待で

きる。脱分化したカルスは、継代培養により栄養繁殖的な増殖を続けるが、培養中に誘発される変異について以下の報告がある。

Armstrong and Phillips (1988)は、培養期間が長くなると、培養によって誘発される変異が増加する一方で、変異がキメラで発現されることが少なくなると報告した。これは、培養初期において発生した変異が、培養後期において蓄積され、変異が獲得されやすくなったこと示している。放射線照射によって誘発され、培養細胞に保持された変異にも、このような蓄積効果は認められるであろう。また、再分化の過程において、その起源細胞が単一であるとの報告があり (Broertjes and Keen 1980)、単一起源細胞への照射は、再分化個体にみられるキメラの問題を解消し、変異獲得率を向上させ得ると考えられる。

本研究において利用した多芽体培養系について、再分化個体が単一細胞起源でなく、細胞群起源となることが、その組織学的観察により示された (第3章)。また、イネのカルスより誘導される不定芽が、単一細胞由来ではないことが Nakano and Maeda (1979)によって示され、薬培養によって得られる再分化個体についても、その起源が単一細胞ではなく細胞群となることが推察された。

しかし、薬培養については、培養直前期の薬は一核期の小胞子を含んでおり、薬培養によって得られる半数性カルスがそれを起源とし誘導されるので、培養直前期照射が変異セグターを最大にしキメラを解消するものと思われる。種子繁殖作物では、単細胞である花粉に照射し、突然変異を誘発させようとする方法が考えられた (Pate and Duncan 1963)。しかし、花粉照射は変異を生じた配偶子と正常な配偶子との間に受精までの過程で競合をおこす可能性があ

り、そのためかえって突然変異を減少させることも考えられる。また、変異が配偶子の一方だけに生ずるので、変異体の出現は M_3 代になる。しかしながら薬培養を利用することにより、配偶子間選択を避け、倍加により変異を照射当代(M_1)に検出することが可能であり、変異の確認のための時間的損失が少なくなるものと考えられる。

佐藤と大村(1974)によるイネの胚発生初期への化学突然変異誘発原処理も、花粉照射同様に変異体の出現は M_3 代になる。また、その処理時間が受粉後数時間と非常に限られている。本研究で利用した多芽体培養は、その不定芽は単一細胞由来ではないが、(1)多芽体化が進行するなかで、切り戻し効果が得られる、(2)変異体の出現は M_2 代であり、胚発生初期処理より1代早くなる、(3)培養系利用のためその処理時間に制限を受けない、などの利点がある。

放射線障害、特に不稔については、変異獲得率を統計的に低下させる1つの要因である。足立と蓬原(1974)は発生初期の胚にX線を照射し、その組織学的観察から、放射線障害が照射時期によって異なること示した。また、変異率向上のため、放射線照射において急照射より障害が少ない、緩照射を行なうことが試みられている(服部ら1993)。放射線障害の回復には個々の細胞の回復(Recovery)と、細胞集団の一部細胞の分裂による回復(Replacement)がある(松尾1964)。本研究では薬培養への照射で、後者の回復機能がカルス誘導と再分化に関し認められた。また、再生個体にみられた生理障害は、脱分化期照射より再分化期照射で大きかった(第2章)。多芽体培養への照射により誘発された腋芽の発生は、培養を利用しない種子照射においては、枯死してしまっていたものであろう。これは、高濃度のサイトカイニンが照射障害から腋芽の発生を回復さ

せたものであり、培養を利用することで放射線障害が回避されたものと思われる（第3章）。これらの回復細胞の一部には、当然突然変異を保有するものが存在すると考えられる。

以上のように、培養系への放射線照射は、これまで行われてきた種子照射や生体照射と比較し、その照射対象が培養状態という特殊な生理状態にあるため、放射線に対し特異的に反応することが期待される。また、その放射線感受性が培養時期、および培養法によって異なるため、変異誘発効果にもそれらによる差異があるものと思われる。

一方、培養過程を利用することにより、変異を新しく誘発するばかりでなく、(1) 変異細胞と正常細胞の競合の回避、(2) 変異セクターの拡大とキメラ解消、(3) 放射線障害からの回復、に大きな効果が期待でき、変異獲得率向上に寄与するものと思われる。

しかしこれらは、あくまでも照射当代の調査により導かれた仮説であり、その確認には、後代にみられる突然変異誘発率の調査および比較が不可欠である。またその際、照射線量を等しくすることも大切であるが、 RD_{50} や LD_{50} のように、その感受性が等しいレベルで比較する必要がある。本研究の薬培養において、その指標として *Plating anther efficiency* (PAE) を提唱した。また、第4章で行ったように、後代系統の由来をはっきりさせ、変異誘発の時期やキメラ性の検定を行なうことは、誘発変異の起源を探り、培養系における突然変異誘発原処理の効果を総合的に検討する上で重要である。

本研究において、培養系への放射線照射が、変異を誘発することは明かであった（第2章）。しかし、検定系統が少なく、培養系への照射が生体照射や種子照射に取って変わるものとなるかを示すこ

... (faint text) ...

とはできなかった。今後の研究に期待するところである。

... (faint text) ...

摘 要

イネの薬培養による Gametoclonal な変異に放射線照射を組み合わせることで、遺伝変異の拡大を試みた。突然変異誘発原利用による変異誘発効果は、処理対象の生育段階によって異なることが種子処理あるいは生体処理で知られており、このことが培養系にも当てはまると考え、イネ品種日本晴の薬培養の培養直前期、脱分化期、および再分化期に⁶⁰Coガンマ線照射を行い、その放射線感受性の比較を行った。その結果、カルス形成に関して、脱分化期照射より培養直前期照射のほうが感受性が高く、脱分化期照射においてもその初期（薬置床 2 日後）と後期（薬置床 7 日後）で比較すると、初期照射で感受性が高かった。このようなカルス形成に関する感受性の差は、照射された時期に小胞子をもつ核数によっているものと思われる。照射された核のうち、それほど障害を受けなかった核が分裂を続けカルス化するため、小胞子が照射時に持つ核が多ければ多いほど、その補償効果によりカルス形成率が高くなるものと思われる。カルス誘導過程の組織学的観察により、培養直前期、薬置床 2 日後および 7 日後の小胞子は、それぞれ 1 個、2 個および多数の核を含んでいた。再分化に関しても同様な補償効果が認められ、脱分化期照射は、再分化に関しほとんど影響を与えないようであった。再分化期照射でもその初期（カルス置床 2 日後）と後期（カルス置床 7 日後）で比較すると、同じ再分化阻害効果でもその質的な違いが認められた。再分化初期照射はカルスの内生ホルモンバランスなどに影響を与え、根の分化を促進させ、芽の分化には阻害的であった。培養後期照射では、再分化過程そのものに障害を与え、根、芽どち

らの再分化にも阻害的であった。本実験において、置床葯数あたりの再分化個体が誘導された葯の数を、Plating anther efficiency (PAE) とし、その放射線半減線量は培養直前期、脱分化期および再分化期照射でそれぞれ、約6Gy、50Gy以上および20~25Gyであった。

1994年度に行った葯培養の無照射区より得られた再分化個体について、その主稈の草丈、穂長、穎花長を測定した。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区別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行ったところ、それぞれの集団が半数体、二倍体、三倍体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再分化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。しかし穎花長においてはそのような影響はほとんど見られず、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ることが明かとなった。葯培養脱分化期および再分化期にガンマ線を照射して、得られた再分化個体当代の草丈の調査を、穎花長により半数体と二倍体を区分し行った。その平均値の比較から、葯培養再分化当代においては、放射線照射による生理障害が認められた。その程度は照射線量にともない増加し、二倍体より半数体において、また、脱分化期照射より再分化期照射でより大きいこ

とが認められた。

再分化個体の後代の変異体の調査から、薬培養への放射線照射が変異を誘発することは明かであった。しかし、検定系統が少なく、培養系への照射が生体照射や種子照射に取って変わるものとなるかを示すことはできなかった。薬培養再分化期に20Gy照射して得られた再分化個体の後代に、酸性フォスファターゼ変異および短稈、濡れ葉変異を分離する系統が、再分化個体別系統で1系統得られた。変異個体と同一カルス由来の系統に同様な変異は確認されず、これらの変異は培養によって、あるいは放射線照射によって別々に誘発されたものであった。濡れ葉変異体とは、その葉身表面の微細構造の観察から、エピクチクラワックスが形成されない変異体であり、そのため濡れ葉形質を示すようであった。またこの変異形質は、原品種とのF₁で正常型を示す劣性形質であった。

酸性フォスファターゼ変異は、単一劣性遺伝子支配の遺伝様式を示した。アイソザイムバンドは共優性を示すことから、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た。

イネ培養系の再分化期照射のひとつとして、イネの多芽体培養への放射線照射を行った。照射に先立ち、多芽体形成過程の組織学的観察を行なった。その結果、主茎基部より発生する芽には2つのタイプがあり、ひとつは第1葉節の分けつ芽である腋芽と、もうひとつは第1葉の背軸側基部より発生する不定芽であった。どちらのタイプの芽も培養後期には、その葉原基基部に新しく芽原基を分化させ、多芽体化を進行させていた。第1葉基部より発生する不定芽は、

表皮第1層と第2層に由来し、またその発生部位は常に決まっており、第1葉の背軸側基部に二カ所、その二カ所で第一葉節の分けつ芽を挟む位置に発生した。

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。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。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、その後代の葉緑変異調査から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期待できなかった。しかし、多芽体培養は、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、変異セクターを大きくすることでキメラを解消し、変異獲得率を高め、一種の繰り返し効果が得られるものと期待された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始適切な御指導、御助言を下さいました、名古屋大学農学部植物遺伝育種学教室の服部一三助教授を始め、武岡洋治教授、和田富吉教官に深く感謝致します。また、実験を行うにあたり、数々の有益な御助言をいただきました、名城大学農学部逢原雄三教授、名古屋大学農学部西村隆雄技官にも深く感謝いたします。

最後に、本研究を行うにあたり、惜しみない御協力を下さいました、名古屋大学農学部植物遺伝育種学教室の岩崎喜代子技官始め、院生、学生、研究生並びに卒業生の皆様に御礼申し上げます。

引用文献

- Abdullah, A.A., M.M. Yeoman and J. Grace (1985) *In vitro* adventitious shoot formation from embryonic and cotyledonary tissues of *Pinus brutia* Ten. Plant Cell Tissue Organ Cult. 5:35-44.
- and J. Grace (1987) Regeneration of calabrian pine from juvenile needles. Plant Sci. 53:147-155.
- Abdullah, R., J.A. Thompson, G.S. Khush, R.P. Kaushik and E.C. Cooking (1989) Protoclonal variation in the seed progeny of plants regenerated from rice protoplast. Plant Sci. 65:97-101.
- 足立尹男・蓬原雄三 (1974) 水稻の胚発育におよぼす放射線の影響. I. 照射胚の組織解剖学的観察. 育種 24:31-37.
- Adkins, S.W., T. Shiraishi, J.A. MaComb, S. Ratanopol, T. Kupkanchanakul, L.J. Armstrong and A.L. Schultz (1990) Somaclonal variation in rice - Submergence tolerance and other agronomic characters. Physiol. Plant. 80:647-654.
- Agrawal, S., N. Chandra and S.L. Kothari (1989) Plant regeneration in tissue cultures of pepper (*Capsicum annuum* L. cv. mathania). Plant Cell Tissue Organ Cult. 16:47-55.
- Allicchio, R., C. Antonioli, L. Graziani, R. Roncarati and C. Vannini (1987) Isozyme variation in leaf-callus regeneration plant of *Solanum tuberosum*. Plant Sci. 53:81-86.
- Arene L., C. Pellegrino and S. Gudín (1993) A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues. Euphytica 71:83-90.
- Armstrong, C.L. and R.L. Phillips (1988) Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. Crop Sci. 28:363-369.
- 渥美久彦 (1989) イネの半数体に関する育種学的研究. 名古屋大学農学研究科修士論文
- Bajaj, Y.P.S., A.W. Saettler and M.W. Adams (1970) Gamma irradiation studies on seeds, seedlings and callus tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. Rad. Bot. 10:119-124.
- Balito, L.P., K. Hattori and Y. Futsuhara (1989) Effects of gamma-ray irradiation on the growth of calli in *Nicotiana* species. Japan. J. Breed. 39:29-37
- Bauer, R. (1957) The induction of vegetative mutations in *Ribes nigrum*. Hereditas 43:323-337.
- Bennett, M.D. (1971) The duration of meiosis. Proc. Roy. Soc. Lond. B. 178:277-299.
- Bergonie, J. and L. Tribondeau (1906) Interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. Compt. Rend. Acad. Sci. 143:983-985.
- Binns, A.N. (1981) Developmental variation in plant tissue culture. Env. Exp. Bot. 21:325-332.
- Brettell, R.I.S., E.S. Dennis, W.R. Scowcroft and W.J. Peacock (1986) Molecular analysis of a somaclonal mutant of maize alcohol dehydrogenase. Mol. Gen. Genet. 202:235-239.
- Broertjes, C. and A. Keen (1980) Adventitious shoots : do they develop from one

- cell ? *Euphytica* 29:73-87.
- Carver, B.F. and B.B. Johnson (1989) Partitioning of variation derived from tissue culture of winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 78:405-410.
- Chu, C.C. (1978) The N_6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*. Science Press, Beijing, 43-50.
- Clarke, J.M., T.N. McCaig and R.M. DePauw (1994) Inheritance of glaucousness and epicuticular wax in durum wheat. *Crop Sci.* 34:327-330.
- Davies, P.A., M.A. Pallotta, S.A. Ryan, W.R. Scowcroft and P.J. Larkin (1986) Somaclonal variation in wheat : genetic and cytogenetic characterisation of alcohol dehydrogenase 1 mutants. *Theor. Appl. Genet.* 72:644-653.
- De Klerk, G.J. (1990) How to measure somaclonal variation. *Acta Bot. Neerl.* 39:129-144.
- , J. Ter Brugge and H. Bouman (1990) An assay to measure the extent of variation in micropropagated plants of *Begonia x hiemalis*. *Acta Bot. Neerl.* 39:145-151.
- Degani, N. and D. Pickholz (1973) Direct and indirect effect of gamma irradiation on the differentiation of tobacco tissue culture. *Rad. Bot.* 13:381-383.
- (1975) Radiation-induced organogenesis: effects of irradiated medium and its components on tobacco tissue culture. *Rad. Bot.* 15:363-366.
- Detrez, C., T. Tetu, R.S. Sangwan and B.S. Snagwan-Norreel (1988) Direct organogenesis from petiole and thin cell layers explants in *Beta vulgaris* cultured in vitro. *J. Exp. Bot.* 39:917-926.
- Devreux, M. and G.T. Scaracia Mugnozza (1964) Effects of gamma-radiation of the gametes, zygote and proembryo in *Nicotiana tabacum* L. *Rad. Bot.* 4:373-386.
- Earle, E.D. and R.W. Langhans (1974) Propagation of *Chrysanthemum in vitro*. I. Multiple plantlets from shoot tips and the establishment of tissue cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 99:128-132.
- Eriksson, T. (1967) Effect of ultraviolet and X-ray radiation on *in vitro* cultivated cell of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. plant.* 20:507-518.
- Evans, D.A., W.R. Sharp and H.P. Medina-Filho (1984) Somaclonal and gametoclonal variation. *Am. J. Bot.* 71:759-774.
- Favret, E.A. (1960) Somatic mutations of four genes for albinism in barley induced by X-rays and ethyl-methane-sulphonate. *Hereditas* 46:622-634.
- Fukui, K. (1983) Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. *Theor. Appl. Genet.* 65:225-230.
- Futsuhara, Y. (1968) Breeding of a new rice variety, Reimei by gamma-ray irradiation. *Gamma Field Symp.* 7:87-109.
- Galun, E. and D. Raveh (1975) *In vitro* culture of tobacco protoplast : survival of haploid and diploid protoplast exposed to X-ray radiation after different times after isolation. *Rad. Bot.* 15:79-82.
- George, L., D.C. Joshua and S. Eapen (1989) Cytogenetic studies on regenerated plants of indica rice cultivars. *Sabrao Journal* 21:103-110.
- Gorden, S.A., B.K. Gaur and L. Woodstock (1971) Correlative inhibition of root emergence in the gamma-irradiated *Coleus* leaf. I. Premorphogenic levels of auxin, RNA and metabolites in the petiole base. *Rad. Bot.* 11:453-461.

- Grandbastien, M.A., J.P. Bourgin and M. Caboche (1985) Valine-resistance, a potential marker in plant cell genetics. II. Optimization of UV mutagenesis and selection of valine-resistant colonies derived from tobacco mesophyll protoplasts. *Genetics* 109:409-425.
- Haberlandt, G. (1902) Experiments on the culture of isolated plant cells. *Sitz-Ber. Mat.-Nat. Kl. Kais. Acad. Wiss. Wien* 111(1):69-92.
- Haque, M.M., D.J. Mackill and K.T. Ingram (1992) Inheritance of leaf epicuticular wax content in rice. *Crop Sci.* 32:865-868.
- 長谷川徹 (1993) ベチユニアの放射線感受性に関する育種学的研究 名古屋大学農学研究科修士論文
- 服部一三・中村和弘・蓬原雄三 (1993) 放射線照射による水稻の突然変異誘発効果の評価. *育種* 43(別2):284.
- Hell, K.G. (1983) Survival of *Nicotiana tabacum* L. cv Wisconsin-38 plants regenerated from gamma-irradiated tissue cultures. *Env. Exp. Bot.* 23:139-142.
- , W. Handro and G.B. Kerbauy (1978) Enhanced bud formation in gamma-irradiated tissues of *Nicotiana tabacum* L. cv Wisconsin-38. *Env. Exp. Bot.* 18:225-228.
- Henke, R.R., M.A. Mansur and M.J. Constantin (1978) Organogenesis and plantlet formation from organ- and seedling-derived calli of rice (*Oryza sativa*). *Physiol. Plant.* 44:11-14.
- Heszky, L.E., L.S. Nam, I. Simon-kiss and K. Lokos (1989) Organ-specific and ploidy-dependent somaclonal variation; a new tool in breeding. *Acta Biologica Hungarica.* 40:381-394.
- 星川清親 (1974) 機械移植栽培のための水稻育苗の理論と技術 (21). *農及園* 49:1549-1552.
- Ichijima, K. (1934) On the artificially induced mutations and polyploid plants of rice occurring in subsequent generations. *Proc. Imp. Acad. Tokyo* 10:388-391.
- Jackson, J.A. and P.J. Dale (1989) Somaclonal variation in *Lolium multiflorum* L. and *L. temulentum* L. *Plant Cell Rep.* 8:161-164.
- Kawai, T. (1962) The relation between radiosensitivity and the development stage in rice. *Gamma Field Symp.* 1:31-42.
- 木下俊郎・森宏一・相川宋敵・丹野久 (1989) イネの薬培養とガンマ線照射による突然変異誘発. *育種* 39(別2):386-387.
- 岸川英利・高木胖・西田晶代 (1980) イネの薬培養におけるカルス形成および器官分化の組織学的研究. *佐大農彙* 49:75-83.
- Kobayasi, S. (1987) Uniformity of plants regenerated from orange (*Citrus sinensis* Osb.) protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 74:10-14.
- Krumbiegel, G. (1979) Response of haploid and diploid protoplasts from *Datura innoxia* Mill. and *Petunia hybrida* L. to treatment with X-rays and a chemical mutagen. *Env. Exp. Bot.* 19:99-103.
- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
- Li, M., T. Abe and Y. Futsuhara (1992) Changes in isozyme patterns associated with the development of calli derived from mature embryo culture of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Japan. J. Breed.* 42:535-543.

- Ling, D.X., D.J. Lockett and N.L. Darvey (1991) Low-dose gamma irradiation promotes wheat anther culture response. *Aust. J. Bot.* 39:467-474.
- Lipucci di Paola, M., D. Fossi, F. Tognoni and V. Nutironchi (1987) Adventitious bud induction *in vitro* from juvenile leaves of *Cupressus arizonica* Green. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 10:3-10.
- MacDonald, M.V., M.A. Hadwiger, F.N. Aslam and D.S. Ingram (1988) The enhancement of anther culture efficiency in *Brassica napus* ssp. *oleifera* Metzg. (Sinsk.) using low doses of gamma irradiation. *New Phytol.* 110:101-107.
- 真島勇雄・河合武 (1960) 生育中の稲の γ 線照射による突然変異の誘発. 育種 16:122-123.
- 松田智明・原弘道・柏葉晃一・長南信雄 (1994) 作物体表面構造の走査電子顕微鏡観察のための試料調製方法 I. イネ科作物葉身. 日作紀 63(別2):263-264.
- 松尾孝嶺 (1964) 放射線農業生物学. 養賢堂, 東京, pp. 267.
- Matsuo, T., H. Yamaguchi and A. Ando (1958) A comparison of biological effects between thermal neutrons and X-rays on rice seeds. *Japan. J. Breed.* 8:37-45.
- McClellan, P., and K.F. Grafton (1989) Regeneration of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis. *Plant Sci.* 60:117-122.
- Meins, F.Jr. (1983) Heritable variation in plant cell culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34:327-346.
- Mendoza, A.B. (1992) Genetic studies on tissue culture and induced somatic mutations in crops. 名古屋大学農学研究科博士論文
- Miura, K., T. Hashimoto and H. Yamaguchi (1974) Effect of gamma-irradiation on cell elongation and auxin level in *Avena* coleoptiles. *Rad. Bot.* 14:207-215.
- Moustafa, R.A.K., D.R. Duncan and J.M. Widholm (1989) The effect of gamma radiation and N-ethyl-N-nitrosourea on culture maize callus growth and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17:121-131.
- Muller, H. J. (1927) Artificial transmutation of the gene. *Science* 66:84-87.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant* 15:473-497.
- and R. Nakano (1967) Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *Am. J. Bot.* 54:963-970.
- , M.N. Shabde, P.M. Hasegawa, F.H. Takatori and J.B. Jones (1972) Propagation of asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 97:158-161.
- Nakano, H and E. Maeda (1979) Shoot differentiation in callus of *Oryza sativa* L. *Z. Pflanzphysiol.* 93:449-458.
- Netting, A.G. and P. von Wettstein-Knowles (1973) The physico-chemical basis of leaf wettability in wheat. *Planta* 114:289-309.
- Nielsen, E., E. Selva, C. Sghirinnzetti and M. Devreux (1985). The mutagenic effect of gamma rays on leaf protoplasts of haploid and diploid *Nicotiana plumbaginifolia*, estimated by valine resistance mutation frequencies. *Theor. Appl. Genet.* 70:259-264.
- Nishi, T., Y. Yamada and E. Takahashi (1968) Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219:508-509.
- and S. Mitsuoka (1969) Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. *Japan J. Genet.* 44:341-346.

- Norman, F.W. (1989) Application of isozymes in plant breeding. Plant breeding reviews vol.6 Timber Press, Portland, Oregon, pp11-54.
- Ogura, H., J. Kozuka, Y. Hayashi, T. Koba and K. Shimamoto (1987) Field performance and cytology of protoplast-derived rice (*Oryza sativa*): high yield and low degree of variation of four japonica cultivars. Theor. Appl. Genet. 74:670-676.
- 大野清春 (1975) イネの葍培養による半数体の作出とその育種的利用 農技研報告 D26:139-222.
- Oono, K. (1978) Test tube breeding of rice by tissue culture. Trop. Agric. Res. Series 11:109-123.
- (1985) Putative homozygous mutations in regenerates plants of rice. Mol. Gen. Genet. 198:377-384.
- Orton, T.J. (1983) Spontaneous electrophoretic and chromosomal variability in callus cultures and regenerated plants of celery. Theor. Appl. Genet. 67:17-24.
- Ostry M., W. Hackett, C. Michler, R. Serres and B. McCown (1994) Influence of regeneration method and tissue source on the frequency of somatic variation in *Populus* to infection by *Septoria musiva*. Plant Sci. 97:209-215.
- Pate, J.B. and E.N. Duncan (1963) Mutations in cotton induced by gamma irradiation of pollen. Crop Sci. 3:136-138.
- Peschke, V.M. and R.L. Phillips (1992) Genetic implications of somaclonal variation in plants. Advan. Genet. 30:41-75.
- Rietveld R.C., Hasegawa P.M. and Bressan R.A. (1991) Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. I. Evidence of genetic stability across tuber generations and diverse locations. Theor. Appl. Genet. 82:430-440.
- Ryan, S.A. and W.R. Scowcroft (1987) A somaclonal variant of wheat with additional β -amylase isozymes. Theor. Appl. Genet. 73:459-464.
- 坂 齋 (1990) イネにおけるマルチプルシュート形成のサイトカイニンによる制御. 日作紀 59 (別1):120-121.
- Sanford, J.C., N.F. Weeden and Y.S. Chyi (1984) Regarding the novelty and breeding value of protoplast-derived variants of russet burbank (*Solanum tuberosum* L.). Euphytica 33:709-715.
- 佐藤光・大村武 (1974) イネの胚発生初期における化学物質投与の効果. 育雑 24(別2):34-35.
- ・岩田信夫・大村武 (1983) イネのぬれ葉突然変異の遺伝子分析. 育雑 33(別2):242-243.
- Spiegel-Roy, P. and J. Kochba (1973) Stimulation of differentiation in orange (*Citrus sinensis*) ovular callus in relation to irradiation of the media. Rad. Bot. 13:97-103.
- Stadler, L.J. (1928a) Genetic effects of X-rays in maize. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 14:69-75.
- (1928b) Mutations in barley induced by X-rays and radium. Science 68:186-187.
- Suzuki, H., Y. Futuhara, F. Tanaka and N. Kurata (1991) Localization of glutelin gene in rice chromosome by *in situ* hybridization. Jpn. J. Genet. 66:305-312.
- Swedlund, B. and I.K. Vasil (1985) Cytogenetic characteristics of embryogenic callus and regenerated plants of *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. Theor. Appl. Genet. 69:575-581.

- Tomaszewski, Z.Jr., B.V. Conger, H. Brunner and F.J. Novak (1988) Effects of gamma radiation on the *in vitro* response of *Dactylis glomerata* leaf segments. *Env. Exp. Bot.* 28:335-341.
- Torrey, J.G. (1966) The initiation of organized development in plants. *Adv. Morphog.* 5:39-91.
- Tsay, S.S., H.S. Tsay and C.Y. Chao (1986) Cytochemical studies of callus development from microspore in cultured anther of rice. *Plant Cell Rep.* 5:119-123.
- Ukai, Y. (1988) Effect of gamma-ray irradiation on growth of calli derived from mature embryos or seeds in barley. *Japan. J. Breed.* 38:292-300.
- Ussuf, K.K. and P.M. Nair (1974) Effect of gamma irradiation of the indole acetic acid synthesizing system and its significance in sprout inhibition of potatoes. *Rad. Bot.* 14:251-256.
- Vajrabhaya, M., T. Thanapaisal and T. Vajrabhaya (1989) Development of salt tolerant lines of KDML and LPT rice cultivars through tissue culture. *Plant Cell Rep.* 8:411-414.
- Wang, A.S., D.S.K. Cheng, J.B. Milcic and T.C. Yang (1988) Effect of X-ray irradiation on maize inbred line B73 tissue cultures and regenerated plants. *Crop Sci.* 28:358-362.
- Wang, H. and F.B. Holl (1988) *In vitro* culture and the incidence of somaclonal variation in regenerated plants of *Trifolium pratense* L. *Plant Sci.* 55:159-167.
- 渡邊薫子 (1990) イネの葉緑体タンパク質に関する遺伝育種学的研究 名古屋大学農学研究科修士論文
- Weber, G. and K.G. Lark (1980) Quantitative measurement of the ability of different mutagens to induce an inherited change in phenotype to allow maltose utilization in suspension culture of the soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Genetics* 96:213-222.
- 山縣弘忠・赤藤克己 (1963a) 人為突然変異の利用に関する育種学的研究 3, 発育段階を異にする水稻へのX線照射が照射当代植物における障害の発現におよぼす影響. *育種* 13:255-263.
- (1963b) 人為突然変異の利用に関する育種学的研究 5, 発育する水への線照射が照射次代の変異におよぼす影響. *育種* 13:263-268.
- 山崎耕字 (1960) 生育条件を異にした場合の作物の形態発生に関する基礎的研究 II. 水稻・小麦における分けつ芽の発生について. *日作紀* 28:262-265.
- Zheng, K.L., Z.M. Zhou, G.L. Wang, Y.K. Luo and Z.M. Xiong (1989) Somatic cell culture of rice cultivars with different grain types : somaclonal variation in some grain and quality characters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18:201-208.

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

1. 調査の目的
 2. 調査の範囲
 3. 調査の方法
 4. 調査の結果
 5. 調査の結論

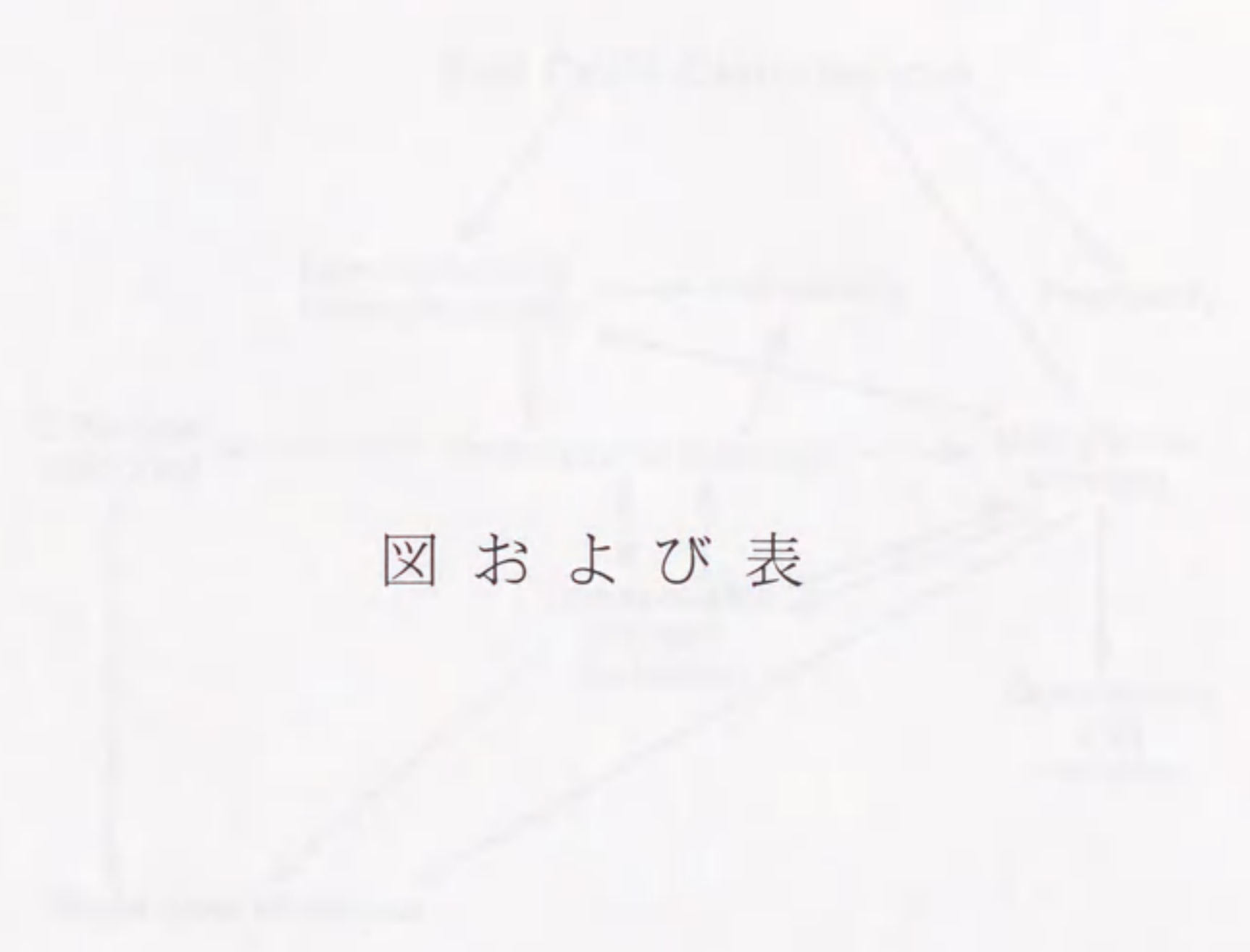


図 および表

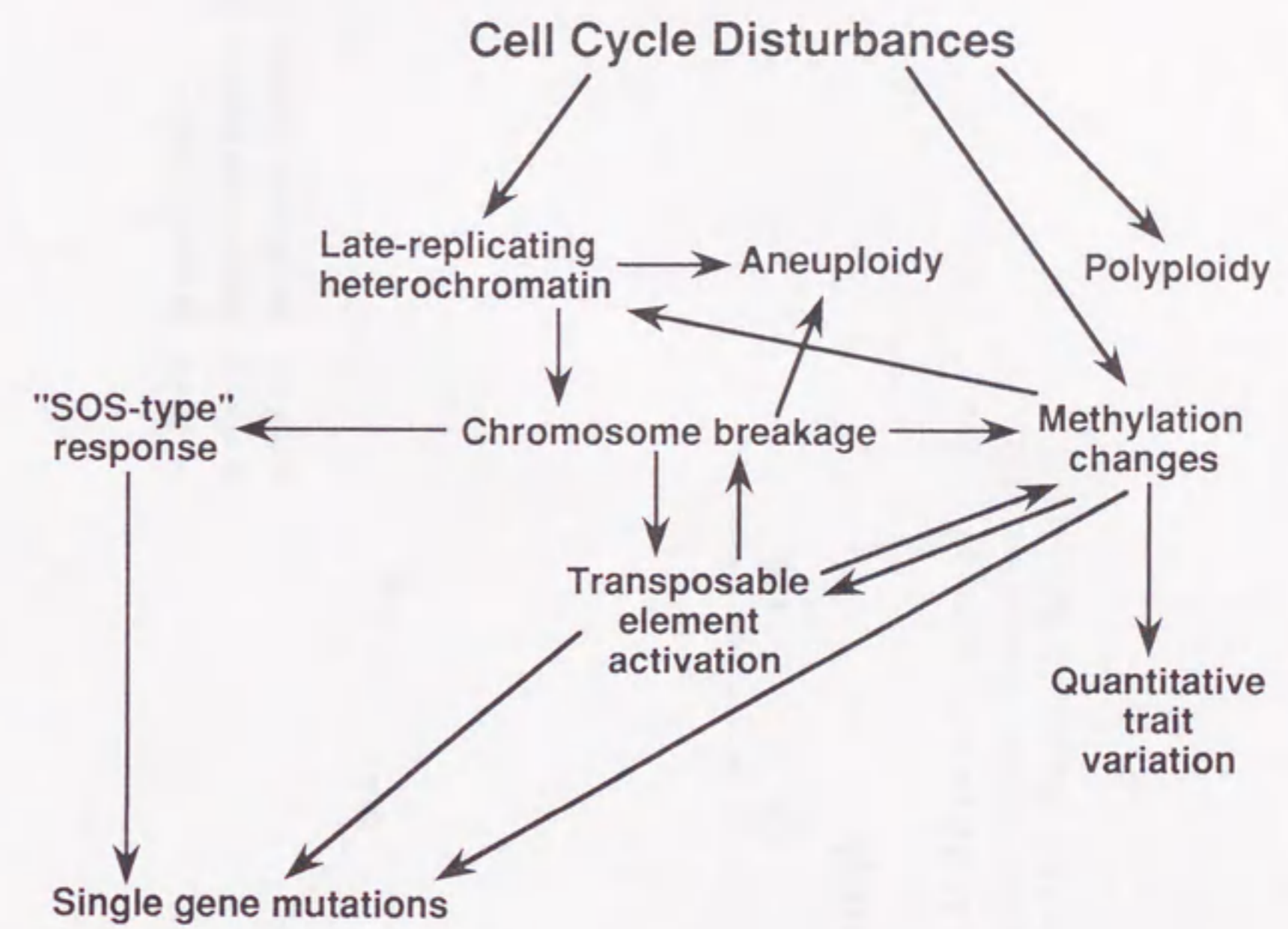


Fig. 1. Hypothesis describing interrelationships between cell cycle disturbances, cytological variation, methylation changes, and genetic variation produced by plant tissue culture (from Peschke and Phillips 1992).

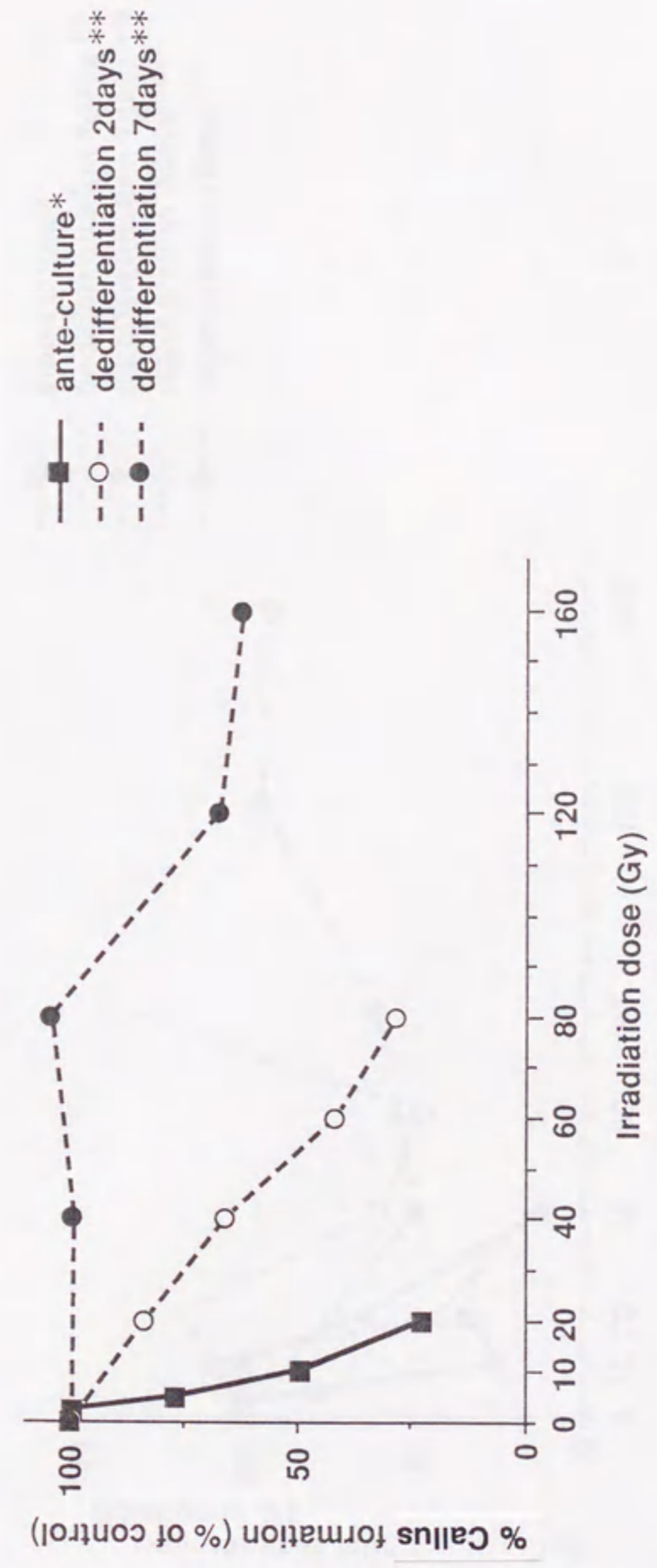


Fig. 2. Irradiation response on callus formation at different stages of anther culture (1994 Data). *: irradiation to anthers prior to plating with cold treatment, **: irradiation to anther at 2 days or 7 days after plating on callus induction medium.

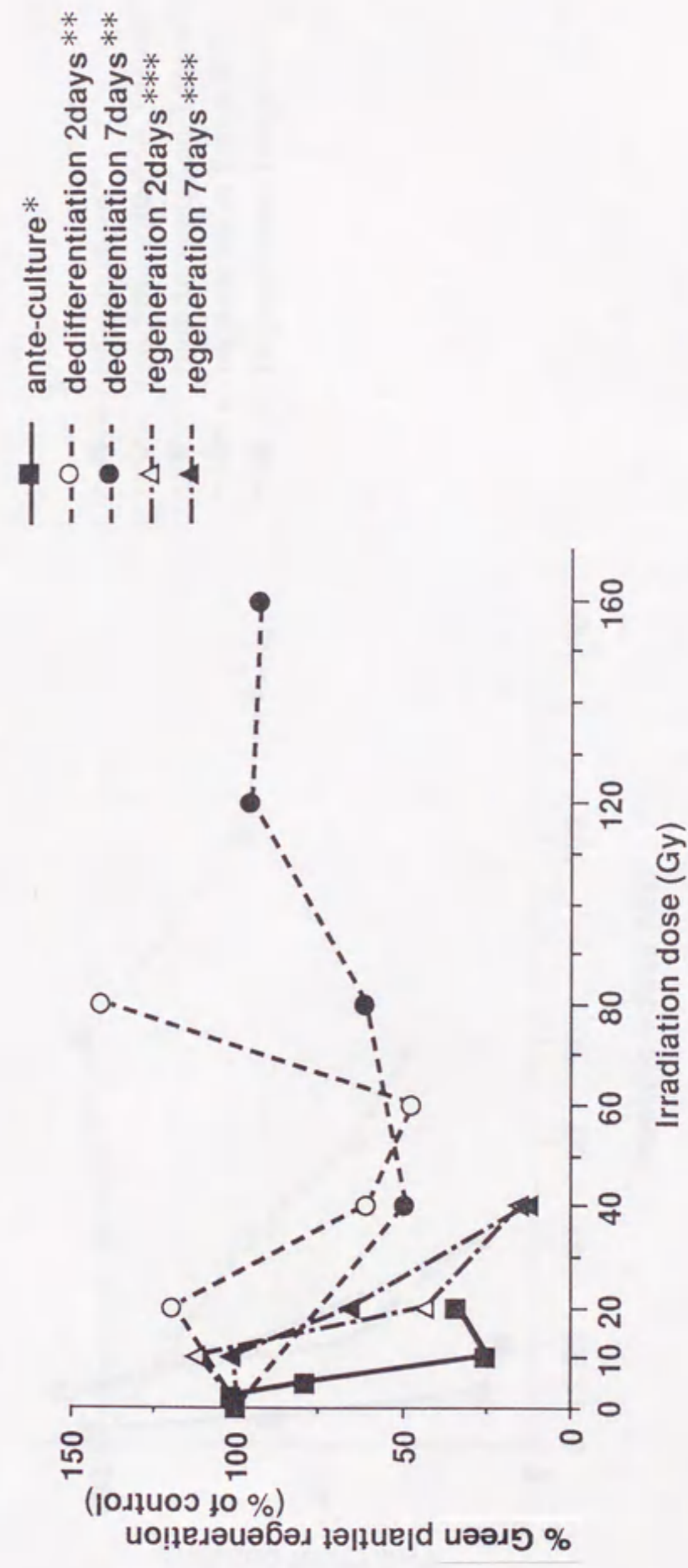


Fig. 3. Irradiation response on green plantlet regeneration at different stages of anther culture (1994 Data). *: irradiation to anthers prior to plating with cold treatment, **: irradiation to anther at 2 days or 7 days after plating on callus induction medium, ***: irradiation to calli at 2 days or 7 days after transfer to regeneration medium.

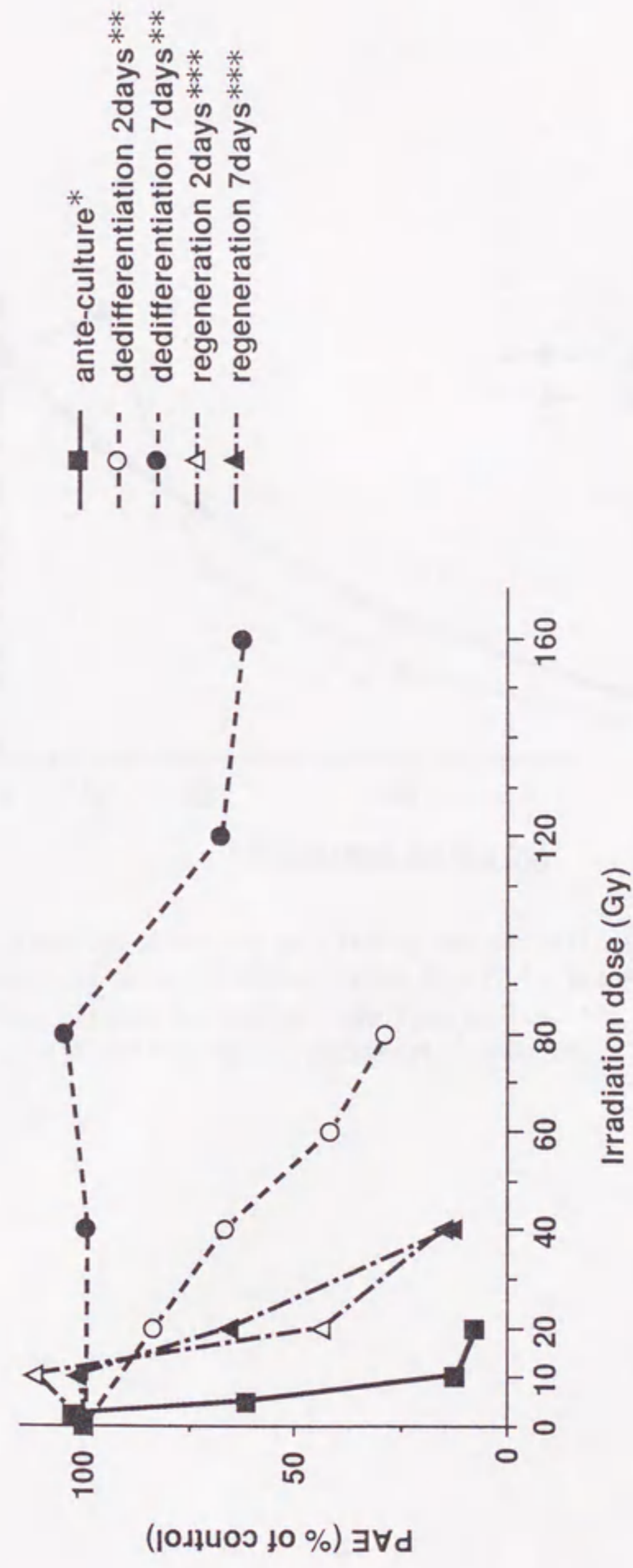


Fig. 4. Irradiation response on plating anther efficiency (PAE) at different stages of anther culture (1994 Data). * : irradiation to anthers prior to plating with cold treatment, ** : irradiation to anther at 2 days or 7 days after plating on callus induction medium, *** : irradiation to calli at 2 days or 7 days after transfer to regeneration medium.

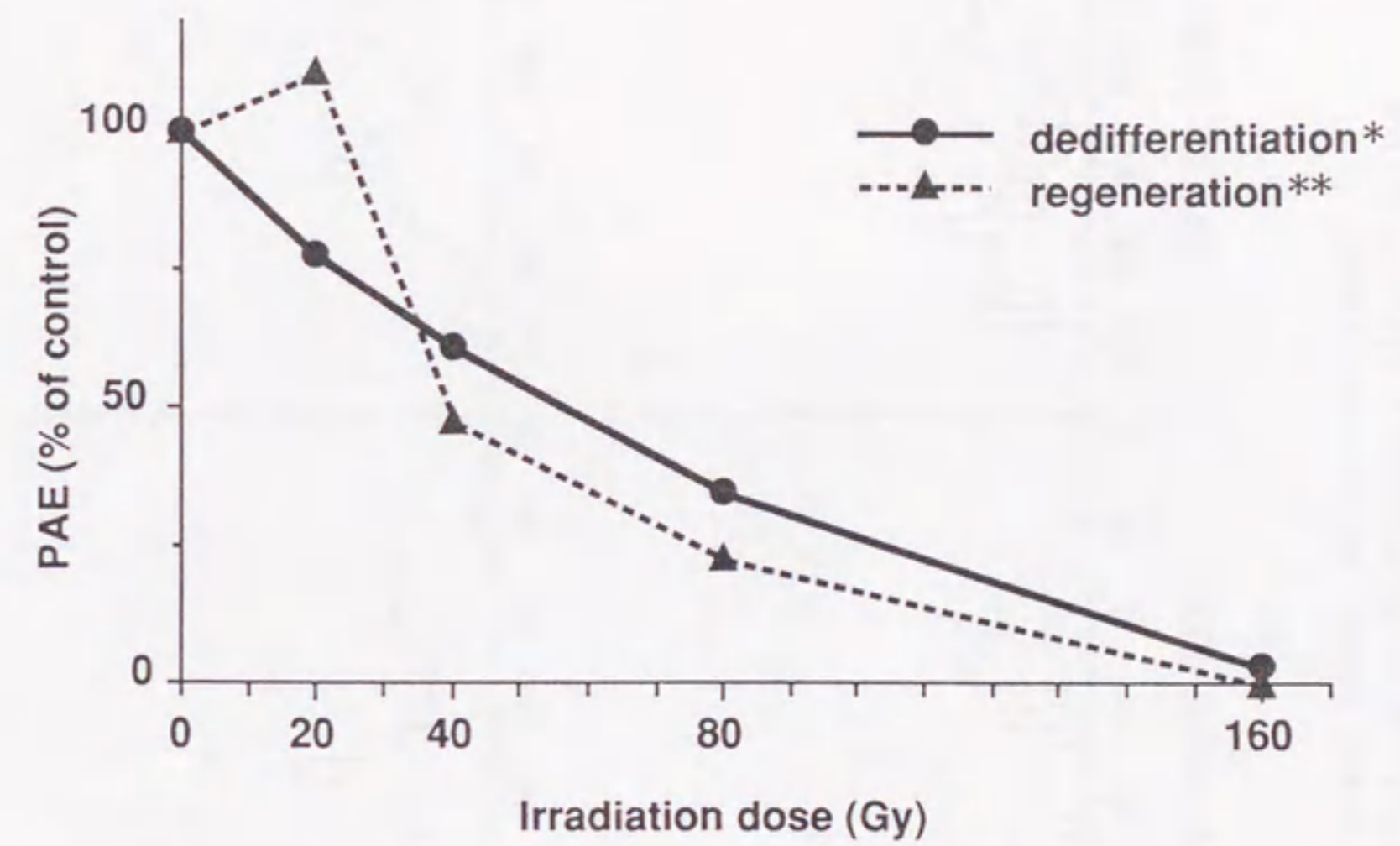


Fig. 5. Irradiation response on plating anther efficiency (PAE) at different stages of anther culture (1990 Data). *: irradiation to anther at 7 days after plating on callus induction medium. **: irradiation to calli at 1 days after transfer to regeneration medium.

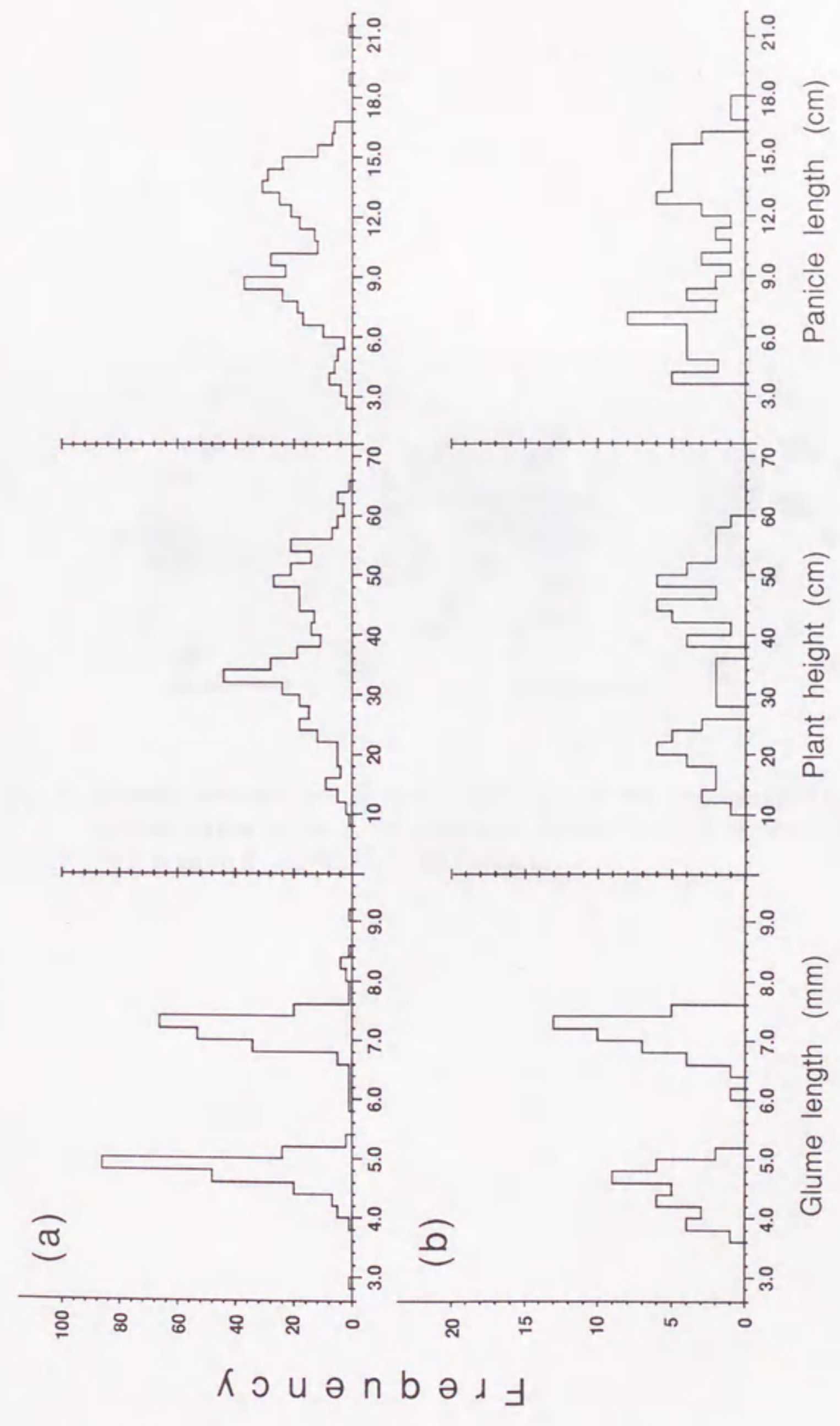
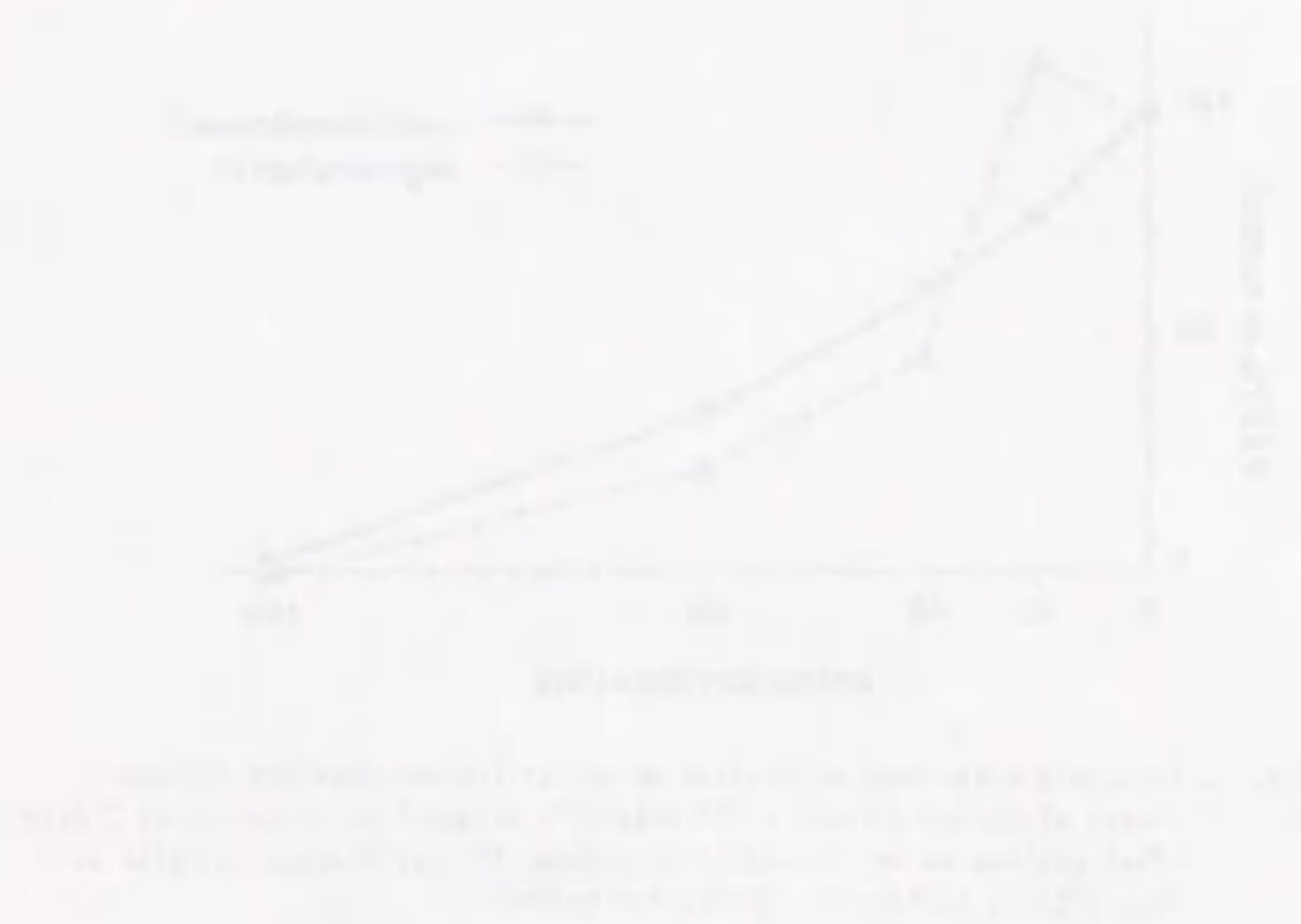


Fig. 6. Distribution of glume length, plant height and panicle length in regenerated plants. (a) 386 plants derived from unirradiated callus (control). (b) 77 plants derived from irradiated callus.

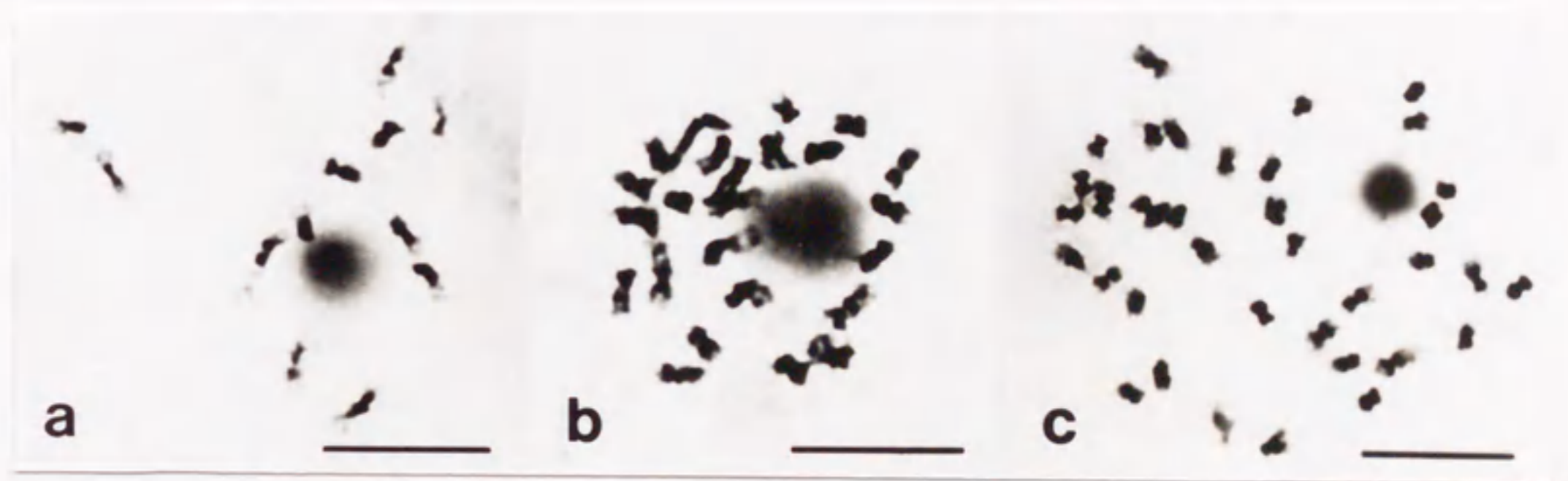


Fig. 7. Mitotic chromosome in root tip cells of the regenerated plants from unirradiated callus. (a) haploid ($2n=x=12$). (b) diploid ($2n=2x=24$). (c) triploid ($2n=3x=36$). Bar= $10\mu\text{m}$.

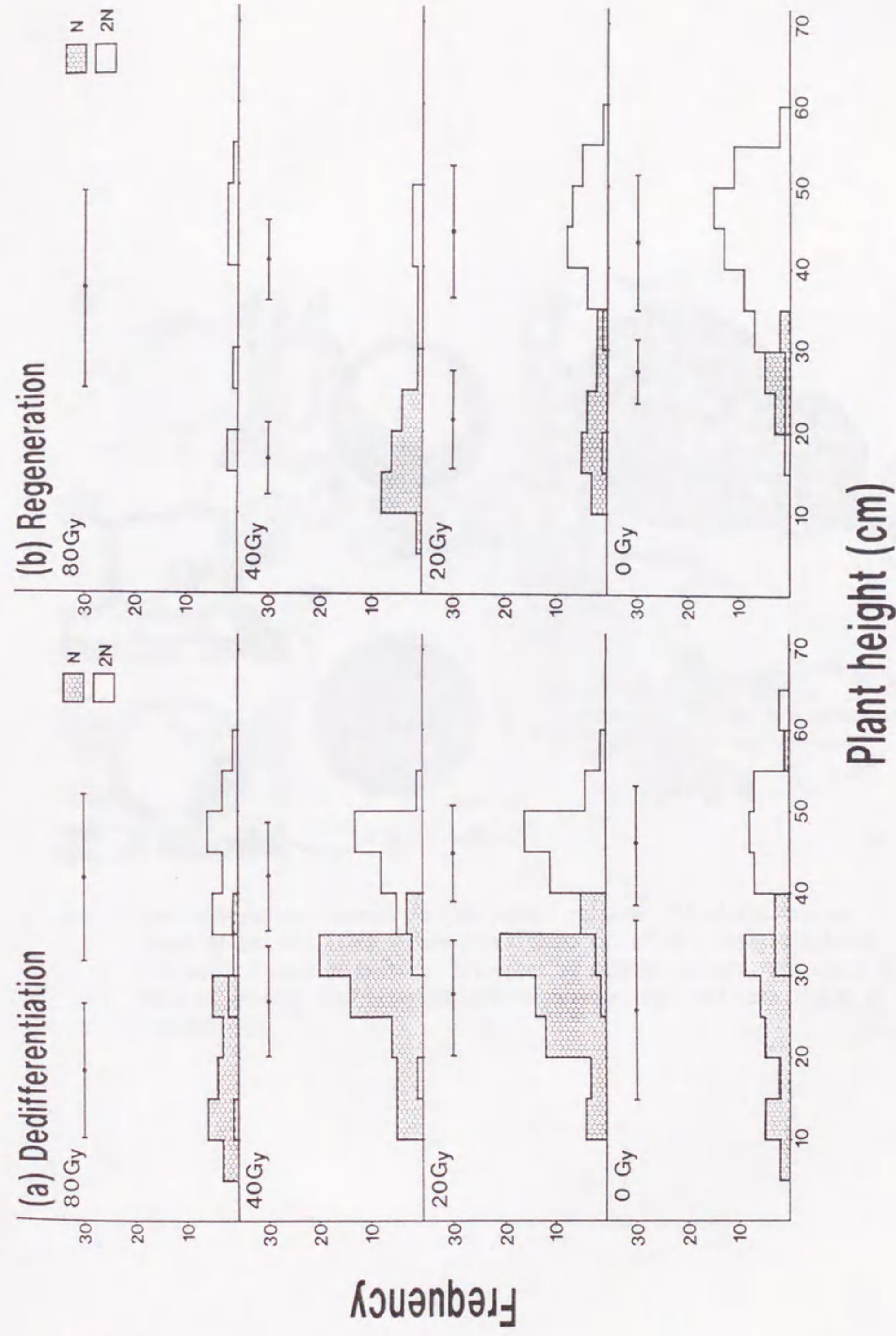


Fig. 8. Distribution of plant height in regenerated plants. (a) derived from anthers irradiated at dedifferentiation stage. (b) derived from callus irradiated at regeneration stage.

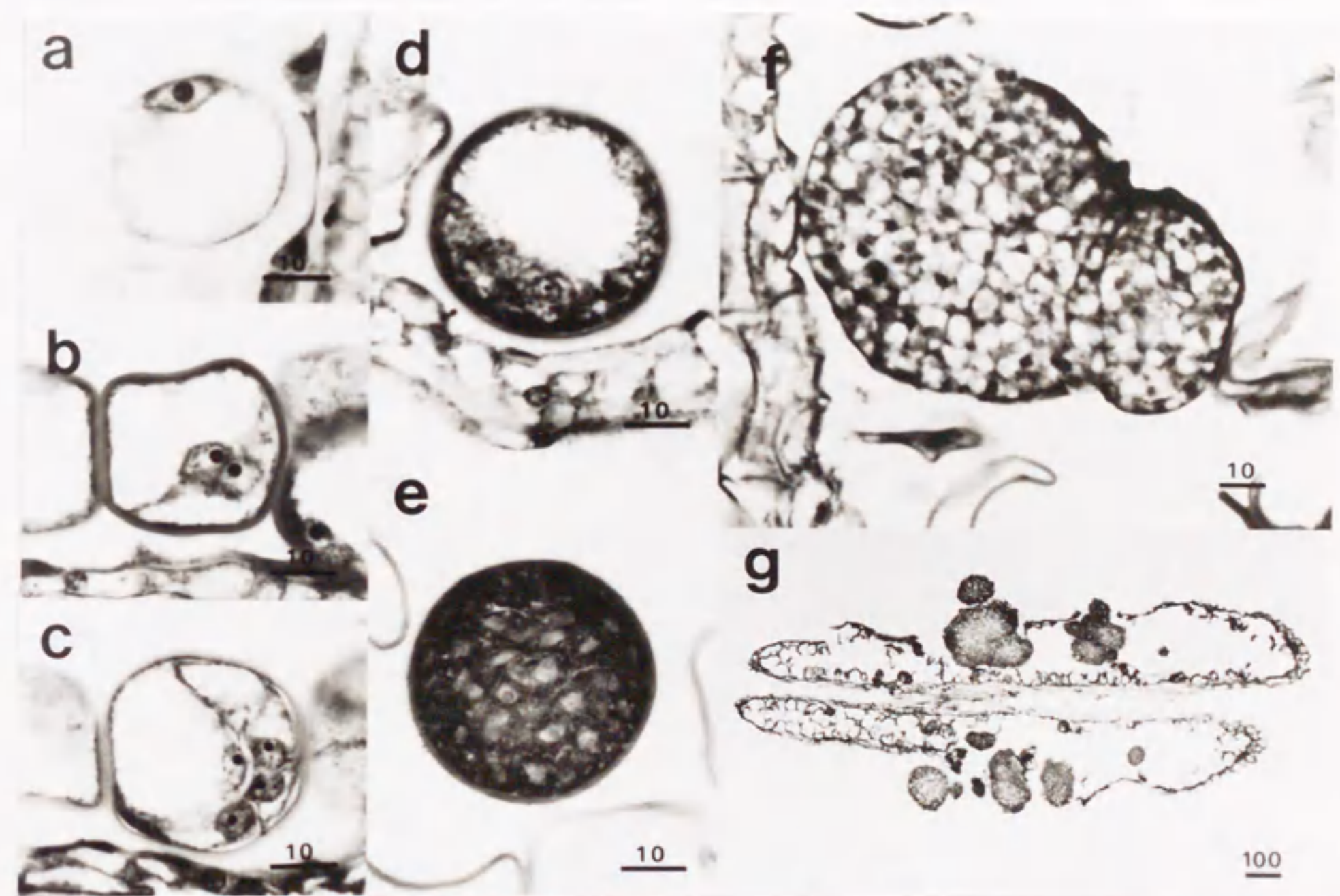


Fig. 9. Callus formation process in rice anther culture. (a) at the time of inoculation. (b) after 2 days of culture. (c) after 3 days of culture. (d) after 7 days of culture. (e) after 13 days of culture. (f) after 16 days of culture. (g) after 20 days of culture. Bars indicate $10\mu\text{m}$ or $100\mu\text{m}$.

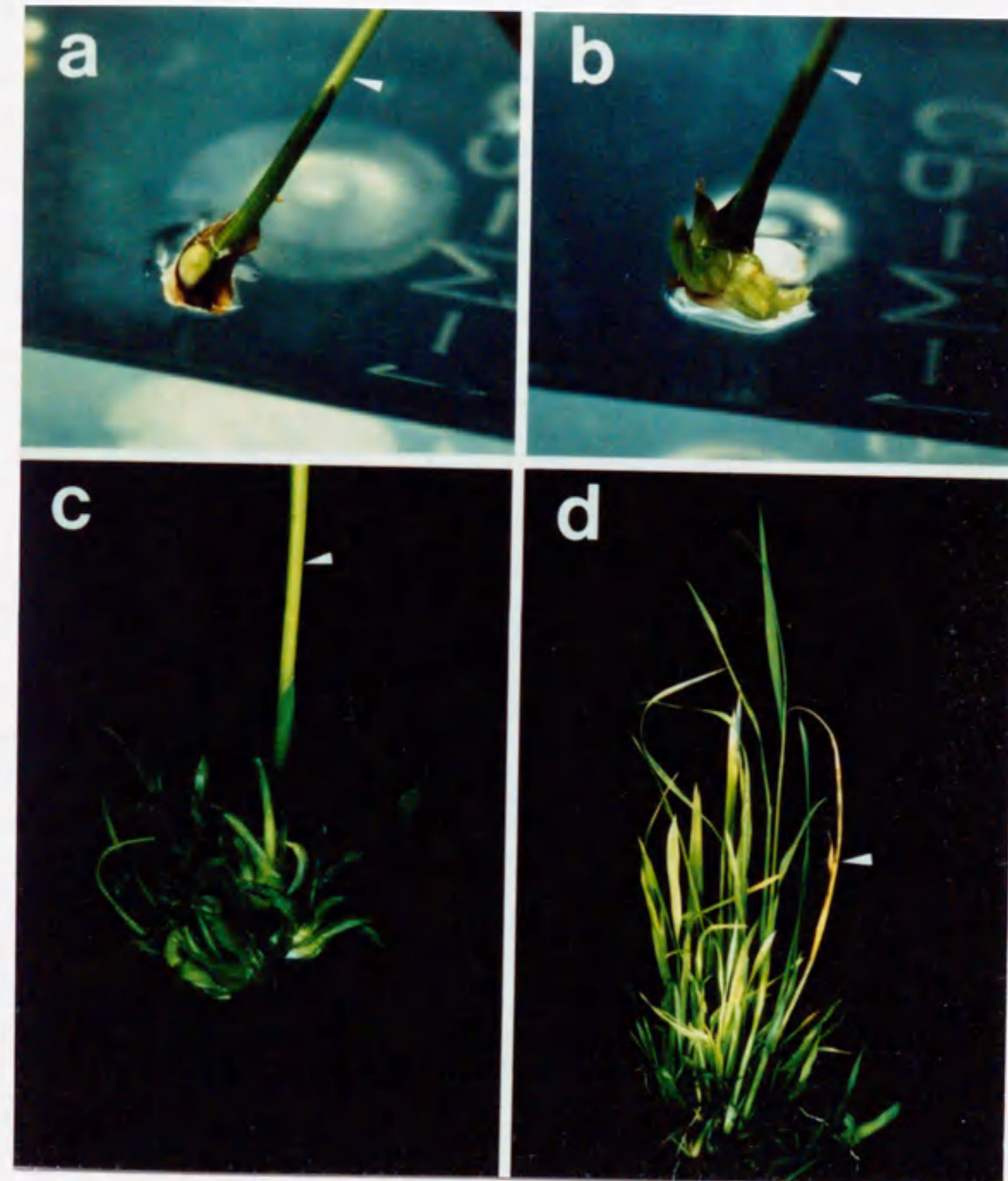


Fig. 10. Stages in multiple shoot formation from cultured rice seeds. (a) after 1 week of culture. (b) after 2 weeks of culture. (c) after 4 weeks of culture. (d) after 6 weeks of culture. Arrow heads indicate main stem.

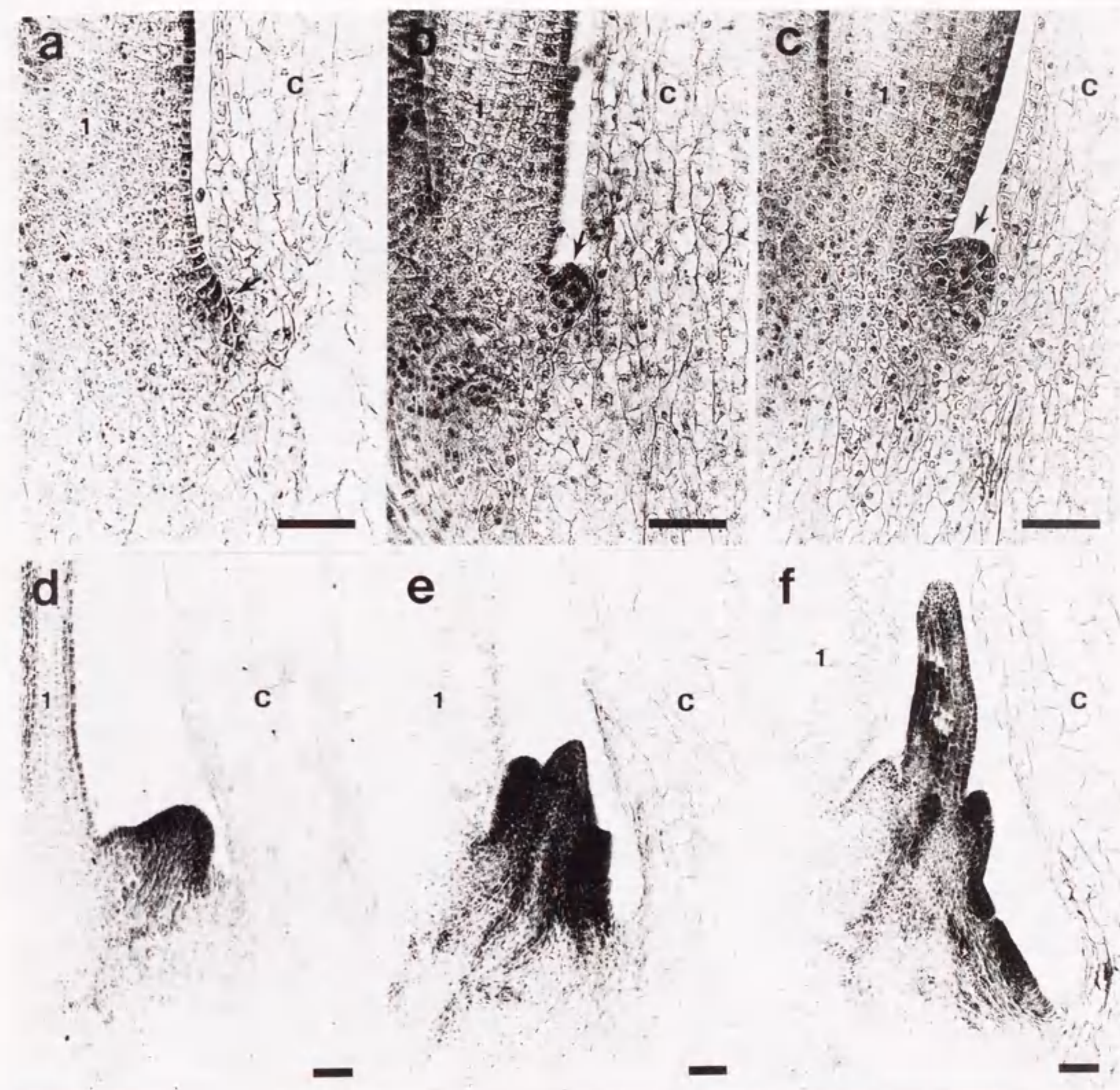


Fig. 11. Developmental sequence of induction of adventitious buds on the basal region of the first leaf. (a), (b) and (c) after 3 days of culture. (d) after 4 days of culture. (e) after 5 days of culture. (f) after 6 days of culture. 1: the first leaf, C: coleoptile. Bar=50 μ m. Note: the densely staining cells with meristematic activity in the epidermal and subepidermal cell layers (showed with arrows) were organized into a meristematic dome and developed to a bud primordium.

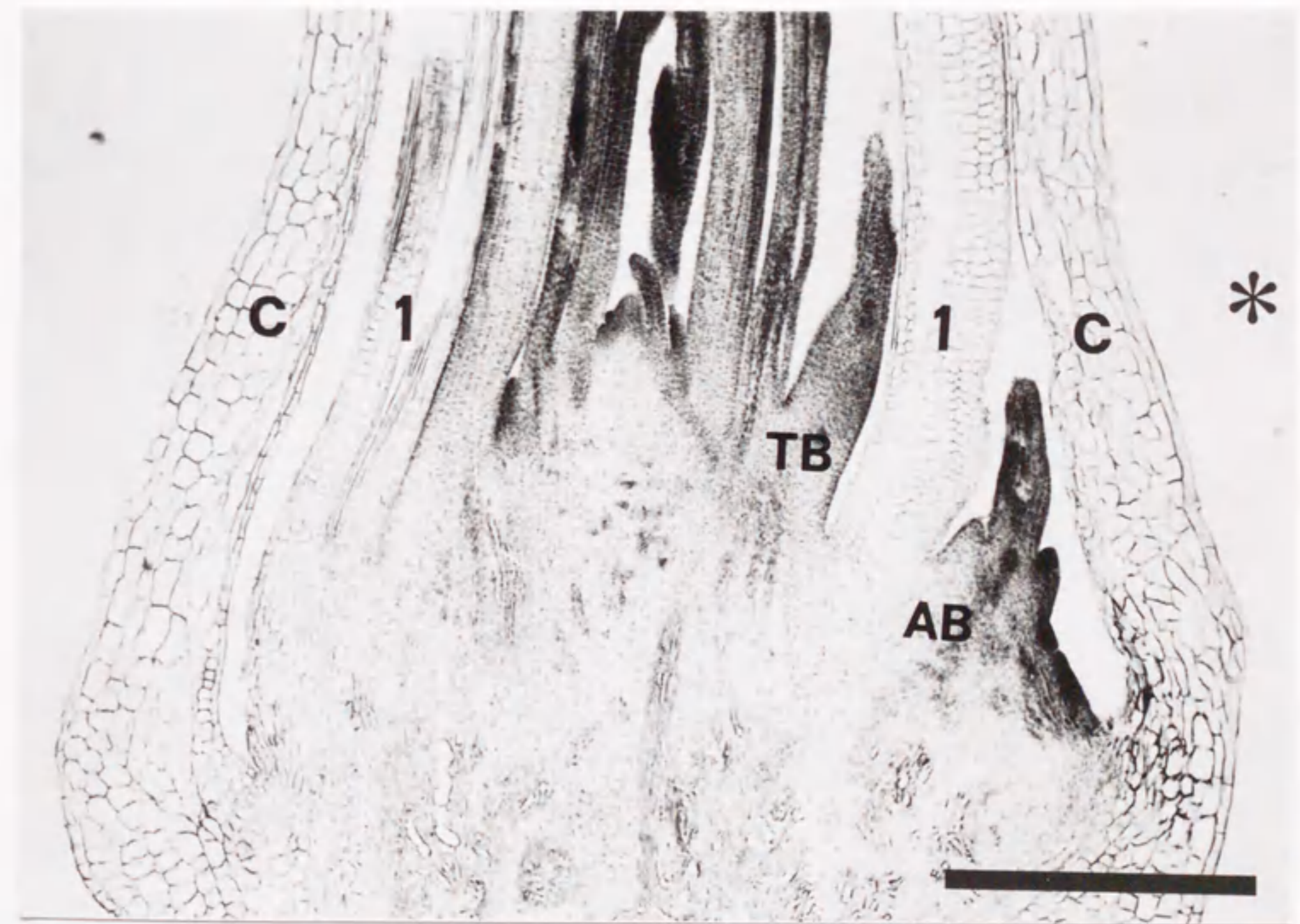


Fig. 12. Longitudinal section of the basal part of main stem after 6 days of culture. 1: the first leaf, C: coleoptile, TB: tiller bud, AB: adventitious bud. Asterisk (*) indicates the side of the first leaf. Bar=500 μ m. Note: the adventitious bud on the base of the first leaf was induced at the same side where the tiller bud of the first leaf node developed.



Fig. 13. Cross section of the basal part of main stem after 7 days of culture. 1: the first leaf, C: coleoptile, AB: adventitious bud. Asterisk (*) indicates the side of the first leaf. Bar=500 μ m. Note: the two adventitious buds of different origin were induced on the basal region of the same first leaf.

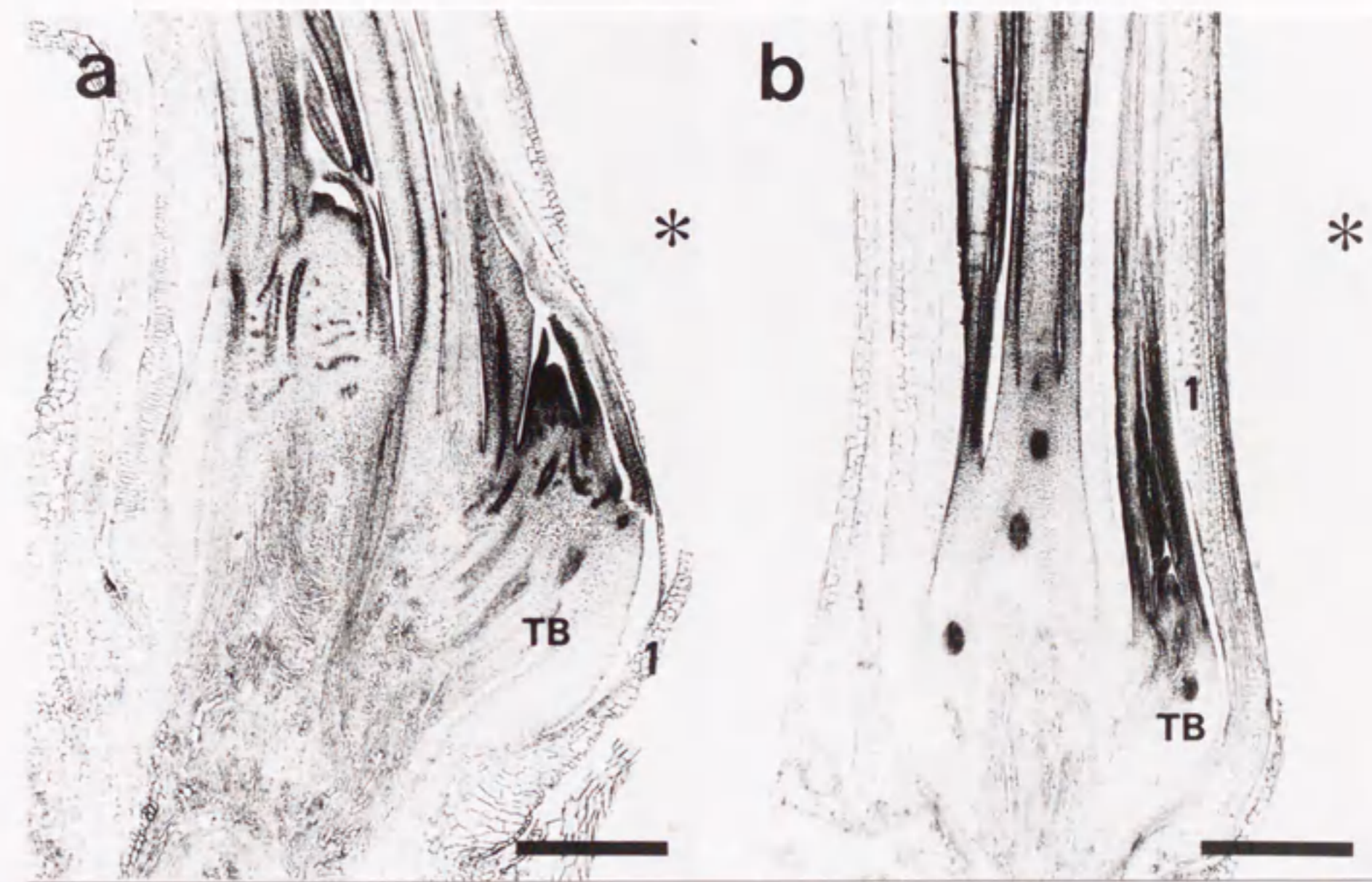


Fig. 14. Longitudinal section of the basal part of main stem after 8 days of culture. (a) main stem induced in medium with high concentration of cytokinin. (b) main stem induced in hormone-free medium (control). 1: the first leaf, TB: tiller bud. Asterisk (*) indicates the side of the first leaf. Bar=500 μ m.

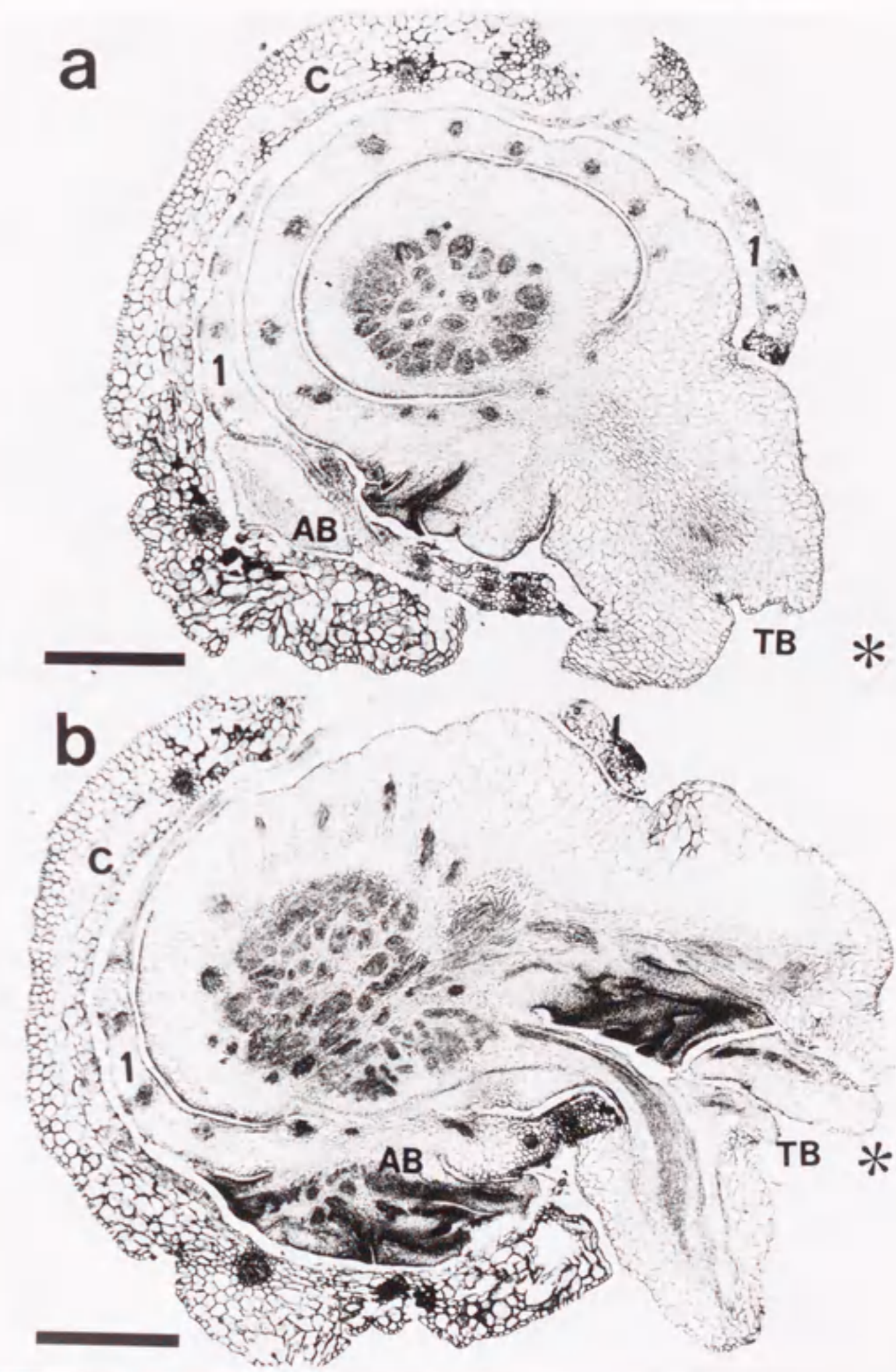


Fig. 15. Cross section of the basal part of main stem after 2 weeks of culture. (a) upper section. (b) lower section. 1: the first leaf, C: coleoptile, TB: tiller bud, AB: adventitious bud. Asterisk (*) indicates the side of the first leaf. Bar=500 μ m. Note: a tiller bud (TB) and an adventitious bud (AB) were developing on the same sample. The tiller bud of the first leaf node split open the first leaf.

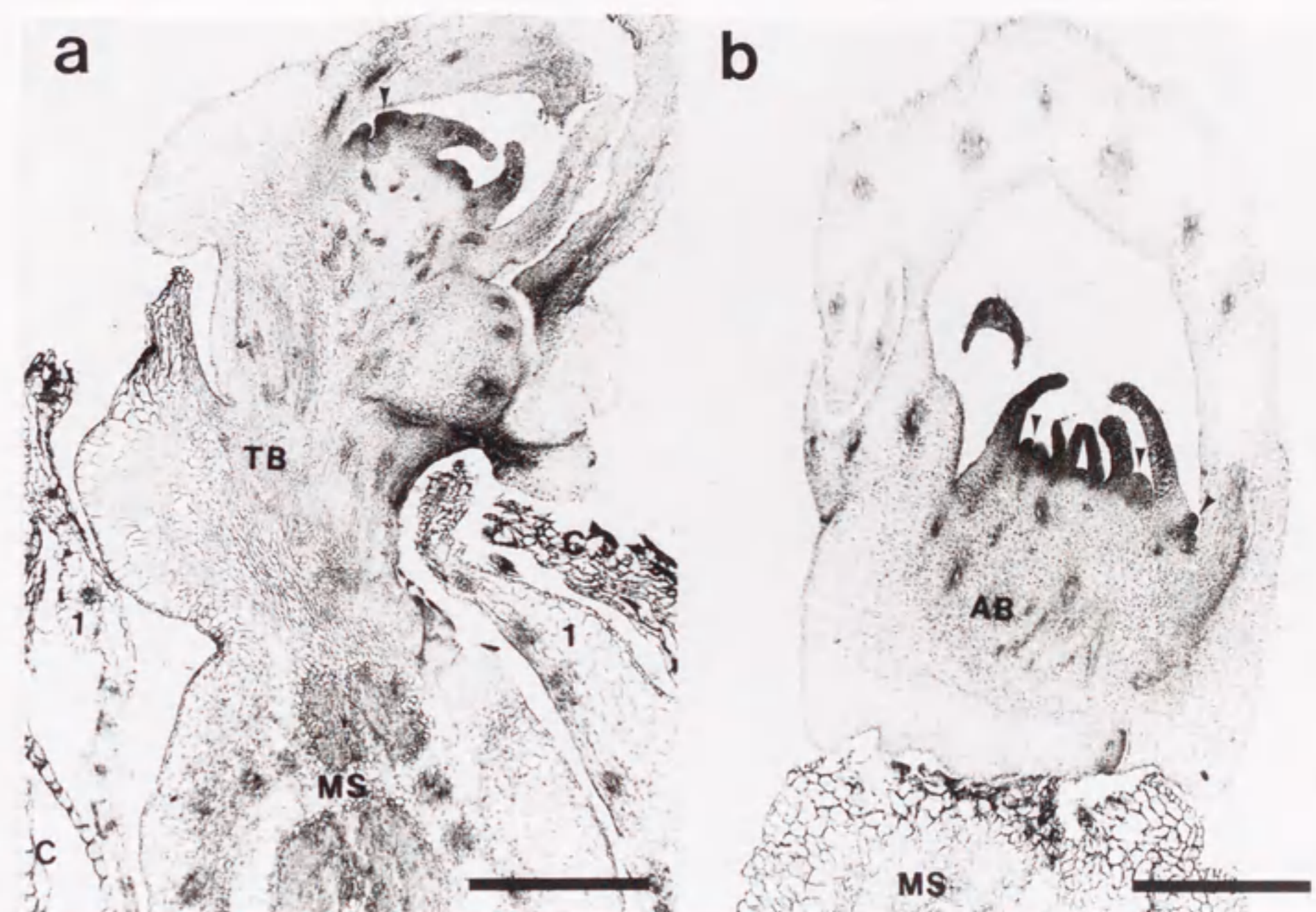


Fig. 16. Longitudinal section of the shoot buds in the later stage of development. (a) multiplication of the tiller bud of the first leaf node. (b) multiplication of the adventitious bud on the basal region of the first leaf. 1: the first leaf, C: coleoptile, TB: tiller bud, AB: adventitious bud, MS: main stem. Bar=500 μ m. Note: the secondary shoots (showed with arrow heads) were induced at the base of leaf primordia.

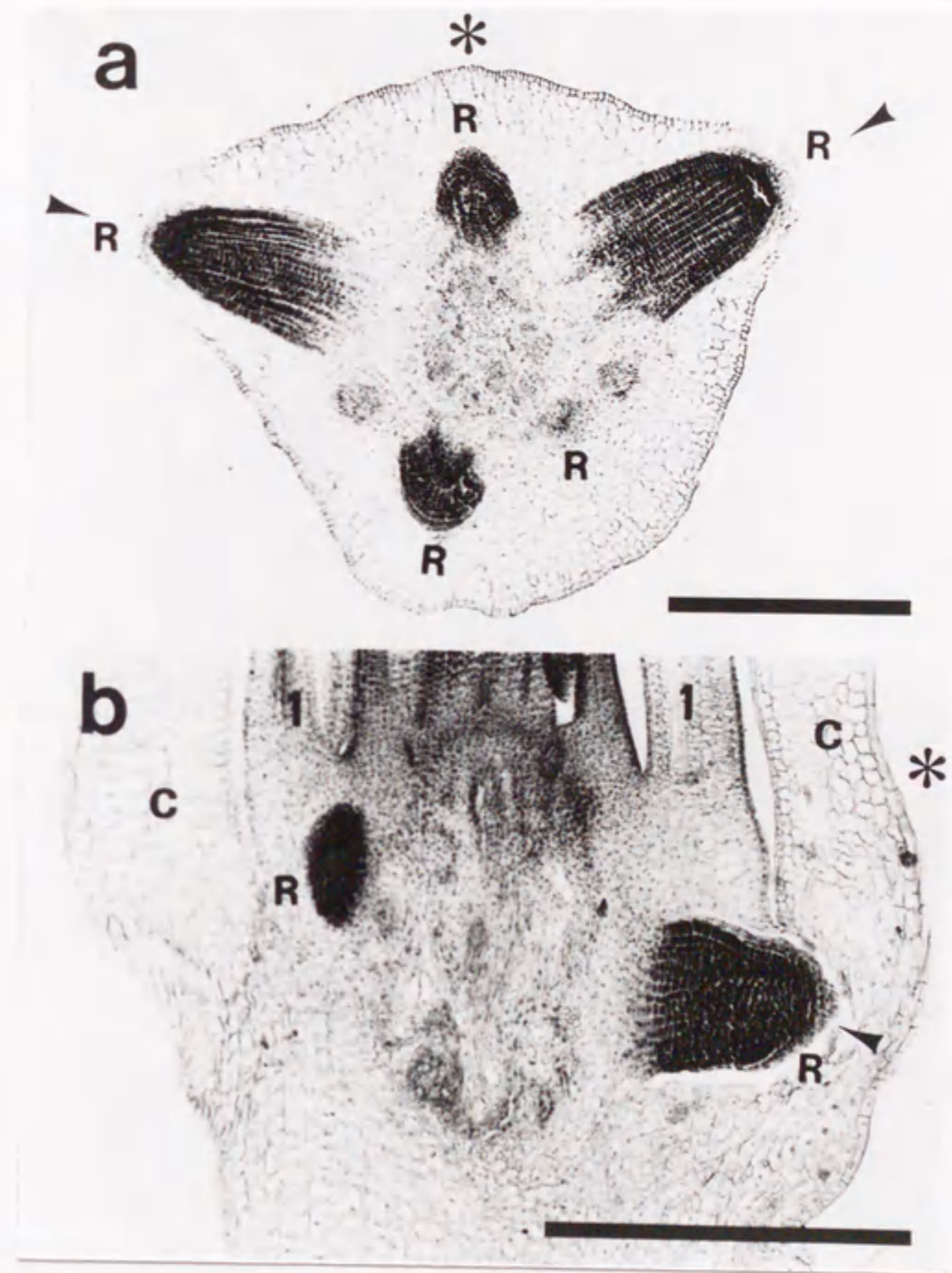


Fig. 17. Sections of the coleoptilar node of control plant after 4 days of culture. (a) cross section. (b) longitudinal section. 1: the first leaf, C: coleoptile, R: crown root. Asterisk (*) indicates the side of the first leaf. Bar=500 μ m. Note: initially the two crown roots (showed with arrow heads) of five crown roots differentiated at almost the same time.

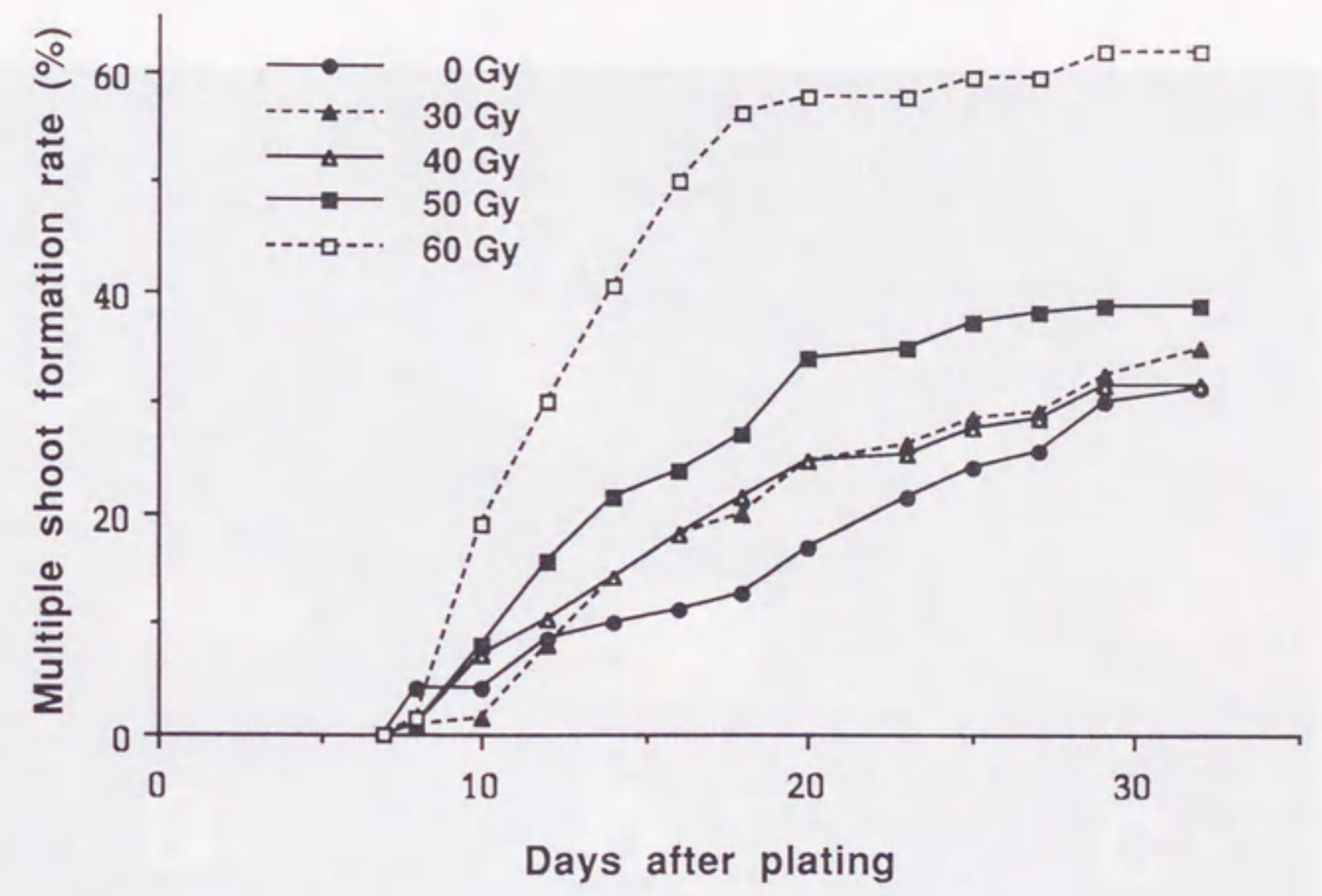


Fig. 18. Irradiation response on multiple shoot formation rate after plating.

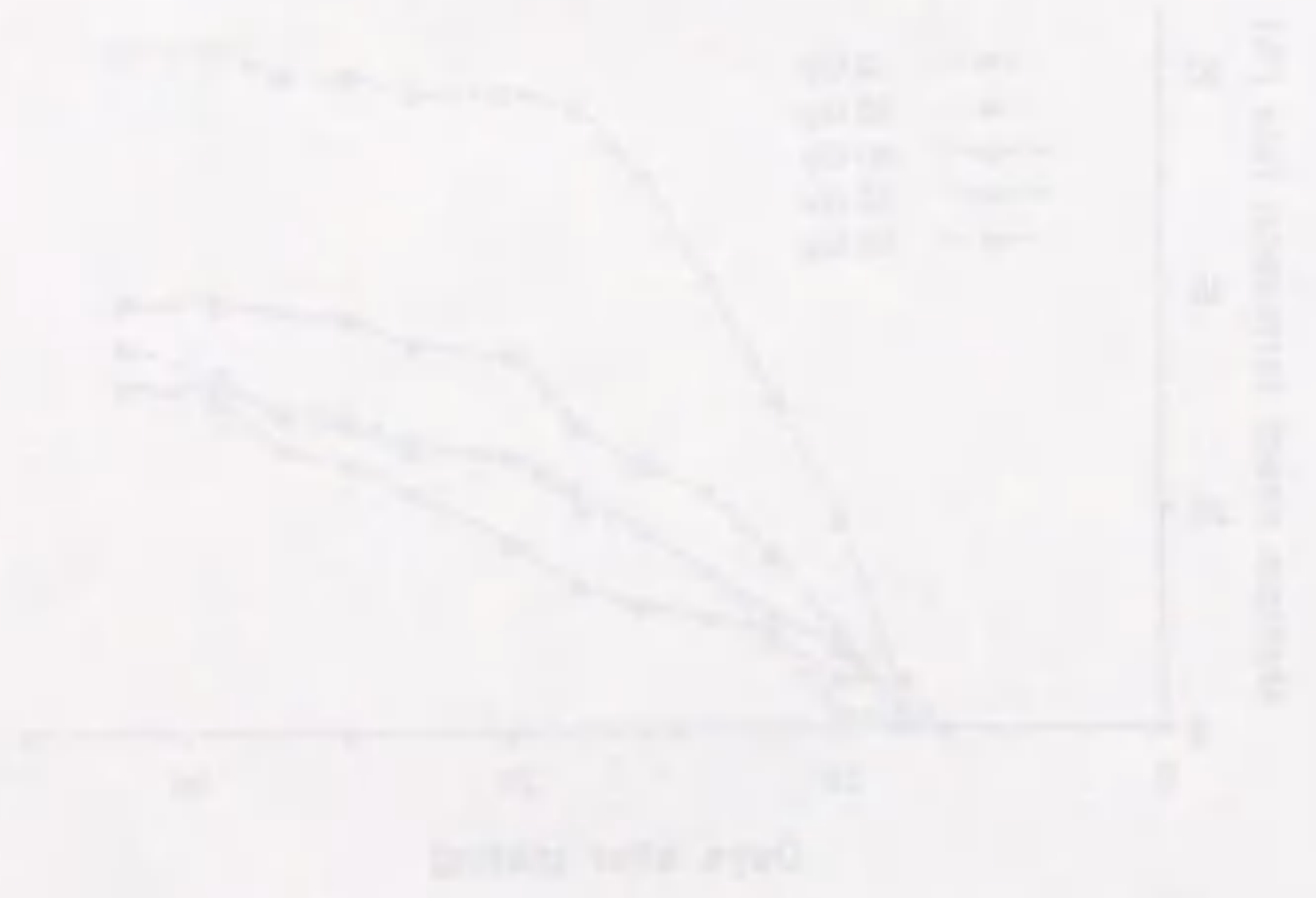


Fig. 19. Different expressions of shoot formation in rice seed exposed to 60Gy of gamma irradiation. (a) dead main stem with no multiple shoot formation. (b) dead main stem with multiple shoot forming at the apical portion. (c) dead main stem with multiple shoot forming at the basal portion.

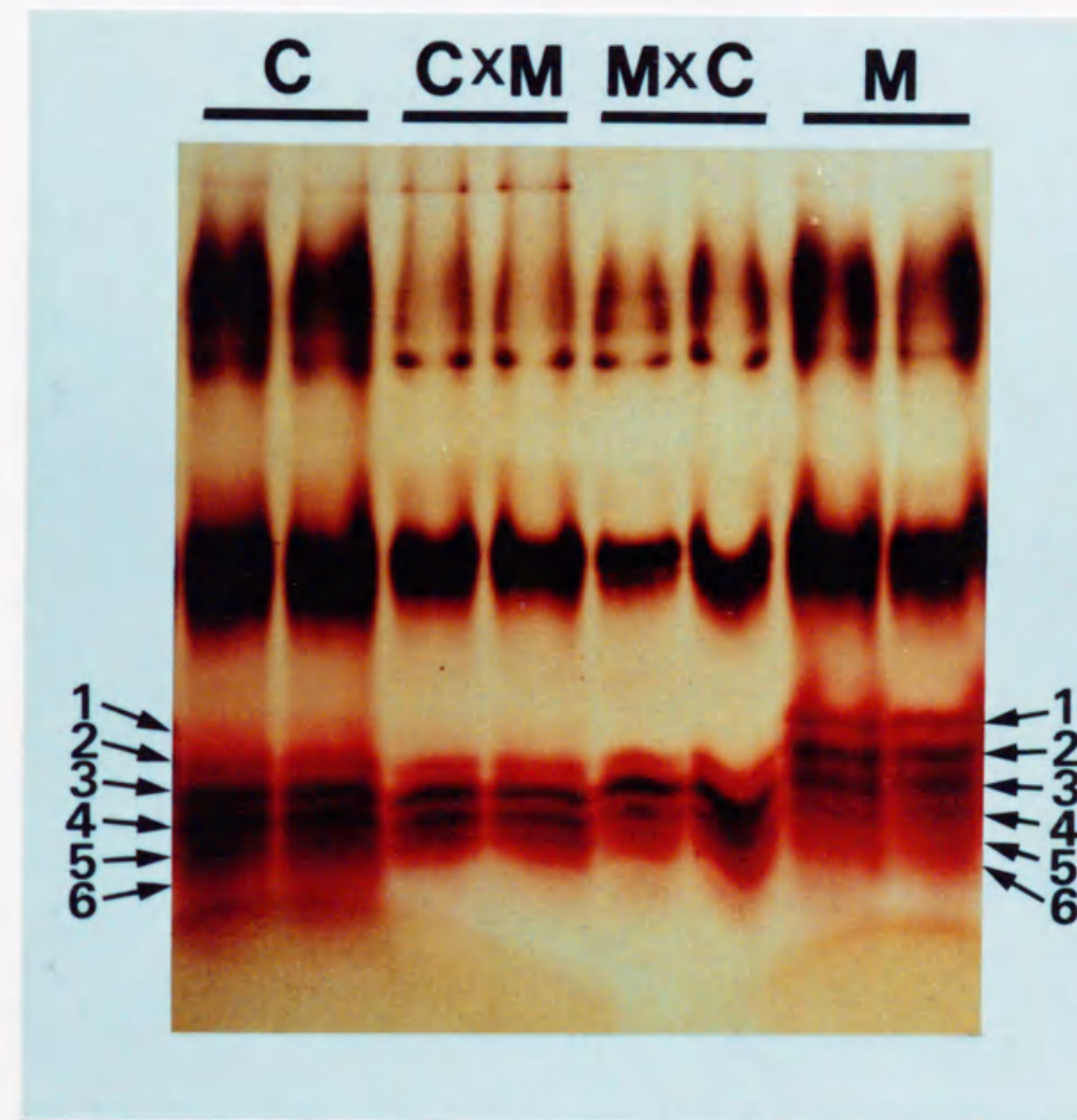
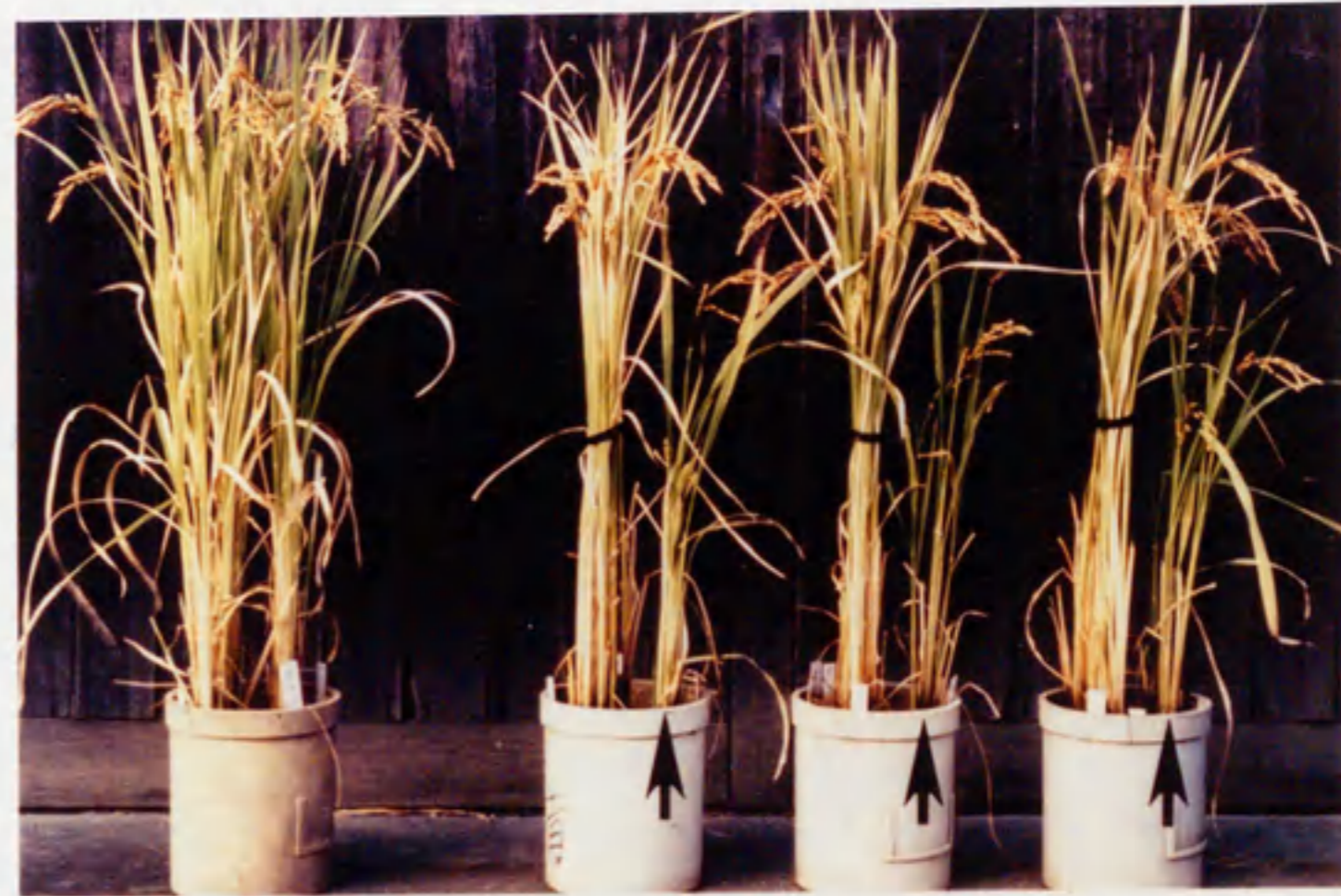
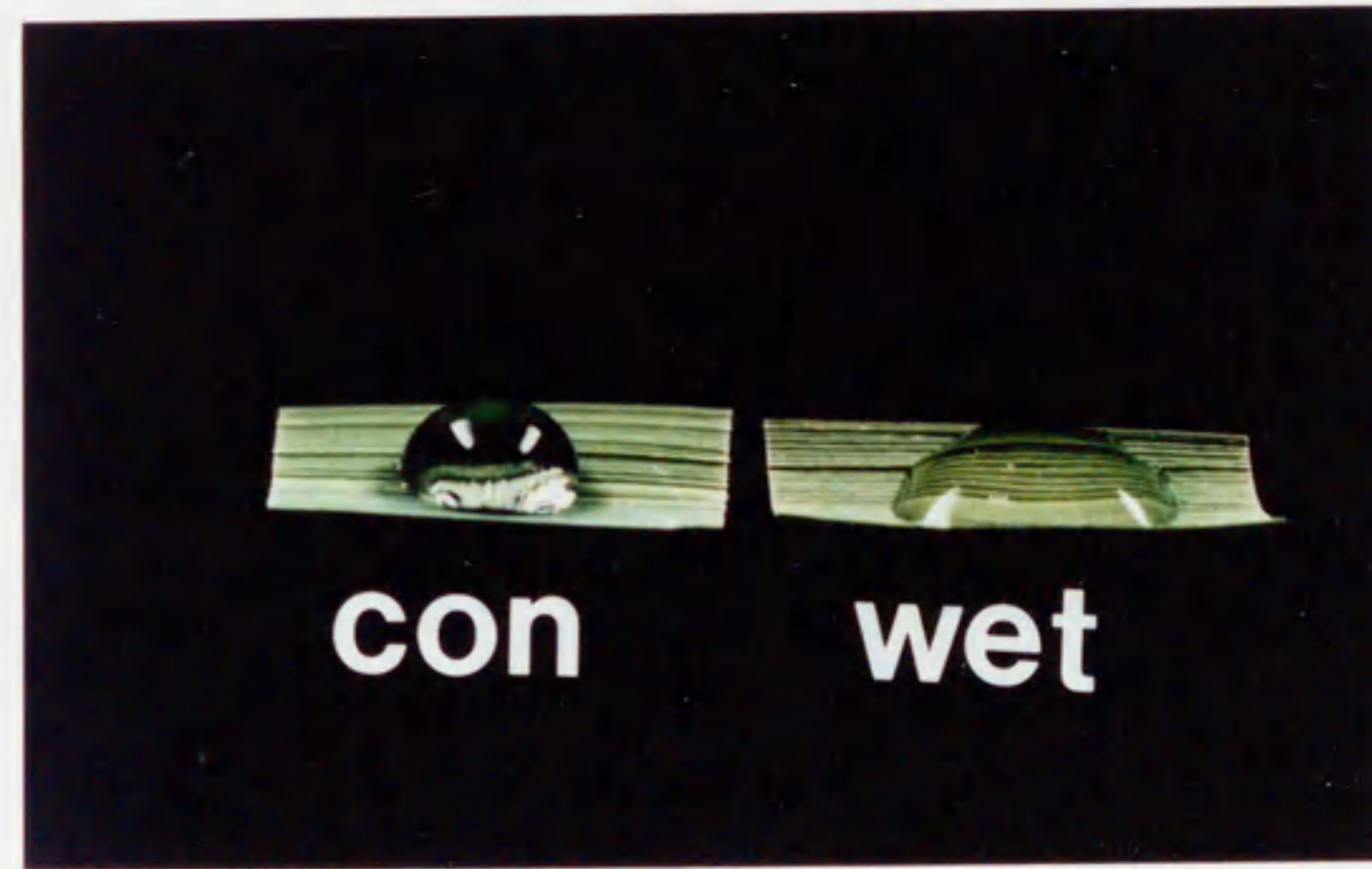


Fig. 20. Zymograms of acid phosphatase. C: Nipponbare (control), M: acid phosphatase mutant (No. 163-1-A-10), CxM: F_1 (Nipponbare No. 163-1-A-10), MxC: F_1 (No. 163-1-A-10 x Nipponbare).



con

163-1-A



con

wet

Fig. 21. Dwarf plants with dripping-wet leaves in variant strain (No.163-1-A).
C: control (Nipponbare), wet: dripping-wet leaf. Arrows indicate dwarf plants with dripping-wet leaves.

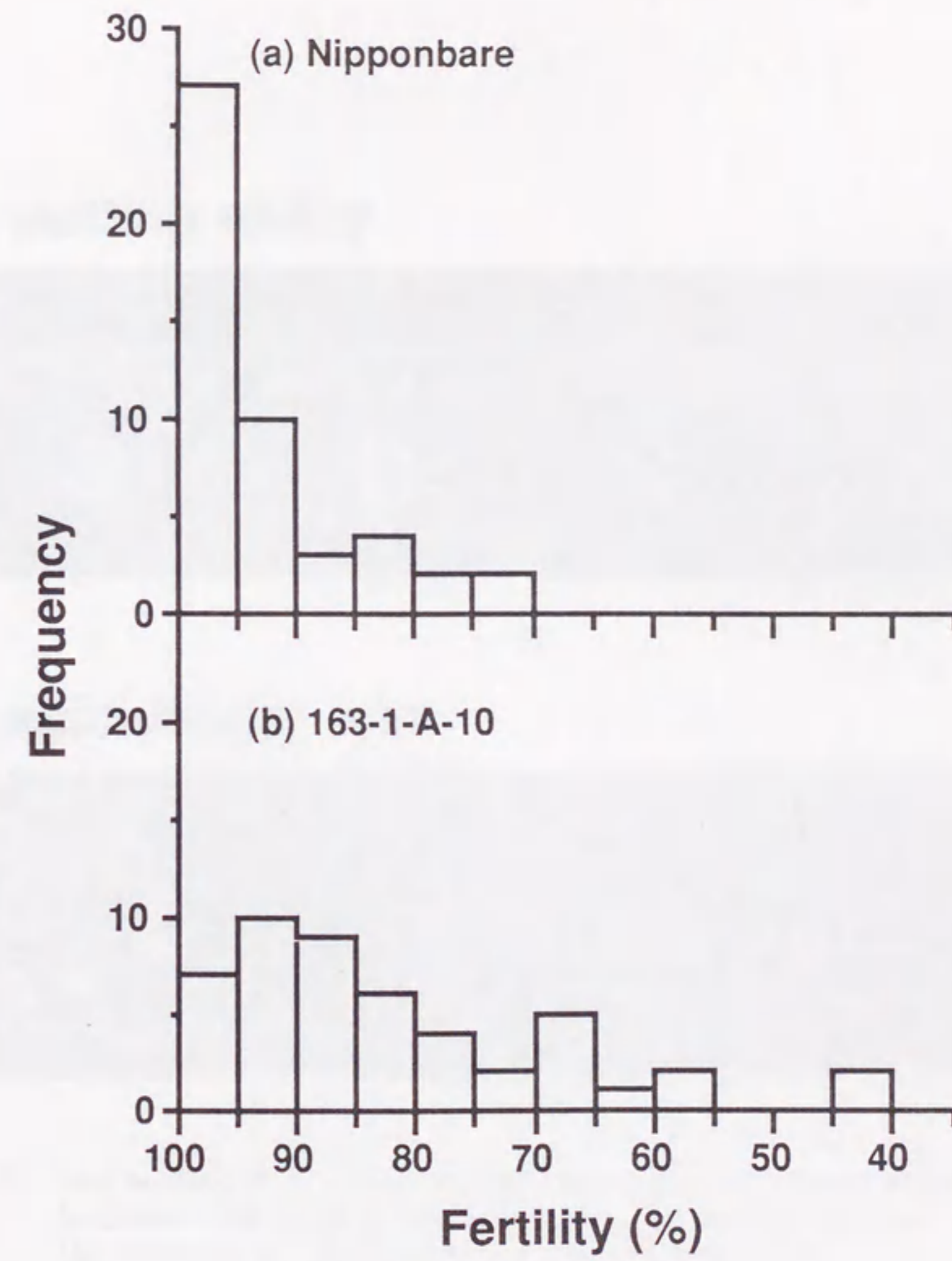
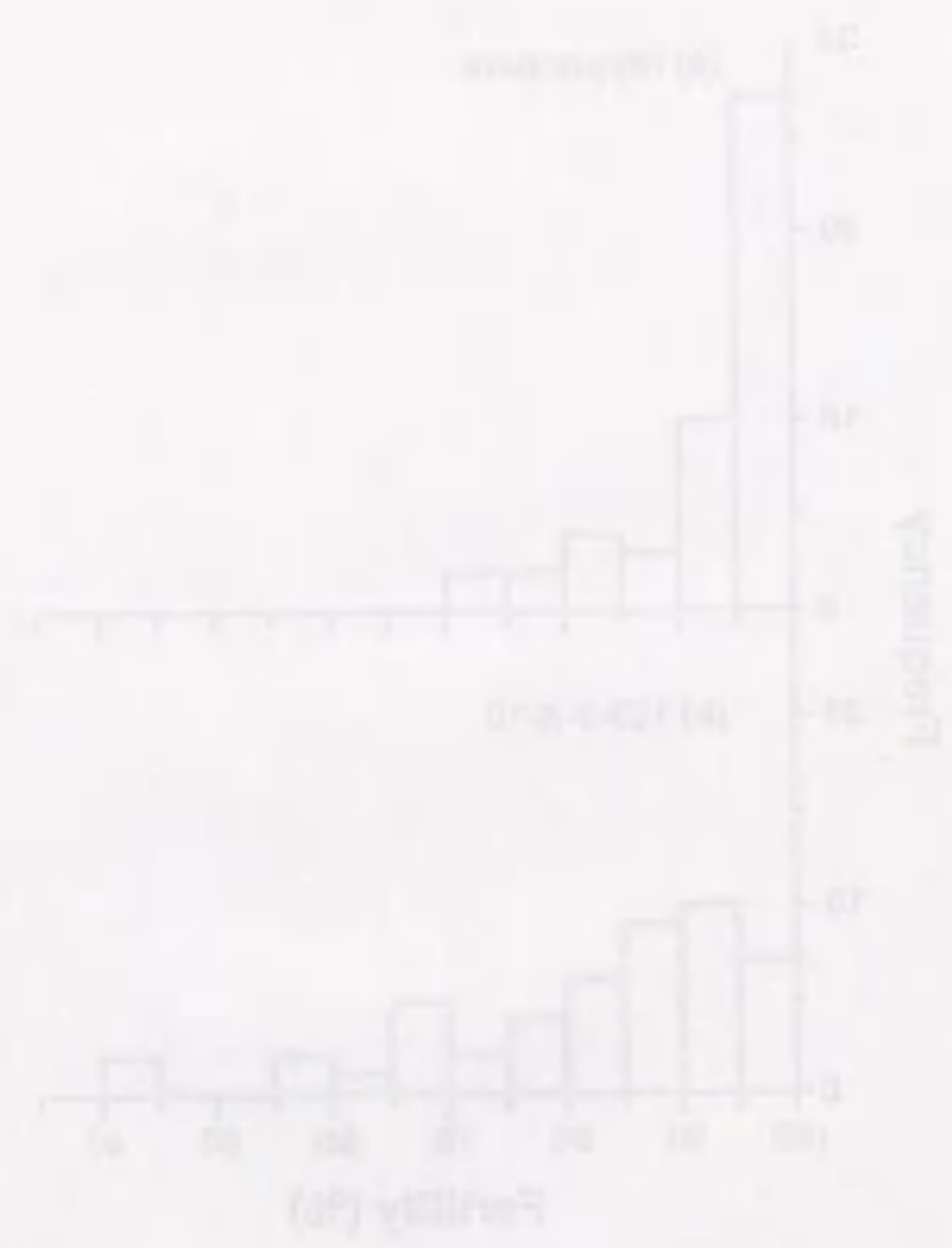
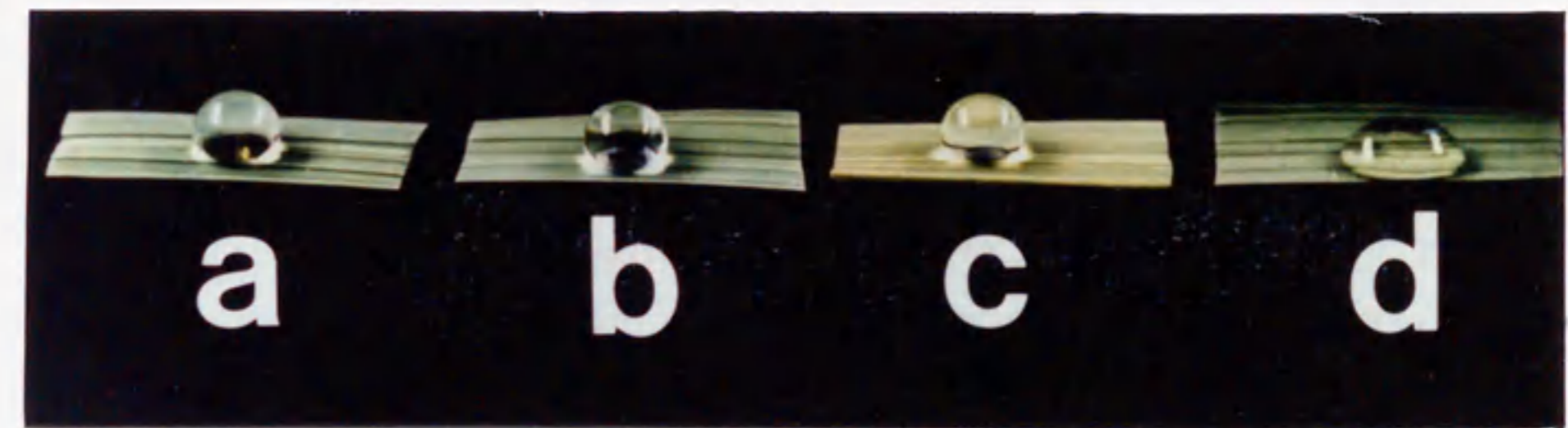


Fig. 22. Distribution of fertility in isozyme variant strain No. 163-1-A-10.
 (a) Nipponbare (control). (b) 163-1-A-10.



(1) wetting ability



(2) epicuticular wax

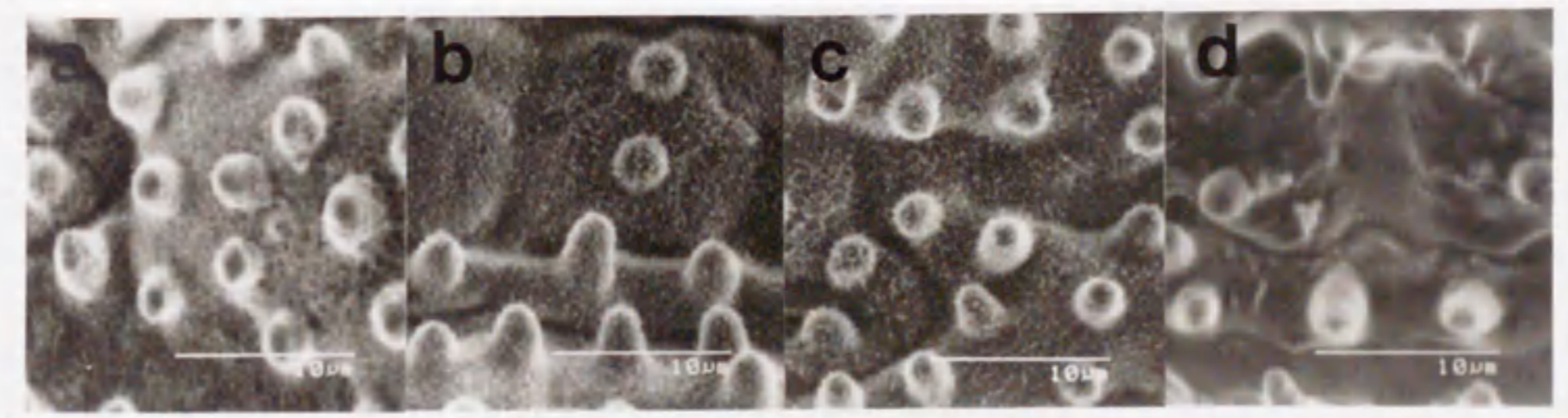


Fig. 23. Leaf surface of F_1 plants derived from reciprocal crosses between Nipponbare and dripping-wet leaf mutant. (1) wetting ability. (2) structure of epicuticular wax from SEM observation.
 a: Nipponbare, b: Nipponbare x Dripping-wet leaf mutant,
 c: Dripping-wet leaf mutant x Nipponbare, d: Dripping-wet leaf mutant.

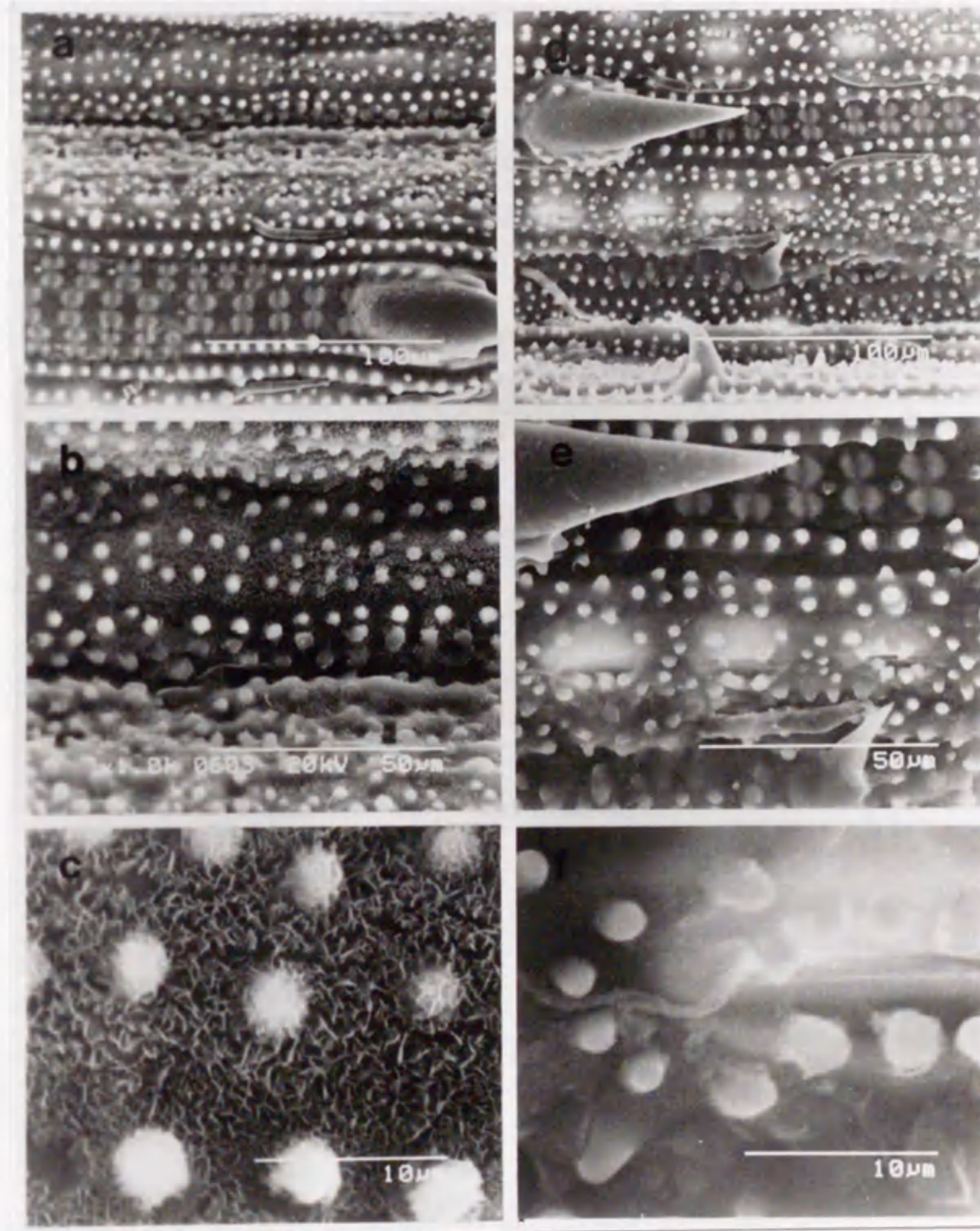


Fig. 24. SEM observations of the flag leaf blade surface at the adaxial side of a dripping-wet leaf mutant. (a), (b) and (c) Nipponbare (control). (d), (e) and (f) dripping-wet leaf mutant.

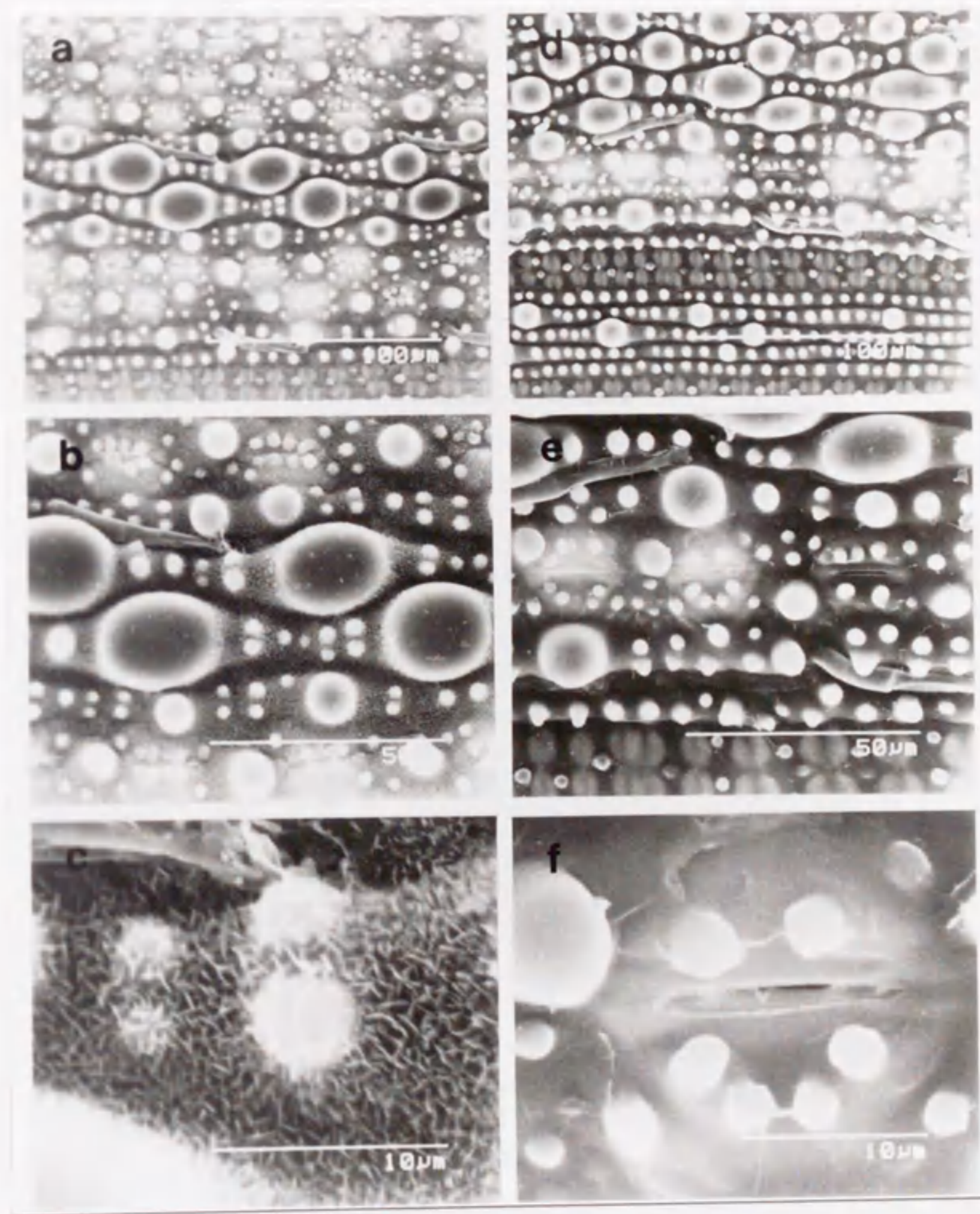


Fig. 25. SEM observations of the flag leaf blade surface at the abaxial side of a dripping-wet leaf mutant. (a), (b) and (c) Nipponbare (control). (d), (e) and (f) dripping-wet leaf mutant.

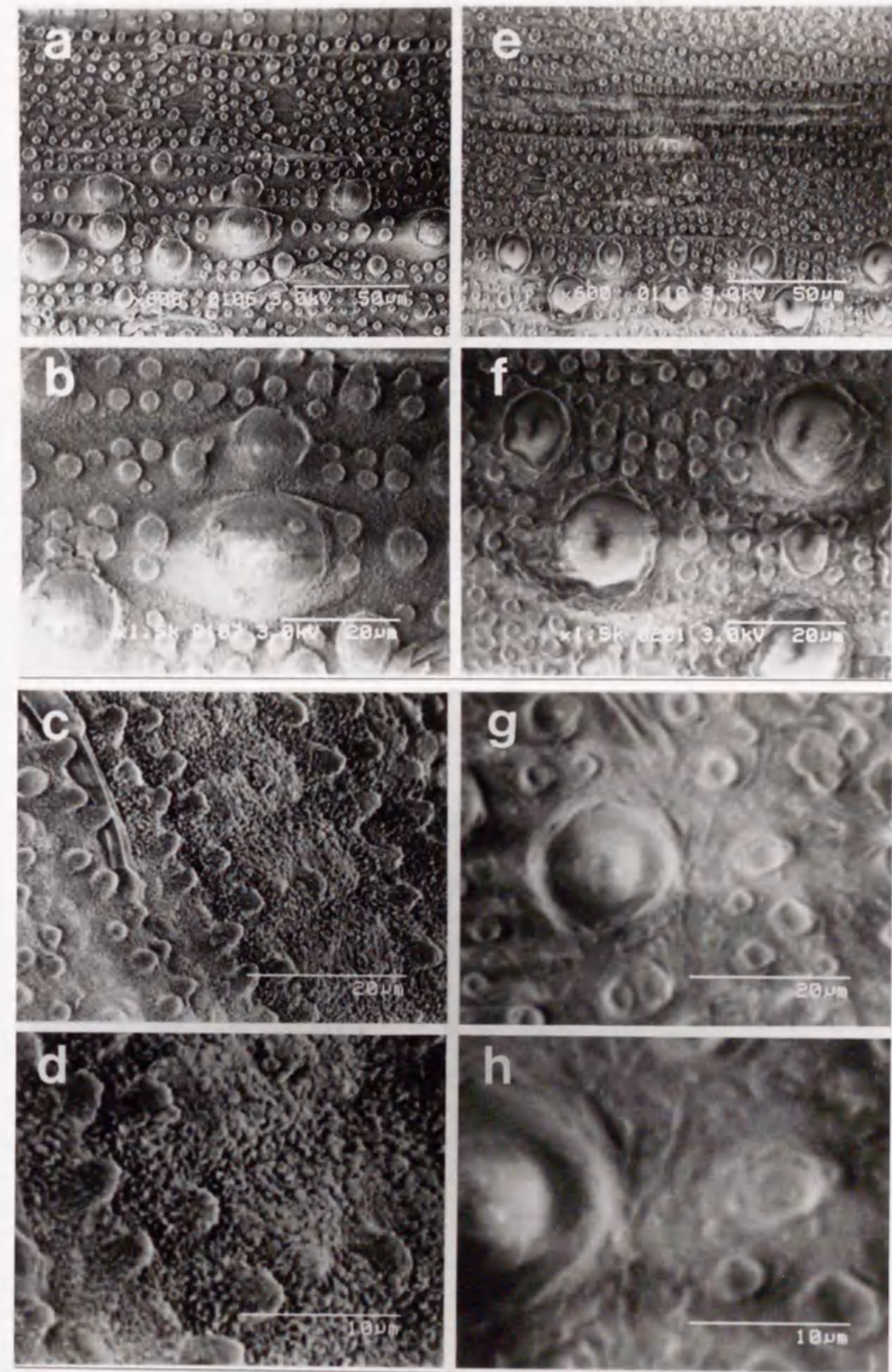


Fig. 26. Cryo-SEM observations of the sixth leaf blade surface at the abaxial side of a dripping-wet leaf mutant. (a),(b),(c) and (d) Nipponbare (control). (e),(f),(g) and (h) dripping-wet leaf mutant.

Table 1. Irradiation response on callus formation and regeneration of root, albino and green plantlet at different stages of anther culture (1994 Data)

Irradiation stage	Irradiation dose	No. of anthers		No. of calli			
		plated	with callus	plated	with roots	with albino	with green plantlet
without cold treatment	0 Gy	360	4 (1.1)	—	—	—	—
	2 Gy	396	4 (1.0)	—	—	—	—
	5 Gy	396	5 (1.3)	—	—	—	—
	10 Gy	396	10 (2.5)	—	—	—	—
	20 Gy	396	2 (0.5)	—	—	—	—
Ante-culture*	0 Gy	432	142 (32.9)	142	5 (3.5)	41 (28.9)	16 (11.3)
	2 Gy	396	131 (33.1)	131	5 (3.8)	13 (9.9)	15 (11.5)
	5 Gy	396	100 (25.3)	100	4 (4.0)	14 (14.0)	9 (9.0)
	10 Gy	216	35 (16.2)	35	3 (8.6)	6 (17.1)	1 (2.9)
	20 Gy	360	27 (7.5)	27	1 (3.7)	3 (11.1)	1 (3.7)
Dedifferentiation	0 Gy	720	216 (30.0)	216	5 (2.3)	18 (8.3)	10 (4.6)
	2 Gy	720	181 (25.1)	181	3 (1.7)	8 (4.4)	10 (5.5)
	4 Gy	720	143 (19.9)	143	5 (3.5)	7 (4.9)	4 (2.8)
	6 Gy	720	90 (12.5)	90	0 (0.0)	2 (2.2)	2 (2.2)
	8 Gy	720	62 (8.6)	62	3 (4.8)	3 (4.8)	4 (6.5)
7 days**	0 Gy	720	206 (28.6)	206	3 (1.5)	16 (7.8)	23 (11.2)
	4 Gy	720	205 (28.5)	180	3 (1.7)	17 (9.4)	10 (5.6)
	8 Gy	720	215 (29.9)	174	3 (1.7)	12 (6.9)	12 (6.9)
	12 Gy	720	139 (19.3)	120	2 (1.7)	8 (6.7)	13 (10.8)
	16 Gy	720	129 (17.9)	114	6 (5.3)	6 (5.3)	12 (10.5)
2 days***	0 Gy	—	—	91	1 (1.1)	6 (6.6)	6 (6.6)
	1 Gy	—	—	108	2 (1.9)	6 (5.6)	8 (7.4)
	2 Gy	—	—	171	2 (1.2)	5 (2.9)	5 (2.9)
	4 Gy	—	—	98	3 (3.1)	2 (2.0)	1 (1.0)
Regeneration	0 Gy	—	—	408	6 (1.5)	17 (4.2)	25 (6.1)
	1 Gy	—	—	486	4 (0.8)	21 (4.3)	30 (6.2)
	2 Gy	—	—	606	3 (0.5)	27 (4.5)	24 (4.0)
	4 Gy	—	—	474	4 (0.8)	13 (2.7)	4 (0.8)

* : anthers prior to plating.

** : anthers at 2 days or 7 days after plating on callus induction medium.

*** : calli at 2 days or 7 days after transfer to regeneration medium.

Table 2. Irradiation response on callus formation and regeneration of root, albino and green plantlet at different stages of anther culture (1990 Data)

Irradiation stage	Irradiation dose	No. of anthers		No. of calli			
		plated	with callus	plated	with roots	with albino	with green plantlet
Dedifferentiation*	0 Gy	540	173 (32.0)	173	9 (5.2)	29 (16.8)	56 (32.4)
	2.0 Gy	612	152 (24.8)	152	3 (2.0)	35 (23.0)	43 (28.3)
	4.0 Gy	648	126 (19.4)	126	11 (8.7)	24 (19.0)	62 (49.2)
	8.0 Gy	576	63 (11.0)	63	6 (9.5)	19 (30.2)	16 (25.4)
	16.0 Gy	648	7 (1.1)	7	1 (14.3)	1 (14.3)	2 (28.6)
Regeneration**	0 Gy	—	—	300	15 (5.0)	35 (11.7)	41 (13.7)
	2.0 Gy	—	—	309	21 (6.8)	28 (9.1)	47 (15.2)
	4.0 Gy	—	—	309	21 (6.8)	19 (6.1)	20 (6.5)
	8.0 Gy	—	—	289	21 (7.2)	5 (1.7)	20 (3.1)
	16.0 Gy	—	—	212	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)

* : anthers at 7 days after plating on callus induction medium.

** : calli at 1 day after transfer to regeneration medium.

Table 3. Test of significance of the average and S.D. of plant height in R₁

Irradiation stage	haploid			diploid		
	Number	Average	± S.D.	Number	Average	± S.D.
Dedifferentiation	0 Gy	33	25.8 ± 10.9	31	46.1 ± 7.6	
	20 Gy	59	27.7 ± 6.4*	40	44.8 ± 5.9	
	40 Gy	53	26.9 ± 6.7*	30	42.1* ± 6.6	
	80 Gy	22	18.4** ± 8.1	22	41.9 ± 10.2	

Regeneration	0 Gy	10	27.4 ± 3.9	60	43.1 ± 8.3	
	20 Gy	16	21.4** ± 6.0	27	44.3 ± 8.1	
	40 Gy	20	16.7*** ± 4.4	6	40.7 ± 4.9	
	80 Gy	0		8	37.4 ± 12.2	

* : significant at 5% level,
 ** : significant at 1% level,
 ***: significant at 0.1% level.

Table 4. Stock solution

(A)	Acrylamide 60%(W/V) solution
(B)	Bis* 2%(W/V) solution
(C)	Separation gel buffer 1 2M Tris**-HCl (pH 6.7, 20°C), 1M Glycine
(D)	Stacking gel buffer 1 0.7M Tris-HCl (pH 6.7, 20°C), 0.04M EDTA-2Na
(E)	Electrode buffer 1 x10 1M Tris, 1.5M Glycine
(F)	10% Ammonium persulfate

*N,N'-Methylenebisacrylamide

**Tris(hydroxymethyl)aminomethane

Table 5. Polyacrylamide gel solution

Separation gel		Stacking gel	
(A)	16.0 ml	(A)	8.0 ml
(B)	12.0 ml	(B)	12.5 ml
(C)	10.0 ml	(D)	10.0 ml
(F)	1.0 ml	(F)	1.0 ml
TEMED*	0.1 ml	TEMED	0.1 ml
H ₂ O	to 100.0 ml	H ₂ O	to 100.0 ml
	(9.9%T, 2.8%C)		(5%T, 5%C)

*N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

Table 6. Staining solution of acid phosphatase

2M Sodium acetate pH 5.0	5.0ml
Fast garnet GBC	250 mg
5% α -Naphthyl phosphate (in 40% ethanol)	1.0ml
3% β -Naphthyl phosphate (in 40% ethanol)	1.0ml
H ₂ O	to 100.0ml

Table 7. Origin of gametoclonal progeny used in the isozyme analysis

Irradiation stage	Dose	No. of calli with regenerated shoot	No. of regenerated plants
Dedifferentiation	20 Gy	9	15
	40 Gy	8	13
	80 Gy	3	5
Regeneration	20 Gy	6*	9
	40 Gy	1	2
No irradiation	0 Gy	27	38

*: one callus (No. 163) was a variant strain.

Table 8. Phenotype analysis of plants derived from the same callus as isozyme variant strain

Callus No.	Regenerated Plant No.	Divided hill No.	No. of R ₂ plant	Phenotype* of R ₂ plant
163	-1	-A	No. 1	-
			2	-
			3	-
			4	-
			5	dwf, wet
			6	acp
			7	-
			8	dwf, wet
			9	-
			10	acp
			11	-
			12	-
			13	-
163		-B	No. 1	-
			2	-
			3	dwf, wet
			4	acp
			5	dwf, wet
			6	-
			7	-
			8	dwf, wet
			9	-
-2	-A	No. 1~29	-	

* acp: acid phosphatase mutant, dwf: dwarf mutant, wet: dripping-wet leaf mutant, -: wild type.

Table 9. Segregation of acid phosphatase mutant type in F₂ populations derived from reciprocal crosses between Nipponbare and isozyme variant strain No. 163-1-A-10

	No. of plants		χ^2 -value	Probability
	wild type	mutant type		
Nipponbare x 163-1-A-10	70	24	$X^2_{3:1}=0.01418445$	0.9051975
163-1-A-10 x Nipponbare	53	19	$X^2_{3:1}=0.07407396$	0.78549475

Table 10. Comparison of some plant characters between Nipponbare and isozyme variant strain No. 163-1-A-10

	No. of Plants	Plant height (cm)	Culm length (cm)	Panicle length (cm)	No. of panicle / plant	No. of glume / panicle	Fertility (%)
Nipponbare	48	103.6±5.9	70.5±3.5	21.4±1.6	7.0±1.5	121.4±16.7	92.6
163-1-A-10	48	103.2±7.3	72.1±6.1	21.6±1.7	7.4±2.0	124.0±15.3	82.1 *

Data: average ± S.D.. *: significant at 5% level.

【報文目録】

- 1) Nakamura, K., H. Suzuki, K. Hattori and Y. Futsuhara

Identification of Ploidy Level of the Regenerated Plants
by Anther Culture in Rice.

Breeding Science 44:19-22 (1994).

- 2) Nakamura, K. and K. Hattori

Histological Observation of Multiple Shoot Formation Site
in Rice Seed Culture.

Breeding Science 45 (1995). (In press)

公表予定論文

- 3) Nakamura, K. and K. Hattori

Effect of ^{60}Co γ -ray Irradiation at Different Stages of
Rice Anther Culture.

Breeding Science (Submitted)