

植物培養細胞に対する mutagens の効果に関する研究 II

菜豆カルスの放射線感受性

森 重之・中西宏夫・塩尻 哲・村上道夫

SHIGEYUKI MORI, HIROO NAKANISHI, SATOSHI SHIOJIRI and MICHIO MURAKAMI

Studies on the effects of mutagens on cultured cells of higher plants II
Radiosensitivity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Kentucky Wonder

要旨: 菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Kentucky Wonder) のカルス, 幼苗および種子に対する γ 線照射の影響を比較した。照射カルスの生長は線量の増加に伴って有意な減少を示したが抑制程度は一様ではなく, 初期から生長が認められた 2.5~5 KR, 生長遅延を示したが生長を続けた 6.25~8.75 KR およびほとんど生長が認められなかった 10 KR 以上のほぼ 3 群に大別された。照射カルスの継代能力は 12.5 KR 以上ではほとんど認められなかった。カルスは線量の増加に伴って褐色の度合およびもろさの程度が増加した。一方, 幼苗照射における生長抑制は, 1 KR では約 50% で頂端分裂組織も正常であったが, 2 KR では顕著な抑制と頂端分裂組織の脱落が認められ, 5 KR 以上では枯死した。また, 種子照射においては, 10 KR までは約 30% の抑制であったが, 20 KR 以上ではほとんど生長が認められなかった。以上の結果から, 生長抑制でみた菜豆のカルス, 幼苗および種子の放射線感受性には顕著な差異が認められた。すなわち, 幼苗が最も感受性で, 種子が抵抗性であり, カルスはほぼその中間であった。

緒 言

現在までに, 突然変異育種によって多数の新品種が作出されている¹⁾が, 本育種法を実施するに際しては, 供試品種の放射線感受性を予め知っておく必要がある。

ところが, 高等植物の放射線感受性に関する従来の研究は, 大部分が気乾種子²⁾あるいは生育中の植物体³⁾についてのものであり, これは菜豆^{4)~6)}においても例外ではない。従って, 植物の培養細胞に対する放射線の影響に関する報告事例は比較的少なく^{7)~21)}, 特に, 同一種において培養細胞および幼苗²¹⁾, あるいは培養細胞, 幼苗および種子⁴⁾の放射線感受性を比較した報告は極めて少ない。

植物培養細胞に対する mutagens の効果に関する一連の実験のうち, 前報²²⁾では, 大豆の 2 品種 (感受性

および抵抗性各 1 品種) のカルスと種子とを用い, 放射線感受性について検討した結果, 両品種の放射線感受性の差異はカルスと種子とでは同程度であり, また, カルスは種子よりも感受性であることが判明した。

本実験は, 菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Kentucky Wonder) のカルスの生長に対する放射線の影響について調査するとともに, 同一品種の幼苗および気乾種子の放射線感受性との比較検討を試みたものである。

材料および方法

供試材料は市販の菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Kentucky Wonder) のカルス, 幼苗および気乾種子である。

供試カルスは無菌幼植物の胚軸由来のものを用いた。なお, 実験手順は前報²²⁾とほとんど同様である。菜豆

カルスの生長に対する添加物の効果についての実験結果²³⁾に基づき、脱分化用および継代培養用の培地には、Linsmaier and Skoog²⁴⁾の培地に蔗糖、30g/l; 酵母抽出物、1g/l; 寒天、8g/l; 2,4-D, 0.5mg/l およびカイネチン、0.5mg/l を添加し、pH を 5.6 に調整したものをを用いた。培養には 10ml の培地を入れた 18φ 試験管を使用し、28±1°C 暗黒条件下で培養した。

放射線照射には、京都大学農学部生物用γ線照射施設の⁶⁰Coγ線(線源の強さ、1800Ci)を使用した。

カルス照射に際しては、継代を2回以上くり返して安定した対数増殖期のカルスを用い、線量率 20KR/hr で、総線量 2.5, 5.0, 6.25, 7.5, 8.75, 10.0, 12.5 および 15.0KR のγ線を照射した。照射後培地照射の影響²⁵⁾を避けるために、同一組成の培地に移植して培養した。調査形質は生体重および乾物重(100°C, 1時間ついで60°C, 24時間乾燥)で、照射後8, 16, 20, 24および28日目に、一方、照射カルスの継代能力については、照射後24日目のカルスを新鮮培地に移植し28日目に、いずれも1区10個体について形態観察と秤量を行なった。

幼苗照射に際しては、1区100粒の種子を鹿沼土を入れた播種箱に播種し、10日後に第1葉を展開した幼苗を抜きとり、バットに水平に並べ、アルミフイルドで根部を覆って、総線量1, 2, 5および10KRを20KR/hrで照射した。照射後幼苗は、磯耕用園試標準処方第1例培養液²⁶⁾の50%溶液を入れたポットに移し、水耕培養を行なった。調査形質は草丈、節数、生体重および乾物重で、照射後0, 4, 8および16日目に1区5~10個体を無作為抽出して調査した。

種子照射に際しては、気乾種子を1区100粒ずつパラフィン紙の袋に入れ、20KR/hrで、1, 2, 5, 10, 20および30KRのγ線を照射した。照射後直ちに鹿沼土を入れた播種箱に播種し、発芽率の調査と形態観察を行なった。播種後10日目に第1葉を展開した幼苗を前述の水耕液を入れたポットで水耕培養した。調査形質は生存率、草丈、節数、生体重および乾物重で、移植後0, 4, 8日目に1区5~10個体を無作為抽出して調査した。

結果および考察

1. カルスに対するγ線照射の影響

以前に行なったカルスに対する照射実験(未発表)において、照射カルス(0.5~40KR)の生長は、無照射に比べていずれも有意な減少を示す事が判明している。しかし、線量によってその減少程度は様ではなく、0.5~5KRでは培養に伴い生(乾)重量は増加し

たが、10~40KRではほとんど生長が認められず、両線量区間にはその生長の様相に顕著な差異が認められた。従って本実験では、上述の結果より、5~10KRの間に3線量区(6.25, 7.5および8.75KR)を設けて、この間の影響をより詳細に検討する事とした。

カルスに対するγ線照射の影響は、第1, 2図および第1表に示すとおりである。無照射のカルスは置床4日目頃から生長をはじめ、8日目以後急速な生長を示したが、20日目以後にはほとんど生長が認められなかった。これは容器(18φ試験管)の容積や養分の欠乏等に起因するものと考えられる。カルスの色は、20日目頃までは乳白色乃至淡褐色を呈し、以後徐々に褐変の度合を増した。一方、照射カルスの生長は、無照射に比べていずれの線量区においても有意な低下を示した。しかし、照射線量によって生長の減少の程度は様ではなく、照射区は生長の様相からほぼ3群に大別出来ると考えられる。すなわち、初期から生長が認められた2.5~5.0KR(I)の区、生長の遅延が認められたがなお生長をつづけた6.25~8.75KR(II)の区および生長がほとんど認められなかった10KR以上(III)の区の3群である。特に、(II)の区においては線量の増加に伴って生長遅延の程度が大となり、6.25KRでは20日、7.5KRでは20~24日、8.75KRでは24日以後になって対数増殖期に入った。この照射カルスの生長遅延は、前報²²⁾の大豆カルスの場合にも認められている。また、図には示していないが、(I)および(II)

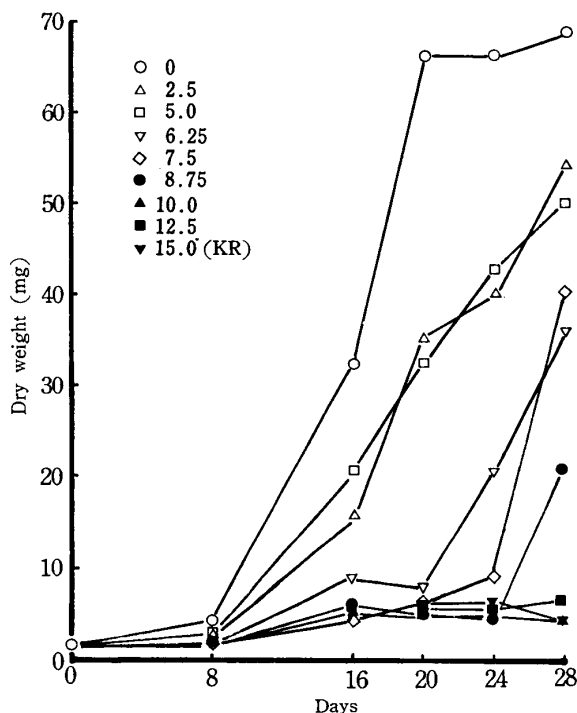


Fig. 1. Callus growth on an agar-solidified medium for 28 days after gamma irradiation.

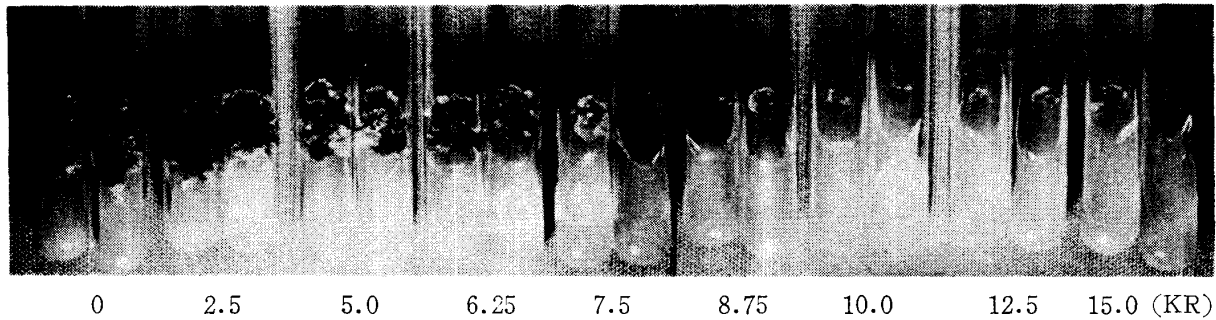


Fig. 2. Callus tissue cultures grown 24 days after gamma irradiation on an agar-solidified, modified Linsmaier and Skoog's medium supplemented with 2,4-D (0.5mg/1), kinetin (0.5mg/1) and yeast extract (1,000 mg/1).

Table 1. Callus growth on an agar-solidified medium for 28 days after gamma irradiation

Dose (KR)	Fresh weight (g)	Dry weight (mg)	Growth index*		Color	Friability
			Fresh weight	Dry weight		
0.00	1.43	68.7	57.5	41.9	Creame to light brown	—
2.50	0.78	54.1	30.8	32.8	Creame to light brown	—
5.00	0.87	50.2	34.5	30.4	Creame	—
6.25	0.50	35.8	19.6	21.4	Creame	—
7.50	0.64	40.4	25.3	24.3	Creame to light brown	±
8.75	0.24	23.0	8.8	13.4	Light brown	+
10.00	0.05	4.6	1.1	1.9	Dark brown	+
12.50	0.09	7.4	2.6	3.6	Dark brown	+
15.00	0.05	4.9	1.2	2.1	Dark brown	+

* Growth index = $\frac{\text{Final weight} - \text{Initial weight}}{\text{Initial weight}}$

の区のカルスは28日以後においてもわずかに生長が認められたが、無照射よりは有意に低い値にとどまった。一方、ほとんど生長の認められなかった(Ⅲ)の区のうち10KRのカルスにおいては45日以後になってわずかに生長が認められたものが存在した。さらに、他のカルス¹³⁾¹⁵⁾や菜豆のカルス⁴⁾において報告されている低線量照射による生長促進効果は、本実験においても大豆²²⁾の場合と同様に認められなかった。この事は、本実験における最低線量が2.5KRと比較的高かった事も一因と考えられる。なお、生体重に関する乾物重の場合とほぼ同様の傾向が認められた。

次に、照射後28日目におけるカルスの生育および諸特性(第1表)についてみれば、生、乾両重量のみならず Growth Index (以下GIと記す)に関しても、照射カルスは無照射に比べて有意に低く、かつ、概して線量の増加に伴って減少した。すなわち、乾物重のGIは無照射が42倍に生長したのに対し、8.75KR以下では13~33倍の生長にとどまり、さらに10KR以上ではわずかに4倍以下の生長を示したに過ぎない。また、

照射カルスは線量の増加に伴って褐色の程度を増すと共に、もろさの程度も増加する傾向が認められた。なお、無照射および2.5KRのカルスの色が淡褐色を示したのは、組織自体の老化によるものと考えられる。

第3図および第4図は、照射カルスの継代能力に関

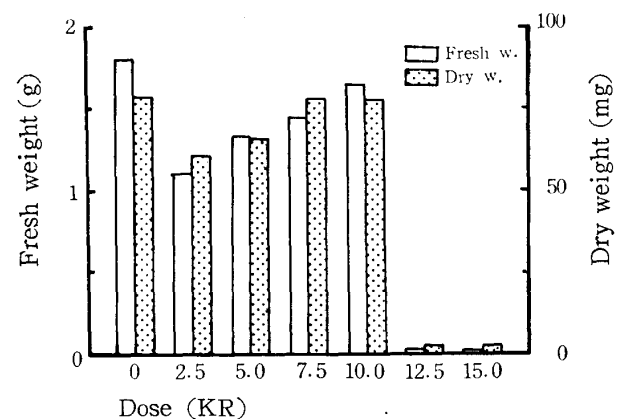


Fig. 3. Callus growth in subculture of gamma irradiated- and 24-day-cultured callus. Callus growth was measured at 28 days.

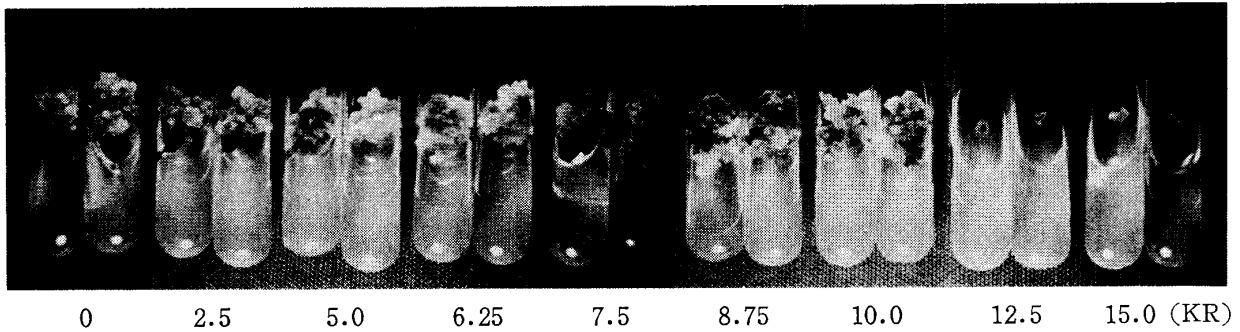


Fig. 4. Callus tissue subcultures grown 28 days gamma irradiated- and 24-day-cultured callus on an agar-solidified, modified Linsmaier and Skoog's medium supplemented with 2,4-D (0.5mg/l), kinetin (0.5mg/l) and yeast extract (1,000mg/l).

して、照射後24日目のカルの培養28日後の結果について示したものである。照射カルの生長は、2.5~10KR では生体重および乾物重とも無照射と顕著な差異は認められず、継代可能である事を示しているが、12.5KR 以上では生長はほとんど認められず褐変死した。特に、照射後28日間の培養によってもほとんど生長の認められなかった 10KR において、継代培養により無照射とほぼ同程度にまで回復が認められたが、この点に関しては前述のごとく、10KR において培養45日以後に低頻度ながら生長を示したカルスが存在した事とも考えあわせると、この線量ではカルの全構成細胞を致死に至らしめるには不十分で、不安定ながらも生長の可能性が残されており、植継ぎの刺激や新鮮な培地に移植する事により、あるいは、培地中の栄養分や植物ホルモンの働き等により生長を示したものと推察される。同様の現象は、前報²²⁾の大豆の照射カ

ルの継代培養においても認められた。

2. 幼苗に対する γ 線照射の影響

播種後10日目の幼苗に対する放射線照射の影響を諸形質について経時的に調査したが、その結果は第5図に、また、照射後16日目における幼苗の状態は第6図にそれぞれ示すとおりである。いずれの形質においても、照射区と無照射区の間には顕著な差異が認められ、その生長は線量の増加に伴って低下し、2 KR 以上ではほとんど生長が認められなかった。主茎の頂端分裂組織は1 KR では正常であったが、2 KR 以上では2日目頃から枯死し脱落した。しかし、2 KR においては10日目以後に側芽の伸長が認められた個体も存在した。また、一般に認められている葉型の形態的異常³⁾のうち、縮葉および斑入りは2 KR 以上において認められた。なお、Bajaj ら⁴⁾も菜豆の品種 Manitou では、1 KR 以下では生長抑制はわずかであるが、2 KR に

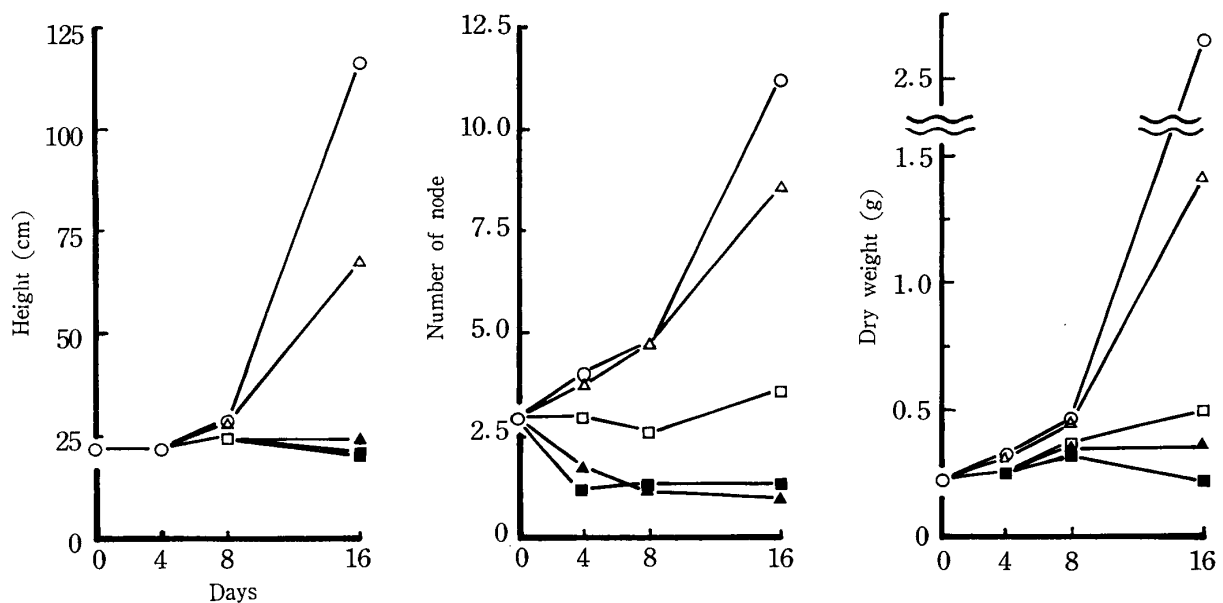


Fig. 5. Growth response of varying doses of gamma radiation on 10-day-old seedlings grown for 16 days. 0 (○—○), 1 (△—△), 2 (□—□), 5 (▲—▲), 10 KR (■—■)

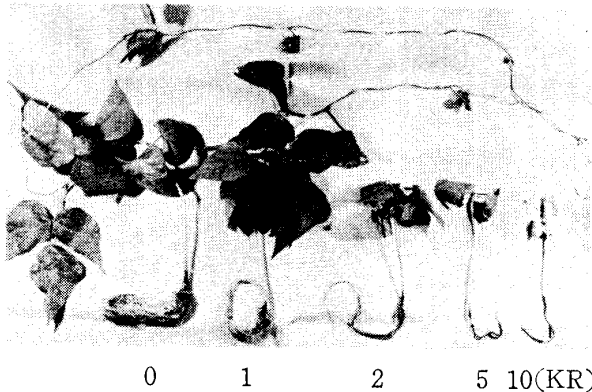


Fig. 6. Effects of varying doses of gamma radiation on 10-day-old seedlings grown for 16 days.

なると抑制も大(約40%)となり、しばしば頂端分裂組織が脱落し、さらに、5 KR 以上では生長は認められず枯死すると述べている。

3. 種子に対する γ 線照射の影響

気乾種子に対する γ 線照射の影響を諸形質について調査した結果は第7図に示すとおりである。幼苗長についてみれば、照射区は概して線量の増加に伴って減少傾向を示し、5 KR 以下では無照射の75%以上、10KR でも約70%の値を示したが、20KR では枯死した。また、節数、生体重および乾物重においてもほぼ同様の傾向が認められた。この事については、Bajaj ら⁴⁾も Manitou の致死線量は 20KR であると報告している。なお、30KR においては、発芽率は100%で、以後わずかに発根はしたが胚軸の伸長が認められず、水耕培養に移す事が出来なかった。また、発芽開始日は高線量区ほど遅延する傾向が認められた。さらに、

生長した植物体には 10KR で斑入り葉等の葉型異常が認められた。

4. カルス、幼苗および種子における放射線感受性の比較

カルス、幼苗および種子照射における生体重および乾物重と線量との関係は第8図に示すとおりである。また、第2表は無照射に比較して生長を50%抑制する線量(RD₅₀)をカルス、幼苗および種子の諸形質について示したものである。なお、第8図は前述のGIを考慮して図示したものであり、また、第2表のカルスのRD₅₀値は、0~10 KR について求めた回帰直線(生体重; $y = 92.8 - 8.52x$, 乾物重; $y = 104.7 - 8.4x$)に基づいて推定した。図および表から明らかな様に、カルス、幼苗および種子の放射線感受性を比較すると、それぞれの間で形質によって差異はあるが、同一種の3者間に顕著な差異が認められた。すなわち幼苗は最も感受性が高く、種子は抵抗性であったが、カルスは両者のほぼ中間に位置した。これに関しては、Bajaj ら⁴⁾は種子よりもカルスの方が抵抗性であると報告し、その抵抗性の一因として、カルスは未分化の状態にあり、構造が簡単で、種々の倍数性を含み、細胞相互間の依存性が少ない事を挙げている。しかしながら、前報²²⁾の大豆の放射線感受性を比較した場合においても、カルスは種子よりも感受性を示していた。一般に、気乾種子よりは浸漬種子²⁷⁾や生育中の植物体²⁸⁾の方が感受性で、代謝の活発な組織ほど感受性が高いとされている。本実験では対数増殖期のカルスに照射したものであり、気乾種子よりも感受性であっても矛盾しないと考えられる。さらに前述したとおり、

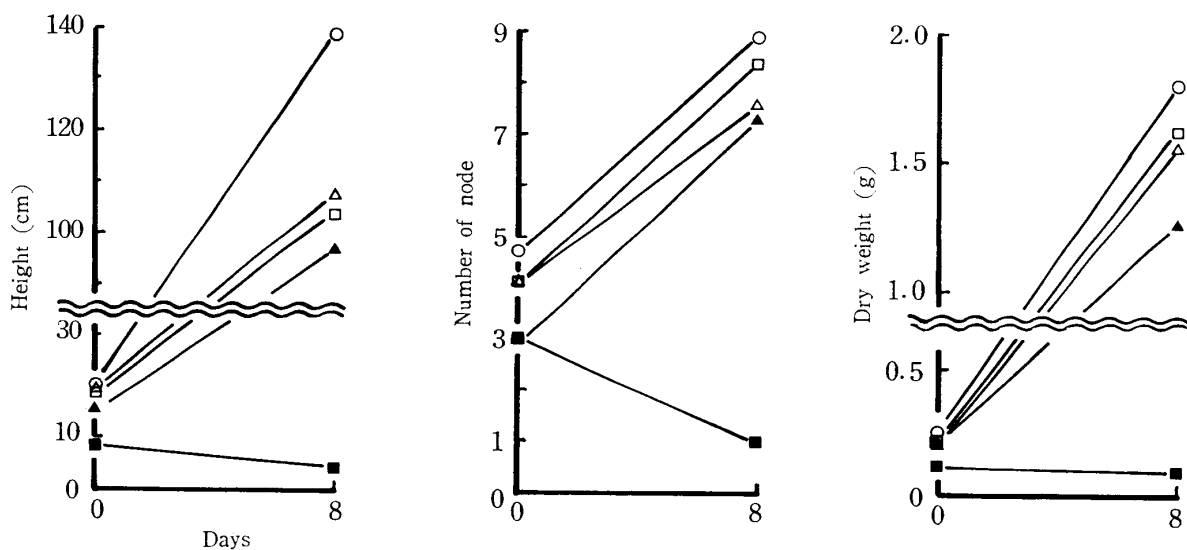


Fig. 7. Growth response of seedlings grown after gamma irradiated seeds. Abscissa indicates days after transplanting to water culture.

0 (○—○), 2.5 (△—△), 5 (□—□), 10 (▲—▲), 20KR (■—■)

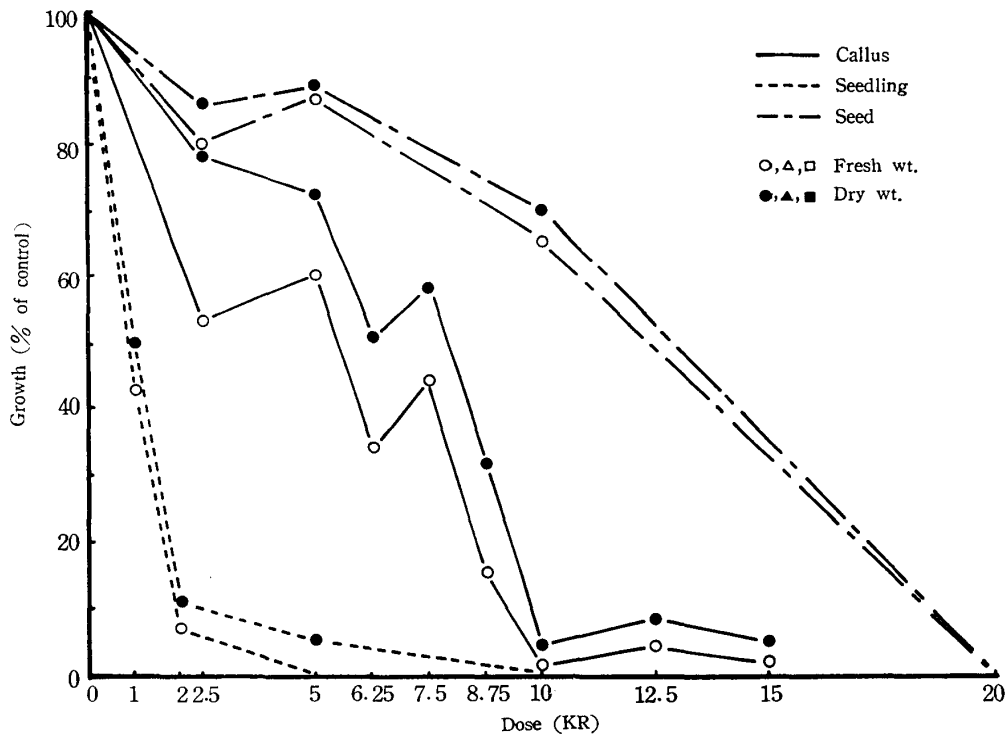


Fig. 8. A comparison of effects of varying doses of gamma radiation on the fresh and dry weight of callus, seedlings and seeds grown for 28 days, 16 days and 18 days respectively.

Table 2. Comparison of RD_{50} among callus tissue, seedlings and seeds

	RD_{50} (KR)			
	Fresh weight	Dry weight	Height	Mean
Callus tissue	5.0	6.5	—	5.8
Seedlings	0.9	1.0	1.0	1.0
Seeds	12.2	13.1	13.0	12.8

照射当代の培養においては、前報²²⁾と同様に、ほとんど生育の認められなかったカルスが、継代培養により無照射とほとんど同程度にまで生長を回復した点や、GI (第1表) が15KRにおいても約2倍の値を示していた点、さらには、以前に行なったカルスに対する照射実験において、GI値は20~40KRまで約1.5を示した事等を考え合わせると、菜豆カルスの致死線量はかなり高線量域にある事が考えられる。次に、菜豆における種子の RD_{50} について検討してみると、Bajajら⁴⁾の報告から生存率、草丈、生体重および乾物重の RD_{50} を推定するとそれぞれ10.9, 8.6, 8.1および6.3KRとなり、また、Mujeebら⁶⁾は品種Blue Lakeで、形態的基準 (seedling performance) でみた D_{50} (半数致死線量) の値として4.5KRを得ている。さらに、Husseinら⁵⁾は6品種を用いて、品種間差異を報告しているが、 D_{50} 値を推定してみると2.3~4.1KRとなる。これらの値と比較してみると、本実験における種子の RD_{50} (平均12.8KR) はかなり高い値を示している

が、これは鹿沼土で10日間育成後、水耕培養を行なった事も影響しているものと推察される。また、高木²⁹⁾は大豆の617品種を用いて莢数の RD_{50} で品種間差異を検討したところ、感受性の差は種子照射では約5倍、生育中の植物の緩照射では約7倍と報告しているので、あるいは品種間差異を反映しているのかもしれない。しかし、大豆²²⁾ではカルスと種子の感受性はほぼ平行的であり、これに反して、水稻 (未発表) では35品種の比較から必ずしもすべての品種が平行的ではないとの結果も得ているので、この点に関しては今後さらに検討を要するものと考えられる。また、本実験においては主として生長量を指標に放射線感受性の比較を行ってきたが、今後は生存率を指標にしてより詳細な比較を行なう必要があると思われる。

謝辞：本実験における γ 線照射に際し、京都大学農学部藤本光宏講師の援助を賜った。ここに厚く御礼申し上げる。

引用文献

- 1) Sigurbjörnsson, B. and A. Micke (1974) : "Polyploidy and induced mutations in plant breeding", IAEA, Vienna, pp. 303-343.
- 2) "Effects of ionizing radiations on seeds", IAEA, Vienna, (1961).
- 3) Gunckel, J. E. and A. H. Sparrow (1961) : "Encyclopedia of plant physiology", **16**, Springer-Verlag, pp. 555-611.
- 4) Bajaj, Y. P. S., A. W. Saettler and M. W. Adams (1970) : *Radiat. Bot.*, **10**, 119-124.
- 5) Hussein, H. A. S. and I. A. M. Disouki (1976) : *Z. Pflanzenzüchtg.*, **76**, 190-199.
- 6) Mujeeb, K. A. and J. K. Greig (1973) : *Radiat. Bot.*, **12**, 437-439.
- 7) Cruz, A. and A. C. Hildebrandt (1968) : *Radiation Res.*, **34**, 604-615.
- 8) Degani, N. and D. Pickholz (1973) : *Radiat. Bot.*, **13**, 381-383.
- 9) Eapen S. (1976) : *Protoplasma*, **89**, 149-155.
- 10) Eriksson, T. (1967) : *Physiol. Plant.*, **20**, 507-518.
- 11) Galun, E. and D. Raveh (1975) : *Radiat. Bot.*, **15**, 79-82.
- 12) Hell, K. G., W. Handro and G. B. Kerbauy (1978) : *Environ. Exptl. Bot.*, **18**, 225-228.
- 13) Holsten, R. D., M. Suggi and F. C. Steward (1965) : *Nature*, **208**, 850-856.
- 14) Howland, G. P., R. W. Hart and M. L. Yette (1975) : *Mutat. Res.*, **27**, 81-87.
- 15) King, G. S. (1949) : *Am. J. Botany*, **36**, 265-270.
- 16) Kochba, J. and P. Spiegel-Roy (1977) : *Environ. Exptl. Bot.*, **17**, 151-159.
- 17) Krumbiegel, G. (1979) : *ibid.*, **19**, 99-103.
- 18) Schieder, O. (1976) : *Molec. Gen. Genet.*, **149**, 251-254.
- 19) Shama Rao, H. K. and S. Narayanaswamy (1975) : *Radiat. Bot.*, **15**, 301-305.
- 20) Spiegel-Roy, P. and J. Kochba (1973) : *ibid.*, **13**, 97-103.
- 21) Venketeswaran, S. and C. R. Partanen (1966) : *ibid.*, **6**, 13-20.
- 22) 森 重之・中西宏夫・谷本忠芳・村上道夫(1976) : 京府大学報, 農**31**, 1-7.
- 23) 森 重之・中西宏夫・塩尻 哲・村上道夫(1977) : 育種, **27**別冊 2, 76-77.
- 24) Linsmaier, E. M. and F. Skoog (1965) : *Physiol. Plant.*, **18**, 100-127.
- 25) Ammirato, P. V. and F. C. Steward (1969) : *Develop. Biol.*, **19**, 87-106.
- 26) 堀 裕 (1966) : "蔬菜・花卉のれき耕栽培", 養賢堂, pp. 70-73.
- 27) Conger, B. V., D. D. Killion and M. J. Constantin (1973) : *Radiat. Bot.*, **13**, 173-180.
- 28) Rudolph, T. D. (1971) : *ibid.*, **11**, 45-51.
- 29) 高木 胖(1974) : 放射線育種場研究報告, 第**3**号, 45-87.

Summary

A comparative study on the effects of ^{60}Co gamma radiation was carried out on callus tissue, seedlings and seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Kentucky Wonder. Callus was obtained from the hypocotyl pieces grown on an agar-solidified, modified Linsmaier and Skoog's medium supplemented with 2,4-D (5 mg/l), kinetin (5 mg/l) and yeast extract (1,000 mg/l). Subculture was conducted on the same medium in the dark at $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Callus was exposed to various doses (2.5-15 KR) of gamma radiation at 20 KR/hr. Fresh and dry weight, potency of growth in subculture of irradiated callus, color and friability were measured. As compared with control, irradiated callus growth showed a significant decrease with increasing doses. Callus growth was classified into three types, i. e. callus began to grow from the early stage of cul-

ture at 5 KR and below, from 6.25-8.75 KR there was a delayed growth, at 10 KR and over there was little visual sign of growth. The potency of growth in subculture for 28 days of irradiated- and 24-day-cultured callus was recognized at 10 KR and below. With increasing doses, color of callus darkened, and the degree of friability increased. While 10-day-old seedlings were irradiated, striking inhibition of growth occurred at 2KR, followed by degradation of the apical meristem and growth ceased completely at 5 KR. Severe inhibition of growth of irradiated seeds occurred at 20 KR and over. A remarkable difference in radiosensitivity was observed among callus tissue, seedlings and seeds, i.e. seedlings were most sensitive, followed by callus tissue, and seeds were most resistant.