

植物培養細胞に対する mutagens の効果に関する研究 I

大豆カルの放射線感受性

森 重之・中西宏夫・谷本忠芳・村上道夫

SHIGEYUKI MORI, HIROO NAKANISHI, TADAYOSHI TANIMOTO and MICHIO MURAKAMI

Studies on the effects of mutagens on cultured cells of higher plants I
Radiosensitivity in callus tissues of soybeans

要旨: 大豆の2品種、シンメジロとタチスズナリの種子とカルスを用い、放射線感受性について比較した。カルスの生育に対する放射線の影響は、線量の増加に伴って増大し、シンメジロでは7.5KR以下では生育したが、10KRではわずかに生育するにとどまり、20KRではほとんど生育が認められず、一方、タチスズナリでは20KRまでは生育したが、30KRではほとんど生育が認められなかった。カルスの生体重および乾物重に関する RD_{50} は、タチスズナリがシンメジロの約2倍であった。照射カルスの継代能力はシンメジロでは10KR以下で、タチスズナリでは30KRでもわずかに認められた。種子照射における生育抑制はシンメジロでは15KR、タチスズナリでは40KR以上で顕著であった。 RD_{50} はタチスズナリがシンメジロの約2倍を示した。以上の結果から、両品種の放射線感受性の差異はカルスと種子とは同程度であり、かつ、カルスは種子よりも感受性であることが判明した。

緒 言

Muller¹⁾や Stadler²⁾が放射線によって人為的に突然変異を誘起させることが出来ることを報告して以来、現在までに、高等植物の種子および生体に対する放射線の影響に関しては多数の報告がなされている。

一般に高等植物の放射線感受性は種によって顕著な差異が認められ³⁾、また、同じ種に属する品種または系統間においても著しく異なることが知られている⁴⁾⁵⁾。大豆においても種子照射⁶⁾⁷⁾や全生育期間の生体照射⁷⁾で品種間差異の大きいことが報告されている。しかしながら、植物の培養細胞に対する放射線の影響に関しては、その報告事例は比較的少なく⁸⁾¹⁴⁾、特に、同一種の種子とカルスとにおける放射線感受性を比較した報告は極めて少ない¹⁰⁾¹³⁾。また、種子および生体照射で認められる感受性の品種間差異とカルス照射に

おける品種間差異とを比較した報告事例は全くない。突然変異育種の遂行に際して、多くの植物の培養細胞について放射線生物学的研究を行なうことは、単に細胞レベルにおける放射線感受性や突然変異の誘起に関する基礎的知見を得るのみならず、突然変異育種の効率化という応用面からも極めて重要なことと思考される。

以上の見地より本実験は、種子および生体照射において放射線感受性の明らかにされている大豆の2品種を用いて、その気乾種子と胚軸由来のカルスに対して放射線を照射し、それぞれの感受性の品種間差異について比較検討するとともに、種子とカルスの感受性の差異についても考察を加え、植物培養細胞に対する放射線の作用機構を解明するための基礎的知見を得ようとしたものである。

材料および方法

供試材料は、高木⁷⁾によって、種子および全生育期間生体照射における放射線感受性が明らかにされている大豆 (*Glycine max* (L.) Merrill) の2品種、シンメジロ ($rs_1rs_1rs_2^+rs_2^+$) とタチスズナリ ($rs_1^+rs_1^+rs_2^+rs_2^+$) の気乾種子および胚軸由来のカルスである。実験手順は以下のとおりである。まず、稔実良好な種子を選んで水洗した後、80%エタノールに5分間浸漬し、さらに、アンチフォルミンの3倍液で8分間振とうしながら表面殺菌を行なった。その後滅菌水で十分に水洗した後、口径22φの試験管に0.8%の寒天を20ml分注し、120°Cで15分間高压滅菌した播種用培地に播種し、27±1°C暗黒条件下で育成して無菌幼植物を得た。この幼植物の胚軸を1cmの長さに切出し、脱分化用培地に1試験管(18φ, 10ml分注)に1個ずつ置床した。脱分化用培地は Murashige and Skoog¹⁵⁾の培地を改良したもので、以下の物質を含んでいる(数値はmg/lを示す)。NH₄NO₃, 1,650; KNO₃, 1,900; CaCl₂·2H₂O, 440; MgSO₄·7H₂O, 370; KH₂PO₄, 170; FeSO₄·7H₂O, 27.8; Na₂-EDTA, 37.3; MnSO₄·4H₂O, 22.3; ZnSO₄·7H₂O, 8.6; CoCl₂·6H₂O, 0.025; CuSO₄·5H₂O, 0.025; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.25; KI, 0.83; H₃BO₃, 6.2; ニコチン酸, 0.5; ピリドキシン HCl, 0.5; サイアミン HCl, 0.1; ミオイノシット, 100; グリシン, 2; ショ糖, 30,000; 寒天, 8,000; 2,4-D, 0.5; カイネチン, 0.2。培地は1NのNaOH或はHClによってpH5.6に調整した。なお、得られたカルの継代培養は脱分化用培地と同一組成の培地を用いて行なった。

放射線照射は、京都大学農学部生物用γ線照射施設において、⁶⁰Co γ線を線量率20KR/hr.で照射した。カルス照射に際しては、1度継代したカルスを28日間培養したものをを用いた。照射線量は2.5, 5, 7.5, 10, 20および30KRで、培地照射の影響¹⁶⁾を避けるために、同一組成の新鮮培地に移し、27±1°Cで培養した。調査形質は生体重および乾物重(100°C, 24時間乾燥)で、1区8~10個体を5日ごとに秤量した。照射カルの継代培養能力に関しては、照射後30日目のカルスを新鮮培地に細切して置床し、30日後の生体重および乾物重を1区7個体について秤量した。一方、種子照射には気乾種子を用い、線量率20KR/hr.で、総線量5, 10, 15, 20, 40および60KRの照射を行ない、照射後直ちに人工気象室(25±1°C)内の鹿沼土を入れた播種箱に播種した。調査形質は発芽率、発芽日数、幼苗長、生体重および乾物重(100°C, 24時間乾燥)

の5形質であり、発芽調査は発芽終了日まで毎日、幼苗長については約5日ごとに、他の諸形質については、照射30日後に各区14個体についてそれぞれ測定した。

結果および考察

1. カルスに対するγ線照射の影響

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。シンメジロのカルスは培養30日後に生体重で約1000mg(置床時の約118倍)に達したが、タチスズナリでは約450mg(約67倍)にすぎなかった。カルスは両品種とも淡黄色を呈したが、シンメジロはもろく、一方、タチスズナリはかたかった。これは前田¹⁷⁾が水稻では品種により“friable”なカルスと“compact”なカルスのあることを報告しているのと類似している。次に、カルスに対するγ線

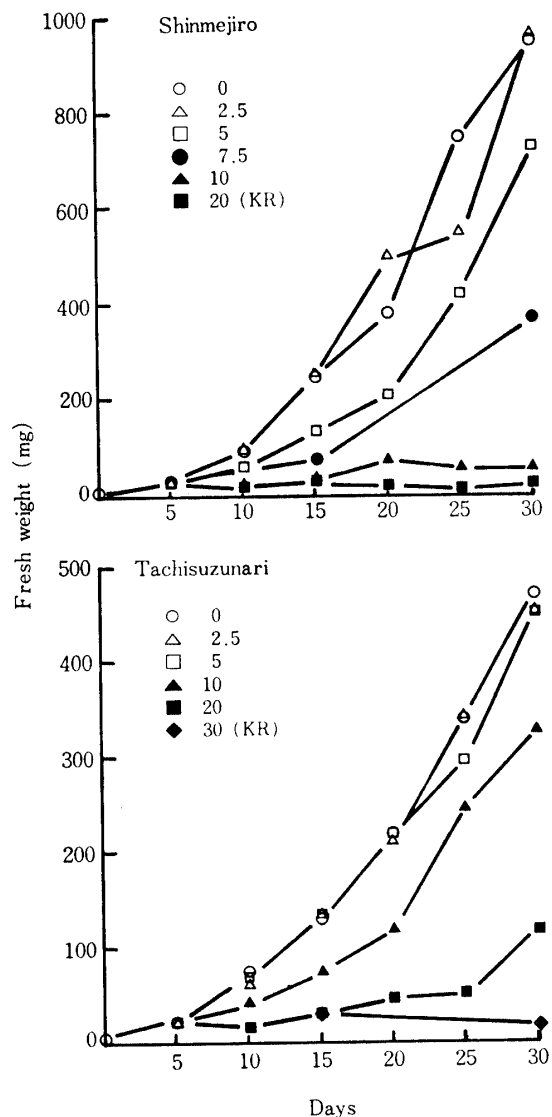


Fig. 1. Callus growth on an agar-solidified medium for 30 days after gamma irradiation.

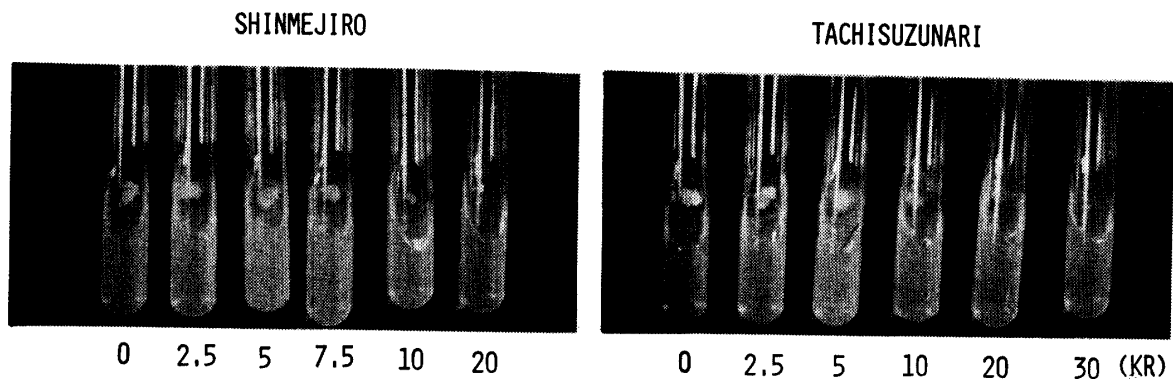


Fig. 2. Callus tissue cultures grown 15 days after gamma irradiation on an agar-solidified, modified Murashige and Skoog's medium supplemented with 2, 4-D (0.5 mg/l) and kinetin (0.2 mg/l).

Table 1. Growth index* of callus on an agar-solidified medium for 30 days after gamma irradiation

Variety		Irradiation (KR)						
		0	2.5	5	7.5	10	20	30
Shinmejiro	Fresh weight	117.9	122.0	91.4	46.0	8.4	3.6	—
	Dry weight	84.6	85.8	61.3	35.9	7.5	3.6	—
Tachisuzunari	Fresh weight	67.4	65.0	64.2	—	46.7	16.9	2.7
	Dry weight	48.0	45.2	42.3	—	32.7	11.0	3.3

* Growth index = $\frac{\text{Final fresh (dry) weight of the culture}}{\text{Original fresh (dry) weight of the culture}}$

照射の影響についてみると、シンメジロは、2.5 KR では無照射とほぼ同程度の生育を示し、他のカルス⁸⁾⁹⁾¹³⁾において報告されているような放射線の低線量照射による有意な生育促進効果は認められなかった。5 KR 以上の線量区においては、線量の増加に伴ってカルスの生育抑制と生育遅延が認められ、10KR では照射後約15日まではほとんど生育が認められず、その後徐々に生育をはじめた。しかし、20KR になればカルスの生育はほとんど認められなかった。これに反し、タチスズナリでは、2.5 および 5 KR のカルスの生育は無照射のそれとほとんど差異がなく、10KR 以上で生育が漸減の傾向を示し、30KR ではほとんど生育を認めることが出来なかった。また、カルスの色は、両品種とも線量の増加に伴って褐色の程度が増加した。高線量照射によるカルスの褐変化については、すでに 2・3 の事例¹³⁾¹⁸⁾について報告されているとおりである。なお、乾物重に関しては、両品種において生体重と同様の傾向が認められた。以上の結果から、生育が抑制されはじめる線量および生育がほとんど認められなくなる線量について両品種を比較すると、シンメジロはタチスズナリよりもかなり感受性(約2倍)であるといえる。

次に、第3図および第4図は照射カルスの継代能力

に関して、照射後30日目のカルスの培養30日後の結果について示したものである。シンメジロのカルスの生育は、無照射に比べて7.5 KR まではほとんど差異が認められず、10KR ではほぼ半減したが継代は可能であった。しかし、20KR においては生育がほとんど認められず褐変枯死した。一方、タチスズナリの照射カルスは、2.5~10 KR においては無照射とほぼ同様の生育を示し、20KR においても約40%の生育を示したが、30KR になれば大部分のカルスは褐変枯死した。しかし、なかにはわずかながら遅れて生育を示したのもあり継代は可能であった。シンメジロの10KR およびタチスズナリの30KR のように、照射後30日間の培養によってもほとんど生育の認められなかったカルスにおいて、継代により生育の回復が認められたが、同様の現象は、菜豆の照射カルスの継代培養¹⁸⁾においても認められている。このことは、上述の照射線量はカルスの全構成細胞を致死に至らしめるには不十分で、不安定ながらも生育の可能性が残されていること、植え継ぎの刺激や新鮮な培地に移植することにより、或いは、培地中の2,4-Dやカイネチンの働きなどにより、生育がはじまったことを示唆するものである。また、一般にカルスでは染色体数の変異が大きく、倍数性や異数性の細胞を含むことが報告されており¹⁹⁾、さらに、

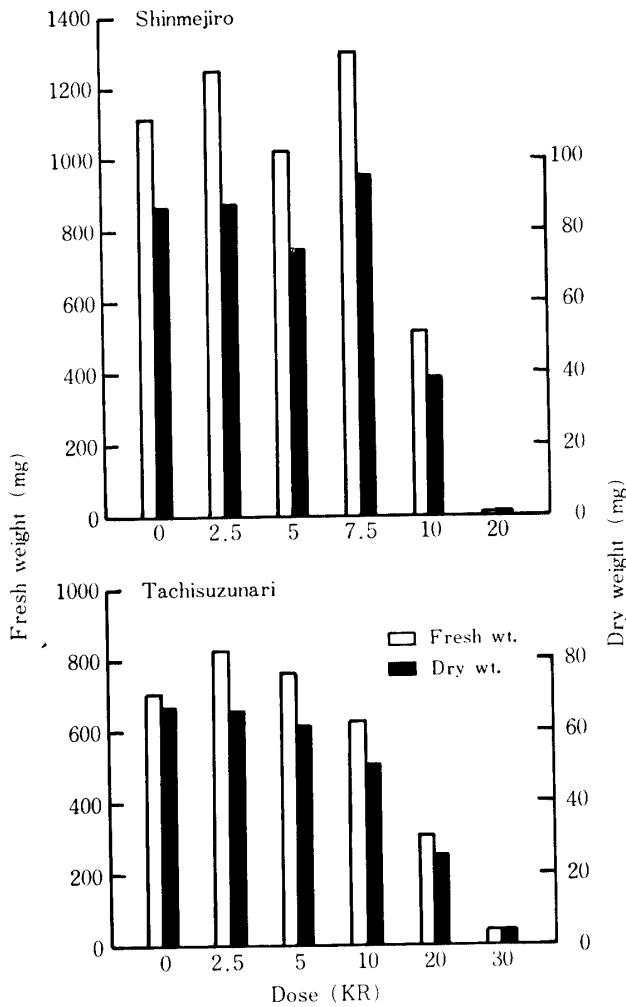


Fig. 3. Callus growth in subculture of gamma irradiated- and 30-day-cultured callus. Callus growth was measured at 30 days.

倍数体は2倍体に比べて放射線感受性が低い²⁰⁾²¹⁾ことが知られているので、これらの細胞が基になって生育の回復が起ったことも考えられる。

2. 種子に対するγ線照射の影響

気乾種子に対するγ線照射の影響を幼苗長について検討した結果は第5図に示すとおりであり、また、種子照射後14日目における幼苗の状態は第6図に示すとおりである。シンメジロではほとんどの種子が5~6日で発芽し、照射による発芽遅延は認められなかった。発芽後の生育は、5KRでは無照射とほとんど差異が認められなかったが、10KRで幼苗長の生育は半減し、また、頂端分裂組織の細胞が枯死するため、初生葉の展開にまで至らない個体も出現した。15KR以上の線量では、いずれの個体も生長点が枯死し、以後の生育は認められなかった。一方、タチスズナリは4~7日で発芽し、線量の増加に伴う発芽遅延がわずかに認められた。幼苗長の生育に対する抑制効果は10KR以上

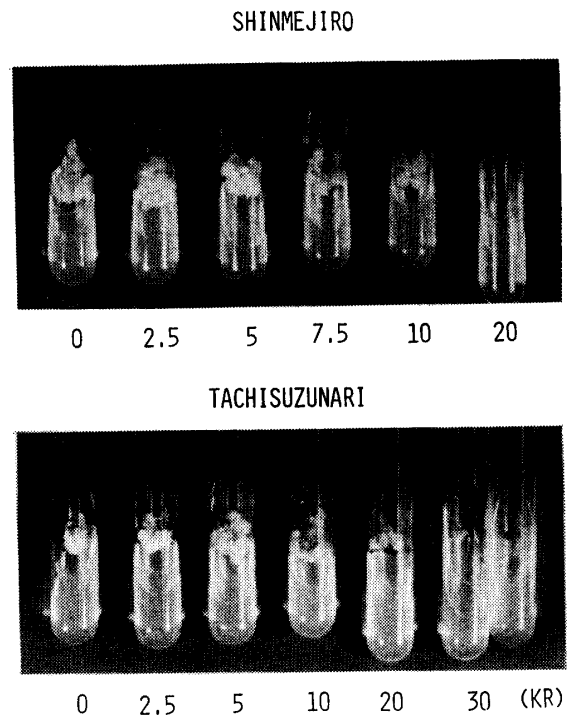


Fig. 4. Callus tissue subcultures grown 30 days of gamma irradiated- and 30-day-cultured callus on an agar-solidified, modified Murashige and Skoog's medium supplemented with 2, 4-D (0.5mg/l) and kinetin (0.2 mg/l).

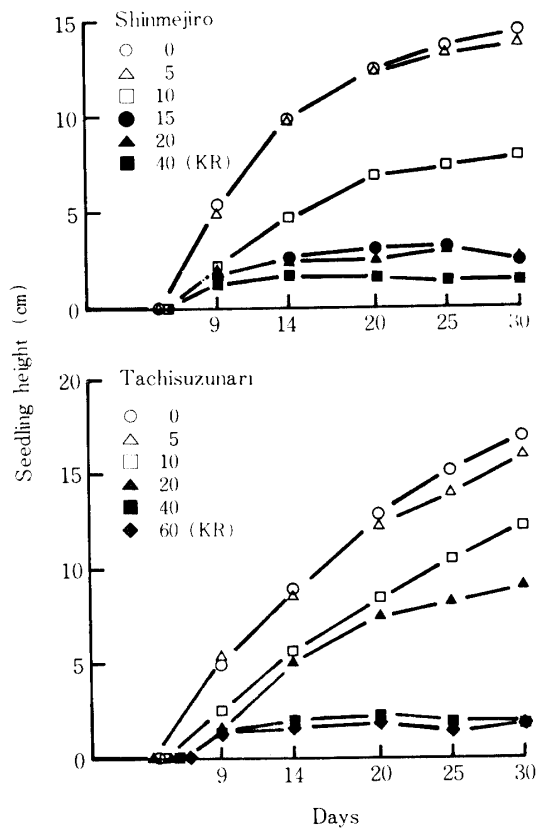


Fig. 5. Growth response of 30-day-old seedlings grown after gamma irradiated seeds.

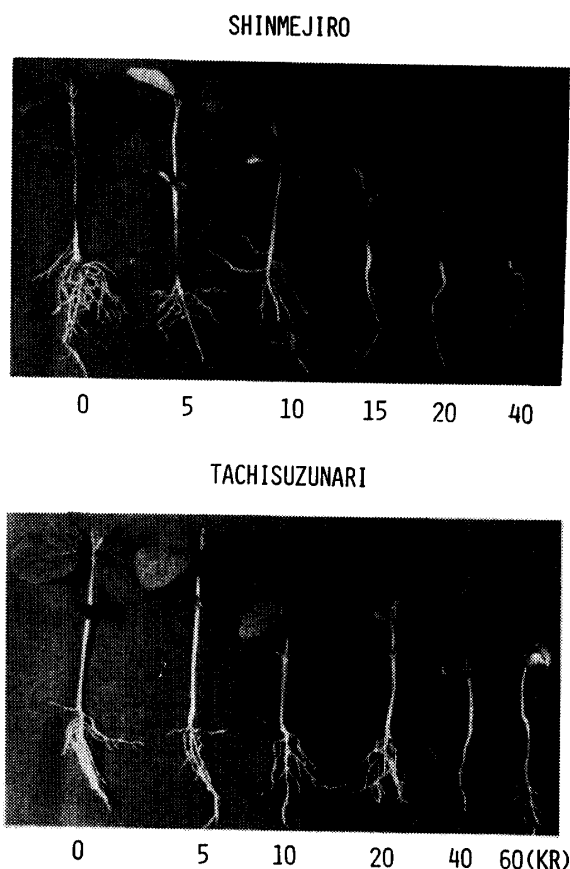


Fig. 6. 14-day-old seedlings grown from seeds exposed to varying doses of gamma radiation.

の照射で顕著に認められ、線量の増加に伴って生育は減少し、40KRでは大部分の個体は生長点が枯死したが、第1本葉を展開した個体がわずかに1個体存在した。しかし、60KRになれば全個体が枯死するに至った。さらに、両品種とも、生育抑制のほか、葉型の形態的異常、すなわち、3複葉における側生葉の矮小化、融合、歪曲および欠損などが認められた。これらの葉型異常は高線量照射の影響として一般に認められている

22)。次に、種子照射後30日目の幼苗における生体重および乾物重と照射線量との関係について考察したが、その結果は第2表に示すとおりである。両重量と線量との間には上述の幼苗長の場合とほぼ同様の傾向が認められ、両品種とも、5 KR では無照射とほとんど差異は認められなかったが、シンメジロでは15 KR, タチスズナリでは40KR の線量区まではほぼ直線的に減少を示し、無照射の重量のほぼ10%前後となった。しかし、さらに高線量になると減少程度はかえってゆるやかになる傾向を示した。

3. カルス照射と種子照射とにおける放射線感受性の比較

シンメジロおよびタチスズナリのカルス照射および種子照射における生体重と線量との関係を照射後30日目について示すと第7図のとおりであり、なお、第3表は両品種のカルスおよび種子照射において、無照射

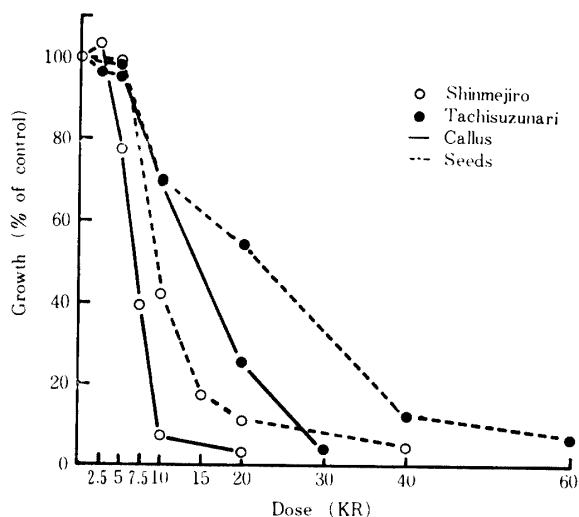


Fig. 7. A comparison of the effect of varying doses of gamma radiation on the fresh weight of callus and seeds grown for 30 days.

Table 2. Growth of 30-day-old seedlings grown from gamma irradiated seeds

Variety		Irradiation dose (KR)						
		0	5	10	15	20	40	60
Shinmejiro	Fresh weight (g)	3.30	3.25	1.38	0.55	0.36	0.16	—
	% of control	100	98.5	41.8	16.7	10.9	4.8	—
	Dry weight (g)	0.46	0.46	0.16	0.05	0.05	0.01	—
	% of control	100	100	34.8	10.9	10.9	2.2	—
Tachisuzunari	Fresh weight (g)	4.18	4.11	2.93	—	2.26	0.50	0.27
	% of control	100	98.3	70.1	—	54.1	11.7	6.5
	Dry weight (g)	0.60	0.54	0.34	—	0.23	0.05	0.03
	% of control	100	90.0	56.7	—	38.3	8.3	5.0

Weights represent mean of 14 plants for each treatment

Table 3. Comparisons of RD₅₀ Between callus and seeds, and between two soybean varieties

		RD ₅₀ (KR)		Tachisuzunari
		Shinmejiro	Tachisuzunari	Shinmejiro
Callus	Fresh weight	6.8	14.4	2.1
	Dry weight	6.9	14.0	2.0
Seed	Fresh weight	9.3	21.9	2.4
	Dry weight	8.8	13.6	1.5
	Seedling height	10.7	21.4	2.0

に比較して生育を50%抑制する線量 (RD₅₀) を照射後30日目について示したものである。放射線感受性に関してまず品種間について比較すれば、これらの図および表より明らかなようにシンメジロはタチスズナリよりも放射線感受性であるといえる。また、その品種間差異の程度は、タチスズナリの方がカルスでは約2倍、種子でもほぼ2倍 (1.5~2.4) の抵抗性を示し、種子における放射線感受性の差異は、カルス、すなわち、細胞レベルにおいてもほとんど平行的で変化しないことが明らかとなった。この点に関連して、高木ら²³⁾は、大豆の種子照射と全生育期間の生体照射では放射線抵抗性は、一般に平行的であることを指摘している。

次に、カルスと種子との放射線感受性について比較すれば、明らかにカルスは種子よりも感受性であるといえる。これに反し、種子はカルスよりも感受性であるというタバコ¹⁰⁾および菜豆¹³⁾についての報告があるが、この両結果の相違については次のことが考えられる。すなわち、タバコや菜豆での研究では、カルスは主として液体培養によっており、本実験は、固形培養をした場合のカルスについて比較したものである。カルスには一定の組織体制が存在し、カルス塊の周縁部分に分裂細胞が存在するとの報告²⁴⁾があり、細胞相互間の関連性の点では、個々の細胞が液体培養の場合ほど独立性を維持しているとは考えられない。次に、両実験の植付量が異なる点も影響しているものと考えられる。すなわち、生体重でタバコは80mg、菜豆は100mgであるのに対し、本実験では8mgで約1/10にすぎない。このことは放射線障害の回復の点で不利に働くことが考えられる。さらに、本実験では28日間培養したカルスに照射し、照射後直ちに細切して新鮮培地に置床しており、カルス照射の影響が細切の影響により実際よりも増巾されて現われていることも考えられる。しかしながら、一般に気乾種子と浸漬種子および気乾種子と生育中の植物体との放射線感受性の比較では、浸漬種子²⁵⁾や生育中の植物体²⁶⁾の方が感受性で、代謝の活発な組織ほど放射線感受性が高いとされている。この点からみれば、カルスが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。さらに前述のように、タチスズナリで30KR照射後4週間以上経過してから徐々に生育を示したカルスが存在したことや、照射当代の培養においては可視的にはほとんど生育を示さなかったにもかかわらず、継代によって生育能力を回復したカルスが両品種で認められたことなどを考え合わせると、カルスの致死線量はさらに高線量域にあるものと考えられる。従って今後カルスに関し、さらに高線量の照射を行なうとともに、培養期間、培養法および植付量の検討、さらには、微生物や動物培養細胞で行なわれているコロニー形成法によって、致死線量を厳密に推定することが必要と思われる。

謝辞：本実験の遂行にあたり、種子の分譲は農林水産省農業技術研究所放射線育種場、山下 淳、佐賀大学農学部、高木 胖の両博士より、 γ 線照射に際しては京都大学農学部、藤本光宏講師、生物用 γ 線照射施設、坂下代益男技官両氏の援助を賜った。各位に対しここに厚く御礼申し上げる。

引用文献

- 1) Muller, H. J. (1927) : Science, **66**, 84~87.
- 2) Stadler, L. J. (1928) : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., **14**, 69-75.
- 3) Sparrow, A. H. and G. M. Woodwell (1962) : Radiat. Botany, **2**, 9-26.
- 4) Yamashita, A. (1964) : Gamma Field Symp., **3**, 91-110.
- 5) Ukai, Y. (1967) : Japan. J. Breed., **17**, 33-36.
- 6) 永松土巳・小川峯登 (1964) : 九州大学農学部学芸雑誌, **21**, 47-55.
- 7) 高木 胖 (1974) : 放射線育種場研究報告, 第3号, p. 45-87.
- 8) King, G. S. (1949) : Am. J. Botany, **36**, 265-270.
- 9) Holsten, R. D., M. Sugii and F. C. Steward (1965) : Nature, **203**, 850-856.

- 10) Venkateswaran, S. and C. R. Partanen (1966): Radiat. Botany, **6**, 13-20.
- 11) Eriksson, T. (1967) : Physiol. Plantarum, **20**, 507-518.
- 12) Trosko, J. E. and V. H. Mansour (1968) : Radiation Res., **36**, 333-343.
- 13) Bajaj, Y. P. S., A. W. Saettler and M. W. Adams (1970) : Radiat. Botany, **10**, 119-124.
- 14) Galun, E. and Dina Raveh (1975) : *ibid.*, **15**, 79-82.
- 15) Murashige, T. and F. Skoog (1962) : Physiol. Plantarum, **15**, 473-497.
- 16) Ammirato, P. V. and F. C. Steward (1969) : Develop. Biol., **19**, 87-106.
- 17) 前田英三 (1967) : 日作紀, **36**, 233-239.
- 18) Murakami, M., S. Mori, H. Nakanishi and S. Shiojiri (1976) : J. Radiat. Res., **17**, 27.
- 19) Shimada, T. and M. Tabata (1967) : Japan. J. Genet., **42**, 195-201.
- 20) Fujii, T. and S. Matsumura (1959) : Japan. J. Breed., **9**, 245-252.
- 21) Yamaguchi, Y. and S. Tsunoda (1969) : *ibid.*, **19**, 350-356.
- 22) Gunkel, J. E. and A. H. Sparrow (1961): "Encyclopedia of plant physiology", **16** Springer, Berlin, pp. 555-611.
- 23) 高木 胖・山下 淳 (1966) : 育雑, **16**別冊 1, 53-54.
- 24) 中野 寛・前田英三 (1974) : 日作紀, **43**, 345-353.
- 25) Ehrenberg, L. and N. Nybom (1954) : Acta Agr. Scand., **4**, 396-418.
- 26) Niwa, M. and M. S. El-Keredy (1967) : Gamma Field Symp., **6**, 47-69.

Summary

Effects of ^{60}Co gamma radiation on hypocotyl-originated callus tissues and seeds of two soybean varieties, *Glycine max* (L.) Merr. vars. Shinmejiro and Tachisuzunari, were compared. Callus growth of Shinmejiro and Tachisuzunari was nearly equal as compared to the control at a dose of 2.5 KR and below 5 KR, and decreased with increasing doses from 5 to 10 KR and from 10 to 20 KR, and ceased practically at 20 KR and at 30 KR, respectively. From comparisons of RD_{50} on the fresh and dry weight between two varieties, Tachisuzunari was about twice as resistant as Shinmejiro. The potency of growth in subcultures for 30 days of irradiated- and 30-day-cultured callus was recog-

nized below 10 KR in Shinmejiro, and slightly at a dose of 30 KR in Tachisuzunari. Severe inhibition of growth of irradiated seeds occurred at and above 15 KR in Shinmejiro and at and above 40 KR in Tachisuzunari. From comparisons of RD_{50} on fresh and dry weight and seedling height of irradiated seeds, Tachisuzunari was about twice resistant as Shinmejiro. Varietal differences in the radiosensitivity nearly equalled in irradiated seeds and in callus tissues. A striking difference in the radiosensitivity between seeds and callus tissues, was observed, however, callus tissues being sensitive than the seeds.