イネ品種 IR8 に由来する短根突然変異体 LM10 幼植物の形態的特性*

梁 正 偉・一 井 眞 比 古

(香川大学農学部)

1995 年 11 月 27 日受理

要 旨: イネ (*Oryza sativa* L.) 品種 IR8 の種子にアジ化ナトリウム (NaN_3) を処理して得られた M_2 幼植物集団から短根変異体を選抜し, M_3 世代でも同様の表現型を示し, かつ分離個体も認められなかった 4 系統のうち, LM10 幼植物の特性について述べる. LM10 の種子根長, 冠根長及び側根長は IR8 より顕著に短かったが, 冠根数は多く, かつ側根密度も高かった. しかし, 草丈は両系統の間に有意な差が認められなかった. 成熟胚及び胚内器官の大きさを比較すると, LM10 の胚長及び胚幅はいずれも IR8 より有意に小さく, 胚内幼根長及び幼根径はいずれも胚長及び胚幅と同様の傾向を示した. LM10 の胚内根冠長は IR8 との間に有意な差がなかったが, 根冠径は有意に短かった. また胚内幼芽長は草丈と同様両系統の間に有意な差が認められなかった. 冠根根端組織の観察によれば, LM10 の分裂域での細胞分裂は正常であり, 分裂域の大きさも IR8 とほぼ同じ程度であったが, 成熟域の皮層細胞長は IR8 より顕著に短かった. 光に対する伸長反応性を調べたところ, LM10 の茎葉の伸長は IR8 と同様, 光照射によって顕著に抑制されたが, 種子根及び冠根の伸長は IR8 と大いに異なり, 光照射によって促進された. これらの結果から, 短根突然変異系統 LM10 はいままでに報告されているイネの短根突然変異系統とは異なる性質を有していることが明らかになった.

キーワード: イネ, 短根, 突然変異体, 根, 光形態形成.

Morphological Characterization of the Seedlings of Short-root Mutant LM10 Selected from Rice (*Oryza sativa* L., cv. IR8): Zheng-wei LIANG and Masahiko ICHII (*Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki-cho, Kagawa 761-07, Japan*)

Abstract: We report the characterization of seedlings of LM10 which is one of the four short-root mutants derived from an M_2 population of rice (*Oryza sativa* L., cv. IR8) seeds treated with NaN_3 . The morphological characteristics in the M_3 generation of LM10 was the same as their M_2 and there was no segregation in M_3 . The lengths of the seminal root, the crown root and the lateral root of LM10 seedlings were significantly shorter than those of IR8, but the number of crown roots and the density of lateral roots were higher in LM10. There was no difference in plant length between the two. The embryo and the radicle length of the mature embryo were shorter in LM10, but no difference was observed in the plumule. The cortex cell length of the maturation zone was remarkably shorter in LM10 than in IR8, though cell division of the meristem zone was normal in the two. Although it is well known that the shoot and root growth of the wild-type are inhibited by light exposure compared to dark, root growth of LM10 was accelerated by light exposure, but shoot growth was inhibited. These results indicated that LM10 is different from mutants reported previously in rice and represents a new mutant concerning root growth of rice.

Key words: Mutant, *Oryza sativa* L., Photomorphogenesis, Rice, Root, Short-root.

作物の根は植物体の支持, 養水分の吸収及び植物ホルモンの生成など多くの機能を持っており, その形態や生理機能は地上部の生育や収量に大きな影響を与えている. したがって, 根の形態や機能及びそれらの遺伝機構の解明は作物生産性の向上にとっても重要な課題であると思われる. このように根は作物にとっても重要な器官であるにもかかわらず, 根の機能や形態に着目した遺伝的改良は殆ど見当たらない. また根に関する遺伝研究は地上部の諸形質に比べ極めて少ない.

根の遺伝的分析を進めるには突然変異体の利用が

有効な手段と考えられている. 最近多くの植物で根に関する突然変異体が作出されるようになり, 根の遺伝研究が急速に進みつつある. トマト¹⁷⁾, トウモロコシ¹⁵⁾, エンドウ¹⁴⁾ 及びオオムギ¹⁶⁾ から様々な根形質変異体が選抜されている⁷⁾. 特にシロイヌナズナでは根に関する多数の突然変異体が選抜され, それらを利用して根の形態形成や環境刺激応答に関する研究が進められている. たとえば, 太い根の *rsw 1* ~ *3*²⁾ や短根 *shr*³⁾, 根毛のない *dwf*¹¹⁾ などの根の形態形成に関する突然変異体は根端の分裂領域や伸長領域, 分化領域の異常に起因するものと考えられている. 一方, 環境応答に関しては異常な重力屈性を示す *dwf* 及び *aux 1*¹¹⁾ や異常な光屈性を示す *rpt*

* 一部は, 日本育種学会第 85 回講演会 (1994 年 4 月) において発表.

1~3¹³⁾などの突然変異体が報告されている。しかしながら、イネではわずかな突然変異体^{4,5,6)}が報告されているにすぎず、イネの根突然変異体の作出が強く期待されている。

本研究ではイネ品種 IR8 の M₂ 幼植物集団から短根イネ突然変異体を選抜し、それら幼植物の生育特性を調べた。

材料と方法

1. 短根突然変異体の選抜

イネ (*Oryza sativa* L.) 品種 IR8 の種子にアジ化ナトリウム (10⁻³ M, 20°C, 6 時間) を処理して得られた M₂ 種子, 約 54,000 粒を変異体の選抜に供試した。0.2% ベノミル水和剤 (30°C) に種子を 24 時間浸漬し, さらにイオン交換水 (30°C) の中で 24 時間催芽させた。1% 寒天を入れた透明スチロール角型ケース (20 cm×10 cm×2.5 cm) に催芽した種子を播種し, 暗条件下 (25°C) で 2 日間培養後, さらに明条件 (蛍光灯, 4,500 lx) 下で 5 日間養成した。根長が IR8 より顕著に短い個体を播種後 8 日目に選抜し, それらを水田土壌を入れたワグナーポット (1/5,000 a) に移植し, ガラス室で M₃ 種子の獲得につとめた。さらに得られた M₃ 種子を用いて変異体の選抜と同様な方法で幼植物を養成し, 得られた変異体の種子根長と草丈を測定し, それらを IR8 と比較した。

2. 短根突然変異体の幼植物の生育特性

M₃ 世代の根長が M₂ 世代と同様に IR8 より有意に短く, また根形質の遺伝的分離も認められなかった 1 系統 (系統名: LM10) 及びその野生型である IR8 を供試した。

1% 寒天を入れた透明スチロール角型ケースに催芽種子を播種し, 28°C の明条件 (蛍光灯, 4,500 lx) 下で幼植物を養成し, 草丈, 種子根長, 冠根長 (最大冠根長), 冠根数, 種子根の側根数及び側根長を播種後 5 日間測定した。なお幼植物の培養期間中, 光は茎葉及び根のいずれにもほぼ均等に当たっていた。また側根数は種子根に現れている全側根数であり, 側根長は根基部から 1 cm 付近における 20 側根長の平均である。

幼植物の生長に及ぼす光の影響を調べるため, 先と同様の方法で幼植物を明及び暗条件下に置き, 播種後 6 日目に幼植物の草丈及び種子根長を測定した。

3. 成熟胚及び冠根組織の観察

開花後 40 日目の成熟胚の縦断切片 (厚さ: 10

μm) を樹脂包埋法⁹⁾により作成し, 胚長, 胚幅並びに胚内の幼根長, 幼根径, 根冠長, 根冠径, 幼芽長及び幼芽径を測定した (第 1 図)。

穂ばらみ期の IR8 及び LM10 植物体の根部から発生した新しい冠根 (長さ約 1.5 cm) を 5 本ずつ採取し, FAA 液で固定した。それら冠根の縦断切片 (厚さ: 2~4 μm) を上記の樹脂包埋法により作成し, 表皮から数えて第 8 及び第 9 列目の皮層細胞の長さを光学顕微鏡で計測した。

結 果

1. 短根突然変異体の選抜

約 54,000 個体の M₂ 幼植物集団から根長の短い変異体を 20 個体選抜した。選抜したすべての個体から種子が得られたので, M₃ 幼植物の特性を IR8 と比較したところ, 20 系統のうちの 4 系統の種子根長は IR8 より有意に短く, 他の 16 系統の種子根長は IR8 とほぼ同じであった。なお, いずれの系統も IR8 と同時に発芽した。4 系統のうちの 3 系統の種子根長は IR8 の 70~85% であったが, 1 系統 (LM10) のそれは IR8 の約 1/3 であった (第 1 表)。しかし, いずれの系統の草丈も IR8 と概ね同じであり, 形質分離も認められなかったため, これらの 4 系統を短根突然変異系統であると判断した。そこで, IR8 より顕著な短根を示し, かつ種子量の豊富な系統 LM10 の特性を調べた。

2. 幼植物の生育特性

LM10 及び IR8 の草丈, 種子根長, 冠根長, 冠根数, 種子根上の側根数および側根長を播種後 5 日間測定した。LM10 は IR8 とほぼ同時に発芽したが,

Fig. 1. Morphological longitudinal section of mature embryo.

a: Embryo length, b: Embryo width, c: Plumule length, d: Plumule width, e: Radicle length, f: Radicle diameter, g: Root cap length, h: Root cap width.

LM10 種子根の伸長は IR8 に比べ発根直後から抑制され、播種後 3 日目には伸長をほぼ停止した。LM10 の種子根長は播種後 5 日目でもわずか 4.5 cm であり、IR8 の約 1/3 であった (第 2 表及び第 2 図)。LM10 の冠根は播種後 2.5 日目から現れ、IR8 より約半日遅れた。発根直後の LM10 の冠根数は IR8 より有意に少なかったが、播種後 5 日目の冠根数は約 7 本で IR8 より有意に多くなった。また、LM10 の冠根長は IR8 のそれより顕著に短く、播種後 5 日目では IR8 の 2/3 であった。LM10 及び IR8 の種子根に現れた側根数はそれぞれ約 80 本及び約 120 本であり、LM10 の側根数は IR8 より有意に少なかった。しかし、LM10 の側根密度 (単位面積当たりの側根数) は IR8 の約 1.5 倍であった。LM10 の側根長は約 2 mm であり、IR8 の約 5 mm より有意に短かった。一方、LM10 幼植物の草丈は IR8 よりやや低い傾向を示したが、その差は有意でなかった。

3. 成熟胚及び胚内器官の大きさ

幼植物の初期生育に密接に関連する胚や胚内器官の大きさを LM10 及び IR8 の成熟胚について調べた。LM10 の胚長及び胚幅はいずれも IR8 の約 90%

であり、LM10 の胚は IR8 より有意に小さかった (第 3 表及び第 3 図)。また幼根長及び幼根径はいずれも胚長及び胚幅の測定結果と同様な傾向を示した。LM10 の根冠径は IR8 より有意に短かったが、根冠長には差が認められなかった。また LM10 の幼芽径は IR8 より短かったが、幼芽長は IR8 より短い傾向を示したもののその差は有意でなかった。このように LM10 と IR8 の幼芽長はほぼ同じであるが、LM10 の幼根長が IR8 より短いという傾向は両系

Fig. 2. Seven-day-old seedlings of IR8 and LM10 (bar: 2 cm).

Table 1. Seminal root length and plant length of seedlings of short-root mutants and IR8.

Line	Seminal root length (cm)	Plant length (cm)
IR 8	12.8±1.6 (100) ¹⁾	7.5±1.4 (100)
LM 10	3.3±0.1 (26)**	6.4±0.3 (85) ^{ns}
LM 90	10.5±1.5 (82)*	7.7±0.3 (103) ^{ns}
LM 110	11.0±0.7 (86)*	7.7±0.4 (103) ^{ns}
LM 199	8.9±2.0 (70)**	7.8±0.4 (104) ^{ns}

Twenty seedlings were observed 7 days after sowing (average of five replications, m±S.D.), ¹⁾: The relative value to IR8 is given in parenthesis, * and **: Significantly different from IR8 at 5 and 1% levels, respectively. ns: Not significant.

Table 2. Morphological characteristics of seedlings of IR8 and LM10.

Character	IR 8	LM 10
Plant length (cm)	6.4± 0.7	6.0±0.2 ^{ns}
Seminal root length (cm)	11.2± 1.1	4.5±0.3**
Crown root length (cm)	3.4± 0.8	2.2±0.3**
Crown root number	5.6± 0.8	6.7±0.8**
Lateral root length (mm)	4.7± 1.2	1.9±0.7**
Lateral root number	122.9±11.8	84.2±5.2**

Ten seedlings were observed 5 days after sowing, **: Significantly different from IR8 at 1% level, ns: Not significant.

統の幼植物における草丈や根長の傾向とよく一致していた。

4. 根の組織学的特性

IR8 及び LM10 の冠根根端組織における分裂域や成熟域を光学顕微鏡で観察し、生長点から成熟域までの皮層細胞長を測定した。LM10 の分裂域での細胞分裂は正常であり、分裂域の大きさも IR8 とほぼ同じであった(第4図)。IR8 の細胞長は生長点から 1.5 mm 付近まではほぼ同じであったが、それより離れるに伴ってほぼ直線的に大きくなり、生長点から 7 mm 付近の成熟域では約 $60\ \mu\text{m}$ であった。一方、LM10 の細胞は 1.2 mm 付近から大きくなり始め、2.5 mm 付近から細胞伸長を停止し、その長さは約 $25\ \mu\text{m}$ であり、IR8 の 1/2 以下であった。また LM10 の成熟域における表皮細胞長も IR8 に比べ明らかに短かった(第5図)。

Table 3. Characteristics of mature embryo of IR8 and LM10.

Character (μm)	IR8	LM10
Embryo length	1602 ± 24 (100) ¹⁾	1454 ± 86 (90)**
Embryo width	702 ± 29 (100)	648 ± 20 (93)**
Radicle length	204 ± 12 (100)	174 ± 20 (85)**
Radicle diameter	381 ± 13 (100)	338 ± 21 (89)**
Root cap length	116 ± 8 (100)	108 ± 14 (92) ^{ns}
Root cap width	351 ± 30 (100)	311 ± 17 (89)**
Plumule length	583 ± 38 (100)	540 ± 55 (93) ^{ns}
Plumule width	472 ± 45 (100)	427 ± 38 (91)*

Ten mature embryo were observed, 1): The relative value to IR8 is given in parenthesis, *and **: Significantly different from IR8 at 5 and 1% levels, respectively. ns: Not significant.

5. 光に対する根の伸長反応

LM10 及び IR8 を明及び暗条件下で6日間培養し、幼植物の生長に及ぼす光の影響を調べた。なお植物の茎葉及び根の伸長は光の照射によって一般に抑制されるので、生長に及ぼす光照射の影響を生長抑制率(%; $(1 - \text{明条件下での特性値} / \text{暗条件下での特性値}) \times 100$)として表した。LM10 及び IR8 の草丈の光による生長抑制率は 20~30% であり、系統間の差は認められなかった(第4表)。明条件下での

Fig. 3. Mature embryo of IR8 and LM10 (bar: $200\ \mu\text{m}$).

Fig. 4. Cortex cell length of the crown root on the boot stage of IR8 and LM10.

IR8 の種子根長および冠根長は暗条件下より顕著に抑制され、それらの生長抑制率はいずれも約 30% であった。しかし、LM10 の明条件下での種子根長及び冠根長はいずれも暗条件下でのそれらより有意に長く、それらの生長抑制率はそれぞれ-24%及び-13%であった。また冠根数も同様な傾向（生長抑制率は-53%）を示した。明条件下で育てた LM10 の根の伸長及び発根性はいずれも暗条件下で育てた場合より旺盛であり、LM10 の根の光に対する反応は多くの栽培品種のそれと著しく異なっていた。したがって、LM10 は短根の特性を有するだけでなく、光に対しても特異的な反応を示す突然変異体であることが示唆された。

考 察

短根突然変異系統 LM10 の種子根、冠根及び側根の長さは IR8 より有意に短かったが、冠根数及び側根密度は IR8 より有意に多かった。しかし、幼植物の草丈では両系統間に有意な差が認められなかった。LM10 の成熟胚を IR8 と比較したところ、LM10 の胚及び胚内幼根の長さは IR8 より有意に短かったが、幼芽長はほぼ同じであった。また、発芽後ただちに現れた種子根が IR8 より顕著に短いことなどから、LM10 の短根性は胚の成熟過程ですでに発現しており、その影響が発芽後にも現れていると思われる。イネの短根突然変異体は Kitano and Futsu-

Table 4. Characteristics and growth inhibition rate of seedlings of IR8 and LM10 grown in light and dark conditions.

Character	Cultural condition	IR 8	LM 10
Plant length (cm)	Light	7.5±1.0**	7.6±0.3**
	Dark	10.3±0.5	9.5±0.6
Growth Inhibition rate (%) ¹⁾		27.3	20.0
Seminal root length (cm)	Light	11.6±1.3**	4.5±0.3**
	Dark	17.0±1.5	3.6±0.4
Growth Inhibition rate (%)		31.8	-23.8
Crown root length (cm)	Light	3.7±0.6**	2.8±0.5 ^{ns}
	Dark	5.6±1.9	2.5±0.3
Growth Inhibition rate (%)		32.9	-12.6
Crown root number	Light	6.0±0.8 ^{ns}	9.7±0.5**
	Dark	5.7±0.5	6.3±0.8
Growth Inhibition rate (%)		-5.1	-52.8

Ten seedlings were observed 6 days after sowing, 1) : Inhibition rate (%) = (1 - characteristics in light / characteristics in dark) × 100, **: Significantly different from dark at 1% level. ns: Not significant.

Fig. 5. Morphology of crown root cortex cell of in maturation zone at booting stage of IR8 and LM10 (bar: 100 μ m).

EP: Epidermis, EX: Exodermis, S: Sclerenchyma, C: Cortex, EN: Endodermis, P: Pericycle.

hara⁹⁾によって報告されている。その突然変異体 RM の成熟胚における幼根の大きさは野生型とほぼ同じであり、短根化に関与する遺伝子 *rt* は発根後に発現することから、LM10 は RM とは異なる性質を有する変異体であると考えられる。短根性は根端の分裂域や伸長域の異常によってもたされる。たとえば短根突然変異体 RM1 及び RM2 は細胞の短小化によるのではなく、細胞増殖能力の低下によると考えられている⁶⁾。また短根突然変異体 RM では細胞の分裂及び伸長が野生型より劣っていた⁹⁾。一方、LM10 の根の成熟域における皮層細胞長は IR8 の 1/2 以下であったが、細胞分裂には異常が認められなかったことから、LM10 の短根性は主に細胞の伸長抑制に起因すると考えられる。

高等植物の茎葉や根の生長は光照射によって抑制されることがよく知られている。短根突然変異系統 LM10 幼植物を明及び暗条件下で培養し、それらの光に対する反応を IR8 と比較したところ、LM10 の草丈は IR8 と同様な反応を示したが、LM10 の根は IR8 とは異なった反応を示した。明条件下で育てられた LM10 の根は暗黒下で育てられた根に比べ旺盛な生育を示し、根長も長く、冠根数も多かった。すなわち LM10 の根は光照射で伸長を抑制されなかった。一方、光形態形成に関する突然変異体の解析から、キュウリやシロイヌナズナのフィトクロームに関与する遺伝子 *lh*¹⁾ 及び *hy 3*¹²⁾ は光照射下でも根の伸長を抑制しないことが知られており、LM10 の光に対する反応は *lh* 及び *hy 3* の作用と同様であった。これらの事実は、LM10 がフィトクロームに関連した突然変異体である可能性を推察させる。

短根突然変異体 RM1 及び RM2^{5,6)} の光に対する反応は LM10 とは異なり、それらの野生型オオチカラ及び IR8 と同様であった¹⁰⁾。したがって、LM10 は RM1, RM2 と異なるタイプの変異体と考えられる。

突然変異系統 LM10 は短根という特性を持つだけでなく、その根は光に対する特異的な伸長反応を示したことから、本変異体は根の形態や生理機能の研究だけでなく光形態形成に関する研究に対しても有用素材になりうると思われる。

引用文献

1. Adamse, P., P.A.P.M. Jaspers, R.E. Kendrick and M. Koornneef 1987. Photomorphogenetic responses of a long hypocotyl mutant of *Cucumis*

- sativus* L. J. Plant Physiol. 127: 481—491.
2. Baskin, T.I., A.S. Betzner, R. Hoggart, A. Cork and R.E. Williamson 1992. Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. Aust. J. Plant Physiol. 19: 427—437.
3. Benfey, P.N., P.J. Linstead, K. Roberts, J.W. Schiefelbein, M. —T. Hauser and R.A. Aeschbacher 1993. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. Development 119: 57—70.
4. Futsuhara, Y. and H. Kitano 1985. Inheritance of a root-growth inhibiting mutant in rice. RGN 2: 70—71.
5. 一井眞比古・石川道夫 1992. イネ短根突然変異体の形態及び生育特性. 育種 42(別2): 284—285.
6. ———・——— 1993. イネ短根突然変異体の形態と生育特性 (2). 育種 43(別1): 206.
7. ———・——— 1994. 植物の根に関する諸問題 [16] —突然変異体による遺伝解析—. 農及園 69: 1233—1237.
8. ———・——— 1995. 細胞・組織の観察. 谷坂隆俊編, 植物遺伝育種学実験法. 朝倉書店, 東京. 56—58.
9. Kitano, H. and Y. Futsuhara 1989. Inheritance and gene expression of a root-growth inhibiting mutant in rice (*Oryza sativa* L.). Proc. of the 6th Internatl. Congr. of SABRAO: 349—352.
10. 梁 正偉・一井眞比古 1994. 短根イネ突然変異体の育成とその特性. 育種 44(別1): 243.
11. Mirza, J.I., G.M. Olsen, T. —H. Iversen and E.P. Maher 1984. The growth and gravitropic responses of wild-type and auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. Physiol. Plant. 60: 516—522.
12. Nagatani, A., J. Chory and M. Furuya 1991. Phytochrome B is not detectable in the *hy3* mutant of *Arabidopsis*, which is deficient in responding to end-of-day far-red light treatments. Plant Cell Physiol. 32: 1119—1122.
13. Okada, K. and Y. Shimura 1992. Aspects of recent developments in mutational studies of plant signaling pathways. Cell 70: 369—372.
14. Olsen, G.M. and T. —H. Iversen 1980. Growth and curvature in seedlings of *Pisum sativum* and an ageotropic mutant. Physiol. Plant. 50: 269—274.
15. Pilet, P.E. 1983. Elongation and gravireactivity of roots from an agravitropic maize mutant: implications of growth inhibitors. Plant Cell Physiol. 24: 333—366.
16. Tagliani, L., S. Nissen and T.K. Blake 1986. Comparison of growth, exogenous auxin sensitivity, and endogenous indole-3-acetic acid content in roots of *Hordeum vulgare* L. and an agravitropic mutant. Biochem. Genet. 24: 839—848.
17. Zobel, R.W. 1975. The genetics of root development. In Torrey J.G. and D.F. Clarkson eds., The Development and Function of Roots. Academic Press, London. 261—275.