放射線および化学薬品による稲の突然 変異誘発に関する研究*

(1) 放射線と化学薬品との組み合わせが稲の生育および
突然変異の誘発におよぼす効果

松 尾 孝 嶺・小 野 沢 芳 郎

(東京大学農学部)

放射線突然変異を育種学的に利用するには、処理に伴う障害をできるだけ少なくして後代に現われる突然変異の出現率を高める必要がある。然るに放射線の生物学的効果は照射時の条件によつて異なることはすでに数多く報告されている。このことは照射条件の工夫によつて生理的障害を少なくして、突然変異率を高めることの可能性を示している。一方化学的突然変異誘発源は放射線と異なる種類の変異を誘発するものがあることも報告されている。

本研究も人為突然変異率を高める方法を知る目的で行なわれたもので、イオン密度の異なる放射線および種類の異なる化学薬品を用いて、これらの各々の稲についての生物学的効果を見ると共に、放射線処理の前後に化学薬品で処理することが稲の生育および突然変異の誘発に如何なる影響があるかを調べた。

本研究の施行に協力された米国・ブルックハーヴェン研究所生物部の係員および東大農場の職員に対して厚くお礼を申し上げたい。なお本研究の一部は農林省の応用研究費によつて行なわれたものである。

I. 実験方法および材料

埼玉農試の原々種圃 1956 年秋生産の水稻農林 29 号種子を米国・ブルックハーヴェン原子力研究所に送付し、1957 年春に同所において松尾が処理を行なつた。照射および薬品処理は、処理前に 75% の湿度に保つたデシケーターに数週間貯蔵しておいた玄米について行なつた。

処理はいづれも 20°C の温度の下で行ない、薬品処理は減圧状態で行ない、処理前に 20 時間水道水に浸漬し、処理後は 24 時間水洗してのち再び 75% R. H. のデシケーターに数時間おき、プラスチックの袋に包んだ。放射線としては X 線と熱中性子を用い、何れも B.N.L. の装置によるもので、その方法は前報⁶⁾に同じである。

化学薬品として用いたものは、突然変異誘発剤としてよく用いられる Diepoxybutane (以下 D. と略称)、 β -propiolactone (B)、紡錘糸形成阻止剤の Colchicine

(C)、Neutron capture としての $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (A) である。

処理を行なつた玄米は直ちに密封して航空便を以つて東大に送り、 M_1 世代 (1957 年) は東大農場に育て、 M_2 世代 (1958 年) は、1958 年春に東大農学部温室に幼植物を育て、葉緑素突然変異の出現率を調査した。各種の放射線、化学薬品の単独または組合照射の場合の稲の LD 50 を決定するための予備実験は総て B.N.L. の 30°C の恒温室中に生育させて行なつた。

予備実験の結果によれば、これらの薬品による休眠種子処理に対する稲の LD50 は、Diepoxybutane では 0.1%, 60 分、 β -propiolactone では 0.5%, 60 分、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ では 2~4%, 24 時間であつた。また放射線と化学薬品とを組み合わせた場合の LD50 は、(1) X 線の 30kr または中性子の $4.9 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ と Diepoxybutane (後処理) の 0.2%, 60 分、(2) β -propiolactone (後処理) の 0.5%, 60 分と X 線の 20kr または $6.4 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ の中性子、(3) Colchicine (前処理) の 0.1%, 60 分と X 線の 10kr または中性子の $3.63 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ 、(4) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (前処理) の 2~4%, 24 時間と中性子の $3.2 \sim 4.9 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ であつた。

このことから本実験では Diepoxybutane 前処理では 0.1%, 60 分に 7.5kr の X 線、後処理では X 線の 25kr または $3.9 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ の中性子に 0.1%, 60 分の薬品処理、 β -propiolactone は 25kr の X 線または $3.9 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ の中性子に 0.25%, 60 分の薬品後処理、Colchicine は 25kr の X 線または $3.9 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ の中性子に 0.05%, 24 時間の後処理、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ は 2%, 24 時間で前処理して $3.9 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ の中性子で照射した。

このほかに、X 線の 25kr、または中性子の $3.9 \times 10^{13} \text{ nth/cm}^2$ の単独照射区、薬品は D-0.1%, 60 分、B-0.25%, 60 分、C-0.05%, 24 時間、A-2%, 24 時間の単独処理区ならびに無処理区を設けた。ただし無処理区は包装前に 24 時間の水浸漬を行なつた。

II. 実験結果

1. 処理当代 (M_1) に対する効果

* 7 月 19 日、1960 受領

Table 1. Germination, growth and survival of M_1 plants treated by radiation, chemicals and with their combination.

Treatments		Germination (%)	Survival (%)			plant height (cm)	
Radiation	Chemicals		at the seeding stage (a)	at the maturity stage (b)	(a) × (b)	at the trans-planting stage	at the maturity stage
0	0	97.9	66.7	92.7	61.8	18.5±2.5	71±5.6
"	A	72.6**	49.6**	83.2	41.3	20.7±4.1	68±3.4
"	B	84.6**	31.6**	77.0*	24.3	18.3±4.7	67±5.7
"	C	83.9**	48.0**	83.3	40.0	16.0±3.4	67±3.1
"	D	51.6**	44.0**	79.4	34.9	17.3±5.2	68±4.8
X	0	97.9	44.9	82.5	37.0	13.0±3.4	65±5.0
"	B	77.6**+	29.3**+	68.1*	20.0	16.4±4.5	66±3.6
"	C	85.6**	38.9**+	85.8 +	33.4	17.4±4.1	63±4.7
"	D	57.9**	17.8**+	43.0**+	7.6	12.3±4.6	59±4.5
(X)	E	46.0**	29.8**	77.0	25.9	15.9±4.4	65±4.1
N	0	97.0	50.4	56.0	28.4	13.1±3.7	62±4.0
"	A	76.3**	25.3**	45.0	11.4	10.1±3.4	57±5.0
"	B	76.6**	37.9**+	48.6 +	18.4	11.3±3.5	58±3.2
"	C	89.7**	39.0**+	67.4* +	30.2	14.9±3.6	61±3.8
"	D	55.3**+	23.5**	34.3**+	8.1	9.6±3.8	61±5.6

Remarks : Treatments by Radiation, 0...no-irradiation, X...X-rays of 25kr, (X)...X-ray of 7.5kr., N...thermal neutron of 3.9×10^{18} nth/cm² flux ; by Chemicals, 0...no-treatment, A...pretreated by Ca (NO₃)₂ 2% solution for 24 hrs., B...post-treatment by β -propiolactone, 0.25% solution for 60 min., C...post-treatments by Colchicine, 0.05% for 24 hrs., D...post-treatment by Diepoxybutane, 0.1% solution for 60 min., E...pre-treatment of 7.5kr. X-ray irradiation by Diepoxybutane, 0.1% for 60 min.

*, **...increased or decreased with the statistical significance of 5% or 1% levels from no-chemical treatments, 0 0, X 0, or N 0. respectively.

+...interaction by the combination of Radiation and Chemicals.

Table 2. Fertility and heading time in M_1 generations and frequency of the chlorophyll mutation in M_2 generation of rice treated by radiation, chemicals and their combinations.

Treatments		Headingtime (Days in Sept.)	Fertility (%)	Frequency of the chlorophyll mutation (%)	
Rrdiation	Chemicals			per a M_1 -plant	per a M_1 -head
0	0	6	90.6	0.29	0.17
"	A	6	83.6**	0	0
"	B	6	92.2*	0	0
"	C	6	87.9**	2.00	0.53
"	D	6	80.6**	6.94	4.21
X	0	6	38.7	10.50	3.79
"	B	6	54.4**+	19.00	8.61**+
"	C	6	49.6**+	13.00	6.02 +
"	D	6	46.3**	12.31	8.91**+
(X)	E	6	65.3**	11.00	5.03
N	0	6	31.1	9.45	5.76
"	A	6	29.1	5.00	2.66* +
"	B	6	41.6**+	13.00	6.40
"	C	6	45.6**+	6.00	2.45* +
"	D	6	33.0 +	5.71	3.57 +

Remarks are the same with table 1.

放射線および薬品類が M_1 におよぼす効果は予備実験の際よりも大きく現われたが、これは処理を B.N.L. で行なつて航空便で東京に送り播種するまでの間に約1週

間を要したことによる貯蔵効果が働いたものと思われる。また処理が玄米であり、これを圃場に直接まいた為に成苗率は一般に不良であつた。

処理別に見た M_1 の生存率、草丈および稔実率は第1表に示す通りである。これによれば化学薬品による処理区は何れも発芽率および成苗率を著しく低下させている。そのうちで比較的に影響の小さいものは Colchicine であり、最も障害作用の大きいものは Diepoxybutane である。

実用上最も問題になるのは、次代の個体数に影響の大きい M_1 の本田での生存率とその稔性であるが、第1表および第2表でみる通りに薬品処理区は何れも生存率の低下が著しい。しかし中性子照射後 Colchicine

で処理したものでは中性子単独照射よりも良好な生存率を示している。

稔実率に対する影響は、薬品の単独処理区の稔実率が

β -propiolactone を除き無処理区よりかなりの程度に低下しているのに対して、放射線と組み合わせたものでは放射線単独照射区に比べて、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ の場合を除いて何れも稔実率が良好となつている。ただし Diepoxybutane の前処理は生存率、稔実率ともに影響が認められない。

前報において放射線処理によつて発生する不稔性が主として染色体異常によることを示したが、これより見て放射線にて照射後の休眠種子に化学薬品をもつて後処理したものに稔性か向上するのは、放射線によつて生じた染色体の切断が薬品処理により回復するものと思われる。

2. M_2 世代における葉緑素突然変異の出現に対する影響

M_2 種子を 1958 年早春にガラス室内で発芽、生育させた幼植物に現われる葉緑素突然変異率は第 2 表に示す通りである。これによれば薬品の単独処理では Diepoxybutane が放射線に近い突然変異率を示した外は突然変異誘発の効果は明らかでなかつた。しかるに、これと放射線と組み合わせた場合においては、(1) X 線処理後に D または B の Chemical mutagens で処理したものである、X 線の単独処理区に比べて明らかに突然変異率が増加し、(2) 中性子照射後に化学薬品で処理した場合の突然変異率は中性子単独処理区に対して有意差がないか、または却つて減少している。しかし突然変異に有意差があつた場合でも、その spectrum は第 3 表に示すように放射線単独処理区に比べて有意差が認められなかつた。

Table 3. χ^2 -test for the mutation spectrum in the chlorophyll mutants induced by treatments of radiation only and by the combinations of radiation and chemicals.

Treatment		Chlorophyll mutants						χ^2
Radiation	Chemicals	albina	viridis	striate	xantha	others	Total	
X-ray	0	13	10	4	0	1	28	1.1049
	B	10	6	8	2	0	26	7.8186
	C	12	8	0	0	1	21	2.6448
	D	8	3	0	3	4	18	12.4718
	E	10	6	2	0	0	18	1.3489
Total		53	33	14	5	6	111	25.3887
Neutron	0	20	11	1	0	2	34	2.3177
	A	4	4	0	0	0	8	1.0072
	B	9	7	1	2	0	19	3.1791
	C	1	7	0	0	0	8	4.7408
	D	1	4	1	0	0	6	2.5723
Total		35	33	3	2	2	75	18.8171

P value for X-rays=0.1~0.05

Neutron=0.7~0.5

III. 考 察

放射線による種子処理にさいして、その前・後に他の処理を施すことが、放射線の生物学的効果に影響することは、すでに数多くの報告がある。例えば、水分の影響としては MCKEY 等 (1951), KNAPP and KAPLAN (1942), KAPLAN (1948, 51) 等が何れも放射線処理前に水に浸漬した吸水種子は突然変異率を高めるとし、また CURTIS and DELIHAS (未発表), CALDECOTT (1955) 等は処理前の種子の含水量によつてその貯蔵効果が異なることを見た。温度の影響も大きく、CALDECOTT and SMITH (1952) は X 線処理前後の加熱が突然変異率を高めると報告し、EHRENBERG and LUNDQUIST (1957) は処理後の発芽時の温度によつて突然変異率が異なることをみている。酸素はとくに放射線の生物効果の過程に大きく影響すると考えられており、NILAN (1955), EHRENBERG 等 (1957), ADAMS and NILAN (1958) 等の実験は何れも放射線処理中、または処理後の O_2 濃度によつて放射線障害または突然変異率が異なることを認めている。しかし中性子ではそのような効果が認められない。

化学薬品に関してはすでに STADLER (1928) がオオムギに Ba, Pb 等を吸収させた種子では X 線効果が高まると報告しており、その後 EHRENBERG 等 (1952), D'AMATO and GUSTAFSSON (1948), GUSTAFSSON and NYBON (1949), KAPLAN (1951), GAUL (1958) 等がコルヒシン, CO_2 , その他の化学薬品を予め種子に吸収させるか、またはその中で種子を、放射線処理するとき

には生存率、稔性または突然変異率が増加することを認めている。

本実験では、種子の前処理は X 線については Diepoxybutane についてのみ行なつたに過ぎず、かつ前処理では放射線抵抗性が弱まるので用いた X 線量も 7.5 kr であつて、単独処理区に比べて線量が小さかつたので前処理の効果を見るのに十分な成果が得られていないが、稔性では X 線の 25 kr 単独処理区より高まり、突然変異率では X 線単独処理と等しいか、やや増

加していることが認められる。一方熱中性子については Neutron capture の意味で予め $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ を吸収させたものを原子炉で処理した。 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ の処理強度は予備実験によつて $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ の単独処理で稲の発芽および生育に相当の影響のあるところとして 2% 液 24 時間処理を行なつたのであるが、中性子単独処理に比べて生存率が低下し、さらに突然変異率も低下した。稔性の低下が僅かであることから見て、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ の前処理が Neutron capture として働き、中性子の染色体切断の効果を高めるに役立つ働きをしたとは認められない。この点に関してはさらに繰返し実験を行なう必要があろう。

Colchicine の後処理は、X 線および中性子処理ともに稔性を増加しているが、突然変異率は増加せず、中性子では却つて減少している。

Diepoxybutane および β -propiolactone はすでに単独で mutagen としての効果があることが認められているが、X 線で処理した後、これらの薬品で後処理すれば放射線または薬品の単独処理に比べて生存率は低下するが、残存個体の稔実率は放射線単独処理区よりも高まり、その次代の葉緑素突然変異率はいずれの単独処理区よりも高まつた。このことから、これらの薬品は X 線により生じた染色体切断の回復に役立つ作用のあるように見られる。しかしこれらの効果は中性子処理においては殆んど認められない。稔性が向上して、かつ突然変異率が高まること、およびそれが X 線の場合には顕著であるが、熱中性子では認められないことについては、突然変異の機構を追究する上から見て興味の深い点である。

次に、従来の研究 (D'AMATO and GUSTAFSSON, 1948; GUSTAFSSON and NYBOM, 1949; GAUL, 1957) は、X 線と化学薬品またはその他の組合せにおいては X 線単独処理に比べて mutation spectrum が異なると報じている。例えば X 線と組み合わされたコルヒシンは X 線単独に比べて数倍の viridis を生じるが、albina は同じ程度にしか生じなかつたという。

本実験では X 線および中性子のそれぞれの単独処理に比べて、放射線と薬品の組み合わせにより、とくに mutation spectrum が異なつたとは認められなかつた。この点が材料の差異によるものであるかどうかは今後の研究によつて確かめ必要があろう。

IV. 摘 要

X 線または熱中性子で水稻種子を照射する前・後に数種類の化学薬品で処理をした結果の生物学的効果について、これらの放射線または化学薬品の単独処理区と比較

した。その結果によれば $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ の前処理は殆んど効果が認められず、Colchicine の後処理は放射線単独処理区に比べて稔性は向上したが、突然変異率には影響ないか (X 線)、却つて低下 (中性子) させた。

chemical mutagen として知られている、Diepoxybutane と β -propiolactone は X 線との組合せにおいては単独処理区に比べて処理植物の生存率を低下させるが、稔性を向上させ、また突然変異率も高まつた。しかし中性子との組合せではそのような効果は見られなかつた。またこれらの薬品を放射線と組み合わせることによつて、放射線単独処理の場合と異なるスペクトラムは得られなかつた。

引用文献

- 1) ADAMS, J. D. and NILAN, R. A. (1958): After effects of ionizing radiation in barley. II. Modification by storage of X-irradiated seeds in the different concentrations of oxygen. *Rad. Res.* 8: 111~122.
- 2) D'AMATO, F. and GUSTAFSSON, A. (1948): Studies on the experimental control of the mutation process. *Hereditas* 34: 181~192.
- 3) EHRENBORG, E. L., GUSTAFSSON, A. and NYBOM, N. (1952): Effect of ionizing radiation in barley. *Ark. Bot. Ser.* 2: 557~568.
- 4) EHRENBORG, E. L. and LUNDQUIST, U. (1957): Post-irradiation effect on X-ray induced mutation in barley seeds. *Hereditas* 93: 390~402.
- 5) GAUL, H. (1957): Die Wirkung von Röntgenstrahlen in Verbindung mit CO_2 , Colchicin und Hiltze auf Gerste. *Z. f. Pflanzenzücht.*, 38: 397~429.
- 6) GUSTAFSSON, A. and NYBOM, N. (1949): Colchicine, X-rays and the mutation process. *Hereditas* 35: 280~284.
- 7) KAPLAN, R. W. (1951): Chromosomen- und Faktormutationsraten in Gerstenkörner bei verschiedenartigen Quellungsbehandlung oder Kälte während oder nach der Röntgenbestrahlung sowie bei Dosisfraktionierung. *Z. ind. Abst. Verbgsl.* 83: 347~382.
- 8) MATSUO, T., YAMAGUCHI, H. and ANDO, A. (1958): A comparison of biological effects between thermal neutrons and X-rays on rice seeds. *Jap. J. Breed.* 8: 37~45.
- 9) NILAN, R. A. (1955): Post-radiation storage effect on chromosomes in barley seeds X-rayed at normally in effective doses. *Genetics* 40: 588.

Studies on mutations induced by radiations and chemicals.

1. The effect of the combination of radiation and chemicals on the growth and mutation frequency of rice.

Takane MATSUO and Yoshiro ONOZAWA
(Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

Résumé

The biological effects of chemicals combined with the X-rays or neutrons on rice seeds were compared with the irradiation of seeds by X-ray or thermal neutron only and the treatment of seeds by $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, Colchicine, Diepoxybutane or β -propiolactone only. (c.f. Table 1, 2)

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ which was used as the neutron capture, gave only a slight effect on growth and fertility of M_1 -plants and decreased the frequency of chlorophyll mutation in M_2 generation when seeds were treated with it just before the irradiation by neutron.

Post-treatment of seeds by Colchicine increased the fertility of M_1 -plant compared with the single irradiation, but gave no effect on mutation frequency when combined with X-rays, and decreased the frequency when combined with neutrons.

Diepoxybutane and β -propiolactone, which are

already known as mutagenic substances, had high effect on germination and survival of M_1 -plants in both the cases; i.e. single application of chemicals or combined with radiation. However, there increased fertility and mutation frequency of treated materials when these chemicals were used as post-treatment substances of X-rays, but there seemed no effect on mutation frequency when they were combined with neutrons. According to this result, these mutagenic chemicals seem to have some chemical action on the process of recovering the breakage of chromosome caused by X-rays.

On the other hand, no different spectra of chlorophyll mutations was obtained by a comparison of the effect of radiation alone with the effect of chemicals combined with radiation. (c. f. Table 3)