Djong-chi CHU : Grain Size Mutations in Rice Induced by Recurrent Treatment of Ethylenimine (English summary on p. 241)

エチレンイミンの累代処理により誘起された イネの籾型変異について

朱 政 治

(名古屋大学農学部, 名古屋市)

chemical mutagen 処理による突然変異の誘起効果に関する研究の一環としてエチレンイミン (EI) を毎代繰り返し処理し、後代に分離してくるイネの籾型突然変異について検討した。

供試材料凱旋糯 (E 39) の EI 処理後2週間目の生存率を調べたところ, LD_{50} は 0.8~1.0% と推察され, 比較的 EI 感受性の低い品種であると考えられた。

籾長と籾幅の頻度分布のパターンは対照区の理論頻度分布と比較的よく一致していたが平均値のプラスまたはマイナス方向への移動が認められた。両形質の分散には頻度分布図から推察されたように対照区に比べて有意な増大がみられなかったのに対して, 平均値にはほとんどの処理区で有意差が認められた。

1974年と1975年の対照区の平均値の差を年次間差とみなし, 世代間の正味 (net) の差を求めたところ, 籾長, 籾幅とも世代を経るに従って減少してゆく傾向を示した。ほとんどの処理区で両形質間に高い正の相関がみられたことから, 処理集団の籾型は小粒化の傾向があると推察された。しかしながら, 相関図において変異限界から籾長, 籾幅ともプラス方向へ変異した大粒型や, 籾長はマイナス, 籾幅はプラス方向へ変異した丸粒型の変異体などが認められたことは, 両形質ともプラスもしくはマイナス方向へ独立に選抜できる可能性を示唆しているものと考えられた。

1回処理区より2回あるいは3回処理区の方が高い変異限界外個体出現率を示したことから, 累代処理法は供試材料 E 39 の籾型に関する限り, 変異の累積効果とかなり高い突然変異誘起効果が期待できるものと考えられた。

緒 言

突然変異育種においてはできるだけ効率よく有用変異を誘起し, それを直接または間接に実用に供することを目標とするが, 育種効率を高めるには突然変異の誘起頻度を高めること, 変異スペクトラムを拡大させることおよび適確な選抜方法を確立させることなどが重要な課題である。また, 対象とする変異形質の多くは polygene 支配によると考えられる量的形質であることから, 大突然変異 (macromutation) の他に主として polygene の変異による小突然変異 (micromutation) の頻度や方向性を正確に評価, 把握することが大切と思われる。

育種効率を高めるといふ見地からみれば, 毎代処理を繰り返す累代処理法は集団内に変異が集積してゆく利点があり (蓬原 1963), 変異スペクトラムが広がり, 高い誘起効果が得られる可能性がある (山口 1962 b) ので1つの有効な方法となり得るであろう。

一方, GAUL (1961) は小突然変異の選抜に際して指標形質の有用性を指摘している。従来用いられてきた葉緑素突然変異出現頻度や形態変異出現頻度については小突然変異の誘起効果との間の関連性を示唆する報告はあるが (山口 1963, 蓬原 1963), 小突然変異の評価方法としての個体分散の増大の有意性検定は測定や計算に大きな労力を必要とするなど検討すべき点も少なくない。

筆者は前報(朱 1976)で粒型の異なる3品種のイネについて誘起変異の頻度および方向性は品種によりまたは形質により異なることを報告したが、ここでは粒の長さや幅の平均値、分散のほか、高ら(1969)の提唱する変異限界外個体出現率を評価の指標として誘起変異の頻度や方向性を推定するとともに両形質間相互の関連性について考察した。また、化学薬剤の1つであるエチレンイミンを累代処理し、それが変異の頻度や方向性にどのような影響を与えるか検討した。

材料および方法

実験には水稻品種凱旋糯(系統番号 E 39)を供試した。

供試材料の EI 感受性を調べるため 0.1 から 1.0% まで5つの濃度の異なる区を設け、気乾種子をそれぞれ2時間浸漬処理して2週間後の生存率を調査した。処理数は各濃度区とも 50 粒ずつ3反復とし、処理温度(室温) 23°C と 25°C の2条件下で実験を行った。EI 溶液は非緩衝溶液(溶媒は蒸留水)で濃度は体積百分率で表わした。

累代処理の方法は Fig.1 に示す通りで、処理濃度は 0.3%, 処理時の温度は3ヶ年いずれも $23 \pm 0.8^\circ\text{C}$ であった。処理種子は水洗後直ちにバットに播種し、5~6葉期に水田に1本植えて移植した。

登熟後1株当たり1穂をとり、それぞれの穂の中央部枝梗から1粒ずつとって1回処理の次代 M_2 とするとともに同じ枝梗から別に2粒ずつをとって2回処理の材料に供試した。翌年、同様な方法で M_2 と $M_{1/2}$ から1株1粒法で採種して M_3 と $M_{2/3}$ 集団を育成した。 $M_{1/2}$ から1株2粒法でとった材料を EI 処理して3回処理当代 $M_{1/2/3}$ とした。なお、採種にあたり著しい不稔や形態異常を伴う個体は対象から除いた。このようにして4年目に都合8通りの処理集団と比較のための対照区2集団を得た。

これらの材料から処理区別に各穂の中央部の1次枝梗粒を5粒ずつとり、粒長と粒幅を計測して平均値および分散を算出して有意性を検定した。平均値については処理区間の有意差検定も行った。粒長と粒幅の分布状態を把握するため両形質の頻度分布と相関分布を求め、同時に相関係数および各区の粒長、粒幅の変異限界(危険率 $\alpha = 0.05$)を高ら(1969)の提唱する方法で求め、プラスとマイナス方向の変異限界外個体出現率を算出して変異の頻度と方向性を推定した。

結 果

供試材料 E 39 の EI 処理後2週間目の生存率は Fig.2 に示す通りであった。23°C と 25°C で処理では温度効果が認められたが LD_{50} は 0.8~1.0% と推定された E 39 は EI 感受性の比較

Fig. 1. Program of recurrent treatment with ethylenimine (EI).

的低い品種であると考えられた。

Fig. 3 は各処理区の籾長と籾幅の頻度分布と両形質間の相関分布を示したものである。

頻度分布については籾長、籾幅とも理論頻度分布のパターンと比較的一致していたが、分布のずれ即ち平均値の移動が認められた。籾長についてみると、例えば M_4 では理論頻度分布から明らかにマイナス方向へ平均値が移動しているのが認められた。籾幅では $M_{2/3}$ ('74) と $M_{2/3/4}$ はプラス方向への移動がみられたのに対して M_4 ではマイナス方向への移動を示すという結果が得られた。

相関図についてみると、3回処理当代である $M_{1/2/3}$ にはほとんど相関のみられない分布を示していたのに対してその次代 $M_{2/3/4}$ では正の高い相関が認められた。 $M_{3/4}$ にもかなり高い相関が認められた。 $M_{3/4}$ と $M_{2/3/4}$ はいずれも小粒化方向への分布傾向がみられたのが特徴的である。また、変異限界を規準としてみると、ほとんどの処理区で籾長、籾幅ともプラスあるいはマイナス方向へ外れた値を持つ個体が認められた。しかし、両形質について同時に変異限界からプラスまたはマイナス方向へ外れた個体は少なく、籾長、籾幅ともプラス方向へ外れる大粒化方向への変異個体は M_3 、 $M_{2/3}$ ('74) と $M_{2/3/4}$ に各1個体みられたのみである。両形質ともマイナス方向へ外れた小粒化方向には M_4 、 $M_{3/4}$ と $M_{2/3/4}$ に比較的多数の個体がみられた。籾長が小さく籾幅が大きい丸粒型方向への変異個体は M_3 と $M_{1/2/3}$ に認められた。長粒型変異個体はなかったがそれに近い個体は M_4 に1個体みられた。

Table 1 は栽植年度別に各区の籾長と籾幅の平均値と分散それに各区間の平均値の差の検定結果

Fig. 2. Survival rate for various concentration of EI in rice variety GAISENMOCHI (Line no. E39)

Fig. 3. (1, 2)

Fig. 3. Correlation between the length and the breadth of grain, and frequency distribution for the length and the breadth of grain.
*: This plot was re-examined.

Table 1. Mean and variance for the grain length and breadth, and results of *t*-test between the treated progenies

Year	Generation	No. of tested plants	Grain length			Grain breadth		
			Mean	Significancy	Variance	Mean	Significancy	Variance
1974	C	40	90.6		4.1016	36.5		1.2608
	M ₃	119	90.5		4.1398	37.6	*	0.9184
	M _{2/3}	103	90.1		5.5348	36.9	**	1.0530
	M _{1/2/3}	70	90.2		3.7325	37.1		1.1535
1975	C	60	90.2		5.1592	37.2		1.3630
	M ₄	81	89.3	*	5.5890	36.9	**	1.5426
	M _{3/4}	83	88.0	*	4.4934	35.7	**	1.0867
	M _{2/3/4}	50	88.2	**	5.0381	35.9	**	1.5790
	(M _{2/3})	88	90.2	**	4.8486	37.5	**	1.1488

*, **: Significant at 5 and 1% level, respectively.

を示したものである。

分散は粒長、粒幅とも対照区に比べ有意な増大はみられなかった。

平均値についてみると、粒長では 1974 年栽植の M₃、M_{2/3} および M_{1/2/3} に有意差はみられなかったものの対照区の平均値より小さな値を示した。これらの次代、即ち 1975 年栽植の M₄、M_{3/4} および M_{2/3/4} ではいずれも対照区に比べ有意に小さな平均値を示した。追試験区である M_{2/3} (75) には有意差はみられなかった。

粒幅では 1974 年栽植の各処理区は対照区に比べてプラスの有意差がみられたが、1975 年度栽植の処理区ではマイナス方向への偏差が認められた。

1974 年と 1975 年の対照区間の平均値の差を年次間変動とみなし、処理区と対照区間の変動に相互作用がないとすれば、M₄ と M₃ の真の差は (M₄ - M₃) から対照区の 1975 年度と 1974 年度の年次間差を引くことによって求められる。ところで、M_{3/4} と M_{2/3} の差には M₄ と M₃ の効果が入っておりこれを差引けばよい。これら平均値の真の差の結果は Table 2 に示したが、世代を経るに従って粒長、粒幅とも小さくなる、つまり小粒化する傾向がみられた。

粒長と粒幅間の相関係数をとってみると (Table 3) 1974 年の対照区と M_{1/2/3} を除いて有意な正の相関がみられた。1974 年の対照区も有意差こそなかったが 5% 水準に近い値であった。M_{1/2/3} は粒長と粒幅間に全く相関関係が認められなかったが、その次代 M_{2/3/4}

Table 2. Net distance between the mean values of each generation

Component	Grain length	Grain breadth
M ₂ -M ₁	+0.1	±0
M ₃ -M ₂	-0.9	-0.5
M ₄ -M ₃	-0.8	-1.4
M _{3/4} -M _{2/3}	-1.7	-1.9
M _{2/3/4} -M _{1/2/3}	-1.6	-1.9

Table 3. Correlation coefficient between the length and breadth of grain in the treated progenies

Year	Generation	Correlation coefficient
1974	C	0.3002
	M ₃	0.3141*
	M _{2/3}	0.4467**
	M _{1/2/3}	0.0010
1975	C	0.7752**
	M ₄	0.3473**
	M _{3/4}	0.5808**
	M _{2/3/4}	0.7084**
	(M _{2/3})	0.4177**

*, **: Significant at 5 and 1% level, respectively.

では1%水準で有意な高い相関を示し注目された。

危険率を5%とした場合の変異限界からプラスまたはマイナス方向へ外れる個体の頻度を Table 4 に示した。籾長、籾幅ともほとんどの区でプラス、マイナス両方向へ外れた個体が認められたが相対的にマイナス方向へ外れる個体が多い傾向が認められた。1974 年栽植の各処理区においては籾幅の大きな個体が多かったのに対して、1975 年栽植の各処理区ではむしろマイナス方向へ外れる個体の方が多かった。処理別に変異限界外個体出現頻度をみると、1 回処理後代の M_3 や M_4 に比べると2 回処理の $M_{2/3}$ や $M_{3/4}$ および3 回処理の $M_{2/3/4}$ の方が高い頻度を示した。 $M_{1/2/3}$ については処理当代であることから実質的には2 回処理の次代 $M_{2/3}$ とあまりかわらないと考えられ、1974 年栽植の $M_{2/3}$ と追試験区の $M_{2/3}$ (75) の中間の値を示した。

考 察

量的形質の変異に関して、mutagen 処理により分散が増大することを認めた報告は多い (OKA *et al.* 1958, 山口 1962 a. b, Brock 1965, 1976, JANA and Roy 1973)。本研究ではいずれの処理区も対照区に比べて有意な分散の増大はみられなかった。しかしながら、蓬原および渡辺 (1969) はイネの稈長についてフジミノリおよびそれを原品種とする短稈突然変異品種レイメイのX線照射区は対照区に比べて分散が有意に大きくなり平均値には有意差が認められなかったのに対して、極短稈系統ふ系 71 号の照射区では分散の増大はみられず平均値に有意差が認められたことを報告している。このように供試材料の遺伝的構成の違いにより分散の大きさを異にする場合のあることも考えられる。

平均値については、有意差の認められなかった区も含めて籾長ではほとんどの処理区で対照区より小さな値を示し、籾幅は 1974 年栽植の処理区で有意に大きくなっていたが 1975 年栽植の各区ではマイナス方向への移動が認められた。また、処理区間の比較では、1974 年と 1975 年の対照区の平均値の差を年次間変動とみなし世代間の正味の差を求めた (Table 2) とところ、世代を経るに従い籾長、籾幅とも減少する傾向が認められた。両形質間の相関係数もほとんどの処理区で高い正の相関を示していた (Table 3) ことから処理集団の籾型は小粒化の傾向があることを示唆しているものと考えられた。OKA ら (1958) はイネの草丈と出穂期について処理後代集団の分散は増大したが、プラスとマイナス両方向の変異が同時に起きているため平均値に有意差がみられなかったと報告している。山口 (1962 a) もイネの籾長と籾幅について同様な結果を得た。これに対して Brock (1965, 1976) は調査形質の淘汰や人為選抜の前歴によるが、random mutation は分散の増大と平均値の移動を引き起すと述べている。JANA and Roy (1973) は変異の頻度や方向性は形質により異なると報告しており、筆者も分散の大きさと平均値の移動は供試材料の genotype および調査形質により異なるという結果を得た (朱 1976)。本実験では分散に有意な増大はみられなかったが、変異限界外個体出現率はかなり高い頻度を示しており (Table 4), EI 処理による籾型変異の誘起効果があったものと考えられ、その結果、籾長と籾幅の平均値に移動がみられ、かつ世代を経るに従いいずれの形質もマイナス方向へ変異する傾向を示したものと推察された。

ところで、相関図で変異限界から外れる個体の頻度についてみると、籾長ではほとんどの処理区でマイナス方向へ外れる個体の頻度がプラス方向へ外れる個体の頻度より高いことがわかる (Table 4)。籾幅は M_3 , $M_{2/3}$ および $M_{1/2/3}$ でプラス方向へ外れる個体の出現頻度が高く、逆に M_4 , $M_{3/4}$ および $M_{2/3/4}$ ではマイナス方向の頻度の方が高くなっており、この点では処理集団の平均値が世代を経るとマイナス方向へ変異する傾向とよく一致しており注目された。しかし、個体別にみると両形質ともプラス方向へ外れた大粒化変異体が M_3 , $M_{2/3}$ と $M_{2/3/4}$ に1 個体ずつ認められ、さらに

Table 4. Frequency of aberrants for the grain length and breadth in the treated progenies

	Year	Generation	Negative direction		Positive direction		Total	
			No. of aberrants	Frequency	No. of aberrants	Frequency	No. of aberrants/ No. of tested plants	Frequency
Grain length	1974	M ₃	7	5.9	5	4.2	12/119	9.2
		M _{2/3}	8	7.8	3	2.9	11/103	10.7
		M _{1/2/3}	2	2.9	2	2.9	4/ 70	5.7
	1975	M ₄	6	7.4	1	1.1	7/ 81	9.9
		M _{3/4}	14	16.9	0	0	14/ 83	16.9
		M _{2/3/4}	7	14.0	1	1.4	8/ 50	16.0
		(M _{2/3})	3	3.4	1	1.1	4/ 88	4.6
Grain breadth	1974	M ₃	0	0	13	10.9	13/110	10.9
		M _{2/3}	1	1.0	3	2.9	4/103	3.9
		M _{1/2/3}	0	0	6	8.6	6/ 70	8.6
	1975	M ₄	3	3.7	1	1.2	4/ 81	4.9
		M _{3/4}	20	24.1	0	0	20/ 83	24.1
		M _{2/3/4}	9	18.0	1	2.0	10/ 50	20.0
		(M _{2/3})	2	2.3	4	4.6	6/ 88	6.8

は粒長についてマイナス方向、粒幅についてはプラス方向へ外れた丸粒化変異体も M₃ と M_{1/2/3} にみられたことから、処理集団の平均値の移動とは関係なく大粒化や丸粒化方向への変異体選抜の可能性のあるものと考えられた。LAWRENCE (1968, 1975) は形質により選抜効果の異なる場合があることを指摘している。ここでは選抜試験は実施されていないが、供試材料 E 39 の粒型に関する限り両形質ともプラス、マイナス両方向への選抜が可能であろうと推察された。

処理区別に変異限界外個体出現率をみると、EI を 1 回処理した M₃ と M₄ および 2 回処理した第 2 世代 M_{2/3} (1974 年と 1975 年栽植の両区) では粒長、粒幅ともそれほど大きな差は認められなかった。3 回処理の当代 M_{1/2/3} もそれほど高い頻度を示さなかった。この区は M_{2/3} の効果に処理当代の効果が加わっていると考えられ、処理時の材料が相当ヘテロ程度の高いものでなければ当代で変異体が分離してくる頻度は高くならないと推定されるので、M_{2/3} (1974 年と 1975 年) に近い値を示したものと思われる。M_{3/4} と M_{2/3/4} は明らかに 1 回処理の各処理後代集団に比べて高い頻度を示した。高ら (1969) は変異限界外個体出現率は個体分散と同等もしくはそれ以上の突然変異誘起効果の評価の指標になり得ると述べているが、本実験では分散に有意な増大はみられなかったものの変異限界外個体出現率は 1 回処理より 2 回あるいは 3 回処理の方がはるかに高い頻度を示したことから、粒型に関する限り累代処理法は変異の累積効果がありかつかなり高い突然変異誘起効果が期待できるものと考えられた。

ところで、累代処理を行う場合、高線量照射は好ましくなく、M₁ 植物の生存に著しい影響を及ぼす恐れのない低い線量を用いる方がよいと山口 (1962 b) や海妻ら (1967) が報告しているが、chemical mutagen による累代処理実験、特に微小突然変異を対象とした報告はほとんど見当たらない (谷坂・山縣 1977)。ここでは 0.3% の EI 濃度を処理に用いたが、UKAI and YAMASHITA (1975) は実用的範囲でできるだけ高い線量を用いた方がよいと報告しており、EI による累代処理の場合にも濃度についてはさらに検討の要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導いただいた名古屋大学農学部 蓬原雄三助教授に感謝の意を表すとともに、実験材料の栽培管理にご協力いただいた本学附属農場の小林喜男教授と戸刈政司氏に厚くお礼申し上げる。

引用文献

- BROCK, R. D. 1965. Induced mutations affecting quantitative characters. *Radiation Botany* **5**: 451~464.
——— 1976. Quantitatively inherited variation in *Arabidopsis thaliana* induced by chemical mutagens. *Environmental and Experimental Botany* **16**: 241~253.
蓬原雄三 1963. 突然変異個体の選抜. 育種学最近の進歩 第4集: 88~95.
———・渡辺利通 1969. 水稻の短稈突然変異に関する育種学的研究. III. 短稈突然変異系統における放射線再照射の効果. 育種 **19**. 別冊 2: 79~80.
GAUL, H. 1961. Use of induced mutants in seed-propagated species. *Mutation and plant breeding*, NAS-NRC **891**: 206~251.
JANA, M. K. and K. ROY 1973. Induced quantitative mutation in rice. *Radiation Botany* **13**: 245~257.
海妻矩彦・平野寿助・後藤虎男 1967. γ 線照射による小麦短強稈突然変異系統の育成と 2, 3 の問題点. 中国農試報告 A 第 14 号: 1~22.
高 泰保・山縣弘忠・赤藤克己 1969. 人為突然変異の利用に関する育種学的研究. VI. 処理次代の変異限界外個体出現率による突然変異誘起効果の評価. 育種 **19**: 89~93.
LAWRENCE, C. W. 1968. Radiation-induced polygenic mutation in *Arabidopsis thaliana*. I. Selection for flowering time. *Heredity* **23**: 321~337.
——— 1975. Radiation-induced polygenic mutation in *Arabidopsis thaliana*. V. Analysis of lines selected for numbers of seeds per pod. *Heredity* **34**: 213~224.
OKA, H., J. HAYASHI and I. SHIOJIRI 1958. Induced mutation of poly-genes for quantitative characters in rice. *The Journal of Heredity* **49**: 11~14.
朱 政治 1976. 水稻におけるエチレンイミン感受性と籾型突然変異の誘起について. 育種 **26**: 187~196.
谷坂隆俊・山縣弘忠 1977. 人為突然変異の利用に関する育種学的研究. XXXIX. イネにおける累代突然変異誘発処理の効果. 育種 **27** 別冊 1: 104~105.
UKAI, Y. and A. YAMASHITA 1975. Comparison of efficiency between recurrent and single mutagenic treatment by mathematical analysis. *Gamma Field Symposia* **14**: 59~99.
山口彦之 1962 a. 放射線照射により生じたイネ籾型の遺伝変異. 第1報 γ 線照射. 育種 **12**: 93~100.
——— 1962 b. 累代照射法による突然変異の作出. 育種 **12**: 141~147.
——— 1962 c. 放射線照射により生じたイネ籾型の遺伝変異. 第2報原子炉内放射線による処理. *Radioisotopes* **11**: 33~38.
——— 1963. 原子炉内放射線と X(γ) 線との生物効果の比較. 育種学最近の進歩第4集: 51~59.

Summary

The effect of induction of mutations for grain size by recurrent treatments with ethylenimine (EI) was studied.

The 50% decrease in survival of M_1 seedlings was observed at 0.8–1.0% of EI concentration. This results indicated that the used material GAISENMOCHI (Line no. E39) had a relatively lower EI sensitivity.

The values of variance in all the treated populations for the length and breadth of grain did not increase significantly compared with those of the non-treated populations. But, for the mean values, there were significant differences among them. This might be expected from the frequency distribution graphs.

When the net distance of mean values between generations was calculated, it showed the decreasing tendency both in the length and breadth of grain as generation goes on. And there were high correlations between the length and breadth of grain in almost

treated populations. These results suggested that the grain size might tend to get smaller by EI treatment.

But in the correlation distribution graphs, large or round grain mutants which varied over the limited range of variation for both characteristics were found, therefore, the possibility of selection to plus and minus directions independently for the length and breadth of grain was supposed.

The frequency of aberrants showed higher values in the populations after second and third cycles of recurrent EI treatments than in those of single treatment. So, it was expected that the recurrent treatment method with EI seemed to be effective for accumulation and induction of grain size mutations.

D. CHU

Faculty of Agriculture, Nagoya University, Nagoya 464