

論文内容要旨

第 I 章 緒 言

花粉や胚の放射線処理による突然変異育種では、受精および受精後の胚発育中に生ずる異常の原因を究明することは、育種の礎材となる突然変異個体をうるため基礎的研究として重要である。

放射線突然変異出現頻度は、照射される線量の増加に伴って増すが、照射可能な限界線量（致死線量）があり突然変異率は自ら限定される。突然変異率の低い作物に対しては、さらに突然変異率の高まる方法を開発することが望まれる。そのための一方法として、照射による障害を軽減あるいは除去し、多くの M_1 個体（照射当代の個体）を獲得することが研究されてきている。その手法の一つとして、高線量照射され通常の生育条件では致死にいたる胚が培養によって成熟個体にまで達するならば高い変異率を期待することができる。また、この手法においては、照射は細胞数の少ない初期の胚に行なえるので、たとえ個体がキメラであっても、そのキメラ部位は大きなセクターとして現われるため、 M_1 および M_2 世代で変異個体を見逃すことが少なく、変異個体選抜の効率を高めうる事が期待できるであろう。

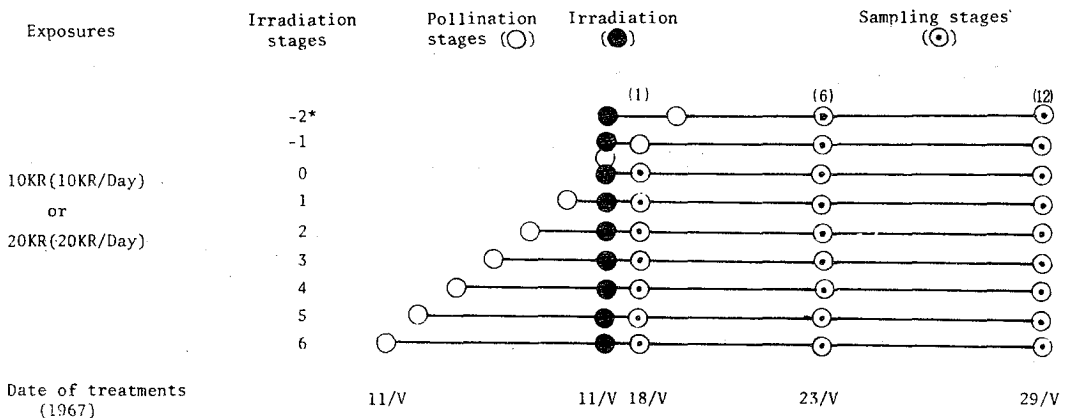
このような観点に立って、本研究では突然変異出現率の低い作物であるブラシカ属のハクサイおよびカンランを対象とし、照射後の胚形成過程を組織学的あるいは組織化学的に追求し、それらの知見をもとに、照射後の胚培養により多数の M_1 個体の養成をはかることを目的として実験を行った。

第 II 章 放射線処理の胚形成におよぼす影響の組織学的研究

第 1 節 ハクサイの発育時期別 γ 線照射

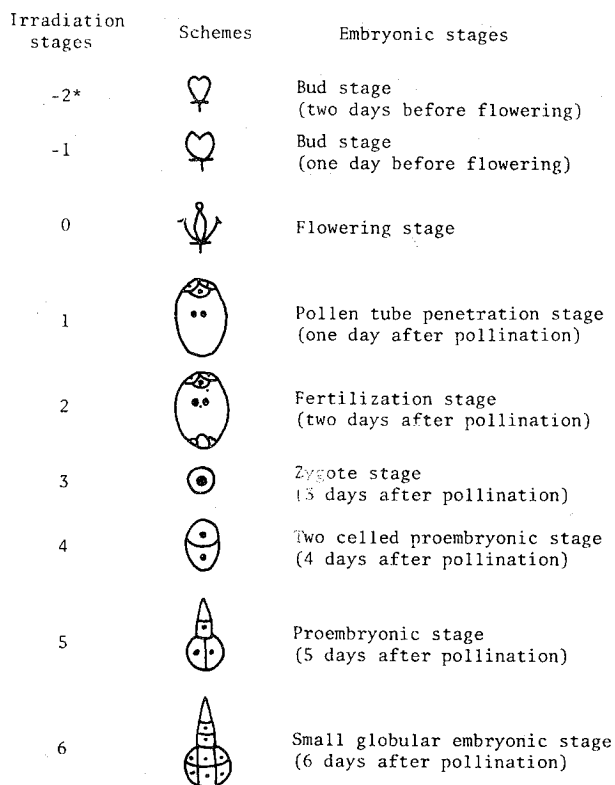
稔実種子の得られない高い線量をいろいろなステージの *in vivo* の胚に照射し (Fig. 1, 2), ①照射後の胚, 胚乳および母性組織の発育障害および形態異常, ②照射後障害を受けた胚の発育を目的として胚培養を行なう場合に、培養が容易にできる大きさをそなえた胚の得られる照射時期, ③胚の発育時期と致死線量との関係を明らかにしようとした。

胚: 照射後 6 日では、照射区で胚発育が遅延し、退化した胚が少ない。照射後 12 日では、胚発育の遅延と停止が認められ、退化した胚が多い。また、胚発育程度の中が広く、early heart embryo (略号, EH) 以上の胚が認められる (Table 1)。



* Figures denote number of days after pollinations.
Figures in parenthesis denote number of days after irradiation.

Fig. 1. Schedule for the histological experiment in Kairyochitose (*E. pekinensis*).



* Figures denote number of days after pollination.

Fig. 2. Embryonic development of *Kairyochitose* (*B. pekinensis*) at irradiation stages.

Table 1. Embryonic development of *Kairyochitose* (*B. pekinensis*) at 12 days after irradiation.

KR	Irradiation stages	No. of embryos degenerated	Developmental stages or No. of cells of embryo									Total	Degenerated embryo %				
			1-3	4-7	8-15	16-30	31-60	61-100	101-200	EH-H	ET-T			LT			
0	-1																
	0											7	7	0			
	1											10	10	0			
	2										2	12	14	0			
	3									1		9	10	0			
	4											5	6	11	0		
	5											8	7	15	0		
6											1	9	10	0			
10	-1	6	3	1	3	3	3		2				21	54.5			
	0	6	1	2	1	2	2	2	7				23	26.0			
	1	7	1						7	2			23	30.4			
	2	6	1						1	9			18	33.3			
	3	4			1	1				7			13	30.7			
	4	1					4			14		2	21	4.7			
	5	2								12	1		16	12.5			
6	1								2	8		11	9.0				
20	-1	6		1	1	1					1		10	60.0			
	0	11		2									13	84.6			
	1	13	1	1		1		1					18	72.2			
	2	16			1				2	4			23	69.5			
	3	14					1	2		1	2		20	70.0			
	4	16	3		3						1		23	69.5			
	5	8			6						1		16	50.0			
6																	

Figures in the table denote number of embryos. See foot-note of Figure 2 for irradiation stages.

LT: Late torpedo embryo.

胚乳：照射後12日では、20 KR照射で胚乳の退化、細胞膜の形成遅延、胚乳の退化が認められる。

形態異常：胚柄の肥大、多仁、胚細胞の壊死が観察され、開花前～受粉1日後照射で多仁の胚乳が多く、全照射時期で壊死細胞と退化胚との関係が強い。

種子稔性（種子数/台座数）と発芽：開花当日から前胚（受粉4日後）の照射で幼苗が得られず10 KR照射が致死線量になるが（Fig. 3, 4）、この時期でも胚はEH期以上に発達した。20KR照射では受粉1日後（花粉管伸長期）から受粉6日後（球形胚期）の時期でEH期以上の胚が少数形成された。

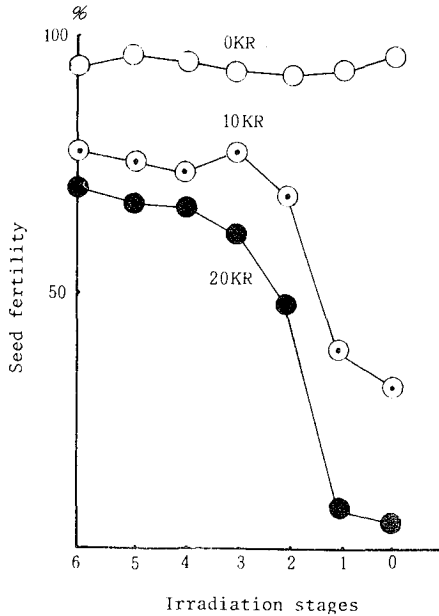


Fig. 3. Seed fertility of Kairyochitose (*E. pekinensis*) following γ -radiation at different embryonic stages.

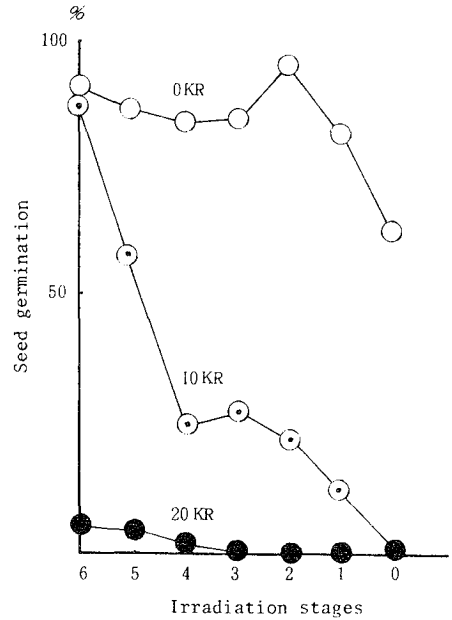
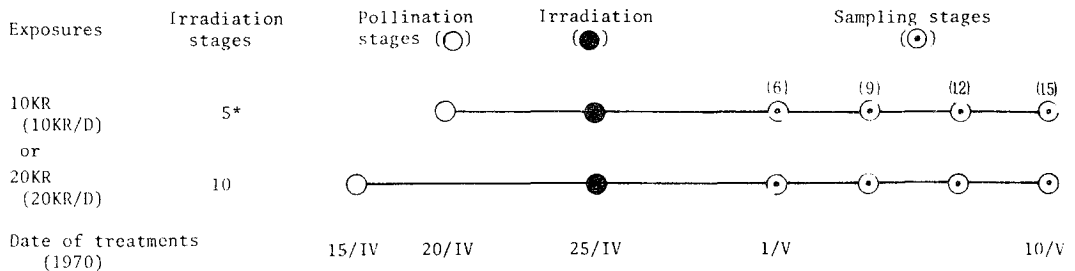


Fig. 4. Seed germination of Kairyochitose (*B. pekinensis*) following γ -radiation at different embryonic stages.

第2節 カンランの発育時期別 γ 線照射

ハクサイとの放射線に対する反応の差異を明らかにするため、受粉後5日の前胚と受粉後10日の球形胚に対して照射し（Fig. 5）、ハクサイと同様に照射後6～15日の①胚、胚乳および母性組織の発育障害、形態異常および②種子稔性・発芽から致死線量を明らかにした。



* Figures denote number of days after pollination.
Figures in parenthesis denote number of days after irradiation.

Fig. 5. Program of irradiation experiment with Kinpai (*B. oleracea*).

胚：胚発育の遅延・停止が認められ、胚の退化は受粉5日後照射で多い（Table 2）。照射後の胚発育程度の中は、10KR照射では照射後15日になると、発育をつづける胚、発育を停止する胚、退化した胚が出現し、発育程度の中は大きくなった。20KR照射では照射後15日になっても、放射線障害が大きく、発育をつづける胚が少ないため10KR照射と比較して発育程度の中は小さかった。

Table 2. Embryonic development of Kinpai (*B. oleracea*) at 6 to 15 days after irradiation.

KR	Irradiation stages	No. of days after irradiation	No. of ovules observed	No. of embryos degenerated (%)	Developmental stages or No. of cells of embryo										
					Z-P	1-3	4-7	8-15	16-30	31-60	61-100	101-200	EH-H		
0		0(5)*	22	0	19	3									
		6(11)	21	0		10	4	7							
		9(14)	28	0			8	13	6						
		12(17)	21	0					3	5	9	4			
		15(20)	28	0							1	14	13		
10	5	6	20	0		10	10								
		9	22	1(4.5)		4	9	7	1						
		12	26	3(11.5)		6	6	6	3	2					
		15	33	3(9.0)		4	6	8	3	5	2	2			
20		6	16	2(12.5)	7	7									
		9	24	1(4.1)		13	9	1							
		12	29	2(6.8)		11	13	3							
		15	26	7(26.9)		9	5	3	1	1					
0		0(10)	38	0				3	10	25					
		6(16)	23	0						2	16	5			
		9(19)	21	0							3	11	7		
		12(22)	16	0									4	12	
		15(25)													
10	10	6	23	0				8	15						
		9	21	2(9.5)				3	1	12	3				
		12	7	0							4	3			
		15	6	0				1	1	0	2	1	1		
20		6	19	0				4	5	10					
		9	18	1(5.5)				3	3	11					
		12	25	3(12.0)					6	9	7				
		15	7	0					1	3	3				

* Figures in parenthesis denote the number of days after pollination.
 Figures in the table denote the number of embryos.

胚の照射時期と放射線障害の関係では、ハクサイ同様に、球形胚時期の照射の方が、若い前胚時期の照射より胚の発育を停止あるいは退化した胚は少なかった。

胚乳：細胞膜の形成は、無照射区と比較して大きな差は認められなかった。

形態異常：壊死細胞を持つ胚が少なく、胚柄肥大、胚乳の多仁が認められた。

種子稔性と発芽：受粉5日と10日後の照射では、10KRおよび20KR照射のいずれでも幼苗が得られず致死線量であり、EH期に近い胚が受粉10日後の10KR照射・照射後15日に少数観察されたに過ぎなかった。

第3節 ハクサイとカンランの比較

両作物の前胚期照射の胚形成について比較した（Table 3）。

ハクサイでは、EH期以上の胚が認められるが、カンランでは認められなかった。

第1節と2節の結果から両作物について比較検討した結果、①胚の壊死細胞は、カンランで少なかったこと、②胚の発育はカンランで遅いこと、③種子稔性と発芽も、カンランで低い。上記のことから、カンランはハクサイよりも放射線に対して感受性が高いと云える。

Table 3. Comparison of embryonic development between Kairyochitose (*B. pekinensis*) and Kinpai (*B. oleracea*) irradiated at proembryo stage.

Varieties	No. of days after irradiation	KR	No. of ovules observed	No. of embryos degenerated (%)	Developmental stages or No. of cells of embryo											
					Z-P	1-3	4-7	8-15	16-30	31-60	61-100	101-200	EH-H	EH-T	LT	
Kairyochitose	6	0	15	0						1	2	1	3	8		
		10	15	0					2	1	4	6	1	1		
		20	15	0			12	3								
	12	0	11	0											5	6
		10	21	1(4.8)							4				2	14
		20	23	16(69.6)			3			3					1	
Kinpai	6	0	21	0			10	4	7							
		10	20	0			10	10								
		20	16	2(12.5)			7	7								
	12	0	21	0						3	5	9	4			
		10	26	3(11.5)			6	6	6	3	2					
		20	29	2(6.9)			11	13	3							

第4節 考察

ハクサイおよびカンランとも、発育初期（配偶子～前胚）よりも発育の進んだ球形胚照射の方が、放射線の影響は小さい。胚発生初期には細胞は活発に分裂し放射線に対して感受性が高いことや、一細胞世代当りに照射される線量の違い、細胞分裂周期の違いによる放射線感受性による差異が、照射時期別の差の原因として挙げられる。

カンランは、ハクサイに比較して放射線感受性が高いが、両作物の放射線障害の差は、核容積の違い（カンランの方が大きい）や細胞分裂周期の長短（カンランの方が胚発育速度が遅い）により生ずることが挙げられよう。

ハクサイとカンランの胚に致死線量以上の線量を照射しても、EH期以上の胚が得られるので、胚を発育中に摘出して培養する可能性が見い出された。

第Ⅲ章 放射線処理の胚形成におよぼす影響の組織化学的研究

発育時期別γ線照射後の胚、胚乳および母性組織（珠心・珠皮・合点組織）の多糖類、蛋白質および核酸の変化とその組織学的異常との関係を検討した。

第1節 ハクサイの発育時期別γ線照射

照射線量、照射時期、照射後の標本採集の時期は、組織学的観察（Fig.1）の場合と同じである。

多糖類：胚の多糖類顆粒の形成は、10KR照射では対照区に比較して形成が遅れ、20KR照射では照射時期に関係なく、多糖類が多く全照射時期で影響が大きかった。頂端・中央胚乳の多糖類は、対照区に比較して、照射区では顆粒の形成開始、移動が遅れ、さらに顆粒が少なく照射の影響が認められた。母性組織では、照射による影響は見い出されなかった。

蛋白質：多糖類に比較して放射線による変化は少なかった。

核酸（DNA）：対照区では胚の発育が進むに伴って増加するが、10KR照射ではその増加が遅れ、20KR照射では全照射時期で核酸は減少した。胚以外の組織では照射の影響は少なかった。

形態異常：胚乳の巨大核および多仁を示した細胞は、高いDNA濃度を示した。

第2節 カンランの発育時期別γ線照射

胚の多糖類の増加は、殆んど認められなかった。胚の蛋白質、核酸（DNAとRNA）は、ハクサイと違ってその含有量の減少が認められ、照射の影響が大きかった。

第3節 ハクサイとカンランの比較

ハクサイでは、多糖類の顆粒分布に変化が認められたのに対して、カンランでは全く認められなかった。

蛋白質は、ハクサイでは対照区と照射区の間で差が認められないのに対して、カンランでは照射区でその濃度が低く、放射線の影響を受けた。

核酸(DNA)は、ハクサイの10KR照射では、対照区と同じ程度の含有量であったが、20KR照射ではその含有量は減少していた。カンランでは、照射区のDNA含有量が低く、放射線により阻害された。

以上のことから、多糖類の生成を除いては、カンランの方がハクサイよりも放射線に対して阻害を受け易いと云える。

第4節 考 察

照射による生化学的变化は、胚では多糖類の代謝異常の頻度が最も高く、蛋白質と核酸が減少しているのに対し、胚乳では、糖代謝異常が少なく、蛋白質と核酸の減少が胚より小さい。母性組織では、これらの三つの物質の変化は、さらに少ないことから、組織別の生化学的变化は、組織学的観察と同様に、胚が最も大きく、胚乳、母性組織の順となる。

第IV章 放射線処理の胚形成におよぼす影響の生長解析的研究

放射線処理の胚、胚乳および胚珠の発育に対する影響を数量的に究明することは、各組織の細胞分裂・伸長への放射線の作用を一層明らかにするとともに、定性的な組織学および組織化学的観察結果の不備を補うことができる。

第1節 ハクサイの発育時期別γ線照射

対照区に対する比(照射区/対照区)で表わした発育障害を示すと以下のようなになる。

胚の細胞数：開花当日～受粉2日後照射で影響が強い(Fig. 6)。

胚の伸長：発育の進んだ時期ほど影響が強い(Fig. 7)。

胚乳の核数：開花当日～受粉2日後照射で影響が強い(Fig. 8)。

胚珠の伸長：開花前照射で若干影響がみられる程度である。

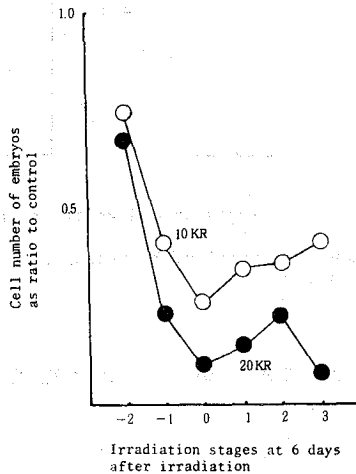


Fig. 6. Cell number of embryos of *Kairyochitose* (*B. pkinensis*) irradiated at different embryonic stages.

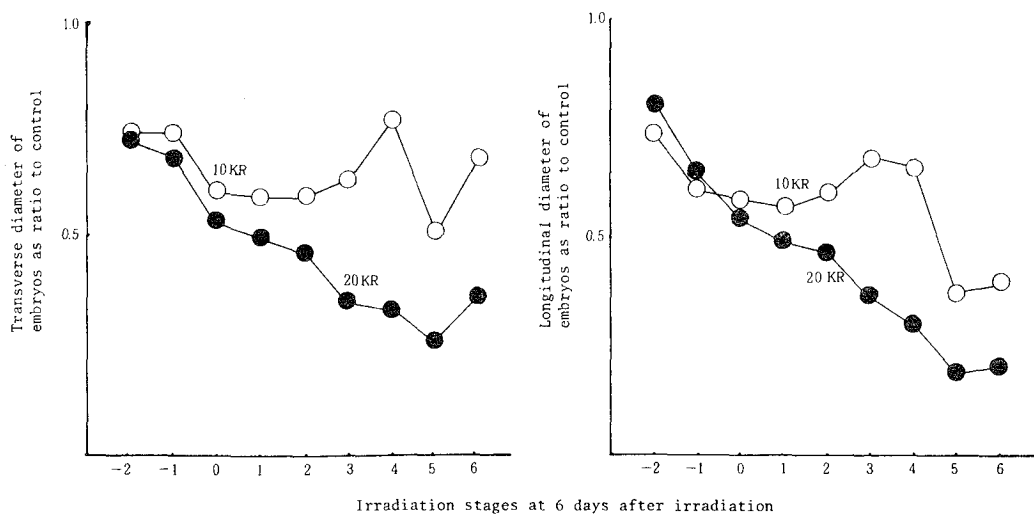


Fig. 7. Transverse and longitudinal diameter of embryos of Kairyochitose (*B. pekinensis*) irradiated at different embryonic stages.

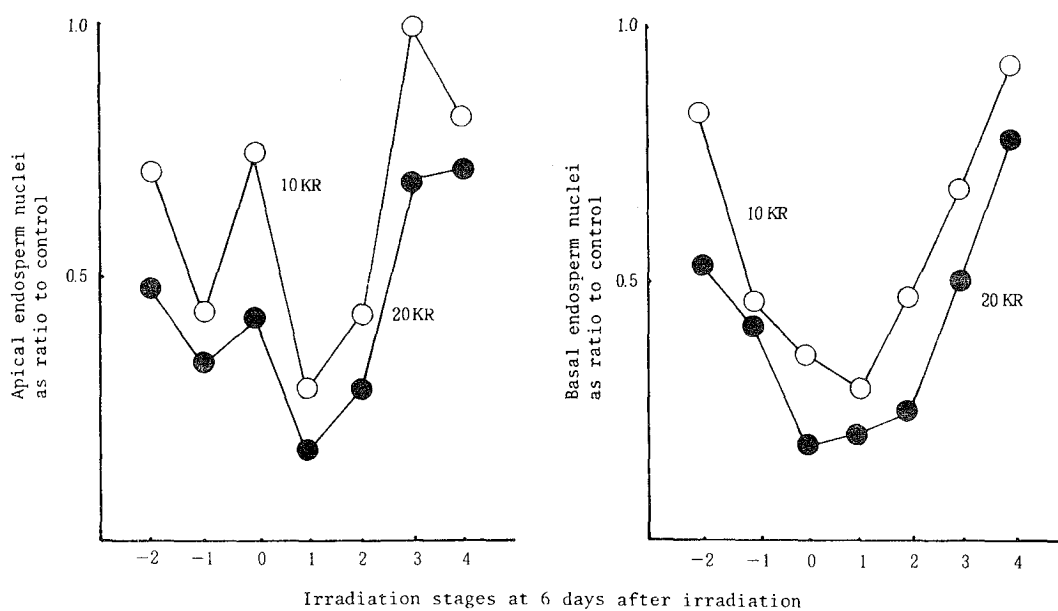


Fig. 8. Apical and basal endosperm nuclei of Kairyochitose (*B. pekinensis*) irradiated at different embryonic stages.

以上の結果から、胚が最も放射線に対して感受性が高く、次に胚乳、胚珠の順である。

第 2 節 カンランの発育時期別 γ 線照射

対照区に対する比で表わした発育障害は、以下のようになる。

胚の細胞数：受粉 5 日後照射で影響が強い。受粉 10 日後の 10 KR 照射で増加が認められる (Fig. 9)。

胚の伸長：10 KR 照射では、受粉 10 日後よりも受粉 5 日後照射で影響が強い。20 KR 照射では、受粉 10 日後の発育の進んだ胚の照射で影響が強い (Fig. 10)。

胚乳の核数：受粉 5 日後照射で影響が強い。受粉 10 日後の 10 KR 照射で核数の増加が認められる。(Fig. 11)。

胚珠の伸長：照射の影響が殆んどない。

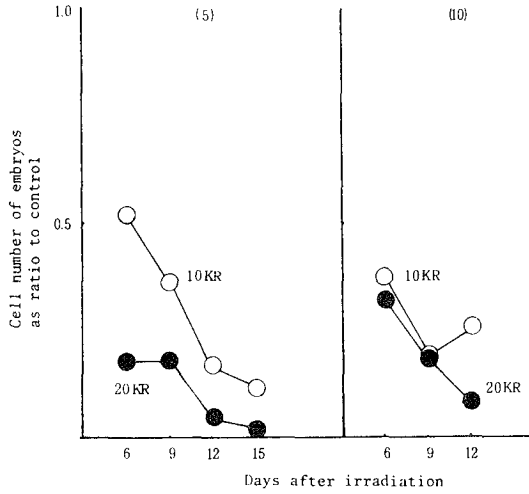


Figure in parenthesis denotes number of days after pollination at irradiation stages.

Fig. 9. Cell numbers of embryos of Kinpai (*B. oleracea*) following irradiation.

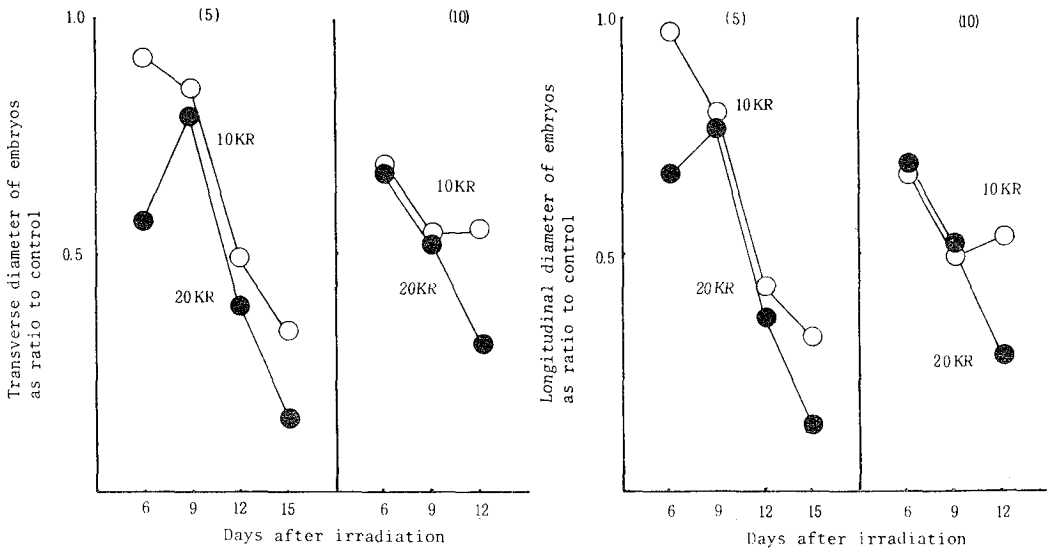


Figure in parenthesis denotes number of days after pollination at irradiation stages.

Fig. 10. Transverse and longitudinal diameters of embryos of Kinpai (*B. oleracea*) following irradiation.

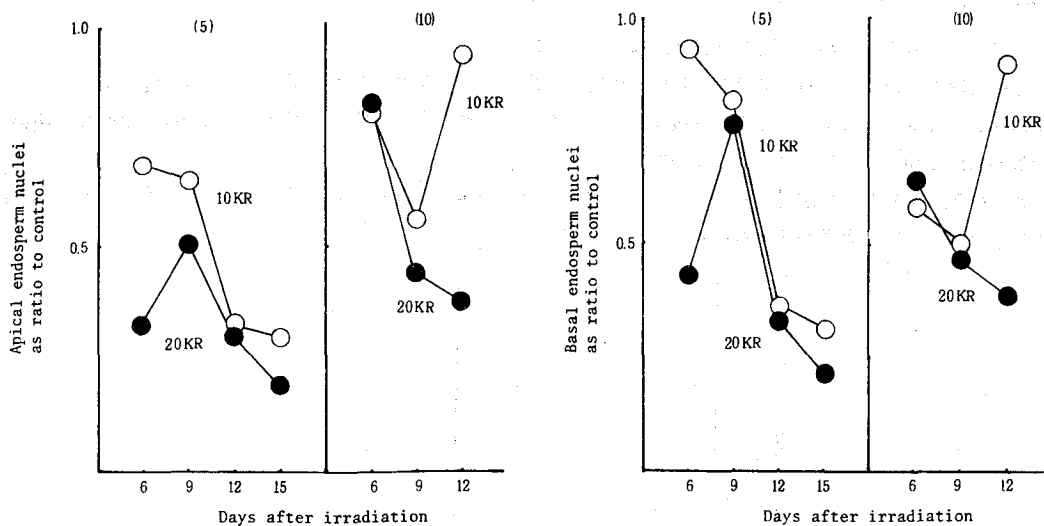


Figure in parenthesis denotes number of days after pollination at irradiation stages.

Fig. 11. Apical and basal endosperm nuclei of Kinpai (*B. oleracea*) following irradiation.

第3節 ハクサイとカンランの比較

各組織でハクサイの方が発育速度が早い (Table 4)。カンランの方が放射線に対して感受性が高かった。

Table 4. Comparison of embryonic development between Kairyochitose (*B. pekinensis*) and that of Kinpai (*B. oleracea*) at 6 days after irradiation.

Varieties	Irradiation KR	stages	No. of ovules observed	Cell number of embryos	Transverse diameter of embryos (u)	Longitudinal diameter of embryos (u)	No. of apical endosperm nuclei	No. of basal endosperm nuclei	Transverse diameter of ovules (u)	Longitudinal diameter of ovules (u)
Kairyochitose	0	(4)*	15	1.0±0.0	14.0±0.3	13.1±1.5	5.0±0.3	4.9±0.7	461.9±11.3	583.6±12.5
Kinpai	0	(5)	20	1.2±0.1	14.0±0.4	12.9±0.4	2.6±0.2	3.2±0.1	656.3±15.1	1052.4±38.2
Kairyochitose	0		15		98.4±6.3	106.5±8.4	41.0±4.2	23.2±3.6	1004.4±47.8	1374.2±45.9
Kairyochitose	10	4(10)**	15	63.5±10.3	76.0±7.0	71.8±6.6	33.7±5.3	30.4±3.2	1007.1±23.5	1332.5±41.6
Kairyochitose	20		15	7.1±0.6	33.8±1.8	32.4±2.0	29.6±2.0	25.9±2.3	1100.1±29.1	1472.4±35.2
Kinpai	0		32	6.2±0.7	23.2±0.9	18.2±0.8	10.0±1.1	9.4±0.7	832.8±21.5	1230.0±43.7
Kinpai	10	5(11)**	32	3.2±0.7	21.4±0.6	17.7±0.6	6.9±0.7	8.8±0.6	817.2±35.0	1245.6±51.1
Kinpai	20		32	1.1±0.1	13.4±1.0	12.2±0.9	3.2±0.2	4.1±0.3	685.2±21.8	1134.0±31.1

* Figure in parenthesis denotes the number of days after pollination at irradiation stages.

** Figure in parenthesis denotes the number of days after pollination at 6 days after irradiation.

Figures in the Table denote mean values and standard error.

See foot-note of Fig. 2 and Fig. 5 for irradiation stages.

第4節 考 察

胚の細胞数・伸長は、放射線処理によって減少するので、胚の生長抑制は胚の細胞数の減少と結びついていると考えられよう。発育中の胚は、細胞分裂が活発な組織であり、高線量では、細胞の有糸分裂の障害をまねき、胚の細胞の増殖能力が消失する。

ハクサイとカンランの各組織で種間の差が認められたが、以下のような点が関係していると考えられる。①照射時点の細胞分裂周期の違いによる放射線感受性の差、②細胞分裂周期の長短、③形態異常（壊死細胞、巨大核、多仁、退化、発育停止）、④生化学的異常（多糖類異常、核酸・蛋白質の減少）、⑤発育速度の違いなどが関与しているものと推察される。

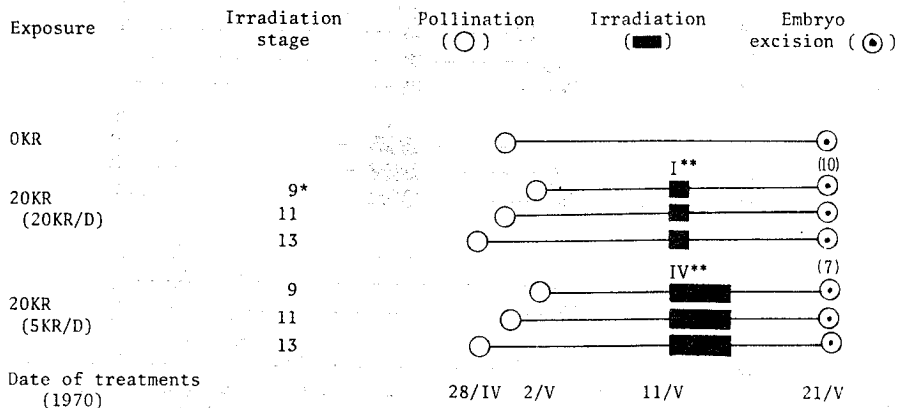
胚、胚乳、胚珠間の器官別の差も数量的に明示されたが、これについても上述した①から⑤までの他に⑥細胞膜の有無、⑦培数性の違い、⑧多糖類、蛋白質、核酸代謝の生化学的活性度の違いが原因として挙げられよう。

第V章 放射線処理後の胚培養

ハクサイおよびカンランの胚に致死線量照射したときの M_1 個体を育成するため、胚のいろいろな発育時期に照射し、①EH期あるいはそれ以上の発育段階に達した胚が得られる率、②培養後の発根、茎葉の伸長および培養によって得られる移植個体 (M_1 個体) 数、③培養後の胚発育過程を組織学および組織化学的に追跡を行なった。

第1節 ハクサイの照射胚の発育分化

EH期以上に達した胚の得られる率および胚の発育分化は、若い胚の照射ほど発育の進んだ胚の照射よりも小さかった。胚は、20KR照射でも、各5KR4日間照射（略号、20(5)KR照射）でも発達した（Fig. 12, Table 5）。



Figures in parenthesis denote number of days after irradiation.
* Figures denote number of days after pollination.

Fig. 12. Schedule of the experiment made with Kashin and Kyoto No. 3 (*B. pekinensis*).

Table 5. Embryonic development of Kashin and Kyoto No. 3 (*B. pekinensis*) at embryo excision at 7 and 10 days after irradiation.

KR	Varieties	Irradiation stages	Excision (days after irradiation)	No. of ovules observed	No. of embryos excised	Embryo excision %	Embryonic development							
							EM	LT	T	ET	LH	H	EH	G
0			(21)	30	30	100	17	13						
20 (5KR/D)	Kashin	9*	7(19)	98	21	21.42				7	0	12	0	2
		11	7(21)	41	32	78.04			4	24	0	4		
		13	7(23)	53	28	52.83				24	0	4		
20 (20KR/D)		9	10(19)	42	40	95.23		1	14	12	0	13		
		11	10(21)	43	39	90.69			4	23	8	0	4	
		13	10(23)	36	32	88.88			3	23	6			
0			(21)	66	66	100	49	15	2					
20 (5KR/D)	Kyoto No. 3	9	7(19)	150	0	0								
		11	7(21)	41	27	65.85		4	14	7	0	1	0	1
		13	7(23)	36	31	86.11		6	22	3				
20 (20KR/D)		9	10(19)	126	26	20.63			4	13	0	7	0	2
		11	10(21)	41	34	82.92			8	16	7	0	3	
		13	10(23)	50	37	74.00	9	13	13	2				

* Figures denote number of days after pollination.

Figures in parenthesis denote number of days after pollination at embryo excision.
Figures in the table denote the number of embryos.

第2節 カンランの照射胚の発育分化

E H期以上に達した胚の率および胚の発育分化は、低線量率（各5KRの4日間照射）照射で高線量照射（20KRの1日間照射）よりも高かった。照射時期では、E H期以上に達した胚の率と胚の発育分化は、若い胚の照射ほど、発育の進んだ胚の照射よりも小さかった（Fig. 13, Table 6, 7, 8）。

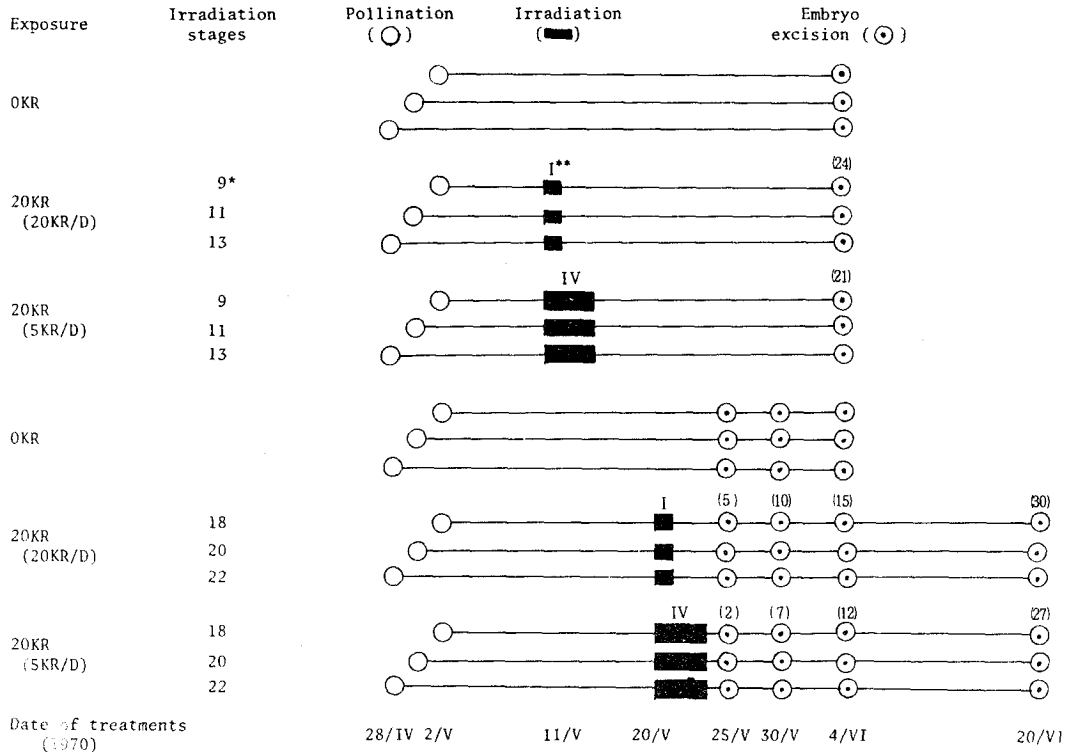


Figure in parenthesis denote number of days after irradiation. *Figures denote number of days after pollination. **Numerals denote duration of irradiation in day.

Fig. 13. Schedule of the experiment made with Kinpai, Kairyofuji, Watanabeseiko No. 2 and Nakawase No. 2 (*B. oleracea*)

Table 6. Embryonic development of *B. oleracea* at embryo excision at 21 and 24 days after irradiation.

KR	Varieties	Irradiation stages	Excision (days after irradiation)	No. of ovules observed	No. of embryos excised	Embryo excision %	Embryonic development										
							LM	M	EM	LT	T	ET	LH	H	EH	G	
0	Kinpai			30	30	100			4	24	2						
	Nakawase No. 2		(33)	77	77	100			52	25							
	Kinpai			30	30	100		6	18	6							
	Watanabeseiko No. 2		(35)	78	78	100			24	37	13	4					
	Kinpai		(37)	30	30	100	3	20	7								
20 (5KR/D)	Kinpai			47	10	21.2					2	5	3				
	Watanabeseiko No. 2	9*	(33)	51	28	54.9				4	15	5	2	2			
	Nakawase No. 2			63	16	25.3			5	5	4	2					
	Kinpai			31	19	61.2					10	4	4	1			
	Watanabeseiko No. 2	11	21(35)	55	44	80.0				2	17	15	3	7			
	Nakawase No. 2			146	55	37.6				25	11	11	8				
	Kinpai			40	25	62.5				10	6	5	4				
	Watanabeseiko No. 2						
	Nakawase No. 2	13	(37)	56	33	58.9				9	11	8	2	1	2		
20 (20KR/D)	Kinpai			52	8	15.3					1	5	2				
	Watanabeseiko No. 2	9	(33)	60	47	78.3					10	7	8				
	Nakawase No. 2			149	20	13.4				4	8	4	2	2			
	Kinpai			141	52	36.8					20	21	10	1			
	Watanabeseiko No. 2	11	24(35)	71	56	78.8				3	21	26	5	0	1		
	Nakawase No. 2			101	30	29.7				2	11	9	6	2			
	Kinpai			60	25	41.6					10	7	8				
	Watanabeseiko No. 2	13	(37)	61	49	80.3				5	21	13	6	2	2		
	Nakawase No. 2			74	37	50.0	1	2	10	10	5	5	2	2			

*Figures denote number of days after pollination.

Figures in the table denote the number of embryos.

Figures in parenthesis denote number of days after pollination at embryo excision.

LM: late mature embryo. M: mature embryo. EM: early mature embryo. LT: late torpedo embryo. T: torpedo embryo.

Table 7. Embryonic development of *B. oleracea* at embryo excision at 2 to 27 days after irradiation.

KR	Varieties	Irradiation stages	Excision (days after irradiation)	No. of ovules observed	No. of embryos excised	Embryo excision %	Embryonic development										EH** %			
							LM	M	EM	LT	T	ET	LH	H	EH	G				
20 (5KR/D)	Kinpai		2(23)	50	38	76.0											7	31	14.0	
	Kairyofuji			37	14	37.8												2	12	5.4
	Kinpai	18*	7(28)	44	26	45.4							11	9						
	Kairyofuji			22	6	27.2								3	3					
	Kinpai		12(33)	26	17	65.3					2	7	7	1						
	Kairyofuji								
	Kinpai		27(48)	57	48	84.2	27	3	3	6	3	3	3							
	Kairyofuji			24	17	70.8			1	4	4	3	4	1						
	Kinpai		2(25)	50	36	72.0								4	15	17			38.0	
	Kairyofuji			26	10	38.4									2	8			7.6	
	Kinpai		7(30)	50	37	74.0							8	23	6					
	Kairyofuji			18	12	66.6							1	7	4					
	Kinpai	20		30	25	83.3					4	8	6	7						
	Kairyofuji		12(35)						
	Kinpai		27(50)	54	47	87.0	24	9	4	6	4	2	1							
	Kairyofuji			33	24	72.7		4	2	3	9	3	3							
Kinpai		2(27)	31	22	70.9							5	2	6	9					
Kairyofuji			25	15	60.0							1	3	10	1			56.0		
Kinpai		7(32)	36	24	66.6					2	7	8	7							
Kairyofuji			37	22	59.4							3	7	10	2					
Kinpai	22		30	20	66.6							9	5	3	3					
Kairyofuji		12(37)							
Kinpai		27(52)	48	48	100.0	27	9	3	6	3	6	3								
Kairyofuji			25	20	80.0		6	3	1	3	4	3								

* Figures denote number of days after pollination. ** Embryos developed more than early heart embryo.

Figures in parenthesis denote number of days after pollination at embryo excision.

Figure in the table denote the number of embryos.

Table 8. Embryonic development of *B. oleracea* at embryo excision at 5 to 30 days after irradiation.

KR	Varieties	Irradiation stages	Excision (days after irradiation)	No. of ovules observed	No. of embryos excised	Embryos at excision %	Embryonic development										EH** %					
							LM	M	EM	LT	T	ET	LH	H	EH	G						
20 (20KR/D)	Kinpai	18*		28	17	60.7												17	0			
	Kairyofuji		5(23)	50	39	78.0												8	31	16.0		
	Kinpai		10(28)	50	34	68.0							6	13	15				4	14		
	Kairyofuji		15(33)	50	18	36.0																
	Kinpai		30(48)	57	38	66.6					3	16	13	6								
	Kairyofuji			50	6	12.0							1	0	3	2						
	Kinpai			26	13	50.0				2	7	1	3									
	Kairyofuji		76	8	10.5							5	2	1								
	Kinpai	20	5(25)	44	28	63.6												5	23	11.3		
	Kairyofuji		10(30)	50	43	86.0							4	28	11						64.0	
	Kinpai		15(35)	50	44	88.0						2	7	26	9							
	Kairyofuji		30(50)	40	27	67.5								15	11	1					65.0	
	Kinpai			69	58	84.0					16	22	16	4								
	Kairyofuji			45	14	31.1								3	11							
	Kinpai			48	37	77.0				1	5	11	10	10								
	Kairyofuji		69	15	21.7						2	8	2	1								
	Kinpai	22	5(27)	34	24	70.5												14	10	41.1		
	Kairyofuji		10(32)	50	47	94.0							6	17	18	6					82.0	
	Kinpai		15(37)	50	46	92.0						3	22	6	6	9						
	Kairyofuji		30(52)	45	28	62.2								1	14	13						
	Kinpai			47	42	89.3					2	20	16	3	1							
	Kairyofuji			30	13	43.3								1	11							
	Kinpai			44	39	88.6		8	6	2	9	9	4	1								
	Kairyofuji		61	20	32.7								3	2	6	9						

* Figures denote number of days after pollination. ** Embryos developed more than early heart embryo. Figure in parenthesis denote the number of days after pollination at excision stages of embryos. Figure in the table denote the number of embryos.

第3節 ハクサイとカンランの比較

ハクサイの花心・改良千オとカンランの金盃の照射後のEH時以上に達した胚の得られる率と発育分化は、各照射時期でほとんど同じであった (Table 9)。しかし、カンランの改良富士は放射線障害が大きく、EH期以上の胚の得られる率は小さく、また、胚の発育が遅れた。このことから、カンランの方がハクサイよりも放射線に対して感受性が高いと云える。

Table 9. Comparison between *B. pekinensis* (P) and *B. oleracea* (O) in embryonic development at embryo excision

KR	Varieties	Irradiation stages	Excision (days after irradiation)	No. of ovules observed	No. of embryos excised	Embryo excision %	Embryonic development					
							MT	LT	T	ET	H	G
0	Kashin	(16)	5	25	25	100			23	2		
	Kairyochitose (P)			25	25	100			25			
	Kinpai	(30)	10	30	30	100		4	24	2		
	Kairyofuji (O)			28	28	100		17	11			
	Kashin	(21)	10	25	25	100	13	12				
	Kairyochitose (P)			42	42	100	37	5				
	Kinpai	(35)	15	30	30	100	24	6				
	Kairyofuji (O)			27	27	100	25	2				
	Kashin	(18)	5	25	25	100		20	5			
	Kairyochitose (P)			20	20	100		17	3			
	Kinpai	(32)	10	30	30	100		2	17	11		
	Kairyofuji (O)			30	30	100	16	11	3			
Kashin	(23)	10	35	33	94.2	32	1					
Kairyochitose (P)			25	25	100	25						
Kinpai	(37)	15	30	30	100	30						
Kairyofuji (O)			30	30	100	30						
20 (20KR/D)	Kashin	11(16)	5	18	14	77.7				1	11	2
	Kairyochitose (P)			44	23	52.2					13	10
	Kinpai	20(30)	10	50	44	88.0				2	42	
	Kairyofuji (O)			40	27	67.5					26	1
	Kashin	11(21)	10	53	42	79.2				3	36	3
	Kairyochitose (P)			71	50	70.4			10	36	4	
	Kinpai	20(35)	15	69	58	84.0			16	22	20	
	Kairyofuji (O)			45	14	31.1					14	
	Kashin	13(18)	5	37	36	97.2					31	5
	Kairyochitose (P)			50	41	82.0					15	23
	Kinpai	22(32)	10	50	46	92.0			3	22	21	
	Kairyofuji (O)			45	28	62.2						28
Kashin	13(23)	10	80	78	97.5		4	26	45	3		
Kairyochitose (P)			51	46	90.1		7	25	14			
Kinpai	22(37)	15	47	42	89.3		2	20	16	4		
Kairyofuji (O)			30	13	43.3				1	12		

Figure in parenthesis denote number of days after pollination at excision stages.
Figure in the table denote the number of embryos.

* Figures denote number of days after pollination.

第 4 節 考 察

E H期以上に達した胚の率は、ハクサイおよびカンランで比較的高く、各照射時期と照射後の胚摘出期で培養する上で十分な量の胚を得られることが明らかになった。

第 5 節 ハクサイの照射胚の培養

第 1 節で致死線量以上照射された胚が E H期以上の胚にまで発達することが明らかになり得たので、これらの胚を培養によりさらに発達させ、発育個体を得るため BLADY ES の培地 (カイネチン, I A A を添加) で胚培養を試みた。

培養後の胚の発育では、受粉 9 日の若い胚の照射の方が、受粉 13 日後の発育の進んだ胚の照射よりも、茎葉の伸長、発根率は低い傾向を示した (Table 10)。

Table 10. Shooting and rooting of embryos of *B. pekinensis* cultured after irradiation at different embryonic stages (BLADYES' medium containing Kinetin 1 mg/l and IAA 2 mg/l).

KR	No. of days after culture	Varieties	Excision (days after irradiation)	Irradiation stages	No. of embryos cultured	No. of embryos developed (%)	No. of shooting	No. of callus	No. of lethal embryos
0					25	13(52.0)	13(13)	0	12
20 (5KR/D)		Kashin	7	9*	18	0	0	0	13
				11	22	1(4.5)	1(1)	0	21
				13	25	25(100)	0	0	25
				9	26	6(23.0)	1(1)	5(0)	20
20 (20KR/D)			10	11	20	4(20.0)	1(1)	3(0)	16
				13	25	6(24.0)	3(2)	1(1)	19
0	30				23	4(17.3)	3(3)	1(0)	19
20 (5KR/D)		Kyoto No. 3	7	9	25	7(28.0)	0	7(0)	18
				11	25	2(8.0)	0	2(0)	23
				13	25	0	0	0	23
				9	23	3(12.0)	1(1)	2(0)	22
20 (20KR/D)			10	11	25	6(24.0)	1(1)	5(0)	19
				13	25	6(24.0)	1(1)	5(0)	19

* Figures denote number of days after pollination.
Figures in parenthesis denote the number of rooting.

第 6 節 カンランの照射胚の培養

茎葉の伸長・発根，移殖率は，低線量率の 20(5) KR 照射の方が 20KR 照射の高線量率より高い。培養後の胚の發育では，受粉 9～13 日後の若い胚の照射の方が，受粉 18～22 日後の發育の進んだ胚の照射よりも茎葉の伸長，発根，移殖率は高かった (Table 11. 12. Fig. 14)。

Table 11. Shooting and rooting of embryos of *B. oleracea* cultured after irradiation at different embryonic stages (BLADYES' medium containing Kinetin 2 mg/l and IAA 2 mg/l).

KR	Irradiation stages	No. of days after culture	No. of embryos cultured	No. of embryos developed	No. of shooting	No. of callus	No. of lethal embryos	No. of plantlets after culture
0	13	10	35	28(15)	1(1)	0	7	0
		20		28(7)	11(8)	10(4)	7	0
		30		27	17(16)	10(4)	8	0
		40		27	17(16)	10(4)	8	16
	11*	10	10	7(2)	0	0	3	0
		20		7	0	7(4)	3	0
		30		7	4(4)	3(0)	3	0
		40		7	4(4)	3(0)	3	4
	13	10	12	11(5)	0	0	1	0
		20		11	3(3)	8(3)	1	0
		30		11	4(4)	7(3)	1	0
		40		11	4(4)	7(3)	1	5
20 (5KR/D)	18	10	25	10(1)	0	0	15	0
		20		10	0	10(1)	15	0
		30		10	0	10(2)	15	0
		40		8	2	6(2)	17	3
	20	10	64	45(2)	0	0	19	0
		20		40	0	22(4)	24	0
		30		38	3	35(7)	26	0
		40		37	4(1)	33(6)	27	3
	22	10	25	21(7)	0	0	4	0
		20		20	2(2)	18(5)	5	0
		30		19	5(3)	14(5)	6	0
		40		18	5(3)	13(5)	7	8

*Figures denote number of days after pollination. Figures in parenthesis denote number of rooting.

Table 12. Shooting and rooting of embryos of Kinpai (*B. oleracea*) cultured irradiation at different embryonic stages (BLADYES' medium containing Kinetin 2 mg/l and IAA 2 mg/l).

KR	Irradiation stages	No. of days after culture	No. of embryos cultured	No. of embryos developed	No. of shooting	No. of callus	No. of lethal embryos	No. of plantlets after culture
20 (20KR/D)	9*	10	41	37(11)	0	0	4	0
		20		35	13(12)	22(5)	6	0
		30		34	17(16)	17(2)	7	0
		40		32	19(18)	13(0)	9	20
	11	10	49	42(8)	0	0	7	0
		20		41	2(2)	39(17)	8	0
		30		40	4(4)	36(23)	9	0
		40		36	4(4)	32(22)	13	22
	13	10	5	3(1)	0	0	2	0
		20		2	1(1)	1(1)	3	0
		30		2	2(2)	0	3	0
		40		2	2(2)	0	3	2
	18	10	71	54(3)	0	0	17	0
		20		53	7(4)	46(7)	18	0
		30		51	8(4)	43(12)	20	0
		40		48	9(5)	39(11)	23	16
	20	10	116	99(3)	0	0	17	0
		20		95	6(1)	6(9)	21	0
		30		87	6(3)	81(13)	29	0
		40		69	7(4)	62(13)	47	18
22	10	85	76(10)	0	0	9	0	
	20		70	7(3)	63(14)	15	0	
	30		68	18(14)	50(10)	17	0	
	40		56	18(15)	38(9)	29	26	

* Figures denote number of days after pollination. Figures in parenthesis denote the number of rooting.

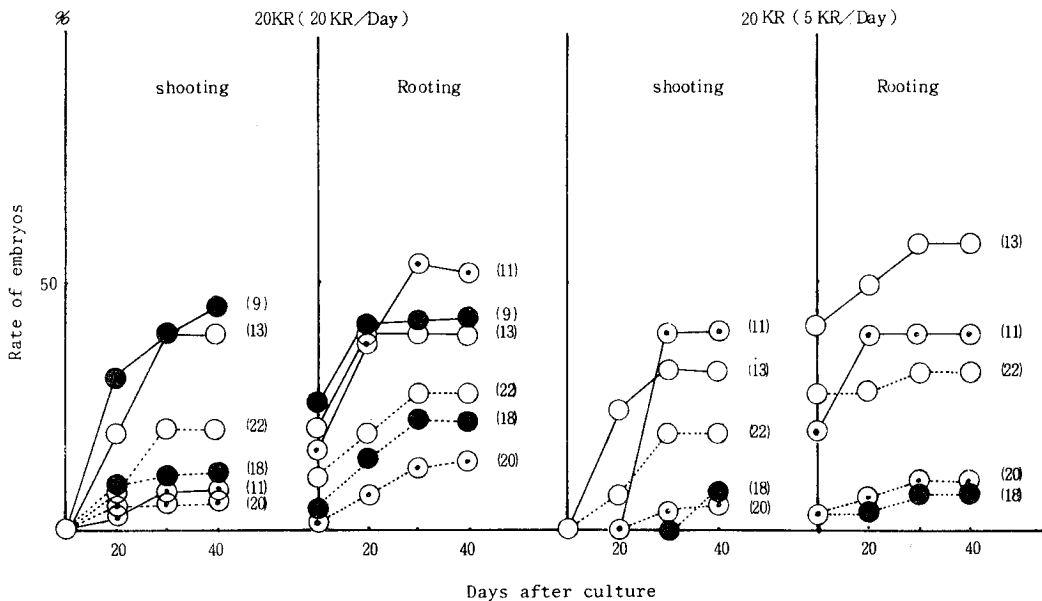


Figure in parenthesis denote number of days after pollination at irradiation stages

Fig. 14. Comparison between irradiation stages of shooting and rooting of embryos in Kinpai (*B. oleracea*) cultured after irradiation at different embryonic stages.

胚培養が照射後の胚を生き続けさせるのにどの程度の効果があるかを示すため、培養後の移植率と種子稔性および発芽率、培養時のEH期以上に達した胚の得られる率との関係を検討した (Table 13)。

Table 13. Seed fertility and germination, embryo excision and plantlets after culture of *B. oleracea* following irradiation.

KR	Varieties	Irradiation stages	No. of ovules	No. of seeds	No. of seedling	Seed fertility %	Seed germination %	Embryo excision %	Plantlets after culture %
0		9*	191	78	65	93.1	80.2	100	.
		11	117	109	92	93.1	85.9	100	.
		13	184	164(89)	82	89.1	92.1	100	45.7
20 (5KR/D)		9	123	0	0	0	0	21.2	25.8
		11	72	3	0	4.1	0	61.2	50.0
		13	54	8	0	14.8	0	62.5	41.6
20 (20KR/D)		9	145	2	0	1.3	0	15.3	48.7
		11	122	5	0	4.0	0	36.8	44.8
		13	130	12	0	9.2	0	41.6	41.6
0	Kinpai	18	191	78	65	93.1	80.2	91.2	.
		20	117	109	92	93.1	85.9	100	.
		22	184	164(89)	82	89.1	92.1	100	59.2
20 (5KR/D)		18	85	4	0	4.4	0	71.6	12.0
		20	59	9	0	15.0	0	81.3	4.6
		22	132	32	0	24.2	0	81.2	32.0
20 (20KR/D)		18	62	2	0	3.2	0	63.9	22.5
		20	145	19	0	13.1	0	83.2	15.5
		22	58	12	0	20.6	0	90.0	30.5
0		18	180	160(50)	37	84.2	74.0	100	54.3
		18	82	12	0	14.6	0	50.0	33.0
		20	137	27	0	19.7	0	70.5	21.4
20 (5KR/D)	Kairyofuji	22	52	0	0	0	0	67.7	22.5
		18	102	0	0	0	0	18.1	3.4
		20	58	0	0	0	0	36.3	11.1
20 (20KR/D)		22	82	0	0	0	0	44.8	2.7

* Figures denote number of days after pollination. Figures in parenthesis denote the number of seeds sown.

照射後の種子発芽率は0%であり、培養時のEH期以上の胚の率と培養後の移植率よりも低かった (Fig. 15)。

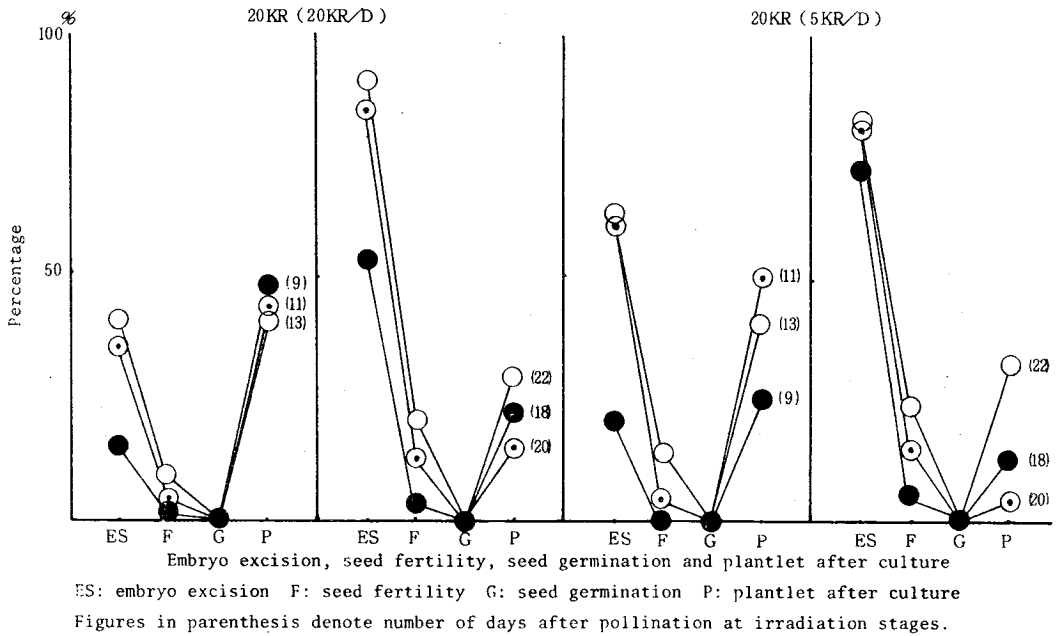


Fig. 15. Comparison between irradiation stages in rate of each source in Kinpai (*B. oleracea*) irradiated at different stages.

このように培養によって得られる幼植物 (M_1 個体) は、種子稔性および発芽率と比較して高い率を示し、胚培養が M_1 個体を確保でき、突然変異率を高める手がかりとなり得ることが明らかになった。

ハクサイとカンランの照射後の胚培養の差は、培養条件が異なるので比較することは困難であり省略した。

第 7 節 考 察

ハクサイの茎葉の伸長・発根率は、培養時の胚の発達程度に左右されるのか、培養時の胚が小さい方が、大きい場合より悪い結果を示している。

カンランの茎葉の伸長・発根率は、ハクサイと異なり胚培養時の胚の大きさによって培養後の胚の発育が左右されなかった。培養時の胚の小さい受粉 9~13 日後照射の方が受粉 18~22 日後照射の大きい場合よりも結果がよかったことから理解できよう。

培養時の胚の大きさおよび培養後の茎葉の伸長・発根は、線量、照射時期によって、それらの出現率に差が認められる。したがって、培養により胚を発育させるためには、それぞれ効率のよい点を選ぶべきであろう。

第 8 節 ハクサイとカンランの照射胚の培養後の組織学および組織化学的観察

培養後、照射されたハクサイの胚は、主として生長点と側根部が分裂を開始して、芽と根を分化するが、一部の胚は子葉からカルスを形成する。

カンランの胚は主として胚軸の表皮下細胞からカルスを形成して生き続けるが、一部の胚は生長点と側根から芽と根を形成する。

新しく分化した組織 (生長点、根端、側根、カルス) は、ハクサイおよびカンランのいずれでも細胞分裂が活発で、その組織部位は蛋白質、RNA、DNA、および多糖類の含有量が高まった。

第 9 節 考 察

ハクサイはカンランよりも、生長点部に障害の軽い細胞が少数残る胚が多い。そのため生長点部の組織が培養により芽を形成するので、カンランのように胚軸の表皮下細胞が脱分化をしてカルスを形成して生き続ける必要が起らないのであろう。

第 VI 章 総 合 考 察

本研究のハクサイとカンランにみられた放射線処理による胚の発育遅延と停止の原因は、組織学的には、胚乳核の異常、壊死細胞を持つ胚、退化した胚などが関与し、生化学的には、多糖類の形成遅延および増加、蛋白質と核酸 (DNA と RNA) の減少が関係していることが明らかになった。さらに、生長解析的には、胚、胚乳の発育速度の減少、細胞数の減少、細胞伸長抑制などが関与していることが判った。これらのそれぞれの障害が胚発生過程中に、お互が別個あるいは相互に作用し合って、放射線効果として現われてくるものと考えられる。

放射線処理後の胚は、種子の得られない致死線量あるいは半致死線量の 10 KR および 20 KR 照射のいずれでも、一部の胚は発育が進み、EH 期以上の胚にまで達することができた。また、これら EH 期以上の大きさにまで発達した胚では、その組織化学的变化は、対照区に比較して、それほど大きくないことが判り、致死線量照射でも胚の発達が続くのがみられた。

胚培養期でも、この EH 期以上の胚は、高い率で生き残っており、さらに、培養により胚は生き続け M_1 個体として生育した。このように高線量照射から M_1 個体の獲得ができて、本実験の目的であった突然変異率を高める手がかりを得ることに成功した。

審 査 結 果 の 要 旨

著者はさきにハクサイとカンランの種間交雑胚の発育について組織学的、組織化学的観察を行ない、その結果を参考論文として提出している。本論文は同様の観察手法を用いて、ハクサイとカンランを材料として、夫々の胚発育に対する放射線処理の影響を観察したものである。

植物の突然変異育種において、放射線処理は有力な手段であるが、処理施設や処理方法の簡便性のため種子を処理対象とすることが多く種子処理の場合の放射線処理の影響については報告が多い。著者が細胞数の少ない幼胚に対する放射線処理を研究対象として取上げたのは、その胚から発生する個体がキメラであっても、キメラ部位は大きなセクターとして現われることが期待できるからである。また著者が勤務していた放射線育種共同利用施設のガンマー圃場を利用すれば、母体内で発育途上にある幼胚を母体と共にではあるが、種々の胚発育の時期に線量を制御しつつ、放射線照射できるからである。以上は一つの視点として評価できる。また、この形での放射線照射の母体組織（珠心、珠皮など）、胚乳、胚の発育に及ぼす影響について、ハクサイとカンランの両種を比較しつつ、組織学的に、組織化学的に、また生長解析の観点より、詳細に観察し、放射線影響についての情報を追加している点も評価することができる。さらにまた著者は、発芽可能の種子の得られない高線量照射の場合も、一部の胚は、early heart 期以上の胚にまで生育すること、このEH期以上まで発達した胚は、胚培養により発育を続け植物個体を得ることができることを実証し、それに関連する各種の条件について検討を加えている。この手法とそれに関する情報も評価できる。

以上、本論文は、ハクサイとカンランを材料として、幼胚期に対する放射線処理の影響を、胚発育途中で人工培地への移植をも加えて、組織学的、組織化学的、生育解析的に検討したものであり、放射線を利用した突然変異育種に関して有用な種々の情報を加えており、著者に対して農学博士の学位を授与してしかるべきものと認めた。