

アクリジン色素およびストレプトマイシン処理によって誘発されたテンサイの雄性不稔性

誌名	てん菜研究会報 = Proceedings of the Sugar Beet Research Association
ISSN	09121048
巻/号	22
掲載ページ	p. 48-54
発行年月	1981年4月

アクリジン色素およびストレプトマイシン処理 によって誘発されたテンサイの雄性不稔性

三上哲夫・木下俊郎・高橋萬右衛門

(北海道大学農学部)

1. 緒言

雄性不稔性にかかわる細胞質因子の性状を解明するには、これらの因子に多様な突然変異を人為的に生ぜしめて、その遺伝解析を行うことが必要である。本報告では高等植物や微生物において細胞質変異の作出に有効性の立証されている streptomycin と 3 種の acridine 色素を変異源に用いて雄性不稔性に関する変異体の誘発を試みた。

2. 実験材料及び方法

供試材料は北海道農業試験場てん菜部から分譲された 4 種の細胞質雄性不稔系統 TK81MS, TK76MS, TA33MS 及び SLC91MS とこれらの各々に対応する維持花粉親 (O 型) 系統である。

各系統の種子を 4 種の化学物質, streptomycin, acriflavine, ethidium bromide 及び acridine orange の水溶液で浸漬処理し M₁ 植物を育成した。処理方法の概要は以下の如くである。

streptomycin, acriflavine: 30℃ の暗所にて 24 時間浸漬処理

ethidium bromide: 5℃ の暗所にて 40 時間処理した後、流水で 30 分間水洗

acridine orange: 21℃ で 48 時間処理

雄性不稔型の分類は従来の規準 (Nagao and Kinoshita 1962) に拠った。すなわち完全不稔型 (C.S.), 部分不稔-b 型 (S.S.b), 部分不稔-a 型 (S.S.a) 及び正常型 (N) の 4 型の仕分けである。

3. 実験結果

4 種の化学物質の処理によって O 型系統, TK81-O, TK76-O 及び TA33-O の M₁ 代には合計

49 個体の部分不稔-b 型 (S.S.b) と 1 個体の完全不稔型 (C.S.) を生じた (Table 1)。また雄性不稔系統である TK81MS, TK76MS, TA33MS 及び SLC91MS を用いて同様の処理を行い、稔性回復型 (N 及び S.S.a) を 2 個体得た (Table 2)。作出された稔性回復型個体は開花期間を通じて葯の裂開が良好で、花粉稔性は 65% (TK81MS より streptomycin で誘発) ならびに 95% (SLC91MS より ethidium bromide で誘発) であった。

一方無処理区の O 型系統 TK81-O, TK76-O, TA33-O においても集団中に S.S.b 程度の低稔性変異体があわせて 6 個体出現し、不稔系統の TK81MS や SLC91MS 中にも C.S. 型の外に 20 個体の S.S.b 型を生じた。M₁ 植物を 1ヶ所に集団隔離して母本別に採種し、その一部を M₂ 代に進め、無処理区との比較の下に誘発変異の遺伝性を検討した。同時に ethidium bromide, acriflavine 及び streptomycin 処理の M₁ で得た C.S. あるいは S.S.b 型の 3 個体についてはこれらに原系統 TK76-O または TK81-O の花粉を交配して次代での分離を調査した。

Table 3 に示す如く TK76-O と TK81-O の無処理区に出現した S.S.b 型 3 個体の翌代では C.S. 型の析出は全くみられず、S.S.b 型の分離頻度もきわめて低かったので、かゝる不稔変異体が少くとも細胞質雄性不稔によるものでないことは明かである。これに対して化学物質で誘発された不稔変異体と O 型個体との交配次代には N や S.S.a の如き稔性回復型も僅かに生じたものの、S.S.b または C.S. のような不稔型が多数を占め、特に TK76-O: 2133 (C.S.) × TK76-O: a の組合せにおいては全個体が C.S. 型となった (Table

Table 1 Induction of male sterile plants from maintainer (type-0) strains by four chemical mutagens

Name of mutagen	Concentration (ppm)	Strain	Male sterile types in M ₁					Seed setting*	
			N	S.S.a	S.S.b	C.S.	Total	Mean	Range of var.
Streptomycin	1000	TK81-0	94	11	5	0	110	4.6	2-5
	1500	TK76-0	222	6	6	0	234	4.5	3-5
	1500	TK81-0	260	16	10	0	286	4.5	3-5
	1500	TA33-0	121	12	1	0	134	4.7	2-5
Acridine orange	500	TK81-0	67	9	1	0	77	4.8	3-5
	1000	TK81-0	55	10	2	0	67	4.1	2-5
	1500	TK81-0	53	10	3	0	66	4.5	2-5
	2000	TA33-0	167	13	1	0	181	4.2	2-5
Ethidium bromide	2000	TK76-0	174	7	6	1	188	4.5	3-5
	2000	TK81-0	189	12	6	0	207	4.4	3-5
Acridine orange	70	TA33-0	52	35	5	0	92	4.4	2-5
	100	TA33-0	31	9	1	0	41	4.7	3-5
	200	TA33-0	20	24	2	0	46	4.5	3-5
Control		TK81-0	112	15	1	0	128	4.6	3-5
		TK76-0	84	4	3	0	91	4.8	2-5
		TA33-0	141	25	2	0	168	4.2	2-5

* Index : 5 (fully fertile) 0 (complete sterile).

Table 2 Induction of male fertile plants from male sterile strains by four chemical mutagens

Name of mutagen	Concentration (ppm)	Strain	Male sterile types in M ₁					Seed setting	
			N	S.S.a	S.S.b	C.S.	Total	Mean	Range of var.
Streptomycin	1000	TK81MS	0	1	3	116	120	4.7	3-5
	1500	TK81MS	0	0	7	228	235	4.6	2-5
	1500	TK76MS	0	0	0	165	165	4.2	3-5
	1500	TA33MS	0	0	0	279	279	4.5	3-5
Acridine orange	2000	TA33MS	0	0	0	219	219	4.3	2-5
Ethidium bromide	2000	TK76MS	0	0	0	197	197	4.8	3-5
	2000	TK81MS	0	0	38	429	467	4.5	3-5
	2000	SLC91MS	1	0	53	299	353	4.7	2-5
Acridine orange	70	TA33MS	0	0	0	96	96	4.3	2-5
	100	TA33MS	0	0	0	82	82	4.5	3-5
	200	TA33MS	0	0	0	97	97	4.6	2-5
Control		TK81MS	0	0	7	136	143	4.8	3-5
		TK76MS	0	0	0	96	96	4.5	2-5
		TK33MS	0	0	0	206	206	4.6	3-5
		SLC91MS	0	0	13	100	113	4.5	3-5

Table 3 Segregations of male sterility in the progenies of male sterile plants occurred in maintainer (type-0) strains, TK76-0 and TK81-0

Strain	Plant No. of M ₁	Phenotype of M ₁ plant	Male sterile types in M ₂					Seed setting	
			N	S.S.a	S.S.b	C.S.	Total	Mean	Range of var.
TK76-0	3053	S.S.b	60	63	4	0	127	4.3	4-5
TK76-0	3056	S.S.b	14	22	1	0	37	4.8	4-5
TK81-0	1161	S.S.b	39	33	2	0	74	4.5	3-5
TK81-0	2081	S.S.a	31	12	0	0	43	4.7	4-5
TK81-0	2106	S.S.a	20	3	1	0	24	4.3	4-5
TK81-0	2110	S.S.a	33	7	1	0	41	4.8	3-5

Table 4 Segregations of male sterility in F₁ plants of the crosses between three male sterile mutants and type-0 plants

Name and concentration of mutagen	Cross	Male sterile types in F ₁					Seed setting	
		N	S.S.a	S.S.b	C.S.	Total	Mean	Range of var.
Ethidium bromide 2000 ppm	TK76-0:2133 (C.S.) x TK76-0:a	0	0	0	46	46	4.5	4-5
Acridlavine 1500 ppm	TK81-0:362 (S.S.b) x TK81-0:b	4	2	75	16	97	4.7	4-5
Streptomycin 1500 ppm	TK81-0:1690 (S.S.b) x TK81-0:b	4	17	96	97	214	4.4	3-5

Table 5 Segregations of male sterility in the progenies of male fertile mutants induced by streptomycin in TK81-MS

Concentration of streptomycin	Plant No. of M ₁	Phenotype of M ₁ plant	Male sterile types in M ₂					Seed setting	
			N	S.S.a	S.S.b	C.S.	Total	Mean	Range of var.
1000 ppm	2010	S.S.b	1	0	4	8	13	4.8	4-5
	2005	S.S.a	1	8	17	22	48	4.6	4-5
Control	2117	C.S.	0	0	0	41	41	4.8	4-5
	2137	S.S.b	0	0	1	22	23	4.6	4-5
	2130	S.S.b	0	0	2	26	28	4.1	3-5

4)。種子着粒率も無処理植物に劣っておらず、上記3種の薬剤によっても細胞質雄性不稔性が作出されたと考えられる。現在更にN細胞質型系統との相反交雑実験を進めて、細胞質遺伝の確認を図っている。

なお№2133に対しては系統TK76-Oから任意に抽出した1個体がO型としての作用を示した。既存のO型系統中には自然起源のS以外にガンマー線誘発の S_{i-8} 、或いは S_{i-4} 細胞質にも共通にO型として機能する個体が含まれているので(木下・高橋1978)、こゝに得られた細胞質がSや S_i 型のいずれかと同種であるか、または新型細胞質かと言う点についてはなお詳細な検討を要するが、おそらくSに近似の細胞質型が作出されたものと考えられる。

一方TK81MSのstreptomycin処理区に生じたS.S.a型の№2005及びS.S.b型の№2010の翌代(M_2)にはS.S.bやC.S.型の外に少数のN乃至S.S.a型の分離を認めた(Table 5)。いずれの個体も原系統由来の劣性標識遺伝子 m に基づく単胚性を発現しており、雑交に起因した稔性回復型とは考え難い。加えて、このような回復型はTK81MSの無処理区には出現しなかったから、かかる復帰変異体も薬剤処理によって誘発されたものとみてよい。たゞ№2005の M_2 代に分離したS.S.a型の1個体№2005-1109(花粉稔性60%)の花粉をTK81MSに交配したところ、 F_1 には回復型を全く生ぜず、また2005-1109 x TK81-O : fの組合せにおいてもN或いはS.S.a型の分離頻度はきわめて低かった(Table 6)。もし核遺伝子変異が誘発されたとするなら、優性よりもむしろ劣性の稔性回復遺伝子突然変異が考えられるし、その外不稔を誘起するウイルス様因子がstreptomycinの如き抗生物質によって稀釈された可能性もあり、その機構の解析は今後の問題として残される。

4. 論 議

本実験に用いた化学物質のうちstreptomycinはクロロプラストDNAに特異的に作用する変異源として緑藻類のクラミドモナス等で用いられている(Sager 1972)。またacridine色素は特に酵母においてミトコンドリアDNAの関係する変異株の作出に効果的であり、最近パールミレットやコム

ギではそれぞれethidium bromide及びacridine orange処理により細胞質突然変異体が誘発された(Burton and Hanna 1976, Davydenko 1978)。今回テンサイのO型系統にこれらの薬剤を処理した結果、雄性不稔変異体を得ることができた。しかも予備試験の成績に基づくなら、細胞質因子起因の雄性不稔性を生じた可能性がきわめて高い。

また雄性不稔系統を用いてstreptomycinあるいはethidium bromide処理を行ったところ稔性回復個体が誘発された。streptomycin作出の回復型については後代検定や交配実験から劣性の稔性回復核遺伝子の突然変異による可能性が考えられた。

トウモロコシやパールミレットにおいてはS→Nなる細胞質復帰変異(Singh and Laughnan 1972, Burton 1977)と優性の稔性回復核遺伝子変異(Laughnan and Gabay 1978, Clement 1975)を自然に生じた事例が報告されている。一方劣性の回復遺伝子突然変異に関しては*Triticum timopheevi*由来の細胞質を有する雄性不稔コムギにX線を照射して作出した例がある(Sasaki *et al.* 1973)。テンサイでは最近Lichter(1978)が高温処理と生長点培養を組合せて不稔系統中に稔性回復型個体を生ぜしめたが、同氏はかかる復帰変異の成因を、RNAを含む細胞質顆粒の稀釈または除去に帰した。著者らの得た復帰変異体については、稔性回復は必ずしも充分でなかったが、Lichterの仮説によってその遺伝機構を説明し得ることも考えられるので、今後詳細な解析を重ねる予定である。

5. 摘 要

細胞質雄性不稔系統とO型系統の種子をstreptomycin及び3種のacridine色素で浸漬処理し、雄性不稔性に関する変異体の作出を試みた。

処理によってO型系統の M_1 代では1729個体の中に49個体のS.S.b型と1個体のC.S.型を、また不稔系統からは稔性回復型(N及びS.S.a)を2個体得ることができた。無処理区のO型系統中にもまれにS.S.b程度の低稔性変異体を生じたが、これらS.S.b型3個体の翌代では不稔型の分離頻度がきわめて低く、かかる変異が少なくも細胞質雄性不稔でないことは明かであった。これに対して

Table 6 Segregations of male sterility in F_1 plants of the crosses between a S.S.a type plant, 2005-1109 in M_1 and plants possessing the recessive genotype of pollen restoring genes, such as TK81MS and TK81-0

Cross	Male sterile types in F_1					Seed setting	
	N	S.S.a	S.S.b	C.S.	Total	Mean	Range of var.
TK81MS* x 2005-1109	0	0	35	28	63	4.8	3-5
2005-1109 x TK81-0**	4	6	185	68	263	4.5	3-5

* Genotype: (S)rf₁rf₁rf₂rf₂, ** Genotype: (N)rf₁rf₁rf₂rf₂

ethidium bromide, acriflavine及びstreptomycin 処理区のそれぞれに出現した不稔変異体にO型の原系統を交配した F_1 においては、不稔個体が多数を占め、これら3種の化学物質によって細胞質因子起因の雄性不稔性が誘発されたものと推論された。

一方、雄性不稔系統TK81MSのstreptomycin処理で生じた稔性回復個体は次代(M_2)に不稔型と回復型を分離した。ただ回復型の分離頻度はきわめて低く、加えて M_2 に出現したS.S.a型とTK81MSとの交雑 F_1 には回復型を全く生じなかったため、かかる復帰変異の機構としては劣性の稔性回復核遺伝子突然変異が考えられる。しかし不稔誘起のウィルス様因子またはRNAを含む細胞質顆粒の抗生物質による稀釈等の可能性を考慮することもできる。今後これらの点に関する検討も行う予定である。

引用文献

- BURTON, G. W. (1977): Fertile sterility maintainer mutants in cytoplasmic male sterile pearl millet. *Crop Sci.* 17: 635-637.
- BURTON, G. W. and HANNA, W. W. (1976): Ethidium bromide induced cytoplasmic male sterility in pearl millet. *Crop Sci.* 16: 731-732.
- CLEMENT, W. M. Jr. (1975): Plasmon mutation in cytoplasmic male-sterile pearl millet, *Pennisetum typhoides*. *Genetics* 79: 583-588.
- DAVYDENKO, O. G. (1978): Quantitative electron microscopic investigation of the acridine dyes effect on the structure and replication of plastids and mitochondria (in Russian). *ЦИТОЛОГИЯ и ГЕНЕТИКА* 12: 291-294.
- 木下俊郎・高橋萬右衛門(1978): てん菜の放射線誘発による細胞質雄性不稔性に有効な花粉親の選抜。てん菜研究会報20: 39-44.
- LAUGHNAN, J. R. and GABAY, S. J. (1978): Nuclear and cytoplasmic mutations to fertility in S male-sterile maize. In *Maize breeding and genetics* 427-446 D. B. Walden (ed.). New York. John Wiley & Sons.
- LICHTER, R. (1978): The restration of male fertility in cytoplasmic male-sterile sugar beet by heat treatment and meristem culture. *Z. Pflanzenzüchtg.* 81: 159-165.
- NAGAO, S. and KINOSHITA, T. (1962): Cuasal genes and character expression of male sterility in beets. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 52: 51-69.
- SAGER, R. (1972): Cytoplasmic genes and organelles. pp. 405 Academic Press, New York.
- SASAKI, M., NISHIYAMA, K. and YASUMURO, Y. (1973): Male-fertility-restoring mutants induced by X-rays in wheat. *Proc. 4th Inter. Wheat Genet. Symp, Missouri Agr. Exp. Sta., Columbia, Mo.:* 259-299.
- SINGH, A. and LAUGHNAN, J. R. (1972): Instability of S male-sterile cytoplasm in maize. *Genetics* 71: 607-620.

Induction of Cytoplasmic Mutations on Male Sterility by Acridine Dyes and Streptomycin in Sugar Beets

T. MIKAMI , T. KINOSHITA and H. TAKAHASHI

Fac. Agr. Hokkaido Univ., Sapporo

Summary

Previously, the authors produced cytoplasmic mutants of male sterility in sugar beets by gamma ray irradiation and EMS treatment. The present paper deals with our recent research in which four kinds of chemical mutagen, i.e. streptomycin, acriflavine, ethidium bromide and acridine orange, were used for the purpose of inducing cytoplasmic mutations concerning male sterility.

Dried seeds of three maintainer (type-0) strains, TK81-0, TK76-0 and TA33-0, were soaked in the deionized water solution of each mutagen. One complete sterile (C.S.) and 49 partial sterile (S.S.b) plants occurred within a total of 1729 M₁ plants of type-0 strains which had been treated with the 4 chemicals, while only six variants of S.S.b type were found within 387 control plants of the same type-0 strains.

The S.S.b type plants, which appeared in the untreated type-0 strains, inherited the male sterility at very low frequencies (2.7 - 3.1%), indicating that the male sterility had not been caused by cytoplasmic genes.

Pollens of the type-0 plants of the strains TK76-0 and TK81-0 were crossed to the three male-sterile (C.S. or S.S.b) mutants obtained in M₁. All F₁ progenies of the cross made between a male sterile mutant, TK76-0:2133 (C.S.), and the type-0 plant of TK76-0:a turned out to be C.S. type. In the F₁ of the other two crosses involving the male sterile mutants, TK81-0:362 and TK81-0:1690, frequencies of the male sterile types (S.S.b and C.S.) occupied 93.8% and 90.2%, respectively. It is highly probable, therefore, that the cytoplasmic mutation from N to sterile factor(S) was induced by streptomycin, acriflavine and ethidium bromide.

A male fertile mutant was obtained from a cytoplasmic male sterile strain, TK81-MS, treated with streptomycin. During the flowering period, the pollen fertility of this mutant, No.2005, was maintained at over 65%, a good level of pollen-shedding. The M₂ progenies of No.2005 segregated into both male fertile and male sterile plants. Among these segregants, a male fertile plant, No.2005:1109 produced S.S.b and C.S. types when crossed with TK81-MS which possesses a genotype of (S)rf1rf1rf2rf2. It is likely that the pollen-fertility

restoration depended on the mutation that occurred in a recessive nuclear gene or genes. However, further investigations are required to clarify the genetic mechanisms of the reversion of pollen fertility, because there are also possibilities that male fertility will be restored through an elimination of male-sterility-inducing virus or particles containing RNA by a treatment with streptomycin.

Proc. Sugar Beet Res. Asso., Japan 22: 48- 54 (1980)