

# 琉球大学学術リポジトリ

## 第2報

### 緩照射の場合(ガンマ線照射によるセイロンベンケイソウの CAM/C\_3 型光合成突然変異株の作出)

メタデータ	<p>言語:</p> <p>出版者: 琉球大学農学部</p> <p>公開日: 2008-02-08</p> <p>キーワード (Ja): セイロンベンケイソウ, 突然変異, ガンマ線(緩照射), 気孔形態, 多肉植物, C_3型光合成</p> <p>キーワード (En): C_3 photosynthesis type, Crassulacean acid metabolism, gamma-ray (chronic irradiation), Kalanchoe pinnata, Malic acid, Mutation (photosynthesis), Stomata</p> <p>作成者: 川満, 芳信, 渡慶次, 努, 川元, 恵子, 永富, 成紀, 野瀬, 昭博, 村山, 盛一, Kawamitsu, Yoshinobu, Tokeshi, Tsutomu, Kawamoto, Keiko, Nagatomi, Shigeki, Nose, Akihiro, Murayama, Seiichi</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p>
URL	<p><a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/3414">http://hdl.handle.net/20.500.12000/3414</a></p>

ガンマ線照射によるセイロンベンケイソウのCAM/C<sub>3</sub>型光合成突然変異株の作出  
— 第2報. 緩照射の場合 —

川満芳信\*・渡慶次 努<sup>\*2)</sup>・川元恵子<sup>\*1)</sup>・永富成紀<sup>3)</sup>・野瀬昭博<sup>4)</sup>・村山盛一\*

Yoshinobu KAWAMITSU, Tsutomu TOKESHI, Keiko KAWAMOTO, Akihiro NOSE and Seiichi MURAYAMA: On the production of photosynthesis mutant in *Kalanchoe pinnata* using the gamma-ray irradiation. — In case of a acute irradiation —

キーワード：セイロンベンケイソウ, 突然変異, ガンマ線 (緩照射), 気孔形態, 多肉植物, C<sub>3</sub>型光合成

Key Words : C<sub>3</sub> photosynthesis type, Crassulacean acid metabolism, gamma-ray (chronic irradiation), *Kalanchoe pinnata*, Malic acid, Mutation (photosynthesis), Stomata

### Summary

In this paper, the possibility of the change to the C<sub>3</sub> type photosynthesis was examined from the inversion of the daytime and nighttime temperature in the culture stage in order to raise photosynthesis efficiency of a CAM plant (Ceylon Benkei, *Kalanchoe pinnata*), and in addition, the production of the mutation by gamma-ray chronic irradiation was examined. Outlines of the result obtained are as follows;

1. Culture plants of the Ceylon Benkei performed CAM cycling which showed the daily variation of malic acid which is peculiar for a CAM plant, while C<sub>3</sub> type gas exchange which shows the active CO<sub>2</sub> absorp-

---

\* 琉球大学農学部生物生産学科

<sup>1)</sup> 現在, 南部農業改良普及センター

<sup>2)</sup> 現在, 那覇植物防疫事務所

<sup>3)</sup> 現在, 農林水産省生物資源研究所, 放射線育種場

<sup>4)</sup> 現在, 佐賀大学農学部

- tion in the light period was done.
2. The malic acid accumulation decreased by the high night temperature condition in the culture stage, and it approached the  $C_3$  type photosynthesis.
  3. Cultured plants which were made to grow at the high night temperature from the callus differentiation made the photosynthesis type change, and original CAM type photosynthesis recovered, when the plants acclimatized.
  4. There was seldom the effect of the gamma-ray irradiation for the difference ( $\Delta$  malic acid) in malic acid content between daytime and nighttime.
  5. Stomatal frequency of the gamma-ray irradiating plants showed the increase tendency, and it was not effective at guard cell length. In addition, stomatal frequency showed the decline in the plants which went through the culture, and guard cell length showed hypertrophying tendency.

## 緒 言

CAM 植物は、 $C_3$ 、 $C_4$ 植物に比べて個葉の光合成能力が低く成長が極めて遅い。その理由として夜間に  $CO_2$ を固定する CAM 型光合成経路を有するためであると考えられる。この特異的な経路は、CAM 植物が乾燥地を生き抜くために進化させたものだといわれる。しかし、栽培面積は減少してきてはいるが沖縄の地域特産品として重要な作物であるパインアップルや、近年生産増加傾向にあるランは CAM 植物に属するが、厳しい乾燥地で栽培されているわけではない。もし、これらの CAM 植物を  $C_3$ 、 $C_4$ 光合成を行うような植物体に変更できれば、特に収穫までに 2~3 年を必要とするパインアップルの成長速度は高まり、栽培期間は短縮され生産性を飛躍的に向上させることができると予想される。

パインアップルでは、交雑に比べ自然の芽条変異による栄養系選抜が育種の主流をなしてきたが、変異は極めて低頻度で現れる。また、栽培期間が長いことや増殖率の低さが最大の障害となっていた。最近では放射線を利用した育種法によって、有刺キメラ層の拡大や葉色変異体、無毛耳個体が得られ、また、培養法との複合により変異の頻度が高まることが知られている (永富, 1993)。しかし、変異目標を生理機能に着目した研究は少なく、特に光合成系のシフトに関しては皆無に等しい。更に、現時点においてパインアップルの光合成タイプは容易に変更しない。

一方、CAM 型光合成を有するセイロンベンケイソウにおいては、昼夜温度を逆転させると夜間に気孔を閉じ昼間に気孔を開いて  $CO_2$ を吸収する、いわゆる  $C_3$ 型光合成への変化が確認されている (野瀬ら, 1991)。また、異なる単独の窒素源供給によりリンゴ酸の蓄積量や酵素活性関係の CAM 特性に影響があるという報告もある (Ota et al., 1988 ; Ota, 1988)。

本報では、パインアップルに比べ  $C_3$ 型光合成への変換の可能性が高いと考えられる可よう性 CAM 植物のセイロンベンケイソウを用いて、培養段階で高夜温条件下にさらし、その時の光合成タイプの変化と、通常培養温度条件移行後の CAM 型特性の回復程度を調査した。更に、前報 (川満ら, 2000) と同様、ガンマ線照射法を採用し、 $C_3$ 型セイロンベンケイソウの作出を試みた。前報は、急照射による光合成型変異の選抜を行ったが、本報は緩照射における影響を調査し、大量増殖及び変異誘発としての組織培養法を用いて突然変異誘発について検討した。

## 材料及び方法

栽培方法：供試材料はセイロンベンケイソウ (*Kalanchoe pinnata* per.) を用いた。材料は、ガラスハウス内で育成し灌水は土壌の乾き具合を見て適宜行った。施肥は、週に1回の割合で液体肥料を与えた。液体肥料の組成は、6mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、12mM  $\text{KNO}_3$ 、2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、10  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、20  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{MoO}_4$ 、0.1mM FeNa-EDTAであった。5月及び11月にカイガラムシが発生したため、スミチオンの1000倍液を展着剤と混ぜて数回散布した。

培養方法：セイロンベンケイソウの葉は葉縁に芽があり、その芽を含むように0.5×0.5cm以下に切った葉片を培養した。直接葉を用いるために葉片はかなり汚染されていると思われ、滅菌方法として、まず、70%アルコールに1分間浸すことによって汚染を減少させた。そして、1%アンチホルミンで5分間滅菌し滅菌水で3回洗浄後葉片を小さく切った。更に、1%アンチホルミンで1分間浸し滅菌水で3回洗浄した。

培地は、基本的にMS培地を用いた。初期多芽形成培地にはNAAを0.5ppm、BAを0.5ppm添加した寒天培地を、カルス形成には2,4-Dを0.5ppm、BAを0.5ppmを添加した寒天培地を用いた。多芽形成し増殖した植物体は、ホルモン無添加の寒天培地に移植して発根させた。カルスは脱分化までに2ヶ月程を必要としたが、誘導されたカルスは初期多芽形成培地に移し芽を分化させ、ホルモン無添加培地で発根させた。その後は、生長を早めるために液体培地で生育させた。

CAM植物はリンゴ酸を夜間に蓄積するため、暗期の長い短日条件が適している。しかし、本実験の主旨から長日条件にすることが有効であると考え、明期14時間、暗期10時間の長日条件を設定した。長日条件では、短日条件よりもセイロンベンケイソウの生長速度は遅いが回転培養することで生長を早めた。

セイロンベンケイソウの成熟葉は、高夜温条件下でC<sub>3</sub>型炭酸ガス代謝を示すことが知られているため、培養段階の温度設定を明期25℃暗期25℃の通常培養温度区と、明期25℃暗期35℃の高夜温区を2区設け、それぞれの条件でカルス形成または多芽形成を行った。

培地のイオン動態：培地中の糖含量と各イオン濃度の減少の様子を示した(図1-1, 1-2, 1-3)。

葉数3~4枚、生重1~2g程度に調整した植物体を用いた。培養植物体の生育にとって不可欠な炭素源であるシュクロースは、培地を継代して2週目では全てが植物体に吸収された。また、必須元素であるN, P, Kをもつ各イオン濃度も培地継代直後から直線的に減少したが、特に $\text{PO}_4^{3-}$ の減少が著しく、1週間経過すると約20%以下に達した。この結果を参考にセイロンベンケイソウの培養植物体の生育と生長を早めるためには、培養段階の生育期間は、培地を継代して10日から14日程の間隔で培地の交代を行う方が効率的であることが示された。しかし、培地中の糖含量が高いと植物の光合成能力が低下するという報告(富士原ら, 1987, 1992)もあり、

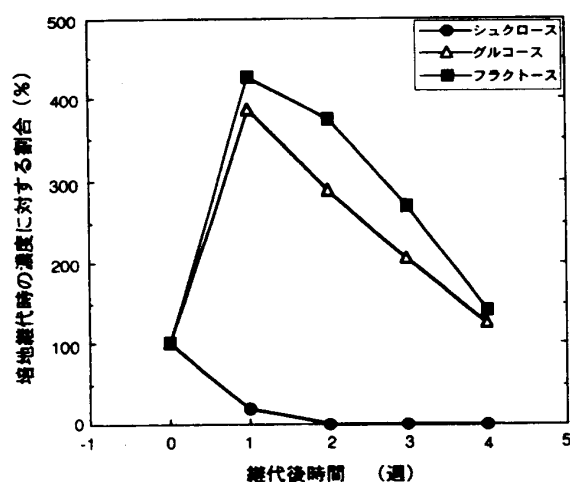


図1-1. セイロンベンケイソウの培養段階における培地中の糖濃度の経時変化。培養時期の明期の光強度及び昼/夜温度はそれぞれ $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25/25℃である。日長は14時間である。

今後その適切な間隔を検討する必要がある。C<sub>3</sub>かCAMかの判断として培養段階での植物体のリンゴ酸含量測定及び容器内CO<sub>2</sub>濃度変化の測定は培地を継代した後4日目に行った。

**リンゴ酸含量測定：**サンプリングは完全展開葉を対象にコルクボーラー(直径1.8cm)で行った。採集後、葉重を測定した後蒸留水を加え10分間煮沸した。その後細かく摩砕して体積を測定した後、3000rpmで18分間遠心分離した。その上澄み液をメンブレンフィルター(孔径0.45μm)でろ過し、高速液体クロマトグラフィー(LC-10A, 島津)を用いてリンゴ酸含量を定量した。

**培養器内CO<sub>2</sub>濃度変化の測定：**培養器内のCO<sub>2</sub>濃度の経時変化を測定するために、赤外線式分析計(LI-6251, ライカー社製)を閉鎖系内に設置して3日間連続して測定した。測定系内の空気はブラシレスファンを内蔵したポンプで循環させた。データは30分毎にマルチロガー(SC-7501, 岩通)で記録させた。尚、IRGAは0~7000ppmまで測定可能であった。

**培養植物体の生重増加の測定：**培養段階の温度条件が植物体の生長に及ぼす影響を調査するために、培養植物の生重増加量を測定する実験を行った。実験には培養植物体の生重を約5gにそろえた小植物体を用いた。培地を1週間毎に継代しその都度生重を測定し、4週間目まで調査を行った。測定は、植物体を置床する前の培地を含む培養瓶の重さと、植物体を置床した後の培養瓶全体の重さを測定し、その差を求め同植物体の生重とした。

#### ガンマ線緩照射個体のスクリーニング法

- 1) 平成6年5月17日, 6月22日にセイロンベンケイソウの幼植物をプラスチックまたはガラス瓶に入れ、通気のため穴を開けた段ボール箱に入れて茨城県大宮にある農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場へ送った。幼植物をさらに放射線育種場にて生育させた後、ガンマーフィールド(線源60Co)及びガンマーグリーンハウス(線源137Cs)において緩照射を行った。線量及び線源からの距離は5.5m 10r/d, 3.5m 25r/d, 2.5m 50r/d, 2.0m 75r/d, 1.8m 100r/dの5処理区であった。照射は各処理区とも平成6年9月8日から平成7年4月4日まで継続して行い、総線量では30Gyから300Gyまでの範囲にあった。
- 2) ガンマ線緩照射を行った草丈約80cmに生長した植物体とその植物体の葉を返送してもらい、植物体は琉球大学ガラス室内において1/5000aワグネルポットに植え替えをした。葉については半分をバー

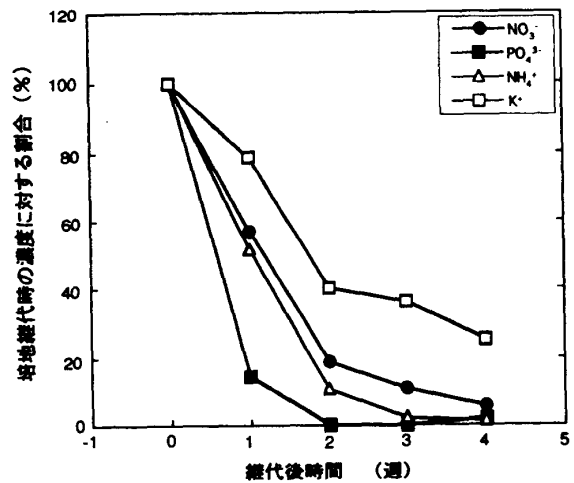


図1-2. セイロンベンケイソウの培養段階における培地中のイオン濃度の経時変化。培養時期の明期の光強度及び昼/夜温度はそれぞれ $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25/25°Cである。日長は14時間である。

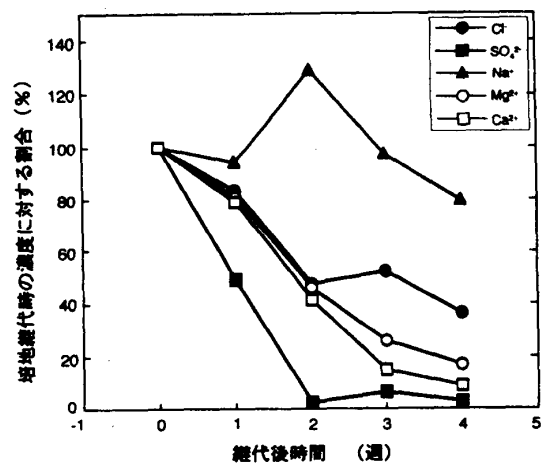


図1-3. セイロンベンケイソウの培養段階における培地中のイオン濃度の経時変化。培養時期の明期の光強度及び昼/夜温度はそれぞれ $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 25/25°Cである。日長は14時間である。

ミキュライトを詰めた育苗箱に植え付け、栄養繁殖させた後普通に生育させた。約5 cm程度に生長した植物体はパーミキュライトを入れたビニールポット(直径9 cm)に植え替えた。

- 3) 残りの葉は、培養に用いた。各処理ごとに分けて増殖させ、ある程度大きくなった植物体をガラス室内に順化させた。
- 4) 培養瓶から植物体を取り出し蒸留水で洗った後、乾熱滅菌したパーミキュライトを入れた育苗箱にピンセットで植え付け蒸留水をかけた。植え付け後、遮光下に数日間置き活着させた。ある程度生長した時点でパーミキュライトを入れたビニールポットに植え替えた。
- 5) スクリーニング
  - a. リンゴ酸含量：CAM植物の特徴としてリンゴ酸の経時的変化がある。リンゴ酸は朝方に増加し、夕方は減少する日変化を示す。すなわち、朝夕のリンゴ酸含量の差( $\Delta$ リンゴ酸)を求めれば、光合成型がCAMかC<sub>3</sub>かを判断できる。リンゴ酸含量の差( $\Delta$ リンゴ酸)を調べるためスクリーニングに入る前に無処理個体の朝方の葉内リンゴ酸含量が最大となる時間と、夕方の最も少ない値を示すサンプリング時間を決定した。採集は、ディスクを葉の中心部分から取り、後で採集する部分は最初の部分より基部側を取った。試料は採集後すぐに液体窒素にて凍結し、反応を停止させた。リンゴ酸含量は調査日の日長、温度等に左右されるため同じ日に採集したもののみを比較した。
  - b. 気孔密度及び孔辺細胞長の測定：CAM植物はC<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>植物に比べ気孔数が極端に少ないのが特徴で、また放射線の影響は表皮系に現れ易いことから、気孔に注目して調査を行った。気孔密度及び孔辺細胞長の測定は、マニキュアによる型り法を用いて行った。葉の中央部にマニキュアを塗り、1~2分乾かした後、両面テープをマニキュアの端に張り付け剥しとり、スライドガラスに張り付け光学顕微鏡にて観察した。気孔密度は、1視野(1.58mm<sup>2</sup>, 15×10倍)当りの気孔数をカウンターを用いて各3箇所づつ数え、その平均値を求めた。孔辺細胞長は、孔辺細胞の長軸の長さを15×40倍の倍率で各8つ測定しその平均を求めた。
  - c. 生葉重/葉面積比：CAM植物は、リンゴ酸を貯蔵するために葉肉組織が厚く多汁性を持つことが必要になってくる。葉の厚さを表すために、リンゴ酸含量測定に用いた葉片の生葉重/葉面積比を求めた。

## 結 果

セイロンベンケイソウの成熟葉において昼温31℃夜温37℃にした場合、C<sub>3</sub>型と同じCO<sub>2</sub>交換を行い、同時にリンゴ酸含は朝夕の差が小さくなりC<sub>3</sub>型光合成に近くなることが知られている(安部ら, 1993)。培養段階にある植物体において昼温25℃夜温25℃にした場合、リンゴ酸含量は成熟葉と比べて1/5程度であるが、暗期にリンゴ酸を蓄積し明期のはじめには最大となるCAM型特有の日変化を示した。一方、明期25℃暗期35℃で生育させた植物体はリンゴ酸蓄積量が減少し、培養段階でも高夜温によってC<sub>3</sub>的なリンゴ酸の日変化に近くことが確認された(図2, 3)。

培養植物体の光合成型を判断するもう1つの指標として、容器内CO<sub>2</sub>濃度の日変化を測定した。比較のためにC<sub>3</sub>植物のパナナを測定したが、容器内のCO<sub>2</sub>濃度は暗期に上昇し明期では低下した。リンゴ

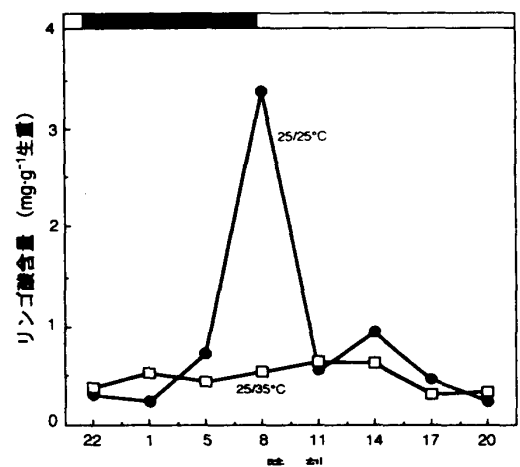


図2. 培養期間の温度条件がセイロンベンケイソウのリンゴ酸含量の日変化に及ぼす影響。図中の温度は昼/夜温度を示す。明期の光強度は $45 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、日長は14時間である。

酸含量の日変化から CAM 活性が高い25/25℃で生育させたセイロンベンケイソウは、暗期の開始と同時にCO<sub>2</sub>濃度は増加した。明期が始まるとCO<sub>2</sub>濃度は減少したが、やがてやや増加に転じ再び減少した。このような変化は、連続測定した3日間とも同じであった。これは、夜間に葉内に蓄積されたリンゴ酸が脱炭酸によって放出され、葉内CO<sub>2</sub>濃度が上昇し容器内に放出されたことに起因していると考えられる。その後、リンゴ酸が全て脱炭酸されると再び容器内CO<sub>2</sub>を光合成に利用しCO<sub>2</sub>濃度は減少した。一般に、培養植物ではCAM化は起こりにくいと言われるが、容器内CO<sub>2</sub>の動きはそれを裏付けている。25/35℃で生育させたセイロンベンケイソウについてはバナナと同じ日変化を示した(図2, 3)。

葉数4~6枚、生重5g程の培養植物体における生重増加量の変化を示した。培地養分の影響をなくすために培地を1週間おきに継代し、その都度植物体の生重を測定した。その結果、高夜温区では生長速度は低下した。夜温を上げることでC<sub>3</sub>型光合成を誘発させたが、そのような条件では夜間の植物体の呼吸がかなり増大し、光合成効率が低下した(図4)。成熟葉における結果においても、高夜温条件下で明期にCO<sub>2</sub>を吸収しているにもかかわらず、CO<sub>2</sub>の吸収量に増加がみられないことが確認されている。

培養植物の光合成は、培地中の糖含量に影響されると言われる。CAM植物のパイナップルでは、培地の糖含量の違いによってリンゴ酸の蓄積量に差が生じることが示されている(松川, 1993)。リンゴ酸量に対する培地中の糖の影響をみるため、培地継代4日目と25日目の暗期終了時(8:00)の葉内リンゴ酸含量を各温度条件下で測定した。25/25℃では、継代後4日目は0.863であるのに対して、継代後25日目では3.802mg g<sup>-1</sup>FWであった。糖含量が多い状態でリンゴ酸含量は減少し、糖含量が少ない状態で増加した。また、明暗期温度が25/35℃では、継代後4日目で0.411mg g<sup>-1</sup>FW、継代後25日後で0.647mg g<sup>-1</sup>FWであった。

表1. 培養期間の温度条件と培地継代後の日数がセイロンベンケイソウのリンゴ酸含量に与える影響。サンプリングは8:00に実施した。

昼/夜温度	培地継代後日数	
	4日	25日
25/25℃	0.863±0.265*	3.802±2.153
25/35℃	0.325±0.125	0.647±0.188

\*単位はmg g<sup>-1</sup>FW.

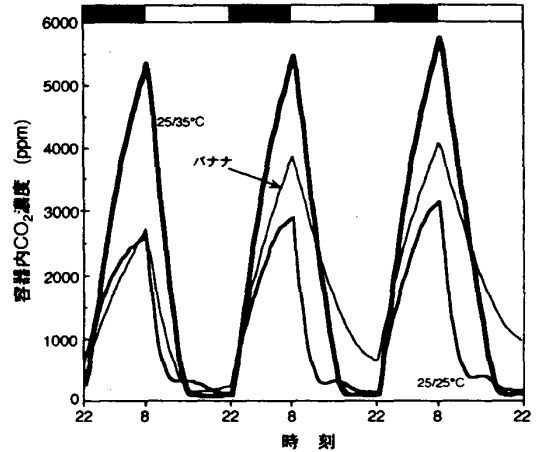


図3. 培養期間の温度条件がセイロンベンケイソウの容器内CO<sub>2</sub>濃度の日変化に及ぼす影響。バナナはC<sub>3</sub>型の比較のため用いた。図中の温度は昼/夜温度を示す。明期の光強度は45 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>日長14時間である。

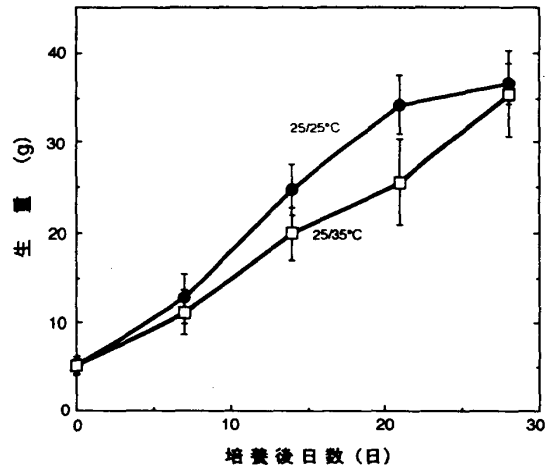


図4. 培養期間の温度条件がセイロンベンケイソウの生重増加に及ぼす影響。図中の温度は昼/夜温度を示す。明期の光強度は45 μmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>日長は14時間である。

温度を明暗期温度25/35℃の高夜温度条件で生育させると、継代後25日においてもリンゴ酸蓄積が抑制されていることが認められる(表1).

高夜温で生育させた培養植物体を明期25℃、暗期25℃の条件に移して20日目までのリンゴ酸含量の変化を調べた。培地の影響をできる限り一定にするため培地継代4日後の8:00におけるリンゴ酸含量を5日間隔で測定した。高夜温条件では0.325mg g<sup>-1</sup>FWの値を示し、通常温度条件にして20日目までリンゴ酸含量が増加する傾向はみられなかった(図5)。しかし、高夜温条件下で生育させた植物体をガラス室内に順化して50日経過した個体のリンゴ酸日変化を調査したところ、最大12.46mg g<sup>-1</sup>FW (8:00)、最

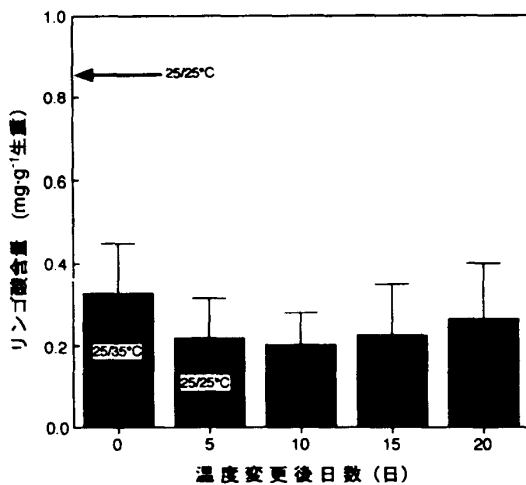


図5. 培養期間の昼/夜温度を25/35℃で生育させたセイロンベンケイソウを25/25℃に変更後のリンゴ酸含量の変化。サンプリングは培地継代4日後の8:00に行った。矢印は25/25℃で生育させた植物体の値を示す。

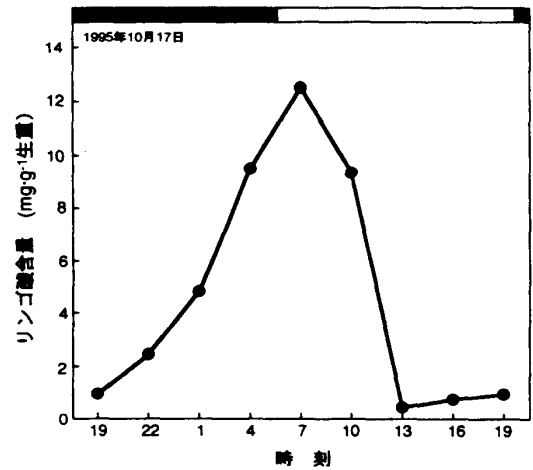


図6. ガラス室内で生育させたセイロンベンケイソウにおける葉中リンゴ酸含量。

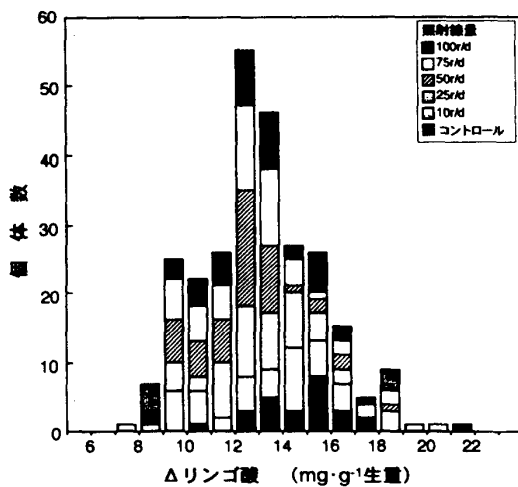


図7. ガンマ線照射がセイロンベンケイソウのΔリンゴ酸に及ぼす影響。サンプリングは8:00と10:00に行い、その差をΔリンゴ酸とした。

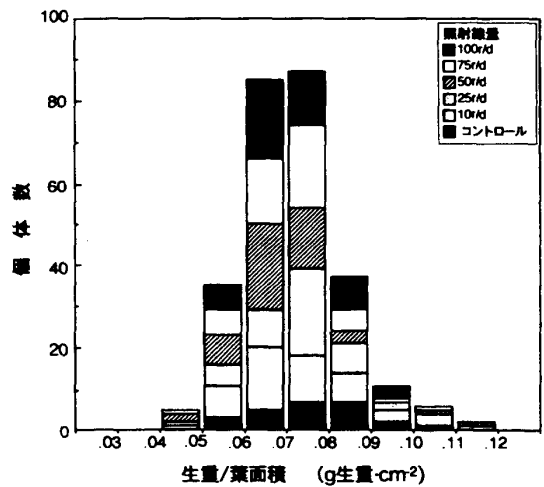


図8. ガンマ線照射がセイロンベンケイソウの生重/葉面積比に及ぼす影響。



少1.44mg g<sup>-1</sup>FW (17:00) を示し CAM 型光合成へ逆戻りしていた。

以上は、培養段階における高夜温条件下での光合成型の変更についての結果であり、温度条件を変えてC<sub>3</sub>型光合成を誘発させてもその光合成効率は低下する事が分かった。以下では、ガンマ線照射後のスクリーニング結果について述べる。ガラス室内のセイロンベンケイソウにおけるリンゴ酸含量の日変化は、最小値は13:00~19:00, 最大値は7:00~10:00にあり、さらに細かく調査したところ最小値は15:00, 最大値は8:00であることが分かった(図6)。これより、朝夕のサンプリング時間を決定し、1日の内に2回リンゴ酸含量を測定してその差をΔリンゴ酸として求めた。コントロールは10~18mg g<sup>-1</sup>FWを示し、ガンマ線照射個体は7~22mg g<sup>-1</sup>FWの範囲を示した。C<sub>3</sub>型であると判断するためにはΔリンゴ酸が1~2 mg g<sup>-1</sup>FWが目標であったが、変動範囲が小さく本調査個体においてはCAM化が抑制されていると思われる個体は得られなかった(図7)。

CAM 植物は葉にリンゴ酸を蓄積するが、生成した酸が細胞質の構造や生化学的プロセスを損なうことの無いように酸を一時的に貯える場所が必要である。この場所としてリンゴ酸を貯えることの出来る大きな液胞を持ち、そのためにCAM植物は葉が厚いのが特徴である(Kluge and Ting, 1978)。コントロールとガンマ線照射個体で生重/葉面積比を比較したところ、ほとんど差異は見られなかった(図8)。

ガンマ線照射及び培養が気孔密度に及ぼす影響を調べた。その結果、コントロールを中心に処理区が広がっており各処理の影響が現れているといえる。線量による変化の方向性は見られないが、ガンマ線照射個体は最高で10r/d照射の1mm<sup>2</sup>当たり75.32個を示し、気孔密度が高くなる傾向が見られた。また、照射+培養個体は、分散のピークが40~50/mm<sup>2</sup>にあり全体的に気孔密度は小さくなる傾向を示すことが分かった(図9)。

CAM 植物は葉の表の気孔数が極端に少ないことも1つの特徴であり、パイナップルにおいては表には全く気孔が無い。セイロンベンケイソウの葉では、裏が表の1.5~2.5倍の気孔数を有しているが、照射によって表の気孔数の減少や、裏の増加によって裏/表比は高い値を示す個体が多かった(図10)。

ガンマ線照射及び培養が孔辺細胞長に及ぼす影響

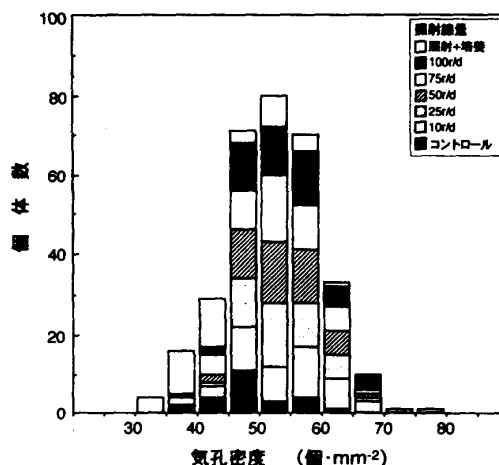


図9. ガンマ線照射及び培養がセイロンベンケイソウの気孔密度に及ぼす影響。

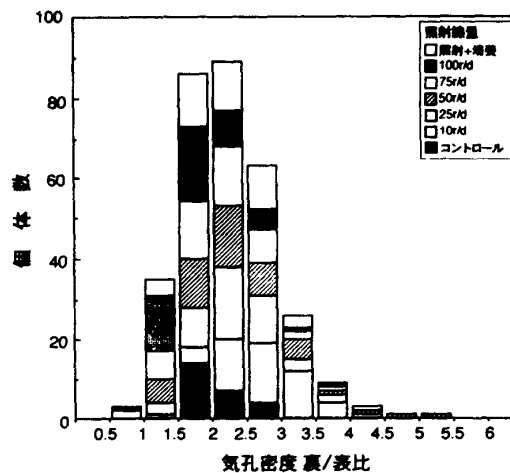


図10. ガンマ線照射及び培養がセイロンベンケイソウの気孔密度の表/裏比に及ぼす影響。

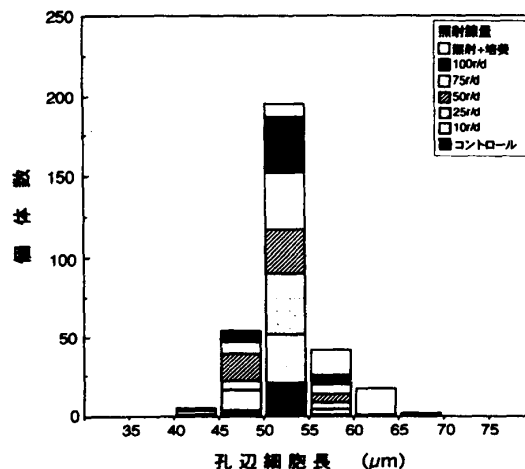


図11. ガンマ線照射及び培養がセイロンベンケイソウの孔辺細胞長に及ぼす影響。

を調べた。その結果、コントロール、照射個体とも50~55 $\mu$ mを中心とした狭い範囲にあり、照射による影響が無いことが分かる。また、気孔密度が小さかった照射+培養個体では孔辺細胞は大きくなる傾向を示し、最大では65.625 $\mu$ mであった(図11)。

照射と培養が気孔密度、孔辺細胞長に与える影響をまとめた。気孔密度、孔辺細胞長のどちらも照射+培養区と培養のみの区の間には、平均値に差がなく、照射による影響は小さい。また、変動係数をみても培養することで若干高くなっているが、照射による影響はなく全体的に低い値を示した(表2)。培養個体の気孔密度の低下と孔辺細胞長の肥大は、培養段階における細胞の膨張が原因だと考えられる。しかし、培養経由植物体の気孔特性については、植物体が草丈約20cmまで生長した時にサンプリングして測定した値なので、その値はその後の生長が進むにつれ、コントロール個体の値に接近することも十分考えられる。

表2. ガンマ線照射及び培養がセイロンベンケイソウの気孔密度、孔辺細胞長に及ぼす影響。

線量 (r/d)	個体数	気孔密度 (pieces mm <sup>-2</sup> )	C V (%)	孔辺細胞長 (mm)	C. V (%)
0	25	48.7 $\pm$ 5.8	11.9	51.8 $\pm$ 2.8	5.4
10	50	54.8 $\pm$ 7.7	14.1	51.2 $\pm$ 2.4	4.7
25	48	54.3 $\pm$ 5.7	10.4	52.6 $\pm$ 1.8	3.4
50	50	53.5 $\pm$ 5.7	10.7	51.6 $\pm$ 2.6	5.1
75	50	52.7 $\pm$ 5.6	10.7	52.2 $\pm$ 2.4	4.5
100	49	54.6 $\pm$ 6.4	11.8	52.5 $\pm$ 2.5	4.8
照射+培養	43	43.9 $\pm$ 7.7	17.6	58.6 $\pm$ 4.1	7.0
培養	21	42.7 $\pm$ 6.2	14.4	58.5 $\pm$ 3.8	6.5

注：CV, 変動係数。

## 考 察

安部(1994)は、セイロンベンケイソウにおいて明期31 $^{\circ}$ C、暗期37 $^{\circ}$ Cの高夜温条件では、夜間のCO<sub>2</sub>吸収が消失しCO<sub>2</sub>放出が認められ、CO<sub>2</sub>交換の日変化はC<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>型光合成であり、同時に葉内の有機酸の蓄積量が減少すると報告している。本報は同じセイロンベンケイソウを用いて、培養植物体における高夜温の影響を調査した。明暗期温度が25/25 $^{\circ}$ Cの培養条件では、容器内CO<sub>2</sub>濃度の変化とリンゴ酸の日変化から明期に活発なCO<sub>2</sub>ガスの吸収を示し、かつ葉内の酸の変動が認められるCAM cycling型光合成を行っていると考えられた。パイナップル、ファレノプシスの培養植物体においても同様の結果が得られている(松川ら, 1998; 土井ら, 1989)。しかし、そのリンゴ酸の蓄積量は、成熟葉に比べると1/5程度である。その要因として、CAM植物はCO<sub>2</sub>をリンゴ酸として液胞に蓄積するが、培養植物体は細胞の齢が若く液胞が未発達であったためにリンゴ酸を十分に蓄積出来なかったと考えられる。また、光独立栄養細胞は植物葉肉細胞と葉緑体の構造や成分については似ていると考えられるが、セイロンベンケイソウ等のCAM植物の培養段階においては、CO<sub>2</sub>吸収が明期に活発であるということは、容器内の環境が大きな要因になっていると予想される。特に、本実験は液体培地で生育させた植物体を測定材料に用いたため、容器内の湿度は常に高い状態であったと考えられ、そのためにCAM化を誘発する必要がなかったと推察される。また、培養段階の明期の光強度は自然条件下に比べかなり低く、そのような弱光条件では解糖系の糖やグルカンの生成が抑制され、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEP-C)の基質となるホスホエノールピルビン酸(PEP)の不足が暗期のCO<sub>2</sub>固定を抑制したと考え

られる。

25/35℃の高夜温培養条件下でも成熟葉と同じように暗期に急激なCO<sub>2</sub>の放出が認められ、また、リンゴ酸の暗期蓄積は抑制されることが明らかになった。高夜温条件下の光合成型の変換については、高夜温では、暗呼吸の増大とCO<sub>2</sub>をリンゴ酸として固定する酵素(PEP-C)のリンゴ酸感受性の変化により光合成系の変換が誘発されたであろうと考えられている(安部, 1993)。すなわち、高夜温により呼吸が活発になり葉内CO<sub>2</sub>を増大させたが、同時に暗期のPEP-Cのリンゴ酸感受性が高まったためリンゴ酸によるフィードバック阻害が大きくなった。その結果、リンゴ酸がほとんど合成されずに固定されなかった内生CO<sub>2</sub>が植物体外に放出された。培養段階における植物体でも同様なことが成り立つと考えられる。また、C<sub>3</sub>型光合成を行う培養植物体をガラス室に順化するとCAM型光合成へ回復したが、高夜温下で誘発されたPEP-Cのリンゴ酸に対する性質も同様に回復したと考えられる。植物は、周りの温度環境に反応して適切な生理機能により適応するという特性を有しており、CAM型光合成からC<sub>3</sub>型光合成への変更もその逆の場合も植物自体の特性の1つであろう。しかし、通常培養温度条件移行後、20日経過してもリンゴ酸の蓄積量に増加が見られなかった事実は、CAM型が回復するまでに1ヶ月以上を必要とすることも予想されるが、CAM型光合成の発現とも関連する問題であり、更に検討する必要がある。一般に、CAM植物の暗期における炭酸ガス吸収の最適温度は10~20℃と云われる。更に、冷涼な夜温と高い昼温の組合せでCAM植物のガス交換の型が典型的に表されることから、CAM型光合成は冷涼な夜温への適応型であるとも言われている(野瀬, 1979)。温度感受性突然変異について考察すると、変異遺伝子産物の熱不安定性に起因するので、理想的には制限温度に暴露する期間と遺伝子の働く時期が一致した場合にのみ表現型に現れると考えられる(杉山ら, 1992)。C<sub>3</sub>型光合成の固定には脱分化時の夜温をセイロンベンケイソウの制限温度まで上げ、温度による光合成的選抜を行えば、代謝的な変異が得られる可能性は高まるものと考えられる。

次に、ガンマ線照射における光合成系変異個体の作出について考察する。昼夜のリンゴ酸含量の差であるΔリンゴ酸については、処理により僅かに変動幅が広がったが極端に小さな値を示す個体は得られず、照射の影響はなかった。葉内にリンゴ酸が蓄積するか否かは、夜間の気孔の開閉に大きく影響され、また放射線の影響は表皮系に現れやすい事もあり、照射と培養が気孔特性に与える影響を調査した。タバコの組織培養で植物体を再生させる場合、気孔周辺部から不定芽が形成され植物体が形成される(松島, 1990)ので、植物体再生に関して表皮系が重要な働きをしていることが十分考えられる。ガンマ線照射個体は、コントロール個体に比べて、気孔密度が大きくなる傾向を示し孔辺細胞長にはほとんど影響が認められなかった。また、培養することで気孔密度は小さく、孔辺細胞長は大きくなる傾向を示した。このような結果は、ガンマ線急照射個体のスクリーニング結果(川満ら, 2000)と類似していたが、変動係数で比較すると急照射による影響が大きかった。前報(川満ら, 2000)および本報では、CAM植物の光合成変異株を誘発することは出来なかったが、葉形や生長点にわずかな障害を示す多芽体が見られた。多芽体については、放射線により部分的に傷ができてその部分に養分が過剰に集まり、そこに多くの生長点ができ(松尾, 1964)と考えられる。しかし、急照射も緩照射も半致死線量には達していないので、更に強い線量での照射、繰り返して照射することが今後の課題だといえる。また、CAM型光合成からC<sub>3</sub>型光合成への変更を目標にする場合、気孔密度を大きく、孔辺細胞長を小さくする方向で選抜を重ねていく必要があると考えられる。

最後に、突然変異育種を考える場合に重要なキメラ性について考察したい。種子や植物体に放射線を照射し、それらの生長点にある分裂組織のどれか1つの細胞に突然変異が起こると、変異した細胞が増殖した細胞群と変異を生じていない細胞群とが混在する状態(遺伝的キメラ)が生ずる。セイロンベンケイソウのような栄養繁殖性植物では、生長点の分裂組織は2~3層の細胞層と各層を構成する多くの細胞とから成り立ち、組織が分化している。その細胞層の中の1細胞に変異が生じたときは周縁キメラとして発見される。周縁キメラからどのようにして遺伝的に同質な変異の部分だけを取り出し増殖させ

るかが課題となる (山口, 1973)。1個の細胞は、植物体に分化する全能性を持つため個体を扱うのと同じ意味で細胞を扱うことができる。更に細胞間の競合が緩和される培養条件下では、細胞に生じた変異 (キメラ性) が淘汰されにくいと考えられるので、従来作出の困難であった形質の突然変異体が出現する可能性が高いと考えられる (若狭, 1981)。

本報で行った緩照射は、低線量で長期間照射を行う方法であり、植物体が細胞分裂を繰り返す全周期にわたり放射線照射を受ける。分裂期の細胞は変異源に対して感受性が高く変異の誘発効果も高いと予想された。しかし、本報では、目標としていたような変異体を作成することは出来ず、変異源処理による変異個体の作出ではその方向性が一定ではなく変異個体を得ることは難しいといえる。ガンマ線緩照射と培養を組み合わせる方法による成功例としてサトウキビでは茎重や茎長等の量的形質に、キクでは花色にそれぞれ変異が固定されており、その有効性が確認されている (永富, 1989, 1991, 1993)。

以上のことから、CAM型光合成からC<sub>3</sub>型光合成への変更を固定するには強い変異源処理を行い、更に、培養、カルスを經由させてキメラ性を排除し変異細胞を増大させることを考慮する必要がある。また、材料の植物体にプロトプラスト培養が確立されているならば、単一の細胞に変異源処理を行い、植物体を分化させることが一段と有効であると考えられ今後検討を必要とする。

## 摘 要

本実験では、CAM植物の光合成効率を高めるためにC<sub>3</sub>型光合成への変更の可能性を培養段階での昼夜温度の逆転から検討し、更に、ガンマ線緩照射による変異個体の作出について検討した。得られた結果の概要は以下の通りである。

1. セイロンベンケイソウの培養植物は、明期において活発なCO<sub>2</sub>吸収を示すC<sub>3</sub>型光合成的ガス代謝を行いながらも、CAM植物特有のリンゴ酸の日変化が見られCAM cycling型光合成を行った。
2. 培養段階においても高夜温条件によりリンゴ酸蓄積量が減少し、C<sub>3</sub>型光合成に近づいた。
3. カルス分化時から高夜温で生育させた培養植物体は光合成型を変更したが、順化させると本来のCAM型光合成が回復した。
4. 昼夜のリンゴ酸含量の差 ( $\Delta$ リンゴ酸) におけるガンマ線照射の効果についてはほとんど影響がなかった。
5. ガンマ線照射個体は気孔密度において増加傾向を示し、孔辺細胞長においては影響がなかった。また、培養を經由した植物体において気孔密度は減少傾向を示し、孔辺細胞長は肥大する傾向を示した。

## 参考文献

1. 安部俊輔 1993. 高夜温がCAM型CO<sub>2</sub>交換に及ぼす影響. 琉球大学学位論文 (修士) .
2. 土井元章・小田尚・浅平端 1989. C<sub>3</sub>及びCAM植物の培養器内気相環境と日長の関係. 生物環境調節 27 (1) :9-13.
3. 富士原和宏・古在豊樹・渡部一郎 1987. 植物培養器内環境の基礎的研究 (3) 培養小植物体を含む閉栓容器内の炭酸ガス濃度測定と培養小植物体の純光合成速度の推定. 農業気象 43 (1) :21-30.
4. 富士原和宏・吉良修司・古在豊樹 1992. バレイショ培養体のCO<sub>2</sub>交換量の時間変化に及ぼす培地シヨ糖濃度の影響. 農業気象 48 (1) :49-56.
5. 川満芳信・安部俊輔・野瀬昭博・川元恵子 1994. 高夜温によるCAM植物の夜間のCO<sub>2</sub>吸収の停止に対する葉面飽差の影響. 日作紀. 63 (別2) :109-110.
6. 川満芳信・川元恵子・渡慶次 努・永富成紀・野瀬昭博・村山盛一 2000. ガンマ線照射によるセイロンベンケイソウのCAM/C<sub>3</sub>型光合成突然変異株の作出. -第1報. 急照射の場合-. 琉大農学報

- 47: 1-16.
7. Kluge, M. and I. P. Ting 1978. Crassulcean Acid Metabolism. Springer-Verlag. p. 68-71.
  8. 松川理恵・川満芳信・村山盛一 1998. 気相型酸素電極法によるパインアップル培養植物体のCAM型光合成の評価. 琉大農学報 45:17-25. 1993.
  9. 松尾孝嶺 1964. 放射線農業生物学. 養賢堂 p.38-64.
  10. 松島久 1990. 表皮細胞のはたらき. 植物細胞工学 12 (3) :273-280.
  11. 永富成紀 1989. 放射線緩照射と組織培養との複合による栄養繁殖性作物の育種法. 農業技術 44 (12) :529-533.
  12. 永富成紀 1991. キクの花器培養による再分化個体の花色変異. 放射線育種場テクニカルニュース 36.
  13. 永富成紀 1993. 放射線照射とバイオ技術の結合. 研究ジャーナル 16 (4) :11-16.
  14. 野瀬昭博・安部俊輔・川満芳信・村山盛一 1991. 夜温がパインアップル及びセイロンベンケイソウのCAM型CO<sub>2</sub>交換に及ぼす影響. 日作紀. 60 (別1) :154-155.
  15. 野瀬昭博 1979. CAM植物における光合成作用とその制御. 農業技術 34:341-347.
  16. 野瀬昭博・安部俊輔・川満芳信 1994. 高夜温がパインアップル, セイロンベンケイソウ及びコダカラベンケイソウのCAM型光合成に及ぼす影響. 日作紀. 63 (別2) :107-108.
  17. Ota, K., T. Tezuka and Y. Yamamoto 1988. Changes in Crassulacean acid metabolism of *Kalanchoe blossfeldiana* by different nitrogen sources. Plant Cell Physiol. 29 (4) :533-537.
  18. Ota, K. 1988. CAM photosynthesis under drought conditions in *Kalanchoe blossfeldiana* grown with nitrate or ammonium as the sole nitrogen source. Plant Cell Physiol. 29 (5) :801-806.
  19. 新免輝男 1991. 環境応答. 朝倉書店 p.142-154.
  20. 若狭暁 1981. 植物組織培養の遺伝育種への応用. 植物の化学調節 16 (2) :103-117.
  21. 杉山宗隆・小澤正一・保谷泉・駒嶺 1992. 脱分化と再分化. 遺伝 46 (11) :40-43.
  22. 山口彦之 1973. 放射線と生物. 哲学出版 p.209-212.