

イネのクロロフィル突然変異の形質発現に関する研究 : II. 低温感受性xantha

佐藤, 光
九州大学農学部育種学教室

相賀, 一郎
九州大学農学部育種学教室

大村, 武
九州大学農学部育種学教室

<https://doi.org/10.15017/23240>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 31 (4), pp.189-193, 1977-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

イネのクロロフィル突然変異の形質発現に関する研究

II. 低温感受性 xantha

佐藤 光・相賀一郎*・大村 武

九州大学農学部育種学教室

(1976年12月14日受理)

Studies on Character Manifestation in Chlorophyll Mutants of Rice

II. Xantha Mutant Sensitive to Low Temperature

HIKARU SATOH, ICHIRO AIGA
and TAKESHI OMURA

Laboratory of Plant Breeding, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812

緒 言

クロロフィル欠失突然変異の形質発現に及ぼす環境要因の影響については、オオムギやトウモロコシなどで数多く研究されている (Bell *et al.*, 1958; Robertson and Anderson, 1961; Walles, 1967; Warner *et al.*, 1969)。イネでは、多くのクロロフィル欠失突然変異が知られてはいるが、これらの形質発現に関する研究はきわめて少ない (大村・田中, 1959)。著者らは、現在保存している多数のクロロフィル欠失突然変異の中に、生育条件の差異によつて、表現型が著しく異なるものが存在することを知つたので、これらの突然変異の形質発現に及ぼす環境の影響について研究を開始した。

前報 (Omura *et al.*, 1977) では、virescent 突然変異におけるクロロフィル代謝について研究し、virescent 突然変異のクロロフィル合成は生育温度に非常に敏感であり、さらに、この温度感受性は培地中の窒素成分によつて大きく影響されることを見出した。

本報では、イネのクロロフィル欠失突然変異の一種である xantha の形質発現に及ぼす温度の影響を、クロロフィル含量を指標として研究した。

本研究は九州大学生物環境調節研究センターで行な

われた。研究の遂行にあたり多大の便宜を与えられた同センター教授松井健博士に深謝の意を表す。なお本研究の一部は昭和49年度文部省科学研究費の援助を受けて行なわれた。記して謝意を表す。

実験材料および方法

実験にはイネの人為誘発突然変異系統 CM-14 を用いた。本系統は、水稻品種「金南風」を突然変異誘起物質 (*n*-ニトロソ-*n*-メチルウレア) で処理してえられた単劣性の xantha 突然変異である。

CM-14 の幼苗は、ほ場条件下で4月下旬に播種すれば橙黄色を呈し、6月下旬に播種すると淡黄緑色となる。幼苗枯死であるため、系統の維持はヘテロ個体で行なつた。

実験に供する幼苗は九州大学生物環境調節研究センターの人工照明室で育成した。生育条件は、温度 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$, $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ または $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 湿度 $65 \pm 5\%$, 照度約 2400 lux であつた。培地は通常前報と同様 White の改良培地 (W培地) を用いたが、色素量に対する培地の影響をみるため、クエン酸鉄のみを含む寒天培地 (A培地) も用いた。

W 培地の組成は $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 739.5 mg, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 287.8mg, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 453.8 mg, KNO_3 80.0 mg, KCl 65.0 mg, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot$

* 九州大学生物環境調節研究センター, 環境庁公害研究所 (茨城県筑波郡矢田部町)

Table 1. Effect of temperature on the amounts of chlorophylls and carotenoids in the third leaf of xantha seedlings grown in two kinds of nutrients.

Temp. °C	Media*	Strains	Chlorophylls		Carotenoids mg/g.f.w.
			mg/g.f.w.	a/b	
20	W	<i>xa</i> +	<0.1 2.7	>10 3.2	0.20 0.32
25	W	<i>xa</i> +	0.7 2.9	7.5 3.2	0.25 0.31
30	W	<i>xa</i> +	1.6 2.9	4.6 3.2	0.27 0.35
20	A	<i>xa</i> +	<0.1 2.2	>10 2.9	0.27 0.34
25	A	<i>xa</i> +	0.8 2.5	6.7 3.1	0.27 0.36
30	A	<i>xa</i> +	0.9 2.6	4.5 3.2	0.19 0.19

* W: Modified White's medium, A: Agar medium added only Fe-citrate.

2 H₂O 21.4 mg, MnSO₄ · 4-6 H₂O 7.18 mg, ZnSO₄ · 7 H₂O 2.16 mg, H₃PO₃ 1.5 mg, KI 0.75 mg, Fe-citrate 15 mg, 寒天 6 g, 蒸溜水 1000 ml である。上述のように CM-14 は分離系統であるため、20°C で 48 時間催芽させた後、xantha 個体を選んで実験に供した。

クロロフィルおよびカロチノイドの定量には十分に展開した第3葉葉身を用いた。採取した第3葉葉身に80%アセトン添加し乳鉢中で磨砕、色素を完全に抽出し、磨砕液を30,000 rpm, 12分間遠心分離し、アセトン抽出液を得た。抽出液中のクロロフィルおよびカロチノイド量は、分光光度計(日立 EPS 033)を用いて吸光度を測定し、Mackinney (1941)の方法に従って算出した。なお、1回の測定に5個体以上を用いた。

結 果

W培地とA培地を用い、20°C, 25°C および 30°C で生育させた xantha の第3葉葉身のクロロフィル含量、クロロフィル a/b 比およびカロチノイド含量を測定した結果を第1表に示した。W培地で生育させた xantha についてみると、クロロフィル量は、生育温度によって著しく異なり、20°C ではきわめて少量であったが、30°C では 1.6 mg/g.f.w. となり、正常型の 55% に達した。クロロフィル a/b 比も生育温度によって変化し、20°C では著しく大であったが、30°C では 4.6 と正常型の値に近づいた。これに反

し、カロチノイド量は生育温度にはほとんど影響されず、0.20 ないし 0.27 mg/g.f.w. の値を示し、正常型より僅かに低い程度であった。生育温度による両色素の消長が xantha の表現型、すなわち葉色を大きく変化させ、20°C では橙黄色、25°C では黄緑色で、正常型と容易に区別できるのに対し、30°C では淡緑色となり、肉眼的には正常型との判別が困難となる。以上の結果から、本実験に用いた xantha は低温感受性突然変異であることが判明した。

A培地においてもW培地の場合とほぼ同様の傾向を示し、培地の影響はほとんど認められなかった。したがって、以後の実験はすべてW培地で行なった。

xantha が低温感受性であることが判明したので、温度の影響をさらに検討するため、次の諸実験を行なった。第1図は22°C, 光照射下で生育させた xantha を、第3葉葉身が十分に展開した後 25°C および 30°C に移してクロロフィルの生合成を経時的に調査した結果である。連続して 22°C で育てた場合にはクロロフィル含量はきわめて低く、かつ、増加は認められなかったが、25°C あるいは 30°C に移すと、時間の経過とともにクロロフィル含量は増加し、30時間後には 25°C では約 0.7 mg/g.f.w., 30°C では約 1.5 mg/g.f.w. となった。この値は第1表のW培地における 25°C および 30°C での xantha のクロロフィル含量にほぼ等しい。以上の結果から、xantha は、低温(20°C)ではクロロフィルは生成されないが、クロロフィル生成能は有しており、適当な温度条

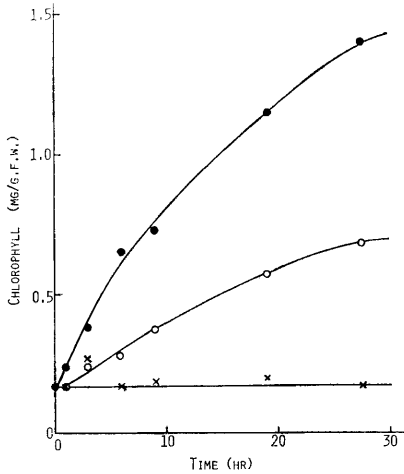


Fig. 1. Time courses of greening at 25°C and 30°C in xantha seedlings grown at 22°C in the light. —x— 22°C, —o— 25°C, —●— 30°C.

件が与えられればクロロフィルを生成するものと推察される。

30°C, 暗黒で発芽, 生育させた xantha および正常型の黄織葉 (etiolated leaf) を 20°C あるいは 30°C で照射し, クロロフィル生成を経時的に調査した結果が第2図である。xantha の幼苗は, 30°C で照射すると数時間の誘導期 (lag phase) を経てクロロフィルの生成が開始され, 30時間後には 0.25 mg/g.f.w. に達した。しかし, 20°C, 照射ではクロロ

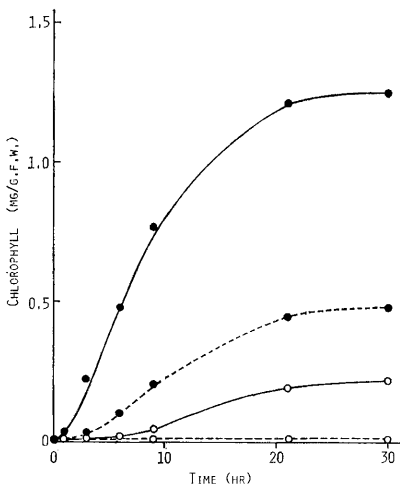


Fig. 2. Time courses of greening in etiolated xantha seedlings grown at 30°C in the dark for 8 days. —●— 20°C, wild type; —●— 30°C, wild type; —o— 20°C, xantha; —o— 30°C, xantha.

フィルはほとんど生成されなかつた。これに対し, 正常型では 30°C はもちろん 20°C における照射でもクロロフィル生成速度は速く, かつ, 生成量も多く, 30時間後に 30°C では 1.25 mg/g.f.w., 20°C では 0.5 mg/g.f.w. に達した。

第3図は 30°C, 暗黒下で育成した黄織葉苗を 20°C, 照明下に 24, 48, 60時間置いた後, 30°C で照射した結果を示している。20°C での照射ではクロロフィル生成はほとんど起こらない (第1表)。しかし, 24, 48, 60時間後に幼苗を 30°C, 照射条件下に移すと, 第2図でみられた誘導期はほとんどなく, 直ちにクロロフィル生成が開始され, 20°C, 照明の期間が長いほどクロロフィル生成速度が速かつた。

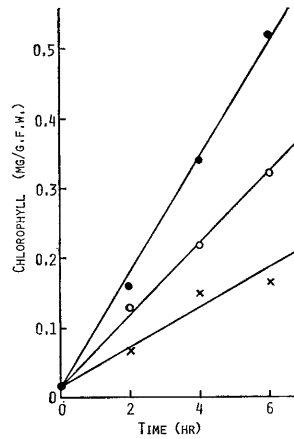


Fig. 3. Time courses of greening at 30°C after illumination at 20°C for 60 hr (—●—), for 48 hr (—o—) and for 24 hr (—x—) in the etiolated xantha seedlings grown at 30°C.

これらの結果は, 照射によるクロロフィルの生成が正常型では 20~30°C の温度範囲では正常に行なわれるのに対し, xantha では 20°C においては阻止されることを示している。

考 察

本研究に用いた xantha は, 前報 (Omura *et al.*, 1977) の virescent と同様, 低温感受性のクロロフィル突然変異であることが明らかになった。しかし, 生育過程における両者の色素生成および低温感受時期には顕著な相違がみられる。xantha ではクロロフィル生成は生育温度依存性を示すが, カロチノイド生成は温度に関係なくほぼ一定であり, 正常型に類似している。これに対して virescent では両色素の生成はとも

に低温感受性を示す (Omura *et al.*, 1977).

低温を感受する生育時期, すなわち遺伝子の作用時期, および低温の作用は, virescent では, 第 1, 2 葉を除けば, それぞれの葉の抽出前 (伸長期) であり, この時期に一度低温に遭遇するとその葉は白化し, これを 30°C に移しても, もはや緑化はみられない. すなわち, この時期の低温によつてクロロフィル生成能が完全に失われる. これに対し, xantha では低温感受時期は葉の抽出以後であり, 光によるクロロフィル生成過程において低温に遭遇すればその生成はみられない (第 1, 2 図). しかし, 低温で黄化した葉を光照射下で適当な温度に置くとクロロフィルは生成される (第 3 図). このことは, virescent とは異なり, 低温によつてクロロフィル生成能が失われるのではないことを示すものといえる. さらに, 第 3 図にみられるように, 20°C, 光照射の期間が長いほど, その後の 30°C, 光照射によるクロロフィル生成速度が速いという事実は, 20°C, 光照射においてもクロロフィル生合成過程がある程度進行していることを示唆している. これらの点から, 両遺伝子の色素形質発現の機作は著しく異なっていると推察される. しかし, その詳細については今後の研究にまたなければならぬ.

クロロフィル代謝 (含量および a/b 比) が温度に強く依存するイネの突然変異には *pgl* (pale green leaf; 岡山吉備穂 2 号), *ch₁* (chlorina; 黄金錦) が知られている (大村・田中, 1959). これらは, 幼苗期にはクロロフィル含量は正常型と変わらないが, 分けつ期に形成される葉では, クロロフィル含量が少なく, 黄緑色を呈する. この結果は制御環境下でえられたものではないので, 断定はできないが, これらの突然変異は高温感受性であると考えられ, xantha や前報で供試した 3 種類の virescent が低温感受性であるのとは対照的である. virescent にも上記のほか低温や高温感受性程度の異なるものが多数えられているので, xantha にもこのような多様性が存在するものと思われる. これらを用いて研究を続行すれば, クロロフィル生合成に関する生理遺伝学的研究は進展するものと期待される.

要 約

イネのクロロフィル欠失突然変異, xantha の形質発現に及ぼす環境要因の影響をクロロフィル含量を指標として研究した.

1. xantha のクロロフィル含量は生育温度によつ

て著しく異なり, 20°C ではきわめて微量であつたが, 30°C では 1.6 mg/g.f.w. と正常型の 1/2 強に達した.

2. クロロフィル a/b 比も生育温度の影響が著しく, 20°C では 10 以上ときわめて大であつたが 30°C では 4.6 に低下した.

3. カロチノイド含量は温度の影響をほとんど受けず, 正常型よりやや少ない程度であつた.

4. 両色素の温度による消長が xantha の葉色を大きく変化させ, 20°C で橙黄色, 25°C では淡黄緑色, 30°C では正常型に近い淡緑色を示した.

5. 20°C で生育させたクロロフィルを欠く黄色苗を 25°C あるいは 30°C に移すとクロロフィルを生成した.

6. 30°C 暗黒下で育てた xantha の黄緑葉苗を 20°C 照明に移してもクロロフィルは生成されなかつたが, 30°C 照明に移すと生成された. また, この黄緑葉苗を 20°C 照明下に置いた後, 30°C で照明すると, 20°C 照明の期間が長いほど 30°C 照明でのクロロフィル生成速度が速かつた.

7. 以上の結果から, この xantha は光によるクロロフィル生成が低温によつて阻害される低温感受性突然変異であるといえる.

文 献

- Bell, W. D., L. Bogorad and W. J. McClrath 1958 Response of the yellowstripe maize mutant (*y₁*) to ferrous and ferric iron. *Bot. Gaz.*, **120**: 36-39
- Mackinney, G. 1941 Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, **140**: 315-322
- Omura, T., H. Satoh, I. Aiga and N. Nagao 1977 Studies on character manifestation in chlorophyll mutants of rice. I. Virescent mutants sensitive to low temperature. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **21**: 129-140
- 大村 武・田中重行 1959 イネの葉緑素突然変異 (クロリナ, キサンサ) のクロロフィル, カロチノイド含量について. 日作九州支報, **14**: 24-26
- Robertson, D. S. and I. C. Anderson 1961 Temperature sensitive alleles of the *y₁* locus in maize. *J. Heredity*, **52**: 53-60
- Walles, B. 1967 Use of biochemical mutants in analysis of chloroplast morphogenesis. In "Biochemistry of Chloroplasts," Vol. 2, ed. by T. W. Goodwin, Academic Press, London & New York, pp. 633-653
- Warner, H. R., N. A. Tuleen, W. D. Bell and

- L. A. Snyder 1969 Effect of a *virido-xantha* mutation in barley on the content of individual plastid pigments. *Molec. Gen. Genetics*, **104**: 241-252

Summary

The effect of growth temperature on the character manifestation in a xantha mutant of rice (CM-14), which was induced by *n*-nitroso-*n*-methylurea treatment, was investigated. The phenotype of xantha seedling was distinctly modified by temperature, having orange yellow leaves at 20°C and light green leaves at 30°C. Therefore, the amounts of chlorophyll and carotenoid in the expanded third leaf was used as a indicator of character manifestation.

The chlorophyll content was negligible at 20°C, whereas it was about 55% of wild type at 30°C. The carotenoid content was unchanged at any temperature, showing nearly the same content as the wild type.

When the chlorophyll-deficient xantha seedlings grown in the light at 20°C were transferred after the emergence of their third leaf to 25°C or 30°C, the third leaf formed chlorophyll. This result is distinctly different from that obtained in the virescent mutants, in which the chlorophyll content was never changed when they transferred after the emergence of their third leaf from 20°C to 30°C. On the other hand, when the green xantha grown at 30°C were transferred to 20°C, chlorophyll content was unchanged.

When etiolated xantha seedlings grown in the dark at 30°C were exposed to incandescent light at 20°C for various periods of time and then they illuminated at 30°C, all of the seedlings had a certain chlorophyll content, however, they reached this content quickly with increase in period of illumination at 20°C.

It is thought from these results that the xantha is a mutant inhibited by low temperature from chlorophyll synthesis in the light.