

放射線照射によるスギの体細胞突然変異の 誘起について

村 井 正 文⁽¹⁾

Masafumi MURAI : Induction of Somatic Mutation of
Cryptomeria japonica by Gamma-Irradiation

要 旨 : 本研究では、スギを 材料に放射線照射による体細胞突然変異を得るための 育種研究として、体細胞突然変異の頻度を左右する要因のうち、スギの系統、照射線量、照射時期 (季節)、および剪定の有無等について実験を行った。また、スギで体細胞突然変異が区分キメラや斑点として発生する割合が他の樹種と比較して低く、完全に変異している体細胞突然変異 (枝変り) が多い理由について解剖学的な研究を行った。

その結果、品種による体細胞突然変異の発生に大きな差があった。さらに、幹の上部に着生する一次枝、多肥栽培、夏期の照射、および無剪定等の要因により、より多くの体細胞突然変異が発生することが明らかになった。この理由として、放射線照射による障害のため一時細胞分裂が停止した後、細胞分裂速度を高め、短期間に放射線障害を修復するような条件のもとで変異細胞と正常細胞間の競合期間が短くなる。その結果、変異細胞が体細胞突然変異として観察できるまでに生長する機会が多くなるものと思われる。また、スギで区分キメラや斑点としての体細胞突然変異が少なかった。スギは本来的に生長点の構成細胞数が少なく、かつ低線量でも茎頂分裂組織の破壊が生じる。その後少数の細胞から新しい生長点組織が形成されることと、スギの茎頂分裂組織の生長は細胞分裂と伸長が併行的に行われる性質であるため、変異細胞と正常細胞の競争と淘汰の結果、全体が変異した体細胞突然変異 (完全枝変り) が多いと考えられる。

目 次

緒 言	130
第1章 体細胞突然変異の頻度を左右する要因	131
第1節 系統による体細胞突然変異の頻度のちがい	131
1. 材料と方法	131
2. 実験結果	132
第2節 放射線の照射線量による体細胞突然変異の頻度のちがい	136
1. 材料と方法	136
2. 実験結果	138
第3節 放射線の照射時期による体細胞突然変異の頻度のちがい	138
1. 材料と方法	138
2. 実験結果	138
第4節 施肥量の多少による体細胞突然変異の頻度のちがい	140
1. 材料と方法	140
2. 実験結果	140
第5節 剪定の有無による体細胞突然変異の頻度のちがい	141
1. 材料と方法	141
2. 実験結果	141

考 察	143
第 2 章 茎頂分裂組織の放射線障害ならびに組織の修復と体細胞突然変異の誘起	145
第 1 節 茎頂分裂組織の修復	145
1. 材 料 と 方 法	145
2. 実 験 結 果	145
第 2 節 茎頂分裂組織の細胞核 DNA の不活性化と修復	147
1. 材 料 と 方 法	147
2. 実 験 結 果	147
考 察	148
結 論	149
1. 体細胞突然変異の頻度を左右する要因	150
2. スギで区分キメラや斑点としての体細胞突然変異が少ない理由	150
引 用 文 献	150
Summary	152
Plate	1~3

緒 言

林木育種の方法は大別すれば、現存するもののなかから優れた特性をもったものを選び出してふやしていく選抜育種、当地でみられない新しい特性をもったものを他地域から導入する導入育種、両親植物のもっている遺伝的特性を組み合わせる交雑育種ならびに雑種強勢育種、および突然変異によって希望のものを造り、これをふやしていく突然変異育種の 5 つに区分される。

突然変異育種を行うための変異誘発の手段として放射線、化学物質等種々あるが、このなかで放射線利用が突然変異誘起の手段として特に材料を大量に扱える点で便利である。

上記の 5 つの育種方法のうち、林木では突然変異育種は、現在、あまり行われていない。しかし、この育種方法はつぎのような長所をもっている。主働遺伝子の突然変異の利用面としては、生産形質（耐病虫性、耐寒性、および耐乾性等）に関与している遺伝子で今までみ出されていないか、または、ごく少数しかないものを作りうる可能性をもっていることである。放射線照射による主働遺伝子の突然変異の利用として、1～2 年生作物では、短稈、早生、および収量増加等の育種に用いられ、その実用的効果も出ている。しかし、林木では現存する集団内の変異の幅が大きいので、現段階では自然に蓄積している優良遺伝子を利用する方法がより効果的と思われる。こうして、林木の突然変異育種の目標はまれな遺伝子の創出にあらう。主働遺伝子の突然変異を目的として、希望の遺伝子が育種しようとする種に存在していないならば、その近縁種にあるかどうか新しい遺伝子作出の目安となる。たとえば、戸田等¹⁾がスギの赤枯病抵抗性遺伝子を創出することを目的として実験したように、スギの近縁種であるセンペルセコイアが赤枯病抵抗性遺伝子を持っている事例から、スギでもその抵抗性遺伝子を作れる可能性がある。

実用化できる突然変異を得るためにはできるだけ大量の材料を用いて育種を行うのが望ましい。そのために、種子を材料にすることが最も大量に扱えるという点で有利といえる。実用化できる突然変異を作るための育種研究としては種子、生体、生殖細胞、および花粉等種々の材料で照射当代と照射後代に発生する両方の突然変異について研究する必要がある。しかし、林木では今のところ遺伝子分析が十分に行われていないことと、林木では他家受精植物であり、ヘテロ性が高く人為的に自家受精をくりかえすと著しい

自殖弱勢を示し、ほとんど種子ができなくなる。また、半数体を作ることも困難であるので、純系を作ることも難しい。したがって、種子、苗木、生殖細胞、および花粉等の照射によって照射後代に発現した変異が放射線によって変異したものか、また、遺伝子の組み替えによって発生した変異なのかの判断は難しい。そのため、現段階では放射線による突然変異の誘起の効果を調べるには照射材料として遺伝的に同一のクローンあるいはクローンコンプレックス等の材料を使うことと、比較の変異を見出しやすい生体照射によって照射当代に発生する体細胞突然変異についての研究を行わざるをえない。

林木では突然変異を誘起するための基礎となる放射線による研究が種子^{2)~7)}および生体^{8)~14)}などについて行われてきた。これらの研究により、種子および生体についての放射線照射線量と放射線障害との関係が明らかにされた。これらの基礎研究によりどの程度の放射線を照射すれば障害が少なく、最も突然変異が多く得られるかについて明らかになってきた。これらの研究に付随して、体細胞突然変異の頻度を高めるために障害を少なくして、できるだけ多量の放射線照射をはかり、かつ、体細胞突然変異の頻度を左右する要因についても考慮されなければならない。また、区分キメラや斑点状の体細胞突然変異を少なくして、全体的（完全）に変異した体細胞突然変異を多く得る方法、体細胞突然変異の遺伝的および生理的特性、その特性が照射の方法、その他の条件によって左右されるかどうか、体細胞突然変異が遺伝子突然変異によるものか、または染色体異常によるものかどうか、および微働遺伝子と主働遺伝子の突然変異との関係等についても研究する必要がある。

本研究ではスギを材料として、体細胞突然変異の頻度を左右する要因について、系統による体細胞突然変異の頻度のちがい、照射線量によるちがい、照射する時期のちがい、施肥量の多少によるちがい、および剪定によるちがいについての実験を行った。また、スギで体細胞突然変異が区分キメラとして発生する割合が他の樹種と比較して低い理由を明らかにするための研究を行った。

この報告は、昭和 38 年から 43 年にかけて実施したものであり、その一部については日林誌等^{14)~17)}にすでに発表しているが、今回発表の機会を得て全体的にとりまとめを行ったものである。

この実験を行うにあたり、終始ご指導いただいた九州大学名誉教授 佐藤敬二博士、同教授 宮島 寛博士、同名誉教授 永松士巳博士、農林水産省農業技術研究所放射線育種場元場長 河原 清博士、同龍野得三氏、同第一研究室長 田中幸彦博士、同第二研究室長（現 果樹試験場育種部長）西田光夫氏、同室（現 林業試験場遺伝育種第一研究室長）大庭喜八郎博士に深謝の意を表する。

第 1 章 体細胞突然変異の頻度を左右する要因

スギで体細胞突然変異を誘起するための基礎研究として、放射線による障害の研究について、突然変異についても研究しなければならない。

体細胞突然変異の頻度を高めるために障害を少なくして、できるだけ多量の放射線照射をはかる方法ばかりでなく、体細胞突然変異の頻度を左右する要因についても明らかにする必要があり、系統による体細胞突然変異の頻度のちがい、照射線量によるちがい、施肥量の多少によるちがい、および剪定によるちがいについて実験を行った。

第 1 節 系統による体細胞突然変異の頻度のちがい

1. 材料と方法

供試材料としてスギさし木 11 系統（クローンおよびクローンコンプレックス）を用い、昭和 41 年度に

実験を開始した。供試系統には北陸産から九州産のものまでのものを用いた。山出し用の各さし木苗を直径 30 cm の素焼き鉢に 2 本植えとし、1 系統当り平均 30 本を照射し、10 本を無照射とした。照射はさし木系統に昭和 41 年 6 月 6～15 日まで 1 日 100 レントゲン (R) の線量率で 600R を照射した。線源は農林省 (現農林水産省) 放射線育種場 (現農業技術研究所放射線育種場) のガンマー線照射場のコバルト 60 (3,000 キュリー) であり、照射の場所は線源より 22.4 m 離れており、根を保護する目的で鉢が完全に土中にかくれるように埋めた。照射後 3 か月目に平地の畑に定植し、体細胞突然変異の検出につとめた。

なお、さし木系統と対比させる意味で、昭和 42 年に長期間照射の結果⁹⁾、体細胞突然変異の頻度が高いクマスギ (雌親) と逆に頻度が比較的低いクモトオシ (雄親) の F_1 16 本と、クマスギの自然受粉種子苗 25 本を 5 月 9～16 日まで、さし木系統と同一の線量率、線量で照射を行った。

体細胞突然変異として判定はつぎのようにして行った。放射線照射後発生した枝が変異していると思われたときには、無照射の同一系統の同じような枝の部位と比較することはもちろん、同一の木の変異した枝の近くの部位にある枝と比較して明らかに異なっている場合に、初めて体細胞突然変異としてラベルをつけた。体細胞突然変異を検出するために 1 年を通じ継続的に調査した。

2. 実験結果

照射区の各さし木系統の体細胞突然変異の頻度を Table 1 に示した。なお、無照射区では、体細胞突然変異は発生しなかった。体細胞突然変異が最も多く発生したクマスギで 1 本の苗から平均 2.3 本が発生し、ついて、モトエスギの 1.9 本、マサヤマスギ、ヤブクグリ、アヤスギ、およびヒトヨシメアサの順で、これらの各系統では苗当り 1 本以上の体細胞突然変異が発生した。発生頻度の最も低いのがメアサで、苗当り 0.36 本とほぼ 3 個体の苗で 1 本の体細胞突然変異が発生した。そのほか、ボカスギ、オキノヤマスギ、およびヤメホンスギでの発生率が低い。

しかし、系統間で体細胞突然変異の頻度を比較する場合には苗単位の頻度で表わすよりも、むしろ照射後に発生した枝当りの頻度で表わす方が適当であろう。なぜならば、照射後に新しく発生した枝数は系統

Table 1. 各さしき系統の体細胞突然変異頻度
Frequency of somatic mutation of each cultivar
(rooted cuttings)

系 統 Cultivar	供試本数 No. of plant irradiated	照射後発生 した枝数 No. of flushed shoots after irradiation	体細胞 突然変異数 No. of somatic mutation	苗当りの体細胞 突然変異数 No. of somatic mutation per plant	枝当りの体細胞 突然変異 Somatic mutation per shoot (%)
クマスギ <i>Kumasugi</i>	35	8,170	81	2.31	1.0
モトエスギ <i>Motoesugi</i>	32	6,709	61	1.91	0.9
マサヤマスギ <i>Masuyamasugi</i>	36	4,668	66	1.83	1.4
ヤブクグリ <i>Yabukuguri</i>	21	4,031	30	1.43	0.8
サンブスギ <i>Sanbusugi</i>	36	4,994	47	1.31	0.9
ヒトヨシメアサ <i>Hitoyoshimeasa</i>	27	5,127	28	1.04	0.5
アヤスギ <i>Ayasugi</i>	30	1,062	19	0.63	1.8
ヤメホンスギ <i>Yamehonsugi</i>	28	3,600	17	0.61	0.5
オキノヤマスギ <i>Okinoyamasugi</i>	29	3,657	16	0.55	0.4
ボカスギ <i>Bokasugi</i>	29	4,333	16	0.55	0.4
メアサ <i>Measa</i>	36	4,505	13	0.36	0.3

Table 2. クマスギの実生苗およびさし木苗の体細胞突然変異頻度
Frequency of somatic mutation of seedlings and cuttings of *Kumasugi*,
Cryptomeria japonica D. Don

系 統 Cultivar	供 試 本 数 No. of plant irradiated	照射後発生 した枝数 No. of flushed shoots after irradiation	体 細 胞 突然変異数 No. of somatic mutation	苗当りの体細胞 突然変異 No. of somatic mutation per plant	枝当りの体細胞 突然変異 Somatic mutation per shoot (%)
クマスギの自然受粉種子苗 Open-pollinated seedlings of <i>Kumasugi</i>	25	19,932	227	9.08	1.1
クマスギ×クモトオシの F_1 苗 F_1 seedlings of <i>Kumasugi</i> × <i>Kumotoosi</i>	16	8,789	36	2.25	0.1
クマスギ (さしき苗) Cuttings of <i>Kumasugi</i>	35	8,170	81	2.31	1.0

によって著しく異なり、クマスギでは1本の苗から照射後に発生した枝数は平均233本、モトエスギでは平均209本にたいして、アヤスギでは平均35本と極めて少なく、クマスギやモトエスギの約1/6にすぎない。このように、系統によって照射後に発生した枝数が大きく異なることにより、体細胞突然変異の発生本数が少ないアヤスギでは枝当りの体細胞突然変異の頻度は1.8%と最も高く、ついで、マサヤマスギ、クマスギ、およびモトエスギの順であった。メアサは体細胞突然変異の本数も少なく、また、枝当りの頻度も0.3%で最も低かった。

さし木系統の中で体細胞突然変異の発生頻度の高いクマスギの実生後代の2系統では Table 2 に示すように、クマスギの自然受粉種子苗では苗当りの頻度はクマスギ×クモトオシの F_1 苗の4倍で、苗当たり9本の体細胞突然変異が誘起された。これらの苗当りの頻度は使用したさし木系統のどれよりも数倍高い値であった。照射後に発生した枝数はクマスギ×クモトオシの F_1 苗で苗当たり平均548本、クマスギの自然受粉種子苗では平均800本であり、各さし木系統のどれよりも多く、親のクマスギのさし木苗の2~3倍も多く発生した。照射後発生した枝当りの体細胞突然変異の頻度はクマスギの自然受粉種子苗とクマスギ×クモトオシの F_1 苗で、それぞれ1.1%と0.4%であり、クマスギの自然受粉種子苗はクマスギ×クモトオシの F_1 苗の約3倍の頻度であった。クマスギの自然受粉種子苗の体細胞突然変異の頻度は親のクマスギのさし木苗のそれとほぼ同程度であったが、クマスギ×クモトオシの F_1 苗では親のさし木クローンと比較して、約半分の頻度であった。

各さし木系統から発生した体細胞突然変異の種類を7つに分類して、Table 3 に示した。葉緑素欠乏による変異(以下葉緑素変異という)は一つのさし木系統内でも黄白色から淡緑色までの変異を示している。これらを葉緑素変異として分類した。また、葉緑素変異と同時に針葉形態が変化したものも葉緑素変異として分類した。これらの葉緑素変異はすべてのさし木系統に発生した。この種の体細胞突然変異はクマスギに最も多く、ついで、マサヤマスギとモトエスギに多く発生した。この3系統から発生した葉緑素変異は黄白色から淡緑色まで多くの変異を示し、クマスギの変異の幅が特に大きいようである。そのほか、ボカスギ、アヤスギ、ヤメホンスギ、オキノヤマスギ、ヤブクグリ、ヒトヨシメアサ、およびサンブスギは淡緑と黄色の2種類の葉緑素変異を生じたにすぎなかった。

Table 3. 各さし木系統の体細胞突然変異の種類
Kind of somatic mutation of each cultivar (rooted cuttings)

系 統 Cultivar	体 細 胞 突然変異数 No. of somatic mutation	体細胞突然変異の種類 Kind of somatic mutation						
		葉緑素 Chloro- phyll	ワックス レス Waxless	形 態 Mor- phology	冬期赤変 Red- sugi in winter	冬期緑色 Green- sugi in winter	黄金型 White primary leaves	ふいり Varie- gation
ク マ ス ギ <i>Kumasugi</i>	81	45	10	20	1	3	1	1
モ ト エ ス ギ <i>Motoesugi</i>	61	43	0	17	0	1	0	0
マ ス ヤ マ ス ギ <i>Masuyamasugi</i>	66	43	8	13	0	2	0	0
ヤ ブ ク グ リ <i>Yabukuguri</i>	30	14	1	13	0	2	0	0
サ ン ブ ス ギ <i>Sanbusugi</i>	47	26	0	18	2	1	0	0
ヒ ト ヨ シ メ ア サ <i>Hitoyoshimeasa</i>	28	14	2	10	0	2	0	0
ア ヤ ス ギ <i>Ayasugi</i>	19	4	0	14	0	0	1	0
ヤ メ ホ ン ス ギ <i>Yamehonsugi</i>	17	4	0	13	0	0	0	0
オ キ ノ ヤ マ ス ギ <i>Okinoyama</i>	16	9	0	7	0	0	0	0
ボ カ ス ギ <i>Bokasugi</i>	16	10	0	6	0	0	0	0
メ ア サ <i>Measa</i>	13	4	0	6	1	2	0	0

ワックスレス変異の体細胞突然変異は枝および葉にロウ質の被覆の少ないと思われる変異である（以下これをワックスレス変異という）。この変異は 11 系統のうち 4 系統のみに発生した。この変異はクマスギとマस्याマスギに、それぞれ、10 本と 8 本と比較的多く、ヒトヨシメアサとヤブクグリでは、それぞれ 2 本と 1 本が発生した。なお、ワックスレス変異はほとんどの場合に形態変異をとまっているのが特徴である。

形態変異として分類した体細胞突然変異も葉緑素変異と同様に変異の幅が広い。それがクマスギで特に著しく、針葉の着生角度が異なる変異、枝全体が伸長した変異、逆に縮小した変異、針葉の太いもの、針葉が長くなる変異、その他種々の奇型を呈するものなどが誘起された。形態変異の体細胞突然変異はすべての系統で発生した。とくに、クマスギ、サンブスギ、およびモトエスギ等に多く発生した。形態変異は、一部のクローンを除いては、葉緑素変異に比較して頻度が少ない。

普通、スギの針葉は春から秋まで緑色であるが、冬期には黄褐色ないし赤色に変色する。放射線照射によってその系統の通常の冬期変色とは異なる変色を示した体細胞突然変異が検出された。この冬期変色の変異には 2 種類が認められ、深紅になるもの（以下冬期赤変という）と冬期でも緑色を失わないもの（以下冬期緑色という）が見い出された。

冬期赤変の変異はクマスギ、サンブスギ、およびメアサの 3 系統にのみ発生した。クマスギの冬期の変色は黄褐色となるので、冬期赤変の変異は容易に判定できた。サンブスギの冬期の色は赤色であるが、体細胞突然変異として発生した枝は赤色度が強く発現する。メアサは、冬期にあまり変色しない系統なので、容易に判定できた。冬期赤変の体細胞突然変異はさし木 11 系統中、3 系統に 4 本発生したにすぎなかった。

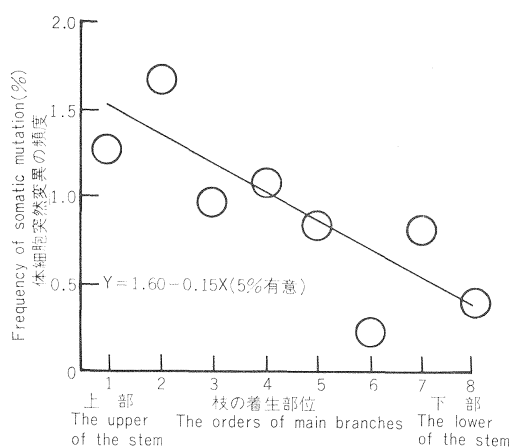
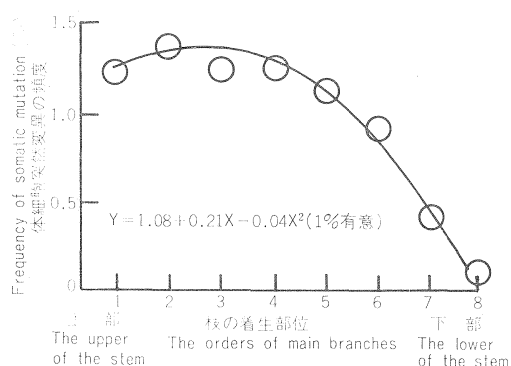
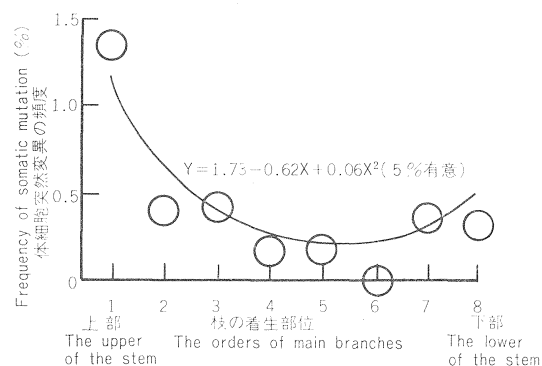
Table 4. クマスギの実生苗およびさし木苗の体細胞突然変異の種類
Kind of somatic mutation of seedlings and cuttings of *Kumasugi*,
Cryptomeria japonica D. Don

系 統 Cultivar	枝変り数 No. of somatic mutation	体細胞突然変異の種類 Kind of somatic mutation					
		葉 緑 素 Chloro- phyll	ワックス レス Waxless	形 態 Mor- phology	冬期赤変 Red-sugi in winter	黄金型 White primary leaves	斑入り Varie- gation
クマスギの自然受粉種子苗 Open-pollinated seedlings of <i>Kumasugi</i>	227	96	51	67	2	1	2
クマスギ×クモトオシ F_1 苗 F_1 seedlings of <i>Kumasugi</i> × <i>Kumotoosi</i>	36	21	6	7	0	0	0
クマスギ (さし木苗) Cuttings of <i>Kumasugi</i>	81	45	10	20	1	1	1

冬期緑色の変異はさし木 11 系統中、7 系統に発生した。この変異の頻度は冬期赤変の変異と同様に少なく、クマスギで 3 本、メアサ、ヒトヨシメアサ、およびマサヤマスギでそれぞれ 2 本、サンブスギとモトエスギでそれぞれ 1 本が発生した。

その他の体細胞突然変異として、園芸品種の黄金スギに似た変異で新条が発生する時のみ白色ないし黄色を呈し、後に正常の緑色を呈するもの（以下この枝変りを黄金型という）がクマスギとアヤスギにそれぞれ 1 本発生した。

また、クマスギで、斑入りの変異が 1 本発生した。この斑入りの体細胞突然変異はさし穂が取れるまでには生長せず、せいぜい 5 cm 程度であった。

Fig. 2 *Motoesugi*Fig. 1 *Kumasugi*Fig. 3 *Bokasugi*

クマスギの実生後代からの体細胞突然変異の種類および頻度は親のクマスギのさし木苗の場合とほぼ同様の傾向を示したが、クマスギ×クモトオシの F_1 苗では冬期赤変、黄金型、および斑入りの変異は誘起されなかった (Table 4)。

さし木 11 系統とクマスギの実生後代 2 系統で、一次枝の着生する部位により体細胞突然変異の頻度が異なり、これらの着生部位による頻度分布曲線は 3 つの型に分けられるようである。一次枝の着生部位を 8 つの区に分けた。すなわち、それぞれの区に照射発生した枝数を上部一次枝からほぼ均等に分け、各区の体細胞突然変異の頻度を Fig. 1~3 に示した。

3 つの型はそれぞれ、

1) 凸型放物線：クマスギ

2) 直線：モトエスギ、ヤブクグリ、マシヤマスギ、オキノヤマスギ、メアサ、およびアヤスギ

3) 凹型放物線：ヒトヨシメアサ、ボカスギ、およびクマスギの自然受粉種子苗

なお、ヤメホンスギとクマスギ×クモトオシスギの F_1 苗は直線または二次曲線のいずれも統計的に有意差はなかった。

体細胞突然変異の頻度分布が凸型放物線を示すクマスギは幹の上部の枝から中部までの変異の頻度がほぼ一定し、一次枝着生の下部になるとその頻度は急に減少する。直線型を示す系統は上部の一次枝着生部位で頻度が高く、下部になるにしたがって直線的に減少した。凹型放物線を示す系統は枝の着生部位の上部で高い頻度を示すが、下部になると急に減少し、また、下部において頻度が高くなった。

以上のように、さし木および実生系統のそれぞれ 1 系統を除く 11 系統の枝の部位による体細胞突然変異の頻度分布が 3 つの型に分かれ、いずれの系統も幹の上部に着生した枝での変異の頻度が下部のそれと比べて統計的に有意に高い値を示しているのが特徴的である。しかし、これらの型と体細胞変異の頻度との間に一定の傾向はみられなかった。

第 2 節 放射線の照射線量による体細胞突然変異の頻度のちがい

1. 材料と方法

供試木として、体細胞突然変異が誘起されやすいクマスギの 2 年生さし木苗を昭和 39 年 4 月 18 日に、それぞれ径 30 cm の素焼鉢に 1 本ずつ植えた。

照射は同年にコバルト 60 (2,000 キュリー) とセシウム 137 (130 キュリー) の 2 種類の線源を使用し、コバルト 60 はガンマー線照射は場、セシウム 137 の照射はガンマー線照射温室で行なった。線量率はいずれも 1 日 20 時間照射で、1 日 50R であり、ガンマー線照射は場、およびガンマー線照射温室では、それぞれ線源より 19.5 m、および 5 m の距離で照射を行った。照射は 10 月 6 日から 11 月 7 日まで、100R から 1,000R までは 100R きざみで、1,200R からは 200R きざみで 1,600R までとし、各照射線量別に 2~4 本の苗木を使用した。また、同年の 5 月 29 日から 6 月 13 日までと、7 月 15 日から 8 月 1 日まで、および 10 月 6 日から 10 月 31 日までの 3 時期に 0~800R を 100R おきに照射を行い、低線量での体細胞突然変異の発生について実験を行った。なお、照射線量率と材料は上記と同じであるが、供試本数は線量当り 6~8 本とした。

体細胞突然変異の検出は次のように行った。10 月に照射した場合には、放射線による組織の障害からの修復は翌年になるので、照射翌年に調査した。また、5 月から 6 月まで、7 月から 8 月にかけて照射を行ったものにたいしては、照射当年と翌年まで変異の検出につとめた。体細胞突然変異の判定の方法は第

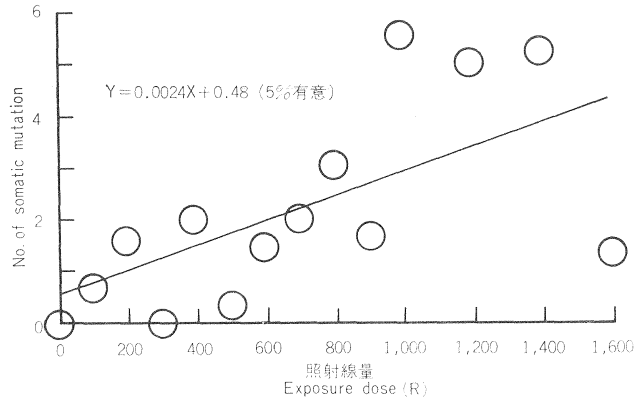


Fig. 4 苗当りの体細胞突然変異の頻度分布
Frequency distribution of somatic mutation per plant.

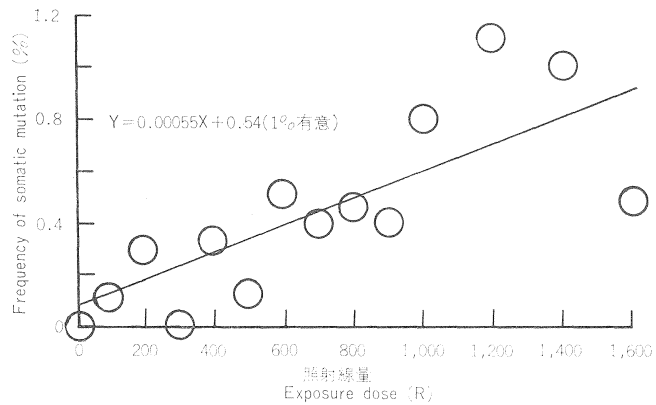


Fig. 5 照射後発生した枝当りの体細胞突然変異の頻度分布
Frequency distribution of somatic mutation per flashed shoot after irradiation.

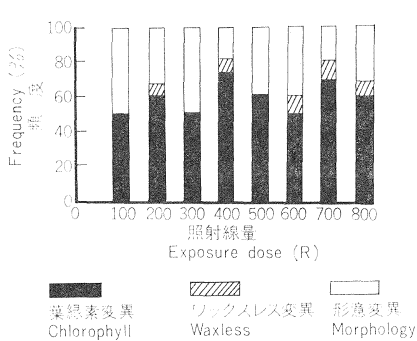


Fig. 6 線量別による体細胞突然変異の種類の頻度の違い
Differences of the kinds of somatic mutation by exposure doses.

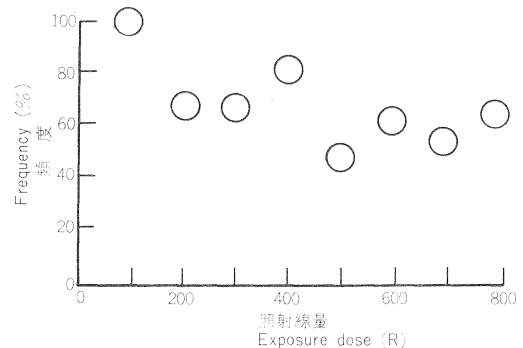


Fig. 7 線量別による葉緑素変異の区分キメラの頻度分布
Frequency distribution of sectorial chimera of chlorophyll mutation by exposure doses.

1 節で述べたとおりである。

2. 実験結果

10 月に 1,600R まで照射した結果は Fig. 4 および 5 に示した。体細胞突然変異の頻度は苗当りでも、また、照射後に発生した枝当りの頻度でも、ほぼ同じような傾向を示した。体細胞突然変異の頻度は線量が増加するにつれて直線的に高くなった。しかし、最高の照射線量である 1,600R では苗当りおよび枝当りの頻度はわずかに減少する傾向もあるように思われる。

Fig. 6 に示したように、各線量による体細胞突然変異の種類別の頻度は照射線量によって多少増減しているが、一定の傾向は認められなかった。葉緑素変異が全体の 50%、もしくはそれ以上を含み、ワックス変異は 5~10% 程度であった。残り 40~45% は針葉形態変異等であった。

放射線照射によって発生した体細胞突然変異のうち、葉緑素変異が最も検出しやすく、また、それが完全に変異しているか、また、区分キメラであるかを調べるにも、最も適当である。Fig. 7 に示したように、線量によって区分キメラ（斑点としての変異を含む）の割合は多少異なり、100R ではすべての葉緑素変異が区分キメラであるが、それ以上の線量ではほぼ 60% の区分キメラであった。スギの体細胞突然変異の区分キメラは広葉樹のそれが小さなセクターとなっているのに比べて、変異量が大きく、斑点としての変異はごく少数しか見られなかった。

第 3 節 放射線の照射時期による体細胞突然変異の頻度のちがい

1. 材料と方法

昭和 40 年春にクマスギの 2 年生さし木苗を直径 30 cm の素焼鉢に 3 本植えとして実験に供した。

放射線照射はその年の 6 月 13~18 日、8 月 5~12 日、および 10 月 6~13 日の 3 時期にガンマー線照射は場で 1 日 100R、総線量 600R の単一線量を照射した。照射にあたり放射線障害から根を保護するために鉢を土中に埋めた。

供試本数は無照射の 2 本を含め、6 月の照射と 8 月の照射にそれぞれ 33 本ずつ、および 10 月の照射に 27 本で合計 95 本を用いた。

2. 実験結果

クマスギのさし木苗 93 本を照射して、合計 301 本の体細胞突然変異が生じた。無照射苗には体細胞突然変異は全然生じなかった。

Table 5. 時期別照射による体細胞突然変異の頻度
Frequency of somatic mutation following different irradiation seasons

照射時期 Irradiation season	供試苗数 No. of plant irradiated	体細胞突然変異数 No. of somatic mutation	照射後発生した枝数 No. of flashed shoots after irradiation	苗当りの体細胞突然変異 No. of somatic mutation per plant	枝当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per shoot (%)
6 月 June	88	86	6,320	2.6	1.36
8 月 August	33	145	3,800	4.4	3.82
10 月 October	27	70	11,755	2.6	0.60

Table 5 に示したように、各照射時期のうち、変異の頻度が高いのは8月照射で、照射後発生した枝当りの頻度は6月の照射の約2倍、および10月の照射の約6倍であった。また苗当りの頻度も8月の照射で高かった。6月の照射では照射を行ったその年のうちに苗木は放射線障害から修復し、体細胞突然変異を検出できるという有利な面がある。6月の照射では変異は1本の苗より平均2.6本生じ、10月の照射による変異の頻度と同程度であった。しかし、10月の照射では、照射された苗木の放射線障害からの修復は翌春になるという不利な点がある。10月の照射では、6月の照射と比較して、照射後修復して発生する枝数が多く、照射後に発生した枝当りの体細胞突然変異の頻度は6月の照射に比較して約半分の発生率を示した。

体細胞突然変異の種類別の頻度は Table 6 および Table 7 に示したように、それらの頻度は照射する時期により異なった。6月の照射では葉緑素変異が46.5%、ワックスレス変異が24.5%、および残り29.1%が形態変異で、葉緑素変異が全体の半数近くを占めた。8月照射では葉緑素変異はこの照射時期で生じた全部の変異の約1/4であり、残りの3/4はワックスレス変異と形態変異であった。これにたいし、10月の照射で発生した葉緑素変異の頻度は他の照射時期の頻度よりも高く、ワックスレス変異の頻度が少ない傾向がみられた。

Table 6. 時期別照射による体細胞突然変異の種類
Kind of somatic mutation following different irradiation seasons

照射時期 Irradiation season	体細胞突然変異の種類 Kinds of somatic mutation			
	葉 緑 素 Chlorophyll	ワックスレス Waxless	形 態 Morphology	計 Total
6 月 June	40 (46.5%)	21 (24.4%)	25 (29.1%)	86 (100%)
8 月 August	38 (26.2%)	56 (38.6%)	51 (35.2%)	145 (100%)
10 月 October	46 (65.7%)	9 (12.9%)	15 (21.4%)	70 (100%)

Table 7. 時期別照射による体細胞突然変異の種類および頻度
Kind and frequency of somatic mutation following different irradiation seasons

照射時期 Irradiation season	葉 緑 素 Chlorophyll		ワックスレス Waxless		形 態 Morphology	
	苗当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per plant	枝当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per shoot (%)	苗当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per plant	枝当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per shoot (%)	苗当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per plant	枝当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per shoot (%)
6 月 June	1.2	0.63	0.6	0.33	0.8	0.40
8 月 August	1.2	1.00	1.7	1.47	1.5	1.34
10 月 October	1.7	0.39	0.3	0.08	0.6	0.13

第 4 節 施肥量の多少による体細胞突然変異の頻度のちがい

1. 材料と方法

材料はクマスギのさし木苗を用いた。昭和 40 年春にさし木を行い、翌年 4 月 20 日に肥料分の少ないと思われる関東ロームの赤土を直径 30 cm の素焼鉢に入れ、1 鉢当り 3 本植えとして実験に供した。

施肥は 5 月 7 日に行い、無、中、および多肥区の 3 段階とし、それぞれの鉢にマルリンスーパー 12 号肥料（市販：アンモニア性窒素 13%，可溶性磷酸（その内、水溶性磷酸 14.5%）17%，および水溶性加里 12.0%）を、16.6 g および 59.8 g ほどこした。

放射線照射線量はガンマー線照射は場において 1 日 75R で、0, 300, 600, および 900R を照射した。照射に供した鉢は線源より 23.4 m の距離におき、それぞれの鉢を完全に土中に埋め、根を放射線障害から保護した。なお照射は昭和 41 年 8 月 5 日から 18 日にかけて行った。

無肥にした鉢は照射した翌年に肥料（マルリンスーパー 12 号）を 16.6 g をほどこして、枝葉の発生をうながし体細胞突然変異の観察につとめた。中肥区および多肥区では照射当年にいずれの照射線量でも新しい枝葉が発生し、同年内に体細胞突然変異を観察することができた。

2. 実験結果

Table 8 に示したように、無肥区では照射後に発生した枝数は無照射の場合が最も多く、苗当り平均 79 本であった。ついで、300R の平均 58 本、600R の平均 40 本、および 900R の平均 4 本であった。これにたいして、中肥および多肥区ともに 600R で枝数が最も多く、ついで 300R、無照射、および 900R の順であり、肥料と放射線の影響の交互作用が著しい。

苗当りの体細胞突然変異の頻度は無肥区および中肥区とも 600R で最も高く、多肥区では 300R で最も高く、ついで、600R および 900R の順であった。

照射後発生した枝数が照射線量によって大きく異なるために、線量と照射後発生した枝当りの体細胞突

Table 8. 施肥量の違いによる体細胞突然変異の頻度
Frequency of somatic mutation following different amount of fertilization

施肥量 Amount of fertilization	照射線量 Irradiation dose (Roentgen)	供試苗数 No. of plants irradiated	体細胞 突然変異数 No. of somatic mutation	照射後発生 した枝数 No. of flashed shoots after irradiation	苗当りの体細胞 突然変異 Somatic mutation per plant	枝当りの体細胞 突然変異 Somatic mutation per shoot (%)
無肥料 Non- fertilization	0	25	0	1,035	0	0
	300	24	8	1,314	0.33	0.6
	600	24	11	958	0.46	1.2
	900	24	0	95	0	0
中肥料 Medium	0	27	0	754	0	0
	300	24	9	1,458	0.38	0.8
	600	24	11	1,657	0.46	0.7
	900	24	2	176	0.08	1.1
多肥料 Large	0	25	0	809	0	0
	300	24	21	1,476	0.86	1.4
	600	23	14	1,835	0.61	0.8
	900	24	2	224	0.08	0.8

Table 9. 施肥量の違いによる体細胞突然変異の頻度
Frequency of somatic mutation following different amount of fertilization

施肥量 Amount of fertilization	供試苗数 No. of plants irradiated	照射後発生した枝数 No. of flashed shoots after irradiation	体細胞突然変異数 No. of somatic mutation	苗当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per plant	枝当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per shoot (%)
無肥料 Non-fertilization	72	2,367	19	0.26	0.80
中肥料 Medium	72	3,291	32	0.44	0.97
多肥料 Large	71	3,547	37	0.52	1.04

然変異の頻度との関係は非常にばらついた。Table 9 に示しているように、線量をこみにした場合には、肥料を多く与えることによって変異の頻度が高い傾向を示している。また、苗当りの頻度も多肥になるほど高くなった。

第5節 剪定の有無による体細胞突然変異の頻度のちがい

1. 材料と方法

昭和40年春にクマスギの2年生さし木苗を直径30cmの素焼鉢に3本植えとし、1処理10～11鉢として実験に供した。

照射はガンマー線照射場で、1日100Rで600Rの単一線量を照射した。照射は6月13～18日、8月5～12日、および10月6～13日の3時期に行った。照射の際には根を保護するために鉢を土中に埋めた。

剪定は照射終了当日に行い、無、弱、および強剪定の段階とした。無剪定は照射後の対照としてそのまま、弱剪定は照射後に幹の先端の2～3の一次枝を残して、それから下部のすべての茎頂分裂組織を2～3cmのところより切り落した。強剪定は幹の先端の2～3の一次枝を残し、それから下部の一次枝を幹の着生部より2～3cm以内のところまで切り落した。弱および強剪定のどちらも幹の先端に残した一次枝を除いては新しい枝葉がすべて腋生分裂組織から発生するようにした。

6月の照射では、年内に新しい枝葉が発生し、体細胞突然変異を観察できるので枝数も年内に出た枝数を数え、枝当りの体細胞突然変異の頻度を計算した。8月の照射では年内に3～4cm程度しか生長せず、翌年になってから照射後発生した枝数を調査した。また、10月の照射では年内に新しい枝葉は発生しないので、すべて翌春から秋にかけて体細胞突然変異の検出につとめた。

2. 実験結果

Table 10 に示したように、剪定によって照射後発生した枝数はどの照射時期においても無剪定区と比較して減少している。6月の照射では照射後に発生した枝数が弱剪定区で無剪定区の約1/3および強剪定区で1/4と減少した。8月の剪定では、弱および強剪定区の枝数は無剪定区に比較して、それぞれ、1/2および1/3と減少した。また、10月の照射でも同様、弱および強剪定区の枝数は無剪定区に比較して、それぞれ、1/5および1/7と減少した。

Table 11 に示したように、強い剪定を行なうほど苗当りの体細胞突然変異の頻度が低かった。無剪定

Table 10. 異なる剪定処理および照射時期による枝の発生本数
Number of shoot following different pruning treatments and irradiation seasons

照射時期 Irradiation season	剪定処理 Pruning treatment	照射個体数 No. of plant irradiated	照射後発生した全枝数 Total No. of flushed shoots after irradiation	平均枝数 Mean No. of shoot
6 月 June	無剪定 No pruning	33	6,320	192
	弱剪定 Light pruning	33	2,036	62
	強剪定 Heavy pruning	33	478	14
8 月 August	無剪定 No pruning	33	3,800	115
	弱剪定 Light pruning	33	1,818	55
	強剪定 Heavy pruning	33	1,185	36
10 月 October	無剪定 No pruning	27	11,755	435
	弱剪定 Light pruning	27	1,968	91
	強剪定 Heavy pruning	24	1,209	59

Table 11. 苗および枝当りの体細胞突然変異の頻度
Frequency of somatic mutation per plant and shoot

照射時期 Irradiation season	剪定処理 Pruning treatment	苗当り体細胞突然変異数 No. of somatic mutation per plant	枝当り体細胞突然変異 Somatic mutation per shoot (%)
6 月 June	無剪定 No pruning	1.7	0.9
	弱剪定 Light pruning	0.8	1.3
	強剪定 Heavy pruning	0.4	1.0
8 月 August	無剪定 No pruning	2.7	2.4
	弱剪定 Light pruning	1.0	1.8
	強剪定 Heavy pruning	0.8	1.8
10 月 October	無剪定 No pruning	1.7	0.4
	弱剪定 Light pruning	0.5	0.7
	強剪定 Heavy pruning	0.4	0.7

区の苗当りの体細胞突然変異の頻度はどの照射の時期でも高く、ついで弱および強剪定の順となった。しかし、照射後に発生した枝当りの体細胞突然変異の頻度は6月照射では無剪定区が0.90%、弱剪定区が1.28%、および強剪定区が1.05%で、弱剪定区の枝当りの頻度が最も高かった。8月の照射では無剪定区の頻度が高く、2.37%であった。また、弱および強剪定区はそれぞれ1.82%と1.86%であった。10月の照射区では剪定区の頻度が高く、無剪定区が剪定区のほぼ半分であった。なお、無照射では変異は1本も発生しなかった。

しかし、上記の結果はすべて剪定区でも幹の上部の剪定を行わない一次枝の部分を含めての体細胞突然

Table 12. 苗の部位別の体細胞突然変異の頻度
Frequency of somatic mutation in relation to upper or lower crowns

照射時期 Irradiation season	剪定処理 Pruning treatment	樹冠部位 Crown position	全枝数 Total No. of branch	体細胞突然変異数 No. of somatic mutation	枝当りの体細胞突然変異 Somatic mutation per shoot (%)
6 月 June	弱剪定 Light pruning	上部 Upper*	528	19	3.60
		下部 Lower**	1,508	7	0.46
	強剪定 Heavy pruning	上部 Upper	308	4	1.30
		下部 Lower	273	1	0.37
8 月 August	弱剪定 Light pruning	上部 Upper	724	28	3.87
		下部 Lower	1,094	5	0.46
	強剪定 Heavy pruning	上部 Upper	1,043	22	2.11
		下部 Lower	142	0	0
10 月 October	弱剪定 Light pruning	上部 Upper	1,398	14	1.00
		下部 Lower	570	0	0
	強剪定 Heavy pruning	上部 Upper	1,049	9	0.86
		下部 Lower	160	0	0

*: 無剪定 No pruning,

**: 剪定 Pruning.

変異の頻度である。Table 12 に示したように、切り残した部分と剪定した部分の体細胞突然変異の頻度を比較してみると、6月および8月の照射の弱剪定区で切り残した部分での頻度は、それぞれ、3.60%と3.87%であった。これにたいして、6月および8月照射区の切り取った部分での頻度は0.46%であった。6月および8月の照射の弱剪定を行った部分での頻度は無剪定区の1/8に減少した。強剪定を行った部分からの体細胞突然変異は6月の照射区では1本も発生しなかった。このように、剪定を行うことにより体細胞突然変異の頻度は著しく減少した。

考 察

第1節に示したように、スギのさし木系統とクマスギの2つの実生系統に放射線照射を行った結果、それぞれの系統の産地による体細胞突然変異の頻度は地理的差によって一定の傾向は認められないようである。

一般に、放射線処理による体細胞突然変異は染色体の欠失により生ずると考えられている。系統間で放射線処理による体細胞突然変異の頻度が異なる原因として、その系統が多くの遺伝子をヘテロで持っているかどうか、その1つの原因と考えられる。つまり、ヘテロ遺伝子型で優性遺伝子の座乗する部分の欠失が生ずれば、劣性形質が発現されることになる。なお、大きな欠失は染色体異常や形態異常を発生するものと考えられる。

照射材料が多くの遺伝子をヘテロで持っている方が、体細胞突然変異が多く発生しやすいことは当然である。

放射線照射によって発生した体細胞突然変異がヘテロ個体から欠失あるいは劣性突然変異により生じたとすれば、照射によって発生したと同じ変異体が照射した同一個体の自家受精により、劣性遺伝子のホモ

として分離するはずである。現在のところ、スギの遺伝子分析は十分には行われていない。そのために、放射線照射によって発生した体細胞突然変異の大部分が劣性突然変異によって発生したものであるかどうかは明らかではないが、そのような劣性遺伝子を保有していることを暗示するものである。

その事例として、クマスギの自家受精の結果¹⁶⁾、うすみどりの苗と黄金スギに似た変異体が劣性ホモとして分離してきた。その他の葉緑素欠乏による変異体は分離しなかった。Table 3 に示したように、クマスギのさし木苗の照射によって発生した体細胞突然変異の内、半数以上が葉緑素に関する変異であった。

また、サンプスギ、メアサ、モトエスギ、マスマスギ、およびボカスギ等のさし木苗の自家受精によって葉緑素に関する劣性遺伝子による変異苗は分離しない（大庭および村井：未発表）。

スギに放射線を照射することによって発生する体細胞突然変異の頻度は苗木の枝の着生部位、照射の時期、および剪定の種類によって異なった。また、施肥の多少によっても異なる。苗木の枝の着生部位別の体細胞突然変異の頻度は幹の上部に着生する一次枝において高く、下部の枝において低かった。照射時期によって体細胞突然変異の頻度がちがひ、8月の照射で最も高く、ついで、6月および10月の照射の順であった。また、剪定を強く行うほど体細胞突然変異の頻度の減少がみられた。このようなちがひについて、つぎのような原因が考えられる。すなわち、スギの体細胞突然変異は染色体変異に起因した変異が比較的多いと思われる。

- 1) 体細胞突然変異のほとんどは染色体欠失により生ずると言われている（NYBON および KOCK¹⁸⁾）。
- 2) Table 13 に示しているように、多くの体細胞突然変異体の花粉稔性が、照射しても変異しなかった枝からの花粉稔性と比較して、低いということから、これらの変異体の大多数は染色体変異によるものであり、一部が劣性突然変異によるものと思われる。

Table 13. スギの体細胞突然変異体の正常花粉率
Rate of normal pollens of somatic mutation in *Cryptomeria japonica*

番 号 Number	系 統 Cultivar	体細胞突然変異体の種類 Kind of somatic mutation	正常花粉率 (%) Rate of normal pollens	
			対 照 Control	体 細 胞 突然変異体 Somatic mutation
1	クマスギ <i>Kumasugi</i>	形 態 Morphology	93.6	44.7
2	クマスギ <i>Kumasugi</i>	形 態 Morphology	87.2	14.9
3	クマスギ <i>Kumasugi</i>	形 態 Morphology	—	96.8
4	クマスギ <i>Kumasugi</i>	形 態 Morphology	86.9	62.3
5	クマスギ <i>Kumasugi</i>	形 態 Morphology	36.7	33.8
6	クマスギ <i>Kumasugi</i>	形 態 Morphology	98.4	36.7
7	クマスギ <i>Kumasugi</i>	形 態 Morphology	98.1	10.2
8	クマスギ <i>Kumasugi</i>	ワックスレス Waxless	45.9	94.3
9	クマスギ <i>Kumasugi</i>	ワックスレス Waxless	98.3	9.4
10	クマスギ <i>Kumasugi</i>	冬 期 緑 Green in winter	—	97.3
11	クマスギ <i>Kumasugi</i>	冬 期 緑 Green in winter	99.4	95.8
12	クマスギ <i>Kumasugi</i>	黄 金 型 White primary leaf	97.9	95.8
13	クモトオシ <i>Kumotoosi</i>	形 態 Morphology	93.0	24.4
14	クモトオシ <i>Kumotoosi</i>	葉 緑 素 Chlorophyll	99.5	50.7
15	タデヤマスギ <i>Tateyamasugi</i>	ワックスレス Waxless	96.8	34.1

そのために、細胞分裂速度が速く、また、より短期間に放射線障害から修復できる条件において変異細胞と正常細胞間の競争がはげしいため、優劣がつきやすく、変異細胞が一枝完全に変異した体細胞突然変異、つまり枝変りとして観察できるまでに生長する機会が生ずるのであろう。しかし、第1節で述べたように、凹型放物線を示す、ヒトヨシメアサ、ボカスギ、およびクマスギの自然受粉種子苗では、頂部とともに地際近くで体細胞突然変異の頻度が若干高くなった。これらのスギの下枝が張っており、そのため、幹の上部の枝と同じような萌芽能力をもっているものと考えられる。このことが体細胞突然変異の頻度を高める原因と考えられる。また、体細胞突然変異の発生頻度は、障害からの修復が短期間に終わる状態、多施肥にした場合、また無剪定において高くなるものと思われる。

第2章 茎頂分裂組織の放射線障害ならびに組織の修復と 体細胞突然変異の誘起

放射線照射によって枝変りが発生することは多くの研究者により報告されている。しかし、体細胞突然変異のキメラに関連して、その照射個体の生長点組織の放射線障害ならびにその放射線障害からの新たな生長点組織の修復については報告が少ない。

本実験では、スギの体細胞突然変異が区分キメラや斑点として発生する割合が低い理由の原因究明のために放射線障害と組織の修復の2つの面について解剖的観察を行い、体細胞突然変異の区分キメラの発生について考察を行った。

第1節 茎頂分裂組織の修復

1. 材料と方法

クマスギの2年生さし木苗を直径30 cmの素焼鉢に3本植えとし、12鉢、36本を実験材料に供した。

照射はガンマー線照射場のコバルト60により、1日100Rで線量を、0、300、600、および900Rとして照射した。照射は昭和42年6月20～30日の間に行った。

茎頂分裂組織等の解剖学的観察に供した材料は照射終了当日から、各線量とも40日後まで1日おきに1処理10個の生長点の試料を採取した。採取した試料は、ただちにクラフⅢ液に24時間固定後、5～6時間流水で洗い、ランドローフシリーズの処理を通して脱水後、硬パラフィンに包埋した。切片は10～20μの厚さにミクロトームで連続切片とし、キシロールで脱パラフィンを除去した。ついで濃度水準のことなるエチルアルコールで順次水までもっていき、サフラニンで5～10分染色後水洗し、先と逆の行程によりエチルアルコールで徐々に脱水し、ファストグリーンで10～30秒染色した。そのあと脱水し、キシロールを通して、最後にバルサムで封じて検鏡に供した。

2. 実験結果

サフラニンは通常細胞核や木部を染色する。しかし、放射線障害を受けた組織の細胞核はサフラニンによって染色されにくくなる。また、ファストグリーンは細胞膜や細胞質を染色する。しかし、サフラニン同様、放射線障害を受けた組織の細胞膜や細胞質は染色されなくなる。また、障害をうけた細胞膜や細胞質はサフラニンによって過染されるようになる。

（1）300R 照射

300Rを照射したクマスギの茎頂分裂組織と腋生分裂組織は、照射を終わった当日では正常であった（Photo. 1）。

照射終了後 2 日目になるとわずかながら放射線障害が現われ、葉原基にサフラニンが集積し始め、茎頂分裂組織のドーム内の細胞が少し壊死し始めるが、まだほとんどの茎頂分裂組織と腋生分裂組織は正常である (Photo. 2)。

照射終了後 4～8 日目になると障害の著しい場合は茎頂分裂組織が完全に壊死して、肉眼でも観察できる。しかし、ほとんどの茎頂分裂組織は頂端細胞群が障害を受け (Photo. 3)、ドームの中央が沈んで平らになり始めている (Photo. 4)。

照射終了後 10～14 日目まで放射線照射後 4～8 日目に観察されるような障害と変らない。この期間まではまだ組織の修復は全然観察されない。

照射終了後 16 日目以後は放射線障害を受けた組織がしだいに修復に向かっており、茎頂分裂組織のごく一部の細胞および核がサフラニンによって濃染するものや、また、茎頂分裂組織の修復のきざしが観察される (Photo. 5)。ついで、茎頂分裂組織の一部細胞から小さな突起が発生し (Photo. 6)、その突起が葉原基を形成し、新しい茎頂分裂組織を形成した (Photo. 7)。

(2) 600R 照射

照射終了当日の茎頂分裂組織は 300R を照射したものに比べて、放射線障害が著しく、茎頂分裂組織はすべてサフラニンが集積して、細胞質と核とが判別できないほどである。

照射後 4～8 日目になると、ほとんどの茎頂分裂組織の組織の頂端細胞群の壊死により致死細胞線 (Photo. 3) が形成されている。放射線障害の進行程度は 300R 照射の程度と大きな違いが認められない。

照射終了後 10～24 日頃までが放射線による障害の最終段階で、障害の程度も大きくなっている。一部の茎頂分裂組織は完全に壊死している。

300R を照射したスギ苗の茎頂分裂組織は照射終了後 16 日目以降より、組織の修復を始めた。それに対し、600R を照射した苗の茎頂分裂組織の修復は遅れ、照射終了後 1 か月後くらいより急に組織の修復が始まった。300R を照射した茎頂分裂組織で観察されたと同様、茎頂分裂組織の一部の細胞より小さな突起として、修復した茎頂分裂組織 (Photo. 5～7) や、また、茎頂分裂組織が完全に壊死して、その茎頂分裂組織の下で葉腋の分裂組織より修復を始め、それが 1 つの茎頂を形成する場合 (Photo. 8) も多く観察された。300R を照射したスギ苗に比較して茎頂分裂組織が完全に壊死して、腋生分裂組織から修復し、茎頂が形成される場合も多いようである。

(3) 900R 照射

900R 照射では、300R および 600R を照射したものに比べ障害が著しく、照射終了当日にすでに茎頂分裂組織が完全に壊死しているものも観察される。

放射線による茎頂分裂組織の障害の発現順序として、低線量で観察されたように、はじめ葉原基にサフラニンが集積し始め、ついで、頂端細胞群の細胞の壊死が起こる。ついで、茎頂分裂組織の中央がしだいに平らになるという順序をとるのが一般的ようである。900R の照射終了後 4 日目になると、頂端細胞群が壊死し始め、ドームが平らになる。

照射終了後 30～32 日目頃までは組織の修復は見られない。完全に壊死した茎頂分裂組織の割合は 8～9 割と思われる。照射終了後 34～35 日目になると修復のきざしがみられ、ほとんどの茎頂分裂組織は完全に壊死しているので、葉腋分裂組織より新しい茎頂が発達する。茎頂分裂組織が壊死していない場合には、低線量で観察されたと同じような修復の方法をとるようである。

第2節 茎頂分裂組織の細胞核 DNA の不活性化と修復

1. 材料と方法

フォイルゲン反応により核染色を行った標本は実験 I で供したと同一の苗を用いた。

茎頂分裂組織等のサンプリングは照射終了当日から1日おきに40日後まで行った。1回のサンプリングは1処理10個を取った。サンプリング後、すぐにアレン液(クロム酸1g, 氷酢酸1cc, 尿素0.5g, および蒸留水100cc)で48時間固定した。固定後6~8時間流水で洗い、ランドローフシリーズを通して脱水し、硬パラフィンに包埋した。切片は10~20 μ の厚さにミクロトームで連続切片とし、その後、キシロールでパラフィンを除去した。エチルアルコールで水溶液の濃度別処理により順次水までもっていき、流水で5分洗い、1規定塩酸60°C中に5分間入れて組織の解離を行った。ついで、急に冷水に入れて解離を中止させ、ついで、フォイルゲン液で40分~1時間半染色した。その後、蒸留水20cc, 10%異性亜硫酸水溶液10cc, および1規定塩酸10ccの混合液に10分ずつ3回浸漬後、蒸留水で洗い、エチルアルコールで脱水し、キシロールを通じて、最後にバルサムで封入し検鏡に供した。

フォイルゲン反応は一名核染色反応、ヌクレアル反応とも呼ばれている。DNAは酸による加水分解によりきわめて容易にプリンを遊離し、同時にデオキシリボースのアルデヒド基も遊離する。このデオキシリボースのアルデヒド基がフクシンと反応して赤紫色となり、DNAの存在場所を染色すると言われている。

2. 実験結果

(1) 300R 照射

照射終了当日の茎頂分裂組織の細胞核は、正常に染色されている(Photo. 9)。照射終了後2~4日目になると少しずつ障害が現われ始め、茎頂分裂組織の2~3割程度は核がわずかに淡く染色されている。照射後6~14日目になると、フォイルゲン反応により核が染色されたものが、染色されず、顕微鏡下で茶褐色として見える。また、しだいに茎頂分裂組織のドームが平らになってくる。照射後16日目頃より、障害を受けた茎頂分裂組織からの修復が始まり、茎頂分裂組織の一部が強く染色され始める。その後、突起として発達した茎頂分裂組織の原基が顕微鏡下で観察できる。

(2) 600R 照射

600Rを照射した場合にも、300Rを照射した場合と同様に、照射後の日数が浅いと大きな障害は少なく、正常な茎頂分裂組織が観察される。しかしながら、照射後4日目頃より、核が茶褐色となり始め、細胞質も核も染色されないものが観察される(Photo. 10)。

照射後30日目までは細胞の修復が認められず、半数もしくはそれ以上の茎頂分裂組織が平らになっている。その後、完全に壊死しなかった茎頂分裂組織は修復に向かい、ドームの少数の細胞がフォイルゲン反応により濃染し、ついで、小さな突起として修復した茎頂分裂組織が形成される。茎頂分裂組織が完全に壊死した場合には、下方の葉腋の腋生分裂組織より新しい茎頂が形成される。

(3) 900R 照射

フォイルゲン反応により核染色を行った場合とサフランインとファストグリーンの二重染色を行った場合には、障害の反応が多少異なるように思われる。フォイルゲン反応では、まず第一に染色されなくなるのは髄状分裂組織や葉原基の核である。900Rでは照射終了当日でも葉原基や髄状分裂組織の核が染色しなくなる。

初め、髄状分裂組織や葉原基の核のみがフォイルゲン反応により染色しなかったものが、しだいに茎頂分裂組織の全部にゆきわたり、茎頂分裂組織の細胞は細胞質と核とが判別できないように紫色に染色される。

照射終了後 34～35 日頃になると障害を受けた組織は修復に向い、一部の細胞が活性化して、フォイルゲン反応により染色し始める。その後、突起として修復した茎頂分裂組織が形成される。また、茎頂分裂組織が完全に壊死した場合には、葉腋の腋生分裂組織より修復した茎頂が形成される。腋生分裂組織より修復した茎頂は照射したスギ苗を肉眼の観察によって見い出すことができる (Photo. 11)。

考 察

1. 茎頂分裂組織の放射線照射による障害と組織の修復について

茎頂分裂組織の放射線照射と修復に関しては、マツとイチイで DONINI¹⁹⁾ と MICKCHE 等²⁰⁾ がそれぞれ報告している。これらの報告でも、茎頂分裂組織の中で、放射線感受性の高い組織は茎頂細胞群であることは一致している。

PRATT²¹⁾ は果樹で放射線障害からの修復の方法として、つぎの 3 つを観察している。

1) 分裂組織の正常細胞が放射線障害を受けた細胞をおしつぶし、回復した分裂組織が再び生長を開始する。障害を受けて壊死した細胞は修復した新しい分裂組織内に致死細胞線として残る。

2) 分裂組織の一部より修復した分裂組織ができ、壊死した細胞は修復した分裂組織内ではなく、障害を受けた組織内に残る。

3) 腋生分裂組織から修復した分裂組織が発生する。

スギの場合には、上記の 1) の修復の方法は観察されなかった。スギでは茎頂分裂組織の細胞の一部が壊死して、致死細胞線ができたときには、上記の 2) の修復の方法である分裂組織の一部より修復した分裂組織が発生し、壊死細胞は修復した分裂細胞内ではなく、障害を受けた組織内に残る。また、スギでは他の植物とは異なり、苗の致死量の 1/10 程度の線量 (300R) という低い線量でも茎頂分裂組織内の少数細胞から組織の修復が起こる。

また、同線量でも、茎頂分裂組織が完全に壊死し、下方の腋生分裂組織から修復した新しい茎頂を形成する。これ以上高い線量 (600R および 900R) でも、やはり新しい茎頂の形成を行う。このように、スギは放射線照射線量の広い範囲にわたって障害からの修復が行われ、修復細胞が茎頂分裂組織のごく少数細胞から、または、少数細胞から形成されている腋生分裂組織から発生する性質をもっている。

2. スギでは区分キメラの体細胞突然変異が少ない理由について

体細胞突然変異として可視的に発現される変異は照射された時点では細胞単位で誘起される。しかし、肉眼で観察できるまでに発育しなければ体細胞突然変異として検出できない。体細胞突然変異は茎頂分裂組織の少数細胞が集団として発育し、斑点となった変異、枝がセクター状に変異したもの (区分キメラ)、および枝全体が完全に変異している体細胞突然変異 (枝変り) として発生する。放射線によって変異した分裂細胞が、枝葉および花卉等に斑点として現われた場合、その変異が葉緑素欠乏および花色の変化であれば観察できるが、形態等が変異した細胞群が斑点として生じても、それを観察することはむずかしい。また、ごく少数細胞 (極端な場合は 1 個の細胞) から形成された斑点としての変異では葉緑素欠乏および花色の変北したものでも肉眼では観察できない。そのために、斑点のような変異ではなく、大きく変化した、または、完全に変異した体細胞突然変異 (枝変り) として発生させるために剪定という手段が用い

られている²²⁾²³⁾。

これにたいして、スギの苗木に放射線照射を行った場合に発生する体細胞突然変異は、その半数近くが完全に変異した『枝変り』である。また、区分キメラとして発生した体細胞突然変異も、大部分が大きく変異した区分キメラとして発生し、ごくまれに斑点としてのキメラの変異が出る程度である。これは生長点の修復に関係する細胞数が本来的に少数なためであろう。先にのべたように、スギを剪定することによって体細胞突然変異の頻度が減少する現象は萌芽能力をそこなうことが原因と考えられる。

剪定を行わずに、体細胞突然変異を大きく変異した区分キメラ、もしくは、完全に変異した『枝変り』として発生させる方法として、関口等²⁴⁾はキンギョソウを用いての実験結果を報告している。それによると、苗の致死線量の約 1/2 以上の高い線量を照射により、腋芽もしくは副芽の細胞群に放射線障害を与えたのち、修復により新しく発生した腋芽、副芽、および不定芽等の解剖的観察により、ごく少数細胞から発生することを観察している。このようにして発生した花卉の花色変異は完全に変異しているか、もしくは、大きな区分キメラになると報告している。

これにたいし、スギでは低線量の照射（苗の致死線量の約 1/10 程度）を行った場合にも区分キメラとしてではなく、完全に変異した『枝変り』を得ることができる。スギのように、低線量の照射を行っても完全に変異した『枝変り』が発生する例として、ヒノキおよびサワラがある。

スギで、なぜこのような完全に変異した『枝変り』が生じやすいかについては、放射線障害によって生長点組織がこわれたのち、極く少数細胞から新しい組織が発生することが原因である。また、冬芽を形成する樹種は、放射線照射によって頂芽が壊死した場合、下部の腋芽または副芽が新しい頂芽となる。この腋芽または副芽はすでに多くの細胞より形成されている。そのために、もし、腋芽または副芽の 1 個の細胞に突然変異が生じて、それは斑点または区分キメラの体細胞突然変異となる。また、先に PRATT²¹⁾がリンゴの分裂組織の修復の 3 つの方法を述べているが、これとはほぼ同様に、スギでも茎頂分裂組織の一部細胞から新しい茎頂が発生する。また、DONNI¹⁹⁾もマツで同様の現象を観察しているが、リンゴやマツではスギのように完全に変異した『枝変り』は多くは発生しない。このちがいは、スギはいわゆる冬芽を形成せず細胞分裂と肥大伸長を同時に行う生長点をもつ樹種であるためである (CROSS²⁵⁾)。冬芽を形成する樹種は一度分裂組織の原基を形成すると、主に、細胞の肥大伸長によって枝葉および花等を形成する。これらの樹種は低い線量で少数細胞から修復した茎頂分裂組織が発生するというような例は少ないと思われる。それゆえ、解剖的に観察された一部細胞からの修復した茎頂分裂組織もスギと比較して、多くの細胞から発生し、ひいては斑点もしくは区分キメラの体細胞突然変異として発生するものと思われる。これにたいし、スギでは他の樹種のように枝葉および花等の原基を形成せず、常に細胞の分裂と肥大伸長が同時に行われるので、変異細胞と正常細胞の競争と、とう汰がはげしく、組織形成の際に変異細胞と正常細胞のどちらの一方に片寄るものと思われる。そのために、スギでは区分キメラや斑点としての変異が少なく、完全に変異した体細胞突然変異（枝変り）の頻度が高いものと考えられる。

結 論

スギの体細胞突然変異を得るための育種研究として、放射線感受性の研究に引き続き、体細胞突然変異の頻度を左右する要因について実験を行い若干の知見を得た。また、スギでは他の植物と比較して、区分キメラや斑点としての変異が少なく、完全に変異した体細胞突然変異（枝変り）が多く発生する原因につ

いて解明した。

1. 体細胞突然変異の頻度を左右する要因

スギの系統により体細胞突然変異の頻度が異なり、その差は照射個体当たりでも、また、照射後発生した枝当たりでも 6～7 倍である。体細胞突然変異の頻度が系統によって異なる原因については明らかでないが、今後、実用的な体細胞突然変異を誘起するための一つの目安となると思われる。

放射線の照射線量が増加するにつれ、それと比例して体細胞突然変異の頻度がふえる。クマスギのさし木苗では体細胞突然変異は照射個体当たり 5 本、照射後発生した枝当たりでは約 1% が最高のものである。しかし、この枝変りの頻度は外的条件その他によって増加できるものと思われる。

一方、体細胞突然変異は、幹に着生する一次枝の部位により、照射の時期（季節）により、施肥の多少により、また剪定の程度により、それぞれ発生頻度が異なる。これはつぎのことが原因と考えられる。

スギの生長は冬芽を形成する樹種とは異なり、細胞分裂と伸長は同時に行われる。そのために、放射線照射によって分裂組織が障害を受けた後、修復するとき、他の樹種よりも正常細胞と変異細胞との競争（体細胞間の競争）が一層はげしいものと考えられる。このため、上述の要因、幹に着生する上部の一次枝、夏期の照射、多施肥、および無剪定の条件のもとでは変異細胞がキメラから一枝完全に変異したものまでに発育する機会が多くなる。また生長点細胞の構成数が少ないため、変異細胞がマスクされる割合が低いので、体細胞突然変異の頻度が高いものと思われる。

このように、肉眼で突然変異として判定できる体細胞突然変異を多く得るためには、多施肥、夏期の照射、大量の放射線照射、剪定を行わないなどの処理が有効と結論できる。しかし、実用的な体細胞突然変異を得るためには、これらの研究に付随して、体細胞突然変異体の種類および頻度、染色体異常か遺伝子突然変異か等の特性についてさらに研究を行う必要がある。

2. スギで区分キメラや斑点としての体細胞突然変異が少ない理由

スギで区分キメラや斑点としての変異が少なく、完全に変異している体細胞突然変異（枝変り）が多い理由については、つぎのようなことが原因している。

スギ苗で放射線照射による障害からの修復は低線量のときでも少数細胞から新しい茎頂分裂組織が発生することと、スギの生長点では細胞分裂と肥大伸長が同時に行われる。そのために、変異細胞と正常細胞との競争がはげしく、組織形成にあたり変異細胞か正常細胞のいずれかに片寄ってくるものと考えられる。そのために、完全に変異した体細胞突然変異（枝変り）の頻度が多いものと考えられる。

引用文献

- 1) 戸田良吉・松永健一郎・津代篤男：日林誌，**48**，250～253，(1966)
- 2) McMAHAN, R. J. and H. D. GERHOLD : Suppl. to Rad. Bot. **5**, 273～281, (1965)
- 3) OHBA, K. : Hereditas **47**, 283～294, (1961)
- 4) OSBORNE, T. S., O. A. LUNDEN and N. J. CONSTANTIN : Rad. Bot. **3**, 19～28, (1963)
- 5) RUDOLPH, T. D. : Suppl. to Rad. Bot. **5**, 185～191, (1965)
- 6) SATO, K. and Y. NISHINA : Sci. Bull. Agri. Kyushu Uni. **13**, 238～242, (1951)
- 7) 仁科芳雄・佐藤敬二：日林誌，**25**，313～323，(1943)
- 8) MERGEN, F. and B. A. THIELGES : Rad. Bot. **6**, 203～281, (1966)
- 9) OHBA, K. : Gamma Field Symposia, **3**, 111～141, (1964)
- 10) SAX, K. and L. A. SHAIRER : Rad. Bot. **3**, 283～285, (1963)

- 11) SPARROW, A. H., L. A. SCHAIRER, R. C. SPARROW and W. F. CAMPBELL : Rad. Bot. 3, 169~173, (1963)
- 12) WOODWELL, G. M. and L. N. MILLER : Science 139, 222~223, (1963)
- 13) 長谷川正男・安馬喜昭・岡田幸郎 : 日林講, 73, 95~97, (1962)
- 14) 村井正文・大庭喜八郎 : 日林誌, 48, 62~68, (1966)
- 15) 大庭喜八郎・村井正文 : 日林誌, 48, 12~19, (1966)
- 16) 大庭喜八郎・村井正文 : 日林誌, 49, 45~52, (1967)
- 17) OHBA, K. and M. MURAI : Gamma Field Symposia 8, 109~120, (1969)
- 18) NYBON, N. and A. KOCH : Suppl. to Rad. Bot. 5, 661~678, (1965)
- 19) DONINI, B. : Rad. Bot. 7, 183~192, (1967)
- 20) MIKSCH, J. P., A. H. SPARROW and A. F. ROGERS : Rad. Bot. 2, 125~129, (1962)
- 21) PRATT, C. : Rad. Bot. 3, 193~206, (1963)
- 22) BAUER, R. : Hereditas 43, 323~337, (1957)
- 23) ZWINTSCHAR, M. : "Mutation and Poliploide" der Eucarpia 125~134, (1961)
- 24) 関口文彦・山川邦夫 : 育雄, 17, 別冊 2, 109~110, (1967)
- 25) CROSS, G. L. : Amer. J. Bot. 28, 573~582, (1941)

Induction of Somatic Mutation of *Cryptomeria japonica* by Gamma-IrradiationMasafumi MURAI⁽¹⁾

Summary

This paper reports the experimental results on induction of somatic mutation of *Cryptomeria* by means of gamma-irradiation emitted from cobalt-60 or cesium-137. The study consists of the frequency of somatic mutation being investigated in various irradiation exposures and under different conditions of experiment: in part II, the reason of seldom occurrence of chimeric somatic mutation in irradiated *Cryptomeria* plants were examined anatomically.

Part. I. Some factors affecting the induction of somatic mutation.

1. The differences of the number of somatic mutations among cultivars.

Two-year-old plants of thirteen cultivars of *Cryptomeria* were irradiated with gamma-ray of total exposure of 600 Roentgen(R) in the gamma-field of the Institute of Radiation Breeding situated in Ibaraki prefecture, Japan. Exposure rate was 100 R/day. Among the cultivars, eleven were rooted cuttings which were treated in June, 1966, and two lots of seedlings of *Kumasugi* were treated in June, 1967. No somatic mutation was detected on non-irradiated control plants. By the irradiation many somatic mutations were induced in the following materials, open-pollinated seedlings of *Kumasugi*, cuttings of *Kumasugi* F_1 seedlings of *Kumasugi* $\times$ *Kumotoosi*, cuttings of *Motoesugi*, and *Masuyamasugi*. However, the maximum number of somatic mutation in relation to the number of newly appeared shoots after irradiation was counted in cuttings of *Ayasugi*, which stroke small number of new shoots in comparison with the other cultivars. On the other hand, it is known that a few numbers of somatic mutation were appeared in cuttings of *Measa*, *Okinoyamasugi*, *Yamehonsugi*, and *Bokasugi*. Especially, mutants in *Measa* were few in number. *Kumasugi* showed a strong tendency to react irradiation and gives mutants. The author, therefore, supposes that this cultivars has special genetic difference from the other cultivars for somatic mutability.

Somatic mutations such as chlorophyll abnormalities, morphological abnormalities, waxless (reduced wax-coating), extremely deep red colour in winter (red-sugi), pale yellow needles in flushing time (OHBA's "white primary leaves" WPL), winter-green, and variegation, were detected in the irradiated cultivars. Though all somatic mutations were classified into above shown seven types, phenotypic variation was observed in each type. For instance, somatic mutations of chlorophyll abnormality include the colour change such as white (albina), creamy white (xantha), light green (viridis), and their intermediates. It seemed that these colour changes were almost all except light green.

Somatic mutations of morphological abnormalities include change such as twisting of needles, sparsely attached large needles, small and densely needles, and various types of malformed shoots needles.

A somatic mutation named waxless mean those whose shoots and needles have reduced wax-coating on the surface of them, showing bright green colour, and they are accompanied

Received December 10, 1979

(1) Tohoku Branch Station

with short needles. These two types of somatic mutations, chlorophyll and morphological abnormalities, were recognized in all thirteen cultivars and the frequencies of them were higher than those of other types.

On the other hand, the frequencies of other types of somatic mutation were comparatively low. The mutants of the type "red-sugi" were observed in cuttings of *Kumasugi*, *Sanbusugi*, *Measa*, and open-pollinated seedlings of *Kumasugi*. Somatic mutations of the type "green-sugi" were also few in number and observed in cuttings of *Kumasugi*, *Sanbusugi*, *Masuyamasugi*, and *Motoesugi*. Somatic mutations of WPL, which seem to be of the same character as the ornamental variety, were now and then induced in very small number in cuttings of *Kumasugi*, *Ayasugi*, and open-pollinated seedlings of *Kumasugi*. As stated above, *Kumasugi* seemed to produce various types in comparison with other cultivars.

It was supposed that the frequency of somatic mutation in relation to the number of newly emerged shoots after irradiation differed by the orders of main branches among the cultivars. Frequency of somatic mutation of every cultivar was higher on those branches near the top of the stem, and decreased on the lower branches.

2. The difference of the frequency of somatic mutation under various radiation exposure.

Since *Kumasugi* showed a very high somatic mutability, this experiment was made using two-year-old cuttings of this cultivar. The frequency of somatic mutation was investigated under various radiation exposures from total exposures of 1,600 R at 50 R/day in the gamma-field and in a gamma-room. The plants were irradiated in October, 1964. Number of somatic mutation rates, i. e. per plant and per newly developed shoot were increased in a manner showing a straight line. There was difference in the type of somatic mutations according to the intensities of exposures. About half number of somatic mutations was of chlorophyll abnormalities and waxless were about ten percent of all mutants. And it was noted that the relative frequency of sectorial chimera, which was only recognized in chlorophyll abnormalities, also maintained a constant level among the various radiation exposures.

3. The frequency of somatic mutation in the different irradiating season.

The cuttings of *Kumasugi* were irradiated in spring, summer, and autumn. It was observed that the irradiation in spring and in autumn, especially, the latter was less effective. A low efficiency in autumn was, perhaps, caused by shortage of recovery period. By the irradiation exposures in autumn, relatively higher frequency of somatic mutations of the type of chlorophyll abnormalities was seen. While by summer irradiation, the frequencies of other types of mutants were obtained, such as waxless or morphological abnormalities.

4. The effect of fertilizing on the mutability of cuttings of *Kumasugi*.

The higher the levels of fertilizing, including N, P, and K altogether, the larger the mutability and the highest rate of mutants for the newly formed shoots was 1.04 per cent. The deficiency of fertilization reduced the frequency of somatic mutation. When the levels of fertilization were the medium, the frequencies of the mutants were also intermediate.

5. The effect of pruning immediately after irradiation in cuttings of *Kumasugi*.

One hundred plants were divided into three groups and they were exposed to irradiation of 600 R. After the irradiation, one group was pruned heavily, another group was not pruned. The pruning, especially when it is heavy, reduced the frequency of somatic mutation.

Part II. Anatomical studies on radiation damages and recoveries of apical meristems and the reason of seldom occurrence of chimeric mutants in irradiated *Cryptomeria* plants.

1. Radiation damages and recoveries of apical meristems.

Two-year-old cuttings of *Kumasugi* were irradiated with exposures, 0, 300, 600 and 900 R of gamma-ray in the gamma-field in June, 1967. Shoot apices were fixed, embedded in paraffin, sectioned, and stained with safranin-fastgreen, or examined by Feulgen's reaction.

1) Effects of irradiation exposure

Meristematic cells in shoot apices and at the needles axils showed no radiation damages at the last day of the 300 R irradiation at 100 R/day. Radiation damages appeared in the cells of some shoot apices and young leaves 2 days later, but damages were very slight. By the 6th day, the damages increased very much, and some shoot species were completely killed which could be recognized microscopically. Apparently, healthy apical meristems, too, cells were almost degenerated, and therefore, the shoot apices became flattened. All young leaves near such apical cones were damaged. Some shoot spines, however, were seemingly normal. By the 16th day, new primordia were newly differentiated from the active single cells or groups of a few cells in the damaged shoot apices and these primordia developed into new shoots. Then the shoot apices were completely killed, new shoot apices differentiated from the needle axils just beneath the shoot apices.

According to the increased exposures, radiation damages of the meristematic cells at shoot apex and at the needle axils were severe. In the radiation exposures of 600 and 900 R, recovery of new primordia developed from the single cells or groups of a few cells were 29th and 35th day after the irradiation, respectively.

2. The reason of seldom occurrence of chimeric mutants in irradiated *Cryptomeria* plants.

The mutants of *Cryptomeria* induced by the irradiation are usually not chimeras but completely or wholly changed mutant shoots. The process of recovery of the apical meristems, studied above, will give an explanation of why the chimera is rare. However, this can also be explained from the view point of the growth type of *Cryptomeria*.

Cryptomeria has the type that cell division in the apical meristem and subsequent differentiation of tissues and organs take place continuously during the elongation of the shoots throughout the growing season, as observed in *Cryptomeria*, hinoki cypress, or red-wood.

Trees such as mulberry, tea plant, pine, and persimon form so called winter buds in which primordia of branches, flowers, leaves are fixed when the shoot elongation is almost ceased.

Trees, such as *Chamaecyparis obtusa*, *C. pisifera*, *Sequoia sempervirens*, all have the same growth characteristics as *Cryptomeria* that they show wholly mutation characteristics as *Cryptomeria*. This characteristics seems to indicate that competition among the cells occurs severely in the trees of this growth type, because cell division is always carried on in their apical meristems, during the growing season. As result induced mutants become visible, the competition seems to have an important role, resulting not in chimera but in completely or wholly changed mutants.

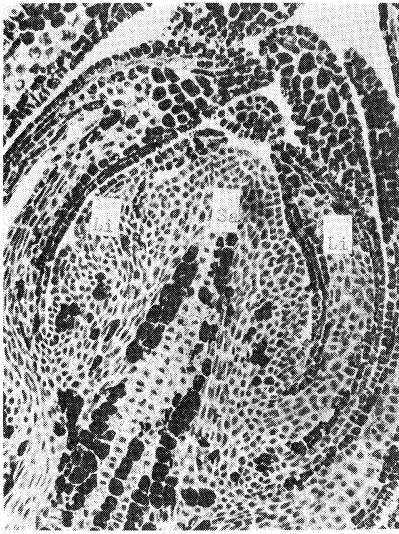


Photo. 1 正常な茎頂分裂組織

Normal shoot apex.

サフランとファストグリーンの二重染色
Double stains of safranin and fast-green.

Sa: 茎頂分裂組織 Shoot apex,
Li: 葉原基 Leaf initial. ×150



Photo. 2 300R 照射後2日目の茎頂分裂組織

Shoot apex by the 2nd day after irradiation exposure (300 R).

葉原基 (Li) にサフランが集積している
Radiation damages appeared in leaf initials (Li). Double stains of safranin and fast-green. ×150



Photo. 3 300R 照射後8日目の茎頂分裂組織

Shoot apex by the 8th day after irradiation exposure (300 R).

頂端細胞群が壊死し、致死細胞線 (矢印) が現われている。フォールゲン反応。
Cells of apical initial were necrosed, and damaged line (arrow) appeared. Feulgen's reaction. ×150



Photo. 4 300R 照射後6日目の茎頂分裂組織

Shoot apex by the 6th day after irradiation exposure (300 R).

茎頂分裂組織のドームが少し平になっている (矢印)。サフランとファストグリーンによる二重染色。
Dome of the shoot apices became flattened (arrow). Double stains of safranin and fast-green. ×150



Photo. 5 300 R 照射後18日目の茎頂分裂組織
Shoot apex by the 18th day after ir-
radiation exposure (300 R).

茎頂分裂組織の一部から新しい始源細胞がみられる (矢印)。サフラニンとファストグリーンの二重染色。

Primodia (arrow) were newly differentiated from the active single cells in the damaged shoot apex. Double stains of safranin and fast-green. $\times 150$



Photo. 6 300 R 照射後18日目の茎頂分裂組織
Shoot apex by the 18th day after ir-
radiation exposure (300 R).

新しい茎頂分裂組織の原基がみられる (Ns)。サフラニンとファストグリーンの二重染色。

New primodia (Ns) differentiated in the damaged shoot apex. Double stains of safranin and fast-green. $\times 150$

Ds : 障害を受けた茎頂分裂組織

Damaged shoot apex.

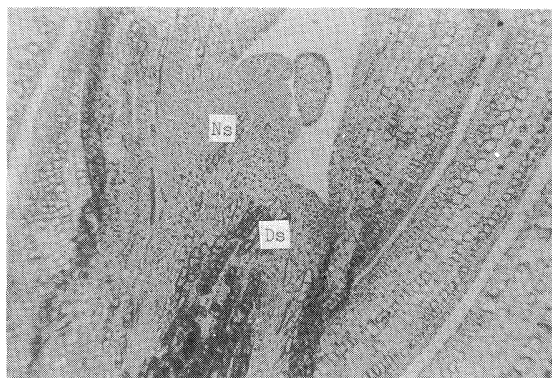


Photo. 7 600 R 照射後30日目の茎頂分裂組織

Shoot apex by the 30th day after ir-
radiation exposure (600 R).

茎頂分裂組織の原基が新しい茎頂分裂組織として発達している (Ns)。サフラニンとファストグリーンの二重染色。

New shoot apex (Ns) differentiated from the damaged shoot apex. Double stains of safranin and fast-green. $\times 150$

Ds : 障害を受けた茎頂分裂組織

Damaged shoot apex.



Photo. 8 900R 照射後31日目
31st day after irradiation exposure
(900 R).

茎頂(矢印)は完全に枯死し、葉腋より修復した
茎頂分裂組織(Ns)が発達している。フォイルゲン
ン反応。

The shoot (arrow) was completely killed, and
new shoot apex (Ns) developed from the
needle axis. Feulgen's reaction. $\times 150$

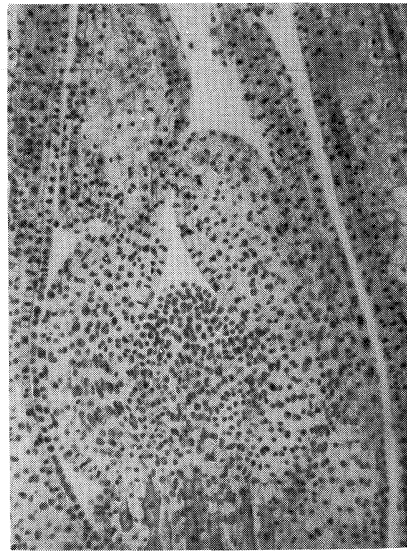


Photo. 9 正常な茎頂分裂組織
Normal shoot apex.

フォイルゲン反応
Feulgen's reaction. $\times 150$

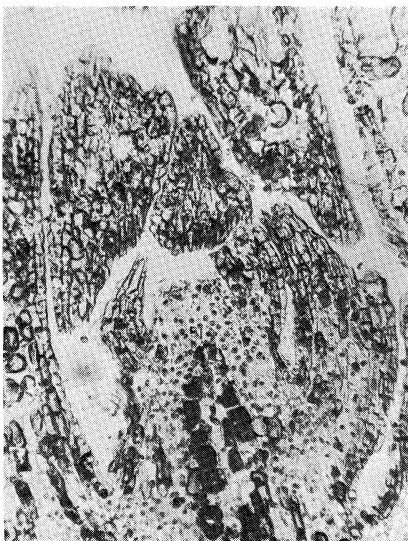


Photo. 10 600R 照射後10日目の茎頂分裂組織
Shoot apex of 10th day after irradiation
exposure (600 R).

フォイルゲン反応により細胞核が染色されない。
Nuclei were not stained with Feulgen's reac-
tion. $\times 150$



Photo. 11 600R 照射
600 R exposure.

葉腋から新しい茎頂(Ns)が出ている。矢印は生
長の止った茎頂。
New shoots (Ns) developed from the needle
axis. The arrows are stunted shoots.