

イオンビーム照射によって花の突然変異が生じたキクのキメラの解消方法

浅見逸夫¹⁾・辻 孝子²⁾・大野 徹³⁾

摘要：成長点にイオンビームを照射し、花色や花型が変異した多数のキク系統を材料にして、キメラを解消する二つの方法を比較調査した。

- 1 変異花の株元から発生する側枝の摘心を2回繰り返して栽培する親株摘心法では、元の変異花と花色と花型が同一となる割合は花卉培養法より高かった。しかし、キメラ解消の確認には2年以上にわたり複数回の栽培が必要であった。
- 2 花卉培養法では、花卉切片からの不定芽分化率が低く、再分化個体がわずかしか得られないこともあるが、1回の培養でキメラを解消した完全変異個体を得られた。しかし、変異花が周縁キメラや区分キメラである場合、異なる細胞由来で得られた再分化個体では、元の変異花とは異なる花色や花型になる可能性があると考えられた。

したがって、効率的にキメラを解消するためには両方の方法を試みるのが望ましいと思われた。

キーワード：キク、突然変異、キメラ、摘心、花卉培養

Efficient Methods to Evaluate Escape from Chimerism in Chrysanthemum Mutated by Ion-beam Irradiation

ASAMI Itsuo, TSUJI Takako and OHNO Tooru

Abstract : We compared two methods to evaluate escape from chimerism in many chrysanthemum lines with ray floret and flower color mutations induced by ion-beam irradiation.

1. "Sucker decapitation" is a method that involves pinching of the lateral shoot twice from the parent plant; this results in a higher probability of obtaining a flower color and shape ratio similar to that of original mutant lines, than that obtained by the floret culture method. However, multiple cultivations for at least over 2 years are necessary for the confirmation of the final chimeric escape.
2. By the floret culture method, the adventitious bud differentiation rate from the petal segment was low, and few plants were regenerated. However, we could obtain a non-chimeric solid mutant in only one culture, which might be of the flower color and shape unlike the original flower, if the original mutated flower was a periclinal or sectional chimera obtained by adventitious bud differentiation from a different cell.

Therefore, efficient methods for escape from chimerism are necessary to apply both of the above-described methods.

Key Words : Chrysanthemum, Mutation, Chimeras, Pinching, Floret Culture

¹⁾環境基盤研究部(現農業大学校) ²⁾環境基盤研究部(現海部農林水産事務所) ³⁾環境基盤研究部

緒言

ガンマ線やイオンビームなどの放射線を植物の成長点に照射すると、成長点付近の多数の細胞に様々な突然変異が生じるので、成長した個体はキメラ(同一個体内に異なった遺伝情報を持つ細胞が混じる状態)になる。そこで、照射して得られた有望な変異個体を新品種候補として利用していくためには、キメラを解消して変異を固定化する必要がある。

従来から、一般的なキメラ解消方法として、①変異個体から伸長した枝の切り戻し(摘心)を複数回繰り返す方法と、②変異部分から組織培養によって不定芽を分化させる方法の2種類が用いられている¹⁾。既に商品化されている様々な突然変異体は照射後にいずれかの方法によって固定化されたと思われるが、実際にキメラ解消のために行われた摘心回数や、両方法におけるキメラ解消効率の比較など、具体的な実施事例報告は少ない。

そこで本研究は、イオンビームを照射して得られたキクの突然変異個体を材料にして上記の二つの方法を行い、それぞれのキメラ解消程度と両方法の長所及び短所を明らかにする目的で行った。

材料及び方法

本研究は愛知県農業総合試験場で2010年9月から2011年11月にかけて実施した。

1 供試材料

2010年9月6日に、当時東三河農業研究所が保有する愛知県育成秋系系統「06-SF-31-1(以後「元系統」)」の組織培養苗の成長点(茎頂)370本へ、日本原子力研究開発機構(現量子科学技術研究開発機構)高崎量子応用研究所のイオンビーム照射施設(TIARA)で炭素イオンビーム($^{12}\text{C}^{6+}$ 320 MeV)1 Gy及び2 Gyを照射した。

照射後、茎頂から伸長した1本の培養シュートと、腋芽が付いた節ごとに切断し、照射茎頂1本につき腋芽由来の培養シュート5本ずつを発根・順化して、2010年11月3日からガラス温室内で1850本を電照栽培した。

12月9日に消灯して2011年3月末日までに開花した1631本の中から花色や花型が大きく変異した42個体(以後、系統)を選抜して用いた。なお、供試した変異系統は、目視で変異花と評価・選抜した時点で、それらのキメラの種類を調査していなかったため、本試験の開始時において、明確な区分キメラ個体以外ではキメラの種類を不明として扱った。また、本試験におけるキクのキメラの解消とは、一般的なキク栽培では親株由来の栄養繁殖で増殖するので、1株の親株から分枝・伸長する次世代の全個体が同一になることとした。

2 用いたキメラの解消方法及び栽培及び培養方法

(1) 親株摘心法(試験1)

2011年4月に、選抜した42個体の変異花を根株ごと掘り取り、プランターに移植して屋外で栽培した。それらの株元から伸長した側枝の頂部を5月19日と6月16日の2回、摘心し、その後に伸長した茎の頂部を採取して7月16日に挿し芽を行った。発根した苗は8月5日にセルトレイに移植して長日条件下で管理し、9月8日にパイプハウスの栽培ベッドに定植して短日条件下で栽培した。各系統の親株由来でそれぞれ12~24本を栽培した。

(2) 花卉培養法(試験2)

選抜した42系統について、それぞれの頭花の花托部から50本程度の舌状花(外観で明らかな区分キメラ花の場合には有望な変異部分)を抜き取り、70%エタノール水溶液で1分、1%アンチホルミン液で5分滅菌した後、十分量の滅菌水で濯いだ。舌状花の付け根部分を1mm以下の長さで切り取り、プラスチックシャーレ内の不定芽分化培地(Murashige and Skoog³⁾(以下MS)培地、ショ糖3%、NAA0.5 mg/l、BA1 mg/l、ゲランガム0.35%)に36切片ずつ置床し、25℃薄明条件下で培養した。約1か月後、分化した不定芽をプラスチックシャーレ内の不定芽伸長培地(1/2 MS培地、ショ糖2.5%、NAA0.02 mg/l、ゲランガム0.35%)に1本ずつ移植した。

供試した42系統全ての花卉培養を行い、その内、不定芽が多数得られた14系統は、3cm以上に伸長した不定芽を頂部から2.5cmの長さに切り取り、液体培地(1/2 MS培地、ショ糖2.5%)を含ませた各辺1cm角の発泡フェノール樹脂(oasis5710、ニッソーグリーン、東京)に挿し、発根した苗を順化して温室内のプランターに定植した。各系統の同一花由来でそれぞれ10~35本を栽培した。

3 調査項目

(1) 親株摘心法

ア 移植した親株から伸長した側枝数(地上部に残っている茎から伸長した側枝と地下部から地中を通して伸長した吸枝の本数)

イ 供試した変異個体(系統)と親株摘心法で増殖した複数本の花色や花型の同一性

(2) 花卉培養法

ア 選抜した種々の系統における花卉培養での不定芽分化率

イ 供試した変異個体(系統)と花卉培養法で増殖した複数本の花色や花型の同一性

試験結果

1 親株摘心法によるキメラの解消(試験1)

(1) 移植した親株の株元から伸長した枝数

移植した親株から伸長した側枝数を表1に示した。親株の地上部の茎から平均1.3本の側枝が、地下部から平均2.7本の吸枝が伸長し、合計本数は1株当たり平均4.0本であった。

表1 移植した親株の株元から伸長した側枝の本数

	伸長数		
	側枝(地上部)	吸枝(地下部)	合計
	本	本	本
平均	1.3	2.7	4.0
標準偏差	1.2	1.2	1.2

注) 供試数は 42 系統

表2 選抜時と親株摘心法で増殖した複数本との花色・花型の同一性

選抜時と同じ花色・花型の開花割合	系統数
100%	16 (38%)
75~99%	14 (33%)
50~74%	10 (24%)
1~49%	0 (0%)
0%	2 (5%)
合計	42 (100%)

注) 供試した 42 系統の親株由来でそれぞれ 12~24 本を栽培し、その中から 42 系統選抜時と同一の花色・花型の本数を割合で示した。



b : 親株摘心法

c : 花卉培養法

a : 選抜時



図1 1224系統の開花状況

注) b:親株摘心法では 24 本、c:花卉培養法では 15 本を栽培した。



b : 親株摘心法

c : 花卉培養法



a : 選抜時

図2 0781系統の開花状況

注) b:親株摘心法では 24 本、c:花卉培養法では 15 本を栽培した。

(2) 供試した変異個体(系統)と親株摘心法で増殖した複数本の開花時における花色や花型の同一性

親株摘心法で増殖後、それぞれの系統由来の花について、花色と花型の同一性を調査した結果を表 2 に示した。選抜時の花色や花型と、親株由来で栽培した複数本全ての花が同一であったのは、42 系統の内の 16 系統(全体の 38%)であった。その中の例として、「1224」系統(以下、本文中では「系統」を略)の選抜時の花を図 1a に、親株摘心法の開花状況を図 1b に示した。

一方、区分キメラとなった花の一部分に有望な黄色花変異が現れた「0781」(図 2a)では、親株摘心法で栽培した 24 本に黄色花は全く無かった(図 2b)。このように、選抜時の花色・花型が全く得られなかったのは、合計 2 系統(全体の 5%)であった。

残りの 24 系統(計 57%)は、選抜時とは異なる花色・花型の花も咲いたが、ほぼ同一の花が栽培本数の 75~99%で得られたのが 14 系統(全体の 33%)、栽培本数の 50~74%で得られたのが 10 系統(全体の 24%)であった。



a : 選抜時 b : 親株摘心法

図3 2143系統の開花状況

注) b : 親株摘心法で17本栽培した内、2本が「元系統」と同じ色に戻る(下の花)。



a : 選抜時 b : 親株摘心法

図4 2571系統の開花状況

注) b : 親株摘心法で12本栽培した内、2本が「元系統」と同じ花色に戻る(一番上)。



a : 選抜時 b : 親株摘心法

図5 1255系統の開花状況

注) b : 親株摘心法で18本栽培した内、6本の開花日が明らかに異なる。

同一の花と異なる花が咲いた例として、選抜時、花色が濃ピンク色に変異した「2143」(図3a)は、栽培した17本の内、15本(88%)が選抜時と同じで、残り2本が元系統の色に戻った(図3b)。また、花色(濃ピンク色)と花型が変異した「2571」(図4a)は、栽培した12本の内、8本(67%)が同じで、残り4本が花型はそのままに花色だけ元系統の色に戻った(図4b)。一方、花色(濃ピンク色)と花型が変異した「1255」(図5a)は、栽培した18本の花色と花型は選抜時と同じであったが、その内の6本の開花日が明らかに異なった(図5b)。

なお、試験1の親株摘心法で開花した42系統の合計727本の内、1頭花(花冠)の中で明らかに色や形が異なる舌状花があると判断できた花は「3393」と「3414」の2系統での8本、全体の1%であった(データ未掲載)。

2 花卉培養法によるキメラの解消(試験2)

(1) 花卉培養における不定芽分化率

供試した42系統中39系統で花卉培養を行うことができた。それぞれの不定芽分化率を調査し、その分布を表3に、置床1か月後の不定芽の分化状況を図6に示した。

不定芽分化率が91%以上の系統は9系統(23%)、51~90%は11系統(28%)、21~50%は4系統(10%)、1~20%は7系統(18%)、不定芽が得られなかった系統は8系統(21%)となった。なお、「元系統」の不定芽分化は35%であった。

(2) 供試した変異個体(系統)と花卉培養法で増殖した複数本の開花時における花色・花型の同一性

不定芽が多数得られた14系統の苗を栽培し、それぞれ選抜時の花色と花型の同一性を調査した結果を表4に示した。

表3 供試系統の花卉培養における不定芽分化率の分布

不定芽分化率	系統数
91%~	9 (23%)
51~90%	11 (28%)
21~50%	4 (10%)
1~20%	7 (18%)
0%	8 (21%)
合計	39 (100%)

注) 1系統につき36切片ずつ不定芽分化用培地に置床した。元系統の不定芽分化率は35%であった。



図6 花卉培養1か月後の不定芽の分化状況

注) 左 : 不定芽分化率1~20%、中 : 21~50%、右 : 51~90%の事例。

表4 選抜時と花卉培養法で増殖した複数本との
花色・花型の同一性

選抜時と同じ花色・ 花型の開花割合	系統数
100%	3 (21%)
75~99%	6 (43%)
50~74%	3 (21%)
1~49%	2 (14%)
0%	0 (0%)
合計	14(100%)

注) 供試数は花卉培養で多数の不定芽が得られた14系統。それぞれ10~35本を栽培し、その中から選抜時と同一の花色・花型の本数を割合で示した。



a : 選抜時 b : 花卉培養法

図7 1634系統の開花状況

注) a : 2 花の内、上側を使用。b : 花卉培養法で 15 本栽培し、全てが選抜時とほぼ同じ。



a : 選抜時 b : 花卉培養法

図8 3504系統の開花状況

注) b : 花卉培養法で 20 本栽培したが、1 本は花型が異なり、別の 1 本は花型が同じで花色が黄色になった。

選抜時に花色が白色で花冠中心部の花卉がさじ弁となった「1634」(図7a)を花卉培養で増殖して栽培したところ、ほぼ選抜時と同じ花色・花型であった(図7b)。このように、選抜時と同じ花色・花型であったのは、供試した 14 系統の内、3 系統(全体の 21%)であった。しかし、残りの 11 系統(全体の 79%)は、開花した花の一部が選抜時の花色・花型とは異なっていた。例えば、「1224」は、親株摘心法では選抜時と全て同じ花になったが、花卉培養法では開花した 15 本が少なくとも 3 種類の異なる花型となった(図1c)。また、明らかな区分キメラ状の黄色変異花が出現した「0781」(図2a)では、花卉培養法で得られた 15 本が全て黄色になったが、選抜時と同じ花型となったのは 11 本(64%)であった(図2c)。さらに、選抜時に花冠中心部が黄色みがかかった白色花変異の「3504」(図8a)は、花卉培養法で栽培した 20 本の内 18 本(90%)が同じ花色・花型であったが、1 本は花型が異なり、別の 1 本は花型が同じで花色が黄色になった(図8b)。

なお、試験 2 の花卉培養法で開花した合計 241 本の花で、1 頭花(花冠)の中で明らかに色や形が異なる舌状花があると判断できた花は全く無かった(データ未掲載)。

考 察

放射線を用いた突然変異育種では放射線を成長点に照射して変異を誘発するが、芽や枝の頂端にある生長円すいが多細胞によって構成されているため、キメラ状態になりやすい。生長円すいは外衣内体説(tunica-corpus theory)に代表されるように、表層(L-1)、次層(L-2)、芯層(L-3)に分かれて層状構造であり、照射によって異なった遺伝情報を持つ細胞が生じた場合、組織層を形成して重なるものは周縁キメラ、縞状に分布するものは区分キメラと呼ばれている¹⁾。

1 親株摘心法について

キメラの解消のためには、摘心(枝の切り戻し)をできるだけ多く繰り返し、変異した組織部分(変異セクター)を拡大又は縮小させ、全て同一遺伝子を持つ 1 個体にする方法が一般的である¹⁾。しかし、摘心を多く繰り返すほど、変異花の固定を確認できるまでの栽培日数と栽培本数が余分に必要となる。

そこで試験 1 では、摘心する回数を 2 回にとどめ、少ない回数でのキメラ解消の程度を調査した。その結果、表 2 のとおり、42 系統の内 16 系統(38%)では、それぞれの処理後に得られた全個体で選抜時と同じ花色・花型であったが、残りの 26 系統(62%)については同一率が低く、選抜時と異なる花色・花型の個体が多かった。親株由来の 2 回摘心ではキメラ解消が不十分であった。

親株摘心法で目的とした変異花が全く得られなかった「0781」(図2a)は、選抜時に開花した 4 花の内、頂花の一部分と側花 1 花で元系統とは異なる黄色に花色変異した区分キメラ個体であった。表 1 では平均 4 本の側枝が親株から伸長していたが、実際に「0781」も地上部側枝が 1

本、地下部の吸枝が3本の計4本であり、それら由来で開花した24本は全て元系統と同じ花色であった。これは、親株の黄色花の変異セクター一部分以外から4本の側枝・吸枝が分枝したためだが、区分キメラ個体では、このように別々のセクター由来で側枝が伸長するので、親株の有望な変異が次世代に継承されるとは限らないことが明らかとなった。そのため、変異個体を次の作型で開花させて、一部でも有望な変異を維持していることを確認する必要があるとともに、次世代の全ての花が同一(同一割合100%)になるまでキメラ解消を確認できないので、本試験の結果から、少なくとも2年に渡る2回以上の栽培が必要であると考えられた。

2 花卉培養法について

花卉培養法は、有望な花(花卉)の突然変異が得られた時、その変異部分だけを切り出して不定芽分化をさせることによりキメラ解消が可能となるもので、Broertjes・Harten⁴⁾によって提唱された。その後、様々な植物種で行われており、服部⁵⁾もキクの花床部の表皮細胞から不定芽を形成されることを確認した上、得られたシュートを栽培すればキメラが解消すると報告している。さらに永富⁶⁾は、放射線照射と組織培養を組み合わせることを推奨している。

しかし、キクにおける花卉培養の難易には品種間差があり⁷⁾、場合によっては再分化個体を得られない恐れがあるので、本法を利用する際には、事前に花卉の不定芽の最適な培養条件を調べる必要がある。本研究においても予備試験を行ったが、供試した「元系統」の不定芽分化率は21~50%とやや低かった。本試験では、表3のとおり、イオンビーム照射後の39系統は分化率が0%から91%以上と異なっていたことから、照射によって不定芽分化の難易程度も変異した可能性もあると考えられた。

本法で生育の良い苗が10本以上確保できた14系統について、選抜時の花色・花型との同一性を調査したところ、培養後に得られた全個体で同一であったのはわずか3系統(17%)であり、残りの11系統(83%)は花色や花型が同一ではなかった(表4)。不定芽を分化させる培養をしているので、培養変異の可能性も否定できないが、1花全体から舌状花を多数採取しているため、1舌状花ごとに異なる変異の区分キメラ頭花であった可能性も考えられる。

一方、柴田がスプレーギク品種「ピンクマーブル」とその枝変わりの周縁キメラ構造を解析した結果、アントシアンとカロテノイド色素が少なくとも表層(L-1)、次層(L-2)の別々の層で異なる発現をして複数の色になることを報告している⁸⁾。本試験で、選抜時に花冠中心部が黄色みを帯びた白色花変異であった「3504」(図8a)から得られた20本の内、1本が黄色花(図8b)になったが、「3504」の舌状花は黄色みがかかった白色なので、次層が黄色の周縁キメラ構造で、黄色花になった1本はその次層の細胞から不定芽が分化した可能性が考えられる。同様に、「1224」(図1c)や「0781」(図2c)も選抜時と異なる花型の花

が咲いたが、それらも選抜時には周縁キメラで、表層(L-1)あるいは次層(L-2)のいずれかの細胞から不定芽が分化したため、花型が異なったことも考えられる。実際に、異なる周縁キメラ構造のジャガイモ突然変異群において、再分化個体はそれぞれ葉形が異なったことが報告されている¹⁾。したがって、試験2で花卉の色や花型が異なる個体が多数得られたが、その原因は元の変異個体の区分キメラと周縁キメラの両方が考えられる。

なお、試験2の結果の最後に記したとおり、一つの頭花の中で花色や花卉型が異なる区分キメラと明らかに判断できた花は開花した241本中に全く無かったので、花卉培養1回で、得られた培養体は完全変異体となったと推察できる。

3 具体的なキメラの解消方法

以上の結果から、親株摘心法では、それぞれの側枝由来で得られた挿し芽は個々に異なる可能性が高いので、翌年の栽培時に全ての花が同一(同一割合100%)になるまで、少なくとも2年次に渡る複数回の栽培が必要である。

一方、花卉培養法では、花卉組織中の1細胞から不定芽が分化しているので、培養1回でキメラを解消した完全変異体を獲得できるが、頭花中の多数の舌状花が区分キメラや周縁キメラ構造である場合には、得られた再分化個体は選抜した有望な変異系統と異なる花色や花型になる可能性や、全く新しい別の花色・花型の花が得られる可能性もある。しかし、不定芽分化率が低いと再分化個体がわずかしか得られない恐れもある。

したがって、放射線を照射して有望な変異花が得られた場合、まず、①開花中の早い時期に変異部分の多数の舌状花を採取して花卉培養法を行うこと、②開花後は株ごと掘り取って、その後に伸長した側枝の摘心を3回以上行った後に挿し穂を採取して有望変異花の確認栽培を行う方法を採用することが望ましい。特に本試験の「0781(図2a)」のように変異セクターの幅が狭い場合や、花の一部のみに有望変異が現れた場合には、親株摘心法では変異を失ってしまう可能性がある。そのため、先に花卉培養法で有望な変異を拾い出し、得られたシュートを固定する方法が確実であると考えられた。一方、周縁キメラ構造によって特殊な花卉が成形されていたり、異なる層の花色の重なりによって珍しい花色が得られている場合は、キメラ構造を維持するため、親株の側枝由来の増殖も併せて行なう必要があると考えられた。

引用文献

1. 山口彦之ら. 突然変異育種. 養賢堂. 東京. p. 69-254 (1983)
2. Murashige, T. and Skoog, F.. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 173-497 (1962)

3. Schmidt, A.. Histologische Studien an Phanerogamen Vegetationspunkten. Bot. 35:591-601(1924)
4. Broertjes, C. and Harten, A.M. Application of Mutation Breeding Method in the Improvement of Vegetatively Propagated Crops. Elsevier Publishing Co. Netherlands. P316(1978)
5. 服部一三. キク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 花床培養におけるシュート再生過程. 育種学雑誌. 42, 227-234(1992)
6. 永富成紀. キクの緩照射と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, 1-2(1991)
7. 大石一史, 桜井雍三. キク花卉組織から再分化した個体の変異について. 愛知農総試研報. 20, 278-284 (1988)
8. 柴田道夫. 花卉品種—キク—. 農業及び園芸, 69(1984)