

## キクの突然変異苗を用いた低温伸長性系統選抜のための涼温培養法の実証

浅見逸夫<sup>1)</sup>・辻 孝子<sup>2)</sup>・三宅律幸<sup>3)</sup>

**摘要**：放射線照射によって突然変異を誘発させた多数のキク培養苗の中から、低温伸長性を持つ系統を培養中に選抜する方法を実証するため、以下の試験を行った。

- 1 炭素イオンビームを照射した多数の培養苗を通常の温度より10℃低い15℃の涼温条件下で培養し、茎伸長の優れた二次側枝7本を一次選抜した。
- 2 一次選抜した二次側枝から得た合計28本の三次側枝を、冬季に暖房温度を12℃に低く設定した温室内で栽培し、伸長の良い13本を二次選抜した。
- 3 翌年の冬季に、再び暖房温度を12℃に設定した温室内で二次選抜した13本から得た13系統を栽培したところ、8系統が低温伸長性を保持していた。最終的に低温伸長性が優れ、かつ奇形花発生程度の低い2系統を三次選抜した。

以上の結果から、1年中いつの時期でも実施できる培養時の選抜により、育種年数の短縮と、栽培労力の削減が実証できた。

**キーワード**：キク、組織培養苗、涼温選抜、低温伸長性、突然変異、イオンビーム

## Demonstration of a Screening Method to Evaluate Stem Elongation Among Chrysanthemum Mutants Under Cool Culture Conditions

ASAMI Itsuo, TSUJI Takako and MIYAKE Noriyuki

**Abstract**: We demonstrate a screening method under cool tissue culture condition to evaluate chrysanthemum lines that have characteristics with stem elongation at a low temperature. Starting from many plantlets grown in tissue culture and mutated by irradiation, we did following tests.

1. Under the first cool condition at 15°C (10°C lower than usual tissue culture), we selected 7 excellent lines with good stem elongation as the 1<sup>st</sup> stage, among 100 plantlets irradiated with carbon ion beams.
2. In winter, we grew 28 lines obtained from the 1<sup>st</sup> selection lines in the greenhouse at 12°C as the minimum temperature. Thirteen excellent lines were selected as the 2<sup>nd</sup> stage.
3. Next winter, we grew the 13 lines obtained from the 2<sup>nd</sup> selection lines in the greenhouse with the same low-temperature condition. 8 lines maintained good stem elongation at a low-temperature. Finally, we selected 2 excellent lines with both good stem elongation and less flower petal deformity as the 3<sup>rd</sup> stage.

Therefore, we demonstrate effective screening at tissue culture stage, which were able to carry out throughout the year. This method could shorten the breeding period and save labor.

**Key Words**: Chrysanthemum, Plantlets by tissue culture, Screening under cool condition, Stem-elongation, Mutation, Ion-beam

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

<sup>3)</sup> 環境基盤研究部

## 材料及び方法

### 緒言

近年の一輪ギクの品種には、摘蕾作業時間を短縮してキク生産者の労働コストを低減できる「無側枝性」と、冬季栽培時の暖房費を節約できる「低温伸長・低温開花性」を持つことが望まれている。従来からの品種育成方法である交雑育種の他に、元の品種・系統の優れた栽培特性を残しつつ、花色・葉色あるいは生育特性など一部の形質だけを変化させる突然変異育種があり、キクでもガンマ線照射により色変わり品種が多量育成されている<sup>1)</sup>。また、生育特性が変異したキクも新たに登場しており、白花一輪ギク品種「神馬」にイオンビーム照射して無側枝性を付与した「新神」が2002年に育成された<sup>2)</sup>。さらに「新神」にイオンビームを再照射して、無側枝性に加えて低温伸長性を付与した「新神2」が2010年3月に品種登録されている<sup>3)</sup>。

イオンビームは従来用いられてきたγ線やX線に比べ、突然変異誘発率が高く、数多くの作物の品種改良に用いられ始めた<sup>4)</sup>。愛知県農業総合試験場では、当場育成キク品種にイオンビームを照射することによって、新花色、無側枝性、低温伸長・低温開花性などの特徴を持つ新品種育成に着手した。その際、照射試料として培養苗を用いた。その理由は、屋外栽培している植物を材料にする場合と異なり、季節を問わず一年中、照射を行える長所があるからである。

しかし、照射したキクについて無側枝性や低温伸長性・低温開花性を実際に評価・選抜しようとする、多数の照射個体を栽培するため大面積が必要で、多大な労力が必要となる。さらに、例えば無側枝性を評価しようとする場合、一般に無側枝性は高気温（昼温30℃以上）条件下での栽培で発現すると言われている<sup>5)</sup>ため、照射個体の選抜は、自然条件では夏季の短い期間でしか評価できない。そこで、浅見ら<sup>6)</sup>は、照射個体の選抜を効率的に行って育種期間の短縮を図るため、培養苗利用の利点を活かし、組織培養室内で一年中、同じ条件で無側枝性の評価を行えるインビトロ検定方法を開発し報告した。

もう一つの期待される形質である低温伸長性も、照射個体の選抜は自然条件では冬季栽培でしか評価できない。もし培養苗の段階で低温伸長性個体を選抜する方法を開発できれば、照射と選抜を1年中いつの時期でも実施できる利点がある。さらに、一次選抜した個体を冬季栽培して二次選抜を行うことにより、選抜に要する年数の短縮と栽培面積の削減が可能となる。

そこで本報では、実際にイオンビーム照射した多数のキク培養苗を材料に、涼温下で培養するインビトロ検定を行って一次選抜した系統を、実際の冬季に低温伸長性を確認する栽培を行ったところ、低温伸長性を持つ系統が得られたので、その結果を報告する。

本研究は愛知県農業総合試験場で2011年4月から2013年3月にかけて実施した。

#### 1 涼温培養による低温伸長性系統の一次選抜(試験1)

##### (1) 供試材料

継代培養している愛知県育成スプレーギク品種「プリティララ」の培養苗を材料として用いた。

##### (2) イオンビームの照射方法

高さ約8 cmの培養苗について茎頂部と葉を葉腋部分で除去し、茎部を節ごとに葉腋直上で切断した。直径6 cm厚さ1 cmのプラスチックシャーレ内のホルモンを添加していないMurashige and Skoog<sup>7)</sup> (以下MS) 固体培地(シヨ糖3%、ゲルライト0.4%)に、切断した茎40本の腋芽部分を上方に向けて挿して固定した。

シャーレを(独)日本原子力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)に搬送し、2011年7月3日に1 Gyの炭素イオンビーム(320 MeV・12C<sup>6+</sup>、LET: 86 keV・μm<sup>-1</sup>)を腋芽の成長点に照射した。

##### (3) 照射苗の培養方法

照射済みシャーレを当場に持ち帰り、ホルモンを添加していないMS固体培地(シヨ糖3%、ゲルライト0.3%)を15 mLずつ分注した直径4 cm高さ15 cmのガラス製培養管に、照射した40本の茎を1本ずつ移植した。

それぞれの腋芽から障害無く茎長8 cm程度まで生育した順に、上位30本の一次側枝を用いた。伸長した側枝は茎頂部を除去し、葉を付けたまま茎1本につき連続した5節に葉腋直上で分割・切断した。分割した節(茎)合計150本は、上記と同じMS培地を10 mLずつ分注した直径3 cm高さ15 cmのガラス製培養管に1本ずつ挿した。

再び、それぞれの腋芽から二次側枝が伸長したが、同じ一次側枝由来の5本の二次側枝が、1本も欠けることなく揃って順調に生育した20系統について、合計100本の二次側枝を頂部から30 mmの長さで切り取り、上記と同じMS培地を10 mLずつ分注した直径3 cm高さ15 cmのガラス製培養管に1本ずつ5 mmの深さで挿し、25℃で培養した。

##### (4) 涼温培養条件下における照射苗の一次選抜方法

予備試験において、低温によるロゼット化などの悪影響をキク培養苗に与えない限界培養温度は通常温度より10℃低い15℃(以下、涼温)であることを確認していたので、発根を目視で確認した移植8日後に、15℃に設定した培養室に培養管を移動した。その後、16時間日長条件下(白色蛍光灯、光合成光量子束密度: 8.8 μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>)で30日間培養し、培養苗の茎長を1本ずつ測定した。調査した100本中で茎長が長い順に上位7本の二次側枝を選抜した。

#### 2 冬季温室における低温伸長性系統の二次選抜(試験2)

##### (1) 一次選抜培養苗の発根方法

一次選抜した二次側枝7本は25℃16時間日長条件下に



表1 イオンビーム照射苗の低温培養後の茎長

枝番 系統名	1	2	3	4	5	平均
	mm	mm	mm	mm	mm	mm
A	48	43	42	42	40	43.0
B	46	41	51	49	42	45.8
C	49	48	49	47	47	48.0
D	47	50	47	45	42	46.2
E	48	47	48	50	48	48.2
F	45	46	50	43	45	45.8
G	50	41	47	45	47	46.0
H	46	51	40	43	46	45.2
I	47	47	45	45	33	43.4
J	43	45	50	44	41	44.6
K	46	41	41	43	44	43.0
L	40	42	45	47	42	43.2
M	36	37	44	47	50	42.8
N	40	56	53	54	56	51.8
O	44	44	48	56	50	48.4
P	41	44	45	47	48	45.0
Q	45	50	45	45	43	45.6
R	45	59	55	44	46	49.8
S	43	40	42	45	46	43.2
T	51	50	46	46	44	47.4
	全平均					45.8

注)15℃培養30日後の培養苗の茎長（培養初日は25 mm）を測定した。  
網掛けの7本を選抜した。



図3 一次選抜系統の温室での生育状況  
注)左から順に、対照、N2、N3、N4、N5、O4、R2、R3を示す。

表2 一次選抜系統の冬季温室栽培における移植2か月後の茎長

枝番 系統名	1	2	3	4	平均	標準 偏差	検定
非照射 (対照)	cm	cm	cm	cm	cm	cm	
	6.5	6.5	7.5	13.5	8.5	3.4	
N2	8.5	16.0	24.5	29.5	19.6	9.3	*
N3	12.5	25.0	25.5	26.5	22.4	6.6	**
N4	20.5	22.5	24.5	25.5	23.3	2.2	**
N5	22.5	24.5	25.5	26.5	24.8	1.7	**
O4	8.5	10.5	12.5	16.5	12.0	3.4	
R2	7.5	9.5	10.0	11.5	9.6	1.7	
R3	13.0	14.5	16.0	17.5	15.3	1.9	

注)選抜系統の側枝4本ずつを順化して最低室温を12℃に設定した温室内で栽培し、移植約2か月後に茎長を測定した。  
網掛けの13本を選抜した。  
検定はDunnnettの方法により、5%(\*)及び1%\*\*の危険率で有意差あり。

## 2 冬季温室における低温伸長性系統の二次選抜（試験2）

最低室温を12℃に設定した温室内で、セルトレイを用いて、一次選抜した7本の二次側枝から得られた三次側枝を各4本ずつ、合計28本を2か月栽培したところ、対照区（非照射）がロゼット状になって茎の伸長が少なく、茎長平均8.5 cmであったのに対し、N2、N3、N4、N5のロゼット化はほとんど無く、それぞれ平均20 cm程度まで伸長したが、O4、R2、R3はあまり伸長しなかった（表2）。この結果から、低温伸長性系統としてN2、N3、N4、N5由来の13本を二次選抜した。

## 3 翌年の冬季温室における低温伸長性系統の三次選抜（試験3）

二次選抜した13本から養成した13系統を栽培し、定

植4、6、8週後の茎長を経時的に測定したところ、定植4週後（0～4週）は対照区（非照射）とほとんど同じ茎長であったが、定植4～6週の間にはN41～44系統が対照区より長く伸長した。定植6～8週の間ではN41～44系統とN51～54系統が対照区より長く伸長し、その結果、6週後の茎長は二次選抜した13系統の内8系統が、対照区より茎長が長かった（図4）。

定植1か月後に消灯し、それぞれの個体の頂花開花時の茎長を測定したところ、対照区は平均66.8 cmであったが、N41～44系統が73.7～75.8 cm、N51～54系統が72.5～75.8 cmと5.7～9 cm、対照区より長かった（図5）。

それぞれの頂花開花日を調べたところ、対照区の平均は消灯後55.4日であった。開花時茎長が長かったN41～44系統は消灯後54.6～55.4日、N51～54系統は54.0

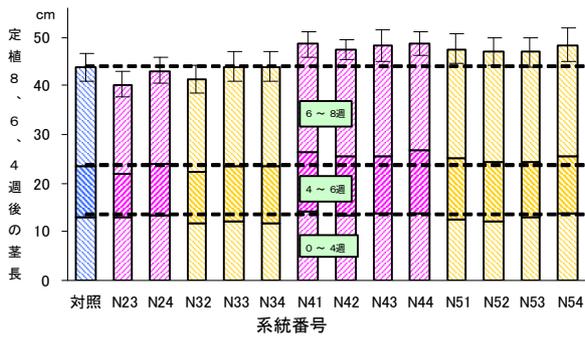


図4 二次選抜した13系統における定植4、6、8週後の茎長  
注) 棒グラフ上のBarは標準偏差を示す。

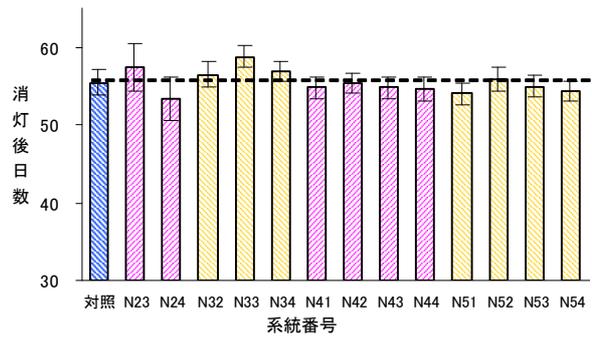


図6 二次選抜した13系統における頂花開花までの消灯後の日数  
注) 棒グラフ上のBarは標準偏差を示す。

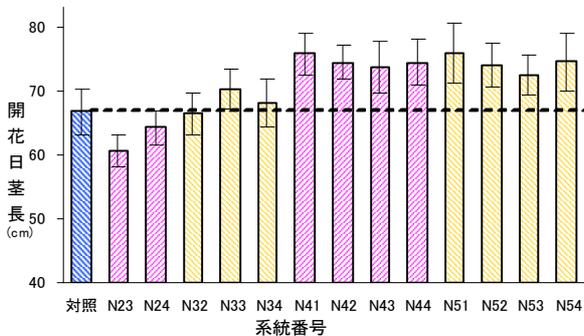


図5 二次選抜した13系統における頂花開花時の茎長  
注) 棒グラフ上のBarは標準偏差を示す。

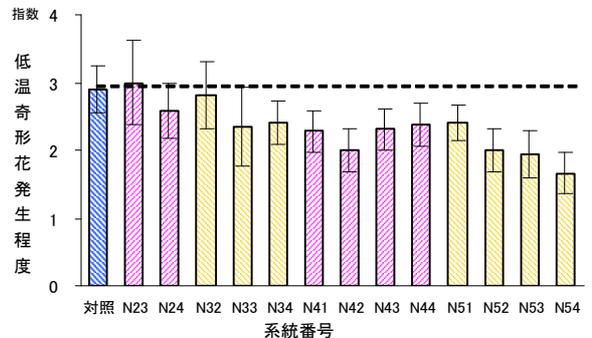


図7 二次選抜した13系統における開花時の低温による奇形花発生程度  
注) 棒グラフ上のBarは標準偏差を示す。

～55.8日と対照区とほぼ同じであった。N32～34系統は56.4～58.8日と対照区より遅かった(図6)。

プリティララで発生する低温栽培時での奇形花発生程度を調査したところ、対照区の発生程度2.9であったのに対し、開花時茎長が長かったN41～44系統の発生程度は対照区より0.5～0.9低く、N51～54系統の発生程度は0.5～1.2低かった(図7)。

以上の結果、最低気温12℃設定の温室栽培での低温伸長性と消灯後、頂花開花までの日数が短い性質(低温開花性)を兼ね備える系統は無かったが、N41～44系統とN51～54系統の低温伸長性が優れていた。それらの中から低温栽培による奇形花発生が少ない性質を考慮して、N42系統とN54系統を三次選抜できた。

### 考 察

放射線照射個体の選抜を効率的に行って、突然変異育種期間の短縮と栽培労力の削減を図るため、浅見ら<sup>6)</sup>は前報で、一年中、同じ条件で評価が行えるキク無側枝性のインビトロ検定方法を報告した。このよう

な培養中の一次選抜は、目的形質を持つ有望な個体を上位から順に抽出できる利点がある。一方、有望個体を明確に抽出できない場合でも、照射した元品種並あるいは元品種以下の形質を持つ多数の照射個体を除外する判断が可能である。

本試験では、培養中の涼温条件下で低温伸長性を示した二次側枝7本を選抜し、それらから由来する系統を、実際の低温条件下で温室栽培したところ、明らかに2系統が低温伸長性を保持していることを確認できたので、今回用いた培養時の評価・選抜が、前報<sup>6)</sup>と同様、選抜に要する年数の短縮と、多数の被評価個体の栽培労力を大幅削減できると考えられた。

一般に成長点に放射線が照射されると、異なる影響を受けた複数の細胞を含む成長点になるので、生長した個体は周縁キメラあるいは区分キメラとなる。得られた有望苗がキメラの場合、個体全体が同一変異細胞になるよう、キメラを解消する切り戻し等の処理が別

に必要となる<sup>8)</sup>。

試験1では、照射した培養苗20本を1回摘心して5本ずつ得られた一次側枝合計100本から、涼温培養条件下において伸長の良かった7本を一次選抜した。その内、照射したO系統からはO4の1本、R系統からはR2とR3の2本を選抜したが、試験2で、それぞれから得られた4本の二次側枝は、R2は対照区(非照射)並、O4とR3系統は対照区より長かったが、20 cm以上伸長したN系統より短かったので、一次選抜時にあった低温伸長性を持つ茎頂の変異セクターが、切り戻しによるキメラ解消によって失われた可能性がある。

一方、試験1で照射したN系統の一次側枝5本の内の4本で低温伸長性に優れる系統が選抜できた。試験2で、N2系統は4本中2本の茎長が20 cmを超えたが、1本がロゼット化し、もう1本もやや短かった。同様にN3系統では4本中3本が、N4とN5系統は4本とも20 cmを超えた。さらに、茎長が20 cmを超えた二次側枝を選んで試験3の温室栽培で評価したところ、N2系統2本とN3系統3本の開花時茎長は対照区並みであったが、N4とN5系統はそれぞれ4本中4本の茎長が長かった。つまり、切り戻しの繰り返しにより、低温伸長性を持つN系統の茎頂の変異セクターが、N2とN3系統では失われたが、N4とN5系統では失われずに、低温伸長性を有する完全変異体に近い個体になったと言えよう。

栽培ギクであるイエギクの葉序は2/5であり<sup>9)</sup>、葉5枚が2周展開すると6枚目が同じ位置になる。通常のキク栽培においては、摘心後は腋芽が2~3本しか伸長しないが、組織培養苗を用いた本試験では、上方から見た成長点のほぼ全周をカバーできるよう、照射苗を摘心後、試験1では連続した5節、試験2では連続した4節の腋芽から側枝を得て、成長点の有望な変異セクターが失われないように努めた。その結果、N4とN5系統を得たが、このように連続した5節の腋芽から側枝を得るといふ、意図を持った操作を行いやすいのも組織培養時の選抜の利点である。

以上のように、キクの突然変異培養苗から低温伸長性個体を選抜する方法として、(1)照射後もそのまま培養を継続して1回から2回摘心を行い、15°Cの涼温条件下で培養して茎伸長の優れた系統の一次選抜を行なう、(2)狭い面積で栽培可能なセルトレイを用いて

最低気温を低く設定した冬季の施設で栽培して二次選抜を行うことの有効性を実証することができた。本試験は愛知県育成スプレーギク品種を対象に行ったが、突然変異育種法により、他の一輪ギク等の品種・系統の低温伸長性個体を選抜・育成する際も、上記の方法が適用できると考えられる。

**謝辞**：本研究を行うに当たり、国立研究開発法人日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門の長谷純宏博士及び鳴海一成博士(現東洋大学生命科学部)にご指導頂いたので、ここに感謝の意を表す。

## 引用文献

1. 永富成紀. キクの緩照射と花器培養による花色変異6系統の育成. 放射線育種場テクニカルニュース. 43 (1993)
2. 今給黎征郎, 永吉実孝, 郡山啓作, 上野敬一郎. 無側枝性輪ギク「新神」の育成. 鹿児島農試研報. 34, 15-19 (2005)
3. 上野敬一郎, 永吉実孝, 今給黎征郎, 郡山啓作, 南公宗, 田中淳, 長谷純宏, 松本敏一. イオンビームの再照射によって秋輪ギク「神馬」の複数形質を改良した新品種「新神2」の育成. 園芸学研究. 12, 245-254 (2013)
4. 田中淳. イオンビーム育種技術の開発と特徴. 放射線と産業. 99, 4-10 (2003)
5. 金子栄一, 森田隆幸. 無側枝性ギクの脇芽形成に及ぼす栽培温度の影響. 園学雑. 71別1, 171 (2002)
6. 浅見逸夫, 長谷川徹, 山田真人. キクの無側枝性評価のための簡易な幼苗及びインビトロ検定法の開発. 愛知農総試研報. 42, 1-6 (2010)
7. Murashige, T., Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497 (1962)
8. 渡辺好郎, 山口彦之. 突然変異育種. 養賢堂. 東京. p. 126-128 (1983)
9. 小西国義. 植物の生長と発育. 養賢堂. 東京. p. 18-22 (1985)