

## キク組織培養苗への軟X線照射が不定芽分化や腋芽の生育に及ぼす影響

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

**摘要**：突然変異誘発のためにキク培養苗器官へ軟X線を照射した場合の種々の品種における放射線感受性を調査した。

- 1 愛知県育成一輪ギク品種「白粧」培養苗の葉切片に軟X線を照射したところ、切片からの不定芽分化率は8.4 Gyで、1切片あたりの不定芽分化数は5.2 Gyで、それぞれ非照射区(0 Gy)の50%程度まで低下した。また、照射後に葉が3日以上以上の暗黒条件に遭遇した場合、不定芽分化に悪影響があった。
- 2 「白粧」を含む4品種の培養苗葉腋芽の成長点に軟X線を照射したところ、照射40日後に10 mm以上伸長する腋芽の割合が、1品種は約19 Gyで、残り3品種は14 Gy~17 Gyで非照射区(0 Gy)の50%以下に低下した。また、伸長した腋芽の重量については、全ての品種が約17 Gy~20 Gyで、茎長については2品種が12 Gy~14 Gy、2品種が17 Gy~18 Gyで、非照射区の50%以下に低下した。

**キーワード**：キク、組織培養、不定芽、突然変異、軟X線、照射時期

### 緒言

イオンビーム照射は低線量でも変異誘発効果が高く、色々な種類の突然変異を引き起こす長所がある<sup>1)</sup>。キクにおいても、新花色<sup>2)</sup>の他、芽無し性<sup>3)</sup>、低温伸長性<sup>4)</sup>、早期開花性<sup>5)</sup>の品種が育成されていることから、当场においても県育成品種に照射して、優れた形質を持つ高品質育種素材を作出することを計画している。しかし、国内でイオンビーム照射を依頼できる施設は限られ照射機会が少ないので、突然変異育種を効率的に行うためには、照射予定キク品種の放射線感受性等を予め調査しておくことが望ましい。

キクの突然変異育種に関する報告は多いが、それらは放射線の種類や照射時期が異なり、単純には比較できない。また、一般的に放射線照射の影響は、放射線の強さだけでなく、照射される器官の違いや品種間差もあると言われている<sup>6)</sup>。さらに、放射線照射には、①組織培養苗器官から不定芽誘導させる際に照射する方法と、②茎頂や葉腋の成長点に照射する方法の二つがある。

浅見ら<sup>7, 8)</sup>は、イチジク培養苗を用いてイオンビームと軟X線の感受性に相関があることを報告している。そこで、キクへのイオンビーム照射の前に、試験が常時実施可能な当场保有の軟X線照射装置を用い、キク品種の培養苗器官への両方の方法における放射線照射の影響を調査した。また、照射試料をイオンビーム照射施設へ往復搬送することを想定し、試料を暗黒下で一定期間、

保管した場合の影響も調査した。その結果、いくつかの知見が得られたので報告する。

### 材料及び方法

本研究は愛知県農業総合試験場で2007年4月から2009年1月にかけて実施した。

#### 1 キク組織培養苗葉切片への軟X線照射が不定芽の分化と生育に及ぼす影響(試験1)

キク培養苗の葉切片に軟X線を段階照射して、不定芽分化率への影響を調査した。さらに照射試料を宅配便等で照射施設へ搬送することを想定し、キク葉を採取してから照射まで暗黒下で一定日数保管した影響を調査した。

##### (1) 供試材料及び照射方法

継代培養で維持している愛知県育成一輪ギク品種「白粧」<sup>9)</sup>の培養植物を用いた。容器内の葉を葉腋部分で1枚ずつ切り取り、葉柄を直径6 cmのプラスチックシャーレ内の固体培地(1/2 Murashige and Skoog<sup>10)</sup>培地(以下MS)、ショ糖3%、ゲルライト0.3%)に挿し、直ちに軟X線をシャーレの蓋越しに種々の線量(1.5~9 Gy)で照射した。なお、シャーレ蓋による透過減衰があるため、予めシャーレ蓋越しで実測した線量で照射した。照射した葉はシャーレに入れたまま25℃暗黒下で3~9日間保管し、3日間隔で葉を取り出して培養試料を調製した。照射は軟X線照射装置(ソフテックス株式会社、M-100WE型、東京:100 KVp、5 mA、120

<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

Gy/hr) を用いた。

(2) 不定芽分化用培地

ショ糖4.5%、NAA0.5 mg/L、BA0.5 mg/L、ゲルライト0.3%を添加したMS培地を、直径90 mm厚さ20 mmのプラスチックシャーレに25 mlずつ分注して用いた。

(3) 培養及び調査方法

照射後に暗黒保管し、シャーレから取り出した葉を3.5 mm角四方に細断し、葉表面が培地に接するようにして1 シャーレ50切片ずつ置床した。培養環境条件は25℃、16時間日長（白色蛍光灯：光強度8.8  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）で行い、置床30日後の不定芽分化率及び1切片あたりの不定芽数を調査した。

(6～36 Gy) で腋芽に向けて照射した。

(3) 培養及び調査方法

照射した茎は直ちにショ糖2.5%、ゲルライト0.3%を添加した1/2濃度のMS培地を40 mlずつ分注したプラントボックス内に、1箱あたり3本ずつ移植した。1試験区あたり30節を供試した。

移植後の培養環境は25℃、16時間日長（白色蛍光灯：光強度40  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）で行い、照射40日後に伸長した腋芽の生存率と10 mm以上伸長した腋芽の割合、腋芽の重量、腋芽の茎長、葉数を調査した。

結果及び考察

2 キク4品種の葉腋芽成長点への軟X線照射が腋芽の生長に及ぼす影響（試験2）

(1) 供試材料

愛知県育成一輪ギク品種「白粹」の他、「神馬」、愛知県育成スプレーギク品種「ドリームスター」「プリティララ」の計4品種の培養苗を用いた。

(2) 照射方法

茎頂部と葉を切除した茎部を節ごとに葉腋直上で切断し、直径90 mm厚さ20 mmのプラスチックシャーレ内のMS固体培地（ショ糖3%、ゲルライト0.3%）に1本ずつ腋芽を上方に向けて挿した。軟X線照射は試験1と同装置・同条件で行い、シャーレの蓋越しに種々の線量

1 キク組織培養苗葉切片への軟X線照射が不定芽の分化と生育に及ぼす影響（試験1）

培養植物から葉を採取し、直ちに葉切片に調製して不定芽分化用培地に置床した場合、置床30日後の不定芽分化率は100%であったが、葉を暗黒下で9日間保管後に切片を細断・置床した場合でも不定芽分化率は100%であった。葉に軟X線を照射した場合は、照射量が多くなるほど不定芽分化率が減少し、その程度は暗黒保管日数が長くなるほど大きかった（表1、図1左）。葉を切り取って直ちに切片を不定芽分化用培地に置床した場合、すなわち暗黒化で保管しない場合、不定芽分化率は8.4 Gy照射で非照射区（0Gy）の50%程度まで低下した（図1左）。

表1 葉の暗黒下保管日数及び軟X線照射量と不定芽分化率（%）

照射後、切片置床までの暗黒保管日数	照射量						
	0Gy	1.5Gy	3Gy	4.5Gy	6Gy	7.5Gy	9Gy
0日	100	100	100	100	80	60	43
3日	100	100	98	79	59	40	33
6日	100	100	98	73	53	36	29
9日	100	94	87	68	48	27	18

注) 培養植物から葉を切り取って葉柄基部をシャーレ内の固体培地に挿して直ちに軟X線を所定量ずつ照射した。照射葉はシャーレに入れたまま25℃暗黒下で保管し、3日間隔で取り出し3.5 mm角に切断してショ糖4.5%の不定芽分化培地に置床した。各区50切片ずつ供試し、置床30日後に調査。

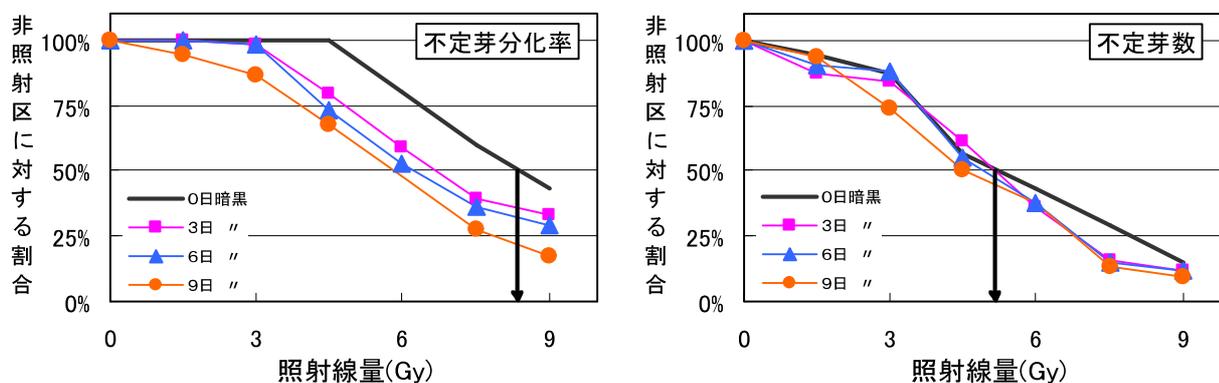


図1 葉の暗黒下保管日数及び軟X線照射量と非照射区に対する不定芽分化率及び不定芽分化数の割合との関係

注) 表2及び表3の0日暗黒区の数値に対する各区の割合を%で示した。

表2 葉の暗黒下保管日数及び軟X線照射量と一切片あたりの不定芽数

照射後、切片置床ま での暗黒保管日数	照射量						
	0Gy	1.5Gy	3Gy	4.5Gy	6Gy	7.5Gy	9Gy
0日	3.13 <sup>a</sup> (1.23)	2.94 <sup>a</sup> (1.22)	2.72 <sup>ab</sup> (1.10)	1.76 <sup>bc</sup> (0.77)	1.34 <sup>cd</sup> (0.87)	0.91 <sup>cde</sup> (0.90)	0.48 <sup>e</sup> (0.59)
3日	3.04 <sup>a</sup> (1.22)	2.65 <sup>ab</sup> (0.99)	2.57 <sup>ab</sup> (1.03)	1.88 <sup>bc</sup> (1.30)	1.09 <sup>cd</sup> (1.10)	0.49 <sup>d</sup> (0.70)	0.37 <sup>d</sup> (0.57)
6日	2.47 <sup>a</sup> (1.01)	2.22 <sup>a</sup> (1.04)	2.17 <sup>ab</sup> (1.00)	1.36 <sup>bc</sup> (1.01)	0.92 <sup>cd</sup> (1.02)	0.36 <sup>d</sup> (0.49)	0.29 <sup>d</sup> (0.46)
9日	2.32 <sup>a</sup> (1.06)	2.17 <sup>ab</sup> (1.06)	1.71 <sup>ab</sup> (1.08)	1.16 <sup>bc</sup> (1.04)	0.88 <sup>cd</sup> (1.10)	0.32 <sup>cd</sup> (0.56)	0.23 <sup>d</sup> (0.58)

注) 試験方法は表2と同じ。

数値は不定芽数の平均値で、かっこ内は標準偏差。

切片置床までの暗黒保管日数ごとの試験区(照射量)において、異なるアルファベット間に5%以下のレベルで有意差あり(Sceffeの方法による多重比較)。

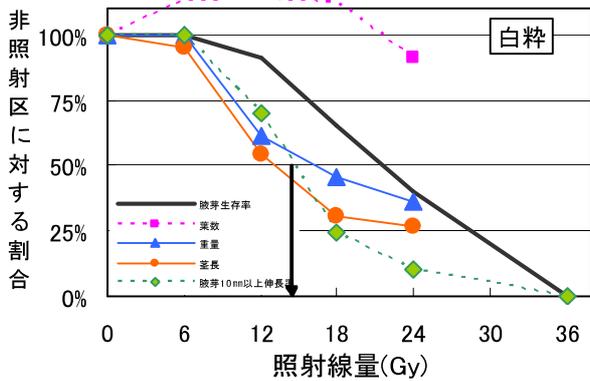


図2 「白粋」における軟X線の段階照射が腋芽の伸長等に及ぼす影響

注) 非照射(0Gy区)の数値(腋芽生存率100%、葉数10.4枚、重量597mg、茎長33.3mm、10mm以上伸長腋芽率100%)に対する各区の割合(%)を示した。

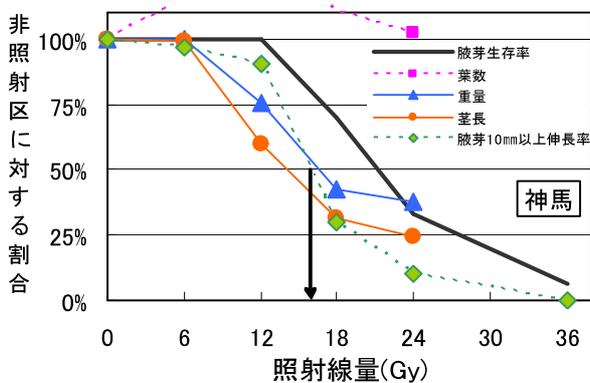


図3 「神馬」における軟X線の段階照射が腋芽の伸長等に及ぼす影響

注) 非照射(0Gy区)の数値(腋芽生存率100%、葉数11.6枚、重量616mg、茎長39.1mm、10mm以上伸長腋芽率100%)に対する各区の割合(%)を示した。

1 切片あたりの不定芽分化数は、照射量が多くなるほど、減少した。しかし、暗黒保管日数ごとに、それぞれ軟X線照射量区の結果を比較したところ、照射量が3Gy以下の場合、非照射区と有意差が認められないが、4.5Gyを超えると明らかに減少した(表2)。暗黒化で保管しない場合、1切片あたりの不定芽分化数は5.2Gy照射で非照射区の50%程度にまで低下した(図1右)。

本試験で追加した暗黒下での保管は、宅配便等による箱内での照射試料搬送を想定した試験である。幸い、近年の日本国内輸送は、離島便ではない限り2日程度であるが、少なくとも3日間の暗黒条件は、葉切片からの不定芽分化と不定芽生育に悪影響を及ぼすことがわかった。

## 2 キク4品種の葉腋腋芽成長点への軟X線照射が腋芽の生長に及ぼす影響(試験2)

軟X線照射40日後の腋芽の生存率と生育程度を、供試した4品種の非照射区(0Gy区)の数値に対する各照射区の数値の割合(%)として図2~図5に示した。

軟X線照射による腋芽生存率への影響は品種によってわずかに異なったが、腋芽生存率が下がるのは4品種とも12Gyを超えてからであった。また、非照射では100%であった腋芽の生長(伸長)は、照射量が多くなるほど腋芽の伸長が悪くなり、非照射に対して10mm以上伸長する割合が50%以下に低下する線量は「ドリームスター」が約19Gyで、他の3品種は14Gy~17Gyであった。

伸長した腋芽の重量が非照射区の50%以下に低下する線量は17Gy~20Gyであった。同様に腋芽の茎長が非照射区の50%以下に低下する線量は「白粋」「神馬」が低く12Gyと14Gyで、その他の品種は17Gy~18Gyであった。軟X線照射で最も影響を受けたのは葉数で、6Gy~18Gy照射で全品種の葉数が非照射区よりも増加したが、増加した理由は不明である。

試験2の結果から、本試験で用いた4品種の培養苗葉腋腋芽の放射線感受性の品種間差はそれほど大きくないこと、腋芽の生存率や生育を半減させる軟X線の線量が

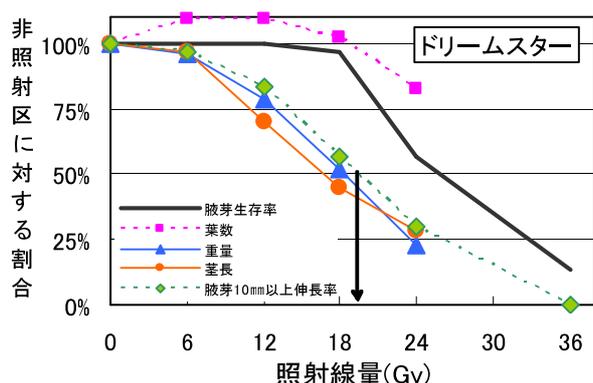


図4 「ドリームスター」における軟X線の段階照射が腋芽の伸長等に及ぼす影響

注) 非照射 (0 Gy区) の数値 (腋芽生存率100%、葉数10.4枚、重量489mg、茎長36.3mm、10mm以上伸長腋芽率100%) に対する各区の割合 (%) を示した。

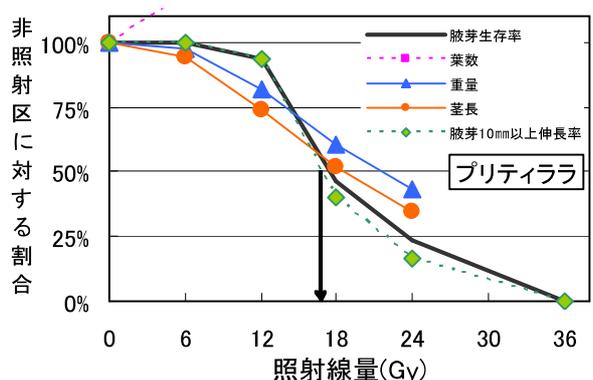


図5 「プリティアラ」における軟X線の段階照射が腋芽の伸長等に及ぼす影響

注) 非照射 (0 Gy区) の数値 (腋芽生存率100%、葉数10.6枚、重量444mg、茎長44.2mm、10mm以上伸長腋芽率100%) に対する各区の割合 (%) を示した。

わかった。今後、当场での本格的な育種に向け大規模な放射線照射を行おうとする場合、照射線量の決定は重要である。適性線量は幼苗の生育量を非照射に対し30~50%抑制する程度とされ、さらに選ばれた線量とその上・下20%の3段階照射が勧められている<sup>6)</sup>。また、カーネーションでは組織培養苗の花弁や葉片から植物体を再生させる際に照射する方法において、植物体再生率の線量反応曲線の肩付近から半減するまでの線量域で、最も効率的に変異体が得られている。キクでは、同様に植物体再生率が半減する線量もしくはそれ以下の線量で最も良く変異体を得ている報告がある一方で、「神馬」では線量反応曲線の肩付近の弱い線量で照射しても花のボリュームや草丈が低下するので、実際には肩の線量の半分程度で照射しているとの報告もある<sup>11)</sup>。したがって、

キク組織培養苗の葉腋腋芽に軟X線を照射する場合、試験2で得られた腋芽の生育程度を半減させる線量以下で照射することが望ましいと思われる。

浅見らは、2品種のイチジク培養苗養液腋芽に軟X線と炭素イオンビームを照射した影響を報告<sup>7, 8)</sup>しており、両放射線照射後の培養苗の生育を比較すると、6 Gy及び10 Gyの軟X線照射は1 Gyの炭素イオンビーム照射 (320 MeV・12C<sup>6+</sup>, LET: 86 keV・μm<sup>-1</sup>) とほぼ同等の影響を与えていたので、本試験の成果も併せて、今後のイオンビーム照射の参考になると思われる。

## 引用文献

1. 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)
2. Nagatomi, S., Tanaka, A., Watanabe, H. and Tano, S. Enlargement of potential chimera on chrysanthemum mutants regenerated from 12C5+ ion beam irradiated explants. TIARA Annual Report 1996, 48-50(1997)
3. 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)
4. 上野敬一郎, 今給黎征郎, 南公宗, 長谷純宏, 永吉実孝, 郡山啓作, 田中敦, 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)
5. 池上秀利, 須山拓郎, 國武利浩, 黒柳直彦, 長谷純宏, 田中淳. イオンビーム照射による「神馬」の突然変異誘発と新系統「JCH1029」の育成. 福岡農総試研報. 25, 47-52(2006)
6. 花卉園芸大百科, 7, 育種/苗生産/バイオ活用. 農山漁村文化協会. 東京. p.105-114(2002)
7. Asami, I., Fukuta, S., Kuroyanagi, A., Ooya, T., Hase, Y., Yokota, Y., and Narumi I. Producing New Gene Resources in Fig by Using Ion-beam Irradiation. TIARA Annual Report 2006, 80(2007)
8. Asami, I., Fukuta, S., Kuroyanagi, A., Ootake, Y., Hase, Y., Yoshihara, Y. and Narumi I. Producing New Gene Resources in Fig by Using Ion-beam Irradiation. TIARA Annual Report 2007, 76(2008)
9. 奥村義秀, 加藤博美, 石川高史, 青木献, 西尾譲一. 輪ギク新品種「白粋」の育成. 愛知農総試研報. 38, 87-93(2006)
10. Murashige, T., Skoog, F.. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum. 15, 473-497(1962)
11. 長谷純宏. イオンビーム照射による品種改良の特徴. 第2回イオンビーム生物応用ワークショップ論文集, 5-8(2004)