

博士論文

花卉の花色およびバレイショの塊茎色の
突然変異育種に関する研究

岡村正愛

目次

章		頁
第1章	序論	1
第2章	細胞・組織培養系の開発によるソマクローナル変異利用育種	6
2-1	緒言	6
2-2	材料及び方法	8
2-3	結果及び考察	12
2-4	小括	27
第3章	イオンビーム育種系の開発によるカーネーション花色変異の創製	29
3-1	緒言	29
3-2	材料及び方法	31
3-3	結果及び考察	35
3-4	小括	54
第4章	花色突然変異の頻度およびスペクトルを意図的に向上させる試み	55
4-1	緒言	55
4-2	材料及び方法	57
4-3	結果及び考察	60
4-4	小括	72
第5章	総合考察	73
要旨		80
謝辞		83
参考文献		84

第1章 序論

育種における突然変異の役割と課題

人類が野生植物を栽培化し作物として改良するようになって1万年以上になる。植物の育種は食用作物や園芸植物の改良を通じて人類の衣食住に重要な役割を果たしてきた。育種の基本要素には育種目標の設定と材料の選択、そして変異の拡大と目的形質獲得個体の選抜がある。変異の拡大は自然交雑や自然突然変異に長い間頼ってきたが、メンデルの遺伝の法則の再発見以降、育種目標に沿って選択した両親を交雑し、その有用形質を併せ持つ後代を得る科学的な育種方法が発展した。突然変異育種は園芸花卉やバレイショなどの栄養繁殖作物で枝変わり等の形で利用されてきたが、X線による人為的突然変異誘発法の発見(Stadler 1928)以降積極的に利用できるようになった。1960年代には化学変異原の研究が活発に行われると共に、ガンマ線利用の進展から電離放射線が突然変異に与える影響の研究が進み、1966年のイネ品種「レイメイ」の育成、各種園芸植物での品種育成など実用化事例が増大した(山口 1983)。1990年代には粒子線であるイオンビームが突然変異に与える影響の基礎研究が進展し(田野 1996)、その産業応用につながる(岡村 2008)。他方で、1950年代から70年代には植物の細胞・組織培養技術が飛躍的に進展した。この技術は外来遺伝子導入による形質転換育種に応用されるとともに、細胞・組織培養自体が突然変異を誘導することが明らかとなりソマクローナル変異利用による育種が提唱された(Larkin and Scowcroft 1981)。

品種改良において突然変異育種が果たす役割として、優良形質をもつ品種での1つ或いは極少数の形質を改良できることがあげられる。突然変異育種の利用によりこれまでに3,000以上の品種が育成されている。そのほとんどがガンマ線照射や化学変異原によるものである(The Joint FAO/IAEA Programme, Mutant Variety Database (MVGDS))。今日、多様化した突然変異育種技術には2つ課題がある。つまり、1) 突然変異育種を実用品種育成に活用する際の各技術の特長と欠点及び利用の明確な指針が示されていないこと、また2) 突然変異はランダムに起こるとされ究極の目標は変異の方向性の制御であるが(渡辺と山口 1983)、にもかかわらず研究例が極少ないことである。つまり、これらの課題に総合的に取り組んだ研究報告はほとんど無い。

材料とした植物での突然変異育種の意義

優良形質を持つ品種で1個または数個の形質をピンポイント改良できるという突然変異育種の特長は特に栄養繁殖植物で効果的となる。キクやカーネーション等の花卉類は同じ栽培体系で多様な花色花形を生産できることが多大な経済メリットを生む。栽培性・生産性・耐病性などに総合的に優れる品種は稀にしか育成されないため、この優良品種から突然変異により様々な花色を得ることが非常に重要となる。キク栽培品種は6倍体であるにも関わらず花色の突然変異体が出現し易い。この要因として、キクは同質倍数体ゲノムをもつこと(Taniguchi et al 2002, 草場ほか 2009)、また花色変異により各種色揃えを作りやすい遺伝子型が商業栽培品種を育種する過程で選ばれてきたことが推定されるが、明確な理由は分かっていない。キク花色の突然変異研究はこれを解明する一助となる。

またイネ、コムギなどと並ぶ主要食用作物であるバレイショは高次倍数性栄養繁殖植物であり、栽培性・耐病性・収量・食味など総合的に優れる優良品種の育成には長期間を要する。交雑育種では後代における形質分離がおこるため両親の有用形質を併せ持つ品種育成は困難を極める(Ross,

1986)。そこで優良品種がもつ欠点を突然変異により改良することが大きな意義を持つ。これらの観点から本研究ではキクやカーネーション等の花卉及びバレイショを材料とした。

材料とする植物体、細胞の生理状態の重要性

細胞組織培養では効率的な培養方法が報告されても、その再現が困難な場合が多い。それは材料とする植物の生理状態、遺伝子の発現状態が異なるためと筆者は推定した。実際にプロトプラストの培養試験では、温室栽培植物よりも試験管で腋芽を植え継ぎ育成した植物（試験管植物）を材料とした場合に安定した分裂頻度を示し、さらに試験管植物でも展開第3~4葉の基部側が最も再現性の高い結果を生むからである。これはソマクローン（体細胞から再分化した植物体）やプロトクローン（プロトプラストから再分化した植物体）における変異の出現のみならず、放射線を照射した場合の変異の出現にも影響すると洞察した。そこで全ての章の試験において、材料の育成方法や材料部位、またその生理状態に留意した。

変異を捉える形質として色の重要性

新たな色の導入は花卉園芸における品種改良の最も大きな目標のひとつである。新しい花色の追加により花色がシリーズ化することで品種群の売上が向上し、その花のカテゴリー自体が活性化するなど大きな経済効果をもつためである。また植物の色は鑑賞価値だけでなく、栄養・健康面でも重要である。例えば野菜・果物等のアントシアニン色素はポリフェノールの一つフラボノイドであり抗酸化作用をもつ。突然変異により得られたキクの花色やリンゴの果皮色、白いエノキタケなどの実用化は、色の変化が新たな価値をもたらす例証である。また色素は典型的な二次代謝産物のひとつであり、植物の感染防御やヒトへの薬効成分など広範な応用が期待できる二次代謝系での変異誘導モデルともなる。またカーネーションは色素に関する代謝系や遺伝子の解析が進んでおり突然変異の機構を調べる対象として優れている。

本論文の目的

育種の目的は優良な品種の育成にある。しかしX線・ガンマ線またイオンビームの照射、ソマクローナル変異などの突然変異育種各手法で実際に品種を育成し、長期間に渡る変異形質の安定性確認を含めて各技術の特長を検証した事例はほとんど無い。本研究では、(1)キクとバレイショ類での高効率プロトプラスト培養系及び植物体再分化系の開発とその利用によるソマクローナル変異品種の開発(第2章)、(2)イオンビーム育種系の開発およびガンマ線照射と比較した場合の特長、カーネーションでの新花色創製(第3章)、また(3)ランダムに起こるとされる突然変異で材料の生理状態を変化させることによる変異の方向性の制御(第4章)について各々研究し、いずれも世界に先駆けた手法開発、品種育成と実用化にいたった筆者の事例を通じて、1)多様化した突然変異育種各技術の特長を有効活用する指針を得ること、2)花色変異の頻度を上げスペクトルを拡大する手法について知見を得ることを目的とする。

(1) 細胞・組織培養系の開発によるソマクローナル変異利用育種

受精卵から植物個体が発生していく間に、一部の体細胞に突然変異が生じ、新形質が発現することが知られている。この現象は古くから枝変わりなどの形で主として栄養繁殖植物の改良に利用されてきた。細胞・組織培養技術を用いれば、体細胞のなかに生じた有用な変異を、その細胞からの

個体再生により拾い上げることができる(岡村 1988)。さらに、細胞組織培養自体により様々な変異が誘導され後代に受け継がれることから細胞組織培養技術を変異拡大の手段とする考えが生まれた(Larkin and Scowcroft 1981)。しかしソマクローナル変異による品種育成事例は学術報告に留まるものが多く、実用販売され5年、10年と長年に渡り突然変異形質の安定性を検証し、突然変異育種技術としての有用性を示した事例はほとんど無い。そこで、1) キク科植物での高効率プロトプラスト培養系の開発、2) バレイショの高効率プロトプラスト培養系の開発と実用品種の育成、3) キクのソマクローナル変異利用系開発と他花卉類への応用、について各々研究し、ソマクローナル変異育種の特長と欠点、また実用品種の育成と事業化後の安定性を検証した。

1) キク科植物での高効率プロトプラスト培養系の開発

細胞・組織培養の基本技術であるプロトプラストからの植物体再分化系の開発は世界に先駆けて日本人の手によりタバコ(*Nicotiana tabacum*)で成し遂げられたが (Nagata and Takebe 1971)、モデル植物であるタバコの手法が適用できない植物種が数多く存在する。キク科 (Asteraceae) は被子植物の約 10%を占め栽培ギクは世界最大の生産量をもつ花卉であるが、タバコの培養方法を用いても数%の細胞分裂頻度しか得られないことが複数のキク属で判明した。本研究ではこの原因を明らかにし効率的な培養法を開発することを試みた。

2) バレイショの高効率プロトプラスト培養系の開発と実用品種「ジャガキッズ」の育成

細胞組織培養では材料とする植物組織や細胞の生理状態が培養結果に大きな影響を与える。しかし生理状態を積極的に改善することで培養効率を向上させることに成功した例は極少ない。そこでプロトプラストを単離する材料組織細胞の生理的な状態を調整・均一化させることにより細胞分裂及びコロニー形成率を向上させ、効率的な植物体再分化系を確立することをバレイショ栽培種 (*Solanum tuberosum*) 及びソラナム属数種で試みた。さらにプロトプラストからの再分化植物体に出現する変異 (プロトクローナル変異) を利用し、枝変りや交雑による育種が困難な材料を用いて実用品種の育成を試みた。

3) キクのソマクローナル変異利用系開発と他花卉類への応用

キクは高次倍数性かつ栄養繁殖というバレイショと類似の特性をもちソマクローナル変異の利用が考えられる。栽培キクでは桃花色の品種から花色の自然突然変異が多く出ることが知られている。そこで桃花色のキク品種「リネカー」の葉を材料としてプロトプラスト変異とソマクローナル変異を調査比較した。また濃紫桃品種は花色の自然突然変異がほとんど出現しない。そこで濃紫桃花色品種「ローズクイーン」の葉および管状花を材料にソマクローナル変異を調査し品種育成を試みた。さらに開発した手法をカーネーション(*Dianthus caryophyllus*)、ペチュニア(*Petunia hybrida*)へ応用することで新品種の育成を意図した。

(2) イオンビーム育種系の開発によるカーネーション花色変異の創製

プラス荷電をもつイオンが原子の近くを通ると電子には引力を原子核には反発力を与えるため電子を原子核から引き離す力が働く。放射線が通過距離当たりで物質にわたすエネルギーを LET (Linear Energy Transfer : 線エネルギー付与) と呼び、このエネルギーが放射線経路での電離と DNA の損傷をもたらす。ガンマ線では点状の損傷が一様・ランダムに分布するが、イオンビームでは経路に沿った直径数ナノメートルの円柱状の領域で高密度に損傷が生じ、修復し難い損傷を誘導する (Kraft et al 1992)。実際にシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の試験では電子線と比イオンビームは 20 倍の突然変異頻度を示す。このためイオンビームはガンマ線などの低 LET 放射線とは異なる

生物効果をもち、その照射により得た突然変異体は、育種目標として選抜した変異形質以外の不要変異を伴う確率が低くなると期待された (田野 1996)。そこで、1) 組織培養利用によるイオンビーム育種技術の開発とカーネーション品種育成、2) イオンビーム照射、ガンマ線急照射・緩照射が花色変異に与える影響、及び3) 交雑遺伝情報解析とイオンビーム育種による輝き花色カーネーションの作出について研究した。

1) 組織培養利用によるイオンビーム育種技術の開発とカーネーション品種育成

キクやカーネーションなど主要花卉類では交雑育種により優良品種を育成し、その品種から自然変異により色揃えを図る。しかし各種花色を得る効率は品種や花色により大きく異なるため、新たな変異原であるイオンビームの利用が望まれていた。基礎研究の蓄積がある原子力機構のイオンビーム照射施設 TIARA (Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application) 炭素イオンビームの組織透過性は 2mm であり実用化のためにはイオンが照射された細胞から効率よく植物体を得る技術の開発が重要な課題であった。そこで第 2 章で開発した細胞組織培養系を活かしイオンビームが照射された細胞から植物体を効率的に再分化させ、かつソマクローナル変異をできる限り併発させない培養系により、効率よく突然変異体を獲得する技術の確立を試みた。またイオンビーム育種技術によるカーネーション品種の育成と、その形質安定性を検証した。

2) イオンビーム照射、ガンマ線急照射・緩照射が花色変異に与える影響の研究

イオンビーム照射により出現する花色や花形の変異について、ガンマ線急照射と緩照射で出現する変異と対照し比較調査した例はない。そこで試験管内で育成したカーネーション植物体を材料にイオンビームを照射した後、またガンマ線を急照射あるいは緩照射した後、腋芽から植物体を得て、そこに出現する花色変異の頻度及びスペクトルを調査した。またイオンビーム照射がバレイショの形質変異に与える影響を調査した。

3) 交雑遺伝情報解析とイオンビーム育種による輝き花色カーネーションの作出

イオンビーム照射は幅広い変異を生むことから新たな花色の創製を意図した。通常、カーネーションはリンゴ酸でアシル化された 4 種のアントシアニンを主要アントシアニンとし、それぞれのアントシアニンに対応した赤色、桃色、暗赤色および紫色を基本花色として発色する (Bloor 1998; Nakayama et al. 2000)。これらの基本花色と葉緑素の緑や他のカロテノイド色素との組合せにより様々な色調が既に作られており、新たな色調を得るのは難しいとされていた。一方、カーネーションには液胞内にアントシアニンの凝集体(AVIs)をもつ特殊花色系統が存在する (Markham et al. 2000)。この特殊花色は暗紫色系の色であり市場性は低い。本研究ではこの特殊な色調に関する交雑遺伝情報を検討することで、そのメンデル遺伝性を明らかにし、これまでになく明るい輝き色調を得ることを試みた。この新たな色調をもつカーネーションにイオンビームを照射し色素構造の変化、色素凝集の程度や色素量の変化を誘導することで様々な輝き色調カーネーションを育成し、特殊花色の発色機構、原因遺伝子、遺伝育種基本情報を明らかにすることを試みた。

以上より、イオンビーム育種の実用化を意図し、また花卉の花色等に与える生物影響に関しガンマ線の急照射・緩照射との違いを検証した。

(3) 花色突然変異の頻度およびスペクトルを意図的に向上させる試み

ソマクローナル変異の発見当初から、材料とする組織により出現するソマクローナル変異が異なると推定されてきた (Bush et al. 1976, Evans and Sharp 1986)。しかし筆者の知る限り統計的な裏づけのある明確な事例はない。そこで第 2 章の組織培養系及び材料の前処理手法に第 3 章で開発したイ

オンビーム照射育種を統合利用することで、意図的に花色突然変異の頻度を向上させスペクトルを拡大する手法の開発を試みた。

1) 組織特異的な花色変異の誘発およびイオンビーム照射による変異の効率と幅の向上

キク栽培種は高次倍数性栄養繁殖植物であり突然変異育種による花色・花形変異の育成は経済的インパクトが高い。しかし実用品種の育成ではその効率が重要となる。つまり不要な変異を併発せずに目的とする突然変異をいかに効率よく得るかが常に課題となる。突然変異誘発の効率 efficiency は植物の受ける生育不良・不稔などのダメージ量に対する特定の遺伝的変異の割合で示される (Nilan RA et al 1965)。本研究では、放射線医学総合研究所の重粒子線がん治療装置 HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) イオンビームを利用し、生育の指標である「草丈」へのダメージを最小限に留めつつ花色突然変異をいかに効率よく得るかをキクの葉と花を材料に試験した。そして「材料とする組織によりソマクローナル変異に差が有るか」、また、「イオンビーム照射を組合せた場合にどうなるか」を検証した。

2) キク管状花の前処理と X 線照射による新品種「ホワイトリネカー」の育成

放射線を照射される材料組織・細胞の生理状態が出現する変異の頻度や幅に影響を与えることが推定されたため、ガンマ線照射だけでは「純白」花色が出現しなかったキク品種「リネカー」で、管状花を材料に、照射前に高ショ糖培地培養と低温処理を施し細胞の生理状態を変化させた後に X 線照射することで「純白」変異体の育成を試みた。

3) ショ糖前処理実生へのイオンビーム照射による花色変異誘導の効率化

組織の違いにより得られるソマクローナル変異に差がある場合、その組織の生理状態や遺伝子発現状態が出現する突然変異の種類や頻度に影響を与えている可能性が考えられる。そこで放射線を照射する細胞の状態を意図的に変化させイオンビームを照射すると花色変異の頻度・スペクトルがどう変化するかを調査した。具体的にはペチュニア（青紫花色）の実生を用いて頂芽に色素を誘導してから炭素イオンビームを照射し M2 系統の花色変異を調査することで、花色の変異体が効率よく得られるか検討した。

以上により、ソマクローナル変異を育成する材料組織の違いにより出現する花色変異に差があるか、それはイオンビーム照射により変化するか、また積極的に細胞の生理状態を変えると出現する変異はどう変化するかについて検証した。

本論文の研究により、ソマクローナル変異の特長と実用品種育成への応用、ガンマ線等低 LET 放射線と比較してのイオンビームの特長、組織培養とイオンビーム照射の組合せにより生まれる効果を検証し、多様化した突然変異育種の各技術を効果的に品種改良に活かす指針を得ること、また突然変異研究の究極の目標である変異の方向性の制御について新たな知見を得ることを意図した。

第2章

細胞・組織培養系の開発によるソマクローナル変異利用育種

2-1. 緒言

2-1-1. キク科植物での高効率プロトプラスト培養系の開発

高効率のプロトプラストの培養系は細胞生物学のみならず植物生理学、育種学、バイオテクノロジーの活用全般に重要である。キク科は多数の観賞用園芸植物、薬用植物、野菜、食用油原料などを含む重要な科である。組織培養の基本培地として最もよく使用される培地に MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) がある。また世界で最初にプロトプラストからの植物体再分化に成功した時に開発された培地は NT 培地 (Nagata and Takebe 1971) である。キク科植物数種でプロトプラストを単離し、NT 培地または MS 培地の無機成分にショ糖、浸透圧調整剤、植物生長調節物質を各種組合せて培養を試みたが、1~3%の頻度でしか細胞分裂を誘導できなかった。さらに、有機酸、ビタミン類、糖類を様々な組合せで作成した培地を試みたが、細胞分裂の頻度は 5%から 10%程度であり不安定な結果しか得られなかった。本研究ではキク栽培種の原種とされるキク属植物 2 種及び薬用キク科植物を材料に、材料植物体の育成方法、MS 培地や NT 培地またそれ以外の様々な無機成分をもつ培地を用いて、プロトプラストの単離培養方法を検討し、高効率プロトプラスト培養系の開発を試みた。その際にプロトプラストの生理状態が実験結果に大きく影響することを考慮し、細胞の生理状態の均一性を維持し、かつ各種培地を複数の区画で培養試験することができる MDA (Multiple-drop-array) 法 (Potrykus et al. 1977) を採用した。

2-1-2. バレイショの高効率プロトプラスト培養系の開発と実用品種育成

栽培中に自然に起こる突然変異と比較し組織培養により生じるソマクローナル変異の頻度は格段に高い。再分化植物体が由来する細胞の数はプロトクローンでは 1 つでありキメラの可能性は低い。また植物体再分化のステップが致命的な変異をふるい落とししてくれる。これらはソマクローナル変異を育種利用する際の利点となる。バレイショは最重要作物の 1 つで、単位面積・時間当りの光エネルギー固定量は作物中最上位にある。コムギ、イネ、トウモロコシに次ぐ生産量を持ち必須アミノ酸含量も高い (EAA index: 76-79)。バレイショの改良は交雑や芽条突然変異 (枝変わり) により進められてきたが、高次倍数体 (多くは 4 倍体) かつ栄養繁殖性で栽培品種の 3 割以上が不稔のため育種効率は必ずしも高くない (Ross, 1986)。そこで突然変異の利用が考えられるが、偶然おこる枝変わりを待つのは効率が悪く、芽への放射線照射はキメラ性などの問題が残る。これらの点でバレイショでのソマクローナル変異は有効な育種手段となりうる。バレイショのプロトクローンで有用変異の出現が報告されているが実用に至っていない (Shepard et al. 1980)。

プロトプラストからの再分化植物体に出現する変異を利用する育種 (プロトクローン育種) では効率の高い培養系が必要である。筆者はキク科植物の葉プロトプラスト培養条件を検討する中でアンモニウムイオンが阻害的な効果をもつことを発見し、MS 培地で 1%程度であった細胞分裂頻度を、培地からアンモニウムイオンを除去することで 50%以上に向上させることに成功した。この試験では試験管植物をもちいた。温室植物体を材料とした場合プロトプラストの単離収率と分裂活性ともに不安定なためである。実験再現の不安定さの原因として温度・湿度・光強度などが日により異なる結果、材料とする植物体や葉の生理状態が日毎に変化することが考えられた。そこでバレイ

シヨ栽培種でプロトプラスト単離材料とする葉を前培養し、材料組織細胞の生理状態を積極的に均一化・活性化させることでプロトプラストの培養効率を向上させる方法を検討した。続いてバレイシヨやソラナム属各種植物に汎用性をもつ、プロトプラストからの効率的な植物体再分化系の開発を検討した。

次に、赤皮・黄肉という特徴的な外観と粉質の良好な食味をもつが目が深いなどの欠点をもち、3倍体のため交雑育種による改良ができないバレイシヨ系統「72218」でプロトプラストからの効率的な植物体再分化系の確立とその利用による品種改良を試みた。

2-1-3. キクのソマクローナル変異利用系開発と他花卉類への応用

キクの商業栽培では生産性・耐病性・花持ちなど総合形質に優れる品種で白・桃・濃桃紫・黄などの花色をシリーズ化して生産販売する。キクは栄養繁殖性高次倍数体というバレイシヨと類似の特性をもちソマクローナル変異の利用が可能と考えられる。筆者はバレイシヨのプロトクローナル変異による新品種育成知見をキク等に活かした。

総合形質に優れるキク品種「リネカー」は桃花色であり一般に様々な色変異が得られやすい。事実自然突然変異によりサーモンや濃紫桃などを得ていた。そこで「リネカー」の試験管植物体の葉を材料としてプロトプラストからの植物体再分化系を確立し、プロトクローンに出現する花色変異を調べた。また同じ葉からソマクローナル変異を誘導し出現する花色変異を比較検討した。

桃花品種と異なり、キクの濃紫桃花品種からは自然突然変異による花色変異が出現し難いことが知られている。そこで次に濃紫桃花色キク栽培品種「ローズクイーン」で葉、及び管状花からソマクローナル変異を再分化し、ソマクローナル変異による新規花色品種の育成を試みた。

キクと並ぶ重要花卉としてカーネーション(*Dianthus caryophyllus*)とペチュニア(*Petunia hybrida*)がある。贈り物として重要な市場を持つポットカーネーション、家庭園芸や景観植物として高い人気をもつペチュニア、ガーデンカーネーションを材料に、ソマクローナル変異による実用品種の育成を試みた。

以上の一連のソマクローナル変異育種利用研究を通じ、植物の種類・材料部位・培養方法により異なると推定される培養効率、得られる変異体の種類について調べることで、また各手法を品種育成に利用する際の指針を得ることを意図した。

2-2. 材料及び方法

2-2-1. キク科植物での高効率プロトプラスト培養系の開発

・植物材料

材料植物として、学術意義の点から現在のキク栽培品種の原種と考えられているキク属 2 種 (Fig. 2-1. シマカンギク *Chrysanthemum indicum* L., チョウセンノギク *C. zawadskii* var. *latilobum*) と、薬用植物であり日本人の伝統的生活に根付いたキク科植物であるヨモギ (*Artemisia vulgaris* L.) を選択した。対照材料としてプロトプラストからの植物体再分化に最初に成功した植物であるタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow) を用いた。



Fig. 2-1 Flower morphology of *Chrysanthemum* wild species used as materials.

Left: *Chrysanthemum indicum*, Right: *Chrysanthemum zawadskii*. (NARO Institute of Floricultural Science; http://www.naro.affrc.go.jp/org/flower/kaki_iden/c3_kiku/kiku_yasei_show/index.html)

Both are regarded as ancestors of modern horticultural cultivars.

・プロトプラストの単離と培養

温室植物体、また試験管植物体の葉から 2 段階法にてプロトプラストを単離した。まず主脈をのぞいた葉を 0.55 M のソルビトール溶液中で 1 mm 角に細断し、同溶液で 2 回洗った後、0.1% ペクテリアゼ Y23、0.1% ドリセラゼ、0.7% セルラーゼオノズカ RS を含む 0.55 M のソルビトール溶液中で 28°C 条件下 2 cm 振り幅 40 回/分で振盪培養した。30~40 分後に培養液を穴サイズ 148 μm のフィルターに通して残渣を除去し、単離されてきた葉肉細胞を含む培養液を得た (1 段階目)。次の段階では、この培養液に 0.55 M のソルビトール溶液を加え 100 x g で 2 分間遠心分離し、沈殿した細胞を 0.1% ドリセラゼ、0.7% セルラーゼオノズカ RS を含む 0.55 M のソルビトール溶液で 28°C 条件下、静置培養した。この処理により葉肉細胞はプロトプラスト化した。この培養液をミラクロス (Calbiochem 社, USA) に通し細胞残渣を取り除いた。この 2 段階法により 20 枚の葉から $7\sim 8 \times 10^5$ のプロトプラストを得ることができた。

単離したプロトプラストはトーマ血球計算盤にて細胞数を計測し $6 \times 10^4/\text{ml}$ に細胞濃度を調整し MDA (Multiple-drop-array) 法 を用い 25°C 弱光下で培養した。培養 9 日後に細胞分裂頻度 (DF: Division Frequency) を計測した。MDA 法とは 40 μl 程度の少量の培地にプロトプラスト等を懸濁した microdroplet を多数 (multiple) 並べて (array) 培養する方法で、1 回の酵素処理で単離された細胞を多数の区画で試験できるため、生理状態の均一な細胞で培地組成による培養効率の差などを確認できる。

プロトプラスト培養に使用した培地の組成を Table 2-1 に示す。主要無機要素組成として各種培養で使われている 9 つの基本培地の無機塩類を使用した。他の微量元素と有機物質は MS 培地の組成とした。また 1.5 mg/l の 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) と 0.5 mg/l の 6-Benzylaminopurine (BA)、2% ショ糖、0.45 M ソルビトールを含む。全培地の pH はオートクレーブ前に 5.6±0.1 に調整した。

Major inorganic elements (mg/liter)	NN67	B5	SH	V-47	KM	NN69	NT	Miller	MS
NH ₄ NO ₃				270	600	720	852	1,000	1,650
KNO ₃	125	3,000	2,500	1,480	1,900	950	950	1,000	1,900
(NH ₄) ₂ SO ₄		134							
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	500							347	
CaCl ₂ ·2H ₂ O		150	200	735	600	166	220		440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	125	500	400	986	300	185	1,233	35	370
NH ₄ H ₂ PO ₄			300						
KH ₂ PO ₄	125			80	170	68	680	300	170
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		150	150						
KCl					300			65	
Total concentration of cation (mN)	7.42	38.76	34.23	36.57	42.07	22.56	37.60	28.59	39.43
mN of NH ₄ ⁺	0.00	1.02	2.60	3.38	7.50	9.00	10.31	12.50	20.63

Common elements (mg/liter): FeSO₄·7H₂O 27.8, Na₂EDTA 22.3, H₃BO₃ 10, MnSO₄·4H₂O 25, ZnSO₄·7H₂O 10, KI 1, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25, CuSO₄·5H₂O 0.025, CoCl₂·6H₂O 0.025, naphthaleneacetic acid 1.5, benzyladenine 0.5, sucrose 20,000, sorbitol 82,000, inositol 100, nicotinic acid 0.5, pyridoxine-HCl 0.5, thiamin-HCl 1.

Abbreviation of media names: NN67, Nitsch and Nitsch (1967); B5, Gamborg et al. (1968); SH, Schenk and Hildebrand (1972); V-47, Binding (1974); KM, Kao and Michayluk (1975); NN69, Nitsch and Nitsch (1969); Miller, Miller (1961); NT, Nagata and Takebe (1971); Murashige and Skoog (1962).

2-2-2. バレイショの高効率プロトプラスト培養系の開発と実用品種育成

・植物材料

バレイショ栽培種の育種系統 KRN0810, KRN0928, KRN0929 及びバレイショの近縁植物 *Solanum phureja*, *Solanum nigrum*, *Solanum photeinocarpum*, *Solanum demissum*, *Solanum pimpinellifolium*, で試験管植物を育成しその葉からプロトプラストを単離した。プロトプラスト培養条件の検討、及びプロトプラスト由来コロニーからの植物体再分化条件の検討にはバレイショ育種系統 KRN0928 を使用した。またプロトプラスト再分化植物体における変異を利用した新品種の育成の試験ではバレイショ栽培品種「アーリーローズ」 x *Solanum phureja* の交配実生から選抜育成されたバレイショ系統「72118」を材料とした。

・プロトプラストの単離と培養

プロトプラスト培養では、23°C, 16 時間日長条件下で培養した試験管植物体の葉の基部側半分を

採取し 1 mm 幅に細切した後、0.5 M ソルビトール、1 mM ポリビニルピロリドン、1% セルラーゼオノズカ RS、0.1% ペクトリアーゼ Y23、0.5% マセロザイム R10、5 mM MES、pH 5.6 の酵素液に移し、25°C で 4~6 時間、暗所で培養しプロトプラストを単離した。このプロトプラストを、0.25 M ソルビトール、1% ショ糖、0.5% グルコース、400 mg/l カゼイン、0.1 mg/l 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D)、0.5 mg/l NAA、0.5 mg/l BA を含み NH₄NO₃ 濃度を 0, 50, 100, 150, 300, 400, 500 mg/l のいずれかとした MS 培地で培養した。

- ・酵素処理前培養（PEC: Pre Enzyme Culture）した葉組織からのプロトプラスト単離

試験管植物の葉の基部側半分を材料とした。葉を 1 mm 幅に細切したものを、酵素処理に先立ち 23°C 暗黒化 4, 16, 20, 24, 或いは 40 時間培養した（PEC: Pre Enzyme Culture 酵素処理前培養）。その培地にはプロトプラスト培養予備試験で最も成績のよかった NH₄NO₃ を 300 mg/l に減じた MS 培地に NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l 加えたものを用いた。その後、4 時間の酵素処理によりプロトプラストを単離し培養した。

- ・プロトプラスト由来コロニーからの植物体再分化

試験管植物の葉を PEC 処理した後に酵素処理によりプロトプラストを単離し、0.5 M ソルビトール液にけん濁し遠心回収することにより洗浄し、バレイショプロトプラスト培地（0.25 M ソルビトール、1% ショ糖、0.5% グルコース、400 mg/l カゼイン、0.1 mg/l 2, 4-D、0.5 mg/l NAA、0.5 mg/l BA を含み NH₄NO₃ を 300 mg/l に減じた MS 培地、pH 5.6）に移し 23°C 暗黒条件下で 5~10 日間培養した。細胞分裂し形成された細胞塊をコロニー培地（0.2 M ソルビトール、2% ショ糖、0.5 mg/l NAA、0.5 mg/l BA を含む NH₄NO₃ を 300 mg/l に減じた MS 培地、pH 5.6）で培養し、2~4 週後に直径 1 mm 程度に成長したものを寒天で固形化させたコロニー培地に移植した。直径 2 mm 程度にまで成長したコロニーを不定芽誘導培地（0.1 M ソルビトール、2% ショ糖、2% coconut water、0.3 mg/l NAA、2 mg/l Zeatin、0.8% 寒天 を含む NH₄NO₃ を 300 mg/l に減じた MS 培地、pH 5.6）に移植した。再分化した不定芽を MS ホルモンフリー培地で発根させ温室に馴化した。コロニー培地、不定芽誘導培地での培養は 23°C、16 時間日長条件にて実施した。

- ・プロトプラストから再分化した植物体における変異（プロトクローナル変異）の調査

バレイショ育種系統 KRN0928 を材料に上記の方法を用いて、214 個体のプロトクローン（プロトプラストからの再分化植物体）を育成し、圃場栽培により変異の有無を調査した。また栽培種の育種系統 KRN0810, KRN0929 及び材料及び方法にあるバレイショ近縁種でプロトクローンを育成した。*Solanum phureja* はプロトプラストからの細胞分裂頻度が低かったため、そのプロトクローンの中に細胞分裂能力や不定芽再分化能力が向上した変異体が出現するか否かについて調査した。

- ・プロトクローンにおける変異の温室、圃場検定と実用品種の選抜育成

プロトプラストから再分化した植物体は試験管内での茎葉の形態、また温室栽培時の形態と生育状態を観察し、奇形や生育不良のものを除外した。その後圃場で栽培し花の色、塊茎の色、収量などの形質検定と優良系統の選抜を実施した。選抜された優良系統については、2 年間の形質安定性検定を実施した。

2-2-3. キクのソマクローナル変異利用系開発と他花卉類への応用

・キク葉からのソマクローン及びプロトクロンの誘導

キク主要栽培品種「リネカー」(桃花色)を材料とした。ソマクローンの誘導では、25°C、16時間日長下で試験管培養している植物体の葉の基部半分を2mm幅に細切り、キク再分化培地(3%ショ糖, 0.1 mg/l NAA, 0.02 mg/l 2,4D, 1 mg/l BA, 0.8% 寒天を含むMS培地)にて培養した。再分化した不定芽をMSホルモンフリー寒天培地に移植し発根させ葉ソマクローンを育成した。

プロトプラストは試験管植物体の葉から単離した。プロトプラストの培養およびコロニー形成はバレイショで開発した方法(Okamura 1994)に従った。但し、プロトプラスト培養ではバレイショのプロトプラスト培養培地からNH₄NO₃を除いたものを用いた。またプロトプラスト由来コロニーからの不定芽の再分化にはキク再分化培地を用いた。

・キク管状花からのソマクローンの誘導

キク栽培品種「ローズクイーン」(濃紫桃花色)を材料とした。温室で育成した花から管状花を取り出し、70%エタノールで30秒間、続いて1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で3分間殺菌後、滅菌水で3回洗浄しキク再分化培地に置床した。25°C、16時間日長条件下で培養し不定芽を誘導し、その後発根させ温室に馴化した。また対照として、試験管育成の植物体の葉からソマクローンを再分化させ開花試験を実施した。

・葉ソマクローン、葉プロトクロン、花ソマクローンの開花検定

上記の方法によりキク品種「リネカー」の葉由来ソマクローン、葉由来プロトクロンを各々2,100個体、2,210個体作出し、それらの生育と開花特性を調査した。またキク品種「ローズクイーン」の花ソマクローン(管状花由来)を510個体、葉ソマクローン500個体を育成し、それらの生育と開花特性を調査した。

・他花卉類への応用

カーネーションでのソマクローンの育成では、ポットカーネーション系統「エスピー」の試験管植物から葉片を調製し、2 mg/l Zeatin、3%ショ糖、0.7%寒天を含むMS培地で25°C、16時間日長下で培養し不定芽を再分化、発根処理し植物体を再生した。

ペチュニアのプロトクロン育成は2-2-2で用いたバレイショの方法に準じた。すなわち、16時間PEC処理し細胞壁分解酵素により単離した葉肉プロトプラストを、NH₄NO₃を300 mg/lとした2-2-2の培地と培養法を用いてコロニー形成、不定芽再分化、プロトクロン育成を実施した。

2-3. 結果及び考察

2-3-1. キク科植物での高効率プロトプラスト培養系の開発

・基本培地 9 種類を用いて培養したプロトプラストの 9 日後の状態

ヨモギの試験管植物体の葉から 2 段階法で単離したプロトプラストを、Table 2-1 の 9 種の基本培地で培養した時の DF を Fig. 2-2 に示す。NN67 培地では約 50% のプロトプラストが細胞分裂し、20~30% のプロトプラストが収縮、また他の細胞は卵型となり細胞分裂開始前の状態を示したが分裂には至らなかった。B5 培地、SH 培地、V-47 培地では 40% のプロトプラストが卵型にまで至り、DF は約 13~15% となった。KM 培地、NN69 培地、NT 培地ではわずか 15% が卵型になり、DF は数% に留まった。Miller 培地と MS 培地が最も分裂頻度が悪く DF は 1~2% であった。この結果 NN67 培地が最高の DF となり、Miller 培地、MS 培地が最低の DF となった。NN67 培地は、1) アンモニウムイオンを含まないこと、2) 無機塩類濃度が極めて低いことが特徴である。そこで次の実験を行った。

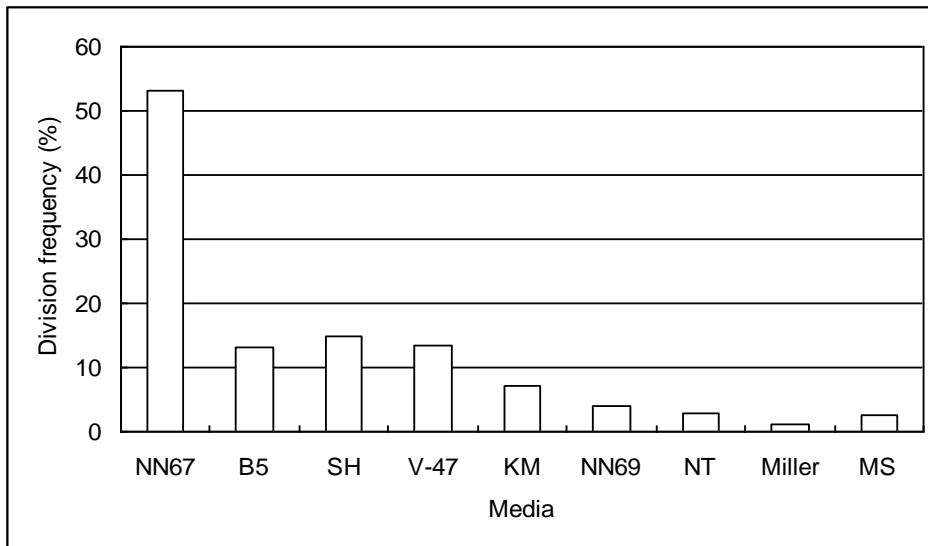


Fig. 2-2 Division Frequency (DF) of *Artemisia* protoplasts in the nine media.

・培地中のアンモニウムイオンの影響

最初の実験で使用した 9 種培地中のアンモニウムイオンの影響を確認するため、Table 2-1 の各培地からアンモニウムイオンを除いた培地を作成しヨモギのプロトプラストを培養した。その結果 NN69、Miller、NT、MS など元の培地のアンモニウムイオン濃度が高い培地からアンモニウムイオンを除いた培地で顕著に DF が高まった (Fig. 2-3)。そこで今度は NN67 培地に硝酸アンモニウムまたは硫酸アンモニウムを加えてヨモギのプロトプラストを培養した。その結果 10 mg/l の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ または 20 mg/l の NH_4NO_3 のアンモニウム塩添加で DF は半減した (Fig. 2-4)。

・培地中の総塩類濃度の影響

次に各基本培地で主要無機塩類のプラスイオン濃度 (マイナスイオン濃度に等しい) を 15 mN にした培地でアンモニウムイオンを含む場合と含まない場合の 2 種類を試験した。その結果、塩濃度

を低くしてもヨモギのプロトプラストを培養した時の DF に大きな変化はなかったが、アンモニウムイオンを除くと DF は顕著に向上した (Fig. 2-5)。

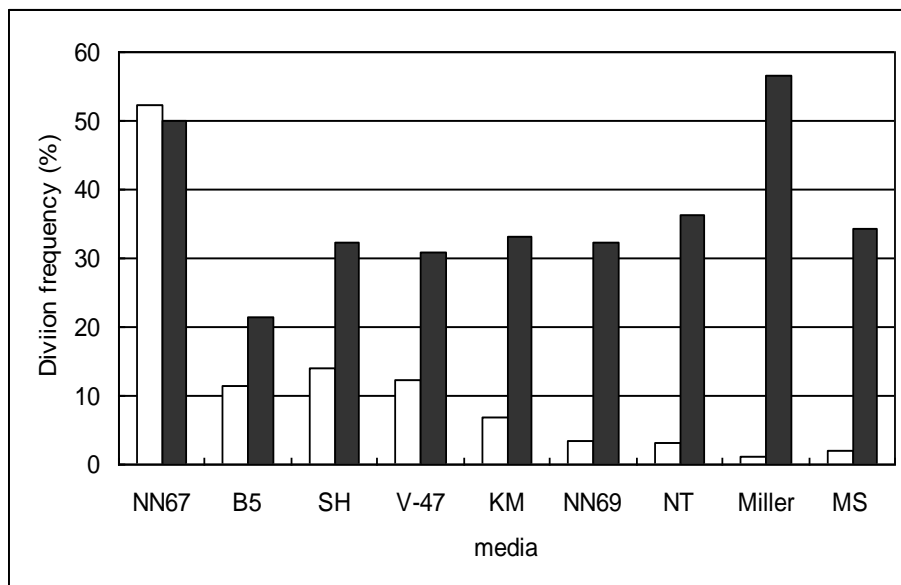


Fig. 2-3 Effect of eliminating NH₄⁺ from the nine media on DF of *Artemisia* protoplasts. White bars: original media, Black bars: without- NH₄⁺ media.

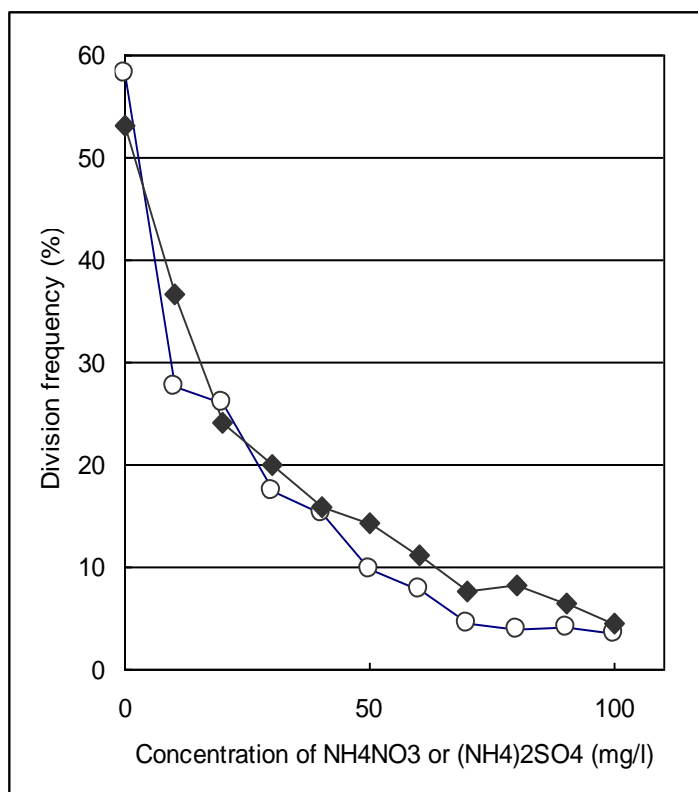


Fig. 2-4 Effect of (NH₄)₂SO₄ (-○-) or NH₄NO₃ (-◆-) concentration in NN67 medium on DF of *Artemisia* protoplasts: White circle: (NH₄)₂SO₄, black diamond: NH₄NO₃

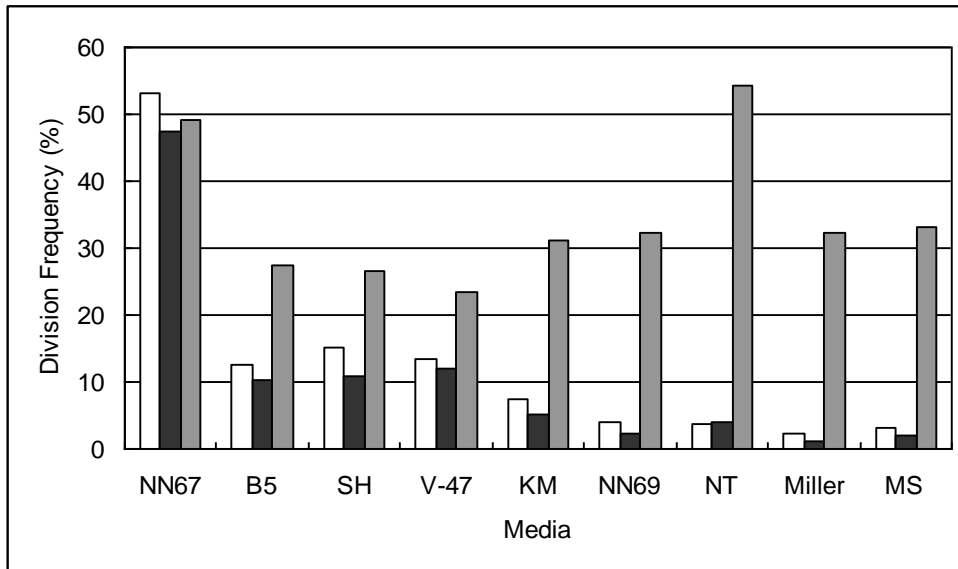


Fig. 2-5 DF of *Artemisia* protoplasts in original media (white bars), 15 mN media (black bars) and 15 mN media without-NH₄⁺ (gray bars)

・アンモニウムイオン及び総塩濃度とキク科植物プロトプラスト培養

C. zawadskii のプロトプラストを培養した結果はヨモギと同じであった。すなわちアンモニウムイオンを含む培地では DF は 10%未満であり、各培地からアンモニウムイオンを除くと明確に DF が向上した。また、*C. indicum* では、Miller 培地以外では DF は比較的高かったが、アンモニウムイオンを除くと DF はやはり顕著に向上した。また両種ともヨモギと同じく、塩濃度を低くしただけでは DF への効果は無く、アンモニウムイオンを除くと DF は顕著に向上した。一方タバコのプロトプラスト培養では、Miller 培地以外の培地についてアンモニウムイオンを含む培地で高い DF を示した (Fig. 2-6)。最も高い DF は NT 培地と SH 培地であり両培地ともにリン酸濃度が高かった。

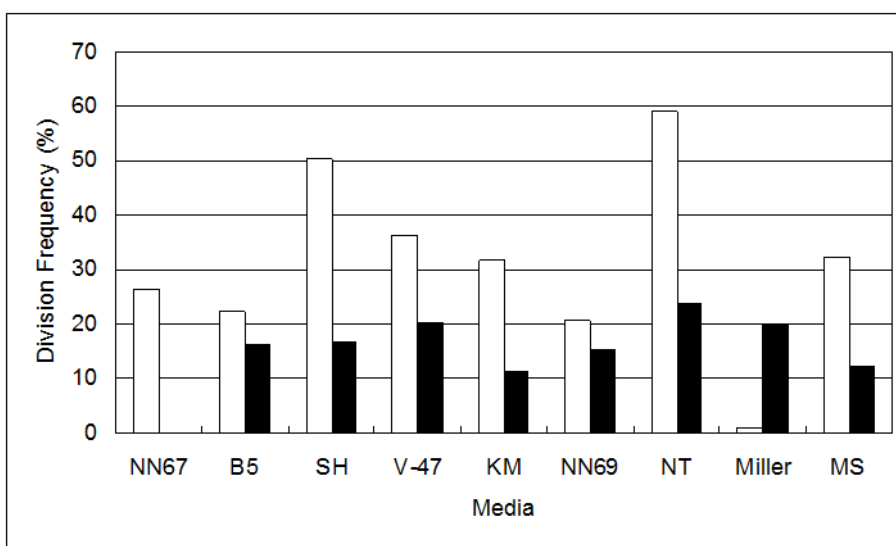


Fig. 2-6 DF of tobacco protoplasts cultured in original media (white bars) or cultured in media without NH₄⁺ (black bars)

Fig. 2-7 はさらに NN67 培地に硝酸アンモニウムを添加した場合の DF への影響を示す。キク科植物ではアンモニウムイオンの添加濃度が増すにつれて DF は低下し、その効果はヨモギで顕著であり、また *C. zawadskii* と *C. indicum* では緩やかに低下した。それに対しタバコではアンモニウムイオンの添加濃度が増すにつれて DF は上昇した。

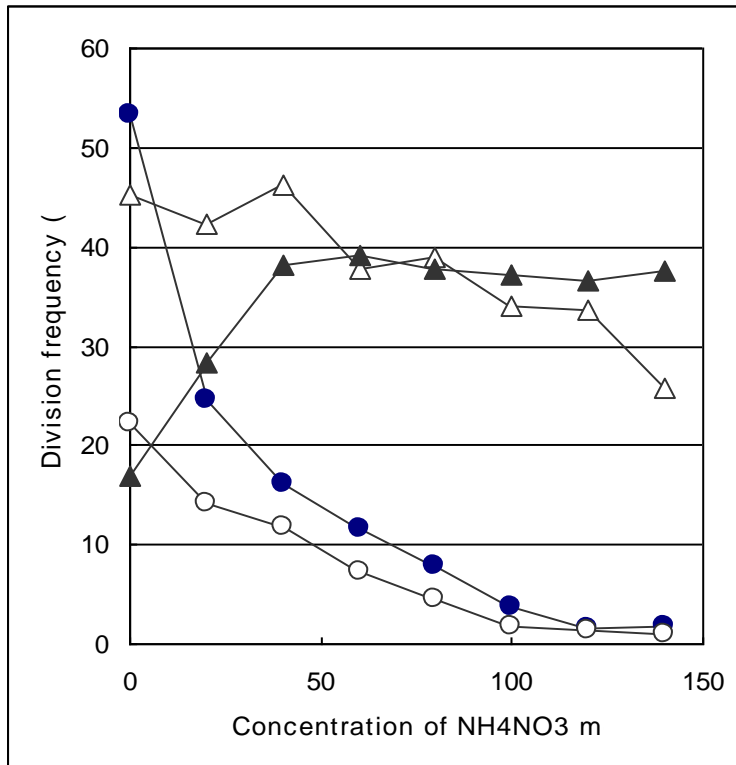


Fig. 2-7 Effect of NH₄NO₃ concentration in NN67 medium on DF of four species: *Artemisia* (-●-), *C. zawadskii* (-○-), *C. indicum* (-△-) and tobacco (-▲-).

・キク科植物プロトプラスト培養系の特徴

キク科植物 3 種で試験管植物体を用いその葉から 2 段階法にて大量のプロトプラストを単離できた。予備試験で MS 培地と NT 培地を基本培地として植物生長調節物質、ビタミン、アミノ酸、有機酸、糖類などを多種多様な組合せにてプロトプラスト培養を試みたが DF は 5% から 10% 程度であった。さらに、NT 培地でタバコプロトプラストを培養した調整培地 (conditioned medium) を用いた場合でも分裂頻度は 25% を超えることはなかった。そこで、基本培地を 9 種類に増やし試験したところアンモニウムイオンを含まない NN67 培地で 50% 以上という高い DF を得ることができた。

プロトプラスト培養に対するアンモニウムイオンの阻害効果はトマト (Zapata et al. 1981)、バレイショ (Shepard et al. 1977) などで報告がある。トマトではアンモニウムイオンを含む培地で 1 週間生きていたがバレイショでは 2~3 日で死んでしまったとされる。ヨモギの場合ほとんどのプロトプラストはアンモニウムイオンを含む MS 培地や NT 培地でも 10 日以上生きていた。これらの報告及び本試験結果から、プロトプラスト培養においてアンモニウムイオンは植物種により異なる阻害効果をもち、バレイショでは致命的効果を、ヨモギの場合は顕著な阻害的效果を、またトマトでは緩やかな阻害的效果を示すと考えられた。Binding et al. (1981) もキク科植物でアンモニウムイオ

ンを含む B5 培地、V-47 培地ではプロトプラストからのコロニー形成率が低いと報告している。

プロトプラスト化の際には大量の活性酸素が発生する。キクは有毒物質である活性酸素の除去に高い効果をもつフェノール・ポリフェノール類を多く含有する (Duha P-D et al 1999)。しかし、この環境が崩れると細胞の活性が下がると推定される。プロトプラストはマイナスに帯電しているため、アンモニウムイオンが引きつけられやすい。アンモニウムイオンは反応性が高く、水溶液中で電離し酸性を示すフェノール類と反応する。その結果、キクのプロトプラストでは活性酸素を無毒化するフェノール類の働きが阻害され、通常の生理状態から著しく細胞内環境が変化し DF が下がった可能性が考えられる。

2-3-2. バレイシヨの高効率プロトプラスト培養系の開発と実用品種育成

・プロトプラストの単離と培養

バレイシヨでは育種系統 KRN0928 や近縁種を含め材料及び方法の 1 段階法で十分な量と培養活性をもつプロトプラストを単離できた。バレイシヨ育種系統 KRN0928 の葉肉プロトプラストを、 NH_4NO_3 濃度を 0、50、100、150、300、400 または 500 mg/l とし浸透圧調整剤等を含む MS 培地 (材料及び方法) で培養した結果、 NH_4NO_3 濃度が 150 及び 300 mg/l の場合に最も DF が高く、50~55% であった。 NH_4NO_3 濃度が 0~100 mg/l の場合 40% 前後の DF であり、また 400 mg/l 以上では 20% 未満の DF となった。次に、 NH_4NO_3 濃度が 150 及び 300 mg/l の 2 種類の培地で得られた細胞塊を、それぞれ同じ NH_4NO_3 濃度のコロニー形成培地で継代培養したところ、150 mg/l 或いは 300 mg/l NH_4NO_3 の培地でのコロニー形成率 (Plating efficiency : 培養したプロトプラスト当りのコロニー形成頻度) は各々 12% 或いは 20% となった。そこで以降の試験ではプロトプラスト培養培地及びコロニー形成培地の NH_4NO_3 濃度を 300 mg/l とした。

・酵素処理前培養 (PEC: Pre Enzyme Culture 処理) 条件の確立

筆者の経験では、材料とする葉の状態が培養効率に影響することは頻繁に見られる現象である。そこで、材料とする葉を前培養して細胞の生理状態を均一化した後に酵素処理してプロトプラストを得ることで、さらに高いコロニー形成率が得られるのではないかと推察した。

バレイシヨ栽培種 (*Solanum tuberosum*) KRN0928 を用いて、材料及び方法に示した培地にて 23°C 暗黒化で 4, 16, 20, 24, 或いは 40 時間培養した後、プロトプラストを単離・培養した。その結果、16 時間 PEC 処理した場合にプロトプラストの収率が良く、かつ 70% 以上という高い DF が得られた (他の PEC 処理時間での DF は 50% 未満であった : data not shown)。また PEC 処理によりコロニー形成率も 20% にまで高まった。そこで *S. tuberosum* に比べ高い DF を示す *S. photeinocarpum*, *S. nigrum* 及び *S. demissum* から単離したプロトプラストでも試験した。PEC 処理なしの場合のコロニー形成率は 3 種ともに 30% 前後であったが、PEC 処理により各々 70%, 70% 及び 50% にまで向上した (Table 2-2)。また *Solanum pimpinellifolium* の DF は PEC 処理無では 10% であったが、PEC 処理により 30% に上昇した。PEC 処理培地は植物成長調節物質オーキシン、サイトカイニンを含むためプロトプラスト単離材料組織の細胞が分裂の方向に変化している可能性が考えられる (岡村 1989)。

・プロトプラストからの植物体再分化系の開発

葉を PEC 処理した後にプロトプラストを単離しバレイショプロトプラスト培地で培養して得たコロニーを不定芽誘導培地に置床すると、KRN0928 では 80% のコロニーから不定芽が誘導された。これは PEC 処理無の場合の 55% を大きく上回った。得られた不定芽は MS ホルモンフリー培地にて発根処理し、植物体を再分化した (Fig. 2-8)。この KRN0928 で確立した方法を Table 2-2 の植物種で試験した。その結果、植物種によりプロトプラストから植物体再分化までの期間は 9~18 週間と異なったが試験した全ての植物種で PEC 処理由来コロニーの方が高い植物体再分化率を示した。

以上の結果から、バレイショのプロトプラスト培養では培地中のアンモニウムイオンの濃度が高まると DF が下がること、コロニー形成率まで含めると NH_4NO_3 を 300 mg/l とした MS 培地が適していること、PEC 処理はソラナム属数種に有効な汎用性の高いものであると分かった。

・プロトプラストから再分化した植物体におけるソマクローナル変異

バレイショ栽培種育種系統 KRN0928 を材料に 214 個体のプロトクローンを育成し圃場栽培により変異の有無を調査した。その結果、葉の形態・花の色・塊茎の形態などでソマクローナル変異が観察された。KRN0928 の花色は薄紫であるがプロトクローンの花は 7% (15 系統) が濃紫色、2% (4 個体) が白色となった。

興味深いことに、親系統よりも高いコロニー形成率及び植物体再分化率を示す個体が *Solanum phureja* のプロトクローンの中に出現した。親の *S. phureja* 系統 KRN01 のコロニー形成率及び植物体再分化率はともに 5% であったのに対し、プロトクローンのなかで「系統 KRN02」のコロニー形成率および植物体再分化率は各々 20% および 25% となった (Table 2-2)。*S. phureja* KRN02 は、不定芽誘導培地に移植後最初に不定化を再分化した *S. phureja* プロトクローン 5 系統を MS ホルモンフリー培地に継代した植物体の葉プロトプラスト培養で DF が最も高かった系統である。これは、細胞壁分解酵素処理により発生する活性酸素、植物成長調節物質など培地成分、プロトプラストからの細胞分裂、コロニーからの不定芽形成など様々なストレス下で最初に不定芽形成に至った個体が、その過程で細胞・組織培養により適した形質を獲得した可能性を示唆しており注目される。

Table 2-2 Efficiency of plant regeneration from protoplasts of some *Solanum* species

Plant species	Line	Plating efficiency (%) ^a	Regeneration efficiency (%) ^b
<i>Solanum tuberosum</i>	KRN0810	12	60
	KRN0928	20	80
	KRN0929	20	80
<i>Solanum phureja</i>	KRN01	5	5
<i>Solanum phureja</i> Proclone	KRN02	20	25
<i>Solanum nigrum</i>		70	90
<i>Solanum photeinocarpum</i>		70	90
<i>Solanum demissum</i>		50	Not Tested
<i>Solanum pimpinellifolium</i>		30	20

a: Plating efficiency (%) is defined as the number of colonies relative to the total number of protoplasts cultured, b: Regeneration efficiency (%) is defined as the number of shoot-forming colonies relative to the total number of colonies plated.

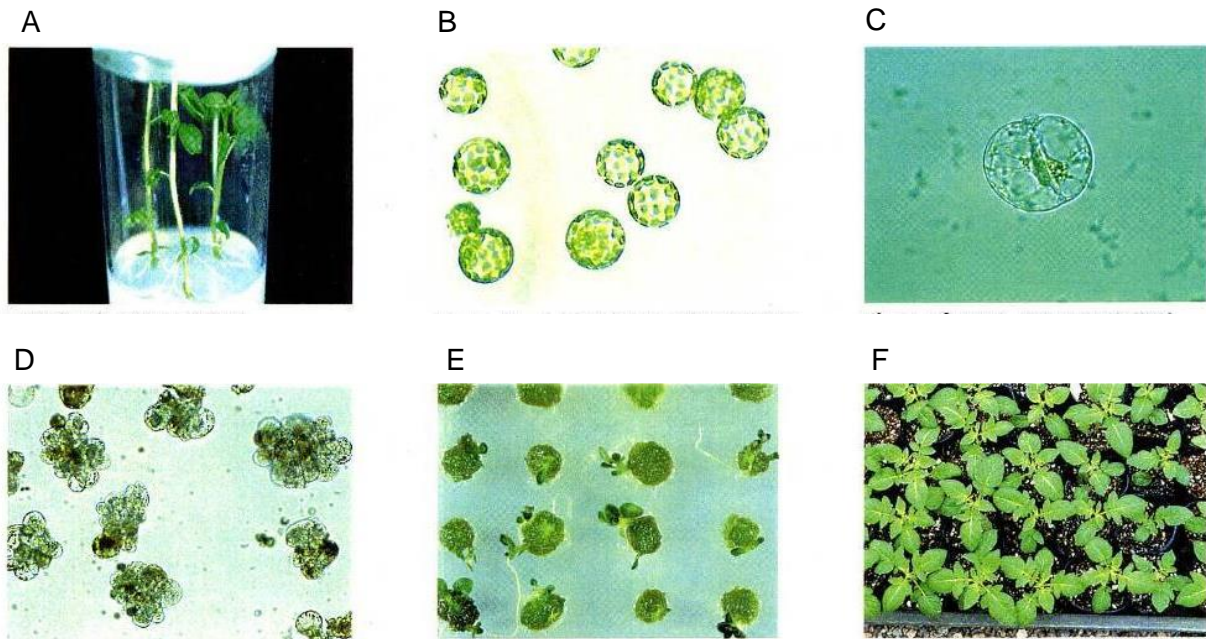


Fig. 2-8 Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.)

A: Plant material used for protoplast isolation, B: Mesophyll protoplasts, C: Cell divisions from protoplasts, D: Colony formation, E: Adventitious shoot formation from protoplast-derived calli, F: Regenerated plants from mesophyll protoplasts.

・プロトクローンに出現する変異利用によるバレイショ新品種「ジャガキッズ」の育成

バレイショ栽培品種「アーリーローズ」 x *S. phureja* の交配実生から選抜育成されたバレイショ系統「72118」は粉質の肉質をもち食味が良好であるが、目が深い、イモの粒揃いが悪いなどの欠点をもつ。また3倍体であり交雑育種ができない。この系統のプロトクローンに出現した変異の中から新品種「ジャガキッズ」を育成した。

プロトプラスト培養から新品種育成までのステップを Table 2-3 に示す。プロトプラストから再分化した植物体を試験管生育の段階と温室栽培の段階で観察し、奇形のない生育の良好な 2,012 系統を選抜した。選抜系統各々で 5 株の圃場試験栽培を実施した。その中で親系統「72118」に対して 90%以上の収量を持つ 861 系統を次年度の圃場栽培試験に供した。選抜 861 系統各々で 15 株を栽培し、一般栽培性、収量などに優れる 98 系統を選抜した。この選抜系統の中で特に、「40 g 以上いも重」に優れ、紫色または赤色の皮色で、粉質かつ良好な食味をもつ 2 系統について、2 年間の生産力検定により「ジャガキッズパープル' 90」「ジャガキッズレッド' 90」を育成した (Fig. 2-9. 岡村ら 1991)。選抜育成した 2 品種の形質特性の一部を Table 2-4 に示す。注目されるのはどちらの品種も総収量は親品種並みであるのに対し、粒揃いが良化し各イモの重量が増えた結果「40 g 以上いも重」が増加していた。また「ジャガキッズパープル' 90」「同レッド' 90」両品種とも染色体数は親と同じ $2n=3x=36$ であった。

・バレイショのプロトクローンにおける皮色の変化

「ジャガキッズパープル’ 90」では皮色が赤から紫に変化したので、本論文ではバレイショの皮色の変化について検証した(Fig. 2-10)。キクやカーネーションなどの花卉類と類似の色素をもつため、その対照となるからである。系統選抜試験に供試した 861 系統について皮色の変化を調査した結果、親と同じ赤色系のものが 77%、紫色となったものが 7%、また色素が薄くなり桃色や橙色となったものが 16% 各々出現した。また茎葉が横に広がる草型をもつ変異体も出現した。

また試験した 861 系統中 1 系統で 1 個体のなかに赤色の塊茎と紫色の塊茎をつけるものが出現した(Fig. 2-10)。これはプロトプラスト由来クローンが基本的に単細胞由来であり、キメラの出現する頻度が低いことを示す例と考えられる。

Table 2-3 Breeding process of “Jagakids Purple 90” and “Jagakids Red 90”

Year	Breeding Process	Number of lines selected
1987	Regeneration of protocloned and selection of superior clones in greenhouse	2,012
1988	Clonal evaluation and selection	861
1989	Preliminary performance test and selection	98
1990	Yield trial and selection of the two cultivars	2

Table 2-4 Characteristics of “Jagakids Purple 90” and “Jagakids Red 90”

Characteristics	Jagakids Purple 90	Jagakids Red 90	Line 72118
Stem: anthocyanin coloration	Purple, very strong	Reddish purple, medium	Reddish purple medium
Flower color	Purple	Reddish purple	Reddish purple
Tuber: Skin color	Purple	Red	Red
Weight of fine tubers (over 20g) (t/10a)	3.7	3.8	3.8
Weight of tubers (over 40g) (t/10a)	3.4	3.5	3.0
Fleshy substance	Powdery	Powdery	Powdery

A



B



C



Fig. 2-9 Potato cultivars Jagakids Purple 90 and Jagakids Red 90 bred by protoclonal variation.

A: Potato cvs. Jagakids Purple 90 (Left), Jagakids Red 90 (Center) and Line 72118 (Right)

B: Potato cvs. Jagakids Purple 90 and Jagakids Red 90 cultivated in the field

C: Potato cvs. Jagakids Purple 90 and Jagakids Red 90 commercially available from 1990

A



B



Fig. 2-10 Protoclonal variations in tuber skin color of potato breeding line 72218

A: Color variation of tubers emerged in the protoclones from the material line 72118 (Upper left),

B: Only one chimeric protoclone with red and purple tubers emerged in 861 protoclones tested.

・バレイショのプロトクローン品種育成の意義

ソマクローナル変異により有用な形質を獲得した事例にトマト (*Solanum lycopersicum*) がある。トマトの葉切片からの不定芽誘導により再分化した 230 個体の植物体、およびその個体からの自殖種子から育てた 11,040 個体について種々の形質を検定した結果、雄性不稔・フザリウム耐性・黄色果実・ジョイントレスなどの農業上の有用形質が得られ、この中からトマト果実中の固形成分が 20%

向上した加工用トマト「DNAP-9」が育成された(Evans and Sharp 1986)。バレイショは栄養繁殖性の高次倍数体であり、交雑育種により両親の良い形質を併せ持つ品種を育成することは困難を極める。芽への放射線照射はキメラ性などの問題が残るのに対しプロトクローナル変異は単細胞由来のためこの恐れが少ない。バレイショのプロトクローンでも有用な変異が報告されていた (Shepard et al. 1980)。しかしプロトプラスト由来植物体に生じた変異を実用品種の育成に適用できた例はなかった。

今回、筆者はバレイショのプロトプラスト培養系による変異作出技術を洗練し、世界に先駆けた新品種の育成、事業化に至った。カラフル化したバレイショ新品種は 1990 年の 10 月から市販され、ホクホクした食感と良食味でコロケやサラダ、ベイクドポテトなどに適し好評を維持し、今日に至るまで 20 年以上継続販売されるロングセラー品種となった。バレイショの芽への放射線照射からの変異ではキメラ性を持つ個体が高頻度で出現するのに対して、プロトクローナル変異では皮色で確認した場合キメラ性を示したクローンは 861 系統中 1 系統のみであり単細胞由来の利点を実証した。本研究はその後のプロトプラスト培養による品種育成 (Arihara et al. 1995) や、様々な作物種でソマクローナル変異による育種が展開されるきっかけとなった重要な意義をもつ。

2-3-3. キクのソマクローナル変異利用系開発と他花卉類への応用

・キク品種「リネカー」の葉ソマクローン、葉プロトクローンにおける花色変異

品種「リネカー」(桃花色)の葉ソマクローンを 2,100 個体、葉プロトクローンを 2,210 個体再生し、温室栽培により生育及び、花の色と形を調査した。プロトクローン栽培区の一部を Fig. 2-11 に示す。ソマクローンからは花色変異として、薄桃 (LP: *Light Pink*) が 86、濃桃 (DP: *Dark Pink*) が 37、薄紅 (CR: *Coral*) が 9、茶 (AM: *Amber*) が 5、薄黄 (LY: *Light Yellow*) が 1 個体の合計 138 個体(6.9%)が出現した。これに対しプロトクローンからは、薄桃が 127、濃桃が 50、薄紅が 28、茶が 24、黄 (Y: *Yellow*) が 4、薄黄が 11 個体各々出現し、合計 244 個体(12.2%)の花色変異が得られた (Fig. 2-12)。プロトクローンの薄桃には白に近いパールを含む。また変異体の草丈を測定した所、親品種「リネカー」の平均が 98.5 cm (標準偏差 $\sigma = 3.9$)であったのに対し、葉由来ソマクローンでは 93.3 cm ($\sigma = 6.0$)、葉由来プロトクローンでは 84.7 cm ($\sigma = 9.3$)となった。

品種「リネカー」において高頻度で花色変異が得られた要因として、1)「リネカー」が淡黄色調をもつ桃花色品種でありキクでは最も花色変異が出現しやすい花色であること、2) 特にプロトクローンでは草丈が低いことから DNA 量の減少(Yamaguchi et al. 2008)も起こっていると考えられ、細胞壁分解酵素処理で発生する活性酸素に対する感受性が同じ花色の他の品種に比べて高いことなどが推定される。

葉ソマクローン及びプロトクローンの花色・花形変異の形態を Fig. 2-13 に示す。バレイショと同様に葉プロトクローンの中に様々な花色・花形変異体を得られた。しかしプロトクローナル変異体は草丈が低く実用的なものは得られなかった。一方で、葉ソマクローンでは変異の幅はやや狭いが、親と同等な生育特性を持つ変異体が多数得られた。

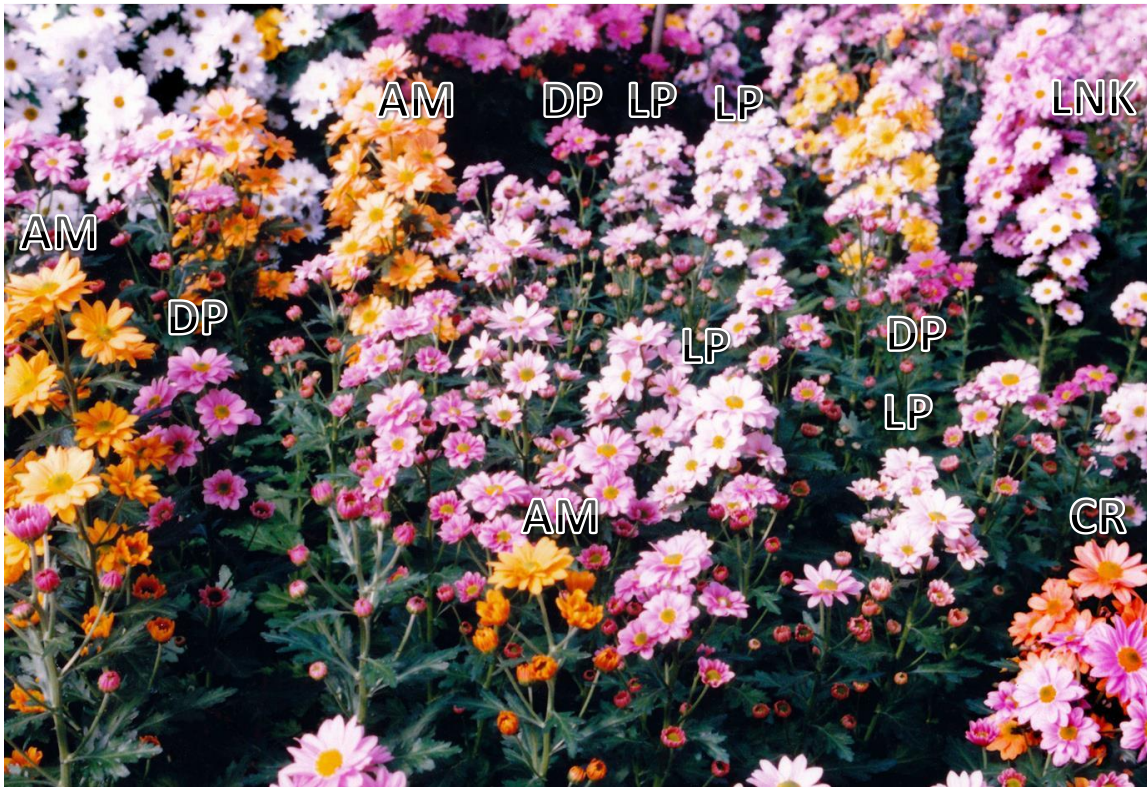


Fig. 2-11 Investigation of flower color in plants regenerated from leaf protoplasts of chrysanthemum cv. Lineker. A wide variety of flower color mutants emerged at a high frequency. (LNK: cv. Lineker, LP: *Light pink*, DP: *Dark pink*, CR: *Coral*, AM: *Amber*).

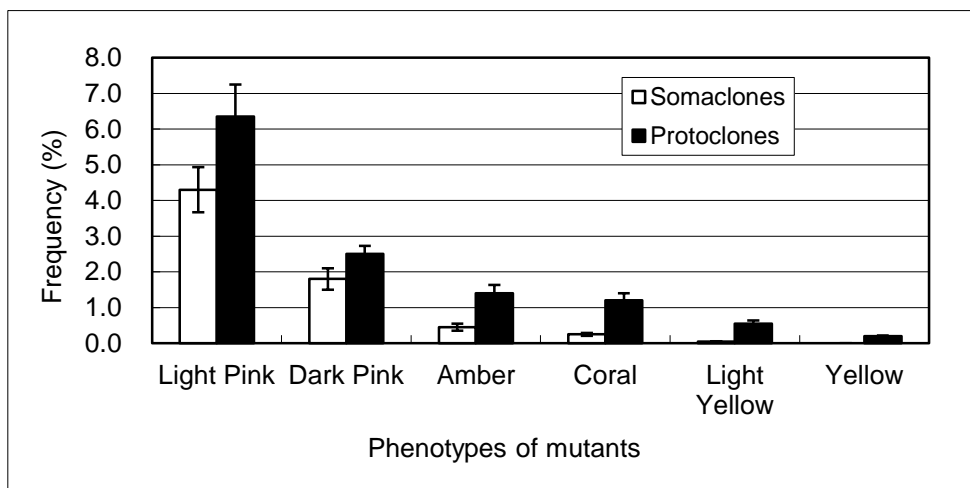


Fig. 2-12 Frequency (%) of flower color mutants emerged in somaclones (white bars) and protocloes (black bars) regenerated from leaves of chrysanthemum cultivar Lineker.

Flower phenotypes were examined in three separate experiments for both somaclones and protocloes. Total numbers of clones examined are 2,100 and 2,210 in somaclones and protocloes, respectively. Higher mutation frequency and wider variation were observed in protocloes than in somaclones. However, the median stem lengths of original cv. Lineker, somaclonal mutants and protoclonal mutants were 98.5+3.9 cm, 93.3+6.0 cm, and 84.7+9.3 cm, respectively.



Fig. 2-13 Flower color mutants emerged in leaf somaclones (upper two rows) and leaf protoclonal (lower three rows) of chrysanthemum cultivar Lineker

・キク管状花からのソマクローナル変異による「ロイヤルウェディングセルエンジ」の育成

キクは花色に関する自然突然変異が出やすく、数百から数千個体栽培するだけで花色変異が出現する品種もある。自然変異の出現頻度は品種の花色により差があり、元の花色が桃（特に淡黄色調をもつ桃）であると極めて高頻度に出現するが、逆に濃紫桃の場合ほとんど出現しない。品種「ローズクイーン」（濃紫桃花色）は自然変異が全く出現しなかった。品種「リネカー」の試験でプロトクローンは草丈が低く実用的でなかったため、品種「ローズクイーン」ではソマクローン再分化による変異育成を試みた。葉ソマクローンを 500 個体開花検定したが薄紫桃の花色変異しか得られなかった。そこで葉以外の組織として管状花からのソマクローナル変異を調査した。

温室栽培植物で開花直後の管状花から不定芽を再分化させた。不定芽を MS ホルモンフリー培地にて発根させた後、試験管内生育が良好なソマクローンを 510 個体選抜し、温室栽培し開花検定を実施した。すると薄紫桃花色となった変異が 17 個体、鮮紫桃色地に底白が入る覆輪花色変異が 3 個体出現した。覆輪花色は鑑賞価値が高いためこの 3 系統を各々 30 株にさし芽増殖し集団検定を行い、草丈、開花早生性、花色の安定性に優れる 1 系統を選抜した。選抜系統について再度さし芽増殖し温室栽培により草型・葉・花など諸形質の安定性を確認し「ロイヤルウェディング（登録名：ロイヤルウェディングセルエンジ）」（品種登録番号 6638）を育成した(Fig. 2-14)。



Fig. 2-14 Chrysanthemum cultivar Royal Wedding (left) with novel pink and white bi-colored flowers bred by somaclonal variation of cultivar Rose Queen (right)

・ソマクローナル変異によるポットカーネーション新品種の育成

ポットカーネーションは「母の日」が生産販売の中心であり年間生産額の半分近くを占める。生産現場では栽培温度や摘心時期の調節により開花を調節する。この調節に正確に反応する栽培特性・開花特性をもつ品種が強く求められていた。麒麟社で育成したポットカーネーション新品種「ミセスパール（登録名エスピー）」はこの特性を有し、栽培鉢の90%以上が「母の日」に合わせて出荷できるため生産者から新たな色の開発を強く求められていた。しかし交雑育種では優良形質を維持しつつ色幅を拡大するのは難しい。そこでソマクローナル変異の応用を試みた。

「エスピー」の試験管植物体から葉片を調製し2 mg/l Zeatin、3%ショ糖、0.7%寒天を含むMS培地で培養し不定芽を再生、発根処理し植物体を再生した。その中から花色が「濃赤：JHS カラーチャート 0408」となったものを選抜し、以後、増殖を行いながら特性の調査を2年間継続し、新品種「ミセスエレガント」の育成を完了した(Fig. 2-15)。さらに「ミセスエレガント」を素材に同様な手法により葉ソマクローンを育成し、開花検定、安定性検定により花色が濃橙赤（JHS カラーチャート 0707）となった新品種「ミセスレッド（登録名：キリカミレッド）」を育成した(Fig. 2-15)。



Fig. 2-15 Pot carnation cultivars Mrs. Elegant (left) with deep red flowers and Mrs. Red (right) with bright red flowers bred by somaclonal variation.

・プロトプラスト培養利用による匍匐性赤色ペチュニア新品種の育成

ペチュニア品種「キリンウェーブ」は世界で最も販売量の多い匍匐性花卉である。ペチュニアでは赤が重要花色であるが、「キリンウェーブ」の交雑育種および挿し穂への X 線照射(10~100 Gy)では赤花色を育成できなかった。筆者はバレイショのプロトクローナル変異により様々な皮色の変異を作出できることを確認していた。そこでプロトクローン再分化系の利用による育種を試みた。

キリンパープルウェーブ（登録名：キリマジ）の葉プロトクローン再分化系を開発し、プロトプラスト培養の過程で低線量の X 線(10 Gy)を照射した。再生植物体を温室栽培し親並みの生育性を有するものを 1,452 系統選抜し圃場で栽培した。そのなかに鮮紅色の花色をもつものを 1 つ発見し、増殖後、諸形質の安定性を確認し、完全な匍匐型で赤のペチュニア（品種登録名：キリマジチェリーレッド：商品名「キリンチェリーレッドウェーブ」）を世界で初めて育成した (Fig. 2-16) (品種登録番号 12082)。この新品種はマゼンタパープル色から赤系色への変異であり、かつ老化した花卉で青色化が認められなかった為、液胞内 pH の変化ではなくアントシアニン色素がデルフィニジン系からシアニジン系に変化した変異体と考えられ、原因として *Hf* 遺伝子発現の欠損が推定された (Chen S et al. 2007)。本品種は小輪匍匐型で、鉢物及び花壇向きの新花色として市販に至った。



Fig. 2-16 Breeding of creeping type petunia cultivar Cherry Red Wave (left) with novel red flower color from X-ray irradiated leaf protoclones of cv. Purple Wave (right) with magenta purple flowers.

・ソマクローナル変異+X線によるキク、カーネーション新品種の育成

次に、ソマクローン再分化と X 線照射を併用することによるキク、カーネーション新品種の育成を試みた。

まずキクの管状花から直接不定芽を誘導し植物体を再分化させる培養系を確立した。この系を用いて、先に育成したソマクローン品種「ロイヤルウェディング」の管状花に X 線を照射し植物体を再分化し、その中から、穏紫桃色に黄白色の底白が入るやや小輪のキク新品種「プリティウェディング」(品種登録番号 8878) を育成した (Fig. 2-17)。



Fig. 2-17 Breeding of chrysanthemum cultivar Pretty Wedding with novel dark pink and white bicolored flowers from X-ray irradiated disk florets of cv. Royal wedding.

Flowers of cv. Pretty Wedding are smaller than cv. Royal Wedding and cup-shaped.

また、カーネーションを材料に、2~4 mm 角の微細葉片から直接不定芽を得る系を確立し、「キリンガーデンカーネシリーズ」3 品種、登録名「キリナデサーモン」(品種登録番号 12102)、「キリナデクールピンク」(品種登録番号 12103)、「キリナデマーブル」(品種登録番号 13052)、を育成した。いずれの品種も日米で市販された。これらにより組織培養系と X 線照射の組合せで事業化に有効な優良品種を育成できることを実証した (Fig. 2-18)。



Fig. 2-18 A series of “Kirin Garden Carnations” bred from X-ray irradiated leaf somaclones.

“Kirin Garden Carnation Salmon (left),” “Kirin Garden Carnation Cool Pink (center),” and “Kirin Garden Carnation Marble (right)” with red and white striated flowers

2-4. 小括 (第2章まとめ)

・材料植物、組織、細胞の生理状態の重要性

筆者はキク科植物プロトプラスト培養でのアンモニウムイオンの阻害効果を発見した。この試験では「材料とする植物・組織・細胞の生理状態」が実験結果に重要な影響を与えることを確認した。すなわち温室植物を材料とした場合その葉から得られるプロトプラストの収量は日により異なり、その分裂頻度は大きく振れた。そこで試験管植物を用い再現性を向上させることができた。しかし、9種類またそれ以上の培地における細胞分裂頻度を正確に比較するためには、同時に単離されたプロトプラストを使うことが必須であった。そのため **Multiple-drop-array** 法(材料及び方法を参照)を用いた。その結果、アンモニウムイオンの阻害効果を再現性良く確認できた。

上記の結果を受け、細胞の状態を均一化させる酵素処理前培養(PEC: Pre Enzyme Culture)系を開発した。1) アンモニウムイオン濃度を調整し、2) 材料の生理状態を揃え、3) 細胞を活性化させることで、バレイショ栽培種及びソラナム属植物数種で葉プロトプラストからの効率的な植物体再分化系を開発することができた。バレイショのプロトプラスト培養による実用品種「ジャガキッズ」育成の研究では、各種の皮色変異個体を総計 23%という頻度で獲得した。これは花色の変異を生みやすいと言われるキクと比べても高い出現頻度であり注目された。

・実用品種の育成

バレイショではプロトクロール変異を利用し新皮色をもつ新品種を育成するとともに、各種皮色変異を誘導できたことから、キクへの応用を意図した。キクのプロトクロール及びソマクロール再分化系を確立し、そこに出現する変異の特徴を明らかにした。キク主要栽培品種「リネカー」(桃花色)の試験管植物体の葉プロトクロール及び葉ソマクロールでは花色変異が各々12%、及び7%出現したが、草丈平均は各々材料品種の86%、及び95%でありソマクロール変異の実用性が高かった。またキク栽培品種「ローズクイーン」(濃紫桃花色)の管状花ソマクロールから新しい覆輪色をもつ品種「ロイヤルウェディングセルエンジ」を育成した。この事例は材料部位を変えることで新規変異が得られる可能性を示唆している。

次にポットカーネーションおよびペチュニアを用いて、各々ソマクロール変異育種の有効性、さらにX線照射との併用効果について調査し、ポットカーネーションでは5品種(ソマクロール変異単独で2品種、ソマクロール再分化+X線照射併用により3品種)、ペチュニアではプロトクロール再分化+X線照射により1品種を育成した。

・培養変異の特徴と実用品種の形質安定性

細胞組織培養では、培地中の無機塩類やビタミン類、各種植物成長調節物質類、外植片として切り出される際に傷を受けるストレス、プロトプラスト培養の場合には更に細胞壁分解酵素処理や活性酸素の発生など、様々なストレスにさらされる。この環境下で、細胞分裂の誘導、不定芽・不定胚の誘導など遺伝子発現がダイナミックに変化し、染色体レベルの変化、DNA配列、反復配列の変化、トランスポゾン活性化などの遺伝的変化、またDNAのメチル化やクロモゾームリモデリングなどのエピジェネティックな変化をもたらし、さまざまなソマクロール変異を生む (Neelakandan and Wang 2012)。これらは細胞のストレス反応であり、またゲノム進化の頭れと考えられる (McClintok 1984)。Arabidopsis で1つの根に由来するソマクロールが詳細に調べられた結果、R0再

分化個体のなかで自殖した 28 系統の R1 において 6 系統が後代遺伝する形質であった。また全ゲノムのシーケンスを調査では 1 遺伝子置換が最も多かった(Jiang et al. 2011)。これらの結果はソマクローナル変異により遺伝的な変異が生まれることを示している。

本研究のなかで実用化されたキク、バレイショなど 4 品種はソマクローナル変異のみで得られたものである。これらは全て安定した形質を示した。つまり、バレイショのプロトクローン品種「ジャガキッズ」は 20 年以上に渡り販売され続けているが形質は安定している。この品種は他の研究者によりトランスポゾンの活性化による遺伝子配列の変化と確認された (Momose et al. 2010)。細胞組織培養でトランスポゾンが活性化する例はイネ (Hirochika 1993)、ニンジン (Ozeki et al. 1997)、サツマイモ (Yamashita and Tahara 2000) などでも確認されているため、高頻度に起こる現象と思われる。また本研究育成のキク 1 品種、カーネーション 2 品種は各々 5 年以上に渡り市販され、キクでは総計 200 万本以上の切花が、カーネーションでも各々 100 万本以上の鉢花が各々生産・流通されたが、変異形質は安定していた。これらの結果は、ソマクローナル変異で得られた品種が長期にわたり安定した形質を示し、実用上問題が無いことを事業レベルで実証した。バレイショのプロトクローナル変異を利用した実用品種「ジャガキッズ」育成は、その後のソマクローナル変異及びプロトクローナル変異を活用した育種の先導的研究事例となった。

第3章

イオンビーム育種系の開発によるカーネーション花色変異の創製

3-1. 緒言

3-1-1. 細胞組織培養利用によるイオンビーム育種技術の開発とカーネーション品種育成

イオンビームは、X線やガンマ線などの低 LET 放射線と比較し高い生物効果をもち、局所的に高いエネルギーを付与するため、DNA 鎖の切断など修復しにくい変異を誘導する (Kraft et al 1992)。材料・バイオ技術研究用イオンビーム照射施設 TIARA が 1993 年に世界に先駆けて建設され、AVF (Azimuthally Varying Field) サイクロトロンにより人工的にイオンビームを作りだせるようになり、植物への影響に関する基礎研究が本格的に開始された。炭素イオンビームは電子線と比較して線量当たり 8 倍から 33 倍の突然変異誘発率を示すこと、またイオンビームは逆位・転座・数 kbp 塩基対の大きな欠失など大規模な DNA の構造変化と、数塩基から数十塩基の欠失などの小規模な DNA 構造変化を生むこと (Shikazono et al. 2001) が明らかになり、モデル植物シロイヌナズナで UV-B 抵抗性植物 (Tanaka et al. 2002) フリル型花卉変異体 (Hase et al. 2000) が作出されてきた。

カーネーションは園芸産業における重要品目である。新花色の育成がもたらす経済的価値は大きい。またバレイショは主要クロップであり突然変異育種に適した特徴をもつ。そこで新しい変異原としてのイオンビームをカーネーション、バレイショに適用できる技術の開発と実用化を意図した。

イオンビームは突然変異育種の新たな変異原として期待されていたが、TIARA のイオンビームは組織透過性が 2 mm と浅く実用化の制限要因となっていた。そこで本研究では、生産性・耐病性・花持性に優れるカーネーション優良品種「ビタル」を材料に、その葉の表層から 1 mm 内の深さの組織から多数の不定芽を誘導する組織培養系を開発し、イオンビームを利用した突然変異誘発により植物新品種を育成する汎用的な技術を確立することを意図した。また開発技術を利用しカーネーションの実用品種で花色シリーズの育成を試みた。

次に、イオンビーム照射がバレイショに与える影響を調査した。イオンビーム照射による植物体生育への影響を生物効果の指標とした。また照射由来植物体の圃場栽培により形質変異を調査し、イオンビームの応用拡大に資する基礎知見を得ることを意図した。

3-1-2. イオンビーム照射、ガンマ線急照射、ガンマ線緩照射が花色変異に与える影響の研究

地球上の生物は天空からの宇宙線 (地上に到着する粒子線は中性子線が多い)、地球上の放射性物質や電磁波に曝されてきた。これは突然変異を引き起こす一因となった。新たな科学技術により人工的にイオンビームを照射できるようになり、ガンマ線とイオンビームの両方が生物の突然変異研究や育種研究に利用できるようになっている (岡村 2003)。ガンマ線の急照射及び緩照射が花色に与える影響について同一品種を用いてイオンビーム照射と比較調査した例はない。筆者はスタンダードタイプのカーネーション品種「スター」(オレンジ地に赤の糸覆輪及び斑点の入る花色)を材料に TIARA の炭素イオンビーム照射と放射線育種場ガンマルームでのガンマ線急照射及び緩照射を利用し、異なる変異誘発処理により出現する変異の特徴を主に花色を指標として調査した。

3-1-3. 交雑遺伝情報解析とイオンビーム育種による輝き花色カーネーションの作出

花色を拡大することは花卉の育種における常に大きな課題である。カーネーションでは桃色、赤色、紫色などのシアニック系の色、黄色と緑色の非シアニック系の色、さらにこれらの組み合わせによるオレンジ色や茶色があるため、花色は出尽くしたといわれていた。カーネーションのシアニック系の主要色素はアントシアニンである。各品種は1種類のアントシアニンを主要アントシアニンとしている。主要アントシアニンの構造と花色の関係は以下の通りである：pelargonidin 3-malyl glucoside (Pg3MG); 桃色、 pelargonidin 3, 5-cyclic malyl diglucoside (Pg3,5cMdG); 赤色、 cyanidin 3-malyl glucoside (Cy3MG); 暗赤色、 cyanidin 3, 5-cyclic malyl diglucoside (Cy3,5cMdG); 紫色。これらの色素の発色団であるアントシアニジンはペラルゴニジンあるいはシアニジンであり、それぞれ結合糖として1つあるいは2つのグルコースを持ち、いずれも構造に1つのリンゴ酸を含むアシル化アントシアニンであることを特徴としている(Bloor 1998; Nakayama et al. 2000)。アントシアニンの組成が単純であることが、カーネーションの色のバリエーションの拡大を困難にしている。近縁のダイアンサス属植物のアントシアニンも同じ種類であるために交配育種によって花色を展開させることも期待できない。遺伝子組換え技術によって主要アントシアニンのアントシアニジンがデルフィニジンである品種も存在する(Tanaka and Ohmiya. 2008)が、本研究では非組換え体を扱う。

カーネーションには薄青紫や暗紫メタリック色調の特殊花色を持つ品種や系統がある（ここではこれらを特殊花色と総称する）。このアントシアニンは液胞の中で凝集体(AVIs)を形成していることが報告されている(Markham et al. 2000)。しかし従来の特殊花色品種は暗紫系であり商品性に劣る。また AVIs に関する知見は限られており(Morita et al. 2005, Zhang et al. 2006) その遺伝様式に関しては筆者の予備的な報告があるのみである (Okamura et al. 2012)。そこで本研究では特殊花色の遺伝様式を明らかにし交配育種によって従来品種よりも輝きの強いメタリック色調の特殊花色を持つ系統を作出し、更にイオンビーム照射によりこの系統のアントシアニンの構造と組成を変化させることで輝きの強いメタリック色調のバリエーションを拡大することを意図した。また新奇特殊花色とアントシアニン組成を調べ代謝系の変化とそれに関与する遺伝子について考察した。

3-2. 材料及び方法

3-2-1. 細胞組織培養利用によるイオンビーム育種技術の開発とカーネーション品種育成

・植物材料と微細葉片からの植物体再分化系

スプレーカーネーション品種「ビタル」(チェリー桃花色、剣弁)を材料に、まず微細組織培養系を開発した。すなわち試験管植物の葉から 5 mm 角の微細葉片を調製し 0.5, 1.0, または 2.0 mg/l Zeatin、と 3% ショ糖、0.7% 寒天を含む MS 培地にて 25°C、16 時間日長 (50 μ Em-2 s-1 白色蛍光灯) 条件下で培養し不定芽を誘導する試験を実施した。得られた不定芽はホルモンフリー MS 培地にて発根させ、植物体を安定した。

・イオンビーム照射方法

上記の微細葉片を 2.0 mg/l Zeatin と 3% ショ糖、0.7% 寒天を含む MS 培地 (MSZ 培地) に置床し 25°C、16 時間日長で 1, 2, 3, または 4 日間培養したものに TIARA の AVF サイクロトロンを用いて 220MeV 炭素イオンビームを照射した。その後の不定芽誘導率を調査した。

・イオンビーム照射組織からの植物体再生と開花試験

照射組織片を 50 ml の MSZ 培地を含む Plant Box に移植培養し、イオンビーム照射 2 か月後に不定芽の再分化率を調査した。開花検定にあたり不定芽を 3% ショ糖、0.7% 寒天を含む MS 培地に移植し発根させた。葉片にガンマ線を照射したものからも同様な方法で植物体を得た。再生植物体を温室に馴化し、開花検定により花色等の形質を調査した。

・イオンビーム照射がバレイショの形質変異に与える影響の調査

バレイショ品種「サッシー」(球形・加工用優良品種)を材料とした。試験管で培養し、5 から 8 節に生育した植物の節を、腋芽を上にしてシャーレに植付け、オートクレーブ殺菌したカプトンフィルムで覆った後に、TIARA の 320MeV 炭素イオンビーム ($^{12}\text{C}^{6+}$, LET 86 keV/ μ m) およびヘリウムイオンビーム ($^4\text{He}^{2+}$, LET 9 keV/ μ m) を照射した。照射した節を MS 寒天培地に移植し、23°C、16 時間日長条件下にて腋芽を伸長させ、草丈を測定することで生育度を調査した。

次に圃場で形質を検定した。腋芽をシャーレに植付けたものに 5 Gy の炭素イオンビームを照射した。照射量は生育度が半減する照射量を参考にして設定した。この芽を MS ホルモンフリー培地に植継ぎ 23°C、16 時間日長条件下、5 節以上に生育した植物体の腋芽をさらに植継いだ。伸長した植物体の腋芽をもう一度植継ぎ、発根植物体を温室に馴化した。そして総計 100 系統を圃場で栽培し形態等を調査した。

3-2-2. イオンビーム照射、ガンマ線急照射・緩照射が花色変異に与える影響の研究

・植物材料とイオンビーム照射方法

スタンダードタイプのカーネーション品種「スター」(オレンジ地に赤の糸覆輪及び斑点の入る花

色)の試験管植物体を用いた。0.1 mg/l NAA および 0.1 mg/l BA, 3% ショ糖を含む MS 寒天培地 (MSNB 培地)に腋芽を含むように切り出した葉片を置き、TIARA の AVF サイクロトロンからの 320 MeV 炭素イオンビームを照射した。

- ・ガンマ線緩照射方法および急照射方法

品種「スター」の試験管植物を用い、農業生物資源研究所 (NIAS) 放射線育種場のガンマルームで Co60 ガンマ線源からのガンマ線を照射した。緩照射は、0.5 Gy/hr の線量率で 3 週間間に 20 時間/日を定期的に 10 日照射した (計 10 回、総線量 100 Gy)。急照射は、12 時間 1 回照射で総線量が 30 から 100 Gy となるよう設計した。

- ・イオンビーム照射及びガンマ線急照射・緩照射した植物の開花検定

放射線を照射した材料で、葉の付け根の脇芽を試験管内で生育させた。その後 5~7 cm まで伸長した植物体で脇芽を含む節を切り出し、MS ホルモンフリー培地にて発根させ温室に馴化した。温室にてさらに頂芽ピンチ (切り戻し) を 2 回繰返し、放射線照射から計 3 回の切戻しを経て伸びてきた腋芽をカーネーション栽培ハウスに定植して開花検定を実施した。

- ・変異体の発現遺伝子の調査

カーネーションの花色には L1 層の遺伝子発現が寄与する。そこで黄色地となった変異体の花卉の L1 層から DNA を回収し、PCR 解析により *chalcone isomerase (CHI)* と *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* 遺伝子 (Ito et al. 2002) の発現を調査した。

3-2-3. 交雑遺伝情報解析とイオンビーム育種による輝き花色カーネーションの作出

- ・栽培方法

カーネーション品種および育種系統の栽培は栃木県さくら市の麒麟社のシックスライト温室で行なった。各品種・系統で挿し穂苗を準備し、6 月に 10 cm 角 8 条ネットに 1 列おきに定植し、自然日光下で 30°C~16°C の範囲で栽培した。

- ・材料品種と交配実験

カーネーション品種「ビームチェリー」(桃, 普通花色)、「ナザレノ」(暗紫, AVIs をもつ特殊花色) (Fig. 3-12a), 育種系統「07MC4」(桃, 普通花色)、「04MC1」(桃, 普通花色)、「06MCP1」(桃, 普通花色)、「01MA1」(暗紫, AVIs をもつ特殊花色) を材料とした。雌親とする品種の開花直前の蕾を除雄し、花粉親とする品種の花粉を筆にて受粉させた後、袋をかけ採種まで他の花粉で受粉しないようにした。得られた種を 128 穴トレイに播種し、本葉 4 葉期まで温室内で育苗したのち、定植した。

- ・アントシアニンの同定と定量

「Lines A, B, C, D」の主要アントシアニン及び関連化合物は高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて解析した。カーネーションの花弁から 10% 酢酸にてアントシアニンを抽出した。10 µl のサ

サンプルをダイオードアレイ検出器装備の HP1100 (Agilent Technologies-横河アナリティカルシステムズ社)、および Inertsil ODS-2 カラム (4.6 mm x 250 mm, GL サイエンス社) 40°C 流速 0.8 ml/min にて分析した。吸収スペクトルは 200-600 nm でモニターした。溶液 A (1.5% H₃PO₄) に 10~50% の溶液 B (1.5% H₃PO₄, 40% アセトニトリル, 50% 酢酸) のグラディエント溶出法にて 40 分間流し分析した。アントシアニン は 505 nm の吸収ピークにて同定、定量した。濃度は pelargonidin 3-rutinoside 等量にて測定した。またフラボノイドは 360 nm の吸収ピークにて同定、定量した。濃度は quercetin 3-rutinoside 等量にて測定した。

- ・ 花卉細胞の顕微鏡観察

上記の方法で栽培したカーネーション植物体の花卉を採取し、プラントマイクロトーム(model MTH-1, 株式会社日本医化器械製作所) をもちいて横断面 (厚さ 100 μm) サンプルを準備し、顕微鏡 (オリンパス生物顕微鏡 BX53) にて観察した。

- ・ 突然変異誘発のためのイオンビーム処理方法

花卉の表面を 70% エタノールに 30 秒間浸けた後、有効塩素濃度を 0.5% とした 次亜塩素酸ナトリウム液にて 3 分間処理し殺菌処理した。その後滅菌水で 3 回洗い、2 mg/l zeatin, 30 g/l ショ糖と 7 g/l 寒天 を含む MS 培地 (MSZ 培地) を含む直径 6 cm のシャーレに置床した。このサンプルをカプトンフィルムで覆い、原子力機構 TIARA の AVF サイクロトロンにて 320 MeV 炭素イオンビーム (LET 76 keV/μm) を照射した。

照射後、培養組織を新しい MSZ 培地に移植し 25°C、16 時間日長 (50 μEm-2 s-1 白色蛍光灯) で培養し、不定芽を誘導した。得られたシュートを 30 g/l ショ糖と 7 g/l 寒天を含む MS 培地に移し発根させた。発根後植物体を温室に順化し、128 穴セルトレイにて生育させ採穂した。この穂を上記温室条件で栽培し開花検定に供試した。

- ・ *Anthocyanin malyltransferase (AMa1T)* 遺伝子と *Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase (AA5GT)* 遺伝子の解析

AMa1T 遺伝子の発現解析では、カーネーションの花弁を液体窒素にて凍結させ、乳鉢と乳棒にて破砕した。次に RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) にて総 RNA を抽出した。各々の RNA から 500 ng を使い、oligo dT adapter primer (Takara Bio, Ohtsu, Japan) 及び M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて第 1 鎖 cDNAs を合成した。PCR は SapphireAmp Fast PCR Master Mix (Takara Bio) で実施し、各々次のプライマーセットを用いた :

DcAMa1TFwd (5'-ATGACACTTTCGCCGCTTGATAATTTG-3') 及び

DcAMa1TRev (5'-CTAGAAAGAGGATAATCCAAGCCACC-3');

DcAA5GTFwd (5'-ATGAACATGTCATGCAAGTTTG-3') 及び

DcAA5GTRev (5'-CCTCGAGTACCAATTTTTCGCG-3').

PCR 条件は次の通りである : 94°C で 1 分間保持し熱変性させ、次に、98°C で 5 秒間熱変性 58°C で 5 秒間のアニーリングの後 72°C で 20 秒間の伸長反応を 1 サイクルとして 30 サイクル実施した。

AA5GT 遺伝子の解析のためのゲノム PCR では、カーネーションの花弁あるいは葉より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて製造メーカーマニュアルに従って DNA を抽出した。

AA5GT 領域を増幅させるのに用いたプライマーセットは次のようにデザインした：

5GT5'F, 5'-GATCGATGAATTGTAAGTTGTAACC-3', 及び

5GT3'R, 5'-AATTCGGTGGCAAAGCCGCCGGAAC-3' (for detection of AA5GT region including full length of coding region);

5GT5'F 及び 5GTR09, 5'-CTGTTTCCACCATGAGTTCGACATCTTC-3' (for detection of AA5GT 5' region);

5GTF01, 5'-GCCAGGCAACGGAGACATAACGTCC-3',及び 5GT3'R (for detection of AA5GT 3' region) である(Fig. 3-14b)。

また、AA5GT 領域の第 10 エクソンに挿入しこの遺伝子を不活性化させるトランスポゾン *Ty1dic1* (挿入部位を Fig. 3-14b に記載)を含む AA5GT/*Ty1dic1* ゲノム領域の検出には、参考文献 (Nishizaki et al. 2011) にあるプライマーセット(5'UTF と Ty1Rev) を用いた

ゲノム PCR は Prime Star GXL DNA polymerase (Takara Bio)を用いて次の条件で実施した：96°C で 3 分間の熱変性処理の後、96°C で 10 秒間の変性処理・56°C で 15 秒間のアニーリング・そして 68°C で 90 秒間の伸長反応を 1 サイクルとして 30 サイクル実施。

3-3. 結果及び考察

3-3-1. 細胞組織培養利用によるイオンビーム育種技術の開発とカーネーション品種育成

・原子力機構 TIARA のイオンビーム照射系の開発

カーネーションの試験管植物体から微細葉片を調整し、0.5, 1.0, または 2.0 mg/l Zeatin、と 3% ショ糖、0.7% 寒天を含む MS 培地で試験した結果、2.0 mg/l Zeatin のものが 50% 以上の安定した不定芽誘導率を示したため、この培地を MSZ 培地と命名し、以降の試験に使用した。

MSZ 培地にて 1, 2, 3, または 4 日間培養したものにイオンビームを照射し、同培地にて不定芽を誘導した。その中で、2 日間培養した後にイオンビームを照射した実験区で最も高い不定芽形成率を得られた。この方法では葉の表面から 200~500 ミクロンの深さの細胞から不定芽が形成されていた (Fig. 3-1)。この技術により、組織内の組織透過性が 2 mm 程度である原子力機構のイオンビーム照射装置であっても、カーネーション新品種の育成にルーチンに利用できる系を確立できた。

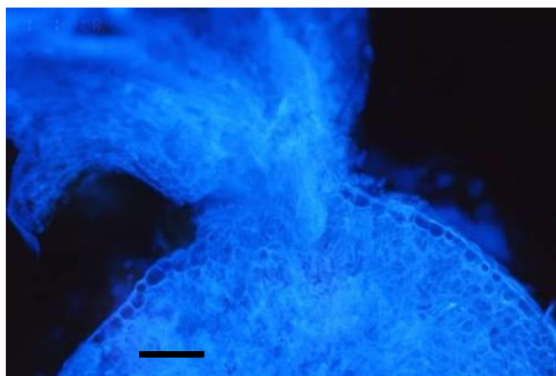


Fig. 3-1 Direct shoot regeneration from carnation leaf tissue without callus formation.

Adventitious shoots are regenerated from tissues less than 500 μ m in depth by using the culture system, Scale bar indicates 200 μ m.

・イオンビームの生物効果

照射したカーネーション培養片からの不定芽再分化率はイオンビーム、ガンマ線とも照射量の増加につれて低下した。しかし不定芽再分化率が半減する線量はガンマ線で 60 Gy であるのに対し炭素イオンでは 15 Gy であり、炭素イオンはガンマ線に比べて生物効果が 4 倍高いことが示された (Fig. 3-2)。また、開花検定で桃色、赤色の花色変異体を得た線量を比べると、イオンビームでは細胞あたり約 20 トラックであったのに対し、ガンマ線ではその 3,000 倍のヒット数に相当する 60,000 スプールであった。これらの結果はイオンビームが低い線量で突然変異を起こし、副次的な遺伝子変異が少ない一部の形質のみが変化した新品種を効率よく作出できることを示唆している。

・イオンビーム育種による突然変異体の特徴

イオンビーム照射系統の開花検定では、赤、桃、濃桃、淡桃、サーモン、黄、クリーム、桃白複色、条斑の花色変異、及び丸弁、ナデシコ花卉、が得られた (Table 3-1)。またガンマ線では赤、桃、微細斑などの花色変異が出現した (Table 3-2)。花色についての変異スペクトルはイオンビーム照射

したものが広く、チェリー色の濃淡など色素の量的変化による変異、黄色への変異、各種条斑花色などのトランスポゾンの挿入（淡桃）と部分的脱落（チェリー色への回復）によると推定される変異など、量的変異および質的変異とも変化に富んでいた (Fig. 3-3)。

また、イオンビーム育種では花形の変化も多数出現し、ナデシコ形花弁、丸弁などが連続的な変異（剣弁、やや剣弁、やや丸弁、丸弁）として観察された (Fig. 3-4)。花色が変化しかつ花弁が丸弁化した系統も出現した。丸弁になり立ち花弁化すると商品価値の高くなるため注目される。またイオンビーム変異体のほとんどが親品種の生育・開花特性を保持していた。これは筆者の開発したカルスを経ずに直接不定芽を誘導できるカーネーション微細組織片培養系がソマクローナル変異を最小限にとどめ、イオンビームであるがゆえ比較的低い線量で花色変異を誘導できたことが要因と考えられる。

Table 3-1 Number of mutants in plants regenerated from leaf cultures irradiated with 220 MeV carbon ion beams

Dose (Gy)	Number of lines tested	Mutants in flower color and/or shape (No.)	Mutation (%) in flower
5	263	Round petals (2), Light pink (1),	1.1
10	284	Pink (1), Dark pink (1), Light pink (2), Salmon (2), Red (1), Striped type; pink and white (2), Dianthus type petals (2)	3.9
15	251	Pink (2), pink/round petals (1), Yellow(1), Red (1), Red/round petals(1), Complex type; pink and white (2)	3.6
30	52	Striped type; pink and white (1), Cream (1)	3.8
Total	850	Flower-color and -shape mutants (24)	

Table 3-2 Number of mutants in plants regenerated from leaf cultures irradiated with gamma rays

Dose (Gy)	Number of lines tested	Mutants in flower color and/or shape (No.)	Mutation (%) in flower
30	350	Pink (1), Minute striped (3)	1.1
50	426	Pink (2), Red (1), Minute striped (4), Round petals (2)	2.1
70	264	Pink (1), Light pink (2), Minute striped (7)	3.8
100	110	Red (1), Minute striped (2)	2.7
Total	1150	Flower-color and -shape mutants (26)	

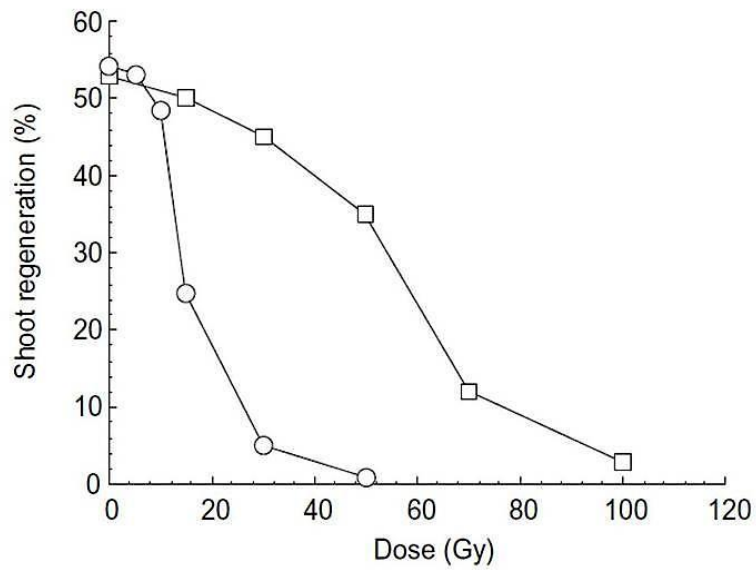


Fig. 3-2 Shoot regeneration frequencies (%) from carnation leaf tissues irradiated with 220 MeV carbon ion beams (○) or gamma rays (□).



Fig. 3-3 A variety of floral mutants obtained from ion beam irradiation of carnation cultivar Vital
 Top (left to right): cv. Vital (cherry, serrated), red, dark pink, salmon.
 2nd (left to right): bi-colored dark, yellow, striped, bi-colored light.
 3rd (left to right): dianthus type, light pink, round red, round pink.
 Bottom (left to right): pink, dianthus type, dianthus type light pink, round type.



Fig. 3-4 Flower shape mutants obtained by ion beam irradiation of carnation cultivar Vital

Top (left to right): cv. Vital (serrated), fewer petals, dianthus type.

Middle (left to right): round petals, smaller petals, dianthus type.

Bottom (left to right): round petals, less petals, dianthus type.

・イオンビーム育種によるカーネーション新品種「ビタルシリーズ」の育成

キクやカーネーションなどの大規模生産花卉では、優れた栽培性・収量性・花持ち性などを併せ持つ優良品種をもとに、突然変異により様々な花色を揃えて花色シリーズとして展開し、生産者や販売者、消費者に提供することが必須となる。ところがカーネーション優良品種「ビタル」へのガンマ線の利用では限られた花色しか得られなかった。これに対し、220 MeV 炭素イオンビームの照射ではガンマ線の約 1/4 という少ない照射量で多様な花色突然変異体が得られることが確認できた。

また、不要変異の併発が少ないか無いため、照射試験を開始してから2年という短期間に、花色が赤の「レッドビタルイオン」(品種登録番号 13587)、桃の「ダークピンクビタルイオン」(品種登録番号 13586)、桃白覆輪の「ミスティピンクビタルイオン」(品種登録番号 13585)という世界初の「イオンビーム育種品種シリーズ」を育成し、商業生産に移行できた。この研究によりイオンビーム育種により親品種の有用形質を保持しつつ様々なピンポイントの形質変化を誘導できることが実証された (岡村 2002)。

A



B



Fig. 3-5 Commercialization of carnation cultivars bred by ion beam irradiation

A: Carnation cultivars Vital ion series produced by ion beam irradiation of cv. Vital (upper right):

“Red Vital” (upper left), “Misty Pink Vital” (center), and “Dark Pink Vital” (lower right).

B: Commercial production of cv. Red Vital.

イオンビーム照射がバレイショに与える影響の調査

・バレイショにおけるイオンビームの照射量と生育度の関係

ジャガイモ品種「サッシー」の試験管植物体にイオン照射研究施設 (TIARA) の炭素イオンビーム ($^{12}\text{C}^{6+}$, LET 86 keV/um) 或いはヘリウムイオンビーム ($^4\text{He}^{2+}$, LET 9 keV/um) を照射し、その植物体の腋芽を MS 培地に植継ぎ、伸長してきた植物体の背丈を測定した結果を Fig. 3-6 に示す。へ

リウムイオンビーム、炭素イオンビームともに照射量の増加に伴い生育量（背丈）は減り、ヘリウムイオンビームでは 11 Gy, 炭素イオンビームでは 6 Gy 前後の照射量で生育が半減した。

・イオンビーム照射バレイショの圃場調査

バレイショ試験管植物体の腋芽に 5 Gy の炭素イオンビームを照射し、その腋芽を植え継ぎ、温室に馴化した後、圃場で栽培した 100 系統の形態等を調査した結果、葉の形態が親品種と異なるものが約 30%出現した。その内訳は、複葉を構成する小葉の枚数が 3 割以上増えたものが 16 個体、葉が丸くなったもの 8 個体、小葉の枚数が増加しかつ丸くなったもの 7 個体となった。また草丈が親の 90%未満のものが 5%出現した。さらに、花色や茎のアントシアニン着色の変異も出現した (Fig. 3-7)。バレイショへのイオンビーム照射により、草丈、葉の形態、花色や茎の色の変異が誘導されることが判明し、試験系統数を増やすことで草型だけでなく塊茎特性の変異体も得られると推定された。

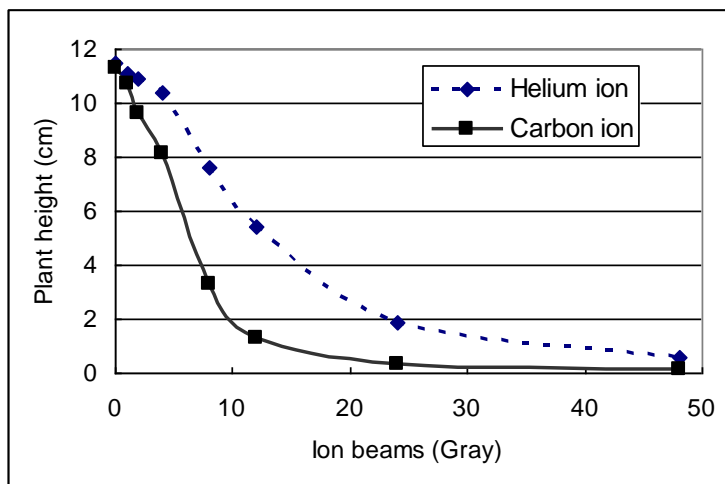


Fig. 3-6 Dependence of plant height (cm) on ion beam dose (Gray) after irradiation of potato bud with helium ion beams (broken line) and carbon ion beams



Fig. 3-7 Flower color and stem color variation in potato plant irradiated with TIARA 320MeV carbon ion beams. Material cultivar Sassy (left) and its color variant (right)

以上の研究により、組織培養系へのイオンビーム照射を一般的育種手段とすることができた。また従来法であるガンマ線突然変異育種と比較して、イオンビーム育種では花色・花形変異の幅をより拡大できることを明らかにした。カーネーション品種シリーズの育成と事業化は、不要変異が少なく多種類の変異が得られるイオンビームの特徴を実証した (岡村 2008)。

3-3-2. イオンビーム照射、ガンマ線急照射・緩照射が花色変異に与える影響の研究

・ガンマ線急照射・緩照射とイオンビーム急照射の生物効果

カーネーション品種「スター」へ 320 MeV 炭素イオンビームまたはガンマ線を急照射した試験管植物体の節を MS ホルモンフリー培地に植え、その腋芽の成長を測定し照射量と生育度（地上部生体重）の関係を調査した。腋芽からの植物体生育度が半減する照射量は炭素イオンビーム及びガンマ線で各々 17 Gy 及び 60 Gy であり、生育度から見た生物効果はガンマ線に比べイオンビームが 3.5 倍高かった。またガンマ線の緩照射では 100 Gy の照射を受けた場合でも照射しない場合と同等の生育度を示した。

・イオンビーム照射、またガンマ線急照射・緩照射による花色変異

花色に関する突然変異体の出現頻度は、イオンビーム照射で 7.7%、ガンマ線急照射及び緩照射で各々 8.2% 及び 4.6% となった。イオンビーム照射では花色変異として、地の色が薄オレンジ、濃オレンジ、サーモンオレンジ、黄色となったもの、また地色が白となり赤色の縞模様のみになったもの (Striped) が得られた (Fig. 3-8)。花形変異では、丸弁化、小型化した花などが得られた。ガンマ線急照射では地の色が薄オレンジ、濃オレンジ、サーモンオレンジが得られた。花色変異の幅はガンマ線急照射よりもイオンビーム照射の方が広がった。ガンマ線緩照射では、地の色の変異体として、薄オレンジ、濃オレンジ、サーモン、黄色が出現した (Fig. 3-8)。3 種類の照射により得られた変異体の種類とその頻度を Fig. 3-9 に示す。花色変異の幅はガンマ線急照射よりも緩照射の方が広がった。



Fig. 3-8 Flower color mutants of carnation cultivar Star (upper left) obtained from irradiation with ion beams (upper row) and chronic gamma rays (lower row).

MSNB 培地は 0.1 mg/l NAA および 0.1 mg/l BA という低濃度の植物生長調節物質を含む。照射個体からの腋芽培養に用いるものでありソマクローナル変異を狙ったものではないが、念のため無照射の材料を用いて MSNB 培地で生育させた芽を温室に馴化し花色を観察した。2 回の試験で計 360 個体について花色を調査したが、親品種「スター」に比べてオレンジ色が薄くなったものが 2 個体

出現しただけであった。ゆえに本試験条件ではソマクローナル変異の影響はごく少なく、Fig. 3-9の結果はガンマ線の急照射・緩照射とイオンビーム急照射による花色変異の幅と頻度の影響を反映していると考えられる。

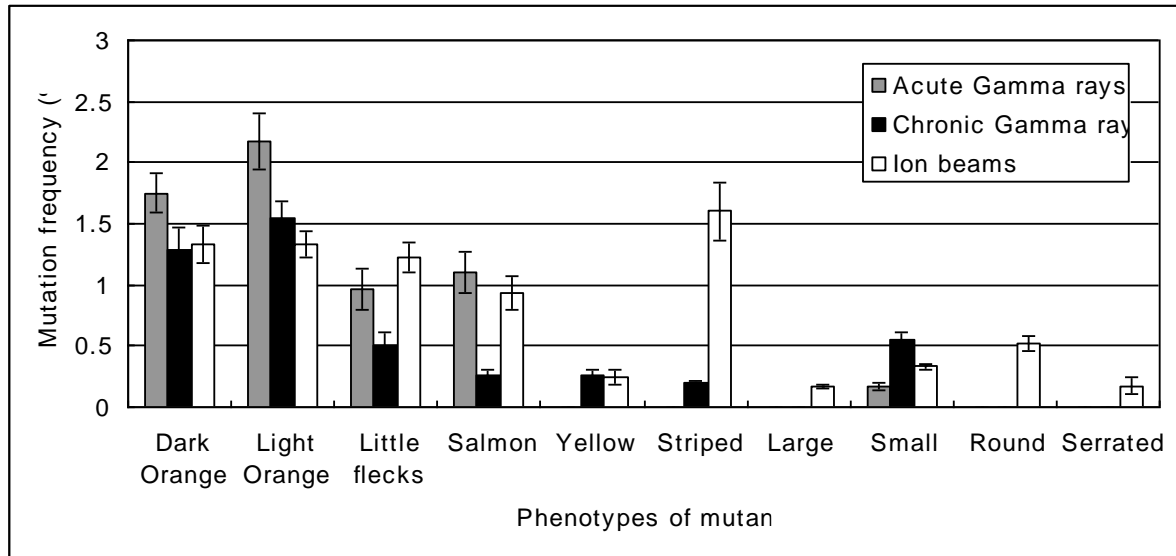


Fig. 3-9 Frequencies (%) of emergence of flower-color and -shape mutants in carnation cultivar “Star” irradiated with acute gamma rays (gray bars), chronic gamma rays (black bars) and ion beams (white bars): Mutation spectrum was wider in plants irradiated with chronic gamma rays or ion beams than in those with acute gamma rays. Yellow color and striped color emerged in both ion beam and chronic gamma irradiations, but not in acute gamma irradiation.

以上の試験によりガンマ線の急照射および緩照射、またイオンビーム急照射による花色変異の幅と頻度を調査できた。イオンビームとガンマ線急照射の間には花色変異個体の出現頻度に大きな差がなかった。得られる花色のスペクトルは、イオンビーム急照射>ガンマ線緩照射>ガンマ線急照射の順に広いことを確認した(Okamura 2006)。ガンマ線では急照射に比べ緩照射のほうが変異の幅が広がった。その理由として、急照射では致死になりこれまで得られなかった黄花色などの変異が緩照射では得られたためと考えられる。すなわち、草本植物でも木本植物でも急照射は高線量率のため同じ細胞の DNA に数多くの傷を受け (Sparrow et al 1961)、その結果出現し難い変異に関する遺伝子が破壊されるまでには致死する確率が高い。対して緩照射では生育中の細胞に低線量率で放射線が照射される結果、1細胞当りの DNA の傷つまり破壊された遺伝子は少ないが長期間の間に多様な変異細胞が得られ、その中に黄花色変異などが含まれていた可能性が考えられる。

・変異体の発現遺伝子の調査

ガンマ線急照射では得られなかった地の色が黄色となった変異体がイオンビーム照射とガンマ線緩照射で得られた (Fig. 3-10)。黄色のカーネーションでは *dTdic1* と呼ばれるトランスポゾン (転移因子 transposable element, TE) が *CHI* と *DFR* の両方の遺伝子に挿入されることで、その発現が阻害され、その結果 Chalcone-2'-glucoside が蓄積し黄色となる (Ito et al. 2002)。この TE の離脱で花色がオレンジに回復することがある。そこでイオンビーム照射およびガンマ線緩照射で得られた黄

色地となった変異体の遺伝子 DNA を調べた。

カーネーションは通常 2 倍体であり、花色には L1 層の遺伝子発現が寄与する。表層キメラで第 2 層が表に出て花色がもとの色に回復することがある (Sagawa and Mehlquist 1957) のはそのためである。そこで上記の、地が黄色に変異した花の花弁から L1 層を回収し、その DNA を用い PCR 解析により *CHI* と *DFR* 遺伝子を調査した。その結果、カーネーション品種「スター」では *CHI* の両方のアリル (*I*) が *dTdic1* の挿入により破壊され *i-m/i-m* となっていた。そして *DFR* では片方のアリル (*A*) は野生型であったのに対し他方はやはり *dTdic1* の挿入により破壊され *A/a-m* のヘテロ型となっていた。これに対して、黄色地となった変異体の *DFR* について PCR 増幅したバンドを見ると、親品種「スター」で野生型であったアリルも破壊され *a/a-m* となっていた (Fig. 3-11, 注: レーン 2 と 3 で僅かに *A* アリルバンドが見えるのは、L1 層サンプリングの際に僅か混入する L2 層のため)。この結果、イオンビーム照射またガンマ線照射により野生型の *DFR* 遺伝子が破壊されたため黄色地の変異体となったことが分かった。



Fig. 3-10 Flower appearance of cv. Star (upper) and its gamma irradiated mutant (lower left) and ion-beamed mutant (lower right).

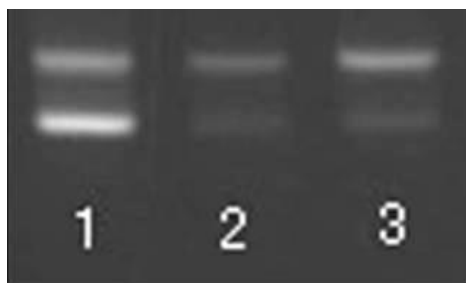


Fig. 3-11 Molecular analysis of *DFR* alleles

1: cv. Star, 2: a gamma-irradiated mutant; 3: a ion-beamed mutant. An upper band indicates *a-m* allele (inactive *DFR* gene disrupted by *dTdic1* transposable element) and a lower band indicates *A* allele (active *DFR* gene). Pale lower bands of *A* allele in lanes 2 and 3 are due to the contamination of L2 layer tissues that inevitably attach to the L1 layer tissue samples.

3-3-3. 交雑遺伝情報解析とイオンビーム育種による輝き花色カーネーションの作出

・交雑遺伝情報解析による、特殊花色の表現型と AVIs の存在との相関の発見

カーネーションの系統群について品種「ナザレノ」(Fig 3-12a) に似た暗紫特殊花色をもつ系統を選びその花卉細胞を観察したところ全ての系統が AVIs を有した。これら特殊花色の遺伝様式を調査するため、育種系統「07MC4」と「04MC1」を選び、正逆交雑を実施した。この2系統の花色は Fig. 3-12a の「ビームチェリー」と同じ桃であり AVIs を有さないにもかかわらず、その後代に特殊花色を分離したことがあった。「07MC4」X「04MC1」交雑からは 69 の普通花色個体と 25 の特殊花色個体が分離した (Table 3-3)。この分離比は 3 : 1 分離比に一致する ($\chi^2 = 0.128, P = 0.72$)。顕微鏡で花卉を観察すると特殊花色 25 個体は全て、そのほとんどの花卉表皮細胞に AVIs を有していた。

「04MC1」X「07MC4」組合せからも普通花色個体 : 特殊花色個体の分離比は 3 : 1 となった (139 通常花色 : 47 特殊花色, $\chi^2 = 0.007, P = 0.93$)。「07MC4」と特殊花色系統「01MA1」と交雑では 55 の普通花色個体と 49 の特殊花色個体が分離した (= 1 : 1, $\chi^2 = 0.346, P = 0.56$)。また特殊花色同士の交雑組合せ「01MA1」X「ナザレノ」からは、ほぼすべての個体が特殊花色となった (開花した 60 個体中 59 個体が特殊花色)。さらに、後者の交雑 3 組合せで得た特殊花色個体を各々ランダムに 10 個体選び花卉細胞を観察すると、すべてが AVIs を有した (Table 3-3)。これらの事実は、特殊花色は AVIs 形成で起こり、その形質は劣性単一遺伝子に支配されているという仮定によく一致している。また育種系統「07MC4」及び「04MC1」はこのアレルについてヘテロであることを示している。

筆者はさらにカーネーション遺伝資源について特殊花色と普通花色の形質分離を調査し、品種「ビームチェリー」(桃普通花色, AVIs なし)と「レッドビタル」(赤普通花色, AVIs なし)は「ナザレノ」と交雑しても全く特殊花色の後代を分離しないこと、それに対して、育種系統「06MP1」(桃普通花色, AVIs なし)は「ナザレノ」と交雑すると 45 個体中 24 の特殊花色個体を分離することを確認した (Table 3-3)。これらの結果により AVIs 形成とそれに伴う特殊形質の発現は、このアレルが劣性ホモとなった場合に起き、「ビームチェリー」と「レッドビタル」とはこのアレルについて優性ホモであり、「06MP1」はヘテロであることが示唆された。

・アントシアニンの組成と特殊花色の表現型発現

特殊花色の表現型についてより深く知るため、各品種・系統のアントシアニンを調査した。主要アントシアニンは「ビームチェリー」, 「07MC4」および「04MC1」では Pg3,5cMdG であり、「レッドビタル」では Pg3MG であった。これに対して特殊花色をもつ系統「01MA」及び品種「ナザレノ」では pelargonidin 3, 5-diglucoside (Pg3,5dG) であった (Table 3-4)。この結果は AVIs の形成にはリンゴ酸 (Malate:カーネーションアントシアニンのアシル基) をもたない非アシル型アントシアニンが決定的な役割を果たしていることを示唆する。さらに「07MC4」X「04MC1」の交雑から得た集団で普通花色をもつものと特殊花色をもつものを 5 個体ずつランダムに選び、そのアントシアニンを調査した。特殊花色個体は全てが非アシル型アントシアニンである Pg3,5dG を持ち、普通花色個体は全てアシル型アントシアニンである Pg3,5cMdG を持っていた (Table 3-4)。この結果は花卉液胞中の非アシル型アントシアニンと AVIs 形成の相関を示す。

Table 3-3 Segregation of the peculiar flower color phenotype in progeny of crosses between normal and peculiar flower color carnation lines

Cross combination		Number of plants examined	Normal color	Peculiar color ^a
Female	Male			
‘07MC4’ (N) ^b	‘04MC1’ (N)	94	69	25
‘04MC1’ (N)	‘07MC4’ (N)	186	139	47
‘01MA1’ (P) ^b	‘07MC4’ (N)	104	55	49
‘06MP1’ (N)	‘Nazareno’ (P)	45	21	24
‘Beam Cherry’ (N)	‘Nazareno’ (P)	30	30	0
‘Red Vital’ (N)	‘Nazareno’ (P)	20	20	0
‘01MA1’ (P)	‘Nazareno’ (P)	60	1	59

^a Peculiar color represents dusky or metallic flower colors that are thought to be conferred by the formation of AVIs in petal epidermal cells

^b (N) and (P) represent normal color and peculiar color, respectively

Note:

‘Nazareno’ and ‘01MA1’ had AVIs, whereas the lines with normal color had no AVIs.

All of the peculiar color individuals segregated from ‘07MC4’ x ‘04MC1’ had AVIs, whereas all five of the randomly chosen normal color individuals had no AVIs.

All ten of the randomly chosen peculiar color plants for each of the three crossings, ‘04MC1’ (N) x ‘07MC4’ (N), ‘01MA1’ (P) x ‘07MC4’ (N) and ‘06MP1’ (N) x ‘Nazareno’ (P), had AVIs in the petal epidermal cells.

Table 3-4. Flower colors and major anthocyanins of normal and peculiar color type carnation lines used in this study

Carnation line	Flower Color	Anthocyanin
(Normal color type)		
‘Beam Cherry’	Pink	Pg3,5cMdG
‘Red Vital’	Red	Pg3MG
‘04MC1’	Pink	Pg3,5cMdG
‘07MC4’	Pink	Pg3,5cMdG
‘06MP1’	Pink	Pg3,5cMdG
(Peculiar color type)		
‘01MA1’	Dusky Purple	Pg3,5dG
‘Nazareno’	Dusky Purple	Pg3,5dG

Note: Five randomly selected peculiar color individuals segregating from the cross ‘07MC4’ x ‘04MC1’ (in Table 1) predominantly contained Pg3,5dG, a non-acylated anthocyanin, whereas five normal color individuals predominantly contained Pg3,5cMdG, an acylated anthocyanin.

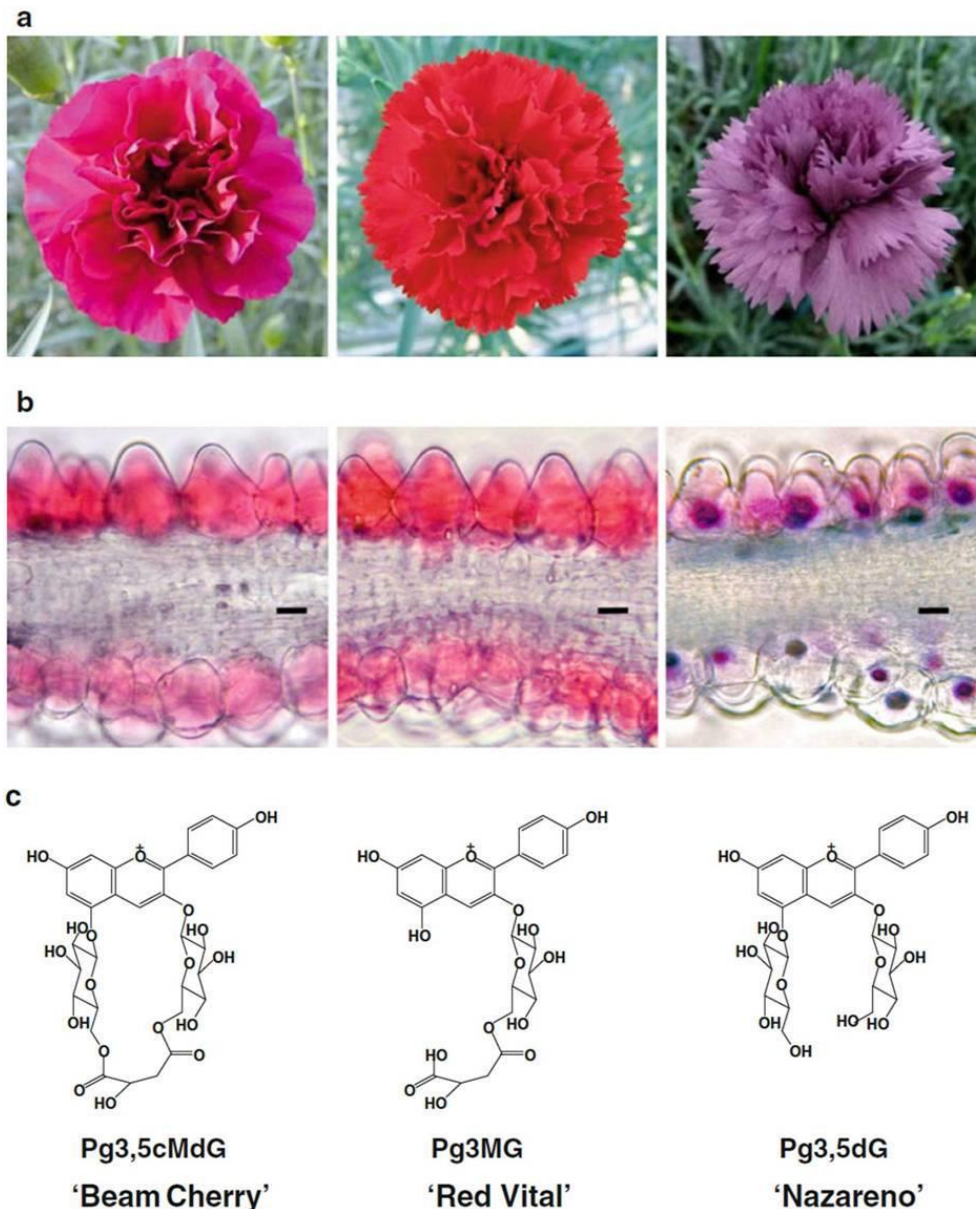


Fig. 3-12 Flower morphologies and anthocyanin structures in carnation cultivars

Flower phenotypes (a), microscopic photographs of transverse cross-sections of petal epidermal cells (b), and the structures of anthocyanins (c) of cvs. (left to right), Beam Cherry (pink, no AVIs), Red Vital (red, no AVIs), and Nazareno (dusky purple, AVIs rich). Scale bars in microscopic photographs indicate 30 μm

・特殊花色系統の作出

上記の分離比の調査に用いた通常花色系統「07MC4」X「04MC1」の交配後代の特殊花色系統から、従来品種よりも強いメタリック調をもつ青紫色の系統を選抜した。これまでにない輝きを持つこの系統について栄養繁殖し50株を2回栽培することで形質の安定性を確認し、「Line A」と命名した。「Line A」はアントシアニンとして非アシル体であるPg3,5dGを独占的に含んでいた。また液胞にはアントシアニンの凝集体(AVIs)が見出された。

本研究では、合理的にカーネーションの特殊花色を拡大することを意図して、特殊花色の遺伝様式および特殊花色の発現に関わる遺伝子を明らかにすることを試みた。その結果、以前に特殊花色を分離したことのある普通花色系統(ここでは特殊花色分離普通花色系統と呼ぶ)同士の交雑では、

普通花色：特殊花色の分離比は3：1に近い値となった (Table 3-3)。さらに、特殊花色分離普通花色系統と特殊花色系統との交雑では、普通花色：特殊花色の分離比は1：1に近い値となり、いずれの分離比も理論値に一致した。これらの事実は特殊花色の発現は単一劣性遺伝子に支配されていることを示している。

・イオンビーム照射による特殊花色系統の色調の拡大作出

「Line A」 (Fig. 3-13a) のアントシアニン組成を変化させることで、色調のバリエーションを拡大することを試みた。そのための突然変異誘発手段として、カーネーションの通常花色系統において花色変異を誘導した実績のあるイオンビーム育種法を用いた。イオンビームは遺伝子の破壊をもたらすことから、Pg3,5dG より構造が単純で、吸光特性・色調の異なる pelargonidin 3-glucoside (Pg3G) を主要アントシアニンとする系統の作出を期待した。そこで「Line A」の花弁へ原子力機構 (JAEA) TIARA イオン照射装置により 320 MeV 炭素イオンビームを照射し、植物体を再生した。その結果、様々な花色を作り出すことに成功した。このなかから最も輝き色調の強いものを選抜し、「Line B」 (赤紫メタリック花色)、「Line C」 (銅赤メタリック花色)、「Line D」 (赤メタリック花色) と命名した。得られた花色変異体の頻度は 7 Gy, 15 Gy, 20 Gy 照射で各々 3.1%, 6.2%, 8.5%であった (Table 3-5)。15 Gy, 20 Gy 照射区での変異体出現率は 3-3-1 で得た品種「ビタル」葉組織へのイオンビーム照射での花色変異出現率 (約 3.7%) よりも高く、また 3-3-2 で得た品種「スター」葉組織へのイオンビーム照射での花色変異出現率 (約 6.5%) 並みであった。

Table 3-5 Number of flower color mutants induced by 320 MeV carbon ion beam irradiation on breeding line 'LineA', Metallic Bluish purple

Dose (Gy)	Number of regenerated plants examined	Number of flower color mutants				Frequency of flower color mutants (%) [*]
		Metallic Reddish purple	Metallic Crimson	Metallic Red	Others ^a (Pink, Violet)	
0	50	0	0	0	0	0.0
7	160	3	0	0	2	3.1
15	145	4	2	2	2	6.2
20	141	4	3	2	3	8.5

^a Others consisted of one Pink and one Slightly Metallic Pink from a 20 Gy irradiation and five Dusky Violet mutants

* The percentage of mutants was calculated as the number of flower color mutants relative to the total number of plants examined

・メタリック特殊花色系統のアントシアニンおよび関連成分の組成と含量の分析

「Line A」と「Line B」の主要アントシアニンは Pg3,5dG であり、「Line B」のアントシアニン濃度は「Line A」の約 68%であった。一方、「Line C」と「Line D」の主要アントシアニンは Pg3G であり、「Line D」のアントシアニン濃度は「Line D」の約 86%であった。

いずれの系統においても、アントシアニンの生合成関連化合物であるフラボノイドの主要成分は kaempferol 3-(6''-rhamnosyl-sophoroside) と kaempferol 3-sophoroside であった (Table 3-6)。

Table 3-6 HPLC analysis of anthocyanins and related compounds in carnation lines: ‘Line A’ (metallic bluish purple, AVIs rich), ‘Line B’ (metallic reddish purple, AVIs average), ‘Line C’ (metallic crimson, AVIs rich) and ‘Line D’ (metallic red, AVIs average)

Breeding lines	Anthocyanins and related compounds ^a	HPLC Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Concentration ^b ($\mu\text{mol}/\text{fresh weight}$)
‘Line A’	Pelargonidin 3, 5-diglucoside	10.1	500, 410 (sh), 328, 274, 268	8.5 ± 0.4
	Flavoniod 1	17.0	348, 295 (sh), 266	5.6 ± 0.2
	Flavonoid 2	18.2	348, 295 (sh), 266	3.4 ± 0.3
‘Line B’	Pelargonidin 3, 5-diglucoside	10.1	500, 410 (sh), 328, 274, 268	5.8 ± 0.3
	Flavoniod 1	17.0	348, 295 (sh), 266	5.9 ± 0.3
	Flavonoid 2	18.2	348, 295 (sh), 266	5.1 ± 0.6
‘Line C’	Pelargonidin 3-glucoside	12.7	502, 428, 332, 276, 270	7.9 ± 0.2
	Flavoniod 1	17.0	348, 295 (sh), 266	5.7 ± 0.1
	Flavonoid 2	18.2	348, 295 (sh), 266	3.2 ± 0.1
‘Line D’	Pelargonidin 3-glucoside	12.7	502, 428, 332, 276, 270	6.8 ± 0.3
	Flavoniod 1	17.0	348, 295 (sh), 266	8.6 ± 0.7
	Flavonoid 2	18.2	348, 295 (sh), 266	4.0 ± 0.2

Flavoniod 1: Kaempferol 3-(6''-rhamnosyl-sophoroside), Flavonoid 2: Kaempferol 3-sophoroside

^a Anthocyanins or flavonoids were detected and quantified based on the absorption at 505 nm or at 360 nm, respectively

^b Concentrations of anthocyanins or flavonoids were calculated as pelargonidin 3-rutinoside equivalents or quercetin 3-rutinoside equivalents, respectively

・メタリック花色系統の AVIs の特徴

4つのメタリック系統「Lines A, B, C, D」の花弁表皮細胞を顕微鏡で観察した(Fig. 3-13b)。その結果、全ての系統が向軸側表皮細胞に AVIs を持っていた。しかし従来の AVIs 含有花弁をもつ品種「ナザレノ」(暗紫色花弁)と異なり、強いメタリック色調をもつ「Lines A, B, C, D」では AVIs の凝集度が高く、液胞液は水のように澄んでいた。加えて、同じアントシアニン組成の系統間で比較すると、背軸側の AVIs の数と程度に差が見られ、色調に変化をもたらしていた。すなわち、「Line A」と「Line C」に比べて明るい色調の「Line B」と「Line D」では背軸側の AVIs の凝集の程度が低かった(Fig. 3-13b)。

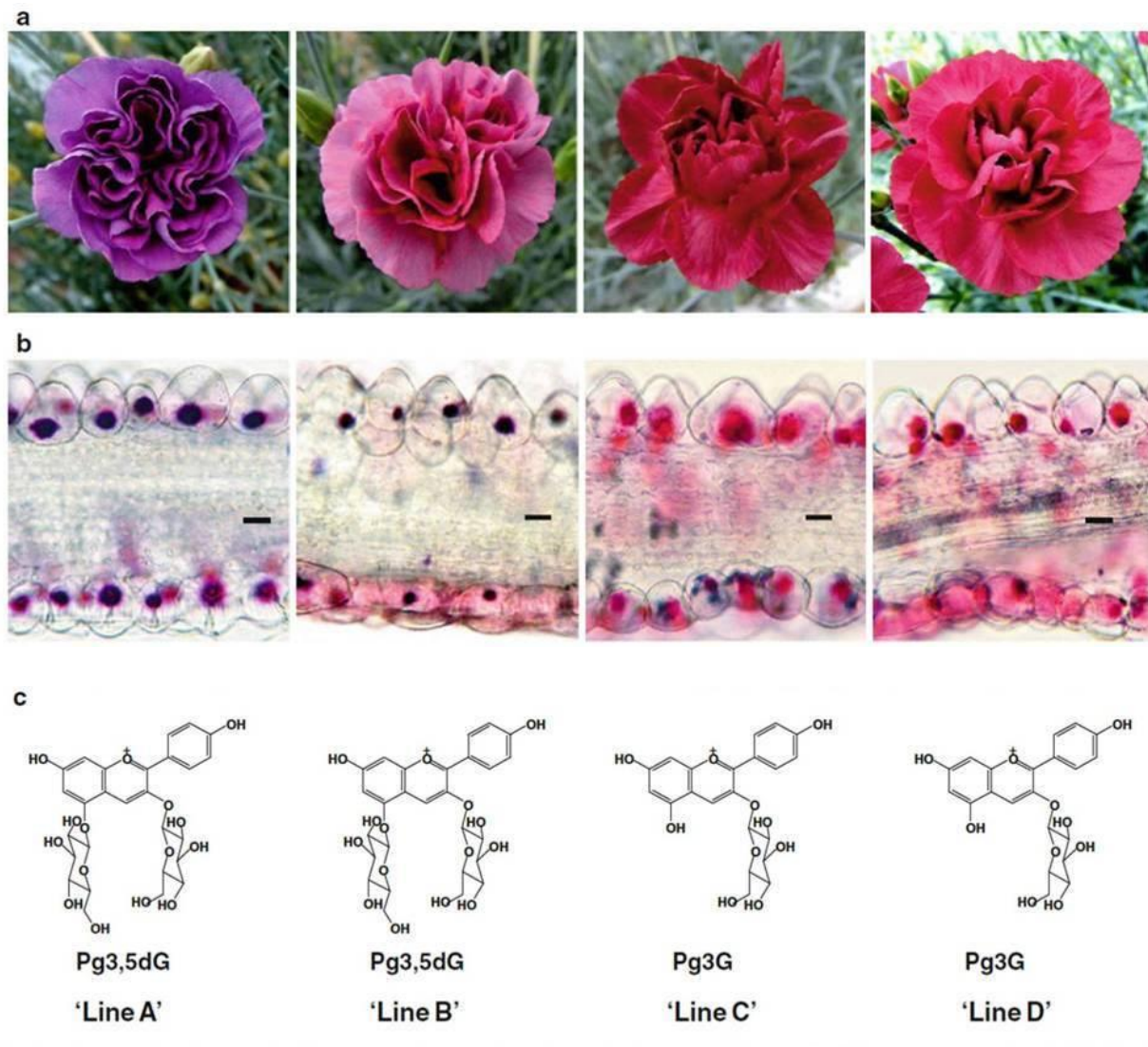


Fig. 3-13 Flower morphologies and anthocyanin structures in mutants with glittering flower colors
Flower phenotypes (a), microscopic photographs of transverse cross-sections of petal epidermal cells (b), and the structures of anthocyanins (c) of carnation breeding lines; (left to right), 'Line A' (metallic bluish purple, AVIs rich), 'Line B' (metallic reddish purple, AVIs average), 'Line C' (metallic crimson, AVIs rich) and 'Line D' (metallic red, AVIs average). *Scale bars* in microscopic photographs indicate 30 μm

・メタリック特殊花色系統の *AMaT* 及び *AA5GT* 遺伝子の発現解析とゲノム PCR 解析
AMaT 遺伝子の発現解析

酵素 *AMaT* は、マリルグルコースがもつマリル基の Pg3,5dG への転移を触媒する酵素である (Abe et al. 2008)。また Anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase (*AA5GT*)は Pg3G を Pg3,5dG に転換する糖の転移を触媒することが知られている (Matsuba et al. 2010)。筆者は得られた 4 種のメタリック色調系統の *AMaT* と *AA5GT* 遺伝子の発現を RT-PCR 法により解析した。*AMaT* 転写産物は「ビームチェリー」で確認されたがメタリック系統 4 種では確認されなかった。また「Line A」と「Line B」では *AA5GT* 転写産物が検出されたが、「Line C」と「Line D」では検出されなかった (Fig. 3-14a)。この転

写物の解析結果は各系統のアントシアニン組成分析とよく一致した。また AMaT 活性の欠落と AVIs 形成との相関を確認できた。

AA5GT 遺伝子のゲノム PCR 解析

赤系のカーネーションでは、トランスポゾン *Ty1dic1* が *AA5GT* 領域の第 10 エクソンへ挿入することにより *AA5GT* 遺伝子が不活性化されアントシアニン色素が Pg3MG となる結果、赤色を呈することが知られている。この DNA 配列は *AA5GT/Ty1dic1* と表現される (Nishizaki et al. 2011)。そこで「Line C と D」における *AA5GT* 遺伝子の不活化がどのような遺伝子の変化によるものであるかを確認するため PCR 解析を実施した。

まず「イオンビームを照射する以前の Line C と D」(つまり Line A) の *AA5GT* 遺伝子の遺伝子型を確認するため、西崎らの報告(Nishizaki et al. 2011)に基づき DNA 配列 *AA5GT/Ty1dic1* を検出するプライマーセット「5'UTF と Ty1Rev」を用い PCR を実施した。すると、コントロールの「ビームチェリー」でも「Line C」、「Line D」でも増幅されたバンドが検出された(Fig. 3-14c)。このことからアントシアニン色素が Pg3G である「Line A」(Table 3-6)は *AA5GT/Ty1dic1* と健全な *AA5GT* アリルを持っていることがわかった。

次に健全な *AA5GT* ゲノム領域を検出するプライマーセットをデザインした(Fig. 3-14b)。つまり、*AA5GT* コード領域全体を検出する: 5GT5'F と 5GT3'R のセット、*AA5GT* 5' ゲノム領域を検出するための 5GT5'F と 5GTR09 のセット、*AA5GT* 3' ゲノム領域を検出するための 5GTF01 と 5GT3'R のセットである。健全な *AA5GT* であることを確認するために、オープンリーディングフレーム全長、5' ゲノム領域、あるいは 3'ゲノム領域を検出するプライマーセットを用いた場合、「ビームチェリー」では増幅バンドが検出されたのに対し、「Line C」「Line D」では増幅バンドは検出されなかった(Fig. 3-14c)。この結果により、「Line A」の片方のアリルがもっていた健全 *AA5GT* の領域全体が「Line C」と「Line D」では欠落していることがわかった。

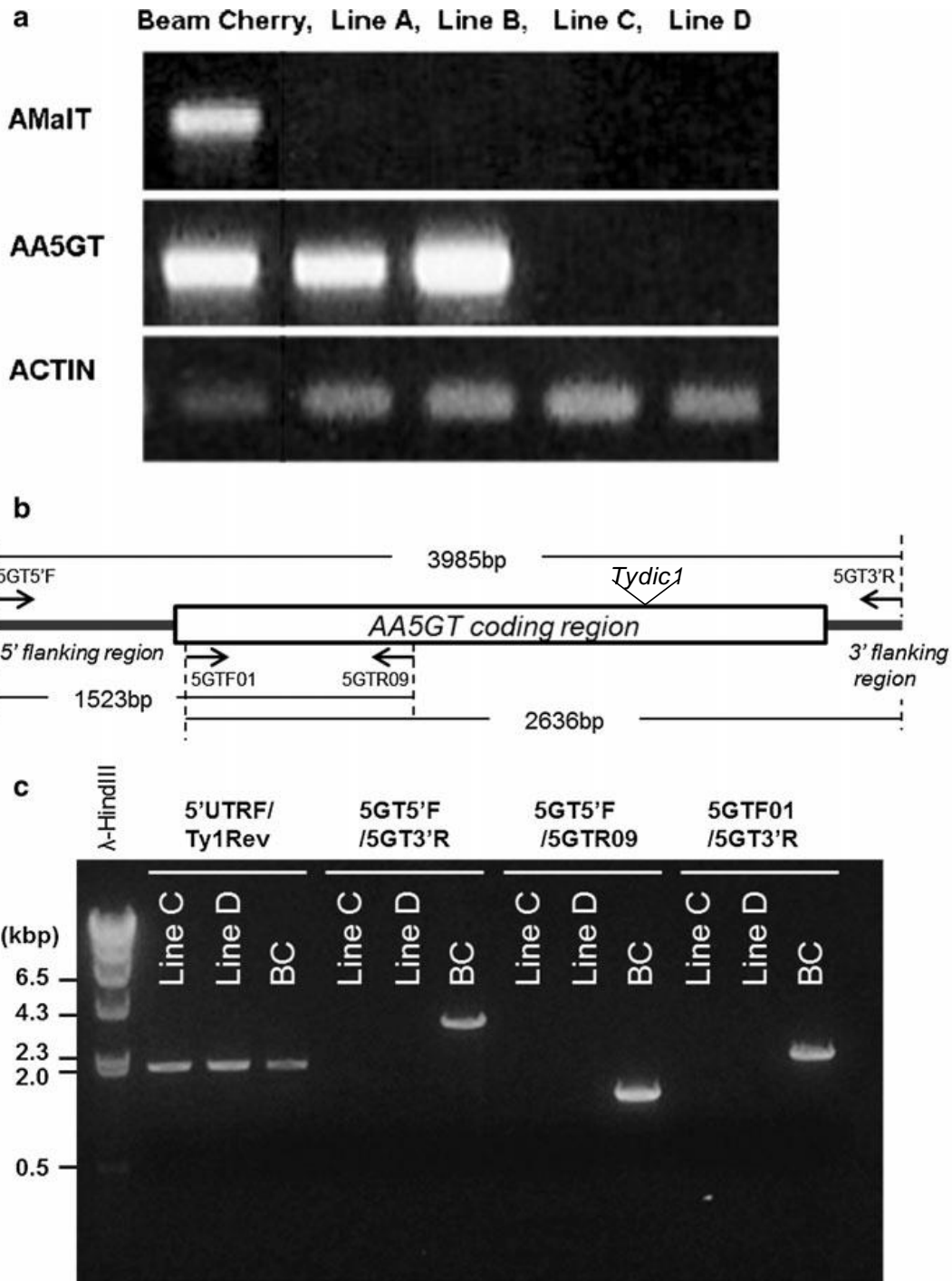


Fig. 3-14 Analysis of *AA5GT* and *AMaIT* genes in glittering carnation lines and cv. Beam Cherry
a) RT-PCR analysis of *AA5GT* and *AMaIT* in a carnation cultivar and breeding lines: (left to right) cv. ‘Beam Cherry’ (pink, no AVIs), ‘Line A’ (metallic bluish purple, AVIs rich), ‘Line B’ (metallic reddish purple, AVIs average), ‘Line C’ (metallic crimson, AVIs rich) and ‘Line D’ (metallic red, AVIs average), b) Primer positions used for the genomic PCR for amplification of *AA5GT* genomic region. Primer sequences were described in Materials and Methods. *Tydic1* is a transposon that inactivates *AA5GT* by inserting into the exon 10. c) Genomic PCR analysis using the genomic DNA extracted from ‘Line C’, ‘Line D’, and ‘Beam Cherry (BC)’ with the primer sets indicated above.

・交雑育種とイオンビーム育種の組合せによる画期的新花色シリーズの創製

普通花色の主要アントシアニンは全てアシル基（リンゴ酸）で修飾されているのに対し、全ての特殊花色系統の主要アントシアニンは非アシル化アントシアニンであった（Table 3-4）。カーネーションアントシアニンのアシル基はリンゴ酸転移酵素（AMaT）で触媒され（Abe et al. 2008）、この AMaT 遺伝子の不活性化により AVIs が生じると推定されていた（Umamoto et al. 2009）。本研究で得た特殊花色に関するメンデル遺伝情報（Table 3-3）、色素情報（Table 3-4）、及び AVIs を有する全てのメタリック系統で AMaT 遺伝子の発現がないこと（Fig. 3-14a）と合わせ考え、筆者は AMaT が特殊花色を制御する遺伝子と特定した。特殊花色系統は *amalt/amalt* 遺伝子型を持ち、特殊花色分離普通花色系統は *AMaT/amalt* 遺伝子型をもつことを示す。

AMaT 遺伝子がホモで不活性化された場合（*amalt/amalt*）にのみ非アシルアントシアニンが合成され、その結果特殊花色が発現する。ゆえに特殊花色系統同士の交雑後代は全て特殊花色となる。しかし特殊花色同士の交雑後代 60 個体で 1 つ（約 1.7%）普通花色を呈するものがあつた（Table 3-3）。これはトランスポゾンの挿入により不活性化していた遺伝子が、そのトランスポゾンの脱離により再活性化する例（Itoh et al. 2002）と類似の機構のためかもしれない。

花卉細胞の顕微鏡観察により、特殊花色を呈する品種・系統の全てで、向軸側の花卉表皮細胞に AVIs が存在することが分かった（Table 3-3 Note 及び Fig. 3-12 と 3-13）。ゆえにカーネーションではアントシアニンの非アシル化により色素が凝集し AVIs が形成されると理解される。これまでに報告されている AVIs による特殊花色カーネーションは薄暗紫系の花色である（Markham et al. 2000）。AVIs による薄暗紫色花色の発現はアサガオでも報告されている（Morita et al. 2005）。本試験で得た青紫輝き系統「Line A」、及びそのイオンビーム育種により育成した「Line B, C, D」は従来の暗紫と異なる輝き花卉を持つ。「Lines A, B, C, D」は全てが、高度に凝集した AVIs を花卉向軸側表皮細胞に有する（Fig. 3-13b）。主要アントシアニンとして「Line A と B」は Pg3,5dG を持つのに対して「Line C と D」は Pg3G を有する（Table 3-6）。アントシアニンの 5 位にグルコースを添加する酵素は AA5GT（Matsuba et al. 2010）である。「Line A と B」は AA5GT mRNA の発現が見られるのに対して、「Line C と D」はこの遺伝子発現がない（Fig. 3-14a）。これらのゲノムプロファイルはいずれも各系統の主要アントシアニンの構造を良く説明しうるものである。

突然変異系統「Line C と D」の AA5GT 遺伝子の分子構造を解析すると両系統ともにこの遺伝子の全領域の欠損変異であつた（Fig. 3-14c）。両系統とも組織培養体にイオンビームを照射し植物体を再分化したものである。組織培養では DNA 配列の変化や遺伝子増幅、転移などが起こる（Neelakandan and Wang, 2012）。しかし DNA の大きな欠損による null 変異はイオンビーム照射でよく起こる現象である（Tanaka et al. 2010）。それゆえ今回の null 突然変異体「Line C と D」はイオンビーム照射により生まれたと考えられる。本試験は、アラビドプシスなどのモデル植物以外でもイオンビーム照射により遺伝子領域全体を含む大きな欠損が起こることを示した貴重な例となる。

花色の比較のためリンゴ酸でアシル化されたアントシアニン Pg3,5cMdG（桃花色）と Pg3MG（赤花色）及び非アシル化アントシアニン Pg3,5dG（暗紫花色）品種の花を Fig. 3-12 に示す。また輝きメタリック色調系統の花を Fig. 3-13 に示す。全ての輝きメタリック系統が向軸側花卉表皮細胞の液胞に強く凝集した AVIs を有し液胞液は水のような透明を呈しているのに対し、従来の暗紫花色 AVIs 品種「ナザレノ」は向軸側細胞液胞液の透明度が低い。水の透明感をもつ液胞液がダイヤモンドの

ように光を散乱することで AVIs により反射される輝きを強め、「Lines A, B, C, D」は輝きメタリック色調をもつと考えられる。また花卉の背軸側の表皮細胞では「Line A」は「Line B」よりも、「Line C」は「Line D」よりも色素の高い凝集性が認められた。同じ色素を持つ系統の間には色素濃度に顕著な違いが認められなかったことから、凝集性の違いが色調の変化の要因となっていると考えられる (Fig. 3-13b)。

凝集性の違いが生じる原因は不明である。アントシアニンの生合成関連化合物であるフラボノイドの中には、アントシアニンと強い分子間相互作用を示す物がある (Yoshida et al. 2009)。「Lines A, B, C, D」は、いずれも同じ主要フラボノイドを有していた。また凝集性の強い「Line A」と「Line C」は、「Line B」と「Line D」に比べてアントシアニン濃度に対するフラボノイドの濃度が低かった (Table 3-6)。アントシアニンの溶解性に与えるおよびフラボノイドの影響の解析は今後の課題である。

今回得られた系統の発現機構は以下のように考えられる。1) *AMaT* の欠損によって通常のチェリー花色系統が持つアントシアニンである Pg3,5cMdG が Pg3,5dG へと変異し凝集体が出現したことで、「Line A」(青紫メタリック花色)が発現した。2) 「Line A」へのイオンビーム照射により *AA5GT* が欠失したことで、アントシアニンが Pg3G へと変異し「Line C」(銅赤メタリック花色)が発現した。3) イオンビーム照射によりそれぞれのアントシアニンの凝集性が弱まる変異が生じたことで、「Line B」(赤紫メタリック花色)、「Line D」(赤メタリック花色)が発現した。アントシアニンの種類と凝集性の違いの組み合わせで、花色のパラエティーが生じていることが示された。

カーネーションは長い育種の歴史を持ち多くの品種が育成されてきた。カーネーションの花色においてシアニック色は既に出尽くし花色の拡大は困難という意見がある。今回の交雑育種とイオンビーム変異を組み合わせたメタリック花色系統の育成とその色調バリエーションの拡大はこの問題に対するブレイクスルーになる。

3-4. 小括 (第3章まとめ)

・イオンビーム育種系の確立と品種の育成

人為突然変異では化学変異原やガンマ線などが使われてきたが、化学変異原による変異体は安定性に欠ける場合がある、ガンマ線では高線量の照射が必要で不要変異を併発しやすいなどの欠点があった。イオンビームは局所的に高密度にエネルギーを付与し高い生物効果を持ち低照射量で変異誘発できる新たな変異原と期待された (田野 1996)。しかし TIARA の炭素イオンビームは組織透過性が 2 mm 程度で材料に限られる。本研究は表面から 0.2~0.5 mm の深さの組織部分から不定芽を誘導する組織培養系を用いてイオンビームを照射する方法を開発した。その結果、親品種の優良形質を保持した様々な変異を作出し短期間に優良品種の花色をシリーズ化できることが実証された。

・イオンビーム照射とガンマ線急照射・緩照射が花色の突然変異に与える影響

本研究により初めてイオンビーム照射またガンマ線急照射・緩照射により出現する花色変異の種類と出現頻度に明確な差があることが示された。またガンマ線緩照射及びイオンビーム照射から得た黄色地となったカーネーション花色変異体の表層 DNA を用い遺伝子型を解析し、黄色は *DFR* と *CHI* の欠損でありオレンジ色部分は *CHI* のみの欠損であることを確認した。照射により得られる花色変異のスペクトルは、イオンビーム急照射>ガンマ線緩照射>ガンマ線急照射の順に広がった (Okamura 2006)。この理由として、急照射では致死になりこれまで得られなかった黄花色などの変異が緩照射では得られるためと考えられた。またこれはカーネーションで、チェリー色から桃色変異を得るのに要した照射量がガンマ線では 30~50 Gy であるのに対しイオンビームでは 10 Gy とガンマ線の 1/3~1/5 であったことと関連があると考えられる。すなわち、1細胞当りのトラック数が極少なくても桃色変異が出現したことは不要な傷が少ない桃色が出やすいことにつながる。

キンギョソウでもガンマ線急照射と緩照射で得られる変異に違いがあることが報告されている (Sparrow et al. 1961)。ガンマ線緩照射は照射植物体の生育への悪影響がイオンビーム照射よりも少なかったことから花色変異体を得るのに有効な手法の 1つと考えられる。

カーネーションへのガンマ線緩照射では 100 Gy 照射しても生育度にほとんど影響がなかった。水生植物 *Anubias congensis* N.E を用いた試験でも 264 Gy/hr の線量率の急照射では LD50 が 32.12 Gy と算定されたのに対して、線量率 0.71 Gy/hr の緩照射では 120.30 Gy まで照射量を上げてでも生存率 100%であった (Tangpong et al. 2009)。この報告は今回 0.5 Gy/hr の線量率でカーネーションにガンマ線緩照射した場合において総線量を 100 Gy に上げてでも生育度に目に見える影響を与えない点と一致している。

・新花色カーネーションの育成

特殊花色を用いた輝き花色カーネーションの育成では特殊花色から様々な輝き花色が育成できたことでイオンビーム照射の有効性が示された。カーネーションのアシル化酵素は cyanidin 系アントシアニンに対しても活性を持つため、pelargonidin 花色で用いた花色拡大手法は cyanidin 系での dusky 花色や輝き花色系統の育成にも有効であると考えられる。これらの特殊花色は日本の美「侘び寂び」の感性に訴えるものと感じており、我が国の花き園芸文化に新たな貢献をもたらすものと自負している。

第4章

花色突然変異の頻度およびスペクトルを意図的に向上させる試み

4-1. 緒言

突然変異により特定の形質を狙ってその形質が変化した変異個体を多く得ることができれば、画期的な技術となる。本試験では放射線を照射される植物の組織・細胞の生理状態や遺伝子発現状態の違いが出現する突然変異にどのような変化をもたらすか、花色を指標として検討した。

まず、発現している遺伝子が異なる葉組織と花組織とでソマクローナル変異とイオンビーム照射変異の差を調べ、次に材料を照射前に処理し生理状態・遺伝子発現状態を意図的に変化させることで突然変異の頻度や幅に差が出るかを試験した。またこれらの方法で実用品種の育成を試みた。

(1) 組織特異的な花色変異誘発とイオンビーム照射による変異の効率と幅の向上

X線やガンマ線により植物突然変異が誘導できることが示されて以来、電離放射線を用いた突然変異研究が広く行われてきた。また細胞・組織培養技術の発展により生まれた様々な技術の1つにソマクローナル変異の利用による突然変異の誘発(Larkin and Scowcroft 1981)があり、多くのクロップで研究され、有用性を示すデータが得られてきた。実際に、イネ、バレイショ、キクなどのクロップで実用品種が得られた(Okamura 1991, 1994, Mohan 2001)。ソマクローナル変異は、その発見当初から材料とする組織により得られる変異が異なると推定されてきた(Bush et al. 1976, Evans and Sharp 1986, Karp A, 1995)。本論文においても、葉ソマクローンでは薄紫桃の花色変異しか得られなかった濃紫桃キク栽培品種「ローズクイーン」で、管状花を材料としたソマクローナル変異により鮮紫桃色に底白が入る新規覆輪の突然変異育種品種「ロイヤルウェディング」を育成した(第2章)。しかし筆者の知る限り組織特異的な変異誘発を統計的に検証した事例は無い。

イオンビームは高い生物効果を持ち、新たな突然変異を誘導できるなどの特長が明らかとなり、高等植物や微生物において様々な生物プロセスの解明や遺伝子の発見など基礎生物学から品種改良などの応用にまで活用を広げている。組織透過性が高く多様なイオン種が利用できる特長をもつ放射線医学総合研究所のHIMACイオンビームは、がん治療を中心とする医療科学で基礎から応用まで世界をリードし(Okada et al. 2010)、ヒトや動物細胞への影響を中心に詳細な研究がなされている(Hamada et al. 2010)。

重要花卉キクでは新規花色花形変異の獲得は大きな経済効果をもつ。キクは高次倍数性栄養繁殖植物であり交雑により有用形質を導入しようとした場合に不要な形質も多く混入する。突然変異育種による実用品種の育成では、不要な変異を併発せずに目的とする突然変異を効率よく得る手法の開発が成功の鍵となる。突然変異誘発の効果 effectiveness は照射線量当りの誘発突然変異の数で、一方、効率 efficiency は植物の受ける生育不良・不稔などのダメージ量に対する特定の遺伝的変異の割合で示される(Nilan RA et al. 1965)。キクを材料にしてDNA量の減少を抑えつつ突然変異を得るにはガンマ線よりもイオンビームがより高い効率を示すことが報告されている(Yamaguchi et al. 2008)。イオンビームはある程度限定された線量でDNA欠失突然変異を誘発できnull変異となるため新たな形質を示す突然変異が得られると考えられる(Tanaka et al. 2010)。細胞・組織培養系を利用しイオンビーム照射する方法は、本論文第3章でのカーネーション新品種育成に有効であった。更にキク(Matsumura et al. 2010)、バナナ(Reyes-Borja WO et al. 2007)、シクラメン(Kondo et al. 2009)、

ピーマン(Honda et al. 2006)などで品種の育成や新規突然変異の獲得に利用されている。そこで本研究では花と葉を材料にソマクローンとイオンビームクローン（イオンビーム照射組織由来植物体）を比較調査することで、優良品種のもつ諸形質への悪影響を最小限に留めつつ花色突然変異体を効率よく得る方法を検討した。そして「材料とする組織によりソマクローナル変異に差が有るか」、また「イオンビーム照射を組合せた場合にその差はどうか」を調査した。

（2）キク管状花の前処理と X 線照射による新品種「ホワイトリネカー」の育成

開花早生性・耐病性・栽培性・花持ち性などの総合形質に優れるキク品種「リネカー」は桃花色であり一般に様々な色変異が得られやすい。実際に濃桃、サーモンなどの花色が自然突然変異やガンマ線照射により得られた。ところが従来手法ではどうしても「純白」が得られなかった。第2章ではバレイショで効果のあった葉プロトクローナル変異による「純白」花色の獲得を試み、白に近い花色系統を得たが、草丈が低く実用性を持たなかった。

イオンビーム照射で出現する変異には材料とする組織により差異があると推定された。そこで放射線を照射する材料細胞の生理状態を変化させることにより出現する変異の頻度や幅が変化する可能性を考え、品種「リネカー」の管状花を材料に照射前培養処理により細胞の生理状態を変化させた後に X 線照射することで、純白変異体の育成を試みた。

（3）ショ糖前処理ペチュニア実生へのイオンビーム照射による花色変異誘導の効率化

電離放射線は数十年に渡り植物の新品種の育成に使われてきた。この間、突然変異の効率を高める多くの試みがなされた。突然変異育種の効率化には不要な変異を伴わずに必要な変異を誘導することが求められる。生存する限界量の放射線を照射することで、より高い突然変異頻度を達成できるが、実用品種の育成には必要以外の変異をできるだけ避けるべく照射量を少なくする必要がある。放射線感受性を上げる外的要因として、これまでに酸素濃度、含水量、温度などが知られている (van Harten 1998)。しかしこれらの場合には不要な変異を減らすために照射量を下げる必要がある。つまり、放射線感受性を全般的に増すことで不要変異の併発を少なくすることは難しい。ガンマ線や X 線は突然変異による品種育成に長い歴史をもつが、新たな突然変異原としてイオンビームが研究者の注目を集め、その有効性が基礎応用両面で証明されてきた (Shikazono et al. 2003, Okamura et al. 2006; Honda et al. 2006, Sasaki et al. 2008)。

花色の主要色素の一つであるアントシアニン色素の合成に関わる遺伝子の発現は、強い光強度、紫外線、低温などのストレスで活性化されることが報告されている (Dubos et al 2008; Hase et al. 2006, Olsen et al 2009)。また糖類もアントシアニン蓄積を誘導することが知られている (Hara et al. 2003, Mita et al. 1997, Tsukaya et al. 1991)。そこで細胞の生理状態により特定の遺伝子（群）の突然変異頻度が増えるならば、その状態を意図的に細胞に作り出す前処理を行うことで例えば花色突然変異の頻度を高めることができるのではないかと仮定し、ペチュニアを材料にその検証を試みた。

4-2. 材料及び方法

4-2-1. 組織特異的な花色変異誘発とイオンビーム照射による変異の効率と幅の向上

・ソマクロン、イオンビームクロンの誘導

キク栽培品種「ヨミステリー」(紫花色)の葉、花を材料にした。葉組織また花組織から不定芽を再分化させて得た植物体を各々、葉ソマクロンまた花ソマクロンと呼ぶ。葉ソマクロンは試験管植物体の葉を3mm角に切り、 NH_4NO_3 を300 mg/lに下げ、0.02 mg/l 2,4D、1 mg/l BA、0.2% ゲルライトを含むMS固形培地(キク再分化培地2)を50ml含むPlant Boxに組織片を10個置床し、不定芽を誘導する方法で作成した。花ソマクロンは色づいた開花直後の腋花(Fig. 4-1の矢印)の舌状花をアルコール及び次亜塩素酸ナトリウムで殺菌後、3-4mm長に切りキク再分化培地2に置床し不定芽を誘導する方法で作成した。両組織とも、16時間日長24°Cで培養した。葉組織或いは花組織にイオンビームを照射した後、不定芽を再分化させて得た植物体を各々、葉イオンビームクロン、花イオンビームクロンと呼ぶ。葉イオンビームクロンは試験管植物体にイオンビームを照射した後に、また花イオンビームクロンは色づいた開花直後の花全体をイオンビーム照射した後に、上記方法で培養し植物体を得た。



Fig. 4-1 Lateral flowers (white arrows) of chrysanthemum cv. YoMystery were used as the starting materials for producing petal somaclones and ion-beam irradiated petal clones.

・イオンビーム照射

イオンビーム照射には放射線医学研重粒子線がん治療装置(HIMAC)(Torikoshi et al. 2007)を用いた。実験1で葉また花組織にアルゴン(Ar)イオンビームを1, 2, 3, 4, 或いは5 Gy照射したイオンビームクロン、及び無照射(0 Gy)のソマクロンを作成した。1試験区あたり葉では50の試験管植物体を、花では10の腋花(各50の舌状花を使用)を照射し、各試験区で500個体を温室で評価した。照射影響は生物効果の代表的指標となる草丈で調査した。すなわち各区で得られた花色突然変異体をランダムに10から15個体選び草丈を調べた。実用品種育成に支障の無い草丈(原品種の90%以上)をもち変異体出現頻度が4~5%以上となる照射線量は3 Gyであったため、実験2, 3はAr 3 Gy照射区(イオンビーム区)と無照射区(ソマクロン区)とで実施した。実験2では葉及び花ソマクロンを580個体前後、イオンビーム照射由来の葉及び花イオンビームクロンを各々700個体前後、温室で評価試験した。実験3では葉及び花組織からのソマクロンまたイオンビームクロンを各々700個体前後、温室で評価試験した。

- ・花切片、葉切片からの不定芽再分化率の計測

組織片を上記の方法で培養し、6週間後にランダムに12個のPlant Boxを選び、置床組織片のうち不定芽を再分化した組織片の頻度を花切片、葉切片各々で計測し不定芽再分化率(%)とした。

- ・温室栽培での草丈と花色の評価

試験管植物体を温室に馴化し、自然日長に22時から2時までの光中断を加えることで栄養成長させた。その後、挿し穂を採取し、定法に従って定植した。6週間の光中断栽培の後、遮光処理により短日栽培に移り、花芽を誘導した。短日栽培8週間で開花が始まり、9週までに開花した個体で花色を観察した。また頂花が開花した時点で草丈を調査した。本試験では実用性のある変異体を効率的に得る手法の開発を目的としている。そこで、花色突然変異体の平均草丈が原品種「ヨミステリー」平均の90%以上ある試験区を実験1で特定した。

- ・花卉細胞の観察

上記の方法で栽培したキクの花弁を採取し、プラントマイクローム(model MTH-1, 株式会社日本医化器械製作所)をもちいて横断面(厚さ100 μ m)サンプルを準備し、顕微鏡(オリンパス生物顕微鏡 BX53)にて観察した。

- ・突然変異体の安定性検定

突然変異体はその形質安定性が重要であるため、各突然変異体クローンを栄養繁殖により30個体に増加し温室に定植し花色の安定性を確認した。花色はThe Royal Horticultural Society-Flower Council of Holland color chartを用い材料との差異を確認した。

- ・統計処理

実験1では各照射試験区における葉と花の突然変異頻度をポワソン分布統計処理し、 p -value < 0.05であるものを有意差ありとした。花色を調査した個体数は、葉ソマクローン495個体、葉イオンビームクローンは1, 2, 3, 4, 5 Gy照射について各々, 490, 485, 492, 488, 485個体、また花ソマクローン494個体、花イオンビームクローンは1, 2, 3, 4, 5 Gy照射について各々, 485, 490, 492, 477, 480個体である。得られた突然変異体は葉ソマクローンからは10個体、葉イオンビームクローンからは1, 2, 3, 4, 5 Gy照射について各々, 10, 19, 22, 27, 33個体。また花ソマクローンでは12個体、花イオンビームクローンでは1, 2, 3, 4, 5 Gy照射について各々, 15, 26, 33, 34, 45個体 (Table 4-1 and 4-2)である。統計処理はMicrosoft Excel program.により実施した。

4-2-2. キク管状花の前処理とX線照射による新品種「ホワイトリネカー」の育成

- ・植物材料と管状花ソマクローンの再生

キク品種「リネカー」(桃花色)の管状花を材料とし、2-2-3の「キク再分化培地」を用い同じ培養条件にて不定芽を誘導しソマクローンを再生した。

- ・材料とする管状花の前処理と X 線照射

1 枚の直径 6 cm シャーレに管状花を 10 個入れ、キク再分化培地のショ糖濃度を 5% に高め寒天を除いた培地にて 25°C 暗黒下で 4 日間培養後、4°C 暗黒下で 3 日間培養した（高ショ糖 4°C 培養処理）。25°C に戻し 1 時間以内に X 線照射装置（オーミクロン OM60R、60 kVp, 5 mA）を用いて線量 1 kR のエックス線を照射した。

対照試験として寒天を除いたキク再分化培地（すなわちショ糖濃度は 3%）にて 25°C 暗黒下で 7 日間培養した（25°C 培養処理）管状花に X 線照射した。

- ・開花検定と新品種の育成

「リネカー」管状花からのソマクローン、また 高ショ糖 4°C 培養処理 或いは 25°C 培養処理した管状花に X 線を照射し再生したソマクローンを温室に馴化した。馴化植物体から得た挿し穂を用いて開花検定を実施した。

4-2-3. ショ糖前処理実生へのイオンビーム照射による花色変異誘導の効率化

- ・植物材料の育成

ペチュニアの花色変異に与える前処理の効果を調査した。一般突然変異の内部標準として葉緑素変異を同時に測定した。11 世代にわたり自殖を経た固定ペチュニア系統 BBss11 (*Petunia hybrida*, 青紫花色) を材料とした。この系統は世界で販売されている品種「ブルーウェーブ」の片親であり商業価値も高い。通常の栽培下で 10,000 個体の花色を調査したが自然突然変異は無かった。色素合成を誘導する前処理条件を見つけるため、このペチュニア実生を用いてショ糖処理、紫外線処理、低温処理を試験した。ペチュニア種子を培養土であるプラグメイト（ホーネンアグリ社）を入れたシャーレに播種し、23°C、16 時間日長（4,000 lux 白色蛍光灯）条件の培養庫に置いた。培養土の湿度保持のため適宜注水した。

- ・イオンビーム照射

原子力機構高崎の AVF サイクロトロン (Tanaka et al. 1997a) の垂直ビームラインを用いた。LET は 76 keV/m (Tanaka et al. 1997b) であり、水換算透過深度は 2.2 mm である。ショ糖処理が色素突然変異に与える効果を調査するのに適切なイオンビーム照射量を決定するため、シャーレで育成 10 日後の実生に対して 0~30 Gy の 320 MeV 炭素イオンビームを照射した。

- ・突然変異体のスクリーニング

上記のショ糖処理した実生へイオンビームを照射した前処理群とショ糖処理を実施しない実生へイオンビームを照射した無処理群の各個体を温室で育成し、M2 種子を採種した。各 M2 系統から 5~20 個体（大半が 10 以上）の個体を温室栽培にて育成し、葉緑素変異と花色変異を調査した。

4-3. 結果及び考察

4-3-1. 組織特異的な花色変異誘発とイオンビーム照射による変異の効率と幅の向上

- ・突然変異体の出現頻度と草丈からの適正な照射線量の決定

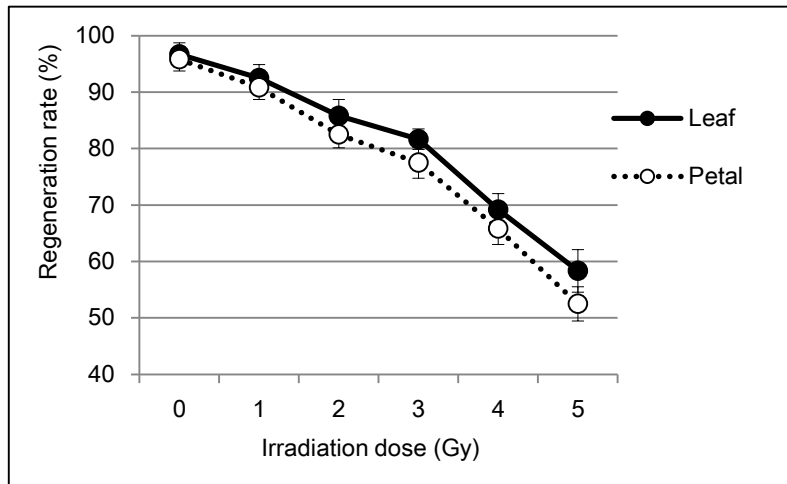
実用に供する花色変異体の草丈は原品種の 90%以上必要である。同時に突然変異誘発の効率 efficiency は高いことが望ましい。HIMAC の Ar イオンビームを 1, 2, 3, 4, または 5 Gy 照射したイオンビーム区と、無照射であること以外は同じ処理を行ったソマクローン区の両者で各区の不定芽再分化率(Fig. 4-2A)と得られた突然変異体の草丈(Fig. 4-2B)、また突然変異体の出現率(Fig. 4-2C)を調査した。

イオンビーム照射量の増加につれて組織片からの不定芽再分化率 (%) と草丈 (cm) は減少した。特に 4 Gy 以上の照射では葉及び花イオンビームクローンの草丈は親の 80%未満と急激に短くなった。それとは対照的に、突然変異体の出現率は葉ソマクローンでは 2.02%であったがイオンビーム照射により 2.04% (1 Gy) から 6.80% (5 Gy) にまで高まった。花組織でも同様であり、花ソマクローンでは 2.43%であったがイオンビーム照射により 3.09% (1 Gy) から 9.37% (5 Gy)にまで高まった (Fig. 2C)。さらにイオンビーム区では全ての照射量で花イオンビームクローンのほうが葉イオンビームクローンよりも有意に高い突然変異出現率を示した (1, 2 及び 4 Gy では $p < 0.05$, また 3 及び 5 Gy では $p < 0.01$)。ここで注目されるのは、葉および花イオンビームクローンの間で、不定芽再分化率 (%) と草丈 (cm) について有意差が無いのに対し、突然変異出現率 (%) では有意差が認められた点である。このことは、花組織は葉組織よりも花色の突然変異の誘導に有利な材料であることを示唆している。

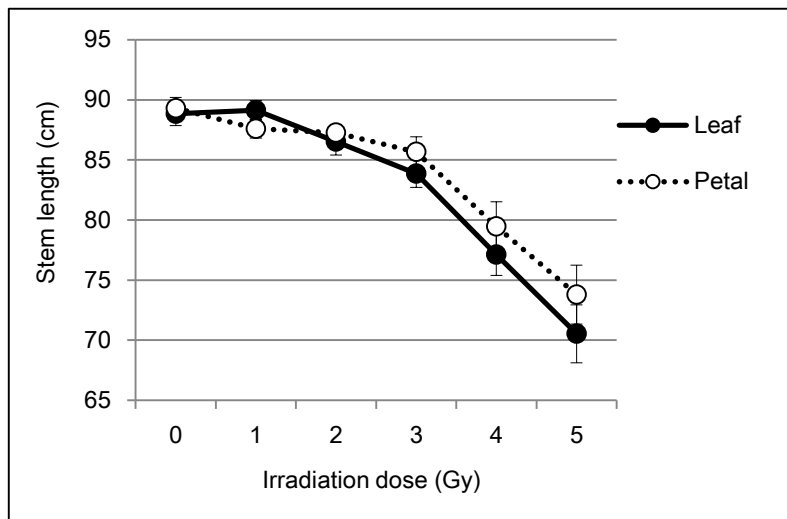
キクの花組織のほうが葉組織よりも花色突然変異がより多く得られたというレポートがある (Nagatomi et al. 1997)。しかしこの報告は内部標準となる他の形質に関する調査が無くまた統計処理などの詳細が不明確である。つまり、本結果により初めて、キク培養体へのイオンビーム照射では花組織が葉組織よりも有意に高い花色突然変異頻度を得られることが示された。

キクのような栄養繁殖性植物では突然変異体を直接実用に供することが多い。本試験では実用性に優れるキクの花色突然変異体の開発を意図している。そのため、以降の試験 (実験 2 及び 3) では、Ar イオンビーム照射量として、突然変異体の草丈平均が原品種の 90%となり、かつ葉で 4.47%、花で 6.71%という突然変異出現頻度を得られる 3 Gy を用いた。

A



B



C

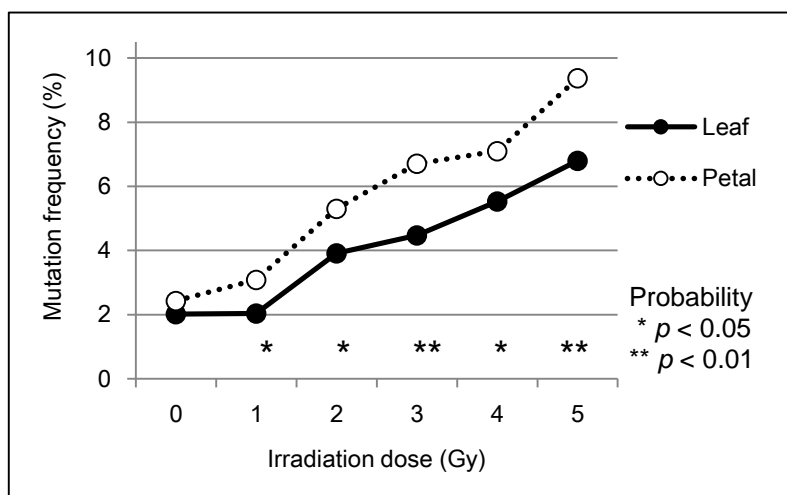


Fig. 4-2 Shoot regeneration rate (A), stem length (B) and mutation frequency (C) in plants regenerated from leaves or petals of chrysanthemum cv. YoMystery irradiated with argon ion beams of 5, 4, 3, 2 or 1 Gy (ion-beam irradiated clones) and 0 Gy (non-irradiated somaclones). Error bars in (A) and (B) represent the standard errors.

・花色変異出現率は花ソマクロンの方が葉ソマクロンよりも高い

原品種の花、及びソマクロン区とイオンビーム区で得られた花色突然変異体の花を Fig. 4-3 に示す。また葉ソマクロンと花ソマクロンについて、実験 2, 3 の開花検定結果と実験 1 の結果を合わせたものを Table 4-1 に示す。開花総個体数に対する突然変異体の頻度 (%) は花ソマクロンで 2.91% (標準偏差 $\sigma=0.55$) となり、葉ソマクロン 2.01% ($\sigma=0.26$) よりも有意に高くなった。葉及び花ソマクロンで *light purple* 及び *dark purple* 変異体を得られたが *yellow* 変異体は花組織を材料とした場合のみ出現した。

材料とする組織により出現するソマクロナル変異が異なる例 (Evans 1989; Karp 1995)、またキク花弁ソマクロンで花梗ソマクロンと比べ開花が早かった例 (De Jong and Custers 1986) があるが、統計的な結果はこれまで得られていなかった。ソマクロナル変異の利用拡大を制限している要因として、何が得られるか不明瞭であることが指摘されている (Jain 2001)。これらの課題に対して、本試験では 1,755 の葉ソマクロン及び 1,744 の花弁ソマクロンを調査し統計解析することで、葉よりも花を材料とした場合により高頻度に幅広い花色変異が得られることを示した。

A



B

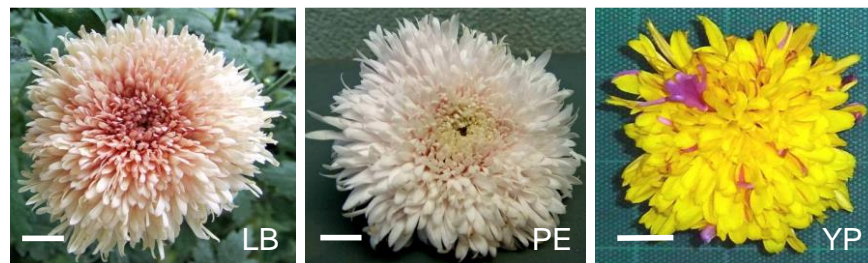


Fig. 4-3 Flower color mutants obtained from somaclones and ion-beam irradiated clones.

(A) cv. YoMystery (YM, purple), *dark purple* mutant (DP), and *light purple* mutant (LP), *brown* mutant (BR), *red* mutant (RE), and *yellow* mutant (YE). (B) Mutants obtained only from ion-beam irradiated petal clones: *light brown* mutant (LB), *pearl* mutant (PE), and *yellow with purple petals* mutant (YP). Scale bars indicate 15 mm.

Table 4-1 Frequency (%)* of flower color mutants in leaf and petal somaclones of chrysanthemum cv. YoMystery.

Tissue source (Experiment number)	light purple	dark purple	brown	red	yellow	Number of plants tested	Flower color mutants in total (%)
Leaf (1)	1.41	0.61	0.00	0.00	0.00	495	2.02
Leaf (2)	1.75	0.52	0.00	0.00	0.00	572	2.27
Leaf (3)	1.16	0.58	0.00	0.00	0.00	688	1.74
Average	1.44	0.57	0.00	0.00	0.00		2.01
STDEV	0.29	0.04	0.00	0.00	0.00		0.26
Petal (1)	1.62	0.61	0.00	0.00	0.20	494	2.43
Petal (2)	2.28	1.05	0.00	0.00	0.18	570	3.51
Petal (3)	1.76	0.88	0.00	0.00	0.15	680	2.79
Average	1.89	0.85	0.00	0.00	0.17		2.91
STDEV	0.55	0.22	0.00	0.00	0.03		0.55

Note: * The percentage of mutants was calculated as the number of flower color mutants relative to the total number of plants that flowered by the end of each experiment.

Table 4-2 Frequency (%)* of flower color mutants in ion-beam irradiated leaf and petal clones** in chrysanthemum cv. YoMystery.

Tissue source (Experiment number)	light purple	dark purple	brown	red	yellow	Number of plants tested	Flower color mutants in total (%)
Leaf (1)	2.64	1.02	0.20	0.20	0.41	492	4.47
Leaf (2)	2.00	0.86	0.43	0.00	0.43	700	3.71
Leaf (3)	2.17	0.87	0.14	0.00	0.29	690	3.48
Average	2.27	0.91	0.26	0.07	0.37		3.89
STDEV	0.33	0.09	0.15	0.12	0.07		0.52
Petal (1)	3.66	2.44	0.20	0.20	0.20	492	6.71
Petal (2)	3.33	2.03	0.58	0.43	0.72	690	7.10
Petal (3)	2.73	2.01	0.29	0.29	0.29	695	5.61
Average	3.24	2.16	0.36	0.31	0.41		6.47
STDEV	0.47	0.24	0.20	0.12	0.22		0.77

Note: * The percentage of mutants was calculated as the number of flower color mutants relative to the total number of plants that flowered by the end of each experiment.

** Clones derived from leaves irradiated with 3 Gy argon ion beams from the Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba (HIMAC) of National Institute of Radiological Sciences HIMAC, Japan.

- ・花組織特異的の花色変異出現頻度と変異の幅はイオンビーム照射により高まる

実験 2 及び実験 3 では、葉また花組織に 3 Gy の Ar イオンビーム照射し再分化したイオンビームクローンを各試験区で 690 クローン以上開花調査した。この結果と実験 1 の Ar イオンビーム 3 Gy 照射区とあわせた結果を Table 4-2 に示す。イオンビーム照射の場合、花組織での変異出現率は 6.47% ($\sigma=0.77$) となり、葉の 3.89% ($\sigma=0.52$) を大きく上回った。また、イオンビーム照射由来の花クローン、葉クローンともに Fig. 4-3A の 5 種類の変異全てが出現した。この結果は、花組織特異的な花色変異出現頻度と変異の幅はイオンビーム照射により顕著に高まることを示唆している。

本試験で得られた結果のメカニズムは今後の研究を待たねばならない。葉組織では紫や黄色などの色素の合成は行なわれていないのに対し、花では色素の合成系が発現している。これが花組織を材料とした場合のほうが葉を材料とする場合よりも花色の変異が得られやすい、つまり花色変異に関する放射線感受性が高い原因である可能性がある。凝集度の低下したクロマチンでは DNA 二重鎖切断が起こりやすいことが示されている (Elia and Bradley 1992)。花組織由来のクローンで花色変異が多いことに関して同様なメカニズムが作用している可能性がある。

- ・アントシアニン系突然変異とカロテノイド系突然変異について

花の色素は主にアントシアニン系色素とカロテノイド系色素とからなる (Tanaka et al. 2008)。アントシアニンフラボノイドの一種で水溶性であり液胞に蓄積され赤、紫から青の色を呈する。カロテノイドは黄、オレンジ、赤色を呈し、脂溶性でプラスチドに蓄積する (Ladygin 2000)。キクでは白、黄、赤、紫、ダークピンク、桃などの花色が知られているが、紫やダークピンク色はアントシアニンが液胞に蓄積することによる (Chen et al. 2012)。カーネーション (*Dianthus caryophyllus*) (Yoshida et al. 2004) やシクラメン (*Cyclamen persicum*) ではフラボノイドが黄花の色素となるが、キクの黄色はほとんどがカロテノイドによる (Kishimoto and Ohmiya 2006)。

本試験で得られた突然変異体の花卉をマイクロトームで細断し、花卉細胞を観察した (Fig. 4-4)。突然変異体 (斜体で示す) *light purple* と *dark purple* では原品種「ヨミステリー」と同じアントシアニン色素で呈色するシアニック系の液胞を有し、かつ黄色のプラチドは皆無であった。この観察結果は原品種「ヨミステリー」と *dark purple*、*light purple* の花色はアントシアニン色素によることを示す。黄色の突然変異体の液胞は水のように透明で細胞質に黄色のプラスチドを有していた。これは、*yellow* の花色はカロテノイドによりものであることを示す。対照的に *brown* と *red* の変異体はシアニック系の赤紫の液胞と細胞質内の黄色のプラスチドを併せ持っていた (Fig. 4-4)。

上記の観察結果から *light purple* と *dark purple* は原品種と同じく黄色カロテノイド色素をもたずアントシアニン系の変異体であること、他方で *brown*、*red* と *yellow* 突然変異体は黄色カロテノイド色素合成能力を持つことがわかった。キク花卉では白色が黄色に対して優性であり、「白」花卉では黄色素が合成された後に carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) により分解され、白を呈する。それゆえに *CmCCD4a* 遺伝子の発現が抑えられると白花から黄色に変異する (黄カロテノイドが合成される) (Ohmiya et al. 2006)。これが本試験でアントシアニン系変異体に比べカロテノイド系変異体が低頻度でしか出現しなかった要因と推定される。

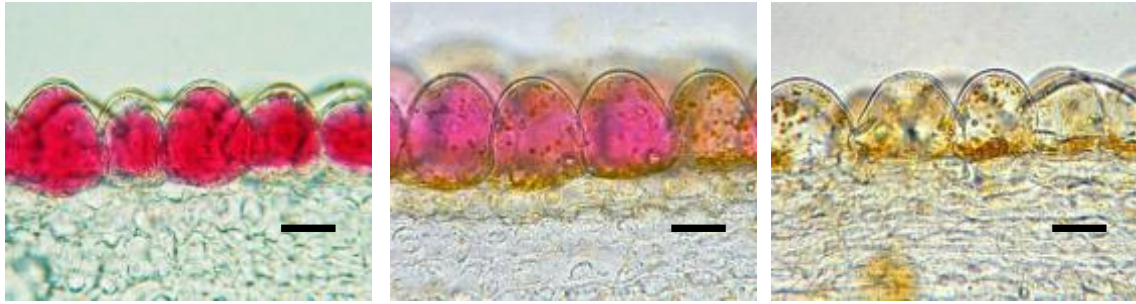


Fig. 4-4 Micrographs of transverse cross-sections of petal epidermal cells: (left to right); wild type cv. YoMystery containing anthocyanin in the vacuoles, the *brown* mutant containing both anthocyanins and carotenoids, and the *yellow* mutant containing carotenoids in the plastids. Scale bars indicate 30 μm .

次に材料とした組織別にアントシアニン系変異体とカロテノイド系変異体の出現の様子を比較した(Fig. 4-5)。ソマクローン及びイオンビームクローンの両方で、アントシアニン系変異の出現頻度は葉組織に比べ花組織由来クローンで有意に高かった。カロテノイド系の変異体についても花組織由来クローンの方が葉組織由来よりも高頻度に出現する傾向があり、ソマクローンでは花組織のみで *yellow* 変異が得られ、かつイオンビーム区でも葉組織由来よりも花由来の方が有意に高い頻度で *red* 変異が得られた(Table 4-1 and 4-2)。花色変異の幅に関してソマクローナル変異では *yellow* 変異しか得られなかったのに対して、イオンビームクローンでは、葉、花組織由来の両方で *brown*, *red* 及び *yellow* 変異体を得られた。

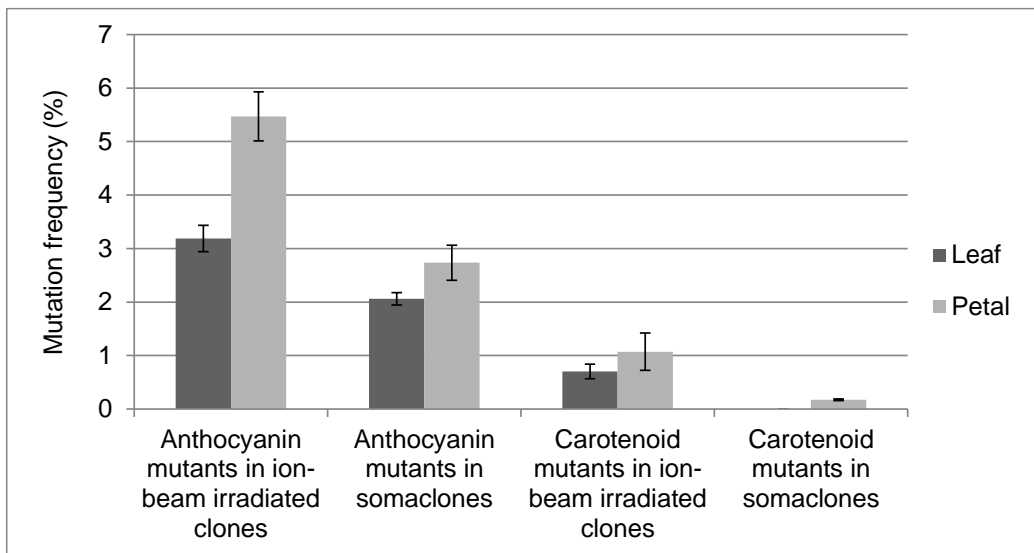


Fig. 4-5 A comparison of mutation frequencies in anthocyanin and carotenoid flower colors between leaf-derived (black bars) and petal-derived (gray bars) clones. Differences in anthocyanin accumulation are responsible for the *light purple* and *dark purple* mutants compared to the wild type cv. YoMystery. Alterations in the carotenoid content compared to the wild type are responsible for the *brown*, *red* and *yellow* mutants. Error bars represent the standard errors.

・突然変異体の安定性試験

実験3で得た花組織由来突然変異体37クローン（ソマクローンからの突然変異体11、イオンビーム照射からの26クローン）を用いて花色変異体の安定性を検定した（Table 4-3）。すなわち、*light purple* と *dark purple* についてはソマクローンから5クローン、イオンビームクローンから10クローンを、各々ランダムに選び（30変異体）、また *brown, red*, 及び *yellow* では全7クローンを試験した。各クローンを栄養繁殖により30個体にまで増殖し、開花検定を実施した。その結果、イオンビーム由来花色変異体は26クローンのうち23クローン（88.5%）が安定した花色を示した。*dark purple* は検査した全ての個体がダークパープル色であった。*light purple, red* と *yellow* では各々1クローンが、突然変異の各花色にパープル花色が混じるキメラ性を示した。ソマクローンにおいても11クローンのうち、8クローン（72.7%）が安定した花色を示した。ソマクローンからの *light purple* では試験した150個体（5クローン各30個体）のうち142個体（96.4%）が安定した花色を示した。つまり、どの花色でも安定した変異体が高頻度で得られた。この結果、本試験で開発した花組織由来のソマクローン、また培養とイオンビームを併用する方法は高い実用性をもつことがわかった。

Table 4-3 Stability of flower color in petal-derived mutants of chrysanthemum cv. YoMystery

Type of clone	Stability level*	light purple	dark purple	brown	red	yellow
Somaclones	individual* (number) clone**	92.6%* (139/150) (3/5)**	100% (150/150) (5/5)	No mutants	No mutants	86.6% (26/30) (0/1)
Ion-beam irradiated clones	individual* (number) clone	97.6% (293/300) (9/10)	100% (300/300) (10/10)	100% (60/60) (2/2)	93.3% (56/60) (1/2)	91.7% (55/60) (1/2)

Note: Mutants obtained from petal tissue in experiment 3 were examined. From *light purple* and *dark purple* flower-color mutants, five or ten mutant clones randomly selected from somaclones or ion-beamed clones were tested, respectively. In the other colors, all the mutant clones were tested.

* Stability was examined at the individual level as well as at the clone level. The individual level of stability (%) was determined as the number of stable individuals relative to the total number of individuals tested.

** Clones that segregated one or more differently colored individuals from the mutated flower color were evaluated as unstable. Thus, clone level stability is shown as the number of stable clones/ number of clones tested.

キク、カーネーションなど園芸植物では生産性・耐病性・花品質など総合的に優れるものを得ることが極めて難しく、優良品種で花色幅を拡大できると大きな経済効果がある。しかし交雑後代で親品種の総合的な優良形質を再現するのは難しい。突然変異は品種の優良形質を保持したまま花色などの経済価値をもつ形質改変ができる。しかし目的とする変異が出現するかは不明である（van Harten 1998）。本試験により、1）花組織由来ソマクローンは葉組織由来ソマクローンよりも花色変異出現頻度が高いこと、2）イオンビーム照射を併用することで花組織由来クローンでの花色変異の出現頻度と幅が顕著に高まること、3）材料組織として花を選択しイオンビームを併用する手法により実用的な草丈と花色の安定性をもつ変異体が高頻度で得られること、が示された。

4-3-2. キク管状花の前処理と X 線照射による新品種「ホワイトリネカー」の育成

- ・管状花ソマクローンの再生と開花検定

品種「リネカー」で自然突然変異及びガンマ線照射では出現しなかった純白花色を得るため、まず管状花からのソマクローナル変異の誘導を試みた。しかし管状花を直接キク再分化培地に置床して得た 1500 系統以上ソマクローンを開花検定しても白花は得られなかった。

- ・前処理した管状花へ X 線照射し再分化したソマクローンの開花検定

品種「リネカー」の管状花を、5%ショ糖を含むキク再分化培地で低温培養し（高ショ糖 4°C 培養処理）、25°C に戻し 1 時間以内に X 線を照射したものからソマクローンを 2,472 個体育成し、開花試験したところ、花色が白色に変異したものが 12 個体得られた。

対照試験としての 3%ショ糖を含むキク再分化培地で 25°C、7 日間培養し X 線照射し再生した 1,976 個体から得られた白色の花弁をもつ変異株は 2 個体のみであり、かつ花弁に微量のアントシアニン着色が認められ純白ではなかった。

- ・新品種の「ホワイトリネカー」（登録名ホワイトリネカーOW-1）育成

高ショ糖 4°C 培養処理後に 25°C に戻し X 線照射した試験区で得られた白花色変異体の中からアントシアニンの桃色が観察されない 4 系統を選抜した。その各々で挿し穂を 24 本得て開花検定することを 2 回繰り返し、純白で生育の良好な 1 系統を最終的に選抜した。

以後、挿し穂の増殖を行いながら特性の調査を継続し、1996 年にその特性が安定していることを確認して「ホワイトリネカーOW-1」育成を完了した(Fig. 4-6) (品種登録番号 8318)。「ホワイトリネカー」は自然突然変異では得られなかった純白であったため、2014 年の現在も継続販売されている。



Fig 4-6 Chrysanthemum cultivar White Lineker bred by ion beam irradiation on the disk florets pre-treated with high sucrose medium.



Fig 4-7 Chrysanthemum cultivar White Lineker (right) and the parent cultivar Lineker (center) and Salmon Lineker (left)

本研究により、キク管状花を高シヨ糖 4°C 培養処理し 25°C に戻し 1 時間以内に X 線照射した場合の白花色変異出現頻度は 0.49% となり、常温培養処理の管状花に X 線を照射した場合の白花変異出現頻度(0.10%)の 5 倍高い効率で白花色変異体が得られることがわかった。さらに、高シヨ糖 4°C 培養処理し常温に戻した後に X 線照射した実験区でのみアントシアニン形成のない純白の花変異を得ることができた。この要因として花組織を材料とし低温培養により細胞の生理活性を抑えた後、常温に戻したことで花色素関連の遺伝子の活動が活発化し、そこに放射線を照射したため、色素関連遺伝子が損傷を起こしやすくなったことが考えられる。これは放射線を照射する前に組織の生理的状态を変えることで、出現する変異に影響を与える可能性を示した初めての事例となる。

4-3-3. ショ糖前処理ペチュニア実生へのイオンビーム照射による花色変異誘導の効率化

・植物材料の育成方法の決定

ペチュニア実生へのショ糖処理では播種 8 日後に 20% ショ糖水 1 ml と水とを加えシャーレ内ショ糖濃度が 3% (w/w) になるようにした。紫外線処理では播種 8 日後に 15 kJm² の紫外線 (UV-B) (CSL-30B, コスモバイオ社) をパルス照射した。低温処理では播種 8 日後に 4°C に 24 時間または 48 時間置いた。その結果、ショ糖処理ではショ糖添加 (最終濃度 3%) 2 日後に色素蓄積が増大し 4 日後には顕著になった (Fig. 4-8)。茎頂、胚軸、子葉下部での色素蓄積が顕著であった。紫外線処理も色素蓄積が見られたが色素はショ糖処理よりも少なく、かつ葉に傷害を与えた。本条件の低温処理では色素の蓄積に効果はなかった。これらの結果から 2 日強のショ糖処理が色素の誘導に十分な効果があると判断された。

・イオンビーム照射線量の決定

本試験では M2 世代での突然変異を調査するため照射ターゲットは茎頂分裂組織となる。播種 10 日後実生では子葉が完全に展開し茎頂が露わになるためイオンビームを照射する適切な材料となる。このことを考慮しショ糖処理が色素突然変異に与える効果を調査するのに適切なイオンビーム照射量を決定する試験を実施した。照射した次の日に実生をポットに移植し温室で育成した。ポット移植時の根の伸長はショ糖処理で抑制されていたが、その後回復した。ショ糖処理群、無処理群ともに 1 か月後の生存率は 10 Gy 照射区において 90% 以上であった。茎葉の生育度は照射量が増すにつれ減少した。また 20 Gy 以上の照射区では 1 か月後の生存率は 0% となった。これまでのイオンビーム照射個体を用いた変異調査試験により、不要変異を併発しない突然変異体を得るためには生存率を下げない程度の低い照射量が適当であることが示されている。そこで本試験の目的には 8 Gy 照射が適当であると判断した。

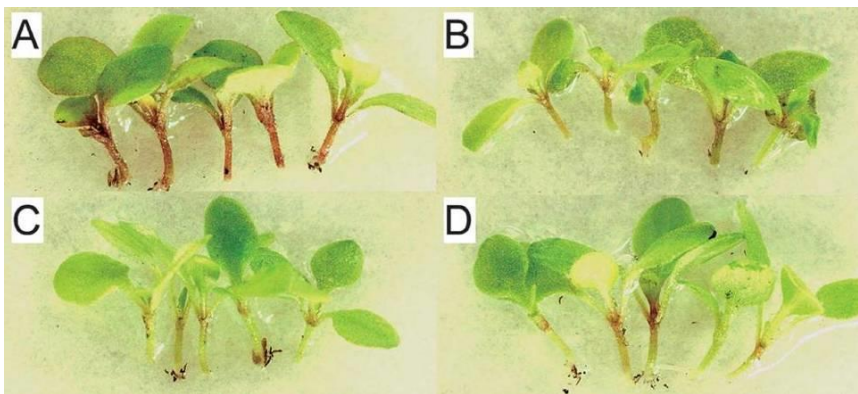


Fig. 4-8 Effect of pretreatments on accumulation of pigments in petunia seedlings

Eight-day-old seedlings were treated with 3% sucrose (A), a pulse 15 kJm⁻² of UV-light (B) or 4° C (C) for 24 hour. Seedlings at 4 days after treatment are shown. The control plants are shown in (D).

・突然変異体の調査と色素変異体の頻度の向上

突然変異体の調査では独立した 3 回の試験を実施した。その結果を Table 4-4 に示す。実験 1 では M1 植物体のうち M2 種子を採種できたのは 20% 弱にとどまった。この主な理由は育成に用いたが

ットが 5cm 角と小さかったことが原因と考えた。そこで実験 2 では直径 9 cm のポットを用いて採種栽培を行った。その結果 M1 個体のおよそ 50% で M2 種子を採種できた。実験 2 では無照射の個体からの採種も実施した。この場合 83% の個体から M2 種子が得られた。この結果はイオンビーム照射により M1 植物体の稔性が落ちたことを示す。実験 3 ではさらに大きな 12cm ポットを用いて M1 植物体を育成した結果、90% 以上の M1 個体から M2 種子を採種できた。

シヨ糖処理区、シヨ糖無処理区ともに M2 世代個体で葉緑素変異体を得られた。葉緑素変異体の頻度は、実験 1, 2 及び 3 において、シヨ糖処理区では各々 0.56%, 0.39% 及び 0.55% であったのに対し、シヨ糖無処理区では各々 0.48%, 0.33% 及び 0.43% となった。つまり 3 回の独立した試験の各々において、シヨ糖処理区と無処理区とで葉緑素変異頻度に有意な差はなかった。また無照射区では葉緑素変異は出現しなかった(実験 2 で実施)。実験 1 で得た葉緑素変異 3 系統で M2 個体を栽培したところ、16 個体中 4 個体が葉緑素変異を分離したもの ($4/16 = 25\%$) と、1/7 のもの(分離比 14%) 及び 3/20 (分離比 15%) となった。つまりこの葉緑素変異は劣性 1 遺伝子支配であった。またペチュニアの 10 日後実生の生殖細胞の数は 1 つか 2 つと期待される。

シヨ糖処理区、シヨ糖無処理区ともに M2 世代個体で花色変異体を得られた。最もよく出現した花色変異はマゼンタ、紫であった。またシヨ糖処理区でのみ、薄紫、白、各種ピコティなどの花色変異が得られた (Fig. 4-9)。花色変異体の頻度は、実験 1, 2 及び 3 において、シヨ糖処理区では各々 1.52%, 1.20% 及び 1.26% であったのに対し、シヨ糖無処理区では各々 0.56% 0.58% 及び 0.47% となった。つまり、独立した 3 回の実験でシヨ糖処理により花色変異の出現頻度が 2 倍以上高まった。この結果は茎頂部にアントシアニン色素を誘導するシヨ糖処理を前処理として行った後、イオンビームを照射した場合には前処理をしない場合に比べて顕著に花色変異の出現頻度が高まることを示している。これはシヨ糖処理が色素合成に関わる遺伝子の突然変異に特異的に影響したことを示す。この手法が他の園芸植物にも有効であると突然変異育種の効率を向上させる上で大きなインパクトを持つ。

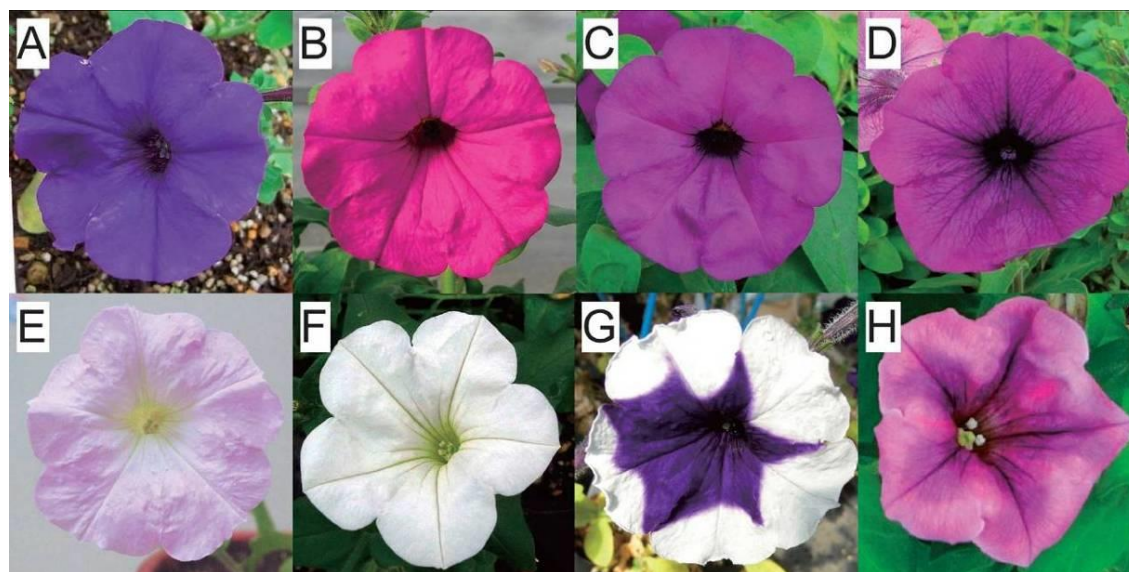


Figure 4-9. Parental line of petunia and flower-color mutants obtained in this experiment. (A) Parental line with violet flower color. (B-H) Flower color mutants. (B) Magenta, (C) Purple, (D) Purple vein, (E) Light pink, (F) White, (G) Blue picotee, (H) Burgundy.

Table 4-4 Effect of pretreatment with sucrose on the frequency of chlorophyll and flower-color mutation

Exp. No	Dose of carbon ions	Addition of sucrose	Frequency (%) of chlorophyll mutants (A)	Frequency (%) of flower color mutants (B)	Flower color of the mutants (number of the mutants emerged)
Exp. 1	8 Gy	+	0.56% (2 / 354)	1.52% (5 / 329)*	Magenta (3), Light pueple (1), Light pink (1)
	8 Gy	-	0.48% (1 / 210)	0.56% (1 / 177)	Red purple (1)
Exp. 2	8 Gy	+	0.39% (4 / 1,018)	1.20% (12 / 1,003)**	Purple (4), Magenta (4), Purple vein (2), Light pink (1), White (1)
	8 Gy	-	0.33% (3 / 909)	0.58% (5 / 868)	Purple (3), Magenta (2)
Exp.3	8 Gy	+	0.55% (11 / 2,001)	1.26% (25 / 1,977)***	Purple (6), Magenta (5), Purple vein (3), Light pink (3), Blue picotee (2), Magenta picotee (2), White (2), Burgundy (1), Light blue (1)
	8 Gy	-	0.43% (9 / 2,099)	0.47% (9 / 1,915)	Purple (3), Magenta (3), Blue (2), Light pink (1)
Control	0 Gy	-	0.00% (0 / 212)	-	-

(A): Number of M₂ lines contained chlorophyll mutants / Number of M₂ lines investigated,

(B): Number of M₂ lines contained flower color mutants / Number of M₂ lines investigated.

*, **, *** Statistically higher from corresponding control value predicted by Poisson distribution (* $p < 0.029$, ** $p < 0.009$, *** $p < 0.001$).

一般に突然変異はゲノム全体にわたりランダムに起こるとされる。今回の試験結果の原因として、シヨ糖処理とそれに続く色素の蓄積が特定の遺伝子（群）か染色体の特定の部位に関して放射線感受性を高めたことが考えられる。今回の試験ではペチュニア実生を3~4日間、高シヨ糖濃度下に置き、色素の誘導された茎頂部にイオンビームを照射した。高シヨ糖処理の間は根の伸長が無処理区に比べ劣ったがその後回復した。M1植物の生存率、稔性ともにシヨ糖処理区、無処理区で差はなかった。175 mMのシヨ糖で処理したダイコン胚軸に大量のアントシアニンの蓄積が起こるがマンノースなどの浸透圧付与ではアントシアニン蓄積はおこらない (Hara et al. 2003)。シロイヌナズナでも6%シヨ糖液処理でアントシアニンの蓄積が起こる (Mita et al. 1997)。本実験のペチュニア実生のシヨ糖処理でも同様な機構で色素蓄積が起こったと思われる。ペチュニアの花色はアントシアニン色素とpHで制御される (Griesbach 1996)。遺伝子解析でアントシアニンの色発現には多くの遺伝子が関与していることが分かっている。これらの遺伝子のどこかに突然変異が起こると花色の変化が起こると予想される。ペチュニア色素遺伝子は多くのアイソザイムがあり、例えばカルコンシンターゼ (CHS)には12のアイソザイムがある。そのうち、花ではCHS-AとCHS-Jの発現が確認されている (Koes et al. 1989)。またペチュニアの色素合成は転写制御によることもある。今回の結果を今後、遺伝子発現の観点から調査する必要がある。しかし本試験で得られた結果により、突然変異の誘発制御は従来考えられていた以上に実現できる可能性があることを明確に示した。

4-4. 小括（第4章まとめ）

突然変異は品種の優良形質を保持したまま、新花色など経済価値をもつ形質を改変・獲得することができる。しかし目的とする変異が出現するかは不明である (van Harten 1998)。本章ではランダムに起こるとされる突然変異を、より方向性を持った変異の誘導法つまり意図的な変異を狙える手法に近づけるべく、花色を指標として様々な方法を試みた。

まずキクを材料に、組織の生理的状态が異なり発現している遺伝子が違うと考えられる葉組織と花組織とで出現する突然変異に差があるかを、ソマクローナル変異及びイオンビーム照射変異について調べた。次に材料を照射前に処理し生理的状态を意図的に変化させたのちに X 線やイオンビームを照射することで突然変異の頻度や幅に違いが起こるかについて試験した。

キク品種「ヨミステリー」の試験では 1) 花組織由来ソマクローンは葉由来ソマクローンよりも花色変異出現頻度が高いこと、2) イオンビーム照射を併用することで花組織由来クローンでの花色変異の出現頻度と幅が顕著に高まること、3) 材料組織として花を選択しイオンビームを併用する手法により実用的な草丈と変異花色の安定性をもつ変異体が高頻度に得られること、が示された。

自然花色変異の出やすいキク花色である桃花色をもつ品種「リネカー」では、自然変異やソマクローナル変異では白花が得られなかった。そこで管状花に高ショ糖濃度培養＋低温培養処理を施し常温に戻した後に X 線照射した。この工夫により、無処理の管状花に X 線を照射した場合に比べ、アントシアニン形成のない白の花色変異を効率よく得ることができ、実用品種の育成につながった。

さらに、通常は緑色であるペチュニア実生の頂芽部分に、高ショ糖処理により色素を誘導した後にイオンビームを照射すると、無処理の緑の頂芽にイオンビームを照射した場合に比べ花色変異の出現頻度は 2 倍以上高まり、その変異の幅は大きく拡大した。これはショ糖処理が色素合成に関わる遺伝子の突然変異に特異的に影響したことを示す。この手法が他の園芸植物にも有効であると突然変異育種の効率を向上させる上で重要な知見となる。

一般に突然変異はゲノム全体にわたりランダムに起こるとされる。上記の研究結果は、色素の存在する花組織、またその蓄積が起こった頂芽組織で、特定の遺伝子（群）あるいは染色体の特定の部位に関して放射線感受性を高めたことが考えられる。

第5章 総合考察

今日多様化した突然変異育種技術には2つの大きな課題がある。つまり1) 突然変異育種各技術がもつ特長と欠点が必ずしも明確でなく各技術を実用育種に活用するための指針が示されていないこと、2) 突然変異はランダムに起こるとされ突然変異研究の究極の目標は変異の方向性の制御であるとされる(渡辺と山口 1983)にもかかわらず、この研究例が極少ないことである。本論文では(1) 細胞・組織培養系の開発とソマクローナル変異育種の実用性検証(第2章)、(2) ガンマ線などの低 LET 放射線と比較したイオンビームの特長とその利用法の開発及び新花色の創製と実用化(第3章)、(3) ランダムに起こるとされる突然変異で材料の生理状態を変化させることによる変異の方向性の制御(第4章)について、各々研究し2つの課題に総合的に取り組んだ。

(1) 細胞・組織培養系の開発によるソマクローナル変異利用育種

・細胞組織培養系の開発

筆者はキク科植物の葉プロトプラスト培養においてアンモニウムイオン(NH_4^+)が阻害的な効果を及ぼすことを発見し MS 培地等で1%程度であった細胞分裂頻度を培地から NH_4^+ を除去することで50%以上にまで向上させることに成功した。 NH_4^+ の影響はキクやバレイショに対しては阻害的でありタバコには促進的であった。キクでは NH_4^+ を全く含まない培地が最適であるのに対しバレイショでは300 mg/l NH_4NO_3 を含む培地でプロトプラストからの細胞分裂頻度が最大となった。これはプロトプラスト培養における培地中の NH_4^+ の効果は植物の種により異なることを示している。

上記の試験でプロトプラストからの細胞分裂頻度は材料とする葉の部位により異なった。そこでプロトプラストの培養効率は材料とする植物細胞の生理状態に左右されると推定し、酵素処理の前に葉細胞の分裂活性を高める処理(PEC 処理)を施すことによりバレイショ及び近縁種でプロトプラストからの細胞分裂頻度を向上させコロニー形成率を倍加させることができた。この原因として植物生長調節物質を含む培地で培養する PEC 処理により細胞の生理状態の均質化が進み、かつ細胞が分裂の方向に向かう変化を起こしている可能性が考えられた(岡村 1989)。

またキクのプロトプラスト培養でも PEC 処理を実施し20%のコロニー形成率と50%という高い植物体再分化率を達成した。キクのプロトクローンでは変異の頻度は高く幅は広がったが、草丈が低く実用性がなかった。 NH_4^+ 感受性の高さと合わせ、キク科植物の少なくとも数種はプロトプラスト化の際の活性酸素などによる細胞ダメージがバレイショよりも大きいことを示唆している。

バレイショ栽培種で確立した1) 試験管植物を材料とし、2) PEC 処理により細胞を均質化・活性化させた後プロトプラストを単離し、3) NH_4^+ 濃度を調整した培地で培養する方法は、ソラナム属近縁種のみならず、ペチュニア、キクにも有効な汎用性の高いものであった。つまりこの方法により得たプロトプラストは、高い効率で細胞分裂・コロニー形成及び植物体再生にまで至った。

・ソマクローナル変異利用育種

バレイショではプロトクローナル変異によりコロニー形成率および植物体再分化率が4倍以上になる変異を発見し(Okamura 1991)、また交配育種のできないバレイショ系統でプロトクローナル変異による新品種「ジャガキッズ」を育成した(岡村 1991, Okamura 1994)。キクのプロトクローンは草丈の低い個体が多く実用性が低かったが、ソマクローンでも変異が得られると考え品種「リネカー」の葉ソマクローンに起こる変異を調査した。すると親と同等の栽培特性を保持した花色変異体、

花形変異体が多数得られた。更に濃紫桃キク栽培品種「ローズクイーン」の葉および管状花ソマクローナル変異の調査では管状花由来個体でのみ覆輪変異が得られ、材料とする組織によりソマクローナル変異に違いがある可能性が示された。

プロトプラストからの再分化植物体に起こる突然変異を利用した世界初の事業化例である「ジャガキッズ」は農水省のパンフレットで長年にわたりバイオテクノロジーの代表的成果として紹介され、その後の様々な作物種でのソマクローナル変異による育種研究のけん引役となった。「ジャガキッズ」は「紫色への皮色変異」を含め、20年以上に渡り安定した諸特性を示し栽培・販売され続けている。キク及びカーネーションのソマクローナル変異品種も5年、10年と継続市販され形質は安定していた。これらの結果はソマクローナル変異で得られた品種が、長期にわたり安定した形質を示し実用上問題が無いことを事業レベルで実証した貴重な事例である。

(2) イオンビーム育種系の開発によるカーネーション花色変異の創製

筆者はカーネーションの葉の表層から0.5 mm程度の深さの組織から植物体を再分化する培養系を開発することでイオンビーム照射組織からの突然変異体獲得技術を確立した。この方法により親品種の耐病性・早生性などの優れた特性を維持し、かつ花の形質が丸弁、覆輪、赤、桃など幅広い変異を生みだし、カーネーション品種シリーズを育成・実用化できることを初めて示した。これは現在も著しい発展を示すイオンビーム育種の先駆的研究となった。

次にイオンビーム照射及びガンマ線急照射・緩照射による花色変異の幅と頻度をカーネーションで調査し、変異個体の出現頻度には大きな差がないものの花色変異のスペクトルは、イオンビーム急照射>ガンマ線緩照射>ガンマ線急照射の順に広いことを示した。またガンマ線急照射で植物体の生育が半減する線量の約2倍の総線量を緩照射しても生育への悪影響がほとんどなかった。つまりガンマ線緩照射は不要な変異を併発させずに花色変異体を得るのに有効な手法と考えられた。

またカーネーションの花色幅を拡大することを意図し、特殊花色の遺伝様式および花色の発現に関わる遺伝子を調査した。特殊花色に関するメンデル遺伝情報、色素情報、及びAVIsを有する全ての輝き花卉系統で*AMa1T* 遺伝子の発現がないことを明らかにし、筆者は*AMa1T* が特殊花色を制御する遺伝子と特定した。次に銅赤輝き花卉系統及び赤輝き花卉系統の*AA5GT* 遺伝子の分子構造を解析し、両系統ともにこの遺伝子の全領域の欠損変異であることを解明した。DNAの大きな欠損によるnull変異はイオンビーム照射でよく起こる現象である(Tanaka et al. 2010)。本試験によりアラビドプシス等モデル植物以外でもイオンビーム照射により遺伝子領域全体を含む欠損が起こることが示された。またイオンビーム照射により色素構造の変化、色素凝集の程度、色素量の変化を誘導し、桃や赤といった平板な色調の品種を材料にして従来なかった輝き色調のカーネーション品種を育成できた。これはほかの園芸植物にも有効である。

本研究でイオンビーム育種により育成されたカーネーション新品種は5品種にのぼり、10年間以上継続販売され、その経済効果は市場卸値レベルで国内外あわせ60億円以上となる。この事実、イオンビーム育種の持つ、1) 変異の誘発率が高い、そのため少ない試料・狭い施設圃場で優良個体選抜ができる、2) 変異のスペクトルが広い、そのため新奇形質をもつ変異体が獲得できる、3) 変異する箇所は少ない、そのため他の不必要な変異を伴わないワンポイント改良ができる、という重要な特長を実用品種の育成と事業化により実証したものである。本研究はイオンビーム育種研究会の発足と発展、その後のイオンビーム育種研究の広範な展開の基盤となった。

(3) 花色突然変異の頻度およびスペクトルを意図的に向上させる試み

突然変異により特定の形質を狙ってその形質が変化した変異個体を効率的に作出することは夢の技術である。材料とする組織により得られるソマクローナル変異が異なると推定されてきたが、統計的な裏づけのある明確な事例はなかった。

紫花色のキク栽培品種を用いて、葉と花という異なる組織から再分化した植物体（ソマクローン区）における花色突然変異の出現率や種類の違い、また葉組織と花組織にアルゴンイオンビームを照射し再分化した植物体（イオンビーム区）における花色突然変異の出現率や種類の違いを各々調査した。開花総個体数に対する突然変異体の頻度は花ソマクローンで約3%と葉ソマクローンの2%よりも有意に高くなった。さらに葉及び花ソマクローンで *light purple* 及び *dark purple* 変異体が得られたが *yellow* 変異体は花組織を材料とした場合のみに出現した。イオンビーム区の花色突然変異は、葉組織照射区 3.9%に対し花組織照射区は 6.5%と出現頻度の有意差はさらに高まった。またイオンビーム区でのみ *brown* と *red* の花色突然変異体が出現した。今回の試験結果は「組織特異的な突然変異の頻度とスペクトラムはイオンビーム照射により顕著に高まる」ことを示した最初の例である。

次に照射材料をショ糖処理し意図的に材料の生理状態を変化させることで突然変異の頻度や幅に差が出るかを試験した。ペチュニア（青紫花色）の実生を3%ショ糖で処理すると茎頂等に色素が劇的に蓄積される。この実生に炭素イオンビームを照射し M2 系統を得た。葉緑素変異の出現頻度はショ糖処理区と無処理区とで同等であったが、花色の突然変異出現頻度はショ糖処理区が無処理区に比較して有意に高く、かつ無処理区では得られなかったピコティ、紫ベイン、白などの花色変異がショ糖処理区でのみ出現した。この結果は、ショ糖前処理でアントシアニンを蓄積させた茎頂にイオンビーム照射することにより花色変異の出現頻度と幅が有意に高まったことを示す。これは放射線を照射する細胞の状態を意図的に変化させてイオンビームを照射することで、花色変異の頻度が向上しスペクトルが広がることを初めて示した例である。

上記研究により、突然変異の誘発制御は従来考えられていた以上に実現できる可能性があることが示された。哺乳類のゲノムでは凝集の緩んだ部位に高頻度で DNA 二重鎖切断 (DSBs) が起こる (Newman et al. 2000; Radulescu et al. 2004)。またガンマ線照射によるヒト細胞での DSBs は凝集の緩んだクロマチン部位の発現が活発に起こっている遺伝子(群)でより起こりやすい (Falk et al. 2008)。これらはクロマチンの凝集度の違いにより特定の遺伝子(群)が突然変異を起こしやすくなる可能性を示す。つまり、本研究で得た結果「色素の生成に関わる遺伝子が発現した状態で放射線を照射すること」が「花色の突然変異の出現頻度が高まる」一因である可能性を示す。

以上の研究と開発を通じて、材料植物体やその組織・細胞の生理状態は、プロトプラスト培養における細胞の活性と細胞分裂頻度、コロニー形成率と不定芽再分化率に大きな影響を与えること、さらに突然変異処理により誘発される変異の頻度及び種類にまで影響することを例証できた。また、本論文で開発した手法により Table 5-1 に示す品種群を育成し、いずれも実用化した。すなわち、ソマクローナル変異の利用ではバレイショ品種及びキク品種を、また X 線と組織培養系の組合せではペチュニア品種、キク品種、カーネーション品種を、さらにイオンビーム育種ではカーネーション品種を、各々育成し、5年、10年またバレイショでは20年以上にわたりその形質の安定性を確認し、各手法の有効性を事業化レベルで実証できた。

Table 5-1 Cultivars of potato, petunia, chrysanthemum, and carnation bred by somaclonal variation, X-ray irradiation with tissue culture, or ion beam irradiation

農林水産植物の種類「バレイショ」 *Solanum tuberosum* L.

登録番号	出願番号	品種名称	出願日	出願者名	育成者	登録年月日	突然変異誘導方法
4054	4093	シヤカキッス [®] ハーブル 90	1990/10/01	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、百瀬眞幸、加藤忠	1994/08/22	培養変異(プロトクローン)

農林水産植物の種類「ペチュニア」 *Petunia* Juss

登録番号	出願番号	品種名称	出願日	出願者名	育成者	登録年月日	突然変異誘導方法
12082	13469	キリマシ [®] チェリーレット	2001/04/23	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、安野紀子、竹下大学	2004/06/04	培養変異+X線照射

農林水産植物の種類「キク」 *Chrysanthemum x morifolium* Ramat.

登録番号	出願番号	品種名称	出願日	出願者名	育成者	登録年月日	突然変異誘導方法
5874	6238	イエロー [®] リズム	1993/08/18	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、工藤博司、吉田義運、鏡勇吉	1997/12/05	X線照射
5875	6239	パール [®] リズム	1993/08/18	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、工藤博司、吉田義運、鏡勇吉	1997/12/05	X線照射
6167	6843	アマゾン	1994/04/28	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、工藤博司、吉田義運、矢田真由美	1998/03/09	X線照射
6638	7346	ロイヤルウェディングセルエンジ [®]	1994/11/22	シヤハン [®] アグ [®] リハ [®] イ(株)	岡村正愛、工藤博司、吉田義運、矢田真由美	1998/07/17	培養変異(ソマクローン)
8318	9288	ホワイトリネカーOW-1	1996/12/04	シヤハン [®] アグ [®] リハ [®] イ(株)	岡村正愛、百瀬眞幸、工藤博司、矢田真由美、戸田雅之	2000/09/05	培養変異+X線照射
8878	9891	プリティウェディング [®]	1997/05/13	シヤハン [®] アグ [®] リハ [®] イ(株)	岡村正愛、矢田真由美	2001/03/19	培養変異+X線照射

農林水産植物の種類「カーネーション」 *Dianthus caryophyllus* L.

登録番号	出願番号	品種名称	出願日	出願者名	育成者	登録年月日	突然変異誘導方法
9247	10318	ミスエレガント	1997/10/21	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、矢田真由美	2001/08/16	培養変異(ソマクローン)
10926	12013	キリカレット [®]	1999/10/06	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、大西昇、大塚雅子	2002/12/16	培養変異(ソマクローン)
13052	13317	キリナテ [®] マーブル	2001/03/19	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、大塚雅子、小田尚	2005/03/23	培養変異+X線照射
12102	13318	キリナテ [®] サーモン	2001/03/19	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、大塚雅子、小田尚	2004/06/04	培養変異+X線照射
12103	13319	キリナテ [®] クールビ [®] ンク	2001/03/19	麒麟麦酒(株)	岡村正愛、大塚雅子、小田尚	2004/06/04	培養変異+X線照射

農林水産植物の種類「カーネーション」 *Dianthus caryophyllus* L

登録番号	出願番号	品種名称	出願日	出願者名	育成者	登録年月日	突然変異誘導方法
13585	15097	ミスティックビートルイオン	2002/10/18	麒麟麦酒(株、独)原子力機構	岡村正愛、安野紀子、大塚雅子、田中淳、長谷純宏	2005/12/07	イオンビーム照射
13586	15098	タークティックビートルイオン	2002/10/18	麒麟麦酒(株、独)原子力機構	岡村正愛、安野紀子、大塚雅子、田中淳、長谷純宏	2005/12/07	イオンビーム照射
13587	15099	レットビートルイオン	2002/10/18	麒麟麦酒(株、独)原子力機構	岡村正愛、安野紀子、大塚雅子、田中淳、鹿園直哉	2005/12/07	イオンビーム照射
16064	18376	レットビートル	2005/05/23	ハルブレ&プラン S.A	エミリオ カル、岡村正愛、田中淳	2008/02/22	イオンビーム照射
17297	19907	ヒームチェリー	2006/06/28	ハルブレ&プラン S.A	エミリオ カル、岡村正愛、田中淳	2009/02/06	イオンビーム照射

さらに、以上の研究により、

(1) 多様化した突然変異育種の各種法の特徴と利用方法については、以下の方向性を得た。

1) ソマクローナル変異利用の基盤としての細胞組織培養系において、培地中のアンモニウムイオンの影響が大きいこと、つまり、タバコでは 1000 mg/l 以上高濃度が適当であるのに対し、キク科植物の多くは全く含まない培地が適していること、またバレイショでは 300 mg/l が適当であることを明らかにした。また PEC 処理によりプロトプラストからの分裂とそれに続くコロニー形成が大きく改善させることを明確にできた。これは細胞の生理状態が均質化・活性化するためと考えられた。

2) ソマクローナル変異を利用するに当たり、キクではプロトプラスト由来植物は変異の幅こそ大きいものの草丈が低く実用的でなくソマクローン再生変異が適当であったのに対し、バレイショではプロトクローンの中に栽培品種として高頻度に実用的なものが得られること、培養適性に関する変異も得られることが分った。この差異の原因としてキクの活性酸素感受性の高さが考えられた。

3) ソマクローナル変異では 1 個または数個の細胞から植物体が再生される為、キメラでない変異体が得られ易い。しかし細胞・組織培養の段階で DNA のメチル化やクロモゾームリモデリングによるエピジェネティック変異が起こり易く (Neelakandan and Wang, 2012) 変異の安定性に課題がある。この課題は材料部位の選択、培養方法の選択により改善され、さらに栄養繁殖を繰返すことによる形質安定性の確認、また種子後代での形質安定性確認により解決できる。実例として本研究のプロトクローナル変異によるバレイショ品種は 24 年間形質が安定していた(品種登録番号 4054 : 以下同じ)。またキク花ソマクローン品種は 5 年間形質が安定していた(6638)。

4) ガンマ線照射や X 線照射による育種の利点として、広く利用されノウハウの蓄積があること、比較的小規模な装置で済むこと、組織透過性が高く材料選択の幅が広いことなどがある。しかし不要変異を併発しやすい、キメラ性をもつ個体が比較的出現しやすい、イオンビームに比べ変異の幅が狭い場合があるなどの課題もある。これらの課題に対してはガンマ線照射を利用することで変異幅を拡大できる可能性があること、また 3 回以上の切戻しを実施した後代を検定しキメラ性を少なくできることが示された。

5) イオンビーム照射は、ヌル変異体を高頻度に得ることができる、不要変異の併発が少ない、変異の幅が広い、新たな変異が得られる等の長所があることを示した。しかし大規模な装置が必要である、また組織透過性が低い装置では取扱い材料に限られる場合がある等の課題があり、組織透過性については材料の調製方法の工夫、培養系との組合せ、また組織透過度の高い装置 HIMAC の利用で解決できることを示した。

6) イオンビーム照射と組織培養の組合せでは、キメラ性の少ないヌル変異が高頻度に得られること、特にイオンビーム照射組織から直接不定芽を再分化する系では不要変異の少ない安定した変異体が高い効率で得られることを示した。組織培養を使う場合、培養期間が長いとエピジェネティック変異が混入する確率が高まる課題があったが、直接不定芽・不定胚を得る手法の開発によりイオンビームの特長を活かすことができると示唆された。本研究で実用化された事例としてキク(8878: 14 年間安定)、カーネーション(10926, 12102, 13587, 17297 他)、ペチュニア(12082)があげられる。

次に

(2) 突然変異育種で変異の方向性を制御する課題に関しては、以下の知見を得た。

1) 材料とする組織部位や変異誘発手法の違いがキクの花色突然変異の誘発にどのような影響を与えるかを調査し、ソマクロナル変異における花色素突然変異の出現頻度は花組織由来のほうが葉組織由来よりも高いこと、またキクの組織特異的な突然変異の頻度とスペクトルはイオンビーム照射により顕著に高まることを示した。

2) キク品種「リネカー」で白花色を作出する研究では、葉ソマクロンでは白系花色は出現せず、葉プロトクロンでは白に近いパールが出現しのみであったのに対し、管状花のソマクロンから低頻度で白が得られ、管状花を「高シヨ糖低温培養した後、常温で X 線照射」した場合に高頻度で白が得られ、純白品種の育成に成功した。

3) さらに、10,000 個体を栽培開花させても花色自然変異が皆無であるペチュニア系統を材料にして、高シヨ糖処理により放射線を照射する細胞の状態を意図的に変化させた後にイオンビームを照射することで花色変異の頻度が向上しスペクトルが広がることを示した。

キク、カーネーションなど園芸植物、またバレイショでは、優良品種は 10 年以上に 1 つといわれる。それは、生産性・耐病性・花や塊茎の品質など総合特性に優れるものを育種することが非常に困難であるためである。つまり優良品種で栽培性や耐病性などの優れた特性を保持したまま、花色、

花形などの幅を拡大できると大きな経済的インパクトがある。しかし交雑育種では後代で形質が分離してしまい親品種の総合的な優良形質を再現するのは困難である。突然変異は品種の優良形質を保持したまま、花色などの経済価値をもつ形質改変ができる。この効率を高めるために様々な手法が考案され試されてきた。

本論文では、商業生産に耐える品種育成に有効なソマクローナル変異の誘導方法及びイオンビーム育種法の開発を試み、いずれも効率的な手法を確立し、新たな知見を獲得し、世界に先駆けた品種登録・事業化に至り、その後の産業応用の先駆的事例となった。すなわち、無機成分の重要性の例証と前培養よりによる汎用的なプロトプラストからの植物体再分化系の確立、プロトプラスト培養変異による世界発のバレイショ新品種「ジャガキッズ」育成事業化と 20 年以上にわたる安定性の確認、イオンビーム育種系の開発とカーネーションでの事業化、また新たな輝き花色の獲得及び関与遺伝子の確認と発現同定を達成した。さらに、幅広い花色変異を高頻度に得つつ出現する変異体の草丈等諸特性への悪影響を避けるには材料組織の選択とイオンビームなど高 LET 放射線利用やガンマ線緩照射の利用が有効である事例を示すとともに、花色の突然変異頻度を向上し変異スペクトルを意図的に拡大する手法について方向性を示した。これらは、今日、多様化した突然変異育種技術の課題、1) 突然変異育種各技術がもつ特長と欠点ならびに各々の技術を実用品種育成に有効活用するための明確な指針、2) 突然変異研究の究極の目標である変異の方向性の制御、の各々に対して有用な知見であり、今後の突然変異育種の展開に重要な意義を持つ。

要旨

植物では 3,000 以上の突然変異品種が育成されているが、ほとんどがガンマ線照射や化学変異原によるものである。1980 年代に発見されたソマクローナル変異、1990 年代に生物研究の進んだイオンビーム照射突然変異、及び細胞組織培養とイオンビーム育種の併用効果について総合的に研究した事例は極少ない。多様化した突然変異育種技術について各々の特長と欠点を明確にし各技術を実用化レベルで有効活用する指針を与える研究例はない。また突然変異はランダムに起こり研究の究極の目標は変異の方向性の制御である(渡辺と山口 1983)とされるが、この研究例は極少ない。本研究では、多様な突然変異育種技術の特長と欠点を明らかにし各技術活用の指針を示すこと、及び突然変異において変異の方向性を制御することを試みた。

1. 細胞・組織培養系の開発によるソマクローナル変異利用育種

プロトプラスト培養系の開発は細胞生物学、生理学などの基礎面、また育種学など応用面ともに重要である。筆者はキク科植物の葉プロトプラスト培養においてアンモニウムイオンが阻害的な効果を及ぼすことを発見し、MS 培地等で 1% 程度であった細胞分裂頻度を、培地からアンモニウムイオンを除去することで 50% 以上にまで向上させることに成功した。また細胞壁分解酵素処理前に材料とする葉組織・細胞の生理状態を調節し細胞分裂活性を高めておくことで、プロトプラストからの細胞分裂頻度を向上させる手法を発見し、その応用によりキクやバレイショの葉プロトプラストからの効率的な植物体再分化系を開発した。この培養系を用いて変異を調査した結果、バレイショではプロトクローナル変異によりコロニー形成率および植物体再分化率が 4 倍以上になる変異を発見した。更にプロトクローナル変異による世界最初の実用化例となるバレイショ新品種「ジャガキッズ」の育成に成功した。

次にキク栽培品種で花色の培養変異を調査した。葉プロトクローンで様々な花色・花形変異体が出現したが草丈が低く実用的なものは得られなかった。一方、葉ソマクローンでは親と同等の栽培特性を持つ花色・花形の変異体が多数得られた。また花色の自然突然変異がほとんど出現しない濃紫桃品種「ローズクイーン」で、葉ソマクローンでは淡紫桃変異しか出現しなかったのに対し、管状花ソマクローンの中に鮮紫桃色に底白が入る新規覆輪が得られ、新品種「ロイヤルウェディング」を育成した。同様な手法をポットカーネーションに応用し新花色 2 品種を育成し、ソマクローン育種の有効性を実証した。またペチュニアプロトプラストからの植物体再分化系に X 線照射を併用し、交雑育種や放射線照射単独では得られなかった匍匐性赤色ペチュニアを世界に先駆けて育成した。

植物細胞は組織培養の過程で培地成分、脱分化、再分化などのストレスにさらされ、染色体や DNA 配列の変化、トランスポゾン活性化などの遺伝的变化に加え、DNA メチル化やクロモゾームリモデリングなどのエピジェネティックな変化を生む。本研究で実用化されたキク、バレイショに関して形質の安定性を調査した。バレイショプロトクローン品種は 20 年以上にわたり販売され続け安定した形質を示し、キク、カーネーション品種は 5 年以上に渡り 100 万本以上の切花・鉢花が市販されたが変異形質は安定していた。これはソマクローナル変異が安定した遺伝的変異を生む実用的な技術であることを事業化レベルで実証した貴重な例となった。

2. イオンビーム育種系の開発によるカーネーション花色変異の創製

イオンビームは、X線やガンマ線などの低LET（線エネルギー付与）放射線と比較し高い生物効果をもち局所的に高エネルギーを付与するため、DNA鎖の切断などの修復し難い変異を誘導する。しかし原子力機構TIARAの炭素イオンビームの組織透過性は2mmである。筆者はカーネーションの葉表層から0.5mmの深さの組織細胞から植物体を再生する培養系を確立することでイオンビーム照射組織からの効率的な突然変異体獲得技術を開発し、炭素イオンビームはガンマ線に比べ4倍生物効果が高く、幅広い花色変異を生み出せることを実証した。また親品種の耐病性・早生性を維持しつつ花の形質が丸弁、覆輪、赤、桃などに变化したカーネーション品種シリーズを育成した。これはその後著しい発展を示すイオンビーム育種の先駆的研究となった。次にイオンビーム照射及びガンマ線急照射・緩照射による花色変異の幅と頻度を調査し、花色変異のスペクトルはイオンビーム照射>ガンマ線緩照射>ガンマ線急照射の順に広いことを示した。またイオンビーム照射、ガンマ線緩照射で得た黄色の花変異体はCHIとDFR色素遺伝子の変異体であることを確認した。これらはイオンビーム育種研究会の発足と発展、その後のイオンビーム育種研究の広範な展開の基盤となった研究として注目される。

次に新規花色の創製にイオンビーム育種を応用した。カーネーションは、通常リンゴ酸でアシル化された4種のアントシアニンを主要アントシアニンとし各アントシアニンに対応した赤色、桃色、暗赤色および紫色を基本花色として発色する。一方、カーネーションには液胞内にアントシアニンの凝集体(AVIs)をもつ暗紫色花卉の特殊花色系統がある。筆者は特殊花色系統のメンデル遺伝様式を調査し特殊花色の発現はアシル化されていないアントシアニンからなるAVIs形成による劣性形質であることを明らかにし、交配育種により青紫色の輝き花色系統を作出した。更にイオンビーム照射により赤紫、銅赤、赤の輝き花色系統を育成した。色素の同定及び花卉細胞の観察により青紫輝き花色系統及び赤紫輝き花色系統のアントシアニンはpelargonidin 3, 5-diglucoside (Pg3,5dG)であるのに対し銅赤輝き花色系統と赤輝き花色系統のアントシアニンはpelargonidin 3-glucoside (Pg3G)であった。また色素の凝集性が異なると花色の明るさに違いが出た。RT-PCR遺伝子解析により、青紫輝き花色系統はアントシアニンの結合糖にリンゴ酸を転位する酵素遺伝子*AMa1T*の発現がないことを解明した。つまりチェリー桃花色を示すアントシアニンのアシル基が欠落しPg3,5dGへと変異し液胞内に凝集体が出現することで青紫輝き花色が発現したと考えられた。本研究により*AMa1T*の欠失が色素凝集を誘導し輝き花色を誘導することが明確にされた。またイオンビーム照射によりアントシアニンの5位の配糖化酵素遺伝子*AA5GT*が欠失しアントシアニンがPg3Gへと変異し銅赤輝き及び赤輝き花色が発現すること、花卉の背軸側表皮細胞液胞内アントシアニンの凝集性が弱まる変異により明るい色調の輝き花色が生じることを各々明らかにした。新たな色調をつくるのは難しいとされていたカーネーションでイオンビーム照射により色素構造の変化、色素凝集の程度や色素量の変化を誘導し新たな輝き色調カーネーションを育成できることを示した。

イオンビーム育種により筆者が育成したカーネーション5品種は安定した形質を示し10年間以上継続販売され、経済効果は市場卸値レベルで国内外あわせ60億円以上となる。以上の事実はイオンビーム育種が、1) 変異の誘発率が高い、2) 変異のスペクトルが広く新奇変異が得られる、3) 変異する箇所は少なく不要な変異を伴わない変異体得られる、という特長をもつことを品種育成・事業化レベルで実証した。

3. 花色突然変異の頻度およびスペクトルを意図的に向上させる試み

突然変異により特定の形質を狙ってその形質が変化した変異体を効率的に作出できれば画期的な技術となる。ソマクローナル変異では材料とする組織により得られる変異が異なると推定されていた。そこで放射線を照射される植物の生理状態が出現する突然変異の頻度と変異幅に影響するかについて、花色を指標として検討した。

キクは世界最大の生産量をもつ高次倍数性栄養繁殖花きであり、優良品種での花色幅拡大は重要な経済効果をもつため突然変異育種に適した植物と言える。実用品種育成では不要な変異を併発せずに目的変異を効率よく得ることが課題となる。キク栽培品種ヨミステリー（紫花色）を用いて、花色変異体の平均草丈が親品種の90%以上を維持し、かつ十分な花色変異頻度が得られる照射量で花と葉からイオンビーム照射クローンを作成し、花と葉からのソマクローンとあわせ総計7,258個体を調査した結果、1) 花色突然変異の出現頻度は葉ソマクロンの2.01% ($\sigma=0.26$)に対し花ソマクローンでは2.91% ($\sigma=0.55$)と材料組織による有意な差があること、2) イオンビーム照射した場合、花組織では6.47% ($\sigma=0.77$)、葉組織では3.89% ($\sigma=0.52$)となり組織特異的な変異出現率が高まること、3) またイオンビーム区でのみ濃赤、茶の花色突然変異体が出現することが各々わかった。この研究は、花色突然変異出現頻度が花組織と葉組織とで異なること、また花色突然変異頻度とスペクトラムはイオンビーム照射により顕著に高まることを示した最初の例である。

次に意図的に材料の生理状態を変化させることで突然変異の頻度や幅に差が出るかを試験した。ペチュニア（青紫花色）の実生を3%ショ糖で処理すると茎頂等に色素が劇的に蓄積される。この茎頂に炭素イオンビームを照射しM2系統を得た。葉緑素変異の出現頻度はショ糖処理区と無処理区とで同等であったが、花色の突然変異出現頻度はショ糖処理区が無処理区に比較して有意に高く、かつ無処理区では得られなかったピコティ、紫ベイン、薄紫、白などの花色変異がショ糖処理区でのみ出現した。これは放射線を照射する細胞の状態を意図的に変化させてイオンビームを照射することで花色変異の頻度が向上しスペクトルが広がることを示す初めての例となった。

以上、本研究は、ソマクローナル変異育種及びイオンビーム育種での新たな知見獲得と技術を利用する際の指針を得るとともに、世界に先駆けた品種登録・事業化に至り、その後の産業応用の先駆的事例となった。カーネーションでは従来にない輝き花色の育成と関与遺伝子を確定した。さらに花色の突然変異スペクトルを意図的に拡大する手法について方向性を示し、今日の突然変異育種の課題に関する重要な知見となった。

謝辞

本論文を作成するにあたり、堤伸浩東京大学大学院教授から丁寧かつ熱心なご指導を賜りました。ここに感謝の意を表します。本論文を精査いただき貴重なご指導と助言を頂きました東京大学大学院の柴田道夫教授、山川 隆教授、伊藤純一准教授、有村慎一准教授の各先生方に深謝いたします。また本研究の中で丁寧なご指導と有益な議論を頂きました、東京農工大学の小関良宏教授、佐々木伸大助教（現：岩手生物工学研究センター）、筑波大学大学院教授兼花き研究所の中山真義先生に感謝の意を表します。またイオンビーム研究で有益な議論を頂きました、日本原子力研究開発機構の田中淳先生、長谷純宏先生に感謝の意を表します。また本論文のもととなった論文の共著者の皆様、キリン株式会社の皆様に様々なご指導・ご協力を頂きました。深謝いたします。

本論文の一部は下記のジャーナルに掲載されたものであるがインターネット公開に関して著作権者の了解を得た。

Plant & Cell Physiology 25: 281-286, Okamura M., Hayashi T., Miyazaki S. (1984) Inhibiting effect of ammonium ion in protoplast culture of some Asteraceae plants.

Nucl Instrum Methods Phys Res B 206: 574-578, Okamura M, Yasuno N, Ohtsuka M, Tanaka A, Shikazono N, Hase Y (2003) Wide variety of flower-color and -shape mutants regenerated from leaf cultures irradiated with ion beams. doi.org/10.1016/S0168-583X(03)00835-8

Plant biotechnology 27: 99-103, Hase Y, Okamura M, Takeshita D, Narumi I, Tanaka A (2010) Efficient induction of flower-color mutants by ion beam irradiation in petunia seedlings treated with high sucrose concentration. doi.org/10.5511/plantbiotechnology.27.99

Euphytica 191: 45-56, Okamura M, Nakayama M, Umemoto N, Cano E.A, Hase Y, Nishizaki Y, Sasaki N, Ozeki Y (2013) Crossbreeding of a metallic color carnation and diversification of the peculiar coloration by ion-beam irradiation. doi.org/10.1007/s10681-012-0859-x

Euphytica 202: 333-343, Okamura M., Hase Y., Furusawa Y., Tanaka A. (2015) Tissue-dependent somaclonal mutation frequencies and spectra enhanced by ion beam irradiation in chrysanthemum. doi: 10.1007/s10681-014-1220-3

参考文献

- Abe Y, Tera M, Sasaki N, Okamura M, Umemoto N, Momose M, Kawahara N, Kamakura H, Goda Y, Nagasawa K, Ozeki Y (2008) Detection of 1-*O*-malyglucose: pelargonidin 3-*O*-glucose-6''-*O*-malyltransferase activity in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Biochem Biophys Res Comm* 373:473–477. doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.153
- Albert NW, Lewis DH, Zhang H, Irving LJ, Jameson PE, Davis KM (2009) Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *J Exp Bot* 60: 2191–2202
- Arihara A, Kita T, Igarashi S, Goto M, Irikura Y (1995) White Baron- a non-browning somaclonal variant of Danshakuimo (Irish Cobbler). *Amer Potato J* 72: 701–705.
- Binding H (1974) Regeneration of haploid and diploid plants from protoplasts of *Petunia hybrida* L. *Z Pflanzenphysiol* 74:327-356
- Binding H (1975) Reproducibly high plating efficiencies of isolated mesophyll protoplasts from shoot cultures of tobacco. *Physiol Plant* 35: 225–227
- Binding H, Nehls R, Kock R, Finger J, Mordhorst G (1981) Comparative studies on protoplast regeneration in herbaceous species of the dicotyledoneae class. *Z. Pflanzenphysiol.*101: 119–130.
- Bloor SJ (1998) A macrocyclic anthocyanin from red/mauve carnation flowers. *Phytochemistry* 49: 225–228. doi.org/10.1016/S0031-9422 (97)01051-0
- Boyes CJ, Zapata FJ, Sink KC (1980) Isolation, culture and regeneration to plants of callus protoplasts of *Salpiglossis sinuate* L. *Z. Pflanzenphysiol* 99: 471–474
- Broertjes C, van Harten AM (1988) Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam
- Bush SR, Earle ED, Langhans RW (1976) Plantlets from petal epiderims and shoot tips of the periclinal chimera *Chrysanthemum morilloium* 'Indianapolis'. *Amer J Bot* 63: 729-737
- Chen S, Matsubara K, Kokubun H, Kodama H, Watanabe H, Marchesi E, Ando T (2007) Reconstructing historical events that occurred in the petunia *Hfl* gene, which governs anthocyanin biosynthesis, and effects of artificial selection by breeding. *Breed Sci* 57: 203-211
- Chen SM, Li CH, Zhu X.R, Deng YM, Sun W, Wang LS, Chen FD, Zhang Z (2012) The identification of flavonoids and the expression of genes of anthocyanin biosynthesis in the chrysanthemum flowers. *Biologia Plantarum* 56: 458-464

De Jong J, Custers JBM (1986) Induced changes in growth and flowering of chrysanthemum after irradiation and in vitro culture of pedicels and petal epidermis. *Euphytica* 35: 137-148

Dubos C, Le Gourrierc J, Baudry A, Huep G, Lanet E, Debeaujon I, Routaboul JM, Alboresi A, Weisshaar B, Lapiniec L (2008) MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 55: 940–953

Duha P-D, Tua Y-Y, Yenb G-C (1999) Antioxidant Activity of Water Extract of Harnng Jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), *LWT - Food Science and Technology* 35: 269-277

Elia MC, Bradley MO (1992) Influence of chromatin structure on the induction of DNA double strand breaks by ionizing radiation. *Cancer Res* 52: 1580–1586

Evans DA, Sharp WR (1986) Applications of somaclonal variation. *Biotechnology* 4: 528-534.

Evans DA (1989) Somaclonal variation - genetic basis and breeding applications. *Trends in Genetics* 5: 46–50.

Falk M, Lukářsová E, Lozubek S (2008) Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to γ -radiation. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2398–2414

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151–158

Grlesbach RJ (1996) The inheritance of flower color in *Petunia hybrida* Vilm. *J Hered* 87: 241–245

Hamada N, Imaoka T, Masunaga D, Ogata T, Okayasu R, Takahashi A, Kato TA., Kobayashi Y, Ohnishi T, Ono K, Shimada Y, Teshima T (2010) Recent advances in the biology of heavy-ion cancer therapy. *J Radiat Res* 51: 365-383

Hara M, Oki K, Hoshino K, Kuboi T (2003) Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugars in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyl. *Plant Sci* 164: 259–265

Hara M, Oki K, Hoshino K, Kuboi T (2004) Effects of sucrose on anthocyanin production in hypocotyl of two radish (*Raphanus sativus*) varieties. *Plant Biotechnol* 21: 401–405

Hase, Y., Tanaka A., Baba T, Watanabe H (2000) FRL1 is required for petal and sepal development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 24: 21–32.

Hase Y, Trung KH, Matsunaga T, Tanaka A (2006) A mutation in the uvi4 gene promotes progression of endoreduplication and confers increased tolerance towards ultraviolet B light. *Plant J* 46: 317–326

- Hirochika H (1993) Activation of tobacco retrotransposons during tissue culture. *EMBO J* 12:2521–2528
- Hase Y, Akita Y, Kitamura S, Narumi I, Tanaka A (2012) Development of an efficient mutagenesis technique using ion beams: Toward more controlled mutation breeding. *Plant Biotechnol* 29: 193–200. doi: 10.5511/plantbiotechnology.12.0106a
- Honda I, Kikuchi K, Matsuo S, Fukuda M, Saito H, Ryuto H, Fukunishi N, Abe T (2006) Heavy-ion-induced mutants in sweet pepper isolated by M1 plant selection. *Euphytica* 152: 61-66
- Itoh Y, Higeta D, Suzuki A, Yoshida H, Ozeki Y (2002) Excision of transposable elements from the chalcone isomerase and dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiol* 43: 578–585. doi:10.1093/pcp/pcf065
- Jain S M (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153–166,
- Jung Y-H, Jeong S-H, Kim SH, Singh R, Lee J, Cho Y-S, Agrawal GK, Rakwal R, Jwa N-S (2008) Systematic secretome analyses of rice leaf and seed callus suspension-cultured cells: workflow development and establishment of high-density two-dimensional gel reference maps. *J Proteome Res* 7: 5187–5210
- Karp A (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302,
- Kao KN, Michayluk MR (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105–110.
- Karp A, 1995, Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85: 295-302,
- Kishimoto S and Ohmiya A (2006) Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) *Physiologia Plantarum* 128: 436–447
- Koes RE, Spelt CE, van den Elzen PJM, Mol JNM (1989) Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene* 81: 245–257
- Kondo E, Nakayama M, Kameari N, Tanikawa N, Morita Y, Akita Y, Hase Y, Tanaka A, Ishizaka H. (2009) Red-purple flower due to delphinidin 3,5-diglucoside, a novel pigment for *Cyclamen* spp., generated by ion-beam irradiation. *Plant Biotechnol* 26: 565-569
- Kraft G, Kramer M, Scholz M (1992) LET, track structure and models. *Radiat Environ Biophys* 31: 161–180.
- 草場信、谷口研至、増田優 (2009) 広義キク属-東アジアで同質倍数性ゲノム進化を遂げた植物群-. 細胞工学別冊「バイオリソース&データベース活用術」秀潤社、東京、205-208

- Ladygin VG (2000) Biosynthesis of carotenoids in plastids of plants. *Biochemistry Biokhimiia* 65: 1113-1128
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60: 197-214
- McClintock B (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801
- Markham KR, Gould KS, Winefield CS, Mitchell KA, Bloor SJ, Boase MR (2000) Anthocyanin vacuolar inclusions - their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry* 55:327-336 doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00246-6
- Matsuba Y, Sasaki N, Tera M, Okamura M, Abe Y, Okamoto E, Nakamura H, Funabashi H, Takatsu M, Saito M, Matsuoka H, Nagasawa K, Ozeki Y (2010) A novel glucosylation reaction on anthocyanins catalyzed by acyl-glucose dependent glucosyltransferase in the petals of carnation and delphinium. *Plant Cell* 22: 3374-3389. doi:10.1105/tpc.110.077487
- Matsumura A, Nomizu T, Furutani N, Hayashi K, Minamiyama Y, Hase Y (2010) Ray florets color and shape mutants induced by $^{12}\text{C}^{5+}$ ion beam irradiation in chrysanthemum. *Scientia Horticulturae* 123: 558-561.
- Meyer Y, Abel WO (1975) Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo-wall and wall formation. *Planta* 125: 1-13.
- Miller CO (1961) A kinetin-like compound in maize. *Proc Natl Acad Sci* 47: 170-174.
- Mita S, Murano N, Akaike M, Nakamura K (1997) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *Plant J* 11: 841-851
- Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166
- Momose M, Abe Y, Ozeki Y (2010) Miniature inverted-repeat transposable elements of Stowaway are active in potato. *Genetics* 186: 59-66
- Morita Y, Hoshino A, Kikuchi Y, Okuhara H, Ono E, Tanaka Y, Fukui Y, Saito N, Nitasaka E, Noguchi H, Iida S (2005) Japanese morning glory *dusky* mutants displaying reddish-brown or purplish-gray flowers are deficient in a novel glycosylation enzyme for anthocyanin biosynthesis, UDP-glucose:anthocyanidin 3-O-glucoside-2''-O-glucosyltransferase, due to 4-bp insertions in the gene. *Plant J* 42: 353-363 doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02383.x
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

Nagata T, Takebe I (1971) Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta* 99: 19-20

Nagatomi S, Tanaka A, Watanabe H, Tano S (1997) Chrysanthemum mutants regenerated from in vitro explants irradiated with $^{12}\text{C}^{5+}$ ion beam. Institute of Radiation Breeding, Technical News No.60

Nagatomi S, Tanaka A, Kato A, Yamaguchi H, Watanabe H, Tano S (1998) Mutation induction through ion beam irradiations in rice and chrysanthemum. *JAERI-Review* 98-016: 41-43

Nakayama M, Koshioka M, Yoshida H, Kan Y, Fukui Y, Koike A, Yamaguchi M (2000) Cyclic maly anthocyanins in *Dianthus caryophyllus*. *Phytochemistry* 55: 937-939 doi:10.1016/S0031-9422(00)00263-6

Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Rep* 31:597-620 doi:10.1007/s00299-011-1202-z

Newman HC, Prise KM, Michael BD (2000) The role of higher order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with X-rays or alphaparticles. *Int J Radiat Biol* 76: 1085-1093

Nilan RA, Konzak CF, Wagner J, Legault RR (1965) Effectiveness and efficiency of radiations for inducing genetic and cytogenetic changes. In: *The Use of Induced Mutations in Plant Breeding*. Report of the FAO/IAEA technical meeting organized by the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the International Atomic Energy Agency in cooperation with the European Association for Research on Plant Breeding, Rome, Italy, 25 May 1964, Pergamon Press, Oxford, pp 71-89

Nishizaki Y, Matsuba Y, Okamoto E, Okamura M, Ozeki Y, Sasaki N. (2011) Structure of the acyl-glucose-dependent anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase gene in carnations and its disruption by transposable elements in some varieties. *Mol Genet Genomics* 286: 383-394 doi 10.1007/s00438-011-0655-7

Nitsch C, Nitsch JP (1967) The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I The production of vegetative buds. *Planta* 72: 355-370

Nitsch JP, Nitsch C (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87

Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S, Sumitomo K (2006) Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology* 142: 1193-1201 doi.org/10.1104/pp.106.087130

Okada T, Kamada T, Tsuji H, Mizoe J, Baba M, Kato S, Yamada S, Sugahara, S Yasuda S, Yamamoto N, Imai R, Hasegawa A, Imada H, Kiyohara H, Jingu K, Shinoto M, Tsuji H (2010) Carbon ion radiotherapy: Clinical

experiences at National Institute of Radiological Science (NIRS). J Radiat Res Research 51: 355-364

Okamura M (1988) Regeneration and evaluation of somatic hybrid plants between *Solanum tuberosum* and *Lycopersicon pimpinellifolium*. In: Puite KJ, Dons JJM, Huizing HJ, Kool AJ, Koornneef AJ, Krens FA (eds) Progress in plant protoplast research. Kluwer, Dordrecht, pp 213–214.

Okamura M. (1991) Potato cell engineering-asymmetric hybridization and intergeneric transfer of disease resistance. In Molecular methods for potato improvement, International Potato Center, Lima (Peru): CIP, 1991. pp. 23-33

Okamura M. (1994) Pomato: potato protoplast system and somatic hybridization between potato and a wild tomato, pp. 209–223 in Biotechnology in Agriculture and Forestry 27, Somatic Hybridization in Crop Improvement I, edited by Y. P. S. Bajaj. Springer-Verlag

Okamura M (2006) “Flower breeding by quantum beam technology and its commercialization” Gamma Field Symposia. Number 45, pp 77-89, NIAS

Okamura M, Tanaka A, Momose M, Umemoto N, da Silva JAT, Toguri T (2006) Advances of mutagenesis in flowers and their industrialization. In: da Silva JAT (ed) Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology Vol 1. Global Science Books, Isleworth, Middlesex, UK, pp 619–628

Okamura M, Momose M, Umemoto N, Toguri T, Tanaka A, Hase Y, Hamaguchi Y, Morishita T (2006) Flower breeding by quantum beam technology and their commercialization. 27th International Horticultural Congress Abstracts: IHC 2006: pp321-322.

Okamura M, Umemoto N, Onishi N (2012) Breeding glittering carnations by an efficient mutagenesis system. Plant Biotechnol 29:209–214. doi:10.5511/plantbiotechnology.12.0104a

岡村正愛 (1988) 植物の分化全能性と細胞工学、バイオミメティック・エンジニアリング (生体模倣工学) 213-236、ISBN-10:4915、さんえい出版

岡村正愛 (1989) バレイショの細胞育種. 組織培養、15 卷 344-348 (ニューサイエンス社)

岡村正愛 (1991) ソマクローナル変異による品種改良ーバレイショ新品種「ジャガキッズの育成ー. 組織培養、17 卷 (6) 207-212 (ニューサイエンス社)

岡村正愛、百瀬眞幸、加藤忠 (1991) プロトプラスト育種による馬鈴薯新品種「ジャガキッズパープル'90」「ジャガキッズレッド'90」の育成. 育雑 41 (別 1) 104-105

岡村正愛 (1993) 細胞融合、魚住武司, 児玉徹 (編) 植物工学 (MARUZEN Advanced Technology) 57-87、ISBN-10: 462103796X 丸善

岡村正愛 (2002) イオンビーム育種法の開発とカーネーション品種シリーズの育成、放射線と産業、No.95 : 57-63

岡村正愛 (2003) 世界 3 大花卉でのイオンビーム育種の実用化--細胞組織培養系の利用によるイオン品種シリーズの育成、放射線と産業 99: 46-53

岡村正愛 (2008) イオンビームによる植物の育種, 美濃部侑三 (編) アグリバイオビジネス—その魅力と技術動向, 34-52、シーエムシー出版

岡村正愛 (2012) 輝く花をつくる : カーネーションのイオンビーム育種. バイオサイエンスとインダストリー 70: 458-460

Olsen KM, Slimestad R, Lea US, Brede C, Lovdal T, Ruoff P, Verhuel M, Lillo C (2009) Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant Cell Environ* 32: 286–299

Ozeki Y, Davies E, Takeda J (1997) Somatic variation during long term subculturing of plant cells caused by insertion of a transposable element in a phenylalanine ammonia-lyase (PAL) gene. *Mol Gen Genet* 254:407–416

Potrykus I, Harms CT, Lorz H, Thomas E (1977): Callus formation from stem protoplasts of corn (*Zea Mays* L.). *Mol Gen Genet* 156: 347-350.

Radulescu I, Elmroth K, Stenerlöw B (2004) Chromatin organization contributes to non-randomly distributed doublestrand breaks after exposure to high-LET radiation. *Radiat Res* 161: 1–8

Reyes-Borja WO, Sotomayor I, Garzón I, Vera D, Cedeño M, Castillo B, Tanaka A, Hase Y, Sekozawa Y, Sugaya S, Gemma H (2007) Alteration of resistance to black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) in banana by *in vitro* irradiation using carbon ion-beam. *Plant Biotechnol* 24: 349–353

Ross H (1986) Potato breeding - problems and perspectives. *J Plant Breed* 13 (suppl.) 21-31

Rout GR, Das P. (1997) Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review. *Sci Hortic* 69: 239-56

Sagawa Y, Mehlquist GAL (1957) The mechanism responsible for some X-ray induced changes in flower color of the carnation, *Dianthus caryophyllus*. *American Journal of Botany* 44: 397-403

Sasaki K, Aida R, Niki T, Yamaguchi H, Narumi T, Nishijima T, Hayashi Y, Ryuto H, Fukunishi N, Abe T, Ohtsubo N (2008) High-efficiency improvement of transgenic torenia flowers by ion beam irradiation. *Plant Biotechnol* 25: 81–89

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 99–204.

Shepard JF, Totten GE (1977) Mesophyll cell protoplasts of potato - isolation, proliferation, and plant regeneration. *Plant Physiol* 60: 313-316.

Shepard JF, Bidney D, Shahin E (1980) Potato protoplasts in crop improvement. *Science* 208: 17-24

Shikazono N, Tanaka A, Watanabe H, Tano S (2001) Rearrangement of the DNA in carbon ion-induced mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 157: 379–387.

Shikazono N, Yokota Y, Kitamura S, Suzuki C, Watanabe H, Tano S, Tanaka A (2003) Mutation rate and novel tt mutants of *Arabidopsis thaliana* induced by carbon ions. *Genetics* 163:1449–1455

Shikazono N, Noguchi M, Fujii K, Urushibara A, Yokota A (2009) The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation. *J Radiat Res* 50: 27–36.

Skirvin RM and Janick J (1976) Tissue culture- induced variation in scented *Pelargonium* spp. *J Amer Soc Hort Sci* 101: 281-290

Sparrow AH, Cuany RL, Miksche JP, Schairer LA (1961) Some factors affecting the responses of plants to acute and chronic radiation exposures. *Radiation Botany* 1: 10–34

Stadler LJ (1928) Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science* 68: 186–187.

Tanaka A, Shikazono N, Yokota Y, Watanabe H, Tano S (1997a) Effects of heavy ions on the germination and survival of *Arabidopsis thaliana*. *Int J Radiat Biol* 71: 121–127

Tanaka S, Fukuda M, Nishimura K, Watanabe H, Yamano N (1997b) IRACM: a code system to calculate induced radioactivity by ions and neutrons. JAERI-Data/Code 97–019 (in Japanese)

Tanaka A., Sakamoto A, Ishigaki Y, Nikaido O, Sun G., Hase Y, Shikazono N, Tano S, Watanabe H. (2002) An ultraviolet-B-resistant mutant with enhanced DNA repair in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 129: 64–71.

Tanaka A, Shikazono N, Hase Y (2010) Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *J Radiat Res* 51: 223–233. doi:10.1269/jrr.09143

Tanaka A (2012) Targeted mutation breeding of flower color by taking advantage of ion-beam irradiation and genomic information. *Plant Biotechnol* 29: 191–192. doi:10.5511/plantbiotechnology.12.0002p

Tanaka Y, Ohmiya A. (2008) Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr Opin Biotechnol* 19:190–197. doi:10.1016/j.copbio.2008.02.015

Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* 54: 733–749

Tangpong P, Taychasinpitak T, Choosak Jompuk C, Jompuk P (2009) Effects of acute and chronic gamma irradiations on *in vitro* culture of *Anubias congensis* N.E. Brown. *Kasetsart J (Nat Sci)* 43: 449 – 457

Taniguchi K, Hara K, Fujishige I, Hiraoka T, Nakata M, Sera T, Inoue N, Chen R, Hong D-Y, Tanaka R (2002) Origin of the cultivated *Dendranthema*. *Advances in Chromosome Sciences* 1: 496-499

田野茂光 (1996) 植物育種におけるイオンビームの利用. 日本アイソトープ・放射線総合会議論文 集 22: 488-494

The Joint FAO/IAEA Programme, Mutant Variety Database (MVGS). <http://mvgs.iaea.org/default.aspx>

Torikoshi M, Minohara S, Kanematsu N, Komori M, Kanazawa M, Noda K, Miyahara N, Itoh H, Endo M, and Kanai T (2007) Irradiation system for HIMAC. *J Radiat Res* 48s: A15-A25

Tsukaya H, Ohshima T, Naito S, Chino M, Komeda Y (1991) Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 97: 1414–1421

Umemoto N, Abe Y, Cano EA, Okamura M, Sasaki N, Yoshida S, Ozeki Y (2009) Carnation serine carboxypeptidase-like acyltransferase is important for anthocyanin malyltransferase activity and formation of anthocyanic vacuolar inclusions. 5th International Workshop on Anthocyanins 2009 in Japan, pp 115

Upadhy MD (1975) Isolation and culture of mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Potato Res* 18: 438-445.

van Harten (1998) Mutation breeding, theory and practical applications, Cambridge University Press, New York

Wang Y, Wang F, Zhai H, Liu Q (2007) Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. *Sci Hortic* 111:173-178.

渡辺好郎、山口彦之(1983) 渡辺好郎、山口彦之 (監修)「突然変異育種」序文 養賢堂

山口彦之(1983) 突然変異の誘発方法 : in 渡辺好郎、山口彦之 (監修)「突然変異育種」pp40-69 養賢堂

Yamaguchi H., Shimizu A, Degi K, Morishita T (2008) Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. *Breed Sci* 58: 331–335.

Yamashita H, Tahara M (2006) A LINE-type retrotransposon active in meristem stem cells causes heritable transpositions in the sweet potato genome. *Plant Mol Biol* 61:79–94

Yoshida H, Itoh Y, Ozeki Y, Iwashina T, Ymaguchi M (2004) Variation in chalcononaringenin 2'-*O*-glucoside content in the petals of carnations (*Dianthus caryophyllus*) bearing yellow flowers. *Scientia Horticulturae* 99: 175-186

Yoshida K, Mori M, Kondo T (2009) Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Nat Prod Rep* 26: 884–915. doi:10.1039/B800165K

Zapata FJ, Sink KC, Cocking EC (1981) Callus formation from leaf mesophyll protoplasts of three *Lycopersicon* species: *L. esculentum* cv. Walter, *L. pimpinellifolium* and *L. hirsutum* f. *glebratum*. *Plant Sci Lett* 23: 41–46

Zhang H, Wang L, Deroles S, Bennett R, Davies K (2006) New insight into the structure and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology* 6:29. doi:10.1186/1471-2229-6-29