

バイオテクノロジーを用いた地域植物資源の
育種学的活用に関する研究

**The Study of Biotechnological Application for
Breeding using Local Plant Resources**

上野 敬一郎

2013

目 次

緒論	1
第1章 地域植物資源の探索と活用	6
— 鹿児島県下で発見されたヒガンバナ属新種の成立解明を例として —	
第2章 種苗増殖における組織培養法の改良とバイオ育種への応用	26
第1節 多糖類産生土壌細菌によるオレガノ組織培養における 水浸状化制御法	27
第2節 再接種不要の細菌による水浸状化制御法の検証	36
第3節 ラズベリーの組織培養における種苗増殖への水浸状化制御法 の応用	42
第4節 シャクナゲの遺伝子組み換え技術の開発	47
第3章 突然変異育種を用いた地域特産作物の品種育成への応用 — 輪ギクを例として —	72
第1節 組織培養を用いたキクの変異誘発と個体選抜技術の確立	74
第2節 無側枝性および低温開花性等有用変異選抜技術の開発	86
第3節 イオンビーム再照射による再改良技術の確立	95
第4章 育成した新品種の全国展開と将来展望 — 鹿児島県育成品種、秋輪ギク‘新神’を例として —	134
第1節 鹿児島県における花き品種育成と栽培普及	135
第2節 品種の保護対策と管理	137
第3節 種苗供給システムの構築と全国展開に向けた方策	139
総合考察	146
摘要	157
Summary	160
引用文献	164
謝辞	177
学会誌公表論文リスト	178

緒 論

地域植物資源の活用

我が国は、北海道から小笠原諸島もしくは琉球列島に至る亜寒帯から亜熱帯の気候のもとで多くの遺伝資源があり、地域生物資源活用大事典（藤巻，1998）では、地域の活性化に役だつ希少，未利用，新資源，地方品種を含め、植物資源 253 種が掲載されている。これらの中には食用作物はもとより、染料や繊維原料作物，薬用植物，観賞用植物および森林資源が含まれ、地域植物資源が衣食住につながり日本の文化に結びつくものであることが示されている。一方、国際的には生物多様性を守り、遺伝資源を持続的に利用していくための枠組みとして、「生物の多様性に関する条約（Convention on Biological Diversity; CBD : 1993）」が発行され、名古屋市で開催された同条約の締約国が集まる生物多様性条約第 10 回締約国会議（Conference of the Parties 10; COP10: 2010）は記憶に新しい。この中で、1) 遺伝資源の採取・利用と利益配分（ABS: Access and Benefit Sharing）に関する国際的な枠組みの策定，2) 生物多様性が失われる速度を 2010 年までに減少させるための「2010 年目標」の検証と新たな「ポスト 2010 年目標」の策定等が議論され、海外の遺伝資源利用については厳しく規制や規定されるに至っている。これらの情勢を含め、国内の地域植物資源についてはその重要度がさらに高まっていると言えよう。

地域植物資源と園芸利用 ～鹿児島県を例として～

鹿児島県レッドデータブック（鹿児島県，2003）によると、鹿児島県は九州の南端に位置し、火山や島嶼を含み、県域が東西約 270 km 南北約 600 km に及ぶことから様々な生物資源の宝庫と言われている。県下には学術的にも価値がある南限種，北限種および固有種が多くみられ、植物約 3,100 種を含め、多種多様な野生動植物が生息・生育することが報告されている。これらの中には、オリエンタ

ルリリーの代表品種である‘カサブランカ’を始め、ユリ類園芸品種の交雑親として用いられてきたテッポウユリやタモトユリ、ウケユリが含まれる。また、街路樹や庭園花木として広く利用されているクルメツツジは、江戸時代から品種改良が行われ（赤司，1919），その源流は霧島性ツツジ類とされる（倉重・小林，2008）。さらに、鉢花や庭園花木として利用される西洋シャクナゲの中でも屋久島交配品種と言われる品種群の交雑親には、矮性で草姿に優れる屋久島シャクナゲが用いられてきた。このように、現在の様々な園芸品種の交雑親に鹿児島県ならびに九州の固有種や自生種が用いられてきた。

一方，2011年現在，鹿児島県の農業産出額は4,000億円を越え全国4位に位置し（鹿児島県農政部，2012），南の食糧基地として消費者ニーズに対応した「かごしまブランド」をはじめ，安心・安全な食の供給を図り，「食と農の先進県」を目指している（鹿児島県農政部，2012）。また，農業産出額の部門別構成比は，畜産57%，耕種41%となっており，耕種部門においてサツマイモ，サトウキビ，茶，露地野菜，花き類等の畑作物は，全国上位の地位を占めている（鹿児島県農政部，2012）。これら多数の品目に対して，主要作物類は国（独法）の品種育成と連携を図る他，水稻，花き類，豆類等の野菜，果樹等では交雑育種を含めた品種改良を進め，主要作物の系統選抜や地域適応性の高い優良品種の育成を図っている。

バイオテクノロジーの活用

このような，多品目を対象とした育種試験においてバイオテクノロジーの活用場面を探るため，著者らは地域植物資源の探索，種苗増殖の効率化，および突然変異による特性改良等を検討し，実用品種を育成することにより，これらの技術の有効性を実証した。また，育成品種の普及を目的として，品種保護や種苗供給体制について検

討し、許諾システムと安定した種苗供給体制により、全国での栽培を実現した。

本研究では鹿児島県の多様な地域植物資源のバイオテクノロジーによる育種学的活用を例として、鹿児島県下で発見されたヒガンバナ属新種の成立解明による地域植物資源の探索と活用、細菌の共生関係を利用した培養植物の水浸状化抑制法による組織培養法の改良と分子育種への応用、およびイオンビーム照射による突然変異育種の地域特産作物への適用について検討した。さらに、この手法で育成したキク新品種の全国展開への方策、問題点、およびその将来性について行政的観点からも考察した。

第1章では、ヒガンバナ属植物を例に、鹿児島県下で発見されたヒガンバナ属新種の成立解明を通して、地域植物資源の探索と活用について検討した。ヒガンバナ属は中国雲南省を起源中心地とし、朝鮮半島を経由して分布を拡大した春出葉型と台湾・南西諸島を経由して分布を拡大した秋出葉型の両種がある(栗田, 1998)。鹿児島県下にはその両種が自生することから、ヒガンバナ属植物分布の二次中心地と言える。これらから自然交雑により発生した新種の起源を解析し、花粉貯蔵や胚培養の検討から種間雑種育成に向けた技術の開発を行った。

第2章では、非病原性の多糖類産生細菌に着目し、植物と細菌類の共生関係を利用した組織培養中における植物体の水浸状化抑制法の検討およびこの手法を遺伝子組み換え技術へ応用し、バイオテクノロジーにおける微生物の活用法について検討した。特に、組織培養を利用した種苗生産や供給の際、植物体が水分過剰で水浸状化を呈し順化効率が低下する。このような問題に対して、細菌接種法(Shetty ら, 1995)を活用し、その効果が認められる菌株に加え、同様の効果を示す菌株の探索を行い、水浸状化回避効果を検討した。

また、接種した菌の植物体中における定着性や宿主範囲の拡大を解析し、実用面での活用の可能性を論じた。

ツツジ属についてこの章では、屋久島交配シャクナゲの品種である‘パーシーワイズマン’を用いて遺伝子組み換え技術の開発を行い、木本性栄養繁殖作物の品種改良手法として技術の確立を検討した。

第3章では、近年従来の放射線より高エネルギーを局所的に付与し、広い変異スペクトルと高い変異率が得られるイオンビーム照射（Tanaka ら、2010）に着目し、輪ギクを例に栄養繁殖作物におけるイオンビームを用いた突然変異育種法（永富、2003）と、実用品種育成に向けた技術開発について検討した。栄養繁殖作物についても育種の基本は交雑によるが、特に高次倍数性作物であるサツマイモやサトウキビの場合、品種育成場所では毎年数千～数万個体の交雑実生から、長期間にわたる選抜・育成プログラムが実施されている。このような栄養繁殖作物について、交雑を必要としない品種改良の手法として、遺伝子組み換えの他、放射線照射等による突然変異育種が挙げられる。これらは、基本的な品種特性を維持し、新たな特性を付加できる点で極めて有用な手法である。しかし、実用レベルの優良変異個体を得るためには、交雑育種と同程度の個体数から選抜・育成する効率の良い培養系と選抜手法が必要である。本章では、第2章で開発した組織培養の効率化に関する知見を基礎とし、第1章の細胞組織科学的知見を基に、核DNA量の選抜への利用を図るとともに、有効な選抜手法の開発により、輪ギク実用品種の育成を通してイオンビーム照射の育種的利用法の確立について検討した。

第4章では、本研究により育成した輪ギク新品種の普及・展開を図る上で育成者権の保護と種苗供給体制が課題となる。そこで、品種識別DNAマーカーの開発の他、本県育成品種の許諾システムや種苗供給体制を検討し、育成品種の普及と全国展開について論じた。

また、突然変異や遺伝子組み換えによる品種育成は、基本的に従属品種となることから、育成者権を保持していない品種については変異誘発の対象とできないという問題がある。そのような場合の対応策として民間企業との連携・共同について検討した。

本論文の研究成果から総合考察では、地域植物資源の探索と活用の成功事例として鹿児島県種子島特産の「安納いも」を取り上げ、その地域ブランドとしての発展過程を論じた。また、茎頂培養における内生菌の存在を提起し、第2章の細菌との共生関係による培養効率向上の他、エンドファイト様の機能性付加について論じた。さらに、イオンビーム照射によるキクの品種育成を通して、イオンビームによる突然変異育種と今後の展開について論じた。

第 1 章 地域植物資源の探索と活用

― 鹿児島県下で発見されたヒガンバナ属新種の成立解明を例として ―

地域植物資源には植物本来の分布拡大により，日本国内に自生しているものの他，人の手によりもたらされ，定着し在来種として存在するものも数多く含まれている．古くは稲作の伝搬をはじめ，茶や椿も薬用および工芸作物としてもたらされ，日本に定着した作物である．甘藷は江戸時代に琉球王朝から寄贈され，種子島で栽培に成功し日本全国に広がり，多くの飢饉を救ってきた歴史がある（かごしまさつまいも小辞典，2005）．また，全国各地の畦畔や墓地に分布するヒガンバナは，食用，薬用として渡来し，救荒作物として広がった（松江，1994）とされている．本論では，地域植物資源の中からヒガンバナを例にその探索と活用について論じた．

Lycoris 属植物は，中国から日本にかけて 15 種ほど分布しており，我が国には 5 種が自生もしくは半自生している（Fig. 1-1-1 A-E）．なかでも鹿児島県下には豊富な自生が見られ，いわば *Lycoris* 属植物の二次中心地といっても過言ではない．その当地において，新しい系統と思われる 2 種類の *Lycoris* が見出された．

これらは，故大野一矢氏（鹿児島県根占町）が県内の *Lycoris* 属を収集した際に選抜し，数年前から *L. traubii* Traub.（ショウキズイセン）の選抜種として‘オオスミ’と‘ベニサツマ’という品種名で市販されるに至っている．花色は前者が樺色で後者が朱紅色であり花色以外の形態的な差異はほとんど見られない（Fig. 1-1-1 F, G）．

著者らは県内をくまなく調査した結果，これらが薩摩半島南端の鹿児島県山川町を中心とした地域に限定して自生していることをつきとめ，さらにその形態，花色素，花粉稔性および核型分析などの調査により，両者が同一起源の雑種，つまり *L. sanguinea* Maxim.（キ

ツネノカミソリ) と *L. traubii* の交雑によるものであると推定した (野添ら, 1978; 上野ら, 1983) .

本実験では, これらの成立を実証するため, *L. sanguinea* と *L. traubii* の人為的な交雑を行い, 両親種とこの 2 系統の *Lycoris*, ならびに得られた交雑実生について形態学的, 細胞学的な観察から比較検討を行った. また, *L. sanguinea* と *L. traubii* の自然交雑の可能性を探るため, 両種の分布ならびに開花期についての調査もあわせて行った.

なお, 本報では新しい系統の *Lycoris* を以下 *L. sp.* と示すこととし, 花色が樺色 (straw colored) の方を *L. sp. A*, 朱紅色 (vermilion) の方を *L. sp. B* と示すこととする (Fig. 1-1-1 F, G). また, 稲荷山 (1953) はシヨウキズイセンを *L. aurea* Herb. と表記しているが, 日本産と中国産の黄色ヒガンバナを別種とした Hayward (1957) の分類に従って, シヨウキズイセンの学名は, *L. traubii* の学名を採用した.

材料および方法

1 交雑実験

Lycoris traubii には染色体数 $2n=12, 13$ および 14 の 3 種類が知られているが (Bose, 1958; Bose・Flory, 1963; 稲荷山, 1953), 鹿児島県下のものはほとんどが $2n=13$ 型であり, よく結実する. また, $2n=12$ および $2n=14$ 型の配偶子がいずれも 1 種類の核型, すなわち前者が $5V+1R$ 型, 後者が $4V+3R$ 型の配偶子を生じる (稲荷山, 1953; 竹村, 1962) とされている. この例に準じると $2n=13$ 型は $5V$ 型と $4V$ 型の配偶子をあわせもつと考えられ, 後代に 2 種類の核型を期待しうることから, 交雑親としては $2n=13$ 型の *L. traubii* を用いた.

また, *L. sanguinea* は 7 月中旬～8 月上旬に開花し, *L. traubii* は 9 月中旬～下旬に開花するため, 開花期に 2 か月近い差がある. そこで, *L. sanguinea* を花粉親とする場合は, 開花期に花粉を採集し, デシケーター (シリカゲル入り) 中で室温乾燥後, -20°C の低温条件

下で貯蔵したものを交雑に供した。これに対して、*L. traubii* を花粉親として用いる場合は、秋咲き性の *L. sanguinea* が新しく見つかったのでこれを母本とした。これら秋咲き性の *L. sanguinea* は、1981年以降著者らの調査で九州中部から南部にかけて分布することが明らかになったもので、特に鹿児島県産のものは *L. traubii* と開花期が完全に一致するため、新鮮な花粉による交雑が可能であった。なお、花粉の低温貯蔵の影響を確認するため、交雑する前に予め新鮮および貯蔵花粉の発芽率を次の方法により調査した。すなわちホールグラスに発芽培地（グルコース 10%、寒天 1%）をとり、蒸留水を 1 滴滴下した上に花粉をまき、保湿した状態で 20℃、24 時間培養して花粉管の伸長した花粉粒を計測した。

交雑は露地育成植物を母本とし、開花直後の開葯前に除雄し、受粉後に袋がけを行った。受粉 1~1.5 か月後、種皮が黒色を呈した完熟した時点で採種した。

2 核型分析

体細胞染色体の観察は、根端を前処理として 0.05% コルヒチン溶液に 6 時間侵漬し、固定せずに 1N-HCl で 60℃、60 秒間解離した後、酢酸オルセインによる押しつぶし法（田中・浜, 1961）により行い、竹村（1961）の報告に従って核型分析を行った。

結果および考察

1 両親種と *L. sp.* の核型

Lycoris sanguinea は 22 本の棒形染色体 (rod-shaped chromosome) を持ち、 $2n=13$ 型の *L. traubii* は 9 本の V 型染色体 (metacentric chromosome) と 4 本の棒状染色体をもっており (Fig. 1-1-2 A, B, Table 1-1-1), これは稲荷山 (1953), Bose (1958), および Bose・Flory (1963) の報告と同様であった。他方、*L. sp.* の染色体数は、樺色の *L. sp. A* が $2n=17$, 朱紅色の *L. sp. B* が $2n=18$ で、前者の核型は 5 本

の V 型染色体をもつ 5V+12R 型，また，後者のそれは 4 本の V 型染色体をもつ 4V+14R 型であった (Fig. 1-1-2 C, D, Table 1-1-1) .

周知のように，*Lycoris* 属植物のうち雑種起源により成立した種としては，*L. albiflora* Koidz. がある．この種の核型は 5V+12R 型であることから，22R 型の *L. radiata* Herb. ver. *pumila* Hort. と 10V+2R 型の *L. traubii* 間の種間交雑により発生したものと推定され (稲荷山，1931, 1932, 1953) ，実際に両種を交雑することによって，その発生起源が実証された (竹村，1962) . すなわち，減数分裂の際，22R 型の *L. radiata* ver. *pumila* は 11R 型の，10V+2R 型の *L. traubii* は 5V+1R 型の配偶子をそれぞれもつことから (稲荷山，1953) ，両種の交雑種は両者の配偶子の和，つまり，*L. albiflora* と同様の 5V+12R 型の核型をもつことになる．この例に準じて考えると，9V+4R 型の *L. traubii* からは減数分裂により 5V+1R と 4V+3R が 1:1 の割合でできる．これが *L. sanguinea* からの配偶子 11R と受精にあずかると，雑種は 5V+12R 型と 4V+14R 型の核型をもつことになる．著者らが観察した *L. sp.* の 2 種類の核型は，この考えの正当性を示唆している．

2 交雑実験

Lycoris traubii を母本とし *L. sanguinea* を花粉親とした交雑は 1981 年 9 月に，また *L. sanguinea* を母本とし *L. traubii* を花粉親とした交雑は 1983 年 9 月に行い，両交雑で雑種種子を得ることができた (Table 1-1-2) . なお，両交雑における結実率は，*L. sanguinea* を母本とした場合の 30.1% に比べて，*L. traubii* を母本とした場合は 7.3% と極端に低かった．この違いは，母本とした *L. sanguinea* の結実性が *L. traubii* のそれより高いことに起因するとも考えられるが，花粉の新鮮さの違い，すなわち *L. traubii* × *L. sanguinea* の場合は発芽率 60% 程度の貯蔵花粉を，また，*L. sanguinea* × *L. traubii* の場合は発芽率 96.5% の新鮮花粉を用いたことも関与していたと考えられる．

いずれにしても，正逆交雑で種子が得られ，未発芽の種子を含むものの雑種個体を得られたこと (Table 1-1-2) は，両種は交雑する機会さえあればたやすく交雑し，雑種が生じることを示唆している．

3 交雑実生の外部形態

Lycoris traubii の実生苗は葉先がとがり，葉幅が中央で広く，広線形の葉をしており，*L. sanguinea* の実生苗は葉先が丸く，葉幅は一定で帯状の葉をしている (Fig. 1-1-3)．このような両種の特徴は，開花株の葉にも同様に認められる (Fig. 1-1-4)．このほか，出葉期，葉の光沢および葉長／葉幅比など他の諸形質においても，実生苗と開花株の特徴は同じであった (Table 1-1-3)．これらのことは *Lycoris* 属植物の場合，葉に関する諸形質が植物の齢によって変わらないことを意味する．

つぎに，正逆双方の交雑において得られた交雑実生は，生育の極端に劣る個体を除くと形態的な個体間差はほとんど認められなかった．またこれらの葉は，先端の形と葉幅が両親種 *L. sanguinea* と *L. traubii* の中間的形質を示していた (Fig. 1-1-3)．これは Fig. 1-1-4 に示した *L. sp.* の場合と同様である．さらに，実生の出葉期，葉の光沢，葉先の形および葉長／葉幅比などの形態的特徴は，*L. sp.* のそれとほぼ同じであった (Table 1-1-3)．これらのことは，*L. sp. A* および *B* が *L. sanguinea* と *L. traubii* の交雑によって生じたとする著者らの推測を裏付けるものである．

4 交雑実生の核型

Lycoris traubii × *L. sanguinea* の組合せから得られた実生の内訳は，5V+12R 型 5 個体，4V+14R 型 3 個体，5V+13R 型の異数体 1 個体，および 4V+13R+1r 型で 1 本の棒状染色体に欠失を生じたもの 2 個体であった (Fig. 1-1-5, Fig. 1-1-6, Table 1-1-1)．これに対して，*L. sanguinea* × *L. traubii* の組合せからは，21 個体の実生が得られたが，そのうち染色体を観察したのは 14 個体であった．これらの核型と個

体数は、5V+12R型 11 個体、4V+14R型 1 個体、および 4V+1v+12R型で1本のV型染色体に欠失を生じたもの2個体であった(Fig. 1-1-6, Table 1-1-1).

これらのことから、得られた交雑実生の中には、異数体や一部の染色体が欠失して染色体異常をきたした個体が、調査した25個体中5個体(20%)とかなり高い頻度で見られるものの、これらは生育が著しく劣っていることから自然界では消滅したと考えられる。そして、これらの交雑から基本的には *L. sp. A* および *B* と同様の2種類の核型(5V+12R型および4V+14R型)が生じることが実証された。

5 両親種の分布と開花期

以上述べたように、*L. sp. A* および *B* は *L. traubii* と *L. sanguinea* の交雑後代実生と出葉期、外部形態および核型が一致し、両種の自然交雑によって成立したとする著者らの仮説が支持されたことになるが、問題は両種の自然開花期が大幅に異なる点で、両種の開花期がいつ、どこで一致し、どのような形で自然交雑が行われたのか、説明が困難である。そこで、上述した実験と併行し九州における *L. traubii* と *L. sanguinea* の分布、ならびに開花期についての調査を進めた。その結果、前者は一般に知られるように、主に九州の南西海岸沿い、特に鹿児島県下に多数分布し、開花期は9月中旬～下旬の秋咲きであった(Fig. 1-1-7)。それに対し、後者は九州の北～中部の山間部には多いものの、鹿児島県下では一般に霧島から高隈山系に自生し、その開花期は7月中旬～8月上旬の夏咲きであった。

しかしながら、Fig. 1-1-7に示したように1982年に至って著者らは熊本県球磨郡相良村(a)および宮崎県西臼杵郡高千穂町(b)で、形態的には夏咲きの *L. sanguinea* とほとんど変わらない、秋咲性(9月上旬～中旬咲き) *L. sanguinea* の存在を確認した。さらに調査を進めることにより、個体数は圧倒的に少ないものの、それは鹿児島県下にも及んでいることが判明した。具体的には、1983年に鹿児島市

皆与志町(c)および川辺郡知覧町(d)で、翌1984年には揖宿郡山川町(e)でさらに遅咲きの秋咲き系統(9月中旬～下旬咲き)が自生もしくは民家の庭先に植栽されているのを見出した。特に *L. sp. A* および *B* が濃密に分布する山川町成川で秋咲きの *L. sanguinea* が見出され、しかも成川の近隣の集落ではまったくそれが見出されなかった。

これらのことは、分布ならびに開花期のいずれからみても、鹿児島県の自然条件下で、特に薩摩半島最南端の山川町成川一帯で両種の自然交雑がおこり、新しい雑種の *Lycoris* が発生したことを示唆するものであった。

6 種の分類について

小松崎(1961)は *L. traubii* の球根に混入していた朱紅色の *Lycoris* をアケボノショウキランという名で紹介している。この *Lycoris* について、竹村(私信)は花色、花粉稔性および核型から *L. sanguinea* と 8V+6R 型の *L. traubii* との交雑により生じた雑種と推測し、“*L. × rubroaurantiaca* Komatsuzaki”の学名で、小松崎氏と共に新種の発表を行う予定であった。ところが、小松崎氏の死去にともない、この *Lycoris* は正式に種として発表されないまま現在に至っている。

一方、米国では正式に種として発表されていないが、*L. “cinnabarinam”* という *Lycoris* が知られている。これは前述の *Lycoris* と同様に、日本から輸入した *L. traubii* の球根の中に混じていたもので、Williams(1983)はこの *Lycoris* について、花色が朱紅色で核型が 4V+14R 型であり、花粉稔性が低いことから、竹村と同様に *L. sanguinea* と 8V+6R 型の *L. traubii* との交雑により生じた雑種と推測しているが、開花期などの違いから人為的な交雑種であろうと報告している。

これらのことから、アケボノショウキランと *L. “cinnabarinam”* の両者は朱紅色の花色をもつ 4V+14R 型の *L. sp. B* と同一と考えられる。また、前述の‘オオスミ’と‘ベニサツマ’は、それぞれ *L.*

sp. A と B であるが，これらは *L. traubii* の選抜種としてつけられた品種名であり，これらについても正式な種としての発表はなされていない．

これらの *Lycoris* がいずれも種として発表されなかった大きな理由のひとつは，繰り返し述べたように，*L. sanguinea* と *L. traubii* の開花期が大幅に異なり，自然交雑の可能性が低いと考えられていたことに起因する．しかしながら，前述のように鹿児島県下で両種の自然交雑の可能性が極めて高いことが示唆され，しかも，両種の人為的な交雑から得られた実生は，*L. sp. A* および B と核型が一致し，形態的にも類似するものであった．以上の結果から判断すると，*L. sp.* は秋咲きの *L. sanguinea* と 9V+4R 型の *L. traubii* との自然交雑により，鹿児島県下で誕生したと考えるのが最も妥当であろう．

これらの結果から，現在この新しい系統の *Lycoris* は *L. sanguinea* と *L. traubii* との自然交雑による雑種起源の種，*L. ×rubroaurantiaca* として栗田は自身のホームページ（ヒガンバナ属の分類：<http://www5e.biglobe.ne.jp/~lycoris/taxonomy-3.html>）で整理し，秋咲き性の *L. sanguinea* についても秋咲き性の分類群 (taxon) を与え，本研究の結果が周知されるに至っている．

本章では，地域植物資源としてヒガンバナ属植物を例に鹿児島県下で発見された *Lycoris* 属新種の成立解明を中心に論じた．一般に知られているヒガンバナ (*L. radiata* Herb.) は 3 倍体で，ほとんど結実することなく分球により旺盛に増殖することから，中国大陸から渡来し，救荒作物として人の手により分布を拡大したものと推察される．それに対して種子でも繁殖する *L. sanguinea* は全国の山野に，*L. traubii* は南西諸島から九州の沿岸部に日本の固有種として分布しており，*L. sp. A* および B は両親種の分布の接点で誕生した．鹿児島県内のこれらヒガンバナ属植物を収集した故大野一矢氏の意

志を継ぎ，鹿児島県南大隅町根占の南大隅農園では，ここで取り上げた２種のヒガンバナを含めて，ヒガンバナ属植物の球根生産が行われている．また，同農園では結実した種子から実生を育成し，得られた個体を選抜して新たな品種として生産販売が行われており，多数の種苗会社のカタログにより全国に販売されている．このようにヒガンバナ属植物は地域植物資源として活用され，地域興しの素材として利用されるに至っている．

要 約

地域植物資源には植物本来の分布拡大や、人の手によりもたらされ、在来種として定着したものなど数多く含まれている。全国各地の畦畔や墓地に分布するヒガンバナは、食用、薬用として渡来し、救荒作物として広がったものとされている。本論では、地域植物資源の中からヒガンバナを例にその探索と活用について論じた。

鹿児島県下で発見された2種類のヒガンバナ属植物について、形態的な諸特性や染色体の核型分析からショウキズイセン (*Lycoris traubii*) とキツネノカミソリ (*L. sanguinea*) の交雑種と推定し、その両親種と考えられる2種の種間交雑、雑種実生の形態、染色体分析、両親種の分布および開花期の調査を行った。その結果、*L. traubii* × *L. sanguinea* および *L. sanguinea* × *L. traubii* の正逆双方の交雑から得られた種間交雑実生の形態は両親種の間中型を示し、*L. sp. A* および *B* と一致していた。また、交雑実生の染色体数ならびに核型は、*L. sp. A* および *B* とそれぞれ一致する 5V+12R 型と 4V+14R 型であった。さらに、*L. sanguinea* および *L. traubii* の分布ならびに開花期の調査から、秋咲き性の *L. sanguinea* の存在を確認し、特に *L. sp. A* および *B* が濃密に分布する鹿児島県山川町成川で、開花期が安全に一致する *L. sanguinea* と *L. traubii* が同所的に分布することを確認した。これらの結果から、鹿児島県下で発見された2種類のヒガンバナ属植物は、ショウキズイセンと秋咲きキツネノカミソリの自然交雑により鹿児島県下で発生したことを証明した。

現在、以上の結果を基に、これらのヒガンバナ属植物は雑種起源の種として分類され、鹿児島県南大隅町で球根生産が行われている。また、同農園で得られた実生から選抜した新たな品種も含めて、種苗会社のカタログにより全国に販売され、地域植物資源が地域興しの素材として利用されるに至っている。

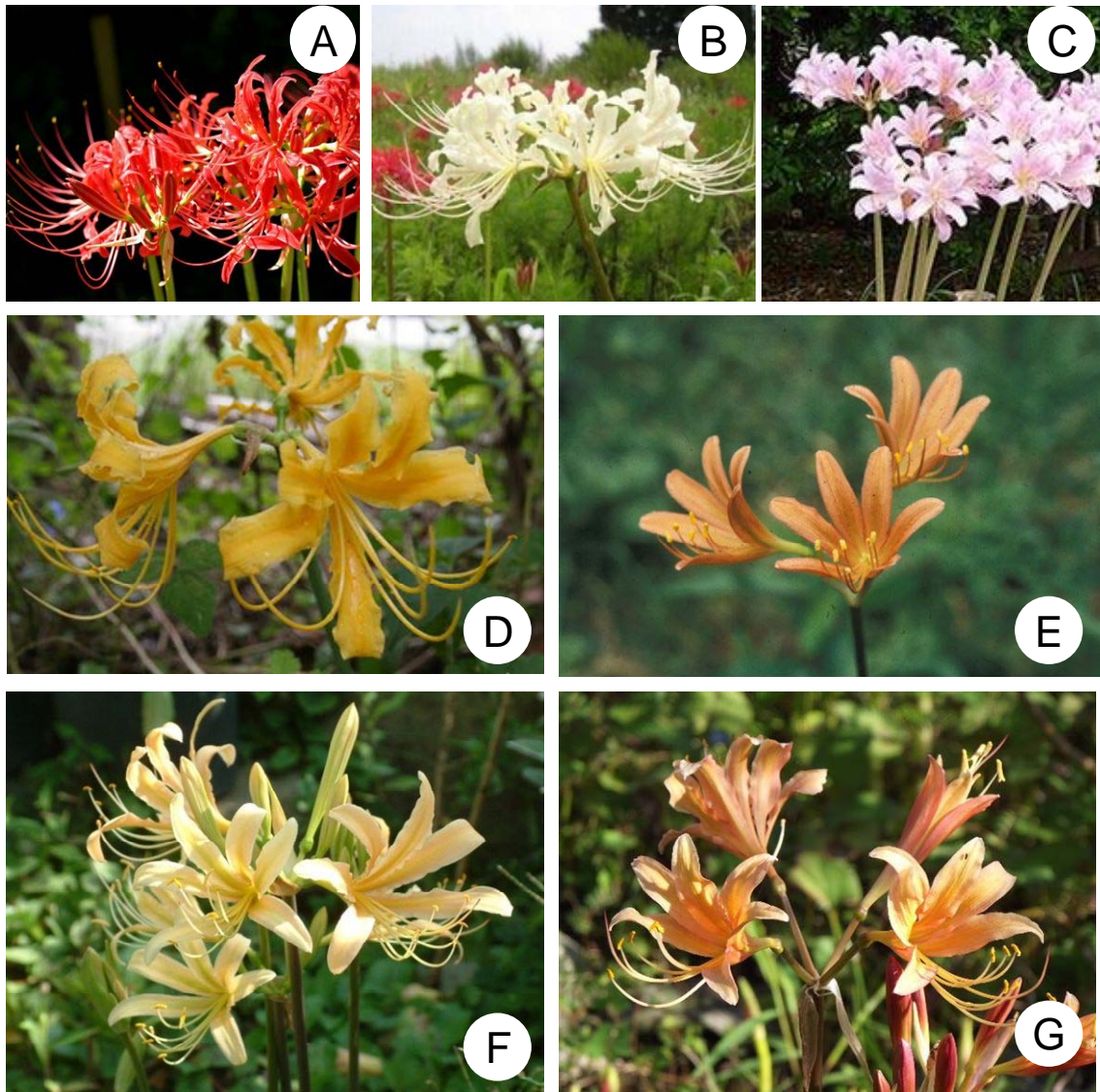


Fig. 1-1-1 Characteristics of *Lycoris* species in Kagoshima, Japan.

A; *L. radiata* ($2n=33$), B; *L. albiflora* ($2n=17$), C; *L. squamigera* ($2n=27$),
D; *L. traubii* ($2n=13$), E; *L. sanguinea* ($2n=22$), F; *L. sp. A* ($2n=17$), G; *L.*
sp. B ($2n=18$)

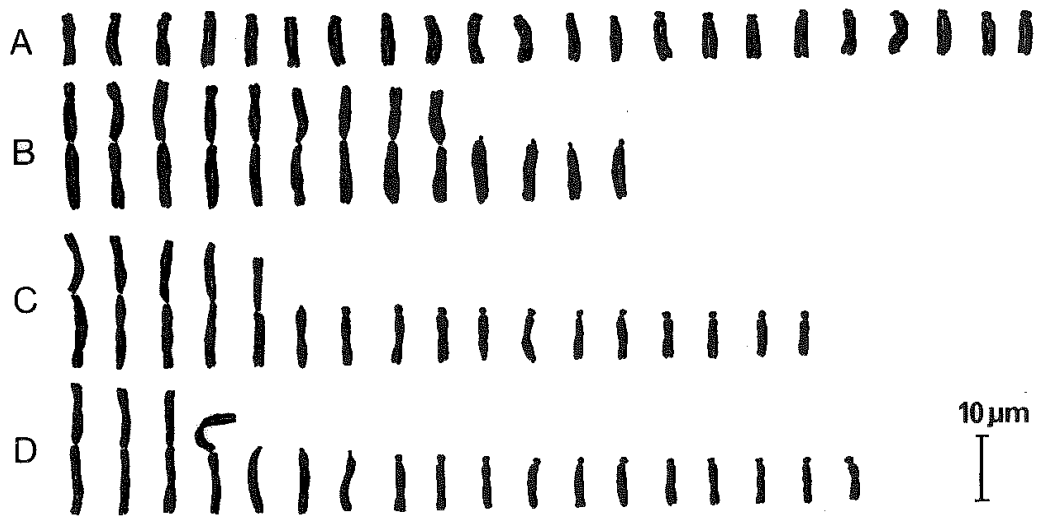


Fig. 1-1-2 Serial arrangement of the somatic chromosomes at metaphase of *Lycoris* species.

A; *L. sanguinea* (autumn flowering type. $2n=22=22R$). B; *L. traubii* ($2n=13=9V+4R$), C; *L. sp. A* ($2n=17=5V+12R$), D; *L. sp. B* ($2n=18=4V+14R$)

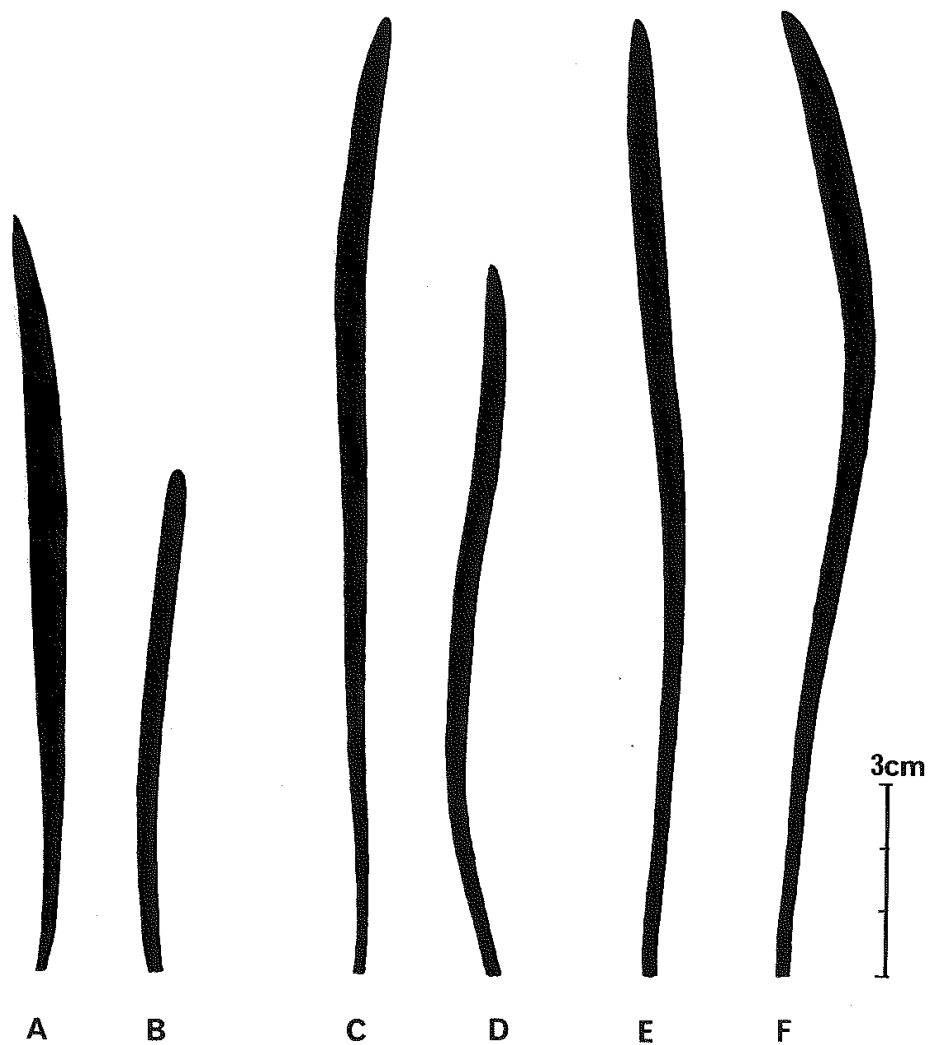


Fig. 1-1-3 Comparison of leaf shapes among seedlings of *L. traubii*, *L. sanguinea* and their inter-specific hybrids.

A; *L. traubii* ($2n=13$), B; *L. sanguinea* ($2n=22$), C; *L. traubii* \times *L. sanguinea* ($2n=17$), D; *L. traubii* \times *L. sanguinea* ($2n=18$), E; *L. sanguinea* \times *L. traubii* ($2n=17$), F; *L. sanguinea* \times *L. traubii* ($2n=18$).

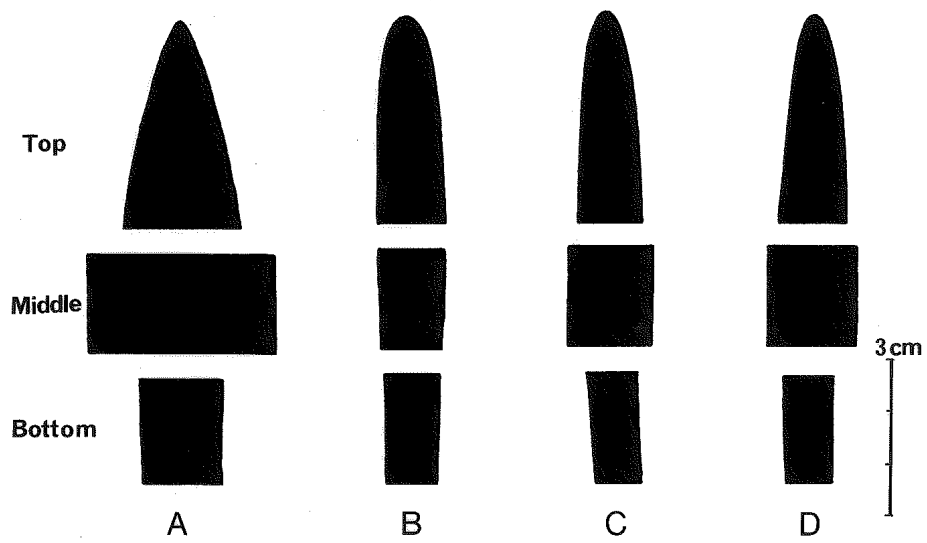


Fig. 1-1-4 Comparison of leaf shapes among the flowering-size plants of *L. traubii*, *L. sanguinea* and *L. sp. A* and *B*.

A; *L. traubii*, *B*; *L. sanguinea*, *C*; *L. sp. A*, *D*; *L. sp. B*.

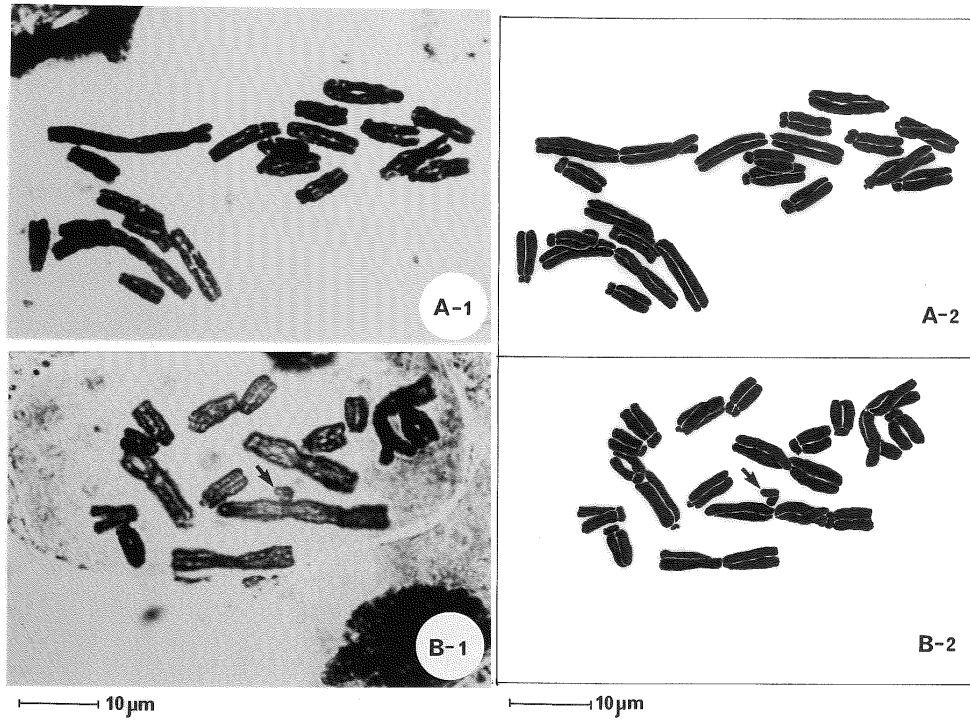


Fig. 1-1-5 Photomicrograph of the somatic chromosomes in root tip cell of inter-specific hybrids (*L. traubii* × *L. sanguinea*).

A-1,2; $2n=18=4V+14R$, B-1,2; $2n=18=4V+13R+1r$. Arrow indicates very small rod-shaped chromosome.

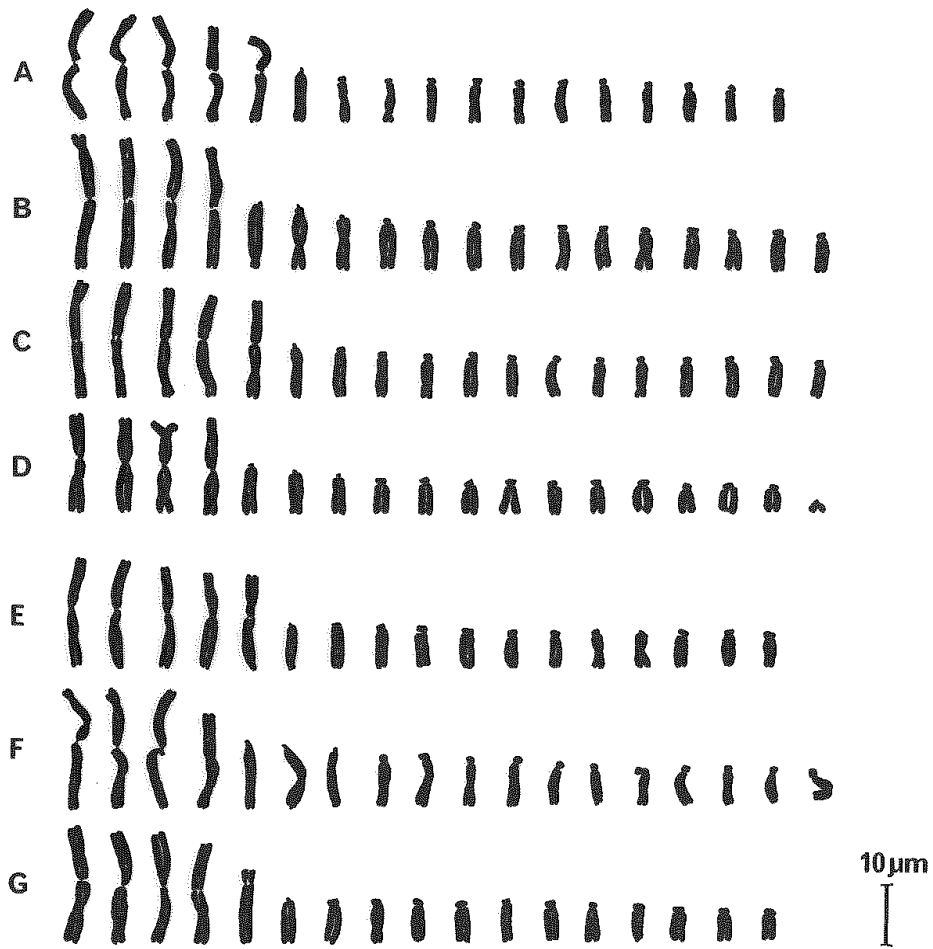


Fig. 1-1-6 Serial arrangement of the somatic chromosomes at metaphase of hybrids between *L. sanguinea* and *L. traubii*.

A-D; *L. traubii* × *L. sanguinea*, E-G; *L. sanguinea* × *L. traubii*.

A; $2n=17=5V+12R$, B; $2n=18=4V+14R$, C; $2n=18=5V+13R$, D;

$2n=18=4V+13R+1r$, E; $2n=17=5V+12R$, F; $2n=18=4V+14R$, G;

$2n=17=4V+1v+12R$.



Fig. 1-1-7 Geographical distribution of *L. sanguinea* and *L. traubii* on the island of Kyushu.

■; *L. sanguinea* (summer flowering type), □; *L. sanguinea* (autumn flowering type), ●; *L. traubii*.
 a; Sagara village in Kumamoto prefecture, b; Takachiho town in Miyazaki prefecture, c; Kagoshima city in Kagoshima prefecture, d; Chiran town in Kagoshima prefecture, e; Yamagawa town in Kagoshima prefecture.

Table 1-1-1. Chromosome number and karyotype of *Lycoris*.

Species and hybrids	2n	Karyotype	No. of seedlings examined
<i>L. sanguinea</i>	22	22R ^z	-
<i>L. traubii</i>	13	9V ^y + 4R	-
<i>L. sp. A</i>	17	5V + 12R	-
<i>L. sp. B</i>	18	4V + 14R	-
	17	5V + 12R	5
<i>L. traubii</i> ×	18	4V + 14R	3
<i>L. sanguinea</i>	18	5V + 13R	1
	18	4V + 13R + r ^x	2
	17	5V + 12R	11
<i>L. sanguinea</i> ×	18	4V + 14R	1
<i>L. traubii</i>	18	4V + v ^w + 12R	2

^z R = rod shaped (telocentric and acrocentric) chromosome,

^y V = metacentric and submetacentric chromosome,

^x r = very small rod-shaped chromosome,

^w v = metacentric chromosome partially deleted.

Table 1-1-2. Result obtained by intra- and inter-specific hybridization.

Combination	No. of pollinated flowers	No. of fructified flowers (%)	No. of seeds obtained	No. of hybrid seedlings germinated
<i>L. traubii</i> self (2n=13)	16	12 (75.0)	78	-
<i>L. sanguinea</i> self (2n=22)	9	8 (88.9)	26	-
<i>L. traubii</i> × <i>L. sanguinea</i>	150	11 (7.3)	11	11
<i>L. sanguinea</i> × <i>L. traubii</i>	93	28 (30.1)	28	21

Table 1-1-3. Comparison of the morphological characteristics among *Lycoris* species and their F₁ hybrids.

Characters	<i>L. traubii</i>	<i>L. sanguinea</i> (autumnal)	<i>L. sp.</i>		<i>L. traubii</i> × <i>L. sanguinea</i>	<i>L. sanguinea</i> × <i>L. traubii</i>
			A: (2n=17)	B: (2n=18)		
Leaf:						
Emergence	early-mid. Oct.	early-mid. Jan.	mid. Oct.	mid. Oct.	mid. Oct.	mid. Oct.
Texture of surface	glossy	glaucous	glaucous	glaucous	glaucous	glaucous
Shape of apex	acute	obtuse	attenuate	attenuate	attenuate	attenuate
Length/ width ratio:						
seedlings ^z	18.1 ± 3.1	21.9	-	-	28.1 ± 1.4	30.8 ± 2.7
flowering-size plant	18.6 ± 2.1	21.4 ± 3.5	31.1 ± 1.8	28.4 ± 1.7	-	-
Flowers:						
Colour of perianth (R.H.S.C.C.) ^y	saffron yellow (21-C)	vermilion (41-A)	straw-coloured (14-C)	vermilion (41-B)	-	-

^z three-years old,

^y The Royal Horticultural Society Color Chart.

第2章 種苗増殖における組織培養法の改良とバイオテック育種への応用

栄養繁殖性作物ではウイルスフリー化や優良系統の種苗供給を目的として、茎頂培養による増殖が行われており、組織培養関連産業において増殖の効率や安定化は種苗生産コストに直接結びつく重要な課題である（大澤，1994）。また、遺伝子組み換えや変異誘発等バイオテクノロジーを用いた研究開発や品種育成においても、組織培養の効率化や安定化は成功に導く重要な課題といえる。ところが、組織培養において再生植物が培養容器中で水分過多となり水浸状化を呈する場合は数多く認められ、その多くは正常な生育を示さず順化が困難で、培養効率の低下につながっている。また、栄養系のクローン増殖を行う上で、変異やキメラの発生は生産する種苗の品質に関わることから、安定した培養系の作出が必要である。本章では、栄養繁殖作物を対象として、非病原性の細菌を用いた水浸状化回避による組織培養法の改善と育種への応用、ならびにキメラ発生回避について論じた。

現在、バイオテクノロジーは遺伝子・タンパク質・酵素レベルへと深化・融合し、医学・薬学・工学といった様々な分野で応用が図られている。農学分野においても機能解析や遺伝子診断等への応用が図られ、環境や育種部門での実用化や生産現場での活用が行われている。このような実用化や活用を図る上で、組織培養の効率化や安定化はその基盤となる。

本章では、まず、多糖類産生の非病原性細菌を利用した組織培養の効率化と安定化を目的として、ATCC（The American Type Culture Collection）から複数の菌種を選択し、水浸状化回避機能を検証した。次に、接種した細菌の植物体内における定着性と持続性について、植物体内の残存性による確認と水浸状化回避機能を指標に検証を行った。さらに、宿主範囲の汎用性として、科の異なる植物種を用い

てその機能を検証し、植物組織培養産業での実用性を検討した。一方、多糖類産生の非病原性細菌という点で共通する、*Agrobacterium* を用いた遺伝子組み換えの栄養繁殖性木本植物への適用を通して育種場面での活用について併せて検討した。

第1節 多糖類産生土壌細菌によるオレガノ組織培養における 水浸状化制御法

水浸状化（ヴィトリフィケーション）は、組織培養による植物のクローン増殖を行う際の生理的な障害となっている（Debergh ら, 1992; Hakkarrt・Versluijs 1983; Kevers ら, 1984）。水浸状化した植物は、膨張し肉厚となり、半透明で脆くなりやすい特徴がある。Kevers ら（1984）は、この生理的な異常が、植物体内の水分過剰に起因し、組織の葉緑素欠乏や木質化の低下を引き起こすと報告している。このように組織培養中の水浸状化は、培養植物の順化や生育の障害となることから、再生効率低下の原因と言われる（Bottcher ら, 1988; Phan・LeTouze, 1983; Sato ら, 1993; Shetty ら, 1995; Zimmerman・Cobb, 1989）。組織培養中の水浸状化を回避し、クローン増殖における効率や品質を向上させる方策として、培地中の糖質濃度の増加（Rugini, 1986; Zimmerman・Cobb, 1989）、培養中の照度変更（Sutter・Langhans, 1979）、ゲル化剤濃度の改変（Bornman・Vogelmann, 1984; Debergh ら, 1981; Zimmerman・Cobb, 1989）、培養湿度の低減（Bottcher ら, 1988）、および Bacto Peptone やその分子量別の添加（Sato ら, 1993）により改善が検討されたが、その効果は限定的で有効な対策には至らなかった。

Shetty ら（1995; 1996a, b）は、オレガノ（*Origanum vulgare*）の試験管内培養から水浸状化を回避する多糖類産生の特異的な細菌（*Pseudomonas* sp.）を単離した。この *Pseudomonas* sp. を接種するこ

とにより，組織培養により栄養系で増殖し，クローン化した複数系統のオレガノに対して，10～15日後には水浸状化を回避することが可能で，接種後の植物体は，水浸状化した植物体と比較して，水分含量が低下し，葉緑素およびポリフェノール含量が増加して正常な生育を示した．そして，この *Pseudomonas* sp.-接種法による水浸状化の回避率は90%以上となり，オレガノの複数系統でその効果を確認できた．この手法を用いることで，栄養繁殖作物の優良系統を効率よく大量に増殖することが可能となり，クローン増殖植物の順化効率やその後の生育向上に有効であると考えられた．

このように，この *Pseudomonas* sp. とオレガノの特定系統を用いて，植物と根圏微生物（細菌類）の水浸状回避効果が検証された (Shetty ら, 1995; 1996a, b)．そこで，本試験では，アメリカのジーンバンクから多糖類産生の非病原細菌を入手し，これまでの報告に基づいて水浸状化の回避効果を比較することにより，菌種の選定と水浸状化の回避効果を検証した．

材料および方法

1 供試した細菌系統

本試験で供試するため，以下の細菌系統をアメリカジーンバンク (ATCC: The American Type Culture Collection, Rockville, Md.) から入手した．これらの系統はいずれも土壌から単離された菌体外に多糖類を産生する細菌類である．

- *Pseudomonas mucidolens* ATCC 4685,
- *Pseudomonas* sp. strain ATCC 31461,
- *Pseudomonas stutzeri* ATCC 31258,
- *Beijerinckia indica* ATCC 21423.

上記4系統にオレガノの水浸状化回避能力を示す *Pseudomonas* sp. strain F (Shetty ら, 1995) を対照として加え，実験に供した．また，*B. indica* は複合多糖類を産生する植物共生性の土壌細菌である．

これら *Pseudomonas* 属菌種は、菌体の消失を避けるため、NA (nutrient agar; Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) 培地もしくは YMA (yeast extract-mannitol agar; Golds ら, 1990) 培地で、*B. indica* は YMA 培地で 25°C, 48~60 時間培養後、5°C で冷蔵保存した。

2 オレガノの組織培養と菌の接種

本試験では、以前の試験 (Shetty ら, 1995) から得られたオレガノの培養系統 O-1 を用いて、種々の細菌類の効果を比較した。培養植物は、1 mg·L⁻¹ BAP (6-benzylaminopurine), 3% ショ糖, 0.3% ジェランガム (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) を含む MS 培地 (Murashige · Skoog 1962) で継代培養を行った。培地は pH 5.8 に調整後、121°C, 15 分間で加圧滅菌した。植物体を置床したシャーレは 20°C 連続光下 (40 μmol·m⁻²·s⁻¹) で培養した。

オレガノ O-1 系統は、30 日間隔で分枝したシュートを切り分け、継代培養することにより増殖と維持を行った。継代培養の 30 日後、オレガノ O-1 系統の分枝した茎頂部を含むシュートを切り取り、前述の 5°C で保存していた種々のバクテリアの菌体コロニーに切断した基部を接触させ、菌の接種を行った。接種したシュートは、1.5% のショ糖を含んだ 1/2 濃度の MS 培地に置床した。各処理は 1 シャーレあたり 7 つのシュートを置床し、4 反復で行った。そして、30 日間培養後に、水浸状化に関連する生理的な要素として、ポリフェノール、葉緑素、水分の含量および植物体の生育量を比較した。

3 水浸状化関連の生理的指標

水浸状化した培養植物体および細菌接種法により水浸状化を回避した培養植物体について、ポリフェノール含量、葉緑素含量、水分含量および新鮮重を測定した。

a. ポリフェノール含量

ポリフェノール含量は、Chandler · Dodds (1983) の方法により計測した。新鮮重約 50 mg の培養植物体を 2.5 ml の 95% エタノール

に浸漬し， -20°C で 48 時間保存後，各サンプルを Tissue Tearor (Biospec. Products, Racine, Wis.) で細断し， $13,000\text{ g}$ で 8 分間の遠心分離を行った．その上澄み 1 ml を試験管 ($16 \times 100\text{ mm}$) にとり， 1 ml の 95% エタノールと 5 ml の蒸留水を添加して攪拌し，各試験管に 0.5 ml の 50% フォリン試薬 (Folin-Ciocalteu reagent) を加え静置した．5 分後， 1 ml の 5% Na_2CO_3 を添加し，十分に攪拌した後，60 分間静置した．その混合液を 95% エタノールをブランクとして分光光度計 (Genesys spectrophotometer: Spectronic, Inc., Rochester, N.Y.) を用いて， 725 nm における吸光度を測定した．検量線は，測定時毎に 95% エタノールに溶解した様々な濃度の gallic acid の吸光度から新鮮重あたりのポリフェノール含量 ($\text{mg} / \text{g fresh weight}$) を算出し，乾物あたりの含量についてもあわせて算出した．

b. 葉緑素含量

総葉緑素含量は，Hipkins・Baker (1986) による分光光度法により測定した．培養植物から新鮮重約 50 mg の葉切片を 5-ml サンプル管にとり， 3 ml の 100% メタノールを加え，蒸散を防止するためラップでカバーして室温暗黒下で 2 時間抽出した．各サンプルは攪拌後，メタノール抽出液の吸光度 (650 nm , 665 nm) を測定した．総葉緑素量は，以下の式で示すようにメタノール 1 ml あたりの重量で算出した．

$$\text{総葉緑素} = 25.8 \times A_{650} + 4.0 \times A_{665} \ (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$$

さらに，葉緑素含量は，以下の式で示すように，各外植片の新鮮重 1 g あたりの量に換算した．

$$\text{葉緑素含量} = [(\text{葉緑素 } \mu\text{g} \cdot \text{メタノール ml}^{-1}) \times \text{メタノール } 3\text{ ml}] \cdot (\text{生重 g}^{-1}).$$

c. 水分含量と植物体の生育

水分含量は，重量測定済みの乾燥容器に，新鮮重 150 mg の培養植物をとり， 105°C で 2 時間乾燥後，デシケーター中で 30 分間冷却し，乾物重を測定した．さらに，1.5 時間後の乾燥容器の重量に変

化のないことを確認した。そして、以下の式により新鮮重 100 mg あたりの水分量として算出した。

$$\text{水分含量} = [(\text{生重} - \text{乾物重}) \cdot (\text{生重})^{-1}] \times 100 \text{ (mg)}$$

植物体の生育は、反復毎に総生体重を個体数で割り、1 個体あたりの重量で示した。

d. 順化にともなう評価

以下の手順で培養植物の順化能力を検定した。

細菌接種の 30 日後、水浸状化したものおよび細菌接種法により水浸状化を回避したシュートについて、ホルモンフリーの 1/2 濃度の MS 培地に移植し、発根させた。30 日後、発根した植物体はパーミキュライトに移植し、高湿度 (100%) 状態を維持するため透明プラスチックで覆った。5 日後、穴の開いたプラスチック・カバーと取り替え、さらに 2 日間被覆した後、カバーを完全に取り除いた。その後、植物体は 25°C、湿度 80% で 16 時間日長下の温室に類似した室内環境に置いた。

順化は各処理ごとに 7~15 個体を供試し、各シュートの水浸状化数を目視により確認するとともに、順化の 1 週もしくは 3 週間後、湿度環境の変化において生存している個体数を計測した。加えて、各植物体の生育量を 5 段階 (枯死, 停滞, 生育小, 中, 大: -, ±, +, ++, +++) で評価した。

結果および考察

細菌接種法により細菌を接種後の植物体の状態は、葉が暗緑色で不透明になり、剛性があるのに対して、無処理区では、脆く、徒長し、ガラス質で淡緑色であり、無処理区の葉緑素含量は、Keversら (1984) および Shettyら (1995) が報告した $600 \sim 700 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ の水浸状化を示す低葉緑素レベルと同程度であった (Table 2-1-1)。また、全ての細菌接種処理区で、植物組織中の水分含量は無処理区より低下した (Table 2-1-1)。 *P. mucidolens* と *P. sp. strain ATCC 31461* 接

種区では, *P. stutzeri*, *B. indica*, もしくはオレガノから単離した *P. sp. strain F* より植物組織中の水分含量の低下程度は少なかった. Kevers ら (1984) および Shetty ら (1995) は, この水分含量の低下が, 水浸状化を回避した植物の順化率向上に必須であると述べている. さらに, 植物組織中の水分過剰は水浸状化した組織を示す一つの指標であり, 木質部におけるリグニン合成レベルの低下に関連することを示すとともに, 異常な水分過多を生じ, 結果的に脆くなることを示唆した.

Pseudomonas mucidolens, *P. sp. strain ATCC 31461*, および *P. stutzeri* を接種したオレガノのポリフェノール含量は, 新鮮重ベースで無接種区の 1.8 mg/g から 2.6~2.8 mg/g となり, 増加が認められた (Table 2-1-1). そして, *P. sp. strain F* および *B. indica* を接種した植物の 30 日後のポリフェノール含量は, 4.6~4.8 mg·g⁻¹ となり他の処理区より高かった (Table 2-1-1). Shetty ら (1995) が *P. sp. strain F* を接種した際のポリフェノール含量は, 無接種区で 7.0 mg·g⁻¹, 接種区では 10.2 mg·g⁻¹ であり, そのレベルと比較すると本実験のポリフェノールレベルは低かったものの, 前報 (Shetty ら, 1996a) と同様に接種によるポリフェノール含量の増加が認められた.

一方, *P. mucidolens*, *P. sp. strain F*, および *B. indica* 接種区のポリフェノール含量は, *P. sp. strain ATCC 31461* および *P. stutzeri* 接種区より, 乾物重ベースで有意に向上した (Table 2-1-1). この結果は, 全般に水浸状化を回避した状態でオレガノのポリフェノール含量が向上するという従来の報告 (Kevers ら, 1984; Shetty ら, 1996a) と一致するものであった. これら種々の多糖類産生細菌と関連するポリフェノール合成量の増加は, Darvill · Albersheim (1984) および Ebel (1986) が報告したエリシター法により植物における二次代謝産物合成が増加する事象と類似している. また, Kevers ら (1984)

が示唆したように、本実験の結果は水浸状化を回避した組織におけるリグニン合成に必要なポリフェノール代謝の転流制御と関与していると推察される。

細菌を接種した植物体の葉緑素含量は、未接種区より増加し、*P. mucidolens*, *P. sp. strain ATCC 31461*, および *P. sp. strain F* 接種区の葉緑素含量は、*P. stutzeri* および *B. indica* 接種区より高かった (Table 2-1-1)。葉緑素含量の増加は、光合成能力の向上につながることから、生長促進およびストレス耐性に関与し、順化後の生存率の向上に結びつくことを示している (Table 2-1-2)。一方、未接種区の場合、低葉緑素含量や高水分含量が IAA (インドール酢酸) 等の植物ホルモンレベルの上昇を引き起こした可能性が考えられ、ここで観察されたような徒長を伴ったことを示唆している。さらに、ポリフェノールやリグニン合成に対する代謝産物の転流を減少させ、その結果、茎が脆くなり、木質部組織の保水力の低下に至るものと考えられる。従来報告では、低葉緑素レベルが水浸状化した組織と関連しており (Bottcher ら, 1988; Kevers ら, 1984; Shetty ら, 1995), 本実験の細菌を接種した全処理区で葉緑素含量の増加が認められたことは、水浸状化における傾向に相反する結果として現れた。

Pseudomonas sp. strain F (Shetty ら, 1996a) のような多糖類産生細菌は、水浸状化を回避する一方で、植物体の生育も抑制した。しかしながら、*P. mucidolens* および *P. sp. strain ATCC 31461* を接種した植物体の生育は、その抑制程度がより少なかった (Table 2-1-1)。ここで用いた細菌は、いずれも接種により植物体の生育を抑制したが、それは節間が短くなることに起因しており、腋芽の分枝による増殖効率は未接種区と同程度であった。このように、生育量に関わらず、次の継代培養の際に、切り分ける分枝数や節数から判断して、多糖類産生の *P. mucidolens* や *P. sp. strain ATCC 31461* を接種した場合、*P. sp. strain F* 接種と同様に、十分な増殖効率と水浸状化を回

避する効果があることを示している。多くの場合、*P. mucidolens* および *P. sp. strain ATCC 31461* を接種すると、植物体の生育や節間伸長の抑制が *P. sp. strain F* 接種より穏やかで、植物体の培養が容易になることから、より効果的といえる。したがって、組織培養で大量増殖を行っている企業等においても、*P. mucidolens* や *P. sp. strain ATCC 31461* などの菌種は、水浸状化を減少させ増殖の最適化が可能となることから、目視による緑色の変化と生育の抑制程度は、菌種を選定する上での効果的な指標となると考えられた。

順化実験から、*P. mucidolens*, *P. sp. strain ATCC 31461*, および *P. sp. strain F* の接種は水浸状化を抑制し、植物体の活性を促進することから、効果的であった (Table 2-1-2)。これらの細菌接種により、他種の培養植物で行うような一般的な温室等の条件下で、培養容器外の環境に容易に順応でき、過大な環境制御を行う必要のないことが示された (Fig. 2-1-1)。これらの結果は、環境に対する植物の順化能力が、細菌の接種と密接に関与していることから、培養環境下の植物は、外的環境に効率的に順応するため、このような有益な細菌を必要とし、無菌植物では生育活性やストレス耐性が低下することを示唆している。

水浸状化を回避するため、前述のように様々な手法が試行されてきたが、簡便さに加え、既存の施設や培養条件の変更が必要ないこと、および水浸状化回避効率の安定性から、細菌接種法が最も効果的といえる。また、本実験で供試した細菌種では、*P. sp. strain F* で得られた結果 (Shetty ら, 1995)と同様の効果が得られ、その効果の持続性や接種植物の培養中に培地にしみ出す細菌の様相から、細菌の定着性が確認された。特に、*P. mucidolens* もしくは *P. sp. strain ATCC 31461* を接種した培養植物は、接種した菌の定着性が確認され、生育の減少は 40~50%にすぎなかった (Table 2-1-1) ことに加え、未接種区と同数の節数が得られることにより、増殖率の減少は認め

られない。さらに、このオレガノと細菌の相互関係は、水浸状化の基礎的なメカニズムを解析する有用な手段として重要であり、*P. sp. strain F* における報告 (Shetty ら, 1995; Shetty ら, 1996a) と同様、水浸状化の回避と多糖類が密接に関与していることが複数の菌種で示された。

このように、菌接種による生育抑制にみられるデメリットは、増殖率を考慮することで解決でき、水浸状化回避によりストレス耐性や順化効率の向上が期待できることから、非病原性の多糖類産生細菌を用いる細菌接種法は、水浸状化の問題を解決する有効な手段といえる。今後、この細菌接種法の適用範囲の拡大や実用化を検討するにあたり、本実験で良い結果をもたらした *P. mucidolens*, *P. sp. strain ATCC 31461* および *P. sp. strain F* 等を用いる予定である。なお、組織培養による増殖で水浸状化が重大な問題で、順化率の向上が求められているラズベリーについては、本章の第3節でその詳細を検討した。

第2節 再接種不要の細菌による水浸状化制御法の検証

Shetty ら (1995) は、オレガノの培養植物に対する *P. sp. strain F* の接種により水浸状化を回避する方法を開発するとともに、これらの効果が、多糖類産生性と密接に関与していることを明らかにした (Shetty ら, 1996a, b). さらに前節では、数種の多糖類産生土壌細菌を用いて、水浸状化の回避とその効果を検証し、菌種の適用拡大に向けた検討を行った。その結果、これらの多糖類産生細菌を接種することにより、オレガノの培養植物では接種後 10~15 日程度で水浸状化を回避し、植物体が正常化するとともに、順化効率が向上し、優良系統の増殖体系に活用可能であることを示した。

本節では、前節で行った非病原性多糖類産生細菌類の接種による水浸状化の回避効果が、再接種を行わずに長期間の継代培養で維持されることを確認するとともに、細菌の植物体内における定着性を検証した。これにより、継代培養毎に再接種する必要がなくなることから、実用化での増殖体系に大きな利益をもたらすことが期待される。さらに、培養植物の生育や増殖率を考慮することにより、実用化を想定した細菌接種法の検証を行った。

材料および方法

1 供試した細菌系統

第2章第1節に準じる。

2 オレガノの組織培養と菌の接種および接種した培養植物の維持

第2章第1節に準じて行い、接種後の植物体は、維持・増殖のため、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP, 3% ショ糖, 0.3% ジェランガムを含む MS 培地 (以下 MS-BAP 培地) で継代培養を行った。

各処理には、反復として 10 個体置床したシャーレを少なくとも 6 枚ずつ用いた。30 日後、生育し増殖した植物体について、水浸状化に関連する生理的な要素として、ポリフェノール、葉緑素、水分の

含量および植物体の生育量を比較した。接種した植物体は、1 回目の増殖後、再接種を行わずに MS-BAP 培地で継代培養し、30 日間隔で 8 回まで継続した。そして、水浸状化に関連する生理因子を各回の継代時に測定するとともに、未接種区についても同様の継代培養を行い、比較対照とした。また、5～8 回の継代培養後、細菌の培養で用いられる YMA 培地 (Golds ら, 1990) 上に継代する培養植物のシュートを置床し、培養物から細菌がしみ出すことにより細菌の存在と定着性を確認した。

3 水浸状化関連の生理的指標

水浸状化した培養植物体および細菌接種法により水浸状化を回避した培養植物体について、第 2 章第 1 節と同様に、ポリフェノール含量、葉緑素濃度、含水量および生重を比較した。なお、得られた結果は、独立した 3 サンプルの平均値で示した。

a. ポリフェノール含量

第 2 章第 1 節に準じた方法で行った。

b. 葉緑素含量

第 2 章第 1 節に準じた方法で行った。

c. 水分含量と植物体の生育

第 2 章第 1 節に準じた方法で行った。

d. 順化にともなう評価

第 2 章第 1 節に準じ、培養植物の順化能力を検定した。継代培養の 30 日後、水浸状化したものと細菌接種法により水浸状化を回避した個体の両方を、発根培地としてホルモンを含まない 1/2 濃度の MS 培地に置床した。15 日後、発根率と根長を測定し、バーミキュライトへ移植した培養植物は、室温で 16 時間日長、湿度 85～90% の条件で順化した。

順化 10 日後、培養から容器外へ移した環境変化の中で生存している植物体の数を計測し、各個体の根長と生育量を 5 段階 (根長：発

根なし， 3 mm 以下， 3～6 mm， 6 mm 以上；生育量：枯死， 停滞， 生育小， 中， 大：-, ±, +, ++, +++）で評価した。

結果および考察

接種後の植物体は， 多回数の継代培養後でも， 再接種なしで水浸状化の回避が可能であった。これらの植物体は， 暗緑色で不透明となったのに対して (Fig. 2-2-1a-c)， 未接種の対照区では， 植物体が脆く徒長し， ガラス質で淡緑色を呈しており (Fig. 2-2-1d)， 水浸状化に特徴的な外観を呈していた。7回および8回の継代培養した植物体について， 水浸状化関連因子の解析を行った。その結果， 全ての細菌接種処理区で， 継代回数に関わらず， 未接種の対照区と比較して水分含量が低下していた (Table 2-2-1)。

接種区のオレガノ培養植物におけるポリフェノール含量は， *P. stutzeri* を除き， 新鮮重ベースで明らかに上昇し， 乾物重ベースでも *P. stutzeri* を除き， ポリフェノール含量の有意な増加が認められた (Table 2-2-2)。

接種後再接種を行わずに7回・8回の継代培養した植物体の葉緑素含量は， 未接種の対照区と比較して高くなった。ポリフェノール含量と同様， 全ての接種区で継代培養中の植物体における葉緑素濃度は， 未接種区より高く， *P. stutzeri* 接種区を除き， 乾物重ベースでも接種区の葉緑素濃度は， 有意に向上した (Table 2-2-3)。

植物体の生育を調査した結果， 再接種なしで8回の継代培養後， 全ての接種区で新鮮重と乾物重の両方が減少した (Table 2-2-4)。このように生育が抑制された一方で， 30日培養後の展開葉数は， いずれの接種区においても未接種の対照区と同程度で， 生育量の減少は， 節間伸長の抑制に起因していた (Fig. 2-2-1a-c)。組織培養による増殖は腋芽の分枝により行うことから， 節数すなわち展開葉数が変化しないことは， 増殖率が変わらないことを示している。また， 未接種の対照区の植物体は， 継代培養で植物体を切り分ける際に， 葉や

茎が脆く壊れやすいのに対して、接種区から得られた植物体は、ピンセットで挟んだ際に茎が折れることはなく、物理的強度が増していた。

5～8回の継代培養後、植物体を細菌用の YMA 培地に置床し、切断した茎の基部から菌体が生み出すことにより接種菌の存在を確認した。*P. stutzeri* 接種区では、継代培養した一部の植物体で、水浸状化の状態に戻る個体が認められ、このような個体は、YMA 培地に置床した際、細菌の増殖がないことから、植物体内の細菌密度が低下していると考えられた。

本実験で、接種区と未接種の対照区における順化 10 日後の生存率は、それぞれ 95% 以上と 85% となり、処理区の差は認められるものの、70% の割合で水浸状化個体を含む未接種区でも高い生存率を示した (Table 2-2-5)。Shetty ら (1995) の報告では、接種区と未接種区で水浸状化していない正常個体の割合は、それぞれ 90% 以上と 50% 以下となり、順化 1 週間後の生存率は、正常個体の割合と一致していた。この生存率の違いは、順化環境が湿度 85%～90% の夏期の高湿時期であったことによるものと推察された。一方、*B. indica* 接種区では、再接種なしの長期継代培養によっても、十分な発根が得られず、植物の生育は抑制された (Table 2-2-5)。

以上のように、従来の研究結果 (Shetty ら, 1995, 1996a) と同様、細菌接種法で水浸状化を回避することが可能であり、複数の菌種で再接種なしに長期間同様の状態を維持することが可能であった。また、水浸状化していない正常個体では、植物体の水分含量の減少が特徴的に認められること (Kevers ら, 1984; Shetty ら, 1995)、水浸状化を回避する過程で、ポリフェノール合成が促進されるという従来の報告 (Kevers ら, 1984; Shetty ら, 1995)、さらに、葉緑素含量の増加と順化率が向上すること (Shetty ら, 1995) などの点で一致する結果が得られた。加えて、植物体の生育は、8 回の継代培養で

抑制されたが、培養期間中の展開葉数に変化がないことから、分枝による増殖に用いる節数は減少せず、増殖率は低下しなかった。そして、このような水浸状回避に関わる葉緑素濃度やポリフェノール含量、植物体の生育量、および発根率等で菌種により差が認められ、その安定性や持続性から *P. mucidolens* および *P. sp. strain F* の接種が効果的であった。

このように、*P. mucidolens* や *P. sp. strain F* のような多糖類産生細菌を一回接種することで、再接種することなしに継代培養で維持され、水浸状化を回避し、順化率が向上することから、組織培養による種苗生産現場に実用上有効であることが示された。

さらに、水浸状化を回避した植物体組織において、高濃度のポリフェノール含量とパーオキシダーゼ活性は密接に関連し(Phan・LeTouze, 1983)、種々の多糖類産生細菌類の接種によるポリフェノール合成の増加は、エリシターとしての刺激による植物体内における二次代謝産物の合成を促進すること(Darvill・Albersheim, 1984; Ebel, 1986; Dixon・Lamb, 1990)、そして、これらのことが水浸状化した植物体のリグニン合成とポリフェノール代謝制御に関与していること(Keversら, 1984)が報告されている。本試験においても、細菌の接種により水浸状化を回避した植物体は、ポリフェノール含量が増加し、茎や葉の剛性が強化されリグニン合成の促進に結びつくことが示された。このことは、二次代謝産物や細菌の産生する多糖類のエリシター効果によるものと推察され、耐病性や環境耐性に結びつくエリシター効果を導くような菌種を選抜することにより、実用化に向けた活用が期待される。

なお、YMA培地上の植物体から接種した細菌がしみ出すことにより、接種した細菌の植物体内における定着性と長期間の持続的な存在を確認した。Perryら(1998)は、細菌が残存する植物体を抗生物質で処理し除菌することにより、水浸状化が再現することを確認し、

細菌の存在と水浸状化が密接に関連することを検証した。

今後、接種した細菌類の定着性や安定性を明らかにするためには、接種した細菌の植物体中における組織部位別の分布状況を細胞学的に確認するとともに、順化後一般栽培における定着持続性の確認が必要であると考えられた。

第3節 ラズベリーの組織培養における種苗増殖への水浸状化制御法の応用

前節で数種の多糖類産生土壌細菌を用いた，水浸状化の回避とその効果を検証するとともに，再接種を行わずに長期間の継代培養で細菌とその効果が維持されることを確認した。

本節では，従来の研究結果から水浸状化回避効果が確認されている *Pseudomonas* sp. strain F (Shetty ら, 1995; Shetty ら, 1996a) を用いて，商業ベースで生産販売されている4系統のラズベリーに対する水浸状化抑制効果を検証し，この非病原性細菌接種法の組織培養産業における種苗増殖や木本性植物種に対する適用範囲の拡大について検討した。

材料および方法

1 供試した細菌系統

オレガノの水浸状化回避能力を示す *Pseudomonas* sp. strain F (Shetty ら, 1995) を実験に供した。この *Pseudomonas* 属菌種は YMA 培地 (Golds ら, 1990) で 25 °C, 48~60 時間培養後，5 °C で冷蔵保存した。

2 ラズベリーの組織培養

本実験に供試したラズベリー (*Rubus* sp.) は，ノースファーム社 (Nourse Farms, Inc. Whatley, MA) が増殖販売している4系統 (CDH-92, GEL-20, Heritage および JCR-FL) を用いた。培養植物は，1 mg·L⁻¹ BAP (benzylaminopurine), 3% ショ糖，および 0.3% ジェランガム (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) を含む MS 培地 (Murashige · Skoog 1962) で継代培養を行った。培地は pH 5.8 に調整後，121°C 15 分間加圧滅菌した。培地を入れたシャーレに，4枚の展開葉をつけたシュートを1個体として7個体ずつ置床し，25°C，16時間日長下 (40 μmol·m⁻²·s⁻¹) で培養した。継代培養を行った30日後，置床し

た植物体は，腋芽が伸長し複数のシュートが多芽状に増殖した．これらのラズベリー培養系統は，30日間隔で分枝した腋芽を切り分け，継代培養することにより維持した．そして，継代培養時の切り分けたシュートを接種材料として用いた．

3 ラズベリー培養植物に対する細菌の接種

細菌の接種は，YMA培地（Goldsら，1990）で培養し，5℃で保存していた *P. sp. strain F* の菌体コロニーに，継代培養時に切り分けたシュートの茎切断部を接触させ，菌の接種を行った．接種後のシュートは，1.5% ショ糖を含む 1/2 濃度の MS 培地に置床した．各処理は 1 シャーレあたり 7 個体の接種後のシュートを置床し，各系統および処理ごとに 4 シャーレを用い反復とした．また，ラズベリーにおける細菌接種法を確立するため，最初の接種処理を行った 4 系統は，再接種なしに 30 日間隔で 5 回以上の継代培養を行った．そして，各培養系統の接種区および未接種の対照区の植物体について，水浸状化に関連する生理的な要素として，ポリフェノール，葉緑素，水分の含量および植物体の生育量を測定した．

4 水浸状化関連の生理的指標

30 日間隔で 5 回の継代培養を行い，*P. sp. strain F* 接種後の培養植物体および未接種の対照区の培養植物体について，ポリフェノール含量，葉緑素含量，水分含量および新鮮重を比較した．なお，得られた結果は，独立した 3 サンプルの平均値と標準偏差で示し，少なくとも 2 回の試験を繰り返した．

a. ポリフェノール含量

第 2 章第 1 節に準じた方法で行った．

b. 葉緑素含量

第 2 章第 1 節に準じた方法で行った．

c. 水分含量

接種区および未接種区の 4 培養系統の植物体は，1/2 MS で継代培

養を行い，初回の 30 日後，および菌を再接種せずに 30 日間隔で 5 回の継代培養後，植物体の水分含量を測定した．なお，測定方法は第 2 章第 1 節に準じて行った．

d. 順化にともなう湿度環境の変化における評価

接種 30 日後，未接種の対照区および接種区の 4 培養系統の植物体は，再接種を行わずに 1/2 MS ホルモンフリー培地に継代培養した．30 日間隔で継代培養を行い，3 回目の継代培養の 2 週間後，培養植物は，バーミキュライトへ移植し，透明プラスチックで覆い湿度を保持した．7 日後，40 cm×40 cm のカバーに直径 1 cm の穴が 9 個開いたプラスチック・カバーに取り替え，2 日後にカバーを取り除いた．順化植物は，室温，16 時間日長条件下で維持した．

順化の 1 週間後および 7 週間後，湿度環境の変化の中で生存している植物体の数を計測した．さらに，各植物体の活性を 5 段階（生育量無，微，小，中，大：-, ±, +, ++, +++）で評価した．

結果および考察

本節では，オレガノから単離した *P. sp. strain F* (Shetty ら, 1995) を用いて，ラズベリーの培養増殖系統に対する水浸状化回避効果を検証した．これまでの研究結果から，オレガノの接種後の植物体は，暗緑色で不透明になり，剛性があるのに対して，未接種の対照は脆く徒長し，淡緑色を呈しており (Shetty ら, 1995)，葉緑素レベルが低いことが水浸状化の特徴とされた (Kevers ら, 1984)．オレガノと異なり，ここで供試した 4 系統のラズベリーの接種区の植物体は，未接種の対照区と比較して，形態的に顕著な変化が認められず，栄養系統の Heritage では，葉色についても変化が認められなかった．しかしながら，栄養系統 Heritage を除いて，未接種の対照区の葉や葉柄は，接種区より徒長し，ガラス化しており，淡緑色を呈していた．そこで，葉色の濃淡を指標に水浸状化率を調査した結果，栄養繁殖系統 CDH-92 および GEL-20 では，接種区で水浸状化率は減少した

ものの、水浸状化率が低い栄養繁殖系統 Heritage および JCR-FL では、接種による水浸状化回避効果は判然としなかった (Table 2-3-1). 順化試験において *P. sp. strain F* が水浸状化の回避に効果的に働くことが明らかとなり、栄養繁殖系統 CDH-92, GEL-20 および部分的ではあるが JCR-FL についても順化植物の順化 7 週後の生存率が向上した (Fig. 2-3-1, Table 2-3-1). これらの結果は、水浸状化と生存率の間に、密接な逆相関関係があることを示している。そして、多くの培養植物では一般的に順化に温室等で多くの環境制御を必要とする (Kevers ら, 1984; Debergh ら, 1992) のに対して、細菌接種法は外的環境に容易に順応できることを示している。

これまでオレガノの試験結果から、接種後の植物体は含水率が減少するとともにポリフェノール含量や葉緑素濃度も対照区より高くなった。ラズベリーの場、接種 30 日後の初期段階では GEL-20 および Heritage 系統の水分含量は減少したものの、他の系統は水分含量の減少は認められなかった (Table 2-3-2). それに対して、再接種なしに 30 日間隔で 5 回継代培養後では、処理区全ての系統で、未接種の対照区より水分含量が減少した (Table 2-3-2). 以上のことから、本実験で供試した全ての系統で、未接種区の植物体と比較して細菌接種法を適用した植物体の水分含量の減少が認められた。

このように、オレガノと比較してラズベリーの培養系統の場合、*Pseudomonas* に対する反応は緩行的であることから、水浸状化回避の観察のためには、再接種を行わない長期間の継代培養が必要と考えられた。そこで、再接種なしに 30 日間隔で 3 回継代培養し、順化試験と同時期の接種 2 か月半後の培養植物について、ポリフェノールと葉緑素の含量を調査した。その結果、CDH-92 の葉緑素濃度に変化は認められないものの、他の系統では処理区全ての植物体で、ポリフェノール含量と葉緑素濃度の上昇を確認した (Table 2-3-2).

ラズベリーで観察された様々な水浸状化回避に関連するポリフェノール合成の増加は、植物における二次代謝産物の合成を促進するエリシター法の例(Darvill・Albersheim, 1984; Ebel, 1980; Dixon・Lamb, 1990; Dixon・Paiva 1995)と類似している。このことは、水浸状化していない組織のリグニン合成に必要な、ポリフェノール産物の生合成制御(Keversら, 1984; Keversら, 1987)と関連しているものと考えられた。

高い葉緑素濃度は、生育の増進やストレス耐性および順化効率の向上に寄与する光合成効率の促進に関連していることを示している(Table 2-3-1, 2-3-2)。未接種の対照区における低葉緑素濃度と高水分含量は、オーキシンやサイトカイニンなど植物ホルモンの生理的なアンバランスから生じる結果であり、そのことが徒長を引き起こすものと考えられる。さらにこれにより、リグニン合成に向かう他の芳香族代謝産物の流動を抑制し、その結果、葉や葉柄が脆くなり、木質部組織の水分許容量の減少につながると考えられる。従来の研究結果も、低葉緑素濃度と水浸状化組織との関連を示しており(Keversら, 1984; Bottcherら, 1988; Shettyら, 1995)、本試験で得られた結果は、このような植物における生合成系と機能発現の関連性を同様に示唆するものであった。

以上のように、細菌接種法は組織培養によって育成された植物体の活力や順応力およびストレス耐性の増強に結びつくことが示された。また、非無菌培養や組織培養における生育強化に対する既報の見解(Herman 1990; Frommelら, 1991; Pillay・Nowak 1997)を支持するものであり、植物と根圏もしくは植物体内に共生する細菌の役割や機能の解析に利用できる可能性がある。さらに、本実験では、商業ベースで生産されているラズベリーの栄養繁殖4系統で細菌接種法の効果を実証できたことから、種苗増殖産業における実用的な活用も十分に期待できる結果であった。

第4節 シャクナゲの遺伝子組み換え技術の開発

Rhododendron 属（ツツジ科ツツジ属）は、園芸的に常緑性や落葉性ツツジ、さらには有鱗片や無鱗片シャクナゲに大別され、数百を越える種が存在する (Arisumi 1989). また、その中でも *R. arboreum*, *R. catawbiense*, *R. ponticum*, *R. wardii*, および *R. yakushimanum* などの種間交雑により育成された無鱗片シャクナゲは、いずれも園芸的な観賞価値が高く、観賞花木として高く評価されてきた (Arisumi 1989). 無鱗片シャクナゲは、矮性のこのような灌木から、大きな高木などいろいろな樹形とともに、白から濃赤色や濃紫色までの濃淡と、黄色、オレンジ、ピンク、藤色そして紫までの様々な範囲の色合いを美しい花房を形成する (Arisumi 1989). このように、常緑性ツツジとともに無鱗片シャクナゲは、観賞用花木の中で最も重要なグループのひとつと言える。

木本類の一般的な品種改良は、これらの生育周期が長いことから、長期間を要する。近年では、外来遺伝子を他植物へ導入する手法 (Jefferson ら, 1987) が多くの植物で確立され、短期間で遺伝的な特性の改変が可能となってきた。また、いくつかの木本性植物で遺伝子組み換えの成功例が報告されているが、観賞用花木類における報告はわずかにすぎない (Bajaj, 1999).

Rhododendron 属植物の組織培養により、葉片 (Fordham ら, 1982; Iapichino ら, 1992), カルス (Economou ら, 1987; Harbage・Stimart 1987), 花芽 (Meyer 1982), および子房 (Dai ら, 1987) から植物体が得られている。本試験の目的は、観賞価値の高いシャクナゲの栄養繁殖系品種における遺伝子組み換え技術の確立で、遺伝子導入により花色や草姿、もしくは耐干性や耐暑性等の環境変動に対する耐性の改変に対する可能性を含めて検討した。

シャクナゲの遺伝子組み換え技術については、著者や他の報告

(Pavingerová ら, 1997) があり, 本実験では *Agrobacterium* の共存培養から遺伝子組み換え植物を再生し, 導入遺伝子の発現を確認した.

材料および方法

1 供試材料および培養法

本試験では屋久島シャクナゲ (*R. yakushmanum* Nakai) の交配品種として知られている ‘Percy Wiseman’ を供試した. 供試植物は茎頂培養によって無菌化し, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Zea (zeatin), 1.5% ショ糖, 0.2% ジェランガム (Wako Chemicals Co., Osaka, Japan) を含むアンダーソン培地 (Anderson 1984) で継代培養を行い栄養系として維持した. 培地は pH 5.0 に調整後, 121°C 15 分間加圧滅菌した. これらの栄養系は 25°C , 16 時間日長下 ($35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) で培養した.

2 不定芽誘導培養

不定芽誘導のため, 5 mm 長に切断した無菌植物のシュートを不定芽誘導培地 ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Zea を含むアンダーソン培地) に置床した. 培養 2 か月後, 葉身, 葉柄, もしくは茎の培地に接した部分は, 肥大し葉身は厚く, 葉柄や茎は太くなった. その肥厚組織を新しい不定芽誘導培地に移植した. 1~2 か月後, その肥厚組織は不定芽を形成し, 植物体が再生した.

3 供試した細菌系統

遺伝子導入のためのバクテリアとして, pBI121 (Jefferson ら, 1987) を組み込んだ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Hoekema ら, 1983) 系統を用いた. なお, pBI121 は CaMV-35S プロモーター (cauliflower mosaic virus-35S promoter) と NOS ターミネーター (nopaline synthase terminator) により発現制御された GUS (β -glucuronidase) 遺伝子と NOS プロモーターおよび NOS ターミネーターにより制御された NPTII (neomycin phosphotransferase II) 遺伝子が連動している (Jefferson ら, 1987).

4 共存培養

A. tumefaciens strain LBA4404/pBI121 を $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulfate, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ rifampicin および $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycin sulfate を含む 2 ml YEB 培地 (Vervliet ら, 1975) により 29°C で 1 昼夜培養し, 5,000 rpm, 5 分間の遠心分離によりバクテリアを回収した. バクテリアのペレットは $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zea と $100 \mu\text{M}$ acetosyringon を含むアンダーソン培地に再懸濁し, バクテリアの濃度は $5\times 10^8 \text{ CFU}\cdot\text{ml}^{-1}$ に調整した. 不定芽誘導のため前培養し, Zea 誘導により得られた肥厚組織 (4 mm^2) をバクテリアを含む懸濁培地に 30 分間浸漬した. その後, 接種部を菌液から取り出し余分な菌液を滅菌濾紙で拭き取り, $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zea と $100 \mu\text{M}$ acetosyringon を含むアンダーソン共存培養培地上に置床した.

5 選抜と植物体再生

Kanamycin 感受性試験は, $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zea と $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulfate を含むアンダーソン培地に, 前培養により得られた葉および茎の肥厚組織を置床し, 1 か月後の生存状態から判定した.

4 日間の共存培養後, 接種した肥厚部分を選抜培地 ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zea, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulfate および $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ carbenicillin を含むアンダーソン培地) に移し, 2 週間ごとに新しい選抜培地に継代した. 2 か月後, 不定芽形成を始めた接種部を再生選抜培地 ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zea, $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulfate および $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ carbenicillin を含むアンダーソン培地) に移した. さらにその 2 か月後, 不定芽を形成した接種部は, 不定芽からのシュート伸長のため, ゼアチン濃度を $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ にした再生培地に移植した. 1~2 cm に伸長したシュートは基部から切断し, 発根培地 (塩類を 1/10 濃度に調整した MS 培地 (Murashige · Skoog, 1962) に $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA (indole-3-butyric acid), $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulfate, 0.7% agar を含む) に移植した.

6 ゲノム DNA の抽出

培養植物の組織を液体窒素で冷却し、乳鉢で粉砕した。粉砕物を 10 ml の洗浄液 (0.1 M HEPES pH 8.0, 0.1% PVP, 4% 2-mercaptoethanol) (Takagi ら, 1993) を入れた 15 ml 遠心管に移し、攪拌後 15,000 rpm で 5 分間遠心分離し、洗浄・回収を行った。その後、沈殿物に新しい洗浄液を加え再懸濁し、遠心洗浄する操作を 3 回繰り返して、ポリフェノールおよび多糖類を除去した。洗浄後の沈殿物から SDS 抽出法 (Honda・Hirai, 1990) によりゲノム DNA を抽出した。

7 PCR による解析

PCR (Polymerase chain reaction) 解析により GUS 遺伝子と NPTII 遺伝子の導入を確認した。反応液には 10 ng DNA, 200 μ M dNTPs, 0.5 μ M の各 primer, 1.0 unit の Taq polymerase (Promega), 2 mM の Mg^{2+} , および Taq polymerase buffer (Promega) を加えた。サンプルは 94°C, 5 分加熱後, 94°C; 1 分, 58°C; 2 分, 72°C; 3 分の反応を 30 回繰り返した。PCR 産物は, ethidium bromide 染色によるアガロースゲル電気泳動により分離した。GUS 遺伝子のプライマーは, GUS 遺伝子の塩基配列 300-319 と NOS ターミネーター遺伝子の塩基配列 1850-1871 位置を設計し, そのシーケンスはそれぞれ 5'-ATG TTA CGT CCT GTA GAA AC-3' (Jefferson ら, 1986) および 3'-GCA AGT TTG TAA ACC GTT ATT T-5' (Bevan ら, 1983) とした。NPTII 遺伝子のプライマーは, NPTII 遺伝子の塩基配列 151-174 および 922-945 位置とし, そのシーケンスはそれぞれ 5'-ATG ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC-3' および 3'-GCG GAA GAA CTG CTC AAG AAG ACT-5' (Beck ら, 1982) とした。

8 サザン解析

ゲノム DNA を制限酵素 *Bam*HI と *Eco*RI で切断し, 電気泳動により分離した後, ナイロンメンブレン (Amersham's Hybond N+) に転

写した。そして、サザン解析は NPTII 遺伝子と GUS 遺伝子断片をプローブとして行った。NPTII 遺伝子のプローブは、35S-NPTII/pUC18 プラスミド遺伝子カセット (Kosugi ら, 未発表) の 1.1 kb *Bam*HI 断片とし、GUS 遺伝子のプローブは pBI221 プラスミド遺伝子 (Jefferson ら, 1986) の 2.1 kb *Bam*HI-*Eco*RI 断片を用いた (Fig. 2-4-3)。これらのプローブをハイブリダイズした後、DIG ラベルし、CSPD 蛍光検出法 (Boehringer Mannheim) により解析した。

9 GUS 活性分析

再生植物の組織化学的 GUS 活性の解析は、Jefferson ら, (1987) の方法を改変した Murakami・Ohashi (1992) の方法により行った。再生植物の茎葉を 1 mM X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) と 5 mM DTT (dithiothreitol) を加えた 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 37°C, 12 時間浸漬し、GUS 活性を調査した。

また、GUS 活性は 4-MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) 分析法 (Kosugi ら, 1990) を改変し、THOSO HPLC システムを用いて FS-8010 蛍光検出器により定量した。

結 果

1 選 抜 と 植 物 体 の 再 生

100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulphate を含むアンダーソン培地に置床して 1 か月後、葉片由来の肥厚組織は褐変し枯死した。茎切片由来の肥厚組織は、徒長枝が得られるものの、抗生物質を含む培地上で白化し (Fig. 2-4-1 A)、不定芽の形成は認められなかった。

A. tumefaciens との共存培養を行い 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulphate を含む選抜培地で 2 か月選抜後、葉や茎の 120 組織片のうち 19 切片は表面に不定芽を形成した (Fig. 2-4-1 B)。枯死した組織片を除去した 19 不定芽のうち 9 芽は、kanamycin sulphate と 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zea を含むアンダーソン培地上で増殖し、多芽体を形成した (Fig. 2-4-1 B)。その多芽体から kanamycin sulphate と 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zea を含む培地上

で緑色を保ち、活発に増殖伸長する 6 個の独立した栄養系を選抜した (Fig. 2-4-1 C-D). そして、その 6 個の独立した栄養系から得られたシュートは、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulphate を含む 1/10 濃度の MS 発根培地で発根した (Fig. 2-4-1 E). 発根個体は、鉢上げ順化後、隔離温室へ移した (Fig. 2-4-1 F). これらの植物体は形態的に正常であった.

2 組み換え植物における NPTII 遺伝子および GUS 遺伝子の確認

植物体中の NPTII 遺伝子と GUS 遺伝子の確認は、PCR 法とサザン・ハイブリダイゼーション法により行った (Fig. 2-4-2, 2-4-3). NPTII 遺伝子特異的もしくは GUS 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行うことにより、制限酵素で処理しない pBI121 プラスミド遺伝子をテンプレートとして、0.8 kb および 1.9 kb の NPTII 遺伝子と GUS 遺伝子に該当する遺伝子断片が増幅された (Fig. 2-4-2, Lane 5). そして、組み換え植物の DNA をテンプレートとした場合も同様の PCR 産物が得られた. それに対して、非形質転換体の DNA を用いた場合、増幅産物は得られなかった.

サザン解析のため、LBA4404/ pBI121 を接種した組織片から得られた 2 個体についてゲノム DNA を抽出した. 抽出したゲノム DNA は、*EcoRI-BamHI* により制限酵素処理し、2.1 kb の GUS 遺伝子断片が供試した 2 個体の組み換え植物から検出され (Fig. 2-4-3B, Lane 2, 3), 5-6 kb の NPTII 遺伝子断片が検出された (Fig. 2-4-3 A, Lane 2, 3). しかしながら、1 個体については他にサイズの異なる NPTII 遺伝子断片が 2 本検出され (Fig. 2-4-3 A, Lane 2), この組み換え体は 3 コピーの NPTII 遺伝子を含んでいることが示唆された. また、LBA4404/ pBI121 から対応するシグナルとして、Fig. 2-4-3 A に示されたサイズの遺伝子断片が反応することはないことから、残存する *Agrobacterium* によるものではないことが示された.

3 GUS 遺伝子の発現解析

形質転換体における GUS 活性の検出として、X-gluc 染色による組み換え植物の茎葉および根における組織化学的な GUS 遺伝子の発現を解析した。35S プロモーターにより GUS 遺伝子は葉、茎および根といった全ての組織で発現した (Fig. 2-4-4 A-D)。CaMV 35S プロモーターは、多くの植物種における組み換え植物の恒常的な外来遺伝子発現プロモーターとして広く用いられており、シャクナゲにおける遺伝子発現は、CaMV 35S プロモーターにより制御された GUS 遺伝子が、植物体の全身で恒常的に発現する典型的な発現パターン (Jefferson ら, 1987) と一致していた。

4-MUG 分析法により、CaMV 35S プロモーターによる GUS 遺伝子の発現活性を定量した。その結果、非形質転換体では検出限界以下であるのに対して、6 個の独立した組み換え体ではそれぞれに異なる GUS 活性を示した (Fig. 2-4-5)。また、その発現活性は、最も高い No. 2 組み換え体の $5.94 \text{ 4MU nmols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ から最も低い No. 6 組み換え体の $0.54 \text{ 4MU nmols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$ となり、組み換え体により発現レベルが 10 倍以上異なっていた (Fig. 2-4-5)。

考 察

本試験では、*Agrobacterium* 接種法によるシャクナゲの遺伝子組み換え技術の確立について論議した。当初共存培養に供試した 120 切片から 6 個体の独立した栄養体の組み換え植物が得られたものの、形質転換効率は 5%と低かった (Fig. 2-4-1)。しかし、ツツジ属における植物体再生技術は多くの種で確立されている (Dai ら, 1987; Economou ら, 1987; Fordham ら, 1982; Iapichino ら, 1992; Harbage · Stimart 1987; Meyer, 1982) ことから、本試験における遺伝子組み換え技術は、シャクナゲを含むツツジ属の遺伝的変異拡大の可能性を持ちあわせており、花色や形態的な特性改変の他、耐寒性や耐暑性等環境ストレスに対する適応性の改変に活用可能と考えられる。

ツツジ属植物における類似した遺伝子組み換え研究は、Pavingerováら (1997) が報告しており、ツツジ属の5品種についてのカナマイシン耐性植物の再生率は5.5~79.5%であり、本実験で得られた5%の形質転換効率より大幅に高かった。しかし、抗生物質耐性個体の獲得率が高い一方で、本試験で発生しなかったキメラの発生を認めている。これは、初期選抜の段階では本試験の1/5~1/2濃度のカナマイシンで選抜を行っており、非形質転換細胞が混入したものと考えられる。また、本試験で非形質転換体の腋芽は $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulfateを含む培地上で、白化するものの枯死せず伸長したこと (Fig. 2-4-1 A) から、茎頂分裂組織の形成後は低濃度のカナマイシンによる選抜は困難であることを示しており、形質転換細胞が混在するキメラ個体では、 $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kanamycin sulfateを含む培地上でも抗生物質耐性個体として生育できたものと推察された。そして、本実験では当初120切片から19切片で不定芽形成を確認し、高濃度のサイトカイニンを含む培地で多芽状の不定芽を長期間選抜することにより、最終的に6個の独立した形質転換体を得た (Fig. 2-4-1)。不定芽を形成した19切片にはキメラが混在していた可能性はあるものの、最終的に得られた6個の形質転換体にキメラが含まれていなかったことは、不定芽発生初期から抗生物質の選抜圧をかけ、多芽体形成と抗生物質耐性によりキメラを分離もしくは排除できたものと考えられた。

シロイヌナズナの形質転換では、遺伝子導入細胞の分離と固定のため、種子を経由する (鹿内 2009) が、栄養繁殖作物の中でも育種に長期を要する木本性植物において、種子を経由したキメラの分離法は適当とは言えない。また、Shinoyamaら (2002) は、キクの形質転換系において、葉片からの不定芽再生系の場合キメラの発生が多いため、形質転換細胞をカルスで選抜することにより安定した形質転換系を確立している。このようなキメラ発生の要因は、不定芽

形成が多細胞を起源とした再生系である（大澤，1988）ことに起因すると考えられるが，本試験や Pavingerová ら（1997）の報告はいずれも不定芽起源の植物体再生系を用いている．栄養繁殖作物でキメラが混入しない安定した形質転換系を確立するためには，本試験で示したように，遺伝子導入の初期段階から適正な選抜圧により非形質転換細胞の増殖を抑制し，多芽状に茎頂部位を増やすことによりキメラ状に混入した非形質転換細胞を分離もしくは排除する必要があると考えられた．

本実験で用いた GUS 遺伝子は CaMV 35S プロモーターによって制御されていることから，植物体の全身で遺伝子が発現することを確認した（Fig. 2-4-4）．また，遺伝子の発現活性は，形質転換体により 10 倍以上の差が認められた（Fig. 2-4-5）が，これは導入された遺伝子のコピー数が形質転換体により異なっていること（Fig. 2-4-3），もしくは異なる染色体に導入された遺伝子の位置効果によるものと考えられた．このように遺伝子の発現レベルが形質転換体により大きく異なることから，有用遺伝子の導入の際は，多数の形質転換体の中から目的にあった発現レベルの個体を選抜する必要があることが示された．

得られた遺伝子組み換え植物は，草丈 40 cm に生長し，花芽を形成し開花段階に至った（Fig. 2-4-6）．しかし，一定温度で管理する隔離温室では低温遭遇期間がなく，開花には至らなかった．今後，花器組織における遺伝子発現や稔性を調査するためには，花芽の休眠打破のための低温処理が必要と考えられた．

要 約

植物の組織培養中に問題となる水浸状化について，多糖類産生の非病原性細菌に着目し，水浸状化回避に効果を認めている *Pseudomonas* sp. strain F および ATCC 保有の菌株の中から *Pseudomonas* 属および *Beijerinckia* 属の 2 属 4 種の細菌について，細菌接種法による水浸状化回避の効果を解析した．これにより，オレガノから単離した *P.* sp. strain F と同様に，他の多糖類産生非病原性細菌において植物の水浸状化を回避する効果が認められ，多糖類産生性により菌種の選定が可能であることを示した．また，植物体に一度接種した細菌は，継代培養によって安定して保持され，植物の水浸状化の回避効果は長期間持続した．このことは，接種した非病原性細菌の植物体内における定着性と安定性を示すものであった．さらに，細菌接種法の適用範囲の拡大を目的に，*P.* sp. strain F を木本性栄養繁殖作物であるラズベリーに接種し，水浸状化回避効果を確認した．細菌接種によりラズベリーの栄養繁殖 4 系統は，水浸状化回避効果に差があるものの，接種した細菌は長期間の継代培養によって保持されるとともに，植物の順化率向上効果が認められた．これにより，細菌接種法の有効性に加え，植物組織培養産業における実用化の可能性が示された．これらのことから，植物の水浸状化回避の作用が，菌体外に産生する多糖類と密接に関係していることを示すとともに，オレガノから単離した菌株だけでなく，同様の特性を持った他の菌株も水浸状化回避に利用可能であること，これらの菌株が植物体内に定着し安定して保持されること，そしてこの方法が植物の科を越えた範囲で適用可能であることなど，細菌接種法は適用範囲が広く，実用化に向けた応用が可能であることを実証した．

Agrobacterium tumefaciens 接種法によりシャクナゲの遺伝子組み

換え植物を作出した。 *A. tumefaciens* は病原性を取り除いたバイナリーベクターによる NPTII と GUS 遺伝子の両方を併せ持つ系統で、シャクナゲの培養植物の茎葉部との共存培養を行った。接種の 3～4 か月後、カナマイシン選抜培地上で不定芽が形成され、植物体が再生した。 NPTII と GUS 遺伝子の導入は、PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法によって確認された。組織化学的な GUS 活性解析から、導入遺伝子は CaMV 35S プロモーターにより、全ての組織で恒常的に発現することが示された。ツツジ属における遺伝子組み換え技術の確立は、花色や形態的な特性改変の他、耐干性や耐暑性等環境ストレスに対する適応性の改変に活用可能と考えられた。

Table 2-1-1. Average water content in control and bacterially inoculated oregano shoot explants from clonal line O-1 30 days after treatment.

Treatment	ATCC No.	Total chlorophyll (mg/g [fresh wt] of tissue) mean (STD)		mg of water in 100 mg of tissue mean (STD)		Phenolics		Plant growth (biomass) (mg/replicate)		
						mg/g (fresh wt) of tissue mean (STD)	µg/g (dry wt) of tissue mean (STD)			
Control (No bacteria)		698	(56)	91.2	(0.9)	1.8	(0.1)	20.7	(1.3)	465
<i>Pseudomonas mucidolen</i>	4685	1,102	(42)	89.2	(0.4)	2.8	(0.2)	26.2	(1.9)	243
<i>Pseudomonas</i> sp.	31461	1,040	(59)	88.5	(0.8)	2.6	(0.2)	22.2	(1.3)	264
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	31258	888	(155)	84.2	(0.8)	2.8	(0.2)	17.7	(1.3)	159
<i>Beijerinikia indica</i>	21423	906	(41)	85.3	(0.7)	4.6	(0.2)	31.5	(1.1)	99
<i>Pseudomonas</i> sp. F	-	1,048	(35)	85.9	(1.0)	4.8	(0.5)	33.8	(3.7)	130

Table 2-1-2. Evaluation of normal development and acclimation in soil of control and bacterially inoculated oregano shoot explants of line O-1 60 days after treatment.

Treatment	ATCC No.	No. of explants	% of shoots hyperhydrated	% survival after acclimation		Plant vigor after 3 weeks of acclimation *
				1 week	3 weeks	
Control (No bacteria)		15	93	100	73	+
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	4685	15	0	100	93	+++
<i>Pseudomonas</i> sp.	31461	15	0	100	93	++
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	31258	15	46	100	93	++
<i>Beijerinikia indica</i>	21423	7	0	100	100	+
<i>Pseudomonas</i> sp. F	-	7	7	100	86	++

* Plant vigor; + low vigor; ++ midium; +++ high vigor. Each experiment had about 15 plants / clonal line / treatment.



Fig. 2-1-1. Surviving of oregano clone O-1 after 3 weeks acclimation following treatment with various bacterial species to reduce hyperhydricity.

Control, uninoculated control; a, *P. mucidolens*; b, *Pseudomonas* sp. strain ATCC 31461; c, *P. stutzeri*; d, *B. indica*; F, *Pseudomonas* sp. strain F. After bacterial treatment, the clones were enclosed with a transparent plastic cover for 1 week before sudden exposure to room temperature and humidity condition.

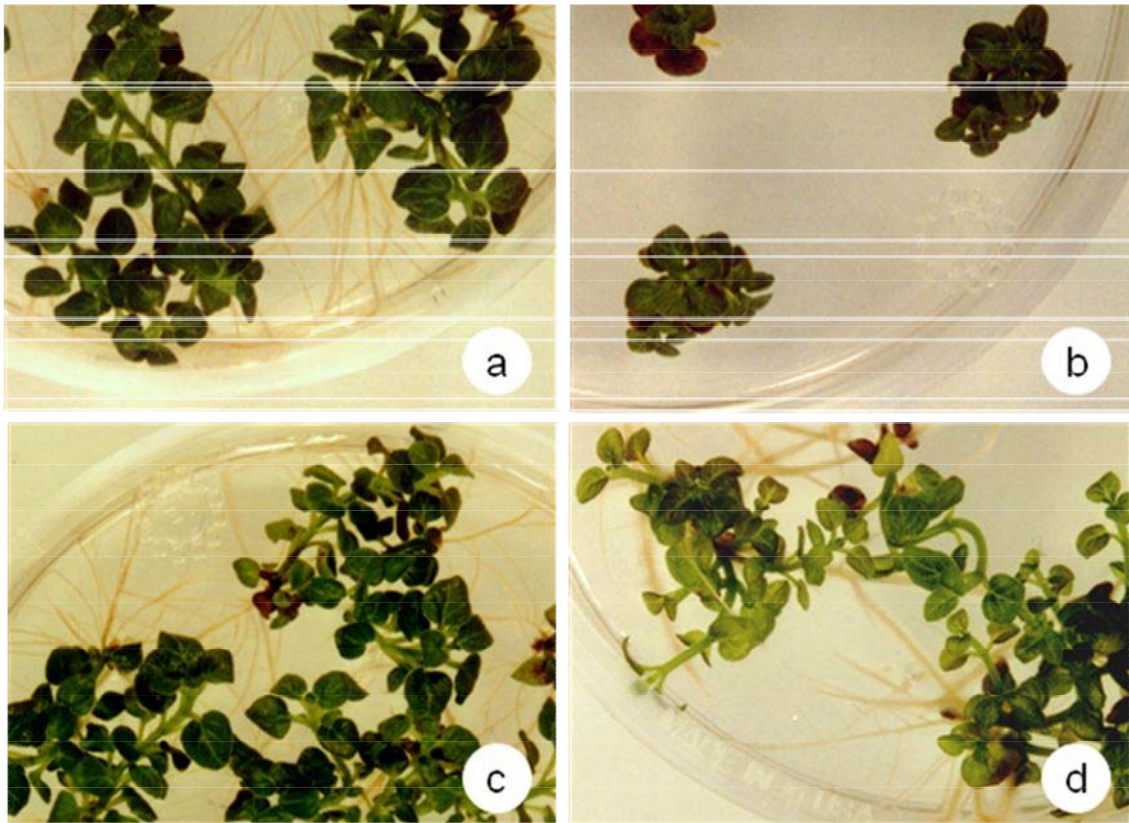


Fig. 2-2-1. Shoot growth of oregano clonal line O-1 on Murashige and Skoog medium / benzylaminopurine after the eighth 30-days subculture cycle without re-inoculation.

- a and after re-inoculation with *P. mucidolens*, b *B. indica*, c *Pseudomonas* sp. F.
- d un-inoculated control.

Table 2-2-1. Average water content in oregano (clonal line O-1) shoot explants after the seven and eight subcultures following inoculation with various bacterial species.

Treatment	Water in 100 mg tissue \pm [SD (mg)]*			
	7th cycle		8th cycle	
Control (No bacteria)	89.3	(0.1)	87.3	(1.7)
<i>P. mucidolens</i>	85.9	(1.1)	79.5	(0.7)
<i>Pseudomonas</i> sp.	83.0	(0.9)	77.7	(1.3)
<i>P. stutzeri</i>	84.3	(0.4)	80.4	(1.2)
<i>B. indica</i>	82.6	(0.5)	79.6	0.0
<i>Pseudomonas</i> sp. F	83.0	(0.3)	81.3	0.0

* Numbers in parantheses indicate standard deviation

Table 2-2-2. Average total phenolic content in oregano shoot explants after the seventh and eighth subcultured following inoculation with various bacterial species.

Treatment	Total phenolics			
	7th cycle		8th cycle	
	(mg/g FW)	(μ g/g DW)	(mg/g FW)	(μ g/g DW)
Control (No bacteria)	2.5 *1	23.6 *1	3.0 *1	23.3 *1
<i>P. mucidolens</i>	7.5 *4	52.8 *4	6.6 *4	32.2 *3
<i>Pseudomonas</i> sp.	7.2 *4	42.4 *3	6.6 *3,*4	29.8 *2,*3
<i>P. stutzeri</i>	3.5 *2	22.2 *1	4.2 *2	21.5 *1
<i>B. indica</i>	5.6 *3	32.2 *2	5.7 *3	27.9 *2
<i>Pseudomonas</i> sp. F	8.7 *4	51.3 *4	6.1 *3	32.6 *3

*1-*4 Means followed by the same superscripts are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple-range test. FW fresh weight, DW dry weight.

Table 2-2-3. Average total chlorophyll content in oregano shoot explants after the seventh and eighth subcultured following inoculation with various bacterial species.

Treatment	Total chlorophyll ($\mu\text{g/g}$ tissue)			
	7th cycle		8th cycle	
	FW	DW	FW	DW
Control (No bacteria)	593 *1	5.6 *1	709 *1	5.6 *1,*2
<i>P. mucidolens</i>	1,246 *3,*4	8.8 *3	1,326 *3	6.5 *3
<i>Pseudomonas</i> sp.	1,234 *3,*4	7.2 *2	1,340 *3	6.0 *2
<i>P. stutzeri</i>	937 *2	6.0 *1	912 *2	4.6 *1
<i>B. indica</i>	1,168 *3	6.7 *1,*2	1,434 *3	7.0 *3
<i>Pseudomonas</i> sp. F	1,367 *4	8.0 *2,*3	1,321 *3	7.0 *3

*1-*4 Means followed by the same superscripts are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple-range test. FW fresh weight, DW dry weight.

Table 2-2-4. Average plant growth of oregano shoot explants after the seventh and eighth subcultures following inoculation with various bacterial species.

Treatment	Plant growth (mg/plate)	
	7th cycle	8th cycle
	Control (No bacteria)	983 *3
<i>P. mucidolens</i>	253 *2	273 *3
<i>Pseudomonas</i> sp.	264 *2	198 *2
<i>P. stutzeri</i>	106 *1	237 *3
<i>B. indica</i>	122 *1	131 *1
<i>Pseudomonas</i> sp. F	271 *2	214 *2

*1-*4 Means followed by the same superscripts are not significantly different at the 5% level by Duncan's multiple-range test.

Table 2-2-5. Evaluation of normal plant development and acclimation in soil of multiple subcultured control oregano shoot explants from clonal line O-1 and of explants inoculated with various bacterial species, 15 days after growth on 50% Murashige and Skoog-hormone-free medium and being transferred to soil.

Treatment	No. of explants	% of hyper-hydricity	% of root formation (length)	% of survival (vigor) after 10 days acclimation
Control (No bacteria)	20	70	100 (+++)	85 (++)
<i>P. mucidolens</i>	20	0	85 (++)	100 (++)
<i>Pseudomonas</i> sp.	20	0	100 (+)	100 (+)
<i>P. stutzeri</i>	20	10	100 (+)	100 (++)
<i>B. indica</i>	20	0	10 (-)	95 (+)
<i>Pseudomonas</i> sp. F	20	0	100 (+)	100 (++)

Root length: - no root; + short (<3 mm); ++ medium (3-6 mm); +++ long (>6 mm).

Plant vigor: ± weak; + low vigor, ++ medium; +++ high vigor.

Table 2-3-1. Evaluation of normal plant development and acclimation in soil of control and *Pseudomonas* sp. F inoculated raspberry of four clonal lines, 2.5 months after treatment.

	Treatment	% hyper-hydrated shoot	% survival with 10 days	% survival after 7 weeks of exposure	Plant vigor* after 7 weeks of exposure
CDH-92	Control	42	83	50	+++
	Inoculated	0	100	100	+++
GEL-20	Control	44	88	56	++
	Inoculated	7	100	93	++
Heritage	Control	0	100	100	+
	Inoculated	0	100	100	++
JCR-FL	Control	21	100	71	++
	Inoculated	20	93	80	++

* Plant vigor; +- weak; + low vigor; ++ medium; +++ high vigor. Each experiment had about 15 plants / clonal line / treatment.

Table 2-3-2. Comparison of average water content, chlorophyll, and total phenolics in uninoculated control and inoculated raspberry explants from four cultivars with standard deviation in parentheses.

	Treatment	1 month* mg water in 100 mg tissue	5 months* mg water in 100 mg tissue	2.5 months* phenolics mg/g FW tissue	2.5 months* total chlorophyll µg/g FW tissue
CDH-92	Control	81.2 (1.1)	86.2 (0.4)	1.9 (0.6)	999 (124)
	Inoculated	80.7 (1.9)	82.5 (0.4)	4.4 (0.6)	979 (156)
GEL-20	Control	83.6 (0.9)	87.1 (0.7)	1.4 (0.2)	729 (203)
	Inoculated	77.4 (0.4)	80.9 (1.9)	2.5 (0.1)	1,483 (75)
Heritage	Control	85.0 (0.7)	85.6 (1.4)	2.4 (0.5)	840 (182)
	Inoculated	81.2 (2.6)	81.5 (0.6)	3.0 (0.4)	1,470 (159)
JCR-FL	Control	83.1 (0.7)	88.0 (0.2)	2.2 (0.1)	891 (171)
	Inoculated	83.5 (1.3)	83.4 (0.1)	3.3 (0.0)	1,113 (188)

* Months indicate the time on 1/2 MS (HF) medium with subculturing done every 30 d without any reinoculation

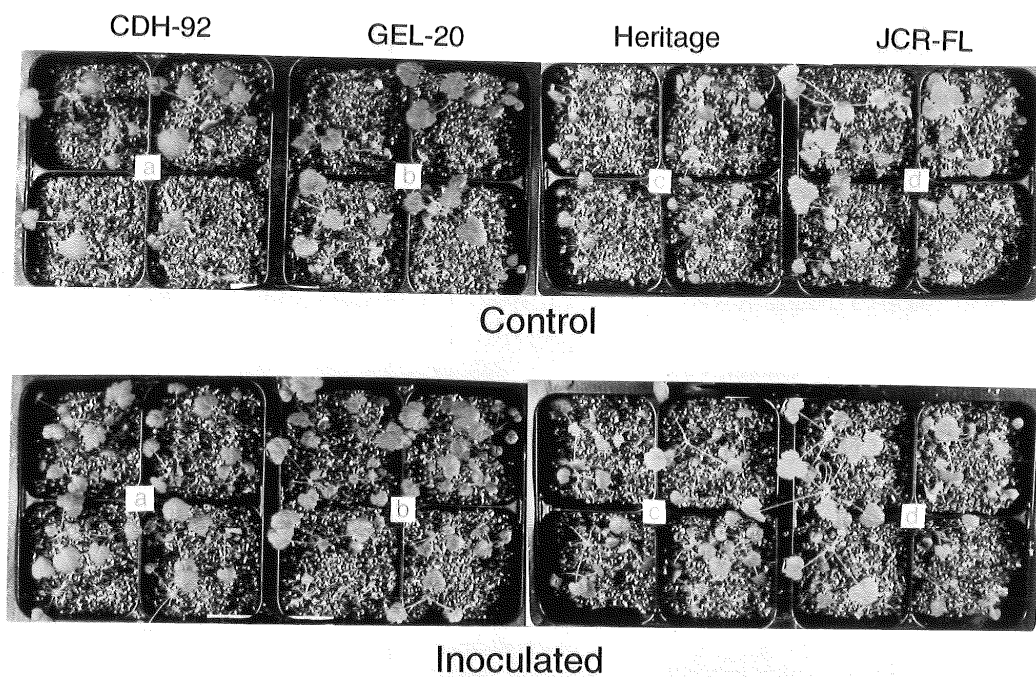


Fig. 2-3-1. Plant growth and vigor of raspberry four clonal lines after 3 weeks exposure.

Control; uninoculated control, inoculated; *Pseudomonas* sp. F strain inoculated clones. a; CDH-92, b; GEL-20, c; Heritage, d; JCR-FL.

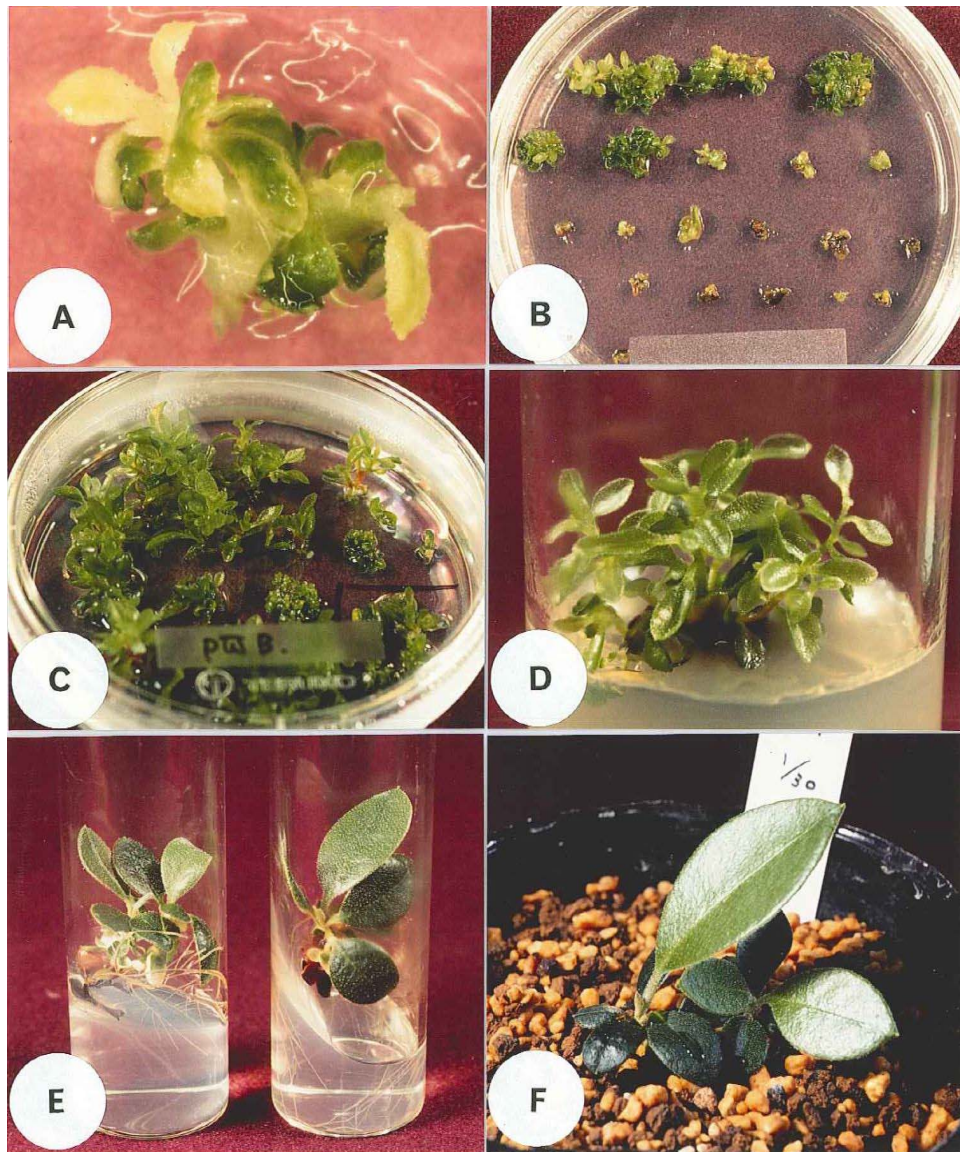


Fig. 2-4-1 Regeneration of transformed shoots and production of transgenic plants.

A Kanamycin selection at 100 $\mu\text{g/ml}$ (non-transformed shoot); **B** Adventitious bud formation on selection medium (Zea 5 mg/l); **C** Regeneration and shoot formation on selection medium (Zea 1 mg/l); **D** Elongation of kanamycin-resistant shoots (Zea 0.1 mg/l); **E** Rooted plants; **F** Transgenic plants established in the greenhouse.

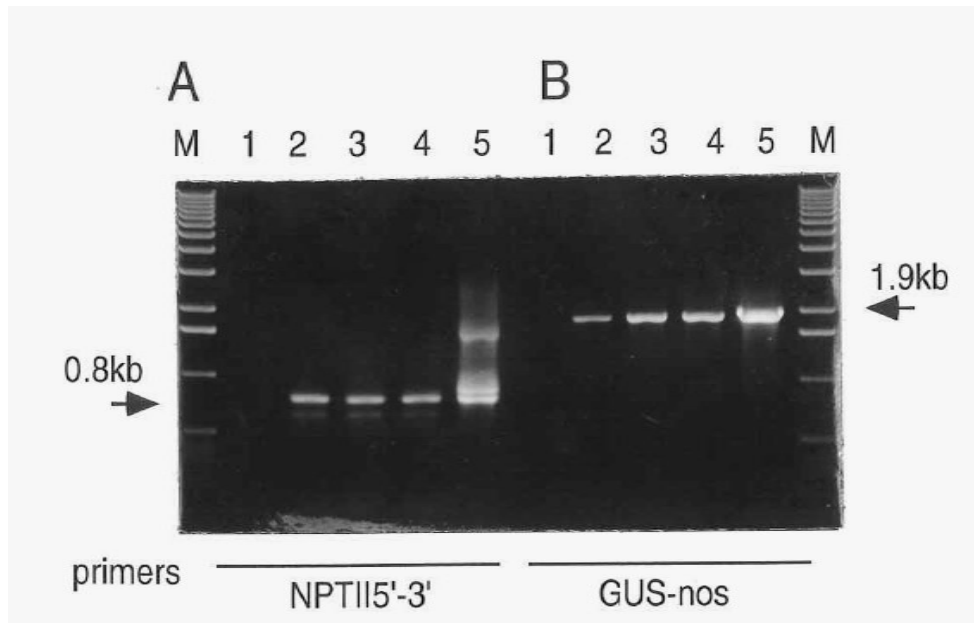


Fig. 2-4-2. PCR analysis of regenerated plants.

A: Detection of the NPTII gene. **B:** Detection of the GUS gene.

Lane M: 1kb ladder Marker. Lane 1: non-transformed control plant.

Lane 2-4: transformed plants with LBA4404/pBI121. Lane 5: plasmid pBI121.

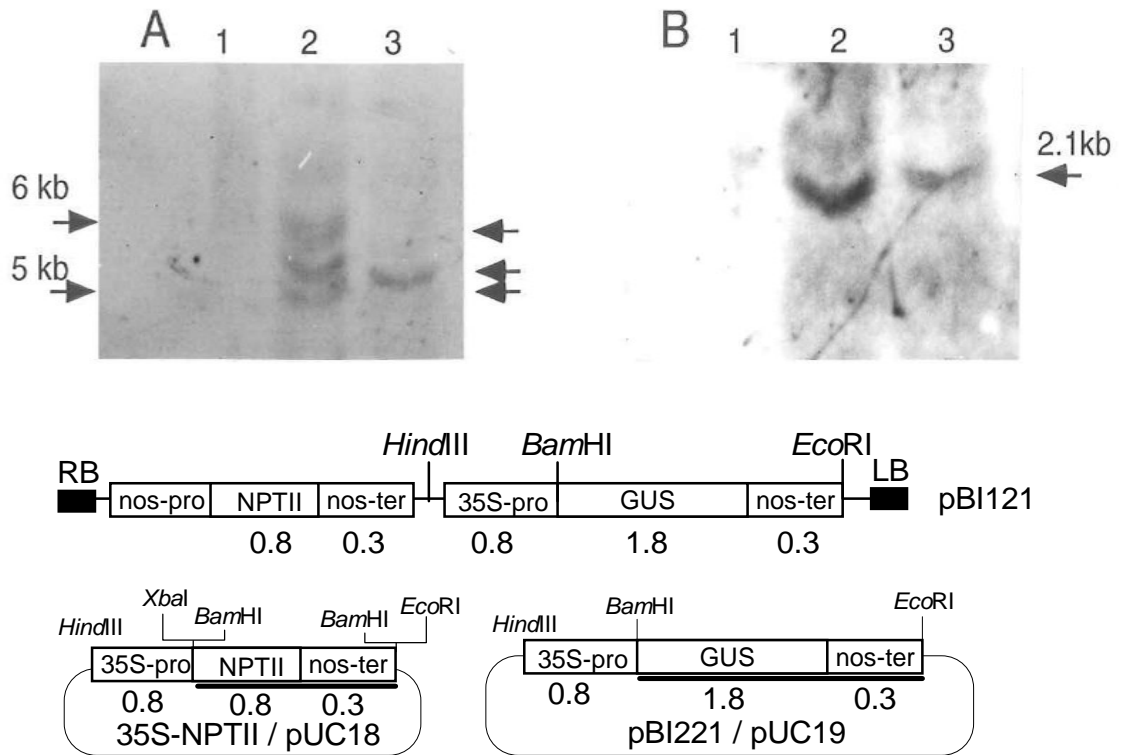


Fig. 2-4-3. Southern hybridization of DNA prepared from *in vitro* non-transformed and transformed plant tissues.

A: Detection of the NPTII gene. The probe was the 1.1 kb *Bam*HI fragment of 35S-NPTII/pUC18 containing the NPTII gene. Arrows on left indicate estimation of 5 and 6 kb size fragments. Arrows on right show hybridizing bands.

B: Detection of the GUS gene. The probe was the 2.1 kb *Bam*HI-*Eco*RI fragment of pBI221 containing the GUS gene. Lane 1: non-transformed control plant. Lane 2,3: transformed plants with LBA4404/pBI121. DNA samples were digested with *Bam*HI-*Eco*RI.

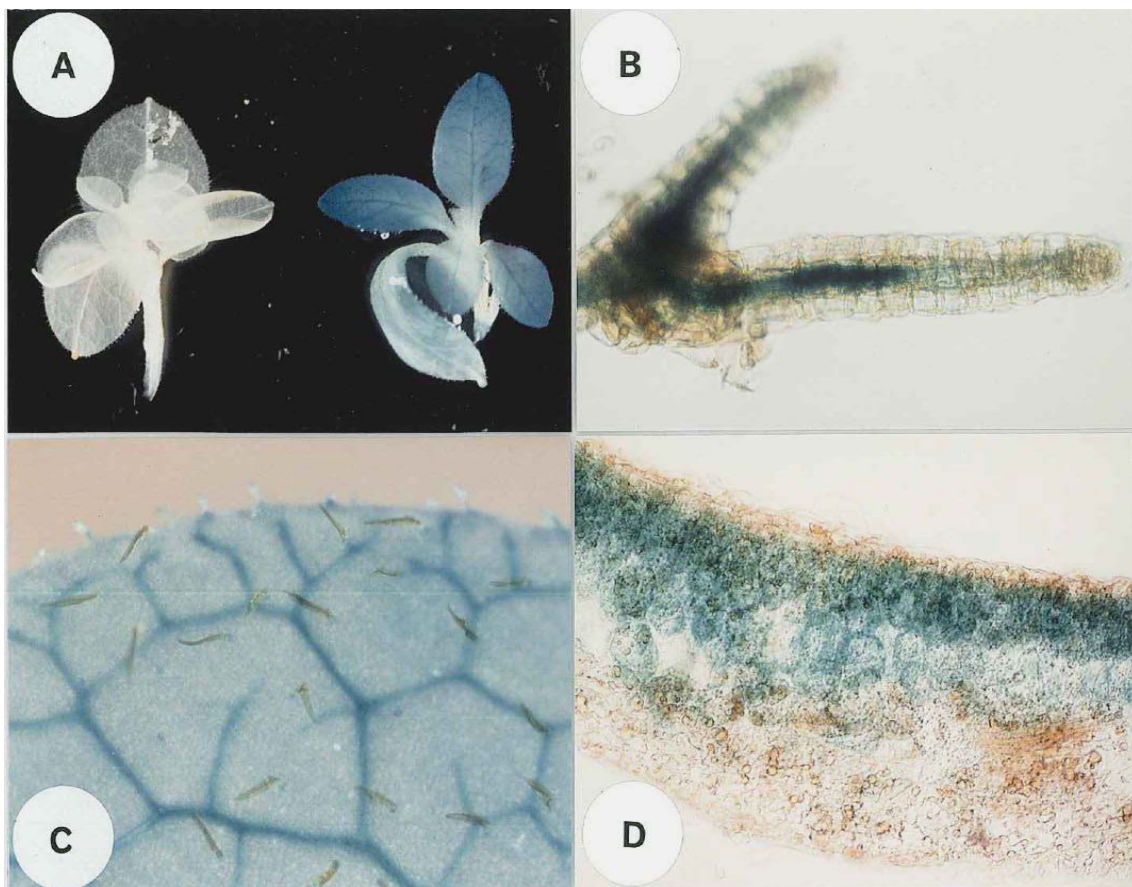


Fig. 2-4-4. Histochemical observation of GUS gene expression in the tissues of transgenic *Rhododendron* plants.

A: GUS assay of non-transformed control (left) and transformed (right) shoot; **B:** Root; **C:** Leaf; **D:** Cross section of leaf.

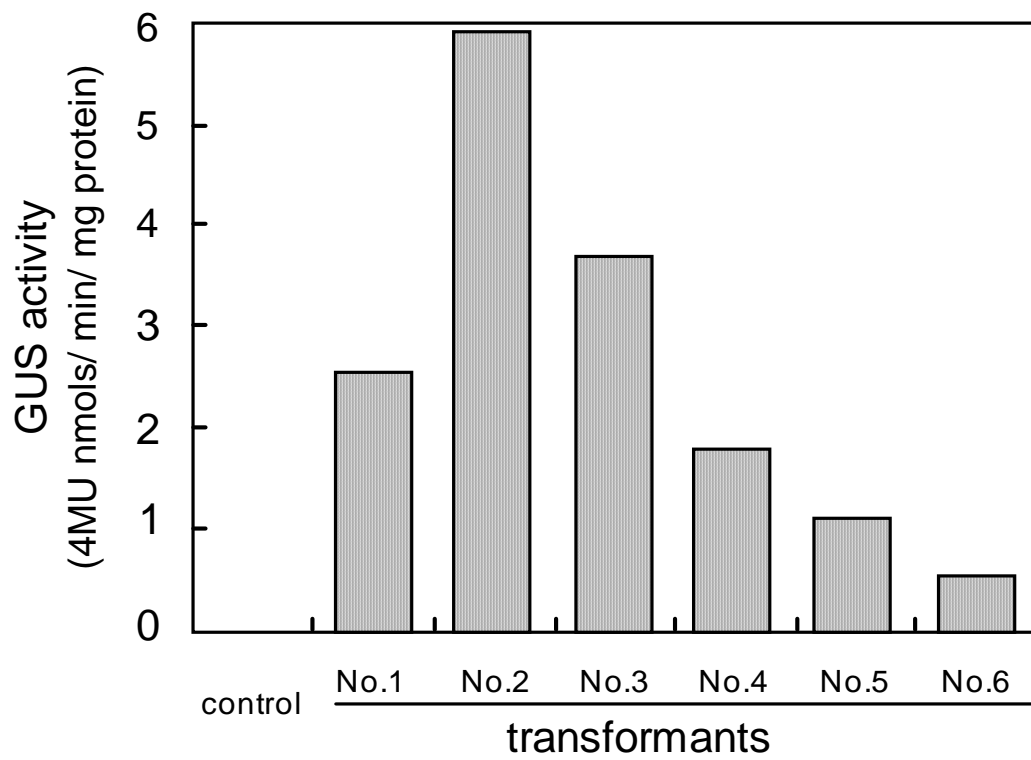


Fig. 2-4-5. GUS activity in the leaf of transgenic *Rhododendron* plants.



Fig. 2-4-6. Present status of transgenic *Rhododendron* plants. Bar = 10 cm.

第3章 突然変異育種を用いた地域特産作物の品種育成への応用

— 輪ギクを例として —

種子繁殖・栄養繁殖といった繁殖様式にかかわらず，育種や品種改良の基本は交配により優良な遺伝形質を集積して行われる．しかしながら，サツマイモ，サトウキビ，キク，イチゴなどゲノムサイズが大きな高次倍数性で栄養繁殖性の作物の場合，遺伝特性を集積し，優秀な品種を育成するためには，多数の交配後代から選抜を繰り返すことはもちろん，後代検定による交配組合せ能力やヘテロシスの利用を図り，長期間にわたる選抜・育成による品種改良が必要となる．実際，サトウキビの場合毎年数万の実生個体から選抜する育種プログラムが実施されており（杉本，2007），高次倍数性の栄養繁殖作物における品種改良の特徴として報告している（杉本，2007）．このような高次倍数性栄養繁殖作物を含めて，交配によらない品種改良の手法として，遺伝子組み換えや突然変異育種があげられる．これらは，基本的な表現形質や品種特性を維持したまま，新たな特性を付加できる点で極めて有用な育種手段といえる．そのため，遺伝子組み換え作物の利用は急速に拡大しており，James（2011）の報告によると，2010年現在，世界の作物栽培総面積15億haの10%にあたる1億4,800万haに達している．ところが，日本では遺伝子組み換え作物に対する一般市民における社会的な許容評価（PA: Public Acceptance）が極めて厳しく，実用品種として環境や人体に対する安全性の評価を終えたものであっても，日本で遺伝子組み換え作物の経済栽培は，2010年段階においても実施されていない（James, 2011）．このように，多額の投資により遺伝子組み換えによる品種改良や安全性評価を行っても，国内では実用品種としての利用が期待できないことから，これに代わる育種法として変異誘発による品種改良の検討を開始した。

本章では，栄養繁殖作物の交配によらない突然変異を利用した育種法として，イオンビームを用いた手法の検討を行った．対象作物として輪ギクを用い，組織培養技術の改善，個体選抜技術，有用変異選抜技術，および再照射による再改良等を検討し，輪ギク実用品種の育成を通して，イオンビーム育種の確立を検討した．

第1節 組織培養を用いたキクの変異誘発と個体選抜技術の確立

キク [*Chrysanthemum x morifolium* Ramat. (*Dendranthema x grandiflorum* Kitamura)] は、世界的にも重要な花き品目であり、我が国の花き生産の3割を占める。鹿児島県においても、キク類は切り花生産の半分にあたる55億円の農業産出額をあげる基幹品目である（鹿児島県農政部，2012）。一般に、花き類は新奇性のある品種が好まれることから、スプレーギク品種については、出荷時期に対応した花色・花形・草姿の異なる2,000種以上の品種が育成されている。しかし、キク類で最も多く生産されている白や黄色の輪ギクは、主に業務用や葬儀用として用いられることから、同色でも色あいや形を揃える必要がある。そのため、生産される品種は限られており、1990年代まで白の秋輪ギクは‘秀芳の力’の単一品種での独占状態が続いていた。一方、主に10～5月に出荷する秋輪ギク‘神馬’は、純白で花形や草姿が良く生育特性に優れることから、2000年以降は30年来主力品種であった‘秀芳の力’を凌駕し、生産量で全国一の品種となっている（永吉，2003）。本節では、‘神馬’を中心にイオンビームを用いた人為的な突然変異誘発と変異個体の育成・選抜技術について検討した。

材料および方法

1 供試品種および材料の調整

Table 3-1-2 で示すとおり、対照品種として用いた‘神馬’の他13品種を供試し、植物体再生系および供試部位の検討を行った。切り花用に栽培された各品種の花弁（舌状花）または葉身部を、70%エタノールで表面殺菌後、有効塩素濃度1.0%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液中で15分間滅菌し、滅菌水で3回洗浄後、2×4 mmの切片に調整し、培地に置床した。

変異誘発等に供試する場合は、各品種の生長点を0.5 mm以下で

無菌的に摘出し、 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA (naphthylacetic acid), $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP (6-benzylaminopurine), 3% ショ糖および 0.3% ジェランガム (和光純薬) を添加し、pH 5.8 に調整した MS 培地 (Murashige・Skoog, 1962) (以下、茎頂培養培地) に置床し、無菌植物を育成して葉身部をその後の試験に供試した。

2 植物体再生系および培養方法

不定芽経由の再生系については、MS 基本培地にオーキシシンとして $0.1\sim 0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA または $1.0\sim 5.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA (indole acetic acid) を、サイトカイニンとして $0.1\sim 2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP を添加し、3% ショ糖を加え、pH 5.8 に調整後、0.3% ジェランガムで固化し不定芽誘導培地として用いた。いずれの培地も 121°C 、15 分間のオートクレーブにより加圧滅菌した。なお、IAA 添加培地の場合、濾過滅菌した IAA をオートクレーブ後の培地に加えて攪拌後、直径 9 cm の滅菌シャーレに 25 ml ずつ分注した。

調整した外植体は、不定芽再生効率の安定化のため、置床する際は葉の背胚軸面を上向きに統一し、1 シャーレあたり 20 切片 (4 列 \times 5 切片) ずつ不定芽誘導培地に置床し、 25°C 、16 時間日長、白色蛍光灯下 ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) で培養した。また、各区とも少なくとも 4 枚のシャーレを用い、4 反復とした。

不定芽誘導培地に置床して 1 か月後、葉切片上に多芽状に形成した不定芽を茎頂培養と同組成の不定芽生育培地 (MS 培地; $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA, $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, 3% ショ糖, 0.3% ジェランガム; pH 5.8) に移植した。1 か月後、生長した外植片を含む不定芽を 4~5 分割し、不定芽の伸長を促すため MS ホルモンフリー培地 50 ml を分注したガラス製 500 ml 培養容器にそれぞれ 10 切片程度を置床した。

多芽体誘導については、 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP および 3% ショ糖を含む MS 液体培地に無菌植物から摘出した茎頂部位を入れて、液体振盪培養を行った。1 か月後、 $5 \times 5 \text{ mm}$ 程度の大きさに分割し、同じ

培地に継代培養することにより，多芽体を誘導した．多芽体は，ホルモンフリー固形培地に移植することにより複数の植物体を再生した．

3 乾燥処理による水浸状化回避

再生個体の水浸状化を回避することを目的に，ホルモンフリー培地に移植する前に乾燥処理を行った．多芽体の場合，液体培地から取り出し，クリーンベンチ内の滅菌濾紙上で20～30分間通風乾燥し，水分減少程度を計測した．その後，ホルモンフリー固形培地に移植して植物体の再生を行い，再生個体の外観から水浸状化を判定した．葉片由来の不定芽についても同様に，外植片が着いた状態の不定芽を4～5分割し，滅菌濾紙上に並べ，クリーンベンチ内で20分間の通風乾燥後，ホルモンフリー固形培地に移植した．

4 順化と育苗

不定芽をホルモンフリー培地に移植した1か月後に，草丈5～10 cmに伸長した再生個体を長さ5 cmのシュートに調整した．殺菌剤（テトラクロロイソフタロニトリル懸濁液剤）と発根剤（インドール酪酸液剤）を含む薬液にシュートを2分間浸漬し，順化に用いた．なお，各薬剤の濃度は製品の記載に従って調整した．

バーミキュライト（2S，旭工業）に水を加え，育苗箱（50×36×10 cm）に敷き詰め，よくほぐしたものを順化・発根床として用いた．ここに上記のシュートを150～250本程度挿し，ポリ袋で密閉して25℃，16時間照明の恒温室で発根を促し，7～10日後，採苗用の移植苗とした．これらは，土床の育苗施設に移植後，1か月間で一般栽培に利用する挿し穂と同程度の大きさに生長した．定植時の苗の均一性を高めるため，育苗圃で生長した苗の上部5 cmを採穂し，発根処理後，切り花生産圃場に定植した．変異誘発当代を展開する試験規模は，作型ごとに3,000～4,000個体とし，11～12月開花と3～4月開花の2作型の試験を実施した．

5 変異誘発処理

照射材料は、無菌植物の葉切片を 2×4 mm の大きさに調整し、6 cm 径シャーレの不定芽誘導培地上に、葉の背胚軸面を上向きに統一して 40 切片置床した。また、シャーレの上部は、滅菌したカプトンフィルム（東レ・デュポン）を張り、パラフィルムで密封して次に示す照射処理を行った。なお、イオンビーム照射は、材料を調整後施設に搬送する期間を要することから、変異誘発処理は葉片の培養開始後 3～5 日目に行った。

イオンビームは、独立行政法人日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のイオン照射研究施設（TIARA）に設置された AVF サイクロトロン加速器により照射した。また、イオンビームは、総エネルギー 220 MeV または 320 MeV の炭素イオンビームを 0.5～5 Gy の線量（試料の厚みを 0.5 mm として線量調整）で、50 MeV または 100 MeV のヘリウムイオンビームを 1～10 Gy の線量で照射した。軟 X 線は TRS-100CX（SOFRON 製）を用いて、線量率 $3.6 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ により 1～20 Gy の線量を照射した。各線量区は少なくとも 2 枚のシャーレを反復として用いた。

照射後の葉切片は、照射時と同様に背胚軸面を上向きにして 1 シャーレあたり 20 切片（4 列 \times 5 切片）ずつ 9 cm シャーレの新しい不定芽誘導培地に置床し、 25°C 、16 時間日長、白色蛍光灯下（ $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）で培養した。また、各処理は少なくとも 4 枚のシャーレを反復として用いた。

6 再生個体の栽培方法と選抜

切り花生産圃場に定植した苗は、11～12 月開花の作型では、無加温のハウス内で 16 時間日長になるように暗期光中断による電照抑制栽培とし、一般の栽培管理を行った。3～4 月開花の作型では、電照抑制期間を最低温度 15°C で、消灯（電照抑制を終了し、長日から短日条件に替わった時点）後は最低温度 18°C で加温管理した。開花

時に葉腋の摘芽数から無側枝性を判定し、消灯後の開花週数、満開時の舌状花弁数および葉形等の形態特性を調査し、優良個体の選抜を行った。

結果および考察

1 植物体の再生

独立行政法人日本原子力機構高崎研究所の加速器である AVF サイクロトロンによるイオンビーム照射では、炭素イオンは到達深度が限定され、厚みのあるサンプルでは細胞層によってイオン粒子が到達しない層や細胞の死滅する層が生じる (Tanaka, 1999)。そのため、変異誘発材料としては厚みがなく一定している葉身と花弁に限定し、植物体再生の培地条件を検討した。また、カルス経由の再生植物の場合、培養中の変異を内在しやすいこと、同一変異細胞由来の再生個体が複数得られる可能性が高いこと、植物体再生に時間がかかることおよび植物体再生が不安定であること (大澤, 1988) などの問題があることから、不定芽による再生系を中心に培養条件を検討した。

切り花用に栽培された‘神馬’の花弁および葉身部を、濃度の異なる NAA または IAA と BAP を組み合わせた不定芽誘導培地に置床し、1 か月後に不定芽形成数を調査した。その結果、 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP を含む不定芽誘導培地で、葉片は 98% の最も高い不定芽再生率を示し、各葉片あたり 16 個の不定芽を形成した結果、1 枚のシャーレから安定して 300~400 個体の再生植物が得られた (Table 3-1-1)。一方、花弁は、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP および $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA + $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP の不定芽誘導培地で、最も高い 60% 程度の再生率、切片あたり約 10 個の不定芽から成り、シャーレあたり 120 個体ほどの植物体を得られた (Table 3-1-1)。

同様に‘神馬’を含む 14 品種について、植物ホルモン濃度と組合せの異なる 8 種類の不定芽誘導培地で不定芽による再生効率を検証

した。その結果、それぞれ最適濃度の組合せで不定芽再生率は、3～100%と品種により大きく異なり、それに伴い再生効率についても品種間差が認められた (Table 3-1-2)。不定芽再生率の低かったスプレーギク 3 品種 (‘エリアス’, ‘ロアール’, ‘サザンチェリー’) は、開花期を日長制御可能な 6～9 月開花の夏秋タイプである。同じ夏秋タイプの輪ギク品種 (‘フローラル優香’ 以下 5 品種) や夏秋小ギク品種 (‘鹿夏のおりひめ’, ‘鹿夏のひこぼし’) では高い再生効率を示したことから、夏秋タイプの日長反応性と不定芽再生能が連鎖しているわけではない。ただし、これまでの試験の中で、夏秋スプレーギク品種群における不定芽再生率はいずれも低かった (データ省略)。これは、夏秋スプレーギクの交配親となる品種や系統が限定され、これらの品種群における遺伝的な背景が限定されていることに起因するものと考えられた。

従来からキク茎葉からの再分化能に品種間差があることは数多くの報告があり (De Jong ら, 1993; Kaul ら, 1990; 深井ら, 1987; Ledger ら, 1991; 宮崎ら, 1976; Renou ら, 1993; 柴田ら, 1992; 高津ら, 1998; Urban ら, 1994), ホルモンバランスや外植体として用いる組織の部位により再分化能の高い品種や条件をスクリーニングし、形質転換系に用いている。その中でも高津ら (1998) は、植物体再生に要する日数の短縮と培養中の変異を考慮し、カルスを経由しない外植片からの不定芽再生系を用いている。一方、Shinoyama ら (2002) は、カルス経由の再分化系を用いることにより、より広範な品種に対する安定した形質転換系の開発に成功している。

本試験において、対象とする品種の再生系に関わる培養部位や培地のスクリーニングは切り花の花弁や葉身を材料に用いた。一方、照射材料には、コンタミや利用時期の問題がない無菌植物の葉身を主に用いた。無菌植物の準備が整う 6 か月間に培地のスクリーニングを行ったため、材料の準備が整い次第、最良の再生条件で照射実

験を行うことができた。ただし、夏秋スプレーギクのような植物体再生効率が低い品種については、外植体とする組織の選択、光条件や温度等の培養環境の検討の他、カルス経由による再分化系の確立を併せて行い、再生効率の向上を図る必要がある。

2 順化と育苗

第2章で述べたように、組織培養における植物体再生において、水浸状化は培養植物の順化や生育の障害となり、再生効率低下の原因となる（Bottcher ら, 1988; Phan・LeTouze, 1983; Sato ら, 1993; Shetty ら, 1995; Zimmerman・Cobb, 1989）。これに対して、様々な対策が図られているが、培養湿度の低減（Bottcher ら, 1988）等を参考に、乾燥ストレスの付与による水浸状化の回避効果を検討した。

茎頂部位を $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP を含む MS 液体培地による振盪培養で継代培養することにより、茎葉が伸長しない多芽体として維持・継代することが可能であった。しかし、この多芽体をホルモンフリー固形培地に移植したところ、再生個体は全て水浸状となった。そこで、この現象を回避するために液体培地中の多芽体を取り出し、クリーンベンチ内の滅菌濾紙上で 20～30 分間通風乾燥し、ホルモンフリー固形培地で植物体の再生を行った。多芽体の水分含量は、20 分の乾燥処理により 3%程度、30 分間で 5%程度減少した（Table 3-1-3）。ホルモンフリー培地に移植して 1 か月後、多芽体の一部に枯死する部位が認められたが、20 分間乾燥処理区は、再生個体の 80%程度が水浸状化を回避し正常に生育した（Table 3-1-3）。また、本実験では秋輪ギク‘秀芳の力’および寒小ギク‘南州の舞’を供試した。両品種の乾燥処理における水浸状化回避効果は共通しており、品種間差が少ないものと推察された。そこで、この手法を用い、不定芽再生の際、不定芽生育培地からホルモンフリー培地へ移植する段階で、同様の乾燥処理を行ったところ、水浸状化した再生個体は皆無となり、安定した順化作業が可能となった。

一般に培養植物の順化は、培地中で発根した根を傷めないように丁寧に取り出し、鉢上げして保湿する。しかし、この方法では作業の繁雑さ等から一度に順化できる数に限度があること、培養容器中の発根苗では新根の発生が遅く、根量も少ないため、生育の不揃いが出やすいことなど問題も多い。また、培養物は一般栽培の挿し穂と比較して小さく軟弱なため、保湿や遮光による順化を必要とする。そこで、通常の栄養繁殖と同様、挿し穂を苗箱に挿し芽し、順化と挿し芽を兼ねた方法により発根苗を得ることを検討した。培養容器内のシュートを長さ 3~5 cm に切りそろえ、発根剤(オキシベロン, 200 倍液, インドール酪酸液剤, バイエルクロップサイエンス)と殺菌剤(ダコニール 1000, 1000 倍液, テトラクロロイソフタロニトリル懸濁液剤, くみあい化学工業)を混用した薬液にシュートを 2 分間浸漬後、後述の水分調整を行ったパーミキュライトを敷き詰めた苗箱に挿し、ポリ袋で密閉して保湿した。密閉挿しした苗箱は、25℃, 16 時間照明 ($35\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) の順化室に置き、3 日後に霧吹きで水分の補給を行った。その結果、挿し芽を行ったシュートは全て発根苗となり、一般栽培で用いる土の採苗圃に植え付けが可能となった (Fig. 3-1-1)。なお、前述の植物体再生の際の乾燥処理を行わない場合、水浸状化したシュートが数%含まれる。これらはこの方法で、雑菌汚染による腐敗はないものの、発根しないことから採苗圃に移植後全て枯死した。しかし、乾燥処理により水浸状化したシュートは生じないため、全ての再生個体を容易に順化し発根苗とすることができ、本試験で開発した方法が採苗圃用の苗として有効であることが明らかとなった。

また、本実験で開発した密閉挿しを行う際のパーミキュライトの含水率は重要で、過湿では発根前に腐敗し、水分が不足すると順化率は 50%以下に低下した (データ省略)。そこで、パーミキュライトの水分調整量を検討した。その結果、水分飽和状態まで給水させ

た場合、乾物重量の 2.6～3.7 倍の水分を吸収した (Table 3-1-4) .
新しいパーミキュライトは水分をほとんど含まないため、パーミキュライト重量の約 2 倍量の水を加えることで、適湿状態に調整できた (Table 3-1-4) . これに対して、再利用する場合は、乾物パーミキュライト重量と同程度の水分を含んでいることから、再利用するパーミキュライト重量の 8～10%の水を追加することにより、適度な水分状態の調整が可能であった (Table 3-1-4) .

次に、得られた発根苗を土の採苗圃に植え付けた。十分に発根した苗は通常の採苗圃における管理で活着し、枯死する個体は 1,000 本中 3～4 本であり、活着率は 99.7%と安定していた(データ省略)。
植え付け時、茎の直径が 2 mm 程度の発根苗は、1 か月間の育苗で茎の太さが一般栽培に利用する挿し穂と同程度の 4～5 mm に生長した。そこで、その先端部の 5 cm を採穂し、圃場定植用の苗として用いた (Fig. 3-1-1) . このように採苗圃で育苗した挿し穂を用いることにより、環境や生育状態による不揃いを排除し、変異誘発当代において生育特性に関わる個体選抜が可能となった (Fig. 3-1-1).

3 培養部位の選定

輪ギクにおいて、花弁 (舌状花) 数は花の品質を左右する重要な形質である (永吉, 2003) . そこで、培養変異を確認するため、輪ギク ‘神馬’ を対象品種として組織培養を行い、部位別に得られた再生個体について、3～4 月開花の作型で開花個体の花弁数を調査した。その結果、Table 3-1-5 に示したように、培養変異が最も少ない茎頂由来個体では、平均花弁数が 165.0 枚で、151～190 枚の範囲に分布した。これに対して、葉片由来の再生個体は、平均花弁数が 162.3 枚で、101～250 枚の範囲に広く分布するが、茎頂部位と同様の 151～190 枚の個体が 89.4%を占めた。また、花弁由来の再生個体では、茎頂および葉片由来の再生個体と比べて、平均花弁数が 130.8 枚と 30 枚程度少なく、花弁数が 190 枚を上回る個体は存在しなかった

(Table 3-1-5). 以上のことから、花卉由来の再生個体では、茎頂や葉片由来と比べ花卉数が減少する傾向があると考えられた。

Nagatomi ら (1997) は、ガンマ線緩照射による花色の変異セクターから花卉培養によりキメラを分離し、花色変異個体を得ており、原品種‘太平’から‘南風の輝’を含む 10 品種の花色変異品種を育成している。また、同品種‘太平’に対するイオンビーム照射では、培養部位として葉片より花卉を用いることで花色変異率が高くなることから、‘イオンの光明’を含む 6 品種が育成されている (永富, 2003)。このように、花色変異を目的とする場合は、培養部位として葉片より花卉を利用する方が変異率は高い。しかし、‘神馬’は白色の輪ギクであり、花色や花形等の基本特性を維持した変異誘発を目的としている。したがって、培養部位として花卉より葉片を利用する方が品質や形態特性を維持した変異誘発に適すると考えられた。

4 イオンビーム照射と線量反応

‘神馬’の無菌植物の葉片を不定芽誘導培地に置床して 3~5 日後、これらを照射材料として、炭素イオン ($220\text{MeV} \cdot ^{12}\text{C}^{5+}$, $320\text{MeV} \cdot ^{12}\text{C}^{6+}$)、ヘリウムイオン ($50\text{MeV} \cdot ^4\text{He}^{2+}$, $100\text{MeV} \cdot ^4\text{He}^{2+}$) および軟 X 線の照射を行った。その結果、軟 X 線では線量の増加に伴い不定芽形成数は直線的に減少し、10 Gy では無照射の 5%以下になった。これは、軟 X 線がガンマ線と同様の電離放射線であり、Nagatomi ら (1997) が示したガンマ線の線量反応と一致する結果であった。それに対して、イオンビームは線種により線量反応は異なるものの、線量の増加に伴って緩やかに不定芽形成数が減少し、その後急激に低下した (Fig. 3-1-2)。これは、イオンビームを *Arabidopsis* に照射した結果 (Tanaka ら, 2002) と一致するもので、電離放射線よりエネルギーが高いイオンビーム照射の特徴といえる。

5 イオンビーム照射による変異の傾向

不定芽数が無照射区の 20%程度に低下したヘリウムイオン (100 MeV) の 10 Gy 照射区では、得られた再生個体の花径、花弁数、舌状花の形など、花器形態に関する様々な形質で変異が認められた (Fig. 3-1-3)。一方、高 LET ($\text{keV}\cdot\mu\text{m}^{-1}$: 線量エネルギー) の炭素イオン (220 MeV, 320 MeV) 照射区では、線量の増加に伴い、花弁数が減少する傾向 (Table 3-1-6) や葉形の異常が増加する傾向 (Table 3-1-7) が認められるものの、その効果や割合は判然としなかった。この理由として、用いたヘリウムイオンは LET が炭素イオンより低いことから (Tanaka ら, 2002) 高線量の照射で再生個体が得られる。その結果、花形・花容、葉形・大きさといった量的遺伝形質により支配される形態特性について多数の変異を内在し、外観上の形態変異が生じたと考えられる。これに対して高 LET のイオン種の場合、高線量では細胞に対するダメージが大きくなるため、再生個体は得られない。一方、低線量では DNA の欠失や置換等の変異を内在するものの、各細胞に生じる変異の数が限られることから (Shikazono ら, 2001)、元品種の特性を維持した変異誘発が可能になるものと考えられた。

イオンビームによる変異誘発を行うにあたり、低 LET・高線量照射により獲得変異の可能性を探り、品種育成のためには高 LET・低線量により遺伝子レベルでのダメージが少ない、品種本来の特性を維持した変異体を獲得する必要性が示唆された。さらに、本実験で得られた結果は、従来の線量と比較すると非常に低い (Tanaka ら, 2002; Nagatomi ら, 1997)。これは、他の報告が種子や植物体を照射材料とし、多くは静止期の核に照射されるのに対して、本実験では、不定芽誘導培地に置床後 3~5 日で細胞分裂開始前の活性が上昇した段階で照射した。従って、放射線に対する感受性が乾燥種子や植物体に対する照射より高まり、低線量での変異誘発を可能にしているものと考えられた。

6 変異誘発システムの構築

本実験では無菌植物の葉片培養開始後、一般の切り花栽培と同様の定植苗を得るまで約18週、種苗を栽培圃場に定植後開花するまで16～18週であった。これにより、Fig. 3-1-1で示すように、イオンビームによる変異誘発から変異体の選抜まで、およそ8か月で完了する変異誘発システムが完成した。このシステムは、栽培圃場へ定植する前に育苗段階を加えることで、個体再生時の生育を揃えることができ、一般の切り花栽培と同様の栽培管理の中で照射当代の選抜を行うことが可能である。さらに、植物体再生効率が安定しているため、開花時期ごとに圃場規模に応じて逆算し、照射スケジュールや照射数量を決定することができる。これにより、鹿児島県ではバイオテクノロジー研究所と農業開発総合センター花き部と連携することで、作型に応じた3,000～4,000本規模の選抜を年間に数回実施する品種育成試験が可能となった。

第2節 無側枝性および低温開花性等有用変異選抜技術の開発

秋輪ギク‘神馬’は、純白で花容・草姿・生育特性に優れることから、従来からの主力品種であった‘秀芳の力’に替わって2000年には生産量で全国一の品種となった。しかし、この品種は側枝の発生が多く、低温遭遇により開花が遅れるといった欠点もあり、生産現場から強く改善が求められている(永吉,2003)。また、側芽を摘み取り、頂芽の花蕾だけを残す輪ギク栽培では、この摘芽・摘蕾作業が栽培管理作業の約1/4を占め、側枝発生の多い‘神馬’の場合、開花時期によっては10aあたり120万個の摘蕾が必要となる(Fig. 3-2-1; 永吉,2003)。そのため、摘蕾数が少ない「無側枝性品種」の育成は、輪ギク最大の育種目標といっても過言ではない。実際、夏秋輪ギク(6~9月開花)では、‘岩の白扇’、‘フローラル優香’および‘精の一世’といった無側枝性品種が栽培の主流となっている(永吉,2011)。

このようなキクにおける無側枝性は、Okamoto・Suto(2003)により高温条件下で腋芽が消失することにより発現することが確認されており、この特性を栽培面で活用し、夏秋輪ギクの開花期にあわせた栽培管理法が検討されている(松本,2000)。また、これら無側枝性品種や系統を交配親として用いた新品種の育成も数多く手がけられ、‘神馬’の交配親にも無側枝性品種が用いられている。そのため、‘神馬’の一般切り花栽培の中から無側枝性の枝変わりが発生し、‘旭神’(農林水産省品種登録12476号)および‘吉良の馬’(農林水産省品種登録15667号)などが選抜・育成されている。しかし、開花時期の遅れや切り花重の減少など栽培特性の劣化が伴うことから、‘神馬’の代替品種にはなっていない。また、定植用の挿し穂や母株の育成時期が高温期となり、栽培時期が低温期にあたる秋輪ギクでは、無側枝性実用品種の育成は難しく、むしろ鹿児島県では高

温期に分枝し増殖が可能で、収穫後の萌芽茎を利用する二度切り栽培適性の高い、無側枝性が発現しにくい系統を選抜し、‘神馬’1号として供給している。

一方、低温期の一般栽培圃場から、開花の早い個体を選抜することにより、低温遭遇による開花遅延を起こしにくい‘神馬’2号が選抜され、種苗法による制約がないことから、現在では全国で広く栽培されている。しかし、低温開花性で側枝発生の少ない系統や品種の育成には至っていない。

そこで、本節では第1節で開発した「変異誘発システム」を活用し、低温開花性と無側枝性という、相反する温度帯で発現する栽培特性について、人為的な変異誘発による特性改変を行い、実用品種育成に向けた技術開発を行った。

材料および方法

1 供試品種および材料の調整

Table 3-2-1 に本実験で供試した品種および系統の由来と特性を示した。‘神馬’の場合、鹿児島県では農家生産圃場から優良個体の収集を行い、系統選抜により生育特性などに特徴のある系統を育成している。これらには、萌芽数が多く二度切り栽培に向く‘神馬’1号、低温開花性に優れる‘神馬’2号、花容・草姿に優れる‘神馬’9-1-1系統がある (Table 3-2-1)。本実験では、Table 3-2-1 に示した‘神馬’3系統を区別して照射するとともに、変異個体の選抜や選抜系統の対照として用いた。また、変異誘発に用いる材料は、第1節に準じて茎頂培養から無菌植物を育成し、その葉身部を試験に供試した。

2 変異誘発と植物体再生

変異誘発に用いるイオンビームは、第1節に準じ、独立行政法人日本原子力機構高崎研究所の AVF サイクロトロン加速器による総エネルギー220 MeV または 320 MeV の炭素イオンビームを 0.5～5

Gy の線量（試料の厚みを 0.5 mm として線量調整）で照射した。軟 X 線は TRS-100CX（SOFRON 製）を用いて、線量率 $3.6 \text{ Gy} \cdot \text{h}^{-1}$ により 5 Gy の線量を照射した。

‘神馬’の不定芽再生系は、第 1 節に示したように、 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP を含む不定芽誘導培地を用い、植物体の再生、順化、および育苗は、第 1 節の変異誘発システムに準じて行った。

3 選抜圃場における栽培条件

キクの無側枝性は、生育中の高温遭遇により発現する（Okamoto・Suto, 2003）ことから、栽培期間が高温期にあたる 8~9 月定植・11~12 月開花作型で無側枝性の選抜を行った。無加温ハウスで 16 時間日長になるように暗期光中断による電照抑制栽培とし、一般栽培管理を行った。開花時に葉腋の摘芽数から無側枝性を判定するとともに、消灯（電照抑制を終了し、長日から短日条件に替わった時点）後の開花週数、満開時の舌状花弁数および葉形等の形態特性を調査することで、優良個体の選抜を行った。

低温開花性の選抜は、生育期間が低温期にあたる 12 月定植・3~4 月開花の作型で、生育期間を通じて一般管理より $4 \sim 5^\circ\text{C}$ 低く、最低温度 $10 \sim 14^\circ\text{C}$ とした低温管理を行うことで消灯後の開花週数から開花の遅延しない形態特性に優れる個体を選抜した。

選抜個体は収穫後の株から萌芽させ、栄養繁殖により増殖して選抜系統とした。次年度、選抜系統は、高温管理が可能な 11~12 月開花の作型と低温に遭遇する 3~4 月開花の 2 作型で特性の確認を行い、系統選抜を行った。

4 ゲノムサイズの測定および核の観察

核 DNA 量の測定は、三柴・三位（1999）および Yamaguchi ら（2008）の方法に従ってフローサイトメータを用いて分析した。開花時の調査個体から採集した測定用の成熟葉は、静止期の核の集積と核サイズの安定化のためにあらかじめ 24 時間以上冷蔵保存した。測定時に

5×15 mm に調整したキクの葉片と DNA 量の対照植物であるサトウキビの葉片を交互に 3 枚重ね、1 ml の単離・染色液（10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.5% Na₂SO₄, 2 mg·L⁻¹ 4,6-diamidino-2-phenylindole）中でカミソリ刃を用いて細断し、30 μm のナイロンメッシュで濾過して 5 分間静置後、フローサイトメータ（Partec PA, PARTEC）を用いて測定した。また、単離・染色液やサンプルの調整・染色過程は、酸化防止のため氷冷して行った。

核 DNA 量測定の指標とする対照植物は、ゲノムサイズがキクの半分程度で安定して測定が可能な植物種として Plant DNA C-values database <<http://data.kew.org/cvalues/>> から得た情報を基に、サトウキビ (*Saccharum officinarum* L. cv. Ni17) を選定した。キクサンプルの核 DNA 量は、対照植物のピーク位置と比較して原品種のピーク位置の平均値を 100%として算出した。

なお、イオンビーム照射後に発生する不定芽の形成過程を確認するため、培養中の葉切片を 3～5 日毎に取り出し、横断切片の切断面の細胞の変化を観察した。葉切片は固定せずに新鮮材料をカミソリ刃により厚さ 50～200 μm に細断し、前述のフローサイトメトリーで用いた染色液（三柴・三位, 1999）に浸漬した。核染色後の横断切片は、落射蛍光顕微鏡下で紫外・可視の観察を行い、組織の状態、細胞の大きさおよび核の数を調査した。

結果および考察

1 無側枝性変異の選抜と品種育成

イオンビーム照射による摘芽数の変化を調査した結果、12 月開花の作型において、炭素イオンビーム（320 MeV）の 1～3 Gy 照射により、摘芽数が 9～16 個に減少した個体が 4.5～12.5% 得られたことから、線量の増加に伴い少摘芽数の個体が増加する傾向が認められた（Fig. 3-2-2）。

このような無側枝性を対象とした作型で、2001年度6,090個体の変異誘発当代から優良変異個体の選抜を行った。その結果、花容・草姿・生育量（切り花重）等が優れる20個体を選抜し、B01-1-1～B01-1-4およびB01-2-1～B01-2-16系統とした。その中で腋芽が消失した無側枝節が確認され、無側枝性を持つと推定される個体は、わずかに2個体（B01-2-14およびB01-2-15）であった。このように、生育量が低下していない変異体の出現頻度は極めて低いものの、従来の枝変わりによる自然突然変異では得られなかった、花容・草姿・生育量に優れる無側枝性発現個体を獲得できた。

次年度、栄養繁殖により増殖し、各選抜個体を系統として系統選抜を行ったところ、変異当代の特性をよく保持していた。このように、特性が分離しないことは、変異個体のキメラ性がないことを示している。さらに、無側枝節が確認できた2系統は、系統選抜時も12月開花の作型で無側枝性を示し（Fig. 3-2-3）、その特性が安定していることから、B01-2-14系統を‘新神’（‘Aladdin’；農林水産省品種登録第14118号；今給黎ら、2006）、B01-2-15系統を‘今神’（‘Imagine’；農林水産省品種登録第14119号）として登録した（Table 3-3-1）。なお、これら2品種の形態特性は、Table 3-3-7に示したように、元品種の‘神馬’と同等の基本特性を示し、無側枝性が改良された品種であることが分かる。また、これら2系統に加え、2002年度照射区から無側枝性を示すB02-1-1系統が得られ（Fig. 3-2-3）、‘神馬’の無側枝性改良手法として変異誘発システムが活用可能であることが確認できたことから、「イオンビーム照射によるキク科植物の突然変異育種法」として（独）原子力研究機構と共同で特許を申請した（特許公開2004-321057）。

2 低温開花性の選抜

秋輪ギク‘神馬’の葉片に変異誘発を行い、生育期間中に低温に遭遇する3月開花の作型で再生個体の開花特性を調査した。その結

果，消灯後の開花週数（電照栽培を終了し，短日条件に替わった時点から開花に至るまでの週数）は系統や苗の来歴によって異なっていた．本実験で用いた系統では，挿し芽増殖苗で比較すると‘神馬’2号<9-1-1系統≦‘神馬’1号の順で開花が遅れる個体の分布が拡大した（Table 3-2-2）．これは，各系統の低温開花性を示す順と一致している．また，苗の来歴では挿し芽増殖苗<茎頂培養苗≦葉片由来苗の順で開花が遅れる個体の分布はさらに拡大した（Table 3-2-2）．‘神馬’の場合，栄養生長期中の低温遭遇により幼若化し，開花遅延を引き起こすことが知られている（永吉，2011）．この幼若化は切り花生産の栽培期間だけでなく，親株，穂冷蔵および挿し芽と多くの時期や種苗の前歴に関係することが報告されている（永吉，2011）．さらに，茎頂培養によるメリクロン苗は，多くの植物種で生育旺盛になることが知られており，挿し芽増殖苗と比べて生育旺盛な茎頂培養苗は，栄養生長から生殖生長への切り替わりが遅れ，開花が遅れる個体が増加したと考えられた．

一方，茎頂培養苗と同様に，葉片由来個体の開花週数は幅広く分布したが，照射の有無や線量による明確な差は認められなかった（Table 3-2-2）．これに対して，消灯後9週までに開花したものを早生型，13週以降に開花したものを晩生型とした場合，線量の増加に伴って開花の早晩に関わる変異が増加する傾向が認められた（Fig. 3-2-4）．これらは，培養植物を同時期に順化し，同一条件下で育苗，栽培管理を行っていることから，ここで示した早生型の中に低温開花性を示す変異体が含まれることが期待された．

変異当代で花容・草姿および生育特性が優れ，開花が遅延しない個体を選抜し，挿し芽増殖による栄養繁殖により次年度，系統選抜を行った．3月開花作型で最低13℃の低温管理を行った結果，消灯後の到花日数は低温開花性を持つ神馬2号が66日，神馬1号が75日，9-1-1系統が77日であった．これに対して，低温開花性により

選抜した B01-3-1～B01-3-18 の 18 系統の到花日数は 63～75 日となり、低温開花性の選抜が可能であると考えられた（データ省略）。一方、同作型で無側枝性の B01-2-15 系統（‘今神’）の到花日数は 77 日、B01-2-14 系統（‘新神’）は 83 日となり、変異誘発に用いた 9-1-1 系統の 77 日と同程度かさらに遅れることから、低温開花性は付与されていないことが明らかとなった。さらに、これら低温開花性選抜系統を 12 月開花作型で栽培した場合、無側枝性を示す系統はなく、無側枝性と低温開花性を併せ持つ系統は選抜できなかった（データ省略）。なお、このような無側枝性や低温開花性は、栄養繁殖による系統で保存されることが‘新神’育成の過程でも示されており（今給黎ら, 2006）、低温開花性と無側枝性を併せ持つ品種の育成が期待された。

3 イオンビーム照射による線量効果と核 DNA 量の変化

‘神馬’および無側枝性変異系統について、各 5 個体の核 DNA 量の測定を行った。その結果、変異誘発に用いた原品種‘神馬’の 9-1-1 系統および低温開花性の‘神馬’2 号の核 DNA 量は、いずれも同程度で、標準偏差 1%程度の範囲で DNA 量の測定が可能であった（Table 3-2-3）。また、原品種の DNA 量を 100%とした場合、無側枝性変異系統の‘今神’は 2%程度 DNA 量が減少しており、‘新神’および B02-1-1 系統は、変異誘発に用いた‘神馬’9-1-1 系統と同等の DNA 量を保持していた（Table 3-2-3）。

低温管理により早生および晩生個体を選抜し、各照射区 10～16 個体の DNA 量を測定した結果、照射線量の増加に伴って DNA 量が 2%以上減少した個体の割合は増加した（Fig. 3-2-5）。一方、早生の 35%および晩生変異の 45%は DNA 量の減少が認められた（Fig. 3-2-5）。これは、開花が遅れた個体の多くは DNA 量が減少していることから、生育の遅延や生育量の低下および葉型等の形態的な異常を伴う（データ省略）ものと推察された。したがって、品種本来の

特性を維持したワンポイントの改良には、生物効果が高いイオンビーム（Tanakaら、2010）を1～3 Gyの低線量で照射し、多数の変異誘発当代の中から、生育量の劣らない変異個体を選抜する必要があると考えられた。

4 キメラ性の解析

本実験で用いている不定芽の発生過程を確認するため、核の蛍光染色により経時的に観察した。Fig. 3-2-6 A, Bに示すように、葉切片を不定芽誘導培地に置床して3日後では、細胞の大きさや数に変化は認められなかった。8日後には表層に近い海綿状組織細胞層の核が隣接する2個もしくは4個（3個観察される核は1個が裏側に隠れている）に増加した（Fig. 3-2-6 C, D）。これは、プロトプラスト培養の一次・二次分裂で細胞数が2個・4個に増加する様相（高山、1986）と酷似していた。一方、同時点で他の組織層における同様の核の増加は認められなかった。さらに、15日後には表層に突起した細胞塊が実態顕微鏡下で観察された。この細胞塊はドーム状で核が整列していることから、他の細胞層のランダムに増殖するカルス細胞と区別でき、茎頂分裂組織と形状が類似した組織形成であると考えられた（Fig. 3-2-6 E, F）。その後、この表層に突起したドーム状の細胞塊は、個々の不定芽となり植物体が再生した。この一連の過程は、不定芽の発生数や位置と一致しており、不定芽は培養8日後に細胞の増殖が確認された表層に近い海綿状組織細胞に由来すると推察された。本実験では、葉片の培養開始後3～5日目の照射であるため、初期分裂開始直前の変異誘発となっている。Yamaguchiら（2010）の場合も培養開始3～4日後に照射していることから、変異誘発後、個々の変異細胞が増殖し変異当代から独立した変異体が得られたと推察された。

一般に植物体に変異誘発を行った場合、変異誘発当代は混在する変異細胞を分離・固定するため、種子繁殖による次世代（Shikazono

ら, 2005), 切り戻し (Yamaguchi ら, 2009) もしくは変異セクターからの植物体再生 (永富, 2002) によって完全変異体を獲得する. これに対して, 葉切片に変異誘発を行い, 植物体を再生する場合, 著者らの前述の例を含め, 変異誘発当代から変異体の選抜が可能である (Yamaguchi ら, 2010). しかし, Shinoyama ら (2002) はキクの葉切片から不定芽経由で得られた形質転換体の場合, 薬剤耐性で判別可能な非形質転換細胞が混在するキメラが多く存在すると報告している. また, 不定芽は多細胞起源とされる (大澤, 1988) ことから, 組織培養を組み合わせた変異誘発の場合も変異細胞が区分キメラとして混在する可能性が考えられる.

Yamaguchi ら (2009) は腋芽に照射した際, 区分キメラによる花色変異を複数回の切り戻しにより分離, 固定しており, 著者らの腋芽に照射した他の試験で区分キメラである斑入り状の葉緑素変異体を得られたことと一致していた. これに対して, 本実験ではアルビノの不定芽が極めてまれに発生するが, これらは独立した完全アルビノ変異体であった (データ省略). また, 本実験で得られた選抜個体は栄養繁殖した個体間で形態的な差異がなく, 形質が安定していたことから, その一部は品種登録に至っている. さらに, ‘新神’の品種識別マーカー (阿部ら, 2007; Shirao ら, 2013) を用いた報告では, 異なる複数の場所で栽培した ‘新神’でも同一の判定結果であった (白尾ら, 2007). なお, ‘新神’の葉切片から再生した選抜個体についても ‘新神’と同一であると識別されている (白尾ら, 2007). 無側枝性や低温開花性等の生理特性に関するキメラ判別は難しいものの, 本実験で得られた変異個体では, 栄養繁殖による形質や識別マーカーの分離が認められなかった. したがって, 個々の変異細胞に由来する独立した不定芽が得られ, キメラ性も低く抑えられたことから, 変異誘発当代での変異個体の選抜は可能であると考えられる.

第3節 イオンビーム再照射による再改良技術の確立

従来から変異誘発に用いられてきた放射線は、ガンマ線やX線等の電離放射線が中心であった。これらと比較して、粒子線のイオンビームは飛跡に沿って物質に与えるエネルギー、いわゆる線エネルギー付与（Linear Energy Transfer: LET）が非常に高く、同じ線量である1 Gyの照射で、ガンマ線では2,000スプール、炭素イオンでは4トラックとなり、細胞核内のDNAに対して電離放射線の数百倍のエネルギーを局所的に付与する特徴がある（Tanakaら, 2010）。そのため、従来のガンマ線やX線と比較して、変異率が高く、変異スペクトルが大きい、不良変異の発生が少ないといった特徴を持っており、種々の植物種で応用が図られている（Tanakaら, 2010）。

著者らは第2節で示したように、2001年度の照射実験から無側枝性変異個体の選抜を行い、‘神馬’の基本的な生育特性を損なわない無側枝性品種‘新神’（農林水産省品種登録第14118号；今給黎ら, 2006）および‘今神’（農林水産省品種登録第14119号）を育成した。しかし、この2品種は、無側枝性を示すものの、‘神馬’と同様に低温遭遇により開花が遅延する欠点も持っている。一方、同様の手法を用いて池上ら（2006）は早期開花系統を育成したが、安定した無側枝性の獲得には至っていない。このように、1回の変異誘発処理では、無側枝性と低温開花性の両形質を併せ持つ変異体の育成には至らなかった。そこで、変異体に再度イオンビームを照射することにより段階的な改良を行うことで、両形質を併せ持つ品種の育成法を検討した。

材料および方法

1 供試品種および材料の調整

本実験では、Table 3-2-1に示した‘神馬’3系統、‘神馬’由来の無側枝性のある‘新神’、‘今神’および無側枝性変異系統のB02-1-1

を区別して照射し、変異個体の選抜や選抜系統の対照として用いた。また、変異誘発に用いる材料は、第1節に準じて茎頂培養により無菌植物を育成し、その葉身部を試験に供試した。

2 変異誘発と植物体再生

変異誘発のための照射試験は、第1節および第2節に準じて行った。不定芽再生系は、第1節に示したように、 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IAA, $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP を含む不定芽誘導培地を用い、植物体の再生、順化および育苗は、第1節の変異誘発システムに準じて行った。

3 栽培条件と選抜手法

無側枝性の選抜は、第2節に準じ、12月開花の作型で行い、摘芽数もしくは無側枝節数を指標として選抜した。また、低温開花性の選抜は、第2節と同様に定植後の栄養生長期中に低温管理が可能な3~4月開花の作型で行い、個体選抜時は最低温度 14°C の低温管理下で栽培し、消灯後の開花週数から開花の遅延しない形態特性に優れる個体の選抜を行った。

選抜個体は、第2節と同様に収穫後の株から萌芽させ、栄養繁殖により増殖して選抜系統とし、次年度、高温管理が可能な11~12月開花の作型と低温に遭遇する3~4月開花の2作型で特性の確認と系統選抜を行った。

4 ゲノムサイズの測定

核DNA量の測定は、第2節に準じて開花時の再生個体から1枚ずつ成熟葉を採取し、フローサイトメータを用いて分析した。

結果および考察

1 DNA量とイオンビーム再照射の可否

本実験では、‘神馬’3系統に加え、‘神馬’由来のイオンビーム照射により得られた無側枝性変異体である‘新神’、‘今神’およびB02-1-1系統を区別して照射した (Table 3-2-1)。その結果、供試したすべての品種・系統で、イオンビーム照射後、変異誘発当代の再

生個体が得られ、‘新神’、‘今神’および B02-1-1 系統に再照射を行った場合も原品種である‘神馬’と同様に変異個体の選抜が可能であった (Table 3-3-1)。しかし、2002 年度‘今神’に照射後再生した 1,461 個体は、照射材料とした‘今神’より生育特性が優れた個体はなく、花容・草姿に優れる変異個体は選抜できなかつた (Table 3-3-1)。これに対して、‘新神’および B02-1-1 系統を照射材料とした場合は、選抜個体が得られた (Table 3-3-1)。これは、‘新神’および B02-1-1 系統の核 DNA 量が原品種である‘神馬’と同程度であったのに対し、‘今神’では減少していた (Table 3-2-3) ことに起因すると考えられる。

原品種および 2003～2005 年の照射試験から得られた再生個体について DNA 量を比較した。その結果、Table 3-3-2 に示したように、‘新神’は‘神馬’と核 DNA 量に差はなく、‘今神’では有意に減少しており、Table 3-2-3 と同様であった。また、‘新神’および‘今神’に再度イオンビームを照射し、各処理区から無作為に 20 個の再生個体を抽出して調査した。その結果、‘今神’では、無照射区の不定芽による再生系を経由することによって、再生個体の DNA 量は有意に減少した (Fig. 3-3-1, Table 3-3-2)。炭素イオンの 4 Gy 照射区ではさらに減少することから、‘今神’の再生個体の核 DNA 量は、ほぼ全個体にあたる 95～100%で、原品種の‘神馬’より減少した (Fig. 3-3-1, Table 3-3-2)。このことは、炭素イオン照射では DNA の大きな構造変化を伴いやすい (Shikazono ら、2001, 2003, 2005) ことから、‘今神’ではゲノムの大きな変化や修復能力低下等が生じ、ゲノムの安定性が低下した結果と考えられ、再照射が適さない変異体であると考えられる。一方、最初の照射で原品種の‘神馬’と同程度の DNA 量を維持している‘新神’では、無照射区の DNA 量は減少せず、イオンビーム照射により平均で 1%程度 DNA 量が減少した (Fig. 3-3-1, Table 3-3-2)。前節で示したように、個体も

しくは系統内の測定結果が標準偏差 1%程度であり、前述の平均値で 1%の差を有意に判定できることから、本実験で用いた DNA 量の測定法は 1%以上の差を検出できると考えられた。そこで、‘新神’の照射区の再生個体について、1%以上 DNA 量が減少した個体数を算出した結果、その割合は 50%であった (Table 3-3-2)。これは、輪ギク品種‘太平’における核 DNA 量の線種・線量に対する反応と一致していた (Yamaguchi ら, 2010)。また、炭素イオン照射後の変異体は、DNA 量の減少を伴う変異と減少を伴わない点突然変異の両方が同程度に存在する (Shikazono ら, 2005) ことが報告されている。‘新神’に照射した際に 50%の再生個体で DNA 量の減少が認められたことは、遺伝子の大きな構造変化が半数で発生したことを意味する。したがって、DNA 量の減少を伴っていない残る半数の再生個体についても点突然変異を含む何らかの変異を内在していることを示唆しており、本実験で得られた再生個体の大半が点突然変異を含めた様々な変異を内在していると推察された。このことは、変異誘発率が高く、点突然変異による変異体の選抜と再照射による変異誘発が可能なイオンビームの優位性を示している。再照射により得られた選抜個体は、栄養繁殖により系統とし、次年度以降の系統選抜に供試した (Table 3-3-1)。

2 変異体における選抜特性の安定性

無側枝性を持つ‘新神’と低温開花性に優れる‘神馬’2号に炭素イオンを照射し、無側枝性を対象とした 11~12 月開花作型と低温開花性を対象とした 3~4 月開花作型で変異誘発当代の選抜を行った。‘新神’の場合は、2003 年度照射により得られた 9,033 個体の変異誘発当代から、生育や花容・草姿に優れ、無側枝性や低温開花性を示す 87 個体を選抜し (Table 3-3-3, Table 3-3-4)、2005 年までの照射試験から 141 個の選抜個体が得られた (Table 3-3-1)。また、強い無側枝性を示すものの DNA 量が減少していない B02-1-1 系統に再

照射を行ったところ，2005年度までの照射試験で1,742個体から，64個の選抜個体が得られた（Table 3-3-1）．Fig. 3-3-2に示したように，‘新神’およびB02-1-1系統にイオンビームを再照射して得られた選抜個体は，原品種‘神馬’と比較して花径は同程度で，舌状花弁数は増加しており，花容が優れる個体であった．

これらの変異誘発個体において，個体選抜時または栄養繁殖系統における無側枝性変異の出現頻度を調査した（Fig. 3-3-3）．原品種である‘神馬’9-1-1系統では，変異誘発当代の2001年12月開花作型における無側枝性変異は拡大するものの出現頻度は低かった（Fig. 3-3-3 A）．一方，‘新神’に再照射を行った場合，2003年度に花容・草姿に優れ無側枝性もしくは低温開花性を示す87個の選抜個体が得られた（Table 3-3-3, Table 3-3-4）．これらは無側枝性が発現しない，すなわち腋芽が発生する3月開花作型で選抜した51個体が含まれることから，それぞれを栄養繁殖系統とし，その84系統について翌年度，2004年12月開花作型での無側枝率を調査した．Fig. 3-3-3 Bに示すように，‘新神’由来変異系統の無側枝率は，‘新神’と同程度の無側枝率 $44.8 \pm 15.7\%$ で，‘神馬’と同様に変異誘発により無側枝性変異が拡大した．さらに，2005年度B02-1-1系統に再照射して得られた生育特性に優れた56個の選抜個体の無側枝率をFig. 3-3-3 Cに示した．B02-1-1系統は無側枝率が80.4%で，56選抜個体の無側枝率は $84.8 \pm 5.0\%$ となり，無側枝性の変異は拡大するものの9割以上が無側枝率80%を超える強い無側枝性を示した．

浅見ら（2010）は，‘神馬’に対する変異誘発では無側枝性変異の出現頻度が低いことから，幼苗や培養物を高温処理することにより，無側枝性の早期選抜を行っている．本実験では，無側枝性の‘新神’やB02-1-1系統を照射材料とすることで，無側枝性変異が高い頻度で安定して得られた．また，秋輪ギクでは，栄養繁殖が夏季の高温期にあたることから，無側枝性が強い品種は挿し穂増殖が困難であ

る（永吉, 2011）. B02-1-1 系統に対する変異誘発では, 2003 および 2004 年度の照射試験から 64 個体を選抜したが, 次年度の系統選抜時の供試数は 33 系統に減少した (Table 3-3-1). これは, 無側枝性により腋芽が消失し, 増殖できない個体が存在したため, 無側枝率が高く増殖率の低い変異個体を選抜の初期段階で淘汰できることを示している. また, ‘新神’ に照射した場合, 無側枝性の異なる変異系統が得られることから, 再照射によって育種目標に合わせた適度な無側枝レベルへ段階的に改良が可能であることを示している.

一方, 低温開花性については, 定植後栄養生長期間に低温に遭遇する 3~4 月開花作型で早期に開花する変異誘発当代を選抜した. これらの選抜個体は栄養繁殖により増殖し, それぞれを系統として, 次年度の 11~12 月開花作型と 3~4 月開花作型に供試した. 変異誘発当代において個体レベルで選抜した特性と, 次年度の系統レベルでの特性について比較した. 2004 年 3 月開花の栽培で, ‘新神’ は開花までに消灯後 9 週を要したが, 選抜個体は 8 週以内の開花個体を選抜した. 次年度 2005 年 4 月開花の作型で, 消灯後の開花週数が ‘神馬’ 2 号は 9 週, ‘新神’ は 12.1 週となる温度管理下で, 選抜系統の開花は 9~13 週となった (Fig. 3-3-4 A). また, 定植後栄養生長期間に低温に遭遇しない 2003 年 12 月開花の選抜では, ‘新神’ より早い消灯後 8 週未満の開花個体を選抜したことにより, 2005 年 4 月開花の作型で, 消灯後の開花週数は 9~13 週となった (Fig. 3-3-4 B). ‘神馬’ の開花遅延は, 低温遭遇による幼若化 (幼若層への誘導) が主な要因とされている (永吉, 2011). また, 幼若化は切り花生産の栽培期間だけでなく, 親株, 穂冷蔵および挿し芽等それぞれの生育時期の環境も影響することが報告されている (永吉, 2011). さらに, 第 2 節で示したように, 茎頂培養苗や葉身由来の再生個体が生育旺盛になり, 開花が遅延すること (Table 3-2-2) から, 変異誘発当代の個体選抜の結果と, 栄養繁殖により増殖した系統選抜時

の開花特性が必ずしも一致しなかった理由と考えられた。しかし、個体選抜時に早期開花性の選抜を行うことにより、系統選抜時には元品種の‘新神’より早期開花の系統が得られたことから、低温開花性の選抜が有効であると考えられた。

3 無側枝性と低温開花性を併せ持つ新品種の育成

2003年度の照射試験では、‘神馬’2号および‘新神’に変異を誘発し、9,831個体から94個体を選抜した（Table 3-3-3, Table 3-3-4）。2004年度にはこれらから得られた92系統を2作型で栽培して、その中から低温開花性および無側枝性を示す6系統を選抜した。これら6系統を含めて2005年4月および11月開花作型で特性評価を行った。その結果、最低温度を12℃で管理した4月開花作型では、Table 3-3-5に示すように、‘神馬’1号および‘新神’は低温遭遇による開花遅延により、到花日数が85日前後となった。これに対して、低温開花性に優れる‘神馬’2号は67日と2.5週の差となった。一方、低温開花性選抜系統の到花日数は、B03-1-3系統が‘神馬’2号より短く、B03-2-2およびB03-2-5系統は同程度で、他は原品種の‘神馬’や‘新神’より早期に開花した（Table 3-3-5）。また、無側枝性が発現しにくい生育期間が低温期の4月開花作型では、摘芽・摘蕾数に大きな差は認められなかった。さらに、植物体の生育量を示す草丈や90 cm切り花重に品種・系統による差が認められた（Table 3-3-5）が、これは到花日数の長短に由来するものと考えられた。ただし、B03-2-2系統は到花日数が短いにもかかわらず、草丈や90 cm切り花重は他系統を上回っている。これは、低温管理下で茎の伸長や展開葉数が上回ることを示しており、低温伸長性につながるものと推察された。

無側枝性が発現しやすい11月開花作型では、Table 3-3-6に示すように、‘神馬’1号および‘神馬’2号の摘芽数が約30個であるのに対して、‘新神’は14.3個と半減した。各選抜系統の摘芽数は、

B03-1-3 系統が‘新神’と同程度の 13.0 個と最も少なく、B03-2-2 系統以外は原品種の‘神馬’より少なかった。また、この作型における到花日数は 51.4～54.1 日で、品種・系統間差は 2.7 日と小さかった。これは、低温に遭遇しない作型では原品種の‘神馬’と開花習性に大きな変化がないことを示しており、生育量の指標となる 90 cm 切り花重に差は認められなかった (Table 3-3-6)。なお、B03-2-2 系統は‘神馬’2 号由来であり、低温開花性を示すものの (Table 3-3-5)、摘芽数は原品種より多くなった (Table 3-3-6)。さらに、この中の 5 系統について低温開花性を確認するため、2006 年 4 月開花作型において、定植後開花まで最低温度 12℃で管理し開花日数を調査した。その結果、電照抑制を終了し短日条件となる消灯後の開花週数は、‘神馬’1 号が 11 週、‘神馬’2 号が 9 週、‘新神’は 13 週であった (データ省略)。Fig. 3-3-5 で示す消灯 81 日後の開花状況は、‘神馬’1 号が開花期、‘神馬’2 号は開花後満開に近い状態、および‘新神’は開花前の状態であり、開花週数の違いを明確に現していた。同条件で栽培した 5 系統の開花状況から、B03-1-3 および B03-2-2 の 2 系統は‘神馬’2 号より早く、B03-2-5 系統は同程度で、B03-1-7 および B03-1-21 の 2 系統は、‘神馬’2 号と 1 号の中間程度であった (Fig. 3-3-5)。これは、供試した 5 系統の低温開花性が‘神馬’1 号および‘新神’より改善されたことを示しており、Table 3-3-5 に示した前年の結果と一致していた。前述のように、変異誘発当代の低温管理による選抜結果と、栄養繁殖により増殖した系統選抜時の低温遭遇後の開花特性は、必ずしも一致しなかった。しかし、栄養繁殖によりクローン増殖した種苗で低温や高温に遭遇する各作型で栽培を繰り返し、特性を把握することにより、‘新神’から‘神馬’2 号と同程度の低温管理が可能な系統が選抜できた。これらの結果から、無側枝性と低温開花性の両形質が改善された B03-1-3 および

B03-2-5 の 2 系統が選抜，育成され（Table 3-3-5, Table 3-3-6），その特性の安定性が確認できた。

4 イオンビーム照射による育成品種と特性評価

低温開花性と無側枝性を顕著に示す B03-1-3 系統を新しいタイプの‘新神’として，‘新神 2’の名称で品種登録を行った（農林水産省品種登録第 19096 号）。この‘新神 2’の特性は Table 3-3-7 に示すように‘神馬’や‘新神’と形態的な基本特性は変わらず，切り花の品質を左右する花径や花弁数は増加し，側枝数が‘新神’よりさらに少なくなった。浅見ら（2010）は，無側枝性の検定結果として，‘新神’を中程度，‘新神 2’は強い無側枝性を示す品種と評価しており，これら 2 品種の無側枝性の安定性が確認されている。

鹿児島県農業経営管理指導指標（鹿児島県農政部，2001）によると，輪ギク栽培において育苗から切り花生産および経営管理に至る 10 aあたりの 1 作における全労働時間は 1,050 時間と見積もられている。そのうち，摘芽・摘蕾作業に要する時間は 390 時間で最も多く，全作業時間の 37% に達する。特に‘神馬’の場合，側枝数が多くなる 11～12 月開花作型では，1 本あたり 30～40 個の摘芽を行う（Fig. 3-2-3）。したがって，120～160 万個 / 10a の花蕾や側枝を摘み取る必要があり（Fig. 3-2-1），摘芽に要する作業時間は前述の 390 時間を上回る。このように，摘芽作業時間は側枝数そのまま反映されることから，‘神馬’と比較して無側枝率 50% の‘新神’の場合，摘芽作業時間は 5 割程度になる。さらに，無側枝率 70% の‘新神 2’の場合，3 割程度に短縮できることから，200～270 時間の省力化につながることになる。また，‘神馬’や‘新神’の場合，低温遭遇により開花が遅延することから，開花遅延を引き起こさないための温度管理として，最低温度を 14～16℃ で管理する必要がある（永吉，2011）。これに対して，低温開花性に優れる‘神馬’ 2 号では，通常より 2℃ 低い 12～14℃ での温度管理が可能である（永吉，2011）。鹿児島県農

業経営管理指導指標（鹿児島県農政部，2001）によると，2～3月出し輪ギク栽培において，暖房に必要なA重油の消費量は $8,000 \text{ L}^{-1} \cdot 10 \text{ a}^{-1}$ が見積もられている．2006年3月開花作型で‘神馬’や‘新神’が開花遅延を起こさない温度管理を行う場合，鹿児島県指宿市における栽培期間中の外気温から必要な燃料消費量として $9,000 \sim 9,500 \text{ L}^{-1} \cdot 10 \text{ a}^{-1}$ が試算された（未発表）．一方，低温管理が可能な‘神馬’2号の場合，同時期の燃料消費量は $6,000 \text{ L}^{-1} \cdot 10 \text{ a}^{-1}$ となり，作型あたり $3,000 \sim 3,500 \text{ L}^{-1} \cdot 10 \text{ a}^{-1}$ の燃料節減が可能と試算されている（未発表）．以上のように，輪ギクに対する無側枝性と低温開花性の両形質の付与が労働力や燃料費の削減に結びつくことが確認できた．

‘新神2’は，神馬系秋輪ギクの最終目標とした無側枝性と低温開花性の両形質を併せ持つ優れた品種として育成した．しかし，水揚げ（日持ち性）の不安定性や，無側枝性が強いことにより高温期の自家増殖が困難であることなどの問題点が明らかとなったため，残念ながら生産量は減少している．この問題を解決するため‘新神’へのイオンビーム再照射による低温開花性の改良が進められており（田之頭ら，2012），‘神馬’に由来する低温開花性と無側枝性を兼ね備えた最終的な改良品種が近々発表される予定である．

以上のように，本研究では‘新神’にイオンビームを再照射することにより，無側枝性および低温開花性の両形質を実用レベルで改変できることが実証できた．このことは，イオンビーム照射が輪ギクの特性改良を行う際，花容・草姿・生育特性に優れ，目的に合わせた特性を付与できる点で，優れた手法であることが明らかとなった．さらに，DNA量が減少していない変異体を選抜することにより，このような変異体を照射材料として，複数の特性を段階的に改良できることが示された．これは，従来の放射線育種では行われなかった，イオンビーム照射に特徴的な変異誘発の新しい手法であり，イ

オンビーム照射による変異誘発を行っている他の植物種においても、
広く応用可能な技術と考えられる。

要 約

高次倍数性の栄養繁殖植物であるキク類について、イオンビーム照射による変異誘発技術の確立を目的として、本章では、まず培養系の確立、照射材料の選定およびイオンビームの線種・線量の検討を行った。その結果、10品種以上のキク類で一般切り花栽培と同様の管理で、3,000~4,000個体の変異誘発当代から、形態および生育特性による優良変異個体を選抜する変異誘発システムを確立した。

この変異誘発システムで得られた変異個体はキメラ性が低く、変異誘発当代での選抜が可能であった。また、白色の秋輪ギク‘神馬’は、我が国における主力品種であるが、側枝の発生が多く、低温遭遇により開花が遅れる欠点がある。‘神馬’を対象としたイオンビーム照射によって、無側枝性変異の選抜から側枝が少ない‘新神’および‘今神’を育成した。しかし、無側枝性と低温開花性の両特性を併せ持つ変異個体は得られなかった。

そこで、イオンビーム照射により得られた変異体に再度変異誘発を行った。その結果、イオンビームを再照射する際は、DNA量が原品種と同程度の変異体を用いる必要があることを示し、再照射による変異誘発および優良変異体の選抜が可能であることを実証した。また、‘新神’にイオンビームを照射し、低温開花性の選抜を行うことにより、無側枝性と低温開花性の特性を併せ持つ変異体が選抜でき、‘新神2’の育成に至った。この無側枝性と低温開花性の両特性の付与は、高品質切り花の省力・低コスト生産を実現するものである。このように、イオンビーム照射による変異誘発は、複数の特性を段階的に改良できることを示している。これらの知見は、輪ギクの特性改良に限らず、イオンビーム照射による変異誘発において、広く適用可能で有効な手法と考えられる。

Table 3-1-1. Influence of phytohormone combination on adventitious bud formation in chrysanthemum cv. 'Jimba'.

Medium	Additional substances (mg/l)			Leaf			Petal		
	NAA	IAA	BA	% of regeneration	No. of adventitious-buds/ segment	Plating efficiency	% of regeneration	No. of adventitious-buds/ segment	Plating efficiency
				frequency (STD)	(STD)	[No. of buds/ plate (STD)]	frequency (STD)	(STD)	[No. of buds/ plate (STD)]
N0.1 B0.5	0.1		0.5	4 (2.5)	2.0 (2.7)	3 (2.9)	31 (16.0)	6.7 (2.5)	46 (36.1)
N0.1 B1.0	0.1		1.0	1 (2.5)	1.0 (2.2)	1 (2.5)	22 (10.9)	5.0 (0.0)	22 (10.9)
N0.5 B0.5	0.5		0.5	44 (23.6)	6.0 (2.2)	55 (33.2)	47 (14.2)	6.7 (2.5)	64 (32.9)
N0.5 B1.0	0.5		1.0	31 (18.5)	5.0 (0.0)	31 (18.5)	48 (22.9)	8.3 (2.5)	89 (55.6)
I1.0 B0.5		1.0	0.5	87 (12.0)	9.2 (2.0)	174 (24.1)	62 (18.4)	10.0 (0.0)	123 (36.7)
I1.0 B1.0		1.0	1.0	74 (23.3)	7.5 (5.2)	148 (104.3)	53 (18.0)	9.4 (1.7)	101 (41.7)
I5.0 B0.5		5.0	0.5	90 (17.3)	13.8 (6.3)	303 (95.0)	55 (18.4)	8.9 (2.2)	103 (47.4)
I5.0 B1.0		5.0	1.0	98 (5.0)	16.0 (6.5)	368 (65.0)	64 (20.9)	9.4 (1.7)	125 (48.0)

Table 3-1-2. Regeneration frequency of some chrysanthemum cultivars using adventitious bud formation medium.

Cultivars	Explants	Medium	% of regeneration frequency	Plating efficiency ^z
Standard type				
'Jimba'	Leaf	I 5.0 B1.0	100	++++
'Jimba'	Petal	I 5.0 B1.0	64	+++
'Sanyo-ohgon'	Leaf	I 5.0 B0.1	100	+++
'Hohada-no-aki'	Leaf	I 5.0 B0.5	85	++
'Yumito-taisan'	Leaf	I 5.0 B0.5	83	++
'Floral-Yuka'	Leaf	I 5.0 B0.5	100	+++
'Tokai-kimba'	Leaf	N0.5 B0.5	30	+
'Sei-un'	Leaf	N0.5 B0.5	61	+++
'Sei-un'	Petal	N0.1 B1.0	75	++
'Summer-yellow'	Leaf	I 5.0 B0.1	100	+++
'Super-yellow'	Leaf	I 5.0 B0.1	100	+++
Spray type				
'Elias'	Leaf	I 5.0 B0.1	3	±
'Elias'	Petal	I 5.0 B1.0	5	+
'Loire'	Leaf	I 5.0 B0.1	5	±
'Loire'	Petal	I 5.0 B0.5	9	+
'Southern-cherry'	Leaf	I 1.0 B1.0	7	±
'Kana-no-orihime'	Petal	I 5.0 B1.0	85	+++
'Kana-no-hikoboshi'	Petal	I 5.0 B1.0	83	+++

^z No. of buds / plate. -: 0, ±: 1-5, +: 5-50, ++: 50-100, +++: 100-200, ++++: 200<.

^y I: IAA, B: BAP, N: NAA, 0.1~5.0: 0.1~5.0 mg·L⁻¹.

Table 3-1-3. Hyperhydricity control in tissue culture generated chrysanthemum by dehydration treatment.

Cultivars	Treatment	Water content of after treatment *	% of dehydrate *	% Survival after subcultured for 1 month (STD)		% of shoots		
						hyper-hydrated (STD)	normal	
'Syuhono-chikara'	Non-treated control	93.6	0.0	100	(0)	100	(0)	0
	Dehydration treatment							
	20 min.	90.9	2.7	85	(7)	20	(9)	80
	30 min.	89.2	4.4	81	(8)	16	(3)	84
'Nansuno-mai'	Non-treated control	92.7	0.0	100	(0)	100	(0)	0
	Dehydration treatment							
	20 min.	89.2	3.5	98	(4)	21	(7)	79
	30 min.	87.8	4.9	85	(7)	41	(11)	59

* mg water in 100 mg tissue,

Table 3-1-4. Water content of vermiculite for rooting and adaptation in shoots of chrysanthemum.

	Water content of mg water in 100 mg vermiculite (STD)		
	before preparation	after preparation	water saturation
A new article	2 (0)	195 (1)	370 (19)
Recycling product	111 (1)	127 (4)	260 (5)

Table 3-1-5. Frequency distribution of number of petals resulting from regenerated plants with different tissue of chrysanthemum cv. 'Jimba'.

No. of petals	Frequency distribution of regenerated plants from different tissue		
	meristem	leaf	petal
	%	%	%
90~100			7.6
101~130		2.1	42.9
131~150		4.3	39.0
151~170	75.0	73.4	8.6
171~190	25.0	16.0	1.9
191~210		2.2	
211~230		1.0	
231~250		1.0	
No. of investigated plants	11	325	371
Average on the number of petals	165.0	162.3	130.8

Table 3-1-6. Effects of dose of irradiation on number of petals resulting from regenerated plants with leaf explants of chrysanthemum cv. 'Jimba'.

Raddiation type	Plant material line		Total dose (Gy)	Percentage of variants to number of petals with regenerated plants						No. of investigated plants		
				~150	~160	~170	~180	~190	~200		~210	~220
control	'Jimba' 9-1-1	meristem culture	0			7.0	72.0	21.0			14	
		regenerated from leaf	0			3.0	18.0	46.0	21.0	3.0	9.0	34
220 MeV · ¹² C ⁵⁺	'Jimba' 9-1-1	regenerated from leaf	2.0	1.0	6.0	26.0	52.0	13.0	2.0		89	
			3.0	2.0	5.0	26.0	49.0	16.0	1.0	1.0	85	
			4.0			16.0	50.0	29.0	5.0		38	
			5.0		6.0	11.0	83.0				18	
320MeV · ¹² C ⁶⁺	'Jimba' 9-1-1	regenerated from leaf	1.0				3.0	47.0	34.0	13.0	3.0	40
			2.0				40.0	44.0	9.0	2.0	5.0	43
			3.0			10.0	42.0	29.0	19.0			21
Soft X-ray (3.6Gy/h)	'Jimba' 9-1-1	regenerated from leaf	5.0			3.0	19.0	47.0	25.0	6.0	64	

Table 3-1-7. Effects of dose of irradiation on leaf shape of resulting from regenerated plants with leaf explants of chrysanthemum cv. 'Jimba'.

Raddiation type	Dose	Percentage of variants to leaf shape with regenerated plants.			No. of investigated plants
		normal	thin ^z	abnormal ^y	
	Gy	%	%	%	
control	0	88.8	10.5	0.7	401
220 MeV · ¹² C ⁵⁺	0.5	81.4	17.6	1.0	204
	1.0	86.7	11.5	1.7	347
	1.5	79.4	18.1	2.5	243
	2.0	58.6	31.5	9.9	111
	3.0	80.2	17.9	1.9	106
	4.0	36.2	57.4	6.4	47
	5.0	41.2	47.1	11.8	17
320MeV · ¹² C ⁶⁺	1.0	85.9	14.1	0.0	447
	2.0	87.0	10.9	2.2	46
	3.0	62.4	34.7	2.9	418
	5.0	45.7	42.9	11.4	35
Soft X-ray (3.6Gy/h)	5.0	91.1	7.6	1.3	381

^z Leaf having deeply incised.

^y Leaf having different size and/or length/width ratio.

Table 3-2-1. Ecological traits and origin of chrysanthemum cultivars used in this study.

Cultivars and line	Origin	Mutation or selection	Ecological traits	Reference
'Jimba' #1	'Jimba'	Field selection	Good sprouting	—
'Jimba' #2	'Jimba'	Field selection	Low temp. flowering	—
'Jimba' 9-1-1	'Jimba'	Field selection	Good flower quantity	—
'Aladdin'	'Jimba' 9-1-1	Ion beam	Non-branching node	Imakiire <i>et al.</i> (2006)
'Imagine'	'Jimba' 9-1-1	Ion beam	Non-branching node	Ueno <i>et al.</i> (2003)
B02-1-1	'Jimba' 9-1-1	Ion beam	Non-branching node	Ueno <i>et al.</i> (2003)

Table 3-2-2. Effects of dose of irradiation on flowering periods resulting from regenerated plants with leaf explants of chrysanthemum cv. 'Jimba' in March 2002.

Radiation type	Plant material line	Plant material	Total dose (Gy)	Percentage of variants on the number of weeks to flowering after lighting stop.							No. of investigated plants	
				~8W	~9W	~10W	~11W	~12W	~13W	~14W		14W~
control	'Jimba' #1	vagitative propagation	0	33.3	58.3	8.3						24
control	'Jimba' 9-1-1	vagitative propagation	0	30.0	70.0							10
		meristem culture	0		18.5	25.9	29.6	14.8	11.1			27
		regenerated from leaf	0		6.4	23.8	23.0	21.7	20.7	4.1	0.3	391
220 MeV · C	'Jimba' 9-1-1	regenerated from leaf	0.5		4.1	11.7	28.6	21.9	27.0	6.6		196
			1.0		4.2	20.8	24.1	19.9	23.0	5.8	2.2	361
			1.5		8.3	19.0	23.4	18.3	18.7	8.3	4.0	252
			2.0		12.8	27.4	23.9	10.3	17.1	5.1	3.4	117
			3.0		13.1	18.7	22.4	20.6	17.8	4.7	2.8	107
			4.0		17.4	6.5	19.6	13.0	17.4	8.7	17.4	46
320MeV · C	'Jimba' 9-1-1	regenerated from leaf	1.0	0.2	2.5	16.4	19.3	16.2	30.6	10.3	4.5	445
			2.0		16.3	20.9	11.6	11.6	18.6	14.0	7.0	43
			3.0		5.7	21.3	23.5	16.0	22.0	7.0	4.4	455
			4.0				13.3	20.0	30.0	10.0	26.7	30
Soft X-ray	'Jimba' 9-1-1	regenerated from leaf	5.0	1.5	8.3	25.1	26.9	14.8	17.8	4.4	1.2	338
control	'Jimba' #2	vagitative propagation	0	78.9	21.1							38
		meristem culture	0	9.5	47.6	7.1	19.0	7.1	9.5			42
Soft X-ray	'Jimba' #2	regenerated from leaf	5.0	2.3	43.7	20.7	14.9	9.2	9.2			87

Table 3-2-3. DNA contents of chrysanthemum cv. 'Jimba' and few axillary buds selected lines.

Plant material		DNA contents	
line	propagation	%	STD
'Jimba' 9-1-1	meristem culture	100.0	0.9
'Jimba' #2	meristem culture	100.0	1.1
'Imagine'	meristem culture	98.1	0.9
	vagitative propagation	98.3	1.2
'Aladdin'	meristem culture	100.0	1.2
	vagitative propagation	100.1	1.2
B02-1-1	meristem culture	100.0	0.5

Table 3-3-1. The number of tested and selected plants, regenerated from leaf cultures irradiated with ion beam from 2001 to 2005.

Cultivars and line	Irradiation year	Number of tested M ₁ plants ^z	Number of selected plants	Line selection ^y	Number of selected line	Resistration
'Jimba' #1	2005	1,372	1	1	0	—
'Jimba' #2	2001-2003	4,535	44	44	7	—
'Jimba' 9-1-1	2001-2002	12,226	17	17	4	2 ^x
'Aladdin'	2003-2005	14,815	141	141	9	1 ^w
'Imagine'	2002	1,461	0	—	—	—
B02-1-1	2004-2005	1,742	64	33	4	—

^z M₁ plants means 'Mutanized 1st generation plants'. These M₁ plants were grown from November to December or from March to April using a flowering cropping system.

^y Each mutant line was vegetatively propagated from M₁ plants. These mutant lines were grown from November to December and from March to April using a flowering cropping system.

^x These two lines were 'Aladdin' and 'Imagine'.

^w This line was 'Aladdin 2'.

Table 3-3-2. DNA contents of tested plants, which regenerated from leaf cultures re-irradiated by ion beam.

Plant material	Radiation type	Dose Gy	Number of tested plants	DNA contents			The number and % of the plants of decreased DNA amount ^y	
				%	t-test ^z	STD	No.	%
'Jimba'	-	-	10	100.0	-	1.0	-	-
'Aladdin'	-	-	15	100.1		1.2	-	-
'Imagine'	-	-	10	98.2	**	1.0	-	-
B02-1-1	-	-	5	100.0		0.4	-	-
'Aladdin'	-	-	16	100.2	-	0.7	-	-
Regenerated plants from re- irradiated	320MeV· ¹² C ⁶⁺	0	20	99.9		0.8	3	15
		1	20	98.8	**	1.7	10	50
		2	20	99.0	*	1.2	10	50
'Aladdin' ^x		3	20	98.8	**	1.4	10	50
'Imagine'	-	-	16	98.2	-	0.9	-	-
Regenerated plants from re- irradiated	320MeV· ¹² C ⁶⁺	0	20	96.9	**	1.3	20	100
		2	20	96.9	**	1.4	19	95
		3	20	97.1		1.3	19	95
'Imagine' ^x		4	20	95.3	**	2.5	20	100

^z Means followed by the superscripts are significantly different at the 5% level (*) or 1% level (**) by t-test.

^y The plants decreased more than 1% DNA amount.

^x Non selected regenerated M1 plants in 2003.

Table 3-3-3. The number of tested and selected plants in December 2003, which regenerated from leaf disc cultures irradiated by ion beam, for selection of few axillary buds.

Plant tested	Radiation	Energy MeV	Dose Gy	Flowering period			Characteristics of cultivar (*) or number of selected plants				
				December			% of nodes without axillary buds				
				Number of tested plants	Number of selected plants	% of selection rate	>80	>50	>30	>10	10>
'Aladdin'	-	-	-	129					*	*	
	C	320	0	445	9	2.0	1	2	4	2	
Regenerated plants from re-irradiated 'Aladdin'			1	1,364	12	0.9	1	2	7	2	
			2	1,323	4	0.3		1	2	1	
			3	1,049	10	1.0			7	3	
			5	194	1	0.5			1		
			sub-total	4,375	36		2	5	21	8	
'Jimba' #2	-	-	-	44					*	*	
	C	320	0	58	0	0.0					
Regenerated plants from irradiated 'Jimba' #2			1	125	2	1.6		1	1		
			2	327	2	0.6		1	1		
			3	288	3	1.0		2	1		
			5	0	0	0.0					
			sub-total	798	7			4	3		
			Total	5,173	43		2	5	25	11	

Table 3-3-4. The number of tested and selected plants in March 2004, which regenerated from leaf disc cultures irradiated by ion beam, for selection of early flowering type.

Plant tested	Radiation	Energy MeV	Dose Gy	Flowering period			Characteristics of cultivar (*) or number of selected plants			
				March			Number of weeks to flowering after lighting stop.			
				Number of tested plants	Number of selected plants	% of selection rate	7	8	9	10
'Jimba' 9-1-1	-	-	-	14				*		
'Jimba' #1	-	-	-	15				*		
'Jimba' #2	-	-	-	27			*			
'Imagine'	-	-	-	33				*		
'Aladdin'	-	-	-	163					*	
B02-1-1	-	-	-	107				*		
			sub-total	359						
	C	320	0	217	3	1.4		3		
Regenerated plants from re-irradiated 'Aladdin'			1	109	0	0.0				
			2	705	6	0.9	4	2		
			3	428	5	1.2	2	3		
	C	220	1	569	12	2.1	1	11		
			1.5	1,519	17	1.1	3	14		
			2	752	8	1.1	2	6		
			sub-total	4,299	51		12	39		
			Total	4,658						

Table 3-3-5. Characteristics of selected lines in April flowering, derived from 'Jimba' or 'Aladdin', and these were mutants after ion beam irradiation.

April flowering cropping system in 2005 ^z							
Cultivar or selected line	Ion beam irradiated plant	Flowering date	Days to flowering in short days	Number of investigated plants	Plant height cm	Weight of 90 cm cut flower g	Number of dis-budding node
'Jimba' #1	-	28-Apr	84.9 a ^y	5	129.8 a ^x	105.2 ab ^x	32.0 a ^x
'Jimba' #2	-	14-Apr	67.2 d	4	115.0 c	105.0 ab	27.8 a
'Aladdin'	'Jimba' 9-1-1	30-Apr	86.4 a	5	129.4 a	109.0 a	32.6 a
B03-1-3	'Aladdin'	7-Apr	62.5 e	6	107.7 d	79.7 bc	31.3 a
B03-1-7	'Aladdin'	14-Apr	70.7 cd	4	110.5 d	80.8 bc	32.5 a
B03-1-16	'Aladdin'	19-Apr	74.4 bc	2	130.0 a	91.5 abc	33.0 a
B03-1-21	'Aladdin'	21-Apr	78.3 b	5	116.8 c	108.8 a	43.6 b
B03-2-2	'Jimba' #2	8-Apr	65.1 de	3	122.7 b	110.7 a	38.7 ab
B03-2-5	'Aladdin'	10-Apr	66.1 de	3	108.0 d	72.0 c	38.3 ab

^z The plants were cultivated with at least 20 plants per line. Planting date: 2004/12/13. Lighting stop date: 2005/2/3. Minimum temperature controlled at 12°C.

^y Different letters within columns indicate significant differences by Tukey's multiple range test ($p < 0.01$)($n=10$).

^x Different letters within columns indicate significant differences by Tukey-Kramer's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 3-3-6. Characteristics of selected lines in November flowering, derived from ‘Jimba’ or ‘Aladdin’, and these were mutants after ion beam irradiation.

November flowering cropping system in 2005 ^z							
Cultivar or selected line	Ion beam irradiated plant	Flowering date	Days to flowering in short days	Number of investigated plants	Plant height cm	Weight of 90 cm cut flower g	Number of dis-budding node
'Jimba' #1	-	24-Nov	52.1 ab ^y	5	121.4 b ^x	75.4 ns	30.0 c ^x
'Jimba' #2	-	23-Nov	51.4 a	5	126.0 a	69.4 ns	31.6 c
'Aladdin'	'Jimba' 9-1-1	24-Nov	54.1 b	7	109.3 d	77.4 ns	14.3 a
B03-1-3	'Aladdin'	25-Nov	52.9 ab	2	120.5 bc	73.0 ns	13.0 a
B03-1-7	'Aladdin'	26-Nov	54.1 b	6	110.5 d	77.5 ns	16.8 ab
B03-1-16	'Aladdin'	26-Nov	54.1 b	7	107.9 d	76.4 ns	26.0 b
B03-1-21	'Aladdin'	26-Nov	54.1 b	7	116.9 c	73.1 ns	19.9 ab
B03-2-2	'Jimba' #2	24-Nov	52.3 ab	3	111.7 d	78.0 ns	45.3 d
B03-2-5	'Aladdin'	26-Nov	54.1 b	5	109.4 d	81.4 ns	24.0 ab

^z The plants were cultivated with at least 20 plants per line. Planting date: 2005/8/18. Lighting stop date: 2005/10/3. Temperature controlled at 25°C by ventilation and non-heating.

^y Different letters within columns indicate significant differences by Tukey’s multiple range test ($p < 0.01$)($n=10$).

^x Different letters within columns indicate significant differences by Tukey-Kramer’s multiple range test ($p < 0.05$).

Table 3-3-7. Characteristics of chrysanthemum cultivars in registration form, derived from 'Jimba', and these were mutants after ion beam irradiation

^z No.	Characteristics	'Jimba'	'Aladdin'	'Imagine'	'Aladdin2'
1	Plant: length	06: medium 120 cm	06: medium 120 cm	06: medium 119 cm	06: medium 120 cm
5	Stem color	01: green	01: green	01: green	01: green
6	Stipule: size	03: small	03: small	03: small	03: small
7	Petiole: attitude	01: very strongly upwards	01: very strongly upwards	01: very strongly upwards	01: very strongly upwards
9	Leaf: length	05: medium 96 mm	06: medium 101 mm	05: medium 91 mm	06: medium 117 mm
10	Leaf: width	04: medium 60 mm	03: medium 57 mm	03: medium 57 mm	03: medium 57 mm
11	Leaf: ratio length/width	1.6	1.6	1.6	1.9
13	Leaf: depth of lowest lateral sinus	05: medium	05: medium	05: medium	04: medium
33	Flower head: diameter (disbudded plants)	05: medium 140 mm	05: medium 144 mm	05: medium 138 mm	06: medium 154 mm
35	Flower head: height (disbudded plants)	06: medium	06: medium	06: medium	06: medium
39	Flower head: density of ray florets	05: medium	06: medium to dense	05: medium	06: medium to dense
41	Flower head: predominant type of ray floret	02: incurving	02: incurving	02: incurving	02: incurving
52	Ray floret: longitudinal axis	01: incurving	01: incurving	01: incurving	01: incurving
58	Ray floret: length	06: med-long 65 mm	07: long 67 mm	05: med-long 61 mm	07: long 76 mm
59	Ray floret: width	05: medium 15 mm	05: medium 15 mm	05: medium 14 mm	05: medium 17 mm
63	Ray floret: main color of inner side	No. 01 white JHSCC	No. 01 white JHSCC	No. 01 white JHSCC	No. 01 white JHSCC
66	Ray floret: pattern of second color of inner side	01: solid	01: solid	01: solid	01: solid
90	Flower habits	Oct.-Nov.	Oct.-Nov.	Oct.-Nov.	Oct.-Nov.
92	No. of lateral buds	06: medium to many	04: medium	02: very few to few	03: few

^zThe number of characteristics in registration form.

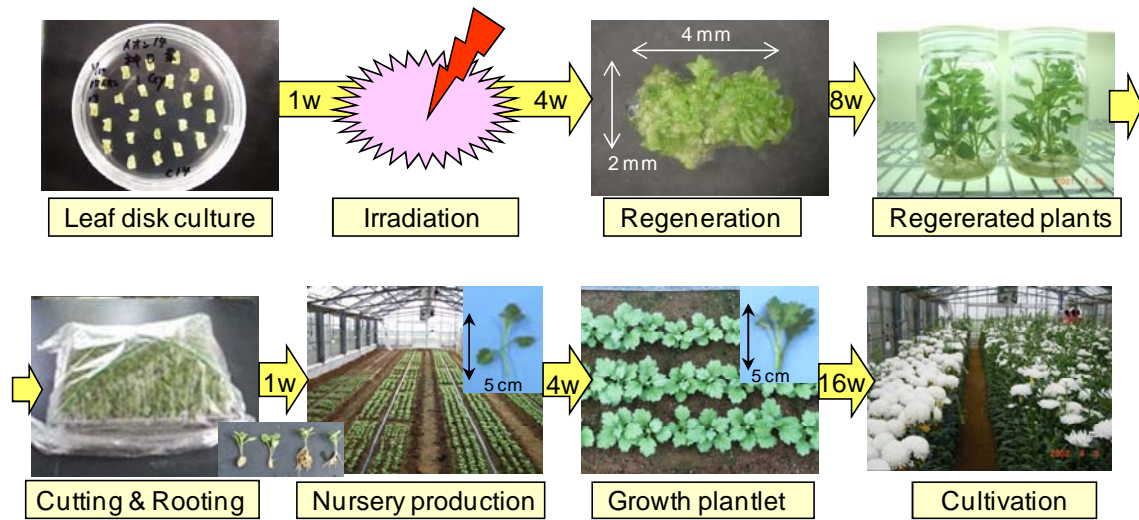


Fig. 3-1-1. Schematic representation of mutation induction of chrysanthemum using ion beam breeding system.

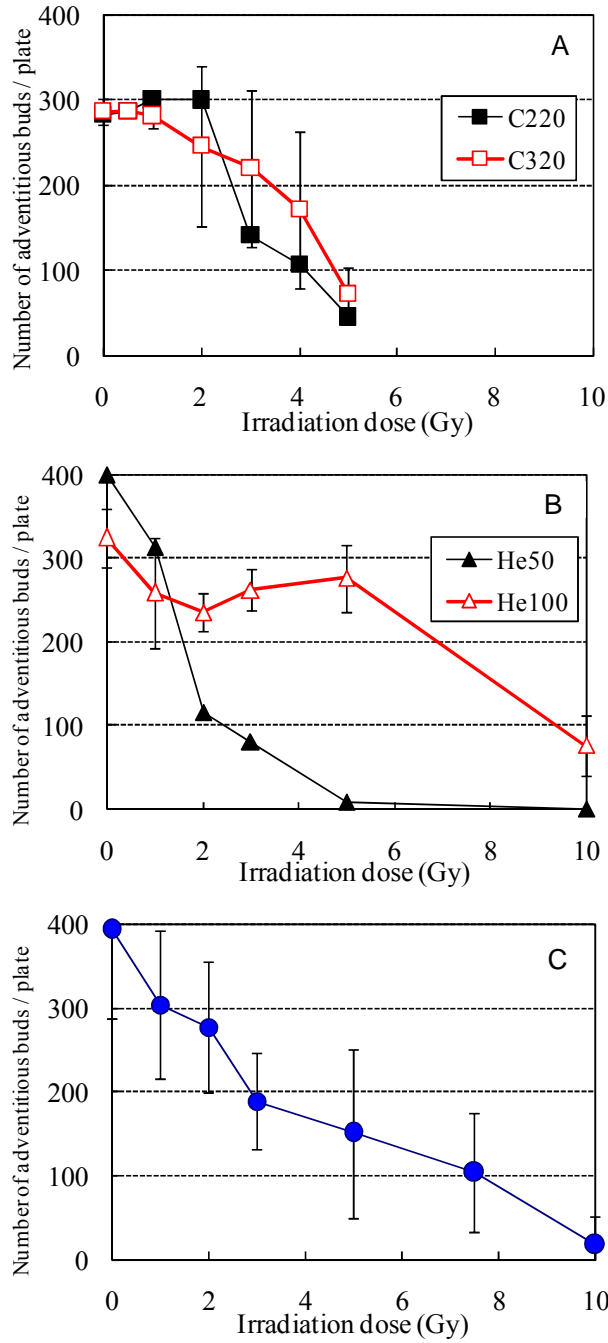


Fig. 3-1-2. Effects of irradiation dose of ion beam or soft X-ray on regeneration of leaf explants.

The regeneration was number of adventitious buds/plate (plating efficiency) , as estimated from at least 80 explants (4 plates × 20 leaf segments/plate) from segments of chrysanthemum cv. ‘Jimba’. A ; 220 MeV or 320 MeV Carbon ion beam, B; 50 MeV or 100 MeV Helium ion beam, C; soft X-ray 3.6Gy/h. 320 MeV - C, 100 MeV - He and soft X-ray irradiations were three times different irradiation.



Fig. 3-1-3. Mutation of flower characters by 100 MeV Helium ion beam irradiation on leaf explants of chrysanthemum cv. 'Jimba'.



Fig. 3-2-1. Disbudding in the chrysanthemum cultivation.

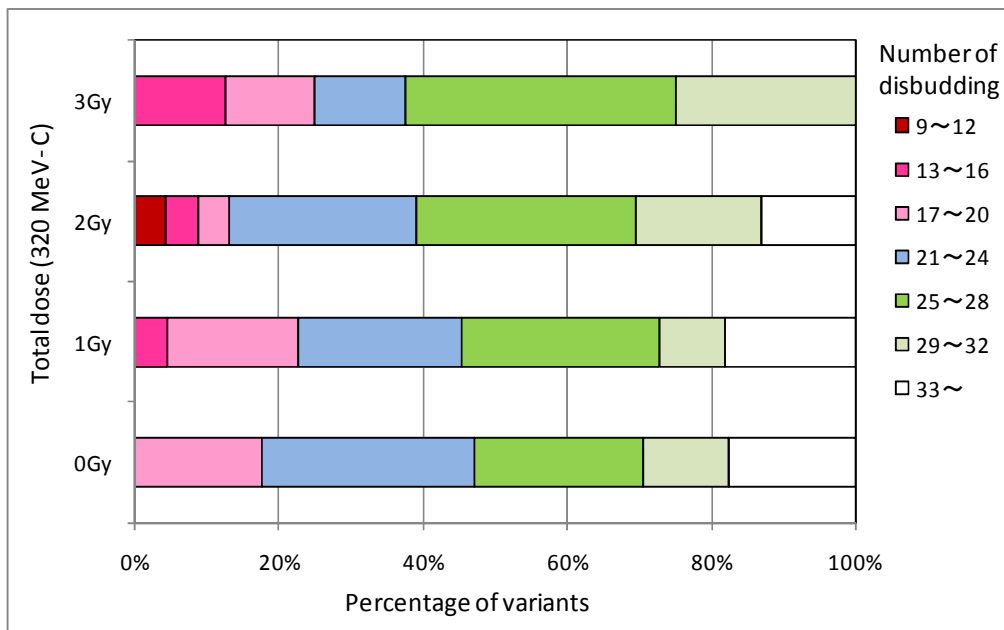


Fig. 3-2-2. Effects of dose of irradiation on number of disbudding resulting from regenerated plants with leaf explants of chrysanthemum cv. ‘Jimba’.

These plants were grown under December flowering cropping system.

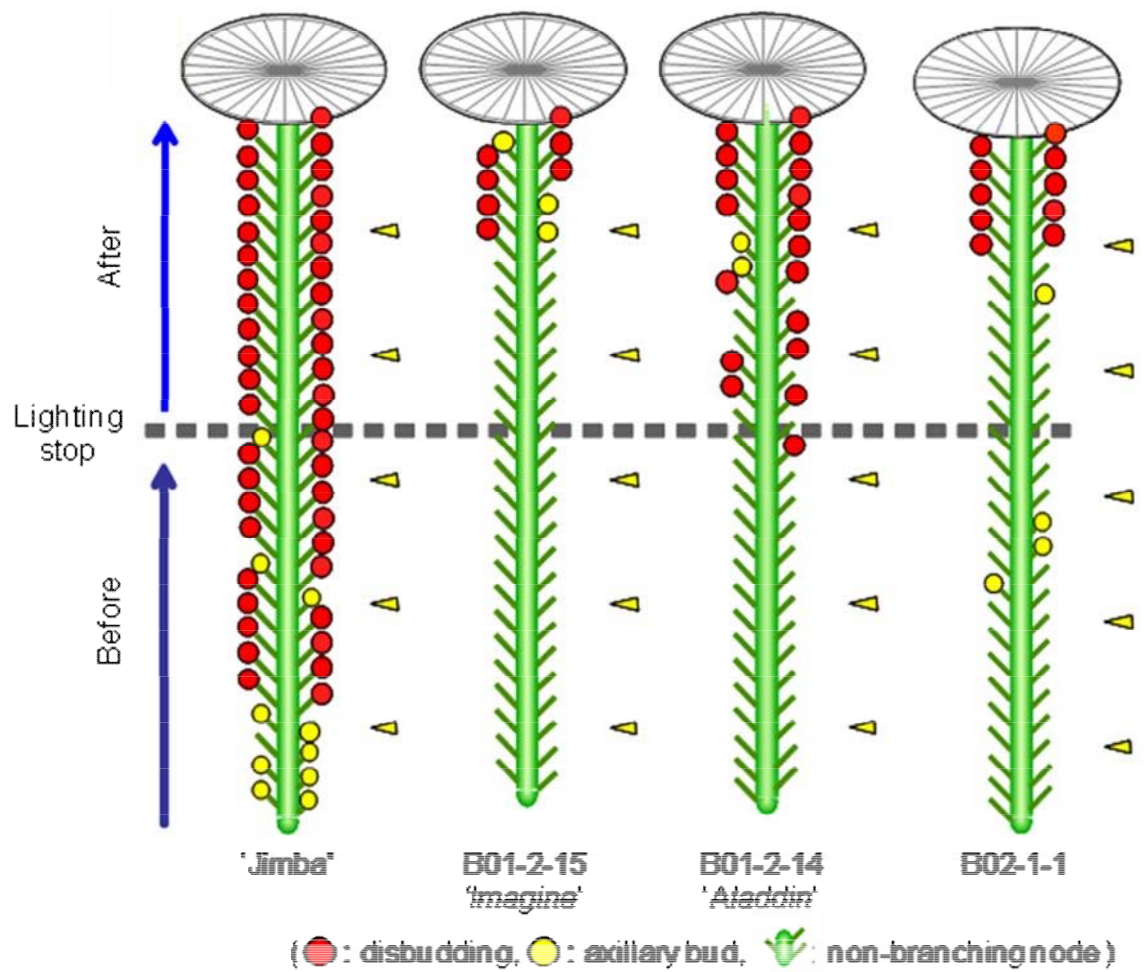


Fig. 3-2-3. Schematic drawing illustration of axillary bud in chrysanthemum cv. 'Jimba' and/or selected mutants.

These plants were grown under December flowering cropping system.

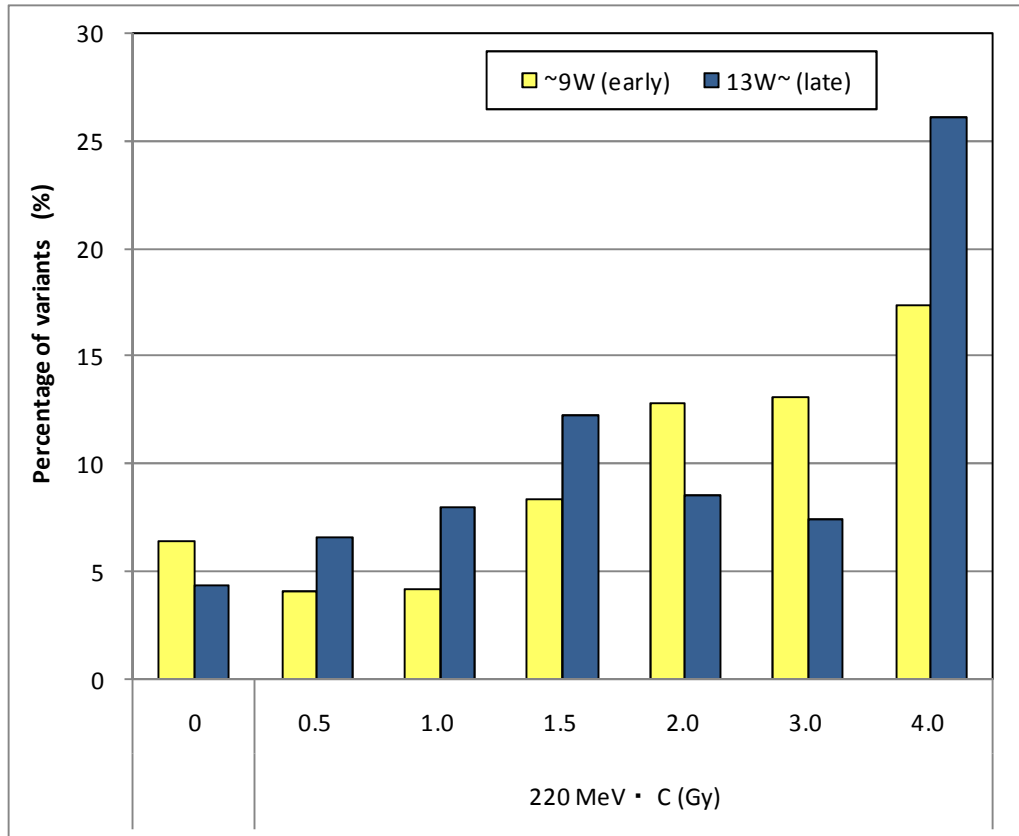


Fig. 3-2-4. Effects of dose of irradiation on flowering periods resulting from regenerated plants with leaf explants of chrysanthemum cv. 'Jimba'.

The early type flowered within nine weeks, and the late type needed it until flowering more than 13 weeks after lighting stop.

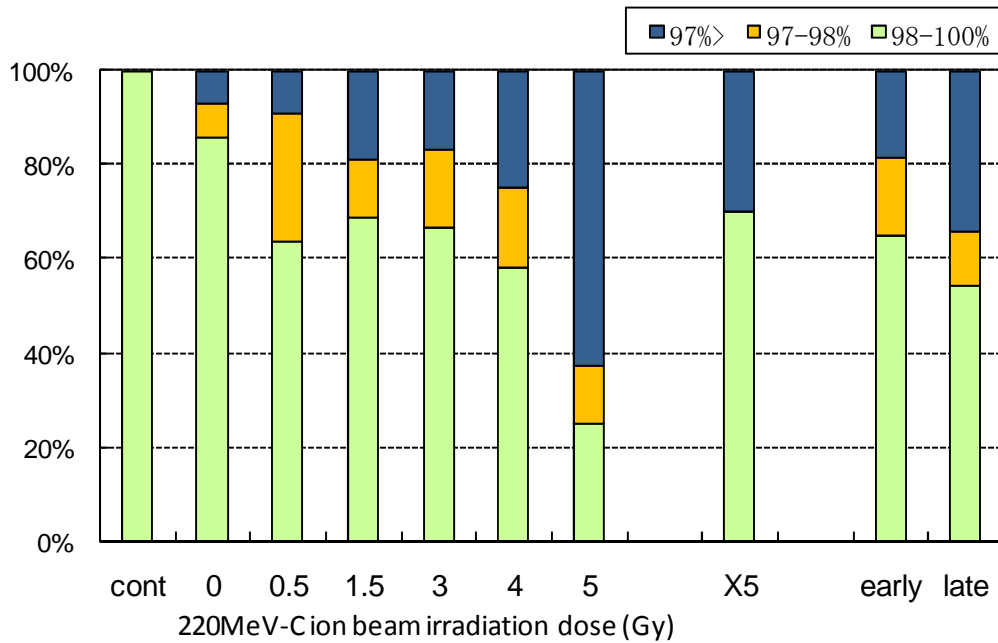


Fig. 3-2-5. Effects of dose of irradiation on nuclear DNA content resulting from regenerated plants with leaf explants of chrysanthemum cv. ‘Jimba’.

Relative DNA content is expressed as the ratio of the nuclear DNA content of investigated plants divided by that of control plants maintained by vegetative propagation. The early type flowered within nine weeks, and the late type needed it until flowering more than 13 weeks after lighting stop.

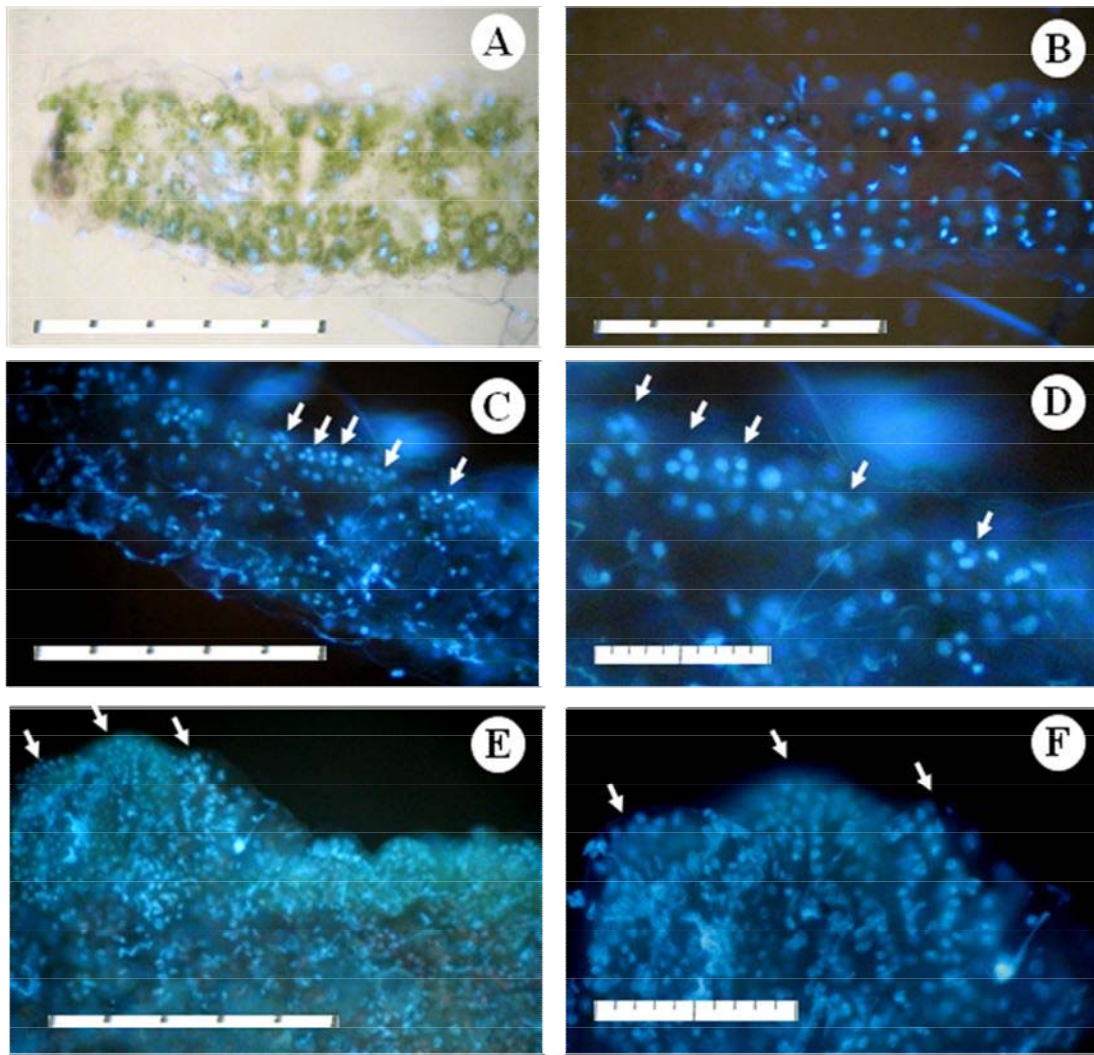


Fig. 3-2-6. Leaf segments of chrysanthemum cv. 'Jimba' during tissue culture.

A and B: after 3 days of leaf tissue culture, the visible light view (A) and UV light view (B). C and D: after 8 days of culture, the start of cell multiplication (arrows). E and F: early stage of adventitious bud formation (arrows) after 15 days of leaf tissue culture. Bar: 500 μm (A-C and E) or 200 μm (D and F).

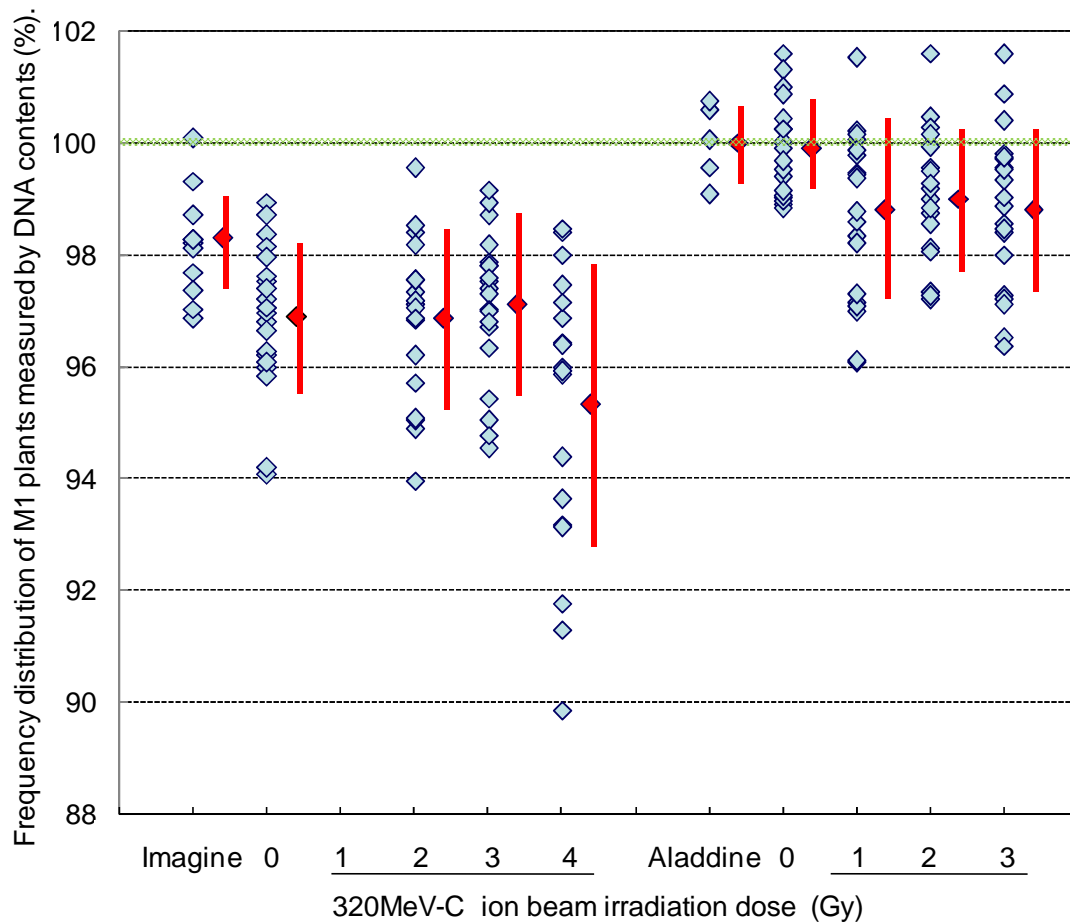


Fig. 3-3-1. Frequency distribution of M_1 plants after C ion beam re-irradiation measured by DNA contents resulting from regenerated with leaf explants of chrysanthemum cv. ‘Imagine’ and ‘Aladdin’.

- ◆: DNA content of each investigated plant.
- ◆: Average of DNA contents of each treatment. Bar is standard.

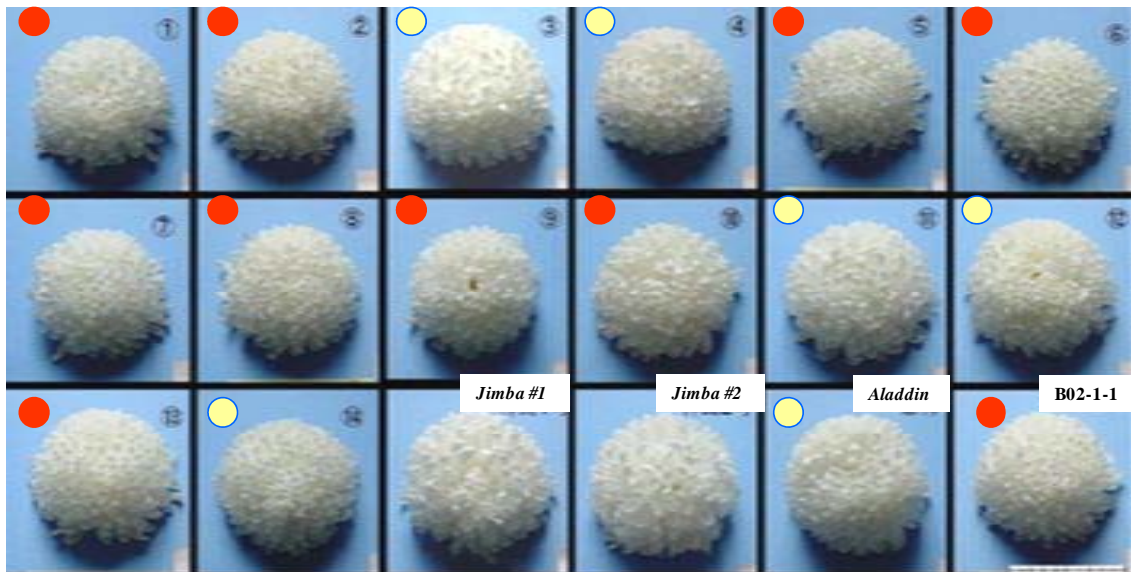


Fig. 3-3-2. Individual selection of few axillary buds mutants, which were derived from leaf of Aladdin or B02-1-1, and these were M_1 plants after Carbon ion beam re-irradiation.

●: Aladdin, ●: B02-1-1 , bar ; 10cm.

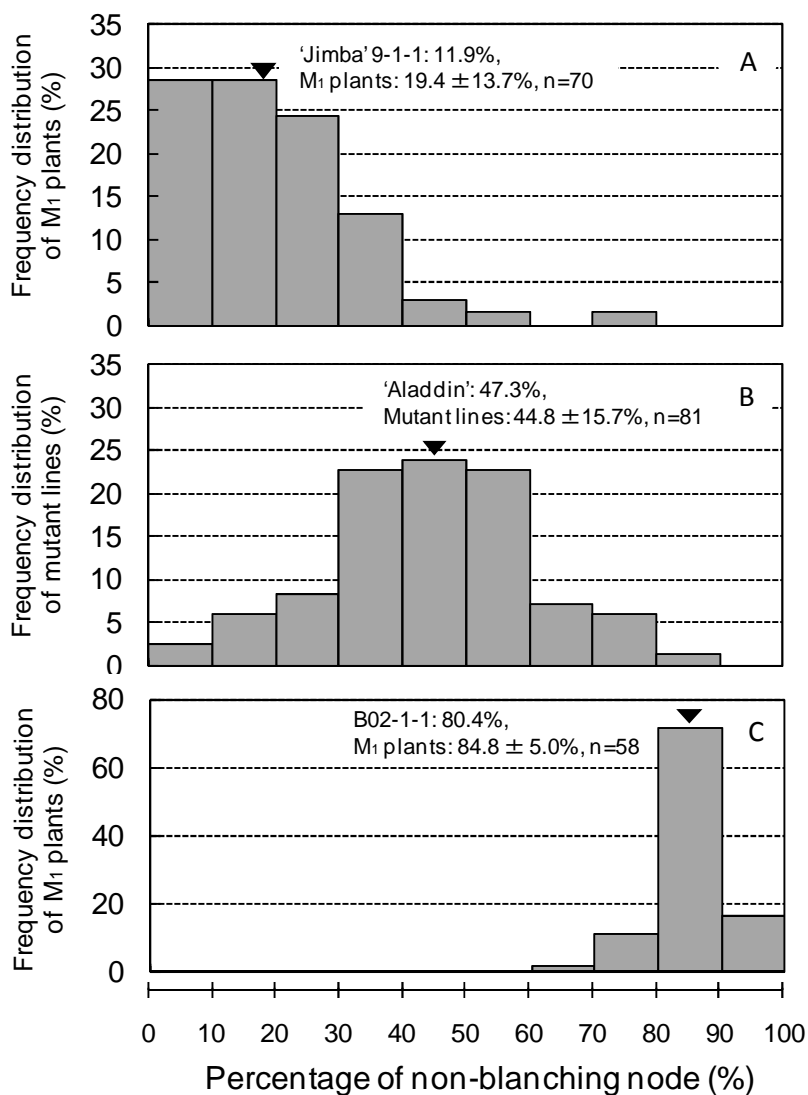


Fig. 3-3-3. Frequency distribution of non-branching node in M₁ plants or selected lines, derived from the leaf of 'Jimba' or non-branching mutants after carbon ion beam irradiation.

A: These 70 M₁ plants were grown under the December flowering cropping system in 2001, derived from the 'Jimba' 9-1-1 line.

B: These 84 selected lines were grown under December flowering in 2004, derived from 'Aladdin' after C ion beam re-irradiation in 2003.

C: These 56 M₁ plants were grown under the December flowering cropping system in 2005, derived from the B02-1-1 line.

▼: The mean point.

The number shows the mean ± STD.

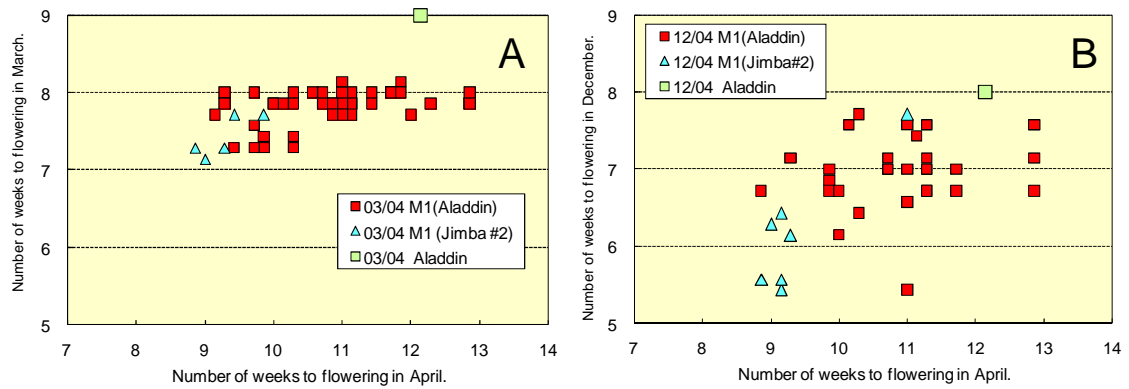


Fig. 3-3-4. Comparison of weeks to flowering in individual / line selection.

A: Individual selected in March. B: Individual selected in December.

Individual selected plants flowered within eight weeks, and vegetative propagated plants were selected by number of weeks to flowering after lighting stop, under April cropping system.

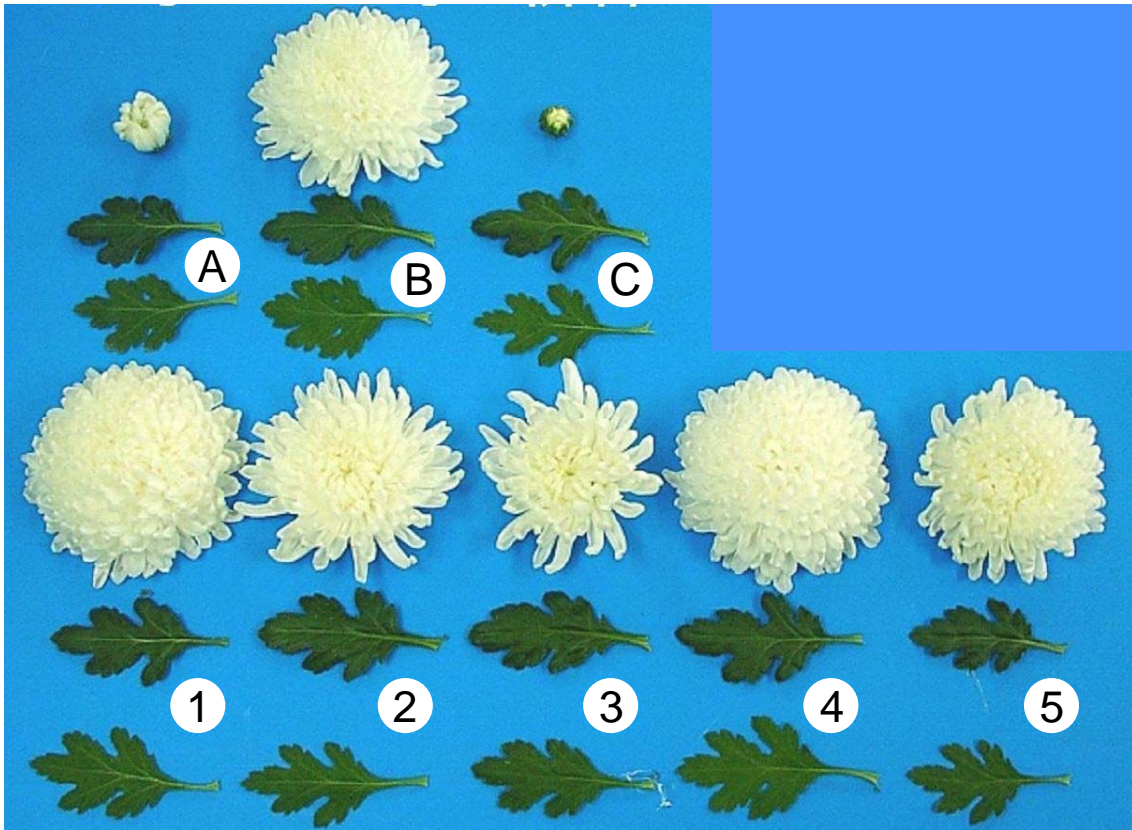


Fig. 3-3-5. Line selection breeding of leaf-derived M_1 plants after carbon ion beam re-irradiation, which possess both non-branching node and low temperature flowering characteristics.

A: 'Jimba' #1, B: 'Jimba' #2, and C: 'Aladdin'. 1 ~ 5: selected mutant line, 1: B03-1-3, 2: B03-1-7, 3: B03-1-21, 4: B03-2-2, 5: B03-2-5. These plants were grown under low temperature (minimum 12°C) control and an April flowering cropping system in 2006, and the flowering after 81 days under short-day condition.

第4章 育成した新品種の全国展開と将来展望

—鹿児島県育成品種，輪ギク‘新神’を例として—

国内で生産されている切り花はキク類がその1/3を占め，なかでも白輪ギクの生産が最も多い（永吉，2003）．その中で秋輪ギク‘神馬’は，純白で花形や草姿が良く生育特性が優れることから，それまで30年来主力品種であった‘秀芳の力’と置き換わった品種で，2000年以降全国一の品種になった（永吉，2003）．しかし，伸長する腋芽数が多く，摘芽作業に多大な労力を要するとともに，冬期の栽培で低温に遭遇することにより，開花遅延を引き起こす（永吉，2003）．そこで，放射線を用いた変異誘発により‘神馬’の特性改良を進め，無側枝性の‘新神’（農林水産省品種登録第14118号，Fig. 4-1-1），‘今神’（農林水産省品種登録第14119号）を育成し，2006年3月登録品種となった．その後，‘新神’に低温開花性を付与した‘新神2’（農林水産省品種登録第19096号）を育成し，2010年3月に品種登録された．

一般に，突然変異育種や遺伝子組み換えによる品種育成は，利用した品種の従属品種として取り扱われ，育成者権は元品種の育成者にも認められている．そのため，これらの育種法による品種改良の対象は，一般に自ら育成者権を持つ品種，もしくは育成者権が及ばない未登録の品種である．一方，‘神馬’は品種登録されていない品種であることから，特性改良に際し育成者権に抵触することはなく，特性改良により育成した品種の育成者権を得ることが可能である．このことが，‘神馬’を対象とした品種育成試験を着手した理由の一つであった．

この章では，鹿児島県を例として，花き類の品種育成と秋輪ギク‘神馬’から育成した新品種について生産現場への普及と全国展開を図る上で生じた問題やその対応について，具体的事例を紹介しな

がら論議した。

第1節 鹿児島県における花き品種育成と栽培普及

鹿児島県の花き類における品種育成と普及は、「品種育成（交配・変異誘発→選抜→品種候補→現地試験→花き品種選定会）」→「品種登録出願」→「フラワーセンターでの増殖・供給」→「県の許諾」→「普及・生産」という一連の流れにより、本県独自の『品種育成・種苗供給システム』により実施されている（Fig. 4-1-2）。そのため、県育成品種の県内生産については、このシステムに沿うことで品種育成から普及へと結びつき、生産振興が図られている。具体的には、次の5つの流れで行われ、特に品種を選定する段階で生産者や販売者が積極的に関わることにより、生産現場のニーズが反映されるシステムになっていることが特徴となっている。

- 1 **現地試験**：系統選抜の段階から産地・農協・市場が参加し、現地試験の供試系統を自ら選定する。そして、生産現場での栽培適性を判断し、作りたいもの・売りたいものを生産現場で選ぶ。
- 2 **花き品種選定会**：生産・流通関係者を交え、許諾料を払う価値が有り、作りたいもの・売りたいものを品種に選定する。
- 3 **増殖・供給**：県の組織であるフラワーセンターが県育成品種の実証展示栽培を行うと共に、増殖し種苗供給を行う。
- 4 **栽培許諾**：許諾は品種の育成者である県と団体で行い、生産者は所属する団体と栽培契約を行う。この許諾と契約により生産者が登録品種の意識を持ち、品種保護の徹底が可能となる。
- 5 **普及・生産**：普及担当者による供給品種の栽培・技術指導はもとより、生産・流通関係者が自ら選び、試作・選定した品種が供給されることからスムーズに普及する。

このように、品種育成から生産・販売までが一体化したシステム

であり、花き類においてはスプレーギクを中心に、鹿児島県育成品種として60件を越える品種が登録・申請されている(品種登録データ検索：<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>)。これらの品種の育成元である試験研究機関は、品種育成とともに新品種の栽培技術を提供し、フラワーセンターから安定した種苗供給が行われることによって、新品種の普及と花き生産の維持・拡大が図られてきた。その結果、‘新神’の場合、2001年に品種育成を開始し、3年後の2004年には新品種の供給が開始され、2006年度には県内輪ギク生産者の9割以上に普及するという驚異的なスピードで育成から普及へ結びつけることができた。

他の都道府県についても、基本的には同様の育種システムを持ち、単独育成品種を独自に利用することに問題は生じない。しかし、輪ギク品種の場合、前述のようにその用途から使用される品種が限定されており、主要産地である愛知県や福岡県で栽培する品種の動向に他の産地は追従せざるを得ない。つまり、輪ギク品種については、県育成品種を県内生産に限定した場合、優れた品種であっても品種の変遷とともに、過去の品種として葬り去られる危険性を含んでいる。そのため‘新神’の場合、県内産地(生産者)から県外へ栽培許諾を行うよう要望が出され、品種を守るための手段として全国展開に向けた準備を進めるに至った。

第2節 品種の保護対策と管理

鹿児島県における品種育成は、従来から県内生産を対象としてきたが、全国を対象とした許諾を進めるためには、「品種の管理」と「安定した種苗供給」が重要度を増す。そこで、本節では育成者権の保護と品種管理の観点から以下検討した。

1 種苗法と育成者権

登録品種は種苗法によって守られており、営利栽培のためには育成者権（品種育成者の権利）を持つ者から許諾を得る必要がある。切り花ではカーネーションやキクで不法栽培された輸入品が水際で摘発され、くい止められた事例がある（農林水産省ホームページ：http://www.maff.go.jp/j/study/sin_hinsyu/index.html）が、これらは花や葉の色・形といった可視的な形態特性で区別が可能であった。

ところが‘新神’の場合、同じ条件で栽培すれば元品種の‘神馬’と区別は可能であるものの、‘新神’は‘神馬’の基本特性を維持した品種である。したがって、無側枝性が発現しにくい低温期に他産地の栽培環境の異なる両品種が混在した場合、形態特性で‘新神’を明確に識別することは非常に難しい。‘神馬’は登録品種でないため、年間数千万本の中国産‘神馬’が輸入されており、その中の一部に‘新神’が混ざっていたとしても、それを特定することは困難を極めるものと考えられる。そのため、遺伝子レベルの品種識別法の開発を急ぐ必要性が生じた。

2 遺伝子レベルの品種識別

これまでキクの栽培品種で DNA 判定を品種識別に利用した例はなかった。それは、2,000 以上の品種があり、ゲノムサイズ（DNA 塩基対の数；イネ＝約 4.5 億，人＝30 億，キク＝94 億塩基対）が大きく解析が難しいことに起因している。また、基本的にキクの品種は形態特性で識別してきたため、それ以上の識別技術は必要としな

かった。花色が異なる品種であれば、切り花の形態特性から明確に判別できるが、‘新神’の場合、無側枝節の有無や花卉数・葉数・托葉の大きさなどの違いはあるものの、これらの形質は栽培環境で変化するため、形態的な識別は困難である。さらに DNA 量が減少していないことから、‘神馬’と遺伝子レベルでの違いもわずかと考えられる。仮に‘新神’の変異が遺伝子レベルで 2,000 塩基対の変異に由来していたとしても、94 億分の 2,000 塩基の違いにすぎず、99.99998%は同一であることを示している。しかしながら、‘新神’の識別技術の確立のため、このわずかな違いから品種識別のマーカを開発する必要があった。

3 ‘新神’の品種識別技術

理化学研究所との共同研究により、植物のゲノム中に多数存在する反復配列の 1 つである転移因子レトロトランスポゾンを利用する方法を用いて、‘新神’と‘神馬’を明確に識別する技術が 2005 年に完成し、その成果を理化学研究所から「キク品種識別法」(阿部ら, 2007; 特開 2007-24433 号)として特許出願した。この手法を用いることによって、切り花の葉や花卉 1 枚から数時間後には‘新神’もしくは‘神馬’, どちらの品種であるかを明確に識別することが可能となった (Fig. 4-2-1; 阿部ら, 2007; 松山, 2009)。さらに、‘新神’由来の改良系統にも応用できることが判っているので、‘新神’の枝変わりを含めた改良を行った場合も判別が可能である。

これによって、国内外での違法栽培やその輸入品を阻止することができ、栽培許諾を受けた生産者が安心して生産できるようになった。現在、低温開花性を付与した‘新神 2’の品種識別マーカも開発できている (松山・白尾, 2011; 特開 2011-24466)。このように、品種育成と併行して品種識別マーカを開発することは、品種保護の観点から極めて合理的な栽培許諾、品種管理法と言える。

第3節 種苗供給システムの構築と全国展開に向けた方策

品種の普及にあたって、優良種苗の安定した供給は生産の安定化や品質保持から不可欠の課題である。鹿児島県内での生産に関しては、生産力や特性を確認した原原種を試験研究機関から県のフラワーセンターへ供給し、ここで増殖した優良種苗が県内産地へ供給されるが、これは県内生産向けに限定される。そのため、県外の生産に向けては別の種苗供給体制が必要となるが、県外向けに別の種苗供給組織を本県で作ることはできない。

一方、一部の大規模農家は海外（インドネシア等）の種苗生産会社に種苗生産を委託し、切り花生産の苗を購入している例がある。そこで、鹿児島県はその種苗生産会社と品種の許諾契約を結び、鹿児島県から原原種の供給を行い、種苗生産会社での増殖を委託した。そして、許諾を受けた生産者は海外で増殖した優良種苗を購入するという全国に向けた種苗供給システムを構築した（Fig. 4-1-2）。これにより、県内外を問わず、許諾を受けた生産者に対して安定した優良種苗の供給が確保でき、全国展開に向けた普及体制が整った。

1 全国展開の状況

2005年度から‘新神’は県外許諾や海外増殖を開始し、2006年度には北は青森から南の沖縄まで全国19県30以上の生産団体と栽培の許諾契約を交わしており、2011年現在の栽培許諾生産者数は、‘新神’が169件、‘新神2’は159件となりその数は2006年から2009年に急激に増加した（Fig. 4-3-1）。これは、‘新神’が無側枝性に加えて、‘神馬’より花卉数や葉数の増加を伴っており、立葉で品質も良いことから、鹿児島県内はもとより他県でも高い評価を得ているためと考えられる。

さらに、鹿児島県農業開発総合センター花き部では、これら新品种の供給開始時に、品種の栽培技術を許諾生産者に向けて、情報誌

「新神通信」として配信した。このように、栽培許諾、種苗供給および技術提供を組み合わせた体制が全国への普及を支援するシステムとなっている。

2 将来展望

神馬系秋輪ギクの最終目標とした無側枝性と低温開花性を併せ持つ‘新神2’であるが、品種育成後、水揚げ（日持ち性）の不安定性や、無側枝性が強いことにより自家増殖が困難であることなどの問題点が明らかとなったため残念ながら生産は減少しているのが現状である。この問題を解決するため、‘新神’へのイオンビーム再照射による低温開花性の改良を再開しており（田之頭，2012）、‘神馬’に由来する低温開花性と無側枝性を兼ね備えた最終改良版として品種育成の完了を間近に控えている。

また、このような突然変異育種により育成した品種は従属品種として取り扱われるため、他者が育成者権を持つ登録品種を対象とすることは問題があるが、育成者権をもつ種苗会社と共同で品種育成を行い、育成した新品种の育成者権を分け合うことも可能である。‘フローラル優香’は静岡県の子会社「晃花園」が育成者権を持つ、‘岩の白扇’と並ぶ無側枝性夏秋輪ギクの主力品種である。この場合、鹿児島県が白色の‘フローラル優香’から黄色の‘フローラル金優香’（農林水産省品種登録第19569号）を育成し、‘フローラル優香’の育成者権を持つ「晃花園」と許諾契約を結んだ。その内容は、鹿児島県内の許諾は鹿児島県が管理し、県外は「晃花園」が管理することで育成者権の分担を図るもので、このような両者にメリットを生み出す方法も県外許諾や全国展開を考える上では重要な方策と言えよう。

このように、主力品種の基本的な特性は維持した上で、育種目標とする栽培特性の改変を行い、品種識別マーカーの開発を組み合わせた品種管理を行って、安定した種苗供給体制により展開を図る。

こうした品種育成から普及まで含めた一連のシステムとして構築できており、今後も県内外を視野とした輪ギクの品種育成や他品目への応用を進めていく予定である。

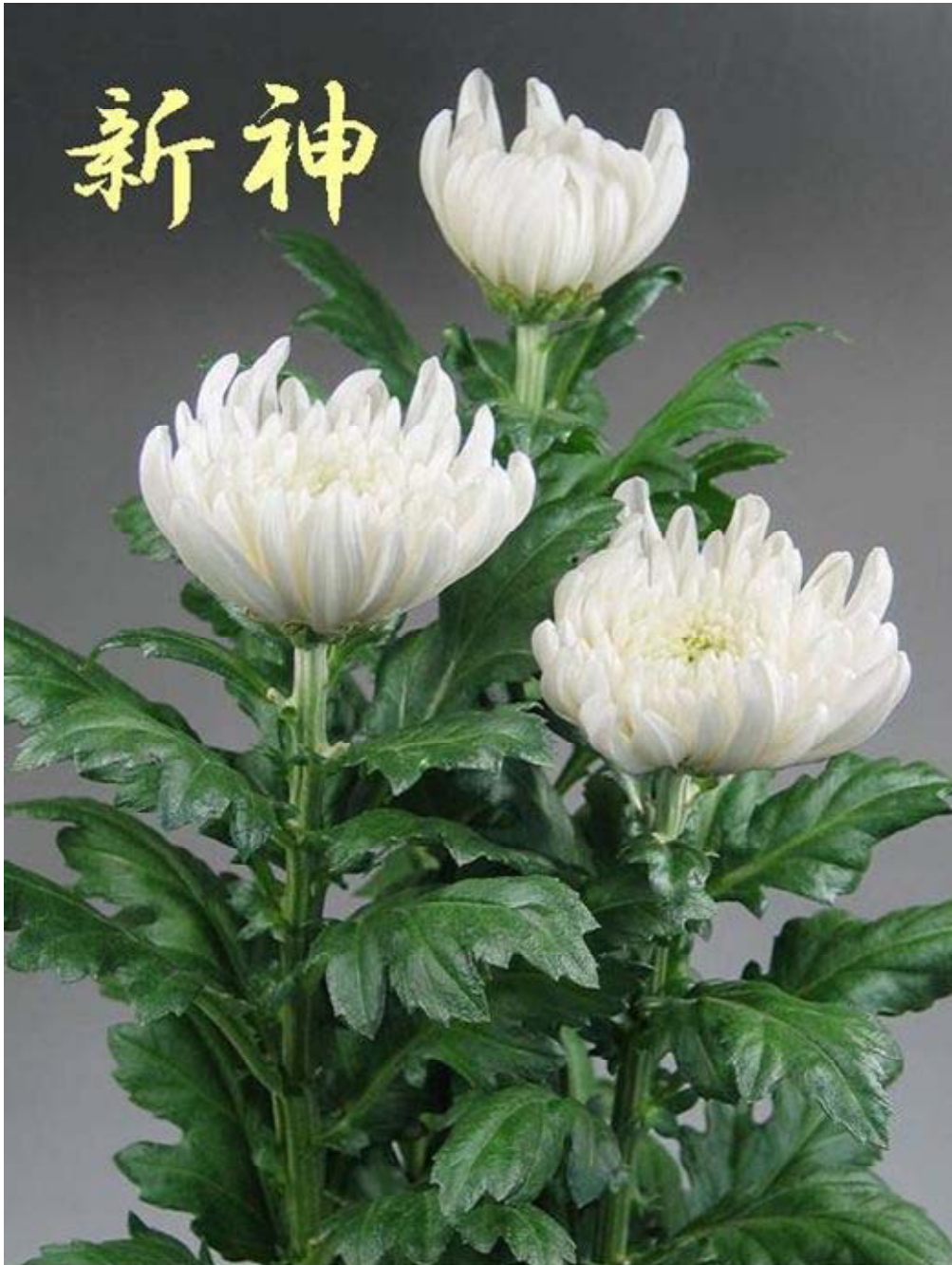


Fig. 4-1-1. Flowering stage of 'Aladdin' (Imakiire *et. al.*, 2006).

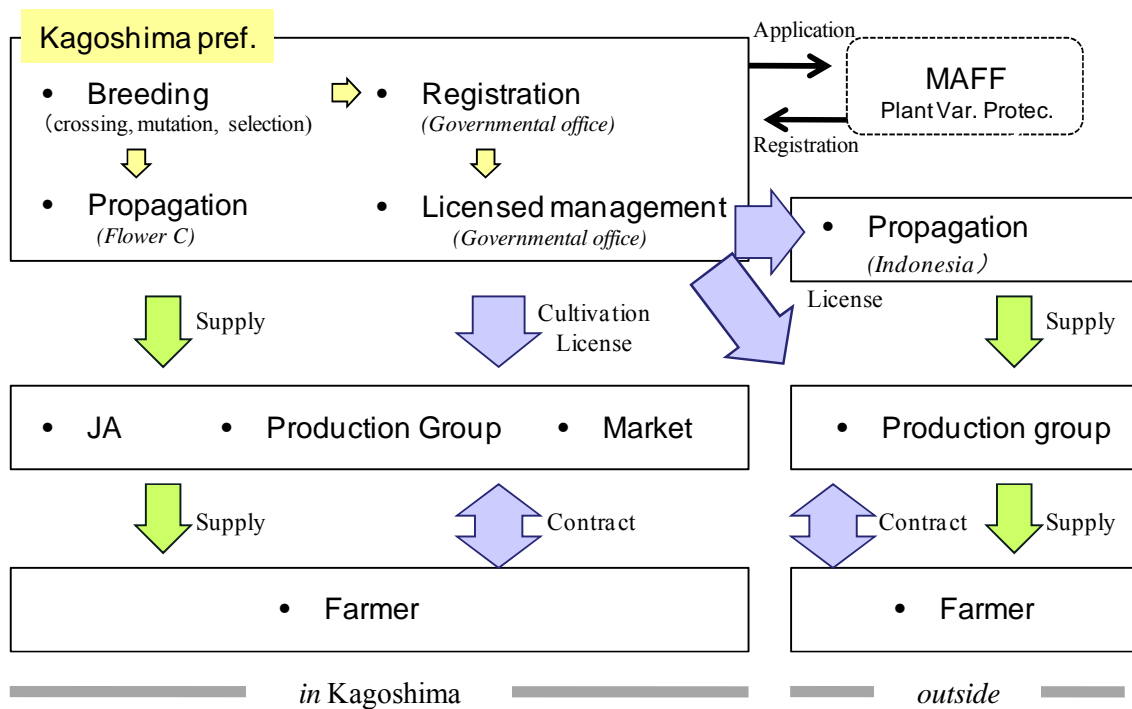


Fig. 4-1-2. Flow of cultivation license and the nursery supply.

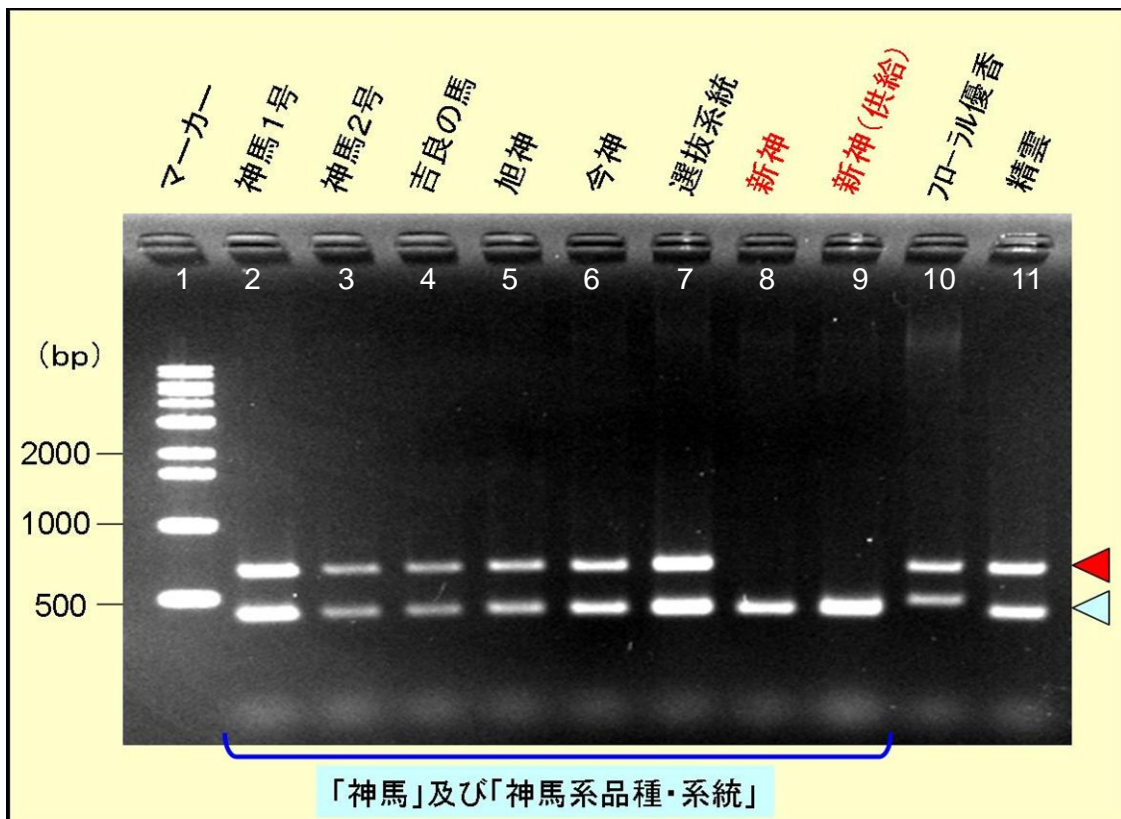


Fig. 4-2-1. PCR analysis of chrysanthemum cultivars (Abe *et al.*, 2007; Shirao *et al.*, 2007).

Lane 1: 1 kb ladder Marker. 2: 'Jimba' #1, 3: 'Jimba' #2, 4: 'Kirano-uma',
 5: 'Kyokushin', 6-7: 'Imagine', 8-9: 'Aladdin', 10: 'Floral-Yuka',
 11: 'Seiun'.

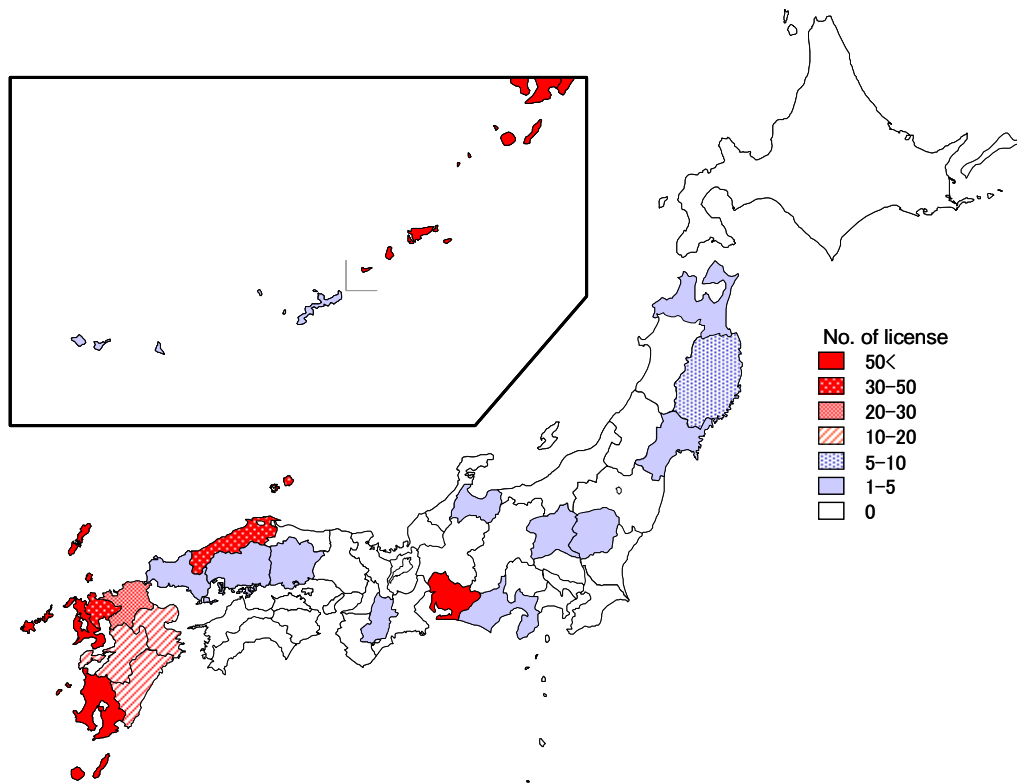


Fig. 4-3-1. The licensed number of cultivation of 'Aladdin' and 'Aladdin 2' in Japan.

総合考察

我が国は、亜寒帯から亜熱帯の気候のもとで多くの遺伝資源があり、数多くの地域植物資源が日本の生活や文化に結びついている。一方、海外の遺伝資源利用については厳しく規制や規定されているため、国内の地域植物資源については重要度がさらに高まっている。本章では鹿児島県を例に地域特産物とその利用について論じる。鹿児島県では、近年「黒」をテーマに特産品のイメージ作りを図っており、「黒豚」「黒牛」「黒薩摩鳥」「黒糖（黒砂糖）」「黒酢」「黒こうじ」「黒米」「黒ごま」など、様々な「黒」が存在する。これに対して、「白」の代表格としては、「かるかん」「桜島大根」「伊佐米」「白波」「しろくま」「白輪菊」などが挙げられよう。このような豊富な特産品は、南北に 600 km、東西に 270 km で島嶼を含む、変化に富んだ恵まれた環境が生み出したものと言っても過言ではない。これらの豊富な遺伝資源や特産品が存在する鹿児島において、農業試験研究の耕種部門では、水稻・エンドウ豆・ニガウリ・イチゴ・桜島大根・カンキツ・ビワ・ユリ・キク・茶等で育種試験を行っており、サトウキビ・サツマイモ等では品種選定を中心に選抜が行われている。

1980年代に入ってバイオテックブームが始まり、各都道府県では農業関係の生物工学研究施設が整備された。鹿児島県では、平成2年（1990年）に育種を支える試験研究機関としてバイオテクノロジー研究所が設立された。ここでは、地域特産農作物を対象として、組織培養による培養系の開発を行い、品種育成への応用や遺伝子レベルの解析へ発展させてきた。なかでも、遺伝子組み換え技術については、交配によらずに新しい特性が付与できる手法として注目し、研究開発を行ってきた。しかし、我が国では遺伝子組み換え作物に対する社会的な許容評価が極めて厳しいことから、国内の実用品種

育成に向けた遺伝子組み換え研究開発は停滞しているのが現状である。そこで、バイオテクノロジーを活用した品種改良手法として、変異誘発技術に着目した。その中で従来放射線として利用されてきたガンマ線やX線等とは変異スペクトルが異なるとされるイオンビームを用いて、サツマイモ、サトウキビ、イチゴ、キクおよびソリダゴについて、2000年から変異誘発試験を開始した。なお、それぞれ対象とした特性は、本研究で示したキクの生育や開花習性の他、サツマイモが澱粉特性（Uenoら、2002）、サトウキビは葉鞘毛群の除去（Takenoshitaら、2010）、イチゴは収穫の早期化（竹之下ら、2009）、およびソリダゴやキクの花色改変（田之頭、2012）であった。

このように、栄養繁殖作物を中心に豊富な地域植物資源の探索・活用、植物組織培養の改善・効率化と品種改良への応用、さらにイオンビームによる突然変異を利用した育種技術と品種育成を検討し、加えて育成品種の生産現場への普及・展開を行ってきた。そこで、地域植物資源を利用したこれらの内容と発展方向について鹿児島県における取組を例として論じた。

1 地域植物資源の探索と活用

地域植物資源の探索・活用面では、鹿児島県下で発見されたヒガンバナ属新種について、組織細胞学的な染色体の核型分析や種間交雑、および分布域と開花時期の調査を通して、雑種起源とする本種の成立解明を行った。現在は、栗田（1998）により核型分析を中心に、ヒガンバナ属植物の分類や、人為交雑を含めた雑種の起源と交配組合せが整理されている。また、鹿児島県南大隅町根占の南大隅農園では、ここで取り上げた2種のヒガンバナを含めて、ヒガンバナ属植物の球根生産が行われ、開花時期には観光農園として開放されて町の観光スポットとして活用されている（南大隅町ホームページ：<http://www.town.minamiosumi.lg.jp/minami04/minami36.asp>）。

また、ヒガンバナ属植物を例に試験を行ったが、ここで得た花粉貯蔵法や胚培養および染色体観察等の手法は、その後、ニガウリの偽受精胚培養による半数体植物の育成（長谷，2012）に展開する基礎となった。さらに、フローサイトメーターにより DNA 量を測定し変異体の選抜やイオンビーム照射による変異誘発の様相を解析したが、このようなゲノムサイズから DNA 量を測定し異数性の判定が可能となることは、組織細胞学による染色体観察と共通しており、両手法の活用と視点が多数の変異体から優良変異の選抜を行う基礎となった。

一方、鹿児島県において、地域植物資源を産業利用として成功した事例に「安納いも」や「種子島紫」などの青果用サツマイモがある。これらは、種子島で自家用として栽培されてきた在来種の中から選抜・育成され（上妻ら，2003）、鹿児島県育成品種として4品種が登録されたもので（‘安納紅’：農林水産省品種登録第6862号，‘安納こがね’：農林水産省品種登録第6863号，‘種子島ろまん’：農林水産省品種登録第7085号，‘種子島ゴールド’：農林水産省品種登録第7086号）、種子島の生産に限定して栽培が許諾されている。2007年以降、栽培面積や生産量は急増し、2011年実績で栽培面積は500 haを越え、地域の基幹品目となった。これらの種苗は系統選抜を行ったウイルスフリー苗として供給され（普及に移す研究成果，2009）、生産量や品質の安定化に寄与している。

しかし、このウイルスフリー苗の維持・増殖の際に、これらの品種は内生菌の残存が原因で増殖率の低下や保存系統の消失に至る問題が発生している（データ省略）。このような問題を解決するため、第2章で用いた植物体内に残存するバクテリアの検定法を応用して、バクテリア用のLB液体培地（和光）に組織片を投入し、菌の増殖の有無によりバクテリアフリーの選抜を行い、種苗増殖・供給の安定化を行っている。

このように、植物資源を地域振興に活用した例を示した。遺伝資源の収集や保存は自治体や国レベルで行われているものの、その成功事例は限られている。これは、地域特産物の市場規模が限定される場合が多いことから生じると考えられるが、今後、育種による生産力の向上や6次産業化の進展による市場規模の拡大により、地域植物資源が活用され発展することを期待している。

2 種苗増殖における組織培養法の改良とバイオ育種への応用

第2章では、多糖類産生細菌の接種により、多種の植物種で水浸状化の回避が可能であり、植物体内に安定して保持されることを示した。また、菌の接種によりエリシター様の刺激からリグニン合成が促進されることが示唆された。

サツマイモでは前述のように茎頂培養時に内生菌の混入が問題となる他、窒素固定に関わる内生菌の存在が明らかになっている

(Asis・Adachi, 2004)。また、農林水産省のプロジェクト研究「新形質付与のためのエンドファイトの機能解明」では、イネ科植物を中心にエンドファイト（植物体内で共生的に生活する菌類）の探索やその共生にみられる寄主と宿主の関係、そして耐病虫性等の機能解明が実施され、プロジェクト研究成果として報告されている（プロジェクト研究成果, 2002）。この中で、エンドファイトの共生による耐病性獲得機構として、エンドファイトの存在によりエリシター機能を持つ物質が放出され、キチナーゼの発現を誘導していることが示唆されている（プロジェクト研究成果, 2002）。また、これらの多くは糸状菌類であり、宿主特異性を示して宿主域が種や菌株ごとに限定されるが、細菌性エンドファイトの場合、宿主域が広く、窒素固定能やキチナーゼ生産能を示すものがあることが報告されている（プロジェクト研究成果, 2002）。

これらのことから、細菌性内生菌を窒素固定能やキチナーゼ生産能、もしくはその他の機能を指標に探索することにより、細菌性エ

ンドファイトを分離し，生育や収量，耐病性等の実用形質向上に寄与する有用エンドファイトの選抜が可能と考えられる．さらに，茎頂培養時に混入する内生菌類は，外生の雑菌類が排除されているので，内生菌の分離が容易であり，無菌植物を利用して分離菌の再接種後の機能解析を行う実験系を確立することにより，実用的な細菌性エンドファイトの開発が期待できる．また，このような細菌性エンドファイトの開発により，無菌のウイルスフリー苗に接種・定着させ，種苗生産の安定化や付加価値向上が期待できる．また，栄養繁殖性作物は容易に増殖可能であることから，品種の管理が難しいが，このようなエンドファイトを種苗生産マーカーとして利用することにより，種苗法による品種保護と併せて，種苗や品種の保護や管理がより広範に適用できるものと考えられ，植物組織培養関連産業のみならず品種開発を行う種苗生産産業への貢献が期待できる．

一方，第2章では，微生物との共生関係を利用して遺伝子を導入し，木本植物であるジャクナゲの遺伝子組み換え技術を確認した．遺伝子組み換え技術は，基本的な表現形質や品種特性を維持したまま新たな特性を付加できる，交配を必要としない品種改良の手法として，極めて有用な育種手段といえる．しかし，前述のように我が国においては遺伝子組み換え作物に対する社会的な許容評価が極めて厳しいことから，国内の実用品種育成に向けた研究開発は必ずしも活発とはいえないのが現状である．一方，遺伝子組み換え技術は，遺伝子解析技術と共に，遺伝子の発現や機能解析に欠くことのできない基本手法であり，育種における遺伝子レベルの選抜や識別マーカー開発に深化している．また，前述のエンドファイトについても，新たな形質付与技術として期待される．ただし，実用化にあたっては遺伝子レベルの解析が不可欠であり，これらの技術の深化と融合により細菌性エンドファイトが早期に実用化に至り，生産現場で活用されることが望まれる．

3 突然変異育種を用いた地域特産作物の品種育成への応用

本研究で行ったイオンビーム照射にあたっては、(財)放射線利用振興協会の支援と文部科学省の「放射線利用技術移転事業」による技術セミナーや専門家派遣・技術研修を活用して研究を開始した。このイオンビーム照射による変異誘発技術の開発や応用として、第3章では輪ギク品種‘神馬’を対象に葉片からの不定芽経由の再生系を利用した「変異誘発システム」を構築した。これにより、イオンビーム照射による変異誘発を行い、実用形質として無側枝性と低温開花性に着目した選抜により、無側枝性品種‘新神’と‘今神’を育成した。さらに、イオンビームの再照射により、高温で発現する無側枝性と低温遭遇による開花遅延を回避するという、相反する温度帯で生じる二つの形質を併せ持つ‘新神2’を育成した。

ここで着目した輪ギクにおける無側枝性とは、高温遭遇により腋芽の葉原基分化が停止し、腋芽や分化した葉腋の分枝性が失われる特性である。夏秋輪ギク‘岩の白扇’の場合、昼温を30℃、夜温を20℃で管理することにより無側枝性が発現する(Okamoto・Suto, 2003)。栽培が夏季の高温期で、育苗・増殖が低温期にあたる夏秋輪ギクでは、このような無側枝性を切り花生産に活用し、栽培管理の省力化が実現されている(松本, 2000)。ところが、栽培が低温期、増殖が高温期にあたる秋輪ギクでは、同じ温度域で無側枝性が発現した場合、腋芽が消失し分枝しないため、母株の育成や増殖が困難となる。

一方、‘新神’の無側枝性発現程度は、12月開花の作型で50%程度であるが、Okamoto・Suto(2003)の報告を参考に、昼夜温の変温管理で無側枝性発現の温度帯を調査したところ、昼温30℃、夜温25℃で無側枝節の発生が認められた(データ省略)。また、2006年6月下旬から8月中旬の夏期育苗中の無側枝率を調査したところ、期間中の気温が最高35.5℃、平均28.9℃、最低24.8℃の中で、無側枝率は神

馬系の品種，系統ごとに，‘神馬’1号：6%，‘神馬’2号：61%，‘新神’：67%，B02-1-1系統：96% となり，系統間で無側枝程度に差が認められた。さらに，この無側枝率は増殖率と相反する関係にある。なお，ここで示されたように，低温開花性に優れる‘神馬’2号は，育苗期間中に‘新神’と同程度の無側枝率を示すものの，12月開花作型における無側枝率は20%程度で，実用レベルの無側枝性とは言えない。このように，秋輪ギクにおける実用的な無側枝レベルは，切り花生産中の無側枝率と，育苗中の増殖率の相反する両形質を考慮した選抜が必要と言える。

夏期の高温期間中に夏秋輪ギク‘サマーイエロー’は，無側枝節が存在せず無側枝性を持たない品種である。この品種について，予備的にイオンビームによる変異誘発を試みた結果，再生した約2,000個体の変異誘発当代に無側枝性を発現する個体は存在しなかった

(データ省略)。このことは，‘神馬’から選抜した無側枝性変異体は，無側枝性が発現する温度帯や感度が増変したものであり，イオンビーム照射による変異誘発で，無側枝性を持たない品種に無側枝性は付与できないことが確認できた。現在は，前述のように無側枝率と増殖率を対比した選抜を行っているが，今後は，無側枝性発現や回復に至る温度帯と感度の簡易検定法の開発が必要と考えられる。

次に，イオンビームの再照射による再改良を検討したところ，無側枝性と低温開花性を併せ持つ品種の育成を通して，高LETのイオンビームの低線量照射による変異誘発の特性を実証した。ここで示したように，再照射を行うためには，DNA量が減少していない変異体を用いる必要があり，生育低下を伴う遺伝子の大きな構造変化ではなく，点突然変異により品種特性を維持した新たな特性付与が可能になることが示された。さらに，‘新神’の場合，通常の栽培で‘神馬’と同じ到花日数で開花させると，展開葉数や花弁数が‘神馬’より多くなり（今給黎ら，2005），生育量（切り花重）が増加する。

これは、変異誘発当代の個体選抜時に、生育旺盛な変異個体を選抜した結果によるものと考えられた。イオンビーム照射では欠失等の失う方向の変異だけではなく、トランスポゾンが活性化し、新たな変異を生み出している可能性が示唆された。実際、‘新神’の品種識別マーカーがレトロトランスポゾンを基に開発できたこと（阿部ら、2007）も、この仮定を支持している。

以上のように、本研究において輪ギクのイオンビームを用いた変異誘発技術を確立した。さらに、実用品種の育成を通して、イオンビーム育種の優位性を実証することができた。現在、‘新神’の再改良を再開している（田之頭ら、2012）。また、これらを応用して、イチゴやサトウキビ等高次倍数性の栄養繁殖作物について、変異誘発による特性改良を進めている。

4 育成した新品種の全国展開と将来展望

品種の育成や普及を行う上で、品種の保護と管理および安定した種苗供給システムの構築が不可欠である。品種の保護・管理は種苗法による育成者権、および品種識別マーカー開発における特許権等の知的財産権に基づいており、品種の栽培と種苗供給・管理が許諾契約により可能となる。

鹿児島県を例とすると、イオンビーム照射により育成した品種については、鹿児島県と（独）原子力研究開発機構の共同出願によりその育成者権を分担している。また、育成者権を持たない品種を利用する場合についても、前述のように共同研究等を通して新品種の育成者権を協議し双方の合意に至った。このように、知的財産権に関わる権利の分配に協議は不可欠であるが、利用・活用を前提とした上での協議でなければ具体性に乏しく、双方の合意に導くことは難しい。県育成品種の普及にあたって、県外許諾を行う際の最も大きな問題は、品種識別マーカーの開発であった。識別マーカーは理化学研究所との共同研究により開発でき、品種の管理が可能となっ

たが、識別マーカ－の周知性や信頼性を確保するため特許申請を行う必要性が理化学研究所から提示された。これに対して、特許の共同出願に係る経費の予算措置が難しかったことから、理化学研究所単独で特許を出願し（阿部ら, 2007）, ‘新神’の許諾実績から相当分の特許の利用料として負担することで両者の協議が成立した。その後、2008年度から農林水産省「DNAマーキングによる栄養繁殖作物の品種・産地判別技術の開発」(課題番号1970)に共同参画し、‘新神2’の品種識別マーカ－の開発に至っている（松山・白尾, 2011; 松山ら, 2012; Shiraoら, 2012）。

このように、育成品種の知的財産権確保の観点から品種識別マーカ－の開発と利用を図った。現在、品種育成の効率化を目的として、遺伝子レベルの選抜マーカ－開発が各分野で進展している。選抜マーカ－の利用は育種の効率化に留まらず、育成品種の識別マーカ－に直結する。今後は「知財保護」という護りの観点のみならず、「攻めの農業」を展開する攻守合わせたツールとして、さらに発展することを期待している。

5 まとめ

本研究では鹿児島県の地域植物資源を例として、これらの評価、培養法の改良および育種への応用を検討し、イオンビーム照射によるバイオテクノロジーを活用した実用品種の育成と生産現場への普及についても議論した。実用品種の育成に至った理由の一つは、変異誘発当代における高精度の選抜にある。また、栄養繁殖作物の場合、長年の増殖・栽培の過程で植物体中の体細胞変異を蓄積しており、同一品種を用いる場合であっても、材料は優良個体を生み出すことが可能な選抜システムを用いる必要がある。これは、全国で栽培されているサツマイモの‘高系14号’には地域に適応した様々な派生システムが存在すること、および本研究で用いた輪ギク‘神馬’の場合も、システムにより変異誘発当代の選抜率が異なることから明らかであ

る。つまり、第1章で論じた地域植物資源の探索として生産現場から優良個体を収集し、優良系統として選抜することから始めて、第2章および第3章で論じたキメラの回避や分離を念頭に試験を進める必要性が示されている。具体的には、次の4つの点に留意する必要がある。

1. 選抜した優良系統を用いて、キメラ性を回避し変異誘発当代での選抜を可能にする変異誘発システムを活用する。
2. 変異誘発当代の選抜を一般栽培と同様の規模、管理により実施し、精度の高い一次選抜から生育量の劣らない変異体を選抜する。
3. DNA量を指標にした選抜により、基本的な品種特性を維持した変異体の選抜が可能となる。
4. 一般栽培に準じた管理により系統選抜を行うことで、種苗生産を含めた実用栽培に則した選抜が可能となる。

上記の視点を踏まえてイオンビーム照射による変異誘発を行うことにより、さらに多く品目で実用品種が育成できるものと考えている。実際、‘新神’育成以降、全国で様々な品目を対象としてイオンビーム照射が行われている（Tanakaら、2010）。しかし、変異スペクトルが広く、変異率が高いイオンビーム照射であっても、交配による品種育成時の交配組合せと同様に、変異誘発に用いる材料や系統の選定を行い、交配育種と同程度の育種・選抜の規模で、生育量の劣らない変異体を選抜することが必要であり、それなしには実用品種の育成には至らないと考えられる。このような視点は、現在のイオンビーム照射による変異誘発試験に活用されており、今後さらに多くの実用品種育成につながり、「イオンビーム育種」として発展することを期待している。また、このような品種育成に向けた一連の技術は、鹿児島県の植物バイオテク研究における基礎となっており、県育成品種の開発を行っている部門との連携により品種育成に向けた技術の展開を行っている。

バイオテクノロジーを含め、分析や解析技術は進歩・深化している。生産現場のニーズと研究シーズの融合を図ることにより、各地域の植物資源が大量増殖や品種育成等、生産現場で活用される実用品目としてさらに発展することを期待したい。

摘 要

鹿児島県は九州の南端に位置し，南北約 600 km に及ぶことから様々な生物資源の宝庫である．本研究では，鹿児島県を例として，地域特産作物を育種的に活用するため，地域植物資源の探索を行い，微生物を利用した組織培養の改善・効率化と形質転換技術の開発ならびにイオンビームによる突然変異を利用した品種改良技術の開発を行った．さらに，これらの技術を活用した実用品種の育成を行い，育成品種の生産現場への普及を行うために，品種の保護技術と種苗供給体制について検討した．

第 1 章では，鹿児島県下で発見された 2 種類のヒガンバナ属植物について，形態的な諸特性や染色体の核型分析からショウキズイセ (*Lycoris traubii*) とキツネノカミソリ (*L. sanguinea*) の交雑種と推定し，その両親種と考えられる 2 種の種間交雑，雑種実生の形態，染色体分析，両親種の分布および開花期の調査を行った．これらの結果から，鹿児島県下で発見された 2 種類のヒガンバナ属植物は，ショウキズイセンと秋咲きキツネノカミソリの自然交雑により鹿児島県下で発生したことを証明した．

第 2 章では，植物の組織培養中に問題となる水浸状化について，多糖類産生の非病原性細菌に着目し，水浸状化回避に有効な *Pseudomonas* sp. strain F および ATCC 保有の菌株の中から *Pseudomonas* 属および *Beijerinckia* 属の 2 属 4 種の細菌について，細菌接種法による水浸状化回避の効果を解析した．これにより，オレガノから単離した *P. sp. strain F* と同様に，他の多糖類産生非病原性細菌において植物の水浸状化を回避する効果が認められ，多糖類産生能により菌種の選定が可能であることを示した．また，接種した非病原性細菌は植物体内において定着性と安定性を示した．さらに，細菌接種法の適用範囲の拡大を目的に，*P. sp. strain F* を木本性

栄養繁殖作物であるラズベリーに接種し，水浸状化回避効果を確認した．ラズベリーの栄養繁殖4系統に一度接種した細菌は，長期間の継代培養によっても安定して保持され，植物の順化率向上効果が認められた．これにより，細菌接種法が植物の科を越えた範囲で適用可能であり，この方法の実用化への可能性が示唆された．

Agrobacterium tumefaciens 接種法によりシャクナゲの遺伝子組み換え植物を作出した．*A. tumefaciens* は病原性を取り除いたバイナリーベクターによる NPTII と GUS 遺伝子の両方を併せ持つ系統で，シャクナゲの培養植物の茎葉部との共存培養を行った．接種の3～4か月後，カナマイシン選抜培地上で不定芽が形成され，植物体が再生した．NPTII と GUS 遺伝子の導入は，PCR 法とサザンハイブリダイゼーション法によって確認された．組織化学的な GUS 活性解析から，導入遺伝子は CaMV 35S プロモーターにより，全ての組織で恒常的に発現することが示された．形質転換体の獲得率は5%と低かったが，キメラを含まず，導入遺伝子の存在，発現活性および発現部位の確認から，安定した形質転換系であった．ツツジ属における遺伝子組み換え技術の確立により，花色や形態的な特性改変の他，耐干性や耐暑性等環境ストレスに対する適応性の改変に活用可能と考えられた．

第3章では，交配を介さない形質付与の手法として，輪ギク‘神馬’を対象にイオンビーム照射による変異誘発技術について検討した．まず，キメラの発生がなく変異誘発当代から変異体の選抜と品種育成が可能な変異誘発システムを構築した．さらに，低温開花性と無側枝性に着目し，この変異誘発システムを用いたイオンビーム照射により，‘神馬’から無側枝性の‘新神’と‘今神’を育成した．この2品種は無側枝性を獲得したものの，低温遭遇により開花が遅延し，無側枝性と低温開花性の2つの特性を併せ持つ変異体は選抜できなかった．そこで，‘新神’にイオンビームの再照射を行

い、低温開花性の選抜を行うことにより、無側枝性と低温開花性の特性を併せ持つ変異体の選抜が可能となり、‘新神2’の育成に至った。変異体の選抜を行う際、その特性選抜の他、DNA量の測定は重要であり、特に再照射による段階的な特性改良を行う場合は、DNA量の減少していない変異体を選抜する必要性が示された。

第4章では、育成品種における品種識別マーカーの開発と種苗供給システムを構築した。これによって、品種の保護と管理および種苗の増殖と安定供給を実現し、生産現場への普及と切り花生産の安定化、さらに鹿児島県育成品種の全国への展開が可能となった。

このように、地域植物資源を対象としたバイオテクノロジーに関わる様々な技術は、探索・活用に始まり、種苗増殖および品種育成を通して地域産業の振興に結びついてきた。また、植物組織培養に微生物を活用する細菌接種法は、エンドファイト様の機能を解析することにより、総合的病害虫管理（IPM: Integrated Pest Management）等、実用技術への発展が期待される。さらに、イオンビーム照射による変異誘発技術によって実用品種を育成し、全国での栽培に発展することができた。この成果は、全国の「イオンビーム育種」の指標となっている。これらの技術が、各地域の様々な植物資源における新たな品種育成、増殖・種苗供給および知的財産権を含む保護等育種学的な活用として今後の研究発展に役立つことが期待された。

Summary

Kagoshima Prefecture is situated in the southwestern region of the Japanese mainland. It is a wide expanse of land stretching approximately 600km from north to south. There are a large number of plant resources, because the climate ranges from temperate to sub-tropical across many islands in this prefectural region. In this study, a selective breeding technology for vegetative propagation of beneficial plants is discussed and this advances technologies for search and utilization of local plant resources. From this foundation improvement plant resources through breeding combined with tissue culture can be developed. Further this research has integrated use of microbial interaction and mutation induction of ion beam irradiation as additional tools for plant resource development. This has provided additional foundation for breeding of new cultivars and cultivation in Japan.

Chapter 1

The authors had discovered in Kagoshima Prefecture, Japan, two new types of *Lycoris* which have straw-colored (*L. sp. A*) or vermilion (*L. sp. B*) flowers. Their morphological characters, characteristic karyotypes, and other characters suggested that these *Lycoris* species might be hybrid between *L. traubii* and *L. sanguinea*. In this study, inter-specific hybridization between these two species was conducted and 32 offspring were analyzed to confirm the hypothesis. The morphological characters of these seedlings were intermediate between both species and the several leaf characteristics resemble *L. sp. A* and *B*. The chromosome numbers of somatic cell in these hybrids were either 17 or 18, and their karyotypes of chromosome configuration also coincided with either *L. sp. A* and *B*. An extensive survey on the distribution of *Lycoris* species revealed the presence of an autumnal flowering *L. sanguinea* in central and southern Kyushu, and especially in Narikawa area in the town of Yamagawa where *L. sp. A* and *B*

were found in abundance. *L. traubii* and *L. sanguinea* were growing side by side and flowered simultaneously from mid- to late September. Based on their distribution, morphological characteristics, and karyotypic similarities, we conclude that *L. sp. A* and *B* are inter-specific hybrids between *L. traubii* and the autumnal flowering form of *L. sanguinea*, and that their origin would be the southern part of Kyushu.

Chapter 2

Hyperhydricity is a physiological malformation affecting clonally propagated plants generated under tissue culture conditions. This malformation is associated with excessive hydration and poor lignification and results in poor regeneration of plants. We have tested hyperhydricity prevention in oregano by several nonspecific polysaccharide-producing rhizosphere bacteria, *Pseudomonas* spp. and *Beijerinckia* sp., prevented hyperhydricity and improved acclimation of oregano clones. It is clear that an initial polysaccharide-producing bacterial treatment can sustain the unhyperhydrated condition over multiple subcultures. These results suggested that bacteria-mediated hyperhydricity prevention may be linked to survival of bacteria in the stem tissues, which may be carried through the next subculture. Based on this study we have tested hyperhydricity prevention in four commercial clonal lines of raspberry (CDH-92; GEL-20; Heritage; JCR-FL) by bacteria (*Pseudomonas* sp. strain F). Acclimatization was enhanced in CDH-92, GEL-20 and to some extent with JCR-FL. Such bacteria-treated clones adapted easily to outside environment or greenhouse conditions without extensive acclimatization. These results confirm the role of plant or rhizosphere associated bacteria, in imparting enhanced vigor and stress tolerance in plants. Such knowledge should be used for rapidly acclimating tissue culture-generated plant clones to outside environment or greenhouse conditions. This has positive implications for commercial applications. Subsequently subcultures can be maintained without

re-inoculation.

Additional use for microbial interaction is the development of transgenic *Rhododendron* plants using soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *A. tumefaciens* strain harboring a binary vector that contained the chimeric NPTII and GUS genes was co-cultivated with stem and leaf segments from *Rhododendron* tissues cultured *in vitro*. Adventitious buds were formed and shoots were regenerated on kanamycin selection medium 3-4 months after inoculation. Integration of the NPTII and the GUS genes was confirmed by PCR and by Southern hybridization analyses. Histochemical GUS assay showed that the inserted gene was expressed in all tissues with the CaMV 35S promoter. In *Rhododendron*, the transformation procedure might have a fundamental role to expand the range of genetic variation such as flower color and morphological characteristics, and to strengthen tolerance to environmental stresses.

Chapter 3

In this study, we described effects of ion beam irradiation on cultures of chrysanthemum. 'Jimba' is the most popular white-flower chrysanthemum cultivar in Japan. However, this cultivar has many lateral buds, and this results in delayed flowering under a low temperature. The objectives of this study were to develop an effective method for obtaining mutations with ion beam irradiation to develop non-chimeric chrysanthemum mutants possessing excellent flowering and cultivation properties. More than 10,000 regenerated plants were obtained and cultured in different cropping systems; for selection of fewer axillary buds or lower temperature flowering line. From the screening of 10,468 M₁ plants derived from the ion-beam irradiated of leaf discs, more than 40 visible mutants were selected. Then, we have succeeded in the introduction of two new cultivars of chrysanthemum with reduced axillary buds named 'Aladdin' and 'Imagine' using ion beam irradiation. However, the flowering in these two cultivars was still suppressed under a low temperature. Therefore, many mutants were selected

in M₁ plants derived from the ion beam re-irradiation of 'Aladdin' and B02-1-1. In M₁ plants of 'Aladdin', DNA contents remained almost the same level as in original 'Jimba'. When we used the re-irradiation technique for plant improvement, the goal was to keep original DNA content of the plant materials or mutants used. These mutants showed favorable flower characteristics similar to the original 'Jimba' cultivar. Further, we succeeded in the introduction of a new cultivar from 'Aladdin', named 'Aladdin 2', in which both desirable characteristics, few axillary buds and early flowering at a low temperature, were combined. These two traits will contribute to labor and/or energy saving. Further to breed new cultivars of chrysanthemum using mutation induction by ion beam irradiation has good potential improving flower quality.

Chapter 4

We developed the cultivar-identification markers of 'Aladdin' and 'Aladdin 2', and made the system to increase these plant phenotypes in nurseries to distribute them to growers. We also enabled protection and the management of the cultivars, and the supply of the nurseries. This means that the farmers can produce these cultivars not only in Kagoshima prefecture but also in rest of Japan.

The bacterial-inoculated method would be able to use in these commercial tissue cultures, because of enhanced vigor and stress tolerance in tissue culture-generated plants. This mechanism is like 'End Fight' of plant associated microbe, and it can be developed as a way to improve plant tolerance to plant disease or stress and can be achieved by natural biological process. Furthermore, we succeeded in the introduction of new cultivars, using ion beam irradiation technique. This novel approach allowed mutation induction of other local plant resources and is being termed 'Ion Beam Breeding'. Mutation induction, microbial interaction and DNA analysis based on above biotechnology techniques have been utilized in the agricultural production for plant resources.

引用文献

- 阿部知子・松山知樹・白尾吏・上野敬一郎. 2007. キク品種識別方法. 特許公開 2007-24433.
- 赤司喜次郎. 1919. 久留米春寒誌 (第四版). 赤司広楽園. 久留米.
- Anderson, W. C. 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of *Rhododendron*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109: 343-347.
- Arisumi, K. 1989. *Rhododendron*. Collected Data of Plant Genetic Resources (3). p. 1119-1120. In: T. Matsuo (ed). Kodansha Sci. Tokyo Japan.
- 浅見逸夫・長谷川徹・山田真人. 2010. キク無側枝性評価のための簡易な幼苗及びインビトロ検定法の開発. 愛知農総試研報. 42: 1-6.
- Asis, C. A. Jr., and K. Adachi. 2004. Isolation of endophytic bacteria associated with the stem of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L) Lam). 35. Annual Scientific Conference of the Crop Science Society of the Philippines. 29 (Supplement no. 1): 77 (Abst).
- Bajaj, Y. P. S. 1999. Transgenic Trees. p. Preface. In: Y. P. S. Bajaj (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 44. Springer. Berlin. Germany.
- Beck, E., G. Ludwig, E. A. Averswald, B. Reiss, and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from Tn5. Gene 19: 327-336.
- Bevan, M., W. M. Barnes, and M. D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucleic Acids Res. 11: 369-385.

- Bornman, C. H. and T. C. Vogelmann. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification *in vitro* in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61: 505-512.
- Bose, S. 1958. Cytological investigation in *Lycoris* 2. Cytological similarity *L. aurea* and *L. traubii*. *Plant Life* 14: 33-37.
- Bose, S. and W. S. Flory. 1963. A study of phylogeny and of karyotype evolution in *Lycoris*. *The Nucleus* 6: 142-156.
- Botcher, I., K. Zoglauer, and H. Goring. 1988. Induction and reversion of vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 72: 560-564.
- Chandler, S. F. and J. H. Dodds. 1983. The effect of phosphate, nitrogen and sucrose on the production of phenolics and solasidine in callus cultures of *Solanum laciniatum*. *Plant Cell Rep.* 2: 105-108.
- Dai, C., C. V. Lambeth, R. Tavern, and D. Mertz. 1987. Micropropagation of *Rhododendron priniphyllum* by ovary culture. *HortSci.* 22: 491-493.
- Darvill, A. G. and P. Albersheim. 1984. Phytoalexins and their elicitors- a defense against microbial infection in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 243-275.
- De Jong, J., W. Rademaker and M. F. Wordragen. 1993. Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 263-270.
- Debergh, P. C., Y. Harbaoui, and R. Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53: 181-187.

- Debergh, P. C., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. von Arnold, R. Zimmerman, and M. Ziv. 1992. Reconsideration of the term <vitrification> as used in micropropagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30: 135-140.
- Dixon, R. A. and C. J. Lamb. 1990. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 339-367.
- Dixon, R. A. and N. L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Ebel, J. 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:235-264.
- Economou, A. S., P. E. Read, and M. J. Spanoudaki. 1987. Azalea regeneration from callus culture. *Acta Hort.* 226: 209-216.
- Fordhman, I., D. P. Stimart, and R. H. Zimmerman. 1982. Axillary and adventitious shoot proliferation on Exbury azaleas *in vitro*. *Hort Sci.* 17: 738-739.
- Frommel, M. I., J. Nowak, and G. Lazaroviz. 1992. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96: 928-936.
- 普及に移す研究成果. 2009. 青果用サツマイモ「安納紅」のウイルスフリー選抜系統「B1号」. 鹿児島県農総センター. 平成21年度普及に移す研究成果集: p. 5-6.
- 藤巻宏. 1998. 地域生物資源活用大事典. p. 1-640. 農山漁村文化協会. 東京
- Golds, T. J., M. R. Davey, E. L. Rech, and J. B. Power. 1990. Methods of gene transfer and analysis in higher plants. p. 341-371. In: J. W.

- Pollard, and J. M. Walker (eds.). Plant Cell and Tissue Culture 6, Humana, NJ. U.S.A.
- Hakkarrrt, F. A. and I. M. A. Versluijs. 1983. Some factors effecting glassiness in carnation meristem tip cultures. Neth. J. Plant Physiol. 89: 47-75.
- Harbage, J. F. and D. P. Stimart. 1987. Adventitious shoot regeneration from in vitro subcultured callus of *Rhododendron* Exbury hybrids. HortSci. 22: 1324-1325.
- Hayward, W. 1957. *Lycoris traubii* sp. nov. Plant Life 13: 40-42.
- Herman, E. B. 1990. Non-axenic plant tissue culture: possibilities and opportunities. Acta Hortic. 280: 233-238.
- Hipkins, M. F. and N. R. Baker. 1986. Photosynthesis energy transduction. p. 51-101. In Hipkins, M. F. and N. R. Baker (ed.), Spectroscopy, IRL Press, Oxford, Washington.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykass, and R. A. Schilperoort. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303: 179-180.
- Honda, H. and A. Hirai. 1990. A simple and efficient method for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. Japan J. Breed. 40: 339-348.
- 深井誠一・陳忠英・大江正温. 1987. キクの葉片培養におけるシュート形成に関する品種間差異. 大阪農技セ研報. 24: 55-58.
- Iapichino, G., S. McCulloch, and T. H. H. Chen. 1992. Adventitious shoot formation from leaf explants of *Rhododendron*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30: 237-241.
- 池上秀利・巢山拓郎・國武利浩・黒柳直彦・松野孝敏・平島敬太・谷川孝弘・坂井康宏・長谷純宏・田中 淳・中原隆夫. 2006. イ

- オンビーム照射による秋ギク‘神馬’の突然変異誘発と新系統
‘JCH1029’の育成. 福岡農総試研報. 25: 47-52.
- 今給黎征郎・永吉実孝・郡山啓作・上野敬一郎. 2006. 無側枝性輪ギク「新神」の育成. 鹿児島農試報告. 34: 15-20.
- 稻荷山資生. 1931. *Lycoris* 属植物の細胞学的研究 (予報). Bot. Mag. Tokyo. 45: 11-26.
- 稻荷山資生. 1932. *Lycoris* 属植物の細胞学的研究 I. しろばなひが
んばなの減数分裂における染色体の結合. Bot. Mag. Tokyo. 46:
426-434.
- 稻荷山資生. 1953. ヒガンバナ属 (*Lycoris*) の細胞学的研究. 生研時
報. 46: 5-10.
- James, C. 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops:
2010. ISAAA. Brief No. 42
- Jefferson, R. A., S. M. Burgess, and D. Hirsh. 1986. β -glucuronidase
from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 83: 8447-8451.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusion:
 β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in
higher plants. EMBO J. 6 (13): 3901-3907.
- 鹿児島県. 2003. 鹿児島県の絶滅おそれある野生動植物-鹿児島県レ
ッドデータブック-. p. 1-320.
- 鹿児島県農業経営管理指導指標. 2001. 秋ギク電照. 鹿児島県農政
部. p. 535-542.
- 鹿児島県農政部. 2012. かごしまの農業. p. 5-8. 鹿児島県農政部農
政課.
- かごしまさつまいも小辞典. 2005. 伝搬と普及. 鹿児島県農政部: p.
1-3.

- Kaul, V., R. M. Miller, J. F. Hutchinson and D. Richards. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 21: 21-30.
- Kevers, C., M. Coumans, M. F. Coumans-Gilles, and T. Gaspar. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. Physiol. Plant. 61: 69-74.
- Kevers, C., R. Prat, and T. Gaspar. 1987. Vitrification of carnation *in vitro*: changes in cell wall properties, cellulose and lignin content. Plant Growth Reg. 5: 59-66.
- 小松崎一雄. 1961. アケボノショウキラン (新称) 日本産 *Lycoris* の新種. 野草. 264: 101.
- Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima, and Y. Arai. 1990. An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: methanol almost completely suppresses a putative endogenous for β -glucuronidase activity. Plant Sci. 70: 133-140.
- 上妻道紀・内村力・安庭誠・神門達也・佐藤光徳・吉田典夫. 2003. カンショの品種‘安納紅’, ‘安納こがね’, ‘種子島ろまん’, ‘種子島ゴールド’の育成. 鹿児島農試報告. 31: 1-15.
- 倉重祐二・小林伸雄. 2008. 発見された神奈川県立農事試験場“榔聞類調査”にみる大正時代のツツジ園芸品種と育種傾向の推察. 園学研. 7(2): 323-328.
- 栗田子郎. 1998. ヒガンバナの博物誌. p. 1-181. 研成社. 東京.
- Ledger, S. E., S. C. Deroles and N. K. Given. 1991. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Cell Rep. 10: 195-199.
- 松江幸雄. 1994. 曼珠沙華 魅せられるまま 彼岸まで. 園芸世界. (9): 10-13.

- 松本由利子. 2000. 無側枝性ギクの生育開花に関する研究 (第2報)
夏秋ギク「岩の白扇」の電照抑制作型における栽培時期と親株
の越冬条件が生育開花に及ぼす影響. 香川県農試報告. 52:
55-64.
- 松山知樹. 2009. 「DNA マーク」で果樹や花の品種を識別する. RIKEN
NEWS. 334 (4): 6-9.
- 松山知樹・白尾吏. 2011. キク品種「新神2」の識別方法. 特許公開
2011-24466.
- 松山知樹・白尾吏・上野敬一郎・古川浩二・岩澤洋樹・阿部知子・
田畑哲之. 2012. イオンビーム照射したキクとシンビジウムで
のゲノム DNA 変異検出. 園学研. 11 (別2): P188.
- Meyer, M. M. 1982. *In vitro* propagation of *Rhododendron catawbiense*
from flower buds. HortScience 17: 891-892.
- 三柴啓一郎・三位正洋. 1999. フローサイトメトリー自由自在 8, 植
物研究への応用. p 67-73. 中内啓光監修. 細胞工学別冊. 秀潤
社. 東京.
- 宮崎貞巳・田代洋丞・島田恒治. 1976. キクの組織培養 (第1報).
佐賀大農彙. 40: 31-44.
- Murakami, T. and Y. Ohashi. 1992. Method for histochemical detection
of GUS reporter gene expression in transgenic plants. Plant Cell
Technol. 4: 281-286.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth
and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:
473-497.
- 長谷健・田之頭優樹・向吉健二・田中義弘. 2012. 偽受精胚培養によ
るニガウリ半数体作出法. 九州農業研究要旨. 75: 129.
- Nagatomi, S., E. Miyahira and K. Degi. 1997. Combined effect of
gamma irradiation methods and in vitro explant sources on

mutation induction of flower color in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Gamma Field Symposia*. 35: 51-69.

永富成紀. 2002. ガンマ線による品種改良. *Energy Review* 2002-5: 12-14.

永富成紀. 2003. イオンビーム照射による花き突然変異育種の展開. *農林水産技術研究ジャーナル*. 26: 33-38.

永吉実孝. 2003. 鹿児島県における放射線育種. *放射線と産業*. 98: 10-16.

永吉実孝. 2011. 無側枝性の発現をめぐって, 神馬の開花遅延防止のための温度管理. p 86-93, p140-145. 大石一史編著. *キクをつくりこなす*. 農文協. 東京.

農林水産省ホームページ. 2006. 植物新品種の保護の強化及び活用の促進に関する検討会最終報告書.

<http://www.maff.go.jp/j/study/sin_hinsyu/index.html>

野添博昭・坂田祐介・有隅健一. 1978. リコリス属植物の系統発生に関する研究 (第1報). *園学要旨*. (春): 300-301.

Okamoto, A. and K. Suto. 2003. Morphological Observation on Viable and Nonviable Axillary Bud Formation in Non-branching *Chrysanthemum* 'Iwnohakusen'. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72: 422-424.

大澤勝次. 1988. 組織培養による種苗の増殖. *農業および園芸*. 63: 92-96, 274-278.

大澤勝次. 1994. 第4章 植物増殖技術. p 95-124. 図集・植物バイオテクの基礎知識. 農文協. 東京.

Pavingerová, D., J. Bríza, K. Kodytek, and H. Niedermeierová. 1997. Transformation of *Rhododendron* spp. using *Agrobacterium tumefaciens* with a GUS-intron chimeric gene. *Plant Sci.* 122: 165-171.

- Perry, P., K. Ueno, and K. Shetty. 1999. Reversion to hyperhydration by addition of antibiotics to remove *Pseudomonas* in unhyperhydrated oregano tissue cultures. *Process Biochemistry*. 34: 717-723.
- Phan, C. T. and R. LeTouze. 1983. A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and vitreous plant of (*Prunus avium* L.) obtained in vitro. *Plant. Sci. Lett.* 31: 323-327.
- Pillay, V. K. and J. Nowak. 1997. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* 43: 354-361.
- プロジェクト研究成果. 2002. 新形質付与のためのエンドファイトの機能解明. 農林水産技術会議. プロジェクト研究成果シリーズ 392: p. 1-81.
- Renou, J. P., P. Brochard and R. Jalouzot. 1993. Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. *Plant Sci.* 89: 185-197.
- Rugini, E. 1986. Almonds. p. 574-611. In D. A. Evans (ed.). *Handbook of Plant Cell Culture*. 4, Macmillan Pub. Co., London, U.K.
- Sato, S., M. Hagimori, and S. Iwai. 1993. Recovering vitrified carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoots using bacto-peptone and its subfractions. *Plant Cell Rep.* 12: 370-374.
- Shetty, K., O. F. Curtis, R. E. Levin, R. Witkowsky, and W. Ang. 1995. Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *J. Plant Physiol.* 147: 447-451.

- Shetty, K., O. F. Curtis, and R. E. Levin. 1996a. Specific interaction of mucoid strain of *Pseudomonas* spp. with oregano (*Origanum vulgare*) clones and the relationship to prevention of hyperhydricity in tissue culture. *J. Plant Physiol.* 149: 605-611.
- Shetty, K., T. Carpenter, O. F. Curtis, and T. Potter. 1996b. Reduction of hyperhydricity in tissue cultures of oregano (*Origanum vulgare*) by extracellular polysaccharide isolated from *Pseudomonas* sp. *Plant Sci.* 120: 175-183.
- 柴田道夫・間竜太郎・池田広・清水明美. 1992. キクの葉切片からの不定芽形成能の品種・種間差. *育学雑.* 42 (別 2): 556-557.
- 鹿内利治. 2009. シロイヌナズナの形質転換. *低温科学* (北海道大学低温科学研究所) 67: 615-616.
- Shikazono, N., A. Tanaka, H. Watanabe, and S. Tano. 2001. Rearrangements of the DNA in carbon ion-induced mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics.* 157: 379-387.
- Shikazono, N., Y. Yokota, S. Kitamura, C. Suzuki, H. Watanabe, S. Tano and A. Tanaka. 2003. Mutation rate and Novel tt mutants of *Arabidopsis thaliana* induced by Carbon Ions. *Genetics.* 163: 1449-1455.
- Shikazono, N., C. Suzuki, S. Kitamura, H. Watanabe, S. Tano and A. Tanaka. 2005. Analysis of mutations induced by carbon ions in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 56: 587-596.
- Shinoyama, H., T. Kazuma, M. Komano, Y. Nomura and T. Tsuchiya. 2002. An efficient transformation system in chrysanthemum [*Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitamura] for stable and non-chimeric expression of foreign genes. *Plant Biotechnol.*, 19: 335-343.

- Shirao, T., K. Ueno, T. Abe and T. Matsuyama. 2013. Development of DNA markers for identifying chrysanthemum cultivars generated by ion-beam irradiation. *Mol. Breed.* 31: 729-735.
- 白尾 吏・上野敬一郎・松山知樹・市田裕之・阿部知子. 2007. 秋輪ギク「新神」の DNA マーカーによる品種識別. 九州農業研究発表要旨集. 70: 203.
- 杉本明. 2007. 「甘み・砂糖・さとうきび」 (10) さとうきびの品種改良. 砂糖類情報. 7: 95-101.
- Sutter, E. and R. W. Langhans. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 104: 493-496.
- Takagi, H., Y. Tanaka, I. Tarumoto, and N. Murata. 1993. Evaluation of genetic diversity of sweet potato germplasm I. Characterization by restriction fragment poly-morphisms analysis. *Japan J Breed* 43 (Suppl. 1): 192.
- 高津康正・友常秀彦・霞正一・佐久間文雄. 1998. 国内産キク品種における茎葉再分化能の差異と効率的な形質転換系の確立. 園学雑. 67 (6): 958-964.
- 高山 覚. 1986. 図解バイオテクノロジー, プロトプラストからの植物の再生. p 4, p181-186. 農業図書. 東京.
- 竹村英一. 1961. ヒガンバナ属の人工雑種の形態学的・細胞学的研究 I. *Lycoris sprengeri* Comes. と *Lycoris straminea* Lindl との雑種 F1 について. *Bot. Mag. Tokyo.* 74: 524-531.
- 竹村英一. 1962. ヒガンバナ属の人工雑種の形態学的・細胞学的研究 III. 4つのV形染色体をもつ人工雑種. *Bot. Mag. Tokyo.* 75: 324-330.
- 竹之下佳久・長谷健・大江正和・斉藤宏之・阿部知子. 2009. イオンビーム照射によるイチゴ品種「さつまおとめ」早生優良系統

- の作出. 第6回イオンビーム育種研究会大会講演要旨集: 17-18.
- Takenoshita, Y., J. Nagai, T. Nagatani, M. Ooe, Y. Hase, A. Tanaka and I. Narumi. 2010. Ion Beam Breeding of Sugarcane Cultivar "Ni17". JAEA-Review 2010-065: 69.
- 田中克己・浜清. 1961. なすりつけ法と押しつぶし法—概説. P188-193. 田中克己・浜清 (共著). 顕微鏡標本の作り方. 裳華房, 東京.
- Tanaka, A. 1999. Mutation induction by ion beams in *Arabidopsis*. Gamma field symposia. 38: 19-27 (Abst.).
- Tanaka, A., A. Sakamoto, Y. Ishigaki, O. Nikaido, G. Sun, Y. Hase, N. Shikazono, S. Tano and H. Watanabe. 2002. An Ultraviolet-B-Resistant Mutant with Enhanced DNA Repair in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 129: 64-71.
- Tanaka, A., N. Shikazono and Y. Hase. 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.
- 田之頭優樹. 2012. 突然変異を利用した花きの新品種育成. 農業かごしま. 11~12月号: 20-21.
- 田之頭優樹・長谷健・永吉実孝・仁田尾学・野澤樹・長谷純宏・鳴海一成. 2012. イオンビーム再照射による秋輪ギク「新神」の段階的特性の改良. 九州農業研究要旨. 75: 153.
- 上野敬一郎・坂田祐介・有隅健一. 1983. Lycoris 属植物の系統発生に関する研究 (第2報). 園学要旨. 58 (秋): 334-335.
- Ueno, K., S. Nagayoshi, K. Shimonishi, Y. Hase, N. Shikazono and A. Tanaka. 2002. Effects of ion beam irradiation on chrysanthemum leaf discs and sweetpotato callus. TIARA Ann. Rep. 2001. JAERI-Review 2002-035: 44-46.

- Urban, L. A., J. M. Sherman, J. W. Moyer and M. E. Daub. 1994. High frequency shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). Plant Sci. 98: 69-79.
- Vervliet, G., M. Holsters, H. Teuchy, M. Van Montagu, and J. Schell. 1975. Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium* strain. J. Gen. Virol. 26: 33-48.
- Williams, M. 1983. *Lycoris* "cinnabarinam" a hybrid between *L. sanguinea* and *L. traubii* ?. Plant Life 50: 95-99.
- Yamaguchi, H., A. Shimizu, K. Degi and T. Morishita. 2008. Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. Breeding Sci. 58: 331-335.
- Yamaguchi, H., A. Shimizu, Y. Hase, K. Degi, A. Tanaka and T. Morishita. 2009. Mutation induction with ion beam irradiation of lateral buds of chrysanthemum and analysis of chimeric structure of induced mutants. Euphytica 165:97-103.
- Yamaguchi, H., A. Shimizu, Y. Hase, A. Tanaka, N. Shikazono, K. Degi and T. Morishita. 2010. Effect of ion beam irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. Breed. Sci. 60:398-404.
- Zimmerman, T. W. and B. G. Cobb. 1989. Vitrification and soluble carbohydrate levels in *Petunia* leaves as influenced by media gel rite and sucrose concentrations. Plant Cell Rep. 8: 358-360.

謝 辞

本論文のとりまとめに際し、ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜った島根大学教授小林伸雄博士，准教授松本敏一博士に厚くお礼申し上げます。また，ご校閲の労と有益なご助言を賜った鳥取大学教授田村文男博士，島根大学教授浅尾俊樹博士，山口大学教授執行正義博士に深く感謝の意を申し上げます。

学生時代から様々な面でご指導とご教示を賜った鹿児島大学名誉教授有隅健一博士，バイオテクノロジーの基礎をご指導していただくと共に終始激励いただいた北海道大学名誉教授大澤勝次博士，（独）農業生物資源研究所大橋祐子博士，ノースダゴダ州立大学教授 Dr. Kalidas Shetty に深く感謝いたします。

本研究の遂行に当たり，終始激励とご助言ならびにご協力を賜った（独）日本原子力研究開発機構田中淳博士，長谷純宏博士，（独）理化学研究所阿部知子博士，松山知樹博士，斉藤宏之博士にお礼申し上げます。また，長年にわたりご助言と激励をいただいた鹿児島県農業開発総合センター元所長軽部稔氏，下西恵大隅支場長に感謝を申し上げます。

品種育成に向けて終始ご助言，ご協力をいただいた鹿児島県農業開発総合センター花き部白山竜次部長，今給黎征郎技術専門員，郡山啓作主任研究員，ご助言，ご指導いただいた鹿児島県バイオテクノロジー研究所永吉実孝所長に深く感謝の意を申し上げます。また，研究にご協力いただき，共に労したバイオテクノロジー研究所細胞機能研究室白尾吏主任研究員（現生産環境部），川畑真由美技術補佐員（現大隅地域振興局）および研究所の皆様へ感謝申し上げます。

最後に，本稿をまとめるにあたり，多大なご理解とご支援をいただいた鹿児島県農業開発総合センター熊毛支場大内田主任研究員，上妻英男技術補佐員，他皆様に末尾ながら厚くお礼申し上げます。

学会誌公表論文リスト

題 目 : 鹿児島県下で見出された *Lycoris* 新種の成立について.

著者名 : 上野敬一郎, 野添博昭, 坂田祐介, 有隅健一

学術雑誌名 : 園芸学会雑誌 (1994) 63 (2): 409-417.

本論文との対応 : 緒論, 第 1 章

題 目 : Genetic transformation of *Rhododendron* by *Agrobacterium tumefaciens*.

著者名 : Kei-ichiro Ueno, Yutaka Fukunaga and Ken-ichi Arisumi

学術雑誌名 : Plant Cell Reports (1996) 16: 38-41.

本論文との対応 : 緒論, 第 2 章第 4 節

題 目 : Effect of Selected Polysaccharide- Producing Soil Bacteria on Hyperhydricity Control in Oregano Tissue Cultures.

著者名 : Kei-ichiro Ueno and Kalidas Shetty

学術雑誌名 : Applied and Environmental Microbiology (1997) 63 (2): 767-779.

本論文との対応 : 緒論, 第 2 章第 1 節

題 目 : Prevention of hyperhydricity in oregano shoot cultures is sustained through multiple subcultures by selected polysaccharide-producing soil bacteria without re-inoculation.

著者名 : Kei-ichiro Ueno and Kalidas Shetty

学術雑誌名 : Applied Microbiology and Biotechnology (1998) 50:119-124.

本論文との対応 : 緒論, 第 2 章第 2 節

題 目 : Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. Isolated from oregano.

著者名 : Kei-ichiro Ueno, Susan Cheplick and Kalidas Shetty

学術雑誌名 : Process Biochemistry (1998) Vol.33. No.4: 441-445.

本論文との対応 : 緒論, 第 2 章第 3 節

題 目 : イオンビームの再照射によって秋輪ギク‘神馬’の複数形質を改良した新品種‘新神 2’の育成

著者名 : 上野敬一郎, 永吉実孝, 今給黎征郎, 郡山啓作, 南 公宗, 田中 淳, 長谷純宏, 松本敏一

学術雑誌名 : 園芸学研究 (2013) 12 (3): 245-254.

本論文との対応 : 緒論, 第 3 章