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

上野敬一郎^{1*}・永吉実孝²・今給黎征郎³・郡山啓作³・
南 公宗³・田中 淳⁴・長谷純宏⁴・松本敏一⁵

¹ 鹿児島県農業開発総合センター熊毛支場 891-3101 鹿児島県西之表市西之表

² 鹿児島県バイオテクノロジー研究所 893-1601 鹿児島県鹿屋市細山田

³ 鹿児島県農業開発総合センター花き部 891-0513 鹿児島県指宿市山川町岡見ヶ水字餅ヶ子

⁴ 独立行政法人日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究部門 370-1292 群馬県高崎市綿貫町

⁵ 島根大学生物資源科学部農林生産学科 690-1102 島根県松江市上本庄町

Breeding of New *Chrysanthemum* Cultivar ‘Aladdin 2’ through Stepwise Improvements of cv. ‘Jimba’ Using Ion Beam Re-irradiation

Kei-ichiro Ueno^{1*}, Sanetaka Nagayoshi², Seiro Imakiire³, Keisaku Koriyama³,
Tomohiro Minami³, Atsushi Tanaka⁴, Yoshihiro Hase⁴ and Toshikazu Matsumoto⁵

¹Kagoshima Prefectural Institute for Agricultural Development, Kumage Branch, Nishinoomote, Kagoshima 891-3101

²Kagoshima Biotechnology Institute, Hosoyamada Kanoya, Kagoshima 893-1601

³Kagoshima Prefectural Institute for Agricultural Development, Flower Division, Ibusuki, Kagoshima 891-0513

⁴Quantum Beam Science Directorate, Japan Atomic Energy Agency, Takasaki, Gunma 370-1292

⁵Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, Matsue, Shimane 690-1102

Abstract

‘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. 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 the objectives of this study were to develop an effective method for obtaining further mutations with ion beam irradiation to develop non-chimeric chrysanthemum mutants possessing excellent flowering and cultivation properties. Many mutants were selected in M₁ plants derived from the ion beam re-irradiation of ‘Aladdin’ and B02-1-1. 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. Furthermore, this novel approach facilitated the mutation-linked induction of genetic changes in other plants, and is being termed ‘Ion Beam Breeding’.

Key Words : flowering ability under low temperature, mutation breeding, non-branching chrysanthemum, plant regeneration

キーワード : 無側枝性キク, 植物体再生, 低温開花性, 突然変異育種

緒 言

放射線育種は、国内外を問わず農作物の改良に広く利用され、2012年現在、世界では3,200品種以上、我が国では480品種以上がこの手法を用いた品種として登録されている。突然変異を起こすための変異原として、従来からガンマ線やX線などの電離放射線が広く利用されてきた(永富, 2002)。これに対して、近年、新たな変異原として粒子線で

あるイオンビームの利用例が増加している(永富, 2003)。イオンビームは、飛跡に沿って物質に与えるエネルギーを示す値である線エネルギー付与 (Linear Energy Transfer: LET) が従来のガンマ線やX線と比較して非常に高い。そのため、変異率が高く変異スペクトルが大きいほか、不良変異の発生が少ないといった特徴が報告され、種々の植物種で応用が図られている (Tanaka ら, 2010)。

キク [*Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat. (*Dendranthema* × *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当たる55億円の農業産出

2012年12月25日 受付. 2013年3月18日 受理.

* Corresponding author. E-mail: ueno-keiichirou@pref.kagoshima.lg.jp

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を越える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・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，15年ほど前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）．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た（永吉，2003）．

著者らは，栄養繁殖作物の交配によらない放射線育種法として，イオンビーム照射による変異誘発法を検討し，秋輪ギク‘神馬’において花形，花卉数，葉形，摘芽数および開花の早晚性など様々な形質について変異が拡大できることを確認した（永吉，2003；Ueno ら，2002，2003）．また，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‘神馬’と同様に低温遭遇により開花が遅延した．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に成功したので報告する．

材料および方法

1. 供試品種および材料の調整

第1表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

（第1表）．また，‘神馬’9-1-1系統にイオンビームを照射後，無側枝性を指標として選抜育成した‘新神’，‘今神’およびB02-1-1系統がある（第1表）．本実験では，第1表に示した‘神馬’3系統および‘神馬’由来の無側枝性を示す3品種・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．

イオンビームの照射材料を得るため，各品種・系統の無菌植物を養成した．茎頂培養に用いる成長点は，0.5 mm以下の大きさで無菌的に摘出し，茎頂培養培地として0.01 mg・L⁻¹ NAA（naphthylacetic acid），0.05 mg・L⁻¹ BAP（6-benzylaminopurine），3%ショ糖および0.3%ジェランガム（和光純薬工業）を添加し，pH 5.8に調整したMS培地（Murashige・Skoog, 1962）に置床した．伸長したシュートは，MSホルモンフリー培地に移植し，無菌植物として維持し，その葉身部を照射材料として以下の試験に供試した．

2. イオンビーム照射による変異誘発法と植物体再生

イオンビーム照射による変異誘発は，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，総エネルギー220 MeVまたは320 MeVの炭素イオンビームを1～5 Gyの線量で照射した．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（MS培地；5.0 mg・L⁻¹ IAA（indoleacetic acid），1.0 mg・L⁻¹ BAP，3%ショ糖，0.3%ジェランガム；pH 5.8）上に40切片置床した．置床する際は，不定芽再生効率の安定化のため，葉の背胚軸面を上向きに統一した．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イオンビーム照射処理に用いた．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，葉片の培養開始後3～5日目に行った．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．

供試材料の不定芽経路の再生系については，前述の不定芽誘導培地を用い，培地調整時に121℃で15分間，オートクレーブによる加圧滅菌後，50℃程度になった培地に濾過滅菌したIAA水溶液を添加し攪拌後，9 cm滅菌シャーレに25 mLずつ分注した．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シャーレ当たり20切片（4列×5切片）ずつ不定芽誘導培地に置床し，25℃，16時間日長，白色蛍光灯下（35 μmol・m⁻²・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．

Table 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)

不定芽誘導培地に置床して1か月後、不定芽を形成した葉切片は茎頂培養と同組成の不定芽生育培地（MS 培地；0.01 mg・L⁻¹ NAA, 0.05 mg・L⁻¹ BAP, 3%ショ糖, 0.3%ジェランガム；pH 5.8）に移植した。さらに1か月後、成長した不定芽を含む葉切片を4～5分割し、不定芽の伸長を促すためMS ホルモンフリーの固形培地 50 mL を分注したガラス製 500 mL 培養容器にそれぞれ約 10 切片を置床した。

3. 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、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本挿し、ポリ袋で密閉して25℃、白色蛍光灯下（35 μmol・m⁻²・s⁻¹）、16時間照明の恒温で発根を促し、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成長した。定植時の苗の均一性を高めるため、育苗圃で成長した苗の上部5 cm を採穂し、発根処理後、切り花生産圃場に定植した。変異誘発当代の再生個体を選抜する試験規模は、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。

4. 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当たる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などの形態

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当たる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4～5℃低く、最低温度10～14℃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。

5. 不定芽発生過程における核観察

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、培養中の葉切片を経時的に取り出し、横断切片を作成して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細断し、横断切片はフローサイトメトリーに用いる染色液（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；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確認した。

結果および考察

1. 変異誘発およびキメラ性の解析

‘神馬’の葉切片にイオンビームを照射したところ、不定芽経由で1シャーレ当たり200～300個の変異誘発個体が再生し（上野ら, 2001）、年間6,000～10,000個体規模の変異誘発と再生個体の選抜試験が可能となった（Ueno ら, 2002, 2003）。また、これらの試験から無側枝性品種‘新神’、‘今神’およびB02-1-1系統が育成された。本実験では、イオンビーム照射により育成されたこれらの3品種・系統に再度イオンビームを照射し変異誘発を行った。その結果、イオンビームの再照射を行った場合も原品種である‘神馬’と同程度の不定芽形成が認められ（データ略）、再生個体が得られた（第2表）。

Table 2. 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’.

一般に植物体に変異誘発を行った場合、変異誘発当時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、変異誘発当時から変異体の選抜が可能であった (Ueno ら, 2002, 2003; Yamaguchi ら, 2010)。しかし、Shinoyama ら (2002) はキクの葉切片から不定芽経路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た。

そこで、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。第1図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 (第1図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。また、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。15日後には表層に突起した細胞塊が実態顕微鏡で観察された。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 (第1図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日後に照射しており、変異誘発後、個々の変

Fig. 1. 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 μ m (A–C and E) or 200 μ m (D and F).

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。

Yamaguchi ら (2009) は腋芽に照射した際、区分キメラによる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の場合に斑入り状の葉緑素変異体が得られる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、独立した完全アルビノ変異体であった (データ略)。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は認められなかった。さらに、‘新神’の品種識別マーカー (阿部ら, 2007; Shirao ら, 2012) 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など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。このことから、個々の変異細胞に由来する独立した不定芽が得られ、キメラ性が低く抑えられたことにより、変異誘発当代での変異個体の選抜が可能となったと推察された。

2. 個体選抜および系統育成

本実験では、炭素イオンビームを1～5 Gyの線量で照射したが、品種本来の特性を維持した変異体の選抜を目的としていることから、植物体の再生数が半減しない1～3 Gy (上野ら, 2001) を主に照射した。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を得られ、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 (第2表)。しかし、‘今神’を照射材料とした場合、花容・草姿に優れる変異個体は選抜できなかった (第2表)。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、選抜個体を得られた (第2表)。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 (Ueno ら, 2003) ことに起因すると考えられる。

Yamaguchi ら (2008) は、キクにガンマ線を照射した場合、DNA量の減少と変異率に高い相関があることを報告している。これに対して、イオンビーム照射の場合は、線エネルギー付与 (LET) がガンマ線やX線と比較して非常に高いため、照射線量当たりの変異誘発率が高い (Tanaka 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’に炭素イオンを1～3 Gy照射した際、再生個体のDNA量は平均で1%程度減少し、約半数はDNA量の減少を伴わない個体であった (Ueno ら, 2004)。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)。このことか

ら、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。本実験では、DNA量が原品種の‘神馬’と同程度の変異体である‘新神’とB02-1-1系統 (Ueno ら, 2003) を再照射に用いることで優良変異体の選抜が可能であることを示した。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 (第2表)。

3. イオンビーム再照射による特性改良

‘神馬’と‘神馬’由来の変異系統である‘新神’およびB02-1-1系統に変異誘発を行い、得られた再生個体につ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

Fig. 2. 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.

出現頻度を調査した（第2図）．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（第2図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85個の選抜個体が得られた（Uenoら、2004）．これらは無側枝性が発現しない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性を調査した．第2図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第2図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、次年度の系統選抜の供試数は33系統に減少した（第2表）．これは、無側枝性により腋芽が消失し、栄養繁殖が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．

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92個体を選抜した（Uenoら、2004）．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°Cで管理した4月開花作型では、第3表に示すように、‘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（第3表）．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（第3表）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、第4表に示すように、‘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

Table 3. 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	Weight of 90 cm cut flower	Number of dis-budding node
					(cm)	(g)	
‘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

^zThe 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.

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

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

Table 4. Characteristics of selected lines in November flowering, derived from ‘Jimba’ or ‘Aladdin’, and these were mutants after ion beam irradiation.

Cultivar or selected line	Ion beam irradiated plant	Flowering date	November flowering cropping system in 2005 ^z				
			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 ($p < 0.05$).

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（第 4 表）。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（第 3 表）、摘芽数は原品種より多くなった（第 4 表）。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°C 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（データ略）。第 3 図で示す消灯 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、2 系統（B03-1-3, B03-2-2）は‘神馬’2 号より早く、1 系統（B03-2-5）は同程度で、2 系統（B03-1-7, B03-1-21）は‘神馬’2 号と 1 号の中間程度であった（第 3 図）。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、第 3 表に示した前年の結果と一致していた。一方、‘神馬’の開花遅延は、低温遭遇による幼若化（幼若相への誘導）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など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）。そのため、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（Ueno ら,

Fig. 3. 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.

2006). 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す、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（第 3 表、第 3 図）。

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 系統が選抜、育成され（第 3 表、第 4 表）、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’の特性は第 5 表に示すように‘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 当たりの 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 本当たり 30 ～ 40 個の摘芽を行う。従って、10 a 当たり 120 ～ 160 万個の蕾や側枝を摘み取る必要があり、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、摘芽作業時間は半分程度になる。さらに、無側枝率 70% の‘新神 2’の場合、3 割程度に減少し、200 ～ 270 時間の省力化につながることを示している。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°C 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°C 低い 12 ～ 14°C 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 $8,000 \text{ L} \cdot 10 \text{ a}^{-1}$ 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 $9,000 \sim 9,500 \text{ L} \cdot 10 \text{ a}^{-1}$ 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 $6,000 \text{ L} \cdot 10 \text{ a}^{-1}$ となり、作型当たり $3,000 \sim 3,500 \text{ L} \cdot 10 \text{ a}^{-1}$ の燃料節減が可能であることが試算されている（未発表）。このように、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

Table 5. Characteristics of chrysanthemum cultivars in registration form, derived from ‘Jimba’, and these were mutants after ion beam irradiation.

No. ²	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

² The number of characteristics in registration form.

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。

以上のように、本実験および他の試験を含めた変異誘発から、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を示した。また、DNA量が減少していない変異体を選抜することが可能であることから、このような変異体を照射材料とすることにより、複数の特性を段階的に改良できることが示された。これにより育成した‘新神2’は、無側枝性と低温開花性を併せ持ち、切り花品質を左右する花径や花弁数が増加しており、高品質切り花の省力・低コスト生産の実現が可能であることを確認した。このような実用レベルの品種育成による実証は、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。

摘 要

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い、植物体の再生過程や変異体、照射材料および選抜手法を検討した。まず、ここで用いる変異誘発システムが、キメラ性の低い手法であることを確認し、イオンビーム照射当からの変異個体選抜が可能であることを示した。また、イオンビーム照射により得られた変異体は、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。さらに、‘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。また、実用品種の育成を通して得られた知見は、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。

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2007-244334.
浅見逸夫・長谷川 徹・山田真人. 2010. キクの無側枝性評価のための簡易な幼苗およびインビトロ検定法の開発. 愛知農総試研報. 42: 1–6.
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. 鹿児島農試研報. 34: 15–20.
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.
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.
Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473–497.
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(3): 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る、神馬の開花遅延防止のための温度管理. p. 86–93, p. 140–145. 大石一史編著. キクをつくりこなす. 農文協. 東京.
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.
Okamoto, A. and K. Suto. 2003. Morphological observation on viable and nonviable axillary bud formation in non-branching *Chrysanthemum* ‘Iwanohakusen’. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72: 422–424.
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 × 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. 2012. Development of DNA markers for identifying chrysanthemum cultivars generated by ion-beam irradiation. *Mol. Breed.* 23: 1–7.
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.
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, p. 181–186. 農業図書. 東京.

- 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・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. 九州農業研究発表要旨集. 75: 153.
- 上野敬一郎・永吉実孝・長谷純宏・鹿園直哉. 田中 淳. 2001. 秋輪ギク「神馬」の培養系を利用した系統育成システムの構築. 育学研. 3(別2): 62.
- Ueno, K., S. Nagayoshi, Y. Hase, N. Shikazono and A. Tanaka. 2003. Effects of ion beam irradiation on the mutation induction from chrysanthemum leaf disc culture. *TIARA Ann. Rep.* 2002. *JAERI-Review* 2003-033: 52–54.
- Ueno, K., S. Nagayoshi, Y. Hase, N. Shikazono and A. Tanaka. 2004. Additional improvement of chrysanthemum using ion beam re-irradiation. *TIARA Ann. Rep.* 2003. *JAERI-Review* 2004-025: 53–55.
- 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.
- Ueno, K., T. Shirao, S. Nagayoshi, Y. Hase and A. Tanaka. 2006. Additional improvement of *Chrysanthemum* using ion beam re-irradiation. *TIARA Ann. Rep.* 2004. *JAERI-Review* 2005-001: 60–62.
- 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. *Breed. 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.