紫褐色に着色する宿存がくを有するホオズキの シンクロトン光照射による突然変異誘発

坂本健一郎^{1,2*}・高村武二郎^{2,3}

¹ 佐賀県農業試験研究センター 840-2205 佐賀市川副町南里

² 愛媛大学大学院連合農学研究科 790-8566 愛媛県松山市樽味

³ 香川大学農学部 761-0795 香川県木田郡三木町池戸

Induction of Mutation by Synchrotron-light Irradiation in Chinese Lantern (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* Makino) with Purplish Brown-colored Persistent Calyx

Kenichiro Sakamoto^{1,2*} and Takejiro Takamura^{2,3}

¹Saga Prefectural Agriculture Research Center, Nanri, Kawasoe, Saga 840-2205

²The United Graduate School of Agricultural Sciences, Ehime University, Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566

³Faculty of Agriculture, Kagawa University, Ikenobe, Miki, Kita, Kagawa 761-0795

Abstract

In purplish brown-colored Chinese lantern (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* Makino), investigation of coloration of the persistent calyx and induction of mutants obtained by synchrotron-light irradiation was carried out. As results of the investigation of pigments in the persistent calyxes by HPLC, the calyxes contained petunidin and malvidin glycosides, and the anthocyanins caused purplish brown coloration. The calyx-color mutants were obtained by synchrotron-light irradiation treatments, and the mutants included those showing increased or decreased purplish brown colored area in the persistent calyxes as compared with the control. The highest percentage of persistent calyx-color mutants was recorded with the 10-Gy irradiation treatment. Furthermore, several mutants with horticulturally desirable traits, such as dwarfism, increased numbers of persistent calyxes per plant, and small persistent calyxes, were also obtained. These results suggest that synchrotron-light irradiation can be a very effective tool for the breeding of Chinese lantern.

Key Words : anthocyanin, mutation breeding, pigment, radiation

キーワード : アントシアニン, 放射線, 色素, 突然変異育種

緒 言

ホオズキ (*Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* Makino) は、東アジア原産のナス科ホオズキ属の多年草であり、古くから薬用植物や観賞用植物として利用されている。我が国においては、観賞用として夏季の鉢物や盆の供え物としての切り花の需要が大きく、主な栽培品種として早生で大実の‘タンバホオズキ’の系統が全国各地で栽培されている(村井, 1994)。佐賀県においても、ホオズキは夏季の主要な栽培品目の一つである。近年では県独自の新品種開発が行われており(中村ら, 2007; 月時ら, 2005)、従来の切り花用品種に加え、盆の時期に限定せず夏季における長期間の観賞を見据えたわい性の鉢物用品種の育成も行われている(高取ら, 2017, 2018)。

花きは観賞を主目的とすることから新規性が常に求められる。また、近年の多様化している花き産業においては、周年流通する品目とともに季節を感じる品目における新品種の育成も重要である(福井, 2016)。その点で、ホオズキは我が国において夏季の風物詩として古くから親しまれてきた観賞植物の一つである。ホオズキの主たる観賞器官は、宿存がくと呼ばれる開花後に果実を囲む筒状のがくが肥大して袋状になったものである。成熟して橙色に着色した宿存がくが主に観賞される部分であるが、花序として観賞されることから成熟前の宿存がくの形質も重要である。しかし、現状生産されているホオズキの宿存がくは、成熟前は黄緑～緑色を呈し、成熟後に橙色に着色するものばかりであり、多様性に乏しい。

佐賀県農業試験研究センターでは、開花時から成熟前の緑色の宿存がくの一部が紫褐色を帯びる紫色ホオズキと呼ばれている系統を保有している。この色は既存品種にはみられない形質であることから、ホオズキの新品種開発のための遺伝資源としての活用が期待される。しかしながら、

2020年10月21日 受付。2020年12月17日 受理。
本報告の一部は園芸学会令和2年度春季大会で発表した。

* Corresponding author. E-mail: sakamoto-kenichirou@pref.saga.lg.jp

これまでに紫色ホオズキの宿存がくが紫褐色に着色する要因およびその着色の変異拡大に関する研究は行われていない。

農作物の品種改良を行う上で、突然変異育種は重要な育種手法の一つであり、特定の形質を短期間で改良することが可能である。花き類ではキクなどの栄養繁殖性作物を中心に、花色や花形などの観賞器官を主に改良する目的で、イオンビーム（阿部・平野, 2013; Miyazaki ら, 2006; 玉木ら, 2017）やガンマ線（Broertjes, 1966; Nagatomi ら, 2000; Yamaguchi ら, 2008）などの放射線を変異原とした突然変異育種が広く行われてきている。さらに、近年では新たな変異原として、高速の電子を加速し磁場をかけて進行方向を曲げることによって生じる放射線の1種であるシンクロトロン光（上坪・太田, 2005）を利用したキクの花色変異個体（Sakamoto ら, 2019）や、イチゴの果皮色変異個体（西ら, 2012）の作出が報告されており、突然変異育種におけるシンクロトロン光の有用性が示されている。ホオズキにおいては、これまでに交雑育種（高取ら, 2017, 2018; 月時ら, 2005）および倍数性育種（中村ら, 2007）による新品種開発が主に試みられてきた。一方で、突然変異育種については、‘タンバホオズキ’の乾燥種子へのガンマ線照射における放射線感受性に関する調査（Yamaguchi, 1988）が行われているものの、変異形質などの詳細については報告がない。

本研究では、紫色ホオズキを遺伝資源として活用した新品種開発のための基礎的知見を得ることを目的として、まず、その宿存がくにおける着色要因について調査を行ったうえで、シンクロトロン光を用いた紫色ホオズキの突然変異誘発について検討した。

材料および方法

1. 宿存がくの着色要因

1) 宿存がくにおける着色の調査（実験1）

供試材料は佐賀県農業試験研究センター保有の開花時から成熟前の宿存がくの一部が紫褐色を帯びるホオズキ系統07PH-1を用いた。なお、本系統は同センター保有のホオズキ遺伝資源を用いた交雑育種の過程で偶発的に出現し、選抜・維持してきたものである。また、対照として宿存がくが紫褐色を帯びない佐賀県在来系統を用いた。2019年の7月から9月にかけてセンター内において宿存がくを開花時、肥大時および成熟時に両系統から採取し、調査に用いた。なお、肥大時においては紫褐色の着色が明確な開花14日後の宿存がくを調査した。各時期の宿存がく上部の紫褐色着色部分の中央および下部の緑色部分の中央について、王立園芸協会カラーチャート（RHS. CC, The Royal Horticultural Society）を用いて測定した。また、肥大時の宿存がくにおいては、RHS. CCでの測定部位と同じ部位をハンディ型色彩計（NR-12A, 日本電色工業(株)）を用いてCIE表色系における L^* , a^* , b^* , C^* および h 値を測定した。

対照の佐賀県在来系統については、07PH-1の測定部位と同じ部位の色を測定した。さらに、各系統の最上位の完全展開葉の節位から5節下付近の茎の色をRHS. CCを用いて測定し、比較した。

2) 宿存がくの色素分析

(1) アントシアニン分析（実験2）

実験1で用いた各系統の宿存がくを分析までの間 -30°C で保存し、分析に用いた。この宿存がくを5%ギ酸メタノールに24時間常温暗黒下で浸漬して得られた粗抽出液を、カートリッジ（Sep-Pak C_{18} Plus カートリッジ, 日本ウォーターズ(株)）に於いて色素類を吸着させ、超純水で洗浄し、可溶親水性夾雑物を除去し精製した。その後、5%ギ酸メタノールで再抽出し、抽出液を孔径 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過して、HPLCを用いて分析した。HPLCシステムには、2台のポンプ（LC-20AD, 島津製作所(株)）、カラムオーブン（CTO-20AC, 島津製作所(株)）で 40°C に維持した2個のInertsil ODS-3 カラム（径 3.0 mm ×長さ 50 mm および径 3.0 mm ×長さ 250 mm , ジーエルサイエンス(株)）および検出器（SPD-M20A, 島津製作所(株)）を用いた。溶媒Aを0.1%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液、溶媒Bを0.1% TFA-20%酢酸-25%アセトニトリル水溶液（ v/v ）とした混合溶液（溶媒A:溶媒B=75:25, v/v ）を用いて、溶媒Bの濃度を40分後に85%に変化させる直線濃度勾配溶出法を適用した。混合溶液の流速は $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ に維持し、検出波長は 530 nm で行った。

(2) アントシアニン分析（実験3）

実験2で用いた07PH-1の試料に同体積の6M塩酸を混合し、 90°C で120分間加熱して完全酸加水分解を行った。得られた加水分解物を実験2と同様の方法で精製した後、5%ギ酸メタノールで色素類を溶出し、ろ過して分析試料とした。分析には実験2と同様のHPLCシステムを用いたが、カラムには、COSMOSIL 5C $_{18}$ -AR-II カラム（径 4.6 mm ×長さ 50 mm および径 4.6 mm ×長さ 250 mm , ナカライテスク(株)）を用いた。溶媒Aを1.5%リン酸水溶液、溶媒Bを1.5%リン酸-20%酢酸-25%アセトニトリル水溶液（ v/v ）とする混合溶液（溶媒A:溶媒B=50:50, v/v ）を用いた。混合溶液の流速は $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ に設定し、検出波長は 530 nm で行った。なお、アントシアニジンの標準色素には、シアニン、デルフィニン、ペチュニンおよびマルビジンの市販試薬（フナコシ(株)）を用いた。

2. シンクロトロン光照射による変異誘発

1) シンクロトロン光照射（実験4）

シンクロトロン光照射には、センター内の無加温のビニールハウス内において2018年8月から2019年3月にかけて増殖した07PH-1の地下茎を用いた。地下茎は照射前に1つの腋芽を有する長さ3~4cm程度に切り分け、調整した。調整した地下茎はプラスチック製長方形型のケースに詰め、乾燥防止のためにチャック付きポリエチレン袋に入れて、照射当日に佐賀県立九州シンクロトロン光研究

センター (SAGA-LS) に持ち込んだ。

シンクロtron光照射は2019年3月に、SAGA-LSのビームライン09 (エネルギー強度: 10~25 keV) において行った。地下茎を詰めたプラスチック製ケースの底部を両面テープでアクリル板に固定した後、照射台上に装着し、シンクロtron光を地下茎の腋芽に照射した。吸収線量は、5, 10, 20, 40 および 80 Gy とし、設定した吸収線量になるように、減衰板として用いたアルミニウム板の厚さの違いにより、試料に照射するエネルギーを調整した。また、シンクロtron光を照射しない無照射区を設け、各照射区および無照射区とも1反復当たり20本の2反復とし、各区合計40本の地下茎を供試した。

地下茎は照射翌日に、市販の育苗用土と粒径2mm程度のパーライトを1:1の割合で混ぜた混合土を充填した128穴セルトレイに植え付け、圃場への定植までの間最低温度15°Cに加温したガラスハウス内で育苗管理した。発芽した地下茎は、照射後44日目に無加温のガラスハウス内に株間15cm間隔で定植し、元肥として市販の緩効性化成肥料を $N:P_2O_5:K_2O=1:1:1\text{ kg}\cdot\text{a}^{-1}$ で施用した。なお、発芽が遅かった一部の個体は照射後63日目に定植した。開花および結実期に入った照射後98日目の生存個体を最終的な生存数とし、生存率を調査した。生存率は照射した地下茎数に対する、枯死した個体を除く、腋芽から成長が認められた地下茎数の割合として算出した。

2) シンクロtron光照射個体における変異形質の調査 (実験5)

開花後、結実に至った照射区および無照射区の個体については、2019年6月から9月にかけて開花14日後の宿根がくを各個体当たり3個 (3個未満の着生個体では1~2個) を採取し、実験1と同様の方法で宿根がくの着色および大きさ (縦径および横径) を調査した。また、紫褐色着色部分については、(宿根がくの全周が紫褐色に着色している部分の長さ)/(宿根がくの全長) $\times 100$ で定義される紫褐色着色割合 (%) の測定を行った。なお、宿根がくの紫褐色着色に関する変異率については、結実した個体数当たりの着色変異個体数の割合として算出した。着色変異個体の獲得率については、各照射区の照射数当たりの着色変異個体数の割合として算出した。さらに、開花および結実がほぼ終了した2019年10月に各照射区の生存個体について、宿根がくの着生数および草丈を調査し、無照射区の個体と比較した。

3) 宿根がくの着色変異個体におけるアントシアニン含量の測定 (実験6)

無照射区および照射区の宿根がくの着色変異が認められた個体について、実験5で調査した宿根がくを測定に用いた。これらの宿根がくは、HPLCによるアントシアニンの測定までの間-30°Cで保存した。この宿根がくを5%ギ酸メタノールに24時間常温暗黒下で浸漬して得られた粗抽出液を脱水・乾固後、5%ギ酸メタノール1mLで再抽出し

てHPLCの試料とした。測定には各個体当たり3試料 (一部の個体では採取できた1試料のみ) を用い、実験2と同様の方法で分析を行った。なお、各変異個体のアントシアニン含量は、実験2で確認された未同定の5種類のアントシアニン (An1, An2, An3, An4, An5) について、無照射区の宿根がくの新鮮重1g当たりのアントシアニン含量の値を100とした相対値として算出した。

結 果

1. 宿根がくの着色要因

1) 宿根がくおよび茎における着色調査

07PH-1および佐賀県在来系統における各時期の宿根がくと、最上位の完全展開葉の節位から5節下付近の茎の外観を第1図に、RHS. CCでの測定値を第1表に示す。07PH-1では宿根がくの上部に肉眼では紫褐色と感じられる着色がみられ、RHS. CCの色のグループでのその着色部位の色は、開花時はBrown (RHS. CC番号200A)、肥大時はGrey-Brown (RHS. CC番号N199A, N199B) に属していた。紫褐色の着色が認められなかった宿根がくの下部はいずれも黄緑色 (RHS. CC番号144A, 145B) を呈していた。一方で、佐賀県在来系統のホオズキの宿根がくの上部および下部は、いずれも開花時および肥大時とも黄緑色 (RHS. CC番号144A, 145A) を呈していた。なお、成熟時の宿根がくの色は、両系統とも朱赤色 (RHS. CC番号33B) を呈していた。また、茎においても07PH-1では肥大時の宿根がく上部と同様の色 (RHS. CC番号N199A) を呈していたのに対し、佐賀県在来系統では黄緑色 (RHS. CC番号146D) であった。色彩計での測定の結果 (第2表)、07PH-1において着色がみられた宿根がくの上部では、その下部および佐賀県在来系統よりも、 a^* 値が明らかに高く、 L^* 値および b^* 値は明らかに低い値を示した。

2) 宿根がくの色素分析

07PH-1の宿根がくのアントシアニンのHPLC分析の結果、主要アントシアニンとして未同定のAn1 (保持時間27.7分) およびAn2 (保持時間24.6分) が検出され、それに加えて少量のAn3 (保持時間27.1分)、An4 (保持時間23.9分) およびAn5 (保持時間29.2分) を含む数種類のアントシアニンが検出された (第2図)。一方で、対照の佐賀県在来系統においてはアントシアニンと考えられるピークは検出されなかった (第2図)。さらに、07PH-1の宿根がくから抽出した色素類の加水分解物のHPLC分析の結果、標準色素のペチュニジン (保持時間6.3分) およびマルビジン (保持時間10.9分) と保持時間が一致した2つのピークが検出された (第3図)。

2. シンクロtron光照射による変異誘発

1) シンクロtron光照射が生存に及ぼす影響

シンクロtron光照射後の地下茎の生存率は、5および10Gy照射区では無照射区と同程度の90%以上であったが、20Gy照射区では60%に、40Gy照射区では18%程度

第1図 ホオズキ 07PH-1 および佐賀県在来系統における宿存がくおよび生育時の茎
07PH-1 の宿存がく：開花時 (A)，開花 14 日後の肥大時 (B)，成熟時 (C)，07PH-1 の茎 (D)，佐賀県在来系統の宿存がく：開花時 (E)，開花 14 日後の肥大時 (F)，成熟時 (G)，佐賀県在来系統の茎 (H)
茎は最上位の完全展開葉の節位から 5 節下付近を調査した

第1表 ホオズキ 07PH-1 および佐賀県在来系統における宿存がくと茎の色^z

系統	宿存がく				茎 ^x
	部位	開花時	肥大時 ^y	成熟時	
07PH-1	上部	Brown 200A	Grey-Brown N199A, N199B	Orange-Red 33B	Grey-Brown N199A
	下部	Yellow-Green 144A	Yellow-Green 145B	Orange-Red 33B	
佐賀県在来系統	上部	Yellow-Green 145A	Yellow-Green 144A	Orange-Red 33B	Yellow-Green 146D
	下部	Yellow-Green 145A	Yellow-Green 145A	Orange-Red 33B	

^z RHS カラーチャートによる測定

^y 開花 14 日後

^x 最上位の完全展開葉の節位から 5 節下付近

第2表 ホオズキ 07PH-1 および佐賀県在来系統の肥大時の宿存がく^zにおける色彩計による測定値および紫褐色着色割合

系統	宿存がく 測定部位	色彩計測定値 ^y					紫褐色 着色割合 (%)
		L*	a*	b*	C*	h	
07PH-1	上部	35.86±1.04 a ^x	-2.54±1.07 a ^x	16.40±1.05 a ^x	16.75±1.15 a ^x	97.84±3.30 a ^x	32.3±1.6
	下部	67.60±0.67 b	-14.82±0.83 b	36.30±0.73 b	39.23±0.95 b	112.13±0.86 b	
	有意性 ^w	**	**	**	**	**	
佐賀県在来系統	上部	44.61±0.83 c	-17.60±0.49 bc	31.00±1.22 c	35.68±1.10 bc	119.71±1.19 cd	0
	下部	64.10±0.58 d	-19.02±0.29 c	44.98±0.42 d	48.85±0.30 d	112.94±0.49 bd	
	有意性 ^w	**	*	**	**	**	

^z 開花 14 日後

^y 平均値±標準誤差 (n=6)

^x 同列内の異なる英小文字間に Tukey の多重検定により 5%水準の有意差があることを示す

^w t検定により **は 1%，*は 5%水準で有意差があることを示す

に大きく低下し、80 Gy 照射区では生存個体は認められなかった (第4図)。なお、40 Gy 照射区の生存個体は他の照射区と比較して、茎の伸長および葉の展開する速度が半分程度と生育が緩慢であった (データ省略)。

2) シンクロトロン光照射が宿存がくの着色に及ぼす影響

第5図に示したように、宿存がくが着生した個体における宿存がくの紫褐色着色割合は、無照射区の個体では 18.5～41.7% (平均 32.5%) であったことから、その割合

第2図 ホオズキ 07PH-1 および佐賀県在来系統の宿根がくに含まれていたアントシアニン
図中の数字は保持時間

第3図 ホオズキ 07PH-1 の宿根がくに含まれていたアントシアニン

Dp : デルフィニジン, Cy : シアニジン, Pt : ペチュニジン, Mv : マルビジン
図中の数字は保持時間

が18%以下の個体は紫褐色着色部分が縮小, 42%以上の個体は拡大したと判断し, それらを着色変異個体として調査した. その結果, 各照射区における紫褐色着色割合は多くの個体で無照射区と同程度であったが(第6図A), 5, 10 および 20 Gy 照射区で 10.5~13.9%の個体で着色部分の拡大(第6図B)が認められ, 10, 20 および 40 Gy 照射区で

第4図 ホオズキ 07PH-1 の地下茎におけるシンクロトロン光照射が生存率に及ぼす影響
図中の縦棒は標準誤差 (n=2)

第5図 シンクロトロン光を照射したホオズキ 07PH-1 における着生した宿根がくの紫褐色着色割合

5.6~33.3%の個体で着色部分の縮小(第6図C~E)が認められた(第3表). なお, 着色部分が縮小した個体のうち, 20 Gy 照射区では宿根がくの一部に着色はみられたものの, 全周の着色がみられなかった2個体(第6図D), 全く着色しなかった1個体(第6図E)が認められ, これらの個体の紫褐色着色割合は0%とした.

各照射区における紫褐色着色に関する変異率(第3表)は, 5 Gy 照射区で10.8%, 10 Gy 照射区で19.4%, 20 Gy 照射区で31.6%, 40 Gy 照射区で33.3%となり, 吸収線量が高い値になるほど変異率も高くなった. また, 得られた着色変異個体のうち, 5および10 Gy照射区では, 着色部分が拡大した個体の割合が大きく, 20 および 40 Gy 照射区では着色部分が縮小した個体の割合が大きくなる傾向が認められた. さらに, 全照射個体に対する宿根がくの着色変異個体の獲得率は, 10 Gy 照射区で17.5%と最も高くなり, 次いで20 Gy 照射区の15.0%となった. なお, 照射区における宿根がくの着色部分の色は, 無照射区と比較して, 明らかな差異は認められなかった(データ省略).

宿根がくの着色変異個体におけるアントシアニン含量の測定結果を第7図に示す. 紫褐色着色部分が拡大した11個体のうち10 Gy 照射区の4個体で, 新鮮重1g当たり

第6図 ホオズキ 07PH-1 におけるシンクロtron光照射により得られた宿ながくの着色変異個体

A : 07PH-1, B : 着色部分が拡大した個体, C : 着色部分が縮小した個体, D : 一部着色した個体, E : 着色しなかった個体

第3表 ホオズキ 07PH-1 におけるシンクロtron光照射が宿ながくの着色に及ぼす影響

吸収線量 (Gy)	照射数	結実個体数 ／生存個体数	調査 個体数	宿ながくの紫褐色着色割合 (X%) ごとの個体数				着色部分変異率 (%) ^x			着色変異個体獲得率 (%) ^u		
				0	0<X≤18	18<X<42	42≤X	縮小 ^w	拡大 ^v	合計	縮小 ^w	拡大 ^v	合計
0	40	40/40	40	0	0	40	0	0	0	0	0	0	0
5	40	37/38	37	0	0	33	4	0	10.8	10.8	0	10.0	10.0
10	40	36/36	36	0	2	29	5	5.6	13.9	19.4	5.0	12.5	17.5
20	40	19/24	19	3	1	13	2	21.1	10.5	31.6	10.0	5.0	15.0
40	40	3/7	3	0	1	2	0	33.3	0	33.3	2.5	0	2.5

^z 開花 14 日後

^y (宿ながくの全周が紫褐色に着色している部分の長さ) / (宿ながくの全長) × 100 (%)

^x (着色変異個体数) / (調査個体数) × 100

^w 紫褐色着色割合が 18% 以下の個体

^v 紫褐色着色割合が 42% 以上の個体

^u (着色変異個体数) / (照射数) × 100

の An1～5 の 5 種類のアントシアニン含量が無照射区の 1.11～1.33 倍と多くなったが、他の 7 個体では 0.34～0.87 倍と無照射区より小さい値を示した。一方、紫褐色着色部分が縮小した 7 個体のうち 6 個体で、アントシアニン含量が無照射区の 0.08～0.83 倍と少なくなり、全く着色しな

かった 20 Gy 照射区の 1 個体ではアントシアニンは検出されなかった。なお、これらの着色変異個体に含まれるアントシアニンの種類は、無照射区と比較して差異は認められなかった。

第7図 ホオズキ 07PH-1 へのシンクロtron光照射により得られた宿ながくの着色変異個体における宿ながく中のアントシアニン含量の差異

図中の縦棒は標準誤差 (無照射区は n=18, s10-A01 および s20-A11 は n=1, その他は n=3)

宿ながくの新鮮重 1g 当たりに含まれる未同定の 5 種類のアントシアニンについて無照射区の値を 100 とした相対値で表示した

図中の黒丸印は宿ながくの紫褐色着色割合

3) シンクロトロン光照射が宿存がくの着生数および大きさ、草丈に及ぼす影響

無照射区および各照射区の各個体において着生した宿存がく数を第8図に示す。無照射区では11～15個着生した個体の割合が最も多かった。5, 10および20 Gy照射区でも、無照射区と同様に11～15個着生した個体の割合が最も多かったが、10個以下の個体の割合が無照射区よりも増加し、吸収線量が高くなるほど、その割合も増加した。40 Gy照射区では宿存がくが着生した3個体のうち2個体が10個以下となった。また、5および10 Gy照射区では無照射区より多い21個以上着生した個体が認められ、5, 20および40 Gy照射区では全く着生しなかった個体も認められた。

無照射区および各照射区の各個体において着生した開花14日後の宿存がくの大きさの分布を第9図に示す。無照

射区および5 Gy照射区では同程度の大きさであったが、10 Gy以上の照射区では無照射区よりも大型化および小型化した個体が認められた。

無照射区および各照射区の各個体における草丈を第10図に示す。無照射区では91.0～100.0 cmの個体の割合が最も多かった。一方、5 Gy照射区では81.0～90.0 cmの個体の割合が最も多く、10および20 Gy照射区では71.0～80.0 cmの個体の割合が最も多く、40 Gy照射区ではすべての個体が70.0 cm以下となり、吸収線量が高くなるほど草丈が短くなる個体の割合が増加した。

なお、宿存がくの着生数や大きさ、草丈について、無照射区の個体における測定値の最小値より小さい、または最大値より大きい値を示した個体を変異個体と判断し調査した結果、各照射区において34個体の変異個体が認めら

第8図 シンクロトロン光を照射したホオズキ 07PH-1における宿存がく着生数の分布

第9図 シンクロトロン光を照射したホオズキ 07PH-1における着生した宿存がくの縦径および横径の分布
開花14日後の宿存がくを調査した

第10図 シンクロトロン光を照射したホオズキ 07PH-1における草丈の分布

第4表 ホオズキ 07PH-1 におけるシンクロtron光照射による宿存がくの着生数および大きさ、草丈に関する変異

吸収線量 (Gy)	照射数	調査 個体数	各変異形質 ² を示した個体数								変異率 (%) ^y	変異個体 獲得率 (%) ^x
			A	B	B D	B D E	B E	C	D	D E		
0	40	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	40	38	1	1	0	0	0	0	1	0	7.9	7.5
10	40	36	2	0	1(1) ^w	0	0	1	5	0	25.0	22.5
20	40	24	0	0	1	1	5	1	6(4) ^w	1	62.5	37.5
40	40	7	0	0	0	1	4	0	1	1(1) ^w	100	17.5

² A: 宿存がく着生数の増加, B: 宿存がく着生数の減少, C: 宿存がくの大型化, D: 宿存がくの小型化, E: わい化

^y (変異個体数) / (調査個体数) × 100

^x (変異個体数) / (照射数) × 100

^w 括弧内は変異個体のうち宿存がくの紫褐色着色部分の縮小を併発した個体数

れ, そのうち6個体では宿存がくの紫褐色着色部分が縮小した変異を併発していた(第4表)。さらに, わい化した個体では宿存がくの着生数の減少や小型化が併発していた(第4表)。

考 察

本研究で用いたホオズキ系統は, 開花時から橙色に成熟する前まで宿存がくの一部が紫褐色を帯びていた。花卉において, 褐色の発現はアントシアニンとクロロフィルもしくはカロテノイドが含まれることにより生じることが示されている(斎藤, 1990)。Iris 属植物の花弁においては, ジャーマンアイリスの褐色系品種ではマルビジン型およびペチュニジン型のアントシアニンとカロテノイド(斎藤, 1990)が, ダッチアイリスの褐色系品種ではデルフィニジン型のアントシアニンとカロテノイド(Mizuno ら, 2015)が花色発現に関与していることが報告されている。さらに, ホオズキと同じナス科植物においては, 未熟果の果皮が紫〜黒に近い色を呈するトウガラシではデルフィニジン型のアントシアニン, クロロフィルおよびカロテノイドが含まれ(Lightbourn ら, 2008), 果皮が紫色を帯びるトマトではペチュニジン型, マルビジン型およびデルフィニジン型のアントシアニンとカロテノイドが含まれている(Jones ら, 2003)ことが報告されている。本研究で用いたホオズキ系統 07PH-1 における宿存がくの上部の紫褐色着色部位には, ペチュニジン型およびマルビジン型のアントシアニンが含まれていた。また, 予備実験における宿存がくの色素抽出液の吸光度測定から, アントシアニン以外にクロロフィルも含まれていることが推察された(データ省略)ことから, この宿存がく上部での紫褐色発現は, デルフィニジン系色素であるペチュニジン型およびマルビジン型のアントシアニンと, それに加えてクロロフィルが含まれることによるものと示唆される。なお, ホオズキの宿存がくからペチュニジン型およびマルビジン型のアントシアニンが主要アントシアニンとして検出されたのは, 本報告が初めてである。

これまでにガンマ線やX線などの放射線照射による突然変異育種では, 生存率が半減する線量(LD₅₀)が照射の目安として用いられてきた(阿部・平野, 2013; 西尾, 2000; 田中, 2003)。しかしながら, 生存率が低下する高線量においては特定の形質以外にも障害が出現しやすい。イオンビームを照射したシロイヌナズナ種子では, 生存率の低下が急激に始まる前の線量の半分程度の線量で, ほとんどの個体が不稔となったと報告されている(Shikazono ら, 2002)。このことから, 田中(2003)はイオンビーム照射における実際の育種場面での変異誘発に効果的な線量(適正線量)について, 生存率を指標とする場合には, 遺伝的背景の大きな変化を回避するためにLD₅₀となる高線量よりも低い, すなわち生存率の低下が急激に始まる前の線量, もしくはその線量の半分でも変異誘発には十分であるとしている。また, イネ種子におけるイオンビームおよびガンマ線照射でも, 両線種とも生存率の低下が急激に始まる前の, 生存率が90%程度となる線量で照射された種子当たりの変異個体数が最も高くなり, 効率よく変異個体を獲得できることが報告されている(Yamaguchi ら, 2009)。本研究におけるホオズキへの照射では, 吸収線量が高くなるほど生存率は低下し, 20~40 Gyの間にLD₅₀となる線量が存在すると推察された。一方で, 線量が高くなるほど宿存がくの着色変異率は高くなったが, 20 Gy以上の照射区では生存率が大きく低下したため, 照射した地下茎当たりの変異個体数は10 Gy照射区で最も高い値を示した。キクの挿し穂にシンクロtron光を照射した場合においても, LD₅₀となる線量よりも低い, 生存率が急激に低下する前の11および23 Gyの吸収線量で, 花色変異率が高くなり, 出現した花色変異の幅も広がった(Sakamoto ら, 2019)。従って, イオンビームやガンマ線の場合と同様に, シンクロtron光においてもLD₅₀となる線量より低い, 生存率が急激に低下する前の線量でも変異個体を効率的に獲得できることが示唆された。また, ホオズキでは生存率が90%程度となった10 Gy程度の吸収線量でも宿存がくの着色をはじめ, 宿存がく着生数の増加や宿存がくの小型化などの変異誘発に

有効であると考えられた。

イオンビームやガンマ線、X線などの放射線の照射による突然変異の誘発は、DNAの塩基置換や欠失により遺伝子が損傷することで生じるものである(平野ら, 2017; 西尾, 2000; Tanaka ら, 2010)。本研究においては、照射により宿存がくの紫褐色着色部分が拡大または縮小する変異が認められ、これらの変異個体では無照射区と比較して宿存がくのアントシアニン含量に差異が認められた。福田(2011)はアントシアニン系色素による有色部と白色部からなる覆輪花色の発現について、アントシアニン系色素合成の代謝抑制機構と、色素合成抑制が発現する花弁上の位置を決定する機構によりなり立つ形質であると報告している。以上のような覆輪花色の発現と同様の機構が、本研究で用いたホオズキの宿存がくの着色においても生じているとすると、アントシアニン系色素を発現する宿存がく上の部位を決定する遺伝子と、アントシアニン系色素の生合成経路における遺伝子が照射により損傷したことで、紫褐色着色部分における変異が生じた可能性が推察された。なお、着色部分が拡大した変異個体のうち、着色部分の色は無照射区と比較して、大きな差異は認められなかった。一方で、アントシアニンによる着色部分が拡大したにも関わらず、アントシアニン含量の相対値が無照射区よりも減少した個体が認められた。アントシアニン含量が多い黒色果皮のブドウ品種では、アントシアニン含量が低下しても、ある一定量を含んでいれば着色には差が生じなかったことが報告されている(内藤, 1964; 宇土ら, 2015)。本研究において認められたこれらの変異個体については、生成されるアントシアニン含量が低下しても着色には、ほとんど影響しなかったものと考えられた。

本研究で用いたホオズキ系統は、既存品種には認められない成熟前の宿存がくの上部から3割程度の部分が紫褐色に着色する形質が大きな特徴である。花色は花きにおいて最も重要な形質で、花色育種では配色、模様などを含めてこれまでにない色の花を生み出すことが目標である(高村, 2012)。従って、その宿存がくの紫褐色着色部分を拡大できれば、さらに観賞価値が増し、花きの新品種に求められる新規性の付与に寄与することができると考えられた。そこで、シンクロtron光を照射した結果、宿存がくの紫褐色着色部分が5割以上に拡大した個体も認められた。これらは園芸的に有用な変異と思われることから、今後の新品種開発への活用が期待される。

放射線を利用した突然変異誘発では、わい化は出現しやすい形質である(西尾, 2000; van Harten, 1998)。また、イオンビームを照射した場合では、バラにおいて花弁数の減少や花の小型化(Yamaguchi ら, 2003)、ホトギスでは葉や花の小型化、花数の増加および減少(Nakano ら, 2010)のような各器官の数や大きさに変異が認められている。本研究においても、照射区の一部の個体では、わい化や宿存がく着生数の増加や減少、宿存がく大型化や小型化が認

められた。さらに、わい化した個体では宿存がくの着生数の減少や小型化が併発する傾向が認められた。シンクロtron光を照射したイネ(吉田ら, 2011)やカンキツ(松尾ら, 2012)においても、わい化が確認されており、本研究で認められた変異もシンクロtron光照射の影響で生じたものと示唆された。一般的に鉢物生産ではコンパクトな草姿が求められることから、草姿改善を目的にわい化剤が利用されている(今西, 2000)。また、佐賀県内でのホオズキの鉢物生産においても出荷前の生育期間中に、わい化剤処理が通常行われている(坂本, 私信)。従って、わい性品種を育成できれば、その作業を省力化でき、栽培管理面の効率化にもつながることが期待される。また、ホオズキの流通時においては、宿存がくが連続的に数多く着生したものが高品質と評価され有利に取引されている(高取ら, 2018)。さらに、ホオズキの宿存がくは料理などに季節感や彩りを添える“つまもの”としても利用され、小型の宿存がくが好まれている(高取ら, 2018)。従って、本研究で認められたわい化や宿存がく着生数の増加、および宿存がくの小型化も、ホオズキの育種においては有用な変異であると思われる。

本研究の結果、紫色ホオズキにおける宿存がくの着色は、ペチュニジン型およびマルビジン型のアントシアニンによるものであることが明らかとなった。また、シンクロtron光照射により宿存がくの紫褐色着色部分の拡大をはじめ、わい化や宿存がく着生数の増加、宿存がくの小型化など、園芸的に有用な変異形質が認められた。以上のことから、突然変異育種はホオズキの変異拡大に有効な手段であることが明らかとなったとともに、シンクロtron光は有用な変異原の一つであると考えられた。今後、本研究で得られた知見を活用した新品種開発が期待される。

摘 要

成熟前の宿存がくの一部が紫褐色を帯びるホオズキ系統について、宿存がくの着色要因を調査するとともに、シンクロtron光を地下茎に照射し、宿存がくの紫褐色着色部分をはじめ各器官における変異個体の誘発を検討した。宿存がくの色素分析の結果、宿存がくの紫褐色部位の着色にはペチュニジン型およびマルビジン型のアントシアニンが関与していることが明らかとなった。また、シンクロtron光照射による変異誘発により宿存がくの紫褐色着色部分が拡大または縮小した変異個体が認められ、照射処理した地下茎当たりの着色変異個体数は10 Gy照射区において高い値を示した。さらに、わい化や宿存がく着生数の増加、および宿存がくの小型化のような園芸的に有用な変異も認められた。以上のことから、シンクロtron光照射による変異誘発は、ホオズキにおいて有効な育種方法であると示唆された。

引用文献

- 阿部知子・平野智也. 2013. 突然変異（イオンビーム）育種. p.124 の2-12. 農業技術大系花卉編. 第5巻. 育種／苗生産／バイオテク活用. 農文協. 東京.
- Broertjes, C. 1966. Mutation breeding of chrysanthemums. *Euphytica* 15: 156–162.
- 福井博一. 2016. 切り花生産と消費の歴史. p.11–35. 今西英雄・福井博一・内藤重之・柴田道夫・土井元章・宇田 明・田中孝幸・西川照子著. 日本の花卉園芸光と影：歴史・文化・産業. ミネルヴァ書房. 京都.
- 福田直子. 2011. トルコギキョウの基部着色型覆輪花色の温度反応と基部着色型覆輪に由来する純白品種の発見. 花き研報. 11: 1–8.
- 平野智也・市田裕之・阿部知子. 2017. 重イオンビームで広がる花きの新品種作出. 化学と生物. 55: 775–782.
- 今西英雄. 2000. 花卉の発育とその制御 植物生長調節物質による開花の制御. p.180–191. 花卉園芸学. 川島書店. 東京.
- Jones, C. M., P. Mes and J. R. Myers. 2003. Characterization and inheritance of the *Anthocyanin fruit (Aft)* tomato. *J. Hered.* 94: 449–456.
- 上坪宏道・太田俊明. 2005. 放射光と物質研究. p.1–4. シンクロトロン放射光. 岩波書店. 東京.
- Lightbourn, G. J., R. J. Griesbach, J. A. Novotny, B. A. Clevidence, D. D. Rao and J. R. Stommel. 2008. Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. *J. Hered.* 99: 105–111.
- 松尾洋一・長谷純宏・野澤 樹・石地耕太郎・竹下大樹. 2012. カンキツ類へのイオンビーム及びシンクロトロン光照射による突然変異誘発. 第8回イオンビーム育種研究会大会講演要旨集. p.19–20.
- Miyazaki, K., K. Suzuki, K. Iwaki, T. Kusumi, T. Abe, S. Yoshida and H. Fukui. 2006. Flower pigment mutations induced by heavy ion beam irradiation in an interspecific hybrid of *Torenia*. *Plant Biotechnol.* 23: 163–167.
- Mizuno, T., A. Uehara, D. Mizuta, T. Yabuya and T. Iwashina. 2015. Contribution of anthocyanin-flavone copigmentation to grayed violet flower color of Dutch iris cultivar ‘Tiger’s Eye’ under the presence of carotenoids. *Sci. Hortic.* 186: 201–206.
- 村井千里. 1994. ホオズキ. p.649–651. 農業技術大系花卉編. 第9巻. 宿根草. 農文協. 東京.
- Nagatomi, S., E. Miyahira and K. Degi. 2000. Induction of flower mutation comparing with chronic and acute gamma irradiation using tissue culture techniques in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *Acta Hortic.* 508: 69–74.
- 内藤隆次. 1964. ブドウ果実の着色に関する研究（第5報）黒色種および赤色種の果色ならびに色素含量に及ぼす光度の影響. 園学雑. 33: 213–220.
- 中村典義・松尾洋一・大藪榮興. 2007. ホオズキの四倍体の作出とその特性. 園学研. 6: 341–345.
- Nakano, M., J. Amano, Y. Watanabe, T. Nomizu, M. Suzuki, K. Mizunashi, S. Mori, S. Kuwayama, D. S. Han, H. Saito, H. Ryuto, N. Fukunishi and T. Abe. 2010. Morphological variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from heavy ion beam-irradiated embryogenic calluses. *Plant Biotechnol.* 27: 155–160.
- 西 美友紀・石地耕太郎・木下剛仁・中島寿亀・伊東寛史・岡 和彦. 2012. シンクロトロン光照射によるイチゴ‘さがほのか’の突然変異体作出. 園学研. 11（別1）: 114.
- 西尾 剛. 2000. 遺伝変異の拡大 突然変異による育種. p.101–116. 日向康吉・佐野芳雄・吉村 淳・武田和義・亀谷寿昭・西尾 剛・内宮博文・笹原健夫・原田久也・池橋 宏共著. 植物育種学第3版. 文永堂出版. 東京.
- 斎藤規夫. 1990. 緑色, 黒色および褐色の花での色素. p.49–56. 農耕と園芸編集部編著. バイオホルティ5. 誠文堂新光社. 東京.
- Sakamoto, K., M. Nishi, K. Ishiji, Y. Takatori and R. Chiwata. 2019. Induction of flower-colour mutation by synchrotron-light irradiation in spray chrysanthemum. *Acta Hortic.* 1237: 73–78.
- Shikazono, N., A. Tanaka, S. Kitayama, H. Watanabe and S. Tano. 2002. LET dependence of lethality in *Arabidopsis thaliana* irradiated by heavy ions. *Radiat. Environ. Biophys.* 41: 159–162.
- 高村武二郎. 2012. 香りと新花色の魅力で消費者をひきつける 育種目標—花色. p.139–145. 農文協編. 最新農業技術 花卉. 4. 農文協. 東京.
- 高取由佳・大藪榮興・千綿龍志・宮崎雄太・松尾洋一・坂本健一郎・松村 司. 2018. 切り枝用ホオズキ品種‘佐賀H5号’および実とり用ホオズキ品種‘佐賀H6号’の育成. 佐賀農セ研報. 39: 17–27.
- 高取由佳・大藪榮興・松村 司・松尾洋一・中村典義・川崎孝和・千綿龍志. 2017. 鉢物用ホオズキ品種‘佐賀H1号’および‘佐賀H2号’の育成. 佐賀農セ研報. 38: 1–17.
- 玉木克知・山中正仁・林 依子・阿部知子・小山佳彦. 2017. キクの品種特性が炭素イオンビーム照射による花色突然変異体の出現に及ぼす影響. 園学研. 16: 117–123.
- 田中 淳. 2003. イオンビーム照射技術の開発と誘発突然変異の特徴. p.5–8. 鹿園直哉・長谷純宏・坂本綾子・大野 豊・田中 淳編著. 第1回イオンビーム生物応用ワークショップ論文集. 日本原子力研究所. 茨城.

- 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.
- 月時和隆・林 三徳・柴戸靖志. 2005. ホオズキ新品種‘姫提灯’の育成. 福岡農総試研報. 24: 130–133.
- 宇土幸伸・里吉友貴・小林和司・齋藤典義・三森真里子. 2015. 糖蓄積がブドウの着色に及ぼす影響. 山梨果試研報. 14: 11–19.
- van Harten, A. M. 1998. Mutation breeding in vegetatively propagated crops. p. 252–302. *Mutation breeding: Theory and practical applications*. Cambridge University Press, UK.
- Yamaguchi, H., Y. Hase, A. Tanaka, N. Shikazono, K. Degi, A. Shimizu and T. Morishita. 2009. Mutagenic effects of ion beam irradiation on rice. *Breed. Sci.* 59: 169–177.
- Yamaguchi, H., S. Nagatomi, T. Morishita, K. Degi, A. Tanaka, N. Shikazono and Y. Hase. 2003. Mutation induced with ion beam irradiation in rose. *Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. B* 206: 561–564.
- 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, T. 1988. Mutation breeding of ornamental plants. *Bulletin of the Institute of Radiation Breeding* 7: 49–67.
- 吉田桂一郎・西 美友紀・石地耕太郎・松本和大・広田雄二. 2011. シンクロトロン光を用いた水稲における突然変異育種法の検討. 第74回九州農業研究発表会専門部会発表要旨集. p. 8.