イチゴカルスへのガンマ線照射が茎葉再分化と再生個体のそう果形成 および形態変異に及ぼす影響

霞 正一

茨城県農業総合センター生物工学研究所 319-0292 茨城県西茨城郡岩間町安居

The Effects of Gamma-ray Irradiation to Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Calli on Shoot Regeneration, Achene Formation and Morphological Variations of Regenerants

Masakazu Kasumi

Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, Ago Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki 319-0292

Summary

Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* 'Nyoho') calli, derived from anthers, were irradiated with gamma-ray at dosages from 100 to 1,600 Gy ($10 \text{ Gy} \cdot \text{hr}^{-1}$) and their effects on callus growth, plant regeneration, and somaclonal variation were analyzed. The growth of callus and percentage of plant regeneration from the callus were reduced slightly at dosages less than 200 Gy, moderately at 400 Gy, and markedly above 800 Gy. Fruit growth associated with seed fertility (>50 %) was morphologically normal at less than 100 Gy, whereas achene formation was significantly inhibited above 200 Gy. The percentages of morphological variation in regenerants formed from the irradiated callus were : 13.7 (no irradiation), 18.6 (100 Gy), 66.0 (200 Gy), 75.7 (400 Gy), and 97.0 (800 Gy). Furthermore, higher dosages yielded wider variations, e.g., thick and small leaf, light leaf color, white flesh, and long fruit. In some regenerants, more than one morphological aberrations developed, some of which were transmissible to daughter plants. These results revealed that the irradiating strawberry callus with gamma-ray resulted in a higher degree and wider spectrum of somaclonal variation than did simple callus culture.

Key Words: anther callus, gamma-ray irradiation, regeneration, somaclonal variation, strawberry.

緒 言

植物の育種操作は、一般に遺伝的変異の拡大、目的形質を有する系統の選抜、形質の固定というステップに分けることができる。そして、育種を効果的に進めるためには、各ステップの効率化が必要となる。このうち遺伝的変異の拡大に関して、従来は交配による方法が主に用いられてきた。一方、細胞・組織培養により得られた再生個体にソマクローナル変異の生じることが多くの植物種で明らかになり (Larkin・Scowcroft, 1981), ソマクローナル変異を用いた既存品種の改良が試みられるようになった。

イチゴの組織培養では、茎頂 (森ら, 1969), やく (西ら, 1974), 葉柄 (Lee・Kim, 1979), 葉身 (Jones ら, 1988), 未熟胚 (Wang ら, 1979) などから植物体が再生されている。イチゴのやく培養からの再生個体には、半数

体が認められず、それらはすべてやく壁体細胞由来であることが示されている (大澤ら, 1974)。江面・雨ヶ谷 (1990) はイチゴやく由来カルスからの再生個体に高頻度でソマクローナル変異が生じ、その中には早生などの優良形質が含まれることを報告した。イチゴに同様のソマクローナル変異の生じることは、他にも数多く報告されている (森下・山川, 1990; Nehra ら, 1992, 1994; Niemirowicz-Szczytt, 1990; Sansavini ら, 1990; Swartz ら 1981; Takahashi ら, 1992; Toyoda ら, 1991)。

ソマクローナル変異を育種に利用するには、変異の幅をできるだけ拡大する必要がある。ソマクローナル変異を拡大する方法として、組織培養と放射線照射との併用がある。著者らはグラジオラスにおいて、組織培養と放射線照射を組み合わせることにより、再生個体の変異が組織培養だけを用いた場合よりも質的・量的に拡大することを報告した (霞ら, 2001)。同様の結果はイネ (木下ら, 1989; 中村・蓬原, 1991; 丹野ら, 1993), サトウキビ (永富, 1988), トウガラシ (Sripichitt ら, 1988),

キク(永富ら, 1989, 1990), ハクサイ(江面ら, 1990)で報告されている。しかし, これまでイチゴでは, 組織培養と放射線を組み合わせた場合の再生個体の変異に関しては, 照射対象に植物体および茎頂を用いた Ivanicka ら(1988)の報告があるのみで, 照射対象にカルスを用いた場合の照射線量と変異の関係, 変異個体の当代および栄養繁殖後代における特性発現については明らかにされていない。

そこで, 著者はイチゴやく由来カルスへのガンマ線照射がカルスの増殖, 茎葉再分化および再生個体のそう果形成や形態変異に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

実験 1. ガンマ線照射がカルス増殖および茎葉再分化に及ぼす影響

イチゴ‘女峰’を用い, カルス誘導は大澤ら(1974)の方法に準じて行った。2 mg・liter⁻¹ 1-ナフタレン酢酸(NAA), 2 mg・liter⁻¹ 6-ベンジルアミノプリン(BAP), 3% ショ糖, 10 g・liter⁻¹ 寒天を添加した LS 培地(Linsmaier・Skoog, 1965)を, pH 5.8 に調製し, 24 × 90 mm φ の試験管に 5 ml ずつ分注した。アルミ箔でふたをして, オートクレーブ(120 °C, 1.2 kg・cm⁻²)後, 斜面培地とした。直径 4~6 mm のつぼみを植物体から採取し, 70% エタノールで 1 分間消毒した後, 少量の界面活性剤を添加した有効塩素 0.5% の次亜塩素酸ナトリウム液で 20 分間表面殺菌した。さらに, 滅菌水で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。このつぼみから無菌的にやくを取り出し, カルス誘導培地に置床した。やく置床 30 日後に誘導されたカルスに, 農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場のガンマルーム(⁶⁰Co, 33.5 TBq)で線量率 10 Gy・hr⁻¹ のガンマ線を総線量 0, 100, 200, 400, 800 および 1,600 Gy となるように照射した。カルスからの再分化も大澤ら(1974)の方法に準じ, カルス誘導培地の組成から NAA を除いた再分化培地に, ガンマ線照射後, 直ちにカルスを

置床した。培養条件はカルス誘導, 茎葉再分化ともに 25 °C, 白色蛍光灯(ネオライン白色 FL40S・W, 東芝ライテック社製)で 50 μmol・m⁻²・sec⁻¹, 16 時間日長とした。茎葉再分化培地置床 60 日後にカルスの大きさと茎葉再分化率を, また 90 日後に茎葉再分化率を調査した。

実験 2. ガンマ線照射したカルスより再生した個体のそう果形成と形態的変異

植物生長調節物質を添加していない MS 培地(100 ml コニカル)に, 実験 1 で得られた再分化個体を継代培養し発根を促した。根が数本になった個体をバーミキュライトをつめた 60 mm φ のポリポットに移植した。移植後数日間は高湿に保ち, その後 1 週間程度で徐々に湿度を下げて順化した。順化個体は, 最高気温 30 °C, 最低気温 5 °C に保ったビニールハウス内に, うね幅 45 cm, 株間 15 cm で 1990 年 9 月 24 日に定植し, 促成栽培した。そう果形成と形態変異を定植後 40 日目から 1 週間ごとに 4 ヶ月にわたり調査した。そう果形成については, 3 花以上開花した個体内, 果実の形状が正常でかつ 50% 以上のそう果が正常な形態である個体を正常そう果個体とした。形態変異は, 江面・雨ヶ谷(1990)および森下・山川(1990)に準じて調査した。

結 果

実験 1. ガンマ線照射がカルス増殖および茎葉再分化に及ぼす影響

ガンマ線照射区のカルスの増殖は, 200 Gy 区まではほとんど抑制されなかったものの, 400 Gy 区でやや抑制がみられ, 800 Gy および 1,600 Gy と線量が増加するに従って, 著しく抑制された。茎葉再分化カルス率は, 400 Gy 区までほとんど低下しなかった。しかし, 800 Gy 区で 27.7% に, 1,600 Gy 区では 2.6% にまで著しく低下した。800 Gy 区および 1,600 Gy 区では再分化個体の半数以上が照射後 60~90 日に発生しており, 再分化率の低下とともに茎葉再分化時期の遅延が認められた(第 1 表)。

Table 1. Effects of gamma-ray irradiation to calli on its growth and shoot formation in strawberry ‘Nyoho’.

Exposure dosage (Gy)	No. of calli explants tested ²	No. (%) of calli		No. (%) of shoot forming calli	
		≤ 10 mm ^y	10mm<	60 days	90 days
0	160	12 (7.5)	148 (92.5)	60 (37.5)	72 (45.0)
100	187	12 (6.4)	175 (93.6)	72 (38.5)	84 (44.9)
200	180	18 (10.0)	162 (90.0)	87 (48.3)	96 (53.3)
400	181	47 (26.0)	134 (74.0)	63 (34.8)	69 (38.1)
800	173	93 (53.8)	80 (46.2)	24 (13.9)	48 (27.7)
1600	151	151 (100.0)	0	0	4 (2.6)

² Materials: Gamma-ray irradiated calli at the dose rate of 10 Gy・hr⁻¹.

Medium: LS medium supplemented with 2 mg・liter⁻¹ BAP.

Investigation: calli; 60 days after cultivation, shoot; 60 and 90 days.

^y Relative size of calli.

Fig. 1. Various mutants induced from gamma-ray irradiated calli in strawberry 'Nyoho'.

A: Aberrant growth of fruits with sterile seeds(arrows) at 400 Gy.

B: Thick leaves at 200 Gy. C: Epinastic leaves(arrows) at 200 Gy.

D: White color of flesh at 100 Gy (right) compared to normal color (left).

Table 2. Effects of gamma-ray irradiation to calli on achene formation of regenerants in strawberry 'Nyoho'.

Exposure dosage (Gy)	No. of test plants	No. (%) of plants with normal achenes ^z
0	128	125 (97.7)
100	95	92 (96.8)
200	72	11 (15.3)
400	53	10 (18.9)
800	39	0 (0)

^z Plants with morphologically normal fruits and achenes (50%<normality).

実験 2. カルスへのガンマ線照射が再生個体のそう果形成および形態的変異に及ぼす影響

再生個体のそう果形成については、100 Gy区では正常そう果個体率が96.8%以上であり、無照射区に対しほとんど差が認められなかった。しかし、200 Gy区では15.3%、400 Gy区では18.9%と著しく低下し、さらに800 Gy区では正常そう果個体がまったく認められなかった(第1図A, 第2表)。

変異個体率は、無照射区で13.7%であったのに対し、100 Gy区では18.6%、200 Gy区では66.0%、400 Gy区では75.7%、800 Gy区では97.0%となり、照射線量が増加するに従い著しく高くなった。同様に、無照射区では7種類の変異形質が観察されたのに対し、200 Gy区では10種類が観察された(第1図B, C, D, 第3表)。ガンマ線照射によって、葉では、厚葉、小葉、淡葉、また果実では白色果肉の形態的変異が増加した。また、照射区および無照射区とも1個体で複数の形態変異を現すものが認められたが、その頻度は400 Gy区以上で高くなった(第3表)。

考 察

イチゴ‘女峰’のやく由来カルスからの再生個体に、形態的変異が15%(森下・山川, 1990)および26%(江面・雨ヶ谷, 1990)生じたことが報告されている。本研究においても、同様の手法でイチゴ‘女峰’のやく由来カルスからの再生個体134個を直接定植し、促成栽培により調査した結果、13.7%の個体に形態的変異を認めた。この結果は森下・山川(1990)、江面・雨ヶ谷(1990)の結果とは

Table 3. Effects of gamma-ray irradiation to calli on morphological variation of regenerants derived from strawberry 'Nyoho'.

Exposure dosage (Gy)	No. of regenerated plants	No. (%) of variants ^z	Frequency (%) of each morphological variation											
			Over-tillering	thick leaves	Small leaves	Epinnastic leaves	Hyponastic leaves	Mosaic leaves	Light color of leaves	White color of flesh	Spherical fruits	Oblong fruits	Deep of seed position	Shallow of seed position
0	131	18 (13.7)	0	3.8	3.8	0	0	0	0	1.5	0.8	3.8	2.3	0.8
100	102	19 (18.6)	0	3.9	6.9	0	0	0	1.0	3.9	0	2.9	0	0
200	100	66 (66.0)	3.0	24.0	23.0	1.0	2.0	0	6.0	2.0	2.0	2.0	0	3.0
400	103	78 (75.7)	20.4	19.4	37.9	1.0	4.9	0	12.6	2.9	1.0	1.0	0	0
800	100	97 (97.0)	11.0	31.0	35.0	7.0	3.0	1.0	23.0	- ^y	-	-	-	-

^z Some of the variants had more than one morphological variation.^y Not recorded, due to abortion of most fruits.

ば一致した。

ソマクローナル変異をさらに拡大する手法として、培養と放射線照射との組み合わせが考えられる。この場合、大きく分けて2つの方法が考えられる。一つは培養前の植物体への照射であり、もう一つは培養によって誘導されたカルスへの照射である。本研究では、他の植物種においても報告数が少なく、イチゴでは全く検討されていない後者の方法について検討した。

ガンマ線照射がカルスの増殖および再分化を抑制することは、ペチュニア(三輪・服部, 1987; 長谷川・服部, 1992), イネ(木下ら, 1989; 谷口・永富, 1989; 中村・蓬原, 1991)で認められている。本研究においても、カルスの増殖は400 Gy以上の照射で抑制された。また、茎葉再分化率については、イネ(中村・蓬原 1991), ペチュニア(三輪・服部, 1987; 長谷川・服部, 1992)では照射線量が200 Gy以下で抑制が認められたのに対し、本研究のイチゴでは照射線量が200 Gyから400 Gyの間で抑制が認められた。このことから、イチゴのカルスはこれらの作物と比べて放射線感受性が低いと考えられる。また、Ivanickaら(1988)は培養中のイチゴ茎頂分裂組織へのガンマ線照射におけるLD₅₀が200 Gyであると報告している。本研究とIvanickaら(1988)では用いた品種、外植体、培養条件、ガンマ線照射方法などが異なるため、単純には比較できないが、ほぼ同様の結果と考えられる。

各種の植物において培養と放射線照射の組合せが形態変異に及ぼす影響が検討されている。サトウキビ(永富, 1988), ハクサイ(江面ら, 1990), トウガラシ(Sripichittら, 1988), キク(永富ら, 1989, 1990), グラジオラス(霞ら, 2001)では、培養と放射線照射の併用によって、形態変異が質的・量的に拡大した。本研究においてもイチゴカルスへのガンマ線照射により得られた再生個体では、培養単独よりも形態変異が質的・量的に拡大した。特に、カルスへ200 Gy以上の高線量を照射した場合にこの傾向が顕著であった。しかし、カルスへの照射線量が200 Gy以上では不稔個体が著しく増加した。このため、育種を目的としたイチゴカルスへの照射線量としては、線量率

10 Gy・hr⁻¹の場合に100 Gyから200 Gyの間が適当であると推定された。なお、観察の結果、100 Gy区のそう果形成は、厚葉変異個体で一部少ない傾向にあったが、他の形態変異個体は正常であった。

誘導された形態変異のうち、厚葉、淡葉、上湾曲葉、果肉白色、果実長形を呈した個体からランナーによる栄養繁殖を行ったところ、増殖個体も同様の形態を示したことから、これらの形質は生理的な変異ではなく、遺伝的な変異である可能性が高いと考えられる。

このように、本研究ではカルスに高線量のガンマ線を照射することにより多くの形態変異が認められたが、果肉の糖分等の成分等に関する変異については今後の検討課題である。

摘 要

イチゴ‘女峰’のやく由来カルスにガンマ線(⁶⁰Co)を10 Gy・hr⁻¹で0~1,600 Gy照射した場合の、カルスの増殖、再分化および再生個体のそう果形成および形態変異に及ぼす影響を検討した。カルスの増殖、再分化は400 Gyでやや抑制され、800 Gy以上では著しく低下した。再生個体のそう果形成は100 Gyまでは正常であったが、200 Gy以上では著しく低下した。変異個体率は培養単独で13.7%に対し、100 Gyで18.6%, 200 Gyで66.0%, 400 Gyで75.7%, 800 Gyで97.0%となり、照射線量が増加するに従い高くなった。さらに、変異形質の種類も増える傾向にあった。発生した変異は葉では厚葉、小葉、淡葉、果実では果肉白色、果実長形が多く認められた。また、1個体で複数の変異を示すこともあった。いくつかの変異形質はランナーによる栄養繁殖後にも保持されたことから、これらは遺伝的な変異の可能性が高い。ガンマ線照射により、カルスからの再生個体の変異が質的・量的に拡大することが明らかとなった。

引用文献

江面 浩・雨ヶ谷 洋. 1990. イチゴの葯カルス由来再分化植物体の変異. 茨城園試研報. 15: 31-38.

- 江面 浩・雨ヶ谷 洋・飯田修一. 1990. ハクサイ培養前種子へのガンマー線照射の再分化個体に対する影響. 育雑. 40(別 1): 32-33.
- 長谷川 徹・服部一三. 1992. ペチュニアの放射線感受性について. 育雑. 42(別 1): 564-565.
- Ivanicka, J., I. Caganova and S. Sojak. 1988. Inconventional breeding techniques for fruit crop improvement. Acta Hort. 224: 429-435.
- Jones, O. P., B. J. Walker and M. G. Beech. 1988. The production of strawberry from callus, cultures. Plant Cell Tissue Org. Cult. 12: 235-241.
- 霞 正一・高津康正・眞部 徹・林 幹夫. 2001. グラジオラス木子へのガンマ線照射がカルス形成, 不定胚形成および再生個体の花色変異に及ぼす影響. 園学雑. 70: 126-128.
- 木下俊郎・森 宏一・相川宗蔵・丹野 久. 1989. イネの葯培養とガンマー線照射による突然変異誘発. 育雑. 39(別 2): 386-387.
- Larkin, P. J. and W. R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
- Lee, Y. B. and Y. R. Kim. 1979. Shoot formation in tissue culture of petiole and leaf blade segments of strawberry. Studies from the Institute of Horticulture, Kyoto University 9: 78-82.
- Linsmaier, E. M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 18: 100-127.
- 三輪直之・服部一三. 1987. ペチュニアの放射線感受性について. 育雑. 37(別 2): 330-331.
- 森 寛一・浜屋悦次・下村 徹・池上雍春. 1969. 組織培養によるウイルス病植物の無毒化. 農事試報. 13: 45-110.
- 森下昌三・山川 理. 1990. イチゴの葯培養における再分化個体の変異. 園学雑. 59(別 1): 420-421.
- 中村和宏・蓬原雄三. 1991. イネの葯培養による再分化に対する放射線の影響. 育雑. 41(別 2): 274-275.
- 永富成紀. 1988. サトウキビのカルス培養再分化個体群に現れた放射線照射の効果. 育雑. 38(別 1): 214-215.
- 永富成紀・出花幸之介・宮平永憲・坂本守章・谷口真美子. 1989. キクの放射線突然変異セクターの花器培養による拡大. 育雑. 39(別 1): 376-377.
- 永富成紀・宮原研三・三井晃一. 1990. キクの照射および培養による花色突然変異のスペクトラム拡大. 育雑. 40(別 1): 388-389.
- Nehra, N. S., K. K. Kartha, C. Stushnoff and K. L. Giles. 1992. The influence of hormone concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 29: 257-298.
- Nehra, N. S., K. K. Kartha, C. Stushnoff and K. L. Giles. 1994. Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. Euphytica 76: 107-115.
- Niemirowicz-Szczytt, K. 1990. Somaclonal variation in strawberry. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry 11. Somaclonal Variation in Crop Improvement I. p. 511-528. Springer-Verlag, Berlin.
- 西 貞夫・大澤勝次・豊田 努. 1974. やく培養の利用に関する研究. I. 数種野菜やくからのカルス形成と植物体の誘導. 野菜試験場報告 A. 1: 1-40.
- 大澤勝次・戸田幹彦・西 貞夫. 1974. やく培養の利用に関する研究. II. イチゴやく培養によるウイルスフリー株の大量育成. 野菜試験場報告 A. 1: 41-57.
- Sansavini, S., P. Rosati, D. Gaggioli and M. F. Toschi. 1990. Inheritance and stability of somaclonal variations in micropropagated strawberry. Acta Hort. 280: 375-384.
- Sripichitt, P., E. Nawata and S. Shigenaga. 1988. Radiation-induced mutation by using *in vitro* adventitious bud technique in red pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Yatsufusa) - analysis of the variant appeared in M₁ generation. Japan. J. Breed. 38: 141-150.
- Swartz, H. J., G. J. Galletta and R. H. Zimmerman. 1981. Field performance and phenotypic stability of tissue culture-propagated strawberries. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106: 667-673.
- Takahashi, H., T. Takai and T. Matsumoto. 1992. Resistant plants to *Alternaria alternata* strawberry pathotype selected from calliclones of strawberry cultivar Morioka-16 and their characteristics. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 61: 323-329.
- 谷口真美子・永富成紀. 1989. イネの組織培養系に対する放射線照射方法の影響. 育雑. 39(別 1): 358-359.
- 丹野 久・相川宗蔵・吉田昌幸. 1993. イネ葯培養における γ 線照射とその後代系統の特性. 育雑. 43(別 2): 283.
- Toyoda, H., K. Horikoshi, Y. Yamano and S. Ouchi. 1991. Selection of Fusarium wilt disease resistance from regenerants derived from leaf callus of strawberry. Plant Cell Rep. 10: 167-170.
- Wang, D. Y., W. P. Wergin and R. H. Zimmerman. 1984. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo of strawberry. HortScience 19: 71-72.