

ベゴニア類のイオンビーム照射による変異誘導

伊東 靖之、関 栄一、大越 一雄、渡邊 学、斉藤 宏之*、林 依子*、阿部 知子*

キーワード：ベゴニア、イオンビーム、突然変異育種、コーラルファンタジー、花色変異

I 緒 言

イオンビーム照射による植物の品種改良技術は、組換えDNA技術とは多少事情が異なり、日本における研究が世界に先駆けて進められてきた分野である。1961年に放射線育種場（現茨城県常陸大宮市）のガンマフィールドで開始された γ 線照射による放射線育種の基礎研究の実施を皮切りに、日本での放射線による植物の突然変異誘発の研究が本格的に行われるようになった（Watanabe, 1981）。すでに1950年代から、イオンビームが生物に対して、突然変異を誘発する効果が高いとの報告はあったが、変異源として γ 線や化学変異剤の主流の座を揺るがす存在とはなりえなかった（Watanabe, 2001）。しかし、1989年に、理化学研究所（埼玉県和光市）に照射施設RARF（RIKEN Accelerator Research Facility）、1991年に、日本原子力研究所高崎研究所（群馬県高崎市）にTIARA（Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application）が完成すると、タバコとシロイヌナズナを材料にイオンビームによる植物照射の影響に関する基礎的研究が着々と進められた（Tanaka et al., 1997; Abe et al., 1995, 2000; 阿部ら2002）。一方、作物としては、当初から花き類が材料として選ばれた。1997年にキクでの成果から、変異スペクトルの広いことが証明され（Nagatomi et al., 1997）、2002年にバーベナ（Suzuki et al., 2002; 阿部・鈴木, 2002）とカーネーション（Okamura et al., 2002）で実用化に成功すると、イオンビームへの注目が全国に広がった。

イオンビームの特徴は大きな線エネルギー付与（Linear Energy Transfer; LET）を持つため、変異誘発に必要な粒子数が少なく、非常に局所的な範囲に巨大な影響を与える。その結果として、各種の生物効果比（Relative Biological Effectiveness; RBE）が増大し

て変異の幅が広がる（吉田ら、2002; 田中、2003）。この理由は、低LETの γ 線やX線では生じない欠失、逆位及び転座といった修復し難い大きなDNA構造の変化を誘発しやすいためである（Shikazono et al., 2001, 2002）。著者らも、この技術には早くから関心を持ち、1997年からベントグラス（Ito et al., 1998, 1999）、1998年からベゴニア及びサトイモについて突然変異体の作出を目的に照射研究を行ってきた（千葉農総研、2002）。

一方、千葉県農業試験場（現千葉県農業総合研究センター）におけるベゴニア類の品種改良は、1980年代後半より、木立性ベゴニアやエラチオール・ベゴニア等で行ってきた（大門ら、1993; Seki and Ito, 1994）。また、1998年～2002年には新品種育成強化促進事業（通称；育プロI期）が実施され、ベゴニアプロジェクトとして重点的に研究が行われた。この「育プロ事業」とイオンビーム研究着手時期が同じであったことから、ベゴニアがイオンビームの主要な材料として位置付けられた。研究当初はベゴニア類の原種を材料に、有用変異獲得の基礎資料となる線量反応の確認を行った。その後、「育プロ事業」の中で、在来ローズ系の球根ベゴニア（*Begonia tuberhybrida*）と球根性ベゴニア原種（*B. boliviensis*）の種間雑種により、新しいタイプのベゴニア「コーラルファンタジー」が育成され（千葉県、2001）、これをきっかけに変異誘導研究も、当品種の花色等のバリエーション拡大に重点を置く方向へ転換した。

そこで、イオンビーム照射がベゴニア類の生育にどのような影響を与えるかを調査し、新しい放射線としての可能性やその利用法について検討するとともに、「コーラルファンタジー」を対象とした一連の実験によって、黄色系の花色変異系統を作出することができたので、その経緯と結果について報告する。

本文に入るに先立ち、本研究を開始及び遂行するに当たって、前千葉県農業総合研究センター長藤家梓博士、現千葉県農業大学校研究科副科長丸論博士より、貴重なご助言及びご指導をいただいた。ここに記して深く感謝の意を表する。

2006年9月25日受理

*理化学研究所に科加速器研究センター
加速器応用研究グループ生物照射チーム

II 材料及び方法

1998年～2004年に理化学研究所の理研加速器研究施設において、各種のペゴニア類にイオンビームを照射し、生物的影響を確認するとともに、2005年からペゴニアの新品種育成を目的に有用変異個体の選抜試験を行った。

なお、培養操作及び照射処理後の植物体の育成は、千葉県農業総合研究センター生物学部植物工学研究室（千葉市緑区）及び同ガラス温室で行い、開花調査は、同育種研究所野菜花き育種研究室（長生郡長生村）のガラス温室内で実施した。

1. ペゴニア類の生育に及ぼすイオンビーム照射の影響

(1) 種子照射

1998年11月に球根性ペゴニアの原種 *B. pearcei* の完熟種子（自殖）を、常法で表面滅菌し、MS基本培地（以下MSとする）を添加した寒天培地（5.5cmプラスチックシャーレ）に置床してから、2日後に吸水種子として、ネオン及び窒素イオンを照射（ $^{20}\text{Ne}^{10+}$ 及び $^{14}\text{N}^+$ 、核子当り135MeV）した。試験区として、両イオン種とも5、10、20、及び50Gyの照射区及び無処理区を設定した。照射処理後、そのままの状態に25℃、16L-8Dの条件で培養し、発芽状況を調査した。生存率は、培養開始8週間後に本葉が展開した実生を生存個体とし、無処理区の生存率を100とした場合の相対的な生存率（比数）で評価した。1区200～300粒を供試し、各区3反復とした。

また、1999年4月に球根性ペゴニアの原種 *B. socotorana* の、乾燥した完熟種子（自殖）にネオンイオンを照射した。試験区として10、20、及び50Gyの照射区及び無処理区を設定した。照射処理後、種子をパーミキュライトを充填した径21cmの素焼き鉢（平鉢）に散播し、覆土せずに底面給水管理を行い、発芽状況を調査した。発芽試験は通常の温室内で実施した。は種後8週間時点で本葉が展開したものを生存個体とし、無処理区の生存率を100とした場合の相対的な生存率（比数）で評価した。1区200粒を供試し、各区3反復とした。

(2) 挿し穂・発根苗照射

2001年2月に、育種研究所で育成中の木立性ペゴニア（*B. incarnata*）と球根性ペゴニア（*B. boliviensis*）の交雑による選抜系統（2系統：ピンク、オレンジ）の挿し穂に、また、同年6月、品種「コーラルファンタジー」の挿し穂及び発根苗に炭素イオンビーム（ $^{12}\text{C}^{6+}$ 、核子当り135MeV）を照射した。照射に際して、8cm長に調製した挿し穂・発根苗を10本ずつ束ね、5、10、20及び50Gyの照射区（6月のさし穂照射は10及び20Gyのみ）及び無処

理区を設定した。1区10本、3反復とした（選抜系統は反復なし）。

照射後直ちに挿し穂は挿し芽、発根苗は鉢上げ（培養土：メトロミック350単用）を行い、挿し穂の場合は照射から3週及び8週間後、発根苗は8週間後に生育伸長の有無を調査した。

また、2002年2月に、選抜系統のオレンジ系統に窒素イオン照射を行った。試験区として5、10、20及び50Gyの照射区及び無処理区を設定した。

一方、2003年5月に「コーラルファンタジー」の挿し穂に対してネオンイオン照射を行った。試験区として5、10及び20Gy照射区及び無処理区を設定した。両年とも供試数、照射後の育成方法及び調査方法は前記と同様とした。

さらに、2004年5月に変異個体数を多く獲得することを目的に、「コーラルファンタジー」の挿し穂に5及び10Gyの炭素イオン照射を行った。

2. イオンビーム照射による有用変異個体の作出

(1) 「*B. incarnata* × *B. boliviensis*」系統の花色変異

前記1. (2)の試験で、選抜2系統のさし穂に2001年に炭素イオン、及び2002年に窒素イオンを照射した後、挿し芽を行った苗について、2～3週間内にその挿し穂の腋芽から新たに伸長した枝葉の葉を用いて組織培養を行った。これらを常法で表面滅菌後、4～5cm角に切断した葉片を1/2MS+0.2mg/1NAA+0.2mg/1BA+3%ショ糖+0.8%寒天、pH5.8の培地に置床した。培養開始後、葉片から直接誘導された不定芽を、逐次、同培地または0.1mg/1NAA+0.5mg/1BAを含んだ培地で継代培養し、増殖・伸長を促した。培養はすべて25℃、16L-8Dの条件下で行った。その後、2～3cmに伸長した茎葉を同組成の植物調節物質を含まない0.8%Gelrite培地に移植して発根を促した。概ね1か月で発根した個体を培養土（メトロミック350：赤玉土＝2：1）を用いて順化した。

以後、順化個体を育成し、開花したものから順次変異株の確認を行い、変異株について、色彩色差計（ミノルタCR321）を用いて花卉の表面の色を計測した。

(2) 「コーラルファンタジー」の花色変異

前記1. (2)の試験で2001年及び2002年に炭素イオン、2003年にネオンイオン照射を行い、挿し芽及び鉢上げ後、概ね2～3週間内に挿し穂及び発根苗の腋芽から、新たに伸長した枝葉の葉片を用いて組織培養を行った。さらに、2004年5月に変異個体数を多く獲得することを目的に、「コーラルファンタジー」の挿し穂に5及び10Gyの炭素イオン照射を行い、同様に葉片の組織培養を行った。これらを前記2. (1)の試験の方法で順化個体を育成し、

開花したものから順次変異株の確認を行った。

2005年4月、黄色に変異した1系統を選抜し、挿し芽により増殖後、「コーラルファンタジー」を対照品種として生育及び開花調査を行った。また、「コーラルファンタジー」の葉挿し繁殖個体から得られ、千葉県が品種登録申請(2006年)した「クリーミーファンタジー」及び「アプリコットファンタジー」の2品種も対照に加え調査を行った。供試数は生育調査で各系統10株、開花調査では各株5花、計50花とした。

Ⅲ 結 果

1. ペゴニア類の生育に及ぼすイオンビーム照射の影響

(1) 種子照射

B. pearcei の吸水種子に対するネオン及び窒素イオン照射の結果を第1図に示した。照射8週間後の無処理区の生存率(本葉まで展開した個体)は75%であった(データ省略、以下同)。無処理区の値を100とした相対的な生存率は、5Gy区の場合、ネオンイオン区で93、窒素イオン区で84であった。10Gy区では、ネオンイオン区で92、窒素イオン区で76であった。しかし、20Gy区では両イオン種とも急激な低下が認められた。2週間後に子葉展開が認められた種子は各区とも50%以上と多かったが(データ省略)、その後正常に生育できず、8週間後には、ネオンイオン区で2未満、窒素イオン区で16と非常に低い値となった。50Gy区では両イオン種とも、一部種皮が破れ肥大したものはみられたが、子葉が展開した種子は全く確認できなかった。

B. socotorana の乾燥種子に対するネオンイオン照射の結果を第2図に示した。照射8週間後の無処理区の生存率は79.7%であった。無処理区の値を100とした相対的な生存率は、10Gy区で86、20Gy区で75、50Gy区で20であった。しかし、50Gy区の個体についてはこれ以後の生育

は認められず最終的にはすべて枯死した。生存した発芽個体を順化後、育成・開花させ外観形態を調査した結果、*B. pearcei* 及び*B. socotorana* とも、草姿、花型及び花色等において変異個体を得ることはできなかった。

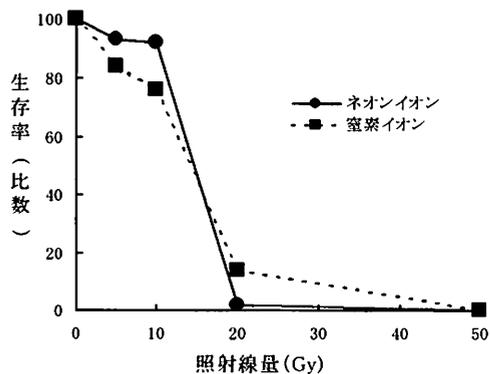
(2) 挿し穂・発根苗照射

B. incarnata × *B. boliviensis* (オレンジ及びピンク系統)の挿し穂への炭素イオン照射の結果は、3週間後に無処理区でも生存率がすでに50%以下となり、この時点で照射区の一部は組織培養に供試することはできたが、8週間後にはいずれの区でも全て枯死した。

「コーラルファンタジー」への炭素イオン照射の結果を第3図に示した。供試した挿し穂及び発根苗とも無処理区の生存率は96.7%であった。無処理区の値を100とした相対的な生存率は、挿し穂で10Gy区で83、20Gy区で48と前試験の「*B. incarnata* × *B. boliviensis*」選抜系統の生存率と比較して高い値を示した。発根苗を用いた場合はさらに高く、5Gy及び10Gy区で93、20Gy区で70であった。50Gy区でも14の生存を示したが、腋芽が伸長した個体は認められなかった。

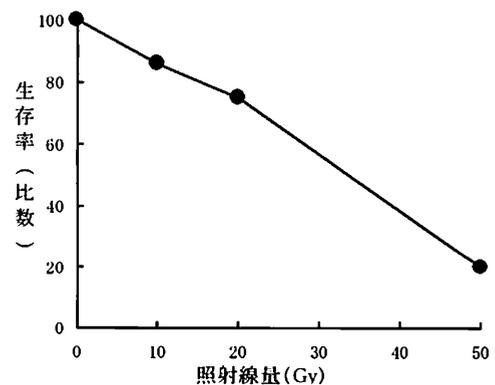
2002年のオレンジ系統の挿し穂への窒素イオン照射の結果を第4図に示した。3週間後の無処理区の生存率(挿し芽活着率)は98.3%であった。無処理区の値を100とした相対的な生存率は、50Gy区でも74と高かったが、その時点ですでに生育の違いは試験区ごとに観察されていた。5及び10Gy区では腋芽の旺盛な伸長が認められたが、20Gy区では半数近くの個体でしか伸長が認められなかった。さらに、50Gy区では伸長する個体は全くなかった。8週間後では、3週間後の無処理区の値を100とした相対的な生存率は、8週間後では93となり、5Gy区で74、10Gy区で54、20Gy区で17と、照射線量が増加するにしたがい、ほぼ直線的に生存率が低下した。50Gy区では、生存する個体は全く認められなかった。

「コーラルファンタジー」の挿し穂へのネオンイオン



第1図 *B. pearcei* 吸水種子へのイオンビーム照射が生存率に及ぼす影響(照射8週間後)

注) 生存率は無照射区の生存率を100とした場合の比数。

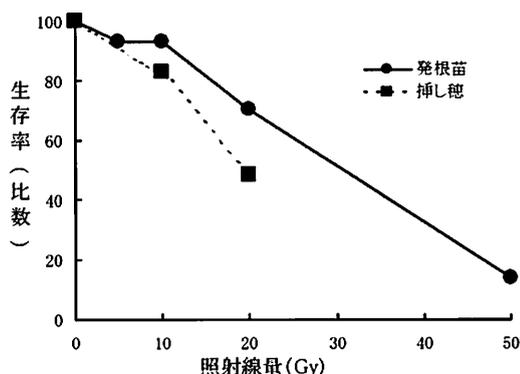


第2図 *B. socotorana* 乾燥種子へのネオンイオンビーム照射が生存率に及ぼす影響(照射8週間後)

注) 生存率は無照射区の生存率を100とした場合の比数。

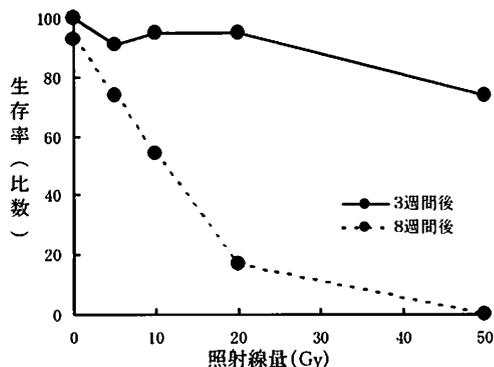
照射の結果を第5図に示した。3週間後では20Gy区の相対的生存率は52であった。8週間後には、5Gy区で31、10Gy区で14となり、20Gy区ではすべて枯死した。炭素イオン照射と比較して全体的に低い値を示した。

2004年の「コーラルファンタジー」への炭素イオン照射でも、5及び10Gyとも生存率で80以上となり、2001年とほぼ同様の結果であった(データ省略)。



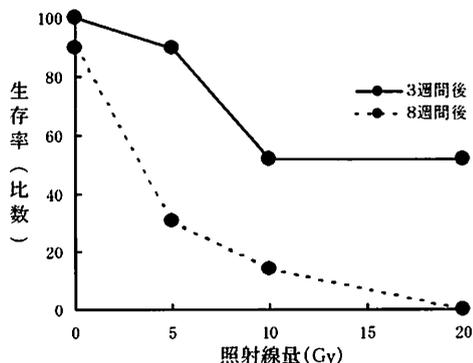
第3図 「コーラル・ファンタジー」への炭素イオン照射が生存率に及ぼす影響 (8週間後調査)

注) 生存率は無照射区の3週間後の生存率を100とした場合の比数。



第4図 B. incarnata x B. boliviensisの挿し穂への銻素イオン照射が生存率に及ぼす影響

注) 生存率は無照射区の3週間後の生存率を100とした場合の比数。



第5図 「コーラル・ファンタジー」の挿し穂へのネオンイオン照射が生存率に及ぼす影響

注) 生存率は無照射区の3週間後の生存率を100とした場合の比数。

2. イオンビーム照射による有用変異個体の作出

(1) 「B. incarnata x B. boliviensis」系統の花色変異

「B. incarnata x B. boliviensis」2系統へのイオンビーム照射株から、組織培養経路による発根個体は、ガラス管ビン(径25mm x 長さ100mm)数で833本、総順化個体数で479株(ピンク系統203株、オレンジ系統276株)であった。最終的に花色の変異を示した「濃ピンク系統」(炭素イオン5Gy照射・培養株由来)と「淡オレンジ系統」(銻素イオン5Gy照射・培養株由来)、各1系統を選抜した。

これらの花卉表面色を色彩色差計により調査した結果を第1表に示した。「濃ピンク系統」では対照の元親と比較し、a*値が9.24増して赤方向に移行した。同時にb*値が9.45増加し黄方向に移行した。彩度の差 ΔC^* は+11.54となり鮮やかな色調となった。結果としてL*値(明度)が低下し濃い色となった。色差 ΔE^*ab は計算式から15.04となり、NBS単位の基準では「別の色系統になる」(12.0~)と判断された(日本色彩学会編、1980)。「淡オレンジ系統」ではa*値が-6.28となり、黄方向に移行して、対照より赤味が少なくなった。b*値は-0.02、L*値は+4.16、彩度差 ΔC^* は-4.87となり、総じて薄い色となった。色差 ΔE^*ab は7.53となり、NBS単位の基準では「きわめて著しく異なる」(6.0~12.0)に該当した。

(2) 「コーラル・ファンタジー」の花色変異

イオンビーム照射後の組織培養による総順化個体数は、2001年の炭素イオン照射由来のものが648株、2003年のネオンイオン照射由来のものが913株、さらに2004年の炭素イオン照射由来のものが856株、合計2,417株を育成した。これらを生育・開花させ外観形態を調査した結果、2005年4月、2004年に炭素イオン10Gyを照射した株から、唯一、花色が黄色を示した1株を確認した。

この変異株を挿し芽繁殖によって増殖した後、変異系統として開花株の生育調査及び開花性状調査を行い、結果を第2表及び第3表に示した。「イオンビーム変異系統」の開花株の生育量は、対照品種「コーラルファンタジー」等と比較して、草丈や株張りでやや大きな値を示したが、いずれの調査項目についても明確な差は認められなかった。開花性状についても、対照品種との比較で、花梗長と花弁数には差がなく、花径がやや小さい値を示した。花弁の色についてのみ、明確な違いが認められた。「コーラルファンタジー」は日本園芸植物標準色票で花弁表面・裏面とも0405(濃桃)に照合し、「イオンビーム変異系統」は表面・裏面とも2503(淡黄)で全く異なり、黄色系統の「クリーミーファンタジー」と全く同じ花色を示した。一方、「アプリコットファンタジー」は表面が1302(浅橙)、裏面が0703(黄桃)とそれらの中間的な色相を示した。

第1表 「*B. incarnata*×*B. boliviensis*」の変異系統の花弁表面色の色差計による比較

系統	L*値	a*値	b*値	彩度 ¹⁾	色差 ²⁾
ピンク元親	58.59±1.90	51.54±1.97	12.15±2.88	53.01±2.34	15.04
濃ピンク	51.42±1.55	60.78±2.42	21.60±3.08	64.55±2.95	
オレンジ元親	45.50±2.27	62.77±2.02	48.41±2.84	79.29±2.96	7.53
淡オレンジ	49.66±2.27	56.49±2.59	48.39±2.77	74.42±2.98	

注1) 彩度： $\sqrt{a^{*2}+b^{*2}}$ 2) 色差： $\Delta E^{*ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2+(\Delta a^*)^2+(\Delta b^*)^2}$

第2表 「イオンビーム変異系統」と「コーラルファンタジー」系品種の開花時の生育 (cm)

品種名	草丈	株張り		葉頂部	葉基部	葉幅	葉柄長	茎径	節間長
		横	縦	の長さ	の長さ				
イオンビーム変異系統	12.5	20.5	19.7	10.2	2.7	4.8	4.0	0.4	1.5
コーラルファンタジー	12.0	18.0	18.0	9.6	2.6	4.9	4.5	0.4	1.5
クリーミーファンタジー	13.5	20.0	19.6	10.1	2.5	4.9	4.5	0.4	1.5
アプリコットファンタジー	12.5	21.0	20.5	9.8	2.6	4.8	4.0	0.4	1.5

第3表 「イオンビーム変異系統」と「コーラルファンタジー」系品種の開花性状

品種名	花梗長	花径長		花弁数	花弁の色 ¹⁾	
		長径	短径		表面	裏面
		cm	cm		cm	枚
イオンビーム変異系統	9.0	6.8	6.7	33~35	2503(淡黄)	2503(淡黄)
コーラルファンタジー	9.0	7.0	7.0	32~38	0405(濃桃)	0405(濃桃)
クリーミーファンタジー	8.3	7.2	7.1	33~37	2503(淡黄)	2503(淡黄)
アプリコットファンタジー	8.5	7.2	7.2	40~42	1302(浅橙)	0703(黄桃)

注1) 日本園芸植物標準色票による判定。

IV 考 察

1. ペゴニア類の生育に及ぼすイオンビーム照射の影響

新品種育成を目的とした変異誘発に関する好適な放射線照射線量については、 γ 線等では半致死線量 (LD50) が使われることが多い。しかし、イオンビーム照射の場合、タバコやシロイヌナズナを用いたモデル実験によれば、生存率が50%に達する以前、すなわち生存率曲線の肩の部分に相当する照射線量において、ほとんどの細胞で染色体異常が観察されていた (Shikazono et al., 2001)。この事実は、生存率を指標とする場合、実際の育種場面において突然変異個体を得るための適正線量は、生存率が急激に低下する前、すなわち、生存率の低下が始まる前の肩に当たる部分、あるいはその半分程度の線量でも十分であることを示している (田中、2003)。

これを今回の試験結果に照合すると、*B. pearcei* の吸水種子に対するネオンイオン及び窒素イオン照射とも、突然変異誘発を目的とした放射線量は、ともに5~10Gyが適正な線量と推定した。実際に20Gyでの生存率では、以後の育成・選抜に供試できる個体は得られなかった。一方、*B. socotorana* の乾燥種子を用いたネオンイオン照射の場合、8週間後までの生存曲線はほぼ直線的な低下を示し、通常みられるS字カーブの軌跡、すなわち急激な変化を示す変曲点となる線量は確認できなかった。線量増加に対する反応が緩慢だったともいえる。このため、適正線量は10~20Gyと推定された。供試した材料の種が異なっていたが、種子の吸水の有無により細胞周期が動いているか否かが要因となり、それが放射線耐性に大きく影響したものと思われる。

適正な線量はイオンの種類や、植物種、標的とする組織及び生育ステージによっても大きく影響される。以前、

日本原子力研究所高崎研究所で行ったペントグラス (*Agrostis palustris*) の乾燥種子への炭素イオン照射 (平均LET、107keV/mm) の結果では、50Gyにおいても90%以上の生存率を保持しており、100Gyではじめて40%程度に急激に低下した(Ito et al., 1998)。一方、理化学研究所でのペントグラス乾燥種子への炭素イオン照射 (表層LET、23keV/mm) では、160Gyでも生存率の低下は観察されなかった(Watanabe et al., 2005)。この違いはLETまたはイオンビームの飛程の影響と考えられるが、いずれにしても、これらの結果から、ペゴニア類の方がペントグラスより感受性が高く、放射線への耐性が弱かったことが伺える。一方、同じペントグラスでも液体培養細胞を用いた炭素イオン照射の結果では、再分化率で評価した場合、5Gyにおいても50%程度の生存率しか得られなかった(Ito et al., 1999)。また、ペゴニアの葉片を無菌的に寒天培地上に置床し、これを標的に窒素イオン照射を実施した条件下では、最も低い設定の5Gyでも生存個体は全く得られなかった(伊東、未発表)。さらに、軟X線を照射源に用いた別の試験においても、1~2kRでしか再生個体が得られなかった(伊東、未発表)。これらの実験結果から、ペゴニアの葉組織のみを放射線照射試験の標的材料とすることは困難であり、非効率であることが実証されていた。そこで、本試験では改善策として挿し穂全体を標的材料として用い、それに組織培養を併用することによって、20Gyでも再生個体を獲得することができた。

交雑種の「*B. incarnata*×*B. boliviensis*」の挿し穂への窒素イオン照射の結果(第3図)にみられるように、この系統は3週間後までは、ある程度の生存率を維持していたが、8週間後になって急激に低下した。これは照射によるダメージからすぐには回復でなかったものと推察される。また、それを助長した大きな要因として、植物自体の草勢が弱かったことが挙げられる。8週間時点での生存曲線から判断すると肩の部分がなく、適正線量は5Gy以下であった。しかし、これに組織培養を併用した場合は、20Gyにおいても少数ではあったが再生個体を獲得することが可能であった。ただし、3週目で74の相対的な生存率を認めている50Gyの場合、新しい腋芽の伸長はなく、照射時に展開していた葉を用いた培養結果でも再生する個体は見られなかった。

また、「コーラルファンタジー」への炭素イオン照射を行ったところ、挿し穂及び発根苗とも10Gyで生存曲線が肩となる部分を形成した(第4図)。このことから、適正線量は5~10Gyと推定された。20Gyでも組織培養により、前者に劣らない生存個体が得られた。これは「コーラルファンタジー」が先の交雑種よりも、照射によるダメー

ジからの回復力が大きいこと、耐病性も含めて草勢が強いこと等の特性を持っていることが影響していると思われる。つまり、栽培しやすい品種であることを示唆している。照射材料の形態の比較では、挿し穂より発根苗の方が優っていたが、その差はごく僅かであった。したがって、「コーラルファンタジー」並の草勢があれば、少なくとも炭素イオン照射の場合、あえて発根苗を用いる必要はないと判断される。

一方、ネオンイオンを用いた場合、急激な生存率の低下が見られた(第5図)。回復力のある「コーラルファンタジー」でも、ネオンイオンはLETが63keV/mmと大きかったものと考えられた。しかし、組織培養の併用により、少数ではあったが最終的に5Gy及び10Gyで、順化個体を獲得することができた。

以上、ペゴニア類に対するイオンビームの各種反応を調査した結果、種子照射では、育種目的で照射する各種イオン種の適正線量のある程度、予想することができた。また、ペゴニア類のように感受性が高く、葉片組織を標的材料とすることが難しい種類においても、挿し穂を材料として、組織培養を併用することによりイオンビーム照射の利用が可能であることを実証できた。

2. イオンビーム照射による有用変異個体の作出

(1) 「*B. incarnata*×*B. boliviensis*」系統の花色変異

479本の順化個体から選抜した「濃ピンク系統」と「淡オレンジ系統」2系統について、花色の違いを色彩色差計により調査した結果(第1表)、その色差 ΔE^*ab はNBS単位で明らかな違いが確認された。この評価基準は米国標準局(National Bureau of Standards)で設定されているもので、「1NBS単位の大きさは、最も良い観測条件において識別できる最小色差の約5倍に相当する」と定義されている(日本色彩学会編、1980)。今回調査した系統の元親系統との色差は「濃ピンク系統」で15.04、「淡オレンジ系統」で7.53となり、その評価からは「別の色系統になる」と「きわめて著しく異なる」に相当し、明らかに違いが認められた。しかし、これはあくまで、ある範囲内に限定された定量的な違いであり、色相的には全く同じ傾向のものであった。すなわち、外見からは「濃淡の違いを判別できる」という域を出ていなかった。確認された違いは、色彩学的には区別できるものであったが、植物の品種を花色面から品種群としてシリーズ化するに至らなかった。

(2) 「コーラルファンタジー」の花色変異

「コーラルファンタジー」は在来ローズ系の球根ペゴニア(*B. tuberhybrida*)と球根性ペゴニアの原種(*B. boliviensis*)の交配により育成された新しいタイプの交雑

品種である。この品種は八重咲きの雄花が主体で雌花の着生が少なく、稔性については確認されていない。したがって、この品種を元に新たな品種を育成するには、突然変異に期待するほかない。幸い、同じ繁殖様式と同じような開花性状を持ち、ペゴニア類の鉢花として主要な種類であるエラチオール・ペゴニアには花色及び花型に多くのバリエーションがあるが、これらの新品種も変異株の利用により育成されている。

3か年にわたり、イオンビーム照射とその後に組織培養を行って「コーラルファンタジー」の改良品種の作出に取り組んだ結果、第2表及び第3表に示す形質を持った「イオンビーム変異系統」を1系統作出した。供試したいずれの系統も生育に大きな差はみられず、原品種「コーラルファンタジー」の花色変異体と判断できた(第2表)。また、「コーラルファンタジー」の花色は日本園芸植物標準色票番号で花卉の表面・裏面とも0405(濃桃)である。予備的な調査で、この赤色素のアグリコンはシアニジンで、配糖体とその主な成分になっていると推察される。しかるに「イオンビーム変異系統」は赤い色素がほとんど存在せず、表面色は花卉の表面・裏面とも2503(淡黄)であった。この黄色色素の成分はフラボノイドであり、「コーラルファンタジー」にも存在することを確認している。つまり、この変異体にもフラボノイドが生成されていることから、アントシアニン合成経路の前駆体であるカルコンを合成する酵素(CHS)は生合成されており、最終段階のアントシアニン合成酵素(ANS)か、その直前のジヒドロフラボノール4-還元酵素(DFR)に変異が生じ、生合成経路が遮断されたものと推察される。

エラチオール・ペゴニアは、通常の挿し芽繁殖においても、数万個体中1個体程度の変異が生じるといわれており、注意深く観察することで変異個体を見つけ出すことは可能である。本試験の結果から、順化個体2,417株から1株の変異体が獲得されたが、0.1%に満たない変異誘導率であったことから、決して高いものとはいえない。したがって、ペゴニアへのイオンビーム照射の方法については、さらに改善する余地がある。今後、どの生育ステージの材料を用いるのが最適か、照射後の育成途中で枯死してしまう個体をいかに救えるか等について再検討し、さらに改良を加えることが必要であろう。

今回、選抜した「イオンビーム変異系統」は類似花色品種の「クリーミーファンタジー」と比較し、生育及び花色に差はなかったが、商品性を大きく左右する重要なポイントである花径の大きさ及び花卉数でやや劣る結果となり、種苗登録するには至らなかった。

なお、この「イオンビーム変異系統」は、今後、イオ

ンビーム照射由来の変異体の解析材料や新たな変異体誘導の母本として活用することを考えたい。

V 摘 要

1998年～2004年に理化学研究所の理研加速器研究施設において、各種のペゴニア類に各種のイオンビームを照射し、適正線量を調査するとともに有用変異個体の選抜を行った。

1. ペゴニア類の生育に及ぼすイオンビーム照射の影響

ペゴニアの種子に対してイオン種及び線量の影響を検討した結果、適正線量は吸水種子へのネオンイオン及び窒素イオン照射で5～10Gy、乾燥種子へのネオンイオン照射で10～20Gyと推定された。

放射線照射に感受性が高く、葉片組織を標的材料とすることが困難なペゴニア類の場合、挿し穂を材料とし組織培養を併用することにより、効果的な照射処理が可能となった。「コーラルファンタジー」の挿し穂照射で、炭素イオン照射の適正線量は5～10Gyと推定された。

2. イオンビーム照射による有用変異個体の作出

「*B. incarnata* × *B. boliviensis*」への窒素イオン照射株から、2変異系統を選抜し、色彩色差計により花色の変化を確認した。「コーラルファンタジー」の挿し穂照射と組織培養の併用により、2,417株の育成個体を鉢上げした。このうち、炭素イオン10Gy照射で花色のみ黄色に変異した1個体を獲得した。

VI 引用文献

- Abe T., S. Yoshida, T. Sakamoto, T. Kameya, S. Kitayama, N. Inabe, M. Kase, A. Goto and Y. Yano (1995). Is irradiation of heavy ion beams at specific stages of the fertilization cycle of plants effective for mutagenesis?. Modification of Gene Expression and Non-Mendelian Inheritance, ed. by Oono & Takaiwa, NIAR, JAPAN. 469-477.
- Abe T., C.H. Bac, T. Ozaki, J.H. Wang and S. Yoshida (2000). Stress-tolerant mutants induced by heavy-ion beams. Gamma Field Symposia. 39. 45-56.
- 阿部知子・鈴木賢一(2002). 重イオンビーム変異育種の可能性：パーペナの花持ち向上. 農及園. 77: 580-586.
- 阿部知子・吉田茂男・鈴木賢一・久住高章(2002). 重イオン突然変異誘発法による植物の品種改良. プレイ

- ンテクノニュース, 90:14-17.
- 千葉県 (2001). 美しい花型で、鑑賞期間の長いペゴニア新品種「コーラルファンタジー」. アクティブ・インフォメーション.
- 千葉県農業総合研究センター (2002). 新品種育成強化促進事業 アグロ育種プロジェクト21研究成果集. 38-41, 118-119.
- 大門弘幸・関栄一・伊東靖之・藤家梓・遠藤宗男 (1993). エラチオール・ペゴニアの組織培養による優良変異系統「ローズエルフ」の作出. 千葉農試研報. 34: 63-68.
- Ito, Y., A. Tanaka, N. Shikazono, H. Watanabe, M. Ohara and A. Fujiie (1998). Effects of Ion Beam on The Seed Germination and In Vitro Regeneration of Creeping Bentgrass. JAERI TIARA Ann. Rep. 1997. 65-67.
- Ito, Y., A. Tanaka, N. Shikazono, H. Watanabe, M. Ohara and S. Maru (1999). An Attempt for Selection of Disease Resistant Creeping Bentgrass by Ion Beams Irradiation to the Seeds. JAERI TIARA Ann. Rep. 1998. 32-33.
- Nagatomi S., A. Tanaka, H. Watanabe and S. Tano (1997). Enlargement of potential Chimera on Chrysanthemum Mutants Regenerated from $^{12}\text{C}^{5+}$ Ion Beam Irradiated Explants. JAERI TIARA Ann. Rep. 1996. 48-50.
- 日本色彩学会編 (1980). 新編色彩科学ハンドブック. 236-247, 261-277. 東京大学出版会. 東京.
- Okamura M., N. Yasuno, M. Otsuka, A. Tanaka, N. Shikazono and Y. Hase (2002). Development of Mutant Varieties "Vital Ion series" in Carnation by Ion Beam Breeding. JAERI TIARA Ann. Rep. 2001. 39-41.
- Seki, E. and Y. Ito (1994). Breeding of New Begonia Varieties. Achievement of Horticultural Experiment Station in Japan. 24th IHC Kyoto. Japan. 164-165.
- 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., A. Tanaka, S. Kitayama, H. Watanabe and S. Tano (2002). LET dependence of lethality in *Arabidopsis thaliana* by heavy ions. Radiat. Environ. Biophys. 41: 159-162.
- Suzuki K., Y. Yomo, T. Abe, Y. Katumoto, K. Miyazaki, S. Yoshida and T. Kuzumi (2002). Isolation of Sterile Mutants of *Verbena hybrida* Using Heavy-Ion Beam Irradiation. RIKEN Accel. Prog. Rep. 35: 129.
- Tanaka, A., N. Shikazono, Y. Yokota, H. Watanabe and S. Tano (1997). Effects of heavy ions on the germination and survival of *Arabidopsis thaliana*. Int. J. Radiat. Biol. 72: 121-127.
- 田中淳 (2003). イオンビームによる植物の突然変異誘発. RADIOISOTOPES. 52: 186-194.
- 吉田茂男・阿部知子・田中隆治・久住高章・鈴木賢一 (2002). 重イオンビームによる突然変異誘発法の開発と応用. 日本植物細胞分子生物学会シンポジウム要旨集. 20: 4.
- Watanabe H. (2001). Significance and expectations of ion beam breeding. Gamma Field Symposia. 40: 15-20.
- Watanabe K., C. Suzuki, Y. Y. Yamamoto, T. Abe, S. Yoshida and K. Yoneyama (2005). Biological effects of heavy-ion-beam irradiation on turfgrass. RIKEN Accel. Prog. Rep. 38: 133.
- Watanabe Y. (1981). The 20 years history of the institute of radiation breeding. Gamma Field Symposia. 20: 1-9.



写真1 照射原品種「コーラルファンタジー」



写真2 選抜した「イオンビーム変異系統」

Mutation Induction by Ion Beam Irradiation in Begonia

Yasuyuki ITO, Eiichi SEKI, Kazuo OHKOSHI, Manabu WATANABE, Hiroyuki SAITO*,

Yoriko HAYASHI* and Tomoko ABE*

Key words : Begonia, Ion beam, Mutation breeding, Coral Fantasy, Flower color variation

Summary

In mutation breeding of begonia, we were investigated the relative biological effectiveness by ion beam irradiation with RIKEN Accelerator Research Facility, and then could be produced some useful mutants.

1. The effects of ion beam irradiation to the growth of begonia.

We have been examined the effects of irradiation to begonia with several kinds of ion beam and dose. The optimum dose to wet seeds of begonia were estimated at 5-10 Gy, by each relative survival rate after irradiation of Ne and N ion beam. While, that of dose to dry seeds were estimated at 10- 20 Gy on Ne ion beam.

By combined method of irradiation with in vitro culture, the cutting could be appropriated target materials in begonia, instead of the segments of leaf which caused great damaged. The optimum dose of C ion beam irradiation to cutting of begonia new variety 'Coral Fantasy' was estimated at 5-10 Gy.

2. The mutant of regenerated from explants irradiated ion beam.

Two mutants which regenerated from cutting of '*B. incarnata* × *B. boliviensis*' irradiated of Ne and C ion beam, were evaluated the various of flower color by colorimeter.

Consequently, 2,417 regenerated plants were established in pots, by combined method of irradiation with in vitro culture on 'Coral Fantasy'. A mutant which only flower color changed with red to yellow, was selected from those of C ion beam irradiated at 10 Gy.

*Nishina Center for Accelerator Based Science

Accelerator Applications Research Division Radiation Biology Team