

## Mutation Breeding with Ion Beams and Gamma Rays

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Dose, Dose rate, Gamma rays, Ion beams, Mutation breeding, Optimum dose, Radiation damage 作成者: 山口, 博康 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00001439">https://doi.org/10.24514/00001439</a>

## 特別報告

イオンビームおよびガンマ線による突然変異育種に関する研究<sup>†</sup>

山口 博康

(平成 24 年 7 月 2 日受付 平成 24 年 8 月 29 日受理)

<sup>†</sup>本論文は千葉大学学位審査論文(平成 23 年 9 月)を和訳し、編集・加筆したものである。

本報告の一部は、Nucl. Instr. Meth. In Phys. Res. B 206, 561-564 (2003); Breed. Sci. 58, 331-335 (2008);

Breed. Sci. 59, 169-177 (2009); Euphytica 165, 97-103 (2009); Breed. Sci. 60, 398-404 (2010) において発表した。

## Mutation Breeding with Ion Beams and Gamma Rays

Hiroyasu YAMAGUCHI

## Summary

Mutation breeding is a useful method for crop improvement. Its success, however, depends on the type of mutagenic treatment and the treatment methods used.

Ion beams show promise as a new mutagen which induces mutations with high frequency and produces novel mutants, because ion beams have high linear energy transfer (LET) and thus have greater biological effects compared with low LET radiations such as gamma rays and X-rays. Therefore, the mutagenic characteristics of ion beams for mutation breeding were investigated.

The practical use of ion beams requires information about effective and efficient doses. In gamma rays, there are no experiment-based reports on the optimum irradiation dose, although gamma rays have been commonly used. In addition, there are few data regarding the usefulness of the gamma ray irradiation with a low dose rate to prevent radiation damage. Therefore, optimum irradiation methods of ion beams and gamma rays for mutation breeding were investigated.

**1. Characteristics of ion beams as mutagens for mutation breeding****1) Efficiency**

Efficiency, which is defined as the ratio of specific, desirable mutagenic changes to plant damage caused by mutagen treatment, was compared between ion beams and gamma rays using rice (*Oryza sativa*) and chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*).

Rice seeds were irradiated with 220 MeV carbon ions (mean LET 107 keV· $\mu\text{m}^{-1}$ ), 320 MeV carbon ions (mean LET 76 keV· $\mu\text{m}^{-1}$ ), 100 MeV helium ions (mean LET 9 keV· $\mu\text{m}^{-1}$ ) and gamma rays. Fertility was examined in the  $M_1$  generation, and the frequency of the chlorophyll mutations was examined in the  $M_2$  generation. The relationship between the mutation frequency per  $M_2$  plant and fertility indicated that the mutation frequency based on fertility induced by ion beams equaled or exceeded that induced by gamma rays.

In an irradiation experiment of leaf explants of chrysanthemum carried out using the same ion beams, the effects of irradiation treatments were investigated using mutation frequency in flower color and nuclear DNA content as indices of

radiation damage. Mutation frequency with the 220 MeV carbon ion beam was high compared to the other ion beams and gamma rays, while there was little reduction in the nuclear DNA content as the irradiation dose increased. In contrast, when the irradiation dose of the 100 MeV helium ion beam increased, the nuclear DNA content decreased, although the mutation frequency did not increase compared to the other treatments. Thus, the efficiency, which was determined as the relationship between the frequency of flower color mutation and the reduction in nuclear DNA content, differed according to the type of ion beam used, and the efficiency with 100 MeV helium ions was lower than that with gamma rays.

In conclusion, the efficiencies of ion beams generally appear to be higher than those of gamma rays; however, some types of ion beams (e.g., 100 MeV helium ions) produced lower efficiencies than those produced by gamma rays.

## 2) Mutated sector size

A wide mutated sector is desirable to establish mutants efficiently. Therefore, the width of mutated sectors with ion beams was compared to that with gamma rays using rice and chrysanthemum.

The results of segregation frequency of chlorophyll mutants in the  $M_2$  generation of rice showed that ion beams produced wider mutated sectors than did gamma rays.

In chrysanthemum, flower color mutants were produced by irradiation of ion beams and gamma rays to lateral buds and by subsequent release of mutants from chimeric status with cutting back twice. Analysis of the chimeric structure made by comparing the flower color of the mutants to that of plants regenerated from the roots of mutants indicated that some of the mutants obtained with ion beams were solid mutants, where both LI and LIII layers were derived from the same mutated cell. No such solid mutants were obtained with gamma rays. Thus, the expansion of mutated sectors through all the layers of shoot apex occurred only with ion beam irradiation.

In conclusion, it appears that ion beams produced wider mutated sectors compared with gamma rays.

## 3) Mutation spectra

New mutagens are expected to have a different spectrum from the mutagens presently used. In a comparison of the relative frequency of each type of chlorophyll mutation (albina, xantha, viridis and others) in rice, no significant differences between ion beams and gamma rays were found. In chrysanthemum as well, the spectra did not seem to differ between ion beams and gamma rays because neither ion-beam- nor gamma-ray-specific mutants were observed, and there was no difference in the relative frequencies of each flower color mutation. From these results, it appears that there was no difference in mutation spectra between ion beams and gamma rays.

## 2. Optimum irradiation methods for mutation breeding

I examined suitable irradiation doses to obtain the maximum number of mutant lines from rice seeds sown after irradiation by both ion beams and gamma rays. As a result, it was found that the number of mutated lines per irradiated seed was highest at the shoulder dose in the survival curves. Irradiation at the shoulder dose did not affect survival markedly, giving approximately 90% survival. This result demonstrated that irradiation with such low doses was enough to efficiently produce mutants. Also in chrysanthemum and rose, mutants were obtained even at low doses of ion beam irradiation that did not affect shoot regeneration or survival, respectively.

To clarify the usefulness of the gamma ray irradiation with low dose rate for reducing radiation damage, I investigated the effect of total irradiation dose and dose rate on flower color mutation and nuclear DNA content as indices of radiation damage in chrysanthemum. Chrysanthemum plants were gamma-irradiated with various total doses at rates of 0.5, 1, and 2 Gy·h<sup>-1</sup>. The frequency of flower color mutation and the nuclear DNA content were investigated in regenerated plants. The dose rate of gamma rays influenced the nuclear DNA content but did not affect mutation frequency, and the same mutation frequencies were obtained without large reductions in nuclear DNA content by 0.5 Gy·h<sup>-1</sup>, when compared with 2 Gy·h<sup>-1</sup>. In conclusion, gamma ray irradiations with high total doses at low dose rates efficiently induced mutations with less radiation damage in chrysanthemum.

**Key Words:** Dose, Dose rate, Gamma rays, Ion beams, Mutation breeding, Optimum dose, Radiation damage

## 目次

総合緒言	49
第1章 イネにおけるイオンビームの変異誘発効果	50
第2章 キクにおけるイオンビームの変異誘発効果、 および核DNA量に及ぼす影響	59
第3章 バラにおけるイオンビームによる突然変異 誘発効果	64
第4章 キクの側芽に対するイオンビーム照射の変異誘発効果、 および誘発された変異体におけるキメラ構造の解析	67
第5章 キクにおけるガンマ線の照射線量および線 量率が突然変異誘発と核DNA量に及ぼす 影響	72
総合考察	76
摘要	78
引用文献	80

## 総合緒言

突然変異育種は、作物の品種改良において重要な方法のひとつである。突然変異が品種改良に使われ始めてからこれまでの75年間に、世界中で3,100品種以上の突然変異品種が作出され、我が国においてはおよそ450品種以上が作出されている(The FAO/IAEA Mutant Variety Database, <http://mvgs.iaea.org/AboutMutantVarieties.aspx>)。

X線を突然変異誘発に利用することは、X線の発見後まもなく、20世紀のはじめにde Vriesによって最初に提唱された。そして、1945年にはX線による初めての突然変異品種が、チューリップでDe Molによって作られた(Broertjes and van Harten, 1988)。化学変異原の実用的利用は1960年代に始まった。その後、エチル

ニトロソ尿素(ethylnitrosourea)、メチルニトロソ尿素(methylnitrosourea)、アジ化ナトリウム(sodium azide)やエチルメタンスルホン酸(ethyl methanesulfonate, EMS)のような化学変異原や、X線、ガンマ線や中性子線、紫外線、レーザーなどが突然変異の誘発に使われてきたが、現在では主にEMSとガンマ線が様々な作物において変異の誘発に広く使われている(The FAO/IAEA Mutant Variety Database)。

このようにガンマ線やEMSが広く使われているが、放射線と化学変異原とでは変異スペクトルに差がある(Doll and Sandfaer, 1969; Gustafsson, 1969; Yamashita et al., 1972)。加えて、それぞれには利点と欠点がある(van Harten, 1998)。従って、変異原のタイプの選択とその処理方法は、突然変異育種の成功のための重要な要因である。

イオンビームは、サイクロトロンにより加速されたイオン粒子である。イオンビームの特徴は、線エネルギー付与(Linear energy transfer: LET)が小さい放射線であるガンマ線やX線と比較して、ターゲットに対して高いエネルギーを局所的に付与することである(Yang and Tobias, 1979; Tanaka, 1999)。そのため生物効果が高く、突然変異率が高いことが期待されている。さらに、イオンビームとガンマ線と同じエネルギーの線量により照射した場合に、細胞を通過するイオン粒子の数はガンマ線が通る数と比べて少ない(Tanaka, 1999)。このような特徴から、イオンビームは染色体への影響がより小さく、目的とした形質のみが変わった変異体が得られることが期待された。そのような期待から、我が国においては1990年代以降、様々な作物でイオンビームを利用した突然変異育種が試みられてきた。そして、これらの突然変異育種プログラムにおいて、キク(Nagatomi et al., 2003; Ueno et al., 2005)、カーネーション、バーベナやその他の作物において新しい突然変異品種が得られてきた(The FAO/IAEA Mutant Varieties Database)。このように、イオンビームは変異誘発方法として広く利用されてきている。しかしながら、作物の突然変異育種のための変異原としての観点からは、イオンビームの特徴は十分には明らかにされていない。

突然変異育種は、目的とする形質のみを改良する方法として知られている。しかしながら、実際には、放射線照射により染色体異常のような障害も引き起こされる。それゆえ、突然変異育種では、目的とする形質における変異率が高いだけでなく、それ以外の影響が小さくなるような、適切な変異原の選択とその処理方法が望まれる。

突然変異育種においては、2つの言葉、「効果

(effect)」と「効率 (efficiency)」が定義されている (Konzak et al., 1965; Mikaelson et al., 1971; Nilan et al., 1965). 「効果」は変異原の処理量あたりの変異体数であり, それに対し, 「効率」は変異原処理により受ける障害に対する目的とした形質における変異の割合として定義されている. Konzak ら(1965)は, 突然変異育種に使われる変異原の有用性は「効果」の高さによるだけでなく, 「効率」の高さも考慮すべきとしている. それゆえ本研究では, イネ (第1章) およびキク (第2章) を使ってイオンビームの「効率」をガンマ線と比較した.

新しい変異原においては, 従来使われてきた変異原とは異なる変異スペクトルが期待される. イオンビームはガンマ線とは異なる特徴を有することから, これまで得られていない新規変異体の誘発が期待される. そこで, イネ (第1章) およびキク (第2章) を使ってイオンビームとガンマ線の変異スペクトルを比較した.

変異セクターが広いことは, 変異体を効率的に作出するために望ましい. 種子や芽に変異原処理して変異体を得るためには, 照射された種子 ( $M_1$ ) や芽 ( $vM_1$ ) の分裂組織中の変異した細胞から, 後代の種子 ( $M_2$ ) や芽 ( $vM_2$ ) が作られなければならない. 種子 ( $M_1$ ) や芽 ( $vM_1$ ) の細胞に変異が起きても, 変異細胞に由来する変異セクターが狭ければ花や芽が変異セクター上に形成される可能性は小さくなり, それゆえ, 変異体を単離することが難しくなる. そのようなことから, イオンビーム照射後に生じる変異セクターの大きさを, イネ (第1章) およびキク (第4章) を使って, ガンマ線と比較した.

また, イオンビームを実際に利用するにあたっては, 変異体獲得に効果的, 効率的な照射線量に関する情報が必須である. そこで, イネ (第1章), キク (第2章) およびバラ (第3章) を使って, 照射線量と変異率の関係を調査した. さらに, イネを使って最適照射線量とその目安を検討した (第1章).

ガンマ線はこれまで広く使われてきた変異原であり, それにより多くの突然変異品種が作出されてきた. しかしながら, ガンマ線の最適照射線量を実験的に示した報告はない. ガンマ線照射では, 生存率が40%~60%や  $M_1$  実生の生育が30%~50%減少する線量が目安として使われてきた ( $LD_{50}$ ; Anonymous, 1977) が, 目的形質以外の遺伝的背景が変わることを避けるため, それらの目安よりも低い線量が使われるようになってきている (van Harten, 1998). 本研究では, イオンビームと同様に, 変異体を効率的に得るためのガンマ線の照射線量とその目安を検討した (第1章).

ガンマ線の照射線量率も照射の効果に影響を及ぼす重要な要素のひとつであり, 致死 (Broertjies, 1968; Killion and Constantin, 1971; Sripichitt et al., 1988), 生育 (Bottino et al., 1975; Killion and Constantin, 1971; Killion et al., 1971; Yamashita, 1964) や稔性 (Killion and Constantin, 1971; Yamashita, 1964) のような様々な反応に影響を及ぼすことが報告されている. ガンマ線の照射方法には急照射と緩照射の2つがある. 急照射は数分から1日程度の時間で高い線量率で照射する方法であり, 一方, 緩照射は数週間からそれ以上をかけて低線量率で照射する方法である. 緩照射は, 照射による障害が小さい変異体が得られることから, 栄養繁殖性作物における突然変異育種において有効とされている. 我が国では, 緩照射のための照射施設であるガンマフィールドが1961年に開設され, 黒斑病抵抗性のニホンナシ (Sanada et al., 1993) や耐霜性やわい性のシバ (Nagatomi et al., 1998a) の品種が作出されている. しかし, ガンマ線照射による障害の発生程度の点からの, 低線量率での照射の有用性に関するデータはほとんどない. 本研究では, キクを用いて照射線量および照射線量率の花色突然変異の誘発, および照射による障害の指標としての核DNA量への影響について調査し, 線量, 線量率およびそれらの相互作用について検討した (第5章).

## 第1章 イネにおけるイオンビームの変異誘発効果

突然変異育種は, 作物の品種改良に有効な方法のひとつである. 突然変異育種の成功のために, 変異原の選択は重要な要素であるが, これまで主に物理的変異原であるX線やガンマ線が変異誘発に用いられ, 多くの突然変異品種が作出されてきた.

イオンビームは, サイクロトロンにより加速されたイオン粒子である. イオンビームの特徴は, ガンマ線やX線のような低LET放射線と比較して, 高いエネルギーを局所的に, 高密度でターゲットに付与することである (Yang and Tobias, 1979; Tanaka, 1999). この特徴により, イオンビームはガンマ線やX線とは異なる変異誘発効果と, これまでに得られていない新しい変異体の誘発が期待されてきた.

イオンビームによる突然変異の誘発は, 我が国においては1990年代以降, 様々な植物で試みられている. これまでに, シロイヌナズナを使った研究で, イオンビームは高頻度で変異を誘発できること, さらに, 広い



変異スペクトルを示すことが報告され、新規変異体が得られている (Hase et al., 2000; Shikazono et al., 2003; Tanaka et al., 1997; Tanaka et al., 2002). さらに、様々な変異体が観賞植物を中心に多くの作物で獲得されており (Hamatani et al., 2001; Hara et al., 2003; Kanaya et al., 2008; Kazama et al., 2008a; Miyazaki et al., 2002; Miyazaki et al., 2006; Nagatomi et al., 1996; Okamura et al., 2003; Yamaguchi et al., 2003), キク (Nagatomi et al., 1996) やカーネーション (Okamura et al., 2003) ではガンマ線によってそれまで得られていなかった変異体がイオンビームにより誘発されている。

このように、イオンビームはその特徴が次第に明らかにされ、また、新しい変異誘発方法として確立されてきている。しかしながら、突然変異育種のための変異原としての観点からのガンマ線やX線との違いや、実際に使うにあたっての最適線量やその指標については十分には明らかにされていない。

異なる変異原の変異誘発効果を比較、評価するために、「効果」と「効率」の2つが使われる (Konzak et al., 1965; Mikaelson et al., 1971; Nilan et al., 1965)。「効果」は、変異原の処理量あたりの誘発された変異体数と定義され、一方、「効率」は、致死や不稔のような変異原処理時代に現れる障害の程度に対する目的とした形質における変異頻度として定義されている。Konzakら (1965) は、突然変異育種における変異原の有用性は、「効果」だけでなく「効率」にもよると述べている。「効果」については、イオンビームはガンマ線 (Fuji et al., 1966; Mei et al., 1994), X線 (Hirono et al., 1970; Yang and Tobias, 1979) や電子線 (Shikazono et al., 2003) と比べて効果が高いことは示されている。しかし、「効率」についてガンマ線やX線と比較した報告はない。

本実験では、イネ (*Oryza sativa* L.) を用いて、イオンビームの効果と効率、誘発される変異のスペクトルをガンマ線と比較しながら調査した。さらに、イオンビームの最適照射線量とその目安について検討した。

## 材料および方法

イネ品種「ひとめぼれ」を供試した。

玄米を直径6 cmのシャーレに、イオンビームが胚に当たるように胚を上にして貼り付けた。イオンビームは、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のAVFサイクロトロンを用い、220 MeV炭素イオン (平均LET 107 keV $\cdot\mu\text{m}^{-1}$ ) を照射線量10, 20, 30, 40, 50

および60 Gyで、320 MeV炭素イオン (平均LET 76 keV $\cdot\mu\text{m}^{-1}$ ) を20, 40, 60, 80, 100および150 Gyで、100 MeVヘリウムイオン (平均LET 9 keV $\cdot\mu\text{m}^{-1}$ ) を50, 100, 150, 200, 250および300 Gyで照射した。ガンマ線は、農業生物資源研究所放射線育種場のガンマルームを使い、1時間あたり10 Gyの線量率で、照射線量100, 150, 200, 250, 300, 350, 400および450 Gyで初付きの種子に照射した。1回の照射に300~1000粒の種子を使い、220 MeVおよび320 MeV炭素イオンでは4反復、100 MeVヘリウムイオンおよびガンマ線では3反復行った。

各処理から種子100粒を使い、照射による致死への影響を調査した。種子を湿らせたロックウールに播種し、約30℃に4~5日間置いた後、温室に移し、播種3日後における発芽数を調査した。無照射の種子の発芽数を100とした場合の照射処理された種子からの発芽数の割合を生存率とした。なお、無照射の種子の発芽率は、玄米および初付き種子ともに93%以上であった。

220 MeV炭素イオンの10, 20, 30および40 Gy, 320 MeV炭素イオンの20, 40, 60, 80および100 Gy, 100 MeVヘリウムイオンの50, 100, 150, 200および250 Gy, ガンマ線の100, 150, 200, 250および300 Gyで生存した実生 ( $M_1$  個体) は水田で栽培し、9月に各  $M_1$  個体の稈長が最も長い穂から  $M_2$  種子を採種した。

稔性と突然変異は、150個体以上の  $M_1$  個体を扱うことができた処理区を使って調査し、稔実率と突然変異率は、区ごとに算出した。

稔性は、 $M_1$  植物50個体の穂における結実率を調査した。

葉緑素変異は、穂別系統法を用い、各穂から25粒の  $M_2$  種子を播種して調査した。発芽後、発芽した実生の数、葉緑素変異の数とそのタイプを調査した。葉緑素変異は、アルビナ (白, *albina*), キサンタ (黄, *xantha*), ビリディス (淡緑または黄緑, *viridis*), および *striata* (白や黄色の縦縞), や *maculata* (緑や黄色の条斑) などを含めた「その他」の4つに分類した。

Figure 3, Figure 4 および Figure 6 に示した「Mutation frequency per  $M_2$  plant」は、調査した  $M_2$  個体数に対する葉緑素変異体数として求めた。Figure 5 および Figure 7 に示した「Mutation frequency per  $M_1$  plant」は、調査した  $M_1$  個体数に対する、後代 ( $M_2$  植物) において葉緑素変異が現れた  $M_1$  系統の数として求めた。Figure 8 に示した「Number of mutated  $M_1$  plants per sown  $M_1$  seed」は、播種した  $M_1$  種子数に対する、後代 ( $M_2$  植

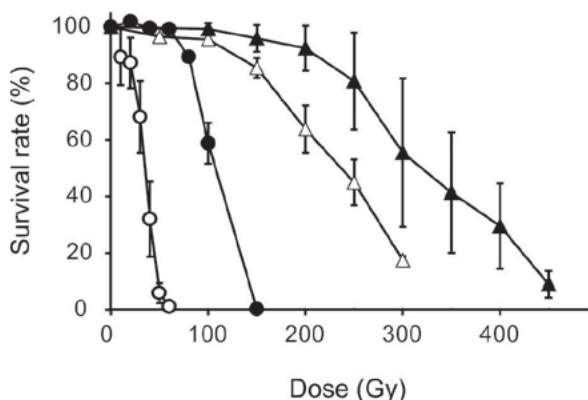
物)において葉緑素変異が現れた  $M_1$  系統の数として求めた。自然突然変異による葉緑素変異の頻度は、無照射の約 49,000 個体を使い評価した。

葉緑素変異の分離頻度は、各穂から 25 粒の  $M_2$  種子を播種し、そのうち 16~25 の  $M_2$  個体が発芽して葉緑素変異を調査できた系統において、発芽した  $M_2$  個体数に対する変異体数として求めた。

## 結 果

### 1) 生存への影響

イオンビームとガンマ線の両者ともに、照射線量-生存率曲線はある線量で肩を示し、それよりも照射線量が高くなると生存率は急減に低下した (Fig. 1)。照射線量-生存率曲線で肩となる線量は、220 MeV 炭素イオンでは 20 Gy、320 MeV 炭素イオンでは 60~80 Gy、100 MeV ヘリウムイオンでは 150 Gy、そしてガンマ線では 200 Gy であった。50% 致死となる線量は、220 MeV 炭素イオンでは 35 Gy、320 MeV 炭素イオンでは 100 Gy、100 MeV ヘリウムイオンでは 240 Gy、そしてガンマ線では 300 Gy であった。このように LET が大きいほど致死への影響が高かった。



**Fig. 1.** Effect of ion beam and gamma ray irradiation on the survival of rice seeds.

Survival rate is expressed as the number of seedlings from the irradiated seeds divided by the number of seedlings from the non-irradiated seeds. ○: 220 MeV carbon ion beam; ●: 320 MeV carbon ion beam; △: 100 MeV helium ion beam; ▲: gamma rays. Vertical bars indicate SE ( $n = 4$  for the 220 and 320 MeV carbon ion beams;  $n = 3$  for the 100 MeV helium ion beam and gamma rays).

### 2) 稔実への影響

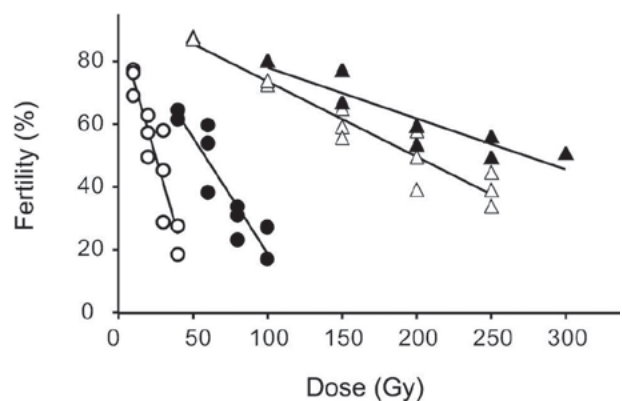
稔実率は、照射線量が高くなるに従って直線的に減少した (Fig. 2)。稔実率への影響も、LET が大きいほど高かった。

### 3) 効 果

効果を評価するため、照射線量と  $M_2$  植物あたり変異頻度の関係を Figure 3 に示した。葉緑素変異頻度は、照射線量が高くなるに従って直線的に増加した。同じ変異頻度を得るために必要な照射線量は、220 MeV 炭素イオン、320 MeV 炭素イオン、100 MeV ヘリウムイオン、ガンマ線の順に高くなった。このように、LET が高いほど変異誘発効果は高くなり、イオンビームのほうがガンマ線よりも高かった。なお、自然突然変異の頻度は、約 0.02% であった。

### 4) 効 率

致死への影響を基準とした効率を評価するため、変異頻度と生存率との関係を調べた。同じ線量で照射しても、照射実験ごとに生存率や変異頻度が異なった (Fig. 1, Fig. 3) ことから、照射実験ごとの生存率と変異頻度をプロットした。



**Fig. 2.** Effect of ion beam and gamma ray irradiation on fertility.

Fertility is determined based on seed set in the panicles of 50  $M_1$  plants selected at random from each lot, which consisted of more than 150  $M_1$  plants derived from  $M_1$  seeds irradiated with each dose on the same day. ○: 220 MeV carbon ion beam,  $y = 90.6 - 1.64x$ ,  $r = -0.918^{***}$ ; ●: 320 MeV carbon ion beam,  $y = 92.6 - 0.738x$ ,  $r = -0.913^{***}$ ; △: 100 MeV helium ion beam,  $y = 97.6 - 0.240x$ ,  $r = -0.959^{***}$ ; ▲: gamma rays,  $y = 94.2 - 0.162x$ ,  $r = -0.896^{**}$ . \*\* and \*\*\* Significant at 1% and 0.1% levels, respectively.

$M_2$  植物あたりの変異頻度は、照射線量が高くなることで生存率が低下するのに伴って増加した (Fig. 4).  $M_2$  植物あたりの変異頻度と生存率との関係は直線的ではなかった. 生存率が 100% から 90% に低下する範囲では、変異頻度は著しく増加した. 一方、生存率が 90% 以下となる範囲では照射線量を高くしても変異頻度の増加は緩やかであった. そのため、生存率が 70% および 90% となる時の変異頻度を比較した. 生存率 90% における変異頻度は、3つのイオンビームともに、 $M_2$  植物あたりの変異頻度は約 1.7% であった. 一方、ガンマ線ではイオンビームよりも低く、約 1.0% であった. 生存率 70% における変異頻度は、320 MeV 炭素イオンで最も高く 2.0% で、以下、100 MeV ヘリウムイオンで 1.9%、220 MeV 炭素イオンで 1.8%、ガンマ線で 1.3% の順であった.

$M_1$  植物あたりの変異頻度と生存率との関係は、 $M_2$  植物あたりの変異頻度と同様であった (Fig. 5). 生存率 90% における  $M_1$  植物あたりの変異頻度は、320 MeV 炭素イオンで最も高く 9.5%、以下、220 MeV 炭素イオンで 9.3%、ガンマ線で 8.4%、100 MeV ヘリウムイオンで 8.1% であった. 生存率 70% においては、100 MeV ヘリウムイオンで最も高く 10.2%、次いで 220 MeV 炭素イオンで 9.3%、320 MeV 炭素イオンで 8.1%、ガンマ線で 6.6%

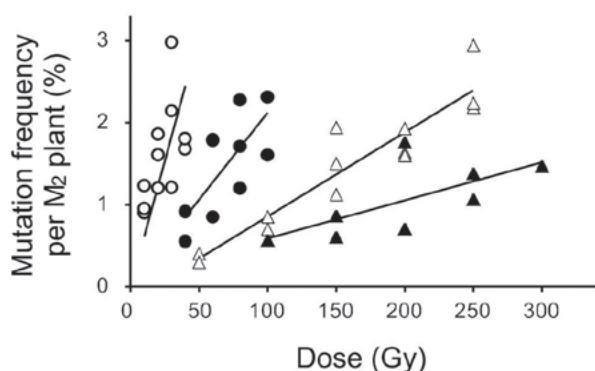


Fig. 3. Effect of ion beam and gamma ray irradiation on mutation induction.

The mutation frequency is determined as the number of chlorophyll mutants divided by the number of  $M_2$  plants investigated, using the  $M_1$ -plant progeny method. ○: 220 MeV carbon ion beam,  $y = 0.876 + 0.0305x$ ,  $r = 0.563$ ; ●: 320 MeV carbon ion beam,  $y = 0.145 + 0.0193x$ ,  $r = 0.696$ ; △: 100 MeV helium ion beam,  $y = -0.171 + 0.0103x$ ,  $r = 0.934^{**}$ ; ▲: gamma rays,  $y = 0.124 + 0.00464x$ ,  $r = 0.685$ . \*\* Significant at 1% level.

であった.

これらの結果から、生存率を基準とした効率は、イオンビームのほうがガンマ線よりも高いことが示唆された. また、生存率を基準とした効率のイオンビームとガンマ線との差異は、 $M_2$  植物あたりの変異頻度の場合のほうが  $M_1$  植物あたりの変異頻度の場合と比較してわず

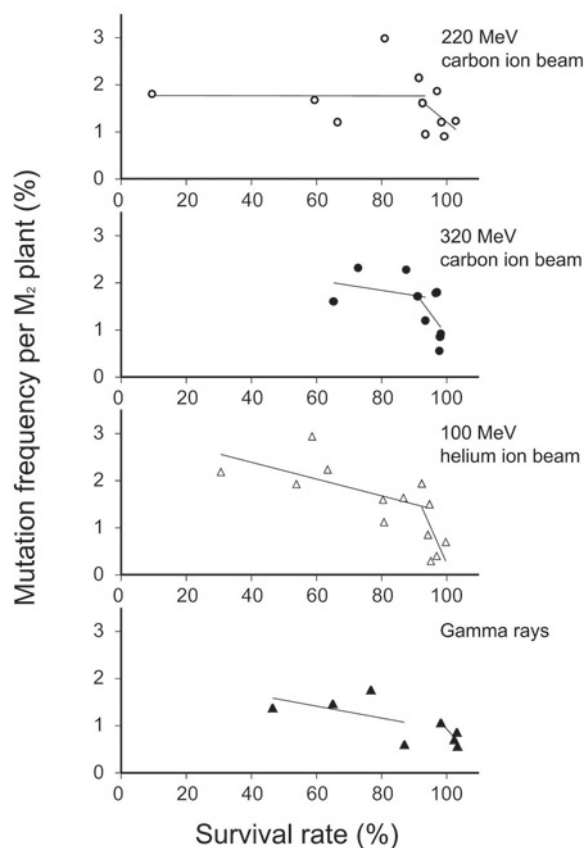


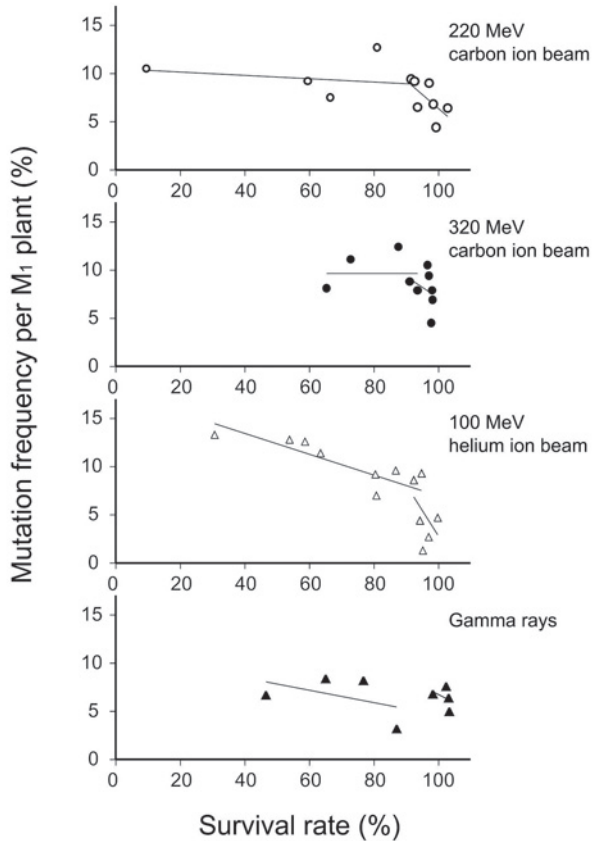
Fig. 4. Relationship between survival rate and mutation frequency.

The mutation frequency is determined as the number of chlorophyll mutants divided by the number of  $M_2$  plants investigated, using the  $M_1$ -plant progeny method. Survival rate is expressed as the number of seedlings from irradiated seeds divided by the number of seedlings from the non-irradiated seeds. The regression lines are calculated in the range of 60%–95% survival and 90%–105% survival individually. 220 MeV carbon ion beam,  $y = 1.77 - 0.0001x$ ,  $r = -0.005$  (for 60%–95% survival) and  $y = 6.91 - 0.057x$ ,  $r = -0.496$  (for 90%–105% survival); 320 MeV carbon ion beam,  $y = 2.70 - 0.011x$ ,  $r = -0.280$  (for 60%–95% survival) and  $y = 10.2 - 0.093x$ ,  $r = -0.492$  (for 90%–105% survival); 100 MeV helium ion beam,  $y = 3.1 - 0.018x$ ,  $r = -0.635^*$  (for 60%–95% survival) and  $y = 15.8 - 0.156x$ ,  $r = -0.614$  (for 90%–105% survival); gamma rays,  $y = 2.18 - 0.013x$ ,  $r = -0.445$  (for 60%–95% survival) and  $y = 8.36 - 0.074x$ ,  $r = -0.825$  (for 90%–105% survival). \* Significant at 5% level.



かながら明瞭であった。

稔実率への影響を基準とした効率を評価するため、変異頻度と稔実率との関係を調査した。稔実率も、生存率や変異頻度と同様に照射実験ごとに異なった (Fig. 2) ことから、照射実験ごとに稔実率と変異頻度をプロット

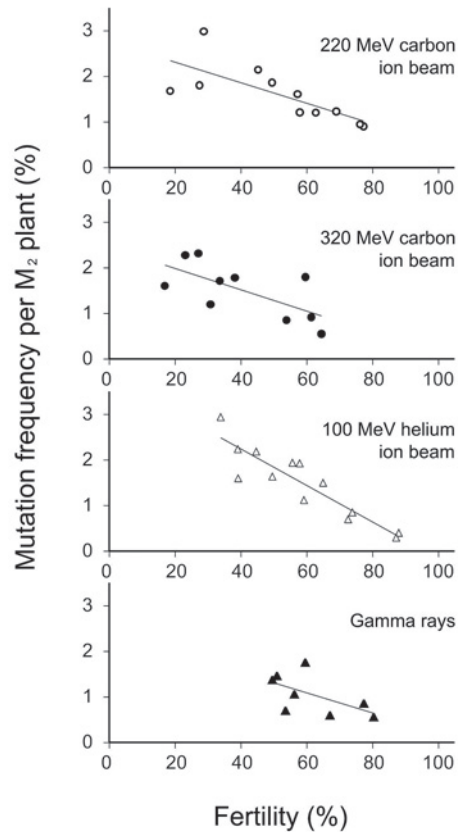


**Fig. 5.** Relationship between survival rate and mutation frequency per  $M_1$  plant.

The mutation frequency is determined as the number of chlorophyll mutants divided by the number of  $M_1$  plants investigated, using the  $M_1$ -plant progeny method. Survival rate is expressed as the number of seedlings from irradiated seeds divided by the number of seedlings from the non-irradiated seeds. The regression lines are calculated in the range of 60%–95% survival and 90%–105% survival individually. 220 MeV carbon ion beam,  $y = 10.5 - 0.0173x$ ,  $r = -0.259$  (for 60%–95% survival) and  $y = 35.4 - 0.290x$ ,  $r = -0.636$  (for 90%–105% survival); 320 MeV carbon ion beam,  $y = 9.84 - 0.0249x$ ,  $r = -0.019$  (for 60%–95% survival) and  $y = 30.2 - 0.23x$ ,  $r = -0.350$  (for 90%–105% survival); 100 MeV helium ion beam,  $y = 17.8 - 0.108x$ ,  $r = -0.819^*$  (for 60%–95% survival) and  $y = 55.9 - 0.531x$ ,  $r = -0.424$  (for 90%–105% survival); gamma rays,  $y = 11.1 - 0.0644x$ ,  $r = -0.465$  (for 60%–95% survival) and  $y = 23.8 - 0.171x$ ,  $r = -0.375$  (for 90%–105% survival). \* Significant at 5% level.

した (Fig. 6, Fig. 7). 稔実率と  $M_2$  植物あたりの変異頻度には負の直線関係が見られ、3種のイオンビームでは稔実率の低下により  $M_2$  植物あたりの変異頻度は有意に増加した (Fig. 6). ガンマ線では有意ではなかったものの、同様の傾向がみられた。稔実率が60%となる時の変異頻度は、220 MeV 炭素イオンと100 MeV ヘリウムイオンでは1.4%, 320 MeV 炭素イオンとガンマ線では1.1%であった。

稔実率と  $M_1$  植物あたりの変異頻度にも負の直線関係がみられた (Fig. 7). 220 MeV 炭素イオン、100 MeV ヘリウムイオンおよびガンマ線では稔実率の低下により

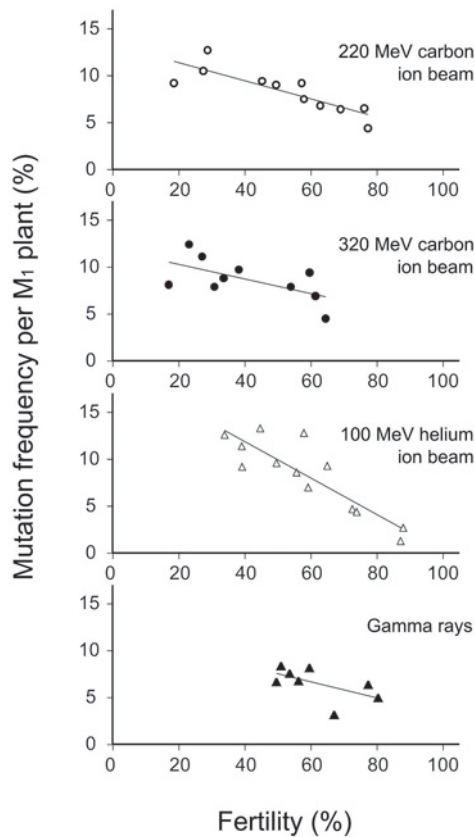


**Fig. 6.** Relationship between fertility and mutation frequency per  $M_2$  plant.

The mutation frequency is determined as the number of chlorophyll mutants divided by the number of  $M_2$  plants investigated, using the  $M_1$ -plant progeny method. Fertility is based on seed set in panicles of the longest culm in 50  $M_1$  plants selected at random in each treatment. 220 MeV carbon ion beam,  $y = 2.76 - 0.0225x$ ,  $r = -0.743^{**}$ ; 320 MeV carbon ion beam,  $y = 3.23 - 0.0383x$ ,  $r = -0.644^*$ ; 100 MeV helium ion beam,  $y = 3.84 - 0.0400x$ ,  $r = -0.911^{**}$ ; gamma rays,  $y = 2.41 - 0.022x$ ,  $r = -0.587^*$  and  $**$  Significant at 5 and 1% levels, respectively.

M<sub>1</sub> 植物あたりの変異頻度は有意に増加した。稔実率が60%となるときの変異頻度は、100 MeV ヘリウムイオンで最も高く8.0%, 次いで220 MeV 炭素イオンで7.5%, 320 MeV 炭素イオンで7.2%, ガンマ線では6.7%であった。

このように、稔実率を基準とした場合に、イオンビームの変異頻度はガンマ線よりも高く、稔実率を基準とした効率はイオンビームのほうがガンマ線よりも高いことが示された。また、生存率を基準とした効率の場合と同様に、稔実率を基準とした効率のイオンビームとガンマ線との差異も、M<sub>2</sub> 植物あたりの変異頻度の場合のほう



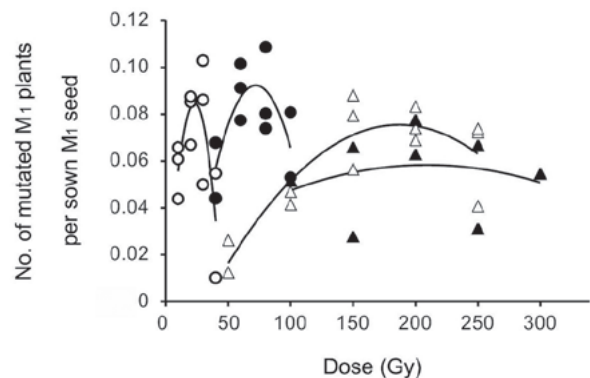
**Fig. 7.** Relationship between fertility and mutation frequency per M<sub>1</sub> plant.

The mutation frequency is determined as the number of chlorophyll mutants divided by the number of M<sub>1</sub> plants investigated, using the M<sub>1</sub>-plant progeny method. Fertility is based on seed set in panicles of the longest culm in 50 M<sub>1</sub> plants selected at random in each treatment. 220 MeV carbon ion beam,  $y = 13.3 - 0.0963x$ ,  $r = -0.842^{**}$ ; 320 MeV carbon ion beam,  $y = 11.9 - 0.0778x$ ,  $r = -0.618$ ; 100 MeV helium ion beam,  $y = 19.6 - 0.194x$ ,  $r = -0.875^{**}$ ; gamma rays,  $y = 11.8 - 0.0856x$ ,  $r = -0.587$ . \* and \*\* Significant at 5 and 1% levels, respectively.

が M<sub>1</sub> 植物あたりの変異頻度の場合と比較してわずかながら明瞭であった。

### 5) 最適照射線量

照射に供試した種子から最も多くの変異体を得るために最適な線量を、照射線量と播種した M<sub>1</sub> 種子あたりの変異体数の関係から明らかにした (Fig. 8). イオンビーム、ガンマ線ともに播種した M<sub>1</sub> 種子あたりの変異体数は、ある照射線量で最大となり、それよりも高い照射線量では減少した。照射線量と播種した M<sub>1</sub> 種子あたりの変異体数の関係に2次曲線をあてはめ、播種した M<sub>1</sub> 種子あたりの変異体数が最も高くなる線量と変異体数を求めると、220 MeV 炭素イオンでは22 Gyで0.085個体、320 MeV 炭素イオンでは73 Gyで0.094個体、100 MeV ヘリウムイオンでは187 Gyで0.076個体、ガンマ線では209 Gyで0.058個体であった。播種した M<sub>1</sub> 種子あたりの変異体数が最も高くなった線量は、3種のイオンビームとガンマ線のいずれにおいても、生存率曲線において肩となる線量に相当した (Fig. 1). また、播種した M<sub>1</sub> 種子あたりの変異体数の最大値は、3種のイオンビームのほうがガンマ線よりも高かった。



**Fig. 8.** Relationship between irradiation dose and the number of mutated M<sub>1</sub> plants per sown M<sub>1</sub> seed.

The number of mutated M<sub>1</sub> plants per sown M<sub>1</sub> seed is determined as the number of M<sub>1</sub> plants that produced chlorophyll mutants in their progeny (M<sub>2</sub> plant) divided by the number of sown M<sub>1</sub> seeds sown after irradiation. ○: 220 MeV carbon ion beam,  $y = -0.696 + 0.780x - 0.0174x^2$ ,  $r = 0.732^*$ ; ●: 320 MeV carbon ion beam,  $y = -8.52 + 0.493x - 0.0034x^2$ ,  $r = 0.726^*$ ; △: 100 MeV helium ion beam,  $y = -3.462 + 0.118x - 0.000315x^2$ ,  $r = 0.869^{***}$ ; ▲: gamma rays,  $y = 1.83 + 0.0383x - 0.0000916x^2$ ,  $r = 0.218$ . \* and \*\*\* Significant at 5% and 0.1% levels, respectively.

## 6) 葉緑素変異のスペクトル

イオンビームとガンマ線の両方で、アルビナ、キサント、ビリディスやスタリナ、マクラータなどが誘発された。両方で照射線量にかかわらず、アルビナの頻度が最も高く、次いでビリディスであった (Fig. 9)。各イオンビームおよびガンマ線ごとに合計した場合のアルビナの相対出現頻度は約 50%，一方、キサントは 8～15%，ビリディスは 25～30%，その他は 8～13%であった (Fig. 10)。このように、各葉緑素変異のタイプの相対出現頻度には、イオンビームとガンマ線とで違いはなかった。

## 7) 分離頻度

3種のイオンビームとガンマ線で、照射線量が高くなるに従って、高い分離頻度を示す系統の数が増加した (Fig. 11)。その結果、分離頻度の平均値は、照射線量の増加にともない高くなった。イオンビーム照射による分離頻度はガンマ線よりも高い傾向がみられ、ガンマ線

では照射線量が 200～300 Gy の範囲では分離頻度は 0.17 だったのに対し、220 MeV 炭素イオンでは 20～40 Gy の範囲で 0.19～0.20、320 MeV 炭素イオンでは 60～100 Gy の範囲で 0.18～0.20、100 MeV ヘリウムイオンでは 100～250 Gy の範囲で 0.16～0.20 であった。

## 考 察

稔実率を基準とした場合のイオンビームの変異頻度は、ガンマ線と同等か高かった。致死を基準とした場合には、イオンビームの変異頻度はガンマ線よりも高かった。さらに、播種した  $M_1$  種子あたりの変異体数は生存率にほとんど影響しない照射線量で最高値を示したが、その値はイオンビームのほうがガンマ線よりも高かった。この結果も、致死を基準とした効率が、イオンビームのほうがガンマ線よりも高いことを示している。これらのことから、イオンビームの「効率」は、ガンマ線と同等かそれ以上であることが示された。

Ekberg (1969) は、オオムギにおいて電離放射線 (中性子線と X 線) による不稔の 82% は主に染色体異常 (転座と逆位) により引き起こされることを報告している。さらに、劣性突然変異により引き起こされる不稔は  $M_2$  世代でなければ現れない。それゆえ、イオンビームやガンマ線照射によりみられた不稔は、おそらく中性子線や X 線による場合と同様に、主に染色体異常によるものと考えられる。従って、稔実率を基準とした効率が高いこ

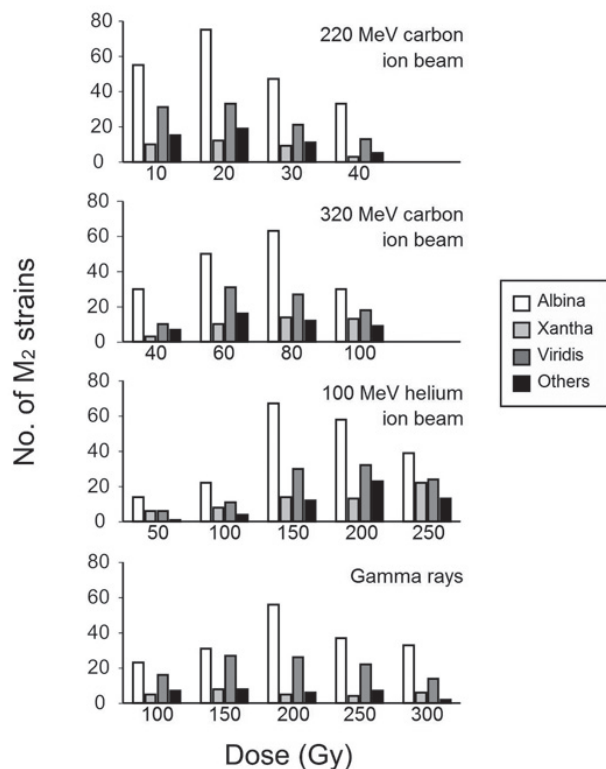


Fig. 9. Frequency distribution of the different types of chlorophyll mutants induced by ion beam and gamma ray irradiation.

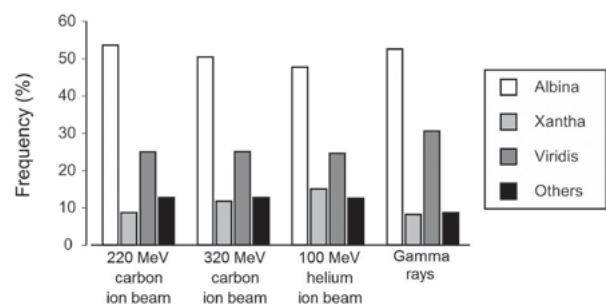


Fig.10. Frequency of the different types of chlorophyll mutants induced by ion beam and gamma-ray irradiation.

The frequency is determined as the number of each type of chlorophyll mutants divided by the total number of chlorophyll mutants induced each radiation type.

とは、染色体異常の程度に対して変異頻度が高いと考えられる。また、Yang and Tobias (1979) は、突然変異の誘発に必要な遺伝的損傷を与える照射をしたときに、ガンマ線は高 LET の放射線と比べて細胞により大きな影響を及ぼすことから、イオンビームはガンマ線よりもより高い効率で生育に障害の少ない変異体を誘発できる可能性を示唆している。これらのことから、イオンビームでは照射によるダメージが小さい変異体を効率的に誘発できると考えられる。

転座や逆位は次世代にある程度は伝達し (Ekberg, 1969)、後代に不稔を引き起こす。従って、種子繁殖性作物では  $M_1$  世代においても不稔の発生が少ないことが望まれる。栄養繁殖性作物では照射当代における変異体が直接品種として使われることから、染色体異常がより小さいことが望ましい。これらの理由から、稔実率を基準とした効率が高い変異原が、有用な変異体獲得のためにより良いと考えられる。

一方、照射線量と変異頻度との関係は、イオンビームではガンマ線よりも低線量での照射で同じ変異頻度で変異体を得ることができること、すなわち、イオンビームにおける照射線量あたりの変異頻度と定義される「効果」が、ガンマ線よりも高いことを示しており、このことは既報 (Fujii et al., 1966; Mei et al., 1994) と一致した。

イオンビームとガンマ線の変異頻度は、 $M_2$  植物あたりの変異頻度と比較して  $M_1$  植物あたりの変異頻度では差が小さかった。この原因として、照射後の茎頂分裂組織における始原細胞数がイオンビームとガンマ線では異なる、すなわち、後述するように、イオンビーム照射後の始原細胞数は、ガンマ線照射よりも少なかった可能性が考えられる。始原細胞ひとつあたりの変異頻度がイオンビームとガンマ線とで同じであっても、始原細胞数が多いと  $M_1$  植物あたりの変異頻度の期待値は高くなる。このような理由から、変異誘発効果は、変異原処理後の始原細胞数の影響を受けない、 $M_2$  植物あたりの変異頻度を用いて比較すべきである。

Kawai は、イネにおいて遺伝的に異なる多くの種類の変異体を獲得するために、生育初期に発生した穂から  $M_2$  種子を採種することを勧めている (qtd. in van Harten, 1998)。Osone (1963) は、主稈の穂は発生学的に胚の内体の始原細胞に由来し、それは5ないし6の細胞からなることを報告している。従って、始原細胞に変異が起きた場合、主稈の穂はキメラになり、それゆえ  $M_2$  種子における葉緑素変異の分離頻度は0.25よりも小さくなる (Osone, 1963)。本実験では、各  $M_1$  植物から主稈であると考えられる稈長が最も長い穂から  $M_2$  種子を採種し、変異体の分離頻度の平均値はすべての照射処

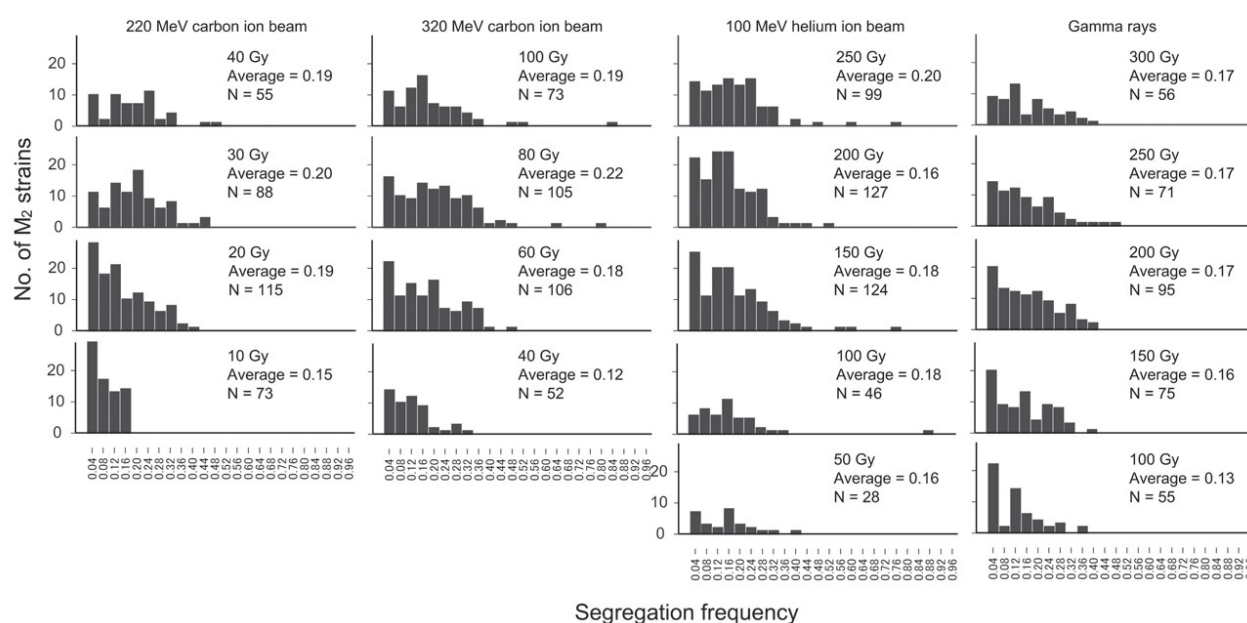


Fig.11. Frequency distribution of segregation frequency of chlorophyll mutants induced by ion beam and gamma ray irradiation.



理において0.25よりも小さかった。

照射線量を高くすると、高い分離頻度を示した系統の数が増加した。分離頻度は、穂の中で変異細胞に由来する部分の割合、すなわち、変異セクターの広さを示している。照射線量を高くしたときに、始原細胞の数が増加することなしに変異細胞由来の部分が広がる可能性は低い。分離頻度が高い系統の増加は、Yamaguchi (1962) や Osoné (1963) によっても議論されているように始原細胞数の減少によるものと考えられる。

本実験で得られたイオンビームでの分離頻度はガンマ線よりも高いという結果は、イオンビーム照射後の始原細胞数がガンマ線のそれよりも少ないことを示している。このような違いをもたらした原因は、イオンビームはLETが高いことから大きなダメージを引き起こすこと、加えて、細胞を通過するイオン粒子数がガンマ線の数と比較して少ない (Tanaka, 1999) ことかもしれない。イオンビームを低線量で照射しても、照射された茎頂分裂組織には大きなダメージを受けて死んだ細胞と、ダメージが小さい、あるいはダメージを受けていない細胞が混在するのに対し、ガンマ線では染色体の多くの箇所を通り、斉一に照射される (Yang and Tobias, 1979) ため、始原細胞間ではダメージの程度に大きな差がないことが予想される。それにより、照射線量が高い場合にはほとんどすべての始原細胞が死に、照射線量が低い場合にはほとんどすべての細胞が生存すると思われる。このようなイオンビームとガンマ線との違いが、照射後の始原細胞の数の違いをもたらすと考えられる。

突然変異育種においては、変異を見つけ、その後キメラを解消して変異体を作成するために、変異セクターが広いことは有用である。この点において、イオンビームのほうがガンマ線よりも優れていることが示された。

新しい変異原には、従来使われてきた変異原とは変異スペクトルが異なることが期待される。イオンビームにより誘発された葉緑素変異の各タイプの相対出現頻度はガンマ線と同様で、アルピナの頻度が最も高く、次いでピリディスであり、このように葉緑素変異のスペクトルには、イオンビームとガンマ線とは有意な差はみられなかった。イネでは、同様の相対出現頻度が、ガンマ線 (Ando, 1968; Yamaguchi, 1962)、X線 (Matsuo et al., 1958)、そして熱中性子線 (Matsuo et al., 1958; Yamaguchi, 1962) で見られている。さらにオオムギでも、ガンマ線 (Doll and Sandfaer, 1969)、X線 (Gustafsson, 1969)、そして中性子線 (Gustafsson, 1969) で同様の結果が得られている。それに対し、化学変異原

であるエチレンオキサイド (ethylene oxide) を処理されたオオムギでは、放射線の場合と異なり、ピリディスの頻度がアルピナより高かった。これらの結果は、各葉緑素変異の相対出現頻度は放射線と化学変異原とは異なるが、放射線の種類による違いはないことを示唆している。

葉緑素突然変異のスペクトルには、イオンビームとガンマ線とで差がなかった。Naito ら (2005) は、高LET放射線である炭素イオンビームと低LET放射線であるガンマ線の両者とも、照射線量にかかわらず大きな欠失を作ることを示したが、そのほとんどは後代に伝達しないと推測している。本研究では、スペクトルはM<sub>2</sub>世代と比較しており、後代に伝達した欠失による変異のみを比較している。このことにより、放射線の種類や照射線量の間でスペクトルに違いがなかったのかもしれない。キク (Nagatomi et al., 1996) やカーネーション (Okamura et al., 2003) では、イオンビームによってガンマ線では得られなかった花色変異体を得られたことが報告されている。Naito ら (2005) は、栄養繁殖性植物においては非伝達性の突然変異も世代を超えて残り、栄養繁殖性作物の遺伝的改良に貢献しているだろうと述べている。キクやカーネーションのような栄養繁殖性作物においては伝達性の変異と非伝達性の変異の両者が検出できることから、イオンビームとガンマ線とでスペクトルの違いが現れたのかもしれない。変異スペクトルの違いを明らかにするためにはさらなる調査が必要であり、多くの作物での様々な形質を対象とした突然変異育種の結果から明らかになっていくと思われる。

イオンビームを実際に使うにあたっては、照射線量の目安が必要である。最適照射線量に関しては、我々の知る限りでは、ガンマ線に関しても実験的に示されていない。それゆえ本研究では、照射し播種された種子から最大の突然変異系統を得るという観点から、イオンビームとガンマ線の両者で適当な照射線量について検討した。その結果、照射された種子あたりの変異体数は、イオンビームとガンマ線の両者において生存率曲線の肩となる線量でもっとも高くなった。肩となる線量における照射では、生存率はおおよそ90%であり、生存にほとんど影響しない。本研究の結果は、そのような低い線量での照射で、十分に効率よく変異体が獲得できることを示している。ガンマ線照射では、生存率40%~60%やM<sub>1</sub>実生の生育が30%~50%減少する線量が目安とされて使われてきたが、現在では、遺伝的背景の大きな変化を避けるためにそれらの目安よりも低い線量が使われてきて

いる (van Harten, 1998). 生存率曲線の肩となる線量は、ガンマ線の従来の照射線量の目安とされてきた 50% 致死線量よりも低い。従って、肩となる線量は、遺伝的背景を大きく変えることなく、特定の形質だけが改変した有用な変異体を効率良く獲得するための照射の目安として適していると考えられる。

## 第2章 キクにおけるイオンビームの変異誘発効果および核 DNA 量に及ぼす影響

キクは、世界中で広く栽培されている花きである。突然変異育種はキクの品種改良において重要な方法のひとつであり、これまでに多くの突然変異品種が、自然突然変異 (枝変わり) やガンマ線、X 線の利用による人為誘発変異によって作出されている。

我が国においては、1990 年代以降、サイクロトロンにより加速されたイオン粒子からなるイオンビームが突然変異の誘発に使われている。イオンビームは、高い線エネルギー付与 (LET) を持ち、そのため、ガンマ線や X 線のような LET が小さい放射線と比較して高い生物効果を有する。シロイヌナズナを用いた実験により、イオンビームは高い頻度で変異を誘発することや、イオンビームにより新しい変異体が獲得され広い変異スペクトルを有することが示されている (Hase et al., 2000; Shikazono et al., 2003; Tanaka et al. 1997b; Tanaka et al., 2002)。近年では、カーネーション (Okamura et al., 2003; Sugiyama et al., 2008a)、シクラメン (Sugiyama et al., 2008b)、ダリア (Hamatani et al., 2001)、デルフィニウム (Chinone et al., 2008)、リモニウム (Chinone et al., 2008)、ラン (Affrida et al., 2008)、オステオスペルマム (Iizuka et al., 2008)、ペチュニア (Miyazaki et al., 2002)、バラ (Hara et al., 2003; Yamaguchi et al., 2003)、トレニア (Miyazaki et al., 2006; Sasaki et al., 2008)、およびバーベナ (Kanaya et al., 2008) などの花きを中心に、様々な植物でイオンビームによる変異誘発が行われてきている。

キクにおいてもイオンビームを利用した変異誘発が試みられている (Furutani et al., 2008; Nagatomi et al., 1998b; Shirao et al., 2007; Suzuki et al., 2005; Ueno et al., 2005; Wakita et al., 2008; Watanabe et al., 2008)。その中でガンマ線では得られなかった花色変異体が得られ (Nagatomi et al., 1998b)、新しい花色 (Nagatomi et al., 2003) や側芽の発生が少ない突然変異品種 (Ueno et al., 2005) が開発されている。このように、イオンビームは

キクの突然変異育種に有効な方法となっている。

放射線照射により突然変異が誘発されるが、同時に照射による障害も引き起こされる。Konzak ら (1965) は、変異原の選択・利用には、変異誘発効果だけでなく染色体異常のような照射によって引き起こされる障害の発生についても考慮すべきであるとしている。キクでは、ガンマ線や X 線の照射によって染色体数が減ることが報告されている (Dowrick and El-Bayoumi, 1966; Ichikawa et al., 1970)。そのような染色体数の減少に伴い花序が小さくなる (Ichikawa et al., 1970) ことから、キクの経済品種の育成においては染色体数の減少は一般に望ましくない。それゆえ、キクの突然変異育種においては変異頻度だけでなく、照射による障害も考慮する必要がある。

核 DNA 量はフローサイトメトリーによって容易に測定ができる。それにより、バナナ (Roux et al., 2003)、ライグラス (Barker et al., 2001) やライ麦の染色体添加系統 (Bashir et al., 1993; Pfosser et al., 1995) では、染色体 1 本の増減を検出できることが報告されている。さらに Yamaguchi ら (2008) は、キクの核 DNA 量はガンマ線の照射線量や線量率の影響を受け、放射線照射による障害の指標として利用できることを示している。

本実験では、キクにおけるイオンビーム照射の変異誘発効果と、照射による障害の指標として核 DNA 量に及ぼす影響を調査した。さらに、誘発される花色変異のスペクトルをガンマ線と比較した。

## 材料および方法

### 1) 植物材料

キク品種 '太平' (*Chrysanthemum morifolium*) を供試した。

### 2) 照射と組織培養

キクの無菌植物から葉片を 10 × 5 mm の大きさに切り出し、6 cm のシャーレ内に調製した 1 mg · L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BA), 0.2 mg · L<sup>-1</sup> 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 2% スクロースおよび 0.9% 寒天から構成される MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) (pH 5.8) に置床し、シャーレをポリイミド製フィルムで覆った。

置床 3 ~ 4 日後に、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の AVF サイクロトロンを用い、220 MeV 炭素イオン (LET 107 keV · μm<sup>-1</sup>) を照射線量 1, 2, 3 および 5 Gy で、320 MeV 炭素イオン (LET 76 keV · μm<sup>-1</sup>) を

1, 2, 3 および 5 Gy で、そして 100 MeV ヘリウムイオン (LET 9 keV $\cdot\mu\text{m}^{-1}$ ) を 2, 5, 10 および 15 Gy で照射した。ガンマ線は、農業生物資源研究所放射線育種場のガンマルームで、1時間あたり 10 Gy の線量率で、照射線量 10, 20, 30 および 40 Gy で照射した。

照射後、葉片を 100 mL 容のコニカルビーカー内に調製した 1 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  BA, 0.2 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 2% スクロースおよび 0.9% 寒天を添加した MS 培地 (pH 5.8) に移植し、カルス誘導し、さらにその 17 または 18 日後に、再分化させるため、100 mL 容のコニカルビーカー内に調製した 1 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  BA, 0.1 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  NAA, 2% スクロースおよび 0.9% 寒天を添加した MS 培地 (pH 5.8) に移植した。

### 3) 再分化率

再分化率は、再分化培地に移植後、6週間後に調査した。照射処理は、1処理あたり 60～100 葉片を用いて、220 MeV および 320 MeV 炭素イオン、100 MeV ヘリウムイオンでは 4 反復、ガンマ線では 5 反復行った。再分化率は、照射した葉片数に対する、1 本以上のシュートの再分化がみられた葉片の割合として求めた。

### 4) 花色変異

ひとつの変異細胞に由来するシュートを重複して取らないよう、ひとつの葉片からひとつのシュートのみを取った。それらを 100 mL 容のコニカルビーカー内に調製した 1% スクロースおよび 0.9% 寒天を添加した MS 培地 (pH 5.8) に植え付け、発根後順化し、6月に圃場に定植し栽培した。11月に Table 1 に示したように各照射処理 128～399 個体について、花色変異を調査した。花色変異頻度は、調査した植物に対する変異体数の割合として求めた。

### 5) フローサイトメトリーによる解析

核 DNA 量は、フローサイトメトリーにより Yamaguchi ら (2008) の方法に従って測定した。エンドウ (*Pisum sativum* cv. 成駒三十日) を内部標準として用い、測定材料の核 DNA 量は、材料のピークとエンドウのピークの位置を比較して求めた。異なる 2 枚の葉を使い、それぞれ異なる日に測定した。対照には挿し芽により維持しているキクを用い、各測定日の最初と最後、および約 10 回の材料測定ごとに 1 回測定した。相対核 DNA 量は、対照の核 DNA 量に対する調査材料の核 DNA 量の比として表した。測定には、220 MeV 炭素イオンの 1, 2 および 3 Gy, 320 MeV 炭素イオンの 2,

3 および 5 Gy, 100 MeV ヘリウムイオンの 2, 5 および 10 Gy, ガンマ線の 10, 20 および 30 Gy を照射した葉片からの再分化植物 50 個体を用いた。対照には無照射の葉片からの再分化植物を用いた。

### 6) 植物体の大きさ

核 DNA 量と葉や花序の大きさとの関係を調査するために、220 MeV 炭素イオンおよびガンマ線照射葉片由来の再分化植物から、相対核 DNA 量が 0.94～1.01 で葉や花の形が原品種 '大平' とほぼ同じである 38～48 個体を使った。挿し木により維持している無照射植物を対照とした。

6月に各再分化植物から 4 つの挿し芽発根苗を育成し、4 つのブロックに各 1 個体ずつ乱塊法により植え付けた。7日後にピンチし、3本の側芽を伸長させた。自然日長下で栽培し、摘蕾し頂花のみを開花させた。11月に、1個体あたり 3本のシュートについて、最も大きい葉の長さおよび幅と花序の直径を測定した。

## 結果

### 1) 再分化への影響

本実験で用いた照射線量の範囲では、イオンビームもガンマ線もカルス形成には影響しなかった。しかしながら、照射線量が高くなるとカルスからの再分化率は低下した (Fig. 12)。再分化率が 50% となる線量は、220 MeV 炭素イオンでは 3 Gy, 320 MeV 炭素イオンでは 5 Gy, 100 MeV ヘリウムイオンでは 10 Gy, ガンマ線では 25 Gy であった。このように、再分化への影響は LET が高くなるに従って大きくなった。

### 2) 核 DNA 量への影響

無照射の葉片からの再分化植物の相対核 DNA 量は 0.98 から 1.03 であり、平均値は 1.00 であった (Fig. 13)。それに対し、照射された葉片からの再分化植物には、核 DNA 量が減少した個体がみられた。最も減少した個体の相対核 DNA 量は 0.92 で、対照と比較して 8% 減少した。これは、キクの染色体数 54 本のうちの約 4 本の減少に相当する。

本実験におけるすべての照射処理で、相対核 DNA 量が 0.97 以下、すなわち無照射の葉片からの再分化植物における相対核 DNA 量以下となった個体の数は、無照射と比較して有意に増加し ( $\chi^2$  独立性の検定,  $P < 0.01$ )、平均値は有意に減少した (Kruskal-Wallis 検定,



$P < 0.01$ ). このように、照射処理によりキクの核 DNA 量は減少した。

照射線量が核 DNA 量に及ぼす影響は、3種類のイオンビームとガンマ線とで異なった。320 MeV 炭素イオン、100 MeV ヘリウムイオン、およびガンマ線では、相対核 DNA 量が 0.97 以下となった植物の数は、照射線量が増加するに従って有意に増加し ( $\chi^2$  独立性の検定, 100 MeV ヘリウムイオンおよびガンマ線,  $P < 0.01$ ; 320 MeV 炭素イオン,  $P < 0.05$ ), 平均値は有意に減少した (Kruskal-Wallis 検定,  $P < 0.01$ ). それに対し, 220 MeV 炭素イオンでは、照射線量が高くなっても核 DNA 量の平均値は減少せず, 0.97 以下の個体数も増加しなかった。

3種類のイオンビームとガンマ線において、核 DNA 量に及ぼす照射の影響の差異を明らかにするため、再分化率がおよそ 50% となる照射線量: 220 MeV 炭素イオンの 3 Gy, 320 MeV 炭素イオンの 5 Gy, 100 MeV ヘリウムイオンの 10 Gy, ガンマ線の 20 Gy における核 DNA 量を比較した。220 MeV 炭素イオン 3 Gy とガンマ線 20 Gy では、相対核 DNA 量の平均値は 0.98 で、0.97 以下となった系統の数は、50 個体中それぞれ 23 個体および 21 個体であった。それに対し、320 MeV 炭素イオンの 5 Gy と 100 MeV ヘリウムイオンの 10 Gy 照射で

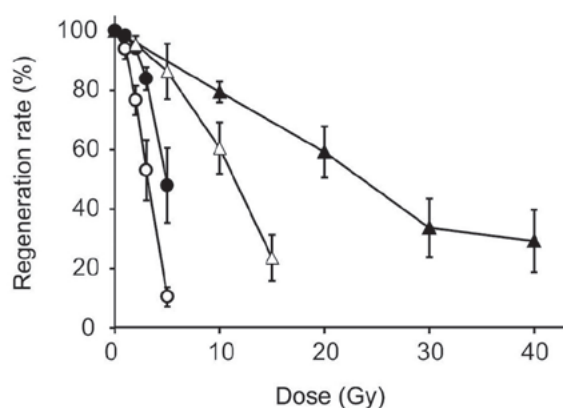
は平均値は 0.96 で、0.97 以下となった系統の数はそれぞれ 38 個体および 41 個体であった。このように、320 MeV 炭素イオンと 100 MeV ヘリウムイオンの核 DNA 量に及ぼす影響は、220 MeV 炭素イオンとガンマ線よりも大きかった。

### 3) 核 DNA 量と植物の大きさ

220 MeV 炭素イオンとガンマ線照射により得られた植物における核 DNA 量と葉長との間には有意な相関があり (220 MeV 炭素イオン;  $r = 0.472^{**}$ , ガンマ線;  $r = 0.427^{**}$ ), 核 DNA 量が少なくなると葉長は短くなった (Fig. 14). 葉長と葉幅には有意な相関 ( $r = 0.915^{**}$ ) があった (データ略) ことから、核 DNA 量が減少した植物の葉は小さいことが示された。ガンマ線では、花序の直径は核 DNA 量との間に有意な相関 ( $r = 0.608^{**}$ ) があった。220 MeV 炭素イオンでも同様の傾向がみられた ( $r = 0.290$ ). 核 DNA 量と花序の直径との関係の傾きには、220 MeV 炭素イオンとガンマ線とで有意な差がみられた ( $t = 2.432$ ,  $P < 0.05$ ).

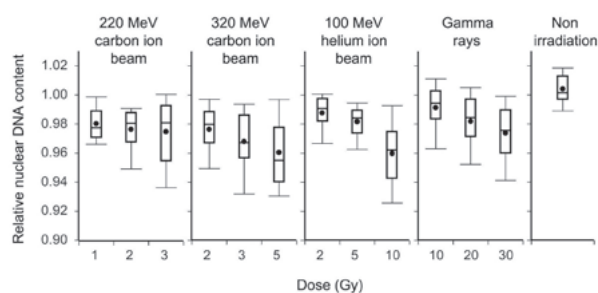
### 4) 変異頻度

イオンビームとガンマ線の両者で、照射線量が高くなるに従って花色変異頻度は高くなった (Fig. 15). 同じ



**Fig.12.** Effect of ion beam and gamma ray irradiation on regeneration in chrysanthemum.

○: 220 MeV carbon ion beam; ●: 320 MeV carbon ion beam; △: 100 MeV helium ion beam; ▲: gamma rays; Vertical bars indicate SE ( $n = 4$  for 220 and 320 MeV carbon ion beams and 100 MeV helium ion beam;  $n = 5$  for gamma rays).



**Fig.13.** Effect of ion beam and gamma ray irradiation on nuclear DNA content in chrysanthemum.

The bottom and top of the box represent the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile, respectively. The band in the box represents the median. The ends of the whiskers represent the 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentile, respectively. Dots plotted inside the box represent the average data. Relative nuclear DNA content is expressed as the ratio of the nuclear DNA content of the investigated plants divided by that of the non-cultured control plants. Data shown in "Non irradiation" were taken from the regenerated plants from non-irradiated leaf explants.



変異頻度を得るために必要な線量は、220 MeV 炭素イオン、320 MeV 炭素イオン、100 MeV ヘリウムイオン、ガンマ線の順に大きかった。このように、LETが高くなるに従って、照射線量あたりの変異頻度は高くなった。なお、本実験で使った方法における花色変異の自然突然変異の頻度は、0.6%であった (Yamaguchi et al., 2008)。

イオンビームとガンマ線の変異誘発効果を比較するため、変異頻度と再分化率 (Fig. 16)、および変異頻度と核 DNA 量 (Fig. 17) との関係进行调查した。再分化率を基準とした場合に、イオンビームによる変異頻度はガンマ線より高い傾向にあった。一方、核 DNA 量を基準とした場合には、220 MeV 炭素イオン、320 MeV 炭素イオン、およびガンマ線による変異頻度は同程度であったが、100 MeV ヘリウムイオンでは、それらより低かった。

### 5) 花色変異スペクトル

花色がピンクである品種‘太平’から11種類の花色変異体が得られた。それぞれの数を Table 1 に示した。イオンビームあるいはガンマ線でだけ現れた変異はなかった。また、本実験では、各照射区で得られた各花色変異体の数が少なかったため統計処理はできなかったが、各花色変異の相対頻度には差がないと考えられた。

## 考 察

変異誘発効果と照射による障害である核 DNA 量の減

少程度には、3種類のイオンビームとガンマ線との間に差がみられた。加えて、変異頻度と核 DNA 量の減少程度との関係にも違いがあった。

核 DNA 量が減少していない花色変異体もみられた (データ略) ことは、核 DNA 量の減少が花色変異に必須でないことを示している。キクにおいて核 DNA 量の減少は、染色体数と同様に花径の減少と相関があることから望ましくない。従って、キクの突然変異育種においては、変異頻度が高く、核 DNA 量への影響が小さい放射線が望ましい。このことから、220 MeV 炭素イオンは本実験で使った3種類のイオンビームの中では最も適していた。220 MeV 炭素イオンによる変異頻度は、他のイオンやガンマ線と同等 (Fig. 15, Fig. 16, Fig. 17) で、一方、照射線量が高くなっても核 DNA 量の減少程度は小さかった (Fig. 13)。これに対して、100 MeV ヘリウムイオンでは、照射線量が高くなると核 DNA 量は減少したものの、変異頻度は他のイオンやガンマ線と比べて高くならなかった。ガンマ線は変異頻度がやや低いものの、照射による障害が少ない変異体を得るためには適していると考えられた (Fig. 17)。

本実験では、LETが  $76 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  の 320 MeV 炭素イオンが花色変異誘発には最も効果的であった (Fig. 15, Fig. 16)。一方、イネにおいて葉緑素変異の誘発には LETが  $9 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$  の 100 MeV ヘリウムイオンが最も効果的であった (Yamaguchi et al., 2009)。Kazama ら (2008a) は、変異誘発効果はイオン種によるのではなく、LETによることを報告している。それゆえ、それ

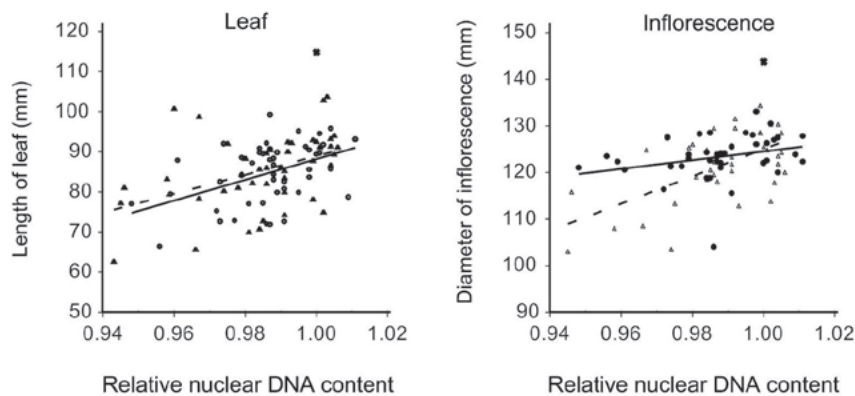


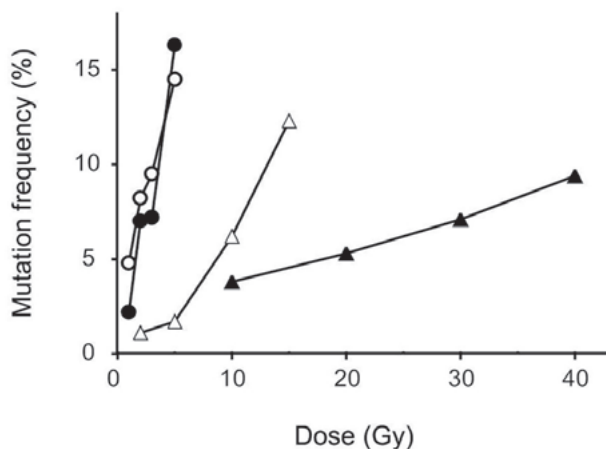
Fig. 14. Relationship between nuclear DNA content and length of leaf, diameter of inflorescence in chrysanthemum.

○, solid line: 220 MeV carbon ion beam, leaf;  $y = -171 + 259x$ ,  $r = 0.472^{**}$ , inflorescence;  $y = 30.3 + 94.1x$ ,  $r = 0.290$ ; ▲, dotted line: gamma rays, leaf;  $y = -146 + 235x$ ,  $r = 0.427^{**}$ , inflorescence;  $y = -167 + 292x$ ,  $r = 0.608^{**}$ ; ×: control plant, \*\*: Significant at 1% level.

ぞれの実験により変異誘発効果が最も高いイオン種が異なったのは、イオンの種類によるのではなく、LETによる可能性がある。シロイヌナズナを用いた実験で、 $M_2$ 世代におけるアルビノ変異体の誘発効果はLETが $30 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ で最も高かった (Kazama et al., 2008a)。従って、変異誘発に最適なLETは、植物の種類によって異なる可能性がある。

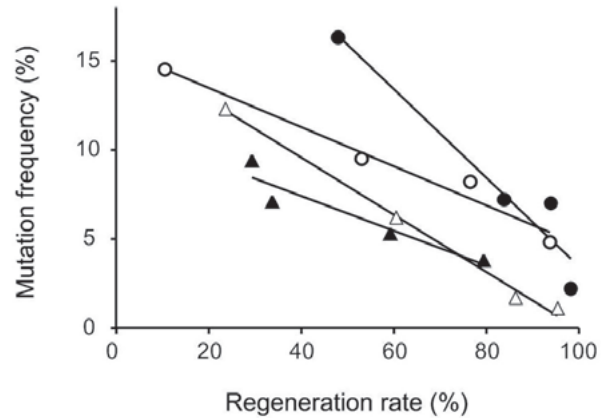
新しい変異原には、従来使われてきた変異原とは変異スペクトルが異なることが期待される。カーネーション (Okamura et al., 2003) やキク (Nagatomi et al., 1998b) では、ガンマ線では得られなかった花色変異体がイオンビームによって得られたことが報告されている。それに対し、イネでは、イオンビームにより誘発された葉緑素変異の3つのタイプ (アルビノ、キサント、ピリデイス) の相対出現頻度はガンマ線と同様であり (Fig. 9, Fig. 10)、イオンビームとガンマ線との間に差はみられなかった。本実験においては、イオンビーム特異的、あるいはガンマ線特異的な変異体は観察されず、また、各花色変異の相対的な出現頻度にも違いがなかったことから、イオンビームとガンマ線との間でスペクトルに違いはないと考えられた。

本実験においては、Nagatomiら (1998b) と同じキク品種 '大平' を用いたにもかかわらず、イオンビーム特異的な変異体は得られなかった。Nagatomiら (2000) は、花色変異の頻度は照射に用いた植物の器官によって異な

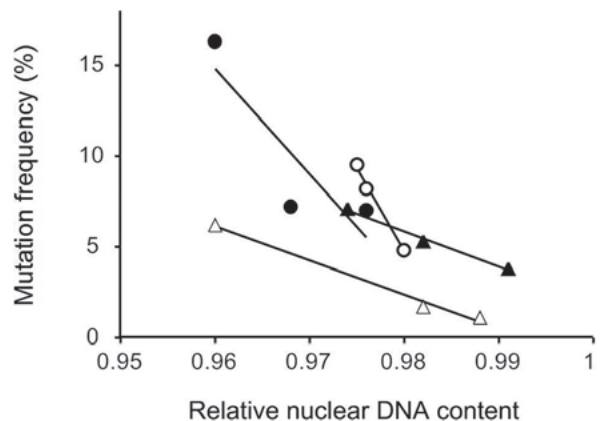


**Fig.15.** Effect of ion beam and gamma ray irradiation on frequency of flower color mutations in chrysanthemum. ○: 220 MeV carbon ion beam; ●: 320 MeV carbon ion beam; △: 100 MeV helium ion beam; ▲: gamma rays.

り、花色変異は葉を材料とした場合に比べて、花卉を材料にした場合のほうが高かったことを報告し、その原因として花色に関与する遺伝子における変異誘発が花卉と葉で異なる可能性を挙げている。Nagatomiら (1998b) は照射材料に花卉を使い、本実験では葉を使ったこと



**Fig.16.** Relationship between regeneration rate and frequency of flower color mutations in chrysanthemum. ○: 220 MeV carbon ion beam,  $y = 15.7 - 0.110x$ ,  $r = -0.986$  \*; ●: 320 MeV carbon ion beam,  $y = 28.3 - 0.249x$ ,  $r = -0.965$  \*; △: 100 MeV helium ion beam,  $y = 16.0 - 0.161x$ ,  $r = -0.998$  \*\*; ▲: gamma rays,  $y = 11.3 - 0.0975x$ ,  $r = -0.945$ . \*and\*\* Significant at 5% and 1% levels, respectively.



**Fig.17.** Relationship between nuclear DNA content and frequency of flower color mutations in chrysanthemum. ○: 220 MeV carbon ion beam,  $y = 900 - 914x$ ,  $r = -0.997$  \*; ●: 320 MeV carbon ion beam,  $y = 572 - 581x$ ,  $r = -0.875$ ; △: 100 MeV helium ion beam,  $y = 187 - 188x$ ,  $r = -0.995$ ; ▲: gamma rays,  $y = 196 - 194x$ ,  $r = -0.996$ . \* Significant at 5% level.

**Table 1.** Type and number of flower color mutants induced by ion beam and gamma ray irradiation.

Radiation	Dose (Gy)	No. of plant investigated	No. of flower color mutants											
			Pale pink	Rather pale pink	Deep pink	White	Pinkish white	Yellow	Pale yellow	Orange	Deep orange	Pale pink/ellow <sup>z</sup>	Pale yellow/yellow <sup>z</sup>	Other
220 MeV carbon ion beam	5	159	5	0	0	5	2	0	2	6	0	0	3	0
	3	337	9	5	0	4	3	0	1	6	2	0	2	0
	2	354	11	1	0	5	4	0	1	4	1	0	2	0
	1	330	1	2	0	5	2	0	1	4	1	0	0	0
320 MeV carbon ion beam	5	239	10	1	2	2	6	0	7	10	0	1	0	0
	3	320	7	0	1	3	2	0	3	1	6	0	0	0
	2	287	7	1	1	1	0	0	4	5	1	0	0	0
	1	268	1	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0	0
100 MeV helium ion beam	15	138	6	3	0	1	2	0	1	2	1	0	0	1
	10	225	2	1	0	6	1	1	0	2	1	0	0	0
	5	291	2	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
	2	275	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Gamma rays	40	128	3	1	1	1	0	0	0	1	4	0	1	0
	30	184	3	0	1	1	2	0	1	5	0	0	0	0
	20	244	4	1	0	2	0	0	0	3	0	0	3	0
	10	399	6	0	0	2	1	0	2	2	0	0	2	0
Non irradiation		937	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1

<sup>z</sup>: color of outer ray floret/color of inner ray floret. The flower color of original cultivar 'Taihei' is pink. Data shown in "Non irradiation" were taken from the regenerated plants from non-irradiated leaf explants.

が、本実験でイオンビーム特異的な花色変異体が得られなかった理由かもしれない。

キクでは染色体数の減少と植物体の大きさに相関があることが報告されている (Dowrick and El-Bayoumi, 1966; Ichikawa et al., 1970) が、核 DNA 量の減少と花序の大きさの関係は 220 MeV 炭素イオンとガンマ線とは異なった (Fig. 14) もの、染色体の減少と同様に核 DNA 量の減少程度にも植物体の大きさと相関がみられた。Roux ら (2003) は、フローサイトメトリーによる核 DNA 量の測定は、バナナの突然変異育種において農業上望ましくない形質をもつ変異体の排除に貢献するだろうとしている。フローサイトメトリーは、キクにおいても同様に、照射による障害の評価や大きな照射障害により植物体が小さくなる可能性のある個体の排除に利用できると思われる。

イオンビームは突然変異育種における変異原として広く使われてきている。しかし、その特徴について、従来用いられてきたガンマ線との違いに関する報告は少ない。今後、様々な作物でのイオンビームを使った突然変異育種を通じて、その特徴が明らかにされることが期待される。

### 第 3 章 バラにおけるイオンビームによる突然変異誘発効果

突然変異育種は、作物の品種改良に重要な役割を果たしてきており、これまでに世界中で 3,100 を越える突然変異品種が作出されている。変異誘発には、一般にガンマ線や X 線が使われてきた。イオンビームは高い線エネルギー付与 (LET) を有し、生物学的効果比 (RBE) が高い。それゆえ、イオンビームの変異誘発効果はガンマ線や X 線とは異なると考えられ、新しい変異原として期待されている。

イオンビームの変異誘発効果は、シロイヌナズナ (Hirono et al., 1970) やイネ (Mei et al., 1994) で調査されており、イオンビームはガンマ線や X 線よりも高い変異誘発効果があることが報告されている。さらに、シロイヌナズナでは、種皮における色素沈着変異体 (Tanaka et al., 1997b)、UVB 抵抗性変異体 (Tanaka et al. 2002)、フリル形花卉の変異体 (Hase et al., 2000) が得られている。さらにキクでは、ガンマ線では得られていない花色変異体が見られている (Nagatomi et al., 1998b)。これらの結果は、イオンビームが変異原として非常に有効で

あることを示している。

突然変異育種は、作物の品種改良、特に栄養繁殖性作物の改良に有効な方法であるが、変異を誘発後品種とするためには、キメラ解消の問題がある。切り戻しを繰り返す方法は、キメラを解消して完全変異体を作成するために有効で、多くの植物種で使われてきた。ガンマ線やX線照射により作出された多くの突然変異品種は、照射後に切り戻しを繰り返す方法により獲得されている。

そこで本実験では、イオンビーム照射と切り戻しを組み合わせた方法による変異体作出をバラの側芽への照射で試み、イオンビームの変異誘発効果を調査した。

### 材料および方法

バラの2品種‘オレンジ・ロザミニ’、および‘レッド・ミニモ’を供試した。無菌培養により育成している植物の茎を1芽ずつ切り分け、側芽が上を向くようにして、6 cm シャーレ内に調製した $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA、 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA、2% スクロースおよび0.9% 寒天を添加したMS培地 (pH 5.8) に植え付けた。それらに、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所のAVFサイクロトロンを用い、100 MeV ヘリウムイオン (LET  $9 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ) および220 MeV 炭素イオン (LET  $107 \text{ keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ ) を Table 2 ~ 4、および Figure 18 に示した線量で照射した。照射後、照射された芽は新しい培地に移植し、2カ月後に生存率を調査した。

伸長したシュートは、2~3つの側芽が入るよう茎を切り分け、新しい培地に植え付けた。さらに、その後伸長してきたシュートを同様の手法で切り分け、植え付けた。それらの芽からシュートが伸長後、発根させ、順化して12 cm ポットに植え、温室内で栽培した。その後生育した茎の側芽から伸長したシュートに開花した花の形質を調査するため、茎の上位節から順次切り戻し、その側芽から伸長したシュートにおける花の形質を調査した。

### 結果および考察

Figure 18 に側芽に対する照射が生存に及ぼす影響を示した。‘レッド・ミニモ’に対する100 MeV ヘリウムイオンでは、照射線量が高くなるに従って生存率は低下した。100 Gy までの照射実験であったが、50% 致死線量 ( $\text{LD}_{50}$ ) は約200 Gy と推測された。‘オレンジ・ロザミニ’においても同様に、照射線量が高くなるに従

て生存率は低下した。 $\text{LD}_{50}$  は50~75 Gy と推測された。‘オレンジ・ロザミニ’に対する220 MeV 炭素イオン照射においても照射により生存率は減少したが、照射線量と生存率との関係は明確ではなかった。これは220 MeV 炭素イオンでは100 MeV ヘリウムイオンよりも飛程が短いため、いくつかの芽においてはイオンビームがターゲットとなる細胞にまで達していなかったため、照射線量を高くしても側芽にあるすべての細胞を殺すに至らなかったことによると考えられた。

‘レッド・ミニモ’に対する100 MeV ヘリウムイオン照射では、照射された61芽のうち、10芽に由来する個体に変異が観察された (Table 2)。‘オレンジ・ロザミニ’では、56芽のうち、9芽に由来する個体に変異が観察された (Table 3)。‘レッド・ミニモ’に対する20~40 Gy の照射、‘オレンジ・ロザミニ’に対する10~30 Gy の照射では生存率への影響はなかったが、変異は

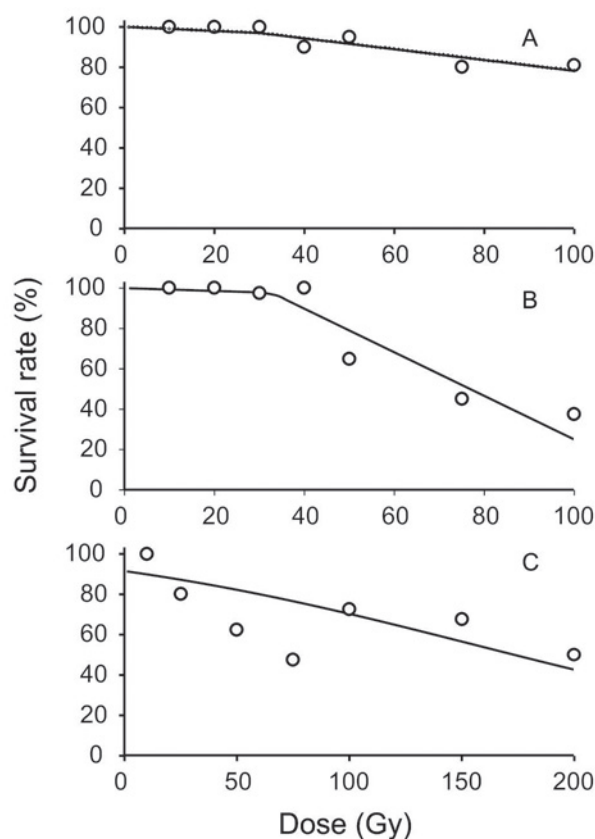


Fig.18. Influence of ion beam irradiation to axillary buds on survival in rose.

(A) 100 MeV helium ion irradiation to ‘Red Minimo.’

(B) 100 MeV helium ion irradiation to ‘Orange Rosamini.’

(C) 220 MeV carbon ion irradiation to ‘Orange Rosamini.’



観察された。

‘オレンジ・ロザミニ’に対する220 MeV炭素イオン照射では、88芽のうち12芽に由来する個体に変異が観察された (Table 4)。100 MeVヘリウムイオンの場合と同様に、高い線量だけでなく、生存率にはほとんど影響しない5 Gy程度の低い線量でも変異が誘発された。

イオンビームの照射により両品種から、花弁数、花の大きさと形において変異が誘発された。花色においては、色が濃くなった変異体が得られた。しかし、異なる花色が出現するようなドラスティックな変異は観察されなかった。

本実験において、イオンビーム照射と切り戻しを繰り返す方法との組み合わせにより、変異体が獲得できた。

組織培養を用いることでキメラを回避し、完全変異体が得られるが、植物種や品種によっては組織培養が難しい、あるいは困難である。それに対し、切り戻しによる方法は様々な作物に適用可能である。それゆえ、この方法を用いることでイオンビームの利用による突然変異育種の適用範囲が拡大すると考える。

ガンマ線による突然変異育種では、40%～60%が致死に至る線量が照射の目安とされてきた (van Harten, 1998)。本実験ではガンマ線を用いていないため、イオンビームとガンマ線との比較はできないが、イオンビームでは生存に影響しないような低い線量でも高い頻度で変異体が獲得できた。この結果は、イオンビームの変異誘発効果はガンマ線とは異なることをうかがわせる。

**Table 2.** Effects of 100 MeV helium ion irradiation to axillary buds of ‘Red Minimo’ on the induction of mutation.

Dose (Gy)	No. of irradiated buds	No. of buds induced mutants	Phenotypes of mutants
40	6	2	Smaller flower size, larger petal number
30	15	4	Fewer petal number, larger petal number, smaller flower size, light flower color
20	11	4	Smaller flower size (2), light flower color, fewer petal number
10	14	0	
5	15	0	

**Table 3.** Effects of 100 MeV helium ion irradiation to axillary buds of ‘Orange Rosamini’ on the induction of mutation.

Dose (Gy)	No. of irradiated buds	No. of buds induced mutants	Phenotypes of mutants
30	9	2	Intense flower color, fewer petal number
20	17	5	Flower shape, smaller flower size (2), petal shape, fewer petal number
10	18	2	Petal shape, light flower color
5	12	0	

**Table 4.** Effects of 220 MeV carbon ion irradiation to axillary buds of ‘Orange Rosamini’ on the induction of mutation.

Dose (Gy)	No. of irradiated buds	No. of buds induced mutants	Phenotypes of mutants
100	7	2	Intense flower color, flower shape
70	10	1	Flower shape
50	12	0	
40	11	1	Fewer petal number
30	11	0	
20	10	0	
10	10	1	Smaller flower size
5	17	7	Bigger flower size, fewer petal number(4), light flower color, reddish flower color

キクでは、イオンビーム照射と組織培養を用いた方法により、イオンビームに特異的な花色変異体を得たことが報告されている (Nagatomi et al., 1998b)。これに対し、本実験ではドラステックな変異は観察されなかった。この違いが用いた方法によるものなのか、あるいは、バラとキクという植物種の違いによるのかは明らかでない。誘発される変異の幅の広さは変異原の特徴として重要であり、さらなる調査が必要である。

#### 第4章 キクの側芽に対するイオンビーム照射の変異誘発効果、および誘発された変異体におけるキメラ構造の解析

イオンビームは高い LET を有し、ガンマ線のような低 LET 放射線と比較して高い生物効果を示す (Fujii et al., 1966; Hirono et al., 1970; Mei et al., 1994; Tanaka et al., 1997a)。このような違いから、イオンビームはガンマ線に比べて高い変異率が期待されている。また、ガンマ線が透過する物質に対しエネルギーを斉一に与えるのに対し、イオンビームでは局所的に高いエネルギーを付与することが、イオンビームのもうひとつの特徴である。このような違いにより、イオンビームとガンマ線とでは植物に対する照射によって生じる障害に大きな差があると考えられる。

被子植物の植物体は3つの層、すなわち、外側から LI, LII および LIII からなる (qtd. in Broertjes and van Harten, 1988)。ガンマ線を茎頂分裂組織に照射すると、一般に、ある一つの層だけが変異し、その他の層は原品種の遺伝子型である周縁キメラの変異体が得られる (Bowen, 1965; Langton, 1980)。さらに、イチイでは、照射後の回復過程において茎頂あるいはその付近の細胞から新しい茎頂が再生する現象が報告されている (Miksche et al., 1962)。リンゴやモモでは、ガンマ線照射により大きなダメージを受け、分裂組織が死んだ芽において、周辺の生き残った少数の細胞から腋性の組織が再生されることが観察されている (Lapins and Hough, 1970)。また、そのような照射による効果を使い、ガンマ線の半致死線量の照射により大きな変異セクターを得て、キンギョソウでは全体が変異したシュートや、トマトではキメラでない果実が得られている (Yamakawa and Sekiguchi, 1968)。

イオンビーム照射は、茎頂分裂組織の始原細胞のうち少数の細胞だけが生存した状態にするための方法として、ガンマ線よりも有効であると考えられ、さらに、イ

オンビームでは、変異細胞由来の組織 (変異セクター) が層を越えて拡大し、完全変異体が得られるような効果があるかもしれない。

キクは花色の変化の観察が容易であることから、突然変異とキメラ構造の調査のために優れた材料である。キクの周縁キメラの花変異体は、LI の組織だけが LII 層や LIII 層とは遺伝的に異なる (Bowen, 1965; Langton, 1980)。根は LIII 層のみに由来する (qtd. in Broertjes and van Harten, 1988) ことから、LIII 層の遺伝子型は根を組織培養して得られた植物の花変異体から判断することができる。それゆえ、変異体が周縁キメラであるか、完全変異体であるかは、元の変異体の花色とその根に由来する植物の花変異体を比較することで決定できる。

本実験では、キクの側芽に対する照射による変異誘発効果をイオンビームとガンマ線とで比較した。さらに、変異細胞由来の組織の拡大の仕方におけるイオンビームとガンマ線との差異を解明するため、得られた変異体のキメラ構造を調査した。

### 材料および方法

#### 1) 植物材料

キク品種 '大平' (*Chrysanthemum morifolium*) を供試した。

#### 2) 照射および花色変異体の作出

無菌培養で維持している植物体から葉を取り除き、茎を一節ずつ切り分けた。各節は側芽が上を向くように 6 cm シャーレ内に調製した 0.9% 寒天培地上に置いた。それらを、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の AVF サイクロトロンを用いて、220 MeV 炭素イオン ( $LET\ 107\ keV\cdot\mu m^{-1}$ ) を照射線量 1, 2, 4, 8 および 16 Gy で、100 MeV ヘリウムイオン ( $LET\ 9\ keV\cdot\mu m^{-1}$ ) を 5, 10, 15 および 20 Gy で照射した。ガンマ線は、農業生物資源研究所放射線育種場で、1時間あたり 10 Gy の線量率で、照射線量 10, 20, 40, 80 および 200 Gy で照射した。照射された芽は、1% スクロースおよび 0.9% 寒天を添加した MS 培地 (pH 5.8) に移した。照射 60 日後に、各照射処理あたり 40 芽を対象に生存率を調査した。

220 MeV 炭素イオンの 2 Gy 照射、100 MeV ヘリウムイオンの 5 および 10 Gy 照射、ガンマ線の 80 Gy 照射では、照射した芽から伸長したシュートの基部から 5 芽までを一節ずつ切り分け、前述と同様の培地に置いた。その後、それらの芽から伸長したシュートについて、基部

から5芽までを一節ずつ切り分け、前述と同様の培地に置きシュートを伸長させた。以上の手順により、照射されたひとつの芽から最大25個体の植物を作出し、照射された各芽に由来する系統ごとに圃場に植え付け、花色を調査した。

切り分けて作出した植物のうちの一つでも花色変異が現れた場合に、変異した系統とした。変異頻度は、調査した系統数に対する変異した系統の割合として求めた。

分離頻度は、切り分けて作出した植物10個体以上を調査できた系統を対象に、調査した個体数に対する花色変異体数の割合として求めた。不完全周縁キメラの個体は変異体として扱った。各処理の調査系統数はTable 5に示した。

### 3) 根からの再分化植物の作出

根からの再分化植物は次のようにして作出した。すなわち、花色変異体の無菌植物を育成し、その根を $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D),  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA, 3%スクロースおよび0.9%寒天を添加したMS培地 (pH 5.8) に置床した。その3週間後に、それらを $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  2,4-D,  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA, 3%スクロースおよび0.9%寒天を添加したMS培地 (pH 5.8) に移植した。再分化植物は、順化後、圃場に定植し栽培した。

## 結果

220 MeV炭素イオンの2 Gy照射ではすべての芽が生存し、それ以上に線量を高くすると生存率は低下した (Fig. 19)。しかし、16 Gyでも15%の生存率を示した。100 MeVヘリウムイオンの5 Gyおよび10 Gy照射では芽の生存に影響しなかったが、20 Gyではすべての芽が枯死した。ガンマ線の40 Gy照射ではすべての芽が生存し、80 Gyでは80%の生存率を示した。200 Gyではすべての芽が枯死した。

生存率に対して同程度の影響を与える線量、すなわち220 MeV炭素イオンの2 Gy, 100 MeVヘリウムイオンの10 Gy, ガンマ線の80 Gyで、それぞれの変異誘発効果を比較した。さらに、変異誘発に及ぼす照射線量の影響も検討するため、100 MeVヘリウムイオンでは5 Gyについても変異誘発効果を調査した。それら4つの照射処理により、12.8%~28.8%という高い頻度で花色変異が現れた (Table 5)。100 MeVヘリウムイオンの5 Gyと10 Gyの照射処理間では $\chi^2$  独立性の検定により有意

な差がみられたが、その他の組み合わせでは有意な差はなかった。

花色がピンクの原品種‘大平’から、淡ピンク、極淡ピンク、濃ピンク、白、ピンクがかった白、黄、淡黄、オレンジ、濃オレンジ、赤の10種類の花色変異体が得られた (Table 6)。花色変異のスペクトルには、照射処理による違いはみられなかった。

花色変異体の分離比の分布をみると、220 MeV炭素イオンでは分離比が0%~19%と100%に多くの系統が分布し、それに対し、分離比が40%~59%の系統はなかった (Fig. 20)。100 MeVヘリウムイオンの10 Gy照射では、分離比が0%~19%と100%に多くの系統がみられ、30%~99%の分離比の系統は少なかった。100 MeVヘリウムイオンの5 Gy照射では、0%~29%に多くの系統が分布し、30%~100%の分離比の系統は少なかった。ガンマ線では、分離比が100%の系統の数が非常に多く、40%~59%の系統はなかった。このように、全体として0%~29%と100%の分離比を示す系統が多かった。

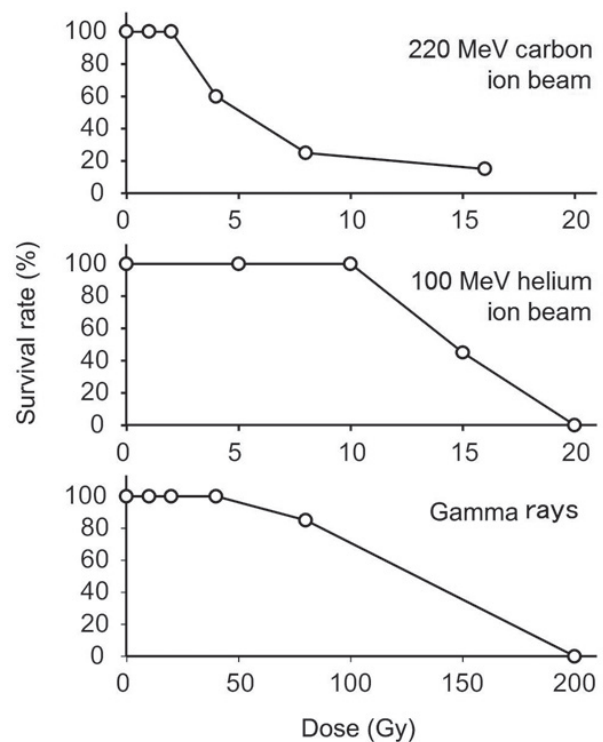


Fig. 19. Effect of ion beam and gamma ray irradiation on survival of lateral buds of chrysanthemum. Survival rate was examined using 40 buds per treatment.

花色変異体のキメラ構造を解析するため、変異体の花色と変異体の根に由来する植物の花色を比較することにより、LI層とLIII層の組織の遺伝子型の差異を調べた。220 MeV炭素イオン照射により誘発された花色変異体では、キメラ構造を解析した9系統のうち5系統で、変異体の花色と変異体の根に由来する植物の花色が同じであった (Table 7)。同様の変異体が、100 MeVヘリウムイオンの10 Gy照射では9系統のうち1系統、100 MeVヘリウムイオンの5 Gy照射では7系統のうち3系統で観察された。それに対し、ガンマ線により誘発された花色変異体では、すべての系統で変異体の花色と変異体の根に由来する植物の花色は異なった。すなわち、解析した10系統のうち8系統で、変異体の根に由来する植物の花色は原品種‘大平’と同じ花色(ピンク)であり、2系統では変異体の花色、あるいは‘大平’の花色とは異なる花色であった。調査した系統数に対する、根に由来する植物の花色が変異体の花色と同じである系統数の比率は、220 MeV炭素イオンと100 MeVヘリウムイオン5 Gyの照射処理で、ガンマ線より有意に高かった (Fisher検定,  $P < 0.05$ )。

## 考 察

本実験では、高い頻度で花色の変化が観察された。このような高い頻度での変化は、周縁キメラの植物において、内部のLII層の組織がLI層を越えて表面に現れることでみられることがある (Broertjes and van Harten, 1988)。しかし、本実験でみられた変化は、様々な花色への変化であることから、本実験における花色の変化は突然変異によるものである。

ガンマ線で誘発されたすべての変異体は、変異体の花色と根に由来する植物の花色が異なり、その結果から周縁キメラと判断された。それに対し、イオンビームにより得られた変異体のいくつかは、変異体の花色と根に由来する植物の花色が同じであり、それらは完全変異体であることが示唆された。このように、イオンビームによってだけ層を越えた変異セクターの拡大がみられた。

完全変異体はイオンビーム照射によってのみ現れた。しかし、生存率への影響がほぼ同じ線量で照射した場合には、イオンビームとガンマ線は同様の変異誘発効果を

**Table 5.** Effect of ion beam and gamma ray irradiation to lateral buds of chrysanthemum on flower color mutation.

Radiation	Dose (Gy)	Mutation frequency (%)
220 MeV carbon ion beam	2	17.4 (37/213)
100 MeV helium ion beam	10	28.8 (32/111)
100 MeV helium ion beam	5	12.8 (16/125)
Gamma rays	80	22.5 (34/151)

Number of mutated strains in flower color (A) and number of investigated strains (B) are shown in parenthesis as (A/B). The strains from which at least one mutated plant emerged in the progenies were counted as a mutated strain.

**Table 6.** Type and number of flower color mutants induced by ion beam and gamma ray irradiation to lateral buds of chrysanthemum.

Radiation	Dose (Gy)	No. of investigated plant	No. of flower color mutants									
			Pale pink	Rather pale pink	Deep pink	White	Pinkish white	Yellow	Pale yellow	Orange	Deep orange	Red
220 MeV carbon ion beam	2	213	11	2	4	3	2	-	5	5	4	1
100 MeV helium ion beam	10	111	7	-	1	-	6	-	8	7	3	-
100 MeV helium ion beam	5	125	5	3	-	1	1	-	-	4	2	-
Gamma rays	80	151	11	2	-	-	5	1	7	6	2	-



示した。従って、完全変異体がイオンビームによってのみ得られたことは、イオンビームの生物学的効果の高さだけでは説明できない。さらに、100 MeV ヘリウムイオンでは、10 Gy 照射だけでなく、それよりも変異頻度が低かった 5 Gy 照射でも完全変異体が得られている。それゆえ、完全変異体が得られた原因は、突然変異の誘発とは異なる原因によると考えられた。

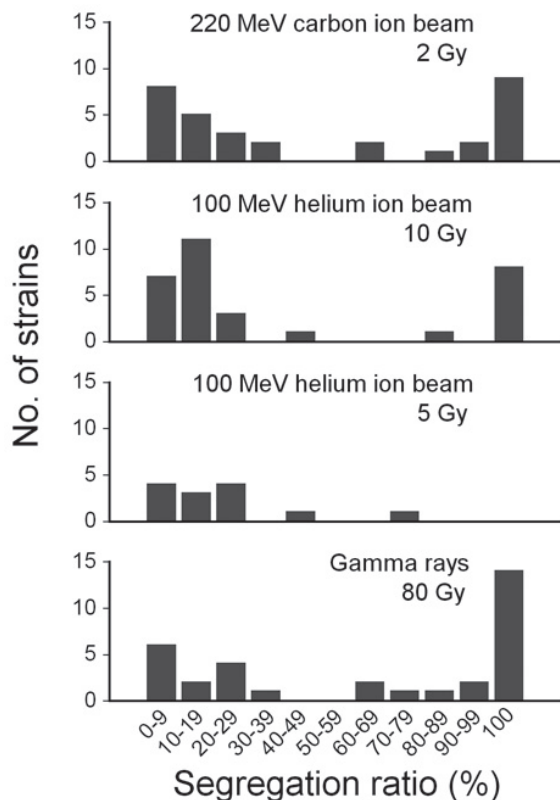
完全変異体は、ひとつの変異細胞に由来する区分キメラの状態から、2回の切り戻しによるキメラ解消の操作により、変異部分が拡大したことにより作出されたと考えられた。従って、イオンビームとガンマ線とでは、茎頂分裂組織において生存する細胞数を少なくするような効果の有無、程度という点において違いがあると思われる。イオンビームは核の限られた範囲にだけ DNA 損傷を与え (Yang and Tobias, 1979)、かつ、非常に少ない

数のイオン粒子が細胞を通過する (Tanaka, 1999)。このようなイオンビームの特徴により、イオンビーム照射によって細胞が受けるダメージには、茎頂分裂組織を構成する細胞間で大きな違いがあると考えられた。すなわち、致命的な箇所にダメージを受けた始原細胞は死に、ダメージが小さい、あるいはダメージがない細胞は生存する。その結果、少数の細胞だけが生き残る状況になる可能性が高い。それに対して、ガンマ線は細胞に齊一に損傷を与える (Yang and Tobias, 1979)。そのため、細胞間で照射による障害における違いがほとんどなく、少数の細胞のみが生存している状況になる可能性は低い。

さらに、イオン粒子は、物質内で止まる直前に極めて高いエネルギーを物質に与える。この性質もまた、少数の細胞のみが生存している状況にすることに、より効果的であると思われる。220 MeV 炭素イオンを高線量で照射しても、すべての側芽は死ななかった。この結果は、220 MeV 炭素イオンが、照射された芽のうちのいくつかでは茎頂分裂組織に達していないことを示している。このことは、220 MeV 炭素イオンの透過深度 (水中での飛程が約 1 mm) は、表層から茎頂分裂組織の始原細胞までの深さとほぼ等しいことを示唆しており、220 MeV 炭素イオンが止まる直前に付与する高いエネルギーが、茎頂分裂組織の細胞に付与された可能性も考えられる。それに対し、100 MeV ヘリウムイオンの LET は 220 MeV 炭素イオンよりも小さく、また、透過深度は 6.2 mm であり始原細胞を通過するため、付与されたエネルギーは小さかったと推測される。このことが、完全変異体作出の効果が、220 MeV 炭素イオンのほうが 100 MeV ヘリウムイオンよりもわずかに高い理由かもしれない。イオンビームの透過深度を制御することにより、完全変異体を効率的に作出できる可能性がある。

花色変異体の分離頻度の分布には、イオンビームとガンマ線との間に大きな差はなく、分離頻度が 0% ~ 29% および 100% を示した系統が多く存在し、分離頻度が 50% 前後を示した系統は少ない傾向がみられた。分離頻度は一般に始原細胞数を反映し、たとえば 2 つの始原細胞のうちひとつに突然変異が起きた場合に分離頻度は 50% となる。そのようなことから、照射によって始原細胞が死に、減少すると分離頻度は高くなる。しかし、これでは、前述のような分離頻度 50% の系統が少なく、分離頻度が 0% ~ 29% と 100% 系統が多いという分離頻度の分布は説明できない。

分離頻度 0% ~ 29% となるのは、以下のような理由に



**Fig.20.** Distribution of segregation ratio of flower color mutant with ion beam and gamma ray irradiation to lateral buds of chrysanthemum. The segregation ratio was determined as the ratio of the number of flower color mutants to the number of investigated plants using the strain in which the flower color of more than ten plants was investigated.

**Table 7.** Comparison of flower color of plants derived from roots of mutants with that of mutants induced with ion beam and gamma ray irradiation to lateral buds of chrysanthemum.

Radiation	Dose (Gy)	Flower color			Suggested chimera structure
		Mutants	Plants derived from roots		
220 MeV carbon ion beam	2	#511	Pale pink	Pale pink	Solid mutant
		#513	Deep pink	Deep pink	Solid mutant
		#524	Pale yellow	Pale yellow	Solid mutant
		#531	Deep orange	Deep orange	Solid mutant
		#532	Deep orange	Deep orange	Solid mutant
		#515	Pale pink	Pink <sup>z</sup>	Periclinal chimera
		#520	Wine red	Pink	Periclinal chimera
		#521	Pale pink	Pink	Periclinal chimera
		#601	Pale yellow	Pink	Periclinal chimera
		100 MeV helium ion beam	10	#546	Pale yellow
#574	Deep orange			Orange	Periclinal chimera
#545	Orange			Pink	Periclinal chimera
#564	Deep orange			Pink	Periclinal chimera
#565	Pinkish white			Pink	Periclinal chimera
#566	Pinkish white			Pink	Periclinal chimera
#568	Orange			Pink	Periclinal chimera
#571	Deep orange			Pink	Periclinal chimera
#572	Pinkish white			Pink	Periclinal chimera
100 MeV helium ion beam	5	#503	White	White	Solid mutant
		#506	Orange	Orange	Solid mutant
		#537	Deep orange	Deep orange	Solid mutant
		#502	Rather pale	pink Pink	Periclinal chimera
		#507	Orange	Pink	Periclinal chimera
		#510	Orange	Pink	Periclinal chimera
		#519	Pale pink	Pink	Periclinal chimera
		Gamma rays	80	#549	Orange
#550	Orange			Deep orange	Periclinal chimera
#557	Rather pale pink			Pink	Periclinal chimera
#558	Pale yellow			Pink	Periclinal chimera
#581	Pinkish white			Pink	Periclinal chimera
#584	Pale pink			Pink	Periclinal chimera
#585	Orange			Pink	Periclinal chimera
#587	Pale pink			Pink	Periclinal chimera
#591	Pale yellow			Pink	Periclinal chimera
#598	Yellow			Pink	Periclinal chimera

<sup>z</sup>: The same flower color as original cultivar 'Taihei.'

よると考えられた。すなわち、多くの植物種で、側芽に形成されているシュートには、すでに2次側芽ができていることが知られている。本実験では、照射された側芽から伸長したシュート上の基部から連続した5つの2次側芽を切り分け、後代を育成した。その5つのうちのひとつに突然変異が起きていた場合には、分離頻度20%が期待される。それゆえ、分離頻度0%~29%は、2次側芽に突然変異が起きたことによるものと考えられる。

一方、分離頻度100%となるためには、2次側芽のLI層の全細胞が、ひとつの変異細胞から形成されている必要がある。従って、分離頻度100%を示した系統は、側芽の照射時には2次側芽がまだ分化しておらず、加えて、側芽のLI層の始原細胞数がひとつ、あるいは少数だった可能性がある。

Yamakawa・Sekiguchi (1968) はキンギョソウとトマトを用いた研究で、分離頻度を調査することにより変異

セクターの広さを調べた。一方、本実験で用いたキクでは、花色変異の分離頻度は2次側芽の分化の程度の影響を受けることから、変異セクターの広さを評価するための指標として適当ではないと思われた。加えて、Bowen (1965) はガンマ線照射された挿し穂の中で、頂部の側芽からのシュートは通常区分キメラであり、一方、基部の側芽からのシュートは完全変異体（すなわち、分離頻度100%）であることを報告している。従って、キクにおいて、変異セクターの広さを変異体の分離頻度から評価することはできないと結論づけられた。おそらく、分離頻度0%~29%となるのは、2次側芽の分化によるものであり、線量や放射線のタイプによるものではないと考えられる。

ガンマ線は、周縁キメラの変異体を作成するのに適していると考えられた。キクにおいて周縁キメラであることは、遺伝的に異なる層間での組み合わせによる様々な表現型が期待できることから、様々な花色の突然変異品種を作るのに有用である (Broertjes and van Harten, 1988)。本実験の結果は、イオンビームとガンマ線を適切に使うことにより、キクの側芽への照射によって完全変異体と周縁キメラの変異体の両者を作成できることを示した。

## 第5章 キクにおけるガンマ線の照射線量および線量率が突然変異誘発と核DNA量に及ぼす影響

キクは、世界で広く栽培されている花きである。突然変異はキクの育種において重要な方法のひとつであり、多くの突然変異品種が、自然突然変異や人為誘発変異によって作出されている。

キクの変異誘発には、ガンマ線やX線が広く使われている。しかし、放射線照射では突然変異が誘発されるだけでなく、染色体異常といった照射による障害が生じる。キクではガンマ線 (Dowrick and El-Bayoumi, 1966; Ichikawa et al., 1970) やX線 (Dowrick and El-Bayoumi, 1966) によって、染色体数が減ることが報告されている。そして染色体数の減少により、キクの花序が小さくなることが報告されている (Ichikawa et al., 1970)。それゆえ、照射による染色体数の減少は、目的とした形質のみが改良された変異体を得るためには望ましくない。従って、キクにおいては、そのような照射による障害が少ない照射方法が望まれる。

ガンマ線やX線の照射線量率は、種々の照射による

影響に違いを与える重要な要素である。線量率の影響は、致死 (Broertjes, 1968; Killion and Constantin, 1971; Sripichitt et al., 1988)、生育 (Bottino et al., 1975; Killion and Constantin, 1971; Killion et al., 1971; Yamashita, 1964) や稔性 (Killion and Constantin, 1971; Yamashita, 1964) などについて、様々な植物で調べられている。それゆえ、キクにおいても照射による障害に対して線量率の影響があると考えられる。

線量率は突然変異にも影響し、照射線量が同じである場合には、線量率が高いほうが変異誘発効果の高いことが、オートムギ (Nishiyama et al., 1966)、トウモロコシ (Mabuchi and Matsumura, 1964) で報告されている。さらに、セントポーリア (Broertjes, 1968) やムラサキツユクサ (Nauman et al., 1975) では、線量率の影響は高線量で高く、低線量では影響が小さいことが観察されている。また、Nagatomi ら (2000) は、キクではガンマ線の緩照射によって効率的に変異体が獲得できることを報告している。しかし、キクにおいてガンマ線の総照射線量および線量率が変異誘発効果に及ぼす影響について示したデータはない。

照射による障害の発生や突然変異誘発効果に及ぼす線量率の影響や、線量と線量率の相互作用に関する情報は、キクの突然変異育種において有用である。本実験では花色突然変異と、照射による障害の指標として核DNA量に及ぼすガンマ線の照射線量および線量率の影響を、照射と組織培養の組み合わせによる方法を用いて調査した。

## 材料および方法

### 1) 照射処理と組織培養

1%スクロース、および0.9%寒天を添加したMS培地 (pH 5.8) (Murashige and Skoog, 1962) を使って挿し芽により維持しているキク '大平' の無菌植物に、農業生物資源研究所放射線育種場のガンマルームにおいて0.5, 1, 2 および5 Gy $\cdot$ h<sup>-1</sup>の線量率で、総線量15, 30 および60 Gyのガンマ線を照射した。照射された植物から葉片を10×5 mmの大きさに切り出し、100 mL容のコニカルビーカー内に調製した1 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> BA, 0.2 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> NAA, 2%スクロース、および0.9%寒天を添加したMS培地 (pH 5.8) に置床した。その3週間後に、シュートを再分化させるため、100 mL容のコニカルビーカー内に調製した1 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> BA, 0.1 mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> NAA, 2%スクロース、および0.9%寒天を添加したMS培地 (pH 5.8)

に移植した。

再分化率は、3～7個体の照射植物から調製した150～300葉片を用いて調査した。各照射処理は4反復行った。再分化率は、照射した葉片数に対する1本以上のシュートの再分化がみられた葉片の割合として求めた。再分化のための培地に移植後、6週間目に調査した。

## 2) 花色突然変異

ひとつの変異細胞に由来するシュートを重複して取らないよう、ひとつの葉片からひとつのシュートのみを切り取り、それらを100 mL容のコニカルビーカー内に調製した1%スクロース、および0.9%寒天を添加したMS培地(pH 5.8)に植え付けた。発根後、順化し、6月に圃場に定植栽培した。11月に各処理100～363個体を対象に、花色変異を調査した。花色変異頻度は、調査した植物数に対する変異体数の割合として求めた。変異頻度の有意差検定は、 $\chi^2$ 独立性の検定を用いて行った。

## 3) フローサイトメトリーによる解析

核DNA量はフローサイトメトリーにより測定した。約0.5 cm<sup>2</sup>の葉片に1 mLの染色液(10 mM Tris, 50 mM sodium citrate, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% (v/v) Triton X-100, 2 mg·L<sup>-1</sup> 4,6-diamidino-2-phenylindole)を滴下し、シャーレ上で細かく刻んだ。30- $\mu$ m ナイロンメッシュでろ過後、フローサイトメーター (Partec PA, Partec, Münster, Germany)を用いて測定した。エンドウ (*Pisum sativum* cv. 成駒三十日)を内部標準として用い、測定材料の核DNA量は、材料のピークとエンドウのピークの位置を比較して求めた。異なる2枚の葉を使い、それぞれを異なる日に測定した。対照には挿し芽により維持しているキクを用い、各測定日の最初と最後、および約10回の材料測定ごとに1回測定した。相対核DNA量は、対照の核DNA量に対する調査材料の核DNA量の比として現した。測定には照射線量および線量率の各組み合わせ、および無照射による再分化植物50個体を用いた。分散の比較、および相対核DNA量の平均値の比較には、Hartley検定およびMann-Whitney検定をそれぞれ用いた。

## 結果および考察

実験に用いた3水準の照射線量(15, 30, および60 Gy)において、照射された植物から得た葉片には、無

照射と同様にカルスが形成された。しかし、カルスからの再分化率は、照射線量率が高くなるに従って低下した(Fig. 21)。再分化率への線量率の影響は照射線量によって異なった。すなわち、照射線量が15 Gyおよび60 Gyでは、線量率による再分化率の違いは小さかったのに対し、30 Gyでは非常に大きかった。

花色変異頻度は、各線量率において照射線量が30 Gyから60 Gyに高くなったときには差異はみられなかったが、15 Gyから30 Gyに高くなると、有意に上昇した( $\chi^2$ 独立性の検定,  $P < 0.05$ ) (Table 8)。それに対し、変異頻度には線量率の違いによる有意な差はなかった。すなわち、15 Gy照射ではすべての線量率で変異頻度は同じであった。30 Gyでは、0.5 Gy·h<sup>-1</sup>と2 Gy·h<sup>-1</sup>での変異頻度は1 Gy·h<sup>-1</sup>よりもやや低かったものの、 $\chi^2$ 独立性の検定による有意差はなかった。同様に、60 Gy照射において、0.5 Gy·h<sup>-1</sup>と2 Gy·h<sup>-1</sup>での変異頻度は1 Gy·h<sup>-1</sup>よりもやや高かったものの、有意な差はなかった。これらの結果は、突然変異頻度は線量率によらず、主に照射線量によって決まることを示している。なお、自然突然変異頻度は、無照射の植物の葉片から再分化した937個体で調査した結果、0.6%であった。

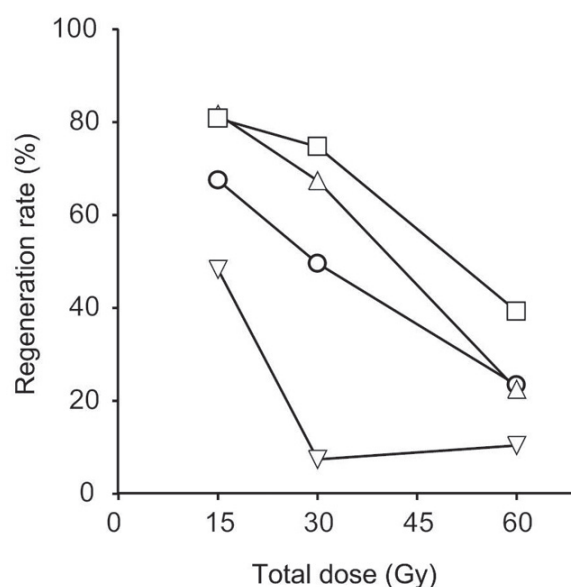


Fig.21. Effects of total dose and dose rate of gamma ray irradiation on regeneration of explants.

The regeneration rate from non-irradiated leaf explants was 100%, as estimated from 100 explants. ▽: 5 Gy·h<sup>-1</sup>; ○: 2 Gy·h<sup>-1</sup>; △: 1 Gy·h<sup>-1</sup>; □: 0.5 Gy·h<sup>-1</sup>.



照射により、花色がピンクの原品種‘大平’から8種類以上の花色変異が得られた (Table 9). 各処理における各変異体の出現数が少ないため統計処理を行うことはできなかったが、各変異体の出現頻度に違いはなく、スペクトルに差はないと考えられた。

核 DNA 量はガンマ線照射の影響を受けた (Fig. 22). 無照射の葉片からの再分化個体における相対核 DNA 量は 0.97 ~ 1.03 の範囲であったが、照射された葉片からの再分化個体では、0.97 よりも小さい個体があった。最も減少程度が大きかった個体は、2 Gy·h<sup>-1</sup> で 60 Gy 照射した葉片からの個体で現れ、10% 減少していた。線量率が 2 Gy·h<sup>-1</sup> と 0.5 Gy·h<sup>-1</sup> においては、照射線量が

高くなるに従って、核 DNA 量の分散は有意に増加した (Hartley 検定,  $P < 0.05$ ).

相対核 DNA 量の平均値の比較から、すべての照射処理により、無照射に比較して核 DNA 量は有意に減少した (Mann-Whitney 検定,  $P < 0.01$ ). 線量率が 1 Gy·h<sup>-1</sup> と 2 Gy·h<sup>-1</sup> では、線量が 15 Gy から 30 Gy になると核 DNA 量は有意に減少した (Mann-Whitney 検定,  $P < 0.05$ ). 同様の傾向が 30 Gy から 60 Gy が高くなったときにもみられた。それに対して、0.5 Gy·h<sup>-1</sup> では、30 Gy では 15 Gy と比べて有意に少なかった (Mann-Whitney 検定,  $P < 0.05$ ) が、30 Gy と 60 Gy とはほぼ同じであった。さらに、60 Gy では、0.5 Gy·h<sup>-1</sup> の時、1 Gy·h<sup>-1</sup> に比べて核 DNA 量は有意に多かった (Mann-Whitney 検定,  $P < 0.05$ ). このような違いは、照射線量が 15 Gy と 30 Gy ではみられなかった。これらの結果は、高線量で照射した場合も低線量率とすることにより、核 DNA 量の減少程度は小さくなることを示している。

核 DNA 量の減少と変異頻度の関係を Figure 23 に示した。2 Gy·h<sup>-1</sup> での照射では、核 DNA 量の減少程度と変異頻度の間には有意な相関があった。同様の関係は、0.5 Gy·h<sup>-1</sup> でもみられた。0.5 Gy·h<sup>-1</sup> では、2 Gy·h<sup>-1</sup> の場合と比べて、核 DNA 量が大きく減少しなくても、2 Gy·h<sup>-1</sup> の場合と同程度の変異頻度が得られた。1 Gy·h<sup>-1</sup> では、核 DNA 量の減少と変異頻度の関係は明確ではなかったものの、その影響は 0.5 Gy·h<sup>-1</sup> と 2 Gy·h<sup>-1</sup> との間でみられた。これらの結果は、キクでは低線量率でガンマ線を照射することにより、核 DNA 量を大きく減少させることなく突然変異を誘発できることを示唆している。

本実験で用いたキク‘大平’において、染色体数の減

**Table 8.** Effects of total dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction.

Total dose (Gy)	Dose rate (Gy·h <sup>-1</sup> )	Frequency of flower color mutation (%)
15	0.5	4.6 (15/325)
	1	5.0 (18/363)
	2	4.3 (9/210)
30	0.5	8.9 (22/248)
	1	12.1 (29/240)
	2	9.6 (26/272)
60	0.5	12.2 (40/326)
	1	8.4 (22/262)
	2	12.0 (12/100)

Number of flower color mutants/number of plants evaluated are shown in parentheses. The frequency of spontaneous mutation was 0.6%, as estimated using 937 plants that regenerated from non-irradiated leaf explants.

**Table 9.** Number of flower color mutants resulting from treatment with different total dose and dose rate of gamma rays.

Total dose (Gy)	Dose rate (Gy·h <sup>-1</sup> )	No. of plant investigated	No. of flower color mutants								
			Pale pink	Rather pale pink	Deep pink	White	Pinkish white	Pale yellow	Orange	Deep orange	Other
15	0.5	325	9	0	0	0	0	4	2	0	0
	1	363	7	0	2	0	0	5	2	0	2
	2	210	4	0	0	0	0	3	1	0	1
30	0.5	248	13	0	0	2	1	4	2	0	0
	1	240	24	0	0	1	2	1	1	0	0
	2	272	10	2	2	1	1	0	10	0	0
60	0.5	326	23	0	1	0	1	4	10	0	1
	1	262	11	0	1	0	0	5	3	2	0
	2	100	6	0	0	0	1	2	3	0	0

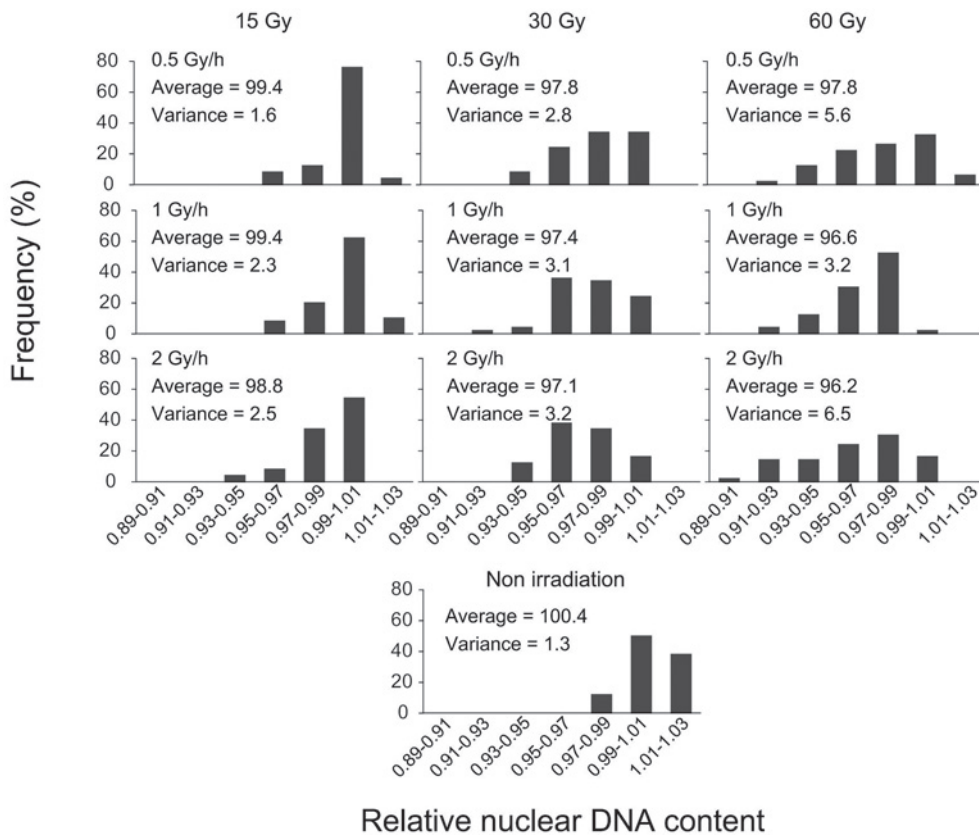
The flower color of original cultivar ‘Taihei’ is pink.

少と同様に核 DNA 量の減少程度は花序の大きさや葉の長さ、幅と有意な相関があった (Fig. 14). サトウキビにおいても、核 DNA 量と茎長、および核 DNA 量と茎径との間に相関があることが報告されている (Degi et al., 2001). 従って、ガンマ線照射による核 DNA 量の減少は、花が小さい変異体の作出のような目的を除いて、栽培品種の作出においては望ましくないと判断される。

セントポーリア (Broertjies, 1968) やオートムギ (Nishiyama et al., 1966) では、変異頻度は線量率の影響を受けることが報告されている。これらの知見は本実験の結果とは一致しないことから、変異頻度に及ぼす線量率の影響は植物の種類によって異なる可能性が考えられる。従って、線量と線量率の影響は、植物材料ごとに評価される必要がある。

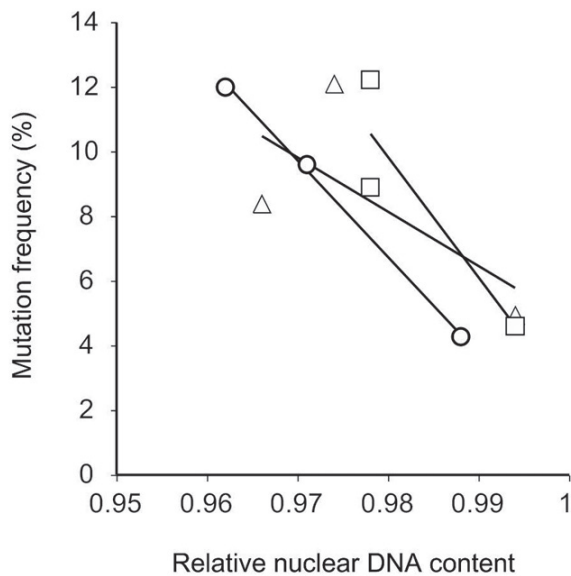
以上のように、低線量率でのガンマ線照射により、植

物への照射の障害を小さくできることが示された。これにより、得られた変異体を直接、品種として使う栄養繁殖性作物の突然変異育種では特に、より低い線量率でのガンマ線照射が有効であることが明らかとなった。ガンマーフィールドは、低線量率で長期間ガンマ線照射する方法である緩照射のための施設であるが、緩照射は栄養繁殖性作物の突然変異育種に有効とされている。ガンマーフィールドにおける線量率は本実験よりも低く、一方、照射期間は一般に長い総照射線量は本実験よりも高い。そのような違いはあるものの、本実験で得られた低線量率でのガンマ線照射が照射による障害の低減に有効であるという結果は、ガンマーフィールドにおける緩照射にも当てはまり、緩照射の有効性を支持するものであると考える。



**Fig.22.** Effects of total dose and dose rate of gamma ray irradiation on nuclear DNA content.

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. Nuclear DNA content was measured in 50 regenerated plants per treatment.



**Fig.23.** Relationship between reduction of nuclear DNA content and mutation induction. 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. Nuclear DNA content was measured in 50 regenerated plants per treatment. ○: 2 Gy·h<sup>-1</sup>; △: 1 Gy·h<sup>-1</sup>; □: 0.5 Gy·h<sup>-1</sup>.

## 総合考察

### 1. 突然変異育種のための変異原としてのイオンビームの特徴

#### (1) 効率

本研究でイオンビーム照射によりみられたイネにおける不稔は、Ekberg (1969) が中性子やX線照射されたオオムギで報告している例と同様に、染色体異常によって引き起こされたと考えられた。また、キクでは、大きな染色体異常である染色体数の減少がガンマ線やX線によって引き起こされる (Dowrick and El-Bayoumi, 1966; Ichikawa et al., 1970) が、イオンビーム照射により核DNA量が減少したことから、イオンビーム照射によっても同様に染色体異常が起きたと考えられた。そのようなことから、染色体異常を基準とした変異頻度、すなわち「効率」を、イオンビームとガンマ線とで比較した。

イネでは、稔実率を基準とした葉緑素変異の頻度から「効率」を比較したが、本研究に使ったイオン種に

よって異なるものの、イオンビームのほうがガンマ線より高い、あるいは同等であった。キクでは、照射による核DNA量の減少と花色変異頻度の関係から「効率」を比較したが、220 MeV炭素イオン照射では、変異頻度は320 MeV炭素イオンやガンマ線と同等であったのに対し、核DNA量は照射線量を高くしてもほとんど減少しなかった。また、100 MeVヘリウムイオンでは、照射線量が高くなると他のイオン種やガンマ線と同様に核DNA量は減少したが、変異頻度はそれらよりも低かった。

このように、イオンビームの「効率」はイオン種によって異なり、キクにおけるヘリウムイオンのように低い場合もみられたが、ガンマ線と比べて概ね高い、または同等であると結論付けられた。

### (2) 変異セクターの大きさ

イネにおいて、イオンビーム照射によるM<sub>2</sub>世代における葉緑素変異の分離頻度は、ガンマ線よりも高かった。加えて、キクの側芽に対する照射では、イオンビーム照射によってのみ、層(LI, LIIおよびLIII層)を越えた変異セクターの拡大がみられた。これらの結果は、ガンマ線に比べてイオンビームではより広い変異セクターが形成されることを示唆している。

イネにおいてイオンビームによる変異セクターがガンマ線よりも広がった原因として、イオンビーム照射後の種子における始原細胞の数がガンマ線の場合と比べて少なくなったことが考えられる。また、キクにおいては、イオンビーム照射後に生き残ったひとつの細胞から完全変異体ができ、あるいは少数の細胞から区分キメラ状態となりその後の2回の切り戻しによるキメラの解消により完全変異体が作出されたと考えられた。このようなことから、イオンビームとガンマ線とでは、照射された茎頂分裂組織における始原細胞の生き残り方に違いがあると考えられた。

イオンビームは、細胞を通過するビームの数が少なく (Tanaka, 1999)、かつ、核の限られた範囲に大きなダメージを与える (Yang and Tobias, 1979)。そのため、イオンビームを低線量で照射した場合にも、照射された茎頂分裂組織においてはいくつかの始原細胞が死に、その結果、大きなダメージを受けて死んだ細胞と、ダメージが小さかった、あるいはダメージを全く受けていない細胞が混在したと考えられた。このように、イオンビーム照射では茎頂分裂組織にある細胞間で照射によるダメージに大きな違いがあると想定された。

それに対し、ガンマ線では、細胞を均一に透過し、損傷を与える (Yang and Tobias, 1979)。従って、照射によるダメージは細胞間でほとんど差はなく、そのため少数の細胞だけが生存する状態になる可能性は低いと考えられた。このように、イオンビームとガンマ線とでは、照射により始原細胞に与えるダメージに違いがあり、その結果、茎頂分裂組織に生存する始原細胞の数に違いをもたらす。それゆえ、イオンビームにより形成される変異セクターは、ガンマ線よりも広がったと考えられた。

### (3) 変異スペクトル

新たな変異原には、これまで使われていた変異原とは異なる変異スペクトルが期待される。イネでは、誘発された葉緑素変異のタイプ間の相対出現頻度にイオンビームとガンマ線との間に差がなく、葉緑素変異におけるスペクトルには差がないことがわかった。キクでも同様に、イオンビーム特異的、あるいはガンマ線特異的な変異体は観察されず、また、誘発された各花色変異の相対的出現頻度にも違いがなかったことから、イオンビームとガンマ線とでスペクトルに差がないことが明らかとなった。

しかしながら、Okamura ら (2003) は、カーネーションにおいてガンマ線では得られていない花色変異体をイオンビームで得たことを報告している。さらに、Nagatomi ら (1998b) は、本研究と同じ品種である‘大平’を使った実験で、イオンビーム特異的な変異体を獲得したことを報告している。

Nagatomi ら (2000) は、花色変異の誘発頻度は照射に用いる材料によって異なり、葉を用いた場合より花卉を用いた場合のほうが、花色変異頻度が高いことを報告している。これは、花色に関連する遺伝子における変異の起こりやすさが、花卉と葉で異なることを示唆している。Nagatomi ら (1998b) は花卉を材料とし、本研究では葉を材料としたことが、本研究でイオンビーム特異的な花色変異体を得られなかった理由かもしれない。

イネの葉緑素変異の比較では、イオンビームとガンマ線とでスペクトルに差がなかった。これに対し、カーネーション (Okamura et al., 2003) やキク (Nagatomi et al., 1998b) では変異スペクトルに差がみられた。Naito ら (2005) は、高 LET 放射線である炭素イオンビームと低 LET 放射線であるガンマ線の両者ともに、照射線量にかかわらず大きな欠失を作ることを示したが、そのほとんどは後代に伝達しないと推測している。キクや

カーネーションのような栄養繁殖性作物においては、伝達性と非伝達性の両方の変異を検出できる。それに対し、イネの葉緑素変異は、 $M_2$  世代に伝達される欠失による変異だけをみていることになる。イネではイオンビームとガンマ線の間で変異スペクトルに違いがなかったのは、このような理由によるかもしれない。

変異スペクトルの違いを明らかにするためにはさらなる調査が必要であり、多くの作物での様々な形質を対象とした突然変異育種への取り組みが行われる中で、次第に明らかになっていくと思われる。

本研究において、イネでイオンビームにより誘発された葉緑素変異の各タイプの相対出現頻度はガンマ線と同様で、アルビナの頻度が最も高く、次いでビリデイスであった。イネでは、同様の傾向が、ガンマ線 (Ando, 1968; Yamaguchi, 1962)、X 線 (Matsuo et al., 1958)、そして熱中性子線 (Matsuo et al., 1958; Yamaguchi, 1962) でみられている。さらにオオムギでも、ガンマ線 (Doll and Sandfaer, 1969)、X 線 (Gustafsson, 1969)、そして中性子線 (Gustafsson, 1969) で同様の結果が得られている。それに対し、化学変異原であるエチレンオキシド (ethylene oxide) (Gustafsson, 1969) や EMS (Doll and Sandfaer, 1969) を処理されたオオムギでは、放射線の場合と異なり、ビリデイスの頻度がアルビナより高かった。これらの結果は、各葉緑素変異の相対出現頻度は放射線と化学変異原とでは異なるが、放射線の種類による違いはないことを示唆している。

## 2. 突然変異育種のための最適照射方法

イオンビームを突然変異育種に使うにあたっては、最適照射線量とその目安となる指標が必要である。また、ガンマ線は長い間、変異原として広く使われてきたが、ガンマ線の最適照射線量についても実験的に示した報告はない。そこで、イネを材料として、イオンビームおよびガンマ線照射した後、播種した種子から最も多くの変異体を獲得するという観点から、適当な照射線量について検討した。その結果、照射された種子あたりの変異体数は、イオンビームとガンマ線の両者において生存率曲線の肩となる線量でもっとも高くなった。肩となる線量における照射では、生存率はおおよそ 90% であり、生存にはほとんど影響しない。イネにおいてイオンビームやガンマ線で引き起こされる不稔は、主に染色体異常によるものであり、そのうち転座や逆位の一部は次世代に伝達すると考えられることから、照射当代 ( $M_1$ ) においても不稔の発生は少ないほうが望ましい。本研究において、



照射線量が高くなるに従って、種子稔性は直線的に低くなったことから、肩となる線量での照射による遺伝的背景の変化はLD<sub>50</sub>の場合よりも小さいと思われる。従って、肩となる線量は、遺伝的背景を大きく変えることなく、特定の形質だけを改変した有用な変異体を効率良く獲得するための照射の目安として適していると考えられる。

キクではシュートの再分化率に影響しない線量、バラでは芽の生存に影響しない低い線量でも、イオンビーム照射により変異体が獲得できた。より低い線量で照射することにより、遺伝的背景の変化が小さい有用な変異体の作出が可能となる。本研究では照射線量の目安を示すことはできなかったが、低線量の照射で十分に変異体が得られた。これらの結果は、有用な変異体を効率的に得るために有用であろう。

ガンマ線の照射では、総照射線量と線量率の選択が可能である。キクでは、花色変異頻度は線量率に影響されず、主に総照射線量によって決まった。それに対し、核DNA量は照射線量と線量率の両者の影響を受けた。この違いは、キクでは低い照射線量率で高い線量を照射することにより、照射による障害が少ない変異体を高い頻度で獲得することが可能であることを示している。それに対し、セントポーリア (Broertjies, 1968) やオートムギ (Nishiyama et al., 1966) では、変異頻度は線量率の影響を受けることが報告されている。変異頻度や照射による障害に及ぼす線量率の影響は、植物の種類によって異なる可能性が考えられることから、線量と線量率の影響は植物材料ごとに評価し、それに応じた適切な照射方法を用いる必要がある。

## 摘 要

突然変異育種は、作物の品種改良に有効な方法のひとつである。突然変異育種では、変異原の選択とその処理方法は重要な要素であり、変異率が高く、一方で変異原処理に付随する障害が少ないことが望まれる。

イオンビームは、ガンマ線やX線と比較して高い線エネルギー付与 (LET) を持ち、高い生物効果を示す。このことから、新しい変異原として高い変異率や、従来用いられてきた変異原では得られなかった新規の変異体獲得が期待されている。そこで、突然変異育種のための変異原としての観点から、従来用いられてきたガンマ線と比較しながら、イオンビームの特徴を明らかにした。

イオンビームの突然変異育種への利用においては、効果的および効率的に変異体を獲得できる最適照射線量に

関する知見が望まれる。一方、ガンマ線においても最適照射線量について実験的に明らかにされている例はない。また、照射による障害を少なくできるとされるガンマ線の低線量率での照射の効果についてもデータは少ない。そこで、イオンビームおよびガンマ線の最適照射方法について検討した。

## 1. 突然変異育種のための変異原としてのイオンビームの特徴

### 1) 効 率

変異原処理による障害の程度に対する変異率の高さは「効率」と定義される。農作物の突然変異育種においては、変異原処理によって付随する障害が少ないこと、すなわち「効率」が高い変異原、処理方法が望まれる。そこで、イネおよびキクを用いてイオンビームとガンマ線とで「効率」を比較した。

イネの種子に、炭素イオン (平均 LET 76 および 107 keV $\cdot\mu\text{m}^{-1}$ )、ヘリウムイオン (平均 LET 9 keV $\cdot\mu\text{m}^{-1}$ )、およびガンマ線を種々の線量で照射し、M<sub>1</sub> 世代において生存率と稔実率を、M<sub>2</sub> 世代において葉緑素変異率を調査し、生存率と葉緑素変異率、および稔実率と葉緑素変異率との関係から効率を求め、比較した。その結果、効率はイオン種によって異なるものの、生存率および稔実率のどちらを基準にした場合にも、イオンビームのほうがガンマ線よりも効率が高い、あるいは同等であることが示された。

同じイオン種を用いて行ったキクの培養葉片に対する照射試験では、照射による障害の指標とした核DNA量に及ぼす影響、および花色変異頻度はイオン種によって異なった。両者の関係から求めた効率を比較したところイオン種によって異なり、ヘリウムイオンではガンマ線よりも効率が低かった。

このように、効率はイオン種によって異なり、ガンマ線と比べて概ね高い、または同等であったが、キクにおけるヘリウムイオンのように低い場合もみられた。

### 2) 変異セクターの大きさ

照射された種子や芽などから変異体を得るためには、後代を得るための種子や芽が、照射された種子や芽の茎頂分裂組織に誘発された変異細胞から形成されなければならない。茎頂分裂組織の細胞に変異がおきても、それから形成される変異セクターが小さい場合には、変異体として分離できる可能性が低くなる。

イネの葉緑素変異の分離頻度から、イオンビームの照

射ではガンマ線と比較してより大きな変異セクターが形成されると推測された。キクでは、側芽にイオンビームおよびガンマ線を照射後、2回の切り戻しを行って作出した花色変異体について、得られた花色変異体の根から植物を再生させてLⅢ層細胞由来の植物を作出し、その花色と変異体の花色を比較することでキメラ構造を解析した。その結果、ガンマ線で得られた花色変異体はすべて周縁キメラだったのに対して、イオンビームでは周縁キメラだけでなく、完全変異体である可能性を示した変異体もあった。これは、イオンビームでは茎頂分裂組織の層構造の破壊と少数の細胞からのその再構築が起これ、変異セクターが層を越えて拡大したためと考えられた。一方、ガンマ線では層構造が壊されるような影響はなかったために周縁キメラとなったと推測された。

以上のように、イオンビーム照射の結果得られる変異セクターのほうがガンマ線と比べて広いことが明らかとなった。

### 3) 変異スペクトル

得られる変異のスペクトルも変異原としての特徴のひとつであり、新しい変異原には従来用いられてきた変異原では得られなかった変異体誘発が期待される。そこで、イオンビームとガンマ線の変異スペクトルの差異を調べるため、イネでは得られた葉緑素変異（アルビナ、キサント、ビリディス、およびその他）の各葉緑素変異の相対出現比率を比較した。また、キクでは誘発された花色変異を比較した。

イネにおける各葉緑素変異の相対出現比率には、本研究で用いた3種のイオンビームおよびガンマ線とで同様の傾向がみられ、アルビナの出現比率が最も高く、次いでビリディスであり、イオンビームとガンマ線の間で差異はなかった。キクでは11種類の花色変異が得られたが、イオンビームにより誘発された花色変異の種類はガンマ線と同じであり、また、出現頻度にも偏りはなく、イオンビームで特に現われやすい花色変異はなかった。

このように、本研究の結果からは、誘発される変異スペクトルにはイオンビームとガンマ線とに違いは認められなかった。

## 2. 突然変異育種のための最適照射方法

イオンビームおよびガンマ線の最適照射線量を明らかにするため、イネを用いて照射種子1粒あたりの変異体数が最も多くなる線量を求めた。その結果、3種のイオンビームおよびガンマ線のいずれの線種においても、生

存率曲線において肩となる線量付近による照射で、効率的に変異体を得られることが示された。肩となる線量での生存率は約90%であり、従来用いられてきた目安である半数致死線量よりも低い線量で十分に変異体が獲得できることが示された。また、キクの培養葉片やバラの側芽に対するイオンビームの照射でも、再分化や生存への影響が小さい低線量での照射によって変異体を得られ、低線量での照射で十分であることが示された。

ガンマ線の照射線量率は、照射による影響の程度に違いを及ぼす要素のひとつである。しかし、突然変異頻度や照射による障害の程度に及ぼす照射線量と線量率の相互作用に関する知見はほとんどない。そこで、キクを用いて花色変異の頻度と照射による障害として核DNA量の減少程度を調べ、それらに対するガンマ線の照射線量および線量率の影響を調査した。

キクの培養植物にガンマ線の総線量15、30および60 Gyを、線量率0.5、1および2 Gy・h<sup>-1</sup>で照射し、葉片を切り出して培養した。再分化植物において花色変異、および核DNA量を調査した。花色変異頻度は総線量が同じであれば線量率に関わらず同じであったことから、変異頻度は照射線量によって決まることが明らかとなった。一方、核DNA量は照射によって減少したが、その程度は総線量および線量率の両者の影響を受け、高線量での照射でも低線量率で照射することにより核DNA量の減少が抑えられた。このように、線量率が核DNA量の減少と花色変異頻度におよぼす影響は異なり、線量率0.5 Gy・h<sup>-1</sup>での照射では、1および2 Gy・h<sup>-1</sup>と比較して核DNA量の減少程度が小さくても同程度の花色変異が得られた。キクでは高い線量を低い線量率で照射することにより、変異頻度を低下させることなく照射による障害の小さい変異体の獲得が可能であることが示された。

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始懇切丁寧な御指導を頂きました千葉大学大学院園芸学研究科 三位正洋教授に謹んで感謝の意を表します。また、有意義な御助言を頂きました千葉大学大学院園芸学研究科 木庭卓人教授、同 佐藤隆英教授、同 中村郁郎准教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたりまして、丁寧な御指導とご鞭撻を頂きました鶴飼保雄博士、永富成紀博士に深くお礼申し上げます。

実験の遂行にあたりご協力、御指導頂きました、日本

原子力研究開発機構 田中淳博士, 同 鹿園直哉博士, 同 長谷純宏博士, 農業生物資源研究所放射線育種場 森下敏和博士 (現, 北海道農業研究センター), 同 出花幸之介氏 (現, 沖縄県農業研究センター), 同 清水明美氏, 同 桑原秀則氏 (現, 中央農業総合研究センター) には心より感謝いたします。

### 引用文献

- Affrida, A. H., A. Sakinah, A. Zaiton, B. Mohd Nazir, A. Tanaka, I. Narumi, Y. Oono and Y. Hase. 2008. Mutation induction in orchids using ion beams. JAEA Takasaki Ann. Rep. 2007: 61.
- Ando, A. 1968. Mutation induction in rice by radiation combined with chemical protectants and mutagens. In: Rice breeding with induced mutations. Report of an FAO/IAEA research co-ordination meeting on the use in induced mutations in rice breeding, held in Taipei, Republic of China, 5-9 June 1967, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 7-15.
- Anonymous. 1977. Manual on mutation breeding (2nd edn). Technical Reports Series No. 119. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Barker, R. E., J. A. Kilgore, R. L. Cook, A. E. Garay and S. E. Warnke. 2001. Use of flow cytometry to determine ploidy level of ryegrass. Seed Sci. & Technol. 29: 493-502.
- Bashir, A., J. A. Auger and A. L. Rayburn. 1993. Flow cytometric DNA analysis of wheat-rye addition lines. Cytometry 14: 843-847.
- Bottino, P. J., A. H. Sparrow, S. S. Schwemmer and K. H. Thompson. 1975. Interrelation of exposure and exposure rate in germinating seeds of barley and its concurrence with dose-rate theory. Rad. Bot. 15: 17-27.
- Bowen, H. J. M.. 1965. Mutation in horticultural chrysanthemum. Rad. Bot. 5 (Suppl.): 695-700.
- Broertjes, C.. 1968. Dose-rate effects in *Saintpaulia*. In: Mutations in plant breeding II. Proceedings of a panel, Vienna, 11-15 September 1967, Jointly organized by the IAEA and FAO, IAEA Vienna, pp. 63-71.
- Broertjes, C. and A. M. van Harten. 1988. Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. Elsevier Science Publisher B. V. Amsterdam, The Netherlands.
- Chinone, S., K. Tokuhiko, K. Nakatsubo, Y. Hase and I. Narumi. 2008. Mutation induction on *Delphinium* and *Limonium sinuatum* irradiated with ion beams. JAEA Takasaki Annual Report 2007: 68.
- Degi, K., S. Nagatomi, T. Morishita and Y. Yamaguchi. 2001. Variance of nuclear DNA content and characters of regenerated mutant clones induced from recurrent chironical irradiation and in vitro culture in sugarcane. Jpn. J. Trop. Agr. 45 (Extra Issue 1): 71-72 (in Japanese).
- Doll, H. and J. Sandfaer. 1969. Mutagenic effect of gamma rays, diethyl sulphate, ethyl methanesulphonate, and various combinations of gamma rays and the chemicals. In: Induced mutations in plants. Proceedings of a symposium on the nature, induction and utilization of mutations in plants jointly organized by the IAEA and FAO and held at Pullman, Wash., 14-18 July 1969, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 195-206.
- Dowrick, G. J. and A. El-Bayoumi. 1966. The induction of mutations in chrysanthemum using X- and gamma radiation. Euphytica 15: 204-210.
- Ekberg, I.. 1969. Different types of sterility induced in barley by ionizing radiations and chemical mutagens. Hereditas. 63: 257-278.
- Fujii, T., M. Ikenaga and J. T. Lyman. 1966. Radiation effects on *Arabidopsis thaliana*. II. Killing and mutagenic efficiencies of heavy ionizing particles. Radiat. Bot. 6: 297-306.
- Furutani, N., A. Matsumura, Y. Hase, R. Yoshihara and I. Narumi. 2008. Dose response and mutation induction by ion beam irradiation in chrysanthemum. JAEA Takasaki Ann. Rep. 2007: 69.
- Gustafsson, Å.. 1969. A study on induced mutations in plants. In: Induced mutations in plants. Proceedings of a symposium on the nature, induction and utilization of mutations in plants jointly organized by the IAEA and FAO and held at Pullman, Wash., 14-18 July 1969, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 9-31.
- Hamatani, M., Y. Iitsuka, T. Abe, K. Miyoshi, M. Yamamoto and S. Yoshida. 2001. Mutant flowers of dahlia (*Dahlia pinnata* Cav.) induced by heavy-ion beams. RIKEN Accel. Prog. Rep. 34: 169.
- Hara, Y., T. Abe, K. Sakamoto, Y. Miyazawa and S. Yoshida. 2003. Effects of heavy-ion beam irradiation in rose (*Rosa hybrid* cv. 'Bridal Fantasy'). RIKEN Accel. Prog. Rep. 36: 135.
- Hase, Y., A. Tanaka, T. Baba and H. Watanabe. 2000. *FRL1* is required for petal and sepal development in *Arabidopsis*.

- Plant J. 24: 21-32.
- Hirono, Y., H. H. Smith, J. T. Lyman, K. H. Thompson and J. W. Baum. 1970. Relative biological effectiveness of heavy ions in producing mutations, tumors, and growth inhibition in the crucifer plant, *Arabidopsis*. *Radiat. Res.* 44: 204-223.
- Ichikawa, S., K. Yamakawa, F. Sekiguchi and T. Tatsuno. 1970. Variation in somatic chromosome number found in radiation-induced mutants of *Chrysanthemum morifolium* Hemsl. cv. Yellow Delaware and Delaware. *Rad. Bot.* 10: 557-562.
- Iizuka, M., R. Yoshihara and Y. Hase. 2008. Development of commercial variety of osteospermum by a stepwise mutagenesis by ion beam irradiation. *JAEA Takasaki Ann. Rep.* 2007: 65.
- Kanaya, T., H. Saito, Y. Hayashi, N. Fukunishi, H. Ryuto, K. Miyazaki, T. Kusumi, T. Abe and K. Suzuki. 2008. Heavy-ion beam-induced sterile mutants of verbena (*Verbena hybrida*) with an improved flowering habit. *Plant Biotechnol.* 25: 91-96.
- Kazama, Y., H. Saito, M. Miyagai, H. Takehisa, H. Ichida, Y. Miyazawa, K. Mishiba, T. Kanaya, K. Suzuki, C. H. Bae, K. Miyoshi, M. Mii and T. Abe. 2008a. Effect of heavy ion-beam irradiation on plant growth and mutation induction in *Nicotiana tabacum*. *Plant Biotechnol.* 25: 105-111.
- Kazama, Y., H. Saito, Y. Yamamoto, Y. Hayashi, H. Ichida, H. Ryuto, N. Fukunishi and T. Abe. 2008b. LET-dependent effects of heavy-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol.* 25: 113-117.
- Killion, D. D., M. J. Constantin and E. G. Siemer. 1971. Acute gamma irradiation of the soybean plant: effects of exposure, exposure rate and developmental stage on growth and yield. *Rad. Bot.* 11: 225-232.
- Killion, D. D. and M. J. Constantin. 1971. Acute gamma irradiation of the wheat plant: effects of exposure, exposure rate, and developmental stage on survival, height, and grain yield. *Rad. Bot.* 11: 367-373.
- Konzak, C. F., R. A. Nilan, J. Wagner and R. J. Foster. 1965. Efficient chemical mutagenesis. In: The use of induced mutations in plant breeding. Report of the FAO/IAEA technical meeting organized by the food and agriculture organization of the United Nations and the International Atomic Energy Agency in cooperation with the European Association for Research on Plant Breeding, Rome, Italy, 25 May 1964, Pergamon Press, Oxford, pp. 49-70.
- Langton, F. A. 1980. Chimeral structure and carotenoid inheritance in *Chrysanthemum morifolium* (Ramat). *Euphytica* 29: 807-812.
- Lapins, K. O. and L. F. Hough. 1970. Effects of gamma rays on apple and peach leaf buds at different stages of development-II. Injury to apical and axillary meristems and regeneration of shoot apices. *Rad. Bot.* 10: 59-68.
- Mabuchi, T. and S. Matsumura. 1964. Dose rate dependence of mutation rates from  $\gamma$ -irradiated pollen grains of maize. *Jpn. J. Genet.* 39: 131-135.
- Matsuo, T., H. Yamaguchi and A. Ando. 1958. A comparison of biological effects between thermal neutrons and X-rays on rice seeds. *Japan. J. Breed.* 8: 37-45.
- Mei, M., H. Deng, Y. Lu, C. Zhuang, Z. Liu, Q. Qiu, Y. Qiu and T. C. Yang. 1994. Mutagenic effects of heavy ion radiation in plants. *Adv. Space Res.* 14: 363-372.
- Mikaelsen, K., K. Karunakaran and I. S. Kiss. 1971. Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays, fast neutrons and ethyl methane sulphonate in rice. In: Rice breeding with induced mutations. III. Report of an FAO/IAEA research co-ordination meeting on the use of induced mutations in rice breeding, India, September 1969. Technical Reports Series No. 131. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 91-96.
- Miksche, J. P., A. H. Sparrow and A. F. Rogers. 1962. The effects of chronic gamma irradiation on the apical meristem and bud formation of *Taxus media*. *Rad. Bot.* 2: 125-129.
- Miyazaki, K., K. Suzuki, T. Abe, Y. Katsumoto, S. Yoshida and T. Kusumi. 2002. Isolation of variegated mutants of *Petunia hybrida* using heavy-ion beam irradiation. *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 35: 130.
- Miyazaki, K., K. Suzuki, K. Iwaki, T. Abe, S. Yoshida and H. Fukui. 2006. Flower pigment mutations induced by heavy ion beam irradiation in an inter specific hybrid of *Torenia*. *Plant Biotechnol.* 23: 163-167.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nagatomi, S., A. Tanaka, A. Kato, H. Watanabe and S. Tano. 1996. Mutation induction through tissue cultures of chrysanthemum by ion beam irradiation. *Breed. Sci.* 46 (Suppl. 1): 62 (in Japanese).
- Nagatomi, S., K. Mitsui and K. Miyahara. 1998a. A new variety of



- Manila grass, "Winter Field" - Frost-resistant and dwarf mutant - Institute of Radiation Breeding, Technical News 63.
- Nagatomi, S., A. Tanaka, A. Kato, H. Yamaguchi, H. Watanabe and S. Tano. 1998b. Mutation induction through ion beam irradiations in rice and chrysanthemum. *TIARA Ann. Rep.* 1997: 41-43.
- 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 Horticulturae.* 508: 69-73.
- Nagatomi, S., H. Watanabe, A. Tanaka, H. Yamaguchi, K. Degi and T. Morishita. 2003. Six mutant varieties induced by ion beams in chrysanthemum. Institute of Radiation Breeding, Technical News 65.
- Naito, K., M. Kusaba, N. Shikazono, T. Takano, A. Tanaka, T. Tanisaka and M. Nishimura. 2005. Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiating *Arabidopsis thaliana* pollen with  $\gamma$ -rays and carbon ions. *Genetics* 169: 881-889.
- Nauman, C.H., A.G. Underbrink and A.H. Sparrow. 1975. Influence of radiation dose rate on somatic mutation induction in *Tradescantia* stamen hairs. *Rad. Res.* 62: 79-96.
- Nilan, R. A., C. F. Konzak, J. Wagner and R. R. Legault. 1965. Effectiveness and efficiency of radiations for inducing genetic and cytogenetic changes. In: The use of induced mutations in plant breeding. Report of the FAO/IAEA technical meeting organized by the Food And Agriculture Organization of the United Nations and the International Atomic Energy Agency in cooperation with the European Association for Research on Plant Breeding, Rome, Italy, 25 May 1964, Pergamon Press, Oxford, pp. 71-89.
- Nishiyama, I., T. Ikushima and S. Ichikawa. 1966. Radiobiological studies in plants. XI. Further studies on somatic mutations induced by X-rays at the *al* locus of diploid oats. *Rad. Bot.* 6: 211-218.
- Okamura, M., N. Yasuno, M. Ohtsuka, A. Tanaka, N. Shikazono and Y. Hase. 2003. Wide variety of flower-color and -shape mutants regenerated from leaf cultures irradiated with ion beams. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* 206: 574-578.
- Osone, K.. 1963. Studies on the developmental mechanism of mutated cells induced in irradiated rice seeds. *Japan. J. Breed.* 13: 1-13.
- Pfossler, M., A. Amon, J. Lafferty, E. Heberle-Bors and T. Lelley. 1995. Gain or loss of single chromosomes in wheat-rye addition lines and in 6x triticales detected by flow cytometry. *Plant Breed.* 114: 555-557.
- Roux, N., A. Toloza, Z. Radecki, F. J. Zapata-Arias and J. Dolezel. 2003. Rapid detection of aneuploidy in *Musa* using flow cytometry. *Plant Cell Rep.* 21: 483-490.
- Sanada, T., K. Kotobuki, T. Nishida, H. Fujita and F. Ikeda. 1993. A new Japanese pear cultivar 'Gold Nijisseiki', resistant mutant to black spot disease of Japanese pear. *Japan. J. Breed.* 43: 455-461 (in Japanese).
- Sasaki, K., R. Aida, T. Niki, H. Yamaguchi, T. Narumi, T. Nishijima, Y. Hayashi, H. Ryuto, N. Fukunishi, T. Abe and N. Ohtsubo. 2008. High-efficiency improvement of transgenic torenia flowers by ion beam irradiation. *Plant Biotechnol.* 25: 81-89.
- 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.
- Shirao, T., K. Ueno, K. Minami, A. Tanaka, S. Imakiire, Y. Hase and A. Tanaka. 2007. Ion beam breeding of chrysanthemum cultivar 'Sanyo-ohgon'. *JAEA Takasaki Ann. Rep.* 2006: 74.
- Sripichtt, P., E. Nawata and S. Shigenaga. 1988. The effects of exposure dose and dose rate of gamma radiation on in vitro shoot-forming capacity of cotyledon explants in red pepper. *Japan. J. Breed.* 38: 27-34.
- Sugiyama, M., Y. Hayashi, N. Fukunishi, H. Ryuto, T. Terakawa and T. Abe. 2008a. Development of flower color mutant of *Dianthus chinensis* var. *semperflorens* by heavy-ion beam irradiation. *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 41: 229.
- Sugiyama, M., H. Saito, H. Ichida, Y. Hayashi, H. Ryuto, N. Fukunishi, T. Terakawa and T. Abe. 2008b. Biological effects of heavy-ion beam irradiation on cyclamen. *Plant Biotechnol.* 25: 101-104.
- Suzuki, K., Y. Takatsu, T. Gonai, M. Nogi, K. Sakamoto, N. Fukunishi, H. Ryuto, H. Saito, T. Abe, S. Yoshida and M. Kasumi. 2005. Flower color mutation in spray-type chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) induced by heavy-ion beam irradiation. *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 38: 138.
- Tanaka, A. 1999. Mutation induction by ion beams in *Arabidopsis*.

- Gamma Field Symp. 38: 19-27.
- 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, Y. Yokota, H. Watanabe and S. Tano. 1997a. Effects of heavy ions on the germination and survival of *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Radiat. Biol.* 72: 121-127.
- Tanaka, A., S. Tano, T. Chantes, Y. Yokota, N. Shikazono and H. Watanabe. 1997b. A new *Arabidopsis* mutant induced by ion beams affects flavonoid synthesis with spotted pigmentation in testa. *Genes Genet. Syst.* 72: 141-148.
- Ueno, K., T. Shirao, S. Nagayoshi, Y. Hase and A. Tanaka. 2005. Additional improvement of *Chrysanthemum* using ion beam re-irradiation. *TIARA Ann. Rep.* 2004: 60.
- van Harten, A. M.. 1998. *Mutation breeding*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Wakita, N., Y. Kazama, Y. Hayashi, H. Ryuto, N. Fukunishi, K. Yamamoto, S. Ijichi and T. Abe. 2008. Induction of floral-color mutation by C-ion irradiation in spray-type chrysanthemum. *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 41: 230.
- Watanabe, H., T. Toyota, K. Emoto, S. Yoshimatsu, Y. Hase and S. Kamisoyama. 2008. Mutation breeding of a new chrysanthemum variety by irradiation of ion beams to 'Jinba'. *JAEA Takasaki Ann. Rep.* 2007: 81.
- Yamaguchi, H. 1962. The chimaeric formation in an X1 panicle after irradiation of dormant rice seed. *Rad. Bot.* 2: 71-77.
- 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. Instr. Meth. In 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, 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.
- Yamakawa, K. and F. Sekiguchi. 1968. Radiation-induced internal disbudding as a tool for enlarging mutation sectors. *Gamma Field Symp.* 7: 19-39.
- Yamashita, A.. 1964. Some aspects of radiosensitivity of crop plants under chronic exposure. *Gamma Field Symp.* 3: 91-110.
- Yamashita, A., Y. Ukai and I. Yamaguchi. 1972. Comparison of genetic effects of gamma-ray irradiation and treatments of chemical mutagens in a six-rowed barley. *Gamma Field Symp.* 11: 73-92.
- Yang, T. C. and C. A. Tobias. 1979. Potential use of heavy-ion radiation in crop improvement. *Gamma Field Symp.* 18: 141-154.