

茨城農総セ
生工研研報
Bull. Ibaraki
Plant Biotech. Inst.
No. 4 2001

ISSN 1341-2809

BULLETIN
OF THE
PLANT BIOTECHNOLOGY INSTITUTE
IBARAKI AGRICULTURAL CENTER

NO. 4
March 2001

茨城県農業総合センター 生物工学研究所研究報告

第 4 号

平成 13 年 3 月

茨城県農業総合センター
生物工学研究所

茨城県西茨城郡岩間町安居 3165-1
Ago, Iwama, Nishi-Ibaraki, Ibaraki, 319-0292, Japan

目 次

放射線照射および組織培養によるグラジオラス花色変異体の作出に関する研究

霞 正一 1

グラジオラス野生種の花粉の長期保存

高津康正, 霞 正一, 眞部 徹, 林 幹夫 51

放射線照射および組織培養による グラジオラス花色変異体の作出に関する研究

霞 正一

目 次

第Ⅰ章 緒言	1
第Ⅱ章 花色変異体を得るための培養系の確立	3
第1節 緒言	3
第2節 木子茎頂からの不定胚形成および植物体再生	3
第3節 花蕾子房からの不定芽形成および植物体再生	8
第4節 木子茎頂からの不定胚由来個体に生じた花色変異	14
第5節 考 察	18
第Ⅲ章 木子、成球または成育中の植物体へのガンマ線照射と花色変異	19
第1節 緒 言	19
第2節 材料および方法	19
第3節 結 果	20
第4節 考 察	24
第Ⅳ章 花蕾子房の培養による花色変異区分キメラ個体からの完全突然変異体の作出	26
第1節 緒 言	26
第2節 材料および方法	26
第3節 結 果	27
第4節 考 察	28
第Ⅴ章 培養前の木子またはカルスへのガンマ線照射が茎葉再分化および再生個体の花色変異 に及ぼす影響	29
第1節 緒 言	29
第2節 材料および方法	30
第3節 結 果	30
第4節 考 察	35

第VI章 花色変異系統の特性と実用性の検証	36
第1節 緒 言	36
第2節 材料および方法	36
第3節 結 果	38
第4節 考 察	40
第VII章 総合考察	40
第VIII章 摘 要	42
謝 辞	43
引用文献	43
Summary	48

略 語 一 覧

BAP : 6-ベンジルアミノプリン

IAA : インドール酢酸

KIN : 6-フルフリルアミノプリン

MS培地 : Murashige and Skoog 培地 (1962)

NAA : 1-ナフタレン酢酸

2, 4-D : 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸

第I章 緒言

グラジオラス属 *Gladiolus* は、アヤメ科に属し、種数は250~300ともいわれ非常に多いが、園芸的には開花時期や生態特性により、大きく春咲き（早咲き）系と夏咲き系に大別されている。生産の主力は夏咲き系で特にグランディフローラ系 (*G. × grandiflora hort.*) が多い（今西, 1989）。グラジオラスは大部分が切り花として利用され、アメリカ、オランダの2大生産国を中心に世界中で生産され、1991年における世界の栽培面積は8429 haで、重要な球根花きの一つとなっている。育種はアメリカ、オランダを中心に行われ、1990年の北米グラジオラス協議会における品種登録数は2300に上っている（Cohat, 1993）。

グラジオラスは栄養繁殖性作物の一つで、これまで実用品種の大部分は交配育種により育成されている（Cohat, 1993；今西, 1988, 1989；川畑, 1997）。一方、栄養繁殖性作物のキク（斉藤, 1983）、リンゴ、カンキツ（池田, 1983b）、ニホンナシ（真田ら, 1993）では、放射線照射などで生じる人為突然変異を利用して、優良品種が持つ優れた特性を損なうことなく、1または数個の欠点を改良した品種が育成されている。特にスプレーギクにおいては、放射線照射により栽培特性が原品種とほとんど同じで花色の異なる突然変異体を利用した品種がシリーズものとして育成されている（大石, 1991）。

グラジオラスでは、花色の異なる多数の品種が栽培されているが、これらは花色と同時に栽培特性が異なるため、管理が煩雑である。もし、花色のみ異なり、他の特性では同一の品種が多数育成されれば、花色に対する消費者の要望を満たし、しかも管理方法が同一な品種を栽培することが可能となり、生産性が向上すると考えられる。このため、栄養繁殖性作物であるグラジオラスにおいても、放射線照射による育種が検討されている（山本ら, 1958；飯塚ら, 1963；射場ら, 1964, 1965；Banerjiら, 1994）が、品種の育成までに至った報告は、まだ1例しかない（Raghavaら, 1988）。

また、突然変異育種においては、培養変異も優良品種の一部形質を改良する手法の一つとして利用され、花きではペラルゴニウム（Skirvin and Janick, 1976）、トレニア（Brand and Bridgen, 1989）、エラチオール・ベゴニア（大門ら, 1993）などで新品種の育成が報告されている。また、キク（Earle and Langhans, 1974；遠藤ら, 1990；市橋・藤野, 1976；宮崎・田代, 1978；大石・桜井, 1988；柴田ら, 1984）、トキワザクラ（Kanda, 1992）、トルコギキョウ（古川, 1993）、ヒャクニチソウ（Stieve and Stimart, 1996）など多くの花きで、組織培養（以下、培養と略記）により花色変異が生じたことが報告されている。これに対し、グラジオラスの培養変異については、アルビノ個体を観察したとするRemotti（1995）の報告があるだけである。グラジオラスにおいても他の花きと同様に培養によって生じた花色変異体の育種への利用は検討する価値がある。

栄養繁殖性作物の突然変異育種において、培養はキメラ状に生じた突然変異セクターから遺伝的に均質な突然変異体を育成する手法として用いられている。これまで、グラジオラス成球への放射線照射により花色変異が花被片にキメラ状に生じることが報告されている（射場ら, 1965）。しかし、分球や木子を介した慣行的な栄養繁殖では、小さな変異セクターから変異が個体全体におよぶ突然変異体（以下、完全突然変異体と仮称する）を得るのは困難であった（射場ら, 1965）。双子葉植物のキク、ベゴニアでは、放射線照射により生じた区分キメラの変異セクターを培養し、完全突然変異体を作出している（二階堂・小野沢, 1989；重松・松原, 1972）。単子葉植物のグラジオラスにおいてもこの手法が利用できれば、花被片の一部に生じた変異セクターから完全突然変異体を作出することが可能と考えられる。そのためには、花被片または変異セクターと組織発生的につながりのある子房などの花器部位を培養し、個体再生を行わせるための培養系を確立する必要がある。また、イネ、カーネーション、キクでは培養前の外植体、または培養によって生じたカルスへガンマ線照射することにより、ガンマ線照

射や培養だけを単独に行うよりも効率的に再生個体に変異の生じることが報告されている (Kinoshitaら, 1989; 永富ら, 1989, 1991; Simardら, 1992; 丹野ら, 1993)。このように培養を単独, または放射線照射と併用して育種に利用する場合には, 特定の部位を外植体とした培養系の確立, および材料の維持が容易で簡便な培養操作で高い茎葉再分化率の得られる効率的な培養系の確立が必要となる。

グラジオラスでは, すでにウイルスフリー化を目的とした茎頂培養系が確立され, 実用化されている (霞, 1997; 高津, 1978, 1982)。一方その他の培養系として, これまでにグラジオラスの花茎, 木子片, 葉基部の葉片など

からの直接, またはカルス経由の茎葉再分化系が数多く報告されている (Bajajら, 1983; Hussey, 1975; Kamoら, 1990; Kimら, 1988; Kim and Kang, 1992; 大城ら, 1974; Remotti and Löffler, 1995; Stefaniak, 1994; 田中, 1977; Tomotsuneら, 1994; Zivら, 1970)。しかし, 茎葉再分化における効率の高低にかかわらず, これらの報告にある培養操作はかなり煩雑である。

そこで, 本研究ではガンマ線照射, 培養および両者の併用の3つの手法を用いてグラジオラスの花色変異を有効に誘発し, 完全突然変異体を効率的に作出する方法を検討した (図1)。

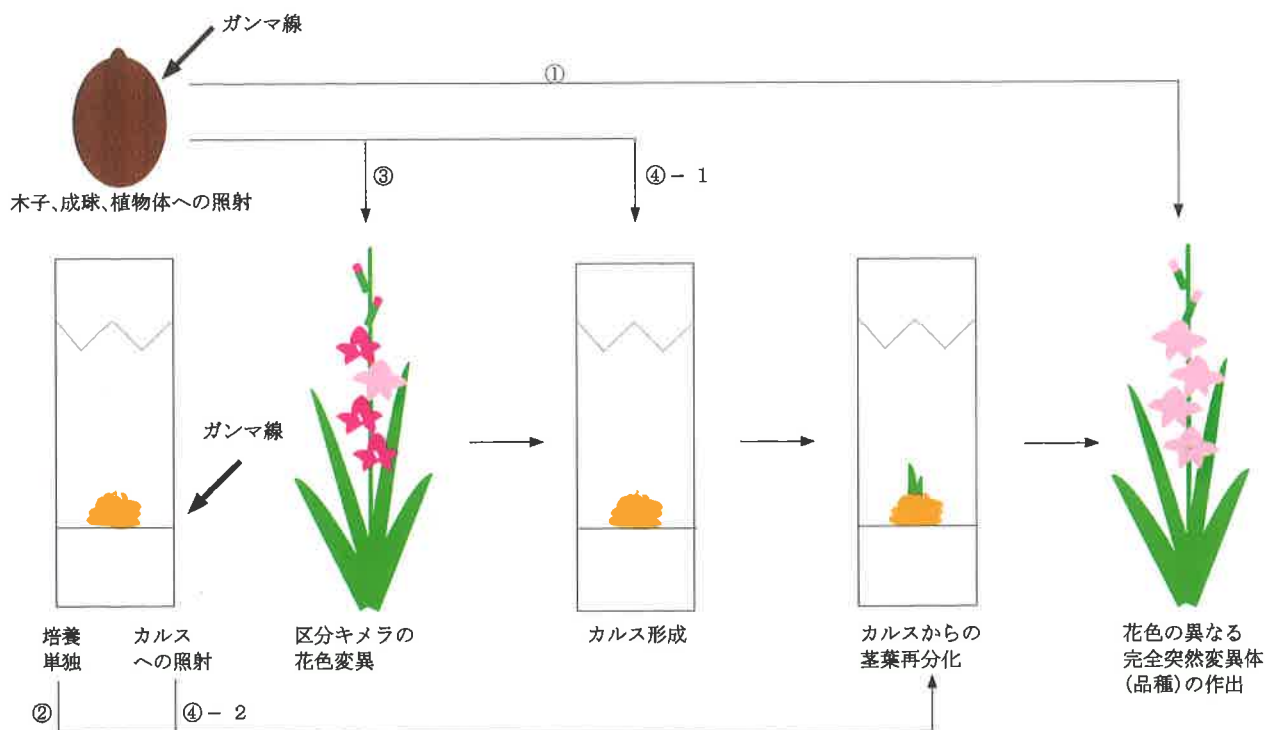


図1. この論文で検討するガンマ線照射および組織培養を用いたグラジオラス花色変異体の作出法

- ①: 木子などへのガンマ線照射により花色変異体を作成する。
- ②: 培養変異により花色変異体を作成する。
- ③: ①の花色変異セクターのみを培養し, 区分キメラのない花色変異体を作成する。
- ④-1: 木子へガンマ線照射し, さらにそれを培養して花色変異体を作成する。
- ④-2: 培養により得たカルスへガンマ線を照射し, さらに培養して花色変異体を作成する。

第Ⅱ章では、グラジオラスの花色変異体を得るための培養系の確立を検討した。外植体には木子、花蕾子房および葉を用いて、これまでほとんど未解明であったカルス、不定胚および不定芽形成に及ぼす、1) 培地に添加する植物成長調節物質の種類、濃度および組合せ、2) 外植体の部位および発育ステージ、3) 外植体の遺伝子型、の3つの要因の影響を検討し、効率的な植物体再生の条件を明らかにした。また、開発した培養系の中で再生個体が最も効率的に得られた木子茎頂からの不定胚培養系を用いて、これまで未解明であった培養による花色変異の出現頻度、変異セクターの大きさ、花色変異の方向およびこれらの品種間差異を明らかにした。

第Ⅲ章では、これまでグラジオラスの花色変異誘発において行われていた成球へのガンマ線照射に対して、安価で個体数を多く扱える木子、または成育中の植物体へのガンマ線照射を検討し、木子の成育および花色変異に及ぼす影響を解明し、有効性を明らかにした。

第Ⅳ章では、第Ⅲ章で行った木子へのガンマ線照射により区分キメラで生じた花色変異セクターから完全突然変異体を作成するために、花蕾子房を分割して培養することで遺伝的に均質な再生個体を得る方法を検討した。

第Ⅴ章では、第Ⅱ章で明らかにした木子茎頂由来カルスからの不定胚より得られた植物体における花色変異の出現頻度をさらに高めるため、これまでグラジオラスでは未検討であった培養前の木子またはカルスへのガンマ線照射の効果について検討した。

第Ⅵ章では、以上の手法で得られた花色変異系統の特性調査を行い、得られた花色変異体の成育特性および花色変異体が原品種と同じ花色に戻る現象を解明した。

なお、この論文は茨城県園芸試験場および茨城県農業総合センター生物工学研究所において実施したバイオテクノロジー試験研究推進事業「グラジオラスの放射線照射による優良母本の作出に関する研究」(平成元年～5年)および新品種育成普及促進事業「グラジオラスの新品種育成に関する研究」(平成6年～10年)を取りまとめたものである。この論文の一部は、すでに霞ら(1993a, 1993b, 1993c, 1994, 1995a, 1995b, 1996, 1998a, 1998b, 1999a, 1999b, 2001), Kasumiら(1994)として報告した。

第Ⅱ章 花色変異体を得るための培養系の確立

第1節 緒言

本章では、培養およびガンマ線照射を単独あるいは、さまざまな組み合わせにより、グラジオラスにおける花色変異を高頻度で誘発し、完全突然変異体を効率的に作出する方法を開発するために、次の実験を行った。

第1に、木子茎頂および花蕾子房を外植体とした簡便かつ効率的な培養系を開発するための実験を行った(第2, 3節)。木子は小さくて取り扱いやすく、安価で、大量に得られ、長期の保存が容易である。また一般にカルスからの茎葉再分化は、より未分化の部位ほど高いといわれている(Nakano and Mii, 1993)。木子茎頂は種子に次いで最も未分化な状態にあると考えられるので、効率的な培養系の確立が期待できる。一方グラジオラス成球への放射線照射による花色変異は、花被片にキメラ状に生じることが報告されている(射場ら, 1965)。しかし、変異セクターは小さい場合が多く、従来の分球や木子を介した栄養繁殖ではキメラのない完全突然変異体を得るのは困難であった。そこで変異セクターのみを切り出し、それを培養することによって、完全突然変異体を作成することが考えられる。そのためには、花被片または花被片に続いて変異が生じていると想定される子房などの花器部位からの培養系の確立が望まれている。

第2に、グラジオラスの培養変異は、アルビノ個体を観察したとするRemotti(1995)の報告だけで、十分な検討はされていない。しかしグラジオラスにおいても他の花きと同様に培養によって生じた花色変異体の育種への利用が期待される。そこで、本章第2節で開発された木子茎頂からの不定胚培養系を用いて、培養によって得られる花色変異の様相を検討した(第4節)。

第2節 木子茎頂からの不定胚形成および植物体再生

1. 緒言

グラジオラスの培養変異による花色変異体の作出を目的に、外植体としてこれまでに報告のあった木子片および葉片に対し、培養操作が簡便でしかも保存が容易な木子を用いて、その茎頂からの不定胚培養系の確立を検討した。

2. 材料および方法

実験1. 木子茎頂からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

供試材料には茨城県農業総合センター生物工学研究所保存の‘トラベラー’の木子を用いた。外皮を剥いだ木子を、70%エタノールに1分間浸漬後、少量のTween-20(0.1%)を添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素0.5%)に20分間浸漬して表面殺菌した後、滅菌水で5分間ずつ3回洗った。外植体として木子から茎頂を1~2 mmの大きさで無菌的に摘出し(図2-1-A, B), 各処理区の培地に39~50個置床した。

培地は3%ショ糖, 10 g/ℓ寒天を含むMS培地を基本培地とし, 1 mg/ℓ NAA, 1 mg/ℓ NAA + 1 mg/ℓ BAP, 1 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAP, 5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ NAA + 1 mg/ℓ BAP, 5 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAPおよび20 mg/ℓ NAAの組合せで植物成長調節物質を添加し, pH 5.8に調製した。これらの培地をφ24×90 mmの試験管に5 mlずつ分注し, アルミ箔でキャップした後, 20分間オートクレープで滅菌し, 斜面培地とした。培養条件は25℃, 暗黒とした。置床80日後にカルス形成数(率), 茎葉再分化カルス数(率)を調査した。

実験2. 胚様体の組織学的観察と不定胚の確認

組織学的観察は本節実験1において5 mg/ℓ NAAを添加したMS培地で形成された胚様体を用いて行った。すなわち, 胚様体の形成されたカルスをファーマー液で固定し, エタノール・ブタノールシリーズにより脱水後, 厚さ10 μmのパラフィン切片を作成し, 定法によってデラフィールドのヘマトキシリンで染色して, 胚様体の発育過程を観察した。

また, 形成された胚様体を植物成長調節物質無添加のMS培地に継代し, 置床7, 14日後に茎葉および根の発育を観察した。

実験3. 木子片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

供試材料には当研究所保存の‘トパーズ’の木子を用いた。本節実験1と同様に滅菌後, 定芽を含まないように上下および側面を切除し, 1辺が約5 mmの立方体にした。

培地はMS培地に植物成長調節物質無添加, 1 mg/ℓ BAP, 5 mg/ℓ BAP, 1 mg/ℓ NAA, 1 mg/ℓ NAA + 1 mg/ℓ BAP, 1 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAP, 5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ NAA + 1 mg/ℓ BAPおよび5 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAP添加の9区で, 本節実験1に準じて作成した。供試数は各処理区37~40個とした。培養条件は本節実験1と同様とし, 置床後90日目にカルス形成数(率), 茎葉再分化カルス数(率)を調査した。

実験4. 葉片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

供試材料には当研究所保存の‘トパーズ’の木子を用いた。本節実験1と同様に滅菌後‘トパーズ’の木子を無菌的にMS培地に播種し, 培養した。1~2ヶ月後, 伸長した無菌植物の葉基部を幅1 cm程度の大きさに切り, 葉片を培地に置床した(図2-2-A)。培地はMS培地に植物成長調節物質無添加, 1 mg/ℓ BAP, 5 mg/ℓ NAAおよび5 mg/ℓ NAA + 1 mg/ℓ BAP添加の4区で, 実験1に準じて作成した。供試数は各処理区30~42個とした。培養条件は本節実験1と同様とし, 置床後60日目にカルス形成数(率), 茎葉再分化カルス数(率)を調査した。

実験5. 木子茎頂からのカルスおよび不定胚形成の品種間差異

供試材料には当研究所保存の‘トラベラー’, ‘トパーズ’および‘ヘクター’の木子を用い, 本節実験1と同様の手法で, 茎頂を培地に50~100個置床した。培地には, 本節実験1で不定胚形成率の高かった5 mg/ℓ NAAを添加したMS培地を用いた。培養条件は本節実験1と同様とし, 置床60日後にカルス形成数(率), 不定胚形成カルス数(率)を調査した。

実験6. 植物体再生および順化

本節実験1で得られたシュートを, MS培地の入った100 ml コニカルビーカーへ継代して60日間培養し, 茎葉と根の伸長を図った。さらに得られた小植物体を6%ショ糖を添加したMS培地の入った100 ml コニカルビーカーへ継代して120~180日間培養し, 球茎の肥大を図った。

培養条件は25℃、白色蛍光灯（ネオライン白色 FL40S・W、東芝ライテック社製）で3,000 lx、16時間日長とした。球径が5 mm程度に肥大したところで、培地から取り出し、15～20日間乾燥させた。その後球茎を5℃下で、3ヶ月間低温処理し、休眠打破した。この球茎を1年間ほ場で養成し、翌年成球5個をほ場に定植し、開花期に花器形態、花被片およびブロッチの色などを目視で調査した。

表2-1. 木子茎頂からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

濃度(mg/ℓ)		供試数	カルス形成数(%)	茎葉再分化カルス数(%)	備 考
NAA	BAP				
1	0	41	36(87.8)a ^z	6(14.6)a	不定胚
1	1	41	32(78.0)a	2(4.9)ab	不定芽
1	5	42	30(71.4)a	3(7.1)ab	不定芽
5	0	43	39(90.7)a	22(51.1)c	不定胚
5	1	39	34(87.2)a	0 b	
5	5	43	36(83.7)a	0 b	
20	0	50	44(88.0)a	24(48.0)c	不定胚

材料：‘トラペラー’ 木子茎頂1～2 mm.

培地：MS培地. 培養条件：25℃、暗条件. 調査：置床後80日目.

^z異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す.

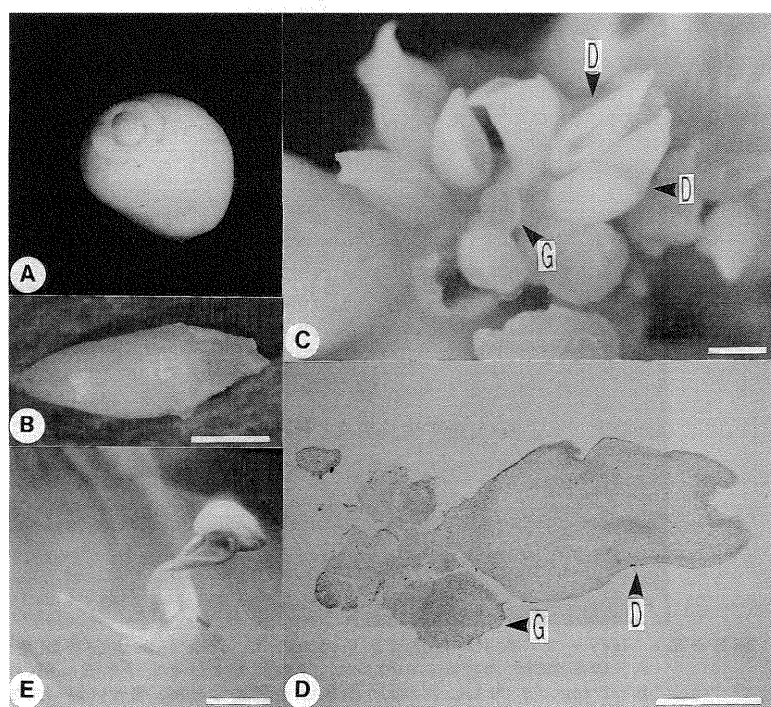


図2-1. ‘トラペラー’ 木子茎頂からのカルスおよび不定胚形成.

A：外皮を剥いた状態の木子.

B：茎頂を1～2 mmの大きさに抽出. バー＝0.5 mm.

C：5 mg/ℓ NAAを添加したMS培地においてカルスから形成された不定胚. 球状胚（G）とさらに発達した胚（D）. バー＝1 mm.

D：不定胚の切片. 球状胚（G）とさらに発達した胚（D）. バー＝0.5 mm.

E：MS培地に継代後、不定胚が成長し葉および根が伸長. バー＝2 mm.

3. 結 果

実 験 1. 木子茎頂からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

木子茎頂からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響を表2-1に示した。カルス形成率はいずれの培地でも71.4%以上で、各区間に有意な差はなかった。単独にNAAを1, 5または20 mg/ℓ添加し

た区では胚様体が形成され、カルスからの茎葉再分化率は、それぞれ14.6, 51.1, 48.0%であった（図2-1-C）。一方、1 mg/ℓ NAAに1または5 mg/ℓ BAPを添加した区で不定芽が形成され、茎葉再分化カルス率はそれぞれ4.9, 7.1%となった。また5 mg/ℓ NAAに1または5 mg/ℓ BAP添加区では茎葉再分化は認められなかった。単独にNAAを5または20 mg/ℓ添加した区において茎葉再分化カルス率が最も高い値を示した。

実 験 2. 胚様体の組織学的観察と不定胚の確認

胚様体を組織学的に観察した結果、接合胚と類似の球状胚および茎葉と根の両極性のある胚様体が、置床後80日目のカルスの表面に認められた（図2-1-D）。また、これらの胚様体は全体が表皮に囲まれ、維管束はカルスや他の組織とつながっていなかった。胚様体を植物成長調節物質無添加のMS培地に置床した結果、7～14日後に茎葉および根の伸長が認められた（図2-1-E）。

実験3. 木子片からのカルス形成および 茎葉再分化に及ぼす植物成長 調節物質の影響

木子片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響を表2-2に示した。カルス形成率は、NAA無添加区では0~12.5%と低かったのに対し、NAA添加区では57.5~92.1%と高かった。NAA添加区では、BAP無添加の方がカルス形成率は高い傾向にあった。

単独にBAPを添加した区および単独に1 mg/ℓ NAAを添加した区では、カルスからの茎葉再分化が全く認められなかった。1 mg/ℓ NAA + 1 mg/ℓ BAP, 1 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAP, 5 mg/ℓ NAA + 1 mg/ℓ BAP添加区では、茎葉再分化カルス率がそれぞれ2.5, 20.0, 5.0%となり、不定芽が形成された(図2-2-B)。単独に5 mg/ℓ NAAを添加した区では、茎葉再分化カルス率が7.9%となり、胚様体が形成された(図2-2-C)。NAAとBAPをともに5 mg/ℓ添加した区では、茎葉再分化カルス率が7.7%となり、不定芽と胚様体の両方が形成された。

実験4. 葉片からのカルス形成および 茎葉再分化に及ぼす植物成長調 節物質の影響

葉基部の葉片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響を、表2-3に示した。NAA無添加区では、カルスは全く形成されなかった。また5 mg/ℓ NAAを添加した区では、カルス形成率が100.0%、茎葉再分化カルス率が16.7%であり、胚様体が形成された。一方、5 mg/ℓ NAA + 1 mg/ℓ BAP添加区では、カルス形成率が73.3%、茎葉再分化カルス率が10.0%

表2-2. 木子片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

濃度(mg/ℓ)		供試数	カルス 形成数(%)	茎葉再分化 カルス数(%)		備 考
NAA	BAP					
0	0	40	5(12.5)a ²	0	a	
0	1	37	0	0	a	
0	5	40	5(12.5)a	0	a	
1	0	40	29(72.5)b	0	a	
1	1	40	23(57.5)b	1(2.5)a		不定芽
1	5	40	27(67.5)b	8(20.0)b		“
5	0	38	35(92.1)c	3(7.9)ab		不定胚
5	1	40	27(70.0)b	2(5.0)ab		不定芽
5	5	39	26(66.7)b	3(7.7)ab		不定芽, 不定胚

材料: 'トパーズ' 木子片。培地: MS培地。

培養条件: 25℃, 暗条件。調査: 置床後90日目。

²異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

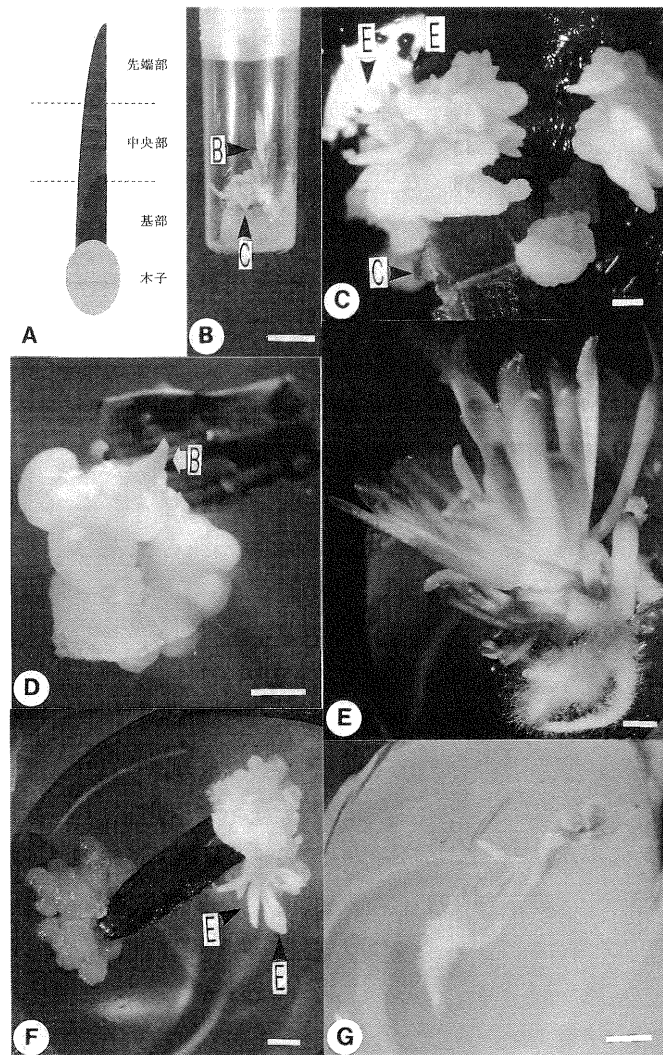


図2-2. 'トパーズ' 木子片と葉片からのカルス, 不定胚および不定芽形成。
A: 無菌植物の葉片からのカルス, 不定胚および不定芽形成に用いた材料。
B: 1 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ BAPを添加したMS培地において木子片(C)由来カルスから形成された不定芽(B)。バー=1 cm。
C: 5 mg/ℓ NAAを添加したMS培地において木子片(C)由来カルスから形成された不定胚(E)。バー=1 mm。
D: 5 mg/ℓ NAA, 1 mg/ℓ BAPを添加したMS培地において葉片由来カルスから形成された不定芽(B)。バー=2 mm。
E: MS培地に継代後, 葉片からの不定芽の伸長および発根。バー=2 mm。
F: 5 mg/ℓ NAAを添加したMS培地において葉基部葉片由来カルスから形成された不定胚(E)。バー=2 mm。
G: MS培地に継代後, 不定胚が成長し葉および根が伸長。バー=2 mm。

で、一部胚様体も認められたが、大部分が不定芽として形成された（図2-2-D～G）。

表2-3. 葉片からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

濃度(mg/ℓ)		供試数	カルス 形成数(%)	茎葉再分化 カルス数(%)	備 考	
NAA	BAP					
0	0	42	0	a ^z	0	a
0	1	39	0	a	0	a
5	0	30	30(100.0)b	5(16.7)a	不定胚	
5	1	30	22(73.3)b	3(10.0)a	不定芽, 不定胚	

材料：‘トパーズ’無菌植物の葉基部葉片。

培地：MS培地。培養条件：25℃、暗条件。調査：置床後60日目。

^z異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

実 験 5. 木子茎頂からのカルスおよび不定胚形成の品種間差異

供試品種ごとの木子茎頂からのカルスおよび不定胚の形成率を表2-4に示した。カルス形成率はいずれの品種でも98%以上と高かったが、不定胚形成率には品種間差異が有意に認められ、‘トパーズ’、‘トラベラー’、‘ヘクター’の順に低くなった。

表2-4. 木子茎頂からのカルスおよび不定胚形成における品種間差異

品種（花色）	供試数	カルス 形成数(%)	茎葉再分化 カルス数(%)
トラベラー（桃色）	100	100(100.0)a ^z	66(66.0)a
ヘクター（赤色）	50	49(98.0)a	9(18.0)c
トパーズ（黄色）	100	100(100.0)a	85(85.0)b

培地：MS培地に5 mg/ℓ NAAを添加。

培養条件：25℃、暗条件。調査：置床後60日目。

^z異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

実 験 6. 植物体再生および順化

‘トラベラー’木子茎頂より不定胚経由で得られた植物体から球茎を形成させ順化した5個体は、花器形態、花被片およびブロッチの色などが原品種‘トラベラー’とほぼ同一であった（図2-3）。

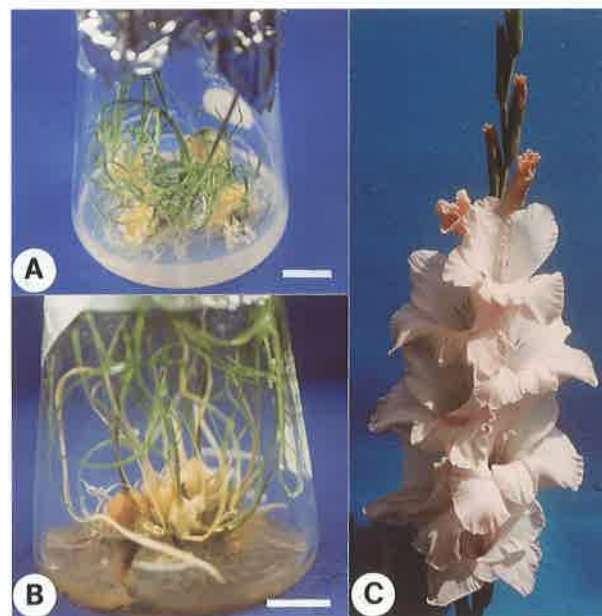


図2-3. ‘トラベラー’木子茎頂の培養により形成された不定胚の成長、球茎形成 および再生個体の開花。バー = 1 cm.

A：MS培地に継代後、不定胚が成長し茎葉および根が十分に伸長。

B：6% ショ糖を添加したMS培地へ継代後、球茎を形成した植物体。

C：球茎順化後、成長し開花した再生個体の様相。

4. 考 察

本節ではグラジオラスの培養変異による花色変異体の作出を目的に、外植体としてこれまでに報告のあった木子片および葉片に対し、新たに木子茎頂からの不定胚培養系の確立を試みた。

まず外植体として木子茎頂、木子片および葉片を供試し、培地に添加するNAA、BAP濃度を検討した結果、木子茎頂を外植体として、NAAを単独に5 mg/ℓ添加した場合、カルス形成率が90%以上、茎葉再分化したカルスの割合が50%以上となり、木子茎頂が木子片および葉片よりも効率的に茎葉再分化した（表2-1, 2, 3）。

これまでにグラジオラスにおいて茎葉再分化が報告された花茎（Kamoら, 1990）、木子片（Kamoら, 1990）；

Kim・Kang, 1992; Remotti, 1995; Stefaniak, 1994; Tomotsuneら, 1994) および葉基部の葉片 (Stefaniak, 1994) などを外植体として用いた培養では、外植体を大量に確保することが困難であった。また、茎葉再分化に至るまでの継代回数が多く、多大の労力を要した。これに対し、本研究の木子茎頂を外植体を用いた場合、冷蔵庫に保存した木子を培養直前に無菌化することによって、大量の外植体をほぼ1年間にわたって確保することが可能である。さらに、用いる茎頂は、大きさ1~2 mmであるため、摘出が肉眼で可能であり、25℃の暗所で継代を行うことなく、2~3ヶ月間経過すれば、効率的に胚様体が形成される。この胚様体を組織学的に観察した結果、接合胚と類似の球状であり、茎葉と根の両極性があり、維管束がカルスや他の組織とつながっていなかった (図2-1-D)。また、胚様体を植物成長調節物質無添加のMS培地に置床後、茎葉および根の伸長がみられた (図2-1-E)。よって、ここで観察された胚様体を不定胚とみなした。したがって、本研究で明らかにした木子茎頂を用いた不定胚培養系は、これまでの報告に比べて簡便かつ効率的な手法と考えられる。

木子茎頂からの不定胚培養系を‘トパーズ’、‘トラベラー’および‘ヘクター’で検討した結果、不定胚形成カルス率には品種間差異が認められ、‘トパーズ’、‘トラベラー’が高く、‘ヘクター’が低かった (表2-4)。

‘トラベラー’の木子茎頂からの不定胚由来の植物体を順化後に栽培した結果、原品種‘トラベラー’とほぼ同一の特性であった (図2-3)。

これらの結果から、取り扱いが簡便で、保存性の高い木子を材料に、その茎頂を外植体とし、単独にNAAを5 mg/ℓ添加したMS培地で培養することで、簡便で効率的な不定胚培養系が確立できた。

第3節 花蕾子房からの不定芽形成および植物体再生

1. 緒言

これまで、グラジオラス成球への放射線照射により花色変異が花被片にキメラ状に生じることが報告されている (射場ら, 1965)。しかし、従来の分球や木子を介した栄養繁殖では、変異セクターが植物体のごく一部にしかあらわれない照射当代の植物体から、完全突然変異体を得るのは困難であった (射場ら, 1965)。この対策として、

双子葉植物のキクおよびペゴニアでは、放射線照射により照射当代の植物体に生じた変異セクターを切り取り、培養することによって、完全突然変異体を作出している (二階堂・小野沢, 1989; 重松・松原, 1972)。本研究では、この手法を単子葉植物のグラジオラスに適用するために、変異が観察される花被片およびそれと発生的に近い位置にある子房を培養し、植物体を再生させる系の確立を試みた。

2. 材料および方法

1) カルス形成および茎葉再分化に及ぼす花器部位の影響

実験1. カルス形成

供試材料は当研究所で保存している‘トラベラー’ (花色: 桃色) をパイプハウスで栽培し、用いた。出穂後、未開花期 (開花2~3日前) の花器部位を花被片の展開予定部 (以下、花被片上部と称する)、花被片基部、子房に分け、外植体とした (図2-4-A)。滅菌は外植体をTween-20 (0.1%) を添加した次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素0.5%) に20分間浸漬し、さらに滅菌水で5分間ずつ3回洗った。花被片上部を5 mm角程度の小片に分割し、花被片基部および子房を5 mm幅程度に輪切りにして2~3個の外植体に分割し、培地にそれぞれ100, 100および84個を置床した (図2-4-B)。

培地はMS培地を基本として、5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ BAP, 3% ショ糖, 10 g/ℓ 寒天を添加し、pH 5.8に調製しφ24×90 mmの試験管に5 mlずつ分注した。アルミ箔で栓をした後、20分間オートクレーブし、斜面培地とした。培養条件は25℃、暗黒とした。置床60日後に、カルス形成数 (率) およびカルス径を調査した。

実験2. 茎葉再分化

本節実験1で形成された花被片基部、子房由来のカルスを3~5 mm角の大きさに分割し、培地に100個ずつ置床した。培地は本節実験1に準じて作成し、植物成長調節物質として2 mg/ℓ BAPを添加した。培養条件は25℃、白色蛍光灯 (ネオライン白色 FL40S・W, 東芝ライテック社製) で3000 lx, 16時間日長とした。置床60日後に茎葉再分化カルス数 (率) およびカルス当たり茎葉数を調査した。

2) 子房からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす小花発育ステージの影響

実験 1. カルス形成

供試材料は当研究所で保存している‘トラベラー’を露地で栽培し、用いた。出穂後、小花の発育ステージを未開花期（開花2～3日前）、開花中期（開花2～3日後）、開花終期（開花6～7日後）の3つに分けて、各ステージの子房を供試した。滅菌は子房を70% エタノールに1分間浸漬し、以下本節1) 実験1に準じて行った。この子房を5 mm幅程度に輪切りにして2～3個の外植体に分割し、各ステージ20, 39および29個を置床した。培地は本節1) 実験1に準じて作成した。培養条件は本節1) 実験1と同様にした。置床60日後に雑菌汚染率、カルス形成数（率）およびカルス径を調査した。

実験 2. 茎葉再分化

本節2) 実験1で形成された各ステージの子房に由来するカルスを3～5 mm角の大きさに分割し、培地にそれぞれ50個ずつ置床した。培地は本節1) 実験2に準じて作成した。培養条件および調査は本節1) 実験2と同様にした。

3) 花蕾子房からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

実験 1. カルス形成

供試材料は当研究所で保存している‘トラベラー’をパイプハウスで栽培し、用いた。出穂後の未開花期（開花2～3日前）の子房（以下、花蕾子房と称する）を供試した。滅菌は本節1) 実験1に準じて行った。この花蕾子房を5 mm幅程度に輪切りにして2～3個の外植体に分割し、20～58個を無菌的に培地に置床した。培地は本節1) 実験1に準じて作成し、植物成長調節物質について無添加、1 mg/ℓ 2, 4-D, 1 mg/ℓ 2, 4-D+1 mg/ℓ BAP, 1 mg/ℓ NAA+1 mg/ℓ BAP, 5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ NAA+5 mg/ℓ BAPおよび10 mg/ℓ NAA+5 mg/ℓ BAPの7区を設定した。培養条件および調査は本節1) 実験1と同様にした。

実験 2. 茎葉再分化

本節3) 実験1の5 mg/ℓ NAA+5 mg/ℓ BAP

添加区で形成されたカルスを3～5 mm角の大きさに分割し、培地にそれぞれ50個ずつ置床した。培地は本節1) 実験2に準じて作成し、植物成長調節物質としてBAPを無添加、0.1, 0.5, 2および10 mg/ℓの濃度で添加した。培養条件および調査は本節1) 実験2と同様にした。

4) 花蕾子房からのカルス形成および茎葉再分化における品種間差異

実験 1. カルス形成

供試材料には茨城県の主力品種で当研究所において保存している‘トラベラー’、‘ヘクター’（花色：赤色）、‘トパーズ’（同：黄色）および‘バイオレット’（同：紫色）の花色の異なる4品種を用いた。これらの品種をパイプハウスで栽培し、出穂後小花から花蕾子房を切り取り、供試した。滅菌、外植体の調整は、本節1) 実験1で述べた方法に準じて行い、上述4品種のそれぞれについて、42, 49, 27, 29個の外植体を置床した。培地は本節1) 実験1に準じて作成した。培養条件および調査は本節1) 実験1と同様にした。

実験 2. 茎葉再分化

本節4) 実験1で形成されたカルスを3～5 mm角に分割し、培地へ24～40個を置床した。培地は本節1) 実験2に準じて作成した。培養条件および調査は本節1) 実験2と同様にした。

5) 植物体再生および順化

本節1) 実験2で花蕾子房由来カルスから形成された茎葉をMS培地を20 mlずつ分注した100 ml コニカルビーカーへ継代培養し、茎葉と根の伸長を図った。さらに得られた小植物体を6%ショ糖を添加したMS培地の入った100 ml コニカルビーカーへ継代して120～180日間培養し、球茎の肥大を図った。培養条件は25℃、白色蛍光灯で3000 lx、16時間日長とした。球茎が5 mm程度に肥大したところで、形成された球茎を取り出し、風乾した。休眠打破を促すため、球茎を2～5℃で3ヶ月以上低温処理後、球茎をポットに定植、栽培し、開花期に花器形態、花被片およびブロッチの色などを目視で調査した。

3. 結 果

1) カルス形成および茎葉再分化に及ぼす花器部位の影響

カルス形成に及ぼす花器部位の影響を表2-5に示した。カルス形成率は花被片上部が0%, 花被片基部が56.0%, 子房が94.0%となり, 子房が花被片と比べて有意に高か

った。また, カルス径が10 mm以上になった割合は花被片基部が23.0%, 子房が75.0%であり, 子房を培養した場合に形成されたカルスにおける大きなカルスの割合が高まった(図2-4-C)。さらに, 観察結果から花被片基部の中でカルス形成率が高かったのは子房に近い部分であった。

表2-5. カルス形成に及ぼす花器部位の影響

培養部位	供試数	カルス形成数(%)		
		<10mm	10mm≤	計
花被片上部	100	0	0	0 a ^z
花被片基部	100	33(33.0)	23(23.0)	56(56.0)b
子 房	84	16(19.0)	63(75.0)	79(94.0)c

材料: 'トラベラー', 温室で養成した個体の開花2~3日前の花。

培地: MS培地に5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ BAPを添加。

培養条件: 25℃, 暗条件. 調査: 置床後60日目。

^z異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

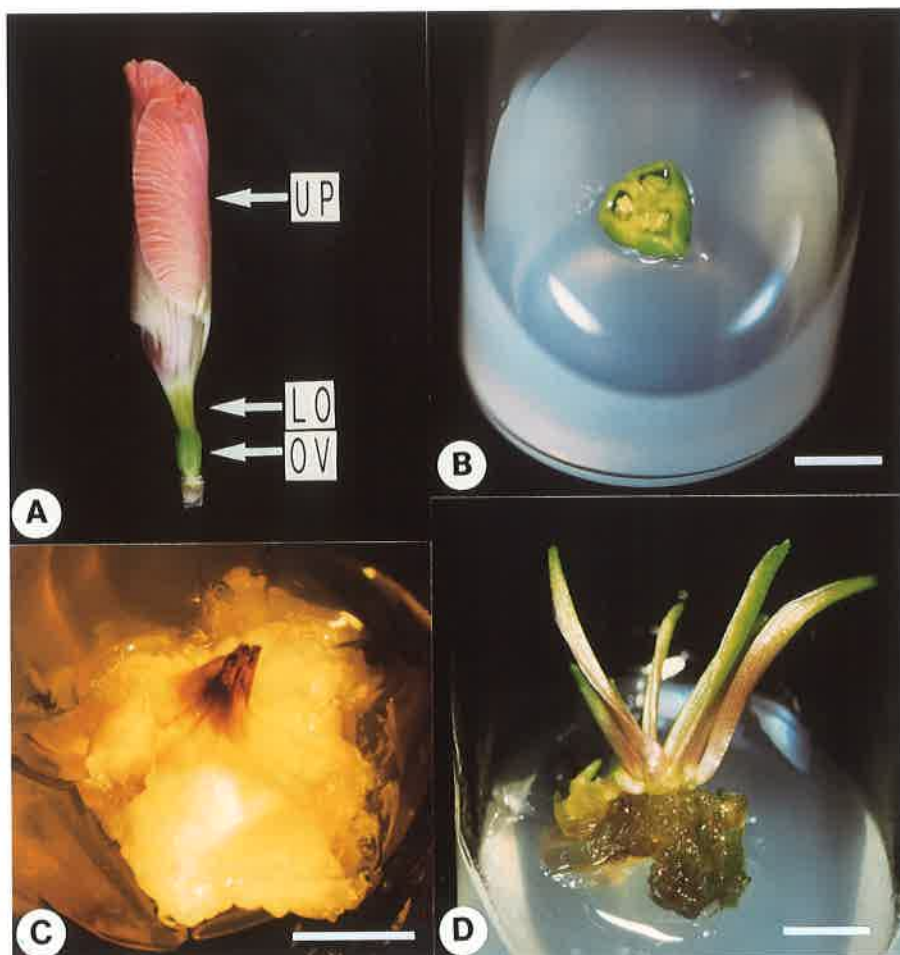


図2-4. 'トラベラー' 子房からのカルスおよび不定芽形成. バー= 5 mm.

A: 材料に用いた花被片上部(UP), 花被片基部(LO)および子房(OV).

B: 輪切りにして置床した子房.

C: 5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ BAPを添加したMS培地において子房から形成されたカルス.

D: 2 mg/ℓ BAPを添加したMS培地におけるカルスからの不定芽による茎葉再分化.

カルスからの茎葉再分化に及ぼす花器部位の影響を表2-6に示した。カルスからの茎葉再分化率は花被片基部が64.0%, 子房が63.0%となり両者に有意な差は認められなかった。またカルス当たりの茎葉数も3~10本で、両

者に差は認められなかった(図2-4-D)。

なお、カルスからの茎葉再分化を実体顕微鏡で観察したところ、不定芽の形成が認められた(図2-5-A)。また、一部には胚様体もみられた。

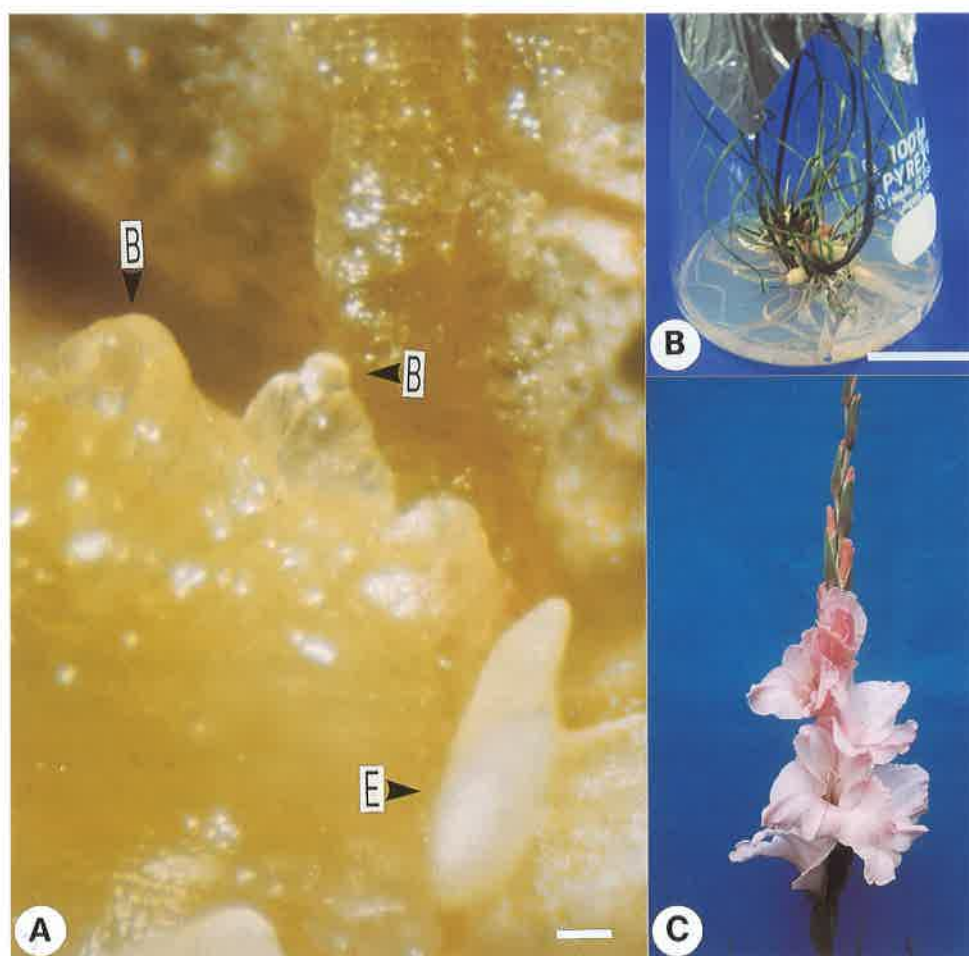


図2-5. 'トラベラー' 子房からの不定芽, 不定胚形成および再生個体の開花。

A: 子房由来カルスに形成された不定芽(B)および不定胚(E)。バー= 0.2 mm。

B: カルスからの不定芽経由で形成された植物体および球茎。バー= 2 cm。

C: 球茎順化後, 成長し開花した再生個体の様相。

表2-6. カルスからの茎葉再分化に及ぼす花器部位の影響

培養部位	供 試 カルス数	茎葉再分化 カルス数(%)	カルス当たり 茎葉数
花 被 片 基 部	100	64(64.0)a ²	3~10
子 房	100	63(63.0)a	3~10

材料: 表2-5で形成したカルス。 培地: MS培地に2 mg/ℓ BAPを添加。

培養条件: 25℃, 3000 ℓx, 16時間日長。 調査: 置床後60日目。

² 同一のアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差がないことを示す。

2) 子房からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす小花発育ステージの影響

子房からのカルス形成に及ぼす小花発育ステージの影響を表2-7に示した。雑菌汚染率は未開花期が5.0%，開花中期が10.3%，開花終期が62.1%となり，開花終期に近づくほど高くなる傾向にあった。カルス形成率は未開花期，開花中期がともに100.0%，開花終期が90.9%であった。径が10 mm以上になったカルスの割合は未開花期が78.9%，開花中期が85.7%であり，両者に差は認められなかった。

表2-7. 子房からのカルス形成に及ぼす小花発育ステージの影響

ステージ	供試 小花数	汚染小花 数(%)	カルス形成数(%)		
			<10mm	10mm≤	計
開花2～3日前	20	1(5.0) ^a	4(21.1)	15(78.9)	19(100) a
開花後2～3日	39	4(10.3)a	5(14.3)	30(85.7)	35(100) a
開花後6～7日	29	18(62.1)b	6(54.5)	4(36.4)	10(90.9)b

材料：露地栽培の‘トラベラー’子房。

培地：MS培地に5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ BAPを添加。

培養条件：25℃, 暗条件, 調査：置床後60日目。

^a異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

カルスからの茎葉再分化に及ぼす小花発育ステージの影響を表2-8に示した。茎葉再分化したカルスの割合は未開花期が66.0%，開花中期，開花終期がともに60.0%となり，小花のステージによる有意な差は認められなかった。カルス当たりの茎葉数は小花のステージによる差がなく，3～10本であった。

表2-8. カルスからの茎葉再分化に及ぼす小花発育ステージの影響

小花ステージ	供試 カルス数	茎葉再分化 カルス数(%)	カルス当たり 茎葉数
開花2～3日前	50	33(66.0) ^a	3～10
開花後2～3日	50	30(60.0)a	3～10
開花後6～7日	50	30(60.0)a	3～10

材料：表2-7で形成したカルス。培地：MS培地に2 mg/ℓ BAPを添加。培養条件：25℃, 3000 ℓx, 16時間日長。調査：置床後60日目。

^a同一のアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差がないことを示す。

3) 花蕾子房からのカルス形成および茎葉再分化に及ぼす植物成長調節物質の影響

花蕾子房からのカルス形成に及ぼす植物成長調節物質

の影響を表2-9に示した。カルスは植物成長調節物質無添加，1 mg/ℓ 2, 4-D, 1 mg/ℓ 2, 4-D + 1 mg/ℓ BAPおよび5 mg/ℓ NAA添加区では全く形成されなかったが，NAA, BAPをともに含んでいる場合に効率的に形成された。特に，5 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAP添加区でカルス形成率は100%となり，他の区と比較して有意に高かった。

表2-9. 花蕾子房からのカルス形成に及ぼす植物成長調節物質の影響

濃度(mg/ℓ)			供試 子房数	カルス形成数(%)		
NAA	2, 4-D	BAP		<10mm	10mm≤	計
0	0	0	20	0	0	0 a ^z
0	1	0	20	0	0	0 a
0	1	1	20	0	0	0 a
1	0	1	20	6(30.0)	3(15.0)	9(45.0)b
5	0	0	20	0	0	0 a
5	0	5	57	6(10.5)	51(89.5)	57(100) c
10	0	5	58	2(3.4)	50(86.2)	52(89.7)d

材料：‘トラベラー’，培養条件：25℃, 暗条件, 調査：置床後60日目。

^z異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

花蕾子房由来カルスからの茎葉再分化に及ぼすBAP濃度の影響を表2-10に示した。茎葉再分化したカルスの割合は，BAP無添加区，0.1 mg/ℓ 添加区に比べて，0.5, 2および10 mg/ℓ を添加した3区が有意に高く，特に2 mg/ℓ 添加区が最も高い傾向にあった。カルス当たりの茎葉数はBAP無添加，0.1および0.5 mg/ℓ 添加区が1～2本であったのに対し，2および10 mg/ℓ 添加区が3～10本となり，多かった。しかし，茎葉の伸長程度は2 mg/ℓ 添加区が，10 mg/ℓ 添加区よりまさっていた。

表2-10. 花蕾子房由来カルスからの茎葉再分化に及ぼすBAPの影響

BAP濃度 (mg/ℓ)	供試 カルス数	茎葉再分化 カルス数(%)	カルス当たり 茎葉数
0	50	10(20.0) ^a	1～2
0.1	50	14(28.0)a	1～2
0.5	50	29(58.0)b	3～10
2	50	33(66.0)b	3～10
10	50	32(64.0)b	3～10

材料：‘トラベラー’の花蕾子房から誘導したカルス。

培養条件：25℃, 3000 ℓx, 16時間日長。調査：置床後60日目。

^a異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

4) 花蕾子房からのカルス形成および茎葉再分化における品種間差異

花蕾子房からのカルス形成と品種の関係を表2-11に示した。カルスは4品種ともすべての外植体に形成された。カルスの大きさは、‘トパーズ’に10 mm未満のカルスが2.5%であった以外は、すべて10 mm以上であった。

表2-11. 花蕾子房からのカルス形成における品種間差異

品 種 (花色)	供試数	カルス形成数(%)		
		<10mm	10mm≤	計
トラベラー(桃色)	24	0	24(100)	24(100)a ²
ヘクター(赤色)	36	0	36(100)	36(100)a
トパーズ(黄色)	40	1(2.5)	39(97.5)	40(100)a
バイオレッタ(紫色)	35	0	35(100)	35(100)a

材料：露地栽培の花蕾子房。

培地：MS培地に5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ BAPを添加。

培養条件：25℃, 暗条件。調査：置床後60日目。

²同一のアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差がないことを示す。

花蕾子房由来カルスからの茎葉再分化と品種の関係を表2-12に示した。カルスからの茎葉再分化率は‘トラベラー’が最も高く、‘ヘクター’が最も低い値を示し、品種間で有意な差が認められた。また、カルス当たりの茎葉数は‘トラベラー’、‘トパーズ’が3～10本、‘ヘクター’、‘バイオレッタ’が1～2本であった。

表2-12. 花蕾子房由来カルスからの茎葉再分化における品種間差異

品 種 (花色)	供試 カルス数	茎葉再分化 カルス数(%)	カルス当たり 茎葉数
トラベラー(桃色)	42	20(47.6)a ²	3～10
ヘクター(赤色)	49	1(2.0)b	1～2
トパーズ(黄色)	27	7(25.9)ac	3～10
バイオレッタ(紫色)	29	3(10.3)bc	1～2

材料：表2-11で形成したカルス。培地：MS培地に2 mg/ℓ BAPを添加。

培養条件：25℃, 3000 ℓx, 16時間日長。調査：置床後60日目。

²異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

5) 植物体再生および順化

形成された茎葉は継代培養後、発根し、球茎を形成した(図2-5-B)。この球茎を定植、栽培したところ植物体は順調に生育し、出穂、開花した。開花した個体は、花被片およびブロッチの色が原品種の‘トラベラー’と同一

で、花器形態もほぼ原品種と同様であった(図2-5-C)。

4. 考 察

二階堂・小野沢(1989)は双子葉植物のキクを用い、ガンマ線照射によってキメラ状に生じた花色変異を含む管状花を培養して、花色について完全突然変異体を得たと報告している。単子葉植物のグラジオラスにおいても花色変異は花被片に生じ、特に花被片上部には明瞭に現れることが観察されている(第三章で詳述)。そこで、本研究では開花2～3日前の蕾の花被片上部を含む小花の各部位からのカルス形成および直接の茎葉再分化を検討した。その結果、花被片上部からはカルス、茎葉ともに形成されなかったが、花被片基部および子房からはカルス経由の茎葉再分化が認められた。花被片基部および子房由来のカルスから茎葉再分化率はほぼ同じで、高い傾向を示したが、カルス形成が優れていたのは子房であったので、培養部位としては子房が最適と判断した。

これまでに、花色変異を示した花被片と同一花の子房だけを培養して変異セクターを拡大したという報告はないが、単子葉植物のグラジオラスでは子房の上部に連続して、花被片が発達している(図2-4-A)。従って、子房と花被片は発生的に近い位置にあり、花被片に生じた突然変異が子房を構成する細胞にも同様に生じている可能性がある(第四章で詳述、図4-1-Bを参照)ので、子房培養によってすべての小花が変異形質を示す個体を得られることが考えられる。

本研究の最終の目的は、グラジオラスの優良な原品種の特性を変えずに、花色だけを変えた品種を育成することにある。そのためには放射線照射した球茎を大量に用いて栽培し、その中から花被片の全体または一部に花色変異を示す個体をスクリーニングし、それらの個体から変異セクターを培養する手法の利用が考えられる。この場合、培養には露地栽培の個体を多く使用する可能性が高いので、雑菌汚染の少ない部位から外植体を採取するのが望ましい。

本研究では開花発育ステージを3段階に分けて、子房培養を行った。開花終期の子房は他の発育ステージに比べて、雑菌汚染が多く、外植体としての利用は不適当と判断した。開花中期の子房は汚染率が低く、カルス形成率、茎葉再分化率とも未開花期の子房と同程度であった。し

かし、開花中期には受粉・受精が完了しているため、開花中に受精した胚からの個体が発生する可能性も考えられ、突然変異以外の遺伝的分離による変異体が再生個体中に含まれる可能性がある。これらのことから、子房培養に用いる小花の発育ステージは、雑菌による汚染率が最も低く、カルスからの茎葉再分化率が最も高かった開花2～3日前の未開花期が最適と判断した。

このように花器部位を培養する際、開花ステージにより茎葉再分化率に差のあることが、Nakano and Mii (1993) により報告されている。つまり、*Dianthus caryophyllus* 'Scania' の未開花期、完全に開花した時期の花弁培養を行った結果、前者は後者より茎葉再分化率が高かったという結果が得られている。このように、より未熟なステージほど茎葉再分化率が高いのは、植物体の部位、さらにそのなかの部分により差があるのと同じように、細胞分裂能力の違いや、これに関連する各器官に含有される内生ホルモンや種々の物質の種類や含量によると考えられる。

なお、グラジオラスの開花2～3日前の花被片では、花色がすでに明瞭になっていて、変異セクターの識別には支障がないと考えられる(第IV章で詳述)。

本研究では、NAAとBAPをともに培地に添加した場合に、はじめてカルス形成が認められ、特にNAA、BAPともに高濃度の5 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAPでカルス形成率がきわめて高かった。また、カルスからの茎葉再分化は植物成長調節物質無添加においても20%認められたが、2 mg/ℓ BAPの添加で66%と最も良好であった。

Hussey (1975) はグラジオラスの子房を外植体にして、MS培地にIAA、NAA、2, 4-Dを単独で添加した培地で培養したが、カルス形成、茎葉再分化はなかったとしている。これは、本研究の結果と一致している。一方、Zivら(1970)はグラジオラスの花茎を外植体として、カルス形成、茎葉再分化を報告している。このときのカルス形成培地の植物成長調節物質組成は5 mg/ℓ NAA + 0.5 mg/ℓ KINで高濃度のオーキシンと低濃度のサイトカイニンの組み合わせであった。一方茎葉再分化培地の植物成長調節物質組成は0.5 mg/ℓ NAA + 0.5 mg/ℓ KINであった。品種や外植体等の条件が異なるので直接比較はできないが、この結果は本研究結果とやや異

なる点がみられる。

これまで、グラジオラスのカルス形成および茎葉再分化に品種間差異のあることが報告されている(Kamoら, 1990; Remotti and Löffler, 1995; Stefaniak, 1994)。本研究では花蕾子房からのカルス形成には品種間差異が小さかったが、カルスからの茎葉再分化率には品種間差異があった。本章第2節で述べたように木子茎頂からのカルスおよび不定胚形成にも品種間差異が認められた。一般に、グラジオラスのカルス形成能およびカルスからの茎葉再分化能には、遺伝子型が影響することが想定される。

以上の結果より、グラジオラスにおいて子房からの茎葉再分化系が確立できた。つまり、開花2～3日前の子房を分割し、5 mg/ℓ NAAと5 mg/ℓ BAPを添加したMS培地で、60日間培養する。形成されたカルスを2 mg/ℓ BAPを添加したMS培地で60日間培養する。形成された茎葉をMS培地へ継代培養し、茎葉と根の伸長を図る。さらに得られた小植物体を6%ショ糖を添加したMS培地へ継代して120～180日間培養し、球茎の肥大を図る。球径が5 mm程度に肥大したところで、形成された球茎を取り出し、風乾する。休眠打破を促すため、球茎を2～5℃で3ヶ月以上低温処理後、球茎を定植、栽培、開花させる。

この培養系を利用して、放射線照射により照射当代の植物体に生じた変異セクターを切り取り、培養することによって、完全突然変異体の作出を行った結果を第IV章で検討する。

第4節 木子茎頂からの不定胚由来個体に生じた花色変異

1. 緒言

グラジオラスの培養変異は、これまでアルビノ個体を観察したとするRemotti (1995) の報告だけで、十分な検討はされていない。しかし他の花きと同様に培養によって生じる花色変異体の育種への利用が期待される。

そこで、本章第2節で開発した木子茎頂からの不定胚培養系を用いて、不定胚由来個体に生じる花色変異の様相および培養変異の対照として通常の栄養繁殖系個体で観察される花色変異の様相を明らかにする。

2. 材料および方法

実験1. 木子茎頂からの不定胚由来個体に生じた花色変異

本章第2節で得られた‘トラベラー’、‘ヘクター’および‘トパーズ’の3品種の不定胚由来の球茎を、1992年に当研究所の露地圃場で1年間養成して、成球にした。翌年、得られた成球64～489球を露地圃場に10 cm間隔の3条植えて定植した。対照区として、分球と木子から養成した成球120球を処理区と同様に栽培した。その他の管理は茨城県花き耕種基準に準じて行った（茨城県農林水産部、1988）。花色変異の調査基準は原品種の花色に対して日本園芸植物標準色票（財団法人 日本色彩研究所製、1984）で1段階以上異なった花色を濃淡により二つに分け、さらに変異セクターの大きさにより、4種類、すなわち花被片半分以上花被片1枚未満（“花被片半分 $\leq$ ”）、花被片1枚以上小花1個未満（“花被片1枚 $\leq$ ”）、小花1個以上株全体未満（“小花1個 $\leq$ ”）、株全体（“株全体”）に分類した。調査は開花期間中2～3日ごとに行った。

実験2. 通常の栄養繁殖系個体における花色変異

当研究所で通常の栄養繁殖系で保存している‘トラベラー’、‘ヘクター’および‘トパーズ’の成球を、1992年および1998年に、露地およびパイプハウスほ場にそれぞれ

の品種ごとに2年間を合計して、264, 94, 120個を定植、開花させた。開花期に小花10個以上を着生した個体について、花色変異を調査した。花色変異の調査基準は原品種の花色に対して日本園芸植物標準色票（財団法人 日本色彩研究所製、1984）で1段階以上異なった花色を原品種に対して淡色化、濃色化および並列した淡色化と濃色化の、3段階に分類し、さらに変異セクターの大きさにより、花被片半分未満（“<花被片半分”）および花被片半分以上（“花被片半分 $\leq$ ”）に分類して個体数を調査した。調査は開花期間中2～3日ごとに行った。

3. 結 果

実験1. 木子茎頂からの不定胚由来個体に生じた花色変異

木子茎頂からの不定胚由来個体の成球を栽培し、生じた花色変異の発生様相を品種ごとに調査し、表2-13に示した。花色変異体の出現頻度は‘トラベラー’が1.5%、‘トパーズ’では0%、‘ヘクター’では0.6%となり品種間で相異が認められた。花色変異は原品種に対して、‘トラベラー’では淡色化と濃色化の両方（図2-6-A, B）、‘ヘクター’では淡色化だけが認められた。花色変異を示した全個体では、着生したすべての小花が同様の花色変異を示した。

表2-13. 木子茎頂からの不定胚由来個体に生じた花色変異における品種間差異

品 種	供試個体数	花 色 変 異 体 数 (%) ²		
		淡 色	濃 色	合 計
トラベラー 不定胚由来個体	545	3(0.6)	5(0.9)	8(1.5)
対 照	120	0	0	0
ヘクター 不定胚由来個体	170	1(0.6)	0	1(0.6)
対 照	120	0	0	0
トパーズ 不定胚由来個体	553	0	0	0
対 照	120	0	0	0

材料：5 mg/ℓ NAAを添加したMS培地で木子茎頂から誘導した不定胚由来の再生個体。

調査：花色変異セクターの大きさが花被片半分以上の個体を調査。

² 花色変異体には、区分キメラは認められなかった。

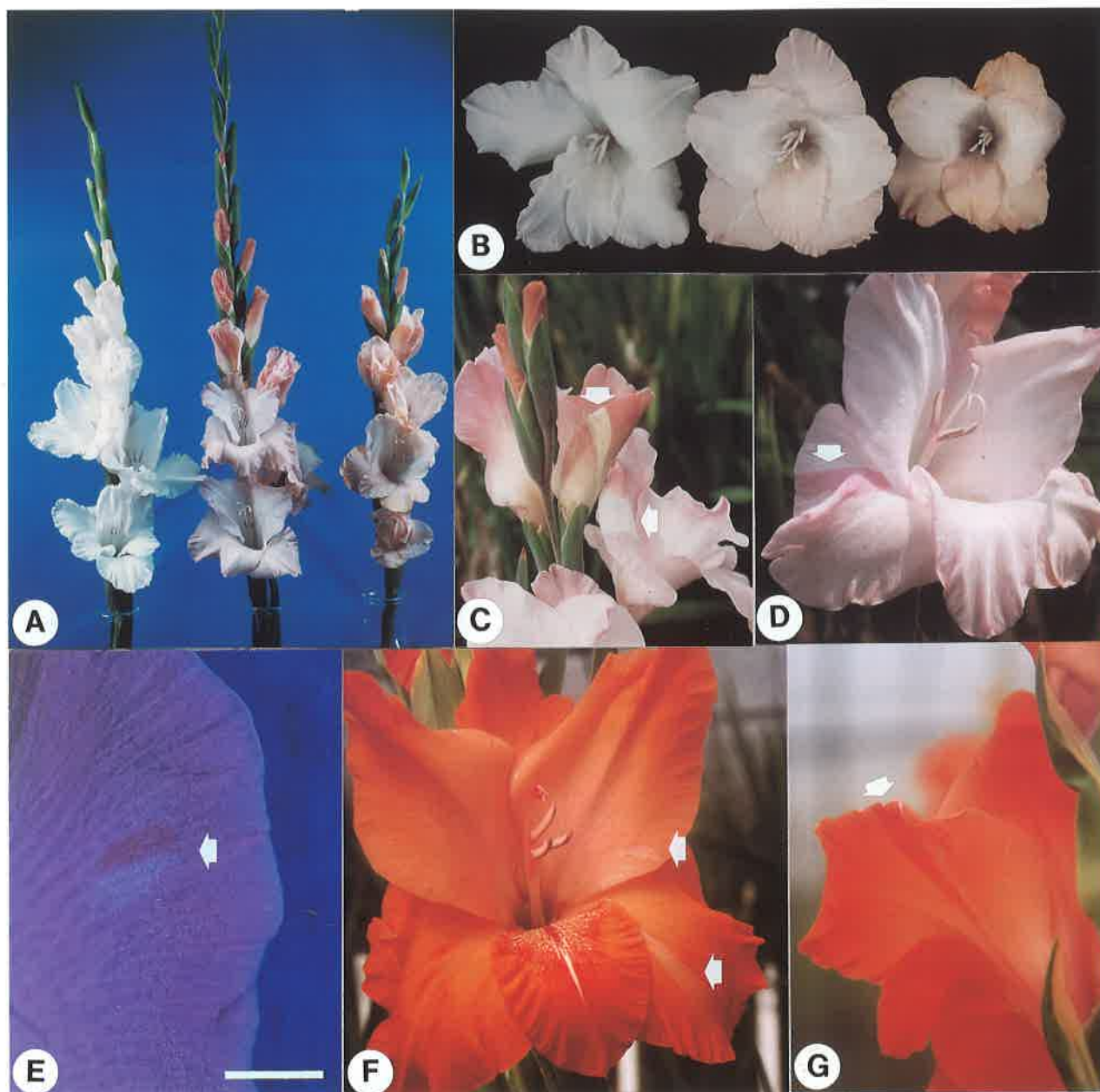


図2-6. 不定胚由来個体に生じた花色変異体と自然突然変異による小さな花色変異.
バー= 5 mm.

A: 'トラベラー' の不定胚由来個体に生じた花色変異体の花穂.

中央; 原品種. 左; 淡桃色個体. 右; 濃桃色個体.

B: Aの小花. 配置もAと同じ.

C: 'トラベラー' に生じた自然突然変異による淡桃色の小さな花色変異 (矢印).

D: Cと同様の濃桃色の小さな花色変異 (矢印).

E: 'トラベラー' に生じた体細胞組換えによるとみられる淡桃色および濃桃色が並列した小さな花色変異 (矢印).

F: 'ヘクター' に生じた自然突然変異による淡赤色の小さな花色変異 (矢印).

G: Fと同様に生じた濃赤色の小さな花色変異 (矢印).

実 験 2. 通常の栄養繁殖系個体における花色変異

通常の栄養繁殖系個体で観察された花色変異を表2-14に示した。調査した‘トラベラー’264個体, ‘ヘクター’94個体のうち, 花被片半分以上の大きさに花色変異した個体は全くなかったのに対し, 花被片半以下の大きさはそれぞれ95個体(36.0%), 26個体(27.7%)が認められた。変異セクターの形状はストライプ状また点状であった。また, 花色変異は淡色化, 濃色化および並列し

た淡色化と濃色化の, 3つが認められた(図2-6-C~G)。トラベラーでは淡色化が83個体(31.4%), 濃色化が7個体(2.7%), 並列した淡色化と濃色化が5個体(1.9%)であったのに対し, ヘクターではそれぞれ23個体(24.5%), 3個体(3.2%), 0となり両品種ともに淡色化への変異が多かった。一方, ‘トパーズ’の120個体には全く花色変異が認められなかった。

表2-14. 通常の栄養繁殖系個体における花色変異

品 種	供試個体数	変異セクターの大きさ別花色変異体数(%)				
		<花被片半分			花被片半分≧	
		淡色	濃色	濃淡両方	計	
トラベラー	264	83(31.4)	7(2.7)	5(1.9)	95(36.0)	0
ヘクター	94	23(24.5)	3(3.2)	0	26(27.7)	0
トパーズ	120	0	0	0	0	0

肉眼観察のみ。小花10個以上を着生した個体を調査。

4. 考 察

本研究の結果, 木子茎頂からの不定胚由来個体における花色変異の出現様相は, 同一個体の一部分の小花のみではなく, すべての小花で認められ, その変異は原品種に比べて濃淡いずれかで, しかもその発生様相に品種間差異が認められた。このように培養由来個体に花色変異の生じることが花卉, 茎を外植体にして得られたキクの不定芽由来個体で報告されている(遠藤ら, 1990; 市橋・藤野, 1976; 大石・桜井, 1988; 柴田ら, 1984)。また, Wakasa(1979)は栄養繁殖性作物のパイナップルを用いて培養を行い, 形態的に異なる多数の変異体を得ている。そして, これらの変異が多数生じた原因として, 培養過程で変異が生じたこと, あるいは培養材料がもともとキメラであったこと, などが考えられるとしている。

通常の栄養繁殖系で保存されていた‘トラベラー’と‘ヘクター’の2品種のみに, 花被片の一部に小さな点状またはストライプ状に花色変異した個体が高頻度に観察された。また不定胚由来の個体においても, これら2品種だけに, 花色についての完全突然変異体が出現した。観察の結果, 多くの不定胚由来の個体には通常の栄養繁殖系と同様に花被片の一部に小さな点状またはストライプ状に花色変異した個体が高頻度に観察された。これに対し, ‘ト

パーズ’には小さな点状に花色変異した個体すら観察されなかった。この事実は, ‘トラベラー’と‘ヘクター’の2品種には花色に関する遺伝子の体細胞自然突然変異が高い頻度で生じ, それがキメラ状に保持されていることを示唆している。これに対し, 一般に植物では, 培養過程で変異(ソマクローナル変異)の生じることが認められている(Bajaj, 1990)。同様のことはグラジオラスにおいても考えられるので, 本研究で得られた花色変異体が培養過程で生じた可能性もある。前者により, 花色変異体が生じたとすれば, 培養による変異の量的拡大になるが, 後者により生じたとすれば, 培養による変異の質的, 量的拡大になる。さらには単一の原因でなく, 両方による可能性も否定できない。また, 斉藤(1983)は, 放射線照射による花色の白色化が, 一般に赤色~紫色のフラボノイド系色素によって花色を表している植物種でみられやすいが, 黄色~橙色のカロチノイド系色素を主としているものではほとんど起こっていないとしている。これらのことから, 花色変異の出現に品種間差異があるのは, 花色に関わる遺伝子の自然突然変異の頻度か, あるいは突然変異した遺伝子の表現度のいずれかに品種間差異があることを示唆している。

本研究では, 原品種の花色に対し, 花色変異の方向が

淡色化または濃色化の一方向だけのものの他に、ごく一部に、淡色と濃色が並列した小斑点が認められた(図2-6-E)。これは‘トラベラー’の花色である桃色が遺伝的には不完全優性のヘテロであって、体細胞分裂において染色分体間の交叉が起り、その結果、体細胞組換えとなり、優性ホモ接合型と劣性ホモ接合型の変異セクターが隣接して生じたためと推論される。このような現象は、タバコ、シロイヌナズナ、トマト、ワタなどで知られている(山下, 1991a)。

以上の結果から、木子茎頂からの不定胚培養によって、自然突然変異またはソマクローナル変異によって生じた突然変異についての完全変異体を作出できることが明らかとなった。

第5節 考察

本章では、培養およびガンマ線照射を単独あるいは、さまざまな組み合わせで用い、グラジオラスにおける花色変異を高頻度で誘発し、完全突然変異体を効率的に作出する方法を開発するために、次のことを検討した。

第1に、培養変異を効率的に誘発するためには、すぐれた培養系が必要となる。そこで外植体として、木子茎頂、木子片および葉片を用い、培地に添加する植物成長調節物質としてNAA, BAPの組合せおよび濃度を比較し、簡便で効率的な培養系の開発を検討した(第2節)。

第2に、グラジオラスでは、成球への放射線照射により花色変異が花被片にキメラ状に生じる。しかし、従来の栄養繁殖では変異セクターが小さい場合、区分キメラのない、完全突然変異体を得るのは困難であった。この対策として、花被片またはそれと発生的に近い位置にある子房などの花器部位を培養し、完全突然変異体を得る方法を開発する必要がある。そこで、外植体に用いる花器部位、小花発育ステージ、培地に添加する植物成長調節物質の組合せと濃度および培養特性の品種間差異を検討した(第3節)。

第3に、グラジオラスでは、これまで培養変異についてほとんど検討はされていないが、他の花きと同様に培養変異による花色変異体の育種への利用が期待される。そこで、本章第2節で開発された木子茎頂からの不定胚培養系を用いて、培養によって得られる花色変異の様相を、通常の栄養繁殖系個体に生じた花色変異と比較検討した。

先ず、グラジオラスの培養変異による花色変異体の作出を目的に、外植体としてこれまでに報告のあった木子片および葉片に対し、新たに木子茎頂からの不定胚培養系の確立を試みた。外植体として木子茎頂、木子片、葉片と培地に添加するNAA, BAP濃度を検討した結果、木子茎頂を外植体として、NAAを単独に5 mg/ℓ添加した場合、カルス形成率が90%以上、茎葉再分化したカルスの割合が50%以上となり、最も効率的に茎葉再分化した。この茎葉再分化は不定胚によるものであった。

次に、花器部位からの培養系の確立を検討した。その結果、外植体に用いる花器部位は、カルス形成率およびカルスからの茎葉再分化率の最も高かった子房が最適であった。子房培養する場合の小花発育ステージは、雑菌による汚染率が最も低く、カルスからの茎葉再分化率が最も高かった開花2~3日前の未開花期が最適であった。培地に添加する植物成長調節物質の組合せと濃度は、カルス形成が、5 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAP, カルスからの茎葉再分化が、2 mg/ℓ BAPで最も良好であった。花蕾子房からのカルス形成には品種間差異が小さかったが、カルスからの茎葉再分化率には品種間差異があった。この茎葉再分化はおもに不定芽によるものであった。

なお、木子茎頂からの不定胚由来個体および花蕾子房からの再生個体は、ともに花器など形態特性が原品種とほぼ同じであった。

さらに、木子茎頂からの不定胚由来個体における花色変異の出現様相を検討した。その結果、花色変異が同一個体の一部分の花被片のみではなく、すべての花被片で認められ、その変異は原品種に比べて濃淡いずれかで、しかもその発生様相に品種間差異が認められた。

グラジオラスでは、これまでに花茎(Kamoら, 1990)、木子片(Kamoら, 1990; Kim and Kang, 1992; Remotti, 1995; Stefaniak, 1994; Tomotsuneら, 1994)および葉基部の葉片(Stefaniak, 1994)を外植体として用いた培養系が報告されている。しかし、これらは外植体を大量に確保することが困難であったり、また、茎葉再分化に至るまでに継代回数が多く、多大の労力を要した。一方、本研究では、木子茎頂を外植体に用いた結果、冷蔵庫に保存した木子を培養直前に無菌化することによって、大量の外植体をほぼ1年間にわたって確保することが可能である。さらに、用いる茎頂は、大きさ1~2

mmであるため、摘出が肉眼で可能であり、継代を行うことなく、2~3ヶ月間経過すれば、効率的に不定胚が形成される。したがって、本研究で明らかにした木子茎頂を用いた不定胚培養系は、これまでの報告に比べて簡便かつ効率的な手法と考えられる。

球根花きでは、これまでユリ類（古川ら、1978）、サクユリ（和田ら、1984）、シベリア・アイリス（浅尾ら、1993）、アマリリス（三位、1975）、ヒヤシンス（Hussey、1975）、オーニソガラム（Hussey、1975、1976）、スイセン（Seabrookら、1976）、ムスカリ（Hussey、1975）、シラー（Hussey、1975）、ハナニラ（Hussey、1975）で子房からの直接、またはカルス経由の茎葉再分化が報告されている。

一方グラジオラスにおいて、花器部位を用いた培養は3例が報告されているが、いずれも茎葉再分化には至らなかった。本研究はグラジオラスの花器部位として子房、花被片基部からの茎葉再分化をはじめて報告したものであり、花被片に生じた花色変異セクターより、培養によって完全突然変異体を作成できる可能性を明らかにすることができた。

木子茎頂を培養して得た不定胚由来の再生個体には、低頻度ではあるが、花色に関する完全突然変異体が出現した。これらが培養中のソマクローナル変異によるものかどうかは不明であったが、体細胞の一部に生じた変異から木子茎頂を培養して完全突然変異体を作成できる可能性が示された。これをガンマ線照射等と組合せることにより、さらに高頻度で突然変異体を得ることが期待できる。

第Ⅲ章 木子、成球または成育中の植物体へのガンマ線照射と花色変異

第1節 緒言

これまで、グラジオラスの育種はほとんどが交配によるもので（川畑、1997）、放射線照射による突然変異育種は5例にすぎない（Banerjiら、1994；射場ら、1964；射場ら、1965；飯塚ら、1963；山本ら、1958）。これらのうち、品種の育成まで至った報告は1例しかない（Raghavaら、1988）。突然変異育種の利点は、他の遺伝形質に大きな影響を与えずに、限られた遺伝子の突然変異によって1または数個の欠点を改良できる点にある。

これまでに行われたグラジオラスの放射線育種では、おもに照射当年に開花確実な成球を比較的少数用い、線量率2~100 Gy/hで100~200 Gyの急照射を行っていた（Banerjiら、1994；射場ら、1964；射場ら、1965；飯塚ら、1963；Raghavaら、1988；山本ら、1958）。

一般に急照射は、緩照射に比べて体細胞突然変異の誘発頻度が高いが、障害の発生を多くする（池田、1983a）。グラジオラスの放射線育種においても、優良な変異体を得るためには障害の発生が少なく、遺伝子突然変異を多くする傾向にある緩照射の利用が考えられる。これまで、緩照射はガンマフィールド内で成育中の植物体に行われていて、大量の休眠状態にある成球への利用は物理的に困難と考えられる。そこで、成球より小さく、大量に扱うことの可能な木子、成育中の植物体およびこれまでに報告のあった成球を用いて、急照射および緩照射によるガンマ線照射がグラジオラスの成育、花色変異の方向、花色変異セクターの大きさに及ぼす影響および品種間差異について検討した。

第2節 材料および方法

実験1. 木子へのガンマ線急照射による花色変異の誘発

供試材料として、坂田園芸株式会社（茨城県新治郡新治村下坂田）より購入した‘ヘクター’（花色：赤色）の直径約5~8 mmの木子を用いた（図3-1-A）。ガンマ線照射は1989年4月7~10日に、農林水産省農業生物資源研究所放射線育種場の屋内照射施設ガンマ・ルーム（⁶⁰Co, 38.2 TBq）において、線量率10 Gy/hで0, 50, 100および200 Gyを照射した（図3-1-B）。各線量区には約8000~9200個の木子を用いた（表3-1）。

1989年4月14日に、うね幅30 cmとした露地圃場に木子をばらまきで播種し、球茎を1年間養成した。1990年5月9日に、収穫した成球のみをうね間10 cm、株間10 cmの3条植えで定植した。その他の管理は茨城県花き耕種基準（茨城県農林水産部、1988）に準じて行った。

木子および成球の発芽率は、播種または定植後50日目に1区300個体について調査した。草丈は、照射当年には播種後100日目に、また照射後1年目には定植後70日目に、各線量区60個体について調査した。花色変異の調査基準は、原品種の花色に対する濃淡、また変異セクターの大きさにより、花被片半分以上花被片1枚未満（“花被

片半分 $\leq$ ”), 花被片1枚以上小花1個未満 (“花被片1枚 $\leq$ ”), 小花1個以上株全体まで (“小花1個 $\leq$ ”) の3段階, 合計6区分を設けた (表3-2)。花色は日本園芸植物標準色票 (財団法人日本色彩研究所製作) を用いて調査した。調査は開花期間中に2~3日ごとに行った。なお, 第Ⅱ章第4節で述べたとおり, ガンマ線照射を行わない通常の栄養繁殖系のグラジオラスでも花被片の半分に達しない小さな点状またはストライプ状の花色変異が高頻度で発生するので, ガンマ線照射による花色変異は変異セクターが花被片の半分以上を越える大きさのものによって評価した。

実 験2. 成球へのガンマ線急照射による花色変異の誘発

供試材料として ‘トラベラー’ (花色: 桃色) の照射当年に開花確実な直径約20 mmの成球を用いた。ガンマ線照射は定植前の休眠期に放射線育種場ガンマルームにおいて線量率10 Gy/hで100 Gy照射した。対照として無照射区をおいた。供試数は照射区が820個, 無照射区が399個であった (表3-3)。

栽培条件は露地圃場に1994年3月28日うね間10 cm, 株間10 cmの3条植えて定植した。その他の管理は茨城県花き耕種基準に準じて行った。花色変異の調査は本章実験1と同様にした。

実 験3. 成育中の植物体へのガンマ線緩照射が花色変異に及ぼす影響

供試材料として ‘トラベラー’ (花色: 桃色), ‘ヘクター’ (同: 赤色) で照射当年に開花確実な直径約20 mmの成球を用いた。1990年4月25日, 赤玉土の入った縦68 cm $\times$ 横19 cm $\times$ 高さ14 cmのプランターに, 株間10 cmで1プランター当たり6~7球を定植した。ガンマ線照射は5月10日から6月30日にかけて, 放射線育種場ガンマフィールド (^{60}Co , 74.4 TBq) において, 線源から10 mの位置にプランターを置き, 線量率1 Gy/日で40 Gy照射した。対照として無照射区を置いた。供試数は ‘ヘクター’, ‘トラベラー’ についてそれぞれ照射区が26, 24個, 無照射区が7個ずつであった (表3-4)。その他の管理および花色変異の調査は, 本章実験1と同様にした。花色変異は原品種の花色に対する濃淡, および変異セクターの大きさにより, 花被片半分未満 (“<花被片半分”), 花被片半分以上 (“花被片半分 $\leq$ ”) の2段階, 合計4区分に分

類した (表3-4)。

実 験4. ガンマ線を急照射した木子における花色変異の品種間差異

供試材料には本県の主力品種である ‘ヘクター’ (花色: 赤色), ‘トラベラー’ (同: 桃色), ‘ハーマジェスティ’ (同: 薄紫色), ‘トパーズ’ (同: 黄色) および ‘富士の雪’ (同: 白色) の5品種を用いた。各品種の木子は茨城園芸株式会社 (茨城県西茨城郡友部町大田) より購入した。照射に用いた木子は直径約5 mmの大きさで, 定植前の1990年3月5日に, 放射線育種場ガンマルームにおいて線量率10 Gy/hで100 Gyのガンマ線を照射した。対照として無照射区を置いた。各品種区の供試木子数は, 最少76個から最大1009個であった (表3-5)。

照射した木子は1990年5月9日に, うね幅30 cmにして露地圃場にばらまきし, 1年間球茎を養成した後, 1991年4月22日に, うね間10 cm, 株間10 cmの3条植えて成球のみを定植した。その他の管理および花色変異の調査は, 本章実験1に準じて行った。

第3節 結 果

実 験1. 木子へのガンマ線急照射による花色変異の誘発

木子へのガンマ線急照射が照射当年および1年後のグラジオラスの成育および開花に及ぼす影響を表3-1に示した。照射当年における木子の発芽率は, 無照射区の72.3%から200 Gy区の62.3%まで, 照射線量が増加するに従い, 低下する傾向にあったが, 異なる線量の間に有意な差はなかった。草丈は, 無照射区の56.6 cmから200 Gy区の24.1 cmまで, 照射線量が増加するに従い有意に低下した。開花個体率は無照射区が4.0%であったのに対し, 100 Gy区が2.1%, 200 Gy区が0.03%と著しく低下した。さらに, 開花始期は, 無照射区の7月30日から200 Gy区の8月18日と照射線量が増加するに従い, 遅延する傾向にあった (図3-1-C)。照射1年後に成球から生じた植物体では, 発芽率, 草丈, 開花個体率について, 50および100 Gy区では, 無照射区と差がみられず, 200 Gy区のみが有意に低下していた。開花盛期は, 無照射区の8月1日から200 Gy区の8月7日までとなり, 照射線量が増加するに従い, 遅延する傾向にあった (図3-1-D)。

表3-1. 木子へのガンマ線急照射が発芽、成育に及ぼす影響

照射後 年次	照射線量 (Gy)	供試 個体数	発芽率 ^z (%)	草 丈 ^y (cm)	開花個体数 (%)	開 花 時 期		
						始期	盛期	終期
当年	0	9286	72.3a ^x	56.6a	371(4.0) a	7/30	8/23	9/19
	50	7964	75.3a	46.5b	353(4.4) a	8/ 1	8/21	9/19
	100	8577	68.0a	38.3c	179(2.1) b	8/ 3	8/21	9/19
	200	7964	62.3a	24.1d	2(0.03)c	8/18	—	9/29
1	0	720	98.5a	61.9a	525(72.9)a	7/21	8/ 1	8/ 7
	50	680	98.4a	57.3a	551(81.0)b	7/23	8/ 3	8/ 9
	100	4320	97.9a	55.8a	3496(80.9)b	7/23	8/ 5	8/11
	200	4050	38.1b	29.7b	581(14.3)c	7/26	8/ 7	8/13

材料：‘ヘクター’。播種、定植：当年；1989年4月14日，1年；1990年5月9日。

ガンマ線照射：木子へ線量率10 Gy/h。^z発芽率：定植後50日目に300個体を調査。

^y草丈：当年；播種後100日目，1年；定植後60日目に60個体を調査。

^x異なるアルファベットは5%水準で有意差があることを示す。

発芽率，草丈はDuncanの多重検定，開花個体数は χ^2 検定によってそれぞれ検定した。

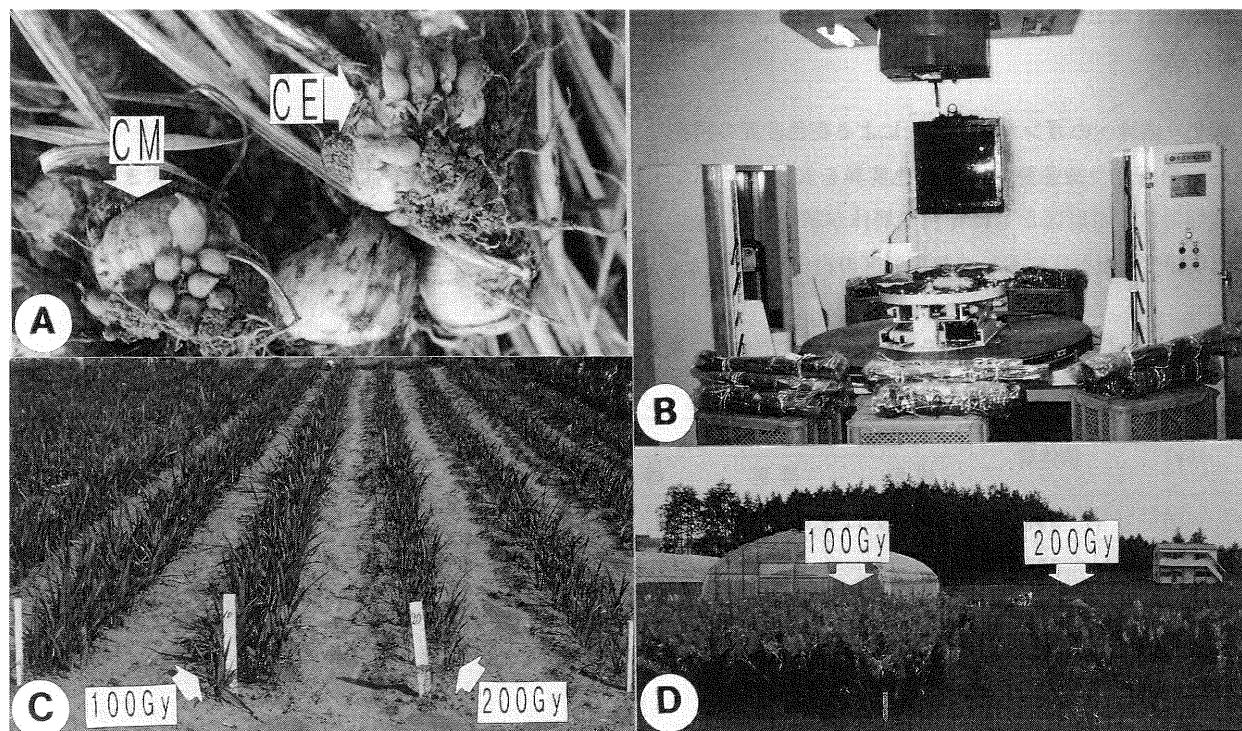


図3-1. 木子または成球へのガンマ線急照射。

A：材料に用いた木子（CE）および成球（CM）。

B：ガンマルームにおける木子へのガンマ線急照射。

C：ガンマ線を急照射した‘ヘクター’木子から養成した植物体の照射当年における成育の様相。

D：同上‘ヘクター’の照射翌年における成育と開花の様相。

木子へのガンマ線急照射による花色変異を表3-2に示した。照射1年後の成球から生じた植物における花色変異体の割合は、無照射区の0.8%から200 Gy区の5.7%と、照射線量が増加するに従い増加する傾向にあった。また、花色は淡色化した個体の割合が、濃色化した個体より2～3倍高かった(表3-2, 図3-2-A, B)。淡色化した変異体

の花色は、すべての鮮橙赤(日本園芸植物標準色票 0706)から明橙赤(同 0705)に変化した(第VI章を参照)。また、変異セクターの大きさでは“小花1個 $\leq$ ”の割合が高かった。なお、花色以外の変異では、100 Gy区で葉が縞状に白色になったものが1個体認められた。

表3-2. 木子へのガンマ線照射が花色変異体数、変異セクターの大きさおよび花色変異の方向に及ぼす影響

照射線量 (Gy)	開花 個体数	変異セクターの大きさ別花色変異体数(%)						計
		花被片半分≦		花被片1枚≦		小花1個≦		
		淡 色	濃 色	淡 色	濃 色	淡 色	濃 色	
0	525	0	0	0	0	2(0.4)	2(0.4)	4(0.8)
50	551	1(0.2)	0	0	0	1(0.2)	0	2(0.4)
100	3496	2(0.1)	0	6(0.2)	0	45(1.3)	28(0.8)	81(2.3)
200	581	0	0	0	0	25(4.3)	8(1.4)	33(5.7)
照射区計	4628	3(0.1)	0	6(0.1)	0	71(1.5)	36(0.8)	116(2.5)

材料: ‘ヘクター’ 木子に線量率10 Gy/hで照射後, 1年間養成した成球を用いた。

定植: 木子; 1989年4月14日, 成球; 1990年5月9日。

栽培方法: 露地栽培した。調査: 開花後, 2～3日ごとに行った。

実験2. 成球へのガンマ線急照射による花色変異の誘発
成球へのガンマ線急照射による花色変異を表3-3に示した。無照射区, 照射区ともに花色変異体が認められたが, その出現頻度は照射区において無照射区の約6倍増加した。

花色変異は原品種に対し, 淡色化のみが生じた。花色変異体の大部分において, 変異セクターの大きさは小花1個に達していなかった。

表3-3. 成球へのガンマ線急照射が花色変異体数、変異セクターの大きさおよび花色変異の方向に及ぼす影響

照射線量 (Gy)	開花 個体数	変異セクターの大きさ別花色変異体数(%)						計
		花被片半分≤		花被片1枚≤		小花1個≤		
		淡 色	濃 色	淡 色	濃 色	淡 色	濃 色	
0	399	2(0.5)	0	0	0	0	0	2(0.5)
100	820	9(1.1)	1(0.1)	13(1.6)	0	3(0.4)	0	26(3.2)

材料: ‘トラベラー’. ガンマ線照射: 成球へ線量率10 Gy/h. 定植: 1994年3月28日。

調査: 開花後, 2～3日ごとに行った。

実験3. 成育中の植物体へのガンマ線緩照射が花色変異に及ぼす影響

成育中の植物体へのガンマ線緩照射による花色変異を表3-4に示した。‘ヘクター’, ‘トラベラー’ともに“花被片半分 $\leq$ ”の花色変異は認められず, “<花被片半分”の

変異が無照射区, 照射区の両方に認められた。変異個体の割合は, 両品種とも照射区がやや高い傾向にあった。また‘ヘクター’, ‘トラベラー’ともに無照射区での花色変異は, 淡色化のみであったのに対し, 照射区では, 両品種とも低率ながら濃色化への変異が認められた。

表3-4. 成育中の植物体へのガンマ線照射が花色変異体数, 変異セクターの大きさおよび花色変異の方向に及ぼす影響

品 種	照射線量 (Gy)	開花個体数	変異セクターの大きさ別花色変異体数(%)				計
			花被片半分≤		花被片1枚≤		
			淡 色	濃 色	淡 色	濃 色	
ヘ ク タ ー	0	7	2(28.6)	0	0	0	2(28.6)
	40	26	8(30.8)	1(3.8)	0	0	9(34.6)
ト ラ ベ ラ ー	0	7	4(57.1)	0	0	0	4(57.1)
	40	24	16(66.7)	1(4.2)	0	0	17(70.8)

球根の定植日: 1990年4月25日, ガンマ線照射期間: 5月10~6月30日,
線量率: 1 Gy/日, 調査: 開花後, 2~3日ごとに行った。

実 験 4. ガンマ線を急照射した木子における花色変異の品種間差異

ガンマ線急照射した木子における花色変異の品種間差異を表3-5に示した。‘ヘクター’, ‘トラベラー’では照射区と無照射区に花色変異が認められたが, ‘ハーマジェスティ’では照射区のみ花色変異が認められた。これに対して‘トパーズ’, ‘富士の雪’では照射区と無照射区ともに花色変異が認められなかった。また, ‘ヘクター’, ‘トラベラー’での花色変異体の照射区における出現頻度は, 無照射区に対して約6倍増加した。

‘トラベラー’, ‘ハーマジェスティ’では, 原品種より淡色化する変異だけが生じたが, ‘ヘクター’では淡色化より頻度は低かったが, 濃色化の変異も観察された(図3-2-C, D)。
‘トラベラー’では, 花色変異セクターの大きさが, “花被片半分 $\leq$ ”, “花被片1枚 $\leq$ ”, “小花1個 $\leq$ ”の各段階でほぼ同じ割合で出現し, 完全突然変異体は観察されなかった。これに対して, ‘ヘクター’では, 花色変異部位の大きな“小花1個 $\leq$ ”のものが大部分であった。

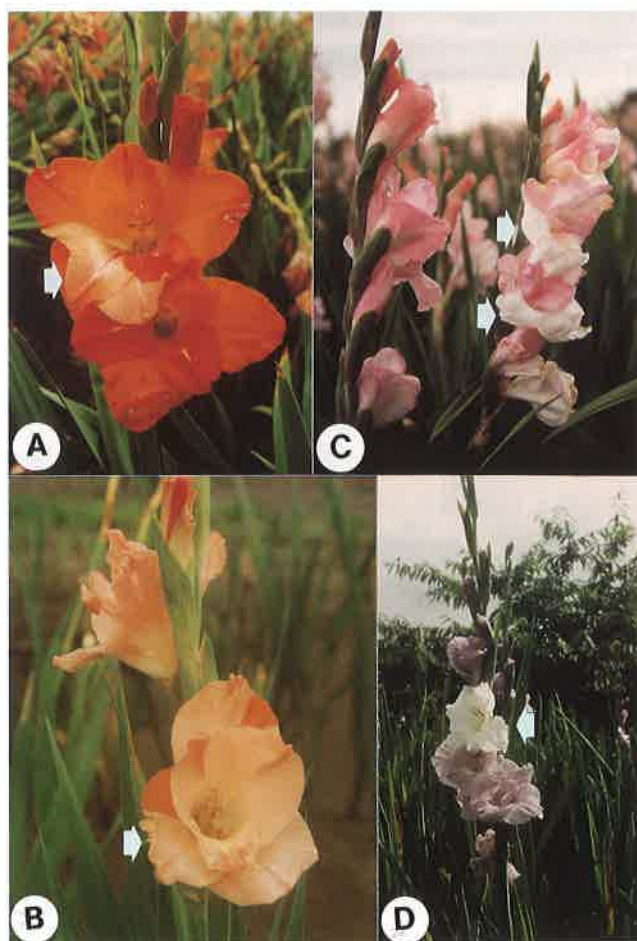


図3-2. 木子へのガンマ線急照射によって出現した花色変異。

- A: ‘ヘクター’100 Gy区に生じた淡赤色(矢印)の花色変異(花被片1枚 $\leq$).
B: ‘ヘクター’100 Gy区に生じた淡赤色(矢印)の花色変異(小花1個 $\leq$).
C: ‘トラベラー’100 Gy区に生じた淡桃色の花色変異.
右: 淡桃色(矢印)の花色変異(花被片1枚 $\leq$). 左: 桃色の原品種.
D: ‘ハーマジェスティ’100 Gy区に生じた白色(矢印)の花色変異(小花1個 $\leq$).

表3-5. 木子へのガンマ線急照射によって生じた花色変異における品種間差異

		変異セクターの大きさ別花色変異体数(%)							
照射線量 (Gy)	開花 個体数	花被片半分≤		花被片1枚≤		小花1個≤		計	
		淡 色	濃 色	淡 色	濃 色	淡 色	濃 色		
ヘクター	0	321	1(0.3)	0	0	0	1(0.3)	0	2(0.6)
(赤色)	100	895	1(0.1)	0	3(0.3)	0	29(3.2)	4(0.4)	37(4.1)
トラベラー	0	568	2(0.4)	0	0	0	0	0	2(0.4)
(桃色)	100	172	1(0.6)	0	1(0.6)	0	2(1.2)	0	4(2.3)
ハーマジスティ	0	130	0	0	0	0	0	0	0
(薄紫色)	100	76	0	0	1(1.3)	0	0	0	1(1.3)
トパーズ	0	745	0	0	0	0	0	0	0
(黄色)	100	1009	0	0	0	0	0	0	0
富士の雪	0	185	0	0	0	0	0	0	0
(白色)	100	258	0	0	0	0	0	0	0

供試材料：木子に線量率10 Gy/h, 総線量100 Gy照射後, 1年間養成した成球を用いた。

ガンマ線照射：1990年3月5日, 定植：木子；1990年5月9日, 成球；1991年4月22日。

調査：開花後, 2～3日ごとに行った。

第4節 考 察

これまでに行われたグラジオラスの放射線育種では, おもに照射当年に開花確実な成球を比較的少数用い, 線量率2～100 Gy/hで100～200 Gyの急照射を行っている。その結果, 花色変異体は得られるものの, 変異セクターが小さく, 分球や木子を介した栄養繁殖でも, 完全突然変異体は, ほとんど得られていない。そこで成球より小さく, 大量に扱うことの可能な木子, 成育中の植物体およびこれまでに報告のあった成球を用いて, 急照射および緩照射によるガンマ線照射がグラジオラスの成育, 花色変異の方向, 花色変異セクターの大きさに及ぼす影響および品種間差異について検討した。

本研究において, 木子への急照射による1年後の成球の発芽率, 草丈および開花した個体の割合は, 無照射～100 Gy区では, ほとんど差がなかったのに対して, 200 Gy区では, 前者の半分以下であった(表3-1)。花色変異体の割合は, 無照射区が0.8%, 50 Gy区が0.4%, 100 Gy区が2.3%, 200 Gy区が5.7%となり, 照射線量が増すに従い, 増加した(表3-2)。一般に突然変異体を最も効率的に得るための最適照射線量は, 放射線障害とのかねあいのもとに, それぞれの作物の50%致死線量であるLD₅₀の1/2程度の低い線量が用いられる場合が多い(蓬原, 1983)。これらを総合的に考え, 木子への最適照射線

量は, 線量率10 Gy/hで100～200 Gyと判断した。これまで, グラジオラス成球への最適照射線量は, 線量率20 Gy/hで, 約100 Gyと報告されている(飯塚ら, 1963, 射場ら, 1964)。本研究の木子を用いた結果は, 飯塚ら(1963), 射場ら(1964)の成球を用いた結果とほぼ一致した。

一般的に照射材料を選択するに当たって, 主に考慮すべき点として次のことが上げられる。第1に, 均一な照射材料を量的に十分に確保できること, 変異原処理操作が簡便なこと, 照射後の栽培管理が容易なことである。第2に, 単一細胞に生起する突然変異は, 確率的事象とされるので, 突然変異の誘発頻度を高め, スペクトラムの幅を広げ, しかも放射線障害の少ない突然変異体を得るには, 選抜の対象になる照射材料の個体数をできるだけ多くする必要がある。また, 処理する系統や品種により, 突然変異の頻度・種類に差のあることが知られている(池田, 1983a)ので, 照射材料の選定には, この点も注意を要する。第3に, 照射からキメラでない変異体を得るまでの時間が短く, コストは少ない方が効率的である。特に, 栄養繁殖性作物の突然変異育種では, 変異が照射当代において小さな変異セクターとなって生じることが多く, 切り戻し法のように, より少ない細胞数で構成されている潜芽などを分化, 発達させ, 変異セクターの拡大が図れ

るものの、これには長時間を要する。そこで、変異原処理をより未分化な時期に行い、より大きな変異セクターを得ることは、時間、コストの点でも有効と考えられる。

グラジオラスでの成育中の植物体への緩照射では、花色変異した個体の割合は、無照射区に対して、照射区がやや増加したが、いずれの花色変異も点状の小さなもので、木子および成球への急照射によって生じた変異セクターよりはかなり小さかった。これは緩照射した成育中の植物体が木子、成球と比べてより分化、発達した状態で変異をおこし、変異セクターが小さくなったためと考えられる。このことは根津（1967）がチューリップ球根へのガンマ線照射時期と変異セクターの大きさを検討した報告においても同様の結果を得ている。また照射材料としてみた場合、成育中の植物体は木子、成球と比べて多数の個体を扱えない。これらの点から木子、成球への急照射に比べて、成育中の植物体への緩照射はグラジオラスの育種に有効とは言い難いと考えられる。

一方、‘トラベラー’における木子および成球へのガンマ線の急照射による花色変異体の割合は、木子への10 Gy照射区が2.3%，成球への10 Gy照射区が3.2%となり（表3-3, 5）、木子および成球へのガンマ線急照射による

花色変異の出現頻度に差はないと考えられる。また、‘トラベラー’における木子および成球へのガンマ線による“小花1個≦”の花色変異体の割合は、木子への照射が1.2%，成球への照射が0.4%で、前者が後者の3倍となり（表3-3, 5）、大きな花色変異セクターを得るには、木子への照射が成球よりも有効であることが判明した。このように木子への照射により生じた花色変異セクターが大きかったのは、木子が成球に比べてより未分化な状態にあったためと考えられる。

前にも述べたように、木子を照射材料とした場合には、成球に比べて変異の出現まで1年を多く要する。しかし、木子は成球に比べて、かなり小さく、扱いやすく、安価である。また木子または成球へのガンマ線照射から成球による開花までの費用を試算すると、取り扱う球茎の数が多くなるほど、木子を用いた方が安価になるので（表3-6）、木子の方が照射材料として多くの個体を利用できる。さらに木子由来の花色変異体は、変異セクターがやや大きい傾向にある。総合的に判断し、照射材料として、木子の方が成球よりも優良変異体を選抜するのに有効と考えられる。

表3-6 木子または成球へガンマ線を100Gy照射した場合の開花までの費用の試算^Z

定植時成球数 照射時の 球茎形態	1,000個		10,000個		100,000個	
	木子	成球	木子	成球	木子	成球
球茎費	@0.05円×1,471個 =74円	@14.4円×1,000個 =14,400円	@0.05円×14,706個 =735円	@14.4円×10,000個 =144,000円	@0.05円×147,059個 =7,353円	@14.4円×100,000個 =1,440,000円
照射料金 ^Y	@5,500円×1回 =5,500円	@5,500円×2回 =11,000円	@5,500円×3回 =16,500円	@5,500円×20回 =110,000円	@5,500円×25回 =137,500円	@5,500円×200回 =1,100,000円
木子1個当たりの 1年間の養成費 ^X	@3.2円×1,471個 ^V =4,707円	—	@3.2円×14,706個 ^V =47,059円	—	@3.2円×147,059個 ^V =470,589円	—
成球1個当たりの 1年間の管理費 ^W	@19.5円×1,000個 =19,500円	同左	@19.5円×10,000個 =195,000円	同左	@19.5円×100,000個 =1,950,000円	同左
合計	29,781円	44,900円	259,294円	449,000円	2,565,442円	4,490,000円
成球→木子	15,119円		189,706円		1,924,558円	

^Z 茨城県農林水産部農業技術課編. 1999.経営改善のための主要作物・作型別経営指標2（花・果樹・畜産）グラジオラス. p431-442.

^Y 照射料金は8kgまでが5,500円.

^X 木子1個当たりの1年間の養成費は10 a当たり球茎生産に係る経費のうち球茎代と出荷経費を差し引いた金額を球茎数で割った.

^W 成球1個当たりの1年間の管理費は10 a当たり切り花生産に係る経費のうち球茎代と出荷経費を差し引いた金額を球茎数で割った.

^V 木子数は木子へガンマ線を100 Gy照射した場合の木子発芽率を68%として、成球時に所定数になるように増加させた.

これらの結果から、花色突然変異体を得る手段として木子へのガンマ線急照射は、成球へのガンマ線急照射および成育中の植物体へのガンマ線緩照射よりすぐれていることが明らかとなった。

グラジオラス成球へのガンマ線照射による花色変異体の出現頻度に品種間差異のあることはすでに報告されている（射場ら, 1965 ; Raghavaら, 1988）。本研究においても同様に花色変異体の出現頻度に品種間差異がみら

れ、‘ヘクター’、‘トラベラー’および‘ハーマジスティー’は高く、‘トパーズ’および‘富士の雪’には全く出現しなかった。放射線照射による白色化は一般に赤色～紫色のフラボノイド系色素によって花色を表している種類で見られやすいが、黄色～橙色のカロチノイド系色素を主としているものではほとんど起こっていない(斉藤, 1983)。本研究で用いた桃色品種‘トラベラー’、黄色品種‘トパーズ’は、それぞれフラボノイド系色素、カロチノイド系色素を花被片に含有していることが報告されている(高津ら, 2000)。このため、‘トラベラー’の花色が桃色から淡桃色に比較的高率に変異したのに対し、‘トパーズ’ではまったく花色変異しなかったと考えられる。このように、花色変異体の出現頻度は花被片に含まれる色素の種類により影響されると推察されたので、グラジオラスの花色変異体を効率的に作出するにはあらかじめ対象品種の色素を調べておく必要がある。

なお、木子への照射により得られた変異セクターの大きさは、成球への照射により得られたものよりやや大きい傾向にあったものの、生じた花色変異の大部分はストライプ状、または点状の小さいものであった。これらの小さな変異セクターから完全突然変異体を作成するため、第Ⅱ章第3節で開発した花蕾の子房培養の利用方法を第Ⅳ章で検討する。

第Ⅳ章 花蕾子房の培養による花色変異区分キメラ個体からの完全突然変異体の作出

第1節 緒言

グラジオラスへの放射線照射による変異体の作出は数多く報告されている(Banerji, 1994; 射場ら, 1964, 1965; 飯塚ら, 1963; 山本ら, 1958)。これらの報告における変異の大部分は花色変異であり、照射当代の植物体に区分キメラの形で生じている。こうした区分キメラを示す個体から完全突然変異体を作成するために、その個体からの分球や木子による栄養繁殖後代における選抜が行われているが、完全突然変異体を得るのは容易ではなく、品種として報告されているのはRaghavaら(1988)の報告のみである。このように、放射線照射による栄養繁殖性作物の育種では植物体の一部に生じた変異セクターから、いかにして完全突然変異体を作成するかが重要に

なる。双子葉植物であるキク、ペゴニアでは、放射線照射に起因するキメラ状の変異セクターから完全突然変異体を作成したことが報告されている(二階堂・小野沢, 1989; 重松・松原, 1972)。

著者らは、第Ⅱ章第3節において、単子葉植物であるグラジオラスの開花2～3日前の子房(花蕾子房)からの茎葉再分化系を確立し、植物体を再生した。そこで、ガンマ線照射した木子から、小花の1/8程度までの小さな花色変異セクターが生じた花蕾の、その子房を培養し、完全突然変異体の作出を行った。

第2節 材料および方法

実験1. 花色変異セクターの大きさによる花蕾子房縦分割がカルス形成および茎葉再分化に及ぼす影響

第Ⅲ章実験4において得られた‘トラベラー’の淡桃色区分キメラを示す個体の花蕾子房を実験に用いた(図4-1-A)。花蕾子房を定法に従い滅菌した。続いて、花被片の変異セクターに対応する花蕾子房の部位を縦方向に切り出して外植体とし、培地に置床した。外植体は変異セクターの大きさによって、1/1(無分割)、1/2 $\leq$ 、1/4 $\leq$ および1/8 $\leq$ に分類した。また、ガンマ線照射した個体で花色変異しなかった花蕾の子房を、分割せずに同様の方法で置床した(図4-1-B, C)。培地、培養方法は第Ⅱ章第3節1)実験1と同様にした。置床後60日目に分割した花蕾子房の大きさごとにカルス形成数(率)を調査した。

花蕾子房から形成されたカルスを、培養開始後60日目に3～5 mm角の大きさに分割し、第2章第3節1)実験2と同様の方法で培養した。置床後60日目に茎葉再分化カルス数(率)、カルス当たり茎葉数を調査した。

実験2. 花色変異セクターの大きさにより縦分割した花蕾子房由来個体の花色

本章実験1でカルス上に形成された茎葉から、第Ⅱ章第2節実験6と同様の方法で球茎を養成し、休眠打破した。これらの球茎を当研究所露地圃場にうね間10 cm、株間10 cmの3条植えで定植し、当年または1年間球茎を養成後の翌年に開花させた。栽培管理は茨城県花き耕種基準(茨城県農林水産部, 1992)に準じて行った。開花期に2～3日ごとに花色を調査した。

第3節 結 果

実 験 1. 花色変異セクターの大きさによる花蕾子房縦分

割がカルス形成および茎葉再分化に及ぼす影響

花色変異セクターの大きさによる花蕾子房の縦分割がカルス形成に及ぼす影響を表4-1に示した。花色が原品種と同様に桃色である小花全体の子房を培養した場合のカルス形成率は、100.0%であった。一方、淡桃色に変異した小花については、分割の程度に関わらず95.0%以上の高いカルス形成率が得られたが、カルスの大きさは分割の程度とともに小さくなる傾向がみられた（図4-1-D）。

表4-1. 花色変異セクターの大きさによる花蕾子房の縦分割がカルス形成に及ぼす影響

小花 の色	花色変異セクターの 大きさ	供試 小花数	カルス形成数(%)		
			<10mm	10mm≤	計
桃色	小花1/1	12	0(0.0)	12(100.0)	12(100.0)a ²
淡桃色	小花1/1	50	18(36.0)	21(62.0)	49(98.0)a
	小花1/2≤	51	18(35.3)	33(64.7)	51(100.0)a
	小花1/4≤	44	22(50.0)	21(47.7)	43(97.7)a
	小花1/8≤	23	16(69.6)	6(26.1)	22(95.7)a

材料：花色変異セクターの大きさに応じて縦分割した花蕾子房。

培地：MS培地に5 mg/ℓ NAA, 5 mg/ℓ BAPを添加。

培養条件：25℃, 暗条件, 調査：置床後60日。

²同一のアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差がないことを示す。

花色変異セクターの大きさによる花蕾子房の縦分割がカルスからの茎葉再分化に及ぼす影響を表4-2に示した。花色変異を示さなかった小花の花蕾子房からのカルス形成に比べて、花色変異した小花由来カルスからの茎葉再分化の割合はやや低かったが、両者の間における有意差は認められなかった。また、カルス当たりの茎葉数は、花色変異の有無あるいは分割程度にかかわらず3~10本で、大きな差は認められなかった（図4-1-E）。

表4-2. 花色変異セクターの大きさによる花蕾子房の縦分割がカルスからの茎葉再分化に及ぼす影響

小花 の色	花色変異セクターの 大きさ	供試 カルス数	茎葉再分化 カルス数(%)	カルス当たり 茎葉数
桃色	小花1/1	23	14(60.9)a ²	3~10
淡桃色	小花1/1	84	46(54.8)a	3~10
	小花1/2≤	178	68(38.2)a	3~10
	小花1/4≤	125	45(36.0)a	3~10
	小花1/8≤	69	35(50.7)a	3~10

材料：表4-1で形成したカルス。

培地：MS培地に2 mg/ℓ BAPを添加。

培養条件：25℃, 3000 ℓx, 16時間日長, 調査：置床後60日。

²同一のアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差がないことを示す。

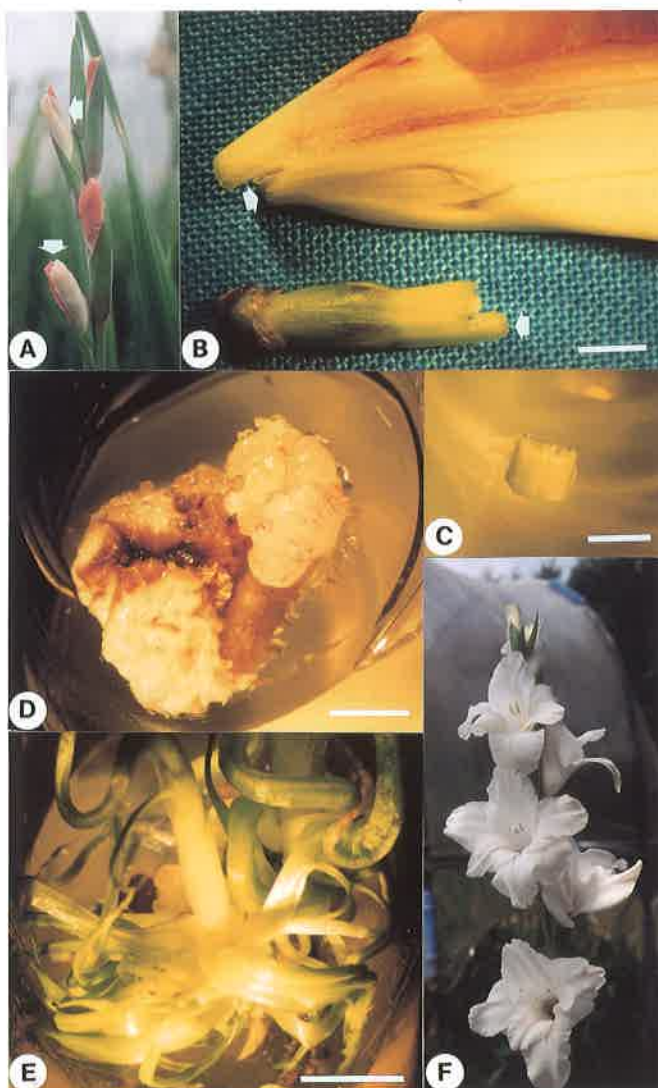


図4-1. ‘トラベラー’の淡桃色に花色変異したと想定できる子房片からのカルス形成、茎葉再分化および植物体再生。バー=5 mm。

A：木子へのガンマ線照射により生じた花蕾の花色変異区分キメラ（矢印）。

B：花色変異区分キメラの花被片基部および子房における様相。下側の矢印は淡桃色へ花色変異した花被片（上側の矢印）から変異が同様に生じていると想定できる子房片。

C：花色変異したと想定できる子房片を切り取り培地へ置床。

D：子房片からのカルス形成。

E：カルスからの茎葉再分化。

F：淡桃色小花だけを着生した再生個体。

実 験 2. 花色変異セクターの大きさにより縦分割した花蕾子房由来個体の花色

花色変異セクターの大きさにより縦分割した花蕾子房由来個体の花色についての調査結果を表4-3に示した。桃

色の小花の子房由来の34個体は、すべてが原品種‘トラベラー’の小花の花色と同一の桃色となり、花色変異した個体は得られなかった。これに対して、淡桃色変異を示した小花の花蕾子房からの再生個体には、分割の程度にかかわらず、淡桃色小花を着生した個体が含まれ、しか

もそれらの個体には花色についてのキメラは観察されなかった。再生個体に含まれる花色変異体の割合は、花蕾子房の分割程度が大きいほど（切片が小さいほど）低い傾向にあった（図4-1-F）。

表4-3. 花色変異セクターの大きさにより縦分割した花蕾子房由来個体の花色

小花の色	花色変異セクターの大きさ	供試個体数	淡桃色小花個体数(%)	桃色小花個体数(%)	備 考
桃色	小花1/1	34	0	34(100.0)	区分キメラ個体なし
淡桃色	小花1/1	77	46(59.7)a ²	31(40.3)	区分キメラ個体なし
	小花1/2≤	171	28(16.4)b	143(83.6)	〃
	小花1/4≤	80	10(12.5)bc	70(87.5)	〃
	小花1/8≤	68	4(5.9)c	64(94.1)	〃

材料：表4-2で形成したシュートから養成した個体。栽培条件：露地栽培。

²異なるアルファベットは χ^2 検定の5%水準で有意差があることを示す。

第4節 考 察

本章では、第Ⅲ章で行った木子へのガンマ線照射により花被片に生じた変異セクターと同様に変異が生じていると想定できる花蕾子房を材料として、第Ⅱ章で開発した花蕾子房の培養系を用いて、完全突然変異体の作出を試みた。

まず、花色変異した部位および花色変異していない部位の花蕾子房の培養特性を検討した。花色変異した部位および花色変異していない部位の花蕾子房を外植体として培養した場合、カルス形成、茎葉再分化カルス率およびカルス当たり茎葉数に差が認められず（表4-1, 2）、両者は培養特性において、差のないことが明らかとなった。花色変異した部位の花蕾子房を縦に1/8の大きさまでの分割した場合においても、カルス形成率、茎葉再分化カルス率、カルス当たり茎葉数は分割の程度にかかわらず差がなかった。しかしカルスの大きさは分割の程度とともに小さくなる傾向がみられた。このことから花蕾子房の分割は、形成されるカルスの大きさに強く影響するが、カルス形成率、茎葉再分化率、カルス当たりの茎葉数にはほとんど影響しないことが明らかとなった。

よって、花色変異区分キメラの変異部位の花蕾子房を縦に1/8の大きさまで分割しても植物体を再生できることが明らかとなった。

淡桃色に花色変異した部位の花蕾子房からの再生個体には、分割の程度にかかわらず、淡桃色の小花を着生した個体が含まれ、しかもそれらの個体には花色についてのキメラは観察されなかった。一方、桃色の小花の子房由来の34個体は、すべてが原品種‘トラベラー’の小花の花色と同一の桃色となり、花色変異した個体は得られなかった。このことから、花蕾子房を分割して培養することで変異セクターのみを分離し、完全突然変異体を作出できることが明らかとなった。

花色が淡桃色の子房からの再生個体に原品種と同じに、花色が桃色の個体が認められた。この原因として、材料が周縁区分キメラであった可能性が考えられる。柴田ら（1984）はキクの‘マーブル’系9品種を用いて花卉培養を行い、培養個体の花色が原品種と異なる場合のあるのは、これらの品種が周縁キメラであることに起因するのであろうと推論した。本研究で用いた個体は、木子へのガンマ線照射により突然変異が生じて、桃色の小花の全

体または一部分が花色変異して淡桃色になった。外観的には淡桃色になっている部分が、柴田らの用いたキクと同様に遺伝的には周縁キメラになっていたことが考えられる。そして、子房培養により遺伝的に花色が変異した子房組織から生じた再生個体は、淡桃色の個体となり、これに対して遺伝的には花色が変異しなかった子房組織から生じた再生個体は、桃色の個体となった可能性が考えられる。

再生個体に含まれる花色変異体の割合は、花蕾子房の分割程度が大きいほど（切片が小さいほど）低い傾向と

なった（表4-3）。これには花被片と子房の組織発生的な関連、変異セクターの大きさと変異が生じた時点での花芽分化程度との関係が考えられるが、今後さらに検討する必要がある。

以上の結果、木子へのガンマ線照射により生じた花色変異セクターが花蕾子房の大きさで縦に1/8までならば、花蕾子房を分割して培養することで変異セクターのみを分離し、完全突然変異体を作出できることが明らかとなった（図4-2）。

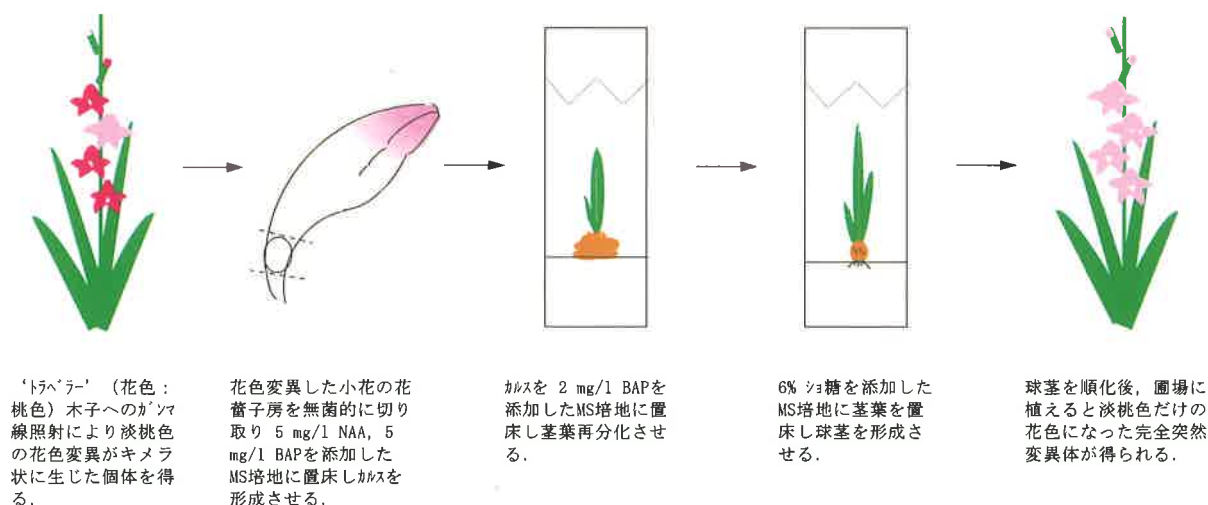


図4-2. 木子へのガンマ線照射により生じた花色変異区分キメラ個体からの完全突然変異体の作出法

第V章 培養前の木子またはカルスへのガンマ線照射が茎葉再分化および再生個体の花色変異に及ぼす影響

第1節 緒言

花きではキク（永富ら，1989，1991），トキワザクラ（神田ら，1990），カーネーション（Simardら，1992）で培養前の外植体へガンマ線照射することにより，ガンマ線照射または培養を単独に行うよりも効率的に再生個体に変異の生じることが報告されている。さらにイネで

は培養によって得られたカルスへガンマ線照射し，再生個体およびその後代に生じる変異が検討されている（Kinoshitaら，1989；丹野ら，1993）。グラジオラスにおいても，外植体へのガンマ線照射による突然変異体の作出は検討すべき課題である。

そこで，本章では第II章第2節で示した木子茎頂からの不定胚培養系を用いて，培養前の木子または培養により形成されたカルスへガンマ線照射し，そのカルスからの茎葉再分化および再生個体の花色変異に及ぼす影響を検討した。

第2節 材料および方法

実験1. 木子へのガンマ線照射が茎頂からのカルス形成

およびカルスにおける不定胚形成に及ぼす影響

供試材料は当研究所で保存している‘トパーズ’（花色：黄色）, ‘トラベラー’（同：桃色）の直径5～10 mmの木子を用いた。放射線育種場ガンマルーム（ ^{60}Co , 44.4 TBq）において線量率10 Gy/hで, ‘トパーズ’には50, 100, 150および200 Gy, ‘トラベラー’には1回目の実験で50, 100, 150および200 Gy, 2回目の実験で50, 100, 200, 300, 400, 500および600 Gyのガンマ線をそれぞれ照射した（図3-1-A）。照射後, 定法に従い, 滅菌した木子から茎頂を1～2 mmの大きさで無菌的に摘出し, 培地に置床した。培地はMS培地を基本とし, 植物成長調節物質として5 mg/l NAA, 3% ショ糖, 10 g/l 寒天を添加し, pH 5.8に調整し, ϕ 24×90 mmの試験管に5 mlずつ分注し, アルミ箔でキャップ後, 20分間オートクレーブし, 斜面培地とした。培養条件は25℃, 暗条件とした。木子茎頂置床後60日目にカルス形成数（率）, 不定胚形成カルス数（率）およびカルス当たり不定胚数を調査した。

実験2. カルスへのガンマ線照射がカルスの成長および不定胚形成に及ぼす影響

供試材料は本章実験1と同様に‘トパーズ’, ‘トラベラー’の木子を用いた。定法に従い, 滅菌した木子から茎頂を1～2 mmの大きさで無菌的に摘出し, 培地に置床した。培地は本章実験1と同様にした。置床後30日目に, カルスの形成された試験管ごと放射線育種場ガンマルームにおいて線量率10 Gy/hで, ‘トパーズ’には50, 100, 150, 200, 250および300 Gy, ‘トラベラー’には1回目の実験において100, 200, 300, 400および500 Gy, 2回目の実験において200, 400, 600, 800および1000 Gyのガンマ線をそれぞれ照射した（図5-A）。照射後, カルスを同じ組成の培地に継代し, 培養した。培養条件は25℃, 暗条件とした。ガンマ線照射後30日目に大きさ別にみたカルスの割合, 不定胚形成カルス数（率）およびカルス当たり不定胚数を調査した。

実験3. 木子へのガンマ線照射が茎頂からの不定胚由来個体の花色に及ぼす影響

本章実験1で得られた不定胚をMS培地に継代し, 茎葉伸長と発根を図り, 再生個体を養成した。これらの個体から球茎を形成させ, 順化後5℃で3カ月間低温処理した。当研究所の露地圃場にうね幅30 cmで球茎をばらまきし, 1年間養成した。翌年, 成球のみを露地圃場にうね間10 cm, 株間10 cmの3条植えで定植した。その他の栽培管理は茨城県花き耕種基準（茨城県農林水産部, 1992）に準じて行った。花色変異は原品種の花色に対して濃色化, 淡色化の2つに分け, さらに変異セクターの大きさにより, 花被片半分以上花被片1枚未満（“花被片半分 $\leq$ ”）, 花被片1枚以上小花1個未満（“花被片1枚 $\leq$ ”）, 小花1個以上株全体未満（“小花1個 $\leq$ ”）, 株全体（“株全体”）の4つに分けて合計8段階に分類して調査した。花色は日本園芸植物標準色票（財団法人 日本色彩研究所製, 1994）を用いて調査した。開花期間中に2～3日ごとに調査を行った。

実験4. カルスへのガンマ線照射が不定胚由来個体の花色に及ぼす影響

本章実験2で得られた不定胚を本章実験3と同様に処理し, 花色変異を調査した。調査は本章実験3と同様に行った。

第3節 結果

1) 木子またはカルスへのガンマ線照射が木子茎頂からのカルス形成, カルスの成長および不定胚形成に及ぼす影響（実験1, 2）

木子へのガンマ線照射が茎頂からのカルス形成に及ぼす影響を, 表5-1に示した。‘トラベラー’でのカルス形成率は, 無照射区が99.0～100.0%であったのに対し, 最大照射線量の600 Gy区においても90.0%となり, 照射線量による大きな差異は認められず, ‘トパーズ’ではすべての照射区で100%のカルス形成率が得られた。一方, 10 mm以上のカルスの割合は, 両品種とも照射線量の増大にともなって低下する傾向がみられ, 特に‘トラベラー’では2回目の照射実験で200 Gy以上の照射区における低下が著しかった（図5-B）。

表5-1. 木子へのガンマ線照射が木子茎頂由来カルスの成長および不定胚形成に及ぼす影響

品種	実験回数	照射線量 (Gy)	置床数	カルス形成数(%)			不定胚形成 カルス数(%)	カルス当たり 不定胚数
				< 10mm	10mm≤	計		
トパーズ	I	0	50	4(8.0)	46(92.0)	50(100.0)	36(72.0)	—
		50	50	4(8.0)	46(92.0)	50(100.0)	30(60.0)	—
		100	50	7(14.0)	43(86.0)	50(100.0)	25(50.0)	—
		150	50	9(18.0)	41(82.0)	50(100.0)	12(24.0)	—
		200	50	15(30.0)	35(70.0)	50(100.0)	10(20.0)	—
トラベラー	I	0	49	9(18.5)	40(81.5)	49(100.0)	35(71.4)	—
		50	49	6(12.2)	43(87.8)	49(100.0)	39(79.6)	—
		100	48	20(41.7)	28(58.3)	48(100.0)	26(54.2)	—
		150	50	11(22.0)	39(78.0)	50(100.0)	22(44.0)	—
		200	50	25(50.0)	25(50.0)	50(100.0)	20(40.0)	—
トラベラー	II	0	100	12(12.0)	87(87.0)	99(99.0)	80(80.0)	19.2
		50	100	14(14.0)	84(84.0)	98(98.0)	72(72.0)	22.2
		100	100	30(30.0)	65(65.0)	95(95.0)	42(42.0)	20.8
		200	100	71(71.0)	20(20.0)	91(91.0)	30(30.0)	34.2
		300	100	79(79.0)	15(15.0)	94(94.0)	23(23.0)	23.9
		400	100	81(81.0)	4(4.0)	85(85.0)	9(9.0)	12.0
		500	100	76(76.0)	7(7.0)	83(83.0)	9(9.0)	12.2
		600	100	83(83.0)	7(7.0)	90(90.0)	11(11.0)	6.7

材料：ガンマ線を線量率10 Gy/hで照射した木子茎頂。

培地：MS培地に5 mg/ℓ NAAを添加。調査：木子茎頂置床後60日目。

カルスへのガンマ線照射がカルスの発達に及ぼす影響を、表5-2に示した。照射区における10 mm以上のカルスの割合は、両品種とも、無照射区に比べて低い傾向にあった。特に、‘トラベラー’においては、2回の照射実験とも、線量の増大にともない、10 mm以上のカルスの割合が低くなる傾向がみられた（図5-C）。

木子へのガンマ線照射が、木子茎頂由来カルスからの不定胚形成に及ぼす影響を表5-1に示した。両品種とも不

定胚を形成したカルスの割合は、照射線量が増加するに従って、低下した。特に、150 Gy以上の照射区では不定胚を形成したカルスの割合は、50%以下となった。‘トラベラー’2回目の照射実験におけるカルス当たりの不定胚形成数は、300 Gyまでの照射区において無照射区よりむしろ大きい値を示したが、400 Gy以上の照射区では著しく減少した（図5-B）。

表5-2. 木子茎頂から形成されたカルスへのガンマ線照射がカルスの成長と不定胚形成に及ぼす影響

品種	実験 回数	照射 線量 (Gy)	置床数	大 き さ 別 カ ル ス 形 成 数 (%)		不定胚形成 カルス数(%)	カルス当たり 不 定 胚 数
				< 10mm	10mm ≤		
トパーズ	I	0	50	4(8.0)	46(92.0)	40(80.0)	—
		50	50	5(10.0)	45(90.0)	29(58.0)	—
		100	50	8(16.0)	42(84.0)	35(70.0)	—
		150	50	12(24.0)	38(76.0)	37(74.0)	—
		200	50	15(30.0)	35(70.0)	22(44.0)	—
		250	50	14(28.0)	36(72.0)	24(48.0)	—
		300	50	10(20.0)	40(80.0)	28(56.0)	—
トラベラー	I	0	81	31(38.3)	50(61.7)	40(49.4)	—
		100	85	32(37.6)	53(62.4)	42(49.4)	—
		200	86	34(42.0)	50(58.0)	38(44.2)	—
		300	85	42(49.4)	43(50.6)	52(61.4)	—
		400	85	48(56.5)	37(43.5)	26(30.6)	—
		500	85	51(60.0)	34(40.0)	36(42.4)	—
トラベラー	II	0	50	11(22.0)	39(78.0)	22(44.0)	16.8
		200	50	12(24.0)	38(76.0)	21(42.0)	18.3
		400	50	20(40.0)	30(60.0)	20(40.0)	19.7
		600	50	16(32.0)	34(68.0)	13(26.0)	17.2
		800	50	31(62.0)	19(38.0)	22(44.0)	20.2
		1000	50	34(68.0)	16(32.0)	13(26.0)	20.0

材料：カルスは5 mg/ℓ NAAを添加したMS培地に木子茎頂を置床し誘導.

ガンマ線照射：茎頂置床後30日目に線量率10 Gy/hで行った.

調査：木子茎頂置床後60日目.

カルスへのガンマ線照射が、不定胚形成に及ぼす影響を表5-2に示した。両品種とも不定胚を形成したカルスの割合はガンマ線照射によって低くなる傾向にあったが、その減少程度は、木子茎頂への照射に比べて小さかった。‘ト

ラベラー’では2回目の照射実験におけるカルス当たりの不定胚形成数は、照射線量によって影響されなかった(図5-C)。

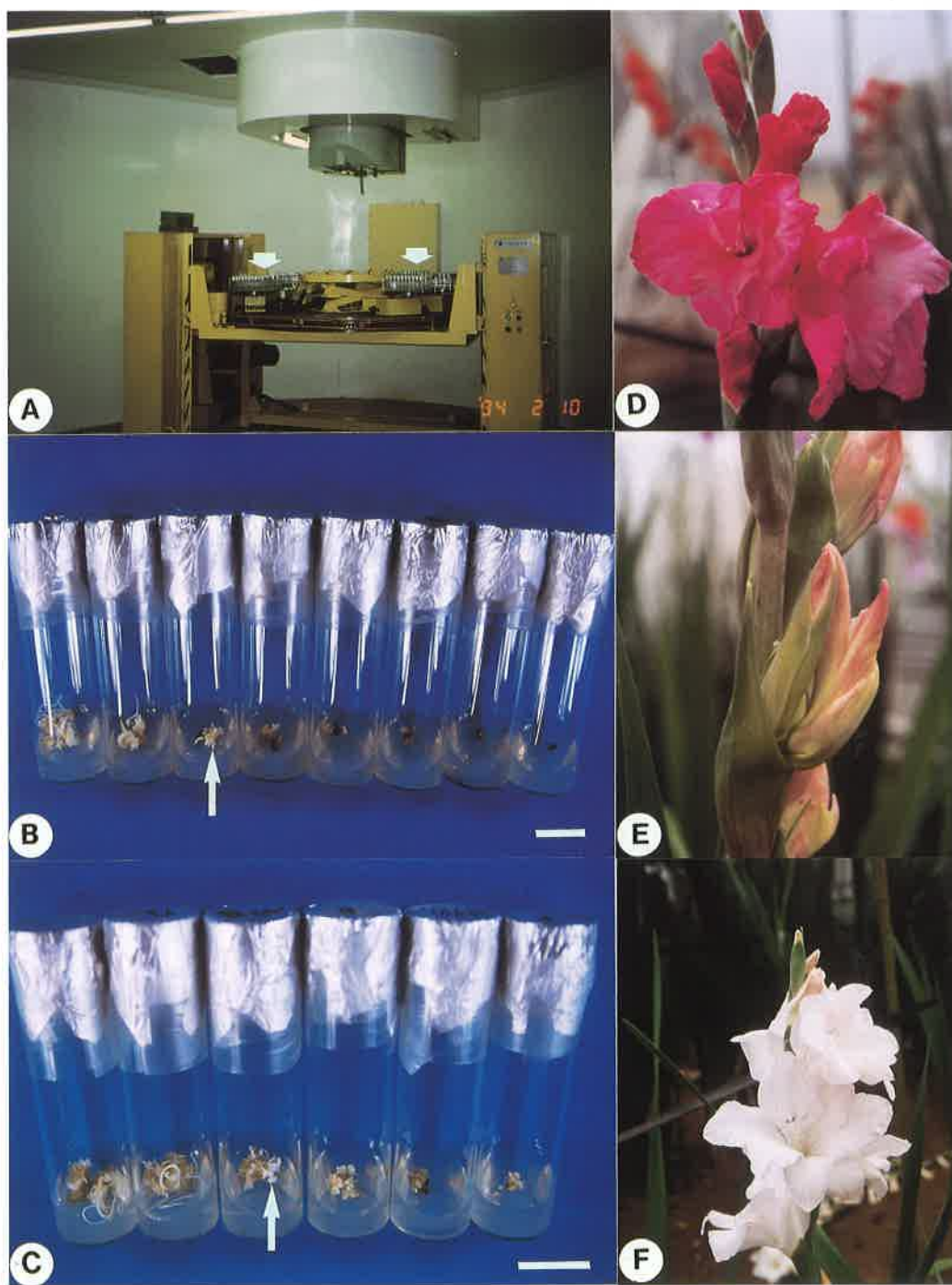


図5. 培養前の木子またはカルスへのガンマ線照射が茎葉再分化および再生個体の花色変異に及ぼす影響. バ = 2 cm.

A: 木子茎頂由来カルス (矢印) へのガンマ線照射.

B: ガンマ線照射した木子から取り出した茎頂由来のカルスの成長と不定胚 (矢印). 照射線量は, 左から 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 Gy, 線量率 10 Gy/h.

C: 木子茎頂由来カルスへのガンマ線照射後のカルスの成長と不定胚 (矢印). 照射線量は, 左から 0, 200, 400, 600, 800, 1000 Gy, 線量率 10 Gy/h.

D: ガンマ線照射した 'トラベラー' の木子茎頂由来カルスに形成された不定胚からの濃桃色の花色変異体.

E: Dと同様に生じた淡桃色の花色変異. この個体では1小花梗に2個の小花が形成される変異もみられた.

F: ガンマ線照射した 'トラベラー' のカルスに形成された不定胚からの淡桃色の花色変異体.

2) 木子またはカルスへのガンマ線照射が不定胚由来個体の花色に及ぼす影響 (実験 3, 4)

木子へガンマ線照射を行い、茎頂からの不定胚由来個体における花色変異の調査結果を表5-3に示した。‘トパーズ’では、いずれの照射線量においても、花色変異が認められなかった。表5-3には‘トラベラー’についての結果のみを示した。花色変異体の割合は、無照射区が1.2%であったのに対し、150 Gy区までは照射線量とともに増加した。しかし、200 Gy区では、開花個体数が3個体と少なく、変異体は認められなかった。花色の変異方

向は、原品種に対し、濃色化が淡色化よりもやや多い傾向にあった。また、濃色化した花色変異体の大部分は、花色が鮮黄ピンク (日本園芸植物標準色票 No. 1004) または鮮紫ピンク (同 No. 9704) であったのに対し、1個体だけは、さらに濃色化して、花色が明紫赤 (同 No. 9706) であった (図5-D)。変異体のうち1個体だけが花色変異について区分キメラとなったが、その他は完全突然変異体であった。‘トラベラー’には花色変異以外に、1つの小花梗に2つの小花をつけた個体が生じ、形態変異も認められた (図5-E)。

表5-3. ガンマ線照射した木子の茎頂由来カルスから不定胚を経て得られた個体における花色変異

照射線量 (Gy)	開花 個体数	変異セクターの大きさ別花色変異体数(%)								計
		花被片半分 ≤		花被片1枚 ≤		小花1個 ≤		株全体		
		淡色	濃色	淡色	濃色	淡色	濃色	淡色	濃色	
0	252	0	0	0	0	0	0	1(0.4)	2(0.8)	3(1.2)
50	172	0	0	0	0	0	0	0	^Y 8(4.7)	8(4.7)
100	51	1(2.0)	0	0	0	0	0	3(5.9)	0	4(7.8)
150	45	0	0	0	0	0	0	^Z 4(8.9)	4(8.9)	8(17.8)
200	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
照射区計	271	1(0.4)	0	0	0	0	0	7(2.6)	12(4.4)	20(7.4)

^Z: 4個体のうち2個体は1小花梗に2個の小花が形成された。

^Y: 8個体のうち2個体は1小花梗に2個の小花が形成された。

材料: ‘トラベラー’ 木子にガンマ線を線量率10 Gy/hで照射した茎頂を5 mg/ℓ NAAを添加した

MS培地で培養し得られた不定胚由来個体。

調査: 開花期間中に2~3日ごとに行った。

カルスへガンマ線照射を行い不定胚由来個体における花色変異についての調査結果を表5-4に示した。‘トパーズ’では、いずれの照射線量においても、花色変異が認められなかった。表5-4には‘トラベラー’についての結果のみを示した。花色変異体の割合は、無照射区が1.

1%であったのに対し、300 Gy区までは照射線量とともに増加したが、400 Gy区以上では増加しなかった。また、変異体のうち1個体だけが花色変異について区分キメラとなったが、その他は完全突然変異体であった (図5-F)。

表5-4. ガンマ線照射した木子茎頂由来カルスから不定胚を経て得られた個体における花色変異

照射線量 (Gy)	開花 個体数	変異セクターの大きさ別花色変異体数(%)								計
		花被片半分 ≤		花被片1枚 ≤		小花1個 ≤		株全体		
		淡色	濃色	淡色	濃色	淡色	濃色	淡色	濃色	
0	88	0	0	0	0	0	0	1(1.1)	0	1(1.1)
100	72	0	0	0	0	0	0	1(1.4)	0	1(1.4)
200	80	0	0	0	0	0	0	2(2.5)	3(3.8)	5(6.3)
300	30	0	0	0	1(5.6)	0	0	3(10.0)	0	3(10.0)
400	18	0	0	0	0	0	0	0	0	1(5.6)
500	21	0	0	0	0	0	0	1(4.8)	0	1(4.8)
照射区計	221	0	0	0	1(0.5)	0	0	7(3.2)	3(1.4)	11(5.0)

材料: ‘トラベラー’ カルスにガンマ線を線量率10 Gy/hで照射し、得られた不定胚由来個体。

調査: 開花期間中に2~3日ごとに行った。

第4節 考 察

本章では第Ⅱ章第2節で示した木子茎頂からの不定胚培養系を用いて、培養前の木子または培養により形成されたカルスへガンマ線照射し、カルス形成、カルスの成長、カルスからの茎葉再分化および再生個体の花色変異に及ぼす影響を検討した。

最初に、木子へのガンマ線照射が木子茎頂からのカルスおよび不定胚形成に及ぼす影響を調べた。カルス形成率は、‘トパーズ’が200 Gy、‘トラベラー’が600 Gyの範囲で両品種とも無照射区に対し、照射線量による大きな差異は認められなかった。一方、10 mm以上のカルスの割合および不定胚を形成したカルスの割合は、両品種とも照射線量が増加するに従って、低下した。カルス当たりの不定胚形成数は、300 Gyまでは照射区が無照射区よりむしろ大きい値を示したが、400 Gy以上の照射区では著しく減少した(表5-1)。これらの結果から、木子への最適照射線量は、カルスおよび不定胚形成のRD₅₀を基準にした場合(山下, 1991b)、線量率10 Gy/hで100~200 Gyと判断された。

次に、カルスへのガンマ線照射がカルスの発達に及ぼす影響を調べた。照射区における10 mm以上のカルスの割合は、両品種とも、無照射区に比べて低い傾向にあった。一方、不定胚を形成したカルスの割合は、両品種ともガンマ線照射によって低くなる傾向にあったものの、その減少程度は、木子茎頂への照射に比べて小さかった。‘トラベラー’ではカルス当たりの不定胚形成数は、照射線量によって影響されなかった(表5-2)。

これらの結果から、カルスへの最適照射線量は、カルスの成長および不定胚形成のRD₅₀を基準にした場合(山下, 1991b)、データにふれが大きくやや不明確ではあるが、線量率10 Gy/hで600~1000 Gyと判断された。

Nakamura and Hattori (1997) はイネの薬培養において培養直前期、カルス形成期、茎葉再分化期の3つの時期別にガンマ線照射を行い、カルス形成、茎葉再分化に及ぼす影響を検討した。その結果、カルス形成について、カルス形成期照射よりも培養直前期照射でその阻害効果が大きかった。また茎葉再分化について、培養直前期で放射線感受性がいちばん高く、次いで茎葉再分化期であり、カルス形成期では感受性がいちばん低かったとしている。また、長谷川・服部(1992)もペチュニアの

不定芽形成に対する胚軸およびカルスへのガンマ線照射において、カルスへの照射の方が不定芽形成率の低下の小さいことを報告している。

本研究の培養前の木子およびカルスへのガンマ線照射は、Nakamura and Hattori (1997) のイネの薬培養における培養直前期照射およびカルス形成期~茎葉再分化期の初期の照射に相当すると考えられる。本研究においても、カルスの発達および不定胚形成の阻害効果はカルスへのガンマ線照射よりも木子へのガンマ線照射の方が大きくなり、Nakamura and Hattori (1997) および長谷川・服部(1992)の報告と類似する結果となった。

これまで、培養前の材料およびカルスへのガンマ線照射が、再生個体の変異に及ぼす影響を検討したものは少なく、イネの薬培養における薬およびカルスへのガンマ線照射が再生個体の後代系統の形質に及ぼす影響を調査したKinoshitaら(1989)、丹野ら(1993)の報告のみであり、いずれも薬培養単独よりもガンマ線照射と併用した方が変異は拡大するとしている。一方、薬とカルスへの照射の違いによる差について、Kinoshitaら(1989)は急照射において薬への照射が、また緩照射においてカルスへの照射がそれぞれ変異の大きいことを示したのに対し、丹野ら(1993)は両者の違いによる差は明らかでなかったとしている。

これらの報告と同様に、本研究においても培養単独よりもガンマ線照射を併用することで花色変異体の出現頻度が高くなり、さらに濃色化した個体および形態変異した個体が認められ、変異が質的にも、量的にも拡大することが明らかになった。一方‘トラベラー’の不定胚由来個体の花色変異に対する培養前の木子およびカルスへのガンマ線照射を比較すると、同線量を照射した場合、木子への照射はカルスへの照射よりも変異が質的にも、量的にも大きい傾向にあった。

本章で行った培養前の木子またはカルスへのガンマ線照射により得られた花色変異体には、キメラ状のものがほとんどなかった。これは、第Ⅱ章第4節の木子茎頂由来の不定胚から得られた花色変異体と同様の結果となった。一般に、不定胚は単一細胞由来とされ、この細胞から植物体に至るまでに変異が生じなければ、キメラが生じないことになる。本章で得られた花色変異体は第Ⅱ章第2節と同様に不定胚由来であることが想定される。よって、培

養前の木子またはカルスへのガンマ線照射を行っても、不定胚由来のため花色変異体には、ほとんどキメラが発生しなかったと考えられる。この手法は花色変異がキメラ状ではなく、完全突然変異体で生じるため、花色変異体を固定化する必要がないので、育種上有効である。

また照射材料としてみた場合、木子は保存が容易で取り扱いも簡便であるため大量にガンマ線照射および培養できるのに対し、カルスは照射前に培養操作を必要とし、ガンマ線の照射時期も制限されるなど、手法が煩雑で、少量しか扱えない等の欠点がある。培養前の木子またはカルスへの照射による花色変異体の出現様相に大きな差は認められなかったので、ガンマ線照射と培養を組み合わせた場合の照射材料として、木子が有効と判断された。

これらの結果から、グラジオラスの培養前の木子またはカルスへのガンマ線照射により、ガンマ線照射または培養を単独に行うよりも効率的に再生個体に花色変異の生じることが明らかになった。特に照射材料としての取り扱いやすさから、木子の有効性が認められ、培養前の木子へ線量率10 Gy/hで100～200 Gyのガンマ線照射が最適であると判断された。

第VI章 花色変異系統の特性と実用性の検証

第1節 緒 言

グラジオラスでは、生産者は消費者の要望により花色の異なる多数の品種を栽培しているが、これらは栽培特性が異なるため管理が煩雑である。もし花色以外の特性

が同一で花色のみが異なる品種が多数育成できれば、消費者の要望にもかない、しかも生産者は栽培管理が同一なので省力的になり、生産性の向上が期待できる。

ところが、一般的に人為突然変異は奇形や致死的なものが多く、農業上実用性のある変異に、こうした劣悪な望ましくない変異をとまなっていることが多い（久木村，1983；松尾，1984）。

そこで、本研究で‘ヘクター’、‘トラベラー’より得られた6つの花色変異系統を原品種と比較してその農業形質における特性を明らかにし、これらの系統における花色以外の形質の変異を調査するとともに、それらの実用品種としての価値を検討した。また、花色変異系統が原品種と同じ花色に戻る現象（以下、この現象を花色復帰と称する）についても調査し、変異した形質の安定性を検討した。

第2節 材料および方法

1) 供試材料

供試材料は、第Ⅱ～Ⅳ章に述べた実験で得られた花色変異体の中から花色以外の形質が原品種に最も類似し、かつウイルス症状の少ない個体を選抜し、2～4世代にわたる調査で特性の安定したことが確認された6系統である。これら6系統の名称、来歴および花色については表6-1に示した。また、花穂および小花の色調と形状を原品種と比較して図6-1に示した。花色復帰については、6系統のうちTEPPおよびTEDPの2系統を用いて検討した。

表6-1. 材料に用いた花色変異系統の名称と来歴

系統名	系統の来歴
HGPR	‘ヘクター’木子へガンマ線100 Gyを照射して得られた原品種より花色の淡い系統
HGDR	‘ヘクター’木子へガンマ線100 Gyを照射して得られた原品種より花色の濃い系統
TEPP	‘トラベラー’木子茎頂からの不定胚由来の原品種より花色の淡い系統
TEDP	‘トラベラー’木子茎頂からの不定胚由来の原品種より花色の濃い系統
TOPP	‘トラベラー’木子へガンマ線100 Gyを照射して生じた小さな花色変異セクターを子房培養により単離・固定化した原品種より花色の淡い系統
TNPP	‘トラベラー’に発見された自然突然変異体で原品種より花色の淡い系統

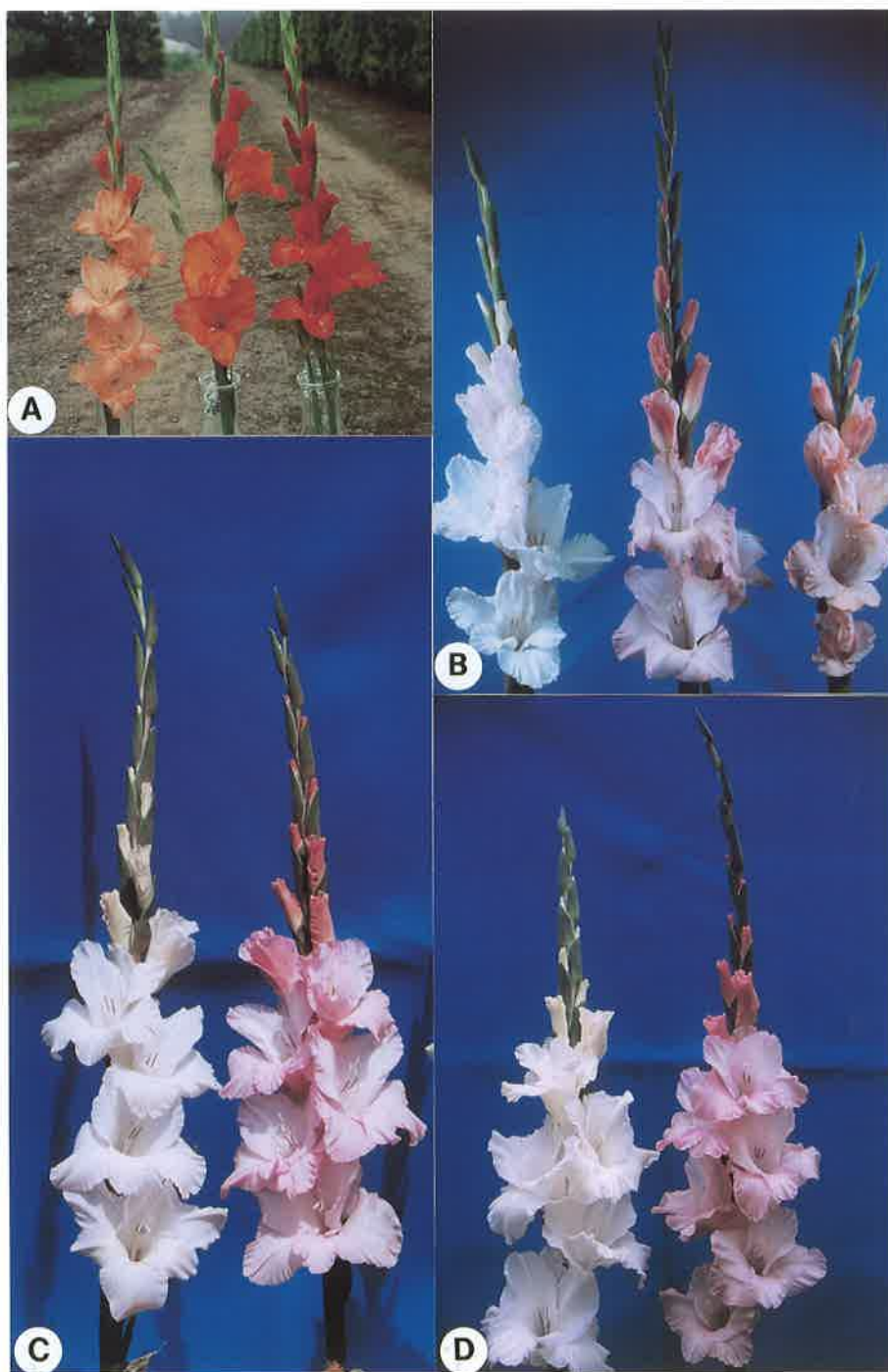


図 6 - 1. 花色変異系統の特性.

- A : 木子へのガンマ線照射により得られた 'ヘクター' の花色変異系統. 中央 ; 原品種.
 左 ; 淡赤色の花色変異系統 HGPR. 右 ; 濃赤色の花色変異系統 HGDR.
- B : 不定胚由来個体から得られた 'トラベラー' の花色変異系統.
 中央 ; 原品種. 左 ; 淡桃色の花色変異系統 TEPP. 右 ; 濃桃色の花色変異系統 TEPD.
- C : 'トラベラー' に発見された自然突然変異の花色変異系統.
 右 ; 原品種. 左 ; 淡桃色の花色変異系統 TNPP.
- D : 木子へのガンマ線照射により花色変異したと想定できる子房片を培養し得られた 'トラベラー' の花色変異系統. 右 ; 原品種. 左 ; 淡桃色の花色変異系統 TOPP.

2) 栽培方法

花色変異系統は、それぞれの原品種を対照として、パイプハウスにうね幅10 cm、株間10 cmの3条植えて定植した。各系統、品種について、直径10~35 mmの成球10個を用いた。‘ヘクター’由来の花色変異系統HGPR、HGDRは、1993年4月6日に、‘トラベラー’由来の花色変異系統TEPP、TEDP、TNPPは、1994年3月25日にそれぞれ定植した。‘トラベラー’由来の花色変異系統TOPPは、1998年3月25日に露地に同様の方法で成球を定植した。栽培管理は茨城県花き耕種基準（茨城県農林水産部、1992）に準じた。

花色復帰については、1994年3月25日にTEPPおよびTEDPの直径5 mm以上の球茎をそれぞれ34および73個、うね間10 cm、株間10 cmの3条植えて定植し、前記耕種基準に準じて栽培した。

3) 調査方法

成育特性として、第1花開花時の草丈、花穂長、第1花の長径、小花数、到花日数、花色、ブロッチの色を調査した。なお、花色およびブロッチの色の基準は日本園芸植物標準色票を用いた。花色復帰の調査は、原品種の花色と同一となった変異セクターの大きさにより、花被片半分以上花被片1枚未満（“花被片半分 $\leq$ ”）、花被片1枚

以上小花1個未満（“花被片1枚 $\leq$ ”）、小花1個以上株全体未満（“小花1個 $\leq$ ”）、株全体（“株全体”）の4段階に分けて、開花期間中2~3日ごとに行った。

第3節 結 果

1) 花色変異系統の特性

‘ヘクター’、‘トラベラー’の花色変異系統の特性を表6-2に示した。花色について、TEDPは原品種と異なる色相であったが、他の花色変異系統は、原品種と同じ色相でその差は日本園芸植物標準色票において、1または2段階であった。ブロッチの色について、HGPR、HGDRは原品種と同じであったが、他の花色変異系統は、原品種と異なるものの、同じ色相でその差は日本園芸植物標準色票において、1または2段階であった。草丈について、花色変異系統は、原品種より低くなる傾向にあった。花穂長について、HGPRは原品種とほぼ同じであったが、他の花色変異系統は、原品種より短かった。第1花の長径について、TEDPは原品種より短かったが、他の花色変異系統は、原品種とほぼ同じであった。小花数について、HGPRは原品種とほぼ同じであったが、他の花色変異系統は、原品種より少なかった。到花日数について、TEPPは原品種よりやや多かったが、他の花色変異系統は、原品種とほぼ同じであった。

表 6 - 2. 花色変異系統の成育特性

年次	品種・系統名	供試 個体数	草丈 (cm)	花穂長 (cm)	第1花の 長径(cm)	小花数	到花日数	花色	ブロッチの色
1993	HGPR	10	146.0 $\pm$ 3.8 ²	63.3 $\pm$ 2.1	9.6 $\pm$ 0.4	17.5 $\pm$ 0.4	100 $\pm$ 1.7	明橙赤(0705)	ピンク白(0701)
	HGDR	10	125.2 $\pm$ 1.3	50.8 $\pm$ 0.9	9.3 $\pm$ 0.3	14.8 $\pm$ 0.3	102 $\pm$ 1.6	濃橙赤(0707)	ピンク白(0701)
	ヘクター(対照)	10	156.8 $\pm$ 4.7	63.1 $\pm$ 2.0	9.7 $\pm$ 0.2	17.5 $\pm$ 0.4	99 $\pm$ 1.6	鮮橙赤(0706)	ピンク白(0701)
1994	TEPP	10	112.0 $\pm$ 4.6	39.6 $\pm$ 2.0	9.2 $\pm$ 0.2	11.0 $\pm$ 0.6	108 $\pm$ 1.7	ピンク白(9701)	淡紫ピンク(9702)
	TEDP	10	114.7 $\pm$ 3.8	40.5 $\pm$ 2.1	8.0 $\pm$ 0.4	12.1 $\pm$ 0.7	104 $\pm$ 1.3	鮮黄ピンク(1004)	鮮紫ピンク(9705)
	TNPP	10	127.9 $\pm$ 1.7	49.3 $\pm$ 1.1	9.6 $\pm$ 0.3	15.4 $\pm$ 0.3	106 $\pm$ 1.7	ピンク白(9701)	淡紫ピンク(9702)
	トラベラー(対照)	10	143.8 $\pm$ 3.7	53.1 $\pm$ 2.0	9.7 $\pm$ 0.3	17.8 $\pm$ 0.5	101 $\pm$ 1.2	紫ピンク(9703)	鮮紫ピンク(9704)
1998	TOPP	10	101.4 $\pm$ 5.3	39.8 $\pm$ 2.2	9.9 $\pm$ 0.3	12.3 $\pm$ 0.4	105 $\pm$ 1.2	ピンク白(9701)	淡紫ピンク(9702)
	トラベラー(対照)	10	125.9 $\pm$ 3.0	52.3 $\pm$ 2.9	9.6 $\pm$ 0.2	15.7 $\pm$ 0.9	103 $\pm$ 1.0	紫ピンク(9703)	鮮紫ピンク(9704)

²: S. E.

1993: 球径10-38 mm, ハウス栽培, 定植日: 4月 6日, 花色: 日本園芸植物標準色票による.

1994: 球径10-38 mm, ハウス栽培, 定植日: 3月25日, 花色: 日本園芸植物標準色票による.

1998: 球径32-38 mm, 露地栽培, 定植日: 3月25日, 花色: 日本園芸植物標準色票による.

2) 花色変異系統の花色復帰

TEPPおよびTEDPにおける花色復帰の調査結果を表6-3に示した。TEPPは調査した34個体中、3個体(8.8%)において花色復帰が観察された(図6-2)。花色復帰

した部位の大きさは個体により異なり, “花被片半分 $\leq$ ”, “花被片1枚 $\leq$ ” および “株全体” のものが, それぞれ1個体ずつ認められた。TEDPでは花色復帰は認められなかった。

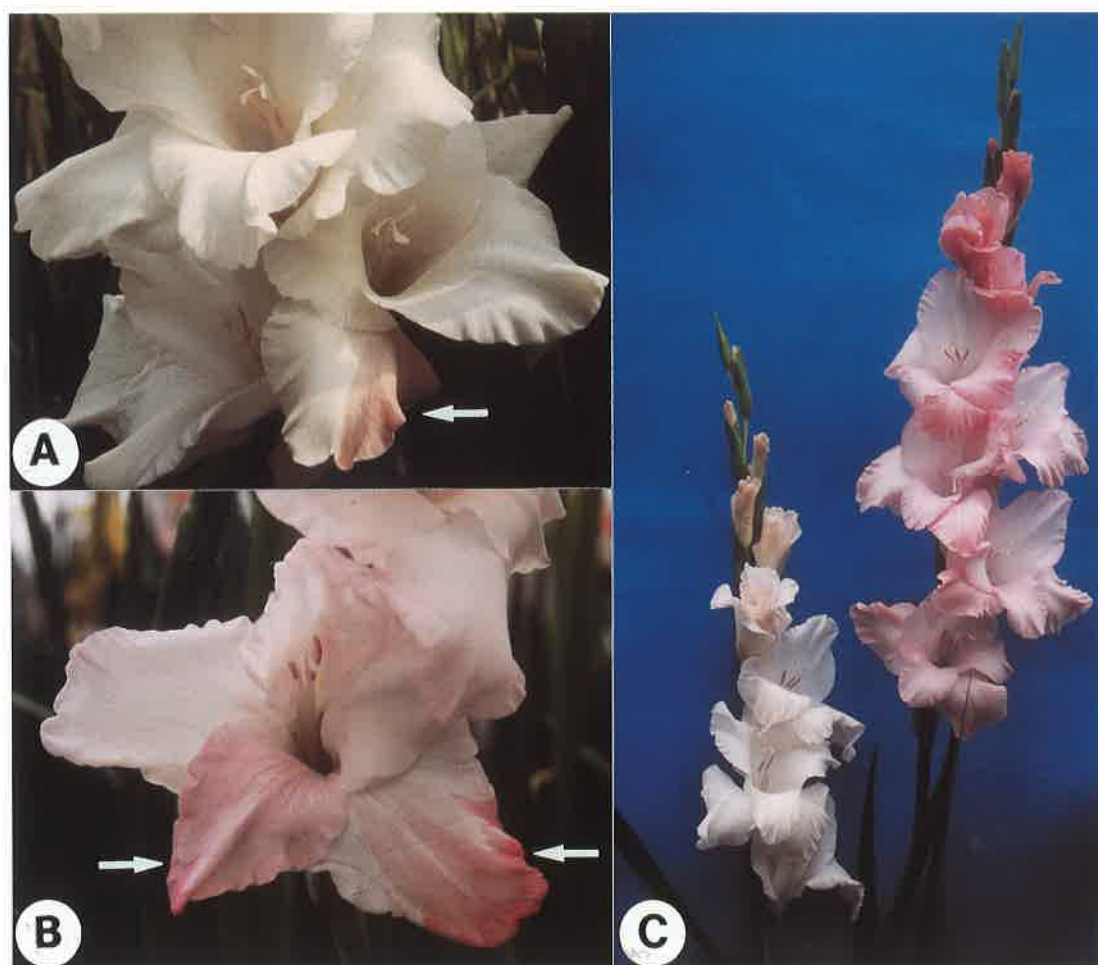


図6-2. ‘トラベラー’ 不定胚由来個体から得られた花色変異系統TEPPに生じた花色復帰。
A: 花被片半分程度の大きさの花色復帰(矢印)。
B: 花被片1.5枚程度の大きさの花色復帰(矢印)。片方の花被片(右側の矢印)ではすじ状に花色復帰。
C: 個体全体に及んだ花色復帰。右; 原品種に花色復帰した個体。左; 淡桃色の花色変異系統TEPP。

表6-3. ‘トラベラー’ の不定胚由来の花色変異系統における花色復帰

系統	供試数	花色復帰部位の大きさ別個体数(%)				合計
		花被半分 $\leq$	花被1枚 $\leq$	小花1個 $\leq$	株全体	
TEPP	34	1(2.9)	1(2.9)	0	1(2.9)	3(8.8)
TEDP	73	0	0	0	0	0

定植日:1994年3月25日。花色:日本園芸植物標準色票による。

第4節 考 察

本章で用いた6系統は、いろいろな手法により得られた花色変異体の中から、花色の程度、ウイルス病の発生程度、形態的特性などを総合的に判断して、優良な個体を選抜・固定したものに由来している。しかし、これら6系統のうち5系統において原品種と比べて調査した植物体各部位のサイズの減少が観察された。藪谷ら（1996）は、ハナショウブの花茎培養由来個体において、原品種と比較し、花茎の短縮、内・外両花被の小型化傾向と複数の形質における同時的な変異が生じたことを報告している。本研究の結果および藪谷ら（1996）の報告を併せ考えると、グラジオラスにおいて放射線あるいは培養によって誘発された花色突然変異は、農業上重要な他の形質の変異をともなうことがあると結論できる。この複数形質に生じた同時的な変異が、1つの突然変異遺伝子の多面発現によるもの（松尾，1984）か、複数遺伝子座の突然変異によるものかは不明であるが、グラジオラスの花色突然変異育種においては、花色以外の形質にも十分注意を払って、優良系統の選抜を行うことが必要である。

‘トラベラー’の不定胚由来の花色変異2系統のうち、TEPPでは、34個体中3個体で花色復帰が観察され、そのうち、1個体ではすべての小花が花色復帰していた（表6-3）。この頻度は変異系統が実用品種として普及する上で、決して無視できないものであり、変異系統の実用品種としての利用にあたっては、変異した形質の安定性に十分な注意が必要であることを示している。一方、もう一つの系統TEDPでは花色復帰がまったく観察されなかった。

本章で供試した6系統のうち、‘ヘクター’由来のHGPRは、草丈以外の形質がほぼ原品種と同じで優良であったが、原品種と同様に高温障害が発生するため、市場性が低かった。同じ‘ヘクター’由来のHGDRも、HGPRと同様の理由で市場性が低かった。TEPPおよびTEDPは、原品種より小型化の傾向がみられ、市場性が低かった。TNPPは原品種‘トラベラー’と比較して、花色の他に、到花日数がやや長く、花数がやや少ない傾向にあったが、その他の草型、茎の強さなどの優れた特性は変化していなかった。よって、本系統は優良品性が認められたので、‘プリンセスサマー’と命名し、1998年5月農林水産省へ品種登録を申請した。TOPPは、花色、ブロッチの色およ

びその他の形態特性の点で、TNPPに酷似しているが、花茎の着色がみられず、淡桃色の花色がはえるので、‘プリンセスサマー’のニューバージョンとして利用が期待できる。

第Ⅶ章 総 合 考 察

グラジオラスにおいて、成球への放射線照射により既存の優良品種から花色だけが異なる突然変異体を作成する試みは、数多く報告されている。しかし、この手法では照射材料の数が少ないため、生じる花色変異体数および変異セクターの大きな個体数が少なく、従来の分球や木子増殖による方法では完全突然変異体を得るのは困難であった。さらに変異スペクトラムの幅も狭かった。

そこで、本研究では放射線照射、培養変異および両者の併用による方法を用いてグラジオラスの花色についての完全突然変異体の作出を図った。

照射材料に木子を用いることで成球に比べてコストがほぼ半減し、より多くの個体を扱えることが明らかとなった。また、両者の花色変異体の出現頻度はほぼ同じで、変異セクターの大きさは木子の方がやや大きくなるので、照射材料に成球よりも木子を用いた方が、大きな変異セクターの花色変異体を、多く得られることが明らかとなった。さらに、放射線照射と培養を併用することにより、放射線照射を単独で行うより花色変異体の出現頻度を高めることができた。この二つの方法によって、これまでより変異の量的拡大が図られることが明らかとなった。

木子へのガンマ線照射により生じた花色変異区分キメラ個体から本研究で開発した花蕾子房の培養を用いて完全突然変異体を作成した。また、取り扱いが簡便で、保存が容易な木子を用いて、茎頂からの効率的な不定胚培養系を開発した。この不定胚由来個体に花色変異が生じ、しかもすべての花色変異体は完全突然変異体として得られた。この二つの方法により、従来から非常に困難とされていた突然変異セクターからの完全突然変異体の作出が容易となった。

培養前にガンマ線を照射した木子の茎頂からカルス経由で得られた不定胚由来個体には、ガンマ線照射または培養を単独で用いた方法では得られなかったさらに濃色化した個体や花色変異の他に形態的変異をともなった個

体が生じた。すなわち、この放射線照射と培養を併用する方法によって、これまでの放射線照射を単独で行う手法よりも変異スペクトラム拡大の可能性が明らかとなった。

なお、これらの方法で得られた花色変異系統は原品種と比較し、草丈が低下するなどの小型化が認められた。よって、グラジオラスの花色突然変異育種では、花色以外の形質にも注意し、優良系統の選抜を行う必要がある。

これらの結果から、グラジオラスの優良品種から花色だけが異なる品種を育成するには、次の方法が有効と考えられる。1) ガンマ線を線量率10 Gy/hで100~200

Gy照射した大量の木子をほ場で栽培して得られた花色変異体と農家の栽培圃場で自然に生じた花色変異体について、大きな変異セクターは分球や木子増殖によって、また小さな変異セクターは花蕾子房の培養によって完全突然変異体を作成する。2) 木子へガンマ線を線量率10 Gy/hで100~200 Gy照射し、茎頂からの不定胚培養系により再生個体を多数育成する。これらの植物体をほ場で栽培し、完全突然変異体を選抜する。この手法では花色変異ばかりでなく、形態変異の出現も期待できる。この二つの方法で得られた完全突然変異体の中から花色以外の形質にも注意し、優良系統を選抜する(図7)。

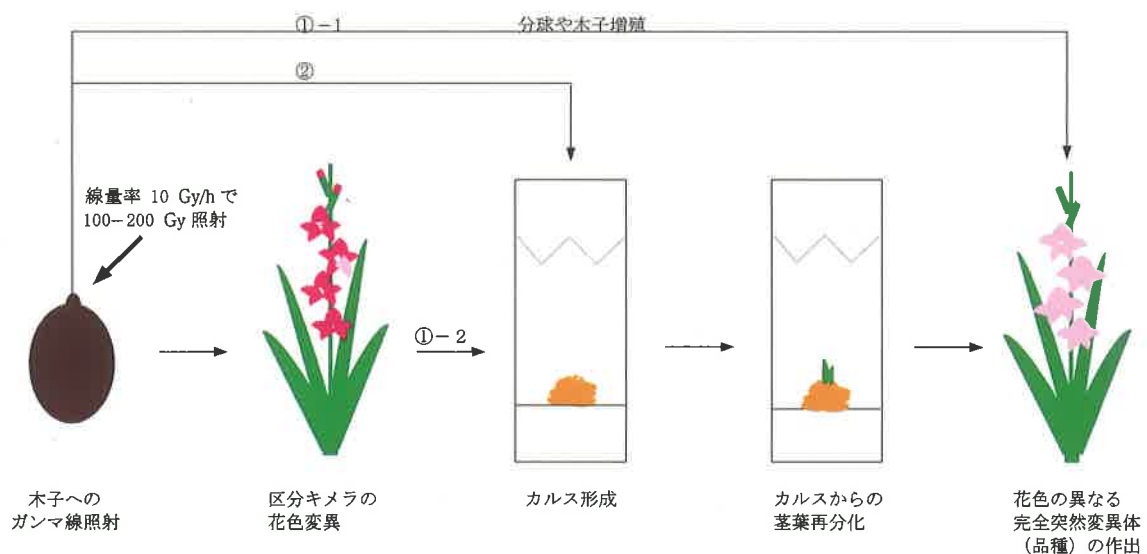


図7. ガンマ線照射および組織培養を用いたグラジオラス花色変異体の作出法

①-1: 木子へガンマ線照射し、分球や木子増殖により完全突然変異体を作成する。

①-2: 小さな花色変異セクターのみを培養し、完全突然変異体を作成する。

②: ガンマ線照射した木子の茎頂からの不定胚由来個体より完全突然変異体を作成する。

*花色変異体は、草丈の低下などをともなうことがあるので、選抜の際には十分注意する。

本研究は以下の点から意義深いものと考えられる。本研究で開発された木子茎頂からの不定胚培養系による花色変異の出現頻度は数%と低く、かつ多数の個体が養成できた。よって種苗の大量増殖技術の一つに利用できる可能性がある。またイチゴカルスからの再生個体ではウイルスの消失が報告されている(大澤ら, 1974)。このため、本研究で開発した培養系で得られた個体はウイルスフリー化している可能性がある。グラジオラスではウイルス病対策が重要テーマの1つになっているので、今後はウイルスフリー化の1手法として、この培養系の利用が期待できる。

イネでは放射線照射と培養の併用はそれぞれの手法を単独で用いる場合よりも変異の拡大に有効であることが知られている。しかし、培養前の材料、または培養により得られたカルスへの放射線照射のどちらが再生個体の変異の出現に有効であるかは、これまでほとんど検討されていない。本研究の結果、両者に大きな差はなく、今後は照射材料として取り扱いやすい点から培養前の材料への放射線照射が有効と考えられる。

キクでは花卉培養を用いて小さな変異セクターから完全突然変異体の作出が報告されている。しかしすべての作物で花卉培養が可能になってはいない。本研究の結果

は、花卉培養の困難な作物においても、花卉と組織的につながりのある花蕾子房のような組織または器官を培養することにより、小さな変異セクターから完全突然変異体を作出できることを示したものである。

以上、本研究を通じて、グラジオラスにおける放射線照射の影響および培養特性を明らかにするとともに、これらの手法を単独または併用して用いることにより、花色変異を効果的に誘発し、完全突然変異体を効率的に作出する方法を確立することができた。

本研究結果は、単にグラジオラスだけに適用するものではなく、その他の球根花きをはじめ、いろいろな作物の突然変異育種にも応用できるものと考えられる。

第Ⅷ章 摘 要

これまで、グラジオラスの実用品種の大部分は交配育種により育成され、放射線照射および培養変異による突然変異体の利用はほとんどなかった。これは、誘発される花色変異が区分キメラとなり、変異が個体全体におよぶ突然変異体（完全突然変異体）の作出が困難なためである。そこで、本研究ではグラジオラスにおいて実用品種としての利用可能な花色突然変異体を作出する方法を確立することを目的に、放射線照射と組織培養を併用した有効な花色突然変異誘発の方法を検討するとともに、生じた突然変異セクターから完全突然変異体を作出する方法を検討した。さらに、これらの方法によって得られた花色変異系統の特性と実用性について検討した。

1) 木子茎頂、木子片、葉片の3種類を外植体として培養を行った結果、木子茎頂は不定胚形成率が最も高く、取り扱いも容易であり、外植体としてもっとも優れていることが明らかとなった。また、不定胚由来の個体は花器形態、花色などが原品種‘トラベラー’とほぼ同一であった。よって、グラジオラスの簡便かつ効率的な不定胚培養系を確立した。

2) 花被片に生じた変異セクターから完全突然変異体を得るための培養に用いる外植体として、花被片の上部、基部および開花2～3日前の子房（花蕾子房）を比較したところ、花蕾子房がカルスおよび不定芽形成ともに最良であった。培地に添加する植物成長調節物質では、花蕾子房からのカルス形成はMS培地にNAA、BAPともに5

mg/ℓを添加した場合、カルスからの不定芽形成はMS培地に2 mg/ℓ BAPを添加した場合がそれぞれ最良であった。花蕾子房由来の個体は、いずれも花器形態、花色などが原品種とほぼ同一であった。よって、単子葉植物では初めて、花蕾子房を用いた不定芽培養系を確立した。

3) 木子茎頂からの不定胚由来個体の中から、低率ではあるが、花色についての完全突然変異体を得られた。また多くの不定胚由来個体に花被片半分以下の大きさの花色変異セクターが生じた。また、花色は淡色化および濃色化の両方向に変異した。一方、通常の栄養繁殖系で増殖した植物体にも、花被片半分以下の大きさの花色変異が観察された。この結果から、木子茎頂を培養することによって、花色変異が増幅するとともに、生じている変異から完全突然変異体を作出できることが明らかになった。

4) ガンマ線を照射した木子を1年間養成後、得られた成球を栽培すると、花色変異の出現頻度および成育障害は照射線量とともに増加した。この結果を総合的に判断して、花色突然変異誘発のための最適な照射線量を、100～200 Gy（線量率 10 Gy/h）と推定した。また、花色は淡色化の方向に変異し、区分キメラとして発生することが多かった。照射材料に木子、成球のどちらを用いても花色変異体の出現頻度、花色変異の方向に差がなかったが、変異セクターは木子の方がやや大きかった。成育中の植物体への緩照射を行ったところ、花色変異セクターが花被片半分以下の小さなもののみであった。これらの結果に、照射コスト、材料の取り扱い易さ等を併せて検討した結果、花色突然変異誘発のための照射材料としては、木子をもっとも優れていると結論した。

5) 花被片に生じた淡桃色の変異セクターに続く花蕾子房の部位を種々の大きさに分割して培養し、再生個体を得た。再生個体の内で淡桃色個体の占める割合は、分割程度が大きく、切片が小さいほど低い傾向にあったが、1小花の1/8の大きさの変異セクターからも淡桃色個体を得られた。すべての花色変異個体は完全突然変異体であった。よって、花蕾子房の培養を行うことによって花色変異セクターから完全突然変異体を作出できることが、単子葉植物において初めて示された。

6) 培養前の木子または培養後形成されたカルスへガンマ線を照射した。カルスの発達および不定胚形成の阻害

は、木子へ照射した場合の方が大きかった。得られた不定胚由来個体の花色変異は、木子に照射した場合の方が質的にも、量的にも大きい傾向にあった。さらに、照射材料としての取り扱い易さも勘案して、カルスよりも、培養前の木子への照射によって、花色変異体を効率的に得られると結論した。

7) 品種‘ヘクター’、‘トラベラー’から得られた6つの花色変異系統の特性を原品種と比較したところ、多くの系統に草丈の低下、小花数の減少などが認められた。よって、グラジオラスの花色突然変異育種においては、花色以外の形質にも注意し、優良系統の選抜を行うことが必要と考えられる。花色変異系統には原品種の花色に戻る現象が低率ながら認められた。

8) 以上、本研究を通じて、グラジオラスにおける放射線照射と組織培養を併用して花色突然変異体を作成する方法を確立した。この方法は、これまで花色に関する突然変異育種が困難とされていた他の栄養繁殖性の单子葉花き植物にも応用できるものである。

謝 辞

本論文を取りまとめるにあたり、茨城大学農学部教授丹羽勝博士、同月橋輝男博士、東京農工大学農学部教授箱田直紀博士、宇都宮大学農学部教授松澤康男博士、茨城大学農学部助教授丸橋亘博士には終始懇篤な御校閲と貴重な御教示を頂いた。

また、本研究を行うにあたり、茨城県農業総合センター生物工学研究所長岡成美博士、前同所長（現、筑波大学農林学系教授）西村繁夫博士、元同所長（現、北海道大学大学院教授）大澤勝次博士、同所果樹・花き育種研究室長林幹夫博士、前同室長（現、同センター園芸研究所果樹研究室長）佐久間文雄博士、元同室長（故）石塚由之氏、元茨城県園芸試験場長根本弘氏、同小沼寛氏、農林水産省中国農業試験場飯田修一博士には終始ご指導と激励を賜り、本論文をとりまとめるにあたり、有益なる御教示を頂いた。

さらに、茨城県農業総合センター生物工学研究所果樹・花き育種研究室高津康正博士、同室眞部徹氏、同室流動研究員（現、筑波大学農学研究科）森中洋一氏、元同室（現、同センター山間地帯特産指導所）友常秀彦氏、元同

室流動研究員（現、茨城大学農学部助手）井上栄一博士、元同室流動研究員吉岡啓子博士、同所野菜育種研究室（現、筑波大学農林学系助教授）江面浩博士、元同室雨ヶ谷洋氏、元同室（現、同センター大宮地域農業改良普及センター）西宮聡氏、同所普通作育種研究室飯田幸彦博士、同センター花き専門技術員大森仁一氏、同センター園芸研究所花き研究室本岡竹司博士、同室市村勉氏、元同花き研究室長（現、同センター鹿島地帯特産指導所長）浅野昭氏、元同室（現、同センター土浦地域農業改良普及センター）永井（旧姓、浦野）永久氏、同センター土浦地域農業改良普及センター下田久氏、同センター下館地域農業改良普及センター丹治功氏、元茨城県園芸試験場資源開発部（現、茨城県病害虫防除所）飯田伸彦氏、元同場花き部長高津勇氏、株式会社坂田園芸専務押手永三氏には研究推進の上でご援助をいただいた。

そして、試験圃場の管理は農業総合センター管理部施設課小島和明氏、同田崎孝氏、同木村茂樹氏、同福岡正子氏、同武田光雄氏のご援助によるところが大きかった。その他、農業総合センター、生物工学研究所および園芸研究所の各位にも多大のご協力をいただいた。

これらの方々には、心から感謝の意を捧げる次第である。

引用文献

- 浅尾俊樹・河瀬晃四郎・吉岡麻理（1993）組織培養におけるシベリア・アイリスの花被基部組織および子房からの苗条形成。植物組織培養。10：188-190。
- Bajaj, Y. P. S., M. M. S. Sidhu and A. P. S. Gill (1983) Some factors affecting the *in vitro* propagation of gladiolus. Sci. Hort. 18：269-275.
- Bajaj, Y. P. S. (1990) Somaclonal variation-origin, induction, cryopreservation, and implications in plant breeding. In：Y. P. S. Bajaj (ed). Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 11. Somaclonal variation in crop improvement I. p. 3-48. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Banerji, S. N., S. K. Datta and S. C. Sharma (1994) Gamma irradiation studies on gladiolus cv.

- white friendship. J. Nuclear Agric. Biol., 23 (3): 127-133.
- Brand, A. J. and M. P. Bridgen (1989) 'UConn White': A white-flowered *Torenia fournieri*. HortScience 24: 714-715.
- Cohat, J. (1993) Gladiolus. p297-320. In: A. A. De Hertogh and M. Le Nard (ed). The physiology of flower bulbs. Elsevier. Amsterdam. the Netherlands.
- 大門弘幸・関 栄一・伊藤靖之・藤家 梓・遠藤宗男 (1993) エラチオール・ベゴニアの組織培養による優良変異系統 'ローズエルフ' の作出. 千葉農試研報. 34: 63-68.
- Earle, E. D. and R. W. Langhans (1974) Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. II. Production, growth, and flowering of plantlets from tissue cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99: 352-358.
- 遠藤元庸・佐々木 力・稲田委久子 (1990) 食用ギクの組織培養による変異体の作出に関する研究 I. 特に培養部位の相違と再生率及び再生個体の特性. 岩手大農報. 20: 17-33.
- 長谷川 徹・服部一三 (1992) ペチュニアの放射線感受性について. 育雑. 42 (別1): 564-565.
- 古川 一 (1993) 組織培養で得たトルコギキョウのいくつかの特性. 植物組織培養. 10: 98-99.
- 古川仁朗・佐々木弘泰・坂本立弥 (1978) ユリの花器培養に関する研究 (第1報) 花器各部の培養と植物体の再生について. 園学要旨. 昭53春: 338-339.
- Hussey, G. (1975) Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae* and *Amaryllidaceae*. J. Exp. Bot. 26: 253-262.
- Hussey, G. (1976) Plantlet regeneration from callus and parent tissue in *Ornithogalum thyrsoides*. J. Exp. Bot. 27: 375-380.
- 蓬原雄三 (1983) 突然変異育種. 突然変異体選抜の実際. 渡辺好郎・山口彦之監修. p. 110-119. 養賢堂. 東京.
- 射場章三・松原尚生・猪越幸雄・岡 充・飯塚義助 (1964) グラジオラスに対する γ 線照射の影響 (II). 都アイソトープ研年報. 3: 109-113.
- 射場章三・松原尚生・岡 充・飯塚義助・松本 壺・工藤 忠 (1965) グラジオラスに対する γ 線照射の影響 (第3報). 都アイソトープ研年報. 4: 85-88.
- 茨城県農林水産部編 (1988) グラジオラス (切花, 球根生産). 花き耕種基準. p. 23-26.
- 茨城県農林水産部編 (1992) グラジオラス (切花). 花き耕種基準. p. 31-32.
- 茨城県農林水産部農業技術課編 (1999) 経営改善のための主要作物・作物別経営指標2 (花・果樹・畜産) グラジオラス. p. 431-442.
- 飯塚義助・岡 充・射場章三・松原尚生・猪越幸雄 (1963) グラジオラスに対する γ 線照射の影響. 都アイソトープ研年報. 2: 169-173.
- 池田 富喜夫 (1983a) 突然変異育種. 誘発方法の比較. 渡辺好郎・山口彦之監修. p. 131-140. 養賢堂. 東京.
- 池田 富喜夫 (1983b) 突然変異育種. 果樹. 渡辺好郎・山口彦之監修. p. 258-264. 養賢堂. 東京.
- 今西英雄 (1988) グラジオラス. 園芸植物大事典. 第2巻. 塚本 洋太郎総監修. p. 133-139. 小学館. 東京.
- 今西英雄 (1989) グラジオラス. 植物遺伝資源集成. 第3巻. 松尾孝嶺監修. p. 1077-1080. 講談社. 東京.
- 市橋万貴子・藤野守弘 (1976) キク小花培養の利用法. 兵庫県農総セ研報. 25: 1-6.
- Kamo, K., J. Chen and R. Lawson (1990) The establishment of cell suspension cultures of *Gladiolus* that regenerate plants. In vitro Cell Dev. Biol. 26: 425-430.
- Kanda, M. (1992) Variation in in vitro propagated plants of *Primula obconica*. In: K. Oono et al. (eds). Plant tissue culture and gene manipulation for breeding and formation of phytochemicals. p. 179-183. NIAR. Tsukuba. Japan.
- 神田 美知枝・永富成紀・山口真美子 (1990) プリムラ・オブコニカの試験管内植物体への放射線照射法と変異誘発. 育雑. 40 (別2): 256-257.
- 霞 正一 (1997) グラジオラス 加除式農業技術大系 花卉編 5 育種/苗生産/バイオテク活用. p. 421-423. 農文協. 東京.

- 霞 正一・雨ヶ谷洋・友常秀彦・高津康正 (1993a) グラジオラス子房由来カルスからの植物体再分化と再生個体の特性. 園学雑. 62 (別1): 438-439.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・江面 浩 (1993b) グラジオラス木子茎頂からの不定胚形成と植物体の再生. 育雑. 43 (別1): 54.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄 (1993c) グラジオラス無菌植物の葉からの不定胚形成と植物体再生. 園学雑. 62 (別2): 500-501.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄 (1994) グラジオラス子房からのカルス形成, 植物体再分化に及ぼす子房縦分割の影響. 園学雑. 63 (別1): 486-487.
- Kasumi, M., H. Tomotsune, Y. Takatsu, F. Sakuma and S. Iida (1994) Expanding flower color variation in *Gladiolus* through mutation breeding and tissue culture. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 44: 230.
- 霞 正一・友常秀彦・高津康正・佐久間文雄・飯田修一 (1995a) グラジオラス木子へのガンマ線照射によって生じた花色変異. 園学雑. 64 (別1): 414-415.
- 霞 正一・友常秀彦・高津康正・佐久間文雄 (1995b) グラジオラスの不定胚培養系による花色変異系統の作出. 園学雑. 64 (別2): 476-477.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄・飯田修一 (1996) グラジオラスの花蕾子房の培養による花色変異キメラの解消. 園学雑. 65 (別1): 370-371.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄 (1998a) グラジオラス無菌植物の葉からの不定胚および不定芽形成による植物体再生. 茨城農総セ生工研報. 2: 83-89.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄 (1998b) グラジオラス花蕾子房からのカルス形成と植物体再生. 園学雑. 67: 951-957.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄 (1999a) グラジオラス木子茎頂からの不定胚形成と花色変異. 園学雑. 68: 168-175.
- 霞 正一・高津康正・友常秀彦・佐久間文雄・飯田修一 (1999b) グラジオラス木子花色変異区分キメラの子房培養による解消. 園学雑. 68: 195-197.
- 霞 正一・高津康正・眞部 徹・林 幹夫 (2001) グラジオラス木子へのガンマ線照射がカルス形成, 不定胚形成および再生個体の花色変異に及ぼす影響. 園学雑. 70: 126-128.
- 川畑 寅三郎 (1997) 加除式農業技術大系 花卉編 5 育種/苗生産/バイテク活用. p. 261-265. 農文協. 東京.
- 久木村 久 (1983) 突然変異形質の選抜. 突然変異育種. 渡辺好郎・山口彦之監修. p. 140-144. 養賢堂. 東京.
- Kim, K. W., J. B. Choi and K. Y. Kwon (1988) Rapid multiplication of *Gladiolus* plants through callus culture. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 29: 312-318 (in Korean, with English summary).
- Kim, K. W. and M. S. Kang (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Gladiolus* callus *in vitro*. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 33: 87-94 (in Korean, with English summary).
- Kinoshita, T., K. Mori and I. Takamura (1989) Mutagenesis by means of anther culture combined with gamma irradiation. Rice Genet. Newsl. 6: 139-141.
- 松尾孝嶺 (1984) 人為突然変異の利用. 育種学. p. 228-238. 養賢堂. 東京.
- Matsuoka, H and K. Hinata (1979) NAA-induced organogenesis and embryogenesis in hypocotyl callus of *Solanum melongena* L. J. Exp. Bot. 30: 363-370.
- 三位正洋 (1975) アマリリスの組織培養に関する研究. (第2報) リン片組織からの器官形成の季節的変動および花梗, 子房部位からの器官形成. 園学要旨. 昭50春: 314-315.
- 宮崎貞巳・田代洋丞 (1978) キクの組織培養 (第3報). 種々の部分の培養によって生じた株の染色体数および花色の変異について. 佐大農彙. 44: 13-31.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- 永富成紀・出花幸之介・宮平永憲・坂本守章・谷口真美子 (1989) キクの放射線突然変異セクターの花弁

- 培養による拡大. 育雑. 39 (別1) : 376-377.
- 永富成紀・宮原研三・三井晃一 (1991) キクの照射および培養による花色突然変異のスペクトル拡大. 育雑. 41 (別1) : 388-389.
- Nakamura, K. and K. Hattori (1997) Effect of ^{60}Co gamma-ray irradiation at different culture stages on rice anther culture. *Breeding Science* 47 : 101-105.
- Nakano, M. and M. Mii (1993) Application of plant biotechnology for breeding of flower crops in the genus *Dianthus*. *Plant Tissue Culture Letters* 10 : 115-122.
- 根津光也 (1967) ガンマ線により誘発されたチューリップの芽条変異の育種学的研究. 富山県農業試験場試験成績特別報告. 7 : 1-74.
- 二階堂孝子・小野沢芳郎 (1989) 器官培養によるキクの花色枝変わりのキメラ解消とその花色解析. 茨大農学術報告. 37 : 63-69.
- 大石一史 (1991) スプレーギク「レインボーシリーズ」の育成. バイオホルティ4. p. 28. 誠文堂新光社. 東京.
- 大石一史・桜井雍三 (1988) キクの花弁組織から再分化した個体の変異について. 愛知農総試研報. 20 : 278-284.
- 大澤勝次・戸沢幹彦・西貞夫 (1974) やく培養の利用に関する研究 II イチゴやく培養によるウイルスフリー株の大量育成. 野菜試験場報告. A1 : 41-57.
- 大城 閑・奥本裕昭・塚本洋太郎 (1974) グラジオラス花茎の無菌培養による器官分化. 園学要旨. 昭49春 : 364-365.
- Raghava, S. P. S., S. S. Negi, T. Y. R. S. Sharhma and K. A. Balakrishnan (1988) Gamma ray induced mutants in gladiolus. *J. Nuclear Agric. Biol.* 17 : 5-10.
- Remotti, P. C. 1995. Primary and second embryogenesis from cell suspension cultures of *Gladiolus*. *Plant Sci.* 107 : 205-214.
- Remotti, P. C. and H. J. M. Löffler (1995) Callus induction and plant regeneration from gladiolus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42 : 171-178.
- 真田哲朗・壽 和夫・西田光夫・藤田晴彦・池田富喜夫 (1993) ニホンナシ黒斑病耐病性突然変異新品種「ゴールド二十世紀」の育成. 育雑. 43 : 455-461.
- 斉藤 清 (1983) 花卉. 突然変異育種. 渡辺好郎・山口彦之監修. p. 252-257. 養賢堂. 東京.
- Seabrook, J. E. A., B. J. Cumming and L. O. Dionne (1976) The in vitro induction of adventitious shoots and root apices on *Narcissus* (Dafodil and narcissus) cultivar tissue. *Can. J. Bot.* 54 : 814-819.
- 柴田道夫・川田穰一・天野正之 (1984) キクの枝変わり品種のキメラ構造の解明に関する研究. 第3報. 小花培養による花色と染色体数の変異. 園学要旨. 昭59秋 : 308-309.
- 重松康司・松原尚生 (1972) 放射線照射したペゴニア・レックスに誘発したキメラ状変異部分からの変異個体の分離と育成. 園学雑. 41 : 196-200.
- Simard M. - H., N. Michaux-Ferriere and A. Silvy (1992) Variants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) obtained by organogenesis from irradiated petals. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29 : 37-42.
- Skirvin, R. M. and J. Janick (1976) 'Velvet Rose' *Pelargonium*, a scented geranium. *HortScience* 11 : 61-62.
- Stefaniak, B (1994) Somatic embryogenesis and plant regeneration of *Gladiolus* (*Gladiolus hort.*). *Plant Cell Rep.* 13 : 386-389.
- Stieve, S. M. and D. P. Stimart (1996) Somaclonal variation in *Zinnia*. In : Y. P. S. Bajaj (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry. vol. 36. Somaclonal variation in crop improvement II.* p. 346-355. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- 高津 勇 (1978) グラジオラスの生長点培養の実際とウイルスフリー化. 農業及び園芸. 53 : 797-800.
- 高津 勇 (1982) グラジオラスの生長点培養によるウイルス無毒化とその実用性. 茨城園試研報. 10 : 11-19.

- 高津康正・霞 正一・眞部 徹・林 幹夫・佐久間文雄
(2000) 夏咲き系グラジオラス (*Gladiolus* × *grandiflora*) の花被片に含まれる色素群に関する調査. 茨城農総生工研報. 3 : 51-58.
- 田中政信 (1977) グラジオラスのウイルスフリー化ならびに花梗培養による増殖. 園学要旨. 昭52秋 : 380-381.
- 丹野 久・相川宗厳・吉田昌幸 (1993) イネ蒴培養における γ 線照射とその後代系統の特性. 育雑. 43 (別2) : 283.
- Tomotsune, H., M. Kasumi and Y. Takatsu (1994) Propagation of *Gladiolus* by somatic embryogenesis. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 44 : 239-244.
- Wakasa, K (1979) Variation in the plants differentiated from the tissue culture of pineapple. Japan. J. Breed. 29 : 13-22.
- 和田 薫・古川二郎・坂本立弥 (1984) 野生ユリの繁殖に関する研究. 園学要旨. 昭59春 : 316-317.
- 薮谷 勤・後藤美恵子・南谷佳栄・清水圭一 (1996) ハナショウブにおける効率的な試験管内増殖法 (2). 育雑. 46 (別1) : 299.
- 山本三夫・松岡清久・大谷俊二・近藤典生 (1958) X線及び γ 線により誘発されたグラジオラス花色の突然変異. 育雑. 8 : 201-202.
- 山下 淳 (1991a) 突然変異誘発の機構. 角田重三郎代表著者. 植物育種学. p. 39-42. 文永堂. 東京.
- 山下 淳 (1991b) 人為突然変異の誘発. 角田重三郎代表著者. 植物育種学. p. 43-49. 文永堂. 東京.
- Ziv, M., A. H. Halevy and R. Shilo (1970) Organs and plantlets regeneration of gladiolus through tissue culture. Ann. Bot. 34 : 671-676.

Studies on Induction of Flower Color Mutants in Gladiolus (*Gladiolus* × *grandiflora* hort.) by Gamma Irradiation and Tissue Culture

Masakazu Kasumi

*Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center
Ago, Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki, 309-0292, Japan.*

Summary

Most of the commercial varieties of gladiolus have been raised by cross breeding during the last 10 decades. Although the mutation breeding is known to be an effective means for obtaining novel varieties in vegetatively propagated ornamental plants in these days, mutant isolation has been restricted by the phenomenon of diplontic selection and subsequent chimera formation that was due to the multicellular origin of the plants. The purpose of this study was to establish the method for obtaining solid mutants of gladiolus having novel flower color by using gamma irradiation and / or tissue culture.

1) Comparative studies on the capability of various explant sources for regenerating plants revealed that the cormel shoot apex was superior to the cormel pieces and leaf blades for its ability of embryogenesis, cost of preparing materials and easiness to be handled. Histological observation confirmed that the induced regenerants were derived from adventitious embryos. There was varietal difference in the ability of somatic embryogenesis. The plants derived from cormel apices were almost identical with the original variety 'Traveler' in the flower characteristics compared. Thus, a simple and efficient culture system in gladiolus was established for obtaining regenerants by using cormel shoot apices as explants.

2) To isolate solid mutants in flower color from mutation sectors in the perianth by tissue culture, the cultural responses of various parts of flowers were compared at different ages. Ovaries obtained from 2 to 3 days before flowering were superior to other flower parts in regenerating adventitious shoots through callusing. The highest efficiency in callus formation was obtained using MS medium supplemented with 5 mg/ℓ NAA + 5 mg/ℓ BAP, while that containing 2 mg/ℓ BAP was most effective in inducing shoots. Varietal differences were observed in the ability of shoot differentiation from ovary-derived calli but not in the ability of callus differentiation.

3) In many of the regenerated plants from cormel shoot apices, flower color mutation was found in smaller parts than half of the tepal. In some of the regenerants, however, whole tepals exhibited mutant color. The flower color mutation was observed in 'Traveler' and 'Hector', but not in 'Topaz'. The mutation with both lighter and deeper color as compared with the original plant was obtained. Flower color mutation was also found in conventional vegetatively propagated plants as smaller sectors than half of the tepals. Here again, flower color mutation was not found in 'Topaz'.

4) Flower color mutation was investigated in the M₁ plants grown from gamma-irradiated cormels and corms as well as in the plants chronically irradiated in the gamma-field. The chronically irradiated plants

exhibited smaller mutation sectors only than half of the tepal. The frequency of mutation and the growth retardation increased in the M_1 plants with the exposed dosages of gamma-ray. The optimum dosage for inducing flower color mutation was estimated to range from 100 to 200 Gy at the rate of 10 Gy/h. Although no conspicuous differences were found in the frequency and the spectrum of flower color mutation between the M_1 plants grown from cormels and corms, cormels were considered to be more suitable than corms as the materials for gamma-irradiation considering the size of mutation sectors observed, the cost of growing and irradiation and the easiness to handle.

5) Ovaries taken from the flower buds in which tepals mutation sectors were observed were divided into pieces of various size and cultured to obtain regenerants through callusing. It was proved that the ovary pieces divided up to $1/8$ of the whole had the capability to form calli and to regenerate plants. Solid mutants of flower color were successfully obtained by culturing ovary pieces adjacent to the tepals in which mutation sectors were observed.

6) Gamma-irradiation was applied either to cormels prior to culture or to cormel-derived callus. Although severer depression of growth and embryogenesis was brought about by the irradiation to the cormels than to the callus, the irradiation to the cormels was recommended as the flower color mutants were obtained at higher rate.

7) Six flower color mutant lines were obtained by the methods mentioned above. These lines showed variations in other traits than flower color such as reduced plant height and decreased floret numbers as compared with the original varieties 'Hector' and 'Traveler'. It was indicated that we should consider not only flower color but also other agronomic traits in order to select elite lines in mutation breeding for flower color of gladiolus. It is also noticeable that the reversion of the flower color to that of the original variety was observed although at very low frequency in some lines.

8) In conclusion, through the experiments stated here, the method of mutation breeding was established for obtaining novel flower color mutants in gladiolus. This method would be applicable to wide range of monocotyledonous ornamental plants which are vegetatively propagated.

Key words : flower color , gamma irradiation , gladiolus , mutant , tissue culture

グラジオラス野生種の花粉の長期保存

高津康正, 霞正一, 眞部徹, 林幹夫

茨城県農業総合センター生物工学研究所, 319-0292, 茨城県西茨城郡岩間町安居 3165-1

12種のグラジオラス野生種および1品種の栽培種について, 花粉の長期保存条件を検討した。その結果, 冷凍することにより1年間は保存が可能で, および保存温度については -20°C と -80°C で大きな差異は認められないことが明らかとなった。

キーワード: グラジオラス, 花粉, 保存

I. 緒 言

グラジオラスはアヤメ科に属する球根花きで本県の主要な花き生産品目の一つである。グラジオラス属植物は南部アフリカを中心に, 中央アフリカ, マダガスカルおよびユーラシアに分布が確認されており, 本属に属する野生種は現在255種とされている (Goldblatt and Manning 1998)。しかしながら, 現在の栽培種はわずか6種の野生種を祖先として交配が繰り返されて育成されたとされていることから (Barnard 1972), その他大部分の野生種は育種素材としての潜在力を秘めた遺伝資源と考えられる。実際に香りをもつ種および青色の花色をもつ種などが存在し, これらの野生種を育種素材として利用することでユニークな新品種の育成が期待できる。

しかし野生種の多くは春咲き性であり, 現在の栽培の主流である夏咲き性栽培種と交雑するためには, 早春の開花期に花粉を採集し, 夏咲き性栽培種の開花期まで一定期間保存しなければならない。

グラジオラス野生種の花粉の長期保存についてはこれまでにいくつかの報告があり, Koopowitz et al.(1984)は, 保存にあたり事前の乾燥処理が有効なことで, 冷凍保存中の花粉は5~6回の融解で生存率が著しく低くなること, および *Gladiolus alatus*, *G. debilis*, *G. rogersii*, *G. orchidiflorus* および *G. tristis* について, -40°C で1年間保存した花粉であっても授精能力を保っていたことを報告している。また Takatsu et al.(in press) は, *G. tristis* の花粉について -20°C でも約6か月間の保存が可能であり, 育種作業の実用上は問題がないことを指摘している。

本研究では, これらの結果を踏まえて12種のグラジオラス野生種および栽培種1品種について花粉の長期保存条件を検討した。

II. 材料および方法

12種のグラジオラス野生種 (*G. carinatus*, *G. carneus*, *G. cuneatus*, *G. gracilis*, *G. monticola*, *G. orchidiflorus*, *G. perneabilis*, *G. tenellus*, *G. tristis*, *G. undulatus*, *G. venustus* および *G. virescens*) の種子を Silverhill Seeds Co.(ケープタウン, 南アフリカ) より購入し, 当研究所のガラス温室内 (12°C ~ 30°C) で育成し開花個体を得た。栽培種 *G. x grandiflora* hort. 'トラベラー' は当研究所で保存しているものを露地圃場で育成させて供試した。開花中の小花よりそれぞれ花粉を採集し, 半日ほど室温で風乾した後, 葉包紙に包んでシリカゲルとともに密封可能なプラスチック容器に入れた。プラスチック容器を -20°C および -80°C の低温冷凍庫に保存し, 保存開始後0, 1, 3, 6および12か月目に花粉の生存率を, Heslop-Harrison and Heslop-Harrison (1970) の方法に従い調査した。すなわち, スライドグラス上に花粉を広げ500 mM ショ糖溶液にFDAストック液 (40.0 % fluorescein diacetate 溶液: アセトンで希釈) を少量加えた発色試薬を滴下して, 蛍光顕微鏡 (BH2-RFL-T2, オリンパス) で観察した。また, 冷凍保存中のグラジオラス花粉は3~4回の融解では生存率が低下しないことが報告されていることから (Koopowitz et al. 1984), 保存する花粉はそれぞれ2包づつを用意し, 凍結・溶解の過程が2回以内になるように配慮した。

III. 結果および考察

保存開始後の花粉の生存率は Table 1 に示した。いずれの種においても保存開始直後は80.3 % ~ 96.6 % と高い生存率を示した。保存中に生存率は徐々に低下し, 12か月後には55.9 % ~ 89.5 % となった。しかしながら, こ

のうちの-20℃で保存した*G. tristis*の花粉(生存率61.7%)を用いて授粉を行ったところ稔実種子が得られ(データ省略),このことから12か月後において上記の生存率があれば実用上は問題ないことが示唆された。また保存温度は-20℃と-80℃の2段階を設定したが,12か月後の生存率には大きな差異は認められず,-20℃でも十分な効果があることが示された。Koopowitz et al.(1984)はグラジオラスの花粉が-40℃で1年間保存可能であることを報告しているが,彼らが試した-40℃という低温および今回実施した-80℃という低温を確保するには専用の低温冷凍庫が必要となる。しかし,-20℃であれば通常の家庭用冷蔵庫の冷凍室でも確保することが可能である。以上のことから,供試したグラジオラス野生種および栽培種‘トラベラー’の花粉は1年間は保存可能であり,また保存温度は-20℃とすることがより実用的であることが示された。

野生種の多くは春咲き性であり,現在の栽培の主流である夏咲き性栽培種と交雑するためには従来,花粉を一定期間保存しなければならないこと,および倍数性の違いから場合によっては雑種種子を得るために胚珠・胚培養等の手法が必要になること等が問題となっていた(高津ら1996)。Takatsu et al.(in press)は,栽培種*G. x grandiflora*‘トラベラー’と野生種*G. tristis*の組合せで交雑実験を行い,受精率が温度により変化することを観察し,比較的低温(15～20℃)で交雑を行うことによって胚珠・胚培養による胚の救済を行わずとも,両者の雑種が得られることを明らかにした。さらに高津(未発表データ)は野生種等のRAPD分析による類縁関係の推定を行い,現在の栽培種と野生種の遺伝的距離はさほど大きくないという結果を得ている。これらのことから,現在の栽培種と春咲き性の野生種においては,花粉の保存が可能となれば両者の間の交雑が可能であると思われる。この点についても本研究の結果ある程度の知見が得られ,今後栽培種と野生種の交雑育種がさらに進展することが期待される。

引用文献

- Barnard, T. T. (1972) On hybrids and hybridization. In: G. J. Lewis, Obermeyer, A. A., Barnard, T. T. (Eds.), *Gladiolus, a revision of the South African species*. J. S. Afr. Bot. Suppl. vol.10, 304-310.
- Goldblatt, P. and Manning, J. (1998) *Gladiolus in Southern Africa*. Fernwood Press, Vleaberg, S.A.
- Heslop-Harrison, J. and Heslop-Harrison, Y. (1970) Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.* 45: 115-120.
- Koopowitz, H., Voss, R. and O'Neil, C. (1984) Long-term storage of gladiolus pollen. *HortSci.* 19: 513-514.
- 高津康正, 井上栄一, 霞正一, 友常秀彦, 佐久間文雄 (1996) グラジオラスの種属間交雑Ⅱ. 胚珠・胚培養による個体獲得とRAPD法による雑種性の検定. 育雑 46 (別2): 237.
- Takatsu, Y., Kasumi, M., Manabe, T., Hayashi, M., Inoue, E., Marubashi, W. and Niwa, M., Temperature effects on interspecific hybridization between *Gladiolus x grandiflora* and *G. tristis*. *HortScience* (in press).

Table 1 Long-term storage of pollen of gladiolus species at -20°C or -80°C . Viability of pollen was measured with the methods described by Heslop-Harrison and Heslop-Harrison (1970) at 0, 1, 3, 6 and 12 months after storage

species	$^{\circ}\text{C}$ ¹⁾	Viability of pollen (%)				
		Month after storage				
		0 month	1 month	3 months	6 months	12 months
<i>G. carinatus</i>	-20	85.5	82.3	62.3	72.8	89.5
	-80	85.5	nt ²⁾	62.3	58.9	70.5
<i>G. carneus</i>	-20	80.3	nt	68.3	nt	78.4
	-80	80.3	79.7	69.3	nt	66.4
<i>G. cunonius</i>	-20	92.0	nt	89.3	nt	87.2
	-80	92.0	nt	64.0	nt	82.9
<i>G. gracilis</i>	-20	96.6	95.4	nt	79.3	67.3
	-80	96.6	nt	84.7	84.8	71.9
<i>G. monticola</i>	-20	89.0	nt	68.0	nt	78.8
	-80	89.0	nt	71.5	nt	70.6
<i>G. orchidiflorus</i>	-20	95.5	nt	nt	93.6	84.1
	-80	95.5	nt	nt	56.7	65.2
<i>G. permeabilis</i>	-20	96.8	92.5	77.4	nt	67.0
	-80	93.3	88.6	60.6	nt	68.5
<i>G. tenellus</i>	-20	85.3	nt	74.5	69.3	55.9
	-80	85.3	nt	87.5	82.3	56.9
<i>G. tristis</i>	-20	85.4	nt	82.9	nt	61.7
	-80	85.4	nt	98.8	80.8	80.7
<i>G. undulatus</i>	-20	91.5	90.5	nt	nt	81.1
	-80	91.5	87.2	84.8	nt	75.3
<i>G. venustus</i>	-20	95.4	nt	94.9	91.5	76.8
	-80	95.4	nt	91.5	84.2	67.9
<i>G. virescens</i>	-20	86.6	nt	80.0	nt	82.8
	-80	86.6	nt	nt	79.6	72.7
<i>G. x grandiflora</i> 'Traveller'	-20	80.6	nt	nt	nt	78.5
	-80	80.6	84.6	nt	nt	76.0

¹⁾ Storage temperature.

²⁾ Not tested.

Long-term Storage of Pollen of Wild Gladiolus Species

Yasumasa Takatsu, Masakazu Kasumi, Toru Manabe and Mikio Hayashi

Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center

Ago, Iwama, Nishi-ibaraki, Ibaraki, 309-0292, Japan.

Summary

The effect of storage temperature on pollen viability was tested, as long-term storage of pollen is necessary to facilitate crossing between spring-flowering species and summer-flowering species. Our study showed that pollen storage of wild gladiolus species (*G. carinatus*, *G. carneus*, *G. cunonius*, *G. gracilis*, *G. monticola*, *G. orchidiflorus*, *G. permeabilis*, *G. tenellus*, *G. tristis*, *G. undulatus*, *G. venustus* and *G. virescens*) and *G. x grandiflora* hort. 'Traveller' was possible at -20°C for one year. Marked difference was not observed in the viability of stored pollen at -20°C and at -80°C in all species.

Key words : gladiolus, pollen, storage

所 長 岡 成 美

編集委員長 富 田 健 夫

編 集 委 員 飯 田 幸 彦

霞 正 一

横 田 国 夫

平 山 正 賢

津 田 新 哉

茨城県農業総合センター生物工学研究所研究報告 第4号

平成13年3月20日発行

発行所 茨城県農業総合センター生物工学研究所
〒319-0292 西茨城郡岩間町安居3165-1
電話 0299-45-8330

印刷所 ワタヒキ印刷株式会社
〒310-0012 水戸市城東1丁目5番21号
電話 029-221-4381(代)

Bulletin
of the
Plant Biotechnology Institute
Ibaraki Agricultural Center
No.4 (2001)

Contents

- Studies on Induction of Flower Color Mutants in *Gladiolus*
(*Gladiolus* × *grandiflora* hort.) by Gamma Irradiation and Tissue Culture 1-49
Masakazu Kasumi
- Long-term Storage of Pollen of Wild *Gladiolus* Species 51-54
Yasumasa Takatsu, Masakazu Kasumi,
Toru Manabe and Mikio Hayashi

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