

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

二階堂 孝子¹⁾・小野沢 芳郎

栄養繁殖作物では、自然に、あるいは人為誘発により出現する枝変わり（体細胞突然変異）が新品種の重要な給源となっており、例へばキクの商業品種のうち、枝変わり由来の割合は30%以上に及ぶといわれている¹⁰⁾。

しかし一般に枝変わり部分の組織（変異セクター）は変異細胞層と起原品種の細胞層とのキメラとなっていることが多く、挿木繁殖を繰り返しても安定して変異形質のみを表現する完全変異系統（ソリッド型）を得るのは必ずしも容易でない²¹⁾。

近年、放射線などを利用して高頻度で枝変わりの誘発が可能になったが、併行してキメラの解消と変異セクターの大型化のための手法として切戻し方法、内部摘芽法、不定芽利用法などが開発され、それぞれ成果を挙げている^{2),5),19)}。一方、Broertjesらは、近年著しい発展を遂げつつある組織培養技術の応用がキメラ解消の効率化に多くの可能性をもつと予想した⁵⁾。これより先、松原らはキクの花色枝変わり部分の組織片を培養し、短期間に完全変異系統の確立に成功したことを報告している¹⁶⁾。

園芸花卉では、花色の変化は新品種成立の重要な要素であるので、いままで、いろいろな角度から数多くの報告がある^{7),11),12),22),25)}。一般に花色の変化の原因は、1)色素の消失または量的変化、2)異なる色素をもつ細胞層の転換、3)新しい色素の発現のいずれかであると考えられる。しかし多くの事例をみると3)の場合は稀で、1)と2)または両者の組合せによる例が多い。特定の起原品種から期待される花色変異の範囲が推定できれば育種を進める上で好都合である。起原品種の枝変わりに

由来する花色変異系統について組織学的あるいは生化学的な解析を行なうことも、このための重要な資料の一つと考えられる^{9),10),22)}。

筆者らは1983年、キク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) の赤色品種デラウェアのγ線照射植物に黄花枝変わりを得、その花卉を培養して完全黄花系統を作出した。さらに、この系統の花色構成を花卉の組織学的観察と色素分析から明らかにし、その遺伝的背景を推定できたので報告する。

材料および方法

キク（ポットマム）の赤花品種デラウェア（1974年、千葉県暖地園芸試験場より分与）の挿芽苗（6～7葉期）を1982年と1983の2栄養世代にわたって農水省放射線育種場のガンマーほ場に搬入し毎世代3.0KRを照射した。2世代目の照射材料のうち1個体に3ケの頭状花を含む黄花枝変わりが見出された。しかしそれからの挿芽繁殖は不可能と認められたので、松原らの手法にならって変異頭状花の管状小花を外植片とする器官培養を試み、最終的に1個体の再生植物を得た。この植物は翌1984年に全花が黄花をつけ、ソリッド型と認められた。そこで、起原品種（D）と黄花変異系統（DY）の舌状小花の組織学的観察ならびに色素分析を行ない、両者の間でどのように異なるかを解析した。

組織培養の方法および花色分析法の概要は次のとおりである。

組織培養：舌状小花からのカルス誘導にはEarleがキクの茎頂培養用に開発したMS基本培地+6 BA（2

1)農林水産省

mg/ℓ)+NAA (0.02mg/ℓ) に 3%しょ糖と0.5%寒天を加えた固型培地を用い25°C, 暗黒下で培養した。ただしカルス形成後は上記組成からNAAを除いたものに継代し照明下で培養した⁶⁾。

組織観察および色素分析： 組織観察は、新鮮な舌状花卉の徒手横断切片を光学顕微鏡下で、主として赤桃色で水溶性のアントシアニンを含む細胞層と、水に不溶で顆粒状に分布するカロチノイド系と推定される色素をもつ細胞層の存在様式に着目して行なった。アントシアニン色素の定量は常法にしたがい新鮮花卉から1%エタノール塩酸で抽出、エーテルを加えて得た沈澱を1%エタノール塩酸に溶かして得た色素液について島津ダブルビーム分光光度計により吸収スペクトルを求める方法によった。カロチノイド系色素の定量は、文献にしたがい、乾燥花卉を6%KOHエタノール溶液して粗抽出液を得、これを温浴上で15~20分間加熱してケン化を促進し、石油エーテルで2回抽出した。次にエーテルを溜去して得た残留物をn-ヘキサンに溶解したものを吸収スペクトル測定用の資料とした。非アントシアニン系フラボノイドの存在が想定されたので、乾燥花卉をメタノールで温浸して得た粗抽出液から、エーテル、酢酸エチルに順次振り取って純化し、最終的に少量のメタノールに溶解してフラボノイド抽出液とした。この抽出液の吸収スペクトルの測定は、島津250ダブルモノグローム自記分光光度計によった^{8),14)}。

結 果

(1) 黄花変異系統の作出

置床した164の管状花は順調にカルスを形成したが、再分化培地に植え替えた後も大部分のものはカルスとしての成長を続け、器官分化の兆候を示したものは少数であった。最終的には2本のシュートを持つ1個のカルスから再生植物が得られた。この植物を置床後5ヶ月で鉢に移植して肥培管理に努めたところ旺盛な生育を示し、やがて多数の黄色花をつけ、キメラは解消されたものと認められた。この変異系統(DY)はその後数次に互って挿芽繁殖を繰り返しているが、異変形質は安定して維持

Table 1 Callus formation and plant regeneration after in vitro culture of yellow florets.

Florets plated	No. of calli obtained	No. of calli with shoot	No. of plants regenerated
164	71	11	1

されているので、完全なソリッド型であると確認される(Table 1)。

(2) 色素群の検索と分析

舌状花卉の切片の観察から起原品種(D)は赤桃色の液胞と黄色の顆粒が共存する1層ないし数層の細胞層が表皮系に接して存在し、内層は黄色顆粒のみを持つ細胞層で構成されているのに対してDYは黄色顆粒を含む細胞のみからなることが認められた。次に舌状花卉をアンモニア蒸気に曝したところ、Dは青く変色したがDYでは変化がなかったことから、Dはアントシアニンとカロチノイドの両方で、DYはカロチノイドのみで主色素を構成しているものと認定された。花卉に含まれる黄色色素にはカロチノイド以外に、多くの例で非アントシアニン系フラボノイド類が知られている⁹⁾。そこで乾燥花卉をメタノールで温浸して得られた淡黄色を呈する粗抽出液についてフラボノイド確認のため、塩化第一鉄エタノール溶液、酢酸鉛溶液および苛性カリ溶液による呈色反応を試みたところ、D、DYともにフラボンまたはフラボノールを含むことが認められた。

以上のように赤桃色のアントシアニン色素はDのみに存在し、黄色のカロチノイドおよび非アントシアニン系フラボノイドは両方に共通して含まれることがわかった。これらの色素について吸収スペクトラムから求められた量的な比較の結果は次のようであった。

アントシアニン：Dの花弁から得られた1%エタノール塩酸抽出液は赤色であったがDYからのものは殆ど無色であった。この抽出液の吸収スペクトルの測定結果はFig. 1のとおりである。Dのもつ535nm附近のピークは、これまでの報告から赤色系のキクに共通して見出されているアントシアニンの一種クリサンテミンと考えられる^{7),8),12)}。

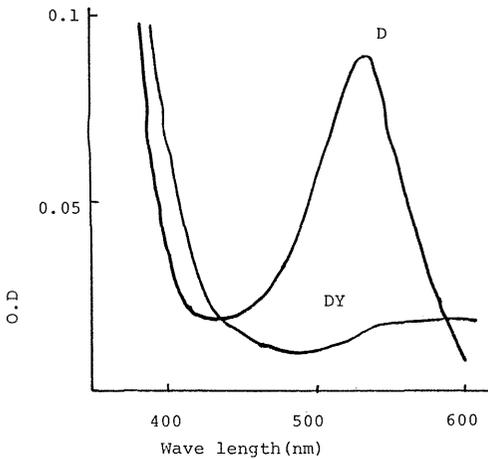


Fig. 1 Absorption spectra of crude extracts with HCl-EtOH from fresh flower petals for anthocyanin pigments, D: Delaware, DY: Yellow mutant.

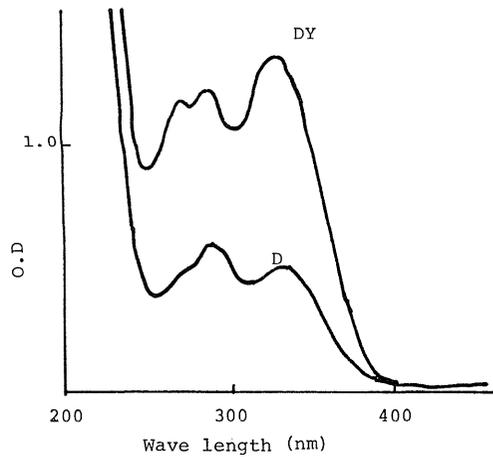


Fig. 2 Absorption spectra of EtOH extracts from dried flower petals for estimated non-anthocyanin flavonoids. D: Delaware, DY: Yellow mutant

Table 2 Content of carotenoids ($\mu\text{g/g}$ d.w.).

Delaware	23.9
Yellow mutant	42.9

カロチノイド系色素：カロチノイド抽出法を適用して得られた黄橙色の抽出液の吸収スペクトルならびにその435nmでの吸光度から文献にしたがって算出した総カロチノイド量を、それぞれFig. 2およびTable 2に示す。Fig. 2にみられる特徴的な3つのピーク¹²⁾から、この色素はカロチノイドであること、また、DもDYも同種のカロチノイドを含むが量的にDYはDに比べて約50%多いことがわかった。

非アントシアニン系フラボノイド：花に含まれる黄色色素には上述のカロチノイドのほかに、アントシアニン類と化学構造が基本的に同じで、合成経路も同列のフラボノイド類が知られている²²⁾。乾燥花弁をメタノールで温浸して得られた粗抽出液についての塩化第二鉄エタノール溶液、酢酸鉛および苛性カリによる呈色反応の結果から、D、DYともにフラボンないしフラボノールを含むと推定された。この抽出液をさらに純化し、

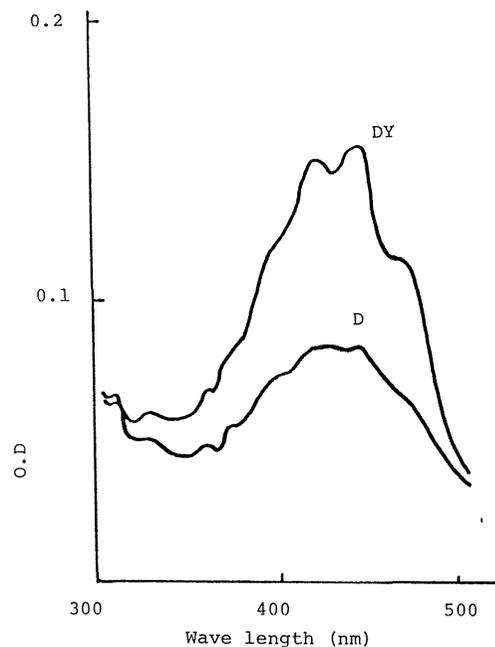


Fig. 3 Absorption spectra of n-hexane extracts from dried flower petals for carotenoids D: Delaware, DY: Yellow mutant

200~500nm波長域での吸収スペクトルを測定したところFig. 3が得られた。フラボノイドの特徴とされる紫外部の二つのピークの存在、塩化アルミニウム、ホウ酸の添加による吸収ピークの移動^{8),12),17)}が認められたことからDとDYとはともに少なくとも330nmと290nm附近に強い吸収帯をもって2種類のフラボノイドを含むと結論される。量的にはDYが著しく多量で特に330nmに吸収ピークをもつ物質は、DYがDの2倍以上を含むと推定される。

考 察

(1) キメラ解消法としての管状花培養の有用性

すでに触れたように栄養繁殖作物の育種では、枝変りの誘発とその利用に依存する度が高い。放射線処理などにより枝変わりの誘発頻度は著しく高まったが、得られる変異セクターは大小さまざまであり、一般にそのまま枝挿しや芽挿しにより変異個体の確立が可能な大型変異セクターの出現頻度は著しく低い²⁰⁾。キメラのタイプにもよるが変異セクターが大型になるほど変異部分からの増殖は容易である一方、キメラがそのまま維持される確率も高い。Broertjesらは特定の草本花卉(セントポーリア、アキメネス、ストレプトカーパスなど)では葉挿ししたとき発生する不定芽が単一細胞起原である事実に着目し、いわゆる不定芽(利用)法(Adventitious bud technique)を開発し多くの品種を育成した^{2),3),4),5)}。この方法が適用できる種は限定されているが、しかしこれらの報告はキメラの解消には単細胞ないしは等質の細胞層に由来する個体の誘導が理想であることを示唆している。この目的にかなない、対象に限定されない一般的手法としては、Broertjes自身も指摘しているように近年著しい進展を遂げつつある組織培養技術の応用が考えられる^{5),26)}。

本研究では小型の変異セクターを構成している管状花(花卉)由来の再分化植物を得ることによりキメラのな花色変異系統を獲得できた。松原は先と同じくキクの桃色花品種ブルーリッジに出現した白花枝変わりの花床の切片を培養して白花系統を作出した¹⁹⁾。また近年柴田らはキクの9品種を用いて、無処理のまま管状花培養を行

ない、そのうちの3品種から花色変異個体を得た²⁴⁾。これについて柴田らは再分化の過程を通じてキメラ構造がなくなり単一の細胞層(L-1層)由来の組織に転換したためと解釈した。この解釈については議論の余地があるが、以上の事例から花卉(小花)や花床など器官分化の末端に属する組織は等質の細胞により構成されているか、キメラがあってもそれほど複雑でない場合が多いと考えられる。前述のように変異セクターは小型のものが多いが、花色変異ではこの部分からの培養が可能なら、得られる再分化植物がソリッド型である確率が高く、この方法が花卉育種、とくに新花色品種の育成を効率的に進めるうえで役立つことが期待される。

(2) 黄花変異系統(DY)の遺伝的背景

組織学的観察および花色分析の結果から起原品種デラウェア(D)の赤色はアントシアニン(クリサンセミン)の存在によるが、得られた黄花変異系統(DY)はこの色素を全く欠いていることが確認された。したがってDYは花色変異の要因として事例の多い細胞層の再配列によるものではなく、アントシアニン合成経路に関わる遺伝子(群)または染色体レベルでの突然変異により、その産生が行なわれなくなったものであることは明らかである。アントシアニン色素合成に関して、ペチュニアではAn遺伝子群の劣性化により白花となることが報告されている¹⁾。

一方、DおよびDYに含まれる黄色色素は、植物に広く存在するカロチノイドと非アントシアニン系フラボノイドの両方が確認されたが、興味のあるのは、いずれの色素群についても量的にはDYがDよりの多かったことである(Fig. 2, 3)。佐保らはコスモスの黄色色素に関する研究報告の中で、一連のフラボノイド系色素の合成経路において、末端にあるアントシアニン生成とその上流にあるフラボンの生成とは競争的な関係にあると述べている²³⁾。DYにおけるアントシアニンの消失と非アントシアニン系フラボノイドの増加についても同じ考え方があてはまる。服部らはDに由来する黄花系統に含まれる黄色のフラボノイド系色素をフラボノールとしたが、起原品種との量的関係には触れていない⁹⁾。

一方、カロチノイドの生成は、フラボノイドのそれとは全く別経路によるとされているから、DYにみられるカロチノイドの増加の理由づけはできないが、稲津らはデージー (Daisy) 系のキクを材料とする体細胞突然変異の誘発研究の中で同様の事例を観察し、この由来について染色体の欠失など遺伝子突然変異以外の原因を想定している¹⁴⁾。Longtonはキクのカロチノイド生成を抑制する優性遺伝子 (I) を報告し、その劣性突然変異によりカロチノイド含量が増すとしている¹⁵⁾。DYについて、アントシアニン合成遺伝子群の変異と I 遺伝子の劣性変異が同時に起ることは確率的に考えにくい全くゼロではない。あるいは、両者が平行して起る何らかの機構が存在するかも知れない。突然変異は劣性方向への変化が大部分とされている。したがって、ここで重要なことは、黄色のカロチノイド色素の増加をたらず変異の誘発について期待がもてる点である。

摘 要

1. 赤花のキク (品種デラウエア) にγ線を照射した材料から黄花枝変わりが見出された。この枝変わり部分の管状花を培養したところ、得られた1個体の再分化植物は、キメラのない黄花変異であった。

2. この黄花変異系統の遺伝的背景を検討するため、花卉に含まれる主色素の量および存在様式を起原品種と比較した結果、1) 黄花変異系統は起原品種のもつ赤桃色のアントシアニン (クリサンテミン) を欠くこと (Fig. 1, 2), 黄色色素のカロチノイドと非アントシアニン系フラボノイドは起原品種と黄花変異系統の両方に存在するが、量的には、両色素とも黄花変異系統に著しく多いことが認められた (Table 1, Fig. 2およびFig. 3)。以上の結果と既報告を参照して、黄花変異はフラボノイド合成経路の比較的下流で赤色のアントシアニン合成をブロックする突然変異が起り、結果的に淡黄色の非アントシアニン系フラボノイドの蓄積をもたらしたと結論した。また、カロチノイドの増加について二つの遺伝的な可能性を想定し、その育種的な意義をのべた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり種々御教示をいただき、参考文献を分与された玉川大学農学部の稲津厚生先生、また、色素分析に関して御指導をいただき、器材の使用に便宜を与えられた本学部の原弘道、正木武治および永山靖美の各先生に心から感謝の意を表します。

文 献

- 1) Anton, G.M. Gerats, E. Farcy, M. Wallroth, S.P.C. Groot and A. Schram: *Genetics*, **106**, 501 (1984)
- 2) Broertjes, C.: *Euphytica*, **18**, 337 (1969)
- 3) Broertjes, C.: *idid*, **21**, 48 (1972)
- 4) Broertjes, C., S. Roest and G.S. Bokelmann: *idid*, **25**, 11 (1976)
- 5) Broertjes, C. and A.M. Harten: *Application of Mutation Breeding Method in the Improvement of Vegetatively Propagated Crops*, p. 316 (1978) Elsevier Publishing Co.
- 6) Earle, E.D. and R.W. Longham: *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **99**, 352 (1974)
- 7) 遠藤元庸・山田健二: *岐阜大農研報*, **33**, 51 (1972)
- 8) 林 孝三: *植物色素—実験—研究への手引*, p. 500 (1980) 養賢堂
- 9) 服部一三・蓬原雄三: *育雑*, **20**, 216 (1970)
- 10) 稲津厚生・佐野 清: *玉川大農研報*, **22**, 14 (1982)
- 11) 稲津厚生・山内 望・塊原良仁: *玉川大農研報*, **23**, 36 (1983)
- 12) 河瀬晃四郎・塚本洋太郎: *園学雑*, **43**, 165 (1974)
- 13) 川村 亮: *新版食品学実験法*, p. 81 (1984) 朝食書店
- 14) 木谷信雄: *近畿大農紀要*, **4**, 1 (1971)
- 15) Longton, F.A.: *Euphytica*, **29**, 807 (1980)
- 16) 松原尚生・重松庸司・須田広勝・橋本真夫: 第10回アイソトープ会議報文集, 412 (1967)
- 17) Mabry, T.J., K.R. Marham and M.B. Thomas: *The Systematic Identification of Flavonoids*, p. 325

- (1973) Springer-Verlag
- 18) 松本 弘・小野澤芳郎：育雜，**36**，別 2，100(1986)
- 19) Nakajima, K.: Gamma Field Symposia, **4**, 55 (1965)
- 20) Onozawa, Y.: Sci. Rep. Fac. Arg. Ibaraki U., **29**, 1 (1981)
- 21) Richard, A.E. Tilney-Basset: Plant Chimera, p. 199 (1986) Edward Arnold Ltd.
- 22) 佐俣淑彦・稻津厚生・苅部フミ・椿谷明子・藪本禎和：玉川大農研報，**16**，31 (1976)
- 23) 佐俣淑彦・稻津厚生：玉川大共同研報，**3**，1 (1983)
- 24) 柴田道夫・川田穰一・天野正夫：園学要旨，昭59秋，308 (1984)
- 25) Stickland, R.G.: Ann. Bot., **36**, 459 (1972)
- 26) 渡辺好郎・山口彦之：突然変異育種，p. 343 (1983) 養賢堂

Establishment of a Non-Chimeric Flower Color Mutation through *in vitro* Culture of Florets from a Sport in Chrysanthemum with Special Reference to the Genetic Background of the Mutation Line Obtained

TAKAKO NIKAIDO and YOSHIRO ONOZAWA

A flower color sport from red to yellow was occurred in the chrysanthemum cultivar Delaware exposed to 3.5 KR of gamma-ray at the seedling stage. The florets from the mutated sector were cultured on the modified Murashige-Skoog medium and only one plantlet was regenerated. And this plant produced all yellow flowers demonstrating to be free from the chimerism. From the result, it was suggested that *in vitro* culture of floret or other floral organs might be an efficient way for escape from chimerism in the mutation breeding of the vegetatively propagated ornamental crops.

In order to estimate the genetic background of the yellow flower mutant line obtained (DY), and its original variety (D) were compared through histological observation and pigment analysis. In the comparison between DY and D, it was found that DY lost red colored anthocyanin completely, suggesting mutation of the gene (s) controlling the pigment synthesis, while it contained increased amounts of yellow pigments, (non-anthocyanin flavonoids and carotenoids) instead.

For reason of increase in the contents of both yellow pigments, the accumulation of some flavonoids which would be the precursor of the anthocyanin and a recessive mutation with dominant gene suppressing carotenoid synthesis were assumed.

(Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ., No. 37, 63~69, 1989)