

ガンマ線緩照射圃場(ガンマーフィールド)から見つかったニホンナシ(*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai)の葉色変異体の特徴

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者名	村松,昇 山ノ内,宏昭 伊藤,祐司 増田,哲男 吉岡,照高 武弓,利雄
発行元	園芸学会
巻/号	10巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 143-149
発行年月	2011年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ガンマ線緩照射圃場（ガンマーフィールド）から見つかったニホンナシ （*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai）の葉色変異体の特徴

村松 昇^{*}・山ノ内宏昭・伊藤祐司^a・増田哲男^b・吉岡照高^c・武弓利雄

農業生物資源研究所放射線育種場 319-2136 茨城県常陸大宮市

Characters of the Leaf Color Mutant of Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai) Found in Gamma Ray Irradiation Field (gamma field)

Noboru Muramatsu^{*}, Hiroaki Yamanouchi, Yuji Ito^a, Tetsuo Masuda^b, Terutaka Yoshioka^c and Toshio Takyu

Institute of Radiation Breeding, National Institute of Agro-biological Science, Hitachi-Ohiya, Ibaraki 319-2136

Abstract

A shoot with leaf color mutation in a Japanese pear ('Osa-Gold') was found among trees treated by chronic gamma-ray irradiation. Seven nurseries raising plants from mutated specimens were surveyed in 2004 and 2009. In 2004, shoots with yellow-green leaves and with yellow-green margin variegation leaves were observed. The comparisons of observation in 2004 and 2009 showed that yellow-green mutant was stable and five types of shoots sprouted from the branches with variegated leaves in 2004 were observed in 2009. These findings showed that the variegated mutant was apparently unstable; however SAM structure in the yellow-green variegations was also stable and the development of L2 and L3 were merely different depending upon leaves. Furthermore, the results of microscopic observation, the phenotypes of cross pollinated seedlings, twin sector variegations showing the yellow-green variegated leaves indicated that the leaf-color mutant was heterozygous and showed a semi-dominant gene. Furthermore mutant cells in the SAM of the variegated shoot occupied the L2 layer. The methods of utilizing these mutants are discussed.

Key Words : 'Osa-Gold', periclinal chimera, SAM, variegation

キーワード : 斑入り, 'おさゴールド' SAM, 周縁キメラ

緒 言

斑入りなどの葉色変異植物は数多くの種で認められ、葉、茎、花、果実、種子と様々な部位に斑が入る。このなかで葉の斑入りは、花の斑入りとともに観賞用に古くから珍重され、観葉植物や景観樹などに利用されている（広瀬、1986）。

斑入りになる原因として、1) 核遺伝子による斑入り、2) 細胞質遺伝による斑入り、3) 周縁キメラによる斑入り、4) ウイルスによるものなどがある（笠原、2008）。

このうち周縁キメラによる斑入りは多くの被子植物で認められ、挿し木や接木、株分けなどによって維持・増殖される。被子植物の多くは、茎頂分裂組織（SAM: shoot apical

meristem）が3層構造をとっており（表層側からL1, L2およびL3と呼ばれる）、それぞれの細胞群が独立して維持され、植物組織の基となる（原、1984; Howell, 1998; Ravanら、1999）。周縁キメラはL1, L2およびL3細胞群のいずれかまたは複数がそれ以外の細胞群とは異なった遺伝子を持つ状態であり、この変異が葉色変異（アルビノなど）である場合に斑入りとなる（原、1984; Szymkowiak, 1996）。斑入りは目で見えて分かる変異であるため、斑入りをいれれば周縁キメラの安定性や分離法の研究が非常に容易になると考えられる。

筆者らの所属する放射線育種場では、ガンマ線を中心とした放射線照射による有用変異体の作出およびその解析を行っている。このうちニホンナシでは、黒斑病耐性の品種が育成されている（壽ら、1992; 増田ら、1998; Masudaら、1997; Sanadaら、1988; Yoshiokaら、1999）。放射線による突然変異は、1細胞由来なので、隣接する変異を起こしていない細胞とともに組織が形成され、周縁キメラとなることがある。このような場合、周縁キメラから完全変異体を分離するか、分離が困難でも周縁キメラが安定であればこの変異体を実用に供することができる（van Harten, 1998）。

2009年12月18日 受付。2010年8月5日 受理。

^{*} Corresponding author. E-mail: muramatu@affrc.go.jp

^a 現在：農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センター

^b 現在：社団法人 日本果樹種苗協会

^c 現在：農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所カンキツ研究拠点

そこで今回、放射線照射を行っているニホンナシ‘おさゴールド’の樹から、周縁キメラによると考えられる葉の斑入り変異がニホンナシとしては初めて得られたので、その解析を行い、斑の安定性とこれらの変異体を利用したキメラの解消方法の開発などについて論議したので報告する。

材料および方法

1. 植物材料とガンマ線照射

1995年に、ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai) ‘おさゴールド’の苗木を農業生物資源研究所放射線育種場内のガンマフィールドに定植した。定植位置は線源 (^{60}Co 88.8 TBq) から約 40, 45 および 50 m とし、各距離に 10 本ずつ計 30 本とした。ガンマ線の照射は 1 日 8 時間、週 5 日行った。このうち線源から 50 m のところに植栽された樹の 1 本から、1999 年頃葉色の変異している部分が認められた。なお、線源から 40, 45 および 50 m 地点の線量は、それぞれ平均 0.09, 0.07 および 0.06 Gy・day⁻¹ であった。2000 年にこの変異部分の枝を切り取り、一般圃場に栽植の 10 本の実生台木にそれぞれ接ぎ木し、増殖させた。

2. 変異の観察

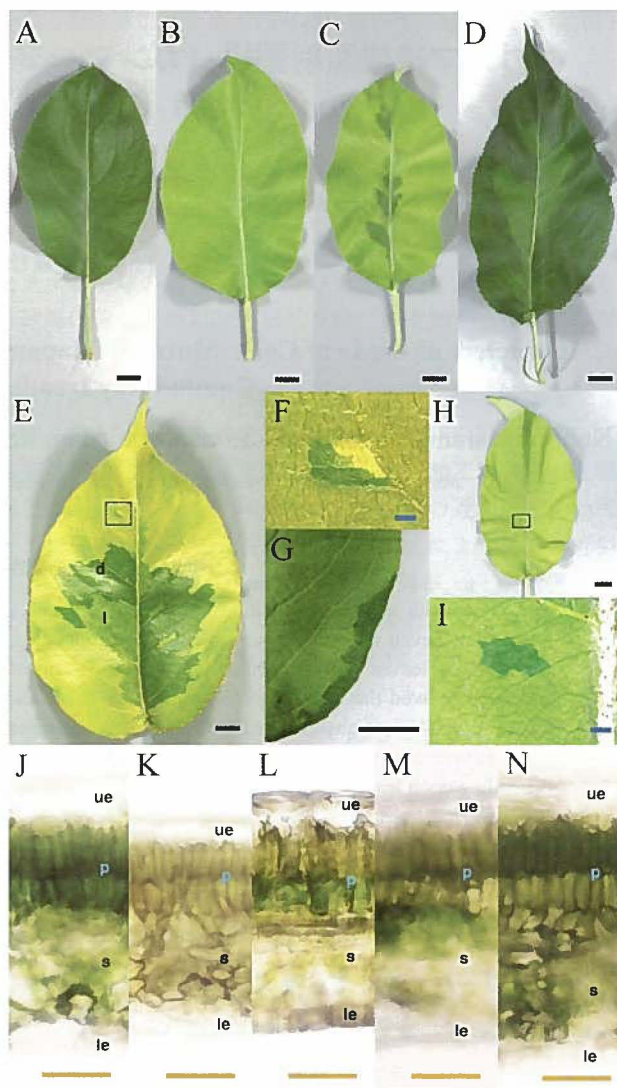
接ぎ木した樹のうち、2004 年 7 月時点で生存していた 7 個体の長枝（発育枝および長果枝）を目視により観察した。その結果、葉の変異として、葉身全体が黄色～黄緑色の葉（以下、黄緑色型とする）（第 1 図 B）と、全体は黄色～黄緑色で中肋部に緑色の斑が目立つ葉（以下、周縁黄緑色型とする）（第 1 図 C）の 2 種類が主として認められた。さらに、変異葉の着生程度から、全ての葉が黄緑色型の新梢（2009 年の調査時点で、この新梢から成長した枝を以下、黄緑色型とする）と周縁黄緑色型の葉が多い新梢（この新梢から成長した枝を以下、斑入り型とする）の 2 種類が認められたため、それぞれについてラベルをつけた。さらに変異の安定性を見るため、2009 年 7 月に各樹の当年枝を観察した。このとき、主脈上に緑色の斑が確認された場合は、その大きさに関わらず周縁黄緑色型の葉とした。

3. 光学顕微鏡による観察

2009 年 7 月に原系統と葉色変異葉から剃刀による徒手切片を作成し、光学顕微鏡で観察した。

4. 果実およびその後代の観察

変異が認められる部分の枝を接いで増殖した樹は、2007 年頃から結実し始めたため、果実表面の斑について 2008 年に観察した。さらに、2009 年に黄緑色型同士、周縁黄緑色型同士の人為交雑および‘幸水’との正逆交雑を行うとともに、自家受粉果実を得た。人為交雑は、開花直前の蕾の時期に除雄を行ってから雌蕊にあらかじめ採取しておいた花粉を交配し、直ちに袋をかけて他の花粉の混入を防いだ。一方、開花直前の花そうに袋をかけて他の花粉の混入を防ぎ、人為的な交配は行わずに自家受粉させた。これらの種子を採取して 2010 年冬に播種し、温室で栽培して発芽から



第 1 図 ‘おさゴールド’で見つかった斑入り葉の様態

A: ‘おさゴールド’の葉（原系統）、B: 黄緑色型の葉、C: 周縁黄緑色型の葉、D: 逆斑型の葉。E: 周縁黄緑色型の葉（“twin sector”（枠内）、d: 斑の緑色の濃い部分、l: 斑の緑色の薄い部分）、F: “twin sector”（E の枠内部分の拡大）、G: 葉縁部分の濃緑色斑、H: 黄緑色型の小型の斑（枠内）、I: 小型の斑（H の枠内部分の拡大）、J: ‘おさゴールド’（原系統）の葉の横断面、ue: 上面の表皮、P: 柵状組織、S: 海綿状組織、le: 下面の表皮（以下同じ）、K: 黄緑色型の葉の横断面、L: 周縁黄緑色型の斑の部分（緑色の濃い領域）の横断面、M: 周縁黄緑色型の斑の部分（緑色の薄い領域）の横断面、N: 逆斑型の葉の斑の部分（緑色の薄い領域）の横断面
横線は黒: 1 cm、青: 1 mm、橙: 0.05 mm を表す

2 週間程度まで、および 5 月中旬に実生個体の葉の形質を観察した。

結 果

1. 斑入りの分類

前述のように、2004 年に見つかった葉の変異は黄緑色型と周縁黄緑色型が観察されたが、2009 年にはその 2 種類に

加えて、葉身全部が元品種と同じ濃緑色の葉（以下、濃緑色型とする）、周縁黄緑色型の葉とは逆の葉縁が濃緑色で中心が黄緑色の葉（以下、逆斑型とする）（第1図D）の計4種類が観察された。なお、黄緑色型の葉と周縁黄緑色型の葉の黄緑色の部位では、主脈上以外にも希に緑色の斑が観察されたが、頻度は低かったので葉や枝の分類にあたっては考慮せず、後述する。

2009年の当年枝は、これら4種類の葉の着生状況により次の5種に分類できた。

黄緑色型）当年枝に着生しているすべての葉が黄緑色の場合

混合A型）黄緑色型の葉、周縁黄緑色型の葉の両方があり、周縁黄緑色型の葉が1枚のみの場合

混合B型）2枚以上または全ての葉が周縁黄緑色型の葉を付けた新梢

逆斑型）逆斑型の葉を付けた新梢

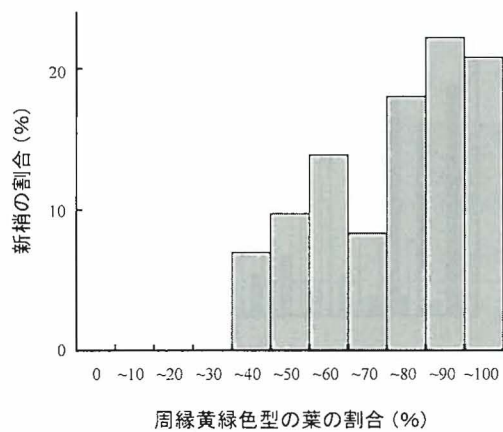
濃緑色型）すべての葉が濃緑色型（正常葉）の場合。

2. 黄緑色の枝から発生した新梢について

2004年と2009年の枝の調査の結果を第1表にまとめた。2004年観察時点で、黄緑色型の長枝は9本だった。そこから発生した長枝と短枝（節間が短く、全長がおおよそ10 cm以下の当年枝を短枝とし、それより長い当年枝を長枝とした）は、ほとんどが黄緑色型であり、まれに混合A型（長枝68本中3本）があった。ただし、混合A型の周縁黄緑色型の葉（3枚）の斑入り部分は、周縁黄緑色型由来の葉の斑よりも小さかった。

3. 周縁黄緑色型の枝から発生した新梢について

2004年に周縁黄緑色型の葉を多数つけた14本の枝から



第2図 混合B型の長枝における周縁黄緑色型葉の割合 (%) の分布

は、前述の5種類すべてが認められた。このうち12本の枝から発生した新梢は黄緑色型、混合A型および混合B型であり、残りの2本のみに逆斑型と濃緑色型のある新梢が発生した。また、混合B型の場合は、新梢あたりの周縁黄緑色型葉の割合はすべて30%以上と高かった（第2図）。

1) 逆斑型および濃緑色型の新梢がない枝について

2004年に斑入り型であった14本の枝のうち、逆斑型および濃緑色型の新梢の発生がない12本からは、2009年は長枝が65本、短枝が233本発生した。

新梢の長さ（短枝・長枝）により葉のタイプの割合が異なり、長枝は全て混合B型であった。一方、冬芽由来の短枝では黄緑色型、混合A型および混合B型の3種類があった。このうち、黄緑色型が最も多かった。従って、短枝では黄緑色

第1表 ガンマーフィールドで得られた変異枝を圃場で育成した葉色変異体の斑入りの状況（当年春枝）

枝の種類 ^a	枝数 (本)	シュートの種類	調査 枝数 (本)	平均 葉数 (枚)	変異の型 ^b				
					黄緑色型	混合A型	混合B型 (本)	逆斑型	濃緑色型
葉全体が黄～黄緑色葉を着けた新梢由来の枝（黄緑色型の枝）	9	長枝 ^w	68	17.4	65 (95.6) ^x	3 (4.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		短枝 ^w	159	4.2	159 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
周縁黄緑色型の葉を着けた新梢由来の枝（斑入り型枝）	14	長枝	80	18.7	3 (3.8)	0 (0.0)	72 (90.0)	3 (3.8)	2 (2.5)
		短枝	310	4.5	235 (75.8)	43 (13.9)	28 (9.0)	3 (1.0)	1 (0.3)
(内訳) 斑入り型枝のうち2009年に逆斑型、濃緑色型どちらの新梢も無かった枝	12	長枝	65	18.2	0 (0.0)	0 (0.0)	65 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
		短枝	233	4.4	180 (77.3)	33 (14.2)	20 (8.6)	0 (0.0)	0 (0.0)
斑入り型枝のうち2009年に濃緑色型の新梢を着けた枝	1	長枝	11	21.3	3 (27.3)	0 (0.0)	6 (54.6)	0 (0.0)	2 (18.2)
		短枝	43	5.7	28 (65.1)	8 (18.6)	6 (14.0)	0 (0.0)	1 (2.33)
斑入り型枝のうち2009年に逆斑型の新梢を着けた枝	1	長枝	4	20.5	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (25.0)	3 (75.0)	0 (0.0)
		短枝	34	3.3	27 (79.4)	2 (5.9)	2 (5.9)	3 (8.9)	0 (0.0)

^a2004年調査

^b変異の型：黄緑色型：全ての葉が黄緑色の新梢

混合A型：黄緑色型の葉＋周縁黄緑色型の両方の葉があるが、周縁黄緑色型は1枚のみ着生した新梢

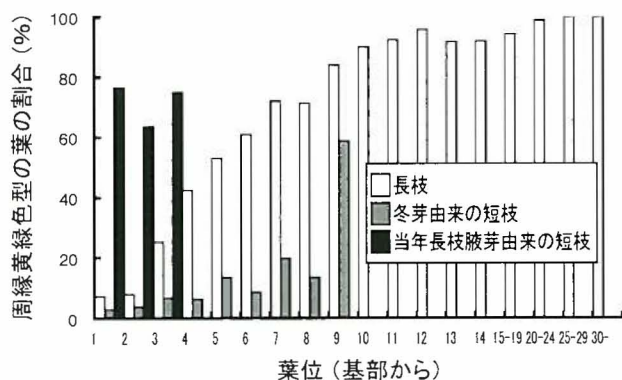
混合B型：2枚以上または全てが周縁黄緑色型の葉を付けた新梢

逆斑型：逆斑型の葉を付けた新梢

濃緑色型：全ての葉が濃緑色の新梢（原系統と同じ正常葉）

^x() 内は全体に対する割合 (%)

^w全長がおおよそ10 cm以下の当年枝を短枝とし、それより長い当年枝を長枝とした



第3図 2004年に斑入り型であった枝から2009年に発生した新梢における葉位ごとの周縁黄緑色型葉の発生割合(ただし、逆斑型と濃緑色型の新梢の発生した枝由来の新梢は除く、第4図参照)

長枝(66本)、冬芽由来の短枝(284本)、当年長枝腋芽由来の短枝(47本)のそれぞれにおいて、基部から1, 2, 3…枚目の葉における周縁黄緑色型の割合を棒グラフで表した

型の葉、長枝では周縁黄緑色型の葉が多く着いていたことになる。なお、当年伸長した長枝の腋芽から2次的に発生した短枝では、混合B型が最も多かった(データ略)。

さらに、長枝、冬芽由来の短枝および当年長枝の腋芽由来の短枝それぞれについて、基部からの葉位ごとの周縁黄緑色型の葉の有無について観察し、その発生割合を求めた。

その結果、長枝と冬芽由来の短枝は基部で黄緑色型の葉の割合が高く、枝の先端になるに従い周縁黄緑色型の葉の割合が高くなったが、当年長枝の腋芽由来の短枝ではいずれの葉位でも周縁黄緑色型の葉の割合が高かった(第3図)。

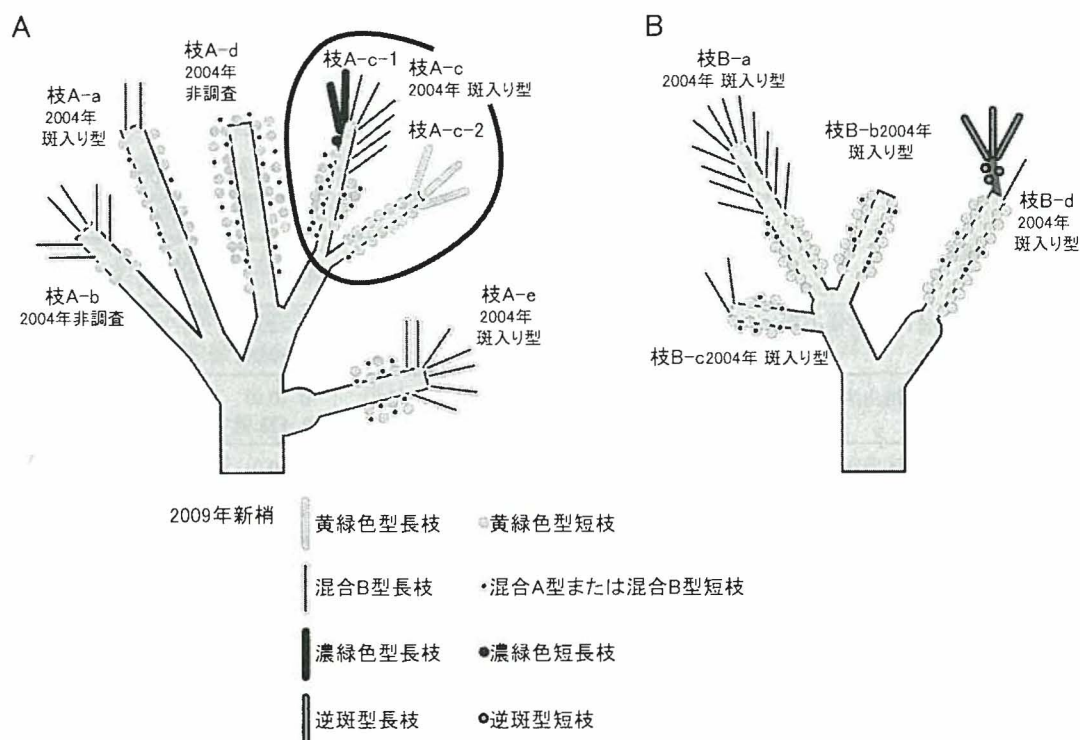
2) 逆斑型と濃緑色型の新梢を持つ枝について

2004年に斑入りの葉をつけた14本のうち、2009年の観察では、逆斑型と濃緑色型の新梢を持つ枝がそれぞれ1本ずつあった。濃緑色型の枝は2つに分岐し、それぞれ異なる性質を持っていた(第4図A)。ひとつは、長枝のすべてが黄緑色型であり、短枝も1本の混合A型を除いて黄緑色型であった。もう一方は、ほとんどは周縁黄緑色型の葉を着けた枝と同様な長枝と短枝をつけたが、元品種の‘おさゴールド’と同様の濃緑色型の長枝2本と短枝1本があった。

2009年の観察で逆斑型の新梢を持つ枝は、全体に逆斑型の葉がある長枝と短枝が3本ずつ認められた(第4図B)。これらは前年の1本の長枝から発生しており、それ以外の新梢は他の周縁黄緑色型由来の枝と同様の状況であった。

4. その他の斑について

その他、頻度は低いものの、黄緑色型および周縁黄緑色型いずれの場合にも、1) 葉縁に濃緑色のしばしば大きい斑(第1図G)、2) “twin sector (twin spot)” (緑色の斑とより黄色の斑が並んでいるもの)(第1図E, F)、3) 場所不定の濃緑色の小さな斑(第1図H, I)の3種類が認められた。



第4図 ガンマーフィールドで出現した葉色変異から増殖した個体における新梢の形質の模式図

増殖した7個体のうち濃緑色型の新梢が出現した個体(A)および逆斑型の新梢が出現した個体(B)について2004年の新梢に由来する枝ごとの新梢の型の着生状況を示した。2005年以降に各枝から2次、3次に発生した枝は省略

第2表 人為交雑および袋かけにより得られた後代実生の形質

交配組み合わせ		播種 種子数	生存 実生数	実生の形質			推測される 分離比	χ^2 (P)
♀	♂			濃緑色型	黄緑色型	黄色致死型		
黄緑色型	幸水	131	99	40	59	0	1:1	3.647 (0.0562 > 0.05)
幸水	黄緑色型	68	52	29	23	0	1:1	0.692 (0.405 > 0.05)
周縁黄緑色型	幸水	132	101	49	52	0	1:1	0.0891 (0.765 > 0.05)
幸水	周縁黄緑色型	5	4	3	1	0	1:1	— ²
黄緑色型	黄緑色型	26	20	5	8	7	1:2:1	1.20 (0.549 > 0.05)
黄緑色型袋かけ ²		28	21	7	10	4	1:2:1	0.905 (0.636 > 0.05)
周縁黄緑色型袋かけ ²		54	40	13	22	5	1:2:1	3.600 (0.165 > 0.05)

² サンプル数が少なすぎるのでカイ二乗検定できなかった² つばみ時期に袋かけを行い、自然交雑による自家受粉種子を得た

5. 光学顕微鏡観察

斑入りの葉および黄緑色葉について光学顕微鏡観察を行い、キメラ性の確認を行った（第1図J～N）。柵状組織は2層観察され、元品種ではどちらも緑色の組織であったが（第1図J）、黄緑色変異ではいずれの組織も黄～黄緑色であった（第1図K）。一方、周縁黄緑色型の葉の斑の部分では、外側（より表側、図では上側の柵状細胞層）の細胞層は黄色であった（第1図L, M）。周縁黄緑色型の斑には緑色のより濃い部分（第1図Eのd）と薄い部分（第1図Eのl）が認められたが、緑色の濃い部分は柵状組織の内側の層（図では下側の柵状細胞層）が緑色であり（第1図L）、緑色の薄い部分では柵状組織はどちらも黄色で、海綿状組織の内側部分（図ではより上の方の海綿状細胞）が緑色であった（第1図M）。海綿状組織でも、斑の最も外側（表皮側）の細胞は黄色であったが、柵状組織よりやや不明瞭であった。また、逆斑型の葉の中肋付近の色が薄い部分の断面は、柵状組織の表面側は濃緑色、内側は黄～黄緑であった。海綿状組織でも同様の傾向があったが、周縁黄緑色型の場合と同様、にその差は柵状組織よりやや不明瞭であった。

6. 果実形質および後代の形質分離

成熟果の表面を観察したところ、いずれの果実においても正常な枝から得られた果実と同様に斑は認められなかった。

2009年の春に人為交雑と自家受粉で得られた果実の種子を、2010年冬に播種・養成した（第2表）。この変異体の元品種‘おさゴールド’は自家和合性なので（増田ら、1998）、自家受粉でも種子が得られると期待される。得られた実生苗は、子葉が薄黄色から黄色で致死性（およそ10日以内に本葉展開以前に枯死。黄色致死型とする）の個体、子葉および本葉が黄緑色の個体（黄緑色型）、濃緑色の個体（濃緑色型）が得られた。この分離比は、黄緑色の葉を示す個体が、野生型遺伝子と葉を黄緑色にする半優性の遺伝子（ホモになると薄黄色で致死と考えられる）とのヘテロであると仮定した分離比1:2:1と矛盾しなかった。‘幸水’との正逆交雑の分離比も、推定される1:1との矛盾も認められなかった。また、‘幸水’を雌親にした場合も1:1の分離比が認められたことから、この黄緑色の形質には細胞質

遺伝子は関与していないことが示された。黄緑色型と周縁黄緑色型で遺伝様式に差が認められなかったことから、どちらのL2も同じ遺伝子型であると推定された。

実生は5月中旬には10枚以上の本葉を展開したので、斑入りを示す個体が現れないかを観察した。その結果、周縁黄緑色型個体由来の実生であっても濃緑色型か黄緑色型のいずれかであり、斑入りの個体はなかった。

考 察

1. 得られた周縁キメラの構造について

多くの被子植物でSAMのL1由来の細胞は葉の表皮系の細胞に分化するとされており、表皮系の細胞は孔辺細胞を除き葉緑素をほとんど作らないため、L1で葉色変異の判断は難しい（Howell, 1998）。一方、L2とL3由来の細胞はいずれも柵状組織、海綿状組織、維管束の細胞に分化するが、L2とL3の違いはL2がより外側と葉縁部分、L3がより内側の主脈付近に分布するとされる（原, 1984; Szymkowiak, 1996）。

今回の観察では、黄緑色型では柵状組織、海綿状組織とも黄緑色の細胞であり（第1図K）、L2およびL3由来の細胞がどちらも黄緑色変異であると考えられた。それに対して、周縁黄緑色型は柵状組織、海綿状組織とも外側の細胞層は黄色、内側は緑色であった（第1図L, M）。従って、周縁黄緑色型の葉はL2由来の細胞が黄緑色変異で、L3は変異していないため斑入りになっていると考えられた。一方、逆斑型ではL2由来の細胞は変異せず、L3由来の細胞が黄緑色変異であると考えられた（第1図N）。

周縁黄緑色型には緑色のより濃い部分（第1図Eのd）と薄い部分（第1図Eのl）が認められたが、緑色の濃い部分は柵状組織の内側の層（図では下側の柵状細胞層）が緑色であり（第1図L）、緑色の薄い部分では柵状組織はどちらも黄色で海綿状組織の内側部分（図ではより上の方の海綿状細胞）が緑色であった（第1図M）。どちらの斑でもより外側の柵状組織の細胞は黄色であったことから、周縁黄緑色型の葉の斑はL2由来の細胞が黄緑色の突然変異、L3は変異していない緑色になる細胞であると考えられた。

前述のように、L1の変異の有無の判定は難しいが、まれ

に葉の分化途中で何らかの原因で L1 由来の細胞が葉肉組織に入り込み葉肉細胞に分化する場合がある。例として、オオバイボタ (*Ligustrum ovalifolium*) の周縁キメラがある (Stewart・Dermen, 1975)。今回の観察でも、黄緑色型、周縁黄緑色型の葉の一部で、葉縁に濃緑色の斑が認められた (第 1 図 G) ため、L1 層は緑色型と推察される。

また、“twin sector” はヘテロの形質が黄緑色でホモがより黄色い形質を示すような場合、ヘテロの変異体の体細胞において姉妹染色体同士の体細胞組み換え (体細胞乗り換え) により、変異遺伝子ホモと野生型遺伝子ホモの細胞が並んで誕生し、それぞれが増殖して結果的に隣り合ったセクター (黄色と緑色) を生ずるとされる (Carlson, 1974; Zhu ら, 1995)。従って、今回 “twin sector” が認められたこと (第 1 図 F) は、この変異体が半優性のヘテロ突然変異であることを示唆するものである。また、この “twin sector” は X 線照射のゲノムの障害 (Evans・Paddock, 1977) や体細胞組換えの指標 (Gorbunova ら, 2000) などに利用されており、研究材料としての価値があると考えられる。

その他の斑のうち、場所不定の濃緑色の小さな斑の発生原因は不明であるが、葉縁が濃緑色の斑や “twin sector” と同じ原因である可能性もある。

2. 葉色変異の安定性について

2004 年時点での黄緑色型枝 (9 本) は、2009 年では発生した 68 本の長枝および 159 本の短枝のうち、長枝の 3 本のみが混合 A 型であった (第 1 表)。葉ごとにみると、1,846 枚中 3 枚のみが周縁黄緑色型で残りは全て黄緑色型であった。さらに、この周縁黄緑色型に分類された葉も前述のように斑が小さく、混合 B 型の周縁黄緑色型の葉の斑とは大きく異なっていた。これらのことから、この周縁黄緑色型の葉は、上述の「場所不定の濃緑色の小さな斑」がたまたま主脈上に形成された可能性がある。従って、黄緑色型の状態は非常に安定であると考えられた。

一方、2004 年時点で斑入り型枝から 2009 年に発生した新梢は、5 種類の変異が認められた。そのため、この斑は不安定のようにみえるが、以下の理由により比較的安定であると考えられた。

斑入り型の枝 14 本のうち、逆斑型と濃緑色型の新梢がなかった 12 本は、長枝は全て混合 B 型、当年冬芽から発育した短枝は黄緑色型、混合 A 型および混合 B 型の 3 種類あったが、黄緑色型が最も多かった (第 1 表)。また長枝、冬芽由来の短枝、当年長枝の腋芽から発育した短枝のそれぞれについて、基部から葉位ごとの周縁黄緑色型の葉の割合を調べた結果、長枝および冬芽由来の短枝の基部では周縁黄緑色型の葉の割合が低かったが、枝の先端になるに従い周縁黄緑色型の葉の割合が高くなった (第 3 図)。一方、当年長枝の腋芽由来の短枝では、枝全体で周縁黄緑色型の葉の割合が高かった。従って、腋芽内において一旦休眠状態を経た葉は、L2 由来の細胞が占める割合が大きかったのに対し、休眠を経ずに発育した葉では逆に L3 由来の細胞

が占める割合が大きかったと考えられる。従って、発生メカニズムは不明であるが、SAM の周縁キメラ構造自体には変化がなかったと思われる。

3. 逆斑型と濃緑色型の枝の発生について

逆斑型と濃緑色型の枝は 2004 年の観察時点では認められなかったが、2008 年には見つかっており、そのときはすでに区分キメラではなかったため、それ以前に形質は固定していたと思われる。従って、2004 年時点では、一部に黄緑色型、逆斑型および濃緑色型の周縁区分キメラが残っていたが、領域が小さく見つけにくかったと推察され、区分キメラ状がその後分離したと考えられる。

4. 後代における形質の分離について

被子植物における胚嚢や花粉などの配偶体の基になる細胞は、一般に L2 由来の細胞から発生する (原, 1984; Szymkowiak, 1996)。今回の交配結果から、周縁黄緑色型の斑入りは核遺伝子や細胞質遺伝によるものではなく、黄緑色型変異と同じ遺伝子型の細胞が周縁キメラ状に存在するために発現し、変異細胞が L2 に分布することが確認できた (第 2 表)。

また、前述のように “twin sector” が存在したことから、この変異は半優性でヘテロ状態であると考えられるが、‘幸水’ との正逆交雑や自家受粉後代の分離比もこの推論を支持する結果であった (第 2 表)。

この葉色 (黄緑色) 突然変異は、肉眼観察や光学顕微鏡による断面の観察などにより、キメラ構造が簡単に分かる。また、今回この葉色突然変異細胞を異なる 3 種類のキメラ様式 (黄緑型、周縁黄緑色型および逆斑型) にもつ変異体が得られた。変異誘発後のキメラ解消のために組織培養法がしばしば用いられる (Abu-Qaoud ら, 1990; Hall ら, 1986) が、今回得られた斑入り変異体を組織培養し、再生個体の形質比較により、キメラの分離精度や各細胞組織 (L1, L2 および L3) からの再生の難易を簡単に判別できる。従って、この度得られた変異体は、キメラ解消のための手法開発や体細胞突然変異の安定性の研究に利用できると考えられる。

摘 要

放射線育種場のガンマフィールドで緩照射を行ったニホンナシ ‘おさゴールド’ において、葉色変異が認められた。変異した枝の部分を切り取り、一般圃場に植栽された実生台木に接ぎ木して養成した結果、全体が黄色～黄緑色 (黄緑色型) の葉および斑入りの葉 (周縁黄緑色型) を持つ 2 種類が主に確認された。2004 年と 2009 年の調査比較により、黄緑色変異は非常に安定と考えられた。一方、変異葉の着生程度などにより斑入り変異枝からは 5 種の枝の変異が認められた。これは斑入り変異が不安定なようであるが、SAM 構造は比較的安定と考えられた。“twin sector” (緑色の黄色の斑が並んでいるもの) の存在、光学顕微鏡による葉身横断面の観察結果および後代実生の葉色から、この葉

色変異は半優性で遺伝的にヘテロであり、茎頂分裂組織のL2に分布していると考えられた。さらに、得られた変異体の利用法について論議した。

引用文献

- Abu-Qaoud, H., R. M. Skirvin and E. Chevreau. 1990. In vitro separation of chimeral pears into their component genotype. *Euphytica* 48: 189–196.
- Carlson, P. S. 1974. Mitotic crossing-over in a higher plant. *Genet. Res.* 24: 109–112.
- Evans, D. A. and E. F. Paddock. 1977. X-ray induced increase of mitotic crossovers in *Nicotiana tabacum*. *Environ. Exp. Bot.* 17: 99–106.
- Gorbunova, V., N. Avivi-Ragolski, G. Shalev, I. Kovalchuk, S. Abbo, B. Hohn and A. A. Levy. 2000. A new hyperrecombinogenic mutant of *Nicotiana tabacum*. *Plant J.* 24: 601–611.
- Hall, H. K., M. H. Quazi and R. M. Skirvin. 1986. Isolation of a pure thornless loganberry by meristem tip culture. *Euphytica* 35: 1039–1044.
- 原 襄. 1984. シュート (苗条). p. 47–71. 基礎生物学選書 3. 植物の形態 (増訂版). 裳華房. 東京.
- 広瀬嘉道. 1986. 斑入り植物の観察と栽培. ニューサイエンス社. 東京.
- Howell, S. H. 1998. Molecular genetics of Plant development. Cambridge University Press, Cambridge.
- 笠原基知治. 2008. 斑入り植物のはなし なぜ、一本の木から違う花が咲くのか. p. 1–96. 斑入り友の会.
- 壽 和夫・真田哲朗・西田光夫・藤田晴彦・池田富喜夫. 1992. ニホンナシ新品種 ‘ゴールド二十世紀’. 生物研報. 7: 105–120.
- Masuda, T., T. Yoshioka, K. Inoue, K. Murata, K. Kitagawa, H. Tabira, A. Yoshida, K. Kotobuki and T. Sanada. 1997. Selection of mutants resistant to black spot disease by chronic irradiation of gamma-rays in Japanese pear ‘Osanijisseiki’. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 66: 85–92.
- 増田哲男・吉岡藤治・真田哲朗・壽 和夫・長柄 稔・内田正人・井上耕介・村田謙司・北川健一・吉田 亮. 1998. ニホンナシ新品種 ‘おさゴールド’. 生物研報. 12: 1–11.
- Ravan, P. H., R. F. Evert and S. E. Eichhorn. 1999. The shoot: primary structure and development. p. 610–614. In: *Biology of Plant* 6 edition. W. H. Freeman and Company, New York.
- Sanada, T., T. Nishida and F. Ikeda. 1988. Selection of resistant mutants to black spot disease of Japanese pear by using host-specific toxin. *Japan. J. Breed.* 38: 198–204.
- Stewart, R. N. and H. Dermen. 1975. Flexibility in ontogeny as shown by the contribution of the shoot apical layers to leaves of periclinal chimeras. *Amer. J. Bot.* 62: 935–947.
- Szymkowiak, E. J. 1996. What chimeras can tell us about plant development? *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 351–376.
- van Harten, A. M. 1998. Mutation breeding. Theory and practical applications. Cambridge University Press, Cambridge.
- Yoshioka, T., T. Masuda, K. Kotobuki, T. Sanada and Y. Ito. 1999. Gamma-ray-induced mutation breeding in fruit trees: Breeding of mutant cultivars resistant to black spot disease in Japanese pear. *JARQ.* 33: 227–234.
- Zhu, D., H. C. H. Schoenmakers, A. M. A. Wolters and M. Koornneef. 1995. A genetic analysis of a tomato (*Lycopersicon esculentum*) genotype with a high frequency of twin spots. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1162–1166.