

# キクのプロトプラストへのイオンビーム照射による突然変異誘発

池上秀利\*・國武利浩・平島敬太・坂井康弘・中原隆夫・

長谷純宏<sup>1)</sup>・鹿園直哉<sup>1)</sup>・田中 淳<sup>1)</sup>

キクの新品種を育成するため、キクのプロトプラストにイオンビームを照射して再生させた植物の変異解析を行うとともに、有用系統の選抜を行った。

‘秀芳の力’の葉からプロトプラストを単離してイオンビームを照射し、プロトプラストからのカルス形成率を調べたところ、カルス半致死線量は ${}^4\text{He}^{2+}$ イオンで4.9Gy、 ${}^{12}\text{C}^{5+}$ イオンで3.3Gyであった。また再生植物の特性調査から、① ${}^{12}\text{C}^{5+}$ イオンの照射により舌状花弁数及び開花日の変異幅は拡大し、② ${}^4\text{He}^{2+}$ 、 ${}^{12}\text{C}^{5+}$ イオンの照射により花型変異率がイオン無照射と比較して2倍以上になり、③ ${}^4\text{He}^{2+}$ 、 ${}^{12}\text{C}^{5+}$ イオンの照射により0.4~2.2%の頻度で花色変異体が出現し、④花弁や葉の形態、葉の毛じ量等の様々な形質で変異が生じる、ことが明らかとなった。

最終的に再生植物660個体の中から花弁数が有意に多い1個体‘福岡1号’を選抜した。

[キーワード：キク、プロトプラスト、イオンビーム照射、突然変異]

Mutation Induction through Ion Beam Irradiations in Protoplasts of Chrysanthemum. IKEGAMI Hidetoshi, Toshihiro KUNITAKE, Keita HIRASHIMA, Yasuhiro SAKAI, Takao NAKAHARA, Yoshihiro HASE, Naoya SHIKAZONO, Atsushi TANAKA(Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan)*Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 24:5-9(2005)

In order to breed a new chrysanthemum variety, we analyzed the mutation patterns of the regenerated plants from protoplasts irradiated with ion beams and selected some commercially superior lines.

We isolated mesophyll protoplasts from leaves of ‘Syuhono-chikara’ and irradiated with two kinds of ion-beam. Lethal dose 50% of the cultured protoplasts was 4.9Gy for  ${}^4\text{He}^{2+}$ , 3.3Gy for  ${}^{12}\text{C}^{5+}$ .

We also revealed several facts:(1)  ${}^{12}\text{C}^{5+}$  ion irradiation expanded the deviations of mutation in petal number and date of flowering (DF), (2) Both  ${}^4\text{He}^{2+}$  and  ${}^{12}\text{C}^{5+}$  ion irradiation enhanced the rate of flower type mutation more than two folds, (3)  ${}^4\text{He}^{2+}$  and  ${}^{12}\text{C}^{5+}$  ion irradiation induced the flower colour mutation at the high rate of 0.4 to 2.2%, and (4) we can induce various kind of mutations in such phenotypes as leaf shape, node length and trichomes of leaves, etc.

Finally, we selected one line having more number of petals than ‘Syuhono-chikara’.

[Key words : Chrysanthemum, protoplast, ion-beam, mutation]

## 緒 言

本県のキクの生産量は全国で第4位であるが、激化する産地間競争の中で、消費拡大や生産コストの低減を図るため、切り花品質に優れ省力栽培に適応した新品種の開発が強く望まれている。

キクは栄養繁殖性であることから、これまでキクの育種では、交雑とともに芽条変異、花卉培養<sup>3)</sup>やプロトプラスト培養<sup>4)</sup>、化学物質<sup>1)</sup>や放射線による人為突然変異等の手法が用いられてきた。放射線を利用したキクの突然変異育種には、X線<sup>6)</sup>、 $\gamma$ 線<sup>5, 12)</sup>等の電磁波が利用されてきた。中でも粒子線であるイオンビームは、X線や $\gamma$ 線等に比べて変異誘発効果が高く、新しい変異誘発原として、近年様々な植物の育種への利用が増加している<sup>2)</sup>。キクにおいても葉や花卉組織の培養とイオンビーム照射を組み合わせることにより、突然変異の誘発頻度が高まることが示されている<sup>8, 9)</sup>。

これまで植物へのイオンビーム照射は、種子、カルス

及び茎頂など多細胞の組織に対して行われてきた。ところが種子やその他の組織は複数の細胞を持つため、放射線照射をする場合キメラの発生が問題となり、特に栄養繁殖性植物では変異を維持できず、もとの性質に戻る(先祖帰り)ことが多い<sup>7)</sup>。しかし、細胞培養によって1細胞から完全な植物体が再生する性質を利用すれば、1変異細胞から1変異体を再生することが可能である。

著者らは、単離したプロトプラストに照射することによりカルス等の組織で生じやすいキメラを回避できるという考えから、また、一度に約5万個のプロトプラストに照射でき個体数の確保が容易であること、あるいは新しい変異性が期待できることからプロトプラストを照射材料として選択したが<sup>4, 10, 11)</sup>、プロトプラストへのイオンビーム照射や、照射したプロトプラストから再生した突然変異を解析した報告はない。

本研究では、上記の利点を利用し、イオンビーム照射がキクのプロトプラストのカルス形成率に及ぼす影響を明らかにし、再生した植物体に見られる突然変異を解析して、有用個体を選抜したので報告する。

\*連絡責任者(バイオテクノロジー部)

1) 日本原子力研究所高崎研究所 イオンビーム生物応用研究部

## 試験方法

### 1 プロトプラストの単離と包埋

キク品種‘秀芳の力’を用いた。茎頂培養で育成した *in vitro* の無菌植物をショ糖30g/l, ゲランガム 2g/l を添加し, pHを5.8に調整した1/2 MS<sup>6)</sup> 培地 (発根培地) で継代して, 25°C, 約6000lux, 16時間照明下で培養した。約6週間培養したキクの葉から, ペクトリアーゼとセルラーゼを用いてプロトプラストを単離した。単離したプロトプラストを, ショ糖0.4M, NAA 1mg/l, BA0.5mg/l を添加し, pH5.8に調整したNN67培地<sup>13)</sup> (初代培地) に  $5 \times 10^5$  cell/mlの密度で懸濁した。アガロース 8g/l を添加した初代培地を直径35mmのシャーレに1ml分注して固化した層の上に,  $5 \times 10^4$  cell/mlになるように同一培地で希釈したプロトプラスト液を, 25 $\mu$ lずつ滴下して包埋した<sup>10)</sup>。

### 2 プロトプラストへのイオンビーム照射と植物体の再生

プロトプラストを包埋したシャーレをカプトン膜 (東レ) で被覆して翌日に, 日本原子力研究所高崎研究所イオン照射研究施設 (TIARA) の深度制御種子照射装置で, イオンビームを照射した。イオン種は<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>, <sup>12</sup>C<sup>5+</sup>の2種類とし, 照射線量は0, 1, 2, 5, 7.5, 10Gyとした。照射の1~2日後に, カプトン膜を取り除き, 初代培地を25 $\mu$ l添加した。その後, 7日間隔で初代培地からショ糖濃度を0.3M, 0.2M, 0.1Mに減じたNN67培地を等量追加しながら25°C, 暗黒下で培養した。4週間後に生育した細胞塊を, ショ糖30g/l, NAA 0.5mg/l, BA 2mg/l, ゲランガム 2g/l添加し, pH5.8に調整したMS培地 (カルス形成培地) 上に広げて25°C, 6000lux, 16時間照明下で培養した。さらに4週間後に, 2~3mmに生育したカルスの数を調査し, イオンビーム照射線量とカルス形成率との関係を解析した。1回の照射について3シャーレを用い2反復の平均をとり, 無照射のカルス形成率を100としたときの相対値で評価した。

さらに, 緑色カルスを, ショ糖30g/l, BA 2mg/l, GA<sub>3</sub> 0.5mg/l, ゲランガム 2g/l添加し, pH5.8に調整したMS培地 (再生培地) に置床し, シュートが形成されるまで, 同培地で3週間間隔で継代した。再生したシュートを, 1/2 MS培地で発根させた後, バーミキュライトを詰めた直径90mmのポリポットに鉢上げした。

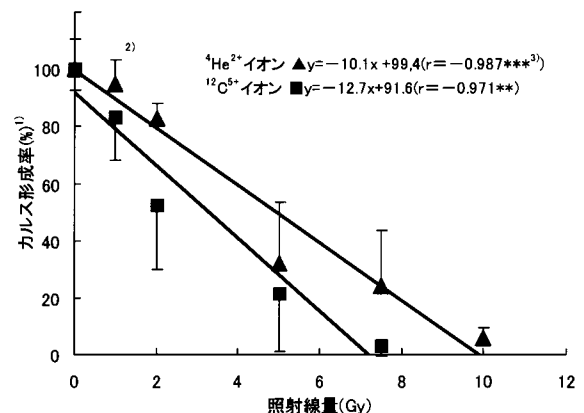
### 3 再生植物の特性評価

再生した植物体660個体を鉢上げ後, 2001年7月2日に, ほ場に定植し, 本県のキク栽培技術指針に基づいて栽培した。再生植物の開花日, 開花時の草丈, 花色, 花型及び花卉数等の主要な形質を調査し, イオンビーム照射の影響を解析するとともに, 特徴がある18系統を1次選抜した。これらの18系統を2002年8月8日に無加温施設に定植して, 同様に開花特性を調査し, 特徴がある6系統を2次選抜した。さらにこの6系統を, 2003年8月8日に同様に定植して開花特性を調査した後, 優良系統を1系統選抜した。

## 結果

### 1 イオンビーム照射がキクのプロトプラストのカルス形成率に及ぼす影響

イオンビームの照射線量とプロトプラストのカルス形成率との関係を第1図に示した。<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>については, 線量2Gyではカルス形成率は約80%であり, 5Gyで30%程度に急激に低下し, 10Gyで5.7%になった。<sup>12</sup>C<sup>5+</sup>については, 1Gyでカルス形成率は約80%であるが, 2Gyで約50%に低下し7.5Gyでは3.3%になった。両イオン種とも照射線量が多くなるにしたがって, カルス形成率が直線的に低下し, カルスの形成率は<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>が<sup>12</sup>C<sup>5+</sup>よりも高かった。<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>と<sup>12</sup>C<sup>5+</sup>の照射線量とカルス形成率についての相関係数はそれぞれ-0.987, -0.971であり高い負の相関が認められた。回帰直線から推定した<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>, <sup>12</sup>C<sup>5+</sup>のプロトプラストに対する半致死線量 (LD<sub>50</sub>) は, それぞれ4.9Gy, 3.3Gy前後であった。



第1図 イオンビームの照射がプロトプラストのカルス形成に及ぼす影響

- 1) イオン照射28日後のカルス形成率を調査, 無照射を100%とした相対値。
- 2) 垂線は, 標準偏差 (n=2) を示す。
- 3) \*\*: P<0.01, \*\*\*: P<0.001。

### 2 再生植物の特性

ほ場に定植したプロトプラスト再生植物660個体のうち, <sup>4</sup>He<sup>2+</sup>の2, 5, 10Gy, <sup>12</sup>C<sup>5+</sup>の2, 5Gy照射区でそれぞれ95, 239, 46, 19, 82個体, 無照射区で49個体の合計530個体について形質を調査した。プロトプラストから再生した植物体は, 培養期間が長く数が多いため, 正確な再生数は把握できなかった。再生植物の草丈と開花日を第1表に, 花型と花色を第2表に示した。

草丈は, 無照射に比べて, <sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 5, 10Gyでは明らかに低くなった (第1表)。<sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 10Gy照射系統の平均草丈は, 無照射系統の平均草丈の81.5%であった。

開花日については, 照射による平均開花日の変化は認められなかった。しかし, <sup>12</sup>C<sup>5+</sup> 5Gyを照射した場合に, 無照射区と比較して開花日のばらつきが拡大する傾向が認められた (第1表)。著しく早生化 (10月6~8日開花) したものが<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>で3個体, 著しく晩生化 (11月8日以降開花) したものが<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>で2個体, <sup>12</sup>C<sup>5+</sup>で1個体の計6個体が得られた (第2図)。

第1表 イオンビームの照射が再生植物の草丈と開花日に及ぼす影響

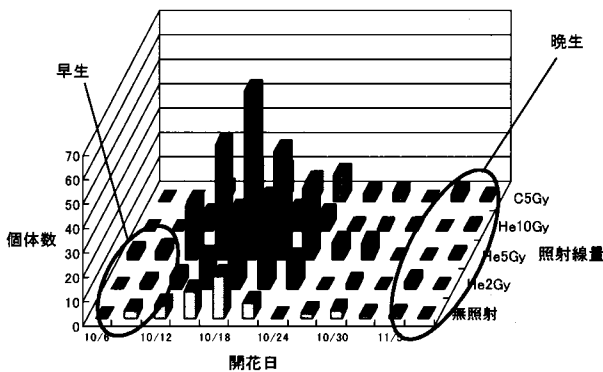
イオン種	線量 (Gy)	調査 個体数	草丈 <sup>1)</sup> (指数)	開花日	
				月/日	標準偏差
無照射	0	49	100.0	10/19	±5.72
	2	95	90.8	10/20	±5.21
<sup>4</sup> He <sup>2+</sup> 50MeV	5	239	87.8 <sup>*2)</sup>	10/19	±4.92
	10	46	81.5 <sup>*</sup>	10/20	±6.61
<sup>12</sup> C <sup>2+</sup> 220MeV	2	19	- <sup>3)</sup>	-	-
	5	82	-	10/21	±6.94 <sup>*</sup>

- 1) 草丈は無照射の平均値を100としたときの相対値。
- 2) \* : 無照射区と比較して5%水準で有意差あり(草丈: t検定, 開花日: F検定)。
- 3) - : データなし。

総花弁数については、照射個体間のばらつきが認められたが、線量と関連は認められなかった(第2表)。しかし、総じて照射線量が高いほど、舌状花率が低下する個体が増加した(第2表, 第3図)。一方、舌状花弁が無照射平均の2倍以上になるものも1個体出現し(データ略), 個体間のばらつきが観察された。

花型については、無照射系統で30.6%, イオンビーム照射系統で64.9%~84.2%の変異の発生が観察され、イオンビームにより花型の変異出現率が2倍以上に上昇した。花型の変異は大部分が花弁のねじれによるものであったが、露芯したものも一部見られた(第2表, 第4図)。

花色については、<sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 2Gyで1個体(1.0%), <sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 5Gyで1個体(0.4%), <sup>12</sup>C<sup>5+</sup> 5Gyで2個体(2.4%)の



第2図 再生植物の開花日の分布

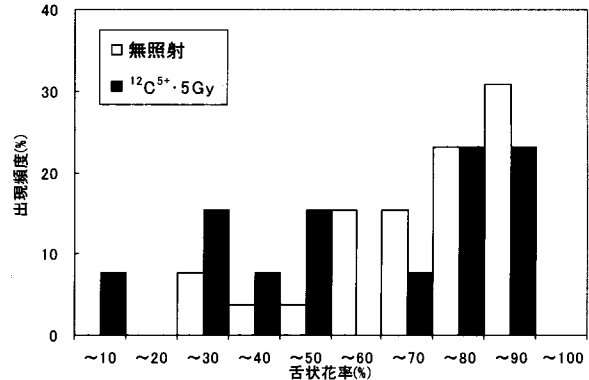
第2表 イオンビームの照射が再生植物の花の形質に及ぼす影響

イオン種	線量 (Gy)	調査個体数	小花数(枚)			舌状花弁率 (%)	各花型別の個体数				花型変異の頻度(%) <sup>1)</sup>	花色		花色変異頻度 (%)
			総小花数	筒状花数	舌状花数		正常	ねじれ	露芯	未開花		白色 <sup>3)</sup>	黄色 <sup>4)</sup>	
無照射	0	49	191	40	151	79.1	34	11	0	2	30.6	49	0	0
	2	95	184	34	150	81.5	33	57	0	0	65.3 <sup>*2)</sup>	94	1	1.0
<sup>4</sup> He <sup>2+</sup> 50MeV	5	239	214	38	176	82.2	84	121	6	4	64.9 <sup>**</sup>	238	1	0.4
	10	46	193	51	142	73.6	15	25	4	0	67.4 <sup>*</sup>	46	0	0
<sup>12</sup> C <sup>5+</sup> 220MeV	2	19	173	51	122	70.5	3	12	0	2	84.2 <sup>*</sup>	19	0	0
	5	82	164	64	100	61.0	17	50	6	3	79.3 <sup>**</sup>	80	2	2.4

- 1) 花型変異の頻度 = (ねじれ + 露芯 + ねじれかつ露芯 + 未開花 / 調査個体数) × 100 (%)。
- 2) \*\*及び\*は無照射区と比較してそれぞれ1%, 5%水準で有意差あり(2×2分割表独立性検定)。
- 3) 供試品種‘秀芳の力’の花色は白色。
- 4) ‘黄・秀芳の力’と同等以上の黄色個体を黄色とした。

黄色の花色変異が出現した(第2表)。

これ以外にも、花弁や葉の形態が変化したものや、葉裏の毛じ量が増減したものなど、多様な突然変異が出現した(データ略)。



第3図 イオンビーム照射プロトプラスト再生個体の舌状花率の分布

- 1) 舌状花率 = (舌状花数 / 総小花数) × 100
- 2) サンプル数: n=20

### 3 有用系統の選抜

2001年度に定植したイオンビーム照射および無照射からの再生植物660個体の中から、従来の‘秀芳の力’と比べて特徴ある形質の18個体を1次選抜した。無照射より3系統, <sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 2, 5, 10Gyより各2, 9, 1系統, <sup>12</sup>C<sup>5+</sup> 5Gyより3系統を選抜した。2002年度にはこの18系統を4~9株ずつ栽培し、花弁数が増加したり、開花日が早いなど実用形質を持つ系統を<sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 2Gyより1系統, <sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 5Gyより4系統, <sup>12</sup>C<sup>5+</sup> 5Gyより1系統の計6系統を2次選抜した。さらに2003年度にこの6系統を10株ずつ栽培し、最終的に有用な変異体として<sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 5Gy照射由来で舌状花弁数が約1.5倍に増加した1個体を選抜し、‘福岡1号’とした(第3, 4表, 第4図)。

## 考察

イオンビームをカルスなど多細胞の組織に照射した場合、照射線量と生存率との関係は低線量域では生存率が高く推移しほとんど低下はみられないが、その後高線量域で急激に低下する曲線となる<sup>1)</sup>。しかし、今回のように単細胞であるプロトプラストに照射した場合、イオン

第3表 再生植物の選抜経過

イオン種	線量 (Gy)	調査系統数(選抜系統数) <sup>1)</sup>		
		2001年	2002年	2003年
無照射	0	49(3) <sup>2)</sup>	3(0)	0(0)
	2	95(2)	2(1)	1(0)
<sup>4</sup> He <sup>2+</sup>	5	239(9)	9(4)	4(1)
	10	46(1)	1(0)	0(0)
<sup>12</sup> C <sup>5+</sup>	2	19(0)	0(0)	0(0)
	5	82(3)	3(1)	1(0)
計		530(18)	18(6)	6(1)

1) 各年度に選抜した系統を次年度に定植

2) ( ) 内は選抜数

第4表 選抜した多花弁系統の特性<sup>1)</sup>

形質	‘福岡1号’	‘秀芳の力’
開花日	11月5日	11月6日
切り花長	84cm	88cm
切り花重量	97g	108g
葉数	50	53
花径	15cm	15cm
舌状花数	291 <sup>**2)</sup>	201
筒状花数	9	10

1) 栽培：2003年度

2) \*\*は‘秀芳の力’と比較して1%水準で有意差あり(t検定)

イオン照射線量とカルスの形成率との関係はより直線的になったが、これはカルスなど複数の細胞では1つの細胞がDNAや染色体の損傷を受け致死になっても他の細胞が増殖すれば生存するが、単細胞のプロトプラストでは致死になればその細胞は生存できず、イオンビーム照射の影響がより反映された結果であると考えられる。

また<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>に比べて<sup>12</sup>C<sup>5+</sup>においてカルス形成率は低かった。これは、<sup>12</sup>C<sup>5+</sup>の直線的エネルギー付与が120keV/ $\mu$ mであり、<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>の17keV/ $\mu$ mに比べて大きく、プロトプラストに対する生物効果が高いことによるものと考えられる。

今回の線量域でイオンビームは無照射と比較して、草丈は低くなる方向に、開花日のばらつきは拡大する方向に(第1表)、花型変異は増加する方向に作用した(第2表)。花弁数についても、線量が増加するにつれ筒状花の割合が高い花が増加する傾向が見られた(第2表、第3図)。また、花色変異は無照射では得られていないが、照射すれば低率ながら線種、線量に関係なく発生した(第2表)。イオンビームによる突然変異体の半数では点突然変異が、残りの半数ではゲノムDNAの逆位、転座、欠失が起きることが明らかにされている<sup>15)</sup>。したがって、今回得られた突然変異体は細胞伸長に関する遺伝子や、開花を調節する遺伝子さらには花の形態を制御する遺伝子などが上述の様々なメカニズムにより変化したものと推定される。

今回プロトプラスト培養とイオンビーム照射を組み合わせることにより、花型変異誘発率が2倍以上に増大し、無照射では全く花色変異が出現していないにも関わらず、0.4~2.4%の頻度で花色変異が誘発された。このことは、2つの手法の組合せがプロトプラスト培養変異単独より

も変異体の出現を飛躍的に高めていることを示唆している。一方で、プロトプラストの場合と同程度の変異誘発率が葉などの組織2カ所にイオンビームを照射して得られるのか、またプロトプラストと組織2カ所でイオンビームによる変異性に違いがあるか等はさらなる検討が必要である。

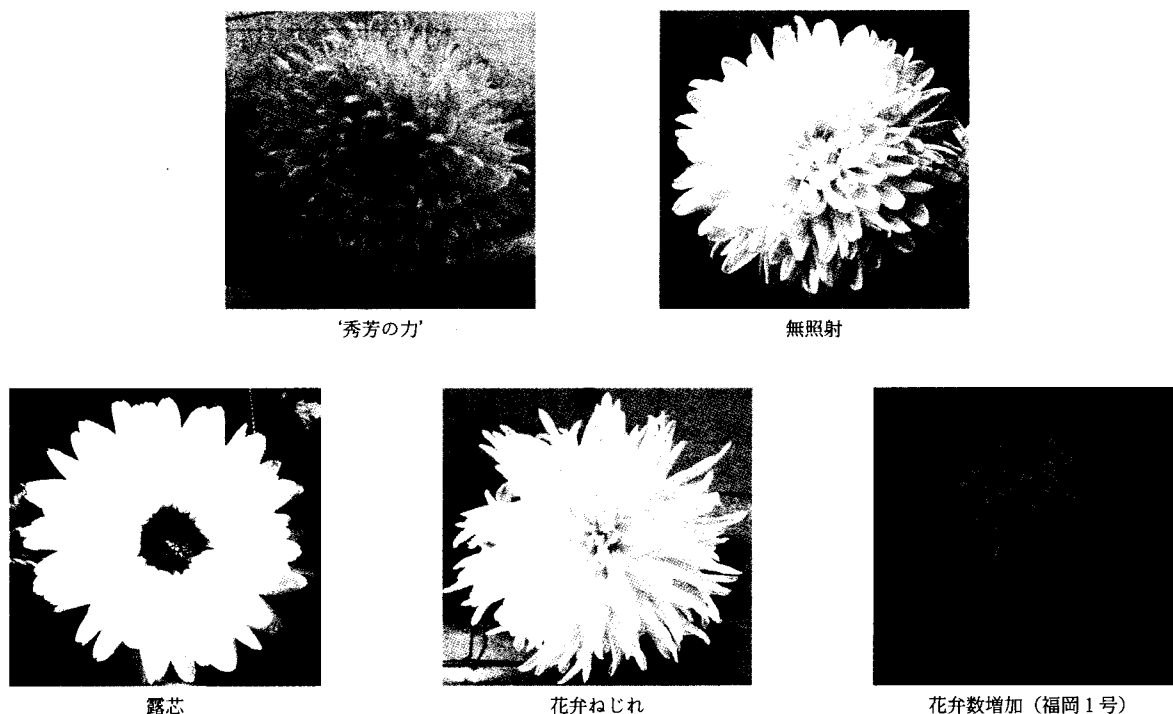
再生個体のうち、花弁数や花型について1次選抜した18系統を2002年度に2次評価した結果、少数の形質については多少のばらつきはあったものの、ほとんどの形質について前年度と同様の傾向を示した(データ略)。したがって、観察された突然変異は遺伝的に安定したものであると考えられる。

今回選抜した‘福岡1号’(第4図右下)は、元の‘秀芳の力’に比べて舌状花が1.5倍に増加しているが、切り花長及び切り花重量でそれぞれ4.5%、10.1%減少しており(第4表)、栽培品種としての価値は低いものの、花のボリュームを向上させるための交配母本としての活用が考えられる。舌状花数が増加した原因の解明は今後の課題であるが、舌状花数自体が量的形質であり量的形質は一般的に多数の遺伝子により支配されていること、高線量の照射が染色体レベルの構造変化を引き起こすことを考慮すると、遺伝子レベルの解析の前に、倍加や欠失により染色体数や核DNA量に増減がないかを調査する必要がある。

イオンビームに限らず突然変異原としての放射線は、その線量が適当でない場合生物に対して好ましくない影響を与える。本実験でも、草丈が低下した個体や、舌状花率が減少した個体、あるいは花型が乱れた個体など、輪ギクとしての実用価値がほとんどない個体の出現率が高かった(第1、2表)。輪ギクに求められている特性から考えると、舌状花率や花のボリュームが低下したり、切り花長が短くなることは商品価値の低下につながる。今回これらの個体が多く出現した区は、<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>の5、10Gy、<sup>12</sup>C<sup>5+</sup>の5Gyなどの半致死線量以上の線量区であった。イオンビーム照射においても、実用的な突然変異を誘発するためには、イオンビームの効果がそれほど強くない20%程度の致死線量(LD<sub>20</sub>)が有効であると一般に考えられているが、本報告においても<sup>4</sup>He<sup>2+</sup> 2Gyなどの低線量区では総花弁数が増加しボリュームのある個体や、花色が白色から黄色に変化した個体など有用な個体が低率ながら得られた。したがって、実用性の高い突然変異系統を得るためには、<sup>4</sup>He<sup>2+</sup>で約2Gy、<sup>12</sup>C<sup>5+</sup>で約1Gy程度あるいは生存率がほとんど低下しないような低線量で大量のサンプルを対象とした照射を行い、さらに得られた多数の再生植物の中から、目標形質のみが変異した個体を選抜することが有効であると思われる<sup>16)</sup>。

## 引用文献

- 1) Emmerling-Thompson, M. Nawrocky, M. M. (1979) Genetic studies of flower color in *Tradescantia*. *J. Hered.* Vol70 115-122.
- 2) 原子力研究所高崎研究所利用計画課(2003) TIARAの利用状況. 第12回TIARA研究発表会要旨集: 31-32.
- 3) 古谷博(1992) キク花弁培養による多芽体形成と植



第4図 再生植物に見られる花型の突然変異

- 物体再生. 広島県立農業技術センター研究報告**55**: 133-143.
- 4) H. Ikegami, H. Murakami, K. Hirashima, T. Nakahara, Y. Hase and A. Tanaka (2002) Effects of Ion Beams on Protoplasts, Petals and Leaves of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* R.). TIARA Annual Report 2001 :28-30.
  - 5) Morishita, T., H. Yamaguchi and K. Degi (2001) The dose response and mutation induction by gamma ray in buckwheat. *Advances in Buckwheat Research*:334-343.
  - 6) T. Murashige and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**:473-497.
  - 7) 永富成紀 (2000) 突然変異育種の成果と展望. *農業技術***55**: 6.
  - 8) Nagatomi S, Tanaka A, Watanabe H, Tano S (1997) Enlargement of potential chimera on chrysanthemum mutants regenerated from  $^{12}\text{C}^{5+}$  ion beam irradiated explants. TIARA Annual Report 1996:48-50.
  - 9) S. Nagatomi, A. Tanaka, A. Kato, H. Yamaguchi, H. Watanabe and S. Tano (1998) Mutation Induction through Ion Beam Irradiations in Rice and Chrysanthemum. TIARA Annual Report 1997:41-43.
  - 10) T. Nakahara, K. Hirashima, M. Koga, A. Tanaka, N. Shikazono and H. Watanabe (1998) Plant Regeneration from Protoplasts of Chrysanthemum Irradiated with  $^{12}\text{C}^{5+}$  Ion Beams. TIARA Annual Report 1997:28-30.
  - 11) T. Nakahara, K. Hirashima, H. Murakami, A. Tanaka, N. Shikazono, Y. Hase and H. Watanabe (2000) Effects of  $^{12}\text{C}^{5+}$  Ion Beams on Germination and Leafing of Seed in Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzvelev.) TIARA Annual Report 1999:31-32.
  - 12) T. Nishio, and S. Iida (1993) Mutants having a low content of 16-kDa allergenic protein in rice (*Oryza sativa* L.) *Theoretical and Applied Genetics***86**:317-321.
  - 13) C. Nitsch and J. P. Nitsch (1967) The internode of flowering in vitro in stem segments. *Planta* **72**:355-370.
  - 14) 大塚寿夫・末松信彦・戸田幹彦 (1985) キクのプロトプラスト培養と植物体再分化. *静岡県農業試験場研究報告***30**: 25-33.
  - 15) 鹿園直哉・田中淳・渡辺宏・田野茂光 (2000) 植物におけるイオンビーム誘発突然変異のDNA解析. 第9回TIARA研究発表会要旨集: 21-22.
  - 16) L. J. Stadler (1928) Genetic Effects of X-rays in Maize. *Proc. N. A. S.* **14**:69-75.
  - 17) 杉浦紳之 (2001) 細胞レベルの影響. *放射線生物学*: 39.
  - 18) 田中淳 (2002) イオンビーム育種技術の開発. 第1回イオンビーム生物応用研究ワークショップ発表要旨集: 2-5.