

Short Report

2017 年度の DNA マーカーを利用したニホンナシ組織培養植物の

イオンビーム照射による変異体作出育種の研究

ニホンナシ ‘秋泉’ 培養個体における鉄イオンビーム照射が生育に及ぼす影響
ならびに鉄イオンビームあるいはアルゴンイオンビーム照射からのシュート増殖

今西弘幸¹, 櫻井健二², 下川卓志³, 上田仁悦⁴, 高橋功⁴

¹ 秋田県立大学アグリイノベーション教育研究センター

² 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

³ 放射線医学総合研究所重粒子医科学センター先端粒子線生物研究プログラム転移機構解析研究チーム

⁴ 秋田県果樹試験場

イオンビーム照射による果樹の新しい突然変異育種法の開発を目指して、ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) ‘秋泉’ の培養個体を用いて、鉄イオン線を 2, 10 および 50 Gy の線量で照射し、その生育に及ぼす影響を評価した。また、変異個体を得るため、‘秋泉’ の培養個体 78 個体に、鉄イオン線 2 Gy あるいはアルゴンイオン線 10 Gy を照射し、新しいシュートの増殖を図った。‘秋泉’ の培養個体は、鉄イオン線 2 Gy の照射線量で生存個体が得られ、10 Gy の照射では照射後の早い段階で枯死はしないものの新しい茎葉の生育がみられず、50 Gy の照射線量では生存できなかった。鉄イオン線 2 Gy あるいはアルゴンイオン線 10 Gy を照射し、新しいシュートを分離し、それぞれ 2 個体あるいは 1 個体を得た。今後は、継代培養を行って新しいシュートの増殖を図るとともに、鉄イオン線およびアルゴンイオン線照射後に増殖・分離をさせたシュートを野外で生育し、変異の有無について解析を進めていく。

キーワード：ニホンナシ, 培養個体, イオンビーム, 鉄イオン, アルゴンイオン

果樹の育種において、既存の品種の形質を改良し、交雑育種法では得られないような形質を付与して新品種の育成が行われており、より効率的に特定の形質だけを改変できる突然変異育種法の研究・開発が望まれている。イオンビーム照射では、高いエネルギーを局所的に付与することができるため、従来のガンマ線照射よりも突然変異率が高く、組織の深部に存在する標的や粒子が通過した領域近傍のゲノム DNA の限られた領域に影響を与えることができる。しかし、イオンビーム照射実験は限られた施設で行われるため、栄養繁殖性の果樹では休眠枝など照射対象が限られている。また照射後も接ぎ木をして圃場での形態調査などを必要とするため、果樹の突然

変異育種は進んでいない。

これまでに、ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) ‘秋泉’ および ‘南水’ の培養個体に炭素イオン線を 2, 10 および 50 Gy の線量で照射し、その生育に及ぼす影響を評価した (櫻井ら, 2016)。その結果、変異の誘発が期待でき、生存個体が得られる照射強度が 2 あるいは 10 Gy であると報告している。また、‘秋泉’ の培養個体にアルゴンイオン線を 2, 10 および 50 Gy の線量で照射し、その生育に及ぼす影響を評価し、変異の誘発が期待でき生存個体が得られる照射強度が 10 Gy であるとした。

そこで、炭素イオン線およびアルゴンイオン線以外の線種において、より効率的な変異個体を得る可

能性を探るため、鉄イオン線を用いて照射線量を変えた照射を行った。また、変異個体を得ることを目的とし、多数のニホンナシ‘秋泉’培養個体を用いて、本研究の結果から明らかになった鉄イオン線の最適照射強度を照射したほか、アルゴンイオン線 10 Gy を照射した。

材料および方法

植物材料

秋田県果樹試験場天王分場から発育枝を採取したニホンナシ‘秋泉’を茎頂培養し、ニホンナシ生育用培地で継代維持した材料を用いた。ニホンナシ生育用培地は、WP 培地 (Lloyd & McCown, 1980) に、3-インドール酪酸 0.01mg/l, ジベレリン酸 1mg/l, ホルクロルフェニユロン 1mg/l およびグルシトール 1 % になるように添加し、pH7.5 に調整したのち、寒天 7g/l を添加したものをを用いた。25℃, 16 時間日長 (白色蛍光灯, 4,000lx) の条件下で培養した。6 週間ごとにニホンナシ生育用培地に植え継いだ。

イオンビーム照射

ニホンナシ生育用培地を入れたプラスチックシャーレ (φ100×40mm) に‘秋泉’培養個体を 6 個置床した。培養個体を国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所 (以下、放医研) に宅配便輸送した。イオンビームの照射は放医研の重粒子線がん治療装置で行った。イオンビームを照射した後、秋田県立大学に返送し、ニホンナシ生育用培地で継代培養を行った。

鉄イオンビームの照射強度の検討

500 MeV 鉄イオン線 (LET 185 keV/μm) を 2, 10 および 50Gy の線量で照射した。放医研と秋田県立大学との郵送のみで、鉄イオン線を照射しなかった培養個体を照射区 0Gy として、コントロールとした。各線量に 12 個体を供試した。

鉄イオンビームおよびアルゴンイオンビーム照射からのシュート増殖

鉄イオンビームおよびアルゴンイオンビーム照射において、それぞれ培養個体 78 個に照射した。鉄イオンビームでは、500 MeV 鉄イオン線 (LET 185

keV/μm) を 2Gy の線量で照射した。アルゴンイオンビームでは、500 MeV アルゴンイオン線 (LET 89 keV/μm) を 10Gy の線量で照射した。いずれのイオン線においても照射しなかった培養個体 12 個体を照射区 0Gy として、コントロールとした。

生育状況

鉄イオンビームの照射強度の検討

茎葉が旺盛に生育している個体 (生育指数 3)、茎葉が生存しているが生育のよくない個体 (生育指数 2)、生存しているが新しい茎葉の生育が見みられない個体 (生育指数 1) および枯死した個体 (生育指数 0) の 4 段階に評価し、照射線量ごとに生育指数ごとの個体数を調査した。それぞれの指数と個体数を乗算し、それら合計を培養個体数で除算し、照射線量ごとの平均指数を算出した。

鉄イオンビームおよびアルゴンイオンビーム照射からのシュート増殖

6 週間ごとにニホンナシ生育用培地に植え継いだ。新しいシュートが増殖した場合には、高さが約 1cm になった段階で元の個体から分離し、ニホンナシ生育用培地で生育させた。

結果および考察

生育状況

鉄イオンビームの照射強度の検討

照射線量別の培養個体を図 1 に記した。また、生育状況の調査結果を表 1 に記した。ニホンナシ‘秋泉’において、照射線量が高くなると生育指数の低い個体数が増加した。これは、イオンビーム照射により生育障害が引き起こされたと考えられる。照射区 2 Gy での平均指数が 2.67 であった。生育指数 3 の個体数が 10 個体 (83.3%) であったことから、照射線量 2 Gy でも照射後の生育が期待される生存個体が得られることがわかった。照射区 10 Gy での平均指数が 0.75 であった。生育指数 1 の個体数が 7 個体 (58.3%), 生育指数 0 の個体数が 4 個体 (33.3%) であったことから、照射線量 10 Gy では照射後の早い段階で枯死はしないものの新しい茎葉の生育がみられないことがわかった。照射区 50 Gy での平均指

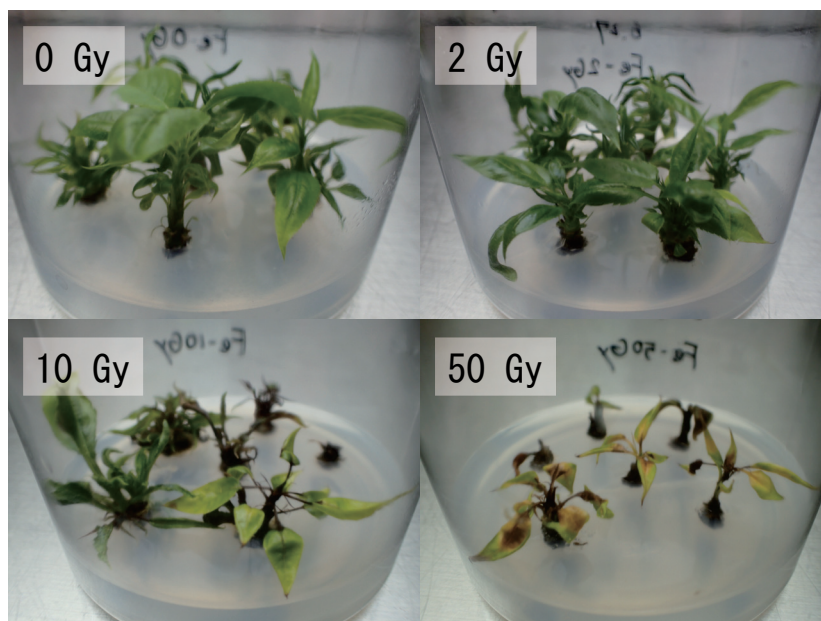


図1 鉄イオンビーム照射線量別のニホンナシ‘秋泉’の培養個体

表1 ニホンナシ‘秋泉’の鉄イオンビーム照射後の生育個体数(%)および生育指数

照射強度 (Gy)	生育個体数(%)				平均生育指数
	生育指数3 ²	生育指数2	生育指数1	生育指数0	
0	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3.00
2	10 (83.3)	1 (8.3)	0 (0)	1 (8.3)	2.67
10	0 (0)	1 (8.3)	7 (58.3)	4 (33.3)	0.75
50	0 (0)	0 (0)	0 (0)	12 (100)	0

²生育指数3：茎葉が旺盛に生育している個体，生育指数2：茎葉が生存しているが生育のよくない個体，生育指数1：生存しているが新しい茎葉の生育がみられない個体，生育指数0：枯死した個体。

数は0となり，鉄イオン線 50 Gy の照射線量での‘秋泉’の培養個体は生存できないことが示唆された。以上の結果から，ニホンナシ‘秋泉’の培養個体では，鉄イオン線の照射線量を 2 Gy で照射することで，生存個体を得られることがわかった。

鉄イオンビームおよびアルゴンイオンビーム照射からのシュート増殖

鉄イオンビーム 2 Gy の線量あるいはアルゴンイオンビーム 10 Gy の線量で照射した後，ニホンナシ生育用培地で継代培養を行った。各イオンビーム線において 78 個体ずつ照射した培養個体のうち，生存した個体は，鉄イオンビームにおいて 76 個体，アルゴンイオンビームにおいて 71 個体であった。このうち，培養個体の生長に伴い，個体によっては不定芽を発生した。不定芽が生長して形成された新しいシ

ュートが約 1cm になった時点で，新しいシュートを分離し，鉄イオンビームにおいて 2 個体，アルゴンイオンビームにおいて 1 個体を得た。

今後は，分離した 3 個体のシュートおよび新たに発生するシュートを育成し，順化後に野外で生育し，十分に葉が得られるようになった時点で，適宜サンプリングを行い，変異個体の有無について解析を進めていく。

結論

本研究では鉄イオン線に対するニホンナシ‘秋泉’の培養個体の生物学的効果を評価することができた。500 MeV 鉄イオン線 (LET 185 keV/μm) において，

2 Gy の照射区で生存個体が得られた。また、10～50 Gy 照射でニホンナシ培養個体は枯死することから、変異誘発に際しての上限が判明した。よって、照射線量 2 Gy での変異誘発が期待できることがわかった。また、鉄イオン線 2 Gy および 500 MeV アルゴンイオン線 (LET 89 keV/μm) 10 Gy の照射したニホンナシ‘秋泉’培養個体を継代し、新しいシュートを増殖させることができた。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 29 年度産学連携・共同研究推進事業によって行われた。

文献

- Lloyd, G. & McCown, B. H. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagator's Society*, 30, 421-427.
- 櫻井健二, 今西弘幸, 松山知樹, 下川卓志 (2016). 「イオンビーム照射がニホンナシ培養個体の生育に及ぼす影響」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』3 : 96-100.

〔 令和 3 年 7 月 30 日受付
令和 3 年 9 月 1 日受理 〕

Mutation Breeding by Ion Beam Irradiation of Tissue Cultured Plants of Japanese Pear Using DNA Markers in the 2017 Business Year

The Effect of Iron Ion Beam Irradiation on the Growth of Cultured Japanese Pear ‘Syusen,’ and Shoot Multiplication with Iron Ion Beam or Argon Ion Beam Irradiation

Hiroyuki Imanishi¹, Kenji Sakurai², Takashi Shimokawa³, Jin-etsu Ueta⁴, Isao Takahashi⁴

¹ Agri-Innovation Education and Research Center, Akita Prefectural University

² Department of Biological Production, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University

³ National Institute of Radiological Sciences, National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

⁴ Akita Fruit-Tree Experiment Station

Our study aimed to develop a new mutation breeding method for fruit crops. An iron ion beam was used to irradiate tissue-cultured plants of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) ‘Syusen’ with three doses (2, 10, and 50 Gy). We evaluated the effects of iron ion beam irradiation on the growth of cultured plants. To create the mutant plants, 78 plants were first irradiated with the iron ion beam at a dose of 2 Gy or with an argon ion beam at a dose of 10 Gy before the current shoots were subcultured. Cultured plants irradiated with iron ion beams at a dose of 2 Gy grew normally; those irradiated with a dose of 10 Gy survived, but did not grow any further; and those irradiated with a dose of 50 Gy died. The current shoots developed from cultured plants that were irradiated with iron ion beams at a dose of 2 Gy and argon ion beams at a dose of 10 Gy produced two and one new plantlets, respectively. In the future, we will investigate the detection of mutant plants that were grown in the field and had multiple shoots that were isolated by subculturing.

Keywords: Japanese pear, *Pyrus pyrifolia*, tissue cultured plant, ion beam, iron ion, argon ion