

Short Report

2018 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 ‘南水’ 培養個体における炭素イオンビーム照射が生育に及ぼす影響
ならびに ‘秋泉’ 培養個体における炭素イオン、鉄イオン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) ‘南水’ および ‘秋泉’ の培養個体を用いて、生育に及ぼす照射の影響を評価した。‘南水’ の培養個体に炭素イオンビームを 2, 5 および 10 Gy の線量で照射した。また、炭素イオンビーム 10 Gy, 鉄イオンビーム 2 Gy あるいは 10 Gy およびアルゴンイオンビーム 10 Gy を照射した ‘秋泉’ の培養個体を継代し、新しいシュートの増殖を図った。‘南水’ の培養個体は、炭素イオンビーム 10 Gy の照射区で生育指数 3 の生存個体が多く得られ、照射線量 5~10 Gy での変異誘発が期待できることがわかった。‘秋泉’ では、炭素イオンビーム 10 Gy において 156 個体、鉄イオンビーム 2 Gy 照射において 158 個体、鉄イオンビーム 10 Gy 照射において 40 個体、アルゴンイオンビーム 10 Gy 照射において 76 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、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，炭素イオン，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。‘南水’ において、10 Gy では生存個体が多かったものの生存率が低く、2 Gy では無照射と同程度の生存率が得られ

たことから変異誘発が低いことが予想された。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（今西ら, 2018）。

そこで、‘南水’を用いて炭素イオン線を照射した場合に、より効率的な変異個体を得る可能性を探るため、照射線量を 2～10 Gy の範囲内とした照射を行った。

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‘南水’および‘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, ホルクロルフエニユロン 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（ $\phi 100 \times 40$ mm）に‘南水’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。

‘南水’における炭素イオンビームの照射強度の検討

290 MeV 炭素イオン線 (LET 13.6 keV/ μ m) を 2, 5 および 10Gy の線量で照射した。放医研と秋田県立大学との輸送のみで、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。

生育状況

‘南水’における炭素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生育指数を算出した。

‘秋泉’における炭素イオンビーム、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

2016 年 9 月 28 日に炭素イオン線 10 Gy, 2017 年 6 月 27 日に鉄イオン線 10 Gy, 2018 年 1 月 19 日に鉄イオン線 2 Gy あるいは 2018 年 1 月 31 日にアルゴンイオン線 10 Gy を照射した‘秋泉’を 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

イオンビーム照射

‘南水’における炭素イオンビームの照射強度の検討

‘南水’における炭素イオンビームの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。いずれの照射線量においても生育指数が高く、照射区 2 Gy での平均生育指数が 3.00 と無照射区 0 Gy と同じであり、照射区 5 Gy で 2.83, 10 Gy においても 2.67 であった。これまでに 10 Gy では生存個体が得られたものの生存率が低いことを報告しているが（櫻井ら, 2016）、今回の結果においては 10 Gy においても高い生存個体数を得たことから、照射線量 5～10 Gy が生存個体を得て変異誘発が期待される照射強度であるものと考えられる。

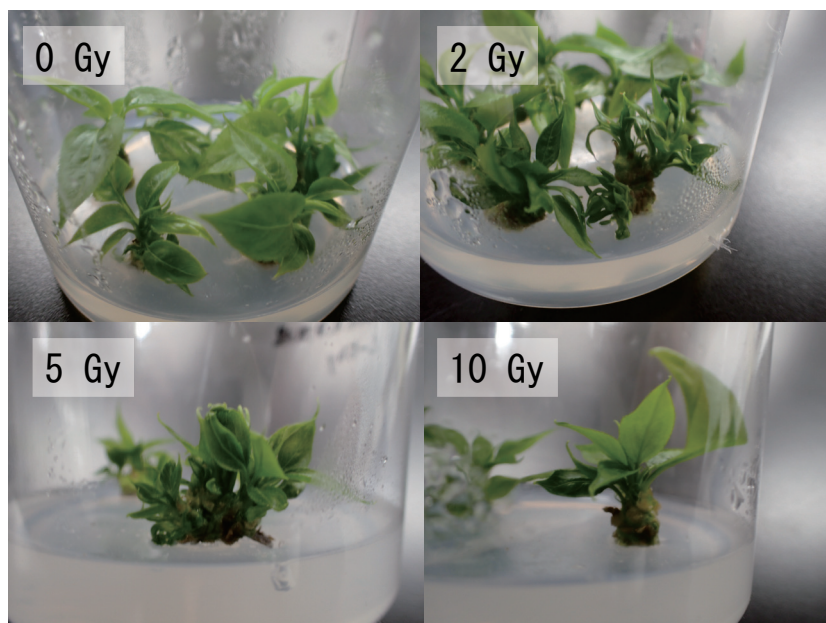


図1 炭素イオンビーム照射線量別のニホンナシ‘南水’の培養個体

表1 ニホンナシ‘南水’の炭素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 ^z	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	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3.00
5	11 (91.7)	0 (0)	1 (8.3)	0 (0)	2.83
10	10 (83.3)	0 (0)	2 (16.7)	0 (0)	2.67

^z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。

生育状況

‘秋泉’における炭素イオンビーム，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

‘秋泉’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て増殖した．炭素イオンビーム10 Gy照射において156個体，鉄イオンビーム2 Gy照射において158個体，鉄イオンビーム10 Gy照射において40個体，アルゴンイオンビーム10 Gy照射において76個体を得た．

今後は，増殖させたシュートを育成し，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

本研究では炭素イオン線に対するニホンナシ‘南水’の培養個体の生物学的効果を評価することができた．290 MeV炭素イオン線 (LET 13.6 keV/μm) において，10 Gyの照射区で生育指数3の生存個体が多く得られた．これまでに報告した結果も合わせて考慮した結果，照射線量5～10 Gyでの変異誘発が期待できることがわかった．また，‘秋泉’において，炭素イオンビーム10 Gy，鉄イオンビーム2 Gyおよび10 Gyならびにアルゴンイオンビーム10 Gyを照射した培養個体を継代し，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 30 年度産学連携・共同研究推進事業によって行われた.

文献

今西弘幸, 櫻井健二, 下川卓志, 上田仁悦, 高橋功 (2018). 「2016 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’ 培養個体におけるアルゴンイオンビーム照射が生育に及ぼす影響および炭素イオンビーム照射からのシュート増殖」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』 5 : 202-206.

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 〕

Mutant Creation and Breeding by Ion Beam Irradiation of Tissue-cultured Plants of Japanese Pear Using DNA Markers in Fiscal Year 2018

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

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

With the development of a novel mutation breeding method for fruit trees by ion beam irradiation, we evaluated the effects of irradiation on growth using cultured plants of the ‘Nansui’ and ‘Syusen’ variants of the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). Cultured plants of ‘Nansui’ were irradiated with carbon ion beam at doses of 2, 5, and 10 Gy. Furthermore, the cultured plants of ‘Syusen’ were irradiated with carbon ion beam (10 Gy), iron ion beam (2 Gy and 10 Gy), and argon ion beam (10 Gy) and were subcultured to proliferate new shoots. The results showed that many surviving cultured ‘Nansui’ plants with a growth index score of 3 were obtained in the group irradiated using 10-Gy carbon ion beam, and mutation induction could be expected at an irradiation dose of 5–10 Gy. In the case of ‘Syusen,’ 156 plants were obtained following 10-Gy carbon ion beam irradiation, 158 by 2-Gy iron ion beam irradiation, 40 by 10-Gy iron ion beam irradiation, and 76 by 10-Gy argon ion beam irradiation. Moving forward, we plan to perform further subculturing for proliferation of new shoots, grow them in a field, and analyze them for the presence or absence of mutation.

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