

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

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 秋田県立大学生物資源科学部附属フィールド教育研究センター

² 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

³ 量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所

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、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た。また、変異個体を得るため、‘秋泉’の培養個体78個体に炭素イオン線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、アルゴンイオン線50 Gyの照射線量では生存できなかったが、2 Gyおよび10 Gyの照射で生存個体が得られた。炭素イオン線10 Gyを照射し、新しいシュートを分離して27個体を得た。今後は、アルゴンイオン線照射を行い、新しいシュートの増殖を図るとともに、炭素イオン線照射後に増殖・分離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, アルゴンイオン, 炭素イオン

果樹はヒトと同じように遺伝的にヘテロであるため、両親が同じであっても後代の形質は多岐にわたる。そのため、交雑育種法では一つの品種を育成するために数千から数万の後代を育成する。また、交雑育種法では、両親にはない形質を後代で発現させることはほぼ不可能である。そのため、果樹の育種法ではガンマ線照射による突然変異育種法も活用されている。これにより、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いる。しかし、ガンマ線等の物理的変異原のみならず、突然変異育種ではゲノムDNA全体にランダムに変異を生じるため、目的の形質以外にも変異を生じる。よって果樹の育種でも、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。

イオンビームとは、サイクロトロンやシンクロトロンなどの加速器により、水素や炭素など様々な原子のイオンを高速に加速したものであり、育種での活用技術では日本は先端を走る。この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。

そこで、多数のニホンナシ ‘秋泉’ 培養個体に炭素イオン線 10 Gy を照射し、変異個体を得ることを目的とした。また、炭素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、アルゴンイオン線を用いて照射線量を変えた照射を行った。

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 ‘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°C, 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 (φ98×42mm) 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 (HIMAC) 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。

アルゴンイオンビームの照射強度の検討.

500 MeV アルゴンイオン線 (LET 89 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輸送のみで、アルゴン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。

炭素イオンビーム照射からのシュート増殖.

培養個体 78 個に 290 MeV 炭素イオン線 (LET 13 keV/μm) を 10Gy の線量で照射した。炭素イオン線を照射しなかった培養個体 12 個を照射区 0Gy として、コントロールとした。

生育状況

アルゴン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。

炭素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

アルゴン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、アルゴンイオンビーム照射線量が 2 および 10 Gy では生育指数の高い個体数が得られた。50 Gy の照射線量での ‘秋泉’ の培養個体は生存できなかつた。照射区 2 および 10 Gy での平均指数がいずれも 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 および 10 Gy で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。以上の結果から、ニホンナシ ‘秋泉’ の培養個体では、アルゴンイオン線の照射線量を 10 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。

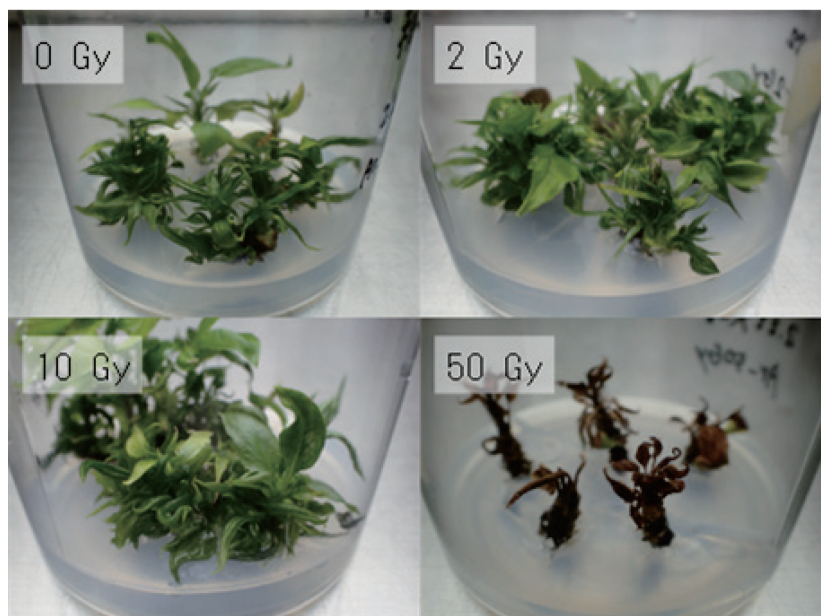


図1 アルゴンイオンビーム照射線量別のニホンナシ‘秋泉’の培養個体

表1 ニホンナシ‘秋泉’のアルゴン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)	0 (0)	2 (16.7)	0 (0)	2.67
10	10 (83.3)	0 (0)	2 (16.7)	0 (0)	2.67
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。

炭素イオンビーム照射からのシュート増殖.

炭素イオンビーム 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培養個体を図2に示した．78個体のうち，生存した個体は66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，27個体を得た．

今後は，アルゴンイオン線照射を行い，新しいシュートを増殖させ，変異の可能性のあるシュートを作成する．また，炭素イオン線照射後に増殖し，分離した27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

本研究ではアルゴン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 アルゴンイオン線 (LET 89 keV/μm) において，2および10 Gy の照射区で生存個体が得られた．また，50 Gy 照射でニホンナシ培養個体は枯死したことから，変異誘発に際しての上限が判明した．よって，10 Gy の照射線量での変異誘発が期待できることがわかった．また，290 MeV 炭素イオン線 (LET 13 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．

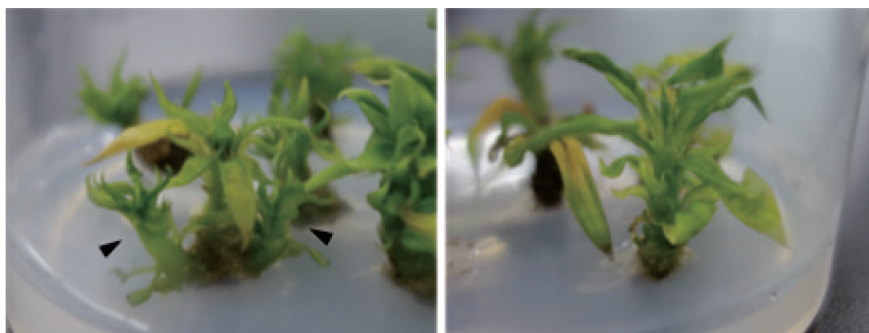


図2 炭素イオンビーム 10 Gy 照射したニホンナシ‘秋泉’の培養個体。左は新しいシュートが発生した培養個体。矢印が新しく発生したシュート。右は新しいシュートが発生していない培養個体。

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.

〔平成 30 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 30 年 7 月 10 日受理〕

Mutation Breeding of Japanese Pear Using Ion Beam Irradiation and DNA Markers of Tissue Cultured Plants in Business Year 2016

Effect of argon ion beam irradiation on the growth, and shoot multiplication with carbon ion beam irradiation of cultured Japanese pear ‘Syusen’

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

¹ Field Education and Research Center, Faculty of Bioresource, 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. Argon ion beam was irradiated at three doses (2, 10, and 50 Gy) on tissue cultured plants of the Japanese pear ‘Syusen’ (*Pyrus pyrifolia* Nakai). The researchers evaluated the effects of argon ion beam irradiation on the growth of cultured plants. To create mutant varieties, 78 plants were irradiated with carbon ion beam at a dose of 10 Gy before being sub-cultured for current shoots. Cultured plants irradiated with argon ion beams at doses of 2 and 10 Gy grew, whereas those irradiated at a dose of 50 Gy died. Current shoots developed from cultured plants that were irradiated with carbon ion beam at a dose of 10 Gy produced 27 new plantlets. In future, the authors will attempt to increase the number of current shoots by sub-culturing cultured plants irradiated with argon ion beams. It is also need to develop and isolate current shoots by sub-culturing, grow in the field, and investigate the detection of mutant plants.

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