

ナス小孢子へのイオンビーム照射による突然変異体の作出

佐伯由美*・内村要介・長谷純宏¹⁾

ナスの突然変異体の作出を目的として、ナス小孢子に対するイオンビームの最適な照射条件を炭素イオン $^{12}\text{C}^{6+}$ (320MeV) を用いて検討した。その結果、照射線量の増加とともに小孢子由来のカルス生存率は直線的に低下した。突然変異体は、0.5Gy 照射では 78 個体のうち色素が欠失した変異体が 1 個体、1Gy 照射では 95 個体のうち葉が黄緑化した変異体が 1 個体出現した。この 2 つの線量を照射した小孢子由来のカルスの生存率は 80% 以上であった。

カルス生存率と変異体作出数からみて、ナスの小孢子に $^{12}\text{C}^{6+}$ (320MeV) イオンビームを 0.5~1Gy の線量で照射すると、照射当代で突然変異体を誘発できることが示唆された。

[キーワード: 突然変異体, イオンビーム, 小孢子, ナス]

A method for producing mutant eggplant (*Solanum melongena* L.) by ion beam irradiation of microspores. SAIKI Yumi, Yosuke UCHIMURA and Yoshihiro HASE (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 33: 39-42 (2014)

To obtain mutants of eggplant, we investigated optimum conditions for the irradiation of eggplant microspores using $^{12}\text{C}^{6+}$ (320MeV) carbon ion beam. As a result, the callus survival rate of the microspores decreased with an increasing radiation dose. With respect to the mutants, 1 mutant without purple color (vein, petiole, and stem) of 78 calluses appeared at 0.5Gy, whereas 1 mutant with viridis (yellowish green leaves) of 95 calluses appeared at 1Gy. The survival rate of microspore-derived calluses under these 2 irradiation conditions was greater than 80% of that of the non-irradiated microspores.

Based on the callus survival rate and characteristics of the mutants, it would be safe to say that irradiation of eggplant microspores with 0.5 - 1Gy using $^{12}\text{C}^{6+}$ (320MeV) carbon ion beam could induce mutants in the M_1 generation.

[Key words: mutation, ion beam, microspores, eggplant]

緒言

ナスは福岡県の野菜産出額第 2 位 (福岡県 2012) であり、「博多ナス」としてブランド化されている重要な品目である。しかしながら、生産者の高齢化に伴う生産面積の減少や燃油等の生産経費の増大など産地は厳しい状況であり、その対応策の一つとして、新しい品種の開発が求められている。

ナスの育種法は、交配が主体である。このため、目標形質を持つ個体の出現率を上げるには、耐病性や栽培特性および果形など農業生産上有用である形質をもつ系統や品種が育種素材として必要である。

新規の形質を付与する方法の一つに、突然変異の利用がある。放射線の一種であるイオンビームは、従来、突然変異体の作出に利用されている X 線や γ 線と比較して、イオン粒子の飛跡に沿いながら集中的にエネルギーを与える。このため、DNA 鎖の切断が生じやすく、突然変異の誘発効果が高い (Tanaka 1999)。また、イオンビームは γ 線と同程度のエネルギーを照射した場合、細胞を通過する粒子数が少ないため (Tanaka 1999)、DNA の損傷箇所も少なく、目的以外の不要な形質変異を生じ難いとされている。これらの特性から、もとの形質を維持しながら、花色や草丈などの新規形質を付与できるワンポイント改良が可能とされている (Tanaka 2010)。実際にイオンビームの照射により、キクの花色や花形の変異体 (Nagatomi ら 1997) や無側枝性 (上野・永富 2004)、イネ (中井ら 1994) や大麦 (Kishinami ら

1994) の耐病性向上などの有用な突然変異体が作出されている (田中 2003a, 渡辺 2004)。しかしながら、一般的な植物体は二倍体 (2X) であるため、イオンビームによって生じた変異は照射後代で初めて確認されることが多く、自殖後代の作出が必要であり、時間を要する。

一方、筆者らはナスの品種育成を効率的に行うため、植物体の再生効率を向上させた小孢子培養技術の改良を行った (佐伯ら 2009)。小孢子は半数性細胞であり、一倍体である。このため、変異が生じた場合、その小孢子から再生させた植物体は、照射当代で変異を確認できる。また、染色体を倍加させるコルヒチン処理を行うことで一度に遺伝形質を固定できる利点もある。これらのことから、イオンビーム照射と小孢子培養を組み合わせれば、早期に突然変異体を作出できると考えられる。ナスの小孢子へのイオンビーム照射については、Takata ら (2006) によりナスの台木として用いられているヒラナス (*Solanum integrifolium*) での報告があるものの、ナス (*S. melongena* L.) では報告例はない。

そこで、筆者らはナスの突然変異体を得る手法としての可能性を検討するため、小孢子に対するイオンビームの最適な照射条件を明らかにするとともに、得られた突然変異体の形質について調査した。

材料および方法

1 小孢子への炭素イオンビーム照射

ナスの供試系統は、単為結果性系統「AE-P11」(野菜

*連絡責任者 (豊前分場: y-saiki@farc.pref.fukuoka.jp)

受付 2013 年 8 月 1 日; 受理 2013 年 11 月 15 日

1) 現 独立行政法人日本原子力研究開発機構・高崎量子応用研究所

茶業研究所より分譲)を用いた。

小胞子の単離は佐伯ら (2009) の方法に準じた。単離後、糖飢餓および高温処理を行った小胞子は、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 0.4mg/L, ペンジルアミノプリン 0.2mg/L, グランガム 0.2%, ショ糖 2%を添加し、pH5.8 に調整した NLN 培地 (Lichter 1981) に 2.0×10^6 個/mL の密度に調整し、直径 35mm シャーレに 1mL 分注後、無菌状態でイオンビームを照射するため、滅菌したカプトン膜で被覆し、照射試料とした。

その後、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の AVF サイクロトロンで加速した炭素イオン ($^{12}\text{C}^{6+}$ ・総エネルギー320MeV) を 0, 0.5, 1, 2, 5, 10Gy の線量で照射した。照射は各線量につき 3 シャーレずつ、2006 年 6 月 12 日と 9 月 5 日に実施した。照射後、25°C の暗黒条件下で培養し、約 1 ヶ月後にカルス形成数を調査した。

2 再生植物体の変異調査

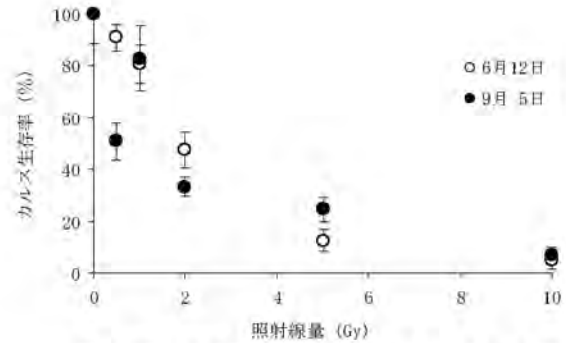
イオンビーム 0~10Gy を照射した小胞子から得られた 416 個のカルスは 25°C, 16 時間日長, 3000Lx の条件で、シュート形成培地で 90 日間、シュート伸長培地で 30 日間、発根培地で 20 日間培養後、6cm ポリポットで順化した (佐伯ら 2009)。その後、再生植物体は、自然条件下のガラス室内で栽培し、第一蕾まで生育させた 338 個体について表現形質の変異を調査した。なお、調査に用いた再生植物体はカルス当たり 1 個体とし、各々を 1 系統として調査した。

結果および考察

イオンビーム照射線量とカルスの生存率を第 1 図に示した。0Gy でのカルス形成数を 100% (67.3 個/mL) とすると、1Gy での生存率は 82.0% (55.2 個/mL), 2Gy では 39.7% (26.7 個/mL) となり、この線量域では生存率はほぼ直線的に低下した。

ヒラナス (Takataら 2006) やユリおよびネギのカルスへのイオンビーム照射 (Kondoら 2003, 2007) でも線量の増加とともにほぼ直線的にカルス増殖が抑制されており、本試験の結果と一致した。また、ヒラナス小胞子の生存率は、2Gy付近で約 80%に低下したと報告されていることから (Takataら 2006)、ナスはヒラナスに比べてイオンビームへの感受性が高いことが示唆された。

従来用いられている γ 線などでは、変異誘発のための適正照射線量の目安として生存率 50% (LD_{50}) が使われることが多い。しかし、イオンビームでは γ 線などより比較的低線量で変異を誘発できること、また不必要な変異を避けるために LD_{50} よりも低い線量が使われている。田中 (2003b) は、種子へのイオンビーム照射を例に、実用的な変異が得られやすいのは生存率が低下し始める閾値の線量からその半分の低線量域であると報告している。本試験では、小胞子への照射であることから、種子照射の場合とは異なり、線量反応曲線に明確な閾値は認



第 1 図 イオンビーム照射線量が小胞子のカルス生存率に及ぼす影響 (2006年)

- 1) 6月12日, 9月5日に各線量 3シャーレずつ, $^{12}\text{C}^{6+}$ ・320MeVイオンビームを照射した
- 2) カルス生存率は, 0Gyに対する割合 (%) で表示
6月12日は0Gy 58.7個/シャーレ, 9月5日は0Gy 76個/シャーレ
- 3) 平均値 \pm SD

められなかった。このため、各線量を照射された小胞子より形成されたカルスを培養し、得られた再生植物体 259 系統の表現形質に現れた変異を調査した結果、照射 0.5Gy 区からは葉脈、葉柄部分の紫色素が欠失した変異体が 78 系統中 1 系統、1Gy 区からは本葉が黄緑化した個体が 95 系統中 1 系統得られた (第 1 表, 第 2 図)。無処理区、2Gy 以上の照射区からは変異体は得られなかった。一般的に、放射線を利用した突然変異の頻度は照射線量に比例する。このため、本試験において 2Gy 以上の線量で変異体は得られなかったのは、調査個体数が少ないためであると考えられた。しかし、高線量の照射は致死や不稔、生長阻害などの劣悪な変異を発生させる可能性が高い。このため、カルスの生存率からみて、 LD_{50} 以下である 2Gy 以上の線量是有形質を持つ変異体を得られる可能性が低いことが推察された。これらのことから、照射小胞子由来カルスの生存率と変異出現数からみた $^{12}\text{C}^{6+}$ ・320MeV イオンビームの適正線量は 0.5~1Gy 程度 (生存率 80%程度) であると考えられた。

Tohjiimaら (2007) は、サトウキビ葉片への $^{12}\text{C}^{6+}$ イオンビーム照射による毛群減少個体の作出を目的に、無照射に対する個体再生率を調査した結果、生存率 75% (2Gy) の線量とその後の圃場での有望個体の選抜数も多く、適正線量であると報告している。Chinoneら (2008) はユリりん片への $^{12}\text{C}^{6+}$ イオンビームの適正線量は、生存率と生育、葉色の突然変異体出現個体数から 0.2~0.4Gy (生存率 90%以上~80%) であること、高橋ら (2004) はヒメイタビを用い再分化率 70~80%に減少する線量が斑入り突然変異体を得られる確率が高かったと報告している。本試験結果もこれらの報告と一致しており、生存率 80%付近は適正線量の一つの目安になると推測された。

本手法で用いた小胞子からの植物体再生過程はカルス経由である (佐伯ら 2009)。このため、変異体の発生要因は、イオンビーム照射によるものと培養変異の 2 通

第1表 小胞子へのイオンビーム照射により得られた変異体 (2007~2008年)

| 照射線量 (Gy) | 調査系統数 ¹⁾ | 変異体数 ²⁾ | 変異の特徴 (個体数) |
|-----------|---------------------|--------------------|----------------|
| 0.5 | 78 | 1 | 葉脈、葉柄の紫色素欠失(1) |
| 1 | 95 | 1 | 葉色の黄緑化(1) |
| 2 | 59 | 0 | |
| 5 | 19 | 0 | |
| 10 | 8 | 0 | |
| 照射区合計 | 259 | 2 | |
| 無照射 | 79 | 0 | |

1) 供試品種は「AE-P11」

1個の小胞子より再生した植物体を1系統として調査した

2) 突然変異体は、第一花出蕾までに外観で選抜した



第2図 小胞子への照射で得られた突然変異体

左：正常個体（無照射）

右：葉脈と葉柄の紫色素欠失変異体(0.5Gy M1世代)

Barは1cm

りが考えられる。無照射区と0.5Gy区の個体数は同程度であるため、得られた変異体はイオンビーム照射由来の可能性がある。このことを確認するためには、さらに個体数を増やして調査する必要がある。

また、一般的に半数性細胞の培養により作出された半数体は遺伝的に形質が固定されていると考えられている。実際にオニコウベナ(降幡ら1998)やピーマン(下元ら2012)では、薬培養由来植物の自殖後代の特性を調査して形質が固定されたのを確認しており、今回得られたナスの変異体についても同様の確認が必要であると考えられる。

半数体作出技術と突然変異育種を組み合わせることで突然変異体を作成する手法は、イネ(高牟禮・木下1993)やタバコ(Hasegawaら1995, Hamadaら1999)で報告されている。高牟禮・木下(1993)は、イネの薬および薬カルスにγ線を照射し得られた突然変異体の5世代後の変異系統を用い、変異形質の固定の確認と遺伝様式を調査した。その結果、得られた突然変異体は単純劣性遺伝子の変異を生じており、遺伝的変異を拡大する方法として、薬培養とガンマー線照射の組み合わせは有効であると報

告している。また、Hasegawaら(1995)はタバコの薬にγ線を照射して薬培養を行い、その薬培養から再生した半数性植物体の中に、突然変異源処理により生じた遺伝的な特性として報告のある帯状化した個体や葉の縁が湾曲した個体が得られたことを報告している。このことは、半数性細胞に突然変異処理をした結果、照射当代で変異体を獲得できることを実証し、早期に突然変異体を得る手法として有効であることを示している。本試験でも、この報告と同様に照射当代で変異体を得られた。

一方、参考として、ナス「AE-P11」種子へのイオンビーム照射を実施した。種子への照射線量は、対無照射区の照射線量の生存率からみて小胞子と同程度と推察された50Gyで行った。その結果、照射当代(M₁世代)で149系統、照射後代(M₂世代)で1833個体を扱ったが、M₁世代では表現形質として判断できる変異体は出現せず、変異体を得られたのはM₂世代であった。このことから、小胞子へのイオンビーム照射による変異体の作出手法は、半数性細胞に変異源処理を行うことにより照射当代で変異体を得られ、二倍体の種子への照射に比べ短期間で変異体を得られることが明らかとなり、変異体作出技術の一つとして活用できると考えられた。

本県では、2012年に着果促進処理を省力化でき、冬期でも外観品質が優れる新品種「省太」(古賀ら2013)が育成され、生産者の高齢化や規模拡大に対する支援策として期待されている。さらに省力的な栽培が可能な栽培特性として、とげなし性の付与がある。ナスのとげは生産者にとって作業時の痛みや果実への傷の恐れから不快な特性である(堀田2003)。とげなし性品種の導入は整枝、摘葉作業と収穫作業時間を20%削減でき、作業性や快適性を向上させた(長屋2005)。ナスのとげは単因子劣性の形質(久野ら2005)であるため、突然変異により形質を付与できる可能性が高く、実際にイオンビーム照射によりとげの消失したユズ(松尾ら2007)や毛郡発生の少ないサトウキビ(Takenoshitaら2008)などの変異体が生産されている。これらのことから、本報告の手法はとげなし性変異体の早期作出に有効であり、本県生産者の労働環境の向上や省力化に貢献できると考えられる。

引用文献

- Chinone S, Ishizawa A, Tokuhiko K, Nakatsubo K, Amamo M, Hase Y, Narumi I and Tanaka A (2008) Mutation induction on oriental hybrid lily irradiated with ion beams. JAEA Takasaki Annual Report 2006:83.
- 福岡県(2012)福岡県食料・農業・農村の動向—平成23年度農業白書。付属統計・資料。p.9.
- 降幡泰永・鈴木誠一・庄子孝一(1998)薬培養によるオニコウベナ(*Brassica campestris* cv. Onikoubena)の固定系統作出。宮城農報65:9-14.
- Hamada K, Inoue M, Tanaka A and Watanabe H(1999)

- Potato virus Y-resistant mutation induced by the combination treatment of ion beam exposure and anther culture in *Nicotiana tabacum* L. *Plant Biotechnology* 16(4):285-289.
- Hasegawa H, Takeshima S and Nakamura A(1995) Effects of gamma-ray irradiation on cultured anthers of Tobacco(*Nicotiana tabacum* L.) Radiosensitivity and morphological variants appearing in the haploid plants. *P. Tiss. Cul. Let.* 12(3):281-287.
- 久野哲志・矢部和則(2005)ナス単為結果性 F₁ 品種ととげなし性系統間の F₂ 分離世代における単為結果性及びとげなし性の遺伝解析. 愛知農総試研報 37 : 29-33.
- 堀田行敏・菅原眞治・矢部和則(2003)ナスの栽培作業を不快にする特性とわが国へのとげなし性の導入. 園学研 2(1) : 1-4.
- Kishinami I, Tanaka A and Watanabe H(1994) Mutation induced by ion beam (C⁵⁺) irradiation in barley. *JAERI TIARA Annual Report 1993(3)* : 30-31.
- 古賀 武・下村克己・末吉孝行・三井寿一・浜地勇次・齊藤猛雄・松永 啓・斎藤 新(2013)単為結果性ナス新品種「省太」の育成. 福岡農総試研報 32 : 52-58.
- Kondo M, Hoshi Y, Kobayashi H, Hase Y, Shikazono N and Tanaka A(2003) Induction of mutation by the ion irradiation to the calli of Japanese bunching onion(*Allium fistulosum* L.) *Takasaki Annual Report 2002*:83-84.
- Kondo M, Ogata K, Hase Y, Yokota Y, Narumi I and Kobayashi H(2007) Induction of mutation by the ion beam irradiation to the calluses of *Lilium* × *formolongi* Hort.(cv. *White Aga*.) *JAEA Takasaki Annual Report 2005*:89-90.
- Lichter R(1981) Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. *Z. Pflanzenphysiol.* 103:229-237.
- 松尾洋一・長谷純宏・横田裕一郎・鳴海一成・大藪榮興(2007)重イオンビーム照射によるユズのトゲ消失変異個体の誘発. 園学研 6 別(1) : 40.
- 長屋浩二(2005)とげなし紺美(こんび). 農業技術体系野菜編 5. 追録第 30 号・2005 年. 農山漁村文化協会, 東京, p. 基 152-2-152-4.
- 中井弘和・進藤俊一・北山 滋・渡辺 宏・高橋 且・小林泰彦・三和浩一・浅井辰夫(1994)人為突然変異の利用によるイネ白葉枯病抵抗性品種育成に関する研究 16 イオンビーム(N⁺)の突然変異誘発効果. 育種学雑誌 44(別 1) : 290.
- Nagatomi S, Tanaka A, Kato A, Watanabe H and Tano S(1997) Mutation induction on chrysanthemum plants regenerated from in vitro cultured explants irradiated with ¹²C⁶⁺ ion beam. *TIARA Annual Report 1995*:50-52.
- 佐伯由美・内村要介・中原隆夫(2009)ナス小孢子からの植物体再生率の向上. 福岡県農総試研報 28 : 17-22.
- 下元祥史・澤田博正・岡田昌久・森田泰彰・水本祐之・木場章範・曳地靖史(2012)薬培養によるピーマン黒枯病抵抗性育種母本の育成. 日本植物病理学会報 78 : 85-91.
- 高牟禮逸朗・木下俊郎(1993)イネ約培養へのガンマ線照射により生じた突然変異体の遺伝. 北大農邦文紀要 18(4) : 437-446.
- 高橋美佐・Sueli kohama・森川弘道(2004)ヒメイタビを用いた高環境修復植物の創成. 第 2 回イオンビーム生物応用ワークショップ論文集 : 34-35.
- Takata K, Saiki Y, Hirashima K, Nakahara T, Hase Y, Yokota Y and Tanaka A(2006) Plant regeneration from ion beam-irradiated microspores of *Solanum integrifolium*. *TIARA Annual Report 2004*:48-49.
- Takenoshita Y, Tohjima F, Nishi H, Shirao T, Nagatani T, Ooe M, Hase Y and Narumi I(2008) Ion beam breeding of sugarcane cultivar "Ni17". *JAEA Takasaki Annual Report 2007*:66.
- Tanaka A(1999) Mutation induction by ion beams in *Apabidopsis*. *Gamma Field Symp.* 38:19-27.
- 田中 淳(2003a)特集/イオンビーム育種研究の最前線 イオンビーム育種技術の開発と特徴. 放射線と産業 No. 99 : 4-10.
- 田中 淳(2003b)総説 イオンビームによる植物の突然変異誘発. *RADIOISOTOPES* 52 : 186-194.
- Tanaka A, Shikazono N and Hase Y(2010) Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *J. Radiat. res.* 51:223-233.
- Tohjima F, Shirao T, Ueno K, Ooe M, Yasuniwa M, Hase Y and Tanaka A(2007) The optimum dose of ion beam irradiation to tissue cultured of leaf explants for breeding sugarcane. *JAEA Takasaki Annual Report 2005*:83.
- 渡辺 宏(2004)総説イオンビームバイオ技術の現状と動向. *RADIOISOTOPES* 53 : 295-305.