

沖縄における種苗知財戦略を核とした重イオンビーム照射による亜熱帯農作物の新品種育成と種苗生産  
 Development of new cultivars by heavy-ion beam irradiation based on strategy  
 for creating intellectual property of subtropical plants

浦崎直也<sup>1)</sup>, 首藤亜耶乃<sup>1)</sup>, 玉城盛俊<sup>1)</sup>, 太郎良和彦<sup>1)</sup>, 徳永 毅<sup>2)</sup>, 緑間敏和<sup>2)</sup>, 堤 伸浩<sup>3)</sup>, 嬉野健次<sup>4)</sup>, 安谷屋信一<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>沖縄県農業研究センター, <sup>2)</sup>(株)アースノート, <sup>3)</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科, <sup>4)</sup>琉球大学農学部

キクでは、茎頂部および腋芽からの多芽体誘導条件を検討した。また、パパイヤでは、片側子葉切除による胚培養法を検討し、胚への直接的な照射を行った。さらに、目的遺伝子周辺領域の多型探索技術およびキク花弁における一過性遺伝子発現システムの開発を検討した。

キーワード: キク, パパイヤ, 重イオンビーム, 培養, DNA マーカー

## 1. 目的

本研究では、重イオンビームおよびγ線照射によるキクおよびパパイヤの新品種育成技術を開発する目的で、1)組織培養システムの確立と変異誘発および②変異体の効率的選抜法の開発、のサブテーマを設け研究を実施した。1)の研究サブテーマについて、重イオンビームの透過深度は1~3mmなので、照射対象物は平面的に配置しなければならない。そのため、まず、植物器官の組織培養システムの確立を目指した。また、2)のサブテーマでは、放射線照射後の変異体におけるDNA解析を行い、DNAマーカーを開発することにより効率的に変異体を選抜する手法の確立を検討した。

## 2. 方法

### 2-1. キクの茎頂培養システムと変異誘発

#### 1) 重イオンビーム照射時の茎頂培養体のサイズと照射後の茎頂培養体の枯死率

第1表および第2表に示す8系統を供試した。これらの系統の茎頂部(高さ約2mm)を摘出し、9cmプラスチックシャーレ内のホルモン無添加のMS寒天培地上で5日間培養した。その後、重イオン線種320MeV<sup>12</sup>C<sup>6+</sup>(5Gy)を照射した。照射後、茎頂培養体を同様の寒天培地上に移植し約2ヶ月間培養した。

#### 2) 茎頂培養体の生育に及ぼすNAAおよびBAの影響

系統‘沖の紅寿’を供試した。茎頂外植体(高さ2~3mm)をMS培地上で約16日間培養し、展開幼葉2~3枚を有する茎頂培養体を準備した。これらを第3表に示すNAAまたはBA添加培地上で継代培養し、培養体の初期生育促進効果を検討した。調査は継代培養後15日目に行った。

#### 3) 多芽体誘導

‘沖の紅寿’を供試した。1節を有する茎節片(約2cm)をin vitro生育中の幼植物体から採取し、1mg/lBA添加の寒天培地上で2週間培養した。その後、節部から発達した腋芽(3~4枚展開した)を茎片から分離し、BAの0, 1.0, 2.5および5.0mg/l添加寒天培地上で約1ヶ月間培養した。

野外生育中の株から茎頂部を摘出し、2~3mmの高さに無菌的に調整した。これらの茎頂外植体をBAの0, 1.0, 2.5および5.0mg/l添加寒天培地上で約1ヶ月間培養した。

#### 4) 茎切片由来カルス再分化系を利用した重イオンビーム照射による変異誘発

スプレーギク‘モーレピンク’の茎(上位節間)を中性洗剤で洗浄後、水洗した。その後、70%エタノールで30秒、Tween20を添加した次亜塩素酸ナトリウム水溶液(有効塩素0.5%)で15分殺菌後、滅菌水で3回水洗した。殺菌後、約2mm厚のディスク状にし、培地に置床した。基本培地は、MS培地(pH5.8)+シヨ糖4%+寒天0.8%とし、植物成長調整物質としてNAA 1.0ppm, BAを5.0ppm加えた。誘導されたカルスは、5mm径に分割し、1, 2および4Gyのイオンビームを照射した。照射後、BA0.5ppm, GA<sub>3</sub> 0.2ppmを添加した培地に継代し、不定芽誘導を試みた。誘導された不定芽を、1/2MS培地に継代し発根を促した。

## 2-2. パパイアの胚培養システムと変異誘発

## 1) 胚培養

重イオンビーム照射効率の向上を図る目的で、胚培養条件を検討した。授粉後 55 日～140 日の果実を用い、胚の実用的培養限界を調査した。また、果実のエスレル処理による種子成熟促進効果も検討した。

## 2) パパイアにおける重イオンビーム照射

授粉後 80 日～100 日目の種子を用いた。種子から胚を摘出し、重イオンビームの透過距離を考慮して片側子葉を除去した。照射線量は、2008 年 10 月に 3, 6 および 12Gy に設定した。また、2009 年 3 月には 1, 2 および 4Gy に設定した。

## 2-3. キクの変異体の効率的選抜法の開発

1)  $\gamma$ 線照射キクの形態・生態的変異の調査

放射線照射したキク(沖の紅寿)の穂を定植し変異の調査を行った。照射個体中で、茎頂部の潰れ(枯死)が確認された個体については摘芯を行い、側枝の誘導を行った(摘心株)。茎頂部が潰れていない株に関しては、上部を切断し挿し穂株として、元株は摘心株として栽培した。両株ともに、花色・分枝数・花数等の調査を行った。

## 2) 目的遺伝子周辺領域の多型探索技術開発

PCR とサザンブロット解析を組合わせた花色合成系遺伝子周辺領域の多型探索法を開発した。PCR には ISSR プライマーと花色合成系遺伝子特異的プライマーを用い、PCR 産物中の花色合成系遺伝子の有無またはサイズの違いをサザンブロット解析により検出した。材料には、沖縄県農業研究センター育種系統 04-557-2(白色)、04-557-14(ピンク)そして 04-557-30(濃紫色)を用いた。

## 3) キク花弁における一過性遺伝子発現システムの開発

葉緑体リボソーム構成タンパク質 L12 移行シグナルと GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子を連結し、キク花弁にパーティクルを用いて導入した。遺伝子導入の成否については、顕微鏡下で GFP の発光を観察することにより判断した。

## 4) 重イオンビーム照射したパパイアの性判別

重イオンビーム照射したパパイアの葉から CTAB 法により DNA を抽出し、Urasaki ら(2002a, 2002b)の方法を用いて性判別を行った。

## 3. 研究成果

## 3-1. キクの茎頂培養システムと変異誘発

## 1) 重イオンビーム照射後の茎頂培養体の枯死率

‘モーレピンク’、‘04-528-6’および‘04-847-26’を用いた実験では、約 30%の外植体が細菌で汚染された。残りの外植体のうち 50～70%は枯死した(第1表)。さらに 8 系統を用いた実験では、細菌汚染率は 0～65%であった。また、‘04-272-1’を除く 7 系統の枯死率は 66～100%であった。一方、‘04-272-1’の枯死率は 10.8%で、他の系統のそれと比較すると著しく低かった(第2表)。

第1表 重イオンビーム照射(5Gy)した茎頂培養体の致死率

| 系統        | 照射した茎頂<br>培養体数 | 育成植<br>物体数 | 汚染培養<br>体数 | 汚染率<br>(%) | 枯死培養<br>体数 | 致死率(%) |
|-----------|----------------|------------|------------|------------|------------|--------|
| モーレピンク    | 46             | 11         | 20         | 30.3       | 35         | 76.1   |
| 04-528-6  | 46             | 24         | 20         | 30.3       | 22         | 47.8   |
| 04-847-26 | 22             | 11         | 12         | 35.3       | 11         | 50.0   |

第2表 キク8系統における重イオンビーム照射(5Gy)茎頂培養体の致死率

| 系統        | 照射した茎頂培養体数 | 育成植物体数 | 汚染培養体数 | 汚染率(%) | 枯死培養体数 | 致死率(%) |
|-----------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 沖の紅寿      | 148        | 21     | 145    | 49.5   | 127    | 85.8   |
| モーレピンク    | 70         | 11     | 0      | 0.0    | 59     | 84.3   |
| 04-529-15 | 47         | 16     | 45     | 48.9   | 31     | 66.0   |
| 03-400-13 | 20         | 0      | 0      | 0.0    | 20     | 100.0  |
| 03-239-3  | 21         | 0      | 29     | 58.0   | 21     | 100.0  |
| 04-528-6  | 23         | 0      | 43     | 65.2   | 23     | 100.0  |
| 04-522-42 | 10         | 0      | 6      | 37.5   | 10     | 100.0  |
| 04-272-1  | 37         | 33     | 36     | 49.3   | 4      | 10.8   |

2) 茎頂培養体の生育に及ぼす NAA および BA の影響

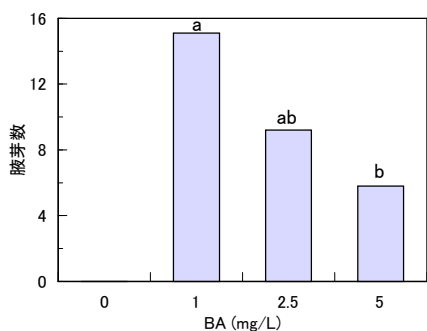
ホルモン無添加区では、葉の展開および茎・根伸長は正常であった。NAA 添加培地では、いずれも不定根が分化し、頂芽の発達は抑制された(第3表)。一方、BA 添加区では、いずれもホルモン無添加区に比較して、展開葉数が増加し茎葉の生育は良好であった。しかし、培養後 20 日目には主茎頂芽の生育は遅延し、腋芽が発達して多芽体になった。

第3表 茎頂培養体の生育に及ぼす NAA および BA の影響

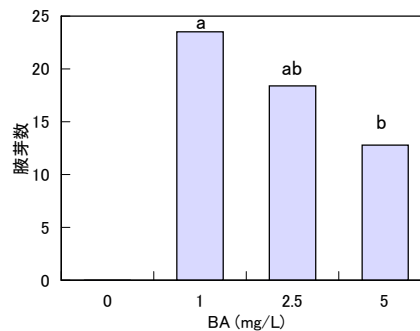
| ホルモン         | 濃度(mg/l) | 茎頂外植体数 | 展開葉数   | 腋芽数/培養体 | 発根培養体数 |
|--------------|----------|--------|--------|---------|--------|
| Hormone free | 0.0      | 12     | 7.3 b  | 0.2 a   | 10     |
| NAA          | 2.5      | 12     | 7.6 b  | 0.0 a   | 12     |
|              | 5.0      | 9      | 8.3 ab | 0.3 a   | 9      |
|              | 10.0     | 8      | 7.2 b  | 0.5 a   | 8      |
| BA           | 2.5      | 12     | 9.3 ab | 0.5 a   | 0      |
|              | 5.0      | 12     | 10.2 a | 0.4 a   | 0      |
|              | 10.0     | 9      | 7.8 ab | 0.3 a   | 0      |

3) 多芽体誘導

1~5mg/ℓBA の試験区を設定し、野外生育株からの茎頂外植体および茎片側芽の苗条を供試して、多芽体形成に関する BA の最適濃度を検討した。茎頂外植体から誘導した多芽体および側芽から誘導した多芽体のいずれにおいても、BA 濃度が1mg/ℓから5mg/ℓに増加するにつれ腋芽数は減少し、1mg/ℓBA で腋芽数は最も多くなった。また、茎片の節の側芽から誘導した多芽体は、茎頂外植体から主導した多芽体より多くの腋芽を生じた(第1図、第2図)。



第1図 茎頂外植体から誘導した多芽体の増殖に及ぼすBAの影響



第2図 側芽から誘導した多芽体の増殖に及ぼすBAの影響

## 4) 茎切片由来カルス再分化系を利用した重イオンビーム照射による変異誘発

第4表に示すように、線量に関係なく、いずれの区からも不定芽が得られた。カルスあたりの不定芽数は、いずれの区も25前後と多かった。得られたシュートを、1/2MS培地に継代し、発根を促したのち、現在、馴化中である

第4表 照射したモーレピンク茎切片由来カルスを BA0.5ppm, GA<sub>3</sub> 0.2pm 添加培地に継代したときの不定芽形成(継代3ヶ月後)

| 照射線量(Gy) | カルス置床数 | 生存数 | 不定芽形成カルス数(%) | カルスあたりの不定芽数 |
|----------|--------|-----|--------------|-------------|
| 1        | 20     | 20  | 20(100)      | 22.2        |
| 2        | 20     | 20  | 20(100)      | 22.1        |
| 4        | 20     | 20  | 20(100)      | 20.0        |

## 3-2. パパイアの胚培養システムと変異誘発

## 1) 胚培養

胚培養による発根率は授粉後 65 日目の種子で 40%と低く、70 日～105 日目では 80～90%に向上した。120 日目では 40%に再び低下し、140 日目には全く発根しなかった。70 日目の種子では、発根率は高まったが、胚軸長と根長が短くなった。また、エスレル処理個体では、胚培養後の胚軸長、根長が長くなり成熟促進効果が認められた。

## 2) パパイアにおける重イオンビーム照射

授粉後 80 日～100 日目の種子を用いた。種子から胚を摘出し、重イオンビームの透過距離を考慮して片側子葉を除去した。2008 年 10 月の照射では、照射線量を3, 6および 12Gy に設定した。また、2009 年3月には1, 2および4Gy に設定した。

## 3) 培養胚への重イオンビーム照射

2008 年 10 月の照射時の3, 6および 12Gy における生存率は、それぞれ 8.0%(753 個体中 60 個体)、3.8%(837 個体中 32 個体)および 0.2%(663 個体中 1 個体)であった。2009 年 3 月では、無処理が 36%(182 個体中 72 個体)、1Gy が 11%(413 個体中 46 個体)、2Gy が 1.9%(420 個体中 8 個体)、4Gy が 1.0%(390 個体中 4 個体)であった。

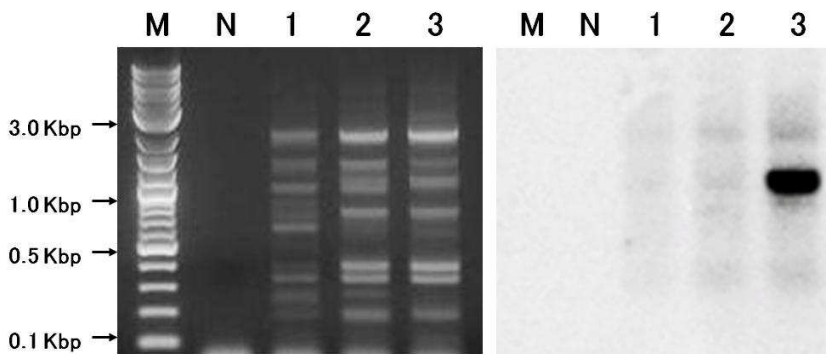
## 3-3. 変異体の効率的選抜法の開発

## 1) 重イオンビーム及びγ線照射キクの形態・生態的変異の調査

γ線照射したキクの形態調査をおこなったところ、照射強度が強くなるにつれ、茎頂部の潰れ株が多く観察された。特に、24Gy 区では顕著で、89.3%の株で観察された。花色の変異については、照射材料である「沖の紅寿」が濃赤紫色であるのに対し、照射株で淡色・底白・絞り・白色の花変異が確認された。6および 12Gy 区における摘芯株の花変異率は約 50%であった。また、24Gy では約 70%の変異率を示した。挿し穂株では、6Gy および 12Gy 区で約 20%であった。、24Gy 区では約 40%であった。

## 2) 目的遺伝子周辺領域の多型探索技術開発

DFR(Dihydroflavonol 4-reductase)遺伝子増幅用プライマーDFRF2 と ISSR59 により増幅された DNA をナイロンメンブレンへブロットングし、DFR 遺伝子をプローブとしてサザンブロット解析を行ったところ、DFR 遺伝子は 04-557-30 を鋳型にした増幅断片中に存在するが、04-557-2 及び 04-557-14 由来の断片中には存在せず、多型を検出することができた(第3図)。



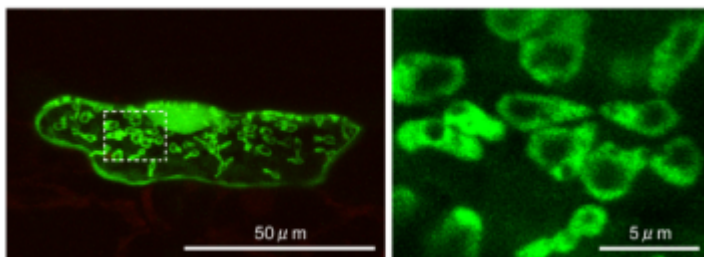
第3図 DFR 遺伝子周辺領域の多型探索結果

左図: アガロースゲル電気泳動の結果, 右図: サザンブロット解析の結果  
プライマーは DFRF2 と ISSR59 を用いた。

M 2-log DNA ladder marker, N 蒸留水(陰性コントロール)  
1 キク育種系統 04-557-2, 2 04-557-14, 3 04-557-30

### 3) キク花卉における一過性遺伝子発現システムの開発

葉緑体リボソーム構成タンパク質 L12 移行シグナルを付けた GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子をキク花卉にパーティクルガンを用いて導入した。その結果, 移行シグナルに従い花卉表皮細胞の葉緑体において GFP の発現を確認することができた(第4図)。



第4図 花卉表皮細胞の葉緑体における GFP の発現  
緑色の発光が GFP である。

### (4) 重イオンビーム照射したパパイアの性判別

3, 6 または 12Gy で照射した個体の性判別を行った。無照射の4個体は両性が3個体, 雌が1個体と判定された。3Gy 区では, 60 個体中, 両性が 49 個体で雌が 11 個体であった。6Gy 区では, 32 個体中 27 個体が両性で, 雌は5個体であった(第5表)。

第5表 重イオンビーム照射パパイアの性判別

| 線量   | 調査<br>個体数 | 判別結果 |    |
|------|-----------|------|----|
|      |           | 両性   | 雌  |
| 無照射  | 4         | 3    | 1  |
| 3Gy  | 60        | 49   | 11 |
| 6Gy  | 32        | 27   | 5  |
| 12Gy | 1         | 1    | 0  |

## 4. 結論・考察

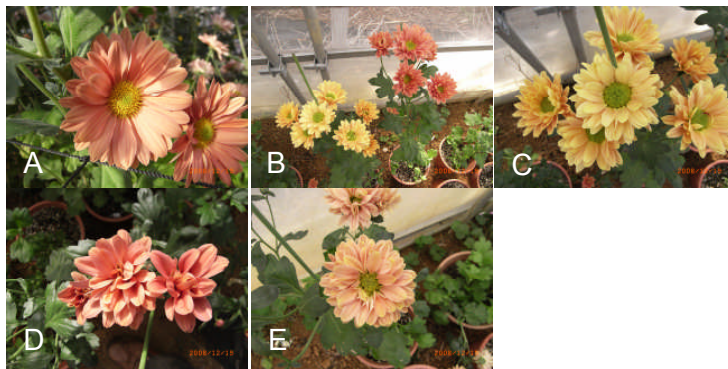
## 1) キクの組織培養システムと変異誘発

ホルモン無添加の寒天培地上で培養した茎頂外植体の照射後の枯死率は、供試した9系統のうち系統'04-272-1'(10%)を除いて、いずれも高かった(50~100%)。そのため、茎頂外植体および茎節片から採取した腋芽シュートの生育に及ぼすBAおよびNAAの影響を調査した。ホルモン無添加区における茎頂培養体は、正常に生育、発根した。1mg/lBA添加区では、腋芽の分化が促進し多芽体となった。

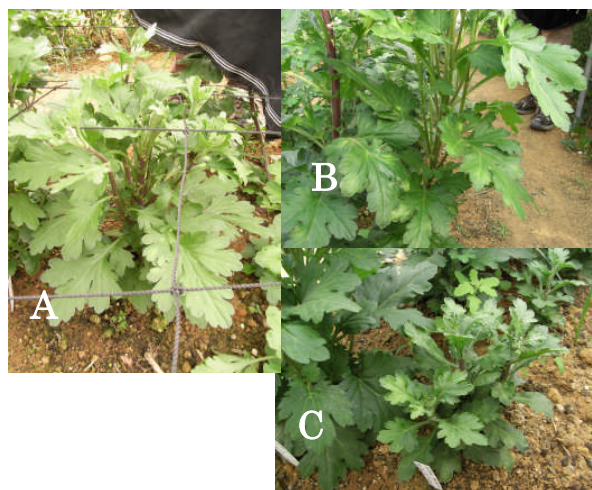
現在、茎節片における腋芽への照射および照射腋芽からの多芽体誘導を検討し、照射効果とキメラ性解消を検討している。

茎片カルスへ照射した場合、線量に関係なく、多くの不定芽が誘導された、また、得られた不定芽から再生し馴化した植物は、現在までに、処理区に関係なく順調に生育している。今後は、開花株より順次、変異の調査を行う予定である。

生存した個体の間には、花色、花型、分枝性に関する変異が観察された(第6図, 第7図)。これらの変異株はキメラ性を調査後、変異の固定化を図る予定である。



第6図 5Gyの重イオンビーム照射の茎頂培養体から育成した植物体の中に検出された花色・花形変異。A: オレンジグラデーション(原系統), B: 変異株における黄色花(左), C: 黄色花の拡大写真, D: 花卉の不規則に配列した花, F: 花卉数の多い花。



第7図 重イオンビーム(5Gy)照射した茎頂培養体から育成した植物体の中に出現した矮性株(AとC)および多分枝株(B)。

## 2) パパイアの胚培養システムと変異誘発

パパイアの実用的胚培養限界は授粉後 70 日目の種子で、授粉後 80~105 日の種子が胚培養における最適な種子であると考えられた。また、エスレル処理により、胚培養後の成熟促進効果が認められることから、エスレル処理と胚培養を併用することで重イオンビーム照射効率の向上に貢献できるものと思われる。

1 回目の重イオンビーム照射時の生存個体数は 93 個体、2 回目の照射では 58 個体であった。2 回の照射における生存率の低さは、線量による影響と同時に馴化過程での問題が考えられる。最適線量、馴化率の向上については再検討の必要がある。2009 年 5 月に 1 回目の照射個体を圃場に定植した。今後、M1 世代の生育特性、開花特性(偏雌性等)、果実特性について調査する予定である。

## 3) 変異体の効率的選抜法の開発

### (1) 重イオンビーム及び $\gamma$ 線照射キクの形態・生態的変異の調査

$\gamma$  線の照射線量に依存して花色・花形変異個体の出現率が高くなった。小ギク品種「沖の紅寿」を材料した場合、 $\gamma$  線照射により効率的に花色変異個体が得られることが分かった。今後、重イオンビーム照射した「沖の紅寿」の花色変異を調査し、 $\gamma$  線との変異個体獲得率を比較する。また、 $\gamma$  線照射により得られた花色変異株を継続栽培し、変異の安定性を調査する。

### (2) 目的遺伝子周辺領域の多型探索技術開発

ISSR59 と DFR 遺伝子の DFRF2 プライマーによる PCR とサザンブロット解析を組み合わせた解析により、供試した系統 04-557-30 には存在するが、04-557-2 及び 04-557-14 には存在しない多型を検出することができた。この結果から、04-557-30 の DFRF2 の下流には、ISSR59 の配列が存在するが、04-557-2 及び 04-557-14 には存在しないか、塩基置換が起こっているものと考えられた。本手法は、PCR 増幅産物中に存在する花色合成系遺伝子周辺領域の多型を検索する手法として有効であると考えられる。

### (3) キク花弁における一過性遺伝子発現システムの開発

移行シグナルに従い花弁表皮細胞の葉緑体において GFP の発現を確認することができたことから、GFP 遺伝子と花色関連遺伝子を連結して導入すると、遺伝子が導入された細胞を GFP で同定し、その細胞の花色変化を調査することができる。本法は、遺伝子組換えにおける組織の培養、再分化そして個体の育成というステップが必要でないため、非常に簡便かつ短期間で、多数の花色を支配すると思われる遺伝子の機能を推定することができる。

### (4) 重イオンビーム照射したパパイアの性判別と誘発変異の早期検出

本照射実験では、材料にハワイで育成された品種サンライズを用いている。サンライズは、両性の自殖の品種であるため、両性と雌が 2 対 1 の割合で出現する。今回の実験では、3 及び 6Gy ともに両性と雌の分離比が約 5 対 1 となる結果であった。この性分離比の歪みの原因については、現在のところ明らかとなっていない。今後は、無照射区を含む照射個体全てをハウス内に定植し、花型による性の再確認と形態調査を実施する。

### (5) まとめ

培養システムと変異率の関係については検討中である。また、In vitro 培養—照射系では実験効率が低下するので、in vivo 培養—照射系での変異誘発技術も開発中である。

パパイアのライフサイクルは長いので(約 2 年)、誘発変異の早期固定技術を開発する必要がある。遺伝変異の早期固定技術として葯・花粉培養がある。しかし、パパイアの両性株の育種・変異固定には適用できない。すなわち、雄および両性の生産する 2 種の花粉(雌または雄性遺伝子)からは雌株のみが発生することが知られている(Rimberia, et al., 2005, 2006)。今後、両性および雄花粉への照射と受粉および次代における性型変異を調査する予定である。

目的遺伝子周辺領域の多型探索技術およびキク花弁における一過性遺伝子発現システムは、誘発遺伝変異、特に花色変異の早期検出に有効であると思われる。今後、誘発変異検出に係るこれらの技術の実行性を検証する予定である。

5. 引用(参照)文献等

Rimberia, K. F., H. Sunagawa, N. Urasaki, Y. Ishimine and S. Adaniya\*  
Embryo induction via anther culture in papaya and sex analysis of the derived plantlets.  
*Scientia Horticulturae* 103(2): 199–208. 2005

Rimberia, K. F., S. Adaniya\*, T. Etoh and Y. Ishimine. 2006.  
Sex and ploidy of anther culture derived papaya (*Carica papaya* L.) plants.  
*Euphytica* 149: 53–59.

Urasaki N, Tokumoto M, Tarora K, Ban Y, Kayano T, Tanaka H, Oku H, Chinen I, Terauchi R (2002a)  
A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya(*Carica papaya* L.).  
*Theoretical and Applied Genetics* 104: 281–285

Urasaki N, Tarora K, Uehara T, Chinen I, Terauchi R, Tokumoto M (2002b)  
Rapid and Highly Reliable Sex Diagnostic PCR Assay for Papaya(*Carica papaya* L.).  
*Breeding Science* 52: 333–335