

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06029

研究課題名（和文）重粒子線局所照射によるカンキツ類の突然変異体誘発に関する研究

研究課題名（英文）Study on mutagenesis by local heavy-ion beam irradiation in citrus

研究代表者

八幡 昌紀（Yahata, Masaki）

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：60420353

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：果樹の突然変異育種を推進させるために、カンキツ類の種子、実生および穂木に対し、重粒子線の局所照射を実施し、核種と吸収線量の違いがそれらの生存率、成育および形態変異に及ぼす影響について調査した。照射対象や核種によって生存率に差が認められたものの、吸収線量の増加に伴い減少した。照射後の植物体の中には生育や形態に影響が認められ、葉形に異常が生じるものや成長が非常に遅く、極小化・矮小化体等を示す個体が複数観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、リンゴやニホンナシ、ブドウ、モモといった枝変わり等の突然変異による品種が多く存在する果樹でも応用され、今まで以上にバラエティーの富んだ新品種育成に発展し、停滞する果樹産業の活性化につながるものと考えられる。また、本研究で育成された突然変異体でDNA多型が検出されれば、突然変異体と野生型との品種識別マーカーとしても利用でき、農産物の信頼を揺るがす品種名・産地偽装や不正利用の問題解決にもつながる。

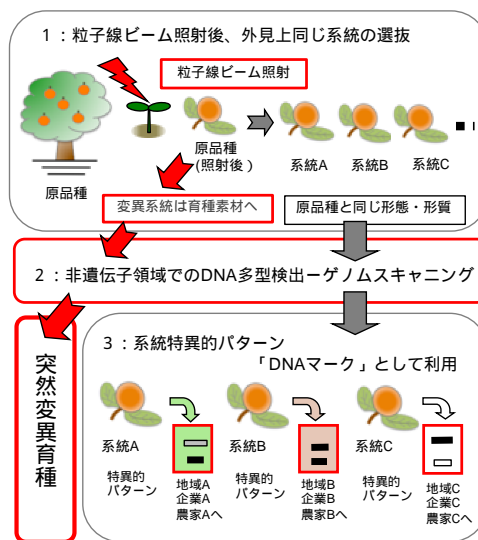
研究成果の概要（英文）：In order to promote mutation breeding in fruit trees, we locally irradiated seeds, seedlings and scions of some citrus cultivars with heavy ion beams, and investigated the effects of different nuclides and absorbed doses on their survival rate, growth and morphological variation. Although differences in survival rates were observed depending on the irradiation targets and nuclides, survival rate decreased with increasing absorbed dose. Some irradiated plants showed abnormalities in growth and morphology such as slow growth, dwarfing and leaf shape.

研究分野：園芸科学

キーワード：イオンビーム 果樹 カンキツ DNAマーカー 突然変異育種

1. 研究開始当初の背景

突然変異育種は、作物の品種改良において重要な方法の一つである。特に果樹では、芽条変異（枝変わり）による自然突然変異からの品種が多く存在し、現在の果樹産業をリードしている。近年、より効率的に突然変異を誘発させるために、サイクロトロンにより加速された重粒子線（イオンビーム）照射が植物の突然変異育種に利用されている。イオンビーム育種技術は、ガンマ線や X 線と比べ、局所的に高エネルギーを付与できる、変異の幅が広く、新しい形質が得られる、ごく低線量でも目的形質の改良を実現できる、などの特徴を有し、多くの作物で突然変異品種が育成されている。一方で、現在育種に利用されているイオンビームの核種は、炭素やネオンが多く、これらの核種より分子量の大きいアルゴンや鉄の照射事例は少なく、核種の違いが植物体の変異に及ぼす影響について不明な部分が多い。また、変異が得られてもその形質が安定せず、キメラ状態になることが多く、その解消に労力を要する。永年性作物である果樹では、多くの照射実験が実施されていながら、他の作物と比べその成果は乏しい。これは、開花年限が長いことに加え、栽培条件の異なる形質評価、特に果実品質は、より時間が必要であることが理由として考えられる。研究代表者らは、これまでに品種内識別・産地判別の技術として「DNA マーキング」の開発を行ってきた（松山、2009）。この技術は日本が世界を先導するイオンビーム生物照射高度化技術と予め決めた非遺伝子領域の配列に入る変異を検出するという概念に基づく本研究独自の「反復配列トラップ」を活用し、結果としてゲノム DNA に「マーク」を付加する技術である。この技術を使い、栄養繁殖性の園芸作物の多芽体や種子、実生にイオンビーム照射を行い、同一形態形質かつ異なる DNA パターンを安定的に有する系統の育成に成功してきたが、選抜の中で形態変異が認められる個体も複数得ることができた（松山ら、2016）。よって、この技術を応用することで果樹でもイオンビーム照射による効率的な突然変異育種が可能であると考へた（第 1 図）。そのためには、より多くの作物で、より効率的に突然変異体を誘導するための科学的な基礎的データの蓄積が必須となる。



第 1 図 DNA マーキングの概要と突然変異育種への展開

2. 研究の目的

近年、イオンビーム照射が植物の突然変異育種に利用され多くの品種が育成されているが、永年性作物である果樹ではその成果は少ない。研究代表者らは、これまでに栄養繁殖性作物、特に園芸作物の品種内識別技術として、イオンビーム照射を経て、同一形態形質かつ異なる DNA パターンを得る「DNA マーキング」の開発を行ってきた。その中で、鑑賞用カンキツであるシキキツの珠心胚実生（クローン実生）の胚軸への局所照射を行った結果、一回の照射によりキメラ性を回避し形態変異を有する個体が得られたため、この技術を応用することで果樹でも効率的に突然変異体誘導ができるものと考えた（第 1 図）。そこで本研究では、イオンビーム照射による突然変異育種を推進させるために、我が国の代表的な果樹であり、突然変異により品種群が形成されているカンキツ類の種子、実生および穂木に対し、重粒子線の局所照射を実施し、核種および吸収線量の違いが対象物の生存率、成育および変異に及ぼす影響について調査した。

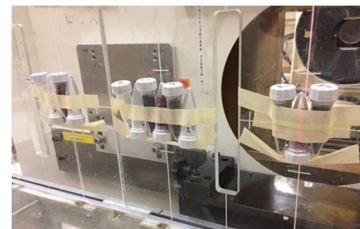
3. 研究の方法

種子への照射実験

種子へのイオンビーム照射実験は、2019 年から 2021 年にかけて実施し、静岡大学農学部附属地域フィールド科学教育研究センター藤枝フィールド栽植のタチバナ [*Citrus tachibana* (Makino) Tanaka]、ナツダイダイ (*C. natsudaidai* Hayata)、ニンボウキンカン (*Fortunella crassifolia* Swingle) およびマメキンカン [*F. hindsii* (Camp. ex Benth.) Swingle] の成熟果から採取した完全種子を用いた。

各種子に、炭素 (C、290MeV/u、LET 14keV/μm)、アルゴン (Ar、500MeV/u、LET 89keV/μm) および鉄 (Fe、500MeV/u、LET 185keV/μm) の 3 種類のイオンビームを、0、5、10、25、50 および 100Gy の吸収線量で照射した。

イオンビーム照射後、各種子を 128 穴セル成型トレイに各処理区およそ 45~50 粒播種した。播種後、25°C16 時間日長条件下で、播種 15 週後まで 1 週間隔で発芽数を調査した。また、播種 20 週後の各処理区の照射実生の生育を観察した。



第 2 図 HIMAC でのイオンビーム照射の様子

実生への照射実験

実生への照射実験は 2019 年と 2020 年に行った。本学藤枝フィールド栽植のウンシュウミカン (*C. unshiu* Marcow.) の‘青島温州’、ニンポウキンカンおよびマメキンカンを試した。成熟果から取り出した完全種子を寒天培地に播種し、発芽後 10 日程度の実生の上胚軸に Fe のイオンビームを照射した。吸収線量は 0、10、25 および 50Gy とした。イオンビーム照射後、イオンビーム照射後、実生をパーミキュライトの入った 2 号ポリポットに移植した。移植後、各処理区の実生の生育を観察し、照射 6 か月後に生存率を調べた。なお、各処理区 5~23 本の実生を試した。

穂木への照射実験

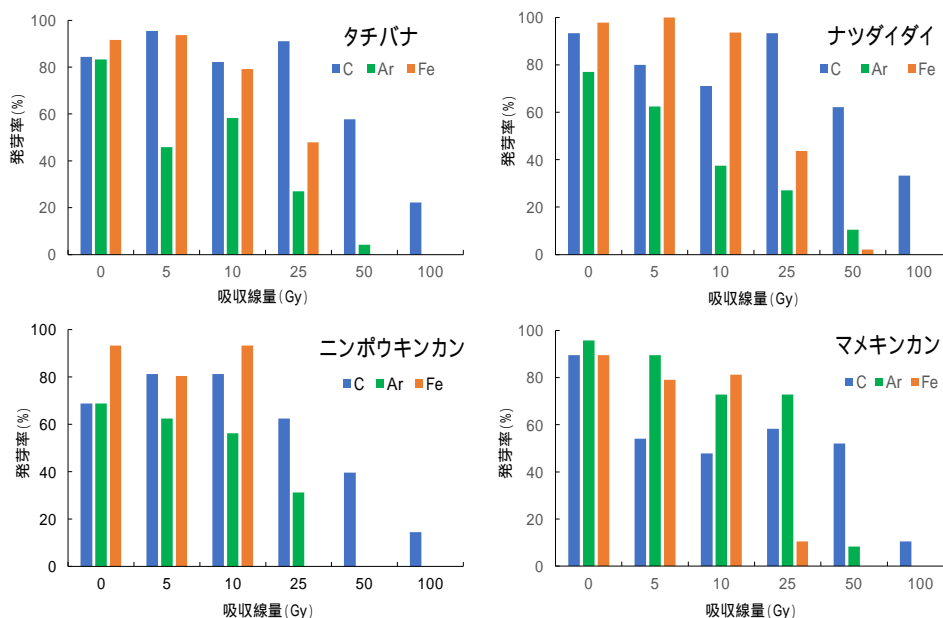
穂木への照射実験は 2021 年に実施した。本学藤枝フィールド栽植のウンシュウミカン‘青島温州’ (*C. unshiu* Marcow.) の一年生枝 (穂木) を試した。2cm 長に調整した穂木全体に C と Fe のイオンビームを照射した。吸収線量は 0、2、5、10、25 および 50Gy とした。照射後、穂木を 3 か月齢のカラタチ [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] 実生の台木に新梢接ぎ木を行った。1 処理区当たり 15 本新梢接ぎ木を行った。接ぎ木 6 か月後に萌芽率を調査し、接ぎ木 12 か月後に樹高、幹の太さおよび展葉数を調査した。なお、各処理区 10 本の接ぎ木個体を試した。

なお、すべての実験におけるイオンビーム照射は、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の重粒子線がん治療装置 (HIMAC) を用いて実施した (第 2 図)。

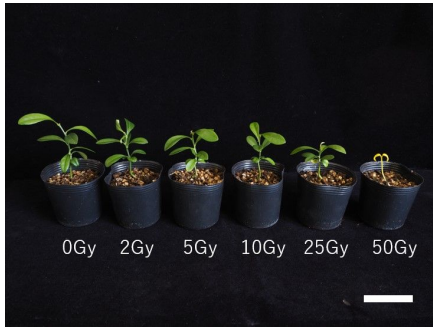
4. 研究成果

種子への照射実験

種子への照射実験では、いずれの種においても吸収線量の増加に伴い発芽のタイミングが遅れが生じ、発芽率も低下した。さらに、核種の種類によっても差が認められた (第 3 図)。例えば、ニンポウキンカンでは、C の 25Gy 照射区で発芽率が 62.5%であったのに対し、Ar の 25Gy 照射区では 31.3%と低く、さらに Fe の 25Gy 照射区では全く発芽が見られなかった。残りの 3 種も同様の傾向が認められた。次に、実生の生育調査を行った結果、樹高は吸収線量の増加に伴い低くなった (第 4 図)、展葉数と節間長は多くの照射区で吸収線量の増加に伴い値が低くなった。



第 3 図 イオンビームの核種と吸収線量の違いがカンキツ類 4 種類の種子の発芽率に及ぼす影響



第4図 マメキンカン種子への Fe イオン
 びーム照射の吸収線量の違いが
 発芽実生の生育に及ぼす影響
 (Bar=5cm)

第1表 鉄 (Fe) イオンビームの吸収線量の違いが
 各カンキツ類実生の生存に及ぼす影響

種・品種	照射強度 (Gy)	供試実生数	生存数	生存率 (%)
'青島温州'	0	13	11	84.6
	10	23	21	91.3
	25	18	4	22.2
	50	10	0	0
	50	15	15	100
ニンボウキンカン	0	15	15	100
	10	17	15	88.2
	25	5	4	80.0
	50	10	0	0
マメキンカン	0	20	18	90.0
	10	17	13	76.5
	25	11	10	90.9
	50	9	0	0
	50	9	0	0

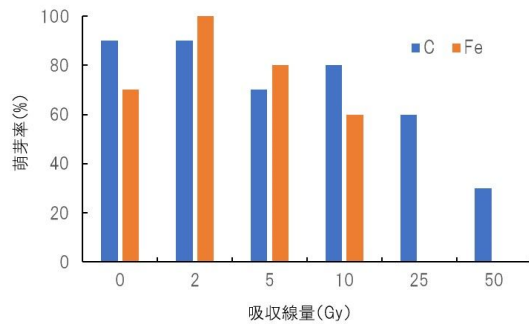
実生への照射実験

本実験で供試した 3 種類のカンキツ類すべてにおいて、Fe 照射では 25Gy 照射区までは実生の生存が認められたが、50Gy 照射区では全て枯死した (第 1 表)。ニンボウキンカンとマメキンカンは、25Gy 照射区の生存率は無照射区と同程度であったが、'青島温州' の 25Gy 区の生存率は 22.2% と、無照射区と比べると低く、植物材料の種類によって吸収線量が生存率に及ぼす影響が異なった。照射後の実生の成育は種子への照射と同様に、照射強度の増加に伴い生育が劣った。

穂木への照射実験

穂木への照射結果も、種子や実生の照射実験と同様に吸収線量の増加に萌芽率も低下するとともに、核種の違いによっても差が認められ、原子番号が大きい Fe の方が低い吸収線量で枯死が認められた (第 5 図)。すなわち、C の 25Gy 照射区の萌芽率が 60% であったのに対し、Fe の 25Gy 以上の照射区では全く萌芽が認められなかった。

接ぎ木後の生育は、C 照射区 (0Gy ~ 50Gy) では 5Gy までは無照射の個体と比べて旺盛な成長を示したが、それ以上の吸収線量の照射区の成長は無照射区と同程度または劣っていた (第 2 表)。それに対し Fe 照射区 (0Gy ~ 10Gy) の接ぎ木個体の成長に差は認められなかった。ただ、両照射区共に照射区から葉が小型化したり、舟状になるものが認められた (第 6 図)。



第5図 イオンビームの核種と吸収線量の違いが
 '青島温州'穂木の接ぎ木後の萌芽率に
 及ぼす影響

第2表 イオンビームの核種と吸収線量の違いが接ぎ木後の'青島温州'接ぎ木苗の
 初期生長に及ぼす影響

核種	吸収線量 (Gy)	樹高 (cm)	幹の太さ (mm)	展葉数
C	0	13.1±4.0	4.9±0.6	11.0±4.5
	2	17.6±7.3	5.8±1.4	14.4±4.9
	5	19.3±10.7	5.6±1.7	13.0±6.4
	10	12.4±3.4	4.7±0.7	12.4±5.5
	25	9.4±1.7	4.2±0.5	7.8±2.1
	50	10.9±4.7	5.4±1.9	7.3±2.6
Fe	0	19.4±4.1	5.0±0.4	13.3±3.3
	2	14.3±6.3	4.2±0.7	12.5±4.0
	5	16.3±6.3	4.9±0.4	14.8±4.7
	10	17.2±6.7	4.8±0.4	14.0±3.7
	25	-	-	-
	50	-	-	-

以上より、種子、実生および穂木へのイオンビーム照射すべてにおいて、核種や吸収線量の違いによって影響が異なり、核種の原子番号が大きいほど、加えて吸収線量が高いほど発芽率や実生成育が低下することが明らかになった。

<引用文献>

松山知樹 .2009 .植物品種識別における DNA マーキングという考え方 .化学と生物 47 : 19-69-175 .

松山知樹・川崎賀也・滝澤慶之・戎崎俊一・北村尚・下川卓志・八幡昌紀 .2016 .粒子線照射によるカンキツ変異体 DNA 多型検出について . DNA 多型 24: 112-114 .



第6図 ウンシュウミカン穂木へのイオンビーム照射によって得た葉形変異体(右)の生育の様子 (Bar=10cm)

左：無照射区 右：C-25Gy 区

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松山知樹・小田切正人・斎藤洋太郎・斎藤徳人・北村尚・下川卓志・八幡昌紀・戎崎俊一・和田智之	4. 巻 29
2. 論文標題 カンキツ突然変異体誘発とDNA多型解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 40-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松山知樹・戎崎俊一・和田智之・北村尚・下川卓志・八幡昌紀	4. 巻 27
2. 論文標題 粒子線照射によるカンキツ変異体の育成と DNA多型解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 92-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島田理暉・富永晃好・周藤美希・向井啓雄・下川卓志・松山知樹・八幡昌紀
2. 発表標題 重粒子線照射花粉の受粉がブンタンとその近縁種の果実品質と種子形成に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高垣開・島田理暉・富永晃好・周藤美希・向井啓雄・下川卓志・松山知樹・八幡昌紀
2. 発表標題 重粒子線照射花粉の受粉による半数体ブンタンの作出
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 島田理暉・富永晃好・下川卓志・松山知樹・八幡昌紀
2. 発表標題 重粒子線照射花粉の受粉がブantan‘紅まどか’の果実品質と種子形成に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 島田理暉・杉浦颯希・細口知椰・富永晃好・下川卓志・松山知樹・八幡昌紀
2. 発表標題 イオンビームの元素種と吸収線量の違いがキンカンの種子発芽と実生生育に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山知樹・小田切正人・斎藤洋太郎・斎藤徳人・北村尚・下川卓志・八幡昌紀・戎崎俊一・和田智之
2. 発表標題 カンキツ突然変異体誘発とDNA多型解析
3. 学会等名 日本DNA多型学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松山知樹・下川卓志・北村尚・戎崎俊一・和田智之・八幡昌紀
2. 発表標題 重粒子線局所照射によるカンキツの突然変異体誘発
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	下川 卓志 (Shimokawa Takashi) (20608137)	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 物理工学部・研究統括(定常) (82502)	
研究分担者	松山 知樹 (Matsuyama Tomoki) (30291090)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------