

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14649

研究課題名(和文) 栄養性木本作物における産地判別のための品種内識別DNAマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of DNA markers for identification of intra-cultivars and for discrimination of production region in fruit trees

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：四季成り性のカンキツであるシキキツ(*Citrus mandurensis* Lour.)の実生に対し、根に当たらないように炭素イオンビーム照射を実施し、品種内識別や産地判別用のDNAマーカーの開発を行った。50Gyまでの照射区では無照射区とほぼ同様の成育を示したが、50Gy照射区では、斑入りや葉形異常となるものや、成長が非常に遅く、極小化・矮小化体等を示す照射体が複数観察された。これらの実生の中から1個体DNA多型が検出された。この個体は接ぎ木繁殖後も安定的にDNA多型パターンを維持していた。

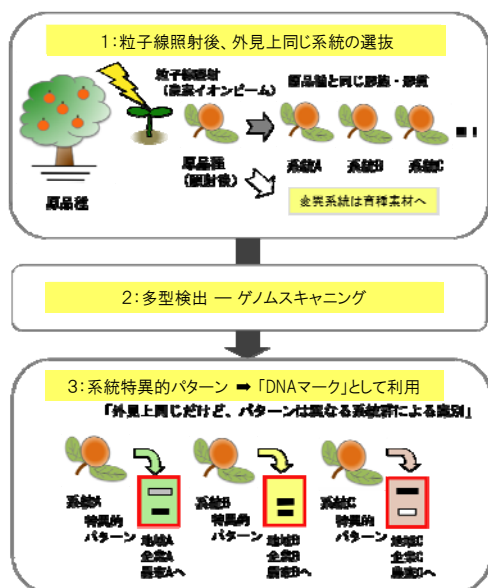
研究成果の概要(英文)：In order to develop DNA markers for identification of intra-cultivars and for discrimination of production region, ion-beam-irradiation was performed for Citrus seedlings except roots. Seedlings obtained from 0 - 30 Gy treatments showed normal growth similar to their controls. However, 50 Gy-irradiated seedlings showed dwarf growth, variegation and mutations of leaf shape. DNA polymorphism was detected from one of them. After grafting propagation, all clones stably maintained the same of DNA polymorphism.

研究分野：果樹園芸学

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

1. 研究開始当初の背景

食品の安全・安心および消費者の信頼確保に係る技術として、DNA マーカーによる取組が進められている。高精度で安定した結果が得られるため、ヒトの個人識別・親子鑑定・犯罪捜査では既に実用され、農作物においても品種識別を目的とした DNA マーカーが幅広い作物種で開発されている。しかし、花き、野菜および果樹の園芸作物品種では芽条変異（枝変わり）など小さな変異により有用形質が付与されるものが多く、マイクロサテライト配列等を使う従来法でのマーカー作出は困難を極める。また、産地判別では同一品種内での比較となり対応はできない。これらの局面打開に向け、本研究課題の共同研究者である松山(化学と生物, 47: 169-175, 2009.) は「DNA マーキング」とする人為的なマークを付与する画期的な技術を考案し、花き類と野菜類において実例を挙げ、変異検出手法を確立した(第1図)。今後も幅広く利用されることが期待されるが、多くの地域特有の有用資源を有する栄養繁殖性木本作物である果樹では実例がないのが現状である。



第1図 「DNA マーキング」のイメージ

2. 研究の目的

ウンシュウミカンをはじめとするカンキツ類は日本全国で栽培され、栽培技術や加工の違いによるブランド化の事例も多い。このような果樹において、品種内識別に資する複数の DNA マーク系統を用意しておくことは地域ブランドや地域グループの生産から消費に至る積極的な取組を保証するツールとして多大な貢献を示すことができる。本研究では、静岡県特産果樹であるカンキツ類を供試し、それらの実生の茎頂に重イオンビーム照射を実施し、品種内識別や産地判別用の DNA マークの開発を行う。

3. 研究の方法

植物材料

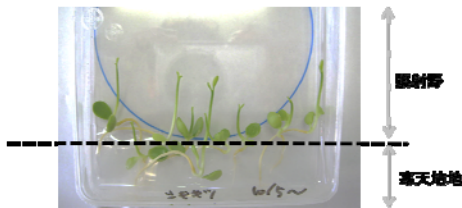
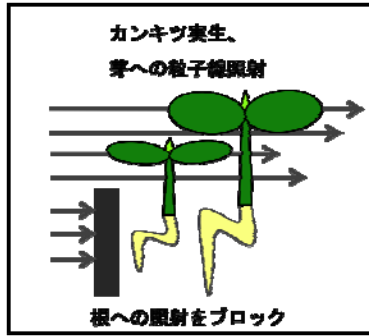
カンキツ類の多くは無性的な胚形成能（珠心胚形成）を有する。そのため一つの種子から複数の実生が生じる。このうち1つは交雑胚由来であり、残りは珠心胚由来の母系クローンとなる。本研究の材料として四季成り性のシキキツ (*Citrus mandurensis* Lour.) の実生を供試した。

重イオンビーム照射

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、発芽 10 日後のカンキツ実生の上胚軸に炭素イオンビーム (290MeV/u, LET 13-20keV/μm) を照射した(第2図, 第3図)。照射強度は 0~100Gy とした。



第2図 HIMAC のイオンビーム照射口



第3図 カンキツ実生への粒子線照射方法

生存・育成調査

イオンビーム照射後、実生をバーミキュライトの入ったポットに移植した。その後、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。

DNA 多型解析

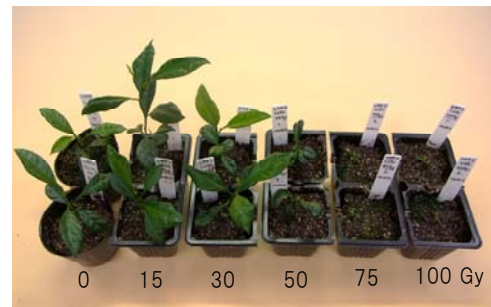
DNA 抽出、プライマーデザイン、PCR 反応および DNA 多型検出は、Shirao ら (Molecular Breeding 31: 729-735, 2013) の改良 RAPD による解析法を適用した。プライマーとして、改良 RAPD プライマー (15mer) 40 種と AP-PCR 用プライマー (TrimPBS) とのセットによる計 80 種を用いた。

4. 研究成果

照射後の実生の生育については、30Gy までの照射区の実生で葉の一部に斑入りまたは葉形異常が見られたものの、無照射区と同様の成長を示した (第4図)。一方、75Gy 以上の照射区では、実生の成長停止が認められ、

その後枯死した。50Gy 照射区においても成長が停止し、枯死する実生が見られたが、成長停止後しばらくしてから第1節間深部から新たに萌芽する実生が認められた (第5図)。これらの実生の生育過程の観察を継続したところ、無照射区の実生と同様に旺盛な成長を示すものと、極小化・矮小化するものが認められた (第6図)。

なお、照射後6か月におけるシキキツ実生の生存率は、線量の増加に伴い低下した (第1表)。照射後1年以内には、75Gy と 100Gy 照射区の実生はすべて枯死した。



第4図 炭素イオンビームの照射線量の違いがシキキツ実生の初期成長に及ぼす影響 (照射後2か月)



第5図 各処理区における照射後のシキキツ実生の成長様子 (照射後2か月)



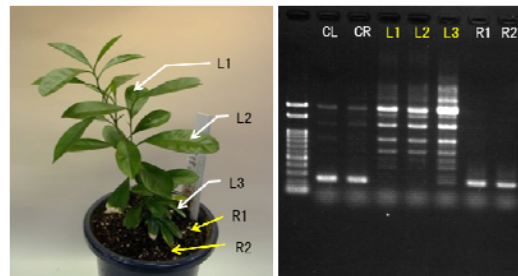
第 6 図 50Gy 照射区におけるシキキツ実生の生育の様子（照射後 3 か月，矢印は旺盛な成長を示す実生を指す）

第 1 表 炭素イオンビームの照射線量の違いがシキキツ実生の生存（照射後 6 か月）に及ぼす影響

照射強度 (Gy)	供試実生数	生存数	生存率
0	30	29	96.7
15	10	10	100
30	15	11	73.3
50	50	34	68.0
75	10	4	40.0
100	15	3	20.0

次に、実生の葉を用いて 80 種の改良 RAPD プライマーセットによる変異スクリーニングを行ったところ、50Gy 照射区の生育が劣る実生 3 個体から DNA 多型が検出された。2 個体については有性胚由来であったが、1 個体（系統番号 503）は珠心胚由来で安定した DNA 多型が認められた。すなわち、第 7 図に示すように、503 における根（非照射野）のバンドパターンは無処理の珠心胚由来実生の根および葉と同一であったが、照射野にあった葉のバンドパターンとは異なっていた。そして、503 の別枝の葉（3 か所）で多型解析を行ったところ、全て同じバンドパターン

を示し、キメラ性が回避されていた。なお、503 の初期生育としては、無照射区と比べ成長がやや劣り、葉が小さくなるなどの特徴を有した。



第 7 図 50Gy 照射区から得られたシキキツ実生（系統番号 503）における葉と根のバンドパターンの比較（CL:無照射実生の葉，CR:無照射実生の根，L1・L2・L3:503 の葉，R1・R2:503 の根）



第 8 図 カラタチ台への接ぎ木後の 503 の生育の様子（接ぎ木後 1 年，左:無照射区，右:503）

この 503 をカラタチやヒリュウに接ぎ木を行い、バンドの DNA 多型パターンを解析した結果、接ぎ木繁殖後も安定的に DNA 多型パターンを維持していた。また、503 は接ぎ木後も無照射区と比べ生育がやや劣り、葉が小さくなる特徴を示している（第 8 図）。以上から、503 はイオンビーム照射によりキメラ性を回避した突然変異を起こしている可能性が示唆された。

本研究課題では静岡県特産果樹であるカンキツ類の実生に重イオンビーム照射を実施し、品種内識別や産地判別用の DNA マーク開発を行ったが、炭素イオン 50Gy 照射区で「DNA マーク」系統の作出に成功した。また、生育や葉の形態に変異も認められた。これらの成果は、本法が品種・系統識別のための DNA マーク作出のみならず、カンキツあるいは木本植物育種において枝変わりの効率的な変異誘発法として新たな展開に繋がる知見と考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

①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. 査読無.

②松山知樹・北村尚・八幡昌紀. 2015. 粒子線照射によるカンキツ変異体誘発と DNA 多型解析. DNA 多型 23: 21-23. 査読無.

[学会発表] (計4件)

①松山知樹・下川卓志・北村尚・戎崎俊一・和田智之・八幡昌紀. カンキツ粒子線照射変異体の育成と接ぎ木による増殖. 園芸学会平成 29 年度秋季大会, 2017 年.

②渡邊桐瑚・八幡昌紀・周藤美希・宮澤俊義・成瀬博規・増田幸直・富永晃好・向井啓雄. γ 線照射した四倍体の花粉の受粉がブント類の種子形成と果実品質に及ぼす影響. 園芸学会平成 29 年度秋季大会, 2017 年.

③松山知樹・戎崎俊一・和田智之・北村尚・下川卓志・八幡昌紀. カンキツ変異体選抜で検出される DNA 多型について. 日本 DNA 多

型学会, 2016 年.

④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. カンキツ実生への粒子線照射について. 園芸学会平成 27 年度秋季大会, 2015 年.

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

松山 知樹 (MATSUYAMA, Tomoki)

国立研究開発法人理化学研究所・戎崎計算

宇宙物理研究室・専任研究員

研究者番号: 30291090

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし