

(様式 3)

農業研究成果情報

No. 813 (平成 30 年 5 月) 分類コード 12-04 熊本県農林水産部

### レタス「ラウンド」のプロトプラストからの再分化条件及びイオンビーム照射の影響

レタスプロトプラストからの再分化カルスはプロトプラスト密度 300~350 個/cm<sup>2</sup> で効率的に得られる。また、炭素イオンビーム (<sup>12</sup>C<sup>6+</sup>) によるカルスの半数致死線量 (=半数カルス生存線量) は 3.3Gy である。

農業研究センター農産園芸研究所バイオ育種研究室 (担当者: 野田孝博)

#### 研究のねらい

突然変異育種においてキメラ個体 (異なった遺伝情報を持つ細胞が混在している個体) の発生が形質の安定性に問題となる。このことを回避するため単細胞であるプロトプラストの変異誘導から再分化する方法が有効である。また近年、有用な遺伝子変異誘導法として放射線のひとつであるイオンビームが種々の農作物育種に利用されている。

そこで、レタスの突然変異育種のためプロトプラストから効率的な再分化条件及びプロトプラストに対するイオンビーム照射条件 (半数致死線量) を明らかにする。

#### 研究の成果

1. レタスプロトプラストからの再分化個体はプロトプラスト密度 300~350 個/cm<sup>2</sup> で効率的に得られる。(表 1、図 1)。
2. 炭素イオンビーム (<sup>12</sup>C<sup>6+</sup>) を照射した場合、照射量が高くなるに従いカルス生存率は直線的に低下し、半数致死線量 (=半数カルス生存線量) は 3.3Gy である (図 2)。

#### 普及上の留意点

1. 本試験においては供試した品種「ラウンド」「カイザー」「ゴジラ」「ブリザード」「Vレタス」のなかで最も再分化効率が良好であった「ラウンド」を用いている。他品種を供試する場合は再分化効率などにおいて品種間で差異を生ずる可能性があるため、供試品種ごとに検討を要する。
2. 2 Gy 以上の照射量によって約 300 個体のカルスから 1 塩基変異/約 1.8Kbp の個体が得られた (表 2)。
3. イオンビーム照射は理研リングサイクロトロンにて実施。
4. 詳細な実験条件等は公表論文を参照。

・澤田ら(2016) 園学研 15(4):347-353

表 1 プロトプラスト濃度・密度のカルス形成及び再分化に対する影響

| プロトプラスト濃度<br>(mL <sup>-1</sup> ) | プロトプラスト密度 <sup>z</sup><br>(個/cm <sup>2</sup> ) | カルス形成数 <sup>y</sup><br>(個/cm <sup>2</sup> ) | 再分化カルス数<br>(個/cm <sup>2</sup> ) | 再分化率 <sup>x</sup><br>(%) |
|----------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| 0.63×10 <sup>4</sup>             | 297.2                                          | 0.99 ab <sup>w</sup>                        | 0.62 b                          | 62.5 b                   |
| 0.75×10 <sup>4</sup>             | 353.9                                          | 1.07 b                                      | 0.63 b                          | 58.3 b                   |
| 0.88×10 <sup>4</sup>             | 415.2                                          | 0.80 ab                                     | 0.38 ab                         | 47.9 ab                  |
| 1.00×10 <sup>4</sup>             | 471.8                                          | 0.62 a                                      | 0.13 a                          | 20.8 a                   |

<sup>z</sup>各濃度に調整されたプロトプラスト浮遊液を 3.0 mL/9cm ペトリ皿に分注.

<sup>y</sup>カルス形成は 28 日間培養後 1.0 mm 以上に成長したコロニー数をカウント.

<sup>x</sup>再分化カルスは 28 日間培養後シュートを形成したカルスをカウントし算出((再分化カルス/カルス形成数)×100).

<sup>w</sup>異なるアルファベット間で有意差あり(p<0.05, Tukey's 多重比較; n=3).

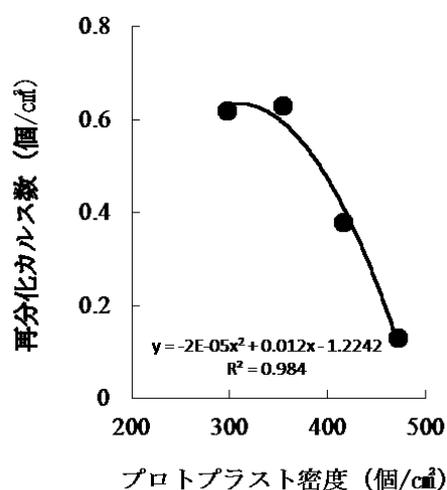


図 1 プロトプラスト密度が再分化カルス形成に及ぼす影響

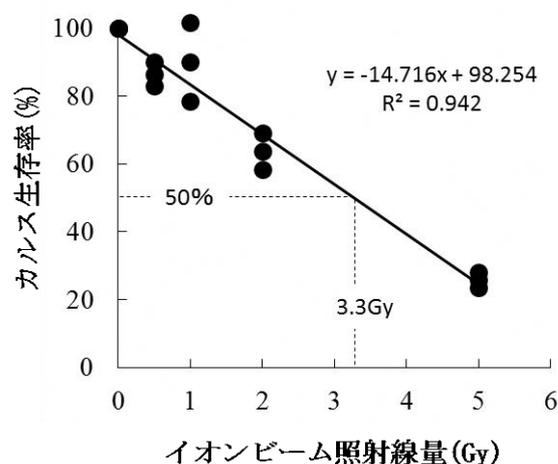


図 2 イオンビーム照射線量がカルス生存に及ぼす影響

カルス生存率は(カルス形成数)/(未照射(0Gy)時のカルス形成数)×100で算出。プロトプラスト密度 353.9 個/cm<sup>2</sup> (濃度 0.75×10<sup>4</sup> mL<sup>-1</sup>) で照射.

表 2 イオンビーム線量と遺伝子変異

| 線量<br>(Gy) | カルス数 | 変異検出カルス数 <sup>z</sup> |
|------------|------|-----------------------|
| 0.5        | 261  | 0                     |
| 1          | 275  | 0                     |
| 2          | 249  | 1                     |
| 5          | 91   | 1                     |

変異検出領域はレタス PPO 遺伝子 (AFSA01050692) の 1819bp の領域.

<sup>z</sup>塩基変異の検出は TILLING 法 (McCallum et al. Nature Biotechnology 18: 455 (2000)) による.