

重イオンビーム照射によるレタス低褐変変異誘導と その育種的利用

澤田, 倫平

<https://hdl.handle.net/2324/2534491>

出版情報：九州大学, 2019, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 澤 田 倫 平

論文題名 : 重イオンビーム照射によるレタス低褐変変異誘導とその育種的利用

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、わが国の主要野菜品目であるレタス (*Lactuca sativa* L.) において、突然変異処理によって切り口が褐変しにくい系統 (低褐変系統) を作出するとともに、DNA マーカーを利用した低褐変品種育成法について明らかにしたものである。

まず、突然変異処理によるキメラ個体の発生を回避するため、プロトプラストへの変異誘導について検討した。熊本県で栽培されている主要 3 品種 (‘冬シスコ’, ‘ラウンド’, ‘ゴジラ’) を用いたプロトプラスト培養において、コロニー誘導培地 1 枚当たりから得られる 1.0 mm 以上のコロニー数、シュート形成率を比較した結果、‘ラウンド’ のシュート形成率が最も高いことが示され、シュート形成に最適なプロトプラスト濃度も明らかにした。

Gelrite に包埋されたプロトプラストに対して炭素イオンビーム ($^{12}\text{C}^{6+}$) を照射した結果、コロニー形成率は照射線量増加にともなって直線的に低下し、半致死線量は約 3.3Gy であった。炭素イオンビームを照射したプロトプラストから得られたカルス集団 (M_1) について、TILLING 法による *PPO* 遺伝子変異を調査したところ、スクリーニングした 869 個の M_1 集団のうち、2Gy, 5Gy 照射カルスの各 1 個体に *PPO* 遺伝子領域の変異が検出された。

変異が検出された 2 個体のカルス (カルス番号 2Gy-3-36, 5Gy-2-27) および無照射 (対照) カルスから誘導された再分化個体を順化し、葉の *PPO* 活性を測定したところ、5Gy-2-27 由来の再分化個体では無照射との間に *PPO* 活性の差は認められなかったが、2Gy-3-36 由来の再分化個体では無照射と比較して *PPO* 活性が約半分であり、対立遺伝子の一方に機能喪失変異が生じた可能性が考えられた。

PPO 活性の低下が認められた再分化個体 (M_1) を栽培した結果、結球性が認められた。一方、 M_1 の自殖種子 (M_2) 集団を栽培したところ、一部の個体は結球性を示したが、ほとんどの個体が結球性を示さず、プロトプラスト培養やイオンビーム照射によって *PPO* 遺伝子以外にも変異が生じたと考えられた。 M_2 集団について *PPO* 活性と TILLING 法による多型解析を行ったところ、「野生型と比較して *PPO* 活性が明らかに低いホモ (aa) 個体」、「*PPO* 活性が野生型と同等以上のホモ (AA) 個体」、そして「*PPO* 活性が上記 aa 個体と AA 個体との中間型を示したヘテロ (Aa) 個体」に分けられ、これらの分離比より、*PPO* 活性低下は単一の *PPO* 遺伝子変異による形質と考えられた。 M_2 集団で *PPO* 活性が低かった aa 個体の後代 (M_3) と ‘ラウンド’ (対照) の葉身を先端部と基部に分け、切断後の褐変程度の経時変化を観察したところ、葉身基部では明確な差は認められなかったが、葉身先端部において変異型の方が対照よりも褐変程度が低く、調製粉体の比色による比較でも同様の傾向が認められた。

低 *PPO* 活性を示した aa 個体における *PPO* 遺伝子のシーケンスを行ったところ、5' 側最初の塩基であるアデニンを 1 番目とした場合、380 番目の塩基が対照 (AA 個体) の ‘ラウンド’ ではシトシンであったのに対して、aa 個体ではアデニンであり、TILLING 法の結果から推定される変異箇所と一致していた。この配列情報をもとに CAPS 法による遺伝子型判別について検討した結果、制限酵素 *Mnl* I による切断断片長多型により AA 個体、Aa 個体、および aa 個体を明確に区別でき、それに

より判断された各個体の遺伝子型は、TILLING 法およびポリフェノールオキシダーゼ酵素活性により判断された遺伝子型と完全に一致することが示された。

本研究で得られた低 PPO 活性を示した aa 個体では、野生型である‘ラウンド’と比較して明らかに結球性が低下したため、戻し交雑による結球性の回復を試みた。開発した CAPS マーカーを用いながら‘ラウンド’を父本または母本とした連続戻し交雑を行った結果、BC₃M₃ 集団では結球率および全重、結球重等の形質が‘ラウンド’と同程度であった。さらに、その集団から選抜した劣性ホモ個体の葉身上部のカットレタスの褐変性は、‘ラウンド’と比較して低く、加工用途に向く実用性の高い低褐変レタス系統を育成することができた。

以上のように、プロトプラストへの重イオンビーム照射によって低褐変レタス系統を作出でき、同形質のジェノタイピングも行うことができた。また、低褐変形質個体を選抜するための CAPS マーカーも構築でき、同マーカーを利用することによって低褐変品種を効率的に育成できることが実証された。