

**[成果情報名]**レタス「ラウンド」のプロトプラストからの再分化におけるプロトプラスト密度及びイオンビーム照射の影響

**[要約]**レタス「ラウンド」の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>で高い率で得られる。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。

**[キーワード]**レタス、プロトプラスト、イオンビーム照射条件、再分化条件

**[担当]**熊本県農業研究センター・農産園芸研究所・バイオ育種研究室

**[代表連絡先]**電話 096-248-6445

**[分類]**研究成果情報

**[背景・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) の発生が形質の固定の上で問題となる。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、レタスプロトプラストからの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。

**[成果の内容・特徴]**

1. レタス「ラウンド」由来のプロトプラストからの再分化シュートはプロトプラスト密度 300~350 個/cm<sup>2</sup>が多い (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)。

**[成果の活用面・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. 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した。
3. レタス褐変との関与が考えられる既知のポリフェノール酸化酵素 (PP0) 遺伝子約 1.8Kbp の領域において、2 Gy 以上の照射量によつての遺伝子変異を有するカルスが得られた (表 2)。このことから、PP0 遺伝子の機能欠失による、切り口が褐変しにくいレタスの育種素材の作出等への活用が期待される。

[具体的データ]

表1 プロトプラストの濃度・密度とカルスの形成数・再分化率

プロトプラスト濃度 (mL <sup>-1</sup> )	プロトプラスト密度 <sup>z</sup> (個/cm <sup>2</sup> )	カルス形成数 <sup>y</sup> (個/cm <sup>2</sup> )	再分化カルス数 (個/cm <sup>2</sup> )	再分化率 <sup>x</sup> (%)
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 3.0mL/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>再分化率は 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) 。

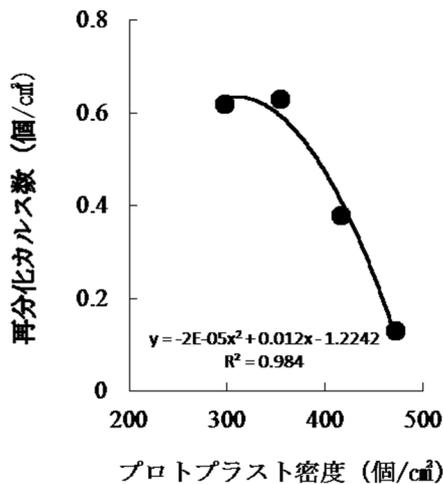


図1 プロトプラスト密度と再分化カルス形成

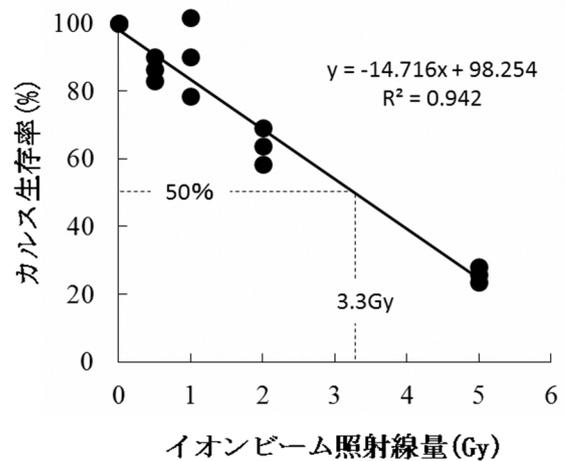


図2 イオンビーム照射線量とカルス生存率

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 PPO 遺伝子領域における塩基変異

線量 (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。

(熊本県農業研究センター)

[その他]

予算区分：県単

研究期間：2014～2016 年度

研究担当者：澤田倫平、野田孝博

発表論文等：澤田ら (2016) 園学研 15 (4) :347-353