

九州シンクロトロン光研究センター 県有ビームライン利用報告書

課題番号：2102007R

BL番号：BL09

(様式第5号)

ダイジョにおける突然変異系統群の創出 Development of mutant lines by using synchrotron light in water yam (*Dioscorea alata* L.)

濱岡 範光・石橋 勇志
Norimitsu Hamaoka, Yushi Ishibashi

九州大学大学院 農学研究院
Faculty of Agriculture, Kyushu University

- ※1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開〔論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表〕が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より1人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

本研究では、ダイジョの放射線突然変異系統の作出を目的として、前回の実験で推定された最適な X-線照射強度に基づき、900 個体の塊茎片に 20Gy の X-線を照射した。その結果、照射後 90 日目の不定芽分化率は、75%であり予想された値よりもいく分高かった。今後、塊茎形質評価およびゲノム DNA 解析を行い、系統育成を進める予定である。

(English)

In this study, we tried to develop mutant lines of water yam by using X-ray from synchrotron. Based on the results of the previous experiment, 900 tuber pieces were irradiated by using X-rays at doses of 20Gy. As a result, the rate of adventitious bud differentiation was 75% at 90 days after treatment and somewhat higher than expected.

2. 背景と目的

ヤマノイモ属植物の食用種であるヤマイモは、熱帯降雨林から温帯にかけて広く分布し、重要な食料源として世界中で広く栽培されている。その一種であるダイジョ (*Dioscorea alata* L.) は、昨今、ジオスゲニンなどの健康増進物質を含むことが明らかとなり、機能性作物としても注目されている。一般にヤマイモでは、種子は実るものの、そのほとんどが不稔となるため種子繁殖はあまり行われず、新芋やムカゴによる栄養生殖を行う。すなわち、ヤマの栽培・育種においては、可食部である新芋とムカゴの形成を制御することが肝要であるが、これらに関わる生理学的因子はほとんど未解明であり、他の作物と比べて品種育成が遅れている。

近年、ヤマイモの全ゲノムが解読され、ゲノム情報を用いた解析が可能となった (Tamiru *et al.* 2017)。私たちは昨年度までに、ヤマゲノム情報を用いた遺伝子発現解析から、ダイジョ塊茎肥大の抑制に働く候補遺伝子を見出している (鍋嶋ら 2020)。本実験課題は、シンクロトロン光照射によりダイジョ遺伝子欠損変異体群を作出し、それら系統群の中から本候補遺伝子の機能が欠損した系統を選抜することを目的とする。その後、当該遺伝子欠損系統の生理特性を評価することで、本遺伝子の機能を明らかにし、塊茎肥大を早期に開始する早生ダイジョの作出を試みる。当施設における前回の実験において、ダイジョ塊茎における変異誘発に適した線量 (20-25Gy) が明らかになった。そこで本実験では、突然変異系統群の作出に向けて、20Gy の線量で塊茎片 900 個体への照射を行った。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

2020年に九州大学農学部伊都圃場で栽培したダイジョ塊茎 (品種: やまとまこうしゃ) を用い、予め、輪切りにし扇状に切り分けた種芋 (生重 2-3g程度)、900個体の実験サンプルを準備した。

九州シンクロトン光研究センター内のBL09により、塊茎外皮を照射面として、20GyでX-線照射を行った。この時、放射線照射範囲に収まるように種芋を重ねて配置することで (図 1 A)、一度の照射で35-40個体のサンプルへの処理を行った (図 1 B)。

照射後のサンプルは、九州大学農学部伊都圃場空調制御室 (気温: 25±5°C、自然日長) において、パーミキュライトを充填したトレイにおいて適量の水を与えて不定芽を誘導した。萌芽が確認された個体から育苗ポット (0.35L、パーミキュライト充填) に随時移植を行った。現在、適宜灌水して栽培を行っている。

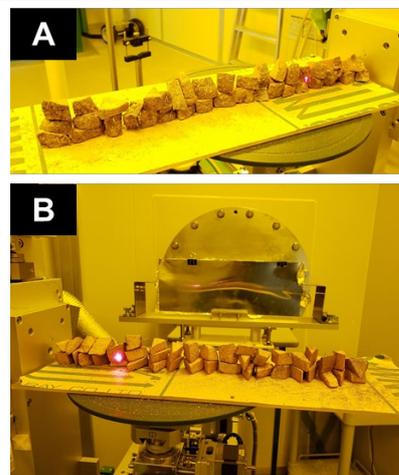


図 1. 照射時の塊茎配置方法
A: 照射面の様子、B: 赤レーザーを用いた照射時ビーム経路の確認

4. 実験結果と考察

表 1 に、照射後 90 日目の生存率 (不定芽分化率) を示す。照射した 900 個体のうち 678 個体で出芽がみられ、75.3 %の生存率であった。この結果は、前回の実験で得られた吸収線量と不定芽分化率の関係により予想された生存率よりもいく分高い傾向があった (図 2)。突然変異誘発における最適照射量の目安となる生存率 50%を加味すると、本実験において不定芽分化した個体の割合は高いと考えられるため、生じた変異についてゲノムレベルで検討していく必要がある (High Resolution Melting 解析・ゲノムシーケンス等)。本研究は、ダイジョの塊茎形質をターゲットとしたものであるため、系統増殖を行った上での形質評価が必須となる。今回の実験で X 線照射した個体については、現在育成中であり、サイズが小さいことから塊茎形質の評価には至っていない。

表 1 照射後の生存個体数および生存率

20Gy 照射個体数	生存個体数	生存率 (%)
900	678	75.3

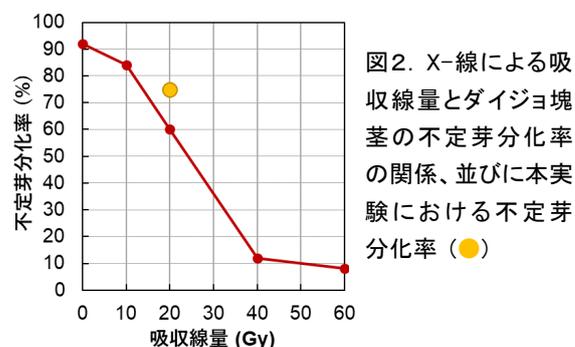


図 2. X-線による吸収線量とダイジョ塊茎の不定芽分化率の関係、並びに本実験における不定芽分化率 (●)

5. 今後の課題

変異体群の形質評価にあたっては、系統の育成・栽培を継続し、葉からゲノム DNA 抽出を行い、リアルタイム PCR 装置を用いた High Resolution Melting 解析を実施する予定である。その中で、候補遺伝子が欠損した系統を見出すことができれば、通常塊茎が肥大しない長日環境下で栽培を行い、塊茎が肥大することを実証したい。一方で、候補遺伝子欠損系統がスクリーニングできなかった場合は、照射強度を 30Gy 程度に再設定し、同様の照射実験を行う必要があると考えられる。また、本手法で得られたダイジョ変異体については、個体内でキメラを生じている可能性があるため、それらをゲノムレベルで詳細に評価し、変異形質の維持・安定性について検討する必要がある。

6. 参考文献

1. Tamiru *et al.* (2017) Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination, *BMC Biology* 15: 86
2. 鍋嶋ら (2020) ヤムイモの塊茎肥大制御機構の解析, *日本作物学会第 249 回講演会要旨集*: 193

7. 論文発表・特許 (注: 本課題に関連するこれまでの代表的な成果) なし

8. キーワード (注: 試料及び実験方法を特定する用語を 2~3) ヤムイモ、ダイジョ、突然変異

9. 研究成果公開について（注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文（査読付）発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後2年以内です。例えば2018年度実施課題であれば、2020年度末（2021年3月31日）となります。）

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文（査読付）発表の報告

（報告時期： 2023年 3月）