

放射線と光技術による育種法開発事業

～放射線利用・原子力基盤試験研究推進交付金（科学技術庁）～

平成11年5月17日

静岡県農林水産部 研究調整室

放射線と光技術による育種法開発事業

～放射線利用・原子力基盤試験研究推進交付金（科学技術庁）～

静岡県農林水産部

研究調整室

1 目的

本県農産物の市場競争力の強化を図るため、主要農産物である茶、ワサビ、メロン等について、機能性を強化した品種や環境調和型品種を育成するシステムの開発と、本県ならではの優良品種を迅速に育成する。

この研究開発のための予算は、科学技術庁が所管する放射線利用・原子力基盤試験研究推進交付金を充当する。

2 事業内容

(1) 効率的な育種・選抜システムの確立

放射線照射による変異の作出と、光分析技術による選抜技術を組合わせて、革新的な育種システムを構築し、優良品種を育成する。

(2) 実施期間

平成9年～13年

(3) 主要対象作物と育種目標

水稲	少肥栽培適応型、低タンパク良食味
メロン	ウイルス病抵抗性
ワサビ	機能性成分（イソチオシアート；辛味成分）
マーガレット	耐高温性、新しい草姿・花型
花き類	日持ち性（カーネーション、ガーベラ）、乾燥・高温耐性（シバ）
茶	高カテキン・低カフェイン、耐病性（炭そ病、輪斑病他）
果樹	温州萎縮病抵抗性台木、ナシ黒斑病抵抗性品種

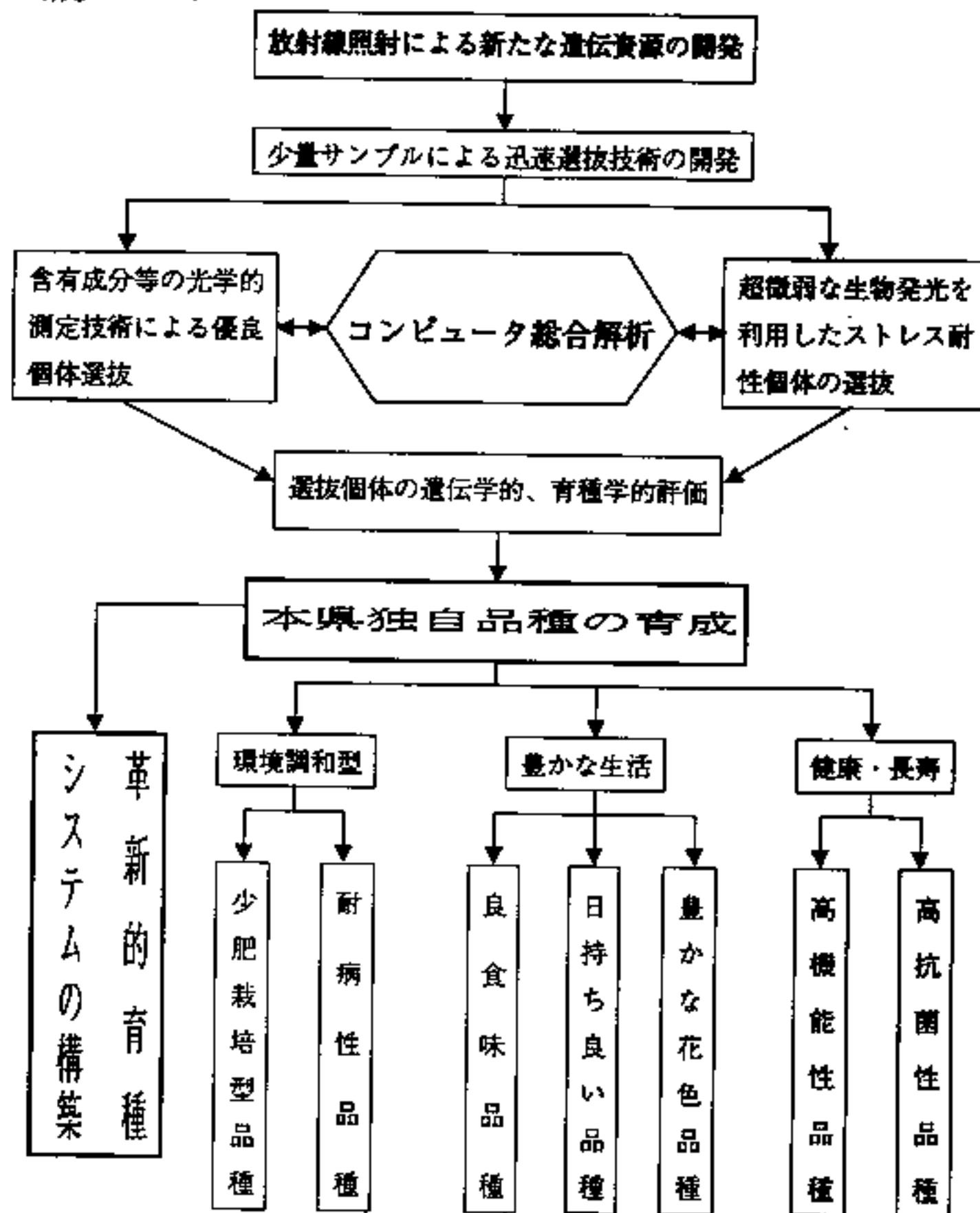
(4) 実施機関

農業試験場、茶業試験場、柑橘試験場、静岡県立大学

(5) 試験研究課題一覧

別紙

＜研究のフロー＞



X 線 照 射

光 技 術 に よ る 高 速 選 抜

成 分 育 種

食味、香気等の良い
品種



生体調節機能などの

機能性強化品種



ワサビ

ストレス耐性育種



マーガレット等



カンキツの
耐病性わい性台木



芝



乾燥

少ない肥料

ストレス



害虫



老化

バラエティーに富んだ
本県独自品種の育成



健康で豊かな生活

環境にやさしい農業

研究課題一覧表

放射線及び光分析技術を活用した革新的な成分育種システムの開発

1 放射線及び光技術の利用による効率的な水稻成分育種システムの開発 (農業試験場)

- ・近赤外法によるタンパクの単粒非破壊測定・選抜体系の確立
- ・非破壊単粒早期検定・選抜法による成分育種体系の確立
- ・光技術を利用した肥料成分吸収能力測定手法の開発
- ・持続的農業展開が可能な少肥栽培向き水稻品種の育成

2 放射線と光技術の利用による効率的なワサビ機能成分育種法の開発 (農業試験場)

- ・近赤外法によるイソチアネート類の非破壊分析法の確立
- ・非破壊選抜法による高イソチオシアネート品種の育成

3 X線と光技術の利用による効率的なチャ成分育種システムの開発 (茶業試験場)

- ・近赤外法によるカテキン・カフェインの少量サンプル非破壊選抜システムの開発
- ・非破壊選抜法による新たな育種素材の開発と品種育成

4 改良品種の生体機能特性に関する評価 (県立大学)

- ・ワサビ、チャの機能性成分の評価と新規生体機能性特性の解明
- ・育成品種の安全性評価

放射線及び光分析技術を活用した革新的なストレス耐性育種システムの開発

5 超微弱光測定技術によるストレス耐性個体の高効率選抜システムの開発 (農業試験場、県立大学)

- ・植物の超微弱発光とストレス耐性との関係解明
- ・高効率超微弱光検出装置の開発とストレス耐性植物選別技術の開発
- ・ストレスに対する情報伝達機構の解析
- ・分子生物学を用いたストレス耐性遺伝子のターゲティング
- ・葉緑素蛍光計測による環境ストレス耐性個体の選抜・解析

6 X線利用によるチャの耐病性個体の選抜 (茶業試験場)

- ・形態的特徴等による病害に対する耐性の簡易検定法の開発
- ・炭そ病、輪斑病、もち病耐性品種の育成

7 放射線利用による果樹の耐病性品種・台木の育成 (柑橘試験場)

- ・形態的特徴等による病害に対する耐性の簡易検定法の開発
- ・黒斑病耐性ナシ品種の育成
- ・果実品質と台木の養水分吸収特性との関係解明並びに選抜手法の開発
- ・温州萎縮ウイルス耐性わい性台木の育成

8 放射線と交雑育種法を組み合わせたマーガレット新育種法の開発 (農業試験場)

- ・組織培養系を利用した変異個体増殖技術の開発
- ・マーケティング力の強い新しいタイプの花き品種の育成

3 主な研究テーマとこれまで得られた成果等（平成9年～10年度）

研究テーマ（実施場所）	これまでに得られた成果
近赤外分析法を活用した低タンパクで食味が良い米の単粒選抜育種システムの開発 （農業試験場）	・変異を発生させる最適なγ線照射量を検討 ・玄米タンパク質単粒分析のための検量線の作成 ・1穂内で粒ごとのタンパク質含量にかなりも差があることを明らかにした。
生体調節機能性成分の高いワサビの迅速な育種システムの開発 （農業試験場）	・変異を発生させるための最適なX線照射量と、植物の生育ステージを明らかにした。 ・うま味に関係するアミノ酸含量が、品種や部位によって差があることを明らかにした。
マーガレット品種の多様化を図るための新しい育種法の開発 （農業試験場）	・照射処理や変異発現のための効率的な組織培養手法を明らかにした。 ・変異を発生させるために必要な放射線量を明らかにした。
植物が発する超微弱な光を測定する技術を活用した、高温乾燥等のストレスに強い作物を選抜するシステムの開発 （農業試験場）	・メロンやタバコについて、病気に対する抵抗性を超微弱光の測定により識別できることを明らかにした。 ・植物のストレスに対する微弱光発生メカニズムには、2つの機構があることを明らかにした。
カテキンなど機能性成分の高い茶や耐病性品種の開発 （茶業試験場）	・花粉の発芽率を指標として、細胞レベルでの最適なX線照射量を明らかにした。 ・挿し穂に変異を誘発しやすいX線照射量を明らかにした。
柑橘のウイルス抵抗性台木及びナシの黒斑病抵抗性優良品種の育成 （柑橘試験場）	・温州萎縮病抵抗性の川野ナツダイダイにγ線を照射し、わい化個体の発生を確認中。 ・ナシ（喜水）の接ぎ穂にγ線を照射し、耐病性個体の発生を確認中。
ワサビや茶品種の生体調節機能や食品としての特性解明 （県立大学）	・ワサビや茶品種の根茎や葉における機能特性を解明するために、ヒト癌細胞等を用いて増殖阻止効果試験を実施中。

光技術と放射線の利用による酒米・おいしい米の育種

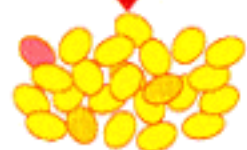
試験場では、単粒成分分析装置を利用して、目的の変異体を早く、的確に選抜し、育種を効率的に行う方法を開発しています。

低タンパク質のイネを育種する

放射線（X線）照射



いろいろな変異が含まれるよう なるべく多くの株から収穫する



様々な変異体が混在する状態

従来の方法では



一粒ずつ播種して栽培

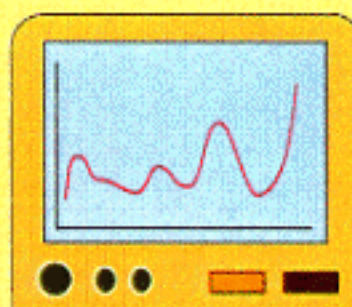


収穫した中の一部を破碎して、化学分析によってタンパク質の含量を調べる



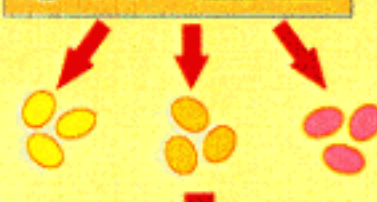
低タンパク質の株を選抜し、栽培する

単粒成分分析装置を利用した場合



収穫した種子のタンパク質含量を瞬時に測定し、選別する

*現在、オートメーションで測定できる装置を開発中



低タンパク質の種子のみを選抜し栽培

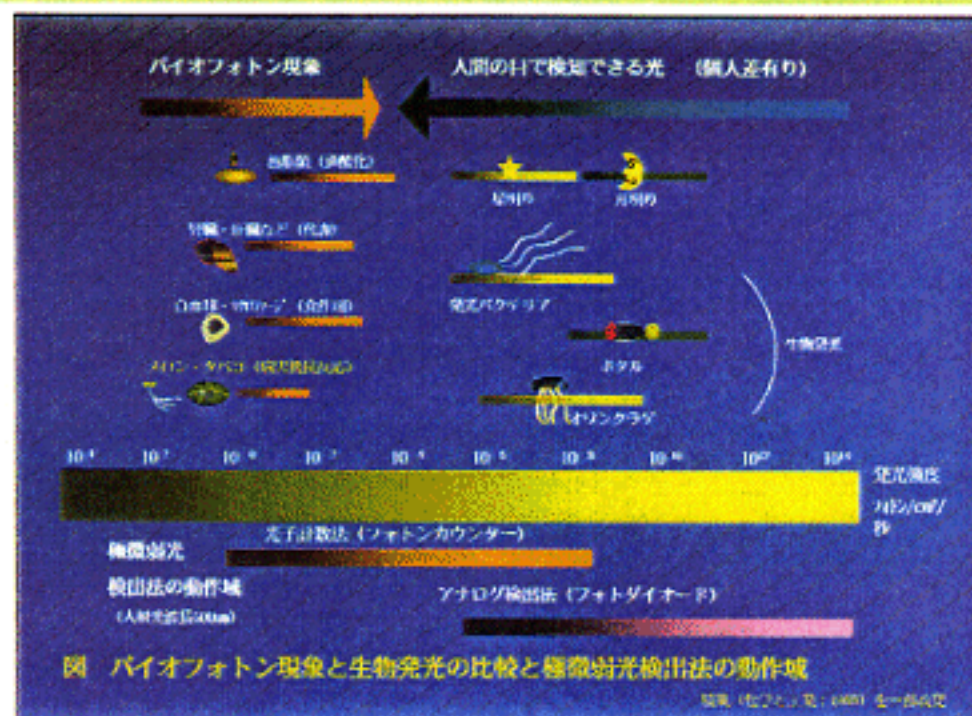
低タンパク質のものだけを効率よく育種できる



光技術によるストレス耐性植物の育種

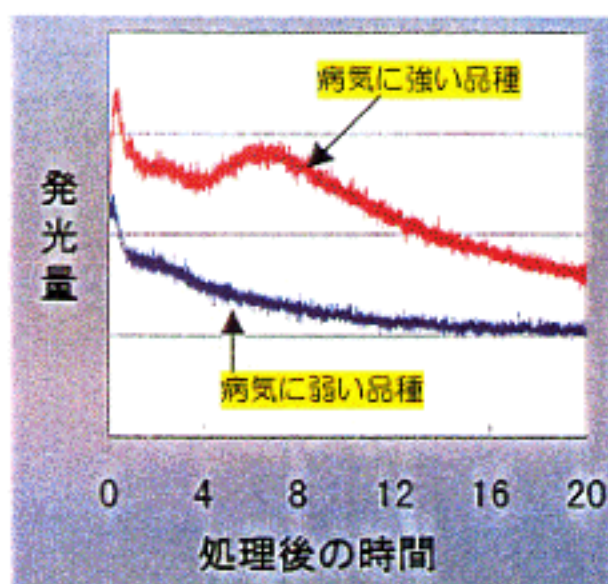
外部からのストレスにさらされた時、そのストレスに強い品種は弱い品種より多くの“バイオフォトン”を発します。

この現象を利用し、病気に強い品種や暑さ寒さに強い品種の選抜を迅速に行うことができます。

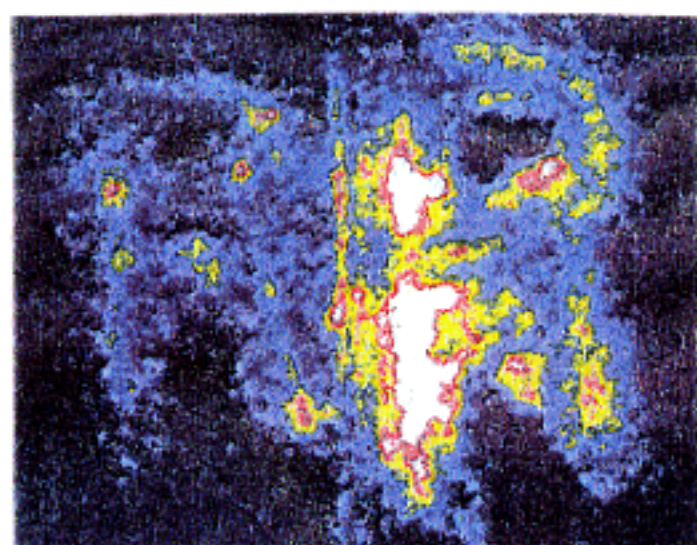


バイオフォトンとは、植物の体内の化学反応に伴って発生する非常に弱い光のことです。

その光の強さは、肉眼で見える最も弱い光の更に数万分の一以下です。



病気に強いメロン品種に病原菌を接種すると発光量が増大する。



サツマイモに「R」の字を書くようにフザリウム菌を接種。右は抵抗性反応が起き光りが出ているが、左は感染し光は少ない。

病気に強いメロン品種に病原菌を接種すると、病害抵抗性反応が起き、弱い品種に接種した時よりもバイオフォトンの発生が増加します。

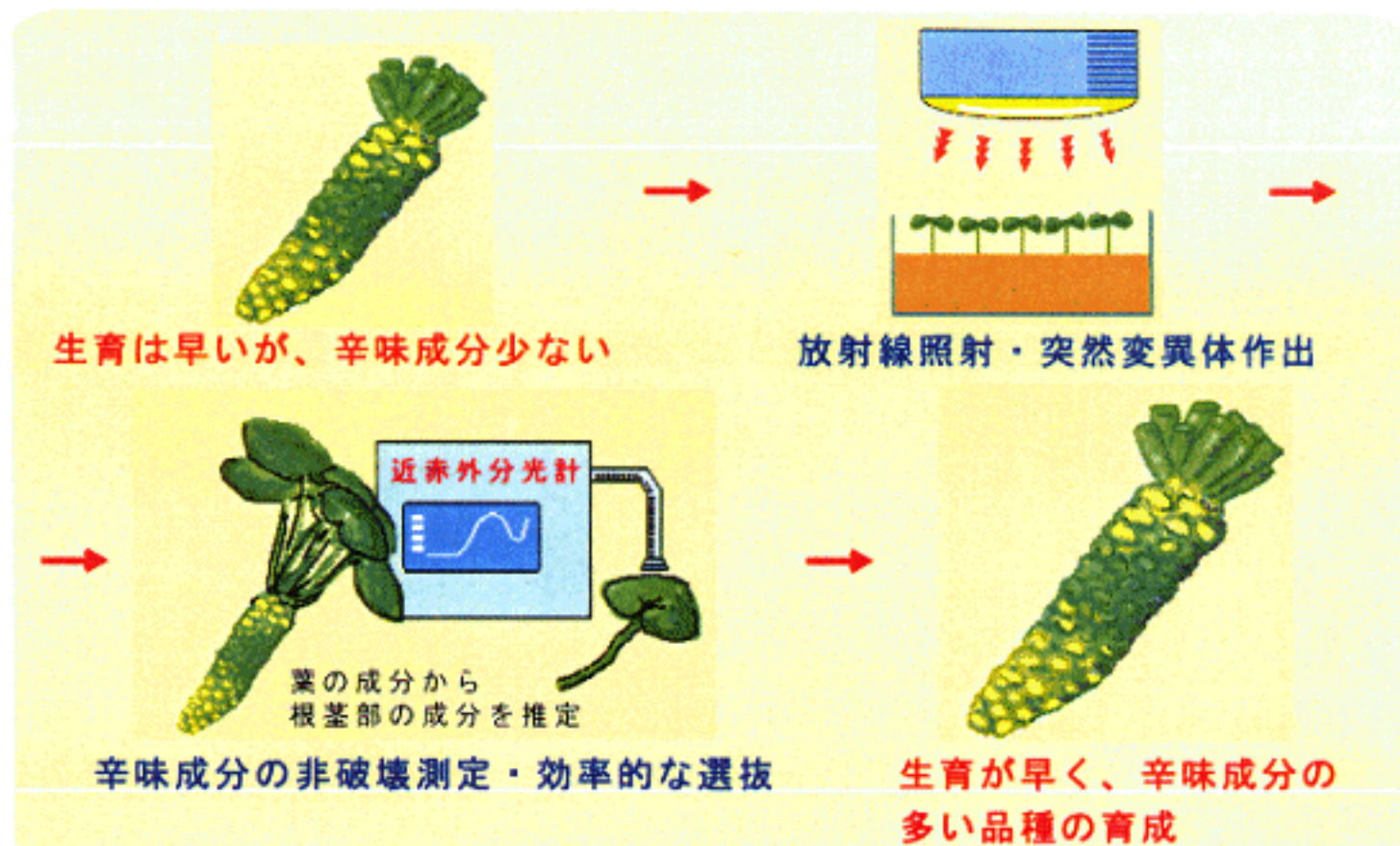
左のグラフ：バイオフォトンの発生量の変化

右の写真：映像化したもの

ワサビの辛味成分の機能性と 放射線を用いた育種法の開発

近年、本県の特産物であるワサビの抗菌作用など、人体への効能が注目されています。農業試験場では、ワサビの辛味成分の機能性に着目し、放射線を利用し効率的に新品種を育成する技術を開発しています。

<放射線を利用した効率的な育種法>



<辛味成分の主な機能性>

- ・発ガン抑制
- ・抗菌作用
- ・老化防止
- ・ビタミンB₁の合成促進
- ・ビタミンCの酸化抑制

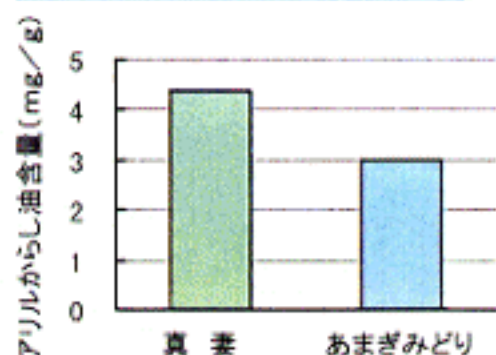


図 根茎部における辛味成分含量

<品種と辛味成分含量の関係>



真妻

あまぎみどり

<真妻>

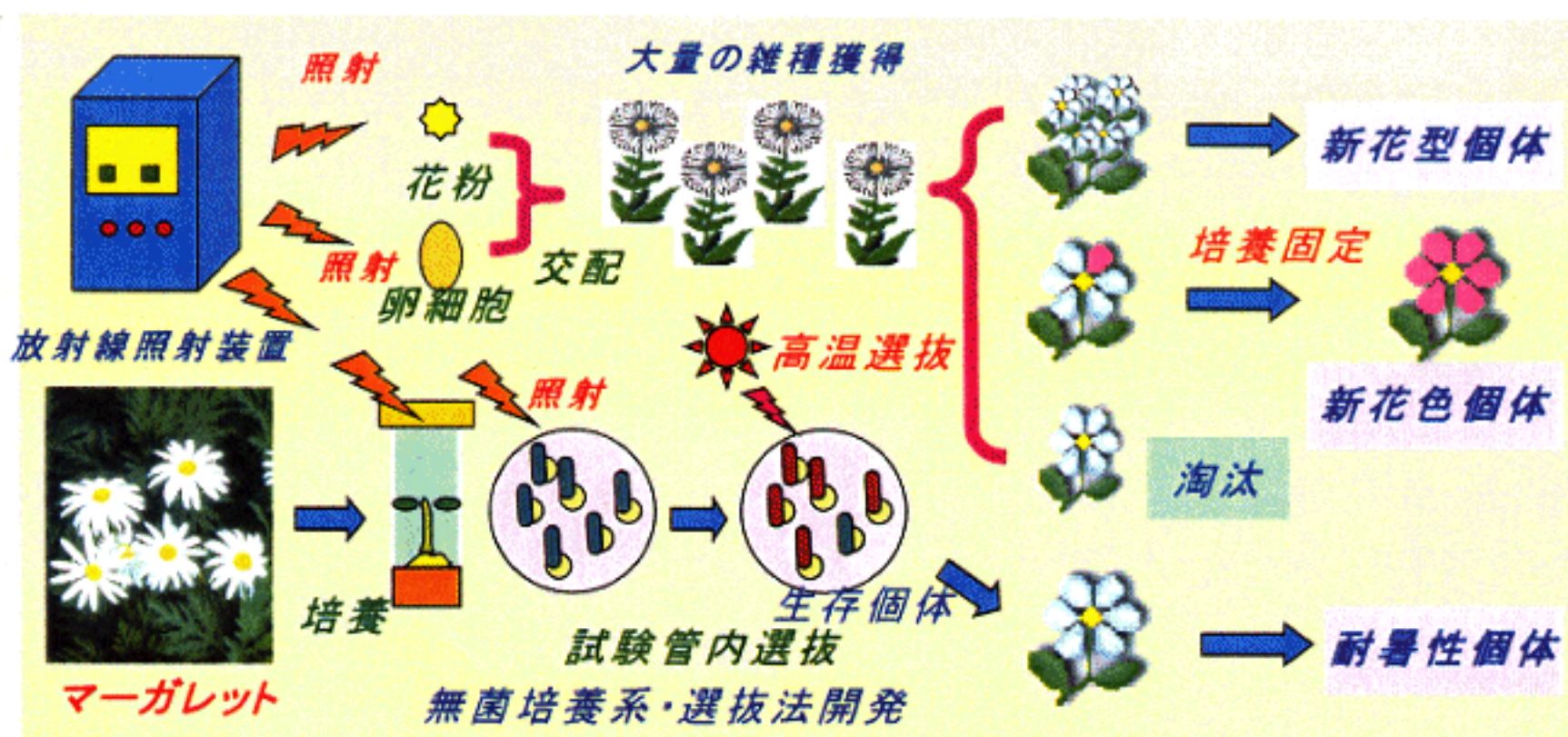
生育は遅いが、辛味成分は多い。

<あまぎみどり>

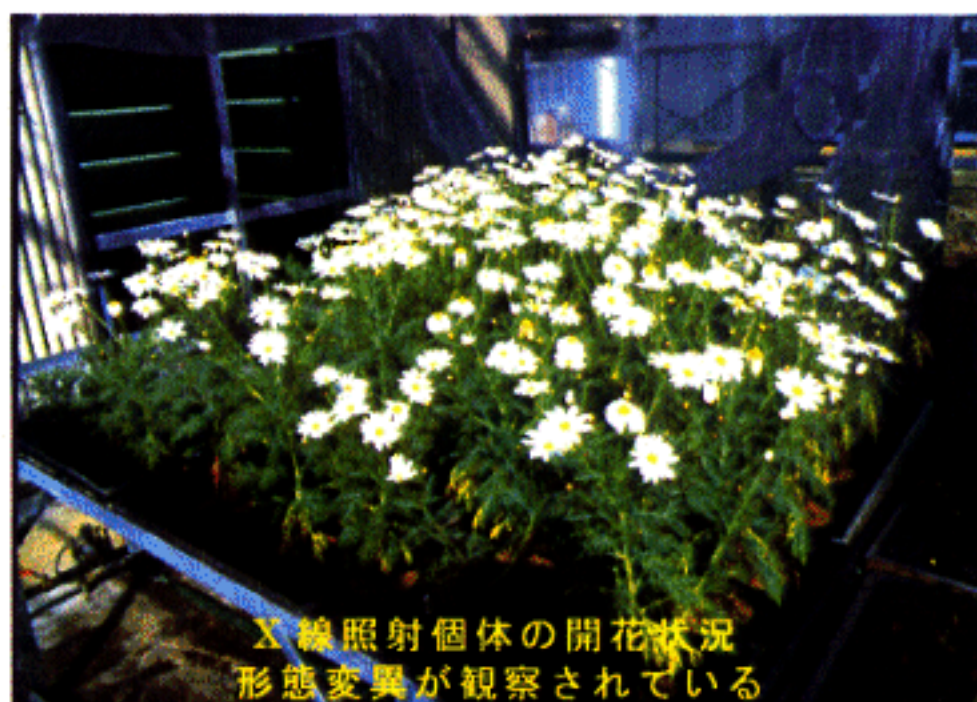
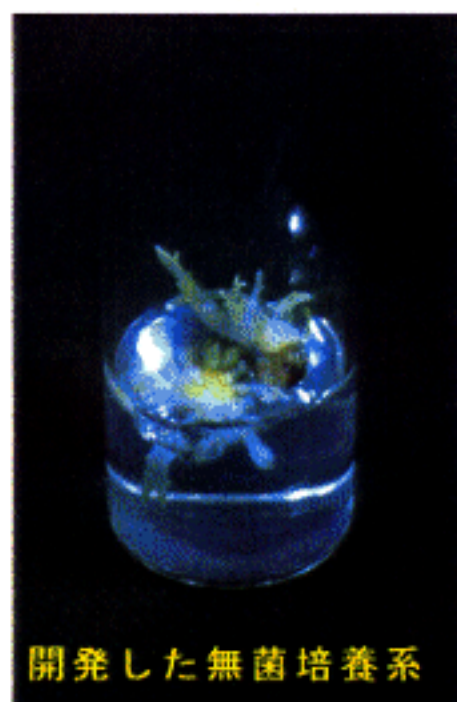
生育は早い、辛味成分は少ない。

放射線と交雑育種法を組み合わせた マーガレット新育種法の開発

マーガレットは三倍体であり、通常の交雑育種法では採種量が著しく少なく、効率が悪い。そこで、放射線を利用した有用突然変異体の作出、放射線照射と交雑育種法を組み合わせた効率的な新品種育成手法を開発しています。



放射線を用いた新育種法開発の全体図



X線照射による変異の誘発

静岡県茶業試験場

これまでに育成された優良な香味をもつ品種に特定の機能成分や耐病性を付与させる育種法として、突然変異育種法が用いられています。

しかしながら、チャではX線を変異源とした事例がないため、まずは変異を誘発しやすい照射条件を明らかにしました。

表 X線の照射強度が挿し穂の生育と奇形率に及ぼす影響

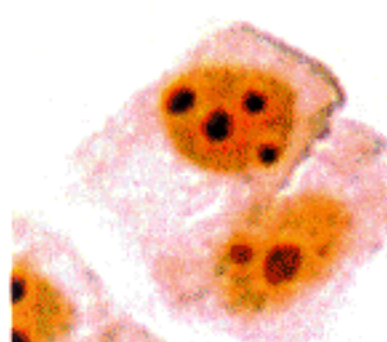
照射強度	生存率	新梢長	奇形数	未萌芽数	奇形率	障害率
KR	%	mm	枚	個体	個体	%
無処理	98	73.0	0	1	0.0	1.2
0.1	95	75.2	2	1	2.4	3.6
0.5	98	65.8	2	4	2.5	7.4
1.0	100	66.5	3	1	3.8	5.0
3.0	90	39.2	42	16	47.3	65.3
5.0	98	38.8	29	25	35.5	66.2
10.0	95	31.5	23	27	27.3	59.4



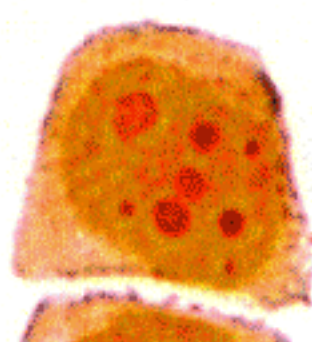
X線照射後の細葉の発現

照射前

照射後



通常の核正体(4個)



核正体の増加(8個)

☆挿し穂にX線を照射することにより、明らかにダメージが生じ、25KR以上では生存率が0%となりました。

☆挿し穂から萌芽した新芽にも奇形や障害が現れますが、その程度は3KR以上で顕著でした。

☆照射後に正常な新芽の発育する個体においても核小体数には増加が見られ、核内DNAに損傷の誘発されることも示唆されました。

近赤外領域の光を利用した茶アミノ酸の定量技術

静岡県茶業試験場

放射線照射によって得られた突然変異体から有用な成分を多く含む個体を育成の初期段階から選び出すためには、光（近赤外線）を利用した迅速な計測技術が不可欠である。

今回、茶の粉体試料を対象に、ケモトリックスの手法（GA、PLS、ANN）を用いて微弱な光情報から複数のアミノ酸類を同時に測定できる解析手法を開発した。図1にGA-PLS-ANNモデルによるアミノ酸量の予測精度を散布図として示した。

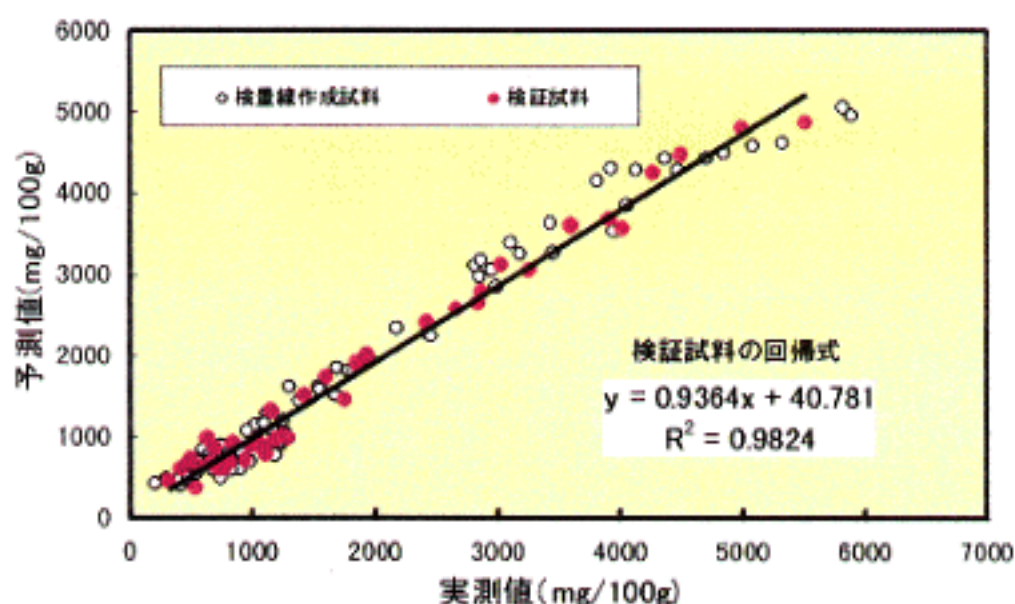


図1 GA-PLS-ANNモデルによる茶総アミノ酸の予測値と実測値との関係

測定結果（検証試料における相関係数 R_2 ）

総アミノ酸	$R_{s2} = 0.991$ 、	アルギニン	$R_{A2} = 0.874$
グルタミン	$R_{G2} = 0.952$ 、	テアニン	$R_{T2} = 0.965$

今後は、これらの手法を発展させて、茶の生葉一枚を対象にカテキン類、カフェインなど主要な成分を同時に定量できる解析システムの開発を目指す。生葉一枚から成分が定量可能となれば、育種の選抜効率は飛躍的に向上し、育種年限は大幅に短縮される。突然変異体から高カテキン、低カフェイン、高アミノ酸などの成分重視型の優良品種の育成が期待できる。

注）GA：遺伝的アルゴリズム（Genetic Algorithm）

PLS：部分最小自乗法（Partial Least Squares）

ANN：ニューラルネットワーク（Artificial Neural Network）

ガンマー線照射による 黒斑病抵抗性ナシの育成

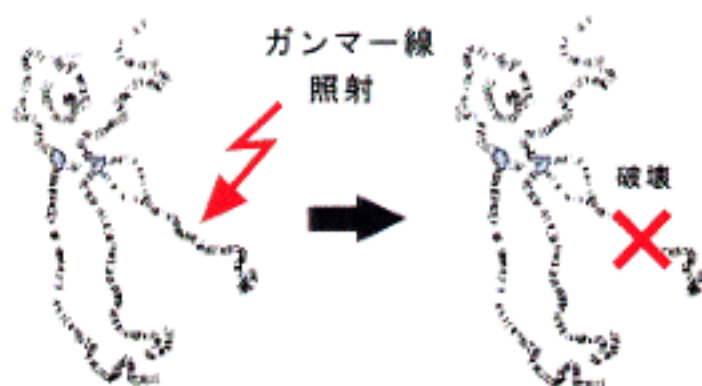
静岡県柑橘試験場

静岡県で育成されたナシ‘喜水’は、早生のナシの中では果実品質が良好であるが、黒斑病にかかりやすい。そこで、穂木にガンマー線を照射して、黒斑病抵抗性のナシを育成する。

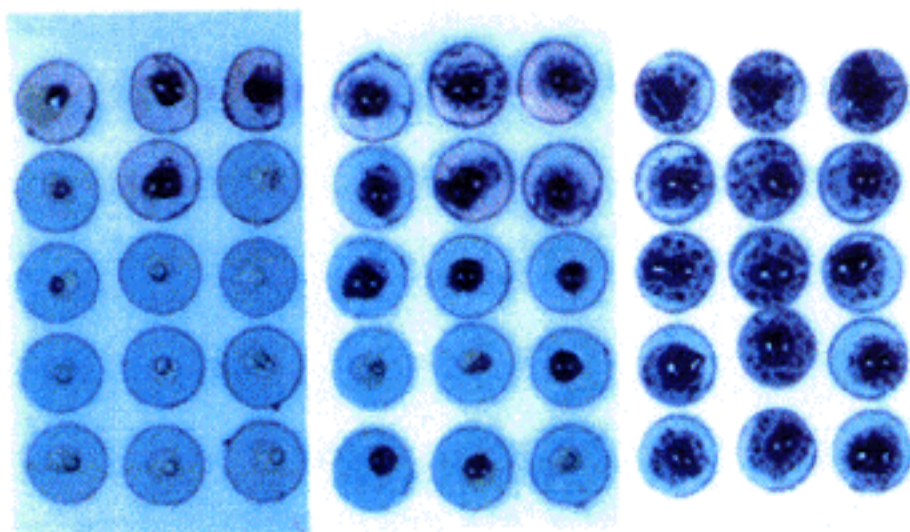
現在、照射した穂木を接木して育苗、選抜中である。



黒斑病り病性のナシ‘喜水’



り病性の遺伝子をガンマー線で破壊!!



抵抗性

半抵抗性

り病性

リーフディスクによる抵抗性の検定

温州萎縮病抵抗性台木の育成

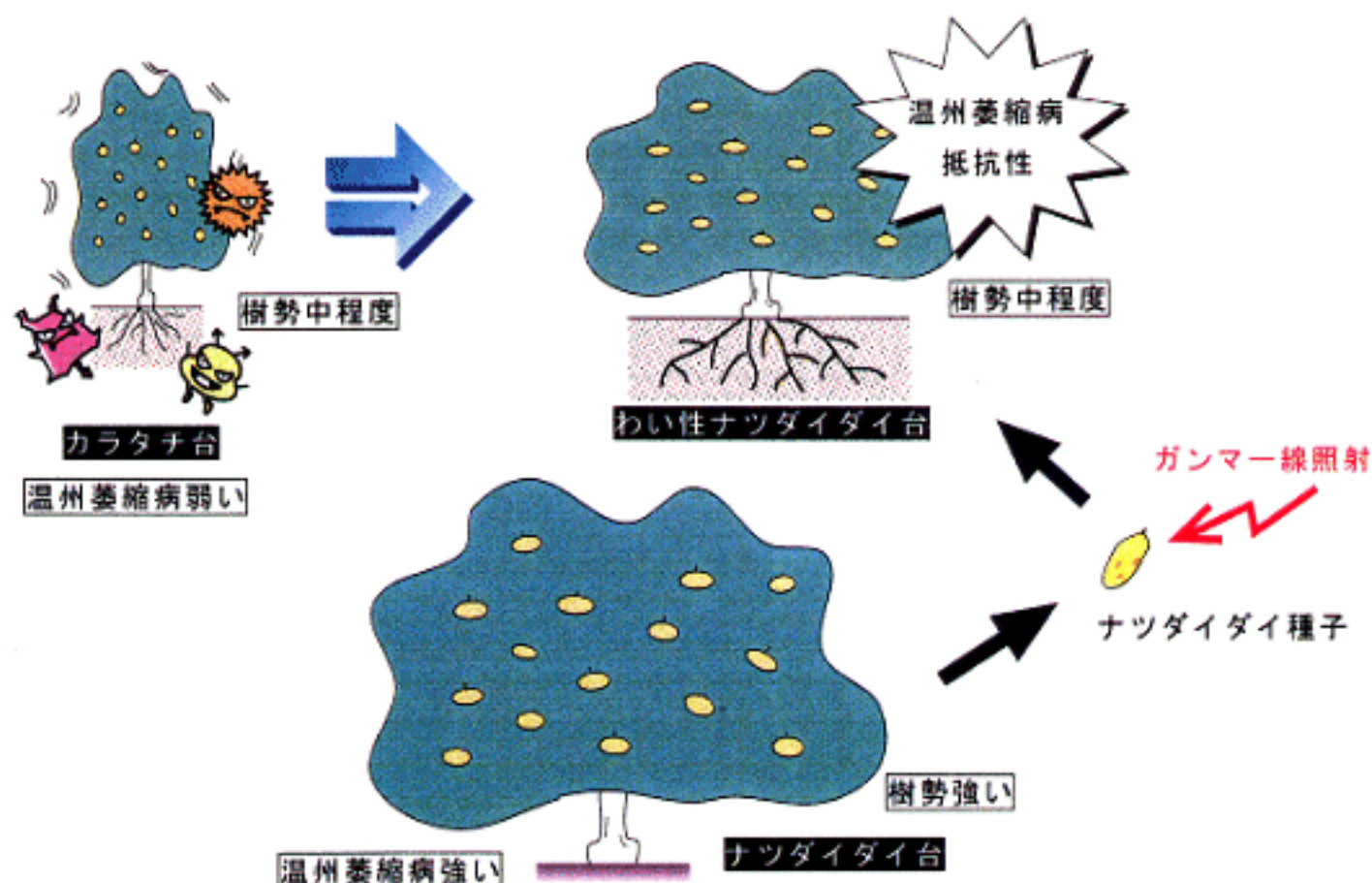
静岡県柑橘試験場

本県の基幹作物の一つである温州ミカンでは、温州萎縮病が問題になっている。温州萎縮病は土壌伝染性であるため、汚染された場所に再びミカンを植えることはできない。ナツダイダイは温州萎縮病に抵抗性であるが、台木として用いると、地上部の温州ミカンは大木になり果実品質も劣ることが知られている。そこで、ガンマー線照射により、わい性のナツダイダイ系統を育成する。

現在、ナツダイダイの種子に照射した個体を育苗、選抜中である。



▲ガンマー線を照射したナツダイダイ実生苗
線量が多いほど生育が抑制される



緑茶とワサビの新しい機能性を探る

静岡県立大学食品栄養科学部

静岡県特産の緑茶やワサビは健康飲料や香辛料として繁用されている。さらに新しい機能性の発見とそれらの発現機構を明らかにすることが期待されている。

今回、緑茶およびワサビの抽出物または有効成分を用いてHeLa細胞の増殖能に対する阻害作用の検定とともにESR（電子スピン共鳴）法による活性酸素捕捉作用を調べた。

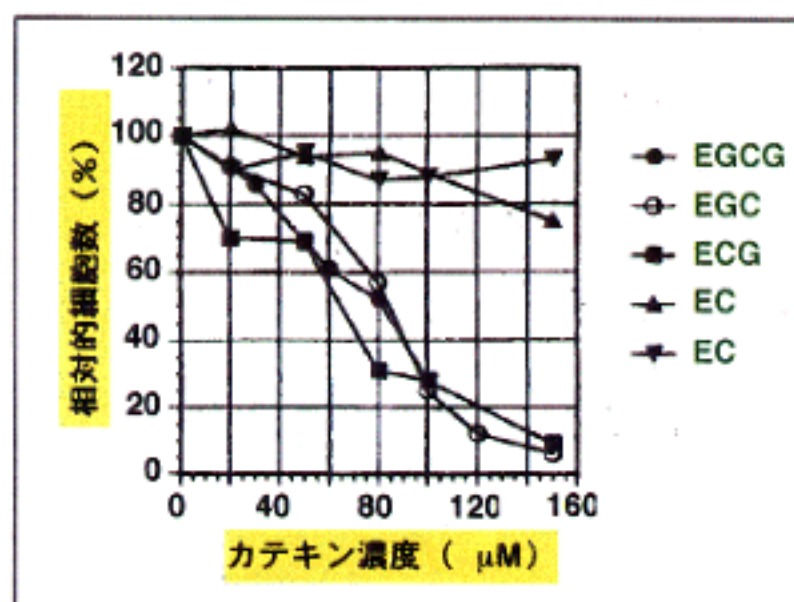


図1. カテキン類のヒト HeLa 細胞に対する増殖抑制

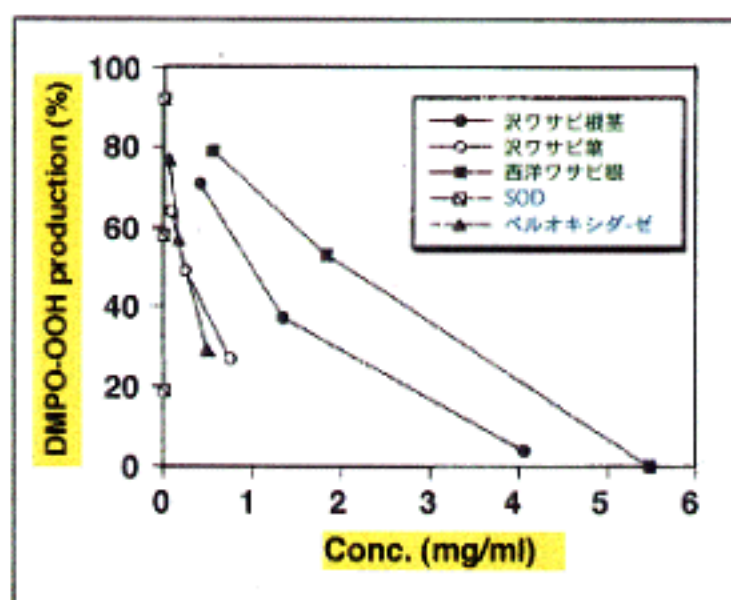


図2. ワサビ抽出物の活性酸素消去作用

結果：いずれの試料も強弱の差はあるが、両活性を有すること、特にワサビ葉の抽出物が強い活性酸素消去作用を示した。

各種カテキン類がヒト癌細胞の増殖作用を示したことから、今後、各種培養細胞を用いて分化誘導活性を調べる予定である。また、ワサビの葉に強い活性酸素消去活性を認めたので、モデル疾患動物を用いて、予防効果を検定したい。これらの活性は既存品種とともに遺伝子改良品種についても検討することが重要であると考えている。

環境ストレス耐性変異植物体の葉緑素蛍光計測による選抜および解析

静岡県立大学 大学院生活健康科学研究科

県内の特産栽培植物に乾燥ストレス耐性を付与することは、栽培の低コスト化と栽培地域の拡大化に繋がると考えられる。植物は、光合成反応に水が不可欠であり、水分の効率的利用により、光障害を回避できる可能性が高い。乾燥耐性植物は、水分効率利用能を獲得していると考えられ、これは耐塩性を指標にして選抜可能である。光障害を回避するためには、さらに強光に対して耐性であることが望まれる。この種の光障害は光合成葉緑素蛍光計測により評価できる。モデル実験植物としての利点から、シロイヌナズナを本課題研究に用いたが、クローニング・解析された遺伝子は、最終的には県内の特産栽培植物に導入予定である。

結果

シロイヌナズナ変異原処理系統を 200 mM NaCl (海水の約半分の塩濃度) 添加培地における 2 週間の生存を指標に選抜し、22,300 のシロイヌナズナ変異誘導系統 (個体としてはその約 8 倍) から、突然変異体 *pst* (photoautotrophic salt tolerance) を 2 系統得た。環境ストレス耐性は、葉緑素蛍光計測により評価した。

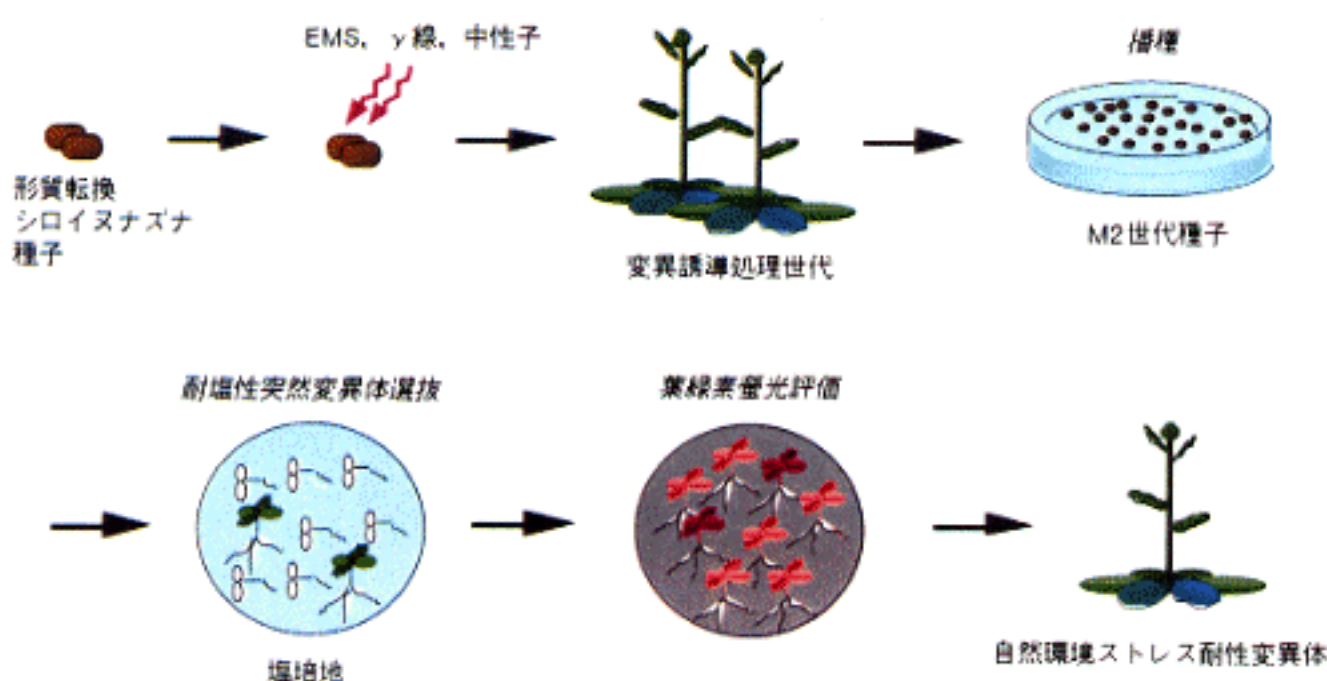


図1 耐塩性突然変異体選抜・評価方法

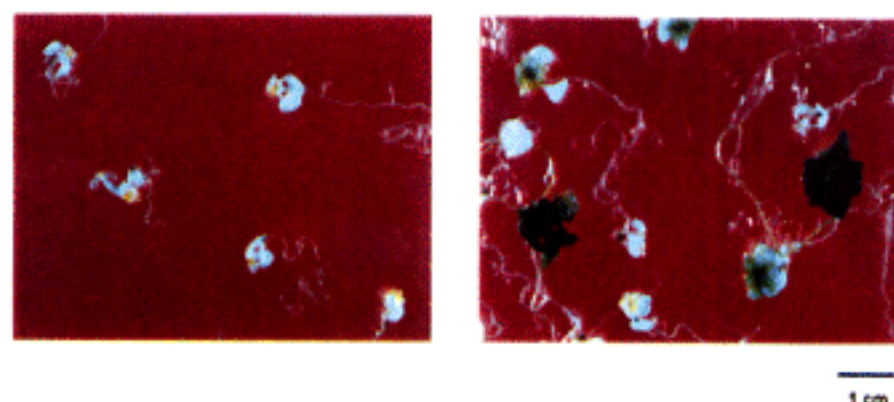
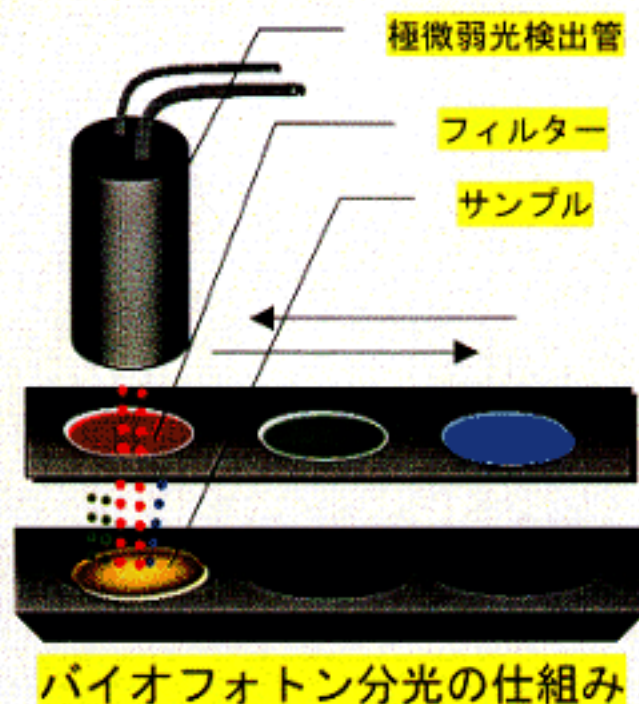
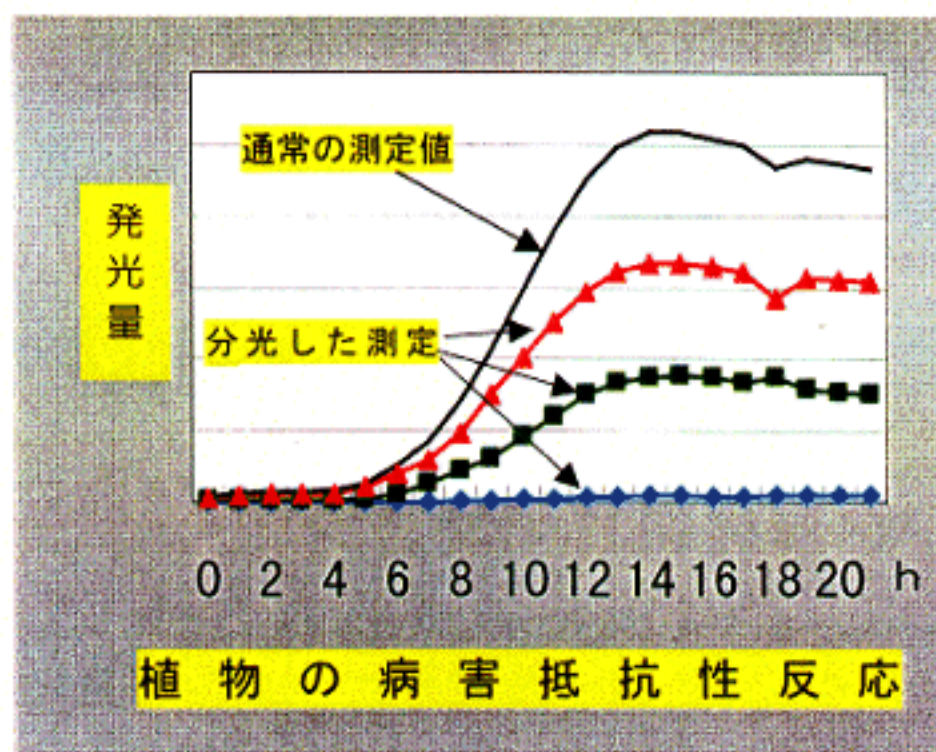


図2 100 mM NaClを含んだ培地において1ヶ月間培養したときの野生型(左)と耐塩性突然変異体 *pst1* (右)

分光型極微弱光測定装置 PCX-100

〔概要〕

植物が放つ、目に見えないほど弱い光“バイオフィトン”について、発生量の変化だけでなく、波長も測定することにより植物体内で何が起きているかを詳しく調べることができます。



〔特徴〕

- ・ 1 フォトン（光の粒子）／ $\text{cm}^2 \cdot \text{秒}$ の発光を捉える超高感度です
（1 フォトン＝ホタルの光の一億分の1程度の光量に相当）
- ・ サンプルをセットしたら後はすべて全自動で測定可能
- ・ バイオフィトンの発生量と波長を調べると植物体内の活動状況を調べることができます。

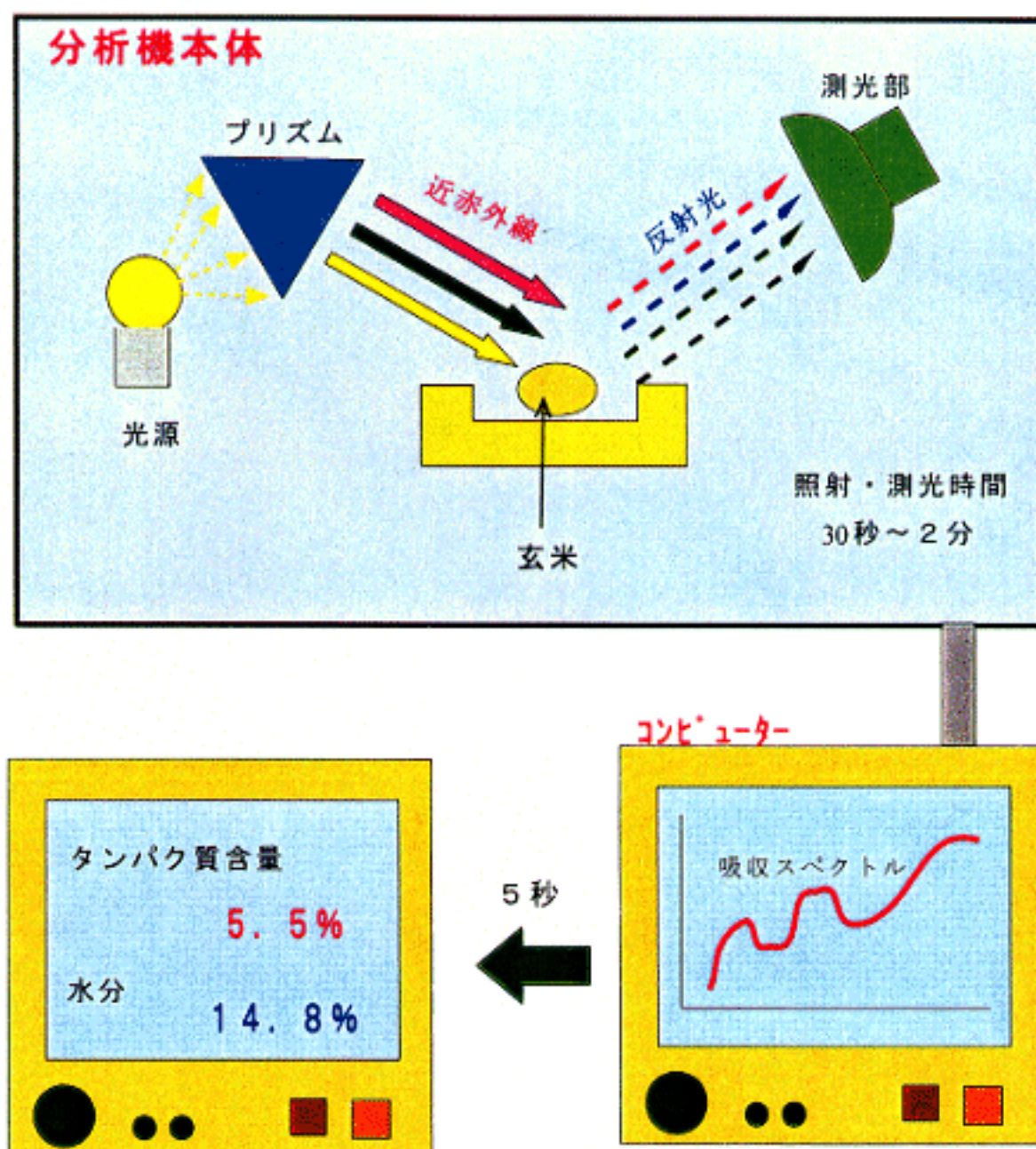
（実用化が期待される研究分野）

- ・ 病気や、暑さ寒さなどのストレスに強い植物品種の選別
（例：耐病性メロン品種）
- ・ 植物の生育に役立つ機能性物質や有用微生物の探索
- ・ 活性酸素除去作用を持つ物質の探索

玄米単粒成分分析装置

[概要]

人間に見えない800～2500nmの光(近赤外線)を玄米に照射し、その吸光特性を解析することによって、玄米の成分組成を分析します。



[特徴]

- ・米(玄米)の成分を1粒ずつ分析することが可能です。
- ・非破壊で、発芽能力を保たせながら分析できます。
- ・短時間で簡単に分析できます。

主要な施設・備品の整備状況

平成9年～10年度

名 称	規格(メーカー)	数量	導入場所	導 入 日 的
玄米単粒成分分析装置	インフライトー500 (フナヰルヘ)	一式	農業試験場	近赤外分析技術により、水稻の良食味個体を初段階で選抜する。
分光型微弱光測定装置	MPU-CP (浜松ホニウス)	一式	農業試験場	植物に発する超微弱光を波長別に測定し、環境ストレスに強い個体を幼植物の段階で選抜する。
X線照射装置	HF-350 (島津)	一式	農業試験場	X線を照射し、水稻、花き、ワサビ等の突然変異体を作成する。
ストレス負荷温室	—	一棟	農業試験場	変異個体に乾燥やウイルスを与え、選抜するために用いる。
データ解析システム	RS16000 Model F50 (IBM)	一棟	農業試験場	超微弱光測定や赤外成分分析で得られたデータから、機能性成分測定やストレス耐性の判定を行うための解析を行う。
軟X線照射装置	M-150WE (ソフテック)	一式	茶業試験場	植物個体、培養組織にX線を照射し、有用な突然変異を誘起する。
茶葉サンプル分析装置	SRT-1D (静岡精機)	一式	茶業試験場	茶変異個体のカテキン、カフェイン含量を迅速に測定し、優良個体を選抜する。
アミノ酸分析装置	HF1100 (フレッツパケット)	一式	茶業試験場	茶の変異個体を味の成分含量(アミノ酸)で選抜する。
走査電子顕微鏡	S-3500N (日立)	一式	柑橘試験場	変異個体の表面構造を超微細に観察し、病害抵抗性個体を迅速に選抜する。
光合成測定装置	CIRAS-1 (小糸工業)	一式	柑橘試験場	ナシ変異個体の光合成能力を測定し、選抜の指標とする。
遺伝子導入装置	ハイブリット・システム (日本ハイブリット)	一式	県立大学	細胞に優良遺伝子を組み込み、ワサビ、茶の生体調節機能を調べる。