

研究課題：てんさい育成系統の培養適性評価と培養効率向上
(612581)

担当部署：中央農試 基盤研究部 細胞育種科

協力分担：なし

予算区分：外部資金 (実用技術開発)

研究期間：2006～2009年度 (平成18～21年度)

1. 目的

てんさいの組織培養適性については系統・品種間差異があり、育成系統の「NK-219mm-O」が高い適性を有することが明らかとなっており、この系統を用いた形質転換法が開発されている。しかし、その他の育成系統については一部を除いて培養適性の優劣が未検討であるため、カルス形成能や不定胚形成能を検定し、培養適性の高い系統を探索する。また、培養適性の低い系統について培養条件等を改良することにより、カルス形成効率および不定胚形成効率の向上をはかる。

2. 方法

供試材料：北海道農業研究センター育成の単胚自殖性のO型 (雄性不稔維持) 61系統。

- 1) てんさい育成系統の培養適性評価：幼植物の本葉3枚をカルス形成培地に置床、約9週間後にカルス形成率・カルス量指数 (0～4) を調査した。また、カルス塊 (3～4mm) を不定胚形成培地に置床、約1ヶ月後に不定胚形成率・カルス当りの不定胚数を調査した。
- 2) カルス形成効率の向上：カルス形成培地に各種オーキシン (NAA、IAA、2,4-D) を添加、あるいはサイトカイニン (BAP) 量を増減させ、カルス形成率を比較した。また、供試部位を本葉から子葉もしくは胚軸に変え、カルス形成率・カルス量指数を比較した。
- 3) 不定胚形成効率の向上：不定胚形成培地のサイトカイニンをBAPからTDZ (thidiazuron)、Zeatin、CPPU (forchlorfenuron) に変え、同一の葉片由来のカルスより取り分けたカルス塊 (3～4mm) を各培地に置床し、不定胚形成率・カルス当りの不定胚数を比較した。
- 4) カルスの増殖性と培養効率の向上：子葉から形成されたカルス 0.05 g 程度を液体培地で120rpm、2週間振とう培養し、カルス重の増加度を調査した。また、増殖したカルスはBAPおよびTDZを添加した培地に置床し、不定胚形成効率の向上効果を検討した。

3. 成果の概要

- 1) カルス形成率は0～88.9%まで、不定胚形成率は0～98.9%までそれぞれ幅広い変異を示したが、両者の間には明確な相関がなく、両形成能は独立していると考えられた。
- 2) 培養適性を示す指標として「培養適性指数」を設定し、その指数を基に61系統を4段階に分類した。その結果、指数10以上の「優良」に3系統、指数10未満～1の「良」に18系統、指数1未満～0.1の「可」に17系統、指数0.1未満の「不良」に23系統が区分された (表1)。
培養適性指数 = (カルス形成率/100) × カルス量指数 × (不定胚形成率/100) × カルス当りの不定胚数
- 3) 本試験の範囲では、カルス形成培地に添加する植物ホルモンの組成を変えてもカルス形成率を向上させることはできなかった。しかし、供試部位を本葉から子葉に変えることで、カルス形成率およびカルス量指数が向上する傾向がみられた (表2)。
- 4) 不定胚形成培地に添加するサイトカイニンをBAPからTDZに変えることで、不定胚形成率およびカルス当りの不定胚数が向上する傾向がみられた (図1)。
- 5) 液体培地でのカルスの増殖性には系統間差があり、重量増加度は20倍弱から100倍以上まで幅広い変異を示し (図2)、増殖したカルスからの不定胚形成数は、BAP添加培地よりTDZ添加培地の方が高い傾向が確認された。
- 6) 培養適性の低い系統については、子葉からカルスを形成させ、次いでTDZ添加培地で不定胚を形成させることで、培養効率を向上させることが可能と考えられた。

表1 培養適性指数と培養適性の評価

系統名	培養適性指数	培養適性の評価	系統名	培養適性指数	培養適性の評価	系統名	培養適性指数	培養適性の評価	系統名	培養適性指数	培養適性の評価
NK-219	24.43	優良	NK-323	1.18	良	NK-254	0.35	可	NK-204	0.00	不良
NK-327	13.75		NK-255	1.18		NK-227	0.24		NK-208	0.00	
NK-181	10.01		NK-310	1.11		NK-311	0.20		NK-214	0.00	
NK-180	8.70	良	NK-299	1.04	可	NK-235	0.12	不良	NK-221	0.00	
NK-291	6.58		NK-230	1.00		NK-205	0.11		NK-229	0.00	
NK-190	5.34		NK-306	0.95		NK-196	0.10		NK-233	0.00	
NK-207	4.71		NK-195	0.75		NK-242	0.08		NK-237	0.00	
NK-328	4.55		NK-244	0.65		NK-220	0.07		NK-239	0.00	
NK-236	4.34		NK-184	0.63		NK-234	0.05		NK-245	0.00	
NK-191	3.78		NK-213	0.59		NK-301	0.04		NK-246	0.00	
NK-326	3.20		NK-203	0.55		NK-324	0.02		NK-248	0.00	
NK-182	2.25		NK-313	0.46		NK-206	0.02		NK-300	0.00	
NK-256	2.01		NK-197	0.45		NK-294	0.01		NK-329	0.00	
NK-295	1.82	NK-193	0.43	NK-290	0.01						
NK-307	1.55	NK-226	0.41	NK-185	0.00						
NK-183	1.46	NK-215	0.39	NK-194	0.00						

表2 供試部位を本葉から子葉に変えた際のカルス形成率およびカルス量指数の変化（一部抜粋）

系統名	カルス形成率(%)		カルス量指数 0-4	
	本葉供試	子葉供試	本葉供試	子葉供試
NK-208	0	0	0	0
NK-300	0	8.3	0	1.25
NK-245	0.6	8.3	1.00	1.75
NK-229	1.1	6.3	0.20	1.00
NK-195	10.0	29.2	1.36	1.43
NK-324	11.1	16.7	1.07	2.25**
NK-254	12.8	47.9	1.23	1.87**
NK-311	12.8	33.3	0.99	1.94**
NK-244	15.6	43.8	1.61	2.33**
NK-323	16.7	77.1**	1.11	1.47*
NK-233	20.6	91.7**	0.97	2.50**
NK-227	27.8	66.7*	1.40	2.81**
NK-196	29.4	100**	1.22	2.00**

注) * および**は、それぞれ5%、1%水準で有意

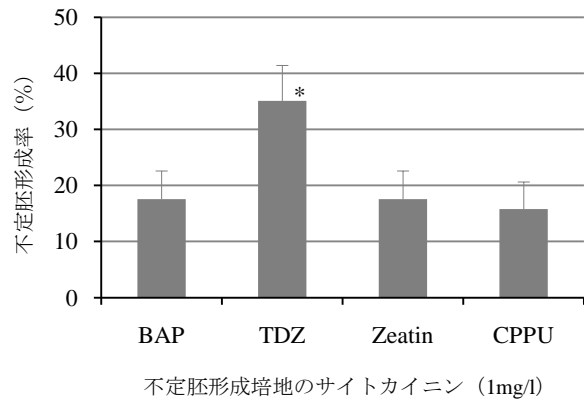


図1 培地に添加するサイトカイニンが不定胚形成率に及ぼす影響（縦線は標準誤差、*は5%水準で有意）

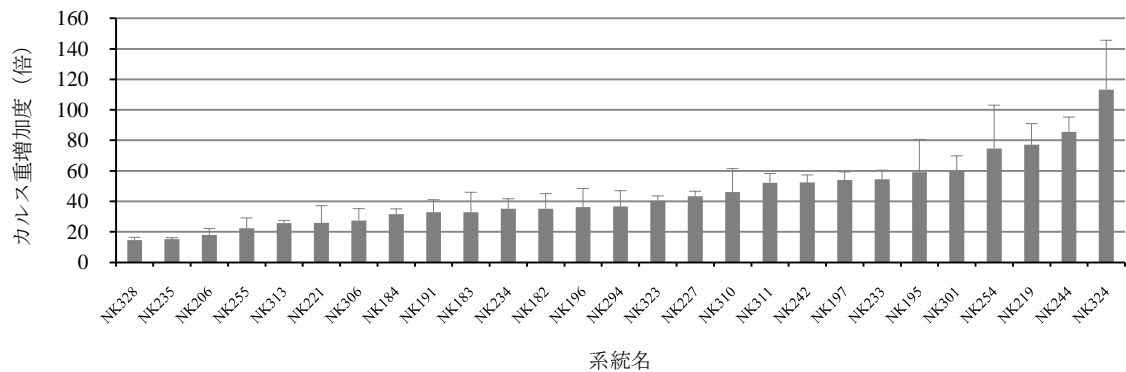


図2 液体振とう培養でのカルス重増加度の系統間差（縦線は標準誤差）

4. 成果の活用面と留意点

- 1) 組織培養を利用したてんさいの素材開発に活用できる。

5. 残された問題とその対応

- 1) カルス形成あるいは不定胚形成が全くみられなかった系統の培養効率の改善。
- 2) 培養適性に関与する遺伝的要因の解明。