

フキの突然変異育種に役立つ効率的な不定芽分化及び軟X線照射方法

浅見逸夫¹⁾・三宅律幸²⁾

摘要：フキ培養苗由来の突然変異個体を効率的かつ早期に得る方法を開発するため、葉柄切片から不定芽誘導時に行う軟X線照射と、不定芽の生育を早める培養方法を組み合わせる手法を検討した。

- 1 フキの培養苗葉柄切片を不定芽分化用固体培地に置床した10日後に、ホルモンを含まない液体培地へ切片を移植して培養することにより、従来の不定芽分化培地に置床したままの方法に比べ、不定芽の生育は約2週間促進した。
- 2 軟X線照射の時期は、キメラ発生の可能性の低い不定芽分化培地への切片置床時、もしくは置床2日以内が適切と思われた。また、照射後の不定芽生育が大きく劣らない範囲で適正と思われる軟X線照射線量は5～10 Gyであった。

キーワード：フキ、組織培養、不定芽、突然変異、軟X線、照射時期

緒言

フキは全国一位の生産量を誇る愛知県特産作物である¹⁾。当場では県内のフキ産地の維持発展に寄与するため、従来のフキ品種「愛知早生」より優れた特性を持つ新品種「愛経2号」の育成を行なうとともに²⁾、フキの組織培養による大量増殖方法を開発した³⁻⁷⁾。

農作物の新品種を育成するための方法として、交雑育種の他に突然変異育種がある。突然変異育種は放射線照射等による変異誘発処理によって一部の形質を改良させる方法であり、栄養繁殖性作物でも多くの実績がある。

放射線を照射する部位、照射時期などは様々であるが、無菌植物体の組織から不定芽誘導させる際に照射する方法が多くの作物で利用されている。しかし、不定芽分化は成功したもの、その後の生育・伸長が遅く、生長した1個体の獲得が遅いという欠点がある。浅見らが報告したフキを用いた方法⁶⁾においても、不定芽の葉長が10 mmに伸長するまで約60日と長い日数がかかった。

現在までに国内で登録・出願されたフキ品種は合計10品種⁸⁾あるが、組織培養中に発生する培養変異を積極的・間接的に利用する方法^{9, 10)}によって「岡山農試B1号」「大阪農技育成1号」「こまち笠」と「愛経2号」の4品種が育成されている。しかし、放射線照射などの突然変異誘発処理により育成された品種はまだない。

本研究ではフキの不定芽由来の突然変異個体を効率的に早期に得るための培養方法を検討した。また、軟X線の照射線量及び照射時期が不定芽の分化と伸長に及ぼす影響を調査した。その結果、いくつかの知見が得られた

ので報告する。

材料及び方法

本研究は愛知県農業総合試験場で2003年4月から2005年4月にかけて実施した。以下の試験の供試材料は、全て継代培養で維持している「愛知早生」フキ培養苗を用いた。

1 培養苗の葉柄切片からの効率的な不定芽誘導方法 (試験1)

(1) 培地条件

不定芽分化用固体培地として、シヨ糖5%、ナフタレン酢酸(NAA) 0.2 mg/L、ベンジルアデニン(BA) 0.5 mg/L、寒天0.9%を添加したMurashige and Skoog¹¹⁾培地(以下MS)を、直径90 mm厚さ20 mmのプラスチックシャーレに25 mlずつ分注して用いた。また、不定芽伸長用液体培地として、ホルモンを含まないMSの液体培地(シヨ糖2%)を直径24 mmの試験管に10 mlずつ分注して用いた。

(2) 培養方法

培養苗の葉柄を株元から切り取り、1 mmの厚さで細断した葉柄切片を葉身方向の切断面が接するよう不定芽分化用固体培地上に置床した。置床後の培養期間を5期間(2日、4日、6日、8日及び10日)とし、その後、それら切片を不定芽伸長用液体培地に移植し、回転培養(2 rpm)を行った。また、液体培地に移植しない対照を設けた。

¹⁾ 環境基盤研究部(現農業大学校) ²⁾ 環境基盤研究部

(3) 調査方法及び培養環境条件

切片置床47日後に、それぞれの不定芽の分化数及び生育（不定芽分化率、不定芽数、葉長、重量）を調査した。培養は全て25℃、16時間日長（白色蛍光灯、光合成有効光量子束密度：2.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ）で行った。

2 分化した不定芽の効率的な培養方法（試験2）

(1) 培地条件及び培養方法

不定芽分化用固体培地は試験1での寒天の替わりに0.3%のゲルライトを添加した培地を用いた。

(2) 培養方法

厚さ1mm葉柄切片を試験1と同様な方法で置床し、置床20日目に不定芽が分化したことを目視で確認した切片を、MS濃度3水準（1/3、2/3、1/1）及びショ糖濃度3水準（1%、2%、3%）を組み合わせた9処理区のホルモンを含まない液体培地（2rpmで回転培養、10mL/本）と固体培地（ゲルライト0.3%）にそれぞれ移植し、移植14日後の不定芽の生育（1切片重量）を調査した。培養は試験1と同様の環境条件で行った。

3 葉柄切片への軟X線照射が不定芽の分化と生育に及ぼす影響（試験3）

(1) 培地及び置床方法

試験1と同じ不定芽分化用固体培地と方法で置床した。

(2) 軟X線照射方法

軟X線照射5時期（置床0日、2日、4日、7日及び10日目）、照射線量8処理（0Gy、2.5Gy、5Gy、10Gy、15Gy、20Gy、30Gy及び40Gy）を組み合わせ、軟X線照射装置（ソフテックス株式会社、M-100WE型、東京）を用い、同一の照射条件（100KVp、5mA、120Gy/hr）で、置床したプラスチックシャーレの蓋越しに葉柄切片へ照射した。なお、シャーレ蓋による透過減衰があるため、予めシャーレ蓋越しで実測した線量で照射した。

(3) 培養及び調査方法

不定芽分化用固体培地に10日間置床し、その後、それら切片を不定芽伸長用液体培地に移植して回転培養（2rpm）を行った。切片置床42日後に相当する移植32日後に不定芽の分化及び生育状況（不定芽分化率、不定芽数、最大葉長、重量）を調査した。さらに調査した不定芽は、分割せずに切片ごとホルモンを含まないMS固体培地（ショ糖2%、寒天0.9%）に移植して60日間培養し、不定芽の生育状況（不定芽伸長率、葉長、重量）を調査した（置床102日後に相当）。培養は試験1と同様な環境条件で行った。

結果及び考察

1 培養苗の葉柄切片からの効率的な不定芽誘導方法（試験1）

固体培地置床日数を2日から2日間隔で10日までとし、培地置床47日後に調査したところ、不定芽分化率は置床2日では0%であったが、置床4日では19%、

表1 不定芽分化用固体培地での培養期間の違いが不定芽の生育に及ぼす影響

培養期間	不定芽分化率 ¹⁾	不定芽		伸長した不定芽 ²⁾ あたり	
		芽数	重量	平均葉長	最大葉長
	%	本/切片	mg/切片	mm	mm
2日	0	—	1.3	—	—
4日	19	1.7	11.3	5.8	7.0
6日	83	2.2	59.2	4.9	6.9
8日	100	3.4	184.8	7.4	13.1
10日	100	3.7	271.7	10.3	18.5
対照	100	5.0	50.9	2.3	4.1

注) 各区につき24切片供試。47日後調査。

1) 「不定芽分化率」は供試切片数に対する1本以上の不定芽分化が確認できた切片数の割合。

2) 「伸長した不定芽」とは不定芽分化以降に2mm以上葉が伸長した不定芽を指す。

6日で83%、8日以上で100%になった。置床8日と10日を比較すると、1切片当たり分化不定芽数は3.4個と3.7個でほとんど変わらないが、置床10日の方が不定芽の葉長（3.4mmと3.7mm）と切片1個あたり重量（184.8mgと271.7mg）が大きかった。また、不定芽分化固体培地で継続培養した対照区に比べ、液体培地に移植した不定芽の方が生育・伸長が優れ、特に1切片から分化した不定芽重量は固体培地の50.9mgに対し、置床10日で液体培地へ移植した区が271.7mgと5.3倍以上になった（表1）。

以上の結果、不定芽分化率がほぼ100%に達するためには、不定芽分化用固体培地に切片を10日間置床すれば十分であること、その後は、ホルモンを含まない液体培地で回転培養することにより、生育の良い不定芽が得られることがわかった。

2 分化した不定芽の効率的な培養方法（試験2）

不定芽分化を確認した切片を、ホルモンを含まない液体及び固体培地に移植し、14日後にそれぞれの切片から分化した不定芽の1切片当たり重量を測定したところ、固体培地に比べ、液体培地の方が重かった（図1）。その理由として、不定芽は未発根であるため、固体培地上では栄養分を狭い接触面からしか吸収できないのに対し、液体培地中では、植物体表面全体で栄養を吸収して生育が進み重量が増加したからであると思われる。

液体培地の培地濃度では、MS濃度が1/3の液体培地で1切片当たり重量が少なかったことから、MS濃度は2/3～1/1が良いと考えられた。液体培地のショ糖濃度については培地濃度ほど大きな差は無かったが、ショ糖1%は2%より明らかに低く、ショ糖3%では2%より葉長や重量が低い区があった。浅見らは前報⁵⁾においてフキ葉柄切片の不定芽誘導の際には不定芽分化培地のショ糖濃度が高い方が不定芽分化率は高いが、分化後の不定芽の生長が悪いことを報告している。したがって、液体培地のショ糖濃度は2%が良いと考えられた。

浅見ら⁶⁾は、誘導したフキ不定芽が約10mmの葉長に

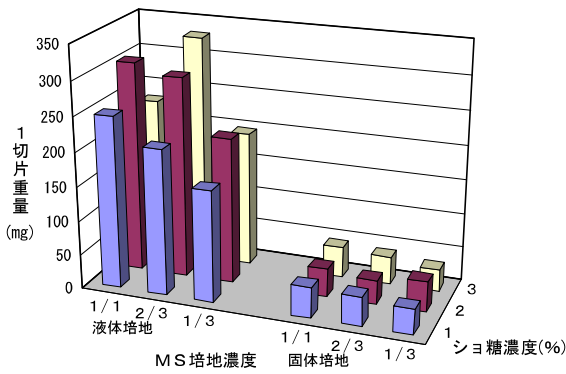


図1 不定芽分化後に移植する培地条件が不定芽の生育に及ぼす影響

注)培地はMS濃度(1/3、1/2、1/1)とショ糖濃度(1%、2%、3%)の組み合わせ。各区20個体を供試。不定芽が分化した切片をホルモンを含まない液体培地及び固体培地に移植し14日後に調査。

伸長した後にオーキシンを添加した液体培地に移植して発根を促す方法を報告したが、その方法では10 mmの葉長に達するまでには不定芽誘導培地に置床後、約60日必要であった。試験1では、置床10日区は43日後に葉長が9.5 mm、47日後に10.3 mmであった。したがって、今回の試験1と試験2の方法を組み合わせ用いれば、60日必要な浅見⁶⁾の方法に比べ、不定芽の生育が約2週間促進されたことから、組織培養による増殖とその後の発根の迅速化が期待される。

3 葉柄切片への軟X線照射が不定芽の分化と生育に及ぼす影響(試験3)

フキ培養苗の葉柄切片への軟X線照射量と照射時期が不定芽分化と不定芽の生育に及ぼす影響を調査した。

置床42日後の調査(図2)では、置床後早い時期の照射ほど不定芽分化に与える影響が大きく、非照射(0 Gy)で100%であった不定芽分化率が50%以下に低下するのは、置床0日後照射では15~20 Gyの間、置床2日後と4日後照射は20~30 Gyの間、置床7日後以降の照射では40 Gy以上と次第に線量が大きくなった。同様に、非照射区(置床0日後0 Gy区)の数値に対する割合が50%になるのは、1切片あたり不定芽数が約10 Gy、1切片あたり重量は10 Gy弱であった(図2)。また、不定芽分化率での傾向と同様、1切片あたり不定芽数と重量が抑制されるには置床後日数が長いほど大きな線量が必要であった。

さらに60日間培養した102日後の調査では、軟X線照射による不定芽生育への悪影響が一層大きくなった(図3)。不定芽が10 mm以上伸長する切片の割合(不定芽伸長率)が50%以下に低下するのは、先の42日後調査より少ない照射量であり、置床0日後と2日後照射では5 Gy以下、4日後で5~10 Gyの間、7日後で10~20 Gyの間、10日後で20 Gyであった。同様に不定芽の1切片当たりの重量も、置床0日後と2日後照射では5 Gy以下であった。

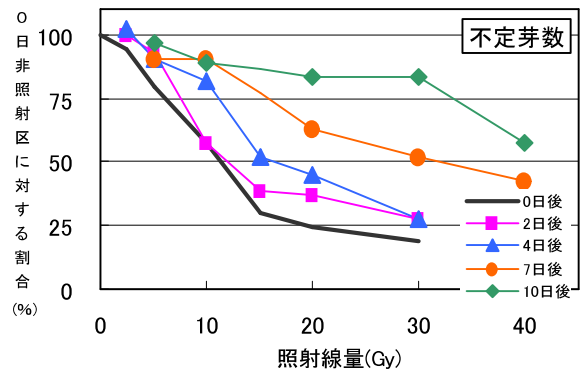
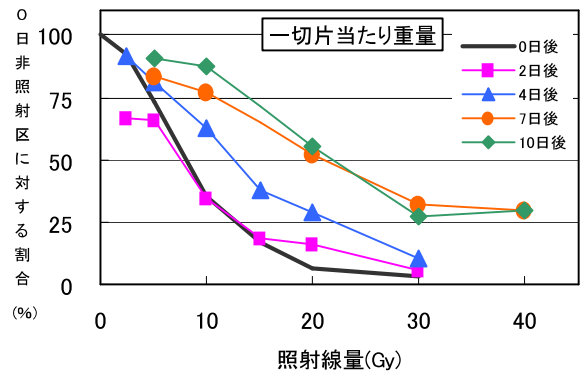
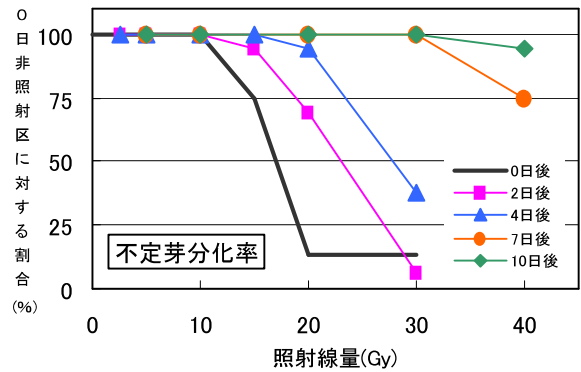


図2 異なる時期での軟X線の段階照射が不定芽分化率や不定芽の生育等に及ぼす影響

注)0日後0 Gy区の数値(不定芽分化率100%、不定芽数5.4本、1切片あたり重量105 mg)に対する各区の割合(%)。8切片ずつ供試。42日後に調査。各区2反復の平均値。

試験3では、切片置床後の早い時期の軟X線照射によって不定芽分化率が低下することから、2日目までの放射線感受性が高いことが分かった。さらに、軟X線照射は不定芽分化率ばかりでなく、不定芽の生育・伸長も大きく抑制した。そのため、照射によって突然変異が生じた不定芽が得られても、変異の有無を確認できるまで生育する苗が少なくなる可能性が高いと考えられる。

試験1では、不定芽分化培地への置床3日以内では不定芽分化率が0%であったが、置床4日で19%、6日で83%、8日以上で100%になった。このことから、不定

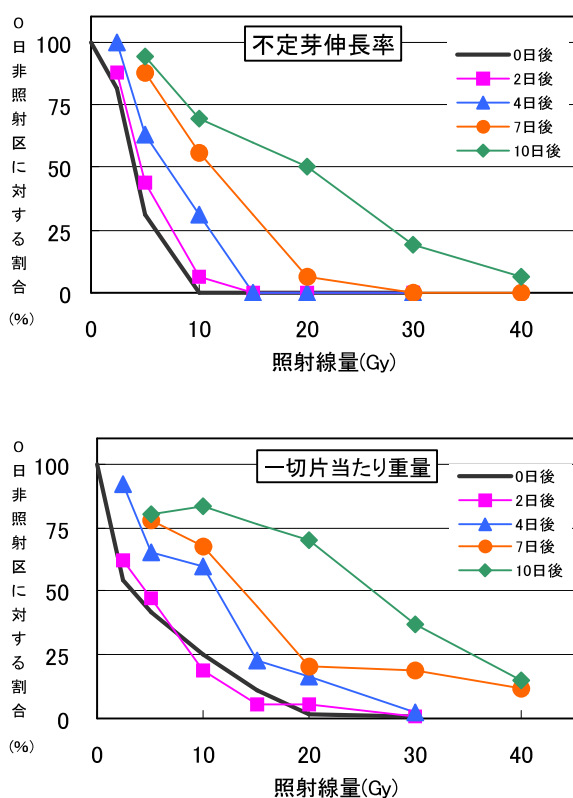


図3 異なる時期での軟X線の段階照射が不定芽伸長率や不定芽の生育等に及ぼす影響

注) 0日後0 Gy区の数値(不定芽分化率100%、一切片あたり重量626 mg)に対する各区の割合(%)。8切片ずつ供試。102日後に調査。各区2反復の平均値。102日後の不定芽伸長率は10 mm以上伸長した不定芽がある切片の割合を示す。

芽の起源となる細胞由来の活発な細胞分裂には、連続した4日以上の上定芽誘導処理が必要であると考えられた。このような分裂し始めた細胞集塊に軟X線を照射すると、変異の程度が異なる複数の細胞を起源とする不定芽ができるため、周縁キメラあるいは区分キメラになる可能性が高い。得られた照射苗がキメラであった場合、個体全体が同一変異細胞になるようキメラを解消する切り戻し等の処理が別に必要となる¹²⁾。

一方、置床2日以内では、分裂細胞集塊はまだ発生していないか、非常に少ないと考えられる。その時期の軟X線照射により、分裂が始まっていない細胞1個ずつに放射線ダメージが与えられるため、照射の影響は直接的に不定芽分化率の低下に繋がる。そのため、放射線感受性の高い試料に線量の低い軟X線を照射することで、キメラの頻度が少ない変異個体を得られる可能性が高いと考えられた。

本格的な突然変異育種における照射線量の決定は重要である。適性線量の選定には幼苗の生育量を非照射に対

し30~50%抑制する程度とされ、さらに選ばれた線量とその上・下20%の3段階照射が勧められている¹³⁾。したがって試験3の結果から上下幅を含めて勘案すると、照射軟X線量は5~10 Gy程度が良いと思われた。

引用文献

1. 農林水産省平成25年産野菜生産出荷統計。都道府県別のふき作付面積、10 aあたり収量、収穫量及び出荷量(2014)
2. 大藪哲也, 矢部和則, 山下文秋. 日持ち性の良いフキ品種「愛経2号」の育成. 愛知農総試研報. 41, 55-60(2009)
3. 矢部和則, 桜井雍三, 飯田孝則, 鷺田純彦. 葉身及び葉柄培養によるフキ (*Petasites japonicus* Fr.Schmidt) 無病苗の作出. 愛知農総試研報. 18, 102-109(1986)
4. 矢部和則, 恒川靖弘, 小川理恵. フキの組織培養による種苗生産システムの開発(第1報) 通気培養法による健全苗の育成. 愛知農総試研報. 27, 145-141(1995)
5. 浅見逸夫, 伊藤(小川)理恵, 犬塚満, 朱宮昭男. フキ無菌植物の葉柄切片からの不定芽誘導. 愛知農総試研報. 31, 65-70(1999)
6. 浅見逸夫, 伊藤(小川)理恵, 犬塚満, 朱宮昭男. フキの葉柄切片から誘導した不定芽のセル成形トレイを用いた発根培養方法. 愛知農総試研報. 32, 53-60(2000)
7. 浅見逸夫, 犬塚満, 朱宮昭男. フキの葉柄切片から誘導した不定芽由来の培養苗の生育特性. 愛知農総試研報. 32, 61-65(2000)
8. 農林水産省品種登録ホームページ-品種登録迅速化総合電子化システム, ふき種品種登録情報. <http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM110.aspx?MOSS=1> (2015.5.19参照)
9. 森下正博・山田貴義. フキの組織培養株の形質変異について. 大阪農技セ研報. 18, 9-18(1981)
10. Iwamoto, Yuzuru., Nakasone, W. and H. Ezura, H.. Efficient Selection of a high-yield line by using somaclonal variation in Japanese butterbur (*Petasites japonicus*). Plant Biotechnology 24, 289-293(2007)
11. Murashige, T., Skoog, F.. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum 15, 473-497(1962)
12. 渡辺好郎, 山口彦之. 突然変異育種. 養賢堂. 東京. p. 126-128(1983)
13. 花卉園芸大百科, 7, 育種/苗生産/バイオテク活用. 農山漁村文化協会. 東京. p. 105-114(2002)