

セイサイとハクサイの体細胞雑種の作出

清 野 栄 美・中 川 文 彦・仲 野 英 秋

(山形県立農業試験場)

Production of Somatic Hybrid between Leaf Mustard (*Brassica juncea* Czern. et Coss.)
and Chinese Cabbage (*B. campestris* L.)

Emi SEINO, Fumihiko NAKAGAWA and Hideaki NAKANO
(Yamagata Prefectural Agricultural Experiment Station)

1 はじめに

山形青菜はタカナの一種で、山形県内で古くから栽培されている漬物用野菜である。近年の消費動向に伴い周年生産が望まれているが、長日条件で抽苔する特性を持つので作期が限られている。また、根こぶ病の被害が生産力向上の阻害要因になっている。そこで、それらを改良するために細胞融合による種間雑種の作出を検討し、体細胞雑種を得たので報告する。

2 試験方法

細胞融合に供試するプロトプラストは、セイサイ（山形青菜）とハクサイ（中間母本農1号（00059702）、根こぶ病抵抗性、農業生物資源研究所より配布）の無菌播種1カ月目の本葉を酵素処理して得た。酵素処理は、細刻した本葉を0.02%マセロザイムR-10、0.1%メイセラゼ、0.5Mマンニトールを修正Murashige & Skoog（以下修正MSとする、無機塩1/2、200mg/ℓNH₄NO₃）培地で調製した酵素液に浸漬し、25℃、16時間静置して行った。プロトプラスト及び融合処理細胞の培養は、以下の方法で行った。すなわち初期培養は、1%ショ糖、0.5Mマンニトール、0.5mg/ℓBA、0.5mg/ℓNAAを含む修正MS培地を用いて行った。コロニーが可視可能な大きさになった時、1%ショ糖、0.8%寒天、0.5mg/ℓBA、0.5mg/ℓ2,4-Dを含む修正MS培地に移植し、生育を促した。カルスが1～2mm大に生育した時、3%ショ糖、0.8%寒天、0.5mg/ℓBA、0.035mg/ℓGA₃を含むMS再分化培地に移植した。その他は仲野らの方法¹⁾に準じた。

(1) セイサイプロトプラストのIOA（ヨードアセトアミド）処理による不活化条件の検討

融合処理細胞の培養の効率化を図るため、セイサイプロトプラストの不活化条件、すなわち分裂阻害条件について検討した。処理方法はIOAのW5溶液で4℃、15分間処理²⁾とした。

(2) セイサイとハクサイの細胞融合の検討

IOA処理セイサイプロトプラストとハクサイプロトプラストを材料に、電気融合を行った。0.1mM CaCl₂の融合バッファーに両プロトプラストを等量ずつ懸濁し、細胞密度を5×10⁵/mlに調製した。細胞融合装置は、BTX製

ECM-200型エレクトロセルマニピレーターを使用し、電気融合条件は、交流周波数1MHz、交流印加時間30秒、交流電界強度100V/cm、パルス印加回数1回、パルス幅50μ秒、パルス電界強度2000V/cmとした。

(3) 融合処理細胞由来再分化個体の特性調査

融合処理細胞から再分化した個体は、常法により発根、馴化した後、無加温ハウス内に定植し特性調査を行った。

(4) 体細胞雑種の自殖第1代の抽苔特性調査

融合処理細胞から馴化育成された個体のうち、雑種と判断された個体の自殖第1代種子を用いて、長日条件下での抽苔所要日数（播種日から抽苔開始日までの日数）を調査した。栽培は人工気象室内とし、2週間育苗の後プランターに移植した。日長は15時間とし、温度は育苗期間は22℃、プランターに移植後は20℃とした。

3 試験結果及び考察

(1) セイサイプロトプラストのIOA処理による不活化条件の検討

培養開始7日目の分裂率はIOA 2mMで、20日目のコロニー形成は3mMで阻害された（表1）。このことから、セイサイのプロトプラストは、IOAの濃度が3mM前後で不活化されることが明らかになった。

表1 セイサイプロトプラストへのIOA処理が分裂、コロニー形成に及ぼす影響

IOA濃度 (mM)	分裂率 (%) (培養7日後)	不活化 程度*	コロニー 形成程度** (培養20日後)
0	11.3	—	+++
0.5	9.1	±	+++
1.0	5.8	+	+++
2.0	0	++	+
3.0	0	+++	—
5.0	0	+++	—

注 * : 全細胞に占める不活化細胞の割合（FDA活性染色による）

— : <5% ± : <25% + : <50%

++ : <75% +++ : 75%≤

** : 1シャーレのコロニー数の平均

— : 0 + : <10 +++ : 100≤

(2) セイサイとハクサイの細胞融合の検討

2, 3mMIOA処理を行ったセイサイプロトプラストと

ハクサイプロトプラストの電気融合試験を行ったところ、融合処理細胞は分裂がまったく認められなかった。その原因としては、IOA処理により不活化された細胞が、電気融合処理により更に損傷を受けて、分裂能を失ったものと考えられる。そこで、IOA処理濃度を0.5, 1 mMに下げて融合したところ、両処理区とも効率よくコロニーを形成し、個体の再生が認められた(表2)。

表2 セイサイプロトプラストへのIOA処理濃度がハクサイプロトプラストとの融合処理後のコロニー形成及び再分化に及ぼす影響

IOA濃度 (mM)	コロニー 形成程度*	再分化培養 カルス数 a	再分化 カルス数 b	再分化率 (%) b/a×100
0.5	+++	220	118	53.6
1.0	+++	220	108	49.1

注. *コロニー形成程度: 表1に準ずる

(3) 融合処理細胞由来再分化個体の特性調査

融合処理細胞から再分化し、馴化育成した41個体の生育特性調査の結果から、外観上雑種と判断された10個体を選抜し、諸特性の調査に供試した。その結果、葉の形はセイサイ型、ハクサイ型、あるいはその中間型を示し、葉の裂縁は中間型を示すものが多かった。葉面の毛じ、花序はハクサイに近い形態を示す傾向があった。なお、全個体が開花したので自殖を行ったところ、3個体で高い稔実程度を示したが、稔実程度の低いものが多く、3個体は不稔であった(表3)。

表3 セイサイとハクサイの融合細胞再分化当代の特性

個体番号	葉の形 1)	葉の 裂縁 1)	葉面の 毛じ 1)	花序 2)	自殖稔 実程度 3)
融合個体					
No.1	倒卵*	+	++	C	+++
No.2	へら	+	++	C	+++
No.4	へら	+	++	C	+
No.29	倒卵*	++	++	C	+
No.30	へら	+	++	C	±
No.31	倒卵*	+	++	C	+
No.32	へら	+	++	C	+++
No.38	倒卵*	+	++	C	-
No.39	へら	+	++	C	-
No.41	短楕円	+	++	未熟花	-
セイサイ	へら	+++	-	J	N.T
ハクサイ	短楕円	-	+++	C	N.T

注. 1): 種苗特性分類調査基準に基づき調査
-;無 +;少 ++;中 +++;多
*: 中間型

2): C;ハクサイ型 J;セイサイ型

3): -;無 ±;僅 +;少 ++;中 +++;多

NT:未実施

(4) 体細胞雑種の自殖第1代の抽苔特性の調査

高い稔実を示した体細胞雑種3個体の自殖第1代について、抽苔特性を調査した結果、これら自殖系統の抽苔開始日は、すべてセイサイよりも遅延した。すなわち、抽苔所要日数はセイサイの43日に対し、自殖系統は早いもので52日、最も遅い株は86日であった(表4)。このことから、細胞融合による体細胞雑種作出技術は、セイサイの晩抽化を図る育種法として有効な手段であると判断される。現在、春播き栽培で圃場における抽苔特性等を調査中である。

表4 セイサイとハクサイの体細胞雑種自殖第1代の長日条件における抽苔特性

	抽苔所要日数(日)
セイサイ	42
雑種自殖第1代	51~85*

注. *: 融合個体をNo.1, 2, 32の自殖第1代1系統5株を供試

なお、根端細胞を用いて染色体数を調査したところ、セイサイ $2n=36$ 、ハクサイ $=20$ に対し、雑種個体はこれらを合計した $2n=56$ であった。このことから、外観のみならず染色体レベルでも雑種性が確認された。

今後、晩抽性を有する優良系統の選抜、育成を図るとともに、根こぶ病抵抗性についても調査する予定である。

4 ま と め

山形青菜の抽苔特性と根こぶ病抵抗性の改良を目的に、セイサイとハクサイの細胞融合を行った。その結果、IOA処理したセイサイとハクサイの融合処理細胞から植物体が再分化した。体細胞雑種と判断された10個体のうち稔実程度の高い3個体の自殖後代について、長日条件下での抽苔状況を調査したところ、自殖系統の抽苔所要日数はセイサイに比較して長くなった。以上のことからセイサイとハクサイの細胞融合技術は、セイサイの晩抽化を図る育種法として有効な手段であると思われる。根こぶ病抵抗性については、今後調査を進める予定である。

引 用 文 献

- 1) 仲野英秋, 清野栄美, 佐藤昌宏. 1992. 山形青菜のプロトプラストからの植物体再分化. 東北農業研究 45: 271-272.
- 2) Terada, R; Yamashita, Y; Nishibayashi, S; Shimamoto, K. 1987. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. Theor. Appl. Genet. 73: 379-384.