

キャベツとハクサイの体細胞雑種における変異

田口拓郎・坂本浩司・寺田雅一

タキイ研究農場

(〒520-32 滋賀県甲賀郡甲西町針 1360)

(1992 年 10 月 14 日受付)

(1992 年 11 月 17 日受理)

キャベツとハクサイの細胞融合により得られた 8 個体の体細胞雑種について、外部形態、染色体数、花粉稔性および自家受粉による種子の稔実率を調査したところ、雑種個体間で変異があることが認められた。雑種には正常な形態を示す複二倍体のほかに、高次倍数体や奇形葉を伴う異数体が含まれていた。異数体を除いて、雑種個体は高い花粉稔性を示し、自家受粉により発芽能力のある種子が多数得られた。

酸性フォスファターゼのアイソザイム分析では、体細胞雑種個体間での差がほとんど認められなかったが、ロイシンアミノペプチダーゼでは、1 個体だけバンドパターンの異なるものが検出された。リボゾーム DNA およびミトコンドリア DNA に関しても、雑種個体間で変異がいくつかみられた。なお、葉緑体 DNA における差は確認できなかった。

1. 緒 言

細胞融合の最大の特徴として、性的に交雑不和合な遠縁間においても雑種個体が得られることが挙げられる。それゆえ、種々の作物で細胞融合による雑種育成の試みがなされ、これまでにナス科やアブラナ科などで多くの体細胞雑種が得られている³⁾。

体細胞雑種の育種への利用を考えた場合、稔性のある複二倍体を得られることが望ましいが、実際に得られた雑種個体では、形態や染色体数などに関して変異があることが報告されている^{4,17)}。形態異常や異数性を示す雑種個体のほとんどは稔性がなく、また形態的に正常な複二倍体の雑種が得られても、遠縁間の融合の場合には、ゲノム間や細胞質と核との不親和性などにより不稔性を示すことが多い。そのため細胞融合により得られた雑種の育種素材としての利用は、あまり進展しているとはいえない状況にある。

細胞融合のもう一つの特徴として、細胞質が混り合うことにより、細胞質のゲノム構成が変わることが挙げられる。*Brassica*⁷⁾ や *Lycopersicon*²²⁾ の体細胞雑種などでは、ミトコンドリアや葉緑体の DNA の解析から、細胞質ゲノムに関して種々の変異の存在が報告されている。

またこの性質を利用して、ミトコンドリア DNA にコードされている細胞質雄性不稔遺伝子や、葉緑体 DNA にコードされている除草剤抵抗性遺伝子を、別の作物へ導入する試みも積極的に行われている^{2,5,12)}。

筆者らは、キャベツとハクサイの細胞融合により得られた体細胞雑種個体の諸特性を把握するため、外部形態、染色体数、稔性およびアイソザイム、核・細胞質の DNA などに関して調査・分析したところ、雑種個体間で種々の変異が認められたのでここに報告する。

2. 材料および方法

赤キャベツ (*Brassica oleracea*, 交雑選抜系 ER159) およびハクサイ (*Brassica campestris*, 品種チヒリ 70) の細胞融合を行い、得られた体細胞雑種 8 個体について調査した。融合および培養方法などは、Taguchi と Kameya¹⁸⁾ の方法に従った。

(1) 染色体数の確認

染色体数の確認は、フォイルゲン染色法を用いて行った。染色の前に、根端組織を 2 mM 8-ヒドロキシキノリンで処理 (20 °C, 4 時間) し、その後カルノア液 (エタノール-酢酸, 3:1) で固定した。

(2) 花粉および種子稔性の調査

鉢上げした雑種個体を春化処理した後、温室にて抽苔開花させた。花粉稔性については、1%アセトカーミンにより染色された花粉の割合を調査した。また、種子稔性の調査は、雑種個体ごとに蕾および開花受粉（自殖）をそれぞれ行い、1花当たりの平均種子数を求めた。交配花数は、各受粉区とも60~80花とした。

(3) アイソザイムの分析

培養容器で育成中の雑種および両親の葉組織（100 mg）を、1 mM EDTA, 0.1% CHAPS を添加した 50 mM HEPES バッファー（pH7.5）中で磨碎した後、その抽出液を濾紙製のサンプルアプリーケーターを用いてゲル上に添加し、等電点電気泳動法により分析した¹¹⁾。泳動後ゲルは、酸性フォスファターゼ¹¹⁾ およびロイシンアミノペプチダーゼ¹⁴⁾ について、それぞれ活性染色を行った。

(4) DNA の分析

CTAB 法¹³⁾ により各材料の葉組織より全 DNA を抽出した。制限酵素により DNA を切断し、0.7% アガロースゲル中で電気泳動を行った後、DNA をナイロンメンブレン（Hybond-N, Amersham 製）に写し取った。ハイブリダイゼーションおよび DNA の検出は、ベリナー・マンハイム社のマニュアルに従った。

プローブとしては、イネの核 DNA 由来の 17S リボゾーム遺伝子（rDNA : Takaiwa¹⁹⁾）を含む 7.7 kb の *EcoR* I フラグメント、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 由来の ATPase α -サブユニット遺伝子（*atpA* : Kadowaki⁹⁾）を含む 2.2 kb の *EcoR* I フラグメントの各クローン、およびブロッコリー（*Brassica oleracea*）の葉緑体 DNA の 4.7 kb *Bgl* II フラグメントを DIG (Digoxigenin) でラベルしたものを用いた。

3. 結果および考察

(1) 外部形態

外部形態の観察から、全ての体細胞雑種の葉脈や葉柄部には赤キャベツ由来のアントシアン系色素の発現がみられ、また葉の表面にはハクサイの特徴である細かい毛茸がある、という共通した特徴が認められた。両形質とも *in vitro* の幼植物の段階から発見がみられた。毛茸の形質は、他の *B. oleracea* と *B. campestris* の体細胞雑種においても同様に観察されているが^{12,15,20)}、Sundberg ら¹⁷⁾ は毛茸のあるタイプとないタイプの2種類を得ている。これは材料に用いた *B. campestris* の作物の種類や品種の違いによるもので、ハクサイを片親に用いた場合には、ナタネなどの場合よりも毛茸の形質は強く発現されるものと考えられる。ほとんどの場合、*in vitro* の幼植物体では *B. oleracea* の特徴的な形質発現がみられ

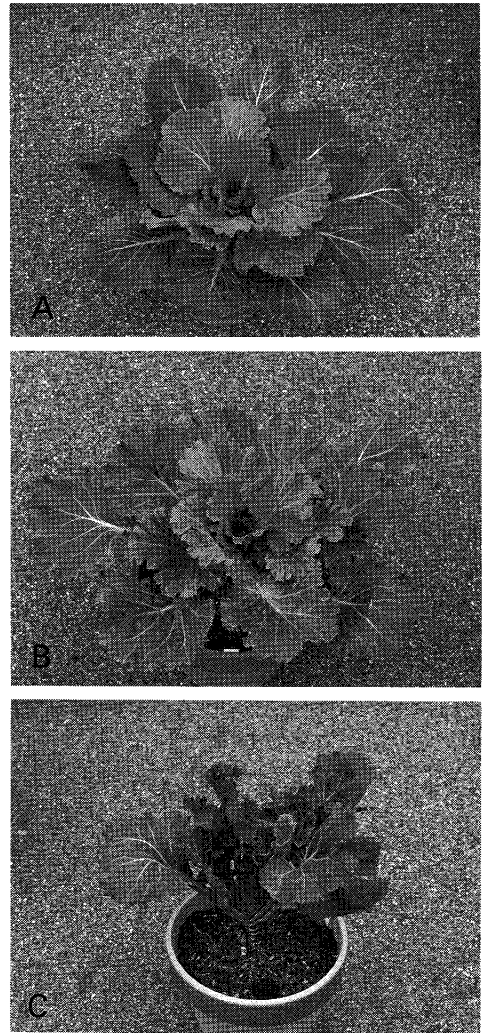


Fig. 1 Morphology of somatic hybrid plants between cabbage and Chinese cabbage. A : SH-22, B : SH-20, C : SH-28

ないため、形態的に雑種を確認することは難しい。しかしながら、本実験のように赤キャベツを片親とした場合には、アントシアン系色素の発現が不定芽分化時からみられるため、ハクサイ由来の毛茸の形質発現との組み合わせから、体細胞雑種の早期確認が可能である。

一方、体細胞雑種8個体の間で形態的な変異もみられた。4個体は円形に近い正常な葉を持ち、生育も旺盛であったが（**Fig. 1-A**）、2個体は葉肉が厚く、若干波打つ傾向を示した（**Fig. 1-B**）。残りの個体は、著しく波打つ奇形葉を持ち、生育は不良であった（**Fig. 1-C**）。しかしながら、Jourdan ら⁵⁾ や Sundberg ら¹⁷⁾ が報告しているような、片親に類似した葉形を持つ雑種個体はみられなかった。

Table 1. Variations in chromosome number, pollen viability and seed fertility in somatic hybrid plants between cabbage and Chinese cabbage.

Plant	Chromosome number (2 <i>n</i>)	Pollen viability	No. of seeds/pollinated flower	
			Open pollination	Bud pollination
Cabbage	18	69.5%	9.7	6.9
Chinese cabbage	20	97.1%	0.2	19.5
Somatic hybrid				
SH-20	56	90.6%	1.3	0.3
SH-22	38	82.0%	4.2	4.2
SH-23	47	13.6%	0	0
SH-24	38	94.1%	3.5	2.9
SH-26	38	86.3%	2.4	4.0
SH-27	38	92.1%	0.9	1.2
SH-28	44	21.7%	0	0.1
SH-42	56	93.4%	0.4	0.1

得られた雑種の野菜としての特性をみるために、一部圃場での栽培試験をしたところ、生育は非常に旺盛であったが、いずれも不完全な結球性しか示さなかった。キャベツとハクサイの種間雑種「ハクラン」は、すでに西⁹⁾や篠崎と管野¹⁶⁾により胚培養を利用して育成されているが、今回の結果と同様に、育成初期においては結球性に関して問題があった（半結球や不結球）ことが報告されている。

(2) 染色体数

フォイルゲン染色法により根端細胞の染色体を調査したところ、雑種個体間で染色体数の変異が認められた（Table 1）。形態的に正常な4個体（SH-22, 24, 26, 27）は、キャベツ（2*n*=18）とハクサイ（2*n*=20）の和に等しい38本の染色体を持つ複二倍体であった。また、肉厚の葉を育する2個体（SH-20, 42）は56本の染色体を有し、キャベツ1個とハクサイ2個のプロトプラストが融合した細胞から生じたものと考えられた。形態的異常のみられた残りの2個体（SH-23, 28）は、44～47本の染色体を持つ異数体であった。

B. oleracea と *B. campestris* との融合から得られた雑種における染色体の変異については、すでにいくつかの報告がなされている。Sundberg ら¹⁷⁾ および Terada ら²⁰⁾ は、得られた体細胞雑種のうち複二倍体（2*n*=38）の割合は30%程度で、それ以外の雑種は高次倍数体か異数体であったと述べている。しかし Jourdan ら⁵⁾ は、特別な系統間（細胞質雄性不稔系統とアトラジン抵抗性系統）での融合で、62%という高い割合で複二倍体を得ている。これらの相違は、用いた材料、培地条件および雑種選抜方法など種々の要因によるものと考えられるが、Jourdan ら⁵⁾ が述べているように、融合から再分化までの期間が短い場合に、複二倍体の割合が高くな

る可能性も考えられる。なお本実験では、再分化までの期間は3ヶ月半余りで、複二倍体の割合は50%であった。

(3) 花粉および種子稔性

雑種の育種素材としての利用を考えた場合、その稔性の有無が重要な問題となるため、得られた雑種個体の花粉稔性および自家受粉による種子稔性について調査した。結果は Table 1 に示す通りである。異数体である雑種2個体（SH-23, 28）の花粉稔性は、13.6%、21.7%と低かったが、残りの雑種6個体は80%以上の高い値を示した。なお、キャベツおよびハクサイの花粉稔性は、それぞれ69.5%、97.1%であった。有性交雑¹⁰⁾や細胞融合¹⁷⁾により得られた合成ナタネでは、栽培ナタネ品種や両親に比べ花粉稔性は低いとされているが、今回細胞融合により得られた複二倍体の体細胞雑種では、そのような傾向はみられなかった。

一方、種子稔性に関しては、花粉稔性の低かったSH-23, 28ではほとんど種子は得られなかったが、他の雑種個体では発芽能力のある自殖種子が多数得られた。しかしながら、1花当たりの種子数は、両親であるキャベツおよびハクサイと比較するとかなり低い値であった。なおハクサイにおける開花受粉で、自殖種子がほとんど得られなかったのは、蕾受粉では多数の種子が得られていることから、自家不和合性（開花時にのみ自家不和合性遺伝子が作用する）によるためと考えられる。

体細胞雑種（*B. oleracea* + *B. campestris*）における稔性に関して、Sundberg ら¹⁷⁾ はナタネの栽培品種や片親に比べかなり低い値（17%）であったと報告しているが、Jourdan ら⁵⁾ は片親に細胞質雄性不稔系統を用いた実験で、雑種間において幅広い変異がみられ、稔性の高い個体も得られたことを示している。一方キャベツとハクサ

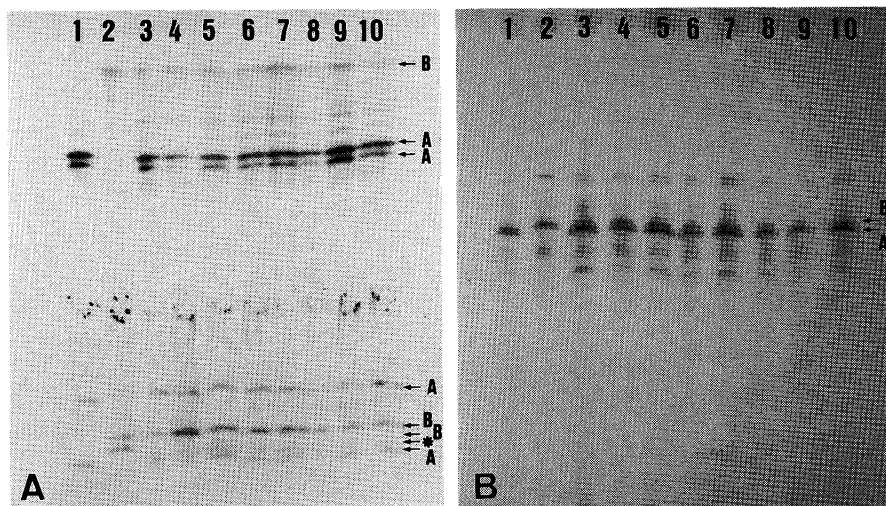


Fig. 2 Acid phosphatase (A) and leucine aminopeptidase (B) isozymes patterns for cabbage, Chinese cabbage and somatic hybrid plants.

Lane 1 : cabbage, 2 : Chinese cabbage, 3-10 : somatic hybrid plants (SH-20, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 42). Arrow indicate cabbage specific bands (A), Chinese cabbage specific bands (B) and novel band (*).

イの有性雑種においては、複二倍体の個体の稔性は強い自家不和合性のため低かったと述べられている⁹⁾。また篠崎と菅野¹⁶⁾は、比較的稔性の高い自家和合系統と稔性の低い自家不和合系統に分かれたことを報告している。これらの雑種においてみられる稔性の差異には、ゲノム間あるいは核と細胞質との不親和性、倍数性、自家不和合性遺伝子などが関与している可能性が考えられる。

複二倍体の体細胞雑種と同じゲノム構成を持つナタネ (*B. napus*) では、自家不和合性がないとされている。そこで雑種の自家不和合性について調査するために、開花受粉および蕾受粉による種子稔性の違いを比較したところ、いずれの個体においても両者で有意な差は認められず (Table 1)、ナタネと同様に自家不和合性がないものと判断された。しかしながら、雑種の自殖後代において、自家不和合性を示す個体の出現がみられたことから、雑種当代では、ハクサイ由来の自家不和合性遺伝子の発現が抑制されていたものと推察された。

(4) アイソザイムの分析

両親および体細胞雑種 8 個体における、酸性フォスファターゼおよびロイシンアミノペプチダーゼのアイソザイムパターンは Fig. 2 に示す通りである。酸性フォスファターゼに関しては、いずれの雑種においてもバンドパターンはほぼ同一であり、キャベツおよびハクサイ由来のバンド (矢印 A および B) と雑種に特有なバンド (矢印*) を合わせ持っていることがわかった (Fig. 2-

A)。

一方、ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) に関しては、雑種 8 個体のうち 1 個体 (SH-28) だけが他の雑種と違うパターンを示した (Fig. 2-B)。雑種 SH-28 以外の個体は、キャベツ特異バンド (矢印 A) とハクサイ特異バンド (矢印 B) の 2 本を持っているのに対し、SH-28 はキャベツ由来のバンド (A) のみであった。培養器内の植物体を材料として用いたことや、反復においても同じ結果が得られたことなどから、SH-28 は他の雑種個体にはない変異を有するものと推察される。体細胞雑種のアイソザイムの変異に関する報告は少ないが、非対称融合により得られた異数体の雑種では、ハクサイのゲノムの一部が欠損したことにより、キャベツ型のアイソザイムパターンを示した例がある²¹⁾。したがって、この SH-28 も遺伝子が座乗しているハクサイの染色体が欠損している可能性が考えられる。しかし、ハクサイ由来の LAP の遺伝子だけが何らかの影響により、発現しなかったことも十分考えられる。

(5) 核および細胞質 DNA の分析

rDNA をプローブとしたハイブリダイゼーションの結果は、Fig. -3A に示す通りである。キャベツは 4 本、ハクサイは 5 本のフラグメントを持ち、その内の 1 本は共通のものであった。一部の個体 (SH-20, 42) を除いて、雑種は両親のフラグメントを合わせ持っており、DNA レベルにおいても雑種性が示された。SH-20 では

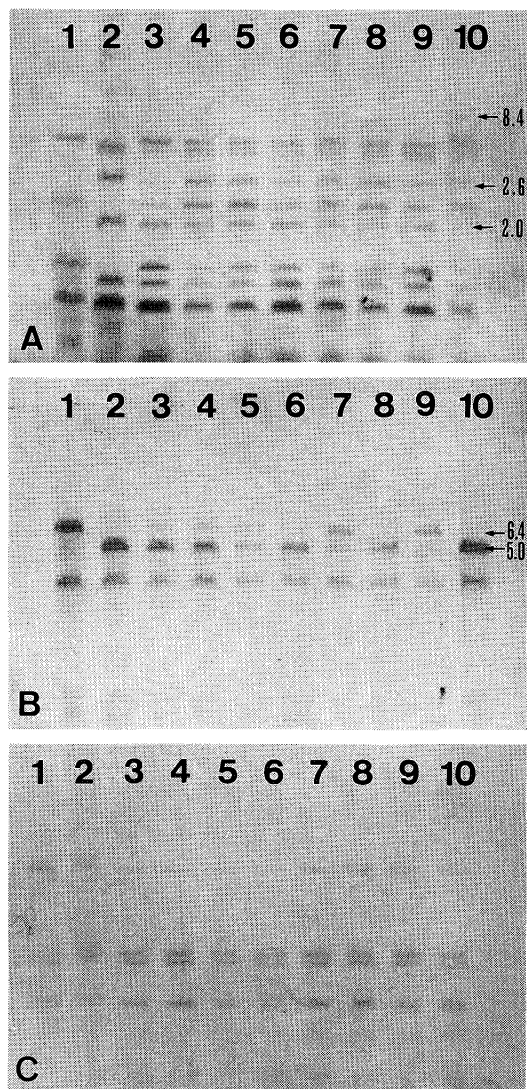


Fig. 3 Southern blot hybridizations of endonuclease digests of total DNAs of cabbage, Chinese cabbage and somatic hybrid plants to labelled DNA fragments.

(A) *EcoR* I digests, hybridized to 7.7 kb rDNA fragments containing 17S gene, (B) *Hind* III digests, hybridized to 2.2 kb mtDNA fragments containing *atpA* gene, (C) *EcoR* I digests, hybridized to 4.7 kb cpDNA fragments.

Lane 1-10: same as **Fig. 2**. Numerals indicate kb.

2.6 kbのフラグメントが1本欠如しており、また SH-42 では 2.0 kb のフラグメントが欠如した代わりに、8.4 kb の新たなフラグメントがみられた。rDNA を用いた雑種の確認法は、*Citrus*⁸⁾ や *Brassica*¹²⁾ の体細胞雑種においても用いられているが、雑種個体間でのこのような

変異は認められていない。

体細胞雑種個体間における mtDNA の変異について分析した結果、ハクサイ型と混在型の 2 つに大きく分かれることが確認された (**Fig. 3-B**)。キャベツおよびハクサイは、6.4 kb と 5.0 kb のそれぞれ特異なフラグメント、および 3.3 kb の共通するフラグメントを 1 本持っていた。雑種 8 個体はいずれも、ハクサイの 2 本の特異フラグメントは共通して有していたが、キャベツ特異フラグメントに関しては、持たないハクサイ型 (SH-24, 27, 42) と持っている混在型 (SH-20, 22, 23, 26, 28) に分かれた。細胞融合では mtDNA の組換えが頻繁に起こることが知られているが^{7,22)}、今回分析したキャベツとハクサイの体細胞雑種においては、そのような組換えを起こした個体の存在は認められなかった。また、キャベツ型を示す個体もみられなかった。一方 Jourdan ら⁵⁾ は、組換え型と *B. campestris* 型の mtDNA のみ存在し、上記の結果と同様に *B. oleracea* 型はみられなかったことを報告している。

葉緑体 DNA (cpDNA) の分析においては、種々の制限酵素 (*EcoR* I, *Bgl* II, *Pst* I) を用いたが、両親間で明確な違いのあるフラグメントは得られなかった。また雑種個体においても、両親と同じフラグメントしか検出されず (**Fig. 3-C**)、cpDNA における変異についての知見は得られなかった。

キャベツとハクサイの雑種は、すでに交雑や胚培養を利用しても得られているが^{9,16)}、細胞質は両親のいずれか一方に由来するという点で、細胞融合による体細胞雑種とは大きく異なる。今回得られた雑種においては、両親のミトコンドリアゲノムが混在しているものが認められた。葉緑体ゲノムに関する情報は得られなかったが、有性雑種にはみられない、新しい組み合わせの細胞質ゲノムが存在することは確かである。Jourdan ら⁵⁾ や Christey ら²⁾ の報告にもあるように、細胞質ゲノムを改良する上で、細胞融合は有効な手段である考えられる。

以上の結果から、キャベツとハクサイの細胞融合により得られた体細胞雑種個体においては、形態、染色体数、稔性、アイソザイムおよび核・細胞質 DNA に関して種々の変異があることが明らかとなった。なお cpDNA に関しては、異なるプローブを用いてさらに詳細に調べる必要がある。

謝 辞

プローブとして用いた rDNA および mtDNA のクローンをそれぞれ提供して頂いた、高岩文雄博士、門脇光一博士 (農業生物資源研究所) に深く感謝致します。ま

た, DNA の分析に際しご指導頂いた西尾剛博士 (放射線育種場) に対して深謝の意を表します。

文 献

- 1) Allen, S. L., M. S. Misch, B. M. Morrison, 1963. J. Histochem. Cytochem., **11** : 706-711.
- 2) Christey, M. C., C. A. Makaroff, E. D. Earle, 1991. Theor. Appl. Genet., **83** : 201-208.
- 3) Glimelius, K., 1988. Plant Cell Tiss. Org. Cult., **12** : 163-172.
- 4) Handley, L. W., R. L. Nickels, M. W. Cameron, P. P. Moore, K. C. Sink, 1986. Theor. Appl. Genet., **71** : 691-697.
- 5) Jourdan, P. S., E. D. Earle, M. A. Mutschler, 1989. Theor. Appl. Genet., **78** : 445-455.
- 6) Kadowaki, K., S. Kazama, T. Suzuki, 1990. Nucleic Acids Res., **18** : 1302.
- 7) Kao, H. M., W. A. Keller, S. Gleddie, G. G. Brown, 1992. Theor. Appl. Genet., **83** : 313-320.
- 8) Kobayashi, S., T. Ohgawara, K. Fujiwara, I. Oiyama, 1991. Theor. Appl. Genet., **82** : 6-10.
- 9) 西 貞夫, 川田 穰一, 戸田 幹彦, 1962. 園試報 A1 : p. 111-156.
- 10) Olsson, G., 1960. Hereditas, **46** : 227-237.
- 11) Rodora, B. J., 1980. Electrophoresis, **1** : 43-56.
- 12) Robertson, D., J. D. Palmer, E. D. Earle, M. A. Mutschler, 1987. Theor. Appl. Genet., **74** : 303-309.
- 13) Roger, S. O., A. J. Bendrich, 1985. Plant Mol. Biol., **5** : 69-76.
- 14) Scandalios, J. G., 1969. Biochem. Genet., **3** : 37-79.
- 15) Schenck, H. R., G. Robbelen, Z. Pflanzenzucht., **89** : 278-288.
- 16) 篠崎 捨喜, 菅野 稔, 1961. 農業及園芸, **36** : 1189-1190.
- 17) Sundberg, E., M. Landgren, K. Glimelius, 1987. Theor. Appl. Genet., **75** : 96-104.
- 18) Taguchi, T., T. Kameya, 1986. Jpn. J. Breed., **36** : 185-189.
- 19) Takaiwa, F., K. Oono, M. Sugiura, 1984. Nucleic Acids Res., **12** : 5441-5448.
- 20) Terada, R., S. Yamashita, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1987. Theor. Appl. Genet., **73** : 379-384.
- 21) Yamashita, Y., R. Terada, S. Nishibayashi, K. Shimamoto, 1989. Theor. Appl. Genet., **77** : 189-194.
- 22) Wachocki, S. E., A. B. Bonnema, M. A. O'Connell, 1991. Theor. Appl. Genet., **81** : 420-427.

Summary

Variations in Somatic Hybrid Plants between Cabbage and Chinese Cabbage

Takuro TAGUCHI, Kohji SAKAMOTO and Masaichi TERADA

Takii Plant Breeding and Experiment Station,

1360 Hari, Kohsei, Kohka, Shiga, 520-32 Japan

There were several variations in morphology, chromosome number, pollen viability and seed productivity in somatic hybrid plants obtained by protoplast fusion between cabbage and Chinese cabbage. Somatic hybrids contained expected normal amphidiploids, polyploids and aneuploids with abnormal leaves. Somatic hybrid plants except aneuploids, had high pollen viability and produced many germinable seeds following self pollinations.

Isozyme analysis for leucine aminopeptidase and acid phosphatase showed few variations on band patterns in somatic hybrid plants. And also some variations were detected on rDNA and mtDNA analysis by Southern hybridization, but unknown on cpDNA.