

称号及び氏名	博士(応用生命科学) 佐藤 正紀
学位授与の日付	平成21年11月30日
論文名	ハクサイ (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i>) の半数体育種に関する研究
論文審査委員	主査 小田 雅行 副査 阿部 一博 副査 大門 弘幸 副査 森川 利信

論文要旨

第1章 緒言

ハクサイは、1875年に本格的に導入されて以来、我が国の気候風土に適合するように品種改良され、現在では最も重要な野菜のひとつになっている。しかし生産現場では、育成された耐病性品種を犯す新しいレースの根こぶ病菌によって壊滅的な被害を受けることがある。また、消費者の嗜好は急速に変化しており、嗜好性の高い品種の育成も需要に追いつかないのが現状である。したがって、防除が困難な土壌伝染性病害である根こぶ病に対する抵抗性ととも、嗜好性の高い品種の早期育成技術の開発が求められている。

ハクサイの品種育成は、固定種に始まったが、第二次大戦後に雑種強勢で斉一性が高く、育成者権の保護が容易な一代雑種 (F₁) 品種が主流となり、現在では市販品種のほとんどが F₁ 品種になっている。通常の交雑育種による F₁ 品種の育成では、10年以上の長い年月を要し、そのうち7~8年 (7~8世代) は F₁ 品種の両親となる純系の育成 (固定) に費やされる。これに対して半数体育種法では、純系の育成が1世代で完了するので、育種年限の大幅な短縮が可能になる。

アブラナ属 (*Brassica*) 植物では、ナタネやブロッコリーで半数体育種が行われている。ハクサイでも蒔培養を用いた半数体育種法による品種育成が報告された経緯はあるが、不定胚形成率が低く、品種や系統によっては不定胚が得られないので、主たる育種法にはなっていない。

本研究では、ハクサイの半数体育種技術を実用化できる水準に改良し、実際に品種を

育成することを目指した。このため、蒴および小孢子培養における倍加半数体の作出効率向上法および半数体育種を行う上で有用な成熟花粉の保存法を開発し、それらの方法を用いて半数体育種法による実用品種の育成を試みた。

第2章 蒴および小孢子培養による倍加半数体の作出

ハクサイの小孢子培養における、不定胚形成の促進法を検討した。不定胚形成率は、培養前の花序あるいは蕾を4℃の低温下で3~10日間処理すると向上し、その効果は蕾処理の方が花序処理より高かった。また、蕾の低温前処理は、7~20日間の処理でも不定胚形成率の向上効果が認められた。低温前処理が不定胚形成の向上効果をもたらすメカニズムを解明するため、蕾の低温前処理中における小孢子の発達を経時的に観察した。その結果、処理前の小孢子は一細胞期後期であったが、徐々に、不均等サイズ二分裂の結果生じた大きさの異なる生殖細胞と栄養細胞からなる二細胞期の小孢子が増加し、低温処理期間中にゆっくりと成熟花粉に発達すると推定された。その中で、わずかではあるが、不定胚形成に進行すると推定される、均等な大きさの2つの核からなる二細胞期の小孢子も観察された。すなわち、低温処理により一部の小孢子が不定胚形成に向かうことが、不定胚形成率が向上する原因のひとつと考えられた。

次に、圃場で特性検定した後に選抜した1個体から、できるだけ多くの倍加半数体を獲得することを想定し、1個体から獲得できる不定胚数の推定を試みた。品種‘W1116’の1個体を温室で栽培し、開花の開始から採集可能な材料蕾をすべて用いて小孢子培養を行った。その結果、開花始めから143日間に27回にわたって花序を採取できた。それらの一部の培養によって得られた不定胚数から、この1個体から970個の不定胚を獲得できると推定された。また不定胚形成率は、開花始めから2ヶ月間は比較的高く、それを越えると低くなることが示唆された。これらの結果は、品種‘W1116’の1個体に基づく事例ではあるが、半数体育種の実行計画を策定する際に考慮すべき事項を示唆している。

半数体は、人為的に倍加した後に育種に利用するが、倍加処理には労力と時間がかかるうえ、その成功率は50%程度と低い。しかし、蒴・小孢子培養により得られる再分化植物体には、半数体の他に自然倍加した二倍体や四倍体が含まれる。これらのうち二倍体は、倍加処理なしで育種に利用できるので、その出現率が高いほど有利である。そこで、培養方法の違いが再分化植物の自然倍加頻度に与える影響を調査した。品種‘W1116’と‘信玄’を用いて蒴培養と小孢子培養を比べると、蕾あたりの再分化植物体の作出効率は小孢子培養のほうが蒴培養より高く、自然倍加した二倍体の出現率は、小孢子培養由来では60%以上であったのに対し、蒴培養由来では20~30%であった。さらに、異なるハクサイ12品種・系統の小孢子培養を行い、再分化植物体の作出と倍数性を調査した結果、二倍体の出現頻度は38~85%であった。これらの結果から、自然倍加の発生頻度は培養条件と材料植物の遺伝子型双方の影響を受けていることが示唆された。また、自然倍加の発生時期を推定するため、小孢子培養によって得られた不定胚の倍数性をフローサイトメーターにより調査した結果、70%が二倍性で30%が半数性であり、倍数性キメラは存在しなかった。このことから、染色体の自然倍加は不定胚形成の初期段階に生じていることが示唆された。

第3章 優良倍加半数体系統の育成

倍加半数体を用いた品種育成では、再分化植物の生育は斉一ではなく開花期も個体ごとに異なるので、これらの個体間、あるいは従来育種により系統選抜を行った個体との間で開花期が一致せず、試験交配できないという問題が生じる。しかし、花粉の保存技術があれば、育種や試験交配の F₁ 種子の採種において開花期の異なる系統間の交配が可能になる。そこで、花粉の保存方法を検討した。始めに、保存した花粉の活性を *in vitro* での発芽能によって評価することとして、*in vitro* での花粉発芽条件を検討した。その結果、花粉発芽培地の最適 pH は 8.0 であった。また、花粉に培地を滴下する前に、相対湿度(RH)66%で 5 時間処理する湿度前処理が *in vitro* 花粉発芽の安定化に有効であった。これらを組み合わせて *in vitro* 花粉発芽による花粉活性評価法を確立した。次に、花粉の保存期間中における湿度と温度について検討した結果、発芽能力の維持には 15%RH が最適であり、15°C~20°Cでは 1 週間、5°Cでは 6 週間、-20°Cでは 1 年程度花粉を保存できることがわかった。また、-20°Cで 1 年間保存した花粉を用いた交配実験の結果、新鮮花粉と同様の受精能力と自家不和合性能力を維持していることがわかった。

次に、半数体育種の実用化、すなわち倍加半数体を用いた品種育成について実証的に検討した。根こぶ病抵抗性を持つ 7 つの F₁ 品種あるいは試作系統の薬培養を行い、合計 740 の倍加半数体の種子を得た。これらについて、根こぶ病抵抗性検定と、圃場栽培での特性調査を行い、根こぶ病抵抗性で、かつ球内色が濃黄色で嗜好性の高い優良倍加半数体系統を 5 系統選抜した。これらを従来の交雑育種法により育成した 3 系統の母本と交配し、組み合わせ能力検定試験によって目的の形質を持つ 2 組合せの F₁ を選抜した。これらは、地域適応性試験を経て F₁ 品種（‘JT103’ と ‘JT107’）として販売された。次に半数体育種法の効率を高めるために、F₂ 選抜個体を材料とする小孢子培養による倍加半数体の作出を行った。F₁ 品種の自殖後代 F₂ 植物 188 個体を圃場で栽培して特性検定を行い、優良個体を選抜した。その後、選抜個体を掘り上げて温室内で栽培し、翌年 4 月に抽苔開花した個体から蕾を採取して小孢子培養による倍加半数体を作成した。一部の倍加半数体は、順化終了後の再分化植物当代を直接圃場に定植して栽培し、検定・選抜した。F₁ 品種を材料にした場合よりも少ない F₂ 倍加半数体 107 系統の中から優良個体を 10 個体選抜した。それらの中から系統選抜した中に、優良育種母本を見いだした。そして、この育種母本を利用して球内色が鮮やかな黄色で根こぶ病抵抗性の F₁ 品種‘ひろ黄’が育成、市販されるに至った。

第4章 総合考察

一連の倍加半数体作出技術を用いて実際に品種が育成され、上市されたことにより、本研究によって確立したハクサイの半数体育種技術は実用レベルに達していることを実証できた。しかし、不定胚形成における品種間差異、培養変異、根こぶ病抵抗性品種の再罹病化といった問題は残されており、今後、新たな抵抗性素材の探索と小孢子培養技術の進展による育種への利用が期待される。

審査結果の要旨

ハクサイの生産は、耐病性品種を犯す新しいレースの根こぶ病菌によって壊滅的な被害を受けることがある。また、消費者の嗜好の急速な変化に品種の育成が追いつかないのが現状である。したがって、難防除土壌伝染性病害である根こぶ病に対する抵抗性(主動遺伝子支配)とともに、嗜好性の高い品種(微動遺伝子支配)の早期育成が求められている。

ハクサイの品種は、雑種強勢で斉一性が高く、育成者権の保護が容易な一代雑種(F₁)が主流となっている。通常の交雑育種によるF₁品種の育成では、10年以上の長い年月を要し、そのうち7~8年(7~8世代)はF₁品種の両親となる純系の育成(固定)に費やされる。これに対して半数体育種法では、固定が1世代で完了するので、育種年限の大幅な短縮が可能になる。ハクサイでは、薬培養による半数体育種法が報告されたが、不定胚形成率が低く、品種や系統によっては不定胚がまったく得られないので、半数体育種法の実用化は遅れている。そこで申請者は、ハクサイの半数体育種技術を実用化できる水準に改良し、その方法を新品種の育成に適用して実用性を検証しようとした。

まず、ハクサイの小孢子培養における不定胚形成条件を検討した。不定胚形成率は、培養前の花序あるいは蕾を4℃の低温下で3~10日間かけて低温前処理すると向上し、その効果は蕾処理の方が花序処理よりも高かった。また、低温前処理を行う前の小孢子は一細胞期後期であったが、徐々に、不均等二分分裂して生じた大きさの異なる生殖細胞と栄養細胞からなる二細胞期の小孢子が増加し、処理期間中にゆっくりと成熟花粉に発達すると推定された。このほか、不定胚形成に進行すると推定される均等な大きさの2つの核からなる二細胞期の小孢子も観察された。これらのことから、低温前処理は一部の小孢子を不定胚形成に向かわせることが明らかになった。

次に、圃場で特性検定した1個体から、できるだけ多くの倍加半数体を獲得する育種現場を想定し、1個体当たりの最大不定胚形成数を推定した。品種‘W1116’では、1個体から970個の不定胚が形成され、その形成率は、開花始めから2ヶ月間では比較的高く、それ以降では低くなった。この結果から、半数体育種では、少数の優良個体から多数の不定胚を獲得でき、その固定化によって育種効率を上げられることが明らかになった。

半数体は、人為倍加による純系の育成に使われるが、倍加処理に労力と時間を要し、成功率の低いことが課題である。しかし、薬・小孢子培養によって再分化した植物体には、半数体の他に自然倍加した二倍体や四倍体が含まれることがある。そこで、培養方法の違いが再分化植物体の自然倍加頻度に与える影響を調査した。自然倍加二倍体の出現率は、小孢子培養が薬培養の約2倍と高かったので、小孢子培養を異なる12品種・系統で行うと、38~85%と比較的に高かった。得られた再分化植物体は、半数体と二倍体のみであり、倍数性キメラは存在しなかった。このことから、自然倍加は不定胚形成の初期段階で生じることが示唆され、小孢子培養によって育種効率が高まることが明らかになった。

倍加半数体による品種育成では、再分化植物の生育は不斉一で、開花期も個体ごとに異なる。したがって、これらの再生個体や系統選抜個体との間で試験交配ができないという問題が生じる。しかし、花粉の保存技術があれば、これを克服できる。そこで、保存花粉の活性を調べるために、25℃、相対湿度(RH)66%で5時間前処理し、pH8.0の花芽発芽培地に置床する花粉活性評価法を開発した。花粉の保存には、25℃では15%RHが最適であり、-20℃では1年間保存できた。保存花粉を用いて交配したところ、新鮮花粉と同様の受精能力と自家不和合性を維持していた。この花粉保存技術によってF₁育種の可能性が高められた。

半数体育種の実用化を意識して倍加半数体を用いた品種育成を試みた。根こぶ病抵抗性をもつ7つのF₁品種あるいは試作系統の薬培養により740の倍加半数体を得た。これらの中から根こぶ病抵抗性で、かつ球内色が濃黄色で嗜好性の高い優良5系統を選抜した。これらを交雑育種法によって育成した3系統の母本と交配し、組み合わせ能力検定試験によって目的の形質をもつ2組合せのF₁を選抜した。これらは、地域適応性試験を経てF₁品種（‘JT103’と‘JT107’）として上市された。次に半数体育種法の効率を高めるために、F₂選抜個体を材料とする小孢子培養によって倍加半数体を作成した。F₁品種の場合よりも少ないF₂倍加半数体107系統の中から優良な10個体を選抜した。それらの系統選抜した中に優良育種母本を高頻度で見出した。そして、これを利用して球内色が鮮やかな黄色で根こぶ病抵抗性のF₁品種‘ひろ黄’が育成、市販されるに至った。このように、一連の倍加半数体作出技術を用いて実際に品種が育成され、上市されたことにより、本研究によって確立したハクサイの半数体育種技術が実用レベルに達していることが実証された。

以上のように、実用化が困難であったハクサイの半数体育種法を実用レベルまで向上させ、品種育成の期間短縮を可能にしたことは、育種学ならびに園芸学に大きく貢献するものと評価できる。よって、本論文の審査および学力確認の結果とあわせて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。