細胞融合による体細胞雑種の育成

第2報 *Nicotiana tabacum* と *N. glutinosa* 及び *N. alata* との組合せについて*

長 尾 照 義

(日本専売公社 中央研究所)

昭和54年1月23日受理

さきに、著者は交雑和合性の低い種間の体細胞雑種の育成に成功したことを報告した⁴⁾。引き続き種間の体細胞雑種の育成を目途に研究を進めているが、今回はタバコ属 60 有余の種の中でも交雑和合性の比較的高い *Nicotiana tabacum* と *N. glutinosa* との組合せ並びに交雑和合性の最も低い *N. tabacum* と *N. alata* との組合せについて検討を重ねた結果、多数の体細胞雑種の育成に成功したのでその概要について報告する。

実験材料及び方法

1. 供試材料

N. tabacum と *N. glutinosa* との組合せにおいては、*N. tabacum* の品種としてブライトエローの突然変異であるアウレアを用い、一方の材料として野生種に属する *N. glutinosa* を供した。また、*N. tabacum* と *N. alata* との組合せでは *N. tabacum* の品種としてパーレー 21 を用い、一方の材料として野生種の *N. alata* No. 1 を供した。供試材料のうち *N. alata* は自家不和合性、その他は自家和合性である⁷⁾。両組合せによる体細胞雑種の育成に用いた *N. tabacum* の両品種は、それぞれ遺伝子座の異なる劣性 2 因子に支配されている葉緑素欠乏型の植物であって、その葉肉細胞のプロトプラストが黄灰色を呈するが、*N. glutinosa* 及び *N. alata* はそのプロトプラストが濃緑色を示し、検鏡下で融合の成否を識別できた。

2. プロトプラストの調製法及び融合

前報⁴⁾と全く同一の手法により実験を進めたが、2 種のプロトプラストをポリエチレングリコールで融合する際、マニトール液中のプロトプラストの密度は前報で述べたほど厳密なものではなく、経験的判断により選定した。

3. 融合細胞の培養

前報⁴⁾と全く同様な培養法を用いた。

4. 雑種カルスの培養、選抜及び雑種植物の分化

融合細胞の培養培地からマニトールを除き、シュクロースの濃度を 30 g/l に増加した寒天培地上にコロニーを流して培養を継続してカルスの形成を促進させ、径 2 cm 大のカルスに生長させた。この期間には *N. tabacum* と *N. rustica* との組合せによる雑種カルスの生成とはほぼ同一であったが、ただ異なる点はこの培地では雑種カルスの選抜が不可能であった。そこで、これらのカルスをすべて採取して、IAA/1 mg/l、カイネチン 1 mg/l を含む RM-1964 培地で約 1 か月培養して雑種カルスの選抜を行った。選抜採取した雑種カルスはゼアチン 1 ~ 5 mg/l を含む RM-1964 培地に移して、茎葉を分化させた。茎葉が分化した植物は 0.02 % の IAA を含む培地に移して発根させた。発根した植物は 4 号鉢に移植し、活着を待って、温室内に移動し、開花結莢まで栽培管理した。なお、長年の交雑実験によって育成に成功した有性雑種も特性の比較検討のため栽培した。

実験結果

1. 融合細胞の分裂

N. tabacum と *N. glutinosa* 及び *N. tabacum* と *N. alata* の融合したプロトプラストの分裂状況を示すと第 1 図及び第 2 図のとおりであった。融合時における両種の融合プロトプラストは両種のプロトプラストの色素体の相違から明らかに判定できた (第 1 図 A 及び第 2 図 A)。これらの融合細胞はやがて両種の細胞質が混合して肥大し (第 1 図 B)、次いで細胞壁が再生されるとともに、核融合が起り (第 1 図 C)、培養後 10~14 日目に細胞分裂が開始された (第 2 図 B 及び第 1 図 D)。その後数回の分裂が繰り返されてコロニーを形成した (第 1 図 E, F 及び第 2 図 C)。

2. 雑種カルスの様相と分化

IAA 1 mg/l、カイネチン 1 mg/l を含む RM-1964 培地上においては、供試した *N. tabacum* のカルスは、両品種とも生長するにしたがって、中央部が黄褐色で

* 大要は第 162 回講演会 (昭和 51 年 10 月) 及び第 166 回講演会 (昭和 53 年 10 月) において発表

周辺部が白色を示す幾分コンパクトな様相を呈して旺盛な茎葉分化の現象を示したが、*N. glutinosa* 及び *N. alata* はいずれも帯緑色のソフトな感触を持ったカルスに生長するにとどまった。これに対し、雑種カルスは両親カルスの形質を備えた、いわゆる、帯緑白色のコンパクトな様相を示した (第3図A)。これらの雑種カルスを採取して、ゼアチン1~5 mg/l を含む RM-1964 培地に移して培養したところ、1塊のカルスから多数の茎葉を発生することが明らかになった (第3図B及びC)。

3. 雑种植物の特性

(1) *N. tabacum* と *N. glutinosa* の雑種

この組合せによる体細胞雑種の特性は第1表に示したとおりである。60個の融合雑種カルスから分化した植物は33個体の多きを数えた。これらの雑種の草丈は両親よりも著しく高いもの、矮性で極端に低いものなど、その変異の幅が大であった。幹の太さ及び葉数もほぼ同様な傾向を認めたが、その大半が両親よりも多葉性を示したことが注目された。第4図Aの中央の植物は、出現した雑種のうちでも生育旺盛で多葉性の No. 31 の全姿を写したものである。

平面上にみた花卉は両親のほぼ中間を示すものから奇形を呈するものまで分散していたが、側面からみた花冠は *N. tabacum* に類似して長く、上部のふくらみ及び萼の形、色などはむしろ *N. glutinosa* に相似した特性を現わしていた (第5図A)。これらの花冠の特性は有性雑種とほぼ似た様相である。また、有性雑種の花色は両親の中間色で赤桃色を示したのに対し、体細胞雑種のそれは赤、桃、赤桃、白の各色を示す個体が分散し、多色であった。

葉形は全般に *N. tabacum* に似て紡錘形であったが、葉柄は *N. tabacum* に似て無柄なもの、*N. glutinosa* に似て有柄なもの、有性雑種に似てその中間形を示すものなどが出現した (第6図A)。葉色は *N. glutinosa* と同様に全個体緑色であったが、No. 12 及び No. 22 の腋芽からは体細胞突然変異が発生して、*N. tabacum* と同様な黄白色の茎葉を呈する植物が生長するなど興味ある現象が認められた。

そのほか、多数の雑種がタバコモザイクウィルスに抵抗性を示し、*N. glutinosa* の耐病性が優位に伝達されていることが明らかにされた。

ところで、染色体数は *N. tabacum* は $2n=48$ 、*N. glutinosa* は $2n=24$ であるから、1個の細胞同士が融合によって完全な複2倍体になったならば、この雑種は $2n=72$ になるはずである。こうした理由に基

づいて、33個体の雑種を解析してみると、完全な複2倍体が5個体 (No. 2, No. 5, No. 25, No. 29, No. 31) *N. tabacum* 1細胞と *N. glutinosa* 2細胞が融合して生じた雑種細胞 ($2n=96$) がカルスから植物体分化までの間に染色体数に変異を起して異数体になったと思われるもの8個体 (No. 9, No. 11, No. 13, No. 14, No. 15, No. 21, No. 24, No. 28)、残りの20個体は複2倍体の雑種カルスから植物体分化までの間に染色体数に変異を起こして $2n=72$ 以下の異数性を示した。

花粉の稔性は数個体の雑種に比較的高いものも出現したが、すべて雄性不稔で結莢するものもあったが、種子は全く生じなかった。しかし、これらの雑種も戻し交雑によって、発芽力のある種子を生産することが明らかになった。すなわち、20個体の雑種に対して両親の花粉を戻し交雑したところ、雌性不稔を示して交雑困難なものは4個体のみであった。

(2) *N. tabacum* と *N. alata* の雑種

この組合せの体細胞雑種の特性は第2表に示したとおりである。8個の融合雑種カルスから生じたものはわずか2個体であった。これらの雑種の草丈はいずれも両親より低かった。葉数の幾分多い種類も出現したが、草型は矮性であった (第4図B)。

花形、花色は、有性雑種では両親の中間を示したが、体細胞雑種はむしろ *N. tabacum* に近い特性であった (第5図B)。

葉形は無柄に近い様相を示して有性雑種とはその姿を異にしたが、葉色は濃緑色で類似していた (第6図B)。

また、これら2個体の雑種とも、有性雑種と同様にタバコモザイクウィルスに抵抗性を示し、*N. tabacum* のバーレー 21 の耐病性が遺伝されていることが明らかにされた。

染色体数は *N. tabacum* $2n=48$ 、*N. alata* $2n=18$ で複2倍体の体細胞雑種は $2n=66$ であるから、No.

Fig. 1. The division process of a fused cell of *N. tabacum*-*N. glutinosa*.

- A: Immediately after fusion.
- B: 7 days after culturing.
- C: 9 days after culturing.
- D: 14 days after culturing.
- E: 18 days after culturing.
- F: 21 days after culturing.

Fig. 2. The division process of a fused cell of *N. tabacum*-*N. alata*.

- A: Immediately after fusion.
- B: 10 days after culturing.
- C: 13 days after culturing.

1の雑種は完全な複2倍体である。この組合せによる体細胞雑種も雄性不稔であったが、戻し交雑によって雑種の特定の形質を遺伝保存することが可能になった。

考 察

前述した細胞融合から体細胞雑種育成までの過程より2～3の注目すべき結果について考察を加えてみたい。

まず、第1に、カルスレベルでの雑種カルスの選抜を培地の選択によって可能ならしめたことである。さきに、著者は *N. tabacum* と *N. rustica* の組合せにおける体細胞雑種の育成の過程において、カルスの色彩または形態の肉眼判別による雑種カルスの選抜法を確立したが⁴⁾、その後いろいろな組合せによる雑種カルスの選抜法を検討しているうちに、カルス培養の培地の条件、とくにオーキシン、サイトカイニンの種類、濃度などの選択によって、雑種カルスの肉眼判別ができることが分かってきたのである。前述した *N. tab-*

acum と *N. glutinosa* 及び *N. alata* との組合せによる雑種カルスの選抜における IAA 1mg/l, カイネチン 1mg/l を含む RM-1964 培地の選択もその一例である。

一方、著者が提唱してきた雑種カルスの肉眼判別法は、片方の素材に用いる *N. tabacum* の品種として、そのカルスが白色でコンパクトな様相を示すものを常用しているところに特徴があるといわねばならない。つまり、こうしたものの葉肉細胞のプロトプラストは、タバコ属植物の中でも培養が最も容易で、かつ、いかなる培養条件にも順応できるから、融合細胞の培養にとって最適な材料といえるわけである。したがって、すでに指摘したごとく⁵⁾、体細胞雑種育成における雑種カルスの選抜は、将来、肉眼判別法が最も有効な方法になると思われる。

第2に、今回の体細胞融合によって育成した多数の植物が異数体で雄性不稔の特性を示したことである。交雑育種においては、従来から雄性不稔品種の利用はトウモロコシ、タマネギなどでは実用的に高く評価されているが、タバコにおいても BURK²⁾ 及び 岡⁶⁾ は *N. megalosiphon*, *N. plumbaginifolia*, *N. glutinosa* を母とし *N. tabacum* を戻し交雑することにより雄性不稔を作成した。今回の体細胞融合によっても、多数の雄性不稔の雑種が出現し、現在、それらに戻し交雑を繰り返してこれらの特性の遺伝的固定を急いでいるが、ほぼ雄性不稔品種の育成が可能であることが分かってきた。今までの結果から、これら雑種の不稔性は、いわゆる、Cytoplasmic male sterility に属するようである。ところで、複2倍体は稔性が高いのが普通であるが、今回の体細胞融合によって生じた複2倍体の雑種群は雄性不稔性を示し、その他の性質もそれぞれ異なることが観察された。これらの現象の解明は今後の研究に待ちたい。

以上の諸実験を通じてみると、将来、植物の種間以上の隔たりを持ったものの間での体細胞融合では、異数体で不稔性が高く、固定性のない不安定なものの出現が多くなるであろうと思われるのであって、これが育種対策の一つとして戻し交雑法が有利な、かつ、不可欠な手段になると思うのである。

第3に、タバコ属の中で交雑合性の最も低い種間の体細胞雑種の育成に成功したことである。*N. alata* のハプロイドの葉肉細胞のプロトプラストを培養して植物を育成した例⁷⁾が、最近、発表されたが、*N. tabacum* と *N. alata* との組合せによる体細胞雑種を育成した例は、世界でも今回が始めてであるように思われる。

Fig. 3. Propagated callus and shoots differentiated from callus masses.

A: *N. tabacum*-*N. glutinosa* somatic hybrid callus.

B: *N. tabacum*-*N. glutinosa* somatic hybrid plants.

C: *N. tabacum*-*N. alata* somatic hybrid plants.

Fig. 4. Flowering plants

A: Left, *N. tabacum*. Middle, *N. tabacum*-*N. glutinosa* somatic hybrid. Right, *N. glutinosa*.

B: Left, *N. tabacum*. Middle, *N. tabacum*-*N. alata* somatic hybrid. Right, *N. alata*.

Fig. 5. The shape of flowers.

A: Upper left, *N. tabacum*. Upper middle, *N. tabacum*-*N. glutinosa* sexual hybrid. Upper right, *N. glutinosa*. Middle & lower, *N. tabacum*-*N. glutinosa* somatic hybrids.

B: Upper left, *N. tabacum*. Upper middle, *N. tabacum*-*N. alata* sexual hybrid. Upper right, *N. alata*. Lower, *N. tabacum*-*N. alata* somatic hybrids.

Fig. 6. The shape of leaves.

A: Upper left, *N. tabacum*. Upper middle, *N. tabacum*-*N. glutinosa* sexual hybrid. Upper right, *N. glutinosa*. Middle & lower, *N. tabacum*-*N. glutinosa* somatic hybrids.

B: Upper left, *N. tabacum*. Upper middle, *N. tabacum*-*N. alata* sexual hybrid. Upper right, *N. alata*. Lower, *N. tabacum*-*N. alata* somatic hybrids.

Table 1. Characteristics of *N. tabacum*-*N. glutinosa* hybrids.

Variety and hybrid	Plant height (cm)	Stalk diameter (cm)	Number of leaves per plant	Chromosome number (2n)	Normal pollen (%)	Back cross*	Tobacco mosaic virus**
<i>N. tabacum</i> (Aurea)	77	1.15	24	48	96		S
<i>N. glutinosa</i>	58	0.95	24	24	92		R
Sexual hybrid	94	0.85	19	36	0		R
Somatic hybrid							
No. 1	92	0.80	24	69	0	E	—
No. 2	89	1.05	31	72	4	E	—
No. 3	97	1.35	49	53	0	—	—
No. 4	75	0.85	55	54	0	—	—
No. 5	103	1.25	43	72	2	E	R
No. 6	97	1.15	42	63	0	E	R
No. 7	43	1.30	34	66	0	E	—
No. 8	105	0.80	19	58	0	E	—
No. 9	80	0.85	41	74	0	—	—
No. 10	51	0.65	18	71	0	E	R
No. 11	62	0.75	25	78	0	E	—
No. 12	60	0.95	36	71	0	E	S
No. 13	87	1.10	29	88	10	D	—
No. 14	60	0.95	28	78	0	E	R
No. 15	45	1.05	19	77	0	D	—
No. 16	78	1.00	36	53	0	E	R
No. 17	130	1.30	45	59	0	—	—
No. 18	86	0.80	21	70	0	E	R
No. 19	112	0.95	40	70	3	E	R
No. 20	65	0.85	38	52	0	—	R
No. 21	85	0.90	21	82	0	D	R
No. 22	65	1.05	27	50	14	E	R
No. 23	103	1.30	53	71	0	—	—
No. 24	110	1.05	49	79	0	—	R
No. 25	113	1.35	47	72	0	—	—
No. 26	82	1.05	33	71	0	—	—
No. 27	43	0.90	16	68	3	E	R
No. 28	21	1.00	20	78	0	—	—
No. 29	50	1.25	28	72	0	D	R
No. 30	60	1.50	36	65	0	—	R
No. 31	111	1.20	44	72	17	E	—
No. 32	89	1.15	25	66	0	—	R
No. 33	31	0.75	62	66	0	—	—

*E: Easy, D: Difficult.

**S: Susceptible, R: Resistant.

Table 2. Characteristics of *N. tabacum*-*N. alata* hybrids.

Variety and hybrid	Plant height (cm)	Stalk diameter (cm)	Number of leaves per plant	Chromosome number (2n)	Normal pollen (%)	Back cross*	Tobacco mosaic virus**
<i>N. tabacum</i> (Burley 21)	107	1.80	29	48	96		R
<i>N. alata</i>	77	0.86	19	18	96		S
Sexual hybrid	92	1.15	20	33	0		R
Somatic hybrid							
No. 1	46	0.85	27	66	0	E	R
No. 2	74	1.15	34	71	0	E	R

*E: Easy.

**S: Susceptible, R: Resistant.

一方において、著者は何回かの交雑実験を重ねて、*N. tabacum* と *N. alata* の有性雑種の育成に成功した。本報告の中にもその特性を示したが、既往の研究業績をみても、その育成の困難性を指摘している⁷⁾。著者はこの組合せを用いて同時に体細胞雑種の育成にも成功したわけである。とにかく交雑困難な組合せでは細胞融合による体細胞雑種の育成も困難をとまなうと考えられやすいが、最近、全く交雑できない属間の体細胞雑種の育成に成功していること³⁾ から考えると、組織培養技術の発展のいかんによっては、交雑不可能な植物同士の体細胞雑種の育成も、近い将来、多くなると思うのである。

本研究にあたり、有益なる助言をいただいた当所特別研究員中田和男博士、並びに、雑種のタバコモザイクウィルスの抵抗性を検定していただいた当所主任研究員高浪洋一博士に厚く感謝の意を表する。

引用文献

1. BOURGIN, J. P. and C. MISSIONIER 1978. Culture de protoplastes de mésophylle de *Nicotiana alata* LINK et OTTO haploïde. Z. Pflanzenphysiol. **87**: 55—64.
2. BURK, L. D. 1960. Male-sterile flower anomalies in interspecific tobacco hybrid. J. Hered. **51**: 27—31.
3. MELCHERS, G., M. D. SACRISTAN and A. A. HOLDER 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. Carlsberg Res. Commun. **43**: 203—218.
4. 長尾照義 1978. 細胞融合による体細胞雑種の育成第1報 *Nicotiana tabacum* と *Nicotiana rustica* との組合せについて. 日作紀 **47**: 491—498.
5. ——— 1978. 細胞融合による育種技術の可能性. Life Science **5**(9): 11—17.
6. 岡 英人 1961. タバコの病害抵抗性の種間移行に関する育種学的研究. 秦野たばこ試験場報告 **49**: 1—44.
7. 田中正雄 1961. タバコ属の種間交雑におよぼす放射線照射花粉の効果. 秦野たばこ試験場報告 **51**: 1—38.

I. BOURGIN, J. P. and C. MISSIONIER 1978. Culture

Somatic Hybridization by Fusion of Protoplasts

II. The combinations of *Nicotiana tabacum* and *N. glutinosa* and of *N. tabacum* and *N. alata*

Teruyoshi NAGAO

(The Central Research Institute, Japan Tobacco & Salt Public Corporation,
Umegaoka, Midoriku, Yokohama 227)

Summary

Mesophyll protoplasts of *Nicotiana tabacum*. cv. Bright Yellow mutant Aurea and *N. glutinosa* and of *N. tabacum*. cv. Burley 21 and *N. alata* were prepared from leaf tissue by enzymatic digestion and were fused with the aid of polyethylene glycol.

When the fused protoplasts were plated on an agar medium or in a liquid medium for cell culture, new cell walls were regenerated from them and the cell division could be seen beginning on the 14th day of culture in the combination of *N. tabacum* and *N. glutinosa*, whereas in that of *N. tabacum* and *N. alata* 10th day of culture (Fig. 1, 2). Cell division process took place over again after that (Fig. 1, 2). After one month culture, almost all of survived protoplasts grew to cell colonies of 1—2 mm in diameter. The cell colonies were placed on an agar medium containing 3.0 mg/l 1-Naphthalenacetic acid and 1.0 mg/l 6-Benzylaminopurine in order to induce callus formation. On the medium, they grew vigorously and formed calli of 2 cm in diameter after 2 months culture. However, it was too difficult to select the hybrid callus. They were transferred to a modified LINSMAIER and SKOOG medium containing 1.0 mg/l kinetine and 1.0 mg/l indoleacetic acid. After one month of culture on this medium, the hybrid calli, showing greenish white with a compact appearance were selected in contrast to the parental type calli tinged with a white or green color (Fig. 3A). Thirty-three somatic hybrid calli of the combination of *N. tabacum* and *N. glutinosa* and 2 calli of the combination of *N. tabacum* and *N. alata* were obtained.

Many plantlets were differentiated from these calli when transferred to enriching zeatin (Fig. 3B & C).

All of the mature flowering plants showed to be perfectly somatic hybrid, and the shape of the leaves and flowers indicated that many somatic hybrids were of an intermediate characteristic between *N. tabacum* and *N. glutinosa* and between *N. tabacum* and *N. alata* (Fig. 5, 6). A few plants had a strong resemblance to a parent or a sexual hybrid (Fig. 5, 6). The plant height of the many somatic hybrids were higher than that of the parental plants, and the male sterility of the greater part of the hybrid plants was visible under investigation, and it was possible to back cross (Fig. 4, Table 1, 2). They were highly resistant to the tobacco mosaic virus (Table 1, 2).

The chromosome number of the somatic hybrids of the combination of *N. tabacum* and *N. glutinosa* was determined: five were amphidiploid, twenty-eight showed aneuploid with 50 to 88 chromosomes (Table 1). On the other hand, the chromosome number of the somatic hybrids of the combination of *N. tabacum* and *N. alata* also was determined: one was amphidiploid and the other aneuploid (Table 2).