原著論文

ダイコンとキャベツとの属間キメラの栄養繁殖後代で認められた新しいタイプの出現とその特徴

肖 秋濱¹⁾・陳 利萍²⁾・保木祐樹²⁾・野口 貴³⁾・平田 豊²⁾

(¹⁾東京農工大学大学院連合農学研究科, 東京都府中市, 〒183-8509, ²⁾東京農工大学大学院農学研究科, 東京都府中市, 〒183-8509, ³⁾東京都農業試験場江戸川分場, 東京都江戸川区, 〒133-0073)

摘要

異種細胞・組織間の形態的, 生理的, 遺伝的相互作用を調べるため, *in vitro* 寄せ接法によりダイコン“美緑菜”と赤キャベツ“ルビーボール”との属間キメラを合成し, これらキメラ植物の外部形態, 生理的特性を詳しく調べた。その結果, 種々の形態的, 生理的相互作用が認められた。V₁世代(最初のキメラ世代V₀から腋芽を培養して得られた栄養繁殖世代)で, 形態的にはダイコンの復帰型と同定された植物のなかで, その植物の葉の表層にワックスを強く発現する, 新しいタイプのキメラの出現が認められた。このタイプの植物は抽苔した花茎の分枝数や花の数が増加し, 開花日は対照植物や通常のダイコンの復帰型より遅かった。またダイコンをこのタイプのキメラ植物に戻し交配した場合の着莢率は高かった。さらにこの新タイプの葉の横断切片の観察から, 柵状組織には通常のダイコンの細胞層より厚い部分が認められ, キャベツの細胞を含む層構造をとっていることがわかった。これを確認するために, アイソザイム分析を行ったところ, やはり両親のバンドを有しており, さらにこのタイプのみに特有の新規バンドが現れたので, この層はキャベツの細胞・組織を部分的に有するだけでなく, 何らかの相互作用をしている可能性が考えられた。また花粉稔性を調査した結果, MRR(ダイコン型をM, キャベツ型をRとし成長分裂組織の起源層構成として表層から内層へ, L I層-L II層-L III層として表す)タイプが最も低く, 戻し交配によって種子は得られなかった。一方, MMRのように生殖細胞形成層であるL II層がダイコンの場合には花粉稔性も高く, ダイコンを花粉親として戻し交配すると正常な“美緑菜”型種子が得られた。この属間キメラの栄養世代(V₀, V₁, V₂)3世代に戻し交配して得られた種子後代の諸形質を調査したが, 現在まで明瞭な遺伝的変異は認められていない。

キーワード: ダイコン属, ブラシカ属, 属間キメラ, 接木, 形態形成, アイソザイム分析

緒言

著者らは新しい遺伝的変異を誘導する方法として, 接木による遺伝的変異の誘導に関する研究(平田1979, 1980, Hirata and Yagishita 1986, Yagishita and Hirata 1987, Hirata *et al.* 1989, 1995, Yagishita *et al.* 1990, Taller *et al.* 1998)やアブラナ属人為合成キメラ植物を利用した変異の誘導に関する研究(Noguchi *et al.* 1992, Noguchi and Hirata 1994, Hirata *et al.* 1990, 1992, 1994, 2000, 2001)を進めてきた。その結果, トウガラシでは40世代以上も安定して維持されている接木変異系統が得られており, 育種母本としての利用も可能となった(Taller *et al.* 1999)。また, アブラナ属種間キメラでは異種組織間の形態的, 生理的相互作用だけではなく, 種子後代における遺伝的変異も得られている(Hirata *et al.* 1990, 1992, 1994, Noguchi and Hirata 1994)。特に興味深いことには, アブラナ属種間キメラに元の親植物を戻し交配して得られた種子世代から細胞質雄性不稔や核遺伝子の変異が得られている(Hirata *et al.* 2001)。

現在, 新たに遠縁植物間でのキメラの合成やそれらの諸特性の解明についての研究を進めている。これまで植物キメラは主にWinkler(1907)の方法による*in vivo*接木法によって作成されてきた。しかし, この方法ではアブラナ属の品種間や種間キメラでは実験に十分な数の個体が得られなかった(Noguchi *et al.* 1989)。また*in vitro*系での混合カルス培養(Marcotrigiano and Gouin 1984)やFeeder培養法による属間細胞接木(cell graft)(Binding *et al.* 1987)を用いたキメラ合成に関する報告に基づいて, それらの追試を行ってきたが, いずれも成功しなかった。そこで著者らはさらに効率よくキメラを得るため, “*in vitro*寄せ接法”(Noguchi *et al.* 1992)を確立した。この方法により, 種間キメラだけでなく, 属間キメラの合成にも成功した(Hirata *et al.* 2000)。本研究では類縁関係の遠い属間キメラの形態的, 生理的特性を明らかにするとともに, 属間キメラ後代で新しい遺伝的変異を見出すことを目的に実験を進めた。

本論文においては, ダイコンとキャベツとの属間キメラにおける形態的, 生理的特性, 特に本実験で見出した新しいキメラタイプの諸特性について報告する。

材料及び方法

ダイコン (*Raphanus sativus*) 品種“美緑菜”(以下 M と略す) (Fig. 1a) および赤キャベツ (*Brassica oleracea*) 品種“ルビーボール”(以下 R と略す) (Fig. 1b) を用いて, “*in vitro* 寄せ接法”(Noguchi *et al.* 1992) によって属間キメラ (Fig. 1c-i) を作成した。得られたキメラの当代植物 V_0 の腋芽培養によって増殖した栄養繁殖植物 (V_1), さらに V_1 から同様な腋芽培養による増殖で得られた栄養繁殖植物 (V_2) の三栄養世代のキメラ植物を本実験に供試した。またこれらキメラの対照植物として“美緑菜”と“ルビーボール”をキメラ植物と同様に腋芽培養により得られたものを用いた。これら栄養繁殖で得られた植物を同一の時期に順化し, 植木鉢に定植した。以後, それらを無加温温室条件下で生育させ, 実験に供した。

キメラ植物のタイプや構造の同定には高等植物で広く認められ, 著者らがすでにアブラナ属種間キメラでその有効性を確かめてきた被子植物の成長点における分裂組織構造 Tunica-carpus 説 (Schmidt 1924) と三層構造起源説 (Satina and Blakeslee 1941) (成長分裂組織の始源細胞層構成を表層から内層へ, L I-L II-L III と記す) に基づき行った。例外的な分裂組織や特殊な場合を除き, 原則的に L I 層は表皮を分化し, L II 層は生殖細胞組織や葉肉を分化し, さらに L III 層は維管束系を分化する。本研究でも, これに沿って, 属間キメラの成長分裂組織の起源層を最外層から L I-L II-L III として表し, 例えば, ダイコン“美緑菜”は表皮から内側へ L I 層が“美緑菜”, L II 層が“美緑菜”, L III 層が“美緑菜”であるので, “美緑菜”の頭文字の M を略して MMM (L I-L II-L III) と記し, 同様に周縁キメラで L I 層が“美緑菜”, L II と L III 層が“ルビーボール”と同定された場合, MRR (L I-L II-L III) と表した。また同一植物体に MMM 部分と MRR 部分 (または MMR 部分) が同時に存在する区分キメラの場合には, MMM+MRR または MMM+MMR+MRR と示すこととした。これら各タイプのキメラ植物についてその形態的特徴, 生理的特性を調査した。また, それらを確認するため, アイソザイム分析を行った。さらに, 生殖細胞層の起源層とされる L II 層を決定する場合は, 組織形態的な観察の他, 戻し交配により得られる種子世代のタイプを確認した。

キメラ植物を構成する異種細胞・組織間の形態的, 生理的特徴を詳しく調べるために, キメラの葉の細胞・組織構造, また抽苔した花茎の分枝数, 開花日, 花色, 花数を調べた。また種属間キメラでは花粉稔性, 着莢率および種子稔性の低下することが知られているので, 本実験の属間キメラについてそれらの特性についても調査した。

各タイプの葉の組織構造解析は, 栄養繁殖で得られた各タイプのキメラ植物を植木鉢に定植後 60-70 日たった材料の先端から 4-5 番目の展開葉を用い, その葉の主脈

を除いた左右の葉身の中央部位を採り, 横断切片を作成し, それらの細胞・組織構造を観察することによって行った。

無加温温室で生育させたキメラ植物が抽苔した後, 植物個体ごとにすべての花茎の一次側枝数を数え, 花茎の分枝数とした。花の数は個体ごとに開花した花全部の合計を花数とした。開花日はその個体に一番目の花が咲いた日を開花日とした。

花粉稔性の調査は植物個体に一番目の花が開花した一週間後を目安に, 調査日当日に開花した花を午前 10 時頃採取して行った。1 個体から 3 花を, それぞれの花から 3 本ずつ雄蕊を採り, その雄蕊の葯から得られた花粉をそれぞれアセトカーミン溶液で染色し, 1 葯当たり 3 視野を光学顕微鏡下で観察した。

キメラ植物の交配は開花の前日の蕾受粉により行い, その両親植物であるダイコンとキャベツを花粉親として用いた (ここでは便宜上, 戻し交配と呼ぶ)。各組み合わせ 20 花を目安として, 戻し交配を行い, 着莢率を調査した。さらに戻し交配で得られた種子をビニールポットに播種し, 発芽率を調べた。

キメラ植物葉の酸性フォスファターゼアイソザイムの分析は Hirata *et al.* (1992) の方法に従って行った。すなわち, 各タイプのキメラの新鮮な葉 500 mg を, 0.7 ml/l のメルカプトエタノールを含む緩衝液 (0.2 M リン酸二カリウムと 0.2 M リン酸一カリウム, pH 7.0) 中で磨碎し, 粗酵素を抽出した。電気泳動には 10% のアクリルアミド分離用ゲルを用い, 泳動バッファーは 5 mM トリス-40 mM グリシン緩衝液 (pH 8.6) を用いた。泳動後ゲルを染色液に浸し, 37°C でバンドが明瞭に現れるまで約 1 ないし 2 時間染色した。なお染色液は 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 50 ml に 100 mg の α -ナフチル酢酸を溶かした後, さらに使用直前に Farst Gernet GBC 塩 100 mg を加えて, よく混合した溶液を用いた。

結果

1. キメラ植物の形態的特徴

キメラ植物の合成に用いた一方の親植物であるダイコン品種“美緑菜”(Fig. 1a) は植物全体が緑色であり, 葉形はへら型の深裂葉を持つ。他方キャベツ品種“ルビーボール”(Fig. 1b) は葉の表面に強いワックスを分泌し, 葉身全体にアントシアニンの発現が明瞭で, また葉形は丸型で葉縁は鋸歯状である。Fig. 1c-i に示すタイプのキメラ植物はこれまでの栄養繁殖 3 世代の間で得られたキメラの基本タイプである。復帰型の MMM (Fig. 1c) と RRR (Fig. 1d) タイプはそれぞれの対照植物と同じ形態を示した。MMR タイプ (Fig. 1e) は主脈およびその二次脈に沿って赤キャベツ品種“ルビーボール”の指標形質であるアントシアニンの発現が見られ, 葉形は“美緑菜”と“ルビーボール”の中間型を示した。また MRR タイプ (Fig. 1f) で

は葉身全体にアントシアニンの発現が見られ、葉形は“ルビーボール”とほぼ同じであった。このようにキメラ植物の葉の形状形成には植物の内層L IIおよびL III層が大きく関与していた。これらの上記の形態はこれまで見てきた種間キメラであるコマツナーキャベツや西洋ナタネの組み合わせでも、全く同様であった(Noguchi and Hirata 1994, Noguchi *et al.* 1996)。以上のタイプのほかには同一植物体にMMR部分(またはMMM部分)とMRR部分が同時に存在したMMR+MRR (Fig. 1g)とMMM+MMR+MRR (Fig. 1h)タイプも得られた。花色は“美緑菜”と“ルビーボール”はそれぞれ白色と黄色である。また、MMRタイプは白色を呈したが、MRRタイプは“美緑菜”と“ルビーボール”の中間の淡黄色を示した。すなわち、L I層とL II層(およびL III層)が異なる場合には両親の中間色になった。通常花の色素は表層で作られるL I層の形質発現によるが、キメラの場合にはL II層との相互作用が現れた。これも種間キメラであるコマツナーキャベツの場合と同様であった(Noguchi and Hirata 1994)。

V₁世代のキメラ植物の中で形態的にはダイコン“美緑菜”と区別できない復帰型MMMとみなされたが、葉の表面にルビーボールと同様強いワックスを発現する新しいタイプ (Fig. 1i) の復帰型個体が出現した。これをMMM(Wax+)タイプとした。このタイプの植物は生育初期にはMMM+MMRあるいはMMM+MMR+MRRの周縁区分型で、その後MMM(Wax+)となった。そして抽苔開花後、ワックスを発現しない通常の復帰型(MMM)植物とは形態的にも大きく異なったものとなった (Fig. 1j, k)。この新しいタイプにおいて、さらにその細胞・組織構造を調べるため、光学顕微鏡で葉の横断切片を観察した。対照の“美緑菜”(Fig. 2a)とその復帰型MMM (Fig. 2c)はほぼ同じ構造を持ち、L II層の柵状組織の細胞が3層規則正しく並んでいた。一方、このMMM(Wax+) (Fig. 2d)タイプの表層には“ルビーボール”の表層と同様、ワックスの層が認められた。そのL II層由来の柵状組織の細胞の大きさや配列は“美緑菜”や復帰型とは異なり、不規則であった。特に柵状組織には“美緑菜”より厚い層が部分的に認められた。

2. キメラ植物の生理的特性

V₁のMMM(Wax+)タイプにおいて花茎の分枝数は2栄養系統で22本および14.7本であり、対照の“美緑菜”や復帰型のMMMの4本と5.6本に比べ倍以上増えていた。また花の数もMMM(Wax+)の2栄養系統ではそれぞれ570と423で、対照“美緑菜”の194と通常の復帰型MMMの300より多く認められた (Table 1)。これらの特性はこれまでの種間キメラで見られなかった現象である。

開花日については、“美緑菜”は2月17日、復帰型のMMMは2月19日、V₁世代のMMM(Wax+)では2栄養系統とも3月30日で、通常の復帰型のMMMおよび対

照の“美緑菜”より1か月以上も遅れた (Table 1)。

供試したキメラ植物の花粉稔性をV₁世代において調査した結果、対照植物“美緑菜”と“ルビーボール”および両親に復帰したMMMとRRRタイプの花粉稔性はすべて80%以上ないし90%以上であり、MMM(Wax+)タイプも80%以上ではほぼ正常であった。それに対して、周縁型のMRRタイプは62.5%で、他に比べ低かった (Table 1)。

属間キメラに見られる着莢率や種子稔性の低下を検討するために、それらの形質について調査した。V₁世代のMMM(Wax+)タイプは“美緑菜”を戻し交配した場合、着莢率が2栄養系統はそれぞれ75.9%および63.5%で対照や復帰型より高い値を示した (Table 1)。一方、各タイプへの戻し交配から得られた種子について発芽率を全体で3,000粒以上調べた。その結果、MMM(Wax+)タイプ、復帰型のMMMやRRRまた周縁型のMMRタイプへ戻し交配して得られた種子はすべて80%以上の正常な発芽率を示した (Table 2)。これらの種子から育成した後代植物はいずれも通常の“美緑菜”や“ルビーボール”と変わらないもののみであった (Table 2)。つまり、MMRタイプのようにL II層が“美緑菜”の時には“美緑菜”を花粉親として戻し交配より得られた種子の後代は“美緑菜”(型)であり、L III層にRがある場合でも種子稔性に影響は認められなかった。MRRタイプは雌蕊自体が奇形で交配しても種子は得られなかった。またRRRタイプに“ルビーボール”を交配して得られた種子後代植物は“ルビーボール”(型)であった。現在まで、これら種子後代の植物には明瞭な変異が認められていない。

3. 酸性フォスファターゼアイソザイム分析

各キメラタイプの葉のアイソザイムパターンを分析した結果 (Fig. 3)、両親への復帰型MMM(データ未掲載)とRRRタイプはそれぞれの対照植物“美緑菜”および“ルビーボール”と同じバンドを持っていた。周縁型のMRRタイプでは“美緑菜”および“ルビーボール”に特異的なバンド (Fig. 3cおよびa, b) がともに現れた。周縁区分型キメラであるMMM+MRRタイプのMMMとMRRとの混在した部位の分析結果でも“美緑菜”と“ルビーボール”両方のバンドが見られ、両組織の存在量にほぼ平行して濃淡が見られた。MMM(Wax+)タイプの植物は一方の親“美緑菜”のバンドを有するだけでなく、他方の親“ルビーボール”のバンドも持ち、さらに両親に存在しない新規のバンド(☆)も有していた。しかし、他のタイプにおいては両親以外の新規のバンドは認められなかった。

考 察

細胞層構成から見ると、本実験に用いた属間キメラにおいて周縁型キメラは2つのタイプ(MMRおよびMRR)しか認められなかった。これまでの種間キメラ、特にキ

Fig. 1. Various types of intergeneric chimeras between Miryokuna and Ruby ball. a: parent Miryokuna (M); b: parent Ruby ball (R); c: revertant type to Miryokuna MMM (MMM=LI-LII-LIII); d: revertant type to Ruby ball RRR; e: periclinal chimera MMR, which expresses anthocyanin along the veins with intermediate leaf shape of two parents; f: periclinal chimera, which expresses anthocyanin on the leaves whose shape is similar to that of Ruby ball; g: mericlinal chimera MMR+MRR; h: mericlinal chimera MMM+MRR+MMR; i: revertant type MMM with wax on the leaf surface; j: inflorescence of MMM revertant type; k: inflorescence of MMM (Wax+) type. Chimeral structure is shown as LI-LII-LIII layers from the surface layer to the inner layer.

Fig. 2. Leaf transversal cross sections of MMM (Wax+) type, MMM revertant type and their parents. a: parent Miryokuna (M); b: parent Ruby ball (R); c: revertant type to Miryokuna MMM (MMM=LI-LII-LIII); d: revertant type MMM with wax on the leaf surface. d shows that palisade parenchyma cells in L2 are irregularly arranged, displaying 4 cell-layer constitution, against those of its Miryokuna parent (a) and MMM revertant type (c), where the L2 palisade parenchyma cells are in a regular arrangement with 3 cell layers. Arrow in d indicates the wax layer. Chimeral structure is shown as LI-LII-LIII layers from the surface layer to the inner layer.

Table 1. Characteristics of MMM (Wax+) type in intergeneric chimeras between Miryokuna and Ruby ball in V_1

	No. of branches (n)	No. of flowers (n)	Flowering date (n)	Pollen fertility (%) (n)	Pod setting (%) (n)
Control					
Miryokuna	4.0±0.8ab (4)	194±11.5cd (4)	17/2a (4)	96.6±1.7e (3)	51.0±3.5cd (4)
Ruby ball	5.0±2.4ab (4)	155±8.6b (4)	26/4c (4)	90.4de (2)	30.8±5.6b (4)
Revertant					
MMM	5.6±3.9b (12)	300±16.1d (12)	19/2a (11)	86.9±7.5cd (3)	50.2±19.2dc (11)
RRR	10.0±3.6c (3)	134±29.3c (3)	16/4bc (3)	80.3±13.7b (3)	26.0±16.4b (3)
Mericlinal					
MMM (Wax+) ¹⁾	22.0±4.2e (3)	570±31.8f (3)	30/3b (3)	92.5±2.2e (3)	75.9f (2)
MMM (Wax+) ²⁾	14.7±2.1d (4)	423±74.2e (4)	30/3b (3)	84.6±4.0cd (3)	63.5±12.6e (3)
Periclinal					
MMR	4.2±0.8ab (5)	183±41.5c (5)	23/2a (5)	81.7±3.5bc (3)	48.2±9.9c (5)
MRR	3.5±1.8a (5)	26±9.5a (5)	1/4b (5)	62.5a (2)	0a (3)

Data are shown as mean ± standard deviation. Within a row, means followed by the same letters are not significantly different at $P=0.05$ (Least Significance Difference Test). Flowering date is shown as day/month. (n): number of chimeral plants investigated. 1), 2): Each MMM (Wax+) is derived from MMM+MMR and MMM+MMR+MRR, respectively.

キャベツ-西洋ナタネの組合せでは可能な組み合わせ8タイプの内、7タイプまでの出現が認められた(Noguchi *et al.* 1996). 本実験の属間キメラで出現タイプの種類の少ないことは、種間キメラに比べて、類縁関係が遠い細胞・組織間での親和性が低く、分化成長が同調しにくいこと、安定した組み合わせが限定されるものと考えられる。し

かし、本実験で安定した周縁キメラタイプの種類が少ないにもかかわらず、 V_1 世代で新しいMMM(Wax+)タイプが出現した。このようなタイプは種属間キメラの研究でこれまでに報告のない例である。このタイプの植物の葉の組織構造、特にLII層の柵状組織では細胞の大きさや配列が不規則であった。それは“ルビーボール”の細胞

Table 2. Seed viability of intergeneric chimeras between Miryokuna and Ruby ball back-crossed with their parents

Mother chimeral plant (♀)	×M (♂)			Progeny type
	V ₀ (%) (n)	V ₁ (%) (n)	V ₂ (%) (n)	
Control				
Miryokuna	—	94.4 (2)	92.6 (2)	Miryokuna
Ruby ball	—	79.8±2.5 (4) ^{a)}	—	Ruby ball
Revertant				
MMM	97±6.8 (35)	97.1±6.6 (9)	94.6±7.8 (3)	Miryokuna
RRR	—	80.0±15.2 (3) ^{a)}	—	Ruby ball
Periclinal				
MMR	96.6±3.5 (11)	—	87.4 (1)	Miryokuna
Mericlinal ^{b)}				
MMM+MMR	97.0±2.1 (4)	93.2 (2) ^{c)}	—	Miryokuna
MMM+MRR	—	97.1 (2)	92.6±12.8 (3)	Miryokuna
MMR+MRR	98.8±2.4 (9)	—	97.0 (1)	Miryokuna
MMM+MMR+MRR	97.0 (1)	88.8±11.7 (3) ^{c)}	92.5 (2)	Miryokuna

Data are shown mean ± standard deviation. ×M: each chimera plant is crossed with Miryokuna except a). (n): number of chimera plants investigated. a): data crossed with Ruby ball. b): the seeds from the underlined part in V₀, V₁ and V₂. c): MMM (Wax+) plants derived from (MMM+MMR) and (MMM+MMR+MRR) of the V₁, respectively.

Fig. 3. Acid phosphatase isozyme banding patterns of leaves in V₁ chimeras between Miryokuna and Ruby ball. Lanes I-III: MMM (Wax+), revertant type MMM with wax on the leaf surface; lane IV: parent Miryokuna (M); lane V: parent Rubyball (R); lane VI: revertant type to Ruby ball RRR (RRR=LI-LII-LIII); lane VII: mericlinal chimera MMM+MRR; lane VIII: periclinal chimera MRR. Arrowheads a and b show Rubyball specific bands; c, Miryokuna specific band; d and e, specific bands of MMM (Wax+). Chimera structure is shown as LI-LII-LIII layers from the surface layer to the inner layer.

が混在したためと思われる。このことは、この新しいタイプの植物葉のアイソザイム分析結果からも示された (Fig. 3)。また、もし“ルビーボール”の細胞が層構造として L III 層に存在するならば、葉の主脈にアントシアニンが発現するはずであり、もし L I 層に存在であれば、表層細胞の形が異なるので、区別ができる。実際にこのタイプにおいて L II 層の形態以外には違いは認められなかった。これらのことから“ルビーボール”の細胞群は L II 層に混在していると見なされるので、他の MMR や

MRR のような周縁キメラと違って、L II 層に“ルビーボール”の細胞が混在する部分的な混合キメラとなっていると考えられる。このため、細胞層の増加また特別な形態的、生理的特性を引き起こしたものと推定される。

MMM (Wax+) 植物の特徴的な性質である多分枝現象及び多花現象は L II 層に“ルビーボール”と“美緑葉”の組織が共存するため、分化や成長のアンバランスを生じ、本来頂芽優性が現れるところが、頂芽の抑制、座死などが分化過程で起こり、多側枝が生じたものと思われる。通常この属間キメラ植物の一方の親である“美緑葉”は他方の親キャベツより生長が速い。それにより、よく見られる現象は区分型キメラ植物体で、“ルビーボール”を含む側の成長が遅れるため、奇形的に歪んだ葉や曲がった茎を生じることである。

開花日については、これまでアブラナ属の種間キメラであるキャベツ-コマツナ、キャベツ-西洋ナタネの研究でキメラ植物の中にキャベツの組織を含む場合、開花がコマツナや西洋ナタネより顕著に遅れることが認められている (Noguchi and Hirata 1994)。今回の MMM (Wax+) 植物の開花日が 1 か月以上も遅れたことはこれら種間キメラの場合 (Noguchi and Hirata 1994, Noguchi *et al.* 1996) と同様、“ルビーボール”による影響と思われる。

花粉稔性についてはすでに Hirata *et al.* (1992) が報告した *Brassica oleracea* と *B. campestris* との種間キメラにおいてキメラ植物の L II 層に“ルビーボール”が含まれる場合、花粉の稔性が低下した。このことは本実験でも MRR で顕著に認められた現象である。しかし、MMM (Wax+) タイプのキメラ植物は L II 層に“ルビーボール”の細胞が混在しているにもかかわらず、花粉稔性はほぼ正常であり、着莢率もこれまでに種間キメラで認められ

ている結果とは逆に、むしろ対照や復帰型などより高かった。種子の発芽率も対照とは差がなく高かった(Table 2)。この例はこれまでのアブラナ属の種間キメラでは見られない現象で、今回の属間キメラに見られた特異的な現象である。この新しいタイプについては、今後さらに細胞層構成や細胞・組織間相互作用の詳しい内容を検討する必要がある。また、もう一つ顕著な現象として、MRRの強い不稔現象があげられる。MMRは種子稔性も正常であったのに対し、MRRでは雌蕊がほとんど奇形であるだけでなく、種子も全く得られなかった。キメラ植物のL I層とL II層の構成が異なる場合、種間キメラの場合にも一般に高い不稔現象が認められる(Hirata *et al.* 1994)が、本実験における属間キメラではより顕著な不稔を示した。

キメラの層構造の決定や相互作用を調べる方法として、アイソザイム分析が用いられてきた。ミカンでは接木キメラの組織検定(上野・西浦 1976)や周縁キメラの同定(Yamashita 1983)に関してすでに報告がある。筆者らもブラシカ属の種間キメラにおいて、酸性フォスファターゼアイソザイム分析を併用することによりキメラタイプの細胞層構成がかなり正確に同定できることをすでに報告している(土田ら 1993, Noguchi *et al.* 1992, Noguchi and Hirata 1994)。本研究でも属間キメラにおける形態的な特性から区分されたキメラの各タイプとアイソザイムのバンドパターンとは比較的よく一致しており、ブラシカ属の種間キメラで認められた結果と同様、キメラタイプの区分の指標として有効であった。V₁世代のMMM(Wax+)タイプでは両組織の存在するMMRやMRRまたMMM+MRRとは異なり、両親の持たないバンドが特異的に認められたことから、異種細胞・組織間に相互作用の存在することが示唆されたが、どのような相互作用が生じているか今後さらなる検討が必要である。現在、分子マーカーを利用して、キメラ諸タイプの遺伝子レベルでの決定や解析を進めている。

これまでキャベツとコマツナとの種間キメラにおいては、その当代のキメラ植物にコマツナを父本とした戻し交配で得られた種子世代植物に複数のCMS等の変異が出現している(Hirata *et al.* 2001)。本実験では3世代にわたる3,000個体以上の種子後代を調べてきたが、変異が認められなかったことから属間キメラでは品種間キメラや種間キメラに比べて、種子後代の変異が極めて得られにくいものと思われる。さらに、この点は検討が必要である。

以上の諸結果から、本研究で得られた属間キメラはこれまで多数合成し、調べてきたアブラナ属の種間キメラと層構造や形態形成など類似した特徴を持っているが、一方でMMM(Wax+)タイプの出現のような特異的な現象も見られており、より詳細な形態形成や細胞組織間の相互作用など、さらなる実験的検討が不可欠である。

これまで行ってきた人為合成キメラは植物の形態形成

や細胞・組織間の形態的、生理的相互作用を明らかにしていく上で、極めて優れた材料を提供している。

謝 辞

本研究の一部は日本学術振興会による科学研究費補助金(No. 12660004)の助成を受け進められている。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

- Binding H., D. Witt, J. Monzer, G. Mordhorst and R. Kollmann (1987) Plant cell graft chimeras obtained by co-culture of isolated protoplasts. *Protoplasma* 141: 64–73.
- 平田 豊(1979)ナスの接木変異I 接木当代及び接穂に由来する後代の胚軸色変異. 育種 29: 318–323.
- 平田 豊(1980)ナスの接木変異II 接木当代及び接木後代の果色ならびに果形変異. 育種 30: 83–90.
- Hirata Y. and N. Yagishita (1986) Graft-induced changes in soybean storage proteins I. Appearance of the changes. *Euphytica* 35: 395–401.
- Hirata Y., H. Sassa and N. Yagishita (1989) Graft transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Proc. 6th Int. Congress of SABRAO*, 531–534.
- Hirata Y., N. Yagishita, M. Sugimoto and K. Yamamoto (1990) Intervarietal chimera formation in cabbage (*Brassica oleracea*). *Japan. J. Breed.* 40: 419–428.
- Hirata Y., N. Yagishita, K. Yamamoto and M. Sugimoto (1992) Interspecific graft chimera Between *Brassica oleracea* and *B. campestris*. *Japan. J. Breed.* 42: 203–212.
- Hirata Y., T. Noguchi, S. Oguni and T. Kan (1994) Genetic constitution of germ cells in intervarietal and interspecific chimeras of *Brassica* induced by *in-vitro* grafting. *Theor. Appl. Genet.* 89: 249–254.
- Hirata Y., N. Yagishita and L. Ledoux (1995) Graft transformation and its mechanism. *Proc. of American-Japanese Co-operation Workshop on "Gene Modification and Non-Mendelian Inheritance"* pp. 325–340, NIAR (Tsukuba, Japan).
- Hirata Y., T. Motegi, Q. B. Xiao and T. Noguchi (2000) Artificially-synthesized intergeneric chimera between *Brassica oleracea* and *Raphanus sativus* by *in vitro* grafting. *Plant Biotechnology* 17: 195–201.
- Hirata Y., T. Motegi, Y. Takeda and K. Morikawa (2001) Induction of cytoplasmic male sterility in the seed progeny derived from artificially-synthesized interspecific chimera in *Brassica*. *Euphytica* 171: 143–149.
- Marcotrigiano M., and F. R. Gouin (1984) Experimentally synthesized plant chimera. 1. *In vitro* recovery of *Nicotiana tabacum* L. chimeras from mixed callus culture. *Ann. Bot.* 54: 503–511.
- Noguchi T., Y. Hirata and N. Yagishita (1989) Intergeneric plant chimera formation by tissue culture methods in tomato-eggplant and mulberry-paper mulberry. *Bull. Fac. General Educ., Tokyo Univ. Agric. and Techn.* 25: 339–354.
- Noguchi T., Y. Hirata and N. Yagishita (1992) Intervarietal and interspecific chimera formation by the *in-vitro* graft-culture method in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 83: 727–732.
- Noguchi T. and Y. Hirata (1994) Vegetative and floral characteristics

- of interspecific *Brassica* chimera produced by *in vitro* grafting. *Euphytica* 73: 273–280.
- Noguchi T., T. Kan, Y. Hirata and M. Takeda (1996) Structural characteristics of interspecific *Brassica* chimeras produced by *in vitro* methods. *Acta Hort.* 407: 233–238.
- Satina and A. F. Blakeslee (1941) Periclinal chimeras of *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. *Am. J. Botany.* 32: 72–81.
- Schmidt A. (1924) Histologische Studien an phanerogamen Vegetationspunkten. *Bot. Arch.* 8: 345–404.
- Taller J., Y. Hirata, N. Yagishita, M. Kita and S. Ogata (1998) Graft-induced genetic changes and the inheritance of several characteristics in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97: 705–713.
- Taller J., N. Yagishita and Y. Hirata (1999) Graft-induced variants as a source of novel characteristics in the breeding of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica* 108: 73–78.
- 土田泰輔・田村悦子・牛島幸一郎・平田 豊・小峰法子・野口 貴 (1993) ブラシカ属種間キメラにおける酸性フォスファターゼアイソザイムパターン. 育種43(別2): 328.
- 上野 勇・西浦昌男 (1976) ザイモグラフィのカンキツ育種への応用 III キメラにおけるパーオキシダーゼアイソザイムについて. 果樹試報 B (Bull. Fruit Tree Res. Stn. B 3: 25–32).
- Winkler H. (1907) Über Pfropfbastarde und Pflanzenliche Chimaeren. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 25: 568–576.
- Yagishita N. and Y. Hirata (1987) Graft-induced change in fruit shape in *Capsicum annuum* L. I. Genetic analysis by crossing. *Euphytica* 36: 809–814.
- Yagishita N., Y. Hirata, H. Mizukami, H. Ohasi and K. Yamashita (1990) Genetic nature of low capsaicin content in the variant strains induced by grafting in *Capsicum annuum* L. *Euphytica* 46: 249–252.
- Yamashita K. (1983) Chimerism of Kobayashi-mikan (*Citrus natsudaidai* × *unshiu*) judged from isozyme patterns in organs and tissues. *Japan. Soc. Hort. Sci.* 52: 223–230.

Characterization of Novel Chimera Plant Obtained from Vegetatively Propagated Intergeneric Chimeras between Radish (*Raphanus sativus*) and Cabbage (*Brassica oleracea*)

Qiubin Xiao¹⁾, Liping Chen²⁾, Yuuki Hogi²⁾, Takashi Noguchi³⁾ and Yutaka Hirata²⁾

¹⁾ United Graduate School of Agricultural Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183–8509, Japan

²⁾ Graduate School of Agricultural Sciences, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo 183–8509, Japan

³⁾ Edogawa Branch, Tokyo Metropolitan Agricultural Experimental Station, Edogawa, Tokyo 133–0073, Japan

In order to analyze the morphological, physiological and genetical interactions between different cells and tissues in chimeras, we artificially synthesized intergeneric chimeras between radish and red cabbage. As a result, various morphological and physiological interactions were observed. A distinctive new type of chimera with high wax secretion (described as WWW (+wax)) on the leaves was found in the V₁ (vegetatively propagated chimeras from original V₀ plants) revertant type to radish. This new type displayed a large number of flower stalk branches and flowers, and a later flowering date than the usual revertant MMM type. When crossed with control radish, the new type showed a higher pod setting rate than the control and revertant type MMM. Microscopic observation revealed that this new type partially had complex and thicker layers in the palisade parenchyma. Isozyme analysis revealed that the new type shared the parental bands

beside its new band. This finding supported the existence of cabbage cells or tissues in the new type and suggested that some interaction between two different cells or tissues had occurred. Pollen fertility observation showed that the periclinal MRR type (LI-LII-LIII layer constitution) showed the lowest pollen fertility, resulting in a lack of seeds in the backcross with control radish. Progenies derived from chimeras crossed with both parents displayed the normal radish or cabbage phenotype during three successive vegetatively propagated generations. Although intergeneric chimeras showed some common characteristics to those of interspecific chimeras, it was more difficult to obtain genetic variation in the progeny.

Key Words: *Raphanus*, *Brassica*, intergeneric chimera, grafting, morphogenesis, isozyme analysis.