

ジャガイモシストセンチュウおよびYウイルス抵抗性二倍体間の細胞融合による四倍体の育成

小村国則・大林憲吾・盛山菜美¹⁾
(長崎県総合農林試験場・¹⁾長崎県農業大学校)

Kuninori Komura, Kengo Ohbayashi and Nami Sakaiyama:
Production of Tetraploid Potato Hybrids through Protoplast Fusions between Dihaploid Resistant to Potato Cyst Nematode and Potato Virus Y

暖地バレイショ栽培では、ジャガイモシストセンチュウやジャガイモYウイルスの発生面積の増加が問題となっている。これらの病虫害抵抗性遺伝子に連鎖するDNAマーカーを開発するため、シストセンチュウおよびYウイルス抵抗性四倍体品種由来の二倍性半数体を各々作出し、接種検定により抵抗性個体を育成した。

病虫害抵抗性を有する二倍性半数体は花粉稔性が劣るため交配による非還元配偶子を利用した四倍体の作出は困難であった。このため、シストセンチュウおよびYウイルス抵抗性二倍性半数体を用いた細胞融合により、シストセンチュウおよびYウイルス抵抗性を併せ持つ複合抵抗性四倍体の育成を図った。

1. 材料および方法

1) シストセンチュウ抵抗性四倍体品種「アトランチック」、Yウイルス抵抗性四倍体品種「デジレー」の各々に栽培二倍種 *S. phureja* 460 を交配し、得られた二倍性半数体から栽培特性の良好な抵抗性個体「99-2-61」, 「D-30」を選び細胞融合の供試材料とした。

2) 細胞融合は、22℃, 16時間日長で茎切片を四週間無菌培養した植物体の葉を1%セルラーゼ「オノズカ」R-10と0.04%マセロザイムR-10を加えた0.55Mマンニトールを含む2 mM MES (pH5.8) の酵素液で4時間処理し、得られたプロトプラストを1:1に混合し、1 MHz, 40Vの高周波電解で30秒間処理した後、1200V/cm, 20 μ secの直流パルスで3回印加の条件下で行った。

3) 融合細胞の培養は齊藤ら²⁾の0.4Mマンニトールを含む1/2 MS (NH₄NO₃無添加) に1リットル当たり0.5mgNAA, 0.5mgゼアチン, 250mgカザミノ酸, 2gシヨ糖, 2mMMES (pH5.8) の培地を用いた。また、カルス形成には0.3Mマンニトールを含む1/2 MS (NH₄NO₃無添加) に0.5mgNAA, 0.5mgゼアチン, 500mgカザミノ酸, 20gシヨ糖, 2mMMES (pH5.8) の培地を用いた。

4) カルスからの再生は齊藤ら²⁾, Shepard³⁾の培地の他に、Kikuta, Y. and Okazawa, Y.¹⁾のTuber disc用培地を改変したMS (NH₄NO₃無添加) + 0.1mgIAA + 0.5mgゼアチン + 1gカザミノ酸 + 40mgアデニン + 0.25Mマンニトール + 1gシヨ糖 + ココナツミルク100ml + 2gゲランガム + 1gMES (pH6.25) の培地を用いた。

5) 再生した植物体はフローサイトメーターによる倍数性の確認、シストセンチュウ抵抗性遺伝子に連鎖するDNAマーカーとYウイルス抵抗性二倍性半数体に特異的なRAPDマーカーとを用いて融合の確認を行った。

2. 結果および考察

齊藤ら²⁾の培地を用いた場合、融合細胞は分裂し、コロニー形成も良かったが、カルス形成はやや劣り、カルスを再生培地に移した結果、褐変して再生植物体は得られなかった。このため、再生培地として用いられているShepard³⁾のSD培地へカルスを移植したが、齊藤ら²⁾の再生培地と同様にカルスは褐変した。

二倍性半数体のTuber disc培養による再生植物体か

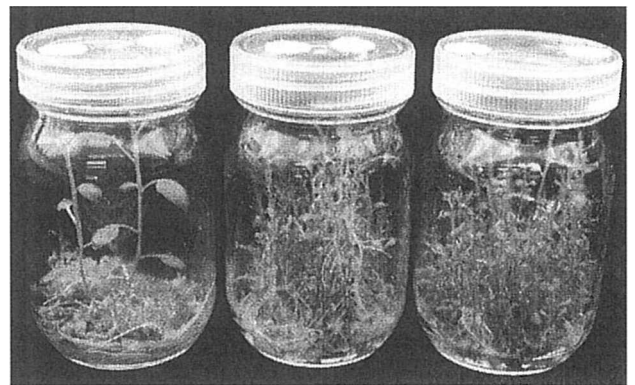
らの倍加個体の作出を行っていたことから、融合カルスをTuber disc培地に移して培養した結果、多くの再生植物体が得られた(第1図)。

Tuber disc用培地はShepard³⁾のSD再生培地に比べて、カザミノ酸が4倍多く、ゼアチンの濃度は四分の一と低い。また、浸透圧調節剤のマンニトール量が0.5M多い。

再生植物体の中からフローサイトメーターを用いて四倍体12個体を選び、DNAマーカーを用いてシストセンチュウ抵抗性の有無を調査した結果、10個体がマーカーを有していた(第2図)。また、「D-30」個体に特異的なマーカーを示すプライマーを用いてRAPD分析した結果、四倍体12個体中すべてがマーカーを有していたことから、10個体が「99-2-61」と「D-30」との融合細胞由来で、2個体は「D-30」同士の融合体であった。なお、融合植物体10個体はガラス室においてYウイルスの接種検定による抵抗性の確認を行っている。

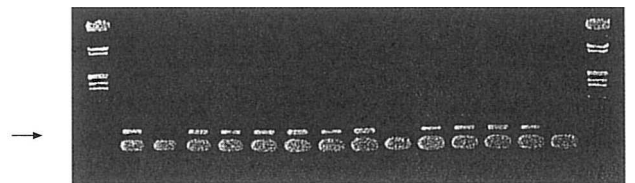
引用文献

- 1) Kikuta, Y. and Okazawa, Y. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 61:166-179, 1982.
- 2) 齊藤 渉・増田 清・喜久田嘉郎・岡澤養三: 日本作物学会紀事 51, 169-170, 1982.
- 3) Shepard, J. F. Plant sci. Lett.: 26, 127-132, 1982.



第1図 融合細胞由来カルスのTuber disc培養用培地での植物体再生

注) 「99-2-61」と「D-30」との細胞融合。



第2図 再生植物体のDNAマーカーによるジャガイモシストセンチュウ抵抗性検定 (→: DNAマーカー)

注) M: 分子量マーカー, A: 「99-2-61 (アトランチック由来二倍性半数体)」

D: 「D-30 (デジレー由来二倍性半数体)」, ①~⑫: 再生個体。