

氏 名(本籍)	えん 遠 どう 藤 りゅう 柳 こ 子
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 7 2 8 号
学位授与年月日	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科資源生物科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	セリの新品種の育成と生態的特性の解明に関する研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 金 濱 耕 基 (副 査) 教 授 三 枝 正 彦 教 授 西 尾 剛

論文内容要旨

緒言

セリ *Oenanthe javanica* (Blume) DC. はセリ科 Umbelliferae の植物で、湿地や流水地に自生している多年草である。日本全国に自生しているほか、ロシアの沿海州から、東南アジア、オセアニアに分布している。

全国のセリ作付け面積は 208ha で、最も栽培面積が多いのは茨城県の 77ha、次いで秋田県の 58ha、宮城県の 27ha の順である。年間の販売量は茨城県が 1,363t で最も多く、次いで宮城県の 636t、秋田県の 358t の順である(1998 年産野菜生産状況表式調査、農林水産省)。宮城県産の販売金額は約 5 億 8 千万円(2000 年産全国農業協同組合宮城県本部取扱実績資料)で、宮城県内の野菜販売金額の中では 6 番目に多い品目である。

セリは冬の野菜として知られているが、野菜としての生産は周年行われている。仙台市中央卸売市場の取扱数量(2000 年)は 12~1 月が最も多く、全体の 50% を占めている。また、平均単価は 12 月が最も高く、1kg 当たり 1,213 円である。晩春~夏には生産量が少なく、平均単価も 1kg 当たり 200~400 円台と低い。

セリは古くから山菜・野菜として採取されたものが利用されてきたほかに、地域特産野菜として栽培されてきた品目であるが、交配等による品種育成は行われず、各産地ごとに栄養繁殖されたものの中から選抜された種苗が在来系統として栽培されている。宮城県内の産地でも、以前は在来系統(‘仙台系’、‘飯野川系’)が栽培されていたが、セリの代表的な系統である‘島根みどり’が導入されて以来、‘島根みどり’の作付けが多くなっている。‘島根みどり’は茎が太くて低温でもアントシアニンが発色しにくく緑色で、市場性の高い優良な系統であるが、セリ葉枯病に罹病しやすいため、‘島根みどり’のように市場性が高く、しかもセリ葉枯病に抵抗性のある新品種の育成が望まれている。

セリの栽培に要する労働時間のうち、約 1/3 は収穫後の出荷調製作業が占めているため、調製作業の時間を短縮するために病害や寒害による下葉の枯れ込みが少なく、基部節間が詰まって、ランナーの発生が少ないことが望まれている。セリは、短日条件ではロゼット葉が発生し、長日条件ではランナーの発生と抽台が起こるといわれているが、セリの生態的特性や日長反応について詳細に検討した報告は見あたらない。

以上のような背景に基づいて、本研究の第 1 章においては、非対称細胞融合法に

よる新規のセリ科野菜の作出や、培養変異を利用してセリ葉枯病抵抗性の新品種を育成しようとした。第2章では、第1章で育成したセリの新品種を供試して、自然条件下における生育特性や温室内での日長反応を調べ、育成親や在来系統と比較しようとした。第3章では、遺伝子工学的手法による耐病性遺伝子の導入の可能性について検討しようとした。

第1章. 組織培養法による新品種の育成.

非対称細胞融合法や培養変異を利用した新品種育成のための基礎技術として、セリでは葉柄、セルリーでは胚軸、アシタバでは葉柄を供試して、不定胚を高率に形成するカルス(embryogenic callus)の形成とカルスからの不定胚形成に及ぼす培地条件と培養環境の影響を調べた。その結果、第1表の培養条件が適していることが明らかになった。

非対称細胞融合法では、融合細胞を培養して分裂させることが第一段階として重要であるので、融合細胞の分裂を促進する方法について調べた。その結果、セルリーのカルスをナース細胞として用いてセリのプロトプラストを培養すると、培養開始後30日までのコロニー形成が促進され、その後のコロニー形成も阻害されなかった(第2表)。セルリーのカルスを振盪培養した培養濾液を調整培地として用いてセリのプロトプラストを培養すると、培養開始後30日のコロニー形成は促進されたが、培養開始後60~90日にはコロニー形成が著しく阻害された(第3表)。ナース培養の方法は調整培地を使う方法と比べて簡便であることから、以下の実験でセリのプロトプラストを培養する場合にはナース培養を行うこととした。

新規のセリ科野菜を作出することを目的として、セリとハマボウフウまたはセルリーとの非対称細胞融合を行った。80kRの軟X線を照射したセリのプロトプラストと、10mM IOA で処理したハマボウフウまたはセルリーのプロトプラストを用いて細胞融合処理を行った結果、カルスやシュートが得られた。得られたカルスを供試してRAPD分析を行ったところ、60系統のカルス中47系統で雑種性が示された(データ省略)。そのうちの6系統についてサザン分析を行ったところ、雑種カルスであることが確認された。セリとハマボウフウの非対称細胞融合で得られた5系統の雑種カルスではセリの一部の染色体と二~四倍性のハマボウフウの染色体から構成され、セリとセルリーの非対称細胞融合で得られた1系統の雑種カルスではセルリーの染色体の

みから構成されていた(第4表). 非対称細胞融合カルスから形成されたシュートは発根しなかったため、独立した個体に発達しなかった。

品質が良く市場性が高いがセリ葉枯病に罹病しやすい‘島根みどり’から、培養変異を利用してセリ葉枯病抵抗性の新品種を育成することを目的として、セリ葉枯病菌の培養濾液から作成した毒素粗画分溶液を‘島根みどり’(園試系)に処理してカルスと不定胚の選抜を行った。その結果、50倍濃縮液相当の毒素粗画分溶液を添加した培地で培養後1日に褐変した不定胚を選抜して育成したところ、1個体がセリ葉枯病に抵抗性を示した。この選抜個体は育成親の‘島根みどり’(園試系)と比べて、小葉当たりの病斑数、全葉に占める病変部の面積率および病斑当たりの分生子殻数が少なく、‘飯野川系’と同程度の抵抗性を示した(第5表, 第1図)。外部形態は‘島根みどり’(園試系)と違いが認められなかった(第6表)。この選抜個体は、種苗法に基づいて品種登録を出願したところ、‘みやぎ VWD1 号’として2002年3月に登録が認められた。

第2章. 新品種‘みやぎ VWD1 号’と既存系統の生態的特性.

新品種‘みやぎ VWD1 号’を供試して自然条件下における生育状態を調べ、導入先の異なる‘島根みどり’の収集系統と比較した。その結果、系統によりやや異なったが、ランナーの発生が盛んになる時期は5月中～下旬(第2図)、基部節間の伸長開始が急速に進む時期は5月上～中旬(第3図)、着蕾時期は7月中～下旬(第4図)で、新品種‘みやぎ VWD1 号’と‘島根みどり’(園試系)に大きな違いは認められなかった。12月に収穫する作型で‘島根みどり’の各系統を比べると、草丈やランナーの発生状況、茎葉の色に違いが認められたが、新品種‘みやぎ VWD1 号’の草丈や1株重は系統内では中程度で、葉や葉柄にアントシアニンを生ぜず、育成親の‘島根みどり’(園試系)と同じく、良好な品質を示した(第7表, 第5図)。

新品種‘みやぎ VWD1 号’を供試して、日長が温室内で栽培されたセリのランナーの発生や、基部節間の伸長、着蕾などに及ぼす影響を調べることを目的として、10月にプランターに植え付けて自然条件下で育て、11月6日から翌年の3月27日にかけて最低気温を10℃、日長時間を8時間または24時間に調節した温室に搬入した。その結果、いずれの時期に搬入しても、ランナーの発生に及ぼす日長の影響は認められなかった(第6図)。主枝の基部節間の伸長は、いずれの時期に搬入しても、長日

によって促進された(第7図)。搬入から主枝の基部節間伸長を開始するまでの日数は搬入時期が遅れるほど早まり、日長時間と系統間の差も小さくなった。いずれの系統においても、8時間日長では24時間日長に比べて節間長が短く、着蕾は24時間日長でのみ認められ、8時間日長では7月上旬まで育てても着蕾しなかった。新品種‘みやぎ VWD 1 号’と‘島根みどり’(園試系)の日長反応に大きな違いは認められなかった。

第3章. 遺伝子工学的手法による耐病性遺伝子の導入.

セリのカルスを供試して、形質転換体を選抜するための抗生物質の種類と濃度について調べたところ、ハイグロマイシン 50mg/l が適していることが示された(第8図)。アグロバクテリウムの系統 EHA101 で形質転換処理を行い、ハイグロマイシン 50mg/l で選抜することによって、セリに GUS 遺伝子を導入することが可能であることが示された(第9図)。GUS 遺伝子が導入された個体は、GUS 活性を示した(第10図)。

セリに病害抵抗性を付与することを目的として、GUS 遺伝子の導入と同様の方法で、セリにチオニン遺伝子の導入を試みた。得られた 123 個のハイグロマイシン抵抗性個体について PCR 法でチオニン遺伝子の導入を確認したところ、31 個体でチオニン遺伝子の存在を示すバンドが現れた(第11図)。今後、形質転換個体のサザン分析を行ってチオニン遺伝子の導入を確認するとともに、病害抵抗性を検定する予定である。

考 察

本研究では、古くから食用に供されているが品種の育成がほとんど行われていないセリについて、培養変異を利用してセリ葉枯病抵抗性の新品種を育成することができた。また、育成したセリの新品種を供試して、自然条件下における生育特性や温室内での日長反応を明らかにした。また、遺伝子工学的手法による遺伝子導入の可能性を明らかにした。今後は、育成した新品種と生態的特性を活用することによって、セリの栽培管理や調製作業が省力化され、さらに、新しい品種が育成されると期待される。

第1表. 不定胚を高率に形成するカルス (embryogenic callus) と不定胚の形成に適した培養条件.

供試材料	embryogenic callusの 形成条件					不定胚の形成条件		
	NH ₄ NO ₃ (mg/l)	2, 4-D (mg/l)	BA (mg/l)	しょ糖 (g/l)	光条件	MS培地 (倍)	しょ糖 (g/l)	温度 (℃)
セ リ	1, 650	0.1	0	30~50	明所	2~1	10	25~30
セルリー	206	0.1 0.5	0.01~0.1 0.1	30~40	明所 または暗所	1	10~50	30
アシタバ	1, 650~206	1.0	0	40	暗所	1	10~50	20~30

第2表. ナース培養の有無がセリのプロトプラストから形成されるコロニー数に及ぼす影響.

ナース培養 ¹⁾	セリのプロトプラストから形成されたコロニー数 ²⁾		
	30日後	60日後	90日後
有	82.0±1.5	580.3±38.3	862.3±22.1
無	5.3±0.9	414.0±25.7	940.7±106.6

1) ナース細胞としてセルリーのカルスを用いた.

2) コロニー数は、 2×10^6 個のセリのプロトプラストから培養開始後30日までに形成された0.3mm以上のコロニー数、または培養開始後60日および90日までに形成された0.5mm以上のコロニー数で示した.

第3表. 調整培地の濃度がセリのプロトプラストから形成されるコロニー数に及ぼす影響.

調整培地 ¹⁾ 濃度 (%)	セリのプロトプラストから形成されたコロニー数 ²⁾	
	30日後	60日後
0	5.3±0.9	414.0±25.7
25	164.7±7.3	39.0±6.4
50	220.0±15.4	22.0±7.1

1) セルリーのカルスを1.0mg/l 2, 4-D, 0.2mg/l BA, 0.4Mグルコースを含んだ2倍濃度のMS培地で14日間振盪培養して調整培地を作成した.

2) コロニー数は、 2×10^6 個のセリのプロトプラストから培養開始後30日までに形成された0.3mm以上のコロニー数、または培養開始後60日までに形成された0.5mm以上のコロニー数で示した.

第4表. 非対称細胞融合系統の雑種性と分化の状況.

系統 ¹⁾	RAPD分析でのプライマー			染色体数 ²⁾	アイソザイム (ACPase)	再分化状況
	OPA01	mt3	LHC1F			
F-4	P1	P1	Oj+P1	Oj7~10 + P1 22~23	P1	シュート形成, 未発根
F-6	P1	P1	Oj+P1	Oj5~10 + P1 33~44	Oj+P1	"
F-9	P1	P1	Oj+P1	Oj15~22+ P1 44	P1	"
F-59	P1	P1	Oj+P1	Oj7~10 + P1 22~24	Oj+P1	不定胚発芽始め
F-65	P1	P1	Oj+P1	Oj5~7 + P1 22	Oj+P1	シュート形成, 未発根
D-56	Ag	Ag	Oj	Ag22	Ag	5mm程度の不定胚

1) F系統: 80kR の軟 X 線を照射したセリと 10mM IOA で処理したハマボウフウを融合.

D系統: 80kR の軟 X 線を照射したセリと 10mM IOA で処理したセルリーを融合.

2) Oj: セリ型. Ag: セルリー型. P1: ハマボウフウ型.

染色体数に幅があるものは, 細胞間で染色体数が異なっていたことを示す.

第5表. 選抜個体, '島根みどり' (園試系) および '飯野川系' へのセリ葉枯病菌の接種による発病程度.

供試系統	病斑数 ¹⁾		全葉に占める 病変部の面積率 (%)	分生子殻数 ²⁾ (個/病斑)
	個/小葉	個/cm ²		
選抜個体 ³⁾	24.3±17.2	1.3±0.9	4.0±3.2	4.6±6.3
島根みどり (園試系)	40.5±22.9	2.0±1.1	47.1±34.0	23.8±16.1
飯野川系	20.7±14.3	1.1±0.8	7.5±5.1	5.4±4.9

1) 病斑数および病変部の面積率は接種20日後に調査した.

2) 分生子殻数は接種28日後に調査した.

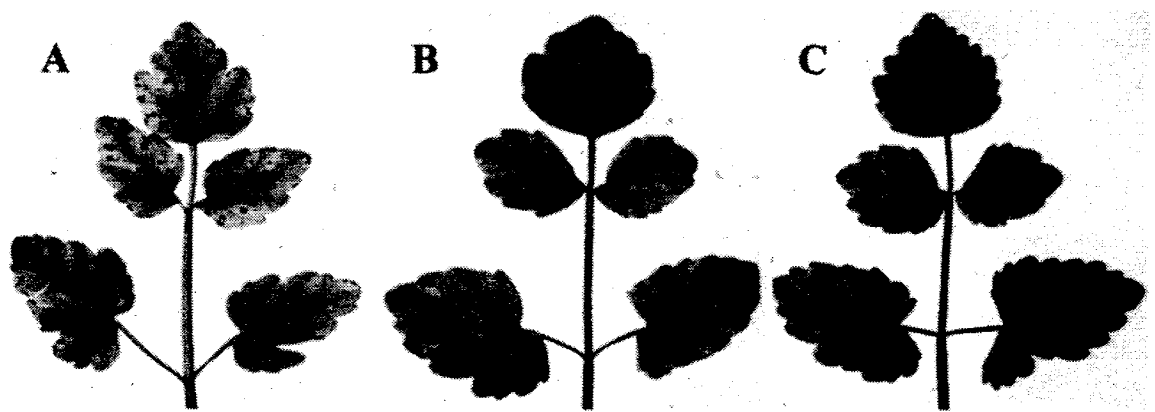
3) 新品種 'みやぎVWD 1号'.

第6表. 選抜個体の形態.

供試系統	草丈 (cm)	葉柄長 (cm)	調整後の 葉数(枚)	調整後の 1株重(g)	小葉の大きさ(cm)	
					横	縦
選抜個体 ³⁾	31.5±0.9	17.7±0.6	4.5±0.2	14.8±0.9	2.6±0.1	2.6±0.2
島根みどり (園試系)	30.7±1.0	17.7±0.5	4.4±0.1	13.6±1.0	2.6±0.2	2.7±0.1

1) 9月21日に苗を植付け, 12月15日に調査した.

2) 新品種 'みやぎVWD 1号'.

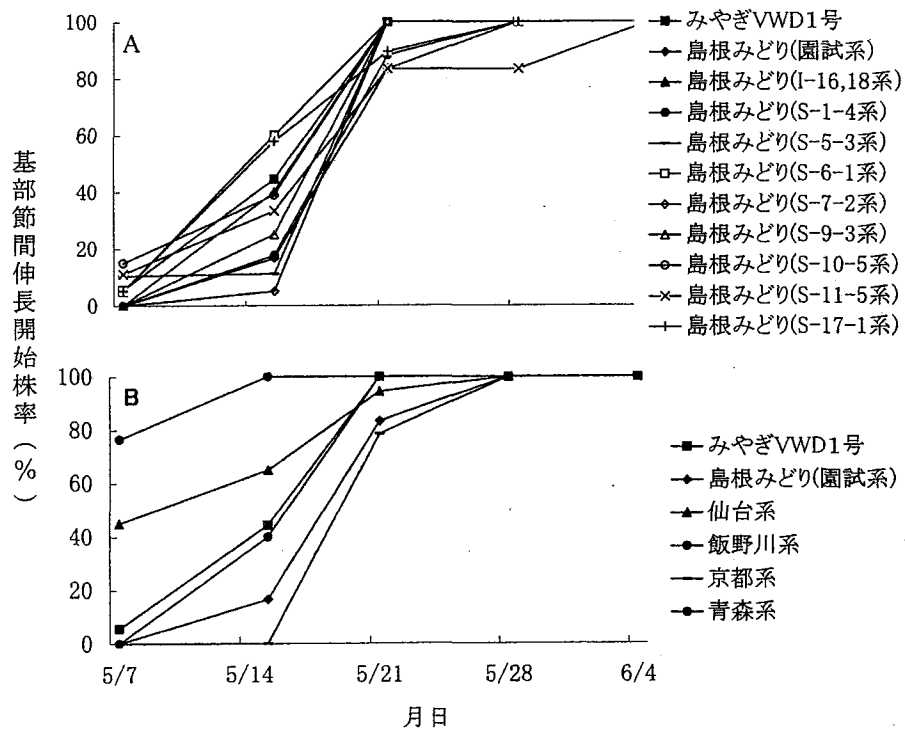
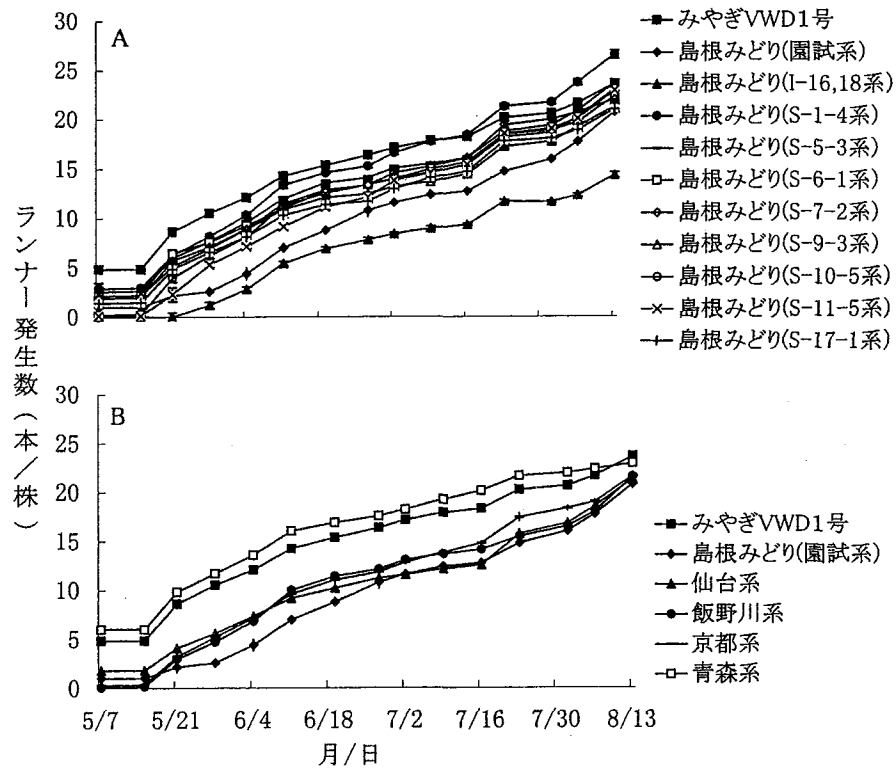


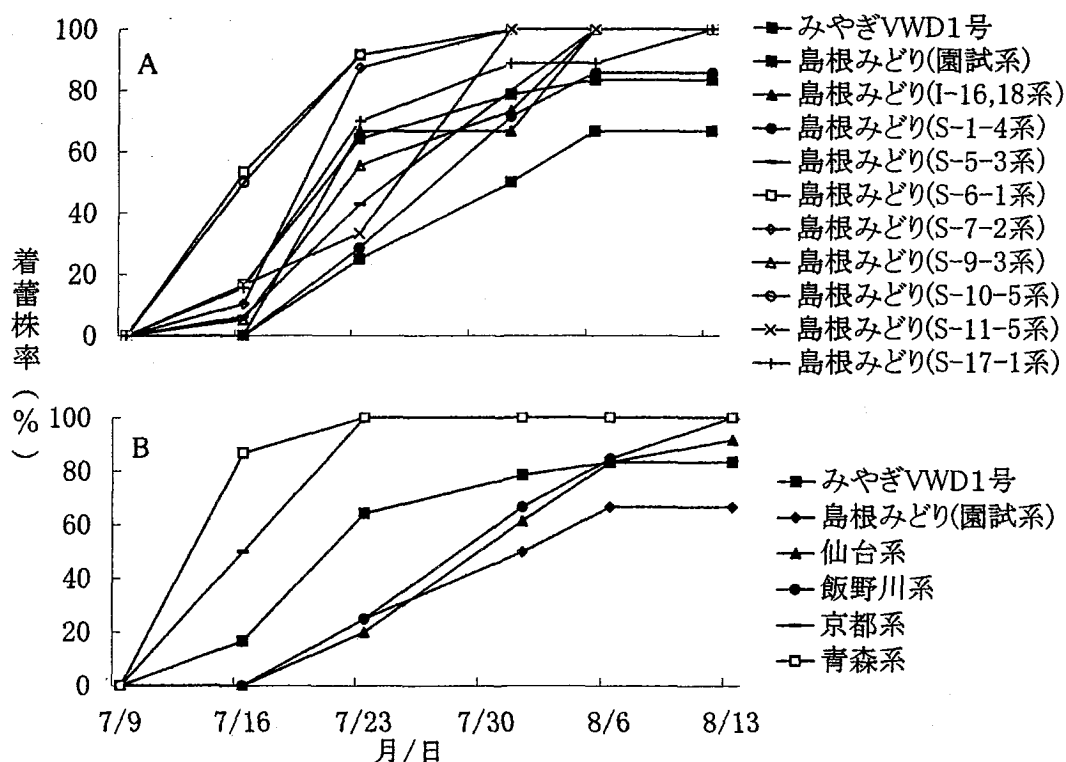
第1図. セリ葉枯病菌接種後の病斑.

A : '島根みどり' (園試系) .

B : 選抜個体 (新品種 'みやぎVWD1号') .

C : '飯野川系' .





第4図. 露地における着苗時期.

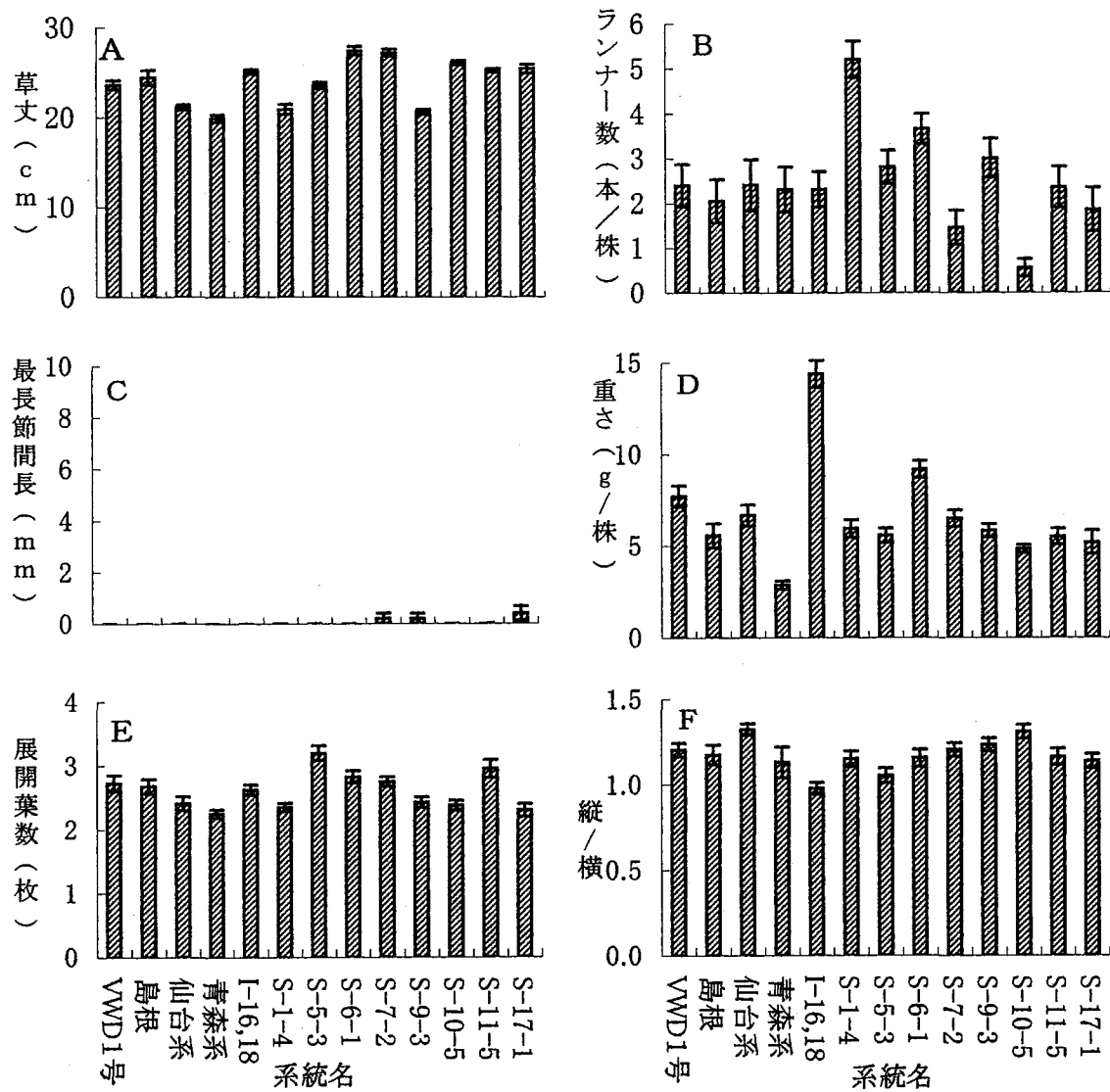
A: '島根みどり'の選抜系統.

B: '島根みどり'と異なる系統.

第7表. 12月の収穫時における各系統の葉色と葉柄色および寒害感受性.

系統	葉色	葉柄色	寒害
みやぎVWD1号	緑	緑	—
島根みどり(園試系)	緑	緑	—
仙台系	やや赤 ¹⁾	緑	+
青森系	やや赤	緑	—
島根みどり(I-16,18系)	基部やや赤	緑	—
島根みどり(S-1-4系)	やや赤	やや赤 ¹⁾	—
島根みどり(S-5-3系)	基部やや赤	基部やや赤	—
島根みどり(S-6-1系)	緑	緑	—
島根みどり(S-7-2系)	緑	緑	—
島根みどり(S-9-3系)	基部やや赤	緑	—
島根みどり(S-10-5系)	緑	緑	—
島根みどり(S-11-5系)	基部やや赤	基部やや赤	—
島根みどり(S-17-1系)	緑	緑	—

1) アントシアニンの発色による赤味.



第5図. 12月の収穫時における各系統の品質.

VWD1号: 'みやぎVWD1号'. 島根: '島根みどり'(園試系).

I-16, 18: '島根みどり'(園試系)の培養変異系統.

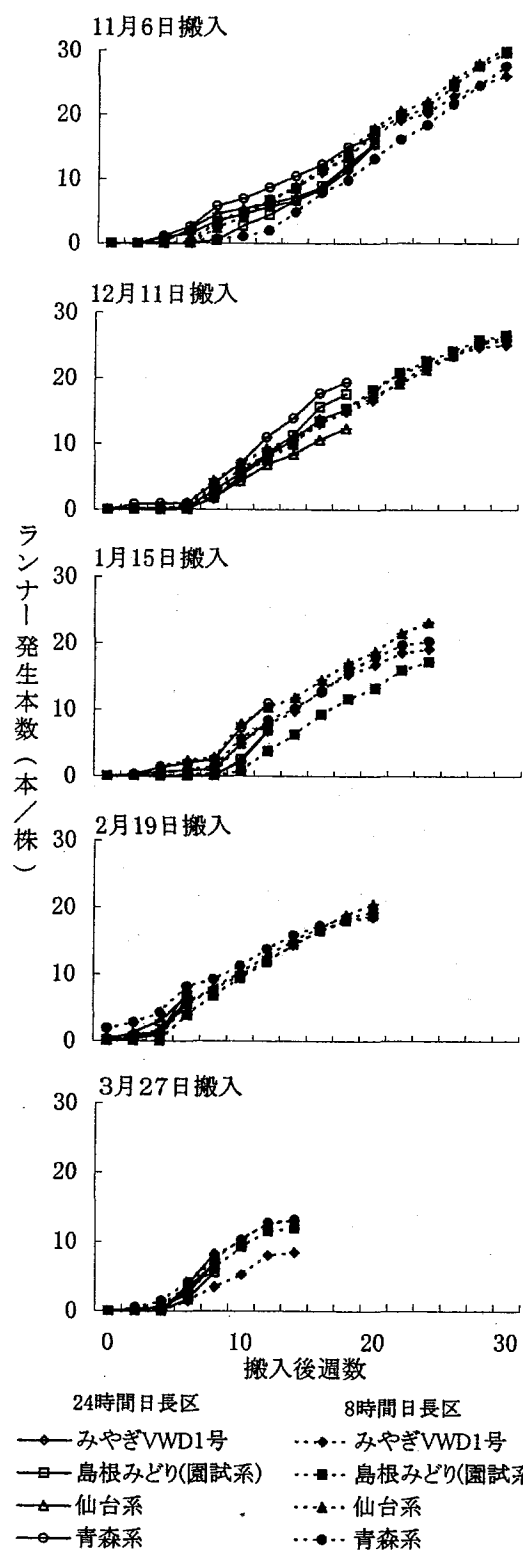
S-1-4~S-17-1: '島根みどり'の選抜系統.

A: 調製後の草丈. B: ランナー数. C: 最長節間長.

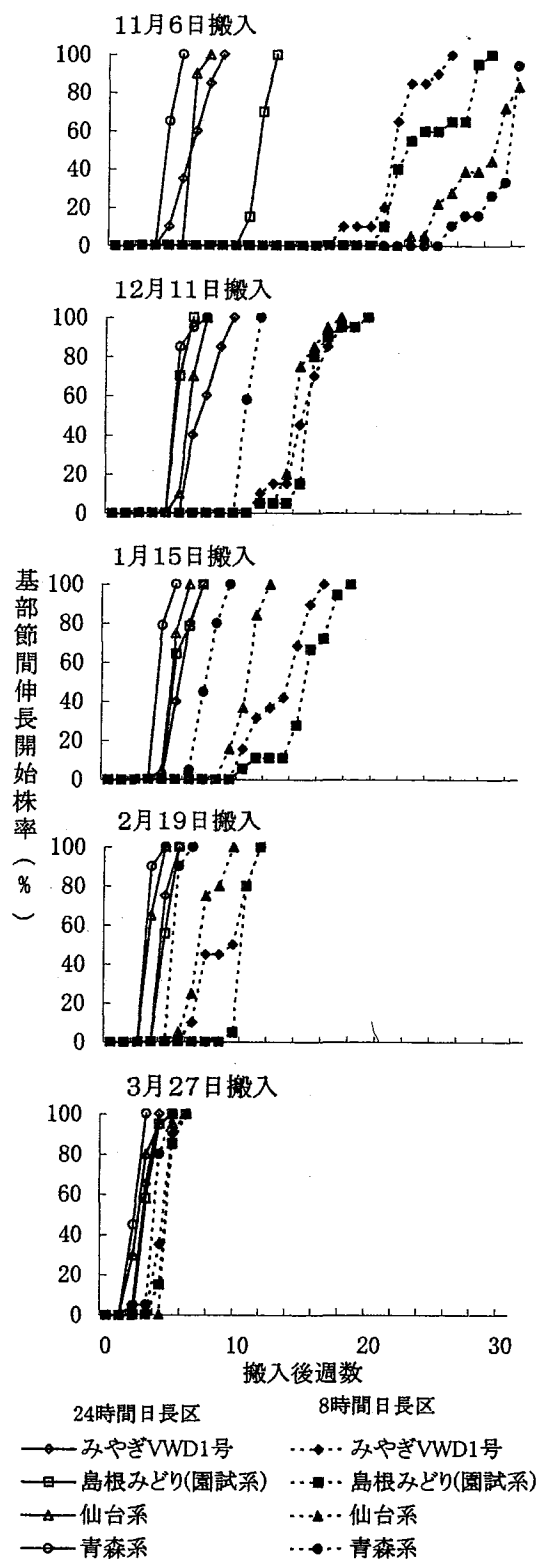
D: 調製1株重. E: 調製後の展開葉数.

F: 最大小葉の縦横比.

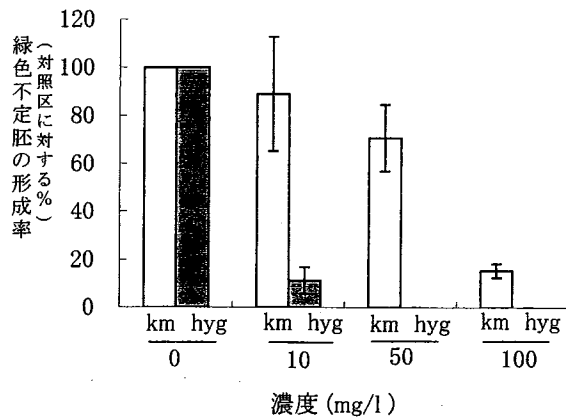
2000年10月1日に植え付けて, 12月27日に収穫して調査した.



第6図. ランナー発生数に及ぼす日長時間と温室への搬入時期の影響.
2000年10月6日にプランターに植えて自然条件下で育てたセリを11月6日から3月27日まで5週間間隔で最低気温10℃の温室に搬入した。

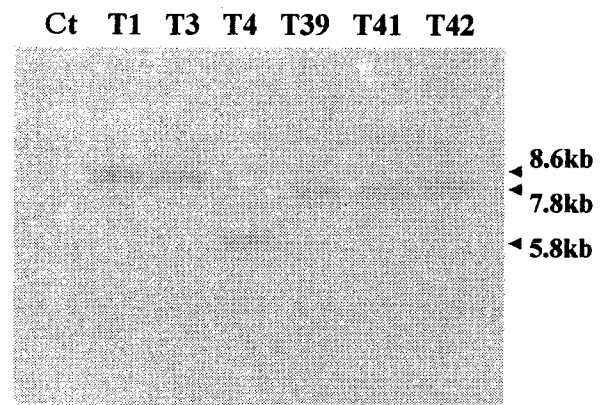


第7図. 主枝の基部節間伸長開始株率に及ぼす時間と温室への搬入時期の影響.
日長2000年10月6日にプランターに植えて自然条件下で育てたセリを11月6日から2002年3月27日まで5週間間隔で最低気温10℃の温室に搬入した。



第8図. セリの緑色不定胚の形成率に及ぼす抗生物質の影響.

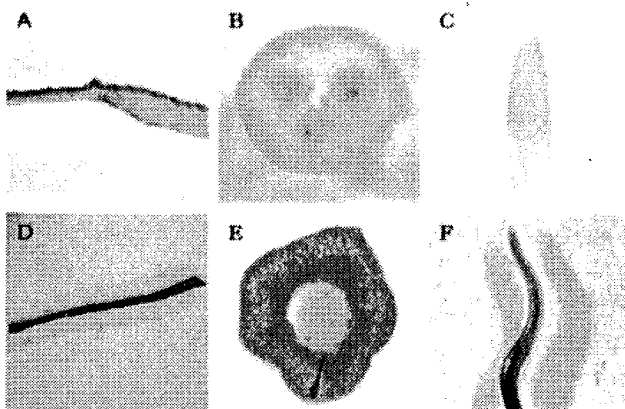
シャーレ1枚当たり 0.1gのセリのカルスを薄く広げて培養した. 培養後3週間に緑色不定胚の形成数を数え, 抗生物質無添加の対照区の緑色不定胚の形成数に対する百分率で示した. 対照区では1シャーレ当たり 495 個の緑色不定胚を形成した.



第9図. セリの形質転換体のサザン分析.

Ct : 非形質転換個体.

T1~T42 : 形質転換個体.



第10図. セリの形質転換個体における GUS 遺伝子の発現.

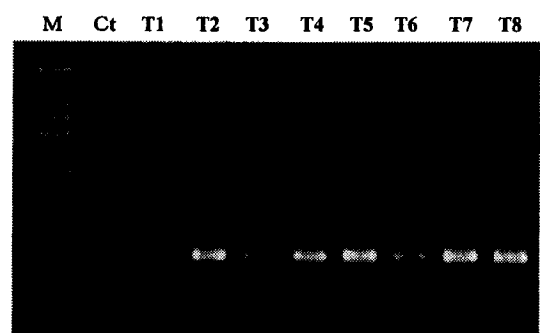
A~C : 形質転換個体T3.

D~G : 形質転換個体T39.

AとD : 成葉.

BとE : 茎.

CとF : 根.



第11図. PCR法によるチオニン遺伝子の確認.

チオニン遺伝子翻訳領域をプライマーとしてPCRを行った.

Ct : 非形質転換個体.

T1~ T8 : 形質転換個体.

T9~T31 : データ省略.

論文審査結果要旨

セリは日本全国に自生しているセリ科の植物で、地域特産野菜として栽培されてきた。宮城県内では約 27 ha 栽培されていて、販売量では全国第 2 位の産地である。セリは古くから栽培されている品目であるが、交配等による品種育成は行われず、各産地ごとに栄養繁殖されたものの中から選抜された種苗が在来系統として栽培されている。宮城県内の産地でも、以前は在来系統が栽培されていたが、セリの代表的な系統である‘島根みどり’が導入されて以来、‘島根みどり’の作付けが多くなっている。‘島根みどり’は市場性の高い優良な系統であるが、セリ葉枯病に罹病しやすいため、市場性が高く、しかもセリ葉枯病に抵抗性のある新品種の育成が望まれている。また、品質の良いセリは、莖葉が緑色で、基部節間が詰まっているものとされ、調製作業の省力化のためにはランナーの発生が少ないことが望まれているが、セリの生態的特性や日長反応について詳細に検討した報告は見あたらない。

以上のような背景に基づいて、本研究においては、培養変異を利用してセリ葉枯病抵抗性の新品種を育成し、その生態的特性を調べようとした。また、遺伝子工学的手法による耐病性遺伝子の導入の可能性について検討した。

その結果、培養変異の選抜により、セリ葉枯病に対して在来系統の‘飯野川系’と同程度の抵抗性を示し、外部形態は育成親の‘島根みどり’（園試系）とほぼ同じ新品種‘みやぎ VWD 1 号’を育成した。

新品種‘みやぎ VWD 1 号’の自然条件下における生育や温室内における日長反応、12 月の収穫時における品質は、育成親の‘島根みどり’（園試系）とほぼ同じであった。また、基部節間の伸長は 8 時間日長に比べて 24 時間日長で著しく促進されることと、セリのランナー発生には日長時間が影響しないことが明らかになった。

アグロバクテリウムの系統 EHA101 で形質転換処理を行い、ハイグロマイシンで選抜することによって、セリに GUS 遺伝子を導入することが可能であったので、この方法を用いてセリに抗菌性タンパク質遺伝子（チオニン遺伝子）を導入した。

以上の結果から、本研究で育成した新品種と生態的特性を活用することによって、セリの栽培管理や調製作業が省力化され、さらに新しい品種が育成されると期待される。そこで、審査員一同は博士（農学）の学位を授与するに値するものと判断した。