

## 学位論文題名

メロンの組織培養において出現する体細胞突然変異と  
その利用に関する研究

## 学位論文内容の要旨

メロンの細胞・組織培養における再生植物体には体細胞突然変異が高頻度に発生するが、それらの変異の中には育種的に重要な諸形質に関する有用な変異が含まれており、植物育種における重要な遺伝的変異拡大方法の一つである。しかし、体細胞突然変異の出現頻度は培養系の違いにより異なると考えられ、体細胞突然変異を利用した育種では変異出現頻度の高い培養系を選び、種苗の大量増殖では変異出現頻度の低い培養系を選ぶなど目的に応じて培養系を選定することが必要となる。このように、各種培養系を利用する場合、培養系と体細胞突然変異の出現頻度の関係を明らかにしておくことが極めて重要である。

本研究では、1) 倍数性変異を指標としたメロンの各種細胞・組織培養系（不定胚形成、不定芽形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系）における体細胞突然変異の出現頻度の評価、2) 倍数性変異の出現機構の解析、3) 高頻度に出現する倍数性変異の利用、4) 体細胞突然変異を利用した低温伸長性メロンの選抜を行い、メロンの細胞・組織培養による再生植物体に生じる体細胞突然変異の出現様相を明らかにし、その実用的な有効性を検証した。

1) 倍数性変異を指標としたメロンの各種の培養系における体細胞突然変異の出現頻度の評価

不定胚由来の再生植物体を調査した結果、四倍体が高頻度に出現しており、この頻度は培養系における他の体細胞突然変異の出現頻度を推定する指標の一つとして有効であると考えられた。そこで不定芽形成、不定胚形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系による再生植物体での四倍体の出現頻度について調査したところ、不定胚または不定芽由来の植物体で高く、それぞれ31%、30%であり、苗条原基由来の植物体では4%であった。腋芽伸長培養系による再生植物体には四倍体が確認できなかった。これらの点からメロンの培養系の中の不

定芽形成および不定胚形成培養系では、倍数性以外の体細胞突然変異の発生も多いものと推察された。また、組織培養技術はメロンの新しい倍数体作出技術になると考えられた。

## 2) 倍数性変異の出現機構の解析

二倍体メロンを外植片とした場合の不定芽形成および不定胚形成培養系の培養初期から植物体再生までの培養細胞の染色体数変化を調べるとともに、四倍体メロンを外植片とした場合の両培養系における再生植物体の染色体数を観察し、組織培養に伴う倍数性変異の出現機構について考察した。不定芽形成培養系では培養開始1週間後から2週間後という早い時期に培養細胞の倍数性変異が急速に拡大すること、植物体再生過程で二倍性および四倍性細胞から選択的に植物体が再生していることが明らかになった。不定胚形成培養系では、培養の進行に伴い細胞中の染色体数の倍数化が急速に進行し、このような細胞の中の二倍性、四倍性および八倍性細胞から選択的に不定胚が形成され、更に、その中の二倍性および四倍性不定胚から植物体が再生してくることが明らかになった。また五倍性以上の高次倍数性細胞からの植物体再生は困難であると推測された。以上のことから、メロンの不定芽形成または不定胚形成培養系では以下の経過で四倍体が高頻度に出現すると考えられる。即ち、1) 組織培養の進行に伴い培養細胞の倍数性変異が急速に拡大する。2) 不定芽および不定胚の分化過程で、これらの多様な細胞中の二倍性、四倍性および八倍性細胞から選択的に不定芽および不定胚が形成され、この段階で異数性や他の倍数性細胞は排除される。3) 更に植物体再生の段階で二倍性および四倍性の不定芽および不定胚から植物体が再生する。

## 3) 高頻度に出現する倍数性変異の利用

メロンの細胞・組織培養における再生植物体は、二倍体、四倍体および二倍性と四倍性細胞をキメラにもつ混数体のみであった。そこで組織培養によって作出した四倍体を利用して育種や遺伝分析に役立つ三倍体や異数体の作出を試みた。三倍体は二倍体×四倍体の交雑で得られた発育不全胚を、異数体は三倍体×二倍体の交配より得られた未成熟種子をMS培地に無菌播種することで作出できた。

## 4) 体細胞突然変異を利用した低温伸長性メロンの選抜

体細胞突然変異の出現頻度が高いとみられる不定芽形成および不定胚形成培養系を利用して、有用変異体として、低温下で果実肥大性に

優れた個体の選抜を試みた。まず効率的な選抜法の開発を行ったところ低温発芽性を指標として母集団の中から果実肥大性が不良な個体を多量に排除することが可能であると考えられた。そこで、この方法を用いて低温下で発芽する個体を不定芽形成および不定胚形成培養系により再生した植物体の後代から選抜した。低温下における選抜系統の発芽率は、選抜を繰り返すことによって向上し、系統により発芽率に10%から100%までの変異幅があったことから、低温発芽形質は、複数の遺伝子に支配される遺伝形質であると推定された。これら低温発芽性により再生植物体の後代から選抜した47系統を低温条件下で栽培した結果、着果が不良な系統と裂果の多い系統が総計で16系統含まれており、最終的には31系統で果実の収穫調査が可能であった。この中で48%に相当する15系統が果実肥大性において元系統より優れており、低温発芽性によって選抜した系統には、低温下での果実肥大も良好な系統がかなり高い確率で含まれていた。果実の発育時期別の肥大速度を品種・系統間で比較すると、初期、中期および終期の肥大速度が元系統より大きい系統は、初期で43%、中期で65%および終期で19%となり、特に、中期の肥大速度の大きな系統が選抜されたと考えられる。

本研究の成果は、更に次のような示唆と課題を提起している。

1) メロンでは、四倍体が他の植物より多く出現するので、それらを様々な場面で利用するため、培養方法の改良などにより倍数性変異を制御することが必要である。2) 不定胚形成または不定芽形成培養系が新しい染色体倍加法となることが明らかになったので、半数体作出技術と組み合わせて、形質の早期固定法の開発が期待される。3) 体細胞突然変異を利用して低温発芽性や低温果実肥大性に優れた変異体を選抜できたので、今後は耐病性、品質、生態的特性などに関しても有用変異体の選抜が期待される。4) 低温発芽性は、作物栽培において極めて重要な形質であり、選抜系統を生理学的に解析することにより、低温発芽性の出現機作が明らかになる可能性がある。5) 低温発芽性や果実低温肥大性を育種に利用するには、両形質に関与する遺伝子の固定、数の推定、優劣および両遺伝子の連鎖などについての解析を進める必要がある。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 田 隆

副 査 教 授 木 下 俊 郎

副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

### 学 位 論 文 題 名

メロンの組織培養において出現する体細胞突然変異と  
その利用に関する研究

本論文は、6章および緒言、摘要、引用文献からなり、図 40、表 27 を含む 151頁の和文論文で、別に参考論文13編が添えられている。

メロンの細胞・組織培養により体細胞突然変異を高頻度に発生させ、これを品種改良に利用することが望まれている。しかし、体細胞突然変異の出現頻度は培養系の違いにより異なると考えられ、体細胞突然変異を利用した育種では変異出現頻度の高い培養系を選ぶなど、目的に応じて培養系を選定することが必要となる。したがって、培養系を利用する場合、培養系と体細胞突然変異の出現頻度との関係を明らかにしておくことが極めて重要である。

本研究では、1) 倍数性変異を指標としたメロンの各種細胞・組織培養系（不定胚形成、不定芽形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系）における体細胞突然変異の出現頻度の評価、2) 倍数性変異の出現機構の解析、3) 高頻度に出現する倍数性変異の利用、4) 体細胞突然変異を利用した低温伸長性メロンの選抜について検討し、メロンの細胞・組織培養系における体細胞突然変異の出現ならびにその実用的な有効性を明らかにした。

### 1) 倍数性変異を指標としたメロンの各種培養系における体細胞突然変異の出現頻度の評価

不定胚由来の再生植物体を調査した結果、四倍体が高頻度に出現しており、この頻度は培養系における他の体細胞突然変異の出現頻度を推定する指標の一つとして有効であると考えられた。そこで、不定胚形成、不定芽形成、苗条原基形成および腋芽伸長培養系による再生植物体での四倍体の出現頻度について調査したところ、不定胚または不定芽由来の植物体では高く、それぞれ31%、30%であったが、苗条原基由来の植物体では4%と低く、腋芽伸長培養系では四倍体が確認できなかった。これらの点からメロンの培養系の中の不定胚および不定芽形成培養系では、倍数性以外の体細胞突然変異の発生も多いものと推察された。

### 2) 倍数性変異の出現機構の解析

二倍体メロンを外植片とした場合の不定胚形成および不定芽形成培養系における培養初期から植物体再生までの染色体数の変化について調べるとともに、四倍体メロンを外植体とした場合の両培養系における再生植物体の染色体数を観察し、組織培養に伴う倍数性変異の出現機構について検討した。不定芽形成培養系では、培養開始1週間後から2週間後の早い時期に培養細胞の倍数性変異が急速に拡大すること、植物体再生過程で二倍性および四倍性細胞から選択的に植物体が再生することが確認された。また、不定胚形成培養系では、培養の進行に伴い細胞の染色体数の倍加が急速に進行し、このような細胞の中の二倍性、四倍性および八倍性細胞から選択的に不定胚が形成され、更に、その中の二倍性および四倍性不定胚から植物体が再生することが明らかになった。

### 3) 高頻度に出現する倍数性変異の利用

メロンの細胞・組織培養における再生植物体は、二倍体、四倍体および二倍性と四倍性細胞をキメラにもつ混数体のみであった。そこで、組織培養によって作出した四倍体を利用して育種や遺伝分析に役立つ三倍

体および異数体の作出を試みた。三倍体は二倍体×四倍体の交雑で得られた発育不全胚を、異数体は三倍体×二倍体の交配から得られた未成熟種子をMS培地に無菌播種することにより作出することができた。

#### 4) 体細胞突然変異を利用した低温伸長性メロンの選抜

体細胞突然変異の出現頻度が高いとみられる不定胚形成および不定芽形成培養系を利用して、低温下での果実肥大性に優れた個体の選抜を試みた。この場合、低温発芽性を指標として母集団の中から果実肥大性の不良な個体を大量に排除することが可能であり効率的であることが明らかになったので、この方法を用いて、不定胚形成および不定芽形成培養系により再生した植物体の後代から、低温下で発芽する個体を選抜した。これらの低温発芽性により選抜した47系統を低温条件下で栽培したところ、48%に相当する15系統が果実肥大性において元系統より優れており、低温発芽性によって選抜した系統には、低温下での果実肥大も良好な系統がかなり高い確率で含まれることが確認された。

以上のように、本研究の成果は、不定胚または不定芽形成培養系を用いることにより体細胞突然変異が出現し、これにより低温伸長性および果実低温肥大性の高いメロン系統の作出が可能であることを実証しており、学術的にも重要であり、メロン栽培技術の改良に寄与するところが大きい。

よって、審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 江面 浩は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。