

博士（農 学） 肥田野 豊

学位論文題名

リンゴの薬培養並びにイネの
細胞質雑種に関する育種学的研究

学位論文内容の要旨

本研究では、組織培養技術を植物育種に適用し、いわゆる「細胞育種」を確立するための基礎研究を行なった。第1部では、リンゴの薬培養を取り上げ、リンゴの特異性に対応した花粉起源の植物体育成法の確立を図った。第2部では、イネの非対称細胞融合により雄性不稔細胞質を導入した細胞質雑種について、不稔性の維持と変動を検討した。また、栽培種と近縁野生種間の細胞質雑種を作出したところ、多くの不稔性個体が生じた。同時に、野生種と類似した形質を有する変異体が生じたので、その形質転換について検討した。

1. リンゴの薬培養による植物体の育成

リンゴの薬培養においては、肉眼的に花粉起源のカルス、薬壁起源のカルス及び不定胚の形成が見られた。花粉カルス及び不定胚は、Murashige と Skoog (1962) の処方による無機塩類とビタミン類にショ糖 30 g/l を加えた基本培地、あるいはこれに植物生長調節物質を低濃度で添加した培地において形成され、一方、これらの培地では薬壁カルスの形成は抑制された。花粉カルスは半数性 ($n=17$) の染色体数を示したが、二倍性のものも見られた。

花粉カルス及び不定胚の形成過程について顕微鏡観察を行なった結果、次のように考えられた。すなわち、薬内の一核期の花粉は充実肥大後、花粉膜の内部で数細胞に分裂し、次いで膜を破って分裂を続け、球状胚から心臓型胚へと胚形成と同様な過程をたどった。しかし、多くの場合この段階で脱分化を生じ、花粉カルスとして増殖した。ただし、一部は魚雷型胚を経て子葉と胚軸を備えた不定胚にまで発達した。これが、リンゴの薬培養において、花粉カルスと不定胚の形成が同時に見られた理由であり、また、これらと薬壁カルスとが異なった培地条件下で形成される理由と考えられた。その機作には内生的な植物生長調節物質の関与が示唆された。

花粉カルス及び不定胚の形成率を高めるため、培養条件の検討を行なった結果、培地への 3 g/l の活性炭の添加、及び 4 °C で 7 日間の薬の低温前処理がともに有効であった。

供試した 40 種の栽培品種及び台木用系統の内で、36 種が花粉カルスを、また、23

種が不定胚を形成したが、それらの形成率にはかなりの変異幅があった。いわゆる「デリシャス系」の品種群においては、芽条変異品種が何れも高い不定胚形成率を示したのに対し、交雑品種間では形成率に変異が大きく、芽条変異体と比べて交雑実生間では遺伝子型に大きな変異が生じることとの関係が示唆された。なお、花粉カルス形成率においても、遺伝的要因の関与が示唆された。

形成された不定胚はそのまま培養を続けると、多くの場合異常な肥厚を示して正常な生長が見られず、植物体育成には、不定胚に4°Cで3か月間の低温処理を施すことにより「発芽的生長」へ転換させる必要があった。シートを展開し、発根した個体は、鉢上げして外界に馴化させた。

薬培養により花粉由来の植物体育成にまで成功したが、鉢上げに至ったのは品種「千秋」に限られており、一般化するためには更に検討が必要である。また、半数体育成法として胚珠や子房の培養、放射線照射花粉による単為生殖の誘発なども検討する必要がある。

2. イネの非対称細胞融合による細胞質雑種の作出

2-1. 細胞質雑種における雄性不稔性の維持と変動

非対称細胞融合により、イネの栽培品種「フジミノリ」へ細胞質雄性不稔系統A-58CMSから $[cms-bo]$ 細胞質を導入した細胞質雑種について、伝達された雄性不稔性の維持と変動を検討した。その結果、当初完全不稔を示した個体のほとんどが、雄性不稔性を安定して維持し、花粉親との交配で次代へ伝達することが確認され、長期間を要する核置換法に代わって、優良品種へ細胞質雄性不稔性を短期間で付与する新技術として、育種の効率化に大きく役立つことが明らかになった。

一方、当初様々な程度の部分不稔を示した細胞質雑種においては、経時的あるいは有性生殖を経ることにより稔性の変動を生じた。一般に稔性が向上したが、後代において変異を生じる場合もあった。また、当初完全不稔を示しながら後に部分稔性に変化した個体も見られ、これを分げつ毎に栄養系として繁殖したところ、栄養系毎の稔性発現に大きな差異を生じた。

上記の現象については次のような仮説でほぼ説明が可能であった。すなわち、親系統の細胞質内にそれぞれ可稔因子と不稔因子があり、細胞質雑種の細胞質中では当初それらが混在してヘテロプラズモンとなる。しかし、細胞分裂を繰り返す過程でそれらに選別が働き、一定の閾値を境にして細胞毎に不稔か可稔かが決定される。したがって、一方への選別が完了した場合には、不稔または可稔の状態が安定して維持されるが、1個体内に両者が混在する状態では選別による稔性の変動が続き、分げつ間や後代の個体間に稔性変異を生じる。

2-2. 栽培種と野生種間の細胞質雑種及び変異体の遺伝分析

イネの栽培品種「キタアケ」に近縁野生種 *Oryza rufipogon* の系統 W-124 の細胞質を導入することを目的として、非対称細胞融合を行ない細胞質雑種を作出した。得られた個体の多くは「キタアケ」に類似した形態を示し、同時にW-124のミトコンドリア

に由来するプラスミド様 DNA B3 を保有していた。これらの細胞質雑種は多様な種子稔性を示し、雄性不稔と見られる個体も含まれていたので、「キタアケ」の核遺伝子と W-124 の細胞質因子との組合せによる新たな雄性不稔系統と考えられた。

一方、得られた個体中の 1 個体 RU-75 は、W-124 に類似した開張型の草型、有芒性、花青素着色、赤米などの形質を有し、これらの形質は自殖により安定して後代に伝達された。また、RU-75 は RFLP 分析において、供試した 86 種の RFLP マーカーの内で、79 種については「キタアケ」型を示したものの、2 種については W-124 型、更に 5 種については両親の何れとも異なる新たなバンドパターンを示した。これらのことから、RU-75 は W-124 から細胞質因子のみならず核遺伝子の一部をも取り込み、更に育成過程で突然変異を生じた可能性が考えられる。

RU-75 の変異形質について検定交雑による遺伝子分析を行なったところ、開張型の草型は染色体 11 の *la* 遺伝子、赤米は染色体 7 の *Rc^d* によると推定された。なお、これらの結果は、RFLP マーカーとの連鎖分析からも支持された。

RU-75 において「キタアケ」と異なる形質及び RFLP のバンドパターンが、何れも同型接合型であったことは注目に値する。この様な形質転換を生じたことは、非対称細胞融合が細胞質因子のみならず核遺伝子の導入法としても有効であることを示した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 木下俊郎
副査 教授 中世古公男
副査 教授 原田 隆

学位論文題名

リンゴの薬培養並びにイネの 細胞質雑種に関する育種学的研究

北方地域の代表的な果樹であるリンゴと主要穀類の一つであるイネについて組織培養技術を育種へ適用し、いわゆる細胞育種を確立するための基礎研究を行なった。木本作物の薬培養は従来きわめて困難であったが、リンゴで花粉起源の植物体を育成できた。また、イネでは細胞融合法によって伝達した雄性不稔細胞質の安定性や変動性を明らかにすると共に栽培種と近縁野生種間の非対称融合法により新型雄性不稔植物や形質転換体を作成した。

本論文は2部10章から成り、83頁で表20と図12を含む。主な内容は下記の如く要約される。

1. リンゴの薬培養による植物体育成

リンゴでは、肉眼的に花粉起源カルス、薬壁起源カルスおよび不定胚形成を判定できたが、花粉カルスと不定胚は、Murashigeと Skoog (1962)の処方による無機塩類とビタミン類にショ糖 30g/lを加えた基本培地、あるいはこれに植物生長調節物質を低濃度で添加した培地において形成された。

薬培養の過程について顕微鏡観察を行った結果、一核期の花粉は充実肥大後、花粉膜の内部で数細胞に分裂し、次いで膜を破って分裂を続け、球状胚から心臓型胚へと発育した。しかし、多くの場合はこの段階で脱分化を生じ、花粉カルスとして増殖し、一部が魚雷胚を経て子葉と胚軸を備えた不定胚に発達した。したがって、リンゴでは花粉カルスと不定胚の形成が同時に見られた。

花粉カルスおよび不定胚の形成率を高めるための培養条件として、培地への3g/lの活

性炭の添加および4°Cで7日間の薬の低温処理がともに有効であった。40種の供試系統中、36種で花粉カルスを、また23種で不定胚を形成し、それらの形成率にはかなりの変異幅がみられた。また花粉カルス形成率においても、遺伝的要因の関与が示唆された。

植物体にまで成長するためには、不定胚に4°Cで3ヶ月間の低温処理を施すことが必要であり、鉢上げにまで至ったのは品種「千秋」に限られていた。

2. イネの細胞質雑種における雄性不稔性の維持と変動

品種「フジミノリ」へ細胞質雄性不稔系統のA-58CMSから雄性不稔細胞質を導入した材料が用意されていた。それらを用いて再生個体第1代(R_1)に生じた雄性不稔個体が自殖により R_2 代個体へ雄性不稔性を安定して伝達することを認め、さらに維持花粉親との交配により R_2 では100%雄性不稔個体を生じたことにより細胞質・核遺伝子型雄性不稔であることを確認した。

一方、 R_1 個体では広い変異幅の部分稔性個体が得られていたので、 R_1 個体を1年間株保存するか、有性生殖を経て R_2 代個体にしたところ稔性の向上を生じた。また、当初完全不稔であった R_1 個体が部分稔性に変化した例もあり、特に分けつ毎に栄養系として繁殖したところ、栄養系毎に稔性の大きな差異を生じた。

これらの現象については、融合親の細胞質がそれぞれ可稔因子または不稔因子で固定していて、融合後の細胞質雑種はそれらの合体によりヘテロプラズモンとなる。 R_1 個体の発生や生育中にヘテロプラズモンに選別が働き、一定の閾値を境にして細胞毎に不稔か可稔かが決定される。したがって、もし選別が完了していた場合には、不稔または可稔の状態で安定して維持されるが、1個体内にヘテロプラズモンが続く場合にはさらに選別が働いて分けつ間や R_2 の個体間で稔性変異を生じるという仮説でよく説明できた。

3. 栽培種と野生稻間の非対称融合による雄性不稔植物の創成

品種「キタアケ」へ野生稻*Oryza rufipogon*の系統W-124の細胞質を導入するため、非対称細胞融合を行って細胞質雑種を作出した。得られた個体の多くは「キタアケ」に類似した形態を示し、W-124からのミトコンドリア中のプラスミド様DNA B3を保有していた。これらの細胞質雑種は多様な種子稔性を示したが、雄性不稔と見られる R_1 個体が含まれていた。したがって、「キタアケ」の核遺伝子とW-124の細胞質因子との組合せにより新たな細胞質・核遺伝子型雄性不稔系統が作成された。

4. 形質転換体 RU75に関する遺伝解析

上記の細胞質雑種のR₁個体の一つであるRU-75はW-124に類似する開張型の草型、有芒性、花青素着色、赤米などの形質を有し、それら以外はすべて「キタアケ」様の特性を示した。出穂性も「キタアケ」と変らぬ早生で種子稔性は46%であった。RU-75を自殖してR₂代を調べるとすべての形質は安定してR₂へ伝達され固定した。また、RU-75個体のRFLP分析によると供試した86種のRFLPマーカーの内の79種については「キタアケ」型を示し、2種についてはW-124型となった。更に他の5種については両親の何れとも異なる新たなバンドパターンを示した。また、W-124の持つミプラスミド様DNAを保持していた。そこで、RU-75はW-124からの細胞質因子のみならず核遺伝子の一部をも取り込んで、更に培養の過程で突然変異を生じていた。

RU-75の変異形質について検定交雑により遺伝子分析を行なったところ、開張型の草型には染色体11の1a遺伝子、赤米には染色体7のRcがそれぞれ関与していた。また、染色体11のRFLPマーカーと1aとの間には連鎖関係が認められた。

RU-75において野生稻由来の形質およびRFLPのバンドパターンが、何れも同型接合であったことは注目に値することで、形質転換によりRU-75を生じたことを示している。

本研究で得られた成果はリンゴやイネの細胞育種にとって有用な知見をえたのみならず、細胞融合により雄性不稔性と形質転換体を生じたのはいずれも新しい事例であり、育種学への貢献が大きかった。

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、本論文の提出者肥田野 豊は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があると認定した。