

学 位 論 文 題 名

アズキ (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI)

の細胞育種に関する基礎研究

学位論文内容の要旨

北海道におけるアズキ栽培は、度々起こる冷害と転換畑での作付の拡大等による病害虫の発生などのため、その生産が不安定であり、畑作経営上大きな問題点となっている。

本研究ではアズキの安定生産を計るために耐病虫性などの優良形質を早急に導入することを目的として育種の新手法である細胞組織培養法と遺伝子導入法の開発を検討した。

アズキの組織培養に適した外植片は上胚軸で、上胚軸の採取時期は播種後7日目で外植片の長さが10mmの場合に再分化率が高かった。基本培地はMSで、サイトカイニンはBAPで濃度が0.1mg/l、ショ糖濃度は30g/l、ゲル化剤は8g/l寒天が最適な培養条件であった。また、ベニダイナゴンが高い再分化能をもつことを明らかにした。さらに、再分化個体を温室で養成して、採種することができた。

次に上胚軸からカルスを誘導し、そのカルスからの再分化条件を検討した。サイトカイニンとしてはBAPが適しており、その濃度は1.0mg/lが好適で、BAPとNAAとを組み合わせると再分化率がさらに向上した。ショ糖は30g/lが適していた。また、6回目の継代カルスでは再分化率が減少しなかったが、12回目のカルスになると再分化率が減少した。一方、上胚軸からNAA(0.05~1.0mg/l)とBAP(1~4mg/l)を組み合わせ誘導したカルスは再分化率が高かったが継代は困難であった。再分化の形態として葉の塊がみられた。この組織はホルモンフリーのMS培地で増殖と継代が可能で、継代中に不定芽の形成がみられ、その再分化能は7ヶ年間維持された。

プロトプラスト培養では上胚軸と上胚軸由来カルスからプロトプラストを単離した。

プロトプラストの培養におけるホルモンとしては 2,4-D と BAP の等量含まれる培地で分裂率が高く、浸透圧調節剤としては 0.3M のグルコースが適当であり、液体培地に比べてアガロスを添加した固体培地で高い分裂率を示した。分裂したプロトプラストはコロニーを経てカルスにまで生育した。供試した全品種でカルスから不定芽が形成され、温室で再分化個体よりの採種ができた。

カルス由来および上胚軸由来の再分化個体について体細胞変異の探索のため、再分化個体の後代系統を 5 年 にわたり圃場試験で調査した。可視的な変異体としては矮性、アルビノ、葉形異常、晩生変異、大粒、小粒、および莢色の変異体を生じ、それらの変異体率は 0.4% ~ 3.8% で、自然突然変異よりもはるかに高率であった。さらに、種子に放射線照射 (X 線、ガンマー線) を行った後に播種し、その上胚軸からの再分化個体での変異体の発生率 (1.3 ~ 6.7%) は通常の培養のみによる場合よりも高かった。

ハツネショウズにおいてかかる体細胞変異体中から粒大選抜により原品種よりも百粒重の明らかに重い系統を作出できた。これらの系統の主茎長は原品種よりもやや短く主茎節数および稔実莢数は同程度で、一莢内粒数が少なく、収量はほぼ原品種程度であった。また、同時に小粒系統も作出できた。原品種のハツネショウズはアズキ落葉病に抵抗性であったが、大粒系統の一つでは感受性になっていた。

遺伝子導入では、*Agrobacterium tumefaciens* を用いてカナマイシン耐性遺伝子 (NPTII, neomycin phosphotransferase) の導入に成功し、サザンブロットハイブリダイゼーションによりカナマイシン遺伝子の存在を確認した。また、GUS (β -グルクロニダーゼ) 遺伝子の発現も確認できた。さらに、インゲンマメに由来するアズキゾウムシ耐虫性遺伝子 (α -amylase inhibitor 遺伝子) をアズキ品種のベニダイナゴンへ導入した。また、*A. rhizogenes* を用いて形質転換個体を得ることができて、オパインであるミキモピンの検出により形質転換体であることを確認した。その個体は根の生育が旺盛で矮化していた。

アズキにおいてアグロバクテリウムを利用した形質転換系が作出されたので将来のアズキ育種に広く役立てることができる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 下 俊 郎

副 査 教 授 原 田 隆

副 査 教 授 三 上 哲 夫

学 位 論 文 題 名

アズキ (*Vigna angularis* OHWI & OHASHI)

の細胞育種に関する基礎研究

アズキ栽培では、冷害や病害虫の発生などのため、その生産が不安定であり、畑作経営上大きな問題となっている。そこで、本研究ではアズキの安定生産を計るために各種の有用形質を早急に導入する育種新技術として細胞組織培養法とアグロバクテリウムによる形質転換法の開発を試みた。

本論文は5章から成り、表48と図19を含む。主な内容は下記の如く要約される。

1. アズキの組織培養法

外植片には発芽種子の上胚軸を用い、材料の採取時期は播種後7日目で長さは10mmとするのが再分化に好適であった。MS基本培地にサイトカイニンとしてBAPを0.1mg/l加え、ショ糖濃度は30g/l、ゲル化剤は8g/l寒天とする条件で、品種「ベニダイナゴン」より高い再分化率を得た。また、再生個体よりの採種も可能であった。

次に上胚軸からカルスを誘導した後に、再分化を計る条件として、サイトカイニンとしてBAPの濃度を1.0mg/lとした。また、BAPとNAAとを組み合わせると再分化率がさらに向上した。ショ糖は30g/lが適していた。なお、6回位継代したカルスにおいても再分化率が減少しなかった。一方、上胚軸か

ら N A A (0.05~1.0mg/l) と B A P (1~4mg/l) の組み合わせにより誘導した葉の塊のような organogenicカルスでは、ホルモンフリーの M S 培地で増殖と継代が可能となり、継代中に不定芽を形成し、その再分化能は7年間も持続した。

2. プロトプラスト培養法

上胚軸や上胚軸由来カルスからプロトプラストを単離・精製した。プロトプラストの分裂を高めるホルモンの条件としては 2,4-D と B A P の等量含まれる場合に最も分裂率が高く、浸透圧調節剤としては 0.3M のグルコースが適当で、アガロースを添加した固体培地で高い分裂率を示した。供試した全品種でプロトプラストからコロニーを経てカルスにまで生育し、さらに不定芽の形成を経て、再分化個体より採種ができた。

3. 体細胞変異体の作出と利用

組織培養により体細胞変異を誘発させるために、カルス由来および上胚軸由来の再分化個体について、それらの後代系統を5年間にわたって圃場条件で継代し、可視的変異体を選んだ結果、矮性、アルビノ、葉形異常、晩生、大粒、小粒および莢色の各変異体を見い出した。それらの変異体率は0.4%~3.8%で、自然突然変異率よりもかなり高率であった。さらに、あらかじめ種子に放射線照射した後に発芽させて、上胚軸を採り、培養して得た再分化個体における体細胞変異の発生率(1.3~6.7%)は上記の培養のみによる場合よりも高率を示した。

かかる方法で「ハツネショウズ」における粒大選抜から原品種よりも百粒重の明らかに重い大粒系統を作出した。この系統の主茎長は原品種よりもやや短く、主茎節数および稔実莢数は同程度で、一莢内粒数が少なく、収量は原品種程度であった。また、同時に小粒変異系統も作出された。

4. アグロバクテリウムによる形質転換法

Agrobacterium tumefaciens を用いる形質転換技術をアズキへ適用して、まずカナマイシン耐性遺伝子 (NPTⅡ、neomycin phosphotransferase) を導入することに成功し、形質転換体のサザンブロットハイブリダイゼーションにより遺伝子の存在を証明した。また、レポーター遺伝子としてGUS (β -グルクロニダーゼ) 遺伝子の発現も確認した。さらに、インゲンマメに由来するアズキゾウムシ耐虫性遺伝子 (α -amylase inhibitor遺伝子) を「ベニダイナゴン」へ導入することに成功し、実際に形質転換体でこの遺伝子に相当する DNA断片の導入を確かめた。一方、A. rhizogenesを用いる形質転換法として、毛状根の培養からの形質転換体で、オパインであるミキモピンを検出し、その個体は根の生育が旺盛で矮化していた。このようにアグロバクテリウムを利用する形質転換系が実際のアズキ育種へ適用できるようになった。

本研究で得られた成果は、アズキの培養技術としてプロトプラストから植物体再生までを確立し、さらに体細胞変異体の育種的利用に役立てた。また、実際に有用遺伝子をアグロバクテリウムの形質転換法でアズキへ導入することに成功した点で、実際育種への貢献がきわめて大きかった。

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、本論文の提出者佐藤 毅は博士(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。