

学 位 論 文 題 名

組織・細胞培養法によるハウレンソウ植物体再生系の
作出とその利用に関する基礎的研究

学位論文内容の要旨

ハウレンソウの栽培面において望まれている全雌性系統の作出と、性表現に関する基礎的な知見を得ることを目的として、組織および細胞培養法による植物体再生系を作出し、その系において得られた再生植物体の特性について検討した。研究内容は、次のように要約される。

1. ハウレンソウの植物体再生系の作出

ハウレンソウの優良株の栄養繁殖や、性表現の解析に利用できる、優れた植物体再生系は確立されていない。そこで、効率的かつ再現性の高い、組織およびプロトプラストからの植物体再生系を作出した。

(1) 予備実験によって、高い植物体再生率を示すハウレンソウ品種および組織片採取部位について検討したところ、‘次郎丸’の根組織片がカルスおよび不定胚形成に優れていることが明らかになった。したがって、この材料を用いて、分化に適した培地主要成分の種類と濃度について検討した。根組織片由来カルスからの不定胚は、オーキシン単用培地では形成されず、オーキシンとサイトカイニンの併用培地において低頻度で形成された。また、不定胚は、オーキシンとジベレリンの併用培地において最も高頻度で、かつ再現性よく形成されることが判明した。6種類の既存培地を用いて根組織片を培養したところ、1/2MS培地とNitsch培地において高い頻度で不定胚が形成されることが明らかとなり、さらに、不定胚形成は、培地の硝酸態窒素とアンモニウム態窒素の比率が2対1の条件下において、全窒素濃度が10～

30mMの場合に最も高い頻度で誘起されることを見出した。また、10種類の糖質を用いて、不定胚形成に対して促進的に働く糖質を選定したところ、フルクトースおよびラフィノースが最も大きな効果を現すことがわかった。

(2) ホウレンソウ芽生えから取り出した子葉、胚軸、および根組織のうち、プロトプラストの収量は子葉組織を用いた場合に最も多く、酵素処理後にピンセットで組織片を崩す処理を施すことによってその収量が増加した。子葉プロトプラストからのコロニー形成には、2,4-D $1\mu\text{M}$ とzeatin $10\mu\text{M}$ の組み合わせが最も効果的であり、この培地の浸透価は、マンニトール0.5Mが至適であることが明らかになった。子葉プロトプラストから形成されたコロニーは、カザミノ酸を添加した液体培地に懸濁すると、カルスを形成した。NAAとGA₃を併用した培地で生長したカルスからは不定胚および不定根が形成され、その後、不定胚は発育して幼植物となり、この不定根から採取した外殖片は、次代の培養における植物体再生に有効であることが判明した。

2. ホウレンソウの植物体再生過程の解析

ホウレンソウ根組織由来の、不定胚を形成しつつあるカルス中の物質の変化を経時的に調べるとともに、植物体再生過程を組織学的に観察し、植物体再生に伴う内的要因について検討した。

(1) ラフィノースを添加した液体培地 (NAA $10\mu\text{M}$ およびGA₃ $0.1\mu\text{M}$ を含む) で根組織片を培養した場合、ラフィノースが分解されて生じられるフルクトースが優先的に利用されていることが判明した。また、このような根組織片によるフルクトースの優先的な利用は、スクロースを添加した液体培地でも確認された。ジベレリン添加培地において形成されたカルス (不定胚形成能を持つ) および無添加培地におけるカルス (不定胚形成能を持たない) からは20種類の遊離アミノ酸が検出され、グルタミン酸、グルタミンおよびプロリンの含量が大きく変動することが明らかになった。また、不定胚を形成しつつあるカルスでは、植物体再生に伴うグルタミン酸含量の減少が顕著であ

り、これが不定胚形成に関与する要因の1つであることが示唆された。電気泳動法により、不定胚形成能を持つカルス中の可溶性タンパク質を不定胚形成に至る各過程ごとに調べたところ、スポット数は根組織片自体および不定胚形成能を持たないカルスのそれよりも少ないことが認められ、ジベレリン存在下ではある種のタンパク質合成の抑制が起こるものと思われた。また、不定胚形成のみられないカルスでは各種タンパク質の合成がほとんど抑制されないことから、ジベレリンによるタンパク質合成の抑制と不定胚形成との間に何らかの関連があるものと推察された。一方、不定胚を形成しつつあるカルス中には、胚様体の形成以前に、不定胚を形成していないカルスでは検出されないタンパク質の出現が確認された。

(2) ホウレンソウの根組織をNAAとGA₃を組み合わせて添加した培地において培養すると、中心柱組織から容易に embryogenic callus (EC) が誘導され、ECが胚様体を形成し、この胚様体から不定胚が形成されることが組織学的観察によって明らかになった。このように、ECは根の中心柱組織を構成している細胞に由来することがわかった。また、組織学的観察により、NAA単用培地では胚様体が形成されず、NAAおよびGA₃を含む培地では形成されたことから、胚様体は培地中のGA₃によって誘導されると考えられる。

3. ホウレンソウの性表現の解析

ホウレンソウの性表現に関する知見を得るために、各種生長制御因子による不定胚由来植物体の性表現の変化について調べた。

(1) ホウレンソウの雌性株および雄性株に由来する、第1代目の再生植物体における雌雄性を検討した結果、雌性株由来の再生植物体は全て雌性を示したが、雄性株由来の再生植物体の性表現には変化が認められ、11.7%の頻度で間性が出現した。さらに、雌性株および雄性株に由来する第2代目の再生植物体における雌雄性を検討した結果、雌性株および雄性株由来の再生植物体の性表現は、ともに間性に変化した。いずれの場合にも、雌性から雄性、および雄性から雌性への

性表現の転換は起きていないことが確認された。雌花の変化によって生じた間性花は自家受粉によって種子を形成し、その種子は発芽力を有していた。しかし、雄花の変化によって生じた間性花は自殖によって種子を形成したが、それらは発芽しなかった。一方、間性株由来の再生植物体は全個体が間性を表した。

(2) 培養系における再生植物体の着花および開花は、長日条件で促進され、短日条件では抑制されるなど、種子由来植物と同様の生育特性を示した。また、再生植物体の性表現は培地へ添加した GA_3 濃度によって変化し、特に、雄性から間性への変化が促進されることがわかった。そこで、培地にジベレリン生合成阻害剤 (AMO1618、CCC) を添加し、雄性から間性への移行を抑制することを試みたところ、これらの薬剤を添加すると、逆に間性株が多く出現した。これらのことから、ハウレンソウの雌性株から間性株への移行または雄性株から間性株への移行において、 GA_3 の作用とジベレリン生合成阻害剤の作用との関連がいかなるものであるかについては明らかにできなかった。

以上のように、本研究は、組織および細胞培養法によってハウレンソウの植物体再生系を作出し、この系が、一般栽培における優良株の栄養繁殖ならびに採種栽培に有用な雌性株の作出と栄養繁殖に応用できることを示すとともに、雌雄性発現機構に関する基礎的知見を得るための実験系となり得ることを明らかにしたものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	原田	隆
副査	教授	喜久田	嘉郎
副査	教授	佐野	芳雄
副査	助教授	増田	清

学位論文題名

組織・細胞培養法によるハウレンソウ植物体再生系の 作出とその利用に関する基礎的研究

本論文は、緒言、本論7章、摘要、引用文献119、図35および表30を含む153頁の和文論文で、別に参考論文4編が添えられている。

ハウレンソウの栽培において望まれている優良株の栄養繁殖、全雌性系統の作出および性表現の解析に応用できる確実な植物体再生系は、これまでに確立されていない。本研究は、組織および細胞培養法による再現性の高い植物体再生系を作出し、その系において得られた再生植物体の特性について検討したもので、内容は次のように要約される。

1. 組織・細胞培養による植物体再生系の作出

(1) 高い植物体再生率を示すハウレンソウ品種および組織片採取部位について検討し、品種‘次郎丸’の根組織片がカルスおよび不定胚形成に優れていることが明らかになった。根組織片由来カルスからの不定胚形成は、オーキシン単用培地ではみられず、オーキシンとサイトカイニンの併用培地において誘起された。さらに、不定胚形成は、オーキシンとジベレリンの併用培地において最も高頻度で起こり、かつ再現性の高いことが明らかになった。また、不定胚形成は1/2MS培地とNitsch培地のように、硝酸態窒素とアンモニウム態窒素の比率が2対1で、全窒素濃度が30mMであるような培地において高い頻度で誘起されることを見出した。添加する糖質は、フルクトースおよびラフィノースが不定胚形成に対して最も大きな効果を現すことがわかった。

(2) ハウレンソウ芽生えの子葉、胚軸、および根組織のうち、プロトプラ

ストの収量は子葉組織を用いた場合に最も多く、プロトプラストからのコロニー形成には、2,4-D $1\ \mu\text{M}$ と zeatin $10\ \mu\text{M}$ の組み合わせ添加が最も効果的で、培地の浸透価は、マンニトール 0.5M が至適であることが明らかになった。コロニーは、カザミノ酸を添加した液体培地に懸濁するとカルスを形成し、このカルスを NAA と GA_3 を併用した培地に移植すると、不定胚および不定根が形成された。その後、不定胚は発育して幼植物となり、また、不定根から外殖片を取って培養すると、植物体を再生することがわかった。

2. 植物体再生過程の解析

ホウレンソウ根組織由来であり、不定胚を形成しつつあるカルスを用いて内部物質の変化を経時的に調べるとともに、植物体再生過程を組織学的に観察した。

(1) ラフィノースを添加した液体培地 (NAA $10\ \mu\text{M}$ および GA_3 $0.1\ \mu\text{M}$ を含む) で根組織片を培養した場合、ラフィノースが分解されて生じると思われるフルクトースが優先的に利用されていることがわかった。ジベレリン添加培地において形成されたカルス (不定胚形成能をもつ) および無添加培地におけるカルス (不定胚形成能をもたない) からは20種類の遊離アミノ酸が検出され、不定胚を形成しつつあるカルスでは、植物体再生に伴うグルタミン酸含量の減少が顕著であり、これが不定胚形成に関与する要因の1つであることが示唆された。また、不定胚形成のみられないカルスでは各種タンパク質の合成がほとんど抑制されないことがわかった。

(2) ホウレンソウの根組織を NAA と GA_3 を組み合わせて添加した培地で培養すると、中心柱組織から容易に embryogenic callus (EC) が誘導され、EC が胚様体を形成し、この胚様体から不定胚が形成されることが明らかになった。

3. 再生植物体の性表現の解析

(1) ホウレンソウの雌性株および雄性株の根を培養して得た再生植物体 (第1代) における雌雄性を検討した結果、雌性株由来の再生植物体は全て雌性を示したが、雄性株由来のものでは雄性のほかに11.7%の低頻度であるが間性が出現した。さらに、これらの雌性株および雄性株の根を培養して得た第2代目の再生植物体では、ともに低率ながら間性が出現したが、いずれの場合にも、雌性から雄性、または雄性から雌性への性の転換は起きていないことが確認された。

(2) 培養系における再生植物体の着花および開花は、長日条件で促進され、短日条件では抑制されるなど、種子由来植物と同様の生育特性を示した。また、再生植物体の性表現は培地へ添加したGA₃濃度によって変化し、特に、雄性から間性への変化が促進されることがわかった。

以上のように、本研究は、組織・細胞培養法によるハウレンソウの植物体再生系を作出し、この培養系が、一般栽培における優良株の栄養繁殖、ならびに採種栽培に有用な雌性株の作出と栄養繁殖に利用できることを示すとともに、雌雄性発現機構の検討に有効であることを明らかにしたもので、新たなハウレンソウ栽培技術の確立に寄与するものと考えられる。

よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者駒井史訓は博士（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。