

氏 名(本籍) 加 藤 紀 夫

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 4 8 3 号

学位授与年月日 平 成 5 年 7 月 15 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 Studies on production of haploid plants  
from ovules by unpollinated and pseudo-  
fertilized ovule culture.  
(未受精胚珠及び偽受精胚珠培養による胚  
珠からの半数体植物作出に関する研究)

論文審査委員(主 査) 教 授 日 向 康 吉  
教 授 亀 谷 寿 昭  
教 授 山 谷 知 行

# 論文内容要旨

## 和文要約

### 序章

半数体植物は、ゲノムを1組しか持たないため突然変異が容易に検出される、1組のゲノムを倍加させることにより直ちに純系の二倍体植物になるなど、育種上の利用価値が認められている。そのため1930年代から半数体を効率よく作出するための研究が盛んに行われてきている。半数体植物の起源としては、葯に含まれる花粉と胚珠の胚嚢内に存在する卵細胞などの半数性の細胞が考えられるが、現在のところ花粉を起源とする葯培養または花粉培養による半数体作出技術の方が先行している。しかし、種によっては花粉からの半数体誘導が困難なものがあり、近年は胚珠からの半数体誘導の研究も進展している。San Noeum (1976) のコムギにおける未受精の子房培養による半数体植物の作出、Raquin (1985) の偽受精の胚珠培養によるペチュニアでの成功以来、両手法を用いた胚珠からの半数体作出の報告は増加し、現在までに11科19属22種についての報告がある。しかしながら、これらの多くは発生率が低い、発生率が安定しないなどの問題点があり、実際の育種に適用できるものは極めて少ない。

本研究においては、胚珠からの半数体作出技術の育種への利用を可能とすることを目的とし、タバコ、ルスチカタバコ及びメロンを材料とし研究を進めた。タバコでは、各種方法により、雌しべ様培養体形成の条件と、半数体植物を作出する方法を検討した。また、ルスチカタバコでは未受精胚珠培養により高頻度で半数体を誘導できる系を確立した。さらに花粉からの効率的な半数体誘導技術が開発されていないメロンにおいても、偽受精胚珠培養により半数体作出法を確立し、この方法は多くの品種群の実際の育種にも適用可能であることを示した。

### 第一章

Nicotiana tabacum の未開花の蕾から抽出した子房をカイネチン (KT) 及びインドー

ル酢酸 ( I A A ) を各種濃度で組合せ添加した培地で培養した。K T が添加された実験区において、花托組織から、柱頭及び花柱に類似した器官 ( 柱頭様、花柱様体 ) 及び葉状の器官が分化した ( 表 - 1 ) 。 5 から 5 0 m m の蕾から摘出された子房において、これらの器官形成が認められた。 5 から 2 0 m m の蕾から摘出した発達段階初期の子房の花托組織では、K T 2 m g / l , I A A 無添加条件下で、また 2 0 - 5 0 m m の蕾から採取した発達段階後期の子房の花托組織では、K T 2 m g / l 、 I A A 0 . 5 m g / l の条件下において、最も高頻度で柱頭様、花柱様体へ分化した。

得られた柱頭様、花柱様体を走査型電子顕微鏡により観察した結果、柱頭様体は乳頭突起を有していた。柱頭様体上にのせた花粉は、発芽し花柱様体のなかへ花粉管を伸長させた。柱頭様、花柱様体は形態的機能的に柱頭及び花柱と類似していることが判明した。

表 - 1 蕾長 5-20 m m ( ステージ I ) 、蕾 20-50 m m ( ステージ II ) の子房を培養した際の花托組織からの柱頭様、花柱様体の形成に対する、カイネチン及び I A A の効果

		雌ずい様体出現子房数			
K T ( m g / l )		I A A ( m g / l )			
		0	0.5	1.0	2.0
ステージ I	0	0	0	0	0
	0.5	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	0	0
	1.0	4 <sup>a,b</sup>	1 <sup>b</sup>	0	1 <sup>b</sup>
	2.0	8 <sup>a</sup>	3 <sup>a,b</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>
ステージ II	0	0	0	0	0
	0.5	1 <sup>d</sup>	3 <sup>c,d</sup>	1 <sup>c</sup>	0
	1.0	0	1 <sup>d</sup>	0	3 <sup>c,d</sup>
	2.0	1 <sup>d</sup>	7 <sup>c</sup>	3 <sup>c,d</sup>	1 <sup>d</sup>

各ステージにおいて、異なるアルファベットを付与した数値はカイ自乗検定で統計的に有意な差があることを示す ( P < 0.05 ) 。ステージ I では各実験区 1 5 個、ステージ II では 1 0 個の子房を実験に供した。

## 第二章

*Nicotiana tabacum* の未受精の胚珠を胎座とともに K T 及び I A A を各種濃度で組合せ添加した培地で培養した。発達段階初期の胚珠は、植物成長調節物質の添加の有無にかかわらず、柱頭様、花柱様体へ分化した。一方、発達段階後期の胚珠は K T の添加条件下においてのみ柱頭様、花柱様体へ分化した。胚珠の発達段階により、柱頭様、花柱様体への分化が導かれる培地条件が明かに異なることが見出された（表-2）。

培養された胚珠から分化する柱頭様、花柱様体は植物成長調節物質の種類及び添加濃度により、多様な形態を示した。しかしながら、胚珠から植物体は分化しなかった。培養中の胚珠の切片を作成し観察した結果、柱頭様、花柱様体は珠皮組織が起源となり、その発達過程において胚嚢が崩壊することが明らかになった。

得られた柱頭様、花柱様体を走査型電子顕微鏡で観察した結果、表面構造は柱頭及び花柱に極めて類似していた。花粉は柱頭様体上で発芽し、花柱様体中へ花粉管を伸長させた。

表-2 蕾長 8-15 mm（ステージ A）、蕾長 25-30 mm（ステージ B）の胚珠を培養した際の胚珠の形態形成に対するカイネチン及び I A A の効果

KT (mg/l) \ IAA	ステージ A				ステージ B			
	0	0.1	1	10(mg/l)	0	0.1	1	10(mg/l)
0	D <sup>1)</sup>	D	D	D	A	A	A	A
0.1	E	E	E	E	E	E	E	E
1	E	E	E	E	E	E	E	E
10	F	F	F	F	F	F	F	F

各実験区、胚珠を伴った 20 切片の胎座を 4 週間培養した。

1) 表中のアルファベットは胚珠が分化した形態をあらわす。

A : 褐変し、萎縮した胚珠      D : 柱頭様、花柱様体

E : 柱頭様、花柱様体及び胚珠様体      F : 胚珠様体を伴った胎座様体

## 第三章

*Nicotiana tabacum* の成熟期の胚珠について、各種栄養素の飢餓処理後の培養、偽受精

後の培養、KT存在下での培養を行い培養結果を比較検討した。KT 2 mg/l 存在下で培養した場合には、胚珠の珠皮組織が柱頭様、花柱様体へ分化し植物体は得られなかった。蒸留水による飢餓処理は、KTの存在下でおこる胚珠の珠皮組織の柱頭、花柱様体への分化を抑制した。さらに飢餓処理を35℃で3日間おこなった後、胚珠を培養すると、胚珠からカルスが誘導された(表-3)。カルスから分化した植物体の多くは、二倍体であったが、一部は半数体の植物であった。得られた植物体について、カナマイシン耐性を遺伝的指標として解析を行ったところ、二倍体植物は体細胞起源であることが判明した。飢餓処理について検討した結果、しょ糖の飢餓が必要であることが分かった(表-4)。

花粉をX線照射により不活化後、受粉させ数日経過した子房から胚珠を胎座とともに摘出し、培養すると子房当たり1.14の頻度で植物体を得られた。植物体はカルスを経由することなく、偽受精により形成された胚が発育することにより得られ、その多くが半数体であることを確認した。

これらの結果により、タバコの胚珠は外的刺激により分化の方向性を変えうることを示した(表-5)。

表-3 培養した胚珠からのカルス形成に対する、飢餓処理期間の効果

飢餓日数	温度 (°C)	カルス形成 <sup>1)</sup>	
		-	+
2 日間	25	10	0
	30	10	0
	35	10	0
3 日間	25	10	0
	30	6	4
	35	0	10
4 日間	25	6	4
	30	4	6
	35	7	3

胚珠は蒸留水による飢餓処理後、2 mg/l カイネチン及び0.5 mg/l 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) を添加したN6培地で培養した。各処理において、10個の子房を実験に供した。

1) - : カルス形成が認められない子房、 + : カルス形成が認められた子房

表-4 胚珠からのカルス形成に対する各種飢餓処理の影響

飢餓処理	カルス形成 <sup>1)</sup>	
	-	+
蒸留水	0	10
蒸留水+無機塩 <sup>2)</sup>	2	8
蒸留水+2.7% マンニトール	4	6
蒸留水+5% しょ糖	10	0

胚珠は各種飢餓培地上で3日間、35度で培養した後、2mg/1カイネチン、0.5mg/1MCPAを含むN6培地で培養した。各実験区、10個の子房を実験に供した。

- 1) - : カルス形成が認められない子房  
 + : カルス形成が認められた子房  
 2) N6の無機塩組成

表-5 各種刺激がタバコの胚珠の分化に及ぼす効果

刺 激	分化様式			
	柱頭様花柱様体	カルス		半数性胚
		二倍体	半数体	
サイトカイニン <sup>1)</sup>	+	-	-	-
軽度の飢餓処理 <sup>2)</sup>	+	-	-	-
+ 培養 <sup>3)</sup> (5% しょ糖)				
飢餓処理 <sup>4)</sup>	-	+	-	-
+ 培養 (5% しょ糖)				
飢餓処理	-	+	+	-
+ 培養 (11% しょ糖)				
偽受精+培養 <sup>5)</sup>	-	-	-	+

- 1) 胚珠は2mg/1カイネチンまたはベンジルアデニン(BA)を添加したNitsch & Nitsch'69 (NN)培地で培養した。  
 2) 軽度の飢餓処理: 25-35℃、2日間または25℃、3日間の処理を行った。  
 3) 胚珠は飢餓処理後、2mg/1カイネチン及び0.5mg/1MCPAを添加したN6培地で培養した。  
 4) 飢餓処理: 30-35℃、3日間または25-30℃、4日間の処理を行った。  
 5) 胚珠はホルモンフリーN6培地で培養した。

#### 第四章

*Nicotiana rustica* の未受精の胚珠を胎座とともに培養した結果、不定胚またはカルス經由の植物体が高頻度で作出された。植物体はKTの添加により、大孢子母細胞期から8細胞期までの発達段階の胚珠から誘導された。KTの添加濃度は8 mg/l、培地の無機塩組成としてはN6培地が適していた(表-6)。植物体の発生率については、材料となる親植物の遺伝子型により大きな差異が認められた(子房当り0~100%) (表-7)。

得られた植物体の61%が半数体植物であった。植物体の倍数性の識別方法として気孔孔辺細胞の葉緑体数を指標とする方法がある。*N. rustica*においても半数体と二倍体のその数には明確な違いが認められ半数体が分化していることがわかった。培養中の胚珠の切片の観察により、不定胚及びカルスの起源の多くが胚嚢内の細胞であるが、一部は珠心組織であることを確認した。

表-6 ルスチカタバコの未受精胚珠培養による不定胚またはカルスの発生頻度と植物成長調節物質の関係

植物成長 調節物質 (mg/l)	培養した 子房数	不定胚・カルスを 形成した子房数 <sup>1)</sup>		培養した子房当りの 不定胚・カルスの発生頻度 (%)
		+	++	
KT 0	IAA 0	10	0	0
4	0.5	10	4	40
8	0.5	20	2	18
16	0.5	10	0	0
8	0	10	1	8
8	4	10	0	5
8	8	10	2	4

基本培地は5%しょ糖及び0.2%ゼランガムを添加したN6培地を用いた。培養開始4週間後に不定胚、カルスの発生頻度を調査した。

- 1) + : 1から3個の不定胚またはカルスが得られた子房数  
 ++ : 4個以上の不定胚またはカルスが得られた子房数

表-7 ルスチカタバコの各種遺伝子型における不定胚及びカルス発生率

遺伝子型	培養した 子房数	不定胚・カルスを 形成した子房数 <sup>1)</sup>		培養した子房当りの 不定胚・カルスの発生頻度 (%)
		+	++	
cv. Rustica	20	2	18	100
cv. No.1	10	0	0	0
cv. Soviet No.4	10	4	0	40
cv. Qumduz 2	10	0	0	0
cv. Maruba tabako	10	4	1	50
cv. K.P.8	10	1	0	10
var. humilis	10	2	0	20
var. brasilia	10	0	0	0
var. pavonii	10	0	0	0

胚珠は2mg/l カイネチン及び0.5mg/l IAAを添加したN6培地で培養した。培養開始4週間後、不定胚及びカルスの発生率を調べた。

1) + : 1から3個の不定胚またはカルスが得られた子房数

++ : 4個以上の不定胚またはカルスが得られた子房数

## 第五章

Cucumis melo の偽受精胚珠培養による半数体植物の作出方法を確立し、得られた植物の倍数性について調査した。X線を照射し不活化した花粉を授粉し、2、3週間経過した子房から胚珠を摘出し、成長調節物質無添加またはIAA 0.01mg/lを添加した培地で培養した結果、胚珠当り最高3.4%で植物体を得られた。供試した12品種すべてから植物体を得られたが、植物体発生率には異なる遺伝子型の供試植物間で差異が認められた(表-8)。

得られた植物の生育初期の主根の染色体数は、半数性を示した。しかしながら、根では生育するに伴い自然倍加が高頻度で起きることが認められた。得られた植物の葉肉細胞のDNA含量を測定した結果は、多くの細胞のDNA量は、種子由来の二倍体植物の半分であるが、一部二倍体と推定される細胞を含むことを示した。しかしながら、花粉母細胞の染色体数は半数性を示し、また花粉稔性を有する個体は出現しなかったため、得られた個



体は半数体と判別した。気孔孔辺細胞内の葉緑体数で倍数性を判定するために、半数体及び二倍体における葉緑体数の平均値を明らかにした（表-9）。

表-8 メロン11品種における偽受精胚珠培養による植物体発生率

品種	変種	子房No.	培養した胚珠数	植物体発生数	発生率 (%)
E. favorite	reticulatus	1	405	4	1.0
		2	345	2	0.6
		3	390	1	0.3
Hamiuri	inodorus	1	400	8	2.0
		2	360	6	1.7
		3	464	2	0.4
F1 Hamiuri	"	1	264	5	1.9
		2	500	3	0.6
Honeydew PF	"	1	285	3	1.1
		2	480	1	0.2
Mauri	conomon	1	325	3	0.9
		2	264	2	0.8
		3	280	1	0.4
Elisabeth	intervarietal hybrid (no net type)	1	460	2	0.4
		2	420	1	0.2
		3	560	0	0
Sweet heart	"	1	400	10	2.5
		2	264	5	1.9
		3	500	3	0.6
Alice	"	1	375	7	1.9
		2	404	2	0.5
		3	600	1	0.2
Cossack	intervarietal hybrid (net type)	1	444	15	3.4
		2	156	2	1.3
		3	525	3	0.6
Bonus No.2	"	1	342	2	0.6
		2	378	0	0
		3	375	0	0
Mauri x Bird nest	intervarietal hybrid	1	568	9	1.6
		2	320	2	0.5
		3	378	2	0.5

胚珠は0.01mg/1IAAを添加したE20A培地で培養した。

表-9 培養により得られた半数体植物及び種子由来の植物体の孔辺細胞に含まれる葉緑体数

	個体 No.	平均	標準偏差
二倍体植物	1	4.95 <sup>a</sup>	0.76
半数体植物	2	2.70 <sup>b</sup>	0.57
	3	2.40 <sup>b</sup>	0.60
	4	2.45 <sup>b</sup>	0.51
	5	3.00 <sup>b</sup>	0.79

異なるアルファベットを付与した数値は、t検定により有意な差が認められたことを示す (P<0.05)。

## 論文審査の要旨

本提出論文は胚珠からの半数体作出技術について、タバコ、ルスチカタバコおよびメロンを材料として開発研究したものである。

まず、タバコの蕾および胚珠から雌しべ様器官が出現する培養条件について検討し、蕾の発育ステージと培地のカイネチン濃度が強く影響することを明らかにした。そして、ここで形成される雌しべ様体は花粉を発芽伸長させる機能を有していることを示した。

ついで、成熟期の胚珠を蒸留水で前培養することによって、半数体を得られることを発見した。この前培養には糖やカイネチンの有無、温度条件が大きく影響することを示し、組織の糖飢餓の影響によるものと考察した。さらに花粉をX線によって不活化してから受粉することによって、胚珠から半数体を得られることを明らかにした。これらの結果から胚珠の分化方向をきめる外的刺激の規則性を明らかにして、タバコ胚珠培養の制御技術を確立した。

次に、ルスチカタバコを材料として用いて、その未受精の胚珠を胎座と共に培養することによって、不定胚またはカルスを経由して半数体が高頻度で得られることを示した。そのための培養条件として、カイネチン添加などが有効であり、また植物体の発生率は系統によって幅広く変異することが分かった。この材料について不定胚およびカルス発生の起源を調査し、その多くは胚嚢内の細胞に由来するものであるが、一部は珠心組織に由来するものであることを明らかにした。

メロンでは花粉培養による半数体の育成が困難であることが知られているので、半数体を得るために胚珠培養法の適用を検討した。X線照射によって不活化した花粉を受粉したのち胚珠を摘出して培養することによって、胚珠当たり最高3.4%の割合で半数体植物が得られることを明らかにした。本技術を適用することによって、品種間に発生率の変異はあるものの、供試した12品種すべてにおいて半数体植物体が得られ、本技術が実用的にも利用できる可能性を示した。

これらの研究成果は半数体を利用した育種に新しい局面を開いたものとして評価されるので、博士（農学）の称号を授与するにふさわしいものと判断した。