

氏 名(本籍) まつ 松 だ 田 なが 長 お 生

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 4 3 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 3 年 9 月 12 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 落 葉 果 樹 類 の 組 織 培 養 に 関 す る 研 究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 日 向 康 吉

教 授 齋 藤 隆

教 授 小 島 邦 彦

論文内容要旨

第1章 緒言

組織培養技術は、育種学、遺伝学、植物生理学、生化学、分子生物学などの発展に伴って細分化を続けながら著しく進展してきた。最近では、この技術は従来の交雑育種の枠を超えた新育種素材の作出を可能にするなど育種分野にも新たな展開をもたらし、茎頂培養、胚培養、蒴・花粉培養、カルス培養、プロトプラスト培養等多岐にわたる組織培養技術の育種的利用が図られている。

落葉果樹類の分野では、これらの技術のうち茎頂培養や胚培養が実用化の段階に達しているものの、プロトプラスト培養や体細胞雑種の作出は数例で成功しているのみであり、カルスからの植物体再生にしてもまだ安定した技術になっているとは言えず、カルス誘導や再分化の最適培地の検討をはじめとして解明すべき問題が多々残されている。本研究では、落葉果樹類における組織培養技術の確立を目指して、カルス誘導法（第2章）、プロトプラスト培養法（第3章）、植物体再分化法（第4章）、遺伝子導入法（第5章）について新技術の開発を行なった。

第2章 カルス誘導法

特に、核果類葉片からのカルス誘導

モモ、オウトウ、スモモ、ウメの野生種を含む15系統を用い、葉片からのカルス形成に及ぼす種々の要因について検討した。モモのグループではNNおよびB5培地がカルス誘導基本培地には有効であった。また、オウトウのグループではMS培地が適していた。オーキシンとして、2, 4-DあるいはNAAを用いた場合、5~20 μ Mの範囲の濃度がカルス誘導に適していたが最適濃度は系統によって異なっていた（Table 1）。BA濃度は、0.2~20 μ Mの範囲がカルス誘導に適していた。照明下と暗黒下では、暗黒下の方がカルス形成量は多かった。炭素源としては、ショ糖およびブドウ糖がカルス誘導に有効であった。これらの結果、モモ、オウトウではカルス誘導に適した培養条件を明らかにすることができた。

第3章 プロトプラスト培養法

1. オウトウ葉肉プロトプラストの培養

酸果オウトウの葉肉プロトプラストの単離および培養条件を検討した。プロトプラストの単離には培養個体の葉片が適しており、葉片をBAで前培養することにより遊離細胞中のプロトプラストの割合が高くなることを見出した (Table 2)。プロトプラストは、ショ糖密度勾配を用いて精製した (Fig. 1)。プロトプラストの培養には、 NH_4NO_3 を除いた培地が適していた。培地の炭素源としては、ブドウ糖の方がショ糖より適しており分裂頻度が高かった。また、カゼイン加水分解物とグルタミンがプロトプラストの分裂には必要であった。プロトプラスト由来のカルスが得られ、そのカルスから不定根を誘導した。

2. モモ懸濁細胞プロトプラストの培養

モモの懸濁細胞プロトプラストの単離および培養条件を検討した。プロトプラストの単離には継代後5日目の細胞が適しており、ペクトリアーゼY-23を含む酵素液で処理した場合良い結果が得られた (Table 3)。プロトプラストの培養には、オウトウ葉肉プロトプラストの場合と同様、ブドウ糖が炭素源として適しており、また、カゼイン加水分解物とグルタミンの添加が必要であった。暗黒下で培養した方が、照明下に比べて分裂頻度は高かった。分裂したプロトプラストは、カルスを形成した。

第4章 植物体再分化法

1. マザクラの葉肉由来カルスからの不定芽誘導

マザクラの葉片から $10\mu\text{M}$ 2, 4-Dと $1\mu\text{M}$ BAを含む培地で誘導したカルスを、BAのみを含む培地に移植し不定芽を誘導した (Fig. 2)。カルスからの不定芽形成には、 10 および $5\mu\text{M}$ BAを含む培地が適していた。再分化した不定芽の増殖および発根個体の形成は容易であった。

2. 核果類子葉からの不定芽誘導

ウメ、スモモ、モモの野生種を含む8系統の未熟な胚を培養し、子葉か

ら直接不定芽誘導に成功した (Fig. 3)。不定芽形成には外植体である胚の発育状態が関係しており、未熟な胚から不定芽が形成された。培地としては、2, 4-DとBAの両方を含む培地が適していたが、それぞれの最適濃度は系統により異なっていた (Table 5)。不定芽形成は、胚軸を除去し子葉のみを培養した場合や、さらに子葉を2~3mmに細断して培養した場合にも起こった。また、不定芽はすべて向軸側に形成された。切片観察により、表皮付近の細胞が分裂を開始し、やがて生長点に分化してゆくことが明らかになった。

3. ブドウにおけるエンブリオジェニックなカルスの作出

ブドウの葉肉由来カルスからの不定胚形成に及ぼす培地組成を検討した。不定胚形成には、カルス誘導時の植物ホルモンの組成が重要であり、オーキシンとして2, 4-D、2, 4, 5-TおよびNOA (Table 5)、サイトカイニンとしてBA、KT-30およびTAG (Table 6)を用いた場合にのみ、不定胚が誘導された。

不定胚塊を、 $1\ \mu\text{M}$ 2, 4-Dを添加したNN培地 (有機物を除く) で培養し、エンブリオジェニックなカルスの作出に成功した。この場合、培地から有機物を除くことが重要であり、有機物を含む培地では不定胚形成能を欠いたカルスのみが誘導された。エンブリオジェニックなカルスは、同組成の培地で維持することができ、ホルモンフリー培地に移植すると多数の不定胚を形成した (Fig. 4)。このようにして得られたエンブリオジェニックなカルスは、不定胚形成能を安定して保持しており、2年以上継代を繰返しても不定胚形成能を消失しなかった。

第5章 遺伝子導入法

特に、キウイフルーツへの外来遺伝子の導入

アグロバクテリウムを利用したキウイフルーツへの遺伝子導入を検討した。葉片にアグロバクテリウムを接種し3日間共存培養した後、アグロバクテリウム除菌用としてカルベニシリン、形質転換細胞選抜用としてカナマイシンを添加した再分化培地 (MS培地に $10\ \mu\text{M}$ ZEAまたは $5\ \mu\text{M}$

4 P Uを添加)で培養した。アグロバクテリウムの感染には、共存培養時に100 μ Mアセトシリノンを添加することが必要であり (Table 7)、その場合にのみカナマイシンを含む培地で不定芽が形成された (Fig. 5)。再分化した不定芽から、G U S 活性を示す個体が得られ (Fig. 6)、カナマイシン抵抗性遺伝子およびG U S 遺伝子を導入したキウイフルーツが作出できた。

第6章 総合論議

落葉果樹類は栄養系繁殖の永年生木本作物であり、組織培養を行なう上での制約が多く、このことが落葉果樹類での組織培養に関する基礎的情報の不足の一因にもなっている。落葉果樹類は、栄養系繁殖のため純系化されておらず、異型接合体である。そのため、未熟胚や子葉、胚軸は、個体ごとに遺伝子型が異なっており、未熟胚を用いた培養系は新たな遺伝子型作成には利用できるものの、遺伝子型の保存には利用できない。その他、生殖器官を用いる場合年1回しか実験ができないことやフェノールなどの二次代謝物が多いことなども問題である。また、いろいろな培養手法を通じて最も解決が望まれているのは、植物体再生条件の解明である。再分化能は遺伝子型によって異なっており、品種間差があるため、まだ安定した技術となっていない樹種も多い。

本論文では、落葉果樹類の特殊性を念頭において、これら果樹類のカルス誘導、プロトプラスト培養、再分化、遺伝子導入の各手法の基礎的知見の蓄積を図った。その結果、核果類では葉片からのカルス誘導に最適な培養条件を明らかにし、数種の植物についてプロトプラスト培養条件や再分化条件を明らかにすることができた。また、ブドウでは不定胚形成により有効な植物ホルモンを新たに見出し、エンブリオジェニックなカルスを作出することに成功した。さらに、キウイフルーツではアグロバクテリウムを用いて遺伝子を導入することに成功した。落葉果樹類においても各種の知見を更に積み重ねて、農業に役立つ組織培養技術が近い将来に展開されるものと期待できる。

Table 1. Effect of auxin concentration on callus induction from leaf disks in *Prunus* spp..

Cultivar and species ^a	Basal medium	Auxin	Fresh weight of induced callus ^b (mg)												
			100	50	20	10	5	2	1	0.5	0.2	0.1			
Hakuho(pe)	NN	2,4-D		5.5	174.4	264.5	203.2	200.5	86.9						
		2,4-D	3.2	3.8	27.5	43.2	68.4	41.2							
Akame(pe)	NN	NAA	2.2	3.1	20.2	25.7	35.1	13.6							
		2,4-D	5.6	7.8	22.0	61.6	121.6	108.2							
P. triloba(pe)	NN	NAA	43.2	79.5	155.6	178.7	98.8	21.6							
		2,4-D		238.8	420.7	300.6	245.9	215.9	188.9						
Meteor(c)	MS	2,4-D		468.0	513.5	410.7	383.4	333.5	209.3						
		2,4-D		251.7	298.5	321.6	311.3	294.4	209.3						
	NN	NAA		287.8	334.9	355.6	198.0	125.2	78.1						
		NAA		509.3	453.0	388.0	340.2	95.2	48.9						
	B5	NAA		358.0	410.0	344.5	298.0	281.4	177.0						
Satonishiki(c)	NN	2,4-D		224.6	266.5	164.8	110.5	78.2							
P. lannesiana(c)	NN	2,4-D		151.3	144.6	91.5	31.3	15.6							
		NAA	12.6	218.1	258.6	106.7	133.8	25.7	20.1						
	NN	NAA	122.3	65.6	26.4	20.7	15.2	9.4							
		CPA	142.5	116.9	33.8	23.0	15.3	8.5							
	NN	IAA	100.5	21.7	11.3	11.6	10.8	9.1							
		2,4,5-T	4.3	9.6	84.8	154.2	231.3	260.9							
	NN	PIC	153.6	224.5	255.8	241.7	243.9	229.2							
White Plum(pl)	NN	2,4-D		3.6	2.9	3.0	4.1	11.6	24.0						
Yellow Egg ^c (pl)	NN	2,4-D		6.7	30.4	29.3	17.5	14.6	14.6						
		NAA		27.5	20.1	14.1	14.5	14.4	17.6						
P. spinosa(pl)	NN	2,4-D		46.4	127.5	99.8	20.5	23.2	12.3						
		NAA	170.0	194.0	97.9	17.2	14.0	12.5	13.7						
Gyokuei(m)	NN	2,4-D		5.6	5.5	7.7	45.4	37.2	82.9						
		NAA		5.4	7.1	20.7	54.0	16.3	12.6	39.7	9.1	8.0			

^a(pe)=peach, (c)=cherry, (pl)=plum, (m)=mume

^bAll culture media were supplemented with 1 μM BA.

^cGlucose (2%) was used as carbon source instead of sucrose.

Table 2. Effect of BA pretreatment on protoplast isolation from cherry leaf.

Treated Days	BA (μ M)	Dark		Light	
		Total isolated cells (10^7 /g FW)	Rate of isolated protoplasts (%)	Total isolated cells (10^7 /g FW)	Rate of isolated protoplasts (%)
1	0	6.6	37.7	8.1	34.6
	1	7.9	42.5	7.3	35.1
	10	5.9	37.5	7.7	39.5
4	0	7.2	50.1	7.2	30.6
	1	6.5	49.7	6.3	47.9
	10	6.6	53.3	6.1	52.5
7	0	5.9	49.0	6.2	3.0
	1	5.0	73.0	6.3	12.8
	10	4.6	62.1	5.0	30.5

Table 3. Effect of enzyme solution and cell age on protoplast isolation from peach suspension cells.

	Age of cell cultures (days)	Yield of protoplasts ($\times 10^6$ /mlPCV)		
		Enzyme solution ^a		
		I	II	III
Exp. 1	3	2.0	1.3	0.7
	5	2.7	1.6	0.9
	7	2.4	1.8	1.0
Exp. 2	3	0.8	0.7	0.6
	5	2.9	2.9	2.4
	7	2.6	1.6	0.4

- ^a I = 2% Cellulase Onozuka R-10, 0.5% Driselase, 0.1% Pectolyase Y-23
 II = 2% Cellulase Onozuka R-10, 1% Driselase, 0.01% Pectolyase Y-23, 0.5% Macerozyme R-10
 III = 2% Cellulase Onozuka RS, 1% Driselase, 1% Macerozyme R-10

Table 4. Effect of the culture medium composition on the adventitious bud formation from the immature cotyledons of stone fruits.

2,4-D (μ M)	BA (μ M)	Regeneration ^a (%)								
		Cultivars ^b								
		Fuji	Abun	Meth	Myro	KD	PS	Naga	Aka	Nema
5	5	6.1	11.1	1.3	11.0	22.5	26.6	3.8	0.0	2.5
5	0.5	3.1	10.0	6.7	2.7	3.8	10.0	0.0	0.0	0.0
5	0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	10.0
0.5	5	0.0	0.0	5.4	2.8	5.6	5.9	3.8	0.0	0.0
0.5	0.5	0.0	0.0	12.2	0.0	5.0	0.0	1.3	0.0	0.0
0.5	0	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0	5	0.0	10.0	2.6	0.0	12.5	0.0	0.0	0.0	0.0
0	0.5	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	2.3	0.0	0.0	0.0
0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

^aMS basal medium was used as culture medium.

^bMume; Fuji=Fujiotan

Plum; Abun=Abundancia, Meth=Methley, Myro=Myrobalan, KD=Krikon Damson, PS=*P. spinosa*

Peach; Naga=Nagano(Okute), Aka=Akame, Nema=Nemaguard

Table 5. Effect of auxin treatment on callus induction from leaf of grape 'Koshusanjaku' and somatic embryogenesis in leaf callus.

Auxin	Callus fresh weight ^a (mg)	Embryogenesis	
		Culture medium	
		I ^b	II ^c
2,4-D	166.6	0/65	3/63
2,4,5-T	56.4	16/65	20/64
CPA	87.0	0/65	0/65
FPA	68.7	0/65	0/64
NAA	176.2	0/65	0/65
NOA	163.4	0/65	0/65
IAA	18.4	0/65	0/65
IBA	19.3	0/65	0/65
PIC	141.4	0/65	0/64

^aLeaf disks were cultured on NN basal medium supplemented with respective auxin at 10 μ M and 10 μ M KT-30.

^bLeaf calli were transferred to a hormone-free medium.

^cLeaf calli were transferred to a medium (without organic component) supplemented with 1 μ M 2,4-D.

Table 6. Effect of cytokinin treatment on callus induction from leaf of grape 'Koshusanjaku' and somatic embryogenesis in leaf callus.

2,4-D (μ M)	Cytokinin (μ M)	Callus fresh weight ^a (mg)	Embryogenesis	
			Culture I ^b	Culture II ^c
10	BA 10	59.6	1/40	0/20
10	5	49.6	0/30	0/20
5	10	62.3	3/40	0/20
5	5	72.7	0/30	1/20
10	KIN 10	58.5	0/20	0/10
10	5	66.9	0/20	0/10
5	10	61.0	0/20	0/10
5	5	59.3	0/20	0/10
10	ZEA 10	65.9	0/20	0/10
10	5	47.3	0/20	0/10
5	10	93.0	0/20	0/10
5	5	77.8	0/20	0/10
10	2iP 10	80.5	0/20	0/10
10	5	61.8	0/20	0/10
5	10	74.9	0/20	0/10
5	5	64.1	0/20	0/10
10	KT-30 10	152.6	0/20	2/10
10	5	173.6		2/10
5	10	207.3	0/10	4/10
5	5	186.0	0/20	4/10
10	TAG 10	20.8	0/20	1/10
10	5	40.6	0/20	1/10
5	10	34.6	0/20	1/10
5	5	28.6	0/20	2/10

^aNN basal medium was used.

^bLeaf calli were not transferred.

^cLeaf calli were transferred to NN basal media (without organic component) supplemented with 1μ M 2,4-D.

Table 7. Effect of acetosyringone and betaine phosphate on callus induction and regeneration from kiwifruit leaf segments at co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*.

Cultivars	Co-cultivation media	Callus formation ^a	Regeneration ^a
Hayward	MS	0/18	
	MS+A ^b	17/17	9/10
	MS+AB ^b	15/18	4/10
Monty	MS	0/23	
	MS+A	16/21	4/11
	MS+AB	25/25	3/13

^aMS basal medium supplemented with 10μ M ZEA was used.

^bA=acetosyringone, B=betaine phosphate

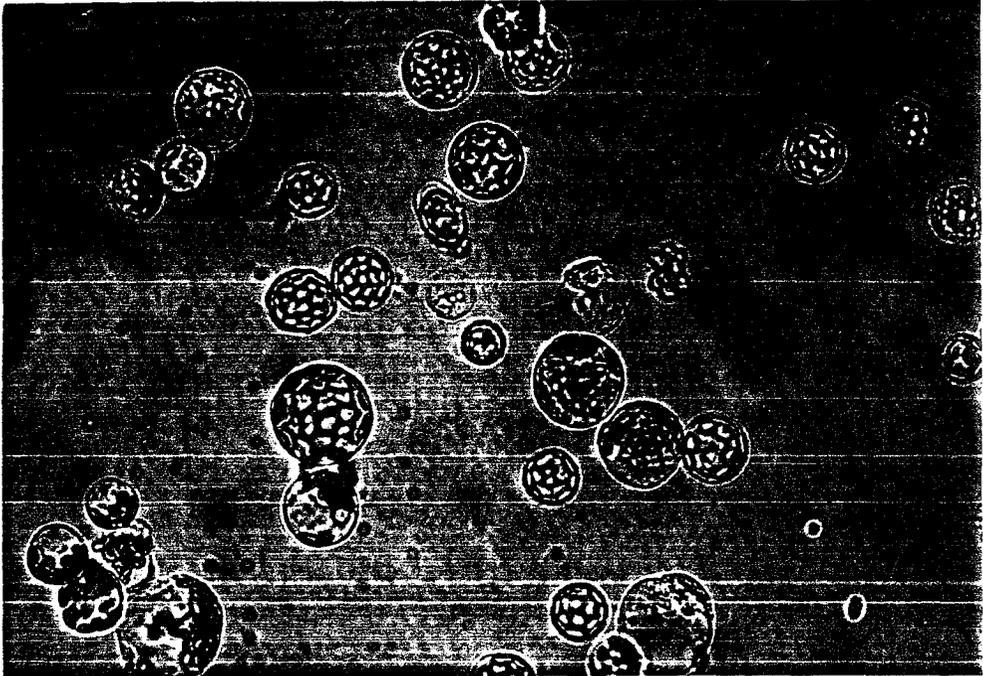


Fig. 1. Isolated and purified mesophyll protoplasts of sour cherry.



Fig. 2. Developing adventitious shoots on leaf callus of *P. lannesiana*.



Fig. 3. Adventitious bud formation on immature cotyledon of *P. spinosa*.

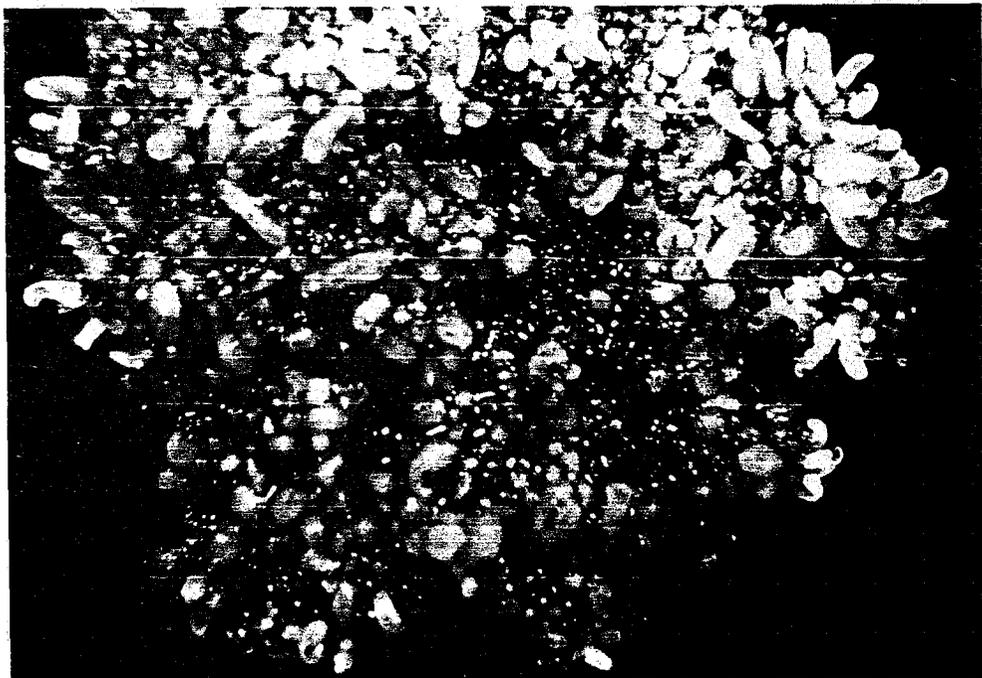


Fig. 4. Numerous somatic embryos derived from embryogenic callus of 'Koshusanjaku' grape.



Fig. 5. Developing adventitious shoots from the callus formed on the mid-rib cut end in 'Monty' kiwifruit.

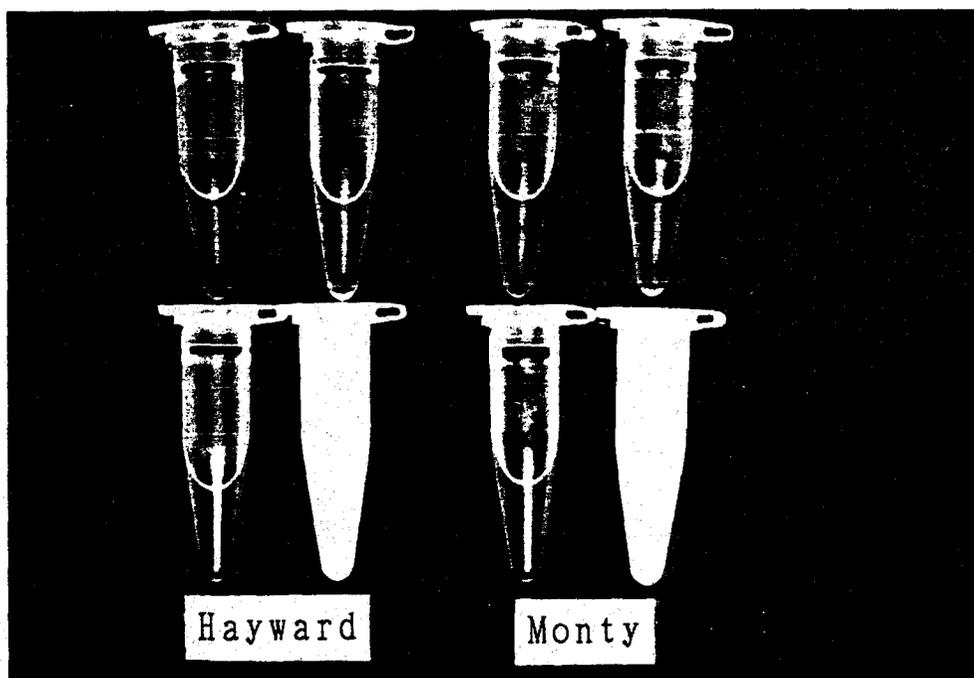


Fig. 6. GUS activities of kiwifruit 'Hayward' and 'Monty'.
 Upper: fluorescence at the starting time of incubation,
 lower: fluorescence after 1 hr incubation,
 left: control plant, right: gene introduced plant.

審査結果の要旨

本論文は果樹類の育種に組織培養を利用することを目的として、モモ、ウメなどの核果類やブドウ、キウイフルーツなどを含む落葉果樹類を材料として、カルス誘導法、プロトプラスト培養法、植物体再分化法、遺伝子導入法などの組織培養技術の開発を行ったものである。

まずモモ、オウトウ、スモモ、ウメなどの野生種を含む核果類の葉片からのカルス誘導に対する培地組成、光、糖などの条件を明らかにした。

次にこの結果を踏まえて、プロトプラストの培養について検討した。オウトウにおいては葉肉細胞からプロトプラストを単離してそのプロトプラストからのカルス誘導に成功し、また、モモにおいては懸濁培養細胞からプロトプラストを単離して培養し、カルスを得ることに成功し、それぞれの培養条件を明らかにした。これらの技術開発は、プロトプラスト培養が困難であった核果類の細胞培養技術を一步進めた成果として評価できる。

組織培養では、植物体の再分化法の開発が最も重要な課題である。本研究ではマザクラの葉肉由来カルスから不定芽を誘導する条件を決定した。次に、ウメ、モモ、スモモなどの核果類では、未熟な胚を培養すると不定芽が誘導できることを発見し、その条件を明らかにした。ブドウにおいては、葉肉由来カルスからの不定胚形成の条件を検討するとともに、この不定胚の塊をさらにホルモンを加えた特定の培地に移植することによって、エンブリオジェニックなカルスの作出に成功した。このカルスは多数の不定胚を一斉に形成し、その性質を2年以上維持し続けた。これらの新知見は、今後の果樹育種法展開の基礎を与えるものである。

組織培養を用いた育種法のもう一つは、遺伝子導入である。本研究では、アグロバクテリウムを用いて、キウイフルーツへの外来遺伝子の導入を試みた。そしてアセトシリノンを添加することによって、GUS遺伝子を導入したキウイフルーツ植物体が得られることを明らかにした。

これらの組織培養に関する新知見は、これまで培養が困難とされてきた落葉果樹類の組織培養による育種の可能性を広げるものである。事実、本論文で検討したブドウの再分化法を利用して、著者はブドウにおいても遺伝子導入植物体が得られることを本論文提出後に確かめている。本論文の研究成果は果樹の育種技術発展の基礎となるもので、著者に博士（農学）の学位を与えるにふさわしいものであると判断した。