

氏 名(本籍) 小 松 田 隆 夫

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 4 3 3 号

学位授与年月日 平 成 3 年 6 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 Research on somatic embryogenesis and
plant regeneration in soybean
(ダイズにおける不定胚形成と植物体再生の研究)

論文審査委員(主査) 教 授 日 向 康 吉

教 授 星 川 清 親

教 授 小 島 邦 彦

論文内容要旨

細胞融合、遺伝子組換え等の実用化には、培養細胞からの植物体再生が必要である。ダイズ [*Glycine max* (L.) Merr.] は主要作物のひとつであるが、植物体再生が依然困難である。ダイズに関して効率のよい再分化手法を作出することは緊急の課題であり、これがこの研究の目的である。本研究ではダイズ未熟胚から不定胚を誘導する方法を見出した。次いで、不定胚形成能の高い品種や系統を探索した。一方、不定胚の成熟および発芽のプロセスの培養条件を検討し、植物体を再生した。さらに復元した植物体の種子タンパク質の分析をおこなって遺伝的安定性を調査した。

1. ダイズ未熟胚組織からの不定胚の誘導

栽培ダイズ(*G. max*)、及び中国東北部に自生する半野生のダイズ(*G. gracilis* Skvortz.)を用いた。*G. gracilis*は*G. max*と充分な交雑親和性があるなど両者の分類基準は明確でなく、一括して*G. max*として扱われる場合が多いが、ここではその再分化能の特性から*G. max*とは別として取り扱った。開花後2-3週間経過したさやから未熟胚を摘出し、胚の全部あるいは子葉部分のみを培養した。培地には、MS無機塩にB5ビタミン、 10mg l^{-1} NAA (あるいは 2mg l^{-1} 2,4-D)、 $5\text{-}30\text{ g l}^{-1}$ ショ糖を加え、pHを7.0に調整し 2.2 g l^{-1} ゲルライトで固化した物を用いた。培養は $0.6\text{ }\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の連続照明下で4週間行い、培養した未熟胚1個当りに形成された不定胚数(以下、不定胚誘導効率と呼ぶ)を求めた。

2,4-Dを含む培地で培養した場合、球状の不定胚が子葉組織から直接的に形成され、縦伸長してラッパ状の胚に成長した(図1)。これに対してNAAで誘導した場合、子葉組織の周辺に褐色のカルスがわずかに形成され、このカルスから不定胚が発生した(図2)。この不定胚ははじめは球状ないし心臓型をしており、発達するに従い明確な子葉と胚軸を分化して、莖頂と小根をもつ胚に成長した。このようにNAAの方がより正常な形態の不定胚を誘導することがわかった。(第1、2章)

培養に適する未熟胚は、成熟乾燥種子の1/2前後の長さの未熟種子か

ら得られた。これより小さい未熟胚では、カルス化せず死んでしまうものの割合が多いことと、1個の未熟胚あたりに形成される不定胚数が少ないために、全体的には効率が悪かった。逆に大きすぎる胚は、不定胚形成能が低く不都合であった。芽生えの子葉組織を培養した場合、不定胚に類似した構造が誘導されたが発芽の機能を持たないものであった。従って、ダイズ不定胚誘導のためには供試する外殖片の種類と発育エイジが重要であった。(第1章)

なお、一般的に言えば、シヨ糖濃度は $5-10 \text{ g l}^{-1}$ の範囲が $20-30 \text{ g l}^{-1}$ の時よりも明確な子葉と胚軸をもつ正常な形態の胚の割合が高かった(図3)。また不定胚誘導の効率も良く、未熟胚当り10個以上の獲得が可能であった(図4)。(第4章)

2. 不定胚形成能の品種・系統間の差異

不定胚形成能の高い材料を探索する目的で、6系統のG. gracilisと20品種のG. maxの不定胚誘導効率を比較した。培地は 30 g l^{-1} のシヨ糖を含むものを用いた。その結果 'T34' や 'Masshokutou Kou 502' などの G. gracilis が高い不定胚誘導効率を示した(図5)。またG. gracilisの不定胚はG. maxのものと比較して高い割合で植物体に再生した。(第2章)

G. maxの中から不定胚誘導効率の高い品種を見い出すことを目的に、281のダイズ品種と、対照として5つのG. gracilisならびに2つの G. soja (野生ダイズ、ツルマメ)をスクリーニングした。その結果、G. gracilisと同等の効率を示すダイズ品種を見い出した(図6)。しかし、全体的にはG. maxはG. gracilisやG. sojaに比較して、不定胚形成率が劣る傾向にあり、かつ不定胚からの植物体再生率も低かった。(第3章)

上記のスクリーニングでは、全く不定胚を誘導できないG. maxが28あった。しかし 5 g l^{-1} シヨ糖を含む培地で再評価したところ、全ての品種が不定胚を形成でき、この培地の有効性が示された。ただし、これとは逆に、 5 g l^{-1} シヨ糖を含む培地で不定胚誘導効率の下がる品種もあり、最適シヨ

糖濃度は品種で一律ではないことがわかった。(第4章)

5, 10, 20, 30 g l⁻¹の4段階のショ糖濃度を用いて16品種・系統の不定胚誘導効率を調べた。その結果、遺伝子型とショ糖濃度との間に有意な相互作用が認められた(表1)。ショ糖濃度の変化に対する各品種系統の安定性(平均に対する各品種の回帰係数で現される)に違いのあることが明らかになった(表1)。ちなみに*G. gracilis*の'Masshokutou Kou 502'はいずれのショ糖濃度においても最も高い不定胚形成能を持ち、同時に平均的な安定性を示した。平均の不定胚誘導効率と、各ショ糖濃度に対する安定性は独立で、遺伝的に互いに異なる支配であると考えられた。(第5章)

3. ダイズ不定胚からの植物体再生法

不定胚の成熟と、成熟した不定胚の発芽と発根に関して、それぞれの発達段階を制御する要因を解析した。

5-10 g l⁻¹のショ糖を含むの培地上で誘導された微小かつ正常な形態の不定胚を、30 g l⁻¹のショ糖を含むMS培地上で2週間培養、さらに60 g l⁻¹のショ糖を含むMS培地で5週間培養した(図7)。不定胚は次第に大きさと生体重を増し、黄化して外見上成長を停止するに至った。この過程で、子葉および胚軸の細胞内にはそれぞれの組織に特異的な種子貯蔵タンパク質が蓄積されていた。一方、ショ糖濃度の低い培地では不定胚は十分発達せず、全タンパク質に占める貯蔵タンパク質の割合も低かった。

成熟した不定胚はジベレリン(GA₃)を0.001-0.1mg l⁻¹添加し、10 g l⁻¹ショ糖を含む1/2MS培地へ移植することにより、速やかに緑化し下胚軸部分が伸長し、続いて本葉の展開と根の伸長を示した(図8)。NAAやブラシノライドには発芽促進の効果は認められなかった。貯蔵タンパク質は発芽と同時に分解された。

この様に、ダイズ不定胚の成熟と発芽では最適ショ糖濃度が異なっていた。不定胚の成熟と発芽の様式は形態形成及び生化学的な意味から受精

胚の様式と類似していた。以上の方法により、G. maxの不定胚の60-64%、G. gracilis の不定胚の77%以上が植物体に発達した。再生植物体は完全な種子稔性を持っていた。(第6章)

4. 種子タンパク質の体細胞変異

再生植物体の変異を調べるため、種子タンパク質組成を指標に分析した。ダイズ種子貯蔵タンパク質のサブユニットは既に同定されているため、その変異は質的形質として検出できる。28個体の再生植物体(E₁)の次代のE₂植物に生じたE₃種子をSDS電気泳動法によって半粒法で分析した。

その結果、新しい種子タンパク質(26KD)を持つ変異(図9)を複数見いだした(表2)。このタンパク質変異は遺伝的であり(表3)、少なくともE₆種子世代まで遺伝することを確認した。また変異体はすべてふ入りになることをE₆世代で観察した。このタンパク質は文献に報告がなく、組織培養のサイクルを経ない種子からは一切見つからなかった。従ってこの変異は、自然交雑や自然突然変異によるものではなく、組織培養のいずれかの過程で生じた体細胞変異に起因するものと考えられた。(第7章)

5. 結論

本研究では、ダイズの培養組織から不定胚を誘導し、その不定胚を成熟させた後発芽させて植物体を復元する系を確立した。不定胚の誘導、成熟、発芽の各過程で、ショ糖濃度が大きく影響することを示した。品種間差異は不定胚誘導効率と発芽率にみられ、全体的にはG. gracilisがG. maxよりも優っていた。培養法の改良や多品種のスクリーニングによって、G. maxの植物体再生率も向上した。本研究で確立した系では100個の未熟胚から600-700個の植物体の再生が可能であり、この植物体再生系は、ダイズにおける胚形成や再分化現象の研究、並びに細胞・遺伝子操作の研究に使用できると考える。



Fig. 1. Globular somatic embryos formed on the cotyledon tissue cultured on MSB medium containing 2 mg l^{-1} 2,4-D and 30 g l^{-1} sucrose.

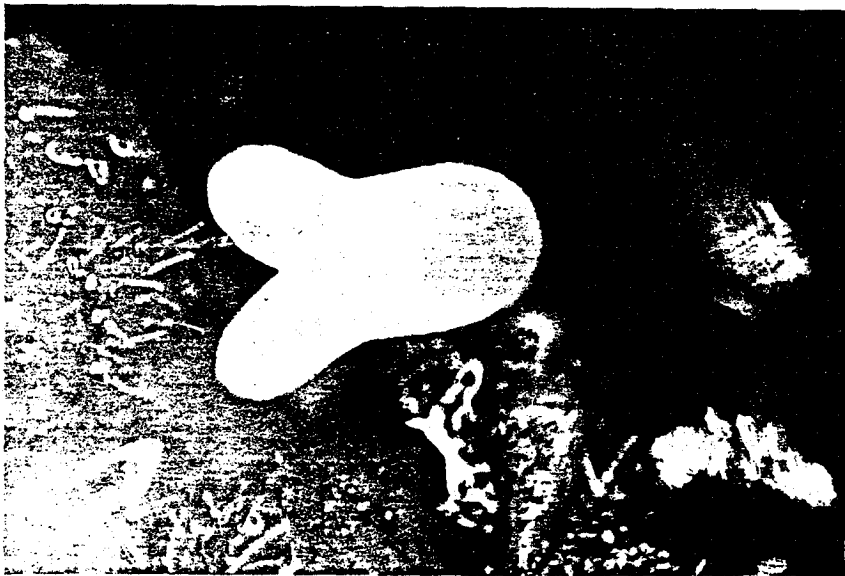
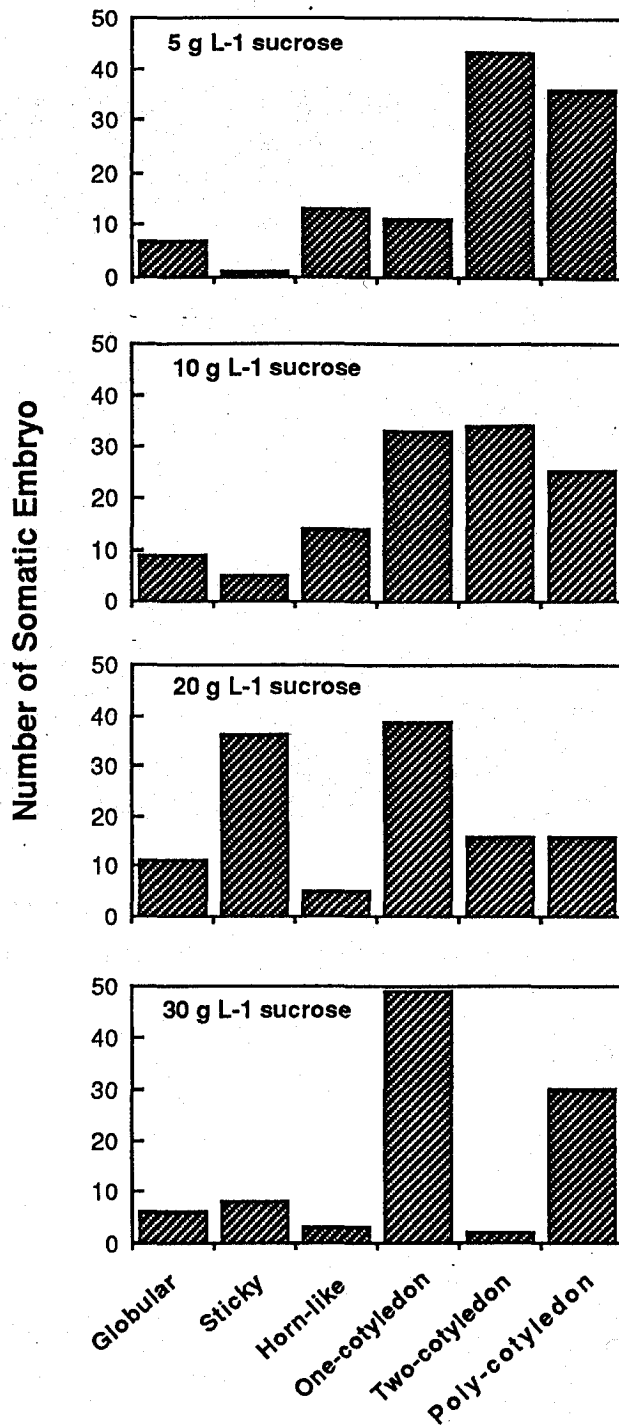


Fig. 2. A torpedo-like somatic embryo induced with 10 mg l^{-1} NAA and 30 g l^{-1} sucrose.



Shape of Somatic Embryo

Fig. 3. Shape of somatic embryos affected by sucrose concentration. Somatic embryos obtained from 40 pairs of cotyledons at 2.5-2.9 mm and 3.0-3.4 mm in length were presented in respective type of shape.

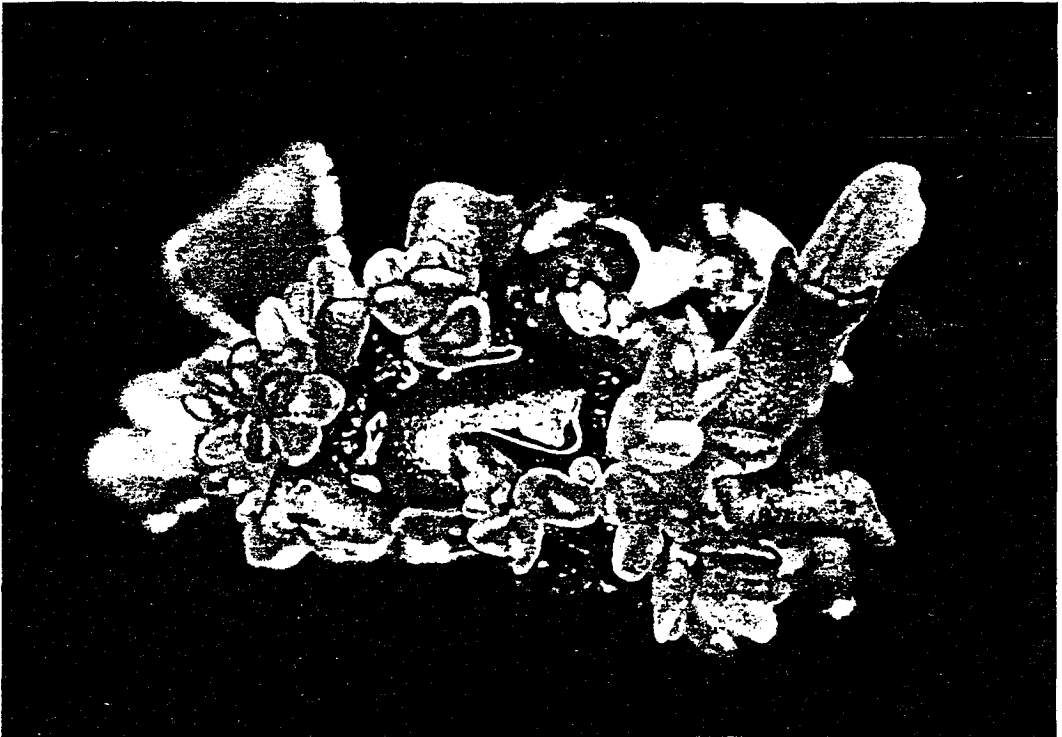


Fig. 4. Somatic embryos induced from an immature soybean cotyledon on MSB medium containing 10 mg l^{-1} NAA and 5 g l^{-1} sucrose after five weeks of culture initiation.

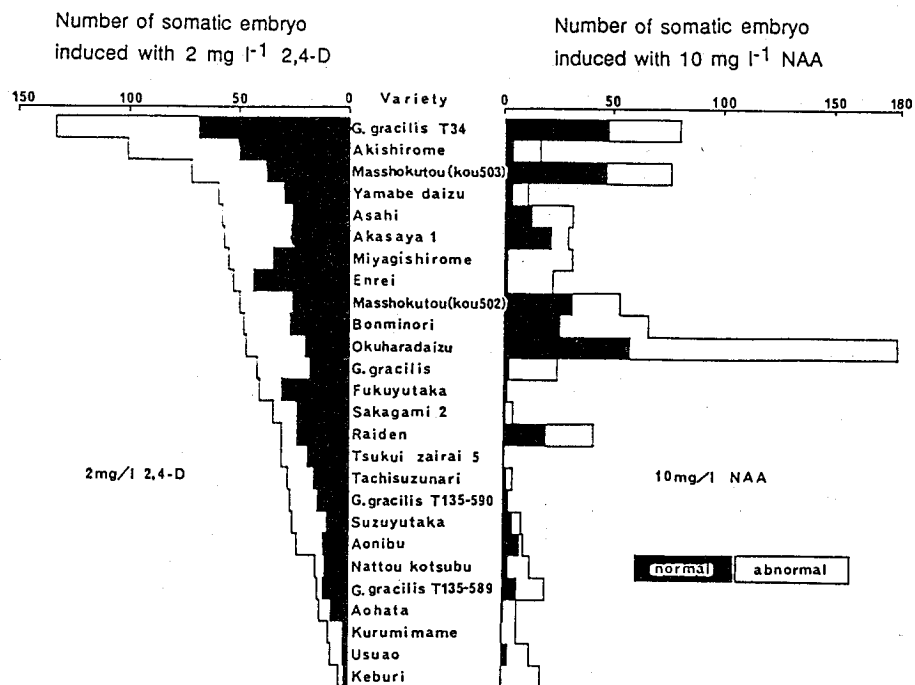


Fig. 5. Number of somatic embryos induced from each of 20 immature embryos cultured on the medium containing either 2 mg l⁻¹ 2,4-D (left) or 10 mg l⁻¹ NAA (right) and 30 g l⁻¹ sucrose.

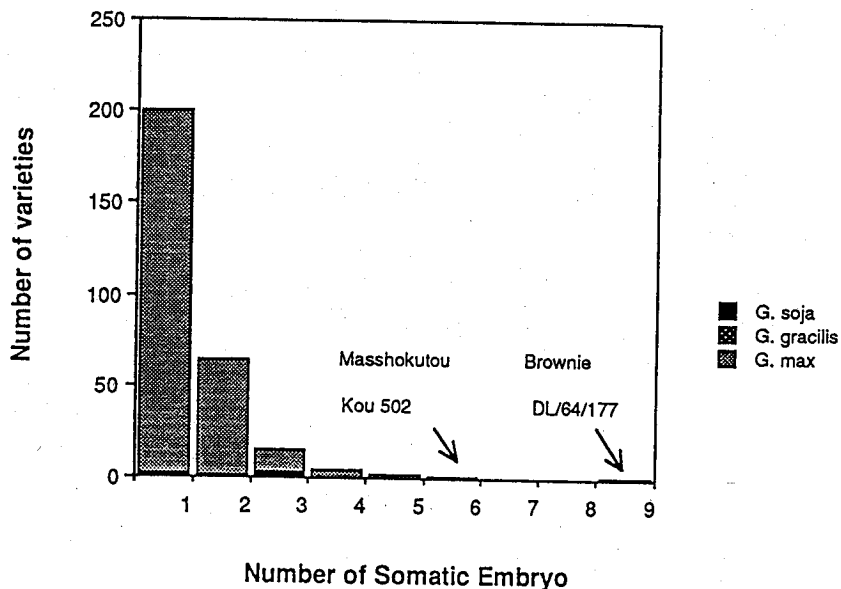


Fig. 6. Screening of 288 soybeans (*G. max*, *G. gracilis*, and *G. soja*) regarding the production of somatic embryo per pair of cotyledons. Embryogenesis medium containing 10 mg l⁻¹ NAA and 30 g l⁻¹ sucrose was used.

Table 1. Analysis of variance for 16 soybean cultivars (genotypes), four sucrose concentrations, two culture rooms, and two dates of culture initiation within each genotype and each culture room (blocks).

source	df	Mean square	
Genotype (G)	15	2.150	**
Sucrose concentration (S)	3	10.632	**
G x S	45	0.240	**
Heterogeneity of regression	(15)	0.502	** #
Deviations from regression	(30)	0.108	
Culture room (R)	1	0.118	
G x R	15	0.199	**
S x R	3	0.165	
G x S x R	45	0.090	
Block (B) within G x R treatments	32	0.186	**
B	(1)	0.019	
G x B	(15)	0.220	**
R x B	(1)	0.017	
G x R x B	(15)	0.175	*
Residual	96	0.083	

*,** Significant at the 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

Tested against deviations from regression.

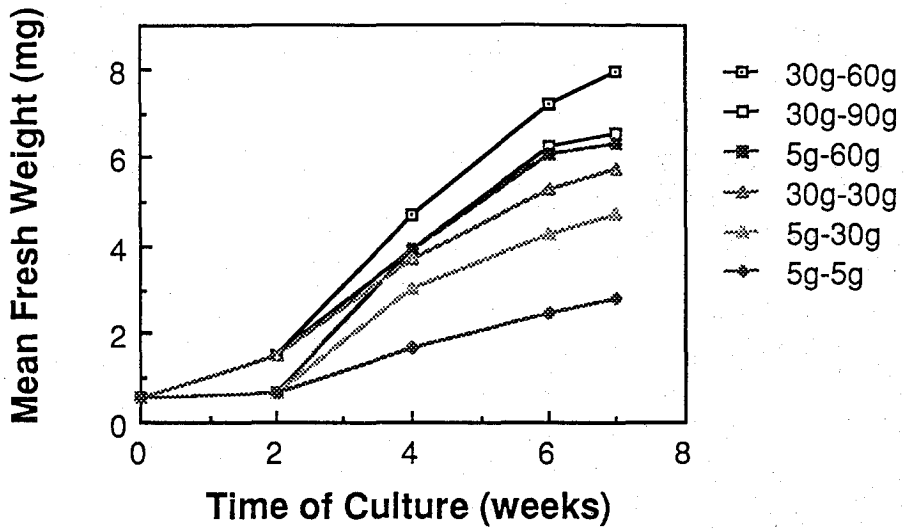


Fig. 7. Increased fresh weight of soybean somatic embryos with elevated sucrose concentration in the maturation media. Somatic embryos were cultured for two weeks on the maturation medium I containing 5 or 30 g l⁻¹ sucrose, and subcultured for five weeks on the maturation medium II containing 5, 10, 20, or 30 g l⁻¹ sucrose.



Fig. 8. Germination of somatic embryos on 1/2 MSB medium containing 0.001mg l⁻¹ GA₃ and 10 g l⁻¹ sucrose.

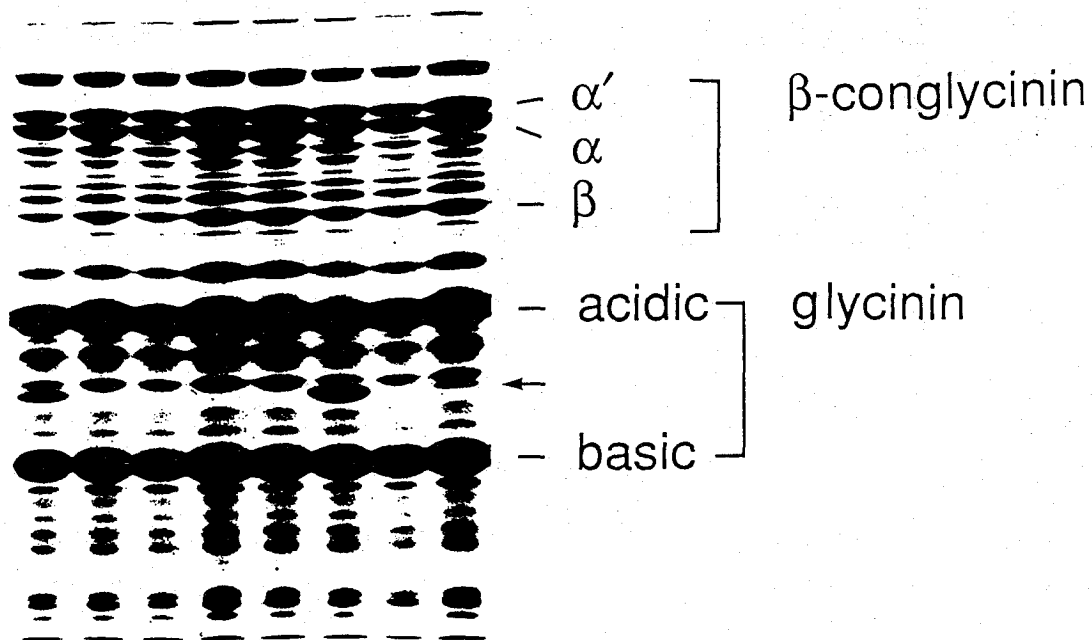


Fig. 9. A novel protein (26 KDa, indicated by the arrow) detected in E₃ seeds by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Table 2. Segregation frequencies of mutation having 26 KD protein detected in E₃ seeds.

E ₂ plant #	No. E ₃ seeds tested	+26 KD	-26 KD

Masshokutou Kou 502 (#7-3)-derived			
7-3-2	12	3	9
7-3-5	21	8	13
7-3-. (24 other E ₂ plants, total)	260	0	260
G. gracilis T34 (#3-53)-derived			
3-53-25	11	2	9
3-53-29	21	5	16
3-53-. (28 other E ₂ plants, total)	318	0	318

Table 3. Segregation frequencies of mutation in E₄ seeds

E ₃ mutant plant #	No. E ₄ seeds tested	+26 KD	-26 KD

7-3-2- 9	12	0	12
7-3-5- 4	4	0	4
-10	22	0	22
-11	8	0	8
-13	16	0	16
-14	30	4	26
-18	13	2	11

Total (7 mutants)	105	6	99
Control (9 wild types)	99	0	99

審査結果の要旨

ダイズは主要作物の一つであるが、その組織培養において植物体再生が困難で、そのために細胞融合、遺伝子組換え等の実用化には多くの困難があった。本研究では、ダイズ未熟胚から不定胚を誘導する方法を検討し、ついで不定胚形成能のきわめて高い品種・系統を探索して発見した。一方、培養で得た不定胚について成熟及び発芽の概念を導入してその条件を明らかにし、高い率で植物体を再生する技術を開発した。更に復元した植物体の種子タンパク質の分析を行って、その遺伝的性質の変化と安定性について調査したものである。

まず、ダイズ未熟胚組織からの不定胚の誘導条件を明らかにし、未熟胚の発育エイジが不定胚の誘導には重要であることを示した。

ついで、約300系統の不定胚誘導の難易性を検討し、*Glycine gracilis*の中に不定胚形成能の高い系統が多いこと、また*G. max*の中にも不定胚形成能の高いものがあることを示した。これらは高度不定胚形成系統として研究者間に広く利用されている。

一方不定胚培養においては、培地の糖濃度を比較的低くして形成させた不定胚は小さいが、それを糖高濃度の培地に移すと、不定胚は次第に大きさと生体重を増加して、黄色に変化し、外見上生長を停止する。この過程で子葉及び胚軸の細胞内にはそれぞれの組織に特異的な種子貯蔵タンパク質が蓄積し、受精胚の成熟と似ている過程と思われた。この成熟胚を糖低濃度の培地に移植すると、速やかに緑化し、下胚軸部分が伸長し、続いて本葉を展開し根を伸長した。また、貯蔵タンパク質は発芽と同時に分解される。以上、不定胚の成熟と発芽の様式は、受精胚の発育様式と類似していることを指摘し、培養胚に成熟と発芽の過程を経過させることによって、ダイズでも不定胚の60%を植物体として発達させることが出来ることを明らかにした。

さらに、再生植物体の変異を種子タンパク質に注目して検討した。新しい種子タンパク質を形成する系統を発見し、それが第6有性生殖世代まで遺伝し、その後消失した。このように培養によって生じる変異には、自然突然変異とは異なる現象もあることを指摘した。

以上本論文はダイズの培養に関して、多くの新知見を加え、かつ高率の再分化系を確立したものであって、農学研究、特にダイズの育種分野に多大の貢献をしたものである。よって、本論文は農学博士を授与するに値するものと判断した。