



ストックの遠縁雑種育成並びに種苗生産への組織培養法の利用

溝添(高岡), 素子

(Degree)

博士(学術)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Date of Publication)

2015-03-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1210

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3092490>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001210>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	みぞ 溝 ぞえ 添 ちと 素 子 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(学術)
学位記番号	博い第216号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成5年3月31日
学位論文題目	ストックの遠縁雑種育成並びに種苗生産への組織培養法の利用

審査委員	主査 教授 前 川 進
	教授 大 川 秀 郎
	教授 上 島 脩 志

論 文 内 容 の 要 旨

ストック (*Matthiola incana* R.Br) は冬場の重要な切花で、花色は白色の他、赤紫、青紫等の紫色系を中心としている。黄色系はクリーム色しか存在せず、鮮やかな黄色のストックが作出されれば、さらにストックの需要の拡大が期待できる。よって、本論文は、第1章では従来通りの育種法である人工交雑によって、また第2章では最新のバイオテクノロジー技術である細胞融合を利用して、黄色のストックの作出を試みた。

また、ストックの現在市販されている種子は、一重と八重が1:1に出現する系統がほとんどである。商品価値の高いのは花卉の豪華な八重咲株のみであるため、生産過程で一重咲株の選別、除去を行わなければならない、生産者にとって大きな負担となっている。組織培養による八重咲株の大量増殖が確立されればこの作業を軽減でき、能率の高い八重株種苗生産が望めるものと期待される。また、突然変異や細胞融合等によって、商品価値の高い株が作出された場合にも、組織培養技術を利用し、増殖することが可能となると考えられる。よって、本論文の第3章では、組織培養を効率よく行うための最適培養条件について、また第4章では、種苗生産において好適な培養環境を確立するため、器官分化に及ぼす共試植物の前歴の影響、培養器環境要因の変動と培養器内植物の形態形成との関係について検討した。

第1章では、黄色ストックの作出を目的とし、ウォールフラワーとの正逆人工交配を行った。ウォールフラワーはストックと属は異なるが、草姿は非常に類似しており、オレンジ等の黄色系を中心とした花色を有している。この黄色遺伝子をストックに導入するために交配を行った結果、ストックを母親に用いた場合に69粒、ウォールフラワーを母親に用いた場合に3粒、合計72粒の種子が得られた。

それらの種子を播種、栽培し、形質を観察したところ、すべてにおいて母親の形質に類似した傾母性の強い個体となり、黄色の雑種植物を得ることはできなかった。これらのことより、得られた種子は偽受精によるものと思われた。しかしながら、花色について母親と異なるものが2個体出現し、それらについてはウォールフラワーとの交雑の可能性も考えられた(第1節)。ストックとウォールフラワー間の受粉後の柱頭観察を光学および走査型電子顕微鏡で行ったところ、各々の柱頭の乳頭組織に花粉管の伸長、侵入が確認され、受精の可能性が示唆された(第2節)。また、雑種個体が作出された場合の検定法として電気泳動を利用するために、まずストックとウォールフラワーの葉片を材料に用いて泳動を行った。その結果、ストックとウォールフラワー間で異なるパーオキシダーゼアイソザイムのバンドパターンが存在し、雑種の識別に電気泳動法が利用できることが示唆された(第3節)。

第2章では、第1章と同様、黄色ストックの作出を目的として、ストックとウォールフラワーの電氣的細胞融合を試みた。細胞融合を行うにあたって、それぞれの植物プロトプラストの単離から植物体再生までの系を確立しておくことが不可欠であるため、それぞれについてプロトプラスト培養を行った。ストックの子葉プロトプラストの初期分裂を高める条件として、1/2 MS 培地の培地組成のうち、サッカロース濃度は4%、マンニトール濃度は0.6Mが適しており、培地の無機態チッ素を有機のグルタミン(10mM)に代えて添加した場合に好結果が得られ、また5℃、水浸漬の前処理を施すことも効果的であった。子葉プロトプラストは第一分裂まで確認でき、ストックの子葉を材料とした場合では初めての報告である。本葉、子葉および下胚軸由来カルスのプロトプラストでは、カルスを1/2 MS 培地に、1 mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA を添加した培地で継代・維持でき、そのカルスを1.5%メイセラゼ+0.05%マセロザイム R10 で酵素処理することで、活性の高いプロトプラストを得ることが、またプロトプラスト培養では、1 mg/ℓ NAA+1 mg/ℓ BA を添加した培地にサッカロースとグルコースを組み合わせて添加した培地により高い分裂率が得られた。またその後、1 mg/ℓ NAA+0.1mg/ℓ BA を添加した培地を添加し培養することでカルス形成まで至った。ウォールフラワーについては、現在まで子葉およびカルスプロトプラストについての報告はない。プロトプラスト培養の最適条件について検討した結果、子葉プロトプラストでは第一分裂、カルスプロトプラストではカルス形成まで確認された(第1節)。次に、ストックおよびウォールフラワーの子葉およびカルスプロトプラストを材料として、個々に融合条件の検討(パールチェーンの形成および融合)を行った。得られた結果をふまえて、実際にストックとウォールフラワーの細胞融合を行ったところ、速やかに融合が成立した組合せは、ストックのカルスプロトプラストとウォールフラワー子葉プロトプラストで、高周波電界強度、1 MHz、200 V/cm 処理後、パルス電圧 1.67 V/cm、パルス幅 32 μs を印加すると、異種間でも融合が成立し、培養4日目に第一分裂が確認され、体細胞雑種獲得の可能性が示唆された(第2節)。

第3章では、組織培養による大量増殖を目的として、ストックの各部位を外植片に用いて、主に器官分化に及ぼす培地組成の最適条件について検討した。植物生長調節物質ではどの部位にも共通して、カルス形成はNAA および2, 4-Dにより、シュート形成はBA やゼアチンにより促進された。培地内のチッ素形態では、NO₃⁻-N:NH₄⁺-Nの比を変えることが器官分化に影響を与え、また無機

態チッ素の代わりに有機態チッ素を添加することでカルス形成率が上がるということが明らかとなった。下胚軸を外植片としたとき、抗オーキシンである AZI および TIBA の添加はカルス形成を抑制し、ポリアミン類であるスペルミジン (0.005mM) の添加はシュート形成に有効であることが認められた。

外植片として下胚軸を用いた場合、本葉および子葉に比べシュート形成率は安定して高く、外植片として最適であると思われた。また、下胚軸および子葉からカルスを誘導し、そのカルスからシュート形成することも可能であったが、カルス誘導時に 2, 4-D を使用したカルスからはシュート形成は見られず、またカルスからシュートを誘導する場合には、BA が効果的で、ゼアチンではシュートが得られなかった (第 1, 2, 3 節)。

また、育種的材料としての利用を考えて、現在まで報告の見られなかった薬培養を試みた。薬からカルス形成に対して、25℃培養ではサッカロースは 10% が適しており、培養温度は 20℃ より 25℃ の方がやや良好であり、30℃ で 1 日高温処理を施した後、20℃ で培養することは効果的であった (第 4 節)。

しかし、組織培養では八重咲株の大量増殖を目的としているため、開花前の段階で、八重咲株を判定する必要がある。その方法として電気泳動法を利用した判別を試みた結果、可溶性タンパクおよびパーオキシダーゼアイソザイムで一重と八重にそれぞれ特異的なバンドが存在し、八重株の判定に利用できることが認められた (第 5 節)。

第 4 章では、組織培養における器官分化に及ぼす環境の影響について論じた。外植体となる植物体の施肥量と光環境は、シュート形成に強く影響していることが認められ、外植体からのシュート形成率の向上をはかるためには、最適な条件を設定し材料植物体を栽培することが重要であることが示唆された (第 1 節)。一方、培養器内の環境は自然環境とは様々な面で異なっていると予想される。培養器内の環境の調節の方法の一つとして、培養器栓を変えることが考えられた。よって、アルミフویل、ルミラー、ミリラップの 3 種類の栓を用いて、培養植物体を含む培養器内の炭酸ガスおよびエチレンに着目して、測定を行ったところ、アルミフویلやルミラーでは、暗期には炭酸ガスの上昇が、明期には低下がみられたのに対し、通気性のあるミリラップでは明、暗期を通して安定していることが明らかになった。エチレンに関しては、ルミラーを用いた場合にやや高い値を示し、いずれの栓においても明期の方がやや高い値を示し、培養器栓の違いによって、培養器内のガスや光環境が異なることが認められた (第 2 節)。また、培養途中にしばしば見られる水浸状化したシュートは、その後の順化を困難なものにしている。この現象は培養器内の異常な環境によって誘導されるものと考えられ、通気性の高いミリラップ栓のもとで水浸状化が抑制されたのは、CO₂ の明期の急激な減少と暗期の異常な蓄積が緩和されるとともに培養器内の湿度が低く保たれることによるものと考えられた。正常と水浸状化シュートを比較するために、正常および水浸状シュートを含む 3 種類の栓を用いた試験管内の CO₂ およびエチレン濃度を測定したところ、CO₂ 濃度に関しては、気密性の高い栓では、暗期では水浸状個体も正常個体と同様に上昇したが、明期での減少は正常個体に比べて緩やかで、培養器外の濃度以下になることはなかった。このことより、水浸状個体の光合成能は正常個体と比較して低いことが示唆された。また、エチレン濃度は、明期ではいずれの栓でも正常個体の方が高い値を

示した(第3節)。次に、水浸状シュートを正常シュートへ回復させる実験を試みたところ、培養器栓に通気性の高いミリラップ栓を使用することによって、正常なシュートに回復することが確認され、またゲル化剤として0.4%ゲルライトや、50mM マンニトール、フロリジン並びに ABA の添加も正常個体への回復に効果があることが示唆された(第4節)。また、水浸状シュートと正常シュートの形態学的比較を行うため、光学および走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、水浸状シュートは葉が非常に肥厚しており、細胞間に大きな細胞間隙が見られ、葉の表面は凹凸が激しく奇形の気孔も多くみられた。また生理学的にもパーオキシダーゼアイソザイムにおいて水浸状個体方が強く染色され、活性が高いことが予想された(第5節)。

論文審査の結果の要旨

冬季における重要な切花であるストックは濃黄色花がなく、新花色作出の期待は大きい。本研究はストックの花色育種を目的として、ストックとウォールフラワーの交配による属間雑種並びに細胞融合による体細胞雑種の育成を試みるとともに、有性繁殖の困難な育種個体や商品価値の高い八重咲個体を組織培養法の利用によって種苗生産することを目的として、最適培養条件を確立しようとしたものである。本論文は4章から構成され、属間雑種の作出に関する研究を第1および2章に、大量増殖に関する研究を第3および4章にまとめられている。

第1章では、濃黄色ストックを作出する手段として、ストックと濃黄花色をもつウォールフラワーとの正逆交配を行ない、属間雑種の作出を試みている。交配により結実した莢数の割合は約4%の低率であった。生育した個体には黄色の雑種個体は得られず、母親に類似した傾母性の強いもので、偽受精の可能性が高いと推論している。さらに、両種間の受粉後の乳頭組織への花粉管の伸長、侵入など組織学的観察をもとに、受精の可能性について検討を加えている。また、ストックとウォールフラワー葉片のパーオキシダーゼアイソザイムの電気泳動を行ない、両親を識別できるバンドの存在することを確かめ、今後、雑種が作出された場合の確認にこの手法が応用できることを示唆した。

第2章では、ストックとウォールフラワーの電氣的細胞融合による属間雑種の作出を目的としてプロトプラスト単離とその培養条件および細胞融合条件を検討している。まず、ストックのカルス及び子葉から活性の高いプロトプラストを単離する条件について、単離時の酵素処理の実験などから明らかにしている。子葉プロトプラストの培養では分裂率を高める条件を確立するとともに、カルスプロトプラスト培養では、NAA と BA の濃度を変えてサッカロースとグルコースを組み合わせた培地でより高い分裂率が得られ、カルスの形成に成功している。一方、ウォールフラワーについてもカルスプロトプラストの培養によってカルスが形成されている。つぎに、ストックおよびウォールフラワーの子葉とカルスプロトプラストについて、個々に融合の条件を明らかにし、その結果をもとに両種の細胞融合実験を試み、体細胞雑種獲得の可能性について考察を行なっている。ストックの「カルスプロトプラスト」とウォールフラワーの「子葉プロトプラスト」で、高周波電界強度1MHz、200V/cm処理後、パルス電圧1.67kV/cm、パルス幅32 μ sを印加すると、すみやかに融合が成立し、その

後、分裂が開始されることを確認している。

第3章では、組織培養による種苗生産を目的としてストックの各部位を外植片に用いて、主に器官形成に及ぼす培地組成の最適条件について検討している。植物生長調節物質では、部位に関係なくカルス形成はNAAおよび2, 4-Dにより、シュート形成はBAやゼアチンにより促進されること、 NO_3^- -N: NH_4^+ -Nの比率や有機態N、抗オーキシン、スベルミジン添加などによって器官分化が影響されることを明らかにしている。一方、下胚軸からのシュート形成率は子葉や本葉に比べ安定して高く、外植片として最適であること、また外植片から一旦カルス化してからシュート形成させる場合に、カルス誘導時には2,4-Dを添加せず、シュート誘導時にはBAの添加が効果的であることを確かめている。八重咲個体のみを大量増殖するとき、実生の段階で八重咲個体を確実に判定する方法として、可溶性タンパクやパーオキシダーゼの電気泳動法が利用できるとしている。

第4章では、組織培養における器官分化に及ぼす環境の影響について論じている。培養前の植物の生育環境の違いにより、培養中の外植体のシュート形成に影響を与えることを認め、材料植物を好適な生育条件で育てることがin vitroの器官形成率を向上させるために重要であると指摘している。植物の生育と培養器内のガス濃度の推移について考察を行ない、培養途中にしばしば発生する水浸状シュートはその後の順化を困難にするが、培養器栓として通気性の高いミリラップフィルムを使用すると水浸状化が抑制されることや水浸状から正常に回復する個体があることを確認している。これは CO_2 の明期の急激な減少と暗期の異常な蓄積が緩和されることと培養容器内の湿度が低く保たれることによるものと推論した。また、正常個体と水浸状個体の組織形態学的な比較や電気泳動によるアイソザイムのバンドパターンの比較を行い、水浸状化の原因の解明に示唆を与えた。

以上のように、本研究は細胞融合にあたって、それぞれの植物のプロトプラストの単離から分裂そしてカルス誘導に至る過程、さらに大量増殖において外植体もしくはそれ由来カルスから植物体再生に至る器官分化の過程について最適条件を明らかにし、プロトプラスト培養による植物体再生の系を確立したこと、さらに、ストックの組織培養による種苗生産に対して重要な知見を得ていることなど価値ある集積であると認める。よって学位申請者溝添素子は、博士（学術）の学位を得る資格があると認める。