



アスパラガスの体細胞胚誘導に関する研究

齊藤, 猛雄

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1998-03-11

(Date of Publication)

2014-02-04

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2221

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3141266>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002221>

※ 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)	齊藤 猛雄 (福井県)
博士の専攻分野の名称	博士(農学)
学位記番号	博ろ第39号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成10年3月11日
学位論文題目	アスパラガスの体細胞胚誘導に関する研究

審査委員	主査 教授 稲垣 昇	教授 安田 武司	教授 王子 善清
------	------------	----------	----------

論文内容の要旨

アスパラガスは、基本的に雌雄異株であることから個体内及び集団内におけるヘテロ性が高く、さらに植物としての特性から効率的な育種は困難な状況にある。そこで、優良個体や親系統をクローン増殖することが望まれている。アスパラガス以外の植物も含めて、効率よくクローン増殖するには組織培養技術が有効であり、特に効率性を考慮した場合は体細胞胚誘導技術を利用することが有利である。

本研究では、アスパラガスの組織培養による苗供給の実用化を目指すとともに体細胞胚形成機構に関する基礎的知見を得るために、①アスパラガスの安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立、②アスパラガス体細胞胚の発芽率向上と斉一的発芽のための条件検討、③アスパラガス体細胞胚誘導時に発現する遺伝子の解析、の3項目について研究を進めた。

第1章では、優良個体を効率的に大量増殖するために安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立を試みた。はじめにembryogenic callusの誘導に適する材料部位の検討を行い、無菌実生を用いる場合は鱗芽部が、成株を用いる場合は若茎の側芽茎頂部が材料として適していることを明らかにした。embryogenic callusの誘導率は約10%程度であった。また、誘導されたembryogenic callusを観察することによって、その性状を明らかにし、アスパラガスembryogenic callusの判別法を確立した。embryogenic callusを増殖するには2,4-D (5 μ M)を含む液体培地で回転振盪培養することが最も効率的であり、増殖率は1週間に8~10倍であった。次に、embryogenic callusから効率的に体細胞胚を誘導するための培養条件、特に培養容器内の環境条件に着目して検討した。液体振盪培養したembryogenic callusを材料として、再分化培地のゲル化剤の種類と濃度及び培養容器のふたに通気性を付与するか否かを検討したところ、再分化培地を高濃度(1.0%)のジェランガムでゲル化するとともに培養容器の口を無菌通気膜(ミリラップ)で覆うことによって、水浸状でない正常な体細胞胚を容易に誘導できることを明らかにした。また、培養容器内の乾燥条件が正常な体細胞胚形成に効果的であったと考えられた。さらに、アスパラガスで確立した体細胞胚誘導系の汎用性をナスを材料に検討した。無菌実生の子葉部切片を材料としてembryogenic callusの誘導を試みた。その結果、

高濃度の2,4-D(50 μ M)を含む培地上で培養した切片を同組成の液体培地中で回転振盪培養することによってembryogenic callusを誘導できることが明らかとなった。誘導されたembryogenic callusを材料として、アスパラガスで確立した培養法を応用したところ、正常な体細胞胚を容易に誘導できることが明らかとなった。embryogenic callusの誘導に関しては品種間差が観察されたが、誘導されたembryogenic callusからの体細胞胚形成に関しては大きな品種間差は観察されなかった。

以上のように、安定かつ効率的にアスパラガス体細胞胚を誘導することが可能となったが、体細胞胚からの発芽率が低いことが問題であった。そこで第2章では、その点を改良するための検討を行った。他の植物で体細胞胚の発芽率向上に効果的であった方法を中心に、アスパラガス体細胞胚へ各種の処理を試みた。embryogenic callusの乾燥処理、体細胞胚誘導培地の無機塩濃度の検討、種々の培地(ABA添加, ショ糖濃度上昇, 抗オーキシシンや抗サイトカイニンの添加等)での体細胞胚の培養、体細胞胚の乾燥処理等を検討した。その結果、顕著に体細胞胚の発芽率を上昇させる条件は明らかにできなかったが、体細胞胚の培養期間が長いほど発芽率は向上する傾向にあり、培養中に体細胞胚が成熟しつつあると思われた。次に、胚発達の正常化を示す生化学的なマーカーの検索を試みた。アスパラガス体細胞胚と接合胚から可溶性タンパク質を抽出してSDS-PAGEを行い、両者を比較した。その結果、再分化処理4週間後の体細胞胚は、完熟種子中の接合胚とカルスの中間的な電気泳動パターンを示した。さらに、成熟した接合胚で特異的に認められる17.5KDのポリペプチドを見出した。このポリペプチドは培養期間の長い(再分化処理7~10週間)体細胞胚にも認められたことから胚の成熟や発芽の準備段階と関連するものと思われ、アスパラガス体細胞胚の成熟条件を検索する上でのマーカーになりうると考えられた。

第3章では、正常な体細胞胚発生時の遺伝子発現を解析するために、アスパラガス体細胞胚誘導系において乾燥条件下で培養した場合と湿潤条件下で培養した場合の細胞について、異なる発現を示す遺伝子の解析をディファレンシャル・ディスプレイ法によって試みた。その結果、直接的に胚発生機構に関与すると思われる遺伝子については明らかにできなかったが、アスパラガスでは報告例のないgypsyグループに属するレトロトランスポゾン様配列が存在することを明らかにしたほか、植物では報告例のないホスホエノールピルビン酸:糖ホスホトランスフェラーゼ系(PTS)に関与する*ptsH*様遺伝子がアスパラガスを含む単子葉植物及び数種の双子葉植物のゲノム中に存在することを明らかにした。さらに、簡易的に微量な遺伝子の発現を解析する手法を示した。

本研究により、アスパラガスを実用レベルでクローン増殖するための基本的な培養系を確立するとともに体細胞胚形成のメカニズム解明の手がかりを示すことができた。

論文審査の結果の要旨

アスパラガス(*Asparagus officinalis* L.)は、雌雄異株の多年生作物であることから同一品種においても集団内におけるヘテロ性が極めて高く、従って、他の種子繁殖性の野菜と比較しても、短期間での効率的な育成は極めて困難な作物である。そこで、生産性や耐病性などの諸形質について優れた個体や親系統をクローン増殖し、これらを育種材料、または生産苗として利用することが望まれている。アスパラガスを始めとして、栄養繁殖性の作物を効率よくクローン増殖するには組織培養技術が不可欠であり、特に近年、均質なクローン苗を効率的に増殖する手段として、体細胞胚誘導技術の利用が試みられている。

しかしながら、体細胞胚誘導技術の利用には克服すべき課題が多く、特にアスパラガスを含めた単

子葉植物では未だ確立した技術には至っていない。そこで本研究では、アスパラガスの組織培養による種苗生産の実用化を目指すとともに、体細胞胚形成機構に関する基礎的知見を得るために、①アスパラガスの体細胞組織からの安定かつ効率的な体細胞胚誘導法の確立、②アスパラガス体細胞胚の発芽率向上と発芽の斉一性のための条件の検討、③アスパラガス体細胞胚形成に関与する遺伝子の解析、の3項目について研究を進めた。第1章では、優良個体を大量増殖するための効率的な体細胞胚誘導法の確立を試みた。はじめに体細胞胚形成能を有するカルス (embryogenic callus) 誘導に適する外植体の検索を行い、実生を用いた場合は鱗芽部が、成株を用いた場合は若茎の側芽の茎頂部が外植体として好適であることを明らかにした。embryogenic callus の誘導率は約10%程度であった。また、embryogenic callusを観察しその性状を明らかにすることで、embryogenic callusを判別する方法を確立した。embryogenic callusを増殖するには2,4-D(5 μ M)を含む液体培地で回転振盪培養することが有効であり、増殖率は1週間に8~10倍であった。次に、embryogenic callusから効率的に体細胞胚を誘導するための培養条件、特に培養容器内の環境条件について検討した。液体振盪培養したembryogenic callusを用いて、体細胞胚誘導に及ぼす培地のゲル化剤の種類および濃度、ならびに培養容器栓の通気性の影響について検討したところ、再分化培地を高濃度(1.0%)のジェランガムでゲル化するとともに培養容器の栓に無菌通気膜(ミリラップ)を使用することによって、水浸状化しない正常な体細胞胚が容易に誘導できることを明らかにした。この原因として、培養容器内の相対湿度の低下(乾燥化)が正常な体細胞胚形成に有効であることが示唆された。

上記のアスパラガスで有効であった体細胞胚誘導技術の汎用性を見るためにナスを材料に用いて検討した。その結果、ナスの無菌実生の子葉部切片を外植体とした場合、embryogenic callusの誘導は、高濃度の2,4-D(50 μ M)を含む培地上で培養後、同組成の液体培地中で回転振盪培養することによってembryogenic callusが誘導できることを明らかにし、誘導されたembryogenic callusは、アスパラガスで確立した培養法を応用したところ、正常な体細胞胚に容易に誘導できることが明らかとなった。embryogenic callusの誘導に関しては品種間差が観察されたが、誘導されたembryogenic callusからの体細胞胚形成に関しては大きな品種間差は観察されなかった。以上のように、第1章では安定かつ効率的なアスパラガス体細胞胚の誘導が可能であることを明らかにした。

第2章では、誘導された体細胞胚からの発芽率を向上させ、効率的に小植物を再生させる方法について検討した。他の植物で体細胞胚の発芽率向上に効果的であった方法を中心に、アスパラガス体細胞胚への各種の処理を試みた。embryogenic callus、および体細胞胚の乾燥処理、体細胞胚誘導培地における無機塩濃度、種々の培地、シヨ糖濃度、および種々の培地成分(ABA, 抗オーキシン, 抗サイトカイニン等)の体細胞胚の発芽に及ぼす影響について検討した。その結果、顕著に体細胞胚の発芽率を上昇させる条件は明らかにできなかったが、体細胞胚を誘導後、発芽培地に移植前の培養期間を延長することで発芽率が向上する傾向が認められた。そこで次に、体細胞胚の発達の正常化を示す生化学的なマーカーの検索を試みた。アスパラガス体細胞胚と接合胚(種子胚)から可溶性タンパク質を抽出してSDS-PAGEを行い、両者を比較した。その結果、体細胞胚誘導処理4週間後の体細胞胚は、完熟種子中の接合胚とカルスの中間的な電気泳動パターンを示した。さらに、完熟した接合胚で特異的に認められる17.5KDのポリペプチドを見出した。このポリペプチドは培養期間の長い(誘導処理7~10週間)体細胞胚にも認められたことから胚の成熟や発芽の準備段階と関連するものと思われる、アスパラガス体細胞胚の成熟度を知る上でのマーカーになりうると考えられた。

第3章では、単子葉植物の胚発生の制御機構を解明するための実験系としてアスパラガスの体細胞胚を用い、正常な体細胞胚発生時の遺伝子発現の解析を試みた。体細胞胚誘導培地上で培養した場合

と、密閉して湿潤条件下で培養した場合の培養細胞（embryogenic callusと体細胞胚が混在）について、遺伝子発現の差異の解析をディファレンシャル・ディスプレイ法により行った。その結果、胚発生機構に直接的に関与すると思われる遺伝子を明らかにできなかったが、アスパラガスでは報告例のなかったgypsyグループに属するレトロトランスポゾン様配列が存在することを示した。また、植物では報告例のないホスホエノールピルビン酸:糖ホスホトランスフェラーゼ系(PTS)に関与する*ptsH*様遺伝子がアスパラガスを含む単子葉植物及び数種の双子葉植物のゲノム中に存在することを示した。

以上、本研究により、アスパラガスの種苗生産を目的とした、実用レベルでの体細胞胚誘導によるクローン増殖の培養系が確立され、また体細胞胚の誘導および成熟のメカニズム解析の分子生物学的な手がかりが示された。したがって、本研究は、今後のアスパラガスの種苗生産および育種にとって重要な貢献を果たすと共に、他の作物の体細胞胚誘導系によるクローン増殖への基礎的資料を提供するものであり、価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。