

|             |                                                                                                                        |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | たむらみほこ<br>田村美穂子                                                                                                        |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (農 学)                                                                                                              |
| 学 位 記 番 号   | 論 農 博 第 2141 号                                                                                                         |
| 学位授与の日付     | 平成 9 年 3 月 24 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 | Ploidy Manipulation through Protoplast Culture Techniques<br>for Persimmon Breeding<br>(カキ育種におけるプロトプラスト培養技術を利用した倍数性操作) |
| 論文調査委員      | (主 査)<br>教 授 杉 浦 明 教 授 矢 澤 進 教 授 池 橋 宏                                                                                 |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、プロトプラスト培養技術を利用したカキ (*Diospyros kaki*) の倍数性育種の可能性を追究するために、倍数性を迅速かつ効率的に判別する方法の確立、プロトプラストへのコルヒチン処理による染色体倍加個体作出、及びプロトプラスト融合による体細胞雑種作出を検討したもので、4章よりなっており、主な内容は以下の通りである。

第1章ではカキ9品種及びカキ属12種の葉原基由来の培養カルスを用いてフローサイトメータによるDNA量の分析を行い、ゲノムサイズ既知の細胞と比較することで各ゲノムサイズを決定し、さらに倍数性既知のカキ品種及び種と比較することにより倍数性未知の品種・種の倍数性を推定した。次いでカルスの染色体観察法を確立し、染色体数を確認することにより倍数性を決定した。供試したすべての野生種は2倍体 ( $2n=30$ ) であり、それらのゲノムサイズは1種を除いて1.6~2.3pg/2Cであった。また、4倍体、6倍体、9倍体のゲノムサイズはそれぞれ3.8pg/2C、5.0~5.2pg/2C、7.5~8.1pg/2Cであり、倍数性とゲノムサイズとの間に高い相関関係を認めた。この結果、培養カルスのDNA量測定により倍数性を容易に判別することができ、これはプロトプラスト培養技術を用いたカキの倍数性育種を行う上での有力な手法となることが明らかになった。

第2章では6倍体 ( $2n=90$ ) のカキ“次郎”のプロトプラストにコルヒチンを処理して得られる染色体倍加植物体作出について述べている。単離直後のプロトプラストに0.1%コルヒチンを3~9日間処理し、得られたカルスをフローサイトメータ分析した結果、6日間処理区で約30%のカルスのDNA含量が倍加しており、12倍体カルスであることを確認した。12倍体カルスからの不定芽分化率及び発根率は元の6倍体より低い傾向にあったが、再生個体の染色体数はすべて  $2n=180$  となっており、プロトプラストへのコルヒチン処理によりキメラを生じることなく効率よく12倍体植物を作出できることが明らかとなった。

第3章ではプロトプラスト融合によるカキ品種間雑種の作出について述べている。融合効率やその後の培養効率の点から高いプロトプラスト収量が体細胞雑種作出に必須であるため、まずカキ7品種について

カルスからのプロトプラスト単離の最適条件を検討した。次いで、最も高いプロトプラスト収量が得られた甘ガキ品種“次郎”と“駿河”のプロトプラストを電気融合した。電気融合後、得られたカルスのフローサイトメータ分析により約17%のカルスのDNA含量が親品種のDNAの倍量になっており、12倍体カルスであることを示した。この12倍体カルスからの不定芽分化率、発根率は両親の中間の値を示し、再生個体も染色体数の計測 ( $2n=180$ ) から12倍体であることを明らかにした。また、RAPD分析の結果、これらの12倍体はすべて“次郎”と“駿河”の融合細胞から再生した品種間体細胞雑種であることを確認した。なお、これらの12倍体植物はコルヒチン処理によって得られた12倍体よりも生育が旺盛であり、雑種強勢を示すことを認めた。

第4章ではプロトプラスト融合による種間雑種作出を検討している。まず、野生種の1種である *Diospyros glandulosa* ( $2n=30$ ) のカルスからのプロトプラスト単離条件を検討し、高い収量が得られる条件を決定した。次いで、*D. glandulosa* とカキ“次郎”のプロトプラストを電気融合し、種間雑種作出を試みた。得られたカルスのフローサイトメータ分析の結果、約9割のカルスが8倍体になっていることを明らかにし、RAPD分析の結果においても両親の核遺伝子を持っていることを示した。そのうち約17%のカルス系統は継代を続ける間に染色体が自然倍加し16倍体となった。種間雑種カルスから再生したシュートはその倍数性を維持しており、さらにRAPD分析、cpDNA分析から、種間雑種の核ゲノムは両親由来であるが、葉緑体ゲノムはすべて *D. glandulosa* 由来であることが示された。16倍体シュートは発根しなかったが、8倍体シュートは正常に発根し、その染色体数は  $2n=120$  であることを確認した。

以上のように、プロトプラスト培養技術を利用して倍数性を操作することにより、種々の倍数体を効率的に作出することの可能性が示され、カキの育種法として有効であろうと結論している。

## 論文審査の結果の要旨

倍数性育種は果実の大型化・無核化、自家不和合性の解除、雑種強勢などが期待されるので、果樹にとって有用な育種法である。このため従来、異なる倍数性同士の交雑、非還元配偶子を利用した交雑、コルヒチン処理による染色体倍加などの倍数体獲得法がとられてきた。いっぽう、カキは雄花着生品種が少なく交雑の範囲が限定されていること、結果年齢に達するまでに長期間を要することなどから、他の果樹に比べて交雑育種の効率が悪く、まして、倍数性育種は殆ど検討されてこなかった。

本論文は、バイオテクノロジーの手法、とくにプロトプラスト培養技術を利用して、倍数性を操作し、カキの倍数性育種の可能性と育種効率の向上を追究しようとしたものであり、評価される主な成果は次の通りである。

1. カキはプロトプラストから植物体再生までに要する期間が長く、また、難発根性であるため、根端による従来の染色体観察では迅速な倍数性の判別を行うことは困難である。そこでカルス段階で倍数性を判別するためフローサイトメータによるDNA量分析の手法を取り入れ、いっぽう、カルスの染色体観察方法を開発して両者の対応から、これまで未知であったカキ属の種やカキ品種の倍数性とゲノムサイズを決定することに成功し、早期に倍数性判別を行う方法を確立した。

2. 6倍体カキ品種“次郎”のプロトプラストにコルヒチンを処理し、得られた12倍体カルスより、これ

まで存在しなかった12倍体植物を効率的に作出した。この方法は単細胞への処理であるためキメラの発生がなく、また、完全甘ガキの優良品種について成功しているので、この12倍体個体も元の品種に近い特性を維持している可能性が高く、有力な育種母本候補になると考えられた。

3. 6倍体完全甘ガキ品種同士(“次郎”と“駿河”)の細胞融合によりカキで初めて12倍体の品種間体細胞雑種の作出に成功した。これは果樹ではカンキツに次ぐ数少ない体細胞雑種の作出例であり、カキにおける画期的な育種方法を開発したものだといえる。なお、得られた12倍体はヘテロ性による雑種強勢を示していることから、それ自体を新たな品種として、あるいは育種母本として利用できる可能性がある。

4. 2倍体の野生種と6倍体のカキ品種との細胞融合を行い、種間雑種個体の作出にも成功した。これにより野生種の有用遺伝子をカキ品種に導入することが可能になったばかりではなく、種間雑種の細胞質ゲノムの選択的排除や染色体の偶発的倍加という細胞遺伝学上興味深い知見も得られた。

以上のように本論文は、従来の育種方法では乗り越えることができない障壁のあるカキについて、プロトプラスト培養法を取り入れることにより迅速かつ効率的な有用倍数体作出の可能性を提示したものであり、果樹園芸学並びに果樹育種の実践面に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成9年2月17日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。