

氏名(本籍)	おお が わら とし ふみ 大河原 敏文 (茨城県)		
学位の種類	農 学 博 士		
学位記番号	博 乙 第 622 号		
学位授与年月日	平成 2 年 10 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
審査研究科	農 学 研 究 科		
学位論文題目	カンキツ類の細胞融合雑種の作出に関する研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	菊池 文雄
副査	筑波大学教授	農学博士	大庭 喜八郎
副査	筑波大学教授	Docteur-ès-Sciences	原 田 宏
副査	筑波大学助教授	農学博士	弦 間 洋

論 文 の 要 旨

カンキツ類は、木本植物の中でも特に栄養生長期間が長く一つの品種の育種に20～30年は必要と言われている。またカンキツ類には、雄性・雌性不稔性、交雑不和合性、多胚性など、交雑育種を困難にしている要因が多く、さらに、遺伝子組成が非常にヘテロであることも効率的な交雑育種を妨げている。このようなことから、本研究では、細胞融合法をカンキツ類の育種に応用する目的で、まず、カンキツ属のオレンジとカラタチ属のカラタチの組合せで体細胞雑種選抜法を確立し、核の遺伝子解析による雑種の同定法の応用と改良を行った。また、細胞融合法によると細胞質の混合も起るため、得られた体細胞雑種植物の葉緑体DNAの解析も行った。さらに、オレンジとカラタチの系で確立した体細胞雑種選抜法と同定法を、交雑が困難で育種の価値が高いと考えられるネーブルオレンジとトロイヤートレンジ、ネーブルオレンジとグレープフルーツの組合せに応用しこれらの体細胞雑種植物を作出した。

1) 植物体再生能をもつトロピタ・オレンジの珠心由来培養細胞のプロトプラストと、植物体再生能をもたないカラタチの葉肉細胞のプロトプラストを融合し培養を行った。トロピタ・オレンジの培養細胞は、6-ベンジルアミノプリン (BAP, 10mg/l) を含む培地で未分化状態で増殖するが、融合処理に耐える活性の高いプロトプラストを得るには、プロトプラストを調製する前に、植物ホルモンを含まない培地で短期間培養する必要があった。また、プロトプラスト培養の培地に高濃度 (0.6M) のショ糖を添加することによって、オレンジの胚様体形成が抑制され、雑種細胞のみが胚様体形成を経て植物体を再生することを見出した。得られた体細胞雑種植物は、三出葉である点で、カラタチの性質を示し、葉の大きさ、光沢の点では、オレンジに類似していた。染色体数は、両親 ($2n=18$) の和の36本であり、複二倍体の体細胞雑種と判定された。

リボソーム RNA(rRNA)遺伝子の解析により雑種の同定を行うため、種々の酵素で切断した両親の rRNA 遺伝子を比較した結果、EcoRI でそれぞれに特異的なマーカーとなるバンドが認められた。体細胞雑種より調製した DNA には両親に特異的なバンドがいずれも認められ、核の雑種性が証明された。

2) rRNA 遺伝子の解析法を改良する目的で、非放射性的のビオチンで標識したプローブを用いた結果、短時間に解像度の高い制限酵素パターンを得ることができた。体細胞雑種クローン間に一部の rRNA 遺伝子断片が異なる 2 種類のパターンが認められたが、同様な 2 種類のパターンはカラタチ個体間にも認められ、これらは体細胞雑種における変異によるものではないと考えられた。

3) 体細胞雑種植物の 6 クローンの葉緑体 DNA を精製し制限酵素で解析した結果、オレンジの葉緑体 DNA を含むものが 1 クローン、カラタチの葉緑体 DNA を含むものが 4 クローン、両親の葉緑体 DNA を含むものが 1 クローン認められた。しかし、後に両親の葉緑体 DNA を含むと判定されたクローンの 9 個体についてタバコ葉緑体 DNA をプローブとして解析した結果、すべてどちらか一方に分離しており、個体内の葉緑体組成も均一であることがわかった。これらのことから、体細胞雑種では、胚様体の段階で両親の葉緑体が共存する場合があるが、植物体の段階では両親の葉緑体は安定して共存せず一方に分離するものと考えられた。

4) ネーブルオレンジは、雄性・雌性不稔性による無核性及び多胚性により交雑育種の素材として用いることが困難である。このため、トロピタ・オレンジとカラタチの組合せで確立した体細胞雑種作出法を、ネーブルオレンジとトロイヤースイトレンジ、ネーブルオレンジとグレープフルーツの組合せに応用した。その結果、それぞれ両親の中間的な形態をもつ複二倍体の体細胞雑種植物が得られ、ビオチンで標識したプローブによる rRNA 遺伝子の解析によって雑種性が確認された。しかし、いずれの場合も葉肉細胞由来と推定された植物体も同時に再生した。

以上の結果から、本研究で開発したカンキツ類の体細胞雑種作出法は、極めて効率が良く、応用範囲の広い方法であると言える。また、ビオチン標識プローブによる rRNA 遺伝子の解析法により、通常の実験室で比較的短時間に体細胞雑種の分子レベルでの同定を行うことが可能になった。また、解像度が高いことから、近縁種間の体細胞雑種の判定に特に効果的であると考えられる。得られた複二倍体の体細胞雑種植物は、カンキツ類の育種上、有用な素材となることが期待される。

審 査 の 要 旨

本研究は、細胞融合による体細胞雑種が得られていなかった木本植物に属するカンキツ類において、初めて体細胞雑種の作出に成功し、さらに体細胞雑種の同定を分子生物学的方法によって行う有効な方法を開発した。

まず、分化能を持つトロピタオレンジの珠心由来培養細胞と、分化能を持たないカラタチの葉肉細胞を融合し、高濃度のショ糖を含む培地で培養し、雑種細胞のみを胚様体形成を経て植物に分化させることに成功した。体細胞雑種の rRNA を解析し、核の雑種性を確認した。さらに rRNA の解析を簡

便化するため、ビオチンで標識した rRNA をプローブとして用い短時間に解像度の高い結果を得る方法を開発した。また、体細胞雑種の葉緑体 DNA の解析を行い、雑种植物が両親のどちらか一方の葉緑体 DNA を保持していることを明らかにした。次に、オレンジとカラタチの組合せで確立した体細胞雑種作出法を、ネーブルオレンジとトロイヤーシトレンジ、ネーブルオレンジとグレープフルーツの組合せに応用し複二倍体の体細胞雑種を得た。

これらの研究成果は、育種的価値の高いカンキツ類の体細胞雑種の作出や同定に広く役立つばかりでなく、他の木本植物への応用が期待され、高く評価できる。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。