

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 淨閑 正史

学位授与の日付 平成20年3月31日

論文名 「トマト茎切断面からのシュート形成促進に関する研究」

論文審査委員
主査 小田 雅行
副査 池田 英男
副査 大門 弘幸

論文要旨

種苗の大量・安定生産技術は、新品種の育成や普及にあたって重要である。一般に種苗は種子繁殖によって増殖されるが、種子繁殖は品種の遺伝的固定に長い年月を必要とする。一方、栄養繁殖では、同じ遺伝子型のクローンが増殖されるので、遺伝的固定を必要とせず、交雑や突然変異で作られた優れた形質をもつ個体を即座に品種化できる。1果実あたり種子数の多いトマトでは、種苗は主に種子で繁殖されているが、近年になって栄養繁殖系の品種が普及し、側枝を用いた挿し木や組織培養によって繁殖されるようになってきた。しかし、側枝の利用では得られる挿し穂に限りがあり、それに組織培養を加えるとコストが高くなってしまう。このため、圃場レベルで使える効率のよい新しい繁殖法が求められ、トマト母株の茎切断面からシュートを得る全茎切断法が提案されている。この方法は、側枝挿しより繁殖の効率が高く、組織培養より簡便で、かつ遺伝的分離もみられないなどの利点をもっており、栄養繁殖系品種の基本的な繁殖法の一つとなる可能性が高い。しかし、本法には品種間差異や季節的変動がみられるため、安定的に大量のシュートを得ることが困難である。したがって、本法の実用化には、シュート形成促進を図るとともに、得られるシュート数の品種間差異や季節変動を最小限に抑える必要がある。本研究では、汎用化のモデルとして、新しいシュートを形成させる部位を主茎部に限定して、第1章ではシュート形成の促進法を検討し、第2章ではその作用機作を明らかにし、第3章では得られたシュート形成促進法におけるシュート形成の品種間差異および季節変動の解消を検討し、側枝を含む全ての茎からの大量シュート形成を検証した。

第1章 全茎切断法におけるシュート形成促進法の検討

組織培養では、組織からの脱分化および分化を促進するために植物成長調節物質が用いられる。組織培養と同様に、全茎切断法においても植物成長調節物質を処理するとシュ-

ト形成を促進できると想定される。トマト‘桃太郎’を供試し、培養土を充填した72穴セルトレイにトマトを播種して雨除けハウスで育苗し、5~6葉の本葉が展開した実生苗を第2葉と第3葉の間で切断した。側枝はすべて基部から切除し、主茎のみを調査の対象とした。茎切断当日から1週間ごとに0, 1, 10および100 mg/L ナフタレン酢酸 (NAA) またはベンジルアデニン (BA) 溶液を葉面散布した。NAAでは、濃度にかかわらずカルスが対照よりも早く形成された。しかし、シュート形成数は、1 mg/Lでは対照よりも有意に減少し、10および100 mg/Lでは0本だった。一方、BAでは、対照と比べてカルスおよびシュートの形成に有意な差は認められなかった。

全茎切断法では、シュートを形成させる際に茎を切断するため、茎切断部付近は傷害による酸化ストレスを受けていると考えられる。そこで、抗酸化物質であるアスコルビン酸 (AsA) の処理によって酸化ストレスを軽減させ、シュート形成の促進を図った。茎切断当日から1週間ごとに0, 1, 10, 100および1000 mg/L AsA溶液を葉面散布した。AsAを葉面散布した茎ではカルスは早期に形成されたが、不定芽の形成は対照と同時期に始まった。しかし、採取できるシュート数は、AsAの濃度にかかわらず、対照よりも有意に増加し、100および1000 mg/Lで最大となった。また、AsAの葉面散布は、茎切断部のAsA含有量を増加させるとともに、活性酸素消去系で働くスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) およびカタラーゼ (CAT) の活性を高めた。これに伴い、AsAを葉面散布した茎では、活性酸素の一種である過酸化水素 (H_2O_2) および脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド (MDA) 含有量が減少した。

組織培養では、外植体を黄化させるとシュート形成が促進されることがある。そこで、全茎切断法において切断後の茎を黄化处理してシュート形成を促進させるため、茎切断直後からアルミニウムのキャップを茎切断部に被せた。その結果、茎の切断面が木化せず、対照と比較してカルスは1週間、不定芽は2週間早く形成された。そして、シュート採取数は36本となり、対照の2倍に増加した。AsAと黄化处理による複合処理には、シュート形成促進効果はみられなかった。

第2章 活性酸素消去系およびフェニルプロパノイド代謝からみたシュート形成促進の作用機作

AsAの葉面散布および黄化处理は全茎切断法でのシュート形成を促進した(第1章)。しかし、AsAの葉面散布と黄化处理による相乗効果はなかった。これは、両処理によるシュート形成促進の同じ作用機作を示唆した。この仮説を実証するため、黄化处理による抗酸化作用を検討した。黄化处理は、茎切断部でのAsA含有量を少なくしたが、SOD、APXおよびCATの活性を高めた。黄化处理した茎では、抗酸化酵素の活性化に伴い H_2O_2 やMDA含有量が減少した。

組織培養では、AsA処理も黄化处理もポリフェノール物質の酸化による褐変を抑制している。そこで、それぞれの処理がフェニルプロパノイド代謝に及ぼす影響について検討した。総ポリフェノール含有量は、AsAを葉面散布した茎および黄化处理した茎において対照よりも低い値で推移した。また、黄化处理した茎の総ポリフェノール含有量は茎切断前よりも低い値を維持した。フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性は、AsAを葉面散布した茎および黄化处理した茎において対照よりも低い値で推移し、茎切断前より

も低い値を維持した。一方、ポリフェノールオキシダーゼおよびペルオキシダーゼには、AsA を葉面散布した茎、黄化处理した茎および対照の茎において有意な差はなかった。これらの結果から、AsA の葉面散布および黄化处理によるシュート形成促進効果は、抗酸化酵素の活性の高まりによる活性酸素の消去と脂質過酸化の抑制に起因すると考えられた。また、フェニルプロパノイド代謝系の律速酵素である PAL 活性の抑制に伴う総ポリフェノール含有量の減少を伴うことも明らかになった。

第3章 シュート形成の品種間差異と季節変動の解消ならびに全茎切断法でのシュートの大量増殖

シュート形成促進法である黄化处理によって品種間差異および季節変動を解消できるかを調べた。品種間差異の解消の検討には、小果トマト‘プチ’、大果トマト‘桃太郎’、ファースト系単為結果性トマト‘ラクナ・ファースト’および単為結果性トマト‘ルネッサンス’を供試した。各品種への黄化处理では、シュート採取数はそれぞれの対照の1.4倍以上に増加し、各品種ともに30本以上のシュートが得られた。次に、季節変動の解消の検討にはトマト‘桃太郎’を供試した。季節を異にして茎切断部を黄化处理したところ、いずれの季節でもシュート採取数は対照の2倍以上に増加し、シュートを形成しにくい冬季においては約30倍にも達した。

次に、主茎とすべての側枝を対象としてシュート形成促進法による実証試験を行った。その結果、全茎切断8週後のシュート形成数は、すべての葉位で有意に増加し、1母株あたりのシュート採取数は、対照の78本に対し、黄化处理では299本となり、3.8倍になった。

本研究では、トマト全茎切断法のシュート形成促進法を検討し、NAA および BA はシュート形成をあまり促進せず、AsA の葉面散布および茎切断部の黄化处理はシュート形成を促進することを明らかにした。AsA の葉面散布および茎切断部の黄化处理によるシュート形成の促進は、抗酸化酵素の活性化による活性酸素の減少および PAL 活性の抑制による総ポリフェノール含有量の減少に起因すると推定された。検討した方法は、全茎切断法におけるシュート形成の品種間差異や季節変動を解消し、実際に1母株から約300本ものシュートを得ることができた。改良された全茎切断法は、栄養繁殖系トマト苗の大量・安定生産を可能にすると考えられる。

審査結果の要旨

種苗の大量・安定生産技術は、新品種の育成や普及にあたって重要である。一般に、種苗は種子によって増殖されるが、種子繁殖は品種の遺伝的固定に長い年月を必要とする。一方、栄養繁殖では、同じ遺伝子型のクローンが増殖されるので、遺伝的固定を必要とせず、交雑や突然変異で作られた優れた形質をもつ個体を即座に品種化できる。トマトでは、種苗は主に種子で繁殖されているが、近年になって栄養繁殖系の品種が普及し始めた。しかし、既存の技術では苗の栄養繁殖効率が低いので、普及が制限されてい

る。このため、圃場レベルで使える効率のよい新しい栄養繁殖法が求められていた。

本研究では、トマト母株の切断面からシュートを得る全茎切断法を改良して、大量かつ安定的なシュート形成促進法を開発しようとした。

第1章では、切断による茎の酸化ストレスを軽減するために、抗酸化物質であるアスコルビン酸 (AsA) を葉面散布した。AsA処理では、採取できるシュート数は、その濃度にかかわらず対照よりも有意に増加し、100 および 1000 mg/L で最大となった。また、AsA処理は、茎切断部のAsA含有量を増加させるとともに、活性酸素消去系で働くスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) およびカタラーゼ (CAT) の活性を高めた。これに伴い、活性酸素の一種である過酸化水素 (H_2O_2) および脂質過酸化の指標であるマロンジアルデヒド (MDA) 含有量が減少したことから、酸化ストレスの軽減によってシュート形成が促進されたと考えられた。さらに、シュート形成を促進させるため、茎切断直後からアルミニウムのキャップを茎切断部に被せて黄化させた。その結果、茎の切断面が木化せず、対照と比較してカルスは1週間、不定芽は2週間早く形成された。そして、シュート採取数は36本となり、対照の2倍に増加した。しかし、AsAと黄化の同時処理による相乗効果は認められなかったため、両処理によるシュート形成の促進は同じ作用機作によると考えられた。

第2章では、その作用機作を明らかにするため、黄化处理による抗酸化作用について検討した。黄化处理は、茎切断部でのAsA含有量を少なくしたが、SOD、APXおよびCATの活性を高めた。黄化处理した茎では、抗酸化酵素の活性化に伴い H_2O_2 やMDA含有量が減少した。組織培養では、AsA処理も黄化处理もポリフェノール物質の酸化による褐変を抑制するので、それぞれの処理がフェニルプロパノイド代謝に及ぼす影響を検討した。総ポリフェノール含有量は、AsAを葉面散布した茎および黄化处理した茎において対照よりも低い値で推移した。また、黄化处理した茎の総ポリフェノール含有量は茎切断前よりも低い値を維持した。フェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性は、AsAを葉面散布した茎および黄化处理した茎において対照よりも低い値で推移し、茎切断前よりも低い値を維持した。一方、ポリフェノールオキシダーゼおよびペルオキシダーゼでは、AsAを葉面散布した茎、黄化处理した茎および対照の茎において有意な差は認められなかった。これらの結果から、AsAの葉面散布および黄化处理によるシュート形成促進効果は、抗酸化酵素活性の高まりによる活性酸素の消去と脂質過酸化の抑制に起因すると考えられた。また、フェニルプロパノイド代謝系の律速酵素であるPAL活性の抑制によってポリフェノール含有量が減少することも明らかになった。

第3章では、シュート形成促進法である黄化处理によってシュート採取数の品種間差異および季節変動を解消または抑制できるかを調べた。まず、特性の異なる4品種のトマトを供試してシュート形成の品種間差異を検討した。その結果、シュートの採取数は、黄化处理によってそれぞれの品種で対照の1.4倍以上に増加し、各品種ともに30本以上になった。変動係数も18.5から8.9に減少し、黄化处理は品種間差異を抑制することが明らかになった。次に、季節を異にして茎切断部を黄化处理したところ、いずれの季節でもシュート採取数は対照の2倍以上に増加し、シュートを形成しにくい冬季には約30倍にも達した。変動係数も94.4から31.5に減少し、黄化处理は季節変動を抑制することが明らかになった。次に、主茎とすべての側枝を対象としてシュート形成促進

法による実証試験を行った。その結果、全茎切断 8 週後の 1 母株あたりのシュート採取数は、対照の 78 本に対し、黄化処理では 299 本となり、大量のシュートを得ることが可能となった。

本研究では、全茎切断法におけるシュート形成の品種間差異や季節変動を解消し、実際に 1 母株から約 300 本ものシュートを得る方法を確立した。その知見は、栄養繁殖系トマト苗の大量・安定生産を可能にするものである。これらの成果は、園芸学および植物繁殖学の発展に大きく貢献するものであり、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（応用生命科学）の学位を授与することを適当と認める。