

ふりがな かどた まさのり  
氏名 門田 真典  
学位 博士(農学)  
学位記番号 新大博(農)第20号  
学位授与の日付 平成16年9月30日  
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
博士論文名 Study on Improvement of Micropropagation and Production of Polyploid Plantlets in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* N) by Plant Tissue Culture  
(組織培養によるニホンナシの苗生産の改善と倍数性小植物体作出に関する研究)

論文審査委員 主査 教授 新美 芳二  
副査 教授 児島 清秀  
副査 教授 池田 武  
副査 教授 福山 利範  
副査 助教授 中野 優

## 博士論文の要旨

ニホンナシは我が国で古くから栽培されてきており、近年では東アジア周辺国だけでなく、オセアニア、北アメリカや南アメリカにも導入されている。これらの品種は長年にわたる交雑や枝変わりの選抜によって新品種として栽培されてきているが、新品種育成は長期間を必要とすることから、この点の改善が求められている。この一つ方法として組織培養の利用が考えられるが、この方法を利用した増殖に関する研究は少なく、また育種に関する研究はほとんどない。

本研究は、(1)ニホンナシ(*Pyrus pyrifolia*N.)の微細繁殖法による健全な苗生産を効率的に行う方法の開発、(2)この改善された増殖方法を用いて、育種を進める上で有効である倍数性小植物体の作出を薬培養や培養中のシュート培養にコルヒチン処理を行って試みており、多くの新しい成果を得ている。

### 1. 微細繁殖法の改善

#### (1) 不定芽の増殖

1) '豊水'と'幸水'を材料として、サイトカイニンの種類と濃度が不定芽の増殖および再生個体のガラス化(水浸状化)に及ぼす影響について調査した。

両品種において11  $\mu$ MのBAを添加した培地で多くの不定芽が形成されたが、TDZおよびCPPUを添加した培地ではBAやKINに比べ多くの不定芽が水浸状化した。'幸水'は'豊水'と比べ水浸状化しやすいことを明らかにした。

2) '豊水'を材料として、7種類の糖と3種類の濃度が不定芽の増殖および水浸状化に及ぼす影響について調査した。

不定芽の増殖には60 mMのソルビトールが最適で、他の濃度のソルビトールおよびシュクロースを用いるとは再生した不定芽の多くが水浸状化することを明らかにした。

3) '豊水'を材料として、2種類の固化剤と5種類の濃度の影響について調べた。不定芽を60 mMのソルビトールおよび0.5  $\mu$ MのIBA、11  $\mu$ MのBAを添加した培地に植え付けた。不定芽数は0.4%と

0.6%寒天区、0.3%ゲランガム区で多く形成され、新鮮重は0.4%寒天区でよいが、0.4%および0.6%寒天区、全てのゲランガム区で30%以上の個体が水浸状化することを明らかにした。

#### (2) 木酢液による不定芽の発根促進

'幸水'および'豊水'、'新興'を材料にして木酢液がin vitroでの増殖および発根に及ぼす影響につ

いて調査した。木酢液はナシのせん定で生ずる廃材を用いた。

木酢液はいずれの品種においても不定芽の増殖を抑制したが、発根を促進した。試験管内で増殖した木本性植物のシュートの発根には木酢液の添加が有効であることを初めて明らかにした。

## 2. 薬培養による3倍体苗の作出

ニホンナシ3品種（‘ゴールド二十世紀’、‘幸水’、‘新興’）とセイヨウナシ(*Pyrus communis*L.) 2品種（‘ル レクチェ’、‘ラ フランス’）の薬培養を行った。

カルス形成は5品種全てで起こるが、不定胚形成は品種間で差があり、不定胚は‘ゴールド二十世紀’、‘新興’と‘ル レクチェ’で形成された。しかし、不定胚形成率は0.03~13%と極めて低かったものの、‘新興’では得られた不定胚は不定芽に発達し、2つの不定芽から小植物体の獲得に成功した。それらを本研究の「微細繁殖」で改善した増殖培地に1ヵ月毎に継代することによって増殖し、増殖したシュートを発根させたあと順化した。フローサイトメトリーや染色体数の調査を行ったところ、再生した個体は半数体ではなく、3倍体であった。半数体ではなく3倍体を得られた原因については明らかにしていない。

## 3. コルヒチン処理による4倍体の作出

‘豊水’では *in vitro* でのコルヒチン処理により4倍体の作出に成功した。増殖中の不定芽をSPM培地（「微細繁殖」の研究で改良した培地）に0.1%、0.01%のコルヒチンを添加した培地に移植し、1、2、4、8日間の培養後、SPM培地に継代培養した。コルヒチン処理した個体の倍数性はフローサイトメトリーで調査し、コルヒチン処理した4ヵ月後に4系統の混数体を選抜した。そしてこれらの混数体を5ヶ月間SPM培地で培養し、得られた増殖中の不定芽の倍数性を調査して、4系統の4倍体を選抜した。選抜された植物体は発根し、順化・鉢上げした小植物体の気孔の長さは2倍体のものよりも長く、4倍体植物の特徴を示した。

## 4. 結論

ニホンナシの不定芽の増殖はWP培地に0.5\_M IBA および11 $\mu$  MBA、60 mM ソルビトール、0.8% 寒天を添加した培地が最適であった。発根は0.1% (v/v) の木酢液を培地に添加することによって促進された。この改善された微細繁殖法を用いることによって、‘新興’においては薬培養によってえられた苗から3倍体、‘豊水’においては不定芽のコルヒチン処理により4倍体を作成することにはじめて成功した。

## 審査結果の要旨

### (1) 公開審査

8月23日、13時50分から14時30分まで、発表30分間、質疑応答10分間で、農学部198講義室で行われた。

主な質問事項として、①サイトカイニンの種類による作用効果の違い、②供試したナシの遺伝的類似性と各処理に対する外植体との関係、③薬培養を行った場合、花粉由来の再生個体であれば半数体ができるはずであるが、3倍体植物ができた理由、④木酢液が発根を促進する理由、などがあつた。

これらの質問に対して、本研究成果に基づき的確に答え、まだ明らかになっていない点は解明するための研究計画などを述べた。

### (2) 審査委員会

公開審査終了後、5名の審査委員全員の出席のもとに審査委員会を午後3時から開催した。申請論文の内容、公開審査の発表内容および質疑応答の結果、申請論文に関連して科学雑誌に投稿し、受理された論文の内容、また学力試験の結果等を総合的に検討した。その結果、審査委員会は、本論文は博士（農学）の博士論文として十分である、と認定した。