

学 位 論 文 要 旨

氏 名	水 谷 高 幸
題 目	<p>近縁野生種 <i>Lactuca saligna</i> L.を用いたレタス <i>L. sativa</i> L.の育種に関する基礎的研究 (Fundamental studies on the improvement of lettuce, <i>Lactuca sativa</i> L., using its wild related species, <i>L. saligna</i> L.)</p>
<p>レタス (<i>Lactuca sativa</i> L.) の近縁野生種 <i>L. saligna</i> L.はいくつかの病害抵抗性を有するほか、部分的交雑親和性を持つため、レタスの遺伝子資源として期待されている。しかし、レタスの育種に本種はこれまであまり利用されてこなかった。そこで、本研究ではレタスの育種に <i>L. saligna</i> を用いるため、その有効な遺伝的特性の探索と両種間に生じる遺伝的な障害の解明について研究を行った。</p> <p>レタスと近縁野生種 <i>L. saligna</i> 間での相互交雑を行った結果、<i>L. saligna</i> を種子親に用いたときのみ雑種 (<i>L. saligna</i> × <i>L. sativa</i>) が得られた。そこで、レタスに <i>L. saligna</i> を交配し、未熟胚珠の培養を試みた結果、雑種 (<i>L. sativa</i> × <i>L. saligna</i>) を得たが、この雑種は抽だいするまでに枯死した。また、レタスと <i>L. saligna</i> 間の細胞融合を行い、体細胞雑種 (<i>L. sativa</i> + <i>L. saligna</i>) を得ることに成功した。体細胞雑種の葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析の結果、本研究で得られた体細胞雑種は <i>L. saligna</i> の葉緑体を有していると考えられた。</p> <p><i>L. saligna</i> × <i>L. sativa</i> は自殖で雑種後代 F₂ を得ることができた。F₂ において <i>Got-1</i> 遺伝子の分離比に大きな歪みを観察した。また、F₁ 雑種をレタスに交配したときこの歪みは観察されなかった。すなわち、この歪みの原因はレタスの <i>Got-1</i> 遺伝子座の近傍に <i>L. saligna</i> の細胞質と不調和を起こすレタス由来の劣性の致死遺伝子が存在するためと考えられた。</p> <p><i>L. saligna</i> とレタス間の雑種後代 F₂ は高頻度で三倍体を生じた。これらは、レタスと <i>L. saligna</i> の非還元性で2倍性の配偶子と、半数性の配偶子から形成されたと考えられた。その三倍体は、種子の重さにおいて2つに分けることができ、重たい種子はレタスの遺伝子を多くもち、軽い種子は <i>L. saligna</i> の遺伝子を多くもっていた。これらの三倍体はトリソミック系統や核置換系統の作出に利用できると考えられた。</p> <p><i>L. saligna</i> × <i>L. sativa</i> の四倍体雑種にレタスを戻し交配したとき、瘦果の色に花粉親の影響 (メタキセニア) が現れた。また、二倍体の雑種においても、同様の現象が確認された。この現象は、遺伝分析のための戻し交雑の成否の判別や商業的 F₁ 採種のための種子の選抜マーカーとして利用できると考えられた。</p> <p>種子繁殖性のレタスでは上述の様々な雑種をそのまま維持するためには栄養繁殖技術を必要とする。また、本研究で得られた三倍体は種子を形成しない。そこで、雑種の花茎の節培養を試みた結果、葉芽を得ることに成功し、栄養繁殖で維持することができた。</p> <p>以上の結果から、レタスの育種に近縁野生種 <i>L. saligna</i> を用いた場合に期待される有用な遺伝現象および遺伝的マーカーを明らかにした。</p>	

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Takayuki Mizutani
題 目	Fundamental studies on the improvement of lettuce, <i>Lactuca sativa</i> L., using its wild related species, <i>L. saligna</i> L. (近縁野生種 <i>Lactuca saligna</i> L.を用いたレタス <i>L. sativa</i> L.の育種に関する基礎的研究)

As *Lactuca saligna*, the related wild species of lettuce has some resistance of disease and partial cross-compatibility with lettuce, the species is expected for gene resources of improving lettuce. However *L. saligna* has not been used frequently for breeding of lettuce. In this study, the investigations of available treats and the genetic barrier between two species were carried out.

In the results of reciprocal crossing between lettuce and *L. saligna*, their hybrids were obtained only when *L. saligna* was used as a seed parent. Although, the hybrid between *L. sativa* and *L. saligna* were obtained by ovule culture, the hybrid was dead before anthesis. Somatic hybrids between *L. sativa* and *L. saligna* which were successful produced amphidiploids were seemed to possess only chloroplast DNA originated from *L. saligna*.

In the *Got-1* locus of F₂ progeny between *L. saligna* and *L. sativa*, the large distortion from the normal segregation of Mendel's law were observed. However, the distortion was not observed when F₁ hybrids were pollinated with *L. sativa*. The distortion was caused by the existence of a single recessive lethal gene, *rl-1*, originated in the gene of *L. sativa*. The *rl-1* gene between *L. sativa* and *L. saligna* was tight linked with *Got-1'* gene.

In the F₂ generation between *L. saligna* and *L. sativa* triploids appeared frequently. These triploids were considered to occur by the fusion between non-reduced gamete and normal reduced one and were separated into two groups by the achene weight; heavy seed were supported by mostly isozyme alleles of lettuce. These triploids are expected to produce the trisomic lines or alien cytoplasmic lines of lettuce.

The metaxenic effect on the pericarp color was observed when tetraploid F₂ were pollinated with *L. sativa*. The same phenomenon was observed diploid F₂ hybrids. This finding will enable us to prevent the contamination at the seed stage of commercial F₁ production of lettuce.

The maintenance of the plants such as F₁ hybrid and triploids is a prerequisite in the lettuce breeding. Nodal culture of the flower stalk enabled the breeding line of lettuce.

These results indicate the feasibility of the *L. saligna* as the important genetic resources for the breeding of lettuce.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏 名	水谷 高幸
審査委員	主査 佐賀大学 教授 田代 洋丞
	副査 宮崎大学 教授 山下 研介
	副査 鹿児島大学 教授 衛藤 威臣
	副査 琉球大学 教授 安谷屋 信一
	副査 佐賀大学 助教授 一色司郎
審査協力者	
題 目	<p style="text-align: center;">近縁野生種 <i>Lactuca saligna</i> L.を用いたレタス <i>L. sativa</i> L. の育種に関する基礎的研究 (Fundamental studies on the improvement of lettuce, <i>Lactuca sativa</i> L., using its wild related species, <i>L. saligna</i> L.)</p>
<p>レタス (<i>Lactuca sativa</i> L.) の近縁野生種 <i>L. saligna</i> L.は、いくつかのレタス病害に対する抵抗性を有するほか、部分的交雑親和性を持つため、レタスの遺伝子資源として期待されている。そこで、本研究ではレタスの育種に <i>L. saligna</i> を用いるため、その有効な遺伝的特性と両種間に存在する育種上の障害について研究を行った。研究成果の概要は以下のとおりである。</p> <p>レタスと近縁野生種 <i>L. saligna</i> 間で相互交雑を行った結果、<i>L. saligna</i> を種子親に用いたときのみ雑種 (<i>L. saligna</i> × <i>L. sativa</i>) が得られた。そこで、レタスを種子親に用いて <i>L. saligna</i> を交配して得られた未熟胚珠の培養を試みた結果、雑種 (<i>L. sativa</i> × <i>L. saligna</i>) を得たが、この雑種は抽だいする前に枯死した。</p> <p>レタスと <i>L. saligna</i> 間で細胞融合を行い、体細胞雑種 (<i>L. sativa</i> + <i>L. saligna</i>) を得ることに成功した。これらの体細胞雑種の葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析を行った結果、本研究で得られた体細胞雑種は <i>L. saligna</i> の葉緑体を有していると考えられた。</p>	

雑種 (*L. saligna* × *L. sativa*) の自殖により後代(F₂)を得ることができた。F₂において *Got-1* 遺伝子の分離比に大きな歪みを観察した。また、雑種 (*L. saligna* × *L. sativa*) をレタスに交配したときこの歪みは観察されなかった。この歪みの原因はレタスの *Got-1* 遺伝子座の近傍に *L. saligna* の細胞質と不調和を起こすレタス由来の劣性の致死遺伝子が存在するためと考えられた。

雑種 (*L. saligna* × *L. sativa*) は自殖により高頻度で三倍体を生じた。雑種 (*L. saligna* × *L. sativa*) の減数分裂及び花粉形成の観察結果から、これらの三倍体は、雑種 (*L. saligna* × *L. sativa*) の非還元性で2倍性の配偶子と半数性の配偶子の接合により形成されたと考えられた。これらの三倍体は、種子の重さにおいて二つのグループに分けることができ、重い種子はレタスの遺伝子を多くもち、軽い種子は *L. saligna* の遺伝子を多くもっていた。これらの三倍体はトリソミック系統や核置換系統の作出に利用できると考えられた。

偶発的に得られた四倍体雑種 (*L. saligna* × *L. sativa*) にレタスを戻し交配したとき、得られた瘦果の色に花粉親の影響 (メタキセニア) が現れた。また、二倍体雑種 (*L. saligna* × *L. sativa*) の自殖後代 (F₃, F₄) においても、同様の現象が確認された。この現象は、遺伝分析のための戻し交雑の成否判別や商業的 F₁ 採種のための種子選抜マーカーとして利用できると考えられた。

レタスは開花結実後、株が枯死するため、レタスの育種においては中間母本等の個体維持が困難である。また、本研究で得られた種々の雑種や後代の個体維持も困難であった。これらの個体維持には栄養繁殖を行う必要があるが、挿木や株分等の通常の栄養繁殖技術は有効ではない。そこで、種々の雑種の花茎を用いて組織培養を試みた結果、節からの個体再生に成功するとともに、一つの個体の花茎を用いて交配と栄養繁殖の両方を可能にする方法を確立することができた。

以上のように、本研究は、レタスの育種に近縁野生種 *L. saligna* を用いる場合に有用な遺伝現象および遺伝的マーカーを明らかにするとともに、いくつかの育種上の障害を克服した。本研究で明らかにされた知見は、レタスの将来の育種におおいに役立つと考えられる。

したがって、審査員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

学力確認結果の要旨

学位申請者 氏名	水谷 高幸
審査委員	主査 佐賀大学 教授 田代 洋丞
	副査 宮崎大学 教授 山下 研介
	副査 鹿児島大学 教授 衛藤 威臣
	副査 琉球大学 教授 安谷屋 信一
	副査 佐賀大学 助教授 一色 司郎
審査協力者	
実施年月日	平成 19 年 1 月 6 日
試験方法（該当のものを○で囲むこと。） (口答)・筆答	
<p>主査及び副査は、平成 19 年 1 月 6 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。また、筆答により外国語（英語）の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	水谷 高幸
[質問 1]	レタスにおいてべト病などの抵抗性テスト方法は開発されているのか。
[回答 1]	レタスの主な病害については圃場での抵抗性試験が行われており、べト病などの一部の病害についてはDNAマーカーなども開発されている。しかし、わが国で近年問題となっている軟腐病や根腐病などの土壌病害やビッグベイン病などのウイルス性病害については、今後の研究に期待するところが大きい。
[質問 2]	本研究では三倍体が出現し、これらをたくみに利用しているが、三倍体の出現は最初から期待されていたことか。
[回答 2]	レタスと <i>L. saligna</i> の雑種の稔実率の低さ、減数分裂の異常から三倍体の出現はある程度予測できた。しかし、三倍体の種子の重さ等の特性が明確になるまでは、これらが有効に利用できるかは不明であった。
[質問 3]	三倍体は自殖で種子が取れるのか。
[回答 3]	自殖では種子を得ることができない。しかし、三倍体を種子親としたとき、レタスあるいは <i>L. saligna</i> との交配は可能である。
[質問 4]	レタスの育種において <i>L. saligna</i> の有用性はこれまでどの程度研究されているのか。
[回答 4]	<i>L. saligna</i> は有用ないくつかの病害抵抗性を有することが知られているが、レタスと部分的交雑不和合性を持つため、あまり研究されてこなかった。しかし、遺伝的変異に富むため、有用な遺伝子資源と考えられ、本研究をもとに研究が発展すると期待される。
[質問 5]	種皮の色に花粉親の影響、すなわち、メタキセニアが現れたが、この現象はレタスの種内交配でも現れるのか。
[回答 5]	レタスにも種子の色に黒と白が存在する。しかし、種内交配ではメタキセニアの現象は観察されない。 <i>L. saligna</i> とレタスの交配でのみ観察される。
[質問 6]	メタキセニアは <i>L. saligna</i> の細胞質の影響によるのか。
[回答 6]	<i>L. saligna</i> を種子親とし、レタスを花粉親としたときのみで雑種が得られる。したがって、本研究で用いた材料は、すべて <i>L. saligna</i> の細胞質を持っており、レタスの細胞質を持つ材料で実験が行われていないので、細胞質の影響についてはまだ明確ではない。

[質問7] レタスとして品種‘ブロンズ’を用いた理由は何か。

[回答7] レタスは古くから栽培されてきたため、多くの栽培変種が成立している。本研究に用いた‘ブロンズ’はリーフタイプであり、一般に知られている結球性のクリस्पヘッドタイプのレタスより花が大きい。また、クリस्पヘッドタイプのレタスの花は、葯筒を花卉が包み込むため、人工交配のための除雄が困難である。そこで、本研究では除雄等の交配作業がしやすい‘ブロンズ’を用いた。

[質問8] レタスは自然条件下では初夏の早朝に開花し、自家受粉すると数時間で閉花する性質があるので、交配を中心とした実験は大変だったと思う。交配を容易にするために、ホルモン処理などによって雄性不稔にする方法はないのか。

[回答8] ジベレリン処理によって頭花を雄性不稔にする技術が開発されているが、処理を行うタイミングや雄性配偶子以外に与える影響などを考慮すると、安定的かつ確実な技術ではない。また、レタスの頭花は一日に数花ずつしか咲かない。例えば、株全体の開花期間が1か月以上にも及ぶため、ジベレリン処理をまめに行い、処理した花の開花日を予想しなければならないことなどを考えると、交配日の早朝に開花する花のみを対象として除雄したほうが確実に好結果を得ることができる。

[質問9] 本研究で開発されたレタスの花茎培養法は、種子生産と同時に、その株の維持、三倍体などの種子生産が困難な植物の維持などに有効だと思う。本研究で得られたレタス三倍体の利用などに期待が膨らむが、実際に利用の可能性はどうか。

[回答9] レタスはサラダ用野菜として今日広く用いられている。また、植物工場での生産やカット野菜としての需要が拡大しつつある。植物工場での生産では、生産コスト軽減のため、生育の早いものが望まれる。また、カット野菜としては、大型のものが好まれる。これらに合致する三倍体レタスの活用には大いに期待がもてると考えられる。

[質問10] *L. saligna* はこれまであまり利用されていないので、これからの遺伝子資源として大いに期待できると思う。せつかく、*L. saligna* をレタスの育種素材として手がけたのだから、世界中から変異系統をコレクションするなど今後の発展につなげてほしい。

[回答10] 御指摘のとおり、*L. saligna* は種内に多くの変異を持つので、様々な系統を集め、レタスの育種に貢献していきたいと思う。

[質問11] レタスは栽培の歴史が古く、エジプトの墳墓の壁画に供物として描か

れているが、それはなぜか。

[回答 11] 紀元前 2500 年ごろの古代王国時代の墳墓の壁画に神への供物としてレタスが描かれているが、これはコスレタスであったと考えられている。コスレタスは、ギリシャ時代には医聖・ヒポクラテスによって薬用植物として紹介されている。今日のような葉菜としてではなく、薬草として利用されていたために、壁画に供物として描かれたと考えられる。

[質問 12] レタスの頭花の開花時間はどれぐらいか。

[回答 12] レタスの花は晴天日の早朝から開花を始め、開花と同時に自家受粉が完了し、3~4 時間で閉花する。しかし、*L. saligna* との雑種後代では、一日中開花している系統も得られる。これらは雄性不稔を利用したレタスの F_1 採種に有効な素材となると思われる。

[質問 13] 人工交配では開花調整などが大変であるが、花粉の貯蔵は可能か。

[回答 13] これまでの実験で半年間貯蔵した花粉を用いて交配を行ったことがある。結実率の低下が見られたが、種子が得られたので、ある程度は花粉の貯蔵が可能と考えられる。

[質問 14] レタスでは雄性不稔の研究例や F_1 採種の実用化の例はあるのか。

[回答 14] 今日レタスの育種において最も期待されている技術の一つが F_1 採種である。いくつかの雄性不稔系統が選抜され、研究されてきたが、頭花の開花時間や放花昆虫の問題があり、実用化はされていない。レタスと *L. saligna* の雑種後代のなかの開花時間の長い個体などを利用することが考えられる。