

学位論文要旨	
氏名	フレダ カランブ リンベリア
題目	薬培養技術を用いたパパイヤの育種に関する研究 (Studies on the breeding of papaya using anther culture techniques)
<p>パパイヤ (<i>Carica papaya</i> L.) は、雌性、両性および雄性株の雌雄混株性を示す。パパイヤの育種では、主に両性株および雄株の両性花（雄花から両性花への変化）の自殖による純系育種が行われている。しかし、純系育成までには6～8世代を要する。本研究では、パパイヤの育種効率の向上を目的に、1) 培養薬からの胚誘導条件、2) 育成した幼植物の性型および倍数性の検定、3) 花粉由来植物の形態変異および4) パパイヤの単為結実性およびジベレリン処理による果実肥大促進について調査した。</p> <p>雄型パパイヤの薬培養システムを以下のようにまとめた。第1段階：0.01 mg l⁻¹ CPPU and 0.1 mg l⁻¹ NAA を含む寒天培地上における薬からの胚誘導、第2段階：0.0025 mg l⁻¹ CPPU を含む液体培地における苗条生長促進、第3段階：IBA 処理による発根促進と幼植物体の育成、第4段階：幼植物の馴化。</p> <p>育成した胚由来の幼植物体は、パパイヤ性診断 DNA マーカーを用い、すべて雌型として判定された。また、幼植物体の倍数性をプロイディーアナライザーで分析し、ほとんどすべての系統が3倍体であると推定した。パパイヤの雌性、雄性および両性株の性型遺伝子は、それぞれ mm, M₁m および M₂m として、また、M₁M₁ は致死として推定されている。雄株 (M₁m) の薬からの雌株 (mm) のみの出現は、育成した植物のすべてが小孢子由来であることを示している。また、3倍性植物の出現は、発達段階の進行した小孢子を使用したことによると推察される。</p> <p>育成した3倍性の雌系統の間に多様な形態的変異が観察された。特に、草丈、節間長、果実収量/株、果実重、および果実数/株の変異幅が大きかった。これらの系統の間に少数の矮性型が出現した。また、単為結実性に関する変異幅も大きかった。これらの矮性および単為結実性は、ハウス栽培用品種の育種に重要である。</p> <p>亜熱帯地域において、両性株は季節的に花性の変化が起りやすく、その果実収量は低下した。一方、雌株は両性株より強い単為結果性を示し、雌株の果実収量は、両性株のそれを凌いだ。しかし、単為結実果は受粉果より著しく小さかった。GA 処理は、果実肥大に著しい効果を示し、その処理果実は自然単為結実果および受粉果より明らかに大きかった。したがって、亜熱帯地域におけるパパイヤ生産では、単為結果性の強い雌型品種の育成と GA 処理による果実肥大促進により、高い果実収量を実現できると推察した。</p> <p>本研究で得られた知見をもとに、薬培養技術はパパイヤの雌のみの品種育成に貢献すると結論づけた。しかし、1) 半数体または半数性二倍体の誘導、2) 雌系統の維持・増殖および3) 雌系統の種子生産法については、さらなる研究課題として残された。</p>	

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	Fredah Karambu Rimberia
題 目	Studies on the breeding of papaya using anther culture techniques (薬培養技術を用いたパパイヤの育種に関する研究)
<p>Papaya (<i>Carica papaya</i> L.) cultivars have been bred through the pure-line breeding systems where hermaphrodite or male plants (seasonally change to bisexual flower) are self-pollinated. Such breeding systems require more than six generations to breed pure lines. In this study, to increase the breeding efficiency of papaya, the author investigated 1) embryo induction from cultured anthers, 2) sex and ploidy of plantlets derived from anther culture, 3) morphological variation in plants derived from pollen, and 4) parthenocarpic ability and promotion of fruit swelling by GA treatments. Finally, the author discussed a potential usefulness of anther culture for the breeding of female papaya.</p> <p>In this study, male anthers containing a mixture of about 48.4% uninucleate, 23.3% mitotic, and 28.4% binucleate microspores were used for anther culture, and its culture systems were established as follows: step 1) embryo induction from anthers on the agar medium with 0.01 mg l⁻¹ CPPU and 0.1 mg l⁻¹ NAA; step 2) enhancement of shoot growth in the liquid medium with 0.0025 mg l⁻¹ CPPU; step 3) promotion of rooting by IBA treatments and establishment of plantlets; and step 4) acclimation of plantlets.</p> <p>All the plantlets derived from anther culture were determined as female using papaya DNA diagnostic PCR assay. This finding indicated that all the female plants were originated from microspores ("m" or "M₁"), because sex genes of female, male, and hermaphrodite is hypothesized respectively as "mm", "M₁m", and "M₂m", and the homozygotes of "M₁M₁" are to be lethal. Furthermore, almost all of them were estimated to be triploids by a ploidy analyzer. This is probably due to the use of microspores at advanced developmental stages.</p> <p>Among the triploid female plants, the diverse morphological variations were observed, especially in plant height, internode length, fruit yield per plant, fruit weight, and the number of fruits per plant. Among these plants, a few of dwarf plants were detected. Moreover, the wide range of variations in parthenocarpic ability was also found among the microspore-derived plants. These dwarf and parthenocarpic nature is important for the breeding of cultivars used for greenhouse cultivation.</p> <p>In subtropical regions, the hermaphrodites were liable to change their flower sex and their fruit yield decreased. On the other hand, the females showed stronger parthenocarpic ability than the hermaphrodites and exceeded the hermaphrodites in fruit yield. However, parthenocarpic fruits were obviously smaller than pollinated fruits. GA treatments were greatly effective for the enhancement of fruit swelling, and the treated fruits were significantly bigger than natural parthenocarpic fruits or pollinated fruits. Therefore, in subtropical regions, the breeding of female cultivars with a high parthenocarpic ability and the promotion of fruit swelling by GA treatment will realize a high fruit productivity of papaya.</p> <p>Based on these findings, the author proposes that the anther culture techniques are potentially useful for the breeding of only female papaya. However, further research subjects remain to be investigated, i.e., the induction of haploids or dihaploids, the maintenance and propagation of female cultivars, and an efficient seed production system of females.</p>	

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	フレダ カランブ リンベリア
審査委員	主査 琉球大学 教授 石嶺 行男
	副査 琉球大学 助教授 安谷屋 信一
	副査 鹿児島大学 教授 衛藤 威臣
	副査 宮崎大学 教授 山下 研介
	副査 佐賀大学 助教授 一色 司郎
審査協力者	
題目	Studies on the breeding of papaya using anther culture techniques (薬培養技術を用いたパパイアの育種に関する研究)
<p>パパイヤ (<i>Carica papaya</i> L.) は、雌性、両性および雄性株の雌雄混株性を示す。パパイヤの育種では、主に両性株および雄株の両性花（雄花から両性花への変化）の自殖による純系育種が行われている。しかし、純系育成までには6～8世代を要する。</p> <p>本研究では、パパイヤの育種効率の向上を目的に、1) 培養薬からの胚誘導条件、2) 育成した幼植物の性型および倍数性の検定、3) 花粉由来植物の形態変異および4) パパイヤの単為結果性およびジベレリン (GA) 処理による果実肥大促進について調査した。</p> <p>パパイヤの薬培養システムを以下のようにまとめた。第1段階：0.01 mg l⁻¹ CPPU と 0.1 mg l⁻¹ NAA を含む寒天培地上における薬からの胚誘導、第2段階：0.0025 mg l⁻¹ CPPU を含む液体培地における苗条生長促進、第3段階：IBA 処理による発根促進と幼植物体の育成、第4段階：幼植物の馴化。</p>	

育成した胚由来の幼植物体は、パパイヤ性診断 DNA マーカーを用い、すべて雌型として判定された。また、幼植物体の倍数性をプロイディーアナライザーで分析し、ほとんどすべての系統が3倍体であると推定した。

パパイヤの雌性、雄性および両性株の性型遺伝子は、それぞれ“mm”, “M₁m” および “M₂m” として推定されている。また, “M₁M₁” は致死として推定されている。本研究で確認した雄株葯 (M₁m) からの雌株 (mm) のみの出現は、育成した植物のすべてが小孢子由来であることを示すとともに、優性ホモ接合体 (M₁M₁) の致死性を裏付けるものである。また、3倍性植物の出現は、発達段階の進行した小孢子を使用したことによると推察された。

育成した3倍性の雌系統の間に多様な形態的変異が観察された。特に、草丈、節間長、果実収量/株、果実重、および果実数/株の変異幅が大きかった。これらの系統の間に少数の矮性株が出現した。また、単為結果性に関する変異幅も大きかった。これらの矮性および単為結果性は、ハウス栽培用品種の育種に重要である。

亜熱帯地域において、両性株は季節的に花性の変化が起りやすく、その果実収量は低下した。一方、雌株は両性株より強い単為結果性を示し、雌株の果実収量は、両性株のそれを凌いだ。しかし、単為結果した果実は受粉果より著しく小さかった。GA 処理は、果実肥大に著しい効果を示し、その処理果実は単為結果した果実および受粉果よりも明らかに大きかった。したがって、亜熱帯地域におけるパパイヤ生産では、単為結果性の強い雌型品種の育成と GA 処理による果実肥大促進により、高い果実収量を実現できると推察した。

本研究で得られた知見をもとに、葯培養技術は、亜熱帯地域におけるパパイヤの雌型品種の育成に貢献すると結論づけた。しかし、1) 半数体または半数性二倍体の誘導、2) 雌系統の維持・増殖および3) 雌系統の種子生産法については、さらなる研究課題として残された。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	フレダ・カランプ リンベリア
審査委員	主査 琉球大学 教授 石嶺 行男
	副査 琉球大学 助教授 安谷屋 信一
	副査 鹿児島大学 教授 衛藤 威臣
	副査 宮崎大学 教授 山下 研介
	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18年 1月19日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)	
<input checked="" type="radio"/> 口答 <input type="radio"/> 筆答	
<p>主査及び副査は、平成18年1月19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。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者
氏 名

フレダ カランブ リンベリア

<質疑応答事項>

[質問 1]: 小花当たり葯はいくつありますか? また, 葯培養には幾つの植物体を用いましたか?

[回答 1]: パパイヤの雄花には, 通常, 小花当たり 10 本の葯があります. また, 葯培養には, 7 株の雄植物を用い, それらから無作為に小花を採取しました.

[質問 2]: パパイヤの両性果実と雌果実の間に品質的な差異がありますか?

[回答 2]: この研究では, 両性果実と雌果実の間の品質的な差異を調査しておりません. また, 私が知る限り, これらの果実の間の品質的な差異を検討した報告はないと思います.

[質問 3]: パパイヤの果実肥大に対する GA 処理の効果は, 世界で初めての報告ですか?

[回答 3]: 初めての報告だと思います.

[質問 4]: 葯培養によって育成した植物体のほとんどが 3 倍体となっておりますが, 3 倍体発生のメカニズムについて説明して下さい.

[回答 4]: Sunderland et al. (1974)によれば, 一核期の花粉核が分裂し, 栄養核と生殖核に分裂した後, 生殖核が退化し栄養核のみが体細胞的に分裂すれば半数体となります. また, 栄養核と生殖核が融合し, その細胞が分裂し多細胞化すると半数性二倍体となります. 二核期の花粉で, 生殖核の核内倍加 (endo-reduplication) が起り, それと栄養核が融合すると 3 倍体となります. Sunderland et al. (1974)による *Datura* の場合と同様に, パパイヤの 3 倍体発生に関しても同じような現象が起っていると思います.

[質問 5]: もし, 一核期の花粉を多く含む葯を培養すると半数体の発生率は高まると思いますか?

[回答 5]: この実験で用いた葯には, 一核期, 分裂期および二核期の小胞子がそれぞれ約 48%, 23%および 28%含まれていました. 分裂期にある小胞子は, 恐らく葯培養中に二核になったと思います. その結果として二核期の小胞子の割合は高くなったと思います. もし, 一核期の小胞子を多く含む葯を使用すると, 半数体または半数性二倍体の割合は高くなると思います. この点については, 再度実験を行いたいと考えています.

[質問 6]: 3 倍性の細胞が形成される際の雄核融合を促進する引き金は何ですか?

[回答 6]: 雄核発生に関する報告はたくさんあります. 植物体の生理条件に関連した花粉の質の要因をの除けば, 高温, ホルモン, 小胞子の浸透圧, 小胞子の糖含量など多くの要因の関与が報告されていますが, 3 倍性細胞の形成を促進する引き金についてはよくわかりません.

[質問 7]: この実験では, 雄株から採取した葯を用いていますが, なぜ両性株か

らの薬を使用しなかったのですか？

[回答7]: 両性株の花の性型は季節により両性型から雄型へ, または両性型から雌型へ変化します. 一方, 雄株の花の性型はほとんど変化しません. したがって, 両性株では, 花性の変化に伴い小花内の薬の状態も変化することが予想されたので, 花性の変化のない雄株の薬を用いました.

[質問8]: GA 処理した果実の食味はいかがでしょうか？

[回答8]: この研究では, パパイヤ果実を野菜として利用することを前提に実験を行いました. そのため, GA 処理後の果実は未熟果実の状態で収穫しました. GA 処理果実の食味 (調理後の食味) は, 未処理の未熟果実のそれと大差ないように思われます.

[質問9]: パパイヤの性判別の際の PCR で, 性判別 primers とともに papain gene の primers を用いていますが, 性判別 primers だけでも良いのではないのでしょうか？

[回答9]: Papain gene に対する primers は無くてもいいです. その primers は internal control として入れました. Internal control としての primers によって, PCR が正常に行われているかがわかります.