



Title	Micropropagation and transformation of jojoba (Simmondsia chinensis (Link.) Schneider), a unique oil-bearing plant
Author(s)	Mohammed, Ismail
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/59612
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name	(Ismail Ahmed Mohammed)
Title	Micropropagation and transformation of jojoba (<i>Simmondsia chinensis</i> (Link.) Schneider), a unique oil-bearing plant (ユニークな油料植物ホホバ [<i>Simmondsia chinensis</i> (Link.) Schneider] のマイクロプロパゲーションと形質転換)
Abstract of Thesis	
Chapter 1: General introduction	
Jojoba [<i>Simmondsia chinensis</i> (Link.) Schneider] is an oil crop that has received much attention in recent years for its valuable oil. It is a dioecious plant species, and only female plants can produce seeds containing the jojoba oil. Jojoba can be propagated through seeds or vegetative methods such as air-layering, grafting, and stem cuttings. Seed propagation results in high genetic heterogeneity and male-biased population, leading to unpredictable and usually low yield. To avoid this, several vegetative propagation methods have been used for jojoba, but they cannot provide sufficient number of elite plants for a large-scale propagation, and also are season dependent. Micropropagation is a good alternative to the conventional vegetative propagation methods. Plants can be regenerated by direct organogenesis from explants or indirect organogenesis from undifferentiated callus cells. It produces a huge number of homogenous superior with conservation of space and time. Therefore, establishment of an efficient micropropagation method of elite jojoba genotypes is necessary. Fluctuation of jojoba production is severely affected by the lack of elite jojoba genotypes and also the damage caused by frost. It does not have any programmed breeding for its improvement. Genetic transformation is the best way for jojoba improvement, but it has not been established yet. Thus, establishment of jojoba genetic transformation is required.	
Chapter 2: High-frequency shoot regeneration of jojoba	
Results of this chapter represent the first report of shoot regeneration using combinations of 6-benzyladenine (BA) and thidiazuron (TDZ) from nodal segments of jojoba. Supplementing TDZ to regeneration media increased the rate of sprouting buds as well as number of shoots per	

explant. For root induction from the shoots, indole-3-butyric acid (IBA) was effective to increase the root number. On the other hand, we have induced the callus from mature jojoba leaves using 2,4- dichlorophenoxyacetic acid alone or with BA or TDZ, but the callus failed to differentiate into shoots in all conditions examined. These results suggested that shoot regeneration using combinations of BA and TDZ from nodal segments is suitable for a large-scale propagation, genetic transformation and conservation of elite jojoba cultivars. They would promote the jojoba cultivation in arid and semi-arid subtropical areas, where cultivation of other useful crops is difficult and effective usage of the land is desired, and could contribute to stimulating the economy of the areas, leading to raise income of farmers.

Chapter 3: *Agrobacterium*-mediated transformation of jojoba

In this chapter, we introduced a foreign gene into jojoba via *Agrobacterium*-mediated transformation, and demonstrated that regeneration of multiple shoots from nodal segment could be an efficient tool for the jojoba genetic transformation. Sonication and shaking of jojoba explants showed no significant effects on transformation efficiency, but had a negative effect on shoot regeneration. Shoots with transgenic cells would be selected by 30 mg L⁻¹ of hygromycin. Results of this study will provide the way to generate transgenic jojoba plants. Establishment of the transformation method in jojoba should facilitate improvement of this unique oil crop via generating transgenic plants with genes of biological or agricultural interest.

Chapter 4: General discussion

We established an efficient micropropagation method of jojoba, and also succeeded to transform jojoba by *Agrobacterium*. Shoot regeneration by using TDZ in combination with BA from nodal segments of jojoba was more effective than previous methods, and it would be so far the best protocol for micropropagation of jojoba. Jojoba cells were transformed by using *Agrobacterium*, and shoots containing stably-transformed cells were regenerated from nodal segments. This would lead to establish the genetic transformation method of jojoba, and would contribute to the jojoba improvement, especially to extend the cultivation area and for stable production of the jojoba oil.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Ismail Ahmed Mohammed)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教 授	村中 俊哉
	副 査	教 授	渡邊 肇
	副 査	教 授	藤山 和仁
	副 査	教 授	福崎 英一郎
	副 査	教 授	紀ノ岡 正博
	副 査	教 授	大政 健史
	副 査	教 授	仁平 卓也
	副 査	教 授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

ホホバ [*Simmondsia chinensis* (Link.) Schneider] は、価値の高いユニークな油「ホホバ油」を産することで近年注目を集めている、乾燥ストレスに強い油料作物である。雌雄異株であり、そのうち雌株のみがホホバ油を含む種子を産することができる。ホホバは種子繁殖、あるいは高取り法、接ぎ木、挿し木といった栄養繁殖で増殖させることができる。しかし、種子繁殖を行なった場合、雄株に偏った遺伝的に多様な集団となり、多くの場合収量が下がってしまう。これを避けるために前述の栄養繁殖の手法が使われてきたが、繁殖の季節が限定されるなどの理由で大規模増殖のために十分な数の優良苗を供給することができていない。マイクロプロパゲーションは、それら従来の栄養繁殖法に代わる優れた方法である。本手法には、植物片より直接植物体を再分化させる方法と、未分化のカルスを経て間接的に植物体を再分化させる方法がある。それらによって多数の優れたクローンを少ない場所と時間で作り出すことができる。そのため、ホホバ優良株の効率的なマイクロプロパゲーション法の確立は必須である。一方、ホホバ油の生産は、優良株の不足のほか、霜害で大きく被害を受けている。遺伝子組換えは、ホホバに霜害耐性を付与するなどの従来の育種では難しい改良を行なう最もよい方法であるが、ホホバではその手法はまだ確立されていない。その確立もまた、ホホバ油の生産拡大には必要である。

このような背景に基づき学位申請者は、植物ホルモン6-benzyladenine (BA) とthidiazuron (TDZ) の組み合わせをホホバの茎の切片からのシュート再分化の培地に用いている。TDZの使用はホホバにおいて最初の試みである。その結果、再分化培地へのTDZの添加量を上げると切片当りの再分化シュートの数が増大することを見出している。そのシュート数は以前の他の植物ホルモンの組み合わせを用いた場合の報告を越えるものである。シュートからの発根についてもindole-3-butyric acid (IBA) が発根数の増大に効果を持つことを示している。一方、成葉から誘導したカルスからのシュート再分化は植物ホルモンの諸条件を検討したが成功していない。これらの結果は、ホホバにおいては茎の切片からのBAとTDZを組み合わせた培地での直接的再分化が大量増殖、形質転換、系統保存に適しており、カルスからの再分化は適していないことを示す。この手法は、他の作物に適さない亜熱帯の乾燥地や半乾燥地で乾燥に強いホホバの栽培を促進し、その地域の土地の有効利用、経済発展、農民の収入上昇に寄与しうるものである。

学位申請者はまた、アグロバクテリウムを用いた外来遺伝子（GUSマーカー遺伝子）のホホバへの導入を行い、前述の、茎の切片からのシュートの再分化がホホバの形質転換の効果的な方法であることを示している。再分化シュートにおける形質転換細胞の存在は、組織化学的染色とRT-PCRによって示されている。染色の結果はまた、再分化シュートは形質転換細胞と非形質転換細胞とのキメラであることを示す。さらに学位申請者は、植物片に超音波処理や震とう処理を試み、それらがシュートの分化効率を減少させることを示しているほか、形質転換細胞を含むシュートを選抜するための条件検討を行い、30 mg/Lのハイグロマイシンを含む培地で選抜できることを示している。この結果は、キメラシュートから完全な形質転換体を得ることがハイグロマイシンを含む培地で再分化を繰り返すことによって可能になることを示唆する。これらの結果はホホバ細胞の形質転換の最初の報告であり、ホホバの組換え体を作るための重要なステップである。

以上のように、本論文はホホバのこれまでで最も効率的なマイクロプロパゲーションの手法を示すとともに、その手法を利用して、ホホバの形質転換に最初に成功したことを述べている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。