

学位論文題名

園芸作物組織の超低温保存に関する基礎的研究

学位論文内容の要旨

本論文は、園芸作物の品種、系統（遺伝資源）を長期間に亘って保存維持するための有効な方法として、植物組織の超低温凍結保存技術を確立するための基礎的研究を行ったもので、内容の概要は以下のとおりである。

1. 茎頂培養による個体再生系の確立と培養特性：リンゴ、ナシ、オウトウ、ハスカップ及びブルーベリーの5種の果樹について、茎頂からシュートを形成させるための条件について検討した結果、リンゴ、ナシ、オウトウ及びハスカップでは培養基中に $BA 10^{-6} \sim 10^{-5} M$ を添加することが有効であり、ブルーベリーのシュート増殖には $2iP$ の添加が適していることが明らかになった。また、オウトウ及びハスカップの茎頂培養では、茎頂の生存及びシュート形成に培地基本成分の濃度が大きな影響を及ぼしていたが、適濃度は各作物において異なっていた。次に、リンゴ及びナシ茎頂の初代培養開始時期について検討したところ、茎頂のシュート形成能は7月及び冬期間に高く、冬季の茎頂は凍結保存の材料に適していることが明らかとなった。ブルーベリーでは、初代培養において茎頂からシュートを形成させることが極めて難しいが、僅かに形成された培養体シュートを用いて、効率的なシュートの増殖に成功した。ハスカップ及びブルーベリーの培養シュート基部を、IBA 高濃度溶液（ $100mg/1$ 程度）に浸漬後、培養土へ挿し木することにより良好な発根が得られた。これらの結果をもとに、各作物の茎頂から植物体を再生させることが可能であることを実証した。

2. 液体窒素凍結・融解後における茎頂の生存と植物体再生：茎頂から植物体を再生させるための培養条件が明らかになったため、液体窒素中で凍結し、融解した茎頂からの植物体再生について検討した。まず、冬季に野外から採取したリンゴ、ナシ、オウトウ及びハスカップの茎頂から液体窒素凍結・融解・培養後に再生植物体を得ることに成功した。この場合、凍結媒液中に8～10%のDMSOを添加すると生存率が高まった。また、ナシ茎頂の液体窒素凍結・融解後の生存率には品種間差が認められ、‘フレミッシュ・ビューティ’、‘身不知’及び‘長十郎’で高く、‘バートレット’及び‘ブランデーワイン’で低かった。凍結処理後の植物体再生率はハスカッ

ブで極めて高く他の作物では低かった。そこで、液体窒素凍結・融解後のリンゴ茎頂を Thidiazuron (TDZ) を加えた培養基を用いて培養したところ、植物体再生率を向上させることに成功した。次に、培養体組織について検討した結果、アスパラガス培養体節部切片は DMSO 8～16% を含む凍結媒液を用いて予備凍結を行うことにより、液体窒素凍結・融解後に高い生存率 (70～80%) を示したが、ハスカップ及びブルーベリーの培養体節部切片では生存個体がほとんど得られなかった。

3. 茎頂の耐凍性と超低温凍結生存性：野外の茎頂の属性である‘耐凍性’と人為的な前処理・凍結・融解操作に伴って茎頂が示す‘凍結生存性’との間には、平行関係が認められた。すなわち、リンゴ及びナシ茎頂の凍結生存性には、耐凍性の変動に伴う季節的変動が認められ、凍結生存性は夏季に低く冬季に高いことが実証された。この場合、リンゴはナシに比べて凍結生存性の高い期間が長く、ナシ茎頂の凍結生存性の変動には品種間差のあることが明らかになった。また、冬季の茎頂のもっている高い凍結生存性は、リンゴでは切り枝を 0℃ で低温保存することにより 8 か月間保持されることが立証された。これにより耐凍性の高い植物材料をほぼ周年入手することができ、関連研究の効率及び凍結保存技術の実用性の向上が可能となった。

4. 凍結生存性の制御：凍結・融解の操作に先立ち、植物材料の凍結生存性を人為的に高める方法について検討した。ブルーベリー及びハスカップ培養体シュートの凍結生存性は、ハードニング (0℃, 1～2 週間) により高まった。また、ハスカップ培養体節部切片の凍結生存性は、前培養 (DMSO 5%, スクロース 0.4M を含む培地で 2 日間) により高くなることを明らかにした。次に、アスパラガス小側枝茎頂の凍結生存性に及ぼす前培養においては、培地中の糖が組織の凍結生存性を高めること並びに至適糖濃度は、グルコースの場合 0.4M であることを明らかにした。また、前培養培地中の DMSO は凍結生存性を低下させるので添加しないほうがよいことがわかった。

5. 凍結生存性の相違と内生成分：野外から採取したナシ及びハスカップ茎頂の内生成分の季節的変動を調べた結果、含水率は夏季に高いが冬季に低くなり、糖及び遊離アミノ酸含量は夏季に低く冬季に高いことが明らかになった。また、アスパラガス培養体シュートの節部組織及び節間部組織中の内生成分について調べた結果、糖及び遊離アミノ酸含量は凍結生存性の高い節部において高く、凍結生存性の低い節間部において低いこと並びに含水率は、僅かに節間部が高いことが実証された。したがって、凍結生存性の高い組織は、含水率が低く可溶性成分の濃度が高いことが明らかになった。次に、アスパラガス小側枝茎頂及びハスカップ培養体節部切片を用いて、前培養に伴う組織内成分の変動を調査した結果、前培養後の組織は培地中の糖を吸収し組織・細

胞内の水を排出していることが示唆された。この場合、糖含量及び含水率から推定した前培養後のアスパラガス茎頂の浸透価が、前培養培養基に添加した糖濃度から推定した浸透価とほぼ一致したことから、前培養は植物組織内の浸透価を高めることにより組織の凍結生存性を高めているものと推測される。

6. 植物組織の構造と凍結生存性：夏季と冬季に採取したナシ茎頂の構造を比較すると、冬季の茎頂は夏季の茎頂に比べて液胞が小胞化し、PLB (protein-lipid body, タンパク質及び脂肪を含む顆粒) の蓄積が多く、緻密な構造を有していた。これは、冬季の茎頂の含水率が夏季に比べて低いことを裏付けていた。次に、液体窒素凍結・融解後の組織を観察した結果、リング茎頂では頂端分裂組織及び葉原基の一部に細胞内凍結により死滅した細胞集塊を見出すことができた。リング茎頂の凍結・融解後の生存率が高い場合でも植物体再生率が低い理由は、凍結・融解過程で生じたこれらの一部の細胞の死によって、茎頂が組織としての機能を失ったことによるものと推測される。また、アスパラガス培養体節部組織では、液体窒素凍結・融解後に生存するのは腋芽のドーム状組織及び擬葉の一部の細胞で、これらは緻密な細胞で構成されていた。特に、ドームを構成する細胞は小さく細胞質で満たされており、液胞は未発達であった。アスパラガス培養体節部組織が高い凍結生存性を有し、液体窒素凍結・融解後の植物体再生率も高い理由は、ドーム状組織が完全に生き残るためであると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 鍬 利 郎

副 査 教 授 筒 井 澄

副 査 教 授 匂 坂 勝之助

副 査 助教授 原 田 隆

本論文は、表22、図75、引用文献136を含む総ページ数252の和文論文であり、7章に分けて論述されている。別に参考論文7編が添えられている。

本研究は、園芸作物の品種、系統（遺伝資源）を保存維持するための有効な方法として、植物組織の超低温凍結保存技術を確立するための基礎について行ったもので、成果の概要は以下のとおりである。

1. 茎頂培養による個体再生系の確立と培養特性：リンゴ、ナシ、オウトウ、ハスカップおよびブルーベリーの5種の果樹について、野外から採取した茎頂から *in vitro* でシュートを形成させ、効率的にシュートを増殖し、発根を促す条件を明らかにした。また、これらの結果をもとに、各作物の茎頂から植物体を再生させることが可能であることを実証した。次に、リンゴおよびナシ茎頂のシュート形成能は7月及び冬期間に高く、冬季の茎頂は凍結保存の材料に適していることを明らかにした。

2. 液体窒素凍結・融解後における茎頂の生存と植物体再生：冬季に野外から採取したリンゴ、ナシ、オウトウ及びハスカップの茎頂から液体窒素凍結・融解・培養後に再生植物体を得ることに成功した。この場合の植物体再生率はハスカップで高く他の作物では低かったが、リンゴでは Thidiazuron (TDZ) を加えた培養基を用いて凍結・融解後の茎頂を培養することにより、植物体再生率を向上させることに成功した。次に、培養体組織について検討した結果、アスパラガス培養体節部切片は液体窒素凍結・融解後に高い生存率及び植物体再生率を示したが、ハスカップ及びブルーベリーでは生存個体がほとんど得られなかった。

3. 茎頂の耐凍性と超低温凍結生存性：野外の茎頂の属性である‘耐凍性’と人為的な前処理・凍結・融解操作に伴って茎頂が示す‘凍結生存性’との間には、平行関係が認められた。すなわち、リンゴ及びナシ茎頂の凍結生存性には、耐凍性の変動に伴う季節的変動が認められ、凍結生存性は夏季に低く冬季に高いことが実証された。この場合、リンゴはナシに比べ凍結生存性の高い期間が長く、ナシ茎頂の凍結生存性の変動には品種間差のあることが明らかになった。また、冬季のリンゴ茎頂がもつ高い凍結生存性は、切り枝を0℃で低温保存することにより8か月間保持されることを立証した。

4. 凍結生存性の制御：ブルーベリー及びハスカップ培養体シュートの凍結生存性は、ハードニングにより高まること、並びにハスカップ培養体節部切片及びアスパラガス若茎小側枝茎頂の凍結生存性は、前培養により高まることを明らかにした。この場合、アスパラガス茎頂の前培養においては、培養基中の糖が組織の凍結生存性を高めること並びに至適糖濃度は、グルコースの場合0.4Mであることを明らかにした。

5. 凍結生存性の相違と内生成分：野外のナシ及びハスカップ茎頂の含水率は夏季に高く冬季に低いこと、並びに糖及び遊離アミノ酸量は夏季に低く冬季に高いことが明らかになった。また、アスパラガス培養体シュートのうち凍結生存性が高い節部組織は、凍結生存性が低い節間部組織に比べて糖及び遊離アミノ酸含量が高く、含水率が低いことを実証した。次に、前培養に伴う組織内成分の変動を調査した結果、前培養後の組織は培地中の糖を吸収し水を排出していた。アス

パラガスでは前培養後の茎頂の浸透価が、前培養培養基に添加した糖の浸透価とほぼ一致したことから、前培養は植物組織内の浸透価を高めることにより組織の凍結生存性を高めているものと推測される。

6. 植物組織の構造と凍結生存性：凍結生存性が高い冬季のナシ茎頂は凍結生存性が低い夏季の茎頂に比べて液胞が小胞化し、物質の蓄積が多く認められ、緻密な構造を有していた。次に、冬季に野外から採取し液体窒素凍結・融解・培養したリング茎頂を観察したところ、頂端分裂組織及び葉原基の一部が細胞内凍結により死滅していた。凍結・融解後のリング茎頂の植物体再生率が低い理由は、これらの一部の細胞の死によって、茎頂が組織としての機能を失ったことによるものと推測される。また、アスパラガス培養体節部組織は液体窒素凍結・融解後に高い植物体再生率を示すが、これは緻密な細胞で構成される腋芽のドーム状組織が、凍結・融解後もほぼ完全に生き残るためであると考えられる。

以上のように本研究は、数種園芸作物において凍結保存技術開発の可能性を実証したばかりでなく、その実用化を図る上での基礎的知見を明らかにしたことは高く評価される。

よって審査員一同は、別に行った学力認定試験の結果と併せて、本論文の提出者、鈴木 卓は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。