

学 位 論 文 題 名

マタタビ属野生果樹の利用に関する基礎的研究
—組織培養法による増殖、耐凍性調査および組織凍結保存—
学位論文内容の要旨

マタタビ属果樹の栽培化，栽培地域の拡大および品種改良の際の基礎的要件である

1. 組織培養系の作出，2. 栄養繁殖に応用できる大量増殖法の確立，3. 耐凍性と被覆保護による凍害防止，4. 優良形質を有する個体を遺伝資源として保存するための組織凍結保存法の作出などについて検討した．概要は以下の通りである．

1. 組織培養系の作出

カルス形成は，サルナシ（成熟葉を除く），マタタビおよびミヤママタタビのすべての外植片において認められた．本研究で用いた野生マタタビ属果樹の各種組織を培養した場合の植物体再生経路について概括的にみると，サルナシでは，新梢節間部切片からシュートが形成されたが，ミヤママタタビでは，新梢節間部切片，葉柄切片，培養体の根切片および培養体の葉から誘導されたカルスにおいて不定芽が形成され，これが発育してシュートになった．また，野生ミヤママタタビの新梢組織由来カルスを継代培養して増殖させたカルスおよび葉柄切片に形成されたカルスから多芽体が形成された．次に，培養体の根切片からはカルスを経由せずに直接的に不定芽が形成され，これからシュートが伸長した．マタタビでは，葉柄切片およびその継代培養によって得られたカルスからシュートが形成された．サルナシ，マタタビおよびミヤママタタビのシュートを基部から切り取り，NAA $1\ \mu\text{M}$ を添加した培地に移植して培養すると発根し，完全な幼植物となった．このほか，培養体の根切片および葉を培養すると，不定胚が形成され幼植物となった．本研究で用いた野生のマタタビ属果樹3種の中では，ミヤママタタビの形態形成能が最も大きいと考えられる．

生長調節物質の影響については，ミヤママタタビの新梢節間部切片および葉柄切片ならびにマタタビ葉柄切片を用いた場合には，シュート形成が生長調節物質の種類および濃度により制御され，CPPU濃度が高くなるに従って，シュート形成率が高く

なるとともに切片当りシュート数が増加した。また、IBAの至適濃度は $0.01\ \mu\text{M}$ であり、 $0.01\ \mu\text{M}$ 以上の場合には、その濃度の上昇に伴いシュート形成が抑制された。このIBAの抑制作用はCPPUの濃度によって異なり、CPPUの濃度が低い場合は大きくなり、CPPUの濃度が高い場合には、小さくなるかまたは消失した。

ミヤマタタビの培養体の根切片および葉を培養した場合には、器官形成または不定胚形成のいずれが誘起されるかは2,4-Dとゼアチンとの濃度比によって異なり、2,4-D濃度がゼアチンのそれより高いときには大量の根が形成され、逆に、ゼアチン濃度が2,4-Dのそれより高い区ではシュートまたは多芽体が形成された。一方、2,4-D 1および $10\ \mu\text{M}$ とゼアチン 1および $10\ \mu\text{M}$ との組み合わせ添加区においては、不定胚形成が認められた。根、シュートおよび不定胚のいずれが形成されるかは2,4-Dとゼアチンとの濃度比によって決定されることが明らかになった。

2. 茎頂培養法による大量増殖

茎頂培養法は組織培養による果樹の増殖法の一つとして非常に重要であるが、多くの果樹では増殖率が低い。本研究では、マタタビ属果樹の増殖率を向上させるため、黄化培養を試みた。その結果、初回の培養で形成されたシュートを黄化し、この節部切片を取って、暗黒下で培養（黄化培養）すると、形成される黄化シュートが長くなり、移植できる側芽数が増加し、側芽増殖率が高くなった。また、単位培養期間を短縮することにより、全培養期間内に増殖できる側芽の数が多くなった。全増殖期間(D)内に増殖できる側芽数(N) $N=b^{D \cdot r/e}$ (b:一つの側芽から増殖した移植・培養可能な側芽数, r:増殖率)で表され、単位培養期間内に形成される移植・培養の可能な側芽数(b)が $b=e$ のときには、最大増殖数 $N_{\max}=e^{D \cdot r/e}$ となり、この時の単位培養期間 $p=e/r$ である。全増殖期間内の増殖数(N)と単位培養期間(p)との関係は $N=(r \cdot p)^{D/p}$ で表される。以上の理論式により、増殖率 r が不変とすれば、移植できる節数が e (2.718) に等しい場合、すなわち、1個の側芽から伸長したシュートが約3個の移植できる側芽をもったときを、節部切り出し・移植の時期として培養を繰り返すと、年間最大の増殖数が得られることが明らかになった。また、黄化培養で得られたシュートを発根培地に移植すると発根して幼植物になった。

3. 耐凍性ならびに被覆保護による凍害防止

耐凍性の季節的变化についてみると、サルナシおよびマタタビの耐凍性は11月以降に徐々に高くなり、1月下旬から2月末まで最も高かった。3月以降は、気温の上昇に

伴い、耐凍性が次第に弱くなった。サルナシおよびマタタビは耐凍性が強く、約 -33°C の低温に耐え、両者の間に差はみられなかった。しかし、本研究で用いたキウイフルーツの2品種は、サルナシおよびマタタビに比べて、耐凍性が顕著に弱かった。サルナシおよびマタタビは耐凍性の向上を目標とする育種においては利用価値が高いことが明らかになった。

冬季には、保護被覆下の樹体近傍温度の変化は気温のそれより少なかった。“わらむしろ”被覆区では、樹体近傍温度が11月から積雪前の12月10日までは、 $-2^{\circ}\text{C}\sim 11^{\circ}\text{C}$ の間で変動し、積雪期間内は $0^{\circ}\text{C}\sim 1^{\circ}\text{C}$ の間で変動したが、融雪後の3月15日から4月末までの間は $-2^{\circ}\text{C}\sim 15^{\circ}\text{C}$ の間で変動した。わらむしろ+土被覆区の温度は、 0°C 以上であり、変動幅は“わらむしろ”被覆区より小さかった。各種被覆条件下の凍害についてみると、サルナシの場合には、無被覆区と被覆区との間には差が認められなかった。キウイフルーツの場合には、凍害発生率は無被覆区で100%と最も高かったが、土被覆区では最も低く、成熟した枝は凍害を被ることなく越冬した。このことから、北海道中央地域では、冬季間樹体を土で被覆すれば、耐凍性の弱い早生の品種でも、栽培できることが明らかになった。

4. 遺伝資源としての組織凍結保存

サルナシ培養体シュート側芽の凍結生存性について検討したところ、糖、アルコールまたはアミノ酸を添加したMiller培地で2日間前培養したのち、グリセリンを含む凍結媒液で処理すると、 -25°C で凍結した場合でも生存個体を得られ、前培養の効果がわずかながら認められた。しかし、サルナシ培養体シュートを、ABA $10\ \mu\text{M}$ を添加した培地に移植し、 5°C で4週間低温処理したのちさらに 0°C で2週間低温処理すると、 -40°C まで緩速冷却した場合においても生存個体を得られ、低温処理の効果が大きかった。低温馴化した側芽を、DMSO 15%とグリセリン 8 Mまたは11.5 Mとを組み合わせ添加した凍結媒液中に60分間浸漬し、次に -30°C まで緩慢に冷却したのち液体窒素(-196°C)に浸漬し、2時間静置したのち急速融解して培養すると、50%の生存率を得られ、凍結・融解後の側芽からシュートが形成され、発根して植物が得られた。

以上のように、本研究で得られた成果は、マタタビ属果樹の栽培化を含めた有効利用を図る際の重要な基礎となるとともに、その利用の促進に寄与するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 田 隆
副 査 教 授 喜久田 嘉 郎
副 査 教 授 吉 田 静 夫

学 位 論 文 題 名

マタタビ属野生果樹の利用に関する基礎的研究 —組織培養法による増殖、耐凍性調査および組織凍結保存—

本論文は、緒言、本論5章、摘要、引用文献86、図46、表29を含む156頁の和文論文で、別に参考論文12編が添えられている。

マタタビ属野生果樹であるサルナシ、マタタビ、ミヤママタタビは、果実の味、香気、肉質が同属のキウイフルーツより優れており、その栽培化、栽培地域の拡大、新品種の作出などによる利用の促進が期待されている。この場合、栽培化には組織培養法などによる優良株の大量増殖が必要であり、栽培地域の拡大には耐凍性の把握、人為的保護による凍害防止などが重要であるほか、新たな優良品種作出に応用できる組織培養系の確立ならびに凍結保存などによる遺伝資源の確実な維持・保存が必要となる。本研究は未利用植物資源の活用を目的として、マタタビ属野生果樹を取り上げ、これらの点について検討したもので、内容は次のように要約される。

1. 組織培養系の作出

マタタビ属野生果樹の組織培養における外植片の種類および培地中の生長調節物質と器官分化および植物体形成との関連について検討し、植物体形成が可能な培養系を作出した。すなわち、シュートは、サルナシでは新梢節間部切片から形成され、ミヤママタタビでは、新梢節間部切片、葉柄切片、培養体の根切片および葉から形成され、また、マタタビでは、葉柄切片から形成された。このようなシュートを基部から切り取り、NAA $1\mu\text{M}$ を添加した培地に移植すると発根し、植物体になることがわかった。さらに、培養体の葉および根切片を培養すると、シュートまたは不定胚を形成し植物体となることを明らかにした。本研究で用いた野生のマタタビ属果樹3種の中では、ミヤママタタビの形態形成能が最も大きいことがわかった。

一方、生長調節物質の影響について検討しており、ミヤマタタビの培養体の根切片および葉を培養した場合、2,4-D 濃度がゼアチンのそれより高いときには根が形成され、逆に、ゼアチン濃度が2,4-Dのそれより高いときシュートが形成された。また、2,4-D 1 および 10 μ M とゼアチン 1 および 10 μ M との組み合わせ添加区においては、不定胚が形成された。このことから、根、シュートおよび不定胚のいずれが形成されるかは 2,4-D とゼアチンの濃度比によって決定されることが明らかになった。

2. 茎頂培養法による大量増殖

果樹の増殖法の一つとして茎頂培養法が用いられているが、多くの果樹では増殖率が低い状況にある。本研究では、マタタビ属果樹の増殖率を向上させるため、茎頂を用いた黄化培養を試み、大量増殖が可能であることを実証した。すなわち、初回の培養で形成されたシュートを黄化し、この節部切片を取って、暗黒下で培養（黄化培養）すると、長い黄化シュートが形成され、移植できる側芽数が増加し、側芽増殖率が高くなった。また、単位培養期間を短縮して培養を繰り返すと一定培養期間内に増殖できる側芽の数が多くなること、すなわち、1 個の側芽から伸長したシュートが約 3 個の移植できる側芽をもったときに側芽移植の適切な時期であることを明らかにした。また、この側芽の培養によって得たシュートを発根させることにより、効率よく植物体を得られることがわかった。

3. 耐凍性調査ならびに被覆保護による凍害防止

北海道中央地域の山野に自生しているサルナシおよびマタタビでは、耐凍性がキウイフルーツのそれに比べて高く、 -33°C の低温に耐えること、ならびに、季節的にみると、耐凍性は 11 月以降に徐々に高くなり、1 月下旬から 2 月末まで高い状態で推移し、3 月以降は、気温の上昇に伴い次第に低くなることが明らかになった。

一方、栽培圃場においては、冬季に樹体を地表面に降ろし保護被覆を行うことにより、凍害発生が少なくなり、耐凍性が比較的低いものでも栽培が可能であること、ならびに、この場合、わらむしろと土による被覆が効果的であることを明らかにした。耐凍性が比較的高いサルナシでは、山野に自生しているものに発生しやすい枝先の凍害もみられず、マタタビ属果樹の中では比較的温暖な気候を好むキウイフルーツにおいても、成熟した枝は凍害を被ることなく越冬することがわかった。

4. 遺伝資源保存のための組織凍結保存

サルナシ培養体のシュート側芽の液体窒素中での凍結保存が可能であることを明らかに

した。すなわち、ABA 10 μ M を添加した培地に培養体シュートを移植し、5°C で 4 週間さらに 0°C で 2 週間の低温処理を行った後、低温馴化した側芽を切り取り、DMSO 15% とグリセリン 8 M または 11.5 M とを組み合わせて添加した凍結媒液中に 60 分間浸漬し、次に -30°C まで緩慢に冷却したのち液体窒素 (-196°C) 中で凍結保存すると、融解後の側芽を培養することにより植物体を得られることを実証した。

以上のように、本研究は、これまで把握されていなかったマタタビ属野生果樹の諸特性を明らかにし、新たな知見を加えるとともに、それらの利用を促進する技術的基礎を提起したもので、未利用植物資源の一つであるマタタビ属野生果樹の利用促進に寄与するものと考えられる。

よって、審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者 劉 永立は博士(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。