

学位論文題名

クロミノウゲイスカグラ栽培化の基礎としての低温遭遇に伴う樹体成分の変化ならびに耐凍性の変動に関する研究

学位論文内容の要旨

クロミノウゲイスカグラ (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) の栽培化、栽培地域の拡大、品種改良などを図る際の基礎となる知見を得ることを目的として、耐凍性の変動および内生物質の変化について検討した。内容の概要は以下のとおりである。

1. 生育地域と耐凍性

北海道内各地で生育しているクロミノウゲイスカグラの耐凍性と、その地域の気象特性について調査した。耐凍性は、10月下旬から12月下旬にかけて高くなり、翌年2月下旬には、生育地域による差が認められた。積雪深の小さい地域では、耐凍性が高いまま維持されていたのに対し、積雪深の大きい地域では低くなったことから、クロミノウゲイスカグラの耐凍性は、その地域の気温と積雪量に関連しているものと考えられる。つぎに、凍害発生状況について組織学的に観察したところ、11月上旬の材料では、 $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結させると、芽の基部および皮層の一部において凍結傷害が発生したが、12月下旬では、 $-40^{\circ}\text{C}$ 凍結においても全ての組織が生存していた。さらに、3月上旬には $-30^{\circ}\text{C}$ 凍結で大部分の組織で発生した。耐凍性は、腋芽では、頂端分裂組織および葉原基で高く、芽の基部で低かった。また、茎では、維管束形成層および表皮直下の組織で皮層よりも高かったことから、耐凍性には、組織による差異のあることが明らかになった。

2. 野外茎頂の耐凍性の変化

再生法により、野外茎頂の耐凍性を評価したところ、8月から11月にかけて徐々に高まり、冬季に極めて高い状態を維持したのち、春季に急速に低下することがわかった。また、耐凍性が高い時期(10月~翌年3月)の茎頂は、超低温( $-196^{\circ}\text{C}$ )で凍結した場合にも生存したが、耐凍性が低くなる時期(4月)のものは生存できないことが判明した。つぎに、TTC還元法によって評価したところ、茎頂の耐凍性は、茎のそれよりも、早い時期に強くなり、冬季間の耐凍性の強い時期には、茎頂と茎との間に耐凍性の顕著な差異はみられなかったが、冬季から春季にかけての耐凍性が弱くなる時期には、茎頂の耐凍性が、茎のそれに比べ、遅くまで高い状態を維持していることがわかった。

3. 野外クロミノウゲイスカグラ茎頂における含水率および内生物質の変化

野外茎頂の含水率は、5月から6月にかけての耐凍性が弱い時期には高く、耐凍性が強い10月~翌年3月には、他の時期のそれと比べて低く推移することが明らかになった。可溶性糖質について調べたところ、総含量およびスクロース含量は、8月から翌年1月まで漸増し、その後減少して、4月から6月にかけて低い値で推移し、フルクトースおよびグルコース含量は、季節を問わず少ない状態にあり、変動の幅も小さかったが、ラフィ

ノースおよびスタキオースの含量は、10月から増加し、11月から翌年3月まで高い値を維持した。遊離アミノ酸の総含量、トレオニン、セリンおよびプロリンの含量は、春季に増加したが、その他の時期にはそれほど変化しなかった。このことから、耐凍性増大に関与する要因としては、組織内における含水率の低下、糖含量の増加、糖濃度の増大および糖組成の変化などが考えられ、特に、糖の中でもラフィノースおよびスタキオースの含量の増減が密接に関連していると推測される。

#### 4. *In vitro* 実験系によるクロミノウグイスカグラ耐凍性の検証

培養植物体の節部切片、節間部切片およびカルスを用いて、低温馴化処理および脱馴化処理を行い、温度処理に伴う耐凍性の変動について検討した。低温馴化期間中の耐凍性の変化についてみると、処理期間が長くなるにつれて増大し、処理開始12日後以降に最も高くなりその状態を維持したが、低温馴化処理を行わない場合では、耐凍性は低く推移することがわかった。低温馴化処理を14日間行った場合の耐凍性についてみると、いずれの材料においても $-5^{\circ}\text{C}$ ~ $-7^{\circ}\text{C}$ の凍結後にも高い生存性を示し、無低温馴化処理区においては、 $0^{\circ}\text{C}$ 以上の冷却温度域では高い生存性を示したが、 $0^{\circ}\text{C}$ より低い冷却温度域では急に生存性が低下することが明らかになった。

つぎに、脱馴化期間中の生存性の変化についてみると、節部切片および節間部切片では、処理開始2日後から8日後にかけて徐々に低下し、カルスでは、処理2日後に著しく低下した。また、いずれの材料においても、処理開始8日後~12日後には、予め低温馴化処理を行わず脱馴化処理も行わない区（無処理区）のものと同程度となった。また、脱馴化していない場合（無脱馴化処理区）は、低温馴化処理により高くなった生存性を維持していることがわかった。脱馴化処理を8日間行った節部および節間部切片の耐凍性についてみると、 $0^{\circ}\text{C}$ 以下の温度域では冷却温度の低下に従って生存性が急激に低下し、無低温馴化処理区の傾向と類似していたが、無脱馴化処理区の材料では、 $-5^{\circ}\text{C}$ ~ $-9^{\circ}\text{C}$ の冷却温度域で比較的高い生存性を示すことが明らかになった。また、この傾向は4日間の脱馴化処理を行ったカルスにおいても同じであった。

組織学的観察を行ったところ、低温馴化した培養植物体の芽においては、茎頂部およびその周辺の葉原基、ならびに茎においては、維管束形成層および表皮直下の組織の生存性の高いことが確認され、カルスでは、低温馴化処理を行うと、組織全体の細胞が生存することがわかった。

#### 5. クロミノウグイスカグラ培養植物体における内生物質の変動

可溶性糖質の総含量についてみたところ、節部切片および節間部切片においては、低温馴化処理開始8日後には、ラフィノースが少量検出され、処理12日後から顕著に増加したのち、20日後まで増加し続けた。また、カルスにおいては、可溶性糖質の総含量およびスクロース含量は低温馴化処理期間が長くなるに従って増加し、ラフィノースは処理開始12日後から20日後にかけて蓄積した。遊離アミノ酸の総含量およびアミノ酸の組成についてみると、いずれの材料においても、低温馴化処理の前後において顕著に変化しないことがわかった。低温馴化処理したカルスから抽出したタンパク質には、等電点5.4、分子質量42kDaのスポットが認められた。

脱馴化に伴う可溶性糖質の変化についてみると、脱馴化処理開始8日後における節部切片および節間部切片では、総含量およびスクロース含量がやや減少し、ラフィノースは、脱馴化処理によって検出不可能な量にまで減少し、脱馴化処理4日間のカルスでは、フルクトース、グルコースおよびスクロースの含量が減少し、それに伴い可溶性糖質の総含量が減少した。また、ラフィノースは、脱馴化処理後には検出されなかった。遊離

アミノ酸の総含量は、いずれの材料においても、脱馴化処理後に顕著な変化を示さなかったが、脱馴化したカルスから得たタンパク質（42kDa）が減少することがわかった。このことから、節部切片、節間部切片およびカルスの低温馴化および脱馴化過程はラフィノースに関連があり、カルスにおいては、さらに、タンパク質に関連があることが示唆された。

以上のように、本研究において得られた成果は、クロミノウグイスカグラの耐凍性の発現および消失に関する基礎的知見を提起するとともに、栽培化および品種育成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 千 葉 誠 哉  
副 査 助 教 授 増 田 清  
副 査 助 教 授 藤 川 清 三 (北海道大学地球環境科学研究科)

## 学位論文題名

### クロミノウゲイスカグラ栽培化の基礎としての低温遭遇に伴う樹体成分の変化ならびに耐凍性の変動に関する研究

本論文は、緒言、本論6章、摘要、引用文献99、図53、表15を含む151頁の和文論文で、別に参考論文3編が添えられている。

野生の小果樹として珍重されているクロミノウゲイスカグラ (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) の栽培化、栽培地域の拡大、品種改良などを図る際の基礎として重要な耐凍性について調べるとともに、その変動と内性物質の変化との関連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. 秋冬季における耐凍性の変化と凍害発生部位

組織観察により調べ、耐凍性は、10月下旬から12月下旬にかけて高くなることがわかった。11月上旬に採取した枝では、 $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結させると、芽の基部および皮層の一部で凍結傷害が発生したが、12月下旬のものでは、耐凍性が高くなり、 $-40^{\circ}\text{C}$ でも全ての組織が生存していた。3月下旬には耐凍性が低下し始め、 $-30^{\circ}\text{C}$ で大部分の組織で凍害が発生した。耐凍性は、腋芽についてみると、頂端分裂組織および葉原基で高く、基部では低かった。また、茎についてみると、維管束形成層および表皮直下の組織で皮層よりも高かったことから、部位により凍害発生が異なることがわかった。一方、実際の栽培面からみると、積雪により凍害が軽減される場合もあった。

#### 2. 培養再生法およびTTC還元法による茎頂耐凍性の評価

再生培養法により野外茎頂の耐凍性を調べたところ、8月下旬から11月にかけて徐々に高くなり、冬季に高い状態を維持したのち、春季に急速に低下することが明らかになった。また、耐凍性が高い時期(10月～翌年3月)の茎頂は、超低温( $-196^{\circ}\text{C}$ )で凍結した場合にも生存したが、耐凍性が低くなる時期(4月)のものは生存できないことが判明した。

つぎに、TTC還元法により調べたところ、茎頂の耐凍性は、茎のそれよりも、早い時期から強くなることがわかった。また、耐凍性の強い冬季には、両者の間に顕著な差はみられなかったが、冬季から春季にかけて耐凍性が弱くなる過程では、茎頂の耐凍性のほう

が、莖のそれより遅くまで高い値を維持していた。

### 3. 野外の莖頂における含水率および内生物質の変化

野外莖頂の含水率は、耐凍性が弱い5月から6月には高く、耐凍性が強くなる10月～翌年3月には、低い状態で推移することがわかった。可溶性糖質についてみると、総含量およびスクロース含量は、8月から翌年1月まで徐々に増加し、その後減少して、4月から6月にかけて低い値で推移した。フルクトースおよびグルコース含量は、季節によらず少ない状態にあり、変動の幅も小さかったが、ラフィノースおよびスタキオースの含量は、10月から増加し、11月から翌年3月まで高い値を維持した。一方、遊離アミノ酸の総含量、トレオニン、セリンおよびプロリンの含量は、春季に増加したが、その他の時期にはほとんど変化しなかった。

これらのことから、クロミノウゲイスカグラの耐凍性増大には、含水率の低下、糖含量の増加、糖組成の変化などが関与しており、特に、糖の中でもラフィノースおよびスタキオース含量の増減が密接に関連していることが示唆された。

### 4. *In vitro*実験系による耐凍性の検証

培養幼植物体に低温馴化処理を行うと、処理期間が長くなるにつれて耐凍性は増大し、12日後に最も高くなり、その後は同じ状態を維持した。一方、脱馴化処理を行うと、耐凍性は、節部切片および節間部切片では、処理開始2日後から8日後にかけて徐々に低下し、カルスでは、2日後に著しく低下した。

また、これらの場合における組織の状態について観察したところ、低温馴化した培養幼植物体の芽においては、生長点部およびその周辺の葉原基の生存性が高く、莖においては、維管束形成層と表皮直下の組織の生存性が高いことを確認した。

### 5. 培養体における内生物質の変動

培養幼植物の低温馴化に伴う可溶性糖質の変化についてみると、総含量は顕著な変化を示さなかったが、低温馴化処理開始8日後にラフィノースが検出され、12日後から顕著に増加し、20日後まで増加し続けた。また、遊離アミノ酸の総含量および組成は、低温処理の前後において顕著な変化を示さなかったが、低温馴化処理したカルスから抽出したタンパク質には、等電点5.4で分子量42kDaのスポットが認められた。

一方、脱馴化処理を行った場合についてみると、8日後には、節部および節間部切片の可溶性糖の総含量、スクロース含量がやや減少し、ラフィノースは検出不可能な量まで減少した。また、カルスでは、4日後にフルクトース、グルコースおよびスクロースならびに可溶性糖の総含量が減少し、ラフィノースも検出されなかった。また、遊離アミノ酸の総含量は、いずれの材料においても脱馴化処理によって顕著な変化を示さなかったが、脱馴化したカルスでは、タンパク質（42kDa）が減少することを確認した。

以上のように、本研究において得られた成果は、クロミノウゲイスカグラの耐凍性に関する基礎的知見を提起するとともに、栽培化および品種育成に役立つものとして高く評価される。

よって、審査員一同は、今西弘幸が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。