

氏 名(本籍) た ざわ かつ じ
 田 澤 一 二

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 6 9 5 号

学位授与年月日 平 成 17 年 4 月 14 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 ユリ科の雌雄異株野菜における種苗の大量増殖方法に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 金 浜 耕 基
 (副 査) 教 授 三 枝 正 彦
 教 授 西 尾 剛

論文内容要旨

はじめに

ユリ科の雌雄異株野菜であるシオデ (*Smilax oldhami* Miq.) とアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は、食味・風味が類似しており、シオデは「山のアスパラガス」、「山菜の王様」等と称されている。園芸作物の中で雌雄異株野菜は多くはなく、シオデとアスパラガスのほかに、ホウレンソウとゼンマイなどが一例としてあげられる。これらの雌雄異株野菜において収量向上を目的とした品種改良の方法として、ホウレンソウでは雑種強勢の利用が一般的に行われており、アスパラガスでも雑種強勢の利用が行われつつある。さらに、アスパラガスでは多収のための戦略として、3倍体品種の育成、雌雄同体性雄性および葯培養を利用した全雄品種の育成なども行われている。

山菜のゼンマイとシオデは種苗生産がされないで収穫されていることから山菜資源の枯渇に晒されている。すなわち、ゼンマイは採取・食用の対象が雌株に限られているため、里山では採取が困難な山菜となりつつある。シオデは前述のようにアスパラガスと同じユリ科野菜であるが、アスパラガスのように発達した多肉質の根茎を有しないため(第1図)、1年に複数回および継続して毎年同じ株から若茎を地際から収穫することが不可能である。すなわち、シオデは根茎の分化と発達が不十分であるため、若茎の裏折収穫と言う方法で翌年の収穫に必要な同化産物を生産・蓄積する栄養体を残存させた収穫方法が必要であることから、山菜としての収穫量は少ない。

そこで本研究では、雌株の乱獲採取によって資源枯渇に晒されているゼンマイと同様に、乱獲採取と低い再生力のため資源枯渇に晒されているシオデを供試して、組織培養による大量増殖方法を開発しようとした。また、シオデと同じユリ科野菜のアスパラガスでは、収量増加の戦略の一つとして、多収であるものの発芽率が低いため種苗の生産効率が低い3倍体品種を供試して、種子の発芽率を向上させる方法を開発しようとした。

第1章. シオデの組織培養苗増殖方法と薬培養の方法.

本章ではまず初めに、実生繁殖では、播種から収穫まで長年月を必要とする山菜のシオデの種苗を組織培養により短期間に大量に増殖する方法を開発しようとした。次いで薬培養により半数体を育成して遺伝子分析の素材とすることを目的に、薬培養の方法を開発しようとした。

第1節. シオデの組織培養苗増殖方法.

目 的

シオデの実生繁殖の場合、播種後地上に出芽するまでに2回越冬する必要がある。しかし、硬実種子であるため自然条件下では地上に出芽するまでにより長い年月を経ていると推察される。出芽後、収穫が可能な植物体に成長するまでには、更に5～6年が必要である。以上のように、シオデの実生繁殖は、時間的、労力的に必ずしも効率的な繁殖方法であるとは言えない。

そこで本節では、組織培養によってシオデの種苗を大量に増殖する方法を開発することとした。

材料および方法

シオデの若い節間茎を自生地および移植圃場から採取し、組織培養の外植体とした。採取した節間茎は、70%エタノールおよびアンチホルミン（有効塩素濃度1%）で滅菌後、滅菌処理により損傷した両端を切断して約2cmに調整した。調整した節間茎を固形MS (Murashige and Skoog, 1962) 培地に置床してプロトコーム様体 (Protocorm-like body, 以下 PLB と略称) を誘導し、PLB から塊状体 (PLB クラスタ) を増殖した。次いで、固形MS 培地上の PLB クラスタから PLB を切り出し、液体MS 培地に移植して振盪培養した (第1次増殖と称する)。更に、第1次増殖で増殖した PLB クラス

ターから 15 週後に PLB を切り出して、再度液体 MS 培地に移植して振盪培養を行った（第 2 次増殖と称する）。

結果および考察

はじめに、無菌的に、高効率で培養可能な節間節位を特定することを目的として、節間節位数とホルモン濃度と反復数の組み合わせ処理区を設けて培養したところ、培養瓶約 300 個全ての処理区でバクテリアが繁殖したので培養を継続することができなかった。その原因として、発達した維管束部の導管にバクテリアが侵入していたものと考えられた。そこで、維管束部の未発達な節間茎を培養したところ、培養に適する節間節位は、維管束が未発達で、バクテリアが導管に侵入していないとみられる茎の上端に近い若い節間茎であることが明らかとなった（データ省略）。したがって、その後は若い節間茎を固形 MS 培地に置床して培養することにした（第 2 図 A）。継代培養を経て、約 90 日後に、固形 MS 培地で誘導した PLB クラスターから PLB を切り出して液体 MS 培地に移植し（第 2 図 B）、振盪培養により PLB（クラスター）の第 1 次増殖を行ったところ、PLB クラスター数と PLB クラスター生体重はスムーズに増加した（第 3 図）。第 1 次増殖における振盪培養では、培養開始とともに培養液の pH の低下（第 4 図）と褐変化がおこった。そのため、培養液の pH の低下と褐変化に対する方策としてシステムインを添加した処理区と培養液の更新を行う処理区を設けたところ、培養液の更新処理区の方が効果的であった（データ省略）。そこで、第 1 次増殖では培養開始後 6 週まで培養液の交換を 2～3 日の間隔で行い、それ以降は 1 週間の間隔で更新することとした。

第 1 次増殖開始後 15 週に形成・増殖した PLB クラスターから PLB を切り出し、新たな液体 MS 培地に移植して、PLB（クラスター）の第 2 次増殖を行った。その結果、第 2 次増殖では、培養液の pH の低下と褐変化が第 1 次増殖に比較して小さかった。ま

た、第1次増殖と比較して、PLB クラスター数が著しく増加して (第5図)、 PLB クラスター内の PLB に不定芽が分化した (第6図)。第2次増殖において PLB に不定芽が分化したのは、 PLB が液体 MS 培地に適応したこと、培養開始後 15 週が不定芽分化の時期に相当することなどによるものと推察されたが、今後の研究課題として残された。分化した不定芽をホルモン・フリーの固形 MS 培地に移植した結果、高頻度で根を分化し (第1表)、容易に順化した (第7図)。

本節の結果、枯渇が懸念されるシオデの山菜資源としての保存と、シオデの栽培における育苗期間の短縮が可能となった。すなわち、実生繁殖の場合に比較して、組織培養による種苗生産から収穫までの期間を約 8 年から約 4 年と 1/2 に短縮することが可能と推察された。ただし、収穫までの年数が短縮された場合でも、若茎発生のための養分を貯蔵する根茎が未発達であるため継続して毎年同じ株から収穫することが不可能であることから、収穫年の異なる複数の圃場でのローテーション栽培が必要である。

第2節. シオデの薬培養の方法.

目 的

シオデは雌雄異株野菜であるため、実生苗を植えた圃場においては異型接合体の個体からなる集団を形成する。シオデと同じ雌雄異株野菜であるアスパラガスでは、倍加半数体を供試して、特定遺伝子の染色体における座乗の同定が行われている。さらに、準同質系の集団が育成されれば、Quantitative trait loci (QTL) 解析などに供試することが可能である。また、倍加半数体から有用な遺伝子型を有する個体を選抜することも可能となる。そこで本節では、薬培養により、シオデの半数体植物を育成することとした。

材料および方法

シオデは散形花序でたくさんの小花を着生することと、小花も適度な大きさである

(第8図) ことから、蕾の採取が容易である。そこで第1節の場合と同様に、自生地および移植圃場から 2.5～3.0mm の蕾を採取し、組織培養の外植体とした。他の植物での知見に基づき、半数体の植物体再生率を高めることを目的として、蕾に 5℃で 1、3、7 および 10 日間の低温処理を行った(第2表)。低温処理後、蕾を定法によって滅菌した後、薬を取り出し、固形 MS 培地に置床した。

結果および考察

固形 MS 培地に置床した薬の内部からカルスと PLB が分化した(第9図A)。これらの PLB を切り出して固形 MS 培地に置床して PLB を増殖した(第9図B)。次いで、固形 MS 培地における PLB クラスターから PLB を切り出して液体 MS 培地に移植し、振盪培養によって PLB (クラスター) の増殖を行った(第9図C)。液体 MS 培地で振盪培養して増殖した PLB クラスターから PLB を切り出してホルモン・フリーの固形 MS 培地に移植したところ、PLB に不定芽が分化した(第9図D)。固形 MS 培地において増殖した PLB クラスターから PLB を切り出してホルモン・フリーの固形 MS 培地に移植しても、PLB に不定芽が分化した(第9図D)。薬培養の場合も、第1節の場合と同様に、PLB (クラスター) の増殖は、固形 MS 培地よりも液体 MS 培地において速かった(データ省略)。ホルモン・フリーの固形 MS 培地に移植した PLB からの不定芽形成と植物体再分化に及ぼす低温処理の影響は、5℃、3 日間の処理区で高かった(第2表)。

本節の結果、他の作物で行われている薬培養の方法に準じて培養すると、シオデにおいても半数体の育成が可能であった。今後の課題として、再分化個体の半数体の確認と、倍加半数体の育成およびその中からの有用系統の選抜が残っている。また、アスパラガスで行われている倍加半数体植物を用いた特定または有用遺伝子分析と同じ方法を用いれば、シオデにおいても倍加半数体を育成することができる可能性が示唆された。

第2章. 3倍体アスパラガスの発芽率向上方法.

雌雄異株野菜であるアスパラガスは、若茎収穫の場合、雌株に比較して、果実を着生しない雄株の収量が高い。しかし、アスパラガスの実生集団の性比は約 1:1 であることから、実生栽培すると雄株の高い収量は雌株の低い収量によって相殺される。そのため、アスパラガスで組織培養による雄株だけの種苗の大量増殖が考えられている。そのほかに、アスパラガスの収量を向上させるための戦略として、雑種強勢の利用、果実を着生しない3倍体品種の育成（ヒロシマ・グリーン）、および実生繁殖性全雄品種の育成（ポロネーズ）が行われている。しかし、実生繁殖性全雄品種ポロネーズの種子は保証発芽率が80%と高いものの、種子は50gで4万円程度と高価である。3倍体品種のヒロシマ・グリーンは種子の価格が2倍体品種（メリー・ワシントン500W、保証発芽率70%）とほぼ同等であるが、通常栽培における発芽率は約40%と低い。このような理由で、アスパラガスの3倍体品種および全雄品種は一般には栽培に利用されていない。

そこで本章では、種子の価格が比較的安価な3倍体品種の低い発芽率の原因を解析し、発芽率を高めて3倍体品種を実際の栽培に利用可能となる方法を開発しようとした。

第1節. リンゴ酸脱水素酵素のアイソザイム分析.

目 的

植物の発芽、生育、結実には、酵素活性が密接に関係している。発芽は、貯蔵物質を分解し、新たな器官形成を行う過程であるため、とくに呼吸系の酵素活性に注目する必要がある。

そこで本節では、呼吸系に関与している酵素のうち、リンゴ酸からトリカルボン酸回路の出発物質となっているオキザロ酢酸を生成する酵素であるL-リンゴ酸脱水素酵素（以下 MDH と略称）に注目し、アスパラガスの2倍体品種、3倍体品種、および全雄

品種を用いて MDH のアイソザイムバンドパターンと、いずれかのバンドが欠失した個体の発現頻度を発現様式と表して調べた。MDH の比較として、基質非特異的酵素として知られているエステラーゼ (以下 EST と略称) と酸性ホスファターゼ (以下 ACP と略称) についてアイソザイムバンドパターンと発現様式についても調べた。

材料および方法

材料には、2倍体品種 (メリー・ワシントン 500W)、2倍体品種のメリー・ワシントン 500W をコルヒチンで倍加して育成された4倍体品種のセト・グリーンにメリー・ワシントン 500W を交配して育成された3倍体品種 (ヒロシマ・グリーン)、および全雄品種 (ポロネーズ) の 2000 年度産種子を供試した。種子は、滅菌後シャーレに濾紙を敷いて播種し、25°C で発芽させた。発芽初期段階のアイソザイム分析には、種子から 1cm の幼芽が発生した生育段階の種子を供試した。

生育の進んだ段階のアイソザイム分析には、2倍体品種 (メリー・ワシントン 500W) および3倍体品種 (ヒロシマ・グリーン) の第 12 葉が最新展開葉となった生育段階の第 10 葉～第 12 葉を供試した。

アイソザイム分析は等電点電気泳動法で行った。等電点電気泳動は、O'Farrell (1975) の方法に準じて作成した溶液を用い、定法に従って行った。

結果および考察

発芽初期段階における MDH のアイソザイムバンドパターンと、いずれかのバンドが欠失した個体の発現頻度を発現様式と表して第 10 図と第 11 図に示した。2倍体品種において、MDH のアイソザイムバンドの欠失個体は極く少なかった。しかし、3倍体品種において、MDH の 2 本のアイソザイムバンド (F と G) は発現していなかった。また、MDH の他の 2 本のアイソザイムバンド (E と H) も多くの個体で発現しない傾向がみられた。全雄品種においても、MDH の 2 本のアイソザイム・バンド (F と G)

は、多くの個体で発現しない傾向がみられた。 EST および ACP に関しては、供試した 3 品種間でアイソザイムバンドパターン、発現様式に一定の傾向はみられなかった(データ省略)。

生育の進んだ段階における MDH のアイソザイムバンドパターンと、いずれかのバンドが欠失した個体の発現頻度を発現様式と表して第 1 2 図と第 1 3 図に示した。3 倍体品種において、MDH アイソザイムバンドの G と H を発現しない個体がやや多かったものの、2 倍体品種と 3 倍体品種間でアイソザイムバンドパターン、発現様式に一定の傾向はみられなかった。したがって、3 倍体品種の種子の発芽率を向上させる方法の一つとして、MDH の基質前処理の効果を調べる必要があると考えられた。

第 2 節. リンゴ酸脱水素酵素の基質前処理による種子の発芽率向上方法.

目 的

本節では、アイソザイム分析の結果に基づき、アスパラガスの 3 倍体品種の発芽率向上を目的としてリンゴ酸脱水素酵素の基質前処理を行った。なお、前節において EST と ACP は、3 品種間でアイソザイムバンドの発現に一定の傾向がみられなかったので、本節では基質特異性が認められた MDH に注目して実験を行った。

材料および方法

発芽処理時に MDH の基質として 0.3%リンゴ酸ナトリウム溶液を 3、5 および 7 日間吸収させる前処理を行った。次に、発芽処理時にリンゴ酸ナトリウムの 0.3、0.8 および 1.0%溶液を 3 日間吸収させる前処理を行った。前処理終了後は純水で発芽させた。

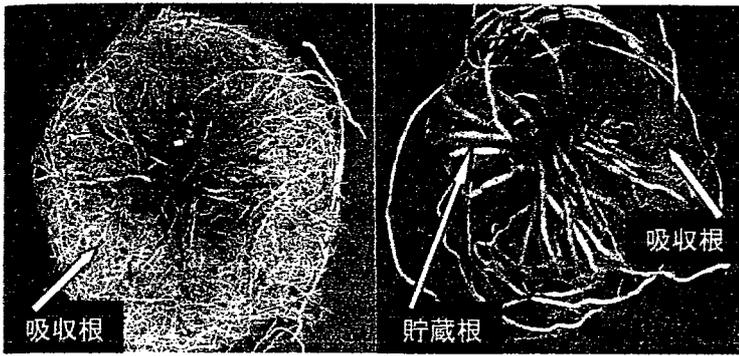
結果および考察

3倍体品種の発芽率は、0.3%リンゴ酸ナトリウム溶液による3日間の前処理が最も高いものとみられた(第14図)。3日間より長い期間の前処理では、時間の経過とともに幼植物が枯死した。リンゴ酸ナトリウム3日間前処理の場合、0.3%で発芽率が最も高く、全雄品種の発芽率とほぼ同じに高まった(第15図)。0.3%より高濃度の場合も、時間の経過とともに幼植物が枯死した。発芽勢は、3倍体品種が全雄品種よりも高い傾向を示した。

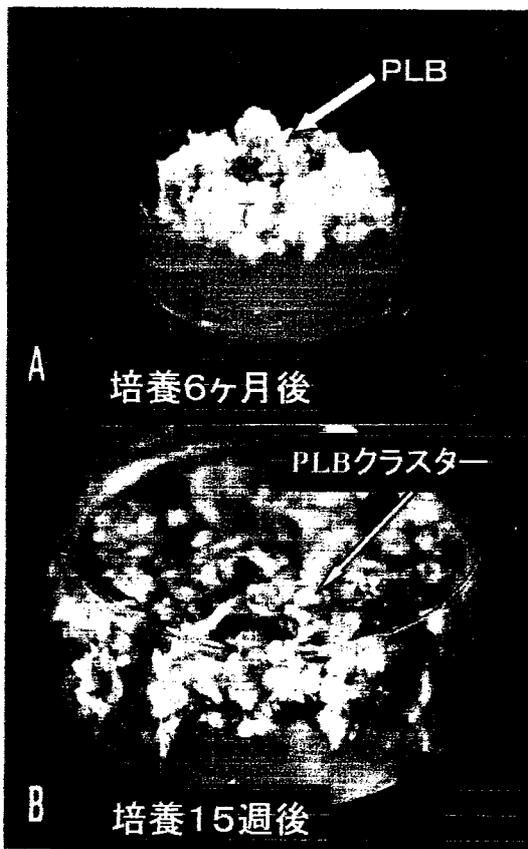
本節の結果、MDHの基質として、0.3%のリンゴ酸ナトリウム溶液で3日間前処理することにより、アスパラガスの3倍体品種の発芽率を2倍体品種の発芽率の保証水準(70%)に高めることができた。なお、本節において、MDHの基質で前処理しても、3倍体品種は2倍体品種に比較して発芽率が低かった。このことから、MDHの活性とともに、他の遺伝的・生理的要因も3倍体品種の発芽率に関係していると考えられた。

まとめ

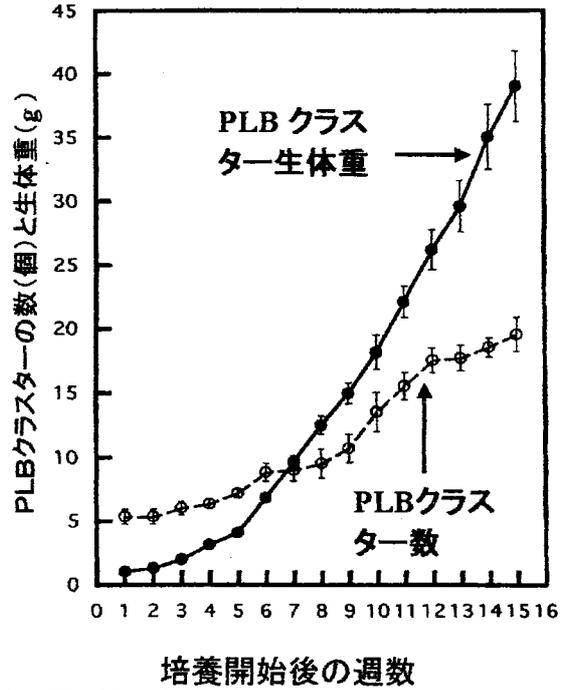
本研究の結果、シオデにおいては組織培養苗の生産とそれを用いた実用栽培が可能であることが示された。また、他の作物で行われている薬培養の方法に準じて異型接合体であるシオデの半数体を比較的容易に育成することができたので、今後倍加半数体を育成することを通して遺伝子分析に役立つと考えられた。アスパラガスにおいては3倍体品種の種子の発芽率を向上させることが可能となったので、3倍体品種を用いた実用栽培の可能性が示唆された。



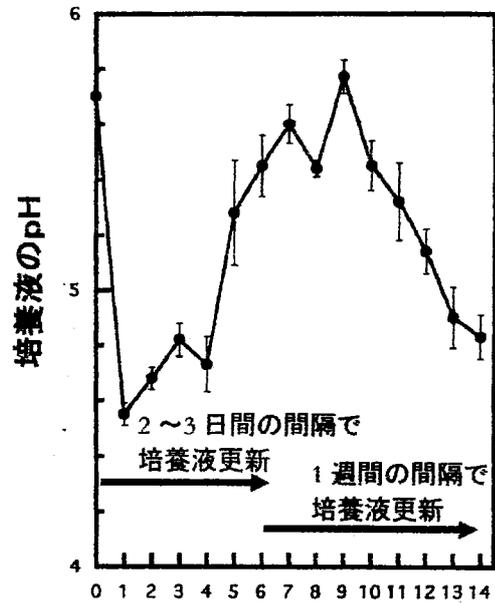
第1図. シオデとアスパラガスの根系の差異.



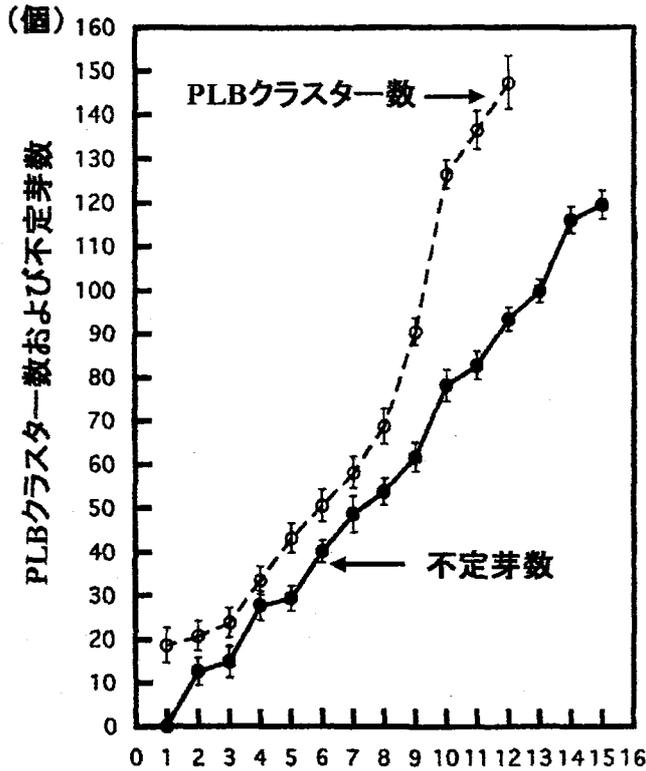
第2図. 固形(A)および液体(B)MS培地におけるPLBとPLBクラスターの増殖.



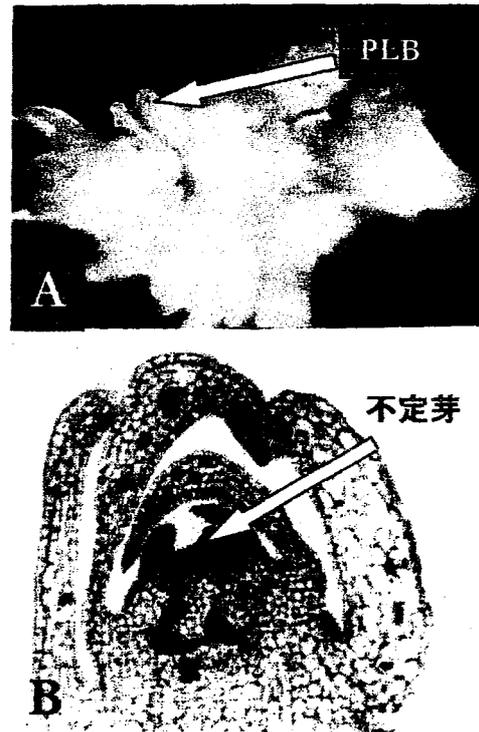
第3図. 第1次増殖におけるPLBクラスターの数と生体重の変動.
注: 図中の垂直線は、標準誤差 (n=6).



第4図. 第1次増殖における培養液のpHの変動.
注: 図中の垂直線は、標準誤差 (n=6).



第5図. 第2次増殖における PLBクラスター数および不定芽数の変動.
注: 図中の垂直線は標準誤差 (n=6).

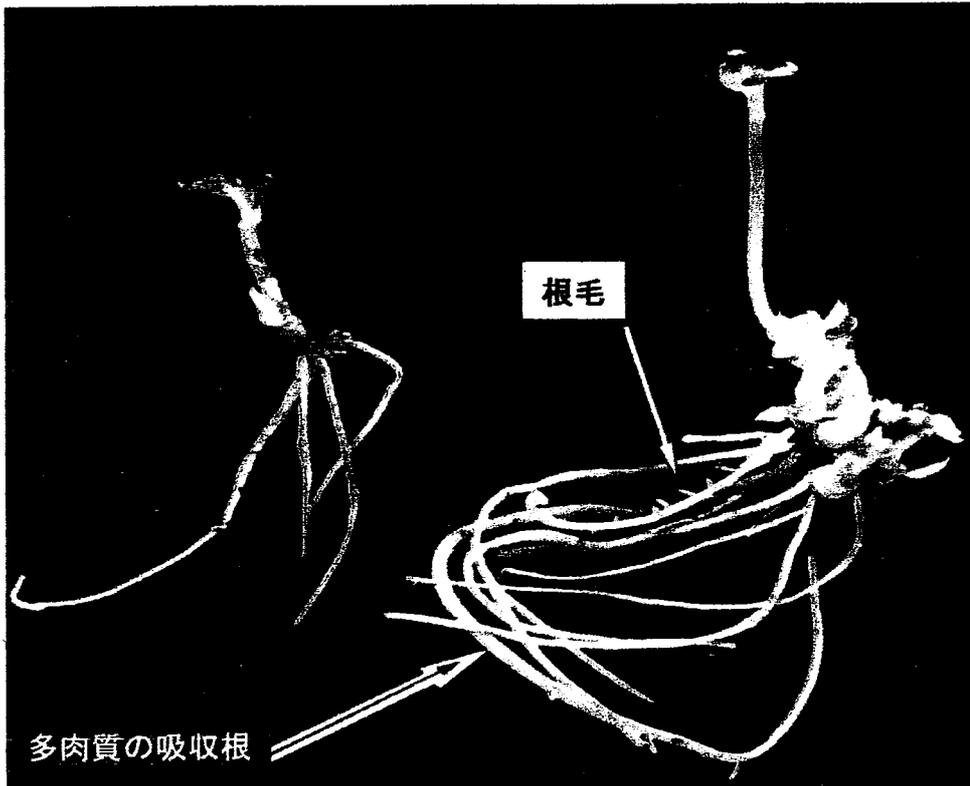


第6図. 第2次増殖において分化した PLBクラスター(A)と PLBに分化した不定芽の縦断面(B).

第1表. 固形MS培地における根の形成に及ぼす α -ナフトレン酢酸(NAA)の影響.

NAA添加培地で 2週間培養後の 経過週数	NAA濃度 (mg/l)				
	処理区A			処理区B	
	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0
	(%)				
3	22.2	41.6	16.7	22.2	33.3
4	33.3	75.0	75.0	44.4	33.3
5	66.7	91.7	91.7	66.7	44.4
	(2.1	3.8	1.0	2.1	1.2)
6	100.0	91.7	100.0	100.0	66.7
	(3.7	4.7	2.5	3.3	7.0)
7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	(-	6.0	2.7	4.5	6.1)
8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
	(-	6.0	5.0	4.5	5.8)

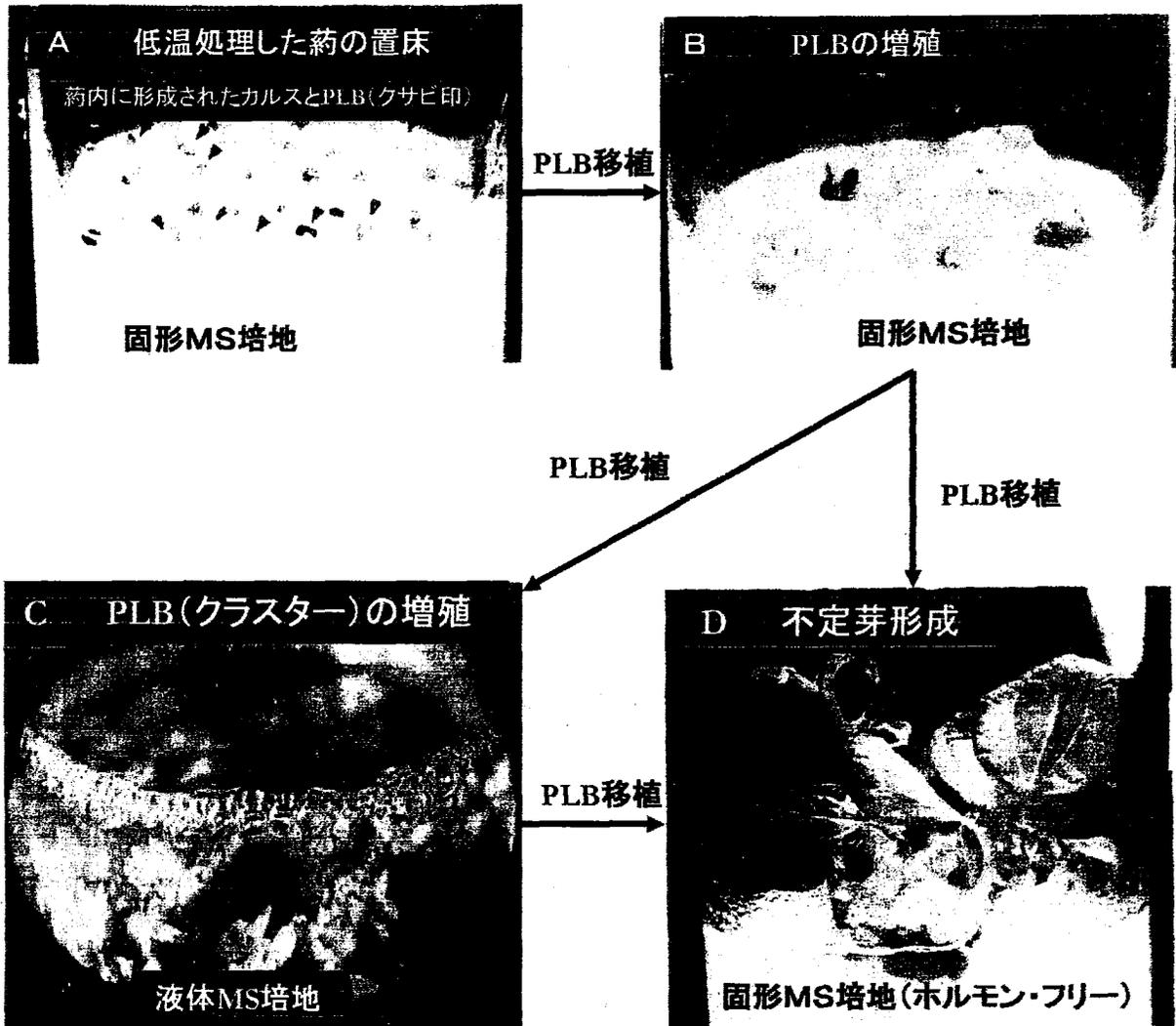
注1: 処理区Aは、NAAを添加した固形MS培地で2週間培養後、ホルモンフリーの固形MS培地に移植した。
 注2: 処理区Bは、NAAを添加した固形MS培地で2週間培養後、引き続き同じ濃度のNAAを添加した固形MS培地で培養した。
 注3: 5、6、7および8週の2段目に示したカッコ内の数字は、1幼植物当たりの根数を示す。



第7図. 第2次増殖後にホルモン・フリーの固形MS培地で発根したシオデの幼植物.



第8図. シオデの散形花序.

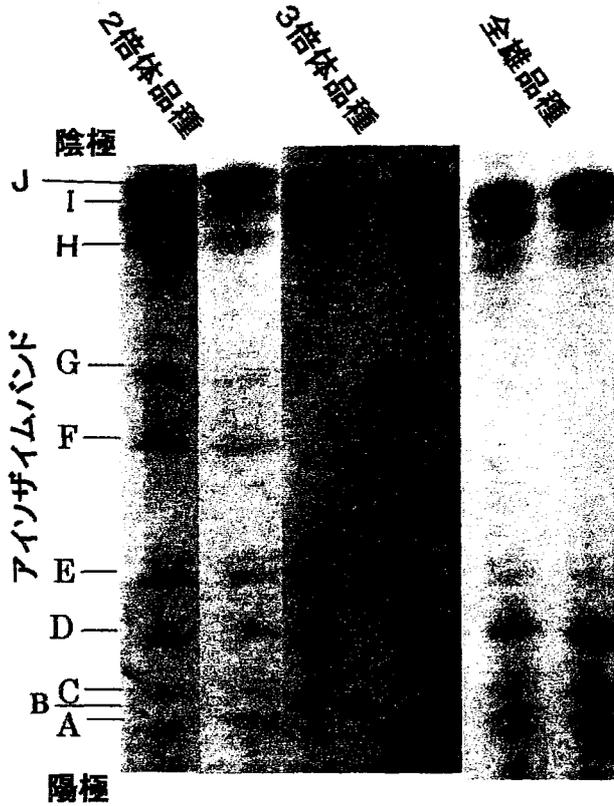


第9図. シオデの葯培養による半数体の育成.

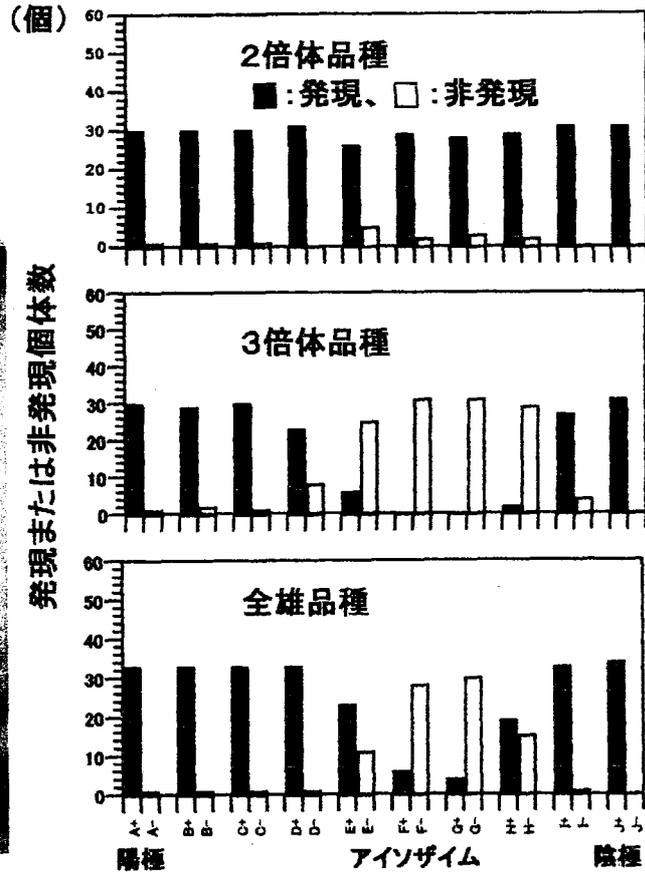
第2表. シオデの葯培養における幼植物体再分化に及ぼす低温処理の影響.

低温 (5°C) 処理日数	置床葯数	固形MS培地で分化・形成された数		
		胚数	不定芽数	幼植物体数
0	100	-	-	-
1	90	-	2	-
3	150	-	23	81
7	200	4	20	-
10	200	-	-	-

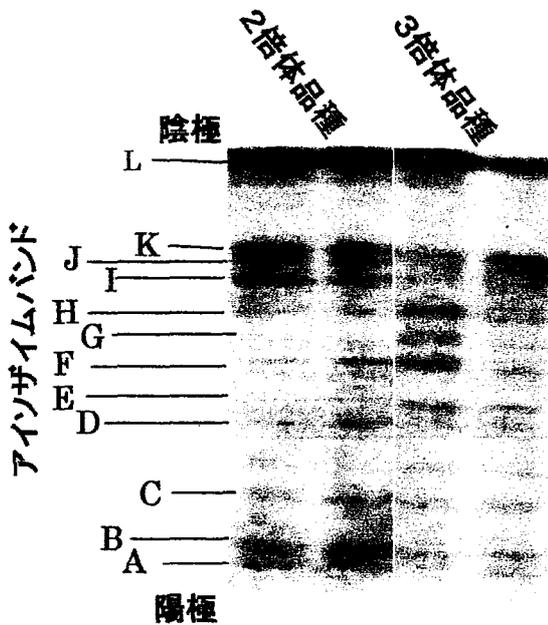
注: 不定芽数および幼植物体数は、それぞれ置床15および50週後の値である.



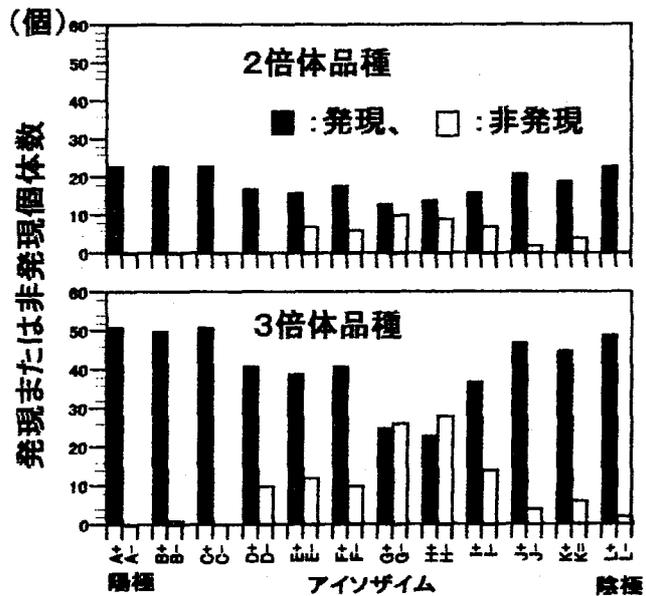
第10図. アスパラガスの発芽初期段階におけるMDHのアイソザイムバンドパターン.



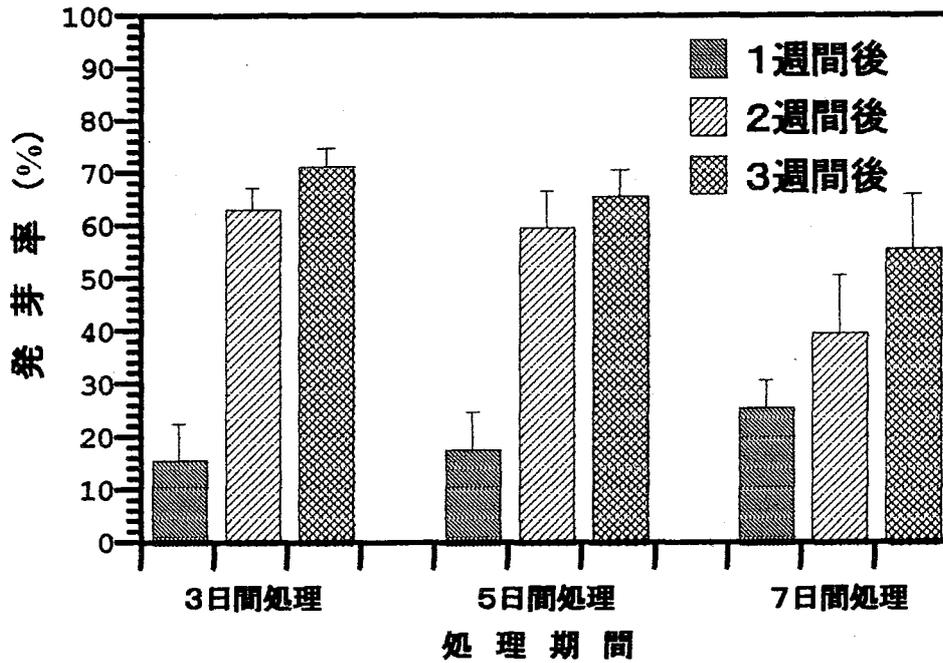
第11図. アスパラガスの発芽初期段階におけるMDHのアイソザイムバンド欠失個体の発現様式.



第12図. アスパラガスの生育の進んだ段階におけるMDHのアイソザイムバンドパターン.

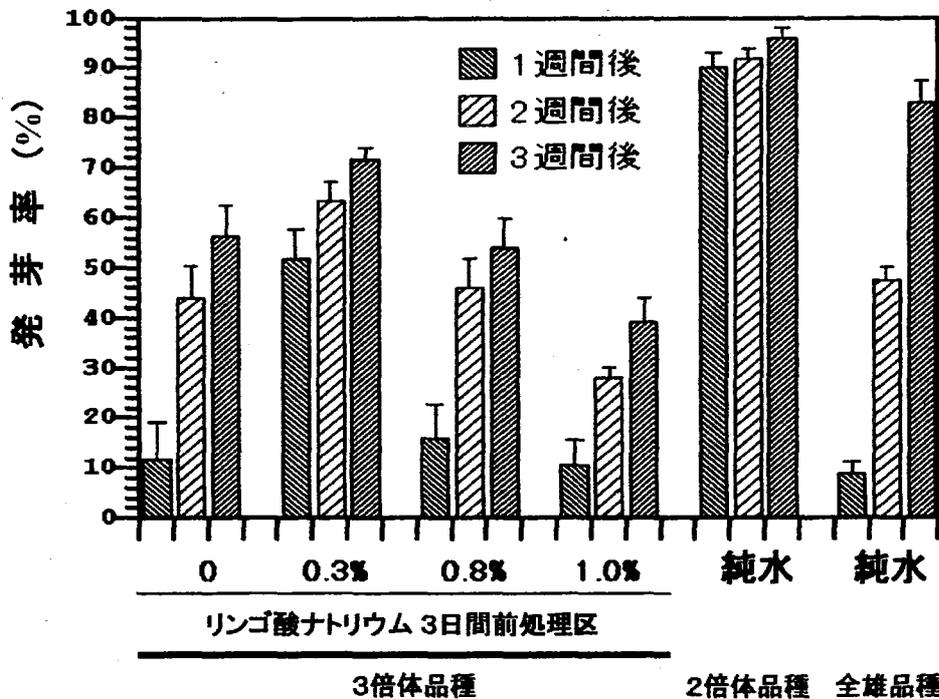


第13図. アスパラガスの生育の進んだ段階におけるMDHのアイソザイムバンド欠失個体の発現様式.



第14図. アスパラガスの3倍体品種の種子発芽に及ぼす0.3%リンゴ酸ナトリウム前処理期間の影響.

注: 5日間と7日間前処理区では、生育日数の経過とともに幼植物が枯死した.



第15図. アスパラガスの3倍体品種の種子発芽に及ぼすリンゴ酸ナトリウム前処理濃度の影響.

注: 0.8%と1.0%前処理区では、生育日数の経過とともに幼植物体が枯死した.

論文審査結果要旨

シオデとアスパラガスは、食味・風味が類似しているユリ科の雌雄異株野菜である。シオデは半陰性植物であるため生育は旺盛でないことと、貯蔵根が発達していないため若茎収穫後の再生力が弱いので、継続して毎年同じ株から収穫することができない山菜である。また、実生繁殖も困難であるため、山菜資源の枯渇に晒されている。さらに、品種改良も行われていないことと、各種形質の遺伝的特徴の解析も行われていない。一方、古くから栽培されているアスパラガスにおいては各種形質の改良が進んでいるものの、雌雄の性比が1:1であるため、実生繁殖すると種子を着生しない雄株の高い収量は雌株の低い収量によって相殺される。アスパラガスにおける収量向上の方法として種子を着生しない3倍体品種が育成されているが、同質3倍体品種は発芽率が低いため実用栽培は行われていない。これらのことから、シオデにおいては種苗を大量に生産して山菜資源を保存するとともに収量を向上することが重要であり、アスパラガスにおいては3倍体品種の発芽率を高めることが収量向上の上で重要である。

そこで本研究においては、シオデの若い節間茎を植物成長調整物質を添加した固形 Murashige・Skoog (MS) 培地に置床してプロトコーム様体 (PLB) を誘導した。固形 MS 培地では PLB の増殖速度が低かったので、固形 MS 培地で誘導した PLB を液体 MS 培地に移植して振盪培養を行った。液体 MS 培地における PLB の増殖速度は高く、さらに PLB 内に不定芽が高い効率で分化した。不定芽を植物成長調整物質を添加しない固形 MS 培地に移植したところ発根し、容易に順化することができた。これらの結果は、シオデの実用栽培のための種苗を組織培養による大量増殖によって供給することを可能にした重要な知見であり、また山菜資源保存の観点からも貴重な知見である。

さらに、品種改良のほとんど行われていないシオデにおいて、遺伝的基礎研究のための素材としての半数体を薬培養によって増殖した。すなわち、若い節間茎を用いた PLB と不定芽の増殖方法と同様な手法を用いて、5°C・3日間の低温処理を行った薬から PLB を増殖し、植物成長調整物質を添加しない固形 MS 培地において PLB から半数性不定芽を大量に発根・順化させた。この結果は、シオデの倍加半数体の育成を可能にし、シオデの多収・耐病性などの諸形質に関する遺伝的研究を可能にする重要な知見である。

アスパラガスにおいては、TCA 回路でリンゴ酸からオキザロ酢酸を生成するリンゴ酸脱水素酵素のアイソザイムバンドパターンの発芽初期段階における発現様式に注目して調べた結果、2倍体品種と全雄品種に比較して発芽率の低い3倍体品種において特定のリンゴ酸脱水素酵素アイソザイムバンドが欠失していることを明らかにした。3倍体品種のアイソザイムバンドパターンにおける特定のリンゴ酸脱水素酵素アイソザイムバンドの欠失に関する知見に基づき、3倍体品種の種子をリンゴ酸脱水素酵素の基質であるリンゴ酸ナトリウム溶液で前処理したところ、リンゴ酸ナトリウム溶液の0.3%・3日間処理を行った区において3倍体品種の発芽率が無処理区よりも有意に高く、市販の2倍体品種の保証発芽率の水準(70%)に高まった。この結果は、アスパラガスの3倍体品種の種子を用いて大量種苗繁殖と収量向上を目的として実用栽培が可能であることを示した重要な知見である。

このように、本研究においては園芸学的に優れた成果が得られたため、審査員一同は博士(農学)の学位を授与するに値するものと判断した。