

氏 名	ま かん じ 間 宮 幹 士
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	論 農 博 第 2484 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	Studies on synthetic seeds of <i>Asparagus officinalis</i> L. (アスパラガス人工種子に関する研究)

論文調査委員	(主 査) 教 授 谷 坂 隆 俊	教 授 矢 澤 進	教 授 米 森 敬 三
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

アスパラガスは雌雄異株で、遺伝的にも固定されていない。また、雄株は雌株より高収性を示す。このため、アスパラガスの高収性および均一性の実現には、優良雄株のクローン増殖が有効であり、中でも、不定胚形成による増殖法は効率が高く、機械化によるスケールアップにも適していると考えられている。本論文は、不定胚形成による雄株の効率的クローン増殖法として人工種子を取り上げ、その作製法について考究したものであり、その内容は以下のように要約できる。

1. 液体培地を用いた効率的な不定胚誘導系について検討した。外植片として無菌植物の貯蔵根を用い、これを液体培地に直接置床することにより、E (Embryogenic) カルス懸濁培養物を得た。E カルス細胞塊は表皮構造をもち、ヨウ素でんぷん反応により染色されたが、NE (Non-embryogenic) カルス細胞塊は、表皮構造をもたず、ヨウ素によって染色されなかった。1 g 当りの E カルスから、5000—7000個の不定胚が誘導された。

2. 不定胚からの苗化に及ぼす糖の種類と濃度、および無機塩濃度の効果を検討した。その結果、用いた糖の種類（シュクロース、グルコースおよびフルクトース）による効果の差は認められなかった。しかし、いずれの糖に関しても、高濃度では根の発育が促進されるが、芽の発育は抑制されること、一方、低濃度では芽の発育が促進されるが、根の発育は抑制されることが明らかになった。ソルビトール添加試験を行ったところ、高濃度における芽の発育抑制は高浸透圧によるものと判断された。また、無機塩濃度を高くすると、芽の発育は促進されるが、根の発育は影響を受けないことが明らかになった。人工種子作製前培養時の糖濃度は、その後の苗の発達にも影響を及ぼし、高濃度ほど根の伸長が良好になることが認められた。したがって、根の生育が良好な 30—50 g l⁻¹ の糖濃度が、前培養時にも、その後の苗化時にも適切であると考えられた。

3. 人工種子の作製にはコンパクトな内封物が要求される。そこで、前培養時には根の伸長を抑制するが、人工種子作製後は根の伸長を抑制しない方法の開発を試みた。数種類の植物ホルモンおよびその濃度の効果を調べたところ、前培養時に IAA を添加することによって、前培養中の根の生育が抑制されること、しかし、人工種子から発生する根の生育は抑制されないことが明らかになった。

4. 前培養した不定胚を内封物として人工種子を作製し、苗化の状況を調査したところ、内封物をアルギン酸ナトリウムゲルで完全に覆った場合には、苗化が著しく阻害されていた。しかし、内封物の子葉部分のみを覆った場合には、高い苗化率が得られたことから、内封物の苗化能力ではなく、人工種子の構造に問題があると考えられた。撥水プレート上に滴下したアルギン酸ナトリウム液滴上に内封物を置床したところ、ゲル球の表面に内封物を配置することができた。この方法を用いれば、発芽率の高い人工種子の大量生産が可能になると考えられた。得られた人工種子を非滅菌土に播種したところ、約半数の種子の苗化が観察された。これらの苗を圃場で栽培したが、問題となる変異は観察されなかった。

5. 人工種子由来苗のコスト計算を行った結果、90日苗の生産コストは、30.2円／ポットであった。このコストは、苗化率がさらに改善されると大きくダウンすることが示された。

6. 不定胚誘導時に、複数の不定胚が離れずに塊になる場合のあることが認められた。これらの不定胚は、サイズおよび形が揃いのため将来の機械化の妨げになる。そこで、単一の不定胚数を増加させる培養法の開発を試みたところ、不定胚

誘導培地に NTA（ニトリロ 3 酢酸）を添加することによって単一胚の割合が増加すること、また、NTA 添加効果は濃度が高いほど大きくなることが認められた。しかし、培養初期からの添加は総不定胚数を減少させたため、添加時期を検討したところ、培養開始から 2 週間目に添加すると総不定胚数は減少せず、単一不定胚数が増加することが明らかになった。

7. アスパラガスにおいて、非滅菌土に直播して苗化が可能な人工種子を世界で初めて作製した。

論文審査の結果の要旨

アスパラガスは雌雄異株のために、親と同一の遺伝子型個体を得ることは困難である。また、雌株より雄株の方が高収性を示すことが知られていることから、高収かつ均一な個体を得るためには、優良雄株のクローン増殖が有効である。中でも、不定胚形成を利用する増殖は、クローン個体の獲得効率が高い上に、機械化によるスケールアップにも適した方法である。本研究は、雄株の効率的クローン増殖に人工種子が最適であると考え、その作製法について検討を加えたものであり、評価すべき点は、以下のとおりである。

1. 液体培地を用いて、効率的に不定胚を誘導する系を確立した。E（Embryogenic）カルス細胞塊は表皮構造をもち、ヨウ素でんぷん反応により染色されること、一方、NE（Non-embryogenic）カルス細胞塊は、表皮構造をもたず、ヨウ素でんぷん反応で染色されないことを明らかにした。

2. 不定胚の苗化に及ぼす、糖の種類と濃度、および無機塩濃度の効果を検討し、糖の種類によって効果の差異がないことを認めた。しかし、高濃度では根の発育が促進されるのに対して、芽の発育は抑制されること、一方、低濃度では芽の発育が促進されるのに対して、根の発育は抑制されることを明らかにした。また、無機塩濃度が高くなるほど芽の発育が促進されること、さらに、この前培養（人工種子作製前培養）の糖濃度は、人工種子から生じる苗の発育にも影響を及ぼし、高濃度ほど根の発育が良好になることを明らかにした。

3. 糖添加前培養培地に置いた不定胚から生じる根は生育旺盛であったが、このような根をもつ不定胚は体積が大きくなりすぎることから、人工種子の内封物としては不適格であると判断した。そこで、前培養時に根の伸長を抑制する方法を探索し、植物ホルモン IAA の培地への添加が前培養時の根の伸長を抑制すること、しかし、人工種子から生じる根の伸長は抑制しないことを明らかにした。

4. 前培養した不定胚を内封物として種々のタイプの人工種子の作製を試み、アルギン酸ナトリウムゲルによる内封物の被覆方法が苗化率に影響を及ぼすことを明らかにした。また、撥水プレート上に滴下したアルギン酸ナトリウム液滴上へ内封物を置床することによってゲル球の表面に内封物を配置できることを認め、この方法によれば発芽率の高い人工種子の大量生産が可能であることを示した。この方法で作製された人工種子は、非滅菌土で苗化が可能であること、さらに、これらの苗を圃場栽培しても問題となる変異が生じないことを認めた。

5. 人工種子由来 90 日苗の生産コストが 30.2 円／ポットであること、このコストは苗化率が改善されると大きく低下することを示した。

6. NTA（ニトリロ 3 酢酸）の不定胚誘導培地への添加（培養開始後 2 週間）が、単一不定胚の誘導を促進することを明らかにした。

以上のように、本研究は非滅菌土に直播しても苗化が可能なアスパラガス人工種子を世界で初めて開発したものであり、植物育種学、園芸学、植物生理学等の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 15 年 2 月 20 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。