HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Evaluation of wild genetic resources and development of tissue culture system in Actinidia species [an abstract of entire text]
Author(s)	朝倉, 一星
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第12679号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65600
Type	doctoral thesis
File Information	Issei_Asakura_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士（環境科学）　　氏 名 朝 倉 一 星

学 位 論 文 題 名

Evaluation of wild genetic resources and development of tissue culture system in *Actinidia* species

（*Actinidia* 属植物における野生遺伝資源の評価と組織培養系の開発に関する研究）

日本に自生する植物遺伝資源の利用と開発を進めるためには、遺伝資源の評価と育種利用に向けた基礎的研究が必要である。本研究では、果実を利用することができる北海道に自生するマタタビ属（*Actinidia*）に着目し、サルナシ（*A. arguta*）、ミヤママタタビ（*A. kolomikta*）、マタタビ（*A. polygama*）を対象に、野生遺伝資源の探索と評価を行い、これらの遺伝資源の今後の形質改良に向けてその基礎となる組織培養系の開発を行ったものである。

日本にはマタタビ属植物が広く分布しており、そのうち、北海道にはサルナシ、ミヤママタビ、マタタビが自生していることが知られている。しかしながら、その分布状況や倍数性、果実の特性についての知見は少ない。本研究では、野生個体群の調査を行い、分布状況と倍数性および果実の特性評価を行った。その結果として、サルナシとミヤママタビについては分布域が重複し、多数の

個体が観察されたが、マタタビについては主に低地の落葉樹林に自生しており、個体数はサルナシ、ミヤママタタビに比して少ないことが分かった。マタタビ属には倍数性の変異があることが知られているため、フローサイトメトリーによる倍数性調査を行った。その結果、ミヤママタビとマタタビは二倍体、サルナシは四倍体であり、それぞれの種内に倍数性の変異は見られなかった。また、果実形態、果実重、可溶性固形物含量（SSC）およびアスコルビン酸含量（AAC）の測定を行い、それぞれの種の特性を明らかにするとともに、それぞれの形質の変異についても解析を行った。果実形態は、サルナシで円～楕円形、ミヤママタタビで楕円～長楕円形、マタタビで長楕円形と変異が見られた。果皮は無毛で、マタタビでオレンジ色、ミヤママタタビで緑～暗緑色、サルナシで明緑色～暗緑色だった。果実重は、ミヤママタタビでサルナシより小形だった。可溶性固形物含量は種内で大きな変異が見られ、サルナシ 1 系統で、非常に高い値（30.8%）を示した。アスコルビン酸含量はミヤママタタビで高く、最高で 805 mg/100 g FW に達するものも見られた。本調査から、北海道に広く分布し、高いアスコルビン酸含量を示す系統を含む二倍体のミヤママタタビの遺伝資源の潜在的価値が見出された。次に、ミヤママタタビを用いて組織培養系の開発に関する研究を展開した。

植物バイオテクノロジーによる形質改良を行う上で、植物組織片からの植物体再生系は必須なものである。そこで、ミヤママタタビの様々な外植片（未熟種子、葉、葉柄、茎、根）を供試し、カルス経由の植物体再生能を評価した。その結果、いずれの部位でも、2,4-D 及びカイネチンを添加した MS 培地上でカルス形成が見られ、カルス形成率は 42.4%～100%の値を示した。誘導したカル

スを、ゼアチンを用いた培地に移植したところ、葉柄由来カルス以外のカルスから不定芽の再生が見られた。不定芽再生率は、根由来のカルスで 41.7%、未熟種子由来のカルスで 9.7%と高い値を示した。カルス当たりの不定芽数は、未熟種子由来のカルスが最も多く、初期培養に用いる外植片によって不定芽再生率が異なることが分かった。未熟種子を供試し、さらに詳細な培養条件の検討を行ったところ、未熟種子由来のカルスでは異なる 2 つのタイプのカルスが観察された。一方は白色で固く、緻密なカルス（コンパクトカルス）で、このタイプのカルスでは不定芽形成は見られなかった。もう一方は白色で分離しやすい粒状のカルス（ノジュラーカルス）で、高い不定芽形成能を有し、これらのカルスを識別することで高い不定芽形成率を示す培養系を確立することができた。再生した不定芽を植物成長調節物質を含まない 1/2MS 培地に移植したところ、容易に発根して植物体が再生した。フローサイトメトリーにより再生植物の倍数性を調査したところ、全て母本と同じ二倍性を示し、培養過程で倍数性変異が生じないことが示された。また、この結果は未熟種子の胚または珠心組織からカルスが誘導されていることが示唆していた。再生植物体は、容易に順化することができた。以上の結果から、ミヤママタタビ未熟種子由来のノジュラーカルスを用いた再生系は本種の効率的な再生系として有用と考えられた。この実験により、ミヤママタタビの組織培養系の基礎を確立することができたため、さらに倍数性変異誘導を目的として新たな培養系の開発を試みた。

二倍体の植物の生活環のうち、受精後の胚珠内に生じる胚乳が三倍性の組織を形成することに着目し、ミヤママタビの胚乳を培養して三倍体を再生させる培養条件について試験を行った。開花後 6〜10 週間目の果実から未熟種子を摘

出し、胚乳を外植片として異なる濃度の植物成長調節物質（2,4-D およびカイネチン）を含む培地に置床して、胚乳を脱分化させカルスを効率的に誘導する条件の検討を行った。培地条件によって異なる性状のカルスが誘導された。1, 2 または 4 mg/l 2,4-D とカイネチンの組み合わせでは、カルスの多くは白色・小型で脆く形態形成能は認められなかった。一方、0.1 mg/l 2,4-D と 1, 2 または 5 mg/l カイネチンを組み合わせた培地において形成された緑色を呈するカルスに不定芽の原基が形成されていることに着目し、ゼアチンを添加した培地に移植して 22°C の明条件下で培養したところ、不定芽の原基から不定芽の伸長が観察された。これらの不定芽を植物成長調節物質無添加の 1/2MS 培地に移植すると容易に発根し、小植物体を得ることができた。これらの小植物体は順化することができた。倍数性を解析したところ、全て三倍体であることが分かった。この結果は、これらのカルスは胚乳から誘導されていることを示していた。本実験により、ミヤママタタビの胚乳は、適切な培養条件下に置くことで脱分化し、カルスを経由して植物体再生する能力を保持していることが明らかとなった。

以上の一連の研究によって、北海道に自生するマタタビ属植物の基礎的情報を整理し、ほとんど取り組まれて来なかったミヤママタビを取りあげて、組織培養の基盤技術を開発することができた。今回の野生遺伝資源の特性評価の結果から、本種の果実形質に関して、同一地域内でも大きな種内変異の存在が示唆されたことから、本種の育種を行う際には、これらの遺伝資源の特性評価に基づいた優良系統の選抜が重要と考えられる。本研究では、ミヤママタタビの未熟種子を用いた効率的な植物体再生系を確立したが、本再生系を基礎として，効率的な染色体倍加、突然変異育種、細胞融合や形質転換等の様々な手法への

応用が期待される。また、本研究で確立した胚乳培養による再生系と、既存のコルヒチン処理等による染色体倍加の手法との併用により、多様な倍数性シリーズの作出及び倍数性間交雑が可能になるものと期待される。倍数性操作の選択肢を広げることは、重要なマタタビ属植物の果樹であり主要な品種に六倍体が含まれているキウイフルーツとの交雑の可能性を高めることにつながり、また、他にも多くの倍数性変異が知られるマタタビ属植物他種との種間交雑を容易にし、マタタビ属植物における遺伝的変異の拡大に寄与することが期待される。