



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Establishment and application of endosperm culture systems to produce polyploid plants in Amaryllidaceae [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	中野, 有紗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第14771号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85816">https://hdl.handle.net/2115/85816</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	NAKANO_Arisa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



# 学位論文内容の要旨

博士 (環境科学)

氏名 中野有紗

## 学位論文題名

### Establishment and application of endosperm culture systems to produce polyploid plants in Amaryllidaceae

(ヒガンバナ科植物における倍数体作出を目的とした胚乳培養系の開発と応用に関する研究)

主に多年生の球根植物であるヒガンバナ科植物には、スイセンやリコリス、クリナムといった魅力的な花を咲かせる種が多く属している。そのため、これらの植物は観賞用として広く栽培および利用されている。しかし、開花には球根の充実が必要であり、種子から開花までに数年以上の長期間を要するため、一般的には球根の分球による栄養繁殖で増殖されている。

育種の手法として倍数性育種がある。染色体セットを三組以上もつ倍数性植物は、二倍性植物に比べ、旺盛な生育や器官の大型化といった特徴を示す。このような性質は、園芸的に有用であるため多くの植物種で倍数体化が試みられている。一般的に、四倍体や八倍体のような正数の倍数体の人為的な作出には、コルヒチンやオリザリンのような有糸分裂阻害剤による染色体倍加が利用されている。また、三倍体のような奇数の倍数体の作出には、二倍体と四倍体との交雑のような倍数体間交雑が利用されている。しかし、倍数体間交雑には次の二つの課題がある。ひとつは、事前の四倍体作出および二倍体と四倍体が同時に開花するように調節する必要があることである。二つ目は、胚乳発生の異常 (胚乳崩壊) に起因する胚の発生不全が生じる受精後障壁である。このような課題から、奇数の倍数体作出は正数の倍数体作出よりも長い期間と労力が必要である。

倍数体作出の方法として、胚乳培養が注目されている。多くの被子植物において二倍性植物の胚乳は、二核性の中央細胞と半数性の精細胞との融合により形成される三倍性組織である。そのため、胚乳培養により二倍性植物同士の交雑種子から三倍体を作成することが可能であり、作出期間の大幅な短縮につながる。しかし、これまでに70種近くの植物で試みられてきたが、実際に三倍体作出に至った事例は30種程度に留まっており、胚乳培養による倍数体作出は技術的に困難であると考えられている。

本研究の目的は、1) ヒガンバナ科植物における胚乳培養系の開発および2) 胚乳培養の利用可能性の拡大である。ヒガンバナ科植物は上述のように長い生活環をもつため、胚乳培養による倍数体作出期間の短縮は非常に効果的と考えられた。また、単子葉植物における胚乳培養に関する先行研究はイネ科植物に限られており、ヒガンバナ科植物における胚乳培養系の開発はユリ科植物など他の単子葉植物への応用の起点となることが期待される。さらに、開発した胚乳培養系を応用し、三倍体のみならず他の倍数体作出を試みた。これにより胚乳培養の利用価値の向上および研究を促し、将来的に胚乳培養が技術的に困難とされる要因の追究へつながることを期待している。

本研究では始めに、ヒガンバナ科の主要なグループであるヒガンバナ亜科に属する16属27種の植物を対象に胚乳培養によるカルス誘導を試みた。培養にはオーキシンとしてピクロラム、サイトカニンとしてベンジルアミノプリンを添加したムラシゲ・スクーグ (MS) 培地を用いた。胚乳培養の結果、6属10種においてカルスが誘導された。カルスが胚乳組織に由来することを調査するため、二倍性植物を内部標準とした相対的核DNA含量をフローサイトメーターにより測定しカルスの倍数性が胚乳組織と同一であるか確認した。その結果、*Cyrtanthus mackenii*, *Haemanthus albiflos*, *H. paucifolius*, *Scadoxus multiflorus*において得られたカルスは胚乳に由来であると考えられ、ヒガンバナ科植物における胚乳培養の利用可能性を明らかにした。次に、最も高いカルス誘導率を示した*H. albiflos*において、胚乳培養系の応用に利用するため、胚乳培養の安定性を評価した。由来する種子、胚乳の成熟度、部位、および培地組成におけるカルス誘導率およびシュート再生率を調査した結果、由来する種子による変動がみられたものの、安定的なカルス誘導およびシュート再生が観察された。

胚乳培養の利用可能性の検証として、開発した*H. albiflos*の胚乳培養系を利用し、六倍体の作出を試みた。六倍体作出は、染色体不対合による不稔性を示す三倍体の稔性回復を目的に行われている。胚乳培養により誘導した三倍性カルスに、有糸分裂阻害剤であるコルヒチン処理し、シュート再生培地で培養を行った。同時に、シュートを再生しつつあるカルスの組織学的観察によりシュート再生経路の調査も行った。処理を施したカルスから再生したシュートは、小植物体へ成長した。フローサイトメーターおよび染色体数の調査による倍数性判定の結果、再生した小植物体に六倍体の存在が確認され、胚乳培養とコルヒチン処理の組み合わせにより、二倍体同士の交雑に由来する種子の胚乳を材料に六倍体が作出可能であることを明らかにした。また、組織学的観察の結果、カルスは不定胚再生および不定芽再生の二種類の経路を保持していることが明らかになった。

次に、胚乳培養の過程で得られる未熟胚の活用方法として、四倍体および八倍体の作出を試みた。上述の*H. albiflos*の胚乳培養の過程で得られた未熟胚を、胚乳培養と同様にピクロラムとベンジルアミノプリンを添加したMS培地で培養し、カルスを誘導した。さらに、得られたカルスに対してコルヒチン処理を行ったのち、植物成長調節物質を含まない1/2MS培地でシュート再生を試みた。また、再生したシュートを用いた組織学的観察による再生経路の調査も同時に行った。小植物体における倍数性調査の結果、コルヒチン処理を施したカルスから四倍体および八倍体が再生していることが明らかになった。先行研究では、しばしば異なる倍数性の細胞が混在するmixoploidによる倍数体作出効率の低下が報告されている。本研究では、mixoploidは1個体であり、高い倍数体作出効率を示した。これは、不定胚による再生経路が関与していると考えられた。

本研究は、ヒガンバナ科植物における胚乳培養系を開発するとともに、胚乳培養の利用可能性を拡大することで二倍性植物間の交雑由来の種子から、二倍体、三倍体、四倍体、六倍体、および八倍体を作成可能であることを実証した。これは倍数性育種の課題である長期間の作出期間や倍数体間交雑障壁を克服しうるものであり、今後の倍数性育種に資することが期待される。また、本研究で開発された*H. albiflos*の胚乳培養系は安定したカルス誘導および植物体再生が可能であることから、今後、分子遺伝学的研究への利用により胚乳組織における植物体再生機構の解明への貢献が期待される。