

## 学 位 論 文 題 名

バラ科サンザシ属植物の組織培養系の確立と  
種間雑種の育成に関する研究

## 学位論文内容の要旨

サンザシ属 (*Crataegus* L.) はバラ科の落葉低高木で、種数は約 1000 種あるとされる。その多くは北半球の冷温帯に分布し、アメリカ、中国、日本、ヨーロッパ等に原生している。そのうち、中国におけるオオミサンザシ (*C. pinnatifida* Bge.) は果樹として利用されているが、日本、アメリカ、ヨーロッパでは観賞樹としてしか利用されていない。日本には、アラゲアカサンザシ (*C. maximowiczii* Schneid) とクロミサンザシ (*C. chlorosarca* Maxim) が北海道に自生しており、ダフリカサンザシ (*C. dahurica* Koehne.) は内モンゴルに自生し、新果樹として利用する素材に恵まれている。

そこで本研究では、中国において茎頂培養例が唯一知られているオオミサンザシの他、ダフリカ、アラゲアカおよびクロミサンザシなど、4 種の茎頂などの組織培養による植物体再生系の確立を目指した。更に、サンザシの果樹としての利用の視点から、初めて 3 種果実の成分分析を行い、それぞれの種の持つ果実成分の特徴を明らかにし、それら 3 種を両親に正逆交雑を実施し、6 組合せの種間雑種を育成するべく、未熟胚培養を行った。最後に、胚培養でフラスコ内に育成中のサンザシの種間雑種候補幼植物体を用いて、RAPD 法による類縁関係および雑種性識別を行った。

本論文の要旨は、以下の通りである。

## 1、サンザシ属植物の組織培養系の確立

オオミ、ダフリカ、アラゲアカおよびクロミのサンザシ 4 種の各組織（茎頂、葉、葉柄、子葉、根、胚軸、胚および葯）を培養し、茎頂、葉、葉柄、子葉および胚の外植片から植物体を形成した。植物体形成に関する初代培養、継代培養および発根に適した培地および植物ホルモンの種類と濃度を明らかにした。この結果、サンザシを用いて初めて組織培養による安定した植物体再生系を確立した。

## 2、サンザシ果実の成分分析

オオミ、ダフリカおよびアラゲアカサンザシ 3 種の果実を用いた成分分析によると、一般成分では、アラゲアカは水分が低く、タンパク質、脂質、炭水化物および灰分がオオミとダフリカより高かった。アラゲアカはカルシウム、リン、カリウム、亜鉛、銅およびマグネシウムでもオオミとダフリカより高かった。 $\beta$ -カロテンはオオミが最も高かったが、ビタミン C、 $\alpha$ -トコフェロール、アントシアニンはアラゲアカが最大で、

特にアントシアニン含量は極端に多く、オオミの 430 倍量が含まれていた。全糖はダフリカが最も高く、フルクトースおよびグルコースの含量はアラゲアカがダフリカより高かった。また、アラゲアカはポリフェノール、シュウ酸およびクエン酸の量も最も高く、3 種の果実成分の特徴が初めて明らかになった。

他の果樹に比べてみると、3 種すべてで、 $\beta$ -カロテン、ビタミン C はリンゴ、スモモおよびアロニアより高く、アラゲアカはタンパク質、 $\alpha$ -トコフェロールもリンゴ、スモモおよびアロニアより高かった。更に、アラゲアカのポリフェノール、シュウ酸およびクエン酸はアロニアより高く、今後サンザシの豊富な機能性成分の有効利用が望まれる。

### 3、胚培養による種間雑種の作出

交雑効率を上げるために、花粉の発芽率および発芽条件を検討した。3 種共にホウ酸濃度として 100 mg/l で花粉の発芽率が最も良好で、特に、アラゲアカの花粉発芽は他の 2 種より優れていた。

サンザシ 3 種の正逆交雑の結実率は、交配後 30 日に比べ 60 日は半減し、受粉不完全による落果が認められたが、交配後 60 日で 15.0~33.3%の結実率が得られた。果実あたりの種子数は高かったが、種子当りの胚形成率は低く、交雑組合せ当たり 57.4~80.4%であった。未熟胚培養によるシュートの形成は、3 種の 6 組合せの種間雑種はともに交雑後 100 日の胚が 60 日より高くなった。特に交配後 100 日のオオミ×アラゲアカの組合せが最も高く、58.8%となり、アラゲアカ×ダフリカの組合せが最も低く、4.8%となった。RAPD 法によってサンザシ 3 種およびそれぞれの種間雑種候補を検定したところ、すべての組合せで種間雑種であることが確認できた。

### 4、RAPD 法による親子鑑定および類縁関係の解析

RAPD 法により多型の検出された増幅 DNA 断片のサイズは主に 2.2kbp から 0.2kbp で、増幅 DNA 断片全体の 86.6%を占めていた。両親 4 種で検出された多型性バンドが 58.5%、正逆交雑は 6 組合せの種間雑種系統の多型性バンドが 66.2%を占めていた。雑種の多型 DNA バンドは両親より高かったことから両親の遺伝的差異が大きいことを示した。また、GC 含量の影響についてみると、両親と雑種はともに増幅 DNA バンドと多型 DNA バンドは 70%GC 含量の場合が 60%より高かった。

RAPD 分析法を用いたサンザシ両親の識別は、4 種サンザシにおける増幅 DNA のバンドパターンの種間差によって容易に区別でき、種および種間雑種の同定に有効であることが明らかとなった。また、F1 個体で検出された増幅 DNA 断片はすべてそれらの親から由来していた。このように親子鑑定には、交雑個体特有のバンドがみられ、幼植物体でも明確に判定することが可能となった。RAPD 分析法がサンザシ属の識別・同定および親子鑑定に応用できることが明らかになった。

以上のように、本研究はサンザシ属植物の組織培養による増殖法を確立して、未利用だったサンザシ果実の成分分析によってアラゲアカサンザシなどの優れた遺伝資源を明らかにした。また、それらを親として用いて 3 親 6 組合せの種間雑種の育成に初めて成功した。これらの素材は中国においてはサンザシの新品種としての利用に、わが国のような果樹として未利用の国では新果樹としての利用に道を拓くものである。

# 学位論文審査の要旨

|    |     |     |    |
|----|-----|-----|----|
| 主査 | 教授  | 大澤  | 勝次 |
| 副査 | 教授  | 喜多村 | 啓介 |
| 副査 | 教授  | 荒木  | 肇  |
| 副査 | 助教授 | 増田  | 清  |

学位論文題名

## バラ科サンザシ属植物の組織培養系の確立と 種間雑種の育成に関する研究

本論文は5章からなり、図 59、表 20、引用文献 230 を含む 184 ページの和文論文であり、他に参考論文が 5 編添えられている。

サンザシ属 (*Crataegus* L.) はバラ科の落葉低高木で、種数は約 1000 種あるとされ、多くは北半球の冷温帯に分布している。そのうち、中国におけるオオミサンザシ (*C. pinnatifida* Bge.) は果樹として利用されているが、日本、アメリカ、ヨーロッパでは観賞樹としてしか利用されていない。日本には、アラゲアカサンザシ (*C. maximowiczii* Schneid) とクロミサンザシ (*C. chlorosarca* Maxim) が北海道に自生しており、ダフリカサンザシ (*C. dahurica* Koehne.) は内モンゴルに自生し、新果樹として利用する素材に恵まれている。

そこで本研究では、中国において茎頂培養例が唯一知られているオオミサンザシの他、ダフリカ、アラゲアカおよびクロミサンザシなど、4 種の組織培養による植物体再生系の確立を目指した。更に、サンザシ 3 種の持つ果実成分の機能性成分の特徴を初めて明らかにし、それら 3 種を両親に正逆交雑を実施し、6 組合せの種間雑種を育成するべく、未熟胚培養を行った。最後に、胚培養でフラスコ内に育成中のサンザシの種間雑種候補植物体を用いて、RAPD 法による類縁関係および雑種性識別を行った。

### 1、サンザシ属植物の組織培養系の確立

オオミ、ダフリカ、アラゲアカおよびクロミのサンザシ 4 種の各組織 (茎頂、葉、葉柄、子葉、根、胚軸、胚および葯) を培養し、茎頂、葉、葉柄、子葉および胚の外植片から植物体を形成した。植物体形成に関する初代培養、継代培養および発根に適した培地および植物ホルモンの種類と濃度を明らかにした。この結果、サンザシを用いて初めて組織培養による安定した植物体再生系を確立した。

## 2、サンザシ果実の成分分析

オオミ、ダフリカおよびアラゲアカサンザシ 3 種の果実を用いた成分分析によると、アラゲアカは水分が低く、タンパク質、脂質、炭水化物、灰分、カルシウム、リン、カリウム、亜鉛、銅およびマグネシウムでオオミとダフリカより高かった。 $\beta$ -カロテンはオオミが最も高かったが、ビタミン C、 $\alpha$ -トコフェロール、アントシアニンはアラゲアカが最大で、特にアントシアニン含量は極端に多く、オオミの 430 倍量が含まれていた。全糖はダフリカが最も高く、フルクトースおよびグルコースの含量はアラゲアカがダフリカより高かった。また、アラゲアカはポリフェノール、シュウ酸およびクエン酸量も高く、サンザシ 3 種の果実成分の特徴が初めて明らかになった。

他の果樹の成分と比べると、3 種すべてで、 $\beta$ -カロテン、ビタミン C はリンゴ、スモモおよびアロニアより高く、特にアラゲアカでは $\alpha$ -トコフェロール、ポリフェノール、シュウ酸およびクエン酸も豊富で、これら機能性成分の有効利用が望まれる。

## 3、胚培養による種間雑種の作出

サンザシ 3 種の正逆交雑の結実率は、交配後 30 日に比べ 60 日は半減し、受粉不完全による落果が認められたが、交配後 60 日で 15.0~33.3%の結実率が得られた。果実あたりの種子数は高かったが、種子当りの胚形成率は低く、交雑組合せ当たり 57.4~80.4%であった。未熟胚培養によるシュートの形成は、3 種の 6 組合せの種間雑種はともに交雑後 100 日の胚が 60 日より高くなった。特に交配後 100 日のオオミ×アラゲアカの組合せが最も高く、58.8%となり、アラゲアカ×ダフリカの組合せが最も低く、4.8%となった。RAPD 法によってサンザシ 3 種およびそれぞれの種間雑種候補を検定したところ、すべての組合せで種間雑種であることが確認出来た。

## 4、RAPD 法による親子鑑定および類縁関係の解析

RAPD 法により多型の検出された増幅 DNA 断片のサイズは主に 2.2kbp から 0.2kbp で、増幅 DNA 断片全体の 86.6%を占めていた。両親 4 種で検出された多型性バンドが 58.5%、正逆交雑は 6 組合せの種間雑種系統の多型性バンドが 66.2%を占めていた。雑種の多型 DNA バンドは両親より高かったことから両親の遺伝的差異が大きいことを示した。RAPD 分析法を用いたサンザシ両親の識別は、4 種サンザシにおける増幅 DNA のバンドパターンの種間差によって容易に区別でき、種および種間雑種の同定に有効であることが明らかとなった。また、F1 個体で検出された増幅 DNA 断片はすべてそれらの親から由来していた。このように RAPD 分析法がサンザシ属の識別・同定および親子鑑定に応用できることが明らかになった。

以上のように、本研究はサンザシ属植物の組織培養による増殖法を確立して、果実の成分分析によってアラゲアカサンザシなどの優れた遺伝資源を明らかにした。また、それらを親として 3 親 6 組合せの種間雑種の育成に初めて成功した。これらの素材は中国においてはサンザシの新品種としての利用に、わが国のような果樹として未利用の国では新果樹としての利用に道を拓くものであり、高く評価できる。よって、審査員一同は、石嶺が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。