

学 位 論 文 題 名

Studies on ploidy distribution, DNA content variations  
and production of polyploid plants  
in Japanese blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.)

(ハスカップにおける倍数性分布, DNA 含量の変異  
および倍数体作出に関する研究)

学位論文内容の要旨

ハスカップ (*Lonicera caerulea* L.; 英名: blue honeysuckle ブルーハニーサックル) はユーラシア大陸北部から北アメリカ北部の寒冷な地域にかけて自生する灌木である。ハスカップの名称はアイヌ語に由来し、北海道に広く分布するほか、本州中部以北の亜高山帯から高山帯に自生することが知られている。その果実にはアントシアニンなどの機能性成分が豊富に含まれ栄養価が高く、北海道では有用な小果樹として古くから利用されてきた。ハスカップの栽培は野生株が主体であるため、果実品質や収量にばらつきが大きい。生産安定や収穫作業の効率化のため、多収で大果、良食味、日持ち性が良く、早生・晩生の優良系統の育成が望まれている。そこで、野生種の遺伝的多様性を解析するとともに、倍数体をもつ器官の大型化などの形質を利用する倍数性育種に着目し様々な倍数体を作成することによる形質改良を試みた。

第1章では、倍数性の観点から北海道および本州に自生する野生種の遺伝的多様性を調査した。北海道(横津岳・勇払湿原・ピヤシリ山・大雪山・美幌峠・大樹・釧路湿原・別寒辺牛湿原・霧多布湿原・別海・標津湿原)および本州の栃木県日光市戦場ヶ原湿原に自生する野生種を収集し、フローサイトメーターおよび染色体観察から倍数性を調査した。その結果、日本には2倍体 ( $2n = 2x = 18$ ) と4倍体 ( $2n = 4x = 36$ ) が自生することが明らかとなった。2倍体は道東地域の釧路湿原、別寒辺牛湿原、霧多布湿原および別海に限定して分布していた。一方、4倍体は横津岳、勇払湿原、ピヤシリ山、大雪山、美幌峠、大樹、霧多布湿原、別海、標津湿原および栃木県戦場ヶ原湿原に分布し、日本には4倍体が広範囲に分布していることが明らかとなった。2倍体が道東の低地の湿原にのみ自生するのに対し、4倍体は低地の湿原から高山帯まで様々な環境下に自生していることから、4倍体は環境適応性が高いことが示唆された。また、フローサイトメーターを用いた相対的DNA含量の測定の結果、4倍体は集団間でDNA含量に変異がみられ、自生地の標高が高くなるにつれて低いDNA含量を示す傾向があり、地理的分布とDNA含量について環境適応の観点から考察を行った。

第2章では、野生から採取した2倍体と4倍体およびこれまでに育成された6倍体および8倍

体を育種素材に用いて倍数体間交雑を行い、新規倍数体系統の育成を試みた。2倍体と4倍体の正逆交雑の結果、 $4x \times 2x$ の交雑から3倍体 ( $2n = 3x = 27$ ) を得ることができ、 $4x \times 2x$ の交雑における授粉後21日から28日の胚珠培養から効率的に3倍体を作出できることが示された。4倍体と6倍体の正逆交雑からは5倍体 ( $2n = 5x = 45$ ) を、4倍体と8倍体を用いた交雑からは胚珠培養を用いて6倍性の異数体 ( $2n = 6x-4 = 50$ ,  $2n = 6x-3 = 51$ ,  $2n = 6x-2 = 52$ ) を得ることができた。その結果をもとに、倍数体間の交雑親和性について、胚と胚乳の倍数性比から検証を行った結果、交雑の成否に胚・胚乳のバランスが重要な要素であることが示唆された。本研究から、2倍体、3倍体、4倍体、5倍体、6倍体、8倍体の倍数体シリーズを得ることができた。作出した倍数体系統は、倍数性が高くなるにつれ気孔サイズおよび花粉直径が大きくなる傾向がみられ、ハスカップの形質改良の目標の一つである果実の大型化に向けて、有用な育種素材となることが期待される。

第3章では育種期間を短縮できる新規倍数体育種法として、 $4x \times 4x$ の交雑由来の6倍性の胚乳組織の培養を試みた。6倍体を作出するためには、2倍体と4倍体の交雑から3倍体を作出し倍加処理を行うか、4倍体を倍加して8倍体を育成し4倍体と8倍体を交雑する必要があるが、胚乳培養技術を用いれば4倍体からダイレクトに6倍体を作出することができるため、育種期間の短縮に繋がる。胚乳から効率的に植物体を再生させる培養条件の検討した結果、MS培地にBAとI BAを添加した培地に胚乳を置床することで、カルスを経由して不定芽原基が分化することが明らかとなった。分化した不定芽原基は1/2 MS培地に $GA_3$ を添加した培地に移した後、1/2 MS培地にBAと $GA_3$ を添加した培地に置床することで不定芽に分化した。分化した不定芽は1/2 MS培地に置床することで植物体に再生することが示された。フローサイトメーターと染色体観察から、再生した植物体は胚乳の倍数性を保持する6倍性の植物であることを確認した。この実験によって6倍体育成の新たな方法を確立することができた。また、この成果は胚乳の特殊性を議論する上で意義のあるものである。胚乳は栄養貯蔵器官としての機能を持ち、胚の成長を支えた後に退化する運命にある特異な組織だが、本研究により、ハスカップの胚乳は遺伝的な可塑性を持ち、培養条件下で植物体になる能力があることを証明することができた。このことは、胚乳が分化全能性を持つことを意味し、胚乳の始原である重複受精を出発点とした胚発生・胚乳分化機構を探る新たなツールとなることが期待できる。

本研究により日本に自生するハスカップには倍数性変異があることが明らかとなり、2倍体と4倍体の地理的分布の情報を整理することができた。また4倍体は自生地間でDNA含量に変異があることが示された。ハスカップの遺伝的多様性に関する研究は少なく、本研究により得られたこれらの情報は、ハスカップの栽培系統の育成、野生種の保全、北ユーラシアや北アメリカに自生する海外の野生種との比較研究の上での基礎的知見として重要なものとなると考えられる。

さらに、これらの野生種から倍数体の作出を試み、倍数体シリーズを得ることに成功した。倍数体はゲノム量の増加による組織・器官の大型化、成分含量の増加、病害抵抗性やストレス耐性の増加など育種的利点が知られている。ハスカップの形質改良に向けて、本研究で育成した倍数体系統は有用な育種素材となることが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 荒 木 肇

副 査 教 授 山 田 敏 彦

副 査 教 授 大 原 雅

副 査 助 教 星 野 洋一郎

副 査 准教授 富士田 裕 子 (北海道大学北方生物圏

フィールド科学センター)

## 学 位 論 文 題 名

### Studies on ploidy distribution, DNA content variations and production of polyploid plants in Japanese blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.)

(ハスカップにおける倍数性分布, DNA 含量の変異  
および倍数体作出に関する研究)

ハスカップ (*Lonicera caerulea* L.; 英名: blue honeysuckle ブルーハニーサックル) はユーラシア大陸北部から北アメリカ北部の寒冷な地域にかけて自生する灌木であり、北海道に広く分布するほか、本州中部以北の亜高山帯から高山帯に自生することが知られている。その果実にはアントシアニンなどの機能性成分が豊富に含まれ栄養価が高く、北海道では有用な小果樹として古くから利用されてきた。しかし、ハスカップの栽培は野生株が主体であるため、果実品質や収量にばらつきが大きい。生産安定や収穫作業の効率化のため、多収で大果、良食味、日持ち性が良く、早生・晩生の優良系統の育成が望まれている。そこで、野生種の遺伝的多様性を解析するとともに、倍数体がもつ器官の大型化などの形質を利用する倍数性育種に着目し様々な倍数体を作成することによる形質改良を試みた研究で、概要は以下である。

第1章では、本邦に自生する株の倍数性と特性を考察している。すなわち、北海道 (横津岳・勇払湿原・ピヤシリ山・大雪山・美幌峠・大樹・釧路湿原・別寒辺牛湿原・霧多布湿原・別海・標津湿原) および本州の栃木県日光市戦場ヶ原湿原に自生する野生種を収集し、フローサイトメーターおよび染色体観察から倍数性を調査したところ、2倍体 ( $2n = 2x = 18$ ) と4倍体 ( $2n = 4x = 36$ ) が自生することが明らかとなった。2倍体は道東地域の低地湿原にのみ自生するのに対し、4倍体は低地の湿原から高山帯まで様々な環境下に自生しているこ

とから、4倍体は環境適応性が高いことを認めた。フローサイトメーターを用いた相対的DNA含量も4倍体は集団間で変異がみられ、自生地の高くなるにつれて低いDNA含量を示す傾向があった。このような倍数性と分布域に関する知見は初めてのものであり、環境条件とハスカップの適応性の研究に発展させることが可能である。

第2章では、野生から採取した2倍体と4倍体およびこれまでに育成された6倍体および8倍体を育種素材に用いて倍数体で交雑を行って3倍体や5倍体も育成したところ、倍数性が高くなるにつれ気孔サイズおよび花粉直径が大きくなる傾向がみられ、ハスカップの形質改良の目標の一つである果実の大型化に向けて、有用な育種素材となることが認められた。交雑組み合わせにおいて胚と胚乳の倍数性比が2:3にすることが交雑実生の育成（胚珠培養による未熟胚の救済や獲得種子の発芽処理）に有効であることを認め、交雑組み合わせの選択に有用な知見を提供した。

第3章では育種期間を短縮できる新規倍数体育種法として、 $4x \times 4x$ の交雑由来の6倍性の胚乳培養を開発した。MS培地にBAとIBAを添加した培地に胚乳を置床することで、カルスを経由して不定芽原基が分化し、その原基をBAと $GA_3$ を添加した1/2強度のMS培地に移植して不定芽を分化させた。そして不定芽はホルモンフリーの1/2 MS培地で植物体に再生し、フローサイトメーターと染色体観察から、再生植物体は胚乳の倍数性を保持する6倍性であった。従来は3倍体を作成して倍加処理、または4倍体と8倍体を交雑で6倍体を獲得してきたが、本手法では4倍体からダイレクトに6倍体を作成でき、育種期間短縮に寄与できる。

胚乳は栄養貯蔵器官で、胚の成長を支えた後に退化する運命にある特異な組織だが、本研究により、ハスカップ胚乳は遺伝的な可塑性を持ち、培養条件下で植物体になる能力を証明できたことから、胚乳の始原である重複受精を出発点とした胚発生・胚乳分化機構を探る新たなツールとなる。

本研究はハスカップの品種改良を目指して体系的に取り組んだ最初の育種学的な研究である。日本に自生するハスカップにを供試して倍数性と地理的分布の情報、および遺伝的多様性に関する情報を提示したが、これらはハスカップの栽培系統の育成、野生種の保全、北ユーラシアや北アメリカに自生する海外の野生種との比較研究をする上で重要な基礎的知見と考えられる。これらの野生種から倍数体の作出を試み、倍数体シリーズを得ることに成功し、倍数体において組織・器官の大型化等を観察しており、ハスカップの形質改良に向けて、本研究で育成した倍数体系統は有用な育種素材となることが期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。