

健康食品として注目される北方系小果樹の育種に関する研究

大澤 勝次・鈴木 卓・三上 哲夫

(北海道大学大学院農学研究科)

北方系小果樹には、果実にアントシアニン等のポリフェノール類やアスコルビン酸といった機能性成分を多量に含むものが少なくない。例えば、北米原産のアロニア（バラ科）の果実には、ブルーベリーのご2倍以上のアントシアニンが含まれるほか、カロチノイド系色素（ β -カロチンと β -クリプトキサンチン）の含有量も目立って多い。また、北海道に自生するハスカップ（スイカズラ科）の果実もアントシアニンとアスコルビン酸に富んでおり、30年前程から栽培化が進められてきた。現在では、北海道の特産品としてハスカップの菓子やワインなどが生産されている。ところが、ハスカップ果実の需要は多いにもかかわらず、近年北海道における栽培面積と生産量は減少傾向にある。果実が小さいため、収穫に手間（コスト）が掛り過ぎるのが最大の原因と云ってよい。アロニアについても、果実が小さいことが栽培上の難点となっている。機能性食品の素材として大きな将来性を秘めた、これら北方系小果樹の栽培

を定着させ、新しい果樹産業として発展させてゆくには、優良個体を選抜し効率的な栄養繁殖法により種苗の増殖を図るとともに、大粒果実を着生する倍数性品種の育種が急務である。そこで、これら機能性に優れた北方系小果樹を材料に、茎頂培養を利用した種苗の大量繁殖技術の確立ならびに倍数体作出を目指し、研究を行った。

1. 茎頂培養による種苗の効率的な栄養繁殖

ハスカップについては、当研究室で既に茎頂培養により組織培養系を確立し、種苗を増殖することに成功している。そこで、まだ培養系が確立できていないアロニアについて、茎頂培養による優良個体の効率的な栄養繁殖の可能性を検討した。

1.1 初代培養

北海道立林業試験場（北海道美唄市）に栽植されている10年生アロニアから1998年3月10日に採取した休眠枝の腋生葉芽から茎頂（横径約1 mm、葉原基4個をもつ）を無菌的に取り出し、

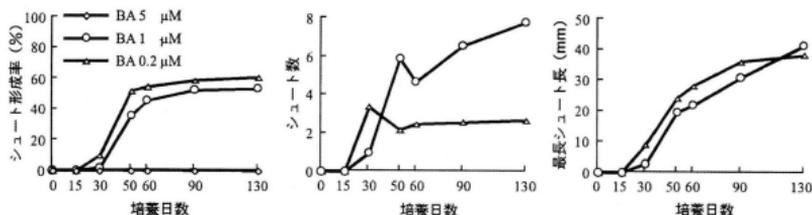


図1 アロニアの茎頂培養（初代培養）におけるシュート形成に及ぼす培地中のBA濃度の影響ならびにその経時変化。シュート形成率は、生存した茎頂に対するシュートを形成した茎頂の割合（%）の平均値で示し、シュート数および最長シュート長は、シュートを形成した茎頂当たりの平均値で表した。

初代培養を行った。培養には、Murashige & Skoog 培地の無機塩およびビタミン類の濃度を、不変、1/2、1/4、1/8 および 1/16 とし、BA0.2、1 および 5 μM 、シヨ糖 30g/l、寒天 7g/l を添加し、pH5.7 に調整したものをを用いた。初代培養では、BA0.2 μM および 1 μM 添加区においては、培養 60 日後まで生存した莖頂の半数にシュート形成が認められたが、BA5 μM 添加区では、莖頂生存率が極めて低く、シュート形成は認められなかった (図 1)。シュート数は、BA1 μM 添加区で 0.2 μM 添加区より多かった。また、生存率は、無機塩およびビタミン類の濃度が 1/4 および 1/8 の区において、90% 以上と高かった。

1.2 継代培養

継代培養は、初代培養で得られたシュートの節部切片を外植体とし、上記と同様の培養基を用いて行った。継代培養では、培地組成にかかわらず全ての培養体が生存し、初代培養と比べて培養特

性が異なることが明らかになった。シュート形成は BA 濃度の影響を受け、培養 60 日後におけるシュート形成率は、BA1 μM および 5 μM 添加区で 90% 以上の極めて高い値となった (図 2)。特に、小葉の密生した長いシュート (平均 35mm) が多数 (培養体当たり平均 9 本) 形成された。無機塩およびビタミン類の濃度が不変の BA5 μM 添加区は、シュートの効率的な増殖に適していると考えられる (図 3、図 4)。一方、BA 低濃度添加区で形成されたシュートは、大葉が少数着生した形状を呈した。

1.3 発根

継代培養で得られたシュート (図 4) を、試験管に詰め殺菌した用土 (パーミキュライト: 鹿沼土; 1:1) へ無菌的に挿木したところ、90% 以上が良好に発根した (図 5)。

1.4 鉢上げおよび馴化

発根したシュートを試験管から取出し、市販の園芸用土へ移植し馴化した。幼植物体は、一度落

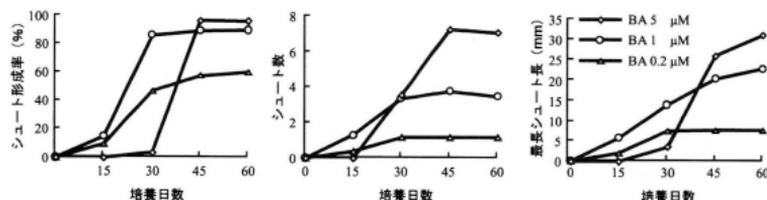


図 2 アロニアのシュート節部切片培養 (継代培養) におけるシュート形成に及ぼす培地中の BA 濃度の影響ならびにその経時の変化。シュート形成率は、生存した外植体に対するシュートを形成した外植体の割合 (%) の平均値で示し、シュート数および最大シュート長は、シュートを形成した外植体当たりの平均値で表した。

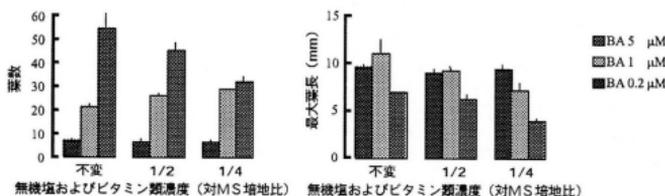


図 3 アロニアのシュート節部切片培養 (継代培養) におけるシュート形成外植体当たりの葉数および最大葉の葉長に及ぼす培地中の無機塩、ビタミン類および BA 濃度の影響。培養 60 日後の調査結果を示す。垂直線は SE を表す。

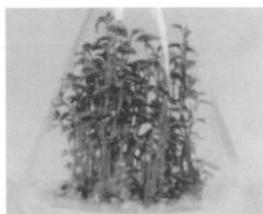


図4 アロニアの初代培養において形成されたシュートの形状。MS培地(不変)にBA 5 μ Mを添加した区の写真を示す。

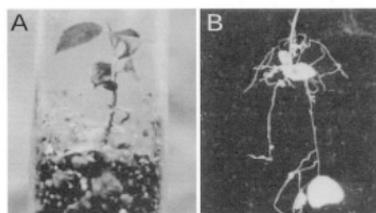


図5 アロニアシュートからの発根。A. 試験管内に詰めた用土(パーミキュライトと鹿沼土を等量ずつ混合したもの)に無菌的に挿木された培養体シュート; B. 発根の様子(処理2か月後)。

葉した後、移植2週間後から新しい葉を展開し始め、移植4か月後には草丈50cmで副梢を有する完全な植物体に成長した(図6)。

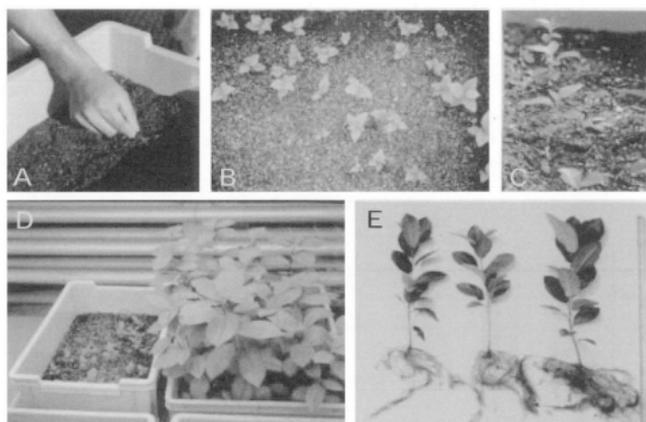


図6 発根したアロニア培養体の鉢上げ・馴化の様子。A. 園芸用土へ移植している様子; B. 移植半月後の幼植物体(落葉後新しい葉が展開); C. 移植1か月後; D. 移植4か月後(右); E. 発根の様子(Dの植物体を掘り出したもの)。

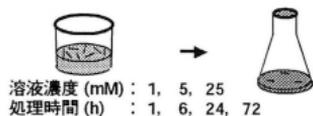
2. 無菌培養系を利用したコルヒチン処理による倍数体作出

2.1 ハスカップ培養体からの倍数体作出

ハスカップ培養体を用いて、倍数体を作成するためのコルヒチン処理の適条件を検討した。

〔材料および方法〕 継代培養により無菌的に維持・増殖しているハスカップ *in vitro* 培養体シートから切り出した節部切片(長さ約5mm, 1節をもつ)を材料とした。培養は、MS培地の無機塩およびビタミン類の濃度を1/2とし、BA1 μ M, GA₃ 1 μ M, ショ糖 30g/lおよび寒天 7g/lを添加し、pH5.7に調整した培養基を用い、25 $^{\circ}$ C, 1日16時間照明(白色蛍光灯, 約60 μ mol/m²/s)の条件下で行った。培養基は、100ml容三角フラスコに20mlずつ分注後、1.1Kg/cm², 120 $^{\circ}$ Cで10分間滅菌した。コルヒチン処理は、以下の3つ方法により行った(図7)。①培養前処理: 材料を、フィルター除菌した1, 5および25mMコルヒチン溶液に1, 6, 24および72時間浸漬後、上記の培養基に植え込んだ。②培養中コルヒチン溶液上層添加: 継代培養20日後の培

1. 培養前処理



2. 培養中コルヒチン溶液上層添加処理



3. コルヒチン添加培地での培養



図7 本研究で検討したコルヒチン処理法の模式図

養体を搭載した寒天培地に、フィルター除菌した 1, 5, 10 および 25mM コルヒチン溶液 5ml を上層添加し、そのまま培養を継続した。③コルヒチン添加培地を用いた培養：基本培地をオートクレーブ後、寒天が固化する前に予めフィルター除菌したコルヒチン溶液を添加・攪拌し、培地中のコルヒチン濃度が 0.5, 1, 5 および 10mM となるように作製した培養基を用いて培養した。1 処理区当たりの外植片数は何れも 18 とした。コルヒチン処理開始から 1, 2 および 3 か月後に、外植片の生存（緑色を呈し、何らかの成長が認められたもの）、カルス形成、シュート形成（長さ 3mm 以上に伸長したもの）、シュート数およびシュート長について調査した。また、培養 4 か月後には、形成されたシュートを切り出し節部切片を継代培養するとともに、節部に着生していた展開

葉（2～3枚）の倍数性を、プロイディアアナライザー（Partec 社製，PA 型）を用いて調査した。

[結果および考察] 培養前処理における外植片の生存率（培養 1 か月後）およびシュート形成率（培養 2 か月後，生存外植片当たり）は各々 30～86%（対照区 100%）および 17～100%（対照区 94%）の値を示し，どちらもコルヒチン濃度が高く処理時間が長い程低い傾向を示した。カルス形成率（培養 3 か月後，生存外植片当たり）は，25～72%（対照区 9%）とコルヒチン処理区で高かった（図 8）。再生シュートの数および長さは，培養 1 か月後ではコルヒチン処理区で著しく小さかったが，培養 2～3 か月後には対照区とほぼ同等の値となった（図 9）。コルヒチン処理後に得られたシュートの倍数性を調査した結果，25mM コルヒチン溶液 1 時間処理区で 2 倍性および 4 倍

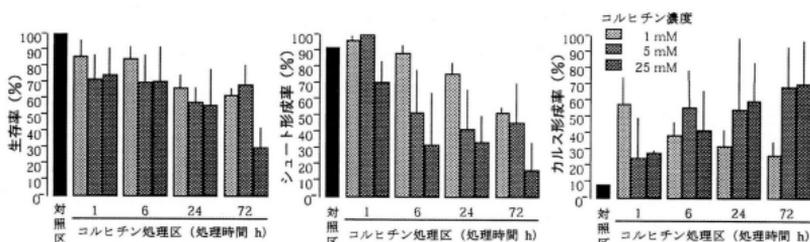


図 8 外植片の生存，シュート形成およびカルス形成に及ぼす培養前コルヒチン処理の影響。対照区は，コルヒチン処理を行わずに通常の継代培養を行った区を示す。垂直線は SE を表す。

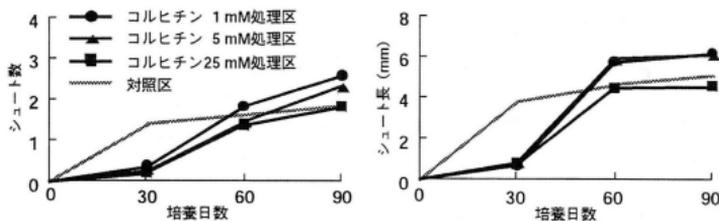


図9 再生シュートの成長に及ぼす培養前コルヒチン処理の影響。培養60日後急にシュートを形成した外植体についての随時的な調査結果を示す。

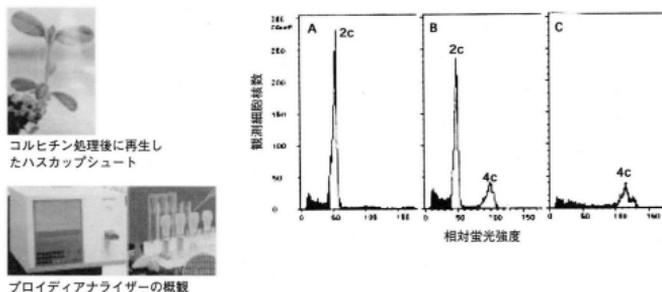


図10 コルヒチン処理後のハスカップ培養体後代に認められた倍数性の変異。A, 2倍性; B, 2倍性+4倍性; C, 4倍性。

性ピークをもつキメラシュート1本が確認された(図10-B)。

次に、培養中コルヒチン溶液上層添加処理における生存率は67～83%、シュート形成率は58～100%で(表1)、コルヒチン添加培地で培養した場合の生存率は80～100%、シュート形成率は67～100%となり(表2)、何れもコルヒチン処理期間が長いにもかかわらず高い値を示した。シュートは、生存外植片当たり1～1.7本形成さ

れた。

これらのシュートの倍数性を調査した結果、培養中上層添加(1および10mM区)で1倍性と2倍性のキメラシュート2本および2倍性と4倍性のキメラシュート1本、コルヒチン添加培地(1, 5および10mM区)で1倍性と2倍性のキメラシュート6本および2倍性と4倍性のキメラシュート4本が形成された(表3)。対照区では1倍性および4倍性のピークをもつキメラシュー

表1 培養中コルヒチン溶液上層添加処理における外植体の生存および成長に及ぼすコルヒチン濃度の影響

コルヒチン濃度 (mM)	供試外植体数	生存数 (%) ^a	カルス形成数 (%) ^b	シュート形成数 (%) ^c	シュート本数
1	12	10 (83.3)	2 (20.0)	10 (100.0)	1.4
5	12	9 (75.0)	2 (22.2)	7 (77.8)	1.7
10	18	13 (72.2)	5 (38.4)	9 (69.2)	1.1
25	18	12 (66.7)	6 (50.0)	7 (58.3)	1.3
対照区	18	18 (100.0)	0 (0.0)	17 (94.4)	2.1

培養60日後に調査。対照区は、コルヒチン溶液上層添加を行わずに培養した区を示す。シュート本数は、シュート形成外植体当りの平均値を表す。^a生存外植体数/供試外植体数×100。^bカルス形成外植体数/生存外植体数×100。^cシュート形成外植体数/生存外植体数×100。

表2 外植体の生存および成長に及ぼす寒天培地中のコルヒチン濃度の影響

コルヒチン濃度 (mM)	供試外植体数	生存数 (%) ^a	カルス形成数 (%) ^b	シュート形成数 (%) ^c	シュート本数
0.5	12	12 (100.0)	1 (8.3)	12 (100.0)	1.3
1	12	11 (91.7)	2 (18.2)	10 (90.9)	1.2
5	15	13 (86.7)	4 (30.7)	11 (84.6)	1.3
10	15	12 (80.0)	6 (50.0)	8 (66.7)	1.0
対照区	18	18 (100.0)	0 (0.0)	17 (94.4)	2.1

培養60日後に調査。対照区は、コルヒチン無添加培地で培養した区を示す。シュート本数は、シュート形成外植体当りの平均値を表す。^a生存外植体数/供試外植体数×100。^bカルス形成外植体数/生存外植体数×100。^cシュート形成外植体数/生存外植体数×100。

表3 再生シュートの倍数性に及ぼすコルヒチン処理の影響

処 理	コルヒチン濃度 (mM)	調査シュート数	倍数性		
			X+2X 数 (%)	2X 数 (%)	2X+4X ^a 数 (%)
培養前処理	25 [1h]	13	0 (0.0)	12 (92.3)	1 (7.7)
培養中上層 添加	1	14	1 (7.1)	12 (85.7)	1 (7.1)
	10	10	1 (10.0)	9 (90.0)	0 (0.0)
培地中添加	1	12	3 (25.0)	9 (75.0)	0 (0.0)
	5	14	0 (0.0)	13 (92.9)	1 (7.1)
	10	8	3 (37.5)	2 (25.0)	3 (37.5)
対照区		35	0 (0.0)	35 (100.0)	0 (0.0)

シュートの倍数性は、プロイディアナライザーを用いて調査した。
^aX, 1倍性; 2X, 2倍性; 4X, 4倍性。

トの形成が確認されなかったので (図 10-A), これらのシュートの形成にもコルヒチン処理が影響したものと考えられる。

以上の結果, 生存および再生率が高く, 4倍性シュートの出現数が最も多かった10mMコルヒチン添加培地での培養が, 倍数体作出に適していると考えられる。この処理区で得られた2倍性および4倍性キメラシュートの形状を, 図 11に示す。なお, これらのキメラシュートを継代培養し, その後代シュートの倍数性をプロイディアナライザーを用いて調べたところ, 4倍性のピークのみを有するシュートの分離に成功した (図 10-C)。これらのシュートは, さらに継代・増殖し, 発根処理および鉢上げ・馴化後, 40個体を圃場に定植した。今後は, これらの再生個体について染色体レベルでの倍数性の確認および形態調査を行う予定である。

2.2 アロニア培養体からの倍数体作出

継代培養により無菌的に維持・増殖しているアロニア in vitro 培養体シュートから切り出した節部組織片を材料とし, 倍数体作出を試みた。ハスカップの結果を参考に, アロニアについてもコルヒチン添加培地を用いて実験を行った。継代用の培地にコルヒチン濃度が0.5, 1, 5および10mM



図11 コルヒチン10mM添加培地で得られた2倍性および4倍性キメラシュートの形状 (ハスカップ)。

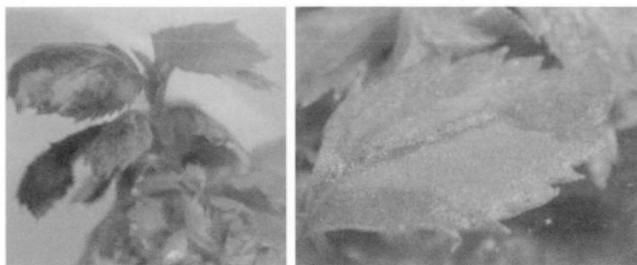


図12 コルヒチン添加培地で培養後、継代3代目に認められたキメラシュートの形状（アロニア）。葉の一部がキメラ状を呈している。これらのシュートは、何れもプロイディアナライザー分析により2倍性および4倍性のピークを示した。

となるように添加したものを培養基として用いた。1処理区当たりの外植片数は何れも18とした。

アロニア培養体は、ハスカップの場合とは異なり、コルヒチン10 μM 添加区で生存個体は得られず、コルヒチン5 μM 添加区における生存率も低かった。コルヒチン0.5および1 μM 添加区における生存率は80%以上と比較的高かった（データ未掲載）。これらの生存個体から得られた、再生シュートの倍数性をプロイディアナライザーを用いて調査したところ、何れも明確なピークを示さなかった。そこで、これらのシュートを、新しい継代培地（コルヒチン無添加）に移植し継代

培養を繰り返したところ、継代3代目以降に2倍性および4倍性のキメラシュートの発生を確認した。これらのシュートに着生している葉は形態的にキメラ状を呈しており（図12）、プロイディアナライザー分析の結果を裏付けていた。

現在、これらのシュートをさらに継代培養し、単独の倍数性ピークを示すシュートの分離を検討している。今後は、倍数性シュートが発生する機構を明らかにするため、継代3代目に発生したキメラシュートを組織化学的方法を用いて調査するとともに、これらのシュートから再生個体を得て、染色体レベルでの倍数性調査を行う予定である。

Polyploidy breeding of functional northern small fruit trees by utilizing *in vitro* cultures treated with colchicine

Katsuji Oosawa, Takashi Suzuki and Tetsuo Mikami

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) and blueberried honeysuckle (*Lonicera caerulea* L. var. *emphylocaryx* Nakai) are one of the most respectable northern small fruit trees in Japan, because the fruits of those species are rich in many functional elements, such as anthocyanins, carotenoids and ascorbic acid. However, the fruits are too small for commercial cultivation. Thus, in order to breed cultivars that bear larger fruits, polyloid breeding has been adopted for *in vitro* cultures of these two plants. The results are summarized as follows:

1. The primary culture of black chokeberry shoot apices was successful on media containing 1/4 strength of Murashige & Skoog's ingredients supplemented with 0.2-1 μ M benzyladenine (BA). The shoots obtained by primary culture were proliferated effectively on the normal strength of MS medium supplemented with 5 μ M BA. Cuttings of the shoot rooted easily (90%) in vermiculite.

2. The culturing on colchicine-supplemented media of blueberried honeysuckle explants was the most effective for obtaining polyploidy shoots among three colchicine treatments examined (immersion in colchicine solution before culturing, addition of colchicine solution on subcultures, and culturing on media supplemented with colchicine).

3. Ploidy analyzer (a type of cell sorter) analysis showed that chimeric tissue of diploid and tetraploid had occurred first from colchicine-treated explants of both blueberried honeysuckle and black chokeberry, and then tetraploidy shoots could be separated from the chimeric shoots during several subculture repetitions. The tetraploidy plants of blueberried honeysuckle that had formed roots were transplanted to soil in the greenhouse and then to the field.