

# オリザリンおよびコルヒチン処理によるスノキ属植物における倍数体の作出

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者名	津田, 浩利 小島, 祥子 鉄村, 琢哉 小松, 春喜 國武, 久登
発行元	園芸学会
巻/号	11巻2号
掲載ページ	p. 205-212
発行年月	2012年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## オリザリンおよびコルヒチン処理によるスノキ属植物における倍数体の作出

津田浩利<sup>1</sup>・小島祥子<sup>2</sup>・鉄村琢哉<sup>2</sup>・小松春喜<sup>3</sup>・國武久登<sup>2\*</sup><sup>1</sup> 宮崎大学大学院農学工学総合研究科 889-2192 宮崎市学園木花台西<sup>2</sup> 宮崎大学農学部 889-2192 宮崎市学園木花台西<sup>3</sup> 東海大学農学部 869-1404 阿蘇郡南阿蘇村河陽Induction of Polyploids in *Vaccinium* Using Oryzalin and Colchicine TreatmentsHirotooshi Tsuda<sup>1</sup>, Shoko Kojima<sup>2</sup>, Takuya Tetsumura<sup>2</sup>, Haruki Komatsu<sup>3</sup> and Hisato Kunitake<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192<sup>2</sup>Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192<sup>3</sup>School of Agriculture, Tokai University, Kumamoto 869-1404

## Abstract

To establish an efficient polyploid induction method, we carried out *in vitro* chromosome doubling of multiple shoots in some *Vaccinium* species. Multiple shoots were aseptically treated with two antimitotic agents, oryzalin and colchicine, at different concentrations and times. After these treatments, the shoots were successively cultured on MW medium containing 5 mg · L<sup>-1</sup> zeatin. The ploidy levels of growth shoots were evaluated by both flow cytometry and chromosome counting. The frequency of chromosome-doubled plant production depended on the kinds of antimitotic agent, treatment concentrations and times, and species. Among the treatment conditions tested, oryzalin induced more chromosome doubling than colchicine. Four species of chromosome-doubled plants were obtained with 0.005% 24-hour oryzalin treatment at the following frequencies: *V. corymbosum* 'Berkeley': 23.3%, *V. smallii*: 5.6%, *V. vitis-idaea*: 40.0%, *V. uliginosum*: 57.8%. These results suggest that oryzalin is very effective for polyploid induction of multiple shoots in *Vaccinium*.

**Key Words** : blueberry, chromosome doubling, flow cytometry, multiple shoot, wild Japanese species

**キーワード** : ブルーベリー, フローサイトメーター, 日本産野生種, 染色体倍加, 多芽体

## 緒 言

現在, 我が国で栽培されているブルーベリーは, 四倍体の北部ハイブッシュブルーベリー (*Vaccinium corymbosum* L.) と南部ハイブッシュブルーベリー (*V. corymbosum* interspecific hybrid) および六倍体のラビットアイブルーベリー (*V. virgatum* Aiton) の3種であり, これらの多くは米国で育成されたものである。一方, 我が国には, ブルーベリーと近縁のスノキ属植物が14種または18種自生している(北村・村田, 1971; 山崎, 1989)。岩垣(1984)は, 古くからこれら日本産野生種の育種素材としての有望性を指摘してきたが, ブルーベリーの品種改良にはほとんど利用されなかった(Hiirsalmi, 1988)。ブルーベリーやその近縁野生種であるビルベリー (*V. myrtillus* L.) は, ポリフェノールなどの抗酸化成分を多く含む機能性果実として注目されている(Kaltら, 1999)。Yoshizawaら(2002)は, 我が国に自生するナツハゼ (*V. oldhamii* Miq.) の果実抽出物のガン細

胞増殖抑制効果を報告しており, 高木ら(2005)は, ナツハゼ果実がブルーベリー栽培品種と比較して高い抗酸化能やポリフェノールを有していることを明らかにしており, 日本産野生種の育種への活用が望まれている。近年, 小松ら(2003, 2006)は, 我が国に自生して果実のポリフェノール含量と抗酸化活性が栽培種よりも高いクロマメノキ (*V. uliginosum* L.) と, 食味に優れる北部ハイブッシュブルーベリー 'Bluecrop' との種間交雑を行い, 両親の中間の果実特性を有する雑種を獲得しており, これらが食味に優れた機能性に富む新品種育成のための育種母本になり得ると報告している。

米国では, ブルーベリー育種の開始以来, 様々な近縁野生種が品種改良に利用されてきた(Chavez・Lyrene, 2009a)。しかしながら, スノキ属においては, 三倍体接合体の崩壊による強いトリプロイドブロックが原因で, 二倍体野生種と四倍体のハイブッシュブルーベリーとの交雑は容易でない(Sharp・Sherman, 1971)。一方, スノキ属における同倍数体間の交雑においては, 稔性を有する樹勢の強い雑種が多数得られている(Lyrene・Ballington, 1986)。そのため, 二倍体野生種を人為的に染色体倍加することで, 四倍体と

2011年7月11日 受付. 2011年9月24日 受理.

\* Corresponding author. E-mail: hkuni@cc.miyazaki-u.ac.jp

の交雑が容易になると考えられる (Chavez・Lyrene, 2009b). 実際、二倍体の *V. elliotii* Chapm. を花粉親として四倍体の南部ハイブッシュブルーベリーと交雑した結果、受粉1花当たりの獲得実生数が0.01であったのに対し、コルヒチン処理により得られた *V. elliotii* Chapm. の同質四倍体を花粉親とした場合では3.86であった (Dweikat・Lyrene, 1991).

コルヒチンによる人為的な倍数体作出方法 (Blakeslee・Avery, 1937) が開発されてから、様々な有糸分裂阻害物質が染色体倍加に利用されてきた。ジネトロアニリン系除草剤であるオリザリン [3,5-ジネトロ-4-(ジプロピルアミノ)ベンゼンスルホンアミド] ( $C_{12}H_{18}N_4O_6S$ ) は、低濃度で多くの染色体倍加個体が得られること (Väinölä, 2000)、奇形器官や成育異常の発生が少ないこと (van Tuyt ら, 1992) などの理由により、近年コルヒチンと同様に染色体倍加に利用されている。実際に、リンゴ (Bouvier ら, 1994)、ナシ (Bouvier ら, 2002)、バナナ (Van Duren ら, 1996) およびキンカン (八幡ら, 2004) など、多くの果樹でオリザリンによる染色体倍加が行われている。スノキ属植物においても、種子 (Chavez・Lyrene, 2009b; Miyashita ら, 2009; Rousi, 1967) や成長点 (Dweikat・Lyrene, 1989; Moore ら, 1964) にコルヒチンを処理することにより染色体倍加個体が作出されているが、これまでにコルヒチン以外の有糸分裂阻害物質の有効性は全く検討されていない。さらに、スノキ属植物の染色体倍加個体の誘導率に言及した報告は少なく、効率的な染色体倍加方法は確立されていない。

そこで本研究では、まず、スノキ属植物における染色体倍加方法を確立するために、栽培品種の多芽体由来シュートをオリザリンとコルヒチンに浸漬処理し、染色体倍加に最適な処理濃度と時間を検討した。次に、栽培品種で確立した最適条件を用いて、我が国に自生するスノキ属植物4種の染色体倍加を試みた。

## 材料および方法

### 1. 栽培品種でのコルヒチンおよびオリザリン処理条件の検討 (実験1)

植物材料として、北部ハイブッシュブルーベリー 'Berkeley' を供試した。Tetsumura ら (2008) と山内 (佐藤) ら (2012) の方法に従い、発芽直前の腋芽を滅菌した後、2%スクロース、0.8%寒天および  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zeatin を添加した MW 培地 [MS 培地 (Murashige・Skoog, 1962) と WPM 培地 (Wolfe ら, 1983) を等量混合] (pH 4.8) に置床し、 $25^\circ\text{C}$ 、24時間連続照明下 ( $38 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) で多芽体を誘導した。2か月ごとに同培地で多芽体を継代培養し、実験に必要なシュート数になるまで継代培養を繰り返した。

新たに発生したシュートを約40mm長に調製し、 $0.2 \mu\text{m}$  のフィルター (ザルトリウス) で滅菌したコルヒチン溶液またはオリザリン溶液に浸漬した。なお、オリザリン溶液は Dimethyl sulfoxide (最終濃度2%) で溶解した。コルヒチン処理は、4種類の濃度 (0.001, 0.005, 0.1 および 0.2%)

と10種類の処理時間 (0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 および 96時間) を組み合わせた20処理区とした。一方、オリザリン処理は、2種類の濃度 (0.001 および 0.005%) と3種類の処理時間 (12, 24 および 48時間) を組み合わせた6処理区を設けた。なお、いずれの処理区も30本のシュートを供試した。コルヒチンまたはオリザリン処理後のシュートを、滅菌水で3回洗浄し、20mmずつに切り分け、前述した培地上に置床した。培養2か月後に、処理したシュートの腋芽から発生したシュートのうち1本を無作為に選び、フローサイトメーター (FCM; EPICS XL, BECKMAN COULTER) で倍数性を解析した。一部改良を加えた Yahata ら (2005a) の方法に従い、採取した試料50mgに1mL chopping buffer [ $6.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Triton X-100,  $6.06 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  トリス塩酸,  $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  RNase,  $50.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Polyvinylpyrrolidone (PVP-10), pH 7.5] を加え、シャーレ上で約100回細かく刻み、 $20 \mu\text{m}$  Cell Trics filter (Partec) によりろ過した。さらに、測定直前に、ろ液に  $50 \mu\text{l}$  の  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Propidium iodide 溶液を加えて混合することで核を蛍光染色し、相対蛍光強度別に核をカウントした。

染色体倍加個体と推測されたものを、山内 (佐藤) ら (2012) の方法に従い順化した。すなわち、FCM解析を行ったシュートと同位置の腋芽から新たに伸長したシュートを採取し、ピートモスとボラ土を等量混合したセル成型トレー ( $20 \times 20 \times$  深さ40mm/セル) に根の無い状態で直接挿し木した。挿し木後、セル成型トレーはプラスチック製の密閉容器に入れ、 $25^\circ\text{C}$ 、相対湿度90~100%、 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  の12時間照明条件下のインキュベータ内で発根と順化を同時に行った。

また、順化2~4週間後に、植物体から根端0.5cmを採取し、一部修正を加えた Fukui (1996) の方法に従い染色体を観察した。すなわち、採取した根端を2mM 8-ヒドロキシキノリンで室温、2時間前処理後、固定液 (エタノール:酢酸=3:1) で室温、1時間固定した。固定後、根端を蒸留水で30分間水洗して固定液を取り除き、3%セルラーゼ "オノズカ" RS (ヤクルト)、2%マセロザイム R-200 (ヤクルト)、1%ペクトリアーゼ Y-23 (キッコーマン) および200mM EDTA を含む酵素液に  $37^\circ\text{C}$  で30分間浸漬した。酵素処理後、根端をスライドガラス上に移し、固定液を加えて細胞を拡散させ、室温で乾燥させた後2%ギムザ液で30分間染色し、水洗後に乾燥させて染色体標本を作成した。これらの染色体標本について、光学顕微鏡 (BX-51, OLYMPUS) を用いて染色体数を数えた。なお、順化後の倍加個体は、ラビットアイブルーベリー台木に接ぎ木して育成した。

### 2. オリザリン処理による日本産野生種の染色体倍加 (実験2)

ナツハゼ (二倍体)、スノキ (*V. smallii* A. Gray) (二倍体)、コケモモ (*V. vitis-idaea* L.) (二倍体) およびクロマメノキ (六倍体) の腋芽を用いて、前記と同様の方法で多芽体を誘

導した。なお、ナツハゼとクロマメノキは新潟県立植物園、スノキは樹美庵（園芸店）、コケモモは湯沢園芸（園芸店）より導入した。これらの多芽体から得られたシュートを、実験1と同様の方法でオリザリン処理を行った。処理条件は、実験1の結果に基づき、0.005%・24時間とし、20～90本のシュートを供試した。培養2か月後に実験1と同様に、得られたシュートの倍数性を解析し、発根処理と順化を同時に行った。また、倍数性キメラ個体に関しては、順

化後に育成して染色体倍加個体を分離した後、ラビットアイブルーベリー台木に接ぎ木した。

## 結果

### 1. 栽培品種でのコルヒチンおよびオリザリン処理条件の検討（実験1）

コルヒチンとオリザリンを処理したシュートは、無処理区と比較して発芽が遅く、その傾向は処理濃度の上昇と処

第1表 北部ハイブッシュブルーベリー 'Berkeley' シュートへのコルヒチン処理が染色体倍加に及ぼす影響<sup>2</sup>

処理濃度 (%)	処理時間	供試数	生存シュート数	生存率 <sup>3</sup>	倍数性		
					4x (%) <sup>4</sup>	4x+8x (%)	8x (%)
対照区 <sup>5</sup>	0	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	12	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	24	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	48	30	29	96.7	22 (73.3)	6 (20.0)	1 (3.3)
	72	30	23	76.7	19 (63.3)	2 (6.7)	2 (6.7)
0.001	96	30	14	46.7	13 (43.3)	1 (3.3)	0 (0)
	12	30	20	66.7	15 (50.0)	5 (16.7)	0 (0)
	24	30	28	93.3	23 (76.7)	5 (16.7)	0 (0)
	48	30	17	56.7	12 (40.0)	4 (13.3)	1 (3.3)
	72	30	29	96.7	26 (86.7)	2 (6.7)	1 (3.3)
0.005	96	30	29	96.7	15 (50.0)	10 (33.3)	4 (13.3)
	0.5	30	29	96.7	28 (93.3)	1 (3.3)	0 (0)
	1	30	28	93.3	27 (90.0)	1 (3.3)	0 (0)
	2	30	28	93.3	28 (93.3)	0 (0)	0 (0)
	4	30	30	100	27 (90.0)	3 (10.0)	0 (0)
0.1	6	30	23	76.7	21 (70.0)	2 (6.7)	0 (0)
	0.5	30	29	96.7	26 (86.7)	2 (6.7)	1 (3.3)
	1	30	24	80.0	23 (76.7)	0 (0)	1 (3.3)
	2	30	30	100	25 (83.3)	5 (16.7)	0 (0)
	4	30	24	80.0	19 (63.3)	4 (13.3)	1 (3.3)
0.2	6	30	24	80.0	18 (60.0)	4 (13.3)	2 (6.7)

<sup>2</sup>コルヒチン処理後に MW 培地で2か月間培養を行い、各シュートの腋芽から新たに発生したシュートを無作為に1本選び、フローサイトメーターで倍数性を解析した

<sup>3</sup>(生存シュート数/供試数)×100により算出した

<sup>4</sup>括弧内は供試数に対する割合を示す

<sup>5</sup>調整したシュートを直接 MW 培地に置床して2か月間培養し、同様に倍数性を解析した

第2表 北部ハイブッシュブルーベリー 'Berkeley' シュートへのオリザリン処理が染色体倍加に及ぼす影響<sup>2</sup>

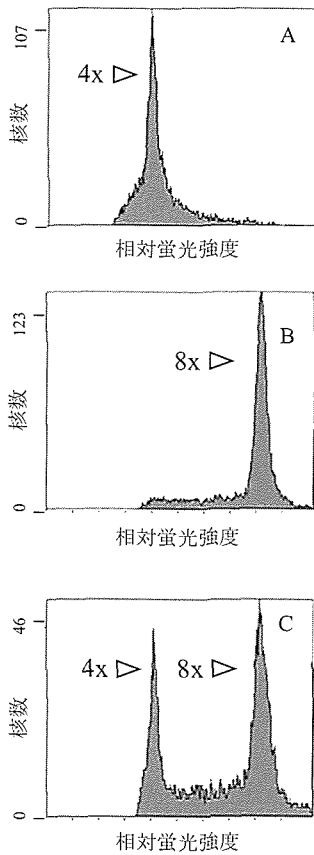
処理濃度 (%)	処理時間	供試数	生存シュート数	生存率 <sup>3</sup>	倍数性		
					4x (%) <sup>4</sup>	4x+8x (%)	8x (%)
対照区 <sup>5</sup>	0	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	12	30	30	100	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	24	30	30	100	23 (76.7)	7 (23.3)	0 (0)
0.001	48	30	26	86.7	22 (73.3)	3 (10.0)	1 (3.3)
	12	30	27	90.0	18 (60.0)	4 (13.3)	4 (13.3)
	24	30	24	80.0	16 (53.3)	1 (3.3)	7 (23.3)
0.005	48	30	1	3.3	1 (3.3)	0 (0)	0 (0)

<sup>2</sup>オリザリン処理後に MW 培地で2か月間培養を行い、各シュートの腋芽から新たに発生したシュートを無作為に1本選び、フローサイトメーターで倍数性を解析した

<sup>3</sup>(生存シュート数/供試数)×100により算出した

<sup>4</sup>括弧内は供試数に対する割合を示す

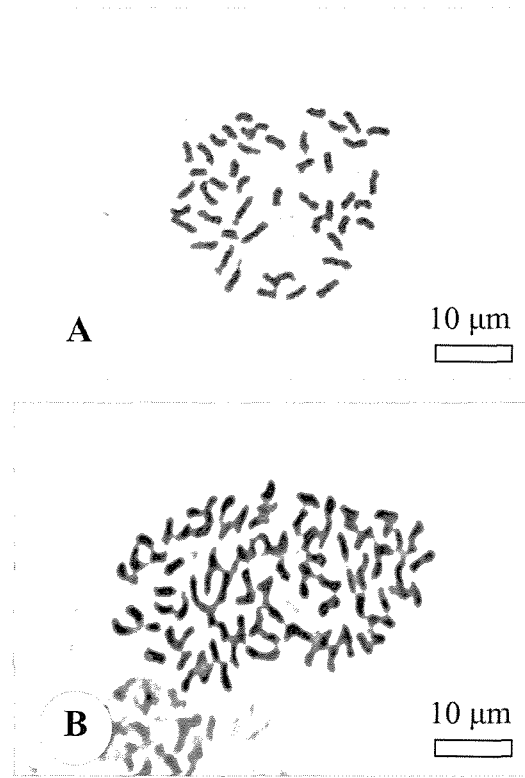
<sup>5</sup>調整したシュートを直接 MW 培地に置床して2か月間培養し、同様に倍数性を解析した



第1図 コルヒチン処理した北部ハイブッシュブルーベリー ‘Berkeley’ の多芽体由来シュートから新たに発生したシュートのフローサイトメーターによる倍数性解析  
A: 四倍体, B: 八倍体, C: 倍数性キメラ (四倍体と八倍体)

理時間の延長により、さらに強くなった。しかし、処理2か月後には個体数に差異があるものの、すべての処理区でシュートが得られた。

コルヒチン処理試験の結果(第1表)、0.001%の12および24時間処理ではすべてのシュートが生存していたが、48時間以上の処理区では処理時間が長くなるにつれて生存率が減少し、96時間処理では46.7%であった。0.005、0.1および0.2%では、処理時間がシュートの生存率に及ぼす影響



第2図 北部ハイブッシュブルーベリー ‘Berkeley’ (2n = 4x = 48) (A) とシュートへのコルヒチン処理から得られた八倍体 (2n = 8x = 96) (B) の根端の染色体

に一定の傾向は見られなかった。生存シュートのFCM解析を行った結果(第1図A~C)、四倍体、八倍体および倍数性キメラ(四倍体と八倍体)が認められた。0.001%の12および24時間処理では、すべてのシュートが四倍性を示した。しかし、48時間区では20.0%の倍数性キメラが誘導され、72時間区では6.7%のシュートが八倍体であった。0.005%のすべての処理区で倍数性キメラ(6.7~33.3%)が得られた。それに対し、八倍体は48時間以上の処理区で得られ、96時間が13.3%と最も高い染色体倍加個体誘導率を示した。0.1%区では、4時間処理で10.0%の倍数性キメラが得られたものの、染色体倍加個体は全く誘導できなかった。0.2%区では、2時間処理以外で染色体倍加個体が得られた

第3表 我が国自生スノキ属植物シュートへのオリザリン処理が染色体倍加に及ぼす影響<sup>2</sup>

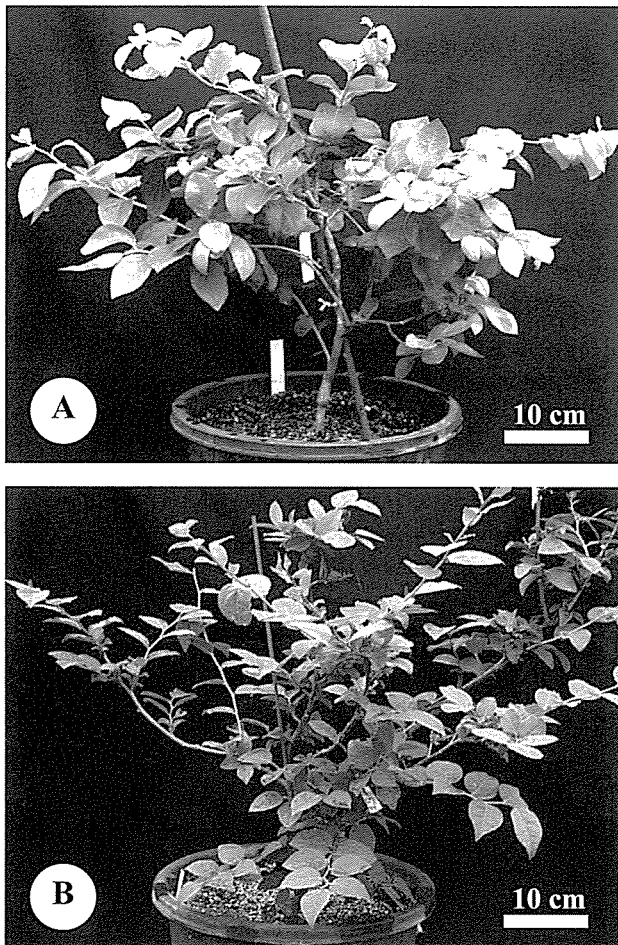
供試個体	供試数	生存シュート数	生存率 <sup>3</sup>	倍数性			
				2x [6x] (%) <sup>4</sup>	2x + 4x [6x + 12x] (%)	4x [12x] (%)	
ナツハゼ	30	26	86.7	23 (76.7)	3 (10.0)	0 (0)	
スノキ	90	82	91.1	44 (48.9)	33 (36.7)	5 (5.6)	
コケモモ	20	16	80.0	0 (0)	8 (40.0)	8 (40.0)	
クロマメノキ <sup>5</sup>	90	90	100	[21] (23.3)	[17] (18.9)	52 (57.8)	

<sup>2</sup>シュートを0.005%のオリザリン溶液に24時間浸漬後、MW培地で2か月間培養を行い、各シュートの腋芽から新たに発生したシュートを無作為に1本選抜しフローサイトメーターで倍数性を解析した

<sup>3</sup>(生存シュート数/供試数) × 100により算出した

<sup>4</sup>括弧内は供試数に対する割合を示す

<sup>5</sup>クロマメノキは六倍体のため、6x、6x + 12x および 12x を示した



第3図 オリザリン処理から得られた染色体倍加個体の接ぎ木2年後の様子  
A: 'Berkeley' (八倍体), B: ナツハゼ (四倍体)

が、その誘導率は6時間処理の6.7%が最高であった。

オリザリン処理を行った結果(第2表), 0.001%区の生存率は12, 24および48時間処理区において、それぞれ100, 100および86.7%であった。一方, 0.005%区では, 12および24時間区が90.0および80.0%の生存率であったのに対し, 48時間区では3.3%と非常に低い生存率であった。

0.001%区では, 染色体倍加個体が48時間区の1個体(3.3%)のみであった。しかし, 0.005%区では, 12および24時間処理でそれぞれ13.3および23.3%の染色体倍加個体が得られた。

FCM解析によって八倍体と推測された個体を順化し, 四倍体とともに根端の染色体数を観察した結果, それぞれ96および48本の染色体数を有する八倍体と四倍体であることが確認され, FCM解析の結果と一致した(第2図)。コルヒチン処理によって得られた八倍体は, 接ぎ木後2年を経過しても順調な生育を示している(第3図A)。

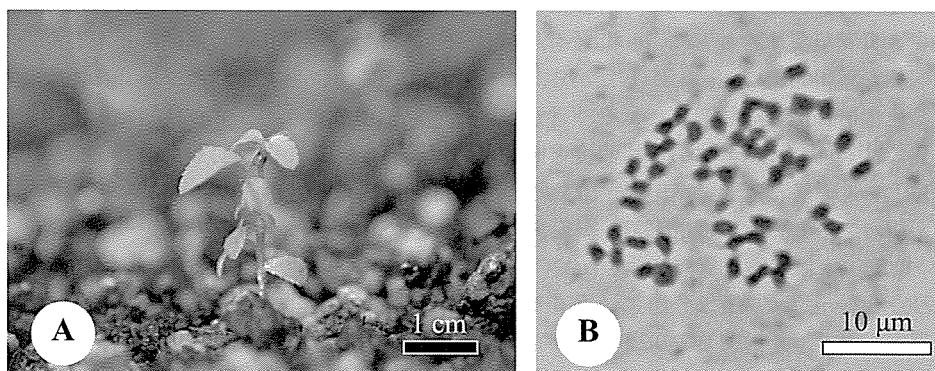
以上の結果, スノキ属植物においては, 0.005%・24時間のオリザリン処理を行うことにより, 効率的に染色体倍加個体を誘導できるものと思われた。

## 2. オリザリン処理による日本産野生種の染色体倍加(実験2)

0.005%・24時間の条件で, 日本産野生種4種にオリザリン処理を行った結果, 生存率は80.0~100%であり, 種間による差異が認められた(第3表)。FCMで得られたシュートを解析したところ, 種によって染色体倍加個体の誘導率が異なった。すなわち, スノキでは四倍体誘導率が5.6%で, 倍数性キメラ(二倍体と四倍体)誘導率が36.7%であり, 倍数性キメラの方が多かった。コケモモでは, 四倍体と倍数性キメラ(二倍体と四倍体)の誘導率がいずれも40.0%となった。クロマメノキでは, 57.8%という高率で十二倍体が得られた。順化した染色体倍加個体の根端の染色体数を調査したところ, FCMで四倍体と推定されたスノキ(第4図)とコケモモは48本の染色体を有する四倍体であることが確認されたが, クロマメノキは正確な染色体数を確認するには至らなかった。ナツハゼは, 四倍体を得られず倍数性キメラ(二倍体と四倍体)の誘導率も10%であったが, 順化後に完全な染色体倍加個体を分離し, ラビットアイブルーベリー台木に接ぎ木し, 順調な生育を示している(第3図B)。

## 考 察

スノキ属では, ラビットアイブルーベリー, ハイブッシュ



第4図 シュートへのオリザリン処理から得られた四倍体スノキ(A)と根端の染色体( $2n=4x=48$ )(B)

ブルーベリーおよびそれらと野生種との交雑種などで、コルヒチン処理による染色体倍加が試みられている (Dweikat・Lyrene, 1989; Goldy・Lyrene, 1984; Lyrene・Perry, 1982; Perry・Lyrene, 1984). これらの研究におけるコルヒチン処理濃度は0~0.2%, 処理時間は6時間~8週間と多様である. Lyrene・Perry (1982) は、コルヒチン処理したシュートでは生存率の減少と生育の抑制が認められ、処理後にコルヒチン無添加培地で培養したシュートの中には、伸長開始まで数か月を要したことを報告している. また、Perry・Lyrene (1984) は、コルヒチンを処理した3種すべてで、コルヒチン濃度の上昇と処理時間の延長によりシュートの生存率が減少する傾向が認められたが、一部では処理時間と生存率に関連性がなかったと報告している. 本研究においても、コルヒチン処理濃度と時間が生存率に及ぼす影響には、一定の傾向が認められなかった. これらのことから、スノキ属植物のコルヒチンへの反応は、処理条件、遺伝子型および供試部位などにより異なるものと推察された.

オリザリン処理では、処理時間の延長 (Allum ら, 2007; Dunn・Lindstrom, 2007; Kermani ら, 2003) と濃度の上昇 (van Duren ら, 1996) により、供試材料の生存率が減少することが報告されている. 本研究においても、オリザリン処理した 'Berkeley' の生存率は、処理濃度の上昇と処理時間の延長により減少した. 特に、0.005%・48時間では3.3%の生存率を示し、同条件のコルヒチン処理の生存率 (56.7%) と比較すると低い値となった. 以上のことから、スノキ属におけるオリザリン処理は、コルヒチンと同様に処理濃度の上昇または処理時間の延長により生存率を低下させるものと思われたが、特に、長時間の処理は植物体へ悪影響を及ぼすものと推察された.

Goldy・Lyrene (1984) は、コルヒチンを添加した液体培地にハイブッシュブルーベリーのシュートを浸漬処理した結果、0.025%で24~48時間処理することにより染色体倍加個体を獲得している. Perry・Lyrene (1984) は、*V. elliotii* Chapm. のシュートに0.01%コルヒチンを2週間処理することにより染色体倍加個体を獲得したが、コルヒチンへの反応は遺伝子型により異なると報告している. Dweikat・Lyrene (1989) は、ハイブッシュブルーベリーと *V. elliotii* Chapm. の三倍体種間雑種 FL 81-19 のシュートを、0.02%コルヒチン添加培地で6日間培養することにより、最も高い頻度で染色体倍加個体を獲得している. しかしながら、これらの報告では、染色体倍加個体の誘導率には全く言及されていない. 本研究では、'Berkeley' において濃度と時間を組み合わせた20のコルヒチン処理区のうち、10処理区で染色体倍加個体が得られ、このうち0.005%の96時間処理区では、13.3%の染色体倍加個体誘導率を示した.

van Duren ら (1996) は、バナナのシュートにコルヒチンとオリザリンを処理し、コルヒチン処理 (0.2%・48時間) の染色体倍加個体誘導率が最高23.1%であったのに対し、オリザリン処理 (0.01%・7日間) のそれは最高29.1%を示

し、オリザリン処理において染色体倍加個体誘導率が高かったとしている. リンゴ (Bouvier ら, 1994) やキウイフルーツ (Chalak・Legave, 1996) でも、コルヒチン処理に比べてオリザリン処理で四倍体の誘導率が高いことが報告されている. 本研究においても、'Berkeley' のオリザリン処理による染色体倍加個体誘導率の最高は23.3% (0.005%・24時間) であり、コルヒチン処理 (13.3%) よりも高い値を示した. 日本産野生種3種においても、5.6~57.8%の割合で染色体倍加個体を獲得し、倍数性キメラ個体から分離した染色体倍加個体を含めると、オリザリン処理により、日本産スノキ属植物すべての染色体倍加個体を獲得することに成功した.

以上の結果、スノキ属の染色体倍加に及ぼすオリザリン処理の有効性が明らかとなった. 本研究で得られた染色体倍加個体は、ラビットアイブルーベリー台木に接ぎ木した後、順調な生育を示している. カンキツにおいては、コルヒチン処理によって得られた染色体倍加個体は、完全にすべての細胞が倍加していない場合、育成中に元の倍数体に戻ることや周縁キメラになることが報告されていることから (古田ら, 2004; 糠谷ら, 2011; Yahata ら, 2005b), 今後は、生育特性や生殖稔性を調査するとともに、染色体倍加した日本産野生種の倍数性の再解析を行う必要があると考えられる.

## 摘 要

我が国に自生するスノキ属植物とブルーベリー栽培品種において、多芽体由来シュートを用いた染色体倍加を検討した. オリザリンとコルヒチンを様々な濃度や時間でシュートに処理し、その後5 mg・L<sup>-1</sup> zeatin を添加した MW 培地で培養した. 培養したシュートの腋芽から新たに発生したシュートの倍数性を解析した. 染色体倍加個体の誘導率は有糸分裂阻害物質の種類、処理濃度、処理時間および供試した種により異なったが、本処理条件内では、オリザリンの方がコルヒチンより高い値を示した. 特に、0.005%・24時間でオリザリン処理を行った場合、北部ハイブッシュブルーベリー 'Berkeley'、スノキ、コケモモおよびクロマメノキにおいて23.3、5.6、40.0および57.8%の染色体倍加個体が得られた. これらの染色体倍加個体は、ラビットアイブルーベリー台木に接ぎ木した後、順調な生育を示している. 以上のように、多芽体由来シュートへのオリザリン処理により、スノキ属植物の染色体倍加個体を効率的に誘導できることが明らかになった.

## 引用文献

- Allum, J. F., D. H. Bringloe and A. V. Roberts. 2007. Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Rep.* 26: 1977-1984.

- Blakeslee, A. F. and A. G. Avery. 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants. *J. Hered.* 28: 393–411.
- Bouvier, L., F. R. Fillon and Y. Lespinasse. 1994. Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots *in vitro*. *Plant Breed.* 113: 343–346.
- Bouvier, L., P. Guerif, M. Djulbic, C. Durel, E. Chevreau and Y. Lespinasse. 2002. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica* 123: 255–262.
- Chalak, L. and J. M. Legave. 1996. Oryzalin combined with adventitious regeneration for an efficient chromosome doubling of trihaploid kiwifruit. *Plant Cell Rep.* 16: 97–100.
- Chavez, D. J. and P. M. Lyrene. 2009a. Interspecific crosses and backcrosses between diploid *Vaccinium darrowii* and tetraploid southern highbush blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134: 273–280.
- Chavez, D. J. and P. M. Lyrene. 2009b. Production and identification of colchicine-derived tetraploid *Vaccinium darrowii* and its use in breeding. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134: 356–363.
- Dunn, B. L. and J. T. Lindstrom. 2007. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Buddleja* to facilitate interspecific hybridization. *HortScience* 42: 1326–1328.
- Dweikat, I. M. and P. M. Lyrene. 1989. Production and evaluation of synthetic hexaploid in blueberry. *Theor. Appl. Genet.* 77: 799–804.
- Dweikat, I. M. and P. M. Lyrene. 1991. Induced tetraploidy in a *Vaccinium elliotii* clone facilitates crossing with cultivated highbush blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 1063–1066.
- Fukui, K. 1996. Plant chromosome at mitosis. p. 1–17. In: K. Fukui and S. Nakayama (eds.). *Plant Chromosome. Laboratory Methods*. CRC Press, Florida.
- 古田貴音・金好純子・金石新作・山口 聡. 2004. カンキツの処理個体における倍数性の変化と四倍体選抜. *園学雑.* 73 (別2): 102.
- Goldy, R. G. and P. M. Lyrene. 1984. *In vitro* colchicine treatment of 4x blueberries, *Vaccinium* sp. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 336–338.
- Hiirsalmi, H. M. 1988. Small fruit breeding in Finland. *J. Agric. Sci. Finl.* 60: 223–234.
- 岩垣駿夫. 1984. スノキ属の種について. p. 10–14. 岩垣駿夫・石川駿二 編著. *ブルーベリーの栽培*. 誠文堂新光社. 東京.
- Kalt, W., C. F. Forney, A. Martin and R. L. Prior. 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4638–4644.
- Kermani, M. J., V. Sarasan, A. V. Roberts, K. Yokoya, J. Wentworth and V. K. Sieber. 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1195–1200.
- 北村四郎・村田 源. 原色日本植物図鑑 木本編I. 1971. 保育社. 大阪.
- 小松春喜・森田恭代・辻 雅水・具志堅綾・小野正輝・井越敬司・小林弘昌・伊藤保之・鹿毛哲朗・吉岡克則・國武久登. 2003. クロマメノキとハイブッシュブルーベリーの種間雑種の育成. *園学雑.* 72 (別2) : 355.
- 小松春喜・大石 寛・桂川明広・山崎裕美・小野正輝・増岡智加子・鹿毛哲朗・吉岡克則・國武久登. 2006. クロマメノキとハイブッシュブルーベリー ‘ブルークロップ’ との種間雑種の果実特性. *園学雑.* 75 (別2): 494.
- Lyrene, P. M. and J. R. Ballington. 1986. Wide hybridization in *Vaccinium*. *HortScience* 21: 52–57.
- Lyrene, P. M. and J. L. Perry. 1982. Production and selection of blueberry polyploids *in vitro*. *J. Hered.* 73: 377–378.
- Miyashita, C., S. Ishikawa and M. Mii. 2009. *In vitro* induction of the amphiploid in interspecific hybrid of blueberry (*Vaccinium corymbosum* × *Vaccinium ashei*) with colchicine treatment. *Sci. Hortic.* 122: 375–379.
- Moore, J. N., D. H. Scott and H. Dermen. 1964. Development of a decaploid blueberry by colchicine treatment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 84: 274–279.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- 糠谷綱希・太田智宏・安田喜一・八幡昌紀・國武久登・小松春喜・新居直祐・向井啓雄・原田 久・高木敏彦. 2011. ニンポウキンカン珠心胚へのコルヒチン処理によって得た倍数体の特性とそれらの三倍体育種への利用. *園学研.* 10: 1–8.
- Perry, J. L. and P. M. Lyrene. 1984. *In vitro* induction of tetraploidy in *Vaccinium darrowii*, *V. elliotii*, and *V. darrowii* × *V. elliotii* with colchicine treatment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 109: 4–6.
- Rousi, A. 1967. Cytological observations on some species and hybrids of *Vaccinium*. *Zuchter/Gen. Breed. Res.* 36: 352–359.
- Sharp, R. H. and W. B. Sherman. 1971. Breeding blueberries for low chilling requirement. *HortScience* 6: 145–147.
- 高木良心・津田浩利・浅野陽樹・加藤智美・小村美穂・柚木崎千鶴子・黒木義一・平原秀秋・甲斐孝憲・小松春喜・杉本安寛・國武久登. 2005. ブルーベリーとその在来野生種の果実における抗酸化活性の評価. *園学雑.* 74 (別2) : 343.
- Tetsumura, T., Y. Matsumoto, M. Sato, C. Honsho, K. Yamashita, H. Komatsu, Y. Sugimoto and H. Kunitake. 2008. Evalua-



- tion of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Sci. Hortic.* 119: 72–74.
- Väinölä, A. 2000. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica* 112: 239–244.
- van Duren, M., R. Morpurgo, J. Dolezel and R. Afra. 1996. Induction and verification of autotetraploids in diploid banana (*Musa acuminata*) by *in vitro* techniques. *Euphytica* 88: 25–34.
- van Tuyl, J. M., B. Meijer and M. P. van Dien. 1992. The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Hortic.* 325: 625–630.
- Wolfe, D. E., P. Eck and C. Chin. 1983. Evaluation of seven media for micropropagation of highbush blueberry. *Hort-Science* 18: 703–705.
- Yahata, M., S. Harusaki, H. Komatsu, K. Takami, H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita and P. Toolapong. 2005a. Morphological characterization and molecular verification of a fertile haploid pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 34–40.
- 八幡昌紀・柏原夕希子・黒木宏憲・國武久登・小松春喜. 2004. ニンボウキンカン種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響. *園学研.* 3: 11–16.
- Yahata, M., H. Kunitake, T. Yabuya, K. Yamashita, Y. Kashiwara and H. Komatsu. 2005b. Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 899–903.
- 山崎 敬. 1989. ツツジ科. p.122–156. 佐竹義輔・原 寛・亘理俊次・富成忠夫 編. 日本の野生植物 木本 II. 平凡社. 東京.
- 山内(佐藤)真希子・津田浩利・荒木啓輔・内田飛香・安田喜一・鉄村琢哉・小松春喜・國武久登. 2012. 我が国自生のスノキ属植物とブルーベリー栽培品種における植物組織培養と試験管外発根を利用したクローン増殖. *園学研.* 11: 13–19.
- Yoshizawa, Y., Y. Fukiya, Y. Izumi, K. Hata, J. Iwashita, N. Murofushi and T. Abe. 2002. Induction of apoptosis with an extract of *Actinidia polygama* fruit in the promyelocytic leukemia cell line HL-60. *J. Health Sci.* 48: 303–309.