

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580031

研究課題名(和文)

キウイフルーツ近縁自生種サルナシに見出された倍数性変異の特異性解明

研究課題名(英文)

Characterization of ploidy variants identified in the wild resources of *Actinidia arguta* relative species to kiwifruit

研究代表者

片岡 郁雄 (KATAOKA IKUO)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：60135548

研究成果の概要(和文)：

日本国内に自生するサルナシに特異的な倍数性変異の特性を明らかにした。二倍体から八倍体に至る広い倍数性変異の存在が確認された。それらの地理的分布の特性が明らかとなり、高次倍数性個体群が東北地方に局在することが示された。これら倍数性変異の形態および果実成分、結実特性が明らかとなった。また、デリシオサ種キウイフルーツとの種間交雑親和性および交雑後代の形質の評価により、育種的な展開の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Ploidy variants of wild *A. arguta* specifically occurred in Japan, were characterized. A wide range of ploidy variance from diploid to octaploid was observed. Geographic distribution of the variants was determined showing the localization of the higher ploidy population in Tohoku area. Morphology, fruit composition and reproductive character of the ploidy variants were determined. Cross compatibility of the ploidy variants with kiwifruit (*A. deliciosa*) was observed. The characteristics of the cross seedlings showed the potential of the variants as breeding materials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：果樹園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：サルナシ, 自生資源, 倍数性変異, 地理的分布, 遺伝的特性, 形態特性, 結実特性, 種間交雑

1. 研究開始当初の背景

サルナシ (*Actinidia arguta*) は日本をはじめ、中国中部からサハリンまで東アジアに広く自生分布する落葉つる性植物である。果実は良好な食味に加え、100g 新鮮重あたり

300mg を超えるビタミンCや、タンパク質分解酵素アクチニジンなどの特徴的な機能性成分を含有することから、近年その潜在的価値が見直され、選抜・改良に向けた遺伝子資源の把握・確保の必要性が世界にも認識され

つつある。

サルナシは、国内では屋久島から北海道まで広域に分布しているが、これまで体系的な植物資源学的研究は行われておらず、地域の特産として栽培方法や加工に関する実用的な検討が行われているのみであった。研究代表者らの予備的調査において、サルナシの自生個体において倍数性に大きな変異があり、その分布が地理的に偏っていることを予察した。また倍数性が形態特性や結実性などの形質発現に深く関わっている可能性を見出した。このような広い範囲の倍数性変異の存在や地理的な局在性は、サルナシが自生する中国等の国々にも例をみないことから、日本に特異なサルナシの倍数性変異について、植物資源学的観点から解析・評価を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、我が国に自生するサルナシに見出された倍数性変異の特異性について、遺伝子資源評価と育種的展開の観点から解析を行うことを目的とした。そのため、倍数性変異の広域調査による分布地図の作成、倍数性変異系統の遺伝的解析に基づく分類学的位置付けの解明、倍数性変異の発現機構の解明を試みた。さらに倍数性変異個体の形態的特性および果実形質、結実特性の評価をおこなった。また、デリシオサ種キウイフルーツとの交配親和性および交雑後代の形質評価を行い、育種的展開の可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 倍数性変異の地理的分布

北海道から九州に至る全国の自生地で採取した個体および各地の研究機関に収集保存の自生個体の127個体について、フローサイトメトリーにより倍数性を調査した。展開中の幼葉あるいは、休眠芽の新梢原器を用いて、核抽出用緩衝液中で細切し、その懸濁液を氷冷して5分静置した後、20 μ m孔径のナイロンメッシュでろ過した。ろ液に氷冷したDAPI染色液を加えて染色し、フローサイトメーターを用いて核の蛍光強度を測定した。

(2) 倍数性変異の遺伝的解析

①葉緑体DNA(cpDNA)領域の解析

サルナシ(*A. arguta*)、シマサルナシ(*A. rufa*)およびキウイフルーツ栽培品種(*A. deliciosa*, *A. chinensis*)から抽出したtotal DNAを用いて、cpDNAの*matK*領域をPCRにより増幅した後、増幅産物(約1500bp)の塩基配列を決定し、系統樹を作成した。加えて、cpDNAにあるSSRマーカーについて*A. arguta*系統間の多型を調査した。

②リボソームDNA(rDNA)のITS領域の解析

A. arguta, *A. rufa*, *A. chinensis*および

*A. deliciosa*のtotal DNAを用いて、rDNAのITS領域(約700bp)をPCRにより増幅し、塩基配列を決定した。*A. arguta*の4倍体系統では、増幅産物から直接シーケンスを読むことが出来なかったため、増幅産物を大腸菌にサブクローニングした後、塩基配列を決定した。2種類のITS配列を有する4倍体系統が確認されたため、これらの配列を識別するためのプライマーを新たに設計し、*A. arguta*各系統が有するITS配列を調査した。

③SSRマーカーによる系統解析

A. arguta(37系統)、*A. rufa*(3系統)、ミヤマタタビ(*A. kolomikta*)およびキウイフルーツ栽培品種(5品種)から抽出したtotal DNAを用いて、既報(Huang et al.;1998, Fraser et al.;2004)のSSRマーカーから*A. arguta*で増幅が確認された4種類のマーカーについて多型を調査した。マーカーの類似度に基づいて系統樹を作成した。SSRマーカーは蛍光標識したプライマーを用いてPCRにより増幅し、得られたフラグメントをキャピラリーシーケンサーにより検出した。

(3) 倍数性変異の形質評価

①形態特性

倍数性の異なる自生個体について、花の形態形質(花径、花弁長、花弁数、花弁色、ガク片色と枚数、花梗長、やくの数・色、雌花の花柱数、子房径、子房の毛じ)、成葉の形態形質(葉身長・幅、葉形、葉身表面・裏面の毛じ、鋸歯、葉柄の長さ・色・毛じ)、果実の形態形質(果形、果皮色・毛じ、果肉色)について調査を行った。

②果実成分

9月上中旬に採取した果実を500ppmエチレンで20℃24時間処理して追熟し果実成分を調査した。

可溶性固形物(TSS)含量は果汁を用いてデジタル糖度計で測定した。滴定酸含量(TA)は、0.05NのNaOHを用いて、pH8.3を終点として滴定を行い、クエン酸含量に換算した。アスコルビン酸含量は、果実赤道部の果肉を用いて2,4ジニロトフェニルヒドラジン比色法により測定した。プロテアーゼ活性は、西山ら(2004)の方法を修正して測定した。pH6.0の50mMクエン酸-NaOH緩衝液0.8mlと果汁0.1mlを混合し、25℃で5分間置いた後、5mMPyr-Phe-Leu pNAを0.5ml加え攪拌し、25℃で5分間インキュベートした。50%トリクロロ酢酸を0.1ml加えて反応を停止後、4℃、10000gで10分間遠心分離し、上澄み液の405nmでの吸光度を測定した。ブランクには、トリクロロ酢酸を加えてインキュベートしたものをを用いた。

③結実特性

サルナシの高次倍数性変異における自家結実性を明らかにするため、六倍性系統および七倍性系統の鉢植え個体を用いて、開花前

から花柱が褐変硫酸紙袋で全体を被った。これらの半数の個体には、自家花粉を、残りの半数の個体には、雄株より採取した稔性花粉を授粉した。また、各々の開花時に自家花粉を採取して、10%ショ糖を含む1%寒天培地上で発芽試験を行った。除袋後に結実率を経時的に調査した。

(4) キウイフルーツとの交配親和性の解明

①交配親和性評価

サルナシの四倍性および六倍性雌個体を用いて、開花前に各々25花に硫酸紙袋かけを行い、開花時に四倍体および六倍体のサルナシ雄個体から得た花粉、またはデリシオサ種キウイフルーツ‘トムリ’と‘マツア’を授粉した。一方、デリシオサ種‘香緑’に対して、四倍体および六倍体サルナシ花粉を授粉した。授粉後に雌ずい内の花粉管伸長を蛍光顕微鏡により観察した。収穫時期に結実率を調査するとともに、果実を追熟後、果実当たり種子数を調査した。得られた種子は、3℃で60日間層積処理した後、20℃で種子発芽率を調査した。

②交雑個体の特性評価

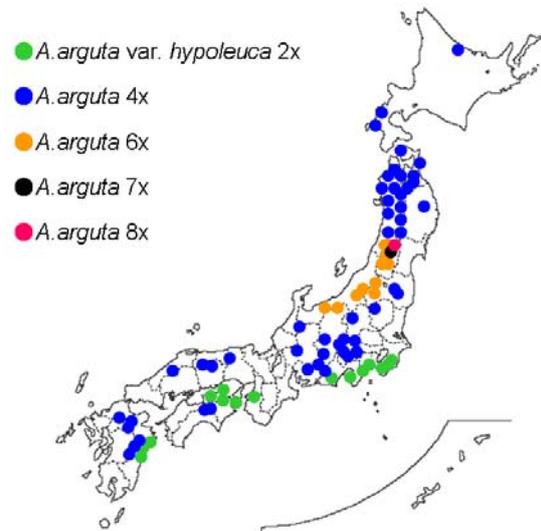
サルナシにキウイフルーツ‘マツア’を授粉して得た5年生の交雑実生個体について、倍数性、花の形態、花粉稔性、葉の形態、果実形質を調査した。

4. 研究成果

(1) 倍数性変異の地理的分布

サルナシの倍数性レベルはフローサイトメトリーにより明確に区別できた。調査した127個体のうち87個体は四倍体、22個体は六倍体、15個体は二倍体、2個体が七倍体、1個体が八倍体であった。二倍体は房総半島以西の太平洋岸に分布していた。四倍体は、北海道から九州に至る全国の山間地に分布していた。一方、六倍体は、山形、福島、新潟、長野県北部にのみ分布していた。七倍体と八倍体は、山形と福島に見出された(第1図)。これらの結果から、我が国のサルナシの自生個体に広い倍数性変異が存在することが裏付けられた。これらのうち、四倍体は、最も普遍的に分布する var. *arguta* と位置付けられた。一方、二倍体は、サルナシの変種に分類されるウラジロマタタビ (*A. arguta* var. *hypoleuca*) とみなされ、var. *arguta* よりも温暖な環境に適応していた。一方、六倍体は、東北から上越の多雪地域にのみ局在し、Nakai (1913) が山形県の月山および湯殿山で採集し、デワノマタタビ (*A. japonica*) と命名したものと推察された。これは後に、*A. platyphylla* A. Gray by Koizumi (1940), *A. arguta* var. *platyphylla* (Gray) Nakai by Ohwi (1965), *A. arguta* var. *arguta*, f. *platyphylla* (A. Gray) H. Ohba (2006) として取り扱われているが、その分布域について

は、明確にされていない。本研究で見出された六倍性の自生個体群については、倍数性とその局在性を考慮し、植物分類学上の位置付けを明確化する必要がある。



第1図 サルナシの倍数性変異とその地理的分布

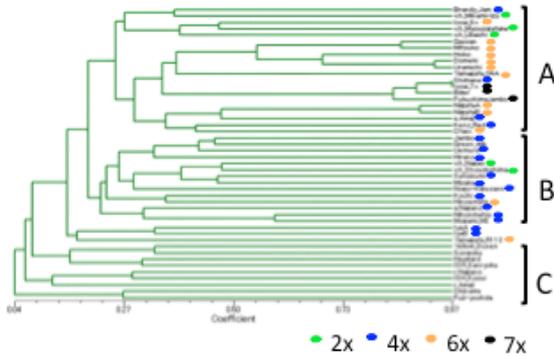
(2) 倍数性変異の遺伝的解析

① *matK* 領域の塩基配列に基づく系統樹において、*A. rufa*, *A. deliciosa* および *A. chinensis* の3種は *A. arguta* 系統とは別のクラスターを形成し、*A. arguta* が栽培種やシマサルナシとは遺伝的に遠いことが示されたが、*A. arguta* 系統間で多型を示すサイトはほとんど無く、*A. arguta* 倍数性変異系統間の類縁関係の解析はできなかった。一方、cpDNA 領域の SSR マーカーには二倍性のウラジロマタタビ (*A. arguta* var. *hypoleuca*) のみで多型を示すマーカーが確認された。このマーカーはウラジロマタタビやその交雑後代の識別マーカーとして利用出来ると考えられた。

② rDNA の ITS 領域の塩基配列情報に基づく系統樹は *matK* 領域を利用した系統樹とほぼ一致した。*A. arguta* の4倍性系統では18S rDNA と5.8S rDNA の間で変異を生じた異なる2種類の配列が存在することが明らかとなった。これらの配列を type-A および type-B として、それぞれの配列を識別するためのプライマーを設計し、倍数性個体を含む *A. arguta*36 系統における変異の分布を調査した。その結果、四倍性以上の全ての系統は type-A と type-B を共に有するのに対し、二倍性のウラジロマタタビ (*A. arguta* var. *hypoleuca*) は type-A しか持っていないことが明らかとなった。この結果は、日本に分布する四倍性 *A. arguta* が種間交雑により生じた可能性を示唆している。

③ 4種類の SSR マーカーについての解析から、

計 125 種の対立遺伝子が検出された。その類似度に基づいて系統樹を作成したところ、四倍性系統と六倍性系統は2つのクラスターに分かれ、それぞれが独立して分化した可能性が示唆された。二倍性のウラジロマタタビ5系統のうち、3系統は六倍性クラスターに、2系統は四倍性クラスターに属していた。SSR マーカーの解析結果からは各サンプルの遺伝的類縁性と地理的分布の間に強い相関は見られなかった (第2図)。



第2図 SSR マーカーの類似度に基づく系統樹 A:六倍性クラスター、B:四倍性クラスター、C:栽培品種および *A. rufa* クラスター

(3) 倍数性変異の形質評価

①形態特性

二倍体の花は四倍体や六倍体と比較して明らかに小さかった。二倍体および四倍体のガク片は赤みがかった。六倍体の花は、より長い花梗と緑色のガク片で特徴付けられた。やくの色はいずれの倍数体においても黒色であった (第3図)。

葉の大きさは、二倍体において、四倍体や六倍体に比べ、明らかに小さかった。二倍体の葉は、裏面が粉白色であることにより特徴付けられた。いずれの倍数性においても、葉形には長楕円形から卵形まで同一倍数性の個体でも変異がみられた。縦/横幅比は二倍



第3図サルナシの倍数性変異の葉、花、果実の形態 (バーは5cm)

体と六倍体で四倍体に比べ大きかった。四倍体の葉柄は赤く、葉の裏面の脈上に硬毛を有していたのに対して、六倍体の葉は、葉柄は緑色で、葉柄や葉の裏面の脈上に綿毛を有していた。

果実の大きさは、二倍体で四倍体や六倍体に比べ小さかった。四倍体の果実は、円形から長楕円形までかなりの変異がみられた。六倍体の果実の多くは、長楕円形であった。七倍体の果実も長楕円形で、比較的大きかったが、正常発達種子を含まれなかった。八倍体の果実は卵形で正常発達種子はわずかしこ含まれなかった。

②果実成分

果汁の TSS 含量は、二倍体において四倍体および六倍体より少なかった。四倍体および六倍体の数個体では 15%以上の比較的高い TSS 含量を示した。アスコルビン酸含量は、同一倍数性においても個体間で大きく異なっていたが、二倍体でやや低い傾向があった。四倍体および六倍体では 100mg/100gFW 以上の高いアスコルビン酸含量を示すものがあった。四倍体および六倍体の果実では、高いプロテアーゼ活性が認められたが、同一倍数性において個体間の変異も大きかった (第1表)。

第1表 サルナシの倍数性変異の果実成分

倍数性	TSS (%)	アスコルビン酸含量(mg/100gFW)	プロテアーゼ活性 (nmol pNA released/min)
2x	10.2-11.9	25.6-34.9	6.1-12.3
4x	11.5-15.1	22.8-111.0	7.1-75.8
6x	11.3-17.0	58.8-110.3	7.5-69.5
7x	10.2-13.3	60.1-66.2	19.5-33.0
8x	11.0	84.2	8.5

③結実特性

六倍体および七倍体ともに、雄株の稔性花粉を授粉した場合、86.1~100%の結実率を示した。一方、花粉遮断を行った場合、六倍体では全て落果した。これに対して、七倍体では、花粉遮断した場合にも 41.7%の結実率が認められた (第2表)。七倍体雌株において、花粉稔性はなく、雌ずい内での花粉管の伸長は全く観察されなかったことから、単為結果による結実性を有することが示された。

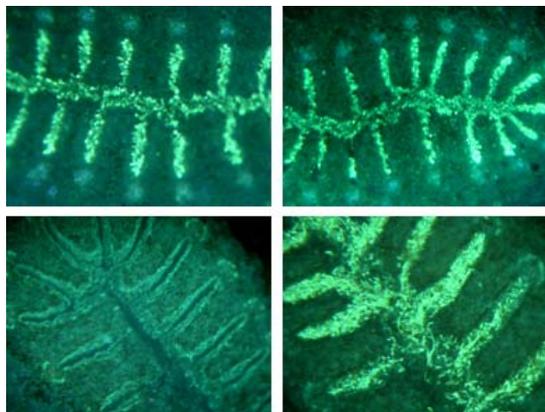
第2表 高次倍数性サルナシの結実特性

倍数性	処理区	授粉後の結実率 (%)		
		1週間	5週間	12週間
7x	授粉	100	91.4	87.8
7x	花粉遮断	100	85.3	41.7
6x	授粉	100	99	95.8
6x	花粉遮断	100	41.2	0

(4) キウイフルーツとの交配親和性の解明

①交配親和性評価

四倍および六倍性サルナシに授粉した‘マツア’の花粉管は、いずれも授粉3日後には子房の中部まで達していた。一方、‘香緑’にサルナシ花粉を授粉した場合には、その倍数性にかかわらず、柱頭での発芽はわずかに観察されたが、花柱基部への進入はみられなかった（第4図）。



第4図 六倍性サルナシとデリシオサ種キウイフルーツの種間交雑における雌ずい内の花粉管伸長（上段左：サルナシ6x×サルナシ6x，上段右：サルナシ6x×‘マツア’，下段左：‘香緑’×サルナシ6x，下段右：‘香緑’×‘マツア’）

サルナシ間では、同一の倍数性、異なる倍数性の組合せに限らず約80%の高い結実率が得られた。また、サルナシに‘マツア’および‘トムリ’花粉を授粉した場合にも結実率は70%以上と高かった。一方、‘香緑’にサルナシ花粉を授粉した場合には、倍数性にかかわらず全く結実しなかった（第3表）。

四倍性サルナシではキウイフルーツ花粉を授粉した場合、サルナシ花粉に比べて、果実重はやや小さかった。六倍性サルナシでは六倍性サルナシを授粉した場合に果実重は最も大きく、‘トムリ’の授粉では小さくなる傾向があった。種子形成については、四倍性サルナシでは、同一倍数性のサルナシ花粉を授粉した場合に最も成熟種子数が多かった。六倍性サルナシでは、四倍性および六倍性サルナシの授粉により多くの成熟種子が得られたが、‘マツア’や‘トムリ’の授粉ではやや少なかった。

サルナシ間およびサルナシとキウイフルーツ間のいずれの交配組合せにおいて得られた種子も発芽した。サルナシにおいて、同一倍数性の交配組合せにより得られた種子の発芽率は85%以上と高かった。異なる倍数性間の交配組合せで約75%であった。四倍性と六倍性いずれのサルナシもキウイフルーツ花粉の授粉により得られた種子は発芽力があり、50%以上が発芽したが、六倍性サルナシと‘トムリ’の組合せで得られた種子で

は25%とやや低かった。

以上の結果から、サルナシは倍数性に関わらずデリシオサ種キウイフルーツを花粉親とする種間交雑で高い交配和合性を有することが明らかとなった。

第3表 四倍体および六倍体サルナシとデリシオサ種キウイフルーツの種内および種間交雑における結実率および果実重と種子形成

交配組合せ	結実率 (%)	果実重 (g)	種子数 / 果実
a. 平野 (4x) × a. 淡路 (4x)	86	7.0	140
× a. 裏道 (6x)	91	7.1	108
× d. マツア (6x)	73	6.7	105
× d. トムリ (6x)	73	6.5	107
a. 光香 (6x) × a. 淡路 (4x)	80	14.3	155
× a. 裏道 (6x)	76	16.2	148
× d. マツア (6x)	84	14.0	128
× d. トムリ (6x)	76	12.3	107
d. 香緑 (6x) × a. 淡路 (4x)	0	—	—
d. 香緑 (6x) × a. 裏道 (6x)	0	—	—
d. 香緑 (6x) × d. マツア (6x)	100	82.8	1062

②交雑個体の特性評価

フローサイトメトリー分析の結果、雑種個体は、両親と同様、全て六倍性であった。葉の形態 成葉の葉形は、種子親の月山が長楕円形、花粉親の‘マツア’が円形であるのに対して、交雑個体では、楕円形または卵形で、両親の間であった。交雑個体は、葉の裏面には毛じがないが、葉柄上に短い毛じが密生している点では月山に類似していた。花の形態 交雑実生の雄花の花径は、いずれも‘マツア’より小さかったが、サルナシの雄系統よりは大きかった。また葯の数も、‘マツア’より少なかったが、サルナシの雄系統よりは多かった。葯の色は、サルナシの雄系統が黒褐色、‘マツア’が黄色であるのに対して、交雑個体では黄色または黄褐色であった。交雑実生の雌花の花は、雄花に比べてやや大きかった。また、種子親の月山に比べて、花径は大きく、葯数が多かった。花柱の数は月山よりやや多かった。種子親の月山の子房には毛じはなかったが、雑種個体には毛のないものと子房の上部が毛じで被われているものがあつた。開花期は、雄雌個体ともに5月中旬で、両親と同様であった。花粉発芽率 いずれの雄個体の花粉も発芽培地上での発芽はみられず、すべて不稔であった。果実形質 雌個体の花に、サルナシの四倍体およびマツアの花粉を授粉したところ結実した。果実を9月上旬に収穫して形質を調査したところ、果実重は3~25gと個体により異なったが、種子親の月山に比べて大きいものが多

かった。果皮色は緑色で果面は平滑なものや果頂部にわずかに毛じがみられるものがあった。果形には大きな変異があり、球形、円筒形、さらにはカボチャ形のものもあった(第5図)。



第5図 サルナシ六倍体とキウイフルーツ‘マツア’の種間雑種の果実形態(上段左:六倍体サルナシ, その他種間雑種個体)(バーは5cm)

エチレン処理により追熟した果実の可溶性固形物含量は、9.3~14.6%, 滴定酸含量は1.5~2.4%の範囲であった。果実当たりの黒色の充実種子数は、月山の127個に比べて少なかった。種子発芽率 3°Cで60日間層積後、20°C, 16日長で種子の発芽を調査したところ、3週間後に7~48%が発芽した。

以上の結果より、六倍性サルナシ月山系統とデリシオサ種キウイフルーツ‘マツア’の種間交雑個体の雄花の花粉は不稔となるが、雌花は結実性を有し、サルナシの外観をもち、より大きな果実が得られることが示され、キウイフルーツの果実形質の多様化を図る上での育種素材として活用できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Kataoka, I., Mizugami, T., Kim, J. G., Beppu, K., Fukuda, T., Sugahara, S., Tanaka, K., Satoh, H. and Tozawa, K.: Ploidy variation of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta*) resources and geographic distribution in Japan. *Scientia Horticulturae*, 査読有, 124巻, 2010, 409-414

[学会発表] (計3件)

- ① Kataoka, I.: Diversity of natural

Actinidia resources in Japan. 7th International Kiwifruit Symposium, 2010年9月13日, ファエノンア (イタリア)

② 片岡郁雄, 林 麻由子, 末澤克彦, 福田哲生, 山下泰生, 別府賢治, 六倍性サルナシ (*Actinidia arguta*) とキウイフルーツ (*A. deliciosa*) の種間雑種の特性, 園芸学会平成21年度秋季大会, 2009年9月26日, 秋田大学

③ 片岡郁雄, 林 麻由子, 金 鎮國, 別府賢治: サルナシ (*A. arguta*) とキウイフルーツ (*A. deliciosa*) の種間交雑における交配和合性. 園芸学会平成21年度春季大会, 2009年3月20日, 明治大学

[その他]

ホームページ等

日本自生のマタタビ属研究—評価と活用—
http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/kataoka%20labo/ik.actinidia_research.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 郁雄 (KATAOKA IKUO)
香川大学・農学部・教授
研究者番号: 60135548

(2) 研究分担者

神崎 真哉 (KANZAKI SHINYA)
近畿大学・農学部・講師
研究者番号: 20330243