

平成21年 5月22日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580026
 研究課題名（和文） 三倍体オニユリにおいて発現する高い有性繁殖能力の進化的背景と遺伝機構の解明
 研究課題名（英文） Evolutionary and genetic backgrounds of high sexual reproduction ability in triploid tiger lily (*Lilium lancifolium*)
 研究代表者
 比良松 道一（HIRAMATSU MICHIKAZU）
 九州大学・大学院農学研究院・助教
 研究者番号：30264104

研究成果の概要：三倍体生物種が稀に高い有性繁殖能力を発現する機構はよくわかっていない。オニユリとその近縁種コオニユリ（いずれもユリ科ユリ属）では、オニユリゲノム2組、コオニユリゲノム1組を有する三倍体オニユリが発生し易く、三倍体オニユリの成熟種子の生産は、花粉親の遺伝子型に大きく影響された。自然条件下での三倍体オニユリの発生と遺伝的分化は、二倍性のオニユリ配偶子と高い交雑親和性を有する一倍性のコオニユリ配偶子によって促進されていると考えられる。こうした性質を有する一倍性配偶子は、ユリ属植物における三倍体レベルでの交雑育種を可能にすると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	570,000	3,970,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：オニユリ、三倍体、有性繁殖

1. 研究開始当初の背景

三倍体植物では栄養器官や花器が巨大化する、生育が旺盛になる、色素等の内成分含量が増大する、果実が種無しになるなどの特徴がよくみられる。こうした特徴の農業的有用性は多くの研究者によって認められており、様々な植物において三倍体が農業作物として利用されてきた。その一方で三倍体を基幹とした継代的な交雑育種は

知られていない。それは、一般に三倍体の配偶子稔性が低いため、三倍体を交配親に用いて後代を大量に得ることが難しいためと考えられる。しかしながら、近年、三倍体でありながら有性繁殖によって子孫を多産する野生の動物や植物が発見されている。現在のところ、三倍体生物種が高い有性繁殖能力を発現する機構はほとんど分かっておらず、そのような能力を利用した育種法

も確立されていない。三倍体の有性繁殖能力が高まる理由を明らかにすると共に、三倍体の交雑後代への有性生殖能力の遺伝性を解明することにより、三倍体を中心に据えた育種法の創成に繋げることができる。

2. 研究の目的

本研究の研究材料として用いる三倍体オニユリは、わが国の里山的環境に普通にみられ、花卉資源としてのみならず、食用(ユリ根)としても古くから利用されてきた歴史を持つ。本種は、二倍体近縁種のコオニユリを花粉親とした場合に多数の実生を生産し、異なる遺伝子型の三倍体オニユリを再生産することができる。筆者らのこれまでの研究によりわかってきた。本研究では、1) 三倍体オニユリの遺伝的分化がどれくらい進んでいるか? 2) 高い有性生殖能力の発現は交配親の進化的背景、すなわち、三倍体オニユリのゲノム構造や二倍体花粉親の種類と関連があるか? 3) 高い有性生殖能力は後代へ遺伝するか? に焦点を絞り、三倍体オニユリが条件的に高い有性繁殖能力を発現する進化的背景や遺伝機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 韓国より収集したオニユリ 149 個体(三倍体 89 個体, 二倍体 60 個体) およびコオニユリ 4 個体の本葉を供試した。各個体 120mg ほどの本葉から Hiramatsu ら(2001)の方法にしたがって、抽出液を得た。得られた抽出液を 1.2×3.5mm の濾紙(Whatman#3)に浸透させ、水平式デンブングル泳動法に用いた。水平式デンブングル泳動法は、Wendel・Weeden(1989)の方法にしたがって行った。9 種の酵素を解析するために、2 種のバッファシステムを使用した。すなわち、Aspartate aminotransferase(AAT), Catarase(CAT), Diaphorase(DIA), Glutamate dehydrogenase(GDH), Glucose-6-phosphate isomerase(GPI)の分析にはシステム 6(Lithium-borate/Tris-citrate, pH8.3, 70mA, 7.5h)を、Fluorescent esterase(FEST), Isocitrate dehydrogenase(IDH), 6-Phosphogluconate dehydrogenase(6PGD), Phosphoglucomutase(PGM)の分析にはシステム 2(Morpholine-citrate, pH6.1, 40mA, 15.5h)を使用した。泳動後、Hiramatsu ら(2001)の方法にしたがって活性染色を行った。検出された対立遺伝子は、尾崎(2003)の方法に準じアルファベットで表記した。

(2) 茎頂倍加処理 30cm×50cm のコンテナに定植し、無加温温室内で栽培した二倍体オニユリ 52 個体(長崎県対馬産)コオニユリ

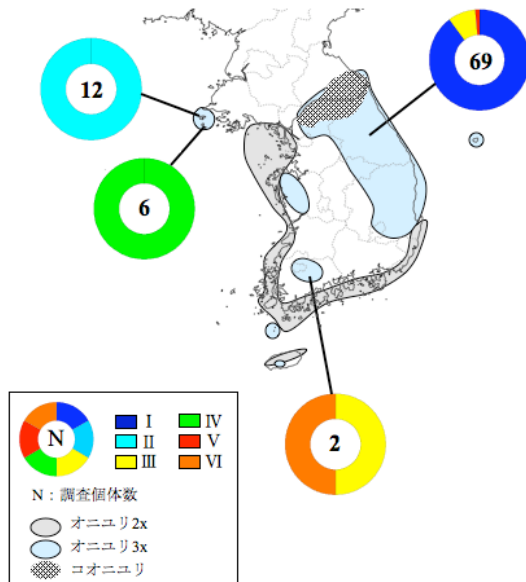
27 個体(長崎県壱岐産, 佐賀県産)を供試し、倍加処理液として 0.025%, 0.05%, および 0.1% コルヒチン溶液を用いて倍加処理を行った。オニユリでは 11cm から 40cm, コオニユリでは 5cm から 17cm に成長した植物体の茎頂部に倍加処理液を 6 時間毎に計 4 回、茎頂分裂組織に浸透するようにバスターピペットを用いて注入した。処理後に伸長した植物体の茎葉の倍数性と花粉形態を観察し、二倍体と比較した。倍数性の判別はフローサイトメトリーによるオニユリ個体の倍数性簡易判別法(比良松ら, 1999)に準じた。すなわち、Extraction Buffer(0.1M/l クエン酸水溶液 100ml あたりに Tween 20 を 500 μ l 添加)に浸漬した本葉 1 枚をかみそりで細断して核を単離させ、その懸濁液をナイロンメッシュでろ過した。得られたろ液を、DAPI を含む Staining Solution(High Resolution DNA Kit, Partec)で約 5 倍量に希釈し、フローサイトメーター(Ploidy Analyzer PA, Partec)で蛍光強度別の核数を測定した。花粉形態の観察は尾崎(2003)の方法に準じて行った。すなわち、開花前に蕾を開き、開葯前の葯を摘出した。葯を葉包紙に包み、25 $^{\circ}$ C で乾燥させ、その後 5 $^{\circ}$ C で貯蔵した。貯蔵花粉を酢酸カーミン液で染色し、光学顕微鏡で観察した。花粉の細胞質が十分に染まったものを完全花粉とし、オニユリは 1 個体あたり 300 粒、コオニユリは 250 粒の完全花粉長径をマイクロメータにより計測した。得られた倍加処理個体と同様の方法で栽培した二倍体オニユリ、コオニユリを供試し、2007 年 7 月 5 日~7 月 18 日に交配を行った。種子親の花蕾を開花直前に除雄した後、粘液の滲出が見られた柱頭に新鮮花粉または 5 $^{\circ}$ C で冷蔵保存した花粉を受粉し、アルミホイルで柱頭を覆った。各組合せとも交配 2 ヶ月半~3 ヶ月後に果実の最大直径が 1cm 以上に達した場合を着果とみなし、着果率を算出した。また、肉眼で胚が内部に確認された種子を完全種子とし、果実あたりの完全種子数を調査した。

(3) 種子親として三倍体オニユリ(6 種類のクローン型、長崎県対馬内山産 14 個体、福岡県宇美産 7 個体、佐賀県産 1 個体、石川県産 1 個体、茨城県産 1 個体)を供試し、コオニユリ(長崎県平戸宮浦産 1 個体、大瀬産 1 個体、壱岐赤瀬鼻産 1 個体、大分県大浜産 1 個体、佐賀県波戸岬産 1 個体)、スカシユリ(宮城県産 1 個体)、および二倍体園芸品種 4 種‘コネチカットキング’, ‘モナ’, ‘ラトビア’の花粉を用いて交配を行った。種子親の花蕾を開花直前に除雄した後、粘液の滲出が見られた柱頭に 5 $^{\circ}$ C で冷蔵保存した花粉を受粉し、アルミホイルで柱頭を覆った。各組合せとも交配 2 ヶ月半~3 ヶ月

後に果実の最大直径が 1cm 以上に達した場合を着果とみなし、着果率を算出した。また、肉眼で胚が内部に確認された種子を完全種子とし、果実あたりの完全種子数を調査した。

4. 研究成果

(1) 韓国の三倍体オニユリは少なくとも 6 種類のクローン型に分化しており、さらに、このうちの少なくとも 4 種類は新規のクローン型であり (第 1 図)、日本と韓国を合わせると、31 種類のクローン型が存在することが明らかとなった。また、二倍体オニユリの分布域周辺には見られないクローン型が存在することから、韓国の三倍体オニユリも日本の三倍体オニユリのようにコオニユリとの種間交雑により遺伝的に分化している可能性が考えられた。



第 1 図 韓国の三倍体オニユリのクローン型の分布。

(2) オニユリ 52 個体およびコオニユリ 27 個体に対しコルヒチン溶液 0.05%, 0.1% で倍加処理をおこなったところ、葉肉細胞の一部もしくは全てが四倍体となった個体が 22 および 6 個体得られた (第 1 表)。これらの個体が分化した葯内には二倍体個体の花粉よりも大きい花粉が多数含まれていた。倍加処理個体から二倍性花粉を選別すれば、異倍数間交配に用いることができる。また、細胞倍加されたオニユリでは、葉腋に分化したムカゴから四倍体オニユリが得られる可能性がある。ムカゴを分化しないコオニユリでは、発芽種子に倍加処理することによって、四倍体獲得をめざす必要がある。

第 1 表 オニユリおよびコオニユリの葉長に倍加処理した際の倍数体の出現。

	濃度 (%)	処理個体数	葉頂枯死 個体数	葉頂生存 個体数	倍数性別の個体数		
					2x	2x+4x	4x
オニユリ	0.025	17	2	15 (13)	3(1)	12(12)	0(0)
	0.05	17	5	12 (5)	4(1)	6(2)	2(2)
	0.1	18	16	2 (2)	0(0)	1(1)	1(1)
コオニユリ	0.025	8	3	5 (5)	3(3)	2(2)	0(0)
	0.05	9	3	6 (6)	4(4)	2(2)	0(0)
	0.1	10	7	3 (3)	1(1)	2(2)	0(0)

※ 0 内の数字は開花個体数

得られた四倍体オニユリと二倍体オニユリ、コオニユリの相互交配の結果、種子親にコオニユリ、花粉親に四倍体オニユリの組合せでは、着果した全ての果実において完全種子が得られ、平均で 5.2 粒の種子が得られた (第 2 表)。このことから、コオニユリのゲノムを 1 組、オニユリのゲノムを 2 組持つ異質三倍体が得られやすいことが示唆された。

第 2 表 倍加個体と二倍体の交配における着果率および完全種子数。(2007 年実施)

種子親(n=個体数)	花粉親(n=個体数)	交配花数	着果率(%)	完全種子数
オニユリ 4x (n=2)	オニユリ 2x (n=1)	2	50.0	1
オニユリ 2x (n=8)	オニユリ 4x (n=1)	10	100	0
オニユリ 4x (n=2)	コオニユリ (n=2)	3	100	0
コオニユリ (n=8)	オニユリ 4x (n=1)	8	62.5	5.2
コオニユリ 2x+4x (n=4)	オニユリ 2x (n=3)	8	0	0
オニユリ 2x (n=7)	コオニユリ 2x+4x (n=3)	8	100	0.5

(3) 三倍体オニユリを種子親に、スカシユリ(二倍体)、二倍体園芸品種を花粉親に用いた場合、交配組合せごとの結実率は 0~44.4% となり、完全種子は全く得られなかった。したがって、実験に用いたこれらの二倍体は、三倍体オニユリの有性繁殖能力を高める遺伝子を保有しないと考えられた。

一方、三倍体オニユリを種子親に、コオニユリ(二倍体)を花粉親に用いた場合、交配組合せごとの結実率は 16.7~69.2%、完全種子数は 0~22 となった。結実率と完全種子数が最も低下したのは、長崎県平戸大瀬産のコオニユリを花粉親とした交配組み合わせであった。したがって、三倍体オニユリの有性繁殖能力は、花粉親となるコオニユリの遺伝子型の影響を受けることが示唆された。

第 3 表 三倍体オニユリを種子親にした交配結果(2008 年交配)

花粉親	交配花数	着果率 (%)	完全種子数	発芽率 (%)
2x-コオニユリ	50	50.0	15.2 (0-58)	77.8
長崎平戸宮之浦	13	69.2	21.9 (3-24)	74.7
長崎平戸大瀬	12	16.7	0	-
大分大浜	7	57.1	3.0 (0-6)	83.3
帯坂赤瀬鼻	7	42.9	22.0 (17-29)	79.2
佐賀波戸岬	11	63.6	12.4 (2-26)	73.9
スカシユリ	9	44.4	0	-
コネチカットキング	9	11.1	0	-
ラトビア	7	0	-	-
モナ	5	0	-	-

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Hiramatsu, M., J. H. Kim and H. Okubo. 2006.10. *Lilium* resources in Japan and Korea. Proceedings of 'The 3rd International Joint Symposium between Korea and Japan: The Recent Status and Perspectives of Agricultural Environment and Biotechnology', pp.3-7. (査読無)
- (2) Kim, J. H., H. Y. Kyung, Y. S. Choi, J. K. Lee, M. Hiramatsu and H. Okubo. 2006.10. Geographic Distribution and Habitat Differentiation in Diploid and Triploid *Lilium lancifolium* of South Korea. Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University 51(2): 239-243. (査読無)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 吉浦絵理・比良松道一・大久保敬. 2008. 高い有性繁殖能力を有する三倍体オニユリ

の起源を探るためのオニユリ, コオニユリの四倍体作出および異倍数体間交配. 平成20年度園芸学会秋季大会.

(2) 吉浦絵理・比良松道一・金鐘和・大久保敬, 韓国に分布する三倍体オニユリの遺伝的分化, 園芸学会平成20年度春季大会, 2008. 03.

(3) Hiramatsu, M., J. H. Kim and H. Okubo. 2006. Liliium resources in Japan and Korea. The 3rd Internatinonal Joint Symposium between Korea and Japan: The Recent Status and Perspectives of Agricultural Environment and Biotechnology.

(4) Oyagi, A., M. Hiramatsu, J. H. Kim and H. Okubo. 2006. Variation in chloroplast DNA haplotype of triploid *Lilium lancifolium*. 27th International Horticultural Congress.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

比良松 道一 (HIRAMATSU MICHIKAZU)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：30264104