

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580024

研究課題名（和文） ユリ科花き園芸作物のゲノム同定とゲノム倍加技術の開発

研究課題名（英文） Development of methods for genome identification and chromosome doubling in liliaceous ornamental plants

研究代表者

岡崎 桂一（OKAZAKI KEIICHI）

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20270936

研究成果の概要（和文）：

倍数性および種間交雑育種法は園芸作物の育種として極めて重要である。そこで、本研究では、染色体倍加の新技术として、笑気ガス処理による花粉の染色体を倍加する方法や種間雑種の不稔性を回復する技術を開発した。また、ゲノムや染色体の同定を行うため、rDNA を用いた FISH 解析や GISH 解析により、雑種のゲノム構成を明らかにする技術を開発した。これらの技術は、ユリおよびチューリップの染色体同定に有効であるとともに、不稔性種間交雑種の稔性を回復させ交配母本とし利用できることを示した画期的な育種法を提示するものである。

研究成果の概要（英文）：

Polyploidization and interspecific hybridization are the most important techniques in horticultural crop breeding. We developed a very innovated method to induce unreduced pollen with nitrous oxide gas in tulips and lilies. The nitrous oxide gas treatment is also applicable for overcoming pollen sterility of the interspecific hybrids via diploidization of pollen mother cells. This method has crucial potential for lily and tulip breeding as well as other agronomic crops.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：園芸・育種学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：FISH / GISH / チューリップ / 染色体 / 笑気ガス

## 1. 研究開始当初の背景

園芸作物の高次倍数化や種間交雑によって、収量性の改善、新奇性の向上が図れる。

このため、倍数性および種間交雑育種法は園芸作物の育種として極めて重要である。しかしながら、両育種法の実施には、染色体倍加

方法や雑種の染色体解析技術の開発が鍵となるが、これらの技術の開発には以下のような困難な点がある。1) 従来法のコルヒチン処理は、作物によっては害作用があり倍数体を得ることが難しい作物が多い(ユリ、チューリップなど)。2) コルヒチン処理に替わる優れた倍加方法がないため、種間雑種の不稔化の問題を、雑種の染色体倍加処理(複2倍体化)により解消することが困難な場合が多い。3) 倍数体や種間雑種の染色体分析は、根端細胞の染色体数のカウント及び核型分析によって従来行われてきたが、この方法では種間雑種の染色体構成を充分解析できない問題点がある。

## 2. 研究の目的

ユリ科花き園芸作物では、上記の問題点が育種上の大きな問題点となっている。そこで、本研究では、この問題を扱うため、ユリ・チューリップを取り上げ、染色体倍加技術(笑気ガス処理)および染色体同定技術(FISHなど)の技術開発を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) FISHによるチューリップの染色体識別法の開発

一般的に、リボゾーマルDNA(rDNA)をプローブとしたFISHによって、rDNAの座乗染色体を同定し、染色体識別のマーカーにすることが行われている。チューリップでは45Sおよび5SrDNAの座乗染色体は明らかでないので、クローンニング済み45Sおよび5SrDNAプローブを用い、これらのrDNAの染色体上の位置を明らかにし個別染色体同定のための染色体マーカーとする。

### (2) 単離染色体由来のマイクロライブラリーを用いた個別染色体の同定

本実験ではユリおよびチューリップの個別染色体を識別するため、染色体プレパラート上からマイクロマニピレーターを用い、個別染色体を単離し、DNA増殖を行った後、マイクロライブラリーを作る。その後、マイクロライブラリーからプローブを調整し、ゲノム中の個別の染色体をFISHによって同定する。

### (3) 笑気ガス処理法の改良と種間雑種の稔性回復

コルヒチン処理に替わりに、小胞子の減数分裂中期の時期に24時間、笑気ガス処理すると2n花粉が生じることが、最近報告された。そこで、本研究では、笑気ガスを花粉母細胞が盛んに分裂している葯発生期の初期に処理し、花粉母細胞そのものを倍加することを考えた。この方法であれば、種間雑種(ゲノムをABとする)を笑気ガス処理することによって葯内の花粉母細胞は倍加される。倍加した花粉母細胞(AABB)では、減数分裂が

正常に行われ稔性ある花粉が得られることが期待される。

### (4) 異種ゲノムのドーズを変えた3倍性種間雑種の育成と種間雑種後代の染色体構成の分析

本実験では、笑気ガス処理由来の2n花粉を異種に交雑し、3倍性の種間雑種(AAB種あるいはABB種)をユリおよびチューリップで育成する。また、笑気ガス処理し、花粉稔性が回復した種間雑種個体の花粉を用いて雑種を育成する。得られた雑種の染色体構成をFISH法、GISH法を用いて解析する。

## 4. 研究成果

(1) FISHによるチューリップの染色体識別を行うため、チューリップの5SrDNAをPCRで増幅してクローンニングしたところ、*T. fosteriana*の典型的な5SrDNAは390bpのリピートユニットを持ち、遺伝子領域は120bpであったが、ユニット内に変異を持つリピートユニットが少なくとも2種類存在することがわかった。さらに、*T. fosteriana* 45SrDNAのリピートユニットが9.4Kbpであることがわかった。クローンニングしたrDNAをプローブとしてFISHを行ったところ5SrDNAは各染色体に散在し、*T. gesneriana*では約50個、*T. fosteriana*では約70個存在した。一方、45SrDNAは両種とも約10個が数本の染色体に分散して同定された。このようにrDNAがゲノム中に多数存在し、染色体構成上の要素となっている例は極めてまれであり、興味深い結果である。多数のこれらのrDNAの染色体上での位置は、*T. gesneriana*と*T. fosteriana*間で異なるほか、*T. gesneriana*の品種間でも異なることが明らかになった。

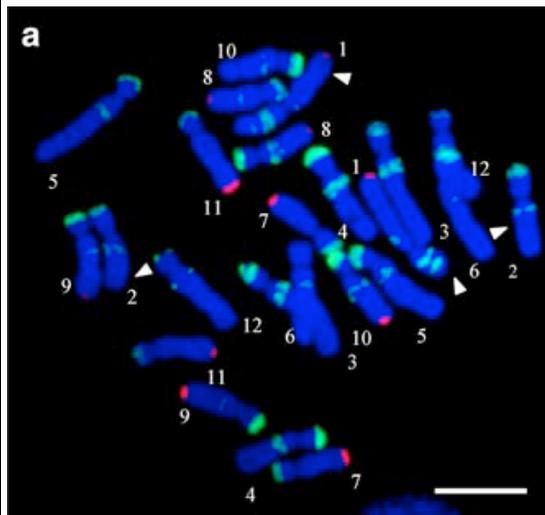


図1. *T. gesneriana* ‘クリスマスドリーム’の5SrDNA(緑)および45SrDNA(赤)をそれぞれのrDNAプローブで検出した像。Bar=10  $\mu$ m

本試験で同定した染色体特異マーカーと染色体の核型を用いることにより、24本ある染色体を個別に同定することが可能となった。この技術は、チューリップの染色工学を利用した遺伝・育種に有用であると思われる。

チューリップの種間雑種 (*T. gesneriana* × *T. fosteriana*) を両親へ戻し交雑した後代からは、たくさんの新品種が誕生しているが、その品種における両親ゲノム間の染色体組み換えを、本研究で開発した rDNA を用いた染色体同定技術と GISH 法を用い明らかにした。これまで、栽培チューリップはもっぱら *T. gesneriana* の種内交雑から育種されてきたが、本研究によって、*T. gesneriana* ゲノムに *T. fosteriana* ゲノムが取り込まれ、新品種が誕生していることをゲノム工学的に初めて明らかにすることができた (データ省略)。

(2) マイクロマニピレーターを用いることにより、プレパラート上に展開した染色体標本から、染色体を一個ずつ拾い上げることができる技術を開発した。その後、単離した染色体から DNA 増殖を行った後、プローブを調整し、FISH を行った。その結果、予想に反して、検出された蛍光はプローブを作成した単離染色体以外の染色体にも検出された (データ省略)。この原因としては、単離した染色体には、各染色体に共通に含まれる反復 DNA 配列があり、それがプローブとして働き、いろいろな染色体にハイブリしたためと思われる。

(3) 種間雑種の稔性回復試験では、不稔花粉率 100% の種間雑種 ‘イエローウィン’ および ‘乙女の姿’ の稔性回復に成功した (図 2)。最適な処理時期 (蕾長が 1~3 mm) を決定したほか、3 倍性 LA ハイブリッド 6 品種において可稔花粉の誘導に成功し、処理に適した蕾のサイズは 3~5 mm であった。

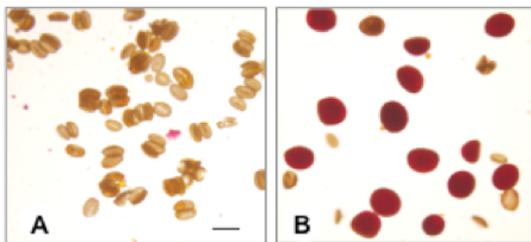


図 2. イエローウィンの無処理個体 (A) と笑気ガス処理により稔性が回復した花粉 (B)。酢酸カーミン染色による。

また、花粉発芽試験で、処理によって稔性回復した花粉が発芽することを確かめたほか、得られた花粉を交雑に用いたところ種子が得られた。この結果は、19-21 年度の 3 ヶ年に渡り再現性を確かめた。

種間雑種の稔性回復技術は、これまで交配母本に用いることができなかった不稔性の種間交雑ユリを母本にした未知の雑種が得られる可能性を示しており、本研究結果は、まったく新しいユリ育種の展開の方向性を示す画期的なものであると言える。

(4) 笑気ガス処理によって得られた 2n 花粉や稔性回復花粉を用い、多数の交雑試験を行った。その結果、レガタの 2 倍性花粉を 2 倍性シンテッポウユリ (さやか) へ交雑したところ、3 倍性の種間雑種の作成に成功し、交配後わずか 1 年で発蕾に至った (9 月下旬から低温期に向かうときに発蕾したため、開花までには至らなかった)。さらに、稔性回復された花粉を用い シンテッポウユリ × 乙女の姿 (LO) で 14 個体の 3 倍体が得られた。乙女の姿 (LO) はシンテッポウユリ × オトメユリの交雑で育成された早期開花性のユリ品種であるが、今回、本品種の稔性回復花粉をシンテッポウユリに戻し交雑できたので、得られた雑種がさらに早期開花性であることが期待できる。このほかにも、シンテッポウユリを親として多数の 3 倍性および 4 倍性の種間雑種が育成できた。特に、3 倍性種間雑種は子房親あるいは花粉親のどちらかのゲノムを 2 セット含むゲノム構成が非対称型の種間交雑となっている。このため、雑種はゲノムを 2 セット供与した両親の方へ形質が似ることとなり、2 倍性種間雑種に見られる両親の中間型の中途半端な特性を回避できる。

以上の交雑試験から、本研究は、これまでの染色体倍加法に比べ育種年限を大幅に短縮して早期開花性ユリが育成できることを示したとともに、不稔性種間交雑種の稔性を回復させ交配母本として利用できることを示した画期的な育種法を提示するものである。

これらの雑種の養成をはかることにより、後代では種々の形質分離が期待でき、早期開花性ユリをはじめ、種々の育種目標に合致した系統の育成が、今後、期待される。

(5) 得られた種間雑種の rDNA-ITS 領域を PCR で増幅し制限酵素で切断することにより多型を検出し、雑種判定が可能であることを実証した (データ省略)。さらに、シンテッポウユリ (雷山) × 2 倍性レガタ花粉 (AH) の交雑から得られた 4 倍体が両種の複 2 倍体雑種であることが、GISH 法で確かめられた (図 3)。したがって、この雑種は、シンテッポウユリ (雷山) の自然に染色体倍加した卵と 2 倍性花粉の交雑に由来するものと考えられた。

また、シンテッポウユリ (FL) × AH の交雑から得られた 3 倍性種間雑種のうち、分析した個体は、シンテッポウユリのゲノムを 2 セット、AH のゲノムを 1 セット含むことが明らか

になった。さらに、シンテッポウユリ (FL) × 乙女の姿 (LO) の交雑から得られた 3 倍性種間雑種は、シンテッポウユリのゲノムを 2 セット、オトメユリのゲノムを 1 セット含むことが明らかになった (データ省略)。

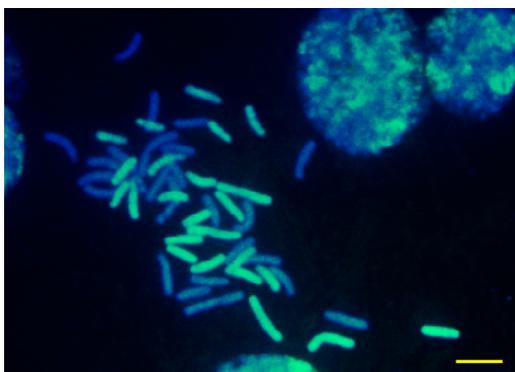


図 3. GISH 法による雑種のゲノム構成の分析。シンテッポウユリ (品種：雷山) × 笑気ガス処理 2 倍性花粉 (品種：AH) の交雑から得られた雑種を分析した。シンテッポウユリゲノムをジゴケシゲニンでラベルし、FITC 標識抗ジゴケシゲニン抗体で染色した。緑色に染色された染色体 (24 本) がシンテッポウユリ由来で、青色に染色された染色体 (24 本) が AH 由来。Bar=10 μm

本中課題では、PCR 法による雑種判定法も開発し、多数の育成個体の雑種性が安価に短時間でできる技術を開発した (データ省略)。上記したように、笑気ガス処理花粉を用いて育成した雑種のゲノム構成を、GISH 法により同定する技術を開発したので、現在育成済みの雑種のゲノム構成や今後展開する育種において雑種後代での染色体の組み換えや染色体構成の分析が可能となった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① H. Mizuochi, H. Matsuzaki, T. Moue, K. Okazaki (2009) Diploid endosperm formation in *Tulipa* spp. and identification of a 1:1 maternal- to- paternal genome ratio in endosperms of *T. gesneriana* L. Sex Plant Reprod., 22:27-36.

② S. Kitamura, M. Akutsu, K. Okazaki (2009) Mechanism of action of nitrous oxide gas applied as a polyploidizing agent during meiosis in lilies. Sex. Plant Reprod., 22:9-14.

③ A. Marasek, K. Okazaki (2008) Analysis of introgression of *Tulipa fosteriana* genome into *Tulipa gesneriana* using GISH and FISH. Euphytica, 160:217-230.

④ A. Marasek, K. Okazaki (2007) GISH Analysis of Hybrids Produced by Interspecific Hybridization between *Tulipa gesneriana* and *T. fosteriana*. Acta Horticult 743:133-137.

⑤ M. Akutsu, S. Kitamura, R. Toda, I. Miyajima, K. Okazaki (2007) Production of 2n pollen of Asiatic hybrid lilies by nitrous oxide treatment. Euphytica 155:143-152.

⑥ H. Mizuochi, A. Marasek, K. Okazaki (2007) Molecular cloning of *Tulipa fosteriana* rDNA and subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization of 5S rDNA and 45S rDNA in *T. gesneriana* and *T. fosteriana*. Euphytica 155:235-248.

[学会発表] (計 9 件)

① 岡崎桂一, 北村里美, 温井祥太郎, 日置智代, 大塚英昭, 三吉一光, 佐藤孝夫, 高取由佳, 高濱雅幹 (2009, 9 月 26-28 日) 笑気ガス処理による不稔性ユリ種間雑種の稔性回復と得られた稔性回復花粉を用いた後代の育成, 園芸学会, 秋田大学

② 北村里美・岡崎桂一 (2007, 9 月 22-23 日) 笑気ガス処理を用いた花粉母細胞の染色体倍加によるユリ種間雑種の稔性回復, 日本育種学会, 山形大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡崎 桂一 (Keiichi Okazaki)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：20270936