

機関番号：13101
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20580023
 研究課題名（和文） コルチカム科花き園芸植物における種間・属間雑種品種の育成
 および類縁関係の評価
 研究課題名（英文） Production of interspecific and intergeneric hybrids and
 analysis of genetic relationship in colchicaceous ornamentals
 研究代表者
 中野 優 (NAKANO MASARU)
 新潟大学・自然科学系・准教授
 研究者番号：00262460

研究成果の概要（和文）：コルチカム科花き園芸植物を用いて遠縁種間交雑を行ったところ、胚珠培養により、グロリオーサ類、サンダーソニアおよびリットニア間の複数の組み合わせにおいて属間雑種が得られた。これらの雑種は、いずれも新規形質を示したことから、コルチカム科花き園芸植物における新品種育成に属間交雑が有効であると考えられた。また、GISH法により属間の染色体が明確に識別できたことから、属間のゲノムの相同性は低いことが予想された。

研究成果の概要（英文）：Interspecific and intergeneric cross pollination was performed using several colchicaceous ornamental plants. Following ovule culture, intergeneric hybrids were successfully obtained among *Gloriosa* spp., *Littonia modesta* and *Sandersonia aurantiaca*. These intergeneric hybrids had novel morphological characteristics compared with their parents, indicating the validity of intergeneric hybridization in the improvement programs of colchicaceous ornamentals. Since parental chromosomes in the intergeneric hybrids could be clearly discriminated by GISH sequence homology among *Gloriosa*, *Littonia*, and *Sandersonia* may be relatively low.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：花卉園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：グロリオーサ、サンダーソニア、リットニア、遠縁交雑、新品種育成

1. 研究開始当初の背景

花き園芸植物の需要の拡大のためには、常に新たな品種が育成される必要がある。食用作物の場合とは異なり、花き園芸植物の育種においては、見た目の新奇性の創造が重要である。また、花き園芸植物にはもともと栄養繁殖性のものが多いために、育種により作出された個体の稔性が問われることが少なく、

その個体が高い鑑賞価値をもっていれば、組織培養により迅速に増殖して新品種を育成することも可能である。このような点から、我々は以前からバイオテクノロジーによる花き園芸植物の新品種育成に関する研究に取り組んできた。特に、「新奇性の創造」に関しては、「胚救出による遠縁種間雑種の作出」が最も有効であると考えている。「胚救

出による遠縁種間雑種の作出」はすでに多くの花き園芸植物の育種に応用されているが、これまでは比較的近縁の組み合わせである種間交雑が主流であった。しかしながら、交雑組み合わせをより遠縁の属間にまで拡大できれば、より高い新奇性をもった品種が育成できると考えられる。

本研究課題で用いたコルチカム科植物の中には、グロリオサ類やサンダーソニアなど、重要な花き園芸が含まれている。しかしながら、コルチカム科花き園芸植物は、それぞれの属内における園芸形質の幅が狭く、形質の拡大が望まれている。我々は、これまでに、数種のコルチカム科花き園芸植物を用いて胚救出による種間・属間雑種の作出を検討し、一部の組み合わせにおいて属間雑種の作出が可能であることを見いだした。また、ほぼ同時期に、ニュージーランドの研究グループがコルチカム科のサンダーソニアとリットニア間の属間雑種の作出に成功し、得られた雑種は新植物サントニア‘ゴールデン・ライト’としてニュージーランドにおいて品種登録されている。これらのことから、コルチカム科における種間・属間雑種作出に関する研究を今後も推し進めることにより、日本においてもコルチカム科の新奇品種が育成できると考えられる。しかしながら、現在のところ、雑種が得られる組み合わせが限られていることや、得られた雑種の増殖および園芸的評価など、検討・解決すべき課題が数多く残されている。

一方、分類学的に遠縁である属間の組み合わせにおいては、一般的に、胚救出を行っても雑種作出は非常に困難または不可能とされている。しかしながら、コルチカム科においては特定の組み合わせで属間雑種がすでに得られていることから、本科における各属の類縁関係は非常に興味深い。今後、広範囲のコルチカム科植物を材料に用いて、さまざまな組み合わせで種間・属間交雑および胚救出を行い、それぞれの組み合わせにおける交雑親和性を調査するとともに、その過程で新たに得られた雑種およびすでに作出されている雑種の生育状況や形質、減数分裂時における染色体挙動およびゲノム構成などを調査することにより、コルチカム科における各植物の類縁関係を評価できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、コルチカム科花き園芸植物における遠縁種間雑種品種の育成、およびコルチカム科花き園芸植物における類縁関係の評価、である。これらの目的にしたがい、さまざまな属間組み合わせにおける交雑親和性の調査、胚救出方法の効率化および属間雑種の作出、属間雑種の効率的な増殖システムの確立、開花した属間雑種の形質調査、属

間雑種の染色体倍加、属間雑種のゲノム構成の調査および減数分裂時における染色体挙動の観察、について検討した。

3. 研究の方法

(1) 交雑親和性の調査

さまざまな属間組み合わせにおいて、通常の柱頭受粉または花柱切断受粉により正逆交雑を行い、蛍光顕微鏡による受粉後の雌蕊における花粉発芽・花粉管伸長の観察、走査型電子顕微鏡 (SEM) による珠孔への花粉管侵入の観察、子房肥大の調査、胚救出による植物体再生効率の調査等により、交雑親和性の程度を調査した。

(2) 胚救出の効率化および雑種個体の作出

受粉後に子房の肥大が観察された交雑組み合わせにおいて、子房から外植体を調製して培養を行い、培養を開始する時期 (受粉後の日数)、外植体の種類 (子房輪切り、胎座付き胚珠、胚珠、胚など)、培地組成 (無機塩類の濃度、浸透圧、植物成長調節物質など) を検討した。

(3) 胚救出由来個体の雑種性の確認

胚救出により得られた個体の雑種性を、フローサイトメトリー (FCM) 分析による相対核 DNA 量の調査、random amplified polymorphic DNA (RAPD) 分析により確認した。

(4) 雑種の増殖

交雑親および属間雑種個体について、組織培養による増殖の条件を検討した。

(5) 雑種の染色体倍加

交雑親および属間雑種の培養物を紡錘糸形成阻害剤で処理し、染色体倍加を試みた。

(6) 雑種の形質調査

交雑親および属間雑種を栽培し、園芸形質 (草丈、草姿、葉形、開花期、開花期間、花数、花形、花色、分球性など) の調査を行った。

(7) 雑種の染色体観察

コルチカム科花き園芸植物における genomic *in situ* hybridization (GISH) 法の確立を検討するとともに、根端細胞における染色体観察および減数分裂時における染色体対合頻度およびキアズマの有無の調査を行った。

4. 研究成果

(1) 交雑親和性の調査

数種のコルチカム科花き園芸植物、サンダーソニア、リットニアおよびコルチカム類を用いて、さまざまな属間組み合わせで正逆交雑を行った (計 54 組み合わせ)。その結果、グロリオサ類、サンダーソニアおよびリットニア間の多くの属間組み合わせにおいて (32 組み合わせ)、交雑受粉後に子房の肥大が観察された。これらの交雑組み合わせにおいては、柱頭での花粉発芽、花柱内における花粉管伸長、子

房内における花粉管伸長、および珠孔への花粉管侵入が観察された。一方、コルチカム類を片親に用いた属間交雑においては、受粉後に子房の肥大がみられなかった。これらの交雑組み合わせにおいては、柱頭上で花粉は発芽するものの、花柱への花粉管の侵入は観察されなかった。

グロリオサ類、サンダーソニアおよびリットニア間の属間交雑組み合わせのうち、交雑受粉後に子房の肥大が観察された 32 組み合わせについて胎座付き胚珠培養を行ったところ、30 組み合わせにおいて胚珠からラーゾーム様構造物が形成された。さらに、19 組み合わせにおいて、ラーゾーム様構造物から植物体が再生した。

これらの結果から、グロリオサ属植物、サンダーソニア属植物およびリットニア属植物間においては、属間交雑親和性が比較的高いと考えられた。一方、コルチカム属植物については、他のコルチカム科植物との属間交雑親和性が低いと考えられた。コルチカム属は、グロリオサ属、サンダーソニア属およびリットニア属とは遠い類縁関係にあることが予想された。

(2) 胚救出の効率化および雑種個体の作出

主に、多数の胎座付き胚珠が得られたリットニア×サンダーソニアの属間交雑において、効率的な胚救出方法の確立を検討した。その結果、培養を開始する時期、外植体の種類、培地組成等が胚救出効率に及ぼす影響は顕著にはみられなかった。

現在のところ、いずれの交雑組み合わせにおいても、外植体としては胎座付き胚珠または子房輪切りを用い、培地としては 0.01 mg/L NAA および 0.01 mg/L BA を添加した 1/2MS 培地を用いている。

(3) 胚救出由来個体の雑種性の確認

核の相対蛍光強度 (RFI) が明らかに異なる植物間の交雑においては、FCM 分析により雑種性の確認を容易に行うことができた。また、両親の RFI が類似している場合や RFI のピークが期待される位置に出現しない場合など、FCM 分析による雑種同定ができない小植物体についても、RAPD 分析により雑種性を確認することができた。FCM 分析と RAPD 分析の組み合わせにより、コルチカム科花き園芸植物における属間雑種の早期確認が可能であることが示された。

(4) 雑種個体の増殖

数種類の交雑親および属間雑種について、培養小植物体の増殖に及ぼす増殖用培地における基本培地および植物成長調節物質が増殖効率に及ぼす影響について検討した。その結果、シュート増殖用培地としては 1 mg/L

BA を添加した MS 培地が、発根用培地としては 10 mg/L BA および 1 mg/L NAA を添加した MS 培地が適していると考えられた。また、塊茎を増殖させる場合には、1 mg/L NAA を単独で添加した MS 培地が適していると考えられた。さらに、これらの条件により、さまざまな交雑親および属間雑種について効率的な増殖が可能であることが明らかとなった。

(5) 雑種の染色体倍加

一部の交雑親および属間雑種を用いて、培養物の生存および染色体倍加に及ぼす紡錘糸形成阻害剤処理の影響を調査した。その結果、10 mg/L アミプロホスメチルで培養シュート基部を処理することにより、植物組織に大きなダメージを与えずに、染色体倍加が可能であることが明らかとなった。現在、この条件を用いて、さまざまな交雑親および属間雑種の染色体倍加を検討している。

(6) 雑種の形質調査

これまで、10 組み合わせ以上の属間雑種が開花に至っている。これらの雑種について形質調査を行ったところ、いずれの雑種も両親にはみられない新規形質を示した。また、新規形質の中には、花き園芸的に有用なものもみられた (図 1)。この結果から、コルチカム科花き園芸植物における新品種育成に、属間交雑が有効であると考えられた。

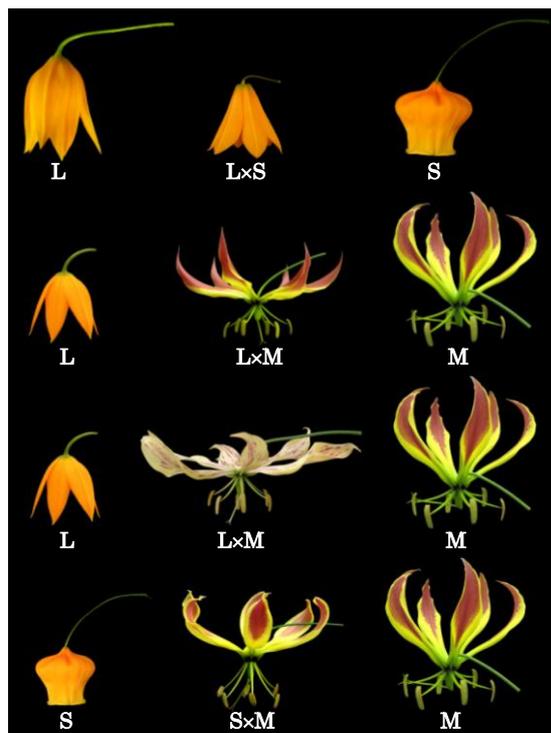


図 1 コルチカム科花き園芸植物における一部の属間雑種の花。L、リットニア；S、サンダーソニア；M、グロリオサ「マロンゴールト」。

(7) 雑種の染色体観察

一部の属間雑種について、GISH 法による根端細胞の染色体観察を検討した。その結果、属間雑種においては GISH 法による異属由来染色体の識別が可能であり、属間雑種におけるゲノム構成が明らかとなった (図 2)。また、ブロッキング DNA を用いなくともクロスハイブリ等がみられなかったことから、グロリオサ属、サンダーソニア属およびリットニア属間のゲノムの相同性は低いことが予想された。現在、GISH 法による減数分裂時における染色体対合の観察を行っている。

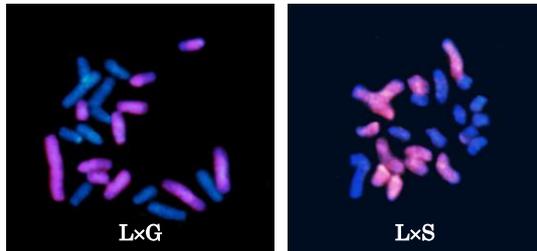


図 2 コルチカム科花き園芸植物における一部の属間雑種の GISH 分析。L、リットニア；G、グロリオサ スペルバ ‘ルデア’；S、サンダーソニア。

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 3 件)

- ① Daisuke Nakazawa, Tomonari Kishimoto, Takeru Sato, Tomoka Saito, Junji Amano, Sachiko Kuwayama, Hajime Okuno, Toshinari Godo, Yusuke Watanabe, Dong-Sheng Han, Masaru Nakano, Genomic *in situ* hybridization (GISH) analysis of intergeneric hybrids in Colchicaceae, *Euphytica*, 査読有, 2011, DOI 10.1007/s10681-011-0393-2
- ② Junji Amano, Daisuke Nakazawa, Sachiko Kuwayama, Yoko Mizuta, Hajime Okuno, Toshinari Godo, Dong-Sheng Han, Masaru Nakano, Intergeneric hybridization among colchicaceous ornamentals, *Gloriosa* spp., *Littonia modesta* and *Sandersonia aurantiaca* via ovule culture, *Plant Biotechnology*, 査読有 26 巻, 2009, 535-541
- ③ Junji Amano, Sachiko Kuwayama, Yoko Mizuta, Toshinari Godo, Hajime Okuno, Masaru Nakano, Morphological characterization of three intergeneric hybrids among *Gloriosa superba* ‘Lutea’, *Littonia modesta* and *Sandersonia aurantiaca* (Colchicaceae), *HortScience*, 査読有, 43 巻, 2008, 115-

[学会発表] (計 6 件)

- ① Daisuke Nakazawa, Takeru Sato, Tomoka Saito, Junji Amano, Sachiko Kuwayama, Hajime Okuno, Toshinari Godo, Yusuke Watanabe, Dong-Sheng Han, Masaru Nakano, Genomic *in situ* hybridization (GISH) analysis of intergeneric hybrids in Colchicaceae, 28th International Horticultural Congress & Exhibition, 2010 年 8 月 25 日, リスボン, ポルトガル
- ② 中澤大将, 斎藤友花, 天野淳二, 桑山幸子, 奥野 哉, 神戸敏成, 渡辺祐輔, 韓 東生, 中野 優, コルチカム科花き園芸植物における胚珠培養による種間および属間雑種の作出 (第 10 報) 2 倍体系統間の属間雑種における genomic *in situ* hybridization (GISH) 法による体細胞染色体の観察, 園芸学会, 2009 年 9 月 27 日, 秋田大学
- ③ 中野 優, 斎藤友花, 天野淳二, 桑山幸子, 奥野 哉, 神戸敏成, 渡辺祐輔, 韓 東生, 中澤大将, コルチカム科花き園芸植物における胚珠培養による種間および属間雑種の作出 (第 9 報) 高次倍数体グロリオサ ‘ヴァースチャイルド’ とサンダーソニア間の属間雑種の形質調査, 園芸学会, 2009 年 9 月 26 日, 秋田大学
- ④ Daisuke Nakazawa, Junji Amano, Sachiko Kuwayama, Yoko Mizuta, Toshinari Godo, Tomoka Saito, Dong-Sheng Han, Masaru Nakano, Intergeneric hybridization among colchicaceous ornamentals, *Gloriosa* spp., *Littonia modesta* and *Sandersonia aurantiaca* via ovule culture, International Symposium on Sustainability in Food Production, Agriculture and the Environment in Asia, 2009 年 9 月 14 日, 新潟大学
- ⑤ Masaru Nakano, Biotechnological approaches to breeding of floricultural plants, 2nd International Meeting for Development of IPM in Asia and Africa, 2008 年 12 月 9 日, ハノイ, ベトナム
- ⑥ 中澤大将, 天野淳二, 桑山幸子, 奥野 哉, 神戸敏成, 中野 優, コルチカム科花き園芸植物における胚珠培養による種間および属間雑種の作出 (第 8 報) 4 倍体グロリオサ ‘マロンゴールド’ とリットニアおよびサンダーソニア間の属間雑種の形質調査, 園芸学会, 2008 年 9 月 27 日, 三重大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~mnakano/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 優 (NAKANO MASARU)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00262460

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し