

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580040

研究課題名(和文)三倍体花き園芸植物の特性と育種的利用に関する研究

研究課題名(英文)The study of characterization and utilization of triploid ornamental plants

研究代表者

加藤 淳太郎(KATO, Juntaro)

愛知教育大学・教育学部・准教授

研究者番号：80303684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：二倍体から生じた三倍体は園芸的に優れているが、出現機構は未知なことが多く、元の二倍体に戻すことは困難とされてきた。

二倍体どおしの交雑で高頻度に三倍体が発現する二交雑組み合わせについて、非還元性配偶子の出現タイプをSSRマーカーにより調査した。異質二倍体(異種ゲノム雑種)では、減数第一分裂の阻害が原因であり、同質二倍体(同一ゲノムによる二倍体)では、減数第二分裂の阻害が原因である可能性が示唆された。一方、三倍体センノウの交配で得られた二倍体と推測される3個体は、高い花粉稔性を保有することが確認されたが、三倍体ヒガンバナの交配で得られた実生は異数体であり、顕著に生育が悪いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Though triploid nature is better than diploid one in ornamental plant, occurrence mechanism of triploids is not known in detail.

In two 2x-2x cross combinations that could produce mainly triploids, unreduced gamete forming pattern were investigated by SSR markers. It was suggested that the unreduced gamete of allo-diploids, which have two different genomes, were formed via inhibition of meiosis I. However, it was also suggested that the unreduced gamete of auto-diploid, which have two same genomes, were formed via inhibition of meiosis II. High pollen fertility could be detected from three plants with diploid chromosome numbers obtained from the crosses using the triploid *Lycnis senno* as parents. However, weak growth were shown from three seedlings obtained from the cross of *Lycoris radiata* used as maternal.

研究分野：園芸学

キーワード：非還元性配偶子 異数性配偶子 三倍体

1. 研究開始当初の背景

三倍体植物は二倍体と比べて花が大きくなるなど園芸植物的価値が高くなることが知られているが、その稔性は低く、育種素材としての利用はほとんどない。秋の代表的植物であるヒガンバナや伝統園芸植物のセンノウはいずれも三倍体のみが日本に現存し、種子が取れないことから、その増殖と維持は栄養繁殖で行われてきた。一方、サクラソウのように基本的には二倍体であるが比較的多くの三倍体とその園芸品種中に含まれている種や、種間・属間交配を中心に育種されたラン科植物の園芸品種にも、多くの三倍体品種が含まれていることが知られる。三倍体植物の人為的な育成には、二倍体をコルヒチン等の薬品によって四倍体化し、四倍体と二倍体を交配して三倍体植物を得ることが知られているが、多くの三倍体植物は人為的に作出されたものではない。

2. 研究の目的

花き園芸植物では、三倍体は比較的多く見られるが、三倍体植物の特性やその育種的利用に関する研究は不十分であり、次のような解明すべき課題がある。1) 三倍体はどのように出現するのか、2) 三倍体自殖後代の稔性はどうなっているのか、3) 三倍体から二倍体は復元できるのかなどである。

日本の伝統園芸植物の一つであるサクラソウと近縁種のカッコソウとの種間雑種を胚珠培養により作出すると、サクラソウを母親にした雑種はすべて三倍体であるのに対し、カッコソウを母親にした雑種はすべて二倍体になることが明らかにされ (Kato and Mii 2000) また、シンビジウムにおいては、キンリョウヘンのゲノムと DNA 含量が顕著に大きいゲノムで構成される二倍体園芸品種と二倍体を交配して得られる後代の DNA 含量から推測される倍数性は三倍体となることが示唆されている。一方、伝統園芸植物で三倍体のみしか日本で栽培されないセンノウでは、以前の研究で、100 系統を超える三倍体のセンノウの自殖後代を得ており、その中から二倍体相当の染色体数を持つ個体が見出されてきた。

本研究では、1) サクラソウ科植物、2) センノウ属を中心とするナデシコ科植物、3) ヒガンバナ科植物および 4) ラン科植物などを中心に、三倍体の形成過程から特性解析を行い、交配により二倍体 三倍体、三倍体 二倍体と倍数性を人為的に変更させる可能性について研究した。

3. 研究の方法

(1) 交配による三倍体形成のパターン解明

非還元性配偶子形成とそのタイプの解析

a) サクラソウの非還元性配偶子

サクラソウとカッコソウの種間交配では、サクラソウの特定の品種を母本とした時に三倍体が出現した。三倍体後代の花形には変

異が見られた。サクラソウにおいては近年そのゲノム情報や SSR マーカーが報告されている (Isagi et al 2001, Ueno et al 2006)。三倍体を再度育成し、サクラソウの非還元性配偶子のタイプを核型分析および DNA マーカーによって調査した。

b) シンビジウムの非還元性配偶子

ラン科植物のシンビジウムでもキンリョウヘンを片親にもつ二倍体園芸品種と二倍体原種を交配して育成された後代を、フローサイトメーターと染色体数により倍数性を確認し、次世代シーケンサーにより作出した SSR 様マーカーを用い、キンリョウヘン特異的マーカーの後代への遺伝性から非還元性配偶子のタイプを調査した。

四倍体 × 二倍体による三倍体形成

a) カーネーションの交配

カーネーションの異質四倍体系統を花粉親に二倍体カーネーションを交配し、土壌に播種すると四倍体がわずかに得られる交配組合せがあることが報告された (Nimura et al 2008)。四倍体がわずかに得られる組み合わせで三倍体が出現しない理由を解明するために、交配種子を無菌播種し育成した系統の DNA 含量をフローサイトメーターで調査した。

b) 倍加四倍体 *Primula* 'Thirty-one' の戻し交配

サクラソウ属植物の種間雑種由来品種 *Primula* 'Thirty-one' の倍加四倍体系統から自家受精による四倍体の作出は報告されていたが、戻し交配による三倍体の育成はできていなかったため、本当に三倍体は育成できないのかを明らかにするために、戻し交配を行い、Kato et al (2001) の培地に播種した。発芽後生育の悪いものは、Zeatin を含む Amano et al (2006) の培地に移植し、生育後倍数性をフローサイトメーターにより調査した。

c) *Zygopetalum*, *Zygonisia* の交配

種間交配により雑種性を保有しない個体 (単為発生個体) が出現することが知られている *Zygopetalum* 属および *Zygonisia* 属 (*Zygopetalum* × *Aganisia*) の三倍体様の DNA 含量を保有する系統と *Cymbidium* を交配し、無菌播種によって三倍体雑種の獲得を試み、得られた発芽種子の倍数性をフローサイトメーターで調査した。

(2) 三倍体植物の稔性配偶子形成能力の解明

ヒガンバナの三倍体と園芸品種の二倍体の人為的自家受精もしくは放任受粉で種子採取を行い、土壌播種もしくは 1/2MS 培地での無菌播種により後代の獲得を行った。

三倍体エビネ品種 (織姫) を用い自家受粉、三倍体間交配により得られた種子を播種し、

後代作出を無菌播種により行った。

三倍体の作出する花粉 DNA 含量の測定をベゴニア・レックスを用いてフローサイトメーターにより調査した。

(3) 三倍体植物からの稔実性二倍体植物の作出と育種的利用

三倍体植物からの稔実性二倍体植物の作出

以前より、三倍体の自殖により二倍体相当の後代がえられているセンノウについて、自家受精による個体数を増やし、生育したのから順にフローサイトメーターによる DNA 含量から二倍体の個体を選抜し、細胞学的観察で確認を行った。

三倍体植物から得られた二倍体植物の育種的利用の試み

すでに得られているセンノウの二倍体相当の染色体を持った個体について、花粉稔性をトルイジンブルーにより調査した。また、花色変異個体が出現したので、HPLC-DAD による色素解析を行った。

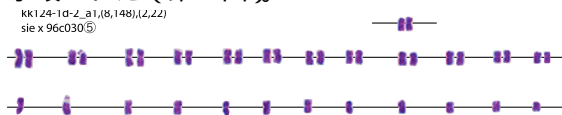
4. 研究成果

(1) 交配による三倍体形成のパターン解明

非還元性配偶子形成とそのタイプの解析

a) サクラソウの非還元性配偶子

サクラソウとカッコソウの種間交配時に見出される三倍体を再度作出し、フローサイトメーターによる DNA 含量測定、染色体観察、SSR マーカーによるヘテロのマーカの分離についてそれぞれ調査した。サクラソウ二倍体品種、'御幸' もしくは '大朝日' から得られた 25 個体では、不和合的な長花柱(pin) x pin の 2 交配由来の 6 個体を除き、すべて三倍体雑種であった。根の生育の良いものについて染色体数を調査したところ、kk124-1 について 38 本の染色体数が見出されたため、視覚的に核型解析を行った結果、サクラソウ由来の染色体が、2 ゲノム分の 24 本より 2 本多く、過剰な 2 本は相同染色体であることが示唆された (第 1 図)。



第 1 図 kk124-1 の核型

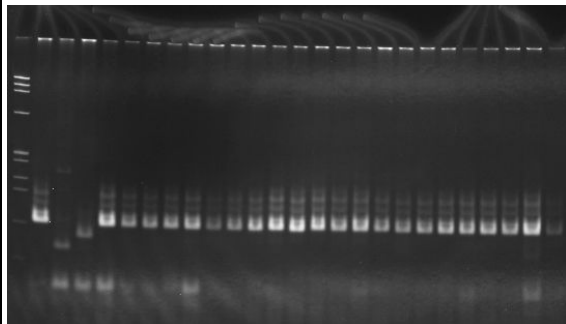
上段サクラソウ由来と推定される染色体、
下段カッコソウ由来と推定される染色体。

親品種の '御幸' '大朝日' では同一の 2 つの SSR マーカーが、ヘテロの遺伝子型として検出され、三倍体雑種ではヘテロの遺伝子型をもつ個体は検出されなかった。以上の結果より、サクラソウの雌性配偶子が作出する非還元性配偶子は、減数第二分裂を行わないことで生じる SDR 型であることが示唆された。

b) シンビジウムの非還元性配偶子

Cymbidium floribundum (キンリョウヘン) は以前の研究で、ゲノムの DNA 含量が他種の 1/2 程度も小さいことが示唆されていた。本種と二倍体の園芸種の交配により作出された二倍体品種は種子がとれにくいとされてきたが、我々の予備的な研究で、後代の獲得に成功したので、本研究ではフローサイトメーターによる倍数性の調査、次世代シーケンサーを用いて作出したキンリョウヘン SSR マーカーの後代への遺伝を調査した。

3 品種を母本とした二倍体との 5 交配組み合わせの後代の DNA 含量の分布は最小 82.2%、最大 85.5% で三倍体が高頻度で出現していることを示唆した。さらに、五倍体もしくは六倍体と推定される DNA 含量の個体および二倍体と推定される DNA 含量ほぼ有する個体がそれぞれ見出され、染色体数の調査の結果、五倍体もしくは六倍体と推測されたほとんどの個体の染色体数は、五倍体的な異数体であることを示した。SSR 様マーカーによる調査の結果、7 マーカーが使用可能であり、調査した全ての三倍体もしくは五倍体の後代からはキンリョウヘン特異的 SSR マーカーが検出された (第 2 図)。



第 2 図 flo20188 を用いたキンリョウヘン特異的マーカーの検出。左から、サイズマーカー、キンリョウヘン、エバニウム、ロウイワニウム、三倍体もしくは五倍体後代。

減数第一分裂の対合が行われれば後代のバンドには分離 (バンドの有無) が見出されると予想されるが、本研究の結果はフローサイトメーターによる DNA 含量調査の結果と同様に、キンリョウヘンを片親とする品種の DNA 含量と同じ DNA 含量を保有する FDR 型の非還元性配偶子が形成されたことが示唆された。

四倍体 x 二倍体による三倍体形成

a) カーネーションの交配

土壌播種により四倍体のみがわずかに得られる二倍体 () x 四倍体 () の組み合わせから三倍体が出現しない理由を解明するために、交配種子を無菌播種することにより育成された後代集団の DNA 含量をフローサイトメーターで調査した。土壌播種では、97

粒中 18 粒[10.3%] の発芽率に対して、無菌播種では 109 粒中 63 粒[57.7%]と高い発芽率となった。フローサイトメーターによる倍数性調査の結果、全て四倍体であり、三倍体は見出されなかった。このことから、三倍体が発芽率の低さの原因でないことが明らかとなった。

b) 倍加四倍体 *Primula* 'Thirty-one' の交配

サクラソウ属植物の種間雑種由来品種 *Primula* 'Thirty-one' の倍加四倍体系統から自家受精による四倍体の作出は報告されていたが、戻し交配による三倍体の育成はできていないため、三倍体の育成は不可能であるか否かを明らかにするために、戻し交配を行った。発芽初期の生育は、*Primula* 'Thirty-one' の作出時と同様に、多くの個体で根しか出現しないものであったが、Zeatin 添加の培地に移植することにより、植物体の再分化が可能となった。倍数性は、雑種であるものは三倍体であるが、三倍体が作出できた組み合わせは 1 組み合わせのみであったことから、花粉親の花粉稔性も原因である可能性が示唆された。

c) *Zygopetalum*, *Zygonisia* の交配

種間交配により雑種性を保有しない単為発生個体が出現することが知られている *Zygopetalum* 属および *Zygonisia* 属 (*Zygopetalum* x *Aganisia*) の三倍体様の DNA 含量を保有する系統と *Cymbidium* の交配による三倍体実生の獲得を、無菌播種によって試みた。実生の倍数性は、フローサイトメーターで調査した。

三倍体 *Zygopetalum* では、交配によって得られた発芽個体の DNA 含量は、調査したすべての個体で三倍体 *Zygopetalum* の DNA 含量と同一であり、雑種性を保有する個体は見出されなかった。一方、*Zygonisia* は染色体観察の結果四倍体であることが明らかとなった。四倍体 *Zygonisia* の二品種 '紫小町' および 'Purple eye' を用いた *Cymbidium* 品種との交配の結果、'紫小町' は多くの発芽種子が得られるが、ほとんどのものが '紫小町' と同じ DNA 含量であり、雑種性を保有するものは '紫小町' の非還元性配偶子が利用された五倍体であると推測された。一方、'Purple eye' からは、発芽率は低いものの、三倍体雑種が得られた。これらの結果から、'紫小町' は非還元性配偶子を形成しやすく、'Purple eye' は減数性配偶子を形成しやすいことが示唆された。

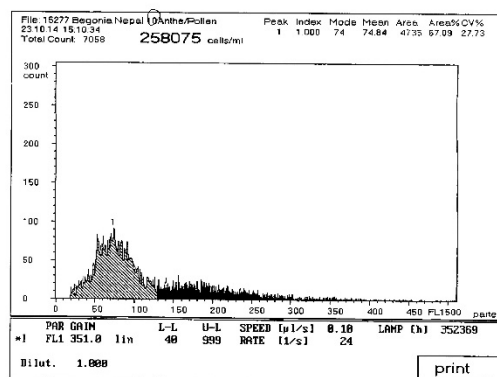
(2) 三倍体植物の稔性配偶子形成能力の解明

三倍体と二倍体のヒガンバナについて、人為的自家受粉もしくは放任受粉により種子採取を行った。二倍体のヒガンバナの発芽個体の DNA 含量をフローサイトメーターで調査したところ、3 年間で 1 個体だけ三倍体個体が見出されたが、残りのものはすべて二倍体

であった。三倍体のヒガンバナの自家受粉および放任受粉では、子房の肥大は二倍体と比べて顕著に小さく、土壌播種では発芽個体は 1 個体も獲得できなかった。一方、近縁な二倍体種が近くに植栽されている場所に植栽されている三倍体ヒガンバナの放任受粉より得られた種子を無菌播種した結果、3 個の発芽個体を得られ、異数性の DNA 含量が検出された。しかし、これらの個体の生育は無菌条件下においても著しく悪く、その後枯死した。以上の結果から、ヒガンバナでは、三倍体の稔性は低いことが明らかとなった。

三倍体エビネ品種 '織姫' をもちい自家受粉、三倍体間交配により得られた種子を播種し、後代作出を無菌播種により行った。受粉後 3 ヶ月目以降より発芽個体が見出された。三倍体間交配でも発芽個体が見出されており、これらの結果から、エビネの三倍体は、比較的高い稔性を保有することが明らかになった。

三倍体ベゴニア・レックスの作出する花粉が保有する DNA 含量をフローサイトメーターにより調査した。二倍体の花粉ではシャープなピークが検出されるのに対し、三倍体のピークは幅広となり (第 3 図) 異数性を含め様々な DNA 含量を保有する花粉が生産されていることが示唆された。



第3図三倍体ベゴニア・レックスの花粉の DNA 含量分布

(3) 三倍体植物からの稔実性二倍体植物の作出と育種的利用

三倍体植物からの稔実性二倍体植物の作出

以前より、三倍体の自殖により二倍体相当の染色体を持つ後代が得られているセンノウについて、自家受精による個体数を増やし、生育したものから順にフローサイトメーターによる DNA 含量から二倍体の個体を選抜し、細胞学的観察で確認を行った。その結果、No.1、No.22、No.56 の三系統の染色体数は、 $2n=24$ であり、二倍体の染色体数と同一であった。トルイジンブルーによる花粉の稔性

調査でも、それぞれ 87.5%、81.1%および 97.5%の値を示し、今後の交配親として有効である可能性が示唆された。

三倍体植物から得られた植物の育種的利用の試み

後代に花色変異個体が見出されたので、その形質を調査した。草型は親株である MS 系統が直立するのに対し、花色変異個体は 2 個体ともにやや匍匐した。匍匐型は三倍体センノウの自殖後代に多く見られている。また、花は三倍体センノウより小さく、花粉稔性は MS 系統が 67.7%であったのに対し、No. 89 および No. 91 はそれぞれ 39.3%および 34.4%と低率であった。染色体数は No.89 は $2n=35$ であったが、No.91 は染色体観察に適した根が得られなかった。園芸植物標準色票による系統色は三倍体センノウが「鮮橙赤」で花色変異個体は「鮮赤橙」であり、マンセル値はそれぞれ 7.5R 5/14 と 10R 5/14 であった。HPLC による分析の結果、鮮橙赤色の MS 系統は、シアニジン 3-ラムノシルグルコシド (Cy3Rut) とペラルゴニジン 3-ラムノシルグルコシド (Pg3Rut) のピークの割合が 84%と 16%であるのに対し、鮮赤橙色の No. 89 では 17%と 83%とその比率が逆転した。このことから、「鮮橙赤」から「鮮赤橙」へと変化したのは主要なアントシアニンがシアニジンタイプからペラルゴニジンタイプへと変化したことが原因であることが示唆された。

<引用文献>

Amano J, Kato J, Nakano M, Mii M (2006) Production of inter-section hybrids between *Primula filchnerae* and *P. sinensis* through ovule culture. *Scientia Horticulturae* 110: 223-227

Isagi Y, Honjyo M, Washitani I (2001) Development of microsatellite marker for *Primula sieboldii* using degenerate oligonucleotide-primed PCR-amplified DNA. *Mol. Ecol. Notes* 1:22-24

Kato J and Mii M (2000) Differences in ploidy levels of inter-specific hybrids obtained by reciprocal crosses between *Primula sieboldii* and *P. kisoana*. *Theor Appl Genet* 101:690-696

Kato J, Ishikawa R, Mii M (2001) Different genomic combinations in inter-section hybrids obtained from the crosses between *Primula sieboldii* (Section *Cortusoides*) and *P. obconica* (Section *Obconicolisteri*) by the embryo rescue technique. *Theor Appl Genet* 102:1129-1135

Nimura M, Kato J, Mii M, Ohishi K (2007)

Cross-compatibility and the polyploidy of progenies in reciprocal backcrosses between diploid carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and its amphidiploid with *Dianthus japonicus* Thunb. *Scientia Horticulturae* 115 183-189

Ueno S, Kitamoto N, Ohsawa R, Tsumura Y, Washitani I (2006) Nine additional microsatellite markers for *Primula sieboldii* E. Morren. *Conserv. Genet* 4: 809-811

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

神戸敏成・安本元樹・佐々木伸大・小関良宏・富田裕明・中田政司 三倍体センノウ (*Lychnis senno* Siebold et Zucc.) の自殖後代に現れた花色変異個体の特性 園芸学会平成 27 年度春季大会(2015 年 3 月 28-29 日千葉大学 千葉県)

Toshinari Godo, Juntaro Kato, Masashi Nakata, Hiroaki Tomita, Yoichiro Hoshino Self - Pollination of triploid *Lychnis senno* Produces diploid plants: Fertile Monoploid Gamete Development in a triploid Plant.

The 29th International Horticultural Congress (2014 年 8 月 17-22 日 Brisbane Australia)

Juntaro Kato, Reika Sato, Toshinari Godo, Masahiro Mii Occurrence of Spontaneous triploid Produced From Diploid in Cultivated *Lycoris radiata*.

The 29th International Horticultural Congress (2014 年 8 月 17-22 日 Brisbane Australia)

松本彩、加藤淳太郎 *Primula* 31 の倍加戻し交配で獲得された後代の倍数性の違い。園芸学会平成 26 年度春季大会(2014 年 3 月 29-30 日 筑波大学 茨城県)

小林加奈、村田強、加藤淳太郎 サクラソウとカッコソウの種間交配で出現した異数性 3 倍体雑種の特徴 園芸学会平成 26 年度春季大会(2014 年 3 月 29-30 日 筑波大学 茨城県)

J Kato, Y Konda, S. Ichihashi Characterization of polyploid plants with unexpected DNA content, obtained from unreduced gamete production cultivars in

Cymbidium.

The 2nd International Orchid Symposium
(IOS2014)(2014年 2月19-21日 Bangkok
タイ)

J KATO, Y EHARA, H SHIOTA, Y
FUTAGAMI, T ISHIDA, M MII, T
YUKAWA, S ICIHASHI Differences on
rates of hybridity among cross
combinations in intergeneric crosses
between *Zygopetalum* or *Zygonisa* and
Cymbidium.

11th Asia Pacific Orchid Conference in
Okinawa. (2013年 2月2-4日 沖縄県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 淳太郎 (KATO, Juntaro)
愛知教育大学・教育学部・准教授
研究者番号：80303684

(2) 研究分担者

神戸 敏成 (GODO, Toshinari)
公益財団法人花と緑の銀行・中央植物園
部・企画情報課長
研究者番号：00393108

(3) 連携研究者

中田 政司 (NAKATA, Masashi)
公益財団法人花と緑の銀行・中央植物園
部・園長
研究者番号：40150859