

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580037

研究課題名(和文) 花き園芸植物における形質転換体を育種親に用いた新品種育成システムの構築

研究課題名(英文) Development of a new cultivar production system using transgenic plants in ornamental plants

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ホトトギス属植物において、既存の形質転換体の形質調査を行い、CHS遺伝子発現が抑制されて花色が白花になった系統およびGA2ox遺伝子の過剰発現により矮性を示す系統を育種親として選抜した。これらと他種とを交雑し胚救出を行ったところ、矮性形質転換体を親に用いた場合に数系統の雑種が得られた。雑種の一部は矮性を示し、かつ、花色等は両親とは明らかに異なっていたことから、形質転換体を親に用いた種間交雑育種の可能性が示された。一方、形質転換体から再分化能力を持ったカルスを誘導し、ソマクローナル変異誘導および染色体倍加を検討しており、現在、カルスから再生した個体の形質調査を行っている。

研究成果の概要(英文)：White-flowered transgenic plants resulted from RNAi suppression of the CHS gene and dwarf transgenic plants resulted from overexpression of the GA2ox gene were selected as breeding materials through characterization of various transgenic plants of *Tricyrtis* spp. Interspecific hybrids were produced via ovule culture when dwarf transgenic plants were used as parents. Some of these hybrids showed not only dwarf phenotypes due to the transgene but also novel flower characteristics compared with the parents, indicating the possibility of interspecific hybridization using transgenic plants in the improvement programs of ornamental plants. On the other hand, induction of somaclonal variants and chromosome doubling were also examined by using embryogenic callus cultures of transgenic plants. Detailed characterization of callus culture-derived plants are now in progress.

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：花き園芸植物 ホトトギス類 形質転換体 遠縁種間雑種 胚救出 ソマクローナル変異 染色体倍加

1. 研究開始当初の背景

現在、形質転換による食用作物の育種は、健康等への不安から、我が国では一般市民には必ずしも受け入れられていない状況にある。しかしながら、花き園芸植物においては、その目的が観賞であることから、形質転換により育成された品種が比較的消費者に受け入れられやすい。実際に、我が国では、形質転換により作出されたカーネーションおよびバラ品種の切り花がすでに市販されている。

形質転換による育種を行う場合には、通常は既存の品種・系統に新規形質のみを導入するため、作出された形質転換体そのものを新品種とすることが一般的である。しかしながら、有用な外来遺伝子(形質)が導入された形質転換体は、育種親としても有用であると考えられる。花き園芸植物の育種では、花色や花形、草姿などの観賞形質における新奇性が重要であることから、外来遺伝子(形質)以外の観賞形質を何らかの方法で変化させることにより、さらなる新品種の育成を期待することができる。

花き園芸植物においては、胚救出による遠縁種間交雑やソマクローナル変異の誘導・選抜等の手法により、すでにさまざまな品種が育成されているが、これらの生物工学的手法による育種は実験室内で行うことが多いため、形質転換体を育種親に用いた新品種の育成には好都合である。例えば、形質転換体を用いた遠縁種間交雑により、外来遺伝子(形質)をもち、それ以外の点については両親とは明らかに異なる形質を示す新品種が育成できる可能性がある。また、形質転換が困難な種への外来遺伝子(形質)の導入の手段としても、形質転換体を用いた遠縁種間交雑は有効であると考えられる。さらに、遠縁種間交雑における外来遺伝子(形質)の機能解析等から、新たな知見が得られることも期待される。一方、形質転換体におけるソマクローナル変異の誘導・選抜を行うことにより、外来遺伝子(形質)をもちつつも、それ以外の観賞形質が個々に変化した品種群(シリーズ)を育成できる可能性がある。また、外来遺伝子(形質)の発現の程度が変化した変異個体が得られる可能性もある。

なお、現在、形質転換により育成された品種においては、外来遺伝子をもった花粉の飛散による環境への影響が懸念されている。一般的に、遠縁種間交雑は不稔であることが多く、また、ソマクローナル変異により、雄性不稔の個体がしばしば得られることが知られている。したがって、花粉が飛散しない雄性不稔の形質転換品種の育成といった観点からも、形質転換体を用いた遠縁種間交雑およびソマクローナル変異の誘導・選抜は有効であると考えられる。

我々は、これまで、主にユリ科花き園芸植物であるホトトギス類やユリ類を材料に用いて、ソマクローナル・イオンビーム変異の

誘導・選抜、胚救出による遠縁種間交雑、および形質転換による新品種育成を検討してきた。それらの検討を通して、ユリ科花き園芸植物では、胚救出による遠縁種間交雑種作出や有用ソマクローナル変異個体の選抜、有用遺伝子が導入された形質転換体の作出がある程度可能であることが明らかにした。

現在までのところ、有用遺伝子が導入された形質転換体を育種親に用い、遠縁種間交雑やソマクローナル変異の誘導・選抜等の手法により新品種を育成する試みはほとんどなされていない。ユリ科花き園芸植物において、このような新しい育種システムを構築することができれば、形質転換体そのものを新品種として利用するばかりでなく、それをもとにさまざまな新品種が育成できることになり、ひとつの形質転換体の利用価値が大きく広がると期待される。

2. 研究の目的

ホトトギス類やユリ類においては、すでに一部の組み合わせにおいて遠縁種間交雑が得られており、また、ソマクローナル変異個体および有用遺伝子が導入された形質転換体も得られている。本研究は、これら過去の成果を組み合わせ、(1) 形質転換体を用いた遠縁種間交雑やソマクローナル変異の誘導・選抜等の手法による花き園芸植物の新たな育種システムの構築、(2) 遠縁種間交雑による外来遺伝子(形質)の他種への導入、および(3) 遠縁種間交雑やソマクローナル変異の誘導・選抜等の手法による形質転換体の不稔化、を目的として行った。

3. 研究の方法

(1) 形質転換体の調査

これまでに作出されている形質転換体について詳細な形質調査を行い、育種親に用いる形質転換体を選抜した。

(2) 種間交雑作出の効率化

主にホトトギス類の非形質転換体を用い、効率的な種間交雑作出のための胚救出条件を検討した。

(3) 胚救出由来個体の雑種性の確認

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

(4) 形質転換体を用いた遠縁種間交雑の作出

上記(1)~(3)と平行して、形質転換体を親に用いた種間交雑を行い、胚救出による雑種作出を試みた。なお、(1)~(3)の結果を随時反映させた。

(5) 形質転換体における植物体再生可能な培養物の誘導

ソマクローナル変異の誘導のために、すでに報告されている方法を用いて、形質転換体から再分化能力をもったカルスを誘導した。

(6) 形質転換体における植物体再生可能な培

養物からの植物体再生

ソマクローナル変異の誘導・選抜のために、すでに報告されている方法を用いて、カルス培養物から植物体を再生させた。

(7) 形質転換体における植物体再生可能な培養物の突然変異処理および植物体再生

染色体倍加個体を効率的に誘導するために、カルスを紡錘糸形成阻害剤で処理し、植物体を再生させた。

4. 研究成果

(1) 形質転換体の調査

ホトトギス、ユリおよびアガパンサスについて、フラボノイド生合成に関する遺伝子(花色の変化)、花器官決定に関するMADS-box 遺伝子(花形・開花期の変化)、ジベレリン生合成・代謝経路関連遺伝子(草型・開花期の変化)、除草剤耐性遺伝子等がそれぞれ導入された形質転換体について、(a) 導入した外来遺伝子により望ましい形質が十分に発現している、(b) 外来遺伝子による形質変化以外は変異がみられない、(c) 稔性があり生育が旺盛である、の3点について特に注目して形質調査を行った。その結果、RNAi 法によりフラボノイド生合成経路のカルコン合成酵素(CHS)の遺伝子発現が抑制され花色が白花になったホトトギス‘東雲’形質転換体、およびジベレリン(GA)代謝に関するGA 2-酸化酵素(GA2ox)遺伝子を過剰発現し矮性を示すホトトギス‘東雲’形質転換体を、本研究の育種親として選抜した。

(2) 種間雑種作出の効率化

ホトトギス属の非形質転換体において、様々な種間の組み合わせで正逆交雑を行い、胚救出を行う際の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)、培地組成(無機塩類の濃度、浸透圧、植物成長調節物質)について検討した。その結果、胚救出を開始する時期としては受粉後2~3週間後が、また、外植体の種類については胎座付き胚珠が適していることが明らかとなった。一方、培地組成については、明確な結果が得られなかった。なお、この実験から、様々な組み合わせのホトトギス種間雑種が得られており、現在、それらの形質調査を行っている。

(3) 胚救出由来個体の雑種性の確認

上記(2)で得られた胚救出由来個体を用いて実験を行ったところ、FCM分析およびRAPD分析により、ホトトギス属における種間雑種の早期確認が可能であることが明らかとなった。

(4) 形質転換体を用いた遠縁種間雑種の作出

上記(1)で選抜されたホトトギス形質転換体を片親に用い、上記(2)で確立された胚救出法により種間雑種の作出を試みた。その結果、GA2ox遺伝子を過剰発現し矮性を示す形質転換体を用いた場合に、タイワンホトトギスや、ヤマジノホトトギス、キイジョウロウホトトギスとの間で胚救出由来個体が得

られ、FCM分析およびRAPD分析により、それらが雑種であることが示された。また、外来遺伝子(ハイグロマイシン耐性遺伝子)特異的プライマーを用いたPCR分析により、およそ半分の雑種に外来遺伝子が遺伝していることが明らかとなった。

一部の雑種はすでに開花しており、それらについて簡単な形質調査を行ったところ、外来遺伝子をもつ雑種は矮性を示した。また、花色や花形に関しては、両親とは明らかに異なる形質を示した(図1)。この結果は、形質転換体を親に用いた種間交雑育種の可能性を示すものである。今後は、稔性調査を含めた詳細な形質調査を行う予定である。

なお、CHS遺伝子発現が抑制され花色が白花になった形質転換体を親に用いた場合には、これまでのところ種間雑種は得られていない。この理由としては、フラボノイド系色素の減少により、稔性が低下したためであると考えている。今後は、新たな育種親の選抜が必要である。



図1 矮性形質転換体を片親に用いて得られた矮性雑種の花

(5) 形質転換体における植物体再生可能な培養物の誘導

CHSの遺伝子発現が抑制され花色が白花になった形質転換体およびGA2ox遺伝子を過剰発現し矮性を示す形質転換体のいずれにおいても、花被からエンブリオジェニックカルスが誘導された。エンブリオジェニックカルスの誘導効率に関しては、非形質転換体と比較して大きな差異はみられなかった。

(6) 形質転換体における植物体再生可能な培養物からの植物体再生

上記(5)のエンブリオジェニックカルスからは、高頻度で植物体が再生した。それらの個体については、現在までのところ顕著なソマクローナル変異は見いだされていない。今後、稔性調査を含めた詳細な形質調査を行

う予定である。

(7) 形質転換体における植物体再生可能な培養物の突然変異処理および植物体再生

上記 (5) のエンブリオジェニックカルスを様々な種類・濃度の紡錘糸形成阻害剤で処理したところ、5~10 mg/L のアミプロホスメチル処理により比較的高頻度で染色体倍加個体が得られることが明らかとなった。今後は、倍加個体の開花をまって、形質調査を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Masahiro Otani, Shuhei Meguro, Haruka Gondaira, Megumi Hayashi, Misaki Saito, Dong-Sheng Han, Masaru Nakano, Overexpression of the gibberellin 20-oxidase or gibberellin 3-oxidase gene from *Torenia fournieri* affects plant morphology in transgenic *Tricyrtis* sp., *Acta Horticulturae*, 査読有, 1025 巻, 2014, 23-30

Haruka Tasaki, Hiroki Takagi, Hanae Otsubo, Chika Hatakeyama, Yusaku Saito, Eriko Oka, Junji Amano, Dong-Sheng Han, Masaru Nakano, Interspecific hybridization between *Tricyrtis flava* and *T. formosana* via ovule culture, *Acta Horticulturae*, 査読有, 1025 巻, 2014, 43-50

Masahiro Otani, Shuhei Meguro, Haruka Gondaira, Megumi Hayashi, Misaki Saito, Dong-Sheng Han, Phithak Inthima, Kanyaratt Supaibulwatana, Shiro Mori, Yusuke Jikumaru, Yuji Kamiya, Tuoping Li, Tomoya Niki, Takaaki Nishijima, Masaji Koshioka, Masaru Nakano, Overexpression of the gibberellin 2-oxidase gene from *Torenia fournieri* induces dwarf phenotypes in the liliaceous monocotyledon *Tricyrtis* sp., *Journal of Plant Physiology*, 査読有, 170 巻, 2013, 1416-1423, DOI: 10.1016/j.jplph.2013.05.002

Yukiko Kamiishi, Masahiro Otani, Hiroki Takagi, Dong-Sheng Han, Shiro Mori, Fumi Tatsuzawa, Hiroaki Okuhara, Hitoshi Kobayashi, Masaru Nakano, Flower color alteration in the liliaceous ornamental *Tricyrtis* sp. by RNA interference-mediated suppression of the chalcone synthase gene, *Molecular Breeding*, 査読有, 30 巻, 2012, 671-680

[学会発表](計5件)

Masaru Nakano, Mitsuyo Ishibe, Masahiro Otani, Shuhei Meguro, Haruka Gondaira, Megumi Hayashi, Misaki Saito, Dong-Sheng Han, Shiro Mori, Tomoya Niki, Takaaki Nishijima, Masaji Koshioka,

Horticultural characterization of a tetraploid transgenic plant of *Tricyrtis* sp. overexpressing the gibberellin 2-oxidase gene from *Torenia fournieri*. 8th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, 2013年7月5日, コインブラ, ポルトガル

石部万葉, 田崎晴香, 高木宏樹, 韓 東生, 神戸敏成, 中野 優, 胚珠培養によるキバナノホトトギスとタイワンホトトギス間の種間雑種の作出, 園芸学会北陸支部大会, 2012年12月4日, 朱鷺メッセ, 新潟市 Masahiro Otani, Shuhei Meguro, Haruka Gondaira, Megumi Hayashi, Misaki Saito, Shiro Mori, Dong-Sheng Han, Tuoping Li, Tomoya Niki, Takaaki Nishijima, Masaji Koshioka, Masaru Nakano, Overexpression of the gibberellin 20-oxidase or gibberellin 3-oxidase gene from *Torenia fournieri* affects plant morphology in transgenic *Tricyrtis* sp., ISHS Symposia at Royal Flora 2011, 2012年1月10日, チェンマイ, タイ王国

Haruka Tasaki, Hiroki Takagi, Hanae Otsubo, Chika Hatakeyama, Yusaku Saito, Eriko Oka, Junji Amano, Yusuke Watanabe, Dong-Sheng Han, Toshinari Godo, Masaru Nakano, Interspecific hybridization between *Tricyrtis flava* and *T. formosana* via ovule culture, ISHS Symposia at Royal Flora 2011, 2012年1月10日, チェンマイ, タイ王国

Nao Okuzumi, Masahiro Otani, Hanae Otsubo, Shuhei Meguro, Yoshihiro Hara, Hiroto Umehara, Mika Igarashi, Dong-Sheng Han, Yoichiro Hoshino, Akira Kanno, Masaru Nakano, Characterization of transgenic *Agapanthus praecox* spp. *orientalis* plants ectopically expressing the class B MADS-box genes, ISHS Symposia at Royal Flora 2011, 2012年1月10日, チェンマイ, タイ王国

[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