

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450036

研究課題名(和文)種・異倍数性間での交雑成否の一側性と誘因される単為発生の解明および園芸的利用

研究課題名(英文) Understanding and horticultural utilization of unilateral cross-compatibility in the cross between species/different ploidy and being induced parthenogenesis

研究代表者

本多 和茂 (Honda, Kazushige)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：30279442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：授粉～受精に至る過程の調査結果より、受精に要する時間がその後の結実や種子充実度に影響を与える場合とそうでない場合とがあり、その違いは用いる両親の倍数性が関与していると判断された。また得られた種子の充実度が高い場合でも発芽が良好な場合とほとんど発芽がみられない場合とがあること、また本属における複相的単為発生現象については、受精に要する時間がその発生のキーとなっている可能性が示唆された。

交雑和合性が低く、通常の交雑では雑種得ることが不可能であった組合せで、新たな胚珠培養方法を試み、長期にわたり発芽がみられない胚珠の発芽促進に効果的な手法を確立し、新たな雑種を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The time requiring from pollination to fertilization affected seed set and its quality in some cases. It was suggested that the differences depended on the polyploidy of parents. It was confirmed that seed quality was not always associated with its germination ability. Possibility had been suggested that the time requiring to fertilization caused diploid parthenogenesis.

Attempting improved methods of ovule culture in the cross obtaining hybrids was impossible, germination was promoted and then hybrids were successfully obtained.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：種間交雑 胚珠・胚培養 デルフィニウム 一側性 単為発生 倍数性 培地組成 花卉園芸的利用

1. 研究開始当初の背景

種間あるいは異なる倍数性間での交雑においては、用いる両親の組み合わせにより、雑種が得られる場合と得られない場合があることは良く知られている。雑種が得られない組み合わせにおいては、雑種胚を含む胚珠や種子を培養することにより雑種を得ることが可能となる場合がある。

申請者はこれまでに、花卉園芸品目の一つであるデルフィニウム (*Delphinium* L.) 属を材料とし、交雑由来の胚珠や種子の培養による新たな雑種育成手法の確立に取り組み、成果をあげてきた (Honda & Tsutsui 1997 *Eupytica*; Honda et al. 2003 *Eupytica*; 本多・小関 2007 園学研別; 本多他 2009 園学研別)。

これまで、様々な組み合わせで交雑を試みてきたわけだが、この過程で、以下のことが明らかとなってきた。

(1)種間あるいは異なる倍数性間での交雑において、交雑の成否には用いる両親の組み合わせのみではなく、どちらを種子親としどちらを花粉親とするか、すなわち交雑方向による影響が大きく、一側性交雑和合 (不和合) 性が存在する場合がある。

(2)得られた後代の中には、

- 雑種性が確認されない、種子親に酷似した形質を有する個体
- 異なる倍数性間での交雑にもかかわらず、種子親と同じ倍数性の個体

が含まれる場合がある (本多・小関 2007 園学研別; 本多他 2011 園学研別)。さらに、これらの後代の中には、花型が種子親と異なるなど、遺伝的な性質を異にすると考えられる個体が混在する場合がある。

本研究で対象とするデルフィニウム属は、これまで品種改良に係る交雑に用いられることがなかった多くの野生種遺伝資源を内在している。一方、これまでの品種改良により、4 倍体、6 倍体といった倍数性既存園芸品種が存在する。

今後の育種可能性を拡げる上で、交雑障壁に関わる(1)の解明への取り組みは重要と考える。また、(2)については本属の種間・系統間交雑における複相 (二倍体) 的単為発生すなわちクローン繁殖の可能性を示唆する。これは、植物の生殖様式における進化・適応を理解する上で興味深く、園芸的利用面においては、優良形質やヘテロシスの固定を可能にし、育種年限の短縮およびハイブリッド品種の育成と増殖の効率化につながると期待される。さらに、これによって得られる個体は、

完全ホモ個体 (ダブルハプロイド: DH) であることが予測され、育種のみならず遺伝解析への利用が期待される。

2. 研究の目的

2012 年度の段階までの交雑によって得られていた知見の一部を表 1 に示す。このように、用いる両親の組み合わせあるいは交雑方向により、多様な結果を示し、ここに何か一定の傾向や法則性を見出すことは難しいように感じる。一方で、胚珠・種子を培養することが雑種形成を促し、さらに、時として種子親由来の単為発生を促しているようにもとれる。

そこで本研究では、本属における交雑成否およびそこにみられる一側性について、これまでに得られた知見も踏まえ、その傾向を包

表 1. 交雑成否と胚珠・種子の培養必要性および単為発生可能性

組み合わせ				雑種獲得	胚珠・種子の培養の必要性	種子親由来の単為発生可能性
♀		♂				
2倍体	Species A	2倍体	Species B	○	無し	?
2倍体	Species B	2倍体	Species A	○	無し	?
2倍体	Species A	2倍体	Species C	○	有り	?
2倍体	Species C	2倍体	Species A	×	—	—
2倍体	Species A	4倍体	Species D	×	有り	有り
4倍体	Species D	2倍体	Species A	○	有り	?
2倍体	Species A	4倍体	Species E	×	—	—
4倍体	Species E	2倍体	Species A	○	有り	有り

括的に明らかにする。さらに、交雑によって誘因される単為発生現象の実態を解明するため以下の調査を行う。

- (1) 交雑成否やその一側性を左右する初期要因として、受粉～受精そして種子形成に至る過程が大きく異なっていることが予想される。そこで、これらの組み合わせ間での種子形成に至るまでの過程を調査し、交雑成否への関与を明らかにする。
- (2) 交雑後得られた種子については、その形質や内部の胚および胚乳の発達状況を調査し、交配組み合わせ間あるいは種子親との比較によりその異同を明らかにし、(1)の要因が及ぼす影響を探る。さらに発芽試験を行い、発芽が認められない場合には胚珠あるいは種子の培養により後代の育成を試みる。
- (3) 後代が得られた場合、その雑種性を確認すると同時に新奇性や園芸的有用性を評価する。一方、雑種性が認められない個体については、倍数性および種子親との相違点や特性から、単為発生由来であることの確認を行う。さらに、花卉としての品質を評価し、園芸的利用可能性を検討する。

3. 研究の方法

キンボウゲ科デルフィニウム属の種間および異なる倍数性間で生じる交雑成否の一側性と誘因される単為発生現象を解明し、園芸的利用可能性を明らかにする目的で、以下の実験を計画する。

(1) 交雑成否と一側性および単為発生を左右する要因の解明

授粉～受精に至る過程

交雑においてその成否を左右する要因の一つとして、初期の段階すなわち、授粉～受精および種子形成に至る過程の相違が考えられる。授粉された花粉がどの程度またどのくらいの時間で発芽し、さらに花粉管を伸長させてその後受精に至るのか？雌ずいが成熟した後、子房内の胚珠に含まれる卵細胞が本来の受精能力を保持している期間は種や倍数性により異なることが予測される。その受精能力保持期間内に授粉された花粉からの花粉管が到達し、受精が行われることで本来の受精が行われると考えられる (Shivanna 2003 Pollen Biology and Biotech.)。申請者は授粉花粉の発芽～受精に至る過程の予備的調査において、授粉～受精に要する時間やその頻度 (受精率) が、交雑組み合わせあるいは同じ組み合わせでも正逆間で大きく異なる場合があることを確認している。このことから、交雑成否あるいはその一側性、さらには交雑が引き金となって引き起こされると考えられる雌性側の複相的 (二倍体的) 単為発生には上述の授粉～受精に至る過程が関与している可能性が示唆される。本研究ではまず、授粉花粉の発芽、花粉管伸長を定性的に調査することで、以降につながる成果を得る。

形成される種子の特性と発達程度

種子の特性は得られた種子の充実度すなわちその後の発芽や生存能力をはかる指標となりうる。種子の充実度は内部の胚と胚乳の発達程度に左右され、特に交雑由来の種子においてはその発達程度が、交雑組み合わせあるいは交雑方向で大きく異なることが予測され、このことが交雑の成否に関わっている可能性があるものと考えられる。そこで、得られた種子の大きさや100粒重といった充実度を示すと考えられる項目について調査を行う。同時に種子の切片を作成することにより内部の胚と胚乳の発達程度を詳細に調査する。種間あるいは異なる倍数性間でみられる一側性不和合性や雌性側の単為発生の要因については、胚乳におけるゲノムインプリンティングの関与が指摘されている (Heig

& Westoby 1991 Phil. Trans. R. Soc. Lond. B ; Kinoshita 2007 Genes Genet. Syst.)

本研究では、様々な種、倍数性間での組み合わせで交雑を試みることを計画しており、それぞれの組み合わせで交雑和合の有無や程度ばかりではなく、の調査結果を結びつけることは、デルフィニウム属における雑種形成機構の実態を明らかにすることにつながる。さらに、胚と胚乳の発達過程にみられる関係を明らかにすることは今後、本属におけるゲノムインプリンティングの関与を明らかにしてゆくための基礎的知見となりうる。

(2) 後代獲得のための胚珠あるいは種子の培養

得られた種子については発芽試験を行い、発芽後の個体育成を行うと同時に、より多くの後代を得るため、胚珠あるいは種子の培養による個体育成についても併せて行う。

(3) 得られた後代の雑種性および単為発生の確認と園芸的利用評価

雑種性の確認と雑種性が確認された個体の評価

これまでに得ている個体および本申請期間中に得られた個体について、倍数性や形質さらには遺伝的マーカーを用いた雑種判定を行う。倍数性については、体細胞の染色体数の確認とフローサイトメーターによる評価を行う。また、申請者は2007年度に核DNAのITS領域のPCR増幅産物を、制限酵素処理することにより一部の種間で雑種判定に有効な多型が得られることを確認している。さらに、新奇性のみならず、生産性や観賞価値の面からの有用性の評価を行う。本評価に際しては、生産現場に近くまた品種評価について実績や経験を有する青森県産業技術センター農林総合研究所花き部の協力も得て行う。得られた雑種そのものを厳密に評価することはいうまでもないが、今後の育種の素材としての価値の評価も併せて行う。

雌性側単為発生由来と判断された個体の評価

により雑種性が認められなかった個体について、その形質や生態的特性を種子親と比較する。得られた個体が交雑により誘引された雌性側単為発生由来である場合、その倍数性は種子親の半数 (n) である場合と複相化した二倍体 ($2n$) である場合とが想定される。申請者らのこれまでの交雑では後者のみ得られており、この場合は遺伝的に劣性な形質もホモ化している可能性が高い。またこの個体が稔性を有する場合、さらに自殖後代

を得ることで直ちに形質を固定できることが期待される。本研究ではこれまでに行ってきた交配組み合わせに加えて新たな組み合わせでも行い、より多くの個体を得ることで、本属における複相的単為発生現象の解明を確固とし、その園芸的利用可能性を見出す。

4. 研究成果

本課題初年度である平成 25 年度は、(1)交雑成否の一側性および単為発生を左右する要因の解明および平成 26 年度にかけては、(2)後代獲得のための胚珠あるいは種子の培養に取り組んだ。交雑においてはその成否を左右する要因の一つとして、初期段階すなわち授粉～受精および種子形成に至る過程の相違が考えられる。この交雑の成否に関わり、また一側性および単為発生を左右する要因を明らかにするため、種間交雑および倍数性の異なる種・系統間での交雑を行い、受精・結果および結実の調査を行った。

授粉～受精に至る過程の調査結果より、用いる両親の正逆により花粉管の伸長および受精までに要する時間に違いが認められた。種子形成すなわち結実の段階では、受精までに時間を要した組合せでも良好な結実がみられる場合もあった。種子の充実度を調査した結果、交雑に用いる両親の正逆で、結果・結実率に大きな違いが見られる組合せにおいても、胚や胚乳の形成は見かけ上正常に行われている場合とその充実度に正逆で大きな違いが認められる場合があり、これは用いる両親が同次倍数性が異倍数性かで異なることが示唆された。得られた種子の発芽試験を行った結果、正逆組合せによる一側性はより明確になり、良好な発芽が確認され多くの個体が得られる組合せの逆交雑で発芽がほとんどみられない組合せも存在した。

これらの調査より、受精に要する時間がその後の結実や種子充実度に影響を与える場合とそうでない場合とがあり、その違いは用いる両親の倍数性が関与している可能性があるものと判断された。また得られた種子の充実度が高い場合でも発芽が良好な場合とほとんど発芽がみられない場合とがあり、後者の要因には、ゲノムインプリンティングの関与が示唆される。得られた結果をさらに検証し一般化、さらには種間交雑の成否の普遍的な判断材料とするためさらに多くのケース、組合せで検討を行うことが今後の課題である。一方、本課題の大きな目的でもあった本属における複相的単為発生現象の解明については、上記の観察・調査により、受精に

要する時間がその発生のキーとなっている可能性があるところまで突き止めることが出来たが、現在、新たな組合せでの個体を育成中でその確認と評価は今後の課題となる。

本属の種間交雑においては、組み合わせにより交雑不和合性が生じるため、胚珠培養による雑種育成が試みられてきた (Honda & Tsutsui 1997 ; Honda et al. 2003)。しかし、胚珠培養を行っても、組み合わせによっては発芽率が低いあるいは発芽後の成長が異常となるなどの問題があった。そこで本課題では平行して種間雑種育成効率の向上を目的とした胚培養方法の改良に取り組んだ。用いる培地について、従来用いられてきた MS (1/4) 培地に加え、新たに Monnier (1976) の培地を用い、さらに培養手法、培養中の胚珠の種皮と胚乳を切り開くことにより胚の一部を露出させる簡易的な胚培養による改良を試みた。

交雑不和合性が低く、通常の交雑では雑種得ることが不可能であった組合せで胚珠培養を試みたところ、1/4MS 培地で 3.7%、Monnier の培地では 17.2% の発芽がみられ、Monnier の培地で発芽率の向上効果を確認した。さらに、胚の一部を露出させる簡易的な胚培養を試みた結果 1/4MS 培地で 52.9%、Monnier の培地では 58.8% の発芽がみられ、発芽率の向上を確認し、長期にわたり発芽がみられない胚珠の発芽促進に効果的な手法の確立となった。その後、胚珠培養により発芽した個体は 1/4MS 培地では異常成長や成長停止が多く、順化に至る個体は得られなかった。Monnier の培地においては、1 個体が順化に至った。胚の一部を露出させる簡易的な胚培養を行った結果、1/4 MS 培地では通常の胚珠培養と同様に異常成長や成長停止により最終的に順化に至った個体はなかった。これに対し、Monnier の培地において発芽した個体は、異常成長や成長停止の頻度が低く、多くの個体で培養中に正常な子葉および本葉の展開がみられ、十分な発根も認められた。現在までに発芽した個体の 40% に相当する 4 個体が順化に至っている。このことから、Monnier の培地は発芽後の個体の正常な成長にも効果的であり、その効果は胚珠培養中に種皮と胚乳を切り開き、胚の一部を露出させることで高められることが明らかになった。

得られた個体の一部は開花に至り、葉の形態や花色などの形質から、明らかに雑種と判断され、その特性の把握、評価を進めている。今後は、より交雑不和合性が低い逆交雑組み合わせあるいは他の種間組み合わせにおいて

もその適用性と効果を検討してゆきたい。本結果の一部は園芸学会平成 27 年秋季大会において公表した。

参考文献

- Honda K, Tsutsui K (1997)
Production of interspecific hybrids in the genus *Delphinium* via ovule culture. *Euphytica* 96: 331-337
- Honda K, Watanabe H, Tsutsui K (2003)
Use of ovule culture to cross between *Delphinium* species of different ploidy. *Euphytica* 129:275-279
- Monnier M. (1976)
Culture in vitro de l'embryon immature de *Capsella bursa-pastoris* Moench (1) . *Rev. Cytol. Biol. Veg.* 39:1-120
- Monnier M. (1995)
Culture of zygotic embryos: In vitro embryogenesis in plants. Trevor A. Thorpe ed. Kluwer Academic Publishers

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

本多和茂・菊池桃加*・前田智雄 (弘前大農学生命科学部, *現所属: 種苗管理センター)
デルフィニウム属における種間雑種育成のための胚珠培養方法の改良
園芸学会平成 27 年度秋季大会: 平成 27 年 9 月 28 日 (徳島大学)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

本多 和茂 (Honda Kazushige)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号: 3 0 2 7 9 4 4 2