

氏名	高村 祐太郎
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第764号
学位授与年月日	令和2年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	リンドウの多様性拡大に関する育種学的研究（Breeding studies on expansion of diversity in gentian）
学位審査委員	主査 岩手大学客員教員 高畑 義人 副査 畠山 勝徳(岩手 准教授), 赤田 辰治(弘前 准教授), 笹沼 恒男(山形 准教授)

## 論文の内容の要旨

リンドウは日本における重要な花き品目であり、盆や彼岸の切り花、敬老の日の鉢物等として利用されている。リンドウの育種では、多くの品種が *Gentiana scabra*、*G. triflora* およびそれらの雑種で育成された二倍体であるため、品種のバリエーションが乏しく、また、多年生で自殖弱勢が強いため F<sub>1</sub> 品種の親系統の作成には時間がかかり、増殖・維持が困難である。本研究は、現在までリンドウ育種にほとんど利用されてこなかった野生種を用い、倍加半数体作出法である未受精胚珠培養、種間交雑を行なうとともに、効率的な染色体倍加法の確立を試みた。加えて、未受精胚珠培養の効率化と胚様体発生機構の解明を試みた。

### 第一章 未受精胚珠培養による倍加半数体作出

野生種リンドウ 5 節 13 種 25 系統を未受精胚珠培養に供試し、2 節 9 種 17 系統で再生植物体を獲得した。特に、栽培種と近縁な *Pneumonanthe* 節、*Cruciata* 節の野生種には未受精胚珠培養が適用可能であることを示した。また、培養条件について、蕾の発達ステージを検討し葯が裂開する前よりも裂開した後の方で培養効率が高いことを明らかにした。胚様体誘導培地では、胚様体発生に重要なショ糖濃度の検討を行ない、7%よりも 10-13%で胚様体発生数が約 1.7-4.8 倍増加する傾向がある一方、高濃度のショ糖は植物体再生率を 12.7-37.5%低下させることが明らかとなり、ショ糖 10%が汎用的かつ効率的であることが示唆された。植物体再生培地の検討では、高濃度の寒天による水分ストレスと硝酸銀によるエチレン作用阻害の効果を調査した。系統により反応が異なったが、寒天 1.6%の培地(通常は 0.8%)の使用、または 10mg/l 硝酸銀を添加した培地で 14 日間処理することで、植物体の再生率を 5.9-20.0%向上できることを明らかにした。胚様体発生機構の解析では、遺伝様式を明らかにするために、培養効率が異なる *G. triflora* 4 系統を用いて胚様体発生能に関する片側ダイアレル分析を行なった。胚様体発生能には相加効果、優性効果の両方が関与すること、胚様体発生能が低い方が優性で、不完全優性であること、広義の遺伝率は 0.995、狭義の遺伝率は 0.532 であることが明らかとなった。形態学的観察では、15 DAC(置床後日数)以降のサンプルにおいて珠孔付近で分裂する卵細胞や、卵細胞以外の細胞が核分裂する様子がみられ、卵細胞が胚様体の起源となるが、

卵細胞以外の細胞も起源となる可能性が示唆された。

## 第二章 種間交雑による遺伝変異の拡大

野生種リンドウ 9 節 20 種と栽培種リンドウ(*G. scabra*, *G. triflora*)を交配し、胚珠培養を行なったところ、8 節 15 種との組合せで正常な実生が得られ、1 花あたり実生数は、栽培種と近縁な *Pneumonanthe* 節、*Cruciata* 節の野生種との組合せで最大 427.7 個と多かった。5 節 11 種の野生種との組合せでは胚救済をせずに種子を登熟させたところ、*G. asclepiadea* を除く *Pneumonanthe* 節の野生種との組合せでは、1 花あたり 50.7-195.3 個と多くの種子が得られ(発芽率 25-80%)、胚珠培養を適用しなくても雑種獲得が可能と推察された。また、*G. asclepiadea* は従来 *Pneumonanthe* 節に分類されていたが、交雑親和性が著しく低く、*Gentiana* 節に分類されるとする近年の分子系統的解析の結果を支持した。正逆交雑では、交雑方向により実生獲得数のみならず雑種個体の形質にも違いがみられ、その重要性が示唆された。胚珠培養で得られた 15 組合せ 82 個体について、DNA マーカーによる雑種検定を行ない、15 組合せ 79 個体が雑種であることを確認し、また、形質調査の結果、多くの形質は両親の中間の特性を持ち、花粉稔性は両親と比べて著しく低かった。

## 第三章 効率的な染色体倍加手法の確立

栽培種リンドウ(*G. scabra*, *G. triflora*)4 系統を用い、コルヒチンやオリザリンの処理条件を検討した結果、コルヒチンでは *G. scabra* では 250  $\mu$  M での処理(四倍体誘導率 22.2-25.0%)、*G. triflora* では 125  $\mu$  M での処理(四倍体誘導率 27.6-30.8%)が検討した条件の中では効率的であることを明らかにした。オリザリンについては、全体的に効率が低く、条件検討が必要と考えられた。一方、栽培種リンドウ 2 種 4 系統を用いて、接合子の笑気ガス処理における自殖後のガス処理開始時期と遺伝子型による影響を調査したところ、いずれの系統でも 5DAP(交配後日数)での四倍体誘導率が 30.8-100%と高く、7DAP を除きキメラの発生は極めて少なかった。また、交配からガス処理開始前までの温度の影響やガス処理容器のサイズ等についても検討し、登熟時の温度が高いと最適処理時期はやや前進すること、ガス処理容器のサイズの影響は小さいことを明らかにした。種間雑種の稔性を回復するために、*G. triflora* と *G. gracilipes* の種間交雑後にガス処理を行ない、複二倍体を作成し、その個体は 80.9%の花粉稔性を有することを確認した。笑気ガス処理の利点として、倍加効率が高く、キメラの発生が少ないことが明らかとなった。

以上より、未受精胚珠培養については野生種リンドウにも適用可能であること、効率的な培養方法、胚様体発生能の遺伝様式や胚様体の起源細胞についての知見を得た。種間交雑については、種間組合せや交雑方向による交雑親和性の違いや効率的な雑種獲得方法を明らかにした。染色体倍加法については、コルヒチンと笑気ガスについて、効率的な処理条件を確立した。これらの知見は、リンドウ育種の基盤となり、今後のリンドウ育種の発展に貢献することが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

リンドウ (*Gentiana* spp.) はわが国オリジナルな花卉品目で、切り花や鉢物として利用されている。しかし、その育種は戦後始まり大部分の品種がエゾリンドウ(*G. triflora*)、ササリンドウ(*G. scabra*)およびそれらの雑種由来の二倍体であるため、品種の多様性が乏し

い。本研究では、現在までリンドウの育種にほとんど利用されてこなかった野生種を用い、倍加半数体作出法である未受精胚珠培養と栽培種との種間交雑を行なうとともに、胚様体発生機構の解明ならびに効率的な染色体倍加方法の確立を試みた。得られた成果は以下の通りである。

1. 野生種リンドウ 5 節 13 種 25 系統を用い未受精胚珠培養を行い、2 節 9 種 17 系統で半数体及び二倍体の再生植物体を獲得し、本手法が野生種にも適用可能なことを明らかにした。また、培養条件について蕾の発達ステージとショ糖濃度 (7~13%) を検討し、葯の裂開前よりも裂開後の胚珠で胚様体発生効率が高いこと、10%ショ糖濃度が比較的効率的であることを明らかにした。さらに、胚様体からの植物体再生培地を検討し通常の 2 倍の寒天濃度(1.6%)、または 10mg/l 硝酸銀添加により、植物体の再生率を 5.9~20%向上できることを明らかにした。胚様体発生機構の解明を遺伝学および組織学的に試みた。胚様体発生能が異なる *G. triflora* 4 系統を用いて片側ダイアレル分析を行ない、胚様体発生能は遺伝的には相加効果、優性効果の両方が関与し、胚様体発生能が低い方が優性で、不完全優性であり、広義および狭義の遺伝率はそれぞれ 0.995、0.532 であることを明らかにした。また組織学的解析により、培養後 15 日以降の胚珠において卵細胞の連続した分裂を観察した。加えて一部卵細胞以外の細胞が核分裂することも観察し、胚様体の起源は卵細胞であるが、卵細胞以外の細胞も可能性があることを示唆した。

2. 野生種を用いた種間交雑による遺伝的拡大の可能性を明らかにするため、野生種リンドウ 9 節 20 種と栽培種(*G. scabra*, *G. triflora*)の種間交雑を試みた。胚珠培養を行ない、8 節 15 種との組合せで正常な実生を得、1 花あたり実生数は 0.3~428 個となり、特に栽培種と近縁な *Pneumonanthe* 節、*Cruciata* 節の野生種との組合せで多くの実生を得た。一方、*Pneumonanthe* 節に属する *G. asclepiadea* との間では交雑親和性が著しく低く、本種が *Gentiana* 節に分類されるとする分子系統解析の結果を支持した。正逆交雑を行い、交雑方向により実生獲得数および雑種個体の形質にも差異が認められることを見だし、種間雑種の作出においては交雑方向を考慮すべきことを指摘した。得られた植物体 15 組合せ 82 個体について、DNA マーカーによる雑種検定を行ない、15 組合せ 79 個体が雑種であることを確認した。また形質調査の結果、多くの形質は両親の中間的特性を持っていることから、今後リンドウの新品種開発に利用できることを明らかにした。

3. 効率的な染色体倍加法を確立するために、コルヒチン、オリザリン、笑気ガスを用いそれらの最適条件を検討した。栽培種 2 種についてコルヒチンおよびオリザリンの処理条件を検討し、コルヒチンでは *G. scabra* で 250  $\mu$ M、*G. triflora* では 125  $\mu$ M の処理により 22~31%の四倍体誘導率となり、調査した条件の中では効率的であることを明らかにした。オリザリンについては用いた処理条件がいずれも効率が低く最適条件を明確にできなかった。笑気ガス処理の検討では、自殖後の接合子に対するガス処理開始時期と遺伝子型による影響を調査し、いずれの系統でも交配後 5 日目の処理で四倍体誘導率が 31~100%と高くキメラの発生も少ないことを明らかにした。また、植物の生育環境の影響やガス処理容器のサイズについても検討し、登熟時の温度が高いと最適処理時期はやや早まること、処理容器のサイズの影響は小さいことを指摘した。種間雑種の稔性を回復するために、*G. triflora* x *G. gracilipes* の種間交雑後の接合子に笑気ガス処理を行なうことで複二倍体を作出でき、本方法が複二倍体を得る効率的な手法であることを指摘した。

以上のように、本研究はリンドウの遺伝的多様性の拡大に関し多くの新知見を得たものであり、今後の品種育成並びに基礎研究に貢献することが期待される。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Takamura, Y., C. Asano, T. Hikage, K. Hatakeyama and Y. Takahata (2019)  
Production of interspecific hybrids between Japanese gentians and wild species of *Gentiana*. *Breeding Science* 69: 680-687.