

博士論文要約 (Summary)

2016 年 4 月 入学

連合農学研究科 生物資源科学 専攻

氏 名 高村 祐太郎

タイトル	リンドウの多様性拡大に関する育種学的研究
<p>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。リンドウは育種の歴史が浅く、これまでに育成された品種の多くは、日本に自生する <i>Gentiana scabra</i>、<i>G. triflora</i> およびそれらの雑種の二倍体である。そのため、育種が進んでいる他の花卉類と比較すると品種のバリエーションが乏しい。また、多年生で自殖弱勢が強いため、F₁ 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リンドウを用い、倍加半数体作出のための未受精胚珠培養、遺伝的変異拡大のための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。</p> <p>第一章 未受精胚珠培養による倍加半数体作出</p> <p>未受精胚珠培養の野生種リンドウにおける遺伝子型間差異の調査には、5 節 12 種 (<i>Chondrophyllae</i> 節 : <i>G. squarrosa</i>、<i>Cruciata</i> 節 : <i>G. cruciata</i>、<i>G. dahurica</i>、<i>G. gracilipes</i>、<i>G. straminea</i>、<i>G. olivieri</i>、<i>G. tibetica</i>、<i>Gentiana</i> 節 : <i>G. lutea</i>、<i>Kudoa</i> 節 : <i>G. sino-ornata</i>、<i>Pneumonanthe</i> 節 : <i>G. parryi</i>、<i>G. pneumonanthe</i>、<i>G. septemfida</i>)19 系統を供試した。3 節 9 種 13 系統で胚様体が得られ、そのうち、2 節 8 種 (<i>G. cruciata</i>、<i>G. dahurica</i>、<i>G. gracilipes</i>、<i>G. olivieri</i>、<i>G. straminea</i>、<i>G. parryi</i>、<i>G. pneumonanthe</i>、<i>G. septemfida</i>)12 系統では、再生植物体を獲得した。再生植物体の倍数性を調査したところ、6 種では半数体を得られており、植物体が減数分裂後の雌性配偶子から発生したことが確認された。栽培種 (<i>Pneumonanthe</i> 節) と近縁な <i>Pneumonanthe</i> 節、<i>Cruciata</i> 節の野生種においては、栽培種と同じ方法で未受精胚珠培養が可能であることを明らかにした。</p> <p>胚様体形成に及ぼす胚珠の発達ステージの影響について、野生種 2 節 3 種 (<i>Cruciata</i> 節 : <i>G. gracilipes</i>、<i>Pneumonanthe</i> 節 : <i>G. asclepiadea</i>、<i>G. septemfida</i>)6 系統を供試して検討した。<i>G. septemfida</i> では、葯が裂開した蕾で胚様体発生数や植物体再生数が多く、また、<i>G. asclepiadea</i> では、葯が裂開した蕾でのみ再生植物体を得られたことから、葯が裂開してい</p>	

ない蕾よりも裂開した蕾において培養効率が低いことを明らかにした。胚様体誘導培地の検討では、栽培種 2 種(*G. scabra*, *G. triflora*) 4 系統を用い、胚様体発生に重要なショ糖濃度の影響(7、10、13%)を調査した。ショ糖濃度は、7%よりも 10-13%で胚様体発生数が約 1.7-4.8 倍増加する傾向がみられた。一方、高濃度のショ糖は植物体再生率を 12.7-37.5% 低下させることも明らかとなり、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、栽培種 *G. triflora* 3 系統を用い、高濃度の寒天(1.2、1.6%)による水分ストレスと硝酸銀(10mg/l: 7、14 日処理)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。

胚様体発生機構を解明するため遺伝学および形態学的に解析した。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ヤレル分析を行なった。親系統である *G. triflora* '12-87-1'、'7-104-1'、'5-131-2'、'AZ1E1' の 1 蕾あたりの胚様体発生数は、それぞれ 13.16、1.38、0.15、0.00 個であった。また、F₁ の 1 蕾あたりの胚様体発生数は、0.09-3.31 個であった。計算プログラム DIALL(鶴飼 1989)を用いてダイヤレル分析をしたところ、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、置床後 15 日以降の培養胚珠において珠孔付近で分裂する卵細胞や珠孔側から発達する胚様体、および卵細胞以外の細胞が核分裂の様子がみられた。したがって、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(*Calathianae* 節: *G. oschtenica*, *Chondrophyllae* 節: *G. jamesii*, *G. squarrosa*, *Cuminalis* 節: *G. acaulis*, *Cruciata* 節: *G. cruciata*, *G. dahurica*, *G. gracilipes*, *G. olivieri*, *G. siphonantha*, *G. straminea*, *G. tibetica*, *Frigidae* 節: *G. algida*, *Gentiana* 節: *G. lutea*, *Microsperma* 節: *G. purpurea*, *Kudoa* 節: *G. sino-ornata*, *Pneumonanthe* 節: *G. asclepiadea*, *G. paradoxa*, *G. parryi*, *G. pneumonanthe*, *G. septemfida*)と栽培種リンドウ 2 種を交配し、胚珠培養を行なったところ、野生種 8 節 15 種との組合せで正常な実生が得られた。1 花あたりの実生数は、*G. scabra* を母本とした時には、*G. paradoxa*, *G. parryi*, *G. septemfida* との組合せで 94.5-427.7 個、*G. triflora* を母本とした時には、*G. cruciata*, *G. dahurica*, *G. olivieri*, *G. paradoxa*, *G. parryi*, *G. pneumonanthe*, *G. septemfida* との組合せで 18.3-258.7 個と多かった。この結果から、栽培種と近縁な *Pneumonanthe* 節、*Cruciata* 節の野生種との組合せでは、実生が得られやすいことが明らかとなった。また、得られる実生数は、同じ種間組合せであっても系統により異なり、*G. scabra* と *G. septemfida* 3 系統

との組合せでは 250.5-427.7 個、*G. triflora* と *G. septemfida* 3 系統との組合せでは 7.5-42.5 個の変異がみられた。一方、栽培種と 5 節 11 種の野生種との組合せにおいて、胚救済法を使わず種子を登熟させたところ、*G. asclepiadea* を除く *Pneumonanthe* 節の野生種 3 種(*G. paradoxa*、*G. pneumonanthe*、*G. septemfida*)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、その発芽率は 25-80%であった。これらについては雑種検定を行っていないが、*Pneumonanthe* 節同士の種間交雑では、胚珠培養を適用しなくても個体の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、他の *Pneumonanthe* 節の野生種と比較すると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 個体が種間雑種であることを確認した。また、花や葉などの形質を調査した結果、多くの形質は両親の中間的特性を持ち、花粉稔性は両親と比べて著しく低かった。花粉稔性が低いことは、種間雑種を直接品種として利用する場合には花持ちの向上が期待され有利であるが、育種素材として利用する上では障害となることから、稔性回復のための染色体倍加法の確立が必要である。

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、無菌植物でのコルヒチンやオリザリン処理の条件を検討した。コルヒチンでは、シュートを浸漬する水溶液濃度(125、250 μ M)を検討した。*G. scabra* は 250 μ M での処理(四倍体誘導率 22.2-25.0%)、*G. triflora* は 125 μ M での処理(四倍体誘導率 27.6-30.8%)が効率的であることを明らかにした。なお、コルヒチン処理では、全体的にキメラ個体の発生率が高かった。オリザリンについては、シュートを水溶液に浸漬する方法、および固形培地に置床する方法のいずれにおいても効率が低く、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)処理での四倍体誘導率が 30.8-100%と高く、7DAP 処理を除きキメラの発生は極めて少なかった。したがって、今回供試した材料では、3-5 DAP で初回から 2 回目の接合子の分裂が生じたと推察される。また、交配からガス処理開始前までの登熟中の温度やガス処理容器のサイズによる影響についても検討した。登熟時の温度については、岩手大学の環境制御室(平均気温 22.2°C)と八幡平市のガラス温室(平均気温 19.9°C)の 2 条件で調査したところ、温度が高いと最適処理時期はやや前進する傾向がみられた。ガス処理容器のサイズについては、小型(13.3cm³)、大型(93.5cm³)の 2 種類の容器で調査したところ、実生獲得数や倍加効率の差異はほとんどみられなかった。さらに、*G. triflora* と *G. gracilipes* および *G. septemfida* の種間交雑後にガス処理を行

ない、複二倍体の作出を試みた。いずれの種間組合せでも四倍体が獲得でき、それらの個体についてはDNA マーカーで雑種性が確認された。*G. triflora* と *G. gracilipes* の複二倍体の形質を調査したところ、葉や花は両親よりも大きく、花粉稔性は80.9%であり、笑気ガス処理により迅速に複二倍体が作出できることが明らかとなった。以上のことから、笑気ガス処理は、倍加効率が高く、コルヒチン処理と比較してキメラの発生が少なく、リンドウの倍加処理には有効であることが示唆された。

以上より、未受精胚珠培養については、栽培種と近縁な *Pneumonanthe* 節や *Cruciata* 節の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。