

学位論文

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)

岩手大学大学院  
連合農学研究科  
生物資源科学専攻

高村 祐太郎

## 目次

緒言 .....	1
第一章 未受精胚珠培養による倍加半数体作出 .....	6
1 序論 .....	7
2 材料および方法 .....	9
3 結果 .....	19
4 考察 .....	43
第二章 種間交雑による遺伝的変異の拡大 .....	49
1 序論 .....	50
2 材料および方法 .....	52
3 結果 .....	58
4 考察 .....	73
第三章 効率的な染色体倍加手法の確立 .....	77
1 序論 .....	78
2 材料および方法 .....	80
3 結果 .....	86
4 考察 .....	100
総合考察 .....	104
摘要 .....	108
謝辞 .....	111
引用文献 .....	112

## 緒言

リンドウ属(*Gentiana*)植物は、世界各地に 15 節からなる約 362 種が存在しており、アジアに 14 節 292 種、アメリカに 6 節 41 種、ヨーロッパに 8 節 29 種、オセアニアに 1 節 12 種、アフリカに 2 節 2 種が分布している(Ho and Liu 2001)。また、日本には、分類学者により異なるが、約 13-18 種が分布している(吉池 1992)。

リンドウは、古くから薬用、観賞用として人々に親しまれてきた植物である。古代ローマ時代には薬効が知られており、現在でも *G. lutea*、*G. scabra*、*G. manshurica* などの根茎や根を乾燥させたものが、苦味健胃薬として用いられている(清水ら 1997)。日本においても、平安時代の随筆『枕草子』に記載がみられるなど、古くから親しまれてきた花である。現在、海外ではロックガーデン用として、*G. septemfida*、*G. acaulis*、*G. asclepiadea*、*G. lutea* などが栽培されている(Köhlein 1991)。日本では、*G. scabra* (ササリンドウ)や *G. triflora* (エゾリンドウ)、それらの雑種から育成された品種が盆や彼岸の切り花、敬老の日の鉢物としても利用されており、我が国オリジナルな花きとして重要な品目の一つとなっている(日影 2013)。

日本におけるリンドウの本格的な栽培は、1955 年(昭和 30 年)頃から長野県で園芸用切り花として始まった(吉池 1992)。その後、岩手県、福島県、山形県などでも行なわれるようになり、1984 年(昭和 59 年)以降は、岩手県が生産量、生産額、栽培面積ともに全国 1 位となっている(日影 2013)。平成 30 年の岩手県におけるリンドウの作付面積は 225ha、出荷量は 51,100 千本であり、全国に占める割合は作付面積で約 52%、出荷量で約 57%である(農林水産省 2018)。また、岩手県の中でも、八幡平市ではリンドウ栽培が特に盛んである。

日本で園芸用リンドウとして用いられているのは、主に *G. scabra* と *G. triflora* の 2 種である。*G. scabra* は 9-10 月頃に開花し、開花時には花弁の裂片が外反転する(吉池 1992)。一方、*G. triflora* は 7-10 月頃に開花し、花弁の裂片は外反転

しない。リンドウの栽培は、始まって間もない頃は *G. scabra*、*G. triflora* の山採り株や実生株を利用して行われており、形質のばらつきが大きかった(吉池 1992; 日影 2013)。そこで、自殖を繰り返して固定種の育成を試みたところ近交弱勢がみられたため、一代雑種( $F_1$ )育種法の利用が検討された。1977年(昭和 52年)には、岩手県園芸試験場(現岩手県農業研究センター)において、リンドウでは最初の切り花用  $F_1$  品種である‘いわて’が育成された。この  $F_1$  品種は、選抜集団間の交配により作出した  $F_1$  雑種である。リンドウにおいても、 $F_1$  雑種は形質や栽培特性が両親よりも優れていることが確認されている(吉池・横山 1984)。その後、多くの  $F_1$  品種が開発され、切り花生産の拡大に大きな役割を果たしてきた(藤原 1994; 高橋 1997)。一方、リンドウは多年生で挿し木や組織培養により安定的に苗の生産ができることから、優良個体が得られると栄養繁殖で増殖でき、栄養系の品種の登録数も年々増加している。栄養系品種は、育苗コストは高いが形質の揃いがよいため、特に鉢物用品種に向いており、一般に欠株率は低い(吉池 1992; 日影 2013)。こうして、現在までに 300 を超える  $F_1$  品種や栄養系品種が開発されている(Nishihara et al. 2018)。

$F_1$  育種法の導入により、一定の揃いをもつ品種を育成できるようになったが、リンドウは自殖弱勢が強く、ホモ接合度の高い両親系統の作出は困難であった。そのため、集団選抜で親株を維持・増殖していたが、親のヘテロ性による  $F_1$  品種の品質低下を引き起こす危険性があった(岩手農研セ 2010; 日影 2013)。また、前述したようにリンドウは多年生植物であり、圃場に定植してから開花するまでには 2 年を要するため、自殖や集団選抜により形質を固定するには長い時間が必要となる。組織培養で  $F_1$  品種の親株を維持する技術が開発されたが、特に *G. scabra* においては組織培養由来の個体は越冬後の欠株率が高いことが判明し、そのことが問題となっている(Hikage et al. 2007)。このような育種上の課題の解決のため、種子増殖可能な純系の親系統の作出が望まれていた。

自殖弱勢のため自殖による純系作出が困難な植物で  $F_1$  育種法を行う場合、親系

統として配偶子由来の半数体を倍加させた倍加半数体(DH)を用いる方法が開発され、実際の育種に利用されている(Forster et al. 2007; Dunwell 2010)。DHの作出法には、雄性配偶子を培養する葯培養や小孢子培養、雌性配偶子を培養する偽受精胚珠培養や未受精胚珠培養、遠縁交雑などがあり、200種以上の植物種で作出が報告されている(Maluszynski et al. 2003)。栽培種リンドウ(*G. triflora*、*G. scabra*)においては、葯培養、未受精胚珠培養の両方から倍加半数体の作出が試みられ、いずれの手法でも倍加半数体が得られている(Doi et al. 2010, 2011; Pathirana et al. 2011)。両者を比較すると、葯培養では、遺伝子型間差異が大きく、系統によっては植物体再生効率が悪く、再生植物体の多くが三倍体であるのに対し、未受精胚珠培養では、多くの遺伝子型で半数体や二倍体の再生個体を得られることが明らかとなっている(Doi et al. 2010, 2011, 2013)。また、得られた倍加半数体は、育種素材や遺伝学の研究材料として活用されている。2012年には、葯培養由来の倍加半数体 Aki-6PS を片親とした F<sub>1</sub> 品種‘安代の秋空’が品種登録されたほか、Aki-6PS を戻し交雑した BC<sub>1</sub> 集団を用いた連鎖地図の作成も行われている(Nakatsuka et al. 2012)。

上述のように、栽培種リンドウでは未受精胚珠培養により倍加半数体を作成できるようになったが、培養効率には系統間で差異があり、また野生種リンドウへの適用は検討されていない。したがって、野生種リンドウへの適用や培養効率向上のための培養条件の検討を行なう必要がある。また、未受精胚珠培養からの胚様体発生機構について、土井(2011)は、形態観察と EST 解析により、胚様体が胚のう内部から生じ、胚様体内で発現する遺伝子は、受精胚特異的なものと共通のものがあることを報告している。しかし、胚様体発生機構については不明な点が多く、特にその遺伝様式は現在のところ解明されていない。胚様体発生機構を理解することは、基礎的には発生分化の解析につながり、実用的には培養効率の向上に結びつく。

2002年(平成14年)には550haあったリンドウの作付面積は、2018年(平成30

年)には 432ha となっており(農林水産省 2002, 2018)、リンドウ生産は縮小傾向にある。その原因は様々あるが、品種育成の観点からは、品種のバリエーション不足による需要減退が考えられる(日影 2013)。リンドウの育種は歴史が浅く、これまでのところ、長期出荷体系の確立や均一化の向上、親系統の安定的な維持・増殖が品種育成における重要課題であった。今後は、それらに加えて需要拡大につながる新奇性のある品種の育成を進める必要がある。また、八幡平市(旧安代町)においては 2002 年からリンドウの輸出が行われているが、国際競争力を確保するためにも、バラエティ豊かな品種を展開していくことが不可欠である(横田 2006; 日影 2013)。そのためには、野生リンドウの利用や倍数性育種により遺伝的変異を拡大することが重要である。

園芸作物では、種間交雑や染色体倍加による遺伝的変異の拡大が広く行われている(斎藤 1969; Van Tuyl and Lim 2003; Sattler et al. 2016)。キク、バラ、ユリなどの主要な花き類では、種間交雑により変異が拡大され、多様な品種が開発されてきた(Anderson 2007; Lim and Van Tuyl 2007; Zlesak 2007)。一方、染色体倍加もバラ、カーネーション、シクラメンをはじめ多くの種で適用例があり、花の巨大化や花色の濃色化などで鑑賞価値の向上に貢献している(Dhooghe et al. 2011)。また、染色体倍加は種間雑種の複二倍体化による稔性回復にも利用されている。

リンドウにおいても、栽培種と野生種との種間交雑で、雑種の獲得が報告されている(Morgan 2004; 岩手農研セ 2006; 玉掛ら 2014)。また、非公開の野生種と栽培種との種間交雑により新奇性の高い赤花リンドウ‘ショウタイムスターレット’や‘恋紅’が育成された例もあり(日影 2016)、種間交雑による育種がもつ可能性は大きいと考えられる。しかし、これまでに種間交雑が行われた組合せは少なく、交雑親和性や効率的な雑種の獲得方法などは不明である。一方、染色体倍加については、Morgan et al. (2003)がオリザリンを用いて *G. triflora* の四倍体作出を報告し、一部の民間育種家がコルヒチンを用いて倍数体品種の開発に成功

しているが(日影 2016)、それ以外にはほとんど行なわれておらず、倍加効率や最適処理条件などは不明である。したがって、倍数体品種の育成のみならず、種間雑種の稔性回復のためにも、効率的な染色体倍加手法を確立することが必要である。

本研究では、園芸用リンドウ育種における遺伝的多様性を拡大するために、未受精胚珠培養、種間交雑、染色体倍加を行なった。未受精胚珠培養については、多数の野生種への適用、蕾ステージの検討や培地条件の検討による培養効率の向上を試みた。加えて、胚様体発生機構の解析を行ない、胚様体の起源や発達様式、胚様体発生能の遺伝様式を明らかにした。野生種と栽培種の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調査、得られた雑種の形質調査を行なった。染色体倍加については、オリザリンやコルヒチン、笑気ガスによる処理の最適条件の検討、および種間雑種の早期複二倍体化を試みた。本研究で得られた知見は、リンドウの品種育成に大きく寄与することが期待される。

## 第一章 未受精胚珠培養による倍加半数体作出



## 1 序論

リンドウの F<sub>1</sub> 育種では、自殖弱勢により親系統の増殖、維持に困難があること、親系統に残るヘテロ性のために F<sub>1</sub> 品種にバラツキが生じることが課題となっている(岩手農研セ 2010; 日影 2013)。また、現在のリンドウ育種は、日本に自生する *G. scabra*、*G. triflora* の 2 種により行われているため遺伝的背景が狭く、品種のバリエーションが少ないことも課題である。

近年、リンドウの F<sub>1</sub> 育種における親系統の作出のため、蒴培養および未受精胚珠培養が開発された(Doi et al. 2010, 2011, 2013; Pathirana 2011)。このうち、未受精胚珠培養は蒴培養と比較して、胚様体形成率、植物体再生効率が高く、遺伝子型間差異も小さいことが明らかとなっている。しかし、未受精胚珠培養が適用されたのは、栽培種リンドウ(*G. scabra*、*G. triflora*)とそれらの雑種に限られている。一方、育種の進展しているキク、バラ、ユリなどの花き類では、種間交雑により多様な特性を持つ品種が開発されており(Anderson 2007; Lim and Van Tuyl 2007; Zlesak 2007)、リンドウの育種においても、遺伝的変異の拡大のため野生種の利用が必要と考えられる。

リンドウの未受精胚珠培養では、培養効率が蕾ステージで異なること、系統間差異があることが明らかとなっており(Doi et al. 2011, 2013)、培養効率を向上するためには、胚様体発生に最適な蕾ステージを明らかにすることが不可欠である。胚様体誘導培地では、高濃度のショ糖を用いるが、ショ糖は炭素源であると同時に浸透圧調節物質であり、配偶子のリプログラミングに重要である(Murovec and Bohanec 2012)。しかし、リンドウではこれまでに 10%以外のショ糖濃度での培養は行われておらず、最適な濃度は不明である。また、胚からの植物体再生について他の植物では高濃度の寒天による水分ストレスや、硝酸銀の添加によるエチレンの作用阻害が、効果的であることが明らかとなっており(彭ら 1994; Li et al. 2013)、リンドウの未受精胚珠培養においても培養効率向上につながる可能性が

ある。

リンドウの未受精胚珠培養では、培養効率に系統間差異がみられ(Doi et al. 2011, 2013)、培養効率は遺伝的変異に基づくものと考えられる。現在まで、他の植物種では組織からの再分化能に関連してダイアレル分析を用いた遺伝解析が行われており(Ou et al. 1989; Ono and Takahata 2000)、半数体発生能に関してもイネの葯培養(Miah et al. 1985; 藺牟田ら 1991)や *Brassica* 属の小孢子培養(Zhang and Takahata 2001)等で、カルス形成や小孢子胚発生について遺伝様式が解析されている。また、未受精胚珠培養で生じる胚様体の起源についても不明な点が多い。サトウダイコン(Ferrant and Bouharmont 1994)、タマネギ(Musial et al. 2001, 2005)、クワ(Thomas 2004)では卵細胞、イネ(Zhou et al. 1986)では反足細胞または助細胞と報告されており、植物種により異なっている。また、珠心や珠皮などの体細胞組織に由来する植物体の再生も報告されている(Mukhambetzhanov 1997)。

本章では、リンドウの未受精胚珠培養について、栽培種以外の野生種を試み、その遺伝子型の影響を調査した。また、3種の野生種を用いた蕾ステージの検討、2種の栽培種を用いた胚様体誘導培地のシヨ糖濃度の検討、および植物体再生培地の寒天濃度、硝酸銀添加の検討を行ない、培養効率の向上を試みた。さらに、未受精胚珠培養からの胚様体発生機構を解明するため、栽培種を用いたダイアレル分析による遺伝様式の解析、ならびに形態学的解析を行なった。

## 2 材料および方法

### (1) 植物材料

野生種リンドウ 5 節 13 種 25 系統および日本の栽培リンドウ 2 種 7 系統を用いた(Table 1-1)。これらの材料は、八幡平市花き研究開発センターのガラス温室および露地圃場で栽培した。実験には、いずれも栽培開始から 1 年以上経過した株を用いた。

### (2) 未受精胚珠培養

未受精胚珠培養は Doi et al. (2011)の方法に準じて行なった。

#### 1) 胚様体の誘導

ガラス温室および露地圃場で栽培していた植物体から採取した蕾(葯も柱頭も裂開していない蕾、または葯は裂開しているが柱頭は裂開していない蕾)は、供試するまでの間 4℃暗黒下で 2-7 日間冷蔵保存した。蕾から取り出した雌ずいを茶こしに入れ、70%エタノールに 30 秒間浸漬後、Tween 20 を数滴加えた有効塩素 2%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 15 分間浸漬して滅菌した。その後、滅菌水で 5 分間ずつ 3 回洗浄した。滅菌した雌ずいから、ピンセットと薬さじを用いて未受精胚珠を取り出し、プラスチックシャーレ(φ60mm×15mm)に分注した 1/2NLN (Takahata and Keller 1991)固形培地(10%ショ糖、0.8%寒天、pH6.0)(胚様体誘導培地)にまんべんなく置床した。1シャーレにつき 1 蕾分の未受精胚珠を置床し、25℃暗黒下で培養した。

#### 2) 植物体の再生と馴化

未受精胚珠から誘導した胚様体は、植物体再生のためにプラスチックシャーレ(φ60mm×15mm)に分注した、1.0mg/l GA<sub>3</sub>を添加した 1/2MS(Murashige and

**Table 1-1.** List of *Gentiana* used in unfertilized ovule culture

Type	Sections	Species	Cultivar / line	Distribution <sup>a</sup>
Wild	<i>Chondrophyllae</i>	<i>G. squarrosa</i>	'27-1171'	Central, Northern and Eastern Asia
			'27-1173'	
	<i>Cruciata</i>	<i>G. cruciata</i>	'27-976'	Europe, Caucasus, Western and Northern Asia
			'27-1057'	
			'27-1058'	
			'27-1059'	
		<i>G. dahurica</i>	'27-977'	Central Asia
			'27-1059'	
		<i>G. gracilipes</i>	-	China
	'27-1063'			
	'27-985'			
	<i>G. olivieri</i>	<i>G. straminea</i>	'25-815'	Southen Caucasus, Western and Central Asia
			'27-990'	China
	<i>Gentiana</i>	<i>G. tibetica</i>	'27-1074'	Himalayan region
			'27-1064'	
<i>Kudoa</i>	<i>G. lutea</i>	'27-1072'	Mountains of Central and Southern Europe, Western Asia	
		'27-1072'		
<i>Pneumonanthe</i>	<i>G. sino-ornata</i>	-	China	
		-		
	<i>G. asclepiadea</i>	-	Central Europe, Caucasus, Western Asia	
		'27-1066'		
		'27-1067'		
	<i>G. parryi</i>	<i>G. pneumonanthe</i>	'27-1066'	United States
			'27-1067'	Europe, Caucasus, Central Asia
			'27-1076'	
			'27-1077'	
			'27-1077'	
<i>G. septemfida</i>	<i>G. septemfida</i>	'7-131-1'	Caucasus to Western, Central and Northern Asia	
		'7-131-2'		
		'9-130-1'		
		'27-1071'		
		'27-1079'		
Cultivated	<i>Pneumonanthe</i>	<i>G. scabra</i>	'23-613'	Eastern Asia
			'26-740'	
	<i>G. triflora</i>	<i>G. triflora</i>	'0-27-29'	Northeastern Asia
			'5-131-2'	
			'7-104-1'	
			'12-87-1'	
			'AZ1E1'	

<sup>a</sup> Referred in Ho and Liu (2001).

Skoog 1962)固形培地(3%ショ糖、0.8%寒天、pH5.7)(植物体再生培地)に移植し、20°C 16 時間日長で培養した。胚様体から根や芽が分化した個体は、ホルモンフリーの 1/2MS 固形培地に移植し、20°C 16 時間日長で培養した。なお、一部 1/2NLN 固形培地上で根や芽が分化する個体が存在したが、それらは直接ホルモンフリーの 1/2MS 固形培地に移植した。再生個体は、培養土(赤玉土：ピートモス：十和田砂 = 2 : 2 : 1)で馴化後、八幡平市花き研究開発センターの露地圃場で栽培した。

### 3) フローサイトメトリーによる倍数性調査

再生個体の葉を約 5mm 角で切り出して核抽出バッファー(CyStain UV Precise P Nuclei Extraction Buffer, Sysmex)に浸漬し、カミソリで細かく切り刻んで核を抽出した。その懸濁液を 30 $\mu$ m のフィルターでろ過して夾雑物を除去した後、DAPI 染色液(CyStain UV Precise P Staining Buffer, Sysmex)を加えて染色した。その後、プロイディーアナライザー(CyFlow PA, Partec)で DNA 量を測定した。

### 4) 押しつぶし法による染色体観察

伸長している根の先端を約 10mm 採取し、2mM の 8-オキシキノリン水溶液に浸漬し、室温で 4 時間前処理した。その後、根端をファーマー液(99%エタノール：酢酸 = 3 : 1、v/v)に一晩浸漬して固定した。根端を水洗した後、60°C の 1N HCl に 8 分間浸漬して組織を解離し、シッフ試薬で染色した。染色した根端をスライドガラス上に移し、カバーガラスの上から指で押しつぶし、光学顕微鏡で観察した。

### 5) データ解析

胚様体数や再生植物体数のデータの解析は、ソフトウェア JMP9.0®(SAS Institute Inc.)を用い、Tukey-Kramer 法による多重検定または Student の t 検定を行なった。

### (3) 未受精胚珠培養の調査項目

上述の方法を基本として、以下の項目について検討した。

#### 1) 野生種リンドウにおける遺伝子型の影響

野生種リンドウ 5 節 12 種 19 系統を用いた。リンドウは雄性先熟であり、葯が裂開した直後は柱頭の先端が閉じていて受粉できないが、雌ずいが受精能力を獲得すると、柱頭の先端が裂開する。実験には、葯も柱頭も裂開していない蕾と、葯は裂開しているが柱頭は裂開していない蕾を用いた。なお、*G. lutea* は葯が裂開する前に柱頭が裂開していたため、柱頭は裂開しているが葯は裂開していない蕾を用いた。

#### 2) 野生種リンドウでの蕾ステージの検討

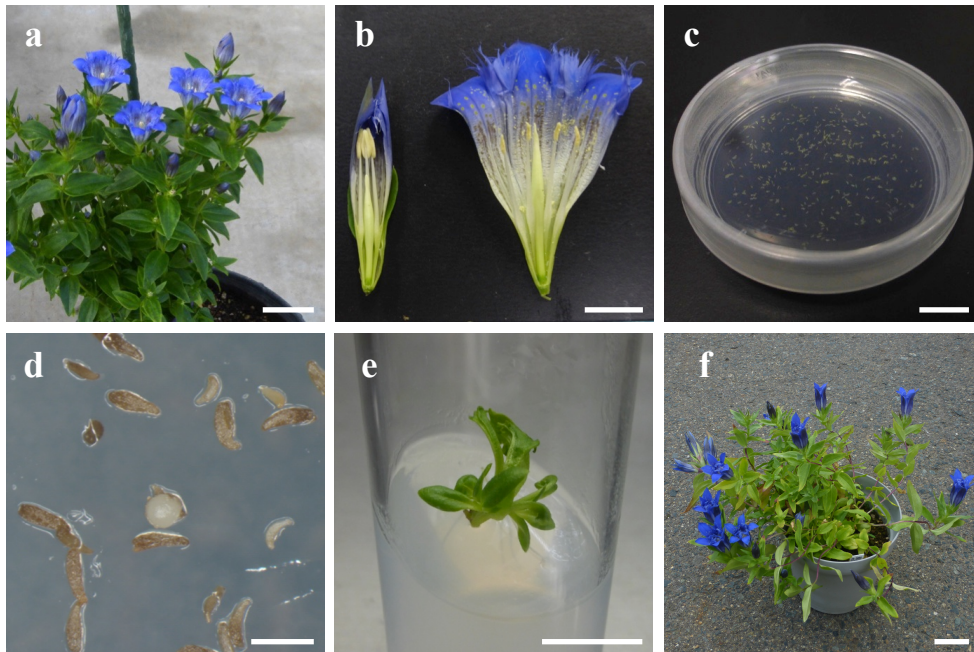
野生種リンドウ 2 節 3 種 6 系統(*G. gracilipes*、*G. asclepiadea*、*G. septemfida*)を用いた。葯も柱頭も裂開していない蕾と、葯は裂開しているが柱頭は裂開していない蕾との 2 つのステージに分けて培養し(Fig. 1-1b)、胚様体誘導と植物体再生に与える影響を調査した。

#### 3) 栽培種での胚様体誘導培地の検討

栽培種 2 種 4 系統を用い、胚様体の誘導に用いる 1/2NLN 固形培地のショ糖濃度(7、10、13%)を検討し、胚様体誘導と植物体再生、および再生個体の倍数性に与える影響を調査した。

#### 4) 栽培種での植物体再生培地の検討

栽培種 1 種 3 系統に由来する 0.5–1.0mm の球状の胚様体を用い、植物体再生に用いる 1.0 mg/l GA<sub>3</sub> 添加 1/2MS 固形培地における寒天濃度(0.8、1.2、1.6%)、および硝酸銀の効果(10mg/l、7、14 日)を検討した。寒天濃度 0.8%の培地に 28



**Fig. 1-1.** Embryo like structure (ELS) induction and plant regeneration in wild gentians (*G. septemfida*). **a** Gentian flower at the time of harvest of flower buds. **b** Two stages of flower buds, Left; anther indehiscence, Right; anther dehiscence. **c** Ovules cultured on 1/2 NLN solid medium. **d** ELS emerged from ovules. **e** A plantlet regenerated from ELS. **f** A regenerated plant grown in soil. The bars in **a** = 50 mm, **b**, **c**, **e** = 10 mm, **d** = 1 mm, **f** = 30 mm.

日間置床する区(1区)、寒天濃度 1.2%の培地に 28 日間置床する区(2区)、寒天濃度 1.6%の培地に 28 日間置床する区(3区)、硝酸銀を添加した寒天濃度 0.8%の培地に 7 日間置床したのち、硝酸銀を添加しない寒天濃度 0.8%の培地に 21 日間置床する区(4区)、硝酸銀を添加した寒天濃度 0.8%の培地に 14 日間置床したのち、硝酸銀を添加しない寒天濃度 0.8%の培地に 14 日間置床する区(5区)を設定した。上記の 28 日間の処理が終了した時点で再生途中の胚様体のシュートの長さ、根の長さ、根の本数を測定した。その後、再生途中の胚様体はホルモンフリーの 1/2MS 固形培地に移植し、28 日間経過した時点で再生した植物体の数を調査した。なお、再生個体は、2 枚以上の葉が展開し、発根している個体とした。

#### (4) 未受精胚珠培養からの胚様体発生機構の解析

##### 1) 遺伝分析

ダイヤレル分析には、親系統として *G. triflora* ‘12-87-1’、‘7-104-1’ ‘5-131-2’、‘AZ1E1’の計 4 系統、およびこれらの片側ダイヤレル交配で得られた F<sub>1</sub>6 系統の計 10 系統を用いた。親系統の胚様体発生能は、‘12-87-1’は胚様体発生数が多く、‘7-104-1’は胚様体発生数が少なく、‘5-131-2’や‘AZ1E1’は胚様体がほとんど発生しない(高橋・日影、私信)。親系統と F<sub>1</sub>6 系統は、2017 年に八幡平市花き研究開発センターの試験圃場に定植して栽培した。各系統の定植数は 16 個体以上とした。2019 年に、親 4 系統と F<sub>1</sub>6 系統のそれぞれ 3 個体から、蒴は裂開しているが柱頭は裂開していない蕾を約 60 蕾採取し、上述した方法で未受精胚珠培養を行なった。培養開始から 2 ヶ月が経過した時点で、各シャーレにおける胚様体発生数を調査した。ダイヤレル分析は、1 蕾あたりの胚様体発生数の値を用い、Hyman (1954)、Griffing (1956)、Jones (1965)の方法により行なった。また、Mather and Jinks (1971)の方法により狭義の遺伝率と広義の遺伝率を求めた。計算には、コンピュータ・プログラム DIALL(鵜飼 1989)を用いた。



## 2) 形態学的解析

### i 材料の採取と固定

胚様体の発生機構の形態観察には、胚様体発生数の多い *G. scabra* ‘23-613’、*G. triflora* ‘12-87-1’を用いた。培養開始後 0 日から 50 日の間、5 日間隔でシャーレから胚珠を採取した。採取した胚珠はバイアル瓶に入れ、直ちに固定液(4%パラホルムアルデヒド、1% Triton X-100、25mM PIPES 緩衝液)に浸漬し、減圧脱気を 2 回繰り返したのち室温で静置した。翌日、再び減圧脱気を行ない、固定開始から 24 時間以上経過後、保存液(25mM PIPES 緩衝液)に浸漬して 4°C で保存した。

また、比較として受精胚の発達過程を調査するため、*G. scabra* ‘23-613’の切り花を用いて人工交配を行なった。切り花は、水と数滴のハイポネックス原液(N-P-K = 6-10-5)を入れたバケツに挿し、16 時間日長、昼温 25°C、夜温 15°C の自然光型環境制御室(コイトトロン、コイト電気株式会社)で維持して種子を登熟させた。その際、バケツの水は 3 日に 1 回程度の頻度で交換し、葉がしおれてきた場合は切り戻しを行なった。胚珠および登熟種子の採取および固定は、交配後 0、2、4、5、6、8、10、15、20、25、30 日目に行なった。

### ii 脱水

下記の脱水系列の i-vii の各溶液に、2 回ずつそれぞれ 1 時間以上サンプルを浸漬した。続いて、包埋時にサンプルを確認しやすくするため、エオシン(アルコール溶性)を添加した溶液 viii に半日以上浸漬し(エオシンは脱パラフィンの過程で脱色される)、その後、エオシンを添加しない溶液 viii に 2-3 時間、3 回浸漬することで脱水した。なお、浸漬中は 30°C、30 rpm に設定したハイブリオーブン(MULTI-SHAKER OVEN HB、タイテック株式会社)で保温および振盪を行なった。

i tert-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O = 0 : 30 : 70

- ii tert-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O = 0 : 50 : 50
- iii tert-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O = 10 : 50 : 40
- iv tert-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O = 20 : 50 : 30
- v tert-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O = 35 : 50 : 15
- vi tert-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O = 50 : 40 : 10
- vii tert-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O = 75 : 25 : 0
- viii tert-BuOH : EtOH : H<sub>2</sub>O = 100 : 0 : 0

### iii パラフィン置換

バイアル瓶の tert-BuOH 量を瓶底から 5mm 程度とし、65°C のインキュベーター(IC402、ヤマト科学株式会社)で温めた。バイアル瓶内の温めた tert-BuOH に、溶解させたパラフィン(融点 56-57°C)(Paraplast Plus®、SIGMA-ALDRICH)を、1 時間以上の間隔を空けながらバイアル瓶の高さにして約 4mm 量ずつ 5 回注ぎ、最終的にはバイアル瓶のおよそ 3 分の 2 までパラフィンで満たした。その後、バイアル瓶のフタを緩め、65°C のインキュベーター内で 2 日間以上静置して tert-BuOH を完全に揮発させた。

### iv パラフィン包埋

包埋容器(φ60mm×15mm または φ35mm×10mm のプラスチックシャーレ)に 50%グリセロール水溶液を塗布後、温めたパラフィンを流し込み、室温で緩やかに凝固させた。包埋容器の底に固層ができたのち、ホットプレート付スターラー上で保温したサンプルを、パラフィンとともにパスツールピペットで吸い取り、包埋容器に流し込んだ。その後、適宜、パラフィンを追加して室温で静置し、パラフィンが完全に凝固したのち、包埋容器を氷水に浮かべて、包埋したサンプルを取り出した。

#### v 薄切、伸展

包埋したサンプルが中央に位置するようにパラフィンブロックを切り出し、アルコールランプで温めたスパーテルで木製のサンプル台にブロックを貼り付けた。ブロックが冷えたら、メスでブロックの上下が平行になるように成形し、約 25℃の室内において、マイクロトーム(RV-240、大和光機工業株式会社)で切片の厚さ 8µm の連続切片を作成した。連続切片は、展着液(10 %アラビアゴム、15 %グリセロール)を薄く塗布して乾燥させた後、水を滴下したスライドグラスに乗せて、38℃の伸展器(FHP-450S、東京硝子器械株式会社)上で保温しながら伸展させた。切片が十分に伸展したら、水を除いて伸展器上で 1 晩乾燥させた。

#### vi 脱パラフィン、水置換、染色、脱水、封入

サンプルを載せたスライドグラスは以下のように処理した。下記の溶液 i、ii でパラフィンを溶解し、溶液 iii-viii で水に置換した後、0.1%トルイジンブルー水溶液(pH 8.1-8.6)(Toluidinblau O、MERCK)で約 90 秒間染色した。水洗後、溶液 viii-i の順で脱水、キシレン置換した。その後、標本封入剤(MGK-S、松波硝子工業株式会社)を滴下し、カバーグラスを被せて永久プレパラートとした。

i 100 % Xylene 10 分間

ii 100 % Xylene 10 分間

iii 100 % EtOH 10 分間

iv 100 % EtOH 10 分間

v 95 % EtOH 10 分間

vi 85 % EtOH 10 分間

vii 70 % EtOH 10 分間

viii 50 % EtOH 10 分間

#### vii パラフィン切片の観察

光学顕微鏡 (Axio Imager A1、Carl Zeiss) およびデジタルカメラ (Axiocam MRC5、Carl Zeiss) を用いて、切片の観察と撮影を行なった。

### 3 結果

#### (1)未受精胚珠培養の調査項目

##### 1) 野生種リンドウにおける遺伝子型

野生種リンドウ 5節 12種 19系統を供試し、遺伝子型による未受精胚珠培養からの胚様体発生の差異を調査した。

未受精胚珠を 1/2NLN 固形培地(胚様体誘導培地)に置床して約 1ヶ月経過すると、褐変化した胚珠の中央付近に球状の胚様体が発生した(Fig. 1-1d)。得られた胚様体は、GA<sub>3</sub>を添加した 1/2MS 固形培地(植物体再生培地)に移植して植物体を再生させ、再生植物体はホルモンフリーの 1/2MS 固形培地で培養した(Fig. 1-1e)。なお胚様体の中には、植物体に再生せずに枯死するものも存在した。再生植物体を馴化して土に移植したところ、一部の個体は開花した(Fig. 1-1f)。

野生種リンドウにおける胚様体発生と植物体再生の結果を Table 1-2 に示した。5節 12種 19系統のうち、*G. squarrosa* 2系統、*G. tibetica* 2系統、*G. sino-ornata*、*G. pneumonanthe* '27-1076'を除く、3節 9種 13系統で胚様体を得られた。胚様体を得られた蕾の割合と 1蕾あたりの胚様体数は、*Pneumonanthe* 節の *G. parryi*、*G. pneumonanthe*、*G. septemfida* ではそれぞれ 17.6-65.4%、0.29-1.99 個、*Cruciata* 節の *G. cruciata*、*G. dahurica*、*G. gracilipes*、*G. straminea*、*G. olivieri* では 4.2-28.0%、0.06-0.40 個、*Gentiana* 節の *G. lutea* では 0.6%、0.01 個であった。胚様体発生には、同一の種でも系統間差があり、1蕾あたりの胚様体数は、*G. cruciata* 3系統では 0.06-0.36 個、*G. pneumonanthe* 3系統では 0.00-1.99 個の変異がみられた。1/2NLN 固形培地(胚様体誘導培地)で得られた 346 個の胚様体を植物体再生培地に移植したところ、163 個体の再生植物体を得られた。胚様体から植物体が再生したのは、胚様体を得られた 9種のうち、*G. lutea* を除く 8種であった。1蕾あたりの植物体再生数や胚様体からの植物体再生率は、*Pneumonanthe* 節の *G. parryi*、*G. pneumonanthe*、*G. septemfida* ではそれぞれ

**Table 1-2.** ELS production and plant regeneration in unfertilized ovule culture of wild gentians

Section / species	Line	No. of cultured flower buds	Frequency of responding flower buds (%)	No. of ELSs	No. of ELSs per flower bud <sup>a</sup>	No. of regenerated plants	No. of regenerated plants per flower bud *	Frequency of plant regeneration (%)
<i>Chondrophyllae</i>								
<i>G. squarrosa</i>	'27-1171'	5	0.0	0	0.00 ± 0.00 bc	0	0.00 ± 0.00 ab	0.0
	'27-1173'	10	0.0	0	0.00 ± 0.00 c	0	0.00 ± 0.00 b	0.0
<i>Cruciata</i>	'27-976'	34	14.7	5	0.15 ± 0.06 c	2	0.06 ± 0.04 b	40.0
	'27-1057'	74	23.0	27	0.36 ± 0.09 c	13	0.18 ± 0.07 b	48.1
<i>G. dahurica</i>	'27-1058'	72	4.2	4	0.06 ± 0.03 c	1	0.01 ± 0.01 b	25.0
	'27-977'	84	11.9	13	0.15 ± 0.05 c	10	0.12 ± 0.04 b	76.9
	'27-1059'	88	15.9	22	0.25 ± 0.07 c	14	0.16 ± 0.05 b	63.6
	'27-1063'	80	8.8	10	0.13 ± 0.06 c	7	0.09 ± 0.04 b	70.0
<i>G. gracilipes</i>	'27-985'	45	8.9	4	0.09 ± 0.04 c	1	0.02 ± 0.02 b	25.0
<i>G. straminea</i>	'25-815'	25	28.0	10	0.40 ± 0.15 c	4	0.16 ± 0.09 b	40.0
<i>G. tibetica</i>	'27-990'	57	0.0	0	0.00 ± 0.00 c	0	0.00 ± 0.00 b	0.0
	'27-1074'	9	0.0	0	0.00 ± 0.00 c	0	0.00 ± 0.00 b	0.0
<i>Gentiana</i>								
<i>G. lutea</i>	'27-1064'	168	0.6	1	0.01 ± 0.01 c	0	0.00 ± 0.00 b	0.0
<i>Kudoa</i>								
<i>G. sino-ornata</i>	'27-1072'	123	0.0	0	0.00 ± 0.00 c	0	0.00 ± 0.00 b	0.0
<i>Pneumonanthe</i>								
<i>G. parryi</i>	'27-1066'	26	65.4	39	1.50 ± 0.33 ab	21	0.81 ± 0.18 a	53.8
	'27-1067'	34	17.6	10	0.29 ± 0.13 c	5	0.15 ± 0.10 b	50.0
<i>G. pneumonanthe</i>	'27-1076'	4	0.0	0	0.00 ± 0.00 bc	0	0.00 ± 0.00 ab	0.0
	'27-1077'	50	24.0	20	0.40 ± 0.12 c	7	0.14 ± 0.06 b	35.0
	'27-1071'	91	60.4	181	1.99 ± 0.28 a	78	0.86 ± 0.17 a	43.1
Total		1079		346		163		

<sup>a</sup> Values show mean ± SE; different letters indicate significantly different at the 0.05 level according to Tukey-Kramer HSD test.

れ 0.14–0.86 個、35.0–53.8%、*Cruciata* 節の *G. cruciata*、*G. dahurica*、*G. gracilipes*、*G. straminea*、*G. olivieri* では 0.01–0.18 個、25.0–76.9%であった。

再生植物体 163 個体から、ランダムに選んだ 79 個体の倍数性をフローサイトメトリーおよび染色体観察で調査した (Table 1-3、Fig. 1-2)。79 個体のうち、27 個体 (34.2%) は半数体、35 個体 (44.3%) は二倍体であり、半数体と二倍体が大部分を占めた。*G. olivieri* 以外の 6 種では、半数体が得られており、再生植物体が減数分裂後の雌性配偶子から発生したことを示した。また、少数ではあるが、三倍体 (5.1%)、四倍体 (5.1%)、キメラ (9.8%) も得られた。

## 2) 野生種リンドウでの蕾ステージの検討

野生種リンドウ 2 節 3 種 6 系統 (*G. gracilipes*、*G. asclepiadea*、*G. septemfida*) の、葯も柱頭も裂開していない蕾と、葯は裂開しているが柱頭は裂開していない蕾を用いた (Fig. 1-1b)。本実験は、同じ材料を用いて 2017 年と 2018 年の 2 回行なった。*G. gracilipes* では、胚様体形成数が少なく蕾ステージによる差異は明確ではなかった。*G. asclepiadea* では、有意差は認められなかったが、2 年間にわたり葯が裂開した蕾でのみ胚様体や再生個体を得られた (Fig. 1-3)。*G. septemfida* においても同様の傾向がみられ、特に '7-131-2' では、2017 年の 1 蕾あたりの植物体再生数、2018 年の 1 蕾あたりの胚様体数において、蕾ステージ間で有意差がみられ、葯が裂開した蕾の効率が高かった。

*G. septemfida* '7-131-2' の再生植物体の倍数性を蕾ステージ別に調査した (Table 1-4)。葯が未裂開の蕾に由来する個体は、調査個体数が少ないものの半数体の割合が高く (75.0%)、葯が裂開した蕾に由来する個体は二倍体の割合が高かった (55.6%)。

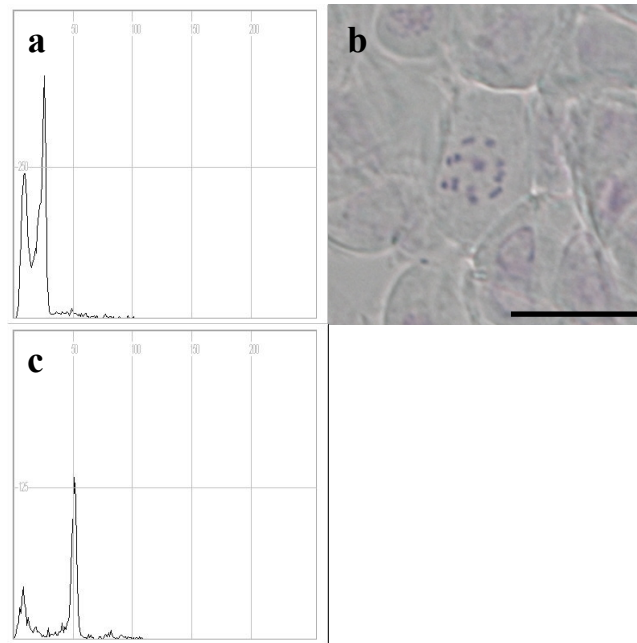
## 3) 栽培種での胚様体誘導培地の検討

栽培種 2 種 4 系統を用い、胚様体誘導培地のシヨ糖濃度 (7、10、13%) を検討し

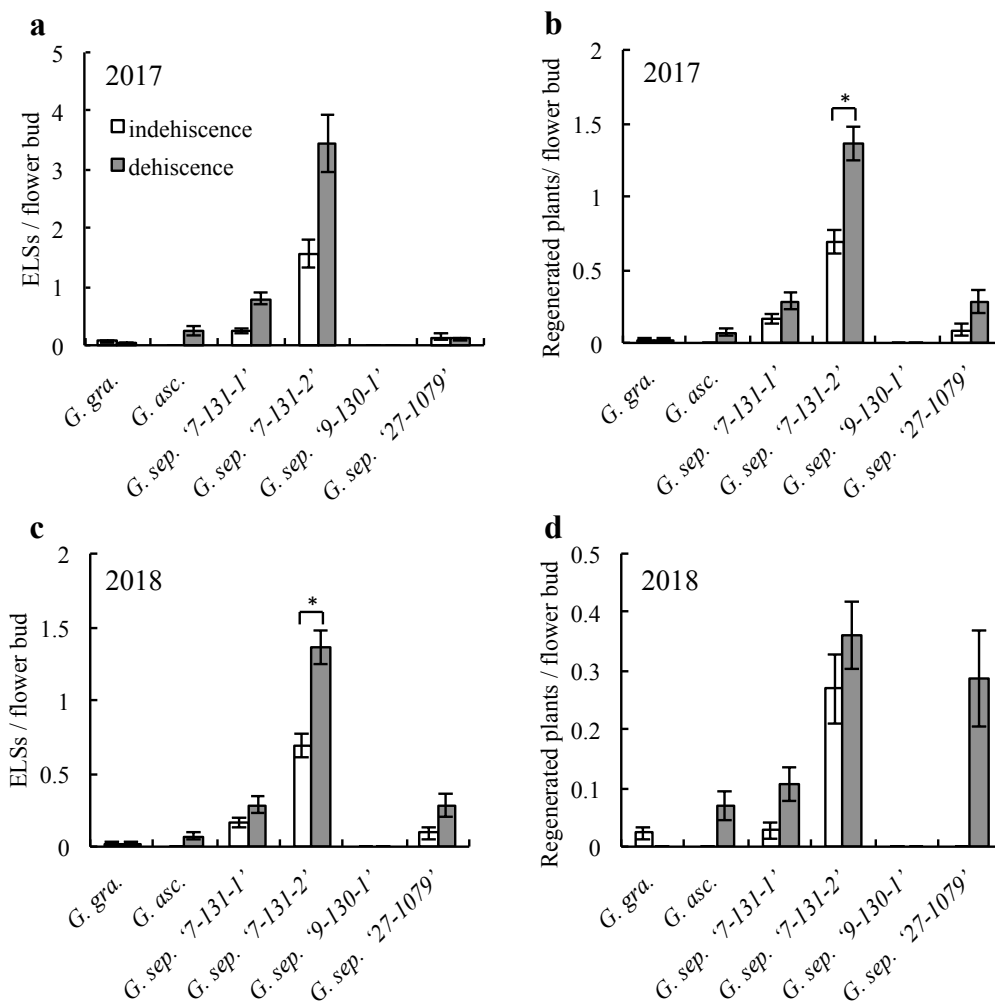
**Table 1-3.** Ploidy level of regenerated plants derived from unfertilized ovule culture of wild genitain

Section / species	Line	No. of analyzed plants	No. of plants (%)				
			x	2x	3x	4x	Chimeric plants
<i>Cruciata</i>							
<i>G. cruciata</i>	'27-976'	3	1 ( 33.3 )	1 ( 33.3 )			1 ( 33.3 )
	'27-1057'	4	1 ( 25.0 )	3 ( 75.0 )			
<i>G. dahurica</i>	'27-977'	8	4 ( 50.0 )	4 ( 50.0 )			
	'27-1059'	5	1 ( 20.0 )	4 ( 80.0 )			
	'27-1063'	1	1 ( 100 )				
<i>G. straminea</i>	'25-815'	1	1 ( 100 )				
<i>G. olivieri</i>	'27-985'	1				1 ( 100 )	
<i>Pneumonanthe</i>							
<i>G. parryi</i>	'27-1066'	4	2 ( 50.0 )	1 ( 25.0 )	1 ( 25.0 )		
<i>G. pneumonanthe</i>	'27-1067'	2		1 ( 50.0 )		1 ( 50.0 )	
	'27-1077'	7	3 ( 42.9 )	4 ( 57.1 )			
<i>G. septemfida</i>	'27-1071'	43	13 ( 30.2 )	17 ( 39.5 )	3 ( 7.0 )	2 ( 4.7 )	8 ( 18.6 )
Total		79	27 ( 34.2 )	35 ( 44.3 )	4 ( 5.1 )	4 ( 5.1 )	9 ( 11.4 )





**Fig. 1-2.** Determination of ploidy level of regenerated plant (*G. septemfida*). **a, c** Flow cytometric analysis, **b** Chromosome counting. **a, b**  $2n = x = 13$  showing a haploid, **c**  $2n = 2x = 26$  showing a diploid. Bars = 20  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 1-3.** Effect of flower bud stage (anther indehiscence, dehiscence) on ELS production and plant regeneration in unfertilized ovule culture of wild gentians. **a, c** No. of ELSs per flower bud. **b, d** No. of regenerated plants per flower bud. **a, b** 2017 and **c, d** 2018. Error bars present the standard error (SE). Asterisks indicate statistically significant differences at the 0.05 level according to Student's *t*-test.

**Table 1-4.** Effect of bud stages on ploidy level of regenerated plants derived from unfertilized ovule culture of wild gentian

Species / Line	Stage of flower bud (state of anther)	No. of analyzed plants	No. of plants (%)				
			x	2x	3x	4x	Chimeric plants
<i>G. septemfida</i> '7-131-2'	indehiscence	4	3 ( 75.0 )	1 ( 25.0 )			
	dehiscence	18	4 ( 22.2 )	10 ( 55.6 )	1 ( 5.6 )	2 ( 11.1 )	1 ( 5.6 )

た。1 蕾あたりの胚様体数についてみると、*G. triflora* ‘12-87-1’は、2017 年はショ糖 10、13%において 7%より約 2 倍多く、2018 年はショ糖 10%において 7%、13%より約 4 倍多かった(Table 1-5、Fig. 1-4)。*‘7-104-1’*の胚様体数は、2017 年はショ糖 7、10%で多く、2018 年も有意差はないがショ糖濃度が低い方が多い傾向がみられた。*‘0-27-29’*では、2 年間ともにショ糖 10、13%においてショ糖 7%よりも多くの胚様体を得られ、その程度は約 2-5 倍であった。*G. scabra* ‘26-740’の胚様体数は、2017 年はショ糖 10、13%においてショ糖 7%よりも約 2 倍多く、一方、2018 年はショ糖 13%では胚様体を得られなかった。また、全体的にはショ糖 10、13%で胚様体発生数が多い傾向がみられた。胚様体からの植物体再生についてみると、いずれの種や系統でも胚様体発生時のショ糖濃度が低いほど再生率が高い傾向がみられた。ショ糖 7%と 13%を比較すると、植物体再生率は 7%の方が 12.7-37.5%高かった。また、再生植物体の倍数性をショ糖濃度別に調査したところ、多くの個体が半数体または二倍体であり、ショ糖濃度による差異はみられなかった(Table 1-6)。

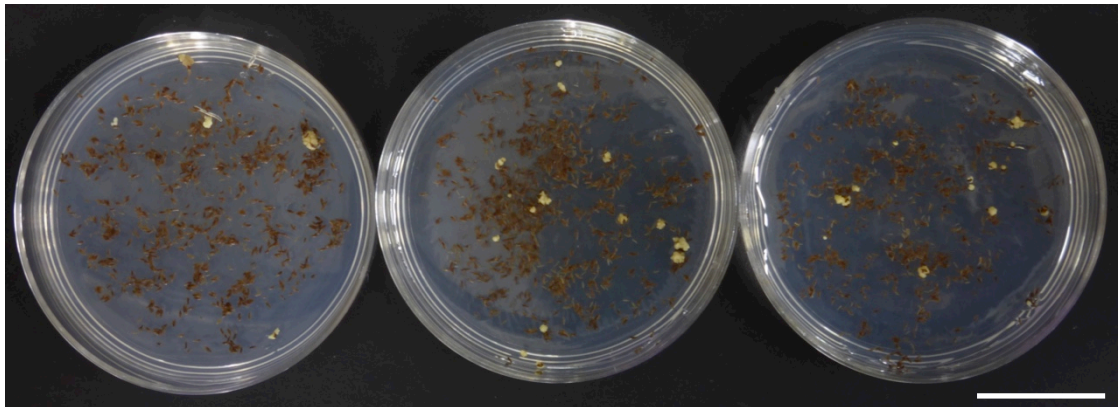
#### 4) 栽培種での植物体再生培地の検討

胚様体からの植物体再生について、*G. triflora* 3 系統の 0.5-1.0mm の球状の胚様体を用い、培地の寒天濃度(0.8、1.2、1.6%)、および硝酸銀の効果(10mg/l、7、14 日)を 5 試験区で検討した。*G. triflora* ‘12-87-1’では、寒天濃度が高い 2 区(寒天 1.2%)や 3 区(同 1.6%)で胚様体を再生させたとき、再生開始から 4 週間後のシュート長や根長が有意に短かったが、8 週間後の最終的な植物体再生率は 1 区(対照区、寒天 0.8%)と比較してほとんど差がなかった(Table 1-7)。硝酸銀の処理期間を検討したところ(4 区、5 区)、4 週間後のシュート長や根長、植物体再生率に差はなく、また、1 区(0.8%寒天)との差も小さかった。しかし、再生植物体の生育は、硝酸銀を添加した 4 区、5 区が優れていた(Fig. 1-5)。*‘0-27-29’*では、3 区でシュート長や根長が有意に短かったが、最終的な植物体再生率は 2 カ年にわた

**Table 1-5.** Effects of sucrose concentration on ELS production and plant regeneration in unfertilized ovule culture

Cultured year	Species	Line	Sucrose concentration (%)	No. of cultured flower buds	No. of ELSs	Frequency of responding flower buds (%)	No. of ELSs per flower bud <sup>a</sup>	No. of ELSs transplanted	No. of regenerated plants	Frequency of plant regeneration (%)
2017	<i>G. triflora</i>	'12-87-1'	7%	28	160	92.9	5.71 ± 0.77 b	56	45	80.4
			10%	29	316	93.1	10.90 ± 1.61 a	63	42	66.7
			13%	29	273	96.6	9.41 ± 1.77 ab	51	29	56.9
		'7-104-1'	7%	19	22	52.6	1.16 ± 0.29 ab	21	12	57.1
			10%	19	37	68.4	1.95 ± 0.55 a	47	22	46.8
	<i>G. scabra</i>	'0-27-29'	13%	20	3	15.0	0.15 ± 0.08 b	9	4	44.4
			7%	25	249	100.0	9.96 ± 1.07 b	64	50	78.1
			10%	18	346	100.0	19.22 ± 2.12 a	87	66	75.9
		'26-740'	13%	29	558	100.0	19.24 ± 2.38 a	59	28	47.5
			7%	31	86	61.3	2.77 ± 0.47 b	70	39	55.7
2018	<i>G. triflora</i>	'12-87-1'	7%	20	50	70.0	2.50 ± 0.56 b	25	20	80.0
			10%	20	205	80.0	10.25 ± 2.65 a	20	13	65.0
			13%	19	50	52.6	2.63 ± 1.01 b	20	11	55.0
		'7-104-1'	7%	10	9	60.0	0.90 ± 0.31 a	8	3	37.5
			10%	10	6	50.0	0.60 ± 0.22 a	3	1	33.3
	<i>G. scabra</i>	'0-27-29'	13%	10	1	10.0	0.10 ± 0.10 a	1	0	0.0
			7%	15	40	80.0	2.67 ± 0.92 b	21	16	76.2
			10%	15	106	80.0	7.07 ± 1.20 b	28	20	71.4
		'26-740'	13%	15	190	100.0	12.67 ± 2.08 a	34	17	50.0
			7%	29	8	17.2	0.28 ± 0.13 ab	-	-	-
		10%	38	18	26.3	0.47 ± 0.15 a	-	-	-	
		13%	32	0	0.0	0.00 ± 0.00 b	-	-	-	

<sup>a</sup> Values show mean ± SE, different letters indicate significantly different at the 0.05 level according to Tukey-Kramer HSD test.



**Fig. 1-4.** Effect of sucrose concentration on ELS production in unfertilized ovule culture (*G. tiffora* '12-87-1', 2017). Left; 7%, center; 10%, right; 13%. Bars = 2 cm.

**Table 1-6.** Effect of sucrose concentration on ploidy level of regenerated plants derived from unfertilized ovule culture of wild gentian

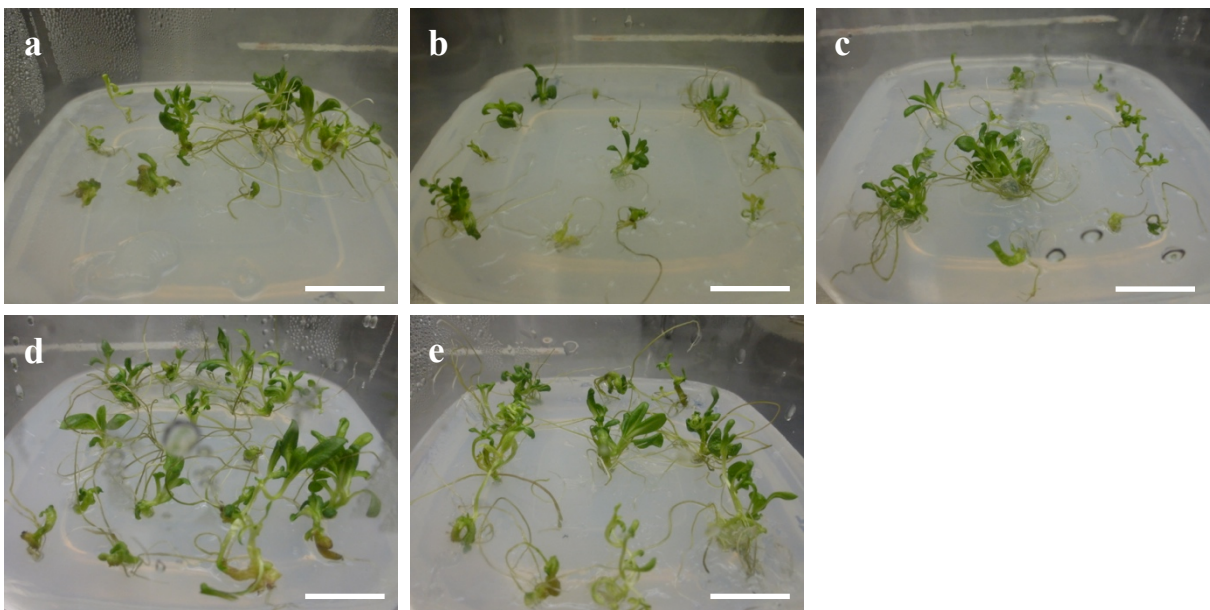
Species	Line	Sucrose concentration (%)	No. of analyzed plants	No. of plants (%)					
				x	2x	3x	4x	Chimeric plants	
<i>G. triflora</i>	'12-87-1'	7%	5		5 ( 100.0 )				
		10%	3	1 ( 33.3 )	2 ( 66.7 )				
		13%	5	2 ( 40.0 )	3 ( 60.0 )				
	'7-104-1'	7%	5	2 ( 40.0 )	1 ( 20.0 )	2 ( 40.0 )			
		10%	5	1 ( 20.0 )	4 ( 80.0 )				
		13%	2	1 ( 50.0 )	1 ( 50.0 )				
	'0-27-29'	7%	5	1 ( 20.0 )	2 ( 40.0 )	1 ( 20.0 )	1 ( 20.0 )		
		10%	5	2 ( 40.0 )	2 ( 40.0 )			1 ( 20.0 )	
		13%	5	2 ( 40.0 )	3 ( 60.0 )				
	<i>G. scabra</i>	'26-740'	7%	4	2 ( 50.0 )	1 ( 25.0 )	1 ( 25.0 )		
10%			5		3 ( 60.0 )	1 ( 20.0 )		1 ( 20.0 )	
13%		4	2 ( 50.0 )	2 ( 50.0 )					

**Table 1-7.** Effect of regeneration medium on plant regeneration from ELS

Cultured year	Species	Line	Regeneration medium components (treatment duration)	No. of cultured ELSs	4 weeks after transplanting			8 weeks after transplanting	
					Shoot length (mm) <sup>a</sup>	Root length (mm)	No. of roots (mm)	Frequency of plant regeneration (%)	
2017	<i>G. triflora</i>	'12-87-1'	(1) Agar 0.8% (28d)	60	7.9 a	-	2.5 a	48.3	
			(3) Agar 1.6% (28d)	59	3.6 b	-	1.8 b	54.2	
			(1) Agar 0.8% (28d)	48	9.5 a	-	1.6 a	64.6	
			(3) Agar 1.6% (28d)	48	4.5 b	-	1.0 b	72.9	
			(1) Agar 0.8% (28d)	5	10.8 a	11.6 a	2.2 a	80.0	
2018	<i>G. triflora</i>	'7-104-1'	(2) Agar 1.2% (28d)	5	6.0 a	7.8 a	1.0 a	100.0	
			(3) Agar 1.6% (28d)	5	4.0 a	7.4 a	1.4 a	80.0	
			(4) Agar 0.8% + AgNO <sub>3</sub> 10mg/l (7d) → Agar 0.8% (21d)	5	9.8 a	10.8 a	2.0 a	60.0	
			(5) Agar 0.8% + AgNO <sub>3</sub> 10mg/l (14d) → Agar 0.8% (14d)	5	8.4 a	11.6 a	2.2 a	100.0	
			(1) Agar 0.8% (28d)	28	7.9 a	11.1 ab	3.1 a	64.3	
'12-87-1'	<i>G. triflora</i>	'12-87-1'	(2) Agar 1.2% (28d)	28	4.0 b	7.2 b	2.4 a	53.6	
			(3) Agar 1.6% (28d)	27	3.7 b	7.5 b	2.2 a	59.3	
			(4) Agar 0.8% + AgNO <sub>3</sub> 10mg/l (7d) → Agar 0.8% (21d)	28	6.9 a	14.8 a	2.3 a	67.9	
			(5) Agar 0.8% + AgNO <sub>3</sub> 10mg/l (14d) → Agar 0.8% (14d)	28	8.0 a	12.4 a	2.9 a	71.4	
			(1) Agar 0.8% (28d)	34	8.9 a	10.6 ab	1.7 a	82.1	
'0-27-29'	<i>G. triflora</i>	'0-27-29'	(2) Agar 1.2% (28d)	35	5.7 bc	8.1 bc	1.2 a	75.0	
			(3) Agar 1.6% (28d)	35	4.2 c	6.9 c	1.5 a	92.9	
			(4) Agar 0.8% + AgNO <sub>3</sub> 10mg/l (7d) → Agar 0.8% (21d)	33	7.8 ab	11.5 ab	1.7 a	65.4	
			(5) Agar 0.8% + AgNO <sub>3</sub> 10mg/l (14d) → Agar 0.8% (14d)	31	7.3 ab	13.0 a	1.4 a	75.0	
			(1) Agar 0.8% (28d)	34	8.9 a	10.6 ab	1.7 a	82.1	

<sup>a</sup> Values show mean, different letters indicate significantly different at the 0.05 level according to Tukey-Kramer HSD test.





**Fig. 1-5.** Effect of regeneration medium on plant regeneration from ELS (*G. triflora* '12-87-1'). Eight weeks after transplanting ELS into various regeneration media. **a** Condition 1; Agar 0.8% (28d), **b** Condition 2; Agar 1.2% (28d), **c** Condition 3; Agar 1.8% (28d), **d** Condition 4; Agar 0.8% + AgNO<sub>3</sub> 10mg/l (7d) and Agar 0.8% (21d), **e** Condition 5; Agar 0.8% + AgNO<sub>3</sub> 10mg/l (14d) and Agar 0.8% (14d). Bars = 2 cm.

り 3 区が最も優れていた。4 区、5 区での再生率は、1 区と比べてやや低かった。一方、‘7-104-1’では、シュート長や根長において試験区間で他の系統と同様の傾向があり、最終的な植物体再生数は 2 区と 5 区で高かった。硝酸銀での処理期間についてみると、いずれの系統においても 14 日間処理の方がやや高い傾向がみられた。

## (2) 未受精胚珠培養からの胚様体発生機構の解析

### 1) 遺伝解析

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 であった (Table 1-8)。また、これらの 4 系統間の  $F_1$  の 1 蕾あたりの胚様体発生数は、‘7-104-1’ × ‘12-87-1’ の組合せで 3.31 個と最も多く、‘5-131-2’ × ‘12-87-1’ および ‘AZ1E1’ × ‘7-131-2’ の組合せで、0.09 個と最も少なかった。 $F_1$  系統の胚様体発生数は、いずれも花粉親系統の発生数よりも少なかった。

胚様体発生数を支配する遺伝子の相加的効果、優性効果に関する分散分析を行ったところ、相加的効果を表す a 項、優性効果を表す b 項は 1% 水準で有意であり、a 項は b 項を大きく上回った (Table 1-9)。また、優性効果に関係する b1 項 (平均優性効果)、b2 項 (親別の優性効果)、b3 項 (特定組合せの優性効果) のいずれも 1% 水準で有意であった。組合せ能力の分散分析の結果は、一般組合せ能力が 5% 水準、特定組合せ能力が 1% 水準で有意だった (Table 1-10)。次に、 $V_r$  (片親を共通とした r 番目の系列の分散) と  $W_r$  (r 番目の系列の  $F_1$  と非共通親との共分散) の関係について検討した (Fig. 1-6)。 $V_r$ 、 $W_r$  グラフの回帰直線の傾きは 0.972 であり、1 に近いことから、非対立遺伝子間の相互作用 (エピスタシス) はなく、相加・優性モデルに適合するとみられた。 $V_r$ 、 $W_r$  グラフにおいて、左下方に位置する点は優性対立遺伝子を多く持つ親に相当し、右上方に位置する点は劣性対立遺伝子を多く持つ親に相当する。回帰直線上の各親の ( $W_r$ 、 $V_r$ ) の点の位置から、

**Table 1-8.** ELS yields from unfertilized culture in four parents and their F<sub>1</sub> hybrids of *G. triflora*

Female	Male			
	12-87-1	7-104-1	5-131-2	AZ1E1
12-87-1	<u>13.16</u> <sup>a</sup>			
7-104-1	3.31	<u>1.38</u>		
5-131-2	0.09	0.57	<u>0.15</u>	
AZ1E1	0.42	0.47	0.09	<u>0.00</u>

<sup>a</sup>The underlined figures represent parental values.

**Table 1-9.** Analysis of variance of the diallel table for ELS induction, owing to Jones (1965)

Source <sup>a</sup>	df	SS	MS	F value
a	3	191.83	63.95	307.12 **
b	6	104.69	17.45	83.80 **
b1	1	38.91	38.91	186.90 **
b2	3	61.07	20.54	97.77 **
b3	2	4.71	2.35	11.30 **
Error	9	1.87	0.21	

\*\* means significant at 5% level.

<sup>a</sup> a; Additive variance

b; Dominance variance

b1; Variance for average dominance deviation

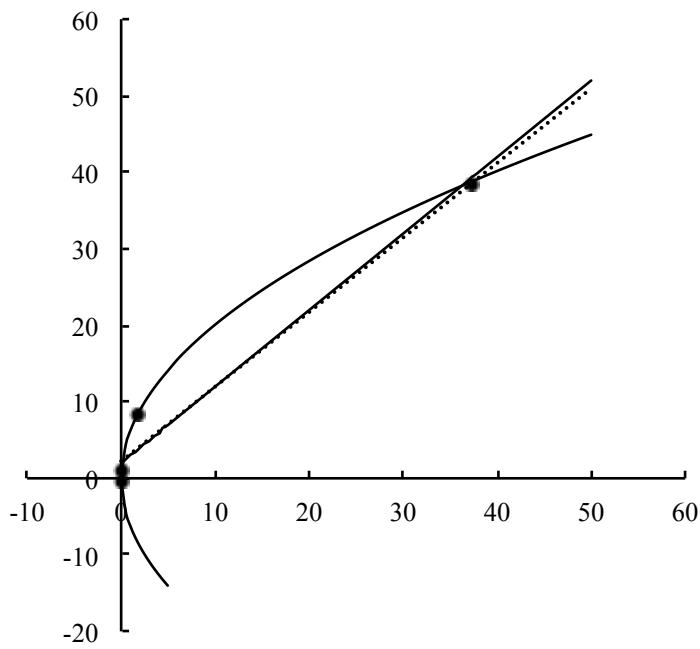
b2; Variance for additional dominance deviation due to parents

b3; Variance for the residual deviation

**Table 1-10.** Analysis of variance for general (GCA) and specific combining ability (SCA) for ELS induction, owing to Griffing (1955)

Source <sup>a</sup>	df	SS	MS	F value
General combining ability (GCA)	3	10.56	3.52	71.21 *
Specific combining ability (SCA)	2	4.71	2.35	47.58 **
Error (E)	5	0.25	0.05	

\*, \*\* means significant at 5%, 1% level, respectively.



**Fig. 1-6.** Vr, Wr graph for ELS production from a 4×4 half diallel table.

‘5-131-2’および‘AZ1E1’は優性遺伝子を多く持ち、‘12-87-1’は劣性遺伝子を多くもつものと推定された。さらに、 $W_r$ 、 $V_r$  等の統計量から遺伝分散成分を推定した (Table 1-11)。D(相加効果)は、 $H_1$ 、 $H_2$ (優性効果)よりもやや大きかった。平均優性度( $H_1/4H_1$ )は、0.896 と 1 以下であり、不完全優性であることが示された。優性遺伝子の平均的作用方向( $h$ )は、-4.271 と形質値を減少させる方向であり、胚様体発生数の少ない方が優性であった。広義の遺伝率は 0.995 と高かったのに対し、狭義の遺伝率は 0.532 であった。

## 2) 形態学的解析

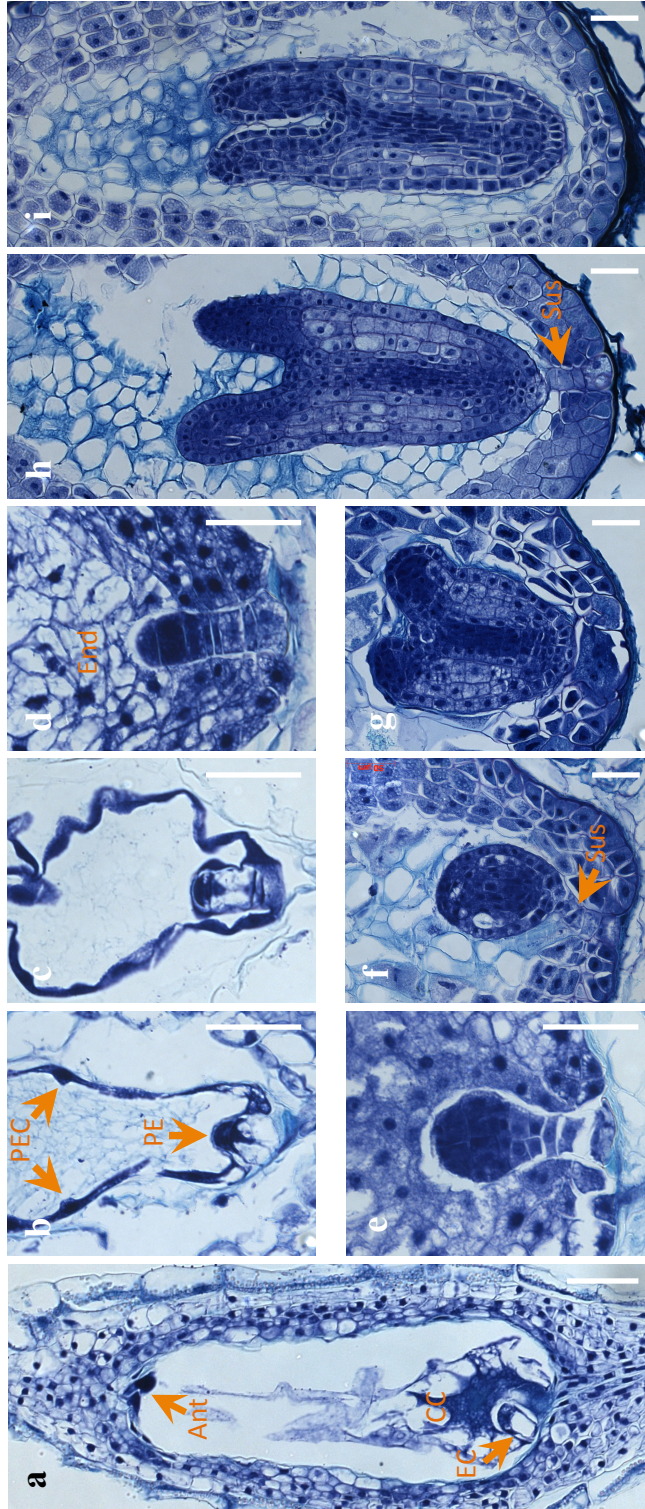
受精胚の発達様式を調査するために、*G. scabra* ‘23-613’の自殖した受精胚の発達を人工交配後 0、2、4、5、6、8、10、15、20、25、30 日目(DAP)に観察した。交配前の胚珠の胚のうちでは、珠孔側に極性が発達した卵細胞と助細胞、その上部に中央細胞、合点側に反足細胞が観察された(Fig. 1-7a)。4 DAP、5DAP には、珠孔の直上付近において、横に分裂した前胚と核分裂を繰り返しながら胚のう内に広がる一次胚乳細胞がみられた(Fig. 1-7b, c)。8 DAP には、前胚の上部の細胞で縦分裂が見られ、胚乳は胚のう全体に広がっていた(Fig. 1-7 d)。10 DAP には球状の前胚(Fig. 1-7e)、15 DAP には胚柄を付属した球状胚となり、胚乳の細胞化が明確に観察された(Fig. 1-7f)。その後、20 DAP には心臓型胚(Fig. 1-7g)、25 DAP には維管束細胞が発達した魚雷型胚となった(Fig. 1-7h)。30 DAP では、25 DAP と比較して胚の形態に変化はみられなかったが、乾燥の進行により細胞内容物が収縮していた(Fig. 1-7i)。

次に、胚様体の起源となる細胞および胚様体の発生過程を明らかにするために、胚様体形成数の多い *G. scabra* ‘23-613’、*G. triflora* ‘12-87-1’の培養後 0~25 日目(DAC)までの胚珠を観察した。培養前の胚珠では、珠孔側に卵細胞、助細胞、中央細胞、合点側に反足細胞が観察され、雌性配偶子の分化は完了していた(Fig. 1-8a)。なお、卵細胞と助細胞は珠孔の直上付近に隣接して存在していたが、細胞

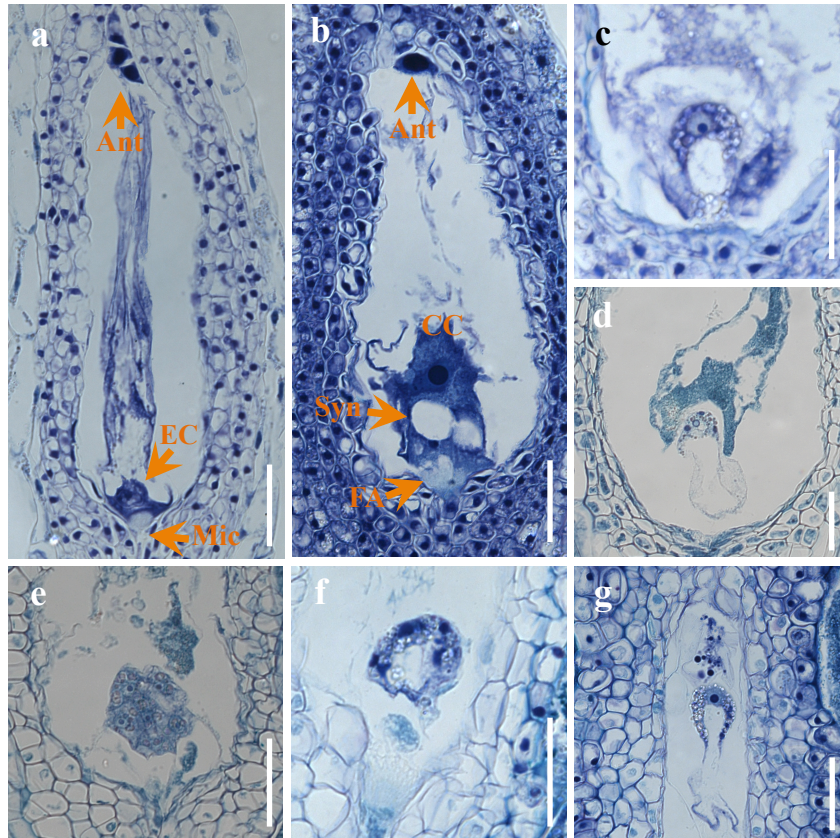
**Table 1-11.** Genetic components of variation for ELS induction in a four-parent half diallel cross of *G. triflora*

Genetic components		Estimated value
Additive variance	D	40.318
Dominance variance	H <sub>1</sub>	32.397
	H <sub>2</sub>	24.808
Product of additive by dominance effects	F	33.630
Square of difference parents and whole diallel	hh	18.194
Environmental variance	E	0.072
Average degree of dominance	(H <sub>1</sub> /D) <sup>1/2</sup>	0.896
Proportion of dominance genes	(H <sub>2</sub> /4H <sub>1</sub> )	0.733
Average direction of dominance	h	-4.271
Balance of positive and negative alleles	{(4DH <sub>1</sub> ) <sup>1/2</sup> +F} {(4DH <sub>1</sub> ) <sup>1/2</sup> -F}	0.191
Narrow-sense heritability		0.532
Broad-sense heritability		0.995





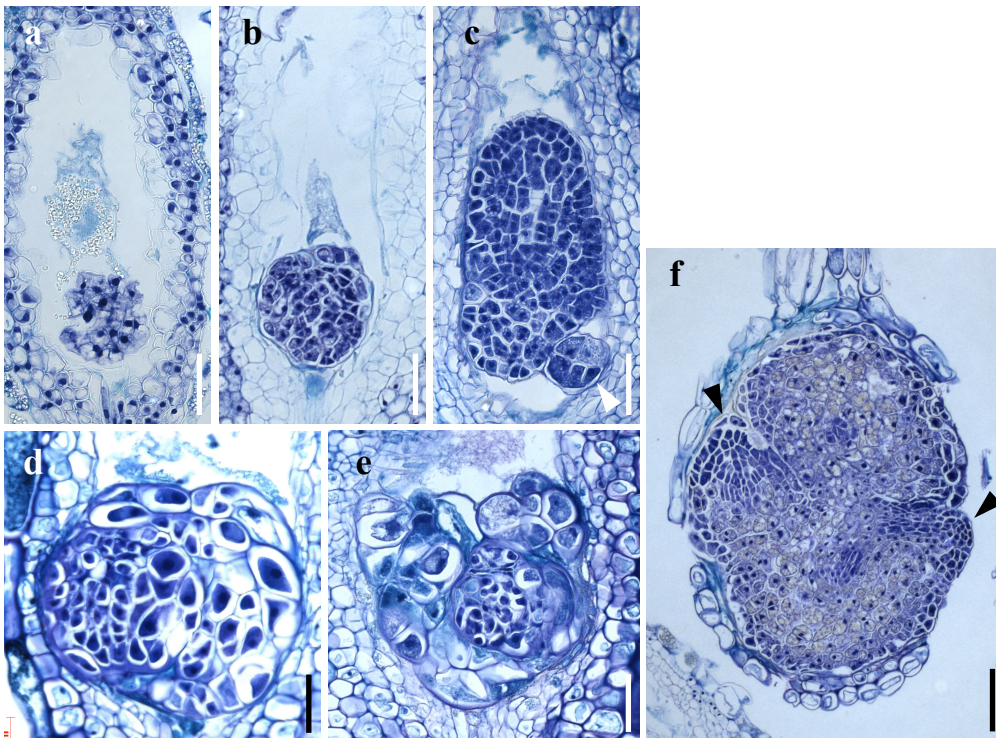
**Fig. 1-7.** Development of embryo and endosperm in *G. scabra* '23-613': **a** 0 DAP (day after pollination), **b** 4 DAP, **c** 5 DAP, **d** 8 DAP, **e** 10 DAP, **f** 15 DAP, **g** 20 DAP, **h** 25 DAP, **i** 30 DAP. Ant: antipodal cell, CC: central cell, EC: egg cell, PEC: primary endosperm cell, PE: proembryo, End: endosperm, Sus: suspensor. Bars = 50  $\mu$ m.



**Fig. 1-8.** Early stage of ELS development in cultured unfertilized ovules of *G. scabra* '23-613' and *G. triflora* '12-87-1'. **a, c** 0 DAC (day after culture), **b** 10 DAC, **d** 25 DAC, **e-g** 15 DAC. **a-c, f, g** *G. scabra* '23-613', **d, e** *G. triflora* '12-87-1'. **c** egg cell with polarity, **d** peripheral division of egg cell, **e, f** cell division on the micropyle, **g** egg cell detachment from the micropyle and coenocyte located on the chalazal end. All panels are shown with the micropyle side down. Ant: antipodal cell, EC: egg cell, Mic: micropyle, CC: central cell, Syn: synergid, FA: filiform apparatus. Bars = 50  $\mu$ m.

の極性の違いにより識別が可能であった。卵細胞は、珠孔側には大きな液胞がみられ、合点側には核を含む細胞内容物が集合していた(Fig. 1-8c)。一方、助細胞は、合点側に大きな液胞がみられ、核や細胞質は珠孔側に集中して存在しており、その下部には織形装置が確認された(Fig. 1-8b)。このような極性を有する卵細胞や助細胞、および中央細胞や反足細胞は、10 DAC までは容易に観察できた(Fig. 1-8b)。ところが、15 DAC 以降の胚のうちでは、助細胞、中央細胞、反足細胞を明確に観察することはできなかった(Fig. 1-8d-g)。一方、卵細胞とみられる極性を持った細胞は、15 DAC 以降も存在が確認できた。そのような細胞は、珠孔の直上付近以外に胚のうちの合点側でもみられることもあった(Fig. 1-8g)。15 DAC 以降の胚のうち内では、卵細胞とみられる細胞の核分裂や、細胞分裂が観察された(Fig. 1-8d-f)。また、分裂していない卵細胞の上部に多核体が付着している場合(Fig. 1-8g)も観察された。

胚様体の発達様式を調査するために、20 DAC から 45 DAC の胚珠を観察した。20DAC の初期段階とみられる胚様体の表面には凹凸があり、多くの核が含まれており、個々の細胞は境界は不明瞭であった(Fig. 1-9a)。発生の進んだ胚様体は表面が滑らかになり、細胞の境界が明確に識別できた(Fig. 1-9b, c)。胚様体は、はじめは球状であるが、次第に胚のうちの内部を満たすように発達しており、小さな多細胞体が付属している場合も観察された(Fig. 1-9c)。また、異なるサイズの核や細胞が混在する胚様体が存在した(Fig. 1-9d, e)。45 DAC には珠皮を破って発達した胚様体が観察され、その表面には茎頂分裂組織様の小さな細胞が密に存在する部位が形成されていた(Fig. 1-9f)。



**Fig. 1-9.** ELS development in cultured unfertilized ovules of *G. scabra* '23-613'. **a, b** 20 DAC, **c** 25 DAC, **d** 35 DAC, **e, f** 45 DAC. **a, b** ELS development on the micropyle, **c** ELS with multicellular bodies in the lower part developed from micropyle end, **d, e** ELS with a mixture of cells and nuclei of different sizes, **f** ELS developed to a size breaks integument. White arrowheads indicate multicellular bodies attached to ELS, and black arrowheads indicate areas where cell division is active. Bars **a-e** = 50  $\mu$ m, **f** = 100  $\mu$ m.

#### 4 考察

リンドウの F<sub>1</sub> 育種では、強い自殖弱勢のため親系統の安定的な維持や増殖が困難であることが課題である。それに対応するため、未受精胚珠培養が純系親作出技術として開発された(Doi et al. 2011, 2013)。しかし、培養効率には系統間差があり、また、野生種リンドウに適用可能かどうかは不明であった。今後、未受精胚珠培養をリンドウ育種に効率的に利用していくためには、野生種への適用や培養効率の向上が必要であり、さらに未受精胚珠からの胚様体発生機構の解明が重要である。

野生種リンドウ 5 節 12 種 19 系統を培養したところ、3 節 9 種 13 系統で胚様体を得られ、2 節 8 種 12 系統では再生植物体を得られた。培養効率については、*Pneumonanthe* 節の *G. parryi*、*G. pneumonanthe*、*G. septemfida* が最も高く、次いで *Cruciata* 節の *G. cruciata*、*G. dahurica*、*G. gracilipes*、*G. straminea*、*G. olivieri* が高かった。栽培種は *Pneumonanthe* 節に含まれ、それと同じ *Pneumonanthe* 節や近縁な *Cruciata* 節の種では(Yuan et al. 1996; Mishiba et al. 2009)、栽培種リンドウと同じ培養方法が適用可能であることが明らかとなった。一方、*Gentiana* 節の *G. lutea* では少数の胚様体のみが得られ、*Chonfrophyllae* 節や *Kudoa* 節の種では胚様体も得られなかった。これらの種では、培養条件の検討やほかの遺伝子型の調査が必要と考えられる。なお、蕾の発達ステージの調査で、*G. asclepiadea* でも植物体を得られていることから、全体では 10 種で胚様体を得られ、9 種で植物体を得られた。

未受精胚珠培養は、*Beta vulgaris* (Gürel et al. 2000)、*Allium cepa* (Geoffriau et al. 1997; Bohanec and Jakse 1999; Michalik et al 2000)、*Cucurbita pepo* (Shalaby 2007)では種内のさまざまな系統に適用でき、汎用性が高いことが明らかとなっており、リンドウでも同様のことが Doi et al. (2011, 2013)で報告されている。一方、種間での汎用性については、Keller (1990)が *Allium* 属の 5 種の

うち 1 種、Juðkevièienė et al. (2005)が *Allium* 属 7 種のうち 3 種で gynogenic embryo を獲得したことを報告しており、胚形成率は *A. cepa* (Edible onion)と *A. fistulosum* (Japanese leek)では高く、*A. porum* (Leek)では低かった。本研究では、*Gentiana* 属の 12 種のうち 9 種で再生植物体を獲得しており、同種系統間のみならず近縁な別種でも適用可能なことを明らかとした。

野生種リンドウにおいて、蕾を 2 つのステージ(葯も柱頭も裂開していない蕾、葯は裂開しているが柱頭は裂開していない蕾)に分けて供試したところ、葯が裂開した蕾で胚様体形成数や植物体再生数が多い傾向がみられた。Doi et al. (2011)は、栽培種(*G. scabra*、*G. triflora*)の蕾を開花前から開花後までの 6 つのステージに分けて培養し、いずれのステージでも培養可能だが、葯が裂開した後の蕾で培養効率が良いことを明らかにしており、本研究での結果と一致した。未受精胚珠培養は、一般的には雄性発生とは異なり広いステージで培養可能であるが、発達後期の胚のうを含む蕾ステージが効率的であることが多くの植物種で明らかとなっており(Mukhambetzhanov 1997; Bohanec 2009; Chen et al. 2011)、本研究もそれを支持した。

野生種リンドウの未受精胚珠培養で得られた再生植物体 101 個体の倍数性を調査したところ、再生植物体が得られた 9 種のうち、*G. olivieri* 以外の 7 種では半数体が得られており、減数分裂後の雌性配偶子から個体の発生が生じていることを示唆した。全体的な傾向としては、半数体や二倍体の割合が高く(それぞれ 32.1%、47.3%)、この結果は栽培種リンドウにおける Doi et al. (2011)の結果(半数体 31.3%、二倍体 55.9%)と一致した。一方、Pathirana et al. (2011)は半数体 58.5%、二倍体 36.9%、Doi et al. 2014 は半数体 57.9%、二倍体 34.3%と報告しており、それらと比較すると半数体が少なかった。再生植物体の倍数性は、遺伝子型や培養条件によって大きく異なることが報告されている(Keller and Korzun 1996)。本研究では、二倍体の再生植物体が純系かどうか調査していないが、Doi et al. (2011)は栽培種リンドウにおいて二倍体の再生植物体において DNA マーカ

一での純系検定を行ない、96.3%が純系であったと報告しており、今回得られた二倍体も純系と推察されるが、今後、再生植物体において DNA マーカーや自殖後代の形質調査による純系検定を行なう必要がある。

栽培種において、胚様体誘導培地のシヨ糖濃度による影響を調査したところ、胚様体発生数は一部の系統を除き、10 または 13% で高い傾向がみられた。シヨ糖は炭素源であると同時に浸透圧調節物質でもあり、半数性細胞の孢子体型発達から配偶体型発達へのリプログラミングにおいて重要な役割を持っていることが示唆されており (Murovec and Bohanec 2012)、本実験の結果でもシヨ糖濃度は胚様体発生に大きく影響していた。一方で、胚様体からの植物体再生率については、胚様体誘導時のシヨ糖濃度が低いほど高くなる傾向がみられた。高濃度のシヨ糖は、胚の発達を阻害する可能性が示唆されている (Keller and Krozun 1996)。また、小孢子培養では、過剰のシヨ糖は胚における著しいデンプン蓄積を引き起こし、植物体再生率を減少させることが報告されている (Baillie et al. 1992; Yeung et al. 1996; Ilic-Grubor et al. 1998)。胚様体発生と植物体再生の両方を考慮すると、シヨ糖 10% での胚様体誘導が適当であると考えられる。

植物体再生培地の寒天濃度 (0.8、1.2、1.6%) および硝酸銀添加 (10mg/l、7、10 日) を検討したところ、寒天濃度 1.6% の培地、または硝酸銀添加培地 (14 日間処理) で対照区と同等かそれ以上の植物体再生率となった。彭ら (1994) は、*Brassica napus* の花粉由来の不定胚において、寒天濃度 1.2–1.6% の培地がもたらす適度な水分ストレスは胚の再生率を高めるが、水分過剰では生理障害、水分不足では栄養吸収阻害により再生率が低下することを明らかにしている。高濃度の寒天培地が植物体再生に効果的であることは、*B. campestris* の子葉培養 (Zhang et al. 1998) や *B. rapa* の小孢子培養 (Takahashi et al. 2012) で報告されている。硝酸銀は、エチレンの作用阻害剤であり (Beyer 1976)、*Cucumis sativus* の子房培養 (Diao et al. 2009) や未受精胚珠培養 (Li et al. 2013)、*Cicer arietinum* の蒴培養、*Brassica* 属でのシュート再生 (Palmer 1992; Eapen and George 1997;

Akasaka-Kennedy 2005)など多くの組織培養で用いられ、効果が示されている。本研究でも、硝酸銀によるエチレンのコントロールは植物体再生の改善に効果があることが確かめられた。

栽培種リンドウでの未受精胚珠培養では、胚様体形成数に系統間差異があるが(Doi et al. 2011, 2013)、その遺伝機構に関しては不明であった。胚様体発生数の異なる *G. triflora* 4 系統を用いて胚発生形成数に関するダイアレル分析を行なった。胚様体発生数を支配する遺伝子の相加効果、優性効果に関する分散分析の結果はいずれも 1%水準で有意であり、胚様体形成には相加効果と優性効果の両方が関与していると考えられた。Miah et al. (1985)はイネの葯培養、Ou et al. (1989)はコムギの体細胞胚形成、Ono and Takahata (2000)はナタネの子葉からのシュート再生、Zhang and Takahata (2001)は *Brassica* 属の小孢子培養において、同様の結果を報告している。さらに、胚様体形成数の遺伝子作用に関してエピスタシスはなく、組合せ能力の分散分析の結果、一般および特定組合せ能力ともに有意であり、イネ(Miah et al. 198; 藺牟田ら 1991)、コムギ(Lazar et al. 1984)、トウモロコシ(Petolino and Thompson 1987)における葯培養の結果と一致した。

藺牟田ら(1991)は、対立遺伝子の一方しか持たない半数性細胞である花粉のカルス形成について、カルス形成率が花粉の遺伝子型だけで決定されるのならば、形成率は相加的効果だけに支配され、優性効果は期待できないと指摘している。しかし、イネの葯培養(Miah et al. 1985; 藺牟田ら 1991)、*Brassica* 属の小孢子培養(Zhang and Takahata 2001)、および本研究では優性効果が認められている。藺牟田ら(1991)は、イネの葯培養で優性効果がみられる原因として、カルス形成率に関する花粉間の干渉作用やカルス形成の有無に関する閾値の存在をあげている。リンドウの未受精胚珠培養においても、胚様体を形成しない胚珠が形成しやすい胚珠の胚様体発生を抑制する可能性や、胚様体形成しやすい胚珠がある一定の割合に達すると胚様体が発生する可能性が考えられる。



リンドウの未受精胚珠培養での胚様体発生数の遺伝は、不完全優性で、発生数が多い方が劣性であり、イネの葯培養におけるカルス形成率の結果と一致した (Miah et al. 1985; 藺牟田ら 1991)。一方、*Brassica* 属の小孢子胚発生は不完全優性または超優性で、発生数の多い方が優性であることが報告されている (Zhang and Takahata 2001)。培養効率の遺伝様式は、植物種や培養方法により異なることが示唆された。また、遺伝率については、広義の遺伝率は 0.995 と高いのに対し、狭義の遺伝率は 0.532 であり、選抜効果の指標である狭義の遺伝率が高くないことから、胚様体発生数の選抜効果はあまり高くないと推定される。

未受精胚珠培養における胚様体の起源細胞は不明で、発達様式の知見も少ないことから、形態学的解析を行った。培養胚珠においては、培養後 5 日目、10 日目には、培養前の胚珠と同様に卵細胞、助細胞、中央細胞とその極核、反足細胞が容易に確認できた。しかし、培養後 15 日目以降の胚のうちでは、極性を持った卵細胞以外は明確に観察できなくなり、培養中に胚のう内の細胞が退化・消失した可能性が考えられる。培養中の胚のうの退化は、クワ (Thomas 2004)、タマネギ (Musial et al. 2005) でも報告されている。培養後 15 日目以降、珠孔の直上付近で卵細胞様の細胞の核分裂や細胞分裂がみられ、卵細胞が胚様体の起源となる可能性を強く示唆した。また、分裂前の卵細胞や分裂した卵細胞様の細胞は、胚のうの珠孔の直上以外でも見られたが、これらは卵細胞の珠孔付近からの離脱や移動と考えられ、オオムギ (Ferrant and Bouharmont 1994) やタマネギ (Musial 2001) での報告と一致した。一方、核分裂した卵細胞様細胞に多細胞体が付着している場合や、分裂していない卵細胞に多核体が付着している場合も観察され、卵細胞以外の細胞が分裂する可能性が示唆された。Doi et al. (2011) は、未受精胚珠培養で低頻度ながらヘテロな個体やキメラな倍数性の再生個体が生じることを報告している。その原因として、卵細胞以外の細胞が分裂して胚様体が生じた可能性が考えられる。

珠孔の直上で生じた胚様体は、次第に細胞を明確に識別できるようになり、中

中央細胞の液胞部分を満たすように合点側に向かって発達していた。その際、まれに発達中の胚様体に別の多細胞体が発生している場合があり、胚様体の起源細胞が単一ではない可能性、または胚様体から別の胚様体が生じる可能性が示唆された。胚様体は、ほぼ同じサイズの細胞の集合体として存在する 경우가多かったが、時として異なるサイズの核や細胞が混在していた。リンドウの未受精胚珠培養では、キメラ個体や倍数体が再生する場合があることから(Doi et al. 2011, 2013, 本結果)、サイズの大きな細胞は自然倍加している可能性が考えられる。Parra-Vega et al. (2015)は、ナタネの小孢子培養で、胚発生の初期に核の融合が起こることを報告している。また、Daghma et al. (2014)はオオムギの花粉胚発生の初期段階に、倍数体のキメラが発生することを報告しており、そのメカニズムとしては、細胞質分裂を伴わない核分裂により生じた2つの娘核の融合を推察している。培養後45日目には、細胞分裂が盛んな部位が存在する大きな胚様体が観察され、この胚様体は植物体を再生する段階へ向かっていると推察される。

以上より、リンドウの未受精胚珠培養では、卵細胞が胚様体の起源となる可能性が高いと考えられる。一方、卵細胞周辺の多核体の存在や胚様体と多細胞体の共存もみられるため、胚のうを構成する卵細胞以外の細胞からの胚様体発生を否定できなかった。Doi et al. (2011)は、二倍体の再生植物体のマーカー分析により、3.7%がヘテロであったことを報告している。なお、今回の実験で観察された胚様体は、いずれも胚のう内部から生じており、珠心や珠皮からの細胞分裂はみられなかったことから、リンドウの未受精胚珠培養では、半数性細胞から植物体が再生していることが確かめられた。

## 第二章 種間交雑による遺伝的変異の拡大

## 1 序論

リンドウの育種では、1977年に最初の F<sub>1</sub> 品種である‘いわて’が開発されて以来、300を超える F<sub>1</sub> 品種や栄養系品種が開発されている(Nishihara et al. 2018)。しかし、これまでに開発された品種のほとんどは、いずれも *Pneumonanthe* 節に分類される *G. scabra* と *G. triflora*、および両種間交雑で育成されており、花や草姿などのバリエーションは限られていた。一方、*Gentiana* 属は 15 節、約 360 種からなり、花色、花型、開花期、草姿には多様性がみられる(Kohlein 1991; Ho and Liu 2001)。

花き類の育種において、種間交雑は遺伝的変異を拡大させるための主要な手段であるが(Van Tuyl and De Jeu 1997)、異なる種同士の交雑では、生殖的隔離により雑種が得られないことが多い。生殖的隔離には、柱頭上で花粉が発芽しなかったり、花粉管伸長が停止したりするなどの受精前隔離と、受精しても胚の発達が途中で停止したり雑種種子が発芽しなかったりするなどの受精後隔離がある。受精後隔離は、胚培養や胚珠培養、子房培養で胚を救済することで克服できることが明らかであり、花卉においても *Lilium* (Van Tuyl et al. 1991)、*Gypsophila* (Kishi et al. 1994)、*Alstroemeria* (De Jeu and Jacobsen 1995)、*Sandersonia* (Morgan et al. 2001)、*Chrysanthemum* (Deng et al. 2011)、*Begonia* (Chen and Mii 2012)など多くの植物種での適用例がある。また、種間交雑では、交雑方向が雑種獲得に大きく影響することが多くの植物種で知られている(香川 1957)。

リンドウにおける種間交雑については、いずれも胚珠培養を適用し、Morgan (2004)が *G. triflora* と *G. lutea* の組合せ、岩手農研セ(2006)が *G. triflora* と 3 種の野生種 (*G. acaulis*、*G. clusii*、*G. frigida*)の組合せ、玉掛ら(2014)が *G. triflora* と 5 種の野生種(*G. dahurica*、*G. tibetica*、*G. andrewsii*、*G. paradoxa*、*G. septemfida*)の組合せで個体獲得を報告している。しかし、詳細については不明な点が多く、これまでのところ、リンドウの種間交雑において胚救済法を用い

ない雑種獲得や、交雑方向による影響に関する知見はみられない。

本研究では、栽培リンドウ 2 種(*G. scabra*、*G. triflora*)と野生リンドウ 20 種を用いて種間交雑を行ない、胚珠培養および種子登熟での個体獲得を試みた。その際、種間組合せによる交雑親和性の違いや交雑方向による影響について調査した。また、種間交雑で得られた個体について、DNA マーカーによる雑種検定や形質調査を行ない、雑種性を確認した。

## 2 材料および方法

### (1) 植物材料

実験には、野生リンドウ 20 種 23 系統、栽培リンドウ 2 種 (*G. scabra*, *G. triflora*) を供試した (Table 2-1)。これらの材料のうち、*G. paradoxa* は、岩手大学農学部植物育種学研究室で保存している個体で、ビニールハウスで鉢植えとして栽培した。それ以外の種や系統は、八幡平市花き研究開発センターのガラス温室または露地圃場、岩手大学農学部の自然光型環境制御室で栽培したものを、切り花または鉢植えの状態に維持、栽培した。

### (2) 種間交雑

#### 1) 人工交配および種子発芽試験、圃場での栽培

実験には、鉢植え、または切り花の状態の母本を用いた。鉢植えは 16 時間日長、昼温 25°C、夜温 15°C の自然光型環境制御室 (コイトトロン、コイト電気株式会社)、または八幡平市花き研究開発センターのガラス温室で栽培し、切り花は自然日長、25°C の室内で維持した。なお、露地圃場で栽培していた材料を母本とする場合、昆虫による意図しない交配や風雨の影響を避けるため、切り花の状態に供試した。リンドウでは、室内での切り花による採種方法でも、十分に採種できることが報告されている (氏原ら 1973)。

人工交配を行なう数日前、供試する蕾は除雄し、交配に用いない蕾は除去した。それから数日後、開花し雌ずいの柱頭が裂開した時点で、爪楊枝や綿棒を用いて柱頭に花粉を塗布した。交配に用いた花粉は、いずれも葯が裂開する前の蕾から採取し、シリカゲルとともに -20°C、または 4°C で保存したものである。なお、人工交配は 2014 年から 2017 年に行なった。

交配後、大部分は胚珠培養に供したが、一部では培養を行わず植物体上で種子を登熟させ種子稔性を調査した。植物体上での種子登熟は、鉢植えの母本を自

**Table 2-1.** List of *Gentiana* used in interspecific hybridization

Type	Sections	Species	Cultivar / line	Distribution <sup>a</sup>
Cultivated	<i>Pneumonanthe</i>	<i>G. scabra</i>	'22-1176'	Eastern Asia
			'22-1326'	
			'15-438-1'	
			'18-424'	Northeastern Asia
			'5-131-2'	
			'7-104-1'	
Wild	<i>Calathinae</i>	<i>G. oschrenica</i>	-	Western Caucasus, Southwestern Russia
	<i>Chondrophyllae</i>	<i>G. jamesii</i>	-	Northeastern Asia
		<i>G. squarrosa</i>	-	Central, Northern and Eastern Asia
			'27-1173'	
	<i>Ciminalis</i>	<i>G. acaulis</i>	-	Alps and Carpathians southwards to Northeastern Spain, Central Italy and Central Yugoslavia
	<i>Cruciata</i>	<i>G. cruciata</i>	'27-1058'	Europe, Caucasus, Western and Northern Asia
		<i>G. dahurica</i>	'27-1059'	Central Asia
		<i>G. gracilipes</i>		China
		<i>G. olivieri</i>	'27-985'	Southern Caucasus, Western and Central Asia
		<i>G. siphonantha</i>	'25-576'	China
		<i>G. straminea</i>	-	China
		<i>G. tibetica</i>	'27-1074'	Himalayan region
		<i>G. algida</i>	'25-585'	Central, Northern and Northeastern Asia
		<i>G. lutea</i>	'27-1064'	Mountains of Central and Southern Europe, Western Asia
		<i>Microsperma</i>	<i>G. purpurea</i>	'25-566'
	<i>Kudoa</i>	<i>G. sino-ornata</i>	'27-1072'	China
		<i>G. asclepiadea</i>	-	Central Europe, Caucasus, Western Asia
	<i>Pneumonanthe</i>	<i>G. pardoxa</i>	-	Caucasus
		<i>G. parryi</i>	'27-1066'	United States
		<i>G. pneumonanthe</i>	'21-1049'	Europe, Caucasus, Central Asia
<i>G. septemfida</i>		'5-39-3'	Caucasus to Western, Central and Northern Asia	
		'7-131-1'		
			'27-1079'	

<sup>a</sup> Referred to Ho and Liu (2001).

然光型環境制御室で栽培し行なった。交配から約1ヶ月間種子を登熟させたのち、莢を収穫し、数日間乾燥させてから内部の種子を取り出した。その後、室温で5日程度乾燥させ、種子重量を測定した。乾燥後の種子は、100 ppmのGA<sub>3</sub>に48時間浸漬後、5日間乾燥させ、発芽試験まで-20℃で保存した。

種子の発芽試験は、水で湿らせたろ紙を敷いたシャーレに播種後、25℃16時間日長の人工気象器(LH-200-RD、株式会社日本医化器械製作所)で行なった。発芽率は播種から14日後に調査した。

なお、*G. scabra* '15-438-1'、*G. triflora* '5-131-1'、と *G. septemfida* '7-131-1' の組合せにおいて種子登熟で得られた種子は、128穴セルトレイに播種し、花き研究開発センターのビニールハウスで約12週間育苗後、露地圃場に定植して栽培した。

## 2) 胚珠培養

胚珠培養は、Morgan (2004)の方法を改変して行なった。交配後10-13日目の胚珠を培養に供した。植物体から採取した子房は、70%エタノールに30秒間浸漬後、Tween 20を数滴添加した有効塩素1.4%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で15分間滅菌し、その後、滅菌水で5分間ずつ3回洗浄した。滅菌した子房から、ピンセットと薬さじを用いて胚珠を取り出し、MS培地(Murashige and Skoog 1962)の無機塩類のうち多量成分(N、P、K、Ca、Mg)の濃度を1/2とした1/2MS固形培地(3%ショ糖、0.8%寒天、1 mg/l GA<sub>3</sub>、pH5.8)を分注したプラスチックシャーレにまんべんなく置床し、20℃16時間日長の人工気象器で培養した。なお、プラスチックシャーレはφ60mm×15mmのものを用い、1シャーレに置床する胚珠は1蕾分とした。胚珠から発生した実生は、約5-10mmに達した時に培養試験管(φ25mm×120mm)に分注したホルモンフリーの1/2MS固形培地(3%ショ糖、0.8%寒天、pH5.7)に移植し、20℃16時間日長で培養した。再生個体は、培養土(赤玉土：ピートモス：十和田砂=2：2：1)に植えて馴化し、八幡平市花き研究開発



センターの露地圃場で栽培した。

### (3) DNA マーカーによる雑種検定

ゲノム DNA の抽出は、改変した CTAB 法(Murray and Thompson 1980)で行なった。約 0.25 cm<sup>2</sup> の生葉をマイクロチューブに入れ、液体窒素で凍結させ、マルチビーズショッカー(MB901U、安井器械株式会社)を用いて 2,000 rpm、10 秒間の破碎を 2~3 回繰り返した。粉末状の葉が入ったマイクロチューブに、65℃ の 2×CTAB 溶液 400μl を加え、65℃ で 10 分間静置した。続いて、クロロホルム/イソアミルアルコール(24:1 v/v)400μl を加え、室温で 15 分間振盪後、12,000 rpm で 1 分間遠心した。上清を回収し、等量のイソプロパノールを加えて転倒混和後、12,000 rpm で 5 分間遠心分離して DNA を沈殿させた。沈殿した DNA は、70 % エタノールでリンスした後、15,000 rpm で 5 分間遠心し、乾燥させ、滅菌水 30μl に溶解させた。

DNA マーカーとして、フラボノイド生合成関連遺伝子 *anthocyanidin synthase (ANS)*、*flavanone 3-hydroxylase (FHT)*、転写制御因子遺伝子 *basic helix loop helix 1 (bHLH1)* のイントロンの長さの多型を用い(Shimada et al. 2009; Nakatsuka et al. 2012; 西原 私信)、それらを検出できる PCR 法のプライマーを(Table 2-2)に示した。両親間で多型を示すマーカーをスクリーニングし、交雑組合せ毎に使用可能なマーカーを明らかにした後、雑種個体を調査した。反応液の組成は、鋳型 DNA 約 60ng、dNTPs 200μM、プライマー 0.15μM、*Taq* DNA ポリメラーゼ 0.5unit で全量 20μl とした。反応には、サーマルサイクラー(TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®、タカラバイオ株式会社)を用い、最初に 94℃ 1 分の熱変性を行なった後、95℃ 20 秒の熱変性、60℃ 40 秒のアニーリング、72℃ 2 分の伸長反応を 35 回繰り返す、最後に 72℃ 5 分間の伸長反応を行なった。増幅した DNA 断片は、1.6%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV 下で観察した。

**Table 2-2.** List of primers used for identification of interspecific hybrids

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>ANS</i> intron	F TGT ATT TAC CCT GAA AGG AAA AGG
	R TCT AAA CCA AGC CCA ACA GAG AGC
<i>FHT</i> 1st intron 1	F GAT TCA TTG TTT CCA GCC ATT TGC
	R GTC ATG GAT CAC AAA ACA AGA TCA
<i>FHT</i> 1st intron 2	F TTA CAC AAA AAT AGG GTC AGT TCC
	R TCG TTA TAA ATA GAT GTG GTC CTC
<i>FHT</i> 1st intron 3	F TTG CAC CTG AAG TAG AAT TTT ACA
	R TTC TGA CAG AAC TTC AAG CAA TTT
<i>bHLHI</i> intron	F AAG GTG ATC GTT GTG AAA ATG TCT
	R GGC CGT CTA GTT TGG TGG TTG GTT

#### (4) 形質調査

親として用いた野生種や栽培種の個体、および種間交雑で得られた個体が開花したとき、葉や花の形質調査を行なった。葉については、主茎の基部から 1/2 に着生する葉の長さと幅を測定した。花については、頂部に着生する花冠の長さ(がくを含む)と、先端の直径を測定したほか、花弁の色や花弁先端の反りの程度を調査した。なお、親の形質データは、3 個体 3 サンプルの平均値であり、種間交雑で得られた個体の形質データは、1 個体の平均的な 1 サンプルの値である。

花粉稔性は、酢酸カーミン染色で染色される花粉の粒数をカウントする方法で調査した。調査数は、1 個体につき 200 粒以上とした。

### 3 結果

#### (1) 種間交雑における種子稔性と発芽試験

*G. scabra* '22-1176'を母本、野生種リンドウ 11 種 12 系統を父本として人工交配を行ない、種子の獲得を試みた(Table 2-3)。種間組合せにより、種子稔性は大きく異なった。*G. paradoxa*、*G. septemfida* '5-39-3'、'27-1079'との組合せでは多くの充実した種子が得られ、1 花あたりの種子数は 107.3–195.3 個、1 蕾あたりの種子重は 8.8–13.7mg、発芽率は 50–80%であった。一方で、*G. gracilipes*(種子量が少なく、種子重は測定不能)、*G. siphonantha* '25-576'、*G. straminea* '25-815'、*G. pneumonanthe* '21-1049'との組合せでは、種子数は 3.3–50.7 個、種子重は 0.3–4.7mg、発芽率は 5–35%であり、種子量、発芽率ともに少なかった。また、*G. jamesii*、*G. squarrosa*、*G. algida* '25-585'、*G. purpurea* '25-809'、*G. asclepiadea* との組合せでは、0.7–17.3 個とわずかに種子が得られたが、それらは発芽能力を有していなかった。さらに、*G. scabra* '15-438-1'、*G. triflora* '5-131-2'、と *G. septemfida* '7-131-1'の組合せで正逆交雑を行なった。*G. scabra* '15-438-1'と *G. septemfida* '7-131-1'との組合せでは *G. scabra* '15-438-1'を母本とした時に種子重が多く、*G. triflora* '5-131-2'と *G. septemfida* '7-131-1'との組合せでは、*G. septemfida* '7-131-1'を母本とした時に種子重が多かった。これらの交配組合せの種子については、シャーレでの発芽試験を実施していないが、いずれの組合せの種子も土に播種したところ、良好な発芽がみられた。

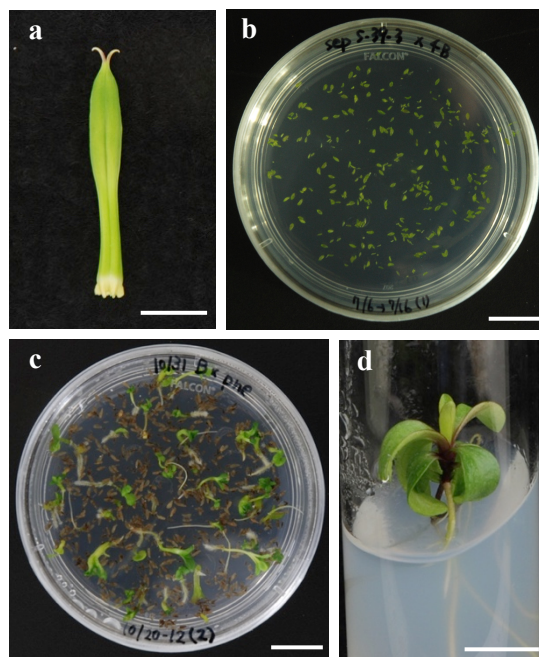
#### (2) 胚珠培養

交配から 10–13 日後、膨らんだ子房から胚珠を取り出し、培地に置床した(Fig. 2-1a, b)。置床から約 1 か月で胚は実生となり、実生を再生培地へ移植すると正常な植物体へと発達した(Fig. 2-1c, d)。胚には、正常な実生へ発達するものだけでなく、カルス状に異常増殖するものや根または葉が欠損した発達をするものも

**Table 2-3.** Seed production from seed maturation in interspecific hybridization between *G. scabra*, *G. triflora* and 11 wild species

Cross combination (♀×♂)	No. of crossed flowers	No. of seed / flower	Seed weight / flower (mg)	Germination rate (%)
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. jamesii</i>	3	0.7	-	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. squarrosa</i>	3	2.3	-	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. gracilipes</i>	3	3.3	-	10
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. siphonantha</i> '25-576'	3	16.7	0.3	5
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. straminea</i> '25-815'	3	15.7	1.2	35
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. algida</i> '25-585'	3	0.7	-	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. purpurea</i> '25-566'	3	17.3	0.7	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. asclepiadea</i>	3	10.3	0.1	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. paradoxa</i> '25-809'	3	107.3	10.0	70
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. pneumonanthe</i> '21-1049'	3	50.7	4.7	25
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. septemfida</i> '5-39-3'	3	135.3	8.8	50
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. septemfida</i> '27-1079'	3	195.3	13.7	80
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. septemfida</i> '7-131-1'	3	-	22.7	-
<i>G. septemfida</i> '7-131-1' × <i>G. scabra</i> '15-438-1'	4	-	11.1	-
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. septemfida</i> '7-131-1'	3	-	6.5	-
<i>G. septemfida</i> '7-131-1' × <i>G. triflora</i> '5-131-2'	3	-	9.6	-

"-" Indicates that the weight could not be measured due to low seed amount.



**Fig. 2-1.** Ovule culture and plant regeneration in interspecific hybridization of gentiana. **a** Swelled stigmas of *G. triflora* '18-424' × *G. gracilipes* (10 days after cross), **b** Ovule culture on 1/2MS (+GA<sub>3</sub>) solid medium of *G. septemfida* '5-39-3' × *G. triflora* '18-424', **c** Germination from ovules on medium of *G. scabra* '22-1326' × *G. pneumonanthe*, **d** Hybrid seedling of *G. scabra* '22-1326' × *G. septemfida* '5-39-3'. Bars = 1 cm.

存在した。胚珠培養で得られた実生数の調査においては、子葉と1対目の本葉が展開し発根しているものを normal seedlings、それ以外のものを abnormal seedlings として計数した。

*G. scabra* を母本、20種の野生種を父本として交雑し、胚珠培養した結果を Table 2-4 に示した。1花あたりの正常実生の獲得数は0-427.7個と組合せにより大きく異なり、*G. oschtenica*、*G. jamesii*、*G. acaulis*、*G. tibetica* ‘27-1074’、*G. algida* ‘25-585’との組合せを除く15種間組合せで正常な実生が得られた。*G. scabra* と *G. paradoxa*、*G. parryi* ‘27-1066’、*G. septemfida* ‘5-39-3’、‘7-131-1’、‘27-1079’との組合せでは1花あたりの正常実生数が94.5-427.7個と多く、正常実生の割合は76.9-99.0%だった。一方、*G. straminea*、*G. pneumonanthe* ‘21-1049’との組合せにおける1花あたりの正常実生数は9.5-21.7個とやや少なく、*G. squarrosa* ‘27-1173’、*G. cruciata* ‘27-1058’、*G. dahurica* ‘27-1059’、*G. gracilipes*、*G. olivieri* ‘27-985’、*G. siphonantha* ‘25-576’、*G. lutea* ‘27-1064’、*G. purpurea* ‘25-566’、*G. sino-ornata* ‘27-1072’、*G. asclepiadea* との組合せでは、正常実生数は0.2-2.8個と少なかった。また、1花あたりの正常実生数は同じ種間組合せでも系統間で異なり、*G. scabra* ‘22-1176’と *G. septemfida* ‘5-39-3’、‘7-131-1’、‘27-1079’との組合せでは250.5-427.7個であったが、*G. scabra* ‘22-1326’との組合せでは94.5-291.2個であった。*G. scabra* ‘22-1176’、‘22-1326’、‘15-438-1’と *G. asclepiadea* との組合せでは0-2.3個の差異がみられた。最終的には、正常実生が得られた15種間組合せのうち、10組合せで192個体の植物体が得られた。

*G. triflora* を母本、14種の野生種を父本とした交雑、および4種間での正逆交雑を行ない、胚珠培養した結果を Table 2-5 に示した。*G. triflora* を母本とした時、すべての種間組合せで正常な実生が得られ、1花あたりの正常実生数は、組合せにより0-258.7個の差異がみられた。*G. triflora* と *G. cruciata* ‘27-1058’、*G. dahurica* ‘27-1059’、*G. olivieri* ‘27-985’、*G. paradoxa*、*G. parryi* ‘27-1066’、

**Table 2-4.** Seedling and plant production from ovule culture in interspecific hybridization between *G. scabra* and 20 wild species

Cross combination (♀×♂)	No. of swollen ovaries cultured	No. of total seedlings obtained	No. of normal seedlings obtained (%)	Normal seedlings / flower <sup>a</sup>	No. of normal seedlings transplanted	No. of plants acclimated	No. of potted plants obtained
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. jamesii</i>	3	0	0 (0.0)	0 ± 0	0	0	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. squarrosa</i>	3	0	0 (0.0)	0 ± 0	0	0	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. gracilipes</i>	3	16	1 (6.3)	0.3 ± 0.3	1	1	1
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. siphonantha</i>	3	7	1 (14.3)	0.3 ± 0.3	1	0	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. straminea</i>	2	41	19 (46.3)	9.5 ± 2.5	19	3	1
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. algida</i> '25-585'	3	0	0 (0.0)	0 ± 0	0	0	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. purpurea</i>	3	4	1 (25.0)	0.3 ± 0.3	1	0	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. asclepiadea</i>	3	12	0 (0.0)	0.0 ± 0.0	0	0	0
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. pardoxa</i>	4	1137	924 (81.3)	231.0 ± 54.6	91	47	23
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. pneumonanthe</i> '21-1049'	3	56	35 (62.5)	11.7 ± 1.2	35	24	17
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. septemfida</i> '5-39-3'	2	608	501 (82.4)	250.5 ± 17.3	42	25	17
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. septemfida</i> '7-131-1'	3	1434	1283 (89.5)	427.7 ± 49.7	62	44	26
<i>G. scabra</i> '22-1176' × <i>G. septemfida</i> '27-1079'	2	896	770 (85.9)	385.0 ± 24.7	42	23	12
<i>G. scabra</i> '22-1326' × <i>G. gracilipes</i>	4	36	11 (30.6)	2.8 ± 1.6	11	4	3
<i>G. scabra</i> '22-1326' × <i>G. asclepiadea</i>	4	277	9 (3.2)	2.3 ± 0.5	9	0	0
<i>G. scabra</i> '22-1326' × <i>G. pardoxa</i>	4	1000	769 (76.9)	192.3 ± 14.6	80	40	17
<i>G. scabra</i> '22-1326' × <i>G. pneumonanthe</i> '21-1049'	3	259	65 (25.1)	21.7 ± 4.8	65	11	10
<i>G. scabra</i> '22-1326' × <i>G. septemfida</i> '5-39-3'	3	882	723 (82.0)	241.0 ± 19.7	60	20	15
<i>G. scabra</i> '22-1326' × <i>G. septemfida</i> '7-131-1'	5	1696	1456 (85.8)	291.2 ± 32.0	96	36	19
<i>G. scabra</i> '22-1326' × <i>G. septemfida</i> '27-1079'	2	232	189 (81.5)	94.5 ± 22.3	46	23	16
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. oschtenica</i>	5	0	0 (0.0)	0.0 ± 0.0	0	0	0
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. squarrosa</i> '27-1173'	6	2	2 (100.0)	0.3 ± 0.2	1	1	0
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. acaulis</i>	6	0	0 (0.0)	0.0 ± 0.0	0	0	0
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. cruciata</i> '27-1058'	6	64	17 (26.6)	2.8 ± 1.4	5	5	5
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	6	13	11 (84.6)	1.8 ± 0.4	5	5	5
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. olivieri</i> '27-985'	6	9	4 (44.4)	0.7 ± 0.4	2	2	2
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. tibetica</i> '27-1074'	6	1	0 (0.0)	0.0 ± 0.0	0	0	0
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. lutea</i> '27-1064'	6	3	2 (66.7)	0.3 ± 0.2	0	0	0
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. sino-ornata</i> '27-1072'	6	16	11 (68.8)	1.8 ± 0.8	3	3	1
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. asclepiadea</i>	6	2	1 (50.0)	0.2 ± 0.2	0	0	0
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. parryi</i> '27-1066'	6	1288	1275 (99.0)	212.5 ± 32.3	4	4	2
Total							192

<sup>a</sup> Values represent the mean ± SE.



**Table 2-5.** Seedling and plant production from ovule culture in interspecific hybridization between *G. triflora* and 14 wild species (reciprocal cross)

Cross combination (♀×♂)	No. of swollen ovaries cultured	No. of total seedlings obtained	No. of normal seedlings obtained (%)	Normal seedlings / flower <sup>a</sup>	No. of normal seedlings transplanted	No. of plants acclimated	No. of potted plants obtained
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. oschtenica</i>	5	10	8 (80.0)	1.6 ± 1.0	2	2	2
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. squarrosa</i> '27-1173'	5	0	0 (0.0)	0.0 ± 0.0	0	0	0
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. acaulis</i>	5	4	1 (25.0)	0.2 ± 0.2	0	0	0
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. cruciata</i> '27-1058'	5	463	329 (71.1)	65.8 ± 13.7	4	4	3
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	4	315	261 (82.9)	65.3 ± 7.6	5	5	4
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. olivieri</i> '27-985'	5	487	451 (92.6)	90.2 ± 23.1	2	2	2
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. tibetica</i> '27-1074'	4	4	3 (75.0)	0.8 ± 0.5	1	1	0
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. lutea</i> '27-1064'	5	6	4 (66.7)	0.8 ± 0.6	1	1	0
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. asclepiadea</i>	4	12	1 (8.3)	0.3 ± 0.3	0	0	0
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. parryi</i> '27-1066'	5	1092	1092 (100.0)	218.4 ± 23.8	4	4	4
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. oschtenica</i>	5	9	9 (100.0)	1.8 ± 0.9	5	5	5
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. squarrosa</i> '27-1173'	3	23	21 (91.3)	7.0 ± 7.0	5	5	5
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. acaulis</i>	1	1	0 (0.0)	0.0 ± 0.0	0	0	0
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. cruciata</i> '27-1058'	4	596	556 (93.3)	139.0 ± 30.6	5	5	5
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	4	174	149 (85.6)	37.3 ± 12.7	5	5	5
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. olivieri</i> '27-985'	3	61	55 (90.2)	18.3 ± 13.8	5	5	5
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. tibetica</i> '27-1074'	2	7	7 (100.0)	3.5 ± 2.5	4	4	4
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. lutea</i> '27-1064'	2	108	88 (81.5)	44.0 ± 10.0	5	5	3
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. asclepiadea</i>	3	131	68 (51.9)	22.7 ± 2.6	5	5	4
<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. parryi</i> '27-1066'	3	776	776 (100.0)	258.7 ± 39.6	5	5	5
<i>G. triflora</i> '18-424' × <i>G. gracilipes</i>	7	55	39 (70.9)	5.6 ± 2.3	29	15	12
<i>G. triflora</i> '18-424' × <i>G. asclepiadea</i>	7	163	3 (1.8)	0.4 ± 0.3	3	0	0
<i>G. triflora</i> '18-424' × <i>G. pardoxa</i>	7	137	135 (98.5)	19.3 ± 4.9	57	33	31
<i>G. triflora</i> '18-424' × <i>G. pneumonanthe</i> '21-1049'	7	545	432 (79.3)	61.7 ± 28.1	116	60	57
<i>G. triflora</i> '18-424' × <i>G. septemfida</i> '5-39-3'	2	16	15 (93.8)	7.5 ± 1.8	12	9	8
<i>G. triflora</i> '18-424' × <i>G. septemfida</i> '7-131-1'	6	133	126 (94.7)	21.0 ± 6.4	74	38	35
<i>G. triflora</i> '18-424' × <i>G. septemfida</i> '27-1079'	2	87	85 (97.7)	42.5 ± 5.3	16	11	11
<i>G. gracilipes</i> × <i>G. triflora</i> '18-424'	3	0	0 (0.0)	0.0 ± 0.0	0	0	0
<i>G. asclepiadea</i> × <i>G. triflora</i> '18-424'	3	4	0 (0.0)	0.0 ± 0.0	0	0	0
<i>G. pneumonanthe</i> '21-1049' × <i>G. triflora</i> '18-424'	3	696	685 (98.4)	228.3 ± 55.3	57	10	10
<i>G. septemfida</i> '5-39-3' × <i>G. triflora</i> '18-424'	3	17	11 (64.7)	3.7 ± 3.2	11	2	1
<i>G. septemfida</i> '27-1079' × <i>G. triflora</i> '18-424'	2	16	8 (50.0)	4.0 ± 1.0	8	1	1
Total							222

<sup>a</sup> Values represent the mean ± SE.

*G. pneumonanthe* ‘21-1049’、*G. septemfida* ‘7-131-1’、‘27-1079’との組合せでは、1花あたり 18.3–258.7 個と比較的多くの実生が得られたのに対し、*G. triflora* と *G. oschtenica*、*G. acaulis*、*G. gracilipes*、*G. tibetica* ‘27-1074’との組合せでは、0.2–5.6 個と少なかった。1花あたりの正常実生数は、同じ種間組合せでも系統間で差があり、*G. triflora* ‘18-424’と *G. septemfida* ‘5-39-3’、‘7-131-1’、‘27-1079’との組合せでは 7.5–42.5 個と変異し、*G. triflora* ‘18-424’、‘5-131-2’、‘7-104-1’と *G. asclepiadea* との組合せでは 0.3–22.7 個、*G. triflora* ‘5-131-1’、‘7-104-1’と *G. squarrosa* ‘27-1173’、*G. olivieri* ‘27-985’、*G. lutea* ‘27-1064’との組合せでは、それぞれ 0–7.0、18.3–90.2、0.8–44.0 個と差異がみられた。また、交雑方向による差異もみられた。*G. gracilipes*、*G. asclepiadea* との組合せでは、*G. triflora* を母本とした場合のみに正常な実生が得られ、*G. septemfida* ‘5-39-3’、‘27-1079’との組合せでは *G. triflora* を母本とした方が正常な実生の数が多かった。一方、*G. triflora* ‘18-424’と *G. pneumonanthe* ‘21-1049’との組合せでは、*G. pneumonanthe* を母本としたときに 3 倍以上多くの正常な実生が得られた。最終的には、正常な実生が得られた 14 組合せのうち、*G. acaulis* との組合せを除く 13 組合せで植物体を得られ、その個体数は合計で 222 個体だった。

### (3) DNA マーカーによる雑種検定

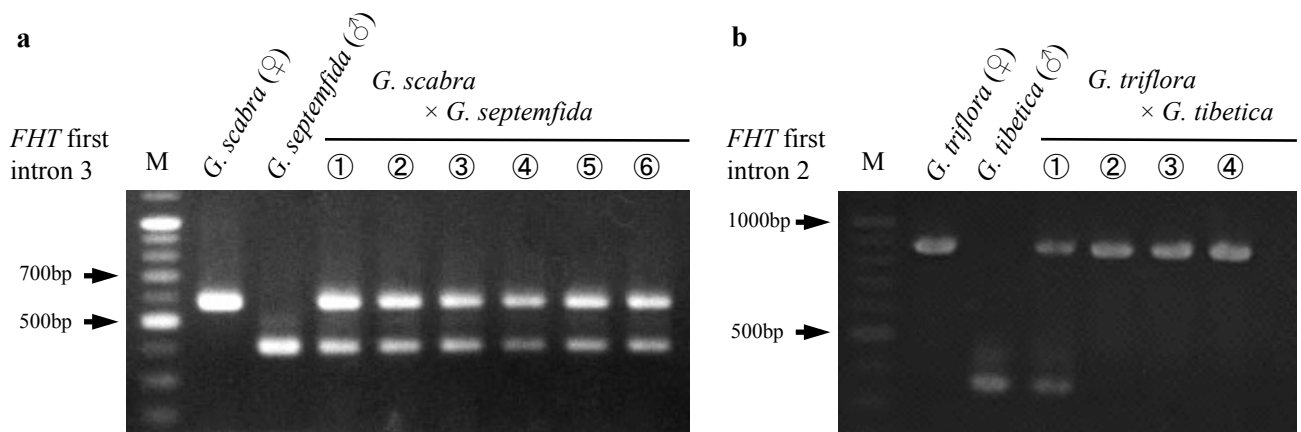
胚珠培養で得られた個体が種間雑種であるかどうかを確認するために、15 組合せからなる 82 個体について、DNA マーカーを用いた雑種検定を行なった。*G. triflora* ‘7-104-1’と *G. tibetica* ‘27-1074’の組合せを除く 14 組合せ 78 個体について、1–2 種類の DNA マーカーで調査したところ、全ての個体で両親のバンドが検出された (Table 2-6、Fig. 2-2a)。一方、*G. triflora* ‘7-104-1’と *G. tibetica* ‘27-1074’の組合せでは、3 つの DNA マーカーで調査したところ、1 個体は全ての DNA マーカーで両親のバンドが検出されたのに対し、3 個体はいずれの DNA マーカーでも母本のバンドしか検出されず (Fig. 2-2b)、これら 3 個体は種間雑種で

**Table 2-6.** Identification of interspecific hybrids using DNA marker

Maternal parents	Paternal parents					
	<i>G. dahurica</i> '27-1059'	<i>G. gracilipes</i>	<i>G. tibetica</i> '27-1074'	<i>G. paradoxa</i>	<i>G. pneumonanthe</i> '5-39-3'	<i>G. septemfida</i> '7-131-1'
<i>G. scabra</i> '22-1176'					6 / 6 (H)	6 / 6 (F3, H)
<i>G. scabra</i> '22-1326'				6 / 6 (F3, H)	6 / 6 (F3, H)	6 / 6 (F3, H)
<i>G. scabra</i> '15-438-1'	5 / 5 <sup>a</sup> (F3) <sup>b</sup>					
<i>G. triflora</i> '18-424'		6 / 6 (A)		6 / 6 (A)	4 / 4 (F3)	6 / 6 (A)
<i>G. triflora</i> '5-131-2'	4 / 4 (A)					
<i>G. triflora</i> '7-104-1'	5 / 5 (A)		1 / 4 (F1, F2, A)			

<sup>a</sup>No. of interspecific hybrids / No. of tested plants.

<sup>b</sup>DNA markers used to test for hybridity. A; *ANS* intron, F1; *FHT* first intron 3, F2; *FHT* first intron 2, F3; *FHT* first intron 3, H; *bHLLH* intron.



**Fig. 2-2.** Confirmation of hybrid plants derived from interspecific crosses using DNA marker. **a** Plants of *G. scabra* '22-1176' × *G. septemfida* '27-1079', **b** Plants of *G. triflora* '7-104-1' × *G. tibetica* '27-1074'. M: 100bp molecular maker.

はない可能性が示唆された。

#### (4) 種間交雑で得られた個体の形質調査

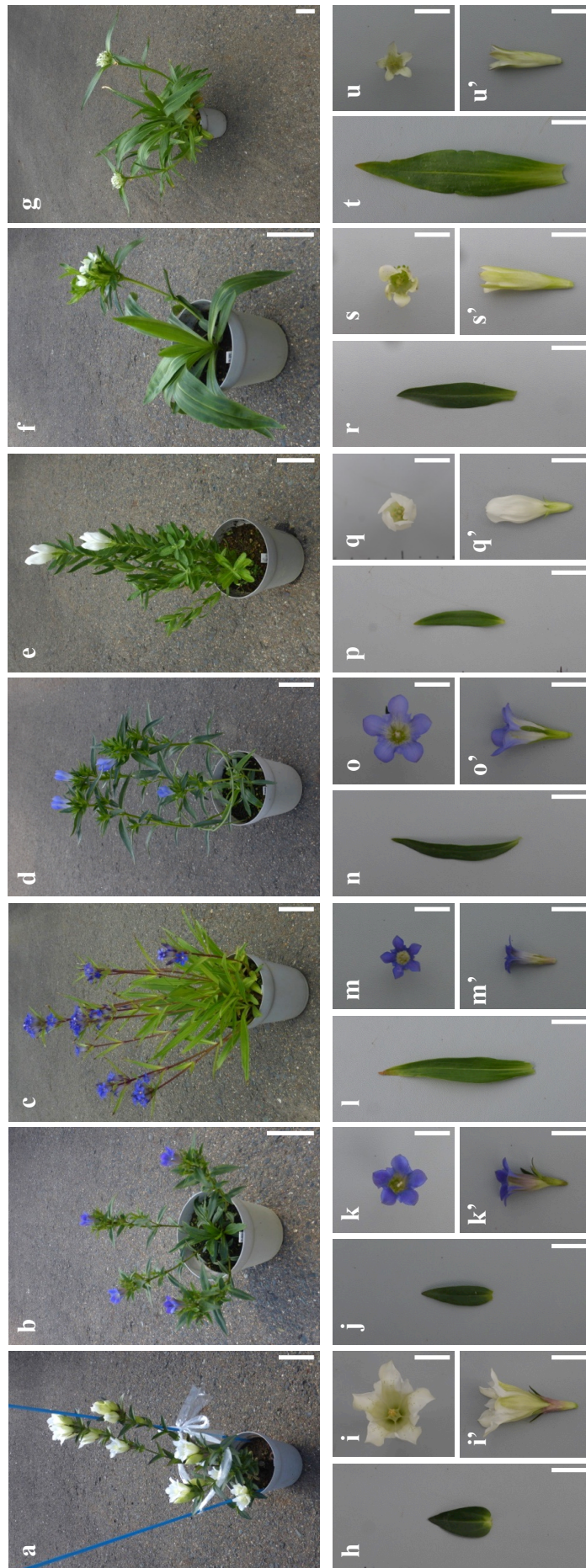
胚珠培養で得られた個体は、2018年の春に馴化し、3寸ポットで栽培した。2019年の春に、それらの個体を4寸ポットに鉢上げした。2019年の7月以降、開花した個体とその両親(同じく4寸ポットで栽培)の形質を調査した。葉の長さや幅、花の長さについては、ほとんどの雑種個体が両親の中間、またはどちらかの親に近い値を示した(Table 2-7, Fig. 2-3)。花色は、白色の栽培種(*G. scabra* '15-438-1'、*G. triflora* '7-104-1')と青色の野生種(*G. cruciata* '27-1058'、*G. dahurica* '27-1059'、*G. olivieri* '27-985')の組合せの個体では淡青色、花弁先端の反りの程度は、花弁先端が直立する栽培種(*G. triflora* '5-131-2'、'7-104-1')と外反転する野生種(*G. cruciata* '27-1058'、*G. dahurica* '27-1059'、*G. olivieri* '27-1074')の組合せの個体では、やや外反転となる場合が多く、ほとんどの個体が両親の中間の形質となっていた。一方で、花の先端の直径については、両親の中間の値である場合もみられたが、親の値を上回る個体が多く存在した。

例えば、*G. scabra* '15-438-1'(葉長 3.5cm、葉幅 1.6cm、白色花、花冠長 4.8cm、花冠直径 3.2cm、花弁先端は外反転)と *G. dahurica* '27-1059'(葉長 7.7cm、葉幅 0.9cm、青色花、花冠長 2.8cm、花冠直径 2.1cm、花弁先端は外反転)の組合せの雑種個体 29-3217 は、葉長 3.7cm、葉幅 1.0cm、淡青色花、花冠長 3.2cm、花冠直径 2.2cm であり、いずれかの親の値に近いものの、すべての調査項目で両親の範囲内の値を示した(Fig. 2-3 a-c, h-m)。 *G. triflora* '7-104-1'(葉長 5.1cm、葉幅 0.9cm、白色花、花冠長 4.5cm、花冠直径 1.1cm、花弁先端は直立)と *G. dahurica* '27-1059'の組合せの雑種個体 29-3173 は、葉長 6.9cm、葉幅 0.9cm、淡青色花、花冠長 3.6cm、花冠直径 3.1cm、花弁先端はやや外反転であり、花冠直径は両親よりも大きかったが、それ以外の調査項目の値は両親の中間だった(Fig. 2-3 c-e, l-o)。 *G. triflora* '7-104-1'と *G. tibetica* '27-1074'(葉長 10.6cm、葉幅 2.3cm、白

**Table 2-7.** Characteristics of interspecific hybrids

	Line / Cross combination (♀×♂)	Plant No.	Leaf		Flower			Pollen fertility (%)	
			Length (cm)	Width (cm)	Color	Length (cm)	Diameter (cm)		Curvature of lobes
Maternal parents	<i>G. scabra</i> '15-438-1'	-	3.5	1.6	White	4.8	3.2	Reflexed	88.9
	<i>G. triflora</i> '5-131-2'	-	5.1	1.6	Dark blue	4.3	1.7	Straight	55.3
	<i>G. triflora</i> '7-104-1'	-	5.1	0.9	White	4.5	1.1	Straight	96.4
Paternal parents	<i>G. cruciata</i> '27-1058'	-	3.8	1.7	Blue	2.3	1.8	Reflexed	58.6
	<i>G. dahurica</i> '27-1059'	-	7.7	0.9	Blue	2.8	2.1	Reflexed	96.5
	<i>G. olivieri</i> '27-985'	-	7.8	0.8	Blue	2.1	1.4	Reflexed	72.9
	<i>G. tibetica</i> '27-1074'	-	10.6	2.3	White	3.4	1.5	Slightly reflexed	86.9
Hybrids	<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	29-3215	4.7	1.2	Light blue	3.9	1.4	Reflexed	-
	<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	29-3217	3.7	1.0	Light blue	3.2	2.2	Reflexed	-
	<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. olivieri</i> '27-985'	29-3220	5.0	1.3	Light blue	3.8	3.3	Reflexed	1.0
	<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	29-3143	6.0	1.5	Blue	3.5	3.1	Slightly reflexed	1.0
	<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	29-3145	6.5	1.2	Blue	3.9	2.1	Slightly reflexed	10.9
	<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. olivieri</i> '27-985'	29-3149	5.0	1.0	Blue	3.6	1.9	Slightly reflexed	1.3
	<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. cruciata</i> '27-1058'	29-3169	4.8	1.3	Light blue	3.2	1.6	Slightly reflexed	0.0
	<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. cruciata</i> '27-1058'	29-3170	4.6	1.3	Light blue	2.6	1.9	Reflexed	-
	<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	29-3173	6.9	0.9	Light blue	3.6	3.1	Slightly reflexed	0.0
	<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. dahurica</i> '27-1059'	29-3174	6.7	1.2	Light blue	4.6	1.7	Slightly reflexed	0.0
	<i>G. triflora</i> '7-104-1' × <i>G. tibetica</i> '27-1074'	29-3202	6.1	1.5	White	4.4	1.8	Slightly reflexed	0.0

"-" indicates that pollen grains could not be observed due to rudimentary development of anthers.



**Fig. 2-3.** Characteristics of parents and interspecific hybrids. **a, h, i, i'** *G. scabra* '15-438-1' (maternal parent), **b, j, k, k'** *G. scabra* '15-438-1' × *G. dahurica* '27-1059' (No. 29-3217), **c, l, m, m'** *G. dahurica* '27-1059' (paternal parent), **d, n, o, o'** *G. triflora* '7-104-1' × *G. dahurica* '28-1059' (No. 29-3173), **e, p, q, q'** *G. triflora* '7-104-1' (maternal parent), **f, r, s, s'** *G. triflora* '7-104-1' × *G. tibetica* '27-1074' (No. 29-3202), **g, t, u, u'** *G. tibetica* '27-1074' (paternal parent). Bars in a-g = 5 cm, h-u = 2 cm.

花色、花冠長 3.4cm、花冠直径 1.5cm、花弁先端はやや外反転)の組合せの雑種個体 29-3202 は、葉長 6.1cm、葉幅 1.5cm、白花色、花冠長 4.4cm、花冠直径 1.8cm、花弁先端はやや外反転であり、花冠直径は両親よりも大きく、花弁先端の反転は父本に近かったが、その他の調査項目の値は両親の間だった(Fig. 2-3e-f, p-u)。また、花粉稔性については、親に用いた系統の稔性は 55.3-96.5%であるのに対し、種間交雑で得られた個体の稔性は 0.0-10.9 であり、著しく低かった(Table 2-7)。中には、葯が退化し、花粉粒を観察できない個体も存在した。

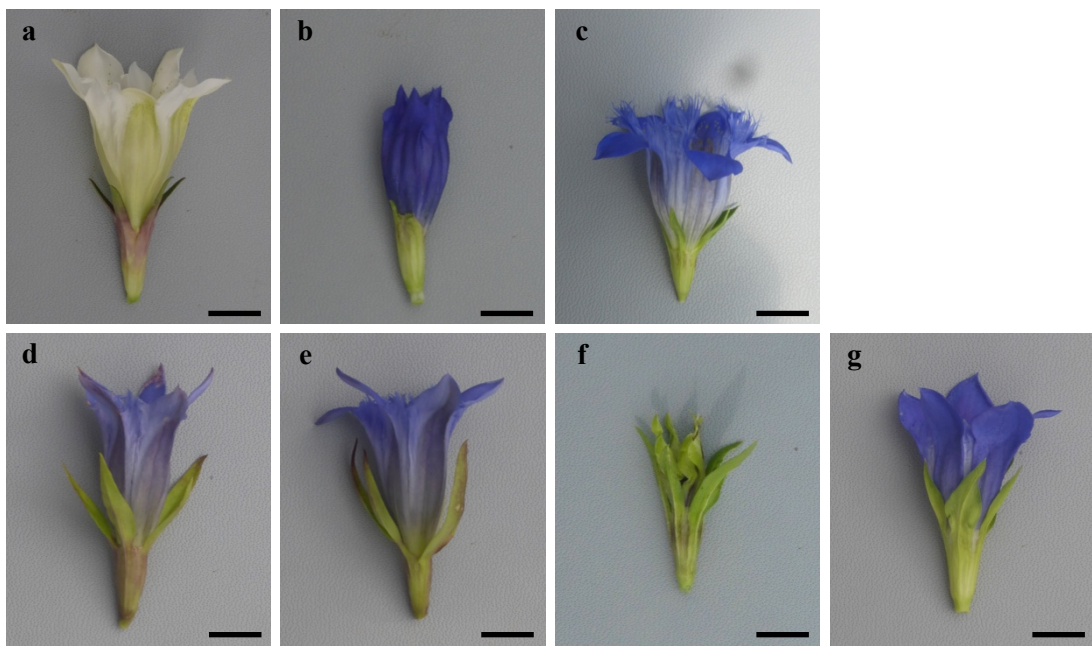
栽培種(*G. scabra* '15-438-1'、*G. triflora* '5-131-2')と野生種(*G. septemfida* '7-131-1')を用い、正逆交雑して得られた個体の形質を調査した。*G. scabra* '15-438-1'との組合せでは、花冠長や花冠直径で交雑方向による差異がみられたが、いずれの交雑方向でも花の形態は正常であり、葉長や葉幅の差異はほとんどなかった(Table 2-8、Fig. 2-4a-e)。一方、*G. triflora* '5-131-2'との組合せでは、*G. triflora* '5-131-2'を母本とした個体は、その逆交雑の個体と比べて葉長、葉幅、花冠長、花冠直径が大きかった。また、花の形態は、*G. triflora* '5-131-2'を母本とすると奇形となったのに対し、その逆交雑では正常だった(Fig. 2-4f, g)。



**Table 2-8.** Characteristics of interspecific hybrids (reciprocal cross)

Cross combination (♀×♂)	Leaf		Flower				Pollen fertility (%)	
	Length <sup>a</sup> (cm)	Width (cm)	Color	Length (cm)	Diameter (cm)	Curvature of lobes		Shape
<i>G. scabra</i> '15-438-1' × <i>G. septemfida</i> '7-131-1'	3.7	2.1	Light blue	4.3	3.1	Reflexed	Normal	1.7
<i>G. septemfida</i> '7-131-1' × <i>G. scabra</i> '15-438-1'	3.7	2.0	Light blue	3.8	3.4	Reflexed	Normal	11.1
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. septemfida</i> '7-131-1'	5.6	2.5	Blue	4.6	3.2	Slightly reflexed	Abnormal	-
<i>G. septemfida</i> '7-131-1' × <i>G. triflora</i> '5-131-2'	4.5	1.8	Green	3.4	1.2	Straight	Normal	0.0

"-" indicates that pollen grains could not be observed due to rudimentary development of anthers.



**Fig. 2-4.** Difference of flower in reciprocal crosses. **a** *G. scabra* '15-438-1' (cultivated), **b** *G. triflora* '5-131-2' (cultivated), **c** *G. septemfida* '7-131-1' (wild species), **d** *G. scabra* '15-438-1'×*G. septemfida* '7-131-1', **e** *G. septemfida* '7-131-1'×*G. scabra* '15-438-1', **f** *G. triflora* '5-131-2'×*G. septemfida* '7-131-1', **g** *G. septemfida* '7-131-1'×*G. triflora* '5-131-2'. Bars = 1 cm.

#### 4 考察

現在のリンドウ育種は、主に日本に自生する *G. scabra* と *G. triflora* の 2 種で行なわれており、品種の多様性が乏しい。新奇性ある品種の開発には種間交雑による遺伝的変異の拡大が有効だが、リンドウにおける種間交雑は、Morgan (2004)、岩手農研セ(2006)、玉掛ら(2014)以外に報告されていない。そこで、栽培種 2 種 (*G. scabra*、*G. triflora*) と 20 種の野生種を用いて種間交雑を行ない、胚珠培養による雑種の獲得を試みた。なお、一部の種間組合せにおいては、胚救済法を用いず雑種が得られるかを調査した。

*G. scabra* と 20 種の野生種を交配して胚珠培養を行なったところ、20 種間組合せのうち 15 種間組合せで正常実生が得られ、そのうち 10 種間組合せでは植物体が得られた。また、*G. triflora* と 14 種の野生種との組合せでは、胚珠培養によりすべての種間組合せで正常実生、13 種間組合せで植物体を得ることができた。栽培種との交雑で、正常実生の獲得数が特に多かったのは、栽培種と同じ *Pneumonanthe* 節に分類される *G. paradoxa*、*G. parrii*、*G. septemfida*、*G. pneumonanthe* との組合せであった。*G. triflora* と *G. paradoxa* および *G. septemfida* との組合せによる雑種獲得は、玉掛ら(2014)も報告している。また *G. triflora* と *G. pneumonanthe* との組合せについて、日影(2016)は、種間交雑が容易であると述べている。本研究の結果は、これらの知見と一致しており、また、*G. scabra* についても同様に *Pneumonanthe* 節の野生種との組合せでは交雑親和性が高いことを明らかにした。また、*Pneumonanthe* 節の種に次いで、正常実生の獲得数が多かったのは、*Cruciata* 節に含まれる *G. cruciata*、*G. dahurica*、*G. gracilipes*、*G. olivieri* との組合せだった。核リボソーム DNA の ITSs (Internal transcribed spacers) 領域や葉緑体 DNA に基づく系統発生解析により、Yuan et al. (1996) および Mishiba et al. (2009) は、*Pneumonanthe* 節と *Cruciata* 節は系統発生的に近縁であることを報告しており、本研究での交雑結果と一致した。一

方、胚珠培養を行わずに雑種が得られるかどうかについて *G. scabra* と 11 種の野生種、および *G. triflora* と 1 種の野生種を用い調査した。その結果、*Pneumonanthe* 節の *G. pneumonanthe*、*G. septemfida* との組合せでは発芽率が高い充実した種子が多く得られ、*Cruciata* 節の *G. gracilipes*、*G. siphonantha*、*G. stramiea* との組合せでは、発芽率の低い種子が少量得られた。したがって、交雑親和性は胚珠培養を行なった場合と同様の傾向であった。しかし、これらの実生では雑種検定を行なっておらず、雑種かどうかは不明であるが、栽培種と近縁な野生種との組合せであれば、胚珠培養を適用しなくても雑種個体を獲得できることが推察された。

栽培種と *Pneumonanthe* 節の野生種との組合せでは、一般に交雑親和性が高かったが、従来の分類において (Nilsson 1967; Ho and Liu 2001)、*Pneumonanthe* 節に分類されている *G. asclepiadea* との組合せでは正常実生数が少なかった (0-22.7)。一方、分子遺伝学的解析によると、*G. asclepiadea* は系統的には *Pneumonanthe* 節よりも *Gentiana* 節に近縁であることが示されている (Yuan et al. 1996; Mishiba et al. 2009)。本研究における交雑結果は、*G. asclepiadea* が *Pneumonanthe* 節には分類されないことを支持した。

*G. scabra* と *G. oschtenica*、*G. jamesii*、*G. acaulis*、*G. tibetica*、*G. algida* の組合せでは正常な実生が得られず、また、*G. triflora* と *G. oschtenica*、*G. acaulis*、*G. tibetica* との組合せでも正常な実生の獲得数は少なかった (0-3.5)。このうち、*G. tibetica* は *Pneumonanthe* 節と近縁な *Cruciata* 節の種であり、*G. jamesii* は *Pneumonanthe* 節や *Cruciata* 節と近縁な *Chondrophyllae* 節の種である (Yuan et al. 1996; Mishiba et al. 2009)。これらの組合せで交雑親和性が低かった理由の一つとしては、供試した系統の影響が考えられる。本研究ではこれらの種については 1 つの系統しか用いていない。一方で、種間交雑における生殖的隔離の程度については、用いる系統により異なることが *Dianthus* (Nimura et al. 2003) や *Brassica* (Tonosaki et al. 2013) 等の多くの作物で報告されている

(Hadley and Openshaw 1980)。したがって、同じ種であっても他の遺伝子型を用いることで、雑種が得られる可能性が考えられる。

本研究では、交雑の方向により実生の獲得程度が異なることも明らかになった。特に、*G. triflora* と *G. gracilipes* との組合せでは、*G. triflora* を母本とした交雑でのみ、雑種が得られた。交雑方向により交雑親和性が異なることは、*Brassica* (Takahata 1990)、*Alstroemeria* (De Jeu and Jacobsen 1995)、*Dianthus* (Nimura et al. 2003)、*Hibiscus* (Van Laere et al. 2007)、*Streptocarpus* (Afkhami-Sarvestani et al. 2012)、*Capsicum* (Manzur et al. 2015)のように多くの作物で報告されている。このような差異が生じる機構は不明であるが、雌蕊・花粉相互作用、花粉管ガイダンス、胚乳のゲノムインプリンティングの影響など、受精前および受精後の隔離が関与していると考えられる(Kinoshita 2007)。

胚珠培養で得られた個体の雑種性を DNA マーカーで調査したところ、15 組合せ 82 個体のうち 15 組合せ 79 個体では両親のバンドが検出され種間雑種であることを確認できたが、*G. triflora* と *G. tibetica* の組合せの 3 個体では、調査した 3 つの DNA マーカーすべてで母本由来のバンドしか検出されず、それらは偽雑種である可能性が示唆された。なお、これらの 3 個体は、開花前に枯死したため形態的に雑種かどうか判断することはできなかった。*G. scabra* では、野生種と交雑して胚珠培養したところ、母本として用いた *G. scabra* とよく似た個体を得られたことがある(日影、私信)。*Hordeum vulgare* と *H. bulbosum* との種間交雑では、*H. bulbosum* の染色体が胚発生 of の早い段階で選択的に除去されることで、半数体が生じることが知られている(Kasha and Kao 1970)。また、*Dianthus caryophyllus* と *D. japonicus* との種間交雑では、母本と非常によく似た個体を得られ、それらの DNA マーカーを調査すると母本のバンドしか検出されなかったことが報告されている(Nimura et al. 2003)。上述の 3 個体については、偽受精により生じた半数体なのか、除雄ミスで自殖が生じて得られた個体なのか不明であるため、再度交配を行なって確かめる必要がある。

種間交雑で得られた個体の形質調査では、花の先端の直径以外の葉や花の形質は、ほとんどの個体で両親の中間的であり、雑種性が確認できた。種間交雑において、両親の中間的な形質の個体が生じることは典型的であり、*Dianthus* (Nimura et al. 2003)、*Capsicum* (Yoon et al. 2006)、*Chrysanthemum* (Cheng et al. 2011)、*Streptocarpus* (Afkhami-Sarvestani et al. 2012)、*Kalanchoë* (Kuligowska et al. 2015)など多くの植物種でも報告されている。一方、花の先端の直径については、両親を上回る値となった個体が多かった。その理由としては、花筒部の直径が大きく花弁先端が展開しない *G. triflora* と、花筒部の直径が小さく花弁先端が外反転する野生種とを交雑したため、花筒部の直径は野生種よりも増大し、一方で花弁先端の外反転は中間的に維持されたためと考えられる。また、*G. septemfida* と *G. triflora* を用いた正逆交雑では、いずれの交雑方向でも胚珠培養をせずに種子が得られ、種子を播種すると植物体は正常に生育したが、*G. triflora* を母本にした個体では奇形花が生じた。したがって、*G. septemfida* のゲノムと *G. triflora* の細胞質は、不親和性を示すことが明らかとなり、遺伝的変異の拡大における正逆交雑の重要性が示唆された。また、種間交雑で得られた個体の花粉稔性は、親と比較して著しく低かった。花粉稔性が低いことは、種間雑種をそのまま品種として利用する場合には、花持ちの向上が期待されるため有利であるが、育種素材として利用する上では障害となる。今後は、稔性回復のため、得られた雑種の染色体を倍加して複二倍体を作成したり、戻し交雑を試みる必要がある。なお、効率的な複二倍体の作出については、3章で詳述する。

### 第三章 効率的な染色体倍加法の確立

## 1 序論

これまでのリンドウの品種の多くは、二倍体の *G. triflora* と *G. scabra*、およびそれらの雑種から開発されており、倍数性育種は一部でしか行なわれていなかった(日影 2016)。また、染色体倍加手法に関しては、Morgan et al. (2003)がオリザリン処理で *G. triflora* の四倍体を作成したことを報告しているが、それ以外の報告は見当たらない。一方、花き類の倍数性育種では、花の巨大化、花色の濃色化、日持ち性の向上、生理障害耐性の向上などが報告されており(Takamura and Miyajima 1996; Ketsa et al. 2001; Okazaki and Hane 2005; Kobayashi et al. 2008; Sattler 2016)、リンドウの育種においても、新たな形質の作出には、倍数性育種が有効と考えられる。また、染色体倍加手法は、種間雑種の複二倍体作出にも用いられ、雑種の稔性回復において重要な役割を果たしている(Asano 1982; Ishizaka and Uematsu 1994; Nimura et al. 2006)。

染色体倍加には、分裂細胞の紡錘糸の形成や発達を阻害する薬剤を用いるが、その中で最も古くから行なわれている手法はコルヒチンによる処理であり、1930年代に開発された(Blakeslee and Avery 1937)。現在、植物の倍数体作出では、コルヒチンが最も一般的に使われているが(Dhooghe et al. 2011)、コルヒチン処理した植物体では、生育異常や稔性低下、遺伝子突然変異の発生がみられることも報告されている(Luckett 1989; Dhooghe et al. 2011)。コルヒチン以外の有糸分裂阻害剤として代表的なものとしては、ジニトロアニリン系除草剤の一種であるオリザリンがあり(Dhooghe et al. 2011)、奇形や生育異常の発生が少ないことや(Van Tuyl et al. 1992)、低濃度で効率的に倍加個体を誘導できることが報告されている(Väinölä 2000)。これらのコルヒチンやオリザリン処理においては、濃度や期間が不十分だと倍数体を得られず、一方、過剰な処理では致死を引き起こすため、効率的に倍数体を誘導するためには、適切な濃度や期間の検討が不可欠である(Dhooghe et al. 2011)。



笑気ガスが紡錘体形成を阻害する作用を持つことは、1940年代に初めて報告された(Östergren 1944)。笑気ガスは、気体であるため組織内部に浸透しやすく、一方、圧力を下げると直ちに消散することから、処理後に組織に残留しないという利点がある(Okazaki et al. 2012)。また、笑気ガス処理したユリの小孢子母細胞の観察により、笑気ガスが微小管の重合を阻害することで染色体倍加を誘導することが明らかとなっている(Kitamura et al. 2009)。これまでに、*Crepis capillaris* (Östergren 1954)、*Triticum dicoccum* (Kihara and Tsunewaki 1960)、*Turipa* spp. (Zeilinga and Schouten 1968)、*Zea mays* (Kato and Birchler 2006)、*Lilium* spp. (佐藤 2015)では、受精後の接合子の倍加による倍数体の作出が、また、*Turipa* spp. (Okazaki et al. 2005)、*Lilium* spp. (Barba-Gonzalez et al. 2006, Akutsu et al. 2007; Nukui et al. 2011)では、花粉母細胞や葯に発達する胞原細胞に対する処理で  $2n$  花粉の作出が報告されている。特に、比較的多くの種で適用例がある接合子での笑気ガス処理についてみると、笑気ガスに対する感受性やガス処理開始適期は、種や品種・系統による差があることが明らかとなっている。さらに、キメラの発生を防ぐため、接合子が最初の有糸分裂を行なう時期にガス処理する必要があり(Kihara and Tsunewaki 1960; Okazaki et al. 2005)、交配後のガス処理時期は、効率的な倍数体誘導において極めて重要な要因の一つである。

本研究では、リンドウにおける効率的な染色体倍加手法を確立するため、コルヒチンについては処理濃度、オリザリンについては主に処理期間の検討を行なった。また、笑気ガスについては、交配後のガス処理開始時期の検討やガス処理容器のサイズ、登熟中の温度の影響について調査した。これらの実験により、効率的に四倍体を誘導できる処理方法を明らかにした。

## 2 材料および方法

### (1) 植物材料

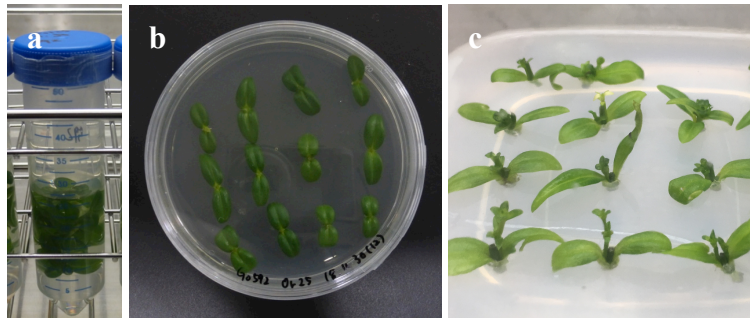
*G. triflora* 3 系統(‘5-131-2’、‘0-27-29’、‘12-87-1’)、*G. scabra* 6 系統(‘26-476’、‘15-438-1’、‘26-444’、‘27-713’、‘27-732’、‘27-735’)、*G. gracilipes* 1 系統、*G. septemfida* 1 系統の合計 4 種 11 系統を用いた。これらの材料は、八幡平市花き研究開発センターにおいて露地圃場やガラス温室で栽培したもの、および組織培養で無菌的に維持されていたものである。

### (2) コルヒチン、オリザリンによる倍加

*G. triflora*、*G. scabra* 各 2 系統を用いた。MS 培地(Murashige and Skoog, 1962)の無機塩類濃度を 1/2 にした 1/2MS 固形培地(3%ショ糖、0.8%寒天、pH5.7)で無菌的に維持されていた植物体を、1/2MS 液体培地(3%ショ糖、0.01%寒天、1mg/l GA<sub>3</sub>、pH5.5)において、20°C 16 時間日長、60rpm で振盪培養することでシュートを増殖した。得られたシュートを長さ約 1-2cm に切り出し、1/2MS 固形培地(3%ショ糖、0.8%寒天、pH5.7)に移植し、20°C 16 時間日長で継代培養して生長させた。その後、シュートを約 1cm の長さに切り出して、倍加処理に供試した。

コルヒチン処理は、シュートを 125 $\mu$ M または 250 $\mu$ M の滅菌したコルヒチン水溶液に 24 時間浸漬した(Fig. 3-1)。オリザリン処理では、シュートを 25 $\mu$ M の滅菌したオリザリン水溶液(最終濃度 1% DMSO を添加)に 24 時間浸漬した。また、オリザリン処理では水溶液処理に加えて、培地での処理を行なった。すなわち、シュートを 25 $\mu$ M オリザリンを添加した 1/2MS 固形培地(3%ショ糖、0.8%寒天、1mg/l GA<sub>3</sub>、1mg/l BAP、pH5.7) (オリザリン添加 Pr 培地) (Morgan et al. 2003 を改変)に 7 日または 14 日間置床した。

コルヒチンやオリザリン処理したシュートは、1/2MS 固形培地(3%ショ糖、0.8%寒天、1mg/l GA<sub>3</sub>、1mg/l BAP、pH5.7)(Pr 培地)に置床し、20°C 16 時間日長で培



**Fig. 3-1.** Chromosome doubling treatment by colchicine and oryzalin. **a** Immersion in colchicine solution, **b** Treatment on Pr medium (1/2MS solid medium supplemented with 1mg/l GA<sub>3</sub> and BAP) with oryzalin, **c** Shoot generation from treated shoot on Pr medium.

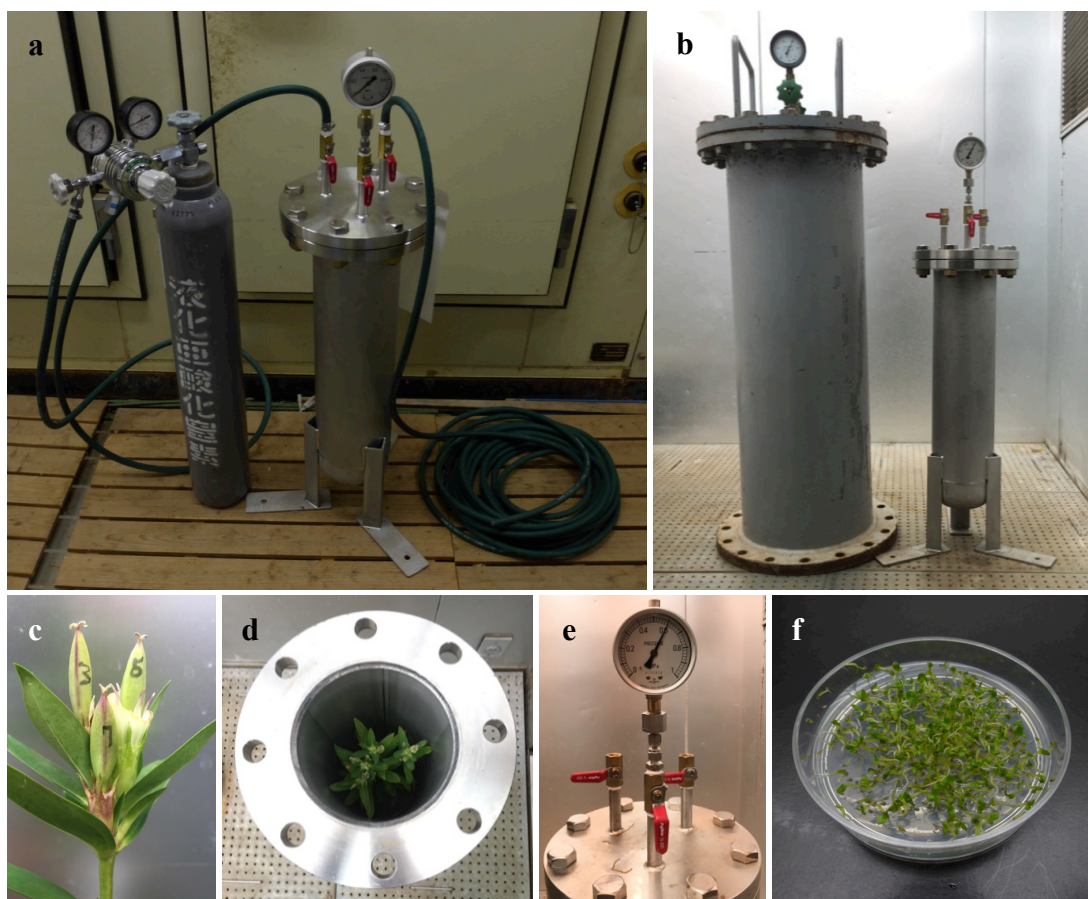
養して新たなシュートを発生させた。新たに発生したシュートは切り出し、ホルモンフリーの 1/2MS 固形培地(3%ショ糖、0.8%寒天、pH5.7)に継代した。その後、生長したシュートの葉を用い、フローサイトメーターで倍数性を調査した。

### (3) 笑気ガスによる倍加

実験には、鉢植え、または切り花の植物体を用いた。切り花の維持には、抗菌剤や無機イオン、糖類を含む水揚げ剤(美咲プロ、OAT アグリオ株式会社)を水で 100 倍希釈した溶液を使用した。笑気ガス処理は、柱頭が裂開した雌ずいに自殖または種間交雑を行ない、交配から 3、5、7 日後(3、5、7 DAP)にガス処理容器内に入れ、6 気圧の笑気ガスで 72 時間処理した(Fig. 3-2)。笑気ガス処理には、大型( $\phi 34 \times 103 \text{cm}$ ,  $93.5 \text{ cm}^3$ ,  $145 \text{ kg}$ )または小型( $\phi 16 \times 66 \text{cm}$ ,  $13.3 \text{ cm}^3$ ,  $32 \text{ kg}$ )の容器を用い、1 度の処理で容器に入れる切り花の本数は 3–6 本とした。笑気ガスによる加圧および減圧は、1 分間に 0.6 気圧のペースで 10 分間かけて行なった。なお、笑気ガス処理は、切り花を少量の上記溶液に浸した状態で行なった。ガス処理終了後の切り花は溶液に浸して維持し、交配から 11–13 日後に 2 章で述べた方法により胚珠培養を行なった。胚珠培養開始後、1 ヶ月が経過した時点で、発生した実生数を調査した。胚珠培養により得られた実生のうち本葉が 2 対以上展開した個体を無作為に選び、倍数性調査を行なった。以上を基本として、以下の条件について検討した。

#### 1) ガス処理開始時期と遺伝子型

*G. scabra* 4 系統の切り花を用いた。自殖から 3、5、7 日後に小型容器を用いて笑気ガス処理を行なった。全ての植物体は、交配から胚珠培養開始までの間、昼温 23°C、夜温 17°C、16 時間日長に設定した岩手大学の環境制御室(コイトロン、コイト電工株式会社)で維持した。



**Fig. 3-2.** Chromosome doubling treatment by nitrous oxide gas. **a** Nitrous oxide gas tank (7.5 kg, 5.2 MPa) with regulator (left), nitrous oxide gas chamber (right). **b** Nitrous oxide gas chamber, left; large chamber ( $\phi 34 \times 103$ cm, 93.5 cm<sup>3</sup>, 145 kg), right; small chamber ( $\phi 16 \times 66$ cm, 13.3 cm<sup>3</sup>, 32 kg). **c** Swelled ovaries after pollination for nitrous oxide treatment. **d** Cut flowers in nitrous oxide gas chamber before treatment. **e** The chamber contained the gas at a pressure of 600 kPa during nitrous oxide gas treatment. **f** Germination from fertilized ovule on 1/2MS (+GA<sub>3</sub>) solid medium after nitrous oxide gas treatment.

## 2) 交配からガス処理開始前までの温度

*G. triflora* '5-131-2'の鉢植えを用いた。交配からガス処理までの登熟を、八幡平市花き研究センターのガラス温室(成り行き)、および岩手大学の環境制御室(昼温 23℃、夜温 17℃、16 時間日長)の 2 区で行なった。実験期間中の気温は、温度データロガー(TR-71U、T&D Corporation)を用いて 10 分間隔で測定した。なお、笑気ガス処理は、いずれも岩手大学の環境制御室で小型容器を用いて行なった。

## 3) ガス処理容器のサイズ

*G. scabra* '27-732'の切り花を用い、岩手大学の環境制御室で行なった。前述の大型または小型の容器を用いた。また、通常は空気を含んだ状態で笑気ガス処理を行なうのに対し、容器内の空気を笑気ガスで置換した処理も行なった。交配に用いる切り花の本数は、いずれの処理条件においても 3 本とした。

## 4) 種間交雑

*G. triflora* 2 系統(鉢植え)を母本とし、*G. gracilipes* 1 系統、*G. septemfida* 1 系統を父本として種間交雑を行なったあと、交雑した植物体を鉢植えごと大型容器に入れて笑気ガスで処理した。交配から胚珠培養開始までの間、植物体は八幡平市花き研究開発センターのガラス温室で維持した。

## 5) 笑気ガス処理で得られた種間雑種の形質調査

2 章と同様の方法で行なった。

### (4) 倍数性調査

#### 1) フローサイトメトリー

1 章と同様の方法で行なった。

## 2) 染色体観察

1章と同様の方法で行なった。

### (5) DNA マーカーによる雑種検定

ゲノム抽出、PCR、電気泳動は、2章と同様の方法で行なった。PCRには、フラボノイド生合成関連遺伝子 *anthocyanidin synthase* (*ANS*)のイントロンの長さの多型を検出できるプライマー(西原、私信)を用いた。

### 3 結果

#### (1) コルヒチン、オリザリンによる倍加

*G. triflora* 2 系統(‘5-131-2’、‘0-27-29’)、*G. scabra* 2 系統(‘26-476’、‘15-438-1’)の無菌シュートを用い、コルヒチンおよびオリザリン水溶液への浸漬、あるいはオリザリン添加 1/2MS 固形培地へ置床し、倍加を試みた(Fig. 3-1a, b)。

シュートをコルヒチンやオリザリン水溶液で処理した時は、いずれの種や系統においても、無処理区と比べて新たに発生するシュートの数が減少した(Table 3-1)。減少の程度は、コルヒチン濃度の増加に応じて大きくなる傾向がみられ、無処理区と比べ 125 $\mu$ M 処理では 64.3–85.7%、250 $\mu$ M では 38.5–70.8%のシュート数であった。オリザリン処理では無処理区に対して 29.5–81.6%のシュート数となり、コルヒチンと同程度の減少がみられた系統とそれ以上の減少がみられた系統があった。倍加処理後に得られたシュートの倍数性を調査したところ、四倍体の誘導率は、*G. triflora* では、125 $\mu$ M のコルヒチン水溶液で処理した時に 27.6–30.8%と高く、*G. scabra* では、250 $\mu$ M のコルヒチン水溶液で処理した時に 22.2–25.0%と高かった(Table 3-1)。25 $\mu$ M のオリザリン水溶液での処理では、四倍体誘導率は 0–4.3%と低かった。

25 $\mu$ M のオリザリン添加 1/2MS 固形培地での処理では、すべての系統で処理期間の延長に応じてシュート発生数の減少がみられ、7 日間処理では無処理区に対して 39.1–96.6%、14 日間処理では 30.2–77.9%であった(Table 3-2)。四倍体誘導率については、*G. triflora* ‘5-131-2’では処理日数による差異は小さかったが、*G. triflora* ‘0-27-29’、*G. scabra* ‘26-476’では 14 日間処理した時に、17.9–26.3%と高かった。

一方、水溶液および培地での処理ともに倍数性キメラがみられた。コルヒチンやオリザリンの水溶液処理では、処理区によるキメラ発生率の差は系統によって異なり明確な傾向はいえなかったが(Table 3-1)、オリザリン添加培地での処理で



**Table 3-1.** Effect of antimetabolic agent on *in vitro* chromosome doubling treatment

Species (strain)	Treatment	Exposure time	No. of shoots treated	No. of shoots obtained <sup>a</sup> (% of non-treatment)	Ploidy level		Ratio of					
					No. of plants analysed	No. of plants analysed	2x	3x	4x	5x	7x	8x
<i>G. triflora</i> '5-131-2'	Water	24 h	14	3.4	5	5	0	0	0	0	0	0.0
	Colchicine (125 µM)	24 h	14	2.6 ( 77.1 )	13	3	4	6	30.8	46.2		
	Colchicine (250 µM)	24 h	14	2.4 ( 70.8 )	15	2	4	1	26.7	53.3		
	Oryzalin (25 µM)	24 h	14	1.4 ( 39.6 )	10	3	2	5	0.0	50.0		
<i>G. triflora</i> '0-27-29'	Water	24 h	36	1.4	5	5	0	0	0	0	0	0.0
	Colchicine (125 µM)	24 h	24	0.9 ( 64.3 )	29	7	6	8	1	27.6	24.1	
	Colchicine (250 µM)	24 h	36	0.7 ( 51.0 )	15	6	1	2	1	13.3	33.3	
	Oryzalin (25 µM)	24 h	36	1.1 ( 81.6 )	27	9	2	1	1	3.7	51.9	
<i>G. scabra</i> '26-476'	Water	24 h	26	3.0	4	4	0	0	0	0	0	0.0
	Colchicine (125 µM)	24 h	28	2.6 ( 85.7 )	26	12	9	4	1	15.4	3.8	
	Colchicine (250 µM)	24 h	26	1.2 ( 38.5 )	16	5	7	4	25.0	0.0		
	Oryzalin (25 µM)	24 h	26	1.7 ( 55.1 )	23	8	12	1	2	4.3	0.0	
<i>G. scabra</i> '15-438-1'	Water	24 h	10	4.0	5	5	0	0	0	0	0	0.0
	Colchicine (125 µM)	24 h	12	3.4 ( 85.4 )	14	1	1	1	12	0.0	85.7	
	Colchicine (250 µM)	24 h	8	2.5 ( 62.5 )	9	2	7	22.2	77.8			
	Oryzalin (25 µM)	24 h	11	1.2 ( 29.5 )	11	9	1	1	0.0	9.1		

<sup>a</sup>No. of shoot obtained after doubling treatment / No. of shoot treated.



は、処理期間が短い区でキメラ発生率が高かった(Table 3-2)。水溶液および培地のすべての処理区を含めて系統別にみると、*G. scabra* ‘26-476’はキメラの発生率が低く(0.0-7.1%)、*G. triflora* ‘5-131-2’、‘0-27-29’は中程度であり(8.3-53.3%)、*G. scabra* ‘15-438-1’はキメラの発生率が高かった(9.1-85.7%)。四倍体以外の倍数性では、三倍体が比較的多く発生しており、一部の種や系統では少数ではあるが五倍体、六倍体、七倍体、八倍体の発生も確認された。

## (2) 笑気ガスによる倍加

### 1) ガス処理開始時期と遺伝子型の影響

*G. triflora* 1系統(‘12-87-1’)、*G. scabra* 4系統(‘26-444’、‘27-713’、‘27-732’、‘27-735’)の切り花を用い、四倍体の誘導効率が高い笑気ガス処理開始時期と、遺伝子型の影響について調査した(Table 3-3)。

笑気ガス処理後に行なった胚珠培養で形成した1蕾あたりの実生数は、無処理区と比較してガス処理区では減少する傾向があり、その程度は7 DAP処理より3 DAP、5 DAP処理で顕著であった。特に、*G. scabra* ‘27-713’の3 DAPまたは5 DAPに処理した時に大きく、無処理区の1/5程度の実生数であった。また、*G. triflora* ‘12-87-1’の無処理区では、1蕾あたり60.0個の実生が得られたが、5 DAP処理区では22.6個であり、*G. scabra* では無処理区では41.8-204.0個の実生が得られたのに対し、3 DAP処理区では0-7.8個、5 DAP処理区では8.2-84.5個と減少した。得られた実生の倍数性を調査したところ、*G. triflora* ‘12-87-1’、*G. scabra* ‘26-444’ではすべての処理区で四倍体を得られ、そのうち5 DAPにおける四倍体誘導率が、それぞれ46.7%、100%と高かった。*G. scabra* ‘27-713’、‘27-732’、‘27-735’では、3 DAP以外の処理区で四倍体を得られ、5 DAPでの四倍体誘導率は30.8-92.9%であった。四倍体誘導率は、遺伝子型間での差異が確認されたものの、いずれの種や系統においても5 DAPで最も高かった。得られた倍数体の割合は、四倍体が最も多かったが、三倍体、五倍体、六倍体、八倍体やキメラも確認され

**Table 3-3.** Effects of timing (day after pollination) and genotype on chromosome doubling using nitrous oxide treatment

Species (strain)	Time of N <sub>2</sub> O treatment initiated	No. of flowers pollinated	No. of seedlings obtained / flower <sup>a</sup> (% of non-treatment)	Ploidy level					Ratio of 4x plants (%)	Ratio of chimeric plants (%)				
				No. of plants analysed										
<i>G. triflora</i> '12-87-1'	Non-treated	4	60.0 ± 34.6	5	5	2x	3x	4x	5x	6x	8x	chimera	0.0	0.0
	3 DAP	5	26.8 ± 11.2 ( 44.7 )	14	10	2	2	2					14.3	0.0
	5 DAP	5	22.6 ± 6.4 ( 37.7 )	15	6	2	7						46.7	0.0
	7 DAP	5	38.2 ± 30.0 ( 63.7 )	16	9	3					4		18.8	25.0
<i>G. scabra</i> '26-444'	Non-treated	8	41.8 ± 13.5	5	5	5							0.0	0.0
	3 DAP	5	7.8 ± 3.3 ( 18.7 )	10	10	4		4		1			40.0	0.0
	5 DAP	3	10.0 ± 9.0 ( 24.0 )	14	14			14					100.0	0.0
	7 DAP	2	61.5 ± 54.5 ( 147.3 )	15	3	6					6		40.0	40.0
<i>G. scabra</i> '27-713'	Non-treated	9	44.0 ± 9.2	5	5	5							0.0	0.0
	3 DAP	2	0.0 ± 0.0 ( 0.0 )	0									0.0	0.0
	5 DAP	6	8.8 ± 2.3 ( 20.1 )	13	8	1	4						30.8	0.0
	7 DAP	5	4.8 ± 1.7 ( 10.9 )	15	5	2	1	1		1	6		6.7	40.0
<i>G. scabra</i> '27-732'	Non-treated	6	204.0 ± 47.6	5	5	5							0.0	0.0
	3 DAP	2	2.0 ± 0.0 ( 1.0 )	2	1						1		0.0	50.0
	5 DAP	2	84.5 ± 27.5 ( 41.4 )	14	14			13		1			92.9	0.0
	7 DAP	2	204.0 ± 36.0 ( 100.0 )	15	5	4	1		4	1	5		26.7	33.3
<i>G. scabra</i> '27-735'	Non-treated	8	90.1 ± 17.6	4	4	4							0.0	0.0
	3 DAP	5	0.6 ± 0.6 ( 0.7 )	0									0.0	0.0
	5 DAP	5	8.2 ± 2.9 ( 9.1 )	12	3	9							75.0	0.0
	7 DAP	5	80.4 ± 17.6 ( 89.2 )	14	7	4	1	4	1	1	2		28.6	14.3

<sup>a</sup> Values represent the mean ± SE.

た。キメラ個体は、*G. scabra* ‘27-732’の 3 DAP 処理での 1 個体を除くと、7 DAP 処理でのみ発生しており、その割合は 14.3-40.0%だった。

## 2) 交配からガス処理開始前までの温度の影響

*G. triflora* ‘5-131-2’ の鉢植えを用い、交配からガス処理開始前までの温度条件による影響を環境制御室(岩手大学)とガラス温室(八幡平市花き研究開発センター)で育成した植物を用いて調査した。実験期間中の平均温度および温度範囲は、岩手大学の環境制御室では、それぞれ 22.2℃および 14.8-22.2℃、八幡平市の花き研究開発センターのガラス温室では、それぞれ 19.9℃および 13.6-31.0℃だった。胚珠培養で得られた実生の数は、どちらの温度条件でも笑気ガス処理により減少し、その程度は笑気ガス処理開始時期が早いほど大きく、無処理区と比べて 3 DAP では 8.1-9.3%、7 DAP では 32.6-67.4%の実生数であった (Table 3-4)。四倍体誘導率は、環境制御室では 3 DAP で 93.3%、5 DAP で 20.0%、ガラス温室では 3 DAP で 53.3%、5 DAP で 45.5%であり、両条件とも 7 DAP での四倍体誘導率が最も低かった (Table 3-4、Fig. 3-3)。また、キメラの発生が 7 DAP でのみ確認された。

## 3) ガス処理容器のサイズとガスの影響

*G. scabra* ‘27-732’の切り花を用い、ガス処理容器のサイズ(小型 ; 13.3cm<sup>3</sup>、大型 ; 93.5cm<sup>3</sup>)および笑気ガスで空気を置換した処理による影響を調査した (Table 3-5)。胚珠培養による実生の形成数については、どちらの容器で処理した場合でも、無処理区と比較すると、処理開始時期が早い方が 1 蕾あたりの実生の減少程度が大きく、特に 3 DAP で顕著だった。減少の程度に容器サイズによる明確な差異はみられなかった。四倍体誘導率は、小型容器では 3 DAP で 71.4%、5 DAP で 42.9%、大型容器では 3 DAP で 28.6%、5 DAP では 46.7%であり、3 DAP では小型容器で 2.5 倍高くなったが、5 DAP では容器サイズ間の差異は小さかった。

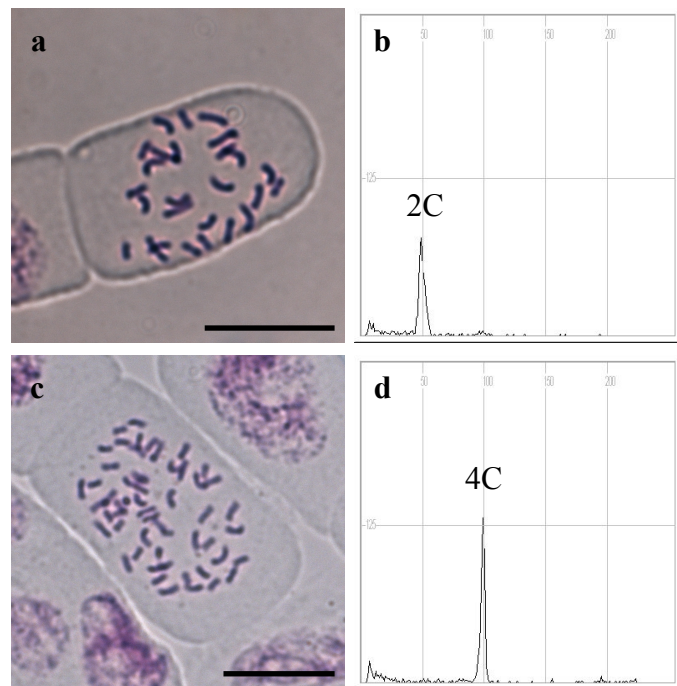
**Table 3-4.** Effect of environment of seed development on chromosome doubling using nitrous oxide treatment

Species (strain)	Seed maturation condition	Time of N <sub>2</sub> O treatment initiated	No. of flowers pollinated	No. of seedlings obtained / flower <sup>a</sup> (% of non-treatment)	Ploidy level				Ratio of chimeric plants (%)	
					2x	3x	4x chimera	4x plants (%)		
<i>G. triflora</i> '5-131-2'	Growth chamber <sup>b</sup> (Max. 27.1°C, Min. 14.8°C, Ave. 22.2°C)	Non-treated	4	114.0 ± 4.2	5	5	0.0	0.0	0.0	
		3 DAP	5	10.6 ± 2.5 ( 9.3 )	15	1	14	93.3	0.0	
		5 DAP	5	34.6 ± 8.3 ( 30.4 )	15	7	5	3	20.0	0.0
		7 DAP	5	76.8 ± 6.4 ( 67.4 )	15	7	1	7	6.7	46.7
	Green house <sup>c</sup> (Max. 31.0°C, Min. 13.6°C, Ave. 19.9°C)	Non-treated	6	100.7 ± 5.4	5	5	0.0	0.0	0.0	
		3 DAP	5	8.2 ± 3.0 ( 8.1 )	15	1	6	8	53.3	0.0
		5 DAP	5	10.6 ± 3.5 ( 10.5 )	11	3	3	5	45.5	0.0
		7 DAP	5	32.8 ± 7.1 ( 32.6 )	15	11	2	2	13.3	13.3

<sup>a</sup> Values represent the mean ± SE.

<sup>b</sup> 16 h light, 23°C for 16 h and 17°C for 8 h.

<sup>c</sup> No photoperiod and temperature controlled.



**Fig. 3-3.** Determination of ploidy level of *G. triflora* '5-131-2' seedling after treatment of nitrous oxide gas. **a, c** Chromosome counting, **b, d** Flow cytometric analysis. **a, b**  $2n = 2x = 26$  showing a diploid (Non-treated) , **c, d**  $2n = 4x = 52$  showing a tetraploid. Bars = 20  $\mu$ m.

**Table 3-5.** Effect of gas chamber size on chromosome doubling using nitrous oxide treatment

Species (strain)	Gas chamber size	Time of N <sub>2</sub> O treatment initiated	No. of flowers pollinated	No. of seedlings obtained / flower <sup>a</sup> (% of non-treatment)	Ploidy level		Ratio of						
					No. of plants analysed	2x	4x	5x	6x	chimera (%)	4x plants (%)	chimeric plants (%)	
<i>G. scabra</i>	-	Non-treated	12	215.0 ± 17.2	5	5					0.0	0.0	
'27-732'	Small	3 DAP	4	24.8 ± 7.3 ( 11.5 )	14	1	10	3			71.4	0.0	
	(φ16×66cm, 13.3cm <sup>3</sup> )	5 DAP	4	133.0 ± 27.3 ( 61.9 )	7		3	1	1		2	42.9	28.6
		7 DAP	4	173.0 ± 3.8 ( 80.5 )	15	7					8	0.0	53.3
Large		3 DAP	5	13.0 ± 5.9 ( 6.0 )	14		4	5	4			28.6	0.0
	(φ34×103cm, 93.5cm <sup>3</sup> )	5 DAP	5	142.4 ± 10.5 ( 66.2 )	15		7	2	1		5	46.7	33.3
		7 DAP	5	165.6 ± 3.7 ( 77.0 )	18	3	4	1			10	22.2	55.6
Gas replaced		5 DAP	5	0.0 ± 0.0 ( 0.0 )	0							0.0	0.0
		7 DAP	5	0.0 ± 0.0 ( 0.0 )	0							0.0	0.0

<sup>a</sup> Values represent the mean ± SE.



笑気ガスで空気を置換した処理区では、ガス処理後、植物体が著しく褐変化しており、胚珠培養を行なったが実生は得られなかった。

#### 4) 種間交雑

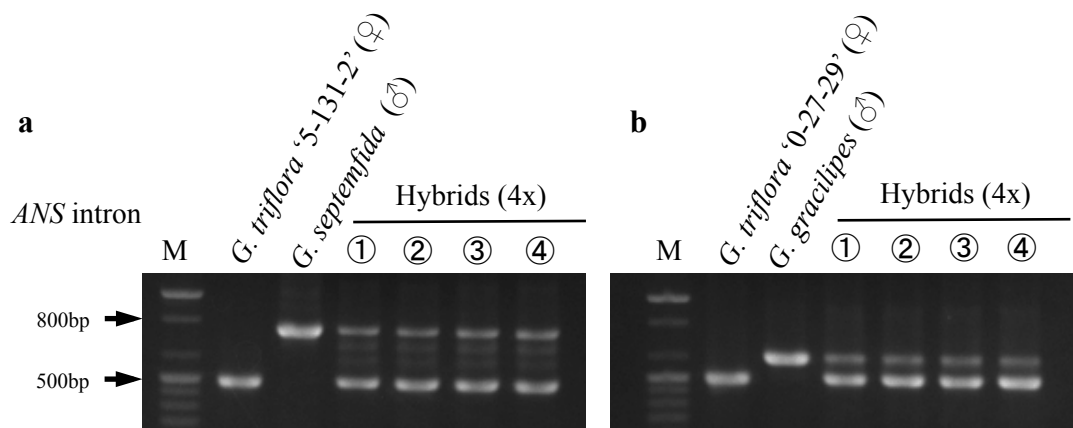
*G. triflora* ‘5-131-2’、‘0-27-29’を母本、*G. gracilipes*、*G. septemfida* ‘27-1079’を父本として種間交雑を行なった後、鉢植えで笑気ガス処理を行ない、複二倍体の種間雑種の獲得を試みた(Table 3-6)。1 蕾あたりの実生数は、*G. triflora* ‘0-27-29’×*G. gracilipes* の交配組合せを除きガス処理区で少なく、特に *G. triflora*×*G. septemfida* の組合せの 3 DAP 処理区(無処理区の 4.0-18.0%)や 5 DAP 処理区(同 7.0-17.3%)で少なかった。四倍体誘導率は *G. triflora* ‘5-131-2’×*G. gracilipes* では 5 DAP、*G. triflora* ‘5-131-2’×*G. septemfida* では 3 DAP 処理区で高く、それぞれ 28.6%、55.0%だった。*G. triflora* ‘0-27-29’との種間交雑では、いずれも 5、7 DAP 処理区で四倍体を得られ、*G. gracilipes* との組合せでは 5 DAP で 23.5%、*G. septemfida* との組合せでは 7 DAP で 55.0%の四倍体獲得率であった。*G. triflora* ‘5-131-2’×*G. septemfida* 由来の四倍体 4 個体、*G. triflora* ‘0-27-29’×*G. gracilipes* 由来の四倍体 4 個体の雑種性を DNA マーカーで調査したところ、すべての個体で両親のバンドがみられ、種間雑種であることが確認された(Fig. 3-4)。

*G. triflora* ‘0-27-29’×*G. gracilipes* の組合せで得られた複二倍体雑種の形質を調査した。*G. triflora* ‘0-27-29’(葉長 5.7cm、葉幅 1.4cm、青色花、花冠長 5.6cm、花冠直径 1.8cm、花弁先端は直立)と *G. gracilipes* (葉長 9.9cm、葉幅 1.2cm、淡青色花、花冠長 2.6cm、花冠直径 1.8cm、花弁先端は外反転)の組合せの雑種個体 29-3217 は、葉長 9.2cm、葉幅 1.6cm、淡青色花、花冠長 5.7cm、花冠直径 2.4cm であり、葉長以外の形質は、すべて両親よりも大型化していた(Fig. 3-5 a、Table 3-7)。また、花粉を酢酸カーミンで染色して観察したところ、花粉サイズは約 45  $\mu$  M と大きく(Fig. 3-5 b)、80.9%と高い稔性を示した。

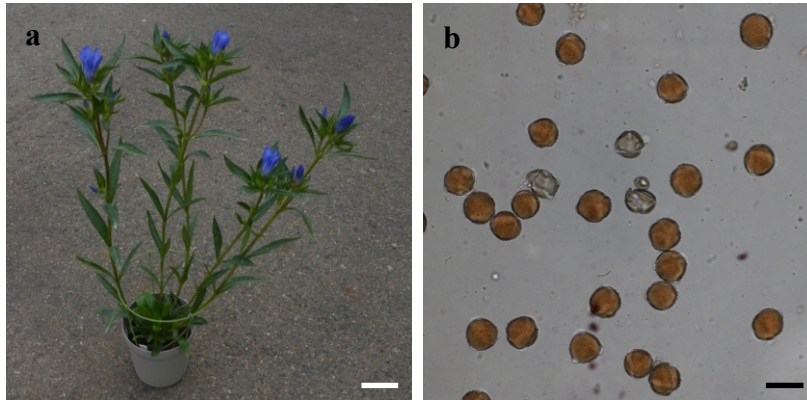
**Table 3-6.** Effects of timing (day after pollination) and genotype on chromosome doubling using nitrous oxide treatment

Cross combinations	Time of N <sub>2</sub> O treatment initiated	No. of flowers pollinated	No. of seedlings obtained / flower <sup>a</sup> (% of non-treatment)	Ploidy level		Ratio of 4x plants chimera (%)	Ratio of 4x plants chimeric plants (%)
				No. of plants analysed	2x 4x chimera		
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. gracilipes</i>	Non-treated	4	100.3 ± 11.5	10	10	0.0	0.0
	3 DAP	3	44.7 ± 14.3 ( 44.6 )	20	19 1	5.0	0.0
	5 DAP	4	5.3 ± 2.2 ( 5.2 )	7	5 2	28.6	0.0
	7 DAP	4	46.0 ± 6.2 ( 45.9 )	20	18 2	0.0	10.0
<i>G. triflora</i> '5-131-2' × <i>G. septemfida</i> '27-1079'	Non-treated	3	80.0 ± 16.0	10	10	0.0	0.0
	3 DAP	3	18.0 ± 4.5 ( 22.5 )	20	7 11 2	55.0	10.0
	5 DAP	4	17.3 ± 3.1 ( 21.6 )	20	15 5	25.0	0.0
	7 DAP	4	65.5 ± 19.7 ( 81.9 )	20	19 1	5.0	0.0
<i>G. triflora</i> '0-27-29' × <i>G. gracilipes</i>	Non-treated	3	18.3 ± 7.2	10	10	0.0	0.0
	3 DAP	3	28.3 ± 3.3 ( 154.5 )	19	19	0.0	0.0
	5 DAP	3	20.7 ± 2.7 ( 112.7 )	17	13 4	23.5	0.0
	7 DAP	2	19.0 ± 4.0 ( 103.6 )	19	15 3 1	15.8	5.3
<i>G. triflora</i> '0-27-29' × <i>G. septemfida</i> '27-1079'	Non-treated	3	72.3 ± 12.3	10	10	0.0	0.0
	3 DAP	3	4.0 ± 1.5 ( 5.5 )	3	3	0.0	0.0
	5 DAP	2	7.0 ± 1.0 ( 9.7 )	8	7 1	12.5	0.0
	7 DAP	2	39.0 ± 17.0 ( 53.9 )	20	9 11	55.0	0.0

<sup>a</sup> Values represent the mean ± SE.



**Fig. 3-4.** Analysis of genetic constitution of tetraploids derived from interspecific crosses and nitrous oxide treatment. **a** Hybrid plants of *G. triflora* '5-131-2' × *G. septemfida* '27-1079', **b** Hybrid plants of *G. triflora* '0-27-29' × *G. gracilipes*. M: 100bp molecular marker.



**Fig. 3-5.** Interspecific hybrids (amphidiploid) derived from interspecific crosses and nitrous oxide treatment (No. 28-3065). **a.** Flower of hybrid, **b.** Pollen grains stained with acetic carmine. Bars in a = 5 cm, b = 50  $\mu$ M.

**Table 3-7.** Characteristics of interspecific hybrids (amphidiploid)

Line / Cross combination (♀ × ♂)	Plant No.	Leaf		Flower			Pollen fertility (%)
		Length (cm)	Width (cm)	Color	Length (cm)	Diameter (cm)	
<i>G. triflora</i> '0-27-29'	-	5.7	1.4	Blue	5.6	1.8	93.8
<i>G. gracilipes</i>	-	9.9	1.2	Light blue	2.6	1.8	56.3
<i>G. triflora</i> '0-27-29' × <i>G. gracilipes</i>	28-3065	9.2	1.6	Light blue	5.7	2.4	80.9

#### 4 考察

現在のリンドウ品種の大部分は二倍体であり、倍数性育種は一部で民間育種家が行なっているが(日影 2016)、倍加の効率性など詳細は不明である。一方、現在まで、リンドウの倍加については Morgan et al. (2003)がオリザリンによる *G. triflora* の染色体倍加法を報告しているが、それ以外は見当たらない。効率的な染色体倍加手法の確立は、倍数体品種の育成や種間雑種の稔性回復に不可欠であり、本研究では、コルヒチン、オリザリンおよび笑気ガスの異なった化学物質を用い、効率的な倍加処理条件の検討を行なった。

倍加処理としてシュートを用い、コルヒチンやオリザリン水溶液や、オリザリンを含む固形培地で処理したところ、コルヒチンでは濃度の増加に応じて、オリザリンでは処理期間に応じて、新たに発生するシュートの数が減少する傾向がみられた。Petersen et al. (2003)は、高濃度のコルヒチンでススキのシュートを処理すると、処理後に発生するシュートの数が減少することを報告している。また、オリザリンについても、長時間の処理や高濃度での処理により、シュートの生存率が低下することがバラ属、フジウツギ属で報告されており(Kermani et al. 2003; Allum et al. 2007; Dunn and Lindstrom 2007)、本研究の結果はそれらと一致した。

コルヒチンとオリザリンの水溶液の間の比較では、四倍体誘導率はそれぞれ 15.4–30.8%、0.0–4.3%であり、コルヒチンの方が高かった。コルヒチン水溶液処理による倍加の最適濃度は、*G. triflora* では 125 $\mu$ M、*G. scabra* では 250 $\mu$ M であり、種間で差があることが示唆された。また、固形培地でのオリザリン処理では 7 日より 14 日処理が高かったが、*G. triflora* の四倍体誘導率は、14 日処理で '0-27-29' が 26.3%であるのに対し、'5-131-2' では 8.3%であり、系統間で感受性が異なることが示唆された。有糸分裂阻害剤に対する感受性の遺伝子型による差異は、ススキ、ボケ、バラでも明らかとなっている(Petersen et al. 2003; Stanys et

al. 2003; Khosravi et al. 2008)。オリザリンについては水溶液と固形培地の 2 処理行だったが、四倍体誘導率が高かったのは固形培地であり、Morgan et al. (2003)の手法の有効性が確認された。一方、水溶液での処理濃度については、データは示していないが 50 $\mu$ M での予備実験でほとんどのシュートが枯死したため、本研究では 25 $\mu$ M で処理を行なったが、今後、濃度や処理時間等を再検討する必要がある。コルヒチンとオリザリンの倍加効率については、オリザリンが効果的な場合(Väinölä 2000; Thao et al. 2003; 津田ら 2012)と、コルヒチンが効果的な場合(Petersen et al. 2003; 八幡ら 2004)があり、対象とする植物材料において比較する必要があると考えられる。

笑気ガスによる倍加処理は、交配後の接合子を標的に行なうことが多くの植物で報告されている(Östergren 1954; Kihara and Tsunewaki 1960; Zeilinga and Schouten 1968; Kato and Birchler 2006; 佐藤 2015)。この方法では、笑気ガス処理を開始する時期が極めて重要であるため、本研究では *G. triflora* 1 系統と *G. scabra* 4 系統を用い、効率的に四倍体を誘導できる時期を検討した。交配後の接合子の笑気ガス処理により、7 DAP の処理時期を除いて得られる実生の数は大きく減少した。笑気ガス処理により、トウモロコシでは無胚種子やシワのある種子の増加(Kato and Birchler 2006)、エンマーコムギでは種子重や種子の発芽率の減少(Kihara and Tsunewaki 1960)が報告されており、本研究の結果と一致した。詳細なメカニズムは不明であるが、笑気ガスにより紡錘体形成が阻害され、それにより細胞分裂が異常となり胚発達や胚乳発達が阻害されることが推察され、特に胚発生のごく初期は感受性が高いと考えられる。四倍体誘導率については、処理開始時期で顕著な差がみられ、今回供試した 2 種 5 系統では、5 DAP でのガス処理で最も効率が高く、キメラの発生も回避できることが示された。接合子の倍加では、初回あるいは 2 回目の分裂中に処理することが望ましく、アジアティックハイブリッド系ユリでは交配後 10-13 日からの処理、トウモロコシでは交配後 30-36 時間からの処理で効率的に倍数体が得られており、この時期は、受精

卵の初回、または初回から 2 回目の有糸分裂が生じる時期と一致していた(Kato and Birchler 2006; Okazaki et al. 2012)。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、5 DAP での四倍体誘導率について、30.8-100%と系統間差異がみられた。笑気ガス処理における倍加効率の系統間差異は、シンテッポウユリ(73.3-100%)(佐藤 2015)、トウモロコシ(0.5-20%)(Kato and Birchler 2006)でも報告されている。

倍加処理についてはキメラの発生頻度も考慮する必要があり、コルヒチンやオリザリンでシュート进行处理する方法では、本実験の結果も含めキメラの発生が多いことが明らかとなっている(Kermani et al. 2003; Petersen et al. 2003; Thao et al. 2003; 津田ら 2012)。笑気ガス処理でも、処理時期が遅れるとキメラが発生することが知られており(Okazaki et al. 2012)、本研究においても、7 DAP ではキメラの発生率が高かった。一方、笑気ガスで接合子进行处理する方法ではキメラの発生は比較的少ないことも報告されており(Kihara and Tsunewaki 1960; Kato and Birchler 2006)、本実験でも 7 DAP での処理を除き、キメラの発生率は極めて低かった。このことは、接合子を笑気ガスで最適時期に処理することが重要であり、また笑気ガスの利点と考えられる。

Kato and Birchler (2006)は、笑気ガスによるトウモロコシの倍加において、供試系統やガス圧、ガス処理開始時期を変えずに処理したにもかかわらず、実験毎に倍加効率に違いがみられ、その原因は受粉後の温度の違いであると推察している。そこで、受粉からガス処理までの温度条件が、倍加効率に与える影響を調査した。環境制御室(22.2°C、14.8-22.2°C)で育成したときの四倍体誘導率は、ガラス温室(19.9°C、13.6-31.0°C)で育成したときと比較して、3 DAP 処理では高く、5 DAP では低かった。この原因として、平均温度が高い環境制御室では、接合子が分裂を開始する時期が早まり、3 DAP での四倍体誘導率が高まった可能性がある。したがって、温度制御ができない条件で交配後育成する場合には、ガス処理開始時期を複数設定できるように時期をずらして交配しておくことが必要と考え



られる。

本研究では、当初の予備実験では大型容器(93.5 cm<sup>3</sup>)を用いて実験していたが、大型容器は移動や蓋の開閉、ボルト・ナットの締結にかかる労力が大きく、さらにガス使用量も多いため、なるべく小型の容器で同様の効果が得られることが望ましい。そこで、小型容器(13.3cm<sup>3</sup>)を用い、大型容器(93.5cm<sup>3</sup>)との倍加効率の差異を調査した。3 DAPでの倍加効率は小型容器の方が約40%高かったが、5 DAPでは容器サイズによる差はほとんどみられなかった。また、実生の獲得数にも差がみられなかったことから、容器サイズによる差異は小さく、小型容器でも十分に倍加個体が得られることが明らかとなった。なお、容器内の空気をガスで置換した処理では、植物体が褐変して実生が全く得られなかったことから、ガス処理時には空気が必要であることが明らかとなった。

種間雑種は一般的に稔性が極めて低く、リンドウにおいても2章で花粉稔性はほとんどないことが明らかであり、育種で利用するためには複二倍体化による稔性回復が不可欠である。そこで、種間交雑後に笑気ガス処理を行ない、迅速な複二倍体獲得を試みた。*G. triflora* 2系統と *G. gracilipes*、*G. septemfida* との組合せでは、全ての組合せで四倍体を得られ、それらの一部についてはDNAマーカーで雑種性が確認できた。さらに、*G. triflora* と *G. gracilipes* の組合せで得られた複二倍体の形質を調査したところ、葉長以外の形質は両親よりも大きく、花粉稔性が回復していることを確認できた。接合子を笑気ガスで倍加する手法は、同質倍数体の獲得のみならず異質倍数体の獲得、稔性回復にも利用できることが明らかとなった。これまでのところ、花粉母細胞や葯に発達する胞原細胞に対する笑気ガス処理での種間雑種の稔性回復は報告されているが、種間雑種の接合子に対する笑気ガス処理の適用は本研究が初めてと考えられ、今後迅速に複二倍体を得られることが期待される。

## 総合考察

リンドウは、日本における重要な花き品目のひとつであるが、栽培や育種の歴史は比較的浅い。育種は F<sub>1</sub> 育種と栄養繁殖作物に準拠した育種が行なわれているが、課題も多い。すなわち品種の多くが自生種である *G. scabra*、*G. triflora* およびそれらの雑種で育成され、品種のバリエーションが乏しいことや、自殖弱勢のため F<sub>1</sub> 育種における親系統の維持、増殖が難しいこと等である。そこで、現在までほとんど育種に利用されていない野生種を用い、F<sub>1</sub> 育種に有用な倍加半数体の作出方法である未受精胚珠培養や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。

リンドウの未受精胚珠培養は、野生種リンドウに対して適用可能かどうか不明であったが、本研究では 5 節 13 種を供試し 2 節 9 種で再生植物体を獲得した。それらの大部分は栽培種(*G. scabra*、*G. triflora*)と近縁な *Pneumonanthe* 節、*Cruciata* 節の野生種であり、これらの種には栽培種と同じ手法が適用可能であることが明らかとなった。本研究では、得られた植物体の純系検定は行なっていないが、7 種の再生植物体には半数体が含まれていることから、雌性配偶子由来の植物体が発生したことを確認できた。野生種リンドウは、栽培種リンドウと異なり遺伝的な固定はほとんど行なわれていないため、今後、野生種リンドウを用いた F<sub>1</sub> 育種に未受精胚珠培養を活用できると考えられる。

リンドウの未受精胚珠培養では、系統間差異がみられることから(Doi et al. 2011, 2013)、蕾ステージや培地条件の検討を行なった。蕾ステージについて、野生種リンドウで検討したところ、葯が裂開した蕾で効率がよい傾向がみられ、栽培リンドウでの Doi et al. (2011)の結果と一致した。培地の浸透圧に着目し、胚様体誘導培地のシヨ糖濃度を検討したところ、シヨ糖 10-13%で胚様体発生数が多く、植物体再生率はシヨ糖 7%の培地で形成した胚様体が最も高かった。胚様

体発生数と植物体再生数の両方を考慮すると、最も効率的なのはシヨ糖 10%での培養であったが、植物体再生率が特に低い系統においては、シヨ糖 7%での胚様体誘導も検討の価値があると考えられる。水分ストレスやエチレンに着目し、植物体再生培地の寒天濃度、硝酸銀添加を検討したところ、寒天濃度 1.6%の培地や硝酸銀 10mg/l 添加培地での 14 日間処理は、再生率の向上に多少の効果を示した。以上より、蒴が裂開した蕾を用いて、シヨ糖 10%で胚様体を誘導し、寒天 1.6%または硝酸銀添加培地での植物体植物体を再生させることが最善と考えられる。一方、培養効率が低い系統に対しては、今後のさらなる検証検討が必要である。

リンドウの未受精胚珠培養では、胚様体発生機構の詳細は不明のままである。胚様体発生能の遺伝様式を解明するため、胚様体発生能が異なる *G. triflora* 4 系統を用い片側ダイアレル分析を行なったところ、培養効率が低い形質が優性であること、不完全優性であること、広義の遺伝率は 0.995 と高いが、狭義の遺伝率は 0.532 と高くないため、選抜による固定効果はあまり高くないと推定された。難培養系統の培養効率を改善するためには、できるだけ培養効率が高く、一般組合せ能力が高い系統を探索して用いる必要があると考えられる。また、培養胚珠の形態観察を行なったところ、珠孔付近で分裂する卵細胞様の細胞がみられ、加えて卵細胞以外の細胞の核分裂もみられたことから、卵細胞が胚様体の起源となるが、卵細胞以外も起源となる可能性が示唆された。卵細胞と助細胞は隣合わせに存在しており、切片での観察には限界があることから、胚様体発生機構のさらに詳細な解明のためには、胚珠を透明化して非破壊的に観察する必要があると考えられる。

リンドウの種間交雑は、Morgan (2004)、岩手農研セ(2006)、玉掛ら(2014)以外には行なわれておらず、交雑親和性や効率的な種間雑種の獲得方法が不明であった。*G. scabra* と野生種 15 種、*G. triflora* と野生種 14 種の組合せで種間交雑を行ない、胚珠培養により正常な実生が得られ、中でも栽培種と同じ *Pneumonanthe* 節の野生種や *Pneumonanthe* 節と近縁な *Cruciata* 節の野生種と

の組合せでは交雑親和性が高かった。また、一部の種間組合せで、胚救済を行わずに種子を登熟させて、種子の発芽率を調査したが、*Pneumonanthe* 節の野生種と栽培種との組合せでは発芽率が高かった。したがって、*Pneumonanthe* 節同士の種間交雑では、胚救済の必要性は低く、種間雑種の F<sub>1</sub> 品種の育成も容易であると推察される。一方、胚珠培養を行なっても *G. purpurea*(*Microsperma* 節)、*G. lutea*(*Gentiana* 節)などの組合せでは正常実生をほとんど得ることができなかったが、これらの野生種は、栽培種(*G. scabra*、*G. triflora*)にはない花色を有しており、遺伝資源として重要である。雑種の獲得には系統間差異や胚と胚乳の相互作用等いくつかの要因が考えられることから、今後、多数の系統を用いたり倍数体の利用を試みる必要があり、さらには、細胞融合による体細胞雑種の作出も検討する必要がある。

種間交雑で得られた個体の形質を調査したところ、多くの個体において葉や花の形態は両親の中間的であった。これまでの栽培種にはないタイプの草姿を持つ個体を得られ、また、花粉稔性は著しく低いため、受粉が起こらず鑑賞期間が長かった。不稔性であることは、種間交雑で得られた個体を F<sub>1</sub> 品種または栄養系品種として直接用いる際には、花持ちの向上につながり有利だと考えられる。一方、F<sub>2</sub> 世代を展開したり、他の系統と交雑する場合、不稔性であることは障害となるため、複二倍体化による稔性回復が必要である。

リンドウの育種では、一部の民間育種家の例を除き、倍数性育種はほとんど行なわれていなかった(日影 2016)。組織培養での倍加処理として、コルヒチン、オリザリンの処理条件を検討したところ、オリザリンの最適処理条件は明らかにできなかったが、コルヒチンでは *G. scabra* は 250  $\mu$  M 水溶液、*G. triflora* は 125  $\mu$  M 水溶液で 24 時間処理することで、倍加効率が高いことを明らかにした。組織培養での倍加は、無菌植物の作成から始まり時間と労力を要するが、未受精胚珠培養で得られた半数体や胚珠培養で得られた種間雑種など、培養植物がある場合には有利である。一方、笑気ガスを用いた方法を検討したところ、多くの系統

において 5 DAP からの笑気ガス処理で倍加効率が高く、倍数性キメラの発生も極めて少ないことが明らかとなった。接合子の笑気ガス処理での倍加は、供試材料が胚発生を行なうことが前提となるが、固定系統や純系からの同質四倍数体の作出や迅速な複二倍体種間雑種の作出に活用できると考えられる。複二倍体の作出については、*G. triflora* と *G. gracilipes* との交雑後に笑気ガス処理をすることで、稔性がある個体を獲得できた。なお、笑気ガス処理では、6 気圧のガスを封入できる頑丈な耐圧容器が必要なところが欠点ではあるが、倍加効率に容器サイズの影響は小さく、小型の容器でも倍加が行なえることも明らかにした。

未受精胚珠培養、種間交雑、染色体倍加において本研究が明らかにした知見は、リンドウ育種における基盤となり、特に野生種リンドウを用いた遺伝的変異の拡大と、効率的な新品種の育成に寄与することが期待される。

## 摘要

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)以降の培養胚珠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 花あたりの実生数は、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的特性を持ち、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 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。



## 謝辞

本研究の遂行にあたり、岩手大学名誉教授高畑義人博士、農学部准教授畠山勝徳博士には、終始、懇切なご指導、ご鞭撻を賜った。弘前大学農学生命科学部准教授赤田辰治博士ならびに山形大学農学部准教授笹沼恒男博士には、論文校閲の労を賜った。八幡平市長田村正彦氏には、岩手大学大学院連合農学研究科への社会人入学、職務と研究の両立をご理解いただき、格別の配慮を賜った。八幡平市花き研究開発センター所長日影孝志博士、高橋亮氏、阿部潤氏、一般社団法人安代リンドウ開発事務局長北口輝男氏には、実験材料の選定、栽培、分譲において多大なるご協力を賜った。新潟大学農学部教授岡崎桂一博士には、笑気ガス処理による染色体倍加にあたり多大なご協力とご助言を賜った。岩手生物工学研究センター園芸資源研究部部長西原昌宏博士には、DNA マーカーを用いた雑種検定にあたり有益なご助言を賜った。土井寿子博士には、未受精胚珠培養法やパラフィン切片作成法について懇切丁寧なご指導を賜った。塚崎素子氏には、実験全般の遂行にあたり多大なご協力を賜った。以上の皆様に対して、ここに深謝の意を表す。最後に、本研究の円滑な遂行にご協力いただいた岩手大学農学部植物育種学研究室の各位にも、感謝の意を表す。

## 引用文献

- Abdollahi MR, Rashidi S (2018) Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 133:39–49.
- Afkhami-Sarvestani R, Serek M, Winkelmann T (2012) Interspecific crosses within the *Streptocarpus* subgenus *Streptocarpella* and intergeneric crosses between *Streptocarpella* and *Saintpaulia ionantha* genotypes. *Sci Hortic* 148:215–222.
- Akasaka-Kennedy Y, Yoshida H, Takahata Y (2005) Efficient plant regeneration from leaves of rapeseed (*Brassica napus* L.): the influence of AgNO<sub>3</sub> and genotype. *Plant Cell Rep* 24:649–654.
- Akutsu M, Kitamura S, Toda R, Miyajima I, Okazaki K (2007) Production of  $2n$  pollen of Asiatic hybrid lilies by nitrous oxide treatment. *Euphytica* 155:143–152.
- Allum JF, Bringloe DH, Roberts AV (2007) Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of in vitro nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Rep* 26:1977–1984.
- Anderson NO (2007) Chrysanthemum (*Dendranthema* × *grandiflora* Tzvelv.). In: Anderson NO (ed) Flower breeding and genetics. Springer, Dordrecht, pp.389–437.
- Asano Y (1982) Overcoming interspecific hybrid sterility in *Lilium*. *J Japan Soc Hort Sci* 51:75–81.
- Baillie AMR, Epp DJ, Hutcheson D, Keller WA (1992) In vitro culture of

- isolated microspores and regeneration of plants in *Brassica campestris*. Plant Cell Rep 11:234–237.
- Barba-Gonzalez R, Miller CT, Ramanna MS, Van Tuyl JM (2006) Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) induces 2n gametes in sterile F<sub>1</sub> hybrids between Oriental × Asiatic lily (*Lilium*) hybrids and leads to intergenomic recombination. Euphytica 148:303–309.
- Beyer EM Jr (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. Plant Physiol 58:268–271.
- Blakeslee A, Avery A (1937) Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. J Hered 28:393–411.
- Bohanec B (2009) Doubled haploid via gynogenesis. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM (eds) Advances in haploid production in higher plants. Springer, Berlin, pp.35-46.
- Bohanec B, M. Jakše (1999) Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. Plant Cell Rep18:737-742.
- Chen JF, Cui L, Malik AA, Mbira KG (2011) In vitro haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. Plant Cell Tissue Organ Cult 104:311-319.
- Chen YM, Mii M. 2012. Intersectional hybrids obtained from reciprocal crosses between *Begonia semperflorens* (section *Begonia*) and *B.* ‘Orange Rubra’ (section *Gaerdita* × section *Pritzelia*). Breed Sci 62:113-123.
- Cheng X, Chen SM, Chen FD, Deng YM, Fang WM, Tang FP, Liu ZL, Shao W (2011) Creating novel chrysanthemum germplasm via interspecific hybridization and backcrossing. Euphytica 177:45–53.
- Daghma DES, Hensel G, Rutten T, Melzer M, Kumlehn J (2014) Cellular dynamics during early barley pollen embryogenesis revealed by

- time-lapse imaging. *Front Plant Sci* 5:675.
- De Jeu MJ, Jacobsen E (1995) Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria* L. and barriers to interspecific hybridization. *Euphytica* 86:15–23.
- Deng Y, Chen S, Chen F, Cheng X, Zhang F (2011) The embryo rescue derived intergeneric hybrid between chrysanthemum and *Ajania przewalskii* shows enhanced cold tolerance. *Plant Cell Rep* 30:2177–2186.
- Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L, Van Huylenbroeck J (2011) Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 104:359–373.
- Diao WP, Jia YY, Song H, Zhang XQ, Lou QF, Chen JF (2009) Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Sci Hortic* 119:246–251.
- Doi H, Takahashi R, Hikage T, Takahata Y (2010) Embryogenesis and doubled haploid production from anther culture in gentian (*Gentiana triflora*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 102:27–33
- 土井寿子 (2011) リンドウの倍加半数体作出に関する遺伝育種学的研究. 岩手大学大学院連合農学研究科博士論文.
- Doi H, Yukoi S, Hikage T, Nishihara M, Tsutsumi K, Takahata Y (2011) Gynogenesis in gentians (*Gentiana triflora*, *G. scabra*): production of haploids and doubled haploids. *Plant Cell Rep* 30:1099-1106.
- Doi H, Hoshi N, Yamada E, Yokoi S, Nishihara M, Hikage T, Takahata Y (2013) Efficient haploid and doubled haploid production from unfertilized ovule culture of gentians (*Gentiana* spp.). *Breed Sci* 63:400-406.
- Dunn BL, Lindstrom JT (2007) Oryzalin-induced chromosome doubling in

- Buddleja* to facilitate interspecific hybridization. Hortscience 42:1326–1328.
- Dunwell JM (2010) Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotech J 8:377-424.
- Eapen S, George L (1997) Plant regeneration from peduncle segments of oil seed *Brassica* species: influence of silver nitrate and silver thiosulfate. Plant Cell Tiss Organ Cult 51:229–232.
- Ferrant V, Bouharmont J (1994) Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. Sex Plant Reprod 7:12-16.
- Forster BP, Heberle-Bors E, Kasha KJ, Touraev A (2007) The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci 12:368-375.
- 藤原一道 (1994) リンドウ育成品種の品種特性. 岩手園試研報 7:125-132.
- Geoffriau E, Kahane R, Rancillac M (1997) Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica 94:37-44.
- Griffing, JB (1956) A generalised treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. Heredity 10:31–50.
- Gurel S, Gurel E, Kaya Z (2000) Doubled haploid plant production from unpollinated ovules of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Rep 19:1155–1159.
- Hadley HH, Openshaw SJ (1980) Interspecific and intergeneric hybridization. In: Fehr WR, Hadley HH (eds) Hybridization of Crop Plants. Agron Inc, Wisconsin, pp133–159.
- Hayman BI (1954) The theory and analysis of diallel crosses. Genetics 39:789–809.
- Hikage T, Saitoh Y, Tanaka-Saito C, Hagami H, Satou F, Shimotai Y, Nakano Y, Takahashi M, Takahata Y, Tsutsumi K (2007) Structure and

allele-specific expression variation of novel  $\alpha/\beta$  hydrolase fold proteins in gentian plants. *Mol Genet Genomics* 278: 95-104

日影孝志 (2016) リンドウ. 柴田道夫編. 花の品種改良の日本史. 悠書館, 東京, pp.109-126.

日影孝志 (2013) リンドウが国際的な花卉品目になる日を夢見て. 育種学研究 15:36-39.

Ho TN, Liu SW (2001) A worldwide monograph of *Gentiana*. Science Press, Beijing, China. p.694

Ilic-Grubor K, Attree SM, Fowke LC (1998) Induction of microspore-derived embryos of *Brassica napus* L. with polyethyleneglycol (PEG) as osmoticum in a low sucrose medium. *Plant Cell Rep* 17:329-333.

藺牟田泉, 菊池文雄, 生井兵治, 鶴飼保雄(1991) イネ蒴培養によるカルス形成率のダイアレル分析. 育種学雑誌 41:153-162.

Ishizaka H, Uematsu J (1994) Amphidiploids between *Cyclamen persicum* Mill. and *C. hederifolium* Aiton induced through colchicine treatment of ovules in vitro. *Breed Sci* 44:161-166.

岩手県農業研究センター農産部応用生物工学研究室 (2006) 岩手県りんどう系統と海外種の胚珠培養による種間雑種作出法の開発. 平成 18 年岩手県農業研究センター試験研究成果書.

岩手県農業研究センター農産部応用生物工学研究室 (2010) 未受精胚珠培養はリンドウの倍数性育種母本作出に利用可能. 平成 22 年度岩手県農業研究センター試験研究成果書.

Jones RM (1965) Analysis of variance of the half diallel table. *Heredity* 20:117-121.

Juðkevièienė D, Stanys V, Bobinas È (2005) Gynogenesis peculiarities of *Allium* L. vegetables grown in Lithuania. *Biologija* 3:6-9.

- 香川冬夫 (1957) 種・属間交雑による作物育種学. 産業図書, 東京, p.555.
- Kasha KJ, Kao KN (1970) High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225:874–876.
- Kato A, Birchler JA (2006) Induction of tetraploid derivatives of maize inbred lines by nitrous oxide gas treatment. *J Hered* 97:39–44.
- Keller ERJ, Korzun L (1996) Ovary and ovule culture for haploid production. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In vitro* haploid production in higher plants, vol 1. Kluwer, Dordrecht, pp.217–235.
- Keller J (1990) Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 47:241–247.
- Kermani MJ, Sarasan V, Roberts AV, Yokoya K, Wentworth J, Sieber VK (2003) Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability. *Theor Appl Genet* 107:1195–1200.
- Ketsa S, Uthairatanakiji A, Prayurawong A (2001) Senescence of diploid and tetraploid cut inflorescences of *Dendrobium* ‘Caesar’. *Sci Hortic* 91:133–141.
- Khosravi P, Kermani MJ, Nematzadeh GA, Bihamta MR, Yokoya K (2008) Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. *Euphytica* 160:267–275.
- Kihara H, Tsunewaki K (1960) Production of polyploid wheat by nitrous oxide. *Proc Jpn Acad* 36:658–668 .
- Kinoshita T (2007) Reproductive barrier and genomic imprinting in the endosperm of flowering plants. *Genes Genet Syst* 82:177–186.
- Kishi F, Kagami Y, Shinohara M, Hatano S, Tsurushima H 1994. Production of an interspecific hybrid in *Gypsophila* by ovule-embryo culture.

- Euphytica 74:85–90.
- Kitamura S, Akutsu M, Okazaki K (2009) Mechanisms of action of nitrous oxide gas applied as a polyploidizing agent during meiosis in lilies. *Sex Plant Reprod* 22:9–14.
- Kobayashi N, Yamashita S, Ohta K, Hosoki T (2008) Morphological characteristics and their inheritance in colchicine-induced *Salvia* polyploids. *J Japan Soc Hort Sci* 77:186–191.
- Kohlein F (1991) *Gentians*. Timber Press, Portland, p.183.
- Kuligowska K, Lütken H, Christensen B, Müller R (2015) Quantitative and qualitative characterization of novel features of *Kalanchoë* interspecific hybrids. *Euphytica* 205:927–940.
- Lazar MD, Baenziger PS, Schaeffer GW (1984) Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther cultures. *Theor Appl Genet* 68:131–134.
- Li JW, Si SW, Cheng JY, Li JX, Liu JQ (2013) Thidiazuron and silver nitrate enhanced gynogenesis of unfertilized ovule cultures of *Cucumis sativus*. *Biol Plant* 57:164–168.
- Lim KB, Van Tuyl JM (2007) Lily: *Lilium* hybrids. In: Anderson NO (ed) *Flower breeding and genetics*. Springer, Dordrecht, pp.517–537.
- Luckett D (1989) Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton. *Euphytica* 42:177–182.
- Maluszynski M, Kasha KJ, Szarejko I (2003) Published doubled haploid protocols in plant species. In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plants A Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht / Boston / London, pp 309-335.
- Manzur JP, Fita A, Prohens J, Rodríguez-Burruezo A (2015) Successful wide



- hybridization and introgression breeding in a diverse set of common peppers (*Capsicum annuum*) using different cultivated Ají (*C. baccatum*) accessions as donor parents. PLoS One. 10:e0144142.
- Mather K, Jinks JL (1971) Biometrical genetics: The study of continuous variation. Chapman and Hall, London. 2nd Edition
- Miah MAA, Earle ED, Kush GS (1985) Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. Theor Appl Genet 70:113–116.
- Michalik B, Adamus A, Nowak E (2000) Gynogenesis in Polish onion cultivars. J Plant Physiol 156:211-216.
- Mishiba K, Yamane K, Nakatsuka T, Nakano Y, Yamamura S, Abe J, Kawamura H, Takahata Y, Nishihara M (2009) Genetic relationships in the genus *Gentiana* based on chloroplast DNA sequence data and nuclear DNA content. Breed Sci 59:119–127.
- Morgan ER (2004) Use of *in ovulo* embryo culture to produce interspecific hybrids between *Gentiana triflora* and *Gentiana lutea*. NZ J Crop Hort Sci 32:343–347.
- Morgan ER, Burge GK, Seelye JF, Grant JE, Warren AGF, Brundell D (2001) Wide crosses in the Colchicaceae: *Sandersonia aurantiaca* (Hook.) × *Littonia modesta* (Hook). Euphytica 121:343-348.
- Morgan ER, Hofmann BL, Grant JE (2003) Production of tetraploid *Gentiana triflora* var. *japonica* ‘Royal Blue’ plants. NZ J Crop Hort Sci 31:65–68.
- Mukhambetzhonov SK (1997) Culture of nonfertilized female gametophytes in vitro. Plant Cell Tissue Organ Cult 48:111-119.
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497.
- Murovec J, Bohanec B (2012) Haploids and doubled haploids in plant breeding.

- In: Abdurakhmonov DI (ed) Plant breeding. In Tech Rijeka, Croacia, pp.87–106.
- Murray MG and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321–4325.
- Musial K, Bohanec B, Jakse M, Przywara L (2005) The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs in vitro and gynogenesis induction in relation to flower size. *In vitro Cell Dev Biol - Plant* 41:446-452.
- Musial K, Bohanec B, Przywara L (2001) Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Sex Plant Reprod* 13:335-341.
- Nakatsuka T, Yamada E, Saito M, Hikage T, Ushiku Y, Nishihara M (2012) Construction of the first genetic linkage map of Japanese gentian (Gentianaceae). *BMC Genomics* 13:672
- Nilsson S. (1967) Pollen morphological studies in the Gentianaceae -Gentianinae. *Grana Palynol* 7:46-145.
- Nimura M, Kato J, Horaguchi H, Mii M, Sakai K, Katoh T (2006) Induction of fertile amphidiploids by artificial chromosome-doubling in interspecific hybrid between *Dianthus caryophyllus* L. and *D. japonicus* Thunb. *Breed Sci* 56:303–310.
- Nimura M, Kato J, Mii M, Morioka K (2003) Unilateral compatibility and genotypic differences in crossability in interspecific hybridization between *Dianthus caryophyllus* L. and *Dianthus japonicus* Thunb. *Theor Appl Genet* 106:1164–1170.
- Nishihara M, Tasaki K, Sasaki N, Takahashi H (2018) Development of basic technologies for improvement of breeding and cultivation of Japanese gentian. *Breed Sci.* 68:14–24.
- 農林水産省 (2002) 都道府県別の栽培農家数、作付(収穫)面積及び出荷量 (1)切り

- 花類 オ リ ん ど う . 農 林 水 産 省 平 成 14 年 産 花 き 生 産 出 荷 統 計 .  
農 林 水 産 省 (2018) 平 成 30 年 産 都 道 府 県 別 の 作 付 (収 穫)面 積 及 び 出 荷 量 (1)切 り  
花 類 オ リ ン ド ウ . 農 林 水 産 省 平 成 30 年 産 花 き 生 産 出 荷 統 計 .
- Nukui S, Kitamura S, Hioki T, Ootsuka H, Miyoshi K (2011) N<sub>2</sub>O induces mitotic polyploidization in anther somatic cells and restores fertility in sterile interspecific hybrid lilies. *Breed Sci* 61:327–337.
- Okazaki K, Hane Y (2005) Comparison of diploid and chimeric forms (4×/2×) of Asiatic hybrid lilies (*Lilium* spp.) under natural and early forcing culture. *NZ J Crop Horticult Sci* 33:261–267.
- Okazaki K, Kurimoto K, Miyajima I, Enami A, Mizuochi H, Matsumoto Y, Ohya H (2005) Induction of 2n pollen in tulips by arresting the meiotic process with nitrous oxide gas. *Euphytica* 143:101–114.
- Okazaki K, Nukui S, Ootuka H (2012) Application of nitrous oxide gas as a polyploidizing agent in tulip and lily breeding. *Floricult Ornament Biotechnol* 6:39–43.
- Ono Y, Takahata Y (2000) Genetic analysis of shoot regeneration from cotyledonary explants in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 100:895–898
- Östergren G (1944) Colchicine mitosis, chromosome contraction, narcosis and protein chain folding. *Hereditas* 30:429-467.
- Östergren G (1954) Polyploids and aneuploids of *Crepis capillaris* produced by treatment with nitrous oxide. *Genetica* 24:54-64.
- Ou G, Wang WC, Nguyen HT, 1989. Inheritance of somatic embryogenesis and organ regeneration from immature embryo cultures of winter wheat. *Theor Appl Genet* 78:137–142.
- Palmer EE (1992) Enhanced shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Rep* 11:541–545.

- Parra-Vega V, Corral-Martinez P, Rivas-Sendra A, Segui-Simarro JM (2015) Induction of embryogenesis in *Brassica napus* microspores produces a callosic subintinal layer and abnormal cell walls with altered levels of callose and cellulose. *Front Plant Sci* 6:1018.
- Pathirana R, Frew T, Hedderley D, Timmerman-Vaughan G, Morgan ER (2011) Haploid and doubled haploid plants from developing male and female gametes of *Gentiana triflora*. *Plant Cell Rep* 30:1055-1065.
- 彭 少華, 高畑義人, 原 道宏, 庄野浩資, 伊藤 實 (1994) 西洋ナタネ(*Brassica napus*)の花粉由来不定胚を用いての植物再生におけるマトリックポテンシャルの影響. *植物工場学会誌* 6:8-14.
- Petersen KK, Hagberg P, Kristiansen K (2003) Colchicine and oryzalin mediated chromosome doubling in different genotypes of *Miscanthus sinensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 73:137–146.
- Petolino JF, Thompson SA (1987) Genetic analysis of anther culture response in maize. *Theor Appl Genet* 174:284–286.
- 斎藤 清 (1969) 花の育種. 誠文堂新光社, 東京, p.407.
- 佐藤孝夫 (2015) 交配後の笑気ガス処理による四倍体シンテッポウユリの作出. 秋田県農業試験場研究報告 第 55 号
- Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* 243:281–296
- Shalaby TA (2007) Factors affecting haploid induction through in vitro gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). *Sci Hortic* 115:1-6.
- Shimada N, Nakatsuka T, Nakano Y, Kakizaki Y, Abe Y, Hikage T, Nishihara M (2009) Identification of gentian cultivars using SCAR markers based on intron-length polymorphisms of flavonoid biosynthetic genes. *Sci Hortic* 119:292–296.

- 清水健美, 邑田 仁, 中山昌明 (1997) リンドウ科 朝日百科 世界の植物 3 種子植物 双子葉類 3. 八尋洲東, 朝日新聞社, 東京, pp.34-44.
- Stanys V, Weckman A, Staniene G, Duchovskis P (2006) In vitro induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 84:263–268.
- Takahashi Y, Yokoi S, Takahata Y (2012) Effects of genotypes and culture conditions on microspore embryogenesis and plant regeneration in several subspecies of *Brassica rapa* L. *Plant Biotechnol Rep* 6:297–304.
- 高橋寿一 (1997) リンドウの高付加価値を創出するための品種開発. 東北農業研究別号 10: 65-73.
- Takahata Y (1990) Production of intergeneric hybrids between a C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species *Moricandia arvensis* and a C<sub>3</sub> species *Brassica oleracea* through ovary culture. *Euphytica* 46:259–264.
- Takahata Y, Keller WA (1991) High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci* 74:235-242.
- Takamura T, Miyajima I (1996) Colchicine induced tetraploids in yellow-flowered cyclamens and their characteristics. *Scientia Horticulturae* 65:305-312.
- 玉掛秀人, 伊藤盟, 森正敏 (2014) リンドウの胚珠培養法による種間雑種の作出. 北海道立総合研究機構農試集報 98:33-42.
- Thao N, Ureshino K, Miyajima I, Ozaki Y, Okubo H (2003) Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 72:19–25.
- Thomas TD (2004) Embryological observation on unpollinated ovary culture of mulberry (*Morus alba* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*

46:87-94.

Tonosaki K, Michiba K, Bang SW, Kitashiba H, Kaneko Y, Nishio T (2013) Genetic analysis of hybrid seed formation ability of *Brassica rapa* in intergeneric crossings with *Raphanus sativus*. *Theor Appl Genet* 126:837–846.

津田浩利, 小島祥子, 鉄村琢哉, 小松春喜, 國武久登 (2012) オリザリンおよびコルヒチン処理によるスノキ属植物における倍数体の作出. *園学研* 11:205-212.

鵜飼保雄 (1989) 量的形質のダイアレル分析のためのパソコン用プログラム DIALL の作成. *育雑* 39:107–109.

氏原暉男, 俣野敏子, 村田孝志 (1973) 栽培リンドウ (*Gentiana*) の受粉様式ならびに採種法に関する研究. *信州大学農学部紀要* 10:115-123.

Väinölä A (2000) Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica* 112:239–244.

Van Laere K, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E (2007) Interspecific hybridization between *Hibiscus syriacus*, *Hibiscus sinosyriacus* and *Hibiscus paramutabilis*. *Euphytica* 155:271–283.

Van Tuyl J, Meijer H, Van Diën M (1992) The use of oryzalin as an alternative for colchicine in vitro chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *Acta Hort* 325:625–630.

Van Tuyl JM, De Jeu MJ (1997) Methods for overcoming interspecific crossing barriers. In: Shivanna K-R, Sawhney V-K (eds) *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 273–293

Van Tuyl JM, Lim K (2003) Interspecific hybridisation and polyploidisation as tools in ornamental plant breeding. *Acta Horticulturae* 612:13–22.

- Van Tuyl, JM, Van Diën MP, Van Creij MGM, Van KleinweeTCM, Franken J, Bino RJ (1991) Application of in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. *Plant Sci* 74:115–126.
- 八幡昌紀, 柏原夕希子, 黒木宏憲, 國武久登, 小松春喜 (2004) ニンポウキンカン種子へのコルヒチンおよびオリザリン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響. *園学研* 3:11–16.
- Yeung EC, Rahman MH, Thorpe TA (1996) Comparative development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv. Topas. I. Histodifferentiation. *Int J Plant Sci* 157:27–39.
- 横田洋之 (2006) 「安代りんどう」輸出の現状. 21世紀政策研究所 <http://www.21ppi.org/pdf/thesis/060824.pdf/>.
- Yoon JB, Yang DC, Do JW, Park HG (2006) Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *Capsicum baccatum* for introgression of anthracnose resistance. *Breed Sci* 56:31–38.
- 吉池貞蔵 (1992) 花専科 育種と栽培 リンドウ. 誠文堂新光社, 東京, p177.
- 吉池貞蔵, 横山 温 (1984) リンドウの育種に関する研究 第2報 一代雑種の利用. *岩手園試研報* 5:109-116.
- Yuan YM, Küpfer P (1995) Molecular phylogenetics of the subtribe *Gentianinae* (*Gentianaceae*) inferred from the sequences of internal transcribed spacers 5ITS of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst Evol* 196:207–226.
- Zeilinga AE, Schouten HP (1968) Polyploidy in garden tulips. II. Polyploidy in Garden tulips. II. The production of tetraploids. *Euphytica* 17:303–310.
- Zhang FL, Takahata Y (2001) Inheritance of microspore embryogenic ability

in *Brassica* crops. Theor Appl Genet 103:254–258

Zhang FL, Takahata Y, Xu JB (1998) Medium and genotype factors influencing shoot regeneration from cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). Plant Cell Rep 17:780–786.

Zhou C, Yang H, Tian H, Liu Z, Yan H (1986) In vitro culture of unpollinated ovaries in *Oryza sativa* L. In: Hu H, Yang H (eds) Haploids of higher plants in vitro. Springer, Berlin, pp.167-181.

Zlesak D (2007) Rose: *Rosa* × *hybrida*. In: Anderson NO (ed) Flower breeding and genetics. Springer, Dordrecht, pp.695–740.