

リンドウ育種における組織培養と
系統解析に関する基礎研究

2001

提 出 先
岩手大学大学院
混合農学研究科

城 守 寛

①

リンドウ育種における組織培養と
系統解析に関する基礎研究

2001

提 出 先

岩手大学大学院
連合農学研究科

城 守 寛

論文目次

第1章 緒論	- 1 -
第2章 リンドウ科園芸植物の組織培養系の確立	- 8 -
第1節 リンドウの再分化系の確立	
第2節 リンドウの不定胚形成の組織学的観察	
第3節 エキザカムの再分化系の確立	
第3章 リンドウ属植物のプロトプラスト培養系の確立	- 51 -
第4章 分子生物学的手法によるリンドウ属植物の系統解析	- 78 -
第1節 <i>G. scabra</i> と <i>G. triflora</i> のRAPD法およびSCAR マーカーによる系統識別	
第2節 葉緑体のPS-ID配列を用いたリンドウ科植物の分子系統解析	
第5章 結言	- 108 -
摘 要	- 113 -
謝 辞	- 117 -
引用文献	- 118 -

第1章 緒 論

第1章 緒論

リンドウ (*Gentiana* spp.) は、独特の花色 (青, 青紫など) から切り花として夏から秋にかけて利用されることが多く, お盆などの日本の風習にとって重要であるだけでなく, 最近ではフラワーアレンジメントの素材としても利用されている。日本では, 生花あるいは鉢物として用いられることが多いが, ヨーロッパでは, ロックガーデンや花壇の植え込みなどとして用いられている。

栽培は, 昭和30年 (1955) ころ長野県で始まり, はじめは, 県内および北海道の自生株を栽培し, 切り花として販売していた (吉池 1992)。その後, 実生からの栽培法の確立, 交配による品種改良などが行われ, 現在に至っている。栽培地域は, 長野県, 岩手県, 福島県および山形県など冷涼な地域が中心であるが, 鳥取県, 島根県および栃木県などでも栽培が行なわれている。これら栽培されているリンドウの大部分の用途は, 切り花用であり, ササリンドウ (*G. scabra*) (図1-1A) およびエゾリンドウ (*G. triflora*) (図1-1B) の野生種からの改良種が使われている。平成6年 (1994) の全国のリンドウの栽培面積は648haとなっている。一方, 鉢物として利用されるリンドウもあり, そのほとんどが山採りのリンドウであるが, 一部, 品種改良も行われている。

岩手県では, リンドウが切り花生産の主力品目としての地位を確立している。その生産は岩手県北部の安代町を中心に, 雫石町, 石鳥谷町, 湯田町, 衣川村および沢内村などで行われ, 昭和60年 (1984) には先進地である長野県を抜いて生産量, 生産額, 栽培面積とも日本一となっている。特に, 販売額では本県の花きの70%をリンドウが占め, その額は約2億9千万円である (岩手県農政部 2000)。

観賞用花きとしてのリンドウの価値は高いが, 従来は, 薬用として用いられてきた。リンドウは, 生薬名を竜胆といい, 苦味健胃剤として, 漢方では, 「肝



図1-1 リンドウ属の植物体

A : *G. scabra*

B : *G. triflora*

胆の火を瀉し、下焦の湿熱を除く」とされ、神農本草経には、「骨間の寒熱、驚癇、邪気を主治し、絶傷を續き、五臓を定め、虫毒を殺す」と記されている。主に根が使われ、その成分は、ゲンチアニン (gentianine)、ゲンチオピクリン (gentiopicrin) などが含まれている。その効用は、健胃の他、リウマチ、膀胱炎、歯肉炎などの消炎とされている。またヨーロッパ産の *G. lutea* の根は、苦味健胃薬やリキュールのカンパリに使われている。

リンドウの育種は、実生からの栽培法が確立した昭和40年ころからで、花色および草姿が優れている株から採種し、目標とする特性を持つ株を選抜していった。しかし、実生株は、株間にばらつきがあり、また自殖を繰り返す行くと株が弱る現象もみられた。昭和52年(1977)に、リンドウではじめて品種登録されたのが、元岩手県園芸試験場(現同県農業研究センター)で育成した切り花用品種の‘いわて’ (*G. triflora* × *G. triflora* var. *japonica* subvar. *montana*) である。その後、昭和57年(1982) ‘奥信濃’ (*G. scabra*) が、品種登録された。一方、鉢物用 リンドウでは、昭和55年 ‘竜峡クイン’ が種苗登録され、‘那須の乙女’ (*G. triflora* × *G. scabra*)、‘アルペンブルー’ (*G. acaulis* × *G. dinarica*) および ‘いわて乙女’ (*G. triflora* var. *japonica* subvar. *montana* × *G. triflora* var. *japonica* subvar. *montana*) と続いて、これ以降多くのリンドウが品種登録された。なお、この後同一種内および *G. triflora* と *G. scabra* の種間交雑による新 F₁ 品種が育成されている。

特に、岩手県では県の試験場、安代町、篤農家を中心に、‘いわて’ (1977)、‘いわて乙女’ (1982)、‘イーハトヴォ’ (1986)、‘ジョバンニ’ (1986)、‘アルビレオ’ (1989) ‘マシェリ’ (1990)、‘ホモイ’ (1990)、‘アルタ’ (1992)、‘ポラーノホワイト’ (1996)、‘ポラーノブルー’ (2000) ‘安代の夏’ (2000)、‘シャインブルー・アシロ’ (2000) および ‘メルヘ

ン・アシロ' (2000) など多くの品種が開発されてきた。現在の優良品種の大部分はF₁育種で行われており、リンドウが強度の自殖弱勢を示すため、交配母本の維持管理と増殖が一つの大きな課題となっている。また、育種目標として、(1) 花色と花型、(2) 作期の拡大、(3) 草姿、(4) 耐病性、(5) 栄養系品種の育成などが挙げられている(吉池 1992, 阿部 1990)。特に、花色については、交雑できる近縁種内では、花色のバリエーションも青色、白色および桃色と限定されており、新しい花色の導入が困難であること、さらに、リンドウ属内は、黄色などの花色を持つ野生種もあり、これらの花色を栽培種に導入するすることができれば新しい品種の作出につながる。また、ササリンドウは一般にさし芽繁殖が容易であるが、優良系統となっているエゾリンドウでは、この技術が実用化に至っていないなどが問題となっている。これらを解決するために、組織培養による大量増殖、ソマクローナル変異、細胞融合、形質転換などのバイオテクノロジーを応用した育種技術の開発が望まれている。

組織培養利用による大量増殖は、生長点からの多芽体や苗条原基の誘導および植物器官からの不定芽および不定胚誘導による増殖方法がある。一般に、花きは、集約的に栽培されることが多いため、組織培養を利用した増殖技術が応用できる範囲が広いと考えられる。リンドウでは、大量増殖に関する報告(佐藤 1986, 阿部 1988, 天野ら 1989, 丸田ら 1989, 西澤ら 1991, 清野ら 1991, 田平ら 1991, 高橋ら 1991, Yamada et al. 1991, 村山ら 1993, Sharma et al. 1993, Hosokawa et al. 1996) はあるが、本格的な実用化には至っておらず、未だに種子による増殖および供給が行われている。また、現在、組織培養による増殖は、*G. scabra*の系統が多いが、切り花用品種の育種素材として多く用いられている*G. triflora*では困難であり、増殖できる種および系統が限られている。

一方、バイオテクノロジーを用いた新品種育成のための技術として、細胞融合、形質転換などの方法があり、多くの作物で実用化に向けて研究されている。これらの基礎的な技術として植物組織からの再生系の確立やプロトプラストからの再分化系の確立が不可欠である。リンドウでは、組織培養やプロトプラストからの再分化の報告 (Takahata and Jomori 1989, Nakano et al. 1995, Meng et al. 1991) もあるが、前述の大量増殖と同様に再分化系が確立している種および系統が少ない。そのため、今後リンドウの新たな品種開発のためには、安定した再分化系の確立は必須である。

園芸用リンドウとしては、前述したように *G. scabra* と *G. triflora* の2種が多く利用されてきた。これら2種は、交雑が容易であり近縁種と考えられるが、その類縁関係は十分に明らかにされていない。一方、リンドウ属全体としてみると361種からなり、リンドウ科 (*Gentianaceae*) の中で最も大きな属であり (清水 1994)、これらはリンドウの新たな品種開発のための遺伝資源として重要と考えられる。リンドウ属の分類は、分類学者により異なるが、Kusnezow (1893, 1896-1904) の分類が今日のリンドウ属の基準とされている。また、Toyokuni (1965) は、リンドウ科を花の構造の違いから、11属35種に分類した。これらに属する共通祖先として原始リンドウ属を仮定した。日本には、リンドウ属約13~18種が存在し、その多くは多年草であるが、一、二年草もある。ヨーロッパには、リンドウ属の命名上の基本種の *G. lutea* が分布し、アルプスには、*G. purpurea*, *G. pannonica*, *G. clusii*, *G. acaulis*, *G. alpina*, *G. verna* などが自生している。中国には、およそ360種のうち248種が分布し (Zheng-yi and Raven 1995)、代表的な種としては、桃色の花のガビサンリンドウ (*G. rubicunda*) などがある。そのほかアメリカ、オセアニアにも分布している。

一方、細胞遺伝学的研究では、リンドウ属の基本染色体数は、 $2n=10, 14, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 42, 44, 52, 78, 96$ と種々のものがあることが報告され、研究者により同一種の染色体数が異なる報告のものもある(遠藤 1998)。現在のところ、これらの種の関係は十分検討されていない。これら植物群の類縁関係を解明することは、リンドウ属の進化を明らかにするだけでなく育種を行う上で必要な基礎的な知見を与えることになる。植物種の類縁関係に関しては近年、分子生物学的手法を用いた解析法の有効性が数多く報告されている(Soltis et al. 1991, 長谷部 1990, Taberlet et al. 1991, ほか)。特に、遺伝情報であるDNA配列を間接的にみるRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法 (Botstein et al. 1980) やRAPD法 (Williams et al. 1990) を始め、特定のDNA配列の塩基配列を直接的に比較することも簡便に行える様になり、強力な解析手段として利用されている (Ward et al. 1981, Eckenrode and Levings 1986, Newton 1988, Wolff and Riji 1995, Edward and Holtsford 1996, Bena and Jubier 1998, Murakami 2000)。

本研究では、リンドウ属植物を用いた細胞工学を利用した育種方法の基礎的な技術開発および種間の系統関係を明らかにするため、第2章でリンドウ科園芸植物の組織培養系の確立を目的として、(1) リンドウの葉片から再分化系の確立、(2) リンドウの不定胚形成の組織学的観察、(3) エキザカムの再分化系の確立を行った。また、第3章では*G. scabra*および*G. triflora*プロトプラスト培養系の確立を目的とした。さらに、第4章では分子生物学手法によるリンドウ属植物の分類を目的として、(1) RAPD法およびSCARのマーカによる*G. scabra* と*G. triflora* の系統識別、(2) 葉緑体DNAによるリンドウ属と近縁属の分子系統解析を行った。