

マーガレットの属間雑種育成に関する研究*

Studies on Intergeneric Hybrids Breeding of
Argyranthemum frutescens (L.)

武藤 貴大

Takahiro Muto

*千葉大学大学院園芸学研究科博士学位審査論文 2020年（令和2年）

目 次

第 I 章 序論

1. 研究の背景..... 1
2. 研究の目的と構成..... 4

第 II 章 胚珠培養法を用いたマーガレットと多年生キク科植物との交配個体の作出

1. 緒言..... 5
2. 材料および方法..... 5
 - 2.1 マーガレットと多年生キク科植物との交配および胚珠培養..... 5
3. 結果..... 6
 - 3.1 マーガレットと多年生キク科植物との交配および胚珠培養..... 6
4. 考察..... 6

第 III 章 作出個体の雑種識別

1. 緒言..... 9
2. 材料および方法..... 9
 - 2.1 DNA 抽出および目的領域の増幅..... 9
 - 2.2 遺伝子マーカーの設計..... 9
 - 2.3 制限酵素反応と電気泳動..... 11
 - 2.4 遺伝子マーカーの汎用性の確認..... 11
3. 結果..... 11
 - 3.1 マーガレットとローダンセマムの識別可能な遺伝子マーカーの選択..... 11
 - 3.2 遺伝子マーカーを用いた交配個体の雑種識別..... 12
 - 3.3 選択した CAPS マーカーの汎用性の確認..... 12
4. 考察..... 12

第 IV 章 マーガレットとローダンセマムの属間雑種個体の形態的評価

1. 緒言..... 15
2. 材料および方法..... 15
 - 2.1 属間雑種個体の形態的特性..... 15
 - 2.2 属間雑種個体の花色特性の定量..... 15
3. 結果..... 16
 - 3.1 属間雑種個体の形態的特性..... 16
 - 3.2 属間雑種個体の花色特性の定量..... 17
4. 考察..... 18
 - 4.1 属間雑種個体の草姿・花数..... 18
 - 4.2 属間雑種個体の花色..... 19
 - 4.3 属間雑種個体のその他の形質の評価の必要性..... 19

第 V 章 マーカー選抜に適した SCAR マーカーの開発

1. 緒言..... 24
2. 材料および方法..... 24

2.1 DNA 抽出および目的領域の増幅.....	24
2.2 遺伝子マーカー (SCAR マーカー) の設計.....	24
2.3 電気泳動.....	24
2.4 遺伝子マーカーの汎用性の確認.....	24
3. 結果.....	26
3.1 マーガレットに特異的な SCAR マーカーの開発.....	26
3.2 ローダンセマムに特異的な SCAR マーカーの開発.....	26
3.3 開発した SCAR マーカーの汎用性の確認.....	27
4. 考察.....	27
第VI章 総合考察	
1. 総合考察.....	29
謝辞.....	31
引用文献.....	32

第I章 序論

1. 研究の背景

マーガレットの概要

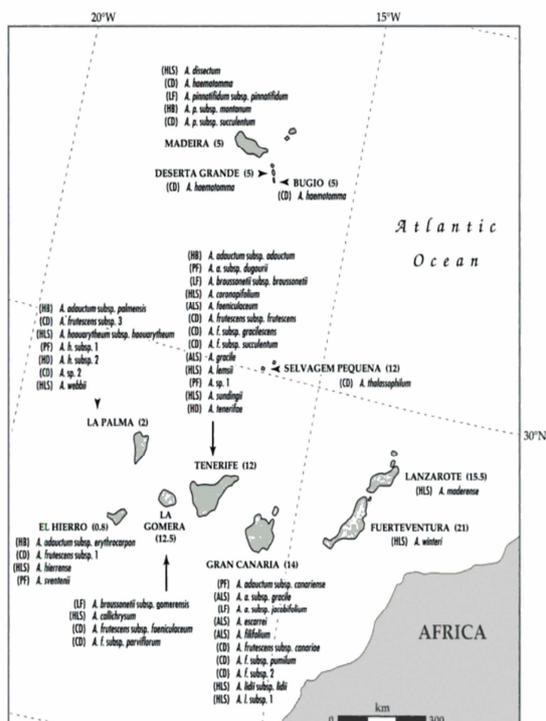
Argyranthemum frutescens (L.) Sch. Bip. は、スペイン領カナリア諸島 (Bramwell et al. 2001) とポルトガル領マデイラ諸島を原産とし、24種 (Bremer et al. 1994; Francisco - Ortega et al. 1997) の原種が報告されている多年生キク科植物である。以前は、*Chrysanthemum* に属していたが、1970年代に広義 *Chrysanthemum* の再分類が繰り返され、マーガレットは、*Chrysanthemum* 属から *Argyranthemum* 属に再分類された (Anderson 2006)。 *Argyranthemum* 属の植物は花型や葉型などが花き園芸的に評価が高い一方、原生地が島々に限られているため、遺伝的に花色の多様性が乏しく 24 種の原種のうち有色種は 3 種のみである (Bramwell and Bramwell 2001; Francisco-Ortega et al. 2000; Press and Short 1994, 第 1 図)。日本には、1880 年代に導入され、1920 年代に静岡県南崎町 (現南伊豆町) に伝来後、大規模な切り花栽培が始まった。鉢物用マーガレットは、1990 年の大阪万博

後のガーデニングブームの到来とともに、海外から多数のマーガレット品種が導入され、鉢物生産が盛んになった (稲葉ら, 2019)。マーガレットの品種開発の歴史は、1987 年にマーガレットで初めて白花の切花用品種が登録され、鉢物用は、1990 年に白花の品種が登録された。1990 年代からマーガレットの品種育成が盛んに行われ、1995 年には初の有色品種が登録された。その後、2003 年には、マーガレットの近縁種であるハナワジク (*Glebionis carinata* (Schousb.) Tzvelev.) との属間雑種品種が品種登録され、2019 年 12 月現在で 211 品種が登録されている。マーガレットは冬から春季にかけて鉢物や花壇苗として利用されている。

静岡県におけるマーガレット生産量・出荷量の推移

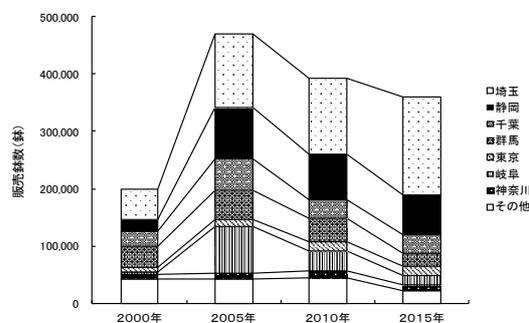
主要市場である株式会社フラワーオークションジャパンでの静岡県の鉢物マーガレット取扱量は、2000 年から 2005 年にかけて出荷量が約 4 倍に増大した。その後は、2005 年の約 9 万鉢をピークに減少傾向で 2015 年は約 7 万鉢の取扱量であるものの、全国第 2 位の取扱量である (第 2 図)。

静岡県の鉢物マーガレット生産は、主に、静岡県東部流通センター農協 (静岡県富士市) マーガレット部会が

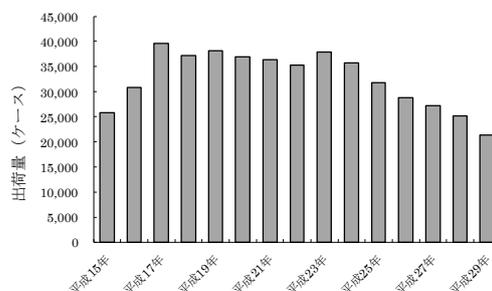


第 1 図 カナリア諸島、マデイラ諸島周辺における *Argyranthemum* 属の分布地図

(Francisco-Ortega et al. 2000)



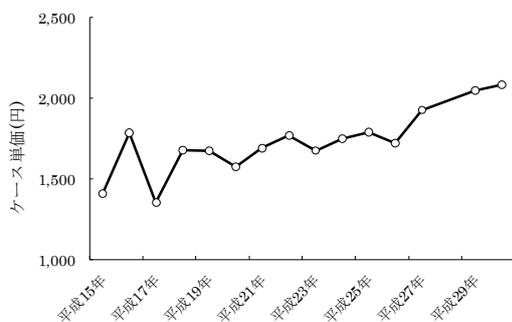
第 2 図 鉢物マーガレット取扱実績 ((株) フラワーオークションジャパン統計データ, 2015)



第 3 図 鉢物マーガレット出荷量の推移 (静岡県東部流通センター農協)

出荷している。静岡県東部流通センター農協は、静岡県と静岡県育成品種の許諾契約し、静岡県が育成した品種を生産出荷している。その出荷量は、平成18年から平成24年までは約3.5万ケースで推移していたが、平成24年以降、夏場の高温や冬場の低温による生育不良や枯死率の増加により、製品化率の低下や出荷期間の短縮等の影響から、出荷量が減少傾向にある（第3図）。

一方、単価は、平成15年はケース単価が約1,500円だったが、平成18年以降は上昇傾向が続いており、平成30年度は約2,000円で、平成15年度比で約3割単価が上昇した（第4図）。その理由として、マーガレット部会の積極的なプロモーション活動やジャパンフラワーセレクションやフロリアード等の品評会での受賞により評価が向上したことにより、市場や販売店における「静岡県のマーガレット」の認知度が高まり、注文数が増加していることが考えられる。



第4図 静岡県における鉢物マーガレット単価の推移（静岡県東部流通センター農協）

近縁種を用いた新たな形質を有する品種育成の取組

育種には、大きく分けて交配（種内や属間等）によるものと、X線やγ線照射や、化学処理およびトランスポゾン突然変異を誘発させて新たな形質を獲得する育種方法がある（Hayes et al. 1955; Luan et al. 2007; Luo et al. 1991; Sasaki et al. 2008）。交配育種において、従来品種にはない新たな形質を持つ品種を育成するには、属間交配は種内・種間交配と比較し優れている。しかし、属間交配では、一般的に、交雑不稔性が高く、胚珠が充実する前に生育が停止し退化してしまうため、種子を得ることは困難である。そのため、胚珠が退化してしまう前に、胚珠を摘出し人工的に培養する胚珠培養技術が利用されている（Sharma et al. 1996）。これまでに胚珠培養技術により、キク属、シクナゲ属、リリウム属などの多くの雑種が作出されてきた（Deng et al. 2011; Eckhaut et al. 2007; Van Tuyl et al. 1991）。

マーガレットにおいても胚珠培養技術を用いた属間雑種が作出されている。マーガレットは花色の多様性に乏しいため、近縁属を用いた品種開発により花色の多様化を目指した。これまでにシュンギク (*Glebionis coronaria* (L.) Cass. ex Spach.) との交配により‘伊豆イエロー’（古里, 1977,1978）の作出や、ハナワギク (*Glebionis carinata* (Schousb.) Tzvelev.) と交配・胚珠培養により属間雑種を作出し、品種登録してきた（Ohtsuka and Inaba, 2008, 稲葉ら 2008, 岩崎ら 2008）。ハナワギクとの属間雑種は、多彩な花色・大輪・芳香性を有するなど観賞価値に重きを置いた育種により、従来のマーガレット品種にはない新たな形質が付与され、他産地との差別化が図られてきた（第5図）。



第5図 マーガレットとハナワギクの属間雑種品種の花の様子

マーガレットと多年生キク科植物の交配個体の作出

マーガレットとハナワギクとの属間雑種品種は観賞価値を重視した品種育成のため花色の多様化、芳香性の付与などが図られてきた一方、マーガレットとハナワギクとの属間雑種品種は、難栽培性、難増殖性、耐寒性・耐暑性などの環境ストレス耐性が低いなど生産性に課題がある。そのため、出荷時期が短く、生産圃場が制限され、出荷量が伸び悩んでいる現状である。以上のことから、栽培性を重視した品種育成が必要である。しかし、これまでマーガレットの属間雑種の作出事例は、開花後の樹勢が著しく低下する1年生草本のシュンギクとハナワギクのみであり、多年生キク科植物との属間雑種の作出が可能であるかは不明である。そこで本研究では、多年生キク科植物のデモルフォセカ (*Dimorphotheca sinuata* DC.), オステオスペルマム (*Osteospermum ecklonis* (de Candolle) Norlindh), サイネリア (*Pericallis hybrida* B. Nord.), 芳香性キク‘アロラム’ *Chrysanthemum lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.)

Makino × *Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.), アルテミシア (*Artemisia absinthium* L.), ローダンセマム 2 種 (*Rhodanthemum gyanum* (Cross. & Durieu) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries. , *Rhodanthemum hosmariense* (Ball) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries.) の計 7 種をマーガレットと交配し, 雑種作出の可能性を検討した。

交配親に供試した各種の特性は以下の通りである。デモルフォセカは, アフリカ南部を原産とするアフリカキンセンカ属で, 花色がオレンジ色から白色まで豊富な花色である。4 月から 6 月ごろ開花し矮性で匍匐性のため, 早春から初夏の間に花壇等の植栽に多く利用されている。オステオスペルマムは, アフリカ南部を原産とするオステオスペルマム属で, 花色が紫色, 黄色, 桃色等花色が豊富である。耐寒性に優れており, 冬から春季にかけて開花するため, 冬場から春先にかけて鉢物や花壇苗として利用されている。サイネリアは, 北アフリカやスペイン領カナリア諸島, ポルトガル領マデイラ諸島を原産とするペリカルシス属で, 青色や桃色, バイカラーがあるなど花色が豊富で, 草姿が良好である。また, 耐寒性に優れ, 11 月から 5 月ごろまで開花することから, 冬から春にかけて鉢物として観賞されている。芳香性キクアロママムは近縁属のキク同士の交雑から育成された品種で, 甘い香りを有する特徴がある。秋季に開花するため, 秋季の鉢物として観賞される。アルテミシアは, ヨモギ属で, 香りが強く, 耐寒性が強い。ローダンセマムは, モロッコ原産のローダンセマム属で, 耐寒性が強く, 氷点下や降霜の条件下でも生育可能である。草姿が良好で, 2 月から 6 月ごろまで開花するため, 冬から春季の花壇の植栽に広く利用されている。

本研究において, マーガレットと上記のキク科植物 7 種の交配を試みた。一般的に属間交配では, 胚珠が生育途中で停止し退化するため種子が獲得されない。そのため, 胚珠が退化する前に摘出し, 人工的に培養する胚珠培養が用いられている (Sharma et al. 1996)。マーガレットと多年生キク科植物との属間交配のため, 胚珠培養法により交配個体の作出を目指した。

交配個体の雑種識別

遺伝子マーカーの開発の歴史は, 1980年にRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) が発表されたが (Botstein et al. 1980), 再現性が高いものの, 判別までに時間がかかることや試薬等コスト高い。さらに, PCR技術が開発されたことを受け (Mullis

and Faloona 1989), 判別が単純でその再現性の高い PCRに基づく遺伝子マーカーが多数開発されてきたことから, あまり広く普及されなかった。PCR増幅の差異により識別する技術としてRAPD (Random amplified polymorphic DNA) が挙げられる

(Williams et al. 1991)。RAPDは10塩基程度の短いランダムプライマーを利用しバンドの発現本数やその有無により識別されるため, 技術的要求度が低く迅速な判定が可能である。しかし, その欠点として, ランダムプライマーの塩基数が少ないため, 再現性が低いことが挙げられる。この再現性の低さを解決する技術として, PCRにより増幅された制限酵素断片長の相違により識別されるAFLP (Amplified fragment length polymorphism; Vos et al. 1995) や, 特異的なプライマーを使用しPCR増幅により識別されるSCAR

(Sequence characterized amplified region; Paran and Michelmore 1993), PCR増幅産物を制限酵素で切断されることにより識別されるCAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence; Konieczny and Ausubel 1993) などのマーカー開発が行われてきた。

RAPD (Kaul et al., 2009), SSR (Simple sequence repeats; Sato-Ushiku et al. 2011), SCAR (Scheef, et al. 2003), CAPS (Kunihisa et al. 2003), AFLP (Chauhan et al. 2004) 等の PCR に基づく遺伝子マーカーは現在でも, 植物全体で品種や系統識別に広く利用されている。また, 遺伝子マーカーを用いて識別する場合には, 品種や近縁種ごとに塩基配列の相違を基に識別することが多く, その中で, 塩基配列の欠損や挿入等の変異が頻繁に起こるリボソーム DNA 内の ITS 領域は, 品種や近縁種を識別する時によく利用される (Álvarez and Wende 2003; Baldwin 1992; Cheng et al. 2016; Eriksson et al. 2003)。

今回, マーガレットは自家和合性のため自家受粉の可能性も考えられることから, 遺伝子マーカーによる雑種識別が必要である。作出された交配個体が両親の属間雑種であるかを遺伝的に判定するために, 1 塩基の違いにおいても識別できること, 両親のリボソーム DNA の ITS 領域の塩基配列が Genbank に掲載されていたことから, CAPS マーカーを採用した。CAPS マーカーは, 塩基配列情報は必要であるものの再現性が高い特徴がある。リボソーム DNA の ITS 領域の塩基配列を基に CAPS マーカーを設計し交配個体における雑種判定を試みた。

交配個体の形態的特性

マーガレットとハナワギクとの属間雑種では、従来のマーガレット品種にはない花色や芳香性など新規形質を有する観賞価値を重視した品種育成が行われてきた。生産する上で重要な草姿や樹勢の強さ、環境ストレス耐性、増殖性に劣っているため、需要があるものの生産量を増やすことが難しいという問題があった。そのため、生産する上で重要な栽培特性に優れた品種育成が必要と考えられる。

マーガレットと交配に供試した多年生キク科植物との属間雑種の作出事例がないことから、作出された場合、形態特性は不明である。キクでの属間雑種は両親と異なる形質が確認された一方 (Tang et al. 2010)、リンドウでの属間雑種は両親と中間的な形質であったと報告がある (玉掛ら, 2014)。そのため、交配個体とその両親との形態調査の結果から、その交配個体の形態や栽培特性を把握する必要がある。また、従来のマーガレット品種にはない新規形質の有無を調査するため、作出された交配組合せによって、必要に応じて詳細な花色や芳香性、剛健性などの特性調査を行う必要がある。

交配個体の安価な雑種識別手法の開発

遺伝子マーカーの種類は多く、RAPD (random amplified polymorphic DNA; Morikawa et al. 2014) や、RFLP (restriction Fragment Length Polymorphisms; Wolff et al. 1995)、SSR (simple sequence repeat; Sato-Ushiku et al. 2011)、SCAR (sequence-characterized amplified region; Scheef et al. 2003)、CAPS (Kunihisa et al. 2003) などにより品種や雑種等の識別がなされてきた。しかし、遺伝子マーカーごとに、再現性や技術要求度、コスト等が異なる。RFLPは、再現性が高いものの、判定までに時間がかかることや試薬等のコストが高いことが課題になっている。CAPS マーカーは再現性が高いものの、操作手順が煩雑で比較的試薬等のコストが高いことから、大量なサンプルを扱う早期選抜時の雑種判定には不向きで、育種期間の短縮化を図るには、再現性が高いことに加え、安価で迅速に大量のサンプルを判別できる遺伝子マーカーを開発する必要がある。

技術要求度が低く迅速に判定できる遺伝子マーカーとして、RAPD が挙げられるが、10bp 程度の塩基配列の短いプライマーのため、PCR 条件によって、結果が異なる場合があり、判定に誤りが生じるなど再現性が低い (DNA 品種識別技術検討会, 2003)。その欠点を

改良した SCAR マーカーは、塩基配列に特異的な 20~25 bp のプライマーを使用するため RAPD マーカーよりも再現性が高く (Paran and Michelmore 1993)、CAPS マーカーと同等な再現性とされている

(Agarwal et al. 2008)。一般的に、SCAR マーカーは、CAPS マーカーと比較して手順が少なく、試薬等コストが CAPS マーカーよりも低いため、CAPS マーカーよりも安価で効率的に識別ができると考えられる。そのため、早期選抜を目的とした SCAR マーカーの開発に取り組んだ。

2. 研究の目的と構成

本研究は、マーガレットと多年生キク科植物との雑種作出の可能性を検討するとともに、剛健で従来のマーガレット品種にはない新たな形質を有する雑種の育成と、育種の効率化を図るための遺伝子マーカーの開発を目的として実験を行った。

はじめに、第II章では、胚珠培養法を用いてマーガレットと多年生キク科植物との交配個体の作出に取り組んだ。これまでマーガレットと多年生キク科植物との属間雑種の作出に関する報告がないため、7種の多年生キク科植物を用いて交配・胚珠培養を試みた。胚珠培養法による発芽率の結果を踏まえ、胚珠培養条件や交配から胚珠摘出までの期間について考察した。加えて、キク科植物におけるマーガレットの遺伝子距離からこれまで作出事例のない近縁種との属間雑種作出の可能性についても考察した。

第III章では、マーガレットは自家和合性であることから、作出した交配個体を遺伝的に雑種であることを判定するために、遺伝子マーカーを設計し、交配個体の雑種判定を行った。加えて、市販品種等を用いて設計した遺伝子マーカーの汎用性を確認した。

第IV章では、これまでマーガレットと多年生キク科植物との属間雑種を作出した事例がないため、形態や花色特性が不明である。そのため、属間雑種個体を作出された場合、両親と形態特性の相違点や、従来のマーガレット品種にはない新規性のある特性の有無に関する調査を実施した。加えて、商品性として重要な形質である花色については色差値の測定と色素量の分析を行い両親と比較した。

第V章では、多量のサンプルを扱う早期選抜時の雑種識別に適している遺伝子マーカーの開発とその汎用性を確認した。第VI章では、総合考察として、第II~V章の結果から研究のまとめと今後の展望について記した。

第II章 胚珠培養法を用いたマーガレットと多年生キク科植物との交配個体の作出

1. 緒言

本章では、マーガレットと多年生キク科植物との交雑性評価と、その雑種個体の作出を目的に実験を行った。

多年生キク科植物のアルテミシア (*Artemisia absinthium* L.), 芳香性キク‘アロママ’

[*Chrysanthemum lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Makino × *Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.], デモルフオセカ (*Dimorphotheca sinuata* DC.), オステオスペルマム [*Osteospermum ecklonis* (de Candolle) Norlindh], サイネリア (*Pericallis hybrida* B. Nord.), ローダンセマム ガヤナム [*Rhodanthemum gayanum* (Cross. & Durieu) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries.], ローダンセマム ホスマリテンゼ [*Rhodanthemum hosmariense* (Ball) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries] の計7種を花粉親に供試し、マーガレットと交配し、交配約3週間後に胚珠を摘出し培養した。

2. 材料および方法

2.1 マーガレットと多年生キク科植物との交配および胚珠培養

多年生キク科植物は多数存在するにも関わらず、マーガレットとその近縁属との属間雑種の作出事例はシュンギクとハナワギクのみである。シュンギクやハナワギクは1年生草本であるため、その属間雑種は、難栽培性・難増殖性など生産する上で課題がある。そこで、今回、

マーガレットとの交雑事例がない多年生キク科植物7種を用いてマーガレットと交配し、交雑評価を行った。

2.1.1 供試植物とその育苗

アルテミシア (*Artemisia absinthium* L.), 芳香性キク‘アロママ’ [*Chrysanthemum lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Makino × *Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.], デモルフオセカ (*Dimorphotheca sinuata* DC.), オステオスペルマム [*Osteospermum ecklonis* (de Candolle) Norlindh], サイネリア (*Pericallis hybrida* B. Nord.), ローダンセマム ガヤナム [*Rhodanthemum gayanum* (Cross. & Durieu) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries.], ローダンセマム ホスマリテンゼ [*Rhodanthemum hosmariense* (Ball) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries] の7種を実験に供試した。

マーガレットは、親株から花芽のついてない挿し穂を

採取し、人工培養土 {セルビート; (株) 富士見工業} を充填した128穴セルトレイに挿し芽を行った。セル苗は、静岡県農林技術研究所伊豆農業研究センター (静岡県賀茂郡東伊豆町) の温室内で育苗した。約2~3週間後に発根が十分確認された挿し芽を3.5号ポリポットにポット上げした。培養土は、赤土、バーク堆肥、セルビートを2:1:3の割合で調整した混合土を使用した。ポット苗は、週に1回の頻度で、液体肥料 {OATハウス1号; (株) OATアグリオ} を1000倍希釈で施与し、約1ヶ月間、温室内で育苗した。その後、6号鉢に鉢上げした後、伊

第1表 マーガレットと多年生キク科植物との交配組合せと交配結果

種子親	交配組合せ	花粉親	交配供試数	胚珠形成数	発芽数	獲得個体数
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘サンデーリップル’		<i>Chrysanthemum lavandulifolium</i> × <i>Chrysanthemum</i> × <i>morifolium</i> ‘アロママ’	3	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘サンデーリップル’		<i>Osteospermum ecklonis</i>	14	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘サンデーリップル’		<i>Pericallis hybrida</i>	5	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘サンデーリップル’		<i>Rhodanthemum hosmariense</i>	3	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘サンデーリップル’		<i>Rhodanthemum</i> ‘アフリカンアイズ’	40	12	7	1
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘ラブリーフレンド’		<i>Artemisia absinthium</i>	6	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘ラブリーフレンド’		<i>Chrysanthemum lavandulifolium</i> × <i>Chrysanthemum</i> × <i>morifolium</i> ‘アロママ’	11	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘ラブリーフレンド’		<i>Osteospermum ecklonis</i>	26	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘ラブリーフレンド’		<i>Rhodanthemum</i> ‘アフリカンアイズ’	10	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘ムーンライト’		<i>Dimorphotheca sinuata</i>	11	0	0	0
<i>Argyranthemum frutescens</i> ‘ブリアンルージュ’		<i>Rhodanthemum</i> ‘エルフピンク’	10	5	2	1

豆農業研究センター内の環境制御温室 (20 m²) 内に移動した。花粉親の7種は、それぞれ3号~3.5号苗を購入し、6号鉢に鉢上げした後、伊豆農業研究センターの環境制御温室 (20 m²) 内に移動した。液体肥料 {OATハウス1号; (株) OATアグリオ} を1000倍に希釈し、週1回の頻度で施与した。

2.1.2 マーガレットと多年生キク科植物との交配

交配は、伊豆農業研究センターの環境制御温室で行った。交配当日に筆を用いて花粉親から花粉を採取し、晴天日の午前中 (午前9時~正午) に交配を実施した。交配後、他からの花粉が入らないように交配袋で覆った。

2.1.3 胚珠培養と順化

マーガレットとハナワギクとの属間雑種では、交配3週間後に胚珠を摘出した場合、充実した胚珠が多く観察され、効率的に胚珠培養できたと報告があることから (植田ら, 2006), それに倣い交配3週間後に交配花から胚珠を摘出し培養した。胚珠培養には、Murashige Skoogの基本培地中 (Murashige and Skoog, 1962) に無機塩の多量要素のみを1/2に希釈した培地 {Murashige and Skoog Plant Salt Mixture ; (株) 日本製薬} をpH5.8に調整し、3%ショ糖、0.3%グララムを添加した培地 (以後1/2MS培地という。) を管ビンに10mLずつ分注し、オートクレーブ (120°C, 20分間) で滅菌した培地を用いた。交配花は、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で10分間殺菌後、滅菌水で2回洗浄した。その後、クリーンベンチ内の解剖顕微鏡下で子房を除去し充実している胚珠を無菌的に摘出し、1/2MS培地に置床した。その後は、23°C 16時間日長条件下の環境制御室で管理し、十分に発根した植物体をパーミキュライトで充填した2号ポリポットに移植した。23°C 16時間日長条件下の環境制御室で約1ヶ月順化させた後、6号鉢に移植し温室で栽培した。

3. 結果および考察

3.1 マーガレットと多年生キク科植物との交配および胚珠培養

マーガレットとローダンセマム ガヤナム [*Rhodanthemum gayanum* (Cross. & Durieu) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries.] との交配した60花のうち、17の充実した胚珠が得られ、最終的に2つの交配個体を得られた (第1表)。一方、それ以外の6種のアルテミシア (*Artemisia absinthium* L.), 芳香性キク ‘アロママ’ [*Chrysanthemum lavandulifolium* (Fisch.

ex Trautv.) Makino × *Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.] , デモルフォセカ (*Dimorphotheca sinuata* DC.) , オステオスペルマム [*Osteospermum ecklonis* (de Candolle) Norlindh] , サイネリア (*Pericallis hybrida* B. Nord.) , ローダンセマム ホスマリテンゼ [*Rhodanthemum hosmariense* (Ball) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries] との交配では、充実した胚珠を得ることはできず、交配個体が作出されなかった。

本研究では、マーガレットとローダンセマムの交配組合せで、胚珠培養法により初めて交配個体を作出することができた (第6, 7図)。

4. 考察

今回マーガレットとローダンセマムの属間交配において、17の充実した胚珠を摘出したが、発芽したものは9個体で、最終的に作出された個体は2個体のみと発芽率および植物体形成率が低かった。一般的に属間交配における障壁として、受精前と受精後の交雑障壁に分けられる。今回、交配個体が作出されなかったまたは作出率が低かった原因を明らかにするために、交配個体が得られなかった組合せも含め、花粉発芽や花粉管伸長の異常等による受精前の交雑障壁か、胚や胚珠に発達異常等による受精後の交雑障壁のどちらの要因であるか調査する必要がある。受精前の交雑障壁の克服事例として、蕾受粉 (福本ら, 1996), 老花受粉 (Ascher・Peloquin, 1966) や、花序の温湯処理 (巢山ら, 2013), 混合花粉の利用、高温での受粉、柱頭への薬剤処理など (Van et al. 1997) が報告されている。そのため、受精前の交雑障壁が要因であった場合には、高温での受粉や混合花粉による交配を行うことで、交配個体の作出が可能になるかもしれない。また、マーガレット品種は2倍体と3倍体があると報告されているが、近年、採種が容易な2倍体品種が鉢物用品種を中心に流通されている (青山, 2000; 稲葉ら, 2019)。一方、今回花粉親に供試した品目の倍数性は不明で3倍体以上の奇数倍数体であった場合、一般的に正常な花粉が形成されないため後代が作出されない。奇数倍数体から稔性のある偶数倍数体を作成する方法として、コルヒチン処理 (Hamill et al. 1992; Yang et al. 2006) や、一酸化二窒素の暴露 (Sattler et al. 2016; Van Tuyl et al. 1992) による倍加や、3倍体の自家受粉や2倍体との戻し交配など3倍体を介した安定的な偶数倍数体の形成 (Ramsey et al. 1998) が報告されている。このように、花粉親が奇数倍数体であ

った場合に、倍数性を誘発するコルヒチン処理や一酸化二窒素の暴露することで、安定的な偶数倍数体を作成し、稔性を回復させることで、交配個体の作出が容易になる可能性がある。

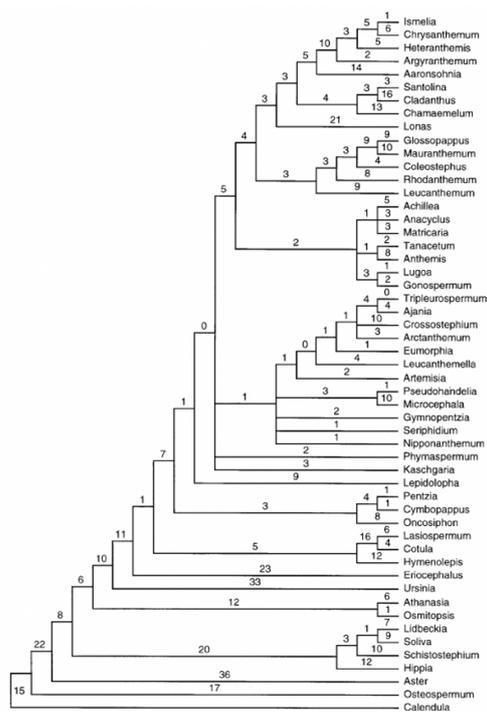


第6図 マーガレット‘ブリアンルージュ’×ローダンセマム‘エルフピンク’の交配個体とその両親の花と葉の形態
(左上：マーガレット‘ブリアンルージュ’，右上：ローダンセマム‘エルフピンク’，下：交配個体)



第7図 マーガレット‘サンデーリップル’×ローダンセマム‘アフリカンアイズ’の交配個体とその両親の花と葉の形態
(左上：マーガレット‘サンデーリップル’；右上：ローダンセマム‘アフリカンアイズ’，下：交配個体)

一方、受精後の交雑障壁の克服には、今回用いた胚珠培養や子房培養が報告されている (Van et al. 1997)。園芸植物における胚珠培養の発芽率に関する研究では、交配から胚珠の摘出までの期間や、培地に添加する糖の種類・濃度、植物ホルモンの濃度・組合せを検討したところ、発芽率や植物体形成率が上昇したと報告されている (Chen and Mii 2012; Cisneros and



第8図 Chloroplast Gene ndhFに基づくマーガレットと近縁種との遺伝子距離 (Watson et al. 2000 引用)

Tel-Zur, 2010; Fratini and Ruiz, 2006; Motohashi et al. 2008; Pellegrineschi et al., 1997; Tar et al. 2018; Yang et al., 2007)。今後、さらに効率的に発芽率の上昇を図るためには、胚珠培養に用いる培地の糖分濃度や、植物ホルモンの濃度・組合せなどの胚珠培養方法と胚珠培養までの交配期間を検討することが必要であると考えられる。それにより、今回作出されたマーガレットとローダンセマムとの交配個体の作出数の増加や、今回作出されなかった種との交配組合せでも培養条件の改良や交配時期・期間を検討することで、新たな雑種個体の作出が可能になるかもしれない。

また、キク科植物の遺伝子距離では、今回供試したローダンセマム、アルテミシア、オステオスペルマムとマーガレットとの遺伝子距離は、ローダンセマムが一番近く、アルテミシア、オステオスペルマムの順で遺伝子距離が近かった (Watson et al.2000; 第8図)。マーガレットとの属間雑種育成の報告があるシュンギクとハナワギクの遺伝的距離は、ローダンセマムよりも近かった。ローダンセマムよりもマーガレットとの遺伝子距離が近いクラダンツス (*Cladanthus arabicus* (L.) Cass.)、サントリナ (*Santolina rosmarinifolia* L.)、ローマンカモミール (*Chamaemelum nobile* (L.) All.)、ローナス (*Lonas annua* (L.) Vines & Druce),

ノースポール *Maurantheum paludosum* (Poir.) Vogt & Oberpreiler),

ムルチコーレ (*Coleostephus myconis* (L.) Rchb. F.),
シャスターデージー (*Leucantheum vulgare* Lam.)
との交配は、マーガレットとの属間雑種作出の可能性が考えられる。

ノースポールやシャスターデージーは、マーガレットと草姿や花型が類似しているが、両者ともに耐寒性に優れ、草姿が良好なため、従来のマーガレット品種にはない耐寒性に優れた属間雑種が作出される可能性が考えられる。また、クラダンツスやムルチコーレは濃黄花でコンパクトな草姿なため、マーガレットに存在しない濃黄花の属間雑種が作出される可能性がある。さらにサントリナやローマンカモミールは芳香性が強く耐寒性に優れることから、芳香性を有する属間雑種が作出される可能性が考えられる。これら両種ともに香草のため、その属間雑種が作出された場合、アロマ効果（鎮静作用）など副次的な効用もあるかもしれない。以上のように、本研究結果やマーガレットとの遺伝子距離の違いを考慮した交配を試みることで、育種目的に即したさらなる属間雑種の作出が期待される。

第三章 作出個体の雑種識別

1. 緒言

第II章において、マーガレットと多年生キク科植物7種を交配・胚珠培養したところ、マーガレットとローダンセマムとの組合せで交配個体が作出された。しかしながら、これまでマーガレットとローダンセマムの属間雑種個体の作出事例がないことから、属間雑種であるかどうか不明である。マーガレットは自家和合性のため、作出した個体は自家受精した可能性も考えられる。そのため、本章では、遺伝的に雑種判定するために、遺伝子マーカーを設計しマーガレットとローダンセマムとの交配個体の雑種判定を試みた。今回、Genbankに両親のリボソームDNAのITS領域の塩基配列情報が掲載されていたことから、雑種判定に用いた遺伝子マーカーは、塩基配列情報は必要であるが、再現性が高いCAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) マーカーを採用し、両親のリボソームDNAのITS領域の塩基配列を基にCAPSマーカーを設計した。また、市販品種等を用いて設計したCAPSマーカーの汎用性を確認した。

2. 材料および方法

2.1 DNA抽出および目的領域の増幅

交配個体とその両親を供試した。サンプルの新葉からDNA抽出キットNucleoSpin Plant II DNA extraction kit (TAKARA BIO INC.)を用いた以下の手順でDNAを抽出した。新葉0.2gを2.0mlスクリュウキャップチューブ(滅菌凍結保存チューブ:ナチュラル; (株)アシスト)に入れ、ジルコニアボール(YTZ-2/KN3324222 2mm, (株)テックジャム)を5粒加えて、液体窒素で凍結後にビーズ式の細胞破碎装置を用いて振動速度5,500rpmで20秒間を3~4回繰り返し粉碎した。遠心分離機を用いて、キャップに張り付いたサンプルを落とした。サンプルを溶解するために、破碎したサンプルをマイクロチューブに移し、Buffer PL1を400 μ l加えvortexで十分に混合させた後、RNaseA溶液10 μ lを加えて混合し、65°Cで10分間保温した。溶解液をろ過するために、NucleoSpin FilterをCollection Tube (2 ml)にセットし、サンプル溶解液をカラムに加えて、11,000 \times g、2分間遠心分離し抽出液と残渣に分離した。抽出液にBuffer PC 450 μ lを添加し、vortexで十分に混合した。カラムへ吸着させるため、

NucleoSpin Plant II Columnを新しいCollection Tube (2 ml)にセットし、その混合液700 μ lをカラムに加えて、11,000 \times g、1分間遠心分離し、ろ液を捨てた。メンブレンの洗浄として、Buffer PW1を400 μ lをカラムに添加し、11,000 \times gで1分間遠心分離した。ろ液を捨てた後、同じCollection Tubeにカラムをセットし、Buffer PW2を700 μ lをカラムに添加し、11,000 \times gで1分間遠心分離した。再びろ液を捨て、Collection Tubeにカラムをセット後、Buffer PW2を200 μ lをカラムに添加し、11,000 \times gで2分間遠心させた。DNAを抽出するために、カラムを1.5mlマイクロチューブにセットし、65°Cに温めたBuffer PE 25 μ lをカラムに添加させ、65°Cで5分間インキュベートした。その後、11,000 \times gで1分間遠心分離し、さらに65°Cに温めたBuffer PE 25 μ lをカラムに添加し、11,000 \times gで1分間遠心分離し、DNAを溶出させた。

リボソームDNAのITS領域を増幅するプライマーの組合せとして、に5' - AGAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3' (Zhao et al. 2010) と ITS4 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al. 1990) を用いた。

PCRの試薬組成は、template DNA (100 ng/ μ L) を1 μ l, 各プライマー (10 μ M) を1 μ l, 5 \times KapaTaq Extra bufferを4 μ l, MgCl₂ (25mM) を1.4 μ l, dNTP Mixture (10mM) を0.6 μ l, KapaTaq Extra DNAポリメラーゼ (5U/ μ L) を0.1 μ l, 滅菌水を10.9 μ l加え、20 μ lに調整した。PCR増幅は、Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)を用いて、95°C 2分, (95°C 20秒, 55°C 15秒, 68°C 2分) \times 35サイクル, 68°C 2分の条件で増幅した。

2.2 遺伝子マーカーの設計

Genbankに掲載されているマーガレット (EF577287) とローダンセマム (L77777) のITS領域の塩基配列を基に、タカラ社のTakara Cut-Site Navigator (http://www.takara-bio.co.jp/enzyme/enzyme_search.php)を活用し、いくつかのCAPSマーカー(制限酵素)の中から、マーガレットのPCR産物では、ある部位において切断されるが、ローダンセマムのPCR産物では、切断されないと考えられる制限酵素を選択した。

```

          10      20      30      40      50
A. frutescens EF577287 AAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGAACCCTGCAAA
R. gyanum L77777 -----T.....

          60      70      80      90     100
A. frutescens EF577287 GCAGAACGACCCGTGAACACGTAATAATAACCGAGCACCGAGTGGGTTAA
R. gyanum L77777 -----C...A...GT.....

          110     120     130     140     150
A. frutescens EF577287 GCGCTTTGTTTGATCCTCTCGGTGCTTTGTCGATGTGCATTTACTCGAGT
R. gyanum L77777 -----A.....C.....CA...A...T....

          160     170     180     190     200
A. frutescens EF577287 CCTTTTGGGCCTTGTGAGTGTGTCATTGGCGCAATAACAACCCCGGCAC
R. gyanum L77777 ...C.....A.....TG.....

          210     220     230     240     250
A. frutescens EF577287 AATGCGTGCCAAGGAAAACATAAAGGCTTGTTCATGTTTGCC
R. gyanum L77777 ..C.T.....G.....C..C.....

          260     270     280     290     300
A. frutescens EF577287 CCGTTCGCGGTGTGCTCATGGGATGTGGCTTCTTTATAATCACAACGCAC
R. gyanum L77777 -----

          310     320     330     340     350
A. frutescens EF577287 TCTCGGCAACGGATATCTCGG---CTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCA
R. gyanum L77777 -----

          360     370     380     390     400
A. frutescens EF577287 AAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAACCATCGAGTTTT
R. gyanum L77777 -----

          410     420     430     440     450
A. frutescens EF577287 TGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCTTTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGG
R. gyanum L77777 -----

          460     470     480     490     500
A. frutescens EF577287 G---CGTCACGCATCGCTTCGCCCGCAAATCTATGTTGGGGGCGGATA
R. gyanum L77777 -----G.....NA.....A.T...A.....

          510     520     530     540     550
A. frutescens EF577287 TTGGTCTCCCGTGCTCATGGCGTGGTTGGCCAAAATAGGAGTCCCTTCGA
R. gyanum L77777 -----

```

第9図-1 マーガレットとローダンセマムのリボソーム DNA における ITS 領域の塩基配列 (Genbank)



第9図-2 マーガレットとローダンセマムのリボソーム DNA における ITS 領域の塩基配列 (Genbank)

2.3 制限酵素反応と電気泳動

制限酵素反応の試薬組成は、PCR 増副産物を 3 μ l、制限酵素 *Afl*II を 0.5 μ l、10 \times M Buffer を 1 μ l、0.1% BSA を 1 μ l、滅菌水を 4.5 μ l 加え 10 μ l に調整した。その後、37 $^{\circ}$ C、3 時間で酵素反応を行い、酵素反応産物 8 μ l と BPB 液 2 μ l を混合したものを 1.5% アガロースゲルのウェルにアプライした。また、ゲルの両端のウェルに 50bp マーカー (Nippon Genetics Co, Ltd) を 5 μ l アプライした。0.1mg/ml になるように Ethidium Bromide を加え 1 \times TAE Buffer で充填させた電気泳動槽を用い、100v、40 分間で泳動した。その後、トランスイルミネーターにのせ写真を撮影し、発現バンドを確認した。

2.4 遺伝子マーカーの汎用性の確認

2.2 で選択した CAPS マーカー (制限酵素 *Afl*II) の汎用性を確認するために、マーガレット 83 品種、ローダンセマム 7 品種を供試した。2.1 と同様に DNA を抽出し目的部位を PCR で増幅し、2.3 と同様な方法で、PCR 産物を酵素反応させた後に、電気泳動により発現バンドを確認した。

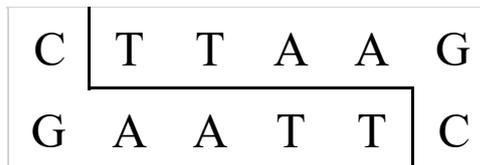
3. 結果

3.1 マーガレットとローダンセマムの識別可能な遺伝子マーカーの選択

Genbank に掲載されているリボソーム DNA の ITS 領

域のマーガレット (EF577287) とローダンセマム (L77777) の塩基配列を基に、マーガレットとローダンセマムで違いが見られる塩基配列を探索した。マーガレットとローダンセマムとの塩基配列の相違は、70~80bp、120~170bp、200~240bp、460~490bp、600~660bp の範囲で確認された (第9図)。

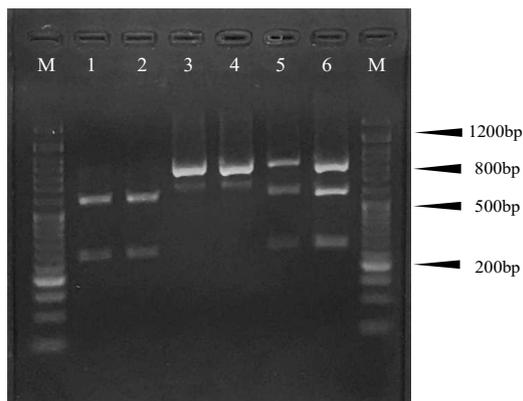
タカラ社の Takara Cut-Site Navigator (http://www.takarabio.co.jp/enzyme/enzyme_search.php) を活用し、マーガレットとローダンセマムを識別可能な制限酵素を探索したところ、227bp の塩基の相違から、制限酵素による切断の有無の違いがみられると考えられた制限酵素 *Afl*II ((株) タカラバイオ) を選択した (第10図)。



第10図 制限酵素 *Afl*II の配列

3.2 遺伝子マーカーを用いた交配個体の雑種識別

制限酵素 *Afl* II を用いた酵素反応物を電気泳動した際のバンドの発現数の違いから雑種判定を行った。マーガレットでは、特異的なバンドが2本(約300bp, 800bp)確認された。一方、ローダンセマムでは、特異的な1本のバンド(約1100bp)が確認された。マーガレットとローダンセマムの交配個体では、3本のバンド(約300bp, 800bp および1100bp)で、両親に特異的なバンドの両方が確認された(第11図)。



第11図 制限酵素 *Afl* II を用いたマーガレット、ローダンセマムおよびその交配個体の CAPS バンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 1~2:マーガレット, 3~4:ローダンセマム, 5~6: マーガレット×ローダンセマム。

- 1: ‘サンデーリップル’, 2: ‘ブリアンルージュ’,
3: ‘アフリカンアイズ’, 4: ‘エルフピンク’,
5: ‘サンデーリップル’× ‘アフリカンアイズ’,
6: ‘ブリアンルージュ’× ‘エルフピンク’

3.3 選択した CAPS マーカーの汎用性の確認

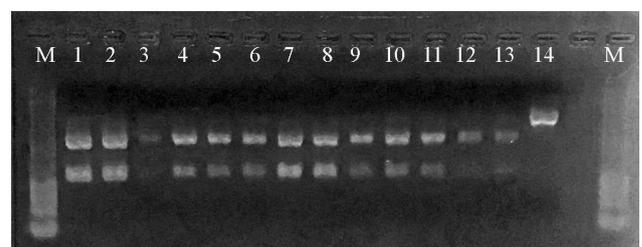
マーガレット 83 品種、ローダンセマム 7 品種を用いて CAPS マーカーの汎用性を確認した。供試した品種のうち、マーガレットでは、バンドが2本確認され、ローダンセマムでは1本のバンドが確認された(第12~18図)。以上の結果から、CAPS マーカー(制限酵素 *Afl* II) は、マーガレットとローダンセマムを識別できる汎用性の高いマーカーであると考えられた。

4. 考察

Genbank により、マーガレットとローダンセマムのリボソーム DNA における ITS 領域の塩基配列情報が得られたため、再現性の高い CAPS マーカーによる雑種識別を試みた。

CAPS マーカー(制限酵素 *Afl* II) を用いた酵素反応物を電気泳動し、バンドの発現数の違いから雑種判定した。マーガレットでは、特異的なバンドが2本(約300bp, 800bp)確認された一方、ローダンセマムでは、特異的な1本のバンド(約1100bp)が確認された。マーガレットとローダンセマムの交配個体では、3本のバンド(約300bp, 800bp および1100bp)がみられ、両親に特異的なバンドの両方であると確認されたため、マーガレットとローダンセマムの雑種であると判定された。

さらに、マーガレット 83 品種、ローダンセマム 7 品種を用いて CAPS マーカーの汎用性を確認した結果、マーガレットでは、バンドが2本確認され、ローダンセマムでは1本のバンドが確認された。以上の結果から、CAPS マーカー(制限酵素 *Afl* II) は、マーガレットとローダンセマムを識別できる汎用性の高いマーカーであることが確認された。本研究の結果、マーガレットとローダンセマムの交配個体は、属間雑種であると遺伝子的に判定されたため、初めてマーガレットとローダンセマムの属間雑種が作出されたことが証明された。



第12図 制限酵素 *Afl* II を用いたマーガレットとローダンセマムの CAPS バンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 1~13:マーガレット, 14:ローダンセマム。

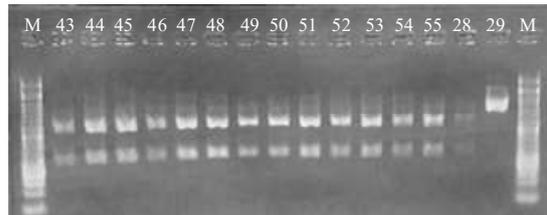
- 1: ‘風恋香’, 2: ‘カーニバルクイーン’, 3: ‘エンジェルマイス’,
4: ‘スイートリップル’, 5: ‘おぼろ月’, 6: ‘ピーチクイーン’,
7: ‘クイーンマイス’, 8: ‘ムーンライト’, 9: ‘ガーネットクイーン’,
10: ‘カナリアクイーン’, 11: ‘キューティーマイス’,
12: ‘サワーリップル’, 13: ‘サンデーリップル’, 14: ‘アフリカンアイズ’



第13図 制限酵素 *AflII* を用いたマーガレットとローダンセマムの CAPS バンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 15~28:マーガレット, 29:ローダンセマム.

15: 'ファイアークラッカー', 16: 'サッシーレッド', 17: 'サッシーピンク', 18: 'サッシーコンパクトホワイト', 19: 'コンパクトディープローズ', 20: 'マギーパステルイエロー', 21: 'ヘリオウォーターメロン', 22: 'ミニダブルホワイト', 23: 'ミニホワイト', 24: 'ミニイエロー', 25: 'イエローアネモネ', 26: 'モンローローズ', 27: 'ダブルディープローズ', 28: 'ブリアンルージュ', 29: 'エルフピンク'



第15図 制限酵素 *AflII* を用いたマーガレットとローダンセマムの CAPS バンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 43~55,28:マーガレット, 29:ローダンセマム.

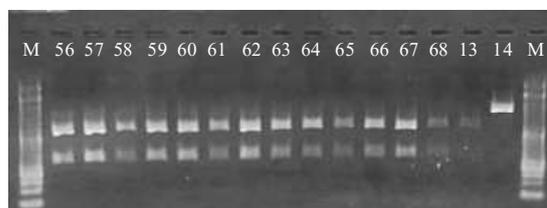
43: 'フェアリーダンスレッド', 44: 'フェアリーダンスイエローマジック', 45: 'フェアリーダンススイートピンク', 46: 'フェアリーアイイエロー', 47: 'サマーソングローズ', 48: 'メテオールレッド', 49: 'コメットピンク', 50: 'ほぼたんパステルピンク', 51: 'ほぼたんスイートピンク', 52: 'ほぼたんピンクホワイト', 53: 'ほぼたんクリーム', 54: 'ほぼたんピンク', 55: 'ほぼたんディープローズ', 28: 'ブリアンルージュ', 29: 'エルフピンク'



第14図 制限酵素 *AflII* を用いたマーガレットとローダンセマムの CAPS バンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 30~42,13:マーガレット, 14:ローダンセマム.

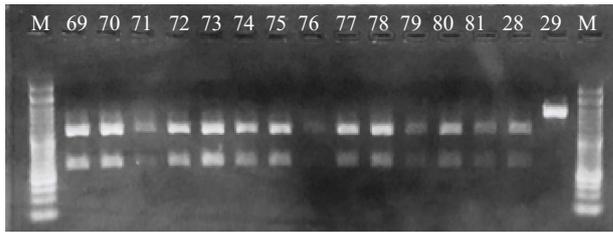
30: 'ボンザレモンイエロー', 31: 'ボンザラズベリー', 32: 'ボンザサクラ', 33: 'ボンザチェリー', 34: 'ボンザイエロー', 35: 'ボンザホワイト', 36: 'ボンザルージュピンク', 37: 'ボンザキャラメルホワイト', 38: 'マックスマムホワイト', 39: 'マックスマムピンク', 40: 'マックスマムレッド', 41: 'マックスマムイエロー', 42: 'フォーシーズンズホワイト', 13: 'サンデーリップル', 14: 'アフリカンアイズ'



第16図 制限酵素 *AflII* を用いたマーガレットとローダンセマムの CAPS バンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 56~68,13:マーガレット, 14:ローダンセマム.

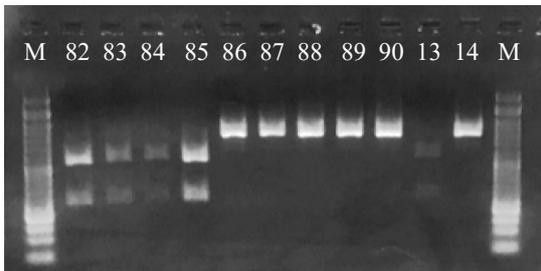
56: 'ほぼたんレモンホワイト', 57: 'ほぼたんイエロー', 58: 'ほぼたんピンクブーケ', 59: 'ルビールビー', 60: 'ダブルチェルシー', 61: '初恋ほっぺ', 62: 'チェルシーガール', 63: 'ほぼたんマカロンピンク', 64: 'ミルクティアラ', 65: 'たんぽぽ', 66: 'エンジェリックキャンディピンク', 67: 'エンジェリックルビー', 68: 'エンジェリックスノー', 13: 'サンデーリップル', 14: 'アフリカンアイズ'



第17図 制限酵素 *Afl*II を用いたマーガレットとローダンセマムの CAPS バンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 69~81,28:マーガレット 29:ローダンセマム.

69: ‘アルプス’, 70: ‘エンジェリックメイズ’, 71: ‘エンジェリックベイビーピンク’, 72: ‘エンジェリックパーガンディ’, 73: ‘エベレスト’, 74: ‘エンジェリックフクシマ’, 75: ‘エンジェリックジャイアントピンク’, 76: ‘エンジェリックレモンパステル’, 77: ‘マーズ’, 78: ‘リフレクションピンク’, 79: ‘キャンディホワイト’, 80: ‘パーカッションホワイト’, 81: ‘パーカッションシンバルライトピンク’, 28: ‘ブリアンルージュ’, 29: ‘エルフピンク’



第18図 制限酵素 *Afl*II を用いたマーガレットとローダンセマムの CAPS バンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 82~85,13:マーガレット

86~90,14:ローダンセマム.

82: ‘パーカッションディープローズ’, 83: ‘パーカッションタンバリンレッド’, 84: ‘パーカッションシンバルダークピンク’, 85: ‘モモコ’, 86: ‘ピーチジャム’, 87: ‘マーキュリー’, 88: ‘エアロローズ’, 89: ‘プチマカロン’, 90: ‘アプリコットジャム’, 13: ‘サンデーリップル’, 14: ‘アフリカンアイズ’

第IV章 マーガレットとローダンセマムの属間雑種個体の形態的評価

1. 緒言

第III章において、マーガレットとローダンセマムとの組合せにより作出された交配個体が両親との属間雑種であると判別された。これまでマーガレットとローダンセマムの属間雑種の作出事例がないことから、その形態特性は不明である。

そこで、本実験では、属間雑種個体の形質を評価するために、属間雑種個体と両親の形態や花色特性を調査した。

2. 材料および方法

2.1 属間雑種個体の形態的特性

2.1.1 供試植物とその育苗

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種個体およびその両親、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種個体およびその両親の6品種(系統)を実験に供試した。

親株から挿し穂を採取し、人工培養土(セルピート; (株)富士見工業)を充填した128穴セルトレイに挿し芽を行った。セル苗は、静岡県農林技術研究所伊豆農業研究センター(静岡県賀茂郡東伊豆町)の温室内で育苗した。約2~3週間後に十分な発根が確認された挿し芽を、3.5号ポリポットにポット上げた。培養土は、赤土、バーク堆肥、セルピートを2:1:3の割合で調整した混合土を使用した。ポット苗は、週に1回の頻度で、液体肥料{OATハウス1号; (株)OATアグリオ}を1000倍希釈で施与し、約6週間、温室内で育苗した。その後、6号鉢に鉢上げした。

2.1.2 生育調査

調査項目は、葉色、花型、花色(舌状花、筒状花)、花粉の有無、草丈、株張り、花首長、花径、一次分枝数、葉長、葉幅、舌状花数、舌状花長、舌状花幅、葉の毛状突起の有無の計15項目で、1区3株3反復とした。

2.1.3 統計解析

各測定項目について、処理区間や供試植物間に有意な差があるかを調べるため、統計解析用ソフトウェア{IBM SPSS Statistics version 22.0; 日本IBM(株)}を用いて、多重比較(Tukey検定)を行った。

2.2 属間雑種個体の花色特性の定量

2.2.1 色彩色差計を用いた花色測定

1品種6株から株ごとに完全開花した舌状花をランダムにサンプリングし、色彩色差計(KONICA MINOLTA INC. CM-700d)を用いて色差値(L*a*b*)を測定した。

2.2.2 色素分析

高速液体クロマトグラフィー(HPLC (High performance liquid chromatography), Prominence シリーズ (LC-20AB, SIL-20A, CBM-20A, SPD-M20A and CTO-20A), (株)島津製作所)を用いて主要なアントシアニン(デルフィニンジン, シアニジン, ペラルゴニン, ペオニン, ペチュニン, マルビジン)の定量分析を行った。舌状花0.1gを2.0ml スクリューキャップチューブ(滅菌凍結保存チューブ: ナチュラル; (株)アシスト)に入れ、ジルコニアボール(YTZ-2/KN3324222 2mm, (株)テックジャム)を6粒加えて、液体窒素で凍結後にビーズ式の細胞破碎装置を用いて振動速度5,000rpmで30秒間粉碎した。遠心分離機を用いて、キャップに張り付いたサンプルを落とした後、MAW (MeOH : CH₃COOH : D.W=9 : 1 : 10)を1ml加えて再度、細胞破碎装置を用いて振動速度5,000rpmで20秒間粉碎し、色素を抽出した。これを遠心分離器に入れて、回転速度12,000rpmで3分間遠心分離を行い、抽出液と残渣に分離した。アントシアニンの溶出している上澄み液を取り、1000 μ lチップにセラミックウールを詰めたものに流して濾過した。全濾液に6規定の塩酸を500 μ l加え、80°Cで1.5時間湯煎して加水分解を行った。湯煎が終わったら、すぐに氷水で冷却した。サンプルが冷めた後に、ジエチルエーテル1mlを加え、ボルテックスで攪拌し、上部のエーテル層と下部の水層に分離させた。アントシアニンは水層に溶けているため、上部のエーテル層のみを取り除いた。残った水層に3-メチル-1-ブタノールを1ml加え、ボルテックスで攪拌した後、上層にアントシアニンが移動するまで1時間程度、静置した。上層のアントシアニンが含まれる層をサンプル瓶に移し、ドライヤーの冷風にて水分がなくなるまで乾燥させた。これにMAWを200 μ l加え、シリンジフィルター(TOYOADVANTEC DISMIC-25HP 孔径0.20 μ m, アドバンテック東洋(株))でろ過してバイアル小瓶に移し、各サンプル100 μ lをHPLC分析

に供した。HPLC 分析機には、(株) 島津製作所 LC-Solution システムを用いた。分析装置の情報および、流速設定は以下の通りである。

<分析装置>

アプリケーション: SHIMADZU LC-Solution
カラム: Shodax C18M No.4E K011518 (4.6×250mm 5μm)
オンラインデガッサ: SHIMADZU DGU-20A3/20A5
送液ユニット: SHIMADZU LC-20AB
検出器: SHIMADZU SPD-M20A
カラムオープン: SHIMADZU CTO-20A/20AC
オートサンプラ: SHIMADZU SIL-20A/20AC/20AHT/20ACHT
システムコントローラー: SHIMADZU CBM-20A/20Alite

<移動層>

- ・ A 液 H₂O : H₃PO₄ = 985 : 15
- ・ B 液 H₂O : CH₃COOH : CH₃CN : H₃PO₄ = 535 : 250 : 200 : 15
- ・ 送液システム: B.CONC
0 - 40min. 20 - 85 %
40 - 45min. 85 - 20 %
50min. STOP
- ・ 流速: 1.0ml/min.
- ・ 検出波長: 530nm
- ・ カラムオープン温度: 40°C

2.2.3 統計解析

各測定項目について、処理区間や供試植物間に有意な差があるかを調べるため、統計解析用ソフトウェア {IBM SPSS Statistics version 22.0; 日本 IBM (株)} を用いて、多重比較 (Tukey 検定) を行った。

3. 結果

3.1 属間雑種個体の形態的特性

3.1.1 交配個体の形態調査

葉色、花型、花色 (舌状花、筒状花)、花粉の有無、草丈、株張り、花茎長、花径、一次分枝数、葉長、葉幅、舌状花数、舌状花長、舌状花幅、葉の毛状突起の有無の計 15 項目の調査結果を第 2~4 表に示した。

1) 葉色

‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種とその両親は、灰緑色であった。‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種およびアフリカンアイズは灰緑色で、‘サンデーリップル’は薄緑色であった。

2) 花型・舌状花色

‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種は、一重咲きで、舌状花が赤紫色であり、種子親と同様な花色であった。一方、‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種は、一重咲きで、舌状花が薄桃色であったが、両親は白花であった。

3) 筒状花色・花粉の有無

‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種は、筒状花が黒茶色で花粉は観察されなかった。‘ブリアンルージュ’は、筒状花が黄茶色で花粉は観察されなかった。‘エルフピンク’は、筒状花が黒茶色で花粉を有していた。一方、‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種は、筒状花が黒茶色で花粉は観察されなかった。‘サンデーリップル’は筒状花が黄色で、‘エルフピンク’は黒茶色であった。両親はともに花粉を有していた。

4) 草丈

‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種の草丈 (61.3cm) は、‘ブリアンルージュ’ (77.0cm) よりも低く、‘エルフピンク’ (39.5cm) よりも高かった。一方、‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種の草丈 (44.0cm) は、‘サンデーリップル’ (31.3cm) よりも高く、‘アフリカンアイズ’ (42.3cm) と同等であった。

5) 株張り

‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種の株張り (36.7cm) は、両親と有意な差がなかった。一方、‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種の株張り (39.2cm) は、‘アフリカンアイズ’ (28.2cm) よりも大きく、‘サンデーリップル’ (36.9cm) と同等であった。

6) 花茎長

‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種の花茎長 (59.3cm) は、‘エルフピンク’ (38.5cm) よりも長く、‘ブリアンルージュ’ (62.0cm) と同等であった。一方、‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種の花茎長 (42.7cm) は、‘サンデーリップル’ (28.3cm) よりも長く、‘アフリカンアイズ’ (41.0cm) と同等であった。

7)花径

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種の花径(48.4mm)は、‘エルフピンク’(40.0mm)よりも大きく‘ブリアンルーージュ’(50.5mm)と同等であった。同様に、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種の花径(45.5mm)は、‘アフリカンアイズ’(35.4mm)よりも大きく‘サンデーリップル’(46.6mm)と同等であった。

8)一次分枝数

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種の一
次分枝数(3.3本)は、‘エルフピンク’(13.0本)よりも少なく‘ブリアンルーージュ’(4.7本)と同等であった。同様に、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種の一
次分枝数(6本)は、‘アフリカンアイズ’(20.7本)よりも少なく、‘サンデーリップル’(8.5本)と同等であった。

9)葉長、葉幅

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種の葉長(48.4mm)、葉幅(28.4mm)は、‘エルフピンク’(26.5mm,14.9mm)よりも大きく‘ブリアンルーージュ’(55.3mm,27.8mm)と同等であった。一方、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種の葉長(48.2mm)、葉幅(22.0mm)は、‘サンデーリップル’(76.8mm,45.1mm)よりも小さく‘アフリカンアイズ’(29.4mm,14.9mm)と同等であった。

10)舌状花数

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種の舌状花数(24.3枚)は、両親よりも枚数が多かった。一方、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種の舌状花数(20.7枚)は、両親と有意な差がなかった。

11)舌状花長、舌状花幅

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種の舌状花長(23.4mm)は、‘エルフピンク’(18.8mm)よりも長く、‘ブリアンルーージュ’(23.6mm)と同等であった。舌状花幅(4.6mm)は、両親よりも狭かった。同様に、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種の舌状花長(21.5mm)は、‘アフリカンアイズ’(16.0mm)よりも長く、‘サンデーリップル’(20.8mm)と同等であった。舌状花幅(6.5mm)は、アフリカンアイズ(5.0mm)よりも広かった。

12)葉の毛状突起の有無

両属間雑種の葉の毛状突起は、花粉親のローダンセ

マムと同じく有していた。

3.2 属間雑種個体の花色特性の定量

3.2.1 色彩色差計を用いた花色測定

マーガレット‘ブリアンルーージュ’×ローダンセマム‘エルフピンク’の属間雑種とその両親の舌状花を色彩色差計で測定し、明度を示すL*値、赤みを示すa*値、黄色みを示すb*値および彩度を示すC*値を表した(第5表)。同様に、マーガレット‘サンデーリップル’×ローダンセマム‘アフリカンアイズ’の属間雑種とその両親の舌状花を色彩色差計で測定し、L*値、a*値、b*値およびC*値を示した(第6表)。

1)L*値

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種では、L*値が両親の間であった。一方、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種では、両親と比べ、有意に低かった。

2)a*値

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種では、a*値は‘ブリアンルーージュ’と同等で、‘エルフピンク’よりも有意に高かった。一方、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種では、両親と比べ、有意に高かった。

3)b*値

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種では、b*値は‘エルフピンク’と同等で、‘ブリアンルーージュ’よりも有意に低かった。一方、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種では、両親と比べ、有意に低かった。

4)C*値

‘ブリアンルーージュ’×‘エルフピンク’の属間雑種では、C*値は‘ブリアンルーージュ’と同等で、‘エルフピンク’よりも有意に高かった。一方、‘サンデーリップル’×‘アフリカンアイズ’の属間雑種では、両親と比べ、有意に高かった。

3.2.2 色素分析

属間雑種の色素組成や色素量を両親と比較するために、マーガレット‘ブリアンルーージュ’×ローダンセマム‘エルフピンク’の属間雑種とその両親および、マーガレット‘サンデーリップル’×ローダンセマム‘アフリカンアイズ’の属間雑種とその両親の舌状花から6つのアントシアニン(デルフィニジン, シアニジン, ペラルゴニジン, ペオニジン, マルビジン, ペチュニジン)を測定した(第7, 8表)。また、‘ブリアンルーージュ’

ユ' × 'エルフピンク'の属間雑種は、色素組成をその両親と比較した(第9表)。

1)デルフィニジン

'ブリアンルージュ' × 'エルフピンク'の属間雑種の含有量は、'エルフピンク'と同等で、'ブリアンルージュ'よりも有意に低かった。一方、'サンデーリップル' × 'アフリカンアイズ'の属間雑種では、検出されたのに対し、両親では検出されなかった。

2)シアニジン

'ブリアンルージュ' × 'エルフピンク'の属間雑種の含有量は、両親の間であった。一方、'サンデーリップル' × 'アフリカンアイズ'の属間雑種では、検出されたのに対し、両親は検出されなかった。

3)ペラルゴニン

'ブリアンルージュ' × 'エルフピンク'の属間雑種では、両親と比べ、有意に含有量が多かった。一方、'サンデーリップル' × 'アフリカンアイズ'の属間雑種では、検出されたのに対し、両親では検出されなかった。

4)ペオニン

'ブリアンルージュ' × 'エルフピンク'の属間雑種およびその両親では、検出されなかった。一方、'サンデーリップル' × 'アフリカンアイズ'の属間雑種では、検出されたのに対し、両親は検出されなかった。

5)マルビジン

'ブリアンルージュ' × 'エルフピンク'の属間雑種の含有量は、'エルフピンク'と同等で、'ブリアンルージュ'よりも有意に低かった。一方、'サンデーリップル' × 'アフリカンアイズ'の属間雑種では、検出されたのに対し、両親は検出されなかった。

6)ペチュニン

両属間雑種およびその両親において、検出されなかった。

7)色素組成

'ブリアンルージュ' × 'エルフピンク'の属間雑種の色素組成は、シアニジン系(シアニジン含有量とペオニン含有量の総量)比率が、約60%であったのに対し、その両親のシアニジン系比率が約90%であった。一方、ペラルゴニジンの比率は、約30%であったのに対し、両親のペラルゴニン比率は約2%であった。デルフィニジン系(デルフィニジン含有量とマルビジン含有量の総量)比率は、3~7%と有意な差は見られなかった(第9表)。

4. 考察

4.1 属間雑種個体の草姿・花数

属間雑種個体の形態調査の結果、両属間雑種ともに、一次分枝数がローダンセマムよりも少なく草丈が高かったことから、鉢物商品として一般的に求められているコンパクトで分枝数が多いものではなかった。しかしながら、花径は、種子親のマーガレットと同等で、花粉親のローダンセマムよりも大きかったため商品性が高いと考えられる。また、'ブリアンルージュ' × 'エルフピンク'の属間雑種は、舌状花数が両親よりも多かった。そのため、マーガレットとローダンセマムの属間雑種は、有益な形態特性を有する場合があると考えられた。さらに、属間雑種では、マーガレットにはない毛状突起が葉や茎に観察された。毛状突起の役割は、強光や乾燥に対する防御、物理的かつ分泌液を出す線状の毛状突起では、その分泌液により病害虫の食害を防除する効果があると言われている(Werker, 2000)。このような特性をマーガレットとローダンセマムの属間雑種が有していた場合、生産側では、農薬使用量・回数の削減がされ生産コストと農薬散布に係る労働時間の削減につながる可能性がある。また、病害虫被害が軽減することで、観賞期間の延長や病害虫防除に関わる農薬散布の削減に寄与されると考えられる。さらに、環境ストレス耐性を有していた場合、環境の変化が激しい露地栽培でも生育への影響が軽減されることから、花壇の植栽にさらに利用されやすくなるかもしれない。以上のことから、雑種個体には、ローダンセマムと同様に毛状突起が観察されたため、耐虫性や耐候性を含む詳細な栽培特性に関する調査が必要である。

作出された属間雑種個体は、ともに筒状花は黒茶色で花粉は観察されなかった。一般的に無花粉の個体は、自家受粉することがないため花の観賞期間が長くなることや、輸送時の振動などで花粉が飛散することがなく、花粉で花が汚れることがないという利点がある。マーガレットの筒状花色は、黄色から黄茶の個体がほとんどであるが、マーガレットとハナワギクの属間雑種では、筒状花が黒茶色で、無花粉であり、ローダンセマムとの属間雑種と同様であった。形態的に属間雑種と推察する指標として、筒状花色と花粉の有無が考えられる。さらにマーガレットとローダンセマムとの属間雑種では、毛状突起が観察された。毛状突起は、マーガレットでは観察されず、ローダンセマムでは観察されることから、マーガレットとローダンセマ

ムとの属間雑種の場合、毛状突起の有無が、形態的に属間雑種と推察する指標になりうると考えられた。

4.2 属間雑種個体の花色

‘ブリアンルーージュ’ × ‘エルフピンク’の雑種個体の舌状花色は、‘ブリアンルーージュ’同様に赤紫色で、色差値 (a*値, C*値) も類似していたが、舌状花の色素分析の結果、総アントシアニン量が両親の中間で、シアニン系やペラルゴニン系の含有量や比率に違いがみられた。

一方、‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種の舌状花色は、両親 (白花) と異なり薄桃色であった。色差値 (L*値, a*値, b*値, C*値) は両親と有意な差が見られた。アントシアニン含有量を分析したところ、属間雑種には、アントシアニンの蓄積が確認されたが、両親ではアントシアニンが検出されなかった。これらのことから、マーガレットとローダンセマムの交配により、両親と異なる新たな花色を有する属間雑種個体を作成する可能性があると考えられた。

白花化の原因遺伝子は、アントシアニン生合成遺伝子 [*Gentian* (Nishihara et al., 2006), *Antirrhinum majus* (Martin et al., 1991)] や、アントシアニン調節遺伝子 [*Antirrhinum majus* (Martin et al., 1991), *Ipomoea nil* (Morita et al., 2006), *Petunia hybrid* (Albert et al., 2011)] や、液胞への輸送関連遺伝子 [*Petunia hybrid* (Mueller et al., 2000)] の変異等など多くの植物で様々な要因の報告がある。これらの知見や花色分析の結果から、両親の白花がそれぞれ異なる色素関連遺伝子の変異に由来することが示唆され、属間雑種は、両親の各原因遺伝子が互いに補完されたため、有色になったと推測された。今後、これらの原因遺伝子の発現解析など詳細な分析を行うことで、両親での白花の要因および、属間雑種での有色化の要因が明らかになると考えられる。

4.3 属間雑種個体のその他形質の評価の必要性

属間雑種の花粉親であるローダンセマムは耐寒性に優れており、冬季から春季にかけて花壇用、鉢物用として流通されている。一方、マーガレットも主に春季に流通されるが、出荷期間としては秋季～春季にかけて出荷されている。マーガレットの生育適温は20～25度で、耐寒性が弱いため、静岡県における冬場の栽培管理では、加温が必須である。栽培温度や栽培品種によっては低温障害が発生し生産性が低下するという課題がある。また、冬場の露地利用は、氷点下まで気温

が下がらない地域や無霜地域に限られている。キク科植物では、耐寒性に優れた近縁種との交配により耐寒性を有する属間雑種が作出されたと報告されている

(Cheng et al. 2010; Deng et al. 2011)。今回作出されたマーガレット × ローダンセマムの属間雑種も、花粉親が耐寒性に優れたローダンセマムであるため、その属間雑種も同様に耐寒性に優れている可能性が考えられる。今後、属間雑種の耐寒性を含めた更なる栽培特性の評価を行う必要がある。

第2表 マーガレットとローダンセマムの属間雑種およびその両親の花・葉の特性

品種	葉色	花型	舌状花色	筒状花色	花粉の有無
<i>A. frutescens</i> ‘ブリアンルーージュ’	灰緑	一重	赤紫	黄茶	無
<i>R. gyanum</i> ‘エルフピンク’	灰緑	一重	桃	黒茶	有
属間雑種	灰緑	一重	赤紫	黒茶	無

品種	葉色	花型	舌状花色	筒状花色	花粉の有無
<i>A. frutescens</i> ‘サンデーリップル’	薄緑	一重	白	黄	有
<i>R. gyanum</i> ‘アフリカンアイズ’	灰緑	一重	白	黒茶	有
属間雑種	灰緑	一重	薄桃	黒茶	無

第3表 ‘ブリアンルーージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種とその両親の形態特性

品種	草丈 (cm)	株張り (cm)	花茎長 (cm)	花径 (mm)	一次分枝数 (本)
<i>A. frutescens</i> ‘ブリアンルーージュ’	77.0 ± 0.6 ^z e ^y	36.5 ± 3.3	62.0 ± 5.5 b	50.5 ± 0.9 b	4.7 ± 0.3 ab
<i>R. gyanum</i> ‘エルフピンク’	39.5 ± 1.2 a	32.3 ± 5.3 n.s	38.5 ± 2.1 a	40.0 ± 1.5 a	13.0 ± 2.1 b
属間雑種	61.3 ± 1.9 b	36.7 ± 1.5	59.3 ± 1.9 b	48.4 ± 0.5 b	3.3 ± 0.7 a

品種	葉長 (mm)	葉幅 (mm)	舌状花数 (枚)	舌状花長 (mm)	舌状花幅 (mm)	毛状突起 の有無
<i>A. frutescens</i> ‘ブリアンルーージュ’	55.3 ± 3.9 b	27.8 ± 1.8 b	20.7 ± 0.9 a	23.6 ± 0.4 b	5.6 ± 0.1 b	- ^x
<i>R. gyanum</i> ‘エルフピンク’	26.5 ± 1.9 a	14.9 ± 1.0 a	20.5 ± 0.3 a	18.8 ± 0.3 a	5.4 ± 0.1 b	○
属間雑種	48.4 ± 4.5 b	28.4 ± 3.3 b	24.3 ± 0.3 b	23.4 ± 0.3 b	4.6 ± 0.1 a	○

z : 平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

y : 表中の同一カラム内の同一英小文字間には Tukey の b 検定により 5%水準で有意な差が存在しないことを示す

x : ‘-’は葉の毛状突起が観察されなかったことを示す。‘○’は葉の毛状突起が観察されたことを示す。

第4表 ‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種とその両親の形態特性

品種	草丈 (cm)	株張り (cm)	花茎長 (cm)	花径 (mm)	一次分枝数 (本)	
<i>A. frutescens</i> ‘サンデーリップル’	31.3 ± 1.0 ^z a ^y	36.9 ± 0.9 b	28.3 ± 1.8 a	46.6 ± 0.7 b	8.5 ± 1.7 a	
<i>R. gyanum</i> ‘アフリカンアイズ’	42.3 ± 2.3 b	28.2 ± 1.4 a	41.0 ± 0.6 b	35.4 ± 0.6 a	20.7 ± 0.3 b	
属間雑種	44.0 ± 4.4 b	39.2 ± 1.6 b	42.7 ± 1.5 b	45.5 ± 1.1 b	6.0 ± 0.0 a	

品種	葉長 (mm)	葉幅 (mm)	舌状花数 (枚)	舌状花長 (mm)	舌状花長 (mm)	毛状突起 の有無
<i>A. frutescens</i> ‘サンデーリップル’	76.8 ± 6.5 b	45.1 ± 3.7 b	21.7 ± 0.2	20.8 ± 0.4 b	20.8 ± 0.4 b	→
<i>R. gyanum</i> ‘アフリカンアイズ’	29.4 ± 1.7 a	14.9 ± 0.6 a	21.0 ± 0.0 n.s.	16.0 ± 1.0 a	16.0 ± 1.0 a	○
属間雑種	48.2 ± 3.7 a	22.0 ± 0.4 a	20.7 ± 0.3	21.5 ± 0.4 b	21.5 ± 0.4 b	○

z : 平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

y : 表中の同一カラム内の同一英小文字間には Tukey の b 検定により 5%水準で有意な差が存在しないことを示す

x : ‘→’は葉の毛状突起が観察されなかったことを示す. ‘○’は葉の毛状突起が観察されたことを示す.

第5表 ‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種とその両親の色差値

品種	L*	a*	b*	C*
<i>A. frutescens</i> ‘ブリアンルージュ’	21.2 ± 0.6 ^z a ^y	44.4 ± 1.1 b	3.1 ± 0.6 b	44.5 ± 1.1 b
<i>R. gyanum</i> ‘エルフピンク’	69.6 ± 1.2 c	8.5 ± 1.0 a	-5.3 ± 0.7 a	10.0 ± 1.1 a
属間雑種	27.6 ± 0.8 b	44.7 ± 1.0 b	-3.0 ± 1.7 a	45.0 ± 0.9 b

z : 平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

y : 表中の同一カラム内の同一英小文字間には Tukey の b 検定により 5%水準で有意な差が存在しないことを示す

第6表 ‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種とその両親の色差値

品種	L*	a*	b*	C*
<i>A. frutescens</i> ‘サンデーリップル’	85.4 ± 0.7 ^z b ^y	-1.3 ± 0.1 a	2.6 ± 0.3 b	3.0 ± 0.3 a
<i>R. gyanum</i> ‘アフリカンアイズ’	83.1 ± 1.2 b	-1.1 ± 0.1 a	2.3 ± 0.2 b	2.6 ± 0.2 a
属間雑種	76.6 ± 0.7 a	6.8 ± 0.8 b	-3.0 ± 0.5 a	7.4 ± 1.0 b

z : 平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

y : 表中の同一カラム内の同一英小文字間には Tukey の b 検定により 5%水準で有意な差が存在しないことを示す

第7表 ‘ブリアンルーージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種とその両親のアントシアニン含有量^z

品種	デルファイニン ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)	シアニン ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)	ペラルゴニン ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)	マルビジン ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)
<i>A. frutescens</i> ‘ブリアンルーージュ’	11.1 ± 2.0 ^y b ^x	540.9 ± 19.3 c	12.1 ± 2.1 a	12.4 ± 3.3 b
<i>R. gayanum</i> ‘エルフピンク’	0.09 ± 0.06 a	5.6 ± 4.7 a	0.12 ± 0.10 a	0.18 ± 0.11 a
属間雑種	2.2 ± 0.3 a	145.6 ± 41.2 b	77.1 ± 18.4 b	3.9 ± 0.7 a

z : ペチュニンおよびペオニンは検出されなかった

y : 平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

x : 表中の同一カラム内の同一英小文字間には Tukey の b 検定により 5%水準で有意な差が存在しないことを示す

第8表 ‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’の属間雑種とその両親のアントシアニン含有量^z

品種	デルファイニン ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)	シアニン ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)	ペラルゴニン ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)	マルビジン ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)
<i>A. frutescens</i> ‘サンデーリップル’	ND ^y	ND	ND	ND
<i>R. gayanum</i> ‘アフリカンアイズ’	ND	ND	ND	ND
属間雑種	0.13 ± 0.03 ^x	9.9 ± 0.7	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.01
				0.18 ± 0.05

z : ペチュニンまたは検出されなかった

y : ND : 不検出

x : 平均値 ± 標準偏差 (n = 6)

第9表 ‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’の属間雑種とその両親のアントシアニン組成比率

品種	総アントシアニン量 ($\mu\text{g} \cdot \text{gFW}^{-1}$)	ペラルゴニン系 (%) ^x	シアニン系 (%) ^w	デルフィニン系 (%) ^v
<i>A. frutescens</i> ‘ブリアンルージュ’	576.4 ^z c ^y	2.1 a	93.9 b	4.0
<i>R. gayanum</i> ‘エルフピンク’	6.0 a	2.0 a	91.0 b	7.1 n.s.
属間雑種	228.7 b	34.1 b	62.9 a	3.0

z : 平均値 (n = 6)

y : 表中の同一カラム内の同一英小文字間には Tukey の b 検定により 5%水準で有意な差が存在しないことを示す

x : ペラルゴニン系 : ペラルゴニン含有量の比率

w : シアニン系 : シアニン含有量とデルフィニン含有量の総和の比率

v : デルフィニン系 : デルフィニン含有量とマルビジン含有量の総和の比率

第V章 マーカー選抜に適した SCAR マーカーの開発

1. 緒言

第三章では、CAPS マーカーによりマーガレットとローダンセマムとの属間雑種であると判定され、そのマーカーの汎用性の高さも確認された。しかしながら、CAPS マーカーを用いた雑種判定は、一般的に、操作手順が煩雑で判定までに時間がかかり、比較的試薬等の費用がかかるため、属間雑種育種を効率的に進める上で、多量のサンプルを扱う一次選抜時におけるマーカー選抜に適していない。CAPS と同等な再現性があり、迅速な判定が可能である SCAR マーカーは、多くの植物の品種識別等に利用されている (Bautista et al. 2003; Mariniello et al. 2002; Melotto et al. 1996)。

そこで、本章では、マーガレットとローダンセマムの属間雑種を育成する過程で多くのサンプルを扱う一次選抜を、より効率的かつ安価に行うために雑種識別可能な SCAR マーカーの開発を試み、そのマーカーの汎用性を確認した。

2. 材料および方法

2.1 DNA 抽出および目的領域の増幅

雑種個体とその両親を供試し、DNA 抽出は第三章 2.1 に準じて行った。

PCR の試薬組成は、template DNA (100 ng/ μ L) を 1 μ l, 各プライマー (10 μ M) を 1 μ l, 5 \times KapaTaq Extra buffer を 4 μ l, MgCl₂ (25mM) を 1.4 μ l, dNTP Mixture (10mM) を 0.6 μ l, KapaTaq Extra DNA ポリメラーゼ (5U/ μ L) を 0.1 μ l, 滅菌水を 10.9 μ l 加え、20 μ l に調整した。マーガレットに特異的なプライマーでは、PCR 増幅を、Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) により、95°C 2 分, (95°C 20 秒, 50°C 15 秒, 68°C 2 分) \times 35 サイクル, 68°C 2 分の条件で増幅した。一方、ローダンセマムに特異的なプライマーでは、PCR 増幅を、Veriti™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA) により、95°C 2 分, (95°C 20 秒, 60°C 15 秒, 68°C 2 分) \times 35 サイクル, 68°C 2 分の条件で増幅した。

2.2 遺伝子マーカー (SCAR マーカー) の設計

Genbank 登録があるマーガレット (EF577287) とローダンセマム (L77777) のリボソーム DNA における ITS 領域の塩基配列を基に (第 19 図), 各両親に特異的な SCAR マーカーを設計した (第 10, 11 表)。設計した

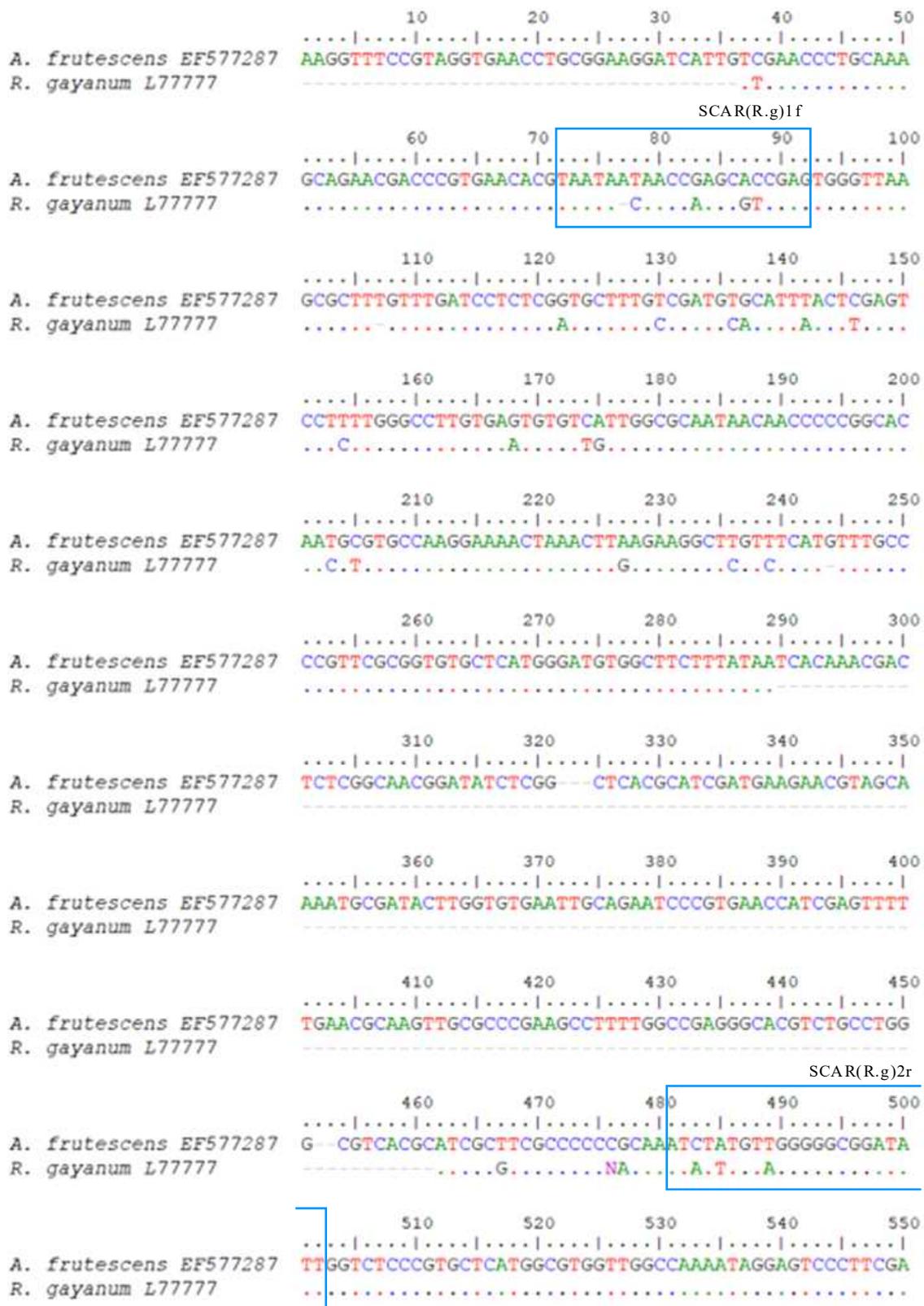
SCAR マーカーと、リボソーム DNA の ITS 領域を増幅するプライマーの 5' - AGAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3' (Zhao et al., 2010) (以下 ITS (C.) という。) と ITS1 5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White et al. 1990) を組合せて PCR 増幅産物を電気泳動し、バンドの有無を確認した。

2.3 電気泳動

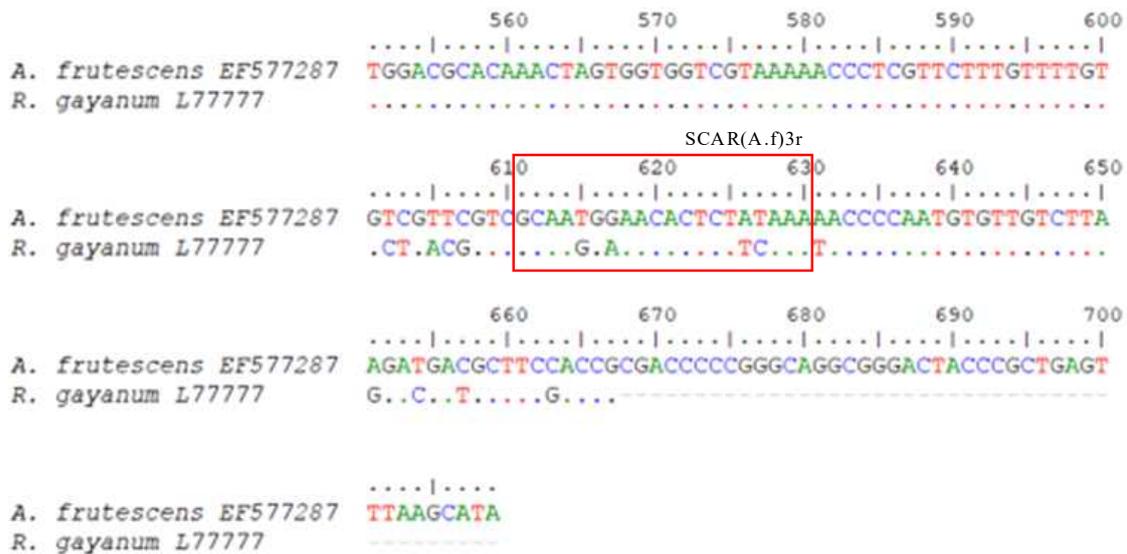
PCR 増幅産物 4 μ l と BPB 液 2 μ l を混合したものを 1.5%アガロースゲルのウェルにアプライした。また、ゲルの両端のウェルに 50bp マーカー (Nippon Genetics Co, Ltd) を 5 μ l アプライした。0.1mg/ml になるように Ethidium Bromide を加え、1 \times TAE Buffer で充填した電気泳動槽を用いて、100v, 40 分間泳動した。その後、トランスイルミネーターにのせ写真を撮影し、発現バンドを確認した。

2.4 遺伝子マーカーの汎用性の確認

2.2 で開発した特異的な SCAR マーカーセットの汎用性を確認するために、マーガレット 22 品種、ローダンセマム 7 品種、雑種 2 系統を供試し、PCR 増幅産物を 2.3 と同様な方法で、電気泳動し発現バンドの有無を確認した。



第19図-1 マーガレットとローダンセマムのリボソーム DNA における ITS 領域の塩基配列 (Genbank)



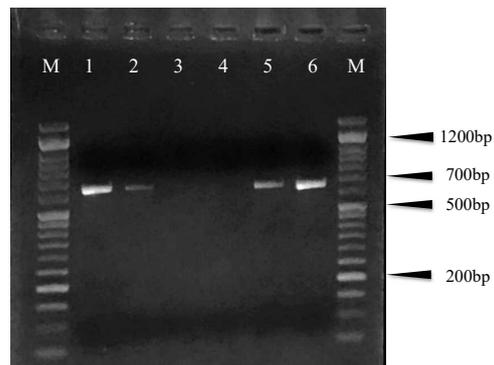
第19 図-2 マーガレットとローダンセマムのリボソーム DNA における ITS 領域の塩基配列 (Genbank)

第10 表 設計したマーガレットに特異的な SCAR マーカー

プライマー名称	5' to 3' sequence	塩基数	アニーリング温度 (°C)
SCAR(A.f) 1f	AAGGAAACACTCTTCAAATACCC	23	51.6
SCAR(A.f) 2f	GTGCTTTGTCGATGTGCATT	20	49.6
SCAR(A.f) 3f	ATGCGTGCCAAGGAAAATA	20	49.6
SCAR(A.f) 4f	TGCTTTGTCGATGTGCATT	20	47.6
SCAR(A.f) 5f	AACTTAAGAAGGCTTGTTC	20	41.8
SCAR(A.f) 1r	GGTCGAAGCATCGTCCTAAG	20	53.7
SCAR(A.f) 2r	ATCTTAAGACAACACATTGG	20	41.8
SCAR(A.f) 3r	TTTATAGAGTGTTCATTGC	20	41.8

第11 表 設計したローダンセマムに特異的な SCAR マーカー

プライマー名称	5' to 3' sequence	塩基数	アニーリング温度 (°C)
SCAR(R.g) 1f	TAATACAACCAAGCGTCGAG	20	45.9
SCAR(R.g) 2f	GATGCGCATTAACCTGAGTCCT	22	49.2
SCAR(R.g) 1r	TCGTTCCTTTGTTTGTGCTGA	21	44.7
SCAR(R.g) 2r	TATTTGAAGAGTGTTCCTTGC	22	47.9
SCAR(R.g) 3r	AATATCCGCCCCCTACAAATAT	22	47.3



第20 図 マーガレットに特異的な SCAR プライマー[ITS (C.) - SCAR (A.f) 3r]を用いたマーガレット, ローダンセマムおよびその属間雑種個体のバンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 1~2:マーガレット, 3~4:ローダンセマム, 5~6:マーガレット×ローダンセマム.

1: 'サンデーリップル', 2: 'ブリアンルージュ', 3: 'アフリカンアイズ', 4: 'エルフピンク', 5: 'サンデーリップル' × 'アフリカンアイズ', 6: 'ブリアンルージュ' × 'エルフピンク'

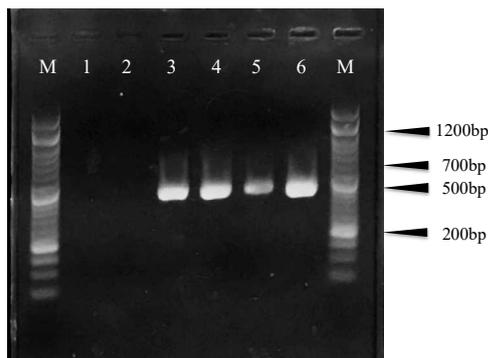
3. 結果

3.1 マーガレットに特異的な SCAR マーカーの開発

設計した SCAR マーカーのうち, ITS (C.) : 5' - AGAAATCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3', SCAR (A.f) 3r : 5' - TTTATAGAGTGTTCATTGC-3' の SCAR マーカーセットでは, マーガレットおよびその属間雑種でバンドが約 700bp で確認されたのに対し, ローダンセマムではバンドが確認されなかった (第20 図).

3.2 ローダンセマムに特異的な SCAR マーカーの開発

設計した SCAR マーカーのうち, SCAR (R.g) 1f : 5' - TAATACAACCAAGCGTCGAG-3', SCAR (R.g) 2r : 5' - AATATCCGCCCCCTACAAATAT-3' の SCAR マーカーセットでは, ローダンセマムおよびその属間雑種でバンドが約 500bp で確認されたのに対しマーガレットではバンドが確認されなかった (第21 図).



第21図 ローダンセマムに特異的な SCAR プライマー [SCAR (R.g) 1f-SCAR (R.g) 2r]を用いたマーガレット、ローダンセマムおよびその属間雑種個体のバンドの発現パターン

M:50bp マーカー, 1-2:マーガレット, 3-4:ローダンセマム, 5-6: マーガレット×ローダンセマム.

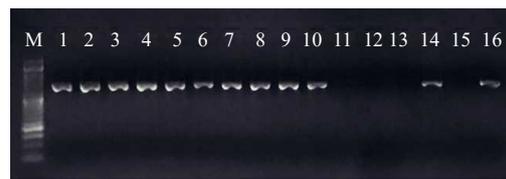
1: ‘サンデーリップル’, 2: ‘ブリアンルージュ’, 3: ‘アフリカンアイズ’, 4: ‘エルフピンク’, 5: ‘サンデーリップル’ × ‘アフリカンアイズ’, 6: ‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’

3.3 開発した SCAR マーカーの汎用性の確認

マーガレット 22 品種, ローダンセマム 7 品種, 雑種 2 系統を用いて設計した SCAR マーカーの汎用性を確認したところ, マーガレットに特異的な SCAR マーカーでは, マーガレットおよびその属間雑種のみバンドが確認された (第 22, 23 図 A). 一方, ローダンセマムに特異的な SCAR マーカーでは, ローダンセマムおよびその属間雑種のみバンドが確認された (第 22, 23 図 B). そのため, マーガレットとローダンセマムを識別できる汎用性の高いマーカーであると考えられた.

4. 考察

SCAR マーカーは, 塩基配列に特異的な 20~25 bp のプライマーを使用するため, 10 bp 程度のランダムプライマーの RAPD マーカーよりも再現性が高いことから (Paran and Michelmore 1993), SCAR マーカーを用いた品種・雑種等の識別は多くの植物で報告されている (Liu et al. 1999; Bautista et al. 2003; Mariniello et al. 2002; Melotto et al. 1996). 本研究において, マーガレットとその属間雑種ではバンドが確認され, ローダンセマムではバンドが確認されないマーガレットに特異的な SCAR マーカーと, ローダンセマムとその属間雑種ではバンドが確認され, マーガレットではバンドが確認されないローダンセマムに特異的な SCAR マーカーの開発に成功した. 開発した両特異的な SCAR マーカーセットを使用することにより, マーガレットとローダンセマムとの雑種判定が可能であると考えられた.



A



B

第 22 図 各特異的な SCAR マーカーを用いたバンド発現パターン

A: マーガレットに特異的な SCAR プライマー [ITS (C.) - SCAR (A.f) 3r]を用いたマーガレット, ローダンセマムおよびその属間雑種個体のバンド発現パターン

B: ローダンセマムに特異的な SCAR プライマー [SCAR (R.g) 1f-SCAR (R.g) 2r]を用いたマーガレット, ローダンセマムおよびその属間雑種個体のバンド発現パターン

M: 50bp DNA マーカー, 1-10, 14:マーガレット品種, 11-13, 15:ローダンセマム品種 16: マーガレット×ローダンセマム雑種

1: ‘エンジェリックジャイアントピンク’, 2: ‘ボンザラズベリー’, 3: ‘ボンザホワイト’, 4: ‘チェルシーガール’, 5: ‘コメットピンク’, 6: ‘キューティーマイズ’, 7: ‘ダブルチェルシー’, 8: ‘ダブルローズピンク’, 9: ‘エベレスト’, 10: ‘風恋香’, 11: ‘アプリコットジャム’, 12: ‘エアルローズ’, 13: ‘マーキュリー’, 14: ‘ブリアンルージュ’, 15: ‘エルフピンク’, 16: ‘ブリアンルージュ’ × ‘エルフピンク’

ムとの雑種判定が可能であると考えられた.

さらに, マーガレット 22 品種, ローダンセマム 7 品種および雑種 2 系統を用いて同様の操作を行ったところ, 各 SCAR マーカーで同様なバンドの発現パターンが確認された. 以上の結果から, 開発した SCAR マーカーは, マーガレットとローダンセマムとの雑種判定を可能とする汎用性の高いマーカーであることが示された.

本マーカーを利用することで, CAPS マーカーと比べ, 雑種判定に伴う費用を 1 サンプルあたり約 500 円抑えられ, 判定までの時間が約 4 時間短縮可能であることから迅速な判定が可能となり, 多量のサンプルを扱う一次選抜時にも, マーカー選抜が導入しやすくなり育種の効率化が図られると考えられる.



A



B

第23図 各特異的な SCAR マーカーを用いたバンド発現パターン

A: マーガレットに特異的な SCAR プライマー[ITS (C.) - SCAR (A.f) 3r]を用いたマーガレット, ローダンセマムおよびその属間雑種個体のバンド発現パターン

B: ローダンセマムに特異的な SCAR プライマー[SCAR (R.g) 1f - SCAR (R.g) 2r]を用いたマーガレット, ローダンセマムおよびその属間雑種個体のバンド発現パターン

M: 50bp DNA マーカー, 17-26, 29:マーガレット品種, 27-28, 30:ローダンセマム品種 31: マーガレット×ローダンセマム雑種

17: ‘ヘリオウォーターレモン’, 18: ‘マーズ’, 19: ‘マックスラムレッド’, 20: ‘マックスラムホワイト’, 21: ‘メテロレッド’, 22: ‘ミニダブルホワイト’, 23: ‘パーカッションディープローズ’, 24: ‘ぼぼたんクリーム’, 25: ‘ぼぼたんレモンホワイト’, 26: ‘リフレクションピンク’, 27: ‘ピーチジャム’, 28: ‘プチマカロン’, 29: ‘サンデーリップル’, 30: ‘アフリカンアイズ’, 31: ‘サンデーリップル×アフリカンアイズ’

今回開発した SCAR マーカーは、それぞれバンドの発現の有無により雑種識別を行ったが、PCR や試薬の調整等の人為的失敗を回避させるため、バンドの長さ、本数により識別することが望ましい。バンドの長さや本数の違いから識別でき、さらにサンプルや試薬の使用量の削減が図れるとともに、同時検出により作業時間の短縮が可能なマルチプレックス PCR は、イネやイチゴの品種識別に活用されている (新村ら, 2005 ; 田崎ら, 2008)。マーガレットとローダンセマムの雑種判定をさらに簡素化・高精度化を図るために、マルチプレックス PCR を開発する必要がある。

第VI章 総合考察

静岡県では、秋季から生産可能な早生のマーガレット品種育成や、花色の多様化を目指し、近縁種との交雑により花色・花型等の観賞価値に重きを置いた育種に取り組んできた。その結果、花色や芳香性など従来のマーガレット品種が有していなかった新規形質を持つ属間雑種が育成され、それら育成品種は、ジャパンフラワーセレクションやフロリアード等品評会で受賞を受けるなど高い評価を受けている。さらに、積極的なプロモーション活動や展示会等への出展などの取り組みを通して、「静岡県のマーガレット」として市場や量販店の認知度は高まり、注文取引が増加し単価は上昇傾向である。しかしながら、近年の冬場の低温や夏場の高温の影響により、枯死率の上昇や、低温・高温障害等による生育不良、製品化率の低下や、出荷期間の短縮、生産圃場の制限などが、マーガレット生産において問題となってきている。以上のことから、従来までの観賞価値に重きを置いた育種開発から、栽培特性を重視した品種育成が必要である。そこで、本研究では、剛健な形質の獲得を目指し、多年生キク科植物とマーガレットの交配を試みた。

第II章において、これまで検討されてこなかったマーガレットと多年生キク科植物との交配を行い、栽培特性に優れた属間雑種の作出を試みた。その結果、デモルフオセカ (*Dimorphotheca sinuata* DC.)、オステオスペルマム [*Osteospermum ecklonis* (de Candolle) Norlindh]、サイネリア (*Pericallis hybrida* B. Nord.) 芳香性キク‘アロマム’ [*Chrysanthemum lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Makino × *Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.]、アルテミシア (*Artemisia absinthium* L.)、ローダンセマム ホスマリテンゼ [*Rhodanthemum hosmariense* (Ball) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries] との交配組合せでは、充実した胚珠が確認されず、交配個体の作出はできなかったが、ローダンセマム ガヤナム [*Rhodanthemum gayanum* (Cross. & Durieu) B.H. Wilcox, K. Bremer & Humphries.] との交配・胚珠培養法により交配個体が作出された。

しかしながら、本研究では、17の充実した胚珠を摘出し、それを培養したが、発芽したものは9個体で、最終的に作出された個体は2個体のみと発芽率および植物体

形成率が低かった。今回、試みた交配組合せでの交雑障壁が、受精前又は受精後によるものかを特定することで、その障壁を克服する手法により交配個体の作出が可能になるかもしれない。受精前における交雑障壁の克服方法として、蕾受粉、老花受粉、混合花粉の利用や高温条件での受粉が報告されている (Ascher・Peloquin, 1966; 福本ら, 1996; 巢山ら, 2013; Van et al. 1997)。受精前の交雑障壁が要因であった場合、上記の方法を試みることで、属間雑種の作出が可能となり、作出率が向上するかもしれない。また、鉢物用マーガレット品種は2倍体品種が主に流通されているが、花粉親に供試した品目の倍数性は不明である。奇数倍数性の3倍体であった場合、一般的に正常な花粉が形成されないため後代が作出されない。コルヒチン処理 (Hamill et al. 1992; Yang et al. 2006) や、一酸化二窒素の暴露 (Sattler et al. 2016; Van Tuyl et al. 1992) による倍加や、3倍体を介した安定的な偶数倍数体の形成 (Ramsey et al. 1998) により、稔性のあるを作出し、稔性を回復させることで、交配個体の作出が容易になる可能性がある。一方、受精後における交雑障壁の克服方法として、今回用いた胚珠培養法や胚培養、子房培養法が報告されている (Van et al. 1997)。今回、マーガレットとハナワギクとの属間雑種作出における最適な胚珠培養法に準じたため、胚珠培養の培地の糖分濃度や、植物ホルモンの濃度・組合せなどの胚珠培養方法と、胚珠培養までの交配期間や交配時期を改良・検討することにより、各交配組合せでの雑種作出に適した方法が確立され、発芽率や植物体形成率の向上が期待される。

キク科植物の遺伝子距離では、マーガレットと今回供試したローダンセマム、アルテミシア、オステオスペルマムの3種と、マーガレットと属間雑種育成報告があるハナワギク、シュンギクとの遺伝子距離は、シュンギク、ハナワギク、ローダンセマム、アルテミシア、オステオスペルマムの順で近かった。今回作出された雑種の花粉親であるローダンセマムよりもマーガレットとの遺伝子距離に近いサントリナ (*Santolina rosmarinifolia* L.)、ローマンカモミール (*Chamaemelum nobile* (L.) All.)、ノースポール (*Mauranthemum paludosum* (Poir.) Vogt & Oberpreiler) 、シャスターデージー

(*Leucanthemum vulgare* Lam.)などは、マーガレットとの属間雑種作出の可能性が考えられるため、新たな属間雑種育成に期待される。

第三章において、マーガレットは自家和合性のため、作出された交配個体が遺伝的に属間雑種であるかを判定した。Genbankに掲載されている両親のリボソームDNAにおけるITS領域の塩基配列を基に選択したCAPSマーカー(制限酵素*AflII*)を用いて、バンドの発現数の違いから雑種判定を試みた。マーガレットとローダンセマムの交配個体では、両親に特異的なバンドの両方が確認されたため、マーガレットとローダンセマムの雑種であると判定された。その結果、本研究により初めてマーガレットとローダンセマムの属間雑種が作出されたことが証明された。

第四章においては、マーガレットとローダンセマムとの属間雑種の形態・花色特性の調査を行った。属間雑種の花形態はマーガレットに類似していたが、葉形態は、ローダンセマムと同様に毛状突起が観察され、従来のマーガレット品種にはない新たな形質が確認された。一般的に毛状突起は耐虫性や環境ストレス耐性効果があることから、農薬使用量・回数の削減への寄与と、病害虫被害の軽減による観賞期間の延長が期待される。また、環境の変化が激しい露地生産でも生育への影響の軽減が期待されることから、農地の効率利用にもつながると考えられる。

花粉親のローダンセマムは耐寒性に優れており、氷点下でも栽培が可能で、冬～春の花壇の植栽や鉢物に使われている。キク科植物では、耐寒性に優れた近縁種との交配により耐寒性を有する属間雑種が作出されたと報告されている(Cheng et al., 2010; Deng et al., 2011)。今回、作出した属間雑種も、花粉親のローダンセマムと同様に耐寒性を有する場合、これまでマーガレットの植栽利用が困難であった寒冷・降雪地域での植栽が可能となり、出荷先の拡大につながると期待される。さらに、生産圃場の加温温度抑制により、省エネルギー化および温室効果ガス削減に寄与されると考えられる。これらの耐虫性や耐寒性を含む詳細な栽培調査を行うことで、より栽培特性に優れた品種育成に期待される。

花色特性では、両親と色素組成の変化や有色化等がみられたことから、今後、さらなるマーガレットとローダンセマムとの属間雑種の作出を図ることで、優れた栽培特性に加え、多様な花色の品種育成が期待される。また、白花の両親から作出された雑種の有色化の要因につい

ては、今後、さらに詳細な色素分析や色素の遺伝子発現等を解析することで、雑種の有色化の原因究明が可能であると考えられる。

第五章においては、マーカー選抜の導入を容易にするため、迅速な判定が可能で低コストなSCARマーカーを開発した。この遺伝子マーカーを早期選抜時に活用することで、マーガレットとローダンセマムとの属間雑種育種の効率化が図れると考えられる。さらに、人為的失敗の回避や、同時検出による判定時間の短縮など簡素化・高精度化を図るために、マルチプレックスPCRの開発が必要である。

これらのことから、本研究で明らかとなった知見を活用し、さらなる胚珠培養法の改良や新たな近縁種との属間雑種育種を検討することは、属間雑種作出の成功率を高め、より栽培特性に優れた属間雑種の育成の一助となるだろう。これまでの観賞価値に重きを置いた育種から、栽培特性に配慮した育種への転換は、低温障害による農業被害の軽減や燃料使用量削減による省エネルギー化、温室効果ガス排出の抑制に大きく寄与するものと考えられる。また、本研究から加温温度抑制に対応する育種や、育種期間の短縮化として、近縁種を用いて栽培特性を重視した育種開発と、遺伝子マーカーの開発により育種の効率化が示された。本研究結果が、加温温度抑制に対応する育種開発の発展およびマーカー選抜による育種の効率化に貢献するものと期待する。

謝 辞

本論文の作成にあたり、千葉大学環境健康フィールド科学センター渡辺均教授には貴重なご助言、ご指導を賜りました。謹んで感謝の意を表します。また、多大なるご指導と激励を賜りました千葉大学環境健康フィールド科学センター安藤匡哉特任助教、黒沼尊紀助教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたっては、静岡県農林技術研究所伊豆農業研究センター長稲葉善太郎博士、生育・加工技術科種石始弘科長、わさび生産技術科長馬場富二夫博士、久松奨上席研究員、加藤智恵美上席研究員、勝岡弘幸主任研究員、農林技術研究所花き生産技術科岩崎勇次郎博士ならびに伊豆農業研究センター職員、元職員各位には、多大なるご指導と激励を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。

引用文献

- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H. (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* 27: 617–631.
- Anderson, N.O. (Ed.). (2006) Flower breeding and genetics: issues, challenges and opportunities for the 21st century. *Springer Science & Business Media*.
- Albert, N.W., D.W. Lewis, H. Zhang, K.E. Schwinn, P.E. Jameson. and K.M. Davies. (2011) Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. *The Plant Journal* 65: 771–784.
- Álvarez, I., Wendel J.F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular phylogenetics and evolution*, 29: 417–434.
- 青山幹男. (2000) マーガレット園芸品種における染色体数と細胞学的特性の観察. 園学雑 69 (別 2): 201.
- Ascher, P.D., Peloquin, S.J. (1966) Effect of floral aging on the growth of compatible and incompatible pollen tubes in *Lilium longiflorum*. *American Journal of Botany*, 53 : 99–102.
- Baldwin, B.G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular phylogenetics and evolution*, 1: 3–16.
- Bautista, R., Crespillo, R., Cánovas, F.M., Claros, M.G. (2003) Identification of olive-tree cultivars with SCAR markers. *Euphytica* 129: 33–41.
- Bramwell, D. and Z. Bramwell. (2001) Wild flowers of the Canary Islands. Editorial Rueda, Madrid.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*. 32: 314.
- Bremer, K. (1994) Asteraceae. Cladistics & Classification. Timber Press, Oregon.
- Chauhan, N., Negi, M.S., Sabharwal, V., Khurana, D.K. and Lakshmikumaran, M. (2004) Screening interspecific hybrids of *Populus* (*P. ciliata* × *maximowiczii*) using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 951–957.
- Chen, Y.M. and Mii, M. (2012) Interspecific hybridization of *Begonia semperflorens* (section *Begonia*) with *B. pearcei* (section *Eupetalum*) for introducing yellow flower color. *Plant Biotechnol* 29: 77–85.
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., Zhou, S. (2016) Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources*, 16: 138–149.
- Cheng, X., S. Chen, F. Chen, W. Fang, Y. Deng and L. She. (2010) Interspecific hybrids between *Dendranthema morifolium* (Ramat.) Kitamura and *D. nankingense* (Nakai) Tzvel. achieved using ovary rescue and their cold tolerance characteristics. *Euphytica* 172: 101–108.
- Cisneros, A and N. Tel-Zur. (2010) Embryo rescue and plant regeneration following interspecific crosses in the

- genus *Hylocereus* (Cactaceae). *Euphytica*. 174: 73–82.
- Deng, Y., S. Chen, F. Chen, X. Cheng and F. Zhang. (2011) The embryo rescue derived intergeneric hybrid between chrysanthemum and *Ajania przewalskii* shows enhanced cold tolerance. *Plant Cell Rep.* 30: 2177–2186.
- DNA 品種識別技術検討会. (2003) 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項—技術開発と利用のガイドライン—
- Eeckhaut, T., E.D. Keyser, J. Van Huylenbroeck, J. De Riek and E. Van Bockstaele. (2007) Application of embryo rescue after interspecific crosses in the genus *Rhododendron*. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 89: 29–35.
- Eriksson, T., Hibbs, M.S., Yoder, A.D., Delwiche, C.F., Donoghue, M.J. (2003) The phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA and the trnL/F region of chloroplast DNA. *Int. J. Plant Sci* 164: 197–211
- Francisco - Ortega, J., Santos - Guerra, A., Hines, A., Jansen, R.K. (1997) Molecular evidence for a Mediterranean origin of the Macaronesian endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae). *Am J Bot* 84: 1595–1613.
- Francisco-Ortega, J., Crawford, D.J., Santos-Guerra, A. and Jansen, R.K. (2000) 14 ORIGIN AND EVOLUTION OF ARGYRANTHEMUM (ASTERACEAE: ANTHEMIDEAE) IN MACARONESIA. *Molecular evolution and adaptive radiation*, 407.
- Fratini, R and M. L. Ruiz. (2006) Interspecific hybridization in the genus *Lens* applying in vitro embryo rescue. *Euphytica*. 150: 271–280.
- 福本修一, 青木千佳, 服部一三. (1996) ペチュニアの蕾受粉における花粉管の挙動観察と, 自家不和合性打破の試み. 育学雑 46: 252.
- 古里和夫. (1977) マーガレット. 新花き. 95: 32–35.
- 古里和夫. (1978) マーガレットの品種について. 園芸植物研究. 1: 34–43.
- Hamill, S.D., Smith, M.K., Dodd, W.A. (1992) In vitro induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids. *Aust. J. Bot.* 40: 887–896.
- Hayes, H.K., F.R. Immer, and D.C. Smith (1955) *Methods of plant breeding*. McGraw-Hill Book Company, Inc.: New York; London; Toronto.
- 稲葉善太郎, 岩崎勇次郎, 馬場富士夫, 石井ちか子, 石井香奈子, 大久保直美. (2008) マーガレットおよびハナワギクの属間雑種における香気成分. 園学雑 7 (別 2): 289.
- 稲葉善太郎. (2019) マーガレット育種と生産振興への貢献. 園学研 18: 97–106.
- 岩崎勇次郎, 稲葉善太郎. (2008) マーガレットとハナワギクの交配による方向性品種の作出. 園学雑 7 (別 2): 290.
- Kaul, K., S. Karthigeyan, D. Dhyani, N. Kaur, R.K. Sharma and P.S. Ahuja. (2009) Morphological and molecular analyses of *Rosa damascene* × *R. bourboniana* interspecific hybrids. *Sci. Hortic.* 122: 258–263.
- Konieczny A and Ausubel F.M. (1993) Procedure for

- mapping Arabidopsis mutations using codominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J* 4: 403–410.
- Kunihisa, M., Fukino, N., Matsumoto, S. (2003) Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134: 209–215
- Luan, Y.S., J. Zhang, X.R. Gao and L.J. An. (2007) Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), in vitro screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 88: 77–81.
- Luo, D., E.S. Coen, S. Doyle and R. Carpenter. (1991) Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1: 59–69.
- Mariniello, L., Sommella, M.G., Sorrentino, A., Forlani, M., Porta, R. (2002) Identification of *Prunus armeniaca* cultivars by RAPD and SCAR markers. *Biotechnol Lett* 24: 749–755
- Martin, C., A. Prescott, S. Mackay, J. Bartlett and E. Vrijlandt. (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1: 37–49.
- Melotto, M., Afanador, L., Kelly, J.D. (1996) Development of a SCAR marker linked to the *I* gene in common bean. *Genome* 39: 1216–1219
- Morikawa, M., T. Muto, A. Santos-Guerra and K. Kondo. (2014) Identifying, discriminating and isolating cultivars of ‘Marguerites’ originated from *Argyranthemum frutescens* parentages and their intergeneric and interspecific hybridities by DNA markers amplified by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat). *Chromosome Botany.* 9: 97–112.
- Morita, Y., M. Saitoh, A. Hoshino, E. Nitasaka, and S. Iida. (2006) Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH and WDR transcriptional regulators and identification of *c* and *ca* mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory. *Plant Cell Physiol.* 47: 457–470.
- Motohashi, T., Toda, M.I., Kondo, K. (2008) Adventitious embryo formation derived from zygotic embryos in *Cycas revoluta*. *Plant Biotechnol.* 25: 589–591
- Mueller, L.A., C.D. Goodman, R.A. Silady and V. Walbot. (2000) AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123: 1561–1570.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1989) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Recombinant DNA Methodology* (pp. 189–204). Academic Press.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497.
- Nishihara, M., T. Nakatsuka, K. Hosokawa, T. Yokoi, Y. Abe, K. Mishiba and S. Yamamura. (2006) Dominant inheritance of white-flowered and herbicide-resistant traits in transgenic gentian plants. *Plant Biotechnol.* 23: 25–31.
- Ohtsuka, H. and Z. Inaba. (2008) Intergeneric hybridization of marguerite (*Argyranthemum frutescens*) with annual chrysanthemum (*Glebionis carinatum*) and crown daisy (*G. coronaria*) using ovule culture. *Plant Biotechnol.* 25: 535–539.
- Paran, I., Michelmore, R.W. (1993) Development of

- reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85: 985–993
- Pellegrineschi, A., C.A. Fatokun, G. Thottappilly and A.A. Adepoju. (1997) Cowpea embryo rescue. 1. Influence of culture media composition on plant recovery from isolated immature embryos. *Plant Cell Rep.* 17: 133–138.
- Ramsey, J., Schemske, D.W. (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annu Rev. Ecol. Syst.* 29: 467–501.
- Sato-Ushiku, Y., Shimada, N., Saito, M., Yamada, E., Hikage, T., Nakatsuka, T., Nishihara, M. (2011) Development of simple sequence repeat markers for identification of Japanese gentian cultivars. *J Jap Soc Hort Sci* 80: 474–485
- Sattler, M.C., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R. (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta.* 243: 281–296
- Sasaki, K., R. Aida, T. Niki, H. Yamaguchi, T. Narumi, T. Nishijima, Y. Hayashi, H. Ryoto, N. Fukunishi, T. Abe and N. Otsubo. (2008) High-efficiency improvement of transgenic torenia flowers by ion beam irradiation. *Plant Biotechnol.* 25: 81–89.
- Scheef, E.A., Casler, M.D., Jung, G. (2003) Development of species-specific SCAR markers in bentgrass. *Crop Sci* 43: 345–349
- Sharma, D.R., R. Kaur and K. Kumar. (1996) Embryo rescue in plants—a review. *Euphytica.* 89: 325–337.
- 新村和則, 金川寛, 三上隆司, 福森武. (2005) イネ品種判別用マルチプレックス PCR プライマーセットの開発. 育種学研究, 7 : 87–94.
- 巢山拓郎, 谷川孝弘, 山田明日香, 松野孝敏, 國武利浩, 佐伯一直, 中村知佐子. (2013) 蕾受粉および温湯処理によるアジサイ種間雑種の自家不和合性打破. 園芸学研究, 12 : 343–349.
- 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業試験場集報, 98: 33–42.
- Tang, F., Chen, F., Chen, S., Wang, X.E., Zhao, H. (2010) Molecular cytogenetic identification and relationship of the artificial intergeneric hybrid between *Dendranthema indica* and *Crossostephium chinense* by GISH. *Plant Systematics and Evolution.* 289: 91–99.
- Tar, KYK., Naing, AH., Ai, TN., Chung, M.Y., Kim, C.K. (2018) Optimization of factors influencing in vitro immature seed germination in *Chionanthus retusus*. *J Plant Biotechnol* 45: 347–356
- 田崎公久, 柏谷祐樹, 小林俊一, 天谷正行. (2008) 日本の主要イチゴ品種を識別するマルチプレックス PCR プライマーセットの開発. 育種学研究 10: 111–115.
- 植田陽子, 山田栄成. 2006. マーガレット属間雑種の子房, 胚珠, 胚の形態の経時的変化. 園学雑. 75 (別 1): 195.
- Van Tuyl, J.M., De Jeu, M.J. (1997) Methods for overcoming interspecific crossing barriers. *Pollen biotechnology for crop production and improvement.* Cambridge Univ. Press, NY. 273–292.
- Van Tuyl, J.M., M.P. Van. Diën, M.G.M. Van. Creij, T.C.M. Van. Kleinwee, J. Franken and R.J. Bino. (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.
- Van Tuyl, J.M., Meijer, B., Van Diën, M.P. (1992) The use of oryzalin as an alternative for colchicine in in vitro chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*. *In VI Int Symp Flower Bulbs.* 325: 625–630.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V.D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper,

- Martin, Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407–4414.
- Watson, L.E., Evans, T.M. and Boluarte, T. (2000) Molecular phylogeny and biogeography of tribe Anthemideae (Asteraceae), based on chloroplast gene *ndhF*. *Mol Phylogen Evol*. 15: 59–69.
- Werker, E. (2000) Trichome diversity and development.
- Williams, JGK., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1991) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531–6535
- White, T.J., T. Bruns, S.J.W.T. Lee and J.L. Taylor. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications* 18: 315–322.
- Wolff, K., Zietkiewicz, E. and Hofstra, H. (1995) Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. *Theor Appl Genet*, 91: 439–447.
- Yang, D., W. Li, S. Li, X. Yang, J. Wu and Z. Cao. (2007) In vitro embryo rescue culture of F₁ progenies from crosses between diploid and tetraploid grape varieties. *Plant Growth Regul*. 51: 63–71.
- Yang, X.M., Cao, Z.Y., An, L.Z., Wang, Y.M., Fang, X.W. (2006) In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*. 152: 217–224.
- Zhao, H.B., F.D. Chen, S.M. Chen, G.S. Wu and W.M. Guo. (2010) Molecular phylogeny of *Chrysanthemum*, *Ajania* and its allies (Anthemideae, Asteraceae) as inferred from nuclear ribosomal ITS and chloroplast *trnL-F* IGS sequences. *Plant Syst. Evol*. 284: 153–169.

