

コルヒチン処理による倍数体デルフィニウムの作出

岡本充智

Production of Tetraploids Delphinium by Colchicine treatment for Breeding Delphinium

OKAMOTO Mitsutoshi

要 旨

二倍体のシネンシス系デルフィニウム (*Delphinium spp.*) と四倍体のエラータム系デルフィニウム (*Delphinium elatum group*) の雑種を育成するために、シネンシス系デルフィニウムにコルヒチン処理を行った。コルヒチン処理後に生存した48個体の倍数性を孔辺細胞長およびフローサイトメトリー法によるDNA量の相対値から求めた。その結果、二倍体が29個体、四倍体が13個体、四倍体以上の多倍体が2個体、二倍体と四倍体のキメラが2個体、四倍体と四倍体以上の多倍体のキメラが2個体と推定した。

二倍体以外の19個体のうち柱頭が正常な17個体とエラータム系品種との交雑により、すべての組み合わせで少量の種子を得ることができた。しかしながらこれらの種子は発芽しなかった。

キーワード：デルフィニウム，コルヒチン，倍加，遠縁交雑，四倍体

1. 諸言

デルフィニウムは、切り花では珍しい花色が青色の希少な花材であるが、落花が発生するため国内導入当初は切り花として営利目的の栽培が行われることはなかった。1980年代にデルフィニウム切り花の品質保持剤としてチオ硫酸銀錯塩 (STS) の効果が確認され切り花として栽培が始まった。栽培開始当初はホテルやデパートの装飾など業務用での利用が多かったが、ここ数年は品種改良や品質保持剤の普及により花束やホームユースでの利用も増加した。花色の特徴から、今後の需要動向も増加が期待され、種苗会社でも品種改良が盛んに行われている有望な切り花である。

愛媛県農林水産研究所では、これまで *Delphinium glandisflorum* 由来のシネンシス系デルフィニウムを中心に雄性不稔性を利用した品種改良を実施してきた。一方、愛媛県における現在の切り花デルフィニウム生産の主流は *D. elatum* 由来

のエラータム系品種である。

これまでシネンシス系で培った育種素材を有効に利用するためには、新たにエラータム系品種との雑種を育成する必要がある。しかしながら、シネンシス系デルフィニウムやデルフィニウムの原種は二倍体 ($2n=16$) であるのに対し、エラータム系品種は四倍体 ($2n=4x=32$) であることから、通常の交雑では雑種を得ることが困難である。遠縁交雑を行って後代を得るためには、シネンシス系デルフィニウムを倍加させることが効果的であると考えられる (塚本, 1973)。

そこで、二倍体のシネンシス系デルフィニウムをコルヒチン処理により倍加し、その特性を調査すると共に、四倍体のデルフィニウムと交雑を行い、雑種個体の獲得を行った。

なお、本研究は、独立行政法人科学技術振興機構による地域イノベーション創出総合支援事業重点地域研究開発推進プログラム平成20年度シーズ発掘試験の採択課題「四倍体デルフィニウムの花持

ち性の改善および花卉の汚れ防止技術の開発」の一部として実施した。

2. 材料および方法

2.1 二倍体品種のコルヒチン処理による倍加

コルヒチン処理は、二倍体のシネンシス系デルフィニウム育成系統の‘愛媛交6号’を用いた。

コルヒチン溶液の濃度は0.03%と0.10%の2種類とした。それぞれの溶液にはTween20を100mlあたり1滴添加した。

供試材料は400穴セルトレーで催芽後、50穴セルトレーに移植し育苗した。移植後、本葉4～5葉期に葉柄の基部の成長点近傍にコルヒチン溶液を1日1回、7日間処理した。それぞれの濃度のコルヒチン溶液で処理した個体数は50個体とした。

コルヒチン処理終了時まで、育苗は人工気象室で行った。育苗中の生育条件は、温度15℃、湿度70%RH、光合成光量子束密度(PPFD) $60 \mu \text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、日長条件12時間とした。

育苗した苗はコルヒチン処理終了後に2008年9月26日にガラス温室に定植した。圃場条件は、畦幅90cm、株間18cm、2条植で、基肥がN:P:K=1.2kg:1.2kg:1.2kg/a、夜温13℃とした。

2.2 孔辺細胞長による倍数性の推定

デルフィニウムの倍数性は、孔辺細胞長とDNAの相対量から総合的に判定した。

試料は抽苔を開始したそれぞれの個体の展開葉を1枚採取して、葉の裏面の表皮を剥ぎ取り、光学顕微鏡で観察した。孔辺細胞の長さは、1試料あたり10個の気孔を測定し、展開葉1枚あたり3つの試料を調査した。

2.3 フローサイトメータによる倍数性の推定

細胞中の相対的なDNA量をフローサイトメトリ法により測定した。

測定には、圃場に定植した個体の完全展開葉を各個体から1枚ずつ供試した。染色試薬はCystain植物DNA分析試薬キット(Partec社06-5-5002)を用いて、チョッピング法により試料を調整した。チョッピング法のプロトコルは同社の標準的な手法を用いた。測定には、フローサイトメータのプロイディーアライザーPA-I型(Partec社)を用いた。

2.4 染色体数倍加個体の主な特性

コルヒチン処理後の個体はすべて圃場に定植し特性を調査した。調査した項目は「デルフィニウム種苗特性分類調査(農林水産省種苗課)」に基づき、草型、草丈(cm)、葉の形、葉の厚さ(mm)、花形、花冠の大きさ(cm)、花色とした。

2.5 倍加した個体とエラータム系四倍体品種の交雑

コルヒチン処理により二倍体以上の倍数性を示す19個体のうち、柱頭が正常な17個体と四倍体のエラータム系品種と交雑を行った。

花粉親は、エラータム系品種のうち、本県の主な栽培品種である、‘ガンマアーミー’、‘ブルーマジック’、および‘パルフェウエーブ’を供試した。

交雑数は、花粉親の種類ごとにそれぞれ12花ずつ交雑した。交雑約1ヶ月後に収穫し、1花あたりの莢数と1莢あたりの種子数を調査した。

3 結果と考察

3.1 二倍体品種のコルヒチン処理による倍加

コルヒチン処理結果を表1に示す。各濃度の処理株数50個体のうち、生存株数は0.03%処理で45株、0.10%処理で3株の合計48株であった。生存した株のうち、展開葉が明らかに奇形葉になっていたのは、0.03%処理で4株、0.10%処理で1株であった。

3.2 孔辺細胞長による倍数性の推定

コルヒチン処理後の48株における孔辺細胞長の平均は、 $101.8 \pm 24.2 \mu \text{m}$ であり、株によりバラツキの傾向が見られた。そこで、各株の平均孔辺細胞長の分布状況をヒストグラムにすると、80-100 μm の孔辺細胞長を持つものと120-140 μm の孔辺細胞長を持つものが主な集団となった(図1)。

コルヒチン処理前の供試材料における孔辺細胞長の平均が 96.8 ± 0.6 で、孔辺細胞長は倍数性と共に長くなる(塚本, 1973)ことから、ここではコルヒチン処理後の孔辺細胞長が102 μm 以下の集団を二倍体、それ以上の集団を四倍体と仮定した(写真1)。

3.3 フローサイトメータによる倍数性の推定

フローサイトメータによる二倍体におけるDNA量の相対値は78.3であった。

表1 二倍体デルフィニウムのコルヒチン処理結果

処理濃度	処理株数	生存株数	うち奇形株数	生存率 (%)	奇形率 (%)
0.03%	50	45	4	90.0	8.9
0.10%	50	3	1	6.0	33.3
合計	100	48	5	48.0	10.4

奇形率 = 奇形株数 / 生存株数 × 100
 供試系統：愛媛交6号 処理日数：各7日

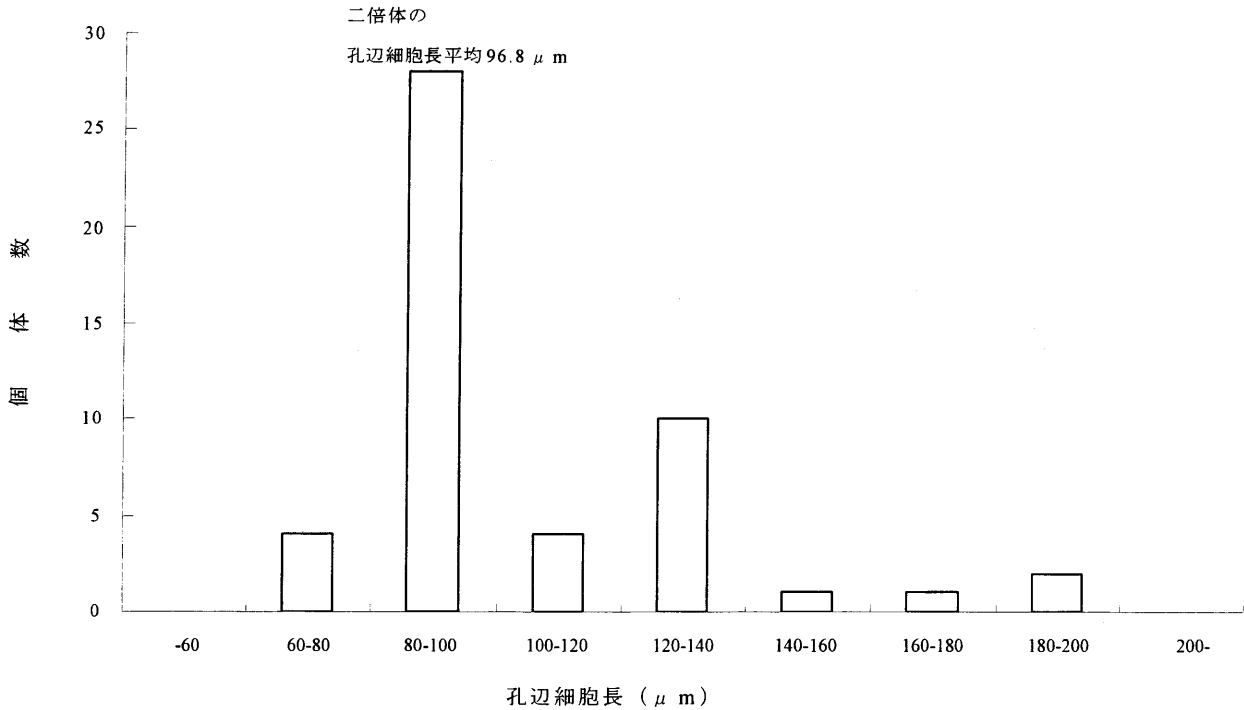


図1 コルヒチン処理個体における孔辺細胞長の分布

3.2の孔辺細胞長の調査で二倍体と推定した32株のうち、29個体はDNA量の相対値が50.0から100.0の間で分布し、残り2個体はどちらも75.0と145.0の2つのDNA相対値を示し、1個体は140.0と280.0の2つのDNA相対値を示した。このように1つの個体で、2つのDNA相対値が測定されるものは、細胞がコルヒチン処理によってキメラ化していると推測した。

次に四倍体と推定した16個体のうち、1個体は相対値140.0と280.0の2つのDNA相対値を示したが、それ以外は単一のDNA相対値であった。

フローサイトメーターによるDNA量の相対値によるヒストグラムを作成したところ、相対値の分布は50-100を示す個体が31個体で最も多く、100-150が10個体、150-200が7個体、200以上が3個体となった(図2)。ただし、キメラについては2回カウントした。そこでDNAの相対値が0-100まで

を二倍体、100-200を四倍体、200以上を四倍体以上の多倍体と仮定した。

孔辺細胞長とフローサイトメーターの測定結果を総合して倍数性を判定するため、それぞれの測定値に基づく散布図を作成した(図3)。その結果、今回のコルヒチン処理により、二倍体29個体、四倍体13個体、四倍体以上の多倍体2個体、二倍体と四倍体のキメラ2個体、四倍体と多倍体のキメラ2個体が得られたと推察される(表2)。

3.4 染色体数倍加個体の主な特性

二倍体品種を倍化させることにより、草丈などが大きくなるとされている(塚本, 1973)。今回コルヒチン処理により倍加したデルフィニウムにおいても、草丈が17.3cm、花冠は0.3cm大きくなった(表3, 写真2, 3, 4)。多倍体か四倍体と多倍体のキメラと判断した4個体は、すべて表1で奇形株

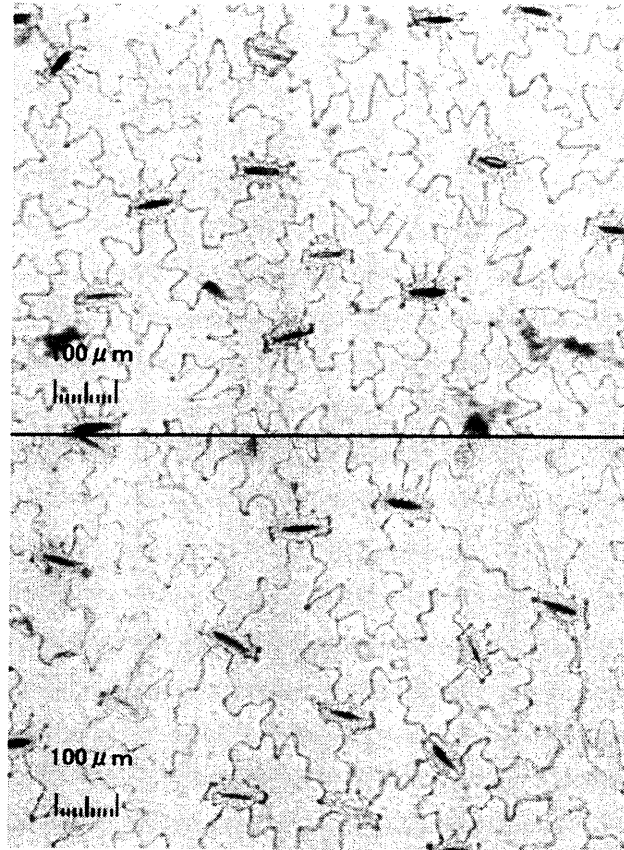


写真1 光学顕微鏡による孔辺細胞長の測定

二倍体(写真上)四倍体(写真下)と推定される。四倍体の孔辺細胞長は長い。

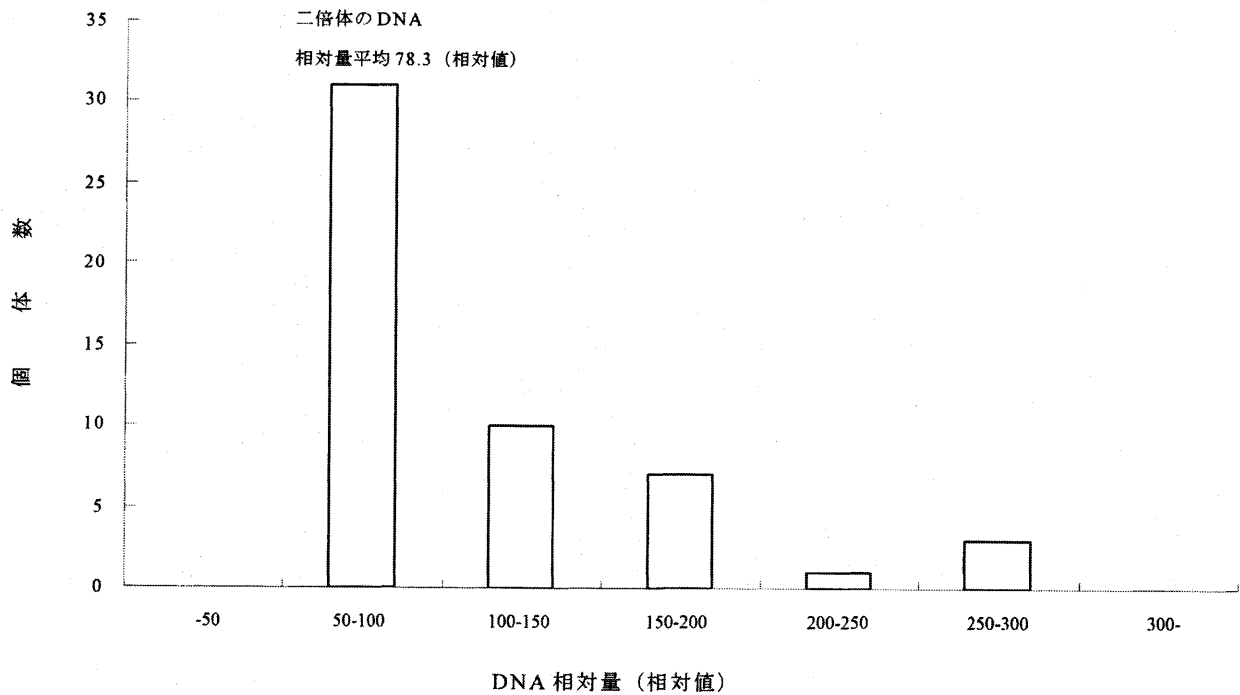


図2 コルヒチン処理個体におけるDNA相対量の分布

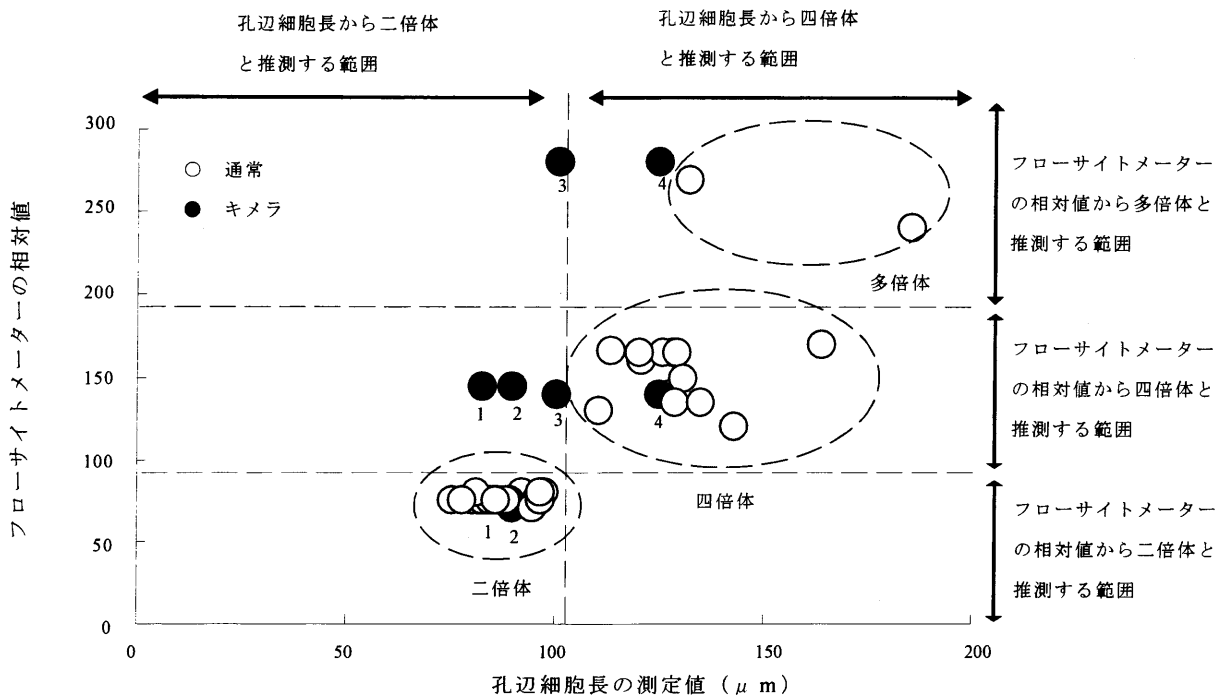


図3 コルヒチン処理個体における孔辺細胞長とフローサイトメーターの測定値の分布と倍数性の推定
●に付した数字は同一のキメラ個体の値であることを示す。

表2 孔辺細胞長とDNA相対量から推定したコルヒチン処理による倍数体の倍数性と個体数

DNAの相対量から推定した倍数性	孔辺細胞長から推定した倍数性		
	二倍体	四倍体	計
二倍体	29		29
四倍体		13	13
多倍体		2	2
二倍体と四倍体のキメラ	2		2
四倍体と多倍体のキメラ	1	1	2
合計	32	16	48

と判断した個体であり、生育中の蕾の退化、開花不全や奇形花が見られた。奇形株と判断した残り1個体は四倍体であった。

3.5 倍加した個体とエラータム系4倍体品種の交雑

花粉親1品種あたり204花の交雑を行い、ガンマアーミーで672莢、ブルーマジックで603莢、パルフェウェーブで608莢が結莢し、各交雑で数粒ずつ種子を得た(表4)。しかしながら種子は、すべてが通常に比べ小型な種子で、発芽しなかった。

四倍体デルフィニウムと二倍体デルフィニウム、六倍体デルフィニウムと二倍体デルフィニウムの組み合わせで、得られた種子から実生個体を得られなかったことが報告されている(本多, 2002)。本試験では、倍数性を揃えているので実生個体を得ることが期待されたが、交雑では実生個体を得られなかった。今後、胚培養など適切な交雑胚の救済を行うことにより、雑種個体を作成できると考えられる。

表3 コルヒチン処理により得た倍数体の主な特性

	二倍体	四倍体	多倍体	二倍体と四倍体のキメラ	四倍体と多倍体のキメラ
草型	開帳型	開帳型	開帳型	開帳型	開帳型
草丈(cm)	88.3	106.0	51.5	83.0	53.2
葉の形*	Ⅲ型	Ⅲ型	Ⅷ型	Ⅲ型	Ⅷ型
葉の厚さ(mm)	0.33	0.34	0.53	0.57	0.55
花形	一重咲	一重咲	—	一重咲	—
花冠の大きさ(cm)	3.8	4.1	—	3.8	—
花色	7605	7605	—	7605	—

調査項目および内容は「デルフィニウム種苗特性分類調査（農林水産省種苗課）」に基づく。多倍体および四倍体と多倍体のキメラは奇形花のため、花の調査はしていない。花色は日本園芸植物標準色表のコードである。

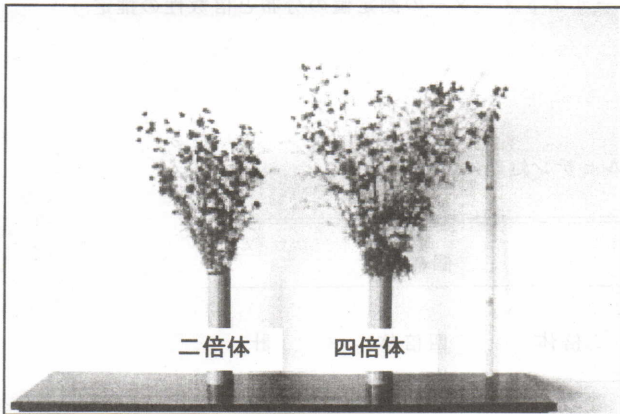


写真2 二倍体と四倍体における花の草姿

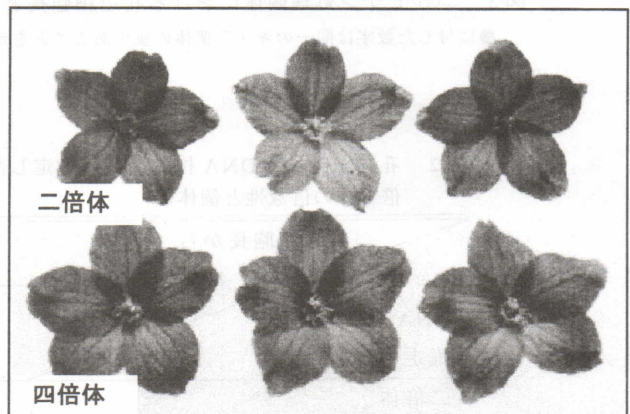


写真3 二倍体と四倍体における花の形態

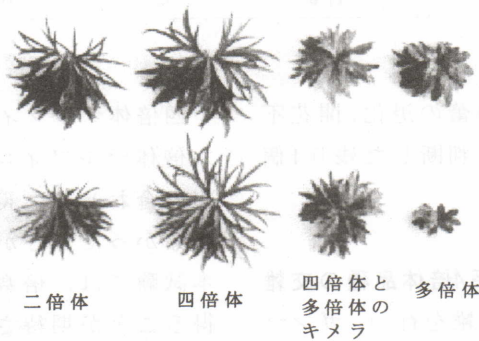


写真4 二倍体と四倍体における葉の形態

四倍体の葉は大きさが異なるが二倍体と比べ形状にあまり差は見られない。四倍体と多倍体のキメラ、および多倍体では、葉は分厚く形状も明らかに異なった。

表4 倍加した個体とエラータム系品種の交配結果

母番号	交配 花数	花粉親 (ガンマアーミー)		花粉親 (ブルーマジック)		花粉親 (パルフェウエーブ)	
		総莢数	種子数	総莢数	種子数	総莢数	種子数
1	12	41	-	52	-	36	-
2	12	38	-	29	-	36	-
3	12	52	-	38	-	38	-
4	12	38	-	30	-	18	-
5	12	46	-	28	-	48	-
6	12	45	-	36	2	36	-
7	12	37	-	36	-	38	-
8	12	36	-	36	-	36	-
9	12	36	-	41	-	37	-
10	12	35	-	37	-	41	-
11	12	38	3	33	1	36	-
12	12	42	-	29	-	36	2
13	12	41	-	36	-	34	-
14	12	39	-	36	-	36	-
15	12	35	-	35	-	37	-
16	12	39	6	35	-	36	-
17	12	34	-	36	-	29	-
合計	204	672	9	603	3	608	2

引用文献

K. Arumuganathan and E. D. Earle (1991) : Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry, *Plant Molecular Biology Reporter*, **9** (3), 229-241.

市橋ら (2001-03-01) : フローサイトメーターによるラン科植物の倍数性調査, 愛知教育大学研究報告, 自然科学, **50**, 39-45.

牛尾ら (2002) : フローサイトメーターによる *Dianthus* 属遺伝資源の倍数性測定, 花き研究所報

告, **2**, 21-26.

塚本洋太郎 (1973) : 花き総論, 養賢堂, 439-448.

本多和茂 (2002) : デルフィニウム属の交雑育種および胚珠培養による雑種育成に関する研究, *Journal of Environmental Science Laboratory, Senshu University*, **9**, 1-54.

三柴啓一郎・三位正洋 (1998) : フローサイトメトリー自由自在 植物研究への応用, *細胞工学*, **17** : 609-615.

Abstract

Tetraploid plants of delphinium were produced by dropping colchicine solution on diploid shoot apex for a week. After colchicine treatment, 48 samples were obtained. And there were shown the polyploidy levels of these samples by guard cell lengths and relative quantity of DNA concentration from Flow Cytometry. As a result, 29 plants were diploid, 13 tetraploid, 2 poliploid, 2 chimera(diploid and tetraploid), 2 chimera(tetraploid and poliploid).

Chromosome-doubled delphiniums and *D. elatum* c.v. 'Gamma army', c.v. 'Blue magic', and c.v. 'Parfait wave', were crossed. There were few seeds produced in all cross combinations. But, all of those seeds were not germination.