

(原著論文)

染色体数の計測およびフローサイトメトリーによる ブバルディア属植物の倍数性の判定

大槻優華^{1*}・宮下智人¹・菊池真司²

¹東京都農林総合研究センター

²千葉大学園芸学研究科

摘 要

アカネ科の低木であるブバルディアの園芸品種には、複数の原種とその種間交雑で作出された多くのハイブリッド系品種があるが、その大部分の倍数性は明らかにされていない。そこで原種2種4系統、ハイブリッド系15品種の計19種類について、染色体の観察とフローサイトメトリーによる倍数性の判定を行った。染色体観察の結果、原種2種 (*B. longiflora* および *B. ternifolia*) 各1系統は染色体が72本で8倍体 ($2n = 8x = 72$) であり、ハイブリッド系品種‘ヨホホワイト’、‘チェリーピンク’は染色体が36本で4倍体 ($2n = 4x = 36$) であることが明らかとなった。次に供試した19種類でDAPI染色によるフローサイトメトリーを行い、相対的蛍光強度 (RFI) を測定した。染色体を観察した4品種・系統ではRFIと染色体数とが1%水準で有意な正の相関を示した。その一次回帰式を検量線に用いて、残り15品種・系統の倍数性を判定した。その結果、ハイブリッド系品種‘ライトピンク、レッド’が4倍体で、それ以外はすべて8倍体であると判定された。ブバルディアは高次倍数体の種や品種が多く、染色体調査では多くの作業時間と高度な技術を要することから、フローサイトメトリーはブバルディアにおける簡易な倍数性の判定法として有用と考えられた。

キーワード：倍数性育種, DAPI, 蛍光染色, 切り花, 交雑育種

簡略表題 ブバルディア染色体

東京都農林総合研究センター研究報告19 : 51-58, 2024

* 著者連絡先 : Email : y-otsuki@tdfaff.com

緒言

ブバルディア (*Bouvardia* spp.) はアカネ科の花弁園芸作物であり、主に切り花として、一部で鉢物として利用されている。主要な産地は国外ではオランダ、国内では東京都、熊本県、静岡県、福岡県などであるが (東京都中央卸売市場, 2020), 国内外ともに生産量は少なく、マイナー品目の位置づけである (宮下ら, 2020)。

現在商用として主に栽培されるハイブリッド系品種は3つの種 (*B. leiantha* Benth., *B. longiflora* (Cav.) Kunth, *B. ternifolia* (Cav.) Schldl.) 間の交雑により育成されたと考えられている (石井・井上, 1968)。既存のハイブリッド系品種はそのほとんどがオランダの一部の企業のみで開発され、公開された育種情報は少ない。また、国内に初期に導入されたハイブリッド系品種は稔性が著しく低いとされ、採種できなかったため、一部の枝変わり品種を除いて国内での品種改良はほとんど進まなかった (宮下ら, 2020)。

品種改良の主な手段として交雑育種があるが、倍数性の異なる個体間では交雑が困難になる事例があり (Husband and Sabara, 2003 ; Zohren et al. 2016), 多様な倍数性の存在する作物で育種を効率的に進めるためには、遺伝資源の倍数性に関する知見を得ることが重要である。ブバルディア属植物の染色体基本数は9で、4, 8, 12倍体があることがわかっている (Lewis, 1962)。しかし現在主流の栽培品種群を含め、遺伝資源の倍数性に関する知見はほとんどない。また染色体の観察および染色体数の計測は、観察に適した材料の調達に時間や労力を要すること、観察に熟練の技術と長い作業時間を要することなどから、効率的かつ迅速な育種の実現のために、ブバルディアにおいて倍数性を簡易評価できる手法を開発することも必要である。

フローサイトメトリーはDNAを蛍光染色してその蛍光強度を測定する手法であり、ゲノムサイズの測定や倍数性の推定を簡易に行うことができる (三柴・三位, 1998)。野菜ではアブラナ科 (Fahleson et al. 1988) やトマト (Arumuganathan et al. 1991), 果樹ではブルーベリー (Costich et al. 1993 ; Miyashita et al. 2009) やカキ (Tamura et al. 1998), 花卉ではガーベラ (Tosca et al. 1999) やカーネーション (牛尾ら, 2002) など幅広い作物で用いられている。またビワでは、種なし品種の育成を目的と

して、2倍体と4倍体の交雑実生からフローサイトメーターを用いて3倍体が選抜された (八幡ら, 2005)。本手法をブバルディアでも活用できれば、効率的な育種を行う上で有用と考えられる。

そこで本研究では、まずブバルディアの原種および一部の栽培品種の染色体数を調査してその倍数性を明らかにした。次いでその情報およびフローサイトメトリーを用いて原種および栽培品種の倍数性の判定を行った。なお、本試験は2015年に実施し、本報告の一部は、園芸学会平成28年度春季大会で発表したものである (大槻ら, 2016)。

材料および方法

1. 供試品種・系統

ブバルディア属の原種2種4系統、ハイブリッド系品種15品種、計19品種・系統を供試した (表1)。原種は *B. longiflora* BL-1, ‘白王冠’, *B. ternifolia* BT-1 および BT-2 の2種4系統である。ハイブリッド系品種は1950年代以降に国内に導入された品種群から ‘チェリーピンク’ など4品種と、2000年代以降に導入された比較的新しい品種群から11品種を用いた。植物体は、東京都立川市の室温15℃以上に管理したガラス室で鉢栽培している株を用いた。

2. 染色体数の計測 (試験1)

(1) 植物材料

B. longiflora BL-1, *B. ternifolia* BT-1, ‘チェリーピンク’, ‘ヨホホワイト’ の4種類を供試した。染色体数を観察する器官としてBT-1, BL-1は葯を供試した。‘チェリーピンク’, ‘ヨホホワイト’ は予備試験において花粉または葯が著しく少ない特性が確認されたことから、根端を供試した。

(2) 染色体標本の作成

1) 前処理

採取した組織を0.045% 8-hydroxyquinoline に浸漬し、4℃で16時間の処理を行った。次に固定液 (酢酸:エタノール=1:3) に浸し、常温で5日間静置して固定した後、70%エタノールに浸して常温で保存した。

2) 標本の作成

酵素乖離法を用いて、各品種・系統当たり5~10枚のスライド (染色体標本) を作成した。固定した組織を蒸留水に10分浸して洗浄した後、スライドガラス上でカミソリにて検体を調整した。余分な組織

表1 供試したブバルディア属植物^a

種類	供試品種 ・系統数	品種・系統名	特徴
<i>Bouvardia longiflora</i>	2	BL-1 白玉冠	
<i>Bouvardia ternifolia</i>	2	BT-1 BT-2	
ハイブリッド系	15	チェリーピンク	日本に1950年代以降に導入された古いハイブリッド系品種群
		ヨホホワイト	
		ライトピンク	
		レッド	
		グリーンサマー	
		グリーンマジック	日本に2000年代以降に導入された比較的新しいハイブリッド系品種群
		ダイヤモンドボルドー	
		ダイヤモンドライラック	
		ホワイトシュープリーム	
		ロイヤルダフネ	
		ロイヤルダフネフレスコ	
		ロイヤルダフネレッド	
		ロイヤルニコレット	
		ロイヤルユリア	
		ロイヤルローザ	
合計	19		

a)宮下ら(2020)より一部引用, 改変。グリーンサマーおよびホワイトシュープリームは三田花店(東京都立川市)から購入。

や水を拭きとった後, 酵素液(2% cellulose Onozuka RS (Yakult (株)) および2% pectolyase Y-23 (協和ケミカル(株)) 10 μ L)を滴下して湿潤箱にスライドガラスを静置し, 37 $^{\circ}$ Cで30分, 酵素乖離処理を行った。処理後, 酵素液をろ紙で取り除き, 45%酢酸カーミンを滴下して1~2分静置した。その後, 検体にカバーガラス(22 \times 22mm)を被せ, アルコールランプで1秒以上加熱した後, ろ紙でカバーガラスの一端を抑えながら爪楊枝でカバーガラスの上から組織を軽くたたき, 細胞を展開させた。次にスライドガラスをろ紙で挟み, 指でゆっくり押しつぶした。作成した標本を光学顕微鏡で観察し, 染色体数の計測に適した標本を選抜した。以降, 同様の作業を必要な標本数が得られるまで繰り返した。

(3) DAPI 染色

作成した標本を-80 $^{\circ}$ Cのフリーザーに一晩置いて凍結させ, カミソリでカバーガラスを取り除いた後, 自然乾燥させた。乾燥させたスライドガラスを蒸留水に浸して軽く洗浄し, ブロワーで風乾した。検体上に5 μ g/mL DAPI 溶液(蒸留水に溶解)10 μ L

を滴下し, 22 \times 22mmのカバーガラスで封入した。染色体数の計測は, Kikuchi et al. (2008)の方法に基づき, 蛍光顕微鏡(OLYMPUS BX53)で観察し, 良好な染色体像を冷却CCDカメラ(CoolSNAP MYO)で撮影後, ソフトウェア(MetaVue ver.7.8.2.0)で画像処理を行った。

2. フローサイトメトリーによる倍数性の推定(試験2)

ブバルディア属の原種2種4系統, ハイブリッド系15品種, 計19種類を供試した(表1)。若い展開葉5mm角程度をガラスシャーレにとり, High Resolution DNA staining kit (CyStain UV Precise P, SYSMEX PARTEC GmbH)のA液(Nuclei Extraction Buffer)100 μ Lを加えてカミソリで細断した。これにA液100 μ Lと純水200 μ Lを加えて, 3分静置後, 30 μ mフィルターでろ過して抽出した核をB液(Staining Buffer)1mLと純水1mLを加えて染色した。この試料液をフローサイトメーターCyFlow PA (SYSMEX PARTEC GmbH)を使って分析し, 相対的核DNA含量を表す相対蛍光強度(Relative fluorescence intensity;

RFI) を1個体当たり3回測定して平均値を算出した。試験1により倍数性が明らかになった4種類 (*B. longiflora* BL-1, *B. ternifolia* BT-1, ‘チェリーピンク’, ヨホホワイト’) のデータをもとに, RFI から倍数性を推定するための検量線を作成した。この検量線を用いて, 上記4種類を除く15種類の倍数性を推定した。

結果

1. 染色体の観察

ブバルディア属植物4種類について染色体を計測した結果, 原種の *B. longiflora* BL-1, *B. ternifolia* BT-1, の染色体数はどちらも72本であった(図1)。ブバルディア属の基本染色体数は $x=9$ (Lewis, 1962) であることから, BL-1とBT-1はどちらも8倍体 ($2n=8x=72$) であることが明らかになった。また, ハイブリッド系品種 ‘チェリーピンク, ヨホホワイト’ の染色体数はどちらも36本であり, 倍数性は4倍体 ($2n=4x=36$) であることが明らかになった。

2. フローサイトメトリーによる倍数性の推定

フローサイトメトリーでブバルディア属植物のRFIを測定した結果, 試験1で倍数性が判明した

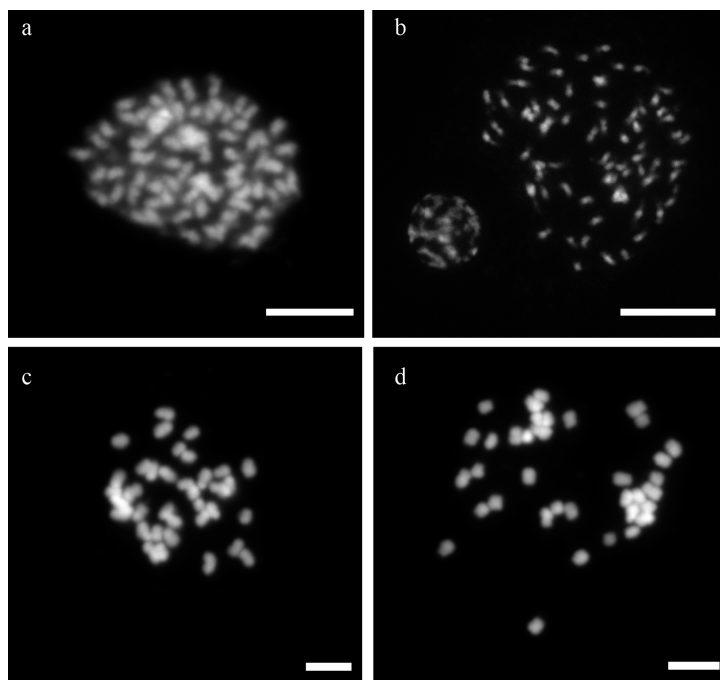


図1 ブバルディア属植物の体細胞の染色体 *B. longiflora* BL-1 (a), *B. ternifolia* BT-1 (b), ‘ヨホホワイト’ (c), ‘チェリーピンク’ (d), バーはすべて5 μ m

BL-1 (8x) は ‘チェリーピンク’ (4x) の約2倍の値のピークを示し, 各々の倍数性の違いを明確に測定することが可能であった(図2)。またその他のすべての品種・系統においても1つの強いピークが認められたため, その値を各品種・系統の標準的な核DNA量を示す値と判断した。

供試した品種・系統のRFI値は大きく2つのグループに分かれた。1つ目が30前後の値(27.3~30.7)を示す4種類で, 試験1で4倍体と判明した2品種(‘チェリーピンク’, ‘ヨホホワイト’)が含まれた。2つ目が50~60程度(50.3~63.1)を示す15種類で, 試験1で8倍体と確認された2系統(BL-1, BT-1)が含まれた。試験1で倍数性が明らかになった4品種・系統について, RFIと倍数性の関係を分析した結果, 1%水準で有意な正の相関($r=0.9967$)が認められた(図3)。その一次回帰式では, $R^2=0.9935$ と高い決定係数が得られた。この式($Y=0.1519 \times \text{RFI} - 0.138$)を検量線に用いて, 倍数性の推定値を算出した。その結果, 試験1で倍

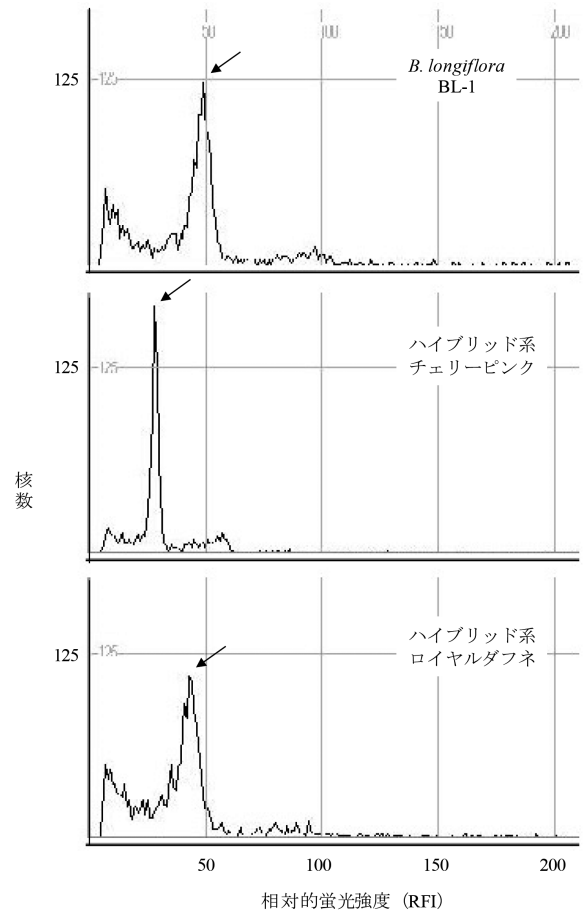


図2 フローサイトメトリーによるブバルディア属植物の相対的蛍光強度 矢印は各品種・系統におけるRFIのピークを示す

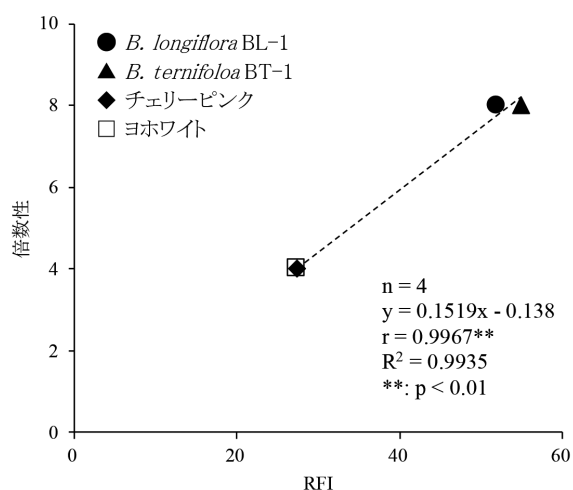


図3 ブバルディア属植物における倍数性と相対的蛍光強度の関係

表2 ブバルディア属植物における相対的蛍光強度および推定倍数性

種類	品種・系統名	RFI	倍数性		
			計算値 ^a	試験1より ^b	推定値 ^c
<i>Bouvardia longiflora</i>	BL-1 白王冠	55.0 53.7	8.2x 8.0x	8x -	- 8x
<i>Bouvardia ternifolia</i>	BT-1 BT-2	52.0 54.3	7.8x 8.1x	8x -	- 8x
ハイブリッド系	チェリーピンク	27.3	4.0x	4x	-
	ヨホホワイト	27.3	4.0x	4x	-
	ライトピンク	30.3	4.5x	-	4x
	レッド	30.7	4.5x	-	4x
	グリーンサマー	58.7	8.8x	-	8x
	グリーンマジック	52.7	7.9x	-	8x
	ダイヤモンドボルドー	54.7	8.2x	-	8x
	ダイヤモンドライラック	55.7	8.3x	-	8x
	ホワイトシュープリーム	54.3	8.1x	-	8x
	ロイヤルダフネ	53.3	8.0x	-	8x
	ロイヤルダフネフレスコ	54.7	8.2x	-	8x
	ロイヤルダフネレッド	51.2	7.6x	-	8x
	ロイヤルニコレット	50.3	7.5x	-	8x
	ロイヤルユリア	63.1	9.4x	-	8x
	ロイヤルローザ	53.7	8.0x	-	8x

a)第3図の倍数性とRFIの検量線の数式 (Y=0.1519×RFI-0.138) に基づく。b)染色体観察により確定。c)計算値および各品種・系統が正倍数体であるとの仮定に基づく

倍数性が既知となった4種類を除く15種類では、ハイブリッド系品種の‘ライトピンク’および‘レッド’が4倍体で、それ以外はすべて8倍体であると判定できた(表2)。

考 察

1. ブバルディア遺伝資源の倍数性

本研究では染色体数の計測とフローサイトメトリーにより、原種2種4系統とハイブリッド系品種15種類の倍数性を判定することができた。その結

果、供試したハイブリッド系品種はいずれも、4倍体と8倍体の品種群に分かれることがわかった。4倍体品種はいずれも1950年代以降に日本に導入された古い品種群である(表1)。一方、8倍体品種はいずれも2000年代以降に導入された新しい品種群であり、現在の生産の主流となっている。この新しい品種群は古い品種群に比べて花や植物体が大きい傾向であり、これは両者の倍数性の違いに起因すると考えられた。

さらに、新しい品種群は古い品種群に比べて花が大きく茎が剛直だとされる(上原・南, 2011)。クワでは倍数体化に伴う巨大性によって導管の組織構造が変化したことが報告されており(関・押金, 1963)、ブバルディアのハイブリッド系品種も染色体倍加したことで導管の組織構造に変化が生じ、水揚げに影響した可能性がある。今後、日持ち性と倍数性との関係を明らかにするうえで、組織構造の調査を行うことも重要と考えられる。

2. 簡易な倍数性検定法の確立

本研究により、フローサイトメーターを用いることで、1サンプル当たり10分程度と迅速な倍数性の判定が可能となった。これは顕微鏡による染色体数の調査の100分の1以下であり、大幅な時間短縮となる。今回観察したブバルディアの染色体は1~2 μm と非常に小さく、また8倍体(72本)など高次倍数性の品種・系統では染色体数が極めて多いことから、顕微鏡による染色体数の計測には熟練の技術と大きな労力を要した。そのため、フローサイトメトリーによる倍数性の判定法は、ブバルディアにおいて極めて有用と考えられた。

ブバルディアの倍数性や交雑に関して、4倍体と8倍体などの異倍数体間の交配で後代が得られること(宮下ら, 2020)、16倍体は雄性の稔性が高いこと(宮下・小坂井, 2021)が報告されている。このような異倍数体間の交雑や高次倍数体の後代からは、従来にない多様な倍数性の個体が生じる可能性がある。また国内では近年、交雑育種による品種開発が進められ、新品种が発表されている(宮下ら, 2021)。本研究で得られたブバルディアの倍数性に関する知見は、これらの研究においても試験設計や考察で活用されている。また本研究で確立したブバルディアの倍数性の簡易判定法は、今後も同様のブバルディアにおける育種や倍数性の研究において有用であると考えられる。

謝 辞

本研究の実施に当たり、試験全般にご助言いただいた千葉大学の佐々英徳教授、植物材料をご提供いただいた伊豆大島ブバルディア生産者部会の皆様ならびに東京都島しょ農林水産総合センター大島事業所の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Arumuganathan K, Slattery J. P., Tanksley S. D., Earle E. D (1991) Preparation and flow cytometric analysis of metaphase chromosomes of tomato. *Theor. Appl. Genet.* 82: 101-111.
- Costich DE, Ortiz R, Meagher TR, Bruederle LP, Vorsan N (1993) Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry. *Theor. Appl. Genet.* 86: 1001-1006.
- Fahleson J, Dixelius J, Sundberg E, Glimelius K (1988) Correlation between flow cytometric determination of nuclear DNA content and chromosome number in somatic hybrids within *Brassicaceae*. *Plant Cell Rep.* 7: 74-77.
- Husband BC, Sabara HA (2003) Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist.* 161: 703-713.
- 石井林寧・井上頼数 (1968) *Bouvardia Salisb* ブバルディア属 (最新園芸大辞典編集委員会編著). 最新園芸大辞典. 第1巻. 誠文堂新光社, 東京. pp310-311.
- Kikuchi S, Matsuki K, Tanaka H, Ohnishi O, Tsujimoto H (2008) Chromosome evolution among seven *Fagopyrum* species revealed by Fluorescence in situ hybridization (FISH) probed with rDNAs. *Chromosome Science.* 11: 37-43.
- Lewis, W, H (1962) Chromosome numbers in North American *Rubiaseae*. *Brittonia.* 14: 285-290.
- 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.
- Miyashita C, Ishikawa S, Mii M (2009) In vitro induction of the amphiploid in interspecific hybrid of blueberry (*Vaccinium corymbosum* × *Vaccinium*

- ashei*) with colchicine treatment. *Sci. Hortic.* 122: 375-379.
- 宮下千枝子・大槻優華・鈴木克彰 (2020) 20種類のブバルディア品種および系統を用いた正逆交配による交雑能力の評価. *園学研.* 19: 159-166.
- 宮下智人・小坂井宏輔 (2021) ブバルディアにおける *in vitro* での好適な花粉発芽条件の確立および花粉特性と稔性との関係性の評価. *園学研.* 20: 149-156.
- 宮下智人・小坂井宏輔・大槻優華・小幡彩夏・大根田順子・澁澤直恵・鈴木克彰 (2021) ブバルディアにおける倍数性および交雑育種の基盤技術の確立と「東京スター」シリーズ3品種の育成. *園学研.* 20 (別1): 292.
- 大槻優華・宮下千枝子・菊池真司・佐々英徳 (2016) ブバルディアの原種および栽培品種の染色体数とフローサイトメトリーによる倍数性の調査. *園学研.* 15 (別2): 252.
- 関 博夫・押金健吾 (1963) 倍数性桑樹に関する研究 育成倍数性桑樹の組織形態学的観察. *日本蚕糸学雑誌.* 32: 97-107.
- Tamura M, Tao R, Yonemori K, Utsunomiya N, Sugiura A (1998) Ploidy level and genome size of several *Diospyros* species. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 306-312.
- Tosca A, Arcara L, Frangi P (1999) Effect of genotype and season on gynogenesis efficiency in *Gerbera*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 59: 77-80.
- 東京都中央卸売市場 (2020) 令和2年東京都中央卸売市場年報 花き編. 東京都中央卸売市場. 東京. p354-355.
- 上原恵美・南 晴文 (2011) ブバルディア 農業技術大系花卉編11. 農文協. 東京. p283-288.
- 牛尾亜由子・小野崎隆・柴田道夫 (2002) フローサイトメーターによる *Dianthus* 属遺伝資源の倍数性. *花き研報.* 2: 21-26.
- 八幡茂木・佐藤三郎・小原 均・松井弘之 (2005) ビワの倍数性による形態および結実特性の差異と二倍体と四倍体の交雑による三倍体の獲得. *園学研.* 4: 379-384.
- Zohren J, Wang N, Kardailsky I, Borrell JS, Joecker A, Nichols RA, Buggs RJA (2016) Unidirectional diploid - tetraploid introgression among British birch trees with shifting ranges shown by restriction site - associated markers. *Molecular Ecology.* 25: 2413-2426.

Determination of ploidy level in *Bouvardia* species by chromosome counting and flow cytometry

Yuka Otsuki^{1*}, Chieto Miyashita¹, Shinji Kikuchi²

¹ Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center

² Faculty of Agriculture, Chiba University

Abstract

Bouvardia, a shrub of the family *Rubiaceae*, contains several hybrid cultivars and the original species, but their ploidy levels have not been elucidated. To determine this, chromosome observation and flow cytometry were conducted in the 19 genetic resources in the Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center including four original species and 15 cultivars. Two original species, *B. longiflora* and *B. ternifolia*, have 72 chromosomes, suggesting octoploidy ($2n = 8x = 72$). Conversely, the hybrid cultivars ‘Yo White’ and ‘Cherry Pink’ have 36 chromosomes, suggesting tetraploidy ($2n = 4x = 36$). Ploidy levels of the 19 original species and cultivars were determined by flow cytometry with DAPI staining. The results showed that the relative fluorescence intensity had a significant positive correlation ($p < 0.01$) between the chromosome number and the ploidy level. The linear regression equation was used as a calibration curve to estimate the ploidy levels of the remaining 15 species and cultivars. The results showed that the hybrid cultivars ‘Light Pink’ and ‘Red’ are tetraploid, whereas all other hybrid cultivars are octoploid. Because the *Bouvardia* species have diverse ploidy levels, flow cytometry can be considered a powerful tool for estimating the ploidy levels of *Bouvardia* species.

Key Words: crossbreeding, cut flower, DAPI, fluorescent staining, polyploidy breeding

Bulletin of Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center, 19: 51-58, 2024

Corresponding author: y-otsuki@tdfaff.com