

## シクラメン倍数体の自殖による後代作出

高村武二郎・堀川真世

Progeny production in selfing of polyploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.).

Takejiro Takamura and Mayo Horikawa

### Summary

The present study was conducted to clarify the traits in propagation of triploid, pentaploid and hexaploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). The pollen fertility of these polyploids was remarkably lower than tetraploids. While the pollen grains of tetraploids showed two clear peaks, 2C and 4C, in flow cytometric analyses, no polyploid except the tetraploids showed clear two peaks without other sharp or broad peaks in the flow cytometric histograms of their pollen grains. Seeds were obtained by the selfing of the triploid, tetraploid and pentaploid. The number of seeds obtained by selfing of the triploid and pentaploid plants was, however, remarkably smaller than the number in selfing of the tetraploid. The germination rate of seeds obtained by selfing of the triploid and pentaploid was also low. Although many progenies obtained by selfing of the triploids and pentaploids showed the same ploidy level as their parents, the aneuploid progenies, of which flow-cytometric histograms were clearly different from those of their parent, were also observed in the progenies germinated *in vitro*.

Key words : cyclamen, triploid, tetraploid, pentaploid, hexaploid, selfing

### 緒 言

日本の冬から春にかけての最も重要な鉢花の一つであるシクラメンの園芸品種は、近年育成された芳香性の一部品種を除いて、22種あるシクラメン (*Cyclamen*) 属の中の *C. persicum* 1種のみから成立している<sup>(1)</sup>。シクラメンには二倍体品種と四倍体品種とが存在するが、20世紀の半ばには、既に多数の二倍体および四倍体の品種が存在していた<sup>(2)</sup>。当時は、花卉の大きさ等から四倍体品種が多く用いられていたが、Wellensiek<sup>(3)</sup>により遺伝様式の複雑さから四倍体レベルでの品種育成が難しいこと等が指摘されて以降は二倍体品種が急増し、現在ではほとんどの品種が二倍体である。

一方、前述のようにシクラメンには二倍体品種と四倍体品種が存在するにも関わらず、三倍体品種は存在しない。シクラメンの二倍体と四倍体との交雑においては、交雑の正逆を問わずその和合性が低く<sup>(2), (4), (5)</sup>、特に Takamura and Miyajima<sup>(5)</sup> は、ごく少数の四倍体後代が得られたのみで、三倍体後代は全く得られなかったと報

告している。このようなこともあり、近年まで異倍数体間交雑による品種改良はほとんど行われてこなかった。

しかしながら、交雑の正逆に関わらず、シクラメンの二倍体と四倍体との交雑における不和合性は、受精ではなく受精後の胚発育不全によることが指摘され<sup>(6)</sup>、胚培養や胚珠培養等による胚救出により三倍体個体を得られる可能性が示された。その後、二倍体と四倍体の交雑後に胎座付き胚珠培養を用いることにより後代の作出が可能であることが示され、三、四、五および六倍性個体作出されている<sup>(7)</sup>。そこで本研究では、これら倍数体を用いたシクラメンの育種に関する知見を得ることを目的として、三、四、五および六倍体個体を用いて、その花粉稔性、自殖による後代形成を調査した。

### 材料および方法

#### 1. 植物材料

二倍体園芸品種‘ピッコロ’ (赤色花) × 四倍体園芸品種‘ライラック’の交雑後の胚珠培養により得られた三、

四, 五および六倍体個体を用いた。

## 2. 花粉のアセトカーミン染色と人工培地上での花粉発芽

開花当日の花粉を採取し、アセトカーミン液で染色して、花粉の染色率を調査した。また、直径9 cmのプラスチックシャーレに注入された10%ショ糖を添加した1%寒天培地 (pH 6.0) 上に、採取した花粉を高村ら<sup>(8)</sup>の方法に準じて置床した。置床後、パラフィルムで密閉したシャーレを20°C暗黒下で24時間培養し、花粉発芽を調査した。

なお、1個体あたり10花を供試し、アセトカーミン染色率の調査では1花あたり200個以上、発芽率については300個以上の花粉を調査した。検鏡には、光学顕微鏡を用いた。

## 3. フローサイトメトリーによる花粉の倍数性測定

高村・吉村<sup>(9)</sup>の方法に準じ、開花当日の花粉を採取し、細胞から核を遊離させるため、植物倍数性分析用DNAキット・核抽出用A液 (Partec社) 中で細断した。懸濁液は室温で5分間放置した後、10  $\mu$ mのフィルター (日本ミリポア) でろ過し、残渣を除去した。DAPI染色後の懸濁液の各核のDNA含量を、プロイディーアナライザーPA型 (Partec社) で分析した。なお、DAPI染色液にはMishiba ら<sup>(10)</sup>により報告された組成のものを用いた。核DNA含有量の相対値は、蛍光強度により評価した。

## 4. 自殖による採種と種子発芽

三, 四, 五および六倍体個体を用い自殖を行った。種子形成率および結実種子数を調査後、得られた完全種子をガラス温室内で播種用の培土 (BM-2 : バーミキュライト = 2 : 1, v/v) に播種し、種子発芽率を調査した。

また、前出の実験とは別途に三および五倍体個体を用いて自殖を行い、得られた完全種子を*in vitro*で人工培地上に無菌播種した。すなわち、種子を70%エタノールに30秒間浸した後、界面活性剤 (Tween 20<sup>®</sup>) を数滴添加した20%次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度2%) で15分間表面殺菌を行い、それらを滅菌水で3回洗浄した後、滅菌したろ紙を敷き、約5 mlの滅菌水を入れた直径9 cmのプラスチックシャーレに置床した。置床後、蓋をし、パラフィルムでシャーレを密封した後、20°C暗黒下で培養した。発芽後、1%ジェランガムを含む3%ショ糖を添加、または無添加の1/2 M-MS2培地<sup>(11)</sup>を40 ml注入した、直径3 mmの穴にミリシールを接着して通気性を確保したポリメチルペンテン製の蓋を

持つ200 mlガラス製ボトルに移植した。植物体を15°C暗黒下で1週間培養した後、15°C, 16時間日長下に移動させた。

いずれにおいても、高村・吉村<sup>(9)</sup>の方法に準じて、得られた実生の倍数性をフローサイトメトリーで検定した。ただし、DAPI染色液はMishiba ら<sup>(10)</sup>により報告された組成のものを用いた。また、核はそれぞれの実生の葉身から遊離し、内部標品としてシクラメンの二倍体園芸品種を用いた。

## 結果および考察

各倍数体における花粉のアセトカーミン染色率 (アセトカーミンによって全体が染色された花粉の割合) を第1表に示した。四倍体では全ての花で90%以上の花粉染色率を示したのに対し、他の倍数体では、花ごとに花粉染色率に大きなばらつきが認められた。なお、一部分のみしか染色されなかった花粉が四倍体ではほとんど認められなかったのに対し、他の倍数体では比較的多く認められた (データ未掲載)。また、各倍数体における花粉の人工培地上での発芽率を第2表に示した。四倍体では、いずれの花においても高い花粉発芽率を示したのに対し、他の倍数体では発芽率が総じて低く、花によるばらつきも大きかった。

第1図に各倍数体の花粉のフローサイトメトリーにおける典型的なヒストグラムを示した。シクラメンの花粉は二核性であるため、通常、個体と同じDNA量とその半分のDNA量をもつ二種類の核が存在する<sup>(9)</sup>。今回の調査においても、四倍体では2Cと4Cの位置に明確なピークが得られ、その他のDNA量を示す核は少なかった。一方、三, 五および六倍体では、それぞれの母株と同等および半分の核DNA量を示すと考えられる核数が多くなる傾向は認められたものの、その他の核DNA量を示す核数が四倍体と比較して著しく多く、明確なピークのみを示したと呼べる個体は認められなかった。

各倍数体の自殖の結果、六倍体では自殖を行ったすべての花が結実しなかったが、三および五倍体では、四倍体に比べ著しく低い割合ではあるものの結実および種子形成が認められた (第3表)。得られた種子を播種用の培土に播種した場合、三倍体では26.8%, 五倍体では58.3%と、四倍体に比べ著しく発芽率が低くなった (第4表)。一方、*in vitro*で播種した場合、三および五倍体のいずれにおいても温室での播種用培土での播種と比較して高い発芽率を示した (第5表)。フローサイトメトリーの結果から、播種用培土で発芽した実生は全て親と同等の倍数性であることが示唆された (第4表) のに對

Table 1. Percent pollen grains stained with acetocarmine in polyploid cyclamen.

Individuals	No. of flowers indicated with pollen viability										Mean pollen fertility (%)
	<10	<20	<30	<40	<50	<60	<70	<80	<90	90-100	
Triploid-1	0	1	1	3	1	1	2	1	0	0	44.9
Triploid-2	0	1	0	1	2	0	2	2	2	0	59.4
Triploid-3	0	0	0	2	0	1	2	1	4	0	66.8
Tetraploid-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	94.7
Tetraploid-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	98.2
Pentaploid-1	0	0	0	1	0	1	1	2	2	3	76.2
Hexaploid-1	0	1	1	0	0	0	3	1	2	2	67.6

Pollen viability: Percent pollen grains stained with acetocarmine completely.

Table 2. *In vitro* pollen germination in polyploid cyclamen.

Individuals	No. of flowers indicated with percent pollen germinated										Mean germination percentage
	<10	<20	<30	<40	<50	<60	<70	<80	<90	90-100	
Triploid-1	4	4	0	2	0	0	0	0	0	0	14.6
Triploid-2	3	2	3	2	0	0	0	0	0	0	17.2
Triploid-3	1	1	4	2	1	1	0	0	0	0	28.4
Tetraploid-1	0	0	0	0	0	0	0	1	6	3	85.7
Tetraploid-2	0	0	0	0	0	0	0	1	3	6	88.9
Pentaploid-1	0	0	2	2	3	2	1	0	0	0	47.4
Hexaploid-1	2	1	3	0	1	1	1	1	0	0	33.5

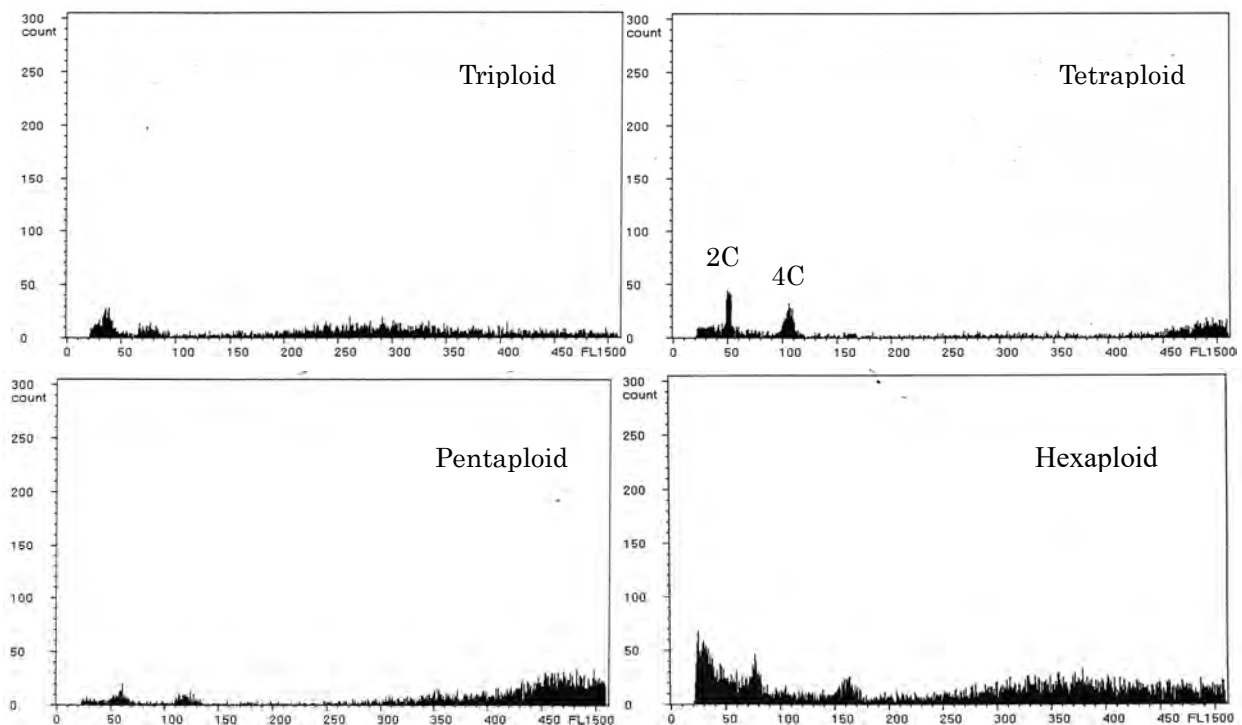


Fig. 1. Typical flow cytometric histograms of DAPI fluorescent intensity of nuclei extracted from the pollen grains of polyploid cyclamen.

Table 3. Fruiting and seed formation in selfing of polyploid cyclamen.

Parents	No. of plants used	No. of flowers pollinated	No. of seed set		Seed set percentage	No. of seeds		No. of FS per fruit
			total	with FS		FS	PS or ES	
Triploid	36	327	38	26	11.6	41	322	1.6
Tetraploid	5	150	77	77	51.3	1933	459	25.1
Pentaploid	2	19	3	3	15.8	12	8	4.0
Hexaploid	2	14	0	0	0	–	–	–

FS: Fully-developed seeds, PS: Partially-developed seeds, ES: Empty seeds.

Table 4. Germination in soil and ploidy levels of the seeds obtained by selfing of polyploid cyclamen.

Parents of selfing	No. of seeds sown	No. of seedlings obtained	Percent seeds germinated	No. of seedlings investigated the ploidy	No. of seedlings with indicated the ploidy level <sup>z</sup>			
					3 x	4 x	5 x	others
Triploid	41	11	26.8	10	10	0	0	0
Tetraploid	250	227	90.8	118	0	118	0	0
Pentaploid	12	7	58.3	7	0	0	7	0

<sup>z</sup> Aneuploids with nearly the same number of chromosomes as triploid, tetraploid and pentaploid might be included in 3 x, 4 x and 5 x, respectively.

Table 5. *In vitro* germination of the seeds obtained by selfing of triploid and pentaploid cyclamen, and ploidy levels of the seedlings.

Parents of selfing	No. of seeds sown	No. of seedlings obtained	Percent seeds germinated	No. of seedlings investigated the ploidy	No. of seedlings with indicated the ploidy level <sup>z</sup>			
					3 x	4 x	5 x	others <sup>y</sup>
Triploid	58	32	55	14	8	0	0	6
Pentaploid	13	10	77	6	0	0	4	2

<sup>z</sup> Aneuploids with nearly the same number of chromosomes as triploid, tetraploid and pentaploid might be included in 3x, 4x and 5x, respectively.

<sup>y</sup> These plants showed clearly different flow cytometric histograms from the histograms of diploid, triploid, tetraploid, pentaploid and hexaploid cyclamen.

し, *in vitro*で発芽した実生では親と同等の倍数性の個体も認められたが, 親よりも核DNA含量の少ない明らかに異数性と思われる個体も認められた(第5表, 第2図).

本研究の結果, 三, 五および六倍体では, 四倍体と比較して花粉稔性が低く, フローサイトメトリーにおいても四倍体の花粉と異なって母株と同等および半分以外の核DNA量を示すと考えられる核が多く認められたことから, これらの倍数体では, 種々の倍数性の花粉が生じていることが示唆される. また, 石坂<sup>(12)</sup>は, シクラメンの四倍体では, 花粉母細胞の減数分裂においてほとんどの染色体が二倍体と同様に二価染色体となり, 正常に減数分裂していることを報告している. このことから, シクラメンの四倍体以外の倍数体では, その花粉母細胞の減数分裂時に多価染色体を生じ, その結果, いわゆる不均衡花粉が形成され, 花粉稔性が個体または花の間で

ばらつき低下する一因となったことも推測される.

各倍数体の自殖の結果, 三, 四および五倍体で種子が得られたが, 四倍体の自殖に比べ三および五倍体の自殖では明らかに得られた種子数が減少した. 三および五倍体は, 四倍体と比較して花粉稔性が低かったが, 種子稔性も同様に低くなるものと示唆される. 三および五倍体の自殖で得られた種子は発芽率も低い値を示し, 土壌で発芽させて得られた実生は全ての個体が親と同等の倍数性であったが, *in vitro*で発芽させて得られた実生では親と同等の倍数性および親よりも核DNA含量の少ない異数性の両方が認められた. 一般的に, 同質三倍体は減数分裂における染色体の行動の不規則性のために, 完全不稔または高不稔となり, 種子繁殖植物では同質三倍性を維持することは困難で, まれに子孫を生じてそれらの多くは異数体になる<sup>(13)</sup>. シクラメンの三および五倍体においても, *in vitro*播種により得られた実生の半数に異



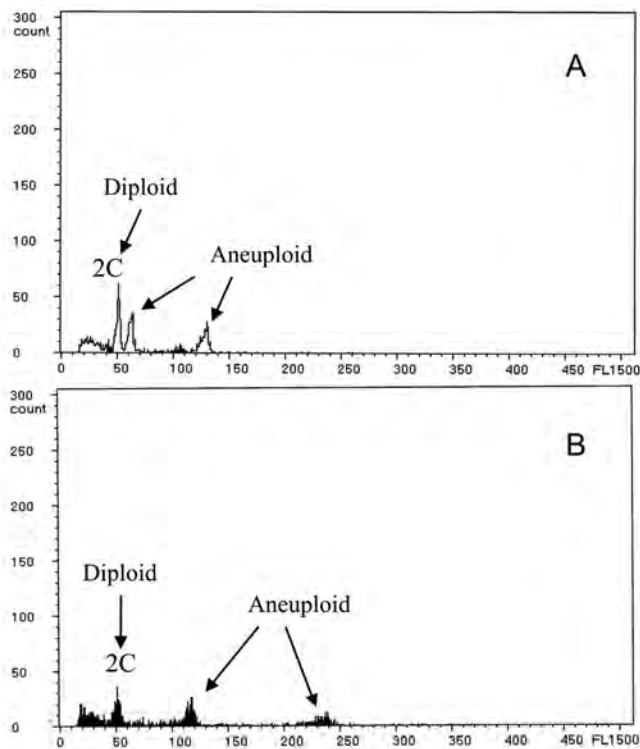


Fig. 2. Typical flow cytometric histograms of DAPI fluorescent intensity of nuclei, extracted from the leaf blade of *in vitro* germinated aneuploid progenies. The diploid is used as the internal standard for the flow cytometry. A: Aneuploid obtained by selfing of the triploid cyclamen, B: Aneuploid obtained by selfing of the pentaploid cyclamen.

数体と考えられる個体が認められ、種子繁殖を通して同じ倍数体の後代系統を育成・維持することは容易ではないと考えられる。なお、今回播種に供した種子は、すべて完全種子と考えられたものであったことから、培土での播種では発芽のための環境が*in vitro*と比較して適当で

はなかったために正倍数体に近いもの以外の種子が発芽できなかったことが推測され、発芽しなかった種子の多くが異数体であったことも推測される。すなわち、異数体種子では、正倍数体に近い染色体数の種子と比較して発芽能力が劣る可能性がある。

本実験の結果より、三、五および六倍体では、種々の倍数性の花粉が生じることが示唆された。また、三および五倍体の自殖でも種子は得られるものの、その数は少なく倍数性の維持も容易でないことが推測された。今後、後代の特性および染色体数の調査や、自殖後の胚救出による植物体の作出等を試み、シクラメン倍数体後代の倍数性発現に関連するさらなる検討を行う必要があると思われる。

## 摘 要

シクラメンの三、四、五および六倍体の繁殖様式に関する特性を把握するために、まず、花粉稔性を調査したところ、四倍体と比較して他の倍数体では明らかに低い値を示した。また、フローサイトメリーによる花粉の倍数性調査の結果、四倍体の花粉では明確なピークが認められたものの、三、五および六倍体では明確なピークのみを示した個体は認められなかった。さらに、三、四および五倍体の自殖で種子が得られたが、四倍体の自殖に比べ三および五倍体の自殖では得られた種子数が少なく、発芽率も低い値を示した。三および五倍体から得られた実生のほとんどは親と同じ倍数性であったが、*in vitro*での播種で得られた実生では親よりも核DNA含量の少ない異数体も認められた。

(1) Grey-Wilson, C.: *Cyclamen*, Timber Press, Portland

## 引 用 文 献

- (2002).
- (2) Legro, R. A. H.: The cytological background of *Cyclamen* breeding. Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen, 59, 1-51 (1959).
- (3) Wellensiek, S. J.: The breeding of diploid cultivars of *Cyclamen persicum*. Euphytica, 10, 259-268 (1961).
- (4) Wellensiek, S. J.: The genetics of diploid  $\times$  tetraploid and reciprocal cyclamen crosses. Züchter, 25, 229-230 (1955).
- (5) Takamura, T. and Miyajima, I.: Cross-compatibility and the ploidy of progenies in crosses between diploid and tetraploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). J. Japan. Soc. Hort. Sci., 64, 883-889 (1996).
- (6) Takamura, T. and Miyajima, I.: Embryo development in crosses between diploid and tetraploid cyclamen (*Cyclamen persicum* Mill.). J. Japan. Soc. Hort. Sci., 65, 113-120 (1996).
- (7) Takamura, T., Yoshimura, N. and Horikawa, M.: Ploidy levels of degenerated embryos in the crosses between diploid and tetraploid cyclamen, Acta Hort., 855, 261-266 (2010).
- (8) 高村武二郎, 中尾友美, 田中道男: 人工培地上でのシクラメン花粉の発芽に及ぼす光および温度の影響. 香川大学農学部学術報告, 48, 39-46 (1996).

- (9) 高村武二郎, 吉村奈津紀: フローサイトメトリーを用いたシクラメン植物体および花粉の倍数性検定. 香川大学農学部学術報告, 59, 49-55 (2007).
- (10) Mishiba K., Ando T., Mii M., Watanabe H., Kokubun H., Hashimoto G. and Marchesi E.: Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Pettunia sensu* Jussieu (Solanaceae). Ann. Bot., 85, 665-673 (2000).
- (11) 高村武二郎, 芋瀬裕香, 名木田由香, 田中道男: シクラメン体細胞胚からの植物体再生に及ぼす培地中の窒素源とジェランガム濃度の影響. 植物環境工学, 18, 105-109 (2006).
- (12) 石坂 宏: シクラメン四倍体品種 'ビクトリア' ( $2n = 4x = 96$ ) の薬培養により得られた二倍体 'ビクトリア' ( $2n = 2x = 48$ ) の特徴. 園学雑., 72 (別1), 376 (2003).
- (13) 渡辺好郎: 育種における細胞遺伝学. 養賢堂, 東京 (1982).