

クルメツツジとキレンゲツツジとの生殖的隔離機構の 解明に基づく常緑性黄花ツツジの作出に関する研究

岡本章秀

(2008年4月23日 受理)

要 旨

岡本章秀：クルメツツジとキレンゲツツジとの生殖的隔離機構の解明に基づく常緑性黄花ツツジの作出に関する研究。九州沖縄農研報告 50:21-110, 2009.

中小輪系常緑性ツツジであるクルメツツジの黄花品種を作出するため、常緑性ツツジとキレンゲツツジとの亜属間交雑で問題となる生殖的隔離機構の様相と、交雑能力に優れる交雑親の遺伝的特性を明らかにすることを試みた。また、得られた実生の外観的特性および栽培管理上の難易性を評価し、暖地向き品種を作出するための方策を提案した。常緑性ツツジ(種子親)×キレンゲツツジ(花粉親)では、キシツツジを種子親に用いた場合を除き、複数の交雑隔離障壁が重複して存在し、各々の隔離障壁は雑種形成を低下させるが、完全な隔離をもたらすことはなかった。また、花粉親とするキレンゲツツジ個体の選定が、交雑実生の獲得に重要であった。クルメツツジの成立に関与した野生種として、既知の3種にモチツツジおよびキシツツジが加わることを推定した。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有するクルメツツジ品種中に、交雑能力に優れる種子親が存在した。雑種弱勢の打破にはモチツツジに特徴的な染色体 T14 と、モチツツジにはなくヤマツツジ等が有する T3 が共存することが必要であった。得られた交雑実生は、葉緑体 DNA が父性遺伝していた。暖地栽培に不向きなキレンゲツツジを黄色花色の提供親に用いた影響が実生の生育に現れたことから、暖地向き品種の育種では、黄色花色の提供親候補の種・品種に対し、暖地での栽培適性を評価するステップを加えることを提案した。

キーワード：育種、交雑隔離、遠縁交雑、核型、クルメツツジ、キレンゲツツジ。

目 次

I. 緒言	22
1. クルメツツジの歴史および生産の現状	
2. 常緑性黄花ツツジ育種の意義と既往の研究成果	
3. 本研究の目的と構成	
II. クルメツツジの品種多様性に対するモチツツジおよびキシツツジの関与	24
1. 葉の背軸側表皮面の形態的特性	
2. 花芽のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・アイソザイム	
3. PCR-SSCP 分析による葉緑体 DNA 多型	
4. 総合考察	
5. 摘要	
III. クルメツツジを種子親としたキレンゲツツジとの交雑能力	49
1. 常緑性ツツジを種子親としたキレンゲツツジとの交雑における交雑隔離障壁	
2. クルメツツジにおける交雑能力の品種間差	
3. 受精および種子発達過程の組織学的観察	
4. 総合考察	
5. 摘要	
IV. クルメツツジとキレンゲツツジとの交雑から得られた実生の染色体構成	75
1. ヤマツツジ節野生種、クルメツツジ、キレンゲツツジ、並びにクルメツツジとキレンゲツツジとの交雑から得られた実生における染色体の核型分析	

2. 総合考察	
3. 摘要	
V. クルメツツジとキレンゲツツジとの交雑から得られた実生の特性	89
1. 実生の葉緑体 DNA	
2. 実生の形態的特性	
3. 総合考察	
4. 摘要	
VI. 総括	101
引用文献	103
Summary	109

I. 緒 言

1. クルメツツジの歴史および生産の現状

常緑性ツツジ園芸品種群であるクルメツツジは、福岡県久留米地方において育成されたキリシマ (*Rhododendron obtusum* Planch.) に対して用いられる呼称であり、明治時代に久留米地方の花木生産業者が、関東地方で発達した江戸キリシマと区別するために名付けた商標名である。花は小～中小輪系、明るい色彩を特徴とする。多花性であるため、開花時には花が樹冠を覆い観賞性に優れる。鉢植え、庭園および緑化用に利用され、これまでに発行された園芸書および種苗カタログには延べ700以上の品種名が記録されているが、現存するのは約350品種である。

クルメツツジの成立は、天保年間(1830～1844年)に久留米藩の御馬廻役であった坂本元蔵(1786～1854年)が実生の繁殖法を発見したことにより始まったと言われている。それまでの山取りから交雑による品種育成が可能となったことで、多くの品種が作出され、1849年に発表された品種番付には128品種が記載されている(赤司, 1934)。この時代は、主に鉢植えにした株を室内で観賞する品種が育成されたことから、花色は弱光下で映える淡い色調の桃色系、花型は種子を形成しないため、花持ちに優れる hose-in-hose (萼が花弁化する) 咲きの品種が好まれた。

明治時代には花木生産業者が精力的に品種改良を実施するとともに、カタログ販売等が行われるようになった。また、国内外の博覧会への出展、宮中への献上による宣伝活動も積極的に行われた。その結果、クルメツツジという名が大阪、関東地方のツツジ盆栽愛好家に広まった。昭和20年代後半には露

地植栽としての用途を開拓し、個人の庭および学校・公園等の公共緑化樹に利用されたことで一般にも知られるようになり、生産量も急激に増加した。昭和40年代前半にはミスト施設を利用した挿し木育苗法が導入され、挿し木用地の確保および労力不足の問題が解消された(福岡県農政部農業技術課・福岡県久留米農業改良普及所, 1977)。このようにして発達したクルメツツジの生産は、現在、北部九州地域、三重県並びに関東地方の都市近郊各県で盛んであり、主要な常緑性ツツジ品種群の一つとなっている。また、久留米市では地域資源として新事業の創出に活用されている他、クルメツツジを植栽したつつじ公園や生産圃場は観光資源として位置づけられている(岡本, 2003)。2005年度の久留米市におけるクルメツツジを中心としたツツジ・サツキ類の苗木・成木の生産額は6.6億円である。また、2003年度の九州沖縄地域でのツツジ・サツキ類の苗木・成木(鉢物を除く)の生産額は33億円と、カーネーション(28億円)やトルコギキョウ(21億円)よりも多い(農林水産省生産局果樹花き課花き対策室, 2005)。

クルメツツジの消費形態には公共的消費と個人消費があり、現在、公共的消費の割合が高い。このため、クルメツツジ全体の需要は公共的消費の動向に左右される。公共的消費は日本の経済状況に大きく影響され、先に述べたように生活環境の改善と公共事業の拡大によって昭和20年代から昭和50年代にかけて増大していった。しかし、最近は樹種の多様化等から漸減しており、今後も日本経済に進展がない中で需要の増加を見込むことはできない。このような状況のもと、生産者は公共的消費に比べ規模は小さいものの、今後の需要増が期待される個人消費をターゲットとした戦略を模索し始めている。

2. 常緑性黄花ツツジ育種の意義と既往の研究成果

ツツジの個人消費に関しては、他の花き類と同様、新規性に対するニーズが高い。常緑性ツツジには黄色の花色をもつ種・品種がないため (GALLE, 1987), 市場からは常緑性黄花ツツジ品種の育成が強く求められている。一方、常緑性ツツジ以外の落葉性ツツジおよび有鱗片シャクナゲには黄花の種・品種があり、落葉性ツツジでは野生種のキレンゲツツジ (*R. japonicum* (A. Gray) J. V. Suringar f. *flavum* Nakai), エクスバリーアザレア品種およびニオイツツジ品種、有鱗片シャクナゲではヒカゲツツジ (*R. keiskei* Miq.), 交雑種の 'Saffron Queen' (*R. burmanicum* Hutch. × *R. xanthostephanum* Merrill) および 'Wren' (*R. ludlowii* Cowan × *R. keiskei* 'Yaku Fairy') が一般に販売されている。しかし、これらの種・品種は常緑性ツツジに比べて高温・強日射に弱く、多湿では根腐れ病を起こすため、九州地方での栽培が難しく、とくに露地栽培では1シーズンで枯死してしまうことが多い。また、同じ理由から九州地方の平地での生産はほとんど行われておらず、有鱗片シャクナゲに代って新潟県で生産されたものが九州の市場を占有している。このような状況を踏まえ、個人消費の増加を見込める新規な黄色の花色を有し、生産者の資本装備や栽培労力については負担増を伴わない九州地方の環境に適した品種を作出する必要がある。

常緑性黄花ツツジ育種のための黄色花色の提供親としては、北海道西南部、本州、四国および九州に自生するキレンゲツツジが最もよく利用されている (赤羽, 1997; 国重, 1978; NOGUCHI, 1932)。キレンゲツツジの黄色花色素はカロテノイド系色素であるため (SPETHMANN, 1980), フラボノイド系色素のように常緑性ツツジ由来のアントシアニンと結合し赤系の花色素を呈することはないとされる (赤羽, 1997)。しかし、常緑性ツツジとキレンゲツツジとの交雑は植物分類学上ツツジ亜属とレンゲツツジ亜属との亜属間交雑となるため生殖的隔離機構が存在し、生存可能な実生を得ることは困難とされてきた (赤羽ら, 1971; CREECH, 1955; NOGUCHI, 1932; URESHINO ら, 2000)。そのような中、実生が得られる野生種および園芸品種の選定が行われ、田村・国重 (1958) はミヤマキリシマ (*R. kiusianum* Makino) およびサツキ (*R. indicum* (L.) Sweet) を種子親とした場合に実

生獲得の可能性があるとした。赤羽 (1993) はミヤマキリシマ '雲仙白' とサツキ '博多白' との交雑実生を種子親に用いた交雑から健全な生育を示す実生を得た。2002年には新潟県の吉田進氏がサツキ '月桂冠' を種子親に用いた交雑から 'ムーンライト' を育成した。これら以外にも趣味家によりサツキを種子親に用いた交雑実生の育成例がある (赤羽, 1993)。一方、クルメツツジを種子親に用いた交雑試験は限られ (NOGUCHI, 1932; 宮澤, 1922), 生存実生が得られたとする報告はない。

これまで行われてきた常緑性ツツジ (種子親) × キレンゲツツジ (花粉親) に関する試験では、種子親に用いる常緑性ツツジの選定を目的としていたため、生殖的隔離機構の詳細については明らかにされていない。加えて、交雑不和合性の評価が種レベルで行われている点についても検討の余地がある。さらに、花粉親に用いるキレンゲツツジに関して、複数の個体を供試して常緑性ツツジとの交雑不和合性の個体間差を調査した報告は見当たらない。

常緑性ツツジ (種子親) × キレンゲツツジ (花粉親) から得られた実生の花色については、花卉抽出液にβ-カロテンが含まれることと、この色素がキレンゲツツジから遺伝することが報告されているが (MIYAJIMA ら, 2000), これまでに報告された実生の花色は淡緑黄~黄白色 (日本園芸植物標準色票) の範囲でしかなく (小林ら, 1999), キレンゲツツジと同程度の黄色花色素を呈する個体は得られていない。

3. 本研究の目的と構成

本研究では、クルメツツジと同様な形態的、生態的特性を示す常緑性黄花ツツジの作出を目的とした交雑育種を進める上で問題となる生殖的隔離機構の解明および交雑能力に優れる交雑親の遺伝的背景を明らかにする。また、今回はじめて得られたクルメツツジとキレンゲツツジとの交雑実生の暖地での生育および外観的特性を評価し、実用品種を作出するための方策を示す。第II章ではクルメツツジの品種多様性に関わる原種の構成について、これまで未検討であったモチツツジおよびキシツツジの関与をいくつかの指標形質を用いて明らかにする。第III章では常緑性ツツジ (種子親) × キレンゲツツジ (花粉親) の交雑に関して、受精前および受精後の交雑隔離障壁を調査し、本交雑の生殖的隔離機構の様相お

よび交雑能力に影響を与える要因の解析を行う。また、クルメツツジ品種中から交雑能力に優れる種子親を選定し、交雑能力とモチツツジおよびキシツツジの遺伝的影響との関係を明らかにする。花粉親に用いるキレンゲツツジについては、交雑隔離障壁および交雑能力の個体間差の有無を明らかにし、花粉親に用いるキレンゲツツジ個体を選定することの有効性を検討する。第IV章ではこれまで報告がほとんどないツツジ染色体の核型分析を行い、本交雑から得られる正常な成長を示す実生の染色体構成の特徴を明らかにする。第V章では得られた実生の葉緑体DNAの遺伝性、雑種第一代における花冠のフラボノイド系およびカロテノイド系色素の発現の様相を明らかにする。また、実生の樹高および外観的特性をクルメツツジと比較することから実用性を評価する。

本稿は京都大学に提出した学位論文を基に編集・加筆したものである。学位論文をとりまとめるにあたり、京都大学大学院農学研究科教授矢澤 進博士に懇切な御指導と御校閲を賜りました。ここに心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、(財)久留米市世界つつじセンター中野勝義氏にはクルメツツジおよび九州地方の野生ツツジについて御教示を賜りました。岩手大学農学部准教授嬉野健次博士には分子遺伝学的手法による分析に多大なる御協力をいただきました。北海道恵山町役場および穂別町役場、青森県十和田市役所、青森営林局三本木営林署、西部赤城自然園、筑波大学農林学系、野菜・茶業試験場緑化植物研究室、(財)久留米市世界つつじセンター、長崎県厳原町役場および大分県玖珠町役場には貴重なツツジ遺伝資源の収集および分譲において格別のご配慮をいただきました。ここに記して御礼申し上げます。

II. クルメツツジの品種多様性に対するモチツツジおよびキシツツジの関与

常緑性ツツジ園芸品種の原種となる野生種はツツジ亜属ヤマツツジ節 (*Rhododendron* section *Tsutsusi*) に属する。ヤマツツジ節に属する種は世界に66種あり、それらの分布は東アジアとその周辺地域に限られている。日本には17種が分布し、中国に次いで多い (CHAMBERLAIN・RAE, 1990)。ヤマツツジ節

に属する種どうしは種間交雑が容易であり (赤羽ら, 1971; 国重, 1978; 田村, 1963), 園芸品種群の成立には複数の種が利用されてきた (国重, 1974; 宮澤, 1918; 田村, 1963; 山崎・野沢, 1979a; 山崎・山崎, 1972)。このため、常緑性ツツジ園芸品種の遺伝的変異の拡大には、突然変異に加え、種間交雑の影響が大きい。

クルメツツジの成立に関与した野生種に関して、牧野 (1917) はミヤマキリシマ (第1図A) をあげ、宮澤 (1918) はヤマツツジ (*R. kaempferi* Planch., 第1図B), ミヤマキリシマおよびこれら2種の交雑種に由来するとした。初島 (1958) はサタツツジ (*R. sataense* Nakai, 1949年に新種として命名される, 第1図C) がクルメツツジの原種の一つであるとされた。小林 (1980) はアントシアニン色素の構成から、江戸キリシマ、ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジなどの交雑によるが、ミヤマキリシマの関与は低いと考察している。これに対して、宮島 (1987) はメチル化フラボノールの分布から、サタツツジの関与は小さく、ミヤマキリシマとヤマツツジとの自然交雑種の影響が強いと述べている。このようにクルメツツジの成立に関与した野生種に関しては、研究者により見解に相違がみられるが、一般にヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジとされてきた。

しかし、田村 (1966) はクルメツツジ‘田子の浦’ (第2図) がリュウキュウツツジ (*R. mucronatum* (Blume) G. Don, 第1図D) との交雑種であるとしている。リュウキュウツツジとはリュウキュウ系品種群に属する‘白琉球’のことで (田村, 1963), 庭園用として多く利用される中大輪系の白花品種である。リュウキュウ系品種群の品種は形態のおよび生態的特性から、モチツツジ (*R. macrosepalum* Maxim., 第1図E) とキシツツジ (*R. ripense* Makino, 第1図F) との種間雑種と考えられている (山崎・山崎, 1972)。

ヤマツツジ節をさらに下位の分類単位で表した場合、ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジはヤマツツジ列、モチツツジおよびキシツツジはモチツツジ列に分類される (山崎, 1989)。このため、クルメツツジにおけるリュウキュウツツジの関与は、ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジ間の交雑では得られない変異の拡大が期待される。しかし、クルメツツジに対するリュウキュウツツジの関



第1図 ヤマツツジ節野生種5種と‘リュウキュウツツジ’
A, ミヤマキリシマ; B, ヤマツツジ; C, サタツツジ; D, リュウキュウツツジ; E, モチツツジ; F, キシツツジ。



第2図 クルメツツジ ‘田子の浦’

与については、花および葉の外観的な特性を目視で評価したことから述べられているに過ぎず(阿部・国重, 1958), これまで明確な指標形質を用いた報告はみられない。そこで、本章では種の分類や雑種性の判別に利用されている形質から、一般にクルメツツジの原種とされるヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジと, リュウキュウツツジの原種とされるモチツツジおよびキシツツジを識別するための指標を作製し, クルメツツジに対するモチツツジおよびキシツツジの関与性を検討する。

1. 葉の背軸側表皮面の形態的特性

簡易に利用できる形質として葉の表皮面の形態に着目した。ヤマツツジ節に属する種の葉の背軸側表皮面の形態的特性の種間差異を明らかにし, モチツツジおよびキシツツジに特徴的な形質の獲得を試みた。次に, クルメツツジ品種とモチツツジとの種間雑種を用いて, 得られた形質の指標としての有用性を検証した。最後に, 得られた指標形質を用いて, モチツツジおよびキシツツジと同じ形態的特性をもつクルメツツジ品種の有無を調査した。

1) 材料および方法

日本に分布するヤマツツジ節17種中(CHAMBERLAIN・RAE, 1990), 葯が縦裂するため別属として扱われることが多いハコネコメツツジ(*R.*

tsusiophyllum Sugimoto; SLEUMER, 1980)を除く16種(第1表)と, ミヤマキリシマに形態的特性が類似するため(宮澤, 1940), モチツツジおよびキシツツジからの遺伝的な影響を受けていないと推定されているクルメツツジ‘裾濃の糸’にモチツツジ花粉を交雑して得られた実生, およびクルメツツジの栽培の始祖とされる坂本元蔵とその同好者により品種の作出が行われたいわゆる坂本時代(1730~1859年)に育成されたクルメツツジ品種(赤司, 1934)の中で(独)農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター久留米研究拠点(福岡県久留米市)に保存されている58品種を供試した。

葉の背軸側表皮面の形態観察について, ヤマツツジ節には形態の異なる春葉と夏葉がある。そこで, 本調査では春葉は6月に1年枝の第1, 2葉, 夏葉は11月下旬に1年枝の中位に着生する葉を用いた。各個体から春葉および夏葉を各2枚採取し, 葉の背軸側表皮面のレプリカをSuzuki's Universal Micro-Printing (SUMP)法を用いて次のように作製した。直径1.6cmのセルロイド製円形プレートに酢酸アミルを塗布し, それを葉面に押し付けて型をとった(井上, 1998)。これを台紙に張り付けプレパラートとした。観察はノマルスキー微分干渉装置を備えた生物顕微鏡で行った。

気孔の密度および大きさに関して, あらかじめヤマツツジについて葉位間の差異を検討した結果, 気

第1表 供試したヤマツツジ節野生種とその採集地

種	採集地
ヤマツツジ <i>R. kaempferi</i>	恵山町（北海道），十和田湖町（青森県），気仙沼市（宮城県），狭山市（埼玉県），下田市（静岡県），余呉町（滋賀県），玉野市（岡山県），久留米市発心山（福岡県），弥生町中の谷峠（大分県）
ミヤマキリシマ <i>R. kiusianum</i>	普賢岳（長崎県），由布岳（大分県），万年山（大分県），根子岳（熊本県），霧島中岳（鹿児島県）
サタツツジ <i>R. sataense</i>	桜島（鹿児島県），垂水市高峠（鹿児島県），大根占町（鹿児島県），佐多町大中尾（鹿児島県）
フジツツジ <i>R. tosaense</i>	愛鷹山（静岡県），不明（愛媛県），北郷村舟方（宮崎県），西郷村和田峠（宮崎県），高鍋町牛牧（宮崎県）
タイワンヤマツツジ <i>R. simsii</i>	徳之島（鹿児島県），石垣島（沖縄県）
ウンゼンツツジ <i>R. serpyllifolium</i>	御坊市（和歌山県）
モチツツジ <i>R. macrosepalum</i>	下田市（静岡県），岩村町（岐阜県），綾部市（京都府），御坊市（和歌山県）
キシツツジ <i>R. ripense</i>	匹見町（島根県），不明（山口県），十和村（高知県），四万十川（高知県）
チョウセンヤマツツジ <i>R. yedoense</i> var. <i>poukhanense</i>	対馬白岳（長崎県）
ケラマツツジ <i>R. scabrum</i>	奄美大島（鹿児島県），東村（沖縄県）
サキシマツツジ <i>R. amanoi</i>	西表島（沖縄県）
オガサワラツツジ <i>R. boninense</i>	父島（東京都）
サツキ <i>R. indicum</i>	下北山村（奈良県），古座川（和歌山県），屋久島（鹿児島県）
マルバサツキ <i>R. eriocarpum</i>	開聞岳（鹿児島県），屋久島（鹿児島県）
コメツツジ <i>R. tschonokii</i>	赤城山（群馬県），黒斑山（長野県）
オオコメツツジ <i>R. trinerve</i>	巻機山（新潟県）

市町村区分は1998年当時。

孔密度に有意な差が認められた。このため，調査には花芽直下から萌芽した1年枝の第1葉のみを用いることとした。1個体当たり5枚の葉について，中央部の中肋を挟む左右2カ所の視野面積0.5mm²中に分布する気孔数を生物顕微鏡下で計数し，1mm²当たりの数値に換算した。このとき同時に各視野の中央

付近に位置する気孔を1個選び長径を計測した。

2) 結果および考察

(1) ヤマツツジ，ミヤマキリシマおよびサタツツジと，モチツツジおよびキシツツジの識別指標
SUMP法を用いることで，含水状態での葉の表

皮面の構造を観察することができた。また、ノマルスキー微分干渉装置を使用し顕微鏡像に陰影を生じさせることで、表皮面の特徴を極面視からでも立体的に把握することができた。供試した16種の葉の背軸側表皮面の顕微鏡像を第3および4図に示した。表皮細胞の形状は3型あり、多くの種が多角形で、縁部(背斜膜)は直線的であった。モチツツジ(第4図D)およびキシツツジ(第4図E)は縁部が丸く楕円形であり、ウンゼンツツジ(*R. serpyllifolium* (A. Gray) Miq., 第4図F)、コメツツジ(*R. tschonokii* Maxim., 第4図G)およびオオコメツツジ(*R. trinerve* Franchet, 第4図H)は縁部が波形となったアメーバ状であった。

表皮のクチクラは緩やかな起伏を呈する種が多かった。モチツツジ(第4図D)およびキシツツジ(第4図E)は個々の表皮細胞が大きく隆起し起伏が顕著であった。タイワンヤマツツジ(*R. simsii* Planch., 第3図F)、サキシマツツジ(*R. amanoi* Ohwi, 第3図G)、オガサワラツツジ(*R. boninense* Nakai, 第3図H)、ケラマツツジ(*R. scabrum* G. Don, 第4図A)、サツキ(第4図B)およびマルバサツキ(*R. eriocarpum* (Hayata) Nakai, 第4図C)は平らであった。

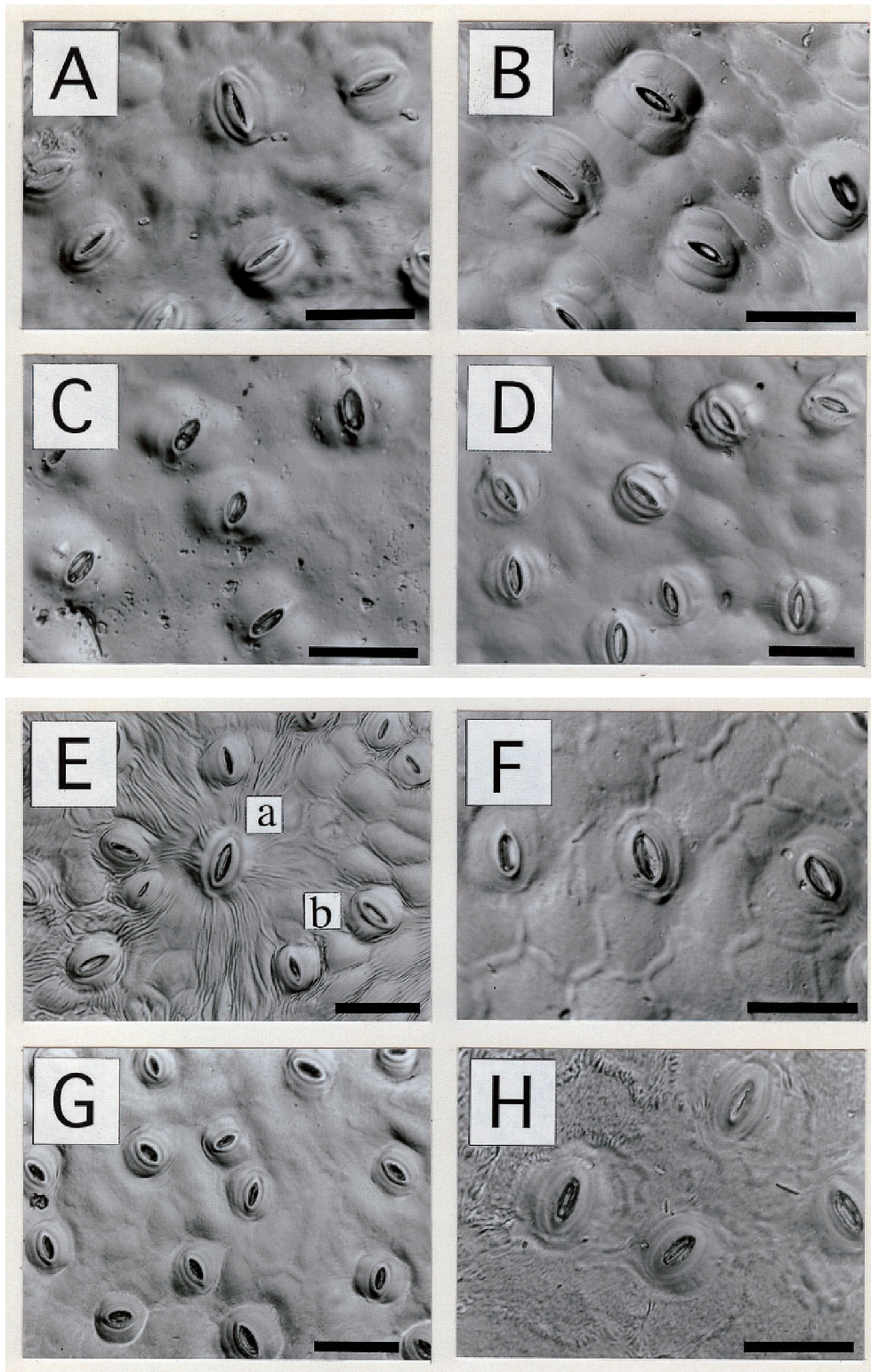
気孔に関して、助細胞の有無、線條の有無、線條の形状および表皮面に対する位置に種間差異が認められた。線條がない種は8種あり、これらをさらに助細胞の有無および表皮面に対する位置から3グループに類別した。助細胞を有する種の中で、ヤマツツジ(第3図A)、ミヤマキリシマ(第3図B)、サタツツジ(第3図C)およびフジツツジ(*R. tosaense* Makino, 第3図D)は助細胞と気孔が表皮面から突出していた。一方、タイワンヤマツツジ(第3図F)、サキシマツツジ(第3図G)およびオガサワラツツジ(第3図H)は気孔と表皮面がほぼ同じレベルに位置していた。助細胞がないウンゼンツツジ(第4図F)では孔辺細胞の周囲にクチクラの縁がみられ、気孔は表皮面と同じレベルに位置していた。線條を有する種は8種あり、これらを助細胞の有無、線條の形状および表皮面に対する位置から5グループに類別した。助細胞を有する種の中で、モチツツジ(第4図D)およびキシツツジ(第4図E)は線條が気孔の長軸方向に対して直角に伸び、助細胞に深い切れ込みが生じていた。チョウセンヤマツツジ(*R. yedoense* Maxim. var. *poukhanense* (H. Lév.)

Nakai, 第3図E)、コメツツジ(第4図G)およびオオコメツツジ(第4図H)は比較的細い線條が孔辺細胞から表皮細胞に向かって放射状に伸びていた。チョウセンヤマツツジの気孔は表皮面と同じレベルに位置し、コメツツジおよびオオコメツツジのそれは表皮面からやや突出した位置にあった。なお、この3種の気孔は助細胞が存在しないか、あるいは明瞭でなかった。助細胞がないケラマツツジ(第4図A)、サツキ(第4図B)およびマルバサツキ(第4図C)は孔辺細胞の周りにクチクラの縁があり、さらにその外側を方向性のない線條が取り囲んでいた。ケラマツツジの気孔は表皮面からやや突出していたが、サツキおよびマルバサツキは突出していなかった。

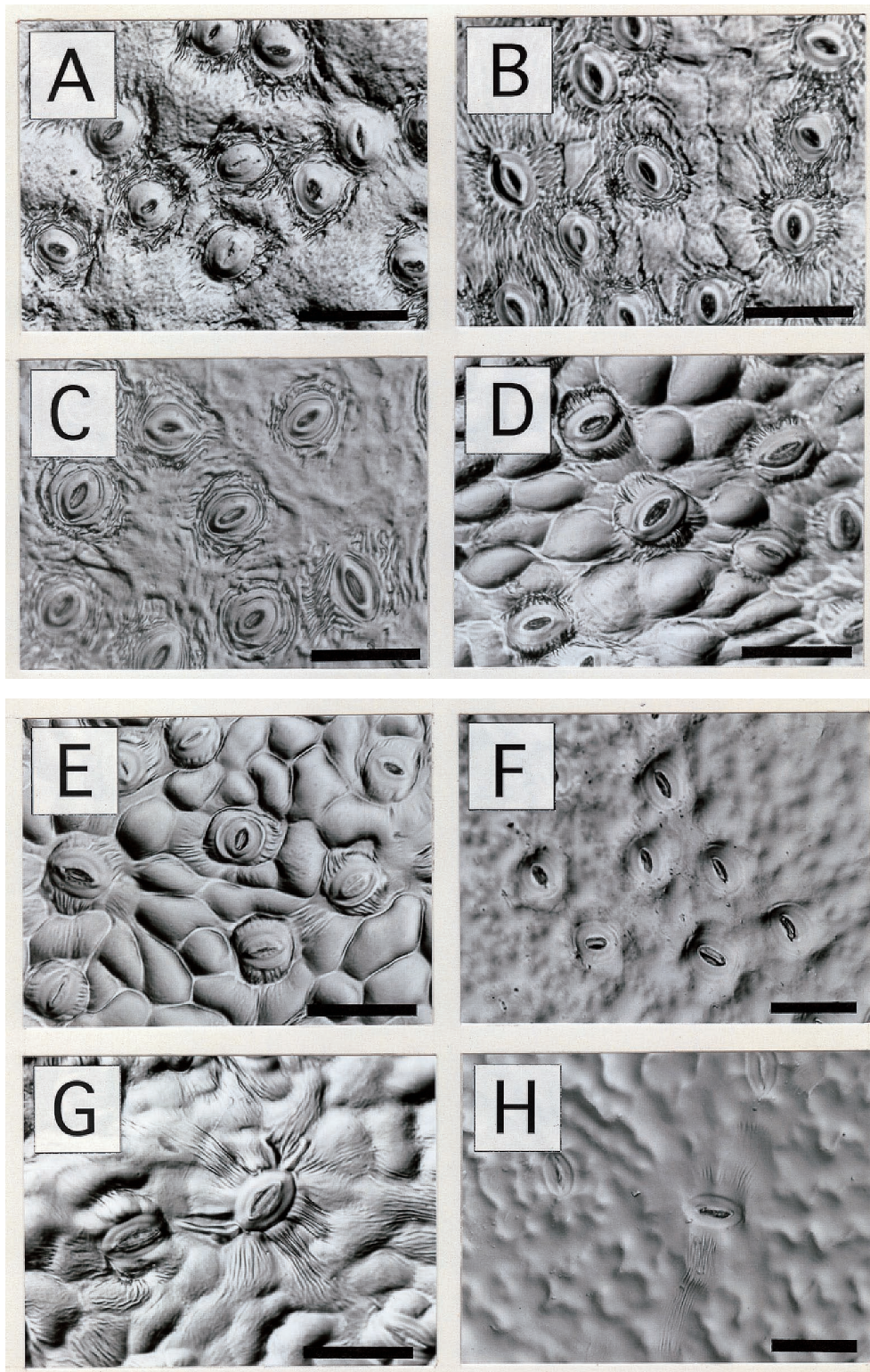
上述した16種の表皮系の形態的特性は、春葉と夏葉で相違は認められなかった。また、同一種内では採集地が異なっても相違は認められなかった。釘貫・村田(1987)は日本産シャクナゲ亜属の葉の表皮系の形態を観察し、表皮細胞の形状、気孔およびその助細胞の形状等について、それぞれの分類群ごとに特徴があることを認めた。今回の観察から亜属より下位の分類単位である節内において、表皮系の形態に多様な変異が存在することが明らかとなった。

表皮細胞の形状、表皮のクチクラの形態的特性、気孔の特徴および気孔と表皮との位置関係から、供試した16種を8グループに類別した(第2表)。これは山崎(1989)がヤマツツジ節を亜節および列の単位に分類した結果と共通する点が多かった。しかし、山崎(1989)はケラマツツジとサキシマツツジを同じ列に分類し、CHAMBERLAIN・RAE(1990)はサキシマツツジをケラマツツジの亜種としているが、これら2種の気孔の形態的特性は大きく異なっていた。

供試した16種における春葉の気孔密度と大きさを第3表に示した。気孔密度について、全個体の範囲は59~523個/mm²、変動係数は49.9%と、変異の大きい形質であった。種ごとの変異幅は種間で相互に重なる場合が認められた。気孔の大きさについて、全個体の範囲は21.3~39.4 μm、変動係数は14.6%と、気孔密度に比較して変異は小さく、種ごとの変異幅は種間で相互に重なっていた。チョウセンヤマツツジには気孔の大きさに‘大’と‘小’の相違が認められ(第1図E)、その割合



第3図 ヤマツツジ節野生種の葉の背軸側表皮面の生物顕微鏡像
 A, ヤマツツジ; B, ミヤマキリシマ; C, サタツツジ; D, フジツツジ; E, チョウセンヤマツツジ (気孔の大きさ a, 大; b, 小); F, タイワンヤマツツジ;
 G, サキシマツツジ; H, オガサワラツツジ。棒線は 50 μ m。



第4図 ヤマツツジ節野生種の葉の背軸側表皮面の生物顕微鏡像
 A, ケラマツツジ; B, サツキ; C, マルバサツキ; D, モチツツジ; E,
 キンツツジ; F, ウンゼンツツジ; G, コメツツジ; H, オオコメツツジ。
 棒線は 50 μ m。

第2表 ヤマツツジ節野生種 16 種の葉の背軸側表皮面の形態的特性

種	表皮細胞 の形状	クチクラ の凹凸	気孔	
			型 ^a	位置 ^b
グループ 1				
ヤマツツジ	多角形	緩やかな起伏	A	表皮面から突出
ミヤマキリシマ	多角形	緩やかな起伏	A	表皮面から突出
サタツツジ	多角形	緩やかな起伏	A	表皮面から突出
フジツツジ	多角形	緩やかな起伏	A	表皮面から突出
グループ 2				
チョウセンヤマ ツツジ	多角形	緩やかな起伏	C	表皮面と同じ
グループ 3				
タイワンヤマツツジ	多角形	平ら	A	表皮面と同じ
サキシマツツジ	多角形	平ら	A	表皮面と同じ
オガサワラツツジ	多角形	平ら	A	表皮面と同じ
グループ 4				
ケラマツツジ	多角形	平ら	D	表皮面から突出
グループ 5				
サツキ	多角形	平ら	D	表皮面と同じ
マルバサツキ	多角形	平ら	D	表皮面と同じ
グループ 6				
モチツツジ	楕円形	顕著な起伏	B	表皮面から突出
キシツツジ	楕円形	顕著な起伏	B	表皮面から突出
グループ 7				
ウンゼンツツジ	アメーバ形	緩やかな起伏	A	表皮面と同じ
グループ 8				
コメツツジ	アメーバ形	緩やかな起伏	C	表皮面から突出
オオコメツツジ	アメーバ形	緩やかな起伏	C	表皮面から突出

a A, 線条がない; B, 線条が気孔の長軸方向に対して直角に伸び、助細胞に深い切れ込みが生じる; C, 線条が孔辺細胞から表皮細胞に向かって放射状に伸びる; D, 孔辺細胞の周りにクチクラの縁があり、さらにその外側を方向性のない線条が取り囲んでいる。

b 表皮面に対する気孔の位置。

は‘大’が17.1%、‘小’が82.9%であった。同様の特性は *Malus* × *purpurea* (A. Barbier) Rehder で認められ、品種を識別する指標として利用されている (MARTENS・FRETZ, 1980)。この特性は供試した種の中でチョウセンヤマツツジのみに認められ、チョウセンヤマツツジを識別するための特性として利用できると考えられた。

気孔の密度および大きさに関するヤマツツジ節の種間の分散、表皮系の形態に基づき類別したグルー

プ間の分散、並びに複数の種から構成されたグループ内の種間の分散を第4および5表に示した。表皮系の形態に基づき類別したグループ間における気孔の密度および大きさの変動は、ともに種間のそれより大きかった。一方、各グループ内での変動は小さく、種間に有意差が認められないグループが多かった。このように気孔の密度と大きさは、表皮系の形態が同じ種間では近似した値を示す傾向にあった。MARTENS・FRETZ (1980) は crabapple 品種間の識別

第3表 ヤマツツジ節野生種16種の春葉の気孔密度および気孔の大きさ

種	個体数	気孔密度 (個/mm ²)	気孔の長径 (μ m)
グループ1			
ヤマツツジ	9	59.0-112.0	30.8-37.4
ミヤマキリシマ	5	152.4-223.8	33.8-34.8
サタツツジ	5	72.0-117.8	30.9-35.1
フジツツジ	5	97.4-133.0	32.8-37.9
グループ2			
チョウセンヤマ ツツジ	1	206.8	(大) 39.4 (小) 30.7
グループ3			
タイワンヤマツツジ	4	135.2-164.2	27.1-33.4
サキシマツツジ	2	204.8-213.4	28.5-30.3
オガサワラツツジ	1	120.2	27.3
グループ4			
ケラマツツジ	3	414.8-523.2	21.3-25.7
グループ5			
サツキ	6	169.6-238.2	23.1-33.3
マルバサツジ	5	158.0-238.2	24.9-28.4
グループ6			
モチツツジ	6	192.0-234.6	24.4-26.9
キシツツジ	4	200.6-296.0	26.7-27.9
グループ7			
ウンゼンツツジ	2	115.6-148.2	24.4-25.9
グループ8			
コメツツジ	2	62.8-78.2	31.7-32.8
オオコメツツジ	1	128.2	26.1

1個体当たり5枚の葉を調査。値は1個体の平均値。

に気孔の数と大きさを用いた。本試験では、気孔密度についてミヤマキリシマと、モチツツジおよびキシツツジの間で変異幅が重複していた(第3表)。大きさはヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジが30 μ m以上、モチツツジおよびキシツツジが30 μ m未満と、両種群の値の範囲は重ならなかった(第3表)。しかし、モチツツジおよびキシツツジと値の範囲が重複する種が他に存在したため、指標形質としては不適と考えられた。

ヤマツツジ節の葉には形態が異なる数種類の毛じ、並びに一部の種では腺毛を生じ、これらは分類上の指標形質として利用されている(CHAMBERLAIN・RAE, 1990; 山崎, 1989)。本試験における観察の結果、

モチツツジおよびキシツツジの葉脈上に毛状突起が認められた(第5図)。この器官は形が刺状で、大きさは毛じおよび腺毛に比べて顕著に小さく、肉眼では観察することができない。毛状突起の分布範囲は、モチツツジでは主脈および一次側脈、キシツツジではさらにそれらから派生する脈に及んだ。なお、生物顕微鏡レベルでは大きさの相違が認められたが、走査型電子顕微鏡による観察の結果、これらは1種類であることが確認された(データ未掲載)。この器官は今回の調査で存在が認められた新規な器官であった。

(2) クルメツツジ‘裾濃の糸’×モチツツジから得られた実生の葉の背軸側表皮面の形態的特性

第4表 ヤマツツジ節野生種16種の気孔密度に関する分散分析

変動要因	平方和	自由度	分散	分散比 (F)
種	104026.38	15	6935.09	39.41*** ^a
グループ ^b	94102.69	7	13443.24	76.40***
グループ1内の種	7207.99	3	2402.66	13.65**
グループ3内の種	1716.32	2	858.16	4.88*
グループ5内の種	25.26	1	25.26	0.14 n.s.
グループ6内の種	419.24	1	419.24	2.38 n.s.
グループ8内の種	554.88	1	554.88	3.15 n.s.
誤差	7918.44	45	175.97	

a *, **, *** および n.s. はそれぞれ5%, 1%, 0.1%レベルで有意差ありおよび有意差なしを示す。

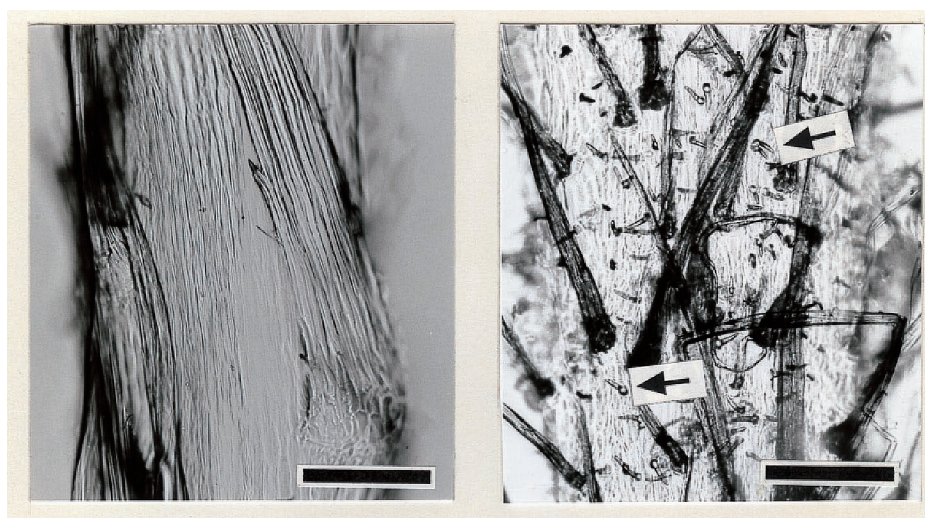
b 第2表参照。

第5表 チョウセンヤマツツジを除くヤマツツジ節野生種15種の気孔の長径の分散分析

変動要因	平方和	自由度	分散	分散比 (F)
種	969.76	14	69.27	16.69*** ^a
グループ ^b	912.5	6	152.08	36.65***
グループ1内の種	16.5	3	5.5	1.33 n.s.
グループ3内の種	6.18	2	3.09	0.74 n.s.
グループ5内の種	5.82	1	5.82	1.40 n.s.
グループ6内の種	3.56	1	3.56	0.86 n.s.
グループ8内の種	25.21	1	25.21	6.07*
誤差	186.87	45	4.15	

a *, *** および n.s. はそれぞれ5%, 0.1%レベルで有意差ありおよび有意差なしを示す。

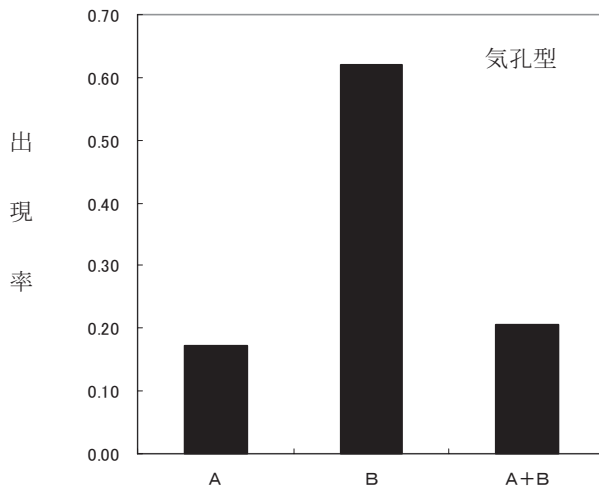
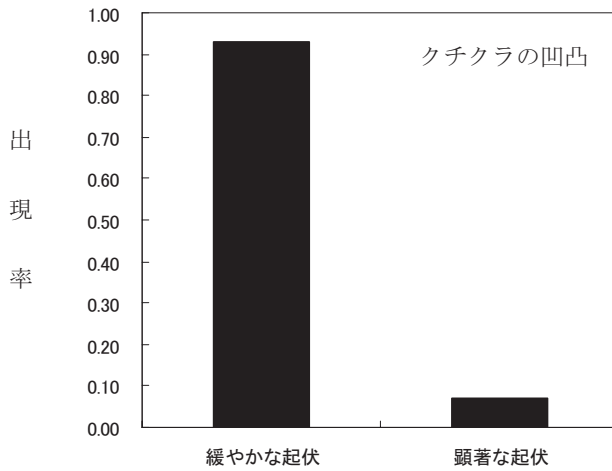
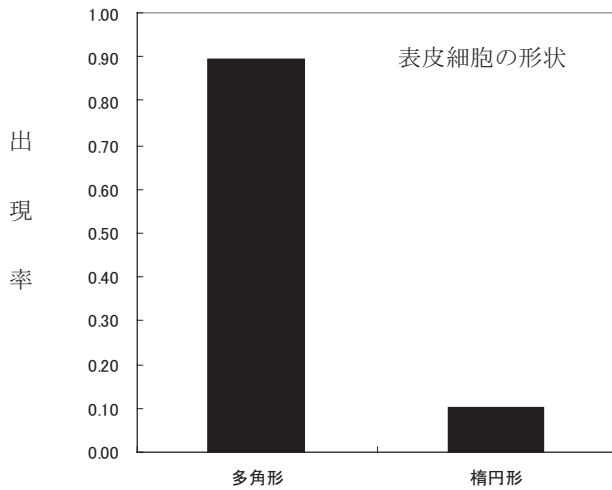
b 第2表参照。



第5図 ヤマツツジ (左) とモチツツジ (右) の中肋の生物顕微鏡像
モチツツジには毛状突起が認められる (矢印)。棒線は200 μm。

クルメツツジ‘裾濃の糸’の葉の背軸側表皮面の形態的特性は、ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジと同じで、モチツツジおよびキシツツジとは異なっていた。クルメツツジ‘裾濃の糸’にモチツツジ花粉を交雑して得られた実生58個体にお

ける表皮系に関する3形質の各特性の出現率を第6図に示した。表皮細胞の形状は52個体が縁部が直線的な多角形、6個体が丸い楕円形を示した。表皮のクチクラの形態は54個体が緩やかな起伏、4個体が顕著な起伏を示した。気孔は10個体が助細胞



第6図 クルメツツジ‘裾濃の糸’にモチツツジ花粉を交雑して得られた実生58個体における表皮系3形質の各特性の出現率
気孔型について、線条がない(A)、線条が気孔の長軸方向に対して直角に伸び、助細胞に深い切れ込みが生じる(B)。

を備え、線条がないヤマツツジ等と同じ型（A型）、36個体が線条が気孔の長軸方向に対して直角に伸び、助細胞に切れ込みが生じるモチツツジ等と同じ型（B型）、また12個体についてはこれら2型が混在していた。

表皮系に関する3形質中1形質以上でモチツツジおよびキシツツジと同じ形態的特性を示したのは51個体であった。葉脈の毛状突起はすべての個体に認められた。これらの結果は、葉の背軸側表皮面

の形態的特性が交雑親に用いた種の影響を受けていることを表すもので、葉の背軸側表皮面の形態的特性はクルメツツジに対するモチツツジあるいはキシツツジの関与を推定するための指標として有効であると考えられた。

(3) クルメツツジの葉の背軸側表皮面の形態的特性はクルメツツジ58品種の葉の背軸側表皮面の形態的特性を第6表に示した。表皮細胞の形状は54品種が縁部が直線的な多角形、4品種が丸い楕円形を

第6表 クルメツツジ58品種の葉の背軸側表皮面の形態的特性

品種	表皮細胞の形状	クチクラの凹凸	気孔型 ^a	毛状突起 ^b の有無
総角	多角形	緩やかな起伏	A	—
曙	多角形	緩やかな起伏	A	—
吾妻鏡	多角形	緩やかな起伏	A	—
美人酔	多角形	緩やかな起伏	A	—
千代の曙	多角形	緩やかな起伏	B	—
筆捨山	多角形	緩やかな起伏	A	—
呉服	多角形	緩やかな起伏	A	+
御所桜	多角形	緩やかな起伏	A, B	—
花筏	多角形	顕著な起伏	A, B	+
初音	多角形	緩やかな起伏	A	—
東山	多角形	緩やかな起伏	A	—
今岡	多角形	緩やかな起伏	A	—
稲妻	多角形	緩やかな起伏	A	—
郭公	多角形	緩やかな起伏	A, B	—
桐壺	多角形	緩やかな起伏	A	—
胡蝶	多角形	緩やかな起伏	A	—
小蝶の舞	多角形	緩やかな起伏	A	—
古金欄	多角形	緩やかな起伏	A	—
小式部	多角形	緩やかな起伏	A	—
雲切	多角形	緩やかな起伏	A	—
雲の上	多角形	緩やかな起伏	A	—
位の紐	多角形	緩やかな起伏	A	—
暮の雪	多角形	緩やかな起伏	A	—
旧宮城野	多角形	緩やかな起伏	A	—
旧青海	多角形	緩やかな起伏	B	—
窓の月	多角形	緩やかな起伏	A	—
松の雪	楕円形	顕著な起伏	B	—
簾の内	多角形	緩やかな起伏	A	—
都紋り	多角形	緩やかな起伏	A, B	—

a A, 線条がない; B, 線条が気孔の長軸方向に対して直角に伸び、助細胞に深い切れ込みが生じる。

b +は認められる, —は認められない。

第6表の続き

品種	表皮細胞の形状	クチクラの凹凸	気孔型 ^a	毛状突起 ^b の有無
鳴海重	多角形	緩やかな起伏	A	+
乙女	多角形	緩やかな起伏	A	+
乱曲	多角形	緩やかな起伏	A	+
桜小町	多角形	顕著な起伏	A, B	-
早乙女	多角形	緩やかな起伏	A	+
勢多の入日	多角形	顕著な起伏	A, B	+
式部桜	多角形	緩やかな起伏	A	-
東雲	多角形	緩やかな起伏	A	-
白妙	多角形	顕著な起伏	A	+
裾濃の糸	多角形	緩やかな起伏	A	-
石橋	多角形	緩やかな起伏	A	-
誰ヶ袖	楕円形	顕著な起伏	A, B	+
田子の浦	楕円形	顕著な起伏	B	+
高蒔絵	多角形	緩やかな起伏	A	+
高砂	多角形	緩やかな起伏	A	-
玉芙蓉	多角形	緩やかな起伏	A	-
玉の台	多角形	緩やかな起伏	A	+
玉縁り	多角形	緩やかな起伏	A	-
照君	多角形	緩やかな起伏	A	-
蔦紅葉	多角形	緩やかな起伏	A	-
通天	多角形	緩やかな起伏	A, B	+
浮む瀬	多角形	緩やかな起伏	A	-
薄雲	多角形	緩やかな起伏	A	-
薄縁り	多角形	緩やかな起伏	A	-
若楓	多角形	緩やかな起伏	A	+
大和錦	楕円形	顕著な起伏	A	+
萬代	多角形	顕著な起伏	A, B	+
夜桜	多角形	緩やかな起伏	A	-
雪の駒	多角形	緩やかな起伏	A	-

a A, 線条がない; B, 線条が気孔の長軸方向に対して直角に伸び、助細胞に深い切れ込みが生じる。

b +は認められる, -は認められない。

示した。表皮のクチクラの形態は49品種が緩やかな起伏, 9品種が顕著な起伏を示した。気孔は45品種がヤマツツジ等と同じA型, 4品種がモチツツジおよびキシツツジと同じB型を示した。また, 9品種については両型が混在してみられ, その割合は品種で異なっていた(第7表)。葉脈上の毛状突起は16品種にみられ, ‘勢多の入日’を除く15品種では春葉および夏葉, ‘勢多の入日’では夏葉のみに認められた。

以上から, 供試したクルメツツジ58品種中, 35品種はヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジと同じ形態的特性を示した。一方, ‘田子の浦’を含む残り23品種については, 表皮系に関する3形質中1形質以上でモチツツジおよびキシツツジと同じ形態的特性を示すか, または葉脈上に毛状突起を有していた。

第7表 A およびB型の気孔が混在して認められたクルメツツジ9品種の各気孔型の出現率

品種	気孔 調査数	春葉		気孔 調査数	夏葉	
		A型 ^a (%)	B型 ^a (%)		A型 ^a (%)	B型 ^a (%)
御所桜	90	66.7	33.3	86	74.4	25.6
花筏	67	22.4	77.6	67	37.3	62.7
郭公	56	91.1	8.9	68	89.7	10.3
都綾り	73	82.2	17.8	82	80.5	19.5
桜小町	55	70.9	29.1	69	88.4	11.6
勢多の入日	56	37.5	62.5	66	45.5	54.5
誰ヶ袖	76	52.6	47.4	60	71.7	28.3
通天	97	92.8	7.2	105	94.3	5.7
萬代	78	91.0	9.0	74	87.8	12.2

1 個体につき 2 枚の葉を調査。

a 第 6 表参照。

2. 花芽のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・アイソザイム

アイソザイムは共優性マーカーとして利用され (Lo SCHIAVO ら, 1983), ツツジでは品種識別 (De LOOSE, 1979), 野生種の系統関係の推定 (宮原ら, 1993) および雑種性の判定 (URESHINO ら, 1998) に関する報告がある。予備試験として 10 酵素種 (アルコール脱水素酵素, 非特異的エステラーゼ, グルタミン酸脱水素酵素, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, グルコース-6-リン酸脱水素酵素, ロイシンアミノペプチダーゼ, リンゴ酸脱水素酵素, ホスホグルコースイソメラーゼ, ホスホグルコムターゼ, パーオキシダーゼ) について調査し, 種内で多型が少なく, 種間では異なるバンドパターンを示す酵素種を選定した結果, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AAT; EC2.6.1.1) が優れた。そこで, ヤマツツジ節野生種の AAT アイソザイムを調査し, モチツツジおよびキシツツジの指標となるアロザイムを得, モチツツジおよびキシツツジに特徴的なアロザイムを有するクルメツツジ品種の有無を調査した。

1) 材料および方法

クルメツツジ, 並びにその他わが国で育成されたおもな常緑性ツツジ園芸品種群 (江戸キリシマ, サツキ, ヒラドツツジ, リュウキュウ系, モチツツ

ジ系およびオオキリシマ系) の原種とされるヤマツツジ節野生種 8 種 (国重, 1974; 宮澤, 1918; 田村, 1963; 山崎・野沢, 1979a および b; 山崎・山崎, 1972; 第 8 表), ヤマツツジ自殖 40 個体, ヤマツツジ (種子親) ×モチツツジ (花粉親) 交雑実生 2 個体, ヤマツツジ (種子親) ×キシツツジ (花粉親) 交雑実生 7 個体および第 1 節で用いたクルメツツジ 58 品種を供試した。

調査には KREBS (1996) が葉芽, 花芽および展開葉のうちアイソザイムの活性が最も高いとした花芽を用いた。10~12月に花芽を採取し, -30℃で2日間冷凍した。乳鉢に冷凍した花芽 0.2 g および磨砕液 (0.3 M Tris, 0.2 M アスコルビン酸, 0.1 M 塩化ナトリウム, 2% Triton X-100, pH7.8) 1ml に海砂を少量加え, 乳棒ですり潰し, 直ちに 16,000 × g で3分間, 4℃下で遠心分離した。上清を容器 (1.5ml 容) に移し, ショ糖 15mg を加えて電気泳動用試料とし, 泳動するまで -30℃で保存した。

ポリアクリルアミドゲル (分離ゲルには7%アクリルアミドおよび0.2%ビスアクリルアミド, 濃縮ゲルには2.5%アクリルアミドおよび0.6%ビスアクリルアミドを含む) を用い, 試料 25 μl を 4℃, 15mA 定電流, 最大 300V の条件で垂直式スラブ電気泳動を行った。電気泳動が終了するまで, およそ 3.5 時間を要した。

泳動終了後, HIRAI ら (1986) の方法に従い AAT

第8表 ヤマツツジ節野生種8種の採取地と供試個体数

種	採集地	供試個体数
ヤマツツジ	穂別町 (北海道)	5
	恵山町 (北海道)	5
	十和田湖町 (青森県)	2
	気仙沼市 (宮城県)	1
	狭山市 (埼玉県)	1
	久留米市発心山 (福岡県)	7
	弥生町中の谷峠 (大分県)	2
	宮崎市双石山 (宮崎県)	4
ミヤマキリシマ	普賢岳 (雲仙山系, 長崎県)	10
	根子岳 (阿蘇山系, 熊本県)	3
	由布岳 (九重山系, 大分県)	8
	万年山 (九重山系, 大分県)	4
	高千穂山 (霧島山系, 鹿児島県)	7
サタツツジ	韓国岳 (霧島山系, 鹿児島県)	4
	桜島 (鹿児島県)	16
	大根占町 (鹿児島県)	6
	根占町辻岳 (鹿児島県)	6
	佐多町大中尾 (鹿児島県)	18
モチツツジ	佐多町伊座敷 (鹿児島県)	5
	御坊市 (和歌山県)	5
	京都市左京区 (京都府)	2
キシツツジ	不明	3
	匹見町 (島根県)	1
	不明 (山口県)	2
ケラマツツジ	四万十川 (高知県)	1
	奄美大島 (鹿児島県)	1
	東村 (沖縄県)	4
サツキ	屋久島 (鹿児島県)	3
マルバサツキ	屋久島 (鹿児島県)	10
	口永良部島 (鹿児島県)	3

について活性染色を行った。バンドの染色強度の測定について、イメージスキャナーを用いてゲルの画像データを得、小島 (1994) の方法に従い、パーソナルコンピュータに取り込んだ画像データの各バンドの染色強度を NIH Image ソフトウェアを用いて計測した。

なお、各個体・品種のアイソザイム分析は1試料につき少なくとも2回行い、異なる年次についても分析を行ったが、反復間のバンドパターンの変異は認められなかった。

2) 結果および考察

(1) ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジの AAT アイソザイム

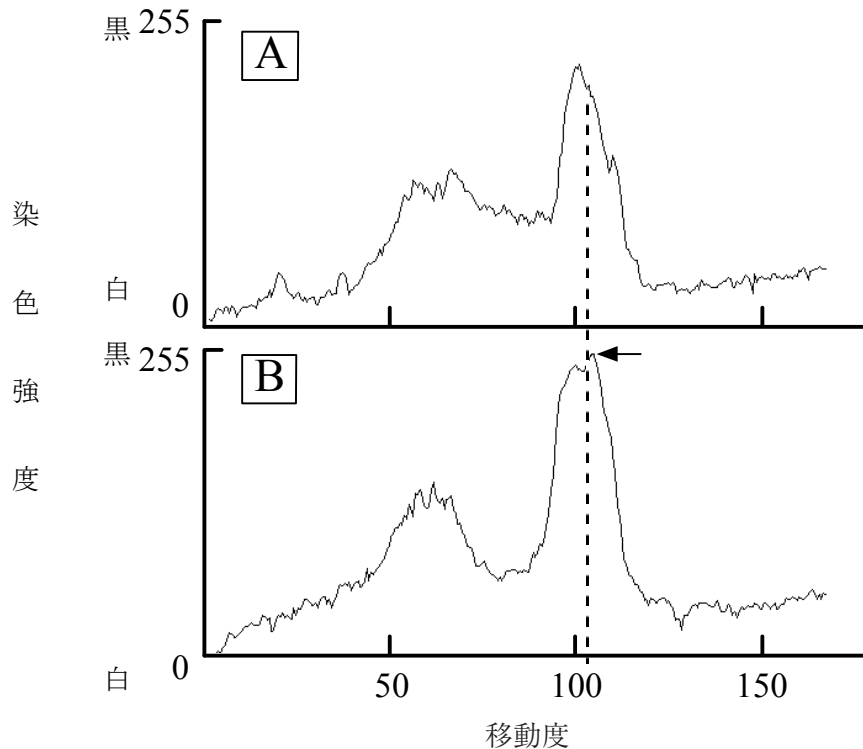
一般にクルメツツジの原種とされるヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジの中で, ミヤマキリシマは多型が最も少なかった。ミヤマキリシマの AAT アイソザイムバンドは3ゾーンに分けることができ、各ゾーンを遺伝子座とし泳動像の陽極側から順に番号を付した。また、*Aat-2* 座で最も陽極にみられたバンドを移動度に基づき '100' とし、これに準じて他のバンドに呼称を与えた。

Aat-2 および *Aat-3* 座にみられるバンドは明瞭で識別が容易であった。*Aat-1* 座のアイソザイムは芽鱗に多く (第7図), 花芽全体から得た粗抽出液ではバンドが明瞭でない場合があった。また, 供試した個体の中にはバンドが認められないことがあり, ヌル対立遺伝子の存在も仮定された。このため, *Aat-1* 座は本試験から除外した。

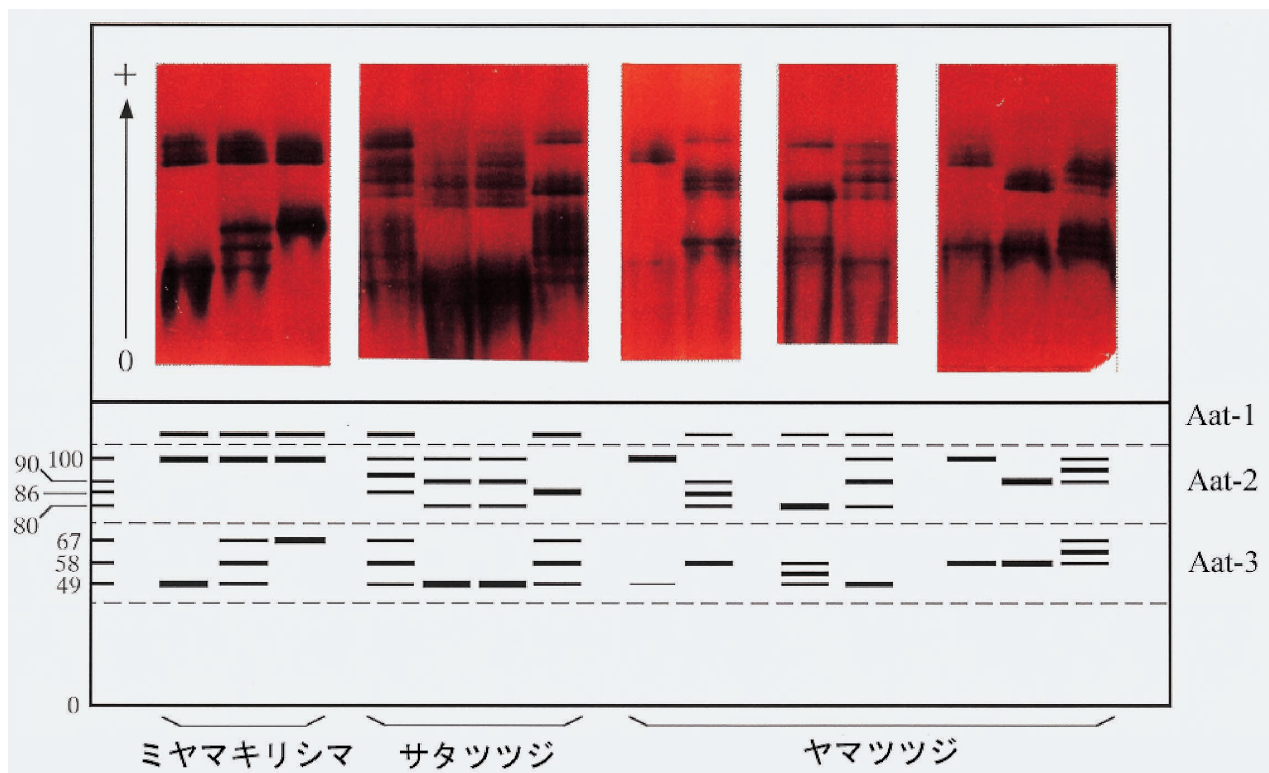
ヤマツツジおよびサタツツジの遺伝子座はミヤマキリシマと同じと推定された。これら3種の *Aat-2* および *Aat-3* 座には1本, もしくは3本のバンドが認められた (第9表, 第8図)。バンドが3本出現した場合, 各バンドの間隔は等しく, 中位のバンドの染色強度は他の2本よりも高いことが認められた (第10および11表)。*Aat-2* 座のバンドパターンが 100 + 90 + 80, *Aat-3* 座のバンドパターンが 58 + 53 + 49 であるヤマツツジの自殖個体についてバンドパターンを調査したところ, 各遺伝子座におけるバンドパターンごとの実生個体数の比率は期待比率との間で有意な差がなかった ($n = 40$, いずれの遺

伝子座ともに $P > 0.9$, 第12表)。AATは同一サブユニットから成る二量体で, ヘテロ型では両親のバンドと中間にヘテロダイマーの雑種酵素に由来する雑種バンドが形成されることが多くの植物種で報告されている (ARULSEKAR ら, 1985; GOTOH・IKEHASHI, 1992; HAUAGGE ら, 1987; 奥 泉 ら, 1990; TORRES ら, 1978; WEEDEN・LAMB, 1985; WENDEL・PARKS, 1982)。これらのことから, 1 遺伝子座に3本のバンドが現れたとき, 中位のバンドは雑種バンドと考えられた。そして, *Aat-2* 座には4対立遺伝子 (*Aat-2¹⁰⁰*, *Aat-2⁹⁰*, *Aat-2⁸⁶* および *Aat-2⁸⁰*), *Aat-3* 座には3対立遺伝子 (*Aat-3⁶⁷*, *Aat-3⁵⁸* および *Aat-3⁴⁹*) が存在すると考えられた。

MIYAJIMA ら (2001) は若葉を用いてホスホグルコースイソメラーゼ, リンゴ酸脱水素酵素およびホスホグルコムターゼのアイソザイムを調査した結果, ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジを識別するマーカーバンドは得られなかったとしている。小林ら (1996) はクルメツツジの原種を推定するた



第7図 ヤマツツジの花弁 (A) および芽鱗 (B) 由来の粗抽出液を用いたアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・アイソザイムの *Aat-1* 座付近にみられる各バンドのデンストグラム
破線は *Aat-1* 座のバンドの位置を示す。染色強度は256階調で表す。



第8図 ヤマツツジ節野生種3種のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・アイソザイムのザイモグラムとその模式図

第9表 ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジにおける *Aat-2* および *Aat-3* 座のバンドパターンと出現個体数

遺伝子座	バンドパターン	ヤマツツジ	ミヤマキリシマ	サタツツジ
<i>Aat-2</i>	100	7	32	7
	90	1	0	0
	86	0	0	2
	80	3	0	15
	100+95+90	8	0	0
	100+93+86	0	0	8
	100+90+80	3	4	19
	90+85+80	4	0	0
	不明瞭	1	0	0
<i>Aat-3</i>	67	0	0	3
	58	10	8	5
	49	4	14	24
	67+63+58	6	0	2
	67+58+49	0	4	8
	58+53+49	4	6	5
	不明瞭	3	4	4

第10表 ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジの *Aat-2* 座において3本のバンドを示した個体に関する各バンドの染色強度

種	100	+	95	+	90	100	+	93	+	86
ヤマツツジ	180.8		205.4		181.0	-		-		-
ミヤマキリシマ	-		-		-	-		-		-
サタツツジ	-		-		-	172.0		208.0		144.4

種	100	+	90	+	80	90	+	85	+	80
ヤマツツジ	146.5		201.5		143.2	230.0		239.0		214.5
ミヤマキリシマ	157.8		195.2		150.8	-		-		-
サタツツジ	152.5		188.5		133.7	-		-		-

値は各バンドの階調の平均値。調査した個体数は第9表参照。

第11表 ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジの *Aat-3* 座において3本のバンドを示した個体に関する各バンドの染色強度

種	67	+	63	+	58	67	+	58	+	49
ヤマツツジ	213.3		226.4		210.6	-		-		-
ミヤマキリシマ	-		-		-	211.3		216.3		190.0
サタツツジ	212.7		223.7		216.3	230.6		246.0		211.5

種	58	+	53	+	49
ヤマツツジ	185.8		202.0		165.4
ミヤマキリシマ	181.7		196.0		169.1
サタツツジ	195.7		215.8		191.0

値は各バンドの階調の平均値。調査した個体数は第9表参照。

第12表 ヤマツツジ個体の自殖実生に関する各バンドパターンの出現個体数と期待比率についての χ^2 検定

バンドパターン	観察個体数	期待比率	χ^2 検定
100	10	1	1.35 ($P>0.9$)
100+90+80	23	2	
80	7	1	
58	10	1	1.35 ($P>0.9$)
58+53+49	17	2	
49	13	1	

め、葉緑体 DNA のリボゾーム RNA 遺伝子の 16S 領域についてポリメラーゼ連鎖反応-制限酵素断片長多型 (RCR-RFLP) 分析を行い、ヤマツツジとミヤマキリシマを識別するマーカーを見いだし、クルマツツジ中にミヤマキリシマと同じ葉緑体 DNA 型をもつ品種が存在することを明らかにした。しかし、他の種については制限酵素切断部位がヤマツツジと同じであったと報告している。今回の試験では、*Aat-2*¹⁰⁰ および *Aat-2*⁸⁰ は 3 種に共通して認められたが、*Aat-2*⁹⁰ はヤマツツジ、*Aat-2*⁸⁶ はサタツツジに特徴的であった (第 13 表)。*Aat-3* 座に関しては、種に特徴的な対立遺伝子は認められなかった (第 14 表)。

(2) モチツツジおよびキシツツジに特徴的なアロザイムの選定

上記以外の野生種 5 種に関して、サツキにはヤマツツジにみられた *Aat-2*⁹⁰、マルバサツキには *Aat-2*¹⁰⁰ がそれぞれ認められた (第 15 表)。一方、モチ

ツツジ、キシツツジおよびケラマツツジにはヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジが示したアロザイムはなかった。キシツツジには移動度が '112'、モチツツジおよびケラマツツジには '104' のバンドが認められた。これらは *Aat-1* 座の近傍に位置していたため、*Aat-1* あるいは *Aat-2* 座のいずれに属するバンドかは不明であった。そこで、ヤマツツジ (*Aat-2*⁹⁰ を有する) にモチツツジおよびキシツツジの花粉を交雑して得られた実生を用いて、'112' および '104' バンドの遺伝子座を検討した。その結果、ヤマツツジ×モチツツジの交雑実生 2 個体は 104 + 97 + 90、ヤマツツジ×キシツツジの交雑実生 7 個体はすべて 112 + 101 + 90 のバンドパターンを示し (第 9 図)、'112' および '104' が *Aat-2*⁹⁰ との間に雑種バンドを形成することが確認された。よって、'112' および '104' は *Aat-2* 座の対立遺伝子 *Aat-2*¹¹² および *Aat-2*¹⁰⁴ と考えられた。*Aat-2*¹¹² はキシツツジ、*Aat-2*¹⁰⁴ はモチツツジおよび

第 13 表 ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジにおける *Aat-2* 座の各対立遺伝子の出現率

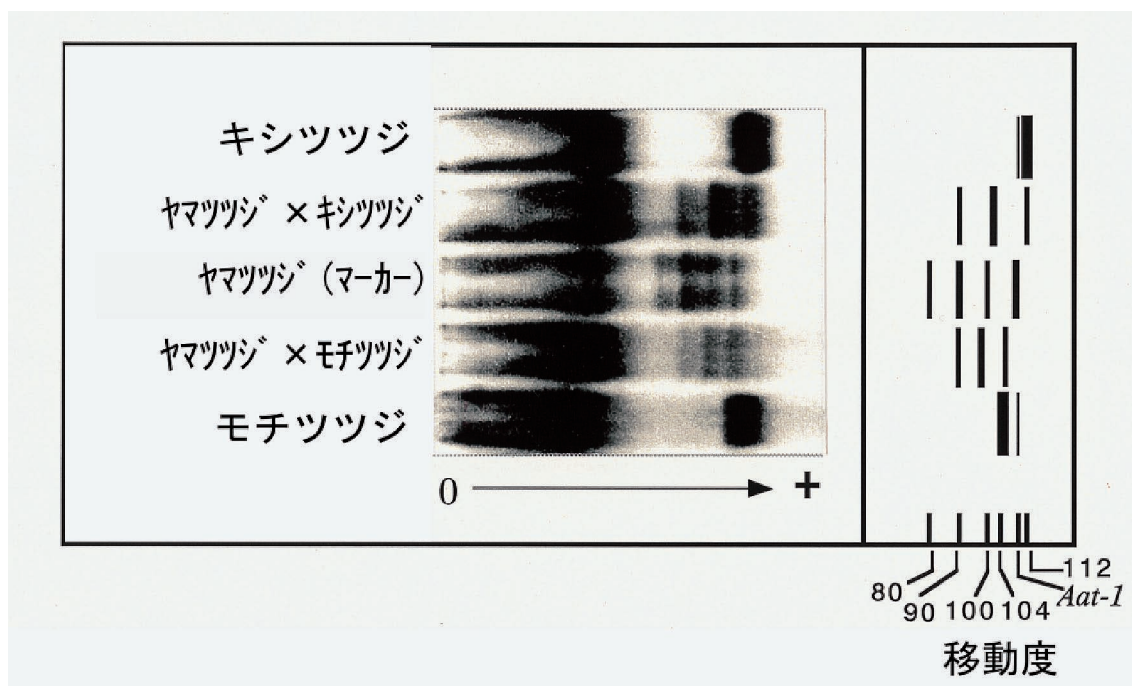
種	<i>Aat-2</i> ¹⁰⁰	<i>Aat-2</i> ⁹⁰	<i>Aat-2</i> ⁸⁶	<i>Aat-2</i> ⁸⁰
ヤマツツジ	0.481	0.269	0.000	0.250
ミヤマキリシマ	0.944	0.000	0.000	0.056
サタツツジ	0.402	0.000	0.118	0.480

第 14 表 ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジにおける *Aat-3* 座の各対立遺伝子の出現率

種	<i>Aat-3</i> ⁶⁷	<i>Aat-3</i> ⁵⁸	<i>Aat-3</i> ⁴⁹
ヤマツツジ	0.125	0.625	0.250
ミヤマキリシマ	0.062	0.345	0.594
サタツツジ	0.170	0.181	0.649

第 15 表 ヤマツツジ節野生種 5 種における *Aat-2* 座の各対立遺伝子の出現個体数

種	個体数	<i>Aat-2</i> ¹¹²	<i>Aat-2</i> ¹⁰⁴	<i>Aat-2</i> ¹⁰⁰	<i>Aat-2</i> ⁹⁰
モチツツジ	10	0	10	0	0
キシツツジ	4	4	0	0	0
ケラマツツジ	5	0	5	0	0
サツキ	3	0	0	0	3
マルバサツキ	13	0	0	13	0



第9図 ヤマトツツジ (*Aat-2^{90/90}*) にモチツツジおよびキシツツジの花粉を交雑して得られた実生のザイモグラム
移動度を表すマーカーとして *Aat-2^{100/80}* であるヤマトツツジ個体を用いた。

ケラマツツジにそれぞれ特徴的な対立遺伝子であった。

矢原 (1982) は集団のヘテロ接合体頻度を調査する場合は5ないし10程度の酵素種を用い、雑種形成の解析のため2種を識別するマーカーが必要な場合は、2種間に差異のある酵素種を選べばよいとしている。よって、*Aat-2* 座のアロザイムはクルメツツジに対するモチツツジおよびキシツツジの関与を推定するための指標として有効と考えられ、*Aat-2¹¹²* はキシツツジのマーカーとして、*Aat-2¹⁰⁴* は付加的にモチツツジのマーカーとして利用することができると考えられた。

(3) クルメツツジの *Aat-2* 座における対立遺伝子の品種間差

第16表にクルメツツジ各品種の *Aat-2* 座の遺伝子型を示した。供試した58品種中54品種はヤマトツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジが示す対立遺伝子から構成されていた。この中にはヤマトツツジにみられた *Aat-2⁹⁰* を有する品種（‘呉服’、‘今岡’、‘稲妻’、‘古金襴’、‘都紋り’、‘鳴海重’、‘白妙’、‘高蒔絵’、‘玉縁り’および‘大和錦’）、サタ

ツツジに特徴的な *Aat-2⁸⁶* を有する品種（‘白妙’および‘大和錦’）が認められた。残り4品種に関して、‘田子の浦’および‘若楓’の対立遺伝子の構成は *Aat-2^{112/100}*、‘花筏’および‘松の雪’のそれは *Aat-2^{104/100}* であった。よって、‘田子の浦’および‘若楓’はキシツツジの遺伝的特性を有する品種であること、‘花筏’および‘松の雪’はモチツツジの遺伝的特性を有する品種であることが示唆された。

3. PCR-SSCP 分析による葉緑体 DNA 多型

ポリメラーゼ連鎖反応—一本鎖高次構造多型 (PCR-SSCP) 分析は、わずかな塩基配列の違いを検出でき、しかも簡便なDNAの変異のスクリーニングの手段である (NISHIZAWA・WATANO, 2000)。葉緑体DNAについて、ヤマトツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジと、モチツツジおよびキシツツジとの間で異なるハプロタイプを示すプライマーセットがすでに明らかにされている (板橋ら, 2003; 小林ら, 2005)。そこで、この手法を用いて、モチツツジおよびキシツツジと同じ葉緑体DNAハプロタイプをもつクルメツツジ品種の有無を調査した。

第16表 クルメツツジ58品種における *Aat-2* 座の遺伝子型

品種	<i>Aat-2</i> 座	品種	<i>Aat-2</i> 座
総角	100 / 80	鳴海重	90 / 80
曙	100 / 80	乙女	100 / 80
吾妻鏡	80 / 80	乱曲	100 / 100
美人粋	100 / 100	桜小町	100 / 80
千代の曙	100 / 80	早乙女	100 / 80
筆捨山	100 / 80	勢多の入り	100 / 80
呉服	100 / 90	式部桜	100 / 100
御所桜	100 / 80	東雲	100 / 80
花筏	104 / 100	白妙	90 / 86
初音	100 / 80	裾濃の糸	100 / 80
東山	100 / 80	石橋	100 / 80
今岡	90 / 80	高蒔絵	90 / 80
稲妻	90 / 80	高砂	100 / 80
郭公	100 / 80	誰ヶ袖	100 / 80
桐壺	100 / 80	田子の浦	112 / 100
胡蝶	100 / 100	玉芙蓉	80 / 80
小蝶の舞	100 / 100	玉の台	100 / 80
古金襴	100 / 90	玉縁り	100 / 90
小式部	100 / 100	照君	100 / 80
雲切	100 / 80	薦紅葉	100 / 80
雲の上	100 / 100	通天	100 / 100
位の紐	80 / 80	浮む瀬	100 / 80
暮の雪	100 / 80	薄雲	100 / 80
旧青海	100 / 80	薄縁り	100 / 80
旧宮城野	100 / 80	若楓	112 / 100
窓の月	100 / 80	大和錦	90 / 86
松の雪	104 / 100	萬代	100 / 100
簾の内	100 / 100	夜桜	100 / 80
都紋り	100 / 90	雪の駒	100 / 100

1) 材料および方法

ヤマツツジ3個体, ミヤマキリシマ5個体, サタツツジ5個体, モチツツジ1個体, キシツツジ3個体およびクルメツツジ37品種を供試した。

新葉約0.5gについて臭化トリメチルアンモニウム (CTAB) 法 (DOYLE・DOYLE, 1987) に多糖類およびポリフェノールを除去する操作を加えた改変CTAB法 (KOBAYASHIら, 1998) により全DNAの抽出を行った。

プライマーについて, NISHIZAWA・WATANO (2000) がタバコの葉緑体DNAの塩基配列をもとに開発した13種類のプライマーセット (ユニバーサルプライマー) の中で, ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよ

びサタツツジと, モチツツジとの間で異なるSSCPバンドパターンを示す *trnW-trnP* (小林ら, 2005) と, キシツツジとの間で異なるSSCPバンドパターンを示す *atpF* イントロン (板橋ら, 2003) の2領域を用いた (第17表)。

PCR増幅について, 反応液 (全量25 μ l) の組成は25ng DNA, 0.5 μ M プライマー, 2.0mM MgCl₂, 0.1mM dNTPs, 2.5 μ l 10 \times reaction buffer および0.5unit *Taq* DNAポリメラーゼ (Amersham Bioscience) とした。増幅条件は95°Cで3分間の熱変性後, 94°C1分間-アニーリング1分間-72°C1分間を35サイクルおよび72°C10分間を1サイクルとした。なお, アニーリング温度は *atpF* では47°C, *trnW-P* 領域で

第 17 表 用いたプライマーセット

PCR産物	プライマーシーケンス	サイズ (bp)
<i>atpF</i> イントロン	5'-TTCATTTGGCTCTCACGCTC-3'	247
	5'-AATGCTGAATCGACGACCTA-3'	
<i>trnW-trnP</i> の 遺伝子間領域	5'-GATTTGAACCTACGACATCG-3'	297
	5'-GATGTGGCGCAGCTTGGTAG-3'	

NISHIZAWA ・ WATANO (2000)

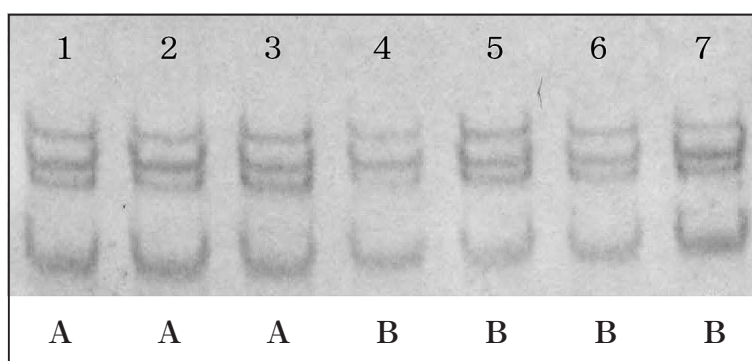
は 51℃とした。

SSCP 分析について、2 μ l の PCR 産物と 8 μ l のホルムアミド色素液 (90%ホルムアミド、0.5% BPB、8%グリセリン) を混合した溶液を 95℃で 3 分間の熱変性処理後、氷上で急冷した。電気泳動はサーモスタットで制御された冷却水循環装置を取り付けたスラブ電気泳動装置を使用し、TBE 緩衝系ポリアクリルアミドゲル (25% MDE gel 溶液 (TaKaRa)、10%グリセリンおよび 1 × TBE) を用いて、試料 10 μ l について 4℃、100V 下で 8 時間電気泳動を行った。ゲルの染色は銀染色法を用いた。葉緑体 DNA の *atpF* の PCR 産物の SSCP バンドの型は板橋ら (2003)、*trnW-P* 領域のそれは小林ら (2005) に従った。

2) 結果および考察

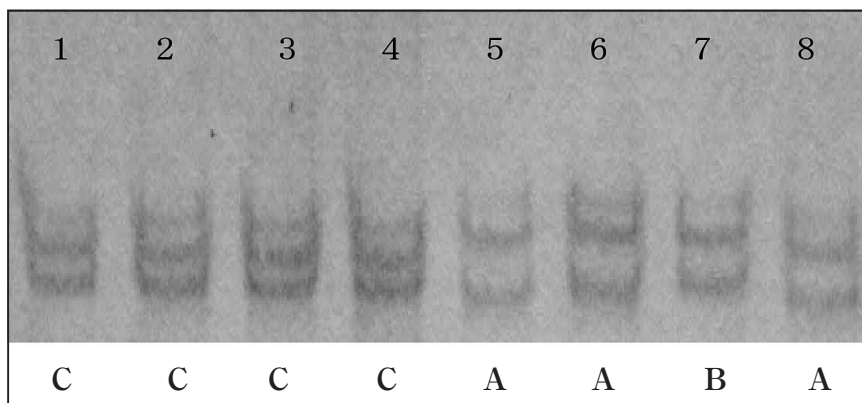
供試した野生種各個体の *atpF* および *trnW-P* 領

域のバンドの型を第 18 表に示した。*atpF* について、キシツツジは A 型、ヤマツツジ、ミヤマキリシマ、サタツツジおよびモチツツジが B 型であった (第 10 図)。*trnW-P* 領域について、ヤマツツジおよびミヤマキリシマは A または B 型、サタツツジが A 型、モチツツジおよびキシツツジが C 型であった (第 11 図)。ミヤマキリシマに関して、*trnW-P* 領域の型と小林ら (1996) の示した葉緑体 DNA の PCR-RFLP 分析の結果と比較したところ、A 型を示す個体はすべて RFLP マーカーがヤマツツジ型、B 型はミヤマキリシマ型であった。これら *atpF* および *trnW-P* 領域のバンドの型の結果から、本試験で供試したヤマツツジ節野生種の葉緑体 DNA のハプロタイプをヤマツツジ型、ミヤマキリシマ型、モチツツジ型およびキシツツジ型の 4 型に分類した (第 19 表)。大分県弥生町中の谷峠で採集したヤマツツジはミヤマキリシマ型を示し、ミヤマキリシマから



第 10 図 ヤマツツジ節野生種における葉緑体 DNA の *atpF* の SSCP バンドパターン

1. キシツツジ (匹見町), 2. キシツツジ (山口県), 3. キシツツジ (四万十川), 4. モチツツジ (京都市), 5. ヤマツツジ (不明), 6. サタツツジ (高峠), 7. ミヤマキリシマ (由布岳)。バンドの型 (A および B) は板橋ら (2003) による。



第11図 ヤマツツジ節野生種における葉緑体 DNA の *trnW-P* 領域の SSCP バンドパターン

1. モチツツジ (京都), 2. キシツツジ (匹見町), 3. キシツツジ (山口県), 4. キシツツジ (四万十川), 5. ヤマツツジ (発心山), 6. ヤマツツジ (不明), 7. ヤマツツジ (中の谷峠), 8. サタツツジ (高峠)。バンドの型 (A, B および C) は小林ら (2005) による。

第18表 ヤマツツジ節野生種5種の葉緑体 DNA の *atpF* および *trnW-P* 領域の SSCP バンドの型

種	採集地	<i>atpF</i>	<i>trnW-P</i>
ヤマツツジ	久留米市発心山 (福岡県)	B	A
	不明	B	A
	弥生町中の谷峠 (大分県)	B	B
ミヤマキリシマ	普賢岳 (長崎県)	B	B
	由布岳 (大分県)	B	A
	黒岩山 (大分県)	B	A
	根子岳 (熊本県)	B	A
	高千穂山 (鹿児島県)	B	B
サタツツジ	垂水市高峠 (鹿児島県)	B	A
	垂水市高峠 (鹿児島県)	B	A
	桜島 (鹿児島県)	B	A
	大根占町 (鹿児島県)	B	A
	佐多町大中尾 (鹿児島県)	B	A
モチツツジ	京都市左京区 (京都府)	B	C
キシツツジ	四万十川 (高知県)	A	C
	匹見町 (島根県)	A	C
	不明 (山口県)	A	C

の遺伝子浸透が推定された。一方、ミヤマキリシマにはヤマツツジ型を示す個体がみられ、ヤマツツジとの自然交雑の影響（宮島ら，2001）が考えられた。

クルメツツジ 37 品種の葉緑体の型を第 20 表に示した。‘総角’，‘裾濃の糸’，‘田子の浦’ および ‘若楓’ はミヤマキリシマ型を示した。そのほかの品種はヤマツツジ型であった。従って，供試したクルメツツジ中にはモチツツジおよびキシツツジ由来の葉緑体 DNA をもつ品種はないと考えられた。

4. 総合考察

クルメツツジの原種とされるヤマツツジ，ミヤマキリシマおよびサタツツジのグループ（ヤマツツジ列）と，リュウキュウツツジの原種とされるモチツツジおよびキシツツジのグループ（モチツツジ列）を区分する分類学上の特性には，若枝の毛の種類，花芽の鱗片の粘りの有無，花柄および萼片の腺毛の有無がある（CHAMBERLAIN・RAE, 1990；山崎, 1989）。モチツツジおよびキシツツジの若枝には開出または斜上する長毛および腺毛が生じ，花芽の芽鱗には粘りがあり，花柄および萼片には腺毛が生じる。しかし，これらの特性はクルメツツジにはまったく認められなかった。このため，クルメツツジに

対してモチツツジおよびキシツツジの関与を明らかにするためには，新たに指標となる形質を見いだす必要が生じた。

MARTENS・FRETZ（1980）は crabapple 9 品種の識別にクチクラの線条の有無と形状の違いが有用であるとし，ACKERMAN・ZHANG（1983）はツバキ属 38 種を調査し，助細胞，孔辺細胞を含めた気孔の形状および表皮細胞の型と，表皮の毛，腺細胞およびコルク細胞の有無から種を分類すること，および種の純度を検証することができるとした。このほか，legume の化石の種の推定（HERENDEEN・DILCHER, 1990）や，一般的な手法では識別が困難なアメリカニレのクローン間（KRAUSE, 1976）について，表皮系の形態的特性を利用した報告がみられる。

日本に分布するヤマツツジ節野生種 16 種は表皮系に関する 3 形質（表皮細胞の形状，クチクラの凹凸および気孔の形状）から 8 群に類別することができ，ヤマツツジ，ミヤマキリシマおよびサタツツジのグループと，モチツツジおよびキシツツジのグループとの間に明瞭な差異が認められた。また，葉の葉脈に生じる毛状突起はモチツツジおよびキシツツジに特徴的な器官であった。以上のことから，葉の表皮系の形態的特性は，わが国で成立した常緑性

第 19 表 葉緑体 DNA の *atpF* および *trnW-P* 領域の SSCP バンド型に基づくハプロタイプの分類

ハプロタイプ	<i>atpF</i>	<i>trnW-P</i>
ヤマツツジ型	B	A
ミヤマキリシマ型	B	B
モチツツジ型	B	C
キシツツジ型	A	C

第 20 表 クルメツツジ 37 品種の葉緑体 DNA のハプロタイプ

ハプロタイプ	品種
ヤマツツジ型	筆捨山，呉服，御所桜，花筏，今岡，稲妻，郭公，桐壺，古金欄，小式部，雲切，窓の月，松の雪，簾の内，都紋り，鳴海重，乙女，桜小町，早乙女，勢多の入日，式部桜，東雲，白妙，誰ヶ袖，高蒔絵，玉芙蓉，玉の台，玉縁り，照君，浮む瀬，薄縁り，大和錦，萬代
ミヤマキリシマ型	総角，裾濃の糸，田子の浦，若楓

ツツジ園芸品種に対して、モチツツジおよびキシツツジの関与を推定するための指標として有用と考えられた。

アイソザイムは“発現する遺伝標識”として、細胞レベルにおいて遺伝子発現を検出することができるマーカーの一つとされ(石川, 1994), 関与する遺伝子の多くが共優性であること, 形態的・生理的形質に直接作用しないこと等から, 西洋クルミ (ARULSEKAR ら, 1985), *Prunus* 属 (BYRNE・LITTLETON, 1989; HAUAGGE ら, 1987) およびペカン (MARQUARD, 1987) 等で雑種性の判別に利用されている。また, リンゴ (DICKSON ら, 1991), ソバ (OHNISHI, 1998), アーチチョーク (ROTTENBERG ら, 1995), キウイフルーツ (TESTOLIN・FERGUSON, 1997) およびシコクビエ (WERTH ら, 1994) 等では栽培種の起源推定に利用されている。

本試験で用いた AAT は基質特異性の高い酵素種であり, エステラーゼおよびフォスファターゼのような非特異的酵素とは異なり多型性が低い傾向にある (GILLESPIE・LANGLEY, 1974)。このため, アロザイムの種内変異は比較的小さかった。*Aat-2* 座に関して, わが国で成立した園芸品種群の原種とされる野生種 8 種から 6 対立遺伝子が得られた。これらのうち, *Aat-2*¹¹² はキシツツジ, *Aat-2*⁸⁶ はサタツツジに特徴的であった。また, *Aat-2*¹⁰⁴ はモチツツジおよびケラマツツジ, *Aat-2*⁹⁰ はヤマツツジおよびサツキのみが有した。このことから, *Aat-2* 座のアロザイムは常緑性ツツジ園芸品種の原種を推定するための指標として有用と考えられた。

SSCP は近縁種間の交雑において種を特徴づける分子マーカーとして RFLP より優れるとされ (WATANO ら, 1995), *Abies* 属 (ISODA ら, 2000) および *Pinus* 属 (WATANO ら, 2004) 等では自然雑種域における個体群の遺伝的構造を解析するために用いられている。常緑性ツツジに関しては, 形態的特性からヤマツツジとモチツツジとの交雑種とされるミヤコツツジ (*R. × tectum* Koidzumi) の雑種性を判定するために用いられている (小林ら, 2005)。本試験では葉緑体 DNA に関して分析を行った。葉緑体は自然環境への適応に関わる遺伝子が核に比べて少なく, 核とは異なり遺伝子間相互作用を示さず, 自然淘汰および育種過程における選抜時の影響も受けないと考えられているためである。

常緑性ツツジの葉緑体 DNA に関して, *atpF* の SSCP バンドの型はキシツツジが A 型, ヤマツツジ, ミヤマキリシマ, サタツツジおよびモチツツジが B 型であり, *trnW-P* 領域の SSCP バンドの型はヤマツツジおよびミヤマキリシマが A 型または B 型, サタツツジが A 型, モチツツジおよびキシツツジが C 型であった。ヤマツツジおよびミヤマキリシマに認められた *trnW-P* 領域の SSCP バンドに関して, ミヤマキリシマ各個体が示した型 (A または B) と小林ら (1996) が示したリボゾーム RNA 遺伝子の 16S 領域の RFLP の型 (ヤマツツジ型またはミヤマキリシマ型) を比較した結果, B 型がミヤマキリシマに特徴的なバンドパターンと考えられた。このことを踏まえて, 2 プライマーによる SSCP バンドの型の組合せから, 葉緑体 DNA のハプロタイプをヤマツツジ型, ミヤマキリシマ型, モチツツジ型およびキシツツジ型の 4 型に分類し, ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジの群と, モチツツジおよびキシツツジを識別するための指標とした。

クルメツツジの成立に関与した野生種は, 一般にヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジとされている。ところが, 田村 (1966) はクルメツツジ ‘田子の浦’ がリュウキュウツツジとの交雑種であると示した。しかし, これは外観的な特性を目視で評価したことから述べられているに過ぎない (阿部・国重, 1958)。本試験の結果, ‘田子の浦’ は葉の表皮系 3 形質がリュウキュウツツジの成立に関わったとされるモチツツジおよびキシツツジと同じ形態的特性を示し, 葉脈には毛状突起が観察された。*Aat-2* 座の対立遺伝子は, キシツツジに特徴的な *Aat-2*¹¹² とヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジが有する *Aat-2*¹⁰⁰ とのヘテロであった。葉緑体 DNA のハプロタイプはミヤマキリシマ型であったが, ‘田子の浦’ はキシツツジ, あるいはモチツツジの遺伝的特性を有する品種であることが示唆された。

‘田子の浦’ 以外の品種にもモチツツジ, あるいはキシツツジに特徴的な特性が認められた。葉の表皮系 3 形質中, 2 形質以上でモチツツジおよびキシツツジと同じ形態的特性を示す, もしくは毛状突起を有する品種をモチツツジ, あるいはキシツツジの遺伝的特性を有する品種とした場合, 17 品種が該当した。AAT アイソザイムに関しては, 1 品種がキシツツジに特徴的なアロザイム, 2 品種がモチツツ

ジおよびケラマツツジに認められるアロザイムを示した。AAT を指標とした場合、葉面形態特性を指標としたときに比べて、モチツツジおよびキシツツジの遺伝的特性を有する品種が少ないと評価された。これらの結果から、クルメツツジの成立にはヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジのほか、モチツツジおよびキシツツジが関わっていることが示唆された。一方、葉緑体 DNA の PCR-SSCP 分析からは、クルメツツジに対するモチツツジや、キシツツジの関与性を示す結果は得られなかった。

リュウキュウツツジは 1692 年に江戸で出版された「錦繡枕」に記載があり、九州には 7～17 世紀にかけての海上貿易で他の植物と共に長崎県平戸に持ち込まれていたことが推定されている（田村, 1963）。このことから、クルメツツジの成立した天保年間にツツジ栽培の盛んであった久留米地方でリュウキュウツツジが栽培されていた可能性は高い。‘田子の浦’は花冠長が 3.7cm, 春葉葉身長が 4.3cm と、クルメツツジ品種中では花および葉が大きいことから（供試した 58 品種の平均の花冠長は 3.0cm, 春葉葉身長は 3.2cm）、中大輪系のリュウキュウツツジ（花冠長 4.9cm, 春葉葉身長 4.9cm）を交雑に利用することにより、クルメツツジの形態的特性の変異を拡大しようとしていたことがうかがわれた。

5. 摘 要

クルメツツジの原種は一般にヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジとされているが、一部の品種についてリュウキュウツツジの関与性が指摘されている。リュウキュウツツジはモチツツジとキシツツジとの交雑種とされる。そこで、クルメツツジの品種多様性に対するモチツツジおよびキシツツジの関与を明らかにすることを目的に、モチツツジおよびキシツツジに特徴的な特性を示す形質の獲得を試み、それらを指標に用いてクルメツツジへのモチツツジおよびキシツツジの関与性を検討した。

わが国に分布するヤマツツジ節野生種 16 種の葉の背軸側表皮面の形態特性を調査した結果、表皮系（表皮細胞の形状、表皮のクチクラの凹凸、気孔の形）および葉脈に生じる毛状突起の有無が指標として利用できることが明らかとなった。供試したクルメツツジ 58 品種中、15 品種が表皮系の 3 形質中 1 形質以上でモチツツジおよびキシツツジと同じ形態的特

性を示した。また、16 品種に毛状突起が認められた。

わが国で育成されたおもな常緑性ツツジ園芸品種群の原種とされるヤマツツジ節野生種 8 種の花芽のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・アイソザイムを調査した。Aat-2 座からキシツツジに特徴的な対立遺伝子 Aat-2¹¹² と、付加的にモチツツジのマーカーとして利用できる対立遺伝子 Aat-2¹⁰⁴ が得られた。供試したクルメツツジ 58 品種中、4 品種がこれらの対立遺伝子をヘテロで有していた。

クルメツツジ 37 品種を供試し、ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジと、モチツツジおよびキシツツジとの間で異なる SSCP バンドを示す葉緑体 DNA の *trnW-P* 領域および *atpF* イントロンをプライマーに用いた PCR-SSCP 分析を行った。供試したクルメツツジはすべてヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジと同じハプロタイプを示した。

Ⅲ. クルメツツジを種子親とした キレンゲツツジとの交雑能力

常緑性ツツジとキレンゲツツジ（第 12 図）との亜属間交雑では生殖的隔離機構が存在するため、交雑育種は進んでおらず、いまだ実用品種の育成には至っていない。本交雑では、常緑性ツツジを花粉親に用いた場合、花柱内での花粉管の伸長停止が起こるため、交雑は完全に阻害される（CREECH, 1955；URESHINO ら, 2000）。一方、常緑性ツツジを種子親に用いた場合、種子形成不能、不発芽、白子の出現および緑色実生の発育停止等、種々の交雑隔離障壁を示す（赤羽ら, 1971；NOGUCHI, 1932；田村, 1963）。

常緑性ツツジを種子親に用いたとき、組合せによってごく少数の生存実生が得られることが報告されている。赤羽（1993）はミヤマキリシマ×サツキの実生、倉重・赤羽（2001）は *R. nakaharai* Hayata を用いて交雑を行い、得られた実生が正常に生育し、開花に至ったことを報告した。クルメツツジを含めたキリシマツツジ×キレンゲツツジについても、いくつかの試みがなされている。NOGUCHI（1932）はクルメツツジを含むキリシマツツジ 6 品種を供試し、実生が得られてもその多くが葉緑素の形成阻害により夭折するが、‘桜きりしま’を用いた交雑から数



第12図 黄色花色の提供親に用いたキレンゲツツジ

個の生存可能な実生が得られ、3cm程度の大きさまで成長したと報告した。宮澤(1922)はある特定の品種との間に実生が得られたが、2年目の夏に枯死したとした。

本章では、常緑性ツツジを種子親、キレンゲツツジを花粉親に用いた交雑における受精前および受精後の交雑隔離障壁、並びに交雑能力に影響を及ぼす要因の解析を行う。また、クルメツツジを用いて交雑能力に優れる種子親の特性を明らかにする。

1. 常緑性ツツジを種子親としたキレンゲツツジとの交雑における交雑隔離障壁

本節では、わが国に分布する常緑性ツツジ野生種に関して、キレンゲツツジとの交雑における受精前および受精後の交雑隔離障壁について詳細な調査を行い、本交雑の生殖的隔離機構の様相を明らかにする。

花粉親に用いるキレンゲツツジに関しては、これまで常緑性ツツジとの交雑不和合性の個体間差異を検討した報告がない。そこで、交雑隔離障壁に関する調査を行い、キレンゲツツジ個体間の交雑能力の差異の有無を明らかにするとともに、花粉親として優れた個体を選定することの有効性を検討する。

1) 材料および方法

常緑性ツツジ野生種 14 種 24 個体、キレンゲツツ

ジ 9 個体を供試した。これらは自生地(第21表)で新梢、または種子を採取し、(独)農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター久留米研究拠点で挿し木、または実生繁殖を行い、常緑性ツツジはガラス室、キレンゲツツジは雨よけハウス内で鉢植えとして栽培管理した。

種子親に用いた常緑性ツツジ野生種の交雑隔離障壁を検討するため、常緑性ツツジ野生種に対してキレンゲツツジ(JAP1, 略号は第12表を参照)の花粉を交雑した。また、対照としてキレンゲツツジを種子親に用いた区を設けた。この場合、キレンゲツツジは自家不和合性であるため(後藤・西村, 1971), JAP7を種子親とした。各交雑隔離障壁および交雑能力に対する花粉親に用いたキレンゲツツジ個体間の差異を検討するため、マルバサツキ(ERI1)を種子親とし、キレンゲツツジ9個体の花粉を交雑した。

キレンゲツツジの開花日(4月中旬)に葯を1.5 ml容のサンプル管に採集した。サンプル管はデシケータに入れ、室温または4℃、暗黒条件下で最長6月中旬まで保存した。常緑性ツツジは開花直前に雄ずいを除去し、柱頭が粘液で覆われた日(受粉適日)に1個体当たり13花以上についてキレンゲツツジ花粉を交雑した。交雑後は袋かけを行わなかった。これは袋かけを行うことにより、雌ずい周辺の温度環境が変化することが指摘されているからであ

る (PALSER ら, 1989)。なお, 訪花昆虫の侵入を防止するため, ガラス室の天窗, 側窓等には金属製網を取り付けた。

交雑 10 日後に 1 個体当たり 3 花の雌ずいを採取し, FAA (ホルマリン:70%エタノール:酢酸=1:18:1 (v/v/v)) で 24 時間固定後, 70%エタノール中に室温で保存した。固定した雌ずいは 38℃ 下で 1N 水酸化ナトリウムに 24 時間浸漬し, 蒸留水で 3 回洗浄後, 0.1%アニリンブルー溶液 (0.1 N リン酸カリウムに溶解) に室温で 7 時間浸した。染色後, 花柱と子房を分離し, 子房は二つに縦断し各々から心皮を取り出した。花柱および心皮をスライドガラスに置き, カバーガラスを被せ軽く押し潰した。作製したプレパラートは蛍光装置を備えた生物顕微鏡 (励起フィルタ EX365/10; 吸収フィルタ BA400; ダイクロイックミラー DM400) を使用して, 花柱基

部の花粉管数および胚珠への花粉管の貫入の有無を調査した。胚珠への花粉管の貫入の判別は WILLIAMS ら (1982) の方法に従った。

さく果は 10 月中旬に採集し, デシケータ中で乾燥, 裂開させた。1 果中の成熟種子数を 1 個体当たり 5 果について調査した。種子は, 鹿沼土の表面を水苔で覆った育苗箱 (51 × 36 × 10 cm) に 11 月中旬播種し, 寒冷紗で被覆した無加温ガラス室 (光合成光量子束密度は日中の平均が屋外の 15% 程度) で管理した。12 ~ 2 月に発芽数および子葉色を週 1 回調査した。子葉色は R.H.S. カラーチャートで計測し, 141B に近似な色を緑, 以下同様に 149B を黄緑, 149D を淡緑, 155B を白および 4D を黄色とした。3 月に別の無加温ガラス室 (寒冷紗で被覆しているため, 光合成光量子束密度は日中の平均が屋外の 23% 程度) に育苗箱を移動し, その後はこの場所で

第 21 表 供試したヤマツツジ節野生種の個体番号, 採集地および花色

種	個体番号	採集地	花色
ヤマツツジ	KAE1	宮城県	白色
	KAE2	福岡県耳納連山	白色
	KAE3	福岡県発心山	朱赤色
	KAE4	不明	朱赤色
ミヤマキリシマ	KIU1	長崎県宝原	白色
	KIU2	大分県黒岩山	白色
	KIU3	大分県由布岳	白地赤紫紋り
サタツツジ	SAT1	鹿児島県桜島	白色
	SAT2	鹿児島県高峠	白色
フジツツジ	TOS1	愛媛県	白色
タイワンヤマツツジ	SIM1	鹿児島県奄美大島	朱色
ウンゼンツツジ	SER1	和歌山県御坊市	淡紫色
モチツツジ	MAC1	京都府京都市	赤紫色
	MAC2	不明	赤紫色
キシツツジ	RIP1	高知県四万十川	白色
	RIP2	島根県匹見市	薄紫色
	RIP3	山口県	薄紫色
チョウセンヤマツツジ	YED1	長崎県対馬	薄紫色
ケラマツツジ	SCA1	沖縄県東村	濃朱赤色
サキシマツツジ	AMA1	沖縄県西表島	濃朱赤色
サツキ	IND1	和歌山県古座川	朱赤色
マルバサツキ	ERI1	鹿児島県屋久島	白色
	ERI2	鹿児島県屋久島	白色
コメツツジ	TSC1	群馬県赤城山	白色
キレンゲツツジ	JAP1~9	大分県清田川	黄色

管理した。

播種から2年後に生存実生数を算定した。実生の雑種性の判別は KOBAYASHI ら (1996) の示した交雑実生の葉の毛じの特性に基づき、向軸側に白色の開出毛が密生している個体をキレンゲツツジとの交雑実生とし、それ以外の個体は各調査項目の算定から除外した。

花柱の長さおよび柱頭の面積と花柱内の花粉管数との関係を明らかにするため、供試した常緑性ツツジの雌ずいを受粉適日に1個体当たり5本採取し、花柱長と、実体顕微鏡下で柱頭の長径および短径の計測を行った。

2) 結果および考察

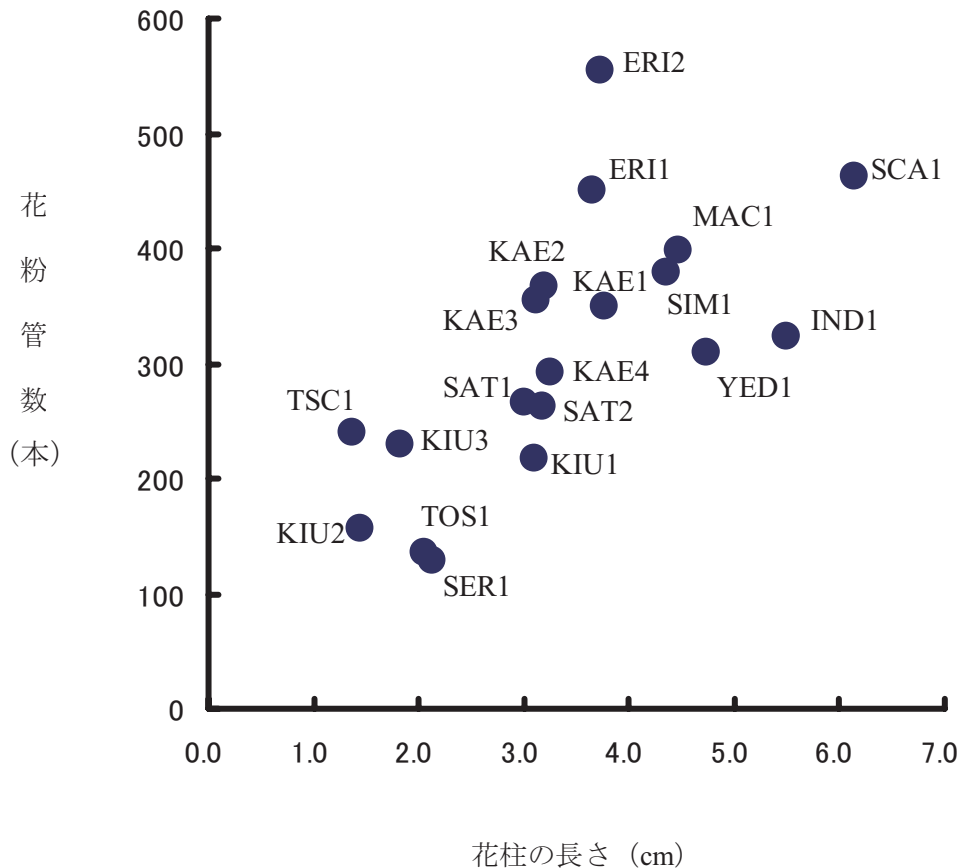
(1) 種子親に用いた常緑性ツツジ野生種の交雑隔離

機構

キシツツジを種子親に用いた交雑を除き、実施したすべての交雑組合せで、多くの花粉管が花柱に貫入していた。花柱基部の花粉管数は100本以上であった(第22表)。このとき、花柱が長い種・個体や柱頭面積が広い種・個体では花粉管数が多かった(第13および14図)。キシツツジを除き、花粉管数/胚珠数(P/O率)は20.7(AMA2)~63.6%(SER1)の範囲、TSC1では202.5%であり(第22表)、多くの組合せで対照区よりも値が低かった。TSC1では1花当たりの胚珠数がごく少ないためP/O率が著しく高かった。キシツツジでは3個体とも花粉管の伸長が完全に阻害されていた。URESHINO ら(2000)はキレンゲツツジ花粉管が先端異常を示すことにより伸長が停止することを認め、その程度が用いた種子

第22表 供試したヤマツツジ節野生種各個体の胚珠数およびキレンゲツツジ花粉を交雑したときの花柱基部の花粉管数および花粉管貫入がみられた胚珠率

種子親	胚珠数	花粉管数 (本)	花粉管数/	花粉管貫入
			胚珠数 (%)	がみられた 胚珠率 (%)
KAE1	593.3	348.7	58.8	4.6
KAE2	965.3	367.0	38.0	13.1
KAE3	797.3	355.0	44.5	15.0
KAE4	919.3	293.0	31.9	12.6
KIU1	453.0	216.7	47.8	3.7
KIU2	355.0	156.0	43.9	7.3
KIU3	434.3	230.0	53.0	22.3
SAT1	825.0	266.3	32.3	0.9
SAT2	969.0	263.0	27.1	6.1
TOS1	419.7	135.5	32.3	5.6
SIM1	815.0	379.5	46.6	32.8
SER1	202.7	129.0	63.6	15.8
MAC1	736.3	398.0	54.1	56.5
MAC2	1507.0	304.0	20.2	29.1
RIP1	1406.3	6.0	0.4	0.3
RIP2	1708.3	3.5	0.2	0.0
RIP3	1586.7	5.6	0.4	0.0
YED1	587.0	310.0	52.8	42.9
SCA1	1854.3	463.0	25.0	9.9
AMA1	1627.3	336.7	20.7	15.4
IND1	865.3	323.5	33.5	15.3
ERI1	1153.0	450.5	39.1	18.6
ERI2	1436.7	555.0	38.6	39.1
TSC1	118.3	239.5	202.5	18.4
JAP7	569.0	358.3	63.0	67.0



第 13 図 種子親に用いたヤマツツジ節野生種各個体の花柱の長さ
とキレンゲツツジ花粉を交雑したときの花柱基部の
花粉管数との関係
個体番号については第 21 表参照。

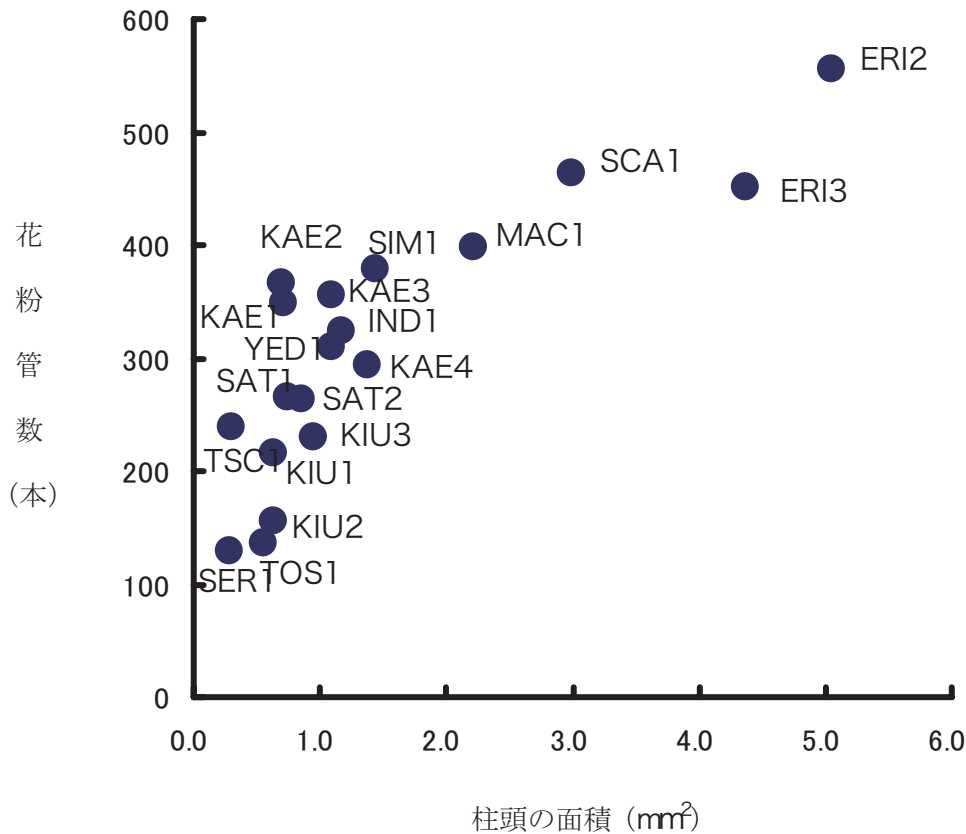
親で異なることを示した。本試験でも花粉管の先端異常が少数認められた。花粉親に用いたキレンゲツツジ個体の花粉稔性は 84.8%であったことから、P/O 率が低い原因として花粉管の伸長阻害による場合と、受粉した花粉量による場合が考えられた。

交雑 10 日後、花粉管が織形装置に貫入し、肥大し始めた胚珠が観察された。キシツツジを除き、花粉管の貫入がみられた胚珠率は 0.9 (SAT1) ~ 56.5% (MAC1) の範囲にあった (第 22 表)。ERI2, MAC1 および MAC2 を除き、この率は P/O 率よりも低かった。対照区では花粉管の貫入がみられた胚珠率が P/O 率と同等であったことから、花柱から胚珠に至る過程での花粉管の伸長阻害および胚珠への貫入阻害が受精前の交雑隔離障壁として考えられた。

結果率はウンゼンツツジおよびキシツツジを用

いた組合せを除き 80% 以上と高かった (第 23 表)。成熟種子数/果は 4.8 (KAE1) ~ 333.4 個 (ERI2) の範囲にあり、個体間で変異が大きかった (第 23 表)。本試験と同様なツツジ類の遠縁交雑を行ったとき、さく果が種子の有無に関係なく得られることが報告されている (CREECH, 1955)。これらのことから、結果率は交雑不和合性の評価には適さないと考えられた。

1 果当たりの成熟種子数の上限は胚珠数によって決定されるが、1 花当たり胚珠数は種子親によって大きく異なっていた (第 22 表)。このため、成熟種子数/胚珠数 (結実率) を用いて種子形成力を評価した。ウンゼンツツジおよびキシツツジを用いた組合せを除き、結実率は 0.8 (KAE1) ~ 44.5% (YED1) の範囲にあり (第 23 表)、多くの組合せで結実率は花粉管の貫入がみられた胚珠率よりも低い値を示し



第14図 種子親に用いたヤマツツジ節野生種各個体の柱頭面積とキレンゲツツジ花粉を交雑したときの花柱基部の花粉管数との関係
個体番号については第21表参照。

た。対照区では同等であったことから、受精失敗および受精後の胚珠の発育停止が交雑隔離障壁として考えられた。

発芽率は0 (KAE3, TSC1) ~ 86.6% (MAC1)の範囲にあった(第24表)。MAC1を除き、すべての組合せで対照区よりも値が低く、発芽不能が交雑隔離障壁として考えられた。

実生の子葉色には緑、黄緑、淡緑および白色と斑入りが認められた。黄緑色の子葉に関してはNOGUCHI (1932) および URESHINO ら (1998) の報告にはみられないが、本試験では多くの組合せで観察された。斑入りについて、緑、黄緑、淡緑および白色からなるいくつかのパターンが認められたが、その詳細については記録しなかった。NOGUCHI (1932) は常緑性ツツジとキレンゲツツジとの交雑において、子葉色の変異が葉緑素の形成阻害によって起こるとした。緑色実生率は0~69.2% (SAT1) の範囲(第

24表)、対照区では98.6%であったことから、葉緑素の形成阻害が受精後の交雑隔離障壁の一つと考えられた。実生の生存に関して、白子は子葉展開後に成長が停止し、発芽から数週間で枯死した。その他の実生については淡緑色の子葉をもつ個体を中心に2枚目の本葉が展開中に成長が停止するもの、夏季に枯死するものが顕著に観察された。この結果、発芽実生が得られた18組合せ中、10組合せでは播種2年後に生存実生が得られなかった。生存実生が得られた8組合せについて、発芽実生から白子を除いた個体数に対する生存実生の割合(生存率)は0.7 (SCA1) ~ 71.3% (MAC1) であった(第24表)。対照区の生存率は96.3%と高かったことから、実生の夭折が受精後の交雑隔離障壁の一つと考えられた。

交雑花当たりの生存実生数(交雑能力)は0~18.4個体/花(MAC1)と、対照区と比較して著しく少なかった(第24表)。このような中、ERI1,

第23表 ヤマツツジ節野生種×キレンゲツツジにおける結果率、成熟種子数および結実率

種子親	交雑花数	結果率 (%)	成熟種子数 ／果	成熟種子数 ／胚珠数 (%)
KAE1	10	80.0	4.8	0.8
KAE2	11	100.0	50.2	5.2
KAE3	10	100.0	16.4	2.1
KAE4	10	90.0	178.2	19.4
KIU1	12	83.3	17.6	3.9
KIU2	13	92.3	16.0	4.5
KIU3	10	100.0	116.0	26.7
SAT1	10	100.0	17.0	2.1
SAT2	10	100.0	58.4	6.0
TOS1	13	92.3	24.4	5.8
SIM1	12	100.0	219.2	26.9
SER1	11	0.0	-	-
MAC1	10	100.0	29.8	4.0
MAC2	12	100.0	61.7	4.1
RIP1	12	0.0	-	-
RIP2	10	0.0	-	-
RIP3	10	0.0	-	-
YED1	10	100.0	261.0	44.5
SCA1	10	90.0	121.6	6.6
AMA1	10	100.0	39.8	24.5
IND1	10	100.0	91.6	10.6
ERI1	10	100.0	144.5	12.5
ERI2	10	100.0	333.4	23.2
TSC1	11	81.8	23.4	19.8
JAP7	10	100.0	285.5	50.2

ERI2, KIU3 および MAC1 を用いた場合は10個体／花以上の生存実生が得られた。

(2) 交雑隔離に対する花粉親に用いたキレンゲツツジの個体間差異

花粉親に用いたキレンゲツツジ9個体の交雑隔離に関わる形質および交雑能力を調査した結果、花粉管の貫入がみられた胚珠率、成熟種子数／果、白子率、生存率および交雑能力に有意な差が認められた(第25表)。個体間差異について第26表に示した。花粉管の貫入がみられた胚珠率は30.4～61.1%の範囲にあり、JAP3はJAP1, JAP8およびJAP9を用いた場合よりも高かった。結果率はすべての組合せで90%以上であった(データ未掲載)。成熟種子数／果は301.4～557.4個の範囲にあり、JAP2およびJAP3ではJAP1およびJAP9を用いた場合よりも多かった。発芽率は9.3～37.6%の範囲にあった。実生の子葉色には、緑、黄緑、淡緑および白色が観察

された。白子率は5.5～18.5%の範囲にあり、JAP4, JAP8およびJAP9ではJAP1およびJAP3を用いたときよりも低かった。生存率は0～20.8%、交雑能力は0～7.3個体／花の範囲にあった。GUERITAINEら(2003)はアブラナ品種と*Raphanus raphanistrum* L.との交雑において、あるアブラナ品種との受精率が最も高い*R. raphanistrum*(花粉親)は他のアブラナ品種とも受精が可能であったとした。本試験では、生存実生が得られた組合せが限られていたため、生存率および交雑能力について花粉親間での統計学的な比較はできなかったものの、JAP1およびJAP4を花粉親に用いたとき、他個体よりも明らかに多くの生存実生が得られたことから、これら2個体を常緑性ツツジとの交雑能力に優れた花粉親として選定した。

第24表 ヤマツツジ節野生種×キレンゲツツジにおける発芽率、子葉色別の実生の出現率、生存率および交雑能力

種子親	播種数	発芽率 (%)	子葉色別実生出現率 (%)					生存率 ^a (%)	交雑能力 ^b (個体/花)
			緑	黄緑	淡緑	白, 黄	斑入り		
KAE1	19	10.5	0.0	0.0	50.0	50.0	0.0	0.0	0.0
KAE2	198	20.2	35.0	12.5	50.0	2.5	0.0	0.0	0.0
KAE3	135	0.0	-	-	-	-	-	-	0.0
KAE4	891	7.9	1.4	1.4	78.6	18.6	0.0	0.0	0.0
KIU1	88	45.5	0.0	2.5	52.5	45.0	0.0	0.0	0.0
KIU2	80	28.8	21.7	60.9	0.0	13.0	4.3	0.0	0.0
KIU3	580	59.1	67.1	2.0	4.1	17.5	9.3	23.0	13.0
SAT1	85	30.6	69.2	0.0	11.5	19.2	0.0	57.1	2.4
SAT2	292	16.8	0.0	0.0	46.9	53.1	0.0	0.0	0.0
TOS1	122	13.1	6.2	50.0	0.0	43.8	0.0	0.0	0.0
SIM1	472	34.5	0.0	1.2	90.2	8.6	0.0	0.0	0.0
MAC1	149	86.6	20.2	75.2	4.7	0.0	0.0	71.3	18.4
MAC2	370	50.5	0.0	61.5	33.2	3.7	1.6	7.2	2.2
YED1	251	68.1	4.1	5.3	77.2	12.9	0.6	0.0	0.0
SCA1	608	25.2	0.0	43.8	54.2	2.0	0.0	0.7	0.2
AMA1	214	15.9	8.8	14.7	64.7	11.8	0.0	0.0	0.0
IND1	458	15.7	16.7	34.7	31.9	16.7	0.0	8.3	1.0
ERI1	578	40.8	28.8	29.7	25.4	16.1	0.0	22.7	11.3
ERI2	308	23.7	15.1	27.4	34.3	23.3	0.0	17.9	10.8
TSC1	117	0.0	-	-	-	-	-	-	0.0
JAP7	402	88.1	98.6	0.0	0.0	1.4	0.0	96.3	168.0

a 播種2年後の生存実生数/発芽実生から白子を除いた実生数。

b 播種2年後の生存実生数/交雑した花数。

第25表 キレンゲツツジ9個体を花粉親に用いたマルバサツキとの交雑における交雑隔離障壁に関わる形質および交雑能力の花粉親間の差異

形質	統計分析法	F比	χ^2 値
花粉管の貫入が みられた胚珠率	分散分析	6.276 *** ^a	-
成熟種子数/果 ^b	分散分析	4.749 ***	-
発芽率	分散分析	2.305 NS	-
白子率	分散分析	5.818 **	-
生存率 ^c	Kruskal-wallis 分析	-	19.588 *
交雑能力 ^c	Kruskal-wallis 分析	-	25.130 **

a *, **, *** および NS はそれぞれ 5%, 1%, 0.1% レベルで有意差ありおよび有意差なしを示す。

b 対数変換。

c 第24表参照。

第 26 表 キレンゲツツジ 9 個体を花粉親に用いたマルバサツキとの交雑における花粉管貫入がみられた胚珠率、成熟種子数/果、発芽率、白子率、生存率および交雑能力

花粉親	花粉管貫入が みられた胚珠率 (%)	成熟種子数 /果	発芽率 (%)	白子率 (%)	生存率 ^a (%)	交雑能力 ^a
JAP1	39.1 bc ^b	333.4 bc	24.9	17.7 a	20.8	7.3
JAP2	49.9 ab	538.0 a	10.3	15.0 ab	0.0	0
JAP3	61.1 a	557.4 a	31.0	18.5 a	0.0	0
JAP4	54.7 ab	413.8 abc	16.8	7.1 b	10.7	5.6
JAP5	48.3 abc	492.0 ab	9.3	16.0 ab	0.0	0
JAP6	53.9 ab	380.6 abc	26.1	9.4 ab	5.4	0.5
JAP7	44.5 abc	361.0 abc	37.6	14.2 ab	0.8	0.7
JAP8	41.3 bc	391.0 abc	14.6	5.5 b	0.0	0
JAP9	30.4 c	301.4 c	22.9	7.5 b	1.9	0.9

a 第 24 表参照。

b Tukey-Kramer 法により異なる文字間に 5% レベルの有意差がある。

2. クルメツツジにおける交雑能力の品種間差

第 1 節で実施した交雑組合せ中には生存実生が比較的多く得られる場合があり、キレンゲツツジとの交雑能力に優れた常緑性ツツジを選定することが、常緑性黄花ツツジを作出するための重要な作業であることが示唆された。

本節では、中小輪系の常緑性黄花ツツジの作出を目的とした交雑育種におけるクルメツツジの種子親としての有用性を明らかにするため、交雑隔離障壁の調査、交雑能力に影響を与える因子の特定、および生存実生が得られる種子親の遺伝的特性を調査する。

1) 材料および方法

第 II 章で供試したクルメツツジ 58 品種中、子房の入り口部分にくびれがあるため、花粉管が胚珠へ貫入することができず、種子ができない性質をもつ hose-in-hose 咲き (国重, 1976) の 16 品種および十分な交雑花数が得られなかった 3 品種を除く 39 品種を種子親として供試した。

キレンゲツツジ JAP1 を花粉親に用いた。花粉の調整は第 1 節と同様とした。4 月中～下旬にかけて種子親 1 品種につき 13 花に対して交雑を行った。

胚珠への花粉管の貫入調査、種子の調整、播種、

発芽実生の調査、子葉色の調査および生存実生の調査を第 1 節と同様に行った。

調査した各形質の正規性を Shapiro-Wilk 法を用いて検定し、正規性が認められなかった場合は変数変換を行った。交雑能力と交雑隔離に関わる形質との関係を明らかにするため、生存実生が得られた組合せについて、各形質間の相関関係の有無を確認し、重回帰分析の変数選択に用いられるステップワイズ法 (選択基準の P 値は追加、除去ともに 0.25) および Bayes プロットによる要因のスクリーニングを行った。このとき目的変数としては、種子親に用いた各品種の子房中の胚珠数が異なっていたため、交雑花当たりの生存実生数ではなく、交雑花当たりの生存実生数/子房当たりの胚珠数を用いた。また、モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有するクルメツツジ品種とそうでない品種の 2 集団間における交雑能力および交雑隔離に関わる各形質の差の有無について、第 II 章で明らかにした葉の背軸側表皮面の形態的特性から供試したクルメツツジ 39 品種を 2 グループに類別し、Wilcoxon-Mann-Whitney 法を用いて有意差検定を行った。

2) 結果および考察

キレンゲツツジの花粉管は交雑 5 日後にクルメ

ツツジの花柱基部において多数観察された。交雑10日後の観察では胚珠への花粉管の貫入が認められ、交雑13日後には受精に伴う胚珠の発達を観察された。花粉管の貫入がみられた胚珠率は2.9～53.5%の範囲にあった(第27表)。1果当たりの成

熟種子数は1.2～271.4個と組合せにより著しく異なった(第27表)。受精から種子形成に至る過程での交雑隔離障壁の評価に関して、第1節では結実率を用いた。この方法で得られる値は受精前の花粉管行動、受精および受精後の胚珠の発達を合わせた総

第27表 クルメツツジ×キレンゲツツジにおける子房当たりの胚珠数、花粉管の貫入がみられた胚珠率および成熟種子数

種子親	胚珠数	花粉管貫入がみられた胚珠率 (%)	成熟種子数/果	成熟種子数/受精胚珠数の推定値 ^a (%)
総角	1006	6.6	43.0	64.4
筆捨山	1133	3.7	26.0	61.5
呉服	852	53.5	261.0	57.2
御所桜	906	17.1	141.0	91.2
花筏	989	33.5	260.0	78.4
初音	1149	12.6	83.0	57.3
今岡	839	23.6	199.0	100.3
稲妻	848	27.1	174.0	75.5
郭公	788	7.9	51.0	81.9
桐壺	646	14.8	44.0	45.6
古金欄	875	24.1	206.0	99.7
小式部	612	2.9	17.0	97.0
雲切	912	16.1	105.0	71.2
窓の月	1153	21.4	118.0	47.6
松の雪	924	23.8	111.0	50.7
簾の内	936	7.5	69.0	97.7
都紋り	918	9.8	67.0	74.9
乙女	854	11.3	35.0	36.7
乱曲	948	21.1	147.0	73.8
桜小町	769	25.7	200.0	101.2
早乙女	824	9.5	71.0	90.3
勢多の入日	733	5.0	1.0	3.2
石橋	869	33.1	196.0	68.1
式部桜	828	21.9	161.0	88.7
東雲	869	17.2	68.0	45.8
白妙	794	21.5	153.0	89.4
裾濃の糸	970	27.1	150.0	57.2
誰ヶ袖	682	22.4	151.0	99.0
高蒔絵	998	29.3	176.0	60.1
玉芙蓉	590	31.2	115.0	62.4
玉の台	1036	8.1	83.0	99.4
玉縁り	1080	27.6	139.0	46.8
照君	792	27.8	84.0	38.2
通天	800	35.0	271.0	96.9
浮む瀬	1096	33.3	178.0	48.7
薄縁り	1181	7.6	70.0	78.2
若楓	1035	18.7	160.0	82.9
大和錦	845	18.3	153.0	99.2
萬代	801	20.7	154.0	92.8

a 受精胚珠数の推定値 = 胚珠数 × 花粉管貫入がみられた胚珠率 × 0.01。

合的な評価値であるため、花粉管の貫入がみられた胚珠率との独立性が保たれていない。そこで、子房に形成された胚珠数と花粉管の貫入がみられた胚珠率の値に基づき、受精可能な胚珠数を推定し、その値に対する種子形成率（1果当たりの完熟種子数／胚珠数×花粉管貫入がみられた胚珠率×0.01）を

求めたところ、3.2～101.2%の範囲にあった（第27表）。結果率は70～100%で、39組合せ中33組合せが100%と高かった（データ未掲載）。発芽率は2.1～59.3%と、すべての組合せで低い値を示した（第28表）。実生の子葉色には、緑、黄緑、淡緑および白色と、一部の組合せで斑入りがみられた。斑入り

第28表 クルメツツジ×キレンゲツツジにおける発芽率、白子率、生存率および交雑能力

種子親	発芽率 (%)	白子率 (%)	生存率 ^a (%)	交雑能力 ^a (個体/花)
総角	50.5	0.9	0.0	0.0
筆捨山	52.7	2.1	0.0	0.0
呉服(+) ^b	23.8	19.3	46.2	23.2
御所桜	28.2	58.8	0.0	0.0
花筏(+)	2.1	0.0	0.0	0.0
初音	2.2	0.0	0.0	0.0
今岡	23.3	7.9	9.5	4.4
稲妻	18.0	14.9	11.2	3.2
郭公	8.6	0.0	0.0	0.0
桐壺	53.2	9.5	9.5	2.0
古金襴	10.2	46.6	19.0	2.4
小式部	52.3	6.7	0.0	0.0
雲切	25.0	6.9	0.0	0.0
窓の月	15.5	28.6	0.0	0.0
松の雪(+)	42.7	8.4	0.0	0.0
簾の内	29.7	19.6	0.0	0.0
都絞	16.6	0.0	0.0	0.0
乙女(+)	27.1	20.8	26.3	2.0
乱曲(+)	22.1	11.7	22.2	6.4
桜小町(+)	24.6	12.2	0.0	0.0
早乙女(+)	16.8	79.1	0.0	0.0
勢多の入日(+)	25.0	0.0	0.0	0.0
石橋	38.0	15.6	0.0	0.0
式部桜	32.8	89.4	0.0	0.0
東雲	17.0	43.1	0.0	0.0
白妙(+)	18.6	7.7	0.8	0.2
裾濃の糸	26.7	13.0	0.0	0.0
誰ヶ袖(+)	39.3	99.0	0.0	0.0
高蒔絵(+)	3.8	36.4	0.0	0.0
玉芙蓉	22.8	71.8	0.0	0.0
玉の台(+)	29.7	9.7	11.6	2.6
玉縁	26.5	1.6	0.0	0.0
照君	34.8	24.7	0.0	0.0
通天(+)	59.3	27.1	2.9	3.4
浮む瀬	20.5	9.9	0.0	0.0
薄縁	45.9	6.8	0.7	0.2
若楓(+)	18.6	10.1	38.1	10.2
大和錦(+)	18.4	2.8	0.0	0.0
萬代(+)	24.3	35.8	41.7	10.0

a 第24表参照。

b モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種。（第6表参照）。

については、主色をその実生の子葉色とし算定した。白子の出現率は0～99.0%と組合せにより著しく異なった(第28表)。

播種から2年後の生存率は26組合せで0%であった。残り13組合せからは生存能力のある実生が得られ、最大で46.2%の値を示した(第28表)。交雑能力は0～23.2個体/花の範囲にあり、11組合せで1個体以上の実生が得られた。特に‘呉服’、‘萬代’および‘若楓’を用いた3組合せからは10個体/花以上の生存実生が得られた(第28表)。

実生が得られた13組合せについて、交雑能力に対する各交雑隔離障壁の影響の程度を評価した。交雑隔離に関わる各形質間の相関係数は最大でも-0.389と低く相関関係は認められなかった(第29表)。次に交雑花当たりの生存可能な実生数/子房当たりの胚珠数(交雑能力/胚珠数)と交雑隔離障壁に関わる形質間との相関については、生存率との間に正の相関関係($r = 0.769$)が認められた(第29表)。ステップワイズ法では、花粉管の貫入がみられた胚珠率および生存率が採択された(第30表)。採択された2変数を説明変数としたとき重回帰分析における R^2 値(寄与率)は0.68、自由度調整 R^2 値

(実質的な寄与率)は0.62であった(データ未掲載)。Bayesプロット値は花粉管の貫入がみられた胚珠率が0.311、生存率が0.320と、残りの3因子よりも顕著に高かった(第31表)。これらの結果から、花粉管の貫入がみられた胚珠率および生存率が交雑能力に強く影響すると考えられた。特に、生存率は交雑能力/胚珠数との間に正の相関が認められたことから、白子以外の実生の生存が交雑能力に最も強い影響を与える因子と考えられた。

第II章でクルメツツジ品種中にモチツツジ、あるいはキシツツジの遺伝的影響を受けた品種が存在することを示唆した。本節の試験では、生存実生が得られた13組合せ中8組合せの種子親がモチツツジおよびキシツツジにみられる葉面形態特性を有する品種であった。さらに、交雑能力が10個体/花以上を示した3組合せすべての種子親がそのような品種であった。そこで種子親に用いた品種に対して、葉の背軸側表皮面がモチツツジおよびキシツツジと同じ形態的特性を有することと交雑能力との関係を検討した。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種を種子親とした組合せでは、そうでない品種を用いた組合せに比べて有意に

第29表 生存実生が得られたクルメツツジ×キレンゲツツジ13組合せにおける交雑隔離障壁に関わる形質および交雑能力間の相関関係

形質	1	2	3	4	5
1. 花粉管の貫入がみられた胚珠率	-	-0.002	-0.143	-0.331	0.381
2. 成熟種子数/受精胚珠数の推定値	-	-	-0.261	-0.159	-0.254
3. 発芽率 ^a	-	-	-	0.315	-0.356
4. 白子以外の実生の出現率 ^b	-	-	-	-	-0.389
5. 生存実生数/白子以外の実生数	-	-	-	-	-
6. 交雑花当たりの生存実生数/子房当たりの胚珠数 ^a	0.567	-0.084	-0.173	-0.381	0.769** ^c

a 対数変換。

b 逆正弦変換。

c **は相関係数の有意差検定において1%レベルで有意差あり。

多くの生存実生が得られた ($Z = 2.059$, $P < 0.05$; 第 32 表)。また、交雑隔離に関わる各形質に関しては、先に交雑能力に強く影響を与えると考えられた生存率が、モチツツジおよびキシツツジの葉面形態特性を有する品種を用いた組合せで有意に高かった ($Z = 2.374$, $P < 0.05$; 第 32 表)。これらの結果から、モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種中にはキレンゲツツジとの交雑能力に優れたものが存在し、そのようなクルメツツジ品種を種子親に用いることで生存可能な実生を得る可能性

を高めることができると考えられた。

赤羽 (1971) および酒井ら (2004) は種子親に 4 倍体サツキ品種を用いると、白子の出現を回避することができ、子葉が緑色の実生の割合が増加することを示した。本試験に供試したクルメツツジ品種はすべて二倍性であるため (岡本・池田, 2005), 倍数性が交雑能力に影響を及ぼすことはなかったと考えられた。

第 30 表 生存実生が得られたクルメツツジ×キレンゲツツジ 13 組合せにおけるステップワイズ法による交雑能力に影響を与える要因の分析

形質	推定値	平方和	F比	P値
花粉管の貫入がみられた胚珠率	0.0162	0.3972	2.756	0.128
成熟種子数/受精胚珠数の推定値	-	0.0324	0.207	0.660
発芽率 ^a	-	0.0548	0.356	0.566
白子以外の実生の出現率 ^b	-	0.0029	0.018	0.895
生存実生数/白子以外の実生数	0.0255	1.6130	11.192	0.007
誤差	0.6815	0	0	1.0

選択基準の P 値は追加, 除去ともに 0.25。

a 対数変換。

b 逆正弦変換。

第31表 生存実生が得られたクルメツツジ×キレンゲツツジ
13組合せにおける Bayes プロットによる交雑能力に
影響を与える要因の分析

形質	推定値	事後確率
花粉管の貫入が みられた胚珠率	2.796	0.3107
成熟種子数/受精 胚珠数の推定値	-0.408	0.0259
発芽率 ^a	-0.585	0.0276
白子以外の実生の 出現率 ^b	-0.976	0.0348
生存実生数/白子以外 の実生数	2.830	0.3203

標本に不純物がないという事後確率：0.50。

a 対数変換。

b 逆正弦変換。

第32表 クルメツツジ39品種×キレンゲツツジにおける花粉管の
貫入がみられた胚珠率, 成熟種子数/受精胚珠数の推定値,
発芽率, 白子以外の実生の出現率, 生存率および交雑能力
に関する種子親の葉面形態特性の違いによる比較

形質	種子親の葉面形態 のタイプ ^a	合計スコア	Z値
花粉管の貫入がみられた 胚珠率	I	352	0.899 NS ^b
	II	428	
成熟種子数/受精胚珠数の 推定値	I	363	1.213 NS
	II	417	
発芽率	I	297	-0.642 NS
	II	483	
白子以外の実生の出現率	I	300	-0.072 NS
	II	480	
生存実生数/白子以外の実生数	I	397	2.374 *
	II	383	
交雑花当たりの生存実生数	I	381	2.059 *
	II	399	

a Iはモチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種 (n=16),
IIは有していない品種 (n=23)。第28表参照。

b *およびNSはWilcoxon-Mann-Whitney テストで, それぞれ5%レベルで有意
差ありおよび有意差なしを示す。

3. 受精および種子発達過程の組織学的観察

花粉管の貫入がみられる胚珠率が減ずる交雑不和合性以外の原因として、種々の植物種で種子親の胚のうの異常が報告されている（北島ら, 1993; MIYAJIMA, 2006; MURATA・MATSUDA, 2003; RALLOら, 1981）。クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑した場合の胚珠への花粉管の貫入に対する種子親の胚のうの影響を明らかにするため、胚のうの発達ステージおよび受粉適日の胚のうの異常について調査した。また、第1および2節で行った交雑隔離障壁に関する調査では、受精から種子形成に至る過程での胚珠退化についてその詳細は不明であった。そこで、花粉管が胚珠に貫入した後、成熟種子に至るまでの胚珠の発達過程を組織学的手法を用いて調査した。

1) 材料および方法

胚のうの発達ステージおよび受粉適日の胚のうの異常を調査するため、第2節の結果から、花粉管の貫入がみられた胚珠率が最も高かった‘呉服’、白花品種中で交雑能力に優れた‘萬代’およびこれら2品種とは異なりモチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有していない‘窓の月’を供試した。開花日および受粉適日に子房を各品種から3個採取し、FAAで固定後、70%エタノール中に室温で保存した。

花粉管の伸長および受精から種子形成に至る過程での胚珠退化を調査するため、‘萬代’および‘窓の月’にキレンゲツツジおよびクルメツツジ‘若楓’（対照区）の花粉を交雑した。花柱内の花粉管伸長を観察するため、交雑2, 3および4日後に雌ずいを各組合せ3本採取し、FAAで固定後、70%エタノール中に室温で保存した。受精後の胚のうおよび接合体を観察するため、交雑10, 20, 30, 40, 60および100日後に子房を各組合せから3個採取し、10, 20, 30および40日後の子房についてはFAA, 60および100日後の子房はFPA₅₀（ホルマリン：プロピオン酸：50%エタノール=5：5：90（v/v/v））で24時間固定後、70%エタノール中に室温で保存した。

花柱内の花粉管の観察は第1節と同様の方法で行った。胚のうおよび接合体の観察について、子房をn-ブタノールシリーズで脱水後、パラフィン包埋した。厚さ10 μm（交雑10, 20, 30および40

日後の試料）、または16～20 μm（交雑60および100日後の試料）の縦断および横断切片を回転式ミクロトームで作製し、1%酸性フクシンおよび0.2%ファストグリーンで二重染色した。プレパラートの観察は生物顕微鏡を用いた。胚のうの発達ステージはPALSERら（1989）、異常胚のうの分類は栽培カキの報告（北島ら, 1993）に従った。

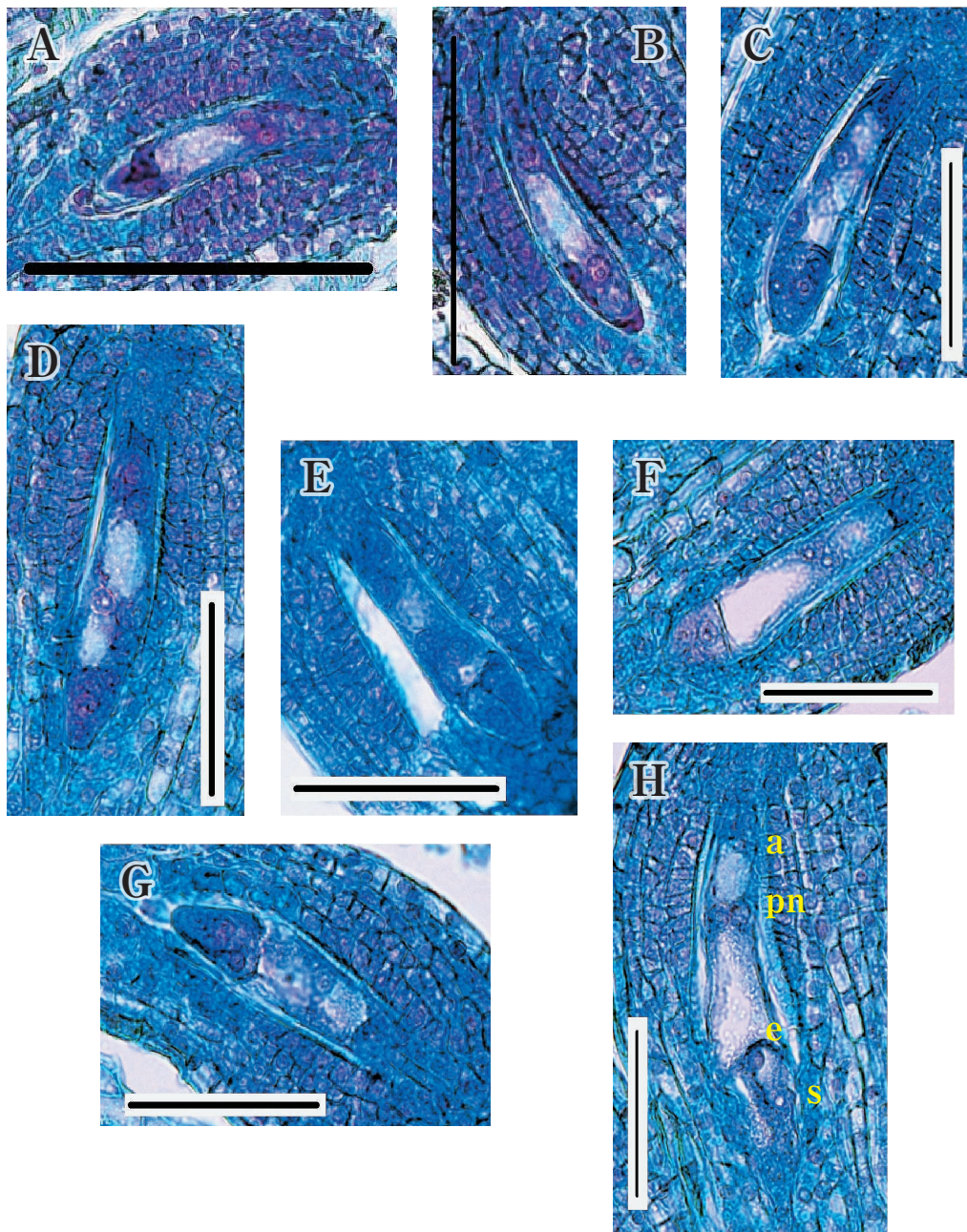
2) 結果および考察

(1) クルメツツジの胚のう形成

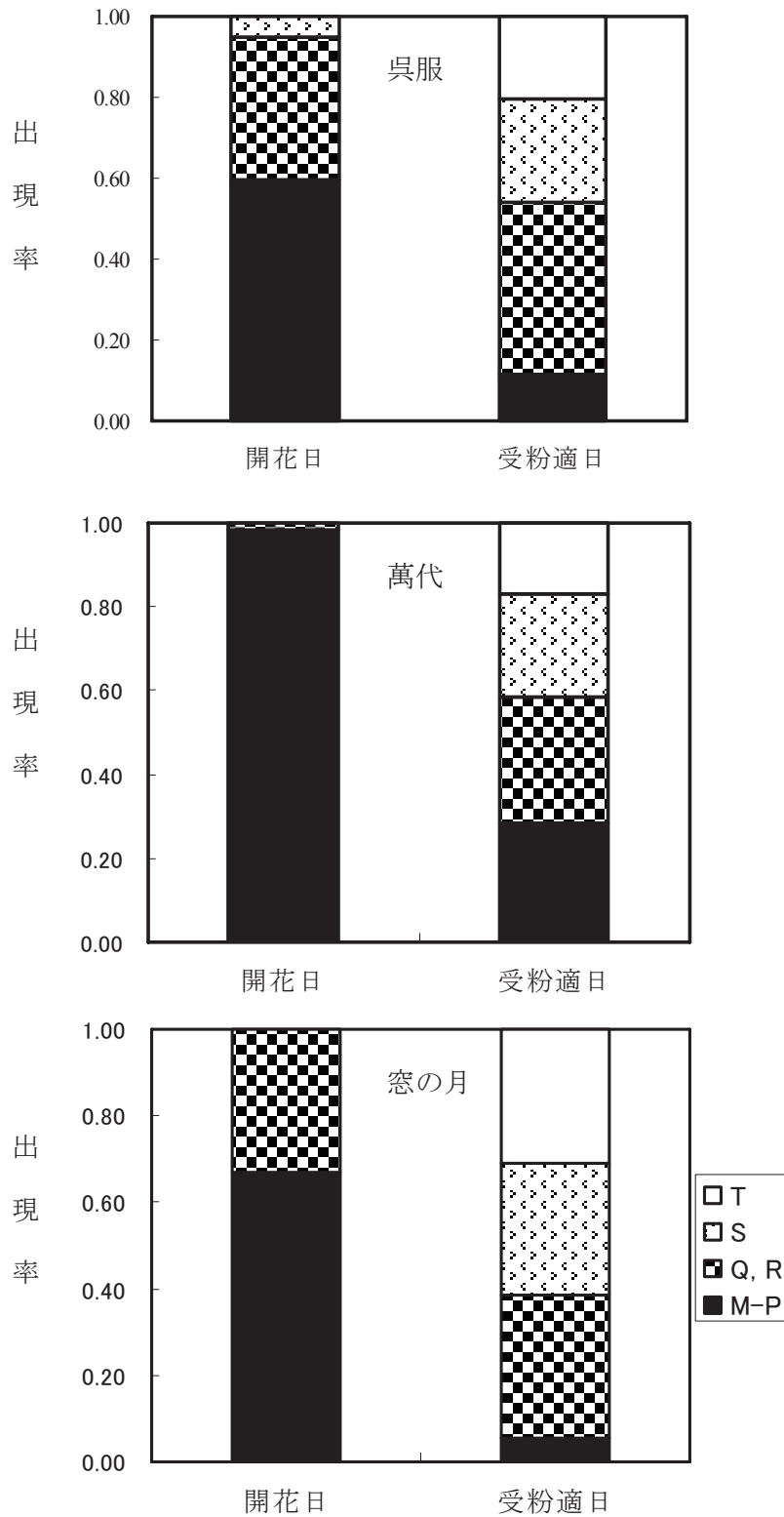
ツツジ属の胚のう形成から受精に至る過程については、KAULら（1986）およびPALSERら（1989）によって明らかにされている。WILLIAMSら（1982）は花粉発芽から受精までの間に生じた不受精の原因と、伸長停止した花粉管の形態異常を詳細に報告した。

クルメツツジの胚のうの発達過程を第15図に示した。クルメツツジの胚のう形成様式はPolygonum型で、被子植物の中で最も多く見られるタイプ（黒岩・黒岩, 2001）であった。胚のうは開花日にはM期（8核期）～S期（過完成移行期）、受粉適日にはO期（極早完成移行期）～T期（早完成期）にあり（第16図）、発達ステージは同一子房内で揃っていないかった。PALSERら（1989）は胚のう発達ステージが子房内の位置（胎座の上下、内外）で異なるとし、下部の外側付近が最も進行が早いとした。本試験では各部位ごとの観察数が少ないためか、そのような傾向は認められなかった（データ未掲載）。受精が可能な胚のうのステージは早完成期以降とされる（PALSERら, 1989）。受粉適日における‘呉服’、‘萬代’および‘窓の月’の早完成期以降の割合はそれぞれ20.2, 17.0および30.8%と、受粉適日の時点で多くの胚のうは受精することができない状態にあった。

クルメツツジ3品種の胚のうには減数分裂異常（第17図A）、核分裂異常（第17図B）および胚のう退化（第17図C）が認められた。正常胚のう率および各異常胚のうの出現率を第33表に示した。正常胚のう率には品種間差が認められ（ $F = 37.0$, $P < 0.001$ ）、‘萬代’および‘窓の月’で低かった。異常胚のうのタイプ別の出現率について、減数分裂異常は‘呉服’および‘萬代’、核分裂異常は‘萬代’および‘窓の月’で高かった。退化胚のうは各品種とも少なかった。‘呉服’、‘萬代’および‘窓の月’



第15図 クルメツツジ‘窓の月’の胚のうステージ
 A, M期(8核期); B, N期(8核期); C, O期(極早完成移行期); D, P期(早完成移行期); E, Q期(早完成移行期); F, R期(完成移行期); G, S期(過完成移行期); H, T期(早完成期)。a, 反足細胞; e, 卵細胞; pn, 極核; s, 助細胞。棒線は50 μ m。

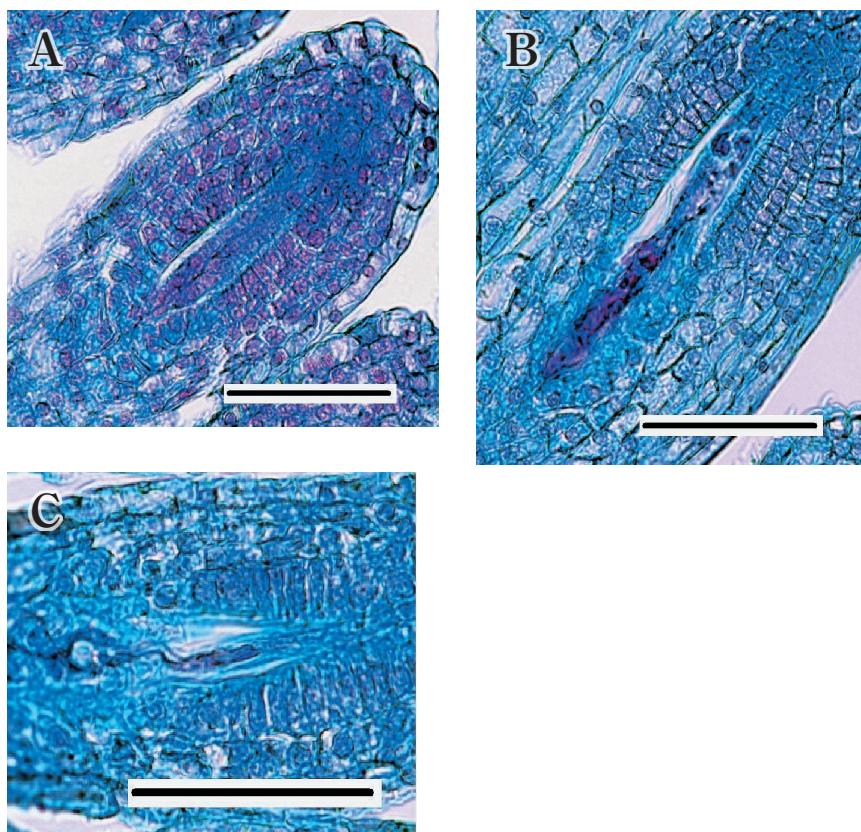


第 16 図 クルメツツジ 3 品種の開花日および受粉に適した日における各胚のうステージの出現率
Palser ら (1989) に従い、M ~ P 期、Q + R 期、S 期および T 期に区分し、出現率を示した。

の正常胚のう率はそれぞれ 70.5, 48.8 および 46.8% と、胚のう形成の異常が本交雑における低受精率の原因の一つと考えられた。

胚乳の遊離核分裂が認められた胚のうを受精とした。‘呉服’, ‘萬代’ および ‘窓の月’ に ‘若楓’

花粉を交雑したとき、受精率（交雑 20 日後調査）はそれぞれ 67.9, 46.6 および 45.3% と正常胚のう率と同等の値を示した（第 34 表）。‘若楓’ 花粉による交雑はクルメツツジ品種間の交雑であるため、交雑隔離障壁は存在せず、ほとんどの正常胚のうで重



第 17 図 クルメツツジ ‘窓の月’ の異常胚のう
A, 減数分裂異常；B, 核分裂異常；C, 胚のう退化。
棒線は 50 μ m。

第 33 表 クルメツツジ 3 品種の正常胚のう率および各異常胚のう率

品種	調査数	正常胚のう率 ^a (%)	核分裂異常率 (%)	減数分裂異常率 (%)	胚のう退化率 (%)
呉服	683	70.5a	7.0	21.2	1.3
萬代	752	48.8b	30.1	20.7	0.4
窓の月	610	46.8b	48.1	4.4	0.7

a Tukey-Kramer 法により異なる文字間に 5% レベルの有意差あり。

複受精が行われていたとみられた。以上から、生物顕微鏡による観察から正常胚のうと判断したものが受精能力をもつ正常な胚のうであること、受粉適日における胚のう未完成が受精に影響しないことが確認された。

(2) クルメツツジ×キレンゲツツジにおける受精から種子形成に至る過程での胚珠退化

種間交雑における受精後の成熟種子に至る過程での胚珠退化に関する報告は多くの植物種でみられ、接合体の退化 (EBADI ら, 1996; SUPUTTITADA ら, 2000), 胚柄の異常 (CHEN・ADACHI; 1995), 接合体の発育遅延および異常と胚乳組織の不形成 (BARONE ら, 1992; DE JEU・CALDERE, 1997), 胚乳組織の不形成 (KWACK・FUJIEDA, 1987; MARTA ら, 2004; RAJESWARI・RAMASWAMY, 2004; 李 ら, 2000) および胚乳の退化および内珠皮の増殖 (BARBANO・TOPOLESKI, 1984; CHEN・ADACHI, 1992) と、その原因は様々である。

交雑 20 日後、胚のうが正常である‘萬代’および‘窓の月’の胚珠に対してキレンゲツツジ花粉を交雑した場合の受精失敗率はそれぞれ 5.1 および 36.0% と、‘若楓’花粉 (対照区) を交雑したとき

の値 (それぞれ 0.8 および 5.1%) よりも大きかった (第 35 表)。胚乳の遊離核分裂は観察されるが、受精卵が退化し始め、胚珠の肥大が認められないものを受精直後の退化とした。受精直後の退化胚珠率はそれぞれ 27.3 および 13.4% と、対照区のそれぞれ 1.6 および 0% よりも高率であった (第 35 表)。胚珠の大きさが不受精に比べて大きい、胚のう内の構造物が崩壊し、萎縮した状態の胚珠を発育停止とした。発育停止した胚珠率はそれぞれ 3.9 および 0.3% と、対照区のそれぞれ 4.0 および 0.4% と同程度であった (第 35 表)。以上の結果、受精失敗および受精直後の胚珠退化が交雑隔離障壁の一つと考えられた。

KAUL ら (1986) は有鱗片シャクナゲ *Vireya* 節の種間交雑では、受精失敗よりも受精後の接合体および胚乳の退化が多いと報告している。本試験では、‘萬代’および‘窓の月’ともに正常に発達した胚珠率は交雑 20, 30 および 40 日後で大きく異ならず (第 36 表)、また、それらの値は第 2 節の試験データ (第 27 表) から求めた結実率と同程度の値を示した (‘萬代’×キレンゲツツジでは 19.2%, ‘窓の月’×キレンゲツツジでは 10.2%)。よって、生殖

第 34 表 クルメツツジ 3 品種にクルメツツジ‘若楓’花粉を交雑したときの受精率

品種	調査数	受精率 (%)
呉服	408	67.9
萬代	545	46.6
窓の月	944	45.3

第 35 表 クルメツツジ‘萬代’および‘窓の月’にキレンゲツツジおよびクルメツツジ‘若楓’の花粉を交雑したときの交雑 20 日後の受精失敗率、受精直後の退化胚珠率および発育停止した胚珠率

交雑組合せ	調査数	受精成功率 (%)	受精失敗率 (%)	受精直後の退化率 (%)	発育停止した胚珠率 (%)
萬代 ×キレンゲ	261	63.6	5.1	27.3	3.9
×若楓	291	93.6	0.8	1.6	4.0
窓の月 ×キレンゲ	206	50.3	36.0	13.4	0.3
×若楓	235	94.4	5.1	0	0.4

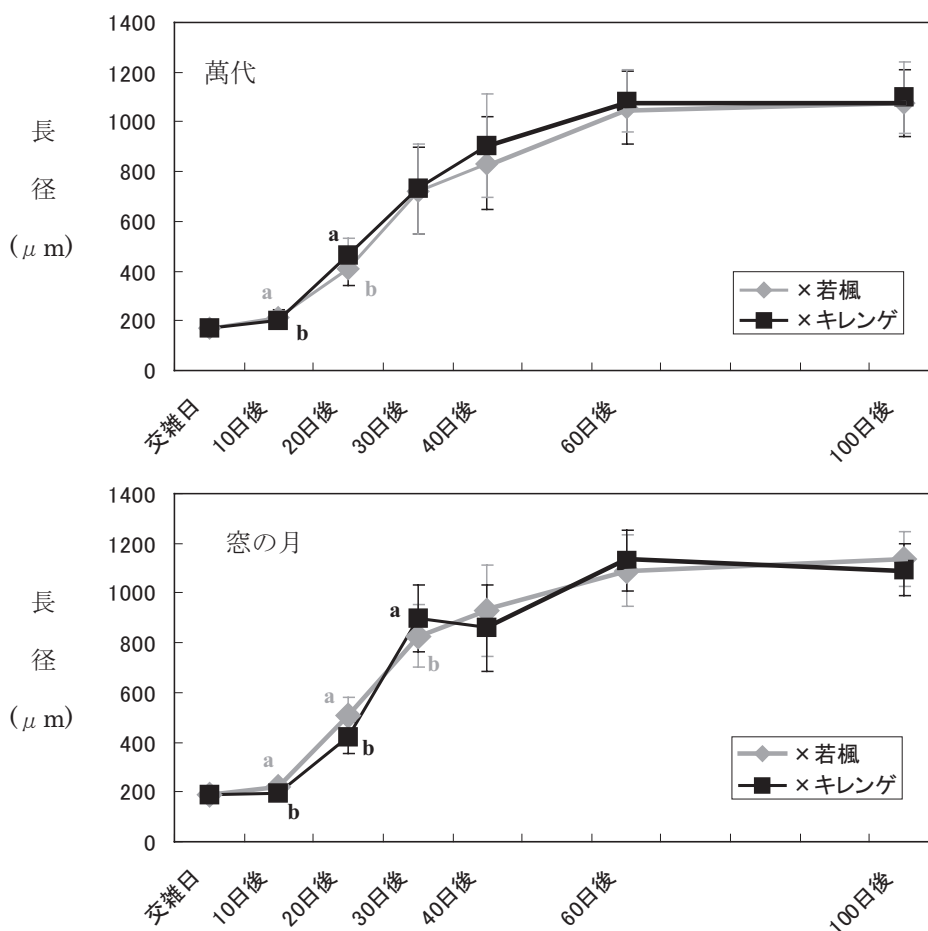
的隔離機構が原因で生じる受精直後を過ぎてからの胚珠退化はないと考えられた。

‘萬代’ および ‘窓の月’ にキレンゲツツジおよび ‘若楓’ 花粉を交雑したときの胚珠および接合体の成長を第18, 19 および 20 図に示した。キレンゲツツジ花粉を交雑した場合、胚珠の大きさは対照区と差はなかったが (第18図)、接合体の大きさは交雑20日後以後の調査で対照区よりも小さかった (第19図)。胚発生のステージについて、キレンゲツツ

ジ花粉を交雑した場合、交雑60日後に頂端細胞と基部細胞との区別ができる状態 (第20図E), 100日後に後期心臓型胚期～魚雷型胚期であった (第20図F)。一方、対照区では交雑30日後に頂端細胞と基部細胞との区別が明瞭となり (第20図I), 60日後には ‘萬代’ で球状胚期 (第20図K), ‘窓の月’ で心臓型胚期となり、100日後には両品種とも魚雷型胚期であった (第20図L)。以上の結果から、キレンゲツツジ花粉を交雑した場合、接合体の成長は

第36表 クルメツツジ ‘萬代’ および ‘窓の月’ にキレンゲツツジおよびクルメツツジ ‘若楓’ の花粉を交雑したときの交雑20, 30 および 40 日後の正常胚珠率

交雑組合せ		正常胚珠率 (%)		
		20日後	30日後	40日後
萬代	×キレンゲ	16.0	17.0	17.5
	×若楓	46.6	39.6	40.3
窓の月	×キレンゲ	12.3	12.1	8.7
	×若楓	45.3	52.2	49.1

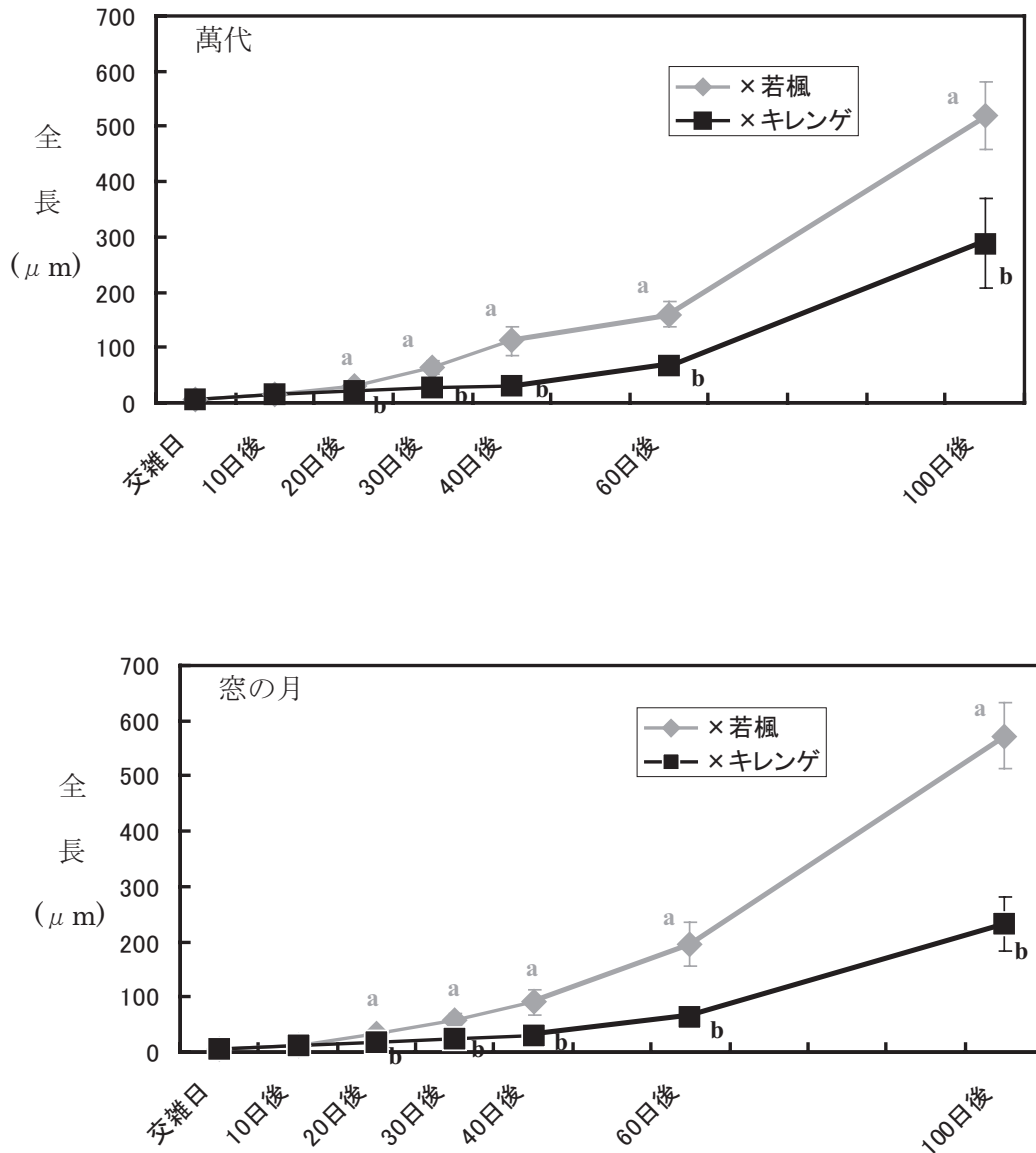


第18図 クルメツツジ ‘萬代’ および ‘窓の月’ にキレンゲツツジおよびクルメツツジ ‘若楓’ の花粉を交雑したときの胚珠の成長
値は平均値±標準偏差。Tukey-Kramer法により異なる文字間に5%レベルの有意差あり。

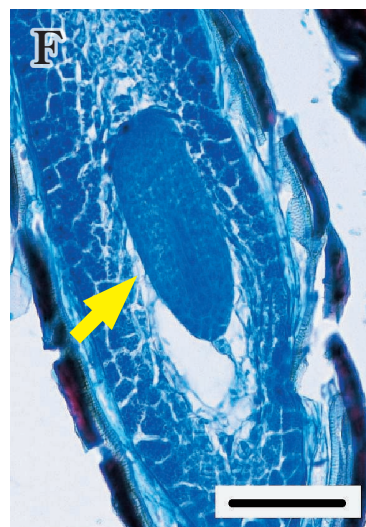
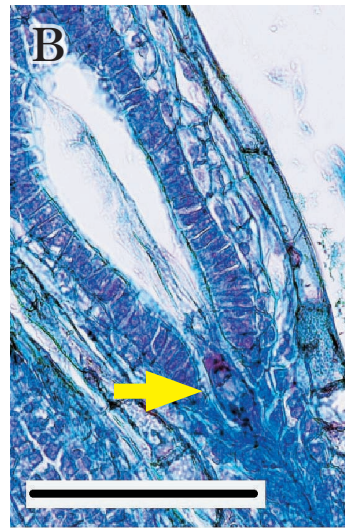
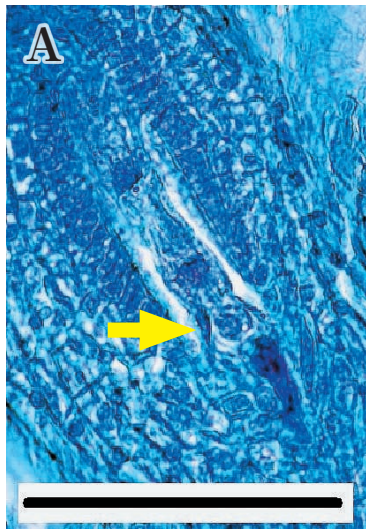
著しく遅れることが明らかとなった。

イチゴ属の種間交雑では重複受精が2, 3日遅れ、その影響で胚発生も大きく遅れることが報告されている(李ら, 2000)。ツツジ属に関しては, *R. kawakamii* Hayata に *R. quadrasianum* Vidal 等の花粉を交雑したとき, それらの花粉管伸長が同種間での交雑に比べて遅いことが観察されている(KAUL, 1986)。このため, キレンゲツツジ花粉を交雑したときに接合体の成長が著しく遅れた原因として, キレンゲツツジの花粉管伸長の影響が想定された。そこで, 交雑2, 3および4日後に‘萬代’および‘窓

の月’の花柱内におけるキレンゲツツジ花粉管の行動を観察した結果, 交雑4日後の‘窓の月’を除いて花粉管の長さは対照区よりも長かった(第21図)。交雑4日後の‘窓の月’については対照区と同長であったが, これは双方とも花粉管が花柱基部に達したためと考えられた。PALSERら(1989)は *R. nuttallii* Booth 間の交雑における花粉管の伸長は1~1.25cm/日とした。‘萬代’および‘窓の月’の花柱内におけるキレンゲツツジ花粉管の伸長はいずれも平均1.2cm/日と *R. nuttallii* と同程度であった。次に花柱を柱頭から基部にかけて4等分し, 各部位



第19図 クルメツツジ‘萬代’および‘窓の月’にキレンゲツツジおよびクルメツツジ‘若楓’の花粉を交雑したときの接合体の成長値は平均値±標準偏差。Tukey-Kramer法により異なる文字間に5%レベルの有意差あり。

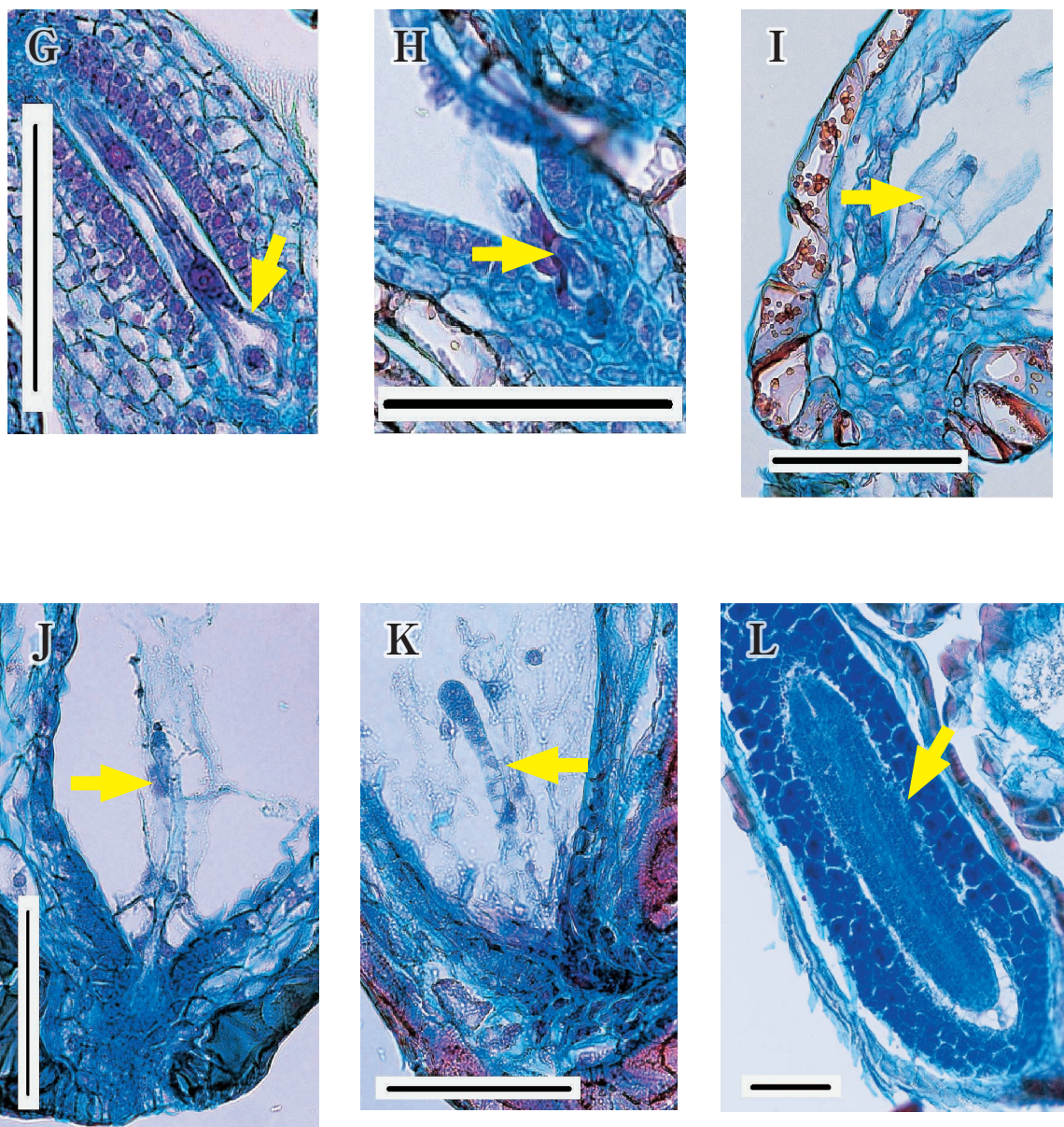


の花粉管数を調査したところ、各調査日で花粉管が観察された最も下位の部位における花粉管数はキレンゲツツジの方が対照区よりも多く、それ以外の部位では対照区の方が多かった。キレンゲツツジの花粉管数がある特定の部位から極端に減少するという現象は認められなかった（第22図）。これらの結果から、クルメツツジ花柱内でキレンゲツツジ花粉管

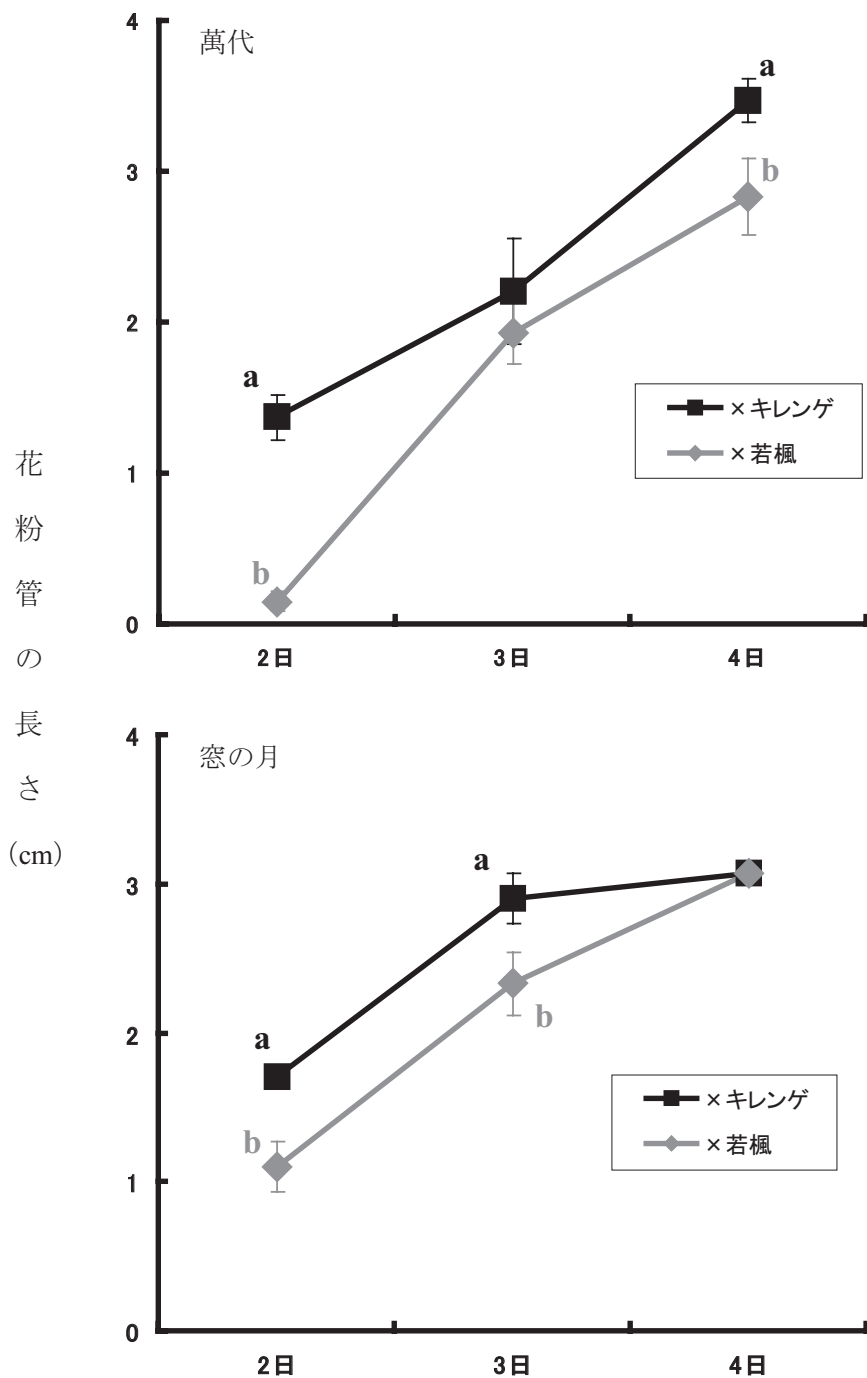
の伸長が緩慢になることはなく、接合体の成長の遅れとは無関係と考えられた。

4. 総合考察

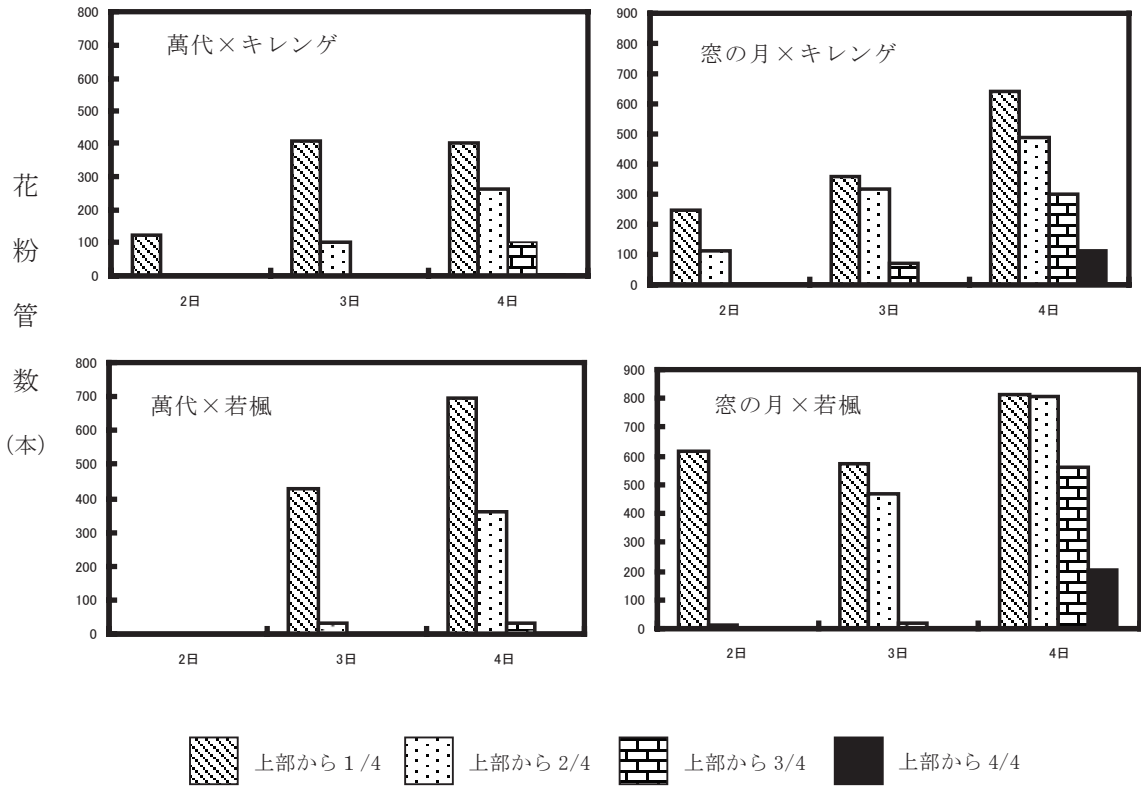
常緑性黄花ツツジの作出を目的とした交雑育種を推進する上で、交雑不和合性を示す常緑性ツツジとキレンゲツツジとの生殖的隔離機構の様相を明らか



第20図 クルメツツジ‘萬代’にキレンゲツツジおよびクルメツツジ‘若楓’の花粉を交雑したときの接合体の顕微鏡像
A～Fは‘萬代’×キレンゲツツジ。A, 10日後；B, 20日後；C, 30日後；D, 40日後；E, 60日後；F, 100日後（後期心臓型胚期）。G～Lは‘萬代’×‘若楓’。G, 10日後；H, 20日後；I, 30日後；J, 40日後；K, 60日後（球状胚期）；L, 100日後（魚雷胚型期）。矢印は接合体を示す。棒線は100 μm。



第21図 クルメツツジ‘萬代’および‘窓の月’にキレンゲツツジおよびクルメツツジ‘若楓’の花粉を交雑したときの花粉管の伸長値は平均値±標準偏差。Tukey-Kramer法により異なる文字間に5%レベルの有意差あり。



第 22 図 クルメツツジ ‘萬代’ および ‘窓の月’ にキレンゲツツジおよびクルメツツジ ‘若楓’ の花粉を交雑したときの花柱各部位の花粉管数

にし、種子親および花粉親の交雑能力を評価することは、より多くの健全実生を獲得するための重要な情報となる。

WILLIAMS・ROUSE (1988 および 1990) は有鱗片シャクナゲ *Vireya* 節内の種間交雑に関して、種子親の花柱長に対する花粉親の花柱長の比 (花柱長比) が 0.2 未満では花粉管が子房まで到達できないとし、KITA ら (2005a) はヨウラクツツジ属の種を花粉親、常緑性ツツジを種子親に用いた交雑では、交雑不和合性の主な原因が花柱長比であるとした。本章で交雑試験に供試した常緑性ツツジ野生種の花柱の長さとは花柱内の花粉管数との関係を調査した結果、花柱の長さが長い常緑性ツツジを種子親に用いた組合せの方が花柱基部の花粉管数が多かった。よって、常緑性ツツジ (種子親) × キレンゲツツジ (花粉親) では交雑不和合性に対する花柱長比の影響はないと考えられた。一方、柱頭面積が大きい種・個体を種子親に用いた交雑で花粉管数が多い傾向が認められたことから、人為的な交雑により十分量の花粉が受粉

されるときは、柱頭面積によって花粉量が制限されていることが示唆された。

常緑性ツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑したとき、NOGUCHI (1932) は結果率が著しく低く、成熟種子数/果も少ないこと、葉緑素の形成阻害および緑色実生の枯死が認められることを報告した。赤羽ら (1971) は組合せによりさく果が得られ、発芽も良好であったが、実生は白子または黄緑色で、発芽間もなく枯死するとした。国重 (1978) は不結実、あるいは実生が得られても葉緑素を欠く白子であるため生存不可能であるとした。今回の試験では、交雑隔離障壁として花粉管の伸長阻害、胚珠への花粉管の貫入阻害、受精阻害、受精直後の胚珠退化、発芽不能、葉緑素の形成阻害および夭折が認められた。また、キシツツジでは花粉-花柱間に完全な不和合性が存在することが明らかになった。従って、キシツツジを種子親に用いた場合を除き、常緑性ツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑した場合、複数の交雑隔離障壁が重複して存在し、各々は雑種形成を低下

させるが、完全な交雑隔離をもたらすことはないことが明らかとなった。BARONEら(2000)は種子親に用いた *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. の個体間で受精率に差があることを示した。本試験でも複数の個体を供試した種では個体間で交雑能力に差が認められたことから、交雑能力の評価は、種ではなく、個体レベルで行う必要があると考えられた。

SAX(1930)はツツジ属における亜属間および節間交雑では、実生を得ることが通常不可能か、あるいは困難であると述べている。本試験でも多くの組合せで生存実生を得ることはできなかったが、ミヤマキリシマ、モチツツジおよびマルバサツキ中に比較的交雑能力に優れた個体が存在した。DONNELLY・CLARK(1962)は *Vicia* 属に関して、交雑親の組合せを選択することによって、交雑能力を向上させることが可能であるとした。クルメツツジ39品種にキレンゲツツジ花粉を交雑した結果、すべての組合せで常緑性ツツジ野生種を種子親に用いた交雑と同様な交雑隔離障壁が認められた。そのような中、1交雑花当たり20個体以上の生存実生が得られる組合せが存在したことから、常緑性ツツジ中からキレンゲツツジとの交雑能力に優れた種子親を選定することは可能と考えられた。

ところで、常緑性ツツジとキレンゲツツジとの交雑に関する研究では、これまで示してきたように種子親に用いる常緑性ツツジ種・品種の交雑不和合性および交雑能力の評価に重点が置かれてきた。このため、複数のキレンゲツツジ個体を供試した研究は限られる(URESHINOら, 2000; URESHINOら, 1998)。また、花粉親に用いるキレンゲツツジ個体間の交雑能力の差異について検討した報告は見当たらない。本試験の結果、花粉管の貫入がみられた胚珠率、成熟種子数/果、白子率、生存率および交雑能力に関して、キレンゲツツジ個体間に有意な差が認められ、本交雑にみられる交雑不和合性が花粉親の影響を受けることが明らかとなった。供試したキレンゲツツジ9個体中7個体からは生存実生が得られないと評価されたが、残り2個体を用いた交雑からは比較的多くの生存実生が得られ、常緑性ツツジとの交雑能力に優れたキレンゲツツジ個体を選定することは重要であると考えられた。

生存実生の獲得に関して、子葉が緑色の個体は花粉親であるキレンゲツツジ由来の葉緑体ゲノムをも

つため、葉緑素の形成阻害を起こさない実生を得るためには色素体が父性遺伝する必要がある(小林, 1996; URESHINOら, 1999)。ところが、URESHINO・MIYAJIMA(2002)はミヤマキリシマ(2x)×キレンゲツツジ(2x)から母性遺伝したミヤマキリシマ由来の葉緑体ゲノムをもち、二倍性のミヤマキリシマ由来の核ゲノムと一倍性のキレンゲツツジ由来のそれを併せもつ三倍性実生が得られたことから、四倍体常緑性ツツジに二倍体キレンゲツツジの花粉を交雑すれば、種子親由来の葉緑体DNAを有する実生であっても核-葉緑体ゲノム間の不和合性を起こさない三倍体実生が得られるとした。このことは、SAKAIら(2004)が四倍体サツキ品種等を種子親に用いた交雑から得られた実生について白子が減少し、緑色の子葉をもつ実生が高率に得られ、それらの葉緑体DNAが種子親由来であったこと、およびアイソザイム分析から三倍性と考えられたことで実証された。このように交雑隔離障壁の一つである白子の発現を回避する方法は比較的研究が進んでいる。しかし、受精前および他の受精後の交雑隔離障壁を回避させる方法に関する報告は少なく、三系交雑を行うことにより発芽率が高まり、比較的多くの緑色実生を得たとする報告(URESHINOら, 1998)があるに過ぎない。

クルメツツジを種子親に用いた交雑では、交雑能力に対して胚珠への花粉管の貫入および白子以外の実生の生存が大きく寄与する一方、白子の影響は小さく、クルメツツジ39品種中18品種を種子親に用いた交雑組合せで白子率は10%以下であった。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種を種子親に用いた場合、実生の生育初期の枯死が回避され、生存率を向上させる効果が認められた。このため、キレンゲツツジとの交雑能力に優れた種子親がモチツツジ、あるいはキシツツジの遺伝的特性を有する品種から得られると考えられた。今回供試した白花品種では、'萬代'を種子親とした場合に多くの生存実生が得られた(10個体/花)。クルメツツジにはカロテノイド系色素の発現に対するフラボノイド系色素のマスクングが起きない白および地色が白の絞り咲き品種が多数存在する。これらの品種からモチツツジ、あるいはキシツツジの遺伝的内容を含んだ品種を抽出し、交雑能力を評価することにより、キレンゲツツジとの交雑に適した種

子親の獲得が期待される。

交雑不和合性以外の交雑を阻害する原因として、クルメツツジ品種に減数分裂異常および核分裂異常といった異常胚のうが観察され、約50%の胚珠が異常胚のうである品種も認められた。サツマイモでは低稔実性に直接関与する原因として、卵装置の発達が停止した異常胚のうが多いため花粉管が胚珠へ貫入しないことが報告されている (MURATA・MATSUDA, 2003)。今回、組織学的観察に供試したクルメツツジ3品種中、最も異常胚のう率が低かった‘呉服’では、花粉管の貫入がみられた胚珠率が53.5%と他の2品種と比較し、2倍以上の高い値を示した。このことから、種子親を選定する際には、異常胚のうの程度についても考慮する必要があると考えられた。

5. 摘要

常緑性ツツジを種子親、キレンゲツツジを花粉親に用いた垂属間交雑における生殖的隔離機構の様相を明らかにすることを目的に、常緑性ツツジ野生種14種24個体にキレンゲツツジ1個体の花粉を交雑した。その結果、交雑隔離障壁として花粉管の伸長阻害、胚珠への花粉管の貫入阻害、発芽不能、葉緑素の形成阻害および夭折が認められた。キシツツジを種子親に用いた場合を除き、複数の交雑隔離障壁が重複して存在し、それぞれは雑種形成を低下させるが、完全な交雑隔離をもたらしことはなかった。キシツツジでは花粉-花柱間に完全な不和合性が存在した。また、常緑性ツツジにおけるキレンゲツツジとの交雑能力の評価は種ではなく、個体レベルで行う必要があることが示唆された。

花粉親に用いるキレンゲツツジ個体の交雑能力の差異を明らかにするため、マルバサツキ1個体にキレンゲツツジ9個体の花粉を交雑した。花粉管の貫入がみられた胚珠率、成熟種子数/花、白子率、生存率および交雑能力について、キレンゲツツジ個体間に有意な差が認められた。よって、花粉親に用いるキレンゲツツジの選定が、本交雑における実生獲得のために重要であることが示唆された。

常緑性黄花ツツジの作出を目的とした交雑育種におけるクルメツツジの種子親としての有用性と、交雑能力に影響を与える因子の特定および生存実生が得られる種子親の遺伝的背景を調査した。クルメツ

ツジ39品種にキレンゲツツジ1個体の花粉を交雑した結果、13組合せから生存実生が得られた。そのうち、3組合せでは1交雑花当たり10個体以上の生存実生が得られた。交雑能力に影響を与える因子として、花粉管の貫入がみられた胚珠率および生存率があげられた。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種を種子親に用いた場合、生存率が高く、交雑能力に優れた。

低受精率に対する種子親の胚のうの影響を明らかにするため、クルメツツジ3品種の胚のう発達ステージおよび胚のうの異常について組織学的手法による調査を行った。その結果、交雑不和合性以外の交雑阻害原因として、胚のうの減数分裂異常および核分裂異常による受精阻害が認められた。

受精から成熟種子に至る過程における胚珠退化の有無について、クルメツツジ2品種を種子親、キレンゲツツジ1個体を花粉親とする交雑を行い、胚珠への花粉管の貫入後から成熟種子に至る過程での胚珠の組織学的観察を行った。その結果、交雑隔離障壁として受精失敗および受精直後の胚珠退化が認められた。また、本交雑では接合体の成長が遅れること、この現象に対するキレンゲツツジの花粉管伸長の影響はないことが明らかとなった。

IV. クルメツツジとキレンゲツツジとの交雑から得られた実生の染色体構成

第III章では、クルメツツジ品種中にキレンゲツツジとの交雑において生存率が高く、交雑能力に優れた品種が存在し、それらがモチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有することを明らかにした。また、第V章で示すように本交雑から得られた実生の成長に関して、モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有するクルメツツジ品種を種子親に用いた交雑から得られた実生は正常な成長を示すのに対して、そのような特性を有さない品種を種子親に用いた交雑から得られた実生はわい化し、成長が停止した。このことから、本交雑における実生の正常な成長には、種子親に用いたクルメツツジ品種の遺伝的特性が何らかの影響を及ぼしていると推察される。

遠縁交雑で問題となる異質細胞質中におけるゲノムの形質発現に際して、特定の染色体の存否が接合

体の生存に関与することが報告されている。大塚 (1980) はコムギ属とその近縁野生種である *Aegilops squarrosa* L. との交雑に関して、*squarrosa* 細胞質のもとでの AB ゲノムの機能発現に過剰染色体として 1D 染色体の存在が不可欠であるとし、TSUJIMOTO ら (1987) は *Agropyron trichophorum* (Link) Richter の細胞質をもつコムギ異質細胞質系統において、正常な草勢を示す個体が *A. trichophorum* 由来の過剰染色体を有することを明らかにした。以上の知見に基づき、クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた実生の生存、並びに正常な成長に、モチツツジ、あるいはキシツツジ由来の染色体の存否が関与しているのかを検討した。

雑種の染色体分析には、個々の相同染色体、あるいは特定の染色体の一部を識別・同定する必要があるが、これには染色体の内部構造に基づく分染パターン分析が有効とされる (日詰, 1991)。植物染色体では染色体上のヘテロクロマチンを染め分ける分染法の一つである C バンド法が分節構造を最もよく現わすとされ (田中, 1980)、コムギ (ENDO, 1986)、*Allium* (CAI・CHINNAPPA, 1987)、アルストロメリア (BUITENDIJK・RAMANNA, 1996)、*Haynaldia villosa* L. (ZHONG ら, 1996) *Medicago* (BAUCHAN・HOSSAIN, 1999) および *Bromus* (TUNA ら, 2001) 等において明瞭な分染像が得られている。本章では、クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた実生の染色体構成を明らかにすることを目的に、まずヤマツツジ節野生種およびキレンゲツツジについて、C バンド法を用いて相同染色体の識別を行った。次にクルメツツジとキレンゲツツジとの交雑から得られた実生の染色体の同定を行い、モチツツジ、あるいはキシツツジに特徴的な染色体が存在するのかを調査した。

1. ヤマツツジ節野生種、クルメツツジ、キレンゲツツジ、並びにクルメツツジとキレンゲツツジとの交雑から得られた実生における染色体の核型分析

1) 材料および方法

供試材料として次に示す野生種、クルメツツジおよび交雑実生を用いた。ヤマツツジ節野生種5種(ヤマツツジ、ミヤマキリシマ、サタツツジ、モチツツ

ジおよびキシツツジ) およびキレンゲツツジ。クルメツツジ品種について、モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種の中で、キレンゲツツジ花粉を交雑したとき実生の生存率が高く、その実生が正常な成長を示した4品種(‘呉服’、‘乙女’、‘若楓’および‘萬代’)と、生存実生が得られなかった‘勢多の入日’。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を示さなかった品種の中で、生存実生が得られた‘古金襴’および得られなかった‘式部桜’。クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた正常な成長を示す実生のうち、‘呉服’×キレンゲツツジ3個体、‘乙女’×キレンゲツツジ2個体、‘若楓’×キレンゲツツジ1個体および‘萬代’×キレンゲツツジ5個体の計11個体。

5月下旬から6月上旬にシュートを採取し、2mM 8-オキシキノリンで5℃、8時間の前処理を行い、固定液(酢酸:エタノール=1:3)で24時間処理した。その後、70%エタノール中に移し、5℃の暗所で保存した。

染色体標本は庄(1990)がカキの染色体標本作製法として用いた酵素解離法により次のように作製した。固定したシュートを水洗後、実体顕微鏡下でシュート頂を切り出し、スライドガラス上に置き、シュート頂を覆うように酵素液(4%セルラーゼ、1%ペクチナーゼ、75mM 塩化カリウムおよび7.5mM Na₂EDTA, pH4.0)を滴下し、37℃で5.5時間処理した。水洗後、前出の固定液を適量滴下しながら、ピンセットでシュート頂を軽く叩き潰し、スライドガラス上に解離した細胞を拡散させた。一晩室温で乾燥させた後、2%ギムザ液(pH6.8リン酸緩衝液で希釈)で室温、25分間染色し、水洗後、室温で一晩自然乾燥させた。生物顕微鏡で鮮明な染色体像をもつ核板の位置を確認後、45%酢酸に数秒浸漬し、脱色した。

C バンド法について、50℃の5%水酸化バリウム溶液で3分間処理し、水洗後、60℃の2×SSC溶液(0.3M 塩化ナトリウム+0.03M クエン酸ナトリウム溶液)で2時間処理した。水洗後、前出の2%ギムザ液で室温、3分間染色した。水洗後、一晩室温で乾燥させ、生物顕微鏡に取り付けた顕微鏡用デジタルカメラで目的の核板を撮影した。得られた画像ファイルは、Adobe Photoshop ソフトウェアを用いて濃染部が明瞭になるように色調を調整した。そ

の後、画像を印刷し、各染色体の短腕と長腕を計測し、Cバンドの位置およびギムザ染色の濃淡を調査した。各調査は野生種では1種につき3個体以上、品種および交雑実生では1品種・個体につき3本以上のシュートから得られた核板について行った。

2) 結果および考察

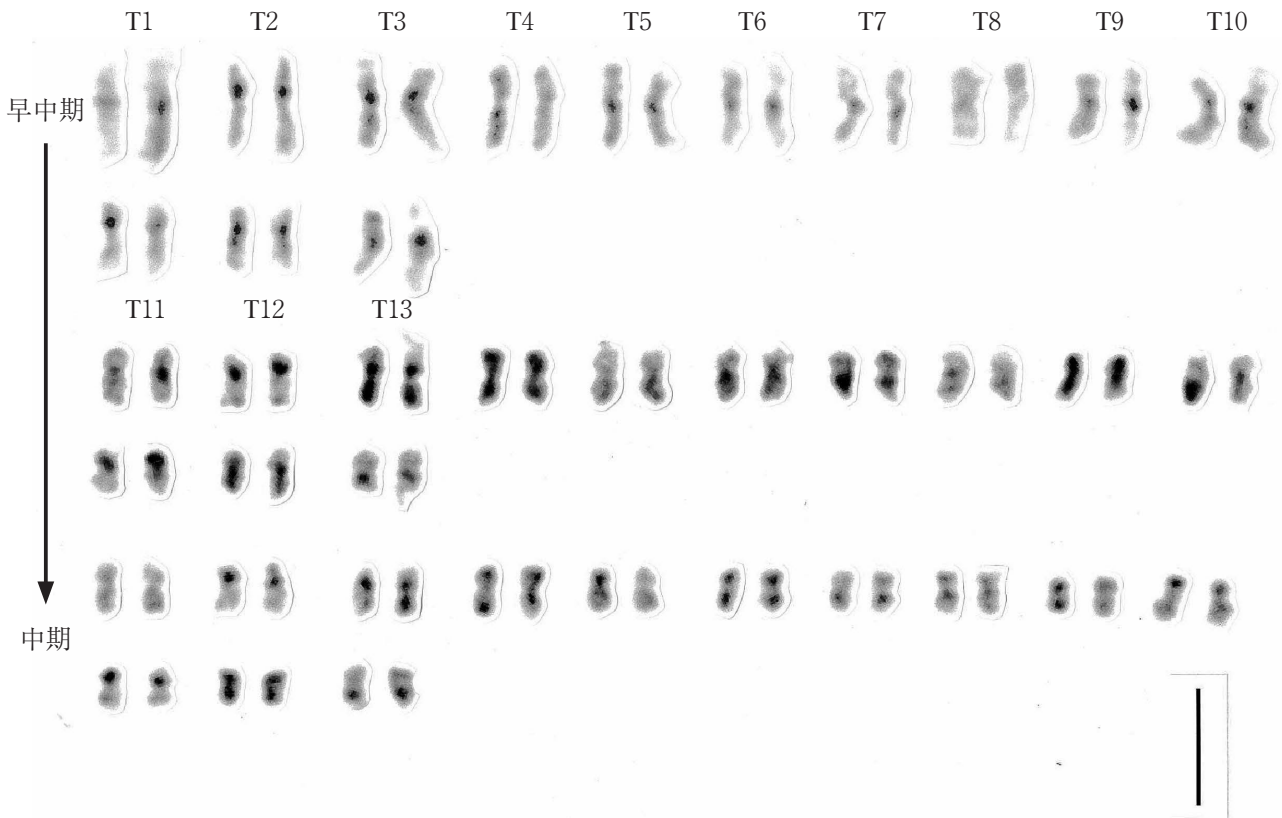
(1) ヤマツツジ節野生種5種の染色体の核型分析

ヤマツツジ ($2n = 2x = 26$) の早中期～中期の3核板の染色体像を第23図に示した。観察された染色体長は、早中期の最大のもので $4.5 \mu m$ 未満と比較的小さかった。Cバンド法により、ヤマツツジでは動原体部に濃染が認められた。染色体末端部は濃染されなかった。濃染された動原体部を早中期の核板を用いて観察したところ、短腕部が濃染されるものと長腕部が濃染されるものがみられた。また、染色体によって、中期では早中期と異なり動原体部の濃染が現れないことがあった。その一方、早中期には認められなかった各腕の中央部および次端部が濃染される染色体が認められた。FUKUI・MUKAI (1988)

はハマアカザ属の染色体の識別・同定において前中期の染色体の長軸方向に沿った濃度分布を利用し、これを凝縮型と命名した。ヤマツツジにみられた濃染部がこれと同一かどうかは不明であるが、本試験における染色体の識別・同定にはこの濃染部についても利用した。

26本の染色体は大きさに並べ、動原体の位置、二次狭窄の有無、Cバンドの位置およびギムザ染色の濃淡から相同染色体を決定した。その結果、13対すべての染色体を識別することができ、大きさに順にT1～T13の呼称を与えた。各相同染色体の相対長および腕比を第37表に示した。ヤマツツジの染色体は、相対長が3.27～4.58の範囲にあり、各染色体の大きさの変異は連続的で不可分であった(単相的)。次中部動原体型の染色体が4対、中部動原体型の染色体が9対あり、次端部および端部動原体型の染色体は観察されなかった。このため、染色体の形態は対称的といえた。最も小さい1対の染色体には長腕に仁形成部位が認められた。

各染色体の主な特徴を以下に示した。また、その



第23図 ヤマツツジの早中期から中期にかけての染色体像
棒線は $5 \mu m$ 。

イデオグラムを第24図に示した。T1：次中部動原体型。長腕の基部が濃染される。T2：中部動原体型。短腕の基部が濃染される。T3：中部動原体型。短腕の端部側は染色が淡い。短腕の基部が濃染される。長腕の基部付近から次端部にかけて濃染されることがある。T4：中部動原体型。長腕の基部から中央部が濃染される。短腕の中央部付近が濃染されることがある。T5：中部動原体型。長腕の基部が濃染される。T6：次中部動原体型。長腕の基部が濃染される。短腕の中央部が濃染されることがある。T7：中部動原体型。長腕の基部が濃染される。長腕の基部付近から次端部にかけて濃染されることがある。T8：次中部動原体型。長腕の基部が濃染される。長腕の中央部が濃染されることがある。T9：次中部動原体型。長腕の基部が濃染される。短腕の中央部が濃染されることがある。T10：中部動原体型。形状が特有である。短腕の基部が濃染される。長腕の中央部付近が濃染されることがある。T11：中部動原体型。短腕の基部が濃染される。T12：中部動原体型。短腕の基部が濃染される。長腕の基部から次端部にかけて濃染されることがある。T13：中部動原体型。長腕の端部側に仁狭窄がある。長腕の基部が濃染される。2本のうち一方が特徴的な形状を示す場合があり、これは仁形成体領域の機能が

抑制されていると考えられた。

ミヤマキリシマ ($2n = 26$), サタツツジ ($2n = 26$), モチツツジ ($2n = 26$) およびキシツツジ ($2n = 26$) の相同染色体をヤマツツジと同様な方法で決定し、ヤマツツジの相同染色体と比較した。ミヤマキリシマおよびサタツツジに関して、両種ともに1対を除き、相対長, 腕比, Cバンドの位置およびギムザ染色性がT1～T13のいずれかとほぼ一致したため、それらをヤマツツジと同じ染色体と同定した(第37表, 第24図および25図)。ヤマツツジとは異なっていた染色体に関して、ミヤマキリシマではT12と同様な相対長および腕比であるが、濃染部が短腕基部ではなく長腕基部に位置している染色体がみられ、これをTk12とした。サタツツジではT4と同様な相対長および腕比であるが、濃染部が短腕基部に位置し、長腕の中央部が濃染されることがある染色体がみられ、これをTs4とした。また、T11には異型性が認められ、短腕の基部が濃染されるものとされないものがあつた。

モチツツジの染色体にはT3, T5およびT6がなく、代わりにヤマツツジにはない3対の染色体が認められ、これらを大きさ順にT14, T15およびT16とした(第38表, 第26図)。相対長は3.25～4.34の範囲にあり、単相的であつた。形態は次中部動原体型

第37表 ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジの各相同染色体の相対長および腕比

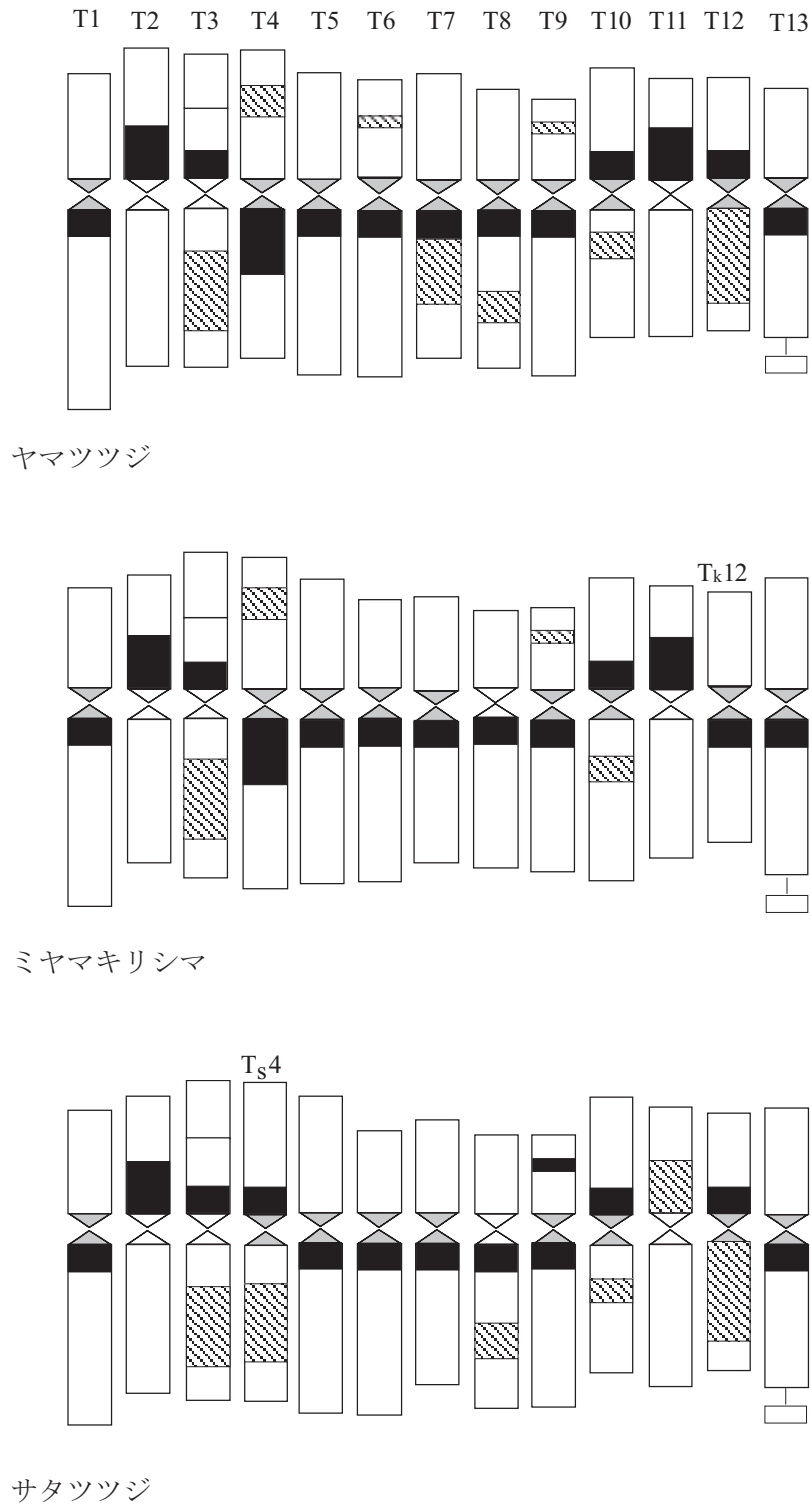
染色体番号	ヤマツツジ		ミヤマキリシマ		サタツツジ	
	相対長	腕比	相対長	腕比	相対長	腕比
T1	4.58	1.90 sm ^a	4.32	1.90 sm	4.23	1.75 sm
T2	4.29	1.20 m	3.82	1.26 m	3.96	1.28 m
T3	4.24	1.26 m	4.35	1.18 m	4.32	1.15 m
T4	4.17	1.16 m	4.43	1.28 m	4.31	1.17 m
T5	4.05	1.56 m	4.11	1.50 m	4.27	1.47 m
T6	3.93	1.71 sm	3.74	1.87 sm	3.78	2.10 sm
T7	3.81	1.39 m	3.50	1.52 m	3.44	1.38 m
T8	3.72	1.74 sm	3.38	1.97 sm	3.65	2.05 sm
T9	3.67	2.07 sm	3.50	1.81 sm	3.61	2.10 sm
T10	3.58	1.17 m	4.05	1.46 m	3.65	1.10 m
T11	3.38	1.27 m	3.56	1.35 m	3.69	1.34 m
T12	3.31	1.21 m	3.25	1.29 m	3.37	1.27 m
T13	3.27	1.44 m	3.99	1.41 m	3.73	1.34 m

a m: 中部動原体型染色体(腕比が1.0～1.7), sm: 次中部動原体型染色体(腕比が1.7～3.0)。

が4対，中部動原体型が9対と対称的であった。

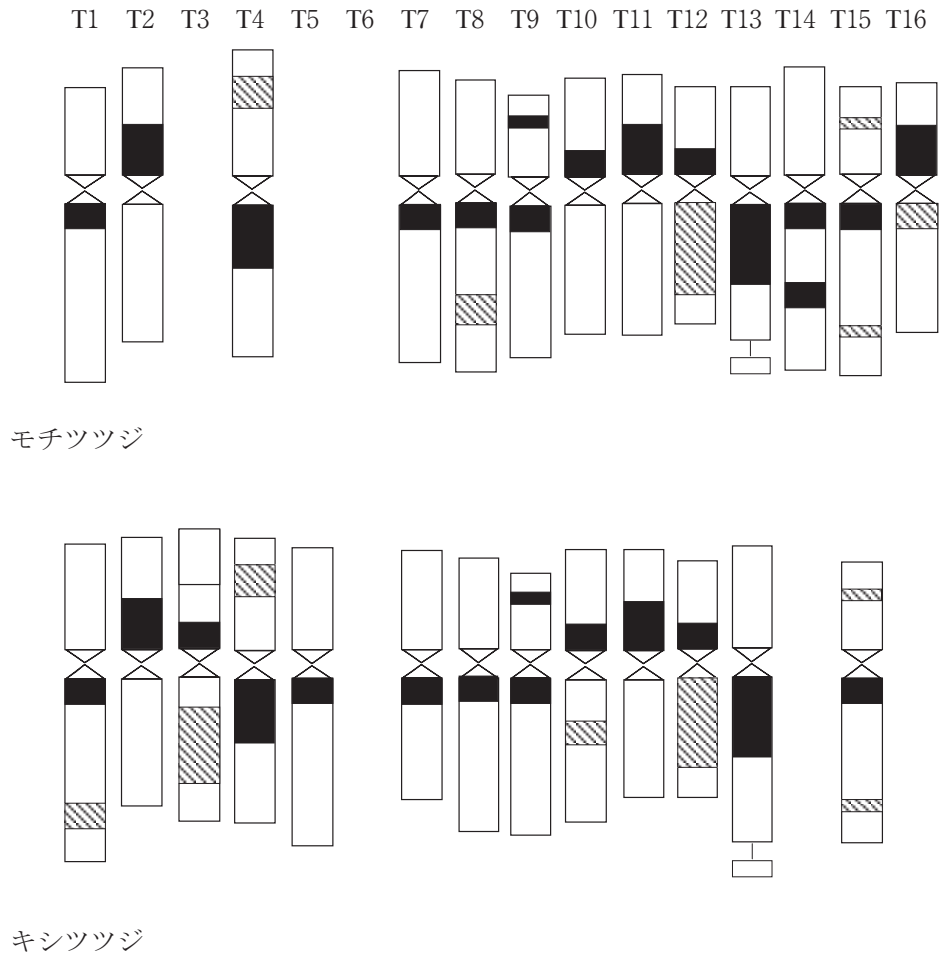
キシツツジの染色体にはT6がなく，代わりにT15が認められた(第38表，第26図)。相対長は3.22

～4.52の範囲にあり，単相的であった。形態は次中部動原体型が4対，中部動原体型が9対と対称的であった。



第24図 ヤマツツジ節野生種5種のイデオグラム

濃染される， 濃染されることがある。



第24図の続き

T14, T15 および T16 の主な特徴を以下に示した。また、そのイデオグラムを第24図に示した。T14: 中部動原体型。長腕の基部および中央部が濃染される。T15: 次中部動原体型。短腕中央部, 長腕基部および長腕次端部が濃染される。T16: 中部動原体型。短腕が濃染される。長腕基部が濃染されることがある。

以上の結果, ヤマツツジ, ミヤマキリシマおよびサタツツジはほぼ同じ核型, 一方, モチツツジおよびキシツツジはそれらとは異なる核型を示すことが明らかとなった。

(2) クルメツツジ品種の染色体構成

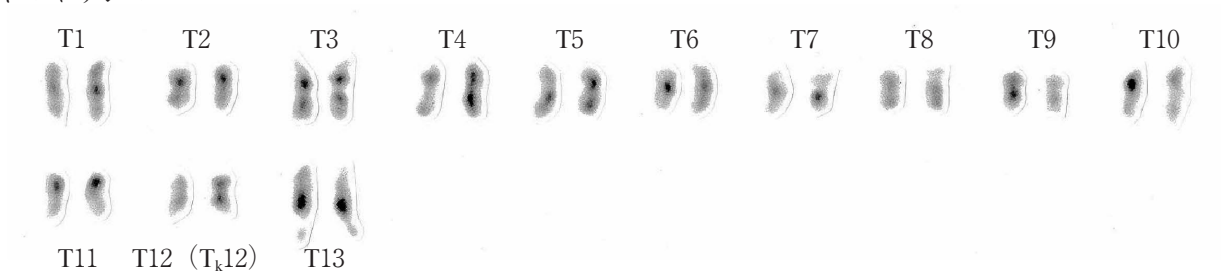
調査した7品種の染色体数はいずれも $2n = 26$ であった。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する5品種の染色体構成をヤマツツジと比較すると, '呉服' (第27図) および '勢多の入日'

(第28図) では T3, T5 および T6 の各1本が T14, T15 および T16 に置き換わっていた。'若楓' (第27図) および '乙女' (第28図) では T3 および T6 の各1本が, T14 および T15 に置き換わっていた。'萬代' (第27図) では T6 の1本が T14 に置き換わっていた。次に, モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を示さない '古金襴' および '式部桜' の染色体構成を調査したところ, ヤマツツジと同じであった (第29図)。

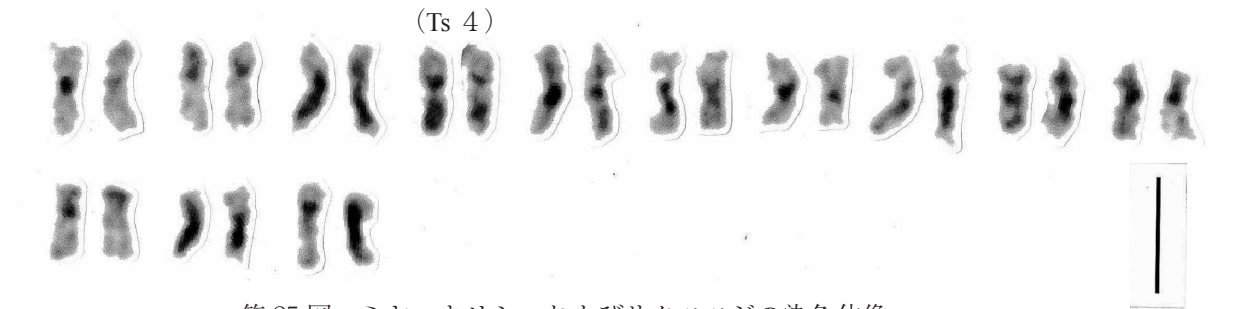
(3) キレンゲツツジ染色体の核型分析

キレンゲツツジ ($2n = 2x = 26$) の染色体はヤマツツジ節と同様, Cバンド法により動原体部が濃染されたが, 染色体末端部は濃染されなかった。濃染された動原体部を早中期の核板を用いて観察したところ, 染色体によって短腕部が濃染されるものと長腕部が濃染されるものがみられた。中期染色体では

ミヤマキリシマ

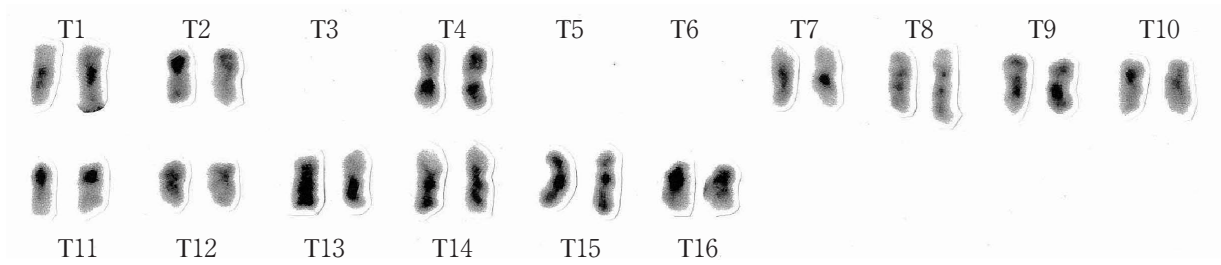


サタツツジ



第25図 ミヤマキリシマおよびサタツツジの染色体像
棒線は5 μ m。

モチツツジ



キシツツジ

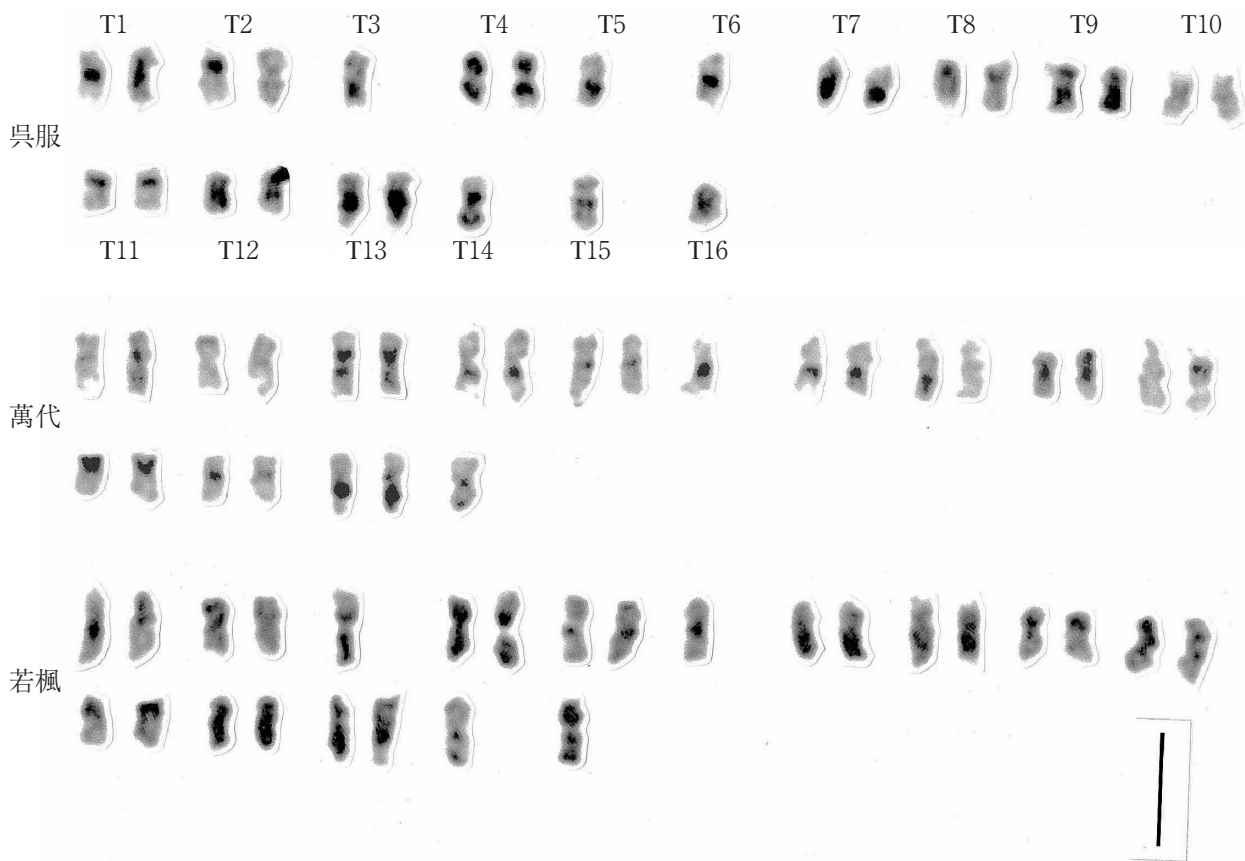


第26図 モチツツジおよびキシツツジの染色体像
棒線は5 μ m。

第38表 モチツツジおよびキシツツジの各相同染色体の相対長および腕比

染色体番号	モチツツジ		キシツツジ	
	相対長	腕比	相対長	腕比
T 1	4.16	2.05 sm ^a	4.52	1.76 sm
T 2	3.82	1.29 m	3.73	1.14 m
T 3	—	—	4.12	1.22 m
T 4	4.34	1.20 m	3.99	1.28 m
T 5	—	—	4.21	1.64 m
T 6	—	—	—	—
T 7	4.10	1.51 m	3.41	1.23 m
T 8	4.13	1.87 sm	3.82	1.70 sm
T 9	3.68	1.88 sm	3.64	2.07 sm
T10	3.56	1.31 m	3.80	1.41 m
T11	3.63	1.33 m	3.41	1.17 m
T12	3.25	1.38 m	3.22	1.38 m
T13	3.49	1.50 m	4.17	1.63 m
T14	4.28	1.56 m	—	—
T15	4.11	2.02 sm	3.95	1.89 sm
T16	3.45	1.41 m	—	—

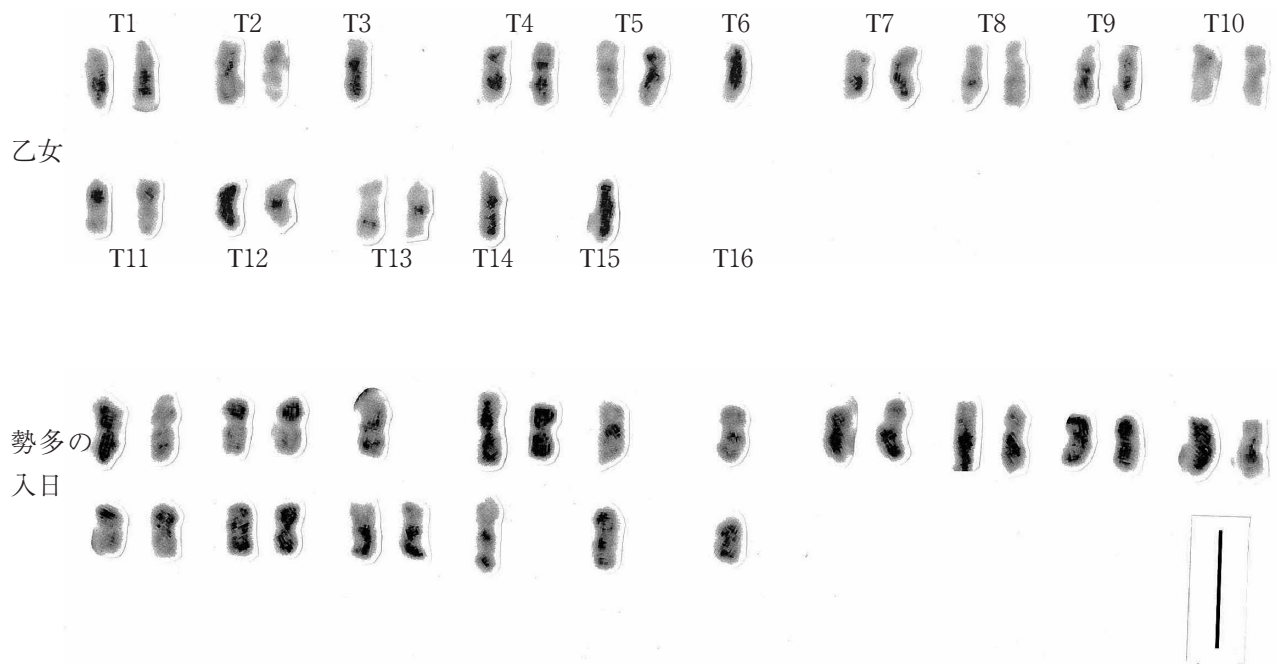
a m : 中部動原体型染色体 (腕比が1.0 ~ 1.7), sm : 次中部動原体型染色体 (腕比が1.7 ~ 3.0)。



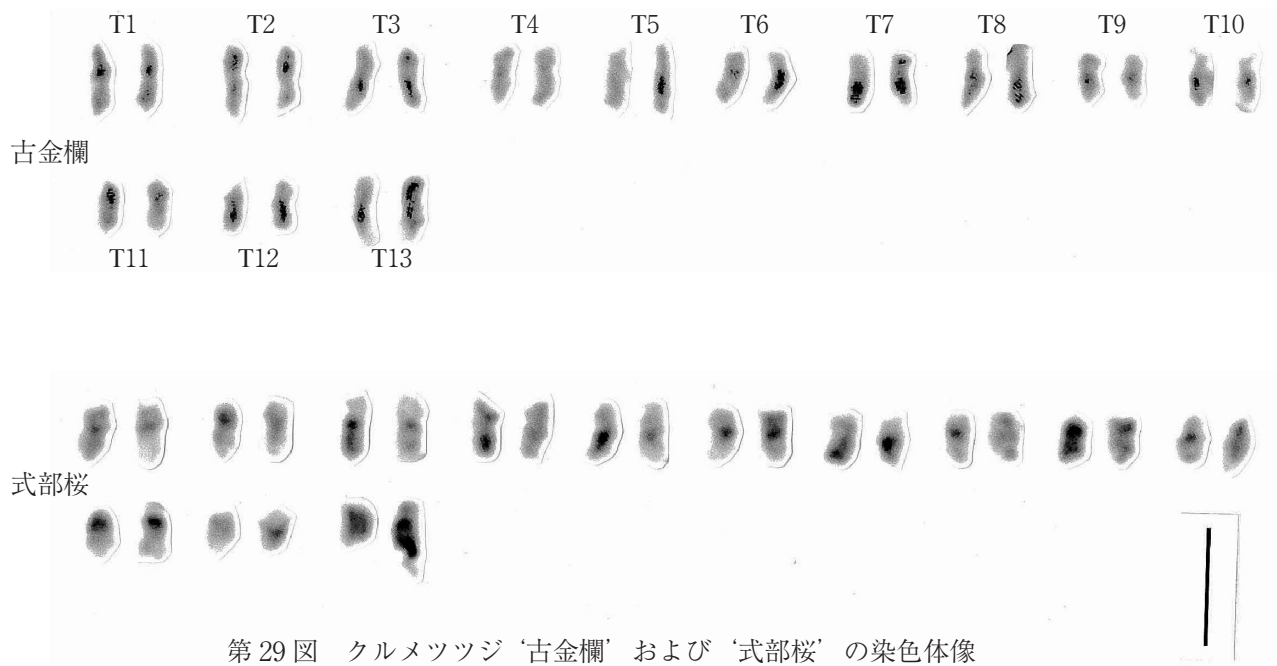
第27図 クルメツツジ '呉服', '萬代' および '若楓' の染色体像
棒線は5 μm。

早中期には認められなかった各腕の中央部および次端部が濃染される染色体が認められた。26本の染色体は大きさに順に並べ、腕比、二次狭窄の有無、Cバンドの位置およびギムザ染色の濃淡から相同染色体を決定し、大きさに順にP1～P13の呼称を与えた

(第30図)。各相同染色体の相対長および腕比を第39表に示した。キレンゲツツジの染色体の特徴について、相対長は2.77～4.70の範囲にあり、単相的であった。形態は次中部動原体型が8対、中部動原体型が5対と対称的で、次端部および端部動原体



第28図 クルメツツジ‘乙女’および‘勢多の入日’の染色体像
棒線は5 μ m。

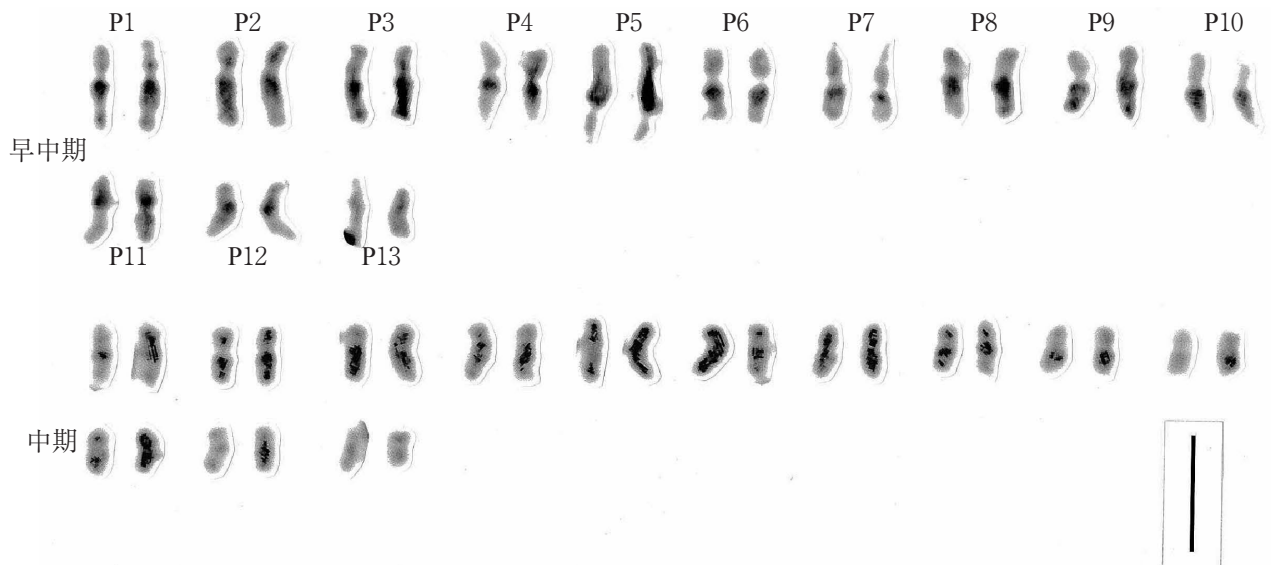


第29図 クルメツツジ‘古金欄’および‘式部桜’の染色体像
棒線は5 μ m。

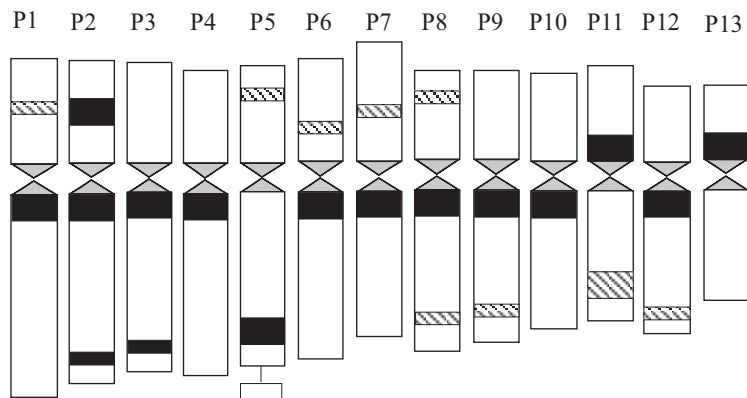
型の染色体はみられなかった。仁形成部位をもつ染色体が1対認められた。

各染色体の主な特徴を以下に示した。また、そのイデオグラムを第31図に示した。P1：次中部動原体型。長腕の基部が濃染される。短腕中央部が濃染されることがある。P2：次中部動原体型。短腕の中央部付近と、長腕の基部および次端部が濃染される。P3：次中部動原体型。長腕の基部および次端部が濃染される。P4：次中部動原体型。長腕の基部が

濃染される。P5：次中部動原体型。長腕の端部側に仁狭窄がある。長腕の次端部が濃染される。短腕の中央部が濃染されることがある。P6：中部動原体型。長腕の基部が濃染される。短腕の中央部および長腕の次端部が濃染されることがある。P7：中部動原体型。長腕の基部が濃染される。短腕の基部付近が濃染されることがある。P8：次中部動原体型。長腕の基部が濃染される。短腕の中央部および長腕の次端部が濃染されることがある。P9：次中部動原体型。



第30図 キレンゲツツジの染色体像
棒線は5 μ m。



第31図 キレンゲツツジのイデオグラム

■ 濃染される, ▨ 濃染されることがある。

長腕の基部が濃染される。長腕の次端部が濃染されることがある。P10：中部動原体型。長腕の基部が濃染される。P11：中部動原体型。短腕の基部が濃染される。長腕の次端部付近が濃染されることがある。P12：次中部動原体型。長腕の基部が濃染される。長腕の次端部が濃染されることがある。P13：中部動原体型。短腕の基部が濃染される。(4) クルメツツジ(種子親) × キレンゲツツジ(花粉親) から得られた実生の染色体構成

クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた正常な成長を示す実生中、11個体の染色体を調査した。染色体数はいずれも $2n = 26$ であった。このうち9個体の核型を同定・識別することができた。核板には他と比較して大きな5本の染色体が認められた(第32図)。これらは形状および濃染部の位置からキレンゲツツジのP1, P2, P3, P4およびP5と考えられた。これら5本の染色体を基に残り21本の染色体を同定した。キレンゲツツジとクルメツツジの染色体の大きさには差があり、キレンゲツツジの染色体が大きかった。中期の染色体像ではP12, P13およびT12の識別が困難であった。

実生9個体の染色体は、キレンゲツツジ由来の13本と、クルメツツジ由来の13本から構成されて

いた。キレンゲツツジ由来の染色体に関して、すべての実生でP1 ~ P13が各1本認められた。クルメツツジ由来の染色体に関して、'呉服'が種子親の「No.1, 2, 3」および'若楓'が種子親の「No.11」では、T1 ~ T4, T7 ~ T15が各1本認められた(第40表)。「乙女」が種子親の「No.4」および'萬代'が種子親の「No.6, 7, 8, 10」では、T1 ~ T5, T7 ~ T14が各1本認められた(第40表)。T6およびT16を有する個体は認められなかった。

2. 総合考察

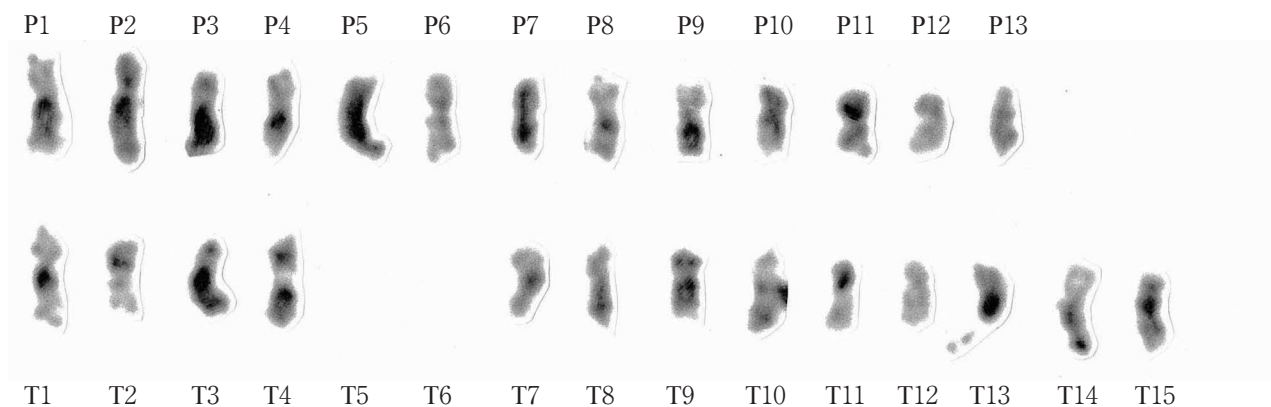
ツツジ属の細胞遺伝学的な研究としては、野生種および園芸品種の染色体数(HOSODAら, 1953; LANTAI・KIHLMAN, 1995; LI, 1957; NAKAMURA, 1931; SAX, 1930)および核型分析(箕作・石井, 1966)に関する報告がみられる。SAX(1930)は有鱗片シャクナゲ、落葉性ツツジおよび常緑性ツツジ等16種の染色体数を調査し、ツツジ属染色体の基本数が $x = 13$ であることを明らかにした。また、地理的に隔離された2種間の交雑種を作製し、その個体の減数分裂時の染色体の対合程度を調査することで、両種の類縁度を推定した。NAKAMURA(1931)はヤマツツジ、ミヤマキリシマ、モチツツジ、キレ

第39表 キレンゲツツジの各相同染色体の相対長および腕比

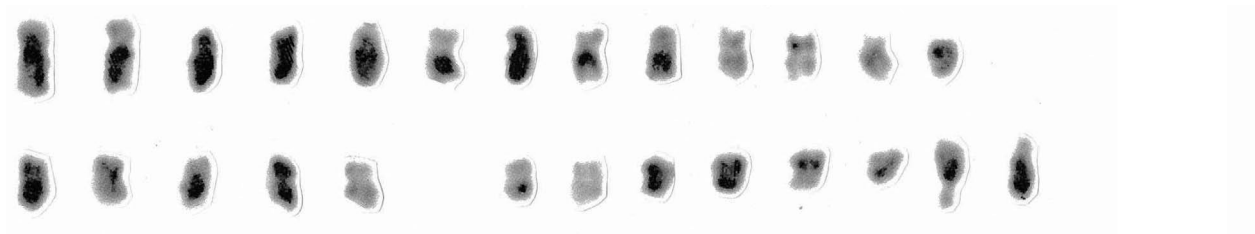
染色体番号	相対長	腕比
P 1	4.70	1.91 sm ^a
P 2	4.43	1.86 sm
P 3	4.23	1.79 sm
P 4	4.12	1.95 sm
P 5	4.11	1.80 sm
P 6	4.09	1.63 m
P 7	4.00	1.22 m
P 8	3.77	1.83 sm
P 9	3.63	1.70 sm
P10	3.41	1.56 m
P11	3.39	1.38 m
P12	3.34	1.88 sm
P13	2.77	1.51 m

a m：中部動原体型染色体(腕比が1.0 ~ 1.7), sm：次中部動原体型染色体(腕比が1.7 ~ 3.0)。

呉服×キレンゲツツジ「No.2」



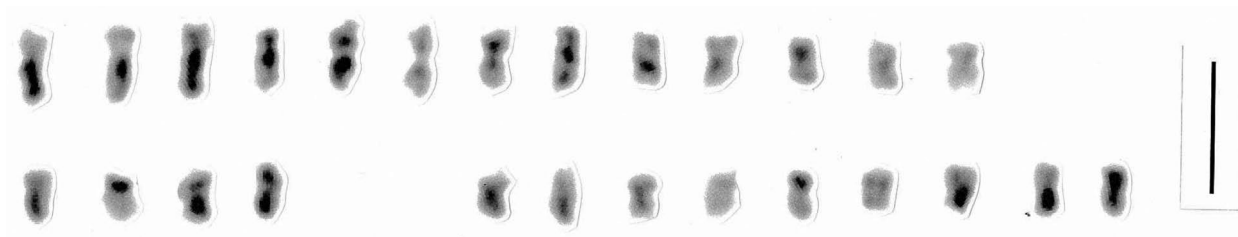
萬代×キレンゲツツジ「No.8」



若楓×キレンゲツツジ「No.11」



乙女×キレンゲツツジ「No.4」



第32図 クルメツツジ(種子親)×キレンゲツツジ(花粉親)から得られた実生の染色体像
各個体の上段はキレンゲツツジ由来, 下段はクルメツツジ由来の染色体。棒線は5 μ m。

第40表 クルメツツジ（種子親）×キレンゲツツジ（花粉親）から得られた実生におけるクルメツツジ由来の染色体構成

種子親 個体番号		染色体番号															
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
呉服	No. 1	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	No. 2	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	No. 3	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
乙女	No. 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
萬代	No. 6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	No. 7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	No. 8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	No.10	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
若楓	No.11	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+は認められる，-は認められない。

ンゲツツジおよびクルメツツジ6品種等の花粉母細胞の減数分裂時の染色体数を調査し、 $n = 13$ であることを示した。Hosodaら（1953）はサツキ12品種の根端細胞の染色体数を調査し、3倍体および4倍体品種が存在することを明らかにした。

核型に関して、箕作・石井（1966）はヤマツツジ、ミヤマキリシマ、モチツツジおよびクルメツツジ‘暮の雪’等を供試し、ヤマツツジが中部動原体型3対、次中部動原体型5対および端部動原体型5対、ミヤマキリシマが中部動原体型3対、次中部動原体型1対、次端部動原体型4対および端部動原体型5対、モチツツジが中部動原体型6対、次中部動原体型2対および端部動原体型5対、‘暮の雪’が中部動原体型6対、次端部動原体型2対および端部動原体型5対から構成されるとした。本試験の結果はそれらとは異なり、ヤマツツジとミヤマキリシマは同様な形態の染色体を有し、中部動原体型9対および次中部動原体型4対から構成されると考えられた。また、モチツツジはヤマツツジおよびミヤマキリシマと3対の相同染色体が異なり、中部動原体型9対および次中部動原体型4対から構成されると考えられた。このような結果の相違に関して、ツツジ属の染色体は比較的小さいため（Li, 1957）、箕作・石井（1966）が行ったアナログ写真を用いた核型分析では各染色体の形態を十分に観察できなかったことが一因と考えられた。本試験では、顕微鏡用デジ

タルカメラを用いて、生物顕微鏡で観察された像を直接、高解像度の画像として撮影する方法を採用した。このため、アナログ写真よりも大きく細密な染色体像を対象とし調査を行うことができた。なお、箕作・石井（1966）は常緑性ツツジの大輪系品種である‘大紫’の核型が中部動原体型9対、次中部動原体型3対および付随体を有する染色体1対から構成されるとしたが、これが本試験で供試した常緑性ツツジの結果に最も近かった。

種間雑種における両親種の推定に関して、アネモネ（Heimbürger, 1962）、*Allium*（Kellerら, 1996）、ユリ（Obataら, 2000）およびチューリップ（Marasekら, 2006）では、染色体の大きさ、動原体の位置および二次狭窄等の染色体形態の特徴を指標に用いた雑種判定がなされている。Obataら（2000）はユリの種間雑種の作出に関する報告の中で、両親種の染色体のうち二次狭窄をもつ1および2番目に大きい染色体を指標として、雑種性の判定を行った。Marasekら（2006）はチューリップの1系統群であるダーウィン・ハイブリッドの3倍体品種の起源を明らかにするため、野生種の染色体中、最も大きく、他の染色体とは異なった中部動原体型を示す染色体を指標とした。本試験では、モチツツジおよびキシツツジに特徴的であった染色体と同等な大きさのものがヤマツツジ中に存在し、また13対の染色体形態は対称的（中部動原体型および次中部動原体型の

染色体で構成されている)であり、指標として利用可能な特徴を備えていなかった。

このように染色体形態が似ているため個々の染色体を識別することが困難な場合、Cバンド法を用いることによって各染色体の識別が可能となることが報告されている (TUNA ら, 2004)。ZHONG ら (1996) は異種染色体の存在を確認するための最も有効な方法である GISH 法を用いた場合には個々の染色体を識別することができないため、コムギ染色体中にある *Haynaldia villosa* 染色体を GISH 法により識別した後、Cバンド法を用いて *H. villosa* のもつ7対の相同染色体のいずれかを決定した。このようにCバンド法は個々の染色体を識別・同定するための有効な手段であるが、染色体の大きさが小さい植物種では利用し難いことが指摘されている (DONG ら, 2001)。

福井 (2006) は植物染色体が DNA 含量の違いにより大型染色体 (L 型) と小型染色体 (S 型) の2種類に分類でき、S 型染色体は体細胞分裂前中期に特異的な不均一に凝縮した凝縮型を生じ、凝縮型を用いば中期では識別・同定ができない S 型染色体を前中期で識別・同定することが可能となる場合があるとした。S 型染色体とは体細胞分裂中期の染色体の大きさが $1 \sim 3 \mu\text{m}$ のもので、アラビドプシス、イネ、ダイズおよび *Brassica* 属が該当し、L 型染色体には染色体の大きさが $10 \mu\text{m}$ 以上のユリ類、ムギ類および *Vicia* 属が該当する (FUKUI, 1996)。今回供試したツツジの染色体には、動原体部に認められた C バンドのほか、染色体によっては短腕および長腕の中央部や次端部が濃染された。観察された染色体の大きさは最大で $4.5 \mu\text{m}$ 未満と S 型染色体に相当していたが、濃染部の出現は前中期ではなくさらに進んだステージであったこと、凝縮部は動原体の近傍に現れるとされるが、本試験で濃染がみられた部位はおもに中央部および次端部であったことから、ツツジ染色体上に現れた濃染部が凝縮型であるとみなすことはできなかった。しかし、この濃染部は異なる種間において同じ形態を示す染色体に共通して認められたことから、ツツジ染色体の識別・同定に有効な指標であると考えられた。

供試したヤマツツジ節野生種5種の核型は、ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジの間でほぼ一致し、モチツツジおよびキシツツジはそれらと

は異なっていた。この傾向は第II章で示した葉の背軸側表皮面の形態的特性および葉緑体 DNA のハプロタイプと同様であった。キレンゲツツジはヤマツツジ節と亜属レベルで異なるため、ヤマツツジ節種とはまったく異なる染色体形態を示した。また、交雑実生の染色体を観察する中で、キレンゲツツジとヤマツツジ節種の染色体の大きさに差があり、キレンゲツツジの染色体が大きいことが明らかとなった。このため、キレンゲツツジ由来の染色体と、クルメツツジ由来の染色体を識別することは可能であった。

コムギと *Aegilops* 属の属間雑種では、接合体が異種染色体を有することによって致死が回避されることが報告されている (MILLER ら, 1982; 大塚, 1980; TSUJI・MURATA, 1976; TSUJIMOTO ら, 1987)。大塚 (1980) は、細胞質ゲノムと核ゲノムとの間に適合関係のない組合せである *Ae. squarrosa* 細胞質のもとでの AB ゲノムの機能発現には、細胞質提供親由来の 1D 染色体が過剰染色体として存在することが必須であることを報告した。常緑性ツツジとキレンゲツツジとの交雑はこれらとは異なり、実生には両親由来の染色体が1セットずつあり、細胞質提供親の染色体も1セット含まれる。しかし、一般に生存実生は得られない。本試験でクルメツツジを種子親に用いたとき、実生の生存率が高く、正常な成長を示す実生が得られた組合せの種子親は、モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有していた。このことから、ヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジがもつ染色体にモチツツジ、またはキシツツジに特徴的な染色体が付加されることが、実生の生存および成長に関係しているのではないかと推察された。

実生の生存と染色体構成との関係について、第III章においてモチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種を種子親に用いた交雑組合せは生存率が有意に高かったが、中には生存実生が得られない組合せも認められた。本試験の結果、生存率が高かった種子親は26本の染色体中、モチツツジおよびキシツツジに特徴的な染色体を1~3本有していた。一方、生存実生が得られない種子親でも、モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種では、モチツツジおよびキシツツジに特徴的な染色体を有していた。このため、実生の生存とモチツツジおよびキシツツジに特徴的な染色体と

の関係はないと考えられた。

次に、実生の正常な成長と染色体構成との関係について、正常な成長を示す実生が有するクルメツツジ由来の染色体をみると、いずれの個体もモチツツジに特徴的な T14 を有していた。生存実生中、わい化した個体の核型は調査できなかったが、正常な成長を示す個体が得られない交雑組合せの種子親の染色体構成はヤマツツジと同じであったことから、わい化した実生は T14 を有していないと推定された。よって、実生の正常な成長と T14 の間には何らかの関係があると考えられた。しかし、T14 を有するモチツツジを種子親に用いた交雑から得られた実生の成長は正常ではなかった。従って、実生の正常な成長には、T14 とその他の染色体の共存が必要と考えられた。その候補として、調査したすべての実生が有し、モチツツジにはない T3 があげられた。なお、異種間において同一と同定した染色体が遺伝子レベルでの相同性を示すという確証はないため、ヤマツツジ、ミヤマキリシマ、サタツツジおよびキシツツジに由来する T3 以外の染色体が関与している可能性も考えられた。

3. 摘要

クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた正常な成長を示す実生の染色体構成を明らかにすることを目的に、ヤマツツジ節野生種 5 種（ヤマツツジ、ミヤマキリシマ、サタツツジ、モチツツジおよびキシツツジ）、キレンゲツツジ、クルメツツジおよびクルメツツジ（種子親）×キレンゲツツジ（花粉親）の交雑実生を供試し、シュート頂の染色体を調査した。酵素解離-ギムザ染色法で染色体標本作製し、鮮明な染色体像をもつ核板に対して C バンド法による分染を行った。

ヤマツツジ ($2n = 26$)、ミヤマキリシマ ($2n = 26$) およびサタツツジ ($2n = 26$) の 13 対の相同染色体の形態はほぼ同じであり、各染色体を T1 ~ T13 とした。モチツツジ ($2n = 26$) には T3、T5 および T6 がなく、代わりに T14、T15 および T16 が認められた。キシツツジ ($2n = 26$) には T6 がなく、代わりに T15 が認められた。

クルメツツジ 7 品種の染色体数はいずれも $2n = 26$ であった。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種は、モチツツジ、あるいは

キシツツジに特徴的な染色体を 1 ~ 3 本有していた。一方、モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を示さない品種には、モチツツジ、あるいはキシツツジに特徴的な染色体がみられなかった。

キレンゲツツジ ($2n = 26$) の相同染色体は、調査したヤマツツジ節野生種 5 種とは異なる形状およびギムザ濃染部をもち、各染色体を P1 ~ P13 とした。

クルメツツジ×キレンゲツツジから得られた正常な成長を示す実生の染色体構成について、調査した 11 個体の染色体数はいずれも $2n = 26$ であった。このうち 9 個体の核型を同定・識別したところ、いずれもキレンゲツツジ由来の 13 本と、クルメツツジ由来の 13 本の染色体から構成されていた。クルメツツジ由来の染色体に関して、モチツツジに特徴的な T14 がすべての個体に認められた。

V. クルメツツジとキレンゲツツジとの交雑から得られた実生の特性

常緑性ツツジ(種子親)×キレンゲツツジ(花粉親)では、得られる実生のほとんどが白子であり、交雑実生を得るためには葉緑素の形成阻害を回避させることが必要とされる(宮島, 1994)。URESHINO ら(1999)は 2 倍性常緑性ツツジを種子親、2 倍性キレンゲツツジを花粉親とした交雑において、葉緑体 DNA が母性遺伝した実生は葉緑体ゲノム-核ゲノム間の不和合性により白子になるとした。しかし、第 III 章でクルメツツジを種子親に用いたとき、白子の発生が比較的少ない交雑組合せが多く認められた。この原因の一つとして、常緑性ツツジ由来の葉緑体 DNA をもつ実生であっても白子にならないことが考えられ、SAKAI ら(2004)は 4 倍体常緑性ツツジを種子親に用いたとき、そのような現象が起こることを報告した。

花粉親に用いたキレンゲツツジは比較的冷涼な地域に分布し、暖地における生産および露地植栽では生育が常緑性ツツジに比べて劣り、場合によっては枯死することが知られている。また、新葉展開期以後はスリップスおよびハダニによる被害が常緑性ツツジより目立つ。これらのキレンゲツツジにみられる常緑性ツツジに比べて劣る特性が交雑実生に発現した場合、花色が黄色を呈したとしても実用品種にすることは困難である。また、今回育成しようとし

ている個体は、花および葉の大きさがクルメツツジと同様であることが望ましい。そこで本章では、得られた実生の葉緑体ゲノムの由来、並びに生育および外観的特性の調査を行うことから、キレンゲツツジを黄色花色の提供親に用いたクルメツツジとの交雑による常緑性黄花ツツジ作出の可能性を検討する。

1. 実生の葉緑体DNA

ツツジ属のいくつかの種・品種では、花粉の発達過程において色素体DNAが消失しないことが報告されている (CORRIVEAU・COLEMAN, 1988; MIYAMURA ら, 1987; NAGATA ら, 1999)。また、常緑性ツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑したとき、実生が白子の場合には葉緑体DNAが常緑性ツツジに由来し、淡緑～緑色の子葉色を呈する場合はキレンゲツツジに由来することが明らかにされている (URESHINO ら, 1999)。本節では、クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた実生について、葉緑体DNAが父性遺伝しているのかどうかを調査する。加えて、キレンゲツツジ花粉の生殖細胞における色素体核DNAの存否を調査する。

1) 材料および方法

葉緑体DNAの調査について、クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた正常な成長を示す実生のうち9個体と、花粉親に用いたキレンゲツツジ JAP1 を供試した。調査はPCR-SSCP法により行った。全DNAの抽出およびPCR-SSCP分析は第II章第3節と同じとした。

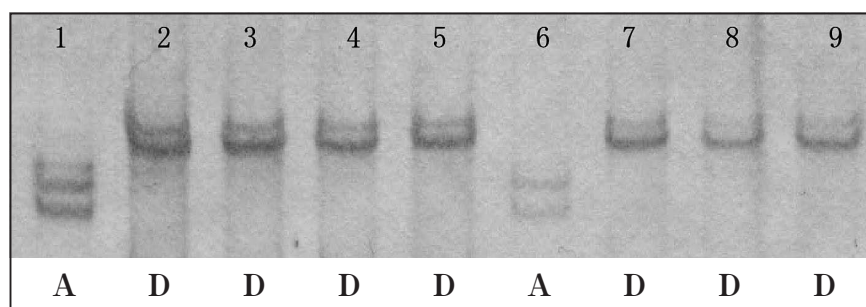
キレンゲツツジ花粉の色素体核DNAの観察について、キレンゲツツジ JAP1 の葯を4月中旬に

採取し、直ちに花粉を寒天培地 (KUBO, 1955) の入ったプラスチック製ペトリ皿 (直径5cm) の中に入れ、23℃下で花粉管の発芽および伸長を促した。15時間後に花粉管の先端が認められる辺りの培地を5mm角に切り出し、スライドガラス上に置き、4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) 液 (CyStain UV 植物分析試薬 B 液, Partec 社) を数滴滴下し、カバーガラスをかけ軽く押し潰した。作製したプレパラートは蛍光装置を備えた生物顕微鏡 (励起フィルタ EX340-380; 吸収フィルタ BA435-485; ダイクロミックミラー DM400) を用いて、生殖細胞中の色素体核DNAを観察した。

2) 結果および考察

キレンゲツツジの *trnW-P* 領域および *atpF* の SSCP バンドパターンは、第II章第3節で調査したヤマツツジ節野生種5種と異なっていたため、それぞれ D および C 型とした (第41表および第33図)。この結果から、実生の葉緑体DNAの由来の判別は *trnW-P* 領域のみを用いることとした。供試したすべての実生の葉緑体DNAの *trnW-P* 領域のバンドの型はキレンゲツツジと同じであり (第41表および第33図)、実生の葉緑体DNAは父性遺伝していると考えられた。第III章では白子の出現率が比較的少ない交雑組合せが多く認められたが、これは父性遺伝する頻度が高かったことによると考えられた。

キレンゲツツジ花粉管の生殖細胞中には色素体核DNAが観察された (第34図)。母性遺伝する植物種では生殖細胞の形成直後にオルガネラ核DNAが分解され、両親性遺伝する植物種では消失しないことが報告されている (MIYAMURA ら, 1987) ことから、



第33図 クルメツツジ (種子親) × キレンゲツツジ (花粉親) から得られた実生における葉緑体DNAの *trnW-P* 領域の SSCP バンドパターン

1. クルメツツジ '呉服', 2. キレンゲツツジ JAP1, 3~5. 呉服 × キレンゲツツジ JAP1 の実生, 6. クルメツツジ '萬代', 7~9. 萬代 × キレンゲツツジ JAP1 の実生。A および D はバンドの型。

上述した交雑実生の葉緑体 DNA が父性遺伝していると考えられたことと矛盾しない結果が得られた。

2. 実生の形態的特性

得られた実生の暖地における幼樹期の生育および冬季の着葉程度をクルメツツジ自殖実生と比較した。花器および葉の形態的特性、並びにスリップスおよび

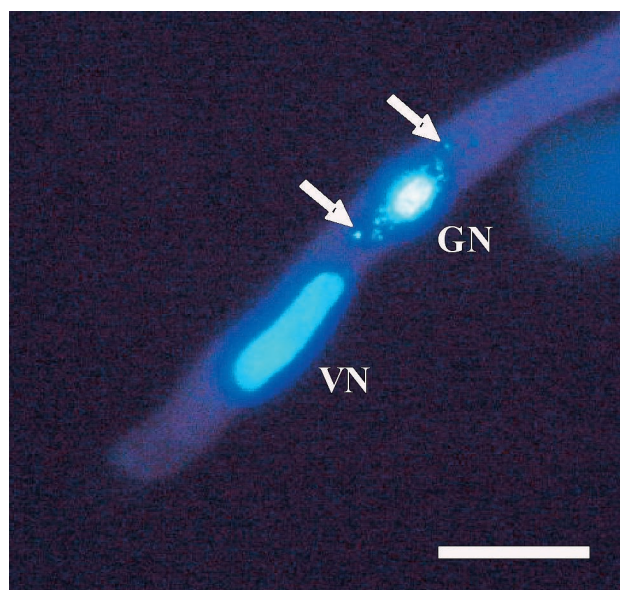
ハダニの被害程度を両親と比較した。調査結果に基づき、キレンゲツツジを黄色花色の提供親に用いたクルメツツジとの交雑における黄花品種の作出の方策について検討した。

1) 材料および方法

クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得

第 41 表 キレンゲツツジ、およびクルメツツジ（種子親）×キレンゲツツジ（花粉親）から得られた実生 9 個体の葉緑体 DNA の *trnW-P* 領域および *atpF* の SSCP バンド型

種・個体	<i>trn W-P</i>	<i>atp F</i>
キレンゲツツジJAP1	D	C
呉服×キレンゲツツジJAP1 No.1	D	—
No.2	D	—
No.3	D	—
No.4	D	—
萬代×キレンゲツツジJAP1 No.1	D	—
No.2	D	—
No.3	D	—
若楓×キレンゲツツジJAP1 No.1	D	—
No.2	D	—



第 34 図 キレンゲツツジ花粉管の DAPI 蛍光顕微鏡像
GN, 生殖細胞核；VN, 栄養細胞核。矢印は色素体核 DNA。棒線は 50 μm

られた実生, その両親およびクルメツツジ自殖実生を供試した。すべての実生は(独)農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター久留米研究拠点において2000年春に交雑し, 同年秋に播種, 養成した個体である。特性調査はジーンバンク特性調査マニュアル(農林水産省生物資源研究所)に従った。

2) 結果および考察

暖地における幼樹期の生育程度を評価するため, 2004年2月に樹高を調査した。交雑組合せごとの実生の平均樹高の範囲は, クルメツツジ(種子親)×キレンゲツツジ(花粉親)で1.6~23.1cm, 对照区のクルメツツジ自殖で34.2~75.7cmと, クルメツツジ×キレンゲツツジから得られた実生の成長はクルメツツジ自殖実生よりも遅かった(第42表)。各組合せの変動係数の範囲はクルメツツジ×キレンゲツツジで15.0~88.6%, クルメツツジ自殖で32.9~40.9%と, クルメツツジ×キレンゲツツジでは比較的変異の大きい交雑組合せが認められた。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を示さな

い品種を種子親に用いた交雑から得られた実生は, すべてわい化した(第35図)。

クルメツツジ×キレンゲツツジから得られた実生の初開花は2004年(交雑4年後)以降にみられ, クルメツツジ自殖実生の交雑2年後よりも遅かった。常緑性ツツジ間の交雑では, 樹高と花芽形成との間に関係が認められていることから(岡本・野中, 1996), 開花が遅れた原因の一つに交雑実生の成長の遅れが考えられた。花芽はクルメツツジと同様に数枚の夏葉に囲まれていたが, 常緑性ツツジのような混合花芽ではなく, キレンゲツツジと同じく各小花が内部鱗片に包まれた純正花芽であった(第36図)。開花した実生中, 花芽が充実し小花が正常に発達した個体の花器形質を調査し, 第43表に示した。花冠長は両親の中位, 裂片幅は両親の中位か, それよりも大きかった。花冠裂片の形について, 上半中央部はクルメツツジより丸く, 下半は細長い傾向が認められた。花色について, 白花ではない品種(‘呉服’および‘乙女’)を種子親に用いた交雑では, 種子親と同様な花色(第37図AおよびC), または白色であった。白花の‘萬代’を用いた交雑では

第42表 クルメツツジ(種子親)×キレンゲツツジ(花粉親)およびクルメツツジ自殖における各交雑組合せの実生の樹高

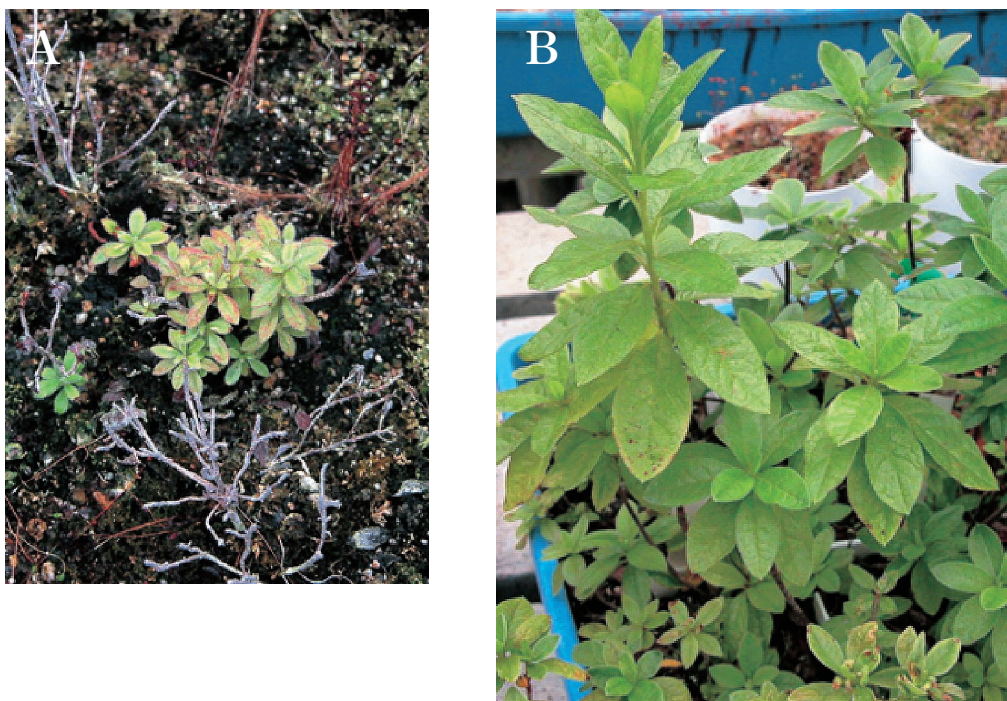
交雑組合せ	調査数	平均値 (cm)	変動係数
呉服(+) ^a ×キレンゲツツジJAP1	13	10.7	53.4
乙女(+) ^a ×キレンゲツツジJAP1	2	23.1	45.9
乱曲(+) ^a ×キレンゲツツジJAP1	2	6.6	15.0
白妙(+) ^a ×キレンゲツツジJAP1	1	8.0	—
若楓(+) ^a ×キレンゲツツジJAP1	9	6.4	42.2
萬代(+) ^a ×キレンゲツツジJAP1	10	15.5	18.3
今岡(-) ^a ×キレンゲツツジJAP1	2	1.8	31.7
桐壺(-) ^a ×キレンゲツツジJAP1	5	5.1	19.6
古金襴(-) ^a ×キレンゲツツジJAP1	3	2.2	88.6
早乙女自殖	4	75.7	32.9
誰ヶ袖自殖	7	37.5	35.3
通天自殖	9	34.2	40.9

2000年4月播種, 2004年2月調査。

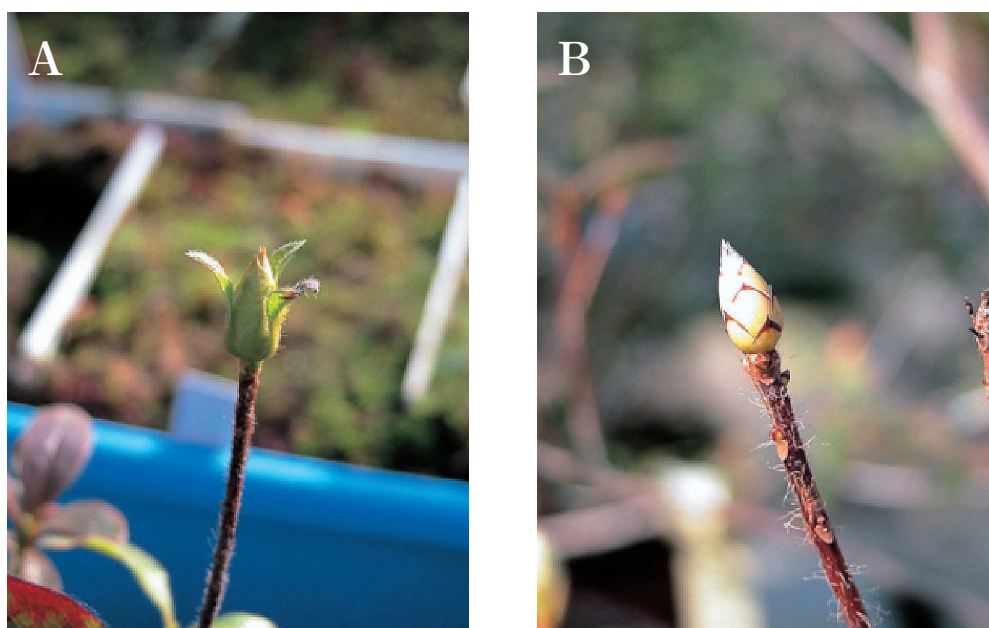
a +はモチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種,
-は有していない品種(第6表参照)。

淡緑黄～白色を呈し（第37図E），その中から黄花ツツジとして市販されている有鱗片シャクナゲのヒカゲツツジと同程度の黄色花色を示す個体「No.6」

が得られた（第38および39図）。MIYAJIMA（2000）は白花の常緑性ツツジ（ミヤマキリシマ×サツキ）を種子親に用いたキレンゲツツジとの交雑から得ら



第35図 クルメツツジ（種子親）×キレンゲツツジ（花粉親）から得られた実生の生育程度
A, 桐壺×キレンゲツツジから得られたわい化個体；B, 萬代×キレンゲツツジから得られた正常な成長を示す個体。



第36図 冬季の花芽 A, 乙女×キレンゲツツジ；B, キレンゲツツジ。

れた実生に関して、蕾時には黄色味を帯びた緑色であるが、満開になるにつれて淡黄色に変化したと述べている。本試験でも開花が進むにつれて花色が退色していく現象が認められ、開花時に淡緑黄色の個体が開花2, 3日後には黄白色となった(第40図)。

酢酸カーミンによる花粉の染色性について、細胞質が染色される花粉粒はほとんどの個体で観察されず、一部の個体でごく少数の花粉粒が染色されることがあった(第41図)。また、両親を花粉親に用いた戻し交雑を行ったところ、稔実種子は得られなかった。従って、本交雑から得られた実生は雑種不稔を示すと考えられた。

2004年6月に調査した成葉の形態的特性を第44表に示した。クルメツツジ×キレンゲツツジから得られた実生の葉身長は3.0～4.5cmと両親の中位よりも小さい値を示した。葉幅は1.4～2.1cmの範囲であった。葉形は楕円形でクルメツツジよりも長

かった。表面の葉脈の溝は「中」～「深」であり、クルメツツジよりも葉の表面の凹凸が目立った。

2003～2005年に調査したスリップスおよびハダニによる被害の程度を第44表に示した。キレンゲツツジではスリップスが未展開葉を加害することで、吸汁部の黒変、葉の伸長・展開の停止といった被害が生じる。クルメツツジではスリップスの加害により吸汁部が黒変することがあるが、葉の伸長・展開は妨げられない。クルメツツジ×キレンゲツツジから得られた実生では、キレンゲツツジと同様な被害が認められた。また、キレンゲツツジはクルメツツジよりもハダニの被害が目立つが、得られた交雑実生はハダニの加害により葉が褐色味を帯び落葉する、または新葉の展開が妨げられるといった被害が認められた。従って、クルメツツジ×キレンゲツツジから得られた実生はクルメツツジよりもスリップスおよびハダニに弱いと評価された。

第43表 クルメツツジ(種子親)×キレンゲツツジ(花粉親)から得られた実生の花器に関する形態的特性

個体・品種		花冠長	花冠上半	花冠上半の	花冠下半の	雄蕊数	花色 ^c	ブロッ チ色 ^c
		(cm)	中央部の 裂片幅 (cm)	裂片の形 ^a	裂片の形 ^b			
呉服×キレンゲツツジJAP1	No.1	3.8	1.6	3/4円形	半円形	5.0	54B	46A
	No.2	4.2	1.6	卵形	長楕円形	5.0	47B	46A
	No.4	3.4	1.2	倒卵形	披針形	5.0	155D	154D
乙女×キレンゲツツジJAP1	No.1	5.2	2.6	半円形	披針形	7.0	58D	43C
萬代×キレンゲツツジJAP1	No.1	4.6	1.9	倒卵形	披針形	6.0	155B	154A
	No.3	4.2	1.8	半円形	披針形	5.0	155D	—
	No.6	4.1	1.6	卵形	披針形	5.0	4D	150A
(種子親)								
呉服		2.8	0.9	長楕円形	倒卵形	5.0	51C/49C	53B
乙女		3.0	1.2	卵形	倒卵形	6.6	49A	50C
萬代		2.9	0.9	披針形	狭倒卵形	5.3	155D	155D
(花粉親)								
キレンゲツツジJAP1		5.4	2.1	3/4円形	長楕円形	5.6	17D	17A

a 花冠上半の3枚の裂片のうち中央部の裂片の形。

b 花冠下半の2枚の裂片の形。

c R.H.S. カラーチャート番号。



第 37 図 クルメツツジ（種子親）×キレンゲツツジ（花粉親）から得られた実生の花
A, 呉服×キレンゲツツジ「No.2」；B, 呉服（種子親）；C, 乙女×キレンゲ
ツツジ「No.1」；D, 乙女（種子親）；E, 萬代×キレンゲツツジ「No.1」；F,
萬代（種子親）。



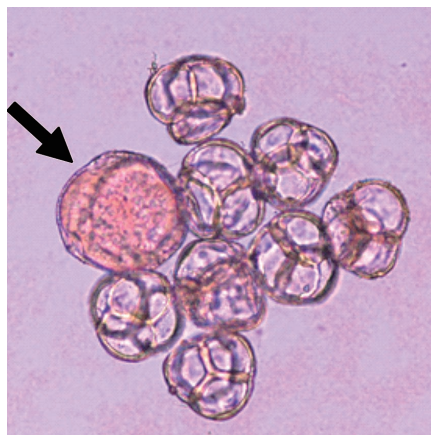
第38図 萬代×キレンゲツツジ「No.6」の切り開いた花冠



第39図 萬代×キレンゲツツジ「No.6」(上)と
白花クルメツツジ「白妙」(下)の花
色の比較



第 40 図 萬代×キレンゲツツジ「No.6」にみられた開花後の花色の退色
蕾時と比較し、開花 3 日目ではほとんど黄色味が失われている。



第 41 図 萬代×キレンゲツツジ「No.3」の花粉稔性酢酸カーミンで染色した。矢印は染色された稔性花粉（ツツジ科の花粉は四集粒）。

2004年2月に調査した冬季の着葉数を第45表に示した。交雑組合せごとの平均値の範囲はクルメツツジ×キレンゲツツジで3.4～6.0枚、クルメツツジ自殖では9.8～12.5枚であった。変動係数はクルメツツジ×キレンゲツツジで39.2～72.4%と、クルメツツジ自殖(15.1～24.2%)よりも変異が大きかった。これらの結果から、クルメツツジ×キレンゲツツジから得られる実生の着葉数はクルメツツジに比べて少ないものの、変異が大きいためキレンゲツツジよりも着葉数が多い個体が見られる可能性があると考えられた。

3. 総合考察

常緑性ツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた実生の葉緑体DNAに関して、小林(1996)は得られた生存実生の葉緑体DNAが父性遺伝していることを認めた。また、URESHINOら(1999)は子葉が緑色、淡緑色、白色およびキメラを示す実生の葉緑体DNAを調査し、緑および淡緑色のときはキレンゲツツジ由来、白色のときは常緑性ツツジ由来であることから、常緑性ツツジの葉緑体ゲノムとキレンゲツツジの核ゲノムとの間に不和合性が生じると考えた。第Ⅲ章で行ったクルメツツジを種子親に用いた交雑では、供試した39品種のうち18品種を

第44表 クルメツツジ(種子親)×キレンゲツツジ(花粉親)から得られた実生の葉に関する形態的特性と、スリップスおよびハダニによる被害の程度

個体・品種	葉身長 (cm)	葉幅 (cm)	葉形	上面の葉脈の溝	スリップスの被害	ハダニの被害
呉服×キレンゲツツジJAP1 No.2	4.5	1.8	楕円形	中	大	やや大
No.3	3.5	1.4	楕円形	中	大	大
No.4	3.6	1.5	楕円形	中	大	大
白妙×キレンゲツツジJAP1 No.1	4.0	1.4	楕円形	深	大	大
萬代×キレンゲツツジJAP1 No.1	4.2	1.8	楕円形	中	大	やや大
No.3	3.0	1.4	楕円形	深	大	大
No.6	4.3	2.1	楕円形	中	大	大
若楓×キレンゲツツジJAP1 No.1	3.5	1.5	楕円形	深	大	やや大
(種子親)						
呉服	3.0	1.2	卵形	浅	なし	中
白妙	3.7	1.7	楕円形	浅	なし	中
萬代	2.8	1.4	卵形	浅	なし	やや大
若楓	3.0	1.5	卵形	浅	なし	中
(花粉親)						
キレンゲツツジJAP1	6.7	1.9	倒披針形	深	大	やや大

第 45 表 クルメツツジ（種子親）×キレンゲツツジ（花粉親）およびクルメツツジ自殖における交雑組合せごとの実生の冬季の着葉数

交雑組合せ	調査数	平均値 (枚)	変動係数 (%)
呉服×キレンゲツツジJAP1	15	3.8	45.8
乙女×キレンゲツツジJAP1	5	6.0	39.2
萬代×キレンゲツツジJAP1	11	4.0	48.8
若楓×キレンゲツツジJAP1	10	3.4	72.4
早乙女自殖	5	9.8	15.1
通天自殖	9	11.2	17.8
誰ヶ袖自殖	10	12.5	24.2

用いた組合せで白子率が10%以下であった（第28表）。このため、常緑性ツツジ由来の葉緑体ゲノムを有する実生であっても、葉緑体ゲノム-核ゲノム間の不和合性による葉緑素の形成阻害を伴わない実生が存在することが仮定された。しかし、調査した交雑実生の葉緑体DNAはすべてキレンゲツツジ由来であった。

一方、マツヨイグサ属には葉緑体ゲノムが5型あり、各型の間には競争力の強弱関係が存在する（常脇・遠藤，1980）。これと同様な現象がヨウラクツツジ属の *Menziesia multiflora* Maxim. と *M. multiflora* var. *purpurea* (Makino) Ohwi との交雑において認められていることから（KITAら，2005b），本試験でみられた各交雑組合せの白子率の高低の要因となる葉緑体DNAの遺伝性に対して、葉緑体ゲノム間の競争力の強弱関係が想定された。第II章においてクルメツツジの葉緑体DNAのSSCPバンドパターンを調査したが、実生の白子率が高かった組合せの種子親である‘式部桜’および‘誰ヶ袖’と、低かった組合せの種子親である‘呉服’および‘松の雪’の葉緑体はいずれもヤマツツジ型であった（第20表）。このため、葉緑体ゲノムに関して‘式部桜’>キレンゲツツジ>‘呉服’というような強弱関係の存在を明らかにすることはできなかった。

赤羽（1993）はミヤマキリシマ‘雲仙白’とサツキ‘博多白’との種間雑種20数個体を種子親に用いたキレンゲツツジとの交雑を行い、その中にキレ

ンゲツツジとの交雑和合性が比較的高い個体があること、得られた1年生実生は樹高が1～11.2cmの範囲（平均4.6cm）にあり、中にはサツキ品種間交雑から得られた実生よりも生育がよい個体が得られることを示した。クルメツツジ（種子親）×キレンゲツツジ（花粉親）から得られた実生はクルメツツジ自殖実生よりも成長が遅く、赤羽（1993）と同様な評価とはならなかった。本試験で実生の養成を行った九州沖縄農業研究センター久留米研究拠点では、キレンゲツツジの葉の展開および新枝の伸長は遅くとも5月下旬までに終了するが、クルメツツジでは秋まで続く。従って、実生の成長が遅れた原因として、高温下での成長に対するキレンゲツツジの遺伝的特性の影響が考えられた。

モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を示さないクルメツツジ品種を種子親とする生存実生は、わい化した。*Ae. squarrosa* 細胞質をもつ二粒系コムギの細胞質置換系統の自殖によって得られた次世代植物には、わい化した個体がみられる（大塚，1980）。また、イネの垂種間交雑ではわい化し、その後成長が停止し致死する個体が見られ、これらは生殖的隔離機構の一つである雑種弱勢とされた（雨宮・明峰，1963）。よって、本試験で認められた実生のわい化は、受精後の交雑隔離障壁の一つと考えられた。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有するクルメツツジ品種が種子親である実生には、正常に成長する個体が多く含まれたことか

ら、モチツツジ、またはキシツツジが本交雑におけるわい化の抑制に関係した遺伝的因子を備えていることが推察された。第IV章で行った染色体に関する調査では、正常な成長を示す実生はモチツツジに特徴的な染色体 T14 を有していた。しかし、T14 単独では正常な成長を示すことは不可能で、他の染色体との共存（候補として T3）が必要であると考えられた。このため、T3 と T14 の共存がわい化の回避に対して何らかの役割を担っている可能性が考えられた。

花器形質に関して、小林ら（1999）は赤羽（1993）が育成した実生の花器形質を調査し、到花年数が2～7年であること、花芽は常緑性ツツジのように夏葉に囲まれるが、葉芽を含む混合花芽ではなく、各小花が内部鱗片に包まれるキレンゲツツジと同じ純正花芽であること、花冠は開いた漏斗形と種子親に似るが、直径は3～6cmと両親よりも小さく、花色は淡緑黄～黄白色で、開花後徐々に退色することを示した。倉重・赤羽（2001）は台湾に分布し、樹型がはい性で分枝が多いため、わが国ではサツキとの交雑に利用されることがある *R. nakaharai* を種子親とした交雑から得られた実生について、花芽は夏葉に囲まれるが、混合花芽ではなく、各小花が内部鱗片に包まれる純正花芽であること、花冠は開いた漏斗型で直径が4.5～5.5cm、花色は濃桃色～明赤色であることを示した。本試験の結果は、これらの報告と花芽が常緑性ツツジとは異なる純正花芽であること、白花以外の品種を種子親に用いたとき種子親と同様な花色を呈すること、黄色系の花色は開花後徐々に退色していくこと、について共通していた。実生の花色に関しては、種子親に用いたクルメツツジ品種と同じ花色を呈する個体がみられる一方で、花粉親であるキレンゲツツジと同程度の黄色を示す個体がみられなかったことから、雑種第一代ではクルメツツジ由来のフラボノイド系色素の発現（生成）が優れるのに対して、キレンゲツツジ由来のカロテノイド系色素の発現が著しく劣ると考えられた。

黄色の花色が退色していく原因としては、開花に伴う花冠の細胞肥大により黄色の花色素を含むプラスチックの密度が低下すること、および開花後は蕾時よりも太陽光線が花冠をよく透過するようになるため黄色が淡く見えること、これらに加えて花冠が太陽光線に曝されることで黄色花色素が分解されるこ

とが想定され、曇天が続く、あるいは強遮光下での栽培では退色の進行が鈍ることが観察されている。常緑性黄花ツツジを育成する上でこの現象は致命的であり、今後の原因解明と打破が求められる。

葉の形質に関して、小林（1996）は赤羽（1993）が育成した実生の葉の大きさが2.7～4.2cmと変異が大きく、葉形は狭楕円形か、楕円形で、落葉程度は常緑性ツツジに比べて顕著であることを示した。一方、倉重・赤羽（2001）は *R. nakaharai* を種子親とした交雑から得られた実生の葉の長さが3.0～3.5cm、幅1.0～1.5cm、葉形が楕円形であること、冬季に葉が残存する実生が得られることを示した。本試験の結果は、これらの報告と葉形および葉の大きさが両親の中位より小さい点で一致していた。しかし、冬季の着葉性については見解の相違がみられた。その原因として、本試験、並びに小林（1996）ではヤマツツジ節の中で最も落葉性が強い種の一つであるミヤマキリシマの遺伝的特性を備えた品種・個体を種子親としているのに対して、倉重・赤羽（2001）は着葉数が比較的多い種を種子親に用いていたことが考えられた。従って、本交雑における実生の冬季の着葉程度は用いた種子親の着葉性に大きく影響されると推察された。これまで報告がみられない虫害に関して、スリップスおよびハダニの被害がキレンゲツツジ並みに高いと評価され、生産および栽培管理上、キレンゲツツジと同様な欠点をもつと位置づけることが妥当とされた。なお、冷涼な東北地方では、交雑実生およびキレンゲツツジ共にこれらの被害はほとんど認められず（嬉野、私信）、暖地に特有な問題であることが指摘された。

このように黄色花色の提供親としてキレンゲツツジを用いた場合、その実生は中小輪系品種群のクルメツツジよりも花および葉が大きかった。また、暖地での生産および栽培管理上の欠点があることも明らかとなった。本交雑で得られた実生からはキレンゲツツジに相当する黄色花色を呈する個体が得られなかったことから、花色をさらに濃くするためにはキレンゲツツジと戻し交雑を行うことが想定されるが、この場合、キレンゲツツジのもつ落葉性および虫害に関する遺伝子の集積が懸念された。また、落葉性の改善、スリップスおよびハダニの被害軽減のためには常緑性ツツジとの戻し交雑が必要と考えられるが、花色が淡くなることは必至である。このた

め、今後の方向としては得られた実生の複二倍体化個体を用いた雑種の後代の育成がもっとも適切と考えられた。一方、黄色花色の提供親として暖地での栽培に不向きなキレンゲツツジを花粉親に利用している点についても検討する必要があると考えられた。ツツジ属中にはレンゲツツジ亜属以外に黄色の花をもつ種・品種があり、とくに有鱗片シャクナゲには常緑性の種が多く、‘Saffron Queen’、‘Wren’および‘Simbu Sunset’ (*R. laetum* J. J. Smith × *R. zoelleri* Warb.)等の黄色花色素を有する品種が存在する。最近、これらの品種が比較的容易に入手できるようになってきた。よって、暖地向き品種の作出を目的とした交雑育種では、まず黄色花色の提供親を選定する作業として、黄色花をもつ種・品種について暖地での栽培適性を評価し、その中から交雑親を選抜するステップを加えることが提案され、今後その有効性について検討していく必要がある。

4. 摘要

クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた実生の葉緑体 DNA の由来を PCR-SSCP 法を用いて調査した。供試したすべての個体の葉緑体 DNA の *trnW-P* 領域のバンドパターンはキレンゲツツジと同じであり、葉緑体が父性遺伝していることが明らかとなった。キレンゲツツジ花粉管の生殖細胞中の色素体核 DNA の存否を明らかにするため、花粉発芽培地で発芽させた花粉管を DAPI 液で染色し、生物顕微鏡で観察したところ、色素体核 DNA の存在が認められた。

クルメツツジにキレンゲツツジ花粉を交雑して得られた実生の特性を調査した。暖地における生育程度を評価するため播種4年目の樹高を調査したところ、交雑実生はクルメツツジ自殖実生より低かった。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を示さないクルメツツジ品種を種子親に用いた交雑から得られた実生はすべてわい化した。交雑実生の初開花は交雑4年後以降で、クルメツツジ自殖実生よりも遅かった。花芽はキレンゲツツジと同じ純正花芽であった。花冠長は両親の中位、裂片幅は両親の中位か、それよりも大きかった。花冠裂片の形について、上半中央部はクルメツツジより丸く、下半は細長い傾向がみられた。花色について、白花ではない品種を種子親に用いた交雑では種子親と同色、ま

たは白色であった。白花品種を種子親に用いた交雑では淡緑黄～白色であった。黄色系の花は開花後徐々に退色した。花粉稔性は一部の個体のごく少数の花粉粒のみに認められた。また、両親の花粉を戻し交雑したとき稔実種子は得られなかった。葉の大きさは両親の中位より小さかった。葉形は楕円形で、表面の葉脈の溝はクルメツツジよりも深かった。スリップスの加害により、吸汁部の黒変、葉の伸長・展開の停止が認められた。ハダニの加害により葉が褐色味を帯び落葉する、または新葉の展開が妨げられることが認められた。冬季の着葉数はクルメツツジ自殖実生よりも少なかった。

VI. 総 括

北部九州地域で生産が盛んな中小輪系の常緑性ツツジであるクルメツツジは、景気の低迷および公共緑化樹の多様化から生産量が漸減している。このような中、生産者は公共的消費から個人消費へターゲットの移行を模索し始めている。クルメツツジの個人消費に対するニーズとして、市場からは黄色の花をもつ品種の育成が求められている。常緑性黄花ツツジの作出を目的とした交雑育種では黄色花の提供親として一般にキレンゲツツジが利用されているが、植物分類学上ツツジ亜属とレンゲツツジ亜属との亜属間交雑となり生殖的隔離機構が存在するため、実用品種は育成されていない。本研究では、クルメツツジを種子親、キレンゲツツジを花粉親とした交雑育種を実施するに当たり問題となる生殖的隔離機構の様相を解明し、これに基づき交雑能力に影響を与える主因および交雑能力に優れる交雑親の遺伝的背景を明らかにすることから、正常な成長を示す実生を効率的に得ようとしたものである。このことを遂行するための作業として、受精前および受精後の交雑隔離障壁の調査と、同時並行でクルメツツジの品種多様性に対するモチツツジおよびキシツツジの関与性を検討した。また、得られた実生に対して、外観的特性および栽培の難易性を評価することから、実用品種を作出するための方策を示した。

常緑性ツツジ(種子親)×キレンゲツツジ(花粉親)における実生獲得までにみられる交雑隔離障壁として、花粉管の伸長阻害、花粉管の胚珠への貫入阻害、受精失敗、受精直後の胚珠退化、発芽不能、葉緑素

の形成阻害および夭折が認められた。キシツツジを種子親に用いた場合、花粉-花柱間に完全な交雑不和合性が存在した。キシツツジ以外の野生種13種を用いた場合は、複数の交雑隔離障壁が重複して存在し、それぞれは雑種形成を低下させたが、完全な隔離をもたらすことはなかった。また、交雑花当たりの生存実生数(交雑能力)の評価は種ではなく、個体レベルで行う必要があることが示唆された。クルメツツジを種子親としたとき、交雑能力は交雑隔離に係る形質のうち「胚珠への花粉管の貫入」および「白子以外の実生における播種2年後の生存(生存率)」に強く影響を受けた。一方、常緑性ツツジとキレンゲツツジとの交雑における不和合性の要因として注目されている核-葉緑体ゲノム間の不和合性から生じる白子の影響は小さいと評価された。

葉の背軸側表皮面の形態的特性および花芽のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ・アイソザイムから、クルメツツジ中にはモチツツジ、またはキシツツジの遺伝的特性を有する品種が存在することが示唆された。モチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を有する品種を種子親に用いた場合、生存率が高く、交雑能力に優れることが明らかとなった。クルメツツジには花色が白および地色が白の絞り咲き品種が多数存在することから、これらの品種からモチツツジおよびキシツツジと同じ葉面形態特性を示す品種を抽出し、交雑能力を評価することにより、キレンゲツツジとの交雑能力に優れた種子親の獲得が期待された。一方、クルメツツジ中には胚のうの減数分裂異常および核分裂異常が多い品種が存在することが明らかとなり、種子親を選定する際には、正常胚のうの程度についても考慮する必要があると考えられた。

花粉親に用いるキレンゲツツジ個体間には、花粉管の貫入がみられた胚珠率、1花当たりの成熟種子数および白子率に有意な差が認められ、他よりも多くの生存実生が得られる個体が認められた。このため、花粉親に用いるキレンゲツツジ個体の選定が、実生獲得のために重要であることが示唆された。

本交雑から得られた生存実生には、正常な成長を示す個体と、わい化する個体がみられた。わい化は交雑隔離障壁の一つである雑種弱勢と考えられた。正常な成長を示す実生の染色体数は $2n = 26$ で、キレンゲツツジ由来の13本と、クルメツツジ由来の

13本から構成されていた。このうちクルメツツジ由来の染色体に関しては、調査したすべての実生にモチツツジに特徴的な染色体T14が認められた。わい化個体にはT14が存在しないことから、T14が本交雑から得られた実生におけるわい化の抑制に関係があると推定された。しかし、T14を有するモチツツジを種子親に用いたとき、得られた生存実生の成長は正常ではなかった。このことから、実生の正常な成長にはT14に加えて、他の染色体の存在が必要と推定され、その候補として正常な成長を示す実生には認められるが、モチツツジにはないT3があげられた。

以上の結果から、花粉-花柱間の完全な不和合性を示さず、T3を有しているヤマツツジ、ミヤマキリシマおよびサタツツジと、T14を有するモチツツジとの交雑種を種子親に用いると、交雑能力が優れ、実生のわい化が回避されるため、効率的に雑種第一代を獲得することができると考えられた。

開花に至った実生の特性について、花および葉はクルメツツジよりも大きく、中小輪系品種とはいえなかった。花色はキレンゲツツジよりも淡い黄色であり、雑種第一代ではクルメツツジ由来のフラボノイド系色素に比べて、キレンゲツツジ由来のカロテノイド系色素の発現(生成)が著しく劣ると考えられた。葉は表面の葉脈の溝が目立ち、落葉性が強く、これらの点を改善する必要がある。成長は、キレンゲツツジと同様、暖地における栽培では生育期間が限られるため遅かった。スリップスおよびハダニによる被害がキレンゲツツジ並みに大きく、栽培管理上の評価は「やや難」とされた。今後、黄色花色を濃色化するためにはキレンゲツツジとの戻し交雑が考えられるが、落葉性と、スリップスおよびハダニによる害に対して望まない方向への遺伝子の集積が懸念された。逆に、落葉性の改善、スリップスおよびハダニの被害回避には常緑性ツツジとの戻し交雑が必要と考えられるが、花色が淡くなることは必至である。このため、今後の方向としては得られた実生の後代を育成していくことが最も適切と考えられた。一方、黄色花色の提供親として、暖地での栽培に不向きなキレンゲツツジを花粉親に利用していることが実生の生育に影響を与えていることから、暖地向き品種の作出のためには、黄色花色の提供親となる黄花種・品種について暖地における栽培適性

を評価した上で交雑親を選定することが提案された。

引用文献

- 1) 阿部定夫・国重正昭 (1958) ツツジに関する研究 (第2報) キリシマツツジの変異とその起源に関する考察. 園学要旨 昭33秋:42.
- 2) ACKERMAN, W. L. and ZHANG, A. I. (1983) Distinguishing *Camellia* L. species using dorsal leaf surface impressions. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **108**:439-444.
- 3) 赤羽 勝 (1993) ミヤマキリシマとサツキのF1植物とレンゲツツジの交雑和合性. 園学雑 62(別1):344-345.
- 4) 赤羽 勝 (1997) ツツジ, シャクナゲ. 「農業技術大系花卉編5」(農山漁村文化協会編). p313-318. 農山漁村文化協会, 東京.
- 5) 赤羽 勝・山中昭雄・高島大典・中枝 健・中村吉彦 (1971) ツツジ属の種間交雑稔性と雑種植物の生育について. 栃木農試研報 15:95-102.
- 6) 赤司喜次郎 (1934) 久留米躑躅誌 (第5版). 80p. 赤司廣樂園, 福岡.
- 7) 雨宮 昭・明峰英夫 (1963) イネの致死補足遺伝子に関する遺伝生化学的研究. 農技研報 D10:139-226.
- 8) ARULSEKAR, S., PARIFITT, D. E. and MCGRANAHAN, G. H. (1985) Isozyme gene markers in *Juglans* species. *J. Hered.* **76**:103-106.
- 9) BARBANO, P. P. and TOPOLESKI, L. D. (1984) Postfertilization hybrid seed failure in *Lycopersicon esculentum* × *Lycopersicon peruvianum* ovules. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **109**:95-100.
- 10) BARONE, A., GIUDICE, A. D. and NG, N. Q. (1992) Barriers to interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* and *Vigna vexillata*. *Sex. Plant Reprod.* **5**:195-200.
- 11) BAUCHAN, G. R. and HOSSAIN, M. A. (1999) Constitutive heterochromatin DNA polymorphisms in diploid *Medicago sativa* ssp. *Falcate*. *Genome.* **42**:930-935.
- 12) BUITENDIJK, J. H. and RAMANNA, M. S. (1996) Giemsa C-banded karyotypes of eight species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Ann. Bot.* **78**:449-457.
- 13) BYRNE, D. H. and LITTLETON, T. G. (1989) Interspecific hybrid verification of plum × apricot hybrids via isozyme analyses. *HortScience* **24**:132-134.
- 14) CAI, Q. and CHINNAPPA, C. C. (1987) Giemsa C-banded karyotypes of seven north American species of *Allium*. *Amer. J. Bot.* **74**:1087-1092.
- 15) CHAMBERLAIN, D. F. and RAE, S. J. (1990) A revision of *Rhododendron* IV. Subgenus *Tsutsusi*. *Edinb. J. Bot.* **47**:89-200.
- 16) CHEN, L. and ADACHI, T. (1992) Embryo abortion and efficient rescue in interspecific hybrids, *Lycopersicon esculentum* and the 'peruvianum - complex'. *Japan. J. Breed.* **42**:65-77.
- 17) CORRIVEAU, J. L. and COLEMAN, A. W. (1988) Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species. *Amer. J. Bot.* **75**:1443-1458.
- 18) CREECH, J. L. 1955. An embryological study in the *Rhododendron* subgenus *Anthodendron* Endl.. *Bot. Gaz.* **116**:234-243.
- 19) DE JEU, M. J. and CALDERE, F. G. (1997) Retarded embryo growth and early degeneration of sporophytic tissue are associated with embryo abortion in the interspecific cross *Alstroemeria pelegrina* × *Alstroemeria aurea*. *Can. J. Bot.* **75**:916-924.
- 20) DE LOOSE, R. (1979) Characterization of *Rhododendron simsii* Planch. cultivars by flavonoid and isoenzyme markers. *Scientia Hort.* **11**:175-182.
- 21) DICKSON, E. E., KRESOVICH, S. and WEEDEN, N. F. (1991) Isozymes in North American *Malus* (Rosaceae): hybridization and species differentiation. *Syst. Bot.* **16**:363-375.
- 22) DONG, F. J., MCGRATH, M. J., HELGESON, P. and JIANG, J. (2001) The genetic identify of alien chromosomes in potato breeding lines revealed by sequential GISH and FISH analyses using chromosome-specific cytogenetic DNA markers. *Genome.* **44**:729-734.
- 23) DONNELLY, E. D. and CLARK, E. M. (1962) Hybridization in the genus *Vicia*. *Crop Sci.* **2**:141-145.
- 24) DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L. (1988) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* **12**:13-15.
- 25) EBADI, A., SEDGLEY, M., MAY, P. and COOMB, B. G. (1996) Seed development and abortion in *Vitis vinifera* L., cv. Chardonnay. *Int. J. Plant Sci.* **157**:703-712.
- 26) ENDO, T. R. (1986) Complete identification of common wheat chromosomes by means of the C-banding technique. *Japan. J. Genet.* **61**:89-93.
- 27) FUKUI, K. 1996. Plant chromosomes at mitosis. In: Plant chromosomes: Laboratory methods. (FUKUI, K. and NAKAYAMA, S. eds.) p1-18. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 28) 福井希一 (2006) 染色体情報表記法. 核型表記法 (凝縮型: Condensation pattern). 「クロモソーム植物染色体研究の方法」(福井希一・向井康比己・谷

- 口研至編著). p136-137. 養賢堂, 東京.
- 29) 福岡県農政部農業技術課・福岡県久留米農業改良普及所 (1977) 久留米市におけるツツジ生産の実態とツツジ産地振興に関する問題点. 171p. 福岡県, 福岡.
- 30) GALLE, F. C. (1987) Evergreen azaleas. In: Azaleas (revised and enlarged edition) . (GALLE, F. C. ed.) p 123-305. Timber Press, Portland, Oregon.
- 31) GILLESPIE, J. H. and LANGLEY, C. H. (1974) A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics* . **76**:837-848.
- 32) GOTOH, S. and IKEHASHI, H. (1992) Survey of isozyme genes by polyacrylamide gel electrophoresis in cauliflower, broccoli and cabbage (*Brassica oleracea*) . *Japan. J. Breed.* **42**:23-32.
- 33) 後藤利幸・西村和明 (1971) レンゲツツジに関する研究. 1. 交配の和合性および花色の発現について. 園学要旨. 昭46秋:232-233.
- 34) GUERITAINE, G., BONAVENT, J. F. and DARMENCY, H. (2003) Variation of prezygotic barriers in the interspecific hybridization between oilseed rape and wild radish. *Euphytica*. **130**:349-353.
- 35) HAUAGGE, R., KESTER, D. E. and ASAY, R. A. (1987) Isozyme variation among California almond cultivars: I. Inheritance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **112**:687-693.
- 36) 初島住彦 (1958) マルバサツキの一群について. 北陸の植物 **7**:19-22.
- 37) HEIMBURGER, M. (1962) Comparison of chromosome size in species of anemone and their hybrid. *Chromosoma*. **13**:328-340.
- 38) HERENDEEN, P. S. and DILCHER, D. L. (1990) Reproductive and vegetative evidence for the occurrence of *Crudia* (Leguminosae, Caesalpinioideae) in the eocene of southeastern north America. *Bot. Gaz.* **151**:402-413.
- 39) HIRAI, M., KOZAKI, I. and KAJIURA, I. (1986) The rate of spontaneous inbreeding of trifoliolate orange and some characteristics of the inbred seedlings. *Japan. J. Breed.* **36**:138-146.
- 40) 日詰雅博 (1991) 植物染色体の核型分析. 植物細胞工学 **3**:78-83.
- 41) HOSODA, T., MORIYA, A. and SARASHIMA, S. (1953) Chromosome number of Satsuki, *Rhododendron lateritium* Pl. *Genetica*. **26**:407-409.
- 42) 井上 勤 (1998) 新版顕微鏡観察シリーズ1 顕微鏡観察の基本. 228p. 地人書館, 東京.
- 43) 石川隆二 (1994) アイソザイムマーカーによるイネ遺伝・育種学の再構築. 育種学最近の進歩 **36**:25-28.
- 44) ISODA, K., SHIRAIISHI, S., WATANABE, S. and KITAMURA, K. (2000) Molecular evidence of natural hybridization between *Abies veitchii* and *A. homolepis* (Pinaceae) revealed by chloroplast, mitochondrial and nuclear DNA markers. *Molecular Ecology*. **9**:1965-1974.
- 45) 板橋 建・嬉野健次・赤羽 勝 (2003) ツツジ属植物における PCR-SSCP 分析に有用な葉緑体 DNA マーカーの検討. 園学雑 **72** (別 2):262.
- 46) KAUL, V., ROUSE J. L. and WILLIAMS, E. G. (1986) Early events in the embryo sac after intraspecific and interspecific pollinations in *Rhododendron kawakamii* and *R. retusum*. *Can. J. Bot.* **64**:282-291.
- 47) KELLER, E. R. J., SCHUBERT, I., FUCHS, J. and MEISTER, A. (1996) Interspecific crosses of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic *in situ* hybridization. *Theor. Appl. Genet.* **92**:417-424.
- 48) KITA, K., KURASHIGE, Y., YUKAWA, T., NISHIMURA S. and HANDA, T. (2005a) Intergeneric hybridization between *Menziesia* and *Rhododendron* based on molecular phylogenetic data. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **74**:51-56.
- 49) KITA, K., KURASHIGE, Y., YUKAWA, T., NISHIMURA S. and HANDA, T. (2005b) Plastid inheritance and plastome-genome incompatibility of intergeneric hybrids between *Menziesia* and *Rhododendron*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **74**:318-323.
- 50) 北島 宣・内田隆男・石田雅士 (1993) カキ '富有' の胚のう形成と受精過程が種子形成に及ぼす影響. 園学雑 **62**:327-335.
- 51) 小林泰生 (1980) ツツジ類の花色に関する研究. (第2報) クルメツツジ園芸品種の成立について. 福岡園試研報 **18**:33-40.
- 52) 小林伸雄 (1996) 常緑性ツツジの類縁関係と園芸品種の起源解明に関する研究. 144p. 筑波大学学位論文.
- 53) KOBAYASHI, N., AKABANE, M., HANDA, T. and TAKAYANAGI, K. (1996) Inheritance of morphological characters and RAPD markers in intersubgeneric hybrids of azalea, (*Rhododendron kiusianum* Makino × *R. indicum* (L.) Sweet) × *R. japonicum* (A. Gray) Suringer f. *flavum* Nakai. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **65**:145-153.
- 54) KOBAYASHI, N., HORIKOSHI, T., KATSUYAMA, H., HANDA T. and TAKAYANAGI, K. (1998) A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. *Plant Tissue Cult. and Biotech.* **4**:76-80.
- 55) 小林伸雄・金谷健至・赤坂仁子・石原美香・中務 明・嬉野健次 (2005) ツツジ属植物の遺伝資源の活用

- 関する研究. (第6報) ミヤマキリシマ (*Rhododendron* × *tectum* Koidz.) の花器形質と葉緑体 DNA パターンについて. 園学雑 74 (別2):498.
- 56) 小林伸雄・川嶋師保子・宮島郁夫・岡本章秀・半田 高・高柳謙治・有隅健一 (1996) ツツジ属の類縁関係と園芸ツツジの起源解明に関する研究. (第6報) 九州各地の野生ツツジ集団および園芸品種の PCR-RFLP 分析. 園学雑 65 (別2):474-475.
- 57) 小林伸雄・倉重祐二・飯塚正英・木村康夫・赤羽勝 (1999) (ミヤマキリシマ × サツキ) × キレンゲツツジの雑種個体の花器形質について. 園学雑 68 (別1):111.
- 58) 小島清嗣 (1994) NIH Image を用いた電気泳動パターンの解析. コンピュータサイエンス 1:17-23.
- 59) KRAUSE, C. R. (1976) Surface characteristics of American elm clones for identification by scanning electron microscopy. *HortScience*. 11:386-388.
- 60) KREBS, S. L. (1996) Normal segregation of allozyme markers in complex *Rhododendron* hybrids. *J. Hered.* 87:131-135.
- 61) KUBO, A. (1955) On the germination of the pollen-grains of Ericaceae. *Japan. J. Bot.* 15:15-27.
- 62) 釘貫ふじ・村田 源 (1987) 日本産シャクナゲ類の葉の表皮系に見られる特徴. 植物分類, 地理 38:349-358.
- 63) 国重正昭 (1974) わが国のサツキ園芸品種. 農業および園芸 49:681-686.
- 64) 国重正昭 (1976) クルメツツジの品種と栽培. 「ツツジ その種類と栽培」(ガーデンライフ編) p 112-124. 誠文堂新光社, 東京.
- 65) 国重正昭 (1978) ツツジ科の種間交雑育種による新品種. 新花卉 100:46-50.
- 66) 倉重祐二・赤羽 勝 (2001) ナカハラツツジとキレンゲツツジの雑種個体の花器形質. 園学雑 70(別1):133.
- 67) 黒岩常祥・黒岩晴子 (2001) 生活環の制御. 受粉と受精. 「成長と分化」(福田裕穂編). p171-181. 朝倉書店, 東京.
- 68) KWACK, S. N. and FUJIEDA, K. (1987) Seed abortion and techniques for obtaining hybrids in interspecific crosses of *Cucurbita*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 55:455-460.
- 69) LANTAI, K. and KIHLMAN, B. (1995) The chromosome numbers of *Ledum palustre* ssp. *decumbens* and of some related taxa. *Hereditas*. 122:181-184.
- 70) LI, HUI-LI. (1957) Chromosome studies in the azaleas of eastern north America. *Amer. J. Bot.* 44:8-14.
- 71) LO SCHIAVO, F., GIULIANO, G. and TERZI, M. (1983) Identifying natural and paraxial hybrids. In: Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. (TANKSLEY, S. D. and ORTON, T. J. eds.) p305-312. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- 72) 牧野富太郎 (1917) きりしまつつじ霧島山ニ無クうんぜんつつじ温泉岳ニ産セズ. 植物研究雑誌 1:172-175.
- 73) MARASEK, A., MIZUOCHI, H. and OKAZAKI, K. (2006) The origin of Darwin hybrid tulips analyzed by flow cytometry, karyotype analyses and genomic *in situ* hybridization. *Euphytica*. 151:279-290.
- 74) MARQUARD, R. D. (1987) Isozyme inheritance, polymorphism, and stability of malate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase in pecan. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112:717-721.
- 75) MARTA, A. E., CAMADRO, E. L., DIAZ-RICCI, J. C. and CASTAGNARO, A. P. (2004) Breeding barriers between the cultivated strawberry, *Fragaria* × *ananassa*, and related wild germplasm. *Euphytica*. 136:139-150.
- 76) MARTENS, J. and FRETZ, T. A. (1980) Differentiation of nine crabapples based on bud and leaf surface features. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105:263-273.
- 77) 箕作祥一・石井 勇 (1966) ツツジ科植物の細胞学的研究. (第1報) ツツジ亜属植物の染色体数と核型. 遺伝雑 41:283-289.
- 78) 宮原佳代・宮島郁夫・松尾英輔 (1993) アイソザイム分析によるサタツツジと他の九州産野生ツツジ類との類縁関係. 園学雑 62 (別2):412.
- 79) MIYAMURA, S., KUROIWA, T. and NAGATA, T. (1987) Disappearance of plastid and mitochondrial nucleoids during the formation of generative cells of higher plants revealed by fluorescence microscopy. *Protoplasma*. 141:149-159.
- 80) MIYAJIMA, D. (2006) Ovules that failed to form seeds in zinnia (*Zinnia violacea* Cav.). *Scientia Hort.* 107:176-182.
- 81) 宮島郁夫 (1987) 九州におけるツツジ属植物の分布と類縁関係. 園芸学会昭 62 年度秋季大会シンポジウム講要 114-121.
- 82) 宮島郁夫 (1994) ツツジ類の花色素について. 今月の農業 38 (3):154-158.
- 83) 宮島郁夫・黒瀬克之・松田鹿徳・上本俊平・坂田祐介 (2001) 九重, 阿蘇山系およびその周辺地域におけるミヤマキリシマ (*Rhododendron kiusianum* Makino) の花器と花色素構成の変異. 園学雑 70:108-114.
- 84) MIYAJIMA, I., MIYAHARA, K., URESHINO, K. and MICHISHITA, A. (2001) Isozyme variations of six evergreen azaleas species distributed in Kyushu, Japan. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70:448-452.
- 85) MIYAJIMA, I., URESHINO, K., KOBAYASHI, N.

- and AKABANE, M. (2000) Flower color and pigments of intersubgeneric hybrid between white-flowered evergreen and yellow-flowered deciduous azaleas. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **69**:280-282.
- 86) 宮澤文吾 (1918) きりしまつつじノ起原. 植物学雑誌 **32**:318-331.
- 87) 宮澤文吾 (1922) きりしまつつじに就て. 遺傳雜 **1**:153-157.
- 88) 宮澤文吾 (1940) 花木園藝 570p. 養賢堂, 東京.
- 89) MOORE, K. (1966) The physiological control of F₁ grass-dwarfs in *Triticum aestivum* L.. *Euphytica*. **15**:329-347.
- 90) MURATA, T. and MATSUDA, Y. (2003) Histological studies on the relationship between the process from fertilization to embryogenesis and the low seed set of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam.. *Breeding Science*. **53**:41-49.
- 91) NAGATA, N., SAITO, C., SAKAI, A., KUROIWA H. and KUROIWA, T. (1999) The selective increase or decrease of organellar DNA in generative cells just after pollen mitosis one controls cytoplasmic inheritance. *Planta*. **209**:53-65.
- 92) NISHIZAWA, T. and WATANO, Y. (2000) Primer pairs suitable for PCR-SSCP analysis of chloroplast DNA in angiosperms. *J. Phytogeogr. Taxon*. **48**:63-66.
- 93) NOGUCHI, Y. (1932) Studies on the species crosses of Japanese *Rhododendron*. 1. On the crossability between various species and the cotyledon color of F₁ seedlings. *Jap. J. Bot.* **6**:103-126.
- 94) 農林水産省生産局果樹花き課花き対策室 (2005) 平成15年花木等生産状況調査. 62p. 農林水産省生産局, 東京.
- 95) OBATA, Y., NIIMI, Y., NAKANO, M., OKAZAKI, K. and MIYAJIMA, I. (2000) . Interspecific hybrids between *Lilium nobilissimum* and *L. regale* produced via ovules-with -placental-tissue culture. *Scientia Hort.* **84**:191-204.
- 96) OHNISHI, O. (1998) Search for the wild ancestor of buckwheat. III. The wild ancestor of cultivated common buckwheat, and of tatar buckwheat. *Economic Bot.* **52**:123-133.
- 97) 大塚一郎 (1980) *Aegilops squarrosa* 細胞質と小麦ゲノムの間の適合関係に於ける D ゲノム染色体の機能. 生研時報 **29**:18-39.
- 98) 岡本章秀 (2003) 福岡県久留米市の地域資源クルメツツジ. 「グリーンツーリズム」(駄田井 正・西川芳明編). p109-122. 創成社, 東京.
- 99) 岡本章秀・池田 広 (2005) 常緑性ツツジ野生種およびクルメツツジの倍数性. 九州沖縄農研野菜花き研究部研報 **4**:88-89.
- 100) 岡本章秀・野中瑞生 (1996) 化学物質処理によるツツジの育種-実生 (M₁) における生育量と幼若性との関係-. 野菜・茶業試験場久留米支場研報 **9**:133.
- 101) 奥泉久人・大庭喜八郎・白石 進 (1990) スギのアスパラギン酸アミノ転移酵素アイソザイムの遺伝. 日林誌. **72**:58-61.
- 102) PALSER, B. F., ROUSE, J. L. and WILLIAMS, E. G. (1989) Coordinated timetables for megagametophyte development and pollen tube growth in *Rhododendron nuttallii* from anthesis to early postfertilization. *Amer. J. Bot.* **76**:1167-1202.
- 103) RAJESWARI, S. and RAMASWAMY, N. M. (2004) Pollen tube growth and embryology of ovule abortion in *Sesamum alatum* and *S. indicum* crosses. *J. Genet. & Breed.* **58**:113-118.
- 104) RALLO, L., MARTIN, G. C. and LAVEE, S. (1981) Relationship between abnormal embryo sac development and fruitfulness in olive. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **106**:813-817.
- 105) 李 玉花・候 秀英・林 亮・景 士西・鄧 明琴 (2000) イチゴ属の種間交雑 *Fragaria* × *ananassa* × *F. vesca* における花粉の発芽異常および胚の発育停止と交雑不和合性の関係. 園学雑 **69**:84-89.
- 106) ROTTENBERG, A., ZOHARY, D. and NEVO, E. (1995) Isozyme relationships between cultivated artichoke and the wild relatives. *Genetic Resources and Crop Evol.* **43**:59-62.
- 107) SAKAI, K., OZAKI, Y., URESHINO, K. and MIYAJIMA, I. (2004) Effectiveness of inter-ploid crosses for overcoming plastome-genome incompatibility in intersectional crosses of azaleas. *Acta Hort.* **651**:47-54.
- 108) SAX, K. (1930) Chromosome stability in the genus *Rhododendron*. *Amer. J. Bot.* **17**:247-251.
- 109) SLEUMER, H. (1980) Past and present taxonomic systems of *Rhododendron*. Based on macromorphological characters. In: Contributions toward a classification of *Rhododendron*. (LUTEYN, J. L. and O' BRIEN, M. E. eds.). p19-26. New York Bot. Gard., New York.
- 110) SPETHMANN, W. (1980) Flavonoids and carotenoids of rhododendron flowers and their significance for the classification of the genus *Rhododendron*. In: Contributions toward a classification of rhododendron. (LUTEYN, J. L. and O' BRIEN, M. E. eds.). p 247-275. New York Bot. Garden, New York.
- 111) SUPUTTITADA, S., ADACHI, T., PONGTONGKAM,

- P., PEYACHOKNAGUL, S., APISITWANICH S. and THONGPRADISTHA. J. (2000) Breeding barriers in the interspecific cross of *Oryza sativa* L. and *Oryza minuta* Presl. *Breeding Science*. **50**:29-35.
- 112) 田村輝夫 (1963) 平戸ツツジに関する研究. 園試報 D 1:155-188.
- 113) 田村輝夫 (1966) 海外で人気のクルメツツジ. 「総合種苗ガイド 2 花木編」(ガーデンライフ・農耕と園芸共編). p 114-119. 誠文堂新光社, 東京.
- 114) 田中隆荘 (1980) 染色体の構造変異. 1. 核型. 「植物遺伝学 I 細胞分裂と細胞遺伝」(山下孝介編). p 335-358. 裳華房, 東京.
- 115) TESTOLIN, R. and FERGUSON, A. R. (1997) Isozyme polymorphism in the genus *Actinidia* and the origin of the kiwifruit genome. *Syst. Bot.* **22**:685 - 700.
- 116) TORRES, A. M., SOOST, R. K. and DIEDENHOFEN, U. (1978) Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *Amer. J. Bot.* **65**:869-881.
- 117) TSUJIMOTO, H., PANAYOTOV, I. and TSUNEWAKI, K. (1987) Behavior of an extra chromosome carried by alloplasmic common wheat lines having *Agropyron trichophorum* cytoplasm. *Japan. J. Genet.* **62**:291-299.
- 118) 常脇恒一郎・遠藤 隆 (1980) 細胞質遺伝. 1. 高等植物. 「植物遺伝学 I 細胞分裂と細胞遺伝」(山下孝介編). p 531-576. 裳華房, 東京.
- 119) TUNA, M., GILL, K. S. and VOGEL, K. P. (2001) Karyotype and C-banding patterns of mitotic chromosomes in diploid Bromegrass (*Bromus riparius* Rehm). *Crop Sci.* **41**:831-834.
- 120) TUNA, M., VOGEL, K. P., GILL, K. S. and ARUMUGANATHAN, K. (2004) C-banding analyses of *Bromus inermis* genomes. *Crop Sci.* **44**:31-37.
- 121) URESHINO, K., KAWAI, M. and MIYAJIMA, I. (2000) Factors of intersectional unilateral cross incompatibility between several evergreen azalea species and *Rhododendron japonicum* f. *flavum*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **69**:261-265.
- 122) URESHINO, K. and MIYAJIMA, I. (2002) The study on the relationship between leaf colors and ptDNA inheritance in intersectional cross of *Rhododendron kiusianum* × *R. japonicum* f. *flavum*, resulting in an unexpected triploid progeny. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **71**:214-219.
- 123) URESHINO, K., MIYAJIMA, I. and AKABANE, M. (1998) Effectiveness of three-way crossing for the breeding of yellow-flowered evergreen azalea. *Euphytica*. **104**:113-118.
- 124) URESHINO, K., MIYAJIMA, I., OZAKI, Y., KOBAYASHI, N., MICHISHITA, A. and AKABANE, M. (1999) Appearance of albino seedlings and ptDNA inheritance in interspecific hybrids of azalea. *Euphytica*. **110**:61-66.
- 125) WATANO, Y., IMAZU, M. and SHIMIZU, T. (1995) Chloroplast DNA typing by PCR-SSCP in the *Pinus pumila* - *P. parviflora* var. *pentaphylla* complex (Pinaceae). *J. Plant Res.* **108**:493-499.
- 126) WATANO, Y., KANAI, A. and TANI, N. (2004) Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) revealed by molecular hybrid index analysis. *American J. Bot.* **91**:65-72.
- 127) WEEDEN, N F. and LAMB, R. C. (1985) Identification of apple cultivars by isozyme phenotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **110**:509-515.
- 128) WENDEL, J. F. and PARKS, C. R. (1982) Genetic control of isozyme variation in *Camellia japonica* L.. *J. Hered.* **73**:197-204.
- 129) WERTH, C. R., HILU, K. W. and LANGNER, C. A. (1994) Isozymes of *Eleusine* (Gramineae) and the origin of finger millet. *Amer. J. Bot.* **81**:1186-1197.
- 130) WILLIAMS, E. G., KNOX, R. B. and ROUSE, J. L. (1982) Pollination sub-systems distinguished by pollen tube arrest after incompatible interspecific crosses in *Rhododendron* (Ericaceae). *J. Cell Sci.* **53**:255-277.
- 131) WILLIAMS, E. G. and ROUSE, J. L. (1988) Disparate style lengths contribute to isolation of species in *Rhododendron*. *Aust. J. Bot.* **36**:183-191.
- 132) WILLIAMS, E. G. and ROUSE, J. L. (1990) Relationships of pollen size, pistil length and pollen tube growth rates in *Rhododendron* and their influence on hybridization. *Sex. Plant Reprod.* **3**:7-17.
- 133) 矢原徹一 (1982) アイソザイムによる種分化研究の現状. *種生物学研究* **6**:67-88.
- 134) 山崎 敬 (1989) ツツジ科. 「日本の野生植物木本 II」(佐竹義輔・原 寛・亘理俊次・富成忠夫編). p122-156. 平凡社, 東京.
- 135) YAMAZAKI, T. (1996) A revision of the genus *Rhododendron* in Japan, Taiwan, Korea and Sakhalin. 179 p. Tsumura Laboratory, Tokyo.
- 136) 山崎 敬・野沢邦之助 (1979a) オオキリシマ系. 「日本の園芸ツツジ」(ガーデンライフ編). p 49-56. 誠文堂新光社, 東京.
- 137) 山崎 敬・野沢邦之助 (1979b) モチツツジ系. 「日本の園芸ツツジ」(ガーデンライフ編). p 33-36. 誠文堂新光社, 東京.
- 138) 山崎 敬・山崎富佐子 (1972) シロリュウキュウ・オオリュウキュウ系ツツジの園芸品. *植物研究雑誌* **47**:167-170.

- 139) ZHONG, S. B., ZHANG, D. Y., LI, H. B. and YAO, J. X. (1996) Identification of *Haynaldia villosa* chromosomes added to wheat using a sequential C-banding and genomic *in situ* hybridization technique. *Theor. Appl. Genet.* **92**:116-120.

Production of Yellow-Flowered Evergreen Azaleas through Clarification of Hybridization Barriers between Kurume Azaleas and Deciduous Species, *Rhododendron japonicum* f. *flavum*

Akihide Okamoto

Summary

Kurume azalea is a brand name for evergreen azalea cultivars bred in Kurume, Fukuoka, which is located in northern Kyushu, and belongs to *Rhododendron obtusum* with medium-small sized flowers. The production of Kurume azaleas has increased since the 1950s because of the great demand as a green plant for public spaces. Azalea growers desired a cultivar with novel yellow flowers to attract consumers. To breed the yellow-flowered evergreen azaleas, yellow-flowered deciduous species, *R. japonicum* f. *flavum* was generally used as a pollen parent. In the cross of evergreen azalea \times *R. japonicum* f. *flavum*, however, pre- and post-fertilization barriers existed so that viable seedlings were rarely obtained. This work was carried out to examine the hybridization barriers between evergreen azaleas as the seed parent and *R. japonicum* f. *flavum* as the pollen parent and to clarify the traits of the seed parents that produced vigorous hybrids efficiently. In addition, a breeding plan was proposed to produce a cultivar suitable for cultivation in warm regions.

1. 1) Samples of dorsal leaf surfaces taken from 16 species of evergreen azalea were examined to establish distinctive characteristics indicative of the presence of *R. macrosepalum* and *R. ripense* genetic properties in Kurume azaleas. Specific characteristics of leaf epidermis (epidermal cell, cuticular topography, and stomatal shape) and the existence of trichomes on veins were studied. *R. macrosepalum* and *R. ripense* were clearly distinguishable from *R. kaempferi*, *R. kiusianum*, and *R. sataense*, which were generally considered to be the original species of Kurume azalea. Dorsal leaf surfaces were examined on 58 cultivars of Kurume azalea. Fifteen cultivars had one or more of the three characteristics of leaf epidermis, which were similar to *R. macrosepalum* and *R. ripense*. Vein trichomes, which occurred on *R. macrosepalum* and *R. ripense*, appeared on 16 cultivars. 2) Eight species of evergreen azalea (*R. kaempferi*, *R. kiusianum*, *R. sataense*, *R. indicum*, *R. eriocarpum*, *R. macrosepalum*, *R. ripense* and *R. scabrum*) considered to be original species of principal domestic cultivar groups were examined for aspartate aminotransferase isozyme in dormant flower buds. *Aat-2*¹¹² was peculiar to *R. ripense*, and *Aat-2*¹⁰⁴ was the species-specific allele of *R. macrosepalum* and *R. scabrum*. In 58 cultivars of Kurume azalea, four cultivars had either *Aat-2*¹¹² or *Aat-2*¹⁰⁴. These results imply that foundation stocks of Kurume azalea are more diverse than had been thought.

2. 1) The nature of hybridization barriers between evergreen azaleas \times *R. japonicum* f. *flavum* was examined using 24 plants of 14 evergreen azalea species. Pre-fertilization barriers were an arrest of pollen tube growth and failure of pollen tubes to penetrate into the ovules; post-fertilization barriers were lack of seed germination, chlorophyll defects in cotyledons of seedlings, and death of young seedlings. Excluding *R. ripense* used as the seed parent, several fertilization barriers overlapped in one cross combination; each barrier reduced hybridization but did not arrest it perfectly. In the case of *R. ripense*, pollen-style incompatibility existed. The number of viable seedlings / pollinated flowers (crossability) of evergreen azaleas to hybridize with *R. japonicum* f. *flavum* must be evaluated for each individual evergreen azalea. 2) A significant difference among nine *R. japonicum* f. *flavum* accessions appeared in the crossability. This result suggests that it is important to select highly crossable *R. japonicum* f. *flavum* plants as the pollen parent. 3) Histological observations were performed for ovules of some Kurume azalea cultivars from anthesis to 100 days after pollination. Abnormal embryo sac formation was one of the causes of the low fertilization rate in this hybridization. Failure of fertilization and abortion of the ovules just after fertilization were the causes of the fertilization barriers. Zygotes developed more slowly than those of a cross of Kurume azalea \times Kurume azalea. 4) Thirty-nine cultivars of Kurume azalea as the seed parents were hybridized with a pollen parent of *R. japonicum* f. *flavum*. Viable hybrids were obtained from 13 crosses. Stepwise fitting and the Bayesian approach revealed that the ovules penetrated by pollen tubes and the ratio of viable hybrids to hybrid seedlings, excluding

albinos, (the survival rate) were related to the crossability. When the Kurume azalea cultivars possessed dorsal leaf features similar to *R. macrosepalum* and *R. ripense* used as the seed parent, the survival rate and the crossability were significantly higher. Some superior seed parents apparently can select among Kurume azalea cultivars with the dorsal leaf features similar to *R. macrosepalum* and *R. ripense*.

3. To clarify the chromosome composition of vigorous hybrids, the C-banded karyotype of the shoot chromosomes was examined using five evergreen species, *R. japonicum* f. *flavum*, seven Kurume azalea cultivars, and nine vigorous hybrids obtained from the cross of Kurume azalea \times *R. japonicum* f. *flavum*. The karyotypes of *R. kaempferi* ($2n=26$), *R. kiusianum* ($2n=26$) and *R. sataense* ($2n=26$) were almost the same, and the 13 homologous chromosomes were called T1 to T13. *R. macrosepalum* ($2n=26$) had three new chromosomes (T14, T15 and T16) instead of T3, T5 and T6, and *R. ripense* ($2n=26$) had T15 instead of T6. All Kurume azalea cultivars examined had 26 chromosomes. The cultivars with dorsal leaf features similar to *R. macrosepalum* and *R. ripense* carried some chromosomes that were peculiar to *R. macrosepalum* and *R. ripense*. The karyotype of *R. japonicum* f. *flavum* ($2n=26$) differed from that of evergreen azaleas, and the 13 homologous chromosomes were called P1 to P13. All hybrids examined had 26 chromosomes, 13 of which were derived from Kurume azalea and the remainder from *R. japonicum* f. *flavum*. All vigorous hybrids examined carried T14. When *R. macrosepalum* (having T14) was the seed parent, the hybrids were not vigorous. Also, all vigorous hybrids examined possessed T3, which was not detected in *R. macrosepalum*. The coexistence of T3 and T14 is thus considered necessary to break down hybrid weakness.

4. This work was the first to report production of vigorous hybrids between Kurume azalea and *R. japonicum* f. *flavum*. The inheritance of cpDNA, external characteristics, and cultural characteristics of the hybrid seedlings were examined to discuss the effectiveness of the breeding of yellow-flowered evergreen azaleas by the cross of Kurume azalea \times *R. japonicum* f. *flavum*. 1) Plastid nucleoid DNA was observed in generative cells of the *R. japonicum* f. *flavum* pollen tubes using fluorescence microscopy after staining with DAPI. PCR-SSCP analysis revealed that all hybrids examined exhibited cpDNA haplotype of *R. japonicum* f. *flavum*. These results indicate that cpDNA of the hybrids was inherited paternally. 2) The trees were lower than self-pollinated progenies of Kurume azalea because the elongating growth of the hybrids stopped in late May. When Kurume azalea cultivars without the dorsal leaf features similar to *R. macrosepalum* and *R. ripense* were used as the seed parent, the hybrids were dwarf. 3) The flowers and leaves were larger than those of Kurume azaleas. In the flower petals, the appearance of carotenoid pigments derived from *R. japonicum* f. *flavum* was weaker than flavonoid pigments derived from Kurume azalea, and there appeared to be a phenomenon that yellow petals turned white after anthesis. 4) Insect injuries by slugs and spider mites were striking, and their degree was the same as for *R. japonicum* f. *flavum*. The results of tree height and insect injuries are considered to be due to using *R. japonicum* f. *flavum*, which is unsuitable for planting in warm regions. In the breeding of yellow-flowered evergreen azaleas for cultivation in warm regions, a step of estimating aptitude for high-temperature environments should be added on the crossbreeding system for choosing the right parents among the yellow-flowered species and cultivars.

Key words: breeding, fertilization barrier, interspecific hybridization, karyotype, Kurume azalea, *Rhododendron japonicum* f. *flavum*.