

フローサイトメーターによる *Dianthus* 属遺伝資源の倍数性測定[†]

牛尾亜由子*・小野崎 隆**・柴田 道夫**

(平成14年7月2日受理)

Estimation of polyploidy levels in *Dianthus* Germplasms by Flowcytometry

Ayuko USHIO, Takashi ONOZAKI and Michio SHIBATA

Summary

We tried to estimate the polyploidy levels of *Dianthus* germplasms preserved in National Institute of Floricultural Science by flowcytometry. The nuclear DNA relative values of them were distributed into three kinds of discontinuous groups which might correspond to the following polyploidy levels ; diploid, tetraploid and hexaploid. The results showed that the estimation of polyploidy levels using flowcytometry would be available in *Dianthus*. As a result, 99 of *Dianthus* germplasms were classified into 8 diploids, 6 tetraploids and 85 hexaploids. It was clarified that most of our *Dianthus* germplasms were hexaploids. The polyploidy levels of several species were newly clarified. For example, *D.kiusianus* native to Japan was suggested to be tetraploid and *D.henteri* and *D.acicularis* which were resistant to bacterial wilt caused by *Burkholderia caryophylli* were suggested to be hexaploids.

Key Words : *Dianthus*, flowcytometry, polyploidy level, DNA relative value

1 緒言

我が国の主要な花きであるカーネーションが含まれる *Dianthus*属は、カーネーションの育種に極めて有用な遺伝資源である。*Dianthus*属はナデシコ科(Caryophyllaceae)に属し、約300種がヨーロッパ、地中海沿岸から日本にかけてのアジア地域に分布している(Hamiltonら, 1989; 伊藤ら, 1989)。花き研究所ではこれまでに*Dianthus*属遺伝資源の収集,保存を行っており(山口ら, 1990; 小野崎,

2001),既にカーネーション萎凋細菌病抵抗性育種などに活用している(Onozakiら, 1998, 1999a, 1999b; 小野崎ら, 2002)。このように*Dianthus*属の有用形質を利用し、種間交雑によって新たな形質をカーネーションに導入することは、カーネーションの育種を進める上で大変重要である。

*Dianthus*属は染色体の基本数が $x=15$ であり、2倍体($2n=30$), 4倍体($2n=60$)および6倍体($2n=90$)が存在する(伊藤ら, 1989)が、カーネーション栽培品種の多くは2倍体であることが報告されている(山口, 1979)。種

* 生産利用部栽培システム研究室

** 生理遺伝部遺伝育種研究室

† 本研究の一部は園芸学会平成13年度秋季大会において発表した。

間交雑を行う上で用いる植物材料の倍数性を明らかにすることは、交雑の正否などを推定する上で重要である。しかし *Dianthus* 属は染色体が1から2 μm と非常に小さく観察が困難であり (Gattら, 1998), 従来行われてきた顕微鏡観察による染色体数の計測では、多大な労力と時間を要する問題があった。近年、フローサイトメーターによる簡易な倍数性測定法が開発され、倍数性の判別や雑種性の確認が可能であることが報告されている (三柴・三位, 1998)。そこで本研究では花き研究所で保存している *Dianthus* 属遺伝資源の倍数性を明らかにすることを目的として、カーネーションの含まれる *Dianthus* 属についてフローサイトメーターによる簡便な倍数性の評価手法について検討した。

2 材料および方法

1) 材料

花き研究所で保存している *Dianthus* 属 遺伝資源99点, 計73品種 (第1表) を材料とした。無加温ビニルハウス内に鉢植えた *Dianthus* 属 遺伝資源 の若い葉または未展開葉身をサンプリングし、実験に供した。なお、これらの材料については種名が付与されているものの、染色体数は明らかにされていない。

2) 方法

(1) 細胞の染色

シャーレに試料の葉を5mm角程度とり、植物倍数性分析用DNA試薬キット (Partec High Resolution Staining Kit for Plant DNA Analysis, Partec GmbH, Munster, Germany) のA液 (核抽出液) を数滴加え、カミソリで試料を細かく刻んで裸核を抽出した。その後、試料液を

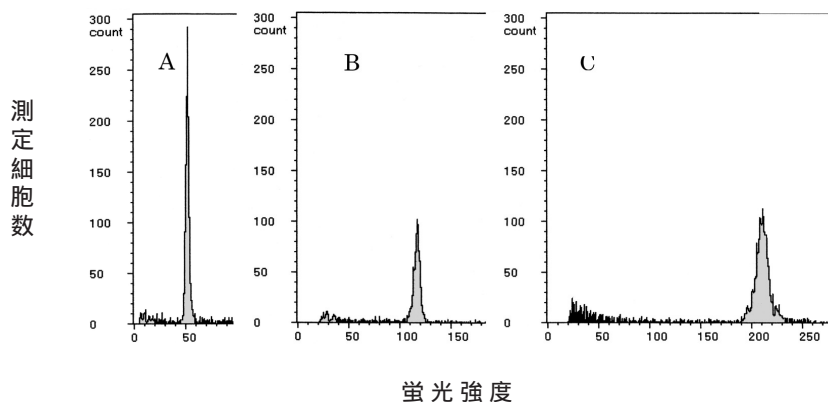
メッシュで濾過し、プラスチック製試験管に移した後、同試薬キットB液 (DAPI染色液) を試料液の約4倍量入れて染色を行い分析に供した。

(2) 測定

フローサイトメーターはプロイディアナライザーPA型 (Partec GmbH, Munster, Germany) を用い、DAPI蛍光強度の測定を行った。

3 結果

第1図に典型的なフローサイトメーターのチャートを示した。横軸は蛍光強度を示し、核DNA量に比例した蛍光強度の位置にピークが検出されている。*Dianthus* 属は染色体の基本数が15で、2, 4および6倍体の存在が知られているが、フローサイトメーターによる測定を行った結果、*Dianthus* 属は蛍光強度の異なる位置にピークを示す3つのグループに分かれた。2倍体種である *D. cruentus* の核DNA量を2とした相対値として求め、倍数性を推定した。Chromosome Atlas (Darlington・Wylie, 1955) で2倍体と報告されている *D. deltooides* (保存番号35) の核DNA相対量は1.85, 4倍体と報告されている *D. arenarius* (同番号7) のそれは5.33, 6倍体と報告されている *D. crinitus* (同番号31) のそれは7.90であった。これらの測定値から推定された各遺伝資源の倍数性と、核DNA相対量との関係を第2図に示した。*Dianthus* 属は核DNA相対量が不連続な3つの分布を示し、それぞれの群が2, 4, および6倍体を示すものと推定された。この結果から *Dianthus* 属ではフローサイトメーターによる倍数性の推定が可能であると考えられた。



第1図. フローサイトメーターによる *Dianthus* 属植物の核DNA相対量の測定チャート

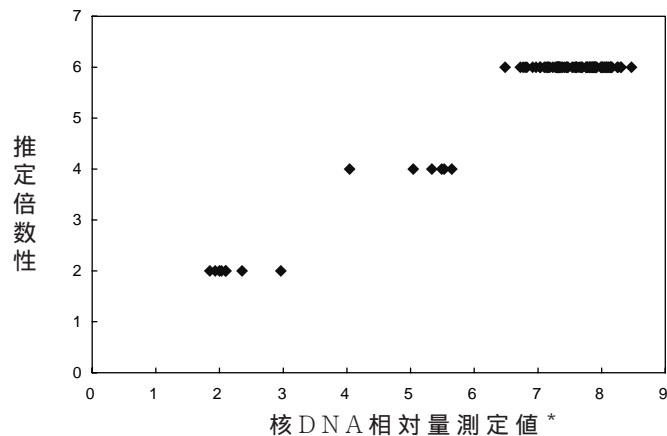
A. 2倍体 (*D. cruentus*: 保存番号35), B. 4倍体 (*D. arenarius*: 保存番号7), C. 6倍体 (*D. crinitus*: 保存番号31)

第1表 *Dianthus*属遺伝資源の核DNA相対量および推定倍数性

保存番号	パスポート番号	種名	核DNA相対量 [*]	推定倍数性
1	27012663	<i>D.acicularis</i>	8.14	6x
2	27012664	<i>D.allwoodii alpinus</i>	8.15	6x
3	27012665	<i>D.alpinus</i>	7.77	6x
4	27012666	<i>D.anatolicus</i>	8.02	6x
5	27012667	<i>D.anatolicus</i>	7.80	6x
7	27012669	<i>D.arenarius</i>	5.33	4x
11	27012673	<i>D.banaticus</i>	2.35	2x
12	27012674	<i>D.biflorus</i>	2.10	2x
16	27012678	<i>D.carthusianorum</i>	2.09	2x
18	27012679	<i>D.barbatus</i>	1.93	2x
28	27012687	<i>D.collinus</i>	7.84	6x
29	27012688	<i>D.collinus</i>	6.49	6x
30	27012689	<i>D.correvoianus</i>	8.01	6x
31	27012690	<i>D.crinitus</i>	7.90	6x
33	27012692	<i>D.cruentus</i>	2.00	2x
35	27012694	<i>D.deltoides</i>	1.85	2x
36	27012695	<i>D.deltoides</i>	5.49	4x
41	27012698	<i>D.ferrugineus</i> ssp. <i>liburnicus</i>	7.65	6x
42	27012699	<i>D.fragrans</i>	7.81	6x
43	27012700	<i>D.furcatus</i>	7.61	6x
44	27012701	<i>D.gallicus</i>	7.75	6x
45	27012702	<i>D.gallicus</i>	7.85	6x
46	27012703	<i>D.gallicus</i>	7.77	6x
49	27012705	<i>D.giganteus</i> ssp. <i>banaticus</i>	2.03	2x
51	27012707	<i>D.gratianopolitanus</i>	7.88	6x
53	27012709	<i>D.gratianopolitanus</i>	7.88	6x
54	27012710	<i>D.gratianopolitanus</i>	7.59	6x
56	27012711	<i>D.gratianopolitanus</i>	8.30	6x
57	27012712	<i>D.haematocalyx</i> ssp. <i>pindicola</i>	7.67	6x
58	27012713	<i>D.henteri</i>	7.78	6x
59	27012714	<i>D.hungricus</i>	7.35	6x
60	27012715	<i>D.imerecticus</i>	4.04	4x
63	27012718	<i>D.lusitanus</i>	2.96	2x
66	27012720	<i>D.monspessulanus</i> ssp. <i>sternbergii</i>	6.77	6x
68	27012722	<i>D.orientalis</i>	7.39	6x
69	27012723	<i>D.pallens</i>	7.47	6x
70	27012724	<i>D.pavonius</i>	7.42	6x
72	27012726	<i>D.petraeus</i> ssp. <i>Sapineus</i>	7.45	6x
73	27012727	<i>D.pinifolius</i>	7.60	6x
74	27012728	<i>D.pinifolius</i> v. <i>Iilacinus</i>	7.33	6x
75	27012729	<i>D.pinifolius</i> ssp. <i>Iilacinus</i>	7.33	6x
76	27012730	<i>D.plumarius</i>	7.31	6x
77	27012731	<i>D.plumarius</i> var. <i>albiflorus</i>	7.37	6x
78	27012732	<i>D.plumarius</i> var. <i>albiflorus</i>	7.19	6x
80	27012734	<i>D.plumarius</i> ssp. <i>praecox</i>	7.33	6x
84	27012738	<i>D.pungens</i>	7.04	6x
86	27012739	<i>D.pyrenaicus</i>	6.72	6x
87	27012740	<i>D.regis</i>	7.29	6x
88	27012741	<i>D.scaber</i>	7.12	6x

保存番号	パスポート番号	種名	核DNA相対量 [*]	推定倍数性
89	27012742	<i>D.seguieri</i>	7.70	6x
90	27012743	<i>D.serotinus</i>	7.15	6x
91	27012744	<i>D.serotinus</i>	6.92	6x
93	27012745	<i>D.squarrosus</i>	6.97	6x
101	27012752	<i>D.sylvestris</i>	7.30	6x
102	27012753	<i>D.tristis</i>	7.44	6x
103	27012754	<i>D.turkostanicus</i>	7.54	6x
104	27012755	<i>D.uralensis</i>	7.23	6x
105	27012756	<i>D.viscidus</i>	7.27	6x
k101	30003248	<i>D.boisieri</i>	8.11	6x
k103	30003249	<i>D.nupicola</i>	8.26	6x
k105	30003250	<i>D.pungens</i>	7.90	6x
k106	30003251	<i>D.turcestanicus</i>	7.31	6x
k119	30003252	<i>D.pontedae gigantiforensis</i>	8.10	6x
k124	30003253	<i>D.antolicus</i>	8.00	6x
k129	30003254	<i>D.reggisstephanii</i>	8.08	6x
k132	30003255	<i>D.fragrans</i>	7.76	6x
k135	30003256	<i>D.velebiticus</i>	7.92	6x
k140	30003257	<i>D.anatiticus</i>	8.04	6x
k141	30003258	<i>D.polymorphus</i>	7.82	6x
k155	30003259	<i>D.tainshanicus</i>	8.02	6x
k159	30003260	<i>D.brevicaulis</i>	7.99	6x
k208	30003261	<i>D.polymorphus praecox</i>	7.89	6x
k218	30003262	<i>D.marshalii</i>	7.85	6x
k239	30003264	<i>D.tatrae</i>	8.13	6x
k240	30003265	<i>D.ktaibelli</i>	5.04	4x
119P-1	30003266	<i>D.pontedae ssp. Gigantiforensis</i>	7.15	6x
127G-1	30003267	<i>D.gratinopolitanus cv. compactus</i>	6.80	6x
130G-1	30003268	<i>D.gallicus</i>	7.03	6x
131P-1	30003269	<i>D.plumarius ssp. semperflorence</i>	7.47	6x
134G-1	30003270	<i>D.plumarius cv. crimson beauty</i>	7.31	6x
142A-1	30003271	<i>D.allwoodii</i>	7.32	6x
147V-1	30003272	<i>D.uralensis</i>	7.10	6x
149S-1	30003273	<i>D.seguieri</i>	6.83	6x
157T-1	30003275	<i>D.tymphaestens</i>	8.47	6x
158T-1	30003276	<i>D.tymphaestens</i>	8.25	6x
209G-1	30003278	<i>D.graniticus</i>	8.05	6x
213G-2	30003279	<i>D.gratinopolitanus cv Biaureif D.graniticus</i>	7.91	6x
214G-2	30003280	<i>D.gratinopolitanus cv Little Jack</i>	8.08	6x
221A-2	30003282	<i>D.anderwoodii</i>	7.88	6x
226D-1	30003283	<i>D.deltoides cv. Albus</i>	7.68	6x
227S-1	30003284	<i>D.spicalifolius</i>	8.16	6x
228R-4	30003285	<i>D.regisstephanii</i>	7.56	6x
229C-1	30003286	<i>D.caryophyllus var. silvester</i>	7.59	6x
232A-1	30003287	<i>D.anarensis</i>	7.81	6x
236A-2	30003288	<i>D.allwoodii</i>	7.17	6x
249A-1	30003291	<i>D.allwoodii cv Doris</i>	5.53	4x
250D-1	30003292	<i>D-H</i>	8.31	6x
541G-1	30003294	<i>D.glacillis</i>	7.61	6x
207	27012704	<i>D.kiusianus</i>	5.65	4x

*核DNA相対量は*D.cruentus*系統を2とした相対値で表示した。



第2図. フローサイトメーターによる*Dianthus*属遺伝資源99点の核DNA相対量の測定結果と推定倍数性との関係 **D.cruentus*系統を2とした相対値で表示した.

第1表にフローサイトメーターにより推定した*Dianthus*属保存遺伝資源の倍数性を示した.

これまでに文献報告されている倍数性 (Darlington・Wylie, 1955; Tuntin・Wlaters, 1993) と, 第1表の結果を比較したところ, 保存番号 2, 4, 5, 7, 12, 16, 18, 28, 29, 31, 33, 35, 42, 44, 45, 46, 49, 51, 53, 54, 56, 63, 76, 77, 78, 80, 84, 89, 90, 91, k101, k105, k124, k132, 127G-1, 130G-1, 131P-1, 134G-1, 142A-1, 236A-2では一致したが, 保存番号 29, 36, 41, 43, 57, 70, 73, 74, 75, 88, 101, 102, 105, 226D-1, 229C-1, 249A-1, 541G-1については倍数性が一致しなかった.

4 考察

*Dianthus*属は染色体が1から2 μ mと非常に小さく, 顕微鏡による染色体数の計測に熟練した技術を要する問題があった. 気孔の大きさを指標として倍数性を推定する方法も試みられてきている(山本・佐藤, 1969)が, 山口ら(1979), 山口(1980)は, 染色体数の顕微鏡下での計測と, 気孔数および気孔の大きさを併せて用いることによってより適確に倍数性が推定できると報告している. しかし, これらをすべて測定するには多大な労力および時間がかかる. 本研究で用いたフローサイトメーターは, 倍数性の推定に数分しかかからず, きわめて簡易に倍数性の推定が可能であることから, 有用な測定法と考えられる. 小野崎ら(2002)はカーネーション萎凋細菌病抵抗性中間母本の育成において, 強抵抗性野生種*D.capitatus*が2倍体であることをフローサイトメーターによる測定で推定しているが, 併せて, カーネーション栽培品種と本種との種間雑種の核DNA相対量が交雑親のほぼ中間値

を示すことを確認しており, 本測定法は, 種間交雑における雑種性の判定にも有効であると考えられる.

保存している多数の*Dianthus*属遺伝資源の倍数性測定結果から, *Dianthus*属は核DNA相対量が3つの不連続な分布を示し, 倍数性を区別できることが明らかとなった. それに対し, キク(*Dendranthema*)属では, 特に高次倍数性を有する遺伝資源において, フローサイトメーターで測定した核DNA相対量が連続的に分布し, 倍数性の推定が困難であることが指摘されている(柴田ら, 2001). これはキク属ではゲノムサイズの変異が大きいため高次倍数体域で連続的となったものと考えられる. *Dianthus*属は同属内においてゲノムサイズの変異幅が少なく, その結果2倍体, 4倍体, 6倍体が明確に判別できるものと考えられた.

供試した*Dianthus*属遺伝資源(99点)のうち, 2倍体が8点, 4倍体が6点, 6倍体が85点で, 全体の85.9%が6倍体と推定された. これらの高次倍数性を有する遺伝資源と2倍性のカーネーション栽培品種との交雑を行っていく場合には倍数性の違いを考慮していく必要がある. 本研究により, これまで倍数性の報告のなかった多くの種について倍数性が明らかとなった. その具体例を挙げると, わが国に自生するヒメハマナデシコ(*D.kiusianus*)についてはこれまで倍数性が報告されていないが, 今回鹿児島県薩摩半島南部沿岸地帯より収集された遺伝資源(山口ら, 1990)の測定により, ヒメハマナデシコは4倍体であることが示された. また, カーネーション萎凋細菌病に対して強度の抵抗性を有する遺伝資源であることが明らかになっている*D.henteri*および*D.acicularis*はともに6倍体であることが明らかになった.

なお、今回材料とした花き研究所で保存中の*Dianthus*属遺伝資源において、既に報告されている倍数性と一致しなかった遺伝資源については導入先等で付与された種名が誤っている可能性も否定できない。今後、改めて形態的特性や生態的特性について文献等との照合を図りながら、遺伝資源に付与されている種名の真偽について再点検していく必要がある。

5 摘要

花き研究所で保存している*Dianthus*属遺伝資源99点について、フローサイトメーターによる倍数性の推定を試みた結果、核DNA相対量を示す測定値が不連続な3つのグループに分かれた。これらのグループはそれぞれ2, 4, および6倍体を示すものと推定され、この結果から*Dianthus*属ではフローサイトメーターによる倍数性の推定が可能であると考えられた。

花き研究所で保存している*Dianthus*属遺伝資源は、2倍体8点、4倍体6点、6倍体85点と推定され、全体の85.9%が6倍体であることが明らかになった。また、わが国原産のヒメハマナデシコが4倍体、カーネーション萎凋細菌病に対して強抵抗性である*D. henteri*および*D. acicularis*が6倍体であるなど、これまでに倍数性に関する報告がなかった種に関して倍数性が明らかになった。

引用文献

- Darlington, C. D. and A. P. Wylie. 1955. Chromosome Atlas of flowering plants. p. 64-65. George Allen and Uniwinn Ltd. London
- Gatt, M. K., K. R. W. Hammett, K. R. Markhan and B. G. Murray. 1998. Yellow pinks: interspecific hybridization between *Dianthus plumarius* and related species with yellow flowers. *Scientia Hort.* 77: 207-218.
- Hamilton, R. F. L. and S. M. Walters. 1989 *Dianthus* Linnaeus. p. 185-191. In: S. M. Walters, J. C. M. Alexander, A. Brady, C. D. Brickell, J. Cullen, P. S. Green, V. H. Heywood, V. A. Matthews, N. K. B. Robson, P. F. Yeo and S. G. Knees (eds.). *The European garden flora* Vol. 3. Cambridge University press, Cambridge.
- 伊藤秋夫・武田恭明・塚本洋太郎・富野耕治. 1989. ナデシコ属. p.455-462. 塚本洋太郎編 園芸植物大辞典. 第3巻. 小学館. 東京.
- 三柴啓一郎・三位正洋. 1998. フローサイトメーター自由自在 植物研究への応用. *細胞工学*. 17: 609-615.
- Onozaki, T., H. Ikeda, T. Yamaguchi and M. Himeno. 1998. Introduction of bacterial wilt (*Pseudomonas caryophylli*) resistance in *Dianthus* wild species to carnation. *Acta Hort.* 454: 127-132.
- Onozaki, T., T. Yamaguchi, M. Himeno and H. Ikeda. 1999a. Evaluation of 277 carnation cultivars for resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas caryophylli*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 546-550.
- Onozaki, T., T. Yamaguchi, M. Himeno and H. Ikeda. 1999b. Evaluation of wild *Dianthus* accessions for resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas caryophylli*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 974-978.
- 小野崎 隆. 2001. 三重県および北海道におけるカワラナデシコ, エゾカワラナデシコの探索収集. 植物遺伝資源探索導入調査報告書17: 49-54.
- 小野崎 隆・池田 広・山口 隆・姫野正己・天野正之・柴田道夫. 2002. 萎凋細菌病抵抗性中間母本カーネーション農1号の育成とその特性. *園芸学研究*. 1: 13-16.
- 柴田道夫・岸本早苗・牛尾亜由子・小野崎 隆・谷川奈津・間竜太郎. 2001. フローサイトメーターによるキク属およびナデシコ属における倍数性の推定. *園芸学会雑誌*. 70別2: 414.
- Tuntin, T. G. and S. M. Walters, 1993. *Dianthus* L. p227-246. In: T. G. Tuntin, N. A. Burges, A. O. Chater, J. R. Edmondson, V. H. Heywood, D. M. Moore, D. H. Valentine, S. M. Walters and D. A. Webb(eds.). *Flora Europaea* Vol. 1. Cambridge University Press. Cambridge
- 山口雅篤・国本忠正・原田重雄. 1979. カーネーション園芸品種の染色体に関する研究. 南九州大学園芸学部研究報告. 10: 25-30.
- 山口雅篤. 1980. カーネーション園芸品種の染色体に関する研究 II. カーネーション園芸品種の染色体数について. 南九州大学園芸学部研究報告. 11: 9-14.
- 山口 隆・姫野正己・小野崎 隆・柴田道夫. 1990. 西南暖地におけるダイアンサス属野性種の探索収集, 植物遺伝資源探索導入調査報告書vol 6: 73-82
- 山本 保・佐藤直己. 1969. コルヒチン処理によるカーネーションの4倍体育成について. 香川農業短期大学校紀要, 2: 1-2