

屋上緑化植物「常緑キリンソウ」(Phedimus sp.)の品種保護および品種開発に向けたDNAマーカーの開発

誌名	育種学研究 = Breeding research
ISSN	13447629
著者名	糀,妙子 藤田,道明 Cho,S.W. 辻本,壽
発行元	日本育種学会
巻/号	20巻1号
掲載ページ	p. 11-15
発行年月	2018年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ノート

屋上緑化植物「常緑キリンソウ」(*Phedimus* sp.) の品種保護および品種開発に向けた DNA マーカーの開発

糀 妙子¹⁾・藤田道明¹⁾・Seong-Woo Cho²⁾・辻本 壽²⁾

¹⁾ (株)フジタ, 鳥取県岩美郡, 〒681-0052

²⁾ 鳥取大学乾燥地研究センター, 鳥取県鳥取市, 〒680-0001

Development of DNA markers in ‘Evergreen Kirinso’ (*Phedimus* sp.), a roof greening plant, for cultivar identification and breeding

Taeko Koji¹⁾, Michiaki Fujita¹⁾, Seong-Woo Cho²⁾ and Hisashi Tsujimoto²⁾

¹⁾ *Fujita Co., Ltd.*, Iwami 681-0052, Japan

²⁾ *Arid Land Research Center, Tottori University*, Tottori 680-0001, Japan

キーワード

常緑キリンソウ (*Phedimus* sp.), 品種識別, DNA マーカー, RAPD, SSR, PCR

緒言

キリンソウ (*Phedimus aizoon* 異名: *Sedum aizoon*) は、ベンケイソウ科に属する多肉性多年草であり、分布域は日本から東アジアである。山地や海岸の岩場などに自生し、形態的な多様性が大きい。野生種は冬季に地上部が枯れ落ち、冬芽を形成して休眠する。近縁種にエゾノキリンソウ (*Phedimus kamtschaticus*)、タケシマキリンソウ (*Sedum takesimense*) 等がある。

(株)フジタ(鳥取県岩美郡岩美町)は冬季に地上部により多くの緑を保つよう品種改良を行い、「トットリフジタ1号」(品種登録第15866号)および「トットリフジタ2号」(品種登録第15867号)(図1)を開発した。これらは品種登録され、「常緑キリンソウ」の通称で呼ばれている。常緑キリンソウは、屋上緑化、法面緑化、壁面緑化など、様々な場所での緑化用植物として広く利用されている。常緑キリンソウは乾燥、湿潤および高温、低温といった様々な環境ストレスに強い。厳しい環境においても自然降雨のみでの生育が可能であるため、灌水設備の設置を必要としない。そのため、低コスト、低メンテナンスの緑化が行える優れた植物である。

今後も市場拡大が見込まれる常緑キリンソウであるが、挿し木によって容易に栄養繁殖が可能であるため、

品種保護のための品種識別マーカー開発が必要であった。また、現在市場に出ている品種は「トットリフジタ1号」のみであり、新しい品種の開発が望まれていた。しかしながら、常緑キリンソウの遺伝学的研究はなく、これらの開発は困難であった。

そこで本研究では、sequence-tagged site (STS) マーカーおよび simple sequence repeats (SSR) マーカーの作製を行った。また、常緑キリンソウの花粉および種子の調査を行った。さらに、体細胞および花粉母細胞における染色体を調査した。

材料および方法

1. 植物材料

常緑キリンソウ品種「トットリフジタ1号」、「トットリフジタ2号」、富山、柏崎、佐渡の自生集団より採集した、3系統のキリンソウ (*P. aizoon*)、さらに、園芸店(アルペンガーデンやまくさおよび大木ナーサリー)から購入したタケシマキリンソウ (*S. takesimense*) を用いた。



図1. 「トットリフジタ1号」(左) および「トットリフジタ2号」(右) の草姿。

編集委員: 安井 秀

2017年3月29日受領 2017年11月27日受理

2018年3月21日 J-STAGE 早期公開

Correspondence: tsujim@alrc.tottori-u.ac.jp

これらのタケシマキリンソウは、それぞれ A および B として区別した。

2. 花粉および種子の観察

6月に屋外で開花した「トットリフジタ1号」の花から成熟花粉を採集し、これを酢酸カーミンで染色後、光学顕微鏡で調査した。また同じ植物を放任受粉させ、2か月後に種子の結実率を調査した。得られた種子はホルモンを添加しないMS培地に播種し、発芽率を調査した。MS培地の作製には、ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類（日本製薬株式会社）を用いた。ビタミン類の調整は、大澤・久保田（2009）に基づいて行った。

3. 染色体観察

体細胞分裂観察用の試料は、「トットリフジタ1号」の根端を約1cm切り取り、滅菌水に入れ、0°C、24時間の前処理を行い、室温のファーナー液で5日間固定して作製した。この試料を酢酸カーミンで20分間染色し、押しつぶし法によりプレパラートを作り、位相差顕微鏡（OLYMPUS BX 41）で観察した。減数分裂観察用試料は、屋外で生育した「トットリフジタ1号」の花蕾（2-7mm）をファーナー液に入れ、室温で7日間固定して作製した。実体顕微鏡の下で葯から未熟な花粉を取り出し、酢酸カーミンで2分間染色して位相差顕微鏡で観察した。

4. 品種識別のための STS および SSR マーカーの作製

上記7種類の植物の展開直後の若い葉0.1g（新鮮重）を、液体窒素中で凍結粉碎した後、MagExtractor -Plant Genome-（TOYOBO）を用い、そのプロトコルにしたがってDNAを抽出した。

STSマーカーの作製のため、まず、常緑キリンソウ2品種とキリンソウ3系統のDNAを鋳型にし、20種類のRAPDプライマー（Operon社、Kit A）でPCRを行った。PCRに用いた反応液の構成は、ゲノムDNA 50 ng、RAPDプライマー 7.5 pmol、10×EX Taq Buffer（Takara Bio, Shiga, Japan）2.5 μl、dNTP mix（2.5 mM, Takara Bio）5 nmol、HybriPol DNAポリメラーゼ（Bioline, London, UK）0.6 Uを合わせて全量25 μlとした。PCRは、94°Cで3分間処理後、変性を94°Cで1分間、アニーリングを34°Cで1分間、伸長を72°Cで2分間を1サイクルとし、これを45サイクル反復した後、最後に73°Cで5分間の条件で行った。PCR増幅産物を電気泳動で分離し、植物間で増幅されるDNA断片のサイズの多型性から、品種識別に利用できそうな特異的バンドを探索した。そのうち、800 bp以下のものについて、STS化を試みた。これら、STS化プライマーを用いて、常緑キリンソウ品種2品種とキリンソウ3系統、およびタケシマキリンソウ2系統のDNAを鋳型とし、PCRを行った。PCRに用いた反応液の構成は、ゲノムDNA 50 ng、フォワードプライマー 5 pmol、リバースプライマー 5 pmol、KAPA Taq Extra Hot Start

Ready Mix PCR Kit（KAPA BIOSYSTEMS）12.5 μlを合わせて全量25 μlとした。PCRは、94°Cで5分間処理後、変性を94°Cで30秒間、アニーリングを30秒間（アニーリング温度はプライマーによって異なる）、伸長を72°Cで15秒間を1サイクルとし、これを35サイクル反復した後、最後に72°Cで7分間の条件で行った。PCR終了後、2%アガロースゲルで電気泳動を行い、多型の確認を行った。

SSRマーカーの作製は、練・宝月（2004）の方法にしたがって行った。その方法を簡単に記載すると付図1のようになる。「トットリフジタ1号」のDNAを制限酵素HaeIIIで切断し、その両端に、48 merの長鎖DNA（5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT-3'）と3'末端をアミノ化した8 merの短鎖DNA（5'-ACCAGCCC-NH₂-3'）から成る不等長アダプターをライゲーションした。次に、アダプター配列と同じ配列を含むアダプター特異的プライマー AP1（5'-CCATCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3'）、AP2（5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3'）を用意した。プライマー AP2 と、SSR配列(AC)₁₀または(AG)₁₀を用いてPCRを行い、SSR配列に隣接する配列のうち片側を増幅した。増幅産物をクローニングし、挿入部分の塩基配列を決定した。その配列それぞれに対して、フォワードプライマーとなるプライマー IP1、IP2を新たに設計した。次に、「トットリフジタ1号」のDNAを制限酵素EcoRV、AluI、RsaI、HincII、SspIで切断し、アダプター付き断片を作製した。6種類のアダプター付き断片それぞれを鋳型に、nested PCRを行った。まず、プライマー IP1 と AP1を用いてPCRを行った後、そのPCR産物を鋳型にプライマー IP2 と AP2を用いてPCRを行った。十分な長さのシングルバンドが出たものをダイレクトシーケンスし、配列を決定した。この、SSR配列に隣接する配列のうちもう片側の配列を元にリバースプライマーとなるプライマー IP3を設計した。作製したプライマー IP1 と IP3のペアを用いて、ゲノムPCRを行った。鋳型とするゲノムDNAは、上に述べた植物7種類を用いた。PCRに用いた反応液は、ゲノムDNA 50 ng、プライマー IP1（フォワードプライマー）10 pmol、プライマー IP3（リバースプライマー）10 pmol、KAPA Taq Extra Hot Start Ready Mix PCR Kit（KAPA BIOSYSTEMS）12.5 μlを合わせて全量25 μlとした。PCRは、94°Cで9分間処理後、変性を94°Cで30秒間、アニーリングを55°Cで30秒間、伸長を72°Cで30秒間を1サイクルとし、これを40サイクル反復した後、最後に72°Cで5分間の条件で行った。PCR終了後、3%アガロースゲルで電気泳動を行い、多型の確認を行った。

結果

1. 花粉および種子の観察

裂開直後の葯から採取した花粉粒を345粒調べたとこ

ろ、そのうち 284 粒が内容物を含む正常な形態の花粉であった (花粉稔性 82.3%)。残りの 61 粒 (17.7%) は不稔花粉であり、そのうち内容物を含まず染色されないもの 60 粒 (17.4%)、粒の大きさおよび染色が不十分なもの 1 粒 (0.3%) であった (図 2i)。正常な花粉は直径 17 μm から 25 μm で、原形質全体が均一に染色されて 3 個の発芽口が確認できた。不稔花粉は 10 μm から 18 μm の大きさであり内容物を欠いていた。

また、放任受粉させた「トットリフジタ 1 号」の 73 の子房に含まれていた 713 粒の種子の形態を調査した結果、厚みのある種子と厚みのない種子の 2 型が存在することが分かった。厚みのある種子は 713 粒の内 4 粒 (0.6%)、厚みのない種子は 709 粒 (99.4%) であった。これらの種子を MS 培地に播種したところ、厚みのある種子は発芽したため正常な種子であることが分かった。また、厚みのない種子は発芽せず秕であることが分かった。よって、「トットリフジタ 1 号」の結実率 (総胚珠数に占める結実種子数の割合) は 0.6% と非常に低いことが明らかになった。多数の子房から厚みのある種子のみを 196 粒集め、これらをホルモンフリー MS 培地に播種したところ、157 粒が正常に発芽した。よって、「トットリフジタ 1 号」より得られた種子における発芽率は 80.1% であった。播種後 8 か月後の時点で合計 112 個体の次代が得られた。これら次代個体は全て常緑性であったが、葉の形態、大きさ、色や草姿の伸長程度などの形質が個体ごとに異なっていた (付図 2)。葉の形態については、細葉や内側に湾曲した葉、鋸歯の深い葉が観察された。また、葉色は濃い緑色から黄緑色を呈するものや、葉の末端部が白く変色したものが観察された。しかしながら、

明瞭に分離する形質は見られなかった。

2. 染色体観察

体細胞分裂の観察のため根端の 5 細胞で染色体数を調査した結果、「トットリフジタ 1 号」の染色体数は $2n=32$ であることが分かった。中期において染色体の全長は 1.4 μm から 2.6 μm であり、染色体間で長さに大きな差はなかった。動原体は明瞭に現れ、24 本の中部動原体染色体と 8 本の次中部動原体染色体が存在した (図 2a)。

減数分裂の観察では、2 mm の花蕾に含まれている葯から、減数分裂の各分裂ステージの細胞が観察された (図 2b-g)。一方、3 mm 以上の花蕾に含まれている葯では、減数分裂が完了しており花粉を形成していた (図 2h)。減数分裂第一中期においては、全ての染色体が二価染色体を形成しており、多価あるいは一価染色体は見られなかった。しかし、後期および終期において若干の染色体橋が見られ、このことは逆位ヘテロの存在を示唆するものであった。しかし、減数分裂はおおむね正常であり、正常な四分子を形成した。

3. 品種識別のための STS および SSR マーカーの作製

1) STS マーカーの作製

20 の RAPD プライマーを用いて PCR を行った結果、OPA-07, OPA-10, OPA-16, OPA-20 の 4 プライマーにより多型バンドが得られた (付図 3)。OPA-07, OPA-10, OPA-20 により得られた多型バンドは「トットリフジタ 1 号」と「トットリフジタ 2 号」に共通であり、OPA-16 により得られた多型バンドは「トットリフジタ 1 号」のみに特異的であった。これらの多型バンドをもとに STS 化を行うために、それぞれのバンドの塩基配列を解読し、その配列を元に 20 または 23 mer のプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて 7 種類の植物について PCR を行い、多型性の再確認を行った。その結果、RAPD プライマー OPA-07, OPA-10, OPA-16 によるバンドから得られた塩基配列を元に設計した 3 組の STS プライマー (付表 1) において、多型を示すバンドが得られた (図 3)。これらの STS マーカー A-07, A-10, A-16 のバンドサイズはそれぞれ 449, 661, および 401 bp であった。

これら 3 個の STS マーカーにおけるバンドは、いずれも「トットリフジタ 1 号」と「トットリフジタ 2 号」の 2 品種間で同一であった。STS マーカー A-07 においては、「トットリフジタ 1 号」および「トットリフジタ 2 号」の 2 品種のみに特異的なバンドが見られた。また、タケシマキリンソウ A とタケシマキリンソウ B の 2 系統は、全ての STS マーカーにおいて同一のバンドパターンを示した。

2) SSR マーカーの作製

SSR 配列を含む配列 25 種類を決定し、それぞれの配列から SSR 配列を含む断片を増幅するプライマーとなるフォワードプライマー IP1 およびリバースプライマー IP3

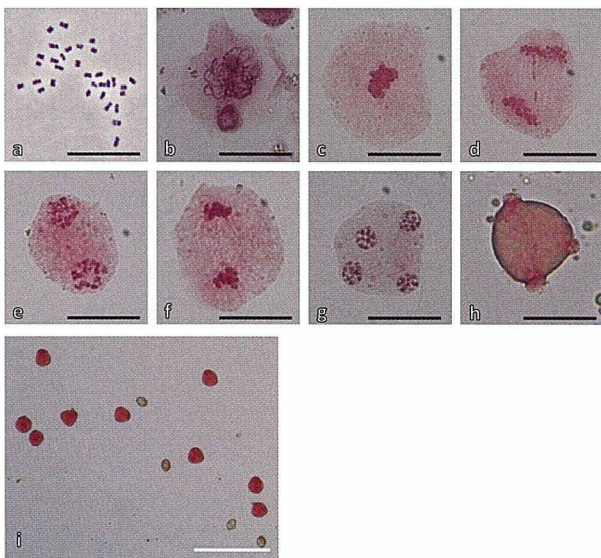


図 2. 「トットリフジタ 1 号」の体細胞の染色体 (a), 減数分裂の様子 (b-g) および「トットリフジタ 1 号」の花粉 (h, i)。b: 第一分裂前期, c: 第一分裂中期, d: 第一分裂後期, e: 第一分裂終期, f: 第二分裂中期, g: 四分子期, h, i: 花粉。黒いバーは 20 μm , 白いバーは 100 μm を示す。

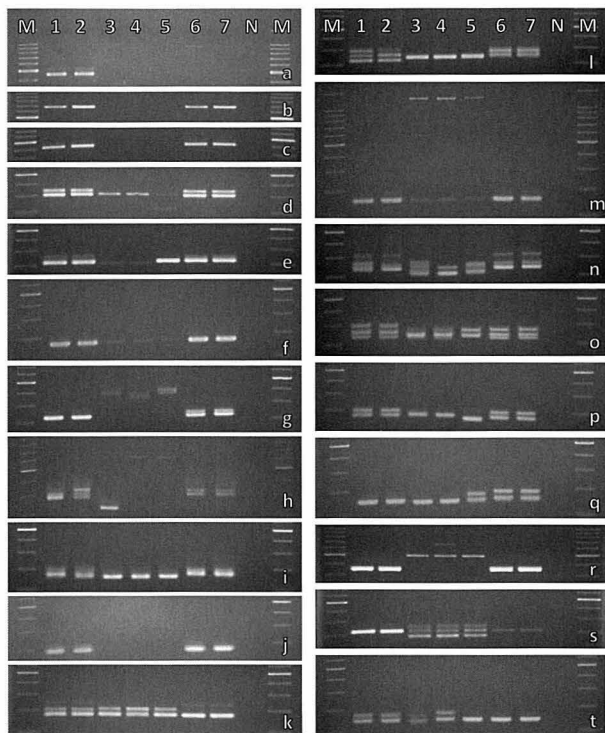


図3. STS マーカーおよび SSR マーカーの電気泳動像. M: 分子量マーカー (100 bp DNA Ladder), 1:「トットリフジタ 1号」, 2:「トットリフジタ 2号」, 3:キリンソウ野生系統 (富山), 4:キリンソウ野生系統 (柏崎), 5:キリンソウ野生系統 (佐渡), 6:タケシマキリンソウ A, 7:タケシマキリンソウ B, N: ネガティブコントロール. a: A-07-2, b: A-10-2, c: A-16-2, d: 251-IP1 と IP3, e: 299-IP1 と IP3, f: 263-IP1 と IP3, g: 274-IP1 と IP3, h: 293-IP1 と IP3, i: 332-IP1 と IP3, j: 353-IP1 と IP3, k: 257-IP1 と IP3, l: 260-IP1 と IP3, m: 298-IP1 と IP3, n: 366-IP1 と IP3, o: 370-IP1 と IP3, p: 376-IP1 と IP3, q: 384-IP1 と IP3, r: 235-IP1 と IP3, s: 238-IP1 と IP3, t: 322-IP1 と IP3 により増幅.

を 25 組設計した. フォワードプライマー IP1 とリバースプライマー IP3 を用いて植物 7 種類について PCR を行い, 多型性の調査を行った. その結果, 17 の SSR マーカー (付表 2) を用いた際に, いずれかの系統において多型を示すバンドが得られた (図 3).

17 の SSR マーカーのうち 1 マーカー (図 3h) は「トットリフジタ 1号」と「トットリフジタ 2号」の間でバンドパターンの違いが明瞭で, 識別可能であった. 2 マーカー (図 3l, n) は, 「トットリフジタ 1号」と「トットリフジタ 2号」の間でバンドパターンの違いが不明瞭で識別困難であった.

6 マーカー (図 3g, k, l, o, q, t) は, 「トットリフジタ 1号」および「トットリフジタ 2号」を, タケシマキリンソウ 2 個体と明確に識別可能であったが, 2 マーカー (図 3h, s) については識別困難であった.

いずれの SSR マーカーも, タケシマキリンソウ A とタケシマキリンソウ B に多型を示さなかった.

考察

1. 花粉および種子の観察と染色体観察

従来「トットリフジタ 1号」の種子は確認されておらず, 不稔品種であろうと考えられて来た. しかし, 本研究によって, 正常な減数分裂を行い花粉稔性も高いことが明らかとなった. しかし, 種子結実率は 0.6% と低いものであった. 次世代からは多様な形態を示す個体が得られ, 今後, 自殖や他の系統との交配による育種の可能性があることを示すことができた.

なお, 今回の研究で「トットリフジタ 1号」の体細胞染色体数は 32 本であることが分かった. タケシマキリンソウの染色体数は $2n=32$ (Weiss *et al.* 2002), キリンソウの染色体数は $2n=32$ から 102 まで生息域によって様々である (Amano 1990). 「トットリフジタ 1号」の染色体数は, タケシマキリンソウおよび一部のキリンソウと同数であるが, Amano (1990) によるとキリンソウの染色体の基本数は $x=8$ であることから, 四倍性であると考えられる. 「トットリフジタ 1号」の減数分裂においては, 四価染色体は見られなかったが, コルヒチンにより倍加した四倍性のソバのように, 同質倍数性でもほとんど二価染色体を示す植物もあるので, これらが同質倍数体か異質倍数体かは分からない.

2. 品種識別のための STS および SSR マーカーの作製

本研究で「トットリフジタ 1号」と「トットリフジタ 2号」の品種識別に利用可能な特異的バンドパターンを示す STS マーカーを 3 個, SSR マーカーを 17 個作製することができた. 「トットリフジタ 1号」および「トットリフジタ 2号」については過去に塩基配列の情報がなく, DNA マーカーもなかった. 本研究で作製したこれらの DNA マーカーは品種識別に有用であり, 品種の保護に利用できる. マーカー開発を行った当時品種登録されていた品種は, 「トットリフジタ 1号」および「トットリフジタ 2号」の 2 品種のみであった. キリンソウおよびタケシマキリンソウの野生個体は, 本研究で比較対象として用いた以外にも様々な遺伝子型の個体が存在していると考えられる. 本研究で開発した DNA マーカーを用いて品種識別を行う際, その目的は, 調査する植物が「トットリフジタ 1号」なのか, 「トットリフジタ 2号」なのか, それ以外の個体なのかを決定することとしている. 本論文に記載した方法により, 高い再現性で明確に品種識別が可能である.

SSR マーカーは一般的に共優性であり, 対立遺伝子の数が多いため品種識別に適している. これまでにもイネやチャなど数多くの植物種において高い多型性が示されている (河野ら 2000, 加藤ら 2008). 本研究においても開発した SSR マーカーは複数本のバンドを示すものが多くあり (図 3n, o など), キリンソウの品種識別においても SSR マーカーの有用性が示された.

特異的なバンドを示した全 20 マーカーの内 1 個の SSR マーカーにおいて、「トットリフジタ 1 号」と「トットリフジタ 2 号」の間で明瞭なバンドパターンの違いが見られた (図 3h)。この 2 品種は互いに近縁であるといわれているが、このマーカーは、「トットリフジタ 1 号」に近縁な個体間での識別にも有用である。タケシマキリンソウ A とタケシマキリンソウ B の 2 系統は、いずれのマーカーでも識別できず、これらはクローンである可能性が高い。

電子付録

- 付表 1. 多型を示した STS マーカーのプライマー配列
- 付表 2. 多型を示した SSR マーカーのプライマー配列
- 付図 1. SSR マーカーの作製方法
- 付図 2. 「トットリフジタ 1 号」から得られた次代の草姿
- 付図 3. RAPD プライマーでの電気泳動像

謝辞

本研究の一部は農水省による品種保護に向けた DNA 品種識別技術実用化事業の支援を受けて実施された。

引用文献

- Amano, M. (1990) Bot. Mag., Tokyo. 103: 67–85.
- 大澤勝次・久保田旺 (2009) 農学基礎セミナー 植物バイオテクノロジーの実際, 農山漁村文化協会, 東京. 228.
- 加藤史子・谷口郁也・物部真奈美・江間かおり・廣野久子・山本 (前田) 万里 (2008) 日本食品科学工学会誌 55: 49–55.
- 河野いづみ・竹内善信・島野公利・佐々木卓治・矢野昌裕 (2000) 育種学研究 2: 49–55.
- 練 春蘭・宝月岱造 (2004) 日本林學會誌 86: 191–198.
- Weiss, H., B.-Y. Sun, T.F. Stuessy, C.H. Kim, H. Kato and M. Wakabayashi (2002) Bot. J. Linn. Soc. 138: 93–105.