

## 胚珠培養によるセイヨウアジサイとカシワバアジサイとの種間雑種の作出

工藤暢宏<sup>1\*</sup>・木村康夫<sup>1</sup>・新美芳二<sup>2</sup><sup>1</sup>群馬県園芸試験場 379-2224 佐波郡東村西小保方493<sup>2</sup>新潟大学農学部 950-2122 新潟市五十嵐二の町8050Production of Interspecific Hybrid Plants by Crossing *Hydrangea macrophylla* f. *hortensia* (Lam.) Rehd. and *H. quercifolia* Bartr. through Ovule CultureNobuhiro Kudo<sup>1\*</sup>, Yasuo Kimura<sup>1</sup> and Yoshiji Niimi<sup>2</sup><sup>1</sup> Gunma Horticultural Experiment Station, Nishi-Obokata 493, Sawa-Azuma, Gunma 379-2224<sup>2</sup> Faculty of Agriculture, Niigata University, Ikarashi 2-8050, Niigata 950-2122

## Summary

Interspecific hybrids of *Hydrangea macrophylla* and *H. quercifolia* were obtained through ovule culture. *H. macrophylla* 'Blue Diamond', 'Haruna' and *H. quercifolia* 'Snow Queen' were used. No viable hybrid seeds were obtained by conventional hybridization. To circumvent the reproductive barrier, ovules were cultured on half-length MS medium containing 3% sucrose. Putative hybrid plantlets were recovered from crosses of *H. macrophylla* 'Blue Diamond' and *H. quercifolia*, but not *H. macrophylla* 'Haruna' and *H. quercifolia*. The plantlets showed an intermediate-type morphology of leaf serration and veins. The importance of ovule culture techniques in *Hydrangea* breeding is discussed.

キーワード：胚珠培養，カシワバアジサイ，交雑不親和性，セイヨウアジサイ，種間雑種

## 緒言

セイヨウアジサイ [*Hydrangea macrophylla* f. *hortensia* (Lam.) Rehd.] は、欧米で育成されたアジサイ品種の総称で、現在ではわが国の重要な鉢物花きの一つになっている。近年、わが国においても民間育種家の手により独自の品種、'ミセスクミコ'、'ブルーダイヤモンド'などが育成されるようになった(末留, 1996)。 *Hydrangea* 属には、約40種あるといわれ中国、ヒマラヤ、日本からフィリピン、スマトラ島、ジャワ島を含む東アジア一帯と南北アメリカ大陸に隔離分布する。落葉性の種はアジアと北アメリカに分布し、常緑性の種は中央・南アメリカに分布する。本属の植物はほとんどが低木で、まれに小高木やつる性になる(McClintock, 1957; 大場, 1995; 山本, 1996)。 *Hydrangea* 属には、園芸品種の成立に関与していない野生種が数多く存在しており、園芸種の変異幅を広げるために、今後、野生種のもつ有用な遺伝資源をアジサイの育種に活用すべきである(工藤, 1999)。

セイヨウアジサイは花色の変異が豊富で園芸的価値が高いが、寒さに弱く越冬中の花芽が枯死しやすい性質がある。一方、北アメリカ原産のカシワバアジサイ (*H. quercifolia* Bartr.) は特徴的な円錐形の花序をもち、耐寒性などの優れた形質をもっている(Lawson-Hall・Rothera, 1995)。セイヨウアジサイにカシワバアジサイの特性を導入できれば新しいタイプのアジサイ育種の可能性が広がり、アジサイ生産者や消費者にとってたいへん有益となる。セイヨウアジサイとカシワバアジサイとの種間雑種作出例はこれまで報告されていない。本報では、胚珠培養によるセイヨウアジサイとカシワバアジサイの雑種作出を報告する。

## 材料および方法

セイヨウアジサイ'ブルーダイヤモンド'、'ハルナ'、とカシワバアジサイ'スノークイーン'を供試した。植物は、プラスチックポットに植えて、無加温のガラス温室内で栽培した。

## 実験1. 交配試験

セイヨウアジサイを種子親、カシワバアジサイを花粉親にして交配し、交配後のさく果形成数と種子形成数を調査した。種子親のつぼみは開花前日にピンセットで除雄し

2001年7月31日 受付。2001年11月16日 受理。  
本研究の一部は園芸学会平成13年度春季大会で発表した。

\* Corresponding author.

た。自然授粉を防ぐため花房全体をポリラップで被覆した。授粉は柱頭の発達を確認し、開花後1~3日の間に行った。交配に供した花粉は開花当日の新鮮なものを選んだ。各々の組み合わせにおいて肥大した子房(さく果)を授粉150日後に採取して風乾し、形成された完熟種子数をさく果ごとに調査した。

### 実験2. 胚珠培養

交配後60~120日まで30日間隔でさく果を20個ずつ採取し、胚珠培養に供試した。採取したさく果の表面をアンチホルミン水溶液(有効塩素濃度約1%)で15分間殺菌した後、滅菌水で3回洗浄した。殺菌したさく果を実体顕微鏡下で解剖し、自家交配の胚珠発達程度を基準として、縦0.7mm、横0.4mm以上に肥大した胚珠を有胚胚珠とみなして、無菌的に摘出し培養した。胚珠培養には、MS(Murashige・Skoog, 1962)の無機塩を1/2に希釈した培地(ショ糖3%, ゲランガム0.25%を含む)を用いた。培地はpHを5.8に調整した後、オートクレーブ(121℃, 20分間)で滅菌した。培養は25℃, 2,000lx(植物育成用蛍光灯, 松下電器), 16時間照明の条件下で行った。

胚珠培養を行うと肥大した胚が胚珠を突き破り現れた。これを胚出現と呼ぶこととし、培養60日後に胚出現数を調査した。これら肥大した胚を30日ごとに新鮮な胚珠培養と同様な培地に継代して、発育を促した。展開葉が4枚以上で発根した実生を、滅菌したパーミキュライトに移植しビニール袋で被覆後、約1週間おきにビニール袋を徐々に切り開き、最後に除去する方法で順化・鉢上げを行った。

培養開始から約12か月に順化後温室で生育する個体数を調査した。

### 実験3. 胚珠培養で得た植物の形態観察

順化した植物を温室で栽培して生育状況と形態的特徴を観察した。

## 結果

### 実験1. 交配試験

セイヨウアジサイ2品種とカシワバアジサイとの種間交配では、どちらの組み合わせでも、授粉後約2週間で子房が緑化肥大しさく果を形成するにもかかわらず、完全な種子は得られなかった(第1表)。種間交配で得た種子は、胚乳が未発達で萎縮していた。一方、セイヨウアジサイの自家授粉のさく果当たり平均種子数は、'ブルーダイヤモンド'では38個、'ハルナ'では41個であった。

### 実験2. 胚珠培養

実験1と同様の交配組み合わせにおいて、胚珠を取り出し培養するとどちらの交配組み合わせでも同じくらいの割合で、肥大した胚が胚珠より現れた(第2表)。胚珠摘出時期が異なっても胚出現率に大きな変化は認められなかった。総胚珠数当たりの胚出現率はそれぞれ、'ハルナ'で2.8%、'ブルーダイヤモンド'で1.9%であった。しかし、'ハルナ'を種子親にした場合では、胚が出現直後に生育を停止し、枯死した。'ブルーダイヤモンド'を種子親にした場合には、非常に低い割合(総培養胚珠数の1.1%)であるが、順化可能な個体まで発達した(第2表)。胚出現率と同

第1表 セイヨウアジサイとカシワバアジサイとの交配による種子形成

交配組み合わせ	交配花数	さく果形成 <sup>z</sup>	さく果当たり種子数 <sup>y</sup>
セイヨウアジサイ 'ブルーダイヤモンド' ×カシワバアジサイ 'スノークイーン'	50	50	—
セイヨウアジサイ 'ブルーダイヤモンド' 自家交配	20	20	38
セイヨウアジサイ 'ハルナ' ×カシワバアジサイ 'スノークイーン'	50	50	—
セイヨウアジサイ 'ハルナ' 自家交配	20	20	41

<sup>z</sup> 交配2週間後に調査した。

<sup>y</sup> 交配150日後に調査した

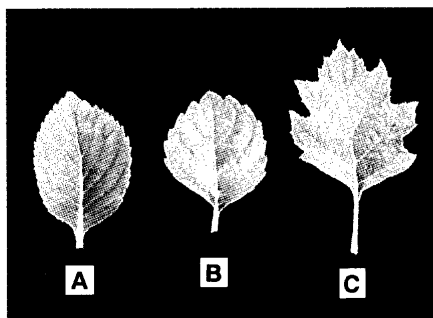
第2表 セイヨウアジサイとカシワバアジサイとの交配で得られた胚珠の培養による雑種植物の獲得

交配組み合わせ	交配後日数	培養胚珠数 <sup>z</sup>	出現した胚 (%) <sup>y</sup>	順化個体 (%) <sup>x</sup>
セイヨウアジサイ 'ブルーダイヤモンド' ×カシワバアジサイ 'スノークイーン'	60	195	4(2.1)	1(0.5)
	90	178	6(3.4)	3(1.7)
	120	169	5(3.0)	2(1.2)
合計		542	15(2.8)	6(1.1)
セイヨウアジサイ 'ハルナ' ×カシワバアジサイ 'スノークイーン'	60	202	5(2.5)	—
	90	212	4(1.9)	—
	120	207	3(1.4)	—
合計		621	12(1.9)	—

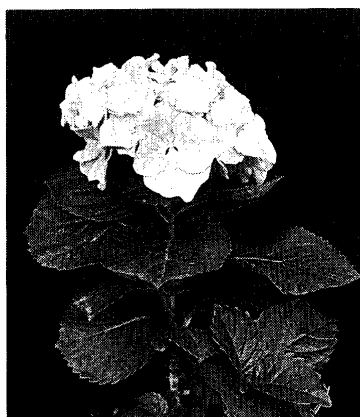
<sup>z</sup> 交配後60~120日、30日間隔で20個のさく果を採取し、胚珠を培養した

<sup>y</sup> 培養後60日に胚珠から出現した胚数を調査した

<sup>x</sup> 順化後温室で生育した個体数(培養開始から約12か月後)



第1図 胚珠培養で得られた再生個体の葉の形態  
 (A) 種子親セイヨウアジサイ‘ブルーダイヤモンド’  
 (B) 胚珠培養による再生個体  
 (C) 花粉親カシワバアジサイ‘スノーキーン’  
 胚珠培養で得られた個体の葉の鋸歯と葉脈部に花粉親のカシワバアジサイの特徴が現れている



第2図 開花した雑種植物 花序にはカシワバアジサイの特徴があまり認められない

様に胚摘出時期が異なっても順化個体数に大きな変化は認められなかった。胚珠培養で得られた実生は生育が極めて緩慢であったが、ネクロシスやクロロシスなどの致死的症状を示さずに発育し、試験管外で生育可能な個体となった。

### 実験3. 再生個体の形態的特徴

順化後温室で栽培した再生個体には花粉親であるカシワバアジサイ特有の鋸歯が観察され、葉の表面の手触りや葉脈にもカシワバアジサイの特性が現れていた。以上の形態的特徴から得られた植物は雑種であると判断された(第1図)。しかし、雑種個体の草姿は種子親に類似していた。また、雑種個体の節間は著しく短縮しており、この点は両親のどちらの形態にも当てはまらない雑種に特異的な形態であった。雑種個体の生育は極めて不安定かつ緩慢で、夏期にはほとんど生育を停止した。培養開始から2年後に雑種6個体のうち1個体が開花したが、花序は中心がやや山型に盛り上がったテマリ型で、種子親の‘ブルーダイヤモンド’の特徴が強く現れており、カシワバアジサイのような円錐形花序を示さなかった(第2図)。

### 考 察

花き育種において、花色、花型、開花習性などの変異を拡大するために、種間交雑が大きな役割を果たしてきた。

種間雑種の獲得率を向上させる目的で、発達途中で退化する雑種胚を救済する胚・胚珠培養技術が積極的に活用されている(Arisumi, 1985; Van Tuylら, 1990; Niimiら, 1996)。Hydrangea属の野生種を遺伝資源として活用し、新奇性の高い種間雑種を作出するためには、交雑不親和性の程度や胚・胚珠培養の適用法などについて検討することが必要である。本実験において、胚珠培養によりセイヨウアジサイとカシワバアジサイとの種間雑種が獲得できることが明らかになった。胚珠培養により得た雑種植物は本葉の鋸歯や葉脈の形態的特徴から雑種であると判断されたが、今後は核型分析や分子マーカーによる詳しい雑種性の確認が必要である。

これまで、Hydrangea属植物における遠縁交雑に関する研究はほとんど行われてこなかった。したがって、Hydrangea属植物の交雑親和性についても十分解明されてはいない(工藤・新美, 1999)。現在でも、セイヨウアジサイは近縁のヤマアジサイやエゾアジサイと交配可能であることが経験的に知られているに過ぎず、依然としてHaworth-Booth (1950)の記述のように「亜節内交雑は比較的容易であるが、亜節間交雑は困難である」という理解の範囲を超えていない。McClintock (1957)の分類では、セイヨウアジサイはMacrophyllae亜節に属し、カシワバアジサイはAmericanae亜節に属するため、両種は、遺伝的にも地理的にも遠縁の関係にあると考えられ、両種間にはなんらかの生殖的隔離機構が存在しても不思議はない。予備的な試験でセイヨウアジサイを種子親とした種間交配において、カシワバアジサイの花粉管がセイヨウアジサイの花柱内をよく伸長することが観察されている(工藤, 未発表)。そのため、本研究の種間交配において、種間雑種が獲得できない主な要因は受精後に形成される雑種胚の生育が不十分なためだと考えられる。一般に遠縁交雑では、(1)花粉が柱頭上で発芽しない、花粉管伸長が花柱内で停止する受精前の障害と、(2)受精が起こるが雑種胚が十分発育しない、(3)雑種植物が幼苗期に枯死する、などの受精後の障害が単独あるいは重複して存在するため雑種植物が得られないと考えられている(中島, 1988)。セイヨウアジサイとカシワバアジサイと種間交配では、上記分類のうちの(2)の障害が起こるために雑種個体の獲得が困難であったと考えられる。工藤・新美(1999)はカシワバアジサイと同じAmericanae亜節に属するアメリカノリノキ(*H. arborescens*)とセイヨウアジサイとも交雑不親和性が存在することを報告している。セイヨウアジサイとアメリカノリノキには、上記分類の(2)と(3)の障害が重複して存在し、胚珠培養によって得た雑種植物に雑種致死現象が起こり、胚珠培養だけでは障害を回避できない(工藤, 1999; 工藤・新美, 1999)。このことから、同じAmericanae亜節に属するアメリカノリノキとカシワバアジサイとではセイヨウアジサイに対する交雑不親和性の程度および様相が異なり、アメリカノリノキの交雑不親和

性の程度がカシワバアジサイより強いことが推察される。今後更に多くの組み合わせで、*Hydrangea* 属の交雑親和性の解明が期待される。

本研究で得られた雑種植物の表現型が、種子親に偏向していた。雑種植物の形態は両親のほぼ中間を示すことが *Limonium* 属で報告されているが (Morgan ら, 1995), 一方、雑種植物の表現型が両親のどちらかの特徴を強く受け継ぐことも他の植物種で知られている (Li ら, 1998)。アラビドプシス (*Arabidopsis thaliana*) と近縁種 (*A. arenosa*) との種間雑種の表現型が、分子マーカーや核型分析で雑種性が確認されているにもかかわらず、種子親のアラビドプシスに偏向していたことが報告されており (Comai ら, 2000), 花粉親に由来するゲノムの特定の遺伝子座にサイレンシングが起きていることが推察されている。本研究においても雑種植物の表現型が種子親に偏る要因を分子レベルで解明する必要がある。

温室で栽培した雑種植物は生育が非常に緩慢で夏期の高湿条件 (最高気温が 30℃ を超える程度) では生育を停止した。セイヨウアジサイとアメリカノリノキとの種間交雑においても雑種の生育が劣る現象が報告されており (工藤・新美, 1999), これらは遠縁交雑で観察される雑種弱勢 (hybrid weakness) に相当する現象であろう。 *Hydrangea* 属の種間交雑において、他の組み合わせでも、同様な現象が起こるかどうかが今後検討する必要がある。

## 摘 要

カシワバアジサイの有用形質をセイヨウアジサイに導入することを目的として、種間雑種の作出方法を検討した。

1. セイヨウアジサイを種子親、カシワバアジサイを花粉親にした種間交配では、受粉後 2 週間ほどで子房が緑化肥大し、さく果を形成するが、完全な種子はできなかった。

2. 交配後のさく果から胚珠を取り出し培養すると胚が発達して、肥大した胚が出現することが確認された。しかし、'ハルナ' を種子親にした場合には、出現直後に胚が生育を停止し枯死した。'ブルーダイヤモンド' を種子親にした場合には、非常に低い割合であるが、順化可能な雑種と思われる個体が得られた。

3. 順化後温室で栽培した再性個体にはカシワバアジサイ特有の鋸歯が観察され、雑種であると判断された。しかし、雑種個体の全体的な形態は種子親の特徴を多く受け継いでいた。培養開始から 2 年後に胚珠から再生した雑種 6 個体のうち 1 個体が開花したが、花序は中心がやや山型に盛り上がったテマリ型で、種子親の 'ブルーダイヤモンド' の特徴が強く現れていた。

## 引用文献

- Arisumi, T. 1985. Rescuing abortive *Impatiens* hybrids through aseptic culture of ovules. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110: 273-276.
- Comai, L., A. P. Tyagi, K. Winter, R. Holmes-Davis, S. H. Reynolds, Y. Stevens and B. Byers. 2000. Phenotypic instability and rapid gene silencing in newly formed Arabidopsis allotetraploids. The Plant Cell 12: 1551-1567.
- Haworth-Booth, M. 1950. The Hydrangeas. Constable, publishers. London.
- 工藤暢宏. 1999. 組織培養によるセイヨウアジサイとアメリカノリノキとの種間雑種の作出に関する研究. 新潟大学学位論文.
- 工藤暢宏・新美芳二. 1999. セイヨウアジサイとアメリカノリノキとの種間雑種の獲得に関する研究. 園学雑. 68: 428-439.
- Li, Z., J.G. Wu, Y. Liu., H. L. Liu and W.K. Heneen. 1998. Production and cytogenetics of the intergeneric hybrids *Brassica juncea* × *Orychophragmus violaceus* and *B. carinata* × *O. violaceus*. Theor. Appl. Genet. 96: 251-265.
- Lawson-Hall, T., and B. Rothera. 1995. Hydrangea. A gardeners' guide. p.9-37. B. T. Batsford Ltd. London.
- McClintock, E. 1957. A monograph of genus Hydrangea. Proc. Calif. Acad. Sci. 9: 147-256.
- Morgan, E. R., G. K. Burge, J. F. Seelye, J. E. Grant and M. E. Hopping. 1995. Interspecific hybridization between *Limonium perigrinum* Berguis and *Limonium purpuratum* L. Euphytica 83: 215-224.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plat. 15: 473-497.
- 中島哲夫. 1988. 試験管内受精と胚珠培養. p. 12-23. 日本育種学会編. 育種学最近の進歩第 29 集. 啓学出版. 東京.
- Niimi, Y., M. Nakano and K. Maki. 1996. Production of interspecific hybrids between *Lilium regale* and *L. rubellum* via ovule culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64: 919-925.
- 大場秀章. 1995. アジサイ科. p. 290-297. 大場秀章・戸部博編. 週間朝日百科植物の世界第 58 号. 朝日新聞社. 東京.
- 末留 昇. 1996. 鉢物用ハイドランジアの品種とその特性. 新花卉. 169: 26-29.
- Van-Tuyt, J. M., M. P. Van-Dein, M. G. M. Van-Creij, T. C. M. Van-Kleinwee, J. Franken and R. J. Bino. 1991. Application on in vitro pollination, ovary culture, ovule culture and embryo rescue for overcoming incongruity barriers in interspecific *Lilium* crosses. Plant Sci. 74: 115-126.
- 山本武臣. 1996. アジサイの系統と品種. 新花卉. 169: 20-25.