

アメリカ大陸原産の*Lycaste*属と*Zygopetalum*属とアジア原産の*Cymbidium*属の遠縁雑種形成

¹塩田浩喜・¹二神友一・²伊藤峻也・³中島克・⁴遊川知久・⁵三位正洋・²加藤享太郎・²市橋正一
〒448-8542 刈谷市井ヶ谷町広沢1 愛知教育大学 ¹大学院教育学研究科および²理科教育講座
³〒476-0011 愛知県東海市富木島町八幡下1 東海市農業センター
⁴〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1 国立科学博物館筑波実験植物園
⁵〒271-8510 千葉県松戸市松戸 648 千葉大学大学院園芸学研究科

Intergeneric hybridization between two Americas orchids, *Lycaste* and *Zygopetalum*, and *Cymbidium*

¹Shiota, H., ¹Y. Futagami, ²S. Ito, ³K. Nakashima, ⁴T. Yukawa, ⁵M. Mii, ²J. Kato and ²S. Ichihashi
1,2. Dept. of Biology, Aichi Univ. of Education, Igaya, Kariya, Aichi448-8542, JAPAN
3. Tokai Munic. Agric. Cent., Fukushima, Tokai, 476-0011, JAPAN
4. Tsukuba bot. Gard., Nati. Muse.Nat. Sci., 4-1-1, Amakubo, Tsukuba, Ibaraki, 305-0005, JAPAN

Summary

In orchid breeding, interspecific crossing is a common method to produce novel cultivars. Although interspecific hybrids are frequently produced in orchids, some hybrids obtained from several wide cross combinations were reported to express hybrid weakness with lethality before the reproductive stage and apomixis like plants were sometimes produced in several specific cross combination. In the present study, we performed 77 crosses of reciprocal 71 cross combinations between *Cymbidium*, which distribute mainly in Southeast Asia and Oceania, and *Lycaste*, mainly distribute in Central and South America. Seeds were obtained in two 2x-2x cross combinations, i.e., between *Cymbidium* Wakakusa and *Lycaste aromatica* and between *Lyc. Shoalhaven* and *Cym. eburneum*, and in a 3x-2x cross combination between triploid *Lycaste* Fire Bird and diploid *Cym. insigne*. In the cross combination between *Lyc. Shoalhaven* and *Cym. eburneum*, although hybridity analysis of seeds by PCR-RFLP of ITS region using a seed as PCR template instead of DNA extraction revealed that not only seeds with hybridity but also ones without hybridity were mixed in an ovary, hybridity analysis of protocorms by flow cytometry revealed that hybridity was confirmed in all protocorms analyzed. These results suggested that in this cross combinations, both hybrid and parthenogenetic seeds could be formed in seed formation but only hybrid seeds had capacity of germination in vitro.

Another *Cymbidium* wide crossing, between *Cymbidium* and *Zygopetalum*, mainly distribute in South America, were also performed. A total of 14 reciprocal intergeneric crosses using 2 tetraploid strains and 9 diploid cultivars of *Cymbidium* and 2 tetraploid cultivars of *Zygopetalum* were conducted. Germinable seeds were obtained from two cross combinations of tetraploid *Zygopetalum* used as seed parents with the pollens of a diploid *Cymbidium* strain and a tetraploid *Cymbidium* cultivars. Flow cytometric analysis of ploidy level revealed that 13 triploid hybrids, 1 tetraploid hybrid obtained by the fertilization of unreduced pollen of *Cymbidium* and 6 tetraploid parthenogenetic *Zygopetalum* were obtained from the cross between 4x *Zyg. Redvale* 'Fire Kiss' and 2x *Cym. Wiganianum*. Furthermore, in the cross between 4x *Zygopetalum* and 4x *Cymbidium*, 24 tetraploid hybrids and 26 tetraploid parthenogenetic like *Zygopetalum* were obtained. These results suggested that both parthenogenetic like plants and intergeneric hybrids could be occurred in the intergeneric crosses between *Zygopetalum* and *Cymbidium*.

緒言

遠縁交雑は、変異の拡大および新品種作出の手段として多くの植物種において試みられてきた。しかし、交雑親和性は組合せにより異なり、a) 雑種作出が可能な組合せと不可能な組合せがあること、b) 可能な組合せ内でも系統間差が大きく目的の形質を保有する系統が利用不可能である、c) 交配可能であっても目的形質が雑種では表現形に現れない、等の理由から、より物理的な細胞融合もしくは遺伝子組み換えなどが現在では着目されている。ラン科植物は他の植物と比べると、種間・属間交配において比較的高い交雑親和性を保有するため、多くのラン科植物の育種は種間・属間雑種形成によって行われ、新たな種間雑種や属間雑種の開発は新規品種開発において未だ有効な手段である。

Cymbidium 属は、*Phalaenopsis* 属、*Dendrobium* 属に次ぐ鑑賞性の高いラン科植物の1つであり、*Cymbidium* 属の変異の拡大は属内種間交配を中心に行われてきた。しかし、近年の交配育種で作出される新品種の変異幅は、既存品種と同程度であり、新規性が乏しいため、今後の新品種の開発には、これまであまり使用されていない異なる属を遺伝資源として用い、フルモデルチェンジ型の新品種開発を行う必要があると考えられる。

南米および中南米に分布する *Lycaste* 属は、*Cymbidium* とは顕著に異なった特徴的な形態を保有するため、*Cymbidium* 育種の新たな遺伝資源としての可能性を保有すると思われる。*Lycaste* 属 × *Cymbidium* 属の属間交配は報告があり、*Cymbidium* の 3x 栽培種と *Lycaste* の 2x 野生種の交配組み合わせによる雑種が形成されているが (Kojima *et al.* 1987) 個体数はわずかであり、開花前の枯死が報告された (小島 2008)。

ブラジルやコロンビアなどの南米熱帯地域の高地に自生する *Zygopetalum* 属も、また特徴的な花形、鮮やかな濃紫色の唇弁および豊かな芳香を保有する種が存在するため遺伝資源としての可能性を保有している。これまでの *Zygopetalum* 属をもちいた属間交雑では、*Zyg. mackyai* を種子親に用いた時に、種子親に酷似した形質を保有するアポミクシスの後代が主に生じることが古くから言われており、*Cymbidium* 属との交雑においてもアポミ

クシス個体が発現すると報告された (森ら 1991)。

本研究では、*Cymbidium* 属の変異の拡大目的として、*Lycaste* × *Cymbidium* および *Zygopetalum* × *Cymbidium* の正逆属間交配を試み、交雑親和性および雑種形成能を調査した。

材料および方法

<植物材料および交配組み合わせ>

実験1 *Cymbidium* × *Lycaste*

Cymbidium 属の4原種 *Cym. floribundum*、*Cym. ebureum*、*Cym. lowianum*、*Cym. insigne* 各1系統の計4系統、2倍体 *Cymbidium* 属交配種8系統、4倍体 *Cymbidium* 属交配種2系統を交配に用いた。*Lycaste* 属は原種 *Lyc. aromatica*、*Lyc. skinneri* の計2系統、2倍体 *Lycaste* 属交配種6系統、3倍体 *Lycaste* 属交配種2系統、4倍体 *Lycaste* 属交配種6系統、8倍体 *Lycaste* 属交配種2系統を使用し、*Cymbidium* 属を母本に28組合せ34交配、逆交配では43組合せ43交配の計71組み合わせ77交配を行った。

実験2 *Cymbidium* × *Zygopetalum*

Cymbidium 属原種 *Cym. floribundum* 2系統、*Cym. ebureum*、*Cym. lowianum* 各1系統の計4系統、2倍体の *Cymbidium* 交配種3品種5系統、4倍体 *Cymbidium* 属交配種1品種1系統の計10系統を用い、4倍体の *Zygopetalum* 交配種である *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* および *Pretty Ann'* の2品種を用い、*Cymbidium* 属を母本に7組合せ7交配を行い、逆交配では7組合せ7交配の計14組み合わせ14交配を行った。

<種子の無菌播種>

交配後6ヵ月程度の未熟種子を、MS 培地 (Murashige and Skoog 1962) の有機物、2%(w/v) シュークローズおよび1%(w/v) 寒天を添加した Hyponex 培地、もしくは10%(v/v) ココナッツウォーター (CW)、0.1mg/l BA、2%(w/v) シュークローズおよび1%(w/v) 寒天を添加した Hyponex-CW-0.1BA 培地の2種類の培地に種子を置床し、プラントルックス24時間連続照明、25℃で培養した。

<種子 の 雑種 判定>

Lycaste を母本とした交配から得られた種子は、CCD カメラを通してピンセットで1粒ずつ取り出し、DNA 抽出を行わず直接鋳型として45S リボソーム中のITS 領域をPCR 増幅した(single seed PCR: SS-PCR) PCR 増幅産物を電気泳動で確認した後、制限酵素 *taq1* で切断するPCR-RFLP 法により雑種判定を行った(Fig.1)。この方法は *Zygopetalum* × *Cymbidium* の組み合わせでは、PCR 増幅が不可能であった。

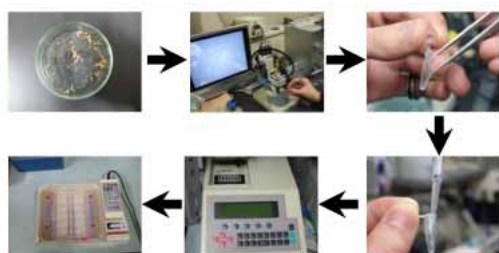


Fig. 1. The procedure of PCR-RFLP analysis of ITS region using a seed as PCR template instead of DNA extracted.

<発芽 個体 の 雑種 判定>

発芽個体は、両親の相対的核DNA 含量に明確な差異が確認されたため、PA 型フローサイトメトリ(Partec 社)を用いて、相対的核DNA 含量を測定することにより、雑種判定を行った。*Zygopetalum* × *Cymbidium* から得られたプロトコームにおいては、DNA 含量解析と共に45S リボソーム中のITS 領域をPCR 増幅し、PCR-RFLP 法により雑種性の確認も行った。

結果および考察

実験 1 *Cymbidium* × *Lycaste*

Cymbidium 属を母本に28 組合せ34 交配行い、2x 栽培種×2x 野生種の組合せである *Cym. Wakakusa* 'Pearl' × *Lyc. aromatica* の1 組合せ、逆交配では43 組合せ43 交配行い、2x 栽培種×2x 野生種の組合せである *Lyc. Shoalhaven* 'Cs1' × *Cym. eburneum* および3x 栽培種×2x 野生種の組合せである *Lyc. Fire Bird* 'Koi' × *Cym. insigne* のそれぞれ1 組合せ計2 組合せから肥大蒴果が得られた。2x 栽培種×2x 野生種から得られた種子1 粒ずつを直接鋳型としたSS-PCR で45S リボソーム中のITS 領域をPCR 増幅し、PCR-RFLP 法により112 種子の雑種判定を行った結果、15 種子でPCR 増幅が可能であり、4 種子で両親特異的バンドパターン

が検出され雑種性が確認された。また、雑種種子以外に、種子親特異的バンドパターンのみが検出された種子、花粉親特異的バンドパターンのみが検出された種子、および両親のいずれのバンドパターンとも一致しないバンドパターンの種子が混在することが明らかとなった(Fig. 2)。

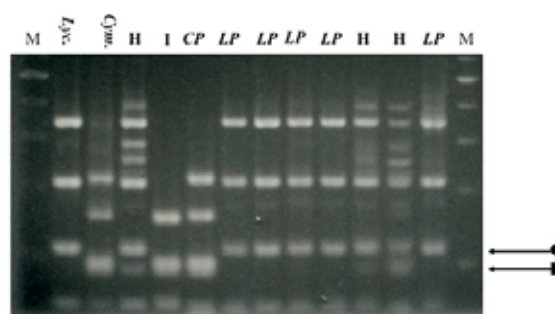


Fig. 2 Hybridity analysis of seeds derived from intergeneric hybridization between *Lycaste* and *Cymbidium* by PCR-RFLP of ITS region digested by *Taq1*.

Cym: *Cymbidium*, *Lyc*: *Lycaste*, *CP*: seeds with specific band pattern of *Cymbidium*, *H*: seeds with hybridity, *I*: irregular band pattern, *LP*: seeds with specific band pattern of *Lycaste* arrowhead with circle: the specific band of *Lycaste*, arrowhead with box: the specific band of *Cymbidium*

播種後3 ヶ月程度でプロトコーム形成が、*Cymbidium* 属を母本とした2x 栽培種×2x 野生種の組合せ、*Lycaste* 属を母本とした2x 栽培種×2x 野生種の組合せ、および3x 栽培種×2x 野生種の組合せからそれぞれ確認され、それぞれ1 個体、7489 個体および10 個体が形成された(Fig. 3)。

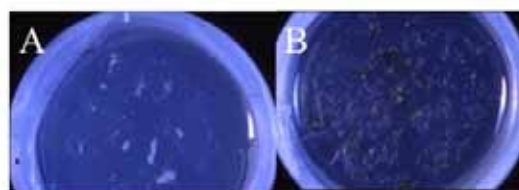
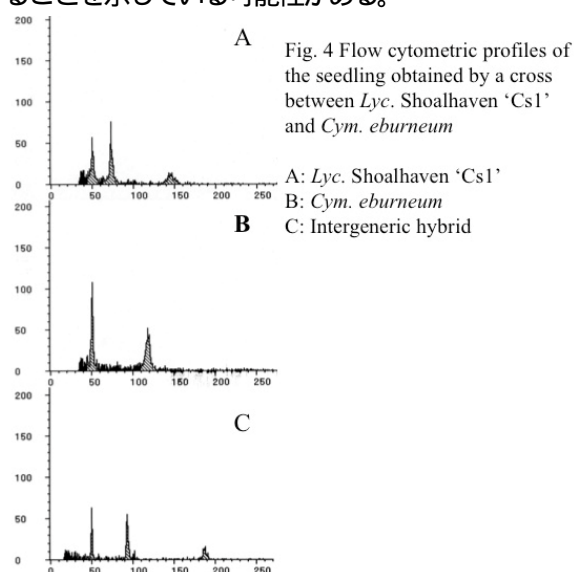


Fig.3 Formation of protocorms derived from intergeneric crosses between *Cym. Wakakusa* 'Pearl' and *Lyc. aromatica* (A) and between *Lyc. Shoalhaven* 'Cs1' and *Cym. eburneum* (B)

両親のDNA 含量に顕著な差異が確認されたため、*Lycaste* を母本として2x 栽培種×2x 野生種から得られたプロトコームを、PA 型フローサイトメトリ(Partec 社)を用い、相対的核DNA 含量による雑種判定を試みた結果、種子のPCR-RFLP による雑種判定の結果とは異なり、全解析個体のDNA 含量値は、解析個体のすべてが雑種であることを示唆していた(Fig. 4)。

一方、3x × 2x の組み合わせ由来10 個体のうち

解析可能な6個体のDNA含量の分布は、三倍体雑種と四倍体雑種のDNA含量を示しており(Fig. 5)、DNA抽出によるITS領域のPCR-RFLPにより雑種性が確認された。三倍体の減数分裂で生じる配偶子のDNA含量の予想される分布は、一倍体の配偶子から二倍体の配偶子のDNA含量の間である。 $3x \times 2x$ の低率な発芽率と三倍体雑種の出現は、三倍体個体から低頻度に生じる二倍体配偶子が異数体的配偶子と比べて雑種形成に有利であることを示している可能性がある。



一方、四倍体雑種の出現は、三倍体の *Lycaste* がさらに低頻度に形成した三倍体の非還元性雌性配偶子が受精/発生に有効であることを示唆している。異数体的なプロトコームが出現しないことは、この組み合わせの種子形成から発生段階において、異数体は生存上不利である可能性を示唆していると考えられる。

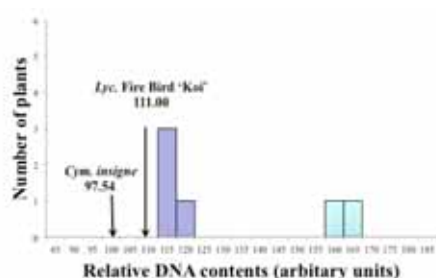


Fig. 5. The distribution of DNA contents in six protocorms derived from intergeneric crosses between triploid *Lyc. Fire Bird 'Koi'* and diploid *Cym. insignis*

以前、*Lycaste* 属と *Cymbidium* 属の属間交配が *Cymbidium* $3x$ 栽培種 \times *Lycaste* $2x$ 野生種で行われた。発芽個体は異数体であり (Aoyama 1987)、その個

体は弱性を示し開花前に枯死したと報告された (小島 2008)。本研究においても、プロトコーム形成数は、 $3x \times 2x$ の交配が $2x \times 2x$ と比べて明白に少なく、異数体個体が弱勢となり淘汰されやすいことが示唆される。一方、本研究では $2x \times 2x$ の交配組合せから比較的多くのプロトコームが形成され、雑種強勢的な発育を示しており、今後の順調な生育が期待される。一方、*Cymbidium* を母本とした組合せにおいては、母親が非還元性雌性配偶子作出することが予備的研究で明らかになっている *Cymbidium floribundum* を片親に持つ品種であったことから、非還元雌性配偶子形成を行う特定の品種のみからしか発芽種子が得られない可能性もある。これらの結果から、*Lycaste* 属とアジア原産の *Cymbidium* 属の間に、交雑親和性のある組み合わせがあることおよび異数体が淘汰されやすい可能性が示唆された。

実験2 *Cymbidium* \times *Zygopetalum*

Cymbidium 属を母本に7組合せ7交配行い、逆交配では7組合せ7交配行った結果、4倍体 \times 2倍体の組合せである *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* \times *Cym. Wiganianum*、および4倍体 \times 4倍体の組合せである *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'* \times *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'* のいずれも *Zygopetalum* 属を種子親とした2組合せより肥大蒴果が得られ、それぞれから発芽個体が得られた (Fig. 5)

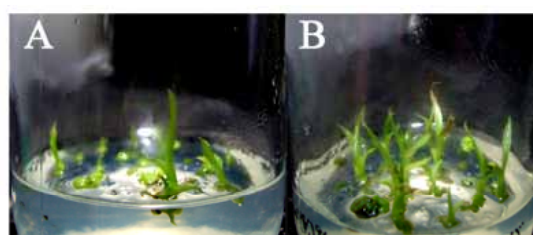


Fig. 6 Intergeneric hybrids and parthenogenetic plants obtained from the crosses between *Zygopetalum* and *Cymbidium*
 A: The plants obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* and *Cym. Wiganianum*
 B: The plants obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'* and *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'*

両親のDNA含量に差異が確認されたため、得られたプロトコームを、PA型フローサイトメトリ (Partec社)を用い、相対的核DNA含量による雑種判定試みた結果、*Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* \times *Cym. Wiganianum* より得られた20個体の相対的核DNA含量は、13個体(65%)は予想される三倍体雑種

6個体(30%)は種子親の *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* と同じ DNA 含量の単為発生様個体、残りの1個体(5%)は花粉親の *Cym. Wiganianum* 非還元花粉由来の4倍体雑種を示していた。*Zyg. Redvale 'Pretty Ann'* × *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'* 由来50個体の相対的核DNA含量は、24個体(48%)は予想される四倍体雑種、26個体(52%)は種子親の *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'* の単為発生様個体のDNA含量を示しており、いずれの交雑からも雑種個体および単為発生様個体が同一蒴果より得られたことが示唆された(Fig. 7)。

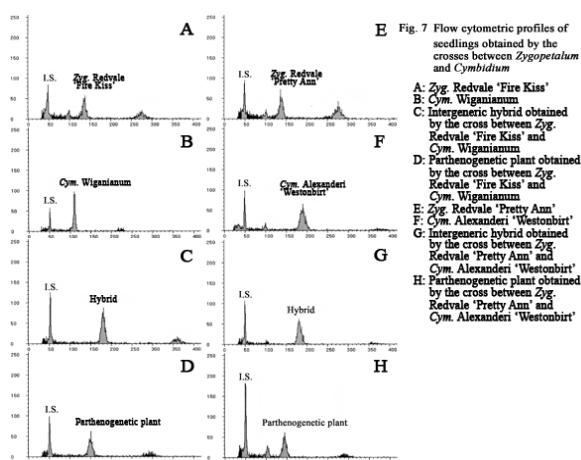


Fig. 7 Flow cytometric profiles of seedlings obtained by the crosses between *Zygopetalum* and *Cymbidium*
 A: *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'*
 B: *Cym. Wiganianum*
 C: Intergenic hybrid obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* and *Cym. Wiganianum*
 D: Parthenogenetic plant obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* and *Cym. Wiganianum*
 E: *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'*
 F: *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'*
 G: Intergenic hybrid obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'* and *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'*
 H: Parthenogenetic plant obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'* and *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'*

45S リボソーム中に存在する介在配列 ITS 領域の PCR-RFLP 解析を行った結果、DNA 含量測定により属間雑種と推測された個体は *Zyg. Redvale* と花粉親である *Cymbidium* の種特異的バンドを両方持ち合わせているのに対し、単為発生と推測される個体は *Cymbidium* の種特異的バンドは検出されなかった(Fig. 8)。

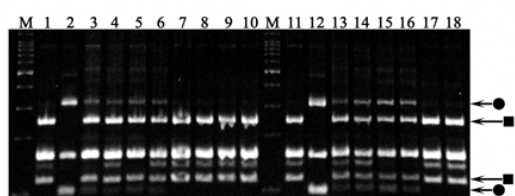


Fig. 8 Analysis of hybridity in protocorms obtained by the crosses between *Zyg. Redvale* and *Cymbidium*
 lane 1: *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'*
 lane 2: *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'*
 lane 3~6: Intergenic hybrid obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'* and *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'*
 lane 7~10: Parthenogenetic plants obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Pretty Ann'* and *Cym. Alexanderi 'Westonbirt'*
 lane 11: *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'*
 lane 12: *Cym. Wiganianum*
 lane 13~16: Intergenic hybrid obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* and *Cym. Wiganianum*
 lane 17 and 18: Parthenogenetic plants obtained by the cross between *Zyg. Redvale 'Fire Kiss'* and *Cym. Wiganianum*
 ●: Specific bands of *Cymbidium*
 ■: Specific bands of *Zygopetalum*
 M: 100 bps ladder marker

発芽個体の得られた2組合せはいずれも *Zygopetalum* を種子親に用いた交雑であり、この属間交配組合せは、*Cymbidium* を母本とした時は交雑が成功しない一側性不適合である可能性が推測された。

一方、*Zygopetalum* 単為発生と推測される個体の形成過程には以下の3つの可能性が推測される。

- 1) 属間雑種からの *Cymbidium* 染色体の選択的脱落後の倍加
- 2) *Cymbidium* 花粉中のオーキシンにより単為発生した還元性配偶子の倍加
- 3) *Zygopetalum* 非還元性配偶子との雑種形成後 *Cymbidium* 染色体が選択的脱落。

しかし、得られた発芽個体はすべて培養中に枯死したことから、減数分裂を伴わない単為発生ではなく、減数分裂後の倍加により対立遺伝子のホモ接合性が高まっている可能性が推測された。雑種個体も同時に枯死してしまっているため、生存上不利に働くゲノム構成や対立遺伝子がこの種間には存在する可能性が推測された。開花に至る雑種を得るためにはさらに多くの組み合わせを供試する必要がある。

以上の結果から、*Zygopetalum* 属とアジア原産の *Cymbidium* 属の交配からも雑種が得られ、*Zygopetalum*-*Cymbidium* 属間には特定の交雑親和性のある組合せがあることが示唆されたものの、幼苗期にすべての個体は枯死した。今後は、枯死しない組合せもしくは雑種の生存に有効な培地組成を検討する必要がある。

本研究により、アメリカ大陸原産である *Lycaste* 属および *Zygopetalum* 属は、特定の組合せにおいて *Cymbidium* 属との間で交雑親和性を保有する可能性が示唆された。雑種を得られる組合せの更なる探索および雑種を育成する培地の検討を行うことにより、*Cymbidium* 属の育種において両種は重要な遺伝資源となり得る可能性が示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、快く材料提供および栽培管理を行っていただいた(株)アボウオーキッド 安保幹太様に感謝の意を表します。

引用文献

- ・ 小島勝也 (2008) 高木農園における育種(シンビジューム及びその属間雑種) *Orchid Sciences* No.19, 21-24
- ・ 森源治郎, 石田源次郎, 今西英雄 (1991) *Zygopetalum mackayi* の単為生殖による種子形成について 園芸学会雑誌 No.60 別冊2 466-467
- ・ Kojima K. Tanaka R. Takaki S Aoyama M. (1987) Introduction of Genes into *Cymbidium* from Other Genera by Wide Crossing. Proceeding of the World Orchid Hiroshima Symposium. 85-94, 137
- ・ Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497