

平成29年10月12日

ALSV ベクター利用・早期開花技術を用いたリンドウの 新たな品種育成について

岩手大学

八幡平市花き研究開発センター

1. 概要

現在のリンドウ品種は日本原産のエゾリンドウ (*Gentiana triflora*) とササリンドウ (*G. scabra*) の2種を基に育成されている。エゾリンドウの開花期は早生～中生(7～9月)で、株の寿命は長く、4～9年間採花が可能である。これに対して、ササリンドウは晩生(開花期は10月)で、株の寿命が1～3年と採花期間が短い。両種には花型に大きな違いがあり、ササリンドウは花弁が開くタイプであるが、エゾリンドウの花型は花弁が閉じた(花弁が外反転しない)タイプである。岩手県八幡平市は切り花リンドウの輸出に取り組んでいるが、海外では花が開くタイプの需要が高いため、輸出は、10月に開花するササリンドウを原種として育種した品種が主力となっている。もし、7～9月に開花するエゾリンドウでも花の開くタイプの品種が作出されると、従来、花弁が開かないために輸出に適さなかったエゾリンドウの輸出が可能となり、輸出量は現在より大幅に増加することが期待される。

「花が開くエゾリンドウ」の品種育成は、エゾリンドウ×ササリンドウの種間雑種から選抜した花の開く個体へエゾリンドウを戻し交配し、これを何度も繰り返すことで、理論上は作出可能と考えられていた。しかし、リンドウは播種から開花まで通常2年を要するため、慣行育種法では戻し交配に10年以上の年限を必要とする。そこで本育種計画では、岩手大学で開発した「リンゴ小球形潜在ウイルス(apple latent spherical virus, ALSV)ベクターを利用したリンドウの高速開花技術」(リンドウの1世代を6ヶ月以内に短縮)を用いて、「花開くエゾリンドウ」新品種の作出に取り組んでいる。2016年にエゾリンドウ×ササリンドウの種間雑種 F1 実生を、ALSVベクター技術により早期開花し、BC1 種子を作出した。さらに花が開くタイプの BC1 実生へのエゾリンドウの戻し交配、および八幡平市花き研究開発センター保存の BC2 および BC3 実生への戻し交配により、2017年の11月には花が開くタイプの BC2、BC3、および BC4 の実生苗が準備できる予定である。

ALSV ベクターによる高速開花技術で得られた後代実生に ALSV が残存していないことを検証するため、ティッシュ・ブロット・ハイブリダイゼーション(TB)法、qRT-PCR 法、および ELISA によるリンドウからの ALSV 検出条件を確立すると共に、後代実生苗(約 500 個体)を検定した。その結果、ALSV 感染リンドウから採種した種子由来の実生苗からは ALSV は全く

検出されず、リンドウでは後代実生に ALSV が種子伝染しないと判断された。

本育種計画では、2017年に高速開花技術で得られた実生(BC2、BC3、およびBC4)を岩手大学隔離温室で栽培しながら、ALSVの残存が無いことを確認し、2017年11月に八幡平花き研究開発センターの実験圃場に移し、越冬させる。2018年に開花性、早晩性、および稔性など特性調査を行い、優良系統を選抜する計画である。

2. 開発の背景

(1) リンドウ属の自然環境での分布

リンドウ属(*Gentiana*)の自生種はアフリカを除く世界のほぼ全域に約400種が分布している。日本で育成されているリンドウの切り花および鉢物品種は、日本に自生しているエゾリンドウ(*G. triflora*)やササリンドウ(*G. scabra*)が品種の原種となっている。エゾリンドウは、比較的標高地の酸性土壌の湿地帯に群生している。8~9月にかけて開花する。ササリンドウは、国内では北海道を除く本州、九州、四国の原野に分布する。開花期は9月下旬~10月にかけてで、遅く開花するものが多い。ササリンドウとエゾリンドウとの種間交雑は系統によっては容易であるが、交雑個体を自殖しても種子を得られないことが多い(日影 2016)。

(2) 日本のリンドウ品種育成の歴史

リンドウの品種は、日本原産の種を用いて日本人によって育種された。栽培初期にはエゾリンドウとササリンドウの野生種が使用された。しかし、実生株は、株間での生育にばらつきがあり、それを解消するため自殖を繰り返すと近交弱勢がみられた。そこで、一代雑種品種(F₁品種)の育成が進み、8~9月に開花するエゾリンドウを用いて多数の品種が開発され、主にお盆・お彼岸などの仏花として用いられるようになり、切り花本数で菊、バラ、カーネーション、ユリに次ぐ品目に成長した。晩生種の品種はササリンドウを用いたF₁品種が主体であるが、採花年数が2~3年と短いことが課題となっている。1994年には648haあった日本のリンドウの栽培面積も2015年には424haまで減少した(農林水産省花き生産出荷統計)。品種や系統の均一性が低いことや、花色や花姿等のバリエーションが限られていることが、需要減退の原因と考えられる。需要が減退していくなか、品種や系統の均一性を高めるため、近年、倍加半数体の作出技術が開発された。また、新規需要開拓のためにEU等への輸出が開始された。

(3) 「花開くエゾリンドウ」開発の背景

8~9月に開花するエゾリンドウは花の外側が鮮やかなブルーで美しいが、花卉が外反転しないので、一般にはエゾリンドウは「開花しない」と思われている。一方、10月に開花するササリンドウは花卉が外反転する。近年始まった切り花輸出では、海外の消費者の嗜好も圧倒的に

花が開くリンドウであったため、10月に開花するササリンドウを主力に輸出している。もし「花開くエゾリンドウ」が育成されると、国内外の新しい需要を創出することができる(下図)。また、花が開くことに加えて、エゾリンドウの特徴である採花年数が長い(4年以上)品種の育成は、生産者の収益向上にとっても価値が高い。

- 日本原産のエゾリンドウ(*G. triflora*)とササリンドウ(*G. scabra*)を利用
 エゾリンドウ：早生～中生(7～9月)：花が開かない：株が強く、5～6年栽培可能
 ササリンドウ：晩生(10月)：花が開く：株が弱く、集花は2年程度
- 切り花生産量：約8000万本
 エゾリンドウ 80% (60%が仏花、20%が装飾ほか)、
 ササリンドウ 10% (装飾+仏花)
 エゾ×ササ 10% (装飾+仏花)
- 輸出(八幡平市 切り花10万鉢) ササリンドウ 85%
 → 輸出や装飾用での使用の拡大のためには、**花が開くエゾリンドウ(早生)が必須。**



リンドウの品種の現状と課題

2. リンゴ小球形潜在ウイルス(*Apple latent spherical virus*, ALSV)の性状

本ウイルスはピコルナウイルス目セコウイルス科チェラウイルス属に所属する。英名は *apple latent spherical virus*、学名は *Apple latent spherical virus* である。日本原産で、1985年に日本の岩手県盛岡市果樹試験場のリンゴ園で、リンゴ樹から偶然見つかったウイルスである。

自然宿主はリンゴのみで、無病徴感染である。宿主域は比較的広く、バラ科(リンゴ、ナシ、モモ、オウトウ、ビワなど)、ナス科、アブラナ科(シロイヌナズナのみ)、アカザ科、ウリ科、マメ科、リンドウ科、ブドウ科、ミカン科植物などに幅広く感染し、リンゴを含むほとんどの植物種で全身感染するが、無病徴である。イネ科には感染しない。

感染植物では、ウイルス誘導ジーンサイレンシング(VIGS)を効率よく誘導する。宿主植物の多くが無病徴で、また茎長分裂組織に侵入して、植物体全体に均一に分布する性質を持つため、遺伝子発現用あるいは遺伝子抑制用(VIGS)ベクターとして利用される。

粒子形態は、球形(径25nm、2粒子性)で被膜はない。成分は核酸が+鎖 ssRNA 2種(RNA1: 6.8kb, RNA2: 3.4kb, GC含量41%)で、外被タンパク質(CP)は3種(25kDa, 24kDa, 20kDa)である。ゲノムの5'末端にはゲノム結合タンパク質(Vpg)が結合していると考えられる。

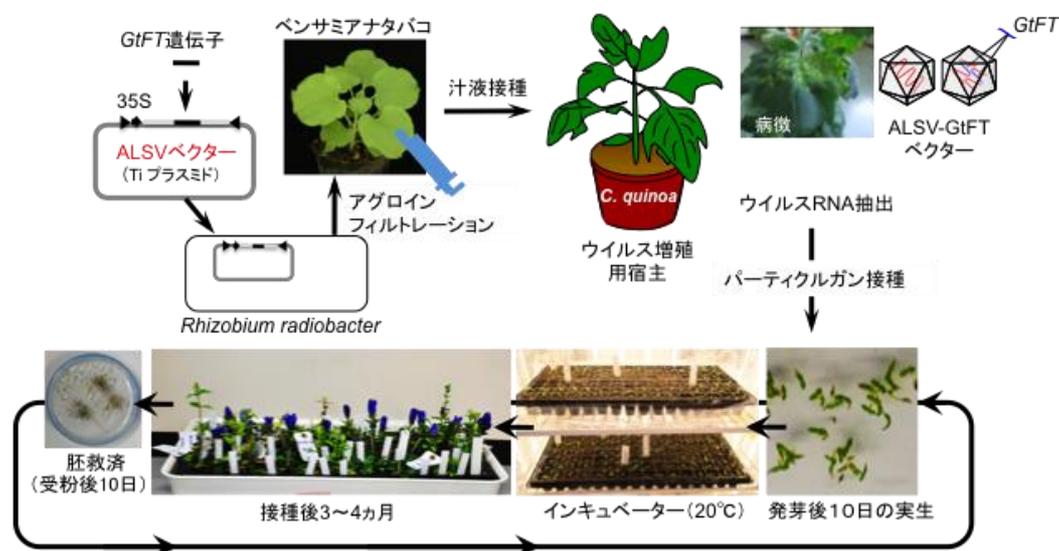
ゲノムの構造は、RNA1(6815nt)は複製関連ポリタンパク質をコードし、RNA2(3384nt)は42 kDa 細胞間移行タンパク質(MP)と3種類のCPをコードしている。ゲノムの5'末端にゲノム

結合タンパク質(VPg)が結合し、3'末端にはポリ(A)配列を持つ。

伝染は、接ぎ木により伝染すると考えられる。実験的には摩擦接種や種子(花粉)伝染が認められるが、1985年に見つかってから30年以上経過しても、感染樹の周辺のリンゴ樹からALSVは検出されていない。種子伝染による垂直伝染率は植物種によって異なっており、シロイヌナズナでは約3%、ベンサミアナタバコでは約2%、ダイズでは20~30%、リンゴでは1~3%(感染樹の花粉を健全樹に受粉した場合は約0.2%)である。また、リンドウおよびトルコギキョウでは種子伝染は認められていない。

3. ALSVベクターを利用した高速開花技術

「花開くエゾリンドウ」を作出するためには、エゾリンドウとササリンドウの種間雑種にエゾリンドウを何度も戻し交配し、花が開く個体を選抜する必要がある。リンドウは1世代に約2年を要するため、戻し交配と自殖を何度も繰り返さなければならない「花開くエゾリンドウ」の育種には、慣行育種法では10数年が必要となる。そこで、「ALSVベクターを利用したリンドウの高速開花技術」を活用することとした(下図)。本法では、リンドウの開花を発芽後3~4カ月に短縮することができ、リンドウの1世代を4~6ヵ月で完了できるため、慣行育種で10数年を要する早生で花開くエゾリンドウ品種の育成を、3年程度の期間で終了できることになり、育種年限の大幅な短縮につながる。



ALSVベクターを利用したリンドウの高速開花技術

4. リンドウ後代実生にはALSVは残存しない。

ALSVベクターによる高速開花技術で得られた後代実生にALSVが残存しているかどうかを検証するため、ティッシュ・ブロット・ハイブリダイゼーション(TB)法、qPCR法、およびELISA

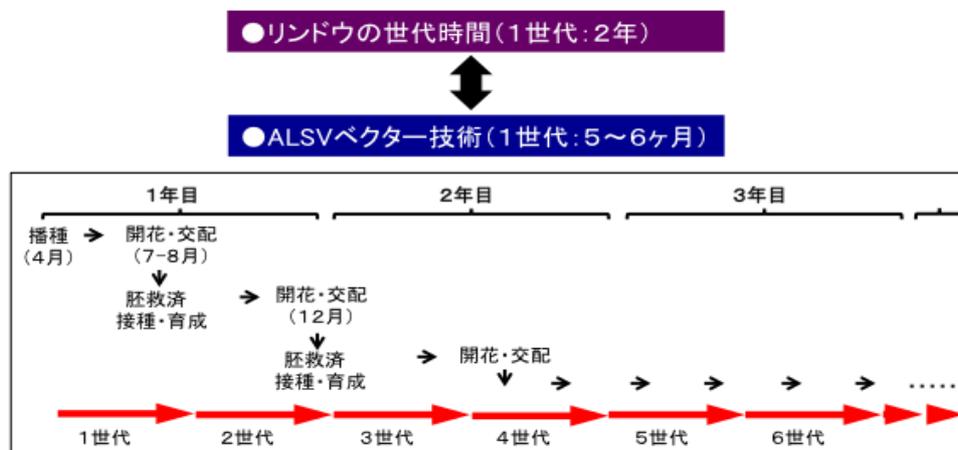
によるリンドウ苗からの ALSV 検出条件を確立すると共に、後代実生苗 (500 個体) を検定した。その結果、ALSV 感染リンドウから採種した種子由来の実生苗から ALSV は全く検出されず、リンドウでは後代実生に ALSV は種子伝染しないと判断された。さらに、2ヵ月、4ヵ月、6ヵ月に qPCR 法と ELISA によりウイルス検定したが、ALSV は全く検出されなかった。以上から、リンドウでは ALSV は種子伝染しないと結論された。

表1 感染植物由来の後代リンドウ実生苗のALSV検定

検定法	標的	生育ステージ	感染数/検定数
TB法	RNA1	子葉展開期 (播種後10日)	0/506
qPCR	RNA1	2-3対葉期 (播種後約2ヶ月)	0/115
	RNA1 RNA2	6-7対葉期 (播種後約4ヶ月)	0/108 0/108
ELISA	外被タンパク質	7-8対葉期 (播種後約6ヶ月)	0/108

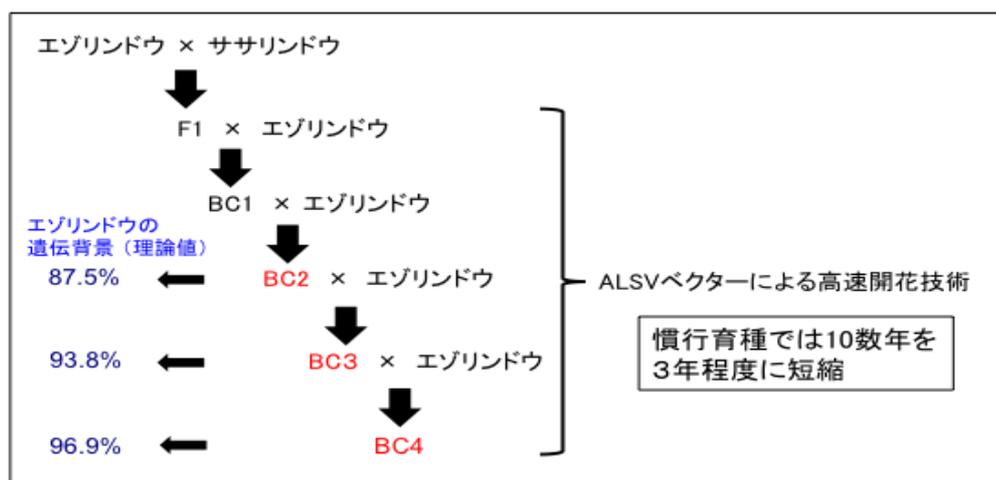
5. 育種プロセスの説明

「花が開くエゾリンドウ」の品種育成は、エゾリンドウ×ササリンドウの種間雑種に、花の開くエゾリンドウを何度も戻し交配することで、理論上は作出可能と考えられていた。しかし、リンドウは播種から開花まで通常2年を要するため、慣行育種法では戻し交配に10年以上の年限を必要とする。そこで本計画では、岩手大学で開発した「ALSV ベクターを利用したリンドウの高速開花技術」(リンドウの1世代を6ヶ月に短縮) (下図)を利用して「花開くエゾリンドウ」品種の育種に取り組んでいる。



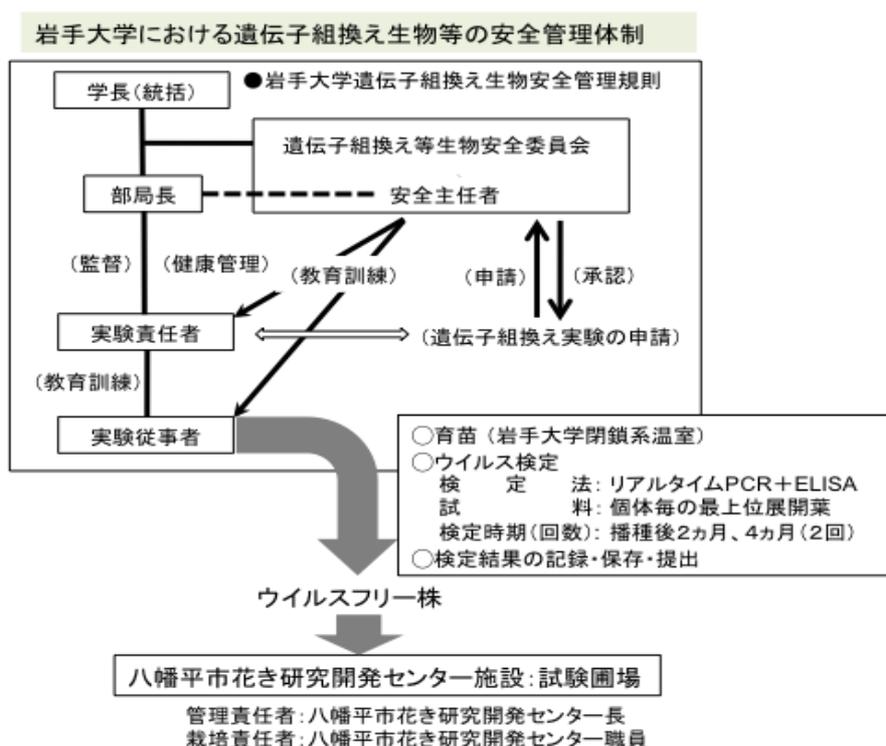
ALSV ベクターを利用したリンドウの高速開花技術

2016年にエゾリンドウ×ササリンドウの種間雑種F1実生を、リンドウのフロリゲン遺伝子を導入した ALSV ベクター(ALSV-GtFT)により早期開花し、BC1 種子を作出した。さらに開花する BC1 実生株へのエゾリンドウの戻し交配、および八幡平市花き研究開発センター保存の BC 2 および BC3 実生への戻し交配により、2017年の11月には花が開くタイプの BC2、BC3、および BC4 の実生苗が準備できる予定である(下図)。



エゾリンドウとササリンドウの BC 系統の遺伝背景

6. 圃場の管理体制

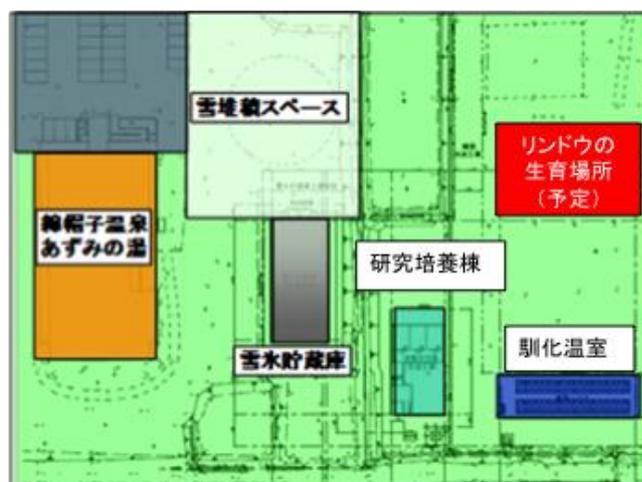


ALSVベクターの作出、リンドウへの接種と早期開花による世代促進は、上図に示したように、岩手大学における遺伝子組換え生物等の安全管理体制(文部科学省／遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律／第二種使用等拡散防止措置)に基づいて実施し、ウイルスフリーであることを証明したリンドウ株を八幡平市花き研究開発センター試験圃場(岩手県八幡平市細野436-9における水田跡地の圃場)において圃場試験に供する。リンドウ鉢の管理は八幡平市花き研究開発センター職員が行う。F1種子から育苗した株の試験圃場での管理は、一般社団法人安代リンドウ開発が委託した生産者が行う。特性調査や交配等の作業は八幡平市花き研究開発センター職員が行う。

7. 圃場における管理方法

(1) 圃場の場所

岩手県八幡平市細野436-9における水田跡地に鉢に移植したリンドウを並べて置く予定である(下の図参照)。管理は八幡平市花き研究開発センター職員が行う。この圃場では、これまで主に培養増殖したリンドウ F1 品種の親株と挿し木用品種の親株を鉢に入れて育苗ハウスで馴化し、育成している。また、この圃場のすぐそばには未受精胚珠培養を実施できる培養棟がある。



BC 系統リンドウ株の育成場所

(2) 圃場における栽培方法

岩手大学より受領する苗は 3 寸鉢で育成されたものである。この圃場でも基本的に鉢栽培の予定である。

ア)平成 29 年 11 月～平成 30 年 3 月までの栽培方法

受領した 3 寸鉢は識別できるようにラベルを付けて圃場に並べる。20 鉢を1つのカゴにいれて風で飛んで行かないようにする。受領した当年は 3 寸鉢のまま管理する。秋から冬にかけても、

そのまま圃場に置いておき、低温に遭遇させて越冬芽の形成を促す。

イ)平成 30 年 4 月～平成 31 年 2 月までの栽培方法

春になると雪が解けて休眠が打破された越冬芽が萌芽してくる。萌芽してから 1 か月後に 3 寸鉢から 4 寸鉢に鉢上げする。花型、稔性、早晩性などに関して形質の優れた系統は開花時に未受精胚珠培養を行う。また交配して自殖種子を得る。

ウ)平成 31 年 3 月～平成 32 年 3 月

自殖種子を播種し、育苗する。形質の優れた系統は開花時に未受精胚珠培養を行う。未受精胚珠培養苗は馴化し、育苗する。

形質が固定したと思われる自殖株および未受精胚珠培養株については、株間での交配およびエゾリンドウ親株との交配を実施し、F1 種子を得る。

(3) F1 検定

得られた F1 種子については八幡平市花き研究開発センターの育苗ハウスで苗を育成したのち、一般社団法人安代リンドウ開発が管理する試験圃場(現時点では場所未定、ただしリンドウの生産圃場の近辺)に定植して、特性調査を実施する。

圃場で育成中に ALSV が増殖を開始することは考えられないが、ALSV はリンドウに病徴を引き起こさないため、外観からは ALSV の感染は確認できないので、圃場で越冬した年の春(5～6月)に全個体について再度岩手大学でウイルス検定を実施することとする。ウイルス検定の結果、万が一 ALSV が検出された場合には、八幡平花き研究開発センターにおいて高圧滅菌処理後廃棄するとともに、生物多様性影響を生ずる恐れがあると認められる場合には、リスクの程度に応じて適切な措置をとる。同時に農林水産省 消費・安全局農産安全管理課および環境省自然環境局野生生物課に速やかに報告する。