

2012 年度

修士論文

キリンソウ

(*Sedum aizoon* var. *floribundum*)

の越冬性向上に関する研究

21131007 柿下 彩夏

指導教員 植物遺伝学 教授 我妻尚広

酪農学園大学大学院 酪農学研究科

目次	
緒論	1
第 I 章 キリンソウの越冬芽分化におよぼす照明の影響	
序文	4
材料および方法	
1. 材料	4
2. 越冬芽の分化におよぼす照明の影響	5
3. 越冬芽の伸長におよぼす照明の影響	5
結果	
1. 越冬芽の分化におよぼす照明の影響	6
2. 越冬芽の伸長におよぼす照明の影響	7
3. 考察	8
第 II 章 北海道に自生するキリンソウおよび市販のキリンソウからの低感光性個体の選抜	
序文	10
材料および方法	
1. 材料	11
2. 低感光性個体の選抜	12
3. 低感光性個体（選抜個体）の葉の形態特性	13

結果および考察	
1. 低感光性個体の選抜	14
2. 低感光性個体（選抜個体）の葉の形態特性	17
第Ⅲ章 キリンソウ茎切片からの植物体再生	
序 文	18
材料および方法	18
結果および考察	20
第Ⅳ章 キリンソウの葉緑体 DNA の増幅と塩基配列の決定	
序 文	22
材料および方法	23
結果および考察	26
総合考察	28
要 約	30
謝 辞	31
引用文献	32
Summary	40
図 表	42

緒 論

近年、地球温暖化の進行や都市の過密化が原因といわれるヒートアイランド現象が深刻化し、大きな問題となっている。これを受け、2000年頃からヒートアイランド現象緩和対策として屋上緑化や壁面緑化などの都市緑化が注目されるようになった（上田 2004）。さらに、都市緑地保全法の改正で緑地の保全および緑化の推進に関する基本計画が導入され、再開発などにおける都市の緑化が義務付けられるとともに、屋上緑化の施工費用補助に関係する条例が日本の主要都市で制定された。そのため、2000年には135.2 haであった屋上緑化の施工面積は、2009年までに272.7 haに達した（国土交通省 2010）。建築法で屋上への積載重量が定められ、屋上緑化は土壌の持ち込みや給水が制限されるため、薄層基盤と呼ばれる薄く軽量の支持基盤が用いられることが多い（薄層緑化技術協会 2013）。そのため、屋上緑化に利用できる植物は限定される。そこで、屋上緑化に利用できる緑化資材として注目されたのがセダム類である。セダム類は乾燥に強く、酷暑少雨でも枯死に至らず（飯島 1995）、岩場に生息する種であるため、薄い支持基盤での生育が可能であることから（飯島 2008）、屋上緑化等に広く利用された。セダム類主体の屋上緑化は2009年までに全体の22.9%となった（国土交通省 2010）。日本における屋上でのセダム類の利用はドイツの屋根緑化技術を参

考しているため（宮沢 2002），温暖多雨な日本にあった施工技術や緑化資材開発の研究が進められ，改良が加えられている（山田ら 2001，吉永ら 2006）．しかし，現在屋上緑化に用いられているセダム類はメキシコマンネングサやコーラルカーペットなどの外来種が中心となっている．

一方，外来生物によって日本在来の植物が駆逐される例が見られ問題となり（村中・鷺谷 2001），2005 年には外来生物法が施行された．これによって外来種の利用には適切な取り扱いが求められ，国立公園などの自然公園や歴史的景勝地では利用を控える動きが強くなった．また，それ以外の公共事業でも外来種の利用を避ける傾向が見られるようになった．近年，外来種による生態系の攪乱を防止する取り組みや生物多様性に配慮した緑化植物の取り扱い方に関する提言が取りまとめられ（亀山ら 2002），自生種や地域性種苗の開発や利用が推進されている．そこで，本研究ではベンケイソウ科マンネングサ属の自生種であるキリンソウ（*Sedum aizoon* var. *floribundum*）に注目した．キリンソウは日本全国に分布しているので，施工現場の近隣地域で種苗の確保が可能で，施工現場付近の遺伝的攪乱のリスクは少なくできるものと考えられる．また，他種との競合の少ない場所に生育することから，他種を駆逐することは考えにくい．これらのことから，キリンソウは生態系保全や生物多様

性に配慮した緑化資材の条件を満たしている。また、キリンソウは多年草であり、秋に越冬芽を分化し、古い葉を落葉して越冬後、翌春には越冬芽が伸長し再生する。キリンソウはセダム類でも特に強健で越冬性も備えており（飯島 2002）、屋上や都市部での利用以外にも道路の法面や中央分離帯の緑化に利用できる。また、無積雪地帯での緑化には常緑性が求められるが、秋に落葉するキリンソウの欠点を補うようなキリンソウの研究も進められ、その施工範囲も拡大している（飯島 2011）。しかし、北海道を中心に施工されたキリンソウの一部が街路灯下で衰退する現象が確認され、街路灯のある道路の中央分離帯などでの利用に支障をきたしている。

そこで、本研究では街路灯下でのキリンソウ衰退の原因を解明するとともに、街路灯下でも衰退しないキリンソウの育成を試みた。すなわち、第Ⅰ章ではキリンソウの越冬芽分化と伸長におよぼす照明の影響を調査した。また、第Ⅱ章では北海道に自生するキリンソウおよび市販のキリンソウから街路灯下でも衰退しない低感光性の育種母材を得ることを試みた。次に、第Ⅲ章では培養変異の拡大を目的にキリンソウ茎切片からの植物体再生法を検討した。さらに、第Ⅳ章では低感光性個体の選抜に用いる DNA マーカーの作成に関する基礎的知見を得るため、PCR 法によるキリンソウの葉緑体 DNA の増幅と塩基配列決定方法を検討した。

第 I 章 キリンソウの越冬芽分化におよぼす照明の影響

序 文

キリンソウは CAM 植物であることが知られており，耐乾性が非常に強く，土壌や水の少ない環境条件でも生育可能である．強健であることから，メンテナンスが困難である道路の中央分離帯や法面緑化に採用されている．しかし，街路灯などによる夜間照明条件下では生育や越冬性が著しく阻害される場合があり，数年で衰退して消失する現象が一部のキリンソウで観察されている．特に，衰退する個体は越冬後の再生が著しく遅延するが，それらの要因は明確になっていない．これまでに，街路灯による夜間照明などの植物への影響に関する報告はホウレンソウなどの野菜では高尾（2004）が，アメリカフウなどの街路樹では橋本・斉藤（2004）や三沢・高倉（1990）が報告している．しかし，キリンソウを含むセダム類での報告は見られない．

そこで，本実験ではキリンソウの越冬後の再生に関係する越冬芽の分化とその伸長におよぼす照明の影響を調査した．

材料および方法

1. 材 料

材料は 2008 年に雪印種苗株式会社より分譲されたキリンソウの

セル苗を酪農学園大学実験圃場（以下実験圃場）内網室で2008年から2010年まで1/2,000 aワグネルポットで生育させた。生育したキリンソウは2010年5月26日に1/5,000 aワグネルポットに株分けし、養成後実験に供した。

2. 越冬芽の分化におよぼす照明の影響

実験には実験圃場実験室内の人工気象器（KOITOTRON NHL-25DA型 小糸工業）を用い、1日8時間照明とした8時間照明区と24時間連続照明とした24時間照明区を設けた。葉面付近での照度は3,000 lxで、温度は8時間照明区の明期を18℃、暗期を10℃とした。また、24時間照明区も8時間照明区と同様の温度設定とした。人工気象器には1/5,000 aワグネルポットで養成していたキリンソウを58 cm×35 cm×10 cmのトレイ3枚に各3ポットずつ並べた。人工気象器内の乾燥が著しいためトレイには水深5 cmまで水を満たした。キリンソウは2010年7月13日から11月5日まで適宜灌水しながら生育させた。10月28日と11月5日に越冬芽を観察し、その長さを11月5日に測定した。また、キリンソウを11月5日に人工気象器から屋外へ移動し、積雪下で越冬させ、翌2011年4月19日に越冬芽を観察し、その長さを測定した。

3. 越冬芽の伸長におよぼす照明の影響

実験は実験圃場で行い、街路灯や建物などの照明の影響を受けな

い自然日長区と街路灯の真下で夜間照明（葉面付近での照度は 40 lx 程度）の影響を受ける街路灯下区を設けた．各区に 1/5,000 a ワグネルポットで養成していたキリンソウを 2 ポット設置した．実験は越冬芽が分化し，2 cm 程度に伸長した 10 月 6 日から開始した．11 月 12 日まで越冬芽を観察し，その長さを 11 月 5 日に測定した．また，実験を行った場所でそのまま積雪下に越冬させ，翌 2011 年 4 月 19 日に越冬芽を観察し，その長さを測定した．

結 果

1. 越冬芽の分化におよぼす照明の影響

キリンソウの越冬芽の分化におよぼす照明の影響を図 1 に示す．キリンソウは 7 月 13 日には 8 時間照明区と 24 時間照明区ともに開花していた．10 月 28 日には 8 時間照明区では開花は見られず，すべての株に越冬芽が分化していた．越冬芽の長さは平均 7.0 cm であった．また，24 時間照明区では全ての株で開花が見られ，越冬芽は 9 株中 3 株で分化していた．越冬芽の長さは平均 0.5 cm で 8 時間照明区に比べ短かった．一方，翌年融雪直後のキリンソウは 8 時間照明区では前年に分化した越冬芽がほとんど生存しており，4 月 19 日には越冬芽の長さは平均 9.4 cm であった．また，24 時間照明区では前年に分化した越冬芽が全ての株で枯れていた．4 月 19 日には 9

株中 6 株で新たに葉が分化し始めていたが、茎葉は小さく、越冬芽の長さは平均 1.2 cm であった。その後、6 月 10 日には 8 時間照明区で旺盛な生育が見られたが、24 時間照明区では生育が劣った。

2. 越冬芽の伸長におよぼす照明の影響

実験期間中である 2010 年 10 月 6 日から 11 月 5 日の最高最低気温の推移を図 2 に示す。また、キリンソウの越冬芽の伸長におよぼす照明の影響を図 3 に示す。10 月 6 日の最低気温は 8.3°C で、10 月 14 日から 5°C を下回る日が増え始めた。自然日長区ではキリンソウの葉が徐々に紅葉し始め、10 月 20 日頃紅葉が進んだ。街路灯下区では紅葉が多少遅れた。11 月 5 日には自然日長区のキリンソウは葉が小さく閉じ、葉縁は赤紫色であった。街路灯下区では葉が開いて全体に淡い緑色を呈した。越冬芽の長さは自然日長区で平均 5.7 cm、街路灯下区で平均 2.1 cm であった。11 月 12 日には自然日長区ではほとんどの葉が鮮赤色を経て落葉したが、街路灯下区では自然日長区に比べて紅葉が鈍く、落葉も遅れた。一方、翌年融雪直後のキリンソウは自然日長区では前年に分化した越冬芽がすべて生存して伸長を始め、4 月 19 日には越冬芽の長さは平均 9.7 cm であった。街路灯下区では前年に分化した越冬芽はすべて枯れていた。4 月 9 日には 9 株中 6 株で新たに葉が分化し始めていたが、茎葉は小さく越冬芽の長さは平均 2.8 cm であった。その後、6 月 10 日には自然日長

区で旺盛な生育が見られたが、街灯下区では生育が劣った。

3. 考 察

8 時間照明区（短日条件）は花芽分化を抑制し、越冬芽の分化を促進することが明らかになった。また、10℃という低温であっても24 時間照明区（連続感光条件）では花芽分化は継続され、越冬芽は短日条件下に比べ分化しづらいことが明らかになった。これまでの越冬芽の分化に関する研究においてアカマツ（池本・四手井 1963）やカラマツ（新里 1984）、シラカンバ（永田ら 1990）、ポプラ（櫛田ら 1999）では越冬芽の分化は短日条件で促進されると報告され、本実験結果と一致した。しかし、それらの報告では越冬芽の分化は日長と温度の相互関係で制御されていると報じられているが、本実験の結果からは日長の影響を強く受けていることが伺われた。また、キリンソウの紅葉は自然日長区（短日条件）では 5℃以下で誘導され、その後落葉することが明らかとなった。しかし、その傾向は街路灯下区（連続感光条件）では抑制され、紅葉や落葉が遅れた。一方、分化した越冬芽は 5℃以下の低温条件であっても街路灯下区（連続感光条件）では伸長した。街路灯などによる夜間照明はホウレンソウでは抽苔を促進させ（高尾 1998）、エダマメやスイートコーンでは花芽形成や出穂を遅延させた（高尾 2004）。これらの作物のように、キリンソウにおいても夜間照明の影響を強く受けることが明

らかとなった。一方，街路灯による夜間照明条件下でも衰退することなく生育するキリンソウを得るためには，夜間照明条件下でも越冬芽を分化し，越冬芽の徒長が見られない感光性の低い個体を選抜する必要があることが示唆された。

第Ⅱ章 北海道に自生するキリンソウおよび市販のキリンソウからの低感光性個体の選抜

序 文

I 章では街路灯などによる夜間照明条件下では越冬芽の分化を抑制することや分化した越冬芽は徒長することが明らかになった（柿下ら 2011）。また，越冬芽を分化しない個体は翌年の再生が遅れ，徒長した越冬芽は積雪下で枯死し，その個体も翌年の再生が著しく遅れることが明らかになっている。さらに，最低気温が 5℃を下回る低温条件や 30 lx 程度の弱い照明下であっても越冬芽が伸長したことから，キリンソウの越冬芽の分化は温度よりも日長に影響を強く受けることが明らかとなり，キリンソウは感光性の高い植物であることが示唆された。以上の点から，街路灯による夜間照明条件下でも衰退することなく生育するキリンソウを得るためには，夜間照明条件下でも越冬芽を分化し，越冬芽の徒長が見られない感光性の低い個体を選抜することで，越冬性の高いキリンソウの育成が可能であることが示唆された。

これまで，感光性に関する品種育成の研究は作物を中心に多く報告されている。イネでは北海道・東北地方の低温長日条件下で生育を完了する感光性をほぼ喪失した極早生品種の育種が行なわれ，感光性遺伝子の研究に至っている（一谷ら 1997）。また，イチゴでは短

日条件でなくとも花芽分化をする四季成り性イチゴが‘大石四季成
一号’をはじめとして多く育成されてきた（高橋 2006）。また，短日
植物であるジュートアサ（A.S.Islam *at el.* 1975）では，感光性のな
い近縁種との交雑育種によって不感光性のジュートアサ品種の育成
を試みた報告もある。しかし，キリンソウの感光性育種に関する報
告は見られない。低感光性個体を選抜するには既存の変異を選抜す
る方法，培養変異や変異原を利用して変異を拡大してから選抜する
方法が考えられる。一方，キリンソウは茎の木本化や紅葉の有無，
花茎の長さ，葉の形や乳頭状突起の有無などの形態変異が多く見ら
れることから（大場 1981），北海道に自生するキリンソウからの選
抜が可能ではないかと考えた。

そこで，本試験では緑化資材として利用するキリンソウの越冬性
を高めるため，北海道に自生するキリンソウおよび市販のキリンソ
ウから低感光性個体の選抜を試みた。

材料および方法

1. 材 料

供試材料の個体記号，採取地および採取年月日を表 1 に示す。主
要な材料採取は 2011 年 5 月から 8 月に行なった。採取地および採取
した個体数は雨竜郡幌加内町で 7 個体（幌加内 1～7），厚岸郡浜中

町で4個体(厚岸1~4), 中川郡本別町で1個体(本別), 勇払郡占冠村で1個体(占冠), 芦別市頼城町で1個体(芦別), 日高郡新ひだか町で5個体(静内1~5), 茅部郡鹿部町で1個体(鹿部), 函館市川汲町で1個体(川汲), 二世群八雲町で3個体(八雲1~3), 古宇郡泊村で1個体(泊), 小樽市忍路町で2個体(忍路1~2)である。また, 雪印種苗株式会社より分譲された10個体は虻田郡京極町で採取したものが4個体(雪印1~4), 増毛郡増毛町で採取したものが1個体(増毛雪印), 厚岸郡で採取したものが2個体(厚岸雪印1~2), そのほか来歴不明のものが3個体(不明雪印1~3)である。さらに, 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター植物園より分譲された道内で採取された詳細不明の2個体(北大1~2)である。採取したキリンソウは実験圃場で養成した。ただし, 芦別と北大1~2は地上部を5cm程度切り取り, 挿し木して発根させ養成した。

2. 低感光性個体の選抜

供試したキリンソウは夜間照明条件下で栽培し, 積雪前に越冬芽の分化状況および融雪後に再生速度を調査し, 越冬芽が正常に分化し, 再生速度の速い個体を選抜した。すなわち, 供試したキリンソウは2011年5月30日に選抜圃場へ定植した。ただし, 5月30日以降に採取した個体は直接選抜圃場に定植した。供試したキリンソウの定植位置を図4に示す。キリンソウは3周の同心円上に定植した。

内側から半径 180 cm に 6 個体，半径 250 cm に 12 個体，半径 320 cm に 24 個体の定植位置を定め，ランダムに定植した．定植した圃場には，同心円の中心に直径 4.5 cm，長さ 4.5 m (3.6 m+0.9 m) の単管を土中に深さ 0.6 m 程度埋めた．単管上部に屋外用照明 (HATAYA RY-200) を設置した (図 5)．照明は高さ 3.6 m 程度に 3 つ取り付け，3 方向に照射し，さらにキリンソウ上面で 30 lx 程度となるように光源の高さと向きを調整した．照明時間は 16 時から 8 時とし，照明期間は 2011 年 9 月 21 日から積雪期まで点灯とした．積雪前の越冬芽の分化状況は 2011 年 9 月 16 日に株の大きさを 1~5 段階の 5 段階で評価した．また，2011 年 9 月 16 日，10 月 5 日，11 月 11 日に越冬芽の有無を調査し，越冬芽の伸長程度を 0~5 段階の 6 段階で評価した．一方，融雪後の 2012 年 4 月 20 日に越冬芽の生死を調査し，生存した個体の越冬芽数を数えた．また，再生速度は 2012 年 4 月 20 日，5 月 7 日，5 月 25 日，6 月 7 日，6 月 22 日，7 月 6 日に個体のサイズを 0~5 段階の 6 段階で評価し，それらを比較した．

3. 低感光性個体 (選抜個体) の葉の形態特性

2011 年 9 月 15 日に採取したキリンソウの葉長・葉幅を 1 個体につき 10 枚計測し，縦横比を算出し，低感光性個体の葉の形態特性を検討した．

結果および考察

1. 低感光性個体の選抜

圃場に定植したキリンソウは、ほとんどが良好に活着した。ただし、挿し木を試みた芦別は定植が遅れ、定植後、積雪前に枯死した。また、北大の2個体と、雪印種苗より分譲された厚岸の2個体と増毛の1個体は圃場への定植が10月5日となり、すでに越冬芽が分化していた。

越冬芽の伸長程度および融雪後の越冬芽数を表2に示す。9月16日には定植した38個体中22個体で、10月5日には34個体で越冬芽が分化しており、11月11日には定植後に枯死した芦別以外のすべての個体で越冬芽の分化が見られた。このことから、越冬芽の分化時期には個体間でばらつきが見られた。また、伸長程度には個体間で差があり、全く伸長しないものから親株との判別ができないほど伸長するものが見られた。さらに、花芽分化する越冬芽も見られた。越冬芽ははやく分化するほど伸長する傾向にあったが、分化時期にかかわらず越冬芽が全く伸長しない個体も見られた。融雪直後には、38個体中18個体で越冬芽が生存し、その他は地上部が枯れていた。越冬芽が生存した個体でもその数には個体間差が生じた。

各個体の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子を図6から43に示す。これらの図から、越冬前の親株の評価値が大きく、

越冬芽が伸長していないほど，融雪後の生存率が高まる傾向が認められた．また，融雪後の評価値から作成した成長曲線のタイプを図44に示す．標準的な成長曲線であるS字曲線を示すAタイプ，初期成長が良好なBタイプ，成長が一時緩慢となるCタイプ，枯死または成長の見られないDタイプの4つに分類できた．Aタイプは本別，占冠，静内2，静内4，鹿部，川汲，八雲1，泊，忍路1，雪印1と3，増毛雪印，厚岸雪印1の13個体，Bタイプは幌加内1から5と7，厚岸3，八雲2と3，不明雪印1と2，北大1の12個体，Cタイプは幌加内6，厚岸1と2と4，静内1と5，忍路2，雪印4，厚岸雪印2，不明雪印3の10個体で，Dタイプは静内3，芦別，雪印2，北大2の4個体であった．AタイプとCタイプには順調に成長し大きくなる個体もあれば，成長が緩慢であり大きくならない個体も見られ，個体間で成長に差が見られた．しかし，Bタイプには成長が緩慢となる個体が見られず，いずれも大きな株となった．一方，Bタイプの個体の越冬芽は分化や伸長が正常であった．このことから，Bタイプの個体を低感光性個体群と考えた．また，Bタイプの中には幌加内2，幌加内4，八雲3，不明雪印1のように融雪後に正常な越冬芽数が多く，初期生育が特に旺盛な個体が見られ，夜間照明下で栽培されても衰退しないキリンソウの育成母材となる個体を選抜できる可能性が示唆された．

作物における感光性の品種間差は、イネ（佐藤・林 1985）、ダイズ（坂ら 1987）、ハウレンソウ（高尾 1998）などの報告から知られており、キリンソウもこれに準じ、採取地間や個体間での差異が認められた。感光性に関する育種はイネでは不感光性遺伝子の導入が行なわれ、これらをもとに開発された低感光性種を親に多くの系統が育成されている（一谷ら 1997）。また、コムギでは栽培場所を異にする品種からの選抜の例があり（藤田ら 1995）、イチゴでは培養変異による感光性の喪失で四季成り性品種が開発されている（五十嵐ら 1994）。本実験で供試したキリンソウでは幌加内や八雲の個体は低感光性の個体が多く、厚岸や静内の個体では感光性個体が多いなど、採取地ごとに異なる感光性を示す傾向にあり、より多くの地域からキリンソウを採取できれば選抜の可能性も大きくなると示唆された。また、キリンソウは形態変異が多いため、低感光性の中でも草姿や葉の形、色等のバリエーションを増やせる可能性もある。

以上の結果、夜間照明下での越冬芽の分化や伸長、さらに融雪後の成長には個体間差があり、夜間照明下でも正常な越冬芽の分化や伸長を示す個体があり、それらは旺盛な初期生育を示すことが明らかになった。また、幌加内 2、幌加内 4、八雲 3、不明雪印 1 のような有望な個体を選抜することができた。

2. 低感光性個体（選抜個体）の葉の形態特性

供試した個体におけるキリンソウ葉の縦横比の度数分布を図 45 に示す。採取した各個体の平均縦横比は 1.7 から 4.1 の変異幅が見られ、2.0 が 10 個体と最も多かった。低感光性個体におけるキリンソウ葉の縦横比の度数分布を図 46 に示す。融雪直後の 4 月 20 日に越冬芽が枯死していた個体は 21 個体であった。生存していたものは 18 個体であり、越冬芽の数は様々であった。4 月 20 日に越冬芽が生存していた個体の葉の縦横比は 1.7 から 2.9 と選抜前と比べて変異の幅が小さくなった。

以上の結果、低感光性のキリンソウは葉の幅が広い傾向があると示唆された。

Ⅲ章 キリンソウ茎切片からの植物体再生

序 文

近年では組織培養技術が発展し、様々な植物で組織培養方法が確立されている。また、カルスを経由した培養では突然変異体が生じることが知られ、イネ（安部ら 1989）やイチゴ（江面 1998）、カーネーション（新井 2001）などでカルス培養由来の培養変異が得られ、品種改良に利用されている。一方、ベンケイソウ科の組織培養に関し、溝延（2001）がセイロンベンケイソウ（*Kalanchoe pinnata Pers.*）で、Yang *et al.*（2012）がオオベンケイソウ（*Sedum spectabile*）で、Su-Juan Zhao *et al.*（2009）がシナマンネングサ（*Sedum alfredii*）で報告しているが、キリンソウでは筆者の知る限り見られない。

そこで、本実験ではキリンソウの培養変異を得るため、キリンソウ茎切片からのカルス誘導および植物体再生を試みた。

材料および方法

材料には 2009 年に雨竜郡幌加内町雨煙別で採取し、実験圃場で養成したキリンソウを用いた。2011 年 6 月 21 日に、花芽分化前のキリンソウの茎を茎頂から 3～6 節目まで採取した。採取した茎から葉を全て取り除き、流水でよく洗浄し、茎表面の汚れを除去した。その後、70%エタノールで 30 秒間、有効塩素濃度 2%の次亜塩素酸ナ

トリウム溶液で 15 分間殺菌し，滅菌水で 3 回洗浄した．洗浄した茎は中央に節を含むよう 5～8 mm に切り分け，実験に供した．カルス誘導期の培地組成を表 3 に示す．MS 基本培地にイノシトール 100 mg/l，ショ糖 30 g/l，2,4-D 0.1 mg/l，BA 0.5 mg/l，ゲランガム 2 g/l を添加した培地を用いた．pH を 5.8 に調節し，直径 25 mm×高さ 100 mm の試験管に 10 ml ずつ分注した．滅菌後，キリンソウの茎切片を，節がカルス誘導培地の表面に接するよう置床し，29 日間培養した．また，不定芽誘導期の培地組成を表 4 に示す．MS 基本培地にイノシトール 100 mg/l，ショ糖 30 g/l，NAA 0.3 mg/l，BA 2.0 mg/l を添加し，ゲランガム 2 g/l を添加した培地を用いた．pH を 5.8 に調節し，直径 25 mm×高さ 100 mm の試験管に 10 ml ずつ分注した．得られたカルスを 5 mm 角程度に分割して不定芽誘導培地に置床し，73 日間培養した．次に，不定根誘導期の培地組成を表 5 に示す．MS 基本培地にイノシトール 100 mg/l，ショ糖 30 g/l，IBA 2.0 mg/l，寒天 10 g/l を添加した培地を用いた．pH を 5.8 に調節し，直径 80 mm×高さ 130 mm のマヨネーズ瓶に 80 ml ずつ分注した．得られた不定芽をその長さで分類し，生育が良好な不定芽を不定根誘導培地に置床し，64 日間培養した．なお，培養はいずれも 25℃，3,000 lx，12 時間照明下で行なった．

結果および考察

茎切片をカルス誘導培地に置床し7日目、茎切片から褐変物質の溶出が見られた(図47. a)。この状態で放置した場合、茎切片が褐変して枯死した。茎切片の枯死を防ぐため、試験管内で茎切片の位置を移動したところ、褐変物質の溶出が見られなくなり、置床した5割程度の茎切片からカルスが得られた。形成したカルスには緑色のもの、不定芽を分化したもの、褐変したものが見られた(図47. b)。不定芽は置床した50個のカルスのうち、18個のカルスから分化した。分化したほぼ全ての不定芽はビトリフィケーションしていた(図47. c)。ビトリフィケーションを防ぐため、固化剤を寒天10 g/lとした培地に移植した結果、新たに分化した不定芽はビトリフィケーションする不定芽が減少した(図47. d)。3 cm以上の正常な不定芽(図47. e)は不定根誘導培地に移植した。不定根誘導培地に移植14日目には12個体全てに発根が見られた(図47. f)。

いくつかの植物ではカルス誘導期に植物体からフェノール類を含む褐変物質が溶出され、これらの物質は植物体の再生を著しく阻害する(石井ら1976)。これらの褐変物質は一般的に、培地への活性炭添加や、若い材料の選択、新しい培地への早期移植などの方法で回避される。また、カトレヤにおいては液体培地を更新しながら培養する方法や、頂芽組織を水でインキュベートした後培養温度を

20℃から 15℃に保つ方法（石井ら 1979）、材料の調整時期を冬季にする、培地にルチンを添加する（石井 1980）などで褐変物質が減少すると報じられている。キリンソウでも褐変物質が溶出したが、これらの方法を取らなくても、培地に置床 7 日以内に同一培地内で茎切片を移動する省力的な方法で回避することができた。また、10g/l と固めの寒天培地に移植することでビトリフィケーションを防止できることが明らかとなった。

以上の結果から、キリンソウの茎切片からの植物体再生が可能で、比較的容易に行えるものであることが示唆された。また、不定根誘導において正常な発根が見られた 12 個体は馴化し、圃場へ定植することができた。

第IV章 キリンソウの葉緑体 DNA の増幅と塩基配列の決定

序 文

II章で行った低感光性個体の選抜には夜間照明を利用できる設備や圃場が必要で、多くの労力と時間を要する。設備や圃場の規模で選抜できる個体数も制限される。一方、近年では DNA 解析による作物の品種識別技術が実用化され、多くの作物で DNA マーカーが開発されている（黒柳ら 2006, 朝野ら 2008, 渡邊・石川 2009, 柿崎ら 2009）。低感光性個体の選抜に DNA マーカーを利用することができれば、夜間照明を利用できる設備や圃場が不必要となり、短時間で選抜が可能で、個体数も制限されない。一方、キリンソウにおける遺伝解析に関する報告は見られず、キリンソウからの DNA 抽出・精製、PCR 増幅および塩基配列決定方法すら確立されてはいない。

そこで、本実験では、低感光性個体の DNA マーカーを作成するための基礎的知見を得ることを目的に、キリンソウからの DNA 抽出、PCR 増幅および塩基配列決定方法の確立を試みた。これらの方法を確立するために、ダイレクトシーケンスが可能で保存性が高く、種間や属間の分類群間での変異を検出する DNA マーカーとして用いられている葉緑体 DNA を用いた（Newton 1999）。

材料および方法

実験には表 1 に示すキリンソウのうち、泊，静内 1，雪印 1，幌加内 1，本別，占冠，忍路 2，鹿部，八雲 1，厚岸 1 と 4，川汲の 12 個体の葉を用いた。採取した葉は茶袋に入れ， -80°C で保存した。

DNA の抽出は SDS 0.3%，NaCl 400 mM，EDTA 5mM と Tris-HCl (pH8.0) 20 mM に調合した SNET と Proteinase K を用いて加熱抽出法で行なった。0.6 ml マイクロチューブに SNET100 μl と Proteinase K 2 μl を添加し， -80°C で保存していた葉をエタノールで消毒したハサミで 3 mm 角に切り取り取り，浸漬させた。チューブをアルミブロック恒温槽に入れ， 55°C で 60 分間加熱して DNA を抽出した。

抽出した DNA は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて，製品のマニュアルに従って精製した。チューブ内の葉を取り除き，Membrane Binding Solution を 100 μl 添加し，ボルテックスで混合した。Collection Tube に SV Minicolumn を挿入し，混合液を SV Minicolumn に添加後，室温で 1 分間インキュベートして DNA をフィルターに吸着させた。インキュベートした SV Minicolumn assembly を 13,000 \times rpm で 1 分間遠心し，Collection Tube 内の液体を除去した。SV Minicolumn に Membrane Wash Solution を 700 μl 添加し，SV Minicolumn assembly を 13,000 \times rpm で 1 分間遠心して洗浄を行ない，Collection Tube 内に振り落とされた液体を除去した。

Membrane Wash Solution の添加を 500 μ l , 遠心を 5 分間としてもう一度行なった。洗浄を終えた SV Minicolumn を取り外し, 新しい 1.5 ml チューブに移し, Nuclease-Free Water を 30 μ l 添加し, 1 分間インキュベートして DNA を溶出させた。その後, 13,000 \times rpm で 1 分間遠心し, 1.5 ml チューブに振り落とされた DNA 溶出液に TE Buffer を 20 μ l 添加し, DNA テンプレートとした。

この DNA テンプレートを用いて *trnL3'exon - trnF* および *trnH - psbA* の遺伝子間領域を PCR 法により増幅した。PCR 反応に用いた葉緑体ゲノム領域とプライマー配列を表 6 に示す。増幅には 2 \times Ampdirect Plus 10 μ l, F-Primer または R-Primer 0.5 μ l, DNA template 0.5 μ l, BIOTAQ 0.1 μ l と滅菌水 8.4 μ l に調合した PCR 反応液を用いた。表 7 に PCR 反応プログラムを示す。反応にはサーマルサイクラーを用いて, 95 $^{\circ}$ C で 10 分間, DNA ポリメラーゼの活性化を行なった後, 熱変性を 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間, アニーリングを 60 $^{\circ}$ C で 1 分間, 伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 1 分間行なうサイクルを 40 回繰り返した。その後, 72 $^{\circ}$ C で 7 分間の伸長反応を追加した。増幅した PCR 産物は 4 $^{\circ}$ C で保存した。

増幅した PCR 産物は 0.8%アガロースゲルを用い, 電気泳動法により分離した。泳動は 100V で 20 分間とした。目的の DNA 断片を回収し, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製し,

シーケンスの DNA テンプレートとした。

シーケンス反応には Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing KIT (Applied Biosystems) を用い、表 8 に示す反応液を調整した。シーケンス反応プログラムを表 9 に示す。シーケンス反応にはサーマルサイクラーを用い、反応条件は、96°C で 10 分間、DNA ポリメラーゼの活性化を行なった後、熱変性を 96°C で 30 秒間、アニーリングを 50°C で 15 秒間、伸長反応を 60°C で 4 分間行なうサイクルを 25 回繰り返す。その後、72°C で 7 分間の伸長反応を追加した。増幅したシーケンス反応液は 10°C で保存した。

増幅後のシーケンス反応液に 125 mM EDTA を 2.5 μ l と 99.5% エタノールを 30 μ l 添加して混合し、室温遮光条件で 20 分間放置した後、12,000 rpm で 20 分間遠心を行ない、DNA を沈殿させた。遠沈後、直ちに上澄みを取り除き、70% エタノールでチューブ内を洗浄し、再び 12,000 rpm で 10 分間遠沈させ、直ちに上澄みを完全に取り除いた。その後、沈殿を一晚室温で乾燥させ、サンプルとした。乾燥後のサンプルに Hi-Di formamide を 20 μ l 添加しボルテックスで混合した後、95°C で 2 分間加熱し、氷水中で急冷した。ABI 310 Genetic Analyzer で塩基配列を決定した。

結果および考察

キリンソウの DNA 抽出には Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を利用し, Membrane Wash Solution での洗浄を 2 回行ったが, PCR 反応によって目的の領域を安定的に増幅させることが困難であった. そこで, 抽出時の DNA の洗浄を 3 回に増やしたところ, 目的の領域を安定的に増幅することが可能となった. キリンソウの葉は多肉質であるため, 洗浄回数を増やすことで DNA 増幅の妨げとなる多糖類などの物質が除去できたものと考えられる.

キリンソウ葉の緑体ゲノム *trnL3'exon - trnF* 遺伝子間領域のうち 407 塩基 (表 10) と, *trnH - psbA* 遺伝子間領域のうち 565 塩基の配列 (表 11) を決定した. しかし, 調査を行った領域内には, DNA マーカー作成の手掛かりとなるような遺伝変異は確認できなかった.

これまでに, 葉緑体 DNA を用いたベンケイソウ科植物の分類体系に関する研究が行なわれてきたが (黛 2007), 種内変異に関する報告は見られない. また, 葉緑体 DNA を用いた種内変異や種間変異の研究は高山植物 (藤井 2008) や絶滅危惧種 (平原ら 2007), 野菜 (山岸ら 2006, 荒木ら 2010) で行われ, バラ (武内ら 2000) では品種の識別が可能な葉緑体 DNA の多型が検出され, サクラソウでは種内変異を検出する SSR マーカーも開発されている (Honj *et al.* 2008). 多肉植物ではアロエ (塩田ら 2003) の種の判別が可能であ

ると報じられている。これらのことから、キリンソウでも他領域を解析することで遺伝変異を検出することは可能と考えている。

また、イネやダイズなどの農作物では感光性に関する核 DNA の遺伝子座が特定され、品種の開発などに役立てられている。キリンソウでも核 DNA に注目すべきである。

本実験ではマーカー作成の手掛かりとなる遺伝変異は確認できなかったが、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を利用した DNA 抽出から精製、シーケンスまでの実験手順の基礎的知見を得ることができた。

総合考察

第 I 章では道路の中央分離帯等に施工されたキリンソウが衰退する要因が街路灯などによる夜間照明であることを証明した。すなわち、一部のキリンソウは夜間照明条件下で光周性が攪乱され越冬芽分化が阻害されること、さらに、分化した越冬芽が徒長して越冬性を失い、積雪下で枯れることで翌年の再生が抑制されるためであることを明らかにした。また、これらの反応は 30 lx 以下の低い照度でも誘引された。これらのことは街路灯による夜間照明条件下でも衰退することなく生育する越冬性の高いキリンソウを得るためには夜間照明条件下でも越冬芽を分化し、越冬芽の徒長が見られない感光性の低い個体を選抜する必要があることを示唆した。

そこで、第 II 章では 30 lx 以下の夜間照明条件下でも正常に越冬芽を分化し、分化した越冬芽が徒長しにくく、越冬後は速やかに再生を開始する夜間照明条件下でも光周性が攪乱されない低感光性のキリンソウの選抜を試みた。その結果、これらの条件を満たす有望な個体の選抜に成功した。また、低感光性のキリンソウ個体は葉の幅が広く、丸い傾向であることを見出した。

一連の実験は街路灯下でも衰退しないキリンソウの育成が可能であることが明らかにした。また、葉の幅が広いキリンソウを収集することで、効率的な育種母材の選抜が可能となることを示唆した。

さらに、第Ⅲ章で培養変異の拡大を目的に確立したキリンソウ茎切片からの植物体再生方法や第Ⅳ章で DNA マーカーの作成に関する基礎的知見を得るため検討した PCR 法によるキリンソウの葉緑体 DNA の増幅と塩基配列の決定方法は、さらに効率的で有効な低感光性のキリンソウ育成に新たな道筋をつけるものと期待される。

一方、キリンソウでは選抜した形質が種子繁殖でどの程度子孫に受け継がれるかなどの遺伝育種学的研究や効率的に種苗を得るための受精生理生態学的研究に関する蓄積が見られず、育種を進めていくためには多くの課題が山積している。さらに、本研究では選抜後 1 年しかキリンソウの成長を観察できていないため、選抜個体の越冬性に関する継続的な調査が必要と考えられる。

しかし、本研究で得られた個体は有望な育種母材であり、夜間照明条件下でも衰退しない新品種育成に向け、他形質の評価を行いながら、遺伝育種学的研究を進めるべきである。

要 約

本研究では街路灯下でのキリンソウ衰退の原因を解明するとともに、街路灯下でも衰退しないキリンソウの育成を試みた。その結果、連続感光条件では越冬芽分化が抑制された。また、分化した越冬芽は徒長し、積雪下で枯死することが明らかになった。そのため、融雪後の再生が遅れ、しだいに衰退することが明らかとなった。また、道内で採取したキリンソウから連続感光条件でも正常に越冬芽を分化する低感光性の個体を得ることに成功した。

また、キリンソウの遺伝変異を拡大するため、キリンソウ茎切片からの植物体再生方法の確立を試みた。その結果、置床後 2~3 日後に茎切片を移動することで褐変物質の溶出を抑制することで正常なカルスを誘導することができた。また、再分化培地の固化剤に 10g/l の寒天培地を用いることでビトリフィケーションを防止することで正常に植物体を再生させることができた。

一方、低感光性個体の選抜を容易にするために、DNA マーカー開発の基礎的知見を得ようとした。その結果、DNA 抽出後 DNA の精製回数を 3 回とすることで安定的に PCR 増幅やシーケンスが可能になり、*trnL3' exon - trnF* 遺伝子間領域のうち 407 塩基と、*trnH - psbA* 遺伝子間領域のうち 565 塩基の配列を決定できた。

謝 辞

本研究の遂行と執筆を行なうにあたり，資源植物学研究室の我妻尚広教授，植物育種学研究室の岡本吉弘准教授には，終始懇切なるご指導と温かい励ましの言葉をいただきました．また，草地学研究室の小阪進一教授，園芸学研究室の森志郎准教授には本稿のご校閲とご指導をいただきました．そして，雪印種苗株式会社の入山義久様，鈴木玲様には研究の機会とキリンソウ種苗提供をしていただくとともに，研究のご助言をいただきました．心より感謝の意を表します．

また，ともに勉学に励み，貴重な学生生活を送った植物遺伝学専攻の九島有梨華氏，石田光氏，小林幹仙氏，ならびに資源植物学研究室の後輩の皆様，先に社会に出た同輩の皆様に，深くお礼申し上げます．

最後に，私生活と学業を続けることを支えてくれた家族に心から感謝致します．

引用文献

- 安部 欣司, 大友 孝憲, 斉藤 清男 (1989) 水稻の培養変異の育種
的利用について : 第 1 報 単一種子カルス再分化系統に出現し
た変異. 日本作物学会九州支部会報 (56) : 59-63.
- 朝野 尚樹, 小曾納 雅則, 野口 健, 伴 義之 (2008) DNA 分析によ
るバレイショ遺伝子型データベース化. 育種学研究 10
(2) :63-69.
- 荒木 直幸, 山内 直樹, 執行 正義 (2010) 種々の野菜における葉
緑体 SSR 領域の DNA 多型性とネギ属植物の種間多型解析への
応用. 園芸学研究 9 (4) :415-420.
- A.S.Islam, M.Haque, M.B.Dewan (1975) An Attempt to Produce a
Photo-neutral Strain of Jute through Interspecific Hybridization. 育
種學雜誌 25 (6) :349-354.
- Cuiqin YANG, Yaoguo QIN, Xin SUN, Shu YUAN (2012) Honghui LIN1
Propagation of *Sedum spectabile* Boreau in Leaf Culture in Vitro.
Not Bot Horti Agrobi40 (1) :107-112.
- 江面 浩, 雨ヶ谷 洋, 霞 正一, 石塚 由之 (1998) 培養変異を利用し
たイチゴ新品種「アンテール」の育成. 茨城県農業総合センタ
ー生物工学研究所研究報告 (2) :75-81.
- 藤井紀行 (2008) 日本産高山植物における本州中部地域の系統地理

学的重要性. 日本植物分類学会誌 8 (1) :5-14.

藤田 雅也, 谷口 義則, 氏原 和人 (1995) わが国西南暖地における
コムギの茎立ち時期の幼穂長と出穂特性との関係. *Breeding
science* 45 (4) :487-491.

薄層屋上緑化技術協会「資料集－生理・生態にもとづくセダム緑化
の勘どころ－」 < <http://www.hakusoryokka.org/index.html>. >
(2013年1月22日参照).

橋本 亜矢子, 斎藤 庸平 (2004) アメリカフウ街路樹における部分
紅葉・落葉現象に及ぼす道路夜間照明の影響. *ランドスケープ
研究* 67:465-468.

平原 友紀, 矢野 興一, 星野 卓二 (2007) 絶滅危惧種ビャッコイ
(*Isolepis crassiuscula* Hook, f.) の染色体と葉緑体遺伝子の分析.
日本植物分類学会誌 7 (1) :23-30.

Honjo, M., S. Ueno, Y. Tsumura, I. Washitani, R. Ohsawa (2004)
Phylogeographic study based on intraspecific sequence variation of
chloroplast DNA for the conservation of genetic diversity in the
Japanese endangered species *Primula sieboldii*. *Biological
Conservation* 120: 211-220.

一谷 勝之, 奥本 裕, 谷坂 隆俊 (1997) 稲作北限地域の不感光性イ
ネ品種に見出された Se-1 座の感光性遺伝子. *Breeding science* 47

(2) :145-152.

五十嵐 勇, 門馬 信二, 藤野 雅丈, 沖村 誠, 興津 伸二, 高田 勝也,

仁井 智己 (1994) . 四季成性イチゴ新品種 ‘エバーベリー’ の
育成とその特性. 野菜・茶業試験場研究報告. A, 野菜・花き

(9) :69-84

飯島 健太郎 (1995) 乾燥条件下におかれた場合の *Sedum* 属の水ス
トレス反応について. ランドスケープ研究 58 (5) :69-72.

飯島 健太郎 (2002) 日本クライメートゾーン 8 に相当する 2 地点に
おけるセダムの生育と越冬性について. ランドスケープ研究 65

(5) :461-464.

飯島 健太郎 (2008) コラム 緑化植物 ど・こ・ま・で・き・わ・
め・る メキシコマンネングサ (*Sedum mexicanum* Britton) .日
本緑化工学会誌 3 (3) :508.

飯島 健太郎 (2011) コラム 緑化植物 ど・こ・ま・で・き・わ・
め・る 常緑系キリンソウ (*Sedum takesimense* NAKAI) . 日本
緑化工学会誌 36 (3) :446.

池本 彰夫, 四手井 綱英 (1963) 樹木の光周性に関する研究 : アカ
マツ稚苗の発育に対する日長処理の有効期および処理期間. 日
本林學會誌 45 (6) :174-180.

石井 實, 正山 征洋, 上本 俊平, 西岡 五夫, 藤枝 國光 (1976) カ

トレヤの組織培養に関する研究 (1) : フェノール物質の分離
同定および同物質の生物活性について. 九州大學農學部學藝雜
誌 31 (2/3) : 99-105.

石井 實, 上本 俊平, 藤枝 國光 (1979) カトレヤの組織培養に關す
る研究-2-培養組織のかわ変防止法について. 園芸學會雜誌 48:
(2) , 199-204.

石井 實 (1980) カトレヤの組織培養に関する研究-3-かわ変前駆物
質の季節的消長と活着率について. 園芸學會雜誌 49 (1) :
127-131.

柿下 彩夏, 我妻 尚広, 岡本 吉弘 (2011) キリンソウ (*Sedum aizoon*
L. var floribundum Nakai) の越冬芽分化におよぼす照明の影響.
日本緑化工学会誌 37 (1) : 167-170.

柿崎 裕子, 中塚 貴司, 川村 浩美, 阿部 潤, 阿部 善子, 山村 三郎,
西原 昌宏 (2009) ササリンドウにおける青花およびピンク花色
識別 DNA マーカーの開発. 育種学研究 11(1):9-14.

亀山 章, 倉本 宣, 小板橋 延弘, 小林 達明, 中野 裕司, 則久 雅司,
藤原 宣夫, 森本 幸裕, 山田 一雄 (2002) 生物多様性保全の
ための緑化植物の取り扱い方に関する提言. 日本緑化工学会誌
27 (3) :481-491.

国土交通省 (2010) 新たな屋上・壁面緑化空間が作出されています.

<[http:// www. mlit. go. jp/ common/ 000124292. pdf](http://www.mlit.go.jp/common/000124292.pdf)> (2013 年 1 月 22 日参照)

黒柳 悟, 水上 優子, 大矢 俊夫 (2006) DNA マーカーによるイネの品種識別. 愛知県農業総合試験場研究報告 (38) : 19-26.

櫛田 達矢, 万木 豊, 永田 洋 (1999) ポプラの冬芽形成に及ぼす明期温度の影響. 日本林學會誌 81 (2) :116-119.

黛 新造 (2007) ベンケイソウ科植物の DNA 塩基配列を用いた分子系統解析, および *Hylotelephium* 属とその近縁属の分類学的再検討. 日本植物分類学会誌 7 (1) :61-66.

宮沢 洋 (2002) 実例に学ぶ屋上緑化 (11) セダム緑化を甘く見るな. 日経アーキテクチュア (732) : 74-79.

三沢 彰, 高倉 博史 (1990) 夜間照明による街路樹の落葉期への影響. 造園雑誌 53 (5) :127-132.

溝延 学 (2001) セイロンベンケイソウの組織培養に関する基礎的研究 (第 1 報) : 葉からのカルス形成に及ぼす培地組成条件の検討. 環境科学研究所報告 8: 345-356.

村中 孝司, 鷺谷 いづみ (2001) 鬼怒川砂礫質河原における外来牧草シナダレスズメガヤの侵入と河原固有植物の急激な減少 : 緊急対策の必要性. 保全生態学研究 6 (2) : 111-122.

永田 洋, 万木 豊, 堀内 洋二 (1999) シラカンバの冬芽形成におよ

ぼす暗期温度の影響. 日本林學會誌 81 (2) :116-119.

Newton,A.C., Allnutt,T.R., Gillies,A.C.M., Lowe,A.J. and Ennos,R.A.

(1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. Trends in Ecology and Evolution14:140-145.

新井 正善 (2001) 培養変異選抜により育成したカーネーション新品種「ユアレッド」の育成経過と生育特性. 東北農業研究 (54) :235-236.

大場 秀章 (1981) マンネングサ属. 佐竹義輔・大井次三郎・北村四郎・亘理俊次・富成忠夫編, 日本の野生植物 草本Ⅱ 離弁花類, 平凡社:142-144.

坂 紀邦, 伊藤 俊雄, 朱宮 昭男 (1987) 終夜照明がダイズの生育・収量に及ぼす影響の品種間差異 . 愛知県農業総合試験場研究報告 (19):86-93.

佐藤 洋一郎, 林 喜三郎 (1985) 日本の在来早生イネ品種の基本栄養生長期間の長さの遺伝様式. 育種學雜誌 35 (2) :160-166.

新里孝和 (1984) マツ属の生長におよぼす日長と気温の影響 (付属演習林) . 琉球大学農学部学術報告 31:233-278.

塩田 寛子, 佐藤 かな子, 長井 二三子, 大久保 智子, 瀬戸 隆子, 浜野 朋子, 上村 尚, 加納 いつ (2003) RAPD 法を用いたアロ

エの判別. 食品衛生学雑誌 44 (4) : 203-207.

Su-Juan Zhao, Zhong-Chun Zhang, Xiang Gao, Gulsum Tohsun, Bao-Sheng Qiu (2009) Plant regeneration of the mining ecotype *Sedum alfredii* and cadmium hyperaccumulation in regenerated plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99:9-16

高橋 春實 (2006) 北日本における四季成り性イチゴ育種の現状と展望. 園芸学研究 5 (3) : 213-217.

高尾 保之 (1998) ホウレンソウの生育および抽だいに及ぼす夜間照明の影響と品種の限界照度. 園芸学会雑誌 67 (5) :778-784.

高尾 保之 (2004) 夜間照明による野菜への影響. 照明学会誌 88 (6) :330-335.

武内 俊介, 野村 和成, 内山 寛, 米田 和夫 (2000) 葉緑体 DNA 多型によるバラ属植物の系統関係の解析. 園芸学会雑誌 69 (5) :598-604.

上田 恭幸 (2004) 充実する屋上緑化支援制度. みどりの都市計画 命を吹き込む街づくり, 株式会社ぎょうせい:36-44.

山田 宏之, 秩父 志乃夫, 中島 敦司, 中尾 史郎 (2001) 薄層基盤上に植栽した *Sedum* 属植物の相互被圧関係について. 日本緑化工学会誌 27 (1) :370-372.

山岸 博, 石橋 篤志, 川口 晋吾 (2006) *Brassica* 属作物における葉

緑体の塩基配列の種間および種内変異. 京都産業大学先端科学
技術研究所所報 5:1-10.

吉永 美香, 比留間 直也, 野田 宗弘, 奥宮 正哉 (2006) メキシコマ
ンネングサと軽量人工土壌を用いた屋上緑化システムの蒸発散
特性. 日本建築学会技術報告集 (23) : 217-222.

渡邊 学, 石川 正美 (2009) 赤花系イチゴの DNA による品種識別技
術. 千葉県農林総合研究センター研究報告 (1) :55-58.

Summary

Studies on improvement of winter survival of *Sedum aizoon* var. *floribundum*

Ayaka KAKISHITA

The decline of *Sedum aizoon* var. *floribundum* under the street light, and the selection of the individuals on high overwintering ability were studied. The continuous lighting condition inhibited differentiation of overwinter buds, while spindly growth of the buds occurred, and the shoots died under the snow during winter season. Subsequently, *S. aizoon* var. *floribundum* was in decline because of the delayed regrowth after overwinter. Furthermore, the low photosensitivity individuals were selected from the ecotypes in Hokkaido.

Plant regeneration from the stem explants of *S. aizoon* var. *floribundum* was tried to cause somaclonal variation. The normal calli were induced because of inhibition of eluted substances from stem explants when these were transferred to the other area of the medium at 2 or 3 days after inoculation. Regenerated plants from the calli, which were cultured on regeneration medium solidified with 10 g/l agar to prevent the vitrified shoots, developed normally.

The chloroplast DNA regions of *trnL3'exon-trnF* and *trnH-psbA* were examined to acquire the fundamental knowledge of development of genetic marker for the screening of the low photosensitivity individuals. DNA amplification and sequencing were stably performed when the extracted DNA was purified three times. As the result, the sequence of 407 and 565 nucleotides were determined in the cpDNA regions respectively.









		8時間照明区	24時間照明区
2010年	7月13日		
	11月5日		
2011年	4月20日		
	6月10日		

図1. キリンソウの越冬芽の分化におよぼす照明の影響.

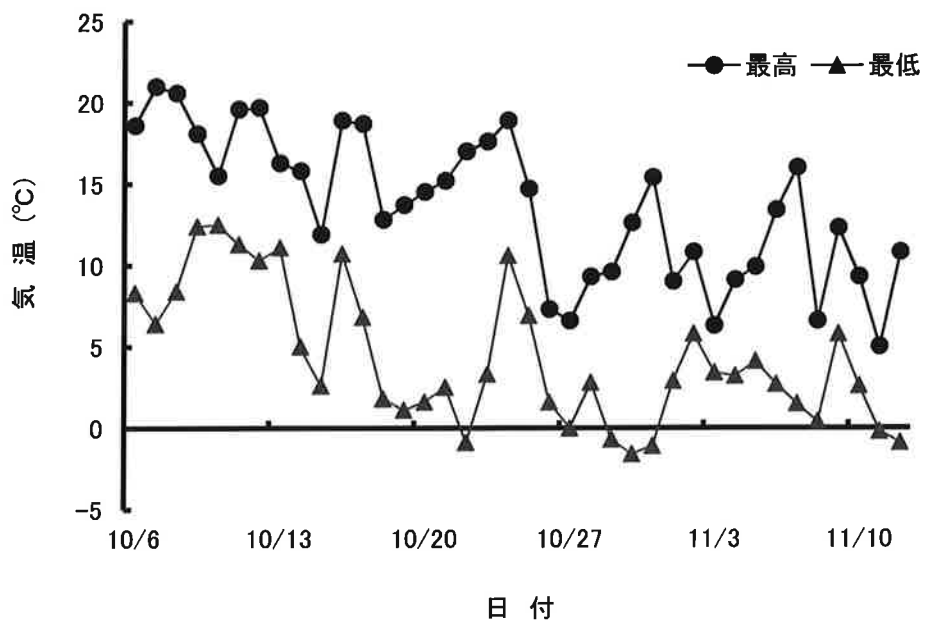


図2. 2010年10月6日から11月5日の最高最低気温の推移.





		8時間照明区	24時間照明区
2010年	11月5日		
			
2011年	4月20日		
	6月10日		

図3. キリンソウの越冬芽の伸長におよぼす照明の影響.



図5. 低感光性個体の選抜を行った圃場の様子.

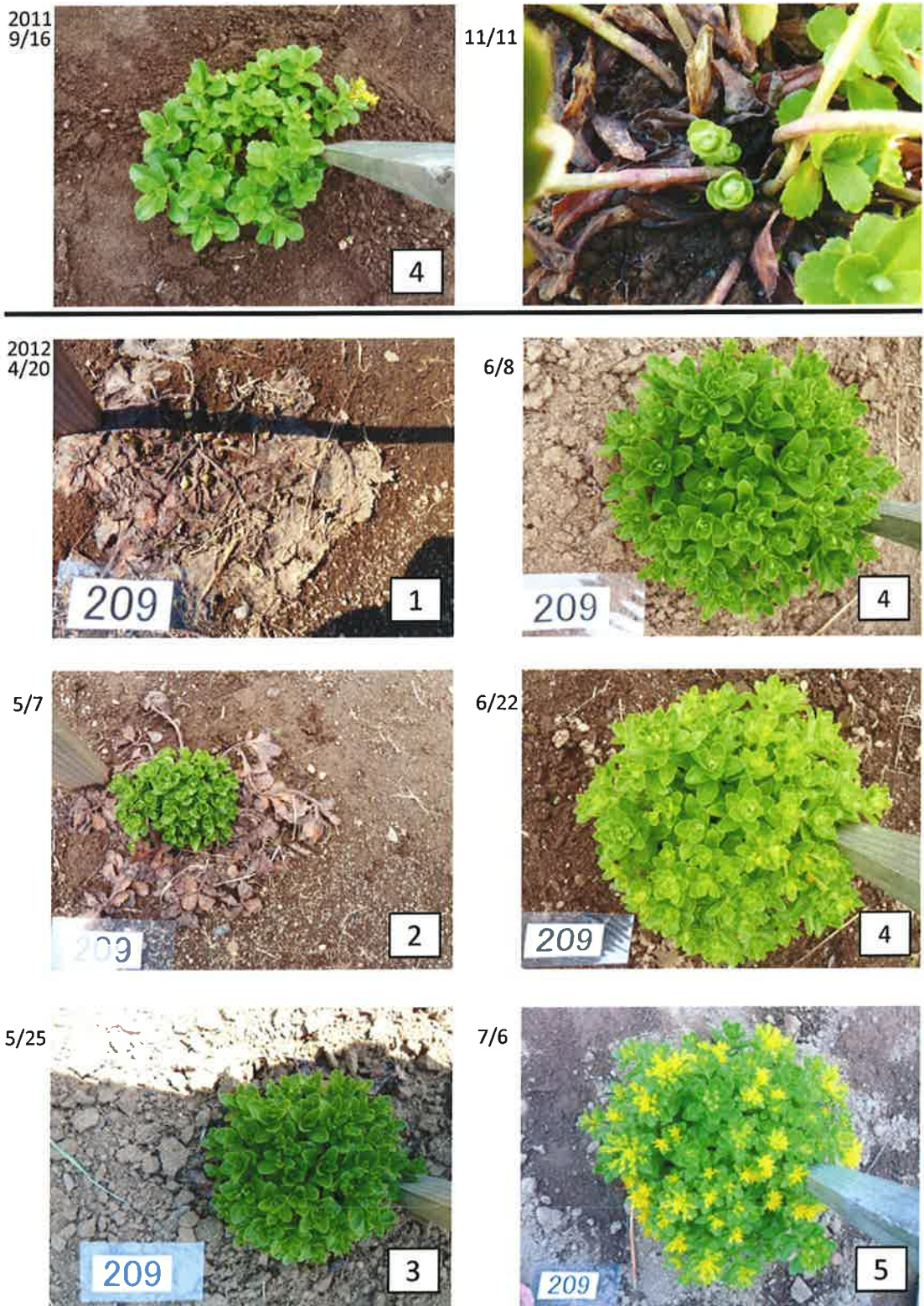


図6. 幌加内1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

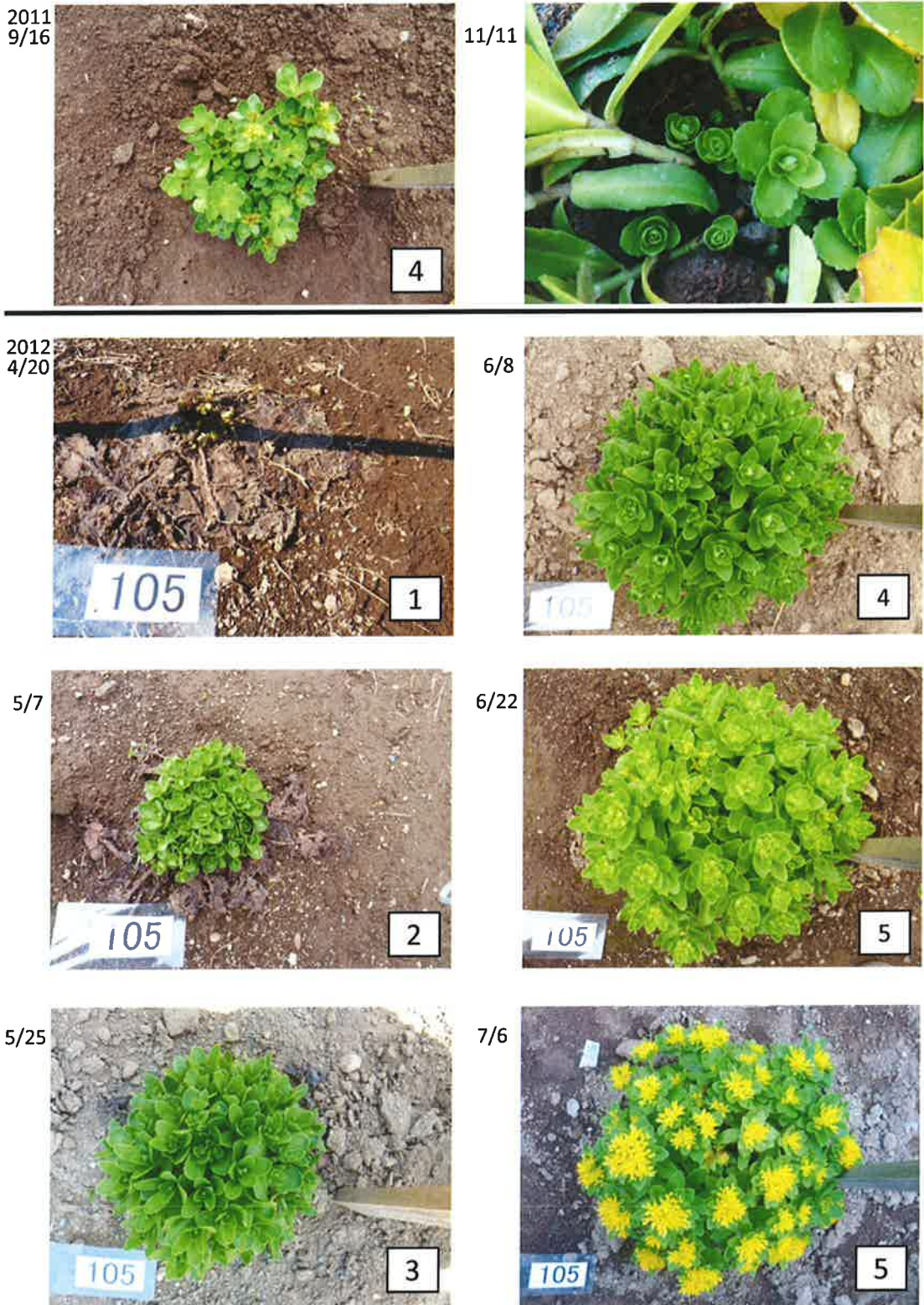


図7. 幌加内2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価。

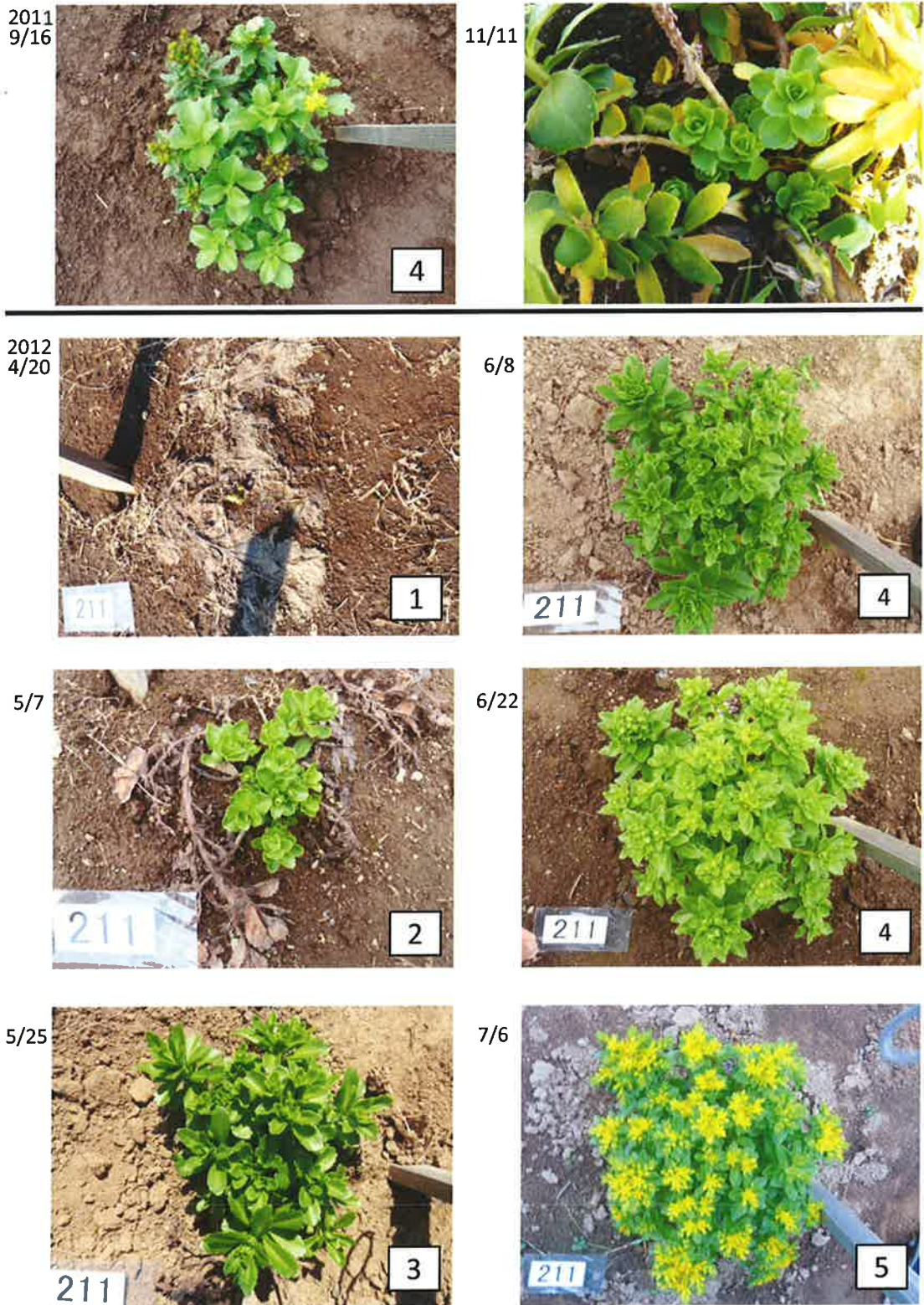


図8. 幌加内3の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

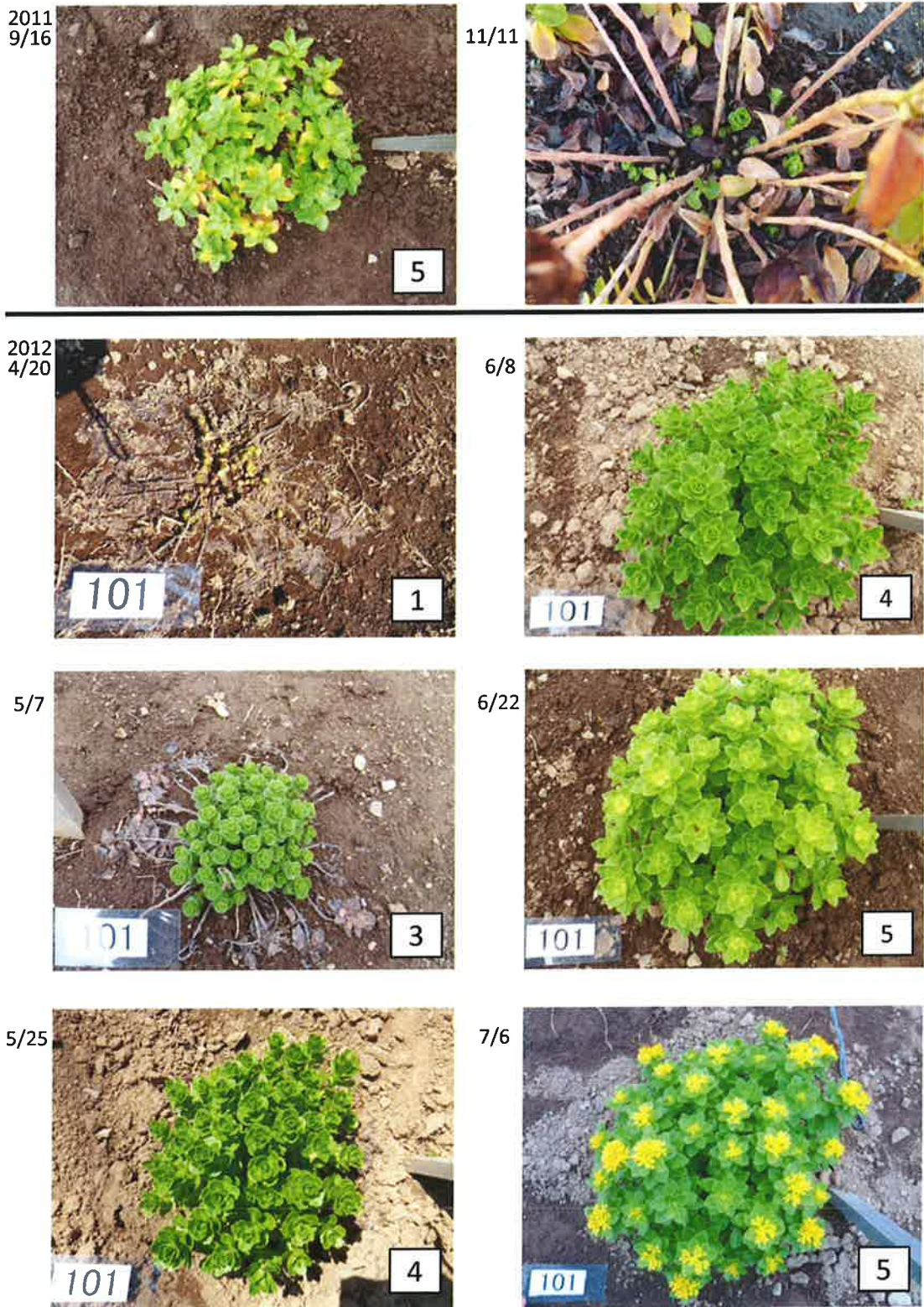


図9. 幌加内4の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

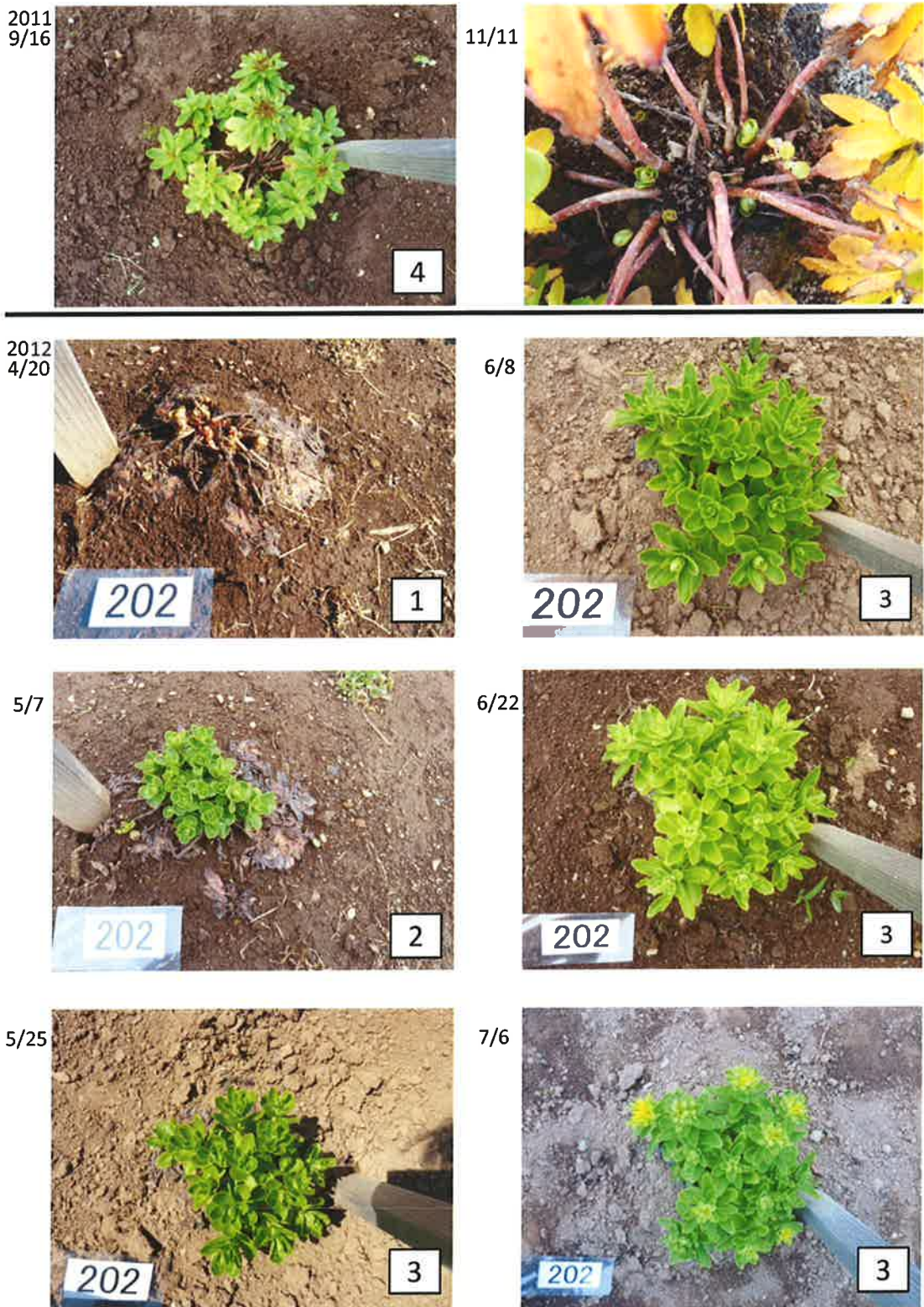


図10. 幌加内5の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価。

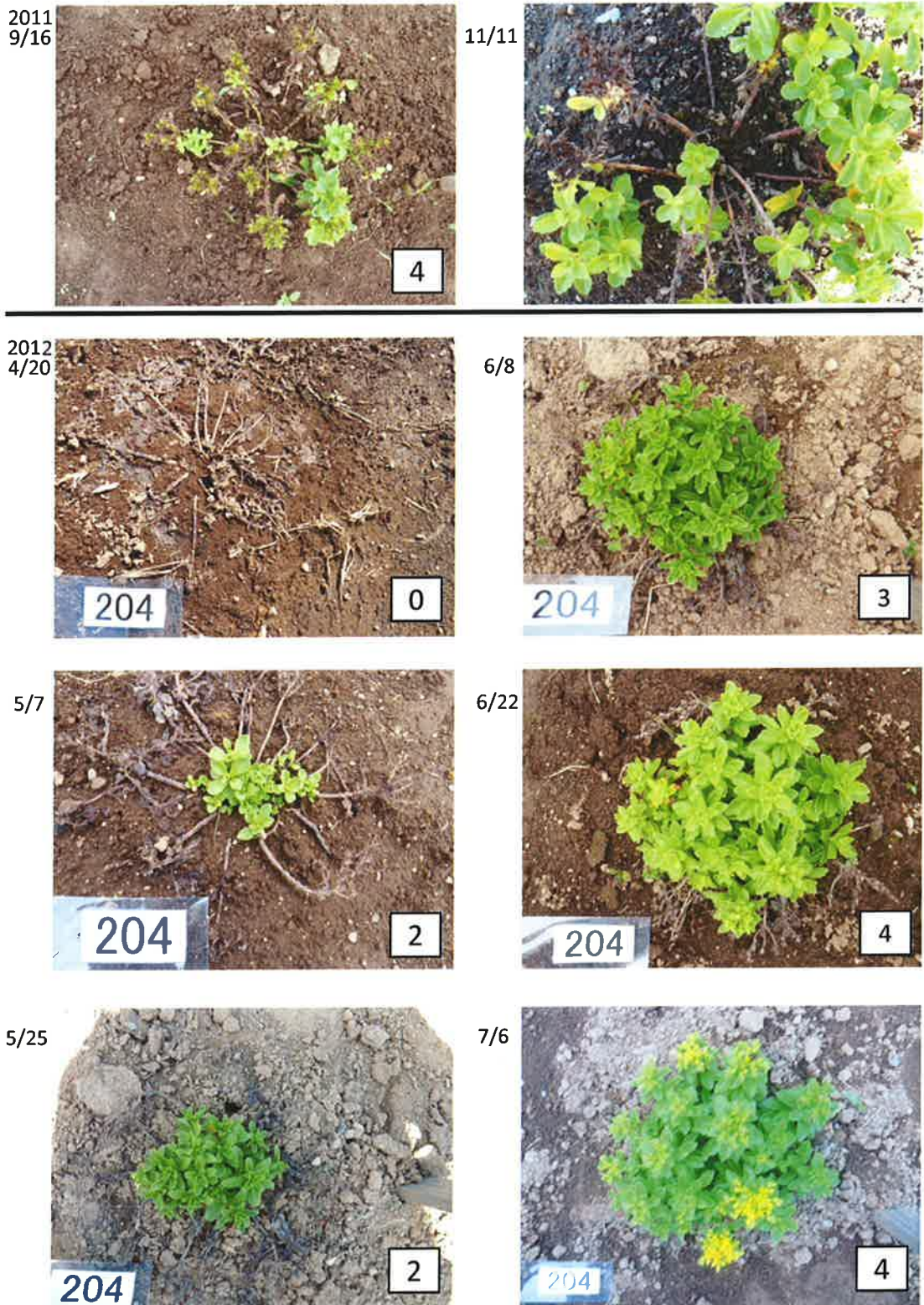


図11. 幌加内6の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

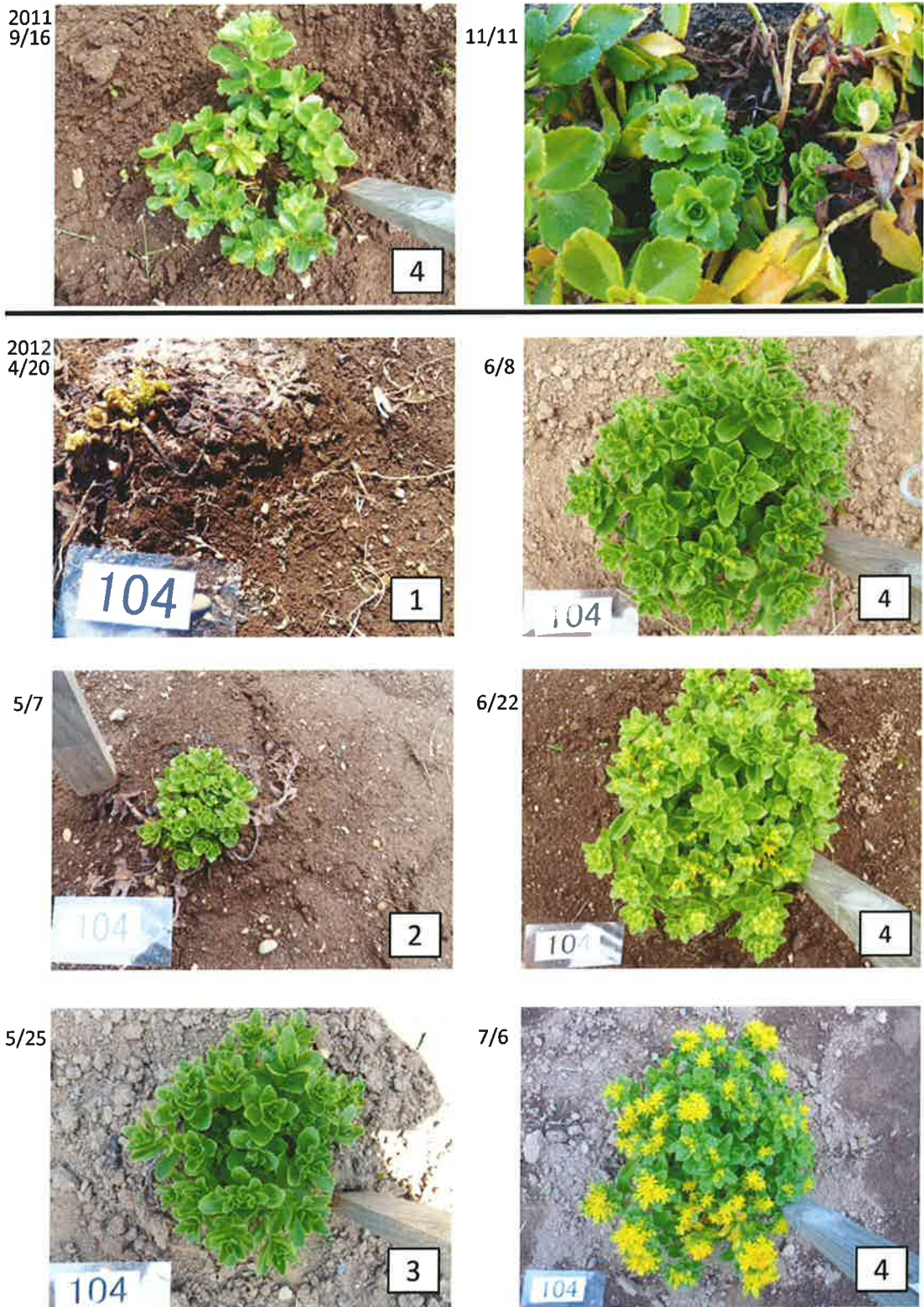


図12. 幌加内7の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価。

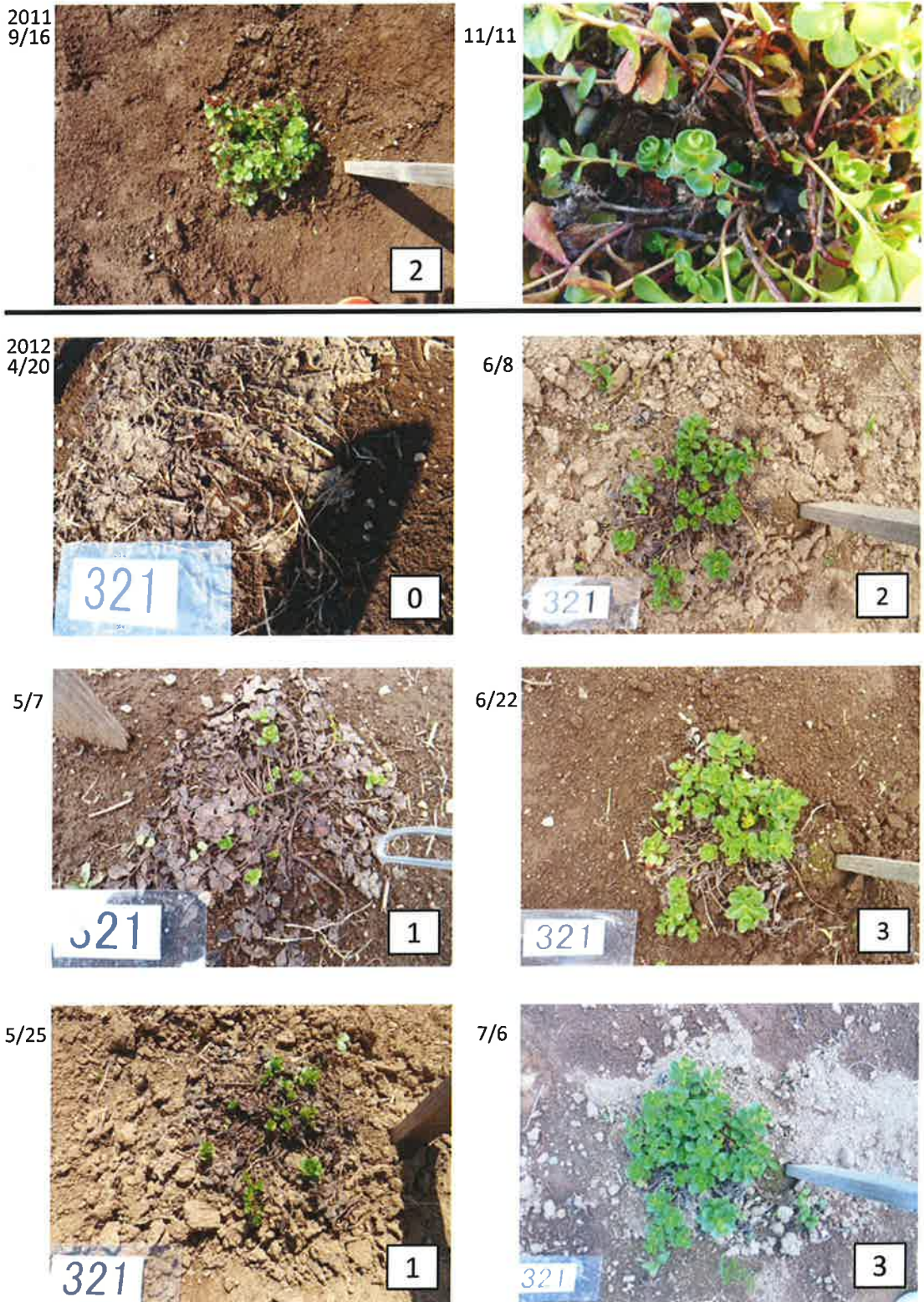


図13. 厚岸1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.



図14. 厚岸2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

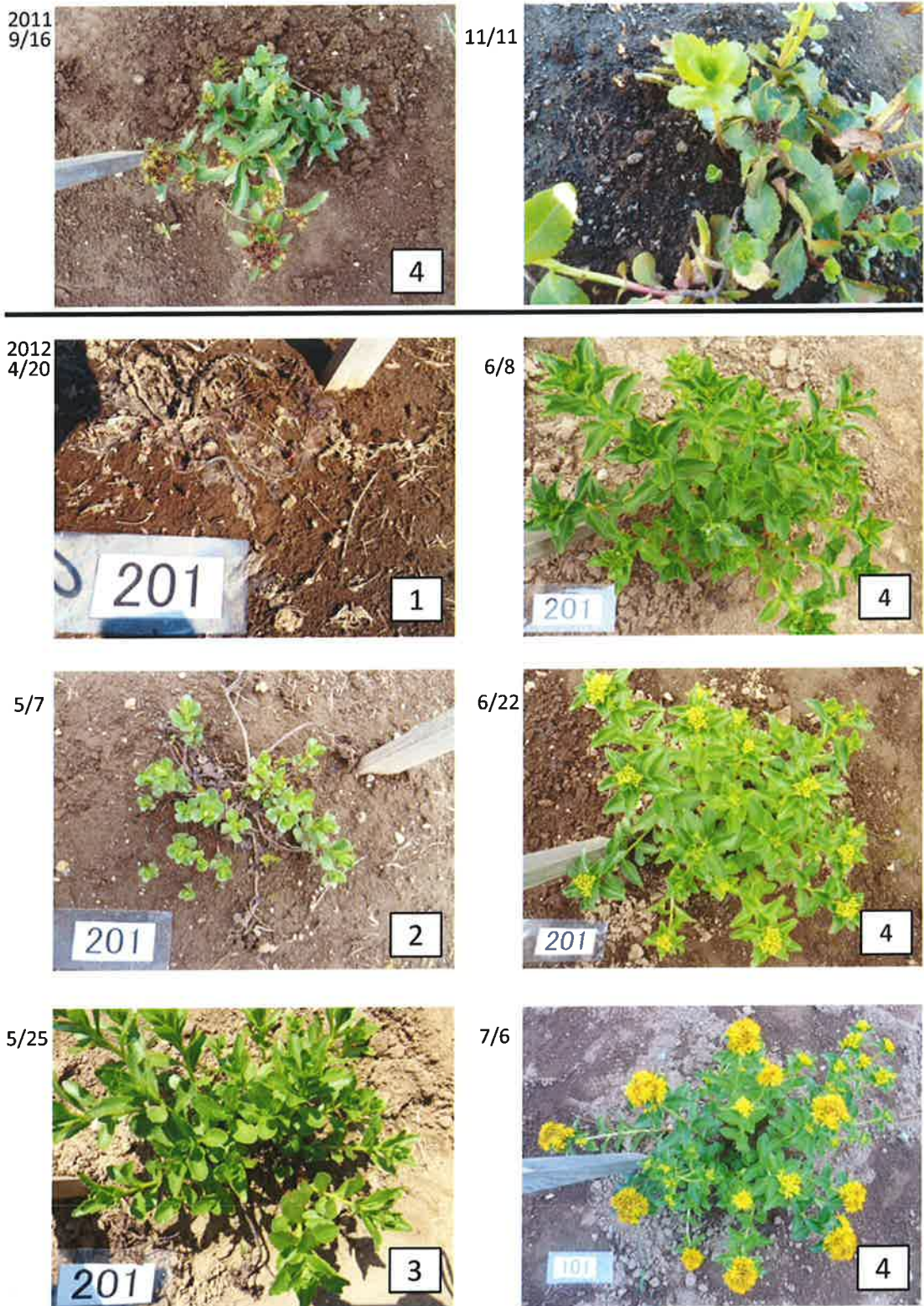


図15. 厚岸3の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

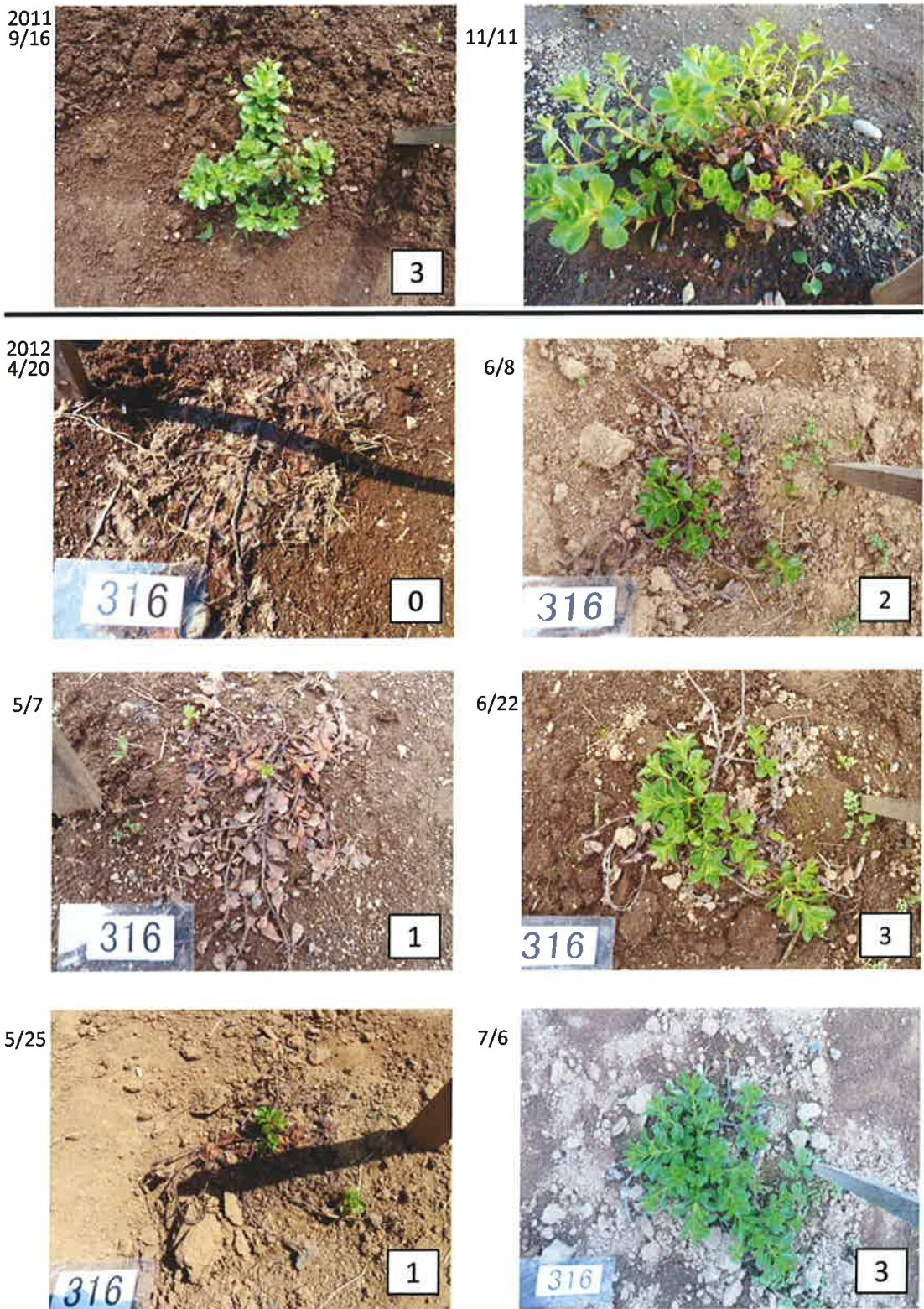


図16. 厚岸4の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

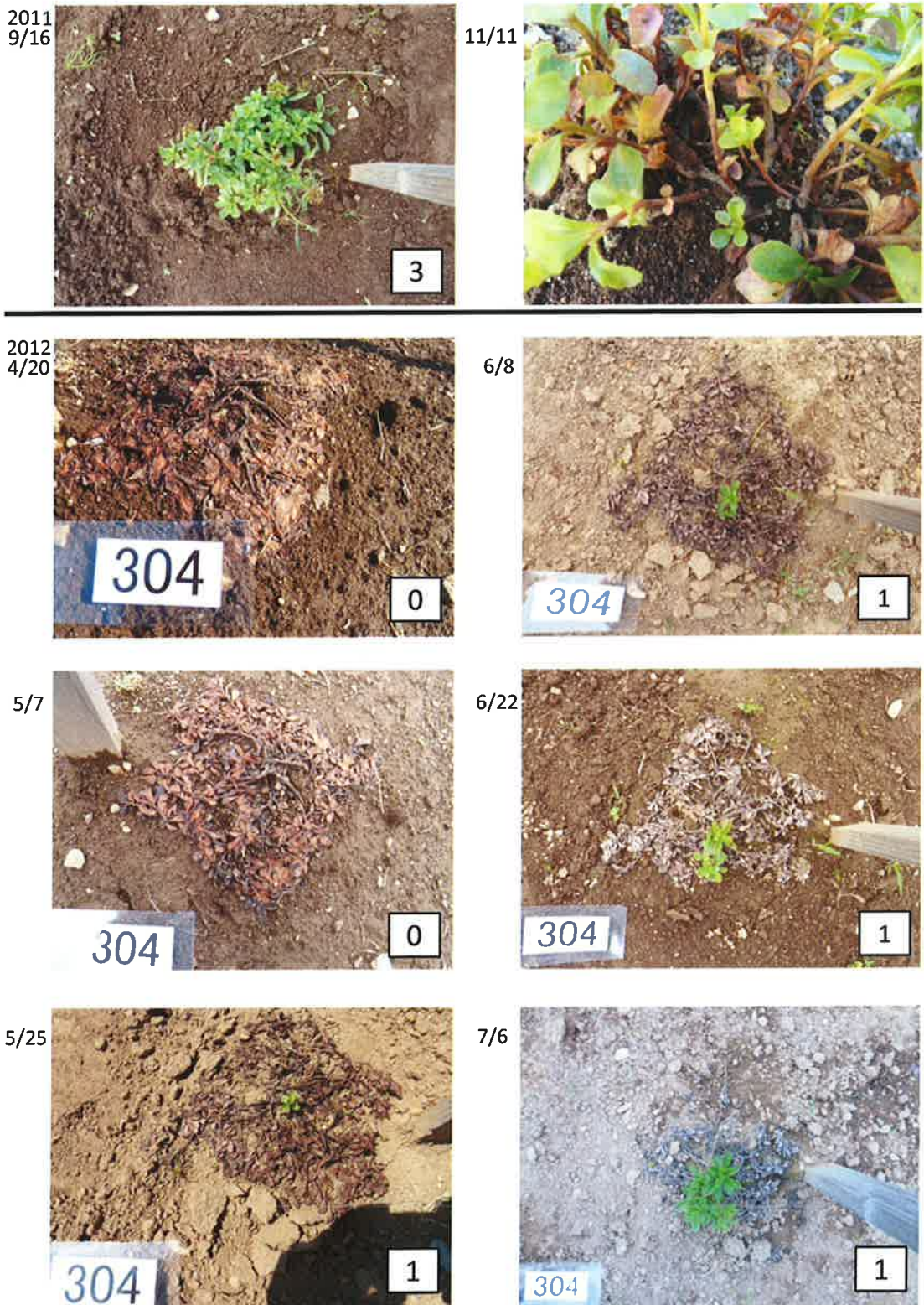


図17. 本別の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

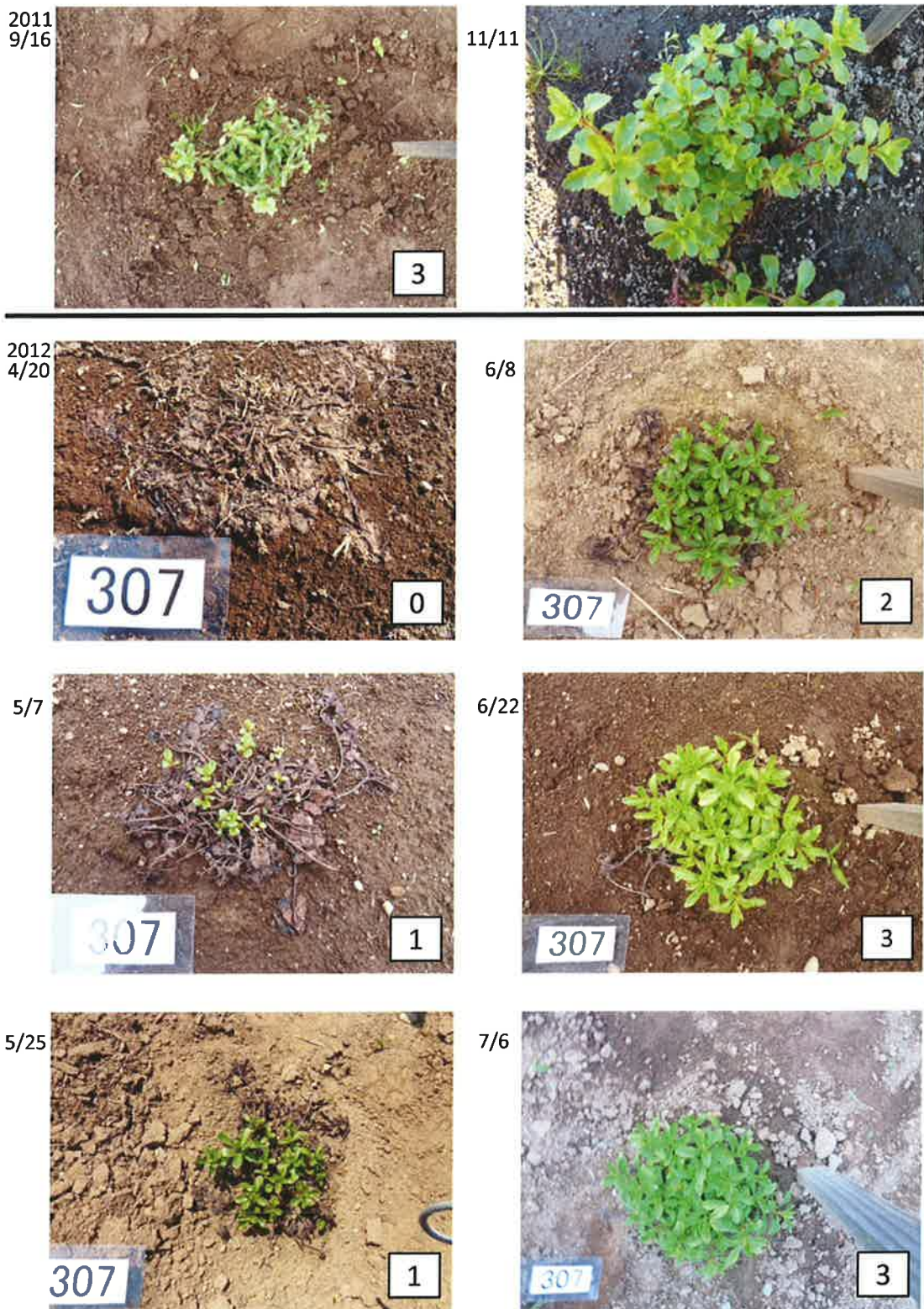


図18. 占冠の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

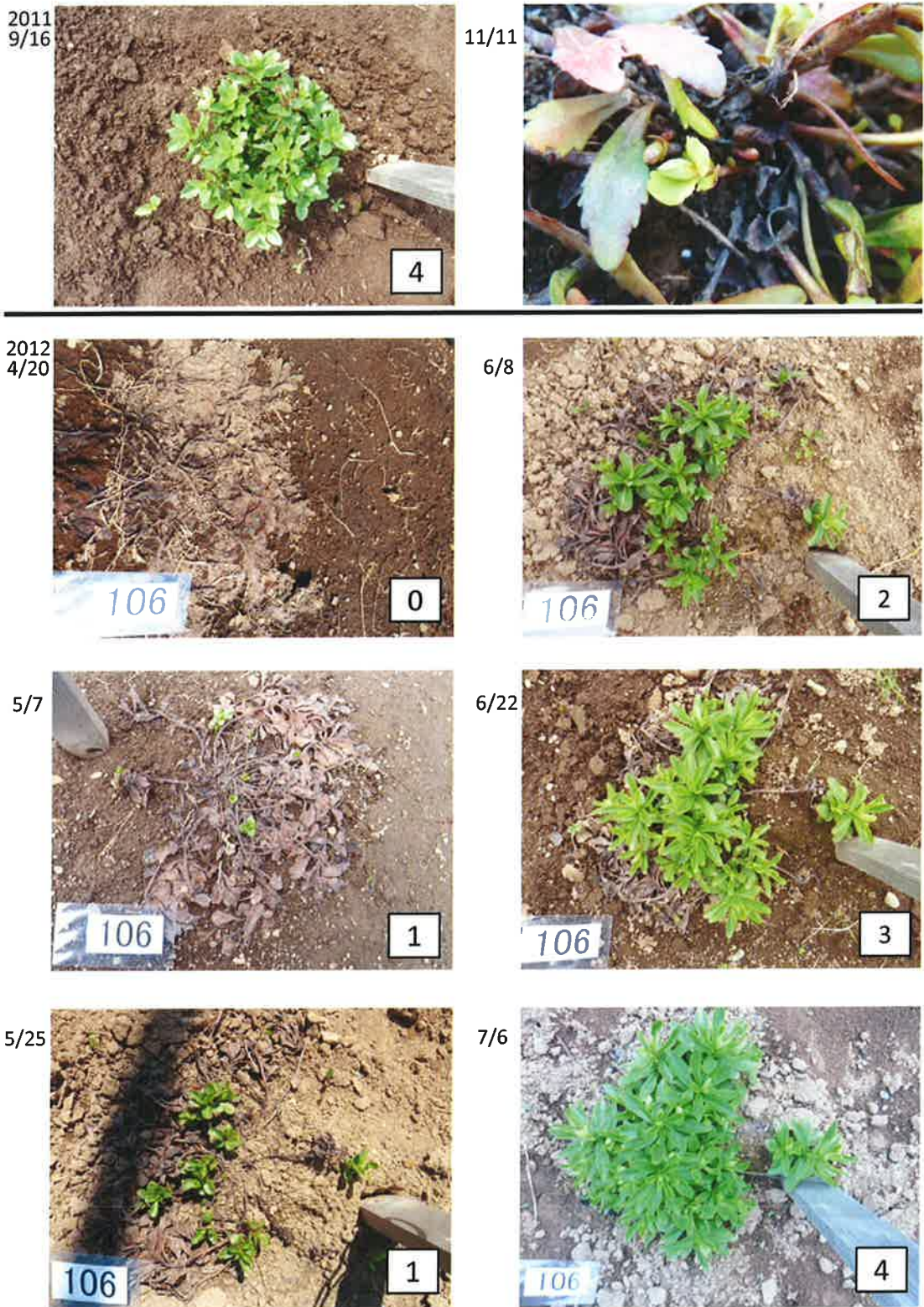


図19. 静内1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

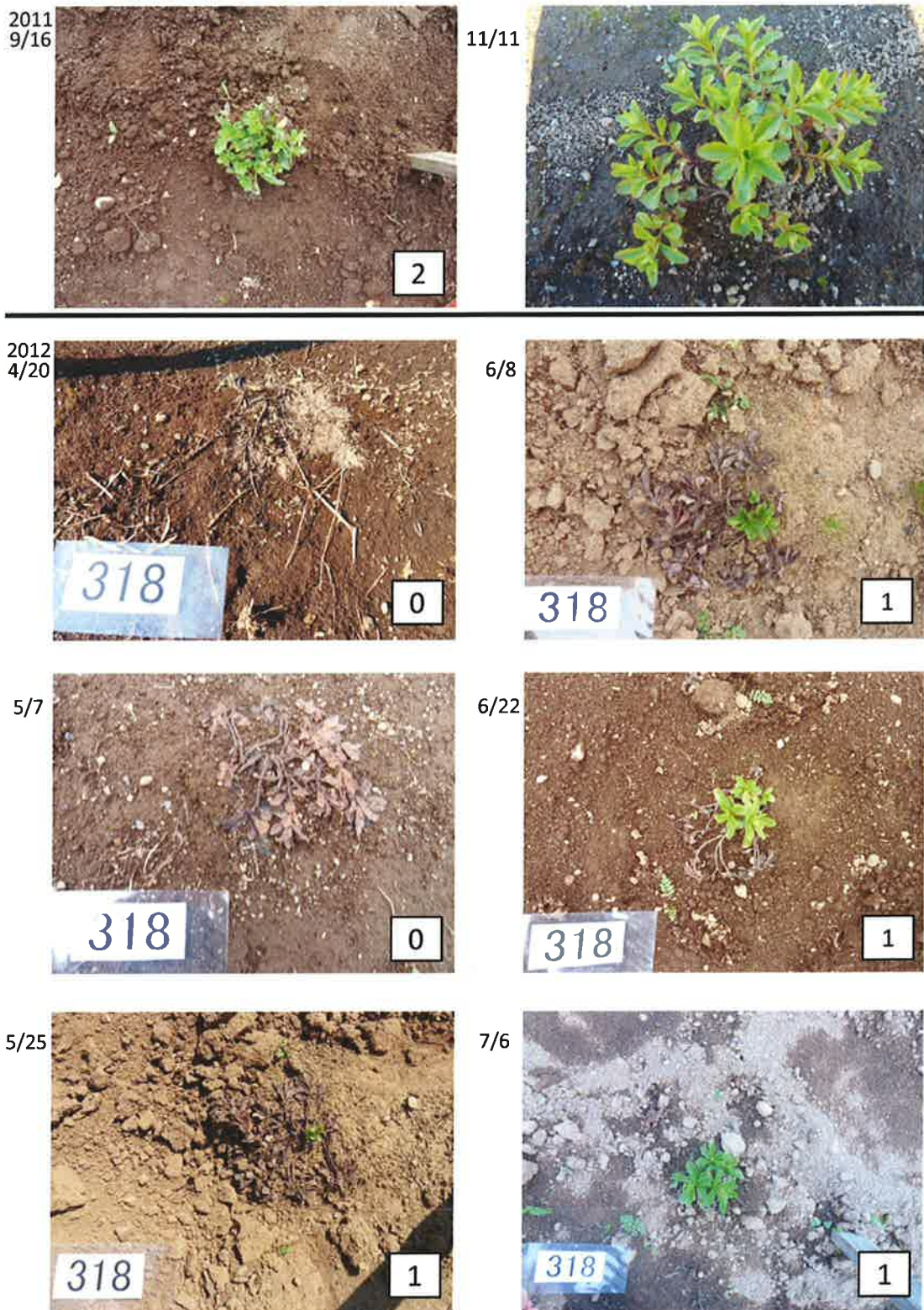


図20. 静内2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

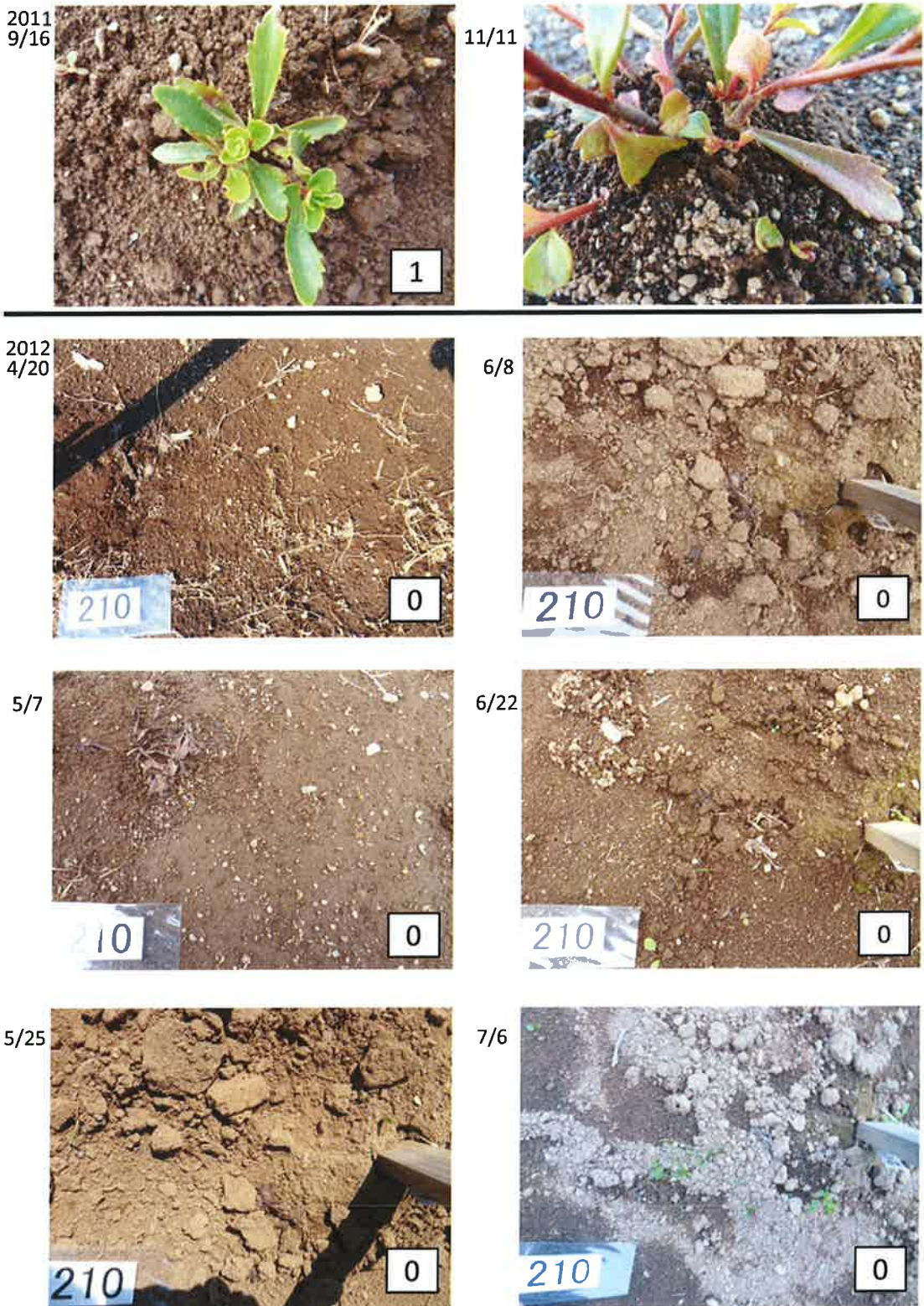


図21. 静内3の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

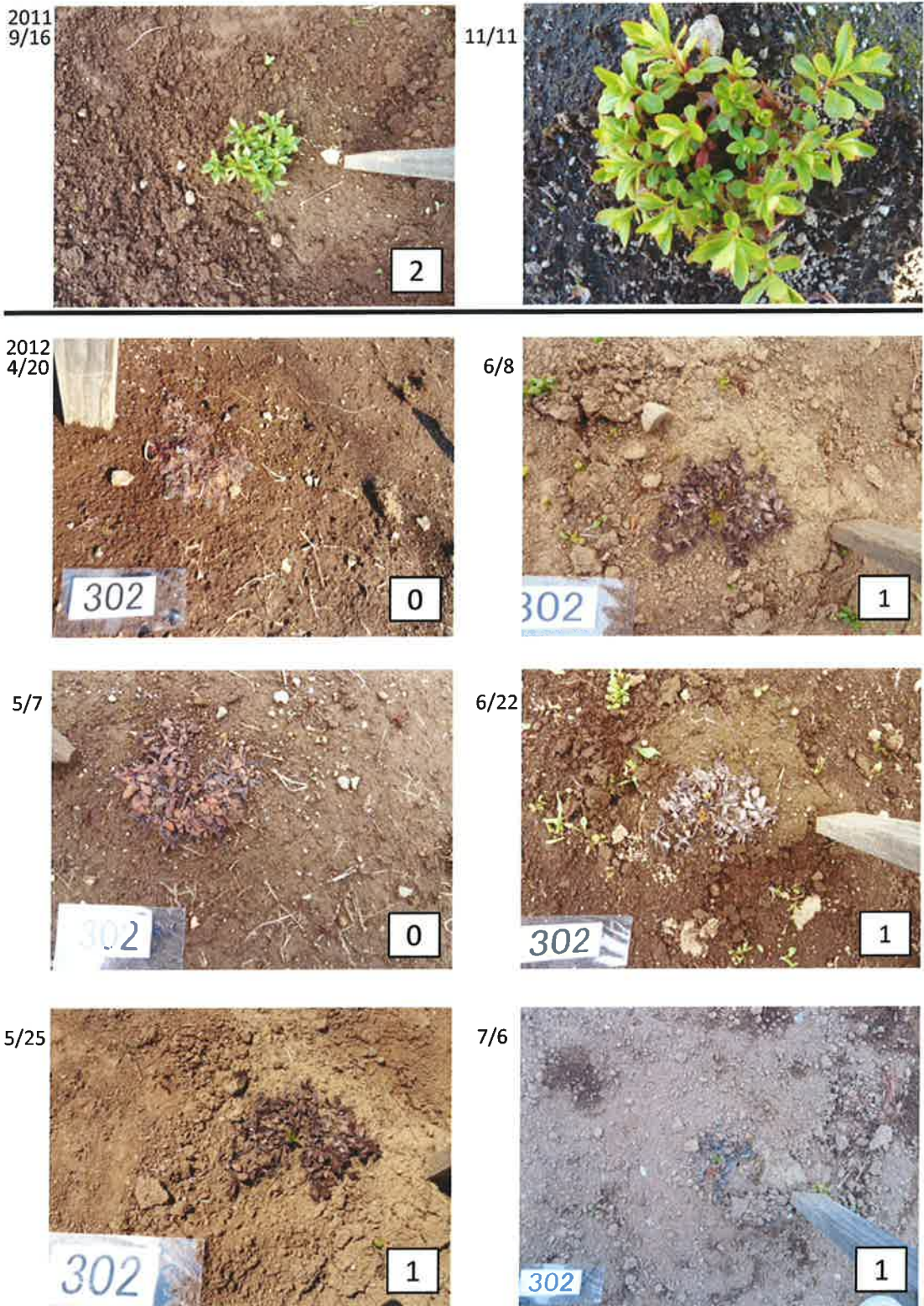


図22. 静内4の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

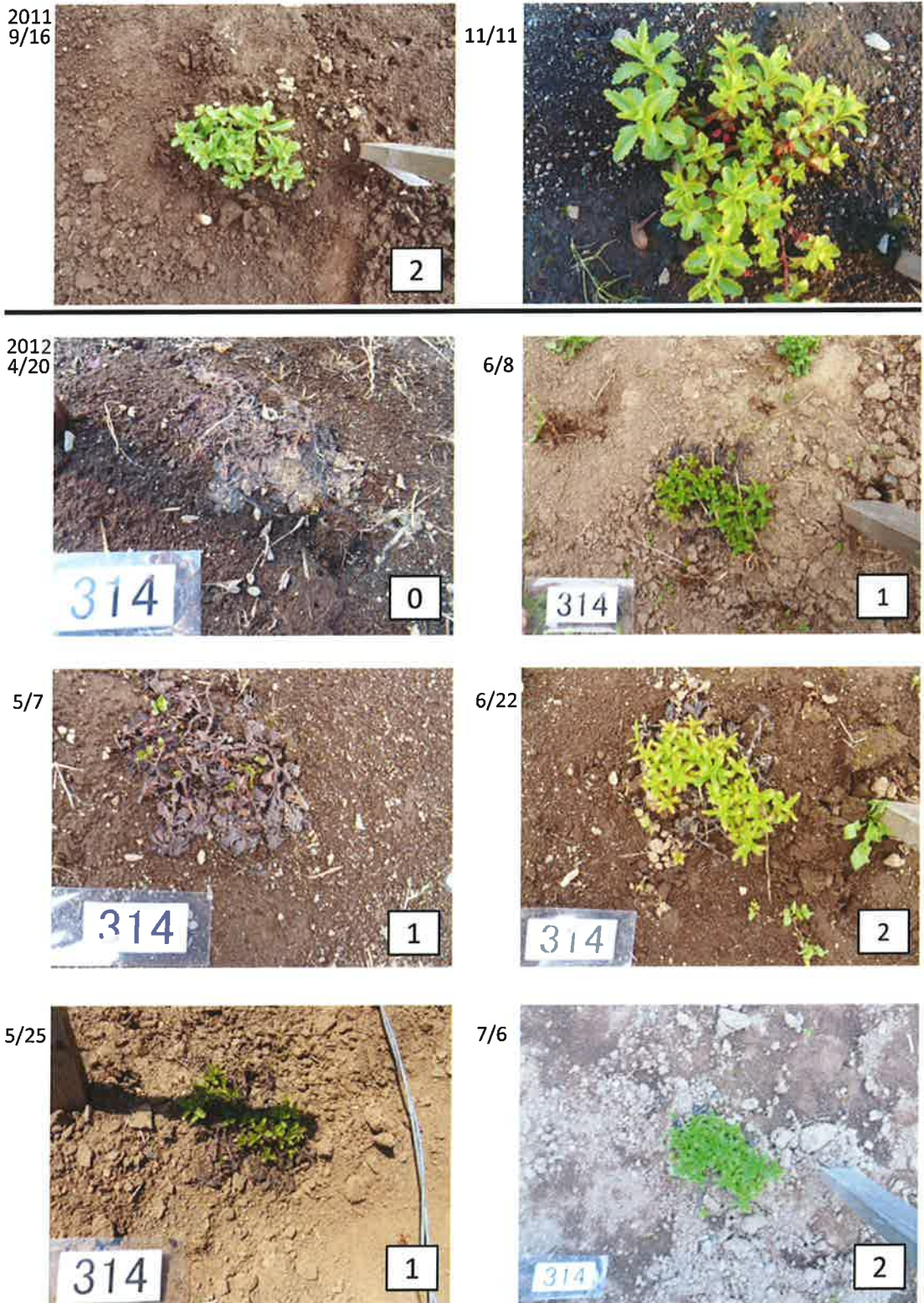


図23. 静内5の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

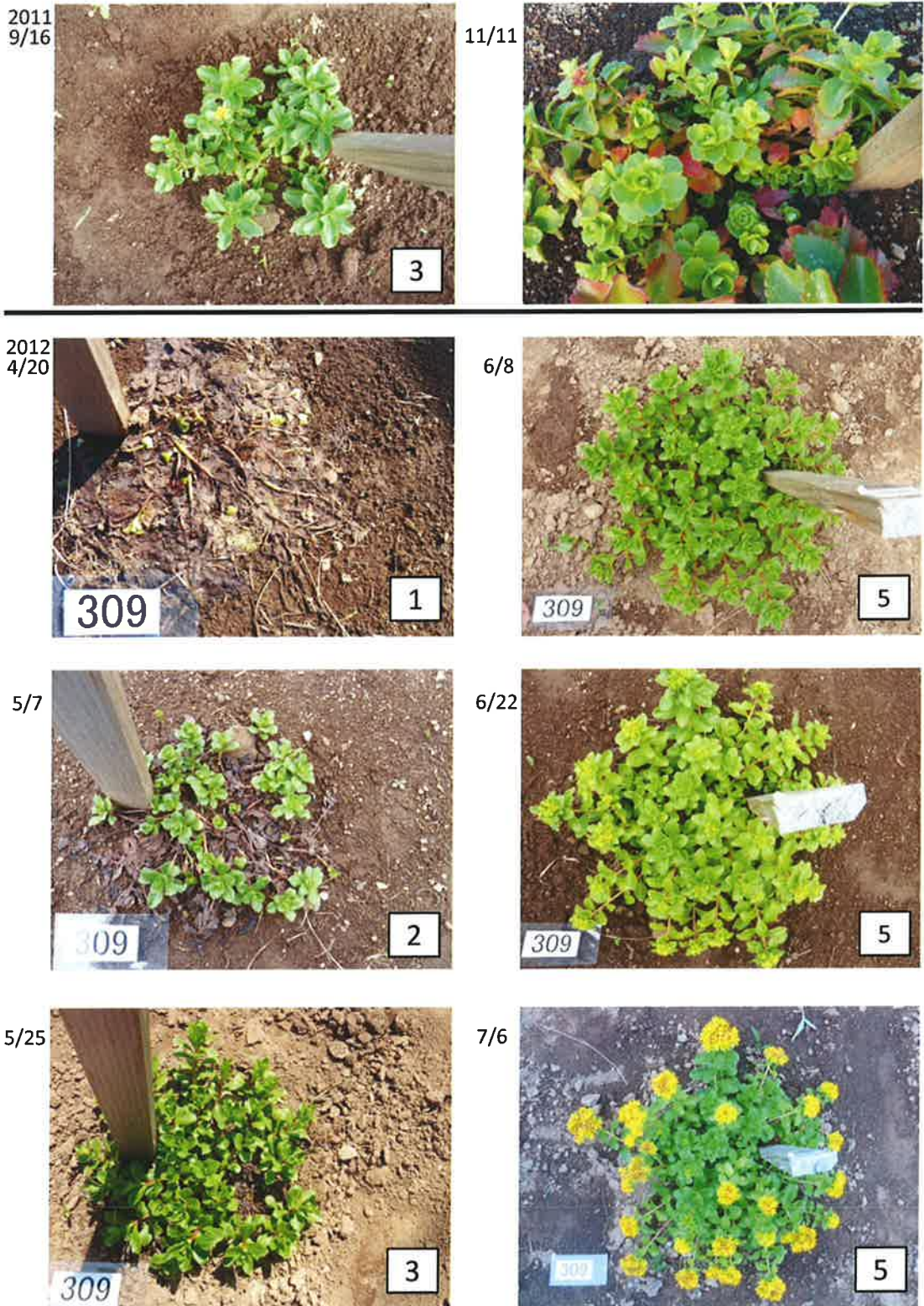


図24. 鹿部の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.



図25. 川汲の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

2011
9/16



11/11



2012
4/20



6/8



5/7



6/22



5/25



7/6



図26. 八雲1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.

左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

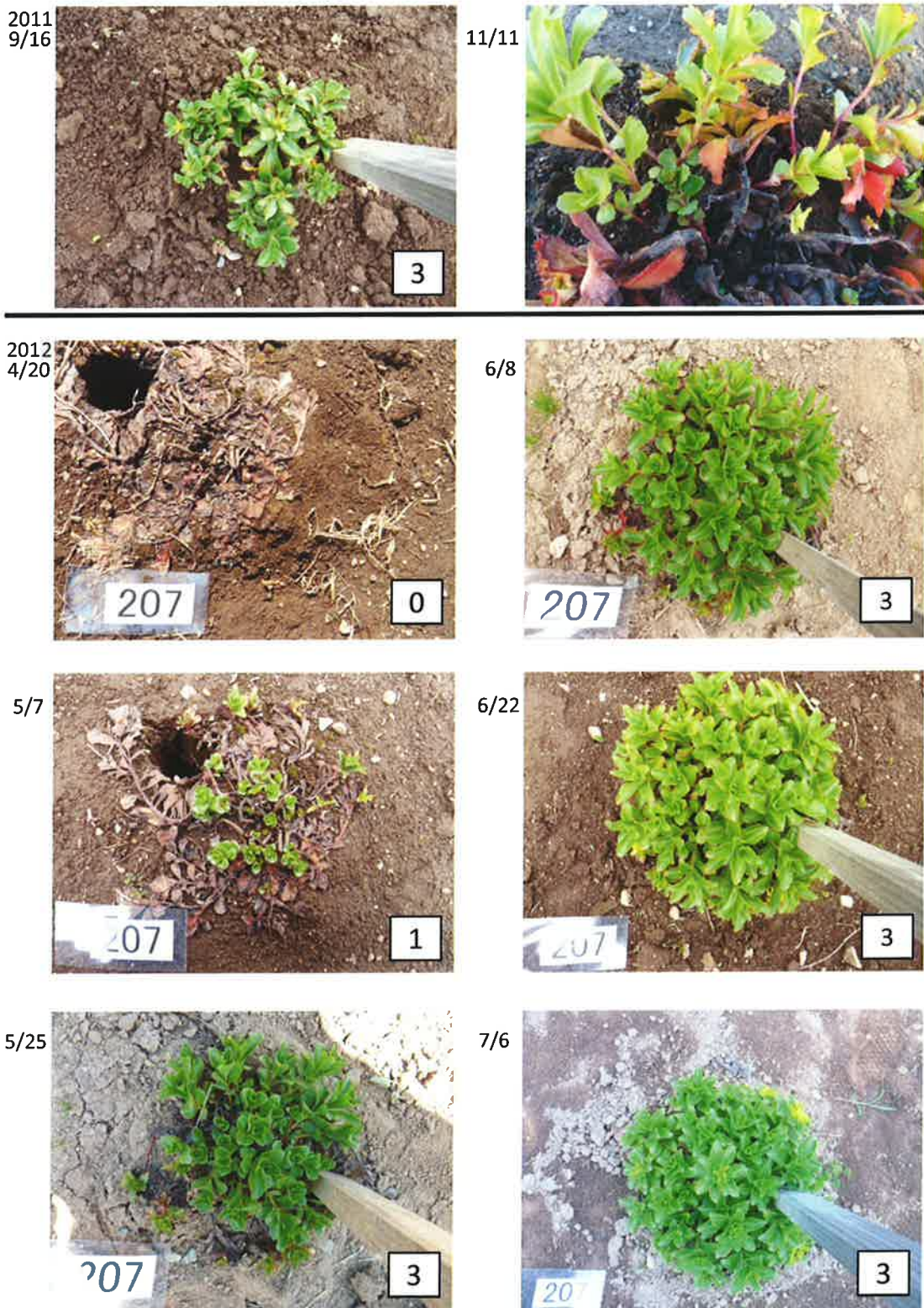


図27. 八雲2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.



図28. 八雲3の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

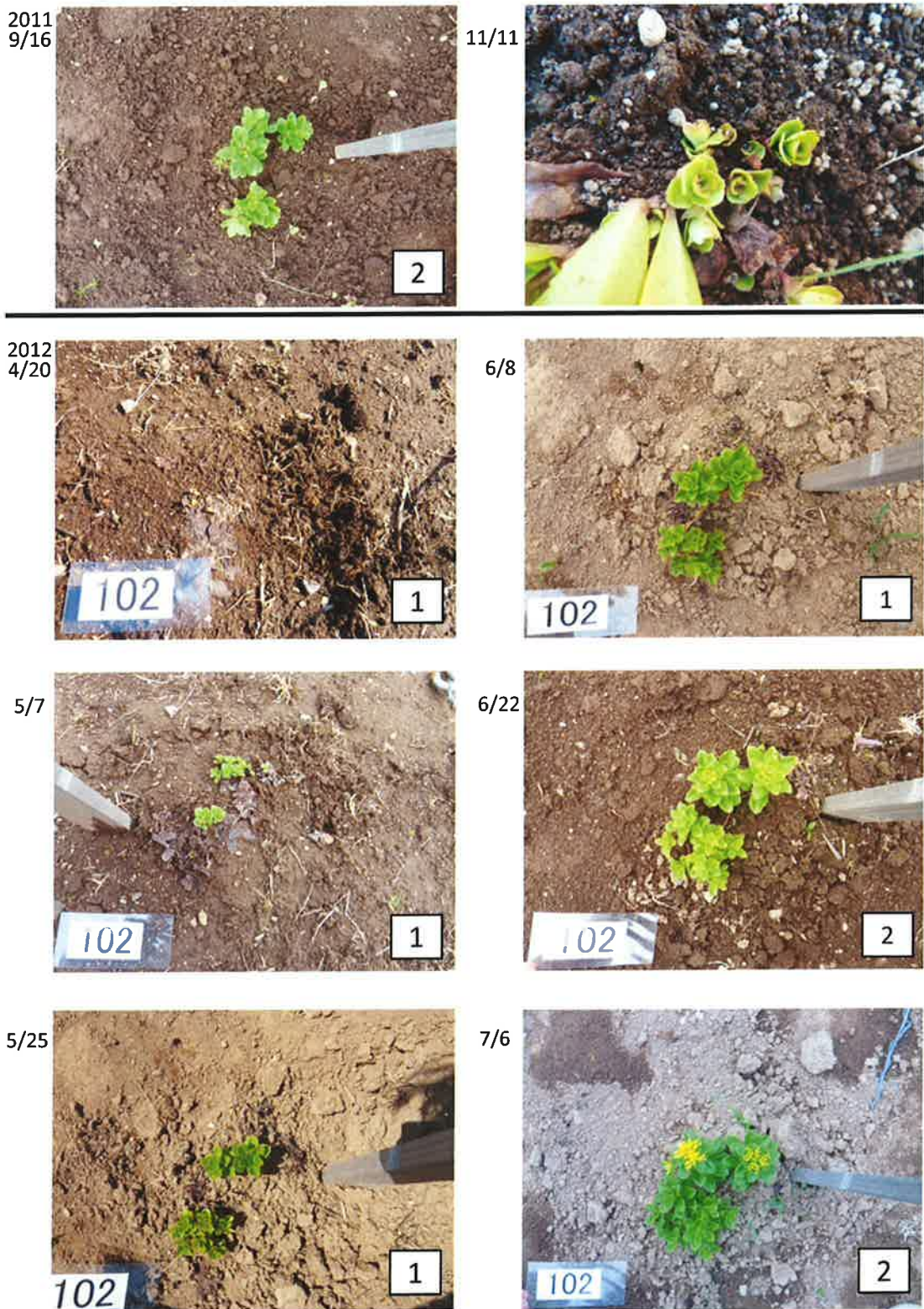


図29. 泊の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価。

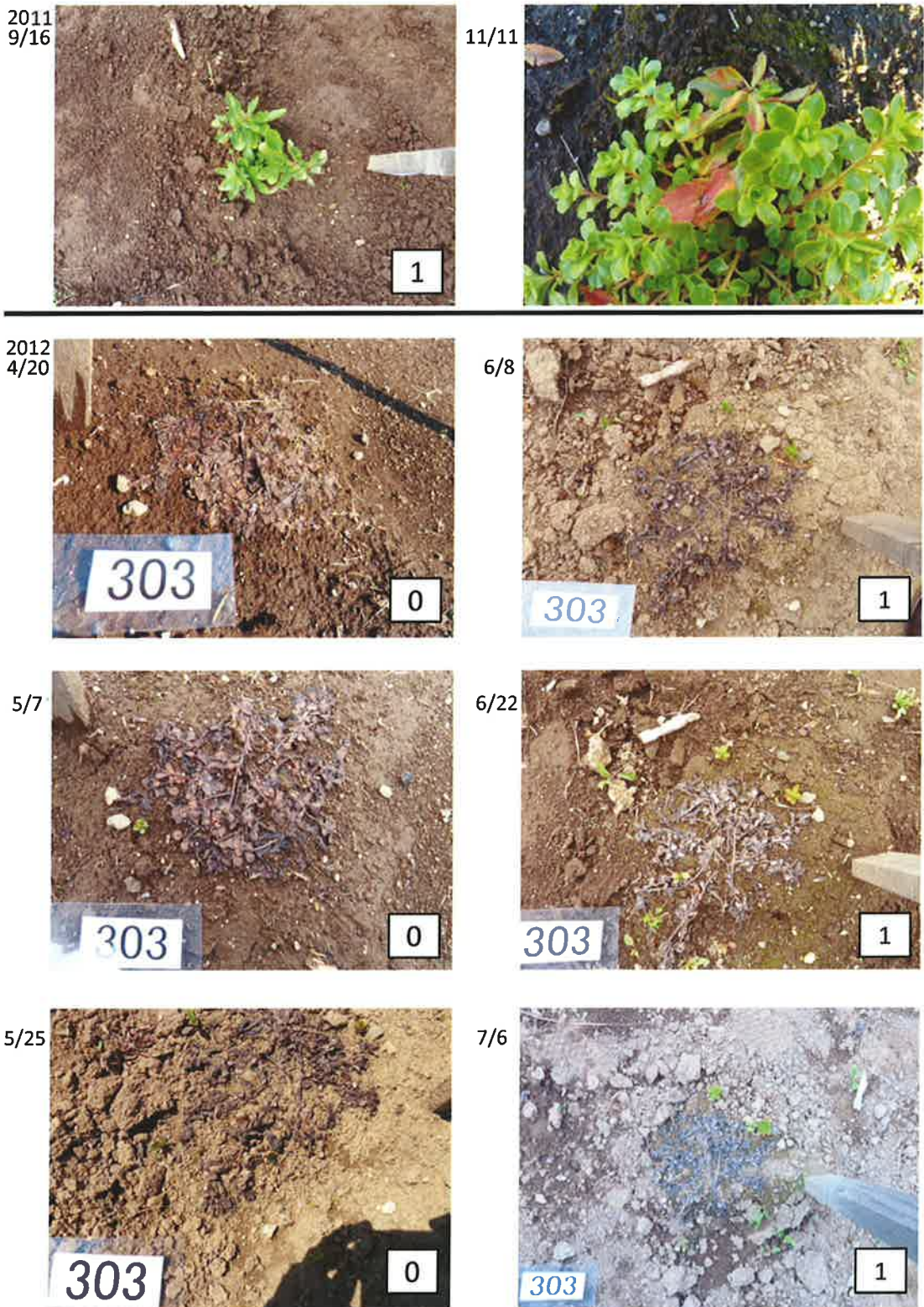


図30. 忍路1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

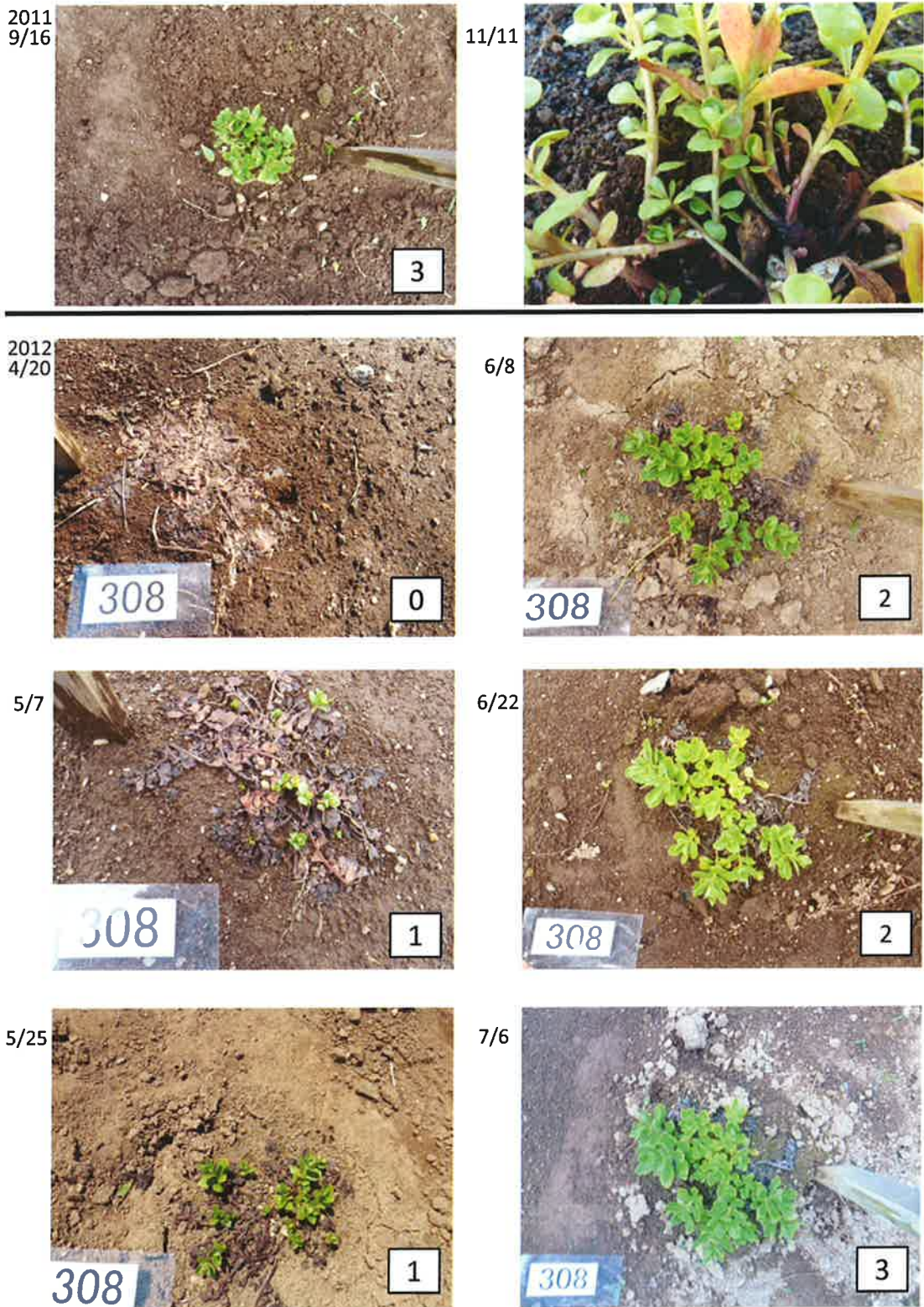


図31. 忍路2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

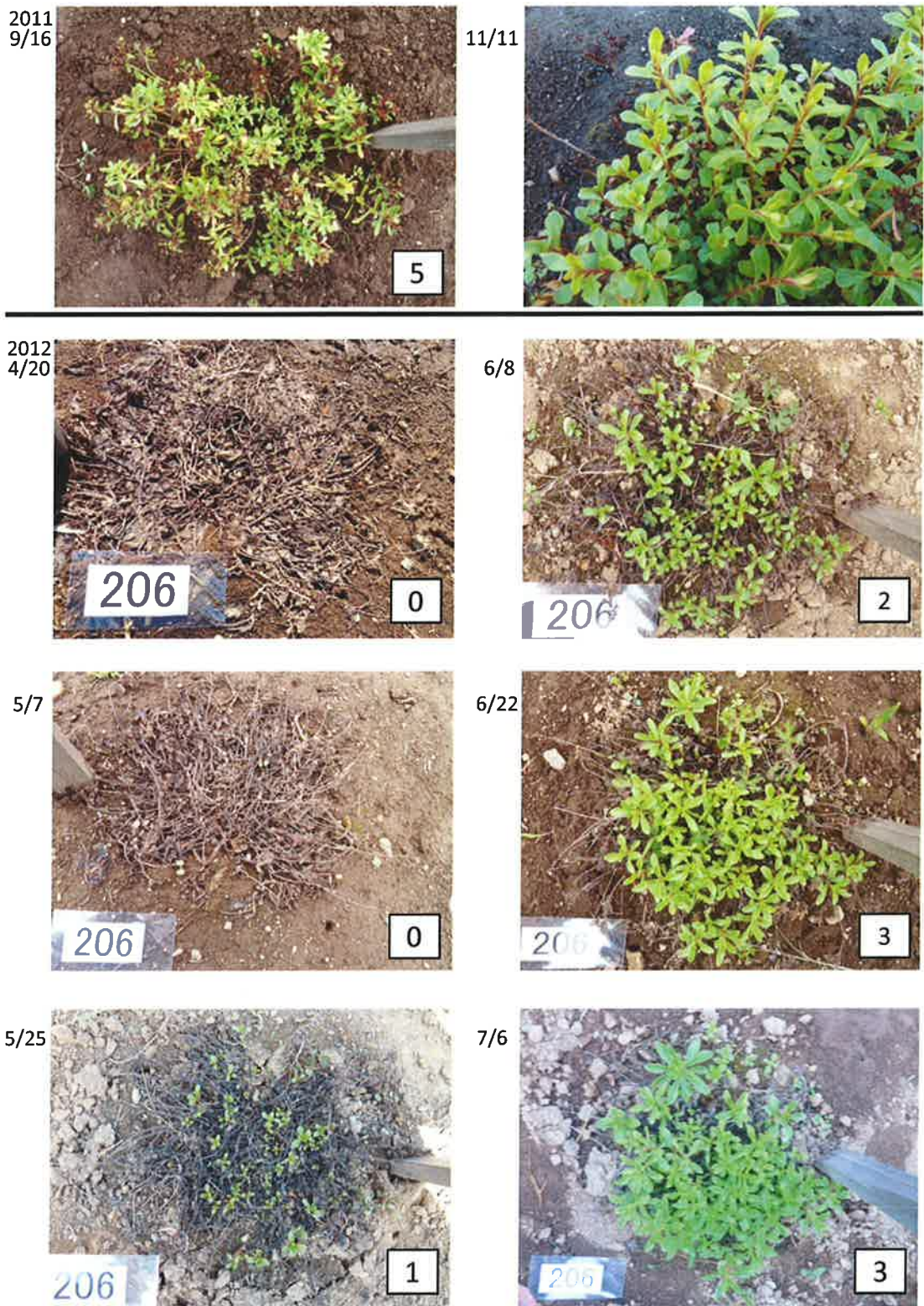


図32. 雪印1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.



図33. 雪印2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

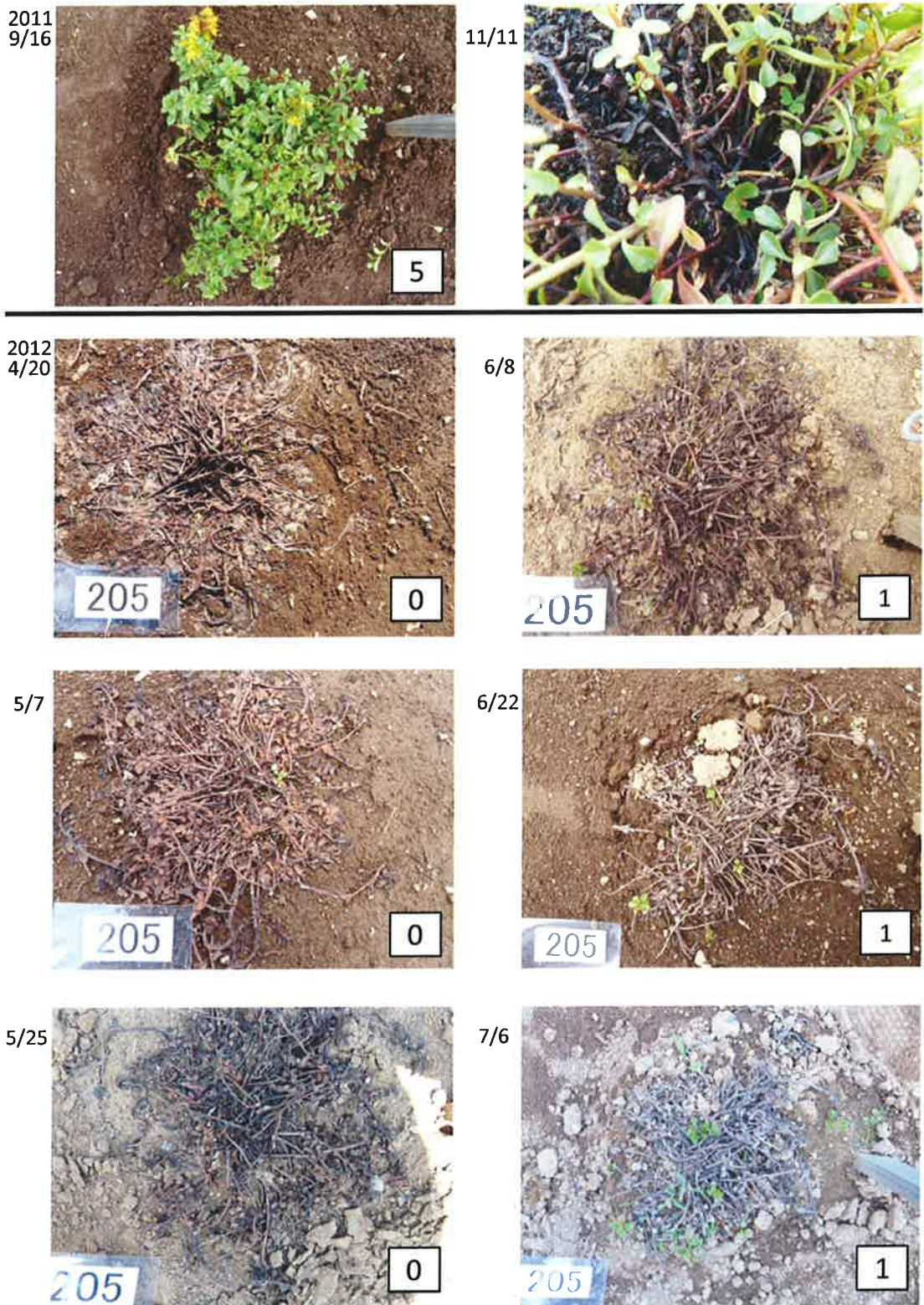


図34. 雪印3の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

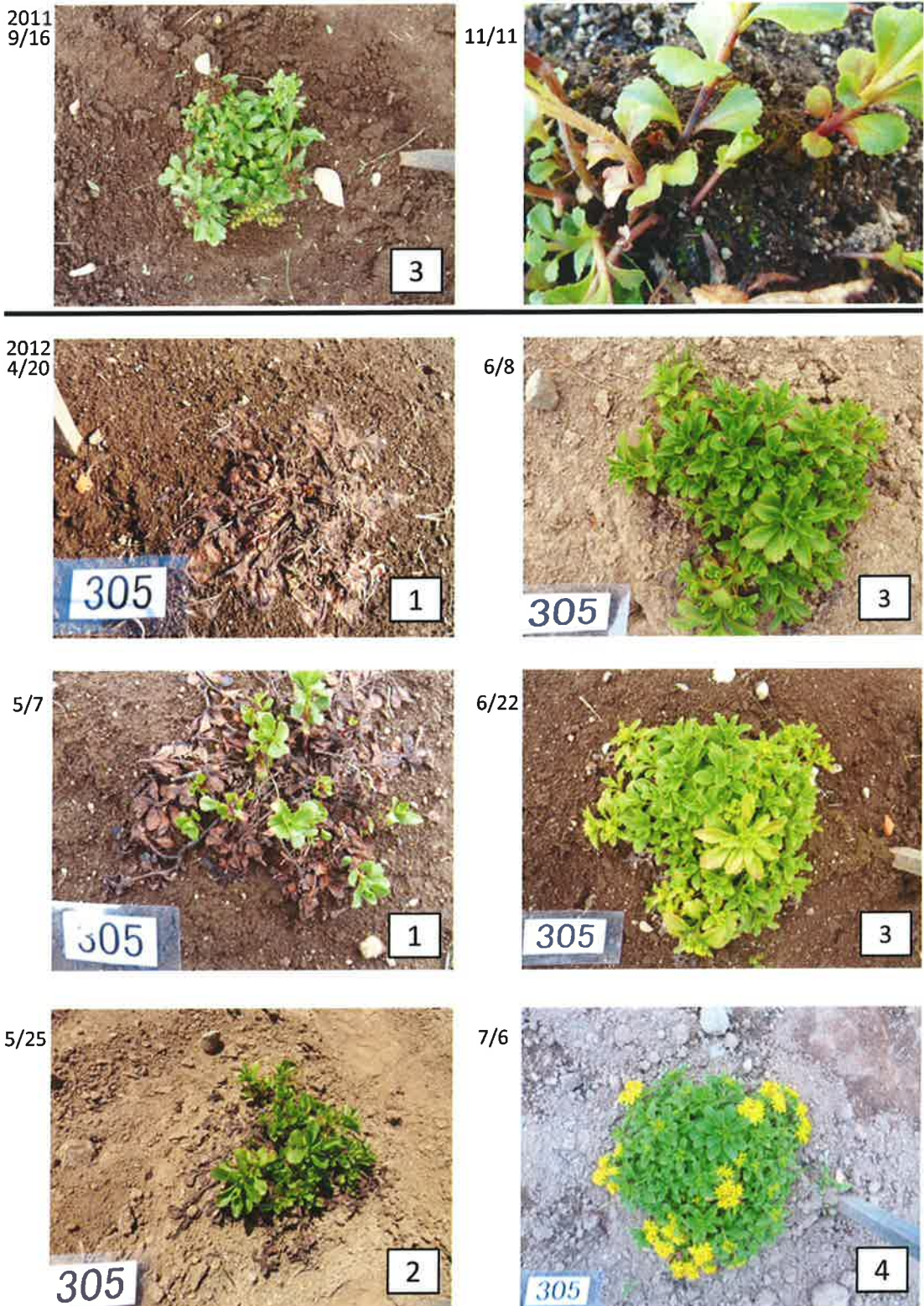


図35. 雪印4の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

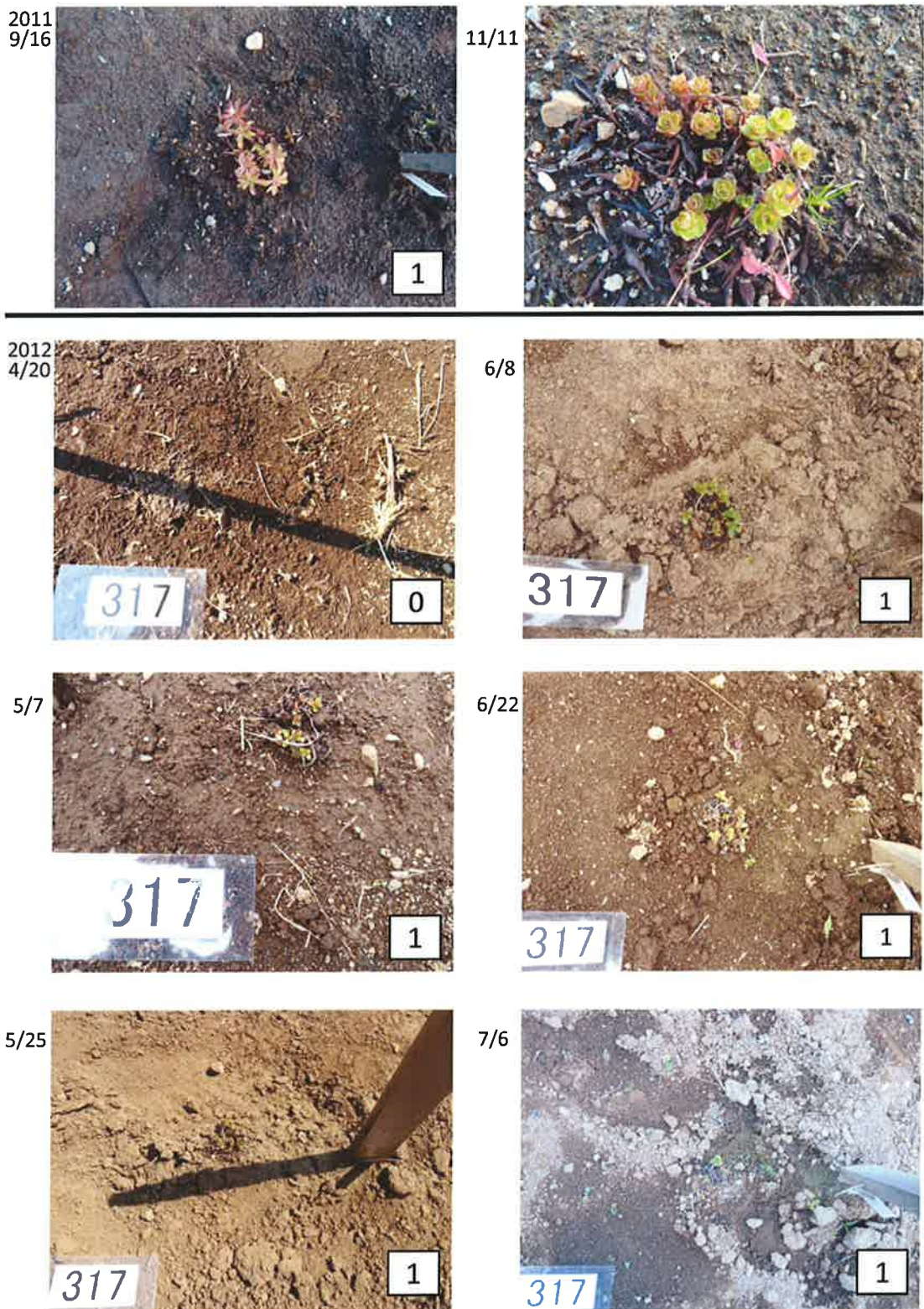


図36. 増毛雪印の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価。

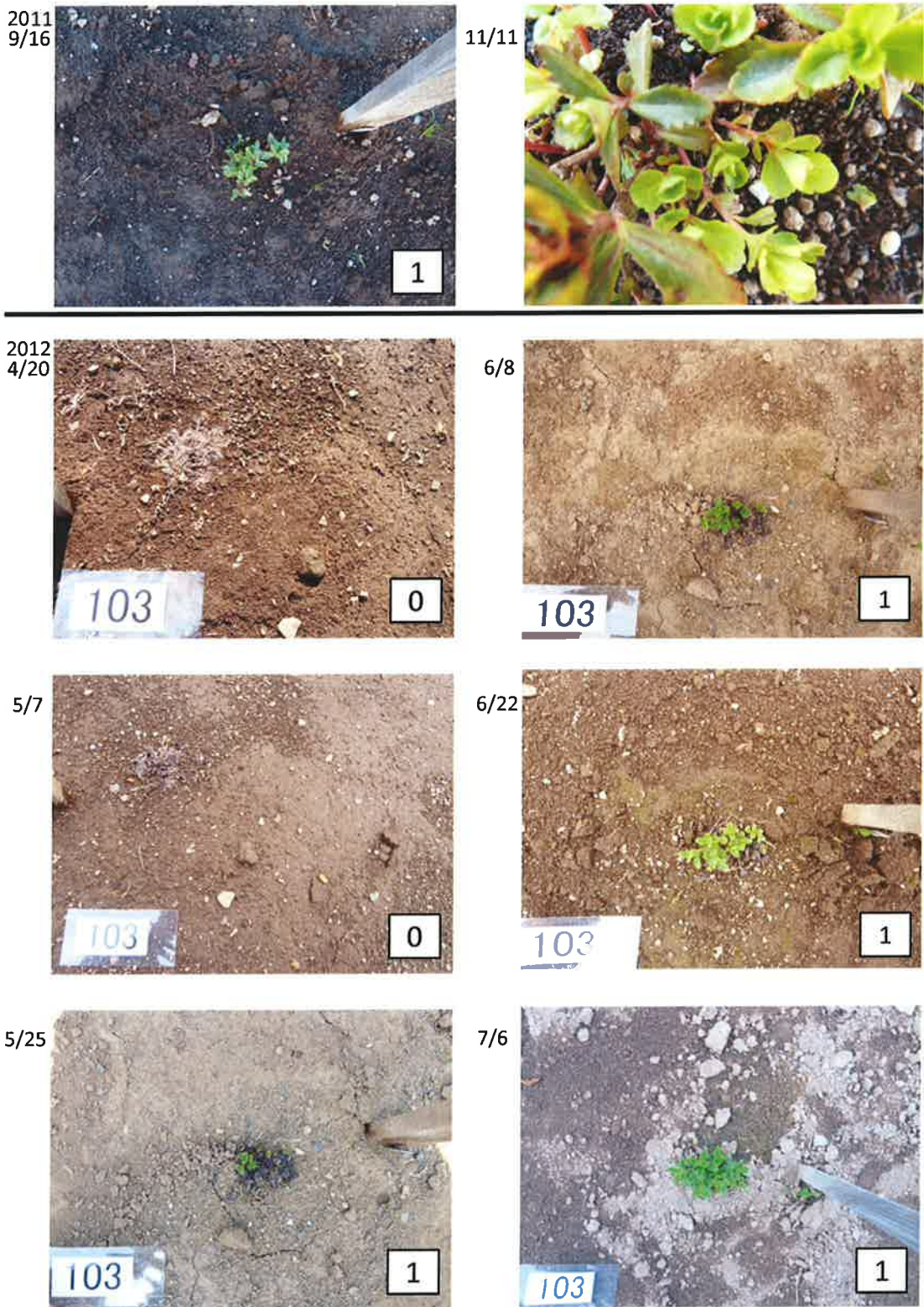


図37. 厚岸雪印1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価。

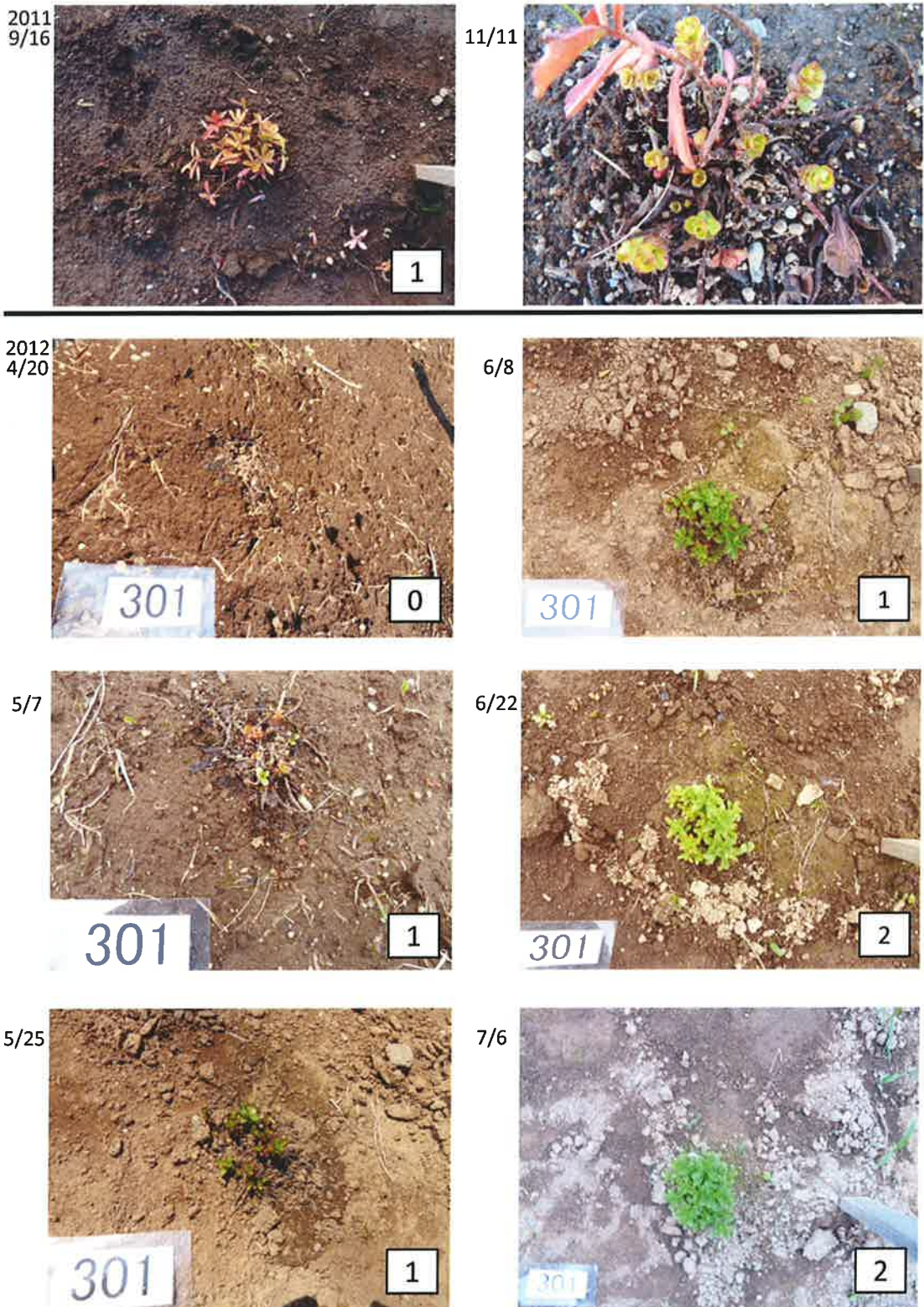


図38. 厚岸雪印2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価.

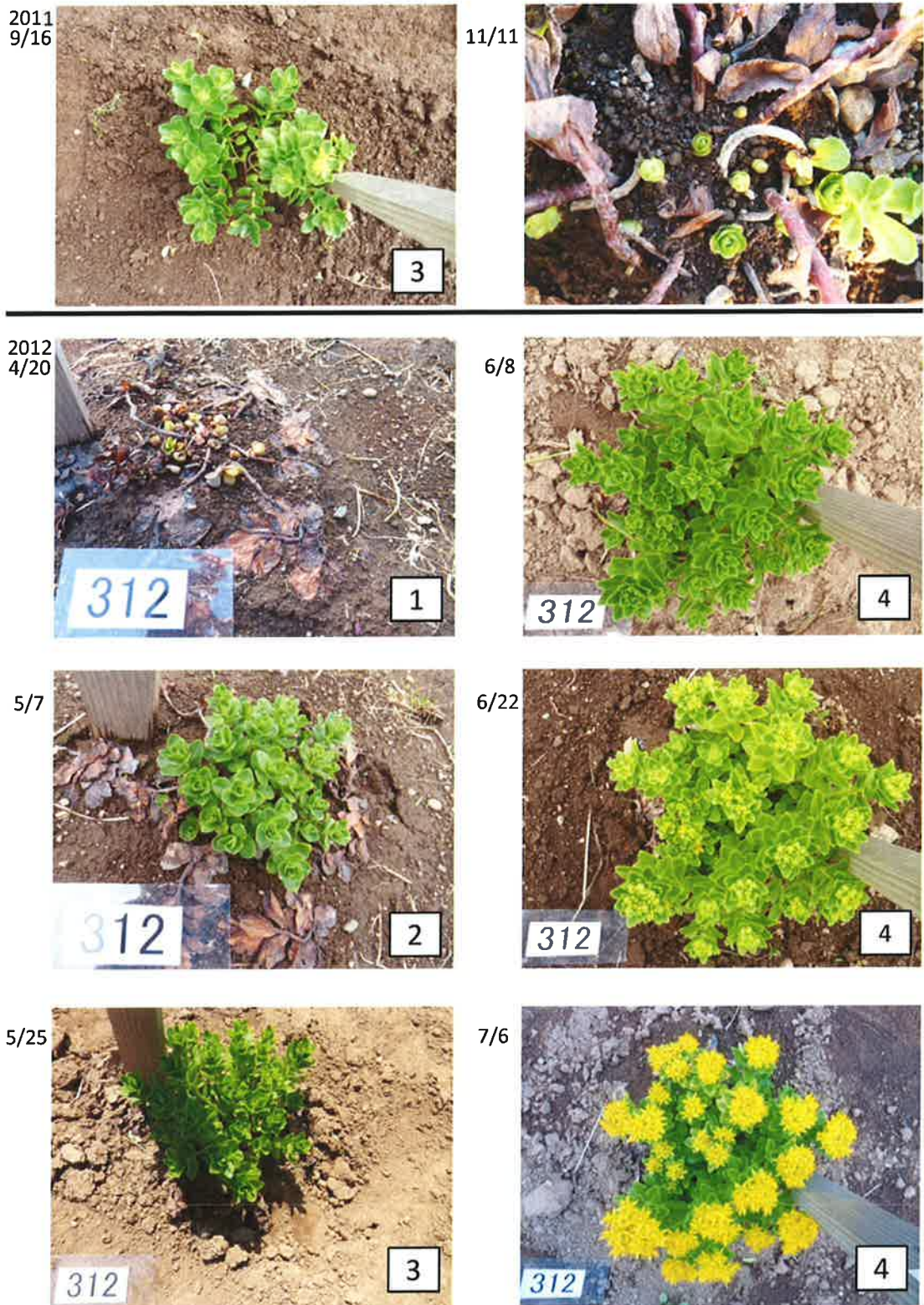


図39. 不明雪印1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価。

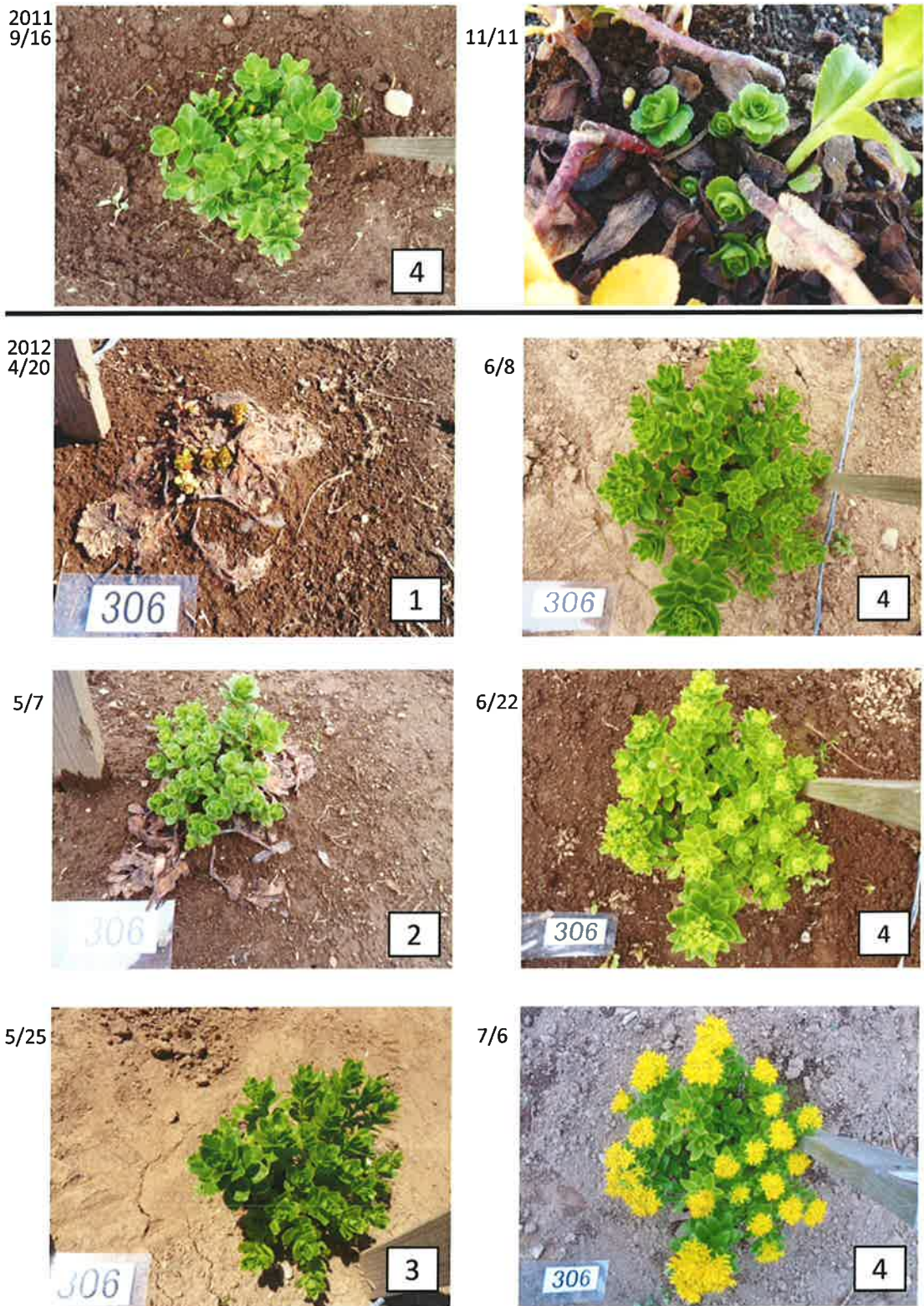


図40. 不明雪印2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.



図41. 不明雪印3の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子。
 左上:越冬前親株の様子とその評価 右上:越冬芽の様子 下:融雪後の生育の様子とその評価。

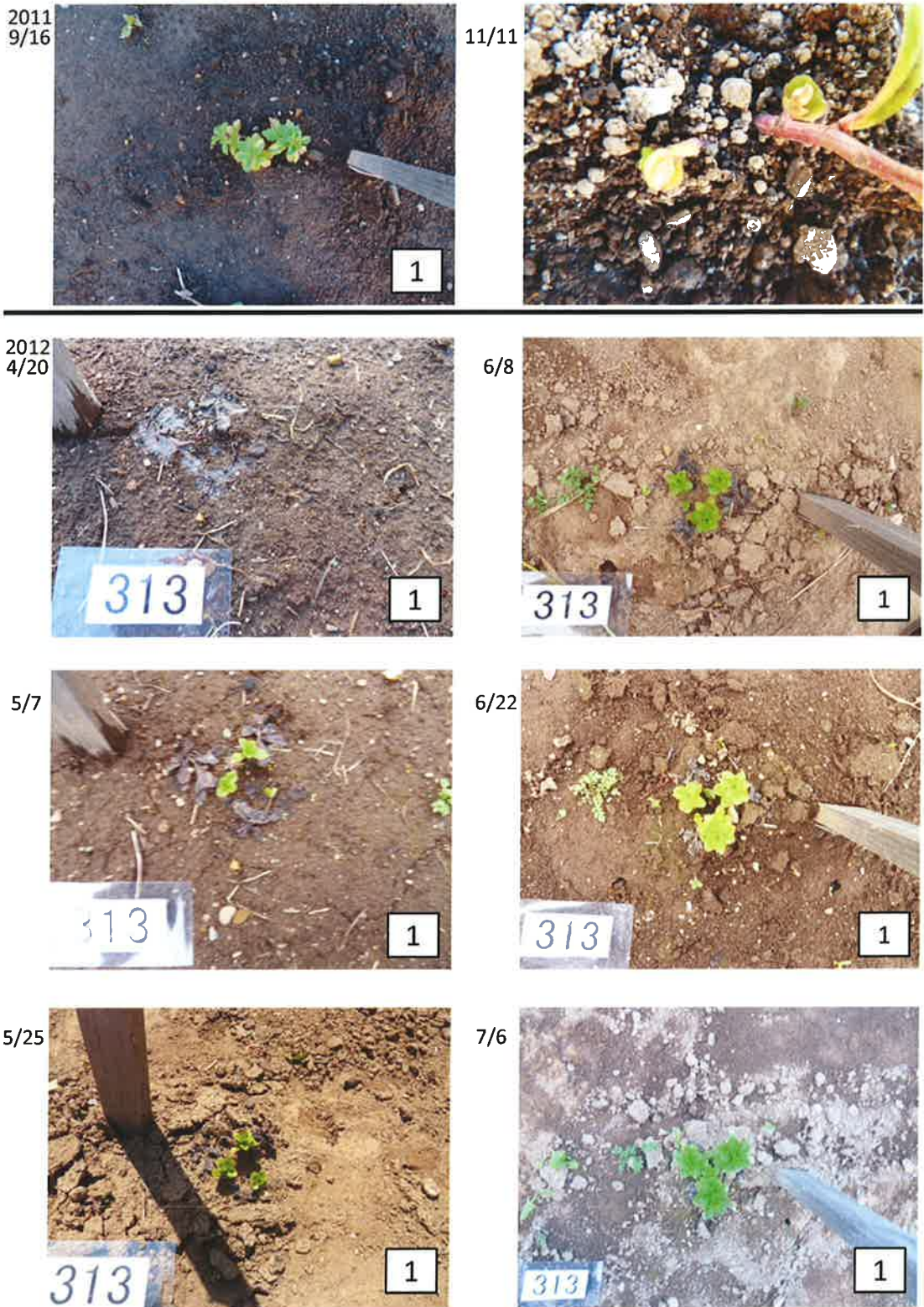


図42. 北大1の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

2011
9/16



11/11



2012
4/20



6/8



5/7



6/22



5/25



7/6



図43. 北大2の越冬前の親株と越冬芽および融雪後の生育の様子.
 左上: 越冬前親株の様子とその評価 右上: 越冬芽の様子 下: 融雪後の生育の様子とその評価.

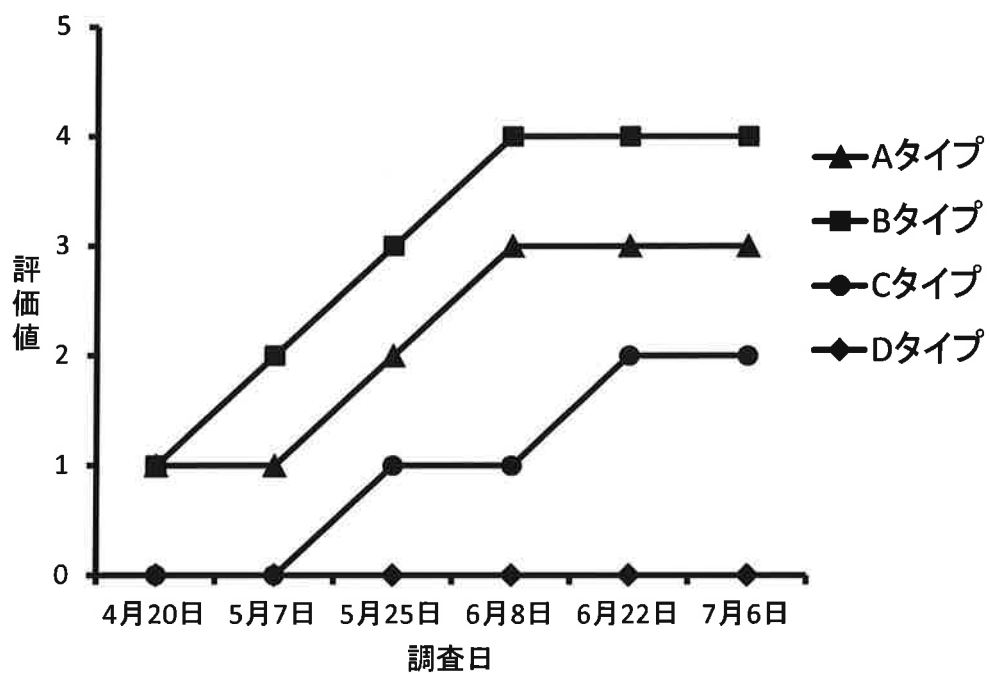


図44. 融雪後の評価値から作成した成長曲線のタイプ.

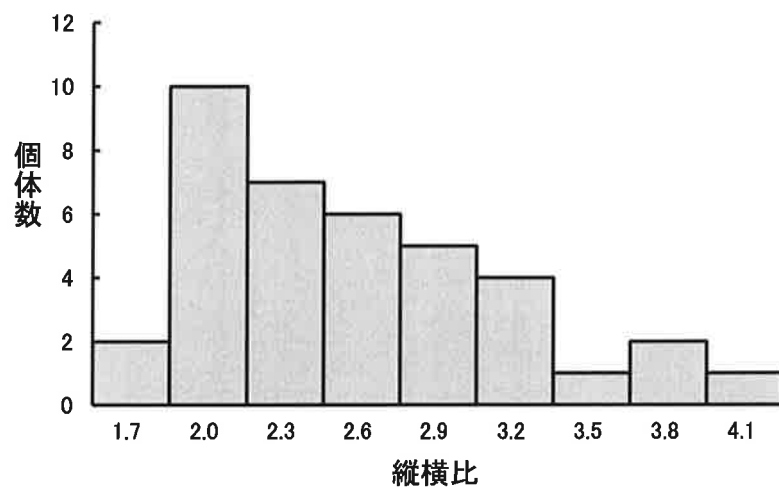


図45. 供試した個体におけるキリンソウ葉の縦横比の度数分布.

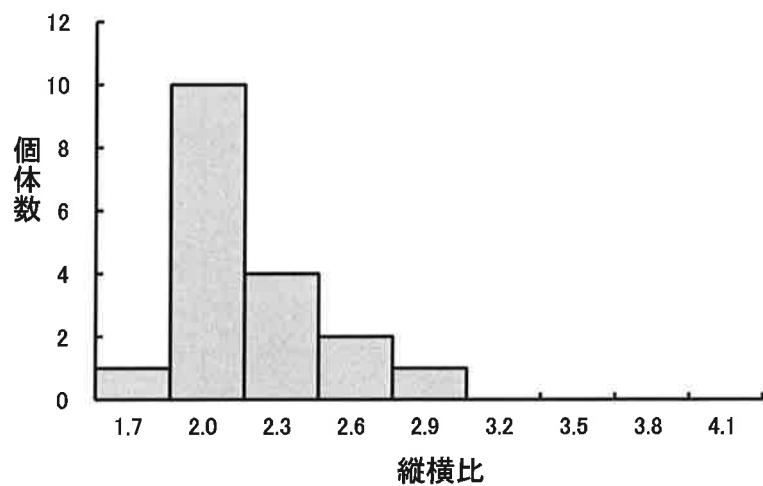


図46. 低感光性個体におけるキリンソウ葉の縦横比の度数分布.

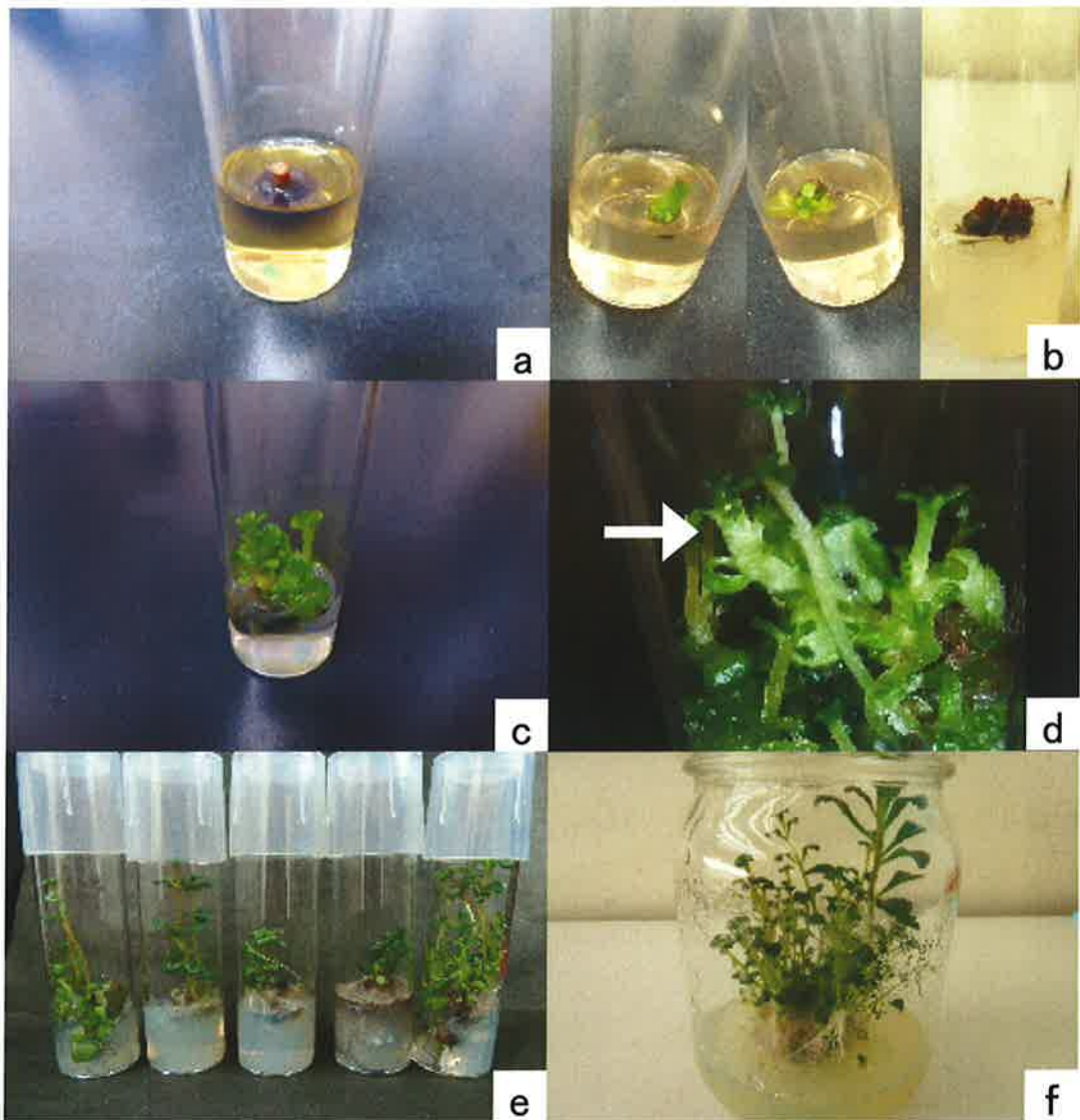


図47. キリンソウの茎切片からの植物体再生.

- a : カルス誘導培地に置床7日目に褐変物質を溶出した茎切片
- b : カルス誘導培地に置床29日目の緑色のカルス (左), 不定芽を分化したカルス (中央), 褐変したカルス (右)
- c : 不定芽誘導培地に移植後20日目にビトリフィケーションを生じた不定芽
- d : 寒天培地に移植後新たに分化した正常な不定芽
- e : 不定芽誘導73日目の3cm以上の不定芽
- f : 不定根誘導14日目の再分化植物体

表1. 供試材料の個体記号, 採取地および採取年月日

個体記号	採取地	採取年月日	備 考
幌加内1	雨竜郡幌加内町	2011年5月27日	
幌加内2	雨竜郡幌加内町	2011年5月27日	
幌加内3	雨竜郡幌加内町	2011年5月27日	
幌加内4	雨竜郡幌加内町	2011年5月27日	
幌加内5	雨竜郡幌加内町	2011年5月27日	
幌加内6	雨竜郡幌加内町	2011年5月27日	
幌加内7	雨竜郡幌加内町	2011年5月27日	
厚岸1	厚岸郡浜中町	2011年7月13日	
厚岸2	厚岸郡浜中町	2011年7月13日	
厚岸3	厚岸郡浜中町	2011年7月13日	
厚岸4	厚岸郡浜中町	2011年7月13日	
本別	中川郡本別町	2011年7月15日	
占冠	勇払郡占冠村	2011年7月15日	
芦別	芦別市頼城町	2011年7月21日	挿し木として採取後、ポットで養成
静内1	日高郡新ひだか町	2011年7月 7日	
静内2	日高郡新ひだか町	2011年7月 7日	
静内3	日高郡新ひだか町	2011年7月 7日	
静内4	日高郡新ひだか町	2011年7月 7日	
静内5	日高郡新ひだか町	2011年7月 7日	
鹿部	茅部郡鹿部町	2011年6月15日	
川汲	函館市川汲町	2011年6月15日	
八雲1	二世群八雲町	2011年6月16日	
八雲2	二世群八雲町	2011年6月16日	
八雲3	二世群八雲町	2011年6月16日	
泊	古宇郡泊村	2011年7月 1日	
忍路1	小樽市忍路町	2011年7月 1日	
忍路2	小樽市忍路町	2011年7月 1日	
雪印1	虻田郡京極町		雪印種苗より2008年に分譲後ポットで養成
雪印2	虻田郡京極町		雪印種苗より2009年に分譲後ポットで養成
雪印3	虻田郡京極町		雪印種苗より2010年に分譲後ポットで養成
雪印4	虻田郡京極町		雪印種苗より2011年に分譲後ポットで養成
増毛雪印	増毛郡増毛町		雪印種苗より2011年10月に分譲
厚岸雪印1	厚岸郡		雪印種苗より2011年10月に分譲
厚岸雪印2	厚岸郡		雪印種苗より2011年10月に分譲
不明雪印1	不明		雪印種苗より2011年9月に分譲
不明雪印2	不明		雪印種苗より2011年9月に分譲
不明雪印3	不明		雪印種苗より2011年9月に分譲
北大1	不明		北大植物園より2011年7月に挿し木で分譲
北大2	不明		北大植物園より2011年7月に挿し木で分譲

表2. 越冬芽の伸長程度および融雪後の越冬芽数

個体記号	越冬芽の伸長程度			越冬芽数
	9月16日	10月5日	11月11日	
幌加内1	1	1	2	12
幌加内2	1	1	2	0
幌加内3	0	1	2	6
幌加内4	0	0	1	37
幌加内5	0	0	1	13
幌加内6	1	2	2	0
幌加内7	1	1	2	27
厚岸1	1	2	5	0
厚岸2	1	2	5	0
厚岸3	0	2	4	14
厚岸4	1	2	5	0
本別	1	2	4	0
占冠	2	3	5	0
芦別	未定植	0	枯死	0
静内1	1	2	3	8
静内2	1	2	5	0
静内3	0	2	3	0
静内4	1	2	3	0
静内5	1	3	4	0
鹿部	0	1	4	13
川汲	1	2	3	7
八雲1	1	1	2	20
八雲2	0	2	3	0
八雲3	0	1	4	0
泊	0	1	1	5
忍路1	2	3	4	0
忍路2	2	3	4	0
雪印1	3	4	5	0
雪印2	2	3	5	0
雪印3	1	4	5	0
雪印4	2	2	5	5
増毛雪印	未定植	1	2	0
厚岸雪印1	未定植	1	2	13
厚岸雪印2	未定植	1	2	0
不明雪印1	0	1	1	28
不明雪印2	0	1	2	19
不明雪印3	0	1	2	11
北大1	未定植	0	1	1
北大2	未定植	0	1	0

表3. カルス誘導期の培地組成

MS基本培地	
イノシトール	100 mg/l
シヨ糖	30 g/l
2, 4-D	0.1 mg/l
BA	0.5 mg/l
ゲランガム	2 g/l
pH	5.8

表4. 不定芽誘導期の培地組成

MS基本培地	
イノシトール	100 mg/l
シヨ糖	30 g/l
NAA	0.3 mg/l
BA	2.0 mg/l
ゲランガム	2 g/l
pH	5.8

表5. 不定根誘導期の培地組成

MS基本培地	
イノシトール	100 mg/l
シヨ糖	30 g/l
IBA	2.0 mg/l
寒天	10 g/l
pH	5.8

表6. PCR反応に用いた葉緑体ゲノム領域とプライマー配列

領域	プライマー配列
<i>trn</i> L (UAA) 3' exon	GGTTCAAGTCGCTCTATCCC
<i>trn</i> F (GAA)	ATTTGAACTGGTGACACGAG
<i>trn</i> H (GUG)	ACGGGAATTGAACCGCGCA
<i>psb</i> A	CGAAGCTCCATCTACAAATGG

表7. PCR反応プログラム

予備加熱	95°C	10min	} 40サイクル
熱変性	94°C	30s	
アニーリング	60°C	60s	
伸長反応	72°C	60s	
反応停止	72°C	7min	
冷却	4°C	∞	

表8. シークエンス反応液の調整

Reaction Mix (Big Dey ver1.1)	1.0μl
5×Sequence Buffer	1.5μl
Primer (5倍希釈)	0.5μl
DNA template	0.5μl
滅菌水	6.5μl
計	10.0μl

表9. シークエンス反応プログラム

予備加熱	96°C	10min	} 25サイクル
熱変性	96°C	30s	
アニーリング	50°C	15s	
伸長反応	60°C	4min	
冷却	10°C	∞	

表10. キリンソウの葉緑体ゲノム *trn* L3 'exon - *trn* F 遺伝子間領域の塩基配列

1-50	TCCCTCTATC	CCCAAAAAGC	GCTTTTGATT	AGCTAACTCA	TTTTCCTATT
51-100	TTTTTTAACG	GTTCAAATCA	AAAATGGGTC	TCTTCCTCCA	CAAAGGTATT
101-150	CGAGCAGCAA	ATTTTTGATC	TTATCAACAG	TCTTGTGATA	TAAATTATAC
151-200	ATGAACAGCT	TTGAGCAAGG	AGTACTCCAC	TCATTTGAAT	GATCCCAAC
201-250	ACATATCATT	ACTCGTACTA	AGACTTACAT	ACAAAGTATT	CTTTTCAAGA
251-300	TCTAGGAAAT	TAGGGGGGCT	AGATAAGACT	TTGTAATACC	CTTTCACCTT
301-350	TTAATTGAC	ATAGACTCCA	GTTTTCAAAT	AAAATGAGTA	GATGATGCGT
351-400	AGGGAATGGT	CGGGATAGCT	CAGTTGGTAG	AGCAGAGGAC	TGAAAATCCT
401-407	CGTGTCA				

表11. キリンソウの葉緑体ゲノム *trn* H - *psb* A 遺伝子間領域の塩基配列

1-50	GTACATCCGC	CCCTTATCTA	GCTAAAGGAT	TTTCTCTTTT	TTCCATTCAT
51-100	CATTATTGTA	TATTCATCAT	TATTGTAATT	GTATTTATTC	TTACTTTCAT
101-150	ACTTAGATCG	AGATATTCTA	TTAGACGTAG	AATGCCAATC	TTTAAAAGAA
151-200	AATGTAAAAA	AAAGGAGTAA	TCAGCTGTGA	CACGTTCACT	AAAAAAAAAT
201-250	CCTTTTGTAG	CTAATCATTT	AGCAGGAAAA	ATGGAAAAAC	TCAACATGAG
251-300	GGAGGAGAAA	GAAATAATAG	TAACTTGGTC	TCGGGCATCT	ACCATTATAC
301-350	CCACAATGAT	TGGCCATACA	ATCGCTATTC	ATAATGGAAA	AGAACATTTA
351-400	CCTATTTATA	TAACGGATCG	TATGGTAGGT	CACAAATTGG	GAGAATTCGC
401-450	GCGAGACATG	GCCTACTCTG	ACTTTCGGAG	AAACGATAAT	AAATCTCGTC
451-500	GTAAAGTCGT	TAATTTGGCG	GAATCAAAAA	AGAATAGAAT	AAATCATTCA
501-550	AAGCAAAGAA	GGGGATATGC	CCATACATAT	CTTTCTAAAG	GAAGATACAT
551-565	ATGGGTATAG	CCCCT			