

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 19 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07640

研究課題名(和文) 新しい栄養系トレニアの創出・増殖・保存に関する研究

研究課題名(英文) Creation, propagation and preservation of Torenia genetic resources

研究代表者

深井 誠一 (FUKAI, SEIICHI)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：80228858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、トレニア属植物について現在利用可能な遺伝資源の評価をした上で、新たな育種素材を創出すべく新規利用の原種を含む6種(*T. fournieri*、*T. concolor*、*T. baillonii*、*T. bicolor*、*T. siamensis*、*T. hirsutissima*)で種間交雑を試み、胚救出法を用いて14交配組み合わせで後代を得、さらに三元交配を試み変異の幅が拡大できることを示した。得られた新規交配種の形質を評価するとともに、それらの簡易な栄養繁殖法と凍結保存による遺伝資源の保存法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、現在流通するトレニア遺伝資源を評価し、それを豊かにするため6種のトレニア種の相互交雑を行い、新規雑種を含む多くの雑種を得、さらにそれを元に戻し交配等を行い花色の変異幅拡大を達成した。さらにこうして得られた交配種の効率的繁殖法ならびに保存法を確立した。これらの研究成果は、学術的にも園芸産業上においても極めて重要な情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the currently available genetic resources in the genus *Torenia* and attempted interspecific crosses with six species (*T. fournieri*, *T. concolor*, *T. baillonii*, *T. bicolor*, *T. siamensis*, and *T. hirsutissima*), including newly available species, to create new breeding material, and obtained progenies in 14 cross combinations using the embryo rescue method, and further tried triparental crosses to show that the range of variation can be expanded. The traits of the new hybrids were evaluated, and their simple vegetative propagation and cryopreservation methods were established.

研究分野：花卉園芸学

キーワード：トレニア 遺伝資源 種間交雑 凍結保存 栄養繁殖 花色

## 1. 研究開始当初の背景

トレニアは、温帯地域で重要な夏の花壇用植物であり、わが国では現在種子系および栄養系品種が商業的に流通している。しかし、現在利用されているトレニア属植物の遺伝資源は限られており、また育種が民間で行われてきたため、育種情報が公開されていない。そこで本研究は、トレニア属植物について現在利用可能な遺伝資源の評価をした上で、新たな育種素材となる遺伝子型を創出すべく種間交雑を試み、その育成ならびに繁殖法を検討し、さらにそれら遺伝資源の保存法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究課題「新しい栄養系トレニアの創出・増殖・保存に関する研究」では、近年発展著しい栄養系トレニアについて、新しい栄養系トレニアの創出とその効率的生産体系に向けた増殖方法、更には安定的な遺伝資源の保存方法を確立することを目的とした。

上記の目標を達成するため、①トレニア属植物について現在利用可能な遺伝資源の評価、②胚培養を用いた種間交雑の検討、③更なる変異幅拡大の獲得、④葉挿し繁殖法を確立、⑤新しい超低温保存法であるクライオプレート法による遺伝資源の保存の検討の5項目について研究した。

## 3. 研究の方法

植物材料は、商業的に扱われているトレニア品種を取集するとともにタイ国王立シリキット植物園と遺伝資源提供に関するMOUを交わし国内で手に入らない3種のトレニアを導入した。

交配には胚珠培養の手法を援用し、得られた植物の雑種性はクロロプラストDNAをターゲットにしたPCR-RFLPにより評価、また倍加は効率的不定芽再生系の確率とそれを利用したコルヒチン処理により行った。

花色は、RHS カラーチャートで判定するとともに、花卉からアントシアニンを抽出し、HPLCにより分離同定した。

繁殖は、コスト面から葉挿し繁殖の適応性を検討した。

遺伝資源の保存は、茎頂を用いて近年開発されたクライオプレート-ヴィトリフィケーション法による超低温下保存の最適条件を検討した。

## 4. 研究成果

### 4-1. トレニア属植物の遺伝資源評価

日本で商業的に流通している25品種を集めその生育特性および花の形質等を調査した。諸形質ならびに染色体数および核DNA量の相対値等から交配親の推定を行った。花色は薄紫から濃い紫、青、赤紫、黄色および白などがあり、さらに黄色のブロッチの有無でそれぞれの品種は特徴付けられた。SEM観察の結果、品種によって花びら表面の細胞の形状が異なることがわかった。*Torenia concolor*は低い円錐形、*T. fournieri*は円錐形、*T. baillonii*は鋭い円錐形であった。種間交配種は親と思われる種の間隔的な細胞形状をしていた。草姿は*T. fournieri*は直立型、*T. concolor*と*T. baillonii*はともに匍匐型であった。種間交配種は半直立型から匍匐型であった。また、葉の大きさや形も品種によって異なった。形態的特徴より、現在流通している交配種の育成には、*Torenia fournieri*、*T. concolor*、*T. baillonii*の3種が関与していると考えられた。栄養繁殖系品種には、二倍体、三倍体、四倍体が含まれていた。倍数性の高い品種はより大きな花を有していた。(Acta Horticulturae, 1167, 205-211.)

*T. fournieri*に含まれるアントシアニンをHPLCで分析、同定した。その結果マルビジン3,5-ジグルコシド、ペオニジン3,5-ジグルコシド、ペチュニジン3,5-ジグルコシド、デルフィニジン3,5-ジグルコシド、シアニジン3,5-ジグルコシドおよびペラルゴニジン-3,5ジグルコシドの6種が検出され、その量的組み合わせにより紫、青紫、ピンク、白などの花色発現になっていた。(Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ., 71, 15-20 (2019))

### 4-2. 交雑育種への利用

#### (1) 種間交雑種の獲得

遺伝的背景の拡大を図るため、*Torenia fournieri*、*T. concolor*、*T. baillonii*の3種に加え*T. bicolor*、*T. siamensis*、*T. hirsutissima*の未利用トレニア属植物3種が導入され、合計6種で相互交雑が試みられた。通常の交配では、30交配組み合わせの内わずか3組み合わせで成熟種子が得られた。種間交雑ではしばしば受精胚が発達を途中で停止することが知られている。このため交配10日後に組織培養により胚救出を行ったところ、新たな14組み合わせで植物体を得ることができた(第1表)。得られた植物は葉緑体DNAをターゲットとしたPCR-RFLPにより、全てが真の雑種であることが確認された。この14組み合わせのうち13組み合わせは、これまで雑種獲得の報告のない新規交配種である(第1図)。得られた雑種は両親の中間の染色体数を示し、花および茎葉の形質は両親の中間であった。花色は両親の形質を受け継ぎ、含まれる花色素の種類と量から見ても両親の中間であった。以上の結果、トレニア種間交雑における胚珠培養の有効性が確認された。(Hortic. Environ. Biotechnol., 60, 443-452 (2019).)

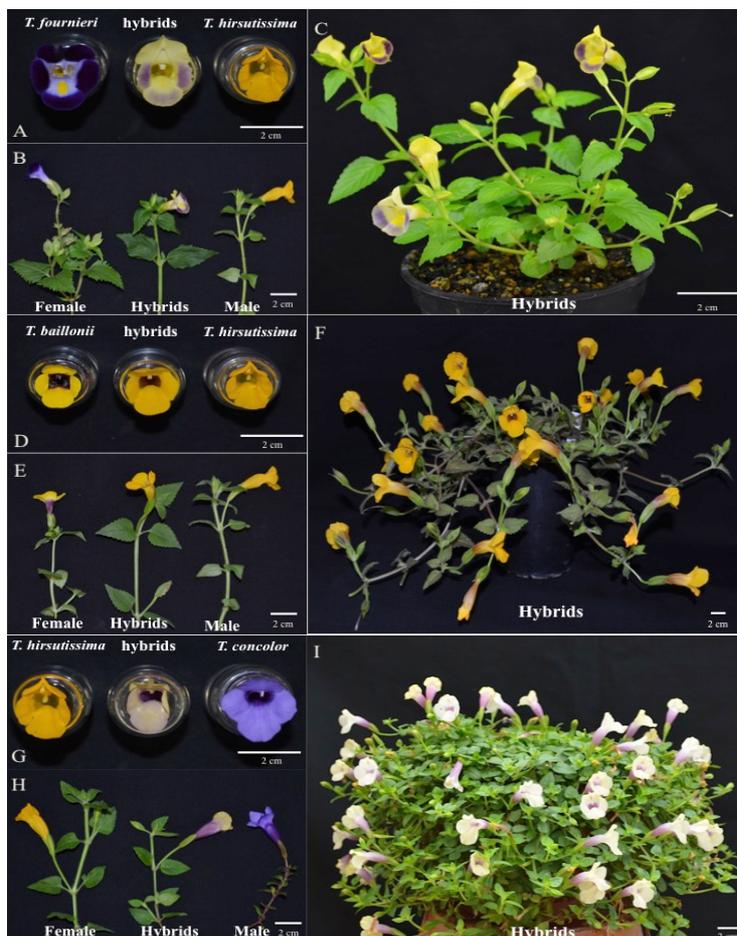
第1表 6種トレニアの相互交配結果

Male \ Female	<i>T. fournieri</i>	<i>T. baillonii</i>	<i>T. bicolor</i>	<i>T. concolor</i>	<i>T. hirsutissima</i>	<i>T. siamensis</i>
<i>T. fournieri</i>		83.3/4.8/48.7 NT	96.6/5/95 NT	0/-/ 10 (4.0)	0/-/ 4 (2.0)	0/-/ 0
<i>T. baillonii</i>	0/-/ 1 (0.4)		0/-/ 1 (0.4)	0/-/ 3 (1.2)	0/-/ 1 (0.4)	0/-/ 1 (0.4)
<i>T. bicolor</i>	0/-/ 0	86.7/25.3/94.2 NT		0/-/ 4 (1.6)	0/-/ 0	0/-/ 0
<i>T. concolor</i>	0/-/ 0	0/-/ 0	0/-/ 1 (0.4)		0/-/ 0	0/-/ 5 (2.0)
<i>T. hirsutissima</i>	0/-/ 3 (1.2)	0/-/ 4 (1.6)	0/-/ 8 (3.2)	0/-/ 2 (0.8)		0/-/ 0
<i>T. siamensis</i>	0/-/ 0	0/-/ 0	0/-/ 0	0/-/ 0	0/-/ 0	

上段：通常交配における種子形成率／1 さやあたりの平均種子数／種子発芽率

下段：胚培養した 250 個の胚珠から得られた発芽個体数 (%)

得られた雑種は全て不稔性を示した。遺伝資源として利用するためには稔性の回復が求められる。まず *in vitro* で育成した植物の葉を用いて、葉外植体に人為的に細かな傷を付けそれをベンジルアミノグリシン 2 mg L<sup>-1</sup> を含む培地で培養することで効率的な不定芽再生系を確立した。傷をつけた葉外植体を BA を含む MS 培地で 15 日間培養した後、BA を含まない MS 培地に移植し、コルヒチンを与えた。コルヒチン濃度の増加に伴い、1 外植体あたりの再生芽の数は 12 から 0.26 に減少した。1500 mg L<sup>-1</sup> のコルヒチンを 20 日間処理が、四倍体の誘導に最適であることが明らかとなった。四倍体のトレニアはすべて稔性のある花粉を生産し、花粉の発芽率は交配種によって 8.7 から 65.4%まで変化した。四倍体は、二倍体の植物に比べて花や葉が大きかった。(Acta Horticulturae 1263, 299-307(2019))



第1図 得られた種間交雑種の例

## (2) 変異幅の拡大

花の色や形のバリエーションを増やすことは、花卉園芸作物として成功するための重要なポイントである。まず様々な花色を持つ *T. fournieri* と黄色の花を持つ *T. baillonii* (B) の交配した。 *T. fournieri* のバイオレット、ディープピンク、ホワイトと B の後代は、親の中間的な染色体数を持ち、花卉の色の変異幅が少なかった。これらは雄性不稔であったが、子房は部分的に機能していた。そこで種間雑種のうちの1つを、両方の親と戻し交配した。 *T. fournieri* バイオレット (TFV×B)×B は、(TFV×B)×TFV に比べて、花卉の色の変異幅が豊富であった。それぞれの子孫の染色体数を調べると、(TFV×B) では染色体数が  $2n=16$  であるものと  $2n=17$  であるものが出現し、その数から  $n=9$  の雌性配偶子が  $n=8$  の雌性配偶子よりも子孫を作る可能性が高いことが示唆された。さらに  $2n=16$  個体のみが花粉稔性を有していた。(TFV×B)×TFV の子孫は、花卉のカラーバリエーションに乏しかったが、その自家受粉により黄色を含まない花卉のカラーバリエーションを持つ子孫が得られた。さらに、(TFV×B)×B の自家受粉では、幅広い黄色ベースの花弁色の変異幅を示す子孫が得られた。今回の結果は、バッククロスと自家受粉によって、トレニアの種間交配種の花色の変異幅の拡大が期待できることを示している。また戻し交配の中で、鋸歯状の花弁を持つ植物が出現した。これを用いさらに交配を重ねることで、新しい特性が子孫に受け継がれた。(Acta Horticulturae 1288, 153-162 (2020))

花色や形態の変異幅を増やすには、三元交配も効果的と考えられる。3つのゲノムが組み合わさることで、観賞価値の高い新たな表現型が生まれる可能性がある。( *T. bicolor* × *T. baillonii* ) の稔性花粉を、 *T. concolor*、 *T. fournieri*、 *T. hirsutissima*、 *T. siamensis* の4種に交配した。 *T. fournieri* × ( *T. bicolor* × *T. baillonii* ) の交配組み合わせだけが5個体の子孫を残した。次に、3つの交配種 ( *T. fournieri* × *T. baillonii* )、 ( *T. fournieri* × *T. bicolor* ) および ( *T. bicolor* × *T. baillonii* ) を子房親として用い、他のトレニア種と交配した。その結果、 ( *T. fournieri* × *T. baillonii* ) × *T. siamensis* から3個体の子孫が、 ( *T. fournieri* × *T. baillonii* ) × *T. concolor* から2つの子孫が得られた。子孫の雑種性はPCR-RFLPによって確認され、試験した植物はすべて真のハイブリッドであった。三元交配種の染色体数は親の中間であり、すべて雄性不稔であった。花色は、ほとんどが両親の中間色で、変異幅は小さかった。(Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ., 72, 17-23 (2020))

三元交配によって作出された ( *T. fournieri* × *T. baillonii* ) × *T. concolor* と *T. fournieri* × *T. concolor* の倍加体に ( *T. fournieri* × *T. baillonii* ) × *T. fournieri* の自殖後代のうち鋸歯状の花弁を持つ白色個体を掛け合わせて作出された C2、C3、C4、C5 の特性調査を行った。草姿、花の特性、葉挿し繁殖性、宿根性等の調査結果より、これら新系統のトレニアはハンギング栽培に適していると考えられた。

### 4-3 効率的栄養繁殖法の確率

得られた交配種は、栄養系品種として実用化が目指される。また夏花壇に利用されるトレニア苗の需要は、春の一時に集中する。このためには経済的かつ効率的な栄養繁殖法の確立が求められる。本研究では、葉挿しによるトレニアの効率的な栄養繁殖法の確立を目指した。25品種のトレニアを、50%遮光のもとで栽培した。葉は、茎の上、中、下の3箇所(約15~20cm)から採取した。この葉から、葉柄のある全葉(WP)または葉柄のない全葉(W)、葉の上半分(UH)または下半分(LH)の4種類の外植体を作成し、メトロミックス培地に挿し温室内で25日間培養した(第2図)。外植体の形は、外植体あたりのシュート数に影響を与え、WPは、W+P、UH、LHに比べて、外植体あたりのシュート数が多かった。またシュートの上位と中位から採取した葉はシュートの数が多く、シュートの長さも長く、高い再生能力を示した。さらに6月(夏)と11月(冬)に、W型外植体をシュートの上部から採取し、自然光を88%遮光した20°C、25°C、30°C恒温条件下で培養した。両季節とも温度が高い条件で高いシュート再生が観察された。葉挿しの組織学的観察では、挿し木後10日目に、下端の維管束付近の膨らんだ部分の表皮下組織に分裂組織が観察された。試験したトレニアの遺伝子型のほとんどで、葉挿しが適応可能



第2図 トレニアの4種類の葉を用いたシュート再生。A)葉柄付きの全葉(W+P)。B)葉全体(W-P)。C)葉の下半分(LH)。D)葉の上半分(UH)。サマーウェーブブルーを挿し木してから25日目。

であり、25 遺伝子型のうち 12 では、高いシュート再生率（85%以上）を示した。(Propagation of Ornamental Plants, 17, 55-63(2017))

#### 4-4 遺伝資源の凍結保存

栄養系トレニア品種の母株ならびに交配のための遺伝資源の維持保存が必要である。凍結保存は、母植物を長期間保存するための最も信頼できる技術の一つである。このため *in vitro* のトレニア茎頂を用いて、新規の凍結保存法であるクライオプレート法を検討した。茎頂のサイズ、前培養の期間と温度、PVS2 への暴露時間、母植物の age と遺伝子型の違いを検討した。トレニア交配種 'Summer Wave Blue' では、2~8 週齢の母株から採取した小さなサイズの摘出株 (0.2mm) を、0.3 M スクローズ MS 培地を用いて 10°C で 2 日間前培養し、液体窒素処理の前に PVS2 で室温 10 分間処理した場合、最も高い再生率 80% を示した。他の *Torenia* 種の再生率は遺伝子型によって 0~80% の範囲で変化した。(Acta Horticulturae 1208, 125-130(2018))

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Laojunta, T., K. Tamiya, T. Narumi - Kawasaki and S. Fukai	4. 巻 60
2. 論文標題 A new interspecific hybrid of <i>Torenia</i> obtained through ovule culture.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hortic. Environ. Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 443-452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13580-019-00136-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Laojunta, T., T. Narumi - Kawasaki and S. Fukai	4. 巻 1263
2. 論文標題 Chromosome doubling of <i>Torenia</i> hybrids by using efficient adventitious shoot regeneration in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 299-307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/actahortic.2019.1263.40	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Laojunta, T., K. Tamiya, T. Narumi - Kawasaki and S. Fukai	4. 巻 1208
2. 論文標題 Cryopreservation of in vitro grown <i>Torenia</i> by cryo-plate vitrification method	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 125-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2018.1208.18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Laojunta, T., T. Narumi-Kawasaki and S. Fukai	4. 巻 1167
2. 論文標題 Characteristics of commercial <i>Torenia</i> cultivars.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 205-211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2017.1167.31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Laojunta, T., T. Narumi-Kawasaki and S. Fukai	4. 巻 17
2. 論文標題 Efficient vegetative propagation of torenia cultivars by leaf cutting	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Propagation of Ornamental Plants	6. 最初と最後の頁 55-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Laojunta, T., Narumi -Kawasaki, T. T. Takamura and Fukai, S.	4. 巻 1288
2. 論文標題 Expansion of flower trait variations in interspecific hybrids between <i>Torenia fournieri</i> and <i>Torenia baillonii</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 153-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17660/ActaHortic.2020.1288.23	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukai, S. and Laojunta, T.	4. 巻 1288
2. 論文標題 New development of <i>Torenia</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 51-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17660/ActaHortic.2020.1288.7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Laojunta, T., Narumi -Kawasaki, T. Takamura, T. and Fukai, S.	4. 巻 72
2. 論文標題 New tri-parental interspecific <i>Torenia</i> hybrids via ovule culture.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.	6. 最初と最後の頁 17-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Laojunta, T., Narumi-Kawasaki, T., Takamura, T. and Fukai, S.	4. 巻 71
2. 論文標題 Anthocyanins determining flowers color of Torenia fournieri	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tech. Bull. Fac. Agr. Kagawa Univ.	6. 最初と最後の頁 15-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Laojunta, T., T. Narumi-Kawasaki, S. Fukai, P. Suksathan.
2. 発表標題 Tri-parental hybrids of torenia via ovule culture.
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Laojunta, T., T. Narumi-Kawasaki, S. Fukai, P. Suksathan.
2. 発表標題 New interspecific hybridization of torenia.
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------