様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　2 年　6 月　8 日現在

機関番号：16201
研究種目：基盤研究(C)(一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K07641

研究課題名（和文）未利用遺伝資源を活用した新しい露地栽培型シクラメンの開発

研究課題名（英文）Studies on breeding of novel GARDEN CYCLAMEN by using the wild genetic resources

研究代表者
高村　武二郎（Takamura, Takejiro）

香川大学・農学部・教授

研究者番号：40253257

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：　C. hederifoliumとC. purpuarscensとの種間交雑後に倍加処理を伴う胚珠培養を行った結果，複二倍体を得ることは容易ではないが，胚珠培養の援用により安定して種間雑種が獲得できることが示された．また，C. coumまたはC. alpinumとC. mirabileとの種間交雑においても，胚珠培養の援用により種間雑種を作出できることが示され，胚珠培養の援用により多くの野生種間の種間雑種が作出できる可能性が示された．さらに，いくつかの種特異的な有用形質が異ゲノム間の交雑でもその雑種に導入可能であることが示唆された．

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究の成果により，未利用遺伝資源を利用した，既存の品種の枠を超えた遺伝資源の開発の可能性が広がり，屋外栽培用のシクラメンの品種開発の発展につながることが期待される．また，これまでにないゲノム構成の種間雑種の作出や異ゲノム間の交雑における有用形質の遺伝様式の解明は，園芸育種学の学術的進展に貢献できるものと期待できる．

研究成果の概要（英文）：　Interspecific hybrids between C. hederifolium and C. purpuarscens were obtained by ovule culture after their interspecific crosses, whereas no amphidiploid was obtained by the ovule culture with polyploidizaton treatment. Interspecific hybrids between C. coum and C. mirabile, and between C. alpinum and C.mirabile were also obtained by the ovule culture. These results suggest that many kind of interspecific hybrids in the genus Cyclamen may be obtained by embryo rescue after the interspecific crosses. Furthermore, it was also suggested that some specific traits of a parent in interspecific crosses in the genus Cyclamen could be observed in the progenies.

研究分野：園芸科学

キーワード：シクラメン　種間雑種　遠縁交雑　花色

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

シクラメンは，冬の鉢花として日本で最も重要な品目の１つであるが，近年では，露地栽培用途も含むいわゆるガーデンシクラメンとしての需要が急増し，定着している．しかしながら，現存の品種は室内観賞用の鉢花として育種されてきたため，ガーデンシクラメンとして必要な性質を備えているとは言い難く，露地での栽培に適したガーデンシクラメン品種の開発が望まれている．

また，既存のシクラメンの園芸品種のほとんどすべてが *Cyclamen* 属22種のうちの *C. persicum* １種のみから成立しており，他の野生種は，鉢物用の芳香性シクラメン数品種の作出に *C. purpurascens* が関与しているのみである．一方，*C. persicum* 以外の *Cyclamen* 属植物中には，耐寒・耐暑性，赤葉や多様な形の葉など園芸品種には欠けている有用形質を有するものがあり，ガーデンシクラメンに適した品種を育成するうえで，未利用の有用遺伝資源であると考えられる．しかし，これら野生種を利用したガーデンシクラメン品種は育成されていない．これは，*Cyclamen* 属には 22 種あるものの，*C. persicum* が他の 21 種と比較して，室内観賞用の育種素材として明らかに優れていたことによるところが大きい．しかし，現在の園芸品種は，耐寒・耐暑性に乏しい，日本の気候では鉢物栽培時でさえも灌水時に塊茎が水に濡れると塊茎が傷んで枯れやすい，など屋外栽培には本来不向きであり，現在急増しているガーデンシクラメン等の用途には，鉢花用品種で比較的強健な品種をとりあえず適用しているものがほとんどであるのが実情である．一方，*C. persicum* 以外の野生種を収集し，その特性を調査したところ，園芸品種と比較して，鉢花用途としては見劣りするものの，ガーデンシクラメン等の屋外栽培用途としては，強健性，耐寒・耐暑性，多様な葉の変異など園芸品種には欠けている有用形質を有する種が多く認められ，これら未利用遺伝資源の利用によりガーデンシクラメンに適した品種の育成が可能になるものと考えられた．また，これら有用形質の利用に関しては，これらの形質の発現機構の解明や形質発現を支配する遺伝子の特定がなされてないものも多く，また複数の遺伝子による支配の可能性もあること等から，分子育種よりも種間交雑や染色体操作による育種素材開発が適当であると考えられた．

２．研究の目的

本研究を含む一連の研究の最終目標は，シクラメンの野生種を利用して開発した新品種の開発，特に未利用遺伝資源を活用した新しい露地栽培型シクラメンを開発し，園芸育種学の進展と花卉産業の振興に寄与することである．その中で本研究では，

（１）　未利用遺伝資源を用いた種間交雑と染色体操作による遺伝資源開発

（２）異なるゲノムを有する種間雑種における種特異的な形質・特性の発現様式の把握

を個別の研究課題とし，これらの課題を解決することで得られた知見を統合し，未利用の有用遺伝資源を利用した新しいシクラメン育種素材の開発に貢献することを目的とした．

３．研究の方法

（１）　未利用遺伝資源を用いた種間交雑と染色体操作による遺伝資源開発

① *C. hederifolium* と *C. purourascens* との種間交雑による遺伝資源開発

①-1 *C. hederifolium* と *C. purourascens* との種間交雑による種間雑種および複二倍体の作出

強い耐寒・強健性と多様な葉の変異を示す *C. hederifolium* と芳香性・四季咲き性を示す *C. purpurascens* との種間交雑を行い，交雑後の胚珠培養および胚珠培養時の倍加処理を試みた．いずれの交雑においても香川大学農学部で栽培されている株を用いた．交雑 28 日後に果実を採取し，表面を殺菌後，胎座ごと摘出した胚珠を 20℃暗黒下で培養した．基本培地には 1/2N-MS 培地に 87.7 mM マルトース, 10％ココナッツウォーター, 0.2％ジェランガムを添加し，pH を 5.8 に調整したものを用いた．また，倍加処理剤として 25 µM アミプロホスメチル (APM)を用いて 4, 7, 14 または 21 日間の処理を行った．培養した胎座付き胚珠は，APM 無添加区では 7 日後に，APM 添加区ではそれぞれの倍加処理期間後に APM 無添加の基本培地に移植した．小植物体が形成された場合には，フローサイトメトリーを用いて雑種性および倍数性の検定を行った．

また，改めて 2 回目の実験として *C. hederifolium* と *C. purpuarscens* との種間交雑後の胚珠培養時に 1 µM APM を用いて 4, 7 または 14 日間の処理を行った．さらに 3 回目の実験として，*C. hederifolium* と *C. purpuarscens* との種間交雑後の胚珠培養時に 125 µM コルヒチンまたは 1 µM APM を用いた 7 または 14 日間の倍加処理を行い，種間雑種と複二倍体の作出を試みた

①-2 *C. hederifolium* と *C. purourascens* との服二倍体と推定された小植物体の倍数性

既出の *C. hederifolium* と *C. purpurascens* との倍加処理を伴った胚珠培養により得られた種間雑種およびその倍数体と推定された個体で，香川大学農学部の温室で順化・育成された成株を用い，フローサイトメトリーにより，その成株時点での倍数性を調査した．

①-3 *C. hederifolium* と *C. purourascens* との種間雑種の倍加

香川大学農学部の無加温ビニルハウスで栽培されている *C. hederifolium* と *C. purpurascens* との種間雑種個体の地上部を除去し，倍加剤を添加したラノリンペーストを除去した地上部の基部に塗布した．ラノリンペーストは, 10 mL ラノリンと 10 mL の超純水 (対照区), 50 µM APM, または 250 µM APM あるいは 12.5 mM コルヒチン水溶液を混合した．塗布後はビニルハウスで栽培し，ラノリンペーストを塗布した部位から萌芽した葉の倍数性を調査するとともに，自花の花粉を用いて自殖を行い，種子形成の有無を調査した．

② *C. coum* および *C. alpinum* と *C,. mirabile* との種間交雑による遺伝資源開発

種子親には *C. coum* および *C. alpinum* を，花粉親には *C. mirabile* を用い，いずれの交雑においても,交雑後 7, 14, 21, 28 日後に果実を採取し, *C. hederifolium* と *C. purpurascens* との種間交雑と同様に胚珠培養を行った．基本培地は， *C. hederifolium* と *C. purpurascens* との種間交雑時と同様としたが, *C. coum* と *C. mirabile* の交雑後の胚珠培養においては, 培地中のマルトースを同濃度のスクロースに置き換え，1/2N-MS 培地以外に，MS 培地，1/4N-MS 培地および B5 培地 (Gamborg ら, 1968)を用いて基本培地の検討を行い, *C. alpinum* と *C. mirabile* の交雑後の胚珠培養では 1/2N-MS 培地でのみ培養を行った．

また，改めて *C. coum* および *C. alpinum* と *C. mirabile* との交雑を行い，*C. coum*×*C. mirabile* では交雑 14 または 28 日後に，*C. alpinum*×*C. mirabile* では交雑 21 日後に果実を採取し，MS 培地，1/2N MS 培地，1/4N MS 培地および B5 培地で培養した．培地への添加物は前述の培地と同様とした．*C. alpinum*×*C. mirabile* では，小植物体の葉が展開した場合に，フローサイトメトリーによる雑種性および倍数性の検定を行った．

（２） 異なるゲノムを有する種間雑種における種特異的な形質・特性の発現様式の把握

① *C. hederifolium* と *C. purourascens* との種間雑種の特性

種間交雑後の胚珠培養により作出された *C. hederifolium* と *C. purpurascens* との種間雑種を香川大学農学部の無加温ビニルハウスで栽培し，2017 年 12 月から 2018 年 11 月まで各個体の開花，出葉または休眠期間を調査した．調査には，複二倍体でない種間雑種であることが確認された個体のみを用いた．

また，*C. hederifolium*，*C. purpurascens* および既に得られているそれらの種間雑種の花を開花当日に採取し，slip および eye の花色を RHS カラーチャートを用いて調査した．さらに，slip 部分の花色を色彩計（NR-12A，日本電色工業製）を用いて調査した．その後，slip と eye を切り分け乾燥させた花弁の slip 部分から 5%ギ酸メタノールで花色素を抽出し，花弁中のアントシアニンを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した．

② 園芸品種特有の花を有する品種と野生種との種間雑種の形質

種子親にペオニジン配糖体を主要花色素とする赤色花園芸品種‘ラルゴ’を，花粉親に *C. hederifolium* および *C. purpurascens* を用いて交雑を行った．交雑 28 日後の果実を採取し， *C. hederifolium* と *C. purpurascens* との種間交雑と同様に胚珠培養を行った．いずれの交雑組み合わせにおいても, *C. hederifolium* と *C. purpurascens* との種間交雑と同様の基本培地に, 0, 1 および 5 μM APM または APM 1 μM 相当のトクノールを添加した．倍加剤を添加した処理区においては, 7 日間培養した後に倍加剤無添加の基本培地に移植した．

また，‘ラルゴ’と *C. hederifolium* および *C. purpurascens* との種間雑種，ならびに既に得られていた複色花品種‘パピヨン’と *C. hederifolium* および *C. purpurascens* との種間雑種を香川大学農学部の温室で開花させ，その園芸品種特有の花色形質の発現を調査した．

４．研究成果

（１） 未利用遺伝資源を用いた種間交雑と染色体操作による遺伝資源開発

① *C. hederifolium* と *C. purourascens* との種間交雑による遺伝資源開発

①-1 *C. hederifolium* と *C. purourascens* との種間交雑による種間雑種および複二倍体の作出

1 回目の *C. hederifolium* と *C. purpurascens* との交雑後の胚珠培養において, 25 μM APM 21 日間処理以外の処理区で小植物体 (第 1 図)が形成された．得られた小植物体の倍数性検定を行った結果, 種間雑種と複二倍体と推定される個体が認められた．複二倍体と推定された個体は, 25 μM APM 4 日間処理区でのみ認められた．

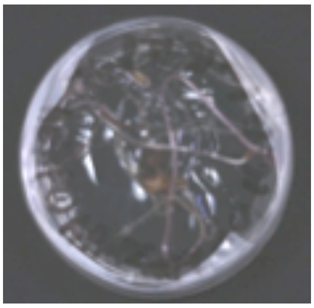
2 回目の *C. hederifolium* と *C. purpurascens* の交雑後の胚珠培養においても，倍加無処理区だけでなく，1μM APM ４，７および 14 日間処理区のいずれにおいても小植物体が形成された．しかしながら, これらの小植物体は全て倍加されていない種間雑種であると考えられた．また, さらに 3 回目の実験においても，種間交雑後の胚珠培養時に 1 μM APM を用いて 4, 7 または 14 日間の処理を行った結果, いずれの処理区においても複二倍体と考えられる個体は認められなかったが，種間雑種は得られた．

①-2 *C. hederifolium* と *C. purourascens* との服二倍体と推定された小植物体の倍数性

フローサイトメトリーによる倍数性検定の結果，幼苗時に複二倍体または複二倍体と種間雑種のキメラと考えられた全ての個体において, 核 DNA の蛍光強度のピークが両親のピークの中間に認められ,これらは全て通常の種間雑種であると推定された (第 1 表). また, 幼苗時に二基三倍体と考えられた個体および幼苗時に二基三倍体と六倍体のキメラと考えられた個体は, 全て二基三倍体であると推定された．このように，本実験の結果，*C. hederifolium* と *C. purpurascens* との倍加処理を伴った胚珠培養により得られた倍数体においては, 幼苗時と成株時で倍数性が異なることがあるものと示唆されたが，その要因としては，倍加処理によって区分キメラが誘導され, 植物の成長とともに倍加されていない細胞の占める割合が高くなったことや, 倍数性検定で採取された葉身組織に倍加された細胞が特異的に多く含まれていたこと等の可能性が考えられた．

①-3 *C. hederifolium* と *C. purourascens* との種間雑種の倍加

種間雑種の塊茎に倍加剤を塗布して処理を行った場合では，250 µM APM で処理を行った 1 個体で萌芽した葉の細胞内の核DNAのDAPI蛍光強度のピークが両親のピークの中間とその二倍の両方に確認されたため種間雑種と複二倍体のキメラであると推定されたが，その他の個体では倍加は認められず, 細胞内の核 DNA の DAPI 蛍光強度のピークが両親のピークの中間に確認された．しかしながら，キメラと推定された個体においても約７か月後に再度倍数性調査を行ったところ倍加されていない種間雑種と推定された．さらに，これらの花で自殖を試みたが全ての個体で種子形成は認められなかった．



第1図　*C. hederifolium*と *C. purpurascens*との種間交雑後の胚珠培養で得られた小植物体

第1表　*C. hederifolium*と*C.purpurascens*との種間雑種の倍数性判定

幼苗時の倍数性判定	個体数	成株時の倍数性判定		
		種間雑種[z]	二基三倍体	複二倍体
二基三倍体	9	0	9	0
複二倍体	3	3	0	0
複二倍体キメラ[y]	80	80	0	0
二基三倍体キメラ[x]	4	0	4	0

[z] 倍加されていない種間雑種

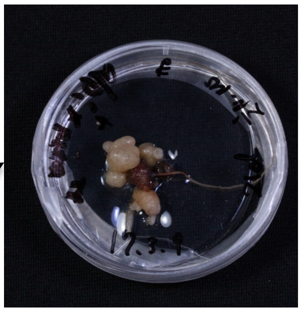
[y] 倍加されていない種間雑種と複二倍体のキメラ

[x] 二基三倍体とその倍加体とのキメラ

② *C. coum* および *C. alpinum* と *C. mirabile* との種間交雑による遺伝資源開発

C. coum と *C. mirabile* との交雑後の胚珠培養においては，交雑から 14 日後に果実を採取し，1/4N-MS 培地で培養した場合と交雑から 28 日後に果実を採取し, B5 培地で培養した場合のみ小植物体（第２図)の形成が認められた．しかしながら，いずれの処理区においても 20 または 21 の外植体（胚珠を有する胎座）のうち１外植体で小植物体形成が認められたのみであった．*C. alpinum* と *C. mirabile* との交雑においても交雑から 21 日後に採取した 21 外植体のうち１外植体でのみ小植物体（第３図）が形成された．２回目の実験では *C. coum* と *C. mirabile* との交雑 14 日後に，MS 培地，1/2N MS 培地，1/4N MS 培地または B5 培地を用いた場合の小植物体形成が認められた外植体数は，それぞれ０，３，１または２であり（置床外植体数は 17～19)，交雑 28 日後に，MS 培地，1/2N MS 培地，1/4N MS 培地または B5 培地を用いた場合の小植物体形成が認められた外植体数は，それぞれ２，１，２または２であった（置床外植体数は 14～16)．また，*C. alpinum* と *C. mirabile* との種間交雑 21 日後に MS 培地，1/2N MS 培地，1/4N MS 培地または B5 培地を用いて胚珠培養を行った結果，それぞれ２，１，３または２外植体で小植物体が得られた（置床外植体数は 25～27)．

第２図　*C. coum*と*C. mirabile*との種間交雑後の胚珠培養で得られた小植物体



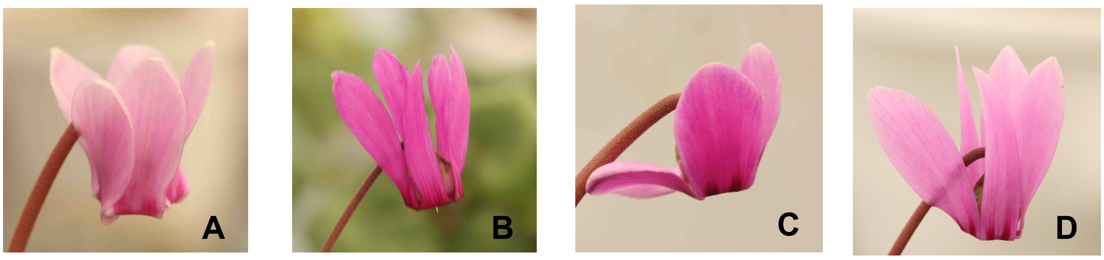
第３図　*C. alpinum*と*C. mirabile*との種間交雑後の胚珠培養で得られた小植物体

（２）　異なるゲノムを有する種間雑種における種特異的な形質・特性の発現様式の把握

① *C. hederifolium* と *C. purourascens* との種間雑種の特性

C. hederifolium は，香川大学農学部の無加温温室の栽培条件では，通常 5 月の終わりから 9 月にかけては出葉も出蕾も認められないが，9～11 月まで出蕾・開花が認められ，花が終わったころから出葉も認められる．一方，*C. purpurascens* は多くの場合は常緑で，9 月以降や春先に開花したりするものも存在するが，多くのものは６～９月上旬に開花する．種間雑種では，多くの個体で６～11 月にかけて出蕾・開花が認められ, 両種の中間的な生育サイクルを示した．出葉も出蕾も認められない明確な休眠期を示す個体はほとんどなかったが，7～9 月には花芽のみで葉を有さない個体も多く認められた．また，12～5 月中旬にかけては全ての個体が葉を有していたが，ほとんどの個体が花芽を有していなかった．このように，*C. hederifolium* と *C. purpurascens* との種間雑種は両親の中間的な生育サイクルを示し，すべての個体が常緑となるとは限らないが，ほとんどの個体が明確な休眠期を示さないことが明らかとなった．

C. hederifolium，C. purpurascens およびその種間雑種の花色・花色素分析を行った結果，花弁の slip 部分において *C. hederifolium* album は RHS カラーチャートのホワイトグループに，その他の *C. hederifolium* および *C. purpurascens* はパープルグループに，それらの種間雑種はパープルグループまたはパープル-バイオレットグループに属していた（第 4 図）．アントシアニンの HPLC 分析の結果, 花弁の slip 部分においてほとんどアントシアニンを含まない *C. hederiholium* album 以外の *C. hederifolium*，*C. purpurascens* および種間雑種花弁の slip 部分では，主要アントシアニンとしてマルビジン 3,5 ジグルコシド（Mv3,5dG）が検出された．

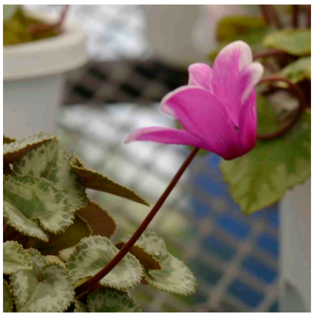


第４図　*C. hederifolium* (A)，*C. purpurascens* (B)，およびその種間雑種 (C, D) の花

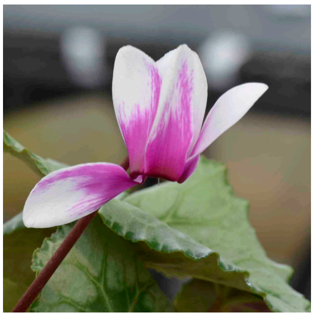
② 園芸品種特有の花を有する品種と野生種との種間雑種の形質

園芸品種特有のペオニジン配糖体を主要花色素とする赤色花の *C. persicum* ‘ラルゴ’と *C. hederifolium* との種間交雑後の倍加処理を伴う胚珠培養を行った結果, 複二倍体は得られなかったが種間雑種は得られた．既出のものも含めたこれらの種間雑種および既出の‘パピヨン’と *C. hederifolium* および *C. purpurascens* との種間雑種の開花株の花色を調査した結果，‘ラルゴ’と紫色花園芸品種との交雑では赤色花が得られるにも関わらず（高村，未発表），‘ラルゴ’と野生種の種間雑種では赤色花は認められず，すべて紫色花であった（第 5 図）．一方，‘パピヨン’と *C. hederifolium* および *C. purpurascens* との種間雑種の開花株では，野生種では認められない複色花（第 6，7 図）を有する株が認められた．このように，種間交雑における園芸品種特有の形質の遺伝について，異なるゲノム間の交雑でも導入可能な形質と不可能な形質，および同種間の交雑と同様の様式の遺伝を示す形質と異なる遺伝様式を示す形質とがあることが示された．

第５図 ‘ラルゴ’と *C. purpurascens*との種間雑種の花



第６図 ‘パピヨン’と *C. hederifolium*との種間雑種の花



第７図 ‘パピヨン’と *C. purpurascens*との種間雑種の花

（３）結論

本研究の結果，*C. hederifolium* と *C. purpuarscens* との種間交雑においては，複二倍体を得ることは容易ではないが, 胚珠培養の援用により安定して種間雑種が獲得できることが示された．なお，胚珠培養時の倍加処理により得られた個体がフローサイトメトリーで複二倍体と判定されても，その株の開花時には倍加されていない種間雑種と判定されたことから，倍数性の検定は作出時だけでなく成株の開花時にも行う必要が示唆された．また，*C. coum* または *C. alpinum* と *C. mirabile* との種間交雑においても，胚珠培養の援用により種間雑種を作出できることが示され，胚珠培養の援用により多くの野生種間の種間雑種が作出できる可能性が示された．

C. hederifolium と *C. purpurascens* の種間雑種の特性については，*C.* 開花期が両親の中間を示し，常緑で休眠を行わない個体が多いことが示され，この交雑組み合わせによって得られた種間雑種は，新しいガーデンシクラメンとして有用であると考えられた．また，園芸品種特有の赤色花形質の種間雑種への導入はできなかったが，同じく園芸品種特有の覆輪花形質を園芸品種と *C. hederifolium* または *C. purpuarscens* との種間雑種に導入することは可能であり，いくつかの種特異的な有用形質が異ゲノム間の交雑でもその雑種に導入可能であることが示唆された．

これらのことは，未利用の有用遺伝資源を利用した新しいシクラメン育種素材を開発する有用な知見であると考えられる

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 高村武二郎・窪田真喜・乗船菜穂
２．発表標題 Cyclamen hederifoliumとC. purpurascensとの種間雑種の生育および開花特性
３．学会等名 園芸学会
４．発表年 2019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
連携研究者	深井　誠一 (Fukai Seiichi) (80228858)	香川大学・農学部・教授 (16201)	