

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580044

研究課題名(和文)シクラメンの青色花発現機構の解明とそれを活用した遺伝資源開発

研究課題名(英文)Studies on mechanism of flower color expression and breeding of new cultivars in bluish-violet flowered cyclamen

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、青紫色花シクラメンと紫色花シクラメンの花弁slip部分では、いずれにおいてもマルビジン3,5ジグルコシドを主要アントシアニンとするものの、青紫色花シクラメンでは、花弁細胞の高いpHにより花弁が青色化していることを明らかにした。また、シクラメンにおいて花弁のpHが高くなり青色化する形質は、単一の劣性遺伝子に支配されている可能性が高いことを示唆した。

研究成果の概要(英文)： Although bluish-violet-flowered cyclamen plants contained malvidin 3'5 diglucoside, which is the main anthocyanin in petal slips of purple-flowered cyclamen, in the petal slips as the main anthocyanin, it was suggested that higher value of pH in petal cells of the bluish-violet flowered plants caused the bluish-colored petals. It was also suggested that that a single recessive gene caused higher value of pH in the petal cells and determined the expression of bluish-colored petals in cyclamen.

研究分野：園芸科学

キーワード：シクラメン 青色花 花色 花色素 アントシアニン pH

## 1. 研究開始当初の背景

シクラメンの花色は、長い間、赤、紫、白およびその中間色に限られており、黄色花や青色花は夢の花色とされていた。そのうち、黄色花に関しては 1980 年代に突然変異体が発見され、現在では多くの品種が育成されているが、青色花品種は現在でも育成されておらず、その開発が強く望まれている。このような状況で、近年、従来の花より花卉の青色味が強い品種・系統が作出され、青色花品種育成のための遺伝資源として期待されている。また、近年になって青紫色花品種が育成されたバラやカーネーションをはじめ、青色花品種の育成が望まれている花きは多く、花き全体においても青色花個体の育成およびその花色発現に関する情報が必要とされている。

シクラメンの最重要形質である花色・花色素の発現およびその遺伝に関しては、未だ不明な点が多いにもかかわらず、現在国内外で体系的な研究はほとんど行われていない。また、シクラメンの青色花の育成または花色の青色化機構の解明に関する研究はほとんど認められない。このように、シクラメンでは、青色花品種育成が強く望まれているのに対し、その花色発現機構の解明および育種の遂行に関する学術的情報が乏しいのが現状であった。

## 2. 研究の目的

青色と同様にシクラメンでは夢の花色とされていた黄色花形質については、その遺伝性が明らかにされるとともに、いくつかの黄色花シクラメンの開発法が提示されており、これらの知見は現在でも黄色花シクラメンの育種に活用されている。そこで、青紫色花シクラメンにおける花卉の青色化機構とその遺伝性を解明し、新しい青色花シクラメン育種の進展に寄与することを主目的として、本研究を行った。

シクラメン花卉の青色化機構の解明については、既存品種と青味が強い花を有する個体との花色と主要花色素、各個体における花卉細胞の pH、および主要花色素と他の花色素との関係を調査・解析することにより、シクラメン花卉の青色化の要因を個体から代謝レベルで明らかにすることを目的とした。

シクラメン花卉の青色花形質の遺伝様式の解明については、青味が強い花を有するシクラメン個体と既存の園芸品種との  $F_1$  および  $F_2$  個体の花色および花卉の pH を調査するとともに、花卉の青色化に関連する遺伝子の発現解析を行い、シクラメン花卉の青色花形質およびその発現要因の遺伝様式を明らかにすることを目的とした。

また、併せてゲノムが異なるシクラメン野生種との種間交雑を試み、種内交雑または未利用遺伝資源を利用した種間交雑による青色花シクラメンの開発法に関して検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) シクラメンの花卉の青色化機構の解明

既存品種と青紫色花系統の花色・花色素・花卉細胞の pH

香川大学農学部の一棟温室で栽培している既存のシアニック系シクラメン品種・系統および鹿毛真耕園で育成された青紫色花系統の花卉を開花当日に採取し、スリップ部分の花色をそれぞれ RHS カラーチャートで調査した。一部の花の花卉は、その後、1 花全ての新鮮花卉のスリップ部分をホモジナイズした後、コンパクト pH メーター (B-212, 堀場製作所) で pH を計測した。その他の花の花卉については、乾燥して保存し、適宜花色素分析に用いた。いずれにおいても、乾燥花卉の slip 部分から 5%ギ酸メタノールで色素類を抽出し、HPLC を用いて花卉中のアントシアニンを調査した。

花卉スリップ部分の青色化に及ぼす pH の影響

香川大学農学部の一棟温室で栽培されている青紫色花系統各個体および紫色花品種の開花当日～3 日後までの花卉を採取し、slip と eye 部分に切り分けて新鮮重を計測した後、乾燥保存し、適宜実験に用いた。乾燥花卉の slip 部分から 5%ギ酸メタノールで色素類を抽出し、HPLC でアントシアニン分析した後、溶液を減圧乾固した。その後、pH 4 または 6 とした酢酸バッファーで色素を再抽出し、その後の溶液の呈色を観察するとともに、再抽出後の吸光度を分光光度計で調査した。また、標品としてマルビジン 3,5 ジグルコシドのバッファー溶液も供試した。なお、酢酸バッファーは、酢酸と酢酸ナトリウムを用いて調製した。

### 花卉と葉片の pH の相互関係

花卉と葉片の pH の相互関係を調査するために、香川大学農学部の一棟温室で栽培されている青紫色花シクラメン個体とシアニック系品種・系統を供試し、開花当日の新鮮花卉のスリップ部分および 2～4 cm の大きさの展開葉の葉身をホモジナイズした後、コンパクト pH メーター (B-212, 堀場製作所) で pH を計測した。

### (2) シクラメン花卉の青色花形質の遺伝様式の解明

既存のシクラメン園芸品種・系統(' KN パ

ーブル', 'ラルゴ', 'ピッコロ(白色花)', 'ピッコロ(赤紫色花)', 523P)と青紫色花シクラメン系統 H<sub>21</sub> 768 または H<sub>21</sub> 781 との交雑で得られた種子から F<sub>1</sub> 個体を香川大学農学部の温室において育成し, 実験に用いた. いずれの植物材料においても花弁は開花当日に採取し, 花弁 slip 部分の花色とそれぞれの花弁の長さ と幅を測定した後, 花弁を slip と eye 部分とに切り分けた. それぞれの F<sub>1</sub> 個体において, 一部の花弁については, slip 部分のみをホモジナイズして得られたホモジネートの pH をコンパクト pH メーターで測定した. 他の花弁については, 新鮮重を測定した後, 40 °C で 20~24 時間乾燥させた. 乾燥花弁は乾燥重を測定した後, 常温乾燥状態で保存し, 適宜花色素分析に用いた. いずれの個体においても乾燥花弁の slip 部分から 5% 酢酸メタノールで色素類を抽出し, HPLC でアントシアニンを分析した. なお, 'KN パープル' と青紫色花系統 H<sub>21</sub> 768 および H<sub>21</sub> 781 に関しては, 年度を替えて再度正逆交雑を行った.

また F<sub>1</sub> 個体の自殖により F<sub>2</sub> 種子を得て, これらを香川大学農学部の温室において播種・育成し, このうち F<sub>2</sub>( 'KN パープル' × H<sub>21</sub> 768) および F<sub>2</sub>( 'KN パープル' × H<sub>21</sub> 781) 個体の花色の分離比を調査した. いずれの植物材料においても開花当日に花弁を採取し, 花弁 slip 部分の花色とそれぞれの花弁の長さ と幅を測定した後, 花弁を slip と eye 部分とに切り分けた. また, これらの個体の slip 部分のみをホモジナイズして得られたホモジネートの pH をコンパクト pH メーターで測定した. 一部の個体では, 幼苗時の葉のホモジネートの pH も測定した.

### (3) 青紫色花系統とゲノムが異なるシクラメン野生種との種間交雑

強健性を有する *C. hederifolium* を種子親に, 青紫色花シクラメン系統の H<sub>21</sub> 768 および H<sub>22</sub> 771 を花粉親に用いて交雑を行った. また, 青紫色花シクラメン系統の H<sub>22</sub> 771, H<sub>24</sub> 714 および H<sub>24</sub> 716 を種子親に, *C. hederifolium* を花粉親に用いた交雑を行った. いずれにおいても交雑 28 日後に着果状況と果実の肥大を調査した.

## 4. 研究成果

### (1) シクラメンの花弁の青色化機構の解明

既存品種と青紫色花系統の花色・花色素・花弁細胞の pH

赤色花品種の花色はいずれも RHS カラーチャートのレッドグループに, 桃色花系統および赤紫色花品種の花色はレッド-パープルグループに, 紫色花品種の花色はパープルグループに属したのに対し, 青紫色花系統の花

色はいずれも RHS カラーチャート番号 91 または 92A~C のバイオレット-ブルーグループであった(第 1 図). また, それぞれの花弁 slip 部分の主要アントシアニンは, 赤色花品種ではペオニジン 3 ネオヘスペリドシド, 赤紫色花品種ではマルビジン 3 グルコシド, 桃色花品種ではペオニジン 3,5 ジグルコシドであったが, 紫色花品種と青紫色花系統ではともにマルビジン 3,5 ジグルコシドが主要アントシアニンであった. このように紫色花品種と青紫色花系統の間では, 花色に明確な違いが認められたにもかかわらず, 花弁中のアントシアニン組成はほぼ同様であった. なお, 青紫色花系統では開花後に明らかな花弁の退色が認められたのに対し, 紫色花品種では, 花色にも大きな変化は認められなかったが, これは青紫色花系統では開花後に花弁中のアントシアニンが大きく減少したことによるものと示唆された.



第 1 図 青紫色花シクラメン系統

一方, 既存の赤, 白, ピンクおよび紫色花品種と青紫色花系統各個体の花弁 slip 部分のホモジネートの pH を調査したところ, 青紫色花以外の品種・系統においては, 花弁のホモジネートの pH は 3.5~4.0 であったのに対し, 青紫色花系統では 5.7~6.1 と明らかに高い値を示した.

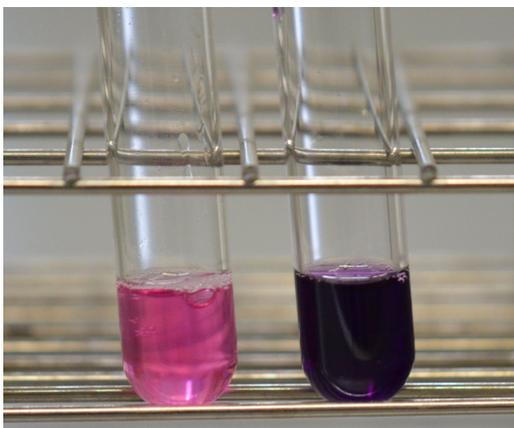
以上のように, シクラメンの青紫色花系統では, 既存の赤, 白, ピンクおよび紫色花品種と比較して, 明らかに花色の青色味が強かったが, その花弁スリップ部分の主要アントシアニンは既存の紫色花品種と同様であり, 主要アントシアニンの種類等が花弁の青色化に影響している可能性は低いものと考えられた. 一方, 青紫色花品種・系統の花弁スリップ部分のホモジネートの pH は, 既存の品種と比較して明らかに高い値を示していたが, アントシアニンは pH が高くなると青色化する傾向があることから, 花弁細胞内の高い pH がシクラメン花弁の青色化を引き起こした可能性が示された.

花弁スリップ部分の青色化に及ぼす pH の影響

青紫色花系統および紫色花品種のいずれにおいても、pH 4 および 6 の酢酸バッファーで色素類を再抽出した場合、pH 4 のバッファーと比較して pH 6 のバッファー溶液の色の青みが明らかに強くなった(第 2 図)。また、pH 4 のバッファーでは、時間が経過してもバッファー溶液の色にはほとんど変化が認められなかったが、pH 6 のバッファーでは、時間の経過により退色が認められた。吸光度を調査した結果、いずれの個体においても pH 4 の酢酸バッファーで再抽出した場合には、時間が経過しても吸光度の変化がほとんど認められなかったが、pH 6 の酢酸バッファーで再抽出した場合には、時間の経過により明らかに吸光度が減少し、再抽出 10 分後のサンプルでは吸光度のピークが検出できないものも認められた。

青紫色花および紫色花のいずれの個体においても、再抽出 1 および 5 分後のサンプルでは、pH 6 のバッファーにおける極大吸収波長が pH 4 における極大吸収波長よりも大きい値を示し、高い pH により花弁中に含まれる色素類の色発現が青方向にシフトすることが示唆された。また、標品のマルビジン 3,5 ジグルコシド溶液も同様の傾向を示したが、吸光度のピーク波長の値は青紫色花および紫色花から抽出された色素を用いた場合より低くなる傾向が認められた。

以上の結果、シクラメン青紫色花系統の花の色は、花弁内細胞の高い pH により花色素の色発現が青色方向にシフトすることに起因しており、さらにその高い pH の影響で、開花後にアントシアニンが減少し、花弁の青色味が失われるものと考えられた。



第 2 図 異なる pH の酢酸バッファーで再抽出した 'KN パープル' のアントシアニン。左: pH 4, 右: pH 6。

#### 花弁と葉片の pH の相互関係

青紫色花個体および青紫色花以外のシアンニック系個体の花弁スリップ部分のホモジネートの pH はそれぞれ 5.8~6.2 および 3.5~4.1 となり、青紫色花個体で明らかに高い値を示した。一方、青紫色花個体および青紫色花以外のシアンニック系個体の葉身のホモジネートの pH においてもそれぞれ 5.5~5.8 および 4.3~4.8 と青紫色花個体で明らかに高い値を示した。以上の結果、青紫色花シクラメンでは、葉身の細胞においても高い pH を示すことが示唆され、この花弁と葉片の pH の相互関係は、青紫色花シクラメン品種の育成における幼苗時での青紫色花個体の選抜に応用できるものと考えられた。

#### (2) シクラメン花弁の青色花形質の遺伝様式の解明

既存のシクラメン園芸品種・系統と青紫色花シクラメン系統との交雑においては、青紫色花系統を種子親とした場合に結果および種子形成が著しく阻害され、種子が得られた場合でも、その逆交雑で得られた種子と比較して著しく小さく、ほとんど発芽しなかった。したがって、まず、既存のシクラメン園芸品種・系統を種子親として得られた F<sub>1</sub> 個体のみを調査した。これら F<sub>1</sub> の花弁長と花弁幅は、いずれの個体においても、全ての個体で花粉親の青紫色花系統よりは著しく大きい値を、全てまたはほとんどの個体で両親より大きい値を示した。また、いずれの交雑組み合わせで得られた F<sub>1</sub> 個体においても、青紫色花を有する個体は認められなかった(第 3 図)。さらに、花弁 slip 部分の花色・花色素ともに、マルビジン 3,5 ジグルコシドを主要アントシアニンとする既存の紫色花品種と他の園芸品種を交雑して得られた F<sub>1</sub> 個体と同様の発現が認められた。一方、花弁 slip 部分のホモジネートの pH は、すべての F<sub>1</sub> 個体において、3.5~4.2 と既存の園芸品種・系統と同様の値を示し、青紫色花系統のように pH 6 前後の高い値や既存の園芸品種・系統と青紫色花系統の中間の値を示す個体は認められなかった。なお、年度を替えて再度正逆交雑を行った結果、'KN パープル' と青紫色花系統 H<sub>21</sub> 768 の正逆交雑のいずれにおいても種子が得られたことから、これらの F<sub>1</sub> 個体の開花株の形質を改めて調査したところ、青紫色花シクラメン個体を種子親とした F<sub>1</sub> 個体は、逆交雑で得られた F<sub>1</sub> 個体と同様の形質を示した。このことから、シクラメンの青紫色花形質は、交雑の正逆に関係なく遺伝する核遺伝形質であるものと推測された。

得られた F<sub>1</sub> 個体のうち F<sub>1</sub>( 'KN パープル' × H<sub>21</sub> 768) および F<sub>1</sub>( 'KN パープル' × H<sub>21</sub> 781) の自殖により得られた F<sub>2</sub> 種子を播種した結

果，葉身や葉柄に強くアントシアニンを発現する実生とほとんど発現しない実生とに分かれ，その比は前者の交雑組み合わせの  $F_2$  では 51 : 10，後者では 44 : 11 であった．‘KN パープル’の実生は全て強くアントシアニンを発現し，青紫色花個体の実生はほとんどアントシアニンを発現しないことから，アントシアニンをほとんど発現しなかった幼苗の葉身を採種して，そのホモジネートの pH を測定したところ  $F_2$ (‘KN パープル’ $\times H_{21}$  768) の 1 個体を除いて全て 5.1-5.7 と高い値を示した．なお，葉身のホモジネートの pH が高い値を示したこれらの個体は，開花時にはいずれも青色みの強い花を有していた(第 4 図)．一方，葉身や葉柄に強くアントシアニンを発現する個体から 10 個体を選抜して葉身のホモジネートの pH を測定したところ，いずれの個体においても 4.0-4.6 と比較的低い値を示した．また，発芽後，葉身や葉柄に強くアントシアニンを発現する個体と比較して，ほとんど発現しない個体では生育が抑制され，開花前に枯死に至る個体の割合が明らかに高かった．開花時の花弁 slip 部分はいずれも有色(白色でない)であり， $F_2$ (‘KN パープル’ $\times H_{21}$  768)で青紫色：他色 = 6 : 48， $F_2$ (‘KN パープル’ $\times H_{21}$  781)で青紫色：他色 = 3 : 30 であった．花弁 slip 部分の pH は青紫色花ではいずれも高い値を示し，その他の有色花ではいずれも低い値を示した．なお，青紫色花系統を用いた他の交雑組み合わせの  $F_2$  個体を含めても，花弁 slip 部分の pH が高い白色花個体は存在したものの，シアニック系個体で花弁 slip 部分の pH が高いのに青色化しない個体は認められなかった．加えて，花弁 slip 部分の pH が高い個体はいずれにおいても花弁が小輪化する傾向が認められた．

‘KN パープル’と青紫色花系統の  $F_2$  世代における花弁 slip 部分の pH が高く青味が強い紫色花個体と pH が低く他の有色花となる個体の比は，前者が劣性と仮定した場合の理論値に 1% レベルでは適合したが 5% レベルでは適合しなかった．しかしながら，幼苗時の葉身のアントシアニンの発現および pH の値に基づいた分離比は 5% レベルで理論値に適合しており，葉身や葉柄に強くアントシアニンを発現し，葉身のホモジネートの pH が高かった個体で開花目に枯死する割合が高かったことと併せると，シクラメンにおける花弁細胞内の高い pH により花弁が青色化する形質は単一の遺伝子に支配される劣性形質であると考えられた．



第 3 図  $F_1$ (‘KN パープル’ $\times H_{21}$  768)



第 4 図 青紫色花の  $F_2$ (‘KN パープル’ $\times H_{21}$  768)

### (3) 青紫色花系統とゲノムが異なるシクラメン野生種との種間交雑

野生種を種子親として青紫色花系統との交雑を試みた結果，肥大した果実を得ることはできなかった．なお，肥大していない果実を用いて胚珠培養を行っても種間雑種個体を得ることはできなかった．シクラメンにおいて野生種を種子親にして，園芸品種と交雑した場合に雑種が得られた報告は見当たらないことと，青紫色花系統と他の園芸品種との  $F_1$  個体に青紫色花を有する個体は認められなかったことから，シクラメン種間雑種における青紫色花個体の作出は容易ではないことが示唆された．

一方，青紫色花個体を種子親として交雑した場合においては，ほとんどの果実が落果し，肥大した果実は得られなかった．青紫色花系統は，総じて種子形成能力が低いものが多く，園芸品種を花粉親とした交雑においても稔性種子が得られないケースが多く認められる．しかしながら，種子親として種内交雑では稔性種子を形成できる個体も認められたことから，種間雑種作出は容易ではないものの，種子形成能力の高い個体の選抜や栽培環境の調節により改善を行う余地はあるものと考えられた．

### (4) まとめ

本研究により花弁内の高い pH がシクラメンの花弁の青色化を引き起こし，それにより青紫色花系統が成立していることが明らかになった．また，青紫色花系統では，その高い pH により開花後に花弁中のアントシアニ

ンが減少し、開花後に退色が起きることも示された。なお、青紫色花系統では花弁だけでなく葉身でも pH が高くなっていたことから、この細胞内の pH が高くなる形質は多面発現しており、開花前に花弁細胞の pH が高い個体を選抜できる可能性が示された。

シクラメン花弁の青色花形質の遺伝様式について、花弁の青色化を引き起こす細胞内の pH が高くなる形質は、1 つの劣性遺伝子に支配されるものと示唆された。また、細胞内の pH が高くなる形質により、花弁の小輪化や株の生存率の低下等が引き起こされた可能性も示された。さらに、青紫色花系統を交雑に用いても F<sub>1</sub> では青紫色花個体は期待できないうえ、青紫色花系統や野生種を種子親とした種間交雑における雑種作出が困難であったことから、ゲノムが異なる種間交雑による青色花種間雑種の作出は容易ではないものと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計3件)

高村武二郎・松崎十士皇、シクラメンの青紫色花系統と他の園芸品種との交雑における F<sub>1</sub> の形質、園芸学会、平成 27 年 3 月 29 日、千葉大学(千葉県千葉市)。

高村武二郎、片岡安奈、鹿毛哲郎、シクラメンの白色花発現機構、園芸学会、平成 25 年 9 月 21 日、岩手大学(岩手県盛岡市)。

高村武二郎、濱田成一、鹿毛哲郎、シクラメンの花弁の青色化に及ぼす pH の影響、園芸学会、平成 25 年 3 月 24 日、東京農工大学(東京都小金井市)。

## 6. 研究組織

### (1)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

### (2)連携研究者

深井 誠一 (FUKAI SEIICHI)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：80228858