

平成30年6月7日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292017

研究課題名(和文) 日本から海外に渡ったツツジ園芸品種の遺伝的選抜と栽培環境適応に関する研究

研究課題名(英文) Genetic selection and adaptation to cultivation environment of azalea cultivars which went abroad from Japan

研究代表者

小林 伸雄 (KOBAYASHI, Nobuo)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00362426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本原産のツツジ野生種から園芸品種が成立し海外への伝播過程を解明するため、花形や花色ならびに土壌と菌根菌の側面から解析した。花器変異形質ではMADS-box遺伝子解析により、二重咲き、八重咲き、采咲き、見染性形質の原因遺伝子を解明し、野生種の細胞質と合わせて変異遺伝子が海外のツツジ品種にも伝播していることを明らかにした。野生種から交配品種になるに従い、アントシアニン色素とその発色要因が複雑に関与し、花色が多様化していた。不利な土壌環境下に自生する野生種の根系にエリコイド菌根菌の共生が確認でき、その菌相は自生地や栽培地により異なっていた。これらの知見は今後の育種情報として活用できる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the process of development of Japanese azalea cultivars from wild species and they spread abroad, flower form, flower color, habitat soil and mycorrhizal fungi of wild species and cultivars were investigated. The responsible MADS-box gene information of flower form mutations; hose-in-hose, double, spider type and long-lasting flower were obtained. The spread of the mutational flower form gene and the plastid of a Japanese wild species were verified in foreign azalea cultivars. As interspecific hybridization progressed, anthocyanins and coloration factors become more complicated, and the diversity of flower color was increased. Ericoid mycorrhizal fungi were colonized in the hair roots of wild azaleas in an oligotrophic soil environment, and the microbial floras were varied in the wild habitats and cultivation areas. These results provide the basic information of the future azalea breeding.

研究分野：花き園芸 園芸育種

キーワード：園芸学 品種改良 ツツジ 花器変異 花色 DNAマーカー 土壌成分 菌根菌

## 1. 研究開始当初の背景

ツツジ園芸品種の原産地は日本であり、江戸時代よりツツジ野生種から変異形質が選抜され、我が国の園芸文化の中で様々な遺伝的変異を有する品種が成立してきた。その後、海外に伝播した園芸品種は、重要な花木として世界各地に普及し栽培され、花の色や形の嗜好性や世界各地の栽培環境や利用形態に対する植物の適応性をもとに選抜・淘汰が行われてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ツツジ園芸品種において、どのような花形や花色とそれを支配する遺伝子が選抜・淘汰され、品種改良に活用されてきたのか、さらに国内外の様々な栽培・土壌環境に適応するためにどのような菌根菌が感染し根系を発達させているのかを解析することを目的としている。日本から海外に伝播した園芸品種の選抜・淘汰された過程を解明し、海外輸出戦略を踏まえた育種目標を策定する基礎情報を得ることが出来ると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 花器変異形質に関する解析

#### 花器変異形質の特性評価 (小林)

日本のツツジ園芸品種に存在する特異な花器変異形質(二重咲き・八重咲き・采咲き・見染性等)に関して、原種ごとに野生種と比較した形態学的調査を行った。また、交配可能な品種については交雑実生系統を作成し、変異形質の遺伝性を評価すると同時に、育種導入の可能性について調査を行った。

#### 花器形質制御遺伝子の解析 (小林・中務)

花器形質を制御する MADS-box 遺伝子に関して、野生種との比較を行い、各品種の花器形質変異の制御に関して解析を行った。二重咲きや見染性形質に関しては、変異した遺伝子をもとに DNA マーカーを開発し、未開花個体の花器形質評価や遺伝解析への応用性を評価した。

### (2) 花色形質に関する解析

#### アントシアニン色素分析 (宮島)

四季咲き性形質を有する朱赤花のキンモウツツジ (*Rhododendron oldhamii*)、ポットアザレア成立に寄与したとされる朱赤花のタイワンヤマツツジ (*R. simsii*)、ならびにヤマツツジの変種で濃桃花のオオシマツツジ (*R. kaempferi* var. *macro-gemma*) を材料として、花色発現要因と花弁内色素構成を調査した。

#### アントシアニン生合成遺伝子 (中務)

赤色と紫色を呈するツツジ野生種および園芸品種とそれらの交配実生について、花色とアントシアニン組成ならびに水酸化酵素遺伝子発現とその遺伝子配列を調査した。

### (3) 土壌と菌根菌に関する解析

#### 自生地の土壌環境 (伴)

島根県内斐伊川流域のキシツツジ自生地において根域の土壌をサンプリングし、風乾後供試試料とした。分析項目は、土壌の pH、可溶性アルミニウム含量、全炭素含量、全窒素含量とし、得られた全炭素・窒素含量から CN 比を算出した。

#### 菌根菌相解析 (広瀬)

島根県内自生のキシツツジ、沖縄県内自生のケラマツツジ、能登半島自生のヤマツツジ、能登と館林で露地栽培されているキシマツツジ、館林と新潟でポット栽培されているキシマツツジまたはアザレアを対象に調査を行なった。各個体の細根を 10-20cm 採取し、流水と界面活性剤を用いた洗浄と塩化水銀を用いた表面殺菌を行った。根は断片化後、クロラムフェニコール入りコーンミールアガール培地に静置した。培養後 1 週間から 4 カ月の間に根から伸長した菌糸を適時切り出し新たな培地に植えることにより菌株を確立した。各菌株について形態観察と rRNA の塩基配列情報によって種同定を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) 花器変異形質に関する解析

本研究、ならびこれまでの研究における各種花器形態品種の解析結果から、花器形態変異はそのほとんどが MADS-box 遺伝子の変異に起因するホメオティック変異によるものであり、【花器変異形質；花器官の形態変異；原因遺伝子】の関係性として、【二重咲き；がくの花弁化；PI 遺伝子】【八重咲き；雌ずいや雄ずいの花弁化；AG 遺伝子】【采咲き；花弁のしべ化や狭細化；AG 遺伝子他】、【見染性；花弁のがく化；AP3 遺伝子】であることが示された。

【二重咲き変異】では、MADS-box；B クラスの PI 遺伝子における挿入変異に起因することを解明した。これを応用して形質特異的 DNA マーカーを開発し、未開花実生集団における二重咲き形質選抜マーカーとしての有効性が示された。また、国内外のツツジ品種について、二重咲き DNA マーカー、葉緑体 DNA マーカーによる解析を行ったところ、海外の二重咲き品種においても、クルメツツジ等と同一の PI 遺伝子変異が検出され、さらに海外のポットアザレア品種でキシツツジ由来の葉緑体 DNA が多数検出された。これらの結果から、二重咲き形質に関する日本の古品種からの同一遺伝子変異の伝播や、環境耐性が高い野生種であるキシツツジ由来の遺伝子が海外のツツジ品種改良においても選抜・淘汰されたことが示唆される。

【八重咲き変異】は C クラスの AG/PLE 遺伝子の配列欠損に由来する遺伝子発現の減少が雄しべや雌しべの花弁化による八重咲きの花器形成に関与することが明らかになった。また、【采咲き変異】のうち、花弁のしべ化は C クラスの AG 遺伝子の発現領域の拡張に由来することが示された。

【見染性形質】では花冠が長期間持続する原因として、B クラスの AP3 遺伝子へのレトロトランスポゾン等の挿入変異に起因する花冠のがく化であることが明らかになった。交配試験により見染性形質は一遺伝子支配の劣性遺伝形質であることが示され、新たな有用花器形質としての今後の育種導入目標が設定された。

## (2) 花色形質に関する解析

朱赤色のキンモウツツジ花冠全体には Cyanidin 3-galactoside と Cyanidin 3-arabinoside が含まれており、赤紫色を呈す花冠上部のプロッチ部分にはこれらに加えて 2 種類のフラボノール (Quercetin 配糖体) を含有していた。同様に赤紫色を呈すタイワンヤマツツジのプロッチ部分には Quercetin 3-glucoside および Quercetin 3-rhamnoside のフラボノールを含有しており、さらに、アントシアニンとフラボノールとの量比が 1:7.5 のときに生花卉と同様の赤紫色を呈することを試験管内再現試験で確認した。オオシマツツジ独特の濃桃色の花色は、Cyanidin に糖が 2 分子結合したアントシアニンに加え、フラボノールを含有することにより発現していると考えられた。

一方、シアニジン色素のみを有する野生種間、あるいはシアニジン+デルフィニジン色素を持つ野生種間の交配実生は、いずれも交配親と同じ花色ならびに色素構成を示した。デルフィニジン色素を合成する個体の花冠では水酸化酵素遺伝子を発現していたが、シアニジン色素を主に合成する個体では発現しておらず、それぞれの色素構成と遺伝子発現の有無が一致した。異なる花色や色素構成を持つ野生種や園芸品種が交雑した場合に、新花色の交雑実生が出現することから、野生種に新しい遺伝子が導入されることにより色素構成が複雑化し、多様な花色が出現することが園芸品種の成立過程における花色の多様化に深く関与したことが示唆された。

## (3) 土壌と菌根菌に関する解析

キシツツジ自生地土壌を分析したところ、可溶性アルミニウム含量は  $\text{tr}:0.4\text{mg}\sim 24.0\text{mg}/100\text{g}$  乾土、pH は 4.93~5.93 で、典型的なツツジ科植物の自生地土壌の範囲であった。土壌中の C 含有量は 0.6~4.6%、N 含有量は 0.05~0.27% で、これより算出される CN 比は 13~17% の範囲であり、自生地の CN 比は比較的低く、土壌中の有機物の分解が比較的進行した状態であることが明らかになった。また、これらの土壌中のキシツツジの根系にはエリコイド菌根の形成が観察されたことから、菌根による有機物の分解が低 CN 比の原因として挙げられる。

菌根菌の解析では、合計 767 菌株を分離培養することができ、これらの菌株の種同定の結果、現段階で少なくとも 102 種に分類された。高次分類群は接合菌門、担子菌門、子囊

菌門と幅広かったが、最も多様な種がみられ、菌株数も多かったのは子囊菌門であった。中でもピョウタケ目に属する種は 30 種以上にのぼり、菌株数も最も多かった。自生と露地栽培の間では共通する種が比較的多くみられたが、ポット栽培ではその様な傾向はみられなかった。今後は海外の栽培環境における菌根菌層との比較を行う予定である。

## 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)

### 〔雑誌論文〕(計 12 件)

- Cheon, K.S., Nakatsuka, A., Tasaki, K., Kobayashi, N., Long-lasting Corolla Cultivars in Japanese Azaleas: A Mutant AP3/DEF Homolog Identified in Traditional Azalea Cultivars from More Than 300 Years Ago. *Frontiers in Plant Science*. 査読有 8:1-10. 2018, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02239>
- Kobayashi, N., Sugai, K., Tsuji, T., Nakatsuka, A., Genetic Relationship of *Rhododendron Ripense* Makino to Japanese Evergreen Azalea Cultivars Evaluated by SSR Markers. *Journal of Plant Genetics and Breeding*, 査読有, 1:101-103, 2017, <https://www.omicsonline.org/open-access/genetic-relationship-of-rhododendron-ripense-makino-to-japanese-evergreen-azalea-cultivar-s-evaluated-by-ssr-markers.pdf#search=%27Genetic+Relationship+of+Rhododendron+Ripense+Makino+to+Japanese%27>
- 郷原優・千慶晟・中務明・小林伸雄・日本の常緑性ツツジ品種における見染性形質の花器形態と遺伝性・園芸学研究, 査読有 16:383-390, 2017, <https://doi.org/10.2503/hrj.16.383>
- Cheon, K. S., Nakatsuka, A., Gohara, Y., Kobayashi, N., Mutant RoPI-1 allele-based marker development for selection of the hose-in-hose flower phenotype in *Rhododendron obtusum* cultivars. *Euphytica* 査読有 2017, 10.1007/s10681-016-1808-x
- Cheon, K. S., Nakatsuka, A., Tasaki, K., Kobayashi, N., Floral Morphology and MADS Gene Expression in Double-flowered Japanese Evergreen Azalea. *The Horticulture Journal* 査読有 2017, 86;269-276. 10.2503/hortj.OKD-025
- Huyen, D. T. T., Ureshino, K., Van, D. T., Miyajima, I., Quercetin 3-glucoside and quercetin 3-rhamnoside found in the reddish-purple blotch area of *Rhododendron simsii* Planch. flowers. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 査読無 62: 53-56. 2017.
- Cheon, K.S., Nakatsuka, A., Kobayashi, N.,

Mutant PI/GLO Homolog Confers the Hose-in-hose Flower Phenotype in Kurume Azaleas. *The Horticulture Journal* 査読有 85:380-387. 2016, 10.2503/hortj.MI-138  
 Baba, T., Hirose, D., Sasaki, N., Watanabe, N., Kobayashi, N., Kurashige, Y., Karimi, F., Ban, T., Mycorrhizal Formation and Diversity of Endophytic Fungi in Hair Roots of *Vaccinium oldhamii* Miq. in Japan. *Microbes and Environments* 査読有 31:186-189. 2016, 10.1264/jsme2.ME16011  
 Huyen, D. T. T., Ureshino, K., Van, D. T., Miyajima, I., Co-pigmentation of Anthocyanin-flavonol in the Blotch Area of *Rhododendron simsii* Planch. *Flowers. The Horticultural Journal* 査読有 85:232-237. 2016, 10.2503/hortj.MI-092  
 Huyen, D. T. T., Van, D. T., Huang, K. L., Miyajima, I., Distribution and composition of flavonols in the flowers of *Rhododendron oldhamii* Maxim. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 査読無 61: 37-40. 2016.  
 Tasaki, K., Nakatsuka, A., Cheon, K.S., Kobayashi, N., Inheritance of the narrow leaf mutation in traditional Japanese evergreen azaleas. *Euphytica* 査読有 206: 649-656. 2015, 10.1007/s10681-015-1479-z  
Nakatsuka, A., Hitomi, M., Tsuma, M., Ito, A., Mizuta, D., Kobayashi, N., Effect of anthocyanin profile and petal pH on flower coloration in evergreen azalea. *Acta Horticulturae* 査読有 1104: 357-361, 2015, 10.17660/Acta Hort.2015.1104.53

〔学会発表〕(計 15 件)

Meanchaipiboon, S., Hitomi, M. Kobayashi, N., Nakatsuka, A., Comparison of flower color and flavonoid hydroxylation related genes in Kurume azalea. 園芸学会平成 30 年度春季大会, 2018 年 3 月 24・25 日, 近畿大学農学部(奈良)  
 郷原優・千慶晟・中務明・小林伸雄. ツツジ属植物の遺伝資源の活用に関する研究(第 44 報) ツツジ見染性形質選抜 DNA マーカーの適用性と各品種由来マーカーの特性について. 2016 年 9 月 10-12 日. 園芸学会平成 28 年度秋季大会, 名城大学(名古屋)  
Kobayashi, N., Cheon, K. S., Nakatsuka, A., Caser, M., Scariot, V., Kurashige, Y., Genetic Contribution of Japanese Evergreen Azaleas to Western Cultivars. 3rd International Symposium on Woody Ornamentals of the Temperate Zone. 2-5 August 2016, Minneapolis, Minnesota, USA.  
 人見菜美・中務明・水田大輝・小林伸雄. (第 43 報) キシツツジ花冠におけるフラボノイド色素生成と関連遺伝子の発現解析. 2016 年 3 月 26・27 日, 園芸学会

平成 28 年度春季大会, 東京農業大学農学部(厚木)  
 千慶晟・中務明・小林伸雄. (第 42 報) ツツジ園芸品種の二重咲き形質に關与する PI/GLO 遺伝子由来マーカーの開発. (同上)  
 水田大輝・中務明・小林伸雄(第 41 報) 霧島山系産常緑性ツツジの色素合成に關わる F3'5'H 遺伝子とその上流領域の配列調査. 2015 年 9 月 26・27 日, 園芸学会平成 27 年度秋季大会, 徳島大学(徳島)  
 郷原優・千慶晟・中務明・小林伸雄(第 40 報) ツツジ見染性品種の大輪化を目的とした交配系統の各種形質評価. (同上)  
 広瀬大・伴琢也・小林伸雄. 河岸岩上に生育するキシツツジに定着する根内共生菌の多様性. 2015 年 5 月 15-17 日, 日本菌学会第 59 回大会. てんぶす那覇(那覇)

〔図書〕(計 3 件)

Kobayashi, N., Kurashige, Y., The secret vivid-red azalea in Noto peninsula, Japan -Noto Kirishima Azalea Guide book-, The laboratory of Plant Breeding, Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 2018, ISBN 978-4-9908297-1-1, P.39.  
 小林伸雄. ツツジ. 花の品種改良の日本史 第 7 章(柴田道夫編) 悠書館, 2016 ISBN 978-4-86582-013-3, pp151-180  
 倉重祐二・小林伸雄. のとキリシマツツジガイドブック. 島根大学植物育種学研究室, 2015, ISBN 978-4-9908297-0-4 P.40.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 伸雄 (KOBAYASHI, Nobuo)  
 島根大学: 生物資源科学部・教授  
 研究者番号: 00362426

(2) 研究分担者

中務 明 (NAKATSUKA, Akira)  
 島根大学: 生物資源科学部・准教授  
 研究者番号: 40304258

伴 琢也 (BAN, Takuya)  
 東京農工大学: 農学部・准教授  
 研究者番号: 20325046

廣瀬 大 (HIROSE, Dai)  
 日本大学: 薬学部・准教授  
 研究者番号: 20513922

宮島 郁夫 (MIYAJIMA, Ikuo)  
 九州大学: 熱帯農学研究センター・准教授  
 研究者番号: 20182024

(3) 連携研究者

研究者番号：

(4)研究協力者

千 慶晟 (CHEON, Kyeong-Seong)

倉重 祐二 (KURASHIGE, Yuji)