

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580025
 研究課題名（和文）
 未利用遺伝資源を活用したシクラメン育種素材の開発
 研究課題名（英文）
 Studies on the breeding of cyclamen by using the wild relatives
 研究代表者
 高村 武二郎（TAKAMURA TAKEJIRO）
 香川大学・農学部・准教授
 研究者番号：40253257

研究成果の概要：

本研究では、未利用遺伝資源であるシクラメン野生種の花色発現、生育サイクルおよび種子発芽に関する特性を明らかにしたうえで、これまでに報告がない園芸品種と *C. colchicum* および園芸品種と *C. mirabile*, *C. hederifolium* と *C. purpurascens* の交雑を含むいくつかの組み合わせにおいて種間雑種を作出し、未利用遺伝資源を利用したシクラメン育種素材の開発に有効な多くの知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：園芸学

科研費の分科・細目：農学，園芸学・造園学

キーワード：シクラメン，野生種，遺伝資源，種間雑種，休眠，花色，アントシアニン，フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

多くの主要花きでは、その主要品種の成立に複数の種が関与しているが、我が国で最も重要な鉢花であるシクラメンの主要品種はすべて *Cyclamen persicum* の種内交雑によって育成されたものである。*Cyclamen* 属には他に21種が存在するが、芳香性品種の育成を目的として *C. purpurascens* が用いられたケース以外に、他の野生種が品種開発に利用された事例

はこれまでにほとんどなかった。また、近年花壇や屋外での寄せ植え等、現在までの鉢花としての用途とは異なる屋外栽培型のシクラメン、いわゆる“ガーデンシクラメン”の需要が急増しているが、現在の主要品種は室内観賞用の鉢花としての生産を念頭に、それに適した *C. persicum* の種内交雑によって育成されたものであり、必ずしも屋外での栽培等の用途に適したものではなかった。

また、*Cyclamen* 属野生種の原生地にお

ける生態的特性については紹介されているが、同一地理的条件下での各種間の特性を比較した詳細な研究はなされておらず、*Cyclamen*属植物の花色と花色素についても、いくつかの種について主要アントシアニンが同定されている以外に、ほとんど報告はなかった。一方、シクラメン野生種固有の特性の中には園芸品種にない有用形質があり、これらの遺伝資源としての活用については古くから期待されてきた。しかしながら、前述のように特性の評価や遺伝資源育成のための体系的な研究は行われてこなかったため、前述の*C. purpurascens*などごく一部の種が利用されつつあるものの、これら未利用遺伝資源を有効活用するための学術的情報が乏しいのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究は、シクラメン未利用遺伝資源の特性を把握し、種間交雑における雑種獲得による新たな育種素材を開発することを試み、未利用遺伝資源を利用したシクラメン育種素材、特にわが国の気候に適した屋外栽培型シクラメン育成のための素材の開発に関する知見を得ようとしたものである。

まず、園芸品種を成立させた *C. persicum* 以外の野生種において、すでに把握している強健性、葉の形質、芳香性以外の形質で、特に重要と考えられる花色・花色素についてその特性を明らかにするとともに、種子の休眠・発芽特性、株の休眠性を明らかにすることを目的として実験を行った。続いて、未利用遺伝資源を用いた種間交雑による育種素材の開発を目的として、園芸品種と野生種および異なる野生種間の種間交雑による雑種作出を試みるとともに、簡便な雑種判定法の確立を試みた。さらに、得られた雑種の特性を調査し、未利用遺伝資源を用いた新しいシクラメン育種素材開発の展望について検討した。

3. 研究の方法

(1) シクラメン未利用遺伝資源の特性

① 花色発現に関する特性

*Cyclamen*属野生種の開花株の花弁を採取し、花色および花弁内の色素の分布様相を調査した。続いて、花弁から色素を抽出し、HPLCを用いて、有色花個体では主要アントシアニンを分析し、花色と主要アントシアニンの関係を調査した。また、白色花個体では、アントシ

アニン以外のフラボノイド系色素についてもHPLCを用いて分析を行った。HPLC分析に関しては、いくつかの典型的な花色の園芸品種も用い、野生種の主要花色素と比較した。

② 我が国での栽培における生育サイクルに関する特性

香川大学農学部が無加温温室内で栽培している*Cyclamen*属野生種数種の生育様相、特に開花期、出葉期、結実期および休眠期を調査した。また、いくつかの種では15℃恒温のファイトトロンで生育させ、無加温温室で栽培した個体との生育サイクルの違いを調査した。

③ 種子の発芽および保存に関する特性

香川大学農学部が無加温温室内で栽培している*Cyclamen*属野生種を自殖し、種子を得た。採種直後、または採種後水洗し、1週間自然状態で風乾した種子を、滅菌蒸留水をふくんだろ紙上に無菌播種した。種子は20または30℃一定、あるいは30℃で28日間維持した後に20℃に移す処理区を設け、発芽勢、発芽率を調査した。いずれの種子においても暗黒条件を維持した。また、種子休眠をあまり示さなかった*C. hederifolium*の種子を液体窒素に浸漬し、解凍後、同様に播種して、液体窒素未浸漬の種子と発芽率を比較した。

(2) 未利用遺伝資源を用いた種間交雑による育種素材の開発

① 種間交雑による雑種作出

二倍体シクラメン園芸品種と*C. colchicum*, *C. hederifolium*, *C. mirabile*または*C. purpurascens*との種間交雑、および*C. hederifolium*と*C. purpurascens*との種間交雑を行った。交雑組み合わせにより、交雑7日後、28日後またはその両方の日に果実を採取し、胎座付き胚珠培養により植物体獲得を試みた。胚珠培養には窒素濃度を1/2にした1/2N MS培地に10%ココナッツウォーター、87.7 mMスクロースおよび2%ジェランガムを添加した培地を用いた。また、いくつかの交雑組み合わせでは、87.7 mMのスクロースの代わりに同濃度のマルトースまたはグルコースを添加し、その影響を調査した。

② フローサイトメトリーまたはPCR分析による雑種性の確認

シクラメン野生種、園芸品種、ならば

に種間雑種の個体の成葉を5-7 mm角程度に切り取り、核抽出用バッファー中で細断した。得られた懸濁液を10分程度放置後、20 μm孔径のメッシュでろ過した。ろ過した懸濁液に4倍量の氷冷したDAPIまたはPI染色液を加えて染色し、懸濁液中の核の蛍光強度をフローサイトメーターで分析した。

また、シクラメン野生種、園芸品種、ならびに種間雑種の個体のからDNAを抽出し、抽出した全DNAを鋳型として、PCRにより、核DNAのrRNAの約500 bp領域を増幅した。増幅の確認は臭化エチジウム1 ppmを含む、0.8%または2.0%アガロースゲルを用いて増幅産物を泳動し、UVトランスイルミネーション上で観察した。続いて、増幅したPCR産物を制限酵素の*Rsa* I, *Hae* III または *Msp* I で消化し、PCR-RFLP法による切断断片長の多型検出を試みた。

③ 種間雑種の形質および繁殖に関する特性

まず、種間雑種の生育サイクル、および花色・花色素発現について調査した。これらの調査の方法については、前述の未利用遺伝資源の特性の調査に準じた。続いて、種間雑種開花株の花粉を採取し、アセトカーミンでの染色率、および人工培地上での発芽率を調査し、花粉稔性について検討するとともに、自殖での種子形成について調査した。さらに、種間雑種および野生種を用いて、シクラメン園芸品種で確立している試験管内植物からの体細胞胚形成または不定芽形成による個体再生法の適用を試みた。

4. 研究成果

(1) シクラメン未利用遺伝資源の特性

① 花色発現に関する特性

シクラメン野生種の花色・花色素発現を調査した結果、有色花個体は、主に花弁表皮細胞の液胞に集積したアントシアニンによって花色発現していること、および多くの種において主要アントシアニンはマルビジン配糖体であるマルビジン3,5ジグルコシドであることを明らかにした。これは、野生種の花色素、特にアントシアニン発現の変異幅は園芸品種に比べて明らかに小さく(第1表)、園芸品種を交雑に用いるか、外来遺伝子を用いない限り、野生種の花色の変異拡大は容易ではないことを示している。また、

白色花系の野生種の花弁にはアントシアニンはほとんど含まれておらず、多くの個体でフラボノールが主要花色素となっていることが示唆された。なお、園芸品種と異なり、白色花弁から抽出した花色素類の加水分解物からアントシアニジンがほとんど検出されない個体が多く、検出された場合も微量であった。園芸品種では、多くの白色花でロイコアントシアニジンからのアントシアニジン生成が阻害されていると考えられているが、本研究の結果は、野生種の白色花の発現機構が園芸品種と異なる可能性を示唆している。

シクラメン野生種の花色・花色素発現に関する報告は少ない。したがって、これらの成果は野生種を利用した育種素材開発に有用な知見であると考えられる。

第1表 シクラメン有色花の主要アントシアニン

種	主要アントシアニン ²
園芸品種(赤花系)	Pn3G, Pn3Nh
園芸品種(赤紫花系)	Pn3,5dG, Cy3,5dG, Mv3G
園芸品種(紫花系)	Mv3,5dG
野生種(共通)	Mv3,5dG

² Pn: ペオニジン, Cy: シアニジン, Mv: マルビジン, 3G: 3グルコシド, 3Nh: 3ネオヘスペリドシド, 3,5dG: 3,5ジグルコシド。

② 我が国での栽培における生育サイクルに関する特性

シクラメンの生育サイクルを調査した結果、ほとんどの野生種で夏季に休眠が認められるものの、*C. purpurascens* や *C. colchicum* のように休眠を行わない常緑の野生種も存在することを明らかにした(第2表)。また、休眠を示す種は、必ずしも成長サイクルの一環として休眠しているわけではなく、夏季の高温により休眠しているものと考えられた。さらに、一部の種で夏季の休眠が、休眠後の順調な開花に影響している可能性が示唆された。これらの成果は、未利用遺伝資源を利用したガーデンシクラメンの育成に有用な知見であり、園芸品種を用いない、野生種間の種間交雑によっても常緑性の個体が育成できる可能性を示している。

第2表. シクラメン野生種の休眠サイクル

休眠	種
休眠無(常緑)	<i>C. purpurascens</i> , <i>C. colchicum</i>
休眠有(秋咲き)	<i>C. africanum</i> , <i>C. cilicium</i> , <i>C. graecum</i> , <i>C. hederifolium</i> , <i>C. mirabile</i> , <i>C. intaminatum</i> , <i>C. persicum</i> , <i>C. rohlgisianum</i>
休眠有(春咲き)	<i>C. alpinum</i> , <i>C. balearicum</i> , <i>C. coum</i> , <i>C. creticum</i> , <i>C. repandum</i> , <i>C. rodium</i>

③種子の発芽および保存に関する特性

シクラメン野生種の種子発芽条件を検討したところ、*C. creticum*, *C. repandum* などいくつかの種で種子休眠が認められた(第3表)。これら種子休眠を示した野生種の多くでは、種子を30°Cで処理することにより休眠を打破できる可能性が示唆された。国内外でシクラメン未利用遺伝資源の種子休眠とその打破についての報告はほとんどなく、この成果は、安定した繁殖と栽培時の均一化に有用な知見であると考えられる。また、野生種種子を一旦液体窒素に浸漬し、その後解凍して播種したところ、種子発芽能力が維持されていることを確認できたことから、冷凍処理による種子長期保存の可能性が示唆された。

第3表. シクラメン野生種の種子休眠

種子休眠	種
休眠無	<i>C. persicum</i>
休眠有 ^z	<i>C. africanum</i> , <i>C. cilicium</i> , <i>C. coum</i> , <i>C. creticum</i> , <i>C. graecum</i> , <i>C. hederifolium</i> , <i>C. mirabile</i> , <i>C. intaminatum</i> , <i>C. persicum</i> , <i>C. repandum</i>

^z 下線の種では、供試した個体すべてにおいて種子休眠が認められた。他の種では種子に休眠があまり認められない個体があった。

(2) 未利用遺伝資源を用いた種間交雑による育種素材の開発

①種間交雑による雑種作出

園芸品種を種子親として野生種との交雑を行った場合、ほとんどの交雑組み合わせで胚の発育不全により種子が得られないものと考えられたことから、胚珠培養を試みたところ、第4表に示した交雑組み合わせで雑種後代が得られた。このうち、園芸品種と *C. colchicum* および園芸品種と *C. mirabile* の種間雑種作出に関してはこれまでに報告がなく、シクラメンの遺伝的改良における未利用遺伝資源の利用に大きく貢献するものと考えられる。また、野生種間の種間交雑においても、これまでに報告のない *C. hederifolium* と *C. purpurascens* の交雑組み合わせにおいて、交雑後の胚珠培養により植物体が得られた。シクラメン野生種間では、ごくわずかの限られた交雑組み合わせで種子が得られる以外は、交雑不和合であり、胚救出等で種間雑種が作出された報告はない。さらに、本研究で用いた *C. hederifolium* は強健性の面から、*C. purpurascens* は常緑性の面からガーデンシクラメンの育成に有用であると考えられ、本研究の成果は、未利用遺伝資源を用いたシクラメンの品種開発に大きく貢献できるものと考えられる。

なお、シクラメンの種間交雑のいくつかの組み合わせでは、通常用いられるスクロースよりもマルトースを用いた場合に比較的多くの雑種が得られる傾向が認められた。

第4表. 雑種が確認された種間交雑組み合わせ

種子親 ^z	花粉親
<u>‘ラルゴ’</u>	<i>C. colchicum</i>
<u>‘ピッコロ’</u>	<i>C. colchicum</i>
<u>‘アンネッケ’</u>	<i>C. hederifolium</i>
<u>523P</u>	<i>C. hederifolium</i>
<u>‘ラルゴ’</u>	<i>C. mirabile</i>
<u>550M</u>	<i>C. mirabile</i>
<u>F₁ LP</u>	<i>C. purpurascens</i>
<u><i>C. hederifolium</i></u>	<u><i>C. purpurascens</i></u>

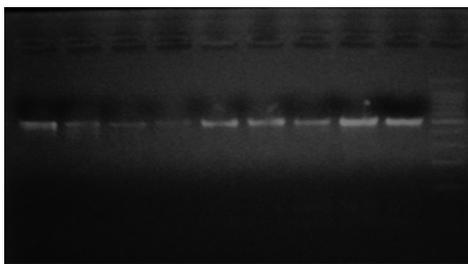
下線は、これまでに報告がない交雑組み合わせ。

^z *C. hederifolium* 以外はすべて二倍体園芸品種または系統

②フローサイトメトリーまたは PCR 分析による雑種性の確認

DAPIおよびPI染色を用いたシクラメン野生種のフローサイトメトリーから、各野生種の核DNA量に種間差異があることを明らかにしたとともに、それぞれのDNA中の塩基構成比（GおよびC：AおよびT）にも種間差異があり、その傾向は亜属の分類と類似していることを明らかにした。また、核DNA量とDNA中の塩基構成比の種間差異を利用した種間雑種の簡易検定が可能であることが明らかになり、本研究で得られた園芸品種と野生種の種間雑種はすべてフローサイトメトリーによる雑種検定が容易であった。フローサイトメトリーによる雑種検定は他の方法に比べて簡便であり、正確な検定には他の方法と組み合わせて用いた方が望ましい点があるが、雑種性の一時的検定には有効な手段になり得るものと考えられた。しかしながら、いくつかの種間では核DNA量とDNA中の塩基構成比に大きな差がなく、これらの種間の交雑においてはフローサイトメトリーのみでは雑種性の判定が難しいものと考えられ、DNAの特定領域の増幅、電気泳動による多型を利用した雑種検定が有効であると考えられた。

シクラメンにおいては葉緑体DNAを用いたPCR-RFLP分析が報告されているが、葉緑体DNAは母性遺伝することが示唆されたことから、種間交雑を用いた遺伝資源開発に利用するには、両性遺伝すると考えられる領域を用いた分析が必要であると考えられた。そこで、核遺伝子のrRNA領域の増幅を試みたところ、多くの種で1バンドの増幅が認められた（第1図）。



第1図. rRNA領域のPCR増幅産物. 左より, *C. africanum*, *C. alpinum*, *C. colchicum*, *C. coum*, *C. graecum*, *C. hederifolium*, *C. purpurascens*, *C. purpurascens silver leaf*, *C. rohlfsianum*の増幅産物. 一番右は100 bp ladder marker.

増幅が可能であった領域が限られていたことから、当初予定していたPCR-SSCPとPCR-RFLPのうちPCR-RFLP分析に絞って野生種および種間雑種の分析を行ったところ、*RSaI*や*HaeIII*等、いくつかの制限酵素を用いた場合に野生種間で多系が認められ、種間雑種の検定にも利用可能であることが確認された。本研究で得られた種間雑種のうち、*C. hederifolium*と*C. purpurascens*の雑種では、両親の核DNA量の差が小さく、フローサイトメトリーによる雑種性の判定は容易ではなかったが、PCR-RFLPの利用により明確に雑種と判断できた。このように、このPCR-RFLP分析は、シクラメンの未利用遺伝資源を用いた育種素材の開発において、有効な雑種検定法になるものと期待される。

③種間雑種の形質および繁殖に関する特性

園芸品種と休眠を行う野生種の種間雑種では、休眠を行わない野生種との種間雑種より、夏期の休眠が強い傾向が認められ、休眠性、開花期等に野生種の影響が認められる場合があることが示唆された。また、花色発現においては、野生種の5GT生成遺伝子の影響で、アントシアニンの配糖体型が3,5ジグルコシド型となり、赤色花系統の育成が困難になることが示唆された（第2図）。なお、園芸品種特有の花心配色パターンが種間雑種においても発現可能であることが示唆された。これらの結果は、未利用遺伝資源を用いた育種素材の開発において有用な知見であると考えられる。



第2図. F₁ (‘ラルゴ’ × *C. colchicum*)の開花株. ‘ラルゴ’は赤色花園芸品種.

また、園芸品種と野生種の種間雑種は、開花に至ったほとんどの個体においても花粉稔性が著しく低かったが、非還元性の花粉と思われる稔性花粉の頻度が比較的高い個体も認められた。しかしながら、

自殖により種子を形成した個体は認められなかった。さらに、野生種ならびに種間雑種は、体細胞胚形成によるマイクロプロパゲーションは困難であったが、不定芽形成を利用したマイクロプロパゲーションにより増殖可能であることが示唆された。これらの知見は、未利用遺伝資源およびそれを利用して育成された育種素材の維持と繁殖に有用な知見であると考えられる。

(3) 今後の展望

本研究の結果、シクラメン未利用遺伝資源のいくつかの特性が明らかになり、その特性を生かした有用未利用遺伝資源を利用したシクラメン育種素材の開発に有効な知見が多く得られた。今後はこれらの知見を利用し、各遺伝資源の特性を有効に活用した新しいシクラメン育種素材の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2件)

- ① 山下英希・高村武二郎, シクラメン園芸品種と *C. colchicum* および *C. mirabile* との種間雑種の作出, 園芸学会, 平成 19 年 9 月 30 日, 香川大学
- ② 山下英希・高村武二郎, シクラメン野生種の核 DNA 量の種間差異, 園芸学会, 平成 19 年 3 月 25 日, 京都テルサ

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・准教授
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