

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580035

研究課題名（和文） 未利用遺伝資源を用いた特異的な花色発現を示すシクラメン育種素材の開発

研究課題名（英文） Breeding of new cyclamen by crosses between cyclamen showing the petal color peculiar to the garden cultivars and wild *Cyclamen* species with useful characteristics

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

研究成果の概要（和文）：

本研究では、シクラメン園芸品種に特異的な色変わりと複色花の発現機構を解明したうえで、これらの特異的な花色発現を示す園芸品種と有用形質を有する未利用遺伝資源との種間雑種およびその複二倍体を胚珠培養とコルヒチン処理により作出した。また、それら種間雑種においても色変わり花や複色花を有する個体が得られることを示し、未利用遺伝資源を用いた特異的な花色発現を示すシクラメン育種素材の開発が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, mechanism of the turning of flower color and the coloration of marginal picotee petals in cyclamen cultivars were clarified. Interspecific hybrids between cyclamen cultivars with petals turning their color or with marginal picotee petals, and wild *Cyclamen* species with useful characteristics were obtained by the ovule culture. The amphidiploids were also obtained by the ovule culture with colchicine treatment. Some plants of the interspecific hybrids had petals turning their color or those with marginal picotee. These results indicate that the breeding of new cyclamen by using cyclamen cultivars with petals turning their color or with marginal picotee petals, and wild *Cyclamen* species

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：園芸科学

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、複二倍体、花色、アントシアニン

1. 研究開始当初の背景

シクラメンでは、花色が最重要形質の1つとして位置づけられており、青色花等まだ育成されていないものはあるものの、黄色花、

複色花、色変わり花などその花色発現の多様化が進んでいる。しかしながら、その花色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

に研究を行い報告している例は少ない。

また、既存のシクラメンの園芸品種は *Cyclamen* 属 22 種のうちの *C. persicum* 1 種のみから成立しており、他の野生種はほとんど園芸作物としては利用されていない。しかしながら、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、これら野生種の遺伝資源としての活用が期待されている。シクラメン園芸品種では、花色変異も花色発現に影響する主要アントシアニンも比較的多様であるが、他の野生種は花色変異の幅も小さい。一方、野生種には、芳香性や強健性など需要は高いものの園芸品種では認められない、またはきわめて不十分な有用形質を有する種がある。

これらのことから、本研究では、園芸品種に特異的な花色発現機構を解明したうえで、有用形質を有する野生種との種間交雑で新たなシクラメンを作出することを構想した。なお、園芸品種特有の花色発現としては、黄花、色変わり花（開花後に花色が変化する花）、複色花が考えられたが、既に種間雑種の花色素発現には野生種のゲノムが影響することを明らかになっており、劣性形質である黄花が認められない野生種を用いた黄色花種間雑種を作出することは容易ではないと予測されるため、色変わり花と複色花に着目することとした。

2. 研究の目的

本研究では、1) 色変わり花および複色花の花色発現機構の解明、2) 園芸品種と未利用遺伝資源の種間雑種の効率的な利用、3) 種間雑種における色変わり花および複色花発現の可能性の解明を解決すべき学術的課題と想定し、シクラメンの花色、特に園芸品種特有の色変わりや複色花について、個体から遺伝子レベルまでの体系的な調査・解析とともに、交雑和合性をもたない種間の雑種獲得技術ならびにその雑種を利用したさらなる育種法に関する技術の開発を行い、未利用遺伝資源を利用した育種素材の計画的な開発法を確立することを試みた。

色変わり花の花色発現機構については、花色・花色素変化を支配する要因を明らかにすることを目的とした。一方、複色花の花色発現機構については、色の異なる部位での花色素の種類と花弁細胞における色素分布の違いを明らかにし、複色花発現の要因を明らかにすることを目的とした。

園芸品種と未利用遺伝資源の種間雑種の効率的な利用については、色変わり花または

複色花園芸品種と野生種との種間交雑後の胚珠培養で確実に種間雑種を獲得することともに、種間雑種を品種育成プログラムに活用する方法を開発するために胚珠培養時のコルヒチン処理による倍加の可能性を明らかにすることを目的とした。

種間雑種における色変わり花および複色花発現の可能性については、種間雑種後代における色変わり花および複色花形質の遺伝性を明らかにすることにより、これらの特異的な花色発現を示す種間雑種の計画的な育成法を検討・開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 色変わり花および複色花園芸品種の花色発現

① 花色変化に及ぼす光の影響

香川大学農学部のビニルハウス内で栽培している‘チャーム’および‘ブライトレッド’の開花直後の花を、ビニルハウスに使用したものと同一フィルム（フィルム区）、390 nm 以下の光を 95% 以上遮断する紫外線カットフィルム（UV カット区）、またはアルミニウム箔で作成した袋（アルミ遮光区）で覆い、7、14 および 21 日後にその花を採取し、実験材料とした。なお、開花 0、7、14 および 21 日後の無被覆の花も対照区として採取した。

採取した花弁は、花色と新鮮重を調査した後、乾燥して保存し、適宜分析に用いた。いずれにおいても、乾燥花弁の slip 部分から 5% ギ酸メタノールで色素類を抽出し、HPLC を用いて花弁中のアントシアニンを調査した。

② 複色花の発現

開花当日に採取したシクラメンの複色花品種‘パピヨン’（赤紫色花）と‘ブルマー・ジュ’の花弁のスリップ部分を白色部と有色部の境界を含むように切り取り、マイクロスライサーを用いて薄切片を調整し、光学顕微鏡下で花色素分布を観察した。また、これらの品種の開花当日に採取して白色部と有色部に切り分け、乾燥して保存していた乾燥花弁の slip 部分から 5% ギ酸メタノールで色素類を抽出し、HPLC を用いて花弁中のアントシアニンを調査した。

③ 花弁の白色発現の解明

シクラメンの白色花発現機構を解明するために、*DFR*、*ANS*、および *3GT* の単離を試みた。*C. persicum* 由来 *DFR*、*ANS*、*3GT*、*actin* 単離のため CTAB 法を用いてシクラメン F₂（‘ピッコロ（赤色花）’ × ‘ピッコロ（紫色

花)の着色開始から展開前までの花弁から total RNA を抽出した。逆転写反応により total RNA から cDNA を合成し、他の植物由来の *DFR*, *ANS*, *3GT*, *actin* の塩基配列を元に設計したディジェネレイトプライマーを用いて PCR を行った。その後、シークエンシングを行い、部分鎖長 *pCypDFR*, *pCypANS*, *pCyp3GT*, *pCypACT1* に相当する部分鎖の塩基配列を決定した。

また、それらアントシアニン生成関連遺伝子のシクラメン白色花品種における発現を調査した。シクラメン白色花品種‘ピュアホワイト’の展開前の花弁をステージ 1、開花当日の花弁をステージ 2 とし、花弁の slip 部分から上記と同様に total RNA を抽出した。白色花におけるフラボノイド生合成下流域関連遺伝子の発現の有無について調査するため、各遺伝子特異的プライマーを用いて RT-PCR 法により *pCypDFR*, *pCypANS*, *pCyp3GT* について遺伝子発現解析を行った。

(2) 園芸品種と野生種の種間雑種獲得

色変わり花園芸品種‘チャーム’または‘ピアス’を種子親に、芳香性の *C. purpurascens* または *C. colchicum* を花粉親に用いた交雑を行った。また、色変わり花園芸品種‘ピアス’を種子親に、強健性を有する *C. hederifolium* を花粉親に用いた交雑を行った。交雑 28 日後に肥大が認められた果実のみを採取し、表面殺菌後、子房壁を取り除き、胎座ごと胚珠を摘出して外植体とした。培地には窒素濃度を 1/2 にした 1/2N MS 培地に 10% ココナッツウォーターおよび 0.2% ジェランガムおよび 3% マルトース水和物を加えたものを基本培地とし、これに 0, 20, 100 または 500 mg · L⁻¹ コルヒチンをそれぞれ添加した培地を用いた。培地は pH 5.8 に調整した後、オートクレーブ滅菌を行った。なお、ココナッツウォーターおよびコルヒチンはオートクレーブ後に添加した。コルヒチン添加培地に置床した外植体は 20°C 暗黒下で 7 日間培養した後に、基本培地に移植した。いずれの培養も 20°C 暗黒下で行った。

また、複色花を有する二倍体シクラメン園芸品種‘プルマージュ’、‘パピヨン’、‘パピリオ’‘プリマドンナ’を種子親に、芳香性の *C. purpurascens* または *C. colchicum* を花粉親に用いた交雑を行った。これらの交雑組み合わせでは、倍加個体を得ることを目的として、1/2N MS 培地に、10% ココナッツウォーター、0.2% ジェランガムおよび 3% のマルトースを添加したものを基本培地とし、100 mg · L⁻¹ コルヒチン添加区と無添加区を設けた。なお、

胚珠培養の方法は前述の方法に準じた。形成された小植物体は継代培養後、葉の展開が認められた時点で、フローサイトメトリーを用いて雑種性および倍加の有無の簡易検定を行った。

さらに、複色花を有する二倍体シクラメン園芸品種‘プルマージュ’、‘パピヨン’、‘ビクトリア’を種子親に、赤みを帯びた若葉を有する *C. mirabile* を花粉親に用いて交雑を行った。これらの交雑組み合わせでは、雑種作出の効率化を目的として、培地には 1/2N MS 培地に、10% ココナッツウォーター、0.2% ジェランガムおよび 87.7 mM のスクロースまたはマルトースを添加したものをを用いた。なお、他の胚珠培養の方法および培養条件は前述の方法に準じた。形成された小植物体は継代培養後、葉の展開が認められた時点で、フローサイトメトリーを用いて雑種性の簡易検定を行った。

(3) 種間雑種における色変わり花および複色花発現の可能性

① 色変わり花

‘チャーム’と *C. purpurascens* および‘ピアス’と *C. hederifolium* (白色花) の種間雑種個体の開花当日および 7 日後の花弁を採取した。採取した花弁は、花色と新鮮重を調査した後、乾燥して保存し、適宜分析に用いた。乾燥花弁の slip 部分から 5% ギ酸メタノールで色素類を抽出し、HPLC を用いて花弁中のアントシアニンを調査した。

② 複色花

‘パピヨン’と *C. purpurascens* の種間雑種の複色花および単色花個体の花弁を開花当日に採取し、slip 部分の花色を調査した後、乾燥保存して適宜分析に用いた。なお、複色花個体では保存前に白色部と有色部を切り分けた。乾燥花弁の slip 部分から 5% ギ酸メタノールで色素類を抽出し、HPLC を用いて花弁中のアントシアニンを調査した。また、開花当日に採取した複色花の花弁を白色覆輪部と有色部の境界を含むように切り取り、マイクロスライサーで薄片に調整し、光学顕微鏡下で花色素分布を観察した。

4. 研究成果

(1) 色変わり花および複色花園芸品種の花色素発現

① 花色変化に及ぼす光の影響

‘チャーム’においては、対照区では、開花 21 日後に明らかに色変わりを示し、花色が濃くなったのに対し、UV カット区では、

あまり色変わりが認められなかった。また、主要アントシアニンのマルビジン 3, 5 ジグルコシド (Mv3,5dG) 量は、開花 14 および 21 日後のいずれにおいても UV カット区で他の処理区よりも低い値を示した。

‘ブライトレッド’においては、開花後の大きな花色の変化はなく、処理区間での花色の差異もほとんど認められなかった。また、主要アントシアニンはいずれもペオニジン 3, 5 ジグルコシド (Pn3,5dG) で、微量または少量の Cy 3,5dG, Mv3,5dG およびペオニジン 3 ネオヘスペリドシド (Pn3Nh) が含まれていた。この中で Pn3,5dG 量は、開花当日と比較して有意に高い値を示していたが、処理区間では明確な差異が認められなかった。一方、Mv3,5dG 量に関しては、対照区では UV カット区およびアルミ遮光区よりも著しく高い値を示した。

以上のように色変わり花の‘チャーム’では、UV カット区で開花後の Mv3,5dG 生成または蓄積が有意に阻害された。一方、色変わり花ではない‘ブライトレッド’の UV カット区では、開花後も Pn3,5dG 量は増加したのに対し、Mv3,5dG の生成または蓄積は明らかに抑制された。これらのことより、シクラメンのいくつかの品種では紫外線が開花後の Mv 配糖体の増大に影響し、品種によってはその増大が開花後の花色変化に影響していることが示唆された。

② 複色花の発現

‘パピヨン’ (赤紫色花) と ‘プルマージュ’ のいずれにおいても、複色花の slip 部分の白色部と有色部の境界を含んだ花弁断面の細胞における花色色素分布を観察したところ、花弁の有色部では、表皮細胞のみにアントシアニンと考えられる赤紫色の色素が観察されたが、白色部においては赤紫色の色素は認められなかった。

両品種のアントシアニンおよびアントシアニンを調査したところ、いずれの品種においても、花弁有色部の主要アントシアニンはマルビジン 3 グルコシド (Mv3G) であり、白色部からはごく微量しかアントシアニンは検出されなかった。

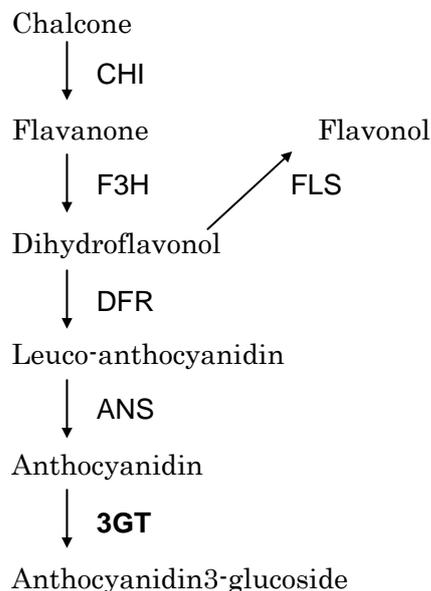
以上のように、シクラメンの複色花品種 ‘パピヨン’ (赤紫色花) と ‘プルマージュ’ においては、花弁の有色部ではアントシアニン生合成経路が機能してアントシアニンが生成されているのに対し、白色部では何らかの要因によりアントシアニン生合成が抑制され、その結果、複色花を生じているものと示唆された。これらのことから、‘パピヨン’

(赤紫色花) と ‘プルマージュ’ 花弁では、アントシアニン生合成に必要な酵素 (DFR, ANS または 3GT) が部位特異的に発現していないものと考えられた。

③ 花弁の白色発現の解明

シクラメンから NADPH 結合領域を有する部分鎖長 *pCypDFR* および 2-オキシグルタル酸ジオキシゲナーゼの結合領域を有する部分鎖長 *pCypANS* が 1 種ずつ得られた。アミノ酸配列を比較したところ *pCypDFR* は *C. graecum* 由来の *DFR* と全体で約 99% の相同性を示し、*pCypANS* は *C. graecum* 由来の *ANS* と全体で約 96% の相同性を示した。部分鎖長 *pCyp3GT* に関しては 2 種が得られ、アミノ酸配列を比較したところ PSPG-box (植物二次代謝産物配糖体化酵素について共通で保存されているアミノ酸領域) を有し、ロベリア由来の *3GT* と全体で約 50% の相同性を示した。この 2 種のアミノ酸配列の相同性は全体で約 85% であった。これらの遺伝子をそれぞれ *pCyp3GT1*, *pCyp3GT2* と暫定的に命名した。

また、RT-PCR の結果、赤色花では上述のすべての遺伝子において発現が確認されたが、白色花においては、*pCypDFR*, *pCypANS*, *pCyp3GT2* の発現は認められたものの、*pCyp3GT1* 検出目的の PCR では予測増幅断片長のバンドが認められなかった。



第 1 図 フラボノイド系色素生合成経路

シクラメンの花弁の白色部分には、フラボノールが含まれていることから、アントシアニン生合成経路 (第 1 図) のジヒドロフラボノールの生成以降、すなわち、DFR, ANS ま

たは 3GT の各酵素による反応のいずれかにおいてアントシアニン生合成が阻害されているものと推測されているが、本研究の結果から、シクラメンの白色花形質は、アントシアニジンの配糖体化を支配する 3GT に相当する *pCyp3GT* の発現抑制または欠失による転写不良により、アントシアニンが生成されないことに起因するものと示唆された。ただし、*pCyp3GT* と考えられるものにはいくつかのコピーがある可能性が示されており、それぞれどれがどの基質に作用するか検討する必要があるとも考えられた。

(2) 園芸品種と野生種の種間雑種獲得

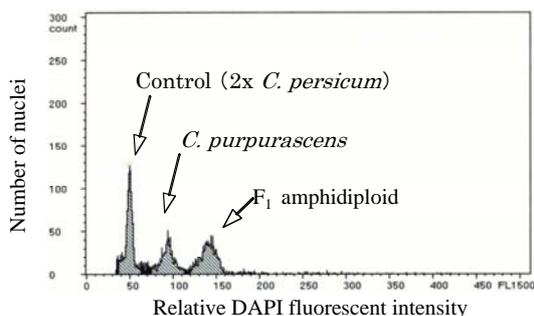
まず、色変わり花園芸品種‘チャーム’または‘ピアス’と芳香性を有する *C. purpurascens* または *C. colchicum* との種間交雑では、全ての交雑組み合わせで種間雑種が得られた。また、‘ピアス’×*C. colchicum* を除く交雑組み合わせにおいて、核DNAの蛍光強度のピークが両親の中間の2倍の値を示す複二倍体と考えられる個体を得られた(第2図)。これらの交雑組み合わせでは、いずれにおいても $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ コルヒチン添加区で複二倍体を得られた。なお、‘チャーム’×*C. purpurascens* では、1個体ながらコルヒチン無処理区で複二倍体を得られたが、他の交雑組み合わせにおいて得られた多数の小植物体中に複二倍体が認められなかったことから、この1個体は非還元性配偶子間の受精か培養時の自然倍加により偶発的に生じたものと考えられた。また、色変わり花園芸品種‘ピアス’と強健性を有する *C. hederifolium* との種間交雑では、複二倍体は得られなかったものの、種間雑種および種間雑種とその複二倍体のキメラ個体を得られた。

複色花園芸品種と芳香性野生種との交雑では、いずれの交雑組み合わせにおいても、コルヒチン無添加区で小植物体を得られた。しかしながら、これらの小植物体のうち、倍数性が確認できたもののなかに複二倍体は認められなかった。一方、コルヒチン処理区では、コルヒチン無処理区より小植物体形成が抑制され、一部の交雑組み合わせでは小植物体を得られなかったものの、‘パピヨン’×*C. purpurascens*, ‘ブルマージュ’×*C. purpurascens*, ‘ブルマージュ’×*C. colchicum* および‘プリマドンナ’×*C. colchicum* の交雑において、得られた小植物体のなかに、複二倍体と考えられる個体が認められた。

一方、複色花園芸品種と園芸品種には認められない赤色葉を有する *C. mirabile* の種間雑

種作出を試みたところ、全ての交雑組み合わせにおいて種間雑種個体を得られた。なお、培地中の糖の種類が小植物体形成へ及ぼす影響は認められなかった。

以上のように、色変わり花品種または複色花品種と有用形質を有する野生種との交雑において、ほとんどの交雑組み合わせで、高い確度で種間雑種が得られ、多くの交雑組み合わせで、胚珠培養時のコルヒチン処理、特に $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ コルヒチン処理により種間雑種の倍加個体を得られることが示された。



第2図. ‘チャーム’と *C. purpurascens* の複二倍体雑種のフローサイトメトリーにおける典型的なヒストグラム。

(3) 種間雑種における色変わり花および複色花発現の可能性

‘チャーム’と *C. purpurascens* の種間雑種において、開花7日後の花弁 slip 部では開花当日のものと比較して、明らかに花色が濃くなる傾向を示す個体が認められた。また、この個体の開花7日後の花弁 slip 部の主要アントシアニンは *Mv3,5dG* で、微量の *Pn3,5dG* も含まれていた。開花7日後の花弁 slip 部の *Mv3,5dG* 量は、開花当日と比較して明らかに高い値を示したことから、花色の変化は *Mv3,5dG* 量の増加によるものと示唆された。

‘ピアス’と *C. hederifolium* (白色花) との種間雑種(第3図A)において、開花当日は白色であるが、開花7日後には薄赤紫色に色変わりする個体が認められた。この個体の開花当日の花弁からはほとんどアントシアニンが検出されなかったものの、開花7日後の花弁からは *Mv3,5dG* が検出された。

‘パピヨン’と *C. purpurascens* の種間雑種の単色花の slip 部分と複色花(第3図B)の slip 部分の有色部は、同様の呈色を示した。また、複色花の白色覆輪部と有色部の境界の細胞における花色色素分布を観察したところ、花弁有色部分で表皮細胞にアントシアニンと考えられる色素が観察されたが、白色覆輪部では、アントシアニンと考えられる色素の発現は認められなかった。また、種間雑種

個体の単色花 slip 部分および複色花 slip 部分の有色部の主要アントシアニンは、いずれも Mv3,5dG であり、少量の Mv3G も検出された。



第3図 ‘ピアス’ と *C. hederifolium* (白色花) との種間雑種(A), および ‘パピヨン’ と *C. purpurascens* の種間雑種 (B) の開花個体。

以上のように、異なる種類のゲノムを有する種間の雑種においても、色変わり花および複色花形質が遺伝し、親の園芸品種と同様の特異的な花色発現を示す個体の獲得が期待できることが示された。なお、これら複二倍体ではないシクラメン種間雑種の花粉稔性を調査した結果、ほとんどの個体が不稔であったものの、非還元性花粉と考えられる稔性花粉を比較的高い割合で形成する個体も認められた。

(4) まとめ

本研究の結果、園芸品種に特異的な色変わりと複色花の花色素発現機構について、前者が紫外線領域の光によるアントシアニン、特に Mv 配糖体の生合成促進によるものであること、後者が花弁表皮部分においてアントシアニンが部位特異的に発現していないことによるものであることが示された。また、これらの特異的な花色発現を示す園芸品種と有用形質を有する未利用遺伝資源との種間雑種およびその複二倍体を作成され、それら種間雑種においても色変わり花や複色花を有する個体を得られることから、未利用遺伝資源を用いた特異的な花色発現を示すシクラメンの育種プログラムの構築が可能であることが示された。

これまでに色変わり花等を有するシクラメン種間雑種およびその複二倍体作出の報告はなく、本研究の成果により、未利用遺伝資源を利用したシクラメン遺伝資源の開発の可能性が広がるものと期待される。

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)

[学会発表] (計5件)

① 近藤奈穂子・高村武二郎、シクラメンに

おける色変わり花種間雑種の作出、園芸学会、平成23年9月25日、岡山大学。

② 岡田 翔・鳴海貴子・深井誠一・高村武二郎、シクラメンの白色花発現機構、園芸学会、平成23年3月20日、宇都宮大学(東日本大震災のため講演会は中止、発表は成立)。

③ 高村武二郎・近藤奈穂子、シクラメンの花色および花色素発現に及ぼす紫外線の影響、園芸学会、平成22年9月20日、大分大学。

④ 藤原亜紀・高村武二郎、シクラメン複色花園芸品種と *Cyclamen purpurascens* との種間雑種における色および花色素発現、園芸学会、平成22年9月20日、大分大学。

⑤ 高村武二郎・藤原亜紀、シクラメン複色花の花色および花色素発現、園芸学会、平成21年9月27日、秋田大学。

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