

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580045

研究課題名(和文) Pelargonium属Hoarea節野生種の変異創出による新規優良品種の作出

研究課題名(英文) Development of desirable cultivars by utilization of wild species in Pelargonium section Hoarea

研究代表者

柿原 文香 (KAKIHARA, Fumika)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：80101377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、Pelargonium属Hoarea節野生種のコニークな特性を持つ新品種の育成である。Hoarea節に属するP. rapaceumの葉片および葉片由来カルスのコルヒチン処理によって4倍体を作成した。これらの花は大型ではなかったが、4倍体作出の方法を初めて提示した。また、P. oblongatum(Hoarea節)とP. fulgidum(Ligularia節)との間で相互交雑を行い、種間雑種後代(F1, F2およびBC1)を得た。これら植物個体では、Hoarea節の特性(花色、花色素および草姿など)の導入が認められ、新規特性を持つ品種育成の育種素材としての活用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop new commercial cultivars of Pelargonium, using wild species in Pelargonium section Hoarea, including some that have great potentials as breeding materials. Colchicine treatment to the leaf of in vitro plantlets and regenerated calli of P. rapaceum (Hoarea section) was carried out. Three tetraploid strains were induced. Although they did not produce large flowers, I propose an initial protocol for colchicine treatment to produce tetraploids of P. rapaceum. Reciprocal crosses between P. oblongatum (Hoarea section) and P. fulgidum (Ligularia section) were performed. Regardless of the seed parent, seeds could be obtained, and F2 and BC1 progeny, which was crossed with P. oblongatum, were also produced. In these progenies, the characteristics of P. oblongatum were observed in the color and pigment of flower and the shape of a plant. Therefore these progenies could be useful as breeding materials for producing promising new cultivars in Pelargonium.

研究分野：農学

キーワード：Pelargonium属 Hoarea節 コルヒチン処理 種間交雑 組織培養 花色 花色素

1. 研究開始当初の背景

Pelargonium 属植物の染色体数の基本数は、 $x=8,9,10$, および 11 が報告されており、特に $x=9$ 及び 11 の系列が多数を占める。染色体数や類縁関係など系統分化に関する研究は多数報告されているが、園芸学・育種学に関する学術的な研究は僅少である。申請者はこれまでに、*Pelargonium* 属植物に関して、本属に特異的な胚珠の選択的発達現象解明、雄性不稔性・交雑親和性や類縁性、種間交雑による諸形質の変異拡大、花色および組織培養法による植物体の再生などの研究を行ってきた。 *Pelargonium* 属野生種は 17 世紀初頭にイギリスに導入され、以来、200 年以上もの間、ヨーロッパを中心に育種され、数多くの園芸品種が育成された。園芸品種は 4 グループに分類され、ヨーロッパや北アメリカを中心に花色・草姿・香りなどが楽しめる主要な花卉として親しまれている。

一方で、既存品種の殆どがヨーロッパで育成されており、日本の気候に適した品種の育成が必要である。また、花卉産業においては多様性が重要視され、常に新規性を持つ系統の作出が切望され、これに対応すべく実用的研究が必要である。

2. 研究の目的

Pelargonium 属の現存園芸種の成立には、野生種 15 節のうちわずかに 5 節しか関与しておらず、未活用の節(種)を育種素材に用いれば、新規品種作出が期待できる。*Hoarea* 節植物は、約 70 種から構成される多数の種を含有する大きな節で、花色・花形・草姿・根形・休眠性など、現存の栽培品種には存在しないユニークな特性を数々持っているものの、既存の栽培品種の成立には全く関与していない。従って *Hoarea* 節は既存品種のイメージとは全く異なる栽培品種を作出する重要な遺伝資源と位置づけられる。そこで、本研究では *Hoarea* 節野生種を育種素材として変異拡大を図り、新規性・区別性に富む優れた特性を持つ、鑑賞価値の極めて高い、かつ、日本の気候に適した新規優良系統創出を試みることにした。

変異の作出は、*Hoarea* 節野生種の葉片培養にコルヒチン処理を加え、大きい花形を持つ 4

倍体系統を作出する、*Hoarea* 節と *Ligularia* 節との間における種間交雑により行った。

3. 研究の方法

Hoarea 節野生種の *P. rapaceum* を供試して葉片培養にコルヒチン処理を加え、大きい花形を持つ 4 倍体系統を作出した。さらに、*P. rapaceum*(*Hoarea* 節)と *P. fulgidum*(*Ligularia* 節)との種間雑種を作出し、*Hoarea* 節野生種が持たない、*P. fulgidum* の有する形質(四季咲き性、常緑、草姿、強健など)を *Hoarea* 節野生種に導入することで、ユニークな特性を持つ系統を作出した。

(1) *P. rapaceum* の 4 倍体系統の作出

葉片およびカルス培養

P. rapaceum の成熟葉からの幼植物再生は、Sukhumpinijら(2010)によった。

再生幼植物の葉片およびカルスへのコルヒチン処理

葉片は、Murashige and Sckoog(MS)液体培地(0.1mg/INAA, 0.1mg/IBA, 30g/l シュークロー、6.5mg/l 寒天を添加)に種々のコルヒチン濃度(0, 10, 1,000mg/l)と処理時間(24, 48, 72 時間)を組み合わせた培地で、振盪培養(100rpm)した。葉片培養により形成されたカルスの処理条件は、コルヒチン濃度(0, 1, 5, 10, 20mg/l)、MS 固体培地、暗黒下、30 日間であった。

倍数性の判定

再生植物体についての倍数性は、フローサイトメーターによる DNA 量の測定、孔辺細胞、花粉粒および花形の大きさの測定結果を、元の 2 倍体植物と比較することで評価した。フローサイトメーター(Accuri C6, BD Biosciences, 東京)による DNA 量の測定は、Jadrná et al. (2009)の方法を参考にを行った。

特性調査

4 倍体と推定された再生植物体について、花色、花粉稔性および自殖による結莢率、種子稔性などの諸特性を調査した。花色については、RHS カラーチャートを用いた目視による調査と、色

差計(ミノルタ, CM-2600d9)を使用してL*a*b*値を測定した(L*は明度, a*は赤色値, b*値は黄色値を示す)。L*a*b*値から彩度(C)を次式により算出した。

$$C = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

花粉稔性の調査は,1%アセトカーミン染色法で行った。

(2) *P. oblongatum* と *P. fulgidum* との種間雑種作出と後代個体の諸特性調査

種間交雑

P. oblongatum (2系統)と*P. fulgidum*(2系統)との間で相互交雑を行い,得られたF₁植物の自殖によるF₂,および*P. oblongatum*による戻し交雑を行い,BC₁個体を得た。

諸特性調査

F₁, F₂およびBC₁の花色,花色素などの形態的特性を評価した。花色および花粉稔性の調査は上述の方法と同様に行った。花色素については,外可視分光光度計(Jasco V-570)により吸収スペクトル(波長)を測定した後,高速液体クロマトグラフィー(HPLC)(Shimadzu LC-20AD)により花弁の色素分析を行った。方法やHPLCの条件はSukhumpinijら(2012)と同様であった。色素の同定には,カロテノイド色素については標準物質を,アントシアニン色素については既知の栽培品種*P. × domesticum* 'Dark venus'を標品として用いた。

4. 研究成果

(1) *P. rpaceum* の4倍体系統の作出

コルヒチン処理により得られた植物個体を,フローサイトメーターによるDNA量(図1),孔辺細胞の大きさ(図2)および花粉粒の大きさ(図3)により倍数性を評価した。再生植物個体の多くは2倍体が混数体で,結果的に,葉片由来1個体およびカルス由来2個体,計3個体が4倍体と評価された。これら植物の花形,花色は2倍体植物のそれらとほぼ同様で,形態的な変異は求められなかった。また,可稔花粉を用いて自殖を試みたが,自殖種子は得られなかった。このように,4倍体植物は作出されたものの,

優良とは言い難い特性を示した。しかしながら,*Hoarea*節において,コルヒチン処理による倍数体作出方法が初めて確立できた。今後,最適処理条件で多数の外植体を用いた実験を行えば,さらに多数の4倍体が得られる。それらの中には,大きな花弁を有するなどの優良個体の出現が期待でき,本実験の成果は,*Hoarea*節を遺伝資源とする*Pelargonium*属植物の倍数性育種を初めて提案した。

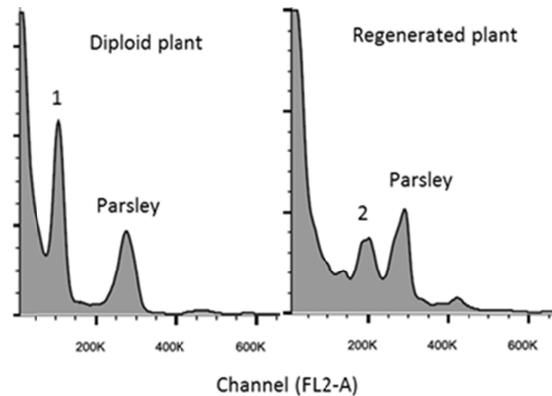
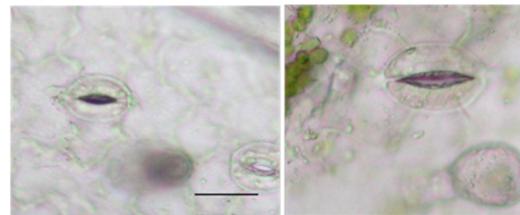


図1. フローサイトメーターによる倍数性の評価

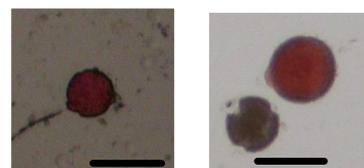
(左: 野生種2倍体, 右: 再生植物4倍体, 標準: パセリ)



野生種2倍体

再生植物4倍体

図2. 孔辺細胞の大きさによる倍数性の評価



野生種2倍体

再生植物4倍体

図3. 花粉粒の大きさによる倍数性の評価

(2) *P. oblongatum* と *P. fulgidum* との種間雑種作出と後代個体の諸特性調査

種間交雑

相互交雑の結果、胚救済法を用いない通常の交雑のみで、いずれを種子親に用いても雑種種子が得られ、健全な植物個体へと生育した。ただし、*P. fulgidum*を種子親とした方が花粉親とするよりも、結莢率、種子稔性ともに良好であった。得られた F_1 個体から、 F_2 および *P. oblongatum* を花粉親とした戻し交雑個体 (BC_1) も容易に得ることができた。

雑種後代植物の諸特性

花色：RHS カラーチャートによれば、*P. fulgidum*(F)の2系統は赤グループ(赤色および薄赤紫色)に、*P. oblongatum*(O)では黄色グループにそれぞれ分類された。 F_1 ($F \times O$) 個体のほとんどは赤い花であったが、薄赤紫色の花を持つ個体も得られた。 BC_1 個体ではさらに花色変異が認められた(図4)。これらの花色を CIEL*a*b*表式系における L*a*b*値で表示したところ、L*a*b*値は幅広く分布しており、 F_2 、 BC_1 世代での花色の変異拡大が確認できた(図5)。

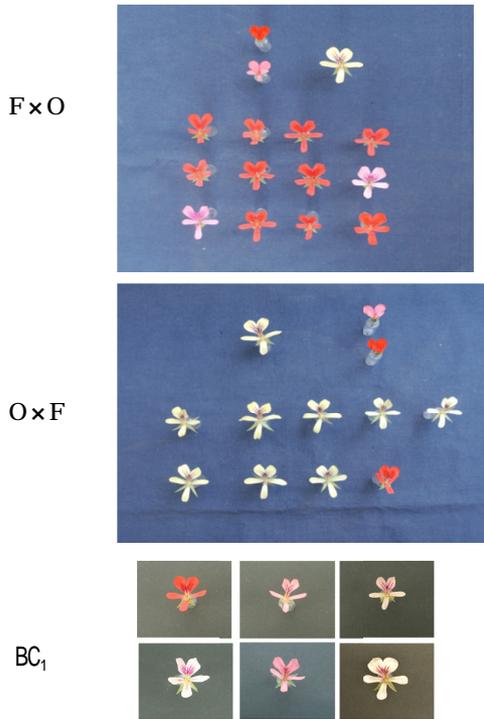


図4. 交雑後代における花色の変異

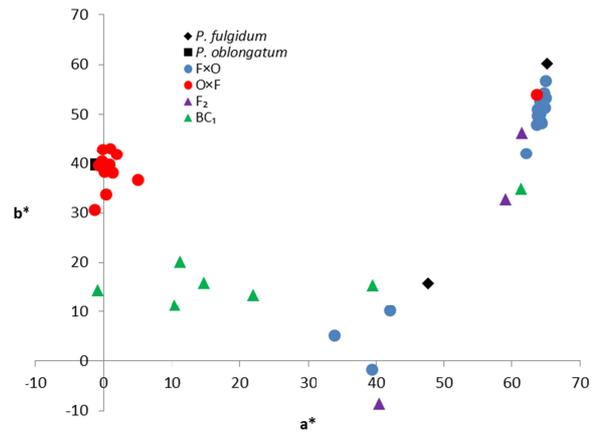


図5. CIEL*a*b*表式系における a*b*値の分布

花色素：分光光度計で吸光度を測定した所、含有色素は、アントシアニンとカロテノイドであると推定された。そこで、アントシアニンおよびカロテノイドを HPLC により調査した。5種類(デルフィニジン Dp, シアニジン Cy, ペラルゴニジン Pg, ペオニジン Pn, マルビジン Mv)のアントシアニンが検出された。また、カロテノイドの主要な色素はルテイン(Lu)で、微量の-カロテンも同定された。赤色系の花弁ではアントシアニン系色素が、黄色系のそれにはカロテノイド色素が主に含まれていた。花弁に含まれるアントシアニンおよびカロテノイド色素の種類、含有量、色素の組み合わせ、および含有割合によって花色に多様性が生じていると結論できた。従って、今後、後代の獲得に当たっては、交雑親の選抜に十分考慮する必要がある。

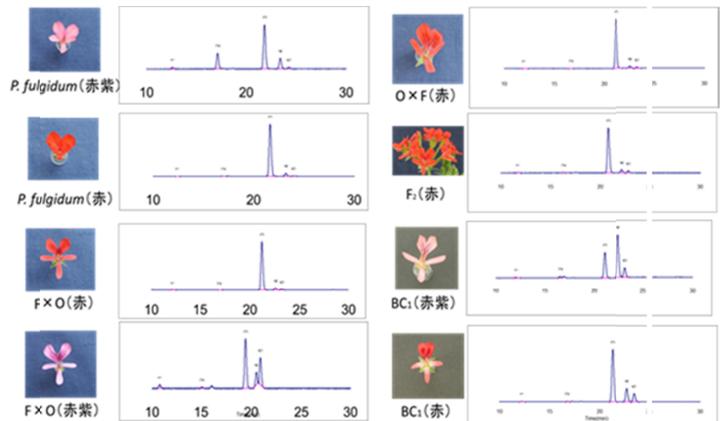


図6. 花色とアントシアニン色素

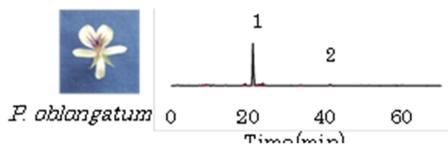


図7. 花色とカロテノイド色素

形態的特性: 葉形, 根形, 草姿, 花形を調査した. $F \times O$ から得られた個体の葉, 根形は両親の中間型を示し, 草姿は *P. oblongatum* のそれに類似していた. 一方, $O \times F$ から得られた個体の1個体は, 中間の特性を示した. その他の12個体は, 葉形, 根形, 草姿, 花形のいずれも *P. oblongatum* のそれとほぼ同様であった. しかしながら, 得られた個体を RAPD 法で分析した結果, 両親固有のバンドが確認され, 雑種であることが裏付けられた.

以上のように, 2 種間における種子稔性は高い上, 得られた雑種の後代は多様な特性を持つことから, これらを育種素材として活用することで, 新規特性を有するペラルゴニウム園芸品種の育成が期待できる.

<引用文献>

Jadrná, P., F. Kobza, and O. Plavcová: Polyploidization of *Pelargonium x hortorum* L. H. Bailey in greenhouse conditions. Hort. Sci. 36, 31-37(2009).

Sukhumpinij, P., Kakiyara, F. and Kato, M.: In vitro regeneration from mature leaf explants of *Pelargonium rapaceum* (L.) L' Hérit. Scientia Hort. 126:385-389(2010).

P. Sukhumpinij, F. Kakiyara, K. Hondo and M. Kato : Analysis of pigments in yellow-flowered *Pelargonium* section *Hoarea*. Acta Horticulturae, 937:711-716(2012).

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】(計2件)

P. Sukhumpinij, M. Inada, K. Hondo, and F. Kakiyara : In vitro Colchicine Induction of

Tetraploids in *Pelargonium rapaceum* (L.) L' Hérit. Acta Horticulturae, In press. 査読有

Fumika KAKIHARA and Kana HONDO:

Effect of Treatment with Concentrated Sulfuric Acid and a Homogenizer, and Temperature at Germination and Storage on Seed Germination in Eight *Pelargonium* Species. Environ. Control Biol., 51 (2), 71-77, 2013 査読有
<https://mc.manuscriptcentral.com/ecinb>.

【学会発表】(計8件)

朝倉健太・本藤加奈・柿原文香:*Pelargonium fulgidum* と *P. oblongatum* との種間交雑後代における諸特性. 日本育種学会四国談話会第77回講演会, 香川県木田郡三木町, 2014年11月28日.

朝倉健太・本藤加奈・柿原文香:*Pelargonium fulgidum* と *P. oblongatum* との種間交雑後代における花色と花色素. 園芸学会平成26年度秋季大会, 佐賀県佐賀市, 2014年9月28日.

P. Sukhumpinij, M. Inada, K. Hondo, and F. Kakiyara: In vitro Colchicine Induction of Tetraploids in *Pelargonium rapaceum* (L.) L' Hérit. 29th International Horticultural Congress, Brisbane, Australia, Aug. 17-22, 2014.

朝倉健太・本藤加奈・柿原文香:*Pelargonium fulgidum* と *P. oblongatum* との種間雑種作出と F_1 個体の諸形質. 日本育種学会四国談話会第77回講演会, 香川県善通寺市, 2013年11月29日.

藪野航大・本藤加奈・柿原文香:*Pelargonium oblongatum* の葉片培養による植物体再生 - 特に, 発根培地の検討. 日本育種学会四国談話会第78回講演会, 香川県善通寺市, 2013年11月29日.

伊藤智理・本藤加奈・柿原文香:*Pelargonium*

属 *Hoarea* 節野生種の RAPD 解析 . 日本育種学会
四国談話会第 77 回講演会, 香川県綾歌郡綾歌町,
2012 年 11 月 30 日.

朝倉健太・本藤加奈・柿原文香 : コルヒチ
ン 処 理 に よ る 四 倍 体 *Pelargonium*
appendiculatum 作出法の検討 . 日本育種学会四
国談話会第 77 回講演会, 香川県綾歌郡綾歌町,
2012 年 11 月 30 日.

大矢祐一郎・本藤加奈・柿原文香 :
Pelargonium oblongatum の葉片培養におけるオ
ーキシンとサイトカイニンの影響 . 日本育種学
会四国談話会第 77 回講演会, 香川県綾歌郡綾歌
町, 2012 年 11 月 30 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿原 文香 (KAKIHARA, Fumika)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号 : 8 0 1 0 1 3 7 7