

令和元年6月14日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15227

研究課題名(和文) エチレン非依存的な切り花の日持ち向上を目指したダリア老化メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism in dahlia flower senescence to extend of the vase life of ethylene independent cut flower

研究代表者

東 未来 (AZUMA, Mirai)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：80783414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ダリアの花の老化メカニズムを明らかにすることによって、エチレン非依存的に老化する切り花の日持ち向上を目的とした。ダリアの花の老化時には、糖質の濃度の低下が見られること、細菌の増殖によって水揚げが悪化すること、この現象には品種間差があることを明らかにした。そのため、品種によっては、糖質と抗菌剤の併用処理が日持ちを延長することを明らかにした。さらに、花弁の萎凋は花弁におけるプログラム細胞死に伴って起こり、このプログラム細胞死が起きるタイミングは品種間差があることを明らかにした。このことからダリアの花の老化は遺伝的に制御されている可能性が高く、老化に関与する遺伝子をRNA-seq解析で探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダリアの花の老化は糖質の不足、水揚げの悪化、エチレンによって促進される場合があり、これらには品種間差があることを明らかにした。そのため、品種によって適切な処理を行うことによって、日持ちの延長効果が期待される。さらに、ダリアの花弁の萎凋はプログラム細胞死に伴って進行することを明らかにした。プログラム細胞死を制御することが可能となれば、より効果的に日持ちを延長することができる。本研究では実験材料と解析スペースの省力化を可能にした小花を用いた日持ち調査方法を確立したため、今後これらの技術を活用することで、より日持ちの延長に有効な薬剤等の効率的なスクリーニングが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cut dahlia flower is a popular floricultural crop, but the vase life of cut dahlia is very short. The flower senescence in several flower species is promoted by ethylene, therefore treatment of ethylene inhibitor can extend the flower vase life in these flower species. However, the flower senescence of dahlia is independent of ethylene effects, and the mechanism of flower senescence in dahlia remains unclear. In this study, we clarified that bacteria proliferation in vase solution and deficiency of carbohydrate promote flower senescence in dahlia. Therefore, treatment of glucose with antibacterial agent can extend the vase life of cut dahlia flower, although this effect depends on cultivar. Furthermore, petal wilting could be induced by program cell death in petal, because petal wilting was observed to occur with program cell death in petal. Additionally, the timing of petal wilting and program cell death differed depending on cultivars.

研究分野：園芸学

キーワード：ダリア dahlia 日持ち プログラム細胞死 エチレン 小花 切り花 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダリア (*Dahlia variabilis*) は主要花き品目になりつつあるが、花の寿命が短いことが最大の欠点である。一般に、花の老化にはエチレンが関与する機会が多い。多くのエチレン感受性の花きでは、エチレン作用阻害剤を処理することによって、寿命を延長できる。しかしながら、ダリアはエチレンに対する感受性は認められるが、エチレン阻害剤処理による老化遅延効果はなく、老化に伴うエチレン生成の上昇が認められないことからダリアの花の老化はエチレンに非依存的であることが明らかにされている。これまでのところ、合成サイトカイニン剤 (BA) の散布処理により、1.5 倍程度日持ちを延ばすことが可能である (Shimizu-Yumoto and Ichimura, 2013) が、寿命は 1 週間程度であり、多くの切り花品目と比較すると長いとはいえない。そのため、ダリアの花の老化機構を明らかにし、ダリアの花の寿命を延長する研究の基盤を確立する必要がある。

ダリアは、遺伝子の情報がほとんど明らかにされていないことに加え、多くの品種は 8 倍体であるため解析が困難な花き品目である。さらに、ほとんどの品種は花が大きく、実験材料として扱いにくい。そのため、ダリアにおけるエチレン非依存的な老化機構の解明のためには、ダリアで花の寿命を解析するための効率的な方法の確立、花の老化時に起こる現象の解明、エチレン非依存的な老化に関わる遺伝子の情報が必要である。

2. 研究の目的

ダリアにおけるエチレン非依存的な老化機構の解明のためには、ダリアで花の寿命を解析するための効率的な方法を確立することが必要である。そのため、(1) 小花実験系による、実験材料・解析スペースの省力化を目指した。一般に、花の老化には (2) 糖質の不足、(3) 生け水内の細菌増殖による導管閉塞、(4) エチレンの影響、(5) プログラム細胞死等が関与していることが知られている。本研究では、このような現象がダリアの花の老化時にも起きているのかを検証することとした。さらに、(6) ダリアの花の老化に関与する遺伝子の探索を試みた。

(1) 小花実験系による、実験材料・解析スペースの省力化

ダリアは小花が集合して一つの花を構成している頭状花序であるため (図 1)、小花を一つの花として扱い、花の寿命を検定することができると考えた。これにより、実験材料と解析スペースを省力化できる。

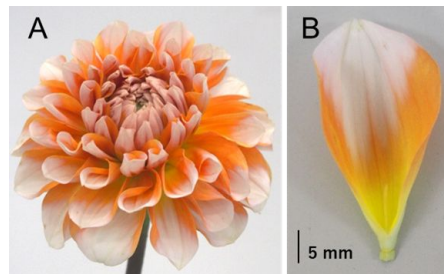


図 1. ダリアの花の形態
A: ダリアの頭状花序, B: ダリアの小花

(2) 糖質の不足がダリアの花の老化に及ぼす影響

花の老化の要因の一つとして、糖質の不足が考えられる。また、ダリアは外側の花弁から萎凋していく特徴があるため、これにはダリアの花序の中で糖質の移行が起きており、その現象が花の老化に影響を及ぼすと推測した。そこで、ダリアの花の老化には糖質の不足が影響しているのか、糖質の不足する要因は何であるのかを明らかにすることを目的とした。

(3) 細菌の増殖がダリアの花の老化に及ぼす影響

花の老化要因の一つとして、水揚げの悪化が考えられる。水揚げの悪化は、生け水内の細菌が増殖することにより、切り花の茎の導管閉塞が起こることによって引き起こされる。そこで、ダリアの場合にも、生け水内の細菌増殖等が花の寿命に影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とした。

(4) エチレンがダリアの花の老化に及ぼす影響

ダリア '黒蝶' では、エチレン処理によって花の萎凋が若干促進することから、エチレンに対する感受性はある程度あることが報告されている。しかしながら、エチレン合成阻害剤による花の老化遅延が見られないことから、他のキク科植物と同様にダリアの花の老化にエチレンは直接的に関係しないと考えられてきた (Shimizu-Yumoto and Ichimura, 2013)。一方で、一部の品種では輸送中の落弁が問題となっている。一般的に、落弁はエチレンの作用によって引き起こされるため、品種によってはダリアの花の老化にはエチレンが関与しているのではないかと推測した。本研究では複数品種のダリアを用い、エチレンに対する感受性およびエチレン生成量の違いを明らかにすることとした。

(5) プログラム細胞死がダリアの花の老化に及ぼす影響

花の老化時にはプログラム細胞死 (PCD) が起きている場合があり、カーネーション等の花きでは PCD に伴って花弁の萎凋が誘導されることが知られている。ダリアの花の老化にも PCD が関与しているのかを明らかにすることを目的とした。

(6) ダリアの花の老化に関する遺伝子の探索

エチレン非依存的な花の老化に関する遺伝子として、*EPH1* (NAC 転写因子) がアサガオで報告された (Shibuya et al., 2014). この *EPH1* 遺伝子の発現を抑制させた形質転換体では、花の日持ちが 2 倍程度延長する。ダリアにおいても、*EPH1* 遺伝子と同等の機能をもつ NAC 転写因子が花の老化に関与している可能性がある。そこで、NAC 転写因子等、ダリアの花の老化に関する遺伝子の探索を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 小花実験系の確立

ダリア‘アジタート’、‘かまくら’、‘黒蝶’、‘マジックピンク’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’、‘ヘブンリーピース’、‘ポートライトペアビューティー’、および‘パープルストーン’の小花を蒸留水に挿して老化に要する日数を検定し、花序全体を蒸留水に挿したときの老化に要した日数と比較することによって、小花実験系の確実性を評価した (図 2)。



図 2. 小花実験系の方法

A: ダリアの頭状花序, B: ダリアの小花

(2) 糖質の不足がダリアの花の老化に及ぼす影響

ダリア‘アジタート’、‘ヘブンリーピース’、‘かまくら’、‘黒蝶’、‘マジックピンク’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’、‘NAMAHAKE キュート’、‘ポートライトペアビューティー’および‘パープルストーン’の切り花および小花を用い、2%グルコース処理を行い、糖質処理による日持ちの延長効果 (花弁が萎凋するまでの日数・新鮮重) を調査した。さらに、ステージ別および列ごとの小花に含まれる糖質の濃度を液体クロマトグラフィー (HPLC) によって測定した。これによって、花の老化時の糖質の濃度の変化を調査した。

(3) 細菌の増殖がダリアの花の老化に及ぼす影響

ダリア‘アジタート’、‘ヘブンリーピース’、‘かまくら’、‘黒蝶’、‘マジックピンク’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’、‘NAMAHAKE キュート’、‘ポートライトペアビューティー’および‘パープルストーン’の切り花において抗菌剤 (CMIT/MIT) 処理を行い、抗菌剤処理による日持ちの延長効果 (花弁が萎凋するまでの日数・新鮮重) を調査した。さらに、生け水に含まれる細菌数を品種別に調査した。

(4) エチレンがダリアの花の老化に及ぼす影響

本研究ではダリア‘カーネリアン’、‘ガーネット’、‘ヘブンリーピース’、‘かまくら’、‘マジックピンク’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’、‘NAMAHAKE キュート’、‘NAMAHAKE マジック’、‘ポートライトペアビューティー’、‘パープルストーン’、‘彩雪’に 10 ppm エチレンの連続処理を行い、エチレンに対する感受性を調査した。これに加えて、‘カーネリアン’、‘ヘブンリーピース’、‘ポートライトペアビューティー’および‘パープルストーン’では花弁および花托の部位別・日数別のエチレン生成量をガスクロマトグラフィー (GC) によって解析した。

(5) プログラム細胞死がダリアの花の老化に及ぼす影響

プログラム細胞死 (PCD) の特徴として、核および DNA の断片化が挙げられるため、ダリアの小花の DNA の断片化の検定を開花後の日数別に行った。PCD 解析には、日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市) 内の圃場に植え付けた 5 品種のダリア‘かまくら’、‘黒蝶’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’および‘ポートライトペアビューティー’を用いた。ダリアは開花後も株付きの状態 (intact) を維持し、花序の一番外側の列の小花を毎日採取し、凍結粉砕後 DNA 抽出を行った。抽出した DNA は RNase 処理後にアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、スミアの有無を確認することで、DNA の断片化を調査した。

(6) ダリアの花の老化に関する遺伝子の探索

PCD および花の老化を誘導する遺伝子を探索することを目的とし、蕾から萎凋に至るまでのステージ別に RNA-seq 解析を行った。RNA-seq 解析には、株付き (intact) 状態の‘かまくら’を用い、サンプリングステージは PCD が起こる前のステージである開花 2 日前、開花当日、PCD が開始する開花後 2 日目、花弁の萎凋が確認された開花後 8 日目の合計 4 ステージとした。サンプルは各花の最も外側の列の花弁を用いた。各花の外花弁は採取後に凍結粉砕し、RNA 抽出を行った。抽出した RNA は DNase 処理後、BGI JAPAN 株式会社に委託して RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 小花実験系の確立

ダリアは小花が集合して一つの花を構成している頭状花序であるため、小花を一つの花として扱い、花の寿命を測定する小花実験系の有効性を検証した。‘アジタート’、‘かまくら’、‘黒蝶’、‘マジックピンク’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’、‘ヘブンリーピース’、‘ポートライトペアビューティー’、および‘パープルストーン’について検証したところ、花序全体で老化に要する日数が長い傾向にある品種‘ムーンワルツ’、‘黒蝶’および‘ミッチャン’では小花単体であっても長い傾向にあった。一方で、花序全体で老化に要する日数が短い傾向にある品種‘マジックピンク’や‘ポートライトペアビューティー’では小花単体であっても短い傾向にあった。以上のように花序全体と小花単体での日持ち日数の傾向が同様であることから、小花実験系が有効であることが示された。この小花実験系を用いることにより、品種の日持ち日数の調査や花の延命剤のスクリーニング等を行う際に、実験材料と解析スペースの省力化が可能となる。また、ダリアの日持ち日数は小花単体で品種間差があることから、ダリアの花の日持ち日数は花弁そのものに起因するものであることが示唆された。

(2) 糖質がダリアの花の老化に及ぼす影響

一般に、エチレン以外の花の老化要因の一つには、糖質不足が挙げられる。そこで、‘アジタート’、‘ヘブンリーピース’、‘かまくら’、‘黒蝶’、‘マジックピンク’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’、‘NAMAHAGE キュート’、‘ポートライトペアビューティー’および‘パープルストーン’のダリア切り花について糖質処理を行った。その結果、糖質処理区では対照区よりも、新鮮重の増加、退色の抑制が確認された(図3)。さらに、同様の10品種のダリアの花に含まれる糖質を調査したところ、全ての品種でグルコースとフルクトースが、イノシトールおよびスクロースよりも高い値で検出された。糖質量の変化を詳細に調査するため、‘ムーンワルツ’および‘ポートライトペアビューティー’で外側の小花と内側の小花に分け、糖質の調査を行った。外側の小花では、グルコースとフルクトース含量が採花2日後から減少したのに対し、内側の小花ではこの減少は見られなかった。ダリアの花は外側から順に萎れるが、花序内での糖質の競合が花の外側からの老化の一因である可能性が示された。



図3. ダリア切り花における糖質処理の効果

‘黒蝶’、‘ミッチャン’、‘ポートライトペアビューティー’において、2%グルコースを処理してから4日後の様子を示した。

(3) 細菌の増殖がダリアの花の老化に及ぼす影響

エチレン以外の花の老化要因の一つには、水揚げの悪化が挙げられる。水揚げは、生け水中の細菌が増殖することによって導管閉塞が起こり、悪化することが知られている。本研究では、‘アジタート’、‘ヘブンリーピース’、‘かまくら’、‘黒蝶’、‘マジックピンク’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’、‘NAMAHAGE キュート’、‘ポートライトペアビューティー’および‘パープルストーン’のダリアで抗菌剤処理を行い、日持ち日数を調査した。その結果、‘かまくら’、‘マジックピンク’および‘パープルストーン’において花弁の萎凋が遅れることが確認された。さらに、これらの品種では抗菌剤処理を行うことによって、新鮮重の低下が抑制された。しかしながら、抗菌剤の効果があまり見られない品種も存在した。各品種別に生け水における細菌の増殖量を調査した結果、品種によって細菌の増殖量が異なることが示された。また、抗菌剤の効果が特に高かった‘かまくら’、‘マジックピンク’および‘パープルストーン’等の品種では、細菌の増殖量も高い傾向にあった。このことから、ダリアの花の日持ち日数には細菌の増殖量も影響しており、この細菌の増殖量には品種間差があることが示された。

(4) エチレンがダリアの花の老化に及ぼす影響

ダリアの花の老化におけるエチレンの影響を改めて調査するため、‘カーネリアン’、‘ガーネット’、‘ヘブンリーピース’、‘かまくら’、‘マジックピンク’、‘ミッチャン’、‘ムーンワルツ’、‘NAMAHAGE キュート’、‘NAMAHAGE マジック’、‘ポートライトペアビューティー’、‘パープルストーン’、‘彩雪’の切り花ダリアを用い、エチレンに対する感受性を調査した。10 ppm エチレンを処理し、萎凋や落弁に要する日数の計測を行った。その結果、エチレン処理によってほとんどの品種で、花弁の萎凋や落弁の促進が見られた。しかしながら、エチレン処理後2日以内に落弁や萎凋が確認できた品種も存在したが、3~4日経過した後に落弁や萎凋が起こる品種も存在した。これらの結果から、過去に報告されている‘黒蝶’で見られたエチレンに対する感受性は、他のダリア品種においてもある程度存在することが示されたが、その感受性の度合い

は品種によって異なることが明らかとなった。

さらに、'カーネリアン'、'ヘブンリーピース'、'ポートライトペアビューティー'および'パープルストーン'のエチレンの生成量を花弁と花托に分けて解析した。その結果、エチレン処理によって落弁が誘導された'カーネリアン'では花托でエチレン生成量が高く、エチレン処理によって花弁の萎凋が誘導された'ポートライトペアビューティー'では花弁でのエチレン生成量が高かった。一方で、'ヘブンリーピース'や'パープルストーン'のようにエチレン生成がほとんど見られない品種も存在した。これらの結果より、花弁や花托からエチレンが生成されて老化が促進される品種も存在すること、エチレンに対する感受性はあるが内在のエチレン生成量はほとんどなく、花の老化にはほとんど影響しないと推測される品種の存在が明らかとなった。

(5) プログラム細胞死がダリアの花の老化に及ぼす影響

糖質と抗菌剤の併用処理によって、切り花ダリアの日持ちが延長することが明らかになったが、他の一般的な切り花と比較すると日持ちの延長効果が少ない。このことから、糖質の不足、水揚げの悪化、エチレンの影響は、老化を促進する要因の一つではあるが、老化を制御する決定的な因子とは言えないと考えた。花の老化、特に花弁の萎凋にはプログラム細胞死(PCD)が関与することが知られている。そこで、ダリアにおいてもPCDが花の老化に影響しているのかを調査した。PCDの解析には、'かまくら'、'黒蝶'、'ポートライトペアビューティー'、'ミツチャン'、'ムーンワルツ'を用いた。これらの品種について、開花後も株付き状態を維持した(intact)花の日持ちを調査したところ、'かまくら'は開花後4日程度で外花弁が萎凋したのに対し、'ミツチャン'では開花10日後も萎凋が確認されず、10日目以降に落弁する傾向にあった。この際に、'かまくら'では開花後2日程度でPCDが開始していたのに対し、'ミツチャン'ではPCDが起きていなかった。他の3品種は開花後5~8日程度で外花弁の萎凋やPCDが確認された。これらの結果から、intactの花でも日持ちに品種間差があり、花弁の萎凋はPCDに伴って起きていることが明らかとなった。

また、切り花においても同様の解析を行った結果、全体的に日持ち日数が短くなることに加え、PCDの開始時期も早まる傾向にあった。

(6) ダリアの花の老化に関与する遺伝子の探索

PCDおよび花の老化を誘導する遺伝子を探索することを目的とし、蕾から萎凋に至るまでのステージ別にRNA-seq解析を行った。RNA-seq解析には、'かまくら'のPCDが起こる前のステージである開花2日前、開花当日、PCDが開始する開花後2日目、花弁の萎凋が確認された開花後8日目の各花の外花弁を用いた。PCDに関連する転写因子としてはNAC転写因子が知られているが、今回のRNA-seq解析ではNAC転写因子と推定される配列が114種類得られ、この中には花の老化に伴って発現が上昇するものも存在した。これらの配列の中に、ダリアの花の老化に関与する遺伝子配列が存在すると考えられる。

引用文献

Kenichi Shibuya, Keiichi Shimizu, Tomoko Niki and Kazuo Ichimura (2014) Identification of a NAC transcription factor, EPHEMERAL1, that controls petal senescence in Japanese morning glory. *The Plant Journal* 79: 1044-1051

Hiroko Shimizu-Yumoto and Kazuo Ichimura (2013) Postharvest characteristics of cut dahlia flowers with a focus on ethylene and effectiveness of 6-benzylaminopurine treatments in extending vase life. *Postharvest Biology and Technology* 86: 479-486

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Azuma Mirai, Onozaki Takashi and Ichimura Kazuo, Effects of bacterial proliferation and soluble carbohydrate levels on the vase life of cut dahlia (*Dahlia variabilis*) flowers, *The Horticulture Journal*, 88, 1, 2019, pp. 106 - 115, 10.2503/hortj.OKD-176 (査読有)

[学会発表](計2件)

東未来, 川口夏生, 熊坂健仁, 百瀬博文, 腰岡政二, ダリア花の老化におけるプログラム細胞死の品種間差, 園芸学会平成31年度春季大会, 口頭発表, 2019

東未来, 小野崎隆, 市村一雄, ダリアの花の老化におけるエチレンの影響, 園芸学会平成29年度秋季大会, 口頭発表, 2017

6. 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。