

令和 4 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15835

研究課題名（和文）矮化剤を利用した花卉複色模様の改変とそのメカニズムの解明

研究課題名（英文）Modification of petal bicolor pattern using plant growth retardants and the clarification of its mechanism

研究代表者

東 未来 (AZUMA, Mirai)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：80783414

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：複色模様のペチュニアに、矮化剤（ジベレリン生合成阻害剤）の一種であるダミノジッドを処理すると花卉の白色部位が増加し、ジベレリン（GA）を処理すると赤色部位が増加することを明らかにした。ダミノジッド処理を行い、白色化したペチュニアでは、活性型GAを処理すると赤色部位が増加し模様が元に戻るが、非活性型GAを処理しても白色のままであった。さらに、複色模様の形成にはCHSの部分的なPTGSが関与していることが知られているが、ジベレリン処理によってCHSのsiRNAが減少し、PTGSが抑制されていることが示された。以上の結果から、ペチュニアの複色模様の形成にはGAが関与している可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペチュニアは鉢物で利用される場合が多く、コンパクトな草姿が求められるため、矮化剤を処理することで徒長の抑制（矮化）を行っている場合があるが、矮化剤は様々な種類があり、その効果は植物種・品種等によっても異なる。本研究では、矮化剤の種類によっては、複色模様ペチュニアの花色に影響を及ぼすことを明らかにし、その現象にはジベレリンが関与している可能性を見出した。このことは、花の複色模様の形成メカニズムを明らかにする上で重要な知見になると考えられる。また、ペチュニアの花色に影響を及ぼさずに草丈を低くする技術や、複色模様の安定化などの模様をコントロールする技術への応用に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that the white area of petunia petals with a bicolored pattern increased when daminozide (a gibberellin biosynthesis inhibitor) treated, and the red area increased when gibberellin (GA) treated. In the daminozide-treated petunias that turned white, the treatment with the active GA increased the red areas and restored the pattern, while treatment with the inactive precursor of GA left the petals white. Furthermore, partial PTGS of CHS is known to be involved in the formation of the bicolor pattern, however gibberellin treatment reduced the amount of CHS siRNA, indicating that PTGS was suppressed. For these results, our study indicated that GAS could be involved in the formation of the petunia bicolor pattern.

研究分野：園芸科学

キーワード：ペチュニア 花色 矮化剤 ジベレリン 複色模様 花

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

花きは花色のバリエーションが豊富なだけでなく、その模様也多岐にわたる。ペチュニアでは二色以上の花色(複色)模様の品種も存在し、その模様のパターンも星形、覆輪、グラデーション模様と多様である(図1)。ペチュニアの花弁に含まれる赤色素としては、アントシアニンが知られており、アントシアニンの合成に關する酵素群は、CHS, CHI, DFR, ANS, 3GT が明らかにされている。ペチュニアの花弁ではこれらの酵素の遺伝子が発現し、アントシアニンが合成されるが、星形模様や覆輪模様等の複色模様の白色部位では CHS の siRNA が発現し、CHS の転写後抑制 (PTGS) が起きていることが明らかにされている。しかしながら、なぜ、花弁の外縁部でのみ CHS の PTGS が誘導されているのかは明らかになっていない。



図1. 多様なペチュニアの花模様

また、ペチュニアは花壇苗や鉢物としての利用が主であるため、草丈が低くコンパクトなものが好まれる。そのため、矮化剤(ジベレリン生合成阻害剤)を処理することで、草丈伸長の抑制が行われるが、花弁の花色にも影響を及ぼす場合がある。現在利用されている矮化剤には多数の種類が存在し、矮化剤に含まれる化合物によって、ジベレリン(GA)生合成経路上のどの酵素の働きを抑制するのか、その作用点は異なる。矮化剤の種類によって、ペチュニアの草姿および花色・模様にも及ぼす影響は異なり、ペチュニアの品種によってもその作用は異なると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、矮化剤がなぜ複色模様にも影響を及ぼすのかを明らかにすることで、複色模様の形成メカニズムの一端を解明することを目的とした。そのため、(1)作用点の異なる4種類の矮化剤と花模様の異なる4種類のペチュニアを用い、草丈や花色に及ぼす影響を明らかにし、(2)各矮化剤の濃度の違いが、花模様や草丈に及ぼす影響を調査した。さらに、(3)花模様の形成にジベレリンが關与するのかを明らかにすることを試みた。(4)ジベレリンや矮化剤が及ぼす、ペチュニアのアントシアニン合成に關する遺伝子発現への影響を調査した。

3. 研究の方法

(1) 矮化剤処理が及ぼすペチュニアの草丈および花模様への影響

植物材料として、赤色単色品種の‘バカラレッド’、グラデーション模様の‘レッドモーン’、複色で覆輪模様の‘レッドピコティ’、星形模様の‘スターレッドアンドホワイト’の模様の異なる赤色系ペチュニア4品種を用いた。各ペチュニアの種子を播種してから約30日後に鉢上げし、鉢上げしてから約30日後に各矮化剤を一株あたり10 mL ずつ葉面散布した。矮化剤は、ダミノジッド、トリネキサパックエチル、パクロブトラゾールおよびプロヘキサジオンカルシウム塩を含む4種類の市販の薬剤を用いた(図2)。矮化剤処理を行なったペチュニアの対照区として、無処理のペチュニアとGA処理を行なったペチュニアも用いた。各矮化剤とGAの葉面散布処理を行なってから、1週間に2回ずつ草丈の長さや花模様の調査を行なった。

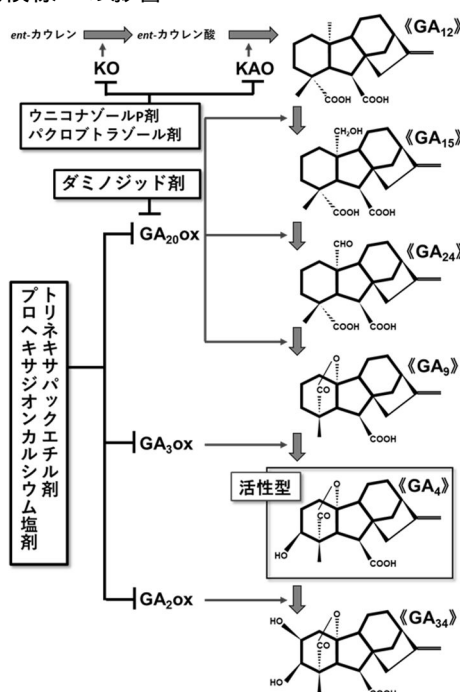


図2. ジベレリン生合成経路と矮化剤の作用点

(2) 濃度別の矮化剤処理が及ぼすペチュニアの花模様への影響

植物材料として、複色で星形模様の‘スターレッドアンドホワイト’を用いた。ペチュニアの種子を播種して約30日後に鉢上げし、鉢上げしてから約30日後に、矮化剤に含まれる化合物標品を1000 ppm, 100 ppm, 10 ppmの3段階に調整し、花芽に10 μL ずつ点滴処理した。化合物は、ダミノジッド、トリネキサパックエチル、パクロブトラゾール

ルおよびプロヘキサジオンカルシウム塩の4種を用い、開花後に花模様の調査を行なった。

(3) GAが及ぼす花模様の形成への影響

ペチュニアの内在のGAとしては、GA₄やGA₉が報告されている。GA₄は活性型GAであり、GA₁₂からGA₁₅、GA₂₄、GA₉と代謝が進み、活性型のGA₄が合成されて、非活性型のGA₃₄に代謝される(図2)。ペチュニアの内在GAが花模様形成に及ぼす影響を調査するため、GA₂₄、GA₉、GA₄、GA₃₄を別々に処理した。ペチュニアは星形模様の‘スターレッドアンドホワイト’を用い、花芽に各GAを10 μLずつ点滴処理を行なった。さらに、GA合成経路を止めた状態で各GAの花模様形成に及ぼす影響を調査するため、ダミノジッド処理を行ったペチュニアの花芽に各GAを10 μL点滴処理した。

また、ペチュニアの内在GA量を明らかにするため、花弁のGA₉、GA₄の定量を試みた。無処理のペチュニアの開花日の花弁を用い、赤色部位と白色部位に分けてGAを抽出し、HPLCによって分画した。GAを含む画分を用い、UPLC/MS/MSによってGA₉およびGA₄の含有量を分析した。

(4) ジベレリンや矮化剤が及ぼすアントシアニン合成に関わる遺伝子発現への影響

ペチュニアの赤色色素であるアントシアニンの合成に関与する遺伝子としては、*CHS*、*CHI*、*DFR*、*ANS*、*3GT*が明らかになっている。矮化剤処理あるいはジベレリン処理による、各遺伝子の発現の変動を明らかにするため、‘スターレッドアンドホワイト’の開花直前の花弁を用いてリアルタイムPCRによる発現解析を行なった。無処理の花弁は赤色部位、白色部位、矮化剤処理およびジベレリン処理は花弁全体をサンプルとした。

ペチュニアの複色模様の形成にはsiRNAによる*CHS*のPTGSが関与していることが、明らかとなっているため、矮化剤処理およびジベレリン処理をした時の*CHS*のsmall RNA量をQuantiMir RT Kit Small RNA Quantitation Systemを用いたリアルタイムPCRによって解析した。

4. 研究成果

(1) 矮化剤処理が及ぼすペチュニアの草丈および花模様への影響

ジベレリンの生合成経路の中で作用点の異なる4種類の矮化剤の処理を行い、それぞれの草姿や花模様へ及ぼす影響を調査した。ダミノジッド、トリネキサパックエチル、パクロブトラゾールを処理したペチュニアでは、全ての品種で草丈が低くなった。特に、パクロブトラゾール処理では、草丈が著しく低くなったことに加え、葉や花の大きさが小さくなった。一方で、プロヘキサジオンカルシウム塩を処理したペチュニアでは、草丈は無処理のペチュニアと比べてほとんど違いはなかった。ジベレリン処理したペチュニアでは草丈が最も高くなった(図3)。



図3. 各矮化剤およびGA処理後2週間後のペチュニア‘スターレッドアンドホワイト’の様子

Control: 無処理, SADH: ダミノジッド処理, TNE: トリネキサパックエチル処理, PBZ: パクロブトラゾール処理, Pro-Ca: プロヘキサジオンカルシウム塩処理, GA: ジベレリン処理

花模様に関しては、ダミノジッド処理

を行った‘スターレッドアンドホワイト’と‘レッドピコティ’では、処理後2週間後に開花した花で白色部位が増加し、ほぼ白色の花となった。一方でジベレリン処理を行った場合には、赤色部位が増加し、ほぼ赤色の花となった。‘パカラレッド’や‘レッドモーン’では、ダミノジッド処理およびジベレリン処理のいずれの処理を行った場合にも花模様に変化はなかった。トリネキサパックエチル処理を行った場合には、全体的に花色が薄くなり、ピンクに変化した。パクロブトラゾール処理では、花の大きさが小さくなるものの、花色・模様には変化がなかった。

以上の結果より、ダミノジッド処理は白色部位を増加、ジベレリン処理は赤色部位を増加、トリネキサパックエチル処理は花色を薄くする効果があることが明らかとなった。

(2) 濃度別の矮化剤処理が及ぼすペチュニアの花模様への影響

ダミノジッド、トリネキサパックエチル、パクロブトラゾール、プロヘキサジオンカルシウム塩を1000 ppm、100 ppm、10 ppmに調整し、ペチュニア‘レッドピコティ’の花芽に点滴処理を行い、花模様への影響を調査した。その結果、ダミノジッド処理は100 ppm以上の濃度で白色部位が増加し、10 ppmではほとんど花模様に影響しなかった。トリネキサパックエチルおよびプロヘキサジオンカルシウム塩の場合には、1000 ppmでは花弁全体の色が薄くなったが、100 ppmでは赤色部位が増加した。10 ppmでは花模様にはほとんど影響はなかった。パクロブトラゾール処理では、花が小さくなったが、花模様には変化がなかった。トリネキサパックエチルとプロヘキサジオンカルシウム塩は作用点が同様であり、ジベレリン生合成経路だけでなく、アントシアニンの生合成経路上の酵素の働きを直接抑制することが報告されている。そのため、花

弁着色が薄くなったと考えられる。ジベレリンの生合成経路上では、ダミノジッドは GA₉ から GA₄ への代謝を主に抑制するため、活性型 GA である GA₄ の蓄積量が減少すると考えられる。一方で、低濃度の処理の場合には、トリネキサパックエチルとプロヘキサジオンカルシウム塩は GA₄ から GA₃₄ への代謝を主に抑制しており、活性型 GA である GA₄ の蓄積量が増加する場合があると考えられる。このような作用点の違いが、矮化剤の種類や処理濃度によって、花模様 に及ぼす影響が変化したものと考えられる。

(3) GA が及ぼす花模様の形成への影響

星形模様、覆輪模様の複色品種のペチュニアにジベレリンを処理すると、赤色部位が増加することが明らかになった。ジベレリンは現在までに 136 種類以上のものが同定されているが、その中で活性を持つジベレリンはごくわずかである。これまでの報告から、ペチュニアの花弁においては GA₉、GA₄ が検出されていることが明らかにされている。GA₄ は活性型 GA であり、GA₁₂ から GA₁₅、GA₂₄、GA₉ と代謝が進み、活性型の GA₄ が合成された後、非活性型の GA₃₄ に代謝される。ダミノジッドは主に GA₁₅ から GA₂₄ への代謝を阻害する化合物であるため、ダミノジッドを処理すると活性型 GA が合成されなくなる。本研究では活性型 GA が赤色部位の領域決定に影響を及ぼすのかを明らかにするため、ペチュニアの内在 GA と考えられる GA の処理実験を行った。GA₂₄、GA₄ および GA₃₄ を処理した結果、GA₂₄ および GA₄ では花弁の赤色部位が増加した。GA₃₄ では花模様に変化はなかった。このことから GA₂₄ はペチュニア生体内で活性型 GA である GA₄ に代謝され、GA₄ と同様の影響を及ぼしたと示唆された。一方で GA₃₄ は、GA₄ が代謝された非活性型 GA であるため、花色に影響を及ぼさなかったと考えられる。

ダミノジッド処理によって GA の生合成経路を止めたペチュニアにおいて、GA₂₄、GA₉、GA₄ を処理した。ダミノジッドを処理したペチュニアでは、赤色部位が減少し、花弁全体が白色になった。活性型 GA である GA₄ 処理した場合には、花弁の赤色部位が増加し、元の花模様に戻る ことが明らかとなった。一方で、GA₂₄、GA₉ を処理した場合には花弁全体が白色のままで、GA₄ のような効果は得られなかった。以上の結果より、活性型 GA である GA₄ は花弁赤色部位を増加させる効果があり、GA₄ はペチュニア花弁の内生 GA でもあることから、花弁の花模様の形成には GA が関与している可能性が考えられる。

花弁の白色部位および赤色部位では、活性型 GA 量が異なっているのではないかとすることを想定し、UPLC/MS/MS を用いて GA 量の測定を試みた。しかしながら、開花後の花においては、赤色部位、白色部位ともに、GA₉、GA₄ のどちらの GA もほとんど検出されなかった。開花後にはすでに GA が代謝されており、花芽の成長初期段階に GA が関与している可能性が考えられる。

(4) ジベレリンや矮化剤が及ぼすアントシアニン合成に関わる遺伝子発現への影響

ペチュニアの赤色系色素であるアントシアニンの合成に関わる遺伝子として、*CHS*、*CHI*、*DFR*、*ANS*、*3GT* の発現解析を行った。赤色部位と白色部位に分けて発現量を調査した結果、*CHS* の発現量は、赤色部位と比較して、白色部位では著しく減少していた。複色模様の形成においては、*CHS* の siRNA によって転写後の抑制 (PTGS) が関与していることが報告されている。ジベレリン処理やダミノジッド処理によって *CHS* の small RNA 量が変化するのかを調査した結果、無処理の赤色部位およびジベレリン処理を行った花では small RNA が検出されなかったのに対し、無処理の白色部位およびダミノジッド処理を行った花では small RNA が検出された。以上の結果から、複色模様のペチュニアでは、*CHS* の転写後抑制によって白色部ができるということ、さらにジベレリン処理によって siRNA の蓄積が抑制されることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 館 葉月, 東 未来, 百瀬 博文, 村松 嘉幸, 窪田聡, 中山 真義, 腰岡 政二
2. 発表標題 ジベレリンが及ぼすペチュニアの複色模様形成への影響
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 未来, 館 葉月, 百瀬 博文, 村松 嘉幸, 窪田聡, 中山 真義, 腰岡 政二
2. 発表標題 矮化剤がペチュニアの花模様に及ぼす影響
3. 学会等名 日本植物色素談話会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東 未来, 館 葉月, 百瀬 博文, 村松 嘉幸, 中山 真義, 腰岡 政二
2. 発表標題 矮化剤処理がペチュニアの花模様に及ぼす影響
3. 学会等名 植物化学調節学会第54回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮本賢二, 工藤陽史, 菅原敬, 牛尾亜由子, 道園美弦, 芳村裕之, 山形敦子, 吉成知温, 藤晋一, 宇田明, 桐生進, 園公一, 今給黎征郎, 渡邊孝政, 佐藤博紀, 東未来, 雨木若慶, 野口有里紗, 服部裕美, 二村幹雄, 斎藤英夫, 吉川信幸, 奥村義秀, 進藤俊英, 諏訪康子, 上田善弘, 土井元章, 中嶋千鶴, 泉義仁, 小高香, 松下陽介	4. 発行年 2021年
2. 出版社 農山漁村文化協会	5. 総ページ数 272
3. 書名 花卉 vol.13	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------