

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06026

研究課題名（和文）交雑育種によるダリアの日持ち性向上と良日持ちダリア系統の老化抑制機構の解析

研究課題名（英文）Improvement of vase life by cross-breeding in dahlia and analysis of mechanism regulating flower senescence in dahlia lines with long vase life

研究代表者

小野崎 隆 (Onozaki, Takashi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・グループ長補佐

研究者番号：90355719

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ダリア切り花の日持ち性を遺伝的に向上するため、日持ち性による選抜と選抜系統間での交雑を5世代にわたって繰り返し、良日持ち性品種エターニティシリーズを育成するとともに、第4世代から常温（23℃）、蒸留水で2週間の日持ち日数を有する超長命性系統003-15を選抜した。NAC転写因子familyに属する3種類のNAC遺伝子（NAC4-4、NAC6-2、NAC9-8）の発現が花の老化の直前に発現上昇し、エチレン処理によって発現が促進されること、その発現上昇の時期は良日持ち性品種では遅れることを明らかにした。これらNAC遺伝子の発現の遅れが、良日持ち性に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダリアは人気の高い切り花品目であるが、最大の欠点は切り花の日持ち性に劣る点である。切り花として流通の多いバラやカーネーションは常温で7日以上日持ちするが、ダリアは日持ちが5日未満と短いため、ホームユース向けの利用が難しかった。本研究で、交雑育種によるダリアの日持ち性向上が可能であることを明確に示し、常温（23℃）、蒸留水で2週間の日持ち日数を有する超長命性系統を選抜した。消費者ニーズの高い日持ち性に優れる点が最大の特徴の、ダリアエターニティシリーズを育成した。さらに、日持ち性向上に関わる3種類のNAC遺伝子の存在を明らかにした本研究は、花きの日持ち性育種への貢献が非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to improve the vase life of dahlia cut flowers genetically, we used 22 cultivars as initial breeding materials, repeatedly crossed them, and selected promising offspring with long vase life for five generations. Then, we developed commercially successful dahlia cultivars, the Eternity series with long vase life. In particular, the 4th-generation line 003-15 vase life was about 14 days in distilled water at room temperature, which we define as ultra-long vase life.

The expression levels of three NAC genes (NAC4-4, NAC6-2, NAC9-8) belonging to the NAC transcription factor family increases just before petal wilting. In ethylene treatment conditions, the expression levels of these genes increased after 1-2 days in all cultivars. These NAC transcription factors might be the key regulators for dahlia flower senescence.

研究分野：花き園芸学

キーワード：日持ち性 超長命性 日持ち日数 交雑育種 老化関連遺伝子 NAC転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ダリアは切り花流通が増加し、年々シェアを伸ばしている新規有望花きであるが、日持ち性に劣る点が最大の欠点である。しかしながら、ダリアを含めた花きの育種目標としては、花色や花型、草姿などの外見的な観賞性の改良に重点がおかれ、日持ち性を考慮した育種はあまり取り組まれてこなかった。そこで、研究代表者らは2014年からダリアの日持ち性の向上を目指した交雑育種を開始した。ダリアの花の老化要因としては、エチレンの作用、生け水内の細菌増殖による水揚げの悪化、糖質の不足等が報告されているが、その影響は品種によって異なり、品質保持剤を処理した場合でも、従来品種では10日以上の日持ちを有することはほとんどない。したがって、これまでに報告されている老化要因の他にも、ダリアの花の加齢による花弁の老化を調節する何らかの仕組みがあると考えられるが、詳細は不明である。

そこで本研究では以下の課題を解決する。

- (1) 交雑育種によるダリアの日持ち性向上効果を検証し、超長命性ダリア系統を開発する。
- (2) ダリアの花の老化機構および良日持ち性ダリアの老化抑制機構を解明する。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者らは2014年から交雑育種によるダリアの日持ち性向上の研究に取り組み、22品種を育種材料として品種間交雑を行い、開花個体の日持ちを調べた(第1世代)。第1世代から日持ち性による選抜とその選抜系統間での交雑を、2017~2018年の第3世代まで繰り返し行い、ダリアの遺伝的な日持ち性向上の可能性を検討した。また、各世代の実生調査において日持ち終了時の老化形態や諸特性を調査し、日持ち性との関係を検討した。ダリアの日持ち性に基づく3世代にわたる選抜と交雑の結果、全実生の平均日持ち日数が、第1世代の4.4日、第2世代の5.2日から、第3世代では6.1日へと第1、第2世代に比較してそれぞれ1.7日、0.9日増加し、世代を進めることにより、日持ち日数が7日以上の日持ち性個体の出現頻度が増加した。日持ちが短い代表的花き品目のダリアについて、交雑育種による日持ち性の向上が可能であることが明確に示され(Onozaki and Azuma, 2019)、さらなる日持ち性向上の可能性が示唆された。

そこで本研究では、第3世代、第4世代選抜系統間での交雑により得た後代である第4世代、第5世代を育成して、第4世代、第5世代実生集団の日持ち性を評価し、日持ち延長効果を検証するとともに、第4世代、第5世代選抜系統の日持ち性を収穫時期、栽培法の異なる3区(夏秋期・露地、夏秋期・ハウス・鉢、冬春期・施設・土耕)で評価し、超長命性を示す系統を最終選抜した。

(2) ダリアは品種によって花の日持ち性が異なり、品質保持剤を処理した場合にもその効果は品種によって異なる。また、交雑育種によって日持ち性が向上することから、花の老化を制御する遺伝子が存在することが示唆された。花の老化を促進する遺伝子としては、アサガオにおいてNAC転写因子 family の *EPHEMERAL1* (*EPH1*) が報告されている(Shibuya et al., 2014)。NAC転写因子は幅広い植物種に存在することが知られており、ダリアでRNA-seq解析を行ったところ、花の老化時に発現するNAC転写因子の存在が認められた。そこで本研究では、RNA-seq解析で検出されたNAC転写因子を花の老化を促進する可能性のある候補遺伝子とし、開花後日数別に発現解析を行うこととした。また、日持ち性の異なる複数品種のダリアを用い、NAC転写因子の発現パターンを比較した。さらに、NAC転写因子の発現にエチレンが関与するのかを明らかにするため、エチレン処理あるいはエチレン作用阻害剤(1-MCP)処理下でのNAC転写因子の発現パターンを解析した。

3. 研究の方法

(1) 2018~2020年10月に第3世代選抜系統間で26組み合わせの交雑を行い、2019~2021年春に交雑種子を播種して開花した233実生の日持ち日数を調査し(第4世代)、2019~2021年10月に日持ち日数6.5日以上(2019年)、6.4日以上(2020年)、7.5日以上(2021年)の合計58系統を1次選抜した(第4世代選抜系統)。

(2) 2020年10月に第4世代選抜系統間で13組み合わせの交雑を行い、2021年春に交雑種子を播種して開花した54実生の日持ち日数を調査し(第5世代)、2021年10月に日持ち日数7.5日以上の31系統を一次選抜した(第5世代選抜系統)。

(3) 本研究における日持ち日数の評価法: 外花弁が水平状態に達した開花ステージで切り花を収穫し、茎長40cmに切り揃え、最上部の葉以外は除去した。蒸留水、抗菌剤液(ケーズンCG $0.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$) およびGLA液(1% グルコース、ケーズンCG $0.5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ および硫酸アルミニウム $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ から構成される品質保持剤, Ichimura et al., 2006)を入れた300 mLまたは500 mL容のコニカルビーカーに1~3本ずつ挿し、気温 23°C (GLA・ 28°C 区は気温 28°C)、相対湿度70%、蛍光灯(光強度: $10 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)で12時間日長に調節した恒温室内に置き、花全体の1/3以上の花弁に萎凋や褐変が確認された日までの日数を調査した。サイトカイニン類の6-ベンジルアミノプリン(6-benzylaminopurine, 以後BA)処理区に用いるBA剤としては、市販のミラクルミストff(クリザール・ジャパン(株))を切り花収穫・調整後、収穫当日の花弁全体に散布した。

(4) 収穫時期、栽培法の異なる3区(夏秋期・露地、夏秋期・ハウス・鉢、冬春期・施設・土耕)を設け、日持ち日数を評価し、超長命性を示す系統を最終選抜した。

(5) NAC 転写因子の品種別発現解析には、‘かまくら’、‘ポートライトペアビューティ’、‘ミツチャン’、‘エターニティトーチ’、‘エターニティルージュ’、‘エターニティロマンス’の6品種を用いた。開花日を外花弁が水平状態に達した日とし、開花2日前から萎凋あるいは落弁が確認されるまで、外花弁を毎日採取した。NAC 転写因子は、RNA-seq 解析で花の老化前に発現が上昇した NAC4-4、NAC4-7、NAC6-2、NAC7-4、NAC9-8 を候補とし、リアルタイム PCR によって品種別に発現パターンを解析した。

(6) エチレン処理時の NAC 転写因子の発現解析には、‘かまくら’、‘ポートライトペアビューティ’、‘ミツチャン’を用いた。収穫した切り花を、茎長 20cm に切り揃え、最上部の葉以外は除去した。400 mL の蒸留水を 500 mL 容の三角フラスコに加え、3 本ずつ挿して 70 L のアクリルボックス内に静置した。エチレン処理区では、アクリルボックス内が $10 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ のエチレンとなるようにシリンジで注入した。1-MCP 処理区では、2.5 mg の 1-MCP を含むエチルブロックを 50 mL の蒸留水に加え、アクリルボックス内に静置し、1-MCP 濃度が $2 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ となるように処理した。外から4列目の花弁を毎日採取し、リアルタイム PCR によって発現量の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 第4、第5世代における全実生の平均日持ち日数は、それぞれ6.4日、8.0日であり、第3世代の6.2日と比較して、それぞれ0.2日、1.8日増加した(図1)。第4世代、第5世代間では、平均日持ち日数1.6日の有意な増加を示し、日持ち日数7日以上の頻度は、第3世代の32.8%から、第4、第5世代ではそれぞれ36.1%、70.4%へ増加した(図1)。したがって、ダリアの日持ち性向上を目標とした選抜と交雑による交雑育種法がダリアの日持ち性向上に非常に効果的であることが示された。

(2) 第4世代選抜系統から、冬春期栽培の蒸留水における日持ち日数が20~21年は13.8日、21~22年は15.9日と、日持ち性並の一般品種‘かまくら’の約2.5倍の超長命性を有する系統003-15を選抜した(表1)。本系統は、夏季高温期(7~8月)採花の抗菌剤区や、高温下(28°C・GLA区)での日持ち日数も、それぞれ11.0日(‘かまくら’の約2.8倍)、11.2日(‘かまくら’の約1.8倍)と優れていた(表1)。一方、品質保持剤GLA液での日持ち延長効果は低く、21~22年冬春期の試験では、蒸留水区よりも日持ちが低下した。

(3) 系統003-15の育成系譜をたどると、第1世代の16親のうち5親が良日持ち性品種‘ミツチャン’であり、‘ミツチャン’の有する良日持ち性に関する遺伝子が集積または重複している可能性が示唆された(Onozaki and Fujimoto, 2023)。

(4) 系統003-15は、 $10 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ エチレン連続処理時には平均2.4日で落弁が生じ、高いエチレン感受性を示した(Onozaki and Fujimoto, 2023)。系統003-15以外に、第5世代選抜系統からも、系統115-20、系統122-15等の超長命性を示す系統が得られており、品種化の可能性を検討している。

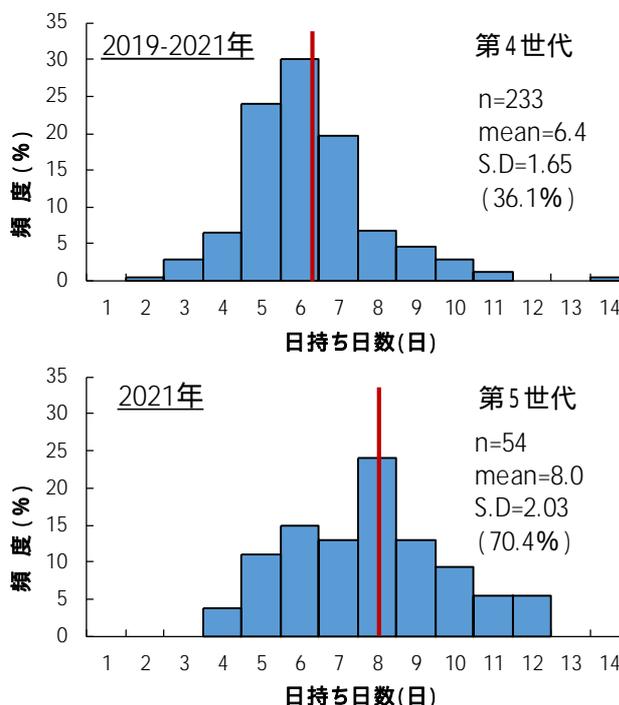


図1 ダリア第4,第5世代における日持ち日数の分布

抗菌剤(ケーソンCG $0.5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)液に、茎長40cm,最上位葉以外を除去した切り花を生けて、23、70%RH,12h日長条件で日持ち日数を評価した。()内の数値は、日持ち日数7.0日以上の頻度。

表1 ‘エターニティルージュ’,系統003-15および‘かまくら’の日持ち日数(日)

品種・系統名	冬春期・施設・鉢栽培				2021年夏秋期 ハウス・鉢栽培				冬春期・施設・土耕栽培					
	20年12月~21年5月 (n=3-5)				7・8月 (n=3-7)				21年12月~22年5月 (n=10)					
	蒸留水	% ^a	GLA	% ^a	GLA	% ^a	GLA	% ^a	蒸留水	% ^a	GLA	% ^a	GLA	% ^a
エターニティルージュ	9.2	164	10.3	151	13.3	145	8.2	205	8.7	138	9.3	139	11.0	149
003-15	13.8	246	14.6	215	15.3	166	11.0	275	15.9	252	12.0	179	13.9	188
かまくら	5.6	100	6.8	100	9.2	100	4.0	100	6.3	100	6.7	100	7.4	100

a: ‘かまくら’の日持ち日数を100とした相対値。150%以上を黄色で着色 日持ち日数11日以上の区を緑色で着色

GLA: 1%グルコース+ケーソンCG $0.5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ + 硫酸アルミニウム $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、抗菌剤:ケーソンCG $0.5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$

GLA 28 区は28、70%RH,12時間日長条件、それ以外は23、70%RH,12時間日長条件で、日持ち日数を評価した。

BA: 市販のミラクリスstoff(クリザール・ジャパン(株))を0日目に花全体に散布した。

(5) RNA-seq 解析で老化前に発現が認められた 5 種の *NAC* 転写因子 *NAC4-4*、*NAC4-7*、*NAC6-2*、*NAC7-4*、*NAC9-8* について、‘かまくら’を用いて開花 2 日前から萎凋が確認された開花後 5 日目までの期間で発現解析を行った。その結果、いずれの *NAC* 転写因子も開花後老化に伴って発現量が上昇する傾向にあった(図 2)。このことから、RNA-seq 解析で同定された *NAC* 転写因子は、ダリアの花の老化に關与する遺伝子である可能性が示された。外花弁が萎凋するまでの日数が 5 日程度と、‘かまくら’と同様に日持ち性の劣る品種である‘ポートライトペアビューティ’では、*NAC* 転写因子発現パターンも‘かまくら’と類似した結果が得られた。一方で、日持ち日数が 10 日程度と良日持ち性品種の‘ミツチャン’では、‘かまくら’や‘ポートライトペアビューティ’と比較すると、全体的に *NAC* 転写因子の発現上昇の時期が遅れることが確認された(図 2)。この傾向は、良日持ち性品種である‘エターニティトーチ’、‘エターニティルージュ’、‘エターニティロマンス’でも同様に認められた。以上の結果から、ダリアの花の老化には、*NAC* 転写因子が關与している可能性が示唆された。また、良日持ち性品種において日持ち性が向上したのは、*NAC* 転写因子の発現上昇の時期が遅れたことが一つの要因である可能性が考えられる。

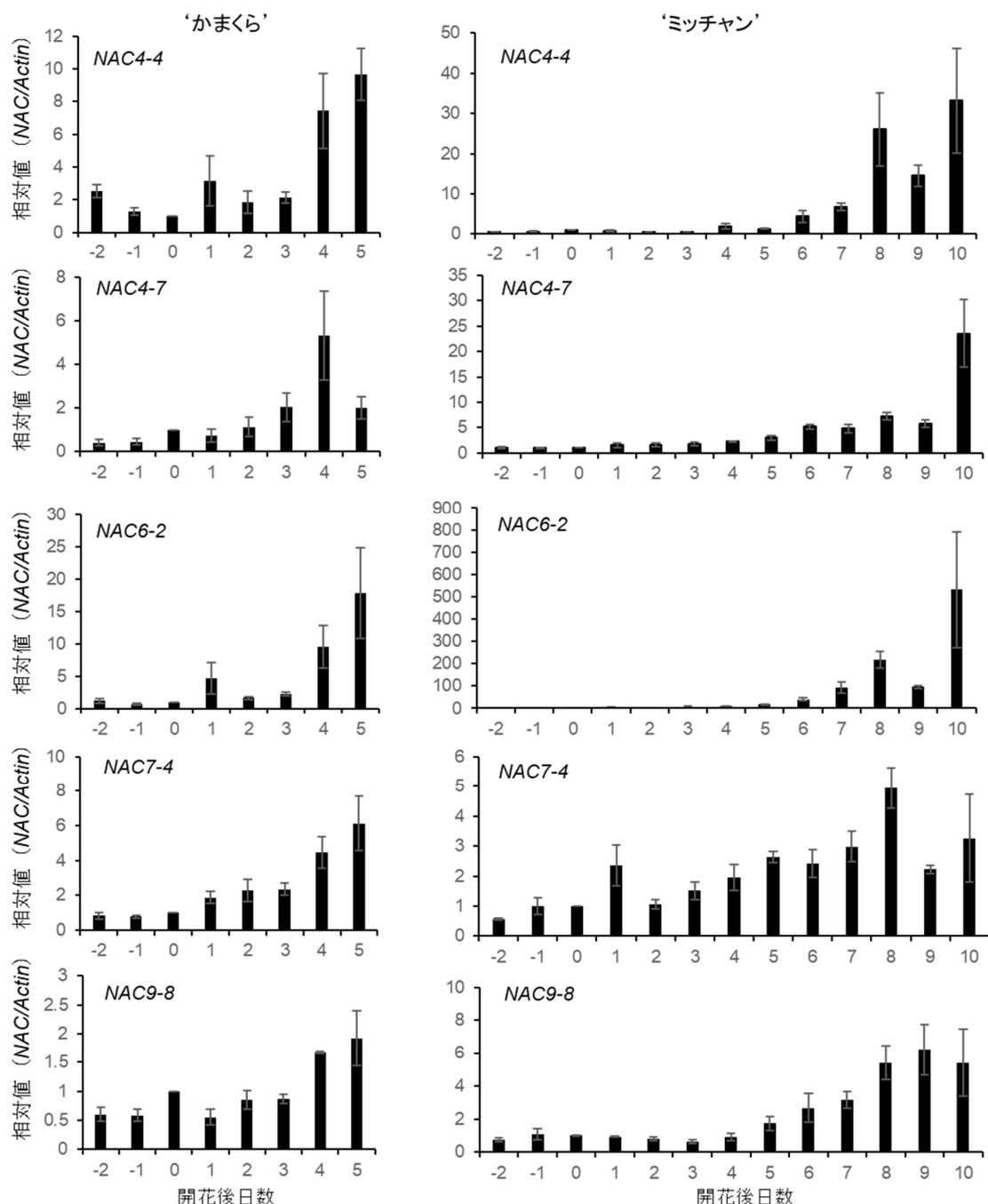


図2. ‘かまくら’と‘ミツチャン’開花後日数別の*NAC*転写因子発現パターン

株についた状態で開花後日数別に採取した外花弁を用いて各*NAC*転写因子の発現解析をリアルタイムPCRによって行った。ハウスキープ遺伝子は*Actin*を用い、開花日を1としたときの相対値で示した。

(6) ‘かまくら’、‘ポートライトペアビューティ’、‘ミツチャン’でエチレン処理、1-MCP 処理時の日持ち日数を比較した。無処理区の場合には、‘かまくら’で 4.5 日、‘ポートライトペアビューティ’

ティ'で5.0日、'ミッチャン'で7.0日と品種間差が認められた(表2)。一方でエチレン処理区では、いずれの品種も3日程度で落弁が確認された(表2)。1-MCP処理を行った場合には、'かまくら'と'ポートライトペアビューティ'で7日程度、'ミッチャン'で9日程度の日持ち日数であったことから、エチレンがダリアの花の老化を促進することが示された。

表2. エチレン処理あるいは1-MCP処理時の日持ち日数(日)

品 種	日持ち日数(日)		
	無処理区	エチレン処理区	1-MCP処理区
かまくら	4.5 ± 0.8 a	2.7 ± 0.6 a	7.0 ± 0.0 b
ポートライトペアビューティ	5.0 ± 0.0 b	3.0 ± 0.0 a	7.0 ± 0.0 c
ミッチャン	7.0 ± 0.0 b	3.0 ± 0.0 a	9.0 ± 0.0 c

(7) NAC 転写因子がエチレンによって発現誘導されるのかを明らかにするため、無処理区、エチレン処理区、1-MCP 処理区の3区間で NAC4-4、NAC4-7、NAC6-2、NAC7-4、NAC9-8 の発現量の比較を行った。その結果、いずれの品種においても NAC4-4、NAC6-2、NAC9-8 はエチレン処理後2日で発現量の上昇が見られた(図3)。NAC7-4 に関しては、エチレン処理を行った場合にも顕著な発現量の変化は認められなかった。無処理区と比較して発現時期が早まったことから、NAC4-4、NAC6-2、NAC9-8 はエチレンによって発現誘導されることが明らかとなった。しかし、1-MCP 処理区でも NAC の発現が停止するわけではないことから、エチレンによって発現誘導される経路と、加齢によって発現誘導される経路があることが考えられる。良日持ち性品種では、NAC の発現時期が遅れるために日持ちが長くなると考えられるが、NAC はエチレンによって発現誘導されるため、エチレン存在下ではいずれの品種の場合にも日持ちが短くなることが示唆された。

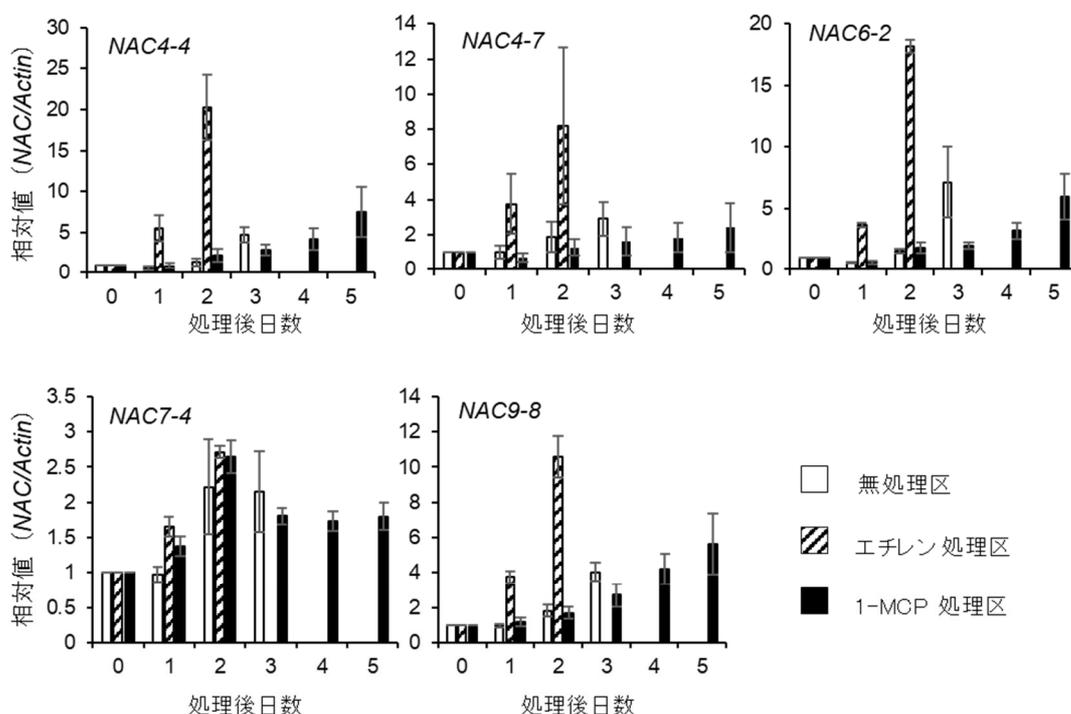


図3. 'かまくら'におけるエチレン処理あるいは1-MCP処理時のNAC転写因子発現パターン

'かまくら'切り花を用い、各処理後日数別に採取した外から4列目の花弁を用いて各NAC転写因子の発現解析をリアルタイムPCRによって行った。ハウスキーピング遺伝子はActinを用い、処理日を1としたときの相対値で示した。

引用文献

- Ichimura, K., M. Taguchi and R. Norikoshi. 2006. Extension of the vase life in cut roses by treatment with glucose, isothiazolinonic germicide, citric acid and aluminum sulphate solution. JARQ 40: 263–269.
- Onozaki, T. and M. Azuma. 2019. Breeding for long vase life in dahlia (*Dahlia variabilis*) cut flowers. Hort. J. 88: 521–534.
- Onozaki, T. and T. Fujimoto. 2023. Breeding long vase life by crossing and selection for five generations in dahlia (*Dahlia variabilis*) cut flowers, and selection of fourth-generation line 003-15 with ultra-long vase life. Hort. J. 92: 308–322.
- Shibuya, K., K. Shimizu, T. Niki and K. Ichimura. 2014. Identification of a NAC transcription factor, EPHEMERAL1, that controls petal senescence in Japanese morning glory. Plant J. 79: 1044–1051.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi Onozaki and Takuo Fujimoto	4. 巻 92
2. 論文標題 Breeding long vase life by crossing and selection for five generations in dahlia (<i>Dahlia variabilis</i>) cut flowers, and selection of fourth-generation line 003-15 with ultra-long vase life	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 335-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.QH-049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小野崎 隆・藤本卓生
2. 発表標題 ダリアの日持ち性の育種に関する研究（第7報）第4，第5世代の育成と超長命性を有する第4世代系統003-15の選抜
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西尾夢乃・東 未来・百瀬博文・小野崎 隆・立石 亮
2. 発表標題 ダリアの花の老化に関するNAC転写因子の探索
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yumeno Nishio, Mirai Azuma, Hirofumi Momose, Takashi Onozaki and Akira Tateishi
2. 発表標題 Identification of NAC transcription factors regulating flower senescence in dahlia and their response to ethylene treatment
3. 学会等名 The 4th Asian Horticultural Congress (AHC2023)（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

農研機構ホームページ
日持ち性に優れたダリア新品種エターニティシリーズ標準作業手順書
https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/naro/sop/153294.html

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
研究分担者	東 未来 (Azuma Mirai) (80783414)	日本大学・生物資源科学部・助教 (32665)	

	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
研究協力者	藤本 卓生 (Fujimoto Takuo)		
研究協力者	西尾 夢乃 (Nishio Yumeno)		

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
---------	---------