

## 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 5 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580043

研究課題名(和文) ジベレリンメタボローム解析による低温要求性木本花卉ラベンダーの開花促進技術の開発

研究課題名(英文) Study on flowering promotion of a cold requirement plant, *Lavandara × intermedia* by gibberellin metabolome analysis

研究代表者

腰岡 政二 (KOSHIOKA MASAJI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80094340

研究成果の概要(和文):

ラベンダー (*Lavandula × intermedia*) の開花特性に関して、以下のことを明らかにした。

1. 典型的な長日植物で緑植物春化型植物の性質を有すること。
  2. 活性型ジベレリンである GA<sub>1</sub> を経由する早期 13 位水酸化経路のジベレリンメタボロームマップを有すること。
  3. 花芽分化にはジベレリンが必須であるが低温の代替は出来ないこと。
  4. 花芽分化に先立ち活性型の内生 GA<sub>1</sub> 量が増加すること。
  5. GA<sub>3</sub> 処理により低温享受量が不十分な植物体の開花促進が可能であること。
- 以上から、低温要求量に応じた GA<sub>3</sub> 処理でラベンダーの開花誘導が可能である。

研究成果の概要(英文):

The following characteristics on flowering of *Lavandula × intermedia* were shown clearly based on the present research. 1. The plant is a typical long-day and green plant vernalization type plant. 2. The early 13-hydroxylation pathway of gibberellin metabolome through biologically active GA<sub>1</sub> exists in the plant. 3. Gibberellin is essential for flower bud formation of the plant, however, it can not replace a trigger by low-temperature. 4. Biologically active endogenous GA<sub>1</sub> concentration increases in advance of flower bud formation of the plant. 5. GA<sub>3</sub> treatment can promote flower bud formation in case of an insufficient amount of low-temperature. As mentioned above, flower induction of the plant might be possible by GA<sub>3</sub> treatment according to the amount of low-temperature demand of the plant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：ラベンダー、花卉、開花調節、ジベレリン、メタボローム

## 1. 研究開始当初の背景

高等植物に存在するジベレリン (GA) 類として現在 136 種類のものが単離・同定され

ており、近年のジベレリン研究から GA<sub>12</sub>-aldehyde を出発物質とする総括的なジベレリンメタボロームマップが推定されている。

このようなジベレリンメタボロームマップの利用により、アラビドプシスやイネにおいてジベレリン生合成遺伝子の解析が飛躍的に進み、矮性イネの遺伝的背景の解明や草丈調節が可能になった。しかし、木本花卉においてはジベレリンメタボローム解析やそれを利用した開花調節に関わる研究は、世界的にも皆無である。一方、低温要求性木本花卉における低温量と花芽分化の関係については、海外でも研究がなされ低温量と内生ジベレリンとの関わりが指摘されている。そこで、ジベレリンメタボロームと低温要求性との関わりを解明することにより、低温要求性木本花卉の開花調節技術に新たな知見をもたらすことができると期待された。

## 2. 研究の目的

欧米では観賞花卉として広く利用される木本花卉であるラベンダー (*Lavandula xintermedia*) の低温要求性に関する研究の予備的試験から、花芽分化には少なくとも10週間の低温遭遇を必要とすること、ジベレリンが開花に対して促進的に反応することを見出した。そこで本研究課題では、ジベレリンメタボローム解析を利用することで、花芽分化に対する低温要求性を調節し、木本花卉の開花促進技術を開発する。そのために、(1) 木本花卉であるラベンダーの開花に関わる低温要求性を精査する。(2) 内生ジベレリンの種類を同定し、活性型ジベレリンの代謝を調べることでジベレリンメタボロームマップを作成する。(3) ジベレリンメタボロームと生育・開花との関わりを解析し、低温要求性に対するジベレリン類の反応性と要求性を明らかにする。以上から、ジベレリンメタボロームの制御に *L.xintermedia* の開花促進技術の開発に資することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ラベンダーの低温要求性の精査

園芸分野で利用される *L.xintermedia* を研究材料として用いた。毎年の実験においては、前年度の6-7月に緑枝を挿し木したものを当年度の5月に一株あたり5本に整枝し、1処理あたり5株を用いた。低温処理は7月から開始し、平均5、8時間日長とした。低温処理後は、昼温/夜温(23/15)に設定した人工気象室で生育した。長日処理は8時間のメタルハイドランプ光と8時間の白熱灯光、短日処理は8時間のメタルハイドランプ光のみとした。メタルハイドランプの光強度は約500 $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/sとした。

### (2) 内生ジベレリンの同定と定量

ジベレリンの抽出・精製・同定は常法に従い、緑枝100gを80%メタノールで抽出した後、液液分配、カラムクロマトグラフィー、

HPLC等で精製した後、矮性イネ短銀坊主による生物活性フラクションを揮発性物質に誘導体化した後、GC-MSで同定した。ジベレリンの定量は、試料の新鮮重量0.2-1g相当毎に重水素ラベル化したジベレリン類(GA<sub>1</sub>、GA<sub>19</sub>、GA<sub>20</sub>およびGA<sub>53</sub>)を内部標準物質として添加し、常法により抽出・精製した後UPLC-MS-MSを用いて行った。

### (3) 薬剤処理

ジベレリン処理(GA<sub>1</sub>、GA<sub>3</sub>、GA<sub>5</sub>およびdimethyl-GA<sub>4</sub>)は低温処理終了後から100ppmの10%アセトン水溶液(0.025%のTween20含有)を茎頂部に10 $\mu$ Lずつ週2回の発蕾まで点滴した。ジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾール(UCZ)は低温処理期間中に、低温処理開始より毎週1回、6.25ppmあるいは12.5ppm溶液の100mLを1鉢当たり土壤処理した。

## 4. 研究成果

### (1) ラベンダーの低温要求性について

生育ステージを調整した挿し木苗を5で10週間まで低温処理した場合、表1に示すように8週間および10週間処理のものは低温後の温暖条件で100%が花芽分化したが、6週間処理では花芽分化しなかった。一方、10週間処理では全ての枝が花芽分化するとともに、発蕾日数および到花日数が短縮した。また、花芽分化は低温処理期間中には起こらず、低温処理後の温暖条件に移行した1週間後から始まった。一方、16時間日長に対し8時間日長では低温処理期間の長さに関わらず、花芽分化は認められなかった。以上から、*L.xintermedia* は花芽分化に低温と長日を必要とする緑植物春化型の長日植物であることが明らかになった。

表1 開花に及ぼす低温処理の影響<sup>a</sup>

低温処理(W)	出蕾株率(%)	出蕾枝率(%)	出蕾日数(日)	到花日数(日)
0	0	0	-	-
6	0	0	-	-
8	100	75.6	35.6	77.9
10	100	100	24.9	64.6
有意差 <sup>b</sup>	無	有	有	有

a: 16時間日長での試験

b: 8週と10週との間の1%水準での有意差を示す

### (2) ジベレリンメタボロームマップ

図1に示すHPLCの生物検定活性クロマトグラムにおいて、GC-MSによりFr.AからGA<sub>1</sub>、Fr.BからGA<sub>20</sub>、Fr.CからGA<sub>19</sub>、およびFr.DからGA<sub>53</sub>をそれぞれ同定した。これにより、*L.xintermedia*における主たるジベレリンメタボロームマップは、活性型ジベレリンのGA<sub>1</sub>を経由する早期13位水酸化経路

GA<sub>12</sub> GA<sub>53</sub> GA<sub>44</sub> GA<sub>19</sub> GA<sub>20</sub>  
 GA<sub>1</sub> GA<sub>8</sub> であることが推定された。

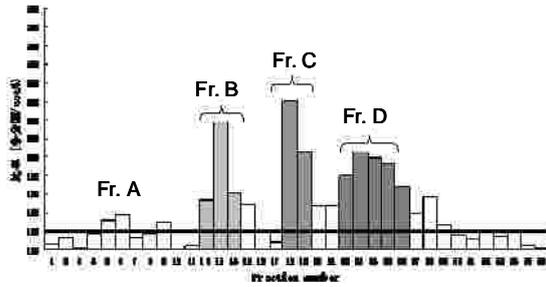


図1 HPLC画分の生物検定活性

### (3) 低温要求性とジベレリン感受性

*L. xintermedia* の花芽分化に対する低温要求性については、表2に示すように低温処理期間の増加に伴い出蕾枝率が増加し、出蕾日数が減少したことから、低温は出蕾の重要な要因であることが再度確認された。また GA<sub>3</sub> 無処理区ではジベレリン生合成阻害剤である UCZ 処理に伴い出蕾枝数が減少し、出蕾日数が増加したことから、出蕾には内生ジベレリンが関与していることが確認された。低温0週では GA<sub>3</sub> 処理しても出蕾は見られず、低温8週に比べ12週の方が GA<sub>3</sub> 処理による出蕾枝率の増加が著しかったことから、低温によりジベレリン感受性が増すことが示唆された。しかし、GA<sub>3</sub> 処理の低温8週区では UCZ 濃度の増加により出蕾枝率が低下し、出蕾日数が増加したのに対し、GA<sub>3</sub> 処理の低温12週区では出蕾枝率と出蕾日数に UCZ 濃度の影響は認められなかった。

表2 低温処理とUCZおよびGA<sub>3</sub>処理が開花に及ぼす影響<sup>a</sup>

低温処理 (W)	UCZ 濃度 (PPM)	GA <sub>3</sub> 濃度 (ppm)	出蕾株率 (%)	出蕾枝率 (%)	出蕾日数 (日)
0	0	0	0	0	-
		100	0	0	-
	6.25	0	0	0	-
		100	0	0	-
8	0	0	54.5	80	35
		100	72	90	32.1
	6.25	0	0	0	-
		100	68	90	37.5
12	0	0	100	100	21.7
		100	74	100	20.7
	6.25	0	62.5	70	28.4
		100	85	100	21.5
12.5	0	0	0	-	
	100	82	90	23.5	

有意差<sup>b</sup>

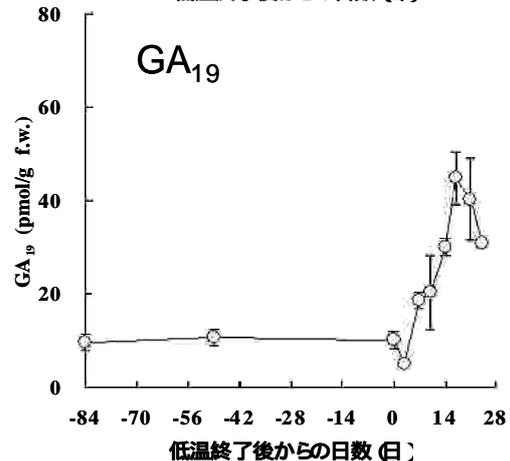
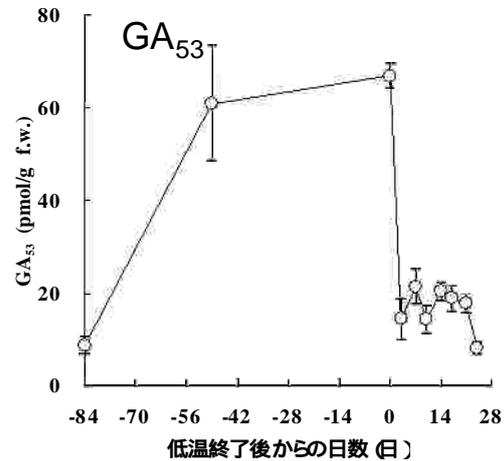
a: 16時間日長での試験

b: 低温、UCZ、GA<sub>3</sub>処理の全ての項目において1%水準での有意差を示す

以上から、低温処理期間が短く花芽分化のための低温充足度が不十分であれば花芽分化はジベレリンの内生量に依存し、低温処理期間が長く低温充足度が十分であれば花芽分化はジベレリンの内生量には依存しないことが示唆された。

### (4) ジベレリンメタボローム

低温処理期間およびその後の温暖条件におけるジベレリンメタボロームにおいて、図2に示すように GA<sub>53</sub> は低温期間中は高く推移していたが低温処理終了時から急激に低下した。GA<sub>19</sub>、GA<sub>20</sub> は低温期間中は低い値でほとんど変化なく低温処理終了7日後から上昇した。GA<sub>1</sub>も同様で、低温期間中は低い値でほとんど変化なかったが低温処理終了7日後から上昇し、14日後に最大になった。このことから低温処理終了後から GA<sub>53</sub> が順次 GA<sub>19</sub>、GA<sub>20</sub>、GA<sub>1</sub> へと代謝され、低温処理終了7日以降に見られた活性型ジベレリンである GA<sub>1</sub> の蓄積が低温処理終了21日以降に見られた出蕾に直接関与したと考えられる。このように、低温処理終了後に GA<sub>53</sub> から GA<sub>20</sub> への代謝に関わる20位酸化酵素遺伝子と GA<sub>20</sub> から GA<sub>1</sub> への代謝に関わる3位酸化酵素遺伝子の強い発現がジベレリンメタボロームの推進力として働き開花を引き起こすと推定された。



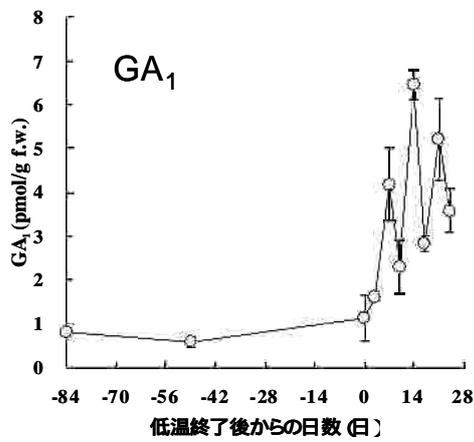
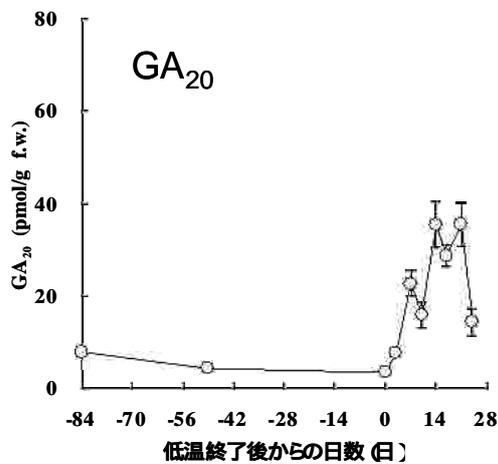


図2 生育期間における内生GA濃度の推移

(5) ジベレリンによる花芽誘導

ジベレリンメタボロームマップから *L. xintermedia* の活性型ジベレリンは GA<sub>1</sub> であることが明らかになっている。ここでは、GA<sub>1</sub> および GA<sub>1</sub> の類縁体である GA<sub>3</sub> と GA<sub>5</sub>、また低温要求性花卉であるストックで著しい開花促進効果を示した dimethyl-GA<sub>4</sub> を用いて、これらの開花促進効果を調べた。表 3 および表 4 に示すように、GA<sub>1</sub> 類縁型ジベレリンの効果は、発蕾促進においては GA<sub>5</sub> > GA<sub>3</sub> > GA<sub>1</sub> の順で優れること、GA<sub>5</sub> では GA<sub>3</sub> に比べて小花数の増加と発蕾促進が認められた。以上から、早期 13 位水酸化経路上で生合成される活性型ジベレリン類の類縁体は、その作用性に強弱はあるもののいずれも同様の作用性を示すこと、内生ではない GA<sub>3</sub> や GA<sub>5</sub> であっても、内生の GA<sub>1</sub> と同様の作用が推定されることなどが明らかになった。一方、dimethyl-GA<sub>4</sub> は、GA<sub>3</sub> に比べて小花数の増加と発蕾促進を示したものの、開花株率、開花枝率の効果は劣った。ここでの試験においても、0~6 週間の低温処理ではジベレリン処理による花芽誘導は認められず、ジベレリン処理は低温処理に取って代わ

ることは出来ないことが明らかになった。6 週間以上の低温処理では、ジベレリン処理による開花株率増加と発蕾促進が認められることから、ジベレリンは低温処理の不足を補完するものであると考えられる。また、十分な低温処理量があれば、外からジベレリン処理しても、内生ジベレリンの働きを加速しないことから、低温量により、ジベレリン感受性に変化があることが推測された。以上から、低温要求量に応じたジベレリン処理で *L. xintermedia* の開花誘導が可能であることが明らかになった。

表3 開花に及ぼす低温とGA処理の影響 (°)

低温処理 (W)	GAの種類	出蕾株率 (%)	出蕾枝率 (%)	出蕾日数 (日)
0	No GA	0	0	-
	GA <sub>1</sub>	0	0	-
	GA <sub>3</sub>	0	0	-
	GA <sub>5</sub>	0	0	-
6	No GA	0	0	-
	GA <sub>1</sub>	0	0	-
	GA <sub>3</sub>	0	0	-
	GA <sub>5</sub>	0	0	-
9	No GA	73.3	67.7	37.7
	GA <sub>1</sub>	86.7	74.3	32.2
	GA <sub>3</sub>	93.3	91	26.7
	GA <sub>5</sub>	80	81.3	25.2
12	No GA	100	100	21.9
	GA <sub>1</sub>	100	100	22.9
	GA <sub>3</sub>	100	98.7	21.9
	GA <sub>5</sub>	100	98.7	21.9
有意差 <sup>b</sup>		有	有	有

a: 16時間日長での試験

b: 低温期間に1%水準での有意差を示す

表4 開花に及ぼす低温とGA処理の影響 (°)

低温処理 (W)	GAの種類	出蕾株率 (%)	出蕾枝率 (%)	出蕾日数 (日)
0	No GA	0	0	-
	DiMe-GA <sub>4</sub>	0	0	-
	GA <sub>3</sub>	0	0	-
	GA <sub>5</sub>	0	0	-
5	No GA	0	0	-
	DiMe-GA <sub>4</sub>	0	0	-
	GA <sub>3</sub>	0	0	-
10	GA <sub>5</sub>	0	0	-
	No GA	20	8	37
	DiMe-GA <sub>4</sub>	60	32	25.5
	GA <sub>3</sub>	80	56	29.9
	GA <sub>5</sub>	80	56	29.1

a: 16時間日長での試験

## 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4件)

安藤ひかる、(腰岡政二)、他、ラベンダーの花芽形成におけるジベレリンと低温との相互作用、園芸学会、2011年9月25日、岡山

堀本大雅、(腰岡政二)、他、ジベレリンはラベンダーの開花における低温必要量の不足を補完する、園芸学会、2010年9月19日、大分

Masasji Koshioka, 他、Flowering characteristics of *Lavandula×intermedia*、International Horticultural Congress、2010年8月23日、Lisbon

曽根一友、(腰岡政二)、他、ラベンダーの花芽形成におけるジベレリンと低温との相互作用、園芸学会、2010年3月22日、藤沢

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

腰岡 政二 (KOSHIOKA MASAJI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80094340