

## 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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2010～2012

課題番号：22580034

研究課題名（和文）

糖を付加した切り花の花色発現機構の解明

研究課題名（英文）

Study on flower color expression mechanism in sugar loaded flowers

研究代表者

深井誠一（FUKAI SEIICHI）

香川大学・農学部・教授

研究者番号：80228858

研究成果の概要（和文）：

生け水への糖添加が、切花の花色を改善することは広く認められている。本課題では、糖付加による花色変化、花色素の構成・量的変化およびアントシアニン生合成関連遺伝子の発現の変化を明らかにし、実用的糖付加方法の開発を試みた。カーネーションでは、貯蔵中の処理糖濃度が高いほど早く開花し、花径も大きくなった。5%スクロース3週間の貯蔵で、切り花中の糖濃度が上昇しエチレン生産のピークが2-3日遅れた。5%スクロースで4-8週間貯蔵した切り花は、いずれも3週間程度の品質保持を示した。低温貯蔵中に主要な2つのアントシアニンは、スクロース処理区でより多く蓄積した。カーネーション花卉から糖誘導型と想定される転写因子遺伝子 *DcAN2* を得たが、外生のスクロースに反応しなかった。*CHS*、*CHI*、*DFR*、*ANS* の発現量がスクロース液貯蔵中に増加し、生けた後も *CHS*、*DFR*、*ANS* および *DcAN2* の発現量はスクロース処理区でより多くなった。グロリオサ切り花の第1、2花では、生け水中の糖の有無による花色の差は認められなかったが、それより上位の花では、スクロースを含む生け水に生けた花は、L値が低くC値が高くなった。また中位の花で花色発現が不良となる現象が認められた。水で生けた切り花では第1花に比べて上位の小花でアントシアニン含量が急激に減少したが、生け水にスクロースがあると、第4及び第5花で第1花と同等までアントシアニン含量が回復した。水の場合は第1花の糖含量が最も高く上位の花ほど低くなった。一方生け水にスクロースがあると、上位の花ほど糖含量が増加する傾向を示した。以上より花卉における糖の不足が発色不良の原因とは言えなかった。第3から5花の *GsDFR* と *GsANS* の発現はいずれも高く、第3花を中心とする発現不良はより下流のアントシアニン生合成関連遺伝子の発現が関与していると推察された。

研究成果の概要（英文）：

It is well known that the sugar addition to water improves the flower color in cut flowers. In this study, flower color change by sugar addition, the composition and quantitative alteration of pigments, and change of gene expression of anthocyanin-biosynthesis related genes were studied, and development of the practical sugar addition method was aimed. In cut carnation flowers, cut flowers stored with higher concentration of sucrose bloomed earlier with larger flowers. Sugar accumulation was observed and the peak of ethylene production was delayed when the cut flowers were stored with 5% sucrose solution for 3 weeks. Cut flowers stored for four to eight weeks with sucrose 5% showed about three weeks vase life. Two main anthocyanins were accumulated during the storage with sucrose. Although transcription factor gene *DcAN2* assumed to be a sugar-induced type was obtained from the carnation petal, it did not react to exogenous sucrose. The expression level of *CHS*, *CHI*, *DFR*, and *ANS* increased during storage with sucrose solution. The expression

level of *CHS*, *DFR*, *ANS*, and *DcAN2* also increased during longevity test. In cut gloriosa flowers. Although no difference in flower color was observed in the 1st and 2 florets of cut flowers with or without sucrose treatment, the upper florets in the cut flowers kept in sucrose solution showed lower L values and higher C values. Moreover, poor flower color expression in the florets in middle position was observed. The anthocyanin content of florets at higher positions decreased rapidly in the cut flowers kept in water. When the cut flowers were kept in sucrose solution the anthocyanin content of 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> florets recovered to equivalent anthocyanin content level of the first floret. Although sugar content of florets at higher positions decreased in cut flowers kept in water, those at higher positions increased in cut flowers kept in sucrose solution. The results showed that the poor color expression was not due to shortage of sugar in florets. Gene expression of *GsDFR* and *GsANS* was high at the 3rd to 5 flowers, suggesting that the poor color expression related to the expression of downstream genes in anthocyanin biosynthesis.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1900,000	570,000	2470,000
23年度	900,000	270,000	1140,000
24年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3500,000	1050,000	4550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸・造園学

キーワード：花卉

#### 1. 研究開始当初の背景

切り花の消費拡大を計るためには、品質保持技術の進展が不可欠である。これまで生け水への糖添加が、アントシアニンを主要花色素とする多くの切花の花色を改善することは広く認められている。このことから、収穫後の流過程を積極的に糖添加の期間と捉え、適切に糖を処理すれば、花色がより優れた高品質切花を創出できる可能性を示していると考えられた。

#### 2. 研究の目的

本課題では、流通中の切花への糖付加による花色変化を、花色素の構成・量的変化およびアントシアニン生合成関連遺伝子の発現の変化を明らかにすることを通して、糖付加による花色発現促進機構を解明することを研究上の目的とする。さらにその実用的成果として流通中の実用的糖付加方法を開発する。

#### 3. 研究の方法

<植物材料>

一つの花が先進むタイプの切花としてカ

ーネーションを、いくつかの小花が順次咲いて行くタイプの切花としてグロリオサを材料にした。

<研究計画>

カーネーション切花では、

- ①適切な糖処理による低温下での流通可能期間解明,
- ②糖付加による花色変化と色素量の変化の解明,
- ③糖付加処理による切花中の糖の蓄積動態解明,
- ④糖付加処理によるアントシアニン生合成関連遺伝子発現の動的把握,
- ⑤アントシアニン生合成関連遺伝子群を発現制御する糖誘導型転写因子遺伝子の検索,

グロリオサ切花では、

- ①適切な糖処理による花色改善と色素量の変化の解明,
- ②糖付加による各小花への糖の蓄積動態の解明,

③小花の発達ステージとアントシアニン生合成関連遺伝子発現の動的把握、以上の点について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) カーネーション

はじめにカーネーション切り花に糖を付加し長期間貯蔵した際の品質保持特性を検討した。カーネーション‘エクセリア’（赤）の切り花は、0.2mMSTSで処理後0~15%スクロースと静菌剤（レジェンドMK）を含む溶液（5SMK）に生けて4℃暗黒下にて3週間貯蔵した後、24℃明条件下で通常の品質保持調査を行った。処理糖濃度が高いほど早く開花し、また花径も大きくなった。糖濃度が10、15%では葉先にクロロシスが発生したことから、最適糖処理濃度を5%とした。次に糖処理した際の切り花中の糖の蓄積とエチレン生産について検討した。STS処理後0又は5%スクロースと静菌剤を含む液で3週間貯蔵した後と前に各部位の糖濃度を分析した結果、0%スクロースで貯蔵した切り花では、全ての器官でスクロース、フルクトース、グルコースの濃度は減少した。一方、5%スクロース区では、花卉での糖濃度が維持され、茎、葉、雌ずい、花托の糖濃度が上昇した。STS処理せず0又は5%スクロースと静菌剤を含む液で3週間貯蔵した切り花における品質保持試験中のエチレン生産は、糖処理した切り花でエチレン生産のピークが2-3日遅れた。

これらの結果を踏まえ、5%スクロースと静菌剤を含む液で4、6、8週間貯蔵した後品質保持試験を実施したところ、いずれの区も3週間程度の品質保持を示した。実用的観点から母の日の出荷を想定して、4月上旬に収穫して5%スクロースと静菌剤を含む液で6週間貯蔵した切り花と5月上旬に収穫して著そうしていない切り花の品質を比較したところ、4月収穫の切り花の方が、茎重が重く、機械的強度が高く、開花時の花径が大きかったが、僅かにL値が高くa\*、b\*値が低くアントシアニン含量も低かった。同様の貯蔵実証試験をカロンテ（濃赤）、フォーチュン（ピンク）、マーロ（うすピンク）、パックス（クリームイエロー）、ゼバ（薄緑ピンクストライプ）を用いて5週間貯蔵を実施したところ、

いずれも貯蔵可能であったが、薄い花色を持つ品種で花色が濃くなる現象が認められた。

次により基礎的知見を得るため、3品種のカーネーション切り花‘エクセリア’、‘ゼバ’、‘マーロ’を0または5%スクロースと静菌剤を含む溶液に生けて、4℃暗黒下で、0、14日、28日間貯蔵し、色素量の変化とアントシアニン生合成関連遺伝子の発現をみた。貯蔵終了直後に最外側の花卉を採取し、色調と新鮮度を測定し、HPLCによるアントシアニン量の分析に供した。同時に採取した花卉から抽出したtotal RNAを用いてRT-PCRにより、カーネーションのPAL、CHS、CHI、F3H、DFR、ANSについて遺伝子発現解析を行った。‘エクセリア’では、スクロース処理区においてPg3G量が14日目に増加、その後減少した。未処理区では貯蔵中に減少した。Pg3MGは両処理区において、貯蔵期間が長くなるにつれて増加した。‘ゼバ’ではPg3Gが貯蔵中に増加し、スクロース処理区でより多く蓄積したが、Pg3MGは検出されなかった。‘マーロ’ではPg3Gが検出されず、Pg3MGはスクロース処理14日目から増加し、未処理区では遅れて増加した。

アントシアニン生合成関連遺伝子の発現解析では、‘エクセリア’は解析した中でPAL以外の発現がスクロース処理区で未処理区より多くなっていた。‘ゼバ’では、ほとんどの遺伝子で14日目に増加し、その後減少するような傾向がみられ、スクロース処理区ではF3H下流のDFRおよびANSの発現が多くなっていた。‘マーロ’ではスクロース処理区でANSの発現量が多くなっていた。

次にカーネーション品種ミラクルルージュの花弁からtotalRNAを抽出し、シロイヌナズナ*AtMYB75/PAP1*様の糖誘導型と想定される転写因子の単離を行った。得られた遺伝子のアミノ酸配列はペチュニアのアントシアニン生合成に関連しているMYB遺伝子*An2*と相同性が高いことから、単離した遺伝子を*DcAN2*とした。*DcAN2*にはR2R3保存領域が確認され、サブグループ10およびフラボノイド生合成系に関与するサブグループのアミノ酸配列と*DcAN2*を比較した分子系統樹から、*DcAN2*はサブグループ10に近いことが確認された。このことより、サブグループ10と類

似した機能を有する R2R3MYB 転写因子であることが考えられた。花弁にスクロースを与えて *DcAN2* の糖誘導性を確認したが、外生のスクロースによる影響は確認できなかった。材料として用いた花弁は、切り前で収穫した切り花に由来し、花弁伸長が盛んな時期であったと考えられ、*DcAN2* が *AN2* と同様に花冠の細胞の成長や伸長による内生のシグナルを受けて発現する MYB 転写因子である可能性を示唆していた。

実際の場面を想定し、スクロース 5% に 4 週間低温貯蔵し、その後常温下で品質保持試験を行いながら、色素量の変化と遺伝子発現を検討した。その結果、Pg3G は低温貯蔵中にスクロース 5% 処理区のほうがスクロース無処理区よりも多く蓄積していた。Pg3MG は常温へ移動後、スクロース 5% 処理区で徐々に増加していた。アントシアニン生合成関連遺伝子発現解析の結果、*CHS*、*CHI*、*DFR*、*ANS* の発現量がスクロース処理を行っている期間で増加していた。6 週目において、*CHI* の発現量はスクロース処理の有無にかかわらず発現がほとんど確認されなかった。*CHS*、*DFR*、*ANS* および *DcAN2* の発現量はスクロース処理区で無処理区より多くなっていた。

## (2) グロリオサ

グロリオサ ‘ミサトレッド’ 切り花は、通常 5 つの小花を着け第 1 花が開花した状態で出荷される。このステージの切り花を用い 0 または 3% スクロースと静菌剤を含む生け水に生け、各小花の開花時に花色を測定すると、切り花採取時に開花していた第 1 花および花弁反転期に有った第 2 花では、生け水中の糖の有無による花色の差は認められなかったが、それより上位の花では、スクロースを含む生け水に生けた花は、水だけの花に比べて、L 値が低く C 値が高くなった。第 1 花から第 5 花までを比較すると、中位の花である第 3 花または第 4 花の花色発現が不良となる現象が認められた。これは、切り花全体を生けた状態で各小花が開花した時点で計測しても、各小花をはじめから切り離して生けても同様の傾向が観察された。またこれは、4 月に収穫された切り花に比べて 7 月に収穫された切り花でより顕著に確認された。収穫

時の中位の小花において花色発現が不良となる傾向は、通常出荷時に 7 つの小花を着けて出荷される新品種 ‘サザンウインド’ でも確認された。

次にスクロース 0, 1, 3, 5% と静菌剤を含む生け水に生けた切り花の各小花花弁のアントシアニン量を比較した。グロリオサの花被における主要花色素は、シアニジン-3-グルコシド (Cy3G) とペラルゴニジン-3-グルコシド (Pg3G) の 2 種類のアントシアニンであった。スクロースを含まない生け水に生けた切花では、第 1 花に比べて、上位の小花の花被におけるアントシアニン含量が急激に減少した。一方、スクロースを含む生け水に生けた切花では、スクロース濃度に関わらず第 1 花に比べて第 2, 第 3 花でアントシアニン量が減少し、第 4 及び第 5 花の両方で第 1 花と同等まで回復した。これらの動向は、測色計の結果と符合し、中位の花の花色発現はアントシアニン量の現象によるものであった。

次に上記と同様の処理をして生けている切り花から各小花が開花した時点で小花を採取して花弁の糖含量を測定した。グロリオサの花弁にはグルコースとフラクトース、更に少量とスクロースが含まれていた。ショ糖を含まない生け水の場合は第 1 小花の花弁の糖含量が最も高く上位の花ほど低くなった。一方ショ糖 5% を含む生け水で生けた場合、各小花の開花時の花被片の糖含量は上位節の花ほど増加する傾向を示した。以上のことから花被の糖蓄積量と花色発現は符合せず、花弁における糖の不足が発色不良の原因とは言えなかった。

最後にアントシアニンの生合成関連遺伝子の発現動態を明らかにするため、他の単子葉植物のアントシアニン関連遺伝子の配列を参考にしながら、グロリオサ由来のアントシアニン関連遺伝子の単離を試み、*GsCHS1*, *2*, *GsDFR1*, *2*, *GsANS* をそれぞれ単離した。これを基に第 3 から 5 花の花弁反転期と開花時の花弁における *GsDFR* と *GsANS* の発現を比較したところ、いずれも高い発現が維持されていることが明らかとなり、上記で認められた第 3 花を中心とする発現不良は、より下流の遺伝子発現が関与していると推察された。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1, Fukai, S., Y. Kubota, M. Seno, P. Yangkhanmman, T. Narumi and T. Takamura: Quality management of cut carnation flower with long-term sucrose treatment. Acta Horticulturae934, 455-463(2012)

[学会発表] (計 2 件)

1, Sumi, T., S. Fujita, T. Narumi, T. Takamura, S. Fukai. Perianth color expression in *Gloriosa superba* L. Abst. International symposium on orchids and ornamental plants. 2012.1.8-12. Chiag Mai.

2, Yoshimoto, H., T. Narumi, T. Takamura, S. Fukai. Effect of sucrose treatment on anthocyanin bio-synthesis-related gene expression in cut carnation flowers. Abst. International symposium on orchids and ornamental plants. 2012.1.8-12. Chiag Mai.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

深井誠一 (FUKAI SEIICHI)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：80228858

(3) 連携研究者

高村武二郎 (TAKAMURA TAKEJIROU)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：40253257

鳴海貴子 (NARUMI TAKAKO)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：30469829