

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292021

研究課題名(和文) キクにおける温度依存型花色発現不良機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of temperature-dependent petal coloration in chrysanthemum

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：キク花弁のアントシアニンの蓄積は温度の影響を受け、20℃に比べて30℃で著しく蓄積量は低下した。花弁が出現した後完全に伸長するまでの期間に最も盛んに起こり、この期間が温度に対して最も影響を受けた。フラボノイド生合成関連遺伝子は Cmp1CHI と Cmp1ANS を1つずつ、Cmp1CHS、Cmp1F3H、Cmp1DFR をそれぞれ2つ単離され、それらは既知の遺伝子の塩基配列と高い相同性を示した。すべての遺伝子は30℃で著しく発現が低下した。BA処理は花弁のアントシアニン蓄積量を増加させた。この処理は花序の発達段階の中でもっともアントシアニン蓄積が盛んなステージにおいて効果が高かった。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of anthocyanin was remarkably decreased at 30℃ compared to 20℃. When inflorescences were exposed to high and cool temperature by developmental stage of inflorescence the accumulation of anthocyanins occurred most intensely during the period from petal appearance to petal elongation stage. This period was most sensitive to temperature. Anthocyanin biosynthesis related genes are determined. A Cmp1CHI, and Cmp1ANS, and two Cmp1CHS, Cmp1F3H and Cmp1DFR were isolated and showed gene sequences similar to chrysanthemum known sequences. All genes were contained the specific conserved region as known anthocyanin biosynthesis gene. Expression of all genes was depressed at 30℃. 50 ppm and 100 ppm BA treatment increased petal anthocyanin accumulation. This treatment was shown to be highly effective in the stage where accumulation of anthocyanins is most active among the developmental stages of inflorescence.

研究分野：園芸学

キーワード：花き キク 花色 高温

1. 研究開始当初の背景

わが国の切り花ギク生産は、多様な生態型を持つ品種群を用い、それらの開花生理に基づいた休眠打破、促成栽培、電照による抑制栽培の確立により周年生産体系を築き上げて来た。しかし、近年、輪ギクは中国から、スプレーギクはマレーシア等からの輸入切り花が急増し、わが国の生産者により一層の低コスト高品質生産を求めている。わが国の施設栽培において、高品質かつ計画的な生産を妨げている主な環境要因は、夏期の高温と冬期の低温である。切り花品質の最も重要な構成要素である花色に対して大きな年較差を示すわが国の栽培環境温度が及ぼす影響を総合的に明らかにし、育種的及び耕種的に対応することが急務となっている。

赤系の花色を生み出す色素であるアントシアニンの生合成経路は、生化学的にも酵素的にもよく研究されており、系の主要酵素遺伝子もクローニングされている(Koes et al. 2005)。しかし夏期が高温とならないオランダ等の欧州では、夏期の高温と花色に関する問題意識が低く、高温と花色発現に関する研究はほとんど行われて来なかった。研究代表者は基盤研究(C)「高温ストレスによるキクの開花遅延と花色変化の生理的解明」を実施し、ピンク花系スプレーギクにおいて高温下で花色発現が不良となる原因が、2つの主要アントシアニンの発現量の低下であることを明らかにし(園芸学研究4(2005)、園芸学研究5(2006)、J. Hort. Sci. & Biotech. 81(2006))、温度に依存した花色発現機構解明の端緒を開いた。一方、冬期の低温と花色の関連に関しては、施設栽培学的アプローチからの暖房コスト削減とそれに伴う切り花の生産性と品質については数多くの研究がなされて来たが、低温域での花色変化を花色色素とそれに関連する遺伝子発現の視点から研究した例は内外にほとんど見られない。

花色は切り花品質の最も重要な構成要素の1つである。キクの施設切り花生産において、高温期と低温期にそれぞれ赤花系品種の発色不良と白花系品種のクリーミー化による品質低下が起こる。これらは共にフラボノイド系二次代謝産物の生合成が温度の影響を受けているためである。

2. 研究の目的

本研究では、まずピンク系キク品種におけるこの温度-花色反応の詳細を明らかにするため、花序の発達段階ごとに異なる温度下に置き、花色発現に及ぼす花序発達段階の影響を明らかにする。その上で対象品種について、フラボノイド生合成系の主要酵素遺伝子を改めて単離し、その発現解析を行うことにより花色変化の内的原因を明らかにする。さらに主要酵素遺伝子の発現を制御している温度誘導型転写因子を探索する。この問題の実際栽培における解決策を提示するため、ケミカルコントロールの可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 供試植物

スプレーギク品種ペリカン
輪ギク 秀芳の力 ほか

(2) 栽培環境

植物の育成は、最低12℃を保ったガラス温室を基本として、深夜4時間の光中断を加えて栄養生長を維持。長日期は暗幕による8時間日長を、短日期は自然日長下で、花芽を誘導した。その他の施肥管理等は慣行に従った。種々の温度処理には、自然光型ファイトトロンを使用し、30,25,20℃処理を実施した。

(3) 花色の測定

測色色差計(NR-3000, 日本電色)をもちいて、花弁の向軸側中央部の色の測定を行い、L*a*b*色調表示を指標として花色発現を評価した。

(4) 花色色素の分析

採取した舌状花は40℃の乾燥機で一昼夜

乾燥させた後乾燥重を測定して、分析まで -20 で保存した。5% ギ酸メタノールで花色素を抽出した後、HPLC で分析した。溶媒には、溶媒 A (1.5% リン酸)、溶媒 B (1.5% リン酸, 20% 酢酸, 25% アセトニトリル水溶液) の混合液 (A:B=75:25, v/v) を用い、40 分後に溶媒 B の割合を 85% に変化させる直線濃度勾配溶出法を適用し、流速は 0.8 mL/min とした。25 水処理区の舌状花 1 g あたりの 2 つのアントシアニン量をそれぞれ 100% とし、各処理区のアントシアニン蓄積量を相対値として算出、評価した。

(5) 遺伝子の単離

花弁が出現して伸長開始するステージから花弁が水平展開するまでの花弁から total RNA を抽出し、cDNA 化した。データベースから得た既知のフラボノイド生合成関連遺伝子配列からプライマーをデザインし、得られた PCR 産物をシーケンス解析にかけた。シーケンスデータはブラスト検索で確認した後アミノ酸配列に翻訳した。

(6) 試験項目

花色発現と温度の関係を L*a*b* 色調表示を指標として、作用する温度域および花序の発達段階の影響を明らかにした。

高温域の花色発現不良については、アントシアニン類について、その種類の同定と花弁中の色素量の変化を定量比較した。

対照品種についてフラボノイド生合成経路の主要遺伝子を単離・同定した。

種々の温度条件下で、フラボノイド生合成経路の主要遺伝子の発現解析を行った。

高温域で、フラボノイド系二次代謝産物の生産増加を目的にベンジルアデニン等の薬剤処理を、低温域でフラボノイド系二次代謝産物の生産抑制を目的にプロヘキサジオン等の薬剤処理を検討した。

4. 研究成果

(1) 花序の発達と高温がキク品種ペリカンの花色発現に及ぼす影響

花序の発達段階を、破蕾期 (花序の上を覆っている薄膜が破れ始めた時期)、花弁伸長開始期 (花弁が見え始めた時期)、花弁展開期 (花弁が完全に伸長し垂直になった時期)、花弁伸長から 1 週間後 (花弁が水平状態になった時期)、2 週間後に区別して、その間の温度を順次 20 又は 30 に変更して花色発現を調査した。

高温下でピンク系花色が薄くなる現象は、L*a*b* 色調において、L 値の上昇 (明るくなる)、a* 値の低下 (赤みが減少する)、C 値の低下 (結果としてくすんだ色合いになる) として反映された。以下これらの値の変化に基づき、花色発現の変化を評価した。

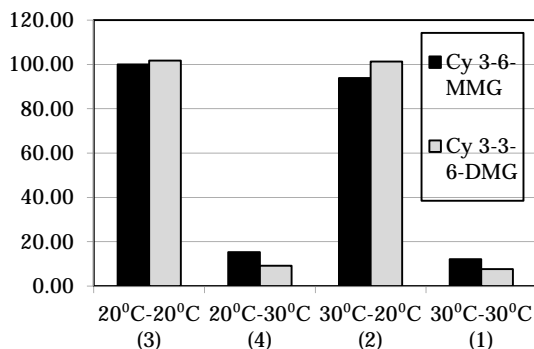
ペリカンの花弁に含まれる 2 主要アントシアニンを分析したところ、シアニジン 3-モノマロニルグルコシド (Cy3-6''-MMG) とシアニジン 3-ジマロニルグルコシド (Cy3-3, 6''-DMG) の 2 種類であり、これは既往の報告 (Nozaki et al. 2006) と一致していた。

20 で開花させると、花弁が伸展してから水平に至るまで花弁の花色素量は増加し杖続け、水平展開 1 週間後には減少した。一方 30 では、花弁が伸展したのち花色素量は急速に低下した。これらの花色素量の変化と花色発現および見た目は一致した。

破蕾から花弁伸長開始期までと花弁伸長開始期から花弁展開期までの温度を 20 もしくは 30 として花色素量を比較した。この期間全期間を 20 に置いた花弁 (第 1 図の処理 (3)) に比べて、破蕾から花弁伸長開始期まで 20 + 花弁伸長開始期から花弁展開期まで 30 に置いた花弁 (第 1 図の処理 (4)) の花色素量は著しく減少していたが、破蕾から花弁伸長開始期まで 30 + 花弁伸長開始期から花弁展開期まで 20 に置いた花弁 (第 1 図の処理 (2)) の花色素量は全期間 20 と同等であった。これらの花色素量の変化と

花色発現および見た目は一致した。

この結果は、30 下では急速にアントシアニンの分解が起こること、主に花卉伸長開始期から花卉展開期までにアントシアニンの蓄積が起こることを示唆した。



第1図 花序の発達段階別温度処理が話基礎量に及ぶ影響

次に破蕾から花卉伸長開始期まで、花卉伸長開始期から花卉展開期まで、花卉展開期から花卉水平展開までの温度を 20 もしくは 30 として花色素量を比較した。30-30-20 区は、全区間 30 区と同等の花色素蓄積量であり、このことは花卉の伸長過程で高温に曝されると、花卉が伸長しきってから展開するまでに新たな花色素蓄積が殆ど起きないことを示唆した。また 20-20-30 区もまた全区間 30 区同等の花色素蓄積量であり、このことは、30 下では急速にアントシアニンの分解が起こることを示唆した。

季咲きのスプレーギクを一定の花序の発達段階に達した後に一時期制御温度に曝す実験でも、同様の傾向が確認された。また複数のピンク系スプレーギクにおいて、温度反応における品種間差異は小さかった。

以上の結果は、キク花卉におけるアントシアニンの生合成は、花卉が出現した後完全に伸長するまでの期間に最も盛んに起こり、この期間が温度に対して最も影響を受けることが明らかになった。

(2) キク品種ペリカンのフラボノイド生合

成関連遺伝子の分離と発現解析

キク品種ペリカンからフラボノイド生合成関連遺伝子を単離し、その塩基配列を決定した。Cmp1CHI と Cmp1ANS を 1 つずつ、Cmp1CHS, Cmp1F3H, Cmp1DFR をそれぞれ 2 つ単離され、それらは既知の遺伝子の塩基配列と高い相同性を示した。Cmp1DFR1 および Cmp1DFR2 は、それぞれ 375, 374 アミノ酸長であった(第2図)。Cmp1DFR1 は、既知の CmDFR の終止コドン位置に 7bp のヌクレオチド配列挿入が認められた。ここで分離した全ての遺伝子のアミノ酸は、既知のアントシアニン生合成遺伝子の特異的な保存領域を含んでいた。

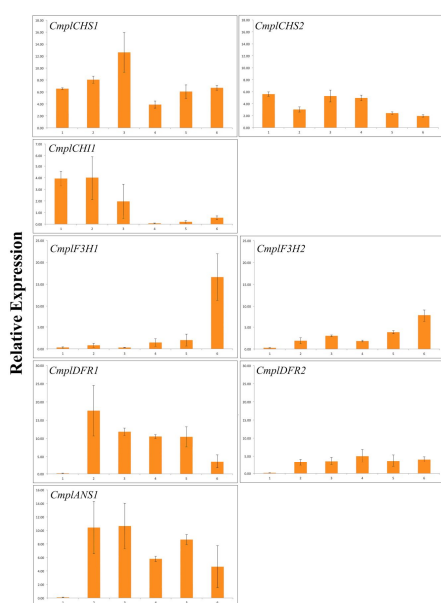


第2図 CmDFR and Cmp1DFRs のアミノ酸配列比較

次に花序の発達ステージを 1. 花序が緑の苞葉で包まれる, 2. 花序の頂部が薄膜で覆われる, 3. 花卉が伸長し始め花序が三角形と成る, 4. 花卉が伸長して垂直になる, 5. 花卉が開き始める, 6. 花卉が水平展開する, に区分して花卉を採取し、単離された遺伝子の発現解析を実施した。Cmp1CHS および Cmp1CHI は無着色の花びらを有するステージ 1 から高い遺伝子発現レベルを示し、一方 Cmp1DFR および Cmp1ANS は薄くピンクに着色開始した花卉を有するステージ 2 から高い遺伝子発現レベルを示した(第3図)。また Cmp1CHS, Cmp1F3H, Cmp1DFR で得られたそれぞれ 2 つ遺伝子は、特異的プライマーを設計した発現解析の結果より異なる遺伝子であると

推察された。なお *CmpIDFR2* は、他の単離された遺伝子とは異なり、第2段階から第6段階まで一定の遺伝子発現を示し、「ペリカン」のアントシアニン生合成経路の重要な酵素として機能していない可能性があった。

以上の結果から、*CmpIChS1* と *CmpIChI* はフラボノイド生合成系の早期発現型の遺伝子として機能し、*CmpIDFR1* と *CmpIANS* は後期発現型の遺伝子として機能していることが示唆された。



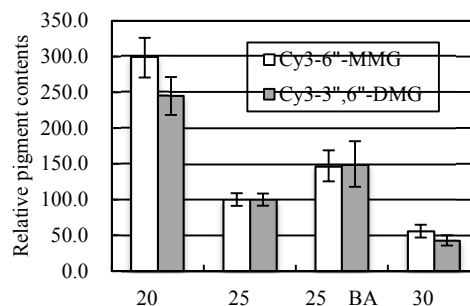
第3図 花序の発達段階別フラボノイド生合成関連遺伝子の発現解析

以上の結果に基づき、花序の発達初期から20及び30下でいた花で発現解析を行った所、30ではすべての遺伝子の発現が一貫して著しく押さえられていることが明らかとなった。またある程度の発達段階まで20に置かれた後に30に曝されても、発現程度は一定度維持されるが、30に置かれた後に20に曝されても、発現は回復しないことが明らかとなった。

(3) 薬剤処理による不良環境下における花色発現の改善

花蕾が破蕾期（花序の頂部が割れれ筒状花が見えた段階）に達した時点から自然光型フ

ァイトロン 20, 25, 30 に置き、25区では水または BA 100 ppm(ともに展着剤アルソープ添加)を、20, 30区では水を1日おきに開花期（花弁が垂直になってから1週間後まで）まで散布した。つぎに、25に置いた株を用い、破蕾期から花弁出現期（舌状花の先端が見えた段階）まで、花弁出現期から花弁垂直期（舌状花の花弁が垂直になった段階）まで、花弁垂直期から開花期（花弁垂直期から1週間後まで）までのそれぞれの期間に BA 50 または 100 ppm を毎日散布した。対照区は全期間水または BA 散布とした。実験3では、30または20で破蕾期から開花期まで水または BA 50, 100 ppm を毎日散布した。すべて1区3本（各3花序）を用い、開花期に花弁を採取して、花色の測定を行い、その花弁を40で乾燥させた後、HPLCでアントシアニン量を決定した。



第4図 ベンジルアデニン処理がキク花弁の花色素量に及ぼす影響

開花させた温度が高いほど L*値が高く、C値は低くなり、花弁の新鮮重当たりのアントシアニン量も低くなった。一方25 BA 処理は、水処理に比べて明らかに花色の赤みが増し、花弁新鮮重当たりのアントシアニン量も1.5倍程度まで増加した（第4図）。花序の発達時期別に BA 処理を行うと、50 ppm 処理、100 ppm 処理ともに、花弁出現期から花弁垂直期まで処理した区が全期間処理した区と同等のアントシアニン量を示し、破蕾期から花弁出現期まで処理した区および花弁垂直期から開花期まで処理した区より優った。こ

の結果は、花序の発達段階の中でもっともアントシアニン蓄積が盛んなステージにおいてBA処理の効果が高いことを示しており、BA処理がアントシアニン蓄積を促進していると考えられた。またBA処理による花色改善効果は20および30下でも確認され、BAの処理濃度に依存してアントシアニン量は増加した。この結果、BAの花色素蓄積促進効果は温度に関わらず認められることが示された。

その他の種々のサイトカイニン活性をもつ物質について検討した結果、尿素系殺菌剤ペンシクロンの1000ppm処理が高温下での花色改善に効果が認められた。

プロヘキサジオンカルシウム処理は、品種ペリカンにおいてアントシアニンの生成を抑制することが明らかとなった。そこでプロヘキサジオンカルシウムを用いて、白花輪ギク秀芳の力の低夜温下での花色のクリーミー化抑制を検討したが、明らかな効果は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Puangkrit, T., T. Narumi-Kawasaki, T. Takamura and S. Fukai. Isolation and analysis of the key enzyme genes in the flavonoid biosynthesis pathway in chrysanthemum. Act Horticulturæ (in press)査読有り

〔学会発表〕(計3件)

1. 深井誠一, 荒木香澄, ティーラニープアングリット, 鳴海貴子, 高村武二郎. ペンジルアデニンによる高温下でのキクの花色発現不良の改善. 園芸研究 15, 別1, 198. 東京農業大学(厚木市)2016年3月

2. 道園美玄・中山真義・深井誠一. 花序の発達過程における高温条件が赤系キクの花色発現に及ぼす影響. 園芸研究 13, 別2, 494. 佐賀大学(佐賀市)2014年9月

3. Puangrit, T., T. Narumi, T. Takamura and S. Fukai Effects of high temperature given at each developmental stage of inflorescence on coloration and pigmentation in petals of chrysanthemum. 園芸研究 13, 別2, 495. 佐賀大学(佐賀市)2014年9月

4. 深井誠一, 浪花美麗, ティーラニティブアングリット・高村武二郎, 鳴海貴子. サイ

トカイニンによる高温条件下でのキクの花色発現不良の改善. 園芸学会中四国支部会研究発表要旨 53, 55. 香川大学(香川県三木町)2014年7月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願なし

〔その他〕

なし

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

(2)研究分担者

高村 武二郎(TAKAMURA, Takejiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号: 40253257

鳴海 貴子(NARUMI-KAWASAKI, Takako)

香川大学・農学部・準教授

研究者番号: 30469829

中山 真義(NAKAYAMA Masayoshi)

独法 農業・食品産業技術総合研究機構・

野菜花き研究部門・花き生産流通研究領域

長

研究者番号: 40237475

(3)連携研究者

道園 美弦(DOUSONO Mituru)

独法 農業・食品産業技術総合研究機構・

野菜花き研究部門・主任研究員

研究者番号: 4070564

佐々木 克友(SASAKI, Katsutomo)

独法 農業・食品産業技術総合研究機構・

野菜花き研究部門・主任研究員

研究者番号: 60469830

(4)研究協力者

Theeraniti Puangkrit

愛媛大学 大学院生