

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580039
 研究課題名 (和文) ファレノプシスの形態形成にかかわる生理活性物質の相互作用と動態解明に関する研究
 研究課題名 (英文) Study on interaction among plant growth regulators for morphology in *Phalaenopsis*
 研究代表者
 窪田 聡 (KUBOTA SATOSHI)
 日本大学・生物資源科学部・准教授
 研究者番号：60328705

研究成果の概要 (和文)：

ファレノプシスの低温による開花誘導機構をサイトカイニン(CK)とジベレリン(GA)の相互関係から検討した。低温後、腋芽の CK 濃度が上昇するとともに腋芽の発育が始まり、その後 GA 濃度が上昇し花茎が発生した。非開花誘導条件の外生 CK と GA の投与は腋芽の開花を誘導し、外生 GA の単独施用は頂芽の開花を誘導した。したがって、ファレノプシスの開花は GA によって誘導されることが強く示唆された。頂芽の開花誘導は世界初であり、新奇植物の作出に寄与することから特許出願した。

研究成果の概要 (英文)：

Mechanisms of flowering by low temperature of *Phalaenopsis* were investigated in terms of interaction between cytokinin (CK) and gibberellin (GA). CK concentration in axillary bud rose at 14 days after low temperature treatment (Low), and initiation of axillary bud development followed close on this peak. Peak of GA concentration in the bud and spiking from the bud appeared at 28 days and at 26 days after Low, respectively. Application of exogenous CK and GA induced spiking from axillary bud under non-flowering condition, high temperature. In addition, GA application induced flowering at apical meristem regardless of temperature conditions. Thus, it was suggested that flowering of *Phalaenopsis* was induced by GA. The floral induction of apical meristem of *Phalaenopsis* was found for the first time in the world. Because this phenomenon might contribute for production of novel plants which is valuable plant for horticulture, a patent was submitted.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	500,000	150,000	650,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：ファレノプシス、サイトカイニン、ジベレリン、開花、形態形成

1. 研究開始当初の背景

ファレノプシス (コチョウラン) は熱帯地方に自生する単茎性の着生ランである。25℃以上では葉が展開しつづけるが、20℃程度の気温 (低温) に約1ヶ月遭遇すると葉の展開は抑制され、上位から3~4節目にある腋芽が発育・伸長し、やがて花茎となり無限花序を形成する。すなわち、農業上の収穫対象となる花が発生するには、その前段階としての腋芽の発育をどのように制御するかが重要であり、腋芽の発育に対する低温の生理的な役割とメカニズムが解明されれば、温度以外の方法による新しい花成誘導技術の開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究ではファレノプシスの形態形成、特に農業上重要な問題となる花生産に直接結びつく腋芽の発達制御のメカニズムを内生生理活性物質の相互関係とそれらの動態およびジベレリン (GA) の感受性を検討することにより解明し、将来的に新しい花成誘導技術の開発に結びつける。そこで本研究では (1) 内生サイトカイニン (CK) と GA の同定、(2) 低温処理期間中の CK と GA の動態と花茎の発生との関係、および (3) 異なる温度条件における外生 CK と GA の投与が花茎発生に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 内生 CK と GA の同定

伸長中の花茎および葉をサンプリングし、80%メタノールで抽出後、 tC_{18} カラムおよび MCX カラムで精製後、得られた CK フラクシオンを高速液体クロマトグラフ (ACQUITY UPLC, waters) にタンデム型四重極型質量分析計 (Quattro Premier, Waters) を組み合わせた UPLC/MS/MS で MRM 分析し、標準物質のリテンションタイムおよびプロダクトイオンの m/z を比較することにより CK を同定した。内生 GA は MCX カラムから得た GA フラクシオンをさらに DEA カラムにて精製後、ODS-HPLC にて 50 フラクシオンに分画し、矮性イネ短銀坊主による生物検定法にて活性フラクションを得た。この活性フラクションを GC/MS にて分析し、標品の KRI とマススペクトルを比較し GA を同定した。

(2) 低温処理期間中の CK と GA の動態と花茎の発生との関係

植物は成熟した白花大輪系の *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'MS240' を供試した。処理区は高温 (昼温 30℃/夜温 27℃) と低温 (昼温 23℃/夜温 18℃) の 2 区を設け、温度処理はガラス温室で行った。日長は両区とも自然日長とし、光条件は寒冷紗で 50%遮光とした。低温区は処理開始 0、7、14、

21、28、35 日後に、高温区は処理開始 7、21、35 日後に上位から 3 節目の腋芽をサンプリングした。サンプリングは 1 回 3 反復として、1 反復当たり 10 株を用いた。これらのサンプルに重水素ラベル CK と GA を添加した後、内生 CK と GA を Dobrev and Kaminek (2002) の方法に従い抽出・分画し、GA は DEA カラムでさらに精製した後、UPLC/MS/MS (MRM 分析) にて内部標準法により定量した。

(3) 異なる温度条件における外生 CK と GA の投与が花茎発生に及ぼす影響

植物は成熟した白花大輪系の *Phalaenopsis Sogo Yukidian* 'MS240' を供試した。温度処理は高温 (昼温 30℃/夜温 26℃)、中温 (昼温 27℃/夜温 23℃)、低温 (昼温 24℃/夜温 20℃) の 3 水準、外生 CK と GA してそれぞれ BA と GA₃ を使い、BA 濃度は 0、2mM の 2 水準、GA₃ 濃度は 0、2、10mM の 3 水準とし、これらを組み合わせて合計 18 区設定した。BA と GA₃ は 50%アセトンで溶解し、これらの溶液を上位から数えて 3 節目の葉腋に毎週 50μL ずつ、12 週間連続して投与した。1 区 3 反復として、1 反復当たり 5 株を供試した。実験は全て人工気象室内で実施し、日長は 12 時間、光強度は約 300 μmol/m²/s とした。

4. 研究成果

(1) 内生 CK と GA の同定

内生 CK として、Z、[9R]Z、iP、[9R]iP が同定された。内生 GA として GA₅₃、GA₁₉、GA₂₀、GA₁ が同定された。これらの GA は早期 13 位水酸化経路に属する GA であることから、ファレノプシスでは早期 13 位水酸化経路が主に機能していると考えられた。

(2) 低温処理期間中の CK と GA の動態と花茎の発生との関係

低温区の腋芽の新鮮重は低温開始 14 日後から増加し始めその後著しく増加し、花茎は処理開始約 26 日後に発生した (図 1)。また、高温では腋芽の発育は観察されなかった。

活性型 CK である iP 濃度は低温開始 7 日後

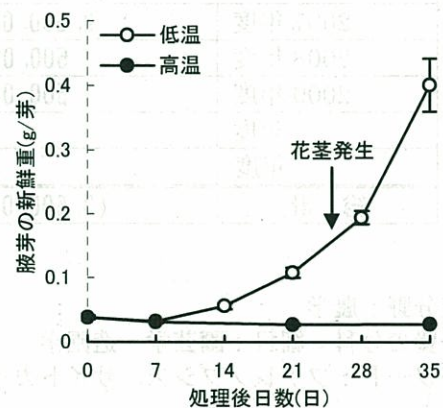


図 1 腋芽の新鮮重の推移

から上昇し始め、14日後にピークとなり、35日後には高温条件とほぼ同程度まで大きく減少した(図2)。

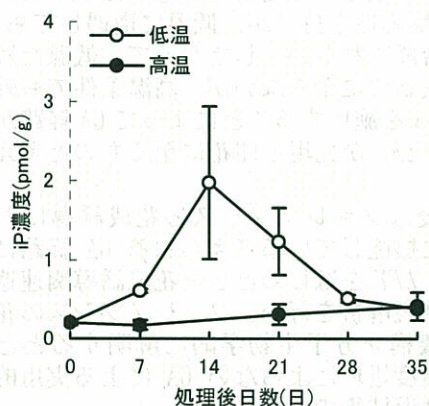


図2 腋芽の ip 濃度の推移

活性型 GA である GA_1 濃度は低温開始 21 日後から上昇し、28 日後に著しく高くなり、その後ほぼ同程度の濃度で推移した(図3)。また高温条件では GA_1 はほとんど検出されなかった。

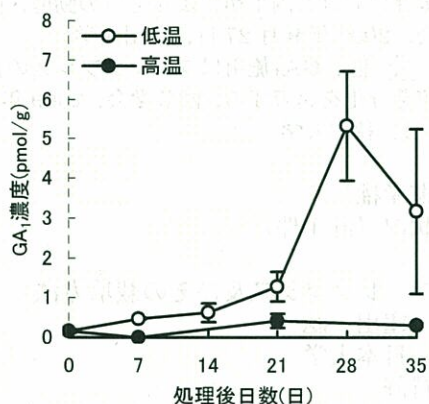


図3 腋芽の GA_1 濃度の推移

以上のことから、低温処理は腋芽の内生 CK の増大をもたらし、CK が腋芽の細胞分裂を促すことにより、腋芽の発育を開始させる。そして、腋芽内で活性型 GA_1 が合成されることにより腋芽が急激に伸長して花茎発生に至ると考えられた。したがって、ファレノプシスの低温による花茎発生は少なくともサイトカイニンとジベレリンの2つの植物ホルモンの生合成により調節されていることが明らかとなった。

(3) 異なる温度条件における外生 CK と GA の施用が花茎発生に及ぼす影響

通常、ファレノプシスの花茎は腋芽から発生し、頂芽が開花することはない。しかし、 GA_3 を単独施用すると温度が異なっても頂芽から花茎が高い確率で発生し、開花した(図4、表1)。したがって、頂芽も開花能力を持ち、頂芽の開花は温度によらず GA によって

直接誘導されることが明らかとなった。この現象は今まで全く報告されておらず、世界で初めての発見例である。 GA_3 施用という非常に簡便な方法により新奇ファレノプシスの作出が可能であり、農業上有用な方法と考えられることから特許出願した(特開2010-94083)。



図4 GA_3 投与による頂芽の開花状況

表1 異なる温度における BA と GA_3 施用が腋芽の花茎発生と頂芽の開花に及ぼす影響

温度	BA (mM)	GA_3 (mM)	腋芽の花茎発生率 (%)	頂芽開花率 (%)
低温	0	0	100.0d ^z	0.0a
	0	2	66.7cd	53.3bcd
	0	10	80.cd	40.0abc
	10	0	100.0d	0.0a
	10	2	100.0d	0.0a
	10	10	100.0d	13.3ab
中温	0	0	86.7d	0.0a
	0	2	53.3bcd	60.0cd
	0	10	60.0cd	53.3bcd
	10	0	100.0d	0.0a
	10	2	100.0d	0.0a
	10	10	100.0d	6.7a
高温	0	0	0.0a	0.0a
	0	2	8.3ab	24.4abc
	0	10	0.0a	86.7d
	10	0	80.0cd	0.0a
	10	2	33.3abc	0.0a
	10	10	73.3cd	40.0abc

Z: 異なる符号間に5%水準で有意差あり

ファレノプシスは短縮茎を持ち、いわゆるロゼット状態で生育しており、温度や日長が

異なってもこの草姿は変わらない。しかし、GA₃を施用すれば著しく茎伸長し開花したことから、頂芽はGAに対する感応性は持つが、いずれの環境においても茎頂部はGAの生合成能を持たないため、ロゼット状態で生育しているものと考えられた。

一方、腋芽からの花茎発生は通常発生が認められない高温条件下にあってもCKを投与することにより高い確率で認められたが(表1)、GAの単独施用では花茎はほとんど誘導されなかった。したがって、GAに対する感応性は高温条件ではほぼ静止状態にある腋芽においては極めて低いが、CKを投与して細胞分裂を促進し成長が始まることにより、GAに対する感応性が高まると考えられる。さらに高温においてもCK単独施用によって、高い確率で花茎が伸長したことから、CKによる腋芽の成長開始は内生GAの生合成をも促進する可能性が示された。

春化植物であるアラビドプシスでは春化(低温)経路、自律的経路、光周期経路、GA経路の4つの花成誘導経路が存在する。現在まで、ファレノプシスの花成誘導経路は明らかではないが、ファレノプシスの花成誘導に日長はほとんど影響しないこと、本研究結果から低温がなくとも活発に成長している頂芽の場合、GAを単独施用することによって花成が誘導されたことから、ファレノプシスではGA経路が主に機能し、GAが直接花形成遺伝子であるLFYの発現を促し、花成に至ると推察された。以上をまとめると、ファレノプシスの花成誘導機構を以下のように整理できる(図5)。

腋芽が低温に遭遇するとCKの生合成が促進され、腋芽の成長が始まりGAに対する反応性が向上する。そして、内生GAはCK経由

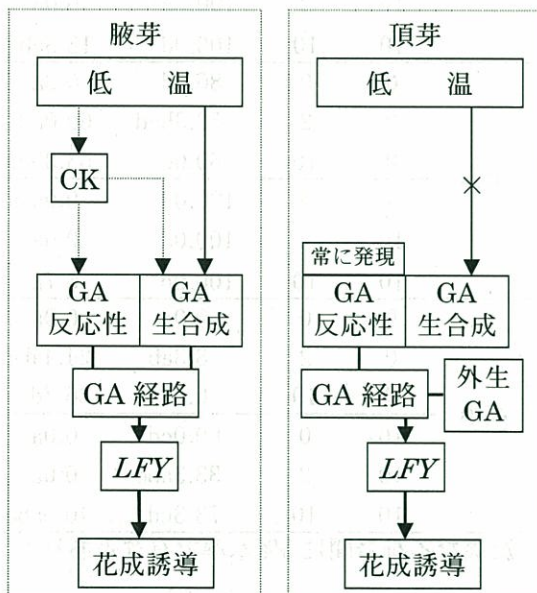


図5 ファレノプシスの花成誘導機構

か低温の直接的な作用によって生合成が活発となる。GA感受性と生合成能が高まるとGA経路が機能し、LFYが発現し開花に至る。

一方、頂芽は温度条件の違いにかかわらず、GAの反応性を持つが、低温に遭遇してもGAは生合成されない。したがって、低温だけでは花成誘導に至らないが、高温条件でも外部からGAを施用することによってGA経路が機能し、LFYが発現し開花に至るものと考えられる。

今後はファレノプシスの花成誘導において主に機能していると考えられるGA経路について、LFYをはじめとした花成誘導関連遺伝子の発現解析を行い、ファレノプシスの花成誘導機構を分子生物学的に解明するとともに、温度処理によらないGAによる実用的な花成誘導技術の開発を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

- ①窪田 聡、他、ファレノプシスの花成誘導期間中の腋芽における内生植物ホルモンの動態、園芸学会、2009年9月27日、秋田大学
- ②窪田 聡、他、GA₃施用はファレノプシスの頂芽の花芽分化を誘導する、園芸学会、2009年9月27日、秋田大学

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：ファレノプシス及びその栽培方法

発明者：窪田 聡

権利者：日本大学

種類：特許

番号：特開2010-94083

出願年月日：2008年10月17日

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

窪田 聡 (KUBOTA SATOSHI)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：60328705