

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07285

研究課題名(和文)カーネーションの温度依存性異常花発生機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of temperature-dependent flower malformation in carnations

研究代表者

山根 健治 (Yamane, Kenji)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：60240066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：鉢物カーネーション'Cherie'の正常花系統(WT)および奇形花系統(mlf)を異なる温度条件で栽培したところ、WT株は正常花のみを咲かせ、mlf株は15℃で92.2%の奇形花を形成し、20℃および25/20℃では有意に低い奇形花率を示した。WTとmlfにおける差異は花芽発達のがく片形成期以降に認められた。RNA-seqによりHSC70、WushcelおよびLOG3などはmlf株花芽で発現が高かった。HSC70およびWushcelにおいてSNIPが検出された。異常花発生機構について考察した。

研究成果の概要(英文)：Temperature regimes that cause malformed flowers were examined by using mutants of the potted carnation 'Cherie'. Plants of normal (WT) and malformed (mlf) lines were grown under several temperature regimes. This flower malformation was reversible depending on the temperature regime. mlf plants produced 92.2% of malformed flowers under constant 15°C, whereas flower malformation was significantly lower under 20°C and 25/20°C. Morphological differences between WT and mlf after sepal formation. RNA-seq revealed that HSC70, Wushcel and LOG3 genes were upregulated in flower buds of mlf plants at 15°C. Mechanism of this malformation was discussed.

研究分野：園芸学

キーワード：奇形花 変異 温度依存 遺伝子発現 花芽分化

### 1. 研究開始当初の背景

生産現場においてポットカーネーションに雌ずいの増加、花卉の葉化または発育不全、多花卉や多雌ずいなどの形態異常花(第1図)が発生し、商品価値を損なう事例がみられた。この形態異常は春季に頻発し、夏秋期には減少したことから、花芽分化期の温度などの環境要因が影響することが推察された。



第1図 正常花(上) 多花卉花(中) 多雌ずい花(下)

バラにおいては、奇形花の一つとしてブルヘッドが知られており、花の発達初期の温度の低下によって誘発されることが報告されている(Zieslin ら, 1969; Moe, 1971)。しかし、カーネーションにおける花の形態異常の報告は少ない。

カーネーションにおける花芽分化ステージについては古里ら(1967)の報告があるが、花芽発育と形態異常の報告についてはほとんどない。

さらに、このような奇形花の発生に関する分子生物学的メカニズムについても報告がない。

### 2. 研究の目的

以上のような現状を踏まえて、第1章では異なる温度条件が異常花発生に及ぼす影響について検討した。

第2章ではカーネーションの花芽分化を光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡で観察するとともに、本異常花発生時の花芽分化ステージの特定を試みた。

さらに、第3章では、本異常花の原因が何らかの突然変異によるものと仮定し、RNA-seq およびゲノムシーケンスなど分子生物学的な調査を行った。

### 3. 研究の方法

#### 第1章 カーネーションにおける温度依存性の異常花発生

鉢物用カーネーション ‘Cherie’ を供試した。

(実験1) 正常花系統(WT) および奇形花系

統(*mlf*)を温室または人工気象室で各区15株ずつ栽培し、小花の異常発生率を調査した。温度区としてT1: 26°C、T2: 14~16/12°C(昼/夜温)、T3: 14~16/12°C(1/10-2/10は17/5°C)、T4: 14~16/12°C(2/10-3/10は17/5°C)、T5: 17/5°C、T6: 17/12°Cを設けた。

(実験2) WTおよび*mlf*株を挿し芽し、5月に移植し、6月よりT7: 15°C、T8: 20°C、T9: 25/20°Cの温度条件下で各区12株ずつ栽培し、8から10月にかけて異常花の発生を調査した。異常花発生率は角変換して分散分析およびTukey多重検定を行った。

#### 第2章 カーネーションにおける奇形花発生と花芽分化ステージ

鉢物用カーネーション ‘Cherie’ を供試した。WTおよび*mlf*株を挿し芽し、5月に移植し、6月より15°C、20°Cまたは25/20°Cの温度条件下で各区12株ずつ栽培し、8から10月にかけて異常花の発生を調査するとともに、花芽の発育を観察した。

(実験1) 光学顕微鏡による観察: 正常および異常区の直径約2~10mmの花芽を280個採取し、パラフィン切片法、三重染色法(Sharman ら, 1943)を用い、顕微鏡観察に供試した。

各花芽の縦断切片を顕微鏡観察した。花芽分化ステージは古里ら(1967)の図を参考にI未分化、II膨大期、IIIがく片形成期、IV花卉形成期、V雄雌ずい形成期、VI胚珠花粉形成期、VII花芽完成期として判別した。I未分化(栄養成長期): 茎頂部は半球型をしており、その周辺に一对の葉原基があり、葉原基は直角方向に順次現れ、次第に半球型の成長点が平たくなり膨大する(II膨大期)。IIIがく片形成期: 先端が5裂したがくの形成がみられる。やがてがく片が伸長し始め、茎頂の頂端分裂組織が更に肥大する。IV花卉形成期: がく片の内側に円周状に花卉が隆起し始め、花卉の原基は丸く肥大しているが、外周より横に薄く広がり始め、花卉の形態を整えてくる。中心部には子房が形成されてくる。V雄雌ずい形成期: 子房が発達し、その基部に葯の形成がみられるようになる。VI胚珠花粉形成期: 子房の中に胚珠が、葯内には花粉が形成される。柱頭も2~4に分かれ発蕾の段階となり、VII花芽完成期となる。(実験2) SEMによる観察: WT株と15°Cの*mlf*株で花芽が形成されたのち、走査型電子顕微鏡(TM3030)と蛍光実体顕微鏡(M205FA, LASX)を用い、様々なステージの花芽の観察および写真撮影を行った。

#### 第3章 温度依存性の異常花についての分子生物学的解析

‘Cherie’のWTおよび*mlf*株を15°Cまたは20°Cの温度条件下で各区10株栽培した。RNA-seq: 正常区(15°Cまたは20°C)および異常区(15°C)の直径約2~3mmの花芽を5~7個

ずつ5反復として全RNAをCTAB法で抽出し、HiSeq (150PE)でRNA-seq解析を行った。各サンプル3G以上のデータとし、合計41.28Gであった。

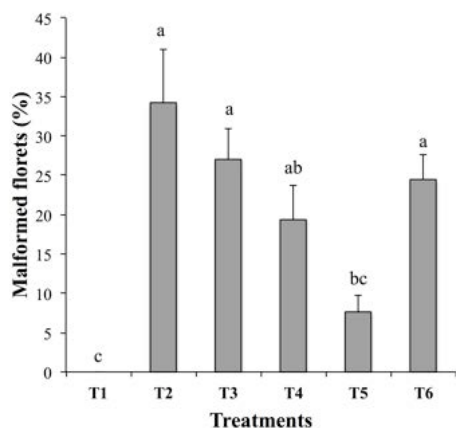
発現遺伝子をカーネーションゲノム(ftp://ftp.kazusa.or.jp/pub/carnation/)にHISAT2 (V. 2.0.5)とStringTie (V. 1.3.1c)を用いてマッピングした。発現変動遺伝子(DEG)をFDR閾値<0.05と最低2倍の変化の条件としてballgownおよびEdgeRで同定し、FPKMで表示した。

ゲノムシーケンス：正常および異常花系統株の葉身からDNAをCTAB法で抽出し、HiSeqで解析した。データ量はそれぞれ24.4Gおよび24.0Gで、coverageは38~39倍であった。Fsatx Toolkitでトリミングし、BWAでマッピングし、SamtoolsでSNPを検出した。

#### 4. 研究成果

##### 第1章 カーネーションにおける温度依存性の異常花発生

(実験1) 全ての栽培温度条件下において、正常花系統では異常花の発生は認められなかった(データ省略)。異常花系統区では処理T2、3、4、5および6区において異常花が発生したが、高温条件のT1では発生しなかった(第2図)。T2(14~16/12°C)区に対して、1ヶ月間夜温を5°CとしたT3およびT4区や夜温を5°C一定としたT5区では異常花発生率が低下する傾向が認められた。

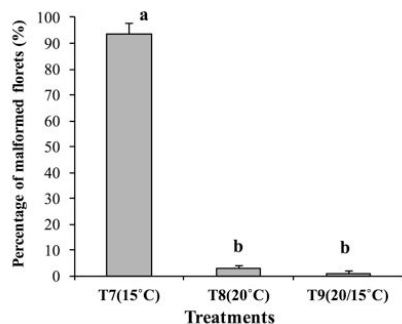


第2図 栽培温度が異常花発生に及ぼす影響。

実験1の異常花発生系統のみ。平均±SE(n=15)。

同一文字間には、Tukey検定により5%水準で有意差なし。

(実験2) T7区では小花の90%以上が異常花となったのに対して、T8およびT9区では異常花はわずかであった(第3図)。



第3図 栽培温度が異常花発生に及ぼす影響。

実験2の異常花発生系統のみ。平均±SE(n=12)。

同一文字間には、Tukey検定により5%水準で有意差なし。

Garrod and Harris (1974)らは5°Cの低温条件下で栽培したとき、カーネーションに多花弁花や貫生花などの奇形が発生することを報告している。しかし、本研究ではカーネーションに好適な15°C前後で最も奇形率が高かったことから、低温とは異なる機構で奇形が誘導されたと考えられる。また、17/5°Cで栽培した*mlf*株を23/18°Cに移したところ、正常花が発育した。反対に、26°Cで正常であった*mlf*株を17/12°Cに移したところ、奇形花が発生したことから、この奇形は温度帯に可逆的に反応することが示された。カーネーションにおいて栽培適温付近での温度依存性の奇形花発生についてはこれまで報告が無く、新規な現象と考えられた。

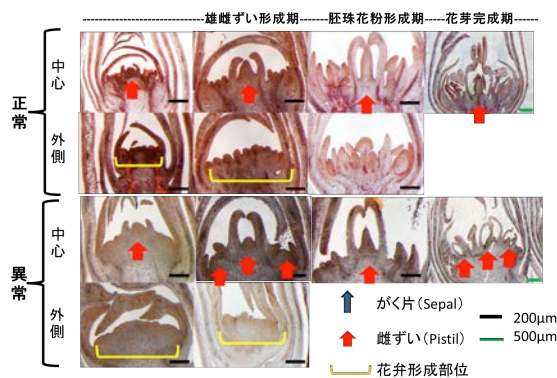
以上の結果から、本異常花の発生は12~17°Cの温度下で誘導され、20°C以上で抑制されることが示された。特に15°C前後の好適な温度で発生する、温度依存性の形態異常であることが確認された。PCR法(Nambaら, 1993)により検出されなかった(データ省略)ことから、ファイトプラズマは本奇形の要因ではないと考えられた。

異常花発生系統株の花芽における異常発生のステージの特定や遺伝的変異などの要因について、さらに検討する必要がある。

##### 第2章 カーネーションにおける奇形花発生と花芽分化ステージ

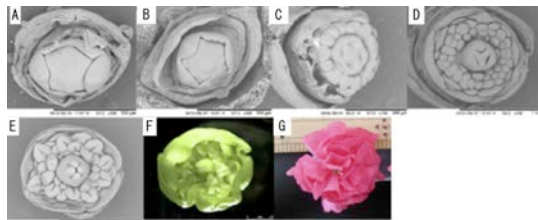
(実験1)カーネーションにおいて、栄養成長期に尖っていた成長点が扁平になるところから花芽の分化が始まる。ガク片形成期までは、WTと*mlf*系統間に差異は認められなかった(データ省略)。Blake (1962)はカーネーションの奇形花の形態について報告し、ガク片は基本的に5枚で、花の器官の中で最も安定していることを報告している。花弁形成期において、異常花では花弁形成が認められなかった。雄雌ずい形成期において、異常花では花弁が形成されておらず、複数の雌ずいが形成されているものがあった(第4図)。

異常花では、花弁形成期から形態的異常が生じ、花弁形成が遅れ、雄雌ずい形成期には雌ずいの連続的な形成および花器官の重複が始まること明らかとなった。



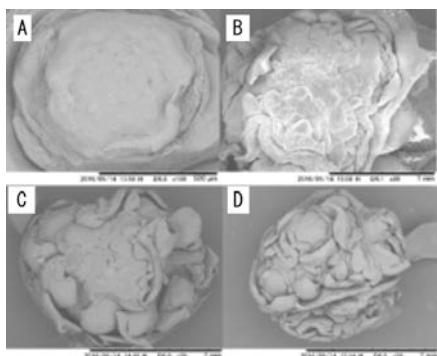
第4図 正常および異常花系統の花芽発達.

(実験2) SEMによる観察例を第5図に示した。正常花ではこの時期に雌ずいとなる器官が確認されるようになり(第5図C)、その周囲で花弁と雄ずいが明瞭に分化・発達し(第5図D, E)、完成した花芽(第5図F)となり、正常に開花した(第5図G)。それに対し多花弁花では雌ずい原基周辺の分化・発達が不明瞭で、器官数が増加していくことが観察された(第6図C)。



第5図 正常花の花芽発育ステージ.

A: 栄養成長, B: がく片形成, C: 花弁形成, D: 雄雌ずい形成, E: 胚珠花粉形成, F: 花芽完成, G: 開花.



第6図 異常花の花芽形態の例.

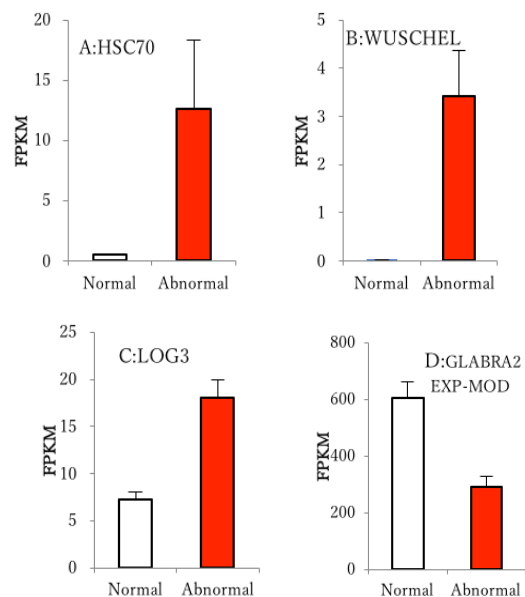
A: がく片形成期, B: 不明瞭, C: 多花弁花, D: 貫生花.

貫生花においては花芽の周囲に1つから複数のこぶのような器官が確認されるようになり、こぶのような器官から二次的花器官へと分化・発達した(第6図D)。多雌ずい花はがく片形成期から花弁形成期にかけて異常が発生すると考えられる。正常花の花芽ではこの時期に雌ずいや花弁の原基の分化・発達が進むが、多雌ずい花の花芽では器官の分化が進まないまま花芽が肥大し、その後起こる分化・発達も不明瞭であった(第6図B)。

### 第3章 温度依存性の異常花についての分子生物学的解析

RNA-seqにより、有意な変動を示した179個のDEGの中で、ストレスや低温反応に関わるHeat shock cognate 70 kDa protein (HSC70)、茎頂における幹細胞の密度を支配するWuschelおよびサイトカイニンの活性化に関わるCytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase (LOG3, 4および5;3のみ表示)などは異常花芽で発現が高かった(第7図)。

一方、GLABRA2 expression modulator(第7図)、Protodermal factor 1(データ省略)およびTranscription factor TCP2(データ省略)など、花芽の頂端分裂組織の維持に関わる遺伝子は異常花で発現が低下した。



第7図 正常および異常花発生系統における4種の遺伝子発現.

特に、HSC70およびWuschelにおいてSNPが検出された(データ省略)。異常花株ではHSC70およびWuschelに何らかの変異があり、両者が15°Cで過剰に発現し、サイトカイニンの活性が高まっていることが示唆された。その結果、花芽の安定性が低下し、花芽の分裂組織が拡大し、花の扁平化や器官の異常な増加につながった可能性が推察された。さらに、変異箇所との関係や変異の後代への遺伝なども含めて検討する必要がある。

引用文献:

- Blake, J. 1962. Ann. Bot. 26: 95-104.
- Furusato, K. 1967. Agric. and Hort. 42: 1115-1116.
- Garrod, J. F. and G. P. Harris. 1974. Ann. Bot. 38: 1025-1031.
- Moe, R. 1971. Physiol. Plant. 24: 291-300.
- Namba, S. et al 1993. Phytopathology 83: 786-791.

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. Yamane, K., K. Sumida, Y. Terui, N. Kojima, C. Burana and T. Kurokura. 2018. Temperature-dependent flower malformation in carnations (*Dianthus caryophyllus* L.). Hort. J. 87(3) *In press*

[学会発表] (計3件)

1. 山根健治・黒倉 健・鈴木智大・小島渚沙・ウアラット カンジャナ・石井一夫. 2017. カーネーションにおける温度依存性の異常花についての分子生物学的解析. 園芸学研究 16(別2): 296. 酪農学園大学.
2. 山根健治・照井友梨・小島渚沙・黒倉 健. 2016. カーネーションにおける温度依存性の異常花発生と花芽分化ステージ. 園芸学研究 15(別2): 448. 名城大学.
3. 山根健治・照井友梨・住田北郎・Burana Chairat・黒倉 健. 2016. カーネーションにおける温度依存性の異常花発生. 園芸学研究 15(別1): 232. 東京農大.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山根 健治 (YAMANE, Kenji)  
宇都宮大学・農学部・教授  
研究者番号：60240066

(2) 研究分担者

黒倉 健 (KUROKURA, Takeshi)  
宇都宮大学・農学部・講師  
研究者番号：10650898

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )