

令和 4 年 4 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15830

研究課題名（和文）多元的解析手法による園芸植物のCa欠乏症発生要因の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a primary factor of Ca deficiency disorder in horticulture crop by structural equation modeling

研究代表者

黒沼 尊紀 (Kuronuma, Takanori)

千葉大学・環境健康フィールド科学センター・助教

研究者番号：10808596

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、経営学や心理学分野で利用されている「共分散構造分析」を用いて、トルコギキョウのチップバーンの発生要因を多元的に解析した。この結果、チップバーン発生品種は、根にCaを過剰に蓄積するため新葉への「Ca移動能」が低いことが明らかとなった。加えて、チップバーン発生の品種間差と「Ca吸収能」、「成長速度」との関連性は低いことが示された。また、根への過剰なCa蓄積の原因遺伝子を探索するため、トランスクリプトーム解析を行った結果、CAX5などの候補遺伝子が抽出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

園芸生産において、生理障害の発生や収量は、いくつもの要因が複合的に関与することで決定される。本研究は、園芸生産分野において「共分散構造分析」を初めて応用した事例であり、その有効性と利用可能性が示された。これより、本手法は、園芸生産の様々な現象を解析する上で重要なツールの一つになり得ると考えられる。加えて、これまでチップバーン発生の要因として、根へのCaの過剰蓄積という「Caの局在性」が報告された事例はみられず、園芸植物のCa欠乏症の発生要因について、新たな知見を提示することが出来た。今後は、この原因をゲノムレベルで解明することで、より詳細な現象の理解と育種開発等への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Structural equation modeling is using study on business administration and psychology. This study was applied the methos in horticulture crop production to elucidate a primary factor of tipburn in lisianthus cultivars. Tipburn-damaged cultivars exhibited lower Ca distribution in new leaves because they accumulated excessive Ca in roots. There was little relevance of tipburn incidence and Ca acquisitions and plant growth rates. In addition, candidate genes causing the excessive Ca accumulation in roots were listed by transcriptome analysis (e.g., CAX5).

研究分野：花卉園芸学

キーワード：共分散構造分析 チップバーン Ca欠乏症 トルコギキョウ チップバーン

1. 研究開始当初の背景

園芸植物の **Ca** 欠乏症は、高 **Ca** 供給下であっても、植物体内で局所的に **Ca** 量が不足し、品質や収量の低下を引き起こす。これまで原因解明へ向けた多くの研究が行われてきたが、原因の特定と具体的な解決策を提示した研究例は少ない。その背景として、先行研究の多くは、「**Ca** 欠乏症の被害度」と「生育特性」の関連性を、単回帰分析や相関分析といった一元的な解析でのみ評価してきたことが挙げられる。実際に、先行研究の中には、「**Ca** 欠乏症の被害度」と「成長速度」に有意な相関関係が確認されたことから、「成長速度が高いため、**Ca** 欠乏症が発生する」と論じた報告例は少なくない (Cox et al., 1976; Lee et al., 2013)。しかし、「成長速度」などの特定の性質が、一元的に **Ca** 欠乏症の発生を制御しているとは考えにくく、「**Ca** 吸収能」や「**Ca** 移動性」などのいくつかの要素が複合的に関与し、**Ca** 欠乏症が発生すると考えられる。以上のことから、**Ca** 欠乏症の発生要因の解明のためには、植物の生育特性 (生理的・形態的特徴) を数値化し、要素間の相互作用と **Ca** 欠乏症への影響度を多元的に解析する必要がある。

一方、心理学や経済学の分野では、共分散構造分析などの多元的な解析手法が広く利用されている。これらの解析手法は、要素間の影響を含めた多元的な解析が可能であり、重回帰分析や因子分析を含んだ複雑な因果関係を 1 つのモデルとして、図解することが可能という特徴がある。

実験植物であるトルコギキョウは、国内産出額が第 5 位の主要切り花品目であり、国内種苗メーカーの世界シェアが 75% 以上を占めるなど、日本が世界をリードし発信している重要な品目の一つである。しかし、生産現場においては、新葉の葉先の **Ca** 欠乏症であるチップバーンの発生が問題視されてきた。また、チップバーンの発生には、品種間差があることが経験的に知られていたが、「トルコギキョウにおけるチップバーン被害度の品種間差の要因」は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、異なる培養液下 (**Ca** 供給量・培養液組成) において、トルコギキョウの **Ca** 欠乏症とそれに関わる生育特性 (生理的・形態的特徴) を数値化し、共分散構造分析に供した。これより、高 **Ca** 供給下における **Ca** 欠乏症の発生要因を明らかにすることを目的とした。さらに、肥培管理の観点から、**Ca** 欠乏症の発生抑制のための方策を提示するとともに、本研究を通して、園芸生産研究分野への共分散構造分析の応用の有効性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験 1 : 高 **Ca** 供給下における **Ca** 欠乏症の発生要因の多元的解析

概要 : 本実験は、閉鎖型苗生産システム内で、**Ca** 濃度のみが異なる培養液を施与し、トルコギキョウの **Ca** 欠乏症の被害度と生育特性の変化を定量した。さらに、高 **Ca** 供給下における **Ca** 欠乏症の発生要因を、共分散構造分析を用いて明らかにした。

詳細 : 中早生の 6 品種を実験に供試した (第 1 表)。供試品種は、播種後、閉鎖型苗生産システム内 (日長 : 14 h / 10 h、温度 : 25 / 20 , 明期の光強度 : 200 ~ 250 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, CO_2 濃度 : 400 ppm) で 30 日間育苗し、3 号ポットに定植した。育苗中は、園試処方 1/4 単位培養液を毎日 10 分間、底面灌水によって与えた。

処理区は、園試処方 1/4 単位培養液 (**Ca**: 40ppm) を低 **Ca** 濃度区とし、 CaCl_2 を用いて、中 **Ca** 濃度区 (**Ca**: 80ppm)、高 **Ca** 濃度区 (**Ca**: 120ppm) を設けた。実験終了後、チップバーン被害率・発生率、相対成長速度、上・中・下位葉の **Ca** 濃度、**Ca** 獲得能 (RGR_{Ca})、根重量当たりの **Ca** 吸収能 (SAR_{Ca}) などについて調査を行った。また、RW、UH、VY の 3 品種については、**K** (カリウム) 濃度も分析を行った。

第 1 表 供試品種一覧

| 供試品種名 | 略称 |
|--------------|----|
| あずまの薫 | AK |
| セレブワイン | CW |
| レイナホワイト | RW |
| 海ほのか | UH |
| ポヤージュビーチイエロー | VY |
| ポヤージュビーチ | VP |

(2) 実験 2 : 異なる **K**、**Mg**、**B** 濃度下におけるチップバーン被害度の調査

概要 : 本実験は、**Ca** との拮抗作用やチップバーン発生に影響を及ぼすと考えられている **K**、**Mg** (マグネシウム)、**B** (ホウ素) の影響を明らかにするため、それぞれ濃度の異なる処理区を設け、栽培試験を実施した。これより、**Ca** 欠乏症の発生抑制に有効な培養液組成を検討した。

詳細 : 実験 1 のうち、高 **Ca** 濃度下でもチップバーン発生度が高かった CW、RW、VP の 3 品種を実験に供試した (第 1 表)。栽培方法、栽培環境は実験 1 と同一とした。

処理区は、園試処方 1/4 単位培養液を標準区 (**K**: 107ppm、**Mg**: 12ppm、**B**: 1.8 ppm、**Ca**: 40ppm) とし、低 **K** 濃度区 (**K**: 54ppm)、低 **K** 高 **Ca** 濃度区 (**K**: 54ppm、**Ca**: 80ppm)、中 **Mg** 濃度区 (**Mg**: 35ppm)、高 **Mg** 濃度区 (**Mg**: 75 ppm)、中 **B** 濃度区 (**B**: 3.6 ppm)、高 **B** 濃度区 (**B**: 5.4 ppm) を設けた。全ての処理区で、チップバーン発生率・被害率を調査し、標準区と有意な差が確認された処理区のみ、各元素分析等を行った。

(3) 実験3：根における過剰なCa蓄積の原因遺伝子の探索

概要：実験1において、チップバーン発生品種に共通して確認された根における過剰なCa蓄積の原因遺伝子を明らかにするため、トランスクリプトーム解析を行った。

詳細：実験1と同様の栽培環境下で、標準区(Ca: 40ppm)および高Ca濃度区(Ca: 120ppm)を設けて実験を行った。供試品種は、チップバーン発生品種としてVPを、チップバーン非発生品種としてUHを用いた(第1表)。定植後6週間が経過した個体の根および葉のRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) 実験1：高Ca供給下におけるCa欠乏症の発生要因の多元的解析

異なる培養液Ca濃度に対するチップバーン発生率・被害度の品種間差

供試6品種は、高培養液Ca濃度下でも高いチップバーン被害度を示すグループ(CW、VP)と、培養液Ca濃度の増加に伴いチップバーン被害度が有意に減少するグループ(AK、RW、VY)、どの処理区でもチップバーンが発生しないグループ(UH)の3つのグループに分類された。

Ca欠乏症の発生要因の多元的解析

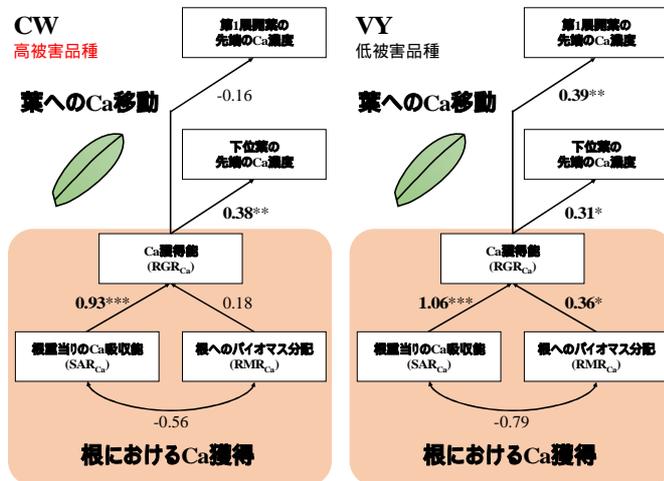
高Ca濃度下でも高いチップバーン被害度を示したCWと、培養液Ca濃度の増加とともにチップバーンが有意に減少したVYを用いて、共分散構造分析を行った(第1図)。この結果、両品種ともに、培養液Ca濃度の増加に伴い、根重当りのCa吸収能(SAR_{Ca})が増加し、Ca獲得能が上昇していることが明らかとなった。VYはCa獲得能の増加に伴い、新葉および下位葉のCa濃度が増加した。一方、CWでは下位葉のCa濃度の増加のみが確認された。これより、高Ca供給下であっても、トルコギキョウがチップバーンを引き起こす原因は、「Caの移動性」に問題があることが明らかとなった。

以上のように、植物の生理・形態的特徴を数値化し、共分散構造分析を行うことで、諸現象を多元的に解析することが可能となった。Ca欠乏症の発生に限らず、植物生産には、いくつかの要素が複合的に関与し合っており、特定の現象を示すことは少ない。そのため、園芸生産研究において、本解析手法は、多元的な解析アプローチとして、諸問題の要因解明に貢献すると考えられた。

さらに、高Ca濃度下でも高いチップバーン被害度を示すCWとVPは、他の品種よりも明らかに根のCa濃度が高く、過剰なCa蓄積が発生していることが明らかとなった(第2図)。すなわち、これらの品種の「Caの移動性」が低い原因は、根への過剰なCa蓄積であると考えられた。

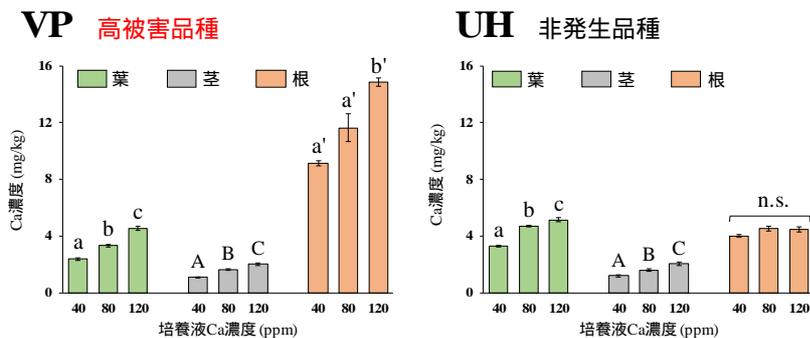
K濃度の影響

RW、UH、VYの3品種について、各部位のK濃度を分析し、チップバーン発生との関連性を評価したが、K⁺/Ca²⁺も含め、有意な関連性は確認されなかった(データ省略)。



第1図 CWとVYの共分散構造分析結果

(Kuronuma et al., 2020a 引用改変)



第2図 VPとUHの部位別のCa濃度(Kuronuma et al., 2020b 引用改変)

(2) 実験2：異なるK、Mg、B濃度下におけるチップバーン被害度の調査

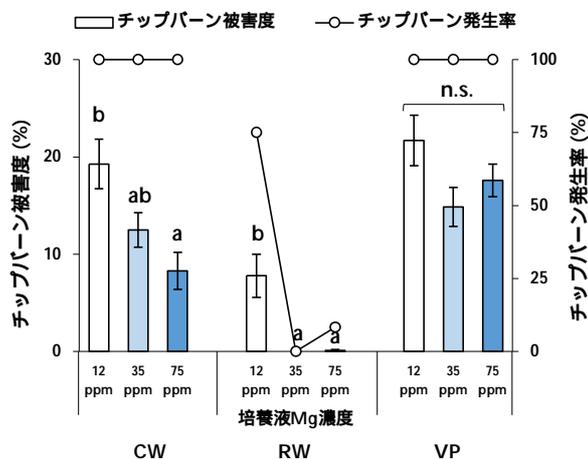
チップバーン発生率・被害度の変化

異なるK、Mg、B濃度下での処理区実験のうち、Mg濃度を変えた処理区のみで、一部品種のチップバーン被害度が有意に減少した。以上のことから、適正な範囲内であれば、KおよびBがトルコギキョウのチップバーン発生に及ぼす影響は小さいものと考えられた。

異なるMg濃度下におけるMgとCaの獲得と分配

供試 3 品種のうち、RW と CW は培養液 Mg 濃度の増加とともに、チップバーン被害度が有意に減少したが、VP に処理区間差は確認されなかった（第 3 図）。この原因を明らかにするため、各品種の部位別の Mg および Ca 濃度を分析した結果、RW と CW では新葉の葉先に Mg が分配される傾向が確認され、これにより Ca の分配も促進されたと考えられた（データ省略）。

トルコギキョウの Mg 要求性は極めて低いと考えられてきたが（Chen et al., 2018）本研究結果より、適正な範囲内の Mg 施与は、チップバーン被害度の軽減に効果的であることが示された。



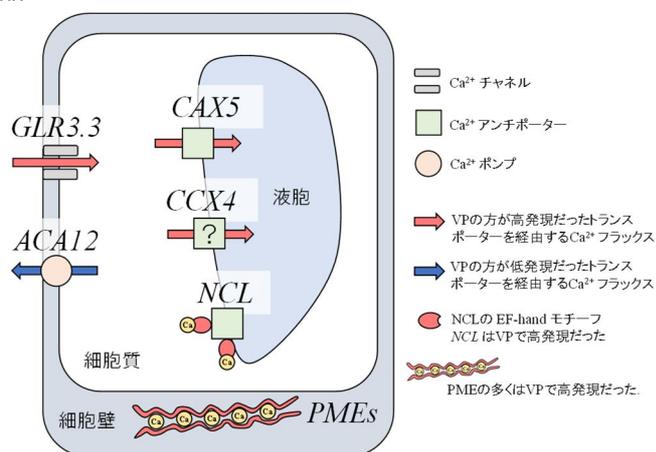
第 3 図 異なる培養液 Mg 濃度下における品種毎のチップバーン被害度と発生率 (Kuronuma et al., 2022 引用改変)

(3) 実験 3 : 根における過剰な Ca 蓄積の原因遺伝子の探索

チップバーン発生品種の VP と非発生品種の UH を用いて、葉と根のトランスクリプトーム解析および発現変動解析を行った結果、チップバーン発生品種の根における過剰な Ca 蓄積の原因として、約 10 個の候補遺伝子が抽出された。

これらの遺伝子について、モデル植物での機能解析の結果をもとに、根における仮定の細胞モデルを作成した（第 4 図）。これより、チップバーン発生品種で共通して引き起こされる根における過剰な Ca 蓄積は、液胞内もしくは細胞壁で発生している可能性が高いと考えられた。

本知見は、あくまで仮想モデルであるため、今後詳細な遺伝子発現解析や機能解析を通して、原因遺伝子を明らかにしていくことで、トルコギキョウの育種開発に貢献できると考えられる。



第 4 図 根における過剰な Ca 蓄積に関する仮定の細胞モデル (Kuronuma et al., 2021 引用改変)

<引用文献>

- Chen, C.T., Lee, C.L., Yeh, D.M. (2018). Effects of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, or magnesium deficiency on growth and photosynthesis of *Eustoma*. *HortScience*, 53(6), 795-798.
- Cox, E.F., McKee, J.M.T., Dearman, A.S. (1976). The effect of growth rate on tipburn occurrence in lettuce. *J. Hort. Sci.*, 51(3), 297-309.
- Kuronuma, T., Ando, M., Watanabe, H. (2020a). Tipburn incidence and Ca acquisition and distribution in lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) cultivars under different Ca concentrations in nutrient solution. *Agronomy*, 10(2), 216.
- Kuronuma, T., Saotome, M., Ando, M., Watanabe, H. (2020b). Excessive calcium accumulation in the roots is a key factor in tipburn incidence under high Ca supply in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivars. *Agronomy*, 10(8), 1123.
- Kuronuma, T., Ishikawa, K., Watanabe, H. (2022). Effects of magnesium application on tipburn incidence and calcium acquisition in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivars. *Horticulturae*, 8(2), 132.
- Kuronuma, T., Watanabe, H. (2021). Search for candidate genes causing the excessive Ca accumulation in roots of tipburn-damaged lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) cultivars. *Agriculture*, 11(3), 254.
- Lee, J.G., Choi, C.S., Jang, Y.A., Jang, S.W., Lee, S.G., Um, Y.C. (2013). Effects of air temperature and air flow rate control on the tipburn occurrence of leaf lettuce in a closed-type plant factory system. *Hort. Environ. Biotech.*, 54(4), 303-310.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kuronuma Takanori、Ishikawa Kanami、Watanabe Hitoshi | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Effects of Magnesium Application on Tipburn Incidence and Calcium Acquisition in Lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i>) Cultivars | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Horticulturae | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/horticulturae8020132 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kuronuma Takanori、Watanabe Hitoshi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Identification of the Causative Genes of Calcium Deficiency Disorders in Horticulture Crops: A Systematic Review | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Agriculture | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/agriculture11100906 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kuronuma Takanori、Saotome Masanori、Ando Masaya、Watanabe Hitoshi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Excessive Calcium Accumulation in the Roots Is a Key Factor in Tipburn Incidence under High Ca Supply in Lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i>) Cultivars | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Agronomy | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/agronomy10081123 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Kuronuma Takanori、Watanabe Hitoshi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Search for Candidate Genes Causing the Excessive Ca Accumulation in Roots of Tipburn-Damaged Lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i>) Cultivars | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Agriculture | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/agriculture11030254 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kuronuma T., Ando M., Watanabe H. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Tipburn Incidence and Ca Acquisition and Distribution in Lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i> (Raf.) Shinn.) Cultivars under Different Ca Concentrations in Nutrient Solution | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Agronomy | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy10020216 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kuronuma T., Watanabe H. |
| 2. 発表標題 Effects of different magnesium concentrations in nutrient solution on tipburn incidence and calcium uptake in lisianthus (<i>Eustoma grandiflorum</i>) cultivars |
| 3. 学会等名 International symposium on tropical and subtropical ornamentals (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|