

第3章

光環境によるバラ切り花の開花制御

一般に植物において、1日のうちある時間帯にのみ開花が進行するという開花リズムがあることは古くから知られている。この開花リズムの制御機構に関する研究が過去に行われており、開花リズムの維持には明暗の刺激が必要になる花と、明暗の刺激のない条件でもリズムを保持する花が存在することが分かっている (van Doorn and van Meeteren, 2003)。例えばユリでは、連続暗条件で保持すると開花が不規則に進むようになり、明期と暗期の切り替わりが開花の進行するタイミングに大きく影響することが報告されている (Bielecki et al., 2000)。バラでは、樹上の花と切り花の開花は明け方から数時間の時間帯に進行する概日リズムを示すことが報告されているが (Evans and Reid 1986, 1988)、このバラの開花リズムに関する研究は少なく、分子機構などの詳細も明らかになっていない。

また、いくつかの花において、花卉が光を受容し自身の成長を制御できるとする報告がなされている。*Calendula arvensis* では、花と葉に異なる日長の光を照射したところ、開花は花に照射された日長に合わせて進行した (van Doorn and van Meeteren, 2003)。またアサガオでも、花卉が光を感知することや、照射する光の波長により開花に与える影響が異なることが報告されている (Kaihara and Takimoto, 1980, 1981a, b)。バラの花卉が光を感知できるという報告はまだなされていないが、バラにおいても花卉が光を感知し自身の成長を制御している可能性がある。また照射する光の波長によって、バラの開花も異なる影響を受けることも考えられる。

切り花の品質向上のためにこれまで多くの研究がなされており、特に花きの老化の研

究を基礎としてエチレン作用阻害剤であるチオ硫酸銀錯塩 (STS) をはじめとする品質保持剤の開発、そして日持ちのよい品種の育種などが進んでいる。しかし、切り花における光の受容や、光環境が切り花の開花に与える影響を調べた研究は少ない。これまでに、日長が切り花の香りの放出量などにも影響することが報告されており (Hendel-Rahmanim et al., 2007; Kaihara and Takimoto, 1980, 1981a, b)、光環境は花における多様な生理作用に影響を与えることが予想される。従って、バラ切り花において日長や光の波長などの光環境が開花に与える影響を解析することは、新たな品質保持技術の開発にもつながる可能性がある。

これまでの我々の研究で、細胞壁タンパク質であるエクспанシンやエンド型キシログルカン転移酵素/加水分解酵素 (XTH) の遺伝子発現量と、開花および花卉成長との相関関係が示されている (Yamada et al., 2007a, 2009b; 落合, 2012)。さらに、水チャネルであるアクアポリンもバラ花卉の肥大成長において重要な役割を果たすことが報告されている (Ma et al., 2008; Xue et al., 2009)。従ってこれらのタンパク質は、バラの開花リズムにおいても重要な役割を果たしている可能性が考えられる。本章の研究では、主にバラ切り花を用いて、花卉成長リズムと光刺激との関係を詳細に明らかにし、さらにその分子機構を解明することを目的とした。

材料および方法

光環境が花弁成長に与える影響

実験材料

名古屋大学フィールド教育支援センター東郷フィールドで栽培管理されているバラ‘プリーティーマン’ (*Rosa hybrid* ‘FEbesa’) を用いた。開花ステージは以下のよう設定した。

Stage 1 つぼみの直径 7 mm 程度

Stage 2 つぼみの直径 12 mm 程度

Stage 3 つぼみが膨らみ、ガクの間から花弁の色が認められる状態 (開花直前)

Stage 4 ガクが先端まで完全に分離し、花弁がまだ剣弁状になっていない状態

Stage 5 外側の花弁が剣弁状になっている状態

Stage 6 露芯している状態

日長が開花リズムに与える影響

Stage 3 で採花したバラを、葉をすべて取り除いた後、11 cm の長さに統一して水中で茎を切り戻した。その後脱イオン水に浸し、25°C・55% 相対湿度・光量子束密度 220-240 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件でグロースチャンバー (BioTron; Nippon Medical & Chemical Instruments Co., Ltd.) 内に置いた。日長が開花リズムに与える影響を評価するため、まず切り花を 12 時間明期・12 時間暗期の日長条件で 1 サイクル保持した後、①12 時間明期・12 時間暗期、②24 時間暗期、③24 時間明期の条件で保持した。また日長の突然の変化が開花リズムに与える影響を評価するため、切り花を 12 時間日長で保持した後に 18 時間日長に移し変化を観察した。開花の様子を 30 分おきにインターバル撮影し、

花の最大直径と花の内側の直径（外側の花弁 6 枚を除いた部分）を、ImageJ software で撮影した画像を解析して測定した (Fig. 21A)。また、得られた花の最大直径の変化から、成長率を求めた。成長率は、処理後日数 n における花の直径を W_n とすると、
成長率 = W_{n+1} / W_n の式で求めた。

バラ花弁の成長リズム

Stage 2 で採花したバラを、条件を揃えるために 4°C で 24 時間保持した後、花弁を花から取って解析に使用した。取った花弁の基部を脱イオン水に浸し、25°C・55% 相対湿度・220-240 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件でグロースチャンバー内に保持した。花弁成長の様子を 30 分おきにインターバル撮影し、ImageJ software で撮影した画像を解析して花弁の最大幅（中央部）を測定した (Fig. 21B)。また、得られた花弁の最大幅の変化から、成長率を求めた。成長率は、処理後日数 n における花弁幅を W_n とすると、
成長率 = W_{n+1} / W_n の式で求めた。

光の波長が開花リズムに与える影響

Stage 3 で採花したバラを、葉をすべて取り除いた後、茎長 11 cm に統一して水中で茎を切り戻した。その後 0.02% (w/v) 8-ヒドロキシキノリン硫酸塩を含む 1% (w/v) グルコース溶液に浸し、25°C・55%相対湿度の条件でグロースチャンバー内に置いた。この時、グロースチャンバー内に LED 照明ユニット (3 in 1; Nippon Medical & Chemical Instruments Co, LTD.) を設置し、光の波長が切り花の開花リズムに与える影響を評価した。切り花を 24 時間暗期で保持した後、①白色光（蛍光灯）、②赤色光（LED:ピーク波長 660nm）、③青色光（LED:ピーク波長 445nm）を 12 時間日長、光量子束密度 70-75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ の条件で照射し開花への影響を観察した。開花の様子を 30 分おきにインタ

ーバル撮影し、ImageJ software で撮影した画像を解析して花の最大直径を測定した。また、得られた花の最大直径の変化から、上記のように成長率を求めた。

開花リズムとアクアポリン、エクспанシン、および XTH 遺伝子の発現

実験材料

Stage 3 で採花したバラを、葉をすべて取り除いた後、茎長 11 cm に統一して水中で茎を切り戻した。その後脱イオン水に浸し、25°C・55% 相対湿度・220-240 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ・12 時間日長の条件でグロースチャンバー内に置いた。明期開始 1 時間後（開花が進行している時）と暗期開始 1 時間後（開花が停止している時）に 5 枚の花弁を採取し、液体窒素で凍結させた後使用するまで -80°C で保存した。

sqRT-PCR によるアクアポリン、エクспанシン、XTH 遺伝子の発現解析

これまでの我々の研究で、3 種類のエクспанシン (*RhEXPA1*、*RhEXPA2*、*RhEXPA3*) と 4 種類の XTH (*RhXTH1*、*RhXTH2*、*RhXTH3*、*RhXTH4*) がクローニングされている。それぞれ、全ての遺伝子に反応するように相同性の高い部分でセンスプライマーとアンチセンスプライマーを設計した。また、バラからは 2 種類のアクアポリン (*Rh-TIP1;1*、*Rh-PIP2;1*) がクローニングされており、それらに特異的なプライマーを設計した (Ma et al., 2008; Xue et al., 2009)。用いたプライマーと反応条件は以下のとおりである。

RhEXPA-F AACCTTGTTCTGATCACCAACGTC

RhEXPA-R CCAGTTTTGGCCCCAGTT TC

98°C 1分, {98°C 10秒, 54°C 30秒, 72°C 20秒}34 サイクル

xth-f-RT-1 TCTTCCTCTGGTTCGACCC

xth-r-RT-1 CCCAATCGTCTGCGTTCC

98°C 1分, {98°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 20秒}37 サイクル

Rh-TIP1;1-F CAT TCGACGGAGCCTCCACG

Rh-TIP1;1-R CCA AGAGCATTTC AATTTAAAGTAACA AA

98°C 1分, {98°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 30秒}33 サイクル

Rh-PIP2;1-F TTGAAAATGACGAAGGAAGTGAGCGA

Rh-PIP2;1-R CCGGATCAGAGAGACCTTACGAG

98°C 1分, {98°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 30秒}25 サイクル

Q-TCTP-S1A GAGGGAGCAACCAAGTTTCTG

Q-TCTP-AS1 TGTAGTAGGCAAAGACCAAAGC

98°C 1分, {98°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 20秒}33 サイクル

結果

光環境が花卉成長に与える影響

日長が開花リズムに与える影響

切り花を 12 時間日長で保持した際の開花成長率（花の最大直径の成長率）は、暗期終了間際から上昇し始め明期開始後すぐにピークを迎えるリズムを繰り返した（Fig. 22）。切り花を連続暗期で保持した場合も、成長率は増減を繰り返すリズムを見せた（Fig. 23）。しかし、ピークの高さは処理後時間とともに減少していき、またピーク間の周期も 24 時間より短くなった。一方、連続明期で保持した切り花の成長にはリズムが見られなくなった（Fig. 24）。最初の 12 時間日長の期間に成長率の急激な上昇（開花の進行）が見られたが、その後は花がほぼ完全に開いた処理 48 時間後付近までゆっくりと開花し続けた。

次に、日長の変化が開花リズムに与える影響を評価するため、切り花を 12 時間日長で保持した後に 18 時間日長に移し変化を観察した（Fig. 25）。12 時間日長で保持している間は、成長率は暗期終了間際から上昇し始め明期開始後すぐにピークを迎えるリズムを繰り返した。しかし 18 時間日長に移したところ、暗期中（処理後 70 時間, 105 時間付近）や明期開始直後（処理後 78 時間付近）に成長率の上昇が見られた（Fig. 25）。18 時間日長における成長率の各ピークの値が小さいのは、この時には花がほぼ開ききっているためと思われる。また、すべての日長条件において、処理を開始した最初の明期で成長率が上昇する傾向が見られた（Figs. 22, 23, 24, 25）。

バラ花卉の成長リズム

バラ花卉を 12 時間日長で保持したところ、切り花と同様、成長率は暗期終了間際か

ら上昇し始め明期開始後すぐにピークを迎えるリズムを繰り返した (Fig. 26)。また、
花卉においても、処理を開始した最初の明期で成長率が上昇した。

開花リズムとアクアポリン、エクспанシン、および XTH 遺伝子の発現

sqRT-PCR により、開花が進行している時 (明期開始 1 時間後) と開花が停止している
時 (暗期開始 1 時間後) における XTH、エクспанシン、アクアポリン (*Rh-TIP1;1*
および *Rh-PIP2;1*) の遺伝子発現量を調べた (Fig. 27)。

エクспанシン遺伝子の発現は、開花が進行している時の花卉と開花が停止している
時の花卉とで、あまり差が見られなかった。XTH 遺伝子の発現量に関しては、2 日目
の暗期開始 1 時間後で発現が若干減少する傾向が見られた。一方、*Rh-TIP1;1* と
Rh-PIP2;1 の発現量は、開花が停止している時に比べて開花が進行している時に発現量
が高くなり、明確な差が見られた。

光の波長が開花リズムに与える影響の解析

切り花に白色光、赤色光、青色光を照射し、開花リズムに与える影響を調べた (Figs.
28, 29, 30)。その結果、全ての処理区で、成長率は暗期終了間際から上昇し始め明期開
始後すぐにピークを迎えるリズムを繰り返した。連続暗期で保持した切り花もリズムを
示したが、成長率の変化の値は他の処理区に比べ小さく、またピーク間の周期も短くな
った。

このとき、開花の速度はそれぞれの処理区で異なっていた (Figs. 28, 29, 30, 31, 32)。
花径の変化を比較すると、白色光を照射した切り花の開花が最も早くなっており、処理
60 時間後で花径はその他の処理区を大きく上回った。赤色光や青色光を照射した切り
花では白色光を照射した切り花に比べ開花が遅れた。また、赤色光を照射した切り花で

は処理 148 時間後でも白色光を照射した切り花に比べ花径が小さくなった。連続暗期で保持した切り花は開花が最も遅れており、処理 148 時間後でも花径がその他の処理区に比べ著しく小さくなった (Fig. 31)。

考察

光環境が花卉成長に与える影響

日長が開花リズムに与える影響

バラの開花は、明け方から一定時間のみ花卉が成長し、その後は翌朝までつぼみの成長を休止するというリズムを繰り返すことが報告されている (Evans and Reid 1986, 1988)。しかし、この現象に関する詳細な研究はこれまで行われていない。そこでまず、葉をすべて除去した切りバラを使用し、開花リズムの維持に葉が必要かどうかを調べた。切り花を 12 時間明期・12 時間暗期の条件下で保持し観察したところ、切り花の開花は暗期終了直前から数時間の特定の時間帯に集中して進行するリズムを示した (Fig. 22)。処理 72 時間後付近のピークはその他のピークに比べ小さくなったが、これはこの時には花がほぼ開ききっているためと思われる。従って、花卉またはがく片が明暗の変化を感知し、葉がなくても開花リズムを維持できると考えられる。

多くの植物が開花リズムを示すが、リズムの維持が概日リズムにより直接的に制御されているものと、リズムの維持に光刺激 (明暗の切り替わり) を必要とするものがある (van Doorn and van Meeteren, 2003)。概日リズムは連続明期・連続暗期の条件下でも継続することが分かっているため (Jones and Mansfield, 1975)、切り花を連続明期・連続暗期の条件下で保持し、バラの開花リズムが概日リズムにより直接的に制御されているかを調べた。連続暗期で保持した切り花は、周期の時間が短くなるなどの変化が見られたものの、開花にリズムが観察された (Fig. 23)。概日リズムは明暗の切り替わりなどの刺激 (ツァイトゲバー) がなくなると、リズムは維持されるが周期や振幅に変化が生じることがあるため (Jones and Mansfield, 1975)、連続暗期で保持した切り花における変化も外部からの光刺激がなくなったために生じたものと思われる。一方、連続明期で

保持した切り花は開花リズムを示さなくなり、開花は一定の速度で連続的に進行した (Fig. 24)。従って、バラの開花リズムは概日リズムのみで制御されているのではなく、リズムの維持には開花リズムの維持には一定期間の暗期が必要であることが明らかとなった。さらに、12 時間日長で保持した切り花は連続暗期で保持した切り花と同様に開花リズムを示すが、その開花速度は連続暗期で保持した切り花に比べ著しく早くなった (Figs. 22, 23, 32)。従って、光の照射は開花速度を促進する働きを持つ可能性がある。開花リズムのメカニズムはまだ明らかとなっていないが、連続明期条件では、中心振動体と出力系 (花卉成長) とのインターフェースに変化が生じ、リズムが消失すると思われる。興味深いことに、バラの香り成分の放出も似た現象を示すことが報告されており、酢酸ゲラニル (geranyl acetate) の放出量は連続明暗条件ではリズムを示すが、連続明条件では放出のリズムが消失する (Hendel-Rahmanim et al., 2007)。従って、明暗の切り替わりなどの光刺激は、植物の多様な現象に影響を与えていることが予想される。しかし今回のバラの開花リズムに関して、Evans and Reid ら (1986) は連続明期・連続暗期の両条件下でリズムが消失したと報告しており、一方 Doi ら (1999) は連続明期・連続暗期の両条件下でリズムが観察されると報告している。いずれの報告も今回の結果とは異なっており、これらの違いは使用したバラの品種や、葉の有無など植物の状態に起因しているのかもしれない。

次に、12 時間日長から 18 時間日長への変化が開花リズムに与える影響を調べた (Fig. 25)。その結果、12 時間日長では暗期終了直前から数時間の時間帯に開花が進行したが、18 時間日長に移した後では、切り花の開花が暗期中に進行した。12 時間の暗期から連続明期条件に移した場合は開花リズムが消失した (Fig. 24)。この結果も、開花リズムの維持には、明期から暗期への切り替わりと一定期間の暗期が必要であることを示していると思われる。また 18 時間日長では明期直前ではなく暗期中に開花が進行したこと

から、開花進行のタイミングは、明期から暗期への切り替わりから数時間後に進むように制御されているのかもしれない。しかし現状では、明期から暗期または暗期から明期への切り替わりなど、どのような刺激が開花の進行するタイミングや時間を決定するのか判断することはできない。今後は、2時間周期、4時間周期、あるいは8時間周期といった日長条件や、暗期中に15分程度の短い期間だけ光を照射する骨格周期実験などを行うことで、光刺激と開花リズムとの関係性をより詳細に明らかにする必要がある。

さらに、18時間日長で保持された切り花は、明期開始直後に開花の進行が観察された (Fig. 25)。その他の実験でも処理を開始した最初の明期で開花が進行する傾向が見られており (Figs. 22, 23, 24)、これらの結果も光の照射が開花を促進する作用を持つことを示しているのかもしれない。また、いくつかの花きで温度の上昇が開花に影響を与えることが報告されており、例えばハナスベリヒユでは、温度の上昇により開花が促進されることが示されている (Ichimura and Suto, 1998)。従って、バラにおいても光が花弁に含まれている色素に吸収されて花弁温度が上昇し、開花の進行に結びついた可能性が考えられる。

バラ花弁の成長リズム

葉をすべて除去した切りバラも、暗期終了直前から数時間の特定の時間帯に集中して進行するリズムを示したことから (Fig. 22)、花弁またはがく片が明暗の変化を感知しているものと思われる。そこで次に、切り花から切り取った花弁でも同様の成長リズムを示すかを確認したところ、12時間日長で保持したバラ花弁は、暗期終了間際から明期開始後の数時間にかけて花弁肥大が進行するリズムを繰り返した (Fig. 26)。処理後48時間付近のピークは処理後24時間付近のピークに比べ小さくなったが、これはこの時には花弁成長がほぼ完了しているためと思われる。以上の結果は、バラの花弁は明暗

の変化を感知し、また自身の成長を日長に同調できることを示している。アサガオでは、赤色光が開花を促進し、またその作用はそのあとに続く遠赤色光により打ち消される (Kaihara and Takimoto, 1980, 1981a, b)。また、明期と暗期の長さの感知には、比較的low光量のフィトクロム応答が関与しているとする報告が出されている (Lumsden, 1991)。バラの花弁における光の受容においても同様の機構が働いている可能性もあり、今後解析していく必要があると思われる。

開花リズムとアクアポリン、エクспанシン、およびXTH遺伝子の発現

開花リズムが多様な花きで観察されているが (van Doorn and van Meeteren, 2003)、そのメカニズムは詳しく調べられていない。一般に開花とは花弁細胞が肥大するとともに花弁が向軸側に反転する反応である。花弁細胞の肥大成長は、花弁細胞内に糖やイオンなどの浸透圧調節物質が蓄積し、その結果花弁細胞内の浸透圧が高まり、水が流入することで引き起こされると考えられている (Yamada et al., 2007a; 伊藤, 2008)。さらに、開花における細胞の肥大成長には細胞壁の伸展性の上昇も必要と考えられる (de Vetten and Huber, 1990; Winkenbach, 1971; 高橋, 2008; 藤谷, 2008)。従ってバラの開花リズムには、花弁細胞の肥大に影響を与えている、①細胞内への糖の蓄積、②水の透過性の変化、③細胞壁の伸展性の変化などが関与していると思われる。

①□ 胞内への糖の蓄積

バラにおける転流糖はスクロースであり、シンク器官である花弁中には特に開花にともなってグルコースとフルクトースが蓄積する (Yamada et al., 2007a)。グルコースやフルクトースは生体内で浸透圧調節物質、呼吸基質としてのエネルギー源、そして各種反応における炭素源としてだけでなく、多くの遺伝子発現を制御するシグナルとしての

働きも担っていることが知られている (Koch, 1996; Rolland et al., 2002; Smeekens, 2000)。花弁細胞の糖含量と開花リズムとの関連性が、Evans and Reid (1988) らによって調べられている。報告によると、花弁中の糖含量は長期的な開花ステージによって変化したが、明期と暗期を含めた 1 日の異なる時間に測定した場合ではあまり変化が見られなかった。従って、花弁中の糖含量は細胞肥大を引き起こす原動力としては機能しているが、開花リズムを直接的に引き起こすものではないと思われる。

②水の透過性の変化

開花リズムのように急激な水の流れを伴う現象には、アクアポリンの関与が考えられる。アクアポリンは別名「水チャネル」と呼ばれる 6 回膜貫通型タンパク質であり、浸透圧差に依存した受動的な水輸送を行う。輸送基質は水分子が主であり、イオンは全く透過しないが、グリセロール、尿素、アンモニア、二酸化炭素、ケイ素、ホウ素等を輸送するアクアポリンが複数発見されている (Maurel, 2007)。アクアポリンは Major Intrinsic Protein Superfamily (MIP) に属し、PIP (Plasma membrane Intrinsic Protein)、TIP (Tonoplast Intrinsic Protein)、NIP (Nodulin-26 like Intrinsic Protein)、SIP (Small basic Intrinsic Protein)、そして XIP (X Intrinsic Protein) の 5 つのファミリーに分類され、例外もあるがそれぞれ PIP は細胞膜、TIP は液胞膜、NIP は細胞膜や小胞体膜、SIP は小胞体膜、XIP は細胞膜に局在することが明らかにされている。また、アクアポリンはメチル化やリン酸化などの翻訳後修飾や pH の変化により、ゲートの開閉が制御されることが報告されている (Katsuhara et al., 2008)。

バラでは、1 種類の PIP と TIP が単離されている。これまでにバラの開花におけるアクアポリンの働きが調べられており、開花に伴い花弁で発現が上昇することや、エチレン処理や水ストレスにより発現が減少することが報告されている (Ma et al., 2008;

Xue et al., 2009)。またチューリップでは、花の開閉がアクアポリンの可逆的なリン酸化によって引き起こされることが示されている (Azad et al., 2004)。バラの開花リズムにおいても、アクアポリンの発現量や翻訳後修飾によるゲートの開閉が重要な役割を担っているかもしれない。

③細胞壁の伸展性の変化

細胞壁の伸展性やそれに関連するタンパク質の働きが開花リズムに影響を与えている可能性も考えられる。植物細胞壁は、多種類の多糖、タンパク質、および芳香属化合物が高度に重合された集合体である。細胞壁は、成長段階では一次細胞壁で構成され、成長を終えると一次細胞壁の内側に強固な二次細胞壁が形成される。一次細胞壁はセルロース微繊維が骨組みをなし、その間をヘミセルロースやペクチンといったマトリックス多糖類が埋めている。このセルロース微繊維間はヘミセルロースと呼ばれる多糖で架橋されており、またセルロース微繊維とヘミセルロースは主に水素結合で結びついている。そのため、細胞壁が伸展するためにはヘミセルロースの切断、繋ぎかえ、もしくはセルロース微繊維とヘミセルロース間の結合が切断されなければならない。XTH は、双子葉植物の主要なヘミセルロースであるキシログルカンの加水分解または転移を行い (Fry et al., 1992; Nishitani and Tominaga, 1992)、エクспанシンは、セルロース微繊維とマトリックス多糖類間の水素結合を切断する役割を持つ (Cosgrove, 1998)。

これまでの研究により、開花に伴い花卉の力学的性質が変化し、またエクспанシンや XTH が花卉細胞の肥大において重要な役割を果たすことが示されている (落合, 2012; 高橋, 2008; 藤谷, 2008; Yamada et al., 2009b)。

本実験で開花が進行している時 (明期開始 1 時間後) と開花が停止している時 (暗期

開始 1 時間後) における XTH、エクспанシン、およびアクアポリンの遺伝子発現量を調べたところ、XTH 遺伝子とエクспанシン遺伝子の発現量はあまり差が見られなかったが、*Rh-TIP1;1* と *Rh-PIP2;1* の発現量は、開花が停止している時に比べて開花が進行している時に高くなった (Fig. 27)。バラ花卉において、XTH とエクспанシンの発現量は開花に伴い上昇することが分かっているが (Yamada et al., 2009b)、今回の実験の結果では、1 日の異なる時間に測定した場合では明確な差は見られなかった。従って、XTH とエクспанシンは長期的な花卉成長には関与するが、開花リズムの制御にはあまり影響しないのかもしれない。しかし今回の実験では、XTH とエクспанシンは遺伝子の全体を認識できるよう共通配列を使用したため、発現量が均一化され差が検出できなかったかもしれない。今後は各遺伝子に特異的なプライマーを設計し、発現量の変化を解析することが必要である。また、開花が進行している時と開花が停止している時の花卉とで、細胞壁の力学的性質を比較する必要もあると思われる。

一方、開花のリズム (進行・停止) と *Rh-TIP1;1* と *Rh-PIP2;1* の発現量に相関が見られたことから (Fig. 27)、アクアポリンの量的な変化による水の透過性の変化が、バラの開花リズムを制御している可能性が示された。しかし、シロイヌナズナでは 35 種類のアクアポリンが報告されており (Johanson et al., 2001)、バラ花卉においても *Rh-TIP1;1* や *Rh-PIP2;1* 以外のアクアポリンが多数存在することが予想される。開花リズムにおけるアクアポリンの役割を明らかにするためには、その他のアクアポリンをバラ花卉から単離し、各アクアポリンの発現量を調べていく必要があると思われる。今後は各アクアポリンのタンパク量の変化や、リン酸化など翻訳後修飾の変化を解析していく必要がある。

光の波長が開花リズムに与える影響

上記の研究で、日長などの光環境がバラ切り花の開花に大きく影響することや、バラ花弁が光を感知できることなどが示された。従って、切り花の開花に促進的あるいは抑制的に働く光環境条件を明らかにすることができれば、新たな品質保持技術の開発にもつながる可能性がある。そこで次に、異なる波長の光が切り花の開花とそのリズムに与える影響を解析した。

切り花に、白色光、赤色光、青色光を照射したところ、全ての処理区で開花リズムが観察され、開花は暗期終了直前から数時間の特定の時間帯に集中して進行した (Figs. 28, 29, 30)。この結果から、切り花は赤色光と青色光を感知できることが明らかとなった。シロイヌナズナにおいて、赤色光受容体のフィトクロム、青色光受容体のフォトトロピンが概日時計の制御に関与することが報告されているが (Devlin and Kay 2000; Li and Yang 2007; Somers et al., 1998)、バラの花弁にこれらの受容体が存在しているかは現在のところ分かっていない。また、上記の花弁を使用した実験で、バラ花弁が光を感知できることが明らかとなったが、今回の実験で使用した切り花ではがく片は取り除いていないため、赤色光や青色光は花弁もしくはがく片、またはその両者によって感知されたものと思われる。今後、花弁による光の受容をより詳細に明らかにするため、がく片を除いた切り花や、花弁のみを使用して同様の解析を行う必要がある。

さらに今回の解析で、光の有無や照射する光の波長によって、切り花の開花速度が大きく変化することが明らかとなった (Fig. 32)。連続暗期条件で保持した切り花では開花速度が最も遅くなったことから (Figs. 31, 32)、光には開花の進行を促進させる効果があるように思われる。また、赤色光や青色光を照射した切り花では白色光を照射した切り花に比べ開花が遅れていた。今回の実験に使用した白色光の光源には蛍光灯を使用しており、多様な波長の光が含まれている。赤色光受容体のフィトクロムと青色光受容体のフォトトロピンは相互作用することが報告されており (Devlin and Kay 2000;

Hughes et al., 2012)、こうした光受容体間の相互作用が、白色光下において単波長の赤色光や青色光下よりも開花が促進された原因かもしれない。そのような可能性を評価するため、今後はLED光源を利用し、赤色光、青色光、あるいは緑色光などを組み合わせ、切り花に照射し、開花に与える影響を評価する必要がある。

本実験で、照射する光の波長により開花速度が変化したことから、この現象を品質保持技術に利用できる可能性があると思われる。一般に、切り花の保管は開花を抑制するため低温そして暗所で行われている。暗所で切り花を保持すると開花の進行が抑制されることが本実験でも示されている (Figs. 31, 32) が、暗所で切り花を保存する弊害も存在する。例えば、一般に暗所で長期間保管された切り花は光合成の不足により葉が黄化してしまう。また、バラの切り花を長期間低温で暗所に保管すると、その後の開花が抑制され完全には開かなくなってしまう。低温で暗所に保管されている切り花に、光合成に有効な赤色光などを短時間照射することで、このような品質低下を改善できるかもしれない。さらに、遠赤色光はアサガオの開花に抑制的に働くことが示されており (Kaihara and Takimoto, 1980, 1981a, b)、バラにおいても開花の進行に抑制的に働く波長が存在するかもしれない。光環境による開花の制御をめざし、今後も解析を進めていく必要がある。

以上のように、本章の研究により、バラ切り花の開花リズムの維持に一定期間の暗期が必要であることや、バラ花卉が明暗の変化の感知できることが明らかとなった。また、開花リズムとアクアポリンの発現量との関連性、そして異なる波長の光を利用した切り花の開花調節の可能性が示された。

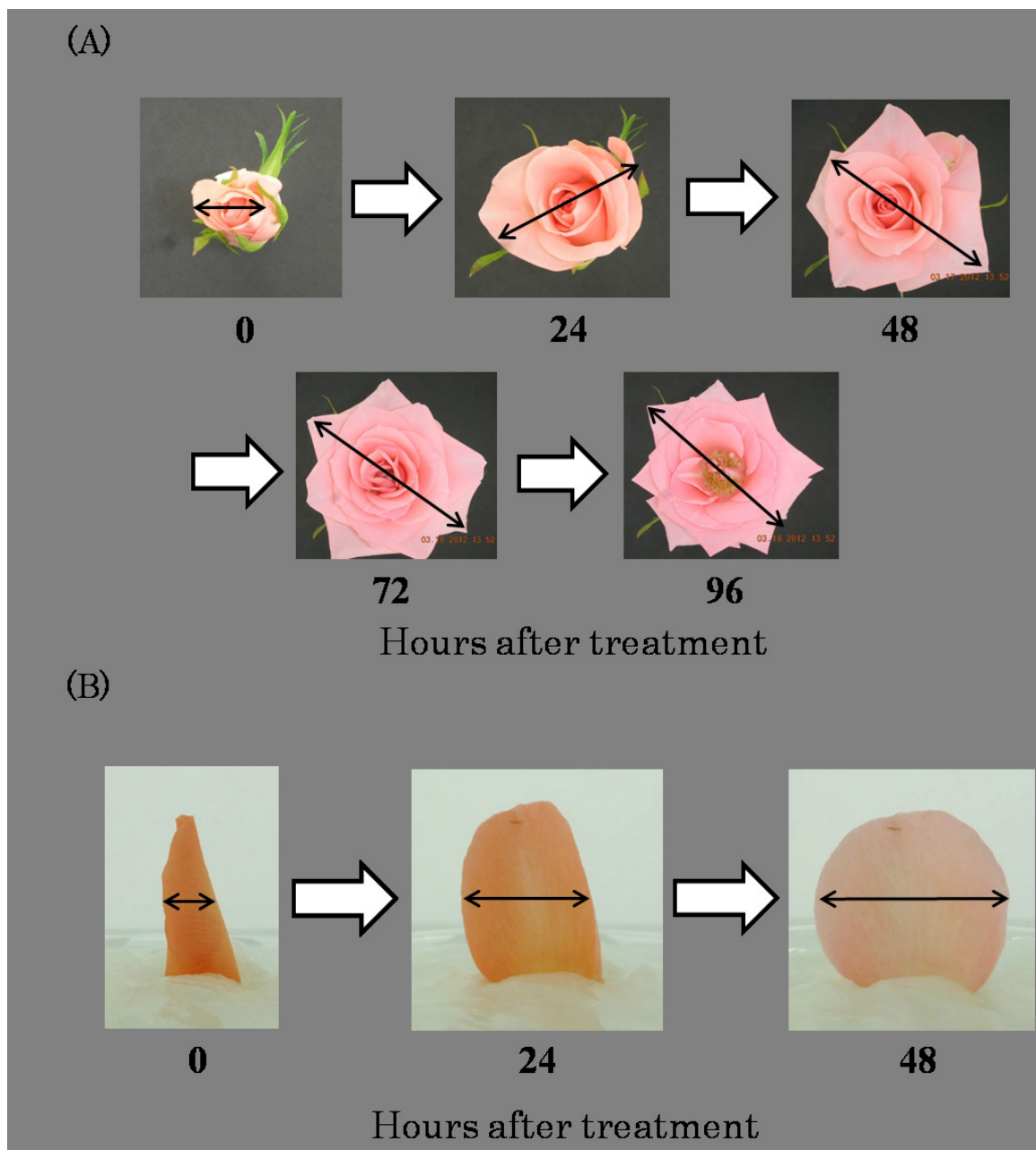


Fig. 21. Time-lapse cinematography of cut rose flower (A) and a petal (B). We measured flower diameter of cut flower and width of petal (50% of petal length from petal top) every 30 min using ImageJ software.

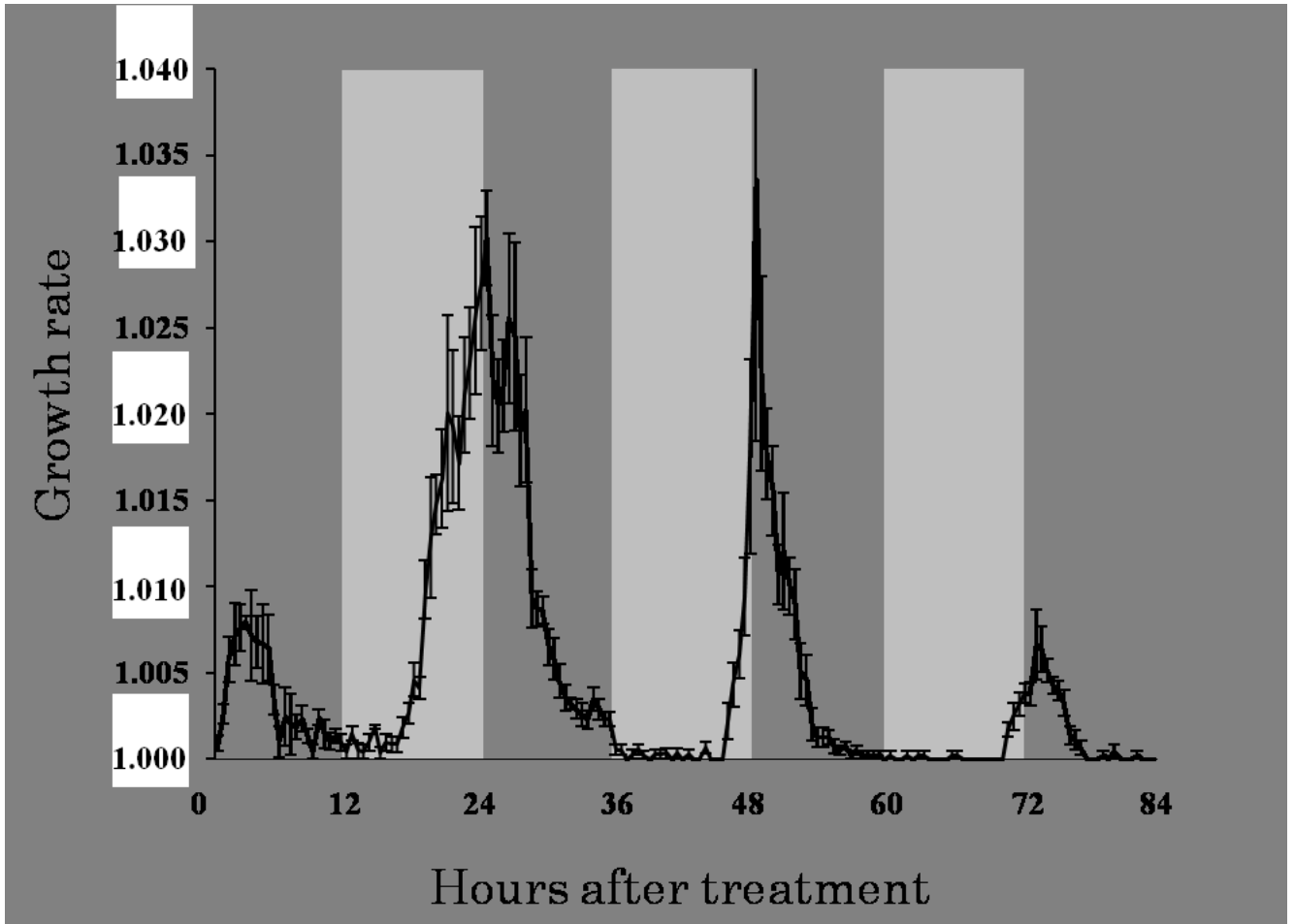


Fig. 22. Growth rate of flower diameter in cut flowers exposed to 12-h light/darkness photoperiod. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. Values are means of 4 experiments \pm SE.

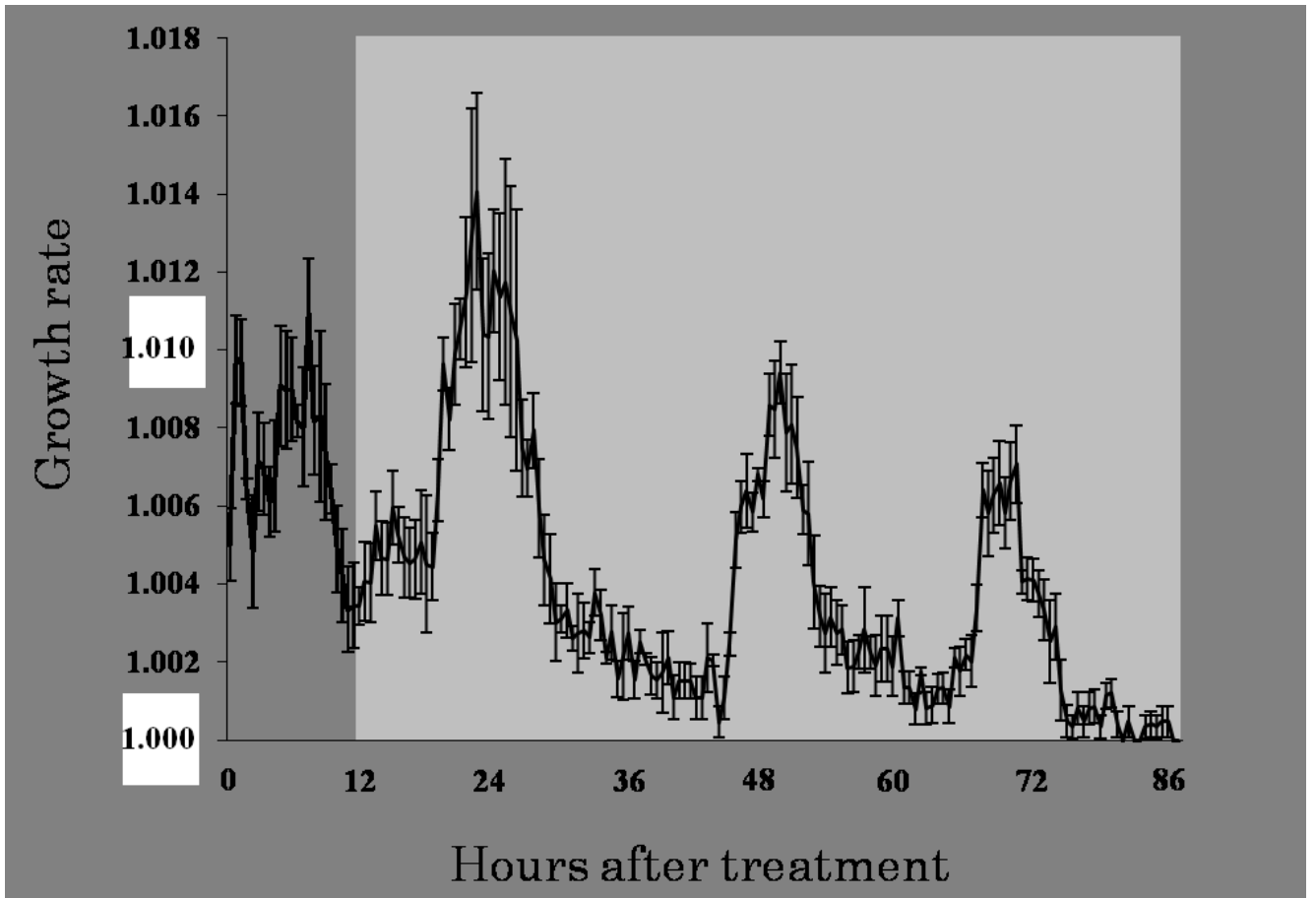


Fig. 23. Growth rate of flower diameter in cut flowers exposed to constant darkness after one cycle of 12-h photoperiod. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. Values are means of 4 experiments \pm SE.

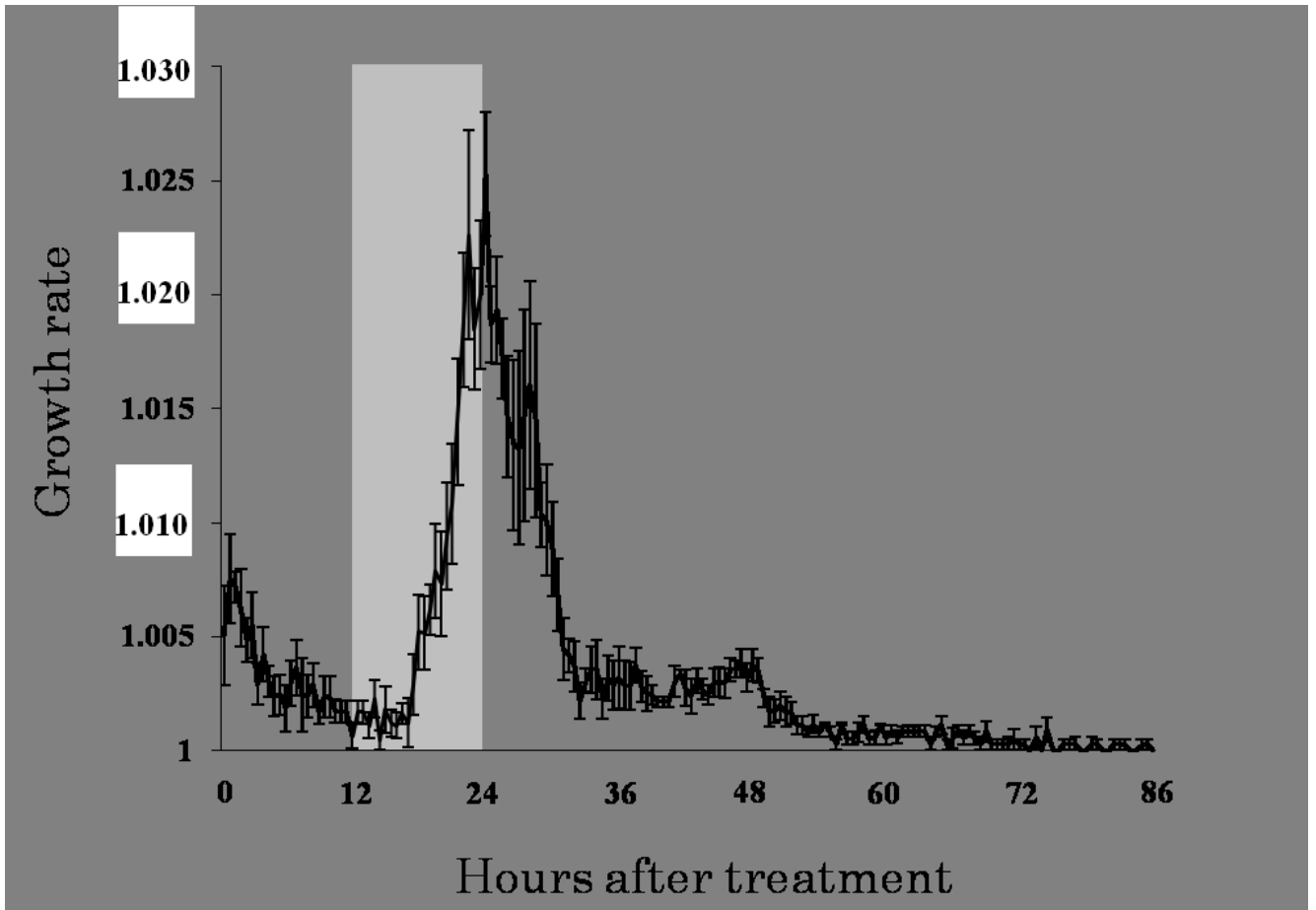


Fig. 24. Growth rate of flower diameter in cut flowers exposed to constant light after one cycle of 12-h photoperiod. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. . Values are means of 4 experiments \pm SE.

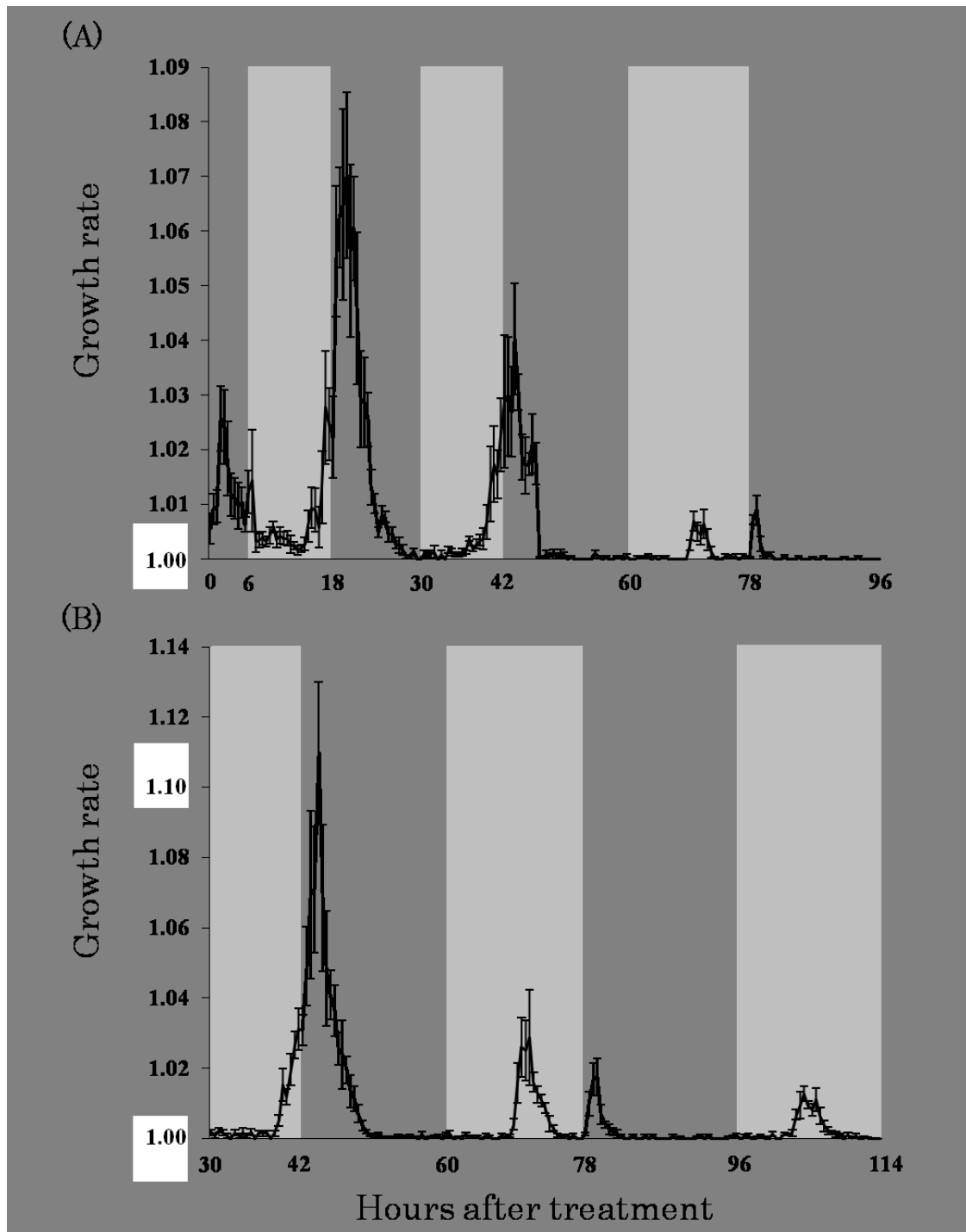


Fig. 25. Growth rate of flower diameter in outermost petals (A) and inner petals (B) in cut flowers exposed to 12-h and 18-h photoperiods. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. Values are means of 4 experiments \pm SE.

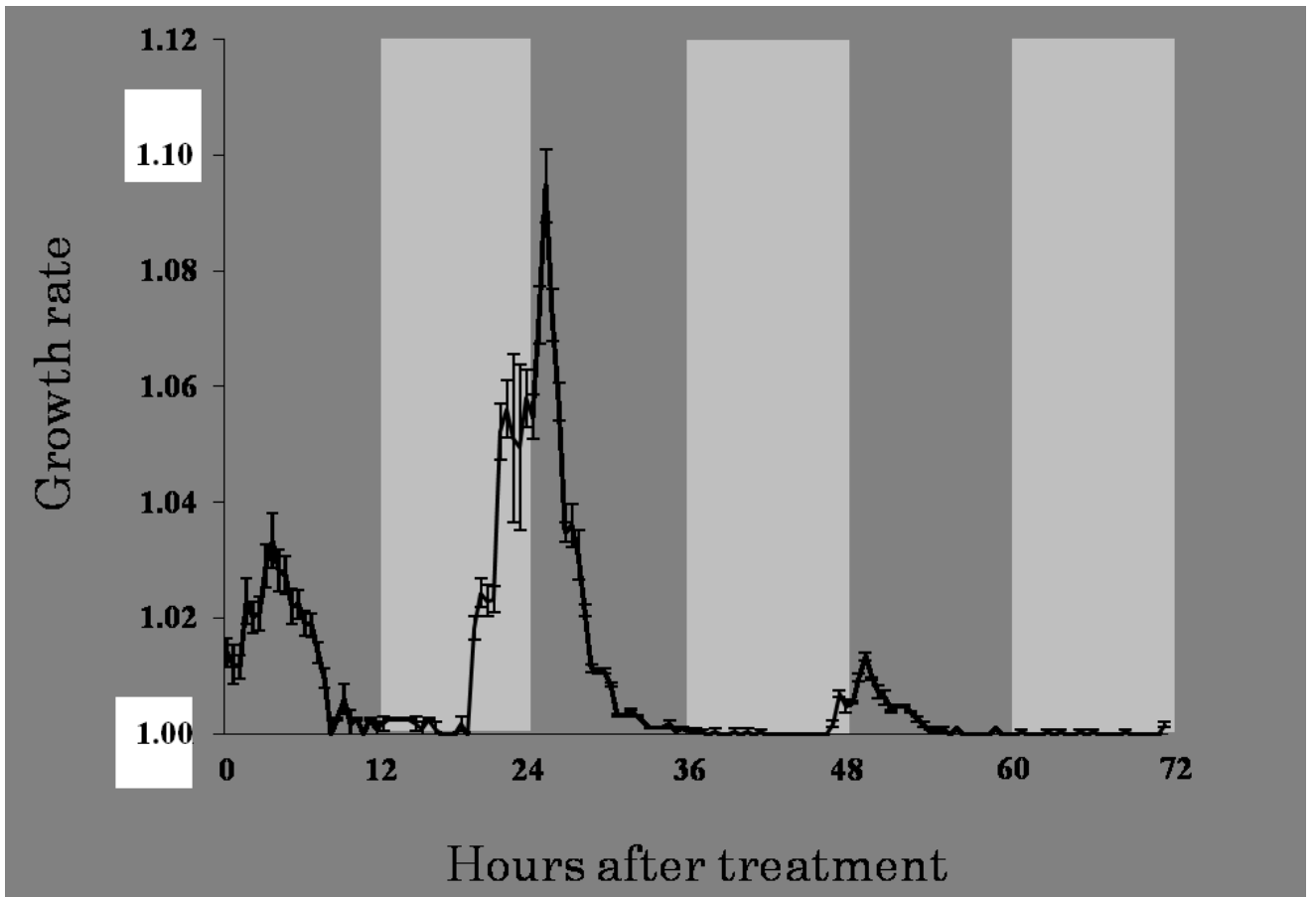


Fig. 26. Growth rate of petal width in petals exposed to 12-h light/darkness photoperiod. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. Values are means of 4 experiments \pm SE.

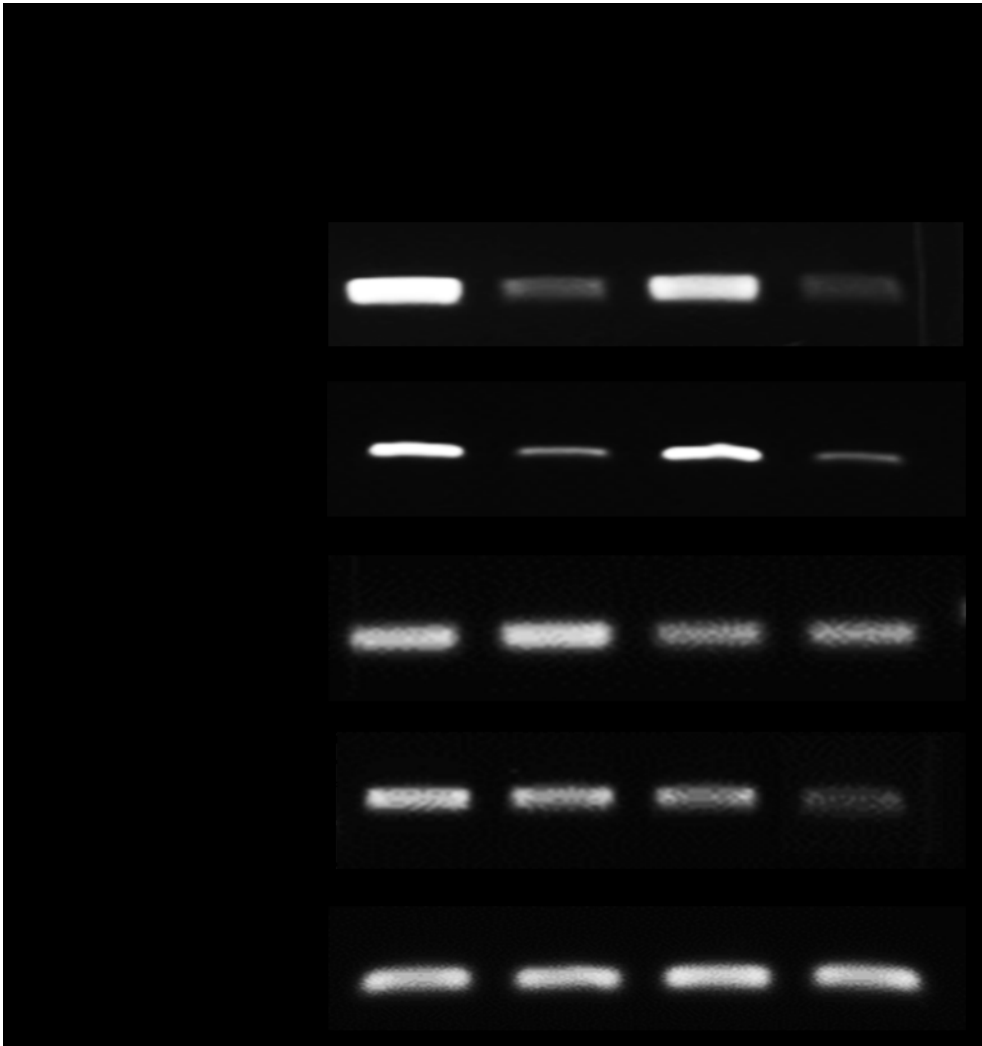


Fig. 27. Expression analysis of *Rh-PIP2;1*, *Rh-TIP1;1*, *RhEXPAs* (*RhEXPA1*, *RhEXPA2*, *RhEXPA3*) and *RhXTHs* (*RhXTH1*, *RhXTH2*, *RhXTH3*, *RhXTH4*) at each time during flower opening in cut rose. *TCTP* was used as the internal control.

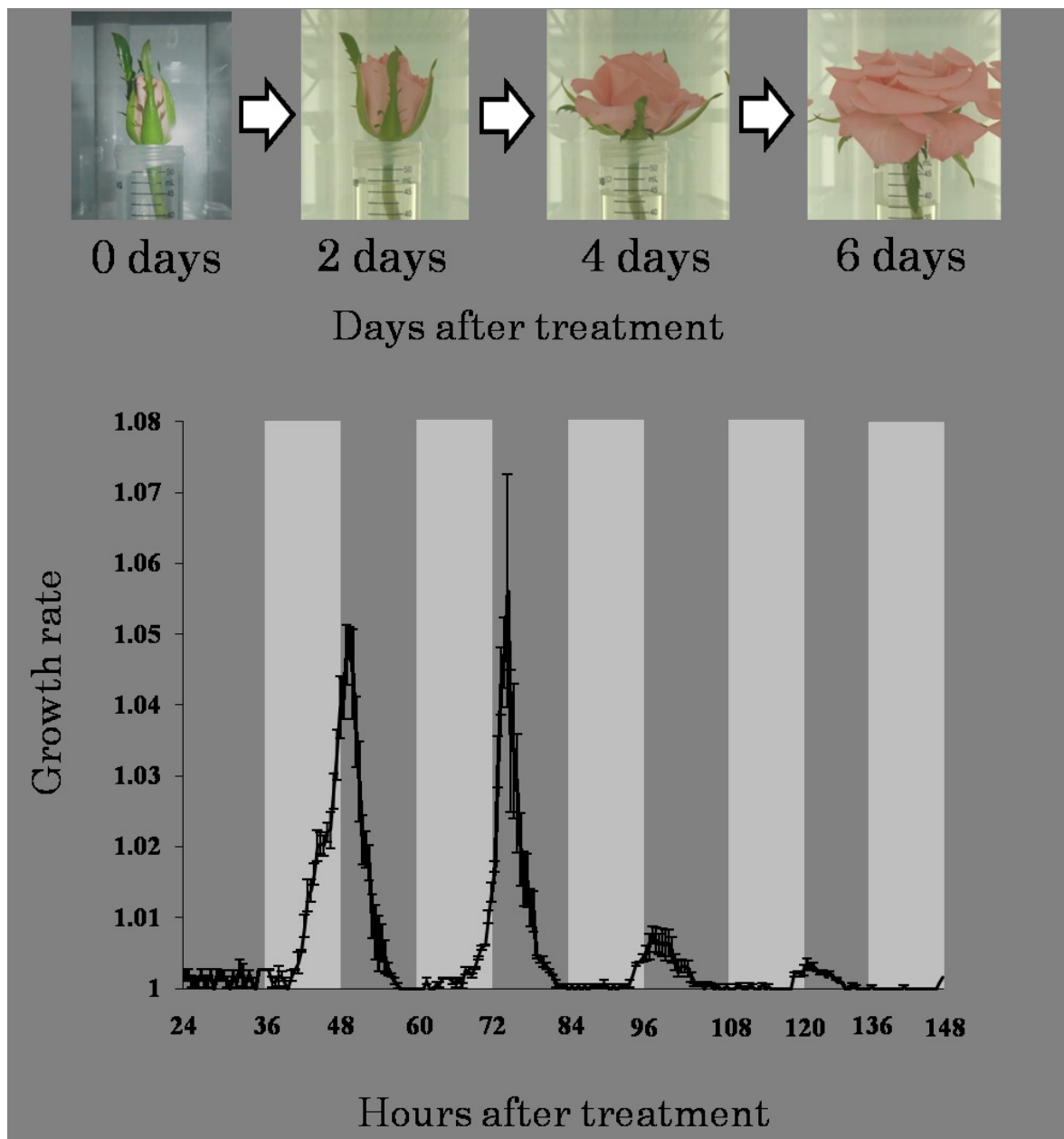


Fig. 28. Growth rate of flower diameter in cut flowers exposed to white light (12 hour light/darkness photoperiod). Cut flowers were held in constant darkness for 24 hour before first light/darkness cycle started. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. Values are means of 3 experiments \pm SE.

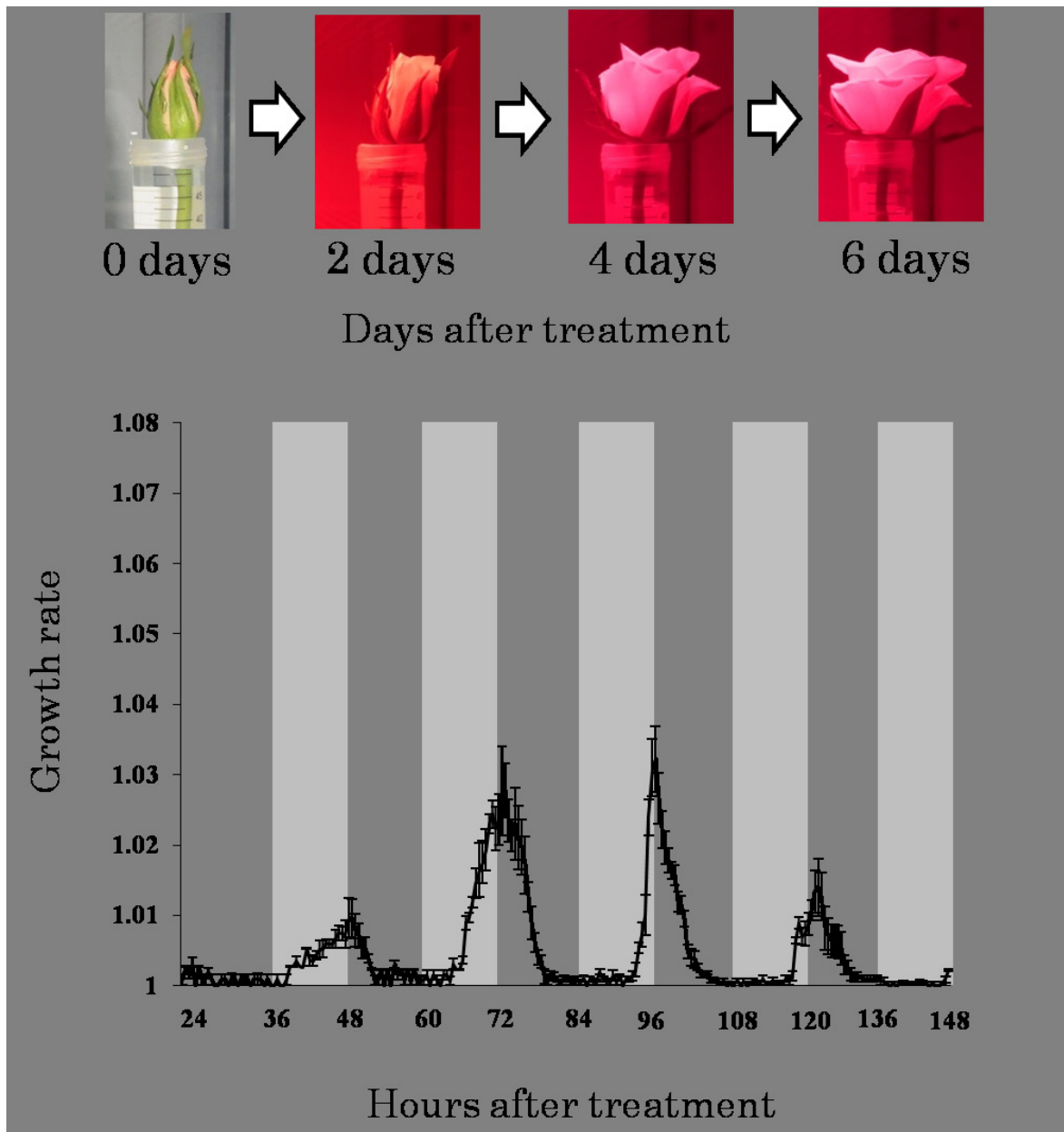


Fig. 29. Growth rate of flower diameter in cut flowers exposed to red light (12 hour light/darkness photoperiod). Cut flowers were held in constant darkness for 24 hour before first light/darkness cycle started. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. Values are means of 3 experiments \pm SE.

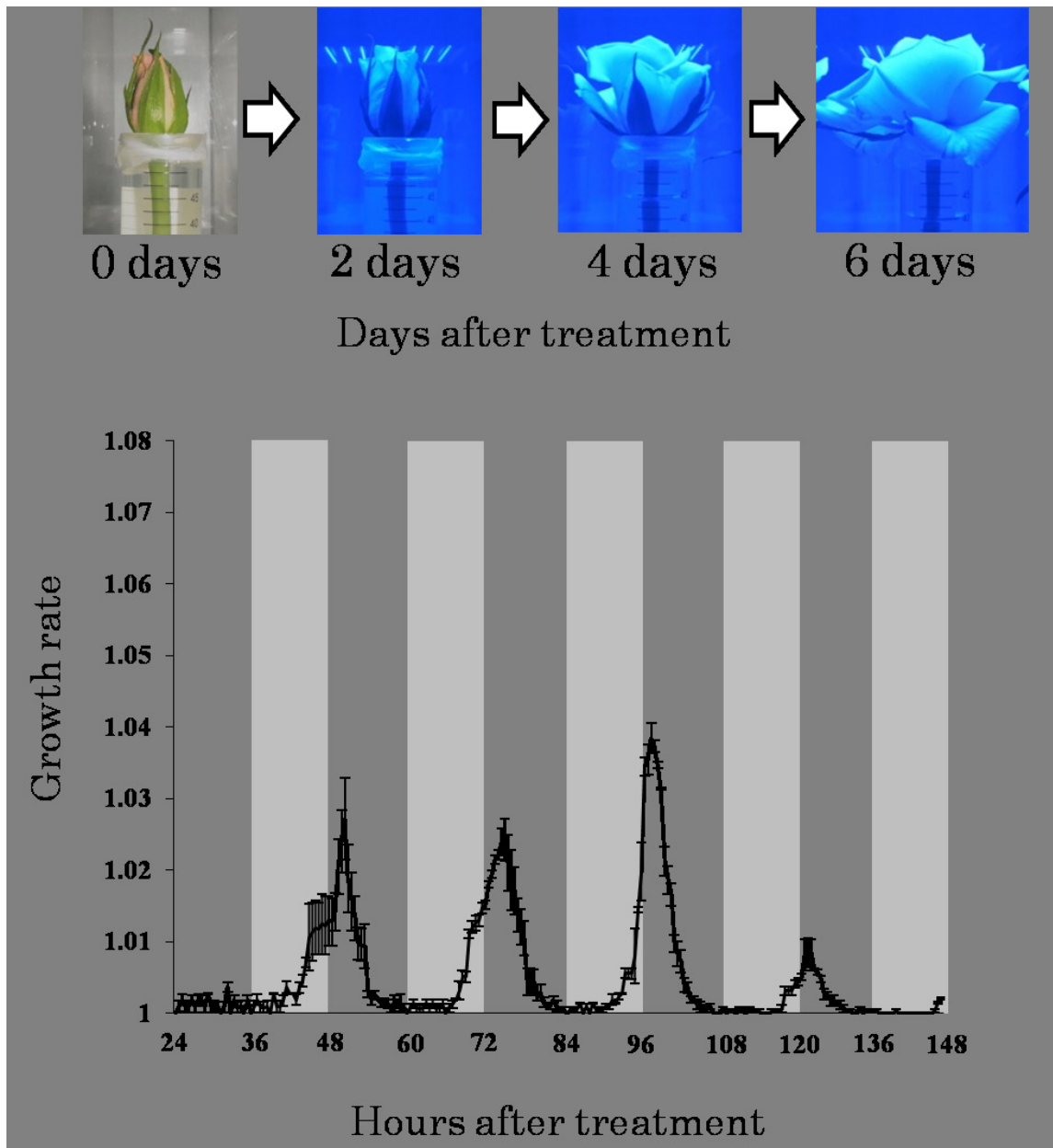


Fig. 30. Growth rate of flower diameter in cut flowers exposed to blue light (12 hour light/darkness photoperiod). Cut flowers were held in constant darkness for 24 hour before first light/darkness cycle started. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. Values are means of 3 experiments \pm SE.

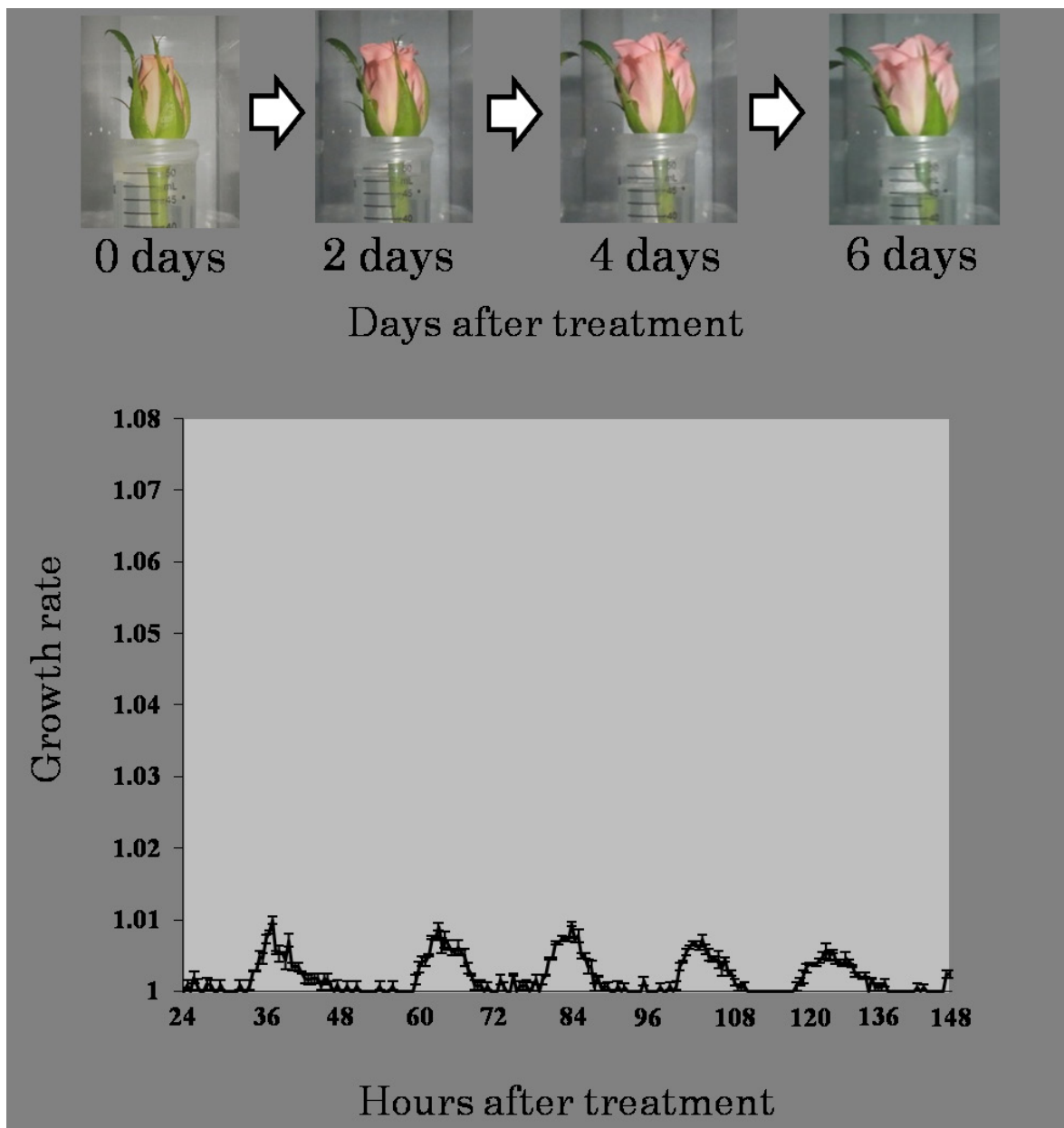


Fig. 31. Growth rate of flower diameter in cut flowers held in constant darkness. Periods of darkness are indicated by shaded area. Values are means of 3 experiments \pm SE.

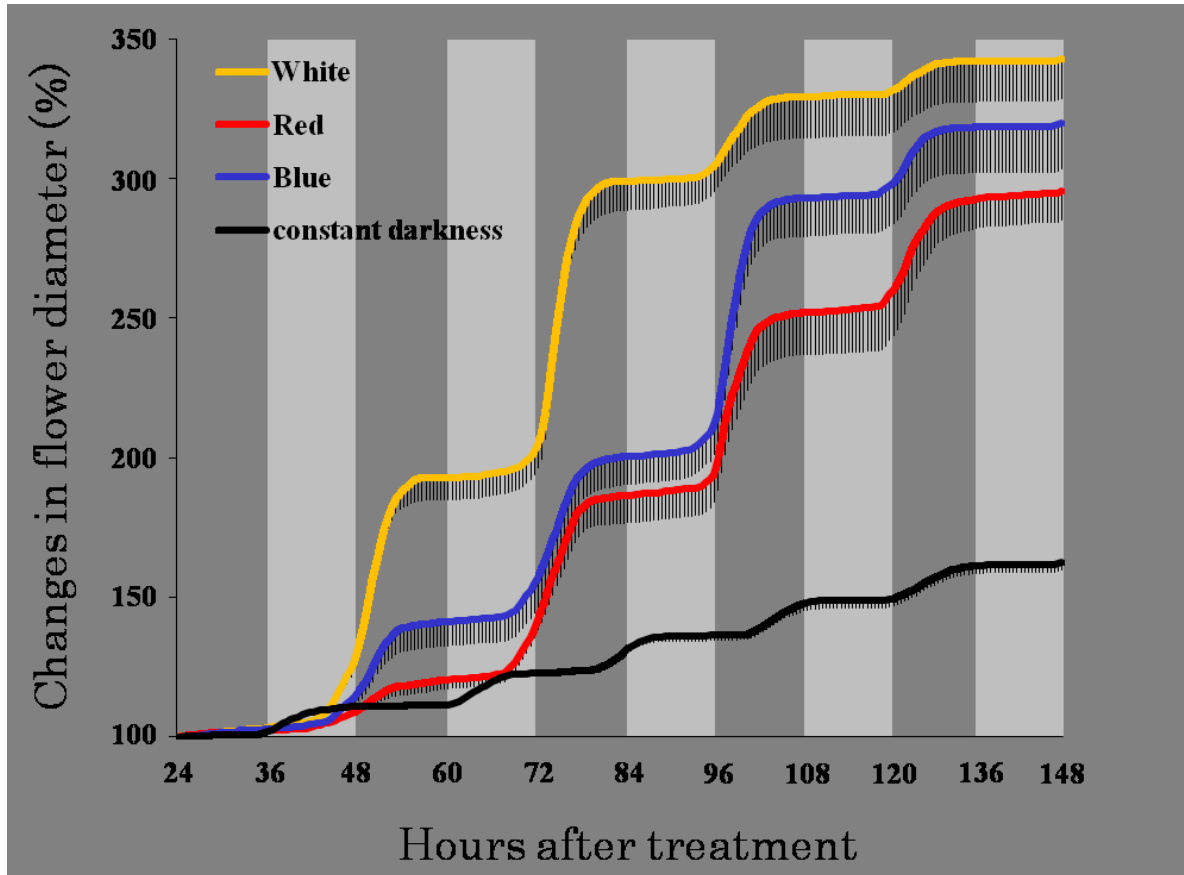


Fig. 32. Changes in flower diameter of cut flowers exposed to white, red, blue light and constant darkness. Cut flowers were held in constant darkness for 24 hour before first light/darkness cycle started. Periods of darkness and light are indicated by shaded and non-shaded areas, respectively. Values are means of 3 experiments –SE.

要約

樹上のバラの開花は明け方から数時間の時間帯に進行する概日リズムを示すことが報告されている。しかしこのバラの開花リズムに関する研究は少なく、分子機構などの詳細も明らかになっていない。そこで本研究では日長や光の波長が切り花の開花リズムに与える影響に注目し、光環境制御による切り花の品質向上技術を開発することを目的として解析を行った。

収穫した切り花を 12 時間明期・12 時間暗期の条件下で保持し観察したところ、切り花の開花は暗期終了直前から数時間の特定の時間帯に集中して進行し、切り花も開花リズムを示すことが明らかになった。次に、切り花を 24 時間暗期で保持すると、周期的な開花の進行が観察されたが、開花が進行する周期は 12 時間明期・12 時間暗期で保持したときに比べ短くなった。一方、切り花を 24 時間明期で保持した場合は開花リズムが観察されず、開花は連続的に進行した。以上の結果から、バラの開花リズムは概日リズムのみで制御されているのではなく、開花リズムの維持には一定期間の暗期が必要であると思われる。また花弁 1 枚を処理した場合でも周期的な花弁の肥大成長が観察されたことから、花弁 1 枚でも明暗の変化を感知し自身の成長を制御できることが示された。

さらに本研究で、切り花に照射する光の波長により開花に与える影響が異なることも明らかとなった。例えば、LED を使用し赤色光と青色光を照射した場合には、開花リズムは観察されたが、開花の進行は白色光を照射した場合よりも抑制された。花弁による光の受容がどのような光受容体によるものかは定かではないが、照射する光の波長やその組合せにより花弁の肥大成長に与える影響が異なることが予想される。以上のように、明暗の周期や光の波長は切り花の開花に大きく影響を与えることが明らかになった。本研究成果は、収穫後の切り花の光環境制御による開花調節へ応用することが可能であ

と思われる。