

キク（Chrysanthemum morifolium）の生育における制御機構の解明に向けて：エチレンおよびジベレリンを介した制御経路

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): Chrysanthemum morifolium, ethylene, gibberellin, flowering, rosette, chilling requirement, dormancy 作成者: 住友, 克彦 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001425

特別報告

キク (*Chrysanthemum morifolium*) の生育における
制御機構の解明に向けて
– エチレンおよびジベレリンを介した制御経路 – †

住友 克彦

(平成 21 年 5 月 7 日受付 平成 21 年 10 月 6 日受理)

An Approach to Revealing Regulatory Growth Mechanisms in *Chrysanthemum morifolium*
– Ethylene and Gibberellin as a Signaling Factor in Growth Regulation –

Katsuhiko SUMITOMO

Summary

The plant hormone ethylene suppresses flower initiation and internode elongation in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.), as does the application of ethephon, which is hydrolyzed in plant tissue and releases ethylene. The effects of ethephon are unstable, and vary with cultivar and time, season, and method of application. We describe the variation in response to ethephon due to temperature, season, and cultivar. The seasonality of extension growth and flowering capacity, growing temperatures, and genetic background of chrysanthemum made the effects of ethephon unstable and variable. Lower temperatures enhanced the suppression of internode elongation and flowering by ethephon, as confirmed by the consistently higher rate of ethylene release and greater slowing of plant extension growth and flowering at lower temperatures. After the summer plant growth, it became more difficult for ethephon-sprayed plants to elongate and flower, because they were in a low-capacity state. Cultivars that easily form rosettes, and show suppression of flowering, are highly sensitive to ethephon. In such cultivars, ethephon induced the formation of rosettes and completely prevented flowering. Since rosette formation and suppression of flowering could be linked to dormancy in chrysanthemum, this indicates that ethylene might be involved in the induction of dormancy in chrysanthemum. Temperature plays a significant role in the annual cycle between growth and dormancy of the herbaceous perennial chrysanthemum. After exposure to high summer temperatures, cool temperatures (<15°C) triggers dormancy. Cessation of flowering and formation of rosettes by cessation of elongation are characteristic of dormant plants, and can be stimulated by exogenous ethylene of ethephon

†本論文は京都大学博士論文を基に編集・加筆したものである。

本論文の一部は The Journal of Horticultural Science & Biotechnology 83:809-815, Journal of Experimental Botany 59:4075-4082, Plant Science 176:643-649 において発表した。

and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Thus, the ethylene response pathway might be involved in the temperature-induced dormancy of chrysanthemum. We used transgenic chrysanthemums expressing a mutated ethylene receptor gene to assess this involvement. The transgenic lines showed reduced ethylene sensitivity: ethylene caused leaf yellowing in wild-type chrysanthemums, but the leaves remained green in the transgenic lines.

Extension growth and flowering of wild-type and transgenic lines varied between temperatures: at 20°C, the transgenic lines showed the same stem elongation and flowering as the wild type. At cooler temperatures, the wild type formed rosettes with an inability to flower and entered dormancy, but some transgenic lines continued to elongate and flower. This supports the involvement of the ethylene response pathway in the temperature-induced dormancy of chrysanthemum. At the highest dosage of ethylene-releasing ethephon, wild-type plants formed rosettes with an inability to flower and became dormant, but one transgenic line did not. This confirms that dormancy is induced via the ethylene response pathway.

The plant hormone gibberellin (GA) induces flower formation in several long-day plants, and exogenous GA can partly substitute for chilling treatment in cold-dependent plants. Both chilling and GA are required to promote flowering of the short-day chrysanthemum as observed in many plants. Chilling and GA requirements for the flowering of 4 cultivars were examined, and their genetic variation was shown: those that required GA also required chilling for flowering, but those that did not require GA showed no chilling requirement. GA had little effect on the increase in expression of *CmAFL1*, an *APETALA1/FRUITFULL* homologous gene from chrysanthemum, under short-day conditions. With regard to *LEAFY* in *Arabidopsis thaliana*, GA promoted the expression of *CmFL*, a *FLORICAULA/LEAFY* homologous gene from chrysanthemum, and the upregulation of *CmFL* required GA in cultivars with a chilling requirement. Therefore, this GA requirement can be attributed mainly to the chilling requirement for flowering.

Key Words: *Chrysanthemum morifolium*, ethylene, gibberellin, flowering, rosette, chilling requirement, dormancy

目次

緒言

第1章 花芽分化および茎伸長におけるエセフォンの影響とその反応を変動させる要因

第1節 低生育温度条件下および高温に遭遇した株ではエセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制は顕著になる

第2節 高温遭遇後に花芽分化能力および茎伸長能力の低下を顕著に示す品種ではエセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応が強く現れる

第2章 キクの休眠誘導におけるエチレン情報伝達系の関与

第1節 エチレン前駆体 ACC による花芽分化・茎伸長の抑制およびロゼット形成の誘導

第2節 STS が花芽分化および茎伸長に及ぼす影響

第3節 エチレン低感受性遺伝子組換えキクを用いた休眠とエチレン情報伝達系の関係解明

第3章 キクの花芽分化におけるジベレリンの役割の解明

第1節 低温要求性品種の花芽分化におけるジベレリン要求

第2節 ジベレリンは *FLORICAULA/LEAFY* 相同遺伝子である *CmFL* の発現を促進し花芽分化を誘導する

総合考察

摘要

謝辞

引用文献

緒言

キク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) は東アジア原産の短日性多年生草本植物である。わが国においては、2006年には年間20.3億本のキク切り花が生産され、生産額は1000億円に達し（農林水産省統計部、

2008）、最も重要な花きである。営利的な切り花生産は、19世紀末から20世紀にかけてアメリカで始められた。その後植物の光周性が発見されると、キクの開花期間を日長調節によって延長することが試みられ（Duffet, 1957）、1930年代後半には日長調節によるキクの周年開花技術が開発された（Poesch, 1931, 1932, 1936; Post, 1931, 1934）。この技術は1950年代にヨーロッパに導入され、欧米を中心に周年生産体系が定着するに至った。欧米での切り花の周年生産には、秋に自然開花する秋ギクが利用されてきたのに対し、明治末期から大正にかけて始められたわが国の切り花生産では、江戸時代に突然変異によって発生した花芽分化に短日を必要としない夏ギクが、秋ギク以外に用いられてきた。大正末期にはアメリカより切り花用品種が導入され、昭和初期にはわが国においても電照栽培やシェード栽培が試みられるようになった。当初施設化が十分に進んでいなかったため、電照栽培は冬季に低温にならない暖地において普及し、シェード栽培はシェード内が高温になりにくい高冷地において普及した。その後、長野県の小井戸直四郎によって、秋ギクから9月咲きギク、8月咲きギク、7月咲きギクからなるいわゆる夏秋ギクが育成され、多大な労力を必要とするシェード栽培は消滅した。わが国の切り花ギクは、これらの日長反応の異なる品種を利用し周年生産され、春から秋にかけては夏ギク、夏秋ギク、秋ギクと連続的に多くの品種を主に露地で栽培し、秋から冬にかけては、暖地において主に施設を用い秋ギクを電照栽培することによって連続的に出荷が行われてきた。このように様々な日長反応性の異なるキクが栽培されているのは、世界に例をみない。

一方、1974年に野菜試験場の川田穰一によってオランダおよびアメリカから周年生産用に品種改良されたスプレーギクがわが国に本格的に導入され、同一施設での周年生産体系の確立を目指し栽培が開始された。ところが、わが国の夏季の高温・過日照条件は、施設内で周年生産を行う上で大きな障害となった。すなわち、自然日長の長い夏季には、花成誘導のため被覆による短日処理が必須となるが、被覆施設内が高温になり、秋ギク品種では開花が著しく抑制された。そこでわが国における同一施設での周年生産体系の確立に向けて、夏季の高温によっても開花遅延しない品種の育成が開始された。その結果、夏秋ギクの中に高温条件下でも開花遅延しにくい品種があることが報告され（Kawata and Toyoda, 1982）、この特性を持つ夏秋ギクを夏季の生産に用いることによって、高温条件下であっても十分な品質の切り花が得

られるようになった(柴田, 1997)。現在, スプレーギクや輪ギク生産では, 同一施設において夏秋ギクと秋ギクを組み合わせて作付けすることで, 周年生産が行われている(福田・西尾, 1984; 川田ら, 1987)。

このようにしてわが国独自の周年施設生産体系は確立されたが, 初夏あるいは低温期に開花遅延がしばしば発生することが問題になった。多年生草本植物であるキクでは, 春に伸長を開始し栄養生長した株は, 夏以降の短日条件下で花芽分化し, 秋に開花・結実した後, 生育をほとんど停止してロゼットを形成し越冬するという一連の生育サイクルを毎年繰り返す。施設栽培においてみられるキクの開花遅延現象は, 多年生草本植物としての温度, 日長等の環境要因に対する生態的反応として数多くの研究がなされた。川田ら(1987)は, 冬の低温期を経たキクの株には, その後適温・適日長条件下でも花成誘導できない期間があり, このため初夏には花成誘導条件を与えても開花遅延が発生することを示した。このように株が低温に長期間遭遇することによって栄養生長から生殖生長への移行が抑制される現象は, わが国の花き園芸分野では「幼若性」と称され, 自然条件下では, この生育特性によって越冬した株が伸長を再開する初春の短日条件下でも花芽分化せず, 栄養生長を維持できると考えられている。また, 秋から冬の低温期には, 株の節間伸長が低下してロゼットを形成し, 開花しなくなる現象がみられる。この現象はわが国の花き園芸分野では「ロゼット化」と称され(小西, 1970, 1975, 1980; 岡田, 1959), 越冬するための休眠現象であると考えられている。この現象を回避するために, 施設の加温, 早朝電照による日長操作, あるいは挿し穂の冷蔵や株の低温処理が行われる(福田・西尾, 1985; 樋口・原, 1974; 小西, 1975; 住友ら, 2007)。また, 株を夏季の高温に遭遇させなければ, このロゼットの形成および開花遅延を抑制できることから, この現象の誘導には高温が強く関与していると推察される(小西, 1980; 大石ら, 1984; 住友ら, 2008)。このように温度に対する生育反応が精査され, これらの知見を活用した生育制御技術が開発されたことによって, 現在キクの周年生産はおおむね安定して行われている。

近年, シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.)をはじめとするモデル植物では, 生育反応を調節する遺伝子が同定され, その発現・機能解析へと研究が深化している。さらにそれらの知見に基づき, モデル植物以外の多くの植物において生育反応の生理的メカニズムが解析されつつある。上述のようなキクの多年生草本植物とし

ての生育特性は, キクの持つ遺伝的性質によって支配され, その遺伝子の発現に環境要因がきわめて大きな影響を及ぼしていると考えられる。すなわち, キクにおいてみられるいわゆる「幼若性」や「ロゼット化」といった現象に直接関与する遺伝子の発現は, 低温や高温といった温度要因によって主に制御されていると考えられる。しかし, キクの生育特性における生理的メカニズムや関与する遺伝子については, ほとんど解明されていないのが現状である。モデル植物の知見を活用し, キクの生育特性における生理的メカニズムを解明することによって, 新しい生育制御技術開発および生態育種のための基礎的な知見を得ることが期待できる。

遺伝子の発現を調節し, 生育における環境応答のなかだちをしていると考えられているものが植物ホルモンである。植物ホルモンとは, 植物が生理機能を調節するために生産する低分子化合物で, 低濃度で生理作用を及ぼすものをいい, 現在, オーキシン, サイトカイニン, ジベレリン, アブシジン酸, エチレン, ブラシノステロイドの6種類が植物ホルモンとして認められている。またそれらに準ずるものとしてジャスモン酸がある。ジベレリンは *ent*-ジベレラン骨格をもつ化合物であり, 現在120種類以上の同族体が確認されている。そのほとんどは生合成系における中間代謝物であり, 実際に生体内で作用しているものは数種類であると考えられており, 伸長生長, 種子発芽誘導, 花芽分化などの重要な生理現象の制御に関わっている。ジベレリンはイソペンテニルリン酸 → *ent*-カウレンの経路で生合成された GA_{12} アルデヒドが, 酸化, 水酸化, エポキシ化等されることによって生合成される(神谷, 1991)。エチレンは果実の成熟や種子の発芽, 花芽形成, 茎葉の成長・老化, 器官脱離などの成長と分化の調節に関与している。高等植物において, エチレンは L-メチオニン → S-アデノシルメチオニン → 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 → エチレンの経路で生合成される(Yang and Hoffman, 1984)。エチレン生成は物理的傷害, 病原体感染, 低温, 高温, 乾燥などの環境ストレスによっても誘導される(Abeles et al., 1992)。これまでキクにおいては, ジベレリンおよびエチレンが生育に及ぼす影響について検討がなされ, ジベレリンによる花芽分化および茎伸長の促進作用(Harada and Nitsch, 1959), エチレンによる花芽分化および茎伸長の抑制作用(Tjia et al., 1969)が報告されている。これらの知見を活用し, GA_3 およびエチレン発生剤エセフォンが植物生長調整剤として登録され, 営利生産において利用されている。しかし, これらの植物ホルモ

ンがキクの生育に及ぼす影響を生理的メカニズムから解析し、キクの生育特性を解明する試みは行われていない。ここでは、キクの花成および茎伸長にエチレンおよびジベレリンが及ぼす影響について実験を行い、キクの生育特性との関係について明らかにした。得られた成果は、キクの生育特性の理解に新たな知見を与えるものと期待される。

第1章 花芽分化および茎伸長におけるエセフォンの影響とその反応を変動させる要因

キクの営利栽培では、開花調節のためエチレン発生剤エセフォンが利用されるが、その効果は不安定である。本章ではエセフォンの効果を変動させる要因として、生育温度がエセフォンの作用に及ぼす影響、キクの生育の季節変化とエセフォンに対する反応の関連、およびそれらの品種間差について報告する。

第1節 低生育温度条件下および高温に遭遇した株ではエセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制は顕著になる

秋ギクを用いたキクの周年生産を行う上で、わが国の夏季の高温、過日照条件は大きな障害であった。すなわち、短日処理のための被覆施設内が高温になることによって開花が著しく抑制されることや、花径が小さくなる、花房の形状が乱れる、赤系品種では花色が淡くなるなどの高温による品質低下が起きることである。一方、夏から秋にかけて自然開花する夏秋ギクの中には高温条件下でも開花遅延しにくい品種が存在する (Kawata and Toyoda, 1982)。この特性を持つ夏秋ギクを夏季の生産に用いることによって、高温条件下であっても十分な品質の切り花が得られるようになった。ところが、この夏秋ギクは時として暗期中断処理期間中に十分な草丈にならないまま花芽分化し発蕾することが営利栽培下で発生し、切り花長が減少し、そのため切り花品質が低下した。長日条件下では、短日植物であるキクの生長点は葉を分化し続けるが、結局は花芽分化し発蕾することが示されている (Cockshull, 1976)。特に夏秋ギク品種では、暗期中断による長日条件下で早期の花芽分化・発蕾が発生しやすいことが報告されている (谷川, 2000)。

エチレンはキクにおいて花芽分化や茎伸長を抑制する (Tjia et al., 1969)。また、エセフォンは植物組織内で分解してエチレンを発生することから (Warner and

Leopold, 1969)、エチレン処理と同様に、キクにおいて花芽分化や茎伸長の抑制を引き起こす (Cockshull and Horridge, 1978; Kher et al., 1974)。これらの知見をもとに、夏秋ギクの営利栽培においては、早期の発蕾を防止するために、エチレン発生剤エセフォンの茎葉散布が定植後1~2回行われている (杉浦・藤田, 2003; 谷川, 2000)。しかし、エセフォンの効果は不安定で、品種や散布時期および散布の方法によって変わることが報告されており (小西ら, 1985; 坂本・土屋, 2007)、キクにおけるエセフォンに対する反応は、環境要因や株の内的要因によって変動すると考えられる。

キクは多年生草本植物で、その生育には季節変化がみられる (Battay, 2000; 久松ら, 2002; 小西, 1980)。春から夏にかけての適温・長日条件下で旺盛な茎伸長を行った後、秋の短日条件下で花芽分化し開花すると同時に、株の基部より吸枝が発生する。吸枝はまもなく休眠状態になり、著しい茎伸長の低下によってロゼットを形成し、花芽分化ができない状態になる。休眠状態の株が再び花芽分化および茎伸長を開始するためには、低温遭遇が必要であり (Schwabe, 1950)、低温要求が満たされた後、春の気温の上昇とともに茎伸長を再開する。Vegis (1964) は多年生植物における生育の季節変化を花芽分化能力および茎伸長能力を用いて説明している。すなわち、花芽分化能力および茎伸長能力が高いときには生育可能な温度範囲が広く、逆にそれらが低いときには生育可能な温度範囲が狭まる。このVegis (1964) の説をキクに当てはめると、上述の生育の季節変化を決定するのは、主に花芽分化能力、茎伸長能力および生育温度であるといえる。

すなわち、キクにおいて低温に遭遇した後の株は、生育温度が低い条件下でも茎伸長し、花芽分化する (小西, 1975) ことから、低温に遭遇することによって花芽分化能力および茎伸長能力が高まるといえる。一方、高温に遭遇した後の株では、茎伸長が低下し、花芽分化しにくくなる (久松ら, 2002; 小西, 1980) ことから、高温に遭遇することによって花芽分化能力および茎伸長能力が低下するといえる。この高温遭遇による花芽分化能力および茎伸長能力の低下には、品種間差があることが示されており、高温遭遇後に速やかに花芽分化能力および茎伸長能力が低下する品種がある一方で、それらの低下がほとんどみられない品種もある (久松ら, 2002)。エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応は、季節や品種によって変わることから、低温または高温に遭遇することによって引き起こされる花芽分化能力および茎

伸長能力の季節変動, およびその品種間差がエセフォンに対する反応の変化に関連していることが示唆される。

ここでは, キクの花芽分化および茎伸長にエセフォンが及ぼす影響を変動させる要因を明らかにするために, 異なる生育温度条件下での花芽分化および茎伸長におけるエセフォンに対する反応を調査した。さらに, 同様の実験を高温に遭遇する前と高温に遭遇した後の株について行うことで, キクの花芽分化能力および茎伸長能力の季節変動, およびエセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応の季節変動を調査し, 両者の関連を明らかにした。これらから得られる知見は, キク生産におけるエセフォンの安定利用技術開発に繋がる基礎となる。

1. 材料および方法

1) 生育温度がエセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応に及ぼす影響およびその季節変動

栽培ギク ‘セイマリン’, ‘あずま’, ‘セイローザ’ (英品種名 ‘Reagan’) の発根苗を 2004 年 11 月 1 日に園芸培土 (クレハ園芸培土; 株式会社クレハ) を充填した栽培箱 (縦 50 cm × 横 33 cm × 深さ 14 cm) に定植し, 無加温ビニルハウス内で管理し冬季自然低温に遭遇させた。2005 年 2 月 14 日に全ての株をガラス温室 (深夜 5 時間暗期中断, 15°C 加温 25°C 換気) に移動し, 親株とした。この親株から挿し穂をとり, 得られた株を異なる 3 段階の生育温度環境下で生育させ, 生育温度がエセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応に及ぼす影響を調査した。

3 月 3 日に親株より採穂しメトロミックス 360 (Sun Gro Horticulture Inc) を充填した 128 穴セルトレイに挿した。園芸培土を充填した 7.5cm プラスチックポットに発根苗を鉢上げし, 株あたり 1 g の緩効性肥料を施した (13N-16P-10K, くみあいロングトータル花き 1 号 70; チッソ旭肥料株式会社)。鉢上げ後展開葉が 10 から 12 枚に達するまで上記のガラス温室内で管理し, 4 月 5 日に 12 時間日長, 25/20°C, 20/15°C および 15/10°C (明期/暗期) に制御した人工気象室に搬入し短日処理を開始した。光源には蛍光灯 (FL40SW; 三菱電機) を利用し, ポット地表面の有効光量子束密度 (PPFD) が $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように照射した。人工気象室への搬入時に, 200 mg L^{-1} のエセフォン溶液 (エスレル 10; 石原産業株式会社, 展着剤として 0.025% TritonX-100 含有) を, それぞれの温度区において各品種 10 株ずつ茎葉が十分にぬれるまで散布した。残りの株には蒸留水 (展着剤と

して 0.025% TritonX-100 含有) を茎葉散布し, 対照区とした。

キクの花芽分化能力および茎伸長能力の季節変動, およびエセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応の季節変動を調査するため, 上記の親株を暗期中断条件下の無加温ガラス室で維持し, 親株が夏季の高温に遭遇した後に上記の実験を繰り返し行った。7 月 26 日に採穂し 128 穴セルトレイに挿した。発根苗を鉢上げ後, 8 月 24 日に上記と同様の 12 時間日長, 25/20°C, 20/15°C および 15/10°C (明期/暗期) に制御した人工気象室に搬入し短日処理を開始した。人工気象室搬入時には上記と同様のエセフォン処理を行った。

人工気象室搬入時および搬入後 6 週目の実験終了時に, 展開葉数を調査した。発蕾が確認された日を記録し, 実験終了時に発蕾が認められなかった株については顕微鏡下で茎頂を観察し, 花芽分化の有無および未展開葉数を調査した。また実験終了時には茎伸長を調査するため人工気象室搬入時の最上位展開葉より上位第 4 葉と第 5 葉の節間長 (4-5 節間長) を測定した。25/20°C で管理した区においては節間長の調査は省略した。

2) 生育温度がエセフォン処理後のエチレン発生量に及ぼす影響およびその季節変動

エセフォン処理による花芽分化および茎伸長の抑制は, エセフォン処理後に発生するエチレンと関連があると考えられる。本実験では ‘セイマリン’ および ‘あずま’ を供試し, 生育温度がエセフォン処理後のエチレン発生に及ぼす影響を調査した。またその季節変動を調査するため, 季節を変えて同様の実験を行った。

実験 1 と同様の環境下で親株を維持し, 2005 年 6 月 18 日に採穂し, 128 穴セルトレイに挿した。発根苗を鉢上げ後, 株を 2005 年 7 月 13 日に実験 1 と同様の異なる 3 段階の生育温度環境の人工気象室に搬入し短日処理を開始した。人工気象室への搬入時には実験 1 と同様にエセフォン処理を行った。人工気象室搬入後 0, 1, 3, 7, 14 および 21 日目に, 茎頂部を展開葉を 1 枚つけて採取し, エチレン発生量の測定に供試した。採取した茎頂部は質量を測定後, 容積 30 mL の気密容器に入れ, 23°C, $\text{PPFD} 200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に制御したインキュベーター内で 1 時間静置した後, 気密容器中の気体をシリンジを用いて 1 mL 分取した。分取した気体中のエチレン濃度をガスクロマトグラフ (GC-14B; 株式会社島津製作所) を用い, 水素炎イオン化検出器で測定した。各区 3 サンプル測定した。季節変動を調査するため, 上記と同様の実験を 7

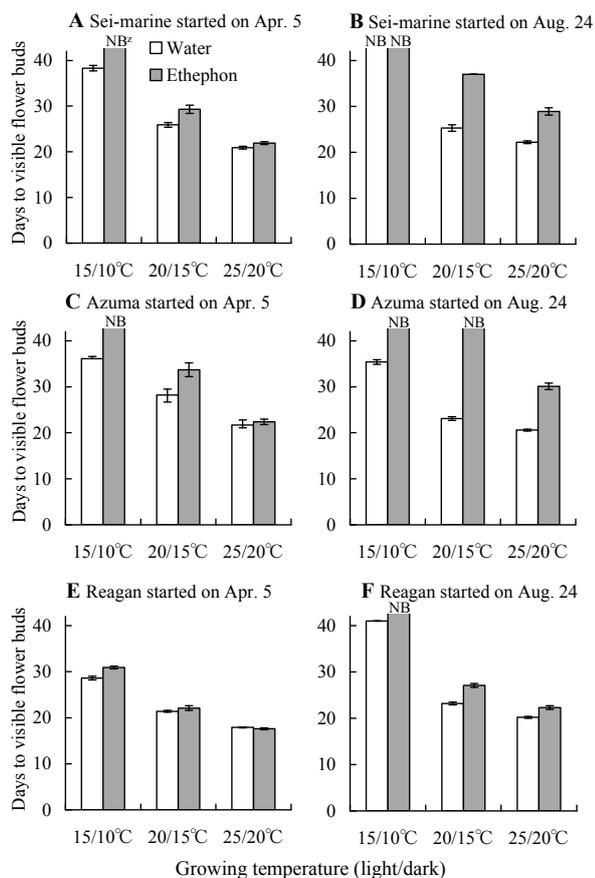


Fig. 1. Effect of ethephon, temperature, and season on days to visible flower buds in chrysanthemum. Days to visible flower buds of control plants (open bars) and ethephon treated plants (gray bars) after transfer into SD phytotron. When plants were transferred to phytotrons, one spray treatment of ethephon (0 or 200 mg L⁻¹) was applied to plants. (A) 'Sei-marine' started on April 5. (B) 'Sei-marine' started on August 24. (C) 'Azuma' started on April 5. (D) 'Azuma' started on August 24. (E) 'Reagan' started on April 5. (F) 'Reagan' started on August 24. Values are means \pm SE (n = 10). ^z NB, no visible flower buds during experimental period.

月 26 日より行った。8 月 24 日に人工気象室へ搬入し短日処理を開始し、同時にエセフオン処理を行い、その後のエチレン発生量を測定した。この実験においては、人工気象室搬入後 7 および 14 日目の測定は行わなかった。各区 10 株を生育調査用の株とし、人工気象室搬入後 6 週目に実験を終了し、実験 1 と同様に開花反応を調査した。

2. 結果

1) 花芽分化および茎伸長に及ぼす生育温度の影響およびその季節変動

エセフオン無処理の場合、4 月 5 日に人工気象室に搬

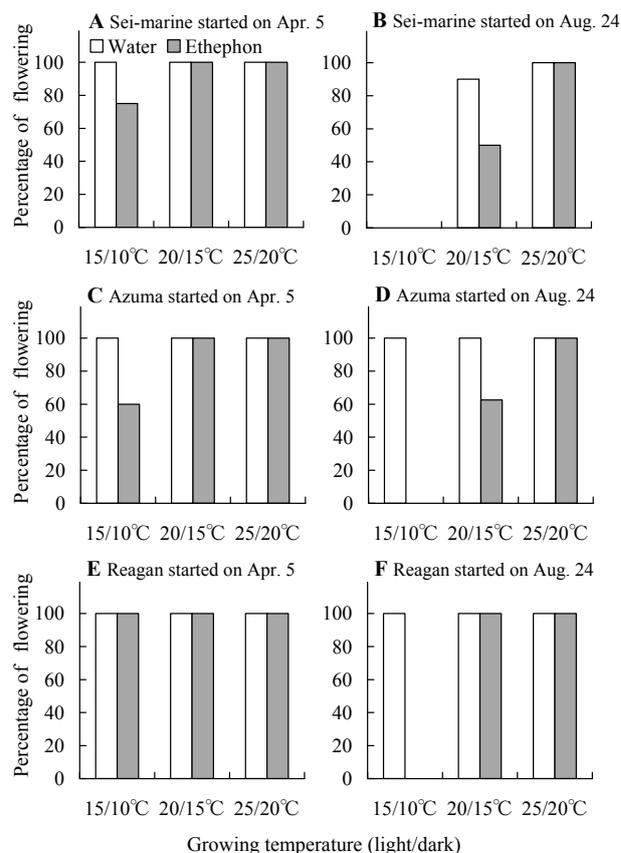


Fig. 2. Effect of ethephon, temperature, and season on percentage of flowering plants in chrysanthemum. Percentage of flowering plants of control plants (open bars) and ethephon treated plants (gray bars). When plants were transferred to SD phytotrons, one spray treatment of ethephon (0 or 200 mg L⁻¹) was applied to plants. Data were collected 6 weeks after transferring to phytotron (n = 10). (A) 'Sei-marine' started on April 5. (B) 'Sei-marine' started on August 24. (C) 'Azuma' started on April 5. (D) 'Azuma' started on August 24. (E) 'Reagan' started on April 5. (F) 'Reagan' started on August 24.

入した区 (4 月 5 日区) では、どの品種においても生育温度の低下に伴って人工気象室搬入から発蕾までの所要日数 (発蕾所要日数) が増加した (第 1 図) が、全ての個体が実験期間中に花芽分化し発蕾した (第 2 図)。短日条件である人工気象室に搬入した後の増加葉数 (増加葉数) は生育温度の影響を受けず、'セイマリン' では 20 から 22 枚、'あずま' では 24 から 26 枚、'セイローザ' では 18 から 20 枚の葉を展開した後、発蕾したことが示された (第 1 表)。キクの茎頂は短日条件下では一定枚数の葉を分化した後、花芽分化を開始する。何らかの要因で花芽分化の開始が抑制されると、茎頂はその期間葉を分化し続けるため葉数が増加する。4 月 5 日区ではどの生育温度条件下でも葉数に差がみられなかったことか

Table 1. Effect of ethephon, temperature, and season on increased number of leaves after transfer into SD phytotrons in chrysanthemum.

Growing temperature (light/dark)	Treatment	Increased number of leaves after transfer into SD phytotrons			
		Apr. 5		Aug. 24	
		Flowering	Non-flowering ²	Flowering	Non-flowering
'Sei-marine'					
15/10°C	Water	21.9 ± 0.6	-	-	28.0 ± 0.6
	Ethephon	31.8 ± 0.7	35.5 ± 0.4	-	31.9 ± 0.4
20/15°C	Water	20.5 ± 0.5	-	19.4 ± 0.7	37.0
	Ethephon	26.4 ± 0.8	-	41.6 ± 2.0	42.8 ± 1.1
25/20°C	Water	22.1 ± 0.5	-	19.8 ± 0.3	-
	Ethephon	25.1 ± 0.6	-	30.1 ± 0.7	-
'Azuma'					
15/10°C	Water	24.1 ± 0.3	-	22.3 ± 0.2	-
	Ethephon	34.2 ± 1.4	36.5 ± 1.5	-	35.8 ± 0.4
20/15°C	Water	26.7 ± 0.7	-	21.3 ± 0.4	-
	Ethephon	33.7 ± 1.3	-	44.6 ± 1.8	48.0 ± 1.7
25/20°C	Water	25.2 ± 0.5	-	22.5 ± 0.3	-
	Ethephon	27.9 ± 0.3	-	35.4 ± 0.6	-
'Reagan'					
15/10°C	Water	19.1 ± 0.3	-	22.8 ± 0.2	-
	Ethephon	20.9 ± 0.2	-	-	32.9 ± 0.2
20/15°C	Water	18.8 ± 0.3	-	19.6 ± 0.4	-
	Ethephon	19.5 ± 0.3	-	25.7 ± 0.2	-
25/20°C	Water	20.1 ± 0.4	-	20.8 ± 0.3	-
	Ethephon	22.6 ± 0.4	-	26.3 ± 0.3	-

When plants were transferred into SD phytotrons, one spray treatment of ethephon (0 or 200 mg L⁻¹) was applied to plants. Values are means ± SE (n = 10). ² Sampled 6 weeks after treatment started.

ら、花芽分化の開始は生育温度の影響を受けなかったと考えられる。また生育温度が低い条件下での発蕾の遅延は、葉の展開速度が緩慢であったためと考えられる。

8月24日に人工気象室に搬入した区(8月24日区)においてエセフォン無処理の場合、'あずま'では生育温度が低下するにつれ発蕾所要日数は増加したが、全ての個体で花芽分化し、増加葉数は変わらず、4月5日区と同様の傾向がみられた(第1表, 第1, 2図)。他方、'セイマリン'では、花芽分化個体率が20/15°C区では90%、15/10°C区では0%に低下した。また、'セイローザ'ではどの生育温度においても花芽分化個体率は100%だったものの、15/10°C区では増加葉数が25/20°C区および20/15°C区に比べ2~3枚多くなった。これらのことより、8月24日区において'セイマリン'および'セイローザ'では、生育温度の低下とともに花芽分化の開始が抑制されたことが示された。したがって'セイローザ'および'セイマリン'では、4月5日区ではみられなかった生育温

度の低下による花芽分化の抑制が、8月24日区ではみられたことから、花芽分化における季節変動が示された。

'セイマリン'は、8月24日・15/10°C区では全く花芽分化せず、この季節変動を顕著に示す品種であった。

エセフォン無処理区における4-5節間長は、どの品種においても生育温度の低下によって減少した(第3図)。「セイマリン」において4月5日区の20/15°C区では4-5節間長は18.4 mmであったが、8月24日区の20/15°C区では15.1 mmとなり、同じ生育温度条件下でも4月5日区にくらべ8月24日区では4-5節間長は小さく、伸長が抑制された。また、他の品種および生育温度条件下でも同様の傾向がみられ、4-5節間長は4月5日区にくらべ8月24日区で低下し、茎伸長における季節変動が示された。「セイマリン」は、8月24日・15/10°C区での4-5節間長は3.5 mmと茎伸長の著しい低下を示し、茎伸長における季節変動が顕著な品種であった。

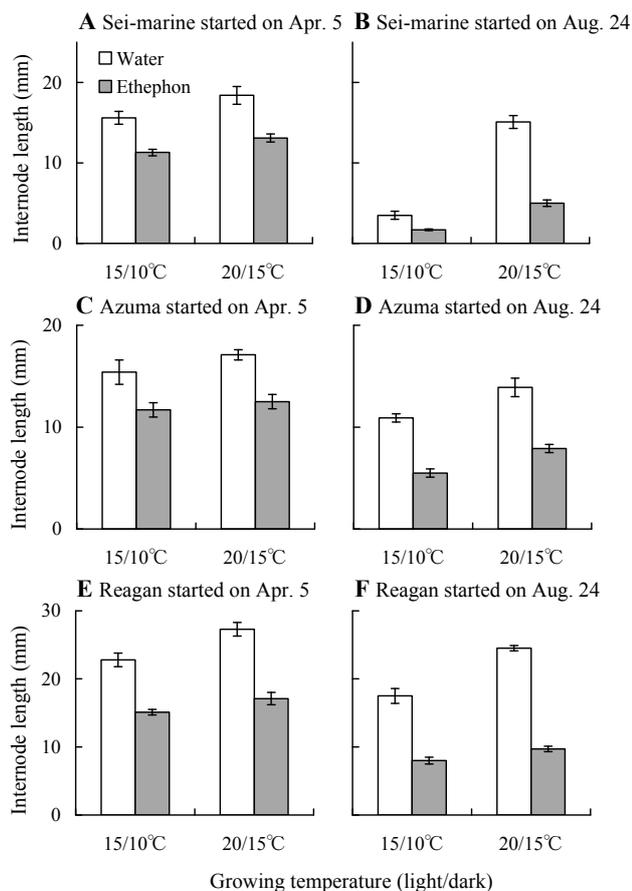


Fig. 3. Effect of ethephon, temperature, and season on internode length in chrysanthemum. Internode length (mm) between the fourth and fifth leaves above the leaf that was the topmost expanded leaf at the beginning of treatment of control plants (open bars) and ethephon treated plants (gray bars). When plants were transferred to SD phytotrons, one spray treatment of ethephon (0 or 200 mg L⁻¹) was applied to plants. (A) 'Sei-marine' started on April 5. (B) 'Sei-marine' started on August 24. (C) 'Azuma' started on April 5. (D) 'Azuma' started on August 24. (E) 'Reagan' started on April 5. (F) 'Reagan' started on August 24. Values are means \pm SE (n = 10).

2) エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応に及ぼす生育温度の影響およびその季節変動

4月5日区の25/20°C区では、どの品種においても発蕾所要日数にエセフォン無処理区とエセフォン処理区との差はみられず、増加葉数はエセフォン処理区で2~3枚多くなった(第1表, 第1図)。「セイマリン」および「あずま」では、生育温度が低下するにつれ、エセフォン処理による増加葉数の増加および発蕾の遅延が大きくなり、15/10°C・エセフォン処理区ではそれぞれ30%および40%の個体が実験期間中に花芽分化しなかった(第2図)。「セイマリン」および「あずま」では、生育温度が低い条件下でエセフォンによる花芽分化の抑制が顕著になった。一方「セイローザ」では、生育温度が低下し

てもエセフォン処理による増加葉数の増加および発蕾の遅延はわずかであり、15/10°C・エセフォン処理区においても全ての個体が花芽分化し発蕾した。

4月5日区の25/20°C区ではエセフォンによる花芽分化への影響はみられなかったが、8月24日区では25/20°C区でもエセフォン処理による花芽分化抑制効果がみられ、エセフォン処理区ではエセフォン無処理区に比べ「セイローザ」で5.5枚、「セイマリン」および「あずま」では10枚以上増加葉数が多くなり、発蕾が遅延した(第1表, 第1図)。「セイマリン」および「あずま」では、4月5日・20/15°C区ではエセフォン処理を行っても全ての個体が花芽分化したが、8月24日・20/15°C区ではそれぞれ50%および40%の個体が花芽分化しなかった。また、8月24日・15/10°C区ではエセフォン処理を行うと、どの品種においても花芽分化しなかった(第2図)。したがって、8月24日区では4月5日区にくらべエセフォンによる花芽分化抑制効果が顕著になることが示された。

全ての区においてエセフォン処理によって4-5節間長の減少がみられた(第3図)。エセフォン処理による4-5節間長の減少量、すなわちエセフォン無処理区とエセフォン処理区の4-5節間長の差は、4月5日区にくらべ8月24日区で大きくなり、「セイマリン」において、4月5日区の20/15°C区では4-5節間長の差は5.3mmであったが、8月24日区の20/15°C区では10.1mmとなり、同じ生育温度条件下でも4月5日区にくらべ8月24日区ではエセフォン処理による4-5節間長の減少は大きかった。また、他の品種および生育温度条件下でも同様の傾向がみられた。以上のことより、エセフォンによる茎伸長の抑制には季節変動があり、4月5日区にくらべ8月24日区で顕著になることが示された。「セイマリン」においては8月24日区の15/10°C区ではエセフォン処理によってほとんど茎伸長が停止し、株はロゼット状になった。

3) エセフォン処理後のエチレン発生量に及ぼす生育温度の影響およびその季節変動

エセフォン処理によって茎頂部より多量のエチレンが発生し、エチレン発生速度および発生パターンは温度によって差がみられた(第4図)。エチレン発生速度は全ての区において処理後1日目に最大となり、その後減少した。3日目以降のエチレン発生速度は生育温度が低いほど高く、15/10°Cでは21日目においてもエセフォン無処理区より高い発生速度を示したが、25/20°Cおよび20/15°Cでは21日目にはエセフォン無処理区と差がみら

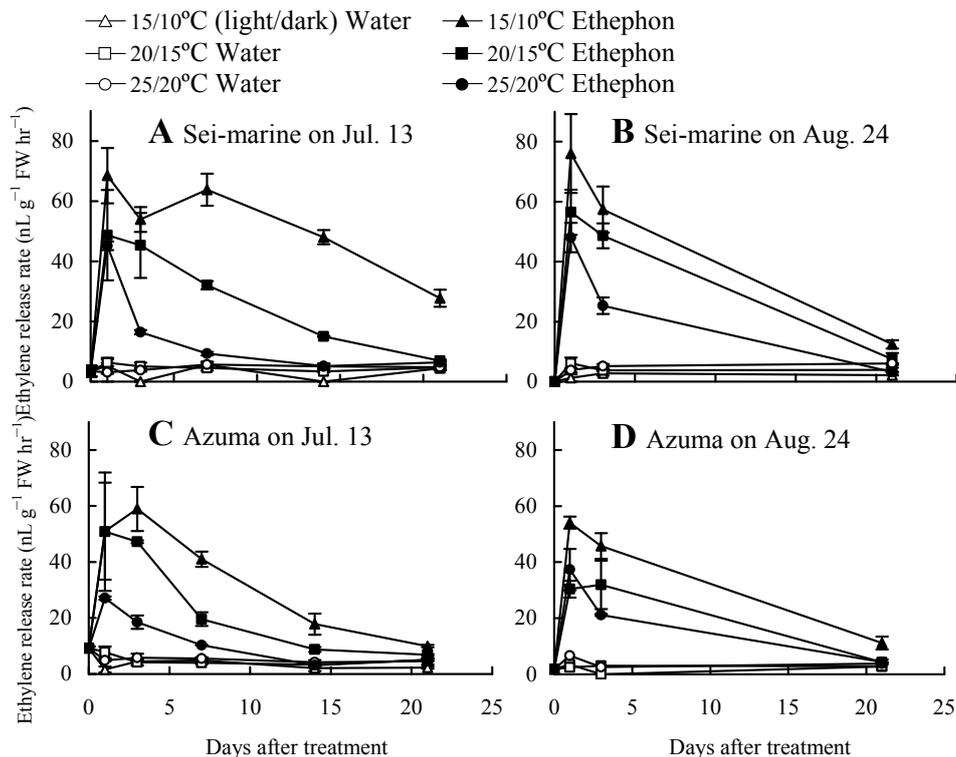


Fig. 4. Effects of temperature and season on ethylene production in shoot tips of chrysanthemum. (A) 'Sei-marine' after treatment started on July 13. (B) 'Sei-marine' after treatment started on August 24. (C) 'Azuma' after treatment started on July 13. (D) 'Azuma' after treatment started on August 24. When plants were transferred to SD phytotrons, one spray treatment of ethephon (0 or 200 mg L⁻¹) was applied to plants. Values are means \pm SE (n = 3).

れなくなった。エセフォン処理後のエチレン発生速度およびパターンに、季節による差および品種間差はみられなかった。エセフォン無処理区でのエチレン発生速度は常に 10 nL g⁻¹ FW hr⁻¹ 以下であり、生育温度、品種および季節による差はみられなかった。

エセフォン処理が花芽分化個体率および発蕾所要日数に及ぼす影響は実験 1 と同様の傾向を示し、生育温度が低いほどエセフォン処理による花芽分化の抑制および発蕾日数の遅延は顕著になった(第 5, 6 図)。また、エセフォン処理による花芽分化および発蕾の抑制は、7 月 13 日区より 8 月 24 日区で顕著であり、エセフォン処理による花芽分化抑制には季節変動がみられることが示された。

3. 考察

Cockshull and Horridge (1978), Kher et al. (1974) および小西ら (1985) によってこれまで報告されているように、本実験でもエセフォン処理によって節間伸長の低下、花芽分化の抑制、発蕾の遅延がみられた。そして、これらのエセフォンの作用は、生育温度および季節に

よって変動することが明らかになった。すなわち、高い生育温度下ではエセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制効果は低く、一方で、低い生育温度下ではエセフォンによるそれらの抑制が顕著になることが示された。また、4 月 5 日区にくらべ 8 月 24 日区では、エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制が顕著となることが示された。

生育温度は株の花芽分化、茎伸長、およびエセフォン処理後のエチレン発生の全てに影響を及ぼした。低温下では花芽分化・発蕾の遅延および茎伸長の抑制がみられ(第 1 表, 第 1, 2, 3 図)、エセフォン処理後のエチレン発生期間が長くなった(第 4 図)。水溶液中のエセフォンの分解は温度に依存しており、低温下で分解速度は低下する(Biddle et al., 1976)。また、サンカオウトウ(*Prunus cerasus* L.) の葉におけるエセフォン処理後のエチレン発生も同様に温度に依存し、低温下ではエセフォンの分解速度が低下する(Olien and Bukobac, 1978)。よって、本実験においては、低温下でのエセフォン分解速度の低下によってエチレン発生期間が長くなったと考えられる。このことより、低温下では花芽分化および茎伸長が抑制

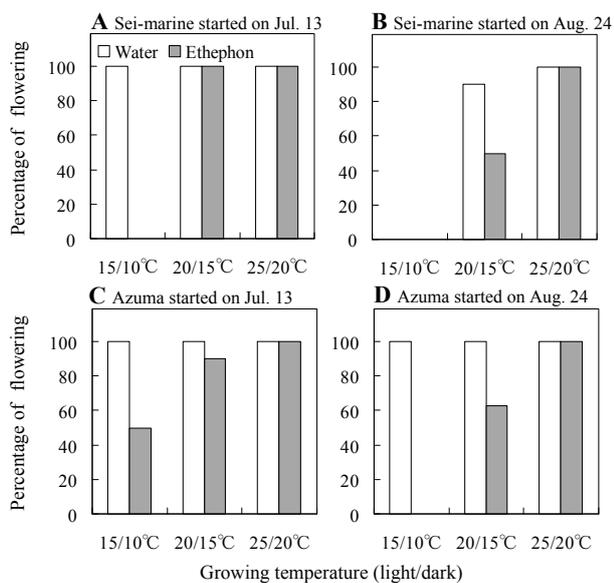


Fig. 5. Effect of ethephon, temperature, and season on percentage of flowering plants in chrysanthemum. Percentage of flowering plants of control plants (open bars) and ethephon treated plants (gray bars). When plants were transferred to SD phytotrons, one spray treatment of ethephon (0 or 200 mg L⁻¹) was applied to plants. Data were collected 6 weeks after transferring to SD phytotron (n = 10). (A) 'Sei-marine' started on July 13. (B) 'Sei-marine' started on August 24. (C) 'Azuma' started on July 13. (D) 'Azuma' started on August 24.

されることに加え、エセフォン処理後長期間にわたりエチレンが発生し、エチレンによる花芽分化および茎伸長の抑制効果が持続したため、エセフォン処理後の花芽分化および茎伸長の抑制が顕著になったと考えられた。

キクの花芽分化および茎伸長は季節的に変化することが示されている (久松ら, 2002; 小西, 1980)。株が3週間以上低温に遭遇することによってキクの花芽分化および茎伸長は促進される (Schwabe, 1950)。一方、株が長期間にわたり夏季の高温に遭遇した後に15°C以下の涼温条件下におかれると、茎伸長が低下し花芽分化が抑制される (小西, 1980; Schwabe, 1955)。また、夏季に高温に遭遇しないように管理した株は、高温に遭遇した株に比べ涼温下でも茎伸長が大きく、短日条件下では速やかに花芽分化する (小西, 1980; 大石ら, 1984)。このことから、高温に遭遇することが、その後の涼温条件下で花芽分化および茎伸長の抑制を引き起こす原因となることが明らかである。本研究では、高温に遭遇する前の株(4月5日区)および高温に遭遇した後の株(8月24日区)を、同一の日長・温度環境制御下で生育させ、株の開花反応および茎伸長を調査することで、花芽分化能力および茎伸長能

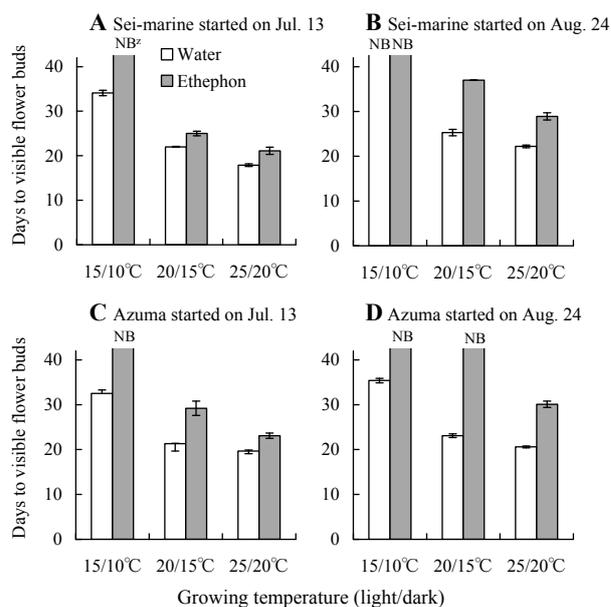


Fig. 6. Effect of ethephon, temperature, and season on days to visible flower buds in chrysanthemum. Days to visible flower buds of control plants (open bars) and ethephon treated plants (gray bars) after transfer into SD phytotron. When plants were transferred to phytotrons, one spray treatment of ethephon (0 or 200 mg L⁻¹) was applied to plants. (A) 'Sei-marine' started on July 13. (B) 'Sei-marine' started on August 24. (C) 'Azuma' started on July 13. (D) 'Azuma' started on August 24. Values are means ± SE (n = 10). ^z NB, no visible flower buds during experimental period.

力の季節変動を評価した。その結果、株が高温に遭遇する前の4月5日区にくらべ、株が高温遭遇した後の8月24日区では、同じ生育温度条件下であっても茎伸長は低下し花芽分化が抑制されることを明らかにし、久松ら (2002) が示したように、株の花芽分化能力および茎伸長能力は、夏季の高温に遭遇した後に低下することを確認した。さらに、'セイマリン' では4月5日・15/10°C区では茎伸長し、全個体が花芽分化したのに対し、8月24日・15/10°C区では茎伸長が著しく低下し、花芽分化しなかった (第2,3図) ことから、Vegis (1964) が指摘したように、キクにおいても花芽分化能力および茎伸長能力が低下した株では、花芽分化および茎伸長が可能となる生育温度の範囲が狭くなることを明らかにした。

エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制の季節変動と花芽分化能力および茎伸長能力の季節変動との間には関連がみられた。高温に遭遇した8月24日区では、株の花芽分化能力および茎伸長能力が低下しており、同時に4月5日区にくらべエセフォン処理による花芽分化および茎伸長の抑制が顕著であった。また、花芽分化能力および茎伸長能力の低下が'あずま'、'セイローザ'

にくらべ顕著であった‘セイマリン’では、エセフォン処理によって強い花芽分化および茎伸長の抑制がみられた。したがって、高温に遭遇して花芽分化能力および茎伸長能力が低下した株、あるいはそれらの低下を顕著に示す品種では、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応が強く現れることが示された。以上のことより、生育温度、株の花芽分化能力および茎伸長能力が、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応を変動させる要因であることが明らかになった。

第2節 高温遭遇後に花芽分化能力および茎伸長能力の低下を顕著に示す品種ではエセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応が強く現れる

坂本・土屋(2007)は、7~10月咲き無側枝性ギク17品種の開花におけるエセフォンに対する反応には大きな品種間差があることを示した。前節において、高温に遭遇して花芽分化能力および茎伸長能力が低下した株では、エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制が強く現れた。すなわち、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応は、株の花芽分化能力および茎伸長能力と関連している可能性が示された。そこで、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応の品種間差もまた、それぞれの品種における花芽分化能力および茎伸長能力と関連している可能性が考えられる。本節では、キク9品種を用い高温に遭遇した後の花芽分化能力および茎伸長能力の品種間差を評価し、同時にエセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応の品種間差を評価することによって、それらの関連を検討した。

1. 材料および方法

‘あずま’、系統94-4008、‘セイマリン’、‘精興光玉’、‘神馬’、‘セイローザ’、‘精興の庵’、‘精興新年’、‘新みどり’の親株を深夜5時間の暗期中断を行った無加温ビニルハウスにて栽培した。それぞれの親株より2005年7月19日および8月18日に採穂し、メトロミックス360を充填した128穴セルトレイに挿し穂した。2週間後園芸培土を充填した9cmプラスチックポットに発根苗を鉢上げした。7月19日に挿し穂した株は8月18日に3℃の人工気象室(明期12時間+暗期中断4時間)に搬入し、9月19日まで低温処理を行った。低温処理中、明期にはポット地表面のPPFDが $70\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように蛍光

灯を用いて光照射した。全ての株は9月19日に株の地際より6cmの高さで主茎を摘心した。発生した側枝は摘心3週後に主茎の最上位より発生したものを残し、他を除去した。以上の方法によって夏季の高温に遭遇した株(高温遭遇区)、および低温に遭遇した後高温に遭遇していない株(低温遭遇区)を準備した。キクの株の花芽分化能力および茎伸長能力は夏季の高温に遭遇した後に低下し、その低下は低温に3週間以上遭遇することによって回復する(小西, 1975, 1980; Schwabe, 1950)。これらの高温あるいは低温に遭遇した株の開花反応および茎伸長を同じ日長・温度環境条件下で測定し比較することで、高温に遭遇したことによる株の花芽分化能力および茎伸長能力の低下程度を評価しようとした。

全ての株は10月10日に自然日長条件、15℃加温、25℃換気のガラス温室に移動した。実験期間中の日長は薄明薄暮各30分を含めて10.4~12.5時間の短日条件であった。ガラス温室に移動した日に低温遭遇区および高温遭遇区のそれぞれ半数の株に 1000 mg L^{-1} エセフォン溶液(0.025% TritonX-100含有)を茎葉が十分にぬれるまで散布した。残りの株には蒸留水(0.025% TritonX-100含有)を茎葉散布した。各区10個体を実験に供試した。

実験は12月24日まで行い、発蕾が確認された日を記録し、実験終了時に発蕾が認められなかった株については、顕微鏡下で茎頂を観察し、花芽分化の有無を調査した。実験終了時に、茎伸長を評価するためガラス温室搬入時の最上位展開葉より上位第4葉と第5葉の節間長(4-5節間長)を測定した。

2. 結果

1) 花芽分化および茎伸長における低温処理の影響の品種間差

‘あずま’および系統94-4008では、高温遭遇後エセフォン処理を行わなかった区(高温遭遇・エセフォン無処理区)では、実験終了時まで花芽分化せず栄養生長を続けた(第7図)。実験終了時における両品種の4-5節間長はともに5mm以下であり、株はロゼットを形成した(第8,9図)。低温遭遇後エセフォン処理を行わなかった区(低温遭遇・エセフォン無処理区)では全個体で発蕾がみられ、4-5節間長は高温遭遇・エセフォン無処理区にくらべ増加した。‘セイマリン’、‘精興光玉’、‘神馬’、‘セイローザ’、‘精興の庵’および‘精興新年’では、高温遭遇・エセフォン無処理区および低温遭遇・エセフォン

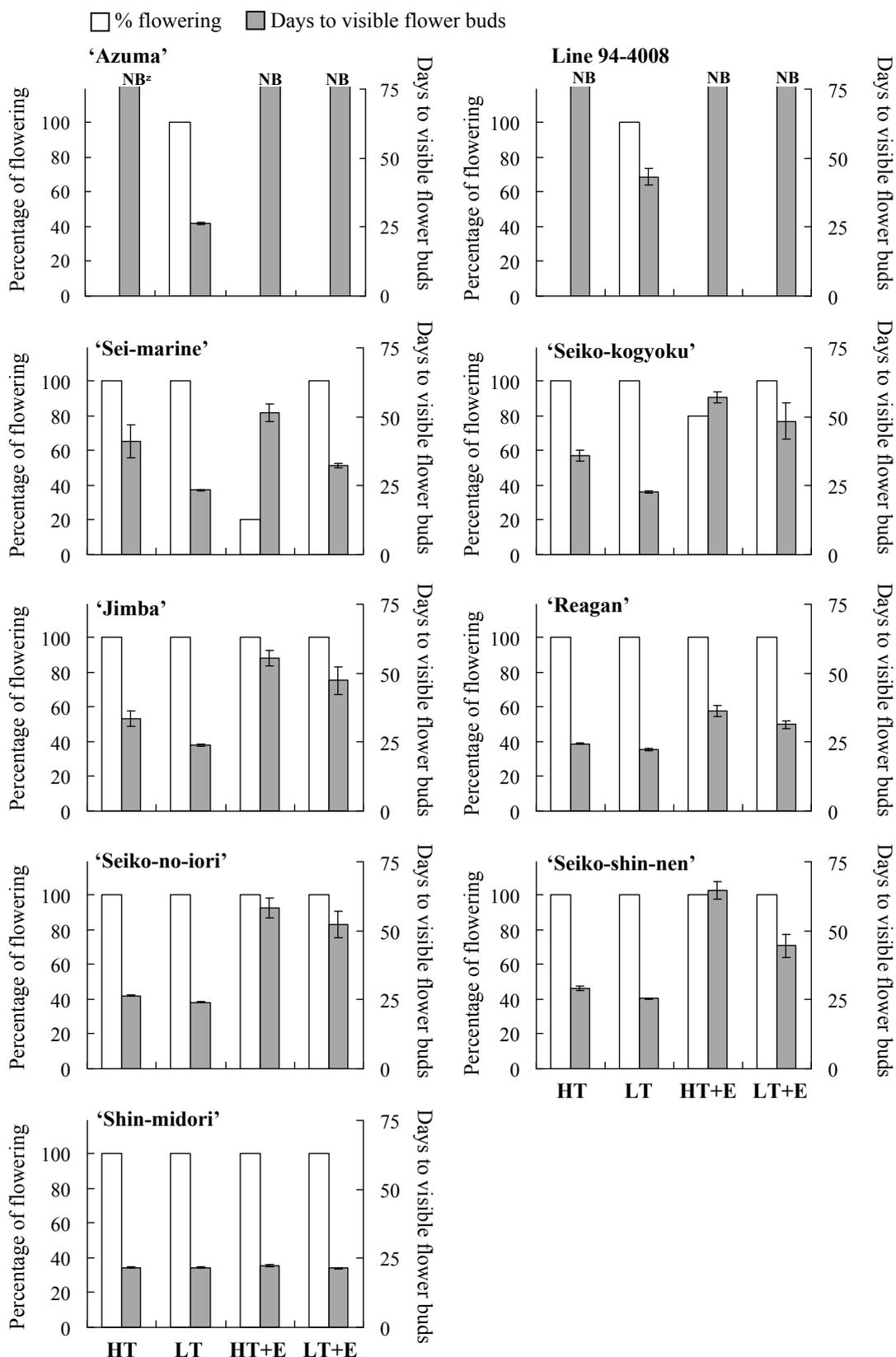


Fig. 7. Effect of chilling pre-treatment and ethephon on percent of flowering plants (open bars) and days to visible flower buds (gray bars) in chrysanthemum. Chilling pre-treatment, 3°C for 30 days. One spray treatment of ethephon (1000 mg L⁻¹) was applied to plants at transfer into SD. HT, unchilled plants without ethephon. LT, chilled plants with ethephon. HT+E, unchilled plants with ethephon. LT+E, chilled plants with ethephon. ² NB, no visible flower buds during experimental period.

無処理区ともに全ての株が花芽分化した。これらの品種において、低温遭遇・エセフォン無処理区では高温遭遇・エセフォン無処理区にくらべ発蕾所要日数が少なく、低温遭遇によって発蕾所要日数は‘セイマリン’では17.7日、‘精興光玉’では13.3日減少した。また、4-5節間長は‘セイマリン’、‘精興光玉’、‘神馬’、および‘精興の庵’では低温遭遇によって増加した。‘新みどり’では、高温遭遇・エセフォン無処理区と低温遭遇・エセフォン無処理区の間には花芽分化個体率、発蕾所要日数および4-5節間長の差はみられなかった。以上のことより、高温遭遇・エセフォン無処理区の花芽分化個体率、発蕾所要日数および茎伸長には大きな品種間差がみられ、また、‘新みどり’以外の品種では、低温遭遇による花芽分化および茎伸長の促進がみられた。

2) エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応の品種間差および低温処理の影響

高温遭遇・低温遭遇両区においてエセフォン処理によって花芽分化個体率の低下、発蕾の遅延および4-5節間長の減少がみられた(第7, 8図)。「あずま」および系統94-4008では、高温遭遇・エセフォン無処理区ではロゼットを形成し花芽分化せず、低温遭遇によって茎伸長し花芽分化するようになったが、低温遭遇後にエセフォン処理を行うこと(低温遭遇・エセフォン区)によって、実験終了時まで花芽分化せず、中でも「あずま」では茎伸長がほとんど停止し、株は高所ロゼットを形成した(第9図)。高温遭遇後エセフォン処理を行った区(高温遭遇・エセフォン区)において、「セイマリン」および「精興光玉」ではそれぞれ80%および20%の個体の実験終了時まで花芽分化せず、また、「セイマリン」では茎伸長がほとんど停止しロゼットを形成する個体のみがみられた(第9図)。一方、低温遭遇・エセフォン区では、これら2品種の発蕾は低温遭遇・エセフォン無処理区にくらべ遅延したものの実験期間中に全個体が発蕾し、花芽分化の抑制は一時的であった。また、エセフォン処理による発蕾の遅延日数、すなわちエセフォン区とエセフォン無処理区の花芽分化の発蕾所要日数の差は、低温遭遇によって小さくなり、「セイローザ」では高温遭遇区におけるエセフォンによる発蕾の遅延(高温遭遇・エセフォン区と高温遭遇・エセフォン無処理区の花芽分化の発蕾所要日数の差)は11.9日であったのが、低温遭遇区におけるエセフォンによる発蕾の遅延(低温遭遇・エセフォン区と低温遭遇・エセフォン無処理区の花芽分化の発蕾所要日数の差)は9.1日に減少した(第7図)。同様に、「精興の庵」では31.7

日が28.2日に、「精興新年」では35.4日が19.3日に減少した。したがって、低温遭遇によってエセフォンによる花芽分化の抑制は軽減されることが示された。「新みどり」では、エセフォン処理は花芽分化個体率および発蕾所要日数に影響を及ぼさなかったが、4-5節間長がわずかに減少した。

3. 考察

‘セイマリン’、‘精興光玉’、‘セイローザ’、‘精興の庵’および‘精興新年’では、エセフォンによる発蕾の抑制は低温遭遇区において高温遭遇区にくらべ小さかった(第7図)。これは、第1節において高温に遭遇する前の花芽分化能力の高い株では、高温に遭遇した後の株にくらべてエセフォンによる花芽分化の抑制程度が小さかったことと同様に、低温遭遇によって株の花芽分化能力が高まったため、エセフォンによる花芽分化の抑制が小さくなったと考えられる。よって、本節においても、エセフォンに対する花芽分化における反応は株の花芽分化能力の変動に連動することが示された。

キクは夏季の高温条件下で長期間生育することによって、花芽分化能力および茎伸長能力が低下し、その後15℃程度の涼温条件下におかれると花成の遅延や茎伸長の低下を示す(小西, 1980)。一方、3週間以上低温に遭遇することによって花芽分化能力および茎伸長能力が高まり、高温遭遇による花芽分化および茎伸長の抑制は回復する(小西, 1975)。「新みどり」を除く品種において低温遭遇区で高温遭遇区にくらべ花芽分化および茎伸長が促進されたことは、言い換えれば高温遭遇区では高温に遭遇したことによって花芽分化および茎伸長が抑制されていたことを示している。そして、この高温遭遇による花芽分化および茎伸長の抑制には大きな品種間差が認められた(第7, 8図)。「神馬」、「セイローザ」、「精興の庵」および「精興新年」では、高温遭遇・エセフォン無処理区において低温遭遇・エセフォン無処理区にくらべ数日発蕾が遅延し、「セイマリン」および「精興光玉」では10日以上大きく発蕾が遅延した。さらに、「あずま」および系統94-4008の高温遭遇・エセフォン無処理区では、実験期間中に花芽分化せず、著しい茎伸長の低下を示し、「あずま」はロゼットを形成した(第9図)。一方、「新みどり」では、高温遭遇・エセフォン無処理区と低温遭遇・エセフォン無処理区の間には4-5節間長および発蕾所要日数における差がなかった。すなわち、「あずま」および系統94-4008は、高温遭遇後の花芽分化能力および

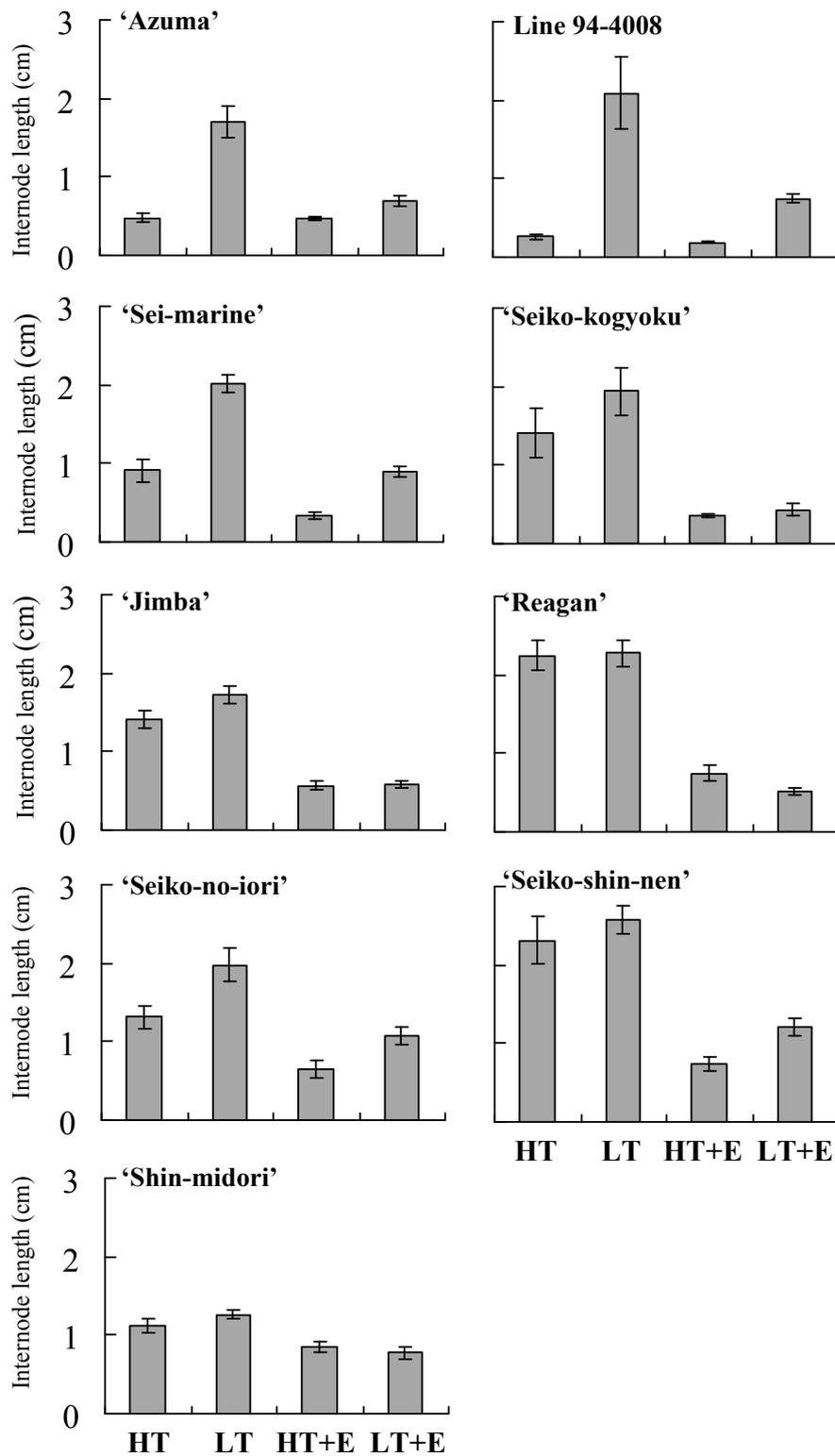


Fig. 8. Effect of ethephon and cold pre-treatment on internode length in chrysanthemum. Internode length (cm) between the fourth and fifth leaves above the leaf that was the topmost expanded leaf at the beginning of treatment. Cold pre-treatment was given to the plants at 3°C for 30 days. When SD started, one spray treatment of ethephon (1000 mg L⁻¹) was applied to plants. HT, unchilled plants without ethephon. LT, chilled plants with ethephon. HT+E, unchilled plants with ethephon. LT+E, chilled plants with ethephon.



Fig. 9. Nine cultivars at the end of experiment. E shows ethephon treated plants. HT, unchilled plants without ethephon. LT, chilled plants with ethephon. HT+E, unchilled plants with ethephon. LT+E, chilled plants with ethephon. When SD started, one spray treatment of ethephon (1000 mg L⁻¹) was applied to plants.

茎伸長能力の低下が顕著な品種であり、‘新みどり’はそれらの低下がほとんどみられない品種であることが示された。高温遭遇後に涼温条件下におかれることで発生する花芽分化の遅延・抑制や茎伸長の低下は、低温遭遇後の急激な茎伸長と並んで、キクの生育の季節変動において特徴的な反応である。この反応を顕著に示した‘あずま’および系統 94-4008 は環境の変化に鋭敏に反応する品種であると考えられる。

エチレンはキクにおいて葉の黄化を誘導し、その反応には大きな品種間差があることが示されている (Doi et al., 2003)。本節では、エチレンに対する花芽分化および茎伸長における反応にも大きな品種間差があることを示した。低温処理を行わなかった高温遭遇株においては‘あずま’や系統 94-4008 のように花芽分化せず、茎伸長の著しい低下を示すものがあり、高温遭遇後の株におけるエセフォン処理の効果の品種間差は比較できなかった。低温処理を行うことで9品種全ての株が速やかな開花反応を示し、再び高い茎伸長を示すようになった。それらの株にエセフォン処理を行い、エセフォンに対する反応の品種間差を評価したところ、その花芽分化および茎伸長における反応には、以下のような大きな品種間差がみられた。すなわち、‘あずま’では実験期間中に花芽分化せず、株は高所ロゼットを形成した。系統 94-4008 ではロゼット形成はみられなかったものの、茎伸長が低下し、実験期間中に花芽分化しなかった。‘セイマリン’、‘精興光玉’、‘神馬’、‘セイローザ’、‘精興の庵’および‘精興新年’では全ての個体が花芽分化したが、発蕾が遅延した。‘新みどり’では茎伸長の低下はわずかであり、開花反応への影響は認められなかった。これらの結果より、高温遭遇によって花芽分化能力および茎伸長能力が低下しやすく、環境の変化に鋭敏に反応する‘あずま’および系統 94-4008 では、花芽分化および茎伸長におけるエセフォンに対する反応が顕著に現れることが示された。

多くの多年生植物において、休眠状態になる前には伸長や葉の展開速度の低下がみられる (Horvath et al., 2003; Ruonala et al., 2006; Vegis, 1964)。キクの休眠導入時も同様であり、茎伸長の低下や開花遅延、花芽分化率の低下を示した後に、茎伸長の停止によりロゼットを形成し花芽分化できなくなり、休眠状態となる。本実験の高温遭遇・エセフォン無処理区において‘あずま’と系統 94-4008 でみられたロゼット形成し花芽分化できない状態は休眠であり、また多くの品種でみられた茎伸長の低下や発蕾の遅延は、休眠に先だって発生する現象であ

ると考えられる。そのような茎伸長の低下や発蕾の遅延を示す株へのエセフォン処理によって、‘セイマリン’の一部の個体および‘あずま’の全個体では、ロゼット形成し花芽分化できない状態が誘導され、休眠状態となった。他の多くの品種では、シロイヌナズナでみられるような一時的な花芽分化の抑制および茎伸長の低下 (Achard et al., 2007) を示しただけであったものの、この結果はヨーロッパシラカバ (*Betula pendula* Roth.) の休眠芽形成 (Ruonala et al., 2006) やジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.) のマイクロチューバーの休眠 (Suttle, 1998) においてエチレンの関与が報告されているように、キクにおいてもエチレンが休眠誘導に関与している可能性を示唆している。

第2章 キクの休眠誘導におけるエチレン情報伝達系の関与

前章では、エチレン発生剤であるエセフォン処理によって、キクの休眠時に特徴的にみられるロゼットを形成して花芽分化ができない状態が誘導され、キクの休眠においてエチレンが関与することが示唆された。本章では、エチレン作用阻害剤およびエチレン低感受性遺伝子組換えキクを用いて、キクの休眠におけるエチレンの関与を明らかにしようとした。

第1節 エチレン前駆体 ACC による花芽分化・茎伸長の抑制およびロゼット形成の誘導

キクは多年生草本植物であり、自然条件下では春から夏にかけての長日条件下で旺盛な茎伸長を行った後、秋の短日条件下で花芽分化し開花すると同時に、株の基部より吸枝が発生する。気温の低下によって吸枝はまもなく休眠状態になり、花芽分化能力を失うとともに、茎伸長が著しく低下してロゼットを形成する。このロゼット形成は、秋から春にかけての低温期のキク切り花生産において大きな障害となるが、これまでの研究によって、施設の加温、早朝電照による日長操作、あるいは挿し穂の冷蔵や株の低温処理によってロゼット形成を回避できることが明らかになっている (福田・西尾, 1985; 樋口・原, 1974; 小西, 1975)。

ロゼットを形成した株は完全に生長を停止するのではなく、冬季においても葉の展開が非常に緩慢に続く。すなわち、キクのロゼット形成はイチゴ (*Fragaria × ananassa* Duchesne; Sønsteby and Heide, 2006) の休眠と

同様に、量的な休眠現象であるといえる。休眠は生育に適さない環境下での生存を可能にする環境適応反応であり (Vegis, 1964), 木本植物における休眠芽形成と同様に、キクのロゼット形成は冬季の低温下で茎頂分裂組織を保護し維持するための反応である。キクでは夏季に長期間高温に遭遇した株が、その後晩秋の15℃以下の涼温条件に遭遇することによってロゼット形成が誘導される (第1, 3図, 久松ら, 2002; 小西, 1980) ことから、その誘導には温度が強く関与していると考えられる。休眠の誘導に関する生理機構は木本植物において詳細に研究されており、ポプラ (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) では休眠は短日によって誘導され、その機構にはフィトクロムが関与し、*CO(CONSTANS)/FT(FLORING LOCUS T)* 制御系が茎伸長の停止および休眠芽の形成を誘導することが明らかにされている (Böhlenius et al., 2006; Olsen et al., 1997)。また、植物ホルモンも休眠の制御に関わっており、これまでにアブシジン酸の関与が示されている (Horvath et al., 2003)。近年、ヨーロッパシラカバの休眠誘導にはエチレンが関与していることが明らかにされた (Ruonala et al., 2006)。また、ジャガイモのマイクロチューバーの休眠がエチレンによって誘導されることから、多年生草本植物においても休眠誘導におけるエチレンの関与が示唆されている (Suttle, 1998)。前章では、エチレン発生剤であるエセフォン処理によって、キクの休眠時に特徴的にみられるロゼットの形成が誘導され、キクの休眠においてもエチレンが関与することが示唆されたことから、本章ではその関与を確認しようとした。本節では、植物体内におけるエチレン前駆体、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸 (ACC) が花芽分化および茎伸長に及ぼす影響を調査し、ACCによってロゼット形成が誘導されることを明らかにし、エチレンによる休眠誘導を確認した。

1. 材料および方法

ガラス温室 (深夜5時間暗期中断, 15℃加温 25℃換気) において管理した栽培ギク 'セイマリン' の親株から挿し穂をとり、メトロミックス 360 を充填した128穴セルトレイに挿した。園芸培土を充填した7.5 cm プラスチックポットに発根苗を鉢上げし、株あたり1gの緩効性肥料を施した (13N-16P-10K)。鉢上げ後同様のガラス温室内で管理し、展開葉が4から5枚に達した株を8時間日長, 20/15℃ (明期/暗期) に制御した人工気象室に搬入した。光源には蛍光灯を用いポット地表面の有効

光量子束密度 (PPFD) が $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように光照射した。人工気象室への搬入と同時に、10 または $50\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ の ACC (シグマアルドリッチジャパン株式会社) 水溶液 (展着剤として 0.025% TritonX-100 含有) を茎頂部に $10\mu\text{L}$ 滴下処理した。株あたりの ACC 処理量は、それぞれ 100 および $500\mu\text{g}$ であった。対照区として蒸留水 (展着剤として 0.025% TritonX-100 含有) を滴下処理した。各区 13 個体供試した。人工気象室への搬入 9 週間後に実験を終了し、発蓄した個体数を調査した。肉眼で発蓄を確認できなかった個体は、顕微鏡下で茎頂を観察し、花芽分化の有無を調査した。実験終了時に人工気象室搬入時の最上位展開葉より上位第 8 葉と第 9 葉の節間長 (8-9 節間長) を測定した。

2. 結果および考察

ACC 無処理区における花芽分化個体率は 61.5% であり、8-9 節間長は 10.1 mm であった (第 2 表)。ACC 処理によって花芽分化個体率および節間長の著しい低下がみられ、 $100\mu\text{g}$ の ACC を処理した区の花芽分化個体率は 15.4%、8-9 節間長は 2.8 mm に減少した。ACC 処理量が増加すると花芽分化個体率および節間長の抑制は強くなり、 $500\mu\text{g}$ の ACC を処理した区では全ての個体が実験期間中に花芽分化せず、8-9 節間長は 1.1 mm となり、茎伸長が著しく低下してロゼットを形成した。よって、エセフォンだけではなく ACC によってもロゼットを形成して花芽分化ができない状態が誘導されることが示され、エチレンがキクの休眠誘導に関与することが示唆された。

Table 2. Effects of ACC on flowering and internode length of chrysanthemum 'Sei-marine'. When plants were transferred into a growth chamber controlled at 20/15°C (light/dark) with an 8 h photoperiod, $10\mu\text{L}$ of ACC (0, 10, or $50\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$) was applied to the shoot tips.

Total ACC dose ($\mu\text{g}/\text{plant}$)	Percentage of flowering plants	Internode length ¹ (mm)
0	61.5	10.1 ± 0.6
100	15.4	2.8 ± 0.4
500	0	1.1 ± 0.1
		**

Data were collected 9 weeks after ACC treatment. Values are means \pm SE ($n = 13$). **, Significant differences between effects of ACC treatments on internode length (ANOVA: $P < 0.01$). ² Length between eighth and ninth leaves above the leaf that was the topmost expanded leaf at the beginning of treatment.

第2節 STS が花芽分化および茎伸長に及ぼす影響

ジャガイモではマイクロチューバーの休眠がエチレンによって誘導され、またエチレン作用阻害剤 2, 5- ノルボルナジエン処理によってマイクロチューバーの休眠が抑制され萌芽が促進されることから、休眠誘導へのエチレンの関与が示されている (Suttle, 1998). 前章および前節では、エセフォンおよび ACC 処理によってキクの休眠時に特徴的にみられるロゼットを形成して花芽分化ができない状態が誘導されることが示された (第2表, 第9図). ここでは、キクの休眠におけるエチレンの関与を明らかにするため、エチレン作用阻害剤チオ硫酸銀錯塩 (STS) が花芽分化および茎伸長に及ぼす影響を調査した.

1. 材料および方法

栽培ギク ‘秀芳の力’ および ‘セイローザ’ (英品種名 ‘Reagan’) を 2006 年 11 月 1 日に無加温ビニルハウスに定植し、冬季の自然低温に遭遇させた. 2007 年 4 月 5 日にこれらの株から挿し穂をとり、メトロミックス 360 を充填した 128 穴セルトレイに挿した. 4 月 26 日に園芸培土を充填した栽培箱 (縦 50 cm × 横 33 cm × 深さ 14 cm) に発根苗を定植し、ガラス温室 (深夜 5 時間暗期中断, 15°C 加温 25°C 換気) において親株として管理した. これらの親株に定植より 7 日ごとに 0.2 mM の STS 水溶液を 1 m² あたり 3 L 頭上かん水した. 対照区として同量の水道を頭上かん水した. 6 月 4 日にそれぞれの親株より挿し穂をとり、メトロミックス 360 を充填した 128 穴セルトレイに挿した. 園芸培土を充填した 7.5 cm プラスチックポットに発根苗を鉢上げし、株あたり 1 g の緩効性肥料を施した. 各区 14 株を供試した. 鉢上げより 1 週間上記のガラス温室内で管理し、6 月 25 日に地際より 6 cm の高さで主茎を摘心し、同時に 12 時間日長, 20/15°C (明期/暗期) に制御した人工気象室に移動し短日処理を開始した. 光源には蛍光灯を利用し、ポット地表面の PPFD が 200 μmol m⁻² s⁻¹ となるように光照射した. 摘心 3 週後に、主茎の最上位より発生した側枝を残し他の側枝を除去した. 人工気象室搬入 8 週後に展開葉数および側枝の茎長を調査した. また発蕾が確認された日を記録し、実験終了時に発蕾が認められなかった株については顕微鏡下で茎頂を観察し、花芽分化の有

無および未展開葉数を調査した.

花芽分化および茎伸長に及ぼす STS の影響の季節変動を調査するために、上記の親株を STS 処理を継続してガラス室内で維持し、親株が夏季の高温に遭遇した後の 8 月 27 日に挿し穂した. 発根後鉢上げした株を 9 月 17 日に人工気象室に移動し短日処理を開始し、上記と同様の調査を行った.

2. 結果

‘セイローザ’ では、親株への STS 処理 (STS 区) および短日処理の開始日は花芽分化個体率に影響を及ぼさず、どの区においても全個体が花芽分化した (第3表). ‘秀芳の力’ では、6 月 25 日区の STS 区, STS 無処理区ともに花芽分化個体率は 85.7% であった. 9 月 17 日区では花芽分化個体率は STS 無処理区で 42.9% に、STS 区で 64.3% に低下し季節変動がみられたが、その低下は STS 無処理区に比べ STS 処理区で小さかった. 花芽分化した個体における人工気象室搬入後の増加葉数は花芽分化節位を示す. 6 月 25 日区において ‘秀芳の力’ の花芽分化節位は STS 無処理区と STS 区の間に差はみられなかった (第10図). 9 月 17 日区では、STS 無処理区の花芽分化節位は 15.3 節であったが、STS 区では 12.2 節となり、親株への STS 処理によって花芽分化が促進された. 花芽分化しなかった個体では、増加葉数に及ぼす STS 処理の影響はみられなかった. ‘セイローザ’ の花芽分化節位は、6 月 25 日区では STS 無処理区, STS 区ともに約 10 節であり、差はみられなかった. 9 月 17 日区では、STS 無処理区では 8.8 節であったが、STS 区では 10.4 節であり、親株への STS 処理によって花芽分化が抑制された. したがって、‘秀芳の力’ において STS 処理を継続的に行った親株より得られた株では、高温遭遇後に涼温条件下で発生する花芽分化の抑制が軽減されることが示された. その一方で、‘セイローザ’ では、わずかではあるが STS 処理によって花芽分化が抑制された.

STS 無処理区において、6 月 25 日区に比べ 9 月 17 日区では側枝の茎長が減少し、特に ‘秀芳の力’ ではその減少が顕著であった (第11図). ‘セイローザ’ では、6 月 25 日区および 9 月 17 日区において STS 処理による側枝の茎長への影響はみられなかった. ‘秀芳の力’ においても 6 月 25 日区では STS 無処理区と STS 区の茎長に差はみられなかったが、9 月 17 日区の花芽分化した個体では STS 無処理区に比べ STS 区において茎長が

大きかった。9月17日区の花芽分化しなかった個体では両区ともに茎長は2 cm 以下となり側枝はロゼットを形成し、休眠状態を示した。

3. 考察

本研究では、エチレン作用阻害剤 STS を継続的に施用した親株から得られた株の花芽分化および茎伸長を測定し、キクにおいてもジャガイモ (Suttle, 1998) で示されたようなエチレン作用阻害剤による休眠抑制作用がみられるかについて調査した。‘秀芳の力’ および ‘セイローザ’ とともに、高温に遭遇する前の株 (6月25日区) では、花芽分化および茎伸長における STS の影響はみられなかった。キクにおいて、高温に遭遇した株では花芽分化能力および茎伸長能力が低下し、高温に遭遇する前の株に比べ花芽分化および茎伸長が抑制されることが示されている (第1表, 第1, 2図, 久松ら, 2002; 小西, 1980)。本研究で用いた2品種においても、高温に遭遇する前の株と後の株を同一の生育環境条件下において、花芽分化および茎伸長を評価し、季節変動があることを確認した (第3表, 第10, 11図)。‘セイローザ’ において高温に遭遇した株 (9月17日区) では、高温に遭遇する前の株に比べ茎長が低下したが、花芽分化

における季節変動はほとんどみられなかった。‘セイローザ’ においては、STS は花芽分化抑制作用を示す (第10図) 場合があった。一方、‘秀芳の力’ の花芽分化および茎伸長には顕著な季節変動がみられ、高温に遭遇した株では花芽分化が抑制され茎長は大きく低下し、花芽分化しなかった個体はロゼットを形成し、休眠状態を示した。この花芽分化および茎伸長の抑制は、親株に継続して STS を処理することで軽減され、STS 区では STS 無処理区に比べ花芽分化個体率および茎伸長が高かった。‘秀芳の力’ における結果は、ジャガイモのマイクロチューバーの休眠がエチレン作用阻害剤によって抑制される (Suttle, 1998) ように、キクにおいてもエチレン作用阻害剤が休眠を抑制する可能性を示唆している。

第3節 エチレン低感受性遺伝子組換えキクを用いた休眠とエチレン情報伝達系の関係解明

Table 3. Effect of STS and season on percentage of flowering plants (%) in chrysanthemum.

Date of transfer into SD phytotron Treatment	Jun. 25		Sep. 17	
	Cont.	STS	Cont.	STS
‘Reagan’	100	100	100	100
‘Shuho-no-chikara’	85.7	85.7	42.9	64.3

Sampled 8 weeks after transfer into SD phytotron (n = 14).

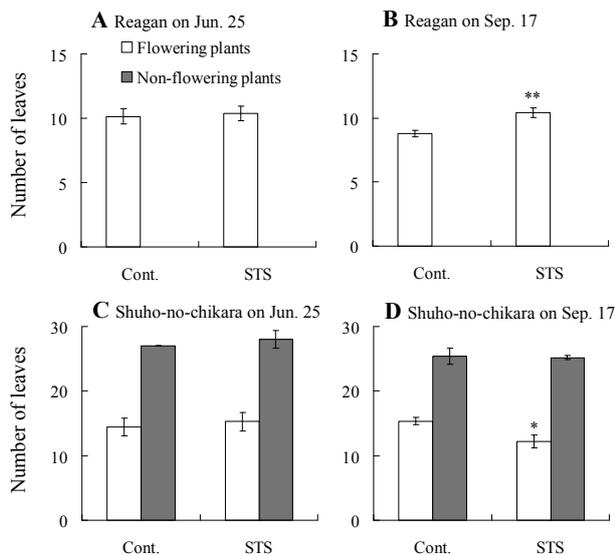


Fig. 10. Effect of STS and season on increased number of leaves after transfer into SD phytotron in chrysanthemum. Data were collected 8 weeks after transfer into SD phytotron. (A) ‘Reagan’ started on June 25. (B) ‘Reagan’ started on September 17. (C) ‘Shuho-no-chikara’ started on June 25. (D) ‘Shuho-no-chikara’ started on September 17. Values are means \pm SE (n = 14). **, Significant differences between control and STS (ANOVA: $P < 0.01, 0.05$).

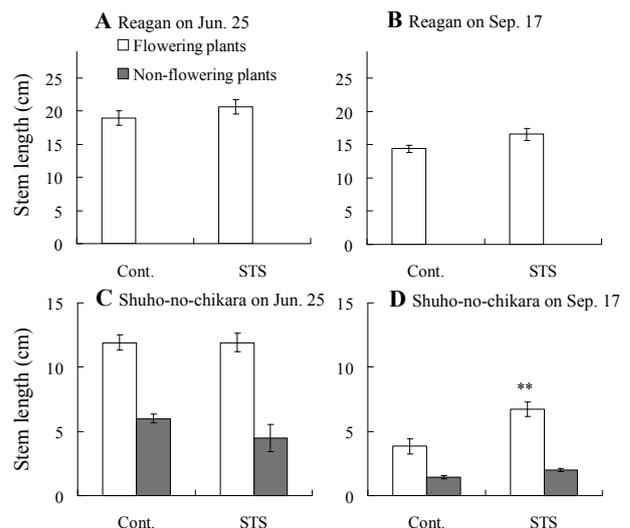


Fig. 11. Effect of STS and season on stem length of chrysanthemum. Data were collected 8 weeks after transfer into SD phytotron. (A) ‘Reagan’ started on June 25. (B) ‘Reagan’ started on September 17. (C) ‘Shuho-no-chikara’ started on June 25. (D) ‘Shuho-no-chikara’ started on September 17. Values are means \pm SE (n = 14). **, Significant differences between control and STS (ANOVA: $P < 0.01$).

ヨーロッパシラカバのエチレン非感受性遺伝子組換え植物においては、休眠誘導条件である短日条件下でも休眠芽の形成が抑制されることから、エチレンはヨーロッパシラカバの休眠を促進することが明らかされている (Ruonala et al., 2006)。キクの休眠は、株が高温に遭遇した後、涼温条件下におかれることで発生することから、温度によって誘導されると考えられる。本節では、エチレン低感受性遺伝子組換えキクを実験に供試し、これらの花芽分化および茎伸長における温度応答反応を調査し、温度によって誘導されるキクの休眠にエチレンが関与していることを明らかにした。

1. 材料および方法

1) 植物材料

栽培ギク ‘セイマリン’ に変異エチレンレセプター遺伝子 *mDG-ERS1 (etr1-4)* あるいは *mDG-ERS1 (Nr)* を導入することによって作出された遺伝子組換えキク系統 (Narumi et al., 2005a) を供試した。これらの導入された変異エチレンレセプター遺伝子は、シロイヌナズナの変異エチレンレセプター遺伝子 *etr1-4* (Chang et al., 1993) およびトマト (*Solanum lycopersium*) の変異エチレンレセプター遺伝子 *Nr* (Wilkinson et al., 1995) に存在する一塩基置換変異を、キクの内在エチレンレセプター遺伝子 *DG-ERS1* (GenBank accession no. AF547624; Narumi et al., 2005b) の cDNA に導入して作成されたものであり、それぞれ *mDG-ERS1 (etr1-4)* および *mDG-ERS1 (Nr)* である。系統 No. 10, No. 19, No. 33 および No. 45 は *mDG-ERS1 (etr1-4)* 導入系統であり、系統 No. 21 および No. 27 は *mDG-ERS1 (Nr)* 導入系統である。

2) 内在および変異エチレンレセプター遺伝子の発現解析

定量リアルタイム PCR を用いて、‘セイマリン’ および遺伝子組換えキク系統の茎頂部における内在エチレンレセプター遺伝子および導入した変異エチレンレセプター遺伝子の発現を解析した。閉鎖系ガラス温室 (深夜 5 時間暗期中断, 15°C 加温 25°C 換気) において栽培した ‘セイマリン’ および遺伝子組換えキク系統のシュート先端部を採取した。RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン株式会社) および RNase-free DNase (キアゲン株式会社) を用い、取扱説明書の手順に従って total RNA を抽出した。Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ロシユ・ダイアグノスティックス株式会社) を用い、取扱説明書の手順に従って 500 ng の total RNA を鋳型として逆転写

Table 4. PCR primers and their sequences used to detect *DG-ERS1*, *mDG-ERS1(etr1-4)*, *mDG-ERS1(Nr)* and *CmACTIN*.

Gene name	Primer	Sequence (5'→3')
<i>DG-ERS1</i>	Forward	ACTAATCAACACCGACAGC
	Reverse	CTCAATCAGATGTATGTGCCA
<i>mDG-ERS1(etr1-4)</i> and <i>mDG-ERS1(Nr)</i>	Forward	CCATCAAGGCAGTGGTGAAC
	Reverse	TTGAACGATCGGGGAAATTC
<i>CmACTIN</i>	Forward	GATGACGCAGATCATGTTCG
	Reverse	AGCATGTGGAAGTGCATACC

し cDNA を合成した。得られた cDNA は DNaseFree 水で 5 倍に希釈し、SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ株式会社) の 15 μ L 反応系に 5 μ L の cDNA を用い、ライトサイクラー (ロシユ・ダイアグノスティックス株式会社) によって定量リアルタイム PCR 解析を行った。キクのアクチン遺伝子 *CmACTIN* (GenBank accession no. AB205087) を各サンプル間の遺伝子発現レベルの補正対照として用いた。各遺伝子 *DG-ERS1*, *mDG-ERS1 (etr1-4)*, *mDG-ERS1 (Nr)* および *CmACTIN* の増幅には、それぞれ第 4 表に示すプライマーを用いた。内在エチレンレセプター遺伝子と導入した変異エチレンレセプター遺伝子を区別して増幅するため、*DG-ERS1* 増幅用の 3 末端側プライマーは *DG-ERS1* の 3 末端非翻訳領域の配列に基づき作成し、また、*mDG-ERS1 (etr1-4)* および *mDG-ERS1 (Nr)* 増幅用の 3 末端側プライマーは NOS ターミネーター配列に基づき作成した。PCR は 95°C で 20 秒間の変性反応後、95°C, 5 秒間 → 60°C, 20 秒間 → 72°C, 15 秒間の反応を 40 回行った。*DG-ERS1*, *mDG-ERS1 (etr1-4)* および *mDG-ERS1 (Nr)* の発現レベルは、それぞれ *CmACTIN* の発現レベルに対する比として補正した。

3) 葉の黄化反応によるエチレン感受性の検定

キクの葉は高濃度のエチレンによって黄化する (Doi et al., 2003)。この反応を利用し、遺伝子組換えキク系統のエチレン感受性を検定した。‘セイマリン’ および遺伝子組換えキク系統を閉鎖系ガラス温室 (深夜 5 時間暗期中断, 18°C 加温 25°C 換気) において栽培し、茎長が 30 cm となるように各系統より茎を 6 本収穫した。収穫後すぐに茎の基部より 10 cm 以内の葉を除去し、200 mL のイオン交換水を入れた容量 300 mL のガラス容器に挿し、ガラス容器を室温 23°C, 相対湿度 70%, 12 時間日長条件の室内に搬入した。明期には蛍光灯を用い、ガラス容器を置いた実験台の表面における PPFd が 10 μ mol m⁻² s⁻¹ となるように照射した。2 日おきにイオ

ン交換水を交換した。収穫後10日目に同室内に設置した50 Lアクリルチャンバー内にガラス容器を搬入し、 $1\mu\text{L L}^{-1}$ のエチレンを48時間処理した。処理後は再び室温 23°C 、相対湿度70%、12時間日長条件の室内でガラス容器を管理した。測色色差計(CM-2600d; コニカミノルタホールディングス株式会社)を用い、収穫後0、10および18日目の茎の最下位葉の L^* 、 a^* および b^* を測定した。葉の黄化程度は L^* と b^* の積を a^* の絶対値で割った値($L^* \times b^* / |a^*|$)で示した(Doi et al., 2004)。

4) 生育温度が低い条件下での遺伝子組換えキク系統の花芽分化および茎伸長

2006年6月1日に‘セイマリン’および遺伝子組換えキク系統の発根苗を園芸培土を充填した栽培箱に定植し、閉鎖系ガラス温室(深夜5時間暗期中断)において親株として夏季管理した。閉鎖系ガラス室内は最低気温が 18°C を下回った時に加温し、気温が 25°C に達した時に換気した。10月26日にこれらの親株より挿し穂をとり、メトロミックス360を充填した128穴セルトレイに挿した。園芸培土を充填した7.5 cmプラスチックポットに発根苗を鉢上げし、上記の温室内で栽培し、展開葉が4から5枚になった11月17日に、11時間日長、気温を 20°C 、 17.5°C または 15°C 一定に制御した3台の人工気象室に各区8から10株を搬入した。光源には蛍光灯を利用し、ポット地表面におけるPPFDが $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように照射した。人工気象室搬入後9週目に実験を終了し、発蕾の有無を調査した。発蕾が認められなかった株については顕微鏡下で茎頂を観察し、花芽分化の有無を調査した。実験期間中の茎伸長を調べるために、人工気象室搬入時および実験終了時に茎長を測定した。

5) エセフォンが遺伝子組換えキクの花芽分化および茎伸長に及ぼす影響

‘セイマリン’および遺伝子組換えキク系統No. 33の親株より2007年7月9日に挿し穂をとり、128穴セルトレイに挿した。7月30日に園芸培土を充填した7.5 cmプラスチックポットに発根苗を鉢上げした。閉鎖系ガラス温室(深夜5時間暗期中断、 18°C 加温 25°C 換気)において栽培し、展開葉が4から5枚になった8月7日に、8時間日長、 $20/15^{\circ}\text{C}$ (明期/暗期)に制御した人工気象室に搬入した。光源には蛍光灯を用いポット地表面のPPFDが $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ となるように照射した。人工気象室搬入と同時に、100または 1000 mg L^{-1} のエセフォ

ン水溶液(エスレル10; 石原産業株式会社; 展着剤として0.025% TritonX-100含有)を茎葉が十分にぬれるまで散布した。対照区として蒸留水(展着剤として0.025% TritonX-100含有)を散布する区を設けた。各区16個体を供試した。人工気象室搬入後6週目に実験を終了し発蕾の有無を調査した。発蕾が認められなかった株については顕微鏡下で茎頂を観察し、花芽分化の有無を調査した。実験期間中の茎伸長を調べるために、人工気象室搬入時および実験終了時に茎長を測定した。

2. 結果

1) 遺伝子組換えキク系統におけるDG-ERS1, mDG-ERS1(etr1-4)およびmDG-ERS1(Nr)の発現解析

全ての遺伝子組換えキク系統において、変異エチレンレセプター遺伝子の発現がみられ、その発現レベルに大きな系統間差がみられた(第12図)。内在エチレンレセプター遺伝子の発現レベルは‘セイマリン’とくらべると、No.19、No.33およびNo.45では同程度であり、No.10、No.21およびNo.27では高かった。最も発現レベルの高かつ

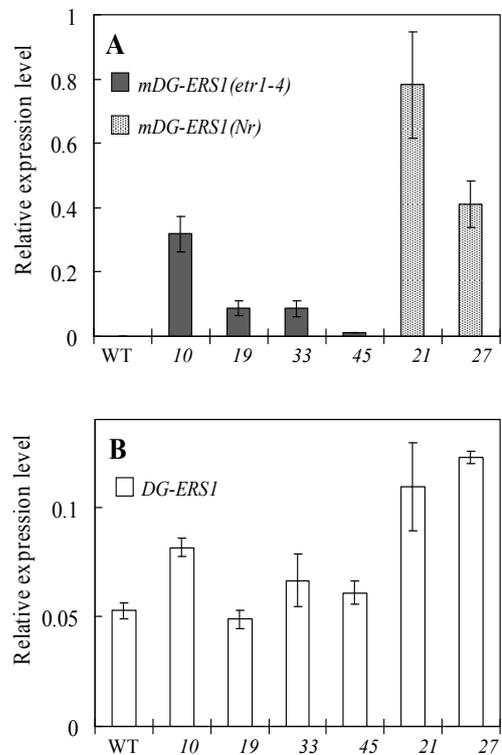


Fig. 12. Q-PCR analysis of mRNA of (A) *mDG-ERS1(etr1-4)* and *mDG-ERS1(Nr)* and (B) endogenous *DG-ERS1* in shoot tips of wild-type and transgenic chrysanthemum ‘Sei-marine’. Transcript levels were compared directly after normalization against a *CmACTIN* loading standard. All values are means \pm SE (n = 3).

たNo.27は‘セイマリン’の約2.1倍の発現を示した。

2) 遺伝子組換えキク系統におけるエチレン感受性の低下

収穫後0, 10および18日後の $L^* \times b^* / |a^*|$ 値の変化を第13図に示した。 $L^* \times b^* / |a^*|$ 値は収穫後10日目までに緩やかに増加した。収穫後10日目より48時間のエチレン処理を行った後, ‘セイマリン’の $L^* \times b^* / |a^*|$ 値は急激に増加し, 葉は黄化した。一方, 遺伝子組換えキク系統における $L^* \times b^* / |a^*|$ 値の増加はわずかであり, エチレン処理後も葉は緑色を保った。このことより, 変異エチレンレセプター遺伝子 *mDG-ERS1 (etr1-4)* あるいは *mDG-ERS1 (Nr)* を導入することによってエチレン感受性が低下することが示された。

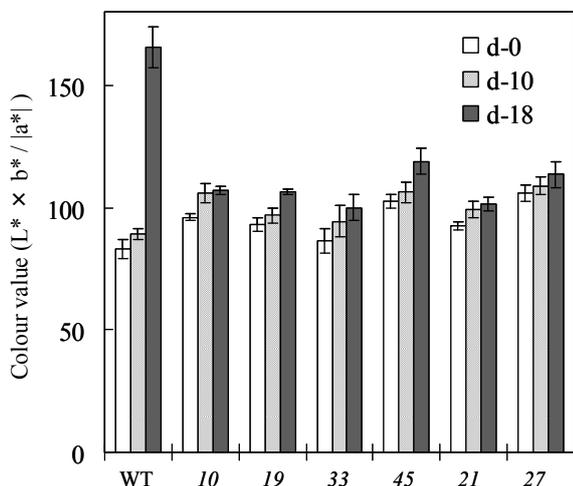


Fig. 13. Changes in leaf colour of wild-type and transgenic chrysanthemum ‘Sei-marine’ on days 0, 10, and 18. The value of $L^* \times b^* / |a^*|$ shows the degree of yellowing. Stems were exposed to ethylene ($1\mu\text{L L}^{-1}$) for 48 h starting on day 10 at 23°C . All values are means \pm SE ($n = 6$).

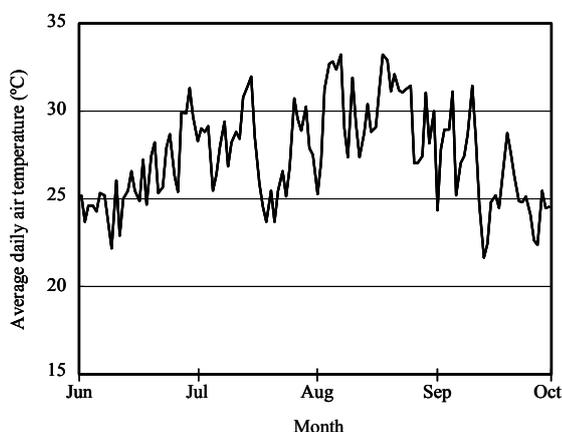


Fig. 14. Average daily air temperatures in a closed glasshouse, where stock plants of wild-type and transgenic chrysanthemum ‘Sei-marine’ were grown during summer.

3) 低生育温度条件下での遺伝子組換えキク系統の花芽分化および茎伸長

キクの花芽分化能力および茎伸長能力は高温に遭遇することで低下し, その後の涼温条件で花芽分化および茎伸長が低下し, ロゼットを形成して花芽分化が不能となり休眠状態となる。本実験では閉鎖系ガラス室内において ‘セイマリン’ および遺伝子組換えキク6系統の親株を夏季に長期間高温に遭遇させた (第14図) 後, 人工気象室内の異なる3段階の生育温度条件下で花芽分化および茎伸長を評価した。‘セイマリン’ および遺伝子組換えキク6系統は, 20°C では全個体が花芽分化した (第15A, 16A, B図)。‘セイマリン’ では生育温度が低下するにつれ花芽分化個体率は低下し, 17.5°C では75%,

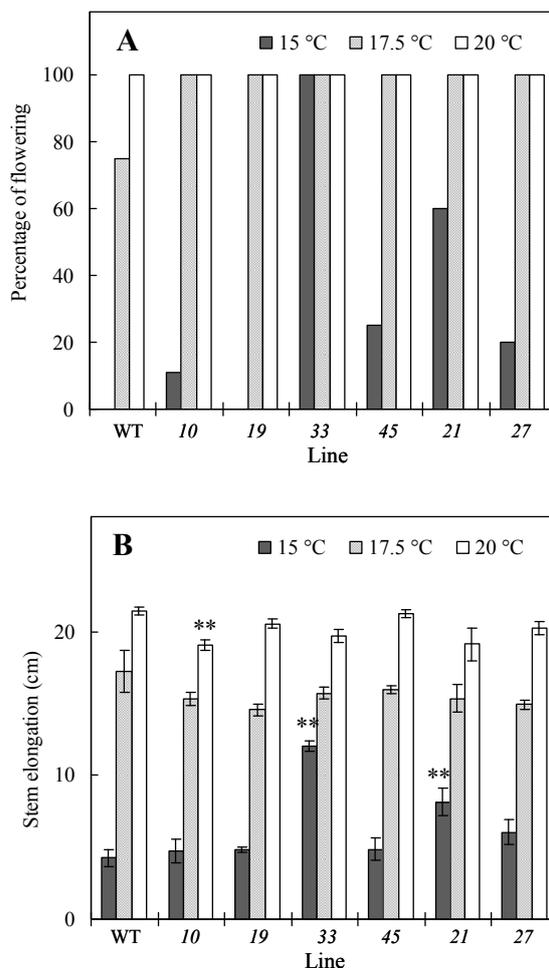


Fig. 15. Effects of temperature on flowering and stem elongation of wild-type and transgenic chrysanthemum ‘Sei-marine’. (A) Percentage of flowering plants and (B) stem elongation at 15, 17.5, or 20°C under 11-h photoperiod. Data were collected 9 weeks after ethephon treatment. All values are means \pm SE ($n = 8-10$). Asterisks indicate significant differences between wild-type and transgenic lines at the same temperature (ANOVA: $P < 0.01$).

15℃では花芽分化はみられなかった。一方、生育温度が低い条件下でも遺伝子組換えキク6系統の花芽分化個体率は‘セイマリン’にくらべ高く、17.5℃で全個体が花芽分化し、15℃でもNo. 19を除く系統で10% (No. 10) から100% (No. 33) の個体が花芽分化した。

20℃では、No. 10を除く遺伝子組換えキク5系統の人工気象室搬入後の茎伸長は‘セイマリン’と差がなかった(第15B, 16A, B図)。No. 10では‘セイマリン’にくらべ茎伸長が小さかった。生育温度の低下とともに‘セイマリン’の茎伸長は低下し、15℃では茎伸長は4cmとなり、株はロゼットを形成した。17.5℃では‘セイマリン’と遺伝子組換えキク6系統間の茎伸長に差はみられなかった。15℃では、遺伝子組換えキク系統No. 10, No.19, No.27およびNo.45の茎伸長は‘セイマリン’と同様に著しく低下し、ロゼットを形成したものの、No. 21およびNo.33の茎伸長は‘セイマリン’より大きく、ロゼットの形成はみられなかった。

4) 遺伝子組換えキク系統 No. 33 の花芽分化および茎伸長におけるエセフォンの影響

‘セイマリン’では、エセフォン処理によって花芽分化および茎伸長が抑制された(第5表)。エセフォン濃度が高くなるにつれその抑制は強くなり、エセフォン1000 mg L⁻¹処理によって花芽分化せず、株は高所ロゼット

トを形成した(第17図)。一方、遺伝子組換えキク系統No. 33では、エセフォン処理による花芽分化個体率の低下はみられなかった。No. 33においてはエセフォン処理による茎伸長の抑制も小さく、エセフォン100および

Table 5. Effects of ethephon on flowering and stem elongation of wild type and transgenic line No. 33 of chrysanthemum ‘Sei-marine’. When plants were transferred to a growth chamber controlled at 20/15 °C (light/dark) with an 8-h photoperiod, one spray treatment of ethephon (0, 100, or 1000 mg L⁻¹) was applied.

Ethephon content (mg L ⁻¹)	Wild type	No.33
Percentage of flowering plants		
0	100	100
100	31.3	100
1000	0	100
Stem elongation (cm)		
0	21.5±0.3	22.6 ± 0.3
100	11.4 ± 0.8	20.6 ± 0.8 **
1000	6.6 ± 0.2	15.5 ± 0.9 **

Data were collected 6 weeks after ethephon treatment. Values are means ±SE (n = 16). **, Significant differences between wild type and No. 33 at the same rate of ethephon (ANOVA: $P < 0.01$).

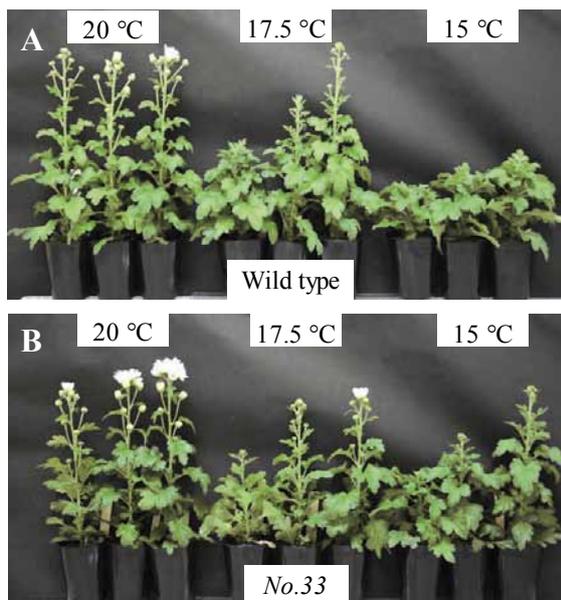


Fig. 16. Effects of temperature on flowering and stem elongation of wild-type and transgenic chrysanthemum ‘Sei-marine’. Representative (A) wild-type and (B) transgenic line No. 33 plants, 9 weeks after growth at 15, 17.5, and 20°C under 11-h photoperiod.

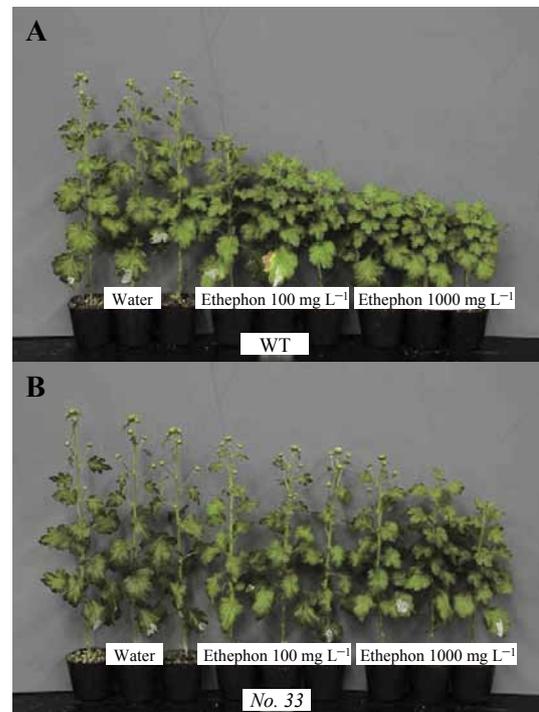


Fig. 17. Representative (A) wild-type and (B) transgenic line No. 33 plants of chrysanthemum ‘Sei-marine’, 6 weeks after transfer into a growth chamber at 20/15°C (light/dark) with an 8-h photoperiod and treatment with an ethephon spray (0, 100, or 1000 mg L⁻¹).

1000 mg L⁻¹ 処理区において‘セイマリン’にくらべ茎伸長は大きかった。

3. 考 察

キクの花芽分化および茎伸長は季節変動を示す。生育温度および前の季節の温度は花芽分化および茎伸長を決定する重要な要因であり (久松ら, 2002; 小西, 1980), 高温に遭遇した株が涼温条件下におかれることで, 茎伸長が停止してロゼットを形成し花芽分化ができない状態になる。これはキクにおける休眠状態であると考えられる。外生エチレンおよびエセフォンは, キクにおいて花芽分化および茎伸長を抑制する (Cockshull and Horridge, 1978; Kher et al., 1974; 小西ら, 1985)。前章では, エセフォン処理によって株がロゼットを形成し花芽分化できない状態になることが示され, さらに本章では, エチレン前駆体 ACC 処理によって花芽分化および茎伸長の抑制が誘導され, 高濃度の ACC 処理によって株はロゼットを形成し花芽分化ができない状態となった (第 2 表)。これらの結果は, エチレンがキクの休眠誘導を促進することを示している。本節ではエチレン低感受性遺伝子組換えキクを用い, 温度によって誘導されるキクの休眠には, エチレンによる情報伝達が関与していることを証明しようとした。

遺伝子組換えキク 6 系統においては, ‘セイマリン’にくらべエチレン処理後の葉の黄化が抑制され, エチレン感受性が低減していた。これら遺伝子組換えキク系統では, 変異エチレンレセプター遺伝子が発現し, また内在エチレンレセプター遺伝子の発現が‘セイマリン’にくらべ増加していた。エチレンレセプターはネガティブレギュレーターとして機能する (Hua and Meyerowitz, 1998)。すなわち, エチレン非存在下ではエチレンレセプターは活性状態にあり, エチレン応答反応を惹起しないが, エチレン存在下では不活性化されエチレン応答反応を誘導する。よって, 遺伝子組換えキク系統においてエチレン感受性の低下を引き起こす原因として, 導入した変異エチレンレセプター遺伝子の発現だけでなく, 内在エチレンレセプター遺伝子の発現が増加することによってエチレンレセプタータンパクが増加し, 活性状態にあるエチレンレセプターの割合が増加することも考えられる。

‘セイマリン’ およびエチレン低感受性遺伝子組換えキク系統の花芽分化および茎伸長における温度応答反応を評価するため, 夏季長期間にわたり高温に遭遇した株

を異なる 3 段階の生育温度環境下で生育させ, 花芽分化および茎伸長を調査した。‘セイマリン’は生育温度の低下とともに花芽分化および茎伸長が抑制され, 15℃ではロゼットを形成し花芽分化ができない状態となった。一方, エチレン低感受性遺伝子組換えキク系統では生育温度が低い条件下でも, ‘セイマリン’より高い花芽分化個体率あるいは茎伸長を示し, ロゼットを形成しない系統がみとめられた。すなわち, エチレン低感受性遺伝子組換えキク系統では, 高温遭遇した後の温度低下による花芽分化および茎伸長の抑制が軽減されることが示された。この結果は, 温度低下によって誘導される花芽分化および茎伸長の抑制には, エチレンを介した情報伝達が関与することを示している。

エチレン低感受性遺伝子組換えキク系統において, エチレン処理後の葉の黄化程度を示す値には系統間差はみられなかったが, 温度に対する花芽分化および茎伸長における反応には大きな品種間差がみられ, 中でも系統 No. 33 は生育温度が低い条件下でも花芽分化個体率は全く低下せず, また茎伸長の低下はわずかであった。変異および内在エチレンレセプター遺伝子の発現レベルには, 系統間差がみられた (第 12 図) が, それらと生育温度が低い条件下での花芽分化および茎伸長における系統間差には量的な相関はみとめられなかった。Aida et al. (2008) はキクの遺伝子組換え植物において, 導入した GUS 遺伝子の発現量および GUS 活性を調べたところ, 両者の間に量的な相関はなく, むしろ GUS 活性レベルは GUS 遺伝子の転写後のタンパク質への翻訳効率によって決まることを示している。本研究においても, 導入した変異エチレンレセプター遺伝子の転写後の制御が変異エチレンレセプタータンパクの生産に影響を及ぼし, 生育温度が低い条件下での花芽分化および茎伸長における遺伝子組換えキク系統間の表現型の違いに寄与している可能性がある。

エチレン低感受性遺伝子組換えキク系統 No. 33 では, 15℃条件下でも全個体が花芽分化しロゼットを形成せず, 最も強く休眠が抑制された表現型を示した。キクの休眠において特徴的にみられるロゼットを形成し花芽分化ができない状態の誘導には, エチレン情報伝達系が関与していることを確認するために, この No. 33 における外生エチレンの影響を調査した。エチレン低感受性遺伝子組換えキク系統では, エチレン感受性の低下によるフィードバック調節を受け, エチレン生合成系が変化している可能性が考えられる。ここではエセフォンを用いてエチレン処理を行った。エセフォンは植物体内に吸収

され、pHの変化によって分解しエチレンを放出する。そのエチレン放出は温度による影響を受けるが、品種間差はみられない(第4図)ことから、エセフォンによって‘セイマリン’およびエチレン低感受性遺伝子組換えキクに同等のエチレン処理を行ったと考えられた。‘セイマリン’では、高濃度のエセフォン処理によってロゼットを形成し花芽分化できない状態が誘導され、休眠状態を示した。一方、No. 33ではエセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制は小さく、高濃度のエセフォン処理によるロゼット形成はみられなかった。これらの結果より、エチレンを介した情報伝達がキクの休眠に関与していることが確認された。

エチレン低感受性遺伝子組換えキク系統では、生育温度の低下に対する花芽分化における反応と茎伸長における反応は異なっていた。No. 10, No. 19, No. 27, No. 33 および No. 45 では、‘セイマリン’と同様に生育温度が低下するにつれ茎伸長が低下したが、花芽分化個体率の低下は‘セイマリン’にくらべ小さく、特に、No. 33では15℃条件下でも花芽分化個体率は全く低下しなかった。これらの結果は、生育温度が低い条件下で発生する茎伸長の低下と花芽分化の抑制のうち、エチレン低感受性の付与によって後者がより軽減されることを示しており、エチレンを介した情報伝達は茎伸長の抑制よりも花芽分化の抑制に強く関与しているといえる。ヨーロッパシラカバでは、短日によって茎伸長の低下および休眠芽の形成が誘導される。エチレン非感受性遺伝子組換えヨーロッパシラカバでは、短日条件下で野生型と同様に茎伸長が低下するものの、休眠芽の形成は阻害されることから、エチレンは短日によって誘導される休眠芽の形成を促進することが示されている(Ruonala et al., 2006)。キクでは、休眠状態となる際には頂芽の花芽分化の抑制および茎伸長の抑制が発生するが、本研究の結果は、両者の中でも頂芽の花芽分化の抑制がエチレンを介した情報伝達によって促進されることを示唆している。自然条件下では、キクは晩夏の短日かつ十分な生育温度条件下で主茎の頂芽が花芽分化する。その後、短日条件下で主茎では花芽が発達し、開花、結実した後、晩秋には枯死すると同時に、主茎の基部より吸枝が現れる。涼温の影響によって吸枝はまもなく休眠状態となり、短日条件下であっても花芽分化しない。このことはキクが越冬するために非常に重要な反応である。もし伸長を開始した吸枝の芽が晩秋の短日条件下で花芽分化すれば、その後の冬の低温によって傷害を受け枯死し、翌年植物体は生長を再開できなくなる。本研究の結果は、エチレンを介し

た情報伝達は涼温・短日条件下での花芽分化を抑制し、芽を保護する役割を果たすことを示している。

エチレン低感受性遺伝子組換えキクでは、高温遭遇後の涼温条件下での休眠誘導が抑制された。これはジャガイモのマイクロチューバーの休眠(Suttle, 1998)やヨーロッパシラカバの休眠(Ruonala et al., 2006)において示されているように、エチレンを介した情報伝達がキクの休眠においても関与していることを示しており、エチレンは多年生草本植物であるキクの生長と休眠を繰り返す生活環において重要な役割を果たしていることを示唆している。

第3章 キクの花芽分化におけるジベレリンの役割の解明

休眠状態になった株が、再び茎伸長し花芽分化できる状態になるためには、低温に遭遇することが必要である。このような花芽分化および茎伸長における低温要求は多くの植物においてみられ、その反応には植物ホルモンであるジベレリンの関与が報告されている。本章では、キクの花芽分化および茎伸長における低温およびジベレリンの影響を調査し、両者の関連を検討した。また、花芽分化におけるジベレリンの機能について追求した。

第1節 低温要求性品種の花芽分化におけるジベレリン要求

多くの植物において、ジベレリンは栄養生長から生殖生長への移行を促進する(Lang, 1957; Pharis and King, 1985)。長日植物シロイヌナズナでは、ジベレリンの生合成および情報伝達系の変異体を用い、内生ジベレリンが栄養生長から生殖生長への移行を促進すること(Koorneef et al., 1985; Wilson et al., 1992)、また内生ジベレリンの低下によって長日下では栄養生長から生殖生長への移行が遅延し、短日下では移行が起こらないこと(Jacobsen and Olszewski, 1993)が明らかにされている。栄養生長から生殖生長への移行に低温遭遇を必要とするグンバイナズナ(*Thlaspi ravens* L.; Hazebroek et al., 1993)、トルコギキョウ(*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.; Hisamatsu et al., 2004)、ダイコン(*Raphanus sativus* L.; Nishijima et al., 1998)およびヨウシュウナタネ(*Brassica napus* L.; Zanewich and Rood, 1995)では、株が低温に遭遇した後、適温条件下においてジベレリン生合成の増加がみられる。また、チューリップ(*Tulipa*

gesneriana L.; Hanks, 1982), ストック (*Matthiola incana* (L.) R.Br.; Hisamatsu and Koshioka, 2000), グンバイナズナ (Metzger, 1985) およびダイコン (Nakayama et al., 1995; Nishijima et al., 1997) では、低温遭遇後に花芽分化あるいは茎伸長におけるジベレリンに対する感受性や反応性が促進される。以上に示したように、ジベレリンは長日植物あるいは低温要求性植物の栄養生長から生殖生長への移行と密接な関係がある。

キクでは栄養生長から生殖生長への移行に短日を必要とする。また第1章において、‘あずま’および系統94-4008では、夏季の高温に長期間遭遇した株は涼温・短日条件下で花芽分化ができない状態となったが、低温に遭遇することで花芽分化能力が回復し、涼温・短日条件下でも花芽分化した(第7, 8図)。つまり、キクの栄養生長から生殖生長への移行には、短日だけでなく低温遭遇も必要であるということが出来る。キクにおいて栄養生長から生殖生長への移行におけるジベレリンの役割を調べたこれまでの研究より、多くの品種ではジベレリン処理によって長日条件下での花芽分化を誘導できない(Kohl and Kofranek, 1957)ものの、花芽分化に短日要求がなく低温要求のみを示す夏ギク品種では、低温に遭遇していない株においてもジベレリン処理によって花芽分化を誘導できることが示されている(Harada and Nitsch, 1959)。したがって、長日植物や低温要求性植物で示されているように、キクの栄養生長から生殖生長への移行にもジベレリンが関与し、特にジベレリンは低温遭遇による花芽分化の促進と密接な関係があることが推察される。本節では、キクの栄養生長から生殖生長への移行におけるジベレリンの役割を明らかにするために、ジベレリンおよび低温遭遇が花芽分化に及ぼす影響を調査した。

1. 材料および方法

栽培ギク‘ナガノクイン’、‘セイローザ’(英品種名‘Reagan’), ‘シテイ’および系統94-4008の親株より2006年9月4日に挿し穂をとり、メトロミックス360を充填した128穴セルトレイに挿した。発根苗は園芸培土を充填した7.5 cmプラスチックポットに鉢上げし、ガラス温室(深夜5時間暗期中断, 15℃加温25℃換気)で管理した。株あたり1 gの緩効性肥料(13N-16P-10K)を施した。鉢上げ10日後にジベレリン生合成阻害剤ウニコナゾール(Rademacher, 2000; UCZ; スミセブンP液剤; 住友化学株式会社)水溶液(50 mg L⁻¹)をポット当たり10 mL(UCZ処理量0.5 mg)土壌灌注し、同時

に25 mg L⁻¹の水溶液を茎葉散布した。1週間後、半数の株を12時間日長, 20/15℃(明期/暗期)に制御した人工気象室に搬入し、短日処理を開始した。光源には蛍光灯を用いポット地表面のPPFDが200 μmol m⁻² s⁻¹となるように照射した。人工気象室への搬入時には再度25 mg L⁻¹のUCZ水溶液を茎葉散布した。人工気象室への搬入時、搬入後2, 4および6日目に、GA₃(ジベレリン協和粉末; 協和発酵工業株式会社)を1株当たりそれぞれ0, 0.025, 0.25, 2.5 μg茎頂部に処理した。なお、GA₃は10%エタノール水溶液(展着剤として0.025% TritonX-100含有)として茎頂部に10 μLずつ処理し、実験期間中の総GA₃処理量は、株あたりそれぞれ0, 0.1, 1, 10 μgであった。残りの半数の株については、3℃の低温人工気象室(明期12時間+暗期中断4時間)に搬入し、8週間低温処理を行った。低温処理中、明期にはポット地表面のPPFDが70 μmol m⁻² s⁻¹となるように蛍光灯を用いて照射した。低温処理後25 mg L⁻¹のUCZ水溶液を茎葉散布し、上述の低温処理を行わなかった区と同様の条件の人工気象室に搬入し短日処理を開始し、同様のGA₃処理を行った。また両区において、UCZとGA₃処理を行わない株も実験に供試した。各処理区あたり14株供試した。人工気象室搬入後56日目に実験を終了し、発蕾した個体数を測定した。発蕾が認められなかった株については、顕微鏡下で茎頂を観察し、花芽分化の有無を調査した。実験期間中の茎伸長を調べるために、人工気象室搬入時および実験終了時に茎長を測定した。

2. 結果

UCZおよびGA₃を処理しなかった場合(無UCZ無GA区), ‘シテイ’および系統94-4008では、低温処理を行わなかった区(無低温区)にくらべ低温処理を行った区(低温区)で茎伸長がそれぞれ3.5および6.8倍大きく、低温によって茎伸長が促進された(第18図)。一方、‘ナガノクイン’では、低温処理によって茎伸長が促進されたが、無低温区との差はわずかであり、‘セイローザ’では低温処理は茎伸長に影響を及ぼさなかった。キクにおいて、UCZによってジベレリン生合成が阻害され、内生ジベレリンレベルが著しく低下することがバイオアッセイによって示されている(Zheng et al., 2004)。すべての品種において、UCZ処理によって茎伸長はほぼ停止し、株はロゼットを形成した(第18, 19図)。この茎伸長の抑制はGA₃処理によって回復し、GA₃処理量の増加とともに茎伸長は増加した。‘シテイ’および系統

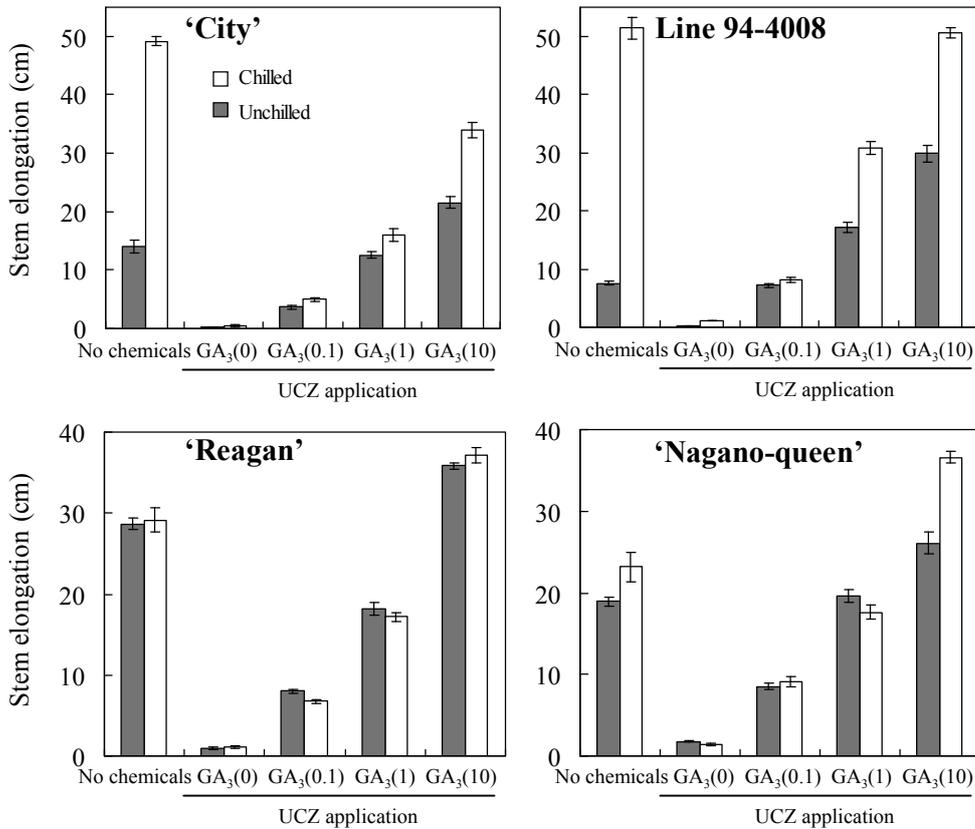


Fig. 18. Effect of GA₃ and chilling on stem elongation in chrysanthemum 'City', line 94-4008, 'Reagan' and 'Nagano-queen'. Shaded bars represent unchilled plants, open bars represent 8-week chilled plants. Error bars represent \pm SE (n = 14). GA₃ (0, 0.1, 1 or 10 μ g per plant in total) was applied over 6 d after UCZ application. No chemicals, non-UCZ- and non-GA₃-treated plants.

94-4008 では、GA₃1 μ g および 10 μ g を処理したどちらの場合においても、無低温区に比べ低温区で茎伸長が大きく、'シティ' および系統 94-4008 の茎伸長における GA₃ への反応は、低温処理によって高まった (第 18 図)。

'シティ' および系統 94-4008 の無 UCZ 無 GA 区において、無低温区の株は花芽分化しなかったが、低温区の株は花芽分化し、これら 2 品種は花芽分化に関して低温要求性であった (第 20 図)。「シティ」および系統 94-4008 では、UCZ 処理によって花芽分化は抑制された。この花芽分化の抑制は GA₃ 処理によって回復し、GA₃ 処理量の増加とともに花芽分化個体率が増加した。「シティ」および系統 94-4008 の無低温区では、GA₃ を 10 μ g 処理した場合でも花芽分化個体率はそれぞれ 7.1% および 21.4% であったが、低温区では GA₃10 μ g 処理によって両品種とも全個体が花芽分化した。「シティ」および系統 94-4008 では、低温処理によって花芽分化における GA₃ への反応が高まった。「セイローザ」および「ナガノクイン」では、全ての処理区で花芽分化し、花芽分化に対して低温要求を示さなかった。これら 2 品種の茎伸

長は UCZ によって抑制された (第 18 図) が、花芽分化は抑制されなかった。

3. 考察

キクの花芽分化および茎伸長には大きな季節変動がみられ、それらは主に温度および日長によって決定される。第 1 章で示したように、前の季節の温度は次の季節における株の花芽分化能力および茎伸長能力を決定する重要な要因である。夏季に高温に遭遇することによって低下した花芽分化能力および茎伸長能力は、低温に遭遇することによって回復する。ここでも、「シティ」および系統 94-4008 では、低温処理によって花芽分化および茎伸長が大きく促進された。

UCZ 処理後に GA₃ 処理を行うことによって、茎伸長はジベレリンに大きく依存していることが明らかになった (第 18 図)。これまでの研究では、低温処理によって茎伸長能力が高まった株が、適温下で急激な茎伸長を示す時には、内生ジベレリンレベルが増加しているこ

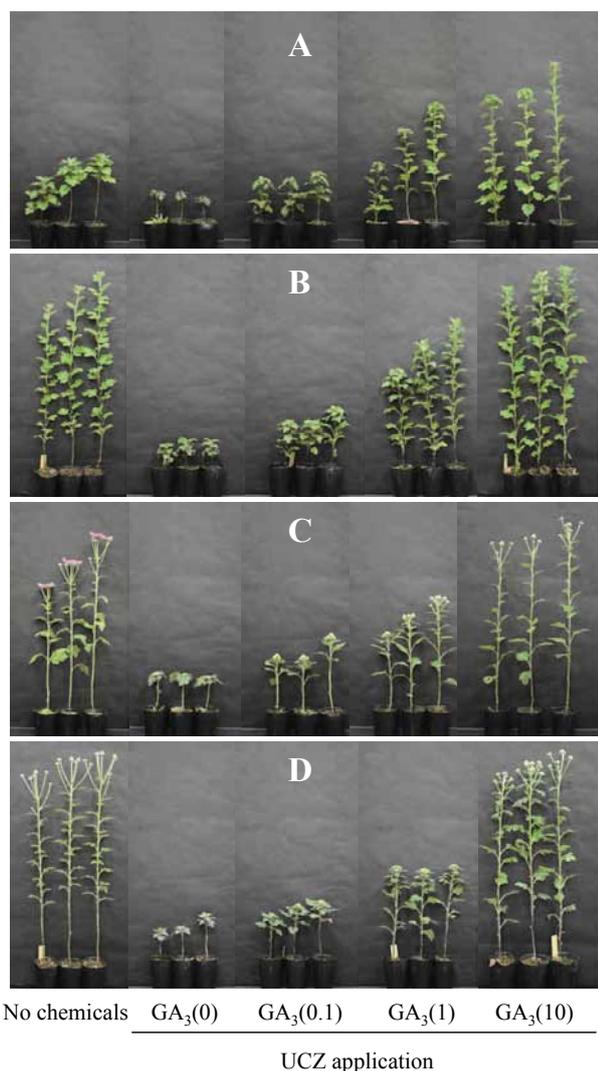


Fig. 19. Plants grown in SD with or without the application of GA_3 . (A) Unchilled line 94-4008. (B) Chilled line 94-4008. (C) Unchilled 'Reagan'. (D) Chilled 'Reagan'. GA_3 (0, 0.1, 1 or $10\mu\text{g}$ per plant in total) was applied over 6 d after UCZ application. No chemicals, non-UCZ- and non- GA_3 -treated plants.

とが、バイオアッセイによって示されており (Tompsett and Schwabe, 1974), 低温処理によって内生ジベレリンレベルが増加し, 茎伸長を促進すると考えられる。さらに, ここでは低温処理によって茎伸長における GA_3 への反応性が高まることを明らかにした。遠赤色光 (730 nm) 照射によってキクの茎伸長における GA_3 への反応性が高まり, それによって茎伸長が促進されることが示されている (Hisamatsu et al., 2008) ように, 低温によって株の内生ジベレリンレベルだけでなくジベレリン反応性も高まり, 茎伸長が促進されると推察される。

花芽分化における低温要求性には品種間差がみられた (第 20 図)。キクの季節ごとの花芽分化能力を評価

した研究 (久松ら, 2002) では, 'シテイ' および系統 94-4008 は花芽分化能力において明確な季節変動を示し, 秋以降は花芽分化を誘導できない品種であった。一方, 'セイローザ' および 'ナガノクイン' は周年安定して花芽分化誘導が可能な品種であった。すなわち, 花芽分化能力における季節変動は, 花芽分化において低温要求性の強い品種で顕著にみられ, 花芽分化における低温要求との関連が示唆された。'セイローザ' および 'ナガノクイン' では, 花芽分化におけるジベレリン要求はみられず, 一方, 花芽分化において低温要求性の 'シテイ' および系統 94-4008 では, 花芽分化においてジベレリン要求性であった。これらの結果より, キクにおける低温とジベレリンの相互作用による栄養生長から生殖生長への移行を促進する制御機構の詳細は明らかにされていないものの, 花芽分化に低温要求を示さない品種では, 栄養生殖から生殖生長への移行はジベレリンに依存しないことが明らかになった。

キクの栄養生長から生殖生長への移行は短日を必要とする。長日条件下ではジベレリン処理によって花芽分化を誘導できず, ジベレリンは短日の代替にはならない (Harada, 1959; Kohl and Kofranek, 1957)。長日植物では, 長日条件下での栄養生長から生殖生長への移行に関連してジベレリン生合成が増加することが明らかになっている (Pharis and King, 1985) が, これはキクにおいてジベレリンが短日の代替とならないこととは相反しない。一方, GA_3 は低温要求の一部代替となり, 'シテイ' および系統 94-4008 の低温処理を行わなかった株において, 数個体ではあるが GA_3 によって花芽分化が誘導された (第 20 図)。低温遭遇によって内生ジベレリンレベルが増加する (Tompsett and Schwabe, 1974) ことから, GA_3 が低温要求の一部代替となったと説明できる。しかし, 低温処理によって花芽分化におけるジベレリンに対する反応性が明らかに高まることから, ジベレリン生合成以外に低温によって制御される花芽分化の促進要因があると考えられる。キクの花芽分化における低温要求は, シロイヌナズナ, オオムギ (*Hordeum vulgare* L.) およびコムギ (*Triticum aestivum* L.) における春化反応と類似している。シロイヌナズナ, オオムギおよびコムギでは, 花成抑制因子である *FLOWERING LOCUS C (FLC)* あるいは *VERNALIZATION2* の発現が低温によって抑制されることによって春化反応が起こる (Cockram et al., 2007; Dennis and Peacock, 2007; Michaels and Amasino, 1999; Trevaskis et al., 2003)。さらに, シロイヌナズナの *FLC* の発現レベルは, 低温に遭遇した期間が増加する

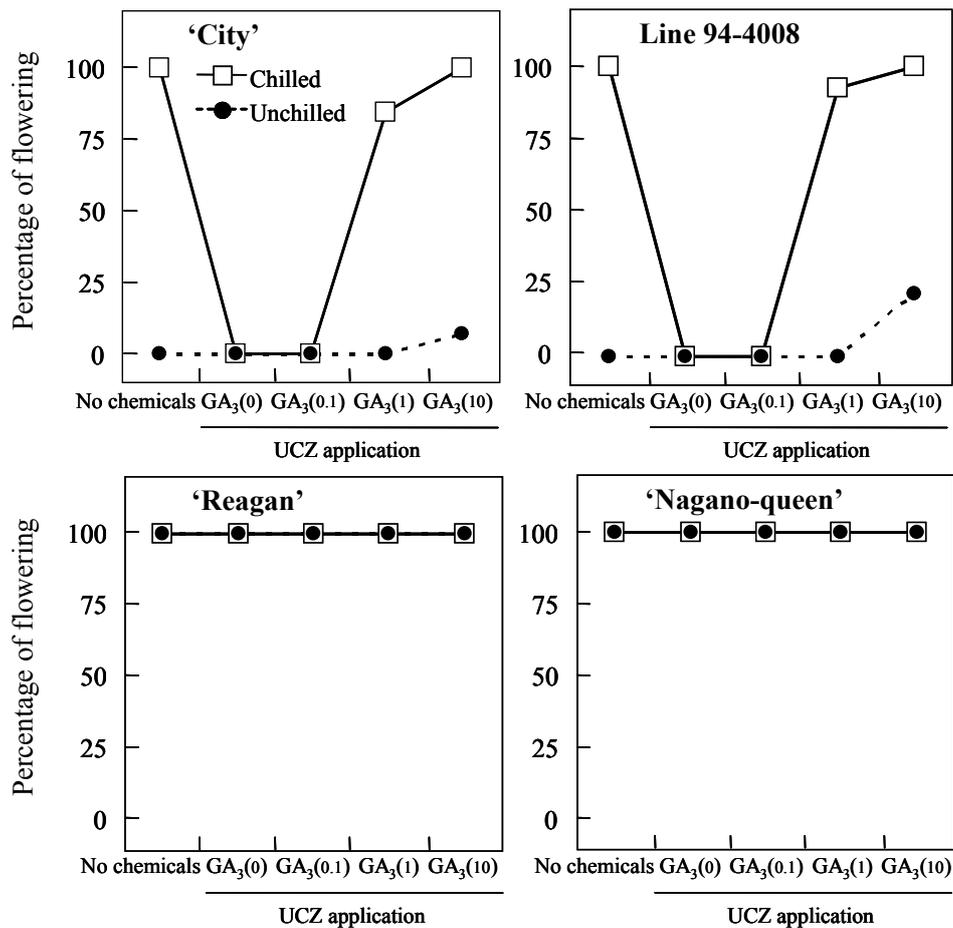


Fig. 20. Effect of GA₃ and chilling on flowering in chrysanthemum 'City', line 94-4008, 'Reagan' and 'Nagano-queen'. Percentage of flowering plants of unchilled (●, broken line) or 8-week chilled plants (□, solid line). Data were collected 56 days after transfer into the SD growth chamber. Error bars represent ± SE (n = 14). GA₃ (0, 0.1, 1 or 10 μg per plant in total) was applied over 6 d after UCZ applications. No chemicals, non-UCZ- and non-GA₃-treated plants.

につれ量的に減少していくことが示されている (Sheldon et al., 2000). キクにもこのような花成抑制因子が存在し、ジベレリンによる花芽分化促進と拮抗的な関係にあると仮定した場合、'シティ' および系統 94-4008 において、低温に遭遇していない株では花成抑制因子が強く作用するため多量の GA₃ 処理を行っても一部しか花芽分化を誘導できないが、株が低温に遭遇して花成抑制因子が減少した場合には、花芽分化誘導に必要な GA₃ 量が減少するという説明が可能である。また、'セイローザ' および 'ナガノクイン' は、この花成抑制因子を欠失した品種であると仮定すると、これらの品種が花芽分化において低温およびジベレリンを必要としないことが説明できる。したがって、花芽分化におけるジベレリン要求性にみられる品種間差は、花芽分化における低温要求性の品種間差が原因である可能性が考えられる。この点に関する解明には、シロイヌナズナやオオムギ、コムギで示されているように、今後キクにおいても低温反応に関係

する遺伝子群を明らかにする必要がある。

第2節 ジベレリンは *FLORICAULA/LEAFY* 相同遺伝子である *CmFL* の発現を促進し花芽分化を誘導する

キクは非常に重要な花き園芸作物であり、古くより日長反応を利用した花成の制御が行われているにもかかわらず、キクの花成制御機構の分子生物学的な解析は行われていない。これまでにシロイヌナズナやキンギョソウ (*Antirrhinum majus* L.) において、栄養生長から生殖生長への移行において重要な役割を果たす花芽形成遺伝子 *FLORICAULA* (*FLO*), *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*API*) および *FRUITFULL* (*FUL*) が発見されている。*FLO* はキンギョソウの花芽形成遺伝子であり、*LFY* はシロイヌナズナにおける *FLO* 相同遺伝子である (Coen et al., 1990; Weigel et al., 1992)。*API* はシロイヌナズナ

の花芽形成遺伝子であり、*FUL* は *API* と冗長的な機能を有する (Ferrández et al., 2000). シロイヌナズナにおいてジベレリンは *LFY* のプロモーターを活性化し、*LFY* の発現を増加させることによって花成を促進する (Blázquez et al., 1998). また長日植物ドクムギ (*Lolium temulentum* L.) において、ジベレリンは花成誘導遺伝子 *FLOWERING LOCUS T* の産物と一緒に花成刺激として作用する (King et al., 2006; King and Evans, 2003). これらは、ジベレリンによる花芽分化の促進が花成関連遺伝子と強く関連していることを示している。

Li et al. (2009) はキクにおいて *FLO/LFY* 相同遺伝子である *CmFL* (GenBank accession no. AB451217) および *API/FUL* 相同遺伝子である *CmAFL1* (GenBank accession no. AB451218) を同定した. 本節では、キクの栄養生長から生殖生長への移行におけるジベレリンの役割を明らかにするために、ジベレリンがこれらの花芽形成遺伝子の発現に及ぼす影響を解析した.

1. 材料および方法

栽培ギク ‘セイローザ’ (英品種名 ‘Reagan’) および系統 94-4008 の親株より 2007 年 7 月 17 日に挿し穂をとり、メトロミックス 360 を充填した 128 穴セルトレイに挿した. 発根した苗を園芸培土を充填した 7.5 cm プラスチックポットに鉢上げし、ガラス温室 (深夜 5 時間暗期中断, 15°C 加温 25°C 換気) で管理した. 株あたり 1 g の緩効性肥料を施した (13N-16P-10K). 鉢上げ 10 日後に 50 mg L⁻¹ の UCZ 水溶液をポット当たり 10 mL 土壤灌注し、同時に 25 mg L⁻¹ の UCZ 水溶液を茎葉散布した. 1 週間後、株を 3°C の低温人工気象室 (明期 12 時間 + 暗期中断 4 時間, 明期の PPFD70 μmol m⁻² s⁻¹) に搬入し、8 週間低温処理を行った. 低温処理後、25 mg L⁻¹ の UCZ 水溶液を茎葉散布し、12 時間日長, 20/17.5°C (明期/暗期) に制御した人工気象室に搬入し、短日処理を開始した. 光源には蛍光灯を用いポット地表面の有効光量子束密度 (PPFD) が 200 μmol m⁻² s⁻¹ となるように照射した. 搬入時、搬入後 2, 4 および 6 日目に、GA₃ を 1 株あたりそれぞれ 0 または 2.5 μg 茎頂部に処理した. なお、GA₃ は 10% エタノール水溶液 (展着剤として 0.025% TritonX-100 含有) として茎頂部に 10 μL ずつ処理し、株あたりの総 GA₃ 投与量は、それぞれ 0 あるいは 10 μg であった. UCZ および GA₃ 処理を行わない株も実験に供試し、各処理区 12 株とした. 発蕾が確認された日を記録し、また人工気象室への搬入後の増加葉数および茎伸

長を調べるために、人工気象室搬入時および搬入 4 週間後に、葉数および茎長を測定した.

GA₃ が *CmFL* および *CmAFL1* の発現に及ぼす影響を調査した. *CmFL* は 413 アミノ酸をコードし、ホンバアブラギク (*Dendranthema lavandulifolium* (Fisch. ex Trautv.) Kitam.) における *FLO/LFY* 相同遺伝子である *DFL* (Ma et al., 2008) とアミノ酸レベルで 97% 以上の相同性がみられる (Li et al., 2009). *CmAFL1* は 236 アミノ酸をコードし、キクにおける *API/FUL* 相同遺伝子である *CDM8* (Shchennikova et al., 2004) とアミノ酸レベルで 69% 以上の相同性がみられる (Li et al., 2009). 栄養生長から生殖生長への移行が起こっている際に、これらの遺伝子の発現が増加することが確認されている (Li et al., 2009). さらに、これらの遺伝子を発現させた遺伝子組換えシロイヌナズナは、早期開花を示すことがわかっている (第 21 図). これらの遺伝子の発現を調べるために、人工気象室搬入後 0, 7, 14, 21 および 28 日目に、処理区あたり 4 株から 5 mm の茎頂部を採取し、RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン株式会社) および RNase-free DNase (キアゲン株式会社) を用い、取扱説明書の手順に従って、total RNA を抽出した. 各サンプルより 500 ng の total RNA を鋳型として Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) を用い、取扱説明書の手順に従って逆転写し cDNA を合成した. 得られた cDNA は DNaseFree 水で 5 倍に希釈し、5 μL の cDNA を SYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ株式会社) の 15 μL 反応系に用い、ライトサイクラー (ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社) によって定量リアルタイム

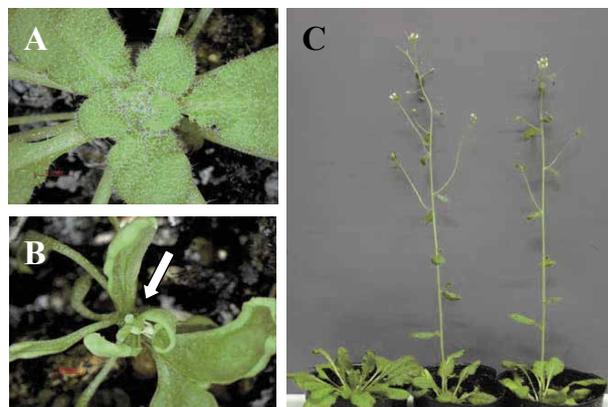


Fig. 21. *CmFL* and *CmAFL1* induce early flowering in *Arabidopsis thaliana* grown under 9-h SD photoperiod at 20 °C. (A) Wild type. (B) *35S::CmFL* transformant. The terminal flower (arrow) is visible. (C) Left, wild type. Middle and right, *35S::CmAFL1* transformants.

PCR 解析を行った。キクのアクチン遺伝子 *CmACTIN* (GenBank accession no. AB205087) を各サンプル間の遺伝子発現レベルの補正対照として用いた。各遺伝子 *CmFL*, *CmAFL1* および *CmACTIN* の増幅には、それぞれ第 6 表に示すプライマーを用いて行った。PCR は 95°C で 20 秒間の変性反応後、95°C, 5 秒間 → 60°C, 20 秒間 → 72°C, 15 秒間の反応を 40 回行った。*CmFL* および *CmAFL1* の発現レベルはそれぞれ *CmACTIN* の発現レベルの相対比とした。さらに、各 PCR 反応系にお

いてそれぞれの遺伝子の発現相対比の最高値が 1 となるように補正した。

2. 結果および考察

UCZ および GA₃ 処理を行わなかった区 (無 UCZ 無 GA 区) において、'セイローザ' では人工気象室搬入後 18.6 日, 系統 94-4008 では 23.8 日で発蕾した (第 7 表)。茎頂部における *CmFL* および *CmAFL1* の発現は、長日条件下では低いレベルで 4 週以上維持される (Li et al., 2009)。本研究においても、人工気象室への搬入時にはこれらの発現レベルは低かった (第 22 図)。短日条件下では両遺伝子の発現は急激に増加し、両品種の無 UCZ 無 GA 区における *CmFL* の発現は、人工気象室搬入後 7 から 14 日で増加した。前節と同様に、系統 94-4008 において UCZ を処理した区 (UCZ 区) では花芽分化が抑制され、*CmFL* の発現増加はみられなかった。系統 94-4008 の UCZ および GA₃ 処理を行った区 (UCZ + GA 区)

Table 6. PCR primers and their sequences used to detect *CmFL*, *CmAFL1* and *CmACTIN*.

Gene name	Primer	Sequence (5'→3')
<i>CmFL</i>	Forward	CATTGATGCCATATTTAACTC
	Reverse	ACACGGATCATTTCATTGTATA
<i>CmAFL1</i>	Forward	CAAGCTCAACCATCAATAGTC
	Reverse	TGCAGCACATGAACGAGTAG
<i>CmACTIN</i>	Forward	GATGACGCAGATCATGTTCG
	Reverse	AGCATGTGGAAGTGCATACC

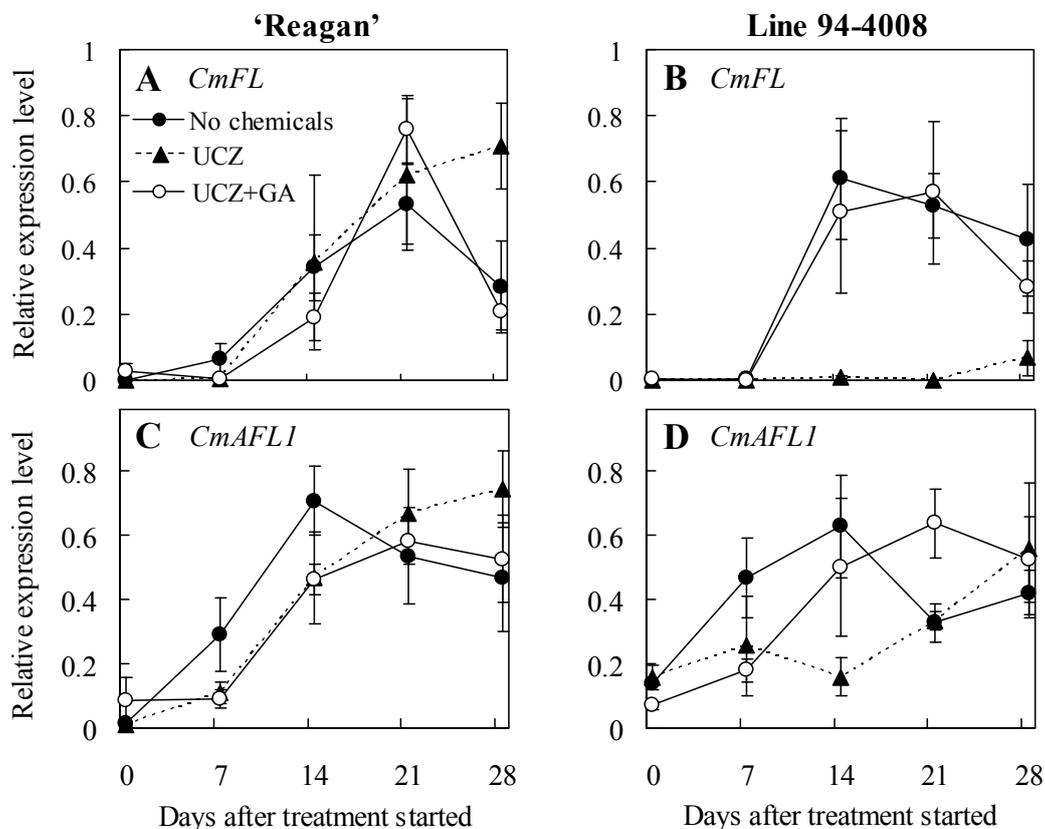


Fig. 22. Effect of GA₃ on the expression of *CmFL* and *CmAFL1* in chrysanthemum. (A) *CmFL* in 'Reagan'. (B) *CmFL* in line 94-4008. (C) *CmAFL1* in 'Reagan'. (D) *CmAFL1* in line 94-4008. Changes in the gene expression are shown as calculated value relative to the maximum value in the same Q-PCR assay. Error bars represent \pm SE (n = 4). No chemicals (●), non-UCZ- and non-GA₃-treated plants. UCZ (▲), an application to soil (0.5 mg per pot) and spray treatments of UCZ (25 mg L⁻¹). UCZ+GA (○), GA₃ (10 μg per plant in total) was applied over 6 d after UCZ application.

Table 7. Effect of GA₃ on flowering and extension growth in chrysanthemum line 94-4008 and 'Reagan'.

Treatments	No chemicals	UCZ	UCZ+GA
UCZ	-	+	+
GA ₃	-	-	+
Line and cultivar	Days to visible flower buds		
94-4008	23.8 ± 0.7 a	NB ² (>90)	22.3 ± 0.6 a
Reagan	18.6 ± 0.1 a	27.8 ± 0.1 c	20.1 ± 0.3 b
Percentage of flowering plants			
94-4008	100	0	100
Reagan	100	100	100
Increased number of leaves after transfer into SD phytotron			
94-4008	19.6 ± 0.5 a	20.3 ± 0.5 a	23.6 ± 0.9 b
Reagan	15.3 ± 0.2 a	15.8 ± 0.2 a	16.8 ± 0.3 b
Stem elongation (cm)			
94-4008	26.7 ± 1.8 b	0.6 ± 0.1 a	31.0 ± 0.6 b
Reagan	23.4 ± 1.4 b	0.7 ± 0.1 a	27.9 ± 0.7 c

Significant differences determined at $P < 0.01$ using Tukey's test are indicated by different letters in each line. Values are mean ± SE (n = 12). No chemicals, non-UCZ- and non-GA₃-treated plants. UCZ, an application to soil (0.5 mg per pot) and spray treatments of UCZ (25 mg L⁻¹). UCZ+GA, GA₃ (10 μg per plant in total) was applied over 6 d after UCZ application. ²NB, No visible flower buds.

における発蕾所要日数は、無 UCZ 無 GA 区と同様であり、UCZ による花芽分化の抑制は GA₃ によって回復した。また、*CmFL* の発現は無 UCZ 無 GA 区と同様に増加した。よって、シロイヌナズナにおいてジベレリンが *LFY* の発現を促進する (Blázquez et al., 1998) ように、キクにおいてジベレリンは *CmFL* の発現を促進し、花芽分化を促進することが示された。

‘セイローザ’では UCZ によって発蕾が遅延したが、全個体が発蕾した (第 7 表)。*CmFL* の発現および増加葉数において、UCZ 区と無 UCZ 無 GA 区の間にはほとんど差がなかったことから、短日条件の人工気象室への搬入後 UCZ 区でも無 UCZ 無 GA 区と同様に花芽分化が始まったと推察される。無 UCZ 無 GA 区では人工気象室への搬入後 18.6 日間に 15.3 枚の葉を展開し発蕾した。一方、UCZ 区では 27.8 日間に 15.8 枚の葉を展開し発蕾した。この結果は、UCZ によって葉の展開速度が低下したことを示している。UCZ 区では無 UCZ 無 GA 区と同様に花芽分化を開始したが、葉の展開速度が低下したため発蕾が遅延したと考えられる。

両品種において無 UCZ 無 GA 区の *CmAFL1* の発現は、人工気象室への搬入後に増加し 14 日目に最大となった。‘セイローザ’の UCZ 区および UCZ + GA 区では *CmAFL1* の発現は無処理区に比べ 1 週間遅れて最大と

なった。系統 94-4008 の *CmAFL1* の発現は、UCZ + GA 区では無処理区に比べ 1 週間、UCZ 区では 2 週間遅れてそれぞれ最大となった。両品種において UCZ 区および UCZ + GA 区では *CmAFL1* の発現増加は遅延したものの、無処理と同程度の発現レベルにまで増加した。したがって、*CmAFL1* の発現増加には低温遭遇と短日条件が必要であるが、ジベレリンによる影響は小さいことが示された。

総合考察

キクはわが国の花き産業において最も重要な花きである。これまで、日長および温度に対する生育反応について数多くの検討がなされ、得られた知見を活用して、電照による開花調節および挿し穂や苗への低温処理による茎伸長・開花促進といった生育開花制御技術が開発されてきた。また、植物ホルモンが生育に及ぼす影響についても検討がなされ、GA₃ およびエチレン発生剤であるエセフォンが、植物生長調整剤として営利生産において利用されている。エセフォンは花芽分化および茎伸長を抑制し (Cockshull and Horridge, 1978; Kher et al., 1974)、営利生産では主に花芽分化抑制による開花調節を目的として用いられるが、その効果は不安定であることが報告されている (小西ら, 1985; 坂本・土屋, 2007)。第 1 章では、エセフォンの効果を変動させる要因として温度に注目し、異なる生育温度条件下および異なる温度に遭遇した株において、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応の解析を行った。生育温度が低い条件下では、エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制が顕著になった。このことは、低温下では花芽分化および茎伸長が抑制されることに加え、エセフォン処理後長期間にわたりエチレンが発生し、エチレンによる花芽分化および茎伸長の抑制効果が持続したためと考えられる。また、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応には季節変動がみられた。キクの生育は季節的な変化を示し、株が 3 週間以上低温に遭遇することによって花芽分化および茎伸長が促進されるが (Schwabe, 1950)、株が夏季に長期間にわたり高温に遭遇した後に 15°C 以下の涼温条件下におかれると著しく茎伸長が低下し、花芽分化が抑制される (小西, 1980; Schwabe, 1955)。Vegis (1964) は多年生植物における生育の季節変化を、花芽分化能力および茎伸長能力を用いて説明している。すなわち、花芽分化能力および茎伸長能力が高いときには生育可能な温度範囲が広く、逆にそれらが低

いときには生育可能な温度範囲が狭まる。これをキクに当てはめると、夏季に長期間高温に遭遇することによって花芽分化能力および茎伸長能力が低下し、涼温条件下では花芽分化が抑制され茎伸長が著しく低下する、と説明できる。第1章第1節では3品種を用いて、高温に遭遇した後の株では高温に遭遇する前の株にくらべて、同じ生育温度条件下でも花芽分化および茎伸長が抑制され、株の花芽分化能力および茎伸長能力が低下することが確認された。このような花芽分化能力および茎伸長能力の季節変動もエセフォンに対する反応に影響し、高温に遭遇して花芽分化能力および茎伸長能力が低下した株では、エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制が顕著になることが明らかになった。さらに、高温に遭遇した株での花芽分化能力および茎伸長能力の低下には品種間差がみられ、それらの低下が顕著である‘あずま’では、エセフォンによって花芽分化および茎伸長が他の品種にくらべ強く抑制され、ロゼットを形成し花芽分化ができない状態になった。したがって、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応は、株の花芽分化能力および茎伸長能力の変動に連動することが示された。これらの知見より、エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制は品種によって大きく変動し、また同じ品種であっても、生育温度が低い条件下や株が高温に遭遇した後は顕著になることを、営利生産においては留意する必要があると考えられる。

第1章ではまた、キクの休眠時に特徴的にみられるロゼットを形成し花芽分化ができない状態が、エセフォンによって誘導されることを示した。これは、キクの休眠誘導にエチレンが関与していることを示唆している。すなわち、株が高温に遭遇した後、涼温条件下におかれることによって休眠が誘導されるが、温度刺激の感受から花芽分化および茎伸長の抑制が誘導されるまでには、エチレンを介した情報伝達系が関与していると推察される。第2章では、‘セイマリン’に変異エチレンレセプター遺伝子を導入することによって作出された遺伝子組換えキク(Narumi et al., 2005a)を利用し、この仮説を検証した。エチレンに対する葉の黄化反応を利用して遺伝子組換え体のエチレン感受性を評価したところ、遺伝子組換えキクにおけるエチレン感受性の低下が確認された。これら遺伝子組換えキク系統では導入した変異エチレンレセプター遺伝子が発現していることが確認され、また内在エチレンレセプター遺伝子の発現が‘セイマリン’にくらべ増加していた。エチレンレセプターはネガティブレギュレーターとして機能する(Hua and Meyerowitz,

1998)ため、遺伝子組換えキク系統では導入した変異エチレンレセプター遺伝子の発現に加え、内在エチレンレセプター遺伝子の発現増加によってエチレンレセプタータンパクが増加し、活性状態にあるエチレンレセプターの割合が増加することも、エチレン感受性の低下を引き起こす原因であると推察された。これらのエチレン低感受性遺伝子組換えキク系統における花芽分化および茎伸長を、生育温度が異なる条件下で調査し、花芽分化および茎伸長における温度応答反応を評価した。‘セイマリン’では、生育温度の低下とともに花芽分化および茎伸長が抑制され、15℃ではロゼットを形成して花芽分化が不能となり、休眠状態となった。一方、エチレン低感受性遺伝子組換えキク系統では、15℃条件下においても茎伸長および花芽分化がみられ、休眠は誘導されなかった。エチレンはジャガイモのマイクロチューバーの休眠(Suttle, 1998)およびヨーロッパシラカバの休眠芽形成を促進する(Ruonala et al., 2006)ことが明らかになっている。本研究の結果より、キクにおける温度による休眠誘導には、エチレンを介した情報伝達系が関与していることが示された。キクの休眠時にみられるロゼットは木本植物における休眠芽の形成と同様に、茎頂分裂組織を冬季の低温から保護し、春に生長を再開するための環境適応反応である。したがって、多年生植物であるキクの休眠と生長を繰り返す生活環において、エチレンは重要な役割を果たしていると考えられる。

夏季に長期間高温に遭遇した後に、涼温条件下で茎伸長が低下し不開花となった株は、低温に遭遇することによって再び茎伸長し花芽分化できる状態になる(Schwabe, 1950)。すなわち、高温遭遇によって花芽分化および茎伸長に低温要求を持つようになる。これまで、多くの植物において茎伸長や花芽分化における低温要求性が示されている。それらの植物の中には、低温遭遇後にジベレリン生合成あるいは花芽分化や茎伸長におけるジベレリンに対する反応性が増すものがあることから、低温遭遇後の花芽分化および茎伸長の促進におけるジベレリンの関与が指摘されている(Hanks, 1982; Hazebroek et al., 1993; Hisamatsu et al., 2004; Hisamatsu and Koshioka, 2000; Metzger, 1985; Nakayama et al., 1995; Nishijima et al., 1997; Nishijima et al., 1998; Zanewich and Rood, 1995)。キクにおいても、ジベレリン処理は低温遭遇の代替となり、花芽分化を誘導することから(Harada and Nitsch, 1959)、キクの花芽分化にもジベレリンが強く関与していると考えられる。第3章では、花芽分化における低温要求性の異なる品種を実験に供試し、キクの

生育におけるジベレリンの役割を低温要求性と関連づけて検討した。茎伸長はジベレリン生合成阻害剤ユニコナゾールにより完全に抑制された。その抑制は GA_3 処理により回復し、 GA_3 処理量が増加するにつれ茎伸長は大きくなった。これは、キクの茎伸長がジベレリンに強く依存していることを示している。また、これまで低温遭遇後には株の内生ジベレリンレベルが増加することが示されている (Tompsett and Schwabe, 1974) が、本研究では、低温に遭遇した株では茎伸長における GA_3 に対する反応性も増加することが明らかになった。したがって、低温に遭遇した株では、ジベレリン生合成およびジベレリンに対する反応性が高まることによって、茎が急激に伸長すると考えられる。花芽分化に関して低温要求性を持たない‘セイローザ’は、花芽分化および花芽形成遺伝子 *CmFL* の発現増加にジベレリン要求性を示さなかったが、低温要求性の系統 94-4008 は、それら両方にジベレリン要求性を示した。よって、花芽分化におけるジベレリン要求性は低温要求性と強く関連しており、シロイヌナズナ (Blázquez et al., 1998) と同様に、キクにおいてもジベレリンは *CmFL* の発現を増加させることにより花芽分化を促進することが明らかになった。これらの結果より、秋に茎伸長が低下し不開花となった株が、冬の低温に遭遇することで低温要求が満たされ、花芽分化および茎伸長が可能な状態になる際には、ジベレリンが重要な役割を果たしていると推察される。

周年施設生産用のキク品種には、高温に遭遇しても株の花芽分化能力および茎伸長能力が低下せず、秋から春にかけての低温期に安定して伸長し開花する形質が求められる。わが国ではこのような品種を育種するために、交雑により得られた実生を露地栽培し自然開花させ、花や茎葉の形質で一次選抜した後、営利栽培と同様の栽培施設環境下で周年試作することによって、高温に遭遇した後の涼温条件下でも茎伸長が低下せず開花も遅延しない系統が選抜される (谷川ら, 2006)。しかし、この選抜には多大な時間と労力を必要とする。第1章では、高温に遭遇した後に株の花芽分化能力および茎伸長能力が顕著に低下する‘あずま’および系統 94-4008 で、エセフォンによって花芽分化および茎伸長が顕著に抑制された一方、高温遭遇後でも茎伸長が低下せず開花が遅延しなかった‘新みどり’では、エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制はわずかであった。これらのことより、高温に遭遇した後、涼温条件下で花芽分化が抑制され茎伸長が顕著に低下する品種では、エセフォンによって花芽分化および茎伸長が強く抑制されることが示唆さ

れた。このことは、言い換えれば、選抜においてエセフォンを利用し、エセフォンによって花芽分化および茎伸長が強く抑制される系統を除外することによって、低温期においても茎伸長が低下しにくく、また開花が遅延しにくい系統を効率的に選抜できる可能性を示している。さらに、第2章では遺伝子組換えによってエチレン感受性を低下させることで、キク切り花の品質低下の大きな要因である葉の黄化を抑制する (Narumi et al., 2005a) だけではなく、低休眠性を付与することが可能であり、低温条件下でも茎伸長し開花するいわゆる「低ロゼット性」品種の作出に繋がること明らかになった。

キクの低温要求を満たすために有効に作用する温度は、 10°C 以下であるとされている (Schwabe, 1950)。通常、キクの周年生産施設内の最低気温は 12°C 以上に保たれ、 10°C を下回らない。このような環境下では、茎伸長や開花に低温要求性を持つ品種は、低温要求が満たされず伸長・開花しない。このため、第3章で示した‘セイローザ’や‘ナガノクイン’のように、茎伸長や開花に低温要求を示さない品種が求められる。第3章の結果より、花芽分化における低温要求性はジベレリン要求性と強く関連していることから、ユニコナゾールなどのジベレリン生合成阻害剤を選抜において利用して、それらによって花芽分化が強く抑制される系統を除外することで、低温要求性を持たない品種を効率的に選抜できる可能性がある。

本報告では、キクの生育反応における植物ホルモンの影響を解析し、エチレンは高温遭遇後の涼温により誘導される休眠と密接な関係があること、およびジベレリンは低温遭遇による花芽分化および茎伸長の促進と密接な関係にあることが明らかになった。このことは、温度刺激の感受から休眠や低温反応を制御する遺伝子の発現に至る過程は、これらの植物ホルモンにより制御されていることを示しており、多年生植物であるキクの生育特性の生理的メカニズムの分子生物学的解析に繋がるものである。また、これらの知見を有効に活用することは、新たな生育制御技術の開発および有用品種の育成に役立つものと期待される。

摘 要

植物ホルモンであるエチレンは、キクにおいて花芽分化および茎伸長を抑制する。エチレン発生剤エセフォンも同様の作用を及ぼす。エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制程度は、品種および散布時期によって変

動することから、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応は、環境要因や株の内的要因によって変動すると考えられる。ここでは、その環境要因として生育温度、また株の内的要因として、低温および高温に遭遇することによって変動する花芽分化能力および茎伸長能力に着目し、それらがエセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応に及ぼす影響を明らかにしようとした。生育温度が低い条件下では、株の花芽分化および茎伸長が抑制されることに加えて、エセフォン処理後のエチレン発生が長期間続くため、エセフォン処理による花芽分化および茎伸長の抑制は顕著になった。また、高温遭遇後の花芽分化能力および茎伸長能力が低下した株では、エセフォン処理による花芽分化および茎伸長の抑制が顕著になった。次に、9品種を用いてエセフォンに対する反応の品種間差を調査し、それらと花芽分化能力および茎伸長能力との関連を検討した。多くの品種では、エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制は一時的であったが、環境変化に鋭敏に反応し、高温に遭遇した後に花芽分化能力および茎伸長能力が著しく低下する品種では、エセフォンによる花芽分化および茎伸長の抑制が強く現れた。そのような品種では、エセフォン処理によって茎伸長が著しく低下してロゼットを形成し花芽分化が不能となり、休眠状態を示した。以上のことより、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応は、生育温度、株の花芽分化能力および茎伸長能力により変動することが明らかになり、また、花芽分化能力および茎伸長能力が変動しやすい品種では、エセフォンに対する花芽分化および茎伸長における反応が強く現れることが示唆された。

多年生草本植物であるキクの生長と休眠を繰り返す生活環において、温度は重要な役割を果たしており、株が長期間夏季の高温に遭遇した後、15℃以下の涼温条件下におかれると、ロゼットを形成して花芽分化ができない状態になる。これはキクにおける休眠現象であり、エセフォンおよびACCを用いた外生エチレン処理によっても誘導される。すなわち、温度によって誘導されるキクの休眠には、エチレンが関与している可能性がある。‘秀芳の力’では、高温遭遇後の涼温条件下で誘導される花芽分化および茎伸長の抑制は、株にエチレン作用阻害剤STSを継続的に処理することによって軽減され、キクにおいてエチレン作用阻害剤が休眠を抑制する可能性が示唆された。次に、変異エチレンレセプター遺伝子を導入した遺伝子組換えキクを実験に用い、キクの休眠におけるエチレンの関与を調査した。野生型株がエチレンに反

応して葉の黄化を示すのに対し、遺伝子組換えキクではエチレン気浴処理後も葉が黄化せず、エチレン感受性が低下していた。野生型株およびエチレン低感受性遺伝子組換えキク系統は、花芽分化および茎伸長において異なる温度反応を示した。生育温度20℃では、両者の花芽分化および茎伸長に差はみられなかったが、生育温度の低下によって野生型株ではロゼットを形成して花芽分化ができない休眠状態となったのに対し、エチレン低感受性遺伝子組換えキク数系統は、花芽分化し茎伸長した。よって、キクの温度による休眠誘導には、エチレンを介した情報伝達が関与していることが明らかにされた。また、野生型株では高濃度のエセフォン処理によって休眠状態になるが、エチレン低感受性遺伝子組換えキク系統では休眠状態は誘導されなかった。このことから、キクの休眠がエチレンを介した情報伝達によって誘導されることが示された。

植物ホルモンであるジベレリンは長日植物において花芽分化を誘導し、また花芽分化に低温要求性の植物では低温の一部代替となる。短日植物のキクにおいてもジベレリンおよび低温が栄養生長から生殖生長への移行を促進することが知られている。4品種の花芽分化における低温およびジベレリン要求について調査し、品種間差を見いだした。すなわち、花芽分化において低温を必要としない品種ではジベレリンも必要とせず、逆に、低温を必要とする品種では同時にジベレリンも必要であった。キクにおける*APETALA1/FRUITFULL* 相同遺伝子である*CmAFL1*の短日条件下での発現増加におけるジベレリンの影響は小さかった。一方、シロイヌナズナの花芽形成遺伝子*LEAFY*と同様に、低温要求性のキク品種では*FLORICAULA/LEAFY* 相同遺伝子である*CmFL*の発現増加にジベレリンが必要であった。したがって、栄養生長から生殖生長への移行および*CmFL*の発現増加におけるジベレリン要求は、低温要求と強い関連があると考えられた。

謝 辞

本論文のとりまとめに際し、終始懇切なご助言とご教示を賜った京都大学大学院農学研究科教授水澤 進博士、助教片岡圭子博士に厚く御礼申し上げる。また、本研究の遂行からとりまとめに至るまで、直接ご指導とご鞭撻を賜った独立行政法人農業・食品産業技術研究機構花き研究所久松 完博士、柴田道夫博士（現在農林水産省農林水産技術会議事務局）に深く感謝の意を表する。

研究の遂行にあたりご指導、ご協力を賜った福岡県農業総合試験場國武利浩研究員、香川大学農学部助教鳴海貴子博士、京都府立大学大学院教授佐藤茂博士、天津农学院李托平博士、豪州連邦科学産業研究機構 Rod W. King 博士、花き研究所小野崎隆博士、道園美弦主任研究員に心より厚く御礼申し上げます。また、研究の遂行にあたりご協力頂いた花き研究所職員各位に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Abeles, F. B., P. W. Morgan and M. E. Saltveit. 1992. Ethylene in plant biology, 2nd ed. Academic Press, San Diego.
- Achard, P., M. Baghour, A. Chapple, P. Hedden, D. V. D. Straeten, P. Genschik, T. Moritz and N. P. Harberd. 2007. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 6484–6489.
- Aida, R., T. Narumi, N. Ohtsubo, H. Yamaguchi, K. Kato, A. Shinmyo and M. Shibata. 2008. Improved translation efficiency in chrysanthemum and torenia with a translational enhancer derived from the tobacco *alcohol dehydrogenase* gene. *Plant Biotech.* 25: 69–75.
- Bathey, N. H. 2000. Aspects of seasonality. *J. Exp. Bot.* 51: 1769–1780.
- Biddle, E., D. G. S. Kerfoot, Y. H. Kho and K. E. Russell. 1976. Kinetic studies of the thermal decomposition of 2-chloroethylphosphonic acid in aqueous solution. *Plant Physiol.* 58: 700–702.
- Blázquez, M. A., R. Green, O. Nilsson, M. R. Sussman and D. Weigel. 1998. Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* 10: 791–800.
- Böhlenius, H., T. Huang, L. Charbonnel-Campaa, A. M. Brunner, S. Jansson, S. H. Strauss and O. Nilsson. 2006. *CO/FT* regulatory module controls timing of flowering and seasonal growth cessation in trees. *Science* 312: 1040–1043.
- Chang, C., S. F. Kwok, A. B. Bleeker and E. M. Meyerowitz. 1993. *Arabidopsis* ethylene response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539–544.
- Cockram, J., H. Jones, F. J. Leigh, D. O'Sullivan, W. Powell, D. A. Laurie and A. J. Greenland. 2007. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication, and sustainable productivity. *J. Exp. Bot.* 58: 1231–1244.
- Cockshull, K. E. 1976. Flower and leaf initiation by *Chrysanthemum morifolium* Ramat. in long days. *J. Hort. Sci.* 51: 441–450.
- Cockshull, K. E. and J. S. Horridge. 1978. 2-Chloroethylphosphonic acid and flower initiation by *Chrysanthemum morifolium* Ramat. in short days and in long days. *J. Hort. Sci.* 53: 85–90.
- Coen, E. S., J. M. Romero, S. Doyle, R. Elliott, G. Murphy and R. Carpenter. 1990. *floricaula*: A homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311–1322.
- Dennis, E. S. and W. J. Peacock. 2007. Epigenetic regulation of flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 520–527.
- Doi, M., Y. Nakagawa, S. Watabe, K. Aoe, K. Inamoto and H. Imanishi. 2003. Ethylene-induced leaf yellowing in cut chrysanthemums (*Dendranthema grandiflora* Kitamura). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 72: 533–535.
- Doi, M., S. Watabe, K. Aoe, K. Inamoto and H. Imanishi. 2004. Leaf yellowing of cut chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Kitamura) 'Shuho-no-chikara' induced by ethylene and the postharvest increase in ethylene sensitivity. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73: 229–234.
- Duffet, W. E. 1957. The impact of year round flowering on commercial chrysanthemum breeding. p. 68–72. In: E. L. Scott (ed.). *The Breeder's Handbook*. The National Chrysanthemum Soc. Inc., Bogota.
- Ferrándiz, C., Q. Gu, R. Martienssen and M. F. Yanofsky. 2000. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* 127: 725–734.
- 福田正夫・西尾譲一. 1984. 夏ギク「精雲」の7～9月開花技術の確立. 愛知農総試研報. 16: 178–182.
- 福田正夫・西尾譲一. 1985. 秋ギク電照栽培における花成誘導期の日長操作が生育開花に及ぼす影響. 愛知農総試研報. 17: 227–232.
- Hanks, G. R. 1982. The response of tulips to gibberellins following different durations of cold storage. *J. Hort. Sci.* 57: 109–119.
- Harada, H. and J. P. Nitsch. 1959. Flower induction in Japanese chrysanthemums with gibberellic acid. *Science* 129: 777–778.
- Hazebroek, J. P., J. D. Metzger and E. R. Mansager. 1993. Thermoinductive regulation of gibberellin metabolism in *Thlaspi arvense* L. (II. Cold induction of enzymes in gibberellin biosynthesis). *Plant Physiol.* 102: 547–552.
- 樋口春三・原幹博. 1974. 秋ギク幼苗の低温処理が生育、開花に及ぼす影響. 愛知農総試研報 B. 6: 62–67.

- Hisamatsu, T. and M. Koshioka. 2000. Cold treatments enhance responsiveness to gibberellin in stock (*Matthiola incana* (L.) R. Br.). *J. Hort. Sci. Biotech.* 75: 672–678.
- 久松 完・西島隆明・腰岡政二・柴田道夫. 2002. キクの節間伸長および花芽分化能力の時期別変動. *園学雑.* 71 (別2): 431.
- Hisamatsu, T., M. Koshioka and L. N. Mander. 2004. Regulation of gibberellin biosynthesis and stem elongation by low temperature in *Eustoma grandiflorum*. *J. Hort. Sci. Biotech.* 79: 354–359.
- Hisamatsu, T., K. Sumitomo and H. Shimizu. 2008. End-of-day far-red treatment enhances responsiveness to gibberellins and promotes stem extension in chrysanthemum. *J. Hort. Sci. Biotech.* 83: 695–700.
- Horvath, D. P., J. V. Anderson, W. S. Chao and M. E. Foley. 2003. Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* 8: 534–540.
- Hua, J. and E. M. Meyerowitz. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 261–271.
- Jacobsen, S. E. and N. E. Olszewski. 1993. Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 5: 887–896.
- 神谷勇治. 1991. ジベレリン. p. 63–81. 高橋信孝・増田芳雄共編. 植物ホルモンハンドブック (上). 培風館. 東京.
- Kawata, J. and T. Toyoda. 1982. The responses to photoperiod and temperature in Japanese July to September flowering chrysanthemums. *Acta Hort.* 125: 93–99.
- 川田穰一・豊田 努・宇田昌義・沖村 誠・柴田道夫・亀野 貞・天野正之・中村幸男・松田健雄. 1987. キクの開花期を支配する要因. *野菜茶試研報.* A1: 182–222.
- Kher, M. A., M. Yokoi and K. Kosugi. 1974. Effect of Ethrel on the growth and flower formation in pot chrysanthemums. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 43: 91–96.
- King, R. W. and L. T. Evans. 2003. Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the “florigen” black box. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 307–328.
- King, R. W., T. Moritz, L. T. Evans, J. Martin, C. H. Andersen, C. Blundell, I. Kardailsky and P. M. Chandler. 2006. Regulation of flowering in the long-day grass *Lolium temulentum* by gibberellins and the *FLOWERING LOCUS T* gene. *Plant Physiol.* 141: 498–507.
- Kohl, H. C. and A. M. Kofranek. 1957. Gibberellin on flower crops. *Calif. Agr.* 11(5): 9.
- 小西国義. 1970. 切り花および鉢花の開花調節. p.257–275. 塚本洋太郎編著. 最新園芸技術 (7) 園芸植物の開花調節. 誠文堂新光社. 東京.
- 小西国義. 1975. さし芽苗の低温処理によるキクのロゼット化防止. *園学雑.* 44: 286–293.
- 小西国義. 1980. キクのロゼット化に関する研究. *園学雑.* 49: 107–113.
- 小西国義・梶原真二・景山詳弘. 1985. エセフォン処理によるキクのロゼット化誘導. *園学雑.* 54: 87–93.
- Koorneef, M., A. Elgersma, C. J. Hanhart, E. P. Van Loenen-Martinet, L. Van Rijn and J. A. D. Zeevaart. 1985. A gibberellin insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 65: 33–39.
- Lang, A. 1957. The effect of gibberellin upon flower formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43: 709–717.
- Li, T., T. Niki, T. Nishijima, M. Douzono, M. Koshioka and T. Hisamatsu. 2009. Role of *CmFL*, *CmAFL1*, and *CmSOC1* in the transition from vegetative to reproductive growth in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. *J. Hort. Sci. Biotech.* 84: 447–453.
- Ma, Y-P, X-H. Fang, F. Chen and S-L. Dai. 2008. *DFL*, a *FLORICAULA/LEAFY* homologue gene from *Dendranthema lavandulifolium* is expressed both in the vegetative and reproductive tissues. *Plant Cell Rep.* 27: 647–654.
- Metzger, J. D. 1985. Role of gibberellins in the environment control of stem growth in *Thlaspi arvense* L. *Plant Physiol.* 78: 8–13.
- Michaels, S. D. and R.M. Amasino. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell* 11: 949–956.
- Nakayama, M., H. Yamane, H. Nojiri, T. Yokota, I. Yamaguchi, N. Murofushi, N. Takahashi, T. Nishijima, M. Koshioka, N. Katsura and M. Nonaka. 1995. Qualitative and quantitative analysis of endogenous gibberellins in *Raphanus sativus* L. during cold treatment and the subsequent growth. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 1121–1125.
- Narumi, T., R. Aida, A. Ohmiya and S. Satoh. 2005a. Transformation of chrysanthemum with mutated ethylene receptor genes: *mDG-ERS1* transgenes conferring reduced ethylene sensitivity and characterization of the transformants. *Postharvest Biol. Technol.* 37: 101–110.
- Narumi, T., Y. Kanno, M. Suzuki, S. Kishimoto, A. Ohmiya and S. Satoh. 2005b. Cloning of a cDNA encoding an ethylene receptor (DG-ERS1) from chrysanthemum and comparison of its mRNA level in ethylene-sensitive and -insensitive

- cultivars. *Postharvest Biol. Technol.* 36: 21–30.
- Nishijima, T., N. Katsura, M. Koshioka, H. Yamazaki and L. N. Mander. 1997. Effects of uniconazole and GA₃ on cold-induced stem elongation and flowering of *Raphanus sativus* L. *Plant Growth Regul.* 21: 207–214.
- Nishijima, T., N. Katsura, M. Koshioka, H. Yamazaki, M. Nakayama, H. Yamane, I. Yamaguchi, T. Yokota, N. Murofushi, N. Takahashi, M. Nonaka and L. N. Mander. 1998. Role of endogenous gibberellins in cold-induced stem elongation and flowering of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67: 319–324.
- 農林水産省統計部. 2008. 平成 18 年産花き流通統計調査報告. p. 8.
- 大石一史・大須賀源芳・米村浩次. 1984. 電照栽培秋ギクの夏期長期冷蔵による親株育成 (第 1 報). 夏期の親株育成温度と生育開花. *愛知農総試研報.* 16: 162–172.
- 岡田正順. 1959. キクの吸枝のロゼット化及びその打破について. *園学雑.* 29: 209–220.
- Olien, C. W. and M. J. Bukobac. 1978. The effect of temperature on rate of ethylene evolution from ethephon and from ethephon-treated leaves of sour cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103: 199–202.
- Olsen, J. E., O. Junttila, J. Nilsen, M. E. Eriksson, I. Martinussen, O. Olsson, G. Sandberg and T. Moritz. 1997. Ectopic expression of oat phytochrome A in hybrid aspen changes critical daylength for growth and prevents cold acclimatization. *Plant J.* 12: 1339–1350.
- Pharis, R. P. and R. W. King. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 517–568.
- Poesch, G. H. 1931. Studies of photoperiodism of the chrysanthemum. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 28: 389–392.
- Poesch, G. H. 1932. Further studies of photoperiodism of the chrysanthemum. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 29: 540–543.
- Poesch, G. H. 1936. Prolonging the flowering period of chrysanthemums with the use of supplementary illumination. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 34: 624–626.
- Post, K. 1931. Reducing the daylength of chrysanthemums for the production of early blooms by the use of black sateen cloth. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 28: 382–388.
- Post, K. 1934. Production of early blooms of chrysanthemums by the use of black cloth to reduce the length of day. *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Bull.* 594: 3–30.
- Rademacher, W. 2000. Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 501–531.
- Ruonala, R., P. L. H. Rinne, M. Baghour, T. Moritz, H. Tuominen and J. Kangasjärvi. 2006. Transitions in the functioning of the shoot apical meristem in birch (*Betula pendula*) involve ethylene. *Plant J.* 46: 628–640.
- 坂本 浩・土屋孝夫. 2007. エセフォン処理が無側枝性ギク品種の開花に及ぼす影響. *園学研.* 6: 411–416.
- Schwabe, W. W. 1950. Factors controlling flowering of the chrysanthemum. I. The effects of photoperiod and chilling. *J. Exp. Bot.* 1: 329–343.
- Schwabe, W. W. 1955. Factors controlling flowering of the chrysanthemum. V. De-vernalization in relation to high temperature and low light intensity treatments. *J. Exp. Bot.* 6: 435–450.
- Shchennikova, A. V., O. A. Shulga, R. Immink, K. G. Skryabin and G. C. Angenent. 2004. Identification and characterization of four chrysanthemum MADS-Box genes, belonging to the *APETALA1/FRUITFULL* and *SEPALLATA3* subfamilies. *Plant Physiol.* 134: 1632–1641.
- Sheldon, C. C., D. T. Rouse, E. J. Finnegan, W. J. Peacock and E. S. Dennis. 2000. The molecular basis of vernalization: The central role of *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3753–3758.
- 柴田道夫. 1997. 夏秋ギク型スプレーギクの温度・日長反応と育種に関する研究. *野菜茶試研報.* 12: 1–71.
- Sønsteby, A. and O. M. Heide. 2006. Dormancy relations and flowering of the strawberry cultivars Korona and Elsanta as influenced by photoperiod and temperature. *Sci. Hort.* 110: 57–67.
- 杉浦広幸・藤田政良. 2003. 露地栽培夏秋ギクのエセフォン処理が生育および形態に及ぼす影響. *園学研.* 2: 319–324.
- 住友克彦・道園美弦・久松 完・小野崎 隆・柴田道夫. 2007. 栽培ギク‘神馬’の冬期の栽培における消灯後の自然短日長条件下での日長延長が生育開花に及ぼす影響. *花き研報.* 7: 1–7.
- 住友克彦・道園美弦・久松 完・柴田道夫. 2008. 栽培ギク‘神馬’において夏季の高温遭遇は低温条件下での開花遅延を引き起こす. *花き研報.* 8: 1–7.
- Suttle, J. C. 1998. Involvement of ethylene in potato microtuber dormancy. *Plant Physiol.* 118: 843–848.
- 谷川奈津・小野崎 隆・池田 広・柴田道夫. 2006. スプレーギクとイソギクとの種間交雑による純白で茎伸長性に優れた小輪ギク品種‘キクつくば 1 号’の育成経過とその特性. *花き研報.* 5: 17–31.

- 谷川孝弘. 2000. スプレーギクのエセフォン利用技術. 農耕と園芸. 55(3): 130–133.
- Tjia, B. O. S., M. N. Rogers and D. E. Hartley. 1969. Effects of ethylene on morphology and flowering of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 94: 35–39.
- Tompsett, P. B. and W. W. Schwabe. 1974. Growth hormone changes in *chrysanthemum moliforium*. Effects of environmental factors controlling flowering. Ann. Bot. 38: 269–285.
- Trevaskis, B., D. J. Bagnall, M. H. Ellis, W. J. Peacock and E. S. Dennis. 2003. MADS box genes control vernalization-induced flowering in cereals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 13099–13104.
- Vegis, A. 1964. Dormancy in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 15: 185–224.
- Warner, H. L. and A. C. Leopold. 1969. Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. Plant Physiol. 44: 156–158.
- Weigel, D., J. Alvarez, D. R. Smyth, M. F. Yanofsky and E. M. Meyerowitz. 1992. *LEAFY* controls floral meristem identity in Arabidopsis. Cell 69: 843–859.
- Wilkinson, J. Q., M. B. Lanahan, H-C. Yen, J. J. Giovannoni and H. J. Klee. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. Science 270: 1807–1809.
- Wilson, R. N., J. W. Heckman and C. R. Somerville. 1992. Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. Plant Physiol. 100: 403–408.
- Yang, S. F. and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 35: 155–189.
- Zanewich, K. P. and S. B. Rood. 1995. Vernalization and gibberellin physiology of winter canola. Endogenous gibberellin (GA) content and metabolism of [³H]GA₁ and [³H]GA₂₀. Plant Physiol. 108: 615–621.
- Zheng, C., G. Jin, H. Ohno, T. Hara and S. Matsui. 2004. Ethylene production and endogenous gibberellin content in chrysanthemum plants as affected by uniconazole, blushing and aminoethoxyvinylglycine treatments. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 73: 568–573.