

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07616

研究課題名(和文) 二年生植物の開花を自在に操るための分子基盤の構築

研究課題名(英文) Molecular Basis for Controlling Flowering in Biennial Plants

研究代表者

黒田 洋輔 (KURODA, Yosuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・上級研究員

研究者番号：40595071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：花を咲かせるタイミングの操作は、作物の生産量や品質や育種効率を向上させるために極めて重要な育種学的課題である。本研究では、二年生のテンサイをモデルとして開花の分子基盤の構築を試みた。まず、「開花の抑制」の実験では、検出されたQTLの一つが一年生と二年生のマスター遺伝子であるBvBTC1座のエクソン内のSNP変異に起因すること、1箇所のSNPで育種形質の改良が可能であることが明らかになった。次いで、「開花の促進」の実験では、1年以上から4ヶ月程度にまで採種期間が短縮される(開花促進に)大きな効果を持ったQTLを見出し、QTL近傍には数種類の既報の開花関連遺伝子が含まれることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国産の主要な砂糖原料である北海道のテンサイは、二年生の生活環を持ち、原料栽培期間である春から秋にかけて多量のショ糖を根に蓄積するが、原料栽培期間中に成長相が転換して抽苔(当年抽苔)が発生する問題がある。「開花の抑制」は、当年抽苔の抑制に貢献する。

テンサイは、屋外では収穫まで栄養成長を続けることで高い収量を確保できるが、品種開発に欠かせない種子生産(開花の誘導)には長期間(半年程度)の春化处理期間が必要であり、種子生産に必要な期間が長期間に及ぶことで、品種開発の年限も長期化する問題がある。「開花の促進」は、品種開発の年限の短縮化に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Manipulating the timing of flowering is an extremely important breeding subject to improve crop production, quality, and breeding efficiency. In this study, we attempted to establish the molecular basis of flowering using sugar beet as a model. First, in experiments aimed at "suppression of flowering," we verified that one of the QTLs detected was due to a SNP mutation in an exon at the BvBTC1 locus, the master gene for annual and biennial plants, and that breeding traits could be improved at this locus. Next, in an experiment to "promote flowering," we found a QTL that had a significant effect in shortening the seed production from more than one year to about four months (promoting flowering), and confirmed that several previously reported flowering-related genes were included in the vicinity of the QTL.

研究分野：植物育種学

キーワード：開花 QTL DNAマーカー選抜 二年生 テンサイ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 花を咲かせるタイミングを操作することは、農作物の生産量・品質を向上させたり、その育種効率を高めたりする上で極めて重要な育種学的課題である。テンサイ、ニンジン、タマネギ、キャベツなどの二年生植物は、根、茎や葉を食用とするため、生産畑(屋外)では花を咲かせてはならない。一方、長期間を要する品種開発を加速させるには、短期間で花を咲かせることが重要である。

(2) 二年生植物は生育1年目に栄養成長を行い、越冬後の生育2年目に生殖成長して2年間の生活環を終える。この二年生を決定づける特徴は、開花の誘導に「ある一定期間の低温を絶対要求(質的低温要求)する」ことである。さらに、開花の誘導に必要な低温期間には系統差(量的低温要求)も見られる。質的かつ量的な低温要求性の制御が、二年生の開花を自在に操る上で最も重要な鍵を握っている。

(3) テンサイは、ニンジン、レタス、セロリ、パセリ、カラシナ、ハウレンソウ、タマネギなどと共に二年生の作物であるが、近年、全ゲノム情報が公開(Dorm *et al.* 2014, *Nature*)されるなど、分子生物学的な基盤が整備されている。これまでに *BvFT* (Pin *et al.* 2010, *Science*), *BvBTC1* (Pin *et al.* 2012, *Curr. Biol.*), *BvFLI* (Reeves *et al.* 2007, *Genetics*) などの低温要求性に関与する遺伝子が単離されている。しかし、これまでに二年生植物の開花を自在に操ることができるような、低温要求性の分子機構はほとんど明らかになっていない。

(4) 申請者が在籍する北海道農業研究センターでは、テンサイの育種を実施しており、世界有数の遺伝資源を保存している。申請者は、その中から、量的低温要求性かつ質的低温要求性の観点から、開花を自在に操るために有用な変異を見出し、解析集団を養成した。

### 2. 研究の目的

本研究は、二年生植物の開花のタイミングが「質的かつ量的な低温要求性に依存する」ことに着目し、テンサイで発見されたユニークな低温要求性の変異系統を用い、全ゲノム情報を活用した解析を通じて、二年生植物の開花を自在に操る。

### 3. 研究の方法

- (1) 屋外栽培で花が咲かない「量的低温要求性」に関与する塩基多型を探索する。
- (2) 超短期間で花が咲く「BLOND の特性(質的低温要求性)」に関与する塩基多型を探索する。
- (3) 上記の「1~2」で明らかにされる塩基多型の情報から関与遺伝子の単離等により、二年生の開花を自在に操るための分子基盤を構築する。

### 4. 研究成果

(1) 国産の主要な砂糖原料である北海道のテンサイは、二年生の生活環を持ち、原料栽培期間である春から秋にかけて多量のショ糖を根に蓄積するが、原料栽培期間中に成長相が転換して抽苔(当年抽苔)が発生する問題がある。これまでにそのメカニズムを解明するために、一年生と二年生のマスター遺伝子である *BvBTC1* のハプロタイプ (Pin *et al.* 2012) に着目して研究を進めた結果、多数のテンサイ系統の抽苔発生程度と遺伝子型には関連があることを見出した。そこで、申請者は、ハプロタイプが異なる系統を両親とした分離系統を育成し、複数年の抽苔調査を行って、その現象を分離世代で検証した。具体的には、抽苔耐性の NK-219mm-O (遺伝子型 'aa') と抽苔易性の NK-323mm-O (遺伝子型 'gg') の交雑に由来する F3 系統群 (2015 年-2016 年 n=95) および F6 系統群 (2017 年-2018 年 n=91) を用いた。表現型検定の結果、いずれの調査年においても、両親系統間の抽苔率には明確な相違が認められ、各世代の全系統平均では両親の中間値であったが、各系統の抽苔率には 0.0% から 100.0% までの幅広い変異が認められた。AFLP マーカー等を利用した QTL 解析の結果、いずれの調査年においても、第 2 染色体と第 6 染色体に抽苔耐性の NK-219mm-O の遺伝子型が抽苔率を低下させる効果を持った QTL が検出された。

(2) 砂糖原料である二年生のテンサイは、屋外では収穫まで栄養成長を続けることで高い収量を確保できるが、開花を誘導するには長期間の春化处理が必要である。一方、一年生のテンサイは、春化要求性がなく短期間で開花できるが(二年生に対して顕性一遺伝子支配)、高頻度で開花(抽苔)株が発生するため原料栽培には向かない。そこで、申請者は、日長反応性の違いに着目して原料栽培と世代促進が両立できる系統の探索を実施し、これまでに「屋外栽培(自然日長)では開花しない特性」と「自然日長よりも人工的に長日にすると無春化のまま開花できる特性」を併せ持つ BLOND (Bolting by longer than natural daylength) 系統を見出し、BLOND 系統が一年生系統や二年生系統とは明確に異なる開花特性をもつこと、1 年以上から 4 ヶ月程度にまで採種期間が短縮される(開花を促進させる)大きな効果を持った形質であることを明らかにした(表 1, 写真 1-

3). さらに, BLOND の開花特性に關与するゲノム領域を解明するため, 全日長条件下で開花が誘導できる BLOND 系統(NK-420mm-O)と, 開花が誘導されない通常の系統(NK-310mm-O)を両親とした雑種第三世代(F3)系統群を解析集団とした. この集団を用い, 既に開花が誘導されることが明らかな検定条件(全日長条件のガラス温室)で栽培して, 各系統の開花(抽苔)率を測定し, 2 ヶ年分の表現型の分離データを得た. 表現型検定の結果, いずれの調査年において, 両親系統間の抽苔率には明確な相違が認められ, 各世代の全系統平均では両親の中間値であったが, 各系統の抽苔率には 0.0% から 100.0% までの幅広い変異が認められた. AFLP マーカー等を利用した QTL 解析の結果, いずれの調査年においても, ある特定のゲノム領域に非常に強い効果を持った QTL が検出された.

表 1 無春化条件下での開花特性

種類	有用特性	BLOND	一年生	二年生
自然日長 (屋外)	未抽苔	○	×	○
自然日長 (屋外)	根部肥大	○	×	○
全日長 (温室)	早期開花	○	○	×

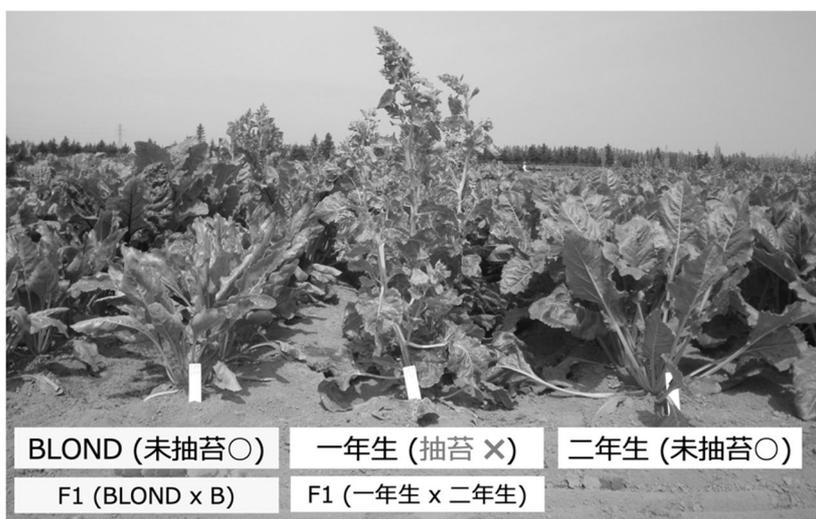


写真 1. 屋外栽培条件下での抽苔特性 (6 月下旬)

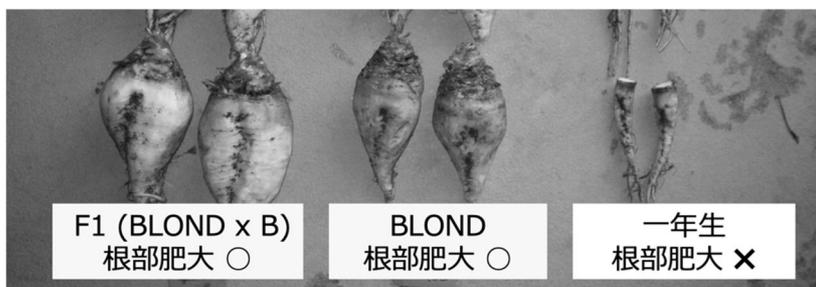


写真 2. 屋外栽培条件下での根部肥大の様子 (10 月上旬)

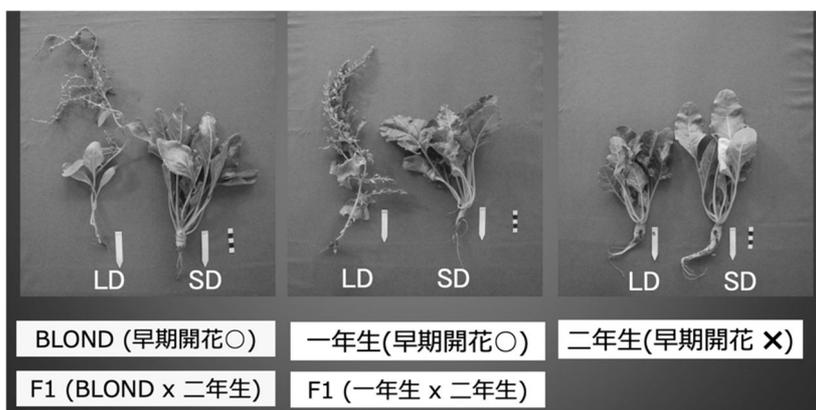


写真 3. 全日長の温室栽培条件下での開花の様子 (播種後 50 日程度であり LD は長日条件、)

(3) 屋外栽培で花が咲かない「量的低温要求性」に関与する塩基多型の探索について、(1)で明らかになった抽苔耐性に関与する 2 種類の QTL のうち、特に寄与率の高い QTL(42%-66%)は、第 2 染色体上の BvBTC1 座のエクソン領域の SNP 変異(非同義置換)に起因しており、「量的低温要求性」に関与する有用変異の一つと考えられる。そこで、SNP 変異の効果を検証するために、2 種類の細胞質雄性不稔維持系統(「NK-195BRmm-O」及び「NK-280mm-O」)について、SNP 変異(DNA マーカー)を利用して育種系統の選抜を行い、選抜後代の抽苔耐性が改良できるのか検証した。その結果、いずれの系統においても選抜前の系統には BvBTC1 座に複数種類の遺伝子型(変異)が検出され、抽苔耐性が改良された選抜系統に共通した遺伝子型('aa')が確認され、1 種類のマーカー選抜で抽苔耐性が大幅に改良できる可能性が実証された(表 2)。抽苔耐性の系統に共通の遺伝子型は、QTL 解析に用いた抽苔耐性系統(NK-219mm-O)と一致しており、解析結果に矛盾が認められなかった。

表 2 遺伝子型で選抜された後代の抽苔株率

種類	個体数	抽苔株率 (%)		
		6/17	7/15	9/19
原系統1 (NK-195BRmm-O) *1	60	38.3 <sup>cd</sup>	71.7 <sup>c</sup>	80.0 <sup>c</sup>
選抜系統1-aa	119	5.9 <sup>ab</sup>	43.7 <sup>b</sup>	62.1 <sup>c</sup>
選抜系統2-gg	179	97.8 <sup>e</sup>	98.9 <sup>f</sup>	98.9 <sup>f</sup>
原系統2 (NK-280mm-O) *2	60	86.7 <sup>f</sup>	95.0 <sup>def</sup>	98.3 <sup>ef</sup>
選抜系統2-aa *3	69	0.0 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	5.5 <sup>a</sup>
選抜系統2-oo	20	75.0 <sup>de</sup>	85.0 <sup>cde</sup>	85.0 <sup>cde</sup>
アマホマレ (“強”基準)	90	18.9 <sup>bc</sup>	32.2 <sup>b</sup>	33.3 <sup>b</sup>
モノパール (“やや強”基準)	90	56.7 <sup>d</sup>	82.2 <sup>cd</sup>	82.2 <sup>cd</sup>
モノヒカリ (“中”基準)	90	95.6 <sup>ef</sup>	96.7 <sup>ef</sup>	96.7 <sup>ef</sup>

アルファベットが異なると 5%水準で有意差(Steel-Dwass 法)

\*1 遺伝子型の種類と頻度(%): aa(65.0), ag(11.7), gg(23.3)

\*2 遺伝子型の種類と頻度(%): ag (1.7), ao (10.0), gg (1.7), oo (63.3), go (23.3)

\*3 遺伝子型 aa は、遺伝子型 ao 間の個体間交配より作成した。

超短期間で花が咲く「BLOND の特性(質的低温要求性)」に関与する塩基多型の探索について、(2)の実施により、BLOND に関与する非常に効果の強い QTL の存在が明らかになった。この QTL は、1 年以上から 4 ヶ月程度にまで採種期間が短縮される(開花を促進させる)大きな効果を持った QTL であり、世代促進に非常に有用と考えられる。そこで、QTL-seq 法で BLOND に関与するゲノム領域の絞り込みを進めた。関与ゲノム領域の推定については、F2 世代より開花が早かった 20 個体のバルク DNA(バルク A)と開花に至らなかった 20 個体のバルク DNA(バルク B)をそれぞれ等量ずつ混合して作成した。これに、解析によるノイズを除去するために、両親系統、雑種第一(F1)世代を加えて、HiSeqX による全ゲノム解析を行った(Depth x30)。全ゲノム配列を対象に、開花に関連する一塩基多型(SNP)を検出するために、基準配列のゲノム配列にアラインメントされた塩基配列のリードの中から、両バルクで異なる SNP を持つリードの割合である  $\Delta$ SNP-index(-1~1)を算出した。これにより、バルクサンプル間でアレル頻度に大きな差がある領域(SNP-index の差が大きいゲノム領域)が検出を試みた。基準配列には「EL10」と「Refbeet1.2」の 2 種類を利用した。 $\Delta$ SNP-index の絶対値が 1 に近いゲノム領域が存在した場合には、ゲノム情報のデータベース(「Refbeet1.2」)より塩基配列の情報を得て、その領域に開花に関与する遺伝子の存在を検索した。その結果、両バルクで SNP-index が異なる( $\Delta$ SNP-index の絶対値が 1 に近い)ゲノム領域を探索した結果、2 種類の基準配列に共通した  $\Delta$ SNP-index が 1.0 に近く、極めて高い 180kb のゲノム領域が特定された。さらに、QTL-seq 解析に用いた両親系統、F1、BLOND バルク、非 BLOND バルクのバリエーションに対するアノテーションと機能予測ツールを用いた解析と、両親とは別種類の様々な系統について、ゲノム変異と開花表現型とのアソシエーションの解析を実施して、BLOND に関与するゲノム領域の絞り込みを試み、開花に関連性のある数種類候補遺伝子を見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 黒田洋輔	4. 巻 62
2. 論文標題 春化苗を利用したテンサイの採種VI. 抽苔耐性と春化处理期間中の遺伝子発現量の関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 てん菜研究会報	6. 最初と最後の頁 11-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 黒田洋輔, 松平洋明, 岡崎和之	4. 巻 60
2. 論文標題 BvBTC1遺伝子座を指標としたテンサイの 抽苔耐性の改良のためのマーカー利用選抜法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 てん菜研究会報	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuroda Y, Takahashi H, Okazaki K, Taguchi K	4. 巻 215
2. 論文標題 Molecular variation at BvBTC1 is associated with bolting tolerance in Japanese sugar beet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10681-019-2366-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 黒田 洋輔, 松平 洋明, 岡崎 和之, 上田 重文, 田口 和憲	4. 巻 59
2. 論文標題 春化苗を利用したテンサイの採種 V. 温室内での採種形質に春化处理期間, 育苗期間と夜間補光が及ぼす影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 てん菜研究会報	6. 最初と最後の頁 9-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 黒田洋輔、松平洋明、岡崎和之、上田重文、田口和憲	4. 巻 58
2. 論文標題 春化苗を利用したテンサイの採種 IV. 春化处理期間が屋外での開花・採種形質に及ぼす影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 てん菜研究会報	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 黒田洋輔、岡崎和之、松平洋明、成廣翼
2. 発表標題 世代促進可能なテンサイの開花特性とその育種への応用
3. 学会等名 てん菜研究会第19回技術研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kuroda Yosuke
2. 発表標題 A New Approach to Control Vernalization Requirement in Biennial Plants
3. 学会等名 PAG (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田 洋輔、松平 洋明、岡崎 和之
2. 発表標題 テンサイの抽苔耐性を支配するQTL
3. 学会等名 育種学研究
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田 洋輔、松平 洋明、岡崎 和之
2. 発表標題 BvBTC1遺伝子座を指標としたテンサイの抽苔耐性の改善
3. 学会等名 日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会会報
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田 洋輔、松平 洋明、岡崎 和之、上田 重文、田口 和憲
2. 発表標題 春化苗を利用したテンサイの採種－ 温室内での開花形質に「春化处理期間」、「育苗期間」と「夜間補光」が及ぼす影響 －
3. 学会等名 てん菜研究会第16回技術研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田 洋輔、松平 洋明、岡崎 和之、上田 重文、田口 和憲
2. 発表標題 二年生テンサイの抽苔耐性に関連する遺伝領域の推定 － F2集団による検証
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田 洋輔、松平 洋明、岡崎 和之、上田 重文、田口 和憲
2. 発表標題 BvBTC1による二年生テンサイの当年抽苔制御効果：分離世代による検証
3. 学会等名 日本育種学会第132回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黒田 洋輔, 田口 和憲, 岡崎 和之, 高橋 宙之, 藏之内 利和
2. 発表標題 世代促進可能なテンサイBLOND
3. 学会等名 日本育種学会第133回講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------