

平成21年5月21日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18580008

研究課題名（和文） サヤダイコンの低温発芽性制御の遺伝的メカニズム解析

研究課題名（英文） Genetic analysis on the regulation of seed germination at low temperature in rat's tail radish (*Raphanus sativus* L.) 'Pakki-hood' .

研究代表者 野村和成 (NOMURA KAZUNARI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90139048

研究成果の概要：

タイ北部で栽培されるサヤダイコン‘パッキフード’が示す開花に対する低温要求性、低温発芽能力について検討した。ダイコン種子内のABA量は種子の乾燥とともに増加し、その後の減少と葉の黄化の進展とに密接な関連が認められた。低温発芽性に関する5箇所の遺伝子領域が見出された。低温発芽性程度と開花に対する低温要求の程度には負の相関が認められた。パッキフードの種子は低温下で吸水とともに低温ストレス応答に関係する遺伝子群が働き、その後、発芽促進にともなって基礎代謝に関わる遺伝子群が働くと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	300,000	3,100,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 育種学

キーワード： 植物育種・遺伝

1. 研究開始当初の背景

サヤダイコンあるいはサヤトリダイコンと呼ばれるダイコンはインドから東南アジアに分布することが知られている（北村1958）。この内、タイ北部で栽培されるサヤダイコン（現地名：パッキフード（Pakki-hood））は根は肥大せず、若い莢（莢果）が食材とされている。形態的特徴からパッキフードは日本のダイコンやインド産のサヤダイコン Rat's tail radish、ハマダイコ

ンと区別され、*Raphanus sativus* L. cv. "Pakki-hood" と命名されている。このダイコンが抽苔、開花した状態は日本で栽培されているダイコンと似ており、花が咲く頃には花序の枝がよく茂って、開花後に莢が多数できる。莢長は10cm程度で軟らかく、東南アジア諸国では煮炊きや油炒めの材料として用いられる場合が多い。生育旺盛で収穫までの期間も短く、今後わが国での利用も期待される。遺伝資源としてその性質を明らかにし

しておく必要がある。野村ら(1996)は、パッキフッドが日本のダイコン品種にみられるような抽苔・開花に対する低温要求性がないこと、低温下でも高い発芽能力を示すことが明らかにした。

低緯度で栽培されるサヤダイコンが、より高緯度のわが国で栽培されるダイコン品種よりも低温発芽性に優れていることは興味をもたれる。発芽期に低温感応して花芽分化が誘導されるダイコンにおいては発芽の低温に対する反応は、発芽、初期成育、花芽分化に影響を与える。したがって、この品種の種子形成期から低温下での発芽期に特異的に発現する遺伝子群は、これらの現象に関与している可能性がある。低温発芽するパッキフッドと、低温発芽性をもたない聖護院など日本のダイコン品種では、種子胚の形成過程や完熟種子胚において発現している遺伝子やタンパク質に違いがあると予想され、その中に低温発芽性に関連するものが含まれている可能性がある。また、種子形成期から発芽期、初期成育期における低温に対する抵抗性機構の違いにも注目する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

パッキフッドならびに日本で栽培されるダイコン品種を用いて、種子形成期から発芽期における遺伝子発現のパターンと発芽の低温に対する反応を解析することにより、低温発芽能に関連する遺伝子を探索し、開花に対する低温要求性との関係について検討する。

1) 種子成熟にともなう ABA 合成と低温発芽能の獲得

タイ北部から導入されたサヤダイコン‘パッキフッド’は低温発芽性、花芽分化に対する低温非要求性という他のダイコン品種にはない特徴をもつ。低温下での発芽能の有無は種子成熟過程における ABA 生合成との関連が考えられる。種子成熟過程における種子水分含量、葉の葉緑素含量、NCED 遺伝子発現量ならびに ABA 量の推移について測定し、低温発芽能獲得との関連について検討した。

2) ダイコンの低温発芽性の QTL 解析

サヤダイコンは日本の品種に比べて莢が長く、一莢粒数が多く、低温下でも高い発芽率を示すといった特異な形質をもつ。分子マーカーによる連鎖地図を作成し、パッキフッドを特徴づける形質に関する QTL 解析を行った。

3) ダイコン品種における低温発芽能と開花に対する低温要求性の関連

‘パッキフッド’は若い莢を食材とするわが国のダイコン品種の新規利用に適用する

ことができる育種素材であるとともに、低温発芽性、花芽分化に対する低温非要求性という他のダイコン品種にはない特徴をもつ。このような品種がタイ北部に適応している要因を明らかにするため、パッキフッドならびに日本の地方品種を用いて低温発芽性と開花に対する低温要求性の関連について検討した。

4) ダイコンの低温下における発芽にともなう遺伝子の発現解析

パッキフッドの低温発芽性は、発芽期以降の低温耐性とは異なる機構によるものであることが示唆されている。ディファレンシャル・ディスプレイ法(DDM)を用いて、低温発芽に特異的な発現遺伝子の探索、発現解析を試みた。

3. 研究の方法

1) 種子成熟にともなう ABA 合成と低温発芽能の獲得

種子成熟過程における種子水分含量、葉の葉緑素含量、NCED 遺伝子発現量ならびに ABA 量の推移について測定した。イムノアッセーにより開花後各時期の種子中の ABA 量を測定した。

2) ダイコンの低温発芽性の QTL 解析

DoiSaket系パッキフッドの自殖系統PK1と宮重系源助ダイコンの自殖系統GSK3-1の交雑後代F₂142個体および個別F₃集団を供試した。RAPDマーカー104、SCARマーカー15を用いてMAPMAKER3.0bによる連鎖地図を作成した。各個体からそれぞれ10莢を無作為にサンプリングし、莢長および一莢粒数を測定した。F₃種子の3°Cにおける発芽率の25°Cにおける発芽率に対する比の逆正弦変換値をF₂各個体の低温発芽性程度とした。QTL解析にはQGene ver3.06を用いた。

3) ダイコン品種における低温発芽能と開花に対する低温要求性の関連

パッキフッド、パキスタンのサヤダイコン‘PK’ならびにわが国の地方品種を供試した。発芽試験のため、濾紙2枚を敷いた9cmシャーレーに7mlの蒸留水を加え、各品種の種子50粒を播種した。2.5~40°C(7段階)で、暗黒下で15日間培養した。温度に対する発芽反応により低温発芽性を評価した。

4) 低温下における発芽にともなう遺伝子の発現解析

暗黒下、3°Cで培養した両品種の種子を経時的にサンプリングし、Total RNAを抽出した。10merあるいは12merのランダムプライマーを用いたDDMにより多型バンドを検出し、TAクローニングして塩基配列を決定

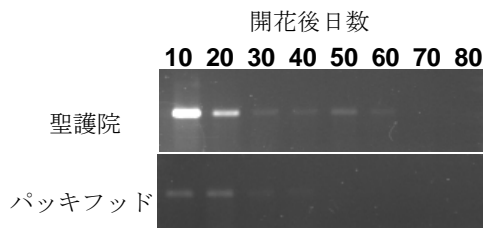
した。

4. 研究成果

1) 種子成熟ともなう ABA 合成と低温発芽能の獲得

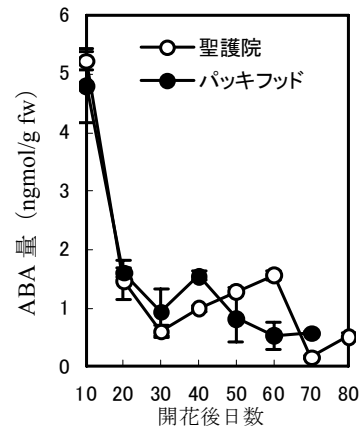
ダイコン品種‘パッキフッド’ならびに‘聖護院’を供試した。

開花 30 日後の種子水分含量は両品種とも約 80% であった。パッキフッドではその後は低下し続け、60 日後に 9%、聖護院では 50~60 日後に停滞がみられ 70 日に 9% にまで低下した。分岐枝基部の葉の葉緑素含量変化を SPAD 値により測定した。分岐枝基部の花の開花 20 日後まではほぼ一定の値を保った。パッキフッドではその後急激に低下し、45 日後には緑色は完全に失われた。聖護院では徐々に低下し、45 日後でもわずかに緑色が保持された。ABA 合成の律速酵素 NCED 遺伝子の種子成熟期間における発現を RT-PCR によって検出した。パッキフッドは開花直後から 40 日後まで、聖護院では 60 日後まで発現が認められ、その後は発現がみられなかった (第 1 図)。



第 1 図 ダイコンの種子成熟ともなう ABA 合成遺伝子 NCED 発現の推移

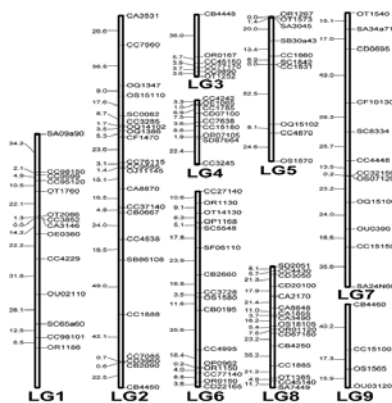
イムノアッセーにより開花後各時期の種子中の ABA 量を測定した。両品種とも開花直後極めて多量の ABA が認められ、30 日後まで急激に減少した後、パッキフッドでは 40 日後、聖護院では 60 日後に増加のピークが認められた (第 2 図)。開花 10 日後から 80 日後まで 10 日ごとに種子を採取し、25 ならびに 3°C におけるシャーレ湿室内での発芽率を調査した。パッキフッドでは、25°C において、開花 30 日後の種子でわずかに発芽が認められ、発芽率は徐々に上昇し、80 日後に 80% 以上の発芽率となった。3°C においては、80 日後まで高い発芽率を示さなかった。一方、聖護院では、25°C において開花 30 日後から高い発芽率を示した。



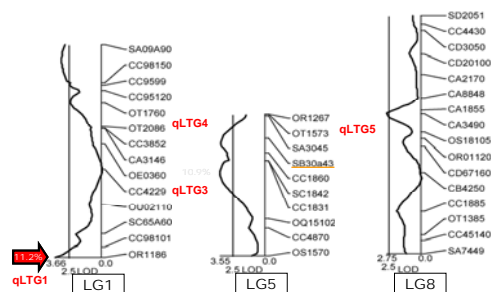
第 2 図 ダイコンの種子成熟ともなう種子中 ABA 量の変化

以上の結果から、ダイコン種子内の ABA 量は種子の乾燥とともに増加し、その後の減少と葉の黄化の進展とは密接な関連が認められるが、発芽能の獲得ならびにパッキフッドの低温発芽能の獲得は ABA 量の変化では説明できないことが示された。

2) 低温発芽性の QTL 解析



第 3 図 分子マーカーによるダイコンの連鎖地図



第 4 図 ダイコンの低温発芽性に関する QTL

分子マーカーによる連鎖地図を作成し、パ

ッキフードを特徴づける形質に関するQTL解析を行った。

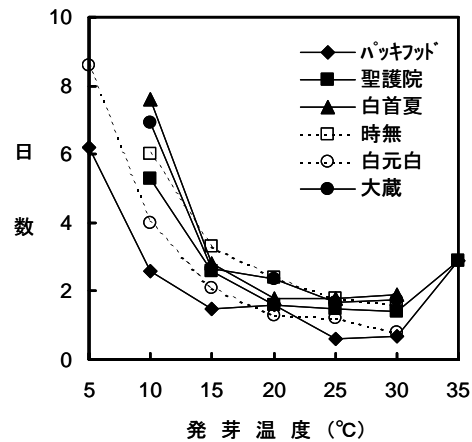
低温発芽性程度はPK1で0.81と高く、GSK3-1で0.02と低い値を示した。F₁は0.18でGSK3-1に近い値を示した。平均莢長はPK1で10.9cm、GSK3-1で4.3cmであった。F₁の平均莢長は5.0cmでGSK3-1に近い値を示した。F₂における莢長の分布は、ピークが2ヶ所にみられた。一莢粒数の平均はPK1が6.2粒、GSK3-1が4.0粒であり、F₁は5.3粒と両親の中間的な値を示した。9連鎖群(LG1~9)からなる連鎖地図が得られた。全長は1469.9cM、平均マーカー間距離は13.6cMであった。低温発芽性については、LG1に2ヶ所、LG5に2ヶ所、LG8にLOD値2.5以上の有意なQTLs(qLTG1~5)が認められた。表現型変異に対する寄与率はそれぞれ11.2%、9.6%、10.9%、10.7%ならびに8.5%であった。qLTG2はGSK3-1の、それ以外のQTLsはPK1の対立遺伝子が低温発芽性を高める効果を示した。莢長については、LG7に2ヶ所、LG9に1ヶ所のQTLs(qLP1~3)が認められた。寄与率はそれぞれ8.3%、8.7%ならびに7.9%であった。これら3つのQTLsはいずれもPK1の対立遺伝子が莢を長くする効果を示した。一莢粒数については、LG3に1ヶ所とLG5に1ヶ所にQTLs(qNSP1, 2)が認められた。寄与率はそれぞれ8.9%、15.9%であった。qNSP1はGSK3-1の、qNSP2はPK1の対立遺伝子が粒数を増やす効果を示した。

3) 低温発芽性程度と開花に対する低温要求程度の関連

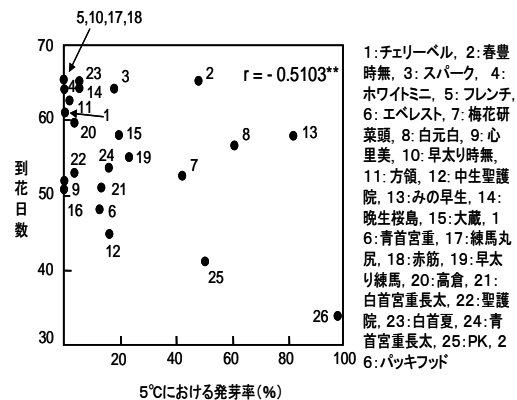
パッキフード、パキスタンのサヤダイコン‘PK’ならびにわが国の地方品種を供試した。発芽試験のため、濾紙2枚を敷いた9cmシャーレーに7mlの蒸留水を加え、各品種の種子50粒を播種した。2.5~40℃(7段階)で、暗黒下で15日間培養した。温度に対する発芽反応により低温発芽性を評価した。25℃で24時間吸水した種子を5、10日間、5℃低温処理後、ポットに移植し、自然日長下(4月6日~6月10日)で栽培した。蕾が肉眼で観察されるまでの日数、最初に開花するまでの日数を調査し、低温要求の程度を評価した。

いずれの品種も15~30℃で高い発芽率を示した。発芽率50%に達するまでの日数で評価した最高発芽温度にはほとんど品種間差異がみられず、40℃以上ではすべての品種で発芽が見られなかった。これに対し、10℃以下の低温域では品種間差異が大きく、10℃では、パッキフードは2.5日で発芽率50%に達したのに対し、白首夏では7.6日を要した(第5図)。一方、開花までの日数には大きな品種間差異が認められ、パッキフードでは34日、白首夏、練馬、時無ならびにフレンチでは65日以上を要した。その他の品種はこの間に分

布し、4群に分けられた。低温発芽性程度と開花に対する低温要求の程度には負の相関が認められ(第6図)、両形質の関連が示唆された。



第5図 各発芽温度において発芽率50%に達するまでの日数

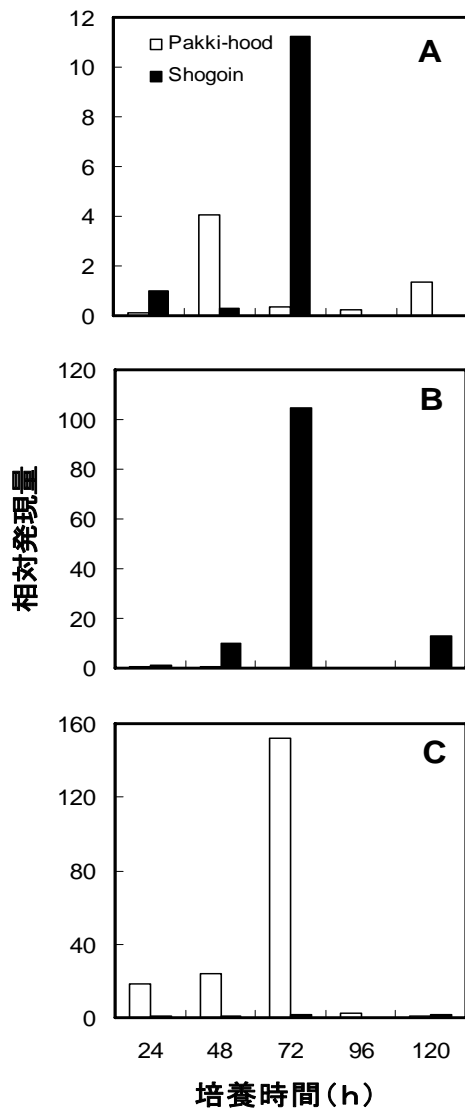


第6図 低温発芽性と低温要求性の関係

4) 低温での発芽にともなう遺伝子の発現

20℃では播種2日後に両品種とも発芽率が90%を超えた。3℃では、播種3日以降からパッキフードと聖護院の発芽率に大きな差が現れ、パッキフードの発芽率は8日後で92%に達した。聖護院では9日後でも発芽率は20%以下であった。パッキフードに特異的なバンドから得られた10クローン、聖護院に特異的なバンドから得られた5クローンについて既知のタンパク質と相同性がみられた。パッキフード特異的クローンはカタラーゼ、ATPase、ジンクフィンガープロテインあるいはコールドショックプロテインなどと相同性が認められた。聖護院ではカタラーゼ、SODならびにATP synthaseなどであった。3℃下での発芽にともなう遺伝子発現の推移の品種間差を検討した。カタラーゼ、SOD

と相同性の高かったクローンでは聖護院でのみ72時間で一時的に発現が増加, ATPaseと相同性の高いクローンではパッキフードでのみ72時間で一時的に発現が増加した(第7図)。その他, 両品種とも72時間で一時的に増加するクローン, 48時間以降, 発現量の増加が続くもの, さらに, パッキフードでのみ72時間以降, 増加が続くクローンがみられた。以上の結果から, ダイコン種子は低温下で吸水が起こると, 発芽が促進か抑制かに関わらず低温ストレス応答に関係するような機能をもつ遺伝子群が働き, 発芽が促進される場合には基礎代謝に関わる遺伝子が働くと考えられた。



第7図 ダイコン種子の3°Cでの発芽ともなうにカタラーゼ (A), SOD (B) ならびにATPase (C) の相対発現量

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計4件)

- 1) 査読有 Shosaku Oshima, Kazumasa Ikeda, Kazunari Nomura. (2009) Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER 1* homolog, *RsTFL1*, from radish (*Raphanus sativus*). Plant Biotechnology 26: inpress.
- 2) 査読有 Oshima S. and K. Nomura (2008) *RsLFY*, a *LEAFY* homologue gene in radish (*Raphanus sativus*), is continuously expressed in vegetative, reproductive and seed development. Plant Biotechnology 25: 579-582.
- 3) 査読有 Tateishi, A., H. Shiba, J. Ogihara, K. Isobe, K. Nomura, K. Watanabe, H. Inoue. (2007) Differential expression and ethylene regulation of β -galactosidase genes and isozymes isolated from avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. Postharvest Biology and Technology 45: 56-65.
- 4) 査読有 Nomura, K., Uesugi, T., Tateishi, A., Shishido, R., Yoneda, K. (2006) Factors controlling seed germinability of rat's tail radish (*Raphanus sativus* L.) cv. Pakki-hood at a low temperature. Jpn. J. Trop. Agr. 50: 29-35.

[学会発表] (計16件)

- 1) 原田瑶恵・林宏行・香取正人・宍戸理恵子・野村和成 (2009) 宮城県内沼のハス野生集団のAFLPによる遺伝的多様性解析. 育種学研究 第11号(別1):288. 3月27日. 筑波大学
- 2) 五十嵐裕美・宍戸理恵子・野村和成・秋元正博・石井尊生・佐藤雅志・Than Sein U・Tin Htut U. (2009) ミャンマーに自生する野生イネ集団の遺伝的多様性評価3. 育種学研究 第11号(別1):70. 3月27日. 筑波大学
- 3) 藤田千絵子・相澤義春・宍戸理恵子・野村和成・秋元正博・石井尊生・佐藤雅志・Than Sein U・Tin Htut U. (2008) ミャンマーに自生する野生イネ集団の遺伝的多様性評価2. 年次変動について. 第10号(別1):225. 3月28日. 明治大学
- 4) 岡本美貴・司馬肇・宍戸理恵子・細野邦昭・野村和成 (2008) イネ葉の枯れ上がりにおける葉緑素含量の現象とプロテアーゼとヌクレアーゼの活性変化の関連性. 育種学研究 第10号(別1):94. 3月28日. 明治大学.
- 5) 相澤義春・藤田千絵子・宍戸理恵子・野村和成・秋本正博・石井尊生・佐藤雅志・U Than Sein・U Tin Htut (2007) ミャンマーに自生する野生イネ集団の遺伝的多様性評価. 育種学研究 第9号(別

- 2号) : 243. 9月22日. 山形大学.
- 6) 恩井美由希・樽沢絵美子・宍戸理恵子・野村和成 (2007) ダイコンの低温下における発芽にともなう遺伝子の発現解析. 育種学研究 第9号 (別2号) : 310. 9月22日. 山形大学.
 - 7) 小見創介・小林哲郎・森山史英・宍戸理恵子・野村和成・池橋宏 (2007) 日印交雑F₁ハイブリッド・イネでの強感光性発現に関するQTL解析. 育種学研究 第9巻 (別冊1号) : 283. 3月30日. 茨城大学.
 - 8) 大島昭作・宍戸理恵子・池田和正・野村和成 (2007) サヤダイコンの花器形成に関する遺伝子単離. 育種学研究 第9巻 (別冊1号) : 148. 3月30日. 茨城大学.
 - 9) Nomura K. 2007. Utilization of plant genetic resources from abroad in Japan. 2007 International Horticulture Forum Symposium on Exploitation and Development of Horticulture-Agenda. Dec. 10. TaiChung, Taiwan.
 - 10) 五月女望・田島健太郎・香取正人・宍戸理恵子・野村和成・池橋宏 (2006) 霞ヶ浦北岸に自生するハス群落のAFLPによる遺伝構造解析. 育種学研究 第8巻 (別冊2号) : 267. 9月22日. 愛媛大学.
 - 11) 小見創介・小林哲郎・森山史英・宍戸理恵子・野村和成・池橋宏 (2006) 日印交雑F₁ハイブリッド・イネの強感光性発現に関与する遺伝子座の分析. 育種学研究 第8巻 (別冊2号) : 185. 9月22日. 愛媛大学.
 - 12) 小見創介・武田一宏・宍戸理恵子・野村和成・池橋宏 (2006) 日印交雑F₁ハイブリッド・イネの出穂遅延に関する補足遺伝子座の分析. 育種学研究 第8巻 (別冊1号) : 88. 3月29日. 東京農工大学.
 - 13) 井上祐一・司馬肇・宍戸理恵子・野村和成・池橋宏 (2006) イネ葉の枯れ上がりにもなうプロテアーゼ, スクレアーゼ活性の変化. 育種学研究 第8巻 (別冊1号) : 95. 3月29日. 東京農工大学.
 - 14) 清水顕史・櫛橋勇介・新名陽平・加藤謙之・宍戸理恵子・野村和成・池橋宏 (2006) イネの低pHストレス耐性に関する遺伝解析. 育種学研究 第8巻 (別冊1号) : 186. 3月29日. 東京農工大学.
 - 15) Keiichi Watanabe, Akira Tateishi and Kazunari Nomura. (2006) Chlorophyll, carotenoid and anthocyanin pigments in sweet peppers (*Capsicum annuum*) fruits of varying genotypes. 27th International Horticultural Congress and Exhibition. 94. Aug. 15. Seoul, Korea.
 - 16) Chiaki Kimizuka - Takagi, Aki Kinbara, Sawao Igarashi, Takashi Fujioka, Rieko Shishido and Kazunari Nomura (2006) Analysis of QTLs for germinability at low temperature in Rat's tail radish originated

from Northern Thailand. 27th International Horticultural Congress and Exhibition. 58. Aug. 15. Seoul, Korea.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 和成 (NOMURA KAZUNARI)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号 : 90139048

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし