

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05613

研究課題名(和文)モモにおける休眠打破および生殖成長相移行メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of breaking dormancy and transfer to reproductive phase in peach

研究代表者

山根 健治 (Yamane, Kenji)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：60240066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：モモ種子をDNAメチル化阻害剤で2週間処理後、5℃下で2週間 ABA合成阻害剤で処理したところ、発芽率に差は無かったが、実生葉のSPAD値が高まり、黄化が抑制される傾向があった。低温遭遇無し(5℃)の種子と5℃に8週間遭遇した種子からDNAを抽出し、全ゲノムバイサルファイトシーケンス法によりメチル化の比較を行った。CpG、CHGおよびCHH配列におけるメチル化レベルは低温遭遇で低下し、モモ種子休眠にエピジェネティクスが関与することが示された。1年生実生では成木よりも1か月以上花芽分化が遅れ、鉢サイズが大きいほど花芽分化が促進され、根域の違いによる株の成長量と花芽数に関連が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モモ種子休眠にエピジェネティクスが関与していることを明らかにした点は学術的に意義がある。モモ1年生実生において鉢サイズにより生殖成長相への転換を促進できることが示されたことから、1年生実生において花芽をつけて鉢物として販売することの可能性が示された点は社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：When peach seeds were treated with a DNA methylation inhibitor for 2 weeks and then treated with an ABA synthesis inhibitor at 5°C for 2 weeks, there was no difference in germination rate, but the SPAD value of seedling leaves increased and yellowing was suppressed. DNA was extracted from seeds that had not been encountered at low temperature and seeds that had been exposed to 5°C for 8 weeks, and their methylation level was compared by the whole-genome bisulfite sequencing method. Methylation levels in the CpG, CHG and CHH sequences decreased with low temperature encounters, indicating that epigenetics is involved in peach seed dormancy. In 1-year-old seedlings, flower bud differentiation was delayed for more than 1 month than in adult trees, and flower bud differentiation was promoted as the pot size was larger. A relationship was found between the growth amount of the seedlings and the number of flower buds due to the difference in the root area.

研究分野：園芸学

キーワード：種子休眠 エピジェネティクス 花芽分化 根圏

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 種子休眠とエピジェネティクス

高等植物の種子の休眠と発芽は複雑な適応形質であり、様々な遺伝要因と環境要因によって制御されている。研究代表者らは通常 6 週間以上の低温遭遇が必要なモモにおいて、低温遭遇、種皮除去、胚の ABA 含量が発芽率と関係することや流水処理により発芽が促進されることを報告した。また、種子胚軸の遺伝子の網羅的な発現解析により、ABA 合成酵素、ABA 分解酵素、ABA 受容に関わる *PP2CA*、休眠に関連する *LEAD-34* や *LeMADS* などの遺伝子発現が関与することを報告した。さらに、2 週間の低温と ABA 合成阻害剤(フルリドン)処理による休眠打破に成功している。しかし、早期発芽した実生において、葉のねじれや成長の遅滞(上胚軸休眠)など低温不足が原因と考えられる症状が観察された。多くの植物において DNA やヒストンのメチル化が遺伝子発現に影響することが知られている。

(2) 幼若相から生殖成長相への移行

一般に木本植物は若いステージでは花を着生しない、いわゆる『幼若相』を持つ。モモの生殖成長相の茎頂においては、クロマチン濃縮、DNA メチル化およびサイトカニン分布範囲の拡大が報告されている。しかし、幼若相から生殖成長相への移行のメカニズムについては、栽培期間が長期に至ることから生理学的・分子生物学的な検討は十分とは言えない。研究代表者らはモモ 1 年生実生への花芽分化期直前の初夏における断根ストレス処理とジベレリン(GA)阻害剤処理により早期開花が誘導されることを報告した。モモ‘矢口’の最低着花節位は 90 節以上であるが、GA 合成阻害剤処理により 70 節以下にも花芽が着生した。しかし、天候により十分に花芽分化を誘導できない年もあることから、早期の生殖成長相への移行のための本質的な要因についてさらに検討する必要がある。

2. 研究の目的

種子の早期発芽技術の確立を目指し、種子休眠の本質とは何かを問うため、種子休眠におけるエピジェネティクスとの関連について検討する。また、早期発芽誘導時の低温不足の種子における奇形葉発生に及ぼすメチル化阻害剤の効果について調査した。また、低温遭遇量の異なる種子の胚軸における DNA メチル化レベルを解析し、直接的にエピジェネティクスの関与について明らかにすることを目的とした。生殖成長相への移行を決める因子は何かを問いとし、栽培法、開花までの生態的特性などについて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 種子休眠とエピジェネティクス

DNA メチル化阻害剤処理の影響

モモ‘矢口’の除核種子を 0.5%次亜塩素酸ナトリウムで殺菌後、シャーレ内で 0, 0.1, 1.0, 10 または 100 mM プロカイン塩酸塩 (P) 溶液で 2 週間浸漬処理後、20 暗黒下で 2 週間 F 処理した。続いて、シャーレ内で 100 μ M フルリドン (和光薬品製) 溶液で 5 2 週間低温処理後にピート主体の培地に播種した。播種 30 日後に、発芽率を調査し、実生の奇形について Zigas and Coombe (1977) の指標に基づいて評価した。31 日後に実生の葉色を SPAD-502 で測定した。

胚軸の DNA メチル化の解析

ハナモモの種子発芽において、低温不足時には実生のわい化や葉身の異常が生じることから、エピジェネティクスの関与が予想される。そこで、採取まで 5 週の低温に遭遇していない 0 week(W) 種子と、5 週の低温に 8 週間遭遇 (8w) した種子から胚軸を抽出し、DNA 抽出キット (NucleoSpin Plant II, タカラバイオ製) と溶解 Buffer PL2 で抽出した。MacroGen Japan に依頼し、全ゲノムバイサルファイトシーケンス法により、メチル化の比較を行った。Accel-NGS Methyl-Seq DNA Library EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research) Kit および Illumina platform で分析した。CpG, CHG および CHH 配列におけるシトシンのメチル化について、モモゲノム配列 (Prunus persica NCBIv2) にマッピングし、メチル化された箇所のアノテーションを行い、それぞれの差異について比較した。

(2) 幼若相から生殖成長相への移行

1 年生実生の生殖成長への移行調査

1 年生実生を低温処理し、播種した。実生を露地または温室内のポットに移植した圃場の 1 年生実生の芽を FAA 固定し、実体顕微鏡下で解剖した。鉢栽培および露地栽培した実生の開花状況、花芽着生節位、最高節位および樹高を調査した。

根圏が生殖成長への移行に及ぼす影響

実生を 6 号または 9 号鉢で栽培した。2 週間毎に樹高と節数を調査し、12 月上旬に花芽を調査した。

4. 研究成果

(1) 種子休眠とエピジェネティクス

DNA メチル化阻害剤処理の影響

種子発芽にエピジェネティクスの関与を明らかにするため、種子に DNA メチル化阻害剤処理を

行ったが、低温不足による生育停滞を打ち消すなどの効果は認められなかった。発芽率には差は無く、異常レベルは低かったが、P 処理区で実生葉の SPAD 値が高まり、黄化が抑制される傾向が認められた。

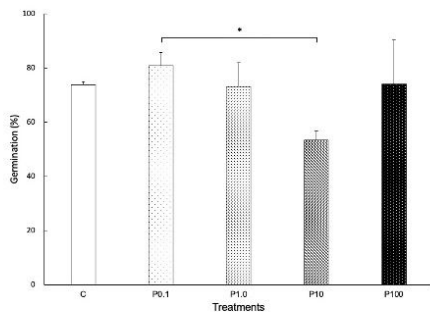


図 1. プロカイン塩酸塩 (P) 処理がモモ種子の発芽率に及ぼす影響。

Mean ± SE (n = 3). *t 検定により有意差あり (p<0.05).

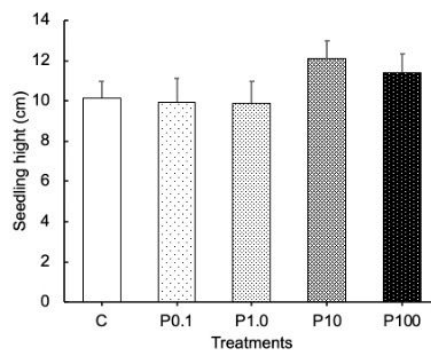


図 2. プロカイン塩酸塩 (P) 処理がモモ実生の草丈に及ぼす影響。

Mean ± SE (n = 9-20).

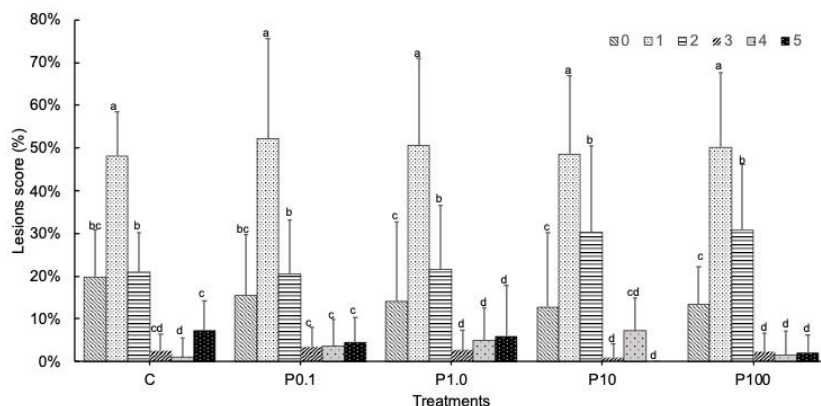


図 3. プロカイン塩酸塩 (P) 処理がモモ実生の葉身の障害に及ぼす影響。

障害スコアは Zigas and Coombe (1977) に基づき 0-5 段階で評価した。Mean ± SE (n = 9-20).

処理濃度内において異なる文字間に Tukey-Kramer 検定により有意差あり (p < 0.05).

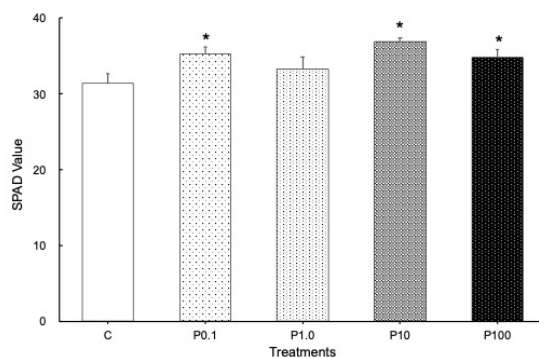


図 4. プロカイン塩酸塩 (P) 処理がモモ実生の葉身の SPAD 値に及ぼす影響。

Mean ± SE (n=9-20). 多項式コントラストテストにより P と発芽率に 1 次モデルの関係 (p<0.0024).

* Fisher の protected LSD 検定により対照区との間に有意差あり (p<0.05).

胚軸の DNA メチル化の解析

0w および 8w 区からそれぞれ 114 および 115M のリードが得られ、GC はそれぞれ 26.4 および 24.4%であった。モモゲノム配列にマッピングし、バイサルファイト法によるメチル化に使用したリード数は 0w 区が 71.7M ,8w 区が 66.1M であった。重複を除いた有効深度は 0w 区が 34.2× , 8w 区が 31.4× であった。

CpG 配列におけるメチル化レベルは、0w 区の 67.8%から 8w 区では 63.2%に低下した(表 1)。CHG 配列におけるメチル化レベルは、0w の 44.6%から 8w では 40.8%に低下した(表 1)。さらに、CHH 配列におけるメチル化レベルは、0w の 21.8%から 8w では 12.2%まで低下した(表 1)。

処理	Total Coverage	メチル化Coverage	メチル化率(%)
CpG			
0w	143,792,701	97,487,732	67.80
8w	127,524,103	80,605,572	63.21
CHG			
0w	168,478,082	75,185,094	44.63
8w	145,552,800	59,341,729	40.77
CHH			
0w	908,647,060	198,479,615	21.84
8w	791,134,785	96,443,686	12.19

モモの 8 本の各染色体上にマッピングされた CpG, CHG および CHH 配列のメチル化レベルを図 5 に示した。全ての染色体グループにおいて、低温を受けていない 0w 区の胚軸の方がメチル化された割合が高かった。特に、CHH 配列において、8w に顕著にメチル化レベルが低下した(図 5)。

0w と 8w 区でメチル化に差異が認められた箇所(図 5)について、プロモーター領域と非プロモーター領域の占める比率を図 6 に示した。CpG および CHG 領域では、2 割程度がプロモーター領域であった。CHH 配列においては、ややプロモーター領域の比率が高く、特に染色体 1 と 5 において 3 割程度がプロモーター領域における差異であった(図 5)。

これらの結果から、モモ種子への低温処理はメチル化レベルに影響し、特に、CHH 配列において低温処理によって顕著に低下した。CHH 配列においては、プロモーター領域のメチル化の変動も大きいことから、エピジェネティクスが種子発芽を制御することが示唆された。種子休眠のより簡便な打破方法を確立するためには、エピジェネティクスの影響を受ける遺伝子群について、さらに検証する必要がある。

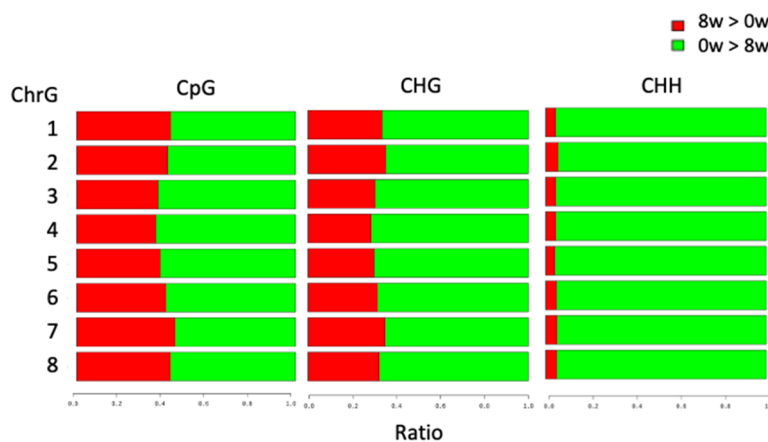


図 5. 各染色体上(ChrG 1~8)における CpG, CHG および CHH 配列のメチル化レベルの差異
赤: 8w でメチル化高, 緑: 0w でメチル化高(判定基準 0.2)

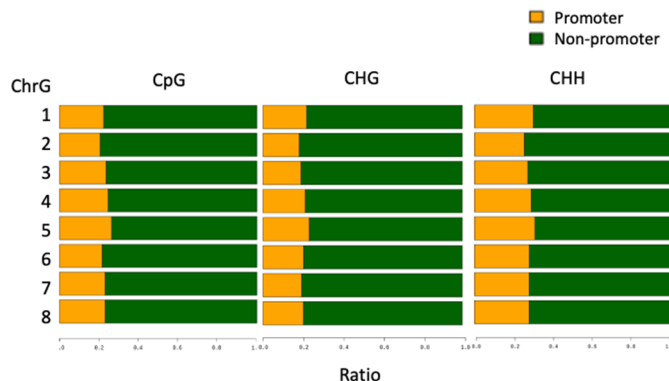


図 6. 各染色体上(ChrG 1~8)における CpG, CHG および CHH 配列のメチル化レベルの差異が認められた箇所の内訳: プロモーター領域と非プロモーター領域

(2) 幼若相から生殖成長相への移行

1 年生実生の生殖成長への移行調査

モモ 8 年生実生では 8 月上旬から花芽分化が認められ、10 月中旬には雌ずい形成期に達した。一方、1 年生実生では、10 月上旬に片形成期の花芽が認められた。10 月中旬には花弁形成期のもが多く、11 月上旬には雄ずいから雌ずい形成期の花芽が多く確認された。

鉢栽培において、生育が順調な株においては、播種後 400 日で開花が認められた。ABA 処理および GA 阻害剤処理は花芽形成を誘導しなかった。成長が旺盛な 1 年生実生においては、130 以上の花芽が形成された。相転移における株の生育程度の影響について調べるために、圃場で栽培した 1 年生実生の開花株と未開花株で生育を比較したところ、株重、根重、茎の最大直径に有意差は認められなかった。

根圏が生殖成長への移行に及ぼす影響

根域を制限するために異なるサイズの鉢で栽培試験を行った。鉢サイズにより生育に差が認められた。6 号鉢では 7 株中 2 株、9 号鉢では 7 株全部に花芽分化した。1 株あたり 6 号で 1.5 個、9 号で 6.7 個着花し、根域の違いによる株の成長量と花芽数に相関が認められた。

30 節程度の実生を圃場に定植し、7 月上旬に 60 節程度の実生にウニコナゾール(U) 断根 (R) および組合せ(UR)処理した。2 週間毎に葉身の採取、樹高および節数を調査し、1 月に花芽を観察した。その結果、花芽数は 1 株あたり対照区 14.7、U 区 4.0、R 区 2.8、UR 区 1.1 で低かったが、U 区で低節位での着花が認められた。断根処理により、根域を制限し、養水分の吸収を抑えたところ、着花数は低下傾向にあった。各処理で花芽数は増加しなかったものの、ジベレリン阻害剤であるウニコナゾール処理により最低着花節位の低下は認められたことから、生殖成長への早期移行は促されたと考えられる。

8 年生に比べて 1 年生実生の生殖相への移行が遅れたこと、鉢サイズに比例して生育量が大きくなり着花が促進されたこと、ジベレリン阻害剤により最低着花節位が低下したことから、幼若相から生殖成長相への転換には、一定程度のシュートと根の生育が不可欠であり、かつ、ジベレリンの活性を低下させることが必要であることが示唆された。開花関連遺伝子の発現については十分な調査ができなかったため、さらに検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamane, K., Y. Naozaki and K. Worarad.	4. 巻 -
2. 論文標題 Physiology and promotion of seed germination in ornamental peach.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Hortic.	6. 最初と最後の頁 197 - 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/actahortic.2021.1312.29	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamane, K., Y. Naozaki and K. Worarad.
2. 発表標題 Physiology and promotion of seed germination in ornamental peach
3. 学会等名 The 3rd Asian Horticultural Congress 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山根健治・大塚みく.
2. 発表標題 観賞用モモ1年生実生の花芽分化時期と温室内鉢栽培による早期開花.
3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会.
4. 発表年 2018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
研究分担者	黒倉 健 (Kurokura Takeshi) (10650898)	宇都宮大学・農学部・講師 (12201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	謝 肖男 (Xie Xiaonang) (30610323)	宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授 (12201)	

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