

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：12101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15514

研究課題名（和文）イチゴの超多収性品種育成を目指した根の発生制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the control mechanism of root development for the breeding of super high-yielding strawberry cultivars

研究代表者

望月 佑哉（Mochizuki, Yuya）

茨城大学・農学部・講師

研究者番号：30805007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、まず低温環境下で水耕栽培した多収性イチゴ品種‘紅ほっぺ’と対照品種‘さちのか’の根の発育特性を調査した。その結果、‘紅ほっぺ’の根の発生量が多く、特に細根の発根が早いことを確認した。次いで、根からRNAを抽出しトランスクリプトーム解析を行ったところ、低温で根やシュートで発現するCRF4や非生物的ストレスで誘導されるERF1の発現が‘紅ほっぺ’で緩やかに増加したことから、‘紅ほっぺ’は低温に対する応答が緩慢であると考えられた。以上のことから、‘紅ほっぺ’は‘さちのか’と比較して低温環境下でも一次根や側根の発達が早く、根量を増やすことに優れているため多収になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、低温環境下における根の発生に関わる遺伝子が数種推定された。これにより、これら遺伝子群を選抜指標の一つとすることで、時期および環境特異的に根量が多い個体を、一部の細根をモニターすることにより選抜し、同一個体の果実の品質について継続的に調査することも可能になる。これは、品質重視から収量重視への育種目標の転換を推進する研究である。このような超多収性品種の育成により、低温環境下でも草勢が弱くならず暖房費の削減が可能になるとともに、環境面に配慮した新たな品種育成の指標ともなり得る。本研究は、園芸作物の育種分野に大きな革新をもたらす研究となる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the root development characteristics of the high-yielding strawberry cultivar 'Benihoppe' and the control cultivar 'Sachinoka' grown hydroponically in a low-temperature environment. As a result, it was confirmed that the amount of roots generated in 'Benihoppe' was larger, and that rooting of fine roots was particularly rapid. Then, RNA was extracted from roots and transcriptome analysis was conducted. The expression of CRF4, which is expressed in roots and shoots at low temperatures, and ERF1, which is induced by abiotic stress, increased moderately in 'Benihoppe'. 'Benihoppe' was thought to have a slow response to low temperatures. Therefore, 'Benihoppe' could develop primary roots and lateral roots faster than 'Sachinoka' even in a low temperature environment, and it is thought that 'Benihoppe' is superior in increasing the amount of roots, resulting in a high yield.

研究分野：園芸科学

キーワード：イチゴ 根 発生 品種間差 低温 可視化 モニタリング 多収性

1. 研究開始当初の背景

日本におけるイチゴの品種育成は、促成栽培向きの品種を中心に、消費者ニーズに合わせて甘さや硬さなどの果実品質を重視して選抜が行われてきた。一方、収量は大果生産品種による増収もみられるが、低温期の暖房機による加温、養液土耕管理など、化石エネルギーや肥料の多投による栽培方法の改善により増収が図られてきた。しかし、過去5年間においては、高齢化や石油価格の高騰による暖房コストの削減に伴い日本のイチゴの栽培面積や収穫量は減少傾向にある。この問題を解決するためには、暖房を最小限に抑えた低温下で成長が停滞しない、収穫が落ち込まないなどの優れた特性を持つ、これまでにない超多収性品種を育成することが不可欠である。

2. 研究の目的

これまで申請者らはイチゴの多収性要因を地上部および地下部の特性から解明するため、多収性品種である‘紅ほっぺ’と対照品種である低収の‘さちのか’を用いて生理生態学的解析を行ってきた(Mochizukiら、2013; 2014)。その結果、多収性の特性の一つとして、低温環境下において根の減少が少ないことが考えられた。しかしながら、イチゴの地下部の特性について着目した研究報告は極めて少ない。この理由として、根の調査は破壊的で多大な労力を要することが挙げられる。植物の根は通常土中に存在するため、同一個体の根系を非破壊かつ経時的に観察、調査することは極めて困難である。他方で、厳寒期における根の発生機構を詳細に解明することは、イチゴの超多収性品種を育成する上で極めて重要な鍵と考えられる。そこで本研究では、まず(1)低温環境下で水耕栽培した多収性品種‘紅ほっぺ’と対照品種‘さちのか’において根の発生特性を詳細に解析した。次いで(2)それぞれの品種の根からRNAを採取し、次世代シーケンサーを介した網羅的な遺伝子発現解析を行い、生育段階や厳寒期の環境に特異的な根の発生制御メカニズムについて、器官形成、植物ホルモン合成等に関連する発現遺伝子レベルから明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 低温環境下で水耕栽培した多収性イチゴ‘紅ほっぺ’の根の発生特性

7.5 cm ポットで育苗したイチゴ‘紅ほっぺ’および‘さちのか’の根を水洗し、1株あたり3本の一次根を無作為に選び、糸で根の基部を軽く括り付けた。その後、クラウンを脱脂綿で覆い、容積11 Lのガラス水槽(20.4 cm × 39.8 cm × 17.2 cm)に8株を定植した。水耕栽培は人工気象室内で行い、室温は25/15 または15/5 (昼/夜) 日長は12時間とした。培養液はOAT-A処方(OAT アグリオ)をEC=0.5、pH=6.0に調整したものをを用いた。なお、培養液の温度は成り行きとした。光源には白色LEDを用い、植物体上部の光強度は約400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。定植後3日、7日、10日、14日、17日、21日(17日、21日は15/5 処理のみ)に無作為に選んだ一次根の長さ、細根の発生数および植物体の新鮮重を記録した。

(2) 低温環境下で水耕栽培した多収性イチゴ‘紅ほっぺ’の根におけるトランスクリプトーム解析

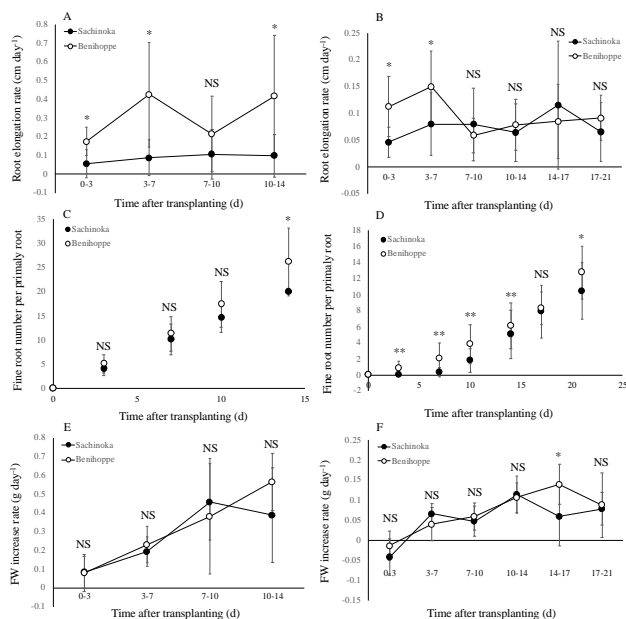
低温環境下または非低温環境下で水耕栽培したイチゴ両品種において、処理後3、7、14日後に植物体を抜き取り、根を採取した。根を直ちに液体窒素で凍結し、Hor borate法を修正してRNAを抽出した。抽出したRNAはNovogene社に委託し、トランスクリプトーム解析を行った。得られた結果をもとに、発根や根の分子に関わるとされる遺伝子の発現量解析、GO エンリッチメント解析およびKEGG エンリッチメント解析を行った。

4. 研究成果

(1) 25/15 条件における1日あたり一次根の伸長速度は、7-10日を除いて‘紅ほっぺ’が‘さちのか’に比べて有意に速かった(第1図A)。15/5 条件では定植後7日までは‘紅ほっぺ’が‘さちのか’に比べて有意に速かったが、その後は差がみられなかった(第1図B)。一次根から発生する細根の本数は25/15 条件では定植後14日において‘紅ほっぺ’が‘さちのか’に比べて有意に多かった(第1図C)。15/5 条件では定植後3日から‘紅ほっぺ’が‘さちのか’に比べて有意に多かった(第1図D)。植物体の新鮮重は15/5 条件の14-17日を除いて、品種間でどちらの温度処理においても差はみられなかった(第1図E、F)。以上より、‘紅ほっぺ’は一次根の伸長速度が速く、一次根から発生する細根の量が多いことがわかった。また、低温環境下において‘紅ほっぺ’の細根の発生が‘さちのか’に比べて早く確認された。従って、‘紅ほっぺ’は低温環境下でも細根の発根が速く、根の表面積を早く確保するため、根量が多くなると推察された。

(2) 低温で根やシュートで発現する *CRF4* (Zwackら、2016) や非生物的ストレスで誘導される *ERF1* (Chengら、2013) の発現が‘紅ほっぺ’では‘さちのか’よりも緩やかに発現が増加したことから、‘紅ほっぺ’は低温に対しての応答が緩慢であると考えられた。また、低温耐性抑制

に關する *DEAR1* (Tsutsui ら、2009) の発現が‘紅ほっぺ’は低温環境で0日目と比較して低下していたことから、‘紅ほっぺ’は低温耐性獲得に有利であると考えられた。一方、‘紅ほっぺ’では‘さちのか’よりも根の発生を抑制する *ERF13* (Lv ら、2021) や *ERF115* (Lakehal ら、2020) 根の伸長を抑制する *MYC2* の発現が低かった。また、低温環境下において0日目と比較して根の発生に關する *ARF1* (Xu and Scheres, 2005) 遺伝子の発現が高かった。これらのことから、‘紅ほっぺ’は‘さちのか’と比較して一次根や側根の発達が早く、低温においても根量を増やすことに優れていると考えられた。低温処理では、両品種ともに3日目において、リボソーム関連遺伝子とスプライソソーム関連遺伝子の発現が低下し、7、14日目においても継続的にリボソーム関連遺伝子の発現が低下した。このことから、低温に曝されたイチゴでは転写、翻訳が非低温と比較して低下していると考えられた。植物の低温シグナル伝達として機能していると考えられている MAPK 経路の遺伝子が‘紅ほっぺ’よりも‘さちのか’で応答が早かったことから、‘紅ほっぺ’は低温に対して鈍感であることが考えられた。一方、いくつかの低温応答遺伝子は、低温処理後数時間で発現が上昇することが報告されている。そのため、‘紅ほっぺ’の保有する低温応答遺伝子は、3日目より早い段階で働いている可能性も考えられた。以上のことから、‘紅ほっぺ’は根の発生、伸長に關する遺伝子の発現が高く、根量の確保に優れていることがわかった。低温に対しては、‘紅ほっぺ’は‘さちのか’よりも鈍感か、あるいはより早い段階で低温耐性を獲得している可能性が考えられた。‘紅ほっぺ’の低温環境応答をより詳細に明らかにするためには、本研究よりも早い段階におけるサンプリングを行う必要があると推察された。



第1図 ‘紅ほっぺ’と‘さちのか’における1日あたりの一次根の伸長速度 (A, B)、一次根から発生する細根本数 (C, D) および植物体新鮮重の推移 (E, F)。人工気象室内の栽培温度は25/15 (A, C, E) および 15/5 (B, D, F) に設定した。*, NS は t 検定の結果 5%水準で有意差あり、または有意差がないことを示す。

一方、いくつかの低温応答遺伝子は、低温処理後数時間で発現が上昇することが報告されている。そのため、‘紅ほっぺ’の保有する低温応答遺伝子は、3日目より早い段階で働いている可能性も考えられた。以上のことから、‘紅ほっぺ’は根の発生、伸長に關する遺伝子の発現が高く、根量の確保に優れていることがわかった。低温に対しては、‘紅ほっぺ’は‘さちのか’よりも鈍感か、あるいはより早い段階で低温耐性を獲得している可能性が考えられた。‘紅ほっぺ’の低温環境応答をより詳細に明らかにするためには、本研究よりも早い段階におけるサンプリングを行う必要があると推察された。

第1表 根の分枝および発生に關する遺伝子群の発現量の比較

遺伝子名	遺伝子機能	Accession No.	環境条件	‘紅ほっぺ’				‘さちのか’			
				処理0日目	処理3日目	処理7日目	処理14日目	処理0日目	処理3日目	処理7日目	処理14日目
<i>CRF4</i>	低温で根やシュートで発現	Q9SUE3	低温	1.00 ^a	1.44	1.71	2.15	0.85	1.92	2.29	1.83
			非低温		0.83	1.99	1.80		0.84	1.70	0.80
<i>ERF1</i>	非生物的ストレス耐性関連	Q8LDC8	低温	1.00	1.41	3.20	4.55	0.87	5.30	3.59	7.08
			非低温		1.17	3.05	0.74		0.90	3.28	1.00
<i>bZIP44</i>	塩・乾燥ストレスで増加	C0Z2L5	低温	1.00	1.21	1.04	1.27	0.65	0.69	1.22	1.61
			非低温		1.02	1.00	0.76		0.93	1.22	0.79
<i>bZIP68</i>	ストレス耐性遺伝子抑制 生長関連遺伝子促進	Q84LG2	低温	1.00	8.91	6.12	7.93	1.63	7.32	7.57	3.98
			非低温		4.34	7.00	1.11		3.88	6.43	2.69
<i>DEAR1</i>	低温耐性抑制	Q9SNE1	低温	1.00	0.26	0.38	0.39	1.09	0.55	0.53	1.07
			非低温		0.35	0.38	0.42		0.39	0.55	0.29
<i>ARR1</i>	根の伸長抑制	Q940D0	低温	1.00	2.24	1.90	3.01	0.95	2.16	2.30	1.71
			非低温		1.37	2.06	0.70		1.21	1.67	1.00
<i>ERF13</i>	側根形成抑制	Q8L9K1	低温	1.00	0.53	0.36	0.16	0.82	0.60	0.28	0.30
			非低温		0.53	0.39	0.50		0.74	0.52	0.92
<i>ERF115</i>	不定根発生抑制	Q9LY29	低温	1.00	0.38	0.40	0.42	1.00	0.56	0.54	1.10
			非低温		0.61	0.41	0.56		0.84	0.67	0.49
<i>MYC2</i>	ジャスモン酸シグナル伝達因子 根の伸長阻害	Q39204	低温	1.00	1.76	1.90	2.34	1.11	2.76	2.99	2.05
			非低温		1.00	2.17	0.52		1.11	2.66	0.85
<i>ARF1</i>	根毛発達	Q9SLB7	低温	1.00	1.48	1.50	1.71	1.25	1.47	1.38	1.23
			非低温		1.22	1.70	0.94		0.95	1.27	0.95
<i>ARF19</i>	側根形成を制御	Q8L7G0	低温	1.00	1.92	1.34	2.27	1.12	2.06	2.06	1.61
			非低温		1.21	1.70	0.65		1.15	1.67	0.89
<i>LBD16</i>	側根形成促進	Q8RYC8	低温	1.00	0.26	0.34	0.67	1.42	0.44	0.31	0.29
			非低温		0.30	0.40	0.34		0.33	0.30	0.35
<i>PIN1</i>	オーキシン輸送	Q94G00	低温	1.00	0.86	0.78	0.81	0.86	0.82	0.77	0.90
			非低温		0.98	0.74	1.11		1.13	0.90	1.12
<i>LAX3</i>	オーキシン輸送促進	Q9FEL6	低温	1.00	1.30	1.01	0.84	0.92	1.01	0.77	0.98
			非低温		1.24	1.13	1.27		0.97	0.85	0.99
<i>WR11</i>	根のオーキシン恒常性	Q6X5Y6	低温	1.00	1.85	1.85	2.37	0.92	3.38	1.11	1.10
			非低温		1.83	2.50	1.14		1.40	1.70	2.79

^a0日目の‘紅ほっぺ’のFPKMを1とし、各処理区でのFPKMを相対的に示した。統計処理は正規化前のFPKMを参照し、各品種の0日目と比較した。赤字は有意な増加、青字は有意な減少を示す。太字および下線は品種間に有意差があるものを示す。各統計処理には検定を用いた (p < 0.05)。

<引用文献>

- Mochizuki, Y., Y. Iwasaki, M. Funayama, S. Ninomiya, M. Fuke, Y. Y. New, M. Yamada and I. Ogiwara. 2013. Analysis of a High-yielding Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Cultivar 'Benihoppe' with Focus on Dry Matter Production and Leaf Photosynthetic Rate. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 82(1): 22-29.
- Mochizuki, Y., Y. Iwasaki, M. Fuke and I. Ogiwara. 2014. Analysis of a High-yielding Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) Cultivar 'Benihoppe' with Focus on Root Dry Matter and Activity. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 83(2): 142-148.
- Tsutsui, T., W. Kato, Y. Asada, K. Sako, T. Sato, Y. Sonoda, S. Kidokoro, K. Yamaguchi-Shinozaki, M. Tamaoki, K. Arakawa, T. Ichikawa, M. Nakazawa, M. Seki, K. Shinozaki, M. Matsui, A. Ikeda and J. Yamaguchi. 2009. DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in *Arabidopsis*. Journal of Plant Research. 122: 633-643.
- Lv. B., K. Wei, K. Hu, T. Tian, F. Zhang, Z. Yu, D. Zhang, Y. Su, Y. Sang, X. Zhang and Z. Ding. 2021. MPK14-mediated auxin signaling controls lateral root development via ERF13-regulated very-longchain fatty acid biosynthesis. Molecular Plant. 14: 285-297.
- Lakehal. A., L., A. Dob, Z. Rahnesan, O. Novak, S. Escamez, S. Alallaq, M. Strned, H. Tuominen and C. Bellini. 2020. ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115 integrates jasmonate and cytokinin signaling machineries to repress adventitious rooting in *Arabidopsis*. New Phytologist. 228: 1611-1626.
- Xu, J. and B. Scheres. 2005. Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 Function in Epidermal Cell Polarity. Plant Cell. 17: 525-536.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 望月佑哉・細久保安奈・井上栄一
2. 発表標題 低温環境下で水耕栽培した多収性イチゴ‘紅ほっぺ’の根の発生特性
3. 学会等名 園芸学会令和4年度園芸学会秋季大会
4. 発表年 2022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
---------	---------