

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658034

研究課題名(和文)花成促進組換え台木から穂木へ花成は伝わるか

研究課題名(英文)Can transgenic rootstock accelerated flowering transduce flowering signal to scion?

研究代表者

和田 雅人(WADA, Masato)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所リンゴ研究領域・上席研究員

研究者番号：40241773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：果樹リンゴの花成シグナル伝播試験、rolC:AtFT組換えリンゴを台木にし、非組換えリンゴを穂木にし、穂木長を変えて接ぎ木をした。2年の研究期間、穂木の花成誘導を観察、しかし穂木長にかかわらず花成誘導は起こらなかった。芽接ぎも試みたが、研究期間内で結果は得られなかった。MdTFL1をサイレンシングした組換えリンゴを台木にし、サイレンスシグナルが非組み換え穂木に伝わるか同様な接ぎ木試験を行ったが、穂木に花成を誘導することは出来なかった。穂木長以外にも、2股にした枝の一方に組換え体リンゴを接ぎ木し、もう一方の葉をすべて取り去り、非組み換えの枝のシンク能を高めたが、その枝でも花成誘導は起こらなかった。

研究成果の概要(英文)：In the signal transduction experiments of flowering on apple, transgenic apples by rolC:AtFT were rootstocks, and nontransgenic apples were scions. They were grafted with changing length of scions. For 2 years of the experiment, no flower induction of scions were observed in spite of lengths. Bud grafting has been tried, we did not have the results in this research period. MdTFL1 suppressed rootstocks by silencing were used for same grafting experiment to detect silencing signal transduction. Nontransgenic scions have not promoted flowering. In other experiment, two shoots from nontransgenic apple was grafted rolC:AtFT transgenic apple to one shoot and other shoot were removed all leaves. The shoot without leaves seemed to increase sink ability, but the shoot did not set flowers.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：花成 リンゴ 台木 接ぎ木

1. 研究開始当初の背景

木本植物であるリンゴは、種子から開花、結実までの1世代に数年を要する。台木を使用して開花までの年限を短縮しても従来の栽培法では3~4年の幼若相の短縮は出来ないと考えられている。我々はこれまでリンゴの世代時間を短縮し、遺伝解析や育種の効率を上げる目的で研究を行ってきた。シロイヌナズナなどのモデル植物で得られた知見を参考にし、シロイヌナズナやイネの花成で主要な働きをする遺伝子に注目した。ひとつは、シロイヌナズナの *FT* 遺伝子、イネの *Hd3a* 遺伝子で、これらを導入し過剰発現させた組換えリンゴは、数ヶ月で開花した。同様にリンゴの *FT* 相同遺伝子 *MdFT1*、*MdFT2* も過剰発現により開花を促進することが出来た。もうひとつは花成抑制に働くシロイヌナズナの *TFL1* 遺伝子である。リンゴの相同遺伝子 *MdTFL1* の発現を抑えた組換えリンゴでも、花成が促進された。*FT* 過剰発現組換え体に比べ *MdTFL1* 抑制組換え体の開花は遅れたが、*FT* 過剰発現リンゴの花が花器官を欠損するものが多いのに対し、*MdTFL1* 抑制体の花は正常に近いものが多かった。このようにリンゴでも *FT/TFL1* の機能は保存されていることが分かった。

2. 研究の目的

リンゴでの開花促進は成功したが、導入した遺伝子がリンゴのゲノム中に組み込まれているため、組換え植物としての制約が付きまとい、解析や育種のツールとしての使いやすさがまだ不十分である。シロイヌナズナやイネの *FT* タンパク分子はフロリゲンとして、日長刺激を受けた葉から維管束を通じて茎頂部へ輸送され、花成誘導に働くと考えられている。そこで、我々は、*FT* や *MdFT1* が過剰に発現している組換え体および *MdTFL1* がサイレンシングされている組換え体を台木にし、非組換えリンゴを接ぎ木し、この非組換え体穂木に花成を誘導させることを試み、花成シグナルの効率的な伝播と花成を誘導する条件を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

花成促進組換えリンゴを台木にし、穂木に非組換えリンゴを接ぎ木する。この穂木へ花成シグナルが伝播し花がつく条件を調べる。まず、台木長を一定にし、非組換え穂木の長さを変えてその効果を調べる。また同じ条件下での非組換え体の芽接ぎを行う。また *FT* 分子種の違いによる花成誘導効果を検討するためシロイヌナズナ *AtFT*、リンゴ *MdFT2* やイネ *Hd3a* を導入した組換えリンゴを作出する。また細胞透過ペプチド(CPP)をつけた *FT* 分子を作成し、これを導入した組換えリンゴを作出し、植物体内の伝播への効果を調べる。また、台木から穂木への伝播の有無を調べる

ため *MdFT* や *FT* タンパク質に特異的な抗体の作成を行う。

4. 研究成果

リンゴ *MdFT2* およびイネ *Hd3a* では花成誘導が起こらなかったため、果樹リンゴでの花成シグナル伝播の試験として、*rolCA**FT* 組換えリンゴ(維管束でシロイヌナズナ *FT* を発現し、早期花成、四季咲き性を持つ組換え体)を台木にし、非組換えリンゴの穂木長を変えて接ぎ木をした。研究機関の2年間穂木への花成誘導を観察した。穂木長にかかわらず、非組換え体の花成誘導は観察できなかった。芽接ぎも行ったが、研究期間内で結果が得られなかった。また、*MdTFL1* をサイレンシングした組換えリンゴ(早期花成、四季咲き性を持つ組換え体)を台木にし、サイレンスシグナルが非組み換え穂木に伝わるか、同様に接ぎ木試験を行ったが、2年間で穂木に花成を誘導することは出来なかった。穂木長以外にも、2股にした枝の一方を組換え体リンゴにし、もう一方の葉をすべて取り去り、非組み換えの枝をソースにしたが、その枝でも花成誘導は起こらなかった。*AtFT* や *MdTFL1* の RNA 分子を穂木で検出すること、またタンパク分子を検出することも出来なかった。以上の結果は、草本のモデル植物で提唱されている仮説、葉で光周性を感受し、そのシグナルを茎頂部に伝え花成を誘導することが、木本植物であるリンゴでは働いていない可能性を強く示唆した。また、サイレンシングシグナルが台木から穂木へ伝播しないことから、耐病性などのサイレンシングシグナルを付与した台木に非組み換え穂木を接ぎ木すれば GM 植物ではないものを無農薬で栽培することなどが期待できるが、本実験では否定的な結果となった。ただし、*FT* シグナル伝播には維管束系での何らかの輸送体の必要性や、サイレンシングシグナルの伝播も同様な伝達系の存在も想定されるため、今後はそれらの解明および応用に研究の焦点を当てるべきだと考える。

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 6件)

Norimitsu Tanaka, Ayano Ureshino, Narumi Shigeta, Naozumi Mimida, Sadao Komori, Sae Takahashi, Yuki Tanaka-Moriya, Masato Wada (CA) (2014) Overexpression of *Arabidopsis FT* gene in apple leads to perpetual flowering. *Plant Biotechnology*, 査読有り, 31:1-10.

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.13.0912a
Chunfen Zhang, Tasuro Tsukuni, Miyuki Ikeda, Mamoru Satoh, Hatsuhiko Okada, Yoshitaka Ohashi, Hideyuki Matsuno, Toshiya Yamamoto, Masato Wada, Nobuyuki Yoshikawa, Shogo Matsumoto, Jijun Li, Naozumi Mimida, Manabu Watanabe, Akira Suzuki, Sadao Komori (2013) Effects of microspore development stage and cold pre-treatment of flower buds on embryo induction in apple (*Malus × domestica* Borkh.) anther culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 査読有り、82: 114-124.
<http://dx.doi.org/10.2503/jjshs1.82.114>
Hitomi Umemura, Shungo Otagaki, Masato Wada, Satoru Kondo, Shogo Matsumoto (2013) Expression and functional analysis of a novel MYB gene, MdMYB110a_JP, responsible for red flesh, not skin color in apple fruit. *Planta*, 査読有り、238:65-76.
DOI 10.1007/s00425-013-1875-3
Naozumi Mimida, Sadao Komori, Akira Suzuki, Masato Wada (CA) (2013) Functions of the apple TFL1/FT orthologs in phase transition. *Scientia Hort.* 査読有り、156: 106-112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.04.001>
Monrudee Kittikorn, Katsuya Okawa, Hitoshi Ohara, Satoru Kondo, Nobuhiro Kotoda, Masato Wada, Mineyuki Yokoyama, Ohji Ifuku, Ariake Murata and Naoharu Watanabe (2013) Application of an Analog of 9, 10-ketol-octadecadienoic acid (KODA), Affected Flower Bud Formation and *MdTFL1* and *MdFT1* Gene Expressions in Apple Buds under Heavy-crop and Shade Conditions. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 査読有り、

138(2):102-107.

<http://journal.ashspublications.org/content/138/2.toc>

Naozumi Mimida, Jijun Li, Chunfen Zhang, Shigeki Moriya, Yuki Moriya-Tanaka, Hiroshi Iwanami, Chikako Honda, Hidemi Oshino, Kaori Takagishi, Akira Suzuki, Sadao Komori, Masato Wada(CA).

(2012) Divergence of *TERMINAL FLOWER1*-like genes in Rosaceae. *Biologia Plantarum*. 査読有り、56(3): 465-472.
<http://link.springer.com/journal/10535/56/3/page/1>

[学会発表](計 12件)

日本植物生理学会第55回年会

果実で発現する MdFT 遺伝子の解析
和田雅人、田中紀充、守谷友紀、本多親子、岩波宏、花田俊男、小森貞男

(2014)講演要旨集337

園芸学会平成26年度春季大会

リンゴ赤果肉品種の果実のアントシアニン蓄積に光と温度が及ぼす影響 本多親子、岩波宏、花田俊男、守谷友紀、和田雅人
(2014) 園学研 13 別1, 262

園芸学会平成26年度春季大会

リンゴの単為結果果実へのジベレリン処理が果実肥大および果実品質に及ぼす影響
田中紀充、岸本結香、山口維尚、和田雅人、守谷友紀、荒川修 (2014) 園学研 13 別1, 264

園芸学会平成26年度春季大会

リンゴの結果枝の長さが果実品質に及ぼす影響の調査 山口維尚、田中紀充、小森貞男、和田雅人、守谷友紀、太田宇則、福岡萌乃、荒川修 (2014) 園学研 13 別1, 265

園芸学会平成25年度秋季大会

公開シンポジウムI 果実形成研究の最前線 - 園芸作物ゲノム情報の実用品種への活用の現状と未来- 4 単為結果リンゴ

品種の解析 田中紀充、和田雅人 (2013) 園学研 12 別2, 38-39

園芸学会平成25年度秋季大会

リンゴMdPI抑制リンゴの解析 和田雅人、田中紀充、守谷(田中)友紀、花田俊男、本多親子、岩波宏、小森貞夫 (2013) 園学研 12 別2, 70

園芸学会平成25年度秋季大会

予備摘果時期がリンゴ‘ファーストレディー’の早期みつ症に及ぼす影響 中條誉志幸、小野寺玲子、原田芳郎、佐藤光明、本多親子、岩波宏、和田雅人、高橋和博 (2013) 園学研 12 別2, 74

園芸学会平成25年度秋季大会

リンゴにおける早期落果性の品種間差の評価方法岩波宏、守谷友紀、本多親子、花田俊男、和田雅人 (2013) 園学研 12 別2, 75

園芸学会平成25年度秋季大会

リンゴ‘はるか’における果実中デンプン含量と新梢葉の光合成速度の変化 佐々木舟、渡邊学、村上政伸、佐川了、和田雅人 (2013) 園学研 12 別2, 288

園芸学会平成25年度秋季大会

ニホンナシ果実成熟期に発現変動するbHLH遺伝子の研究滋田徳美、和田雅人、中島育子、斎藤寿広、國久美由紀、寺上伸吾、山本俊哉、西谷千佳子 (2013) 園学研 12 別2, 290

園芸学会平成24年度秋季大会

MdFT2過剰発現組換えリンゴの解析 和田雅人、耳田直純、田中紀充、守谷(田中)友紀、本多親子、岩波宏、小森貞男 (2012)園学研 11 別 2, 127

果樹バイテクゲノム研究会

リンゴの接ぎ木伝播性シグナル利用に関する研究 和田雅人、守谷(田中)友紀、本多親子、岩波宏、小森貞男 (2012) 講演要旨集 7p

〔図書〕(計 2件)

和田雅人、JA 全農、グリーンレポート JM 台木を利用したリンゴ低樹高栽培における作業の省力効果、2013、8-9.

和田雅人 他、化学同人、形質転換プロトコル(植物編)「リンゴの形質転換プロトコル」、2012、157-166.

6. 研究組織

(1)研究代表者

和田 雅人 (WADA, Masato)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所 リンゴ研究領域 上席研究員

研究者番号 4 0 2 4 1 7 7 3