

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871104

研究課題名(和文) 二年生テンサイの低温要求性の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of chilling requirement in biennial sugar beet

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畑作基盤研究領域・主任研究員

研究者番号：40595071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：栄養成長から生殖成長への成長相転換をさす「花成」のタイミングは、植物の適応性や作物の生産性を大きく左右する。二年生植物における花成の誘導にはある一定期間の冬(低温)が必要であるが、花成に必要な冬の長さはどのように決定されているのか明らかでない。本研究は、二年生テンサイ(*Beta vulgaris*)の分子機構を解析した結果、日本で育成された二年生テンサイの低温要求性には一年生と二年生のマスター遺伝子として知られているBvBTC1が大きく関与していることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Timing of flowering, which refers to the growth phase transition, is greatly affects the productivity of crops as well as the adaptability of the plant. Although cold period like winter is necessary for the biennial plants to induce flowering, it is not clear how to determine the length of cold periods to promote flowering. The present study found that the BvBTC1, which was known as a master gene distinguishing annual from biennial, was greatly involved in the chilling requirement of Japanese sugar beet (*Beta vulgaris*).

研究分野：植物育種学

キーワード：低温(春化)要求性 抽苔耐性 二年生 テンサイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 二年生植物は1年目には栄養成長してそのまま越冬し、2年目に生殖成長して2年間の生活環を終える。二年生植物の花成の誘導にはある一定期間の低温(春化)を絶対的に必要とするため、低温要求性の現象を解明することは、二年生植物の生活環の本質を明らかにするために重要である。近年、シロイヌナズナやイネなどの一年生モデル植物では花成に關与する遺伝子の単離、機能解析や、多数系統による変異解析等によりこれまで知られていなかった遺伝子レベルでの花成制御のメカニズムへの理解が急速に深まりつつある。しかし、これまでに二年生植物の花成のタイミングを決定づける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。

(2) 近年、二年生植物では初めてとなるテンサイの全ゲノム情報が公開された(Dohm et al. 2012)。この情報を活用すれば、二年生植物の低温要求性に關与する遺伝子を効率よく探索・単離できる。テンサイはナデシコ目に属し、これまでにゲノムの解読が進められているシロイヌナズナ、イネ、ダイズ、リンゴ、トマトなどとも比較的遠縁な関係にあるため、遺伝子や分子機構の比較により低温要求性に關連する新しい知見が期待できる。

(3) 低温要求性には複数の遺伝子の關与が想定される。そのため最初から由来が異なる系統を解析に用いると、それぞれの遺伝子の効果を明らかにすることは困難である。申請者はこれまでにテンサイの育種研究を通じて、由来の明らかな系統を多数保有している。その中で、原系統からわずか数%程度の選抜圧で低温要求性が高い(抽苔しにくい)系統の分離を見出した。少数で効果の高い遺伝子の存在が推定されるこの原系統と選抜系統は、遺伝的背景が似通っているため低温要求性に關与する遺伝子を効率よく単離できる。さらに由来の異なる複数ペアの原系統と選抜系統から単離された關与遺伝子を統合することで、複数の遺伝子の關与が想定される低温要求性の分子機構を包括的に明らかにすることが期待できる。

2. 研究の目的

テンサイゲノムの情報や、少数で効果の高い遺伝子が推定される低温要求性の低い原系統と低温要求性の高い選抜後の系統に着目し、二年生植物テンサイの低温要求性に關与する候補遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) テンサイの低温要求性に關連する DNA 配列の単離
- (2) 低温要求性と BvBTC1 多型との関係 I (遺伝的に固定化が進んだ系統)
- (3) 低温要求性と BvBTC1 多型との関係 II (遺

伝的に分離する雑種系統)

- (4) 低温要求性と BvBTC1 多型との関係 III (交雑後代)

4. 研究成果

(1) 遺伝的背景が似通っているものの低温要求性が異なる系統間で DNA 多型を比較した解析により低温要求性に關連する分子マーカーの探索を行った。AFLP 法に基づく 1024 種類のプライマーペアによる多型を解析した結果、10 種類のプライマーペアにより低温要求性の程度への關連が期待される多型を見出し、さらに、それらの多型バンドのクローニングにより、BvBTC1 と高い相同性を示す遺伝子領域が単離された。

(2) BvBTC1 は、時計遺伝子の機能をもつ遺伝子群に属し、一年生と二年生を制御するマスター遺伝子として報告されているが、二年生テンサイの低温要求性(抽苔耐性)への程度關与しているのか明らかでない。そこで、当年抽苔しやすい抽苔耐性が弱い日本の育種系統 6 種類の中にどのような BvBTC1 のハプロタイプが含まれるのかを cDNA シーケンスにより解析した。その結果、日本の育成系統には二年生特有のハプロタイプ("a")のほかにも 2 種類の一年生特有のハプロタイプ("f"および"g")が含まれることを明らかにした。また、簡易判別可能な CAPS マーカーを作成(図 1)して、過去の特性検定により抽苔耐性が"強"~"弱"であることが明らかな、遺伝的にも固定化が進んだ 35 系統 207 個体の BTC1 遺伝子型を解析して、抽苔耐性が強い系統ほど、遺伝子型 aa の頻度が高く(強 78%、中 53%、弱 29%)、ハプロタイプ"f"および"g"を持つ遺伝子型の頻度が低いことなどを明らかにした(図 2)。

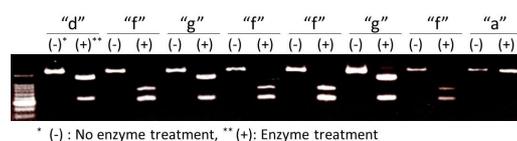


図 1. 開発した CAPS マーカーによる遺伝子型のパターン

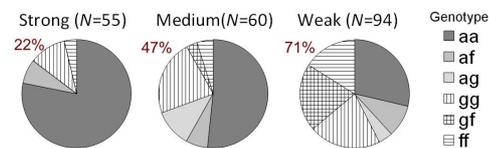


図 2. 抽苔耐性と BvBTC1 遺伝子型との関係

(3) 同一系統内で BvBTC1 遺伝子型の分離が想定される 7 系統 210 個体を用いて、人為春化处理法により誘発された抽苔の有無による表現型と BvBTC1 遺伝子型との關連を解析した。その結果、BvBTC1 遺伝子型の頻度は、同一系統内の未抽苔個体と抽苔個体で異なる

り(p<0.01),未抽苔個体ほどハプロタイプ“a”を持つ *BvBTC1* 遺伝子型の割合が高く,ハプロタイプ“f”および“g”の *BvBTC1* 遺伝子型の割合が少ない傾向が明らかになった(表1).

表1. 抽苔表現型と *BvBTC1* 遺伝子型との関係の一例

Strain	Bolting tolerance	Pheno -type	N	Genotype (%)					
				aa	af	ag	gg	gf	ff
StrainE	Medium	B	6	0	0	17	83	0	0
		NB	14	100	0	0	0	0	0
StrainF	Medium ~Weak	B	16	0	6	0	13	50	31
		NB	16	0	25	13	6	50	0

(4) *BvBTC1* 遺伝子の効果をより詳細に解明するために、抽苔発生の少ない遺伝子型“aa”のテンサイ系統(NK-219mm-O)と抽苔発生の多い遺伝子型“gg”のテンサイ系統(NK-323mm-O)の分離世代を育成(図3)して、その当年抽苔の変異について調査した。F3系統群(n=112)の遺伝子型の内訳は、“aa”が28系統,“ag”が54系統,そしてggが30系統であった。また、F6系統群(n=66)の内訳は、“aa”が24系統,“ag”が8系統,そして“gg”が34系統であった。F6系統群では“gg”の頻度が“aa”に比べて若干多かったものの、各世代の遺伝子型の頻度と期待値の間に相違はみられなかった(p>0.05,χ²検定)。圃場で発生した抽苔率は、各系統群の両親系統間で明確な相違がみられ、NK-219mm-Oが全期間を通じて0%であったのに対し、NK-323mm-Oが6月17日にはほぼピークに達して83.3%であった(図4)。同日における系統群全体の平均抽苔率は53.9%(F3系統群)および75.0%(F6系統群)であったが、各系統群の抽苔率には広いレンジが見られた(図5)。その抽苔率は、遺伝子型によって異なり(p<0.01)、遺伝子型“aa”の抽苔率(F3, 16.8%; F6, 49.3%)が、遺伝子型“ag”(F3, 61.0%, F6, 79.2%)や“gg”(F3, 92.0%, F6, 92.1%)と比べて低いことを明らかにして(図5, 表2), *BvBTC1* が二年生テンサイの低温要求性には大きな影響を及ぼす要因であることを突き止めた。

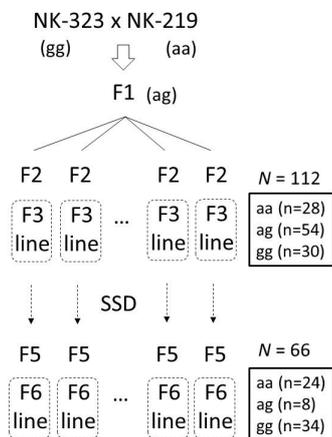


図3. 分離集団の *BvBTC1* 遺伝子型の構成

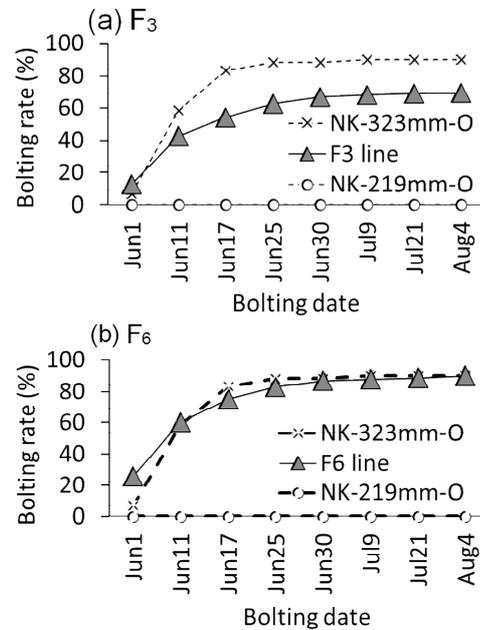


図4. 抽苔率の推移 (a) F3系統群, (b) F6系統群

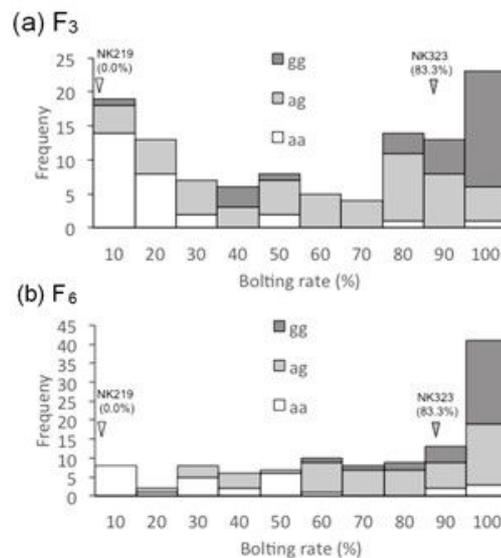


図5. *BvBTC1* 遺伝子型からみた F3 系統群(a) および F6 系統群(b)の抽苔率(%、6/17)の頻度分布

表2. *BvBTC1* 遺伝子型からみた F3 系統群および F6 系統群の平均抽苔率 (%、6/17)

<i>BvBTC1</i> genotype	Bolting rate (%)					
	F3 lines (n=112)			F6 lines (n=66)		
	n	ave.	sd	n	ave.	sd
aa	28	16.3	23.3	24	49.3	38.3
ag	54	56.8	28.4	8	79.2	25.7
gg	30	83.9	23.9	34	92.1	22.4
χ ² test	p < 0.01			p < 0.01		

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 田口和憲, 春化苗を利用したテンサイの採種 I. 温室における苗と母根の比較, てん菜研究会報, 査読有, 56, 2015, 1-6

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 田口和憲, 春化苗を利用したテンサイの採種 II. 生育条件が開花形質へ及ぼす影響, てん菜研究会報, 査読有, 56, 2015, 7-12

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 田口和憲, 春化苗を利用したテンサイの採種 III. 抽苔耐性が高温条件下の開花形質へ及ぼす影響, てん菜研究会報, 査読有, 56, 2015, 13-20

〔学会発表〕(計8件)

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 松平洋明, 田口和憲, 一年生と二年生のマスター遺伝子 BvBTC1 はテンサイの当年抽苔を制御する, 日本育種学会第 129 回講演会, 2016 年 3 月 22 日, 横浜・横浜市立大学

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 松平洋明, 田口和憲, テンサイの分離世代における当年抽苔の変異, 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会平成 26 年度年次講演会, 2015 年 12 月 5 日, 札幌・北海道大学

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 田口和憲, 脱春化处理によるテンサイの花成関連遺伝子の発現量の変化, 日本育種学会第 128 回講演会, 2015 年 9 月 12 日, 新潟・新潟大学

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 田口和憲, 春化处理後の高温によるテンサイの脱春化の評価, てん菜研究会第 13 回技術発表会, 2015 年 7 月 17 日, 札幌・北農ビル

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 田口和憲, 日本のテンサイにおける抽苔遺伝子 BvBTC1 の変異, 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会平成 26 年度年次講演会, 2014 年 12 月 6 日, 江別・酪農学園大学

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 田口和憲, 日本のテンサイにおける抽苔遺伝子座 B の変異, 日本育種学会第 126 回講演会, 2014 年 9 月 27 日, 都城・南九州大学

黒田洋輔, 田口和憲, 岡崎和之, 高橋宙之, テンサイの低温による花成関連遺伝子発現量の変化, 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会平成 25 年度年次講演会, 2013 年 12 月 7 日, 江別・酪農学園大学

黒田洋輔, 高橋宙之, 岡崎和之, 田口和憲, 低温処理後の高温がテンサイ幼苗の花成へ及ぼす影響, てん菜研究会第 11 回

技術発表会, 2013 年 7 月 19 日, 札幌・北農ビル

6. 研究組織

(1)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畑

作基盤研究領域・主任研究員

研究者番号: 40595071