

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20580026

研究課題名（和文）レタスのチップバーン発生機構の解明と抵抗性品種の選抜

研究課題名（英文）A study on a mechanism of tipburn incidence and selection of resistant cultivars in lettuce

研究代表者

宇野 雄一（UNO YUICHI）

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90304120

研究成果の概要(和文):チップバーンは、カルシウム欠乏時に発生する野菜の生理障害であり、収穫物の商品価値と収量を低下させる。本研究では、レタスのチップバーン抵抗性の簡易評価法を確立し、同方法により選抜した感受性品種が栽培時の指標品種として利用できることを確認した。また、チップバーンの原因遺伝子として、カチオン/H⁺アンチポーターをコードするCAX遺伝子を一候補とみなし、レタスから4種類の遺伝子（*LsCAX2*, *3a*, *3b*, および *5*）を単離し解析を行った。そのうち、2種類の遺伝子がコードするタンパク質にはCaの輸送特異性に関与する2つの領域が高度に保存されていた。さらに、CaCl₂による*LsCAX*遺伝子の発現誘導において、抵抗性品種と感受性品種との間に差異があり、同遺伝子がチップバーンと関係している可能性が推察された。*AtDREB1A*を別の原因遺伝子候補と考え、同遺伝子を過剰発現させたレタスのチップバーン抵抗性をコントロールと比較した結果、チップバーン発生率が有意に高いことが明らかとなり、ストレスとチップバーンとの関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文):Lettuce (*Lactuca sativa* L.) tipburn is a physiological disorder caused by calcium deficiency that decreases the crop value. In this study, an efficient method was established to evaluate lettuce resistance to tipburn in vitro. A sensitive cultivar identified by this method was validated its utility as indicator plants to monitor environmental conditions. On the other hand, to identify the responsible gene for tipburn incidence, four cDNAs corresponding to cation/H⁺ (CAX) exchanger were isolated from lettuce (*LsCAX2*, *3a*, *3b*, and *5*). Sequence alignment revealed that both A and B domains which involved in calcium selection were conserved in two LSCAXs. The different expression of *LsCAX* genes by CaCl₂ between sensitive and resistant cultivars suggested the relevance of these genes to tipburn incidence. *AtDREB1A* was supposed to be another responsible gene. Overexpression of *AtDREB1A* in lettuce resulted in increasing tip-burned leaves. This result indicated that tipburn incidence is involved in stress response of lettuce.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3700,000	1110,000	4,810,000

研究分野：野菜資源学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：カルシウム、Ca-Hアンチポーター、欠乏症、ストレス、チップバーン、抵抗性、レタス

1. 研究開始当初の背景

チップバーンは、植物がカルシウム欠乏に陥った際に頻発する、葉の先端部から壊死が始まる生理障害である。特にレタス等の葉菜類の可食部位に発生するものは商品価値を著しく低下させるため、その経済的損失は大きく、生産量の50%に達することもある(Benoit・Ceustermans, 1986)。また、チップバーン発生個体率が5%を超えると、同一圃場の収穫物の購入を拒否されるケースもある(Hayes・Simko, 2010)。特に結球性レタスにおけるチップバーンは、消費する段階になって初めて気づくことも多く、産地の信用に関わる重大な問題となっている。

チップバーンは、カルシウム欠乏以外にも、植物の成長速度に関与する多くの環境要因の影響を受ける。概して高温、窒素過多のような、植物の成長を促進する要因はチップバーンの発生頻度を高める(Saure, 1998)。このような理由から、チップバーンは夏季の露地栽培や、養液栽培のように生育を促進する条件下で多発する。このほかにも蒸散(Botterberg ら; Goto・Takakura, 1992; Barta・Tibbitts, 1986)、ジベレリンやサイトカイニンの植物ホルモン(Corgan・Cotter, 1971)がチップバーンの発生に影響することも報告されている。しかしながら、どれも原因の決め手になり得ず、チップバーンの発生要因と機構を特定するには至っていない。

チップバーンの対策は、発生しにくい品種を使用する方法であり、その選抜に関して、いくつかの報告例がある(Cox・McKee, 1976; Nagata・Stratton, 1994; Ryder・Waycott, 1998)。しかしながら、圃場栽培試験による評価が多く、変動幅が大きいため僅差が見分けにくい欠点がある。また、植物体が生育するまでの数ヶ月間の長い期間が必要となる上、スペースの問題から条件設定や供試品種に限界が生じる。そこで本研究では、迅速かつ省スペースで、環境を制御しやすい *in vitro* のチップバーン抵抗性評価法を開発することにした。

チップバーンのもうひとつの対策としては、発生しにくい環境を構築する方法が挙げられる。具体的な例としては、カルシウム剤の葉面散布、送風による蒸散促進(Goto・Takakura, 1992; Frantz ら 2004)、光サイクルの短縮化による乳管膨圧上昇の抑制(Tibbitts ら, 1985; Goto, 2003)、レタス茎部除去による、収穫後貯蔵時のチップバーン発生の抑制(Misaghi ら 1992)、遠赤外光の遮断などが報告されている。しかしながらこれらの方法は対症的であり、装置の初期コストや操作の煩雑性が問題であった。そこで、本研究では、コスト負担なしに環境をモニタリングできる技術の開発を目指し、感受性品種を指標として栽培植物と混植する方法を検討することにした。

チップバーンの抵抗性には品種間で強弱があることから、原因遺伝子の関与が示唆されており、特に *CAX* 遺伝子の持つ機能が重要視されてい

る(Hirschi, 1999)。*CAX* は液胞膜に存在する細胞質内の Ca 濃度の制御において重要な役割を担うカチオン/ H^+ アンチポーターである。シロイヌナズナでは、*CAX1*~*CAX6* のホモログが存在するが、特に *CAX1* がカルシウム輸送に関与し、 N 末端の自己阻害領域を欠損させた場合に(*sCAX1*)、 Ca^{2+} を特異的に輸送する活性型タンパク質として機能することが知られている。また、*sCAX1* をコードする cDNA を過剰発現させた場合に、様々な植物種において Ca 含有量が増加することが報告されている(Hirschi, 1999; Park ら, 2004, 2005, 2009)。さらに、*sCAX1* を過剰発現させたタバコでは若いシュートにおいてチップバーンが(Hirschi, 1999)、トマトでは尻腐れ病の多発が確認されており(Park ら, 2005)、 Ca^{2+} の液胞内隔離によって細胞質内の Ca^{2+} が不足することに起因すると考察されている。仮にレタスにおいても *CAX* 遺伝子が Ca 含有量に影響を与え、チップバーンの発生に関与するならば、同遺伝子の操作により抵抗性品種の作出が期待できる。そこで本研究では、レタス由来の *CAX* 遺伝子(*LsCAX*)の単離と発現解析を行い、チップバーンとの関連性を考察した。

他の原因遺伝子の候補として考えられるのは、ストレス関連の遺伝子である。チップバーン発生率が成長速度に比例することから、ストレスが関与していると考えられている(Saure, 1998)。そこで、乾燥・低温などストレスに応答する遺伝子群の発現を促進させる転写因子をコードするシロイヌナズナの *DREB1A* 遺伝子のチップバーンとの関連性を調べることにした。ここでは、*AtDREB1A* を過剰発現させて環境ストレス耐性が向上したトランスジェニック・レタスを材料として用い、チップバーン抵抗性を調査した。

2. 研究の目的

本研究では、レタスのチップバーン発生機構の解明と抵抗性品種の選抜を目指し、具体的には

- (1)レタスチップバーン抵抗性の *in vitro* 評価法の開発、
- (2)チップバーン感受性レタスの指標植物としての利用、
- (3)チップバーン関連候補遺伝子の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試材料

材料には、6種類の非結球型(リーフ)、5種類の半結球型(バターヘッド)、および8種類の結球型(クリスピーヘッド)のレタス品種を用いた。

(2) *in vitro* 評価試験

3%のスクロースのみを含む0.8%寒天培地にて発芽させたレタスの実生を、子葉完全展開時に様々な濃度の Ca および EGTA を含む MS 寒天培地に移植した。移植8日後にチップバーンの発生率を測定した。

(3) 養液栽培試験

1/2 Hoagland 水耕液で第3本葉形成時まで育苗した実生を、通常および Ca 無添加の Hoagland 水耕液にそれぞれ移植した。水耕栽培の期間は2週間とし、新鮮重およびチップバーン発生葉数を測定した。

(4) 養液土耕栽培試験

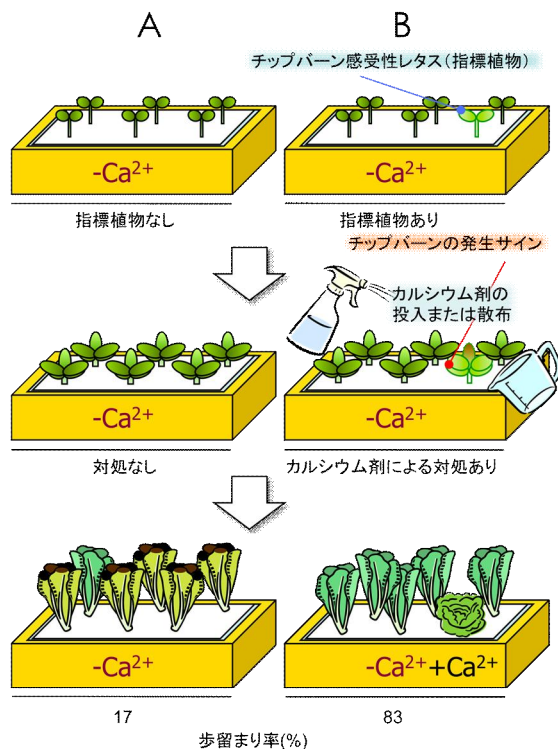
27日間育苗した実生苗を、バーミキュライトとパーライトを入れたプランターに定植し、養液を灌水して69日後に収穫した。養液と測定項目は前項にしたがって行った。

(5) 圃場栽培試験

第6葉が展開し始めた実生苗を実験圃場に定植し、慣行法で栽培した。チップバーンを促進させるために、元肥には石灰を使用せず、養液土耕栽培試験と同様に養液を施肥した。

(6) 指標品種を用いた試験

感受性品種‘マリノ’を指標品種として用い、養液栽培、養液土耕栽培、および圃場栽培により試験を行った。指標品種にチップバーンが出始めた時点で塩化カルシウム溶液を投与するか、市販のカルシウム剤を葉面散布して効果を確認



第1図 チップバーン感受性レタスの活用
指標植物の有無によるAおよびBの処理区を設定し、栽培用のレタスを栽培した。B区には指標植物として感受性レタスを一緒に栽培し、チップバーンが発生したことを確認した後、カルシウム剤の投入または葉面散布で対処した。

した(第1図)。

(7) *LsCAX* 遺伝子のクローニング

各 *LsCAX* 遺伝子の全長配列を決定するために、データベース上の EST 情報をもとにプライマーを設計し、RACE 法によりクローニングを行った。

(8) ストレス応答性と組織特異性の発現解析

無菌播種した7日目の実生を培地から引き抜き、根部を80mMの $CaCl_2$ 溶液、1%および10% PEG #200, 滅菌蒸留水に浸した。低温処理は、 $5^{\circ}C$ のインキュベーター内に移すことにより行った。短期試験の各処理時間は1, 3, 5, 10, 24時間とした。長期試験では、カルシウムを0mMおよび30mMに変更、もしくは1mMのEGTAを添加した播種用培地を予め使用し、7日間の培養を行った。組織特異性の材料には、4ヶ月齢のレタスの葉、根、花、蕾及び種子を用いた。それぞれの凍結サンプルからRNAを抽出し、RT-PCRまたはリアルタイムPCRにより発現解析を行った。また、サザンハイブリダイゼーションによりコピー数の推定を行った。

(9) *AtDREB1A* 過剰発現体におけるチップバーンの解析

35Sプロモータにより*AtDREB1A*遺伝子を過剰発現させたレタスを使用した。播種後7日目の実生をカルシウム無添加のMS培地に移植し、14日後にチップバーン発生葉数を調査した。

4. 研究成果

(1) レタスチップバーン抵抗性の *in vitro* 評価法の開発

寒天培地において第1葉が展開するまで生育させたレタス実生を0~0.6mMのカルシウムもしくはカルシウムに対して高いキレート作用のあるEGTAを0~1.0mM含む培地に移した。まず3つの品種を用いてチップバーン抵抗性判別に適した濃度の検討を行った結果、カルシウムの濃度間でのチップバーン発生頻度には差が見られなかった。EGTA区では0.01mMにおいてチップバーンが誘発されたが、0.1mMおよび1.0mMとの間で差異が見られた。チップバーンの発生は品種によって大きな差があり、障害発生要因の程度が高い条件と低い条件での評価が必要であると考え、0.01mMおよび1.0mMのEGTAを含む条件での品種評価を行った。リーフレタス、半結球レタス、結球レタスから合計19品種を評価試験に供試した。リーフレタスおよび半結球レタスにおいては0.01mM区、1.0mM区の両方でチップバーンの発生が観察された(第1表)。過去の研究ではチップバーンの評価に発生個体率が使用されていたが、本研究では発生葉率という指標を採用することでより適切に評価できた。結球レタスでは、どちらの濃度区においても有意差は認められなかった。リーフレタスの品種評価において、両方のEGTA濃度区で有意差の認められた‘ノーチップ’と‘マリノ’を用い、室内での水耕栽培と圃場でのポット栽培による実証試験を行うこととした。水耕栽培試験にはカルシウムを含まないよう組成変更したHoagland and Arnon養液を用いた。‘マリノ’では栽培4日目にはチップバーンが観察されたのに対し、‘ノーチップ’では7日目まで発生しなかった。また最終的なチップバーン発生率は‘マリ

第1表 in vitro チップバーン評価法によるレタスのタイプ別抵抗性

タイプ/品種	チップバーン発生葉率 (%)		
非結球型 (リーフ)			
グリーンウェーブ	71.7	± 5.1	a
マリノ	61.1	± 5.8	a
レッドファイヤー	60.6	± 8.0	ab
グランドラビット	47.2	± 5.2	ab
ハリウッド	46.1	± 6.4	ab
ノーチップ	32.2	± 8.4	b
半結球型 (バターヘッド)			
サンタクララ	66.7	± 7.7	a
オカヤマサラダナ	57.2	± 7.3	ab
ウェアヘッド	55.0	± 7.4	ab
サマーグリーン	30.8	± 8.4	b
サングリーン	20.0	± 4.8	b
結球型 (クリスピーヘッド)			
パークレー	19.4	± 6.1	a
キャスパー	18.3	± 7.1	a
ラプトル	18.3	± 6.6	a
キングクラウン	16.7	± 5.1	a
ブリザード	12.8	± 5.1	a
グレートレイクス 366	6.1	± 3.2	a
メルボルン MT	4.4	± 4.3	a
ロジック	4.4	± 2.9	a

1mM EGTA を含むカルシウム欠乏培地に 8 日間培養した際のチップバーン発生葉率
異なるアルファベットは、Tukey-Kramer の多重検定により 5% レベルで有意差があることを示す

ノ'の方が有意に高かった。露地栽培試験では通常の Hoagland and Arnon 養液またはカルシウムを欠乏させた養液を灌水し栽培したところ、両試験区ともに‘マリノ’の方が‘ノーチップ’よりも有意にチップバーン発生葉数が多くなった。これら2つの実証試験でカルシウム欠乏の程度が弱い条件と強い条件の両方で in vitro 評価と結果が一致し、本手法によるレタスのチップバーン抵抗性の評価が可能であることが分かった。本研究で明らかとなった抵抗性品種は生産現場の栽培品種として、感受性品種は、カルシウム剤投与のタイミングを予測する指標品種として利用できると考えられた。

(2) チップバーン感受性レタスの指標植物としての利用

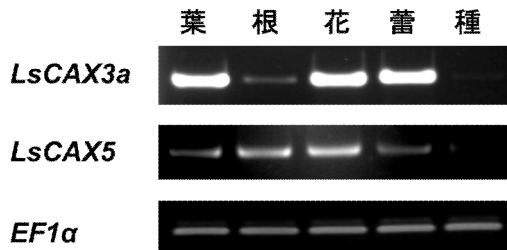
栽培用品種として‘ハリウッド’および‘フリルアイズ’、指標品種として‘マリノ’を用いた。室内の養液栽培試験において、対照区では栽培用品種・指標品種ともに健全に生育したが、カルシウム欠乏区では栽培開始 8 日目あたりから栽培用品種にチップバーンが発生した。指標品種‘マリノ’においては、栽培品種より2日程度早く症状が出たので、この時点でカルシウムを投与した。カルシウム非存在下において栽培品種の症状のみで対応した場合は歩留まり率が 42% であったのに対し、指標品種で対応すると 70% まで回復した。また、含水率を除くすべての調査項目において、指標品種の使用により有意な増加が認められた。栽培品種として供試した2品種において、同様の結果が得られた。さらに、アンモニア態窒素過多の試験を行った場合、カルシウム

存在下でもチップバーンが多発し、歩留まり率は 12% に落ち込んだが、指標品種の使用による早期対処の結果、67% まで回復した。温室内で結球性レタスを用いて養液土耕栽培試験を行った結果、同様にして指標品種を混植し、チップバーンが発生した時点でカルシウムを与えた場合、チップバーン発生葉率を有意に下げることができた。しかしながら、圃場試験においてはカルシウム投与による有意差が確認できなかった。この原因は、土壤中の残留カルシウムや、窒素過多、湿度など複合要因の影響によるものと考えられた。以上により、チップバーン感受性品種は、環境制御が整った養液栽培などのシステムにおいて、指標として効果的に使用できると考えられた。この方法は設備投資やランニングコストが必要なく、チップバーン発生の目視確認が難しい結球性レタスについても、Ca 投与の時期を適切に判断できる可能性がある。

(3) チップバーン関連性候補遺伝子の解析 1
δ CAX 遺伝子δ

レタスの EST データベースから、シロイヌナズナの CAX (*AtCAX*) 遺伝子のオーソログを探し、プライマーを設計した。RACE 法で 4 種類の遺伝子を単離し、それぞれ *LsCAX2*, *LsCAX3a*, *LsCAX3b* 及び *LsCAX5* とした。アミノ酸レベルでは、*LsCAX3a* が *AtCAX1* と最も高い相同性を有していた。系統的解析により、イオンの輸送特異性が異なる Type IA および Type IB の 2 つのグループに分類することができた。*LsCAX3a*, *3b* には Ca の輸送特異性に関与する A および B ドメインが高度に保存されていた。また *LsCAX2* と *LsCAX5* には Mn 輸送能に関わる C1,D ドメインの保存性が高かった。サザン法により、*LsCAX* はそれぞれ 1~7 個のコピー数を持つと考えられ、ゲノム内にはまだ未知のホモログが存在していると予想された。

LsCAX3a および *LsCAX3b* の発現は、0 時間のコントロールに比較して、24 時間の Ca 処理により有意に上昇した。ただし *LsCAX3b* は、24 時間の水処理によっても発現が上昇していたため、微妙な浸透圧変化により遺伝子発現が変化している可能性があると考えられた。他の 2 種類の *LsCAX* 遺伝子は Ca 処理による大きな発現の変化は認められなかったが、10% PEG #200 の 24 時間処理により発現が有意に上昇した。部位特異性を調査したところ、*LsCAX2* 及び *LsCAX3b* は他の組織に比べ、根での発現量が低かった。*LsCAX3a* の発現は葉、花、蕾で強く、*LsCAX5* は根、花で主に発現がみられた(図2)。*LsCAX3a*, *3b* の発現パターンは *AtCAX3* よりも *AtCAX1* に近く、機能的に *AtCAX1* と類似する可能性が示唆された。以上の結果から、*LsCAX3a* が *AtCAX1* に対する相同性が最も高いこと、発現パターンが類似していることが明らかとなり、Ca²⁺/H⁺ アンチポーターをコードしている可能性があると考えられた。80mM CaCl₂ を 24 時間処理した際の 4 種類の *LsCAX* の発現量を調査したところ、チッ



第2図 LsCAX遺伝子の組織特異的発現
4ヶ月齢のレタスの様々な組織からRNAを抽出し、RT-PCRによる発現解析を行った。EF1 α の遺伝子はコントロールとして用いた。

チップバーン感受性品種の‘マリノ’よりも、抵抗性品種の‘ノーチップ’の方が高かった。従ってLsCAX遺伝子のカルシウム応答性発現と、チップバーン抵抗性との関連性が推察された。

(4) チップバーン関連性候補遺伝子の解析
DREB1A遺伝子

AtDREB1A遺伝子を過剰発現させてストレス耐性が付与されたレタスのチップバーン抵抗性を調査したところ、ベクターのみを形質転換させたコントロールのレタスと比較して、チップバーン発生葉率が有意に高くなることが明らかとなった(第2表)。チップバーンは、ストレス耐性と深い関係があると示唆されており(Saure, 1998, 2001)、チップバーン感受性品種の‘マリノ’が耐塩性を持つことから、興味深い(Maruyamaら, 2008)。その原因としては、耐性の獲得に伴う蒸散抑制などが考えられるが、今後の調査課題としたい。

第2表 AtDREB1A遺伝子の過剰発現によるチップバーンの誘発

系統	チップバーン発生葉率 (%)
PBE2113	49.7 \pm 2.1
35S-DREB1A-18	60.8 \pm 1.0**

**Studentのt検定により1%レベルで有意差有

(5) 結言

レタスのチップバーン発生機構の解明と抵抗性品種の選抜を目標として研究を行った結果、in vitro試験による抵抗性品種の評価方法を開発し、感受性品種の指標としての利用を考案した。また、チップバーン関連性が推測される遺伝子を逆遺伝学的に解析し、CAXおよびDREB1A遺伝子が候補となることを示唆した。しかしながら、チップバーン発生機構の全容解明にまでは至らなかった。レタスのチップバーンはポリジーン支配であることが示唆されており、6個のQTLが関与していることが最近報告されている(Hayes・Simko, 2010)。本研究で調査した候補遺伝子の解析を進めると共に、他の原因遺伝子を特定していくことが今後の課題である。

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1件)

①Koyama, R., Sanada, M., Itoh, H., Kanechi, M., Inagaki, N. and Uno, Y. (2012) In vitro evaluation

of tipburn resistance in lettuce (*Lactuca sativa* L.), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 108:221-227, 2012, 査読有

[学会発表](計5件)

①Koyama, R., Sanada, M., Okubo, H., Itoh, H., Kanechi, M., Inagaki, N., Uno, Y. (2011) In vitro evaluation of tipburn resistance in lettuce (*Lactuca sativa* L.), Annual Conference of the American Society for Horticultural Science (Hawaii), oral session abstracts, 54-55

②大久保裕史, 小山竜平, 稲垣昇, 金地通生, 宇野雄一 (2011): 指標品種の利用によるレタスのチップバーン抑制技術の開発、園芸学会近畿支部滋賀大会(大津)、2011.8.31 研究発表要旨集 p.14

③小山竜平, 真田光浩, 伊藤博通, 金地通生, 稲垣昇, 宇野雄一 (2010)レタスのチップバーン抵抗性診断法の評価、平成22年度園芸学会近畿支部兵庫大会(神戸)2010.8.31 研究発表要旨集 p.21

④山口裕貴, 難波亨輔, 金地通生, 稲垣昇, 宇野雄一(2010)レタスのCAX(cation exchanger)相同性遺伝子の同定と発現解析、平成22年度園芸学会近畿支部大会(神戸)2010.8.31 研究発表要旨集 p.21

⑤真田光浩・伊藤博通・小山竜平・森岡愛・木村周二・金地通生・稲垣昇・宇野雄一(2008): in vitroにおけるレタスのチップバーン抵抗性診断法の確立、平成20年度園芸学会近畿支部会(京都)2008.9.5 研究発表要旨集 p.11

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 雄一 (UNO YUICHI)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 90304120