

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07654

研究課題名(和文) ナデシコ属野生種の低温春化型開花機構の解明

研究課題名(英文) Study of the low-temperature dependent flowering in wild Dianthus species

研究代表者

八木 雅史 (YAGI, MASAFUMI)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・上級研究員

研究者番号：40391403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生存に不利な環境下での開花を抑制するシステムである低温要求性の開花は、園芸栽培化の過程で失われた形質の一つである。本研究では、開花に低温を必要としないカーネーションと一定期間の低温を要するナデシコ属野生種 *Dianthus capitatus* を材料に、開花に必要な低温期間の検討、遺伝解析を行うための分離集団および連鎖地図の作成、低温処理中のマイクロアレイ解析による発現解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カーネーションは代表的な切り花であるが、開花にかかわる分子生物学的な制御機構はほとんど明らかになっていない。本研究では、ナデシコ属野生種との比較解析を通じて、低温に対する開花制御にかかわると考えられる遺伝子を明らかにした。今後は、開花制御機構全体をより詳細に明らかにすることで、光にも温度にもマイルドな反応を示すカーネーションの開花への理解が深化するとともに、野生種の積極的な利用による開花習性の異なる新奇カーネーションの作出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Low temperature dependent flowering, which was a system that suppresses flowering in unsuitable environments, is one of the traits lost during horticultural cultivation. In this study, we conducted studies of flowering time by low temperature treatment, genetic analysis using segregating population, and expression analysis by microarray, using carnations that do not require low temperature for flowering, and wild *Dianthus capitatus*, which needs constant low temperature.

研究分野：花き育種

キーワード：ナデシコ パーナリゼーション 春化 低温 連鎖地図 マイクロアレイ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

園芸植物は、一重から八重、一季咲きから四季咲き、花器官の大型化、日持ち性の改良など人間の使いやすい、より魅力的な形を目指して長い年月をかけて野生種が改良され、現在の品種群が成立している。そのような園芸品種化の過程で取り除かれた野生種のもつ不都合な形質の一つに「低温春化型開花」が挙げられる。不適当な環境下で開花しないために、一定期間冬季の低温にさらされないと開花が起こらない、野生種がもつ生存に不可欠な開花制御機構であると考えられる。

カーネーションは、複数のナデシコ属野生種の交配により誕生したと考えられるが、低温春化を必要とせず、周年開花するように品種改良が進められてきた。カーネーションでは低温期の生育遅延が、収穫本数の減少に直結することから、低温伸長性の優れる品種の育成が求められる。また、低温伸長性の優れる品種は、燃油コストの削減に直結することから、より低温域で栽培可能な品種へと改良が求められている。ところが、現在の栽培品種は低温に対する反応性、要求量、期間に関してマイルドな反応をもつ品種しか存在せず、カーネーションの品種間での遺伝解析を行うことを難しくしている。

我々は、カーネーションの重要病害として知られる萎凋細菌病抵抗性の育種素材としてナデシコ属野生種 *Dianthus capitatus* を用いた育種を進めてきた。*D. capitatus* は、温室内(12加温)で栽培を継続すると抽苔せず、開花もしないが、一定期間の低温条件に遭遇することで開花に至り、5一定の低温でも開花するといった栽培種と異なる低温への反応を示すことを見出している。

低温春化型の開花の分子機構として、シロイヌナズナやムギなどでは VERNALIZATION1 (VRN1) や FRIGIDA (FRI) 等が FLOWERING LOCUS C (FLC) の発現を抑制していることが知られており、FLC がさらに SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1) や FLOWERING LOCUS T (FT) の遺伝子発現を下方制御して開花を抑制していると考えられている。一方で、カーネーションをはじめナデシコ属では、低温のみならず、開花制御に関わる遺伝子全体の解析が遅れており、多様な開花特性(開花時期、日長・温度への反応)を有する品種・系統を理解するうえで、その解明が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、開花に低温を必要としないカーネーションと一定期間の低温を要するナデシコ属野生種の比較解析を行うことで、低温要求に関わる原因遺伝子を明らかにし、ナデシコ属における開花制御の分子機構の理解を深めることを目的とする。そこで、*D. capitatus* およびカーネーション栽培種を材料に、開花に必要な低温期間の検討、遺伝解析を行うための分離集団および連鎖地図の作成、低温処理中のマイクロアレイ解析による発現解析を行い、低温および開花に関連する遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 開花に及ぼす低温処理日数の影響

2018年6月6日に挿し芽を行い、7月に鉢上げ後、2018年9月3日から4、6、8、10週間(各5個体)5の低温条件下で栽培した後、最低夜温18の温室で栽培を継続し、開花までの日数を調査した。

(2) 連鎖地図の作成

開花に低温要求性のないカーネーション‘カーネアイノウ1号’と要求性のある *D. capitatus* の F₁ 集団 65 個体を作成した。両親ならびに F₁ 集団を用いて ddRAD-seq 解析を行い、リファレンスゲノム DCA_r1.0 (<http://carnation.kazusa.or.jp/>) にマップし、SNP コールを行った。得られた分離データをもとに、JoinMap 4.1 (Kyazma 社) を用いて連鎖地図を作成した。

(3) 遺伝子のクローニングおよび配列比較解析

全ゲノムが解読された‘フランススコ’、早生の‘カーネアイノウ1号’、晩生の‘ライトピンクバーバラ’および *D. capitatus* について、葉から抽出した RNA から合成した cDNA を鋳型として、5' UTR と 3' UTR を約 100bp 含むコード領域の PCR クローニングを行った。また、抽出した gDNA を鋳型として 2~4kb 程度のプロモーター領域の PCR クローニングを行った。

(4) マイクロアレイ解析

開花に低温要求性のないポットカーネーション‘サマドレス’と *D. capitatus* を慣行栽培後、5の低温処理を開始し、2、4、6週目の茎頂のサンプリングを行った。RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて RNA 抽出を行い、カーネーションのゲノムデータベースをもとに作成したカスタムマイクロアレイ(44K, Agilent 社)を用いて、Cy3 により1色法で発現解析を行った。

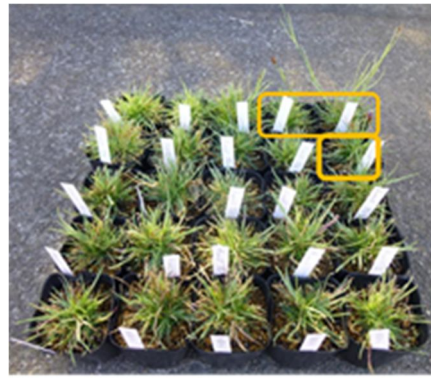
(5) FT および FLC の機能解析

葉を液体窒素で凍結し、マルチピーズショッカー(安井器械)により粉碎した。Maxwell 16 核酸自動精製システム (Promega) によって Total RNA を抽出し、FT および FLC 候補遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により確認した。また、シロイヌナズナを用いて FT および FLC 候補遺伝子の過剰発現体を作成し、抽苔日数を調査した。

4. 研究成果

(1) 2019年3月までに、6週間の低温処理では全く開花せず、8週間では1個体、10週間では2個体が開花し、1個体で抽苔が認められたことから *D. capitatus* の開花には、5 で少なくとも8週間以上の低温が必要であると推察された(図1)。

(2) ddRAD-seq 解析を用いて得られた SNP マーカーについて連鎖解析を行った結果、1228個の SNP マーカーが、19連鎖群で構成される、全長 1406.7cM の連鎖地図を作成した(図2)。これまで作成した連鎖地図と比較し、2連鎖群(16、17連鎖群)は該当する領域が見つからなかったが、その他は標準連鎖地図と高い相同性の並びを持った連鎖地図であった。本連鎖地図を用いて、加温条件下での開花の有無および到花日数を形質データとして、連鎖解析を実施したが、有意な連鎖マーカーは得られなかった。今後、これらの F₁ 個体を自殖した F₂ 種子を用いて、形質の評価ならびに連鎖解析を進める。



低温処理週数	開花個体
10	2/5
8	1/5
6	0/5
4	0/5
0	0/5

図1 低温処理後の *Dianthus capitatus* の 2019年1月9日の様子 (黄色の囲みが開花済み)

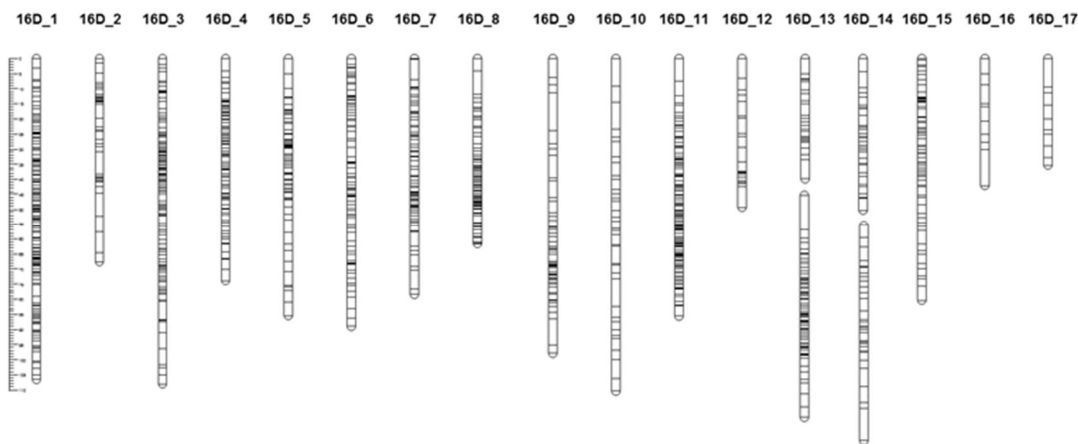


図2 ‘カーネアノウ1号’ × *D. capitatus* の F₁ 集団の連鎖地図
1228個の SNP マーカー、全長 1406.7cM

(3) カーネーションにおいてシロイヌナズナの FT と類似配列を持つ遺伝子はカーネーションゲノムデータベース (<http://carnation.kazusa.or.jp/>) では8種類存在した。そのうち同じナデシコ目に属するビート (*Beta vulgaris*) やカスミソウ (*Gypsophila paniculata*) のオルソログと最も高い相同性 (Blast スコア値) を示し、かつ花成促進能に重要とされるアミノ酸を全て保存していたのは Dca19666.1 のみであった。同遺伝子のコード領域と約 2 kb のプロモーター領域について、早晩性が異なる品種間の配列を比較したところ、SNPs を含むいくつかの変異が存在したが、形質との関連性は確認できなかった。一方、FLC については、シロイヌナズナの FLC と類似配列を持つ遺伝子が 33 個存在し、うち 22 個は MADS および K ドメインを有していた。そのうち、Dca45290.1 および Dca42306.1 はビートの FLC (BvFL1_v3) と最も高い相同性を示した。‘フランススコ’ および *D. capitatus* の両種における 4 種類を比較すると、翻訳産物の配列に影響する塩基の変異が見られた。また 4 kbp のプロモーター配列には SNP を含む多数の InDel が存在した。

(4) マイクロアレイによる発現解析の結果、ビートの FLC と相同性の高い Dca45290.1 および Dca42306.1 は、低温処理により、カーネーション品種および *D. capitatus* とともに一旦発現は減少し、経過とともに再上昇した。また、MADS および K ドメインを持つ遺伝子である Dca57893.1 は、*D. capitatus* では低温処理に応じて発現量が低下し、カーネーションと異なる発現パターンを示した(図3)。このことから低温に応答する FLC である可能性が示唆された。

(5) カーネーションの FT 相同性遺伝子である Dca19666.1 過剰発現体は、野生型と比較して抽苔が促進された。また、FLC 相同性遺伝子である Dca45290.1 および Dca42306.1 の過剰発現体には抽苔遅延する系統が存在した。さらに Dca42306.1 については、カーネーション品種および *D. capitatus* の由来に関係なく遅延が認められたので、コード配列の違いが低温春化型開花機構を決めている可能性は低いと考えられた。以上により、Dca19666.1 は FT オルソログとして、Dca45290.1 と Dca42306.1 は FLC オルソログとして、カーネーションの開花調節に関わっていることが示唆された。

今後は、マイクロアレイ解析により見出された遺伝子を含め、部位や時期別に詳細な発現やメチル化を調査するとともに、カーネーションの形質転換による遺伝子の機能解析を行う。

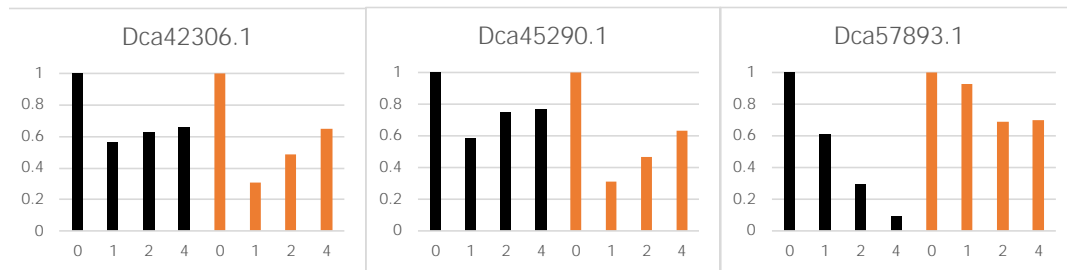


図3 5 の低温処理期間中の各遺伝子発現パターン
 (横軸：処理週数、縦軸：低温処理前(0)=1とした時の相対値
 黒：*Dianthus capitatus*、橙：カーネーション)

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 Yagi Masafumi, Shirasawa Kenta, Hirakawa Hideki, Isobe Sachiko, Matsuno Junko, Uno Yuichi, Tanase Koji, Onozaki Takashi, Yamaguchi Hiroyasu	4. 巻 262
2. 論文標題 QTL analysis for flowering time in carnation (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 109053 ~ 109053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109053	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木雅史, 岡本花弥, 岩崎万由子, 小西晴香, 山口博泰, 宇野雄一
2. 発表標題 カーネーションにおけるFTおよびFLCオルソログの解析
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木 雅史, 宇野 雄一, 岡本 花弥, 白澤 健太
2. 発表標題 ナデシコ属野生種の有する低温要求性開花機構の解明に向けた研究
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡本花弥, 八木雅史, 岩崎万由子, 宇野 雄一
2. 発表標題 カーネーションにおけるFTオルソログの解析
3. 学会等名 園芸学会近畿支部奈良大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木雅史・白澤健太・平川英樹・磯部祥子・松野純子・棚瀬幸司・小野崎隆・山口博康
2. 発表標題 カーネーションの開花期に関するQTL解析
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	宇野 雄一 (Uno Yuichi) (90304120)	神戸大学・農学研究科・准教授 (14501)	