

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15828

研究課題名(和文)タマネギの成長相転換を司る植物体の生育ステージと関連遺伝子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the developmental stages and genes that relates to phase transition in onion cultivars

研究代表者

池田 裕樹 (Ikeda, Hiroki)

宇都宮大学・農学部・助教

研究者番号：90782053

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)：タマネギは可食部(鱗茎)の肥大程度が生産性に直結するため、本研究では秋まきタマネギを用いて、鱗茎肥大に関する研究を進めた。植物体の生育と鱗茎肥大を促すAcFT1遺伝子の発現を解析したところ、葉数および葉面積とAcFT1遺伝子の発現に強い正の相関がみられ、鱗茎肥大に葉数や葉面積の確保が重要であることを遺伝子レベルで示した。また遺伝子の網羅的発現解析により、鱗茎肥大に関係すると考えられる新規遺伝子を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タマネギの鱗茎肥大について、個体レベルと遺伝子など分子レベルの双方の視点から解き明かそうとする研究は、世界的にも限られている。また、鱗茎肥大における植物体の生育ステージの重要性に関する学術的知見は少ない。本研究で遺伝子発現との関連性を解析することで、生育に関する要素の中でも、特に葉数や葉面積が重要であることが明らかとなった。また鱗茎肥大に関する新たな遺伝子も見出ししており、本研究の成果は栽培管理の高度化や、新品種育成などにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Onion is one of the most important vegetable crops in the world. In this study, we compared changes in plant growth and bulb development of four onion cultivars to elucidate the important developmental stages and genes that relates to phase transition in onion cultivars. A comparison of growth parameters revealed that the increase in total leaf number and area were almost inhibited in winter. In spring, these growth parameters increased rapidly from the early maturing cultivar. Since AcFT1 gene play a key role in the bulb development of cultivated onions, we conducted expression analysis of AcFT1 gene. Correlation analysis of AcFT1 gene expression and total leaf number and area was conducted, and strong positive correlations were observed. Therefore, our study genetically demonstrated that leaf number and area are important for inducing onion bulb development. We also conducted transcriptome analysis, and identified a numerous gene that may relate to the onion bulb development.

研究分野：園芸科学

キーワード：タマネギ 鱗茎肥大 成長相転換 生育ステージ 遺伝子

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タマネギ (*Allium cepa* L.) の可食部 (鱗茎) は葉が肥大した部分で、肥大開始時には葉身の展開が停止し、葉鞘の内部に貯蔵葉が分化して鱗茎を形成する。鱗茎の肥大程度は収量に直結するため、その肥大メカニズムの解明は学術的にも実用的にも重要である。鱗茎の肥大には日長と温度が重要なことが知られており、日長に関しては品種ごとに異なる限界日長を越えると肥大する。遺伝子レベルでは、FT 遺伝子の 1 つである *AcFT1* が長日条件で発現し、鱗茎の肥大を促すことが示唆されている。このように日長が鱗茎肥大に及ぼす影響については、いくつかの先行研究が行われているが、温度が鱗茎肥大に及ぼす影響に関する知見は少ない。また遺伝子レベルの研究は、前述の FT 遺伝子に関する研究が報告されている程度で、学術的知見の充実が望まれる。そこで研究代表者は、科研費 研究活動スタート支援の研究課題 (16H07440) で、温度が鱗茎肥大に及ぼす影響を研究した。その結果、タマネギの生育に伴う展開葉数や鱗茎サイズ増加が、日積算気温と強い正の相関を示すこと、著しい高温条件下では葉身の展開が停止して鱗茎肥大に強制的に移行することなど、温度と鱗茎肥大の新たな関係性を解明した (Ikeda et al., 2019)。また *AcFT1* の発現解析を、露地で春まき栽培したタマネギ 3 品種で行い、*AcFT1* の発現が品種の早晚性と一致することを解明するとともに、日長が鱗茎肥大のトリガーの一つであることを遺伝子レベルで示した。一方で研究活動スタート支援の研究課題では、日長と温度が鱗茎肥大に必要な条件を満たしても肥大しない現象を、春まき栽培した複数の品種で 2 年間にわたり確認した。これは「日長と温度が鱗茎肥大に必要な条件に達すると肥大開始する」という従来の知見とは異なる。そのため研究代表者は、タマネギの鱗茎肥大には日長と温度以外の要因として、葉数あるいは葉面積で定義される「植物体の生育ステージ」が関係すると予想した。これが正しければ、鱗茎は日長と温度、日長反応可能な「植物体の生育ステージ」という 3 つの要素が全て揃うことで肥大する。本研究では、この鱗茎肥大における植物体の生育ステージの重要性と、鱗茎肥大に関する *AcFT* 以外の遺伝子の解明を、学術的「問い」として追究することにした。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、タマネギの鱗茎肥大における「植物体の生育ステージ」の重要性を証明するとともに、鱗茎肥大に関する新規遺伝子を明らかにすることである。そこでタマネギの成長相転換には、日長・温度とともに「植物体の生育ステージ」が関係するという仮説を検証する。また鱗茎が肥大開始する前後の生育ステージにおいて、トランスクリプトーム解析 (RNA シークエンス) により遺伝子の発現変動を網羅的に比較し、鱗茎肥大に関与する新規遺伝子を探索する。

### 3. 研究の方法

研究材料のタマネギは、2018 年から 2019 年、および 2019 年から 2020 年に、宇都宮大学農学部附属農場 (栃木県真岡市、以下附属農場) で栽培した。品種は、栃木県で一般的な「ソニック」, 「ターボ」 (以上、タキイ種苗 (株)), 「慶」 ((株) トーホク), および「もみじ 3 号」 ((株) 七宝) を用いた。2018 年 9 月 11 日と 2019 年 9 月 12 日に、培養土を充填した 288 穴セルトレイに播種し、圃場に定植するまで附属農場の温室で育苗した。圃場はようりん化成肥料で施肥し、畝を黒色マルチで被覆した。苗は条間 15 cm, 株間 15 cm の 4 条植えとし、2018 年 11 月 9 日と 2019 年 11 月 6 日に、品種ごとに 3 区画に分け、圃場に手植えで定植した。

#### (1) 植物体と鱗茎の生育調査

生育調査では、植物体の倒伏 (葉身が地面に倒れた状態) を、鱗茎の成熟と収穫の指標とした。定植後約 1 か月から倒伏までの間、1 区画から 5 株を抜き取って 1 反復とし、3 反復分の合計 15 株を調査対象とした。総展開葉数 (発芽してから出葉した葉身の累計)、葉面積、草丈、葉鞘の直径 (葉鞘径)、鱗茎の直径 (鱗茎径)、植物体と鱗茎の新鮮重および乾物重を計測した。供試品種それぞれについて、50% の植物体が倒伏した日 (半数倒伏日) から 10 日以内に収穫し、収穫時の生育調査を行った。地上部および鱗茎の乾物重は、植物体を 70°C に設定した通風乾燥機で 2 週間以上乾燥させて計測した。肥大指数は、鱗茎径と葉鞘径の比から算出した。

#### (2) 生育および鱗茎肥大に伴う日長反応性遺伝子の発現

鱗茎肥大に関係する既知の遺伝子である *AcFT1* と *AcFT4* の発現解析は、定植後約 5 週目から 29 週目 (2019 年 5 月 29 日) まで、1 か月ごとに行った。サンプリング日の午後 1 時に、1 反復あたり 5 株の葉身をサンプリングした。なおサンプリングは、抽苔していない株を選んで行った。サンプリングした葉身は、ただちに液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。RNA の抽出は、パウダー状に粉碎した葉身の凍結サンプルから、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。cDNA の合成には、ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡 (株)) を用いた。定量的リアルタイム PCR (qPCR) には、蛍光試薬に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡 (株))、装置は LightCycler 96 Real-Time PCR System (Roche) を用いた。*AcFT1*, *AcFT4*, およびリファレンス遺伝子として用いた *Acβ-tubulin* のプライマー配列は、Lee ら (2013) を参照した。4 品種それぞれの相対発現量は、 $\Delta\Delta Ct$  法による相対定量により算出した。

### (3) RNA シーケンスによる鱗茎肥大に関する新規遺伝子の探索

定植後 10 週目, 18 週目, 26 週目の各生育ステージでサンプリングした葉身と茎盤部から抽出した RNA を用いて, RNA シーケンス (以下, RNAseq) を行った. RNAseq には, NovaSeqTM 6000 System (イルミナ (株)) を用いた. 最大リード長は 2×150 bp とした. 得られた合計 676,803,136 リードについて, ソフトウェアでリードデータのクオリティチェックを行うとともに, fastq データからアダプター配列を取り除くプログラムにより, アダプター配列と低クオリティリードの除去を行った. 得られた fastq ファイルから, リボソーム RNA (rRNA) のデータベースを用いて rRNA を除去した. de novo アセンブルおよびクラスタリング解析を行い, 得られた配列をリファレンスとした. その後, 転写産物の発現量を算出し, 発現差を解析した. 発現差解析で得られた候補遺伝子に対して, 相同性検索 (Blast) でアノテーションを行った.

## 4. 研究成果

### (1) 植物体と鱗茎の生育調査

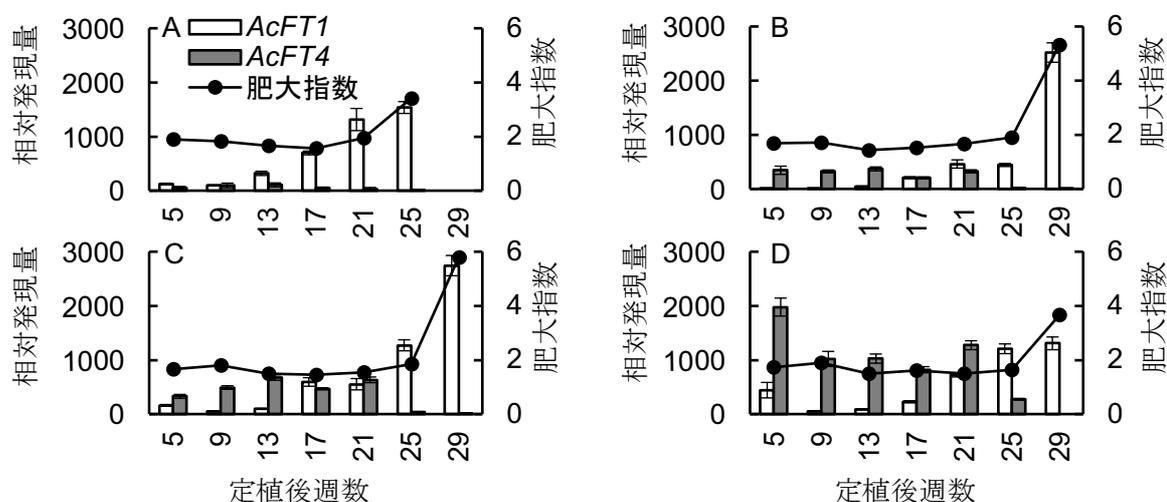
半数倒伏日, 収穫日, および収穫時における植物体の生育および鱗茎の大きさを調査した結果, 植物体の倒伏は両年とも同じ傾向が見られ, ‘ソニック’, ‘ターボ’, ‘慶’, ‘もみじ 3 号’ の順であった. 2019~2020 年の倒伏時期は, 2018~2019 年に比べて 4~12 日程度早かった. 総展開葉数は早生品種に比べて晩生品種で多く, 倒伏の順序と一致した. 葉面積や草丈, 地上部の新鮮重, 地上部の乾物重は, 2018~2019 年に比べて 2019~2020 年の値が大きかったが, 品種の早晚性との関係は認められなかった. 鱗茎径, 鱗茎の新鮮重および乾物重は, 品種間でほぼ同じで, 早晚性との関係は見られなかった. 乾物率は, 早生品種で晩生品種よりも低い傾向が見られた.

定植後から倒伏までの植物体の生育および鱗茎肥大の様相についても, 2018~2019 年および 2019~2020 年に調査した. 2018~2019 年については, 早生品種 ‘ソニック’ が定植後 27 週目で, 続いて他の 3 品種も, おおよそ早生品種から順に総展開葉数と葉面積の増加, および草丈の伸長が停止した. 鱗茎径, 鱗茎の新鮮重, 鱗茎の乾物重は, ‘ソニック’ では定植後 23~25 週目 (4 月 17 日~5 月 1 日) 頃から増加し, 他の品種も早晚性に従って順に増加し始めるなど, 収穫期に向けて急激に肥大した. 生育の経時的な変化については, 両年とも概ね同様の傾向を示したが, 2018~2019 年と 2019~2020 年の総展開葉数および葉面積の推移を比較すると, 2019~2020 年では, より早い時期に葉数および葉面積が急激に上昇していた.

春まき作型で同様の生育調査を行った, 研究代表者の研究活動スタート支援での研究結果と, 本研究の秋まき作型での結果を比較すると, 収穫時の総展開葉数は早生品種ほど少ない, 生育の様相は品種の早晚性に関わらずほぼ同じで, 途中で早生品種から順に総展開葉数や葉面積の増加が停止する, といった点が共通していた. タマネギは鱗茎の肥大が開始する際, 葉身の形成が停止するため, 総展開葉数や葉面積の増加が停止した時期と前後して, 鱗茎の肥大が開始する. 本研究でも総展開葉数や葉面積が停止した順, すなわち早生品種から順に鱗茎径や鱗茎の新鮮重, 乾物重が急増し, これらも春まき作型での結果と一致していた. これらの結果から, タマネギの生育や鱗茎肥大の様相は, 作型に関わらず共通していることが示された.

### (2) 生育および鱗茎肥大に伴う日長反応性遺伝子の発現

2018~2019 年にサンプリングした葉身において, *AcFT1* および *AcFT4* の発現量を測定した. (第 1 図). *AcFT4* は, 生育初期に発現が高い傾向がみられた. その後, 生育が進むにつれて *AcFT4* の発現は減少した. 一方, *AcFT1* の発現は徐々に増加した.



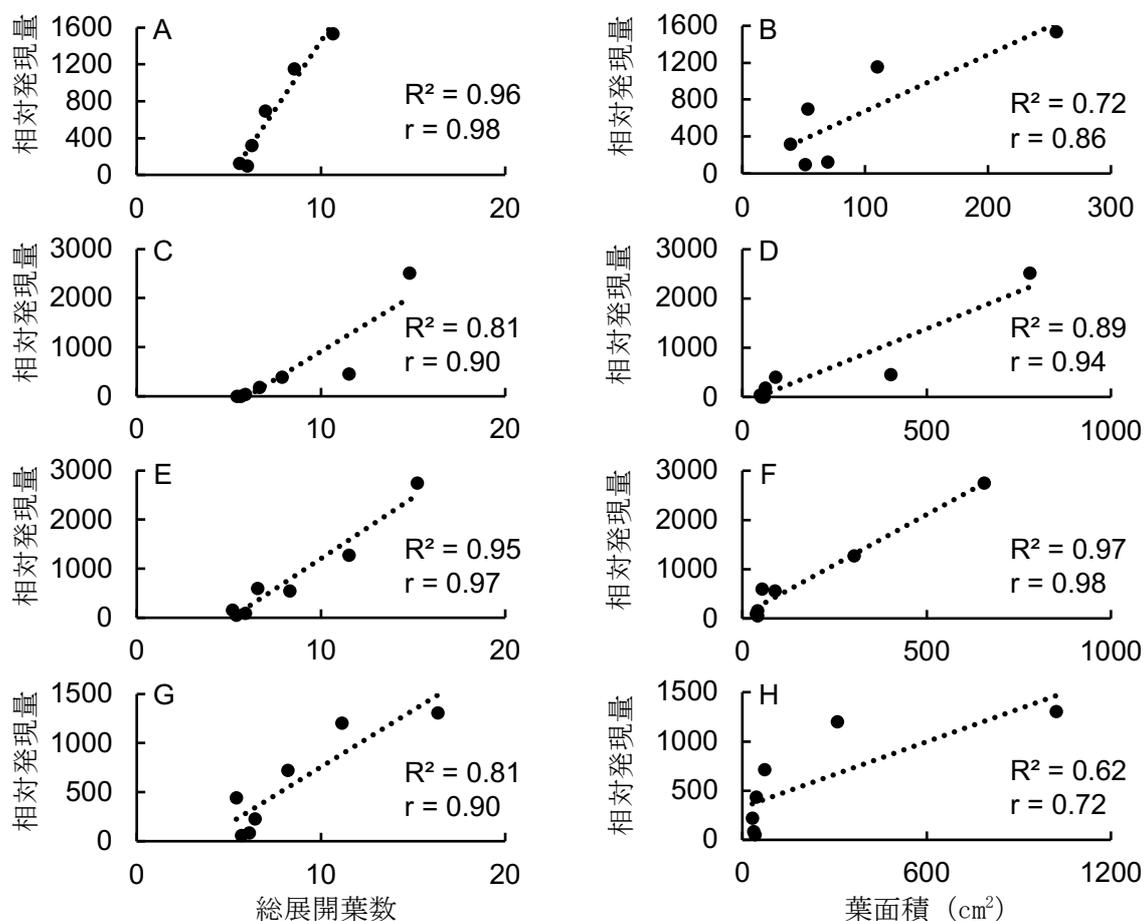
第 1 図 *AcFT1* と *AcFT4* の相対発現量および鱗茎と葉鞘の直径の比 (肥大指数)  
A: ‘ソニック’, B: ‘ターボ’, C: ‘慶’, D: ‘もみじ 3 号’. ‘ソニック’ は定植後 29 週目の時点で収穫が完了していたため, データなし. 縦棒は標準誤差 (n=3).

研究代表者が実施した、春まき作型における *AcFT1* の発現解析では、*AcFT1* の発現は早生品種ほど早く上昇した。秋まきタマネギを用いた本研究でも、*AcFT1* の発現は早生品種ほど早く増加開始し、植物体の生育に伴い発現が上昇した。そのため *AcFT1* の発現も、作型を問わず早晩性に従って変化することが確認された。また *AcFT1* の発現上昇は、すべての品種において肥大指数が 2 を超える前に生じていた。同様の傾向は、春まきタマネギでも報告されていることから、本研究の結果は *AcFT1* の発現によってタマネギ品種の肥大開始時期や早晩性を判断できるとする春まき作型での結果を裏付けるとともに、*AcFT1* の発現を指標とした肥大開始時期や早晩性の判断が、秋まき栽培でも可能と考えられた。一方で *AcFT4* の発現については、全ての品種で収穫期に向けて減少した。*AcFT4* は品種の限界日長よりも短日な条件で発現して葉身の展開を促進し、*AcFT1* と拮抗的に作用することで肥大を抑制することが知られている。また春まき作型での研究においても、本研究と同様に植物体の生育に伴って発現が減少することが報告されている。従って *AcFT4* についても、作型に関わらず生育に伴って発現が減少すると考えられた。

### (3) 植物体の生育と遺伝子発現の相関

植物体の生育と遺伝子発現の関係を明らかにするため、*AcFT1* の発現と植物体の生育（総展開葉数および葉面積）について、相関分析を行った。*AcFT1* の発現量は、4 品種全てにおいて、総展開葉数や葉面積の増加に伴って直線的に増加した（第 2 図）。総展開葉数と葉面積のいずれにおいても正の相関が見られたが、総展開葉数は葉面積よりも強い相関が確認された。

本研究を含む複数の研究で、葉数および葉面積の確保が鱗茎肥大に重要である可能性、および *AcFTs* がタマネギの葉身で発現することが示されている。また本研究で *AcFT1* の発現は、いずれの品種においても総展開葉数および葉面積と正の相関を示した。4 品種すべての *AcFT1* と総展開葉数、および葉面積の相関を分析した場合でも同様に、正の相関がみられた。この結果は、*AcFT1* の発現上昇に、葉数や葉面積の確保が必要であること、および *AcFT1* の発現上昇と総展開葉数、および葉面積の増加の関係は、品種とその早晩性に関わらず同じであることを示唆している。よって本研究の結果より、*AcFT1* の発現上昇とそれに伴う鱗茎肥大には、葉数および葉面積の確保が重要であることが遺伝子レベルで裏付けられた。



第 2 図 ‘ソニック’ (A, B), ‘ターボ’ (C, D), ‘慶’ (E, F), ‘もみじ 3 号’ (G, H) における *AcFT1* の発現量と生育（累計展開葉数、葉面積）の相関  
総展開葉数 (A, C, E, G) および葉面積 (B, D, F, H) は 15 株の平均値とした。

#### (4) RNA シークエンスによる鱗茎肥大に関する新規遺伝子の探索

*AcFT1* の下流に位置して鱗茎肥大と関連する新規遺伝子は、茎頂で発現し、葉身の *AcFT1* と共発現している可能性が高いと考えた。そこで RNAseq で得られた配列の中から、*AcFT1* と共発現し、かつ茎頂でより高く発現している遺伝子を探索した。その結果、有力な候補遺伝子を明らかにすることができた。この遺伝子について qPCR で発現解析を行ったところ、鱗茎の肥大とともに発現が上昇することが確認された。この遺伝子に関する詳細な研究はタマネギにおいて行われていないことから、今後は形質転換やゲノム編集等により、鱗茎肥大に関する新規遺伝子であることを証明していく。

以上のように本研究では、秋まき作型で栽培したタマネギにおいて生育調査と遺伝子の発現解析を行い、鱗茎肥大に葉数および葉面積の確保が重要であることを遺伝子レベルで証明した。すなわち本研究の学術的「問い」の1つであった、タマネギの鱗茎肥大における植物体の生育ステージの重要性を示すことができた。またもう1つの「問い」であった、鱗茎肥大に関与する新規遺伝子の候補も明らかにすることができた。今後は(4)でも述べたように、当該遺伝子が鱗茎肥大に関する新規遺伝子であることを形質転換やゲノム編集等で証明していくとともに、遺伝子の機能解析等を進めることで、タマネギの鱗茎肥大メカニズムをより詳細に解明していく。

#### <引用文献>

- ① Ikeda, H., T. Kinoshita, T. Yamamoto and A. Yamasaki. 2019. Sowing time and temperature influence bulb development in spring-sown onion (*Allium cepa* L.). *Sci. Hortic.* 244: 242–248.
- ② Lee, R., S. Baldwin, F. Kenel, J. McCallum and R. Macknight. 2013. FLOWERING LOCUS T genes control onion bulb formation and flowering. *Nat. Commun.* 4: 2884.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 H. Ikeda, T. Yamamoto, T. Kinoshita, H. Tsukazaki, A. Yamasaki	4. 巻 89
2. 論文標題 A comparative study on the growth and bulb development of several onion ( <i>Allium cepa</i> L.) cultivars sown in spring in the northeast region of Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 586-592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2503/hortj.utd-200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 H. Ikeda, H. Tsukazaki	4. 巻 1312
2. 論文標題 Expression analysis of bulb development-related genes in onion cultivars	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17660/ActaHortic.2021.1312.5	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 H. Ikeda, H. Tsukazaki
2. 発表標題 Expression analysis of bulb development-related genes in onion cultivars
3. 学会等名 The 3rd Asian Horticultural Congress 2020 (AHC2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井貴也、須藤美貴、鈴木菜月、池田裕樹
2. 発表標題 秋まきタマネギにおける日長反応性遺伝子の発現および生育との関係
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田裕樹
2. 発表標題 タマネギにおける日長・温度感応メカニズムに関する研究
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 鈴木菜月、石井貴也、池田裕樹
2. 発表標題 タマネギの生育および抽苔の発生に伴う花成関連遺伝子の発現変動
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 N. Suzuki, T. Ishii, H. Ikeda
2. 発表標題 Expression analysis of the onion AcFT2 gene that induces flowering and bolting
3. 学会等名 The 17th Japan Solanaceae Consortium (JSOL2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平間史保、鈴木菜月、謝 肖男、池田裕樹
2. 発表標題 秋まきタマネギにおける分球の発生率と内生オーキシンの品種比較
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
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
---------	---------