

令和 5 年 7 月 26 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15519

研究課題名(和文) 種子休眠との関連性から紐解く、ナシの芽の自発休眠機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of bud endodormancy in pear based on their relationship with seed dormancy

研究代表者

竹村 圭弘 (Takemura, Yoshihiro)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：70731545

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)：低温処理前後のナシの種子を用いて比較トランスクリプトーム解析を実施した。解析の結果、1サンプル当たり約4.56Gb、約45,630,000リードのシーケンスデータを取得した。また、低温処理後に発現量が低下した遺伝子として、9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) 遺伝子、ABSCISIC ACID-INSENSITIVE-5 (ABI-5) 遺伝子、DELLA protein GAI (GAI) 遺伝子などが選抜された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種子の休眠深度をもとに低温要求量の少ないニホンナシ品種の早期選抜方法の確立が期待される。また、ナシで同定された遺伝子情報や確立される技術は他の落葉果樹でも育種や施設栽培へ応用されるなど、多くの波及効果が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Comparative transcriptome analysis was performed using pear seeds before and after cold treatment. We obtained about 4.56 Gb of sequencing data per sample and about 45,630,000 reads. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) gene, ABSCISIC ACID-INSENSITIVE-5 (ABI-5) gene, and DELLA protein GAI (GAI) gene were selected as genes whose expression level decreased after low-temperature treatment.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：休眠

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに、少低温要求性ニホンナシ品種の育成と芽の低温要求性の遺伝様式の解明を目的として、タイワンナシ横山とニホンナシ系統 TH3 の後代である F1 系統群の自発休眠特性について調査を行ってきた。その結果、ニホンナシの芽の低温要求性も他の樹種と同様に量的形質遺伝子座によって制御されていることを確認するとともに、F1 系統の中からは低温要求性の多少が異なる個体群を選抜してきた。一方、芽の自発休眠と同様に、種子の休眠打破にも一定量の低温積算が必要とされているが、両形質の関係性については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、芽の低温要求性の違いが後代の種子の低温要求量に及ぼす影響について調査を行うとともに、両形質に関連する遺伝子の発現解析を行った。

3. 研究の方法

タイワンナシとニホンナシの後代である自家和合性系統群 (F1 系統群) を供試した。F1 系統群のうち低温要求量の少ない 2 系統 (No. 17, No. 33)、低温要求量の多い 4 系統 (No. 24, No. 45, No. 47, No. 109) を選抜し、各系統の自殖によって得られた種子をサンプルとした。

実験 1: 果実への低温蓄積が種子の休眠深度に及ぼす影響 自然交配で得た '雲井' に果実状態で低温処理する「果実低温区」と種子状態で処理する「種子低温区」を設けた。また、低温処理 (5℃, 暗室) を 2 週間と 4 週間を行った後、発芽試験 (15℃, 3 週間, 暗室) を行った。

実験 2: 種子の発芽率の比較 低温処理を 2, 4 および 6 週間行う 3 処理区と無処理区を設け、種子の発芽試験を行った。低温処理は 5℃ の暗室内 (湿潤条件下) で行い、その後、15℃ の暗室で 3 週間培養した後に発芽率を算出した。

実験 3: 比較トランスクリプトーム解析 実験 1 で用いた系統 No. 17 の無処理区と低温処理 2 週間後の種子から total RNA を抽出し、DNBSeq による比較トランスクリプトーム解析を行った。

実験 4: 関連遺伝子の発現解析 実験 2 の解析結果をもとに、発現量の有意差が確認された遺伝子を選抜し、低温要求量の少ない 2 系統 (No. 17, No. 33) と低温要求量の多い 2 系統 (No. 24, No. 47) の種子および葉芽における発現量の継時的変化をリアルタイム定量 PCR 法によって解析した。解析には、低温処理 0~6 週間後の種子、および低温積算量 (CU) が 150, 300, 600 に到達した際の葉芽を供試した。さらに、'王秋' と '新水' (多 CU・早生) に '長十郎' の花粉を用いて得た種子に 0 週間と 4 週間の低温処理を行った後、total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法によりエチレン感受性遺伝子である 3 種類の RAP2 の発現量を解析した。また、CU600 と CU1800 の低温を蓄積した葉芽についても同様の解析を行った。

4. 研究成果

低温処理 2 週間後の発芽率は両処理区とも低い値を示したが、4 週間後の発芽率は果実低温区の 6.1% に対し、種子低温区では 48.5% と有意に高い値を示した。よって、種子への低温処理は種子を摘出した状態で行うことが適切だと考えられた。低温要求量の多い系統のうち No. 24, No. 45, No. 47 の種子は、無処理および低温処理 2 週間後に 10% 以下の低い発芽率を示し、その後の低温積算によっても 50% 程度でプラトーに達する系統が多かった。一方、低温要求量の少ない No. 17 と No. 33 の種子では、無処理で 10% 以上、低温処理 4 週間では 80% 以上の発芽率を示し、No. 24, No. 45, No. 47 の 3 系統と比較して有意に高い値となった。これらの結果をもとに、低温処理前後の種子を用いて比較トランスクリプトーム解析を実施した。解析の結果、1 サンプル当たり約 4.56Gb、約 45,630,000 リードのシーケンスデータを取得した。また、低温処理後に発現量が低下した遺伝子としては、ABA 合成の律速酵素である 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) 遺伝子、ABA 応答性遺伝子の発現を誘導する転写因子 ABSCISIC ACID- INSENSITIVE-5 (ABI-5) 遺伝子、ジベレリン (GA) のシグナル伝達を抑制させる DELLA protein GAI (GAI) 遺伝子などが選抜された。一方、発現量が増加する遺伝子としては、ABA の不活性化に関与する abscisic acid 8'-hydroxylase (CYP707A) 遺伝子、活性型 GA を合成する gibberellin 20 oxidase 2 like (GA20ox) 遺伝子、GA20ox を活性化させる protein GAST1-like (GAST1) 遺伝子などが確認された。リアルタイム PCR による発現解析の結果、ABA の合成に関わる NCED-3 遺伝子、ならびに GA 応答の抑制に関わる GAI 遺伝子の発現量が、両休眠の打破時に著しく低下していることが確認された。一方で、ABA の不活性化に関与する CYP707A-1 遺伝子と、活性型 GA の生合成に関与する GA20ox 遺伝子は低温遭遇時間の増加に伴い発現量が増加していた。これらの遺伝子発現パターンが両休眠期における ABA と GA 含量の変化と関係しており、両休眠の制御に共通する遺伝子であることが示唆された。また、他の CYP7070A 遺伝子や protein GAST1 like 遺伝子は種子と葉芽で異なる発現量の推移を示した。

また、種子での RAP2 の発現量は 3 種類とも '新水' に比べ '王秋' で 2 倍~3 倍高く、このうち 2 種類については 2 品種とも低温蓄積後に 50%以上発現量が低下した。一方、葉芽では 3 種類とも '王秋' に比べ '新水' で 1.7 倍~5.8 倍発現量が高く、このうち 2 種類については 2 品種とも低温蓄積後に発現量が低下した。

以上の結果から、芽の低温要求量の多少は、その後代の種子の休眠深度にも影響することが示唆された。また、両休眠打破期における GA 合成の時期はやや異なることが推察され、それぞれの休眠制御には独自の経路が存在している可能性も示された。今後は他の遺伝子についての解析を進めることでより詳細な機構解明に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田卓司・北村睦季・田村文男・竹村圭弘
2. 発表標題 ナシの種子と葉芽の休眠打破に要する低温要求性の関係と関連遺伝子の発現解析
3. 学会等名 園芸学会令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高澤咲絵・冥加晟弥・竹村圭弘
2. 発表標題 交配の組み合わせの違いがニホンナシの種子の低温感受性に及ぼす影響
3. 学会等名 第11回 低温・氷温研究会
4. 発表年 2023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
---------	---------