

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 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580025

研究課題名（和文） 2倍体イチゴを用いた四季成り性遺伝子の単離と利用

研究課題名（英文） Isolation and utilization of everbearing genes in diploid strawberry

研究代表者

西山 学 (NISHIYAMA MANABU)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80312627

研究成果の概要（和文）：イチゴのように、同一種内で短日性と長日性の系統が利用されている植物は、生産上および学術上、貴重である。本研究では、2倍体のワイルドストロベリーをイチゴ属のモデル植物として供試した。四季成り性の系統を供試し、自家受粉や交雑して得られた実生の中には長日条件で開花に至った個体があり、これらの個体は四季成り性である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： In plant, it is rare that long-day variety and short-day variety exist in the same species and strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) is one of such a plant. In strawberry cultivars, long-day cultivars can produce fruits through the year so this characteristic is called “everbearing”. This characteristic is very important in agricultural production. Because strawberry is an octoploid plant, inheritance in strawberry is complex. Thus, we studied “everbearing” characteristic using *F. vesca* which is a diploid plant and model plant of *Fragaria*. Self- and cross-pollinated lines were bred and grown under long-day condition. Some of these lines exhibited everbearing characteristic.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：園芸学

科研費の分科・細目：農学，園芸学・造園学

キーワード：イチゴ，四季成り性，二倍体，遺伝

1. 研究開始当初の背景

イチゴ (*Fragaria × ananassa*, 8倍体) には、一季成り性品種（一般に質的短日性）と、四季成り性品種（一般に量的長日性）がある。イチゴのように、同一種内で短日性と長日性の品種や系統が利用されている植物は、生産

上および学術上、大変貴重である。そこで、本研究では、イチゴの一季成り性品種と四季成り性品種の花成関連遺伝子を単離・比較することにより、四季成り性の分子機構を明らかにし、育種等への利用に資することを目的とした。栽培種は高次倍数体で遺伝子の解析

が困難であることから、本研究では特に、イチゴ属のモデル植物として2倍体のワイルドストロベリー (*F. vesca*) を供試した。花成関連遺伝子については、モデル植物であるシロイヌナズナやイネをはじめとして様々な植物において単離され、機能解析が行われてきたが、これらの植物の花芽分化の光周反応、すなわち長日性と短日性は植物種に依存する。短日性と長日性の切換えは、既述のいずれかの遺伝子の機能的な変異によることは明白であるが、異なる種間での相同遺伝子の比較は、種々の遺伝子に多様性がみられることから容易ではない。したがって、同一種内で長日性と短日性をもつイチゴにおける本研究の遂行によって、シロイヌナズナやイネでは得られなかった長日性と短日性の要因が明らかとなることが期待され、その学術的意義は園芸学にとどまらなると考えられる。また、長日性と短日性を切換える遺伝子が明らかとなれば、四季成り性と完全に連鎖するDNA マーカーとして利用可能である。現在、品質の優れた一季成り性品種に四季成り性を導入することが求められており、本研究の成果として高精度のマーカーが得られれば、効率的な育種に貢献できる。

2. 研究の目的

イチゴには短日性（一季成り性）と長日性（四季成り性）の品種や系統が存在するが、栽培植物で同一種内に異なる日長反応を示す植物は、イチゴ以外にはほとんどない。四季成り性の分子機構を明らかにすることは、栽培上や学問上、重要である。しかし、イチゴの栽培種は、高次倍数体で遺伝子の解析が困難である。そこで、イチゴ属のモデル植物として2倍体のワイルドストロベリーの一季成り性の系統と四季成り性の品種などを供試する。

3. 研究の方法

ワイルドストロベリーの一季成り性と四季成り性の系統・品種を供試し、花成関連遺伝子について分子生物学的なアプローチを行う。内容は（1）花成関連遺伝子の単離と比較、（2）四季成り性の分離との関連の調査、（3）栽培品種における四季成り性関連遺伝子の調査、である。ワイルドストロベリーは2倍体であるため、8倍体である栽培種と比べて各遺伝子における対立遺伝子の構成が単純であると考えられる。

材料

22年度当初からの計画には、ワイルドストロベリーの一季成り性の系統PI-602924, PI-637962と、四季成り性品種の‘Alexandria’, ‘Baron Solemacher’を供試する。また、国内で栽培されている栽培種の四季成り性品

種と一季成り性品種を供試する。

（1）花成関連遺伝子の単離と比較

ワイルドストロベリーから常法によってRNAを抽出し、PCRによる花成関連遺伝子のクローニングを行う。配列情報はGenome Database for RosaceaeとDNA Data Bank of JapanのESTなどから、相同性検索によって得る。対象とする遺伝子はシロイヌナズナにおける*GI*, *CO*, *FT*, *SOCI*であり、各遺伝子の配列を利用してイチゴにおける相同配列のプライマーを設計する。得られたcDNA断片をもとにRACE法によって全長のcDNAを得る。得られたcDNAの配列を利用してゲノミックサザン解析によってゲノム上のコピー数を検討するとともに、四季成り性と一季成り性との間のcDNA配列の比較を行う。

ワイルドストロベリーの花成の光周性に関する情報は不十分であることから、温度と日長を制御して、各品種・系統の日長反応性を確認する。その際、発現解析に供するサンプルを、長日および短日条件下で、花芽形成過程の各段階において採取する。上記で得られたcDNA配列を利用して、ノーザン解析あるいはリアルタイムPCRによる発現解析を行い、花成との関連を明らかにする。特に遺伝子ファミリーを形成しているなどの理由によって、同一個体から複数種類の花成関連遺伝子が得られた場合は、この発現解析によって花成との関連が明らかになった遺伝子について詳細な検討を行う。花成との関連が示唆された花成関連遺伝子のうち、四季成り性と一季成り性で、各遺伝子の機能に関わる部位におけるアミノ酸配列の違いが見出された遺伝子について、詳細に検討する。具体的には、長日性のシロイヌナズナと短日性のタバコに、四季成り性と一季成り性から得られた変異を含む各cDNAを導入して花成への影響を調べる。

（2）四季成り性の分離との関連の調査

一季成り性と四季成り性の各花成関連遺伝子の比較によって見出された変異が、四季成り性と関連があるかどうか、遺伝学的な調査を行う必要がある。そこで、一季成り性と四季成り性の各品種・系統を交雑し、 F_1 の自殖後代 (F_2) を得て、花成の長日性の分離と花成関連遺伝子の変異の分離を比較する。21年度はワイルドストロベリーの各系統・品種の栽培と交雑を行い、 F_1 の採種と栽培を行う。自然光または人工光ファイトトロンを利用して生育を促進し、早期に F_2 種子を得る。四季成り性遺伝子の候補となった遺伝子の変異について、一季成り性と四季成り性の交雑後代である F_2 の長日性の分離との相関を調べる。具体的にはファイトトロンにおいて日長を制御して花成反応を調べるとともに、各個体からゲノムDNA抽出して該当する遺伝子を

PCRによって増幅して、配列を調査する。

(3) 栽培品種における四季成り性関連遺伝子の調査

(1) において四季成り性遺伝子の候補となった遺伝子の配列における変異が、多様な栽培品種の一季成りと四季成りにおいて花成の日長反応と対応するかどうかを明らかにすることで、四季成り性遺伝子の同定に寄与する。供試する品種は、四季成り性では‘なつあかり’、‘デコルージュ’、‘サマーベリー’など15品種、一季成り性では‘とちおとめ’、‘さちのか’、‘北の輝’など30品種とする。当研究室で栽培実績のある11品種については栽培して試料を採取し、他の品種については各地試験場または産地において試料の提供を依頼する。

4. 研究成果

(1) 花成関連遺伝子の単離と比較

当初目的としていた花成関連遺伝子を単離することができなかった。

(2) 四季成り性の分離との関連の調査

①2010年度の結果

‘Alexandra’、‘ミグノネット’、ワイルドストロベリーの変種 (*F. vesca* var. *vesca*) の系統を供試し、実生から栽培した。昼温 (6~18時) / 夜温 (18~翌6時) を 25/20°C に設定した自然光型ファイトトロン内で、自然日長 (10.5~16時間) で栽培した。

‘Alexandra’ と ‘ミグノネット’ が開花し、はほぼ1年を通して連続して開花した。一方、*F. v. var. vesca* の系統は、栽培期間中に開花しなかったが、多数のランナーを発生させた。以上の結果、‘Alexandra’ と ‘ミグノネット’ の二つの品種は四季成り性であり、*F. v. var. vesca* の系統は一季成り性であることが明らかとなった。*F. v. var. vesca* の系統が開花しなかったのは、8倍体のイチゴの一季成り性品種と同様に、花芽形成をさせるためには低温や短日に遭遇させる必要があることが推察された。また、この結果から、本実験の温度・日長条件でワイルドストロベリーを栽培することにより、四季成り性の系統と一季成り性の系統を分離することが可能であることが明らかとなった。

②2011年度の結果

前年度と同様に、四季成り性の系統の ‘Alexandra’ と ‘ミグノネット’ と、一季成り性の系統の *F. vesca* var. *vesca* を供試した。昼温 (6~18時) / 夜温 (18~翌6時) を 25/20°C に設定した自然光型ファイトトロン内で、自然日長 (10.5~16時間) で栽培した。また、この年度は、四季成り性であると考えられた2つの品種について、自家受粉と交雑を行って、それぞれで種子を得た。一

方、一季成り性系統の *F. vesca* var. *vesca* は栽培期間中に開花しなかったことから、秋に自然光型ファイトトロンから搬出して露地に移すことで低温に遭遇させたところ開花した。この結果、*F. vesca* var. *vesca* も栽培品種の一季成り性品種と同様に、花芽分化させるためには低温に遭遇させる必要があることが明らかとなった。また、開花したことから、自殖させたり、四季成り性の2品種と交雑させたりすることで実生を得た。なお、この年は、3月11日の東日本大震災による停電で植物育成装置が停止した際に、温度が保てずに低温に遭遇したためか、植物体に何らかの生理的な変化があったのか、四季成り性の品種が当初の予定通りに開花しなかったため、交配などを行う時期が当初の予定より遅くなった。

③2012年度の結果

前年度までの試験で、ワイルドストロベリーの四季成り性系統であると考えられた ‘Alexandra’ と ‘ミグノネット’ について、自家受粉や交雑して得られた実生の四季成り性の判定を試みた。また、四季成り性の系統と一季成り性の系統を交雑して得られた実生についても、同様の判定を行った。昼温 (6~18時) / 夜温 (18~翌6時) を 25/20°C に設定した自然光型ファイトトロン内で、自然日長 (12~16時間・3~10月) で栽培したところ、四季成り性の系統から得られた実生では、自殖や交雑に関わらず、試験期間中に開花に至った個体があり、これらの個体は四季成り性である可能性が示唆された。一方、一季成り性の系統を自殖して得られた実生は開花しなかったが、四季成り性の系統との交雑で得られた実生では、一部の株が開花した。以上の結果、ワイルドストロベリーの四季成り性は優勢であると推察されたが、本試験では十分な数の実生が得られなかったことから、ワイルドストロベリーにおける四季成り性の形質の遺伝については、F₂ 世代を得ることも含めて今後も検討する必要があるが、これを明らかにすることができれば、高次倍数体である栽培種への応用も可能になると考えられる。

(3) 栽培品種における四季成り性関連遺伝子の調査

花成の日長反応を調べることを目的として、露地における開花状況を2010年~2012年の3年間にわたって調べた。四季成り性品種の場合、品種間差異が認められたものの、4~10月に連続して開花したことから、供試した品種はいずれも四季成り性を示し、長日性であることが明らかとなった。しかし、供試したいずれの品種も8~9月に開花した花房数は少なかった。高温条件におかれた四季成り性品種の花芽分化には日長が影響を及

ぼし、長日では花芽分化が著しく促進される一方で、短日では花芽分化が抑制される。花芽分化が促進されたり抑制されたりする境となる日長（限界日長）には品種間差異が認められることが知られている。本研究の研究期間において、夏は非常に高温であったことから、8～9月における開花花房数の減少は、高温による花芽分化の抑制が原因であり、供試した品種の限界日長が長かったために、この期間の自然日長（13～15.5時間）では花芽分化が抑制されたことが推察された。

四季成り性品種の‘なつあかり’を供試して、無加温のガラス室内で栽培した。温度は成り行きとし、日長は、9時～17時は自然日長、17時～翌日の9時はシルバーポルトウで被覆して遮光し、その中で、白熱電球を用いて照明を行う24時間日長区と照明を行わない8時間日長区を設けた。この結果、‘なつあかり’の花房発生は24時間日長で多かったことから（図1）、四季成り性品種は長日性であることが示された。

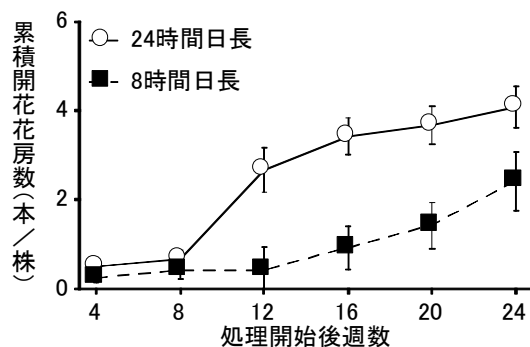


図1 ‘なつあかり’の花房発生数に及ぼす日長の影響。

一季成り性品種の場合、4～6月に開花したが、それ以外の期間では開花しなかった。一季成り性品種は、秋の低温短日で花芽分化し、休眠を経て翌春の温暖な温度と長日の下で生殖器官の発達が進められて開花する。その後の高温・長日では花芽分化が抑制されるために夏の間は開花しない。本研究で供試した一季成り性品種も、これまでに報告された一季成り性品種と同様の花成の日長反応を示し、短日性であることが明らかとなった。以上の結果は、1)の実験において四季成り性遺伝子の候補となった遺伝子が明らかとなった場合、その配列における変異が、多様な栽培品種の一季成りと四季成りに関して花成の日長反応と対応するかどうかを明らかにする上の重要なデータとなると考えられる。

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)

[学会発表] (計1件)

① 西山 学，四季成り性イチゴ‘なつあかり’の成長に及ぼす秋冬季の夜間補光における光質の影響，園芸学会，2012年9月22日，福井県立大学福井キャンパス。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 学 (NISHIYAMA MANABU)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：80312627

(2) 研究分担者

金山 喜則 (KANAYAMA YOSHINORI)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10233868

(3) 連携研究者

()

研究者番号：