

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25850008

研究課題名(和文)ジベレリン欠損変異が関与するバレイショの収量性及び栽培化過程の解明

研究課題名(英文) Study on yield and domestication process of potato through analysis of gibberellin deficient mutant.

研究代表者

浅野 賢治 (ASANO, Kenji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター 畑作物開発利用研究領域・主任
研究員

研究者番号：80547034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：国内のバレイショ品種の交配後代に見られる矮性個体について、同座性検定による分離比から、これまでに収量性等との関係性が示唆されているga1変異体と同一であることを明らかにした。ジベレリン(GA)合成酵素遺伝子近傍のSSRマーカーとの連鎖解析により、ga1変異体について、1つのGA合成酵素遺伝子近傍が原因遺伝子の候補領域であることを特定した。しかしながらこのGA合成酵素遺伝子のエキソン領域には原因と思われる変異は見つからず、遺伝子発現の低下も見られなかった。

研究成果の概要(英文)：During potato breeding process, extreme dwarf plants are often observed in population derived from cross between Japanese potato varieties. It is not clear whether the dwarf phenotype is controlled by same gene with previously reported dwarf mutants, ga1, although phenotypes such as small and dark green leaves, ball-shaped mass of foliage, and rosette dwarf resembles that of ga1 mutants. Involvement of ga1 locus in potato yield and photoperiod response are indicated in previous studies. In this study, allelism test between ga1 mutants and dwarf plants observed in Japanese population were performed. Based on segregation ration in two population, it was confirmed that Japanese dwarf mutants are allelic to ga1. Linkage analysis with SSR markers closely located to gibberellin (GA) biosynthetic genes indicated that a gene catalyzing early step of GA biosynthesis is strong candidate of responsible gene for ga1.

研究分野：植物育種学

キーワード：バレイショ 矮性 ジベレリン

1. 研究開始当初の背景

ジベレリン (GA) は植物細胞の分裂や伸長を促進する植物の成長に必須の植物ホルモンの一つであり、本ホルモンが欠損すると植物は矮性・花形成異常・種子発芽異常などの症状を示す。またイネやコムギにおいて、GA 合成及び信号伝達への変異が栽培化とその後の近代品種の成立に大きく貢献したことが申請者らの研究から明らかになっている (Asano *et al.*, 2011 PNAS, Asano *et al.*, 2007 Breed. Sci., Sasaki *et al.*, 2002 Nature, Peng *et al.*, 1999 Nature)。バレイシヨでは、GA は塊茎形成にも関与していることが知られており、塊茎形成を阻害するような条件下では、ストロンにおいて GA 合成酵素遺伝子の発現量の増加や GA の蓄積が観察されている (Bou-Torrent *et al.*, 2011 PLoS ONE, Xu *et al.*, 1998 Plant Physiol.)。

現在世界中で栽培される普通バレイシヨはチュペローサム亜種 (*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*) であり、元々南米アンデス地域の栽培種であったアンディゲナ亜種 (*S. tuberosum* ssp. *andigena*) に由来する。アンディゲナ亜種は短日性が強く、日本やヨーロッパなど緯度の高い地域では塊茎形成をしないか極晩生となるが、16 世紀後半にヨーロッパに導入され、ヨーロッパのような長日条件下でも塊茎が形成されるような人為選抜が加えられた。その結果チュペローサム亜種が成立したとされており、この長日条件への適応がチュペローサム亜種の成立にとって最も重要な過程の一つであったと考えられている。

バレイシヨ品種間の交配後代集団では、組合せにより頻度は異なるものの、多くの組合せで矮性個体が出現する。この矮性個体は *ga1* 変異体に酷似した特徴を有しており、*ga1* と同座の遺伝子の変異によるものであると考えられている。*ga1* では内性 GA 量が減少していること、GA 処理により表現型が回復することから GA 合成遺伝子に変異があることが示唆されている (Bamberg and Hanneman 1991 Am. J. Pot Res)。*ga1* は劣性変異であり、劣性ホモ (*gggg*, *ga1* を *g*, *GA1* を *G* とする) では矮性個体となるがヘテロであればゲノム中の *ga1* の数が多いほど多収になる (*GGGg* < *GGgg* < *Gggg* の順に多収) と報告されている。また、通常短日条件下でしか塊茎を形成しないアンディゲナ亜種であっても、*ga1* ホモ個体は長日条件下でも塊茎形成が見られることから、*ga1* への変異と長日適応の関係も指摘されている (Bamberg and Hanneman 1993 Potato Research, Bamberg and Miller 2012 Am. J. Pot Res)。このようにバレイシヨにおいて矮性変異と収量性及び長日適応の間に何らかの関係性があると考えられているものの、これまでに矮性変異の原因遺伝子を単離するなど詳細に解析した例はない。そこで本研究では矮性変異の原因遺伝子を単離し、矮性変異と収量性や日長反応性の関

係を明らかにしようと試みた。

2. 研究の目的

国内のバレイシヨ品種間交配の後代に見られる矮性変異体について、海外で報告されている *ga1* 変異体と同座であるかを明らかにする。また、矮性変異体の原因遺伝子を特定し、この遺伝子がバレイシヨの生育過程においてどのような働きをし、収量性や日長反応性にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 供試材料

交配後代に多く矮性個体が出現する国内主要品種であるコナフブキを花粉親、*ga1* 変異体 GS194 及び *ga1* を二重式に有する (*GGgg*) Pito を種子親として雑種集団を作出した。また、GS194 × コナフブキから分離した正常個体 20 個体、矮性個体 55 個体及び Pito × コナフブキから分離した正常個体 24 個体、矮性個体 27 個体を用いた。

(2) 交配及び実生の育成と表現型調査

植物材料の育成は農研機構北海道農業研究センター (芽室研究拠点) の育成温室内で実施した。交配は開花したコナフブキから花粉を採取し、開花前に除雄した GS194 及び Pito の雌ずいに受粉させた。GS194 については矮性個体であるため、50ppm の GA₃ 溶液を 2-3 日に一度噴霧し表現型を回復させて交配に用いた。交配後約 30 日で果実を収穫し、柔らかくなった果実から種子を洗い出した。種子は播種前に 2,000ppm の GA₃ 溶液に 48 時間浸漬し培土に播種した。播種後 4-5 週間経過し、矮性表現型が明らかになったあと、表現型を調査し矮性個体に分離頻度を調査した。

(3) GA 合成遺伝子のバレイシヨ染色体上へのマップ

これまでにシロイヌナズナやイネなどの他の植物種で報告されている GA 合成酵素遺伝子のアミノ酸配列をクエリーにして、バレイシヨゲノム PGSC *S. tuberosum* group Phureja DM1-3 Pseudomolecules (v4.03) (<http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/blast.shtml>) に対して BLAST 検索を行った。

(4) GA 合成酵素遺伝子近傍の SSR マーカーとの連鎖解析

バレイシヨゲノム上にマップされた GA 合成酵素遺伝子近傍に座乗する 26 の SSR マーカーを用いて、Pito × コナフブキの雑種集団において連鎖解析を行った。

(5) GA 合成酵素遺伝子の発現解析

Pito × コナフブキの雑種集団から得た正常個体及び矮性個体それぞれ 2 個体と GS194 の葉から抽出した RNA から合成した cDNA を

用いて、定量PCR法によってGA合成酵素遺伝子の遺伝子発現を比較した。内部標準遺伝子には *ef1* を用いた。

4. 研究成果

(1) Pito×コナフブキの雑種集団では正常個体と矮性個体が832:27で分離した。この分離比について²検定を行った結果、Pito及びコナフブキの両者が同じ矮性遺伝子を二重式に有し、染色体分離モデルを想定した場合に期待される分離比に適合した(表1)。しかしながら、この結果からはPitoが *ga1* とは異なる矮性変異も二重式に有する可能性が否定できないため、*ga1* 変異体であるGS194×コナフブキの雑種集団でも分離比の確認を行った。その結果この集団では正常個体と矮性個体が405:68で分離した。これはコナフブキが *ga1* を二重式に有し、染色体分離モデルを想定した場合に期待される分離比に適合した(表1)。以上の結果から国内のバレイショ品種も *ga1* 変異を有しており、品種育成の過程で出現する矮性個体の一部は *ga1* 変異体であることが明らかとなった。

表1 *ga1* と日本の品種が持つ矮性変異との同座性検定

交配組合せ	分離比(観察値)		想定される遺伝子型の組合せ	矮性個体の割合(期待値)		χ^2 値	
	正常	矮性		I	II	I	II
Pito×コナフブキ	832	27	<i>Ggg</i> × <i>Ggg</i>	8.3	12	30.3 ^{***}	64.2 ^{***}
			<i>Ggg</i> × <i>GgG</i>	2.7	4.9	0.42 ^{NS}	5.9 [*]
			<i>GgG</i> × <i>GgG</i>	0	0.9	-	46.0 ^{***}
GS194×コナフブキ	405	68	<i>gggg</i> × <i>GgG</i>	16.7	22.2	1.79 ^{NS}	16.8 ^{***}

I: 染色体分離モデル, II: 染色体分離モデルを想定

NS: 5%水準で有意差無し

***, * それぞれ0.1%及び5%水準で有意差有り

(2)GA合成酵素遺伝子のバレイショゲノムへのマップ

これまでに Valkonen et al (1999)によるジベレリンの定量結果から *ga1* では、GA合成経路の初期の経路に欠損があることが推定されている。そこで該当する5つのGA合成遺伝子、コパニル2リン酸合成酵素(*CPS*)、カウレン合成酵素(*KS*)、カウレン酸化酵素(*KO*)、カウレン酸化酵素(*KAO*)、*GA20ox* のバレイショゲノム上の位置を明らかにすることとした。他の植物種で報告されているこれらの遺伝子のアミノ酸配列をクエリーとしたBLAST検索の結果、*CPS*は6番染色体と8番染色体上の3か所、*KS*、*KO*、*KAO*はそれぞれ7番染色体、4番染色体、1番染色体に1か所ずつ、*GA20ox*は1番染色体、3番染色体、6番染色体、9番染色体、10番染色体上の7か所にマップされた(図1)。

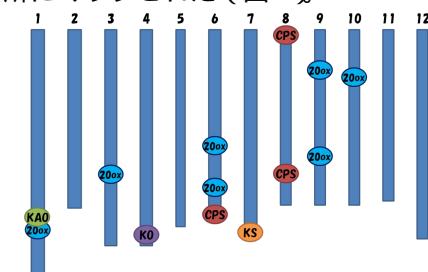


図1. GA合成酵素遺伝子のバレイショゲノム上の位置

(3) GA合成酵素遺伝子近傍のSSRマーカーとの連鎖解析

バレイショゲノム上にマップされたこれらの13のGA合成酵素遺伝子近傍に座乗する26のSSRマーカーを用いて、Pito×コナフブキの雑種集団において連鎖解析を行った。その結果GA合成の初期段階を触媒する合成酵素遺伝子近傍の二つのSSRマーカーと表現型の間に関係がみられた(図2)。

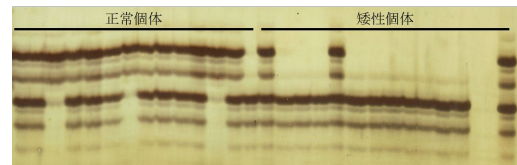


図2 GA合成酵素遺伝子近傍のSSRマーカーによる連鎖解析

(4) 候補遺伝子の塩基配列の解析

候補のGA合成酵素遺伝子について、GS194においてエキソン領域の塩基配列を決定し、コナフブキと比較した。その結果コナフブキとの間に5か所の非同義置換を見出した。これらの変異をCAPSマーカー化し、Pito×コナフブキ及びGS194×コナフブキの雑種集団で遺伝子型を決定した。その結果、すべての矮性個体でGS194と同じ変異をホモ型に有していたが、一部の正常個体でもこれらの変異をホモ型に有していたため、これらの変異は矮性変異体の原因ではないと考えられた。そこでイントロン領域やプロモーター領域への変異が原因であると考え、それらの領域の解析を行った。その結果、GS194ではプロモーター領域に設計したプライマーでPCRが増幅しない領域があり、この領域に大きな挿入または欠損があることが推測された。また、2つのイントロン領域にも数10bpの挿入/欠損があることが明らかになった。これらの3つの変異は、すべての矮性個体でGS194と同じ変異をホモ型に有していたが、一部の正常個体でもこれらの変異をホモ型に有していたため、これらの変異は矮性変異体の原因ではないと考えられた。

(5) GA合成酵素遺伝子の発現解析

候補としたGA合成酵素遺伝子に見られた非同義置換は、いずれも矮性変異の原因ではないと考えられた。そこで、遺伝子の発現量に差があると考え、正常個体と矮性個体との間で定量によって遺伝子の発現量を比較した。Pito×コナフブキの雑種集団から得た正常個体及び矮性個体それぞれ2個体とGS194の葉において定量PCR法によって遺伝子発現を比較した結果、矮性変異体で遺伝子発現の低下は見られず、反対に若干発現量が高い傾向が見られた(図3)。このことから遺伝子発現量の低下も矮性変異の原因ではないと考

えられた。現時点では矮性変異体の原因を明らかにするには至っていないが、すべての矮性個体でこの領域がホモ型となっていることから、この遺伝子若しくは近傍の遺伝子への変異が矮性の原因である可能性が高いと考えている。*ga1* がバレイシヨの収量性や生育に及ぼす影響を明らかにするためには、原因となる変異の特定が必要であり、さらなる詳細な解析が今後必要となる。

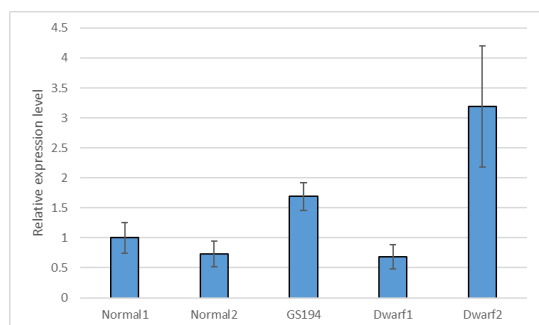


図3. 正常個体と矮性個体における GA 合成酵素遺伝子の発現量の比較

< 引用文献 >

Asano *et al.*, (2007) Genetic and molecular analysis of utility of *sd1* in rice breeding. *Breed. Sci.* 57 (1) 53-28

Asano *et al.*, (2011) Artificial selection for a green revolution gene during japonica rice domestication. *PNAS* 108 (27) 11034-11039

Bamberg and Hanneman (1991) Characterization of a new gibberellin related dwarfing locus in potato (*Solanum tuberosum* L.) *Am. J. Pot. Res.* 68 (1) 45-52

Bamberg and Hanneman (1993) Transmission and yield effects of a gibberellin mutant allele in potato. *Pot. Res.* 36 (4) 365-372

Bamberg and Miller (2012) Comparisons of *ga1* with other reputed gibberellin mutants in potato. *Am. J. Pot. Res.* 89 (2) 142-149

Bou-Torrent *et al.*, (2011) Gibberellin A1

metabolism contributes to the control of photoperiod mediated tuberization in potato. *PLoS ONE* 6 (9) e24458

Peng *et al.*, (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400 (6741) 256-261

Sasaki *et al.*, (2002) Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416 (6882) 701-702

Spud DB Potato Genomics Resource (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/integrated_searches.shtml)

Valkonen *et al.* (1999) Dwarf (*di*) haploid *pito* mutants obtained from a tetraploid potato cultivar (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) via anther culture are defective in gibberellin biosynthesis. *Plant Sci.* 149 (1) 51-57

Xu *et al.*, 1998 *Plant Physiol.* (1998) The role of gibberellin, abscisic acid, and sucrose in the regulation of potato tuber formation in vitro. *Plant. Physiol.* 117 (2) 575-584

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Satoru Tomita, Seishi Ikeda, Shogo Tsuda, Nobutaka Someya, Kenji Asano, Jun Kikuchi, Eisuke Chikayama, Hiroshi Ono, Yasuyo Sekiyama (2016) A survey of metabolic changes in potato leaves by NMR-based metabolic profiling in relation to resistance to late blight disease under field conditions. *Magnetic Resonance in Chemistry* 55(2), 120-127.

Christine D. Santiago, Shogo Yagi, Motoaki Ijima, Tomoya Nashimoto, Maki Sawada, Seishi Ikeda, Kenji Asano, Yoshitake Orikasa, Takuji Ohwada (2017) Bacterial compatibility in combined inoculations enhances the growth of potato seedlings. *Microbes and environments* 32(1), 14-23

Kenji Asano and Seiji Tamiya (2016) Breeding of Pest and Disease Resistant Potato Cultivars in Japan by Using Classical and Molecular Approaches. *Japan Agricultural Research Quarterly* 50 (1), 1-6 (査読有)

浅野賢治 (2015) ジャガイモシストセンチュウ抵抗性品種育成のこれまでとこれから *いも類振興情報* 124, 35-39 (査読無)

Kazuyuki Mori, Kenji Asano, Seiji Tamiya, Takashi Nakao, Motoyuki Mori (2015) Challenges on breeding potato cultivars to grow in various environments and to meet different demands. *Breeding Science* 65 (1), 3-16 (査読有)

Ayako Okuno, Ko Hirano, Kenji Asano, Wakana Takase, Reiko Masuda, Yoichi Morinaka, Miyako Ueguchi-Tanaka, Hidemi Kitano, Makoto Matsuoka (2014) New approach to increasing rice lodging resistance and biomass yield through the use of high gibberellin producing varieties. *PLoS One* 9 (2) e86870 (査読有)

[学会発表](計 11 件)

津田昌吾, 田宮誠司, 浅野賢治, 下坂悦生, 辻博之 夏季高温による収量低下対策技術としての早生バレイショの晩植栽培 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会 2016年12月3日 北海道大学 (北海道・札幌市)

浅野賢治, 山下陽子, 下坂悦生, 田宮誠司 DNA マーカーによるジャガイモシストセンチュウ抵抗性遺伝資源候補の探索 日本育種学会第 130 回講演会 2016年9月25日 鳥取大学 (鳥取県・鳥取市)

浅野賢治 近縁栽培種を使った交配親系統群の特性評価と今後の方向性 2015年11月14日 次世代バレイショセミナー 観月苑 (北海道・音更町)

浅野賢治, 小嶋美紀子, 榊原均, 田宮誠司 バレイショの品種育成過程に見られるジベレリン欠損変異体の遺伝解析 日本育種学会第 126 回講演会 2014年9月27日 南九州大学 (宮崎県・都城市)

Kenji Asano Importance of multiplex genotypes in potato breeding and their rapid selection by quantitative real-time PCR 2014年10月21-22日 第7回東アジア作物科学セミナー かでる 2.7 (北海道・札幌市)

浅野賢治 病害虫抵抗性遺伝子数の迅速推定法の開発 2014年11月9日 次世代バレイショセミナー 観月苑 (北海道・音更町)

浅野賢治 Development of rapid estimation method of multiplex genotypes for disease resistance genes

in potato. 2014年11月12-13日 Potato Research Workshop in Obihiro 2014 帯広畜産大学(北海道・帯広市)

浅野賢治, 岡田昌宏, 田口和憲, 伊藤淳士, 平藤雅之 モバイルデバイスを用いた育種における形質調査の効率化 日本育種学会第125回講演会 2014年3月22日 東北大学(宮城県・仙台市)

浅野賢治, 岡田昌宏, 田口和憲, 伊藤淳士, 平藤雅之 Efficient data collection and management for breeding using mobile devices. PhenoDays 2013 2013年10月17日 castle Kasteel Vaalsbroek (オランダ・vaals)

津田昌吾, 田宮誠司, 西中未央, 浅野賢治, 向島信洋 バレイショの細胞質遺伝子型の違いが高温年の収量に及ぼす影響 日本育種学会・日本作物学会 北海道談話会 2013年12月7日 酪農学園大学(北海道・江別市)

平藤雅之, 濱田安之, 吉田智一, 木浦卓治, 伊藤淳士, 田口和憲, 浅野賢治, 辻博之, 池田成志, 西中未央, 杉浦綾, 本多潔 Agricultural Big Data for Field Phenomics. PhenoDays 2013 2013年10月17日 castle Kasteel Vaalsbroek (オランダ・vaals)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: ジャガイモ作物体の生育状態診断方法
発明者: 関山恭代, 富田理, 小野裕嗣, 池田成志, 浅野賢治, 小林晃, 小林有紀
権利者: 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
種類: 特許
番号: 特願 2015-109720
出願年月日: 2015年5月29日
国内外の別: 国内

名称: ばれいしょ品種「パールスターチ」
発明者: 田宮誠司, 津田昌吾, 森元幸, 小林晃, 高田明子, 浅野賢治, 西中未央, 向島信洋
権利者: 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
種類: 品種登録
番号: 出願番号 30106
出願年月日: 2015年4月13日
国内外の別: 国内

名称: ばれいしょ品種「あかね風」
発明者: 津田昌吾, 森元幸, 小林晃, 高田明子, 田宮誠司, 西中未央, 浅野賢治, 向島信洋
権利者: 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
種類: 品種登録
番号: 出願番号 28822
出願年月日: 2014年1月7日
国内外の別: 国内

〔その他〕

アウトリーチ活動

浅野賢治 ヨーロッパにおけるジャガイモ シロシストセンチュウ対策 ~育種と生産体系について~ 種ばれいしょ生産に関する勉強会 2017年2月21日 種苗管理センター (茨城県・つくば市)

浅野賢治 ジャガイモシロシストセンチュウ抵抗性品種の育成と将来に向けた取り組み 倶知安町認定農業者協議会研修会 2016年6月23日 ようてい農業協同組合 倶知安支所(北海道・倶知安町)

浅野賢治 北海道農業研究センターでのバレイショ育種の今後 - ヨーロッパ視察を経験して - 種馬鈴しょ栽培技術研究会 2016年2月23日 笹井ホテル(北海道・音更町)

浅野賢治 有望新系統北海105号について JA 斜里町畑作総合講習会 2014年2月20日 JA 斜里町 (北海道・斜里町)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 賢治 (ASANO Kenji)
国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター 畑作物開発利用研究領域・主任研究員
研究者番号: 80547034