

早期開花遺伝子の活用による 果樹世代促進育種法

「第2回新たな育種技術研究会、2013'10/29」

**(独)農研機構・果樹研究所
品種育成・病害虫研究領域**

上席研究員 山本俊哉

- 1. 果樹における早期開花遺伝子＋世代促進の意義**
- 2. 果樹における「早期開花遺伝子の活用による果樹世代促進育種法」の現状と展望**
 - a) 開花促進遺伝子を利用したカンキツ育種期間の短縮技術開発
 - b) 植物潜在性ウイルスベクターの機能を活用したカンキツ類の遺伝子機能解析技術および開花促進技術の開発
 - c) カルタヘナ法、食品安全について
- 3. その他(果樹、花きでのNBTの可能性)**

早期開花遺伝子 (FT)



農研機構

- フロリゲン (**florigen**): 植物において花芽形成を誘導するシグナル物質として提唱された植物ホルモン(様物質)
- 1936年に提唱されてから2007年に至るまで約70年間存在が確認されず、幻の植物ホルモンともいわれていた
- 1999年に京都大学の荒木らによって、シロイヌナズナで**FT (FLOWERING LOCUS T) 遺伝子**が発見された
- フロリゲンの正体は、**FTタンパク質**であるという結果が2007年に示された

果樹研のグループ(大村、遠藤ら)が、公的データベースに登録していた**カンキツ果実**由来の発現遺伝子(機能不明EST)の中に、**FT遺伝子**があった(果樹研が本家!?)。



果樹研でFT遺伝子の解析と
早期開花への利用

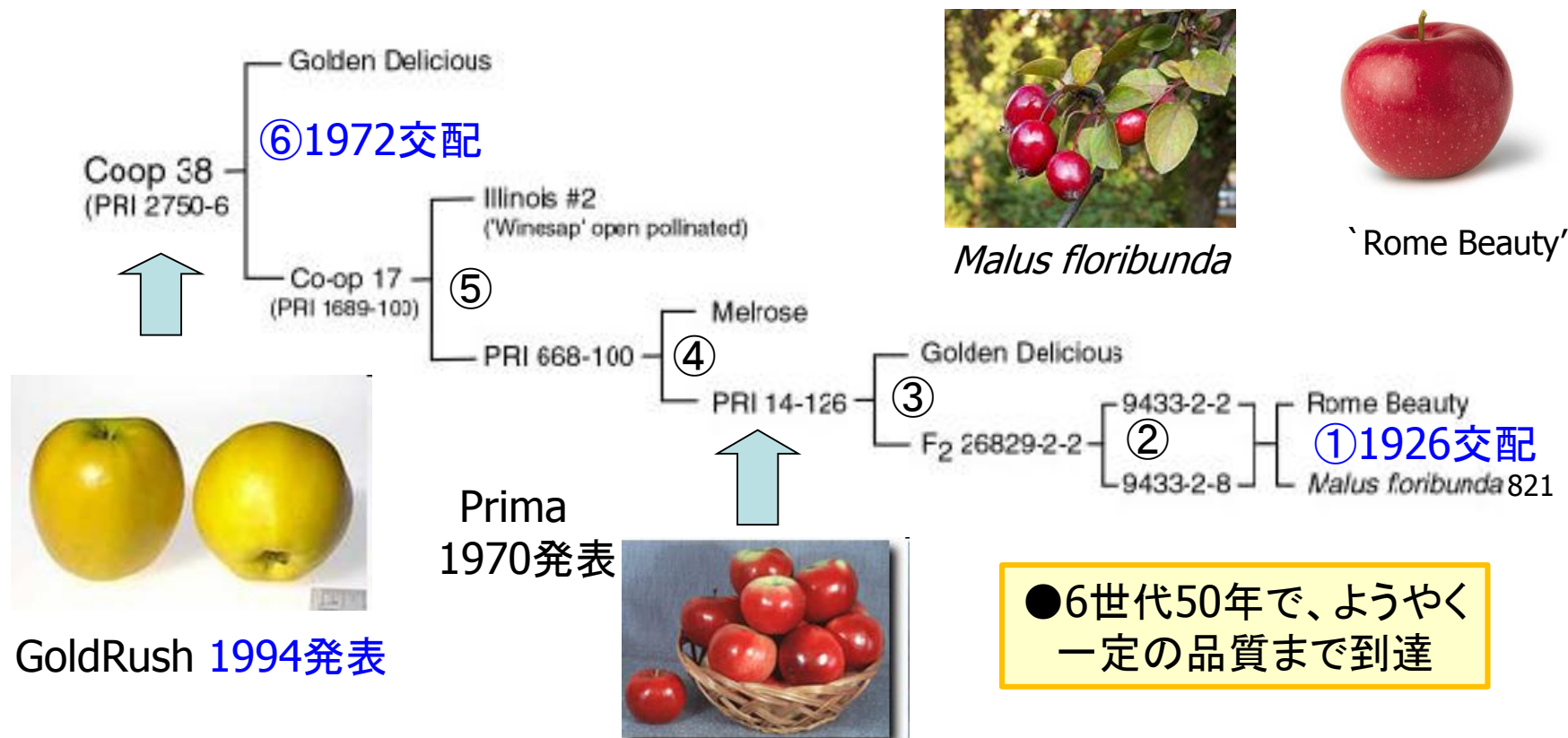
Science (1999)

A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals

Yasushi Kobayashi,¹ Hidetaka Kaya,¹ Koji Goto,² Masaki Iwabuchi,^{1*} Takashi Araki^{1†}

Flowering in *Arabidopsis* is promoted via several interacting pathways. A photoperiod-dependent pathway relays signals from photoreceptors to a transcription factor gene, *CONSTANS* (*CO*), which activates downstream meristem identity genes such as *LEAFY* (*LFY*). *FT*, together with *LFY*, promotes flowering and is positively regulated by *CO*. Loss of *FT* causes delay in flowering, whereas overexpression of *FT* results in precocious flowering independent of *CO* or photoperiod. *FT* acts in part downstream of *CO* and mediates signals for flowering in an antagonistic manner with its homologous gene, *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*).

リンゴ黒星病抵抗性育種 *M. floribunda* 由来 *Vf* 遺伝子の栽培リンゴへの導入



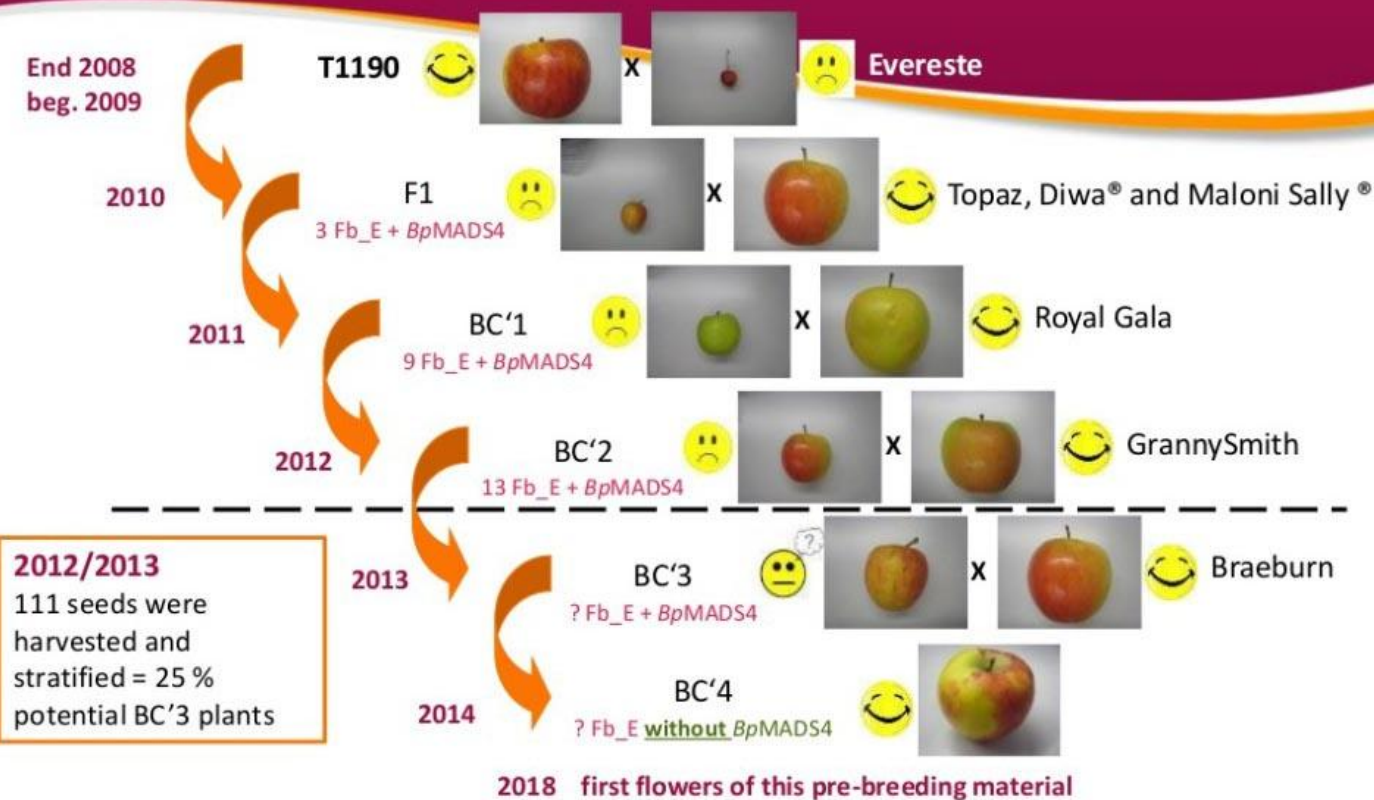
●6世代50年で、ようやく一定の品質まで到達

●1世代を1-2年で経過できれば、飛躍的に育種が進展

早期開花技術＋世代促進育種法の開発が大いに期待

Fast-track breeding

State of the art



2012/2013
111 seeds were harvested and stratified = 25% potential BC'3 plants

2018 first flowers of this pre-breeding material

●リンゴ鑑賞用品種 'Evereste'

- ・火傷病抵抗性保有
- ・黒星病抵抗性保有

●MADSbox 遺伝子導入リンゴ

- ・播種後1年以内に開花

●2018年に早期開花遺伝子を抜いた育種素材が開花予定？



次世代ゲノム基盤プロジェクト

「作物に画期的な形質を付与する新しいゲノム育種技術の開発」

- a) 開花促進遺伝子を利用したカンキツ育種期間の
短縮技術開発(GMO1003)

農研機構果樹研究所

遠藤朋子、島田武彦、藤井 浩

- b) 植物潜在性ウイルスベクターの機能を活用したカンキツ類の
遺伝子機能解析技術および開花促進技術の開発(GMO1002)

岩手大学農学部

吉川信幸

カンキツ組換え体における早期開花

カラタチに *CiFT* 遺伝子 (カンキツ *FT* ホモログ: 花成促進遺伝子) を導入・異所発現させると、組換え体が早期開花・結実し、雑種後代にも遺伝

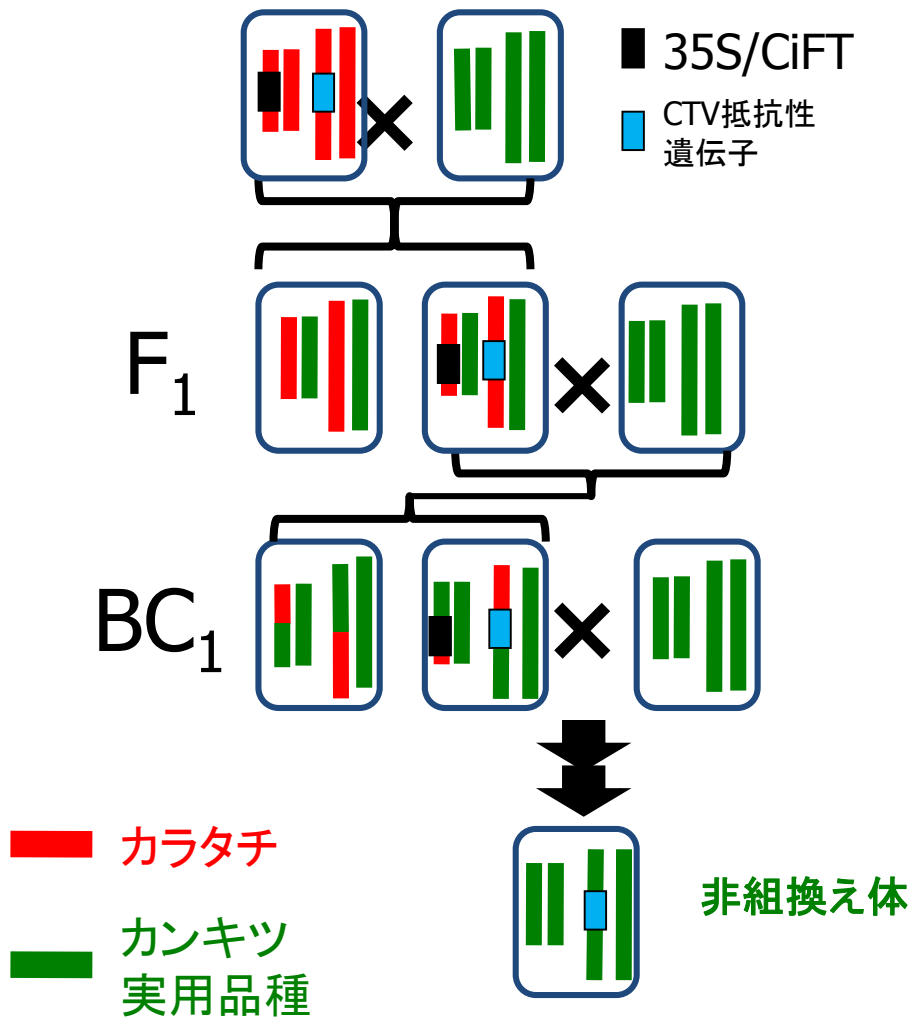


- カラタチ胚軸に *P35S::CiFT* を導入
不定芽を選抜・育成

- 導入から1年程度で
開花開始
- 2年程度で果実結実

- 早期開花・結実性
を示す雑種後代が
得られる

カラタチがもつ優性1遺伝子支配のカンキツリステザウイルス (CTV)
抵抗性をカンキツ実用品種へ取り込む



* *CiFT* 組換えカラタチと実用カンキツ品種を交配する

* 外来 *CiFT* と CTV 抵抗性遺伝子を有する個体を DNA マーカーで選抜し、世代を進める

* ゲノムを広範囲にカバーするマーカーでカンキツ型への遺伝子座置換を推定する

* 育種の最終段階で外来遺伝子を分離除去する

研究目標(5年間)

①カンキツ類における世代促進育種法の開発

通常の交雑育種では、安定して開花・結実するまで7-10年程度要するところを、1世代あたり2-3年程度に短縮した世代促進育種技術を開発する。

●カラタチ由来のCTV抵抗性遺伝子をカラタチから3世代進んだカンキツ育種素材に導入する。

●外来遺伝子が分離除去された個体を解析して、外来遺伝子をもたないCTV抵抗性カンキツ品種や育種素材の作成が可能であることを検証する。



期待される成果

●カンキツの育種期間を短縮する、NBT利用(遺伝子操作は途中利用のみ・導入遺伝子フリー)の新規育種技術が開発される。

<研究目的>

既にリンゴや各種作物で実績のある植物潜在性ウイルス

(リンゴ小球形潜在ウイルス、ALSV)ベクターを用いて、先ず

(1)カンキツ類の有効なVIGS系を開発する。続いて、植物の開花関連遺伝子、
例えば開花促進に働く遺伝子 (*Flowering locus T*, **FT**) の発現、また開花の
抑制遺伝子 (*Terminal flower 1*, **TFL1**) のVIGSによる抑制、さらにFT発現と
TFL1発現抑制を同時に行うウイルスベクターを構築し、

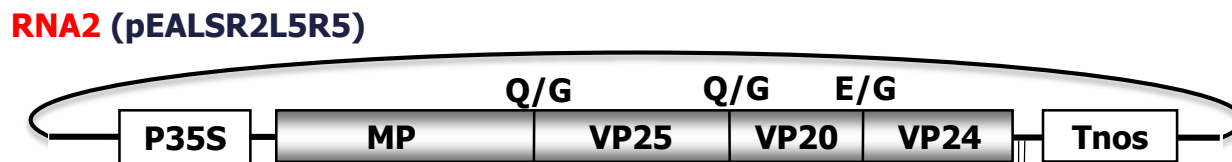
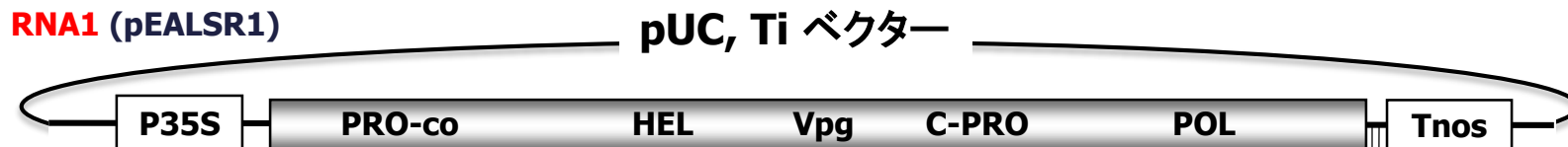
(2)カンキツ類実生苗の幼若期間を数ヶ月に短縮する開花促進技術ならびに

(3)1世代を1年以内に完了する世代促進技術を開発することを目的とする。

ALSVの特徴

- 1) 潜在感染 (病気を起こさない)
- 2) 宿主範囲が広い (果樹、野菜、花など各種植物に感染する)
- 3) 茎頂分裂組織に侵入する
- 4) 果樹(リンゴ)園での水平伝染はない
(花粉や昆虫などによる自然伝染は認められない)
- 5) 日本オリジナル

早期開花用ALS_{SV}ベクター



*Xho*I - *Sma*I - *Bam*HI

Q/G Q/G

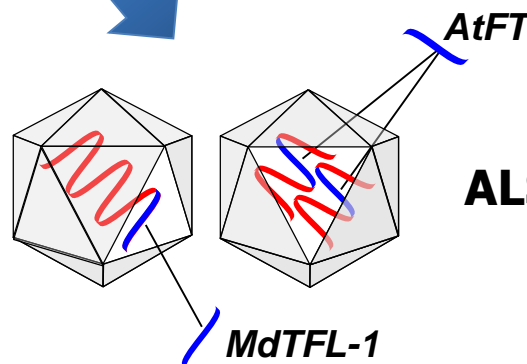
発現したい
遺伝子

抑制したい
遺伝子

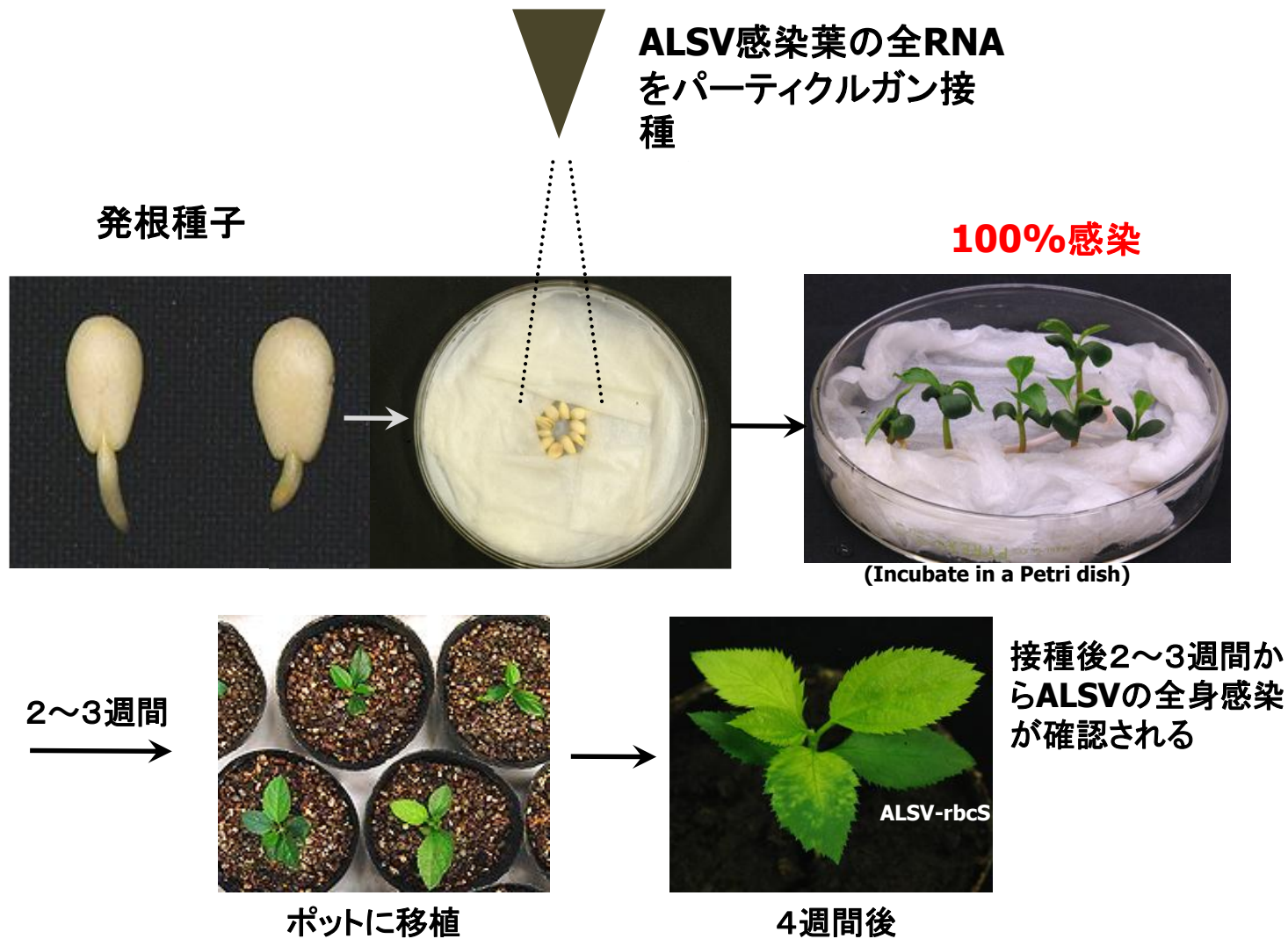
抑制したい
遺伝子

リンゴ由来
*TFL1*遺伝子
(*MdTFL1*)

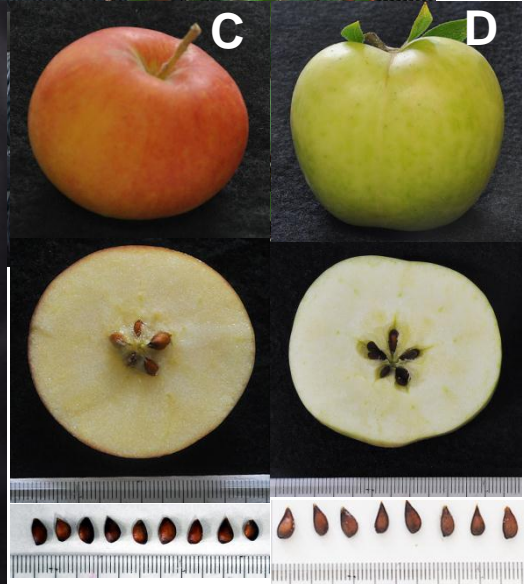
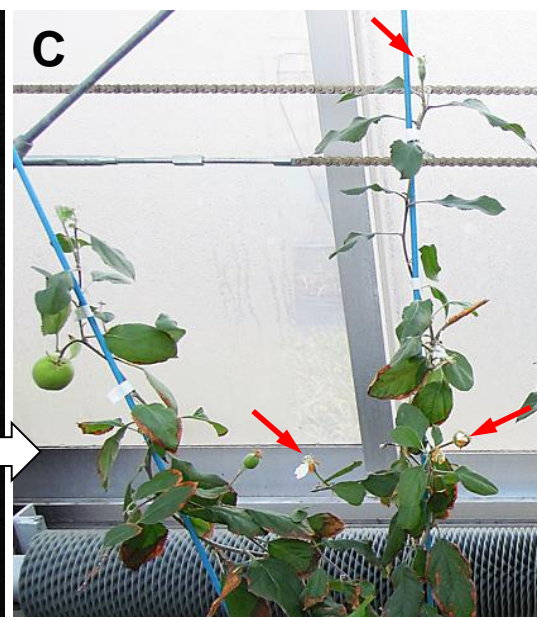
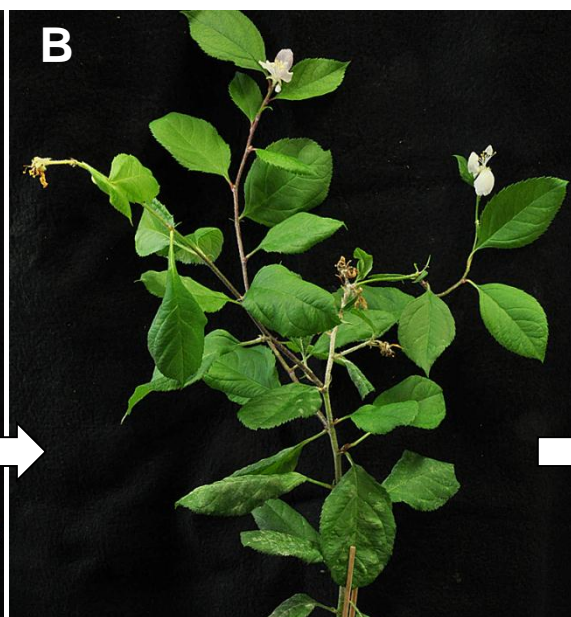
シロイヌナズナ由来
*FT*遺伝子(*AtFT*)



ALSV-*AtFT*/*MdTFL*



ALSV ベクターのリンゴ実生苗への接種法



検定法	検定時期 (発芽後月)	感染試料数／検定試料数 (種子伝染率)
ELISA	2	2／381 (0.52%)
qPCR	4	2／381 (0.52%)
	8	0／132

* 2および4カ月の試料でALSVが検出された2試料のELISA値は1.49と1.89で、TaqManプローブ法ではCt値が23.3と23.9であった。

ミカン科果樹(種子胚)へのALSVの感染



農研機構

属	類	種類	感染/接種個体		
			全RNA	濃縮RNA	
ミカン属	オレンジ類	バレンシアオレンジ	0/10	3/3	
	グレープフルーツ類	グレープフルーツ	—	6/6	
	香酸柑橘類	ユズ	ユズ	—	6/6
		カボス	カボス	—	3/3
		レモン	レモン	5/6	15/15
		スダチ	スダチ	—	5/5
		雑柑類	ヒュウガナツ	8/20	—
		甘夏	2/10	—	
		サンフルーツ	5/6	—	
	タンゴール類	イヨカン	—	5/5	
	ブンタン類	晩白柚	—	5/5	
	ミカン類	ウンシュウミカン	—	5/5	
	キンカン属	キンカン類	キンカン	—	6/6
カラタチ属	カラタチ類	カラタチ	—	5/5	

カラタチ CiFT組換え体系統と非組換え体の葉の形態と樹形

組換え体



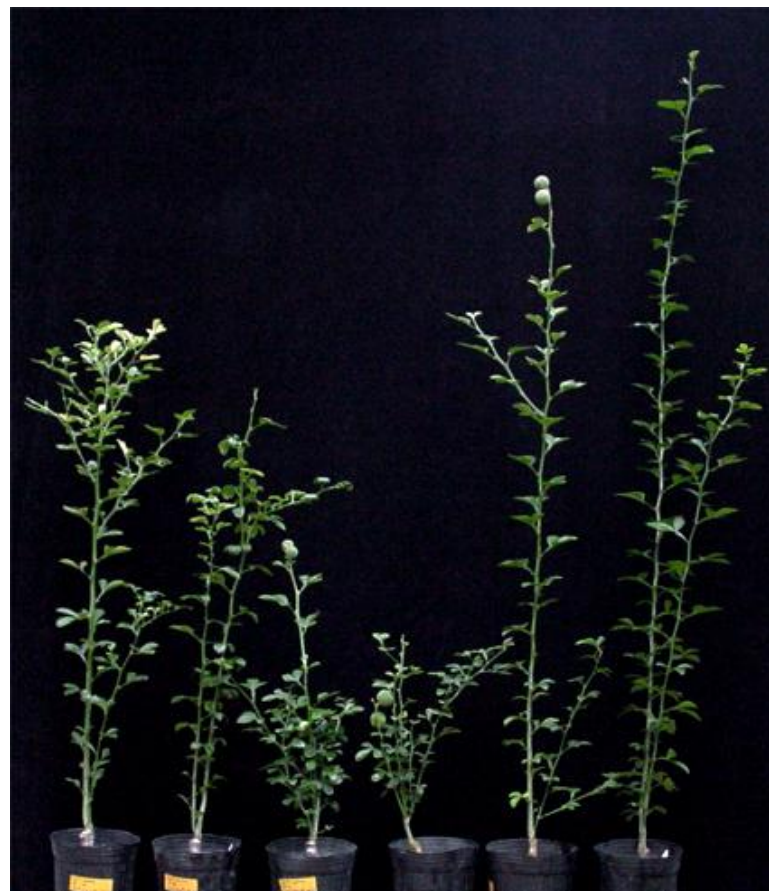
非組換え体



- 組換え体では、
 - ① 葉が小さく、カールする傾向がある、
 - ② 樹形が、分枝が多くなり、わい化する傾向がある
- 外来遺伝子が抜けた個体では形態変化なし



組換え体



組換え体

非組換え体

- カラタチ非組換え体 (WT) と *CiFT* 組換え体 (CNT) の香気性成分 (モノテルペン) 組成比較
- 果実、花とも、主要な3成分の比はほぼ同じ

Table 2. Peak area percentages of β -myrcene, *d*-limonene, and (*E*)- β -ocimene in flowers and fruit of transgenic plants and controls

花

Plant material	β -myrcene (Rt=7.95)	<i>d</i> -limonene (Rt=8.95)	(<i>E</i>)- β -ocimene (Rt=9.46)	Total
Flower		Peak area (%)		Total
1-7	35.5 (1.00)	33.08 (0.93)	15.32 (0.43)	83.9
1-15	37.07 (1.00)	3.45 (0.09)	21.82 (0.59)	62.34
2-39	34.23 (1.00)	24.07 (0.70)	17.41 (0.51)	75.71
4-1	33.63 (1.00)	10.56 (0.31)	19.75 (0.59)	63.94
4-34	35.72 (1.00)	10.77 (0.30)	19.21 (0.54)	65.7
5-4	36.27 (1.00)	15.84 (0.44)	25.7 (0.71)	77.81
<i>P. trifoliata</i> (WT)	29.06 (1.00)	26.05 (0.90)	17.07 (0.59)	72.18
<i>P35S::CiFT</i> (CNT)	34.58 (1.00)	38.21 (0.94)	14.26 (0.41)	87.05
Peel		Peak area (%)		Total
1-7	37.9 (1.00)	36.91 (0.97)	3.58 (0.09)	78.39
2-39	30.5 (1.00)	33.51 (1.10)	2.97 (0.10)	66.98
4-34	44.25 (1.00)	16.35 (0.37)	2.32 (0.05)	62.92
5-4	46.1 (1.00)	20.06 (0.44)	3.41 (0.07)	69.57
<i>P. trifoliata</i> (WT)	40.25 (1.00)	39.74 (0.99)	7.38 (0.18)	87.37
<i>P35S::CiFT</i> (CNT)	36.74 (1.00)	34.55 (0.94)	4.66 (0.13)	75.95

果実

Values are averages of two experimental replications

Numbers in parentheses indicate the ratio to peak area of β -myrcene

Endo T., T. Shimada, H. Fujii, F. Nishikawa, A. Sugiyama, M. Nakano, T. Shimizu, Y. Kobayashi, T. Araki, L. Peña, M. Omura. (2009) Development of a *CiFT* co-expression system for functional analysis of genes in citrus flowers and fruits. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 78: 74-83.

- カンキツのFTは、果実の発現遺伝子＝ESTとして見出された
- カンキツのFTのmRNAは、果実で高発現する
- 他の植物(リンゴ等)においても、FTホモログのmRNAは果実で蓄積している
- FTのmRNAやタンパクに毒性や害があるという報告は、調べた限りでは無い
- 通常の交雑育種で、カラタチが持つCTV抵抗性遺伝子をカンキツ品種に取り込み、カンキツ中間母本農7号、農8号、オーラスターの3品種が果樹研で育成されている
- ミカン科の野生植物は、広く日本の暖地に自生分布し、自然交雑する

ブドウの果皮色改変



農研機構

シャインマスカット =ブドウの希望の星



2006年品種登録

ブドウの女王
「マスカットオブアレキサンドリア」の孫

●マスカット香

●肉質良好 ●日持ち性良

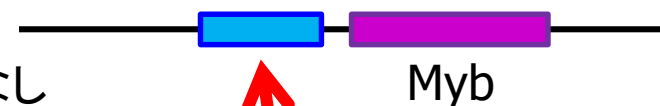
●裂果性なし ●栽培容易

★もう二度と育種できないほどの芸術品

着色あり
(Myb活性あり)



着色なし
(Myb活性なし)



レトロトランス
ポゾンの挿入

ゲノム編集技術を用いて、
レトロトランスポゾンを選択的に削除させる



果皮色の異なる
「シャインマスカット」シリーズ



攻めの切り札

リンゴ「ふじ」を自家和合に

ふじの特徴

- きわめて高い日持ち性
- 良食味、良食感
- 日本での生産1位 (52%)
- 世界での生産1位 (21%)



結実が不安定

- リンゴは自家不和合性
- 開花期の低温・長雨で結実率が低下
- 授粉や結実管理が全労働時間の約10%

238 Kbpの欠失

花粉側因子

花柱側因子

S₄-RNase

S₂

S₄sm

S₂-RNase

S₄-RNase

ニホンナシでは、S-RNaseが欠失した自家和合性品種「おさ二十世紀」あり

ゲノム編集技術を用いて、S-RNaseを破壊・改変

自家和合の「ふじ」

攻めの切り札