

リンドウ *W14/15* 遺伝子の多型と
越冬芽の低温応答

2011. 3

岩手大学大学院 連合農学研究科
生物資源科学専攻 (岩手大学)

日 影 孝 志

論文目次

第1章 緒論	- 1 -
1. 本研究の背景	- 2 -
(1) リンドウの育種の歴史と現状	- 2 -
(2) <i>W14/15</i> 遺伝子に関する研究	- 7 -
2. 本研究の目的	- 15 -
第2章 <i>W14/15</i> 遺伝子の多型	- 16 -
1. 目的	- 17 -
2. 材料および方法	- 19 -
(1) 材料および生育条件	- 19 -
(2) DNA の調整	- 21 -
(3) PCR 条件、PCR 産物のサブクローニングおよび塩基配列 の決定	- 22 -
(4) 対立遺伝子特異的プローブを用いたドットブロットハイブリダイゼ ーション	- 26 -
(5) 系統樹の作成	- 27 -
3. 結果	- 27 -
(1) <i>W14/15</i> 遺伝子塩基配列の多型	- 27 -
(2) 種および品種の1塩基多型 (SNP)	- 33 -
(3) <i>W14/15</i> 遺伝子に基づくリンドウの系統樹	- 34 -
4. 考察	- 38 -
第3章 <i>W14/15</i> 対立遺伝子と越冬芽の低温応答	- 41 -
1. 緒言	- 42 -

2. 材料および方法	- 43 -
(1) 実験に用いたリンドウの品種・系統	- 43 -
(2) 生育条件および低温処理	- 45 -
(3) 越冬生存率、枯死率および休眠の深さの解析	- 46 -
(4) 統計解析	- 46 -
3. 結果	- 48 -
(1) <i>W14/15</i> 遺伝子型と越冬生存率	- 48 -
(2) <i>W14/15</i> 遺伝子型と休眠	- 52 -
(3) <i>W14/15</i> 遺伝子型と枯死率	- 52 -
4. 考察	- 55 -
第4章 総合考察	- 60 -
1. <i>W14/15</i> 遺伝子の多型と系統解析	- 61 -
2. <i>W14/15</i> 遺伝子とリンドウの低温応答	- 62 -
(1) 越冬生存率	- 63 -
(2) 越冬前の越冬芽の枯死	- 63 -
(3) 休眠の深さ	- 64 -
(4) <i>W14/15</i> 遺伝子の機能の推定	- 65 -
(5) 本研究の成果を活用した育種	- 67 -
摘要	- 69 -
謝辞	- 72 -
引用文献	- 73 -

第1章

緒論

1. 本研究の背景

(1) リンドウの育種の歴史と現状

リンドウ (*Gentiana* spp.) は、お盆やお彼岸に切花として使われる日本の重要花卉品目である。最近は敬老の日の鉢物として利用も定着している。

リンドウの栽培は昭和 30 年(1955)ころ長野県で始まり、各地の自生株を栽培し、切り花として販売していた (吉池 1992)。その後、実生からの栽培方法が確立され、交配による品種改良が行われるようになった。栽培地域は、岩手県、福島県、長野県および山形県などの冷涼な地域であるが、島根県、鳥取県および栃木県などでも栽培されている。これら栽培されているリンドウの用途は大部分が切り花である。栽培初期にはエゾリンドウ (*G. triflora* Pall var. *japonica*) (図 1-A, B) とササリンドウ (*G. scabra* Bunge var. *buergeri*) (図 1-C) の野生種が使用されている。しかし、実生株は、株間での生育にばらつきがあり、さらにそれを解消するため自殖を繰り返すと株が弱る現象がみられた。そこで、岩手県園芸試験場(現岩手県農業研究センター)ではリンドウでは初の一代雑種品種 (F₁ 品種) 「いわて」を昭和 52 年 (1977) に育成し、株のばらつきや自殖弱勢の問題を解決した。さらに岩手県では「マシリー」、「ジョバンニ」等の切り花品種を開発し、岩手県安代町 (現八幡平市) を中心に岩手県内各地で栽培が行われるようになった。昭和 60 年 (1984) には岩手県は先進地である長野県を抜いて生産量、生産額、栽培面積とも日本一となった。平成 6 年には日本のリンドウ栽培面積は 648ha となり、切り花本数で菊、バラ、カーネーション、ユリに次ぐ品目に成長した。

F₁ 品種の親株は当初は集団選抜で育成していたため、選抜に経験が必要で、

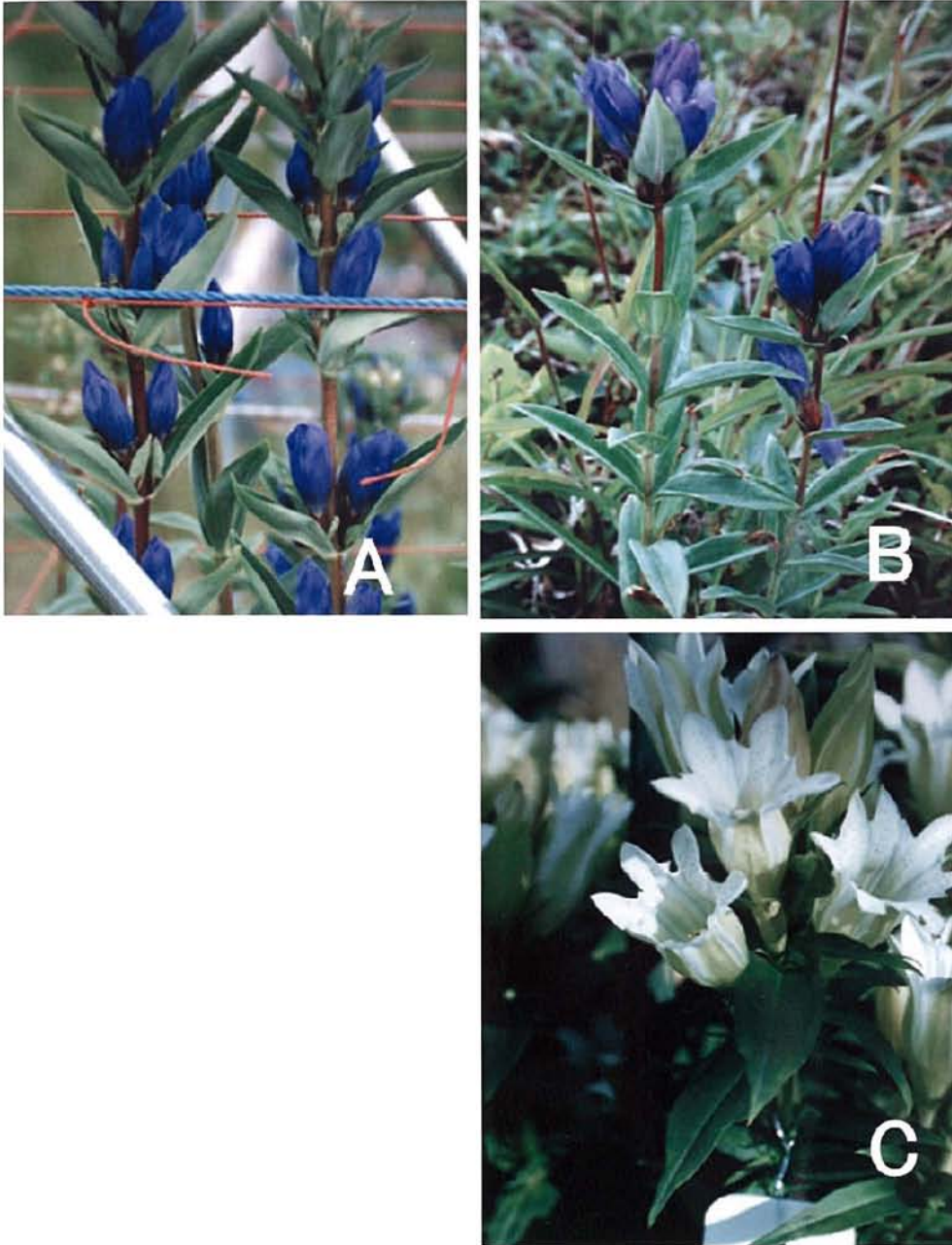


図1 日本の切り花用リンドウの野生種

A: *Gentiana triflora* var. *japonica*

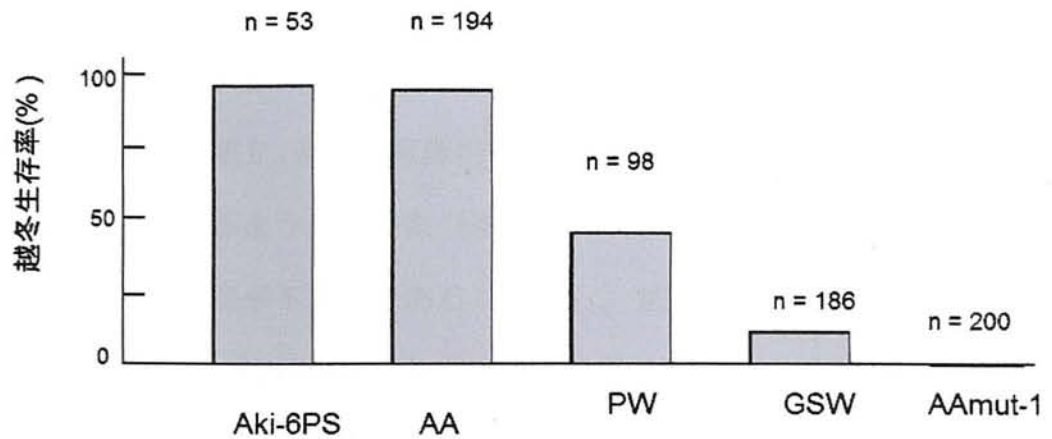
B: *Gentiana triflora* var. *japonica* f. *montana*

C: *Gentiana scabra* var. *buergeri*

時として重要形質の変化や品種の崩壊をまねく危険性がある。そこで、これらのF₁品種の親株を組織培養で増殖する研究が行われた。エゾリンドウ (*G. triflora* Pall var. *japonica*) の親株を組織培養するときの課題はエゾリンドウは試験管からポットに移植した年の冬までに越冬芽を形成せず、結果として株が枯死してしまうことであった。そこで、福島県農業試験場では茎頂組織を15°Cで培養すると効率的に越冬芽を形成することを明らかにし、親株を組織培養で維持することが可能となった (佐藤 1986)。八幡平市花き研究開発センターでは、「安代の秋」、「安代の夏」、「安代の初秋」、「安代の晩秋」「さわかぜ」等の品種の親株を10~15°Cで組織培養で維持しており、産地の拡大に貢献している (日影 2009)。しかしながら、ササリンドウ (*G. scabra* Bunge var. *buengeri*) の親株、たとえば図 2-A (Hikage et al. 2007) に示したように、GSWは、組織培養での増殖は簡単であり、ポットに移植したのちも越冬芽は比較的容易に形成されるが、越冬時に株落ちしてしまい、せっかく増殖できても親株として利用する前に枯死してしまうことが課題となっている。

F₁品種の親株を組織培養で維持できるようになった品種であっても、品種により「株落ち」の程度に差があることが明らかになり、その改善が求められるようになった。たとえば、「安代の秋」という品種は「N27」という親株を母親に、「Y8」という親株を父親にしたF₁品種であるが、定植後3年目の欠株は八幡平市内では10%以下であり、欠株の少ない品種である。それに対し「安代の初秋」という品種は「AZ」という親株を母親に、「N27」という親株を父親にした品種であるが、図 2-B に示したように八幡平市内の「安代の秋」と同一の生産圃場で調査したところ、3年目の欠株は八幡平市内では20%以上となり、欠株の多さが経営上の大きな課題となっている。さらに、晩生種の品種はササリンドウ (*G. scabra* Bunge var. *buengeri*) に属する親株同士を交配させるこ

A



B

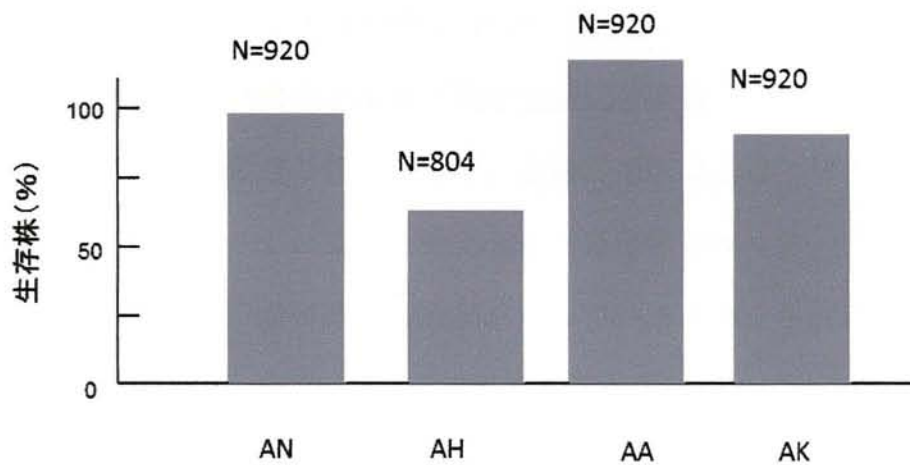


図2 品種・系統のポット栽培における越冬生存率(%)および圃場定植3年目のF1品種の生存株(%)

A: 各品種系統の越冬生存率(%)を越冬後萌芽した株/越冬前の株数×100により求めた。栽培2年目の株(15cmポット)を野外で育て越冬させた。

B: 八幡平市切通の同一圃場を調査した。2003年6月に定植し、2005年6月に生存株数を調査した。

Nは調査株数を示す。

品種名の省略: AA(安代の秋)、PW(ピュアホワイト)、AAmut-1(安代の秋の変異体)、AN(安代の夏)、AH(安代の初秋)、AZ(安代の風)

Aki-6PSはAAの薬培養由来の純系、GSWはF₁品種の親系統である。

とが多いが、どの品種も欠株率の高さが品種育成上最大の課題となっており、優れたF₁品種の育成は少ないのが現状である。

ササリンドウのF₁品種の育成に課題があることから近年、エゾリンドウとササリンドウの種間雑種F₁品種や組織培養と挿し木で増殖する栄養系品種が多数育成され利用されるようになった（空閑 2006）。種間雑種F₁品種については種間雑種種子の確保が不安定であることから、登録品種数は増えていないが、栄養系品種については年々増加している。栄養系品種は育成過程で欠株個体は除かれることから、欠株の問題は大きな課題になっていない。しかし一般的に栄養系品種の苗代が高いことから高単価の見込めるピンク花色系統のみで育種が進められており、栄養系品種のバリエーションが乏しいのが課題である。

平成6年には648haあった日本のリンドウの栽培面積も平成17年には498haまで減少している（農林水産省「花き生産出荷統計」）。この原因はいろいろ考えられるが、品種育成の観点からは、品種や系統による欠株の問題が交配による育種の障害となっていることや、花色や花姿等のバリエーションが豊富になっていないことが、需要減退の原因となっていると考えられる。

このように、リンドウの育種は、F₁品種が主体となっていて、親株を組織培養することにより形質の均質な品種が育成されるようになったが、組織培養で増殖した親株をポット栽培するときの1年目の越冬時の株落ち、育成されたF₁品種の定植3年目以降の株落ち、特にササリンドウ (*G. scabra* Bunge var. *buergeri*) を親株にしたときの定植3年目以降の株落ちの問題が大きな課題となっている。

(2) *W14/15* 遺伝子に関する研究

リンドウは、越冬前に地際に越冬芽を形成し、それが冬期間休眠し、春に休眠が打破されて萌芽してくる。「株落ち」という現象はこの越冬芽の形成、耐寒性、休眠などと深くかかわっている可能性がある。

リンドウの越冬芽に関する研究は極めて少ないが、これまでに、いくつかの報告がある。越冬芽の発生について、佐藤ら (1988) は短枝茎のえき芽が形成される場所につくられるとした。福島県農業試験場では茎頂組織を 15°C で培養すると効率的に越冬芽様器官を形成し、親株の越冬生存率が向上することを明らかにした (佐藤 1986)。また、最近ではエゾリンドウとの種間雑種品種

「Showtime Spotlight」を用いて、越冬芽の 94% は茎の地際の部分から形成されるが 6% は貯蔵根から形成されたことを報告している (Samarakoon et al., 投稿準備中)。このように越冬芽の形成に関してはいくつか研究報告があるものの、越冬芽の耐寒性などの分子機構をあきらかにする研究や、耐寒性のマーカー遺伝子などの研究報告はなかった。

私の在学する当研究室では、リンドウの株落ちは、越冬時に越冬芽が存在することと深く関わっていると考え、越冬芽に多く蓄積されるタンパク質の研究を進めてきた。

そこで、Takahashi et al. (2006) は「株落ち」の少ない品種「安代の秋」を用い、越冬芽などのリンドウの各組織のタンパク質を 2 次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、越冬芽に特に多いと思われるタンパク質の部分アミノ酸配列を調べた。その結果、越冬芽に多く蓄積される 10 個以上のタンパク質が同定され (図 3)、これらのタンパク質は、ほかの植物でこれまでに低温やストレス関連タンパク質とわかっているタンパク質と相同性をもつことが分か

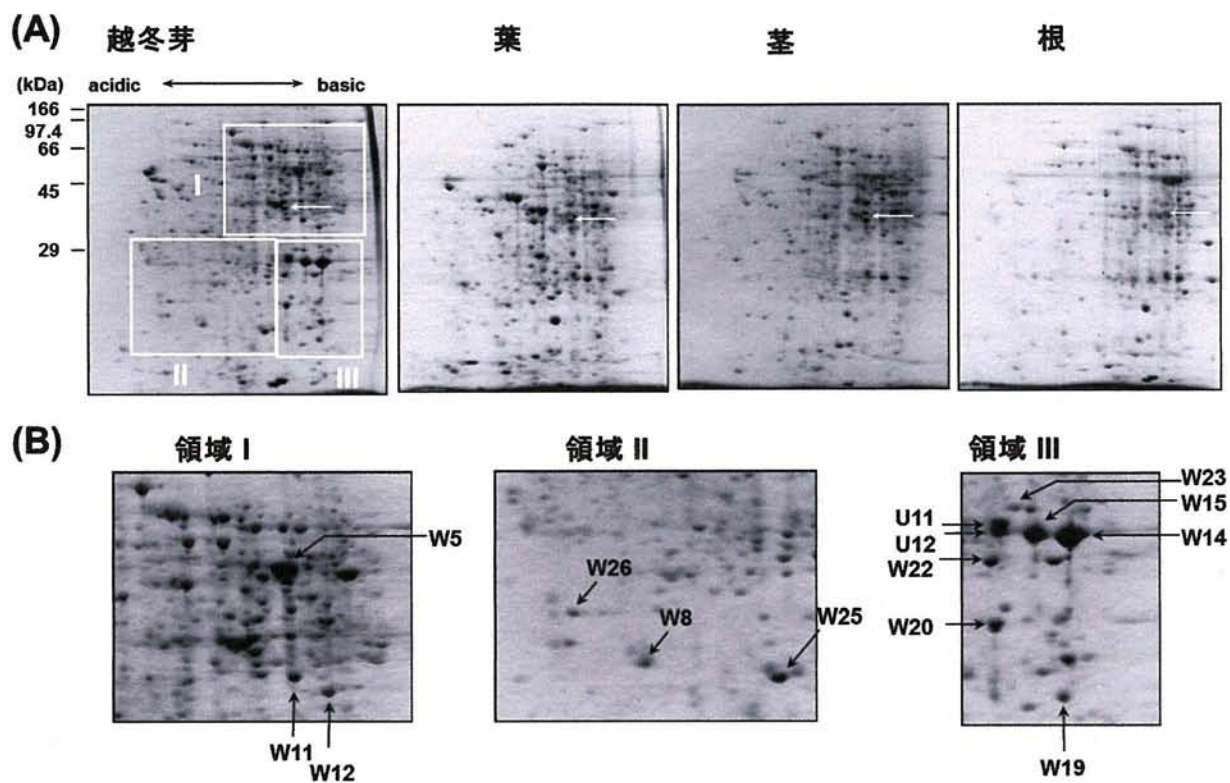


図3. リンドウ品種「安代の秋」に顕著に蓄積されているタンパク質

(A) : リンドウ品種「安代の秋」の越冬芽、葉、茎および根からタンパク質を抽出し、それぞれ150 μ gを二次元電気泳動した。白の矢印は組織による蓄積の違いを比較するために使用したアクチンの位置を示す。

(B) : 3つの領域を拡大したものである。黒の矢印はほかの組織と比較して越冬芽で多く蓄積されたタンパク質であることを示す。

表1 リンドウの越冬芽に特に多く蓄積されたタンパク質の部分アミノ酸配列に相同なタンパク質

越冬芽のタンパク質(二次元電気泳動のスポット番号)	相同性タンパク質(植物の種名)	生体での機能・性質・発現	文献
W8	Dehydration-inducedタンパク質 (<i>Brassica napus</i>)	低温や乾燥により誘導され発現してくる	
W11	Glyoxalase I (<i>Citrus paradisi</i>)	ABAや塩類、低酸素等により誘導され発現してくる	Espartero et al. (1995), Veena et al. (2001)
W12	Isoflavone reductase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		
W14 ^{a)}	Ethylene-induced esterase (<i>Citrus sinensis</i>)	エチレンにより誘導され発現してくる	Zhong et al. (2001)
W15 ^{a)}	Ethylene-induced esterase (<i>Citrus sinensis</i>)	エチレンにより誘導され発現してくる	Zhong et al. (2001)
W19	Ribosomal protein S11 (<i>Hordeum vulgare</i>)		
W20	Membrane pore protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	低温、浸透ストレスにより誘導され、発現してくる	Drea et al. (2006)
W23	Enolase (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	低温により誘導される遺伝子(LOS2)の転写因子	Lee et al. (2006)
W25	Thioredoxin peroxidase (<i>Capsicum annuum</i>)	低温耐性、抗酸化	Do et al. (2003)
W26	Translationally controlled tumor protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	植物の生長の制御に関わっている	berkowitz et al. (2008)
U11 ^{b)}	Cytoplasmic ascorbate peroxidase (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	低温耐性、抗酸化	Shigeoka et al. (2002), Najami et al. (2008)
U12 ^{b)}	Cytoplasmic ascorbate peroxidase (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	低温耐性、抗酸化	

^{a)} W14およびW15の4つの断片は1つのペプチド断片を除き同じアミノ酸配列であった。

^{b)} U11およびU12は6つの断片は1つのペプチド断片を除き同じアミノ酸配列であった。

った (表 1)。また、これらのタンパク質はまだ低温にならない夏のうちに蓄積されていることがわかった。さらに、越冬生存率の低いことがわかっている「安代の秋」の変異株を用いた実験で、*enolase*、*cytoplasmic ascorbate* および W14、W15 と名付けた *ethylene-induced esterase* と相同性のある 2 つのアイソザイムのうちの一方のタンパク質が変異株の越冬芽でとくに蓄積が少ないことがわかった (図 4)。*Arabidopsis* の *enolase* は、核内で低温ストレスに対する転写因子として働いて、低温耐性を高め (Shigeoka et al. 2002)、*cytoplasmic ascorbate* は、組換え体をもちいた試験で低温ストレス耐性を高める (Smirnoff 1998) ことがわかっており、越冬生存率の低いこの変異体では低温耐性に関わっていることが強く示唆された。*ethylene-induced esterase* と相同性のある W14 と W15 の 2 つのアイソザイムタンパク質についても、変異体での蓄積量の低下は低温耐性と関わっている可能性が強く示唆されたので、W14 および W15 タンパク質の研究をさらに進めることにした。

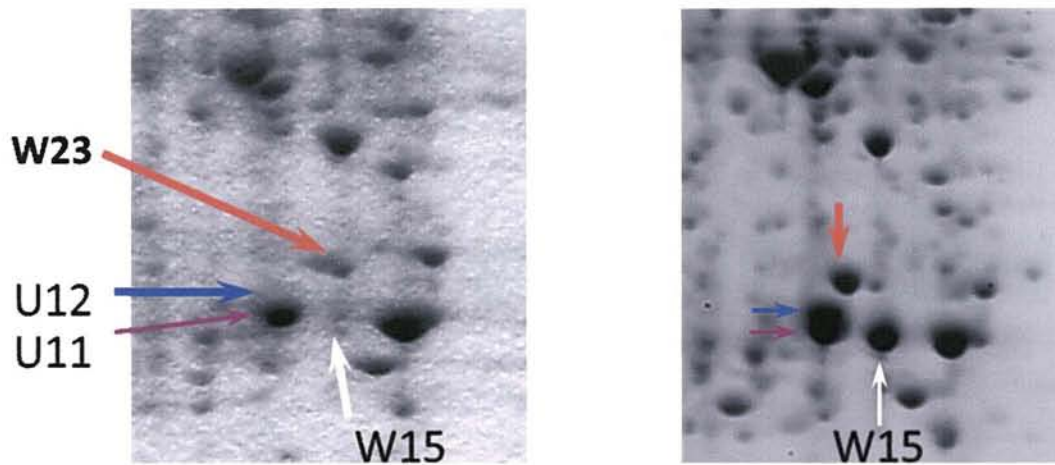
まず、W14 および W15 タンパク質をコードする cDNA をクローニングし、cDNA の塩基配列を決定し、それをもとにゲノム DNA の塩基配列を決定した (Hikage et al. 2007)。*W14* および *W15* 遺伝子のゲノム構造の模式図を図 5 に示す。*W14* および *W15* 遺伝子は 3 つのエクソンと 2 つのイントロンから成り立っていたが、*W14* 遺伝子はイントロン 2 の長さが 82bp であるのに対し、*W15* 遺伝子のそれは 71bp であった。*W14* のイントロン 2 は *W15* のイントロン 2 と比較すると、2bp の欠失があったのに対し、*W15* は 13bp の欠失があった。

また、W14 および W15 タンパク質は 259 アミノ酸からなるタンパク質で、3 つのアミノ酸配列の違いしかなかった。W14 および W15 タンパク質のそのアミノ酸配列の S⁸¹、D²⁰⁹ および H²³⁷ は、nucleophile (S, C or D)、

A

変異体越冬芽

越冬芽



B

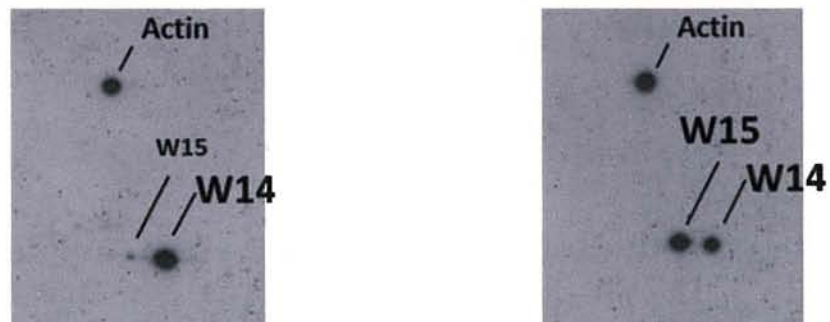


図4 「安代の秋」の変異体越冬芽に蓄積されたタンパク質

150 μ gのタンパク質を二次元電気泳動した。

Aは野生および変異体のCCBゲル染色の結果である。

BはW14/W15タンパク質抗体およびアクチン抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果である。

W23(enolase)、U12(cytoplasmic ascorbate peroxidases)およびW15タンパク質が変異体では少なくなっている。

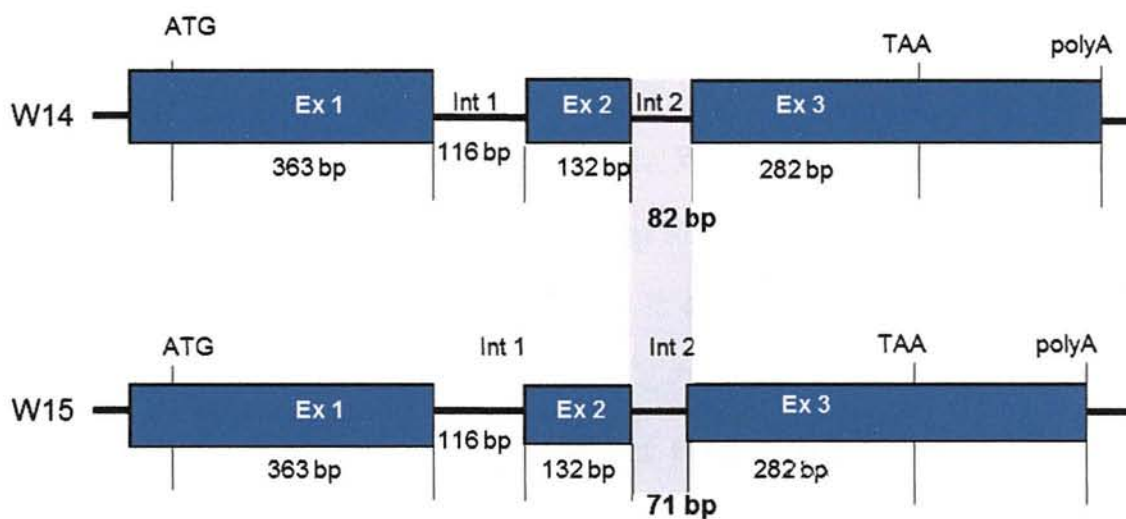


図5 W14およびW15タンパク質をコードするゲノム遺伝子構造

Exはエキソンの略、intはイントロンの略である。

エキソンのうちタンパク質をコードしている領域およびイントロンの塩基の長さを示した。

W14遺伝子のイントロン2は82bpであるのに対し、W15遺伝子の長さは71bpである。

acid (E or D) およびヒスチジン (H) からなるいわゆる catalytic triad をもっていて、これらのタンパク質は α/β hydrolase fold superfamily に属するタンパク質であることがわかった。そこで、W14 および W15 遺伝子はほんとうにエステラーゼ遺伝子であるのかどうかを確かめるために、GST 融合 W14 および W15 タンパク質を発現するプラスミドベクターを作り、これらのタンパク質を大腸菌で発現させたところ、たしかに W14 および W15 タンパク質を発現していることを W14/W15 抗体を用いて確認し、1-naphtyl acetate を基質としてエステラーゼ活性を測定した。その結果、W14 および W15 タンパク質はともに活性があることがわかった (Hikage et al. 2007) (図 6)。また、7つの品種・系統および安代の秋の葯培養で得られた4つの純系リンドウを用いて、W14/15 遺伝子の構造解析を行ったところ、この2つの遺伝子是对立遺伝子であることが分かった。すなわち、各品種・系統は W14/14、W14/15 および W15/15 遺伝子型の3種類のどれかであり、純系は W14/14 または W15/15 であった。さらに、越冬生存率のあまり高くない W14/15 遺伝子型の1系統は越冬芽に W14 タンパク質だけが蓄積されていることや、越冬生存率の高い系統は W15 タンパク質が蓄積されていた (Hikage et al. 2007) ことから、この遺伝子と越冬生存率の間に相関がある可能性がでてきた。

W14/15 タンパク質の相同性検索をし、機能について報告のあるタンパク質を調べてみると、*Catharanthus roseus* の Protein S (CrPS) (Lemenager et al. 2005) と 78% ともっとも高い相同性を示した他、*Citrus siensis* の ethylene-induced esterase (EIE) (Zong et al. 2001) と 52%、*Lycopersicon esculentum* の methyl jasmonate (MeJA) hydrolyzing esterase (MJE) (Stuhlfelder et al. 2002, 2004) と 47% の相同性を示した。このように、W14/W15 タンパク質と相同性を示すタンパク質は Phytohormone-mediated

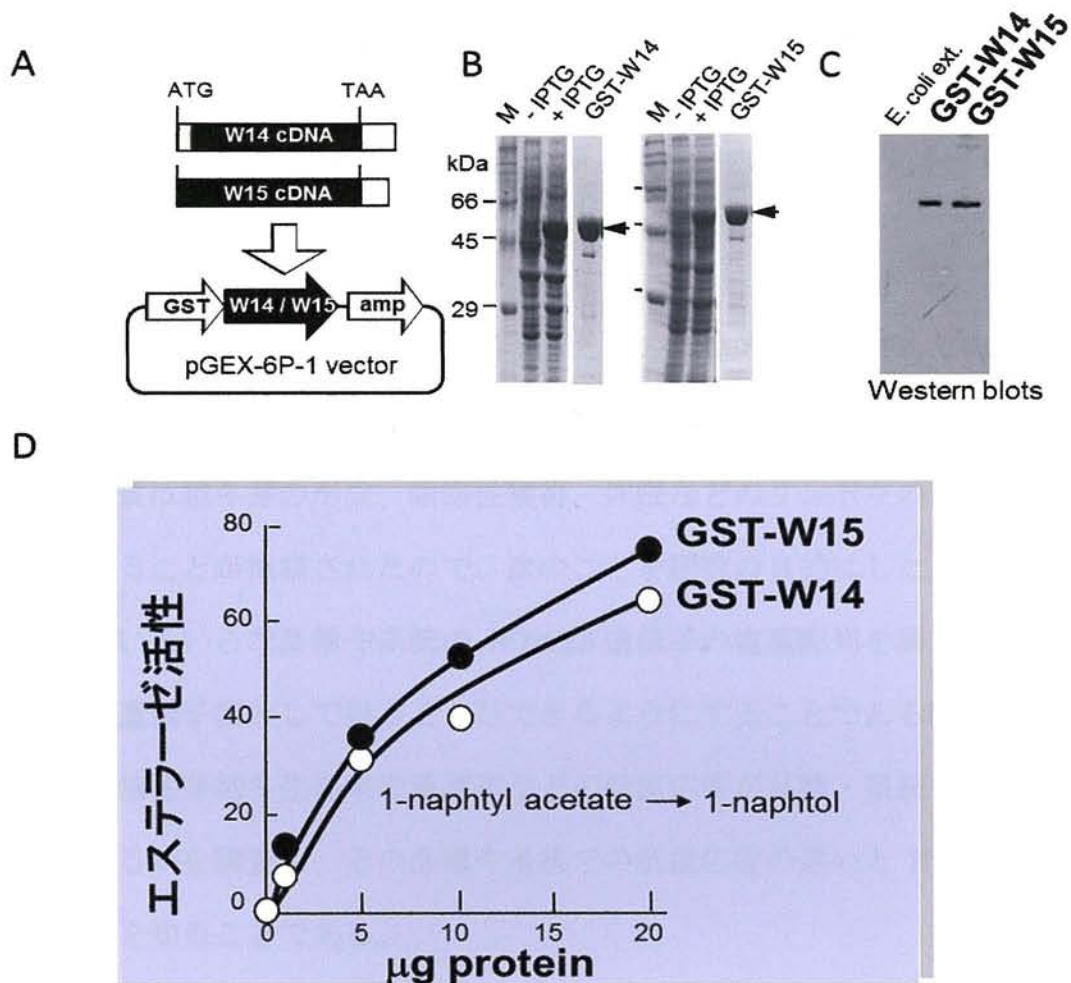


図6 GST融合タンパク質の作製およびそのエステラーゼ活性

AにGST融合W14およびW15タンパク質を発現するpGEX-6P-1プラスミドのコンストラクトを示した。

BはGST融合W14およびW15タンパク質の大腸菌で発現を示した。IPTGがない場合(-IPTG)、IPTGがある場合(+IPTG)およびグルタチオン-S-セファロース4Bで精製した場合のSDSゲル電気泳動図(CCB染色)である。

Cは精製したGST融合タンパク質をSDSゲル電気泳動し、W14/W15抗体を用いてウエスタンブロットングした結果を示す。

Dは精製したGST融合タンパク質のエステラーゼ活性を示したものである。基質には1-naphtyl acetateを使用し、1-naphtolの相対量をインゲルエステラーゼ活性アッセイ(Miyazaki et al. 2003)により調べた。

または defence-related シグナリングのパスウェイに関わっており、W14 と W15 も同様の機能がある可能性があった (Hikage et al. 2007)。

2. 本研究の目的

リンドウの「株落ち」現象を解明するための基礎的知見を得るためになされてきた上記 (2) の基礎的研究から、越冬芽に多く蓄積されるこの W14/W15 タンパク質は越冬芽の形成、耐寒性獲得、休眠などのリンドウの低温応答に関わっていることが推察されたので、次のことを研究の目的にした。

まず、いろいろな品種や系統の W14/15 遺伝子の塩基配列を調べ、品種や系統を違う遺伝子型として扱うことができるようにすることである。

次に、越冬芽越冬生存率や萌芽率などの低温応答が品種・系統でどのようになっているかを調査し、その品種や系統での低温応答の違いと W14/15 遺伝子との相関を知ることである。

さらに、低温応答の違いが確認された系統が、交配実験によってもその低温応答が同じ遺伝子を持つ個体で再現されるかどうかを確かめ、低温応答のマーカースとして W14/15 遺伝子が使用できる可能性を知ることが目的とした。

第2章

W14/15 遺伝子の多型

1. 目的

リンドウ属は 360 種以上の種から成立し (Ho and Lju 2001)、アフリカ以外の世界中に分布している (Koehlein 1991; Struwe et al. 2002)。これらのうち、日本では 13 から 18 の野生種が自生している (Yonezawa and Kawano 1989; Yoshiike 1992)。リンドウは日本でもっとも重要な切り花の一つであり、日本に自生しているリンドウのうち、エゾリンドウ (*G. triflora* Pall var. *japonica*) とササリンドウ (*G. scabra* Bunge var. *buengeri*) を 20 世紀中頃に山堀りして利用したのがはじまりである。現在では多数の F₁ 品種が育成されているが、カーネーション、バラおよびキクなどの他の切り花品目と比較すると、花の色、形態および耐病性などの遺伝的変異が少ない。これは限られた種を利用した育種がおこなわれているためである。*G. pneumonanthe* や *G. septenifida* は日本に自生はしていないが *G. triflora* や *G. scabra* と交配可能なことが確認されている。また、Showtime Starlet (SS) という品種は花色がいままでの世界で育成された切り花品種にない赤色であるが、これまでに日本で品種育成に利用したことのない種と *G. scabra* の交配種である (Morgan E. 私信)。このようにこれまでのリンドウに新規の形質を導入しようとする、交配可能なリンドウ属の種との交配およびその種の DNA 情報の有効利用が重要になってくる。

また近年植物品種の世界的流通に伴い、その品種の育成者権を保護することが近々の課題になっている。DNA 品種識別技術はその品種が不法に利用された場合の証拠として利用が可能であり、花卉でも DNA 品種識別の確立が求められている。

このような観点から、日本の切り花に用いた自生の *G. triflora* Pall var. *japonica* と *G. scabra* Bunge var. *buengeri* やこれらと交配可能な種の系統分類、

種間交雑品種の識別、品種の DNA 鑑定など、塩基配列情報の利用が重要でありまた有効である。

これまで RAPD (Jomori et al. 2000)、SCAR マーカー (Shimada et al. 2009)、プラスチド DNA の塩基配列 (Gielly and Taberlet 1996; Gielly et al. 1996; Mishiba et al. 2009)、核リボゾーム遺伝子の internal transcribed spacer の塩基配列 (Gielly et al. 1996) および核遺伝子含量 (Mishiba et al. 2009) がリンドウ属で分類や系統分化の研究としてなされてきた。しかしながら、核 DNA レベルでの研究はあまりなされておらず、交配可能な種間および種内の遺伝的關係、品種や系統間での遺伝的差異を核 DNA レベルで研究することは、F₁ 品種や種間雑種品種を育成するうえで有用な情報を与えてくれる。

このような観点からも、W14 または W15 タンパク質をコードするゲノム DNA の塩基配列の構造を解析することの意義は大きい。W14/W15 遺伝子は *G. triflora* Pall var. *japonica* の越冬芽に多く存在すること (Takahashi et al. 2006)、株の越冬生存率と相関がある可能性があること (Hikage et al. 2007)、これら 2 つのタンパク質は α/β hydrolase fold superfamily (Heikinheimo et al. 1999) に属しており、W14 遺伝子と W15 遺伝子是对立遺伝子であること (Hikage et al. 2007) がわかっている。さらに、この α/β hydrolase fold superfamily のなかには植物のホルモン関連シグナリングや防御関連シグナリングに関わっていると考えられるカルボキシエステラーゼがあることがわかっている (Zong et al. 2001)。

本研究の目的は、この遺伝子の塩基配列の多型の構造を明らかにし、品種・系統をすべてちがうハプロタイプ対として区別することである。この多型が明らかになることにより、品種・系統によって違う低温応答との相関解析も可能となると同時に、品種識別、交配親の推定、系統分類の情報も得ることができ

ると考えられる。

2. 材料および方法

(1) 材料および生育条件

本実験では、*G. triflora* var. *japonina* に属する品種・系統として7系統、*G. triflora* var. *japonica* f. *montana* に属する3系統、*G. scabra* var. *buergeri* に属する4系統、*G. triflora* と *G. scabra* の種間交雑種に属する4系統、SS (Rhindo New Zealand Ltd.が育成した赤い花色品種)、*G. pneumonanthe* 1系統および *G. septenifida* 1系統を用いた。これらの実験材料の品種系統名、種名、繁殖様式、育成者および育成経過を表2に示した。Azuma (AZ) および Kushiro (Kush) はそれぞれ、福島県の吾妻山、北海道の釧路高原の野生種由来の系統である。Kuroyachi (Kuro)は岩手県八幡平国立公園内の黒谷地に生息していた個体の葉を、環境省の許可のもとに集めたものである。Aki-6PS、Aki-16PS、Aki-33PS および Aki-81PS は AA の蒔培養由来の倍化半数体の自殖系統 (純系) である (Doi et al. 2010)。Gpn-57(Gpn)は *G. pneumonanthe* の蒔培養由来の倍化半数体である (Doi et al. 未発表)。Kuro 以外の品種系統は八幡平市花き研究開発センターの温室で育てた。

表2 W14およびW15遺伝子の塩基配列研究のための材料

品種/系統(略記)	種名	繁殖様式	材料 ¹⁾	特記事項
1. N27	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	挿し木	A	
2. Yahaba 8 (Y8)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	挿し木	A	野生種
3. 安代の秋(AA)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	種子	A	F ₁ 品種, N27 x Y8
4. Aki-6PS (6PS)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	種子	A	AAの葯培養により得られた倍加半数体
5. Aki-16PS (16PS)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	種子	A	AAの葯培養により得られた倍加半数体
6. Aki-33PS (33PS)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	種子	A	AAの葯培養により得られた倍加半数体
7. Aki-81PS (81PS)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	種子	A	AAの葯培養により得られた倍加半数体
8. Kuroyachi (Kuro)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i> f. <i>montana</i>		B	本研究のために採取した野生種
9. Azuma (AZ)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i> f. <i>montana</i>	挿し木	A	野生種
10. Kushiro (Kush)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i> f. <i>montana</i>	挿し木	C	野生種
11. Oze (OZ)	<i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i>	挿し木	A	野生種
12. SP6A1 (SP6)	<i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i>	挿し木	A	
13. GSW100 (GSW)	<i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i>	挿し木	A	
14. Sasa Pink (SsP)	<i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i>	挿し木	A	
15. ピュアホワイト (PW)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i> x <i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i>	挿し木	A	
16. ラブリーアシロ (LA)	<i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i> x <i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i>	挿し木	A	本研究により父親が <i>G. scabra</i> の系統であることがわかった
17. メルヘンアシロ (MA)	<i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i> x <i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	挿し木	A	
18. シャインブルーアシロ (SB)	<i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i> x <i>G. triflora</i> var. <i>japonica</i>	挿し木	A	
19. ショウタイムスターレット (SS)	(<i>G. scabra</i> var. <i>buengeri</i> x unknown) x unknown	挿し木	A	3倍体
20. Gpn-57 (Gpn)	<i>G. pneumonanthe</i>	挿し木	A	葯培養により得られた倍加半数体
21. Lagodechiana (Gsept)	<i>G. septemfida</i>	種子	C	

¹⁾A: 八幡平市花き研究開発センター所有 B: 環境省の許可を得て、葉を採取した。C: 岩手県農業研究センター所有

(2) DNA の調製

ゲノム DNA の調製は GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit(SIGMA-ALDRICH)を用いて行った。

その手順は以下のとおりである。

① 抽出操作を始める前に、65°C 恒温槽を準備。Elution buffer を必要量 (サンプル数 + 1) 分注し、65°C 恒温槽で加温。

② 各植物体の若葉部分 (70-80 mg) を 2 ml ねじ口チューブ [アルミナビーズ (直径 2 mm) を 1/3 程度入れてオートクレーブしたもの] にサンプリングし、DNA 抽出を行うまで -80°C で保存する。乳鉢、乳棒を用いてサンプル破碎を行う場合は、アルミホイルなどに包んで -80°C で保存する。

③ サンプルの破碎

Micro Smash™ MS-100 (TOMY) を用いて、5,500 rpm、20 秒間行う。この操作を、サンプルが溶けないように破碎と破碎の間に液体窒素で冷却しつつ、サンプルがきめ細かい粉末状になるまで繰り返す (4-5 回程度)。

④ 粉末状に破碎したサンプルに 350 μ l Buffer part A、50 μ l Buffer part B (SDS が析出している時は加温し、完全に SDS を溶かしてから使用) を加えて混和する。

⑤ 65°C 恒温槽で 10 分間インキュベートする (インキュベート後にサンプルの粘度が高い場合は、Buffer part A および Buffer part B を半量ずつさらに加えて再度インキュベートし、⑥ で加える precipitation solution 量を 1.5 倍にする)。

⑥ Precipitation solution 130 μ l を加えて混和し、氷上で 5 分間インキュベートする。

- ⑦ ⑤のインキュベートの間に、GenElute Nucleic acid Binding Column に 500 μ l column preparation solution を加え、15,000 rpm、1 分間遠心する。遠心後の溶液を捨て、⑩ で使用するまで室温に置いておく。
- ⑧ 氷上でインキュベートしたサンプルを 15,000 rpm、5 分間遠心し、上清を GenElute Filtration Column に移す。
- ⑨ 15,000 rpm、1 分間遠心した後、得られた溶液に 700 μ l Binding Solution を加えて混和する。
- ⑩ 溶液 700 μ l を ⑦で準備した GenElute Nucleic acid Binding Column へ 移し、15,000 rpm、1 分間遠心する。チューブに集めた溶液は捨てる。(サンプル溶液が残っていた時は、遠心後の溶液を捨て、同じカラムにサンプルを加えて再度遠心を行う)
- ⑪ カラムを新しい collection tube (付属) にセットする。500 μ l wash solution を加えて 15,000 rpm、1 分間遠心し、溶液を捨てる。カラムを新しい collection tube にセットし、500 μ l wash solution を加えて 15,000 rpm、3 分間遠心し、溶液を捨てる。
- ⑫ カラムを新しい collection tube にセットし、65°C に温めておいた elution buffer 100 μ l を加え、15,000 rpm、1 分間遠心する。溶出液を再度カラムに戻し、15,000 rpm、1 分間遠心する。
- ⑬ 得られた溶液について吸光度測定および電気泳動により濃度を測定する。DNA 溶液は -20°C. で保存した。

(3) PCR条件、PCR産物のサブクローニングおよび塩基配列の決定

- ① プライマーは超純水を用いて 100 pmol/ μ l に調整し、ストック溶液とす

る。PCR 反応液の調整には、ストック溶液を超純水で 10 pmol/ μ l に希釈したものを使用する。どちらの溶液も -20°C で保存した。

② PCR 反応は、以下のように全容量 20 μ l の反応型で行った。

滅菌水	13.6 μ l
10 x rTaq reaction Buffer	2.0 μ l
2.5 mM dNTP mix	1.6 μ l
Forward primer (10 pmol/ml)	0.4 μ l
Reverse primer (10 pmol/ml)	0.4 μ l
rTaq DNA polymerase (0.5 u/ml)	1.0 μ l
ゲノム DNA 溶液 (50-100 ng/ml に調整したもの)	1.0 μ l
全容	20.0 μ l

③ PCR 反応

反応温度は 95°C、3 分のプレヒート後、95°C 5 秒、55°C 30 秒、72°C 40 秒を 35 サイクル行い、最後に 72°C 3 分の伸長反応を行った。

PCR 後、反応液 5 μ l に 6 x loading buffer 1 μ l を加えて電気泳動サンプルとした。電気泳動は 2 % アガロースゲルで行い、サイズマーカーには 100 bp DNA ラダーを用いた。

④ プライマー

用いたプライマーを表 3 に示した。また、プライマーの位置と方向は図 7 に示した。

⑤ PCR 産物のサブクローニングと塩基配列の決定

PCR 産物は直接塩基配列を決定するか、pCR-Blunt (Invitrogen) にクローニングし、5 ~ 10 のクローンを用いてのエラーが最小になるよう塩基配列を決定した。塩基配列の決定は BigDye Terminator v.3.1 を用いて行った。

表3 本研究に用いたPCRプライマー

プライマー名	塩基配列 (from 5' to 3') ^a
W15-158S	TCACAAAATGCATGCAACGC
15-AA82S	GATACTTGTAGGACATAGTGGC
W14S2	AGTCGGCATGGAGAAGTTCC
Ex2-S1F	GCAAGGACTCCAATAGAAGC
W15-AA163S	CTAGTCTCTACCATTTGTCCC
W15-AA194S	AGCTGTTAAGTTCACGGACG
AAR1	CCAAAACGTGGAACAACGGCC
W15-AA124A	GCTTCTATTGGAGTCCTTGC
W15-AA158A	ACAGGGGCAAATGGTAGAG
W15-AA176A	TCTACAAACAATGCACCTGG
W15-3'UTR-143AS	AATGAACAATCCATCACTCC

a 位置と方向については図7参照。

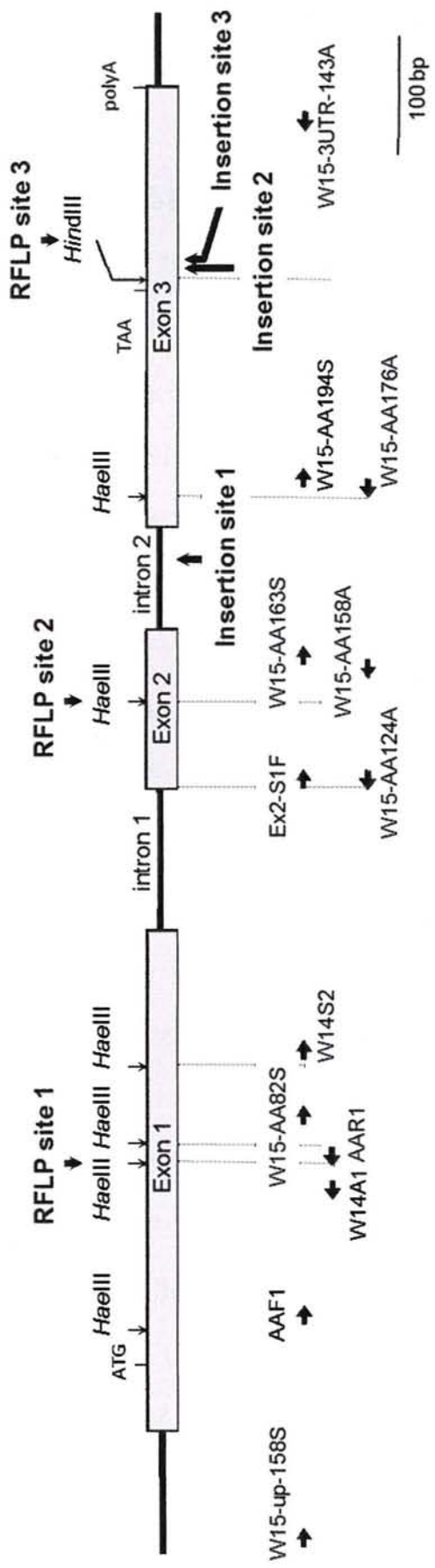


図7 W14およびW15遺伝子構造
 RFLPサイト1~3、インサージョン/デレーションサイト1~3および設計プライマーの位置と方向を示した。
 プライマーの塩基配列は表3に示した。

(4) 対立遺伝子特異的プローブを用いたドットブロットハイブリダイゼーション

異なった品種・系統の一塩基多型 (SNP) を検出するために、Shirasawa et al. (2006)の方法を用いて、プローブとして 5'側を digoxigenin(DIG)でラベルしたオリゴヌクレオチドをプローブとして用いてドットブロットハイブリダイゼーションを行った。それぞれの品種・系統のゲノム DNA を PCR で増幅して目的とする SNP サイトを含む DNA 断片を得た。ほぼ同じ量の増幅 DNA 断片をナイロンメンブラン (Hybond-N, Amersham Life Science) の上にスポットして、UV 照射によりクロスリンクした。このフィルターを大量の非特異的コンペティター (別の対立遺伝子に対応するオリゴヌクレオチド) を加えた 0.02%の SDS と 1%のブロッキング剤 (Roche) を含む 5×SSC 液に浸し、対立遺伝子特異的に DIG ラベルされたオリゴヌクレオチドを加え、50℃で一晩置き、ハイブリダイズした。さらにフィルターを常温で 0.1%の SDS を含む 2×SSC で 2 回洗い、50℃20 分の条件で 0.1%SDS を含む 0.1×SSC で 2 回洗った。フィルターをさらに TBS (0.9%NaCl および 0.02%NaN₃ を含む 50mM Tris-HCl バッファー、pH8.0) に常温で 5 分浸し、1%ブロッキング剤 (Roche) を含む TBS に常温で 30 分浸した。次にフィルターを 1%ブロッキング剤に入れ anti-DIG-AP Fab antibody(Roche)を加え、常温で 30 分間インキュベートした。フィルターを TBS で 10 分 3 回洗い、AP9.5 バッファー(0.1M NaCl および 5mMMgCl₂ を含む 100mM Tris-HCl バッファー、pH9.5)に 3 分浸し、37℃の CSPD 液 (Roche) に 5 分浸した。ハイブリタイズされたシグナルはフィルターを X 線フィルムにさらして検出した。

(5) 系統樹の作成

W14 遺伝子と *W15* 遺伝子の系統樹は 21 系統の 31 個の *W14* または *W15* 遺伝子の塩基配列から MEGA ソフトウェアを用いて近隣結合法 (NJ 法) により作成した (Kumar et al. 2008)。

3. 結果

(1) *W14/15* 遺伝子塩基配列の多型

W14 遺伝子と *W15* 遺伝子是对立遺伝子であったので、品種・系統の *W14/15* 遺伝子の塩基配列の多型を見つけることにより、品種識別、交配親の推定、系統分類の情報を与えるのみならず、越冬芽の形成や耐寒性に関連した形質とこの遺伝子との相関を明らかにするための手法を得ることができる。このような観点から、表 2 に示した *G.triflora*、*G.scabra*、*G.puneumonanthe* この 4 種以外の未知の種を含む 21 品種・系統について、塩基配列を決めた。

その結果、品種・系統で制限酵素サイトの有無、挿入/欠失の有無が存在することがわかった。図 8~10 に示したように、*Hind* III サイト (AAGCTT) (制限酵素サイト 3)、挿入 1、2 および 3 の有無により *W14/15* 遺伝子を 7 つのタイプに分けることができた。タイプ I は制限酵素サイト 3 があり、挿入 1、挿入 2 および挿入 3 がないタイプである。タイプ II は制限酵素サイト 3 があり、さらに、挿入 2 があるタイプである。タイプ III は制限酵素サイト 3 および挿入 1 があり、挿入 2 および挿入 3 がないタイプである。タイプ IV は、制限酵素サイト 3 に塩基置換があり *Hind* III が働かなくなっており、かつ挿入 1 があり、かつ挿入 2

および挿入 3 がないタイプである。タイプ V は制限酵素サイト 3 に塩基置換があり *Hind*III が働かなくなっており挿入 1 および 2 があり、挿入 3 がないタイプである。タイプ VI は制限酵素サイト 3、挿入 1 および挿入 2 があり、挿入 3 がないタイプである。タイプ VII は制限酵素サイト 3、挿入 1、挿入 2 および挿入 3 があるタイプである。さらにこれらの 7 つのタイプは *Hae*III 認識部位（制限酵素サイト 1 と制限酵素サイト 2）の有無とそのほかの SNP サイトにより、10 のサブタイプに分けることができた。

この分類により、21 のすべての品種・系統をハプロタイプ対すなわち対立遺伝子型として示すことができた（表 4）。タイプ I (*W15a* および *W15a'*) とタイプ III (*W14a* および *W14a'*) は *G.triflora* および *G.triflora* と *G.scabra* の種間雑種にのみ見られた。タイプ II は *G.septenfida* にのみあるものだった。タイプ IV (*W14b1*) とタイプ V (*W14b2* および *W14b2'*) は *G.scabra* および *G.triflora* と *G.scabra* の種間雑種にのみ見られた。タイプ VI (*W14b3*) は *G.pneumonanthe* にのみ見られた。タイプ VII (*W14c1* および *W14c2*) は SS にのみ見られた。SS は未知の種と *G.scabra* との種間雑種に未知の種をバッククロスしたものであり、しかも確実にこの未知の種はほかの 4 種 (*G.triflora*、*G.scabra*、*G.pneumonanthe* および *G.septenfida*) とは違う種である（育成者の E d Morgan 私信）。従って、タイプ VII は *G.triflora*、*G.scabra*、*G.pneumonanthe* および *G.septenfida* 以外の別種に存在するハプロタイプであると考えられる。

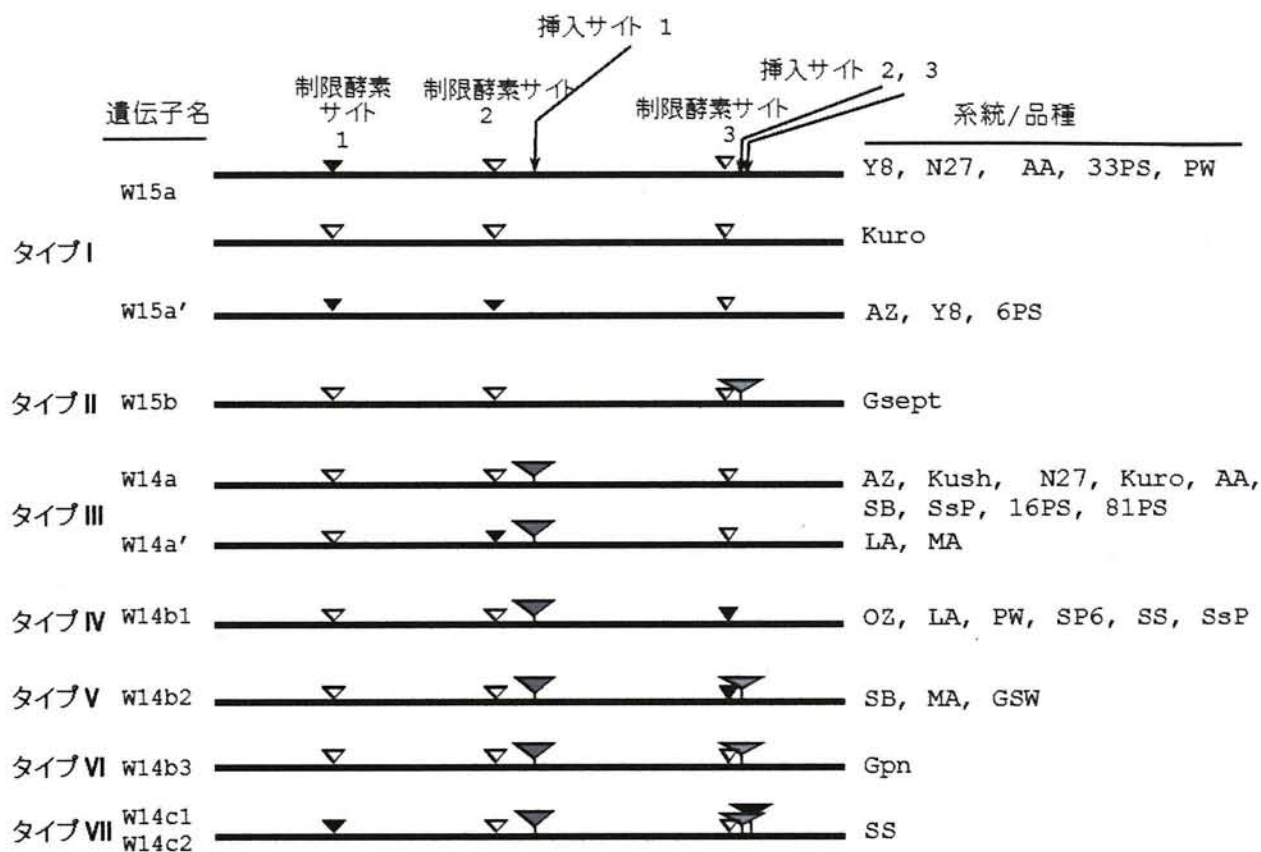


図8. 種・品種・系統におけるW14およびW15遺伝子の塩基配列多型

制限酵素サイト3および挿入サイト1、2および3により7つのタイプに分けられる。

遺伝子名はたとえばW14a遺伝子は14aと略記した。

品種・系統名は右側に列記した。

制限酵素サイトにおける「▼」は遺伝子置換により反応すべき制限酵素が働かなかったことを示す。

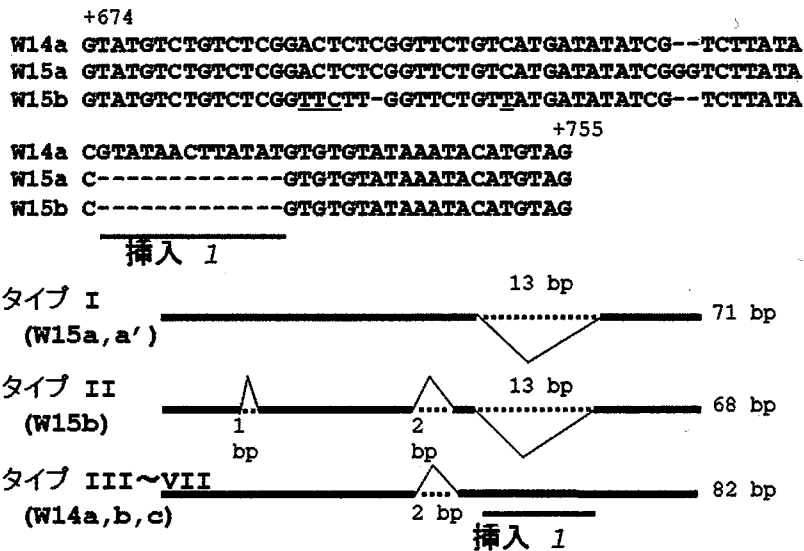


図9 種・品種・系統におけるW14およびW15遺伝子のイントロン2の塩基配列多型
タイプIとタイプIIの遺伝子には挿入1がないのに対し、タイプIII~VIIの遺伝子にはある。
タイプII~VIIは2bpの欠失がある。
塩基の上に示した数字は品種AAのW14遺伝子の転写開始点を(+1)としたときの塩基の位置である。

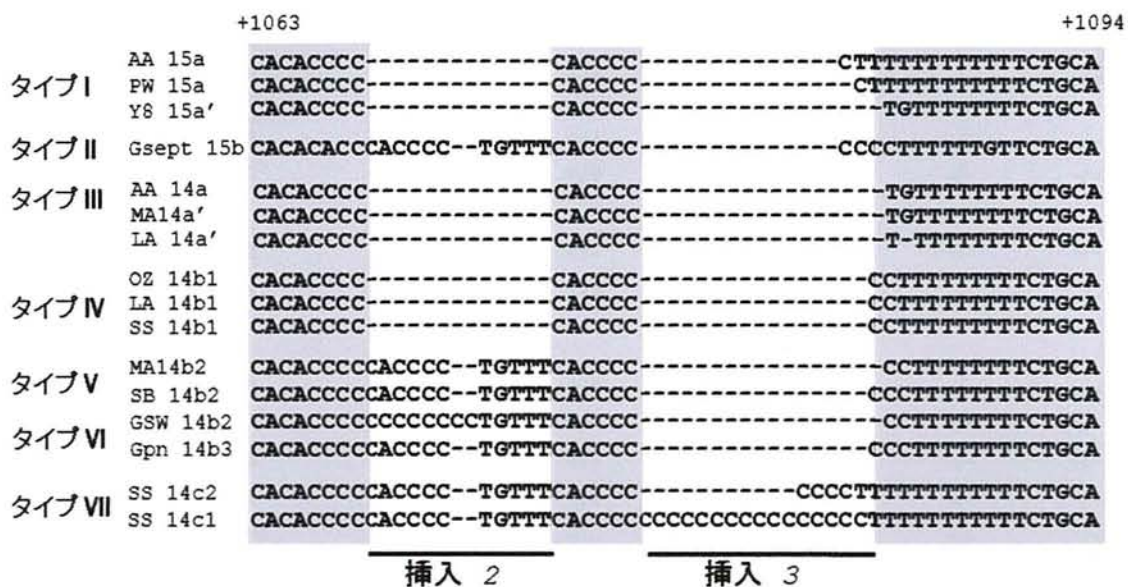


図10 種・品種・系統におけるW14およびW15遺伝子の挿入2および3近傍の塩基配列多型塩基の上に示した数字は品種AAのW14遺伝子の転写開始点を(+1)としたときの塩基の位置である。

挿入2はタイプ II および V ~ VIIに存在し、挿入3はタイプVIIに存在する。

表4 様々な品種系統および種におけるW14/W15遺伝子座での対立遺伝子型

品種/系統	対立遺伝子型	制限酵素サイト ¹⁾			挿入サイト ²⁾		
		1 (HaeIII)	2 (HaeIII)	3 (HindIII)	1	2	3
Y8	15a/15a'	-/-	+/-	+/+	-/-	-/-	-/-
N27	14a/15a	+/-	+/+	+/+	+/-	-/-	-/-
Kuro ³⁾	14a/15a	+/+	+/+	+/+	+/-	-/-	-/-
	15a/15a	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
AZ	14a/15a'	+/-	+/-	+/+	+/-	-/-	-/-
Kush	14a/15a	+/-	+/+	+/+	+/-	-/-	-/-
AA	14a/15a	+/-	+/+	+/+	+/-	-/-	-/-
	14a/15a'	+/-	+/-	+/+	+/-	-/-	-/-
	15a/15a'	-/-	+/-	+/+	-/-	-/-	-/-
	15a/15a	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
6PS	15a'/15a'	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-
16PS	14a/14a	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
33PS	15a/15a	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
81PS	14a/14a	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-	-/-
OZ	14b1/14b1' * ⁴⁾	+/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-
SP6	14b1/14b1'	+/-	+/+	-/-	+/+	-/-	-/-
GSW	14b2/14b2'	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-
PW	14b1/15a	+/-	+/+	-/+	+/-	-/-	-/-
LA	14a'/14b1	+/+	-/+	+/-	+/+	-/-	-/-
MA	14a'/14b2	+/+	-/+	+/-	+/+	-/+	-/-
SB	14a /14b2	+/+	+/+	+/-	+/+	-/+	-/-
SsP	14a/14b1'	+/+	+/+	+/-	+/+	-/-	-/-
Gpn	14b3/14b3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
Gsept	15b/15b	+/+	+/+	+/+	-/-	+/+	-/-
SS	14b1/14c1/14c2	+/-/-	+/+/+	-/+/+	+/+/+	-/+/+	-/+/+

1) +は示された制限酵素サイトの塩基配列であることを示し、- は変異した塩基配列(1塩基置換)であることを示す。

2) +は挿入配列が存在することを意味する。

3) ふたつの違う遺伝子型があった。

4) *のある対立遺伝子対の一方の遺伝子は、部分的な塩基配列とRFLP解析によって決定した。

(2) 種および品種の 1 塩基多型 (SNP)

上記の多型に加えて、1 塩基多型を示すサイトが多数あった。図 11 には、AA の W14 遺伝子の塩基配列とそれに対する 1 塩基置換を示した。塩基位置を転写開始点からの相対的位置で示したときに、T⁻²⁸、C⁻¹⁷、G⁺³²⁹ および C⁺⁴⁷¹ は *G. triflora* に特異的に存在する塩基であった。また、T⁺⁹⁰¹、G⁺¹⁰⁰²、A⁺¹⁰⁶⁷、C⁺¹¹²⁰ および C⁺¹¹²⁴ は用いたすべての *G. scabra* に特異的に存在する塩基であった。また、G⁻⁵⁷、G⁺¹⁷⁰、C⁺¹⁷³、G⁺⁴³⁴、G⁺⁵¹⁰、G⁺⁵¹⁹、C⁺¹⁰¹³、および C⁺¹¹⁴² は Gpn (*G. pneumonanthe*) の W14b3 遺伝子にのみ見られた。このように、これらの 1 塩基多型は *G. triflora*、*G. scabra*、*G. pneumonanthe* および *G. septenfida* を区別するマーカーとして用いることができることがわかった。

さらに、品種・系統特異的 1 塩基多型も多数あった。たとえば、T⁺²⁸⁸ および T⁺⁴¹³ は SB の W14b2 にのみ存在した。同様に C⁺³²⁸、T⁺⁴⁵⁷ および C⁺⁹³⁷ は MA の W14b2 遺伝子にのみ存在し、A⁺²⁴⁵ および G⁺¹⁰²⁴ は GSW の W14b 遺伝子にのみ存在した。さらに 2G⁺¹³⁴ および G⁺⁴⁶⁹ は SB および GSW の W14b2 遺伝子にのみ存在し、A⁺³⁶⁹ は LA、MA および PW の W14b1 遺伝子および W14b2 遺伝子に存在し、T⁺⁶²⁹ は LA および MA の W14a' 遺伝子に特異的に存在した。

SNP サイトを塩基配列決定法によらずに確かめることは、品種育成など多くの品種・系統および個体を扱う分野では重要であることから、アリアル特異的プローブを用いてドットプロットハイブリダイゼーションを行った。典型的な例として転写開始点からの相対的位置が +134 と +629 の塩基に着目した (図 12)。+134 の塩基については AA、LA、MA は A であるのに対し、SB は A と G であることが分かっている。そこでこれらの品種それぞれの PCR で増幅した +134 を含む DNA 断片をフィルターにスポットし、アリアル特異的プロ

ープ 134G または 134A とハイブリダイズしたところ、SB からの DNA スポットのみにプローブ 134G とハイブリダイズした (図 12B)。このことから、+134 での SNP はドットプロットハイブリダイゼーションにより確かめることができることが分かった。同様にプローブ 629T と 629C を用いてドットプロットハイブリダイゼーションを行い、LA と MA に存在する *W14a* 遺伝子の SNP を確かめた。その結果、9 品種のうち、LA と MA のみが T⁺⁶²⁹ をもち、他の品種は両方のアレルとも C を持っていることが分かった (図 12C)。+629 の位置は RFLP サイト 2 (*Hae*III サイト、図 7 参照) の位置と対応している。Y8 の *W14a'* 遺伝子は +628 の位置の C が T に置換されていて *Hae*III サイトも GGCC から GGTC に変異している。LA と MA の *Hae*III サイトは GGCT であるが、Y8 の DNA 断片をスポットした部分は 629T とハイブリダイズしなかった。この結果から、このドットプロットハイブリダイゼーションは正確に塩基配列データを反映していることが分かった。

(3) *W14/15* 遺伝子に基づくリンドウの系統樹

本研究で決定した 31 の *W14/W15* 遺伝子の塩基配列を用いて、無根系近隣結合法 (unrooted NJ 法) により系統樹を作ったところ (図 12)、9 つのサブファミリーに分けることができた。サブファミリー i から iv は *G. triflora* に属し、viii と ix は *G. scabra* に属していた。また、v は *G. pneumonanthe*、vi は *G. septenifida* に属していた。vii はこれらの 4 つの種とは違う非公開の種に属

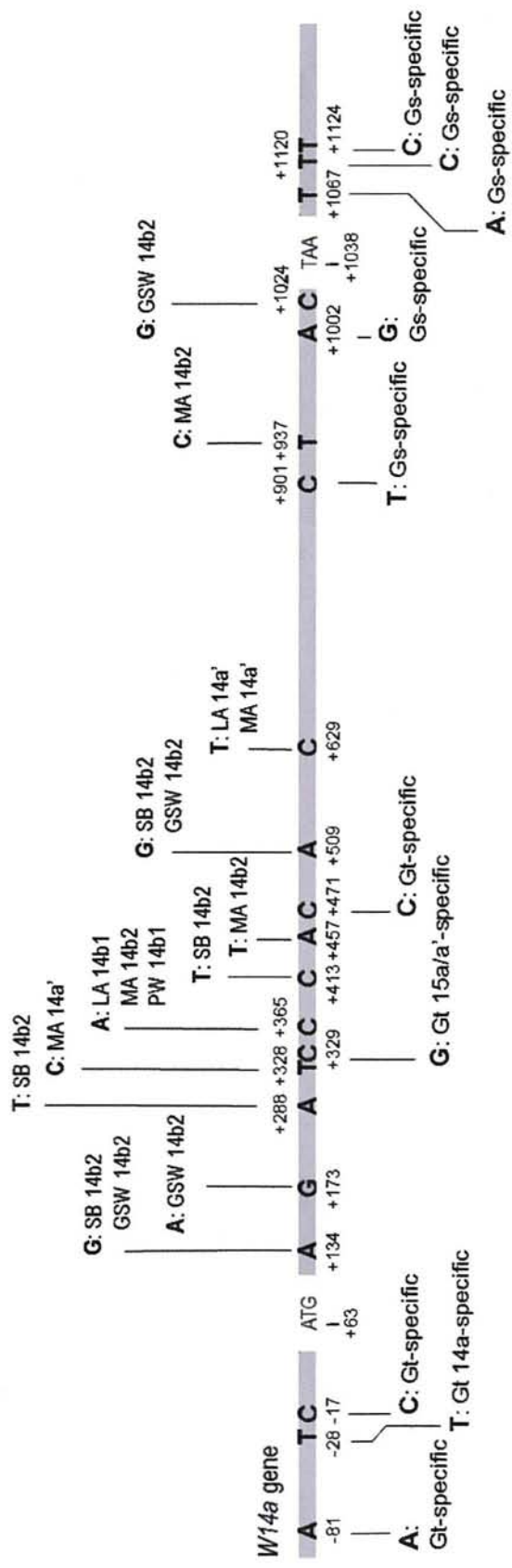


図11 W14およびW15遺伝子における1塩基多型 W14a遺伝子(品種aa)の塩基配列の塩基に対して、上側に示した塩基は、塩基置換された塩基のうち、略記された品種および系統に特異的な塩基である。下側に示した塩基配列は、塩基置換された塩基のうち、種特異的な塩基である。Gtは*Gentiana triflora*の、Gsは*Gentiana scabra*の略記である。遺伝子名の略記は図6に示されたものを用いた。塩基の下に示した数字は品種AAのW14a遺伝子の転写開始位置を(+1)としたときの塩基の位置である。

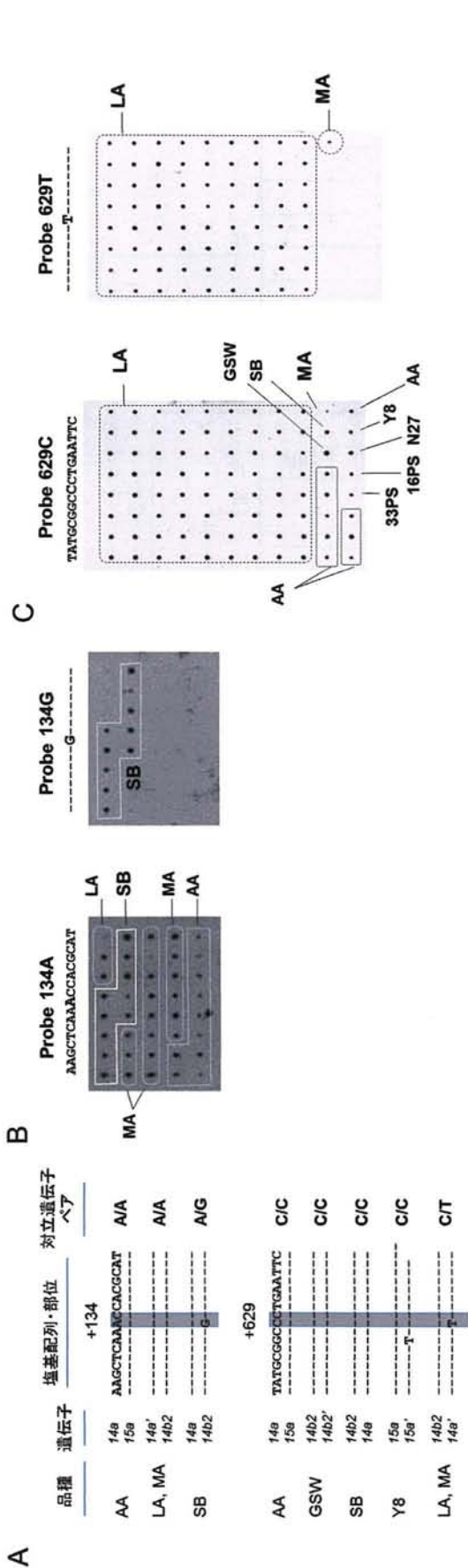


図12 W14/15遺伝子のドットプロットハイブリダイゼーションによるSNPの検出
 Aには塩基配列位置+123のSNPと近傍の塩基配列を上段に示し、+629のSNPと近傍の塩基配列を示した。テストした品種のなかで、SBのみがG⁺¹³⁴であり、LAおよびMAのみがT⁺⁶²⁹である。
 BにはG⁺¹³⁴を検出するためのドットプロットハイブリダイゼーションの結果を示した。図に示した各品種のゲノムDNAをプライマーAAF1とW14A1を用いてPCRを行った。PCR産物をナイロンフィルターにスポットし、+134にGまたはAを持つアリアル特異的DIGラベルされたオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションはDIGラベルされた134Gプローブと過剰量のラベルされていない134AおよびDIGラベルされた134Aプローブと過剰量のラベルされていない134Gを加えて行った。それぞれのスポットは図に示したそれぞれの品種から得られたDNAと対応する。
 CにはLAおよびMAのT⁺⁶²⁹を検出するためのドットプロットハイブリダイゼーションの結果を示した。図に示した各品種のゲノムDNAをプライマーEx2-S1FとW15-AA158(図7参照)を用いてPCRを行った。+629にTまたはCを持つアリアル特異的DIGラベルされたオリゴヌクレオチドを用いて、Bと同様の方法を行った。

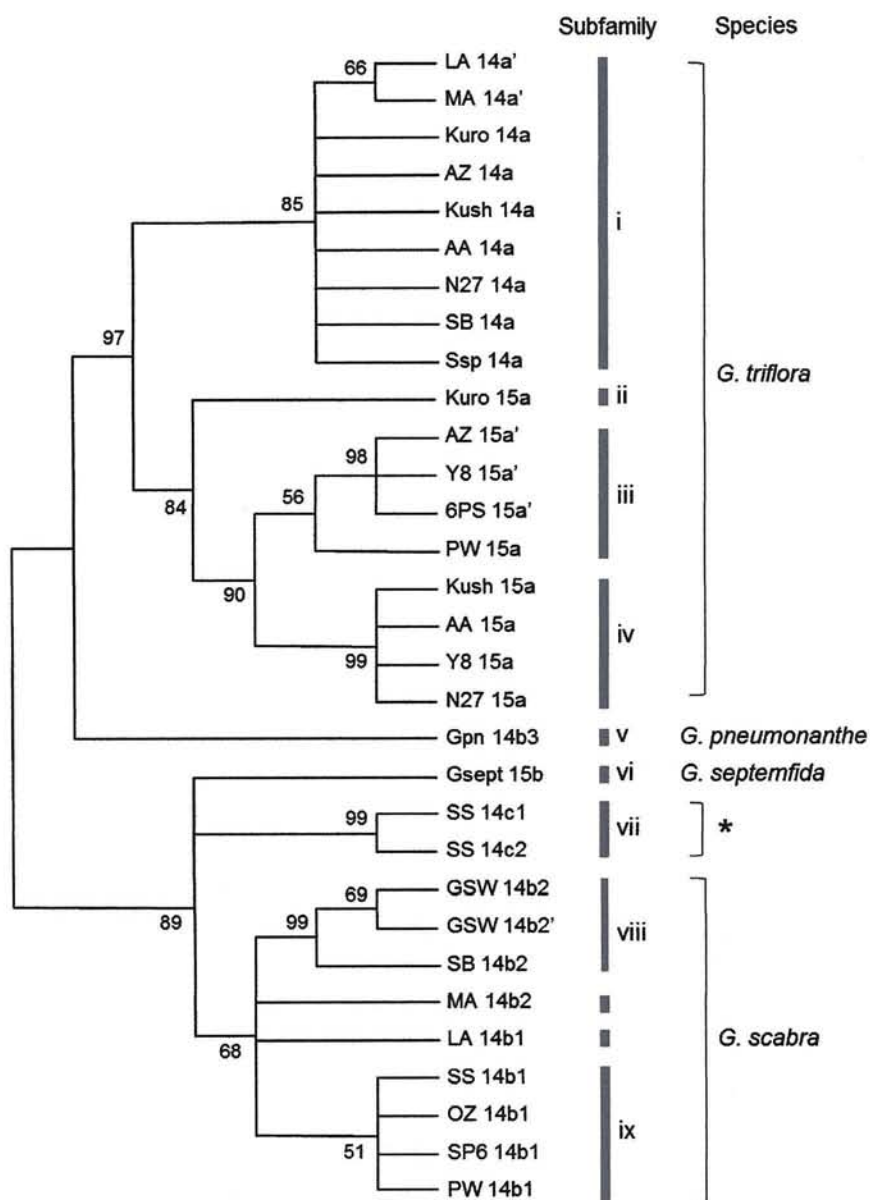


図13 31個のW14/15遺伝子のNJ法による系統樹

品種名、遺伝子名の略記はそれぞれ表4、図10による。

この解析にはAAのW14遺伝子の転写開始点を+1としたときの+63から+1184の位置までの塩基配列領域を用いた。

Boot strap valueは1,000のreplicatesから計算し、branchの位置に示した。

*は非公開の種であるが、*G. scabra*、*G. triflora*、*G. pneumonanthe*および*G. septemfida*以外の種である。

していた。*G. triflora* の野生種についてみると、八幡平高原の黒谷内地内に自生していた葉のサンプリング (Kuro) の *W14/15* 遺伝子のハプロタイプ対は i (14a) と ii (15a) のファミリーに分かれており、福島県の吾妻山からサンプリングした葉 (AZ) のハプロタイプ対は i (14a) と iii (15a')、北海道の釧路 (Kush) からサンプリングした葉 (Kush) のハプロタイプ対は i (14a) と iv (15a) に分かれていた。これらの系統は日本特有の *G. triflora* var *japonica* f. *montana* に属している。しかし、*W14/15* 遺伝子の系統解析の結果は、これらの野生種はそのなかに亜種または種内変異があることを示唆している。さらに Y8 は岩手県の矢巾に自生しているリンドウ *G. triflora* var. *japonica* から育成された系統であるが、*W15a'* はサブファミリー iii に属し、*W15a* は iv に属していて、Kuro、AZ および Kush とは違う遺伝子型であった。

4. 考察

本研究では、5 種類の種に属する 21 品種の *W14/15* 遺伝子の塩基配列を決定した。そして、7 つのタイプと 10 のサブタイプに分けた。この遺伝子の遺伝子型により、品種・系統だけではなく、種を区別することができた。これまで、リンドウ属の分類は形態学的基準を用いて行ってきた。最近分子レベルでの取り組みもなされているが (Mishiba et al. 2009 ; Shimada et al. 2009)、核 DNA の塩基配列レベルで、種間の系統関係や分類上の位置の系統関係の情報は少ない。*W14/15* 遺伝子の遺伝子型の多型は、系統解析の指標として使用でき、系統分類のみならず、種、品種・系統の同定にも使用できる。

これまでのところ、本研究が、リンドウ属の核遺伝子の多型を用いて、種・品種・系統間の系統解析を行った最初の例である。*G. triflora*、*G. scabra*、*G.*

pneumonanthe、*G. septenifida*を含む5つ以上の種を *W14/15* 遺伝子の遺伝子型多型により分けることができた。クロロプラスト DNA の塩基配列の研究では、*G. triflora*、*G. scabra* および *G. pneumonanthe* は *Pneumonanthe* 節に属し同じハプロタイプであり、NJ 法や strict consensus tree により分けることができなかった (Mishiba et al. 2009)。その点、*W14/15* 遺伝子の遺伝子型による解析で、詳しい系統解析が可能になったといえる。

G. triflora の分類に関しては、*G. triflora* var. *japonica* の野生種 Y8 と *G. triflora* var. *japonica* f. *montana* の野生種 Kush、AZ および Kuro の解析から、4 カ所の日本の山に起源を持つそれぞれの野生種は、異なったハプロタイプの対で構成されていることがわかった。この結果は、*G. triflora* var. *japonica* と *G. triflora* var. *japonica* f. *montana* に分けて、高山地帯の lindou は *G. triflora* var. *japonica* f. *montana* であるとする分類とは一致しない。この分類に関しては、日本の lindou 種の地理的相違が形態学に織り込まれたと指摘されている (米澤と川野 1989) が、本研究のデータはこれを支持している。すなわち、すべて日本の野生種は *G. triflora* var. *japonica* で、その中に亜種、種内変異または生態型があるのではないかと考える。

lindou の品種・系統の家系図や育種経過を知るのにこの *W14/15* 遺伝子の遺伝子型多型は有効な手段である。たとえば、LA は *G. triflora* と未知の系統とが自然交配した F_1 に未知の系統がさらに自然交配したものである。本研究によりこの未知の交配親についてより詳しい情報が得られた。LA は *W14a/W14b1* という遺伝子型である。*W14b1* というハプロタイプは *G. scabra* に属するハプロタイプであることから、*G. scabra* に属する系統が自然交配したものであることがわかる。さらに、SS や OZ も *W14b1* に属することから、この系統またはこれに近い系統と交配したものと推測できる。品種 AA は Y8 (*G.*

triflora, *W15a/W15a'*) と N27 (*G. triflora*, *W14a/15a*) の交配 F₁ 品種である。そこで、AA を個体別に調べたところ、4つの遺伝子型すなわち、*W14a/W15a*, *W14a/W15a'*, *W15a/W15a* および *W15a/W15a'* の個体が存在した。このように *W14/15* 遺伝子の遺伝子型多型は交配の経過を推測できることから、リンドウの種・品種・系統の同定にも有効な手段となる。さらに育成者権を主張する際に利用することも可能である。

アリアル特異的オリゴヌクレオチドを用いたドットプロットハイブリダイゼーション法は、*W14/15* 遺伝子のヘテロのアリアルペアーを識別できた。この方法は多数の個体を扱う育種、品種識別、育成経過の調査、系統樹の評価等で今後の利用価値が高いと考えられる。

第 3 章

W14/15 対立遺伝子と

越冬芽の低温応答

1. 目的

多年生植物のリンドウは、いったん定植すると5年程度切り花を収穫することから、定植後できるだけ長く生存して収穫できることが農業経営上最も望まれる。近年、リンドウの切り花品種が多数育成されているが、それらの多くは定植後2～3年で欠株が目立ち、経営上の大きな問題になっている。

リンドウは、越冬前に地際に越冬芽を形成し、それが冬期間休眠し、春に休眠が打破されて萌芽してくる。上に述べた育成品種の欠株はこの越冬芽の形成、耐寒性、休眠などと深くかかわっているに違いない。

これまでに当研究室では、越冬芽の生理機能及びその機能発現のしくみを知るために、越冬芽特異的に発現あるいは蓄積されるタンパク質の解析を行ってきた。その結果、W14、W15と名付けた新規エステラーゼを同定し (Takahashi et al. 2006)、それらの各々が対立遺伝子の一方にコードされていることを報告した (Hikage et al. 2007)。この遺伝子には品種・系統によっていくつかの RFLP サイト、SNP サイト、イントロン長の違いおよび数～10 数塩基の挿入／欠失が存在し、大別して7種類のハプロタイプが存在する。従って、このような W14/W15 遺伝子の多型は越冬芽の種々の表現型と相関するマーカーとなり得る。もし W14/W15 遺伝子型と越冬芽の形成、耐寒性や休眠との相関が認められれば、欠株の少ない品種を育成する際の選抜マーカーとしての利用が可能になる。本研究はこの可能性を検証した。

最近、リンドウ品種「安代の秋」の薬培養からいくつかの純系が育成された (Doi et al. 2010)。本研究ではそれら純系リンドウを片親に用いて各種品種・系統との交配を行い、様々な W14/W15 対立遺伝子型をもつ系統を作出し、越冬芽の越冬生存率や休眠の深さとの相関を調査した。その結果、越冬生存率と

W14/15 対立遺伝子型との間に相関を見出すことができた。

2. 材料および方法

(1) 実験に用いたリンドウの品種・系統

用いた品種およびその親系統を表 5 に示した。「安代の秋 (以下 AA)」: エゾリンドウ (*G. triflora*) の F1 品種、 Aki-6PS (以下 6PS)、 Aki-16PS (16PS) 及び Aki-33PS (33PS) : AA の蒔培養由来の純系リンドウの自殖系統、「6PS×16PS」および「6PS×33PS」: AA 由来の純系リンドウ同志の F1 系統、「N55×6PS」: エゾリンドウの自殖系統と純系系統との F1 集団、 *Gentiana Scabra Blue* (以下 GSB): ササリンドウ (*G. scabra*) の自殖系統、 *Gentiana Scabra White 100* (GSW): ササリンドウ (*G. scabra*) の自殖系統、 ササピンク 6A1 (SP6) : ササリンドウ (*G. scabra*) の自殖系統。「ラブリーアシロ (以下 LA)」、「シャインブルーアシロ (以下 SB)」、「ピュアホワイト (以下 PW)」、「Katsuata2C (以下 K2C)」および「ショウタイムスターレット (以下 SS)」は栄養系品種である。品種 SS は Rhindo New Zealand Ltd. (ニュージーランド) の育成品種で、それ以外は八幡平市花き開発研究センターの育成品種または系統である。

表5 本研究に用いた材料

品種・系統	略記	繁殖様式	育成経過
安代の秋	AA	種子	<i>G. triflora</i> F1品種
Aki-6PS × Aki-6PS	6PS	種子	倍加半数体自殖系統
Aki-6PS × Aki-16PS	16PS	種子	倍加半数体自殖系統
Aki-6PS × Aki-33PS	33PS	種子	倍加半数体自殖系統
N55 × Aki-6PS	N55 × 6PS	種子	<i>G. triflora</i> × 倍加半数体自殖系統
GSB × GSB	GSB	種子	<i>G. scabra</i> 自殖系統
GSW100 × GSW100	GSW	種子	<i>G. scabra</i> 自殖系統
SP6A1 × SP6A1	SP6	種子	<i>G. scabra</i> 自殖系統
ピュアホワイト	PW	挿し木	<i>G. triflora</i> × <i>G. scabra</i>
ラブリーアシロ	LA	挿し木	<i>G. triflora</i> × <i>G. scabra</i>
シャインブルーアシロ	SB	挿し木	<i>G. scabra</i> × <i>G. triflora</i>
Katsumata 2 C	KC2	挿し木	<i>G. triflora</i> f. <i>montana</i>
ショウタイムスターレット ^{a)}	SS	挿し木	(<i>G. scabra</i> × unknown) × unknown

a) ショウタイムスターレットは Rhindo New Zealand Ltd.所有の品種である。

(2) 生育条件および低温処理

すべての栽培試験は八幡平市花き研究開発センター（岩手県八幡平市叭田 70 番地）の温室および野外で行った。栄養系品種 LA、SB、PW、K2C および SS は、2007 年 5 月 15 日にバーミキュライト（規格M）を入れた 128 穴トレイに挿し穂を行い、最低気温 10℃に設定した温室で発根させた。2 ヶ月後、鹿沼土（規格中粒）：バーミキュライト（規格M）：ココピート（4：4：2）を配合した 9 cmポットに移植し、10℃以上に設定した温室で 2007 年 9 月 30 日まで育てた。その後野外に移して育て、2008 年 6 月 7 日に萌芽してきた株を 15 cmポットに移植し、2009 年春まで野外で育てた（図 15-B に概要を示した）。

種子からの発根は図 15-A のように行った。2008 年 5 月 5 日に培養土「システムソイル」を入れた 128 穴トレイに、ジベレリン（100 ppm）で 1 昼夜処理した種子を播種した。最低気温 20℃以上の育苗温室で 2 ヶ月間育て、ジベレリン溶液（100 ppm）を葉面散布したのち、鹿沼土（規格中粒）：バーミキュライト（規格M）：ココピートを配合（4:4:2）した用土を入れた 9 cmポットに移植し、10℃以上に設定した温室で育て、その後 2008 年 9 月 30 日に 15℃以上に設定した温室に移した。2009 年 1 月 5 日に野外に移し育てた。

越冬生存率は、種子及び栄養系とも野外で越冬させた後 4 月後半の萌芽率で決定した。PW、SB、K2C、LA、6PS、6PS×16PS および N55×6PS の一部の個体は、低温による傷害（枯死）及び休眠打破に要する低温期間の長さを調べるために 2009 年 9 月 30 日まで野外で育てたのち、0 日、15 日、30 日、45 日および 60 日間 2℃の低温下で生育させた。低温処理後 10℃以上に設定した温室に移し、60 日後の生存率、萌芽率を調べた（図 15-A、B、及び以下の (3) 参照）。

(3) 越冬生存率、枯死率および休眠の深さの解析

越冬芽から茎葉が展開している芽を萌芽とした。越冬生存率は、越冬前の越冬芽数と越冬後萌芽してきた芽数を調査し、越冬後に萌芽してきた芽の数／越冬前の越冬芽数×100 (%) を越冬生存率とした。栄養系品種（ポット栽培）については、上記(1)により2007年に挿し芽した苗を2009年の春まで育てて、2008年11月30日に調べた越冬芽数と2009年5月15日に調べた萌芽数から求めた。種子繁殖の品種（ポット栽培）は、2009年1月5日に越冬芽数を調べた後、温室外（野外）に3月20日まで放置した。その後、10℃以上に設定された温室に戻し5月20日までの萌芽数を調べた。

低温による枯死率は、2℃処理後60日目の1株あたり枯死越冬芽数/2℃処理終了後60日目の1株あたり全芽数×100 (%) により求めた。越冬芽全体が完全に褐変した芽を枯死越冬芽とした。休眠の深さ（休眠打破に要する低温期間の長さ）は一定期間の2℃処理後、60日間温室で生育させ、この間に萌芽した越冬芽の数で比較した。萌芽率は、1株あたりの越冬芽の萌芽数／全越冬芽数×100 (%) とした。

(4) 統計処理

越冬生存率は、全生存越冬芽数と全枯死越冬芽数を数え、 χ^2 独立性の検定を行った。萌芽率および枯死率のデータは平均値±標準誤差で示した。枯死率は、二元配置分散分析の後、チューキーの多重比較検定で解析した。

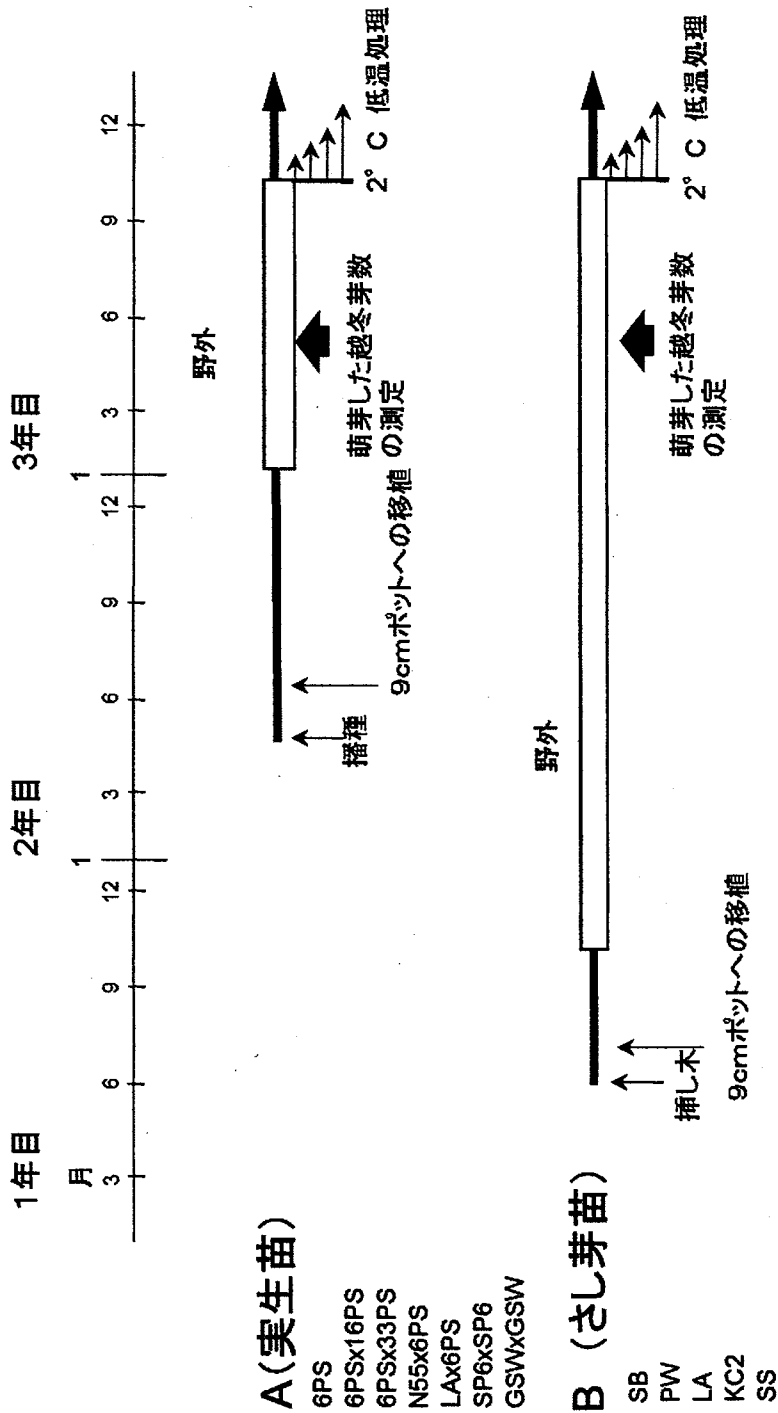


図14 リンドウの生育条件、越冬生存率、休眠の深さおよび枯死率測定の概略

A: 種子繁殖品種・系統の生育条件および低温処理
 B: 挿し木繁殖品種・系統の生育条件および低温処理方法
 黒の横棒は温室で生育させたことを示す。
 長方形は野外で生育させたことを示す。

3. 結果

(1) *W14/15* 遺伝子型と越冬生存率

本研究室では以前、越冬芽で特に多く蓄積している *W14*、*W15* と名付けた新規エステラーゼを同定し、それらをコードする遺伝子（以下 *W14/15* 遺伝子）は対立遺伝子であることを報告した（Takahashi et al., 2006; Hikage et al., 2007）。この遺伝子には少なくとも 7 つのタイプの多型が存在し、それらはさらに 10 のサブタイプに分類できることを前章で明らかにした。タイプ I には *W15a*、*W15a'*、および *W15b*、タイプ III には *W14a* および *W14a'*、タイプ IV には *W14b1*、タイプ V には *W14b2*、タイプ VI には *W14b3*、タイプ VII には *W14c1* および *W14c2* のサブタイプが存在する（Hikage et al. 2010）。

これら *W14/15* 対立遺伝子型と越冬芽の野外での越冬生存率との相関を調べた結果が図 14 である。品種 AA、LA および 6PS の越冬生存率は 90% 以上であったが、GSB、SP6、GSW および SS は 30% 以下であった（図 15）。品種 PW は約 50% で上記 2 群の間であった。

これらの品種の越冬生存率を *W14/15* 対立遺伝子型と対比させたところ、*W14b1* あるいは *W14b2* 型ハプロタイプを対立遺伝子の一方または両方にもつ品種・系統は越冬生存率が低くなる傾向が見られた。すなわち、GSB（*W14b1/W14b1*）、SP6（*W14b1/W14b1*）、GSW（*W14b2/W14b2*）、SS（3 倍体：*W14b1/W14c1/W14c2*）、PW（*W14b1/W15a*）など *W14b1* や *W14b2* 遺伝子をもつ品種は越冬生存率が低く、逆にそれらを持っていない品種・系統（AA や 6PS）は高くなっていた。例外として、越冬生存率の高い品種 LA（*W14b1/W14a'*）も *W14b1* 型を対立遺伝子の一方にもつが（後述）、上述の結果は特定のハプロタ

イプが越冬生存率を低下させる可能性を示唆した。

そこで、この可能性を検証するために、越冬生存率の高い純系系統 6PS (*W15a'/W15a'*)に品種PWの *W14b1* 対立遺伝子または品種LAの *W14b1* 対立遺伝子を導入した交配集団を育成した。それらは個体ごとに対立遺伝子型を決定し、温室で生育させてすべての越冬芽を休眠させた後、野外に放置して越冬生存率を決定した (図 14 および材料と方法参照)。

結果を図 16 に示したが、*W14b1/W15a'* 遺伝子型の PW x 6PS 系統 (L2)の越冬生存率は *W15a/W15a'* 遺伝子型の PW x 6PS 系統 (L1) に対して低く、L1 と L2 の越冬生存率は χ^2 検定の結果 $p < 0.01$ となり有意な差であった。品種 LA (*W14b1/W14a'*) と 6PS との交配集団についても同様の結果が得られ、*W14b1/W15a'* 遺伝子型の LA x 6PS 系統 (L2)の越冬生存率は *W14a/W15a'* 遺伝子型の LA x 6PS 系統 (L1) に対して低く、L1 と L2 の越冬生存率は χ^2 検定の結果 $p < 0.01$ となり有意な差であった。6PS (*W15a'/W15a'*) x 33PS (*W15a/W15a*)の交配集団 (*W15a'/W15a*)では越冬生存率の低下は見られなかった。これらの結果は、*W14b* 型を対立遺伝子としてもつ品種・系統は越冬生存率が低下するという可能性を強く支持する。

ところで、前述したように品種 LA (*W14b1/W14a'*) は *W14b1* 型対立遺伝子をもつが越冬生存率が高く、上の可能性とは矛盾する。この理由については現在解析中であるが、LA x 6PS 集団の中で *W14b1/W15a'* 系統のもの (L2) が越冬生存率の低いグループに分離した (図 16) ということは、越冬生存率が高い個体であっても、*W14b* 型を対立遺伝子の一方にもつ個体はその次の世代で越冬生存率が低下する可能性を示している。この点も踏まえ、*W14/15* 対立遺伝子型は育種現場における耐寒性選抜マーカーとして利用できる有用性を示している。

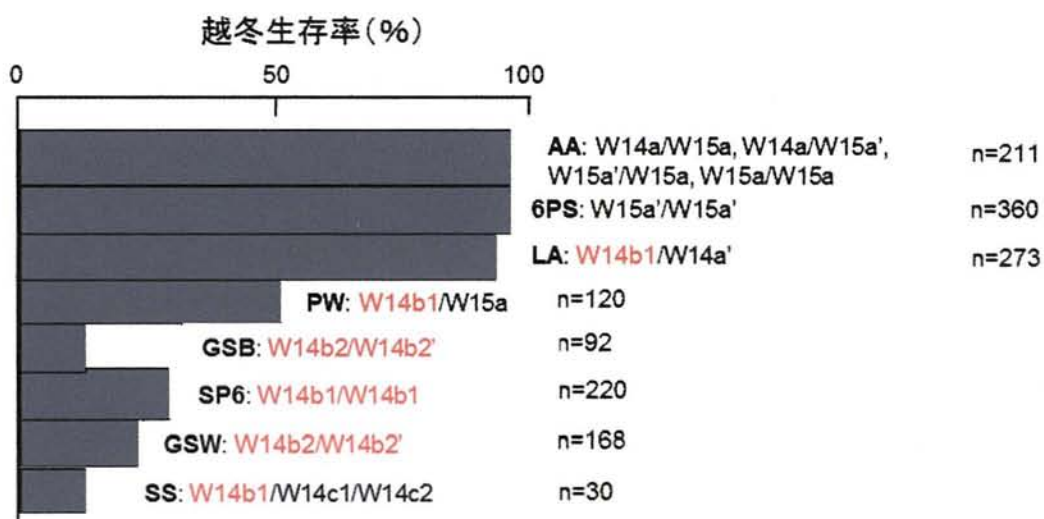


図15 越冬生存率とW14/15遺伝子型

種々の品種/系統の野外での越冬生存率を示す。

越冬生存率は各品種系統の萌芽芽数/全越冬数×100より求めた。

各品種/系統の調査全越冬芽数はnで示した。

対立遺伝子型は図8の遺伝子名を用いた。

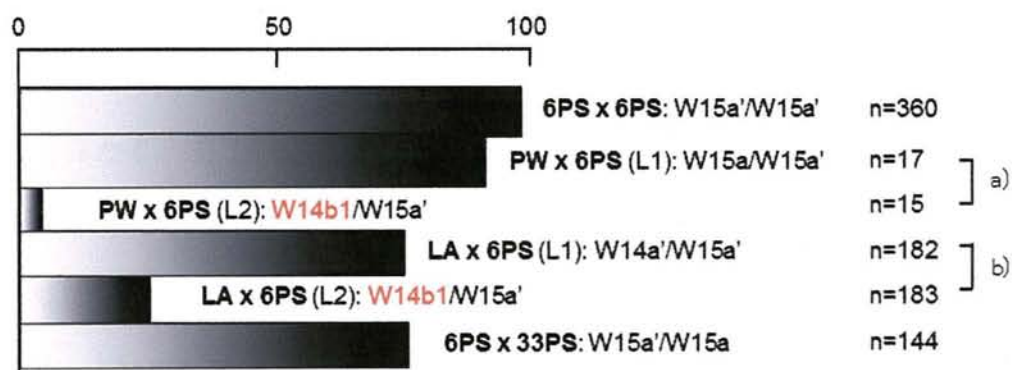


図16 越冬生存率とW14/15遺伝子型

6PS×6PS、PW×6PS、LA×6PSおよび6PS×3PSの交配F₁集団を作出し、越冬生存率を調査した。PW×6PSおよびLA×6PSの交配集団についてはW14/15遺伝子型別に越冬生存率を調べた。

越冬生存率は萌芽芽数/全越冬数×100より求めた。

各品種/系統の調査全越冬芽数はnで示した。

対立遺伝子型は図8の遺伝子名を用いた。

a) PW×6PSのL1とL2の越冬生存率は χ^2 検定の結果 $p < 0.01$ となり有意な差が認められた。

b) LA×6PSのL1とL2の越冬生存率は χ^2 検定の結果 $p < 0.01$ となり有意な差が認められた。

(2) *W14/15* 遺伝子型と休眠

次に、6PS、6PS×16PS、N55×6PS、LA、PW、SB および KC2 の休眠の深さ（休眠覚醒に要する低温期間の長さ）を検討した。ポット栽培のリンドウを、越冬芽の休眠誘導がおこる9月末まで野外で生育させ、その後、種々の期間2℃の低温処理を行った（図 17）。低温処理の後、越冬芽の萌芽環境下（最低気温10℃以上に設定した温室）で60日間生育させ、萌芽した越冬芽数を計測した（図 17）。結果を図 18 に示した。萌芽に要する低温期間は品種・系統によって明らかに異なり、最も短かったのは K2C で、30～40 日間の低温処理で実験に供した越冬芽の50%が萌芽した。PW、SB および N55×6PS の50%萌芽に要する低温期間は45～60日であった。LA および 6PS の越冬芽は調べた中で最も休眠が深く、60日間の低温処理でもほとんど萌芽しなかった。用いた品種・系統の *W14/15* 対立遺伝子型を図中に示したが、この対立遺伝子型と萌芽率との相関は見られなかった。また、LA、SB、および PW はササリンドウ (*G. scabra*) とエゾリンドウ (*G. triflora*) の種間交配種であり、K2C はエゾオヤマリンドウ (*G. triflora f. montana*) であるが、これらの遺伝的背景も萌芽率との相関はなかった。

(3) *W14/W15* 遺伝子型と枯死率

この実験では、低温処理による傷害の程度を知る目的で越冬芽の枯死率も調べた（図 19）。その結果、驚いたことに、品種・系統によっては越冬芽が休眠後一定期間内に低温に晒されないと枯死に至ることがわかった（図 19）。品種 PW、SB の越冬芽は、低温処理しないと PW は100%、SB は75%が枯死したが、

9月下旬

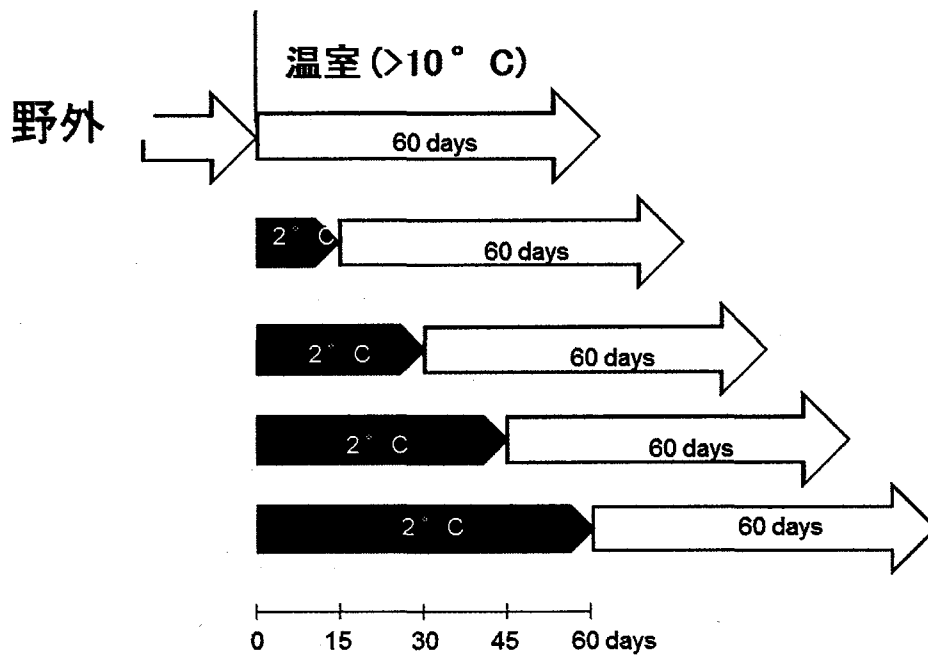


図17 休眠の深さ(萌芽に要する低温期間の長さ)の解析実験ストラテジー
野外でポット栽培し、一定期間2°Cの低温処理をした後、温室に戻して60日間生育させ、萌芽数を計数した。

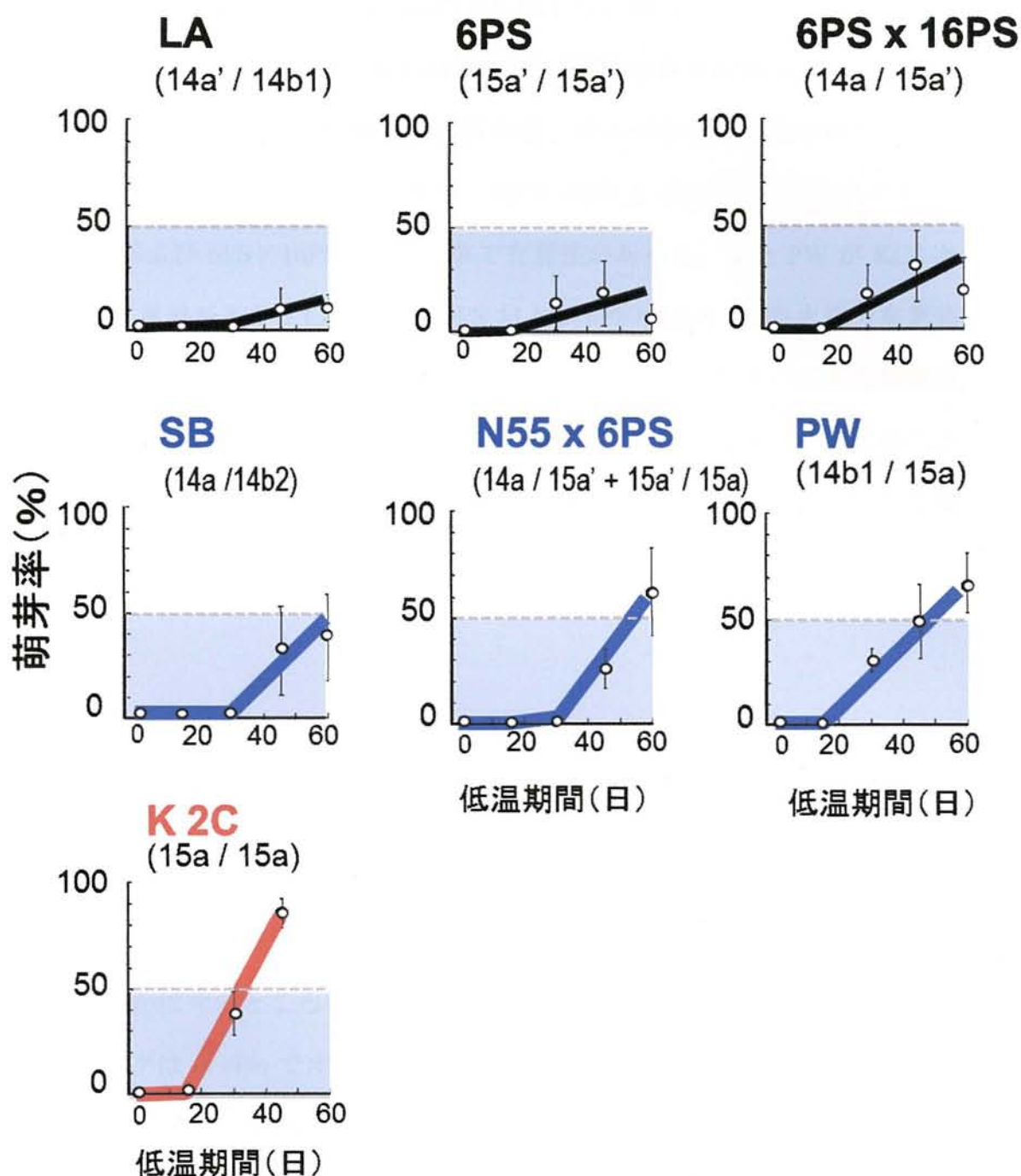


図18 低温処理の長さとの萌芽率(%)の関係

各低温処理区とも各品種・系統につき5~7株を用いた。

萌芽率は1株あたり萌芽数/1株あたり越冬芽数×100より求めた。

各品種・系統別に、品種名略記(表5参照)、遺伝子型(図8参照)、低温処理日数ごとの萌芽率の平均値、標準誤差および平均値の近似曲線を示した。

15~30 日の低温処理でその枯死率は大きく低下し、30 日の低温処理では、PW は 25%、SB は 46%になった。それに対して、K2C は 0 日の低温処理でも越冬芽の枯死はなかった。二元配置分散分析の後、チューキーの多重比較検定を行ったところ、枯死率の品種による差は、SB が K2C と 1%水準で有意差があり、N55×6PS および 6PS×16PS と 5%水準で有意差があった。また PW が KC2 と 1%水準で有意差があり、LA、N55×6PS および 6PS×16PS と 5%水準で有意差があった。また、枯死率の低温期間による差は、0 日および 15 の低温処理区が 30 日および 45 日の低温処理区に対して、1%水準で有意差があった。このことから、品種間差は大きいですが、低温処理をしないと越冬芽の枯死率は高くなる傾向があった。

4. 考察

本研究ではリンドウ越冬芽の越冬生存率が *W14/15* 遺伝子の対立遺伝子型と相関することを示した。*W14/15* 遺伝子がコードしているエステラーゼ、*W14/15* タンパク質 (Takahashi et al. 2006; Hikage et al. 2007) が耐寒性付与に直接働いているか否かは今のところ不明であるが、この酵素タンパク質のシロイヌナズナホモログは *in vivo* でオーキシシンやアブシジン酸、ジャスモン酸などのメチルエステルの脱メチル化に関与することが示唆されている (Yang et al., 2008) ことから、これら植物ホルモンの活性を制御することによって耐寒性強弱 (越冬生存率) を制御している可能性がある。もちろん、*W14/15* 遺伝子と同一染色体上でリンクする耐寒性付与遺伝子がある可能性も否定できない。いずれにしても、*W14/15* 対立遺伝子型は越冬芽の耐寒性強弱を予測できるマーカーとして有用であることを本研究は示した。

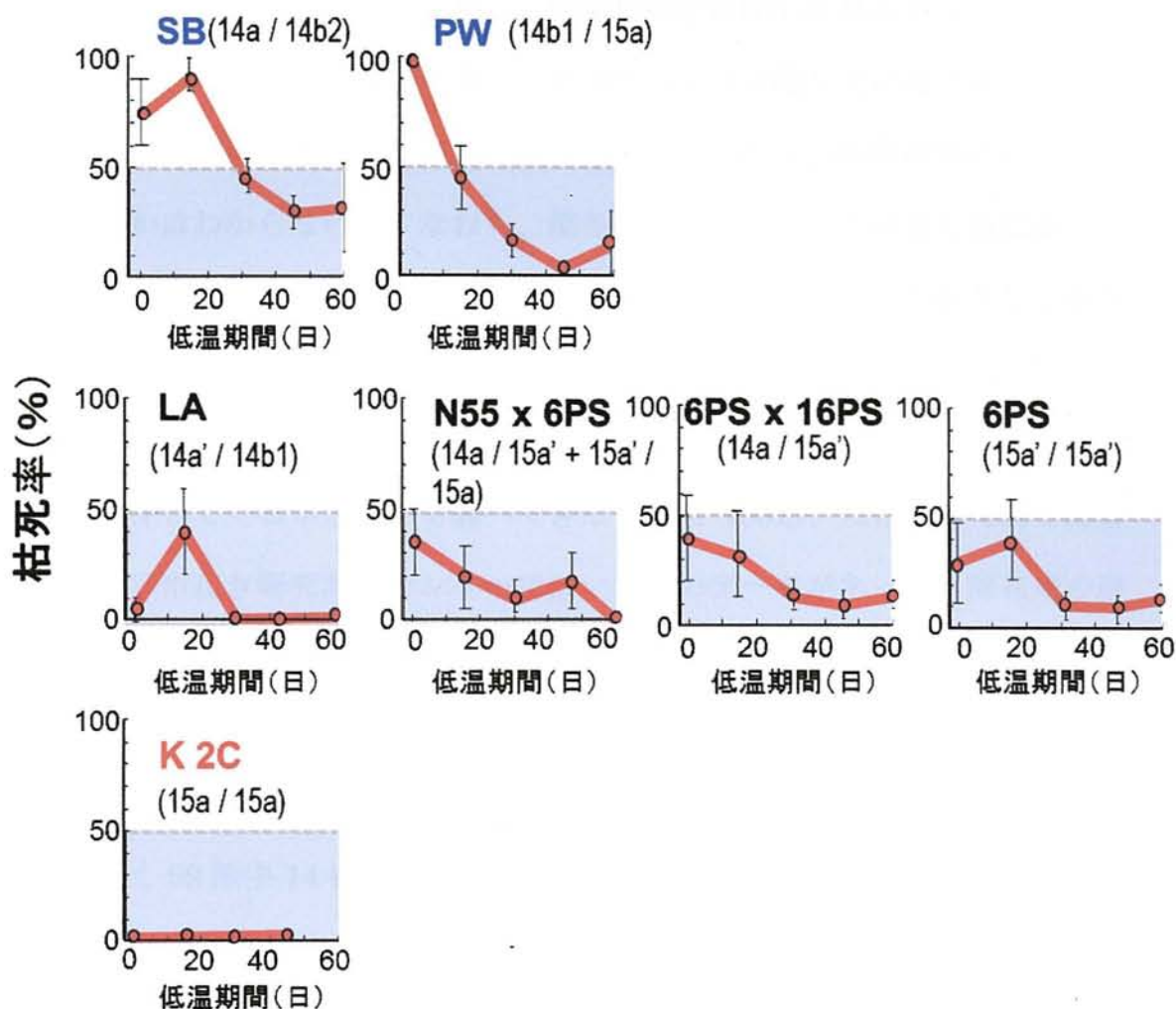


図19 低温期間の長さとお越冬芽の枯死

図17に示した低温処理終了後60日目に枯死越冬芽数を調べた。

各低温処理区とも5~7株を用い、枯死率は1株あたり枯死越冬芽数/1株あたり全越冬芽数×100から求めた。

各品種・系統別に、品種名略記(表5参照)、遺伝子型(図8参照)、低温処理日数ごとの枯死率の平均値、標準誤差を示し、平均値を棒線で結んだ。

二元配置分散分析の後、チューキーの多重比較検定を行ったところ、枯死率の品種による差は、SBがK2Cと1%水準で有意差があり、N55×6PSおよび6PS×16PSと5%水準で有意差があった。またPWがK2Cと1%水準で有意差があり、LA、N55×6PSおよび6PS×16PSと5%水準で有意差があった。また、枯死率の低温期間による差は、0日および15の低温処理区が30日および45日の低温処理区に対して、1%水準で有意差があった。

本研究では *W14/15* 遺伝子型と休眠打破に必要な低温被曝量との間には明確な相関はみられなかった。しかし、低温処理を開始した日が 9 月 30 日であったため、この時の越冬芽の生理的状态はたしかに休眠していること、すなわち萌芽してこないことは確認できたが、どの程度の深さの休眠状態になっていたかどうかはわからない。すなわち、越冬芽の状態によってはどんなに長い低温処理を行っても萌芽してこない可能性もある。夏や秋に低温処理をして萌芽してくるかどうかを調べた報告はなく、これまでに行われてきた休眠の深さを調べる試験は、野外で生育している株を温室に 12 月から 1 月に持ち込み、その株が萌芽してくるかどうかで調べてきた (吉池 1992)。ただ、未発表であるが、八幡平市花き研究開発センターでは、以下のデータがあった。開花期の違う AZ、Y8、Aki-6PS、N27、および GSW を用いて、9cm ポットに入れて野外で生育させた 2 年生の株を用いて、2010 年 7 月 5 日から 9 月 15 日までの 70 日間 2°C の低温処理を行ったところ、未萌芽株の発生割合 (%) は、GSW が最も低く 99 株中 14 株(14.1%)、次に 6PS が 59 株中 10 株(16.9%)、Y8 が 135 株中 47 株(34.8%)、N27 が 116 株中 49 株(42.2%)、AZ が 85 株中 66 株(77.6%) になった。AZ、Y8、N27、Aki-6PS および GSW の野外での開花期はそれぞれ 8 月上旬、8 月下旬、9 月中旬、9 月下旬、10 月上旬である。開花期の早い品種ほど 70 日の低温処理を行っても越冬芽が萌芽してこない傾向があるように見えた。また、低温処理終了後 60 目の調査で萌芽してこない株はすべて欠株となった。越冬芽の休眠が深い場合は、70 日の低温処理でも萌芽しないことを確認できたので、休眠の深さを調べるには、すべての品種・系統が低温処理期間内に萌芽してくる時期であることが必要であると考えられる。本研究における 9 月 30 日からの低温被曝試験は低温処理日数が 60 日行ってもほとんど未萌芽である系統があった (LA と 6PS) ので、そのような系統は萌芽してこな

い越冬芽のステージであった可能性が高く、この実験により休眠の深さを比較することはできないと思われる。越冬芽が最も深く休眠する時期は品種によって異なるので、休眠のステージをそろえて低温処理するには、それぞれの品種の休眠が最も深くなる時期を知る必要がある。たとえば開花期の休眠が最も深い時期であると仮定すると、本実験でもそうであったように、その時期に低温処理をしても萌芽してこない可能性が高いので、いろいろの品種を開花期から30日したら低温処理を開始するなど、低温処理期間内に萌芽できるようにして試験する必要がある。

本研究では、低温被爆を受けないと枯死する越冬芽があり、それには品種間差があることがわかった。PW や SB は低温被爆がなされないままであると越冬芽が枯死する系統であった。今回ポット栽培試験した品種・系統の平均的な開花時(茎頂点のつぼみの50%が色づく日は6PSが7月下旬、K2Cが8月上旬、6PS×16PS および N55×6PS が8月下旬、PW、LA および SB が9月中旬であることから、越冬芽の形成時期も品種・系統によって異なり、開花期から推察すると6PSやK2Cの越冬芽はほかの品種よりも早く形成されていたと思われる。そうであれば、6PSやK2Cの越冬芽はその形成時から低温被爆までの期間が長いにもかかわらず枯死率が低かったことになる。これは、越冬芽が低温被爆を受けない状態がつづいたときは、品種や系統により越冬芽が生存し続ける能力に差があることを意味している。また、圃場にリンドウを定植した場合、越冬芽の形成時期は実生1年苗と2年生株の間で大きな違いがあり、実生2年株では実生1年苗に比べ40~60日早くなる(佐藤ら1988)。従って、越冬芽が冬期に低温被爆を受けるまでの期間は品種や系統さらに定植からの年数によって異なる。また、今回の試験では定植時(6月上旬)に茎葉にジベレリン処理をしていることから実生1年生苗の越冬芽の形成時期はさらに遅くなっていると思

われる。これらの点は今後さらに検討する必要がある。SB および PW の遺伝子型はそれぞれ *W14a/W14b2*、*W14b1/W15a* であるので、もしかしたら、越冬生存率と同じく *W14b* を遺伝子型の一方に持つ遺伝子型が低温被爆しないときに枯死率と相関しているかもしれない。今後、6 PS との交配実験で確かめる必要がある。

第4章

総合考察

1. W14/15 遺伝子の多型と系統解析

本研究は、リンドウ属の核遺伝子の多型を用いて、種・品種・系統間の系統解析を行った最初の例である。本研究では 10 の W14/15 遺伝子のハプロタイプ (W15a、W15a'、W15b、W14a、W14a'、W14b1、W14b2、W14b2'、W14b3 および W14c) に分けると、*G. triflora* は W15a、W15a'、W14a、W14a' のなかから 1 対、*G. scabra* は W14b1、W14b2、W14b2' のうちから 1 対、*G. pneumonanthe* は W14b3/13b3 および *G. septenfida* は W15b/15b を遺伝子型とすることがわかった。クロロプラスト DNA の塩基配列の研究では、*G. triflora*、*G. scabra* および *G. pneumonanthe* は *Pneumonanthe* 節に属し同じハプロタイプであり、NJ 法や strict consensus tree により分けることができなかった (Mishiba et al. 2009)。*G. triflora* と *G. scabra* の区別については、これまでの RAPD 法 (城守ら、2000) では *G. scabra* に属する OZ を *G. triflora* に分類するなどまだ正確な区別のできる方法はこれまで開発されておらず、W14/15 遺伝子の遺伝子型による解析で、はじめて詳しい系統解析が可能になったといえる。

近年日本のリンドウと外国種を交配し、新規性のあるリンドウを育種する研究が盛んに行われている。特にも、胚珠培養 (Morgan 2004) や倍数体作出技術 (Morgan et al. 2003) を駆使して種間雑種を作出した SS は、非公開の種と *G. scabra* を用いて育種したものである (Morgan 私信) が、本研究により、SS は W14b1/14c1/14c2 という遺伝子型であり、確かに *G. scabra* の W14b1、本研究で *G. triflora*、*G. scabra*、*G. pneumonanthe* および *G. septenfida* とは違う種として同定した W14c1 および W14c2 をもっていたので、種間雑種であることを証明し、しかも 3 倍体であることも明らかにできた。このように、本研究によってはじめてリンドウでも、種の区別はもちろんのこと、種間雑種

の判定、雑種の親の判定が可能となった。

品種識別についても、本研究により初めて1遺伝子での識別が可能になった。これまで、核遺伝子を用いた品種識別法としては SCAR マーカーが開発されている (Shimada et al. 2009)。これはいくつかのフラボノイド生合成遺伝子のイントロンの長さの違いを利用した SCAR マーカーで、これにより栄養系品種の識別を可能にしたものであるが、この方法では、簡易に識別できる利点がある一方、識別できない品種があると別のマーカーを探さなければいけない欠点がある。W14/15 遺伝子は1遺伝子の塩基配列をしらべることで確実に品種識別できることから、よりたしかな方法といえる。今後は SCAR マーカーによる簡易識別で識別できなかった品種・系統を詳細に調査するときこの遺伝子は有用であると思われる。

W14/15 遺伝子は、育種を行う上で有益な情報を与えてくれる。SS が非公開の種を交配親に使用していたことや、自然受粉で育成された LA が W14b2 遺伝子をもつことから、種間雑種であったことは、本研究ではじめて明らかになったが、そのほかにも、W14/15 遺伝子型がヘテロである個体を交配親に選定して育種を行えば、胚珠培養や花粉培養でできた個体が純系であることの証明、種間雑種を育成したときの雑種の判定、倍数性の確認などが容易にできることになり、今後育種の場面での利用が期待される。

2. W14/15 対立遺伝子の多型とリンドウの低温応答

本研究では、リンドウの「株落ち」現象を解明するための基礎的知見を得ることを目的としていたので、この章では、本研究で得られた知見をこれまでに得られた知見と比較して総合的に W14/15 遺伝子がどのように低温応答と相関

し、最終的に「株落ち」現象と関連しているかを考察したい。

(1) 越冬生存率

欠株の原因のひとつとして、越冬生存率の低下すなわち耐寒性の低下があげられる。本研究では *W14b* 遺伝子をもつ系統の越冬生存率が低いことを明らかにできた。しかし、*W14b1* や *W14b2* 以外の遺伝子の越冬生存率との相関についてはまだ明らかにしていない。

厳寒な山岳地帯にある野生種の *AZ* や *Kuro* は、*W15* 遺伝子をヘテロでもっていることから、もしかしたら *W15* 遺伝子が耐寒性と関連している可能性はある。また、たしかにエゾリンドウの F_1 品種も欠株発生率に品種間差があることから、*W14a/15a* 遺伝子型の F_1 品種から F_2 を展開して、数年にわたって遺伝子型別に越冬芽数を調査していく必要がある。

(2) 越冬前の越冬芽の枯死

越冬生存率のほかに越冬芽の越冬前の枯死も可能性としてあげられる。本研究においては、*PW* や *SB* は低温被爆がなされないままであると越冬芽が枯死する系統であった。これは、越冬芽が低温被爆を受けない状態がつづいたときは、品種や系統により越冬芽が生存し続ける能力に差があることを意味している。*K2C* は低温被爆期間がなくても越冬芽の枯死はない系統であった。*K2C* の開花期は 8 月上旬であり、開花期の早いエゾオヤマリンドウの系統である。越冬芽も 8 月にはできている。すなわち、越冬芽ができてから低温被爆をうけるまでの期間が長い系統である。本研究ではエゾオヤマリンドウは *W15* 遺伝

子を遺伝子型の一方または両方にもつことを明らかにしたが、*W15* 遺伝子は低温被爆を受ける前の期間が長い越冬芽の生存ともなんらかの相関があるのかもしれない。また、ササリンドウは *W14b* 遺伝子をホモにもつことも本研究で明らかにしたが、ササリンドウは一般的に開花期が 10 月～11 月と遅い傾向があり、越冬芽の形成も遅いと思われる。このような系統の越冬芽はできてからあまり時間がたたずに低温被爆すると考えられるので、低温被爆を受けなくても越冬芽を生存させ続けることは生態的には必要ないと考えられる。今後確かめなければいけないことであるが、ササリンドウの越冬芽は越冬芽形成後すぐに低温被爆を受けないばあいは枯死する可能性がある。SB や PW はエゾリンドウとササリンドウの種間雑種であり、*W14b* 遺伝子を遺伝子型の一方に持っている、開花期はともに 9 月中旬となっているため、越冬芽も 9 月下旬にはできていた。このような品種は越冬芽ができてから低温被爆するまでにある一定の期間があり、今回のように 2 か月間低温被爆されなかった場合は越冬芽が枯死するのは *W14b* 遺伝子をもっているササリンドウの越冬芽の特徴である可能性がある。このように、*W14b* 遺伝子は越冬生存率のみならず、越冬芽の低温被爆前の枯死とも相関している可能性が示唆される。

(3) 休眠の深さ

次に越冬芽の休眠と深い関わりがある越冬芽の萌芽に関して、エゾリンドウとの種間雑種品種「Showtime Spotlight」を用いた研究で、形成された越冬芽を 1 年にわたって経過観察したところ、萌芽してこない越冬芽はすべて 1 年以内に枯死にいたることが報告された (Samarakoon et al. 投稿予定)。本研究においても、低温処理終了後萌芽してこなかった越冬芽はその後すべて枯死した

ことを確認している。今回の低温処理試験では萌芽率と *W14/15* 遺伝子との間には相関関係を見出すことはできなかったが、すべての越冬芽が萌芽してこない株は最終的に枯死すること、および萌芽した越冬芽以外は最終的に枯死することから、リンドウの欠株率の品種間差の一因になっている可能性はある。

これまでの結果を総合的に考えると、越冬芽の形成数の不足、低温被爆前の越冬芽の枯死、越冬中の越冬芽の枯死、萌芽しない越冬芽の枯死のどれかにより、またはいくつか組み合わさって起きることで、結果的に大きな欠株率の差となってくると思われるが、*W14/15* 遺伝子型は、すくなくとも越冬中の枯死（耐寒性）とは相関しており、もしかしたら、越冬前の越冬芽の枯死とも相関している可能性がある。

(4) *W14/15* 遺伝子の機能の推定

W14/15 遺伝子は *Nicotiana tabacum* の salicylic acid-binding protein 2 (SABP2) と 53%の相同性を示したが、最近の研究で、この SABP2 はタバコで methyl salicylate esterase として働き、メチルサリチル酸 (MeSA) をサリチル酸 (SA) に変えて全身獲得抵抗性 (SAR; systemic acquired resistance) を誘導することがわかった (Park et al. 2007, Tripathi et al. 2010)。また、*W14/W15* 遺伝子と 54%の identity を持つ *Arabidopsis thaliana* の AtMES1 も SABP2 と同じ機能をもち、SAR を誘導することも報告された (Vlot 2008)。

リンドウの病気に関しては、キュウリモザイクウイルスの被害が大きいことから弱毒ウイルスによる病気被害の軽減について研究がなされてきた (高柳ら 2005)。これまでに、八幡平市では3種類の弱毒キュウリモザイクウイルスをリンドウ品種「安代の秋」に接種し、6年間にわたって圃場での栽培試験をし

たところ、栽培年数が長くなると欠株発生率は高くなっていくが、ウイルス接種区は無接種区に比較して低く、その差は栽培年数が長くなると顕著になることを明らかにしている。さらに、ウイルスの被害を弱毒キュウリモザイクウイルスで防ぐことができたことに加え、NDM-1 という弱毒ウイルスを接種した株はほかのウイルスを接種した株と比較して、顕著に欠株発生率が低いことがわかっている（日影ら 2005）。この理由はまだわかっていないが、ウイルス接種により SA が発生し、SAR が誘導されるなどの反応が起きて、その結果として欠株発生率が低下する可能性が考えられる。そうであるとする、W14/W15 遺伝子が MeSA を SA に変えて、SAR などを誘導し、土壌病害抵抗性等を高めて、結果として欠株発生率を低下させた可能性はあると考えられる。

また、W14/15 遺伝子と 57% の identity を示した *Arabidopsis thaliana* の AtMES は、methyl-3-acetic acid ester (MeIAA) の脱メチル化酵素としても働き、indole-3-acetic acid (IAA) の活性化と密接に関わっていることが報告された（Yang et al. 2008）。さらに W14/15 遺伝子は *Lycopersicon esculentum* の methyl jasmonate (MeJA) hydrolyzing esterase (MJE) (Stuhlfelder et al. 2002, 2004) と 47% の相同性を示した。MJE は生育に関わっているだけでなく、傷や病原体への反応において重要な役割を果たしている (Stuhlfelder et al. 2004)。非宿主病原体によって活性化され、病原体の感染への抵抗性を獲得する (Waspi et al. 1998)。W14/W15 タンパク質は CrPS、EIE とともに相同性を示した。これらのタンパク質もホルモン誘導や防御関連のシグナリング経路に関わるものである。たとえば、EIE はエチレンによって誘導される (Zong et al. 2001)。

α/β hydrolase fold superfamily は構造的に関連のある数多くのタンパク質からなっており、一連のファミリータンパク質は多様な触媒機能をもち、基質

特異性も幅がある (Holmquist 2000)。これは、このファミリーの各タンパク質は多機能性を持っている可能性があり、異なった細胞タイプでは異なったシグナル経路で異なった働きがある可能性がある。事実、トマトの MeJA を加水分解する MJE は、アブシジン酸 (ABA) やインドール酢酸 (IAA) のメチルエステルなどの基質に対しても十分にエステラーゼ活性を示す (Stuhlfelder et al. 2002)。CrPS は塩、エチレンおよび MeJA によって誘導され、ジベレリン酸によって阻害される (Carpin et al. 1997; Yahida et al. 1998; Gantet et al. 1998)。EIE や MJM は植物の重要なホルモンであるエチレンや ABA と関係しているようである。これらのホルモンは低温を含む非生物学的ストレスを制御している (Lui et al. 1998; Yu et al. 2001; Wang et al. 2004; Zhang et al. 2005)。ABA は低温耐性に関わるシグナリングの経路を発動する必須の転写因子を誘導している。

W14/15 遺伝子と相同性の高いタンパク質の機能が、SAR などの病害抵抗性であったり、IAA、JA などの植物ホルモンの活性化の制御であったりするということは、もしかしたら、*W14/15* 遺伝子は越冬芽の形成、越冬芽の越冬前の生存、休眠、越冬中の生存 (耐寒性)、萌芽のすべてと密接に関わっているかもしれない。

(5) 本研究の成果を活用した育種

本研究では、今日まで大きな問題であったササリンドウの「株落ち」の問題を、*W14b1* 遺伝子をマーカーとして用いることにより、解決できる可能性をはじめて示すことができた。*W14/15* 遺伝子の多型とリンドウの低温応答との相関を調べたところ、越冬生存率と *W14/15* 遺伝子型との間に相関関係がみられ

たことから、これらの遺伝子型は越冬生存率のマーカーになりうることがわかった。すなわち、事前に遺伝子型を調べておくことと、交配後代の個々の個体について遺伝子型を調べて選抜した後、越冬生存率の高い個体を選抜することにより、より効果的に越冬生存率の高い個体を選抜していくことができると期待される。

実際に育種現場で利用するには、*W14b* 遺伝子をもつと越冬生存率が低くなることは今回のポット試験で確かめることができたが、圃場レベルでも同じ現象が起こることを確認する必要がある。また、*W14/15* 遺伝子が育種形質上好ましくない遺伝子との連鎖がないかどうかを明らかにする必要がある。圃場では定植後 3 年目までは欠株はあまり生じないため、実際に確認するには 4～5 年の歳月を要するが、もし圃場でも同様の結果が得られた場合は、このマーカーを使用することで、育種期間の短縮が可能となり、育種上の大きな成果が期待できる。

摘 要

切り花リンドウは、いったん定植すると5年程度収穫するので、できるだけ長く生存して収穫できることが農業経営上もっとも重要である。近年、定植2～3年目で多くの株が枯死する品種もあり、問題となっている。

リンドウは、越冬前に地際に越冬芽を形成し、耐寒性を獲得し、冬期間休眠し、春に萌芽してくる。株の枯死は、この越冬芽の形成、耐寒性、および休眠と深く関わっている。

申請者の研究室では、リンドウ品種「安代の秋」の越冬芽に多く蓄積する2つのタンパク質 W14 及び W15 を同定し、それらが非常によく似たアミノ酸配列をもつこと、両タンパク質とも α/β ハイドロラーゼスーパーファミリーの持つ基本構造を有し、*in vitro* では実際にエステラーゼを示すこと、および両タンパク質をコードする遺伝子是对立遺伝子の関係にあることなどを明らかにしてきた。

W14 及び W15 が越冬芽に特に多く蓄積することは、それらが越冬芽の形成、耐寒性、あるいは休眠など低温に係わる生理機能に何らかの関与をしていることを示唆する。また、同一ではない W14 と W15 が対立遺伝子の産物であることは、それらの遺伝子（以下 *W14/15* 遺伝子と記す）に多型が存在することを示唆する。本研究はこのような視点に立ち、*W14/15* 遺伝子の多型解析を行うとともに、多型と越冬芽の低温応答との相関を解析した。

1. 品種間でみられる *W14/15* 遺伝子の多型

21 種類の品種・系統を用いて葉から DNA を抽出し、*W15* 遺伝子の塩基配列

をもとに設計したプライマーを用いて PCR を行い、その産物を pCR-Blunt ベクターにサブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、品種・系統により 3 箇所の RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) サイト、3 箇所の挿入/欠失サイトが存在することが判明した。これらのサイトの有無および他の 1 塩基多型などにより *W14/15* 遺伝子は 10 種類のハプロタイプ (*W15a*, *W15a'*, *W15b*, *W14a*, *W14a'*, *W14b1*, *W14b2*, *W14b2'*, *W14b3* および *W14c*) 分類することができた。

この多型により、*G. triflora*, *G. scabra*, *G. septemfida*, *G. pneumonanthe* など異なるリンドウの種 (species) を同定することが可能である。また、*G. triflora* (エゾリンドウ) や *G. scabra* (ササリンドウ) では上記の多型以外に幾つかの品種・系統特異的な SNP (Single Nucleotide Polymorphism) も存在したので、*W14/15* 遺伝子の多型は、栽培品種・系統の個体識別に用いることも可能である。

2. *W14/15* 対立遺伝子とリンドウ越冬芽の低温応答

次に、上記の *W14/15* 遺伝子多型とリンドウ越冬芽の耐寒性との相関を知るために、13 種類のリンドウ品種・系統をもちいてリンドウ越冬芽の越冬生存率を調べ、上記 10 種類のハプロタイプからなる対立遺伝子型との相関を調べた。

その結果、*W14b1* または *W14b2* ハプロタイプを対立遺伝子ペアの一方または両方に持つ品種・系統は低い越冬生存率を示すことが判明した。そこで、交配により上記ハプロタイプの遺伝子を別の越冬生存率の高い系統に導入したところ、これらのハプロタイプを対立遺伝子の一方にもつ系統は越冬生存率が低下した。従って、*W14/15* 遺伝子の多型は耐寒性予測マーカーになり得る。

以上のように、本研究では *W14/15* 遺伝子の多型解析を行い、10 種類のハプロタイプを同定した。さらに、この多型により、系統分類、品種識別が可能であることを示し、さらに耐寒性予測の遺伝子マーカーにもなり得ることを示した。このようなリンドウの種・系統の識別法の開発は本研究が初めてである。

謝辞

本研究を行うに当たり、研究テーマを頂き、直接ご指導頂きました堤賢一教授に深く感謝致します。そして、本研究に携わる上で随時適切なお指導を頂きました高畑義人教授、遠藤元庸前教授、斎藤靖史准教授、山下哲郎准教授に心から感謝申し上げます。

また、本研究を岩手大学寒冷バイオフィロントニア研究室と一緒に研究してくれた大学院生、学生の皆様、特に、高橋美穂氏、下平義孝氏、佐藤史氏、久米浩平氏、千葉さくら氏に心から感謝申し上げます。また、研究支援員として研究を手伝ってくださった、小栗清美氏、斉藤くれあ氏、渡辺修二氏に心から感謝申し上げます。また、岩手大学大学院農学研究科の土井寿子氏に心から感謝申し上げます。

また、本研究を進める上で、リンドウの品種・系統をご提供くださいました八幡平市、一般社団法人安代リンドウ開発、岩手県農業研究センターおよび The New Zealand Institute for Plant & Food Ltd. に深く感謝申し上げます。

また、多くのご助言、激励を頂きました八幡平市長田村正彦氏、八幡平市花き研究開発センター前所長吉池貞蔵氏、八幡平市花き研究開発センターの横山温氏、高橋亮氏、遠藤満氏、岩手生物工学研究センターの西原昌宏氏、中塚貴司氏、The New Zealand Institute for Plant & Food の Ed Morgan 氏に深く感謝いたします。

引用文献

- Berkowitz, O., R. Jost, S. Pollamann and J. Masle (2008) Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 3430-3447
- Carpin, S., L. Quelhazi, M. Filali, J.C. Chenieux, M. Rideau and S. Hamdi (1997) The relationship between the accumulation of a 28 Da polypeptide and that of indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *J. Plant Physiol.* 150: 452-457
- Cowles, C.R., J.N. Hirschhorn, D. Altshuler and E.S. Lander (2002) Detection of regulatory variation in mouse genes. *Nat. Genet.* 32: 432-437
- Do, H.M., J.K. Hong, H. W. Jung, S. H. Kim, J.H. Ham and B.K. Hwang (2003) Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonau campestris* pv. *Vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 196-205
- Doi, H., R. Takahashi, T. Hikage and Y. Takahata (2010) Embryogenesis and doubled haploid production from anther culture in gentian (*Gentiana triflora*). *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 102: 27-33
- Drea, S.C., N.T. Lao, K.H. Wolfe and T.A. Kavanagh (2006) Gene duplication, exon gain and neofunctionalization of OEP-16-related genes in land plants. *Plant J.* 46: 723-735
- Eason, J., M. Debenham, A. McLachlan and E. Morgan (2007) Novel

- red-flowered *Gentiana*: An emerging export cut flower crop from New Zealand. *Acta Hort.* 755:259-266
- Espartero, J., I. Sanchez-Aguayo and J.M. Pardo (1995) Molecular characterization of glyoxalase I from a higher plant; upregulation by stress. *Plant Mol. Biol.* 29: 1223-1233
- Gantet, P., N. Imbault, M. Thiersault and Doitreau P (1998) Necessity of a functional octadecanoic pathway for indole alkaloid synthesis by *Catharanthus roseus* cell suspensions cultured in auxin-starved medium. *Plant Cell Physiol.* 39: 220-225
- Gielly, L. and P. Tabert (1996) A phylogeny of European gentians inferred from chloroplast trnL(UAA) intron sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 120: 57-75
- Gielly, L., Y.M.Yuan, P. Kupfer and P. Taberlet (1996) A phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: chloroplast trnL (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 5:460-466
- Glazier, A.M., J.H. Nadeau and T. J. Aitman (2002) Finding genes that underlie complex traits. *Science* 298: 2345-2349
- Guo, M., M.A. Rupe, C. Zinselmeier, J. Habben, B.A. Bowen and O.S. Smith (2004) Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell* 16: 1707-1716
- Heikinheimo, P., A.Goldman, C.Jffries and D.L.Ollis (1999) Of barn owls and bankers: a lush variety of alpha/beta hydrolases. *Structure Fold Des.* 7: R141-R146

- 日影孝志 (2009) 八幡平市の花き (りんどう) の振興策 岩手経済研究
324:6-15
- Hikage, T., Y. Saitoh, C. Tanaka-Saitoh, H. Hagami, F. Satou, Y. Shimotai, Y. Nakano, M. Takahashi and K. Tsutsumi (2007) Structure and allele-specific expression variation of novel alpha/beta hydrolase fold proteins in gentian plants. *Mol. Genet. Genomics* 278: 95-104
- 日影孝志・吉池貞蔵・小湊正幸・新子泰規・佐山春樹 (2005) 弱毒キュウリモザイクウイルス接種によるリンドウの6年間のウイルス防除効果. 日本植物病理学会報 69 : 320-321
- Ho, T.N. and S.W. Liu (2001) A worldwide monograph of *Gentiana*. Science press, Beijing, China
- Holmquist, M. (2000) Alpha/beta hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1:209-235
- 城守 寛・中村郁郎・亀谷七七子・高畑義人 (2000) ササリンドウ (*Gentiana scabra*) およびエゾリンドウ (*G. triflora*) の RAPD 法および SCAR マーカーによる系統識別. 育種学研究 2: 81-87
- Knight, J.C. (2004) Allelic-specific gene expression uncovered. *Trends Genet.* 20: 113-116
- Knight, H., D.Z. Zarka, H. Okamoto, M.F. Tomashow and M.R. Knight (2004) Abscisic acid induces CBF gene transcripton and subsequent induction of cold-regulated genes via the CRT promoter element. *Plant Physiol.* 135: 1710-1717
- Koehein, F. (1991) GENTIANS. Christopher helm, Ltd.,UK
- Kumar, S., M.Nei, J. Dudley and K. Tamura (2008) MEGA: a

- biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9:299-306
- Kumar, D. and D.F. Klessing (2003) High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 16101-16106
- Lee, S.P., Y. Guo, M. Ohta, L.Xiong, B. Stevenson and J.K. Zhu (2002) LOS2, a genetic locus required for cold-responsive gene transcription encodes a bi-functional enolase. *EMBO J.* 21:2692-2702
- Lemenager, D., L. Ouelhazi, S. Mahrng, B. Veau, B. St-Pierre, M. Rideau, J. Aguirreolea, V. Burlat and M. Clastre (2005) Purification, molecular cloning, and cell-specific gene expression of alkaloid-accumulation associated protein CrPS in *Catharanthus roseus*. *J. Exp. Bot.* 56:1221-1228
- Liu, Q., M. Kasuga, Y. Sakuma, H. Abe, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406
- Mishiba, K., K. Yamane, Y. Nakano, S. Yamamura, J. Abe, H. Kawamura, Y. Takahata and M. Nishihara (2009) Genetic relationships in the genus *Gentiana* based on chloroplast DNA sequence data and nuclear DNA content. *Breeding Sci.* 59: 119-127

- Morgan, E.R. (2004) Use of in ovulo embryo culture to produce interspecific hybrids between *Gentiana triflora* and *Gentiana lutea*. New Zealand J. Crop Hort. Sci. 32: 343-347
- Morgan, E.R., B.L. Hofman and J.E. Grant (2003) Production of tetraploid *Gentiana triflora* var. *japonica* 'Royal Blue' plants. New Zealand J. Crop Hort. Sci. 31: 65-68
- Najami, N., T. Janda, W. Barriah, G. Kayam, M. Tal, M. Guy and M. Volokita (2008) Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. Mol. Genet. Genomics. 279: 171-182
- 農林水産省「花き生産出荷統計」1980年～2004年
- O' Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Bio. Chem. 250: 4007-4021
- Park, S.W., E. Kaimoyo, D. Kumar, S. Mosher and D.F. Klessig (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. Science 318: 113-116
- 佐藤裕則・小野恵二・勝木謙蔵・岡崎幸吉 (1988) リンドウの越冬芽の発生・発育とさし芽法 山形園試報告 7 : 24-41
- 佐藤光子 (1986) 組織培養による福島県リンドウの大量増殖と新系統育成 第1報 組織培養苗の冬至芽形成について. 園学雑 昭 63 東北支部 : 59-60
- Shigeoka, S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta and K. Yoshimura (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J. Exp. Bot. 53: 1305-1319

- Shirasawa K., Shiokai S., Yamaguchi M., Kishitani S. and T. Nishio (2006)
 Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar
 identification in rice. *Theor. Appl. Genet.* 113: 147-155
- Shimada, N., T. Nakatsuka, Y. Nakano, Y. Kakizaki, Y. Abe, T. Hikage, and
 M. Nishihara (2009) Identification of gentian cultivars using SCAR
 markers based on intron-length polymorphisms of flavonoid
 biosynthetic genes. *Sci. Hort.* 119: 292-296
- Smirnoff, N. (1998) Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin.*
Biotech. 9: 214-219
- Stuhlfelder, C., F. Lottspersch and M.J. Mueller (2002) Purification and
 partial amino acid sequences of an esterase from tomato.
Phytochemistry 60: 233-240
- Stuhlfelder, C., M.J. Mueller and H. Warzecha (2004) Cloning and
 expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving
 esterase. *Eur. J. Biochem.* 271: 2976-2983
- Struwe, L., J.W. Kadereit, J. Klackenberg, S. Nilsson, K.B. Thiv M, von
 Hagen and V.A. Albert (2002) Systematics, character evolution, and
 biogeography of *Gentianaceae*, inducing a new tribal and subtribal
 classification. In: Struwe L, Albert VA (eds.)
Gentianaceae-Systematics and Natural History. Cambridge
 University Press, UK, pp21-309
- 空閑宏典 (2006) リンドウ. “農業技術体系花卉編 5 育種苗生産バイオテク活
 用” 農産漁村文化協会, 東京. 330: 100-106
- Hikage, T., Y. Saitoh, C. Tanaka-Saitoh, H. Hagami, F. Satou, Y. Shimotai, Y.

- Nakano, M. Takahashi and K. Tsutsumi (2007) Structure and allele-specific expression variation of novel alpha/beta hydrolase fold proteins in gentian plants. *Mol. Genet. Genomics* 278: 95-104
- Takahashi, M., T. Hikage, T. Yamashita, Y. Saitoh, M. Endou and K. Tsutsumi (2006) Stress-related proteins are specifically expressed under non-stress conditions in the overwinter buds of the gentian plant *Gentiana triflora*. *Breed. Sci.* 56:39-46
- 高柳直幸・山田恵・小湊正幸・新子泰規・佐山春樹・日影孝志 (2005) サテライト RNA を持つ弱毒キュウリモザイクウイルス (CMV) を接種したリンドウ苗は、強毒 CMV が感染するとサテライト RNA が増える。日本植物病理学会報 71 : 239
- Tripathi, D., Y.L. Jiang and D. Kumar (2010) SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Lett.* 548 (15); 3458-63
- pression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *Plant J.* 17: 385-395
- Veena, V., S. Reddy and S.K. Sopory (1999) Glyoxalase I from *Brassica juncea*: molecular cloning, regulation and its over-ex
- Vlot, A.C., P.P. Liu, R.K. Cameron, S.W. Park, Y. Yang, D. Kumar, F. Zhou, T. Padukkavidana, C. Gustafsson, E. Pichersky and D.F. Klessig (2008) Identification of likely orthologs of tobacco salicylic acid-binding protein 2 and their role in systemic acquired resistance in

- Arabidopsis thaliana*. Plant J. 56:445-456
- Wang, H., Z. Huang, Q. Chen, Z. Zhang, H. Zhang, Y. Wu, D. Huang and R. Huang (2004) Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. Plant Mol. Biol. 55: 183-192
- Waspi, C., B. Misteli, M. Hasslacher, A. Jandrositz, S.D. Kohlwein, H. Schwab and R. Dudler (1998) The defense-related rice Pir7b encodes an α/β hydrolase fold protein exhibiting esterase activity toward naphthol AS-esters. Eur. J. Biochem. 254: 32-37
- Yahida, A., C. Kevers, T. Caspar, J.C. Chenieux, M. Ridau and J. Creche (1998) Cytokinines and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. Plant Sci. 133:9-15
- Yan, H., W. Yuan, V.E. Veluculescu, B. Vogelstein and K.W. Kinzler (2002) Allelic variation in human gene expression. Science 297: 1143
- 米澤信道・河野昭一 (1989) 日本産リンドウ属リンドウ節植物の変異性と分類学的地位 Acta. Phytotax Geobot. 40: 13-30
- 吉池貞蔵 (1992) “花専科育種と栽培リンドウ”, 誠文堂新光社, 東京
- Samarakoon, U. C., K.A. Funnell, D.J. Woolly, G.K. Burge and E.R. Morgan (2010) Crown Buds in Gentian: Appearance, Shoot Emergence and Development. In press.
- Yang, Y., R. Xu, C-J. Ma, A.C. Vlot, D.F. Klessing and E. Pichersky (2008) Inactive methyl indole-3-acetic acid can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the AtMES esterase family of

Arabidopsis. Plant Physiol. 147:1034-1045

Yu, X.M., M. Griffith and S.B. Wiseman (2001) Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. Plant Physiol. 126: 1232-1240

Zhang, X., Z. Zhang, J. Chen, Q. Chen, X.C. Wang and R. Huang (2005) Expressing TERF1 in tobacco enhances drought tolerance and abscisic acid sensitivity during seedling development. Planta 222: 494-501

Zong, G.Y., R. Goren, J. Riov, E.C. Sisler and D. Holland (2001) Characterization of an ethylene-induced esterase from *Citrus siensis* by competitive hybridization. Physiol. Plant 113: 267-274