

| | |
|-------------|--|
| 氏名 | 中野 玄 |
| 学位（専攻分野の名称） | 博士（農学） |
| 学位記番号 | 甲第776号 |
| 学位授与の日付 | 平成31年3月21日 |
| 学位論文題目 | トマトの早期開花性と草姿に関わる QTL 解析 |
| 論文審査委員 | 主査 教授・博士（農学） 峯 洋子 教授・博士（農学） 雨木若慶 准教授・博士（農学） 西尾善太 農学博士 杉山信男* |

論文内容の要旨

第1章 研究の背景と目的

施設栽培トマトでは、年間収量を高めることが経営上重要であるとされるが、わが国のトマトの年間収量は1980年代以降 $10\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ 以下でほぼ横ばいである。わが国のような高温多湿地域における栽培では、夏季の高温による減収を抑えることが重要である。高温による負の影響を抑え、年間収量を向上させる栽培法の一つとして、栽植密度を高め、収穫を第1～3花房で打ち切る、低段密植栽培が提案されている。この栽培法では、1株あたりの収量は減少するが、年間作付け回数を増加させることで面積あたりの年間収量を維持、あるいは向上させることができる。低段密植栽培の特性を十分に発揮させるためには、第1～3花房の開花や収穫までの日数が短く、また密植条件下でも高い群落光合成速度を維持できる品種の育成が必要であると考えられるが、低段密植栽培に向けた品種育成はほとんど行われていない。

開花時期は発芽、花芽分化、花芽発達などの諸過程に分割することができ、それぞれが異なる機作によって制御されていると考えられる。しかし、これまで行われてきた花成に関する研究では、開花時期は花芽分化時期によって左右されると考え、発芽や花芽発達過程については考慮されていない場合が多い。また、花芽分化までの日数（DFI）は、第1花房下葉数（LN）と葉原基が一つ分化するために要する日数（PLA）の積であるが、PLAを制御する量的形質遺伝子座（QTL）についてはほとんど調べられていない。さらに、低段密植栽培では相互遮蔽によって受光量が低下するので、密植条件下での受光態勢に優れた草姿を持つ品種の育成、利用が重要と考えられるが、草姿に関わる QTL についての研究例は極めて少ない。

有用形質の QTL 近傍に位置する DNA マーカーの遺伝子型にもとづいて選抜（MAS）を行うことによって効率的に育種を進めることができる。しかし、QTL×QTL（エピスタシス）交互作用や QE 効果（QTL×環境交互作用）によって、導入した QTL の効果が打ち消

*東京農業大学 元教授

される場合がある。したがって、環境条件や遺伝的背景が異なっても安定的に効果を発現する QTL を見出すことが育種上、重要になるが、エピスタシスや QE については、まだ十分に調べられてはいない。

そこで本研究では、(1) 開花時期を花芽分化、発芽、子葉展開などの諸過程に分け、戻し交雑自殖系 (BIL) を用いた QTL 解析を行い、(2) QTL 解析によって検出された QTL 領域のみを野生種の染色体断片で置換した準同質遺伝子系統 (NIL) を複数の環境で栽培し、開花に関わる QTL の効果に及ぼす QE の影響を評価すること、また (3) 密植条件に適した草姿 (葉の角度や広がり) に関わる QTL について調査し、開花に関わる QTL との関連について検討することを目的とした。

第 2 章 開花日数ならびに開花に至るまでの諸過程に関わる QTL 解析

第 1 節 花芽分化時期についての QTL 解析

トマトの播種から開花までの日数 (DTF) を子葉展開や花芽分化といった素過程に分割した研究はほとんどなく、播種から開花までの、いずれの発達過程に関わる QTL によって DTF が制御されているのかは不明である。そこで、トマト栽培種 *Solanum lycopersicum* ‘M570018’ と近縁野生種 *S. pimpinellifolium* (PI124039) の交配に由来する BC₁F₇₋₈ 世代 (BIL) 111 系統を春と秋、各 1 回の栽培で DTF と LN を調べ、播種日を 4 回に変えた実験で DFI と子葉展開までの日数 (COT) を調べ、QTL 解析を行った。DFI は実体顕微鏡で茎頂分裂組織を観察して決定した。

QTL 解析の結果、第 1, 7 染色体に DTF QTL が検出された。また、第 3, 4, 6, 7 染色体に DFI QTL が検出され、第 3, 7 染色体の DFI QTL が検出された領域に LN QTL が検出された。第 7 染色体の DFI QTL, LN QTL が検出された領域と DTF QTL が検出された領域は一致した。一方、COT を制御する QTL は第 1 染色体に二つ、第 4 染色体に一つ検出された。これらのうち、第 1 染色体に検出された二つの QTL のうちの一つ (*cot1-1*) と第 4 染色体の QTL (*cot4*) は DTF QTL と同じ領域に検出された。同じ植物材料を用いた先行研究では、第 1, 7 染色体の他、本実験で DFI QTL や LN QTL が検出された第 3, 4, 6 染色体の領域に DTF QTL が検出されている。さらに、これら DTF QTL, DFI QTL, LN QTL, COT QTL は相加効果の方向が同じであった。以上の結果から、DTF を制御している QTL として DFI QTL と LN QTL が重要であるが、COT QTL も DTF の制御に関与していることが示唆された。

第 2 節 発芽関連形質についての QTL 解析

COT は発芽の早晩の影響を受けやすいと考えられるが、発芽に関する QTL についてはまだ十分に調べられてはいない。そこで第 2 節では、BIL を用いて 25°C と 15°C の 2 つの発芽温度で QTL 解析を行い、発芽時期を制御する QTL と QE を調べ、発芽温度 (環境) に関

わらず安定的に発現する QTL を見出すことを目的とした。第 1 節と同じ BIL 111 系統を用い、発芽に関わる形質として最終発芽率 (FGP), FGP の 50%, 90% に達するまでの日数 (GT_{50} , GT_{90}), 平均発芽日数 (MGT), MGT の変動係数 (COVAR) について QTL 解析を行った。

その結果, MGT, GT_{50} , GT_{90} に関わる QTL が第 1, 2, 3 染色体にそれぞれ一つずつ検出され, このうち第 1 染色体に検出された QTL は第 1 節で DTF QTL, COT QTL が検出された領域に検出された。FGP に関わる QTL は第 3 染色体の MGT, GT_{50} , GT_{90} に関わる QTL と同じ位置に一つ, COVAR に関わる QTL は単独で一つ検出された。

発芽に関わる QTL のほとんどは QE を示し, 特定の発芽温度では効果が打ち消された。QE を示さず, 安定的な効果を発現する QTL は第 3 染色体に検出された MGT, GT_{50} , GT_{90} QTL で, この QTL は野生種由来の対立遺伝子が発芽時期を遅らせる方向に働いた。したがって, 第 3 染色体に検出された発芽に関わる QTL を早期発芽性の育種に利用するのは難しいと考えられた。

第 3 節 葉間期についての QTL 解析

花芽分化の早晩は日数 (DFI), あるいは花芽分化までに分化した葉原基数 (LN) で表される。葉原基が分化してから次の葉原基が分化するまでの日数は葉間期 (PLA) と呼ばれるが, DFI, LN, PLA の間には $DFI = LN \times PLA$ の関係が成り立つ。しかし, DFI を LN と PLA に分解して解析した報告はない。そこで, 第 1 節で用いた BIL 111 系統を用い, 5 月, 6 月, 9 月に計 3 回実験を行った。子葉展開後毎日, 1 系統あたり 2 個体について実体顕微鏡下で葉原基数を計測し, 系統ごとに葉原基数を横軸, 子葉展開後日数を縦軸にプロットして近似直線を求め, その傾きを PLA とした。この実験の範囲内では, 花芽分化が認められる前にサンプルがなくなってしまう系統が大半であったため, LN を測定することが出来なかった。PLA QTL は第 1, 4 染色体にそれぞれ一つずつ検出された。このうち, 第 1 染色体の PLA QTL が検出された領域は第 1 節で DTF QTL が検出された領域と一致した。しかし, この領域には DFI QTL, LN QTL が検出されなかったため, これら QTL と PLA QTL の関係は明らかにできなかった。一方, 第 4 染色体の PLA QTL は相加効果の方向が第 1 染色体の PLA QTL とは逆で, 野生種由来の対立遺伝子が PLA を大きくする方向に働いた。

第 3 章 NIL を用いた QTL 解析

第 1 節 第 1 染色体の DTF QTL 検出領域

第 2 章で行った QTL 解析によって, 第 1 染色体のマーカー TGS0308~C2_At5g49480 近傍には, DTF, COT, MGT, GT_{50} , GT_{90} , PLA を制御する QTL がまとまって検出され, これら QTL では野生種由来の対立遺伝子が日数を短縮する方向に働いていることが明らかとなった。しかし, DTF の制御に重要な役割を果たしている DFI QTL は, この領域には

検出されなかった。組み換え近交系や BIL のような通常の QTL 解析集団では比較的効果の小さい QTL を検出することは難しいとされる。そこで本実験では、TGS0308～C2_At5g49480 を野生種ホモ型に置き換え、その他の領域をすべて栽培種ホモ型にした NIL を育成し、DTF に関連する過程として COT, DFI, DMB (子葉展開から肉眼で蕾が見えるようになるまでの日数), FDD (蕾が見えるようになってから開花までの日数), LN を、COT に関連する形質として FGP, MGT, GT₅₀, GT₉₀, COVAR を、DFI を構成する要素として LN と PLA を栽培種と比較し、この領域にこれら QTL が存在するかどうかを確かめた。NIL (87-132 系統) と両親の栽培試験を計 9 回行い、COT, DMB, FDD, DTF, DFI, LN を調査した。その結果、DTF では 6 回、COT と DMB では 5 回、FDD では 2 回、LN では 1 回の試験において、栽培種よりも 87-132 系統で有意に日数が短く、葉数が少なくなった。DFI については、9 回中 8 回の試験で花芽分化が早まり、うち 5 回で 2 日以上花芽分化が早まった。

15℃と 25℃で発芽試験を行い、FGP, MGT, GT₅₀, GT₉₀, COVAR を調査したところ、15℃条件での MGT, GT₉₀ は栽培種に比べ、87-132 系統で有意に短くなったが、FGP, GT₅₀, COVAR に関しては栽培種と 87-132 系統間に有意な差は認められなかった。一方 25℃条件下の 87-132 系統では栽培種に比べ、FGP が低く、その他の形質は有意に大きくなった。

87-132 系統と両親を計 3 回栽培し、DFI, PLA, LN を測定した。その結果、DFI と PLA については、DFI, PLA とともに 87-132 系統では栽培種より短くなった。一方、LN には有意差がなかった。

以上の結果から、第 1 染色体の TGS0308～C2_At5g49480 近傍の野生種由来の染色体断片は、COT, DMB, DFI を短縮させる働きを示すことが明らかとなった。QE の影響は発芽に関わる形質で大きく、野生種由来の対立遺伝子が 15℃では発芽を早めたが、25℃では逆に遅らせた。また LN に対する影響はほとんどなく、主に PLA QTL の効果が DFI に影響し、その結果 DTF にも影響を及ぼしていると推察された。

第 2 節 第 3 染色体の DFI QTL 検出領域

第 2 章第 1 節では 4 つの DFI QTL が検出されたが、野生種由来の対立遺伝子が花芽分化時期を遅らせる方向に働くのは、第 3 染色体の DFI QTL だけであった。さらに、この DFI QTL 領域には、LN QTL が検出されており、この QTL も LN を増加させ、開花時期を遅らせる方向に働いた。しかし、この領域に DTF に関連する過程である COT, DMB, FDD を増加させる QTL が存在するかどうかは明らかになっていない。野生種由来の対立遺伝子が開花時期を遅らせる QTL は、早期開花性品種の育成に利用することは難しいが、トマトの開花メカニズムを解明するためには必要な知見である。そこで本実験では、第 3 染色体に検出した DFI QTL に着目し、この QTL を含む領域(マーカー CBF～LELAT59G～TGS0103) が野生種ホモ型となった NIL を育成し、COT, DMB, FDD や発芽時期に関わる形質を栽

培種と比較した。81-18 系統は CBF~TGS0103 近傍, 81-28 系統は CBF 近傍, 81-64 系統は LELAT59G~TGS0103 近傍に野生種の染色体断片を持っており, その他の領域はすべて栽培種ホモ型であった。野生種, 栽培種, 3 つの NIL について開花時期に関連する過程を調査した結果, COT は 3 つの NIL すべてで栽培種よりも短くなった。DMB と LN に関しては, 81-64, 81-18 系統で DMB は長く, LN は大きくなり, 81-28 系統で DMB は短く, LN は小さくなった。FDD は 81-18 系統のみ栽培種よりも短くなった。DFI, DTF も栽培種と比較して, 81-64, 81-18 系統で長く, 81-28 系統で短くなった。これらの結果から, 81-28 系統が野生種由来の染色体断片を有する領域には DFI, DMB, LN を小さくして開花時期を早める QTL, 81-18, 81-64 系統が同様の染色体断片を有する領域には DMB を長く, LN を大きくして開花を遅延させる QTL が存在することが示された。81-18 系統と 81-64 系統を比較すると, 81-28 系統と同様, CBF 近傍領域に染色体置換断片を有する 81-18 系統は DMB, DTF, DFI が短くなった。これは, 81-18 系統では開花を早める QTL と遅延させる QTL の両方が働いた結果であると考えられた。この領域には, BIL を用いた実験では発芽に関わる QTL が検出されなかったが, 本実験ではいずれの NIL でも MGT, GT₉₀ が短縮されたことから, これら 3 つの NIL で置換断片が重複している領域に発芽時期を制御する QTL が存在する可能性が考えられた。

第 3 節 第 4 染色体の DFI QTL 検出領域

BIL の QTL 解析で DFI QTL が検出された 4 つの領域のうち第 3, 6, 7 染色体には LN QTL が検出されているが, 第 4 染色体の DFI QTL 領域には LN QTL だけでなく, PLA QTL も検出されなかった。このことは, 実際には LN QTL か PLA QTL が存在しているにもかかわらず, BIL を用いた通常の QTL 解析では検出できない, 効果の小さな QTL であった可能性が考えられる。そこで, 第 4 染色体のマーカー SSR603~TGS0411 近傍のみが野生種の染色体断片に置き換わった NIL (1-123 系統) を, 播種時期を変えて両親とともに栽培し, COT, DMB, FDD, DTF, DFI, LN を調査した。4 回の試験のうち, 1-123 系統の DTF は 4 回すべての試験で栽培種より有意に短くなった。COT は 2 回, DMB は 3 回, FDD は 3 回の試験で栽培種よりも有意に短く, LN は 1 回の試験でのみ有意に小さくなった。COT については 1 回の試験で, 栽培種よりも有意に長くなることが認められた。統計処理は行っていないが, DFI に関しては 4 回の試験すべてで栽培種よりも短くなった。

15°C と 25°C の温度条件で発芽試験を行い, 発芽に関わる形質を調査したが, 温度条件に関わらず, 栽培種と 1-123 系統で差はなかった。播種時期を 3 回に変えて両親と 1-123 系統を栽培し, DFI, LN, PLA を測定した結果, LN に有意差は認められなかったが, DFI, PLA は 3 回すべての実験で短くなった。

これらの結果から, 第 4 染色体のマーカー SSR603~TGS0411 近傍に存在する野生種由来の QTL は, 発芽に対する効果はなく, LN よりも主に, PLA の制御によって DFI に影響

を及ぼしていると考えられた。

第4章 草姿に関わる QTL 解析

群落光合成量はトマトの収量を決める要因の一つであり、群落の受光態勢などによって左右される。低段密植栽培のような密植条件では茎葉の相互遮蔽によって受光量が減少して群落光合成量が低下、収量が減少する。しかし、葉のサイズや出葉角度によって相互遮蔽の程度に差があるため、植物体の構造（草姿）によっては収量の低下を防ぐことが出来る。これまでの章では、低段密植栽培に適した品種育成のために早期開花性に着目してきたが、早期開花性でも密植に不向きな草姿を示す品種であった場合、低段密植栽培の特徴を十分に発揮できない可能性がある。そこで本実験では、草姿について QTL 解析を行い、検出した QTL の中に、開花関連 QTL の近傍に位置する QTL があるかどうかを調査した。春と秋にガラス温室内で BIL 111 系統を栽培し、草丈、全葉数、節間長、葉長、垂線長、直線距離、下垂角度、着生角度、屈曲度、草冠サイズ (CAN) などを調査した。調査した 20 形質のうち、14 形質について計 24 の QTL を検出した。CAN が小さいと隣り合う植物体同士の葉の重なりが少なくなるので、CAN は密植適応性に関連した形質と考えられる。本実験では CAN QTL が第 2, 4, 12 染色体に計 5 つ検出された。これら QTL のうち、第 12 染色体に検出された QTL は、野生種由来の対立遺伝子が CAN を小さくする方向に働いた。一方、第 4 染色体に検出された QTL は、CAN を拡大させる方向に働いていたが、野生種由来の対立遺伝子が花芽分化を早める QTL の近傍に座乗していた。したがって、低段密植栽培向きの品種育成にあたっては、これらの QTL を分離する必要があると考えられた。

第5章 総合考察

BIL と NIL を組み合わせた QTL 解析によって、第 1, 3, 4, 6, 7 染色体に DFI QTL が 5 つ検出されたが、これら DFI QTL の検出領域には LN QTL や PLA QTL など、開花に関連する QTL や発芽に関連する QTL がまとまって検出された。また、これら 5 つの領域には、本研究および既往の研究で DTF QTL が検出されていることから、DFI は DTF の制御に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、第 1, 4 染色体の NIL では LN が小さくなる場合も認められたが、その効果は小さく、これらの染色体では主に PLA が DFI を制御していると考えられた。また、BIL を用いた実験で第 3, 6, 7 染色体には LN QTL が検出されたことから、DFI は PLA と LN の両方、もしくはいずれかの QTL の影響を受けていると考えられた。NIL を用いた実験で DTF を COT, DMB, FDD に分割して調査した結果、COT や FDD は環境の影響を受けやすく、特に FDD の効果は他の 2 つの過程よりも効果が小さいことが示された。これに対し、DMB は環境に対し安定的に効果を発現することが多く、DTF の制御において、DMB QTL が大きな影響を及ぼしていると考えられた。

しかし、DMBとDFIは重複する期間があることから、DMB QTLがDFI QTLと同じQTLである可能性もあり、この点については今後検討する必要がある。以上の結果を総合し、第1, 3, 4染色体の開花関連QTLがDTFの制御にどのように関与しているかについて考察し、染色体によってDTF制御の機作が異なることを明らかにした。

なお、単独で効果を発揮するQTLの評価において、NILは有用な実験材料であるとされるが、本研究においてもBILを用いた実験では検出できなかったQTL(第1染色体のDFI QTL, 第3染色体のDFI QTL, DMB QTL, LN QTL, 第4染色体のPLA QTL)を新たに検出することができ、その有用性が示された。また、本研究で検出したQTLは個々の効果は小さく、育種への利用にあたっては、これらのQTLを集積する必要がある。QTLの集積にあたっては、エピスタシスによって効果が打ち消される場合があるが、本研究では十分な検証を行うことはできなかった。エピスタシスは、NIL同士を交配し、両QTLを持つNILの効果を各QTLの効果の和と比較することによって正確に評価できるので、現在、本研究で育成したNIL同士を交配し、後代を育成中である。

審査報告概要

トマトの増収技術として注目される低段密植栽培では、早期開花性と、密植条件下でも優れた受光態勢となる草姿を併せ持つ品種の育成が望まれている。申請者は、これら特性に関する量的遺伝子座(QTL)解析を行い、第1, 3, 4, 6, 7染色体に開花までの日数(DTF), 花芽分化までの日数(DFI), 花房下葉数(LN), 葉間期(PLA), 子葉展開日数, 発芽関連形質, に関わるQTLがまとまって検出されることを明らかにした。第1, 3, 4染色体において、QTL検出領域だけを野生種染色体断片で置換した系統を育成して解析を行い、DFIはPLA QTLあるいはLN QTLによって制御されており、これらQTLは他のQTLに比べ、安定的に大きな影響をDTFに及ぼしていることを明らかにした。さらに、第4染色体のDFI QTLは、草冠サイズに関わるQTLの近傍に検出されていた。この領域に野生種断片があると、開花は早まるが、草冠が大きくなって受光態勢が悪化するので、育種に当たっては、これらQTLの分離が必要と考えられた。以上、本研究は低段密植栽培に向けた品種育成の基礎となる情報を提供したもので、審査員一同は申請者に博士(農学)の学位を授与する価値があると判断した。