

## ラズベリー秋季結実性品種における花成誘導要因の解明と

### 花芽形成関連遺伝子の単離

人工気象器内での生育および花芽分化にかかわる遺伝子のリアルタイム PCR 解析

今西弘幸<sup>1</sup>, 黒倉健<sup>2</sup>, 藤晋一<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 秋田県立大学生物資源科学部附属フィールド教育研究センター

<sup>2</sup> 宇都宮大学農学部生物資源科学科

<sup>3</sup> 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科

日長と温度がラズベリー (*Rubus idaeus* L.) の花芽形成にどのように関係しているのかを調査するため、ポット栽培したラズベリー秋季結実性品種の‘ヘリテージ’を 25°C, 16 時間日長あるいは 8 時間日長の条件下に置き、その生育状況について検討した。また、花芽形成関連遺伝子の発現解析を行うため、ラズベリーと同じバラ科の花芽分化にかかわる遺伝子 5 種のプライマーを使用してリアルタイム PCR 解析を行った。16 時間日長における生育が旺盛となり、吸枝長は 204cm, 節数は 85 となった。8 時間日長においては、吸枝長が 81cm, 節数は 54 となった。いずれの日長条件下においても花芽の分化は起こらなかった。今後は、温度を変えるか日長条件を変化させるなど花芽が分化する条件を探る予定である。吸枝の上位節の腋芽における API の発現量は、6 月 22 日では低かったが 7 月 8 日には高くなり、花芽分化に関与している可能性があるものと思われる。その他の遺伝子については、発現量の変化が判然としなかった。今後は、ラズベリー用のプライマーを設計し、形態観察を合わせて遺伝子の発現解析を行うことにより詳細な解析が可能になるものと考えられる。

**キーワード:** ラズベリー, 秋季結実性品種, 花芽, 日長, API

ラズベリーには、1 年生の吸枝が結果母枝となり、その上位の節に結実する「秋季結実性品種」および越冬した 2 年生の吸枝が結果母枝となる「夏季結実性品種」の 2 種類がある。これらの品種を用いて促成および抑制栽培を組み合わせた長期収穫が試みられているが、とりわけ秋季結実性品種の花芽形成についての知見が十分ではないため、安定的な長期収穫の栽培体系の確立には至っていない。一方、近年カンキツやリンゴなどの果樹において、花芽形成に関連した FT 遺伝子群の発現に関する知見が得られはじめ (Endo et al., 2005; Kotoda et al., 2010), 果樹の花芽形成に関する遺伝子解析が重要な研究課題になってきている。

本研究はラズベリー秋季結実性品種の花芽分化に焦点を絞り、日長・温度制御下における花成誘導要因を探り、分子生物学的手法によるラズベリーの花芽形成機構について基礎的知見を得て、長期安定収穫技術の開発に適用することを目的とした。これまでに人工気象器内にポット栽培した秋季結実性ラズベリー‘ヘリテージ’を置いたものの、生育途中で多くの個体が枯死し、光量子速度密度量が不足しているものと考えられた (今西と藤, 2015)。また、露地で栽培している夏季結実性ラズベリー‘チルコチン’の腋芽から伸長した芽の形態観察を行い、未分化、花芽分化の発達途中および花芽分化の完了したものがみられたことを確認している。

本報告では、日長と温度がラズベリーの花芽形成にどのように関係しているのかを調査するため、ポット栽培したラズベリー秋季結実性品種を用いて、これまでより光量を増加させた人工気象器内において日長および温度を制御した条件下に置き、その生育状況について検討した。また、ラズベリーにおける花芽形成関連遺伝子の発現解析を行うため、ラズベリーと同じバラ科の *Fragaria vesca* で用いられるプライマーを使用してリアルタイム PCR 解析を行った。

### 材料および方法

#### 日長・温度制御下においてポット栽培したラズベリー ‘ヘリテージ’ の生育

2015年11月2～6日に、秋季結実性ラズベリー ‘ヘリテージ’ を株分け後に、バクテローズ処理を行い、用土（プライムミックス（TKS-2）（サカタ）：赤玉土（小粒）：鹿沼土（小粒）＝1：1：1の土14LにマグアンプK（中粒）（N:P:K:Mg＝6：40：6：15）30gを施用）を入れた苗箱に定植し、最低温度15℃に設定したガラス温室で生育させた。12月1～2日に、株分けした際に用いた用土と同じ組成の用土を入れた7.5号Yポットに鉢上げし、これまでと同じ条件で生育させた。12月16～18日に9号のプラスチックポットに定植し、人工気象器に入れ、ポットの置床面が90cmとなるように、棚の上に置いた。これまでに光量子速度密度量が不足していることが考えられたため、人工気象器に40W蛍光灯4本／坪を追加設置した。光源は175Wメタルハライドランプ2機／坪および40W蛍光灯4本／坪とし、日長を16時間（16時間明期・8時間暗期）および8時間（8時間明期・16時間暗期）の2水準とした。温度はいずれの日長条件においても25℃に設定した。各条件に16ポットを置いた。吸枝の生育に伴い、2016年3月9日にポットを人工気象器の床に下ろした。吸枝長および節数を2回／月測定し、花芽分化の状況を観察した。

#### 野外において栽培したラズベリー ‘ヘリテージ’ の花芽分化にかかわる遺伝子発現解析の検討

地植え雨除けで栽培している秋季結実性ラズベリー ‘ヘリテージ’ の吸枝を2015年6月22日（以下、6月とする）および7月8日（以下、7月とする）に採取した。吸枝の先端から5節目までの頂芽および腋芽（以下、上位節とする）ならびに中位から下位にかけての腋芽（以下、中下位節とする）を切り出し、外皮から剥いて5mm角以下の切片に調整し、RNAlater RNA Stabilization Reagent で処理した。処理した腋芽1つずつを個別にCTAB法（Chang et al., 1993）によりRNAを抽出した。プライマーは、ラズベリーと同じバラ科の花芽分化にかかわる遺伝子である *SOCI*, *FT3*, *TFL1*, *API*, *FUL1* の解析で使われる5種を用いた（Mouhu et al., 2013）。リアルタイムPCRは、LightCycler 480 システムII（ロシュ）を用いて、PCR反応、蛍光検出、定量解析を行った。反応条件は、Mouhu et al.（2013）に従って行い、定量解析の結果は、*MSII* との存在比で解析した。

### 結果および考察

#### 日長・温度制御下においてポット栽培したラズベリー ‘ヘリテージ’ の生育

吸枝長は、株分けから2か月後の2月5日に16時間日長において20cm、8時間日長において31cmであったが、2月19日に16時間日長および8時間日長において順に41cmおよび42cmとなった（図1）。その後、16時間日長における生育が旺盛となり、6月17日には16時間日長において204cm、8時間日長において81cmとなった。節数についてみたところ、2月5日に16時間日長および8時間日長において順に19節および20節とほとんど差がみられなかったが、6月17日には16時間日長において85節、8時間に長において54節となった（図2）。花芽分化の状況についてみたところ、いずれの日長条件下においても頂芽の伸長が止まらず、腋芽の発芽もみられず、栄養生長のみが行われていた。今後は、温度を変えるか日長条件を変化させるなど花芽が分化する条件を探る予定である。

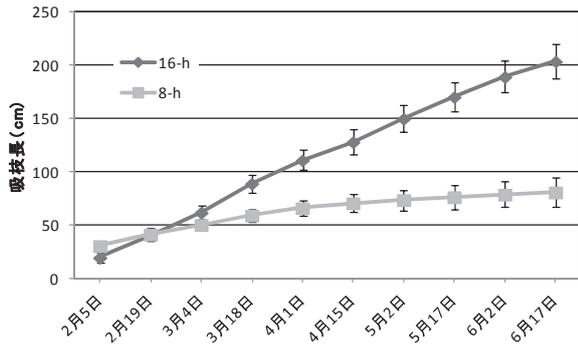


図 1 人工気象器内におけるラズベリー ‘ヘリテージ’ の吸枝長の変化。

16-h; 16時間日長(16時間明期・8時間暗期),  
8-h; 8時間日長(8時間明期・16時間暗期)。

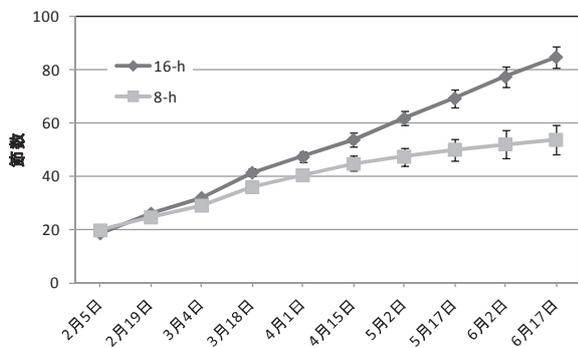


図 2 人工気象器内におけるラズベリー ‘ヘリテージ’ の節数の変化。

16-h; 16時間日長(16時間明期・8時間暗期),  
8-h; 8時間日長(8時間明期・16時間暗期)。

### 野外において栽培したラズベリー ‘ヘリテージ’ の花芽分化にかかわる遺伝子発現解析の検討

上位節の API についてみたところ、6月において発現量が低かったが、7月には発現量が高くなった。中下位節においては、6月と7月のあいだに発現量の差異は認められなかった。その他の遺伝子については、発現量の変化が判然としなかった。‘ヘリテージ’のような秋季結実性品種の場合、吸枝のある節位から上位節の腋芽にのみ花芽分化が起こり、それより下位の節位では花芽分化が起こらない (Carew et al., 2000)。花芽形成の最初の段階に必要とされる API の上位節における発現量の変化は、花芽分化に関与している可能性があると思われる。

今後は、ラズベリー用のプライマーを設計し、形態観察を合わせて遺伝子の発現解析を行うことにより詳細な解析が可能になるものと考えられる。

### 謝辞

畠山博樹氏をはじめ本学フィールド教育研究センター一園芸班の皆様には、研究材料の管理にご協力いただいた。本研究は、秋田県立大学平成27年度学長プロジェクト研究費〔創造的研究〕によって行われた。

### 文献

- Carew, J.G., Gillespie, T., White, J., Wainwright, H., Brennan, R., & Battey, N.H. (2000). The control of the annual growth cycle in raspberry. *J. Hort. Sci. Biotech.*, 75, 495–503.
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Reporter*, 11, 113-116.
- Endo, T., Shimada, T., Fujii, H., Kobayashi, Y., Araki, T., & Omura, M. (2005). Ectopic Expression of an *FT* Homolog from *Citrus* Confers an Early Flowering Phenotype on Trifoliolate Orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Research*, 14(5), 703-712.
- 今西弘幸, 藤晋一 (2015). 「ラズベリー秋季結実性品種位における花芽誘導要因の解明と花芽形成関連遺伝子の単離 人工気象器内での生育および花芽発育段階の形態観察」『秋田県立大学ウェブジャーナル B』2 : 134-137.
- Kotoda, N., Hayashi, H., Suzuki, M., Igarashi, M., Hatsuyama, Y., Kidou, S., Igasaki, T., Nishiguchi, M., Yano, K., Shimizu, T., Takahashi, S., Iwanami, H., Moriya, S., & Abe, K. (2010). Molecular Characterization of *FLOWERING LOCUS T*-Like Genes of Apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant and Cell Physiology*, 51(4), 561-575.
- Mouhu, K., Kurokura, T., Koskela, E.A., Albert, V.A., Elomaa, P., & Hytönen, T. (2013). The *Fragaria vesca* homolog of SUPPRESSOR OF

OVEREXPRESSION OF CONSTANS<sub>1</sub> represses  
flowering and promotes vegetative growth. *Plant  
Cell*, 25(9), 3296–3310.

〔 平成 28 年 7 月 20 日受付 〕  
〔 平成 28 年 7 月 31 日受理 〕

## Elucidation of the Flower Initiation Factor and Isolation of the Gene related to Flower Bud Formation in a Primocane-Fruiting Raspberry Cultivar

Chamber growth and the analysis of genes related to flower bud formation using real-time quantitative PCR

Hiroyuki Imanishi<sup>1</sup>, Takeshi Kurokura<sup>2</sup>, Shin-ichi Fuji<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Field Education and Research Center, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

<sup>2</sup> Department of Agrobiological and Bioresources, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University

<sup>3</sup> Department of Biological Production, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

To investigate the relationships between flower bud formation, photoperiod, and temperature, the primocane-fruited raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivar 'Heritage' was cultured in 10-L pots in a growth chamber controlled at 25°C with a 16-h light and 8-h dark (16-h photoperiod) or 8-h light and 16-h dark (8-h photoperiod) photoperiod. To examine gene expression, genes related to flower bud formation using five primer pairs from the analysis of Rosaceae, including *R. idaeus*, were analyzed using real-time quantitative PCR. Raspberry plants under a 16-h photoperiod vigorously grew, with suckers reaching 204 cm in length and a node number of 85. When grown under an 8-h photoperiod, the sucker length was 81 cm, and 54 nodes were measured. Flower bud formation was not observed under the 16-h or 8-h photoperiod. The cause for a lack of flower bud formation requires further investigation, including growth under different temperatures and changes to the photoperiod. The expression level of *API* in the axillary bud in the upper part of suckers was low on June 22 but high on July 8. This finding may be related to flower bud formation. The expression level of the other genes was indistinct. More detailed investigations require the design of primers for raspberry genes and an analysis of gene expression in combination with morphological observations.

**Keywords:** raspberry, primocane-fruited raspberry cultivar, flower bud, photoperiod, *API*