

研究紹介

接ぎ木による開花誘導のアブラナ科
作物の育種および採種への利用

元木 航

(応用植物科学コース)

Application of grafting-induced flowering to
the breeding and seed production of
cruciferous crops

Ko Motoki

(Course of Applied Plant Science)

Grafting-induced flowering has the potential to be applied to plant breeding and seed production, to shorten the time needed for floral induction, and to expand the environment in which seed production is possible. However, it is difficult to induce flowering by grafting in some crop species, which currently limits the use of this technique to specific plant species. We have established a technique for inducing flowering in cabbage (*Brassica oleracea* L.) by grafting, which had hitherto been considered difficult, by clarifying the causes of different flowering responses caused by various rootstocks. This article introduces the key factors for the floral induction of cabbage by grafting and its potential application to the breeding and seed production of cruciferous crops. It was observed that cabbage grafted onto *B. oleracea* rootstocks did not flower at all, while cabbage grafted onto some accessions of *Raphanus sativus* rootstocks did flower. Furthermore, the ability of *R. sativus* to induce flowering of grafted cabbage varied even within the species. Immunoblotting analysis of the FLOWERING LOCUS T (FT) protein, a main component of florigen, revealed that floral induction was quantitatively correlated with the level of accumulated FT protein in the grafted scion. It was concluded that increasing the total amount of FT protein produced in the rootstock is important for the stable floral induction of the grafted cabbage, and this can be accomplished by increasing FT transcription and the leaf area of the rootstock. Field cultivation experiments with cabbage progenies obtained by the grafting method indicated the direct applicability of this method to breeding and seed production in cruciferous crops.

Key Words : *Brassica oleracea*, *Raphanus sativus*, grafting, rapid flowering induction, florigen

緒 言

接ぎ木とは複数の植物体をつなぎ合わせ、新しいキメラ個体を作る技術である。園芸分野では苗木の増殖、樹勢の制御あるいは病虫害抵抗性の付与といった様々な目的で、古くから利用されてきた。一方で植物科学においては、植物の開花制御機構を理解するための重要な現象として、接ぎ木によって引き起こされる開花誘導が盛んに研究されてきた^{1,2)}。この過程では、非誘導条件下にある植物が、開花誘導された植物に接ぎ木されることによって直接的に開花誘導される。この現象に基づき、植物に広く共通する移行性の開花誘導物質「フロリゲン」が特定の誘導条件下の葉で合成され、茎頂部へと移行して開花を誘導するという仮説が立てられた¹⁾。フロリゲンの正体は長年不明であったが、近年、小さな球状タンパク質である FLOWERING LOCUS T (FT) とそのオルソログが、フロリゲンの主要な構成要素であることが明らかにになった³⁻⁹⁾。

接ぎ木による開花誘導は非開花誘導条件下の植物を開花させられることから、交配や種子生産の時間を短縮し、育種サイクルを早める育種技術として利用できる可能性がある。実際に接ぎ木による開花誘導は、世代時間が長い、あるいは自然条件下での開花が困難ないくつかの作物種の開花誘導に応用されている¹⁰⁻¹²⁾。しかし、接ぎ木による開花誘導が困難あるいは不安定な植物種も多く報告されており¹³⁻¹⁹⁾、この技術は植物一般に実用化されるには至っていない。著者らは、台木に用いる植物種の違いにより引き起こされる異なる開花反応の原因の解明を通して、接ぎ木による開花誘導が困難と考えられてきたアブラナ科作物のキャベツ (*Brassica oleracea* L.) の開花誘導技術を確立してきた。本稿ではその研究成果とアブラナ科作物の育種や採種への応用可能性を紹介する。

ダイコンへの接ぎ木によるキャベツの開花誘導現象

世界中で栽培される重要なアブラナ科の葉菜類であるキャベツは、他のアブラナ科植物と同様に開花誘導に低温遭遇を必要とする。それに加えて、キャベツには一定の大きさに成長するまで低温に感応しない幼若相が存在し、さらに開花誘導に必要とする低温遭遇期間も長い^{20,21)}。発芽から開花までに必要な期間は半年以上と長い。このことはキャベツの育種や種子生産上の問題となっている。接ぎ木による開花誘導はキャベツの開花までの期間を短縮できる可能性があったものの、安定した開花誘導はこれまで実現されてこなかった。唯一の成功例であった香川 (1957) の報告では、花成誘導したキャベツに接ぎ木したキャベツは全く開花しなかった一方で、ダイコン (*Raphanus sativus* L.) に接ぎ木したキャベツでは5個

体中1個体が開花したことが記載されている²²⁾。しかし、香川の発見はその後再現されてこなかった。近年では、花成誘導したダイコンにキャベツを接ぎ木しても開花が起こらなかった例も報告された²³⁾。これらの結果は、接ぎ木によってキャベツの開花を誘導できる可能性がある一方で、台木として使用する植物種やその他の条件によって、開花誘導の成否が左右される可能性を示唆していた。

その中で、著者が以前に所属していた京都大学蔬菜花卉園芸学研究室では、矢澤進博士が発見した難開花性キャベツ‘不抽苔’^{24,25)} (Kinoshita et al. 2021, 2023)の採種方法として、接ぎ木による花成誘導が経験的に用いられており、キャベツではなくダイコンを含む特定の植物種を台木に用いた際に、接ぎ木した‘不抽苔’の開花が誘導される傾向を観察していた。そこで改めて、通常の開花性をもつキャベツ‘渡辺成功1号’を穂木に、*B. oleracea*および*R. sativus*の複数系統を台木に用いた詳細な接ぎ木実験を制御環境下で実施し、上述の現象の再現性を確認した。その結果、先行研究と同様に*B. oleracea*台木に接ぎ木したキャベツは全く花芽分化しなかった一方で、*R. sativus*台木の一部の系統において接ぎ木したキャベツが花芽分化した。それだけでなく、*R. sativus*台木の系統間でも、接ぎ木したキャベツの花芽分化割合には0-75%と大き

な差がみられたことから、接ぎ木したキャベツを花成誘導する能力には、*R. sativus*の種内でも違いがあることを見出した。また*R. sativus*台木への接ぎ木により開花したキャベツから正常な種子を得ることが可能であることも確認された²⁶⁾ (Fig. 1)。

台木の植物種による開花誘導反応の違いをもたらす要因

*R. sativus*への接ぎ木によるキャベツの花成誘導メカニズムを推定するために、主要な花成関連遺伝子の発現解析を行った結果、接ぎ木により花成誘導されたキャベツでは低温遭遇時にみられる *FLOWERING LOCUS C* 遺伝子の発現低下および *FT* 遺伝子の発現上昇は観察されなかった。このことから、従来の接ぎ木による花成誘導モデルと同様に台木から供給される FT に依存して花成誘導が起こっていることが示唆された²⁶⁾。*B. oleracea*の FT は花成促進作用をもつと示されていること²⁷⁾、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において同定されている FT の機能性や移行性に関わるアミノ酸残基に関して *B. oleracea* と *R. sativus* との間でほとんど違いがみられないこと、さらに接ぎ木実験に供試した *R. sativus* 系統間でも *FT* のアミノ酸配列に多型はなかったことから、台木から穂木に供給される FT の量的な違いがキャ

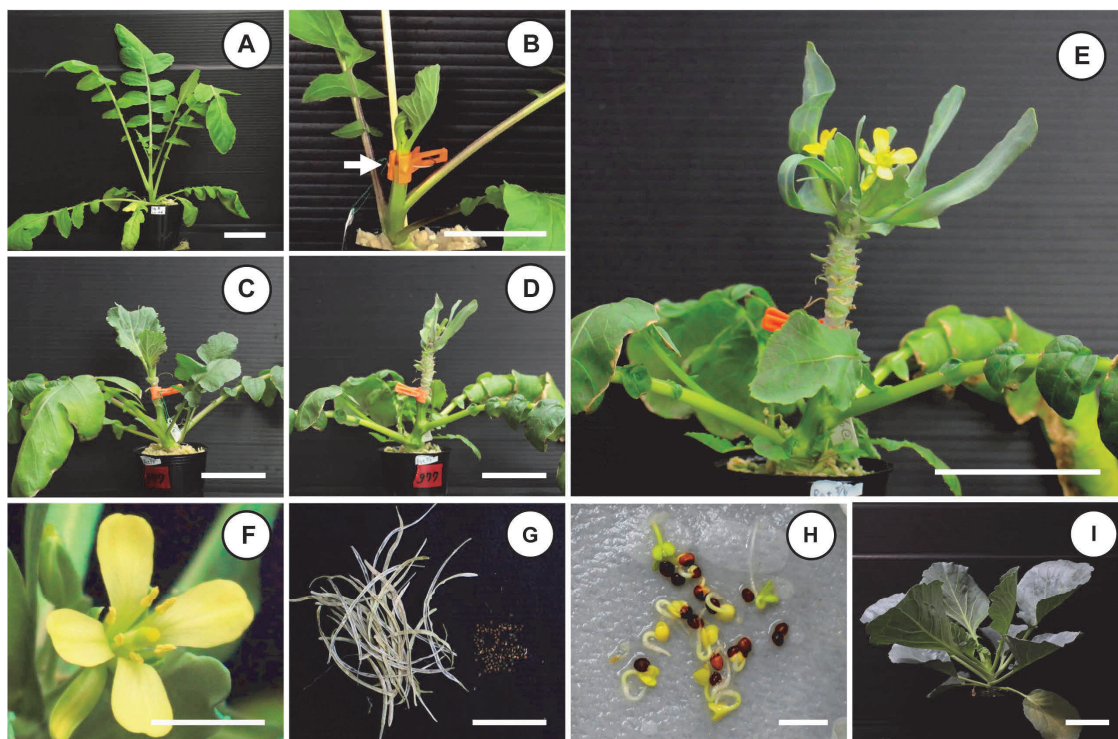


Fig. 1 Non-vernalization flowering and seed production of cabbage by grafting onto a bolting radish rootstock. (A) A typical radish rootstock. (B) Rootstock and scion immediately after grafting. (C-F) Time-course pictures of non-vernalization flowering of ‘Watanabe-seiko No.1’ cabbage grafted onto radish, (C) 25 days after grafting (DAG), (D) 53 DAG, (E) 57 DAG, and (F) close-up picture of (E). (G) Seed pods and seeds produced by non-vernalization flowered cabbage. (H) Germination of the seeds of (G). (I) Normally-grown seedlings of the seeds of (G).

[Cited from Motoki et al. (2019) *Frontiers in Plant Science*. 9, 1967.]

ベツの開花反応の違いをもたらしているという仮説を立てた。この仮説を検証するために、*B. oleracea* および *R. sativus* の FT を検出できるペプチド抗体を開発し、ウエスタンブロット解析により、接ぎ木したキャベツに蓄積した FT を定量する手法を確立した。複数種の *B. oleracea* および *R. sativus* 台木に接ぎ木したキャベツにおける FT 蓄積濃度を測定した結果、接ぎ木後のキャベツ穂木に蓄積した FT の量には、穂木の花芽分化の有無による有意差がみられ、さらに穂木が出蕾するまでの日数とは負の相関関係を示した (Fig. 2)。この結果は、FT の量的な違いがキャベツの開花反応の違いをもたらしているという先の仮説を支持していた。さらに穂木への FT の蓄積量に影響する台木の要因を明らかにするため、*R. sativus* 系統間で違いがみられた FT 発現量および葉面積に着目した。台木への種子春化处理、日長処理および摘葉処理によって、台木の FT 発現量および葉面積を人為的に変化させて接ぎ木実験を行い、これらの要因がともに接ぎ木した穂木における FT 蓄積量の変動に寄与していることを明らかにした⁽²⁸⁾。

接ぎ木により採種された種子の特性

以上の研究を通して、接ぎ木によってキャベツを安定して開花誘導するための条件を明らかにした。一方で、

この方法を育種や採種に利用するためには、得られた種子の特性を明らかにする必要がある。複数の植物種において採種時の環境が種子の発芽後の形質に影響すると報告されている⁽²⁹⁻³¹⁾。そこで、接ぎ木による花成誘導を経て形成されたキャベツ種子と低温処理による通常の採種法により得られた種子の特性を、圃場での栽培試験により比較した。キャベツ '渡辺成功 1 号' から栄養繁殖により単離した 2 クローン系統について、低温処理および *R. sativus* 台木への接ぎ木によって花成誘導し、CO₂ 処理によってそれぞれ自殖種子を得た。種子の大きさおよび個体あたりで得られた種子量は接ぎ木による採種法で小さくなる傾向がみられた。これらの種子に由来する実生について 2 年間に渡って露地圃場で夏まき栽培を行い、主要な農業形質 (植物体サイズ、結球重および開花期) を比較した。2 年間を通して系統による違いがみられた形質があった一方で、採種法による違いが両年ともに見られた形質はなかった。したがって、*R. sativus* 台木への接ぎ木による採種法は、採種量が少ないことを考慮する必要がある一方で、それ以外の点では従来法と同様にキャベツの育種および採種に利用できると考えられた⁽³²⁾。

アブラナ科作物の育種への利用可能性

接ぎ木による開花誘導はアブラナ科作物の育種や採種

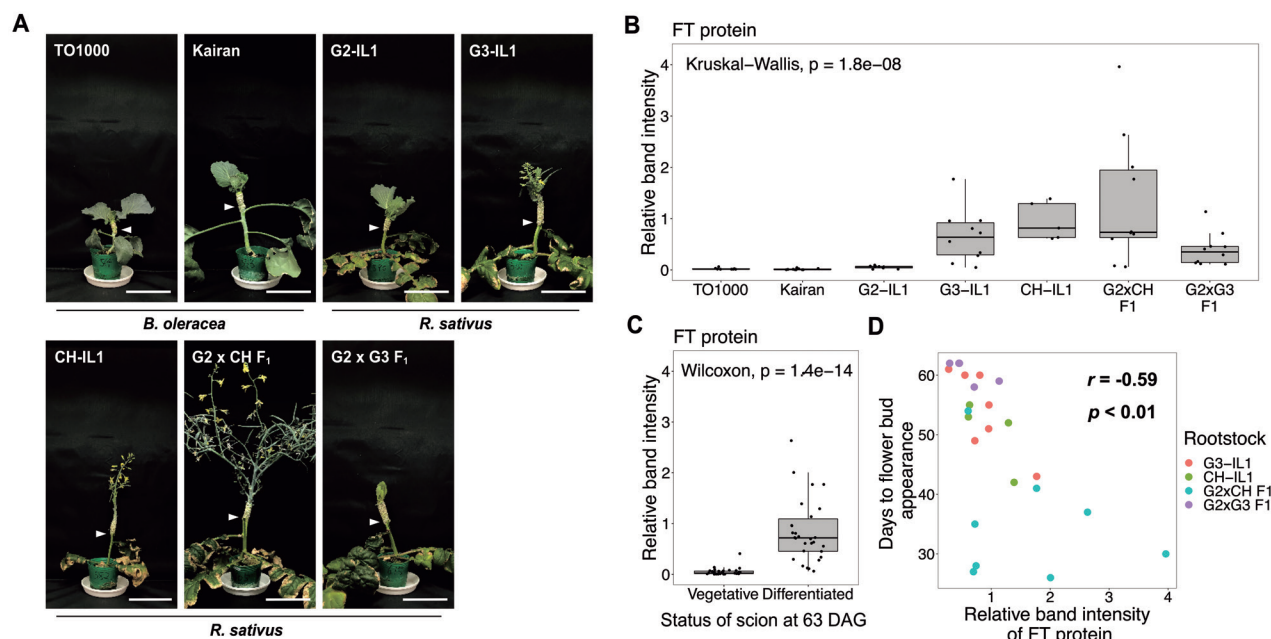


Fig.2 Relationship between FT protein accumulation and the flowering response of the grafted cabbage scions. (A) Representative pictures of grafted cabbage scions showing different flowering response by rootstocks. (B) Accumulation of the FT protein in the grafted cabbage scion at 35 DAG. Results of the statistical test for the difference among the rootstocks are shown in the graph. (C) Difference in the accumulation of FT protein in the scion at 35 DAG by the floral status at 63 DAG. Results of the statistical test for the differences among the floral status are shown in the graph. (D) Relationship between FT protein accumulation in the scion at 35 DAG and the number of days to flower bud appearance. The linear correlation coefficient is shown in the graph.

[Modified from Motoki et al. (2022) *Plant and Cell Physiology*. 63 : 1230-1241.]

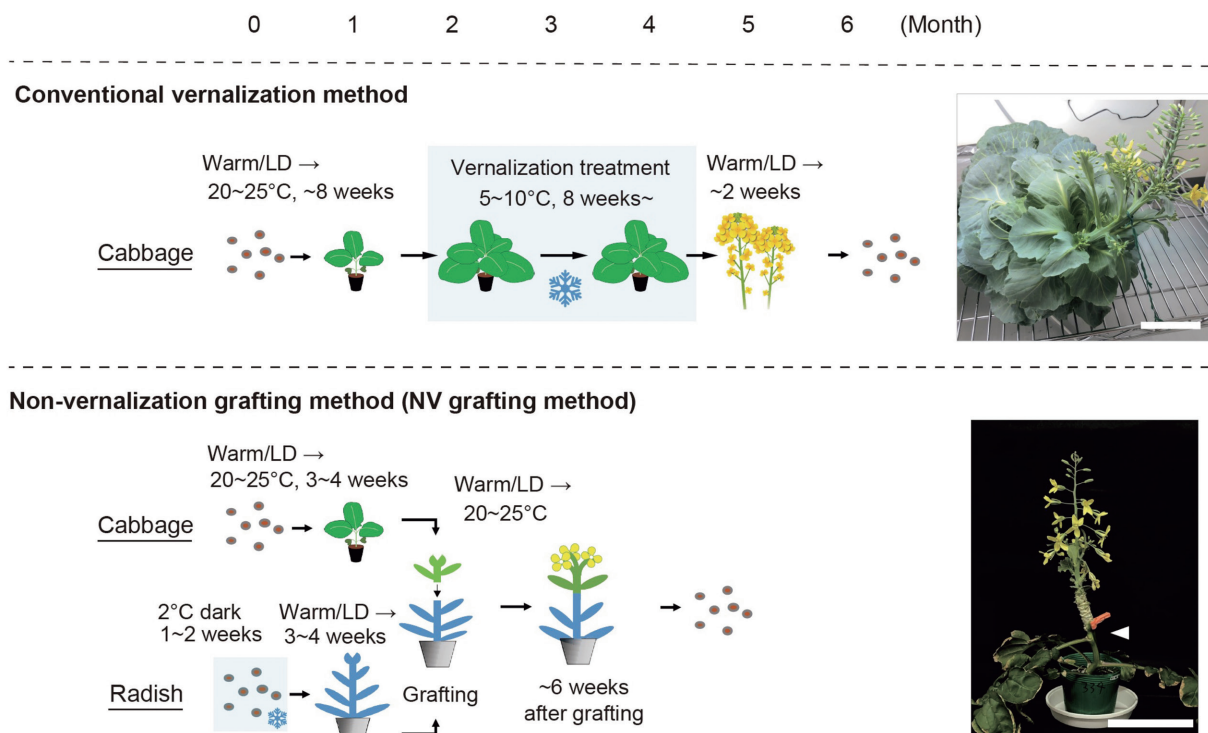


Fig. 3 Outline of the conventional vernalization method and non-vernalization grafting method for the cabbage seed production.

[Modified from Motoki et al. (2023) *The Horticulture Journal*. 92 : 66-76.]

においていくつかの応用が期待される。これまでの研究を通して見出した開花誘導能力の高いダイコン台木を用いることにより、キャベツの幼苗(播種後1ヶ月以内)を春化处理なしに接ぎ木後1.5~2ヶ月で開花を誘導することができている。これは、従来の春化处理による開花誘導に要する期間の約半分である(Fig.3)。またカブ(*B. rapa*)、ナタネ(*B. napus*)、およびダイコンといった他のアブラナ科作物についても、接ぎ木による開花誘導が可能であることを確認している(未発表データ)。育種においては世代促進技術としての利用が第一に考えられる。既存品種への細胞質雄性不稔や耐病性遺伝子などの導入など、連続戻し交配の場面で特に有効であると考えており、実際に日本のいくつかの種苗会社では本手法の導入が進められている。また、自然条件下では開花時期の異なる品種間で交配を行うために、同時に開花誘導を行うための技術としても利用できる可能性がある。エジプトにおける研究では、自然条件下で開花しにくい外国由来のキャベツ品種を、接ぎ木開花誘導法を用いて現地の育種に導入する試みが報告されている³³⁾。別の観点からは、本手法は室内環境の省スペースで採種を行うことができるため、遺伝子組換え植物やゲノム編集植物など閉鎖系で扱う必要がある植物の採種への利用も考えられるだろう。

終わりに

本研究を通して、FTタンパク質を高度に供給できるダイコン台木を用いることにより、接ぎ木による開花誘導法をキャベツの実用的な育種や採種に利用できる可能性を示した。今後は、台木のFTタンパク質の供給能力に関わる形質(FT遺伝子発現量および葉面積)を制御する遺伝的要因および環境要因を明らかにすることにより、本技術の一般化および高度化を進めていく。この研究を通して、アブラナ科作物だけでなく、これまで接ぎ木による開花誘導が困難とされてきた他の作物種における開花誘導法の開発にも繋がる手がかりを示していきたい。

文 献

- 1) Chailakhyan, M. K : New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Comptes Rendus l'Académie des Sci. l'U.R.S.S.* **XIII**, 79-83 (1936)
- 2) Zeevaart, J. A. D : Physiology of flower formation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **27**, 321-348 (1976)
- 3) Abe, M., Y. Kobayashi, S. Yamamoto, Y. Daimon, A. Yamaguchi, Y. Ikeda, H. Ichinoki, M. Notaguchi, K. Goto, and T. Araki : FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*, **309**, 1052-1056 (2005)
- 4) Corbesier, L., C. Vincent, S. Jang, F. Fornara, Q. Fan, I. Searle, A. Giakountis, S. Farrona, L. Gissot, C. Turnbull, et al. : FT protein movement contributes to long-distance signaling in

- floral induction of *Arabidopsis*. Science, **316**, 1030–1033 (2007)
- 5) Kobayashi, Y., H. Kaya, K. Goto, M. Iwabuchi, and T. Araki : A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. Science, **286**, 1960–1962 (1999)
 - 6) Lifschitz, E., T. Eviatar, A. Rozman, A. Shalit, A. Goldshmidt, Z. Amsellem, J. P. Alvarez, and Y. Eshed : The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **103**, 6398–6403 (2006)
 - 7) Lin, M. K., H. Belanger, Y. J. Lee, E. Varkonyi-Gasic, K. I. Taoka, E. Miura, B. Xoconostle-Cázares, K. Gendler, R. A. Jorgensen, B. Phinney, et al. : FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. Plant Cell, **19**, 1488–1506 (2007)
 - 8) Notaguchi, M., M. Abe, T. Kimura, Y. Daimon, T. Kobayashi, A. Yamaguchi, Y. Tomita, K. Dohi, M. Mori, and T. Araki : Long-distance, graft-transmissible action of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. Plant Cell Physiol., **49**, 1645–1658 (2008)
 - 9) Tamaki, S., S. Matsuo, L. W. Hann, S. Yokoi, and K. Shimamoto : Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. Science, **316**, 1033–1036 (2007)
 - 10) Soares, J. M., K. C. Weber, W. Qiu, D. Stanton, L. M. Mahmoud, H. Wu, P. Huyck, J. Zale, K. Al Jasim, J. W. Grosser, et al. : The vascular targeted citrus *FLOWERING LOCUS T3* gene promotes non-inductive early flowering in transgenic Carrizo rootstocks and grafted juvenile scions. Sci. Rep., **10**, 1–18 (2020)
 - 11) 砂川浩一 : 甘藷の開花促進に関する研究 第1報 アサガオ, ヒルガオおよびヨルガオが, 接穂の生育並びに開花促進に及ぼす影響. 沖縄農業, **5**, 10–14 (1966)
 - 12) Ye, J., Y. Geng, B. Zhang, H. Mao, J. Qu, and N. H. Chua : The *Jatropha* FT ortholog is a systemic signal regulating growth and flowering time. Biotechnol. Biofuels, **7**, 91 (2014)
 - 13) Bull, S. E., A. Alder, C. Barsan, M. Kohler, L. Hennig, W. Gruissem, and H. Vanderschuren : *FLOWERING LOCUS T* triggers early and fertile flowering in glasshouse cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Plants, **6**, 22 (2017)
 - 14) Odipio, J., B. Getu, R. D. Chauhan, T. Alicai, R. Bart, D. A. Nusinow, and N. J. Taylor : Transgenic overexpression of endogenous FLOWERING LOCUS T-like gene *MeFT1* produces early flowering in cassava. PLoS One, **15**, 1–16 (2020)
 - 15) Tränkner, C., S. Lehmann, H. Hoenicka, M.-V. Hanke, M. Fladung, D. Lenhardt, F. Dunemann, A. Gau, K. Schlangen, M. Malnoy, et al. : Over-expression of an *FT*-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. Planta, **232**, 1309–1324 (2010)
 - 16) van de Pol, P. A. : Floral Induction, floral hormones and flowering. Meded. Landbouwhoges. Wageningen, **72**, 1–89 (1972)
 - 17) Wenzel, S., H. Flachowsky, and M. V. Hanke : The Fast-track breeding approach can be improved by heat-induced expression of the *FLOWERING LOCUS T* genes from poplar (*Populus trichocarpa*) in apple (*Malus × domestica* Borkh.). Plant Cell. Tissue Organ Cult., **115**, 127–137 (2013)
 - 18) Wu, Y., Y. Ma, M. Wang, H. Zhou, Z. Gan, R. Zeng, L. Ye, J. Zhou, J. Zhang, and C. Hu : Mobility of FLOWERING LOCUS T protein as a systemic signal in trifoliate orange and its low accumulation in grafted juvenile scions. Hortic. Res., **9**, uhac056 (2022)
 - 19) Zhang, H., D. E. Harry, C. Ma, C. Yuceer, C. Y. Hsu, V. Vikram, O. Shevchenko, E. Etherington, and S. H. Strauss : Precocious flowering in trees : The *FLOWERING LOCUS T* gene as a research and breeding tool in *Populus*. J. Exp. Bot., **61**, 2549–2560 (2010)
 - 20) Ito, H., and T. Saito : Time and temperature factors for the flower formation in cabbage. Tohoku J. Agric. Res., **12**, 297–316 (1961)
 - 21) Miller, J. C. : A study of some factors affecting seed-stalk development in cabbage. Cornell Univ. Agr. Exp. Stat. Bull., **488**, 1–46 (1929)
 - 22) 香川 彰 : 甘藷の低温感応に関する研究(第2報)低温刺激の移行ならびに低温感応時の摘葉が花成におよぼす影響. 岐阜大農研報, **8**, 43–56 (1957)
 - 23) 浜本 浩・吉田祐子 : 種子冷蔵処理ダイコンを台木とした接ぎ木はアブラナ科穂木の花成に影響するか. 園学研, **11**(別2), 190 (2012)
 - 24) Kinoshita, Y., M. Ko, and H. Munetaka : Upregulation of tandem duplicated *BoFLC1* genes is associated with the non-flowering trait in *Brassica oleracea* var. *capitata*. Theor. Appl. Genet., **136**, 41 (2023)
 - 25) Kinoshita, Y., K. Motoki, and M. Hosokawa : Characterization of a non-flowering cabbage mutant discovered 42 years ago. Hort. J., **90**, 374–381 (2021)
 - 26) Motoki, K., Y. Kinoshita, and M. Hosokawa : Non-vernalization flowering and seed set of cabbage induced by grafting onto radish rootstocks. Front. Plant Sci., **9**, 1967 (2019)
 - 27) Itabashi, E., D. J. Shea, N. Fukino, R. Fujimoto, K. Okazaki, T. Kakizaki, and T. Ohara : Comparison of cold responses for orthologs of cabbage vernalization related genes. Hort. J., **88**, 462–470 (2019)
 - 28) Motoki, K., Y. Kinoshita, R. Nakano, M. Hosokawa, and T. Nakazaki : Quantitative analysis of florigen for the variability of floral induction in cabbage/radish inter-generic grafting. Plant Cell Physiol., **63**, 1230–1241 (2022)
 - 29) 萩屋 薫 : 時無大根種子の「本場・場違」問題に関する研究(第1報)産地及び種子の大小と抽臺との関係. 園芸学会雑誌, **18**, 65–70 (1949)
 - 30) 萩屋 薫 : 時無大根種子の「本場・場違」問題に関する研究(第2報)種子の刈取時期及び採種部位と抽苔性との関係. 園芸学会雑誌, **19**, 61–67 (1950)
 - 31) 篠原捨喜 : 十字花科作物を中心とした抽苔開花現象の種生態学的研究. 特に登熟中の種子に起こる春化現象とその役割について. 静岡県農業試験場特別報告, **6**, 1–166 (1959)
 - 32) Motoki, K., Y. Kinoshita, R. Nakano, M. Hosokawa, and T. Nakazaki : Investigation of the Field Performance of Progenies Obtained by a Non-vernalization-grafting Floral Induction Method in Terms of Application to Cabbage Breeding and Seed Production. Hort. J., **92**, 66–76 (2023)
 - 33) EL-Eslamboly, A. A. S. A., and H. H. Hamed : New techniques to induce flowering and produce seeds of foreign cabbage varieties as a main step for a superior hybrids production. Int. J. Environ., **10**, 66–82 (2021)