

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658023

研究課題名(和文)ニホンナシ自殖系統におけるリンゴ全ゲノム情報を用いた近交弱勢の解析

研究課題名(英文) Study on inbreeding degeneration in Japanese pear by using S2 progeny originated from Osa Nijisseiki having self-compatibility

研究代表者

井上 栄一 (Inoue, Eiichi)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：90292482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴやニホンナシなど果樹の多くは自分の花粉で受粉が出来ない性質(自家不和合性という)を持つことで子孫での遺伝子のヘテロ性(雑種性)を保ってきました。ところが、最近の果実の品種改良では、優良な品種を親として近親交配が繰り返されるので、遺伝子のホモ化(同質化)が進んでいます。このため、最近の品種では、劣性遺伝子が原因とみられる生育障害や果実の障害が出やすくなっていると言われています。本研究では、自分の花粉で受粉出来る珍しいニホンナシ(梨)品種を用い、自殖を2回繰り返してホモ化の程度を高めたときにどのような現象が起きるか明らかにしようとしてしました。

研究成果の概要(英文)：Almost all fruits trees including Japanese pear have self-incompatibility. In this research, to study inbreeding degeneration, we produced self-pollinated progeny of Japanese pear by using self-compatible cultivar Osa Nijisseiki. The negative correlation observed between the homo-zygosity and plant height in S2 individuals reflected a negative effect of the homogeneity on their growth. This S2 progeny may become valuable material for the genomic research about the inbreeding degeneration in Japanese pear.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：ニホンナシ 自家和合性 SSRマーカー 近交弱勢 ホモ化 劣性形質

## 1. 研究開始当初の背景

リンゴやニホンナシなど、バラ科果樹の多くは強力な自家不和合性を持つためほとんど自殖後代を得ることが出来ない。そのうえ果樹は成熟までに多くの年数を必要とし、個体の維持管理にも多大な労力を要するため、一部の重要形質以外の遺伝解析は進展していない。一方、これまでの果樹育種では、栽培品種や育種素材が特定の品種や遺伝子型に偏る傾向があり、その結果、他殖性の果樹では表面化しないはずの劣性形質と推定される生理障害が発生し問題となっている。ニホンナシにおいても、品質に優れる‘二十世紀’や同一家系の品種を交雑親として多くの品種が育成されているため、遺伝子のホモ化が進んでいる (Terakami et al, 2009)。ホモ化の影響として、主要品種である‘豊水’や‘あきづき’等では、みつ症等の果実障害が発生し易くなっているとも推察されている。しかし、これまで劣性形質を実際に検証する方法は無かった。

我々は、現在までニホンナシにおける遺伝子マーカーの開発に関する研究および果実の生理障害に関する研究に従事してきたが、その過程で、自家和合性品種を用いることによって自殖によりホモ化レベルを高めた実験材料の作出が可能であると着想した。具体的には‘おさ二十世紀’の自殖により育成された‘なし中間母本農1号’を $S_1$ 世代(自殖第1世代)とみなして、出発材料とすることで短期間のうちに $S_2$ 世代を得ることが可能であると着想した。この擬似 $S_2$ 世代を解析することによって、ゲノムのホモ化レベルを高めたニホンナシにおいてどのような表現型が生ずるのかをモニタリングすることが可能である。さらに、最近公開されたリンゴにおける全ゲノム解読の結果 (Velasco et al., 2010) やナシのオリゴアレイ (Nishitani, 2010) を最大限に利用し、ホモ化レベルの異なる系統間におけるゲノム構造や遺伝子発現と樹園地における形質発現を比較研究することによって、近交弱勢の実態を明らかにできると考えた。

我々は、既に‘なし中間母本農1号’の自殖によって $S_2$ 世代の3年生樹の作出に成功しているため、採択年度より直ちに $S_2$ 世代のゲノム構造および表現型の解析を開始することができる。

## 2. 研究の目的

本研究では‘おさ二十世紀’の自殖後代である‘なし中間母本農1号’をさらに自殖した世代を $S_2$ 世代として用いる。そして、ニホ

ンナシでは報告のない自殖第2世代を用いて、圃場における形質の発現に及ぼすゲノム構造の影響を解析することが目的である。

$S_2$ 世代の各個体を対象として、ナシ標準連鎖地図上のSSRマーカーを用いたゲノムホモ化レベルの解析を行い、各個体の表現形質を観察評価した結果との相関を解析し、ゲノムホモ化が各形質に及ぼす影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) DNAマーカーの開発と利用

ナシ自家和合性品種‘おさ二十世紀’およびその $S_1$ である‘なし中間母本農1号’そしてその自殖後代である $S_2$ 世代22個体を用いて、樹体の生育評価とSSRマーカーを用いたホモ化レベルの解析を行った(第1表)。

主たる材料として研究に用いた $S_2$ 世代を得るための交配は、本課題開始前の2007年4月に茨城県農業総合センター生物工学研究所において行った。自家交配は、自家和合性をもつ‘おさゴールド’の $S_1$ 品種である‘なし中間母本農1号’の花柱に同品種の花粉を受粉した後、他家花粉を防ぐために袋掛けして行った。同年9月に結実した5果を収穫し、28粒の種子を採取した。これを2008年1月31日に温室内で播種したところ22粒が発芽した(発芽率78.6%)。22個体の発芽実生を同年4月3日に茨城大学農学部附属フィールドサイエンス教育研究センター果樹園に定植し、個体番号‘1’から‘22’を付与して、本課題を開始するまで育成した。

### (2) ニホンナシSSR遺伝子座の解析

$S_2$ 実生22個体(3年生)を材料として用いた。また栽培品種の中から世代間の遺伝子型の変遷を検討する際の対照品種として‘ゴールド二十世紀’および‘おさゴールド’(擬似 $F_1$ 世代)、および‘なし中間母本農1号’( $S_1$ 世代)を用いた。さらに品種育成過程で‘二十世紀’が祖先品種として用いられているものなかから、‘幸水’、‘豊水’、‘秋栄’、‘あきづき’を、一方‘二十世紀’を祖先に持たない品種のなかから‘新高’を材料として用いた。これらの品種の若葉より改変CTAB法によりゲノムDNAを抽出し、SSR解析に用いた。SSR解析にはニホンナシ標準連鎖地図および品種識別に用いられている42マーカーを用いた。

### (3) ニホンナシ $S_2$ 実生の生育調査

近交弱勢の程度が反映されると報告されている1年生実生の樹高を調査し、マーカー遺伝子型のホモ化程度との相関を解析した。

$S_2$ 実生22個体の播種1年後における樹高を調査し解析に用いた。播種後は剪定を一切行わず、樹高は、地際から最も長い枝までの長

さを記録した。各個体の樹勢についても、継続して観察した。

(4) ニホンナシ S<sub>2</sub> 実生の開花調査

自根で生育する S<sub>2</sub> 実生 22 個体について、最終年度前年までいずれも 4 月に開花状況の調査を行った。6 年生となる最終年度のみ、3 月に開花直前の花芽の着生状況を調査することにより開花する個体を判別した。

4. 研究成果

(1) S<sub>2</sub> 実生における SSR 遺伝子座のホモ化程度

S<sub>2</sub> 実生 22 個体は 42 の SSR 遺伝子座において、‘なし中間母本農 1 号’由来のアリルのみを持っていた。このことから S<sub>2</sub> 実生‘1’~‘22’に雑種性は無く、‘なし中間母本農 1 号’の自殖世代であることが確認された。42 遺伝子座のうち、擬似 F<sub>1</sub> 世代においては全体の 24% (10 座)、S<sub>1</sub> 世代の‘なし中間母本農 1 号’において 64% (27 座)、S<sub>2</sub> 世代で 69 (29 座) ~ 88% (37 座) の遺伝子座がホモ化していることが明らかになった (第 2 図)。S<sub>1</sub> 世代と S<sub>2</sub> 世代の間と比べて、擬似 F<sub>1</sub> 世代から S<sub>1</sub> 世代へ進む過程でのホモ化の進行が顕著であった (第 1 表)。また、S<sub>2</sub> 世代‘18’においては第 5, 10, 12, 15, 連鎖群の大部分がホモ化していると推察された。擬似 F<sub>1</sub> 品種と S<sub>1</sub> 品種との間でホモ化する対立遺伝子に偏りがみられたが、これは‘なし中間母本農 1 号’が育成される課程での人為選抜による影響であると推察された。一方、品種では‘二十世紀’の家系である‘あきづき’でホモ化遺伝子座率が最も高かった。‘あきづき’では、晩生化を目指して‘二十世紀’と遺伝的関係の無い‘新高’が祖先品種として用いられている。しかし、同品種を含む 4 系交雑の後、最終的な後代の選抜課程において‘豊水’の果実品質が目標とされたことにより、‘二十世紀’の家系のもつ両食味に関連する遺伝子が集積されることにより、結果的にホモ化レベルが上昇したと推察された。またこの結果は、本研究の着想時に仮説とした、最近の品種における顕著なホモ化を示唆するものである。

(2) S<sub>2</sub> 実生における初期生育の変異と SSR 遺伝子座のホモ化程度の関係

S<sub>2</sub> 実生の樹勢には、明らかな個体間差が認められた。それを裏付けるように、1 年生実生の樹高にも大きな変異が認められた (最小 9.8cm ~ 最大 45.0cm)。S<sub>2</sub> 世代のホモ化遺伝子座率と 1 年生実生の樹高の相関係数をとったところ、5%水準で負の相関が確認された (第 3 図)。この結果はニホンナシにおいて近親交

配が 1 年生実生の樹高に大きな影響を及ぼすという佐藤ら (2008) の報告を支持するものであった。このように、ゲノムのホモ化レベルの上昇が認められた S<sub>2</sub> 世代において、近交弱勢とみられる生育抑制が確認された。

(3) ニホンナシ S<sub>2</sub> 実生の開花と今後の展望

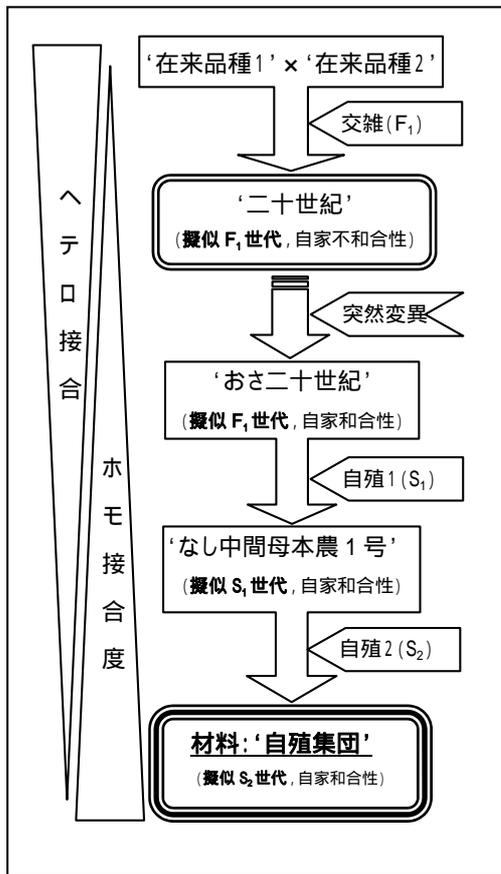
自根で生育する S<sub>2</sub> 実生 22 個体においては、5 年生時までに開花は観察されなかった。しかし、満 5 年生である 2014 年 3 月時点で花芽の着生状況を調査したところ、22 個体中 27.3%にあたる 6 個体で着生が確認され、生殖成長への相転換が認められた。一方、相転換した個体と、自殖弱勢の兆候が顕著に表れる樹高や幹直径との相関は認められなかった。このことは、ゲノムのホモ化レベルが、実生が相転換までに要する期間に影響しないことを示唆している。

本研究、開花した S<sub>2</sub> 実生を用いて、果実の生理障害などの発生に及ぼすゲノムホモ化レベルの影響の評価を計画していた。この小課題については、最終年度まで開花がみられなかったことから達成できなかったが、最終年度の終わりに開花する個体が確認されたことで、次年度以降に実施可能であると考えられる。また、開花した個体をさらに自殖し、S<sub>3</sub> 世代を獲得して、ゲノムのホモ化が樹体の生育に及ぼす影響をより詳細に調査し、基盤研究として発展させていく予定である。

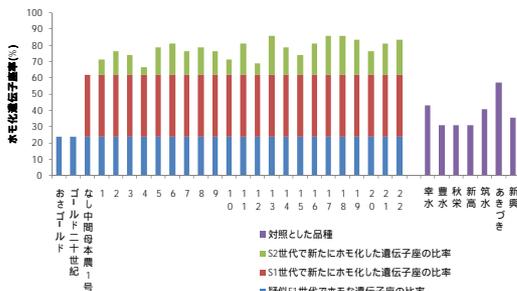
第 1 表 擬似 F<sub>1</sub> 世代, S<sub>1</sub> 世代, S<sub>2</sub> 世代の SSR 遺伝子型

連鎖群	遺伝子座	擬似 F <sub>1</sub> 世代		S <sub>1</sub> 世代	S <sub>2</sub> 世代	
		‘ゴールド二十世紀’	‘おさゴールド’		‘なし中間母本農 1 号’	‘4’
1	NH013a	199/203	199/203	199/203	199/203	203/203
	CH01e07	95/102	95/102	95/102	95/102	95/102
4	CH02c02b	109/123	109/123	123/123	123/123	123/123
	CH02h11a	110/136	110/136	110/136	110/136	110/136
7	EMPC11f	129/129	129/129	129/129	129/129	129/129
	NH019b	203/209	203/209	203/203	203/203	203/203
8	EMPC11e	155/172	155/172	155/172	155/172	155/155
	IPPN13	254/256	254/256	256/256	256/256	256/256
9	CH01f02	233/235	233/235	233/235	233/235	233/235
	EMPC10i	248/260	248/260	248/258	258/258	258/258
10	CH01f07a	181/202	181/202	202/202	202/202	202/202
	CH02c11	223/235	223/235	235/235	235/235	235/235
11	EMPC105	153/167	153/167	167/167	167/167	167/167
	EMPC114	143/166	143/166	166/166	166/166	166/166
11	NH017a	99/104	99/104	99/99	99/99	99/99
	IPPN14	250/254	250/254	254/254	254/254	254/254
13	IPPN02	140/173	140/173	173/173	173/173	173/173
	CH03d02	187/195	187/195	187/187	187/187	187/187
14	CH03d06	160/160	160/160	160/160	160/160	160/160
	IPPN01	137/137	137/137	137/137	137/137	137/137
15	IPPN07	197/210	197/210	210/210	210/210	210/210
	CH02c09	248/256	248/256	248/256	248/256	248/248
17	CH02d0b	177/177	177/177	169/169	169/169	169/169
	CH03b06	84/91	84/91	84/91	84/91	91/91
17	EMPC104	121/121	121/121	121/121	121/121	121/121
	IPPN07	230/254	230/254	230/254	230/254	254/254
17	IPPN08	160/166	160/166	160/166	160/166	160/160
	IPPN09	239/247	239/247	239/239	239/239	239/239
17	NH102	175/179	175/179	175/179	175/179	175/175
	NH025a	87/116	87/116	ND	ND	116/116
17	NH015a	100/100	100/100	100/100	100/100	100/100
	NH026b	181/201	181/201	181/201	181/201	181/201
17	EMPC001	158/158	158/158	158/158	158/158	158/158
	EMPC011	146/155	146/155	146/146	146/146	146/146
17	EMPC102	177/187	177/187	177/187	177/187	177/187
	EMPC110	181/181	181/181	181/181	181/181	181/181
17	IPPN05	234/258	234/258	234/234	234/234	234/234
	IPPN16	228/228	228/228	228/228	228/228	228/228
17	IPPN18	385/343	385/343	385/343	385/343	385/343
	NH004b	120/149	120/149	120/149	120/149	120/120
3 or 11	NH024b	118/118	118/118	118/118	118/118	118/118

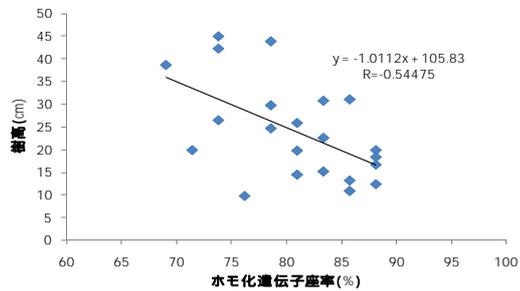
ピンク塗りの部分はホモである遺伝子座 緑塗りの部分はヘテロである遺伝子座を示す。ND はデータの欠損を示している。



**第1図** 本研究課題における挑戦的な疑似自殖試験のアイデア。原品種である‘二十世紀’を不明である交配親間の疑似F<sub>1</sub>と位置づけることによって、同品種の自家和合性突然変異系統‘おさ二十世紀’の自殖個体である‘なし中間母本農1号’を疑似S<sub>1</sub>世代とみなすことができる。さらに本研究で用いる‘なし中間母本農1号’の自殖世代は、疑似S<sub>2</sub>世代とみなすことができる。



**第2図** 疑似F<sub>1</sub>世代(‘おさゴールド’, ‘ゴールド二十世紀’), S<sub>1</sub>世代(‘なし中間母本農1号’), S<sub>2</sub>実生と対照品種におけるSSR遺伝子座のホモ化程度。



**第3図** ニホンナシS<sub>2</sub>実生の1年生時の樹高とSSRマーカー遺伝座のホモ化率との相関。5%水準で有意な負の相関関係が見られた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

- Eiichi Inoue, 『QTL controlling dots development of fruit skin in Japanese pear』, Fruits and Roots: a celebration and forward look, 2013年11月6~7日, イーストモーリング,(連合王国)
- Eiichi Inoue, 『S<sub>2</sub> progeny of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) ‘Osa Nijisseiki’ having self-compatibility and their homozygosity estimated by SSR analysis』, 2013 American Society for Horticultural Science, 2013年7月22~25日, パームデザート(アメリカ)
- 小川達也, 井上栄一, 他, 『ニホンナシ果実のみつ症発生過程における組織学的観察』, 園芸学会平成24年度春季大会, 2012年3月29日, 大阪府立大学。
- 井上栄一, 他, 『ニホンナシにおける果皮色形質を制御するQTLの検出』, 園芸学会平成23年度秋季大会, 2011年9月24日, 岡山大学

[その他]

シンポジウム開催

『次世代シーケンサーとDNA塩基配列情報の農業研究への展開—果樹ゲノム研究から品種識別まで—』, 茨城大学農学部研究推進委員会, 2010年2月26日, 茨城大学農学部。

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 栄一 (INOUE EIICHI)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号: 90292482

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し

(4)研究協力者

霞 正一 (KASUMI MASAKAZU)

茨城県農業総合センター・生物工学研究  
所・室長 (協力時)

郷内 武 (GONAI TAKERU)

茨城県農業総合センター・生物工学研究  
所・主任研究員 (協力時)