

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450038

研究課題名(和文) リンゴの完全ホモ個体の作出による育種・遺伝解析の効率化モデルの構築

研究課題名(英文) Construction of efficient genetic analysis model for apple breeding by production of doubled haploids.

研究代表者

小森 貞男 (KOMORI, Sadao)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：00333758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：薬培養によるリンゴの倍化半数体(DH)の作出では胚様体形成、胚様体からのシュート誘導、増殖・馴化の各過程が律速要因となることが判明した。効率よくDHを獲得するためには上記の過程で分化能・増殖能に優れる品種を選抜することが重要で‘千秋’、‘Starking Delicious’、‘世界一’を好適品種として選抜した。1核前期から後期の花粉を多く含む緑蕾後期から中心花紅蕾前期の花叢を採取し、25日～35日間の低温処理を行うことで胚様体形成率が高まることが明らかになった。DH個体を片親に使用した交雑実生群を用いることで遺伝解析の精度が向上した。作出したDHから開花・結実する個体が確認された。

研究成果の概要(英文)：All processes of “embryo formation”, “shoot induction” and “shoot multiplication and acclimatization” are important for obtaining DHs in apple anther cultures. It is important for efficient acquisition of DHs to select cultivars with high differentiation and multiplication capability in the processes. ‘Senshu’, ‘Starking Delicious’ and ‘Sekaiichi’ were selected as the cultivars suitable for anther culture. It was clarified that the sampling of flower bud at late “Tight clustre” to early “First pink” stage which mainly contained “early uninucleate” to “late uninucleate” microspore and chilling treatment for 25 to 35 days of flower buds were efficient for increasing embryo formation. The seedlings which used DH as a parent were raised, and it was proven that the simplification of mode of inheritance was possible. Acquired DHs were cultivated in the field, and the individual with fertility was found.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：リンゴ *Malus × domestica* Borkh. 薬培養 倍加半数体

## 1. 研究開始当初の背景

育種技術の発展によって播種後2年でのリンゴ実生の開花も可能になっているが、依然としてリンゴの育種・遺伝解析の効率化は自家不和合性に起因する高度なヘテロ性によって阻まれている。リンゴは自殖弱勢を示しやすく交雑による純系の作出は不可能で、薬培養等による以外に完全ホモ個体(Doubled Haploid (DH))は獲得できない。薬培養によるDHの獲得は可能であるが、遺伝解析に供試できる個体数を得るためには、胚様体形成、シュート誘導、馴化、植物体の維持などの問題を解決する必要があり、遺伝解析用として十分なDH個体群の作出は実現していない。現在、果樹分野で培養技術を有する研究者は少なくリンゴでDHを作出できる技術を有するのは申請者が属する岩手大学農学部だけである。また、申請者は果樹研究所果樹ゲノム研究領域や農業生物資源研究所放射線育種場、福島県果樹研究所と密接に研究協力を行っており、既に獲得した数個体の開花・結実する‘千秋’由来のDHをゲノム研究に供試する準備を始めている。

## 2. 研究の目的

遺伝解析にDH集団を用いることで、多数の形質が効率よく解析可能となり、高度にヘテロな果樹の育種・遺伝解析の飛躍的な進展が期待できる。DH獲得の過程では、胚様体形成、シュート誘導等の段階で多くの個体が失われる。遺伝解析に供試できる健全なDHを多数獲得するには、毎年10万個以上の薬を置床し実験材料を作成した上で、花蕾の低温処理方法の確立による胚様体形成率の向上、発芽誘導培地の糖濃度決定、自根や緑枝接ぎによる馴化方法の確立、圃場での開花誘導を成功させる必要がある。目的の実現には高度な培養技術と同時に、植物体を圃場で維持するだけの栽培管理技術を確立する必要がある。また、由来の異なる2系統のDHの交雑で遺伝的背景が同じF<sub>1</sub>種子が獲得できれば、変異源の利用により突然変異系統群が作出でき、果樹に特有な遺伝子の機能解析も進展する。リンゴのDH個体群を作出することで、育種・遺伝解析が困難な果樹における研究発展のモデルケースとして研究のあるべき方向性を示す事につなげる。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究材料

本研究ではリンゴ品種‘千秋’を中心に‘祝’、‘世界一’、‘Starking Delicious’ (SD)等の品種を毎年10万個を目途に薬培養を行い、研究期間内に100個体のDH獲得を目指した。

### (2) 花蕾の低温処理期間の決定と低温処理中の花粉と花蕾ステージの関係解明

花蕾ステージが緑蕾期から全花紅蕾期の‘祝’、‘千秋’、‘SD’を採取して、花蕾の低温処理(4°C)期間を0日から25日まで設定し、処理日数ごとの胚様体獲得率を把握した。なお、‘祝’については低温処理期間を30日まで、‘SD’については50日まで延長した。また、中心花紅蕾前期に採取した‘祝’、‘千秋’、‘SD’を用いて、冷蔵期間中の花粉ステージの変化を調査した。

### (3) ‘千秋’由来のDH個体群を用いた詳細な遺伝解析

量的形質(QTL)を含めた主要な形質について、果樹研究所ゲノム研究領域、福島県果樹研究所との連携により、DHを解析材料用いた遺伝解析により、主要形質の詳細な遺伝様式を明らかにした。

### (4) ‘千秋’以外の品種に由来する稔性を有するDH個体を作出

‘千秋’以外の‘SD’等に由来するDHを作出し、既に獲得している開花し稔性を有する‘千秋’由来のDH個体との交雑を行い、F<sub>1</sub>種子の作出を目指した。

## 4. 研究成果

### (1) DH個体の作出

毎年10万個の薬の置床を目途に培養を行った。内訳は‘千秋’が約6万個、‘祝’、‘世界一’、‘SD’が各1万個、その他の品種が合計1万個である。培養の結果、各品種の胚様体形成率は‘祝’14.4%、‘世界一’0.8%、‘千秋’2.4%、‘SD’6.2%、‘ふじ’0.4%、‘紅玉’1.3%、‘つがる’0.5%、‘Wijcik’0.2%となり、‘祝’、‘SD’、‘千秋’、‘紅玉’、‘世界一’の順に高かった。

一方、胚様体からのシュート形成率は‘祝’1.6%、‘世界一’12.5%、‘千秋’21.6%、‘SD’5.2%、‘ふじ’0%、‘紅玉’0%、‘Wijcik’0%、‘つがる’17.4%となり、‘千秋’、‘つがる’、‘世界一’、‘SD’で高く、多くの品種からはシュートが誘導できなかった。

獲得したシュートの数を生存薬数で除したシュート獲得効率は‘祝’0.25%、‘世界一’1.00%、‘千秋’0.30%、‘SD’0.27%、‘つがる’0.09%となった。‘千秋’143個体、‘SD’143個体、‘世界一’3個体は培養での維持に成功し、そのうち‘千秋’56個体、‘SD’18個体、‘世界一’1個体でシュートの増殖に成功し、さらに圃場条件に馴化できた個体数は‘千秋’25個体、‘SD’1個体である。

35種類のSSRマーカーを用いた薬培養由来個体の遺伝子型調査の結果、獲得したすべての個体は親品種のalleleを1個だけ有していることから(表1)、花粉由来の個体である



が存在し、糖度についてはLG10とLG15、酸度についてはLG16に座落していた。その中でも酸度はLOD値が20以上の極めて高い値が得られ、1因子の遺伝子型で分離パターンが説明可能と判明した。DH個体を片親に使用することで、QTLの検出感度が飛躍的に向上し、遺伝様式の単純化が可能であることが実証された。

(4) ‘千秋’以外の品種に由来する稔性を有するDH個体を作成

上述のように‘千秋’25個体、‘SD’1個体について圃場条件への馴化に成功した。これらのDHのうち、生育が良好な20個体のS遺伝子型を調べたところ、‘千秋’由来のDHはS<sub>1</sub>S<sub>1</sub>型が8個体、S<sub>7</sub>S<sub>7</sub>型が12個体検出された。‘SD’由来個体はS<sub>28</sub>S<sub>28</sub>型であった(表1)。これらの個体のうち‘Se-12’は2015年に開花・結実し、果実を4個収穫した(図1)。「Se-12’は自然交雑で結実し、4果平均果実重は88.8g、1果当たり種子数は完全種子0.5個、しいな6.3個であった。‘Se-12’は‘千秋’由来のDHであるが、花粉稔性を有する‘千秋’由来のDHである‘95P6’ (S<sub>1</sub>S<sub>1</sub>)とは異なるS遺伝子型(S<sub>7</sub>S<sub>7</sub>)であることから、交雑による実生の育成が可能と推定される。



図1 開花・結実する‘千秋’薬培養由来DH‘Se-12’の果実

## 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)

[雑誌論文] (計2件)

- ①Zhang, C., Sato, S., Tsukuni, T., Sato, M., Okada, H., Yamamoto, T., Wada, M., Matsumoto, S., Yoshikawa, N., Mimida, N., Takagishi, K., Watanabe, M., Cao Q. and Komori, S. Elucidating Cultivar Differences in Plant Regeneration Ability in an Apple Anther Culture. *The Horticulture Journal*. doi: 10.2503/hortj.MI-094. (2016) 査読有
- ②Zhang, C., Tsukuni, T., Ikeda, M., Sato, M., Okada, H., Ohashi, Y., Matsuno, H., Yamamoto,

T., Wada, M., Yoshikawa, N., Matsumoto, S., Li, J., Mimida, N., Watanabe, M., Suzuki, A. and Komori, S. Effects of the microspore development stage and cold pre-treatment of flower buds on embryoid induction in apple (*Malus × domestica* Borkh.) anther culture. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **82** : 114-124. (2013) 査読有

[国際学会発表] (1件)

[学会発表] (計6件)

- ①Yamamoto, T., Kunihisa, M., Nishitani, C., Terakami, S., Komori, S., Sato, M. and Okada, H. Doubled-haploid plants in apple-attractive applications for breeding and genetics. *Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*. 2015年6月14-18日. The Bologna University, Italy.
- ②小森貞男, 柳本麻衣, 高岸香里, 守谷(田中)友紀, 和田雅人, 山本俊哉, 村上政伸, 渡邊 学. 交配後2年での開花を実現するためのリンゴの播種期前進の試み. *園学研* **14(別1)** : 74. 2015年3月28-29日. 千葉大学 (千葉県)
- ③張 春芬, 道合 了, 佐藤聡太, 佐藤 守, 山本俊哉, 森田 泉, 壽松木章, 渡邊 学, 小森貞男. リンゴの薬培養において胚様体の大きさ, 胚様体形成時期がシュート形成に及ぼす影響. *園学研* **13(別1)** : 259. 2014年3月29-30日. 筑波大学 (茨城県)
- ④國久美由紀, 押野秀美, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 滝田雄基, 山口奈々子, 岡田初彦, 山本俊哉, 小森貞男, 佐藤 守. 薬培養由来倍加半数体品種‘リンゴ中間母本 95P6’を利用した果実形質のQTL解析. *園学研* **13(別1)** : 74. 2014年3月29-30日. 筑波大学 (茨城県)
- ⑤佐藤 守, 國久美由紀, 滝田雄基, 押野秀美, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 山口奈々子, 岡田初彦, 山本俊哉, 小森貞男. 薬培養由来倍加半数体品種‘リンゴ中間母本 95P6’の交雑F1集団の果実品質. *園学研* **13(別1)** : 73. 2014年3月29-30日. 筑波大学 (茨城県)
- ⑥押野秀美, 國久美由紀, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 山口奈々子, 岡田初彦, 佐藤 守, 小森貞男, 山本俊哉. リンゴ薬培養由来倍加半数体品種‘リンゴ中間母本 95P6’を利用したQTL解析に向けての連鎖地図作製. *園学研* **12(別2)** : 279. 2013年9月20-22日. 岩手大学 (岩手県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小森 貞男 (KOMORI Sadao)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号 : 00333758