

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712004

研究課題名(和文)キュウリ属作物の果実品質改良に寄与するゲノムデザイン育種基盤の構築

研究課題名(英文) Development of breeding techniques based on genome information for improvement of fruit quality traits in cucumber and melon

研究代表者

吉岡 洋輔 (YOSHIOKA, Yosuke)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：50462528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：キュウリ属作物の新規需要を生み出す新品種の効率的な育種に寄与するゲノムデザイン育種基盤を構築することを目的に、画像解析等の情報処理技術を用いた形質評価法に基づく遺伝解析により果実品質関連形質の遺伝性を明らかにした。具体的には、果実の肥大性、形態、食味食感等の果実品質に多様な変異をもつキュウリ・メロン遺伝資源を用い、果実形態や果実物性を定量的に評価し、QTL解析によりこれら形質を支配する量的形質遺伝子座を同定した。本研究の結果に基づいてキュウリ属作物における果実品質の高精度DNA選抜技術等の確立が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to genome-based breeding techniques for cucumber and melon, this study performed clarify the inheritance of important fruit quality traits based on genetic analyses with new phenotyping method based on information processing techniques. Specifically, we focused on cucumber and melon genetic resources that exhibited wide variation in fruit morphological traits, such as fruit size, shape and fruit texture traits, evaluated their phenotypes quantitatively, and detected quantitative trait locus associated with these traits by QTL analyses. Based on these results, marker assisted selection systems can be developed for fruit quality traits in cucumber and melon.

研究分野：園芸科学

キーワード：ウリ科 果実品質 ゲノム 遺伝子 育種

1. 研究開始当初の背景

日本人1人当たりの野菜消費量が低迷し、これに対応して地域経済の要である野菜園芸農業の生産額も漸減傾向にある。かつては野菜の農業粗生産額で上位だったキュウリ属作物(主にキュウリやメロン)についても、ライフスタイルの変化や日本型食生活の崩壊に伴う消費量の減少や、生産者の高齢化や担い手不足による生産力の低下など、他の多くの野菜と同様に消費と生産の両面で解決の糸口が見えない大きな問題を抱えている。現在でもキュウリ・メロンが重要な野菜であることには変わりはないが、消費量及び生産量は年々減少し、30年前に比べ作付面積で約半減、出荷量では約4割減少した。これまで、国民のバランスの良い食生活の回復や産地経済の持続可能な発展を実現するために、野菜の消費と生産に関わる種々の研究・事業が官民挙げて取り組まれてきた。しかし、キュウリ・メロンについては、消費形態が生食や漬物にほぼ限定されているために消費の大幅な回復が見込めないこと、消費減少に伴う価格の低迷に加えて生産資材(燃油、肥料、農薬等)が高騰していること、さらに、農家の生産意欲を減退させるほどの多大な栽培労力が必要とされることから、他の野菜以上に問題解決までの道のりは遠い。しかし、近年の加工・業務用野菜需要の急速な伸びに注目すれば、ひとつの有望な解決策が提案できる。すなわち、世界の多様なキュウリ・メロンの遺伝資源を利用し、ゲノムデザイン育種により様々な加工・業務用需要に対応する新品種を短期間で育成する、これを実践することにより現在のキュウリ・メロンが抱える消費と生産の問題を解決できる。

近年、わが国では社会状況や生活スタイルの変化に伴い、小売店で購入した野菜を家庭で調理して消費することから加工食品や外食・中食で消費する方向へと、野菜の消費形態が大きく変化している。したがって、食品製造や外食・中食事業者が消費者ニーズを把握し、最適な原材料を用いて魅力のある商品を開発することができるように、多様な原材料の供給力を強化することがキュウリ・メロンの消費拡大を図る上で特に重要である。世界に目を転じると、大きさ、形、色、食味食感等の果実品質が大きく異なる多様なキュウリ・メロンの果実が様々な方法で調理され食されている。例えば、欧米や中近東では短太形のキュウリが、またアフリカ等の一部の地域では極めて細長いメロンが生食はもちろん加熱調理の食材として用いられている。現在のわが国では、一部の伝統品種を除いて、果実品質の多様性が著しく乏しく、利用場面がほぼ限定されている。しかし、形態、色、食味食感等の点で優良かつ多様な特性をもつ新品種が育成され、様々な加工食品や外食・中食商品に最適な品質の果実を提供できるようになれば、キュウリ・メロンの利用場面が格段に広がり、魅力のある新しい原材料

としての新規需要の創出が期待される。そして今後のキュウリ属作物育種においては、多様な育種素材を用い、個々の加工・業務用需要に対応する新品種を短期間で育種する、いわばオーダーメイドによる新品種開発を可能にするゲノムデザイン育種の実践が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、果実の肥大性(形や大きさ)、形態、食味食感等の果実品質に多様な変異をもつキュウリ・メロン系統に注目し、キュウリ属作物の新規需要を生み出す新品種の効率的な育種に寄与するゲノムデザイン育種基盤を構築する。キュウリ属作物は単位面積あたりの栽培可能個体数が少なく、また、果実品質関連形質の多くが多数の遺伝子に支配され、かつ栽培環境の影響を受ける難評価形質であるため、表現型計測が遺伝子解析のボトルネックになっている。そのため、キュウリ属作物では一部を除いて、果実品質を支配する遺伝子座の同定及び遺伝子単離が進んでこなかった。そこで本研究では、栽培、表現型測定及びデータ解析までの一連のフェノーム解析の各段階に種々の先端技術を取り入れ、果実品質の定量的評価のハイスループット化を可能にする。

3. 研究の方法

(1) キュウリ果実品質関連形質の遺伝解析
 キュウリ育種において果実形態は収量性や耐病性と並んで特に重要な選抜対象である。そこで、果実形態の効率的選抜技術の開発に資する情報の獲得を目的として、組換え型自殖系統(RIL)の果実形状を楕円フリー工法に基づいて詳細に評価し、QTL解析を行った。供試材料として、球形の果実を着けるCS-PMR1と、現行F1品種に類似した円筒形の果実の固定品種「山東」の交雑後代より育成した111系統のRILを用いた。開花後10日前後の幼果(各系統約10果)の画像について、背景処理などの前処理を行った後に、各果実の輪郭形状を楕円フリー工法・主成分分析により評価した。各主成分(PC)や実測値から算出したL/D比などの果実の形態形質について、SSRマーカーで構築した連鎖地図情報を用いてQTL解析を行った。

また、キュウリでは果実の「硬さ」やシャキシャキ等の擬態語で表現される「クリスプネス」といった食感が特に重要な選抜対象であり、世界各地で様々な果実物性をもつキュウリ品種が育成されている。著者らはこれまでに果実の硬さやクリスプネスに関わる果実物性をプランジャ貫入試験により定量的に評価し、その評価値を用いて世界の様々な品種・系統の多様性を明らかにしてきた。そこで、キュウリの果実物性の遺伝性を明らかにすることを目的に、果実物性が大きく異なる日本型品種と英国温室型品種及び日本型品種と野生型系統の交雑後代の果実物性を

定量的に評価し、SSR マーカーで構築した連鎖地図情報を用いて QTL 解析を行った。

(2) メロン果実物性の定量的評価法の確立
メロンにおいて、硬さや様々な擬音語・擬態語で表現される食感のおいしさを決める重要な特性である。メロンの果肉の性質(肉質)はメルティング質、繊維質、粉質などに分類される。肉質は果肉の硬さとともに育種における重要な選抜対象になっており、例えば、マスクメロンではメルティング質であることが強く求められる。食感の改良を目指した育種や遺伝解析を行う際には食感に関わる果実物性の精度の高い評価が必要になる。しかし、メロンの果肉物性は硬度などの簡単に計測できる物性値を除いて、評価者の主観に基づく評価が広く用いられている。一方、近年では様々な測定機器を用いた果実の物性評価法が開発され、これら新しい評価法は誤差が生まれやすいこれまでの評価法に代わるものとして期待されている。その中でも試料をプランジャ等で破断するときを得られる応力曲線の解析に基づく物性評価は、メロンと同じキュウリ属に分類されるキュウリにおいて有効であることが報告されている。そこで、本研究ではこの解析法をメロン果実の物性評価に適用しその有効性を検証した。

供試材料として果実物性が大きく異なることが期待される世界各地に由来する 15 品種・系統を用いた。一回目の栽培試験では、筑波大学つくば機能植物イノベーション研究センターの農場内のプラスチックハウスで各品種・系統を 10 個体ずつ栽培し、外観品質の調査、試食及び物性測定試験により各品種・系統の収穫適期を検討した。物性測定試験では、小型卓上試験機(EZ-test, Shimadzu)を用いて圧縮・破断試験を行い、プランジャの種類(直径 1 mm、2 mm 及び 3 mm の円柱型)や試験条件を検討した。さらに、二回目の栽培試験では、同農場のプラスチックハウスで各品種・系統を 8~18 個体栽培し、交配後日数の異なる未熟果と成熟果を収穫した。収穫した果実を縦方向に 4 等分し、各断片の中央部を切り出し 4 つの果実片を作成した。次に小型卓上試験機を用いて、直径 2 mm の円柱プランジャを果肉側から 1 mm/sec のスピードで各果実片に貫入させ、応力曲線データを得た。得られた応力曲線の特徴量(波形の複雑さの程度)を二次微分値の解析とフラクタル解析により算出した。

(3) メロン果実形態の遺伝解析

メロン育種において果実形態は収量性や耐病性と並んで特に重要な選抜対象である。そこで、果実形態の効率的選抜技術の開発に資する情報の獲得を目的として、果実形態が大きく異なる 2 系統間の交雑後代(F2 世代)を用いて QTL 解析を行った。供試材料として、わが国の代表的なマスクメロン品種であるアールスフェボリット春系 3 号と雑草メロンの交雑後代より育成した F2 世代集団を作成

した。F2 集団の栽培は抑制栽培と普通栽培の 2 回行い、開花当日の雌花の子房の大きさを計測するとともに、受粉後約 40 日前後の果実の画像について、背景処理などの前処理を行った後に、果長、果径、ネットの程度及び胎座の大きさ等を評価した。また、各果実から得られた種子の大きさについても画像解析により評価した。さらに、F2 世代集団の各個体の幼葉から DNA を抽出し、RAD-Seq 解析による SNP ジェノタイピングを実施し、得られた SNP に基づいて連鎖地図を作成した。各形態的形質について、連鎖地図情報を用いて QTL 解析を行った。

4. 研究成果

(1) キュウリ果実品質関連形質の遺伝解析
楕円フリーエ法・主成分分析により、キュウリ果実の主要な形状変異を抽出した。果実の L/D 比に強く関連する PC1 では 6 つの QTL が検出され、そのうち第 1 連鎖群の 2 領域と第 2 連鎖群の 1 領域は、実測値に基づいて算出した果実の L/D 比の QTL 解析でも検出された。これら全ての QTL において「山東」由来の対立遺伝子が L/D 比を大きくする効果を持つことが認められた。果実の果柄部や花痕部のふくらみに関わる形状要素(PC2~4)では、それぞれ 5 つの QTL が検出された。PC2 では、検出された 5 つの QTL のうち 4 つで、「山東」由来の対立遺伝子が値を低くする方向、つまり果実の先端のふくらみを小さくする効果をもつことが分かった。PC3 と PC4 では、最も効果の大きな QTL では、CS-PMR1 由来の対立遺伝子がこれら主成分の値を低くする方向へ形状を変化させる効果を持つことが認められた。さらに、その他の果実形態では、果実長で 5 つ、果実径で 6 つ、果径比で 5 つ、胎座割合で 4 つ、いぼ・とげの大きさで 3 つ、いぼ・とげの密度で 3 つの QTL が検出された。いくつかの形質では、ほぼ同じ領域に QTL が検出された。また、果実形態の QTL とべと病とうどんこ病に対する抵抗性の QTL と同じ領域に検出されたことから、果実形態と抵抗性遺伝子は強く連鎖していることが示唆された。

果実物性の QTL 解析の結果、果実の 3 つの部位(胎座、果肉、果皮)の硬度において、各部位で 2~4 個の QTL が検出された。クリスプネスについて、日本型品種と英国温室型品種の交雑後代では第 6 染色体に、日本型品種と野生型系統の交雑後代では第 1、第 2、第 3 及び第 6 染色体に QTL が検出された。これら全ての QTL において、日本型品種の対立遺伝子がクリスプネスを上げる効果を持っていた。以上の結果から、キュウリの果実硬度やクリスプネスには複数の遺伝子が関与しており、野生型等の素材からクリスプネスが高い系統を育成するためには、多くの遺伝子を集積する必要があることがわかった。また、クリスプネスにおける 2 集団間の QTL 数の違いは、高クリスプネス性の選抜効率は育

種素材によって大きく異なること示しており、集積すべき遺伝子が多い場合には DNA マーカー選抜技術の活用が育種の効率化に大きく寄与するものと考えられる。

(2) メロン果実物性の定量的評価法の確立
一回目の栽培試験において3種類のプランジャを用いた場合に得られる応力曲線を比較した結果、どの太さのプランジャでも同じような波形の応力曲線が得られた。そのため、二回目の栽培試験では全果実に対し直径 2 mmのプランジャを使用した。また、外観評価と試食試験の結果に基づいて各品種・系統の果実の成熟日数を推定し、二回目の栽培試験における成熟果の収穫時期を決定した。

二回目の栽培試験では各品種・系統から 8 ~16 個の成熟果と、交配日から成熟するまで 1 週間毎に 1~6 個の未熟果を収穫し、物性測定試験に供試した。成熟果では応力曲線の解析対象区間の二次微分値の総和 (SD 値)、フラクタル次元及び平均硬度に有意な相関が認められた。SD 値と硬度の相関係数は 0.82 であり、硬度が高い果実ほど SD 値も高い傾向にあった。一方フラクタル次元と硬度の相関係数は低く (0.25)、フラクタル次元は硬度とは異なる特徴を捉えていると考えられた。また、SD 値とフラクタル次元の相関係数は 0.6 であり、これらの特徴量は似たような波形の特徴を捉えているものの、必ずしも完全に同じではないことが示唆された。

SD 値とフラクタル次元には品種・系統間に有意な差が認められた。肉質が粉質とされるモモルディカメロンとメルティング質のマスクメロンの SD 値やフラクタル次元は極めて低く、サクサクした食感が特徴のハミウリは他の品種・系統と比べて高かった。この結果から、応力曲線データから算出される SD 値やフラクタル次元により、滑らかさや歯触りに関わる肉質を評価しているものと考えられた。また、SD 値やフラクタル次元は果実の成熟に伴って変動し、変化が生じる時期やその程度は品種・系統によって様々であることが分かった。

以上、本研究で用いた評価法はメロンの肉質の品種・系統間差や成熟に伴う比較的微細な変動を定量的に評価することが可能であることから、これまで様々な擬音語・擬態語で評価されてきたメロンの肉質の新しい評価法として有効であると考えられた。

(3) メロン果実形態の遺伝解析

RAD-Seq の結果、遺伝解析材料のアールスフェボリット春系 3 号と雑草メロンには 2,771 個の SNP が検出された。2 回の栽培で供試した F2 世代 273 個体の SNP ジェノタイプデータに基づいて高密度連鎖地図を作成した。作成した連鎖地図は全長 1496.7cM であり、メロンの基本染色体数と同じ 12 連鎖群より構成される。また、本地図には 1,833 マーカーが座乗し、平均座間距離は 0.82cM であった。本地図を用いて QTL 解析を行った結果、果実の形態形質では 30 個、雌花の形

態形質では 20 個、種子形態では 11 個の QTL が検出された。以上の結果から、本研究で供試した雑草メロンを育種素材として目的とする果実形態をもつ品種を育成するためには、非常に多くの遺伝子を集積する必要があることが分かった。メロンの栽培には多大な労力と時間がかかることから、DNA マーカー選抜技術の活用が育種の効率化に大きく寄与するものと考えられる。今後、今回検出された QTL の効果を検証し、特に重要な QTL を同定するとともに、効率的な育種に寄与するマーカー選抜技術の確立を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Yoshioka, Y., K. Shimomura, M. Sugiyama. Exploring an East Asian melon (*Cucumis melo* L.) collection for parthenocarpic ability. Genetic resources and crop evolution 65: 91-101. 2017. (査読有り)

Shimomura, K., N. Fukino, M. Sugiyama, Y. Kawazu, Y. Sakata, Y. Yoshioka. Quantitative trait locus analysis of cucumber fruit morphological traits based on image analysis. Euphytica 213: 138. 2017. (査読有り)

Shimomura, K., H. Horie, M. Sugiyama, Y. Kawazu, Y. Yoshioka. Quantitative evaluation of cucumber fruit texture and shape traits reveals extensive diversity and differentiation. Scientia Horticulturae 199: 133-141. 2016. (査読有り)

[学会発表](計 5 件)

Fitriyah, F., S. Isobe, K. Shirasawa, Y. Yoshioka. Mapping of quantitative trait loci of fruit morphological traits in melon (*Cucumis melo* L.). PAG Asia 2018. 2018.

Shimomura, K., M. Sugiyama, Y. Kawazu, Y. Yoshioka. Quantitative trait loci analysis of fruit texture traits in cucumber. XIV SOLANACEAE and 3rd CUCUBITACEAE Joint Conference (Solcuc2017). 2017.

下村晃一郎, 杉山充啓, 川頭洋一, 吉岡洋輔. キュウリの果実物性に関する QTL 解析. 園芸学会平成 28 年度春季大会. 2016.

Ahmad Zaelani, 杉山充啓, 川頭洋一, 下村晃一郎, 大澤良, 吉岡洋輔. メロンにおける単為結果性系統の単為結果力と果実形質の評価. 日本育種学会第 128 回講演会. 2015.

Yoshioka, Y., N.Fukino, M.Sugiyama,
Y.Kawazu, K.Shimomura, Y.Sakata. QTL
analysis of cucumber fruit shape based on
elliptic Fourier descriptors.
Cucurbitaceae 2014.2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 洋輔 (YOSHIOKA, Yosuke)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：5 0 4 6 2 5 2 8

(3) 連携研究者

下村 晃一郎 (SHIMOMURA, Koichiro)
農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花
き研究部門・研究員
研究者番号：7 0 5 8 5 8 9 3

磯部 祥子 (ISOBE, Sachiko)
かずさ DNA 研究所・先端研究部・植物ゲノ
ム・遺伝学研究室長
研究者番号：2 0 3 4 3 9 7 3

白澤 健太 (SHIRASAWA, Kenta)
かずさ DNA 研究所・先端研究部・主任研究
員
研究者番号：6 0 5 2 7 0 2 6

(4) 研究協力者

西 典子 (NISHI, Noriko)
松村 啓子 (MATSUMURA, Hiroko)
森山 佳世 (MORIYAMA, Kayo)
陳 蕤坤 (CHEN, Ruikun)
アーマド ザエラニ (AHMAD, Zaelani)
岩谷 拓郎 (IWAYA, Takuro)
ファウジアトゥル フィトリア
(FAUZIATUL, Fitriyah)
松尾 宏樹 (MATSUO, Hiroki)
内藤 千陽 (NAITO, Chiharu)