

令和元年6月11日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14846

研究課題名（和文）果皮培養によるセイヨウナシ周縁キメラ特異的果実形質の分離とその育種的利用法の確立

研究課題名（英文）Isolation of coloring trait of red skin pear by pericarp culture, and application for breeding

研究代表者

池田 和生（IKEDA, Kazuo）

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：80555269

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：セイヨウナシ品種の多くは果実の表面が緑色または黄色だが、突然変異によって赤く着色する品種も存在する。果皮の着色は陽光面着色と全面着色が存在するが、全面着色は表皮の遺伝情報が異なり、交配育種の親としては利用できない。本研究では、全面着色形質を遺伝する形質へと導くため、その形質を示す果皮の細胞からの植物体の再生を試みた。その結果、赤く着色するカルスを脱分化させるための培養条件を明らかにすることができた。さらには果皮細胞由来の赤いカルスの代謝物質を解析することで、着色メカニズムの一部が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セイヨウナシにおいて遺伝しない形質とされる果実の全面赤着色形質を分離する試みはこれまでほとんど行われていない。本研究では、組織培養を用いて果皮由来の細胞からのカルス形成が可能であることを明らかにし、このカルスからシュートを再分化することにより全面着色形質を遺伝する形質へと導くことが可能となることを示した。また、得られたカルスのメタボローム分析の結果からセイヨウナシ果皮の着色メカニズムの一部が解明された。これらの成果は今後のセイヨウナシ育種に大いに貢献する知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Most of the pear cultivars show a green or yellow fruit skin, but some cultivars turn red by mutation. The coloring of the pericarp is characterized by the presence of blush type and full coloring; solid type, but the solid type is chimera, so that can not be used as a parent for breeding. In this study, we tried to regenerate the plant from the cells of the fruit skin, in order to lead to the coloring trait to inheritant trait. As a result, we were able to clarify the culture conditions for dedifferentiation of red-colored calli. Furthermore, some of the coloring mechanisms were elucidated by metabolome analysis of the red callus derived from the pericarp cells.

研究分野：園芸科学

キーワード：セイヨウナシ 組織培養 着色 果皮 アントシアニン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セイヨウナシの着色形質は半世紀以上前から遺伝学的見地から研究がおこなわれており、‘スタークリムソン’をはじめとした全面着色形質は周縁キメラであることが要因で遺伝しない形質であるとされてきた (Dayton, 1966)。一方で近年、‘スタークリムソン’の後代には赤着色を呈する個体が現れることが指摘され (石黒ら、2008) Dayton の報告と矛盾した情報が得られている。申請者はこれらの知見を踏まえ、着色に関与するアントシアニン合成メカニズム解明に向けて遺伝学的、分子生物学的視点から研究を進めており、陽光面着色形質と全面着色形質は品種固有の特性であることを明らかにしている。

一方、果樹において自然突然変異によりキメラ化して品種となった例も存在し、上述のセイヨウナシやグレープフルーツで報告がなされている。植物は3つの起源層から分化するため、最外層である L-1 層から分化する果皮表面のみが遺伝的に異なる場合、その形質は遺伝しないとされる。この L-1 層のみの変異を L-2 層もしくは全層の変異にすることができれば遺伝する形質として交雑育種上非常に有用な特性となると考えられる。そのためには L1 層由来の細胞からの組織の再分化が必要とされ、組織培養技術の適用が求められる。再分化の条件は、植物の種、品種あるいは用いる組織などによって著しく異なることが知られており、セイヨウナシと同じバラ科であるリンゴでは葉外植片からの不定芽形成 (増田ら、1987)、ウメでは成木を用いた培養条件の検討 (米光ら、2003) が行われている。ナシについても組織培養に関する研究が数例報告されている。ニホンナシでは茎頂培養による大量繁殖の研究が多く行われ、発根に少し問題があるが茎頂培養系は確立してきた。Banno ら (1989) がニホンナシの茎頂培養からのシュート形成について培養条件等の検討を行ったところ、高濃度のオーキシンを添加した時、発根率の増加が見られた。さらに、茎葉からのカルス形成については、オーキシンの添加、中でも 4FA (4-fluorophenoxyacetic acid) および 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) がカルス形成を促進し、Murashige & Skoog (MS)、Linsmair & Skoog (LS)、修正 MS および Woody Plant Medium (WPM) 培地においてカルス形成が良好であったことが報告されている (河合ら、1992)。セイヨウナシについても茎頂培養による大量増殖の研究が行われている。鈴木らによると、展葉数と最大葉長に対するサイトカイニンの促進効果が認められた (鈴木ら、1987)。また、シュートの再分化に及ぼす培地成分および生長調節物質の影響についての検討を行ったところ、同様に Thidiazuron (以下、TDZ) の添加はシュートの再分化を促進し、Nitsch & Nitsch (NN) 培地 (Nitsch and Nitsch, 1969) においてシュート形成が良好であった (Hennayake ら、2003)。ナシについての組織培養に関する研究はこのように数例報告されているが、実生以外の組織からの再分化の頻度は一般に低く、多くの品種について実用化するのはまだ困難な点を残している。

### 2. 研究の目的

上述のように、セイヨウナシの全面赤着色形質を遺伝する形質へと導くためには L1 層由来の果皮からの再分化シュートを得ることが目的となる。本研究では、セイヨウナシ果皮培養において、基本培地、外植片、固化材、オーキシンおよびサイトカイニンがカルス形成およびシュート再生に及ぼす影響を検討するとともに得られたカルスを利用し着色形質の代謝経路について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養条件の検討

山形県寒河江市の山形県農業総合研究センター園芸試験場植栽のセイヨウナシ‘リーガル・レッド・コムス’および‘ロージー・レッド・パートレット’の2品種を用いた。果実は0.2%次亜塩素酸ナトリウムで5分間表面殺菌後、滅菌水で洗浄した。その後、ピーラーとメスを用いて果皮を約5mm角に調製して外植片とした。外植片数は培地に5つずつ置床し、1区当たり100とした。基本培地として、NN培地または改変NN培地を用いた。培地には、オーキシン(NAA)、サイトカイニン、ショ糖3%、および固化剤を添加した。供試培地は培養瓶に20mlずつ分注後、アルミホイルで栓をし、オートクレーブにて加圧滅菌した。なお、本報告で供試した培地はすべてpH5.8に調整した。培養はインキュベーター内で25℃暗黒下にて1ヶ月間、その後16時間日長にて行った。これらは同培地に植え継ぎ30~40日間隔で継代培養を繰り返し、試験は3反復とした。また、培養4ヶ月後にカルス形成率を調査し、得られたカルス形成数からカルス形成率を算出し、角変換した後Tukey法により分散分析を行った。

#### 1) カルス形成に及ぼす基本培地の影響

基本培地として、NN培地および窒素含量を減らした改変NN培地を用いた。

#### 2) カルス形成に及ぼす固化剤の影響

固化剤としてゲランガム0.4%および寒天0.8%を用いた。

#### 3) カルス形成に及ぼすオーキシンの影響

オーキシンとしてNAAを用い、0.1および0.2 mg・L<sup>-1</sup>の濃度について検討した。培地は、(1)と同様のものを用いた。

#### 4) カルス形成に及ぼす外植体のサンプリング時期の影響

セイヨウナシ幼果は2016年5月19、24、27、31日に、セイヨウナシ果実は2016年9月20日にサンプリングを行った。培地は、(2)と同様のものを用いた。外植片数は培地に5

つずつ置床し、1区当たり幼果は100、果実は250とした。

5) サイトカイニンに種類と濃度の影響

サイトカイニンの種類や濃度を各々以下の様に変え添加し、計6処理区準備した。

6-Benzylaminopurine (以下、BAP) は  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  とした。TDZ は  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  とした。

(2) 果皮培養由来カルスのメタボローム分析

セイヨウナシ‘リーガル・レッド・コムス’の幼果から5mm角の外植片を調整し、チチアズロン  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、ショ糖3%、および固化剤としてゲランガム0.4%を添加した改変NN培地上で培養した。培養は外植片を置床後25暗黒下にて1ヶ月間培養した後、16時間日長条件下で培養を行い、約1ヶ月毎に継代培養を行った。得られたカルスを赤着色カルスおよび非赤着色カルスに分離し、3回以上継代培養経て着色形質が固定したカルスを解析に用いた。サンプリング後すぐに凍結乾燥を行い、前処理後、メタノール抽出を行いCE-TOF-MSに供しイオン性代謝物を分析した。

4. 研究成果

(1) 培養条件の検討

培養開始約30日後の暗黒条件下においてカルス発生が確認でき、それらのカルスは赤色、緑色、白色のものが観察された。幼果の果皮を外植片に用い基本培地を改変NN培地とした場合にカルス形成は良好であり(第1表)、カルス形成に及ぼす固化剤の影響についての検討を行ったところは、ゲランガムを添加した場合で高いカルス形成率が得られた(データ略)。また、カルス形成に及ぼすオーキシンの影響についての検討を行ったところ、NAA濃度の間ではカルスの形成に顕著な差はみられなかった。そのため、オーキシンとしてNAAを添加する場合には  $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  で十分であると考えられる。

第1表. カルス形成に及ぼす基本培地, サンプリング時期およびオーキシンの影響

		NAA濃度		サンプル	
		$0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	幼果	果実
		カルス形成率 <sup>z</sup> (%)	カルス形成率 <sup>z</sup> (%)	カルス形成率 <sup>z</sup> (%)	カルス形成率 <sup>z</sup> (%)
リーガル・レッド・コムス	NN培地	$70.7 \pm 11.04 \text{ a}$	$78.3 \pm 3.65 \text{ a}$	$78.0 \pm 5.91 \text{ a}$	$78.5 \pm 4.36 \text{ a}$
	改変NN培地	$76.3 \pm 14.24 \text{ ab}$	$91.3 \pm 5.46 \text{ b}$	$9.2 \pm 15.85 \text{ b}$	$66.3 \pm 11.42 \text{ a}$
ロージー・レッド・バートレット	NN培地	$70.7 \pm 17.07 \text{ a}$	$75.0 \pm 12.02 \text{ a}$	$77.9 \pm 16.30 \text{ a}$	$70.2 \pm 3.59 \text{ a}$
	改変NN培地	$64.0 \pm 6.32 \text{ a}$	$75.7 \pm 7.38 \text{ a}$	$59.3 \pm 8.06 \text{ a}$	$73.4 \pm 2.99 \text{ a}$

異なる小文字のアルファベット間には5%水準の有意差があることを示す(Tukey検定)

<sup>z</sup> 平均値 ± 標準誤差を示す

また、幼果皮を外植片とした場合、‘リーガル・レッド・コムス’については、サイトカイニンの種類および濃度差間における有意差はなく、カルス形成率が良好であった(データ略)。一方で、‘ロージー・レッド・バートレット’については、BAPよりもTDZを添加した培地で高いカルス形成率が得られた。果皮由来カルスを外植片とした場合、両品種ともBAP処理区におけるカルス生存率が極めて低かったが、TDZ処理区におけるカルス生存率は高かった(第2表)。また、両品種ともTDZ  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  添加した区において、極めて高いカルス生存率が得られた。よって、両品種ともカルスを維持し続ける必要がある場合、TDZ  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  添加した培地に移植することが好ましいと考えられた。しかしながら、果皮由来カルスからのシュート形成には至らなかった。一方で、培養過程で、赤く着色したカルスを得ることができた、これらはL-1層由来の細胞から形成されたと推測される。

第2表. 果皮由来カルスからのカルス形成に及ぼすサイトカイニンの影響

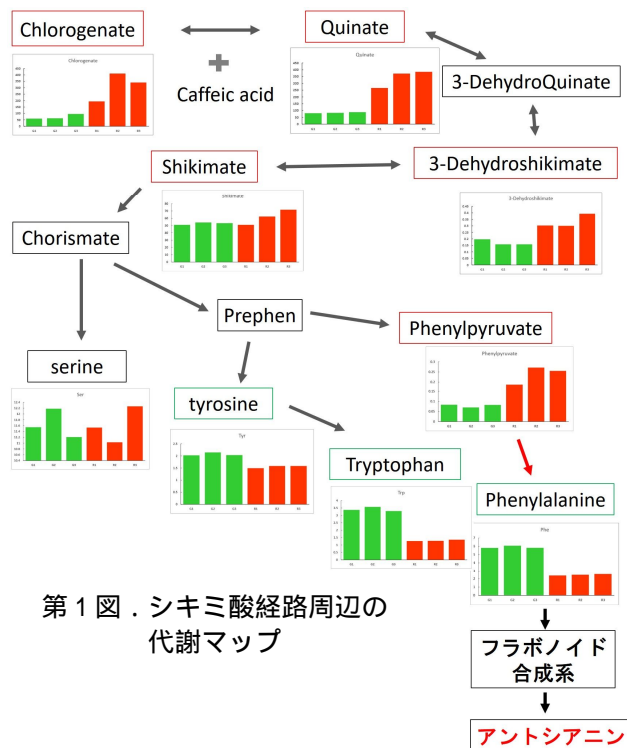
品種	BAP濃度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	カルス生存率 <sup>z</sup>		TDZ濃度 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	カルス生存率 <sup>z</sup>	
		(%)			(%)	
‘リーガル・レッド・コムス’	0.1	$7.4 \pm 3.7$	ab	0.1	$17.2 \pm 8.8$	ab
	0.5	$0 \pm 0$	a	0.5	$33.0 \pm 5.7$	bc
	1	$5.1 \pm 5.1$	ab	1	$70.5 \pm 12.4$	cd
	2.5	$20.8 \pm 3.2$	abc	2.5	$76.3 \pm 8.2$	d
	5	$19.5 \pm 4.5$	ab	5	$88.0 \pm 2.5$	d
	10	$15.3 \pm 8.3$	ab	10	$71.0 \pm 11.2$	cd
‘ロージー・レッド・バートレット’	0.1	$31.7 \pm 12.4$	ab	0.1	$69.0 \pm 3.0$	bc
	0.5	$13.3 \pm 13.3$	a	0.5	$67.3 \pm 11.7$	bc
	1	$10.2 \pm 5.2$	a	1	$79.0 \pm 10.0$	bc
	2.5	$22.9 \pm 5.4$	ab	2.5	$87.6 \pm 9.7$	c
	5	$49.5 \pm 6.9$	abc	5	$92.5 \pm 7.5$	c
	10	$70.1 \pm 5.1$	bc	10	$76.7 \pm 6.8$	bc

異なる小文字のアルファベット間には5%水準の有意差があることを示す(Tukey検定)

<sup>z</sup> 平均値 ± 標準誤差を示す

## (2) 果皮培養由来カルスのメタボローム分析

緑または白色のカルスを非着色カルス (Green), 赤色のカルスを着色カルス (Red) としてメタボローム分析を行った結果、アニオン性代謝物 37 種類、カチオン性代謝物 106 種類の代謝物を検出した。それらの代謝物について赤色色素であるアントシアニンを含むポリフェノール合成経路およびそれらに間接的に必要とされるシキミ酸経路の代謝物に注目した結果、赤着色カルスにおいて特に、クロロゲン酸とキナ酸が多く含まれており、シキミ酸経路の活性が非常に高いことが示された(第1図)。一方、シキミ酸経路から合成されるフェニルアラニンについては着色カルスの含有量が低かった。これはフェニルアラニンから始まるアントシアニンの合成に使用されているため、含有量が低いことが示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

阿部美里・八代真緒・佐々木泰子・池田和生. 組織培養による赤着色系セイヨウナシの果皮からのカルス形成. 平成 29 年度園芸学会東北支部大会. 2017 年 8 月 18 日. 山形大学農学部 (鶴岡市)

池田和生・広瀬諒一・阿部美里・太田智弥・及川 彰. 赤着色系セイヨウナシの果皮培養由来カルスのメタボローム分析. 園芸学会平成 31 年度春季大会. 2019 年 3 月 23、24 日. 明治大学農学部 生田キャンパス (川崎市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 村山秀樹

ローマ字氏名: Hideki MURAYAMA

所属研究機関名: 山形大学

部局名: 農学部 食料生命環境学科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 40230015

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。