

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：81604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07653

研究課題名(和文) リンゴの超早期開花を非形質転換で誘導する為の相転換機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of phase change of apple seedlings for extreme precocious flowering in apple with no transmission of genetic modification

研究代表者

岡田 初彦 (Okada, Hatsuhiko)

福島県農業総合センター・果樹研究所・主任研究員

研究者番号：50504081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴは最も重要な果樹作物の一つである。播種から開花に至るまでの幼若相が長いことが、育種・遺伝解析を行う際の障害となっている。自根実生の場合は開花まで10年程度を必要とする。通常の育種において育種効率を高めるためには幼若相から成熟相への相転換の促進は必須である。本研究では *Malus hupehensis* の無配偶種子を遺伝的背景が斉一なモデル系として、肥培管理の改良により播種から2年で開花させる技術を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基本的に高度なヘテロ性を有するリンゴの研究において、栽培種実生集団を用いた試験研究では、遺伝的な要因により結果が大きく左右される場合が少なくない。リンゴの相転換を精確に解析するうえでも、種子親と花粉親の組合せの影響を極力排除する必要がある。本研究では、リンゴ近縁種 *M. hupehensis* のアポミクシスを利用することにより、遺伝的バックグラウンドをできる限り均一にしたうえで、早期開花を実現する技術体系を明らかにできる。このことにより安定的なモデル系が確立でき、さらに非形質転換で花芽誘導を促進することから、実際のリンゴ育種の効率化に直結した技術となる。

研究成果の概要(英文)：Apple (*Malus domestica* Borkh.) are one of the most important fruit crops worldwide. The long duration from sowing to flowering presents difficulties for breeding and genetic analysis of apple trees. In the case of own-root seedlings, about 10 years are needed. In order to improve the efficiency of normal breeding, accelerate flowering by reducing the juvenile or vegetative phase of the trees after sowing is indispensable. In this study, the improvement of fertilizer application has been able to produce flowering seedlings approximately 2 years after sowing with uniformity genetic background using apomictic seeds of *Malus hupehensis* Rehd.

研究分野：園芸科学

キーワード：リンゴ 早期開花 相転換 アポミクシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)木本植物であるリンゴは、播種後、初開花まで6～8年程度の幼若期間を経過後、初めて花成刺激に反応可能になる過渡相を経て、毎年、安定して花成が起こる成熟相へと移行する。リンゴはアグロバクテリウム法を用いたゲノム改変が可能になったが、播種から開花に至るまでの幼若相が長いことが改変した形質の確認や挿入された配列の除去の妨げとなっている。

(2)通常のリンゴ育種において育種効率を高めるためにも、幼若相から成熟相への相転換の促進は必須である。しかし、リンゴ栽培種の実生はヘテロ性が高く、遺伝的な生育のバラツキが大きいことなどから相転換を解析するためのモデル系が存在していなかった。

2. 研究の目的

これまでリンゴの相転換または幼若性に関する研究が多数報告されてはいるが、相転換機構は十分に解明されず、実用的な相転換促進技術の開発には至っていない。そこで本研究では、リンゴの近縁種でアポミクシス(無配偶生殖)を有する *Malus hupehensis* の種子を、遺伝的背景が斉一なモデル系として、早期開花が可能な育苗体系の構築、正確な相転換時期の把握、

植物ホルモンの動態の解析を行ない、リンゴの相転換機構を解明することを目的とした。また、本研究の成果をリンゴ育種の現場へ迅速に技術移転が可能となるよう、目指すモデル育苗体系は形質転換技術を使わず、種々の栽培管理技術を体系的に組み上げることにより実現することを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 早期開花が可能な育苗体系の構築

既存の育苗方法によるリンゴ交雑実生の生育は、播種から1年で樹高1m程度であるが、早期開花を目標として、播種から半年で安定的に樹高2m以上の生育を確保できる耕種的条件を検討する。特に、連続的な生長量を確保するのに好適な窒素の施肥量と施肥方法および肥料の種類を明らかにする。さらに、樹高2m超後の誘引などによる花芽形成促進技術の効果を検証する。

(2) 正確な相転換時期の把握

幼若相から成熟相への転換時期を正確に把握することは本研究の基本である。相転換は基本栄養成長量を充足した後に誘導されると考えられることから、成長量の指標となり得る樹高などの項目や幼若期特異的なとげなどを毎年調査し、初花成(相転換)と相関の高い指標を決定する。花成とともにこれら成長量や形態的指標の裏付けを行うことによって、遺伝子組換えによる早期開花と明確に区別し、本来の相転換を判別することが可能である。さらに、緑枝接ぎやファイトトロン等での連続成長による早期相転換処理において、これらの指標の有効性を示す。

(3) 相転換時の植物ホルモンの動態の解析

早期開花の育苗体系と相転換の指標が明らかになった時点で、相転換時の植物ホルモンの動態を解析する。花成と関わるオーキシシンとサイトカイニン、およびそれらに加えてジベレリンについて、播種後の経時変化および実生の先端の成熟相と基部の幼若相の各部位の植物ホルモンを分析してその動態を調査し、相転換に関わる植物ホルモンを明らかにする。

4. 研究成果

リンゴの早期開花研究では、栽培品種の交雑実生を用い加温ガラス温室で冬季の育苗と緑枝接ぎにより、一部の実生個体を交配後2～3年で開花させることに成功した報告がある(高岸香里ら,2009;高岸香ら,2010)。しかし、これらの相転換の研究においては、遺伝的背景が多様な種子を用いているため、結果の精度や再現性に問題があった。本研究では *M. hupehensis* のアポミクシスを利用して、実生の遺伝的な斉一性を確保した上で、加温ガラス温室内・24時間日長下(図1)でポット育苗を行い、播種から1年以内に樹高2m以上を確保できる施肥条件を検証した。

(1) 1年目は4月上旬に播種を行い、肥培条件は移植時に元肥としてシグモイド型緩行性被覆肥料(N20%、K13%)スーパーNKエコロング203の100、140、180をそれぞれ容積比でタキイ育苗培土30に対して1の割合で培養土に混用施用した。光条件はLED電球(2400lmおよび640lm)を用い、光源から50cm下で3000lux 24時間日長。温度条件は、最低気温は加温により10℃、最高気温は自然換気により40℃程度とした。追肥は硝酸石灰区(N16%)1.6g(N成分0.26g)/ポット、液体肥料区(N6%、P10%、K5%)500倍の2区とし、硝酸石灰は2週間に1回、液体肥料は毎週施用した。*M. hupehensis* 実生苗の生育は、播種から約6ヶ月後の10月上旬には施肥の有無に関わらずほぼ停止した(図2)。この時の樹高は最大で157cm、最小で48cm、平均98cmで、目標とした2mには達しなかった。施肥が *M. hupehensis* 実生苗の生育に及ぼす効果は、元肥については培養土単体で無施肥のほうが生育は良好であった。これは、今回の試験では施肥量を標準よりかなり多く施用したことにより、窒素の過剰障害が発生し生育が抑制されたと推測される。一方、追肥では液体肥料の生育促進効果が有意に高かった(表1)。一度生育が停止した実生は、切り返しやシアナミド処理等を施しても再伸長がみられなかったことから、ポットごと4℃冷蔵庫に入れ2カ月程度低温処理を行った後、再度温室に戻したところ再伸長が始まり、3～5ヶ月で樹高は最大314cm、最小228cm、平均277cmとなったが、花芽



図1 LEDランプによる電照

の10月上旬には施肥の有無に関わらずほぼ停止した(図2)。この時の樹高は最大で157cm、最小で48cm、平均98cmで、目標とした2mには達しなかった。施肥が *M. hupehensis* 実生苗の生育に及ぼす効果は、元肥については培養土単体で無施肥のほうが生育は良好であった。これは、今回の試験では施肥量を標準よりかなり多く施用したことにより、窒素の過剰障害が発生し生育が抑制されたと推測される。一方、追肥では液体肥料の生育促進効果が有意に高かった(表1)。一度生育が停止した実生は、切り返しやシアナミド処理等を施しても再伸長がみられなかったことから、ポットごと4℃冷蔵庫に入れ2カ月程度低温処理を行った後、再度温室に戻したところ再伸長が始まり、3～5ヶ月で樹高は最大314cm、最小228cm、平均277cmとなったが、花芽

の分化は確認できなかった。これらの実生のうちハウス外（網室内）で自然休眠させた 15 本中 2 本が、播種から約 2 年後の 2019 年 4 月下旬に開花にいたった(図 3)。

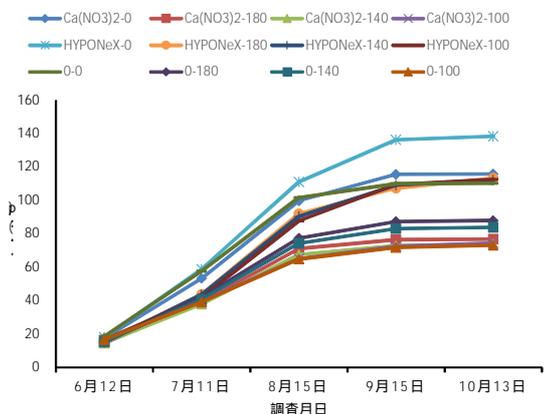


図 2 M. hupehensis 実生苗の樹高の推移 (2017 年)

(2) 2 年目は、1 年目の結果をふまえて播種時期の検討と施肥体系の改良を目指した。育苗時の光条件は前年同様、温度条件は最低気温を 10 上げて 20 とした。播種時期を 1、2、3 月中旬の 3 期に分け、施肥条件は元肥を施用せず、追肥は液体肥料(ハイポネックス; N6%、P10%、K5%)500 倍毎週施用または液体肥料 500 倍毎週施用 + 尿素 500 倍葉面散布 4 回/週の 2 区とし、さらに 1 月播種区のみ散布液体肥料 250 倍 2 週間毎施用区を設けた。対照は追肥無しとした。本年度は温室から屋外に出すまで生育が止まることなく 7 ヶ月以上伸長が続いた。播種時期別の生育を比べると、播種時期が遅くなるほど生育は劣った。追肥が M. hupehensis 実生苗の生育に及ぼす影響は、液体肥料の濃度、葉面散布の有無による差は無く、いずれも対照区より生育が促進された(表 2)。今回の試験では、1 月に播種し、液体肥料の追肥を施用することにより、9 月までに目標とする樹高 200 cm は確保出来たが、播種から 1 年で花芽の分化は確認出来なかった。1 月播種実生のうち 20 本についてポットごとほ場に定植して栽培を継続したところ、樹高は平均 352cm (最大 356cm、最小 306cm) となり播種から約 2 年 3 か月後の 2019 年 4 月下旬に 75% の実生が開花に至った。

(3) 3 年目は、1、2 年目の結果をふまえて、引き続き播種時期の検討と施肥体系の改良を目指した。育苗時の光条件、温度条件とも前年同様とした。播種時期は 11、12、1 月中旬の 3 期に分け、施肥条件は元肥を施用せず、液体肥料 (ハイポネックス; N6%、P10%、K5%) 250 倍隔週 1 回施用 (6 月 20 日以降 500 倍毎週施用) とし、さらに液体肥料 500 倍葉面散布 4 回/週散布区を設けた。対照は追肥無しとした。前年度の試験では、液体肥料 250 倍隔週施用と 500 倍毎週施用で有意な差が見られなかったことから、今年度は液体肥料 250 倍隔週施用で試験を開始したが、前年度と比べて生育が劣ったことから、6 月中旬以降液体肥料 500 倍毎週施用に切替えた。11 月播種、12 月播種では液肥追肥区の生育が優れ、葉面散布の効果は見られなかった。1 月播種では処理区間では差が無かった。以上の結果から、播種から 1 年以内で樹高 2 m 以上の生育を確保するには、12 月中旬までに播種を行い、定期的な液肥の追肥が必要と考えられた。また、今回の試験では花芽分化誘導のために樹高 2 m

表 1 施肥と樹高の関係(2017)

元肥	追肥	樹高 (cm)
LP100	Ca(NO3)2	74.6
	HYPONeX	112.7
	無	73.2
LP140	Ca(NO3)2	73.8
	HYPONeX	112.3
	無	84.0
LP180	Ca(NO3)2	76.9
	HYPONeX	113.4
	無	88.1
無	Ca(NO3)2	115.9
	HYPONeX	138.5
	無	110.4
F値	元肥	42.8 ***
	追肥	23.9 ***
	交互作用	ns

注) 分散分析結果 ***0.1%水準で有意差有、ns 有意差無

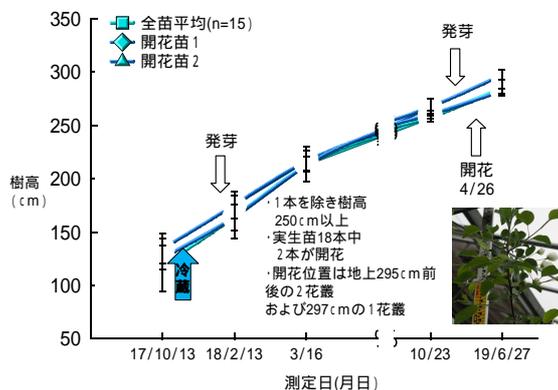


図 3 実生苗の生育経過(2017-2019)

表 2 播種時期と樹高 (2018 年)

播種月日	1月12日	2月13日	3月13日
肥料	樹高(cm)		
追肥1	259.5 ^b	206.0 ^b	103.8 ^b
追肥2	253.3 ^b	214.1 ^b	91.1 ^b
追肥3	267.6 ^b	—	—
対照	217.3 ^a	151.9 ^a	40.4 ^a
分散分析	***	***	***

注) Tukey の多重比較により異符号間には 5% 水準で有意差あり
 追肥 1: ハイポネックス 5 0 0 倍/week + 尿素 5 0 0 倍葉面散布/2days
 追肥 2: ハイポネックス 5 0 0 倍/week
 追肥 3: ハイポネックス 2 5 0 倍/2week
 対照: 追肥無し

超の生育に達した一部の実生苗について、培養土を洗浄した後パーミュキュライトへの移植やリング処理を実施したが、いずれの実生も次年度に花芽分化は確認できなかった。

(4) 本研究では、播種から2年程度で開花に至る耕種条件を明らかにした。これまでの研究(小森ら, 2017)で、*M. hupehensis* 無配偶生殖実生において樹高と幹周が花成の指標として正確であり、樹高 250cm、幹周 7~8cm で、特に樹高は精度が高い指標で再現性も高いことを示してきたが、本研究では、樹高は上記条件を満たし、幹周は小さい実生で花成形成が確認されており、より精度の高い指標の特定には至っていない。また、相転換に関わる植物ホルモンの動態解析も実施できていない。本研究では実生苗を徒長的に生育させていることから、相転換が起こっていても花芽形成誘導に至っていないことが推測される。今後は生育を促進しつつ、自然条件下で花芽分化が開始される7月までに樹高 250 cm以上を達成しつつ、耕種的条件および花芽誘導処理等を検討する。

<引用文献>

高岸香里・山本翔太・李 積軍・張 春芬・副島淳一・渡邊 学・田中紀充・壽松木 章・小森貞男(2009) 播種後2年で開花したリンゴ交雑実生の生育特性. 園学研 8 (別 2): 393.

高岸香里・山本翔太・李 積軍・張 春芬・副島淳一・渡邊 学・壽松木 章・小森貞男(2010) JM7 に接木した播種後3年目のりんご個体の花芽形成状態. 園学研 9 (別 1) : 266.

小森貞男・守谷(田中)友紀・岡田初彦・金山喜則・渡邊 学(2017) *Malus hupehensis* (無配偶生殖実生)の開花特性. 園学要旨. 平 29 東北支部: 11-12.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小森貞男・守谷(田中)友紀・岡田初彦・金山喜則・渡邊 学
2. 発表標題 Malus hupehensis (無配偶生殖実生)の開花特性
3. 学会等名 園芸学会東北支部
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡田初彦・小森貞男・渡邊学
2. 発表標題 Malus hupehensis(無配偶生殖実生)の生育促進に関する研究
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉嘉儀・岡田初彦・小森貞男・村上政伸・渡邊学
2. 発表標題 Malus hupehensis(無配偶生殖実生)の水耕栽培を利用した早期開花
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小森 貞男 (Komori Sadao) (00333758)	岩手大学・農学部・教授 (11201)	

