

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15222

研究課題名(和文)少低温要求性ニホンナシ品種の早期選抜方法の検討

研究課題名(英文)Study on early selection method of low-chilling Japanese pear cultivar

研究代表者

竹村 圭弘 (TAKEMURA, Yoshihiro)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：70731545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：少低温ニホンナシ品種(LC)を選抜するための分子マーカーの開発を目的として、タイワンナシ(LC)、ニホンナシ(HC)、およびそれらのF1とF2後代を用いて次世代シーケンサーによるRAD-seq解析を行った。得られた多型中の120個は、F2後代のLCとHC間で0.8を超えるSNPインデックスを示した。BLASTnを用いた解析により、これらの多型において、NACドメインタンパク質やFボックスタンパク質をコードする遺伝子との相同性が高い領域が確認された。これらの同定された多型遺伝子座は、ナシ属植物の自発休眠打破に要する低温要求性を推定する分子マーカーとしての役割を果たす可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の暖冬による影響でナシの休眠打破に必要な低温積算量が不足し、世界各地の低緯度地域、並びに日本の西南暖地でも春の開花遅延や発芽不良が散見されており、少低温要求性ニホンナシ品種の育成は急務とされている。果樹類の新品種育成には多大な労力と時間を要するため、有用形質を示す個体を早期に選抜するための分子マーカーの開発が求められており本研究はこれの一助になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming to develop a molecular marker for selecting a low-chilling (LC) Japanese pear cultivar, we performed RAD-seq analysis by next-generation sequencing of the Taiwanese pear (LC), Japanese pear (HC) and their F1 and F2 progenies. Among these polymorphic loci, 120 showed an SNP-index of over 0.8 in LC and HC seedlings of the F2 progenies. The analysis using the BLASTn revealed highly homologous regions to a gene that codes for NAC-domain protein or F-box protein in polymorphic loci with a high SNP-index. Thus, the polymorphic loci identified in this study may play a role as molecular markers to estimate chilling requirements for breaking endodormancy in *Pyrus* plants.

研究分野：園芸

キーワード：自発休眠 低温要求量 ニホンナシ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

落葉果樹の芽は秋季から自発休眠に入り、冬季に一定量の低温量を遭遇させることで自発休眠から覚醒し、翌春に萌芽することが可能となる。しかしながら、近年の暖冬による影響で休眠打破に必要な低温積算量が不足し、世界各地の低緯度地域、並びに日本の九州でもニホンナシの春の開花遅延や発芽不良が問題視され、持続的安定生産を脅かしている。自発休眠打破に必要な低温要求量(チルユニット:CU)は樹種や品種ごとで異なっており、リンゴやブドウ、モモなどでは低温要求量の少ない品種が既に育成されているが、少低温要求性を示すナシ品種については確認されていないため、低温要求量の少ない品種の育成と自発休眠機構の解明が急務とされている。

2. 研究の目的

落葉果樹の芽の自発休眠打破に必要とされる低温要求量は、樹種や品種ごとで固有のものであるが、近年の暖冬による影響で、休眠打破に必要な低温積算量の不足によるニホンナシの開花遅延や発芽不良が発生している。これまでに申請者は、低温要求量の少ないタイワンナシとニホンナシ系統の交配により得られたF1系統を用いての少低温要求性ニホンナシ品種の育成を行ってきた。さらに、F1系統の自殖によるF2系統群の作出にも成功しており、その中からは低温要求性の多少が異なる個体を選抜している。課題申請する研究では、F2系統群を用いての『低温要求性の多少を判別するDNAマーカーの選抜』を行うとともに、『少低温要求性ニホンナシ品種の候補選抜』を行う。

3. 研究の方法

(1) 低温要求性の多少を判別するDNAマーカーの選抜

‘おさ二十世紀’の自殖後代であるニホンナシ系統TH3と少低温要求性タイワンナシ横山、TH3×横山のF1系統の自殖後代であるF2系統群を供試した。CU600時における横山、TH3、F1系統およびF2系統群の発育指数(Fig.1)をもとにF2個体の分布を調べた。また、F2系統群の幼葉からゲノムDNAの抽出し次世代シーケンサを用いてのRAD-seq解析を行い、低温要求量の多少に關与する遺伝子の網羅的解析を行った。

(2) 少低温要求性ニホンナシ品種の候補選抜

F1系統から選抜した個体とニホンナシの交配により得られたAF1系統群18系統についてCU600時に葉芽が5節連続着生した枝を5本程度採取して水挿し加温処理を行い、葉芽の発育指数を調査した。また、AF1系統を中間母本として品種登録を行うため一年枝・幼葉・花器・本葉の形・大きさ・色などの形質について調査を行った。さらに、低温要求量の多少を評価するDNAマーカーの探索SSRマーカーを用いてTH3・横山間で異なる増幅断片長を示すマーカーを選抜し、増幅断片長と数塩基の反復の回数を調査した。これらのマーカーをF2系統群中で低温要求量の多い系統と少ない系統各5系統ずつの計10系統においても同様の調査を行った。用いたマーカーはリンゴにおいて低温要求性に關与する遺伝子座の存在が示唆されている第9染色体上に焦点を置き、ニホンナシに加え、セイヨウナシ、リンゴ由来のものを54マーカー供試した。

4. 研究成果

(1) 低温要求性の多少を判別するDNAマーカーの選抜

発育指数の平均値は、横山(‘Hengshanli’)が4.4、TH3が1.5、F1系統No.72は3.6となった。また、F2系統群の平均値をもとにヒストグラムを作成した結果、F1系統No.72と同程度の発育指数3.6~4.0の値を示す個体が最も多く確認された(Fig.2)。また、F2系統群の多くは横山とTH3の間に広く分布しており、低温要求量の多少の決定にはQTLが關与していると示唆された。さらに、F2系統群の中には、横山と同程度の値を示す個体もみられ、これらの系統群は少低温要求性に關与する遺伝子を保有していると推測された。F2系統群を用いてのRAD-seq解析を行った結果、56,719個の変異が検出され、得られた17,162個の多型中の120個は、F2後代間で0.8を超えるSNPインデックスを示した。BLASTnを用いた解析により、高いSNPインデックスを持つ多型において、NACドメインタンパク質やFボックスタンパク質をコードする遺伝子との相関性が高い領域が確認された。これらの同定された多型遺伝子座は、ナシ属植物の自発休眠打破に要する低温要求性を推定する分子マーカーとしての役割を果たす可能性があると考えられた。

(2) 少低温要求性ニホンナシ品種の候補選抜

栽培品種で最も低い低温要求量を示すニホンナシ品種‘豊水’ではCU600の不十分な低温積算では発育指数が平成29年度では2.0、平成30年度では2.7と低い値であった。AF1系統では‘豊水’よりも有意に高い発育指数を示す系統が平成29年度では9系統、平成30年度では6系統で確認でき、2カ年を通して‘豊水’よりも有意に発育指数の高いAF1No.17、38、39、42、43、45が少低温要求性を有していると考えられた。また全てのAF1系統の発育指数が親の‘秋栄’とF1No.74の発育指数の間に広く分布した。低温要求量の多少の決定にはQTLが關与することが報告されており、今回の実験においてもQTLの關与が示唆される結果となった。幼葉、成葉、

花器についてはその程度にばらつきのあるの形質が多かったが、一年枝の皮目の大きさ、毛じの粗密、葉芽の着き方については種子親の‘秋栄’の形質に似る傾向があった。今後は果実に関する項目についても調査を行い、AF1 系統を中間母本として品種登録する予定である。54 マーカー中 14 マーカーにおいて横山、TH3 の両方で増幅断片が検出され、その中で数塩基の反復が確認できたのは 11 マーカーであった。数塩基の反復の回数は横山、TH3 間では差が確認されたが、低温要求量の異なる F2 系統群 10 系統の間では差が確認されず、今回用いたマーカーでは低温要求性に関与する遺伝子座の同定には至らなかった。今後は F1 系統群での検討や、未だ供試していない 9 番染色体上のマーカーに加え、他の染色体においても調査を行っていく必要がある。



Fig. 1. The developmental stage of leaf bud in *pyrus* plant.

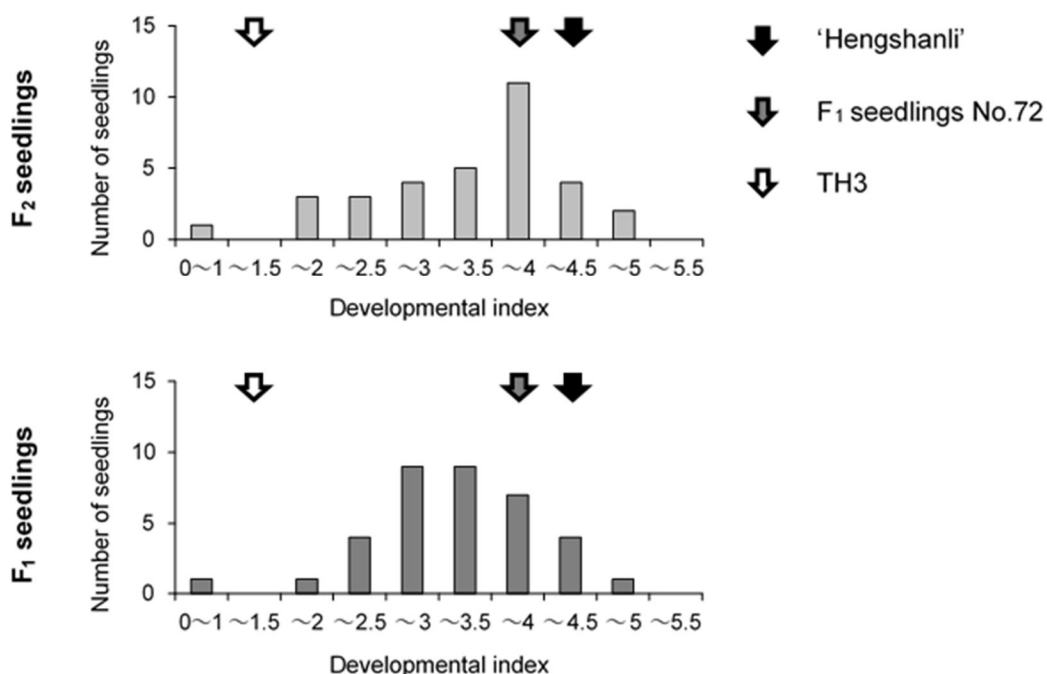


Fig. 2. The histograms of developmental index in F₁ and F₂ seedlings.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Y. Takemura, F. Tamura	4. 巻 19
2. 論文標題 Draft genome sequence of Taiwanese pear (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Date in brief	6. 最初と最後の頁 1871-1873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Takemura, F. Tamura	4. 巻 19
2. 論文標題 Draft genome sequence of Japanese pear (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Date in brief	6. 最初と最後の頁 2221-2223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Y. Takemura, Y. Shida, K. Tanaka, S. Yajima, F. Tamura
2. 発表標題 RAD-seq analysis of genes related to chilling requirements for endodormancy breaking in pyrus plant
3. 学会等名 6th Plant dormancy symposium (国際学会)
4. 発表年 2018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