

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06033

研究課題名（和文）極晩生モモ‘玄桃’の果実成熟特性およびその制御機構の解明

研究課題名（英文）Studies on regulatory mechanisms of ultra-late maturing trait in 'Gento' peach

研究代表者

河井 崇 (KAWAI, Takashi)

岡山大学・環境生命科学学域・助教

研究者番号：90721134

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）：本研究では、モモ‘玄桃’において見出された極晩生の成熟特性の制御機構を明らかにするため、F1後代における形質の遺伝様式および果実発育中の生理学的・組織学的変化について調査した。‘玄桃’の極晩生の成熟特性はF1後代では分離しなかったが、果実の成熟時期が2群に分かれ、その早晩と第4連鎖群のNAC遺伝子における9bpのindelが一致した。‘玄桃’の果肉における細胞径やABA含量の増加時期は、果実発育に対応して一般品種より著しく遅いことが明らかになった。今後はこれらの結果と、トランスクリプトーム解析やF2後代を用いた遺伝解析を組み合わせることで、‘玄桃’の極晩生成熟特性の制御機構の全容解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

収穫後の長期貯蔵が困難なモモにおいて、果実の成熟時期の多様性の確保およびその制御機構の解明は栽培・育種の両面で重要な課題である。本研究では、岡山県内で11月に収穫されるモモ‘玄桃’の極晩生の成熟特性に着目して、その遺伝様式や、果実発育過程における果肉細胞および植物ホルモンの変化に関する知見を獲得した。‘玄桃’のような特性を示す品種・系統はこれまで報告がなく、本研究で得られた成果は栽培・育種における‘玄桃’の利用拡大に繋がるだけでなく、これまで困難であったモモの果実成熟の人為的な制御や、多様な熟期・果実品質をもつ新品種の育成に応用されると期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the mechanisms regulating ultra-late maturing trait in 'Gento' peach, its inheritance in F1 progeny as well as physiological and histological changes during fruit development were investigated. Although F1 individuals that matured as late as 'Gento' were not observed, maturity date in F1 progeny exhibited a binominal distribution and 9 bp indel in NAC gene on LG4 co-segregated with the maturity date of all the individuals. Cell size and ABA content in the flesh of 'Gento' increased much later than common peach cultivar, corresponding to their fruit growth patterns. These results, combined with transcriptome analysis by RNA-seq and future genetic analysis using F2 progeny, will help us to fully understand the molecular basis for the ultra-late maturing trait in 'Gento'.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：モモ 果実成熟 収穫時期 NAC遺伝子 果肉細胞 顕微鏡観察 植物ホルモン RNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モモは商業的に重要な作物であるが、収穫前後に急速に軟化が進むため、収穫作業や流通時期の短期集中が問題となっている。この問題に対するアプローチとして、「収穫後の棚持ち期間の延長」および「多様な収穫期をもつ品種の育成」の大きく二つが考えられる。前者については、これまでの基礎生理学的な先行研究により、モモなどのクライマクテリック型の果実では果実自身のエチレン生成能と、エチレンにより果肉が軟化・崩壊する反応性の二つが棚持ちに影響することが見出されている。また、より実用的な研究として、近年、申請者らのグループは高性能0 コンテナを用いた晩生モモ品種の貯蔵試験に取り組んでおり、果実品質を維持しながら数週間の貯蔵に成功している。

これらの成熟期～ポストハーベスト期における研究と比較して、「多様な収穫期をもつ品種の育成」に関する研究については、基礎・応用の両面で思うように進展していないのが現状である。その背景として、日本の主要なモモ品種の多くは中国から導入された‘上海水蜜桃’に由来する近縁な集団であり、育種素材における熟期の多様性が低いことや、モモの育種や遺伝子研究はこれまで早生品種を中心に進められており、特に晩生品種に関する知見が乏しいこと等が挙げられる。多様な成熟特性をもつ新品種の育成およびその制御機構の解明のために、現在の主要品種とは異なる特性・由来をもつ育種素材の活用が求められている。

近年、岡山県内において、晩生品種よりさらに熟期が遅い“極晩生”のモモ‘玄桃’の栽培が進められている。一般的な品種が7～9月に成熟するのに対して、‘玄桃’は11月中旬～下旬まで成熟が完了しないことから、流通時期の大幅な差別化を図ることができる。本品種は他品種と異なる制御機構を介して果実が成熟すると考えられ、申請者らの研究グループはその一端として、果実発育第 期 の長さが成熟遅延に関連することを見出している。また、モモの糖組成は一般的にスクロースの割合が高いのに対して、‘玄桃’は甘味が強いフルクトースを高蓄積することから、糖集積の制御においても特異な性質をもつと示唆される。これらの特性は新品種育成の際の新たな付加価値となり得るだけでなく、果実の成熟機構を解析する際の遺伝資源としても有用である。

しかしながら、民間育成品種である‘玄桃’の果実生理、栽培方法、由来についてはまだ不明な点が多く、各形質の遺伝様式も明らかにされていない。また、収穫前の落果・裂皮などの問題もあり、これらが‘玄桃’の栽培・育種利用の遅れの一因となっている。栽培上の問題点との関連性を含めて、‘玄桃’の特異な果実成熟特性の制御機構を遺伝子レベルで明らかにできれば、栽培・育種における‘玄桃’の利用拡大に繋がるだけでなく、モモ全般の熟期・果実品質の制御に資する知見の獲得が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、特異な成熟特性をもつ民間育成品種‘玄桃’およびその交雑後代を用いて、遺伝学的解析、生理学的・組織学的解析、網羅的な遺伝子発現解析を組み合わせることで、その制御機構の解明を目指す。申請者らの研究グループは‘玄桃’やその交雑後代・自殖後代を既に作出・育成しており、最終的な育種利用を見据えた形質評価や遺伝解析が可能である。さらに申請者らは、晩生モモ品種の貯蔵試験に取り組む過程で、一般品種と肉質、棚持ち性、収穫時期が異なる他の民間育成品種を発見しており、これらの品種と比較しながら果実の特性を評価できる。

‘玄桃’のような果実成熟特性をもつ品種・系統は、果樹類のモデルとして古くから研究が進められてきたモモにおいてもこれまで報告例がなく、本研究により得られる知見は園芸学のみならず植物生理学的にも新規性・創造性が高い。果実成熟時期や糖集積に関わる原因遺伝子およびその遺伝様式が明らかになれば、形質との関連が裏付けられた精度の高いDNAマーカーの開発が可能となり、多様な熟期・果実品質をもつ新品種の育成に繋がると期待される。以上のように、本研究の実施により、基礎・応用の両面からモモ全般の栽培・育種の進展に貢献できると期待される。

3. 研究の方法

実験(1)(2)では、‘玄桃’後代を用いて果実成熟に関わる諸形質を評価し、‘玄桃’の極晩生成熟特性の遺伝様式・年次変動を確認した。また、その制御に関わる染色体領域の特定を試みた。

(1) 後代における表現型・遺伝様式の調査

岡山大学農学部附属山陽圏フィールド科学センター植栽の‘清水白桃’×‘玄桃’F1後代、‘玄桃’自殖後代および親品種を供試した。十分な着果数が確保できた個体を対象に、樹内の中程度の位置に着果した果実を5果実ずつ選び、5月以降、継時的に側径を調査した。調査果実とその周辺果実の果実肥大様相、外観、果肉硬度、エチレン生成量を指標に収穫日を決定し、満開日から収穫日までの日数を成熟日数として算出した。調査は2018～2020年の3か年行った。

(2) 成熟日数の制御に関わる染色体領域の特定

(1) で調査した表現型データを用いて、GWAS 解析によりその制御に関わる染色体領域の特定を試みた。ddRAD-seq 解析により親品種と後代の SNPs データを取得し、rrBLUP を用いて GWAS 解析を行った。また、先行研究でモモの熟期への関与が示唆されている第 4 連鎖群の *NAC* 遺伝子 (Prupe.4G186800) の配列を親品種間で比較し、確認された多型について PCR およびフラグメント解析により後代の遺伝子型を調査した。さらに、発育中の果実を用いて *NAC* 遺伝子の発現解析を行った。

実験 (3) ~ (5) では、発育期間中に継時的に採取した果実を用いて、果肉細胞の顕微鏡観察、植物ホルモン分析、RNA-seq 解析を行った。各実験の結果を相互に対応させられるよう、(3) ~ (5) ではいずれも同じ果実に由来する果肉サンプルを用いた。

(3) 果肉細胞の顕微鏡観察

2020 年に岡山大学農学部附属山陽圏フィールド科学センター植栽の‘玄桃’および‘清水白桃’を供試した。5 月中旬から各品種の収穫時期まで約 1 ヶ月おきに 6 果実ずつ果実を採取した。重量、側径を測定した後、赤道面側径部分の果肉をブロック状に切り出し、FAA で固定した。マイクロスライサーで約 40~500 μm の厚さの連続切片を作製し、光学顕微鏡 (デジタルマイクロスコープ VHX-2000) で写真を撮影した。専用の画像解析ソフトウェアを用いて核~外果皮の長さ (果肉厚) とその直線上の細胞数を計測し、果肉厚を細胞数で除して平均細胞径 (以下、細胞径と記載) を算出した。

(4) 植物ホルモンの分析

上記の果肉サンプルについて、液体クロマトグラフィーにより主要な植物ホルモンの含量を分析した。

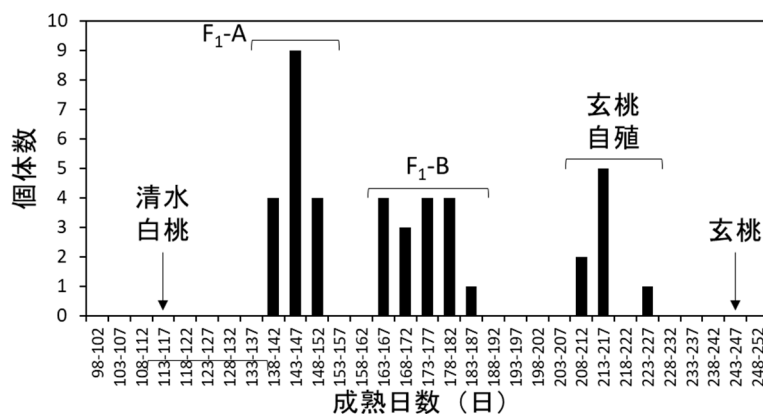
(5) RNA-seq 解析

上記の果肉サンプルについて、ホットボレート法により RNA を抽出し、RNA-seq 用ライブラリを作成した。HiSeqX_Ten によりシーケンスを行い、OmicsBox を用いて得られたリードデータ (PE150) を解析した。

4. 研究成果

(1) 後代における表現型・遺伝様式の調査

F1 後代の果実肥大様相と成熟日数は親品種の形質の間で分離し、親品種と同程度の成熟日数を示す個体はみられなかった (第 1 図)。F1 後代は自殖後代より熟期が早く、また、F1 後代内でも成熟日数が短い個体群 (F1-A) と長い個体群 (F1-B) に 1:1 分離した。複数年の形質評価ができた個体において F1-A と F1-B の関係は一致していた。



第 1 図 後代における成熟日数の分離 (2018 年)

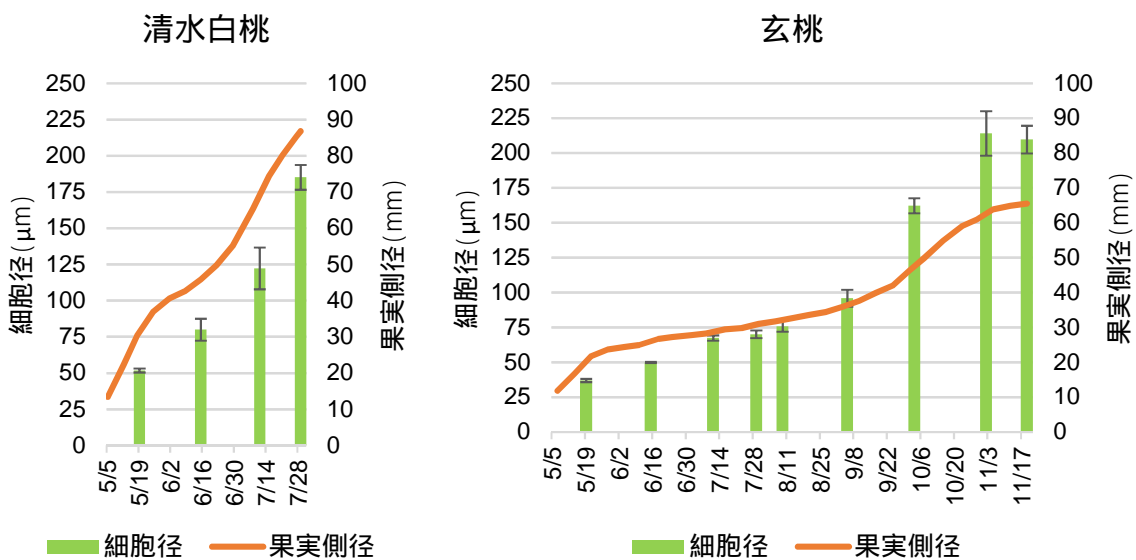
(2) 成熟日数の制御に関わる染色体領域の特定

GWAS 解析の結果、第 4 連鎖群に成熟日数と有意な相関を示す SNPs のピークが検出された。このピーク近傍に座乗する *NAC* 遺伝子の配列を親品種間で比較したところ、既報の第 3 エキソンにおける 9bp の indel (‘清水白桃’ +/-、‘玄桃’ -/-) に加えて、プロモーター領域における 156bp の indel (‘清水白桃’ -/-、‘玄桃’ +/+) が確認された。後代の *NAC* 遺伝子型と成熟日数との関連を確認したところ、9bp の indel が F1 後代における熟期の早晩と共分離 (F1-A +/-、F1-B -/-) した。‘玄桃’のプロモーター領域における 156bp の挿入が熟期に及ぼす影響を確認するため、果実における *NAC* 遺伝子の発現量を未熟期~成熟期まで継時的に調査したところ、親品種間の熟期や果実発育に対応した発現量の差異は確認されなかった。

以上、実験(1)(2)より、‘玄桃’の成熟遅延に関わる因子は顕性ではなくF1では分離しないこと、‘清水白桃’は熟期の制御に関わる効果の大きい主要因子をヘテロでもつことが示唆された。また、NAC遺伝子の9bpのindelが‘清水白桃’がヘテロでもつ主要因子、あるいはその因子と連鎖する多型である可能性が考えられた。

(3) 果肉細胞の顕微鏡観察

‘玄桃’、‘清水白桃’ともに最初に果実を採取した5月中旬から収穫時期まで細胞数はほとんど変化しなかった。従って、‘玄桃’においても一般品種と同様、5月中旬までにおおむね細胞分裂は完了していると考えられた。果実サイズが小さい‘玄桃’は発育期間を通して‘清水白桃’より細胞数が少なく、果肉細胞数が品種ごとの果実サイズに強く影響するとの先行研究と一致していた。一方、収穫時の最終的な細胞径に品種間で大きな差異はなかったが、両品種とも細胞肥大と果実肥大は類似したパターンを示し、品種間で細胞肥大が進む時期が大きく異なった(第2図)。果実発育第1期(肥大停滞期)から第2期(肥大再開期)への移行が著しく遅い‘玄桃’では、それに対応して細胞肥大が進む時期も9~10月と著しく遅かった。この対応関係は特に内部の果肉細胞において顕著だった。発育期間全体における果実サイズと細胞径との間に強い正の相関がみられたことから、細胞肥大のタイミングが著しく遅いことが‘玄桃’の果実発育遅延ならびに極晩生の成熟特性と密接に関連すると考えられた。



第2図 ‘清水白桃’および‘玄桃’の果実における細胞径の変化

(4) 植物ホルモンの分析

‘玄桃’、‘清水白桃’ともに果実発育第1期から第2期への移行期にABAが検出され、その後成熟が進むにつれて増加していった。従って、‘玄桃’においても一般品種と同じく第2期後半以降の果実成熟・老化にABAが関与するが、果実発育に対応してその増加時期が著しく遅いことが明らかになった。IAAは成熟果におけるエチレン生成と同様の増加パターンを示し、エチレン生合成経路の上流でその制御に関わるとの先行研究と一致していた。

(5) RNA-seq解析

maSigProを用いてタイムコースの発現変動遺伝子をクラスタリングしたところ、9つのクラスターに分類された(R-squared>0.7, FDR<0.05)。そのうちいくつかのクラスターは‘玄桃’および‘清水白桃’の果実発育と類似した発現パターンを示した。また、edgeRを用いたペアワイズ比較により、同一サンプリング日における‘玄桃’と‘清水白桃’の発現変動遺伝子を検出した(FDR<0.05, logFC>1)。今後はこれらの遺伝子群、あるいは各品種の第1期から第2期への移行期前後の発現変動遺伝子に着目し、より詳細な解析を進める。

以上、実験(3)~(5)より、‘玄桃’の果実発育と果肉の細胞数・細胞径および植物ホルモンの関係について基礎的な知見が得られた。今後はRNA-seq解析で検出された発現変動遺伝子のうち、特に果実肥大や植物ホルモンに関連する遺伝子に着目することで、得られた結果を相互に関連させながら‘玄桃’の極晩生成熟特性の制御機構解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 福田文夫・玉木由佳・河井 崇・牛島幸一郎・平野 健・小田賢司・原 美由紀・深松陽介・森永邦久・中野龍平	4. 巻 20
2. 論文標題 極晩生モモにおける果実肥大および成熟様相	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 65-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hrj.20.65	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小坂勇貴・河井 崇・田原慎也・福田文夫
2. 発表標題 極晩生モモ‘冬桃がたり’の果実発育過程における果肉細胞の数と大きさの変化
3. 学会等名 園芸学会令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牛島幸一郎・河井 崇・浅野貴洋・福田文夫・中野龍平
2. 発表標題 日本モモ品種‘あかつき’および極晩生品種‘冬桃がたり’の高精度参照ゲノムの作成
3. 学会等名 園芸学会令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河井 崇・牛島幸一郎・三宅春菜・草加芽依・深松陽介・原 美由紀・鶴木悠治郎・日原誠介・中野龍平・小田賢司・福田文夫
2. 発表標題 モモ‘冬桃がたり’の極晩生成熟特性のF1後代における遺伝様式
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
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	福田 文夫 (FUKUDA Fumio) (60294443)	岡山大学・環境生命科学研究科・准教授 (15301)	
研究分担者	中野 龍平 (NAKANO Ryohei) (70294444)	京都大学・農学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	牛島 幸一郎 (USHIJIMA Koichiro) (20379720)	岡山大学・環境生命科学研究科・准教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------