

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380021

研究課題名（和文）

ナシ属初の自殖 F2 集団を用いた果実有用形質のマッピングと高機能新品種開発への応用

研究課題名（英文） The mapping of useful traits related to fruit quality using F2 self population and breeding of high quality cultivars in *Pyrus*

研究代表者

板井章浩（ITAI AKIHIRO）

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：10252876

研究成果の概要（和文）：

果樹においては結実までに時間を要し、このことが、育種のもっとも大きな問題点となっている。Marker Assisted Selection (MAS) は、DNA マーカーによって、育種選抜する方法で、世代交代に長い年月を必要とする果樹においては、MAS の利用価値が特に高い。申請者らはナシ果実の品質の重要な決定因子である味の因子のひとつである糖組成について MAS が利用できる状態になり、さらには重要病害である黒星病、黒斑病に関する MAS の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：

A long juvenile phase and high level of heterozygosity due to a strict gametophytic incompatibility have limited the parental combinations in pear breeding programs. Marker-assisted selection (MAS) is considered to be a powerful tool for increasing selection efficiency by identifying favorable genetic combinations. In this research, we have developed DNA markers for sucrose content responsible for taste improvement. Moreover, DNA markers linked to black spot and scab resistance were developed. These markers should be useful for the selection of seedlings with good taste and disease resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：果樹園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：ナシ、自殖 F2 集団、糖組成、インベルターゼ、SSR、Marker Assisted selection (MAS)

1. 研究開始当初の背景

果樹においては結実までに時間を要し、このことが、育種のもっとも大きな問題点となっている。ナシにおいても最低5年以上結実までに時間を要する。Marker Assisted Selection (MAS) は DNA マーカーによって、

様々な遺伝形質を予測し、育種選抜する方法で、世代交代に長い年月を必要とする果樹においては、MAS の利用価値が特に高い。しかしながら、ナシにおいて利用できるマーカーは、申請者らが開発したエチレン生合成経路の ACC 合成酵素遺伝子の多型に基づく貯

蔵性に関するマーカーと自家和合性のみであり、特においしさなどの果実の有用形質については全く開発されていない。このため、ナシ育種の効率化のためには果実の有用形質についてのMASの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、自殖F2集団（‘おさ二十世紀’ X ‘慈梨’ F1の自殖交配集団）や様々な遺伝集団を利用して、果実有用形質の分離の調査や病害抵抗性の調査および連鎖解析を行い、果実の糖組成、糖度、大きさ、肉質、追熟性などの有用形質と黒斑病、黒星病などの病害抵抗性を制御する連鎖地図の領域決定を行い、さらに有用形質に連鎖したDNAマーカーを開発し、最終的には複合病害抵抗性および高食味を有する高機能性新品種開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ナシのシュクロース含量に関するDNAマーカーの開発

収穫果実の食味を構成する甘味は、糖の種類と量によって影響され、果実の品質を決める重要な要因のひとつである。ナシ果実の主な糖成分はフルクトース、ソルビトール、グルコース、シュクロースの4種類であり、糖組成に品種間で大きな差がみられ、中でも食味の良好さとシュクロース含量との関連が示唆されている。シュクロース高蓄積型品種の‘おさ二十世紀’および低蓄積型品種の‘慈梨’の果実を成長中期より経時的に採取し、各糖含量をHPLCにて定量した。また、それぞれの果実からRNAを抽出して、*PpSPS1*, *PpSUS1*, *PpAIV1*, 2 cDNAをプローブに用いてノーザン解析を行った。シュクロース蓄積の異なる品種をそれぞれ低・中・高蓄積型の3グループに分け、それぞれのグループから数品種を実験に供試した。各品種の幼葉からDNAを抽出し、いくつかの制限酵素で消化した後、*PpAIV2*cDNAをプローブに用いてサザン解析を行った。またサザン解析で用いた品種を中心に、成熟期の果肉から全RNAを抽出し、*PpAIV2*cDNAをプローブに用いてノーザン解析をおこなうとともにリアルタイムPCRを用いた定量解析も行った。

(2) ナシ高密度連鎖地図開発のためのマーカーの開発

セイヨウナシとニホンナシのF1雑種集団を用いて、各個体から抽出したDNAを用いた。AFLP分析およびSSR分析を行った。SSRマーカーは、ナシ由来、リンゴ由来、*Prunus*属由来の計400プライマーを用いた。またナシ果実、葉、枝などの各組織、様々なステージ由来のEST解析を行い、その配列情報中に存在するSSRモチーフを有する配列からプライマーを設計した。さらに次世代シーケンサー

GS-FLXを用いて、ニホンナシおよびセイヨウナシゲノム配列を得て、得られた配列から2-15塩基モチーフの反復配列を得た。それより約180種類のプライマーを作成し、マッピングに供した。

(3) ナシ病害抵抗性DNAマーカーの開発

ニホンナシにおいて、黒星病および黒斑病が2大病害であるが、これまでにそれらの病気に連鎖したマーカーが同定されている。用いた病害抵抗性マーカーは、黒星病について3SSRマーカーであり、黒斑病について、二十世紀など罹病性に連鎖した2SSRマーカーである。これらのマーカーで、ニホンナシ交配集団1000個体以上用いて、病害抵抗性DNAマーカーの選抜を行った。

4. 研究成果

(1) ナシのシュクロース含量に関するDNAマーカーの開発

‘おさ二十世紀’では成熟に近づくにつれてシュクロース含量が増加したが、‘慈梨’では成熟期になってもシュクロースの蓄積がほとんどみられなかった。ノーザン解析の結果、*PpSUS1*の発現は両品種で常に高い発現を示した。*PpAIV1*は両品種で発現がほとんどみられなかったが、*PpAIV2*の発現は、2品種で大きな差が見られ、‘おさ二十世紀’ではほとんど発現が見られなかったのに対し、‘慈梨’で高い発現がみられた。シュクロース含量の品種間差異に*PpAIV2*の発現の関与が考えられたため、シュクロース蓄積の異なる品種を用いサザン解析を行った。結果、品種間で極めて多くの多型が見られ、さらに各グループ間のバンドパターンに差異が見られた。中でも*EcoR I*で消化した場合、4kbおよび3kb付近に位置するバンドは中・低蓄積型の品種に特異的に検出され(第1図)、高蓄積型の品種には全く見られず、シュクロース低蓄積型判別マーカーとして利用できる可能性が示唆された。また発現解析を行ったところ、*PpAIV2*はシュクロース低蓄積型のほとんどの品種において高い発現を示し、中・高蓄積型での発現は見られない、もしくはその発現が非常に低かった。このことから中・低蓄積型では、*PpAIV2*の発現が鍵となることにより、シュクロースが分解され、その含有量が少なくなるということが示唆された。また、高い発現が見られた品種は、サザン解析で4kbおよび3kb付近に特異的なバンドが検出された品種とほぼ一致しており、*PpAIV2*における高い発現と特異的なバンドの間に関連が見られた。

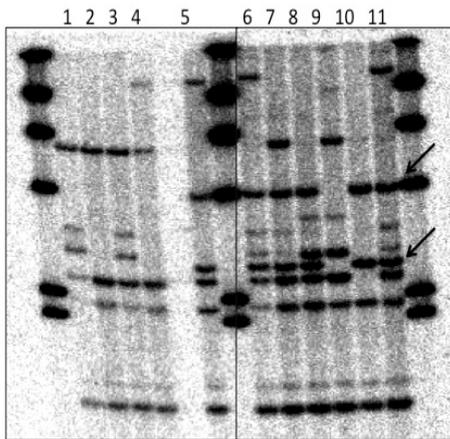
(2) ナシ高密度連鎖地図開発のためのマーカーの開発

AFLPおよびSSR分析により、セイヨウナシお

よびニホンナシでそれぞれ 1100 cM、平均 2 cM をカバーする連鎖地図が作成された。リンゴ由来のマーカーも効率よくマッピングされた。次世代シーケンサーによるゲノムのシーケンスにより新たに 100 以上 SSR マーカーを開発することに成功した。これらのマーカーは、これまで疎であった領域にもマッピングされ、より連鎖地図が高密度化された。今後はより SSR マーカーを増やすと同時に次世代シーケンサーを用いた SNP マーカーを加えていくことにより高密度化を計り、ゲノム育種に利用する必要がある。

(3) ナシ病害抵抗性 DNA マーカーの開発

利用したマーカーは、巾着由来の黒星病抵抗性個体およびおさ二十世紀由来の黒斑病罹病性個体を効率よく選抜することができた。また同時にリンゴのゲノム情報を用いて、両病気に対するより連鎖したマーカーの開発に成功し、今後さらに高確率で、両病害抵抗性個体の選抜が可能になることが期待される。



第1図 シュクロース含量の異なる品種のPpAIV2のサザン分析
1:愛甘水 2:豊水 3:秋栄 4:新高 5:天の川 6:土佐条錦 7:金平糖 8:霜被
9:太平 10:関西一 11:馬次郎

発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① Itai, A., T. Igori, N. Fujita, H. Murayama, M. Egusa, and M. Kodama. Ethylene analog and 1-MCP enhance black spot disease development in *Pyrus pyrifolia* Nakai. HortScience, 47:228-231. 2012 査読有
- ② Nishitani, C., A. Yamaguchi-Nakamura, F. Hosaka, S. Terakami, T. Shimizu, K. Yano, A. Itai, T. Saito and T. Yamamoto. Parthenocarpic genetic resources and gene expression related to parthenocarpy among four species in pear (*Pyrus* spp.) Scientia Horticulturae 136 : 101-109. 2012. 査読有

- ③ Nishitani, C., Shimizu, T., Fujii, H., Hosaka, F., Terakami, S., Nakamura, Y., Itai, A., Yamaguchi-Nakamura, A. and Yamamoto, T. Oligoarray analysis of gene expression in ripening Japanese pear fruit. Scientia Horticulturae 124:195-203. 2010. 査読有

- ④ Nishitani, C., S. Terakami, Y. Sawamura, N. Takada and T. Yamamoto Development of novel EST-SSR markers derived from Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Breeding Science 59: 391-400. 2009. 査読有

- ⑤ Terakami, S., T. Kimura, C. Nishitani, Y. Sawamura, T. Saito, T. Hirabayashi and T. Yamamoto. Genetic linkage map of the Japanese pear 'Housui' identifying three homozygous genomic regions. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 78 : 417-424. 2009. 査読有

- ⑥ Itai, A. and T. Tanahashi. Inhibition of sucrose loss during cold storage in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) by 1-MCP. Postharvest Biol. Technol. 48: 355-363. 2008

〔学会発表〕(計 34 件)

- ① 寺上伸吾 ニホンナシ黒斑病原因遺伝子座のファインマッピングとBACコンティグの構築 育種学会 宇都宮大学 2012. 3. 30
- ② 山本俊哉 ニホンナシにおける収穫期を始めとする果実形質のQTL解析 育種学会 宇都宮大学 2012. 3. 30
- ③ 山本俊哉 ニホンナシにおける病害抵抗性と自家和合性実生のDNAマーカー選抜 園芸学会 大阪府立大学 2012. 3. 29
- ④ 板井章造 ニホンナシ果実の糖組成の品種間差異の分子機構 園芸学会 大阪府立大学 2012. 3. 29
- ⑤ 板井章造 ニホンナシ黒斑病の病斑拡大におけるエチレンの作用 植物化学調節学会 2011. 11. 2 宇都宮大学
- ⑥ 板井章造 : プロピレンと 1-MCP処理によるニホンナシ黒斑病の病斑拡大 園芸学会、岡山大学 2011. 9. 25
- ⑦ 西谷千佳子 ナシにおける遺伝子発現とゲノム機能解析 9. 次世代シーケンサーの配列情報を利用したニホンナシとセイヨウナシのマイクロアレイ作成 園芸学会、岡山大学 2011. 9. 25
- ⑧ 山本俊哉 ニホンナシ育種におけるDNAマーカー開発と利用 園芸学会、岡山大学 2011. 9. 23
- ⑨ 新山雄基 低温処理がセイヨウナシ果実のエチレン関連遺伝子の発現に及ぼす影響 園芸学会、宇都宮大学 2011. 3. 19
- ⑩ 村山秀樹 ナシ果実における成熟中のメ

タボローム解析 園芸学会、宇都宮大学
2011. 3. 19

①尾形亜希子 ナシの交雑実生に見出された若年老化型の解析 園芸学会、宇都宮大学
2011. 3. 19

②東克行 ナシ果実の初期成長および形態形成に関わる遺伝子の発現解析 園芸学会、宇都宮大学
2011. 3. 19

③畑中隆介 ニホンナシ果実のショ糖含量を制御するCAPSマーカーの同定 園芸学会、宇都宮大学
2011. 3. 19

④西谷千佳子 ナシにおける単為結果性品種の探索と単為結果性機構の解析 5. マイクロアレイ分析で取得した単為結果関連遺伝子群の解析 園芸学会、宇都宮大学
2011. 3. 19

⑤保坂ふみ子 ナシの連鎖地図X V. 4塩基、5塩基モチーフSSRマーカーの開発 園芸学会、宇都宮大学
2011. 3. 19

⑥寺上伸吾 ナシの連鎖地図XVI. リンゴゲノム情報を利用したニホンナシ黒斑病感受性連鎖マーカーの高密度化 園芸学会、宇都宮大学
2011. 3. 19

⑦Terakami, S. Genome Sequencing Analysis in Japanese Pear Plant and Animal Genome XIX Conference, San Diego
2011. 1. 20

⑧Itai, A. Development of DNA markers for fruit sugar composition in pear 11th International pear symposium, 2010. 11. 22 General Roca, Argentina

⑨金會澤 レトロトランスポゾン挿入部位配列を用いたニホンナシ品種固有マーカーの開発 園芸学会、大分大学
2010. 9. 19

⑩西谷千佳子 ナシにおける遺伝子発現とゲノム機能解析 8. 次世代シーケンサを用いたニホンナシESTの収集 園芸学会、大分大学
2010. 9. 19

⑪浜亮介 東北地方より収集したナシ遺伝資源 (第5報) エチレン生成量の多様性とその関連形質 園芸学会、大分大学
2010. 9. 19

⑫保坂ふみ子 シにおける単為結果性品種の探索と単為結果性機構の解析 4. ナシカスタムオリゴアレイを用いたナシの単為結果関連遺伝子の探索 園芸学会、日本大学
2010. 3. 22

⑬田中誠之 マイクロアレイ解析によるGA誘導性ナシ果実肥大関連遺伝子の探索 園芸学会、日本大学
2010. 3. 21

⑭板井章浩 ニホンナシ果実の糖組成に関するDNAマーカーの開発 園芸学会、日本大学
2010. 3. 21

⑮板井章浩 ニホンナシ果実成熟関連ACC合成酵素遺伝子 *PpACS2* の転写因子の解析 植物化学調節学会、東北大学
2009. 10. 30

⑯寺上伸吾 ナシの連鎖地図 XIV. 巾着における黒斑病感受性遺伝子座の同定 園芸学会、秋田大学
2009. 9. 27

⑰Itai, A. Differential expression of gibberellin biosynthetic genes in fruit and seed during development and new method for promoting fruit growth in pear 11th Plant Growth regulation in Fruit Production ボローニア大学
2009. 9. 20

⑱西谷千佳子 ナシにおける遺伝子発現とゲノム機能解析 7. ニホンナシマイクロアレイの設計と利用 園芸学会、明治大学
2009. 3. 20

⑲寺上伸吾 ナシの連鎖地図 XII. ナシ標準連鎖地図の高密度化 園芸学会、明治大学
2009. 3. 20

⑳Yamamoto, T. Reference Genetic Linkage Maps and Their Application to Marker Assisted Selection in Pear. Plant and Animal Genome XVII Conference San Diego
2009. 1. 9-14.

㉑Yamamoto, T. A Bin Mapping Set for the Reference Genetic Map of Pear Plant and Animal Genome XVII Conference San Diego
2009. 1. 9-14.

㉒山本俊哉 SSRマーカーによるニホンナシのDNA品種識別技術マニュアルの作成 園芸学会、三重大学
2008. 9. 28

㉓寺上伸吾 ナシにおけるPIP markerの利用 園芸学会、三重大学
2008. 9. 27

㉔板井章浩 ジベレリン生合成経路遺伝子発現解析に基づくナシ果実新規肥大促進法の開発 園芸学会、三重大学
2008. 9. 27

[図書] (計4件)

① R. L Bell and Itai, A. *Pyrus In Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* Vol.6 Temperate Fruits. C. R. Kole (ed), Springer, Heidelberg. 2011. p147-178.

② Yamamoto, T. and E. Chevreau *Pear Genomics*. In "Genetics and Genomics of Rosaceae" Folta K. M. and Gardiner S. E. (eds.), Springer, USA. 2009. p. 163-186

③ Dirlwanger, E. B. Donoyes-Rothan, T. Yamamoto and D. Chagne In "Genetics and Genomics of Rosaceae" Folta K. M. and Gardiner S. E. (eds.), Springer, USA. 2009. p. 539-561.

④ 板井章浩 *ニホンナシ 果実の事典* 杉浦 明・宇都宮直樹・片岡郁雄・久保田尚浩・

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板井 章浩 (ITAI AKIHIRO)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：10252876

(2) 研究分担者

児玉 基一郎 (KODAMA MOTOICHIRO)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00183343

山本 俊哉 (YAMAMOTO TOSHIYA)

(独)農業・食品産業技術総合研究機構・果樹
研究所・上席研究員

研究者番号：60355360

村山 秀樹 (MURAYAMA HIDEKI)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：40230015