

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06029

研究課題名（和文）リンゴゲノム編集技術実用化のための培養技術の開発

研究課題名（英文）Development of culture technology for practical application of apple genome editing

研究代表者

小森 貞男（Komori, Sadao）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：00333758

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）：リンゴのゲノム編集実用化のための培養技術の確立を試みた。実験は(1)倍加半数体（DH）の葯培養による胚様体の形成、(2)珠心細胞由来の胚様体の作出、(3)成長点由来カルスからのシュート形成、(4)ゲノム編集個体のキメラ解除過程の体系化、の4つである。(1)ではDH品種‘95P6’の葯培養で不定胚形成率が高いことを明らかにした。また、小孢子培養で球状胚の形成まで成功した。(2)では‘ふじ’の珠心培養で不定胚の作出に成功したが、胚が由来する細胞を確認する必要がある。(3)では‘ふじ’のカルスから高頻度でシュート誘導に成功した。(4)では形質転換経由のゲノム編集個体の効率的な作出手順を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果樹生産は国民の豊かな生活を支える産業であり、なかでもリンゴは国内生産量がウンシュウミカンに次ぐ第2位の重要な作物である。日本のリンゴは高品質で国内のみならず海外からの需要も多いが、近年の果樹産業従事者の減少に伴い、国内外の需要に答えることができなくなりつつある。この問題に対応するためには高品質を維持しながらも省力特性を有する品種の育成を実現する必要がある。省力特性の例として自家和合性や耐病虫性付与、樹姿の改良があるが、これらの特性を既存品種に導入する場合、交雑を経ない一過的な発現によるゲノム編集による必要がある。本研究の成果はリンゴにおける実用的なゲノム編集の実現のための有益な知見である。

研究成果の概要（英文）：We attempted to establish a culture technique for practical application of genome editing in apple. The following four experiments were conducted. (1) Formation of embryoid by anther culture of doubled haploids (DH), (2) Induction of adventitious embryos derived from nucellar cells, (3) Shoot formation from meristem-derived callus, and (4) Constructing procedures of the chimera release process in genome-edited individuals. In (1), the anther culture of DH cultivar '95P6' showed a high rate of adventitious embryo formation. Globular embryos were formed by microspore culture. In (2), we succeeded in producing adventitious embryos by nucellar culture of 'Fuji', and it is necessary to confirm that the embryo is derived from nucellar cells. In (3), we succeeded in inducing shoots from callus of 'Fuji' at a high frequency. In (4), we clarified the efficient procedure for generating genome-edited individuals.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：リンゴ 組織培養 ゲノム編集 不定胚 成長点 カルス シュート再分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年 CRISPR/Cas9 を使用したゲノム編集が様々な生物で可能になっているが、数塩基の欠失・挿入はカルタヘナ法および国内法の規制に抵触せず、遺伝子組換え植物として扱われない。自殖性で遺伝的に固定している作物の場合、形質転換で CRISPR/Cas9 をコードしている配列を染色体に組み込み、その領域が転写・翻訳されることで変異を誘導し、その後、交雑により染色体に挿入されている部位を除くヌルセグリガントが有効である。しかし、リンゴのように他殖性で遺伝的に高度にヘテロな植物では、交雑により品種のゲノム組成が変化するためヌルセグリガントは有効ではなく、リボヌクレオプロテイン(RNP)の一過的発現によりゲノム編集を誘導する直接導入法が望ましい。リンゴでゲノム編集を実現するためには、様々な培養方法を改良することと、キメラ解除の方法を確立する必要がある。

### 2. 研究の目的

リンゴのゲノム編集技術を実用的な技術とするためには培養技術の更なる発展が必要で、本研究では品種の遺伝子組成を変えずに目的遺伝子のみの改変を行うため、以下の実験を行った。

(1)倍加半数体(Doubled Haploid(DH))個体の薬培養による胚様体の形成

(2)珠心細胞由来の不定胚の作出

(3)成長点に由来するカルスからのシュート形成

(4)ゲノム編集におけるキメラ解除の過程の体系化

### 3. 研究の方法

(1)DH 個体の薬培養による胚様体の形成

リンゴの DH 品種である‘95P6’の薬培養を行って胚様体形成率を調査した。培養手順、培地組成は Zhang et al. (2013, 2017)と同じである。また、‘ふじ’、‘Alkmene’、‘Gala’、‘Remo’、‘Reka’、‘世界一’、‘千秋’、‘95P6’を用いて小孢子培養を行った。培養方法は液体振とう培養で培地及び培養手順は Höffer ら (1999)の方法を用いた。小孢子濃度は 1ml あたり  $10^4 \sim 10^6$  に設定した。さらに、‘Starking Delicious’の DH である SD8 と‘95P6’の交配を行い  $F_1$  実生の作出を行った。

(2)珠心細胞由来の不定胚の作出

岩手大学西下台圃場および滝沢農場で栽植している‘ふじ’、‘王林’、‘千秋’の開花後 10 日から 40 日の種子から珠心細胞を取り出し珠心培養を行い、胚様体を獲得するために好適な開花後日数を探った。種子の滅菌はクリーンベンチ内で行った。採取した種子は 70% エタノール (0.1% Tween20 を含む) で 30 秒、0.5% 次亜塩素酸ナトリウム (0.1% Tween20 を含む) で 2 分 30 秒滅菌し、その後、滅菌水で 3 分ずつ 5 回洗浄をした。洗浄した種子は縦半分に切断し、胚嚢を取り除いた。外種皮と内種皮はつけたままとし、切断面が下になるように、27 種類のホルモン組成 (第 1 表) の珠心初期培地 (MS 基本培地 + ショ糖 3% + Gelrite 0.7%) に置床した。1 区 20 切片 (10 粒に相当) ずつ (1 シャーレあたり 5 切片 × 4 シャーレ) となるように置床し、25°C の暗所で培養した。継代は 60 日ごとに行い、カルス形成率は 60 日後に調査した。形成したカルスの一部はホルモンフリーの珠心胚形成培地 (MS 基本培地 + ショ糖 3% + Bacto Agar 2%) に移植した。

(3)成長点に由来するカルスからのシュート形成

実験材料には培養で維持している‘ふじ’を用いた。継代は MS 基本培地 (Murashige and Skoog, 1962) にインドール酢酸、ベンジルアミノプリン等を添加した 1001 シュート増殖培地 (伊藤ら, 1997; 小森ら, 1997) を用いた。1001 シュート増殖培地で維持していたシュートを成長点を切り出す 1 カ月前、2 カ月前、3 カ月前の継代時に 25°C の暗黒条件下に移した。暗黒条件下に移してから 1 カ月後、2 カ月後および 3 カ月後に暗黒処理中に伸長した葉緑体をもたない白化したシュートから腋芽を含まないように 0.5mm の長さで成長点を切り出した。シュートには暗黒処理中に伸長した葉緑体をもたない白化したものを使用した。成長点切り出しはクリーンベンチ内で実体顕微鏡 (SZ61, OLYMPUS) を用いて注射針 (NANOPASS 34G 4mm, TERUMO) で行った。置床数は 1 シャーレあたり 5 個とし、25°C の暗黒条件下で 20 日間培養した。Caboni ら (2000) のカルス誘導培地で増殖したカルスを Caboni ら (2000) または Saito and Suzuki (1999) のシュート誘導培地へ移植した。シュート誘導培地は 25°C、16 時間日長の薄明条件で 2 週間培養後、16 時間日長の明条件で培養し、1 カ月ごとに継代を行った。その他、2 週間、4 週間および 6 週間の暗黒処理を経てから 16 時間日長の薄明条件に移行する区も設けた。いずれの区でも 1 カ月ごとに継代を行い、シュート誘導培地に移植してから 3 カ月後に再分化率を求めた。

(4) ゲノム編集におけるキメラ解除の過程の体系化

Nishitani ら (2016) が構築した PDS 配列を有する CRISPR/Cas9 をコードするプラスミドを組み込んだ *Agrobacterium* LBA4404 株をリンゴ品種 ‘Greensleeves’ に感染させ、形質転換体を作成した。形質転換体の作出には Li ら (2011) の方法を用いた。作出した形質転換体から PDS 遺伝子に変異

が導入され、白化したシュートが発生する過程を詳細に調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DH 個体の薬培養による胚様体の形成

‘95P6’は他のリンゴ品種と比較して薬培養による胚様体形成率および植物体再生率が高く、実験材料として好適であることが判明した。

小孢子培養は品種によってカルス増殖の程度が異なった球状胚は‘Alkmene’で 21 個、‘Remo’と‘Gala’が 2 個、‘ふじ’で 1 個の形成が確認されたが、植物体の形成には至らなかった。小孢子密度は 10<sup>6</sup> が好適であった。

‘Starking Delicious’の DH 系統である SD8 に‘95P6’の花粉を授粉して F<sub>1</sub> 実生の作出に成功した。この F<sub>1</sub> 個体は圃場で順調に生育しており、開花後果実形質等の斉一性を調査する予定である。

##### (2) 珠心細胞由来の不定胚の作出

カルス形成率は‘ふじ’、‘王林’、‘千秋’の順に高かった。‘ふじ’、‘王林’ともに滝沢農場より西下台圃場のカルス形成率が高く、採取場所による差が認められた。回帰分析の結果 2,4-D の添加がカルス形成に有意に効果があり、少量の TDZ の添加も有効であることが示された。一元配置分散分析で培地に添加した植物成長調節物質の最適濃度を調べたところ、2,4-D は 0.2mg/L と 2mg/L が有意にカルス形成を促進し、0.05mg/L の TDZ も有効であることが示された。

培地ごとの不定胚形成率を第 1 表に示した。オーキシン無添加区の開花後 30 日目の‘ふじ’と‘千秋’および開花後 40 日目のほぼすべての個体はカルス形成を伴わずに不定胚を形成していた。このことから、これらの不定胚はカルスを経由せずに直接胚形成したことが推察された。第 1 表の結果を基に単回帰分析により各種ホルモンが不定胚形成に及ぼす影響を調べたところ、NAA および 2,4-D は添加量が少ないほど有意に不定胚形成を促進し、TDZ は添加量が多い方が不定胚形成を促す傾向が認められた。一元配置分散分析で各種ホルモンの最適濃度を調査したところ、2,4-D を加えないことが不定胚形成に最も有効と判明した。実験では珠心胚形成培地に移植する前に不定胚形成するものが多くみられた（第 1 表、上付き Z, Y）。カルスを胚形成培地に移植した後ではほとんど胚形成が見られることはなかった。

滝沢農場で採取した開花後 40 日目の‘王林’を No.2 培地を用いて誘導したカルスでのみ珠心胚形成培地移植後にシュートの分化が見られた（第 1 表、上付き X）。また、珠心胚形成培地移植前にカルスから直接シュートが分化しているものも見られた。

珠心培養で形成されたカルスおよび不定胚の S 遺伝子型および SSR マーカーを用いて由来を調査したところ S 遺伝子型は種子親と同じ遺伝子型でありながら、SSR マーカーは交雑胚由来を示す個体があった。今後さらにカルスおよび不定胚の由来の調査を行う必要がある。

##### (3) 成長点由来するカルスからのシュート形成

暗黒処理期間が‘ふじ’の成長点由来カルスに及ぼす影響を第 2 表に示した。カルス形成率は全区で 90% 以上と高い結果となった。Saito and Suzuki (1999) のシュート誘導培地を経由した系では暗黒 0 カ月と暗黒 1~3 カ月の区の間でシュート再分化率に有意な差が認められた。Caboni ら (2000) のシュート誘導培地では、暗黒処理期間の間で再分化率に有意な差は見られなかったが、Caboni らのシュート誘導培地を経由した系では 2 カ月間、Saito and Suzuki のシュート誘導培地を経由した系では 3 カ月間の暗黒処理で最も高い再分化率を示した。

シュート誘導培地での暗黒処理期間が‘ふじ’成長点由来カルスの再分化に及ぼす影響を第 3 表に示した。カルス形成率は全区で 100% であった。暗黒処理期間で再分化率に有意差は見られなかったが、6 週間のシュート誘導培地での暗黒処理の区で最も高い再分化率 68% を示した。この値は過去に報告された栽培リンゴ品種のカルスからの再分化率の中で最も高い値の一つだった。

##### (4) ゲノム編集におけるキメラ解除の過程の体系化

形質転換体実験開始から 6 カ月目に株元から白化したシュートが出現した。PDS 遺伝子への変異は白化したシュートが出現する以前（実験開始後 5 カ月目）から確認されていた。20 カ月におよぶ継代期間中に新たな変異は検出されなかったことから、ゲノム編集は実験開始初期に誘導され継代期間中は新たな変異は生じないことが示唆された。これらのことから、RNP の一過的発現によるゲノム編集でも変異が導入されたシュートを 6 カ月程度継代し続けることでゲノム編集個体が獲得できることが推察された。

ゲノム編集におけるキメラ解除過程が明らかになったことから、上記に培養方法を用いて作出したキメラ状態のゲノム編集個体からキメラが解除できる可能性が示された。

#### < 引用文献 >

Caboni, E., P. Lauri and S. D' Angeli. 2000. In vitro plant regeneration from callus of shoot apices in apple shoot culture. *Plant Cell Report* 19: 755-760.

Höffer, M., A. Touraev and E. Heberle-Bors. 1999. Induction of embryogenesis from isolated apple microspores. *Plant Cell Rep.* 18: 1012-1017.

伊藤裕二・小森貞男・大村三男・金山喜則・山喜昭平・副島淳一. 1997. ソルビトール合成酵素遺伝子を増幅した形質転換リンゴの作出. *育学雑.* 47: 157.

小森貞男・伊藤裕二・西沢洋子・副島淳一. 1997. キチナーゼ遺伝子を増幅した形質転換リンゴの作出. 育学雑. 8(4): 419-426.

Li, J., Komori, S., Sasaki, K., Mimida, N., Matsumoto, S., Wada, M., Soejima, J., Ito, Y., Masuda, T., Tanaka, N., Shigeta, N., Watanabe, M., Suzuki, A., 2011. Pre-culture before *Agrobacterium* infection to leaf segments and meropenem improves the transformation efficiency of apple (*Malus × domestica* Borkh.). Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 80(3), 244-254.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A reserved medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

Nishitani, C., N. Hirai, S. Komori, M. Wada, K. Okada, K. Osakabe, T. Yamamoto, and Y. Osakabe. 2016. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 6: 31481

Saito, A., and M. Suzuki. 1999. Efficient shoot-regeneration from calli of apple rootstock [*Malus × prunifolia* var. ringo Asami Mo84-A] and cultivar [*Malus × domestica* cv. 'Fuji']. *J. Plant Physiol.* 155: 620-624.

第1表 珠心初期培地のホルモン組成と各培地がカルス形成と不定胚形成に及ぼす影響

| 培地No. | ホルモン濃度 (mg/L) |           | カルス形成率(%) |      |      |      |    |      |        |      |      |    |                |      | 不定胚形成率(%)       |                 |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------|---------------|-----------|-----------|------|------|------|----|------|--------|------|------|----|----------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|       | Auxin         | Cytokinin | 開花後30日    |      |      |      |    |      | 開花後40日 |      |      |    |                |      | 開花後30日          |                 |                 | 開花後40日          |                 |                 |                 |                 |
|       |               |           | 下台王林      | 滝沢王林 | 下台ふじ | 滝沢ふじ | 千秋 | 下台王林 | 滝沢王林   | 下台ふじ | 滝沢ふじ | 千秋 | 下台王林           | 滝沢王林 | 下台ふじ            | 滝沢ふじ            | 千秋              | 下台王林            | 滝沢王林            | 下台ふじ            | 滝沢ふじ            | 千秋              |
| 1     | 2,4-D 0.2     | TDZ 0.05  | 90        | 45   | 85   | 80   | 15 | 95   | 90     | 70   | 100  | 50 | 0              | 0    | 0               | 0               | 5 <sup>z</sup>  | 0               | 5 <sup>z</sup>  | 0               | 0               | 0               |
| 2     | 2,4-D 0.2     | TDZ 0.5   | 60        | 10   | 95   | 75   | 15 | 95   | 80     | 80   | 95   | 25 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0 <sup>x</sup>  | 0               | 0               | 0               |
| 3     | 2,4-D 0.2     | TDZ 1.0   | 45        | 0    | 65   | 70   | 15 | 75   | 70     | 70   | 50   | 20 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 5 <sup>yw</sup> | 5 <sup>z</sup>  | 0               | 0               | 0               |
| 4     | 2,4-D 0.2     | BAP 0.2   | 35        | 0    | 55   | 65   | 20 | 80   | 90     | 85   | 85   | 30 | 0              | 0    | 0               | 10 <sup>y</sup> | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 5     | 2,4-D 0.2     | BAP 0.5   | 30        | 0    | 80   | 40   | 5  | 90   | 80     | 95   | 75   | 0  | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 5 <sup>z</sup>  | 5 <sup>z</sup>  |
| 6     | 2,4-D 0.2     | BAP 1.0   | 10        | 0    | 65   | 45   | 0  | 60   | 70     | 90   | 60   | 40 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 5 <sup>z</sup>  | 0               | 0               | 0               | 5 <sup>z</sup>  |
| 7     | 2,4-D 2.0     | TDZ 0.05  | 40        | 0    | 65   | 60   | 5  | 75   | 80     | 100  | 75   | 60 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 8     | 2,4-D 2.0     | TDZ 0.5   | 25        | 5    | 75   | 40   | 15 | 65   | 70     | 80   | 25   | 35 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 9     | 2,4-D 2.0     | TDZ 1.0   | 5         | 0    | 65   | 25   | 10 | 60   | 65     | 70   | 35   | 45 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 10    | 2,4-D 2.0     | BAP 0.2   | 80        | 20   | 100  | 55   | 25 | 90   | 75     | 65   | 40   | 55 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 11    | 2,4-D 2.0     | BAP 0.5   | 11        | 65   | 0    | 85   | 60 | 0    | 85     | 60   | 55   | 70 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 12    | 2,4-D 2.0     | BAP 1.0   | 60        | 0    | 85   | 70   | 0  | 80   | 75     | 85   | 35   | 45 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 13    | 2,4-D 5.0     | TDZ 0.05  | 35        | 0    | 60   | 70   | 20 | 70   | 75     | 75   | 25   | 30 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 14    | 2,4-D 5.0     | TDZ 0.5   | 20        | 0    | 60   | 60   | 0  | 60   | 80     | 75   | 30   | 20 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 15    | 2,4-D 5.0     | TDZ 1.0   | 15        | 0    | 65   | 30   | 30 | 45   | 50     | 80   | 15   | 30 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 16    | 2,4-D 5.0     | BAP 0.2   | 5         | 0    | 55   | 20   | 25 | 55   | 75     | 75   | 10   | 40 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 17    | 2,4-D 5.0     | BAP 0.5   | 15        | 0    | 60   | 35   | 15 | 45   | 70     | 70   | 40   | 50 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 18    | 2,4-D 5.0     | BAP 1.0   | 15        | 0    | 60   | 25   | 5  | 45   | 55     | 65   | 40   | 30 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 19    | -             | TDZ 0.05  | 40        | 40   | 0    | 0    | 0  | 5    | 0      | 0    | 0    | 0  | 5 <sup>z</sup> | 0    | 10 <sup>z</sup> | 0               | 15 <sup>z</sup> | 10 <sup>z</sup> | 10 <sup>z</sup> | 15 <sup>z</sup> | 0               | 0               |
| 20    | -             | TDZ 0.5   | 40        | 0    | 0    | 0    | 0  | 5    | 0      | 0    | 0    | 0  | 0              | 0    | 0               | 5 <sup>z</sup>  | 5 <sup>z</sup>  | 5 <sup>z</sup>  | 10 <sup>z</sup> | 10 <sup>z</sup> | 25 <sup>z</sup> | 5 <sup>z</sup>  |
| 21    | -             | TDZ 1.0   | 25        | 0    | 0    | 0    | 0  | 0    | 0      | 0    | 0    | 0  | 0              | 0    | 5 <sup>z</sup>  | 5 <sup>z</sup>  | 10 <sup>z</sup> | 15 <sup>z</sup> | 5 <sup>z</sup>  | 5 <sup>z</sup>  | 10 <sup>z</sup> | 10 <sup>z</sup> |
| 22    | -             | BAP 0.2   | 15        | 5    | 0    | 0    | 0  | 0    | 5      | 0    | 0    | 0  | 0              | 0    | 0               | 5 <sup>z</sup>  | 5 <sup>z</sup>  | 5 <sup>zw</sup> | 5 <sup>z</sup>  | 5 <sup>z</sup>  | 15 <sup>z</sup> | 0               |
| 23    | -             | BAP 0.5   | 15        | 0    | 15   | 0    | 0  | 0    | 0      | 0    | 0    | 0  | 0              | 0    | 5 <sup>z</sup>  | 0               | 0               | 5 <sup>z</sup>  | 0               | 0               | 15 <sup>z</sup> | 0               |
| 24    | -             | BAP 1.0   | 0         | 0    | 40   | 0    | 0  | 10   | 0      | 0    | 0    | 0  | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 10 <sup>z</sup> | 5 <sup>z</sup>  | 0               | 0               |
| 25    | NAA 3.0       | BAP 10    | 10        | 5    | 40   | 25   | 0  | 50   | 30     | 45   | 45   | 10 | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 26    | NAA 3.0       | BAP 1.0   | 15        | 0    | 40   | 20   | 0  | 60   | 60     | 45   | 65   | 5  | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               |
| 27    | NAA 3.0       | BAP 0.5   | 40        | 0    | 65   | 35   | 5  | 45   | 15     | 45   | 65   | 5  | 0              | 0    | 0               | 0               | 0               | 0               | 0               | 5 <sup>z</sup>  | 0               | 0               |

z: 置床後60日以内に胚形成  
y: 置床後60~120日目に胚形成  
x: 胚形成培地誘導後にカルス経由のシュート再分化を6カ月後に観察  
w: 5カ月後に胚形成培地に移植していないカルスからのシュート再分化が確認された区  
1シャーレあたり5切片を置床  
1区あたり4シャーレ使用  
1区あたり20切片 (10粒観察) を置床

第2表 シュート増殖培地での暗黒処理が 'ふじ' 成長点由来カルスからのシュート再分化に及ぼす影響

| 1001シュート増殖培地での暗黒処理期間 | シュート誘導培地 | シャーレ数 <sup>z</sup> | カルス形成率 (%) |   |      |    | シュート再分化率 (%) <sup>y</sup> |   |      |     |
|----------------------|----------|--------------------|------------|---|------|----|---------------------------|---|------|-----|
|                      |          |                    | 平均値 ± 標準偏差 |   |      | ns | 平均値 ± 標準偏差                |   |      | a   |
|                      |          |                    | 平均値        | ± | 標準偏差 |    | 平均値                       | ± | 標準偏差 |     |
| 0ヶ月                  | Caboni   | 12                 | 93.3       | ± | 9.9  | ns | 3.3                       | ± | 7.8  | a   |
| 1ヶ月                  | Caboni   | 15                 | 100.0      | ± | 0.0  | ns | 13.3                      | ± | 14.5 | ab  |
| 2ヶ月                  | Caboni   | 5                  | 92.0       | ± | 17.9 | ns | 20.0                      | ± | 20.0 | abc |
| 3ヶ月                  | Caboni   | 5                  | 100.0      | ± | 0.0  | ns | 8.0                       | ± | 11.0 | ab  |
| 0ヶ月                  | Saito    | 7                  | 97.1       | ± | 7.6  | ns | 2.9                       | ± | 7.6  | a   |
| 1ヶ月                  | Saito    | 15                 | 100.0      | ± | 0.0  | ns | 29.3                      | ± | 19.8 | b   |
| 2ヶ月                  | Saito    | 5                  | 100.0      | ± | 0.0  | ns | 36.0                      | ± | 16.7 | b   |
| 3ヶ月                  | Saito    | 5                  | 96.0       | ± | 8.9  | ns | 44.0                      | ± | 32.9 | bc  |

Tukey-Kramer HSD検定(異なるアルファベットは0.1%水準で有意), ns:有意差なし

<sup>z</sup>1シャーレあたり成長点5個置床

<sup>y</sup>シュート誘導培地に移植後、3カ月目に再分化率を調査

培養手順(培地): シュート増殖(1001) - カルス誘導(Caboni) - シュート誘導(Caboni または Saito)

光条件: シュート増殖(0, 1, 2, 3カ月間暗黒) - カルス誘導(20日間暗黒) - シュート誘導(2週間薄明 明条件)

第3表 シュート誘導培地での暗黒処理期間が 'ふじ' 成長点由来カルスのシュート再分化に及ぼす影響

| シュート誘導培地での暗黒処理期間(週) | シャーレ数 <sup>z</sup> | カルス形成率 (%) |   |      |    | 再分化率 (%)   |   |      |    |
|---------------------|--------------------|------------|---|------|----|------------|---|------|----|
|                     |                    | 平均値 ± 標準偏差 |   |      | ns | 平均値 ± 標準偏差 |   |      | ns |
|                     |                    | 平均値        | ± | 標準偏差 |    | 平均値        | ± | 標準偏差 |    |
| 0                   | 5                  | 100        | ± | 0    | ns | 44.0       | ± | 26.1 | ns |
| 2                   | 5                  | 100        | ± | 0    | ns | 64.0       | ± | 8.9  | ns |
| 4                   | 5                  | 100        | ± | 0    | ns | 60.0       | ± | 24.5 | ns |
| 6                   | 5                  | 100        | ± | 0    | ns | 68.0       | ± | 30.3 | ns |

Z: 1シャーレあたり5カルス置床

Tukey-Kramer HSD検定(5%水準)

ns:有意差なし

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 0件）

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>Sato, H., N. Kawato, F. Li, K. Ito, A. Shinoda, T. Hasunuma, J. Liu, Y. Kawaharada, C. Nishitani, M. Wada, M. Watanabe and S. Komori | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Shoot regeneration via callus derived from shoot apex of apple cultivar 'Fuji'.   | 5. 発行年<br>2023年 |
| 3. 雑誌名<br>The Horticulture Journa  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-       |

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>川戸菜摘, 佐藤晴香, 篠田亜美, 李芙蓉, 蓮沼大地, 西谷千佳子, 川原田泰之, 小森貞男 | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>培養維持期間および培地組成がリンゴ葉切片のシュート再分化に及ぼす影響             | 5. 発行年<br>2023年 |
| 3. 雑誌名<br>育種学研究   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし                             | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                    | 国際共著<br>-       |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名<br>佐藤晴香, 川戸菜摘, 渡邊 学, 小森貞男 |
| 2. 発表標題<br>リンゴ茎頂カルスからのシュート再分化系の作出 |
| 3. 学会等名<br>園芸学会                   |
| 4. 発表年<br>2021年                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川戸菜摘, 佐藤晴香, 渡邊 学, 小森貞男            |
| 2. 発表標題<br>'ふじ'葉切片からのシュート再分化率向上に影響する植物ホルモン濃度 |
| 3. 学会等名<br>園芸学会                              |
| 4. 発表年<br>2021年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>佐藤晴香, 川戸菜摘, 西谷千佳子, 渡邊 学, 小森貞男 |
| 2. 発表標題<br>リンゴ珠心カルスからのシュート再分化系の作出        |
| 3. 学会等名<br>園芸学会東北支部令和3年度大会               |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川戸菜摘, 佐藤晴香, 邊見珠月, 篠田亜美, 西谷千佳子, 小森貞男 |
| 2. 発表標題<br>リンゴの珠心培養で作出したカルスおよび不定胚の起源に関する調査     |
| 3. 学会等名<br>園芸学会                                |
| 4. 発表年<br>2022年                                |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|                           |                       |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |