

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25年5月31日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21580033

研究課題名（和文）温暖化に対応しうる無休眠性ナシ品種の育成とそれを用いた休眠の分子機構解明

研究課題名（英文）Studies in breeding of non-dormant pear cultivars and molecular mechanisms of bud dormancy.

研究代表者

田村 文男（TAMURA FUMIO）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50217197

研究成果の概要（和文）：

自家和合性ナシ個体と低温要求の著しく低い横山ナシとの交雑によって得られた F₁ 個体を用いて研究を行った。3 年間における F₁ 個体の低温要求量の調査結果から低温要求量は量的遺伝子座の存在が確認された。一方、休眠に関与する遺伝子として Auxin-responsive family protein および Auxin influx carrier component の存在が確認された。

研究成果の概要（英文）：

This study was conducted using the F₁ obtained from a self-compatible pear strain TH3 x Yokoyama having lowest chilling requirement. Results obtained bud break data of F₁ for 3 years proposes pear plants had quantitative trait loci determining chilling requirements as a genetic factor. We also worked about gene expression analysis and found that expression levels of Auxin-responsive family protein and Auxin influx carrier component may relate to endodormancy development of Japanese pear.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：ニホンナシ、自発休眠、温暖化

1. 研究開始当初の背景

近年自発休眠打破に必要な冬季の低温積算が満たされなくなり、春季の発芽や開花が困難になりつつある。今後温暖化が進行すれば現在のナシ産地での栽培は困難になることが明確であり、根本的な対策としては、少低温要求性ナシ品種の育成が不可欠といえる。

これまで、著者らによってニホンナシ品種の低温要求量が明らかになれてきたが、モモ

やリンゴに観られるような著しく低温要求量の低い品種は存在しないことが示されている。

著者は現在、「おさ二十世紀」の自殖第1代から選抜した自家和合性遺伝子のホモ接合体に低温要求性の著しく低い横山を交配して育成した F₁ 約 200 個体を育成・保有しており、これらを育種材料並びに遺伝分析の材料として用いることで、これまで不明であったナシの休眠の遺伝様式が明らかにでき

るものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では上記の F1、F2 を用い、現在まで全く不明であったナシの低温要求量の遺伝様式明らかにするとともに、自発休眠の分子機構に関する知見を得ようとした。

3. 研究の方法

(1) ニホンナシ系統 TH3 と少低温要求性タイワンナシ横山の F1 における自発休眠特性 ‘おさ二十世紀’ の自殖後代で S4sm 遺伝子をホモでもつニホンナシ系統 TH3、台湾在来ナシ横山、およびそれらの交雑によって得られた F1 系統群の萌芽率を 3 年間にわたり調査した。得られた結果から遺伝様式について仮説を立て検定を行った。

(2) ニホンナシの芽の自発休眠導入および打破に關与する遺伝子の解析

ニホンナシの自発休眠機構の解明を目的として、DD 法により自発休眠の導入および打破に關与する候補遺伝子を単離した。GeneFishing™ DEG Premix Kit の全 120 プライマーセットを使用し、導入期、最深期および打破期でバンド強度の異なる 124 個の cDNA クローンを単離し、これらの発現量の休眠導入、破処理時によって比較した。

4. 研究成果

(1) ニホンナシ系統 TH3 と少低温要求性タイワンナシ横山の F1 における自発休眠特性 ‘おさ二十世紀’ の自殖後代で S4sm 遺伝子をホモでもつニホンナシ系統 TH3、台湾在来ナシ横山、およびそれらの交雑によって得られた F1 系統群の萌芽率を 3 年間にわたり調査した。F1 個体は S 遺伝子の判定と SSR マーカーによる親子鑑定の結果から、全個体がこの両親に由来する後代であると同定された。全調査日において横山の萌芽率は 60%以上であり、11 月下旬～1 月上旬までの間に自発休眠に導入しなかった(第 1-1 表)。一方、TH3 の萌芽率は常に横山に比べて低く、その値は 12 月上旬から 1 月上旬にかけて徐々に上昇した。いずれの調査日ともに、F1 個体が示す萌芽率は横山と TH3 の萌芽率の間に広く分布した。全 9 回の調査日のうち 8 回の調査日において、F1 個体の萌芽率の平均値は横山より TH3 の萌芽率に近い値を示した。そこで TH3 が自発休眠の深度に関する優性遺伝子をホモでもつと仮定し χ^2 検定を行ったが、この仮定は棄却された(第 1-2 表)。これらの結果から、低温要求量を定める遺伝要因には QTL が存在すると考えられた。多くの F1 個体の落葉期は TH3 の落葉日に比べ横山の落葉日に近かった。一方、F1 個体の展葉期は横山と

TH3 の展葉日のほぼ間にあたる 4 月 9 日に集中していた。従って、これらの形質は休眠打破のための低温要求とは直接關与せずに遺伝するものとみなされた。

第 1-1 表 台湾在来ナシ横山、ニホンナシ ‘ゴールド二十世紀’ および ‘幸水’ の萌芽率の季節的变化

品 種	萌芽率 (%) ¹			
	11 月 22 日	12 月 1 日	12 月 22 日	1 月 5 日
横 山	64.0 a ²	60.0 a	64.0 a	72.0 a
ゴールド二十世紀	36.0 a	8.0 b	8.0 b	12.0 b
幸 水	12.0 b	4.0 b	0.0 b	0.0 b

¹ 23°C で水挿し加温処理し 28 日後に調査

² 同列内の異なる英文字は χ^2 検定において 5%水準で有意差あり

第 1-2 表 TH3×横山の F1 個体の (萌芽率分布) 多低温要求性遺伝子の検定結果

調査日	多低温要求性		少低温要求性		χ^2 値 ³	χ^2 値 ⁴
	個体数 ²	個体数 ²	個体数 ²	個体数 ²		
2008 年度	12 月 1 日	38	3	0	0.220	13.124**
	12 月 22 日	31	10	0	2.439	1.735
	1 月 5 日	31	10	0	2.439	1.735
2009 年度	12 月 1 日	41	0	0	0.000	21.259**
	12 月 22 日	16	25	0	15.243**	13.124**
	1 月 5 日	37	4	0	0.390	10.847**
2010 年度	12 月 1 日	33	8	0	1.561	3.905*
	12 月 22 日	34	7	0	1.195	5.314*
	1 月 5 日	28	13	0	4.122*	0.108

¹ TH3 および ‘横山’ の萌芽率の平均を閾値とし、萌芽率が閾値以下の個体

² TH3 および ‘横山’ の萌芽率の平均を閾値とし、萌芽率が閾値以上の個体

³ TH3 が多低温要求性に関する優性遺伝子をホモでもつ場合の期待値 (TH3:横山= 1:0) に対する χ^2 値

⁴ 期待値 (TH3:横山= 3:1) に対する χ^2 値

*、** はそれぞれ 5%または 1%水準で有意

(2) ニホンナシの芽の自発休眠導入および打破に關与する遺伝子の解析

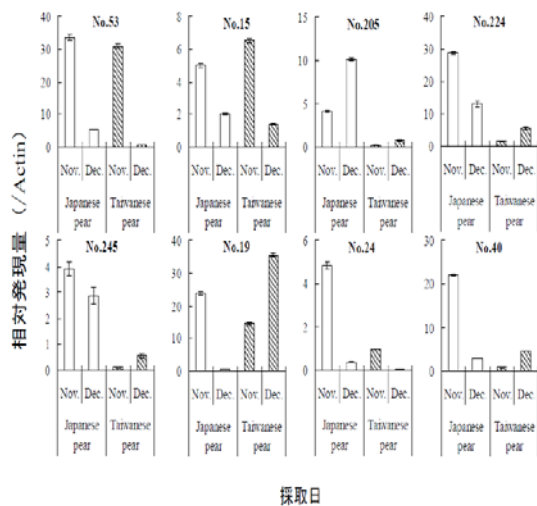
ニホンナシの自発休眠機構の解明を目的として、DD 法により自発休眠の導入および打破に關与する候補遺伝子を単離した。GeneFishing™ DEG Premix Kit の全 120 プライマーセットを使用し、導入期、最深期および打破期でバンド強度の異なる 124 個の cDNA クローンを単離した。そのうち、導入期、最深期および打破期でバンド強度が強かったクローンは、それぞれ 30、54、19 クローン、導入期と打破期の両ステージでバンド強度が強かったクローンは 21 クローンであった。BLASTX による同源性検索の結果、12 個の遺伝子が機能性遺伝子として確認され(第 2-1 表)、ステージ間で有意な発現量の差がみられた 8 クローンについてリアルタイム PCR 法で発現解析を行った。ニホンナシの自発休眠導入期から最深期にかけて発現量が低下した No. 19 と No. 40 の 2 つの遺伝子は、同時期のタイワンナシの芽において発現量が増加した(第 2-1 図)。この 2 つの遺伝子は、それぞれ Auxin-responsive family protein と E3 ubiquitin ligase をコードする遺伝子と高い同源性を示すことが確認された。No. 15 は Tonoplast intrinsic protein (TIP) 1、No. 205 は Thaumatin-like protein をコードする遺伝子と高い同源性を示し、これらの遺

伝子は最深期から打破期にかけて発現量が低下した。また No. 15 はシアナミド処理 24 時間後に発現量が増加した後、72 時間後には低下し、No. 205 はシアナミド処理後、徐々に発現量が低下した(第 2-2 図)。

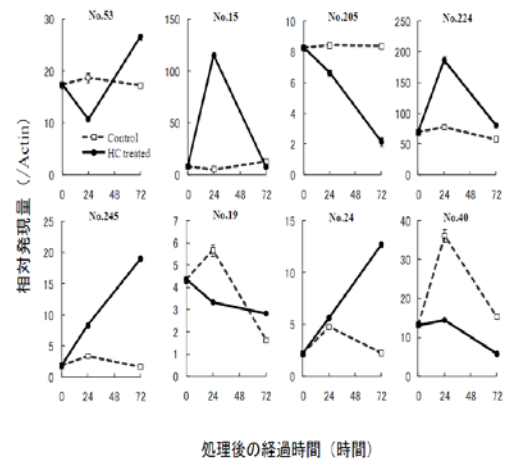
これらの遺伝子は、自発休眠の導入および打破の調節に関与していると考えられ、今後、機能や生体内での役割を詳細に調査する必要があるものと思われた。

第 2-1 表 BLASTX による相動性検索の結果

ステージ	クローン (No.)	cDNA (bp)	相動性遺伝子	E 値	Accession number
導入期	8	470	40S ribosomal protein S4 (<i>Prunus armeniaca</i> ; 081363)	1e ⁻⁵⁰	AB721409
	53	561	PREDICTED: hypothetical protein (<i>Vitis vinifera</i> ; XP_2285166)	4e ⁻¹¹	AB721410
	115	369	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (<i>Plantago major</i> ; CAJ43712)	5e ⁻⁰⁸	AB721411
最深期	11	484	Dormancy-associated protein (<i>Codonopsis lanceolata</i> ; AAW02792)	3e ⁻¹⁸	AB721412
	15	662	Tonoplast intrinsic protein 1 (<i>Mimosa pudica</i> ; BAD90703)	2e ⁻⁷³	AB721408
	205	407	Thaumatin-like protein (<i>Pyrus pyrifolia</i> ; ACN97419)	2e ⁻¹²	AB721416
	224	397	Fructose-bisphosphate aldolase, putative (<i>Ricinus communis</i> ; XP_002533605)	2e ⁻²⁸	AB721417
打破期	245	307	Auxin influx carrier component (<i>Populus trichocarpa</i> ; XP_002309128)	3e ⁻¹⁴	AB721419
導入期	19	567	Auxin-responsive family protein (<i>Brassica rapa</i> ; ABV89626)	8e ⁻¹⁹	AB721413
	24	633	Protein CYPRO4, putative (<i>Ricinus communis</i> ; XP_002518769)	4e ⁻⁴³	AB721414
打破期	40	481	E3 ubiquitin ligase PUB14, putative (<i>Ricinus communis</i> ; XP_002510099)	1e ⁻⁴⁰	AB721415
	236	364	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase, putative (<i>Ricinus communis</i> ; XP_002524583)	8e ⁻¹³	AB721418



第 2-1 図 ニホンナシとタイワンナシにおける候補遺伝子の発現量の変化



第 2-2 図 シアナミド処理による候補遺伝子の発現量の変化

5. 主な発表論文等

(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 4 件)

- ① Yoshihiro Takemura, Katsuou Kuroki, Kazuhiro Matsumoto, Yusuke Ban, Takaya Moriguchi, Fumio Tamura, Identification and expression analysis of candidate genes related to endodormancy induction and breaking in *Pyrus pyrifolia*, *Scientia Horticulturae* 155, 2013, 65-7
- ② Yoshihiro Takemura, Katsuou Kuroki, Kazuhiro Matsumoto, Fumio Tamura, Cultivar and areal differences in the breaking period of bud endodormancy in pear plants, *Scientia Horticulturae* 154, 2013, 20-24
- ③ 竹村圭弘, 黒木克翁, 松本和浩, 森口卓哉, 中田 昇, 田村文男, ニホンナシ系統 TH3 と少低温要求性タイワンナシ横山の F1 における自発休眠特性, *園学研*, 11(2), 2012, 181-187
- ④ 竹村圭弘, 須藤幸子, 池田隆政, 松本和浩, 田村文男, ニホンナシ‘ゴールド二十世紀’の芽の自発休眠は低温によって導入される, *園学研*, 10(1), 2011, 87-92

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① Yoshihiro Takemura, Shinji Fukuda, Kazuhiro Matsumoto, Fumio Tamura, Expression analysis of the candidate genes related to induction and breaking of endodormancy in Japanese pear, *International Horticultural Congress, Lisboa*, 2010

- ② 竹村圭弘, 須藤幸子, 黒木克翁, 秋吉大貴, 平岡雅広, 有馬麻衣子, 北川絵理, 田村文男, ニホンナシの自発休眠導入に及ぼすABAの影響とそれに関与する候補遺伝子群の解析, 園学研, 9(別) 1, 2010, 68
- ③ 竹村圭弘, 須藤幸子, 黒木克翁, 秋吉大貴, 平岡雅広, 田村文男, 少低温要求性ナシ系統選抜のためのRAPD解析, 園学研, 8(別)2, 2009, 148.
- ④ 須藤幸子, 池田隆政, 竹村圭弘, 福田真史, 黒木克翁, 平岡雅弘, 田村文男, ニホンナシ葉芽の自発休眠打破に要する低温要求量の品種間差異, 園学研, 8(別)2, 2009, 147
- ⑤ 竹村圭弘, 須藤幸子, 黒木克翁, 伴雄介, 森口卓哉, 田村文男, ニホンナシの自発休眠導入および覚醒に関与する候補遺伝子群の発現解析, 園学研, 8(別)1, 2009, 66
- ⑥ 竹村圭弘, 須藤幸子, 黒木克翁, 伴雄介, 森口卓哉, 田村文男, ニホンナシの自発休眠導入及び覚醒に関与する候補遺伝子群の解析, 園学研, 7(別)2, 2008, 162
- ⑦ 竹村圭弘, 伴雄介, Xiao-Ming Pang, 田村文男, 森口卓哉, ニホンナシの自発休眠打破に関与する候補遺伝子群の解析, 園学研, 7(別) 1, 2008, 40

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 文男 (TAMURA FUMIO)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号: 50217197

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし