

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24380022

研究課題名(和文)大規模ゲノム情報と自殖F2集団を利用したナシ育種の効率化と新規優良品種の育成

研究課題名(英文) Breeding of new pear cultivars by constructing efficient breeding system using large scale genome information and F2 self population

研究代表者

板井 章浩 (ITAI, Akihiro)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・教授

研究者番号：10252876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ナシ自殖F2集団を材料にして、リンゴゲノム情報および次世代シーケンサーにより取得したニホンナシおよびセイヨウナシのESTおよびゲノム配列の大規模ゲノム情報を統合し、病害抵抗性、単為結果性、などの有用形質に関するマーカー開発を行い、育種現場で実際に適用し、新品種開発に役立てることを目的として実験を行った。‘おさ二十世紀’×‘マックスレッドバートレット’のF2集団においては、連鎖地図を作成し、ブラウンスポット病罹病性に関するQTL解析を行い、近傍のマーカーを得た。これらは育種に利用可能である。また単為結果性に関してはRNA-seq解析を駆使し、単為結果性に関連する転写因子群を同定した。

研究成果の概要(英文)：Using an F2 population from a self cross of F1 between European pear ‘Max Red Bartlett’ and Japanese pear ‘Osa Nijisseiki’, we constructed integrated genetic linkage map consisted of SSR markers derived from largescale information of apple, European pear and Japanese pear. We also performed quantitative trait locus (QTL) analysis of brown spot disease susceptibility and resulted in making SSR markers linked to its susceptibility. The molecular mechanism of parthenocarpy has not understood yet. Here, we have searched genes related to parthenocarpic fruit in pear by RNA-seq analysis. Expression of several trans factors genes showed strongly correlated to the development of parthenocarpic fruit. These candidate genes were selected for further transgenic experiment to clarify the role of parthenocarpy.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：ナシ 連鎖地図 病害罹病性 QTL解析

1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノム解析技術の進歩は早く、昨年度近縁のリンゴドラフトゲノムが明らかになり、利用できる状態にある。またナシにおいては、研究代表者と研究者分担者との共同で、ESTを用いた約3000個のcDNAアレイの開発を始め、次世代シーケンサーにより、二十世紀、豊水、ラフランスの大規模ゲノム情報を得て今後の育種に利用できる状態にある。さらに、ナシは、自家不和合性を有するため、遺伝解析が自殖性の植物に比べ困難を極めてきた。申請者らは、遺伝解析用のF2集団の育成に、自家和合性突然変異体‘おさ二十世紀’を利用し、セイヨウナシ‘Max Red Bartlett’を交配したF1集団の中から自殖交配したF2集団の系統の育成を開始し、ようやく果実形質の解析が可能になった。

2. 研究の目的

本研究では、まずこれら大規模ゲノム情報から、SNP, SSR, AFLPからなるマーカー開発を行う。次に、自殖F2集団を利用して、連鎖地図の作成を試みる。その後さらに、F2集団における病害罹病性の分離の調査およびQTL解析を行い、有用形質に連鎖したDNAマーカーを開発することを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) F2集団を用いた連鎖地図の作成

自家和合性のニホンナシ栽培品種‘おさ二十世紀’(*P. pyrifolia* Nakai)と、中度の罹病性を示すセイヨウナシ栽培品種‘マックスレッド・バートレット’(*P. communis* L.)、それらの種間交雑によるF1集団(8個体)と、F1集団内で中度罹病性、自家和合性の1系統(OMB38)の自家授粉によるF2集団(93個体)を遺伝子連鎖地図の作成に用いた。これら材料からDNAを抽出した。

遺伝子連鎖地図の作成に用いたのは単純反復配列(SSR)マーカーで、ナシ、リンゴ由来のゲノム配列とEST配列に基づいている。

‘おさ二十世紀’と‘マックスレッド・バートレット’、OMB38およびF2集団(93個体)においてSSRマーカーを用いPCR法を用いてDNA断片の増幅を行った。増幅したPCR産物はPRISM 3100 DNA sequencer (Biosystems, USA)を用いて分離・検出を行った。

遺伝子連鎖地図の作成にはJoinMap version 4.0 (van Ooijen)を用いた。

(2) ブラウンスポット病罹病性遺伝子座のQTL解析

植物材料は(1)と同様のF2集団を用いた。

1 Sv 毒素の抽出

菌株は、新潟県で発生したセイヨウナシ罹病葉から単孢子分離されたブラウンスポット病菌(*Stemphylium* sp.)を使用した。これらの分離菌株はPDA培地上で保存し、実験に使用した。

2 AK 毒素の抽出

AK毒素の抽出は、Tanakaら(Tanaka et al., 1999)の方法に従った。菌株は、ナシ黒斑病菌(*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype)を使用した。

上記の2毒素を葉に溶液として植物材料の幼葉に接種、2~3日後の病斑の様子を観察した。評価は全て2年にわたり2度以上行った。

3 QTL 解析

ブラウンスポット病と黒斑病への罹病性・抵抗性に基づいた表現型マーカー、SvbとAni(Terakami et al., 2007)を作成した。Multiple QTL model mapping (MQM)、Interval mappingのためにMapQTL ver. 6.0を使用した。ゲノムワイドなLOD値は5000反復のPermutation testに基づいて決定し、QTLは $p < 0.05$ で有意な結果とした。また罹病性・抵抗性の評価は、高度罹病性、中度罹病性、抵抗性の3段階で評価した。

(3) 単為結実性に関わる因子の探索

ニホンナシ品種‘豊水’の開花時に花柱を完全に取り除き、未受粉区(未Cont.)、未受

粉 + GA ベースト処理区 (未 G₄P) 未受粉 + GA + サイトカイニンペースト処理区 (未 G₄PBC) 未受粉 + サイトカイニンペースト処理区 (未 BC) そして X 線照射花粉受粉区 (X 線) 通常花粉受粉区 (受 Cont.) の計 6 処理区を設け、ナシ果実の着果率を調査するとともに、収穫した果実の品質調査および幼果の細胞観察を行った。上記処理区開花 1 週後果肉の RNA を抽出後、ライブラリを作成し RNA-seq 解析を行った。その結果をもとに、未受粉区の果肉と比べ受粉区の果肉において 3 倍以上または 1/3 倍以下に発現が変動した遺伝子を選抜した。

4. 研究成果

(1) F2 集団を用いた連鎖地図の作成

145 種の SSR マーカーのうち、9 種のマーカーが複数の座を示し、全 147 座と *Svb*, *Ani* を 21 連鎖群に分類した。連鎖地図は全長 842.638 cM、マーカー間の平均距離は 5.655 cM だった。LG の大きさは最大が LG 11 の 130.6 cM で最小は LG 8 の 13.5cM であった。

(2) ブラウンスポット病罹病性遺伝子座の QTL 解析

‘おさ二十世紀’ と ‘マックスレッド・バートレット’、その F1 集団 8 個体、F2 集団 91 個体について、ブラウンスポット病への感受性 (抵抗性、高度・中度罹病性) を評価した。Sv 毒素の接種から 2~3 日後に評価し、2 反復以上行った。‘おさ二十世紀’ は接種から 3 日後も病斑の拡大のない抵抗性だった一方で、‘マックスレッド・バートレット’ は壊死性の病斑の拡大が認められるものの、拡大の停止する中度の罹病性だった。F1 集団は 5 個体が中度罹病性、3 個体が抵抗性を示し、F1 における罹病性と抵抗性の期待頻度 1:1 とほとんど一致した。

F2 集団では 74 個体が罹病性、17 個体が抵抗性を示し、期待頻度 3:1 とわずかに歪を示した。また罹病性個体 74 個体のうち、27 個体は高度罹病性、47 個体は中度罹病性で期待

頻度 (高度罹病性 : 中度罹病性 : 抵抗性 = 1:2:1) と一致した。表現型マーカーの *Svb* および *Ani* を除いた 147 座からなる連鎖地図を用いて、ブラウンスポット病罹病性座と黒斑病罹病性遺伝子座の QTL 解析を行った。ブラウンスポット病は LG 11 (LOD 値 7.29)、黒斑病は LG 10 (LOD 値 2.90) と LG 11 (LOD 値 11.66) に有意な QTL が認められた。その他の連鎖群では最大 LOD 値が、ブラウンスポット病と黒斑病ともに有意な QTL は認められなかった。

(3) 単為結実性に関わる因子の探索

未受粉対照区 (未 Cont.) に比べ受 Cont. 区で 3 倍以上に発現が増大した 7,396 遺伝子および、1/3 倍以下に発現が減少した 5,094 遺伝子の存在が明らかとなった。その中から、bHLH、MYB、NAC、zinc finger などの転写因子と相同性を示し、かつ受粉で増大した 162 遺伝子、減少した 152 遺伝子を選抜した。さらにその中で 1/11 倍以下に減少した comp60345 は、未 Cont. 区において開花約 2 週後で果実成長が停止し、落果が誘発される現象に関与している可能性が考えられた。

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 22 件)

1 S. Terakami, S. Moriya, Y. Adachi, M. Kuniyoshi, C. Nishitani, T. Saito, K. Abe, and T. Yamamoto (2016): Fine mapping of the gene for susceptibility to black spot disease in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Breeding Science* 査読有 66: 271-280.

2 T. Yamamoto and S. Terakami (2016): Genomics of pear and other Rosaceae fruit trees. *Breeding Science* 査読有 66: 148-159.

3 S. Nishio, T. Hayashi, T. Yamamoto, M. Yamada, N. Takada, H. Kato, C. Nishitani

- and T. Saito (2016) Validation of molecular markers associated with fruit ripening day of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) using variance components. *Scientia Horticulturae* 査読有 199: 9-14
- 4 L. Percepied, D. Leforestier, E. Ravon, P. Guérif, C. Denancé, M. Tellier, S. Terakami, T. Yamamoto, M. Chevalier, Y. Lespinasse and C. E. Durel (2015): Genetic mapping and pyramiding of two new pear scab resistance QTLs. *Molecular Breeding* 査読有 35:197.
- 5 A. Itai, R. Hatanaka, H. Irie and H. Murayama (2015): Effects of storage temperature on fruit quality and expression of sucrose phosphate synthase and acid invertase genes in Japanese pear. *The Horticulture Journal* 査読有 84:227-232.
- 6 N. Charoenchongsuk, K. Ikeda, A. Itai, A. Oikawa and H. Murayama (2015): Comparison of the expression of chlorophyll-degradation-related genes during ripening between stay-green and yellow-pear cultivars. *Scientia Horticulturae* 査読有 181:89-94.
- 7 Murayama, H., M. Sai, A. Oikawa and A. Itai (2015): Inhibitory factors that affect the ripening of pear fruit on the tree. *The Horticulture Journal* 査読有 84:14-20.
- 8 S. Terakami, C. Nishitani, M. Kunihiisa, K. Shirasawa, S. Sato, S. Tabata, K. Kurita, H. Kanamori, Y. Katayose, N. Takada, T. Saito, and T. Yamamoto (2014): Transcriptome-based single nucleotide polymorphism markers for genome mapping in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *Tree Genetics & Genomes* 査読有 10: 853-863.
- 9 T. Yamamoto, S. Terakami, N. Takada, S. Nishio, N. Onoue, C. Nishitani, M. Kunihiisa, E. Inoue, H. Iwata, T. Hayashi, A. Itai and T. Saito (2014): Identification of QTLs controlling harvest time and fruit skin color in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breeding Science* 査読有 64:351-361.
- 10 H. Iwata, T. Hayashi, S. Terakami, N. Takada, T. Saito and T. Yamamoto (2013): Genomic prediction of trait segregation in a progeny population: a case study of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *BMC Genetics* 査読有 14: 81.
- 11 I. Nakajima, Y. Sato, T. Saito, T. Moriguchi and T. Yamamoto (2013): Agrobacterium-mediated genetic transformation using cotyledons in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breeding Science* 査読有 63: 275-283.
- 12 T. Yamamoto, S. Terakami, S. Moriya, F. Hosaka, K. Kurita, H. Kanamori, Y. Katayose, T. Saito and C. Nishitani (2013): DNA markers developed from genome sequencing analysis in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Acta Horticulturae* 査読有 976: 477-483.
- 13 K. Nashima, T. Shimidzu, C. Nishitani, T. Yamamoto, H. Takahashi, M. Nakazono, A. Itai, K. Isuzugawa, T. Hanada, T. Takashina, S. Matsumoto, S. Otagaki, A. Oikawa and K. Shiratake (2013): Microarray analysis of gene expression patterns during fruit development in European pear (*Pyrus communis*) *Scientia Horticulturae* 査読有 164:466-473.
- 14 K. Nashima, H. Takahashi, M. Nakazono, T. Shimidzu, C. Nishitani, T. Yamamoto, A. Itai, K. Isuzugawa, T. Hanada, T. Takashina, M. Kato, A. Oikawa and K.

- Shiratake. (2013): Transcriptome analysis of giant pear fruit with fruit specific DNA reduplication on a mutant branch. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 査読有 82:301-311.
- 15 H. Iwata, T. Hayashi, S. Terakami, N. Takada, Y. Sawamura and T. Yamamoto (2013): Potential assessment of genome-wide association study and genomic selection in Japanese pear *Pyrus pyrifolia*. Breeding Science 査読有 63: 125-140.
- 16 F. Pierre-Marie, L. Roux, D. Christen, B. Duffy, S. Tartarini, L. Dondini, T. Yamamoto, C. Nishitani, S. Terakami, Y. Lespinasse, M. Kellerhals and A. Patocchi (2012): Redefinition of the map position and validation of a major quantitative trait locus for fire blight resistance of the pear cultivar 'Harrow Sweet' (*Pyrus communis* L.). Plant Breeding 査読有 131:656-664.
- 17 S. Terakami, Y. Matsumura, K. Kurita, H. Kanamori, Y. Katayose, T. Yamamoto and H. Katayama (2012): Complete sequence of the chloroplast genome from pear (*Pyrus pyrifolia*): genome structure and comparative analysis. Tree Genetics & Genomes 査読有 8:841-854.
- 18 Hoytaek Kim・寺上伸吾・西谷千佳子・澤村豊・栗田加奈子・金森裕之・片寄裕一・齋藤寿広・山本俊哉 (2012): 4塩基, 5塩基モチーフ SSR マーカーのニホンナシ品種識別への利用. DNA 多型、査読有 20: 58-61.
- 19 C. Nishitani, C., T. Saito, B. E. Ubi, T. Shimizu, A. Itai, T. Saito, T. Yamamoto and T. Moriguchi (2012): Transcriptome analysis of *Pyrus pyrifolia* leaf buds during transition from endodormancy to ecodormancy. Scientia Horticulturae 査読有 147:49-55.
- 20 C. Nishitani, A. Yamaguchi-Nakamura, F. Hosaka, S. Terakami, T. Shimizu, K. Yano, A. Itai, T. Saito and T. Yamamoto (2012): Parthenocarpic genetic resources and gene expression related to parthenocarpy among four species in pear (*Pyrus* spp.) Scientia Horticulturae 査読有 136:101-109.
- 21 A. Ogata, A. Itai, M. Nishiyama, K. Kanahama and Y. Kanayama (2012): Analyses of early rough bark phenotype found in seedlings of a cross between the European pear 'Bartlett' and the Chinese pear 'Yali'. Scientia Horticulturae 査読有 148:1-8.
- 22 A. Itai, T. Igori, N. Fujita, H. Murayama, M. Egusa and M. Kodama (2012): Ethylene analog and 1-MCP enhance black spot disease development in *Pyrus pyrifolia* Nakai. HortScience 査読有 46:228-231.
- 〔学会発表〕(計 17 件)
- 1 藤井美希、村山秀樹、板井章浩他 セイヨウナシ ACC 合成酵素 (PcACS1) の低温誘導性発現メカニズムの解析、園芸学会、徳島大学 (徳島県徳島市) 2015.9.26-27
- 2 友松康一、山本俊哉、児玉基一郎、村山秀樹、板井章浩他 ナシブラウンスポット病罹病性遺伝子座のマッピング、園芸学会、徳島大学 (徳島県徳島市) 2015.9.26-27
- 3 藤井美希、村山秀樹、板井章浩他 ナシ ACC 合成酵素 (PpACS1) のプロモーター領域のメチル化解析および核タンパク質との相互作用解析、園芸学会、千葉大学 (千葉県千葉市) 2015.3.28-29
- 4 小仁所邦彦、山本俊哉他 ニホンナシ品種の糖組成および SSR 多型による遺伝的類縁関係の評価 園芸学会、千葉大学 2015.3.28-29
- 5 西尾聡悟 ニホンナシの収穫期に関連する DNA マーカーの検証 園芸学会、千葉大学

千葉県千葉市) 2015.3.28-29

6 山本俊哉他 最適な両親組合せを決定するゲノムワイド予測 - ニホンナシでの検証 - 園芸学会、佐賀大学(佐賀県佐賀市) 2014.9.27-29

7 藤井美希、村山秀樹、板井章造他 ナシ ACC 合成酵素 (PpACS1) のプロモーター領域のメチル化解析、園芸学会、佐賀大学(佐賀県佐賀市) 2014.9.27-29

8 Murayama,H., A. Itai 他 Starch degradation after harvest in 'La France' pear XII International pear symposium, Leuven, Belgium 2014.7.14-18

9 Itai, A., H. Murayama 他 Transcriptome analysis reveals the role of plant hormones in pear fruit set XII International pear symposium, Leuven,Belgium 2014.7.14-18

10 森下恭行、村山秀樹、板井章造他 次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析によるナシ着果制御機構の解明、園芸学会、筑波大学(茨城県つくば市) 2014.3.29-30

11 山本俊哉 気候変動に対応した果樹育種(招待講演)育種学会、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市) 2013.10.12-13

12 寺上伸吾、山本俊哉他 ニホンナシ黒斑病罹病性遺伝子近傍領域の塩基配列決定、園芸学会、岩手大学 2013.9.20-21

13 奈島賢児、山本俊哉、板井章造他 セイヨウナシ'ラフランス'の果肉における成長ステージ別マイクロアレイ解析、園芸学会、岩手大学(岩手県盛岡市) 2013.9.20-21

14 山本俊哉 落葉果樹のDNAマーカー、分子育種、ゲノム育種に関する研究(招待講演)ガンマフィールドシンポジウム、農業生物資源研究所(茨城県常陸大宮市) 2013.7.17

15 村山秀樹、板井章造他 セイヨウナシ'ラ・フランス'果実における収穫後のデンプンの消失に関する研究、園芸学会、東京農

工大(東京都小金井市) 2013.3.23

16 寺上伸吾、山本俊哉他 ナシの連鎖地図 XVIII. SNP アレイを用いたニホンナシ高密度連鎖地図の構築、園芸学会、福井県立大学(福井県吉田郡永平寺町) 2012.9.22

17 板井章造、村山秀樹他 マイクロアレイ解析による GA 誘導性ナシ単為結果関連遺伝子の探索 園芸学会、福井県立大学(福井県吉田郡永平寺町) 2012.9.22

[図書](計3件)

1 板井章造 (2015):果実の発育、果樹園芸学、米森敬三編、224、朝倉書店、東京

2 A.Itai (2015): Watercore in fruits. *In* Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants. 220, Y. Kanayama, A. V. Kochetov (eds), Springer, Tokyo

3 児玉基一朗・伊藤真一・板井章造 (2013):病原菌ゲノム解析とゲノム情報の活用 菌類きのご遺伝資源 発掘と活用「持続社会構築に向けた菌類きのご資源活用」編集委員会編、172、丸善プラネット、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

板井 章造 (ITAI, Akihiro)
京都府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号: 10252876

(2)研究分担者

児玉 基一朗 (KODAMA, Motoichiro)
鳥取大学・大学院連合農学研究科・教授
研究者番号: 00183343

村山 秀樹 (MURAYAMA, Hideki)
山形大学・農学部・教授
研究者番号: 40230015

山本 俊哉 (YAMAMOTO, Toshiya)
国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・ユニットリーダー
研究者番号: 60355360