

## 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) (海外学術調査)

研究期間：2013～2016

課題番号：25304007

研究課題名(和文) ナシ属植物の伝播にともなう果実形質および病原菌の共進化過程の解析

研究課題名(英文) Analysis of co-evolution process of fruit traits and pathogenicity associated with pear domestication

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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナシにおいて特に起源地から西への伝播において、遺伝資源の調査を行い、将来日本で栽培されているナシへの新規機能性果実形質の付加、病害抵抗性の導入に資するための遺伝資源評価を行うことを目的として研究を行った。イタリアとアメリカにおいては、それぞれ世界各地から収集された系統や野生種について、主に成熟特性やデンプン蓄積特性、単為結実性、各種病害罹病性の調査を行った。また野生種のメタボローム解析およびポリフェノール含量の解析を行った。また遺伝資源の探索では、イランの半乾燥地帯の遺伝資源の探索において、極めて乾燥耐性を持つ種を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pyrus species is considered to originate in the mountainous area of southwestern China and to spread into east (Asian group) and west (European Group). The objective of our research is to make novel breeding strategies for pear. We have collected Pyrus genetic resources with good fruit traits by evaluation and characterization of them. We have evaluated the susceptibility of Alternaria and Stenphylium disease by screening total 700 varieties. Many varieties were susceptible to Stenphylium disease. We also got data for metabolomics and polyphenol composition of Pyrus species. Based on the metabolomics data and clustering analysis, pear species were divided into 4 groups. We also found one specie has the highest drought resistance. It will be a promising breeding material as a drought resistant rootstock.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：ナシ属 栽培化 病害罹病性 果実形質 耐乾性

## 1. 研究開始当初の背景

ナシ属植物は、リンゴやマルメロとの祖先種から分化したのち、約 5500 万年前中国西南部に起こり、その後西に向かって栽培化され、ヨーロッパにて大発展を遂げたセイヨウナシグループと東に向かい中国・日本で発展したアジアナシグループの大きく 2 つのグループに分類される。この両グループ間には、果実形質(肉質・形態・味・香り)、耐寒性、耐乾性、耐病性など形態・生理・機能など様々な遺伝的形質の違いが見られる。また、現在ナシの最重要病害として黒星病があるが、セイヨウナシとニホンナシにおいて感染する菌が分化している。すなわち、黒星病については、セイヨウナシには、*Venturia pirina* が感染し病気を起こすのに対し、アジアナシには、*V. nashicola* が感染し、症状は同じであるが、両方感染することはない。ナシ赤星病についても同様に東洋と西洋で菌が分化している。植物と菌がそれぞれ東西に分化している興味深い例である。さらに黒斑病は、アジアナシの一部の二十世紀などの品種が、黒斑病菌の生成する毒素に感受性を持ち罹病する。

## 2. 研究の目的

このように独自に分化し、セイヨウナシグループとアジアナシグループにおいて観察される独自の遺伝的形質について、一体どの時点で、どこで形成されていったのか明らかになっていない。これらを明らかにすることは今後のナシ栽培植物の進化と栽培化の解明およびナシ育種においても重要である。そのため、起源地からの伝播において、野生および半野生ナシの収集と評価を行う必要がある。本研究は世界各地のナシ属植物を用いて、1)メタボローム解析による果肉成分に関する遺伝資源評価、2)遺伝資源の黒斑病、黒星病、赤星病、ブラウンスポット病罹病性に関する評価、3)新規機能性台木開発のための野生種の保全と選抜を目的として実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) メタボローム解析

アジアナシグループに含まれるホクシマメナシ (*P. betulifolia*)、マメナシ (*P. calleryana*)、河北梨 (*P. × hopeiensis*)、*P. serotina*、栽培品種‘豊水’、‘おさゴールド’とセイヨウナシグループに含まれる *P. communis*、*P. elaeagnifolia*、*P. spinosa* (*P. amygdaliformis*)、*P. fascicularis*、栽培品種‘ゼネラル・レクラーク’の収穫適期の果肉を液体窒素を用いて凍結粉砕した後、メタノール抽出を行い、CE-TOF-MS でメタボローム解析を行った。なお解析は 5 果を 1 反復として 3~5 反復行った。

### (2) ポリフェノール成分解析

*P. caucasica*、*P. nivalis*、*P. salicifolia*、*P. syriaca*、*P. xerophila*、*P. pashia*、*P. cordata*、*P. spinosa*、*P. koehnei*、*P. cossonii*、*P. fauriei*、*P. uyematsuana*、*P. phaeocarpa*、*P. pyraster* から、成熟期の果実を、1 反復新鮮重 3g 以上(果実数は 5~10 個に及んだ)としてそれぞれの個体で 3 反復および 4 反復採集した。各果実の果皮、果芯を取り除き、果実のみを反復ごとにとりまとめ、-80 凍結保存した。

各反復ごとに、約 1 週間ずつ凍結乾燥機にかけ、各サンプルが完全に乾燥し、各反復ごとに 50mg ずつエッペンチューブに測り取り、-20 凍結保存した。

凍結保存していた粉砕済みサンプルの入ったエッペンチューブに、それぞれ 500  $\mu$ L の 80%メタノールを加え、約 10 分間激しくボルテックスを行った。15000rpm、5 分間遠心を行い、上清を新しいエッペンチューブに移した。上清中の懸濁が沈殿するのを待ち、沈澱をなるべく吸い込まないようにして上清をピペットマンで吸い取り、フィルターを先端に取り付けた注射器に上清を移し、80%メ

タノール抽出物を HPLC にかき、クロロゲン酸、ジカフェオイルキナ酸、アルブチンの定量を行った。

### (3) ニホンナシ黒斑病、セイヨウナシ黒斑病、セイヨウナシブラウンスポット病原菌の生成する毒素による遺伝資源評価

植物材料はアメリカ合衆国農務省のナシ属遺伝資源圃場 (USDA、アメリカ合衆国オレゴン州コーバリス) に生育する約 500 品種および系統、イタリアポローニア大学が所有する約 200 品種および系統の幼葉を実験に供試した。

#### 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原菌 (*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。

malt 培地に褐色斑点病菌を接種し、25℃、暗下で約 8 週間静置培養した。培養終了後、培養液を減圧ろ過して培養ろ液を得た。MeOH で洗浄し、次に蒸留水で平衡化した HP20 (DIAION) カラムに培養ろ液を通した。得られた画分をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、水に溶解し、毒素活性を調べた。活性画分を蒸留水 50 mL に溶解した。その後も各種カラムを用いて精製し、再度蒸留水に溶解したものを SV 毒素として使用した。

#### 2 AK,AM 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、ナシ黒斑病原菌 (*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype) およびセイヨウナシ黒斑病の評価としてはリンゴ斑点落葉病病原菌 (*Alternaria alternata* Apple pathotype) 使用した。ジャガイモ寒天培地 (PDA) で培養、維持した。PDA上で培養したそれぞれの菌体を5mm角程度にメスで切り取り、0-276菌株はPDB培地へ20ピース程度植菌した。1週間、

室温で静置培養した後、キムワイプでろ過し、余分な菌糸を除去した。ろ過後、凍結乾燥し、最終的に99%EtOHで10倍濃縮となるよう溶解した。これらは4℃、暗下で保存した。

上記の3毒素を葉に溶液として植物材料の幼葉に接種し、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。

### (4) 新規機能性台木開発のための野生種の保全と選抜

イランにおいては、カスピ海沿岸沿いのギーラン州、イラク隣接地帯のコーデスタン州、さらにイラン農務省の収集するイラン在来品種の調査を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) メタボローム解析

解析の結果、それぞれの果実から142種の代謝産物のメタボロームデータを取得した。これらの代謝産物の含有量に基づいてクラスター解析を行った結果、ホクシマメナシ、マメナシ、河北梨、*P. spinosa*、*P. communis*、*P. elaeagnifolia*、*P. serotina*を含むクラスターと、栽培品種‘豊水’、‘おさゴールド’、‘ゼネラル・レクラーク’、野生種

*P. fascicularis*から構成されるクラスターに大きく分類することができた。さらにクラスターはホクシマメナシ、マメナシ、河北梨のクラスター-1と、*P. spinosa*、

*P. communis*、*P. elaeagnifolia*、*P. serotina*のクラスター-2に分類され、クラスターは‘ゼネラル・レクラーク’と*P. fascicularis*のクラスター-1と‘豊水’、‘おさゴールド’のクラスター-2に分類することができた。

クラスター-1では約30種の代謝産物が他のクラスターに比べて高い傾向が認められた。

以上の結果より、メタボローム解析によりナシ果実の成分の特徴付けを行うことができ、栽培化に関わる物質の同定や品種間差異

をより明らかにすることが可能であった。

#### (2) ポリフェノール成分解析

測定した3種のポリフェノールのうち、各ポリフェノールのすべての系統における平均値を比較すると、アルブチンで最も含有量が多く、最も低い3,5-ジカフェオイルキナ酸と比較して約40倍の含量の差が認められた。この結果は、3種のポリフェノールのうちでは、含有量をもとに考えると、アルブチンが最も重要なポリフェノールであると思われる。アルブチンの含量では、朝鮮半島に分布する *P. fauriei* において突出して多く、最も含量の少なかった *P. syriaca* と比べて乾燥重換算で約400倍の差が認められた。含有がほぼ認められない種とそうでないものとの間で差が明瞭であった。

クロロゲン酸の含有量では、*P. salicifolia* と *P. salicifolia* で約40倍、*P. pashia* と *P. pashia* で約15倍の差があり、系統による差が大きかった。また、どの種でも含まれていることが示された。

3,5-ジカフェオイルキナ酸については、*P. caucasica* や *P. nivalis* などで含有が全く認められず、生合成の有無がはっきりと存在した。

#### (3) ニホンナシ黒斑病、セイヨウナシ黒斑病、セイヨウナシブラウンスポット病原菌の生成する毒素による遺伝資源評価

それぞれ世界各地から収集された系統や野生種について、調査を行った。病害抵抗性について大規模なスクリーニング調査を行い、イタリアとアメリカ両国の協力機関が有する遺伝資源について、アメリカUSDAにおいては、計約500品種、野生種、系統について、イタリアボローニャ大学においては計約200品種について、セイヨウナシブラウンスポット病、黒斑病、赤星罹病性のスクリーニングを行った。結果、セイ

ヨウナシブラウンスポット病においては、約8割以上の品種系統が罹病性と判定され、西洋系のみならずアジア系の品種、野生種でもかなりの系統が罹病性であり、病原菌の蔓延次第では、全世界に被害が拡大する可能性を見いだした。一方、ニホンナシ黒斑病罹病性のセイヨウナシではほぼ見られず、セイヨウナシ黒斑病罹病性の品種系統はテストした約10%程の品種系統で罹病性と判定された。

#### 4) 新規機能性台木開発のための野生種の保全と選抜

イランの各地域による多様性が確認された。北部のギーラン州では、ニホンナシやチュウゴクナシのようなアジア系と非常によく似た形質を持つ個体が確認され、一方、コーデスタン州においては、アジア系とよく似た形質を持つ個体は全く確認されず、多数の野生種 *P. syriaca* の個体が確認されるなど地域による差がはっきり見られた。さらに収集されたイラン在来品種には、乾燥耐性に強いものやアジア系との雑種個体と思われるものが存在していた。

#### 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9件)

1 Katayama, H., Amo, H., Wuyun, T., Uematsu, C., Iketani, H. (2016): Genetic structure and diversity of the wild Ussurian pear in East Asia. *Breeding Science*, 査読有, 66, 90-99.

2 Oikawa, A., T. Otsuka, R. Nakabayashi, Y. Jikumaru, K. Isuzugawa, H. Murayama, K. Saito, and K. Shiratake, K.

(2015): Metabolic Profiling of Developing Pear Fruits Reveals Dynamic Variation in Primary and Secondary Metabolites, Including Plant Hormones. *PLoS One*, 査読

有 10(7), e0131408

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131408>

3 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.

4 Yamada, K., Uematsu, C. and Katayama, H. (2015): Pear (*Pyrus L.*) genetic resources from Northern Japan: organoleptic evaluation of ornamental pear trees. *Acta Horticulturae* 1094, 査読有, pp. 117-122.

5 Ieguchi, T., Takaoka, M., Nomura, K., Uematsu, C. and Katayama, H. (2015): Pear (*Pyrus L.*) genetic resources from Northern Japan: evaluation of antioxidant capacity. *Acta Horticulturae* 1094, 査読有, pp. 539-548.

6 Wuyun, T., Amo, H., Xu, J., Ma, T., Uematsu, C. and Katayama, H. (2015): Population structure of and conservation strategies for wild *Pyrus ussuriensis* Maxim. in China. *PLoS ONE*, 査読有, 10 (8), e0133686, doi:10.1371/journal.pone.0133686.

7 Wuyun T., Ma T., Uematsu C., Katayama H. (2013): Low genetic diversity of wild Ussurian pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) in Inner Mongolia, China revealed by hypervariable regions of chloroplast DNA. *Tree Genetics & Genomes*, 査読有, 9, 167-177.

8 Katayama, H., Ohe M., Sugawara E. (2013): Diversity of odor active compounds from wild and local varieties of Iwateyamanashi (*Pyrus ussuriensis* var.

*aromatica*) revealed by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA). *Breeding Science*, 査読有, 63, 86-95.

9 片山寛則 (2013): “蘇るイワテヤマナシ遺伝資源”, *ゲノム手法・情報を利用した果樹研究の展開*, 果実日本, 査読無, 68巻, 8号, 99-102.

〔学会発表〕(計10件)

1 片山寛則 東アジアの野生梨 (*Pyrus ussuriensis*) の集団構造と起源に関する研究. 日本育種学会、横浜市立大学 (神奈川県横浜市) 2016.3.22

2 片山寛則 ナシのルーツを求めて: 世界のナシ、日本のナシ、「作物の起源と人が育てた栽培植物」日本育種学会公開シンポジウム、新潟大学(新潟県新潟市) 2015.9.11-12

3 片山寛則 国の野生梨の保全研究への貢献と神戸大学におけるイワテヤマナシのジーンバンクの紹介、園芸学会、徳島大学 (徳島県徳島市) 2015.9.26-27

4 友松康一、及川彰、村山秀樹、板井章造 ナシ野生種および栽培品種果実のメタボローム解析 園芸学会中四国支部大会、米子ビッグシップ(鳥取県米子市) 2015.7.25 (支部大会賞受賞)

5 家口嵩広、片山寛則 他 フェノール類に着目した東北地方由来のナシ属遺伝資源の評価 園芸学会、千葉大学(千葉県千葉市) 2015.3.28

6 及川彰 他 バラ科果樹果実のメタボローム解析、日本農芸化学会、明治大学(東京都千代田区) 2014.3.28-3.30

7 AMO, H., H. Katayama 他 Conservation strategy of wild Ussurian pear in China based on the genetic structure analysis 日本生態学会、広島国際会議場(広島県広島市) 2014.3.18

8 大塚貴生、及川彰 他 バラ科果樹統合オミクスデータベース Fruit Omics Database 園芸学会、岩手大学(岩手県盛岡市)

2013.9.20-21

9 村山秀樹、及川彰、板井章造 他 セイヨウナシ果実における樹上成熟ならびに追熟中の代謝産物の変動 園芸学会、岩手大学 (岩手県盛岡市) 2013.9.20-21

10 家口嵩広、片山寛則 他 東北地方より収集したナシ遺伝資源 (第8報) 果実に含まれる主要フェノール類の特徴づけ. 園芸学会、岩手大学 (岩手県盛岡市)

2013.9.20-21

〔図書〕(計 1 件)

A.Itai (2015): Watercore in fruits. *In* Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants. 220, Y. Kanayama, A. V. Kochetov (eds), Springer, Tokyo  
〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 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 基一郎 (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

及川 彰 (OIKAWA, Akira)  
山形大学・農学部・准教授  
研究者番号：50442934

片山 寛則 (KATAYAMA, Hironori)  
神戸大学・農学研究科・准教授  
研究者番号：50294202

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )