

# 博士論文要約 (Summary)

平成30年 4月入学  
連合農学研究科 生物生産科学専攻  
氏名 清水 拓

タイトル	果肉難褐変性を有するリンゴ品種の効率的な育成に関する研究
<p>I. 序論</p> <p>リンゴの果肉褐変は、加工品や中食産業におけるリンゴ果実の用途を制限する大きな要因の1つである。難褐変性を有する高品質なリンゴ新品種を開発し、普及を進めることで、リンゴ需要の拡大が期待できる。しかしながら、従来の褐変程度評価手法はどれも労力・時間・金銭のコストが大きく、優良個体の選抜のために大量の評価を行う必要がある育種選抜試験には適さないため、難褐変性を持つリンゴ品種の開発は進んでいない。また同じ理由から、特に生食用途に近い条件における褐変程度の品種間差を解析し、遺伝解析を行った研究例はごく限られている。本研究は、これらの課題を解消し、難褐変リンゴ品種の育成を効率化することを目標として、果肉褐変の効率的な評価法の開発と、それを用いた褐変程度の品種間差の解明、並びに褐変に関連する遺伝的要因の探索を行った。</p>	
<p>II. 本論</p> <p>第1章. リンゴ果肉褐変の効率的な定量評価系の開発</p> <p>リンゴの褐変は、ポリフェノールオキシダーゼ (PPO) の働きによるポリフェノール (PP) の酸化、重合で生じる着色物質が原因であると言われている。そのため、リンゴの褐変の評価方法としては、吸光光度の測定によるポリフェノール (PP) 含量の測定やポリフェノールオキシダーゼ (PPO) 活性の測定が行われることが一般的であるが、これらの方法はどれもサンプルの調製や分析、解析に時間を要し、また専用の機器や試薬が必要であることから、1日に数百点の調査を行う必要があるリンゴ育種における形質評価には不向きである。そこで、本章では低コスト・省労力なリンゴ果肉褐変の評価を実現するため、デジタルカメラを用いた効率的な実験系の開発を行った。</p> <p>「材料及び方法」</p> <p>デジタルカメラで複数のサンプルを同時に撮影し、得られた画像中の各サンプル領域から色彩値を抽出する系を作成し、リンゴ果肉サンプルの経時的な測定を行った。サンプルには一般的なすりおろし果肉ではなく、野菜スライサーで調製した果肉ディスクを用いた。褐変程度の評価に用いる指標としては、ある色の褐色の程度を表す Browning Index (BI) およびその2色間の差である <math>\Delta BI</math> と、ヒトの視感に合わせた色差式である CIE DE2000 (<math>\Delta E_{00}</math>) を検討対象として用い、従来法で良く用いられる <math>L^*</math>、<math>a^*</math>、<math>b^*</math>による評価との比較を行って、褐変評価に適する指標を選択した。</p> <p>「結果」</p> <p>デジタルカメラで 42 サンプルを同時に撮影し、色標本による測定位置ごとの校正を経て各サンプルの色彩値を同時に定量測定する系を開発した。色標本の繰り返し測定により測定系の測定精度を確認したところ、平均値との色差の標準偏差 <math>\Delta E_{ab}^*(SD)</math> は 0.07 以下で、一般的な3種類の色彩計の公称測定精度と同等であった。開発した手法で測定を行う</p>	

ために必要な費用は約 200000 円であった。

リンゴ果肉の褐変程度評価系の条件検討の結果、果肉ディスクをサンプルとした場合には調製時間がすりおろしサンプルの 1/10 で済み、調製中の果肉色変化も小さかった。また褐変の評価には 24 時間後までに 8 回の経時的な測定を行い、この内最大となった指標値を品種の代表値とすることが適切であると考えられた。褐変程度の指標としては  $\Delta BI$  が、褐変した際の褐色の程度としては BI が、それぞれ最も感覚による評価に近かった。

#### 「結論及び考察」

開発した測定系と、安価な色彩計の代表である Nix Pro 2、高機能な色彩計の代表である CR-410 (コニカミノルタ, 東京) のカタログ情報、そして本節において使用した NF333 で得られた情報をそれぞれ比較すると、開発した測定系は Nix Pro 2 の 50000 円と比較すると 4 倍であるが、CR-410 や NF333 と比較した場合には 1/4 程度であった。色彩値測定の処理効率が 42 倍であることや、測定面積を柔軟に変更可能であるなど拡張性が高いこと、非接触で安定的に測定が可能なことなどを考慮すると、開発した色彩値測定系は十分に低コストで有用なものであると考えられた。

以上をもとに開発した果肉ディスクサンプルの経時測定による褐変程度評価法では、従来法の 42 倍以上への処理効率の向上と、測定に要する作業的、時間的なコストの削減によって、育種選抜試験の個体調査のような他の作業との並行が実現された。

## 第 2 章. リンゴ果肉褐変の程度および進行速度の品種間差の解析

リンゴの褐変については従来から多くの研究が行われており、そこには比較的大きな品種間の差異が存在するという知見が得られている。この品種間差をよく把握することは、効率的な交雑育種の計画において非常に重要である。しかしながら、調査に手間がかかることから日本国内における栽培品種について 100 品種またはそれ以上の品種数を用いた難褐変性評価試験の報告は存在していない。そこで本章では、難褐変リンゴ品種のための有用な交雑親情報を得るため、第 1 章で開発した評価法を用いた品種間差解析を行った。

#### 「材料及び方法」

農研機構リンゴ研究拠点に植栽されるリンゴ品種・系統および交雑実生個体 282 種を測定対象として、各種 3 果ずつ供試した。収穫した果実より果肉ディスクを調製し、経時的な褐変程度の評価を行った。得られた褐変程度の経時変化データを基に、非線形回帰を行い、種ごとに褐変が進行する速さの解析を行った。さらに、得られた褐変程度、褐変する速さ、褐変前後の BI 値を変数として用い、リンゴ品種・系統群のクラスタリングを行った。

#### 「結果」

2018 年から 2020 年にかけて、142 のリンゴ品種・系統と 82 の交雑育種実生の果実の褐変程度を評価した。またこれらの経時測定データを用いて、回帰分析により褐変する速さの指標を求めた。この方法を用い、品種・系統・交雑実生計 207 種について褐変する速さを推定した。

4 つの褐変関連指標の品種間差をもとに行った Ward 法による階層的クラスタリングでは、126 の品種・系統が 5 つのクラスターに分類された。同じ品種・系統群を用いて行った k-means++法による非階層的クラスタリングでは、4 つのクラスターへの分類が提案された。これらのクラスターが持つ意味について考察するため、クラスタリングに用いた 4 つの変数による主成分分析を行い、品種・系統ごとの主成分スコアをプロットしてクラスターとの関係を確認したところ、k-means++法によるクラスターでより明確な分類が行わ

れていることが確認された。

#### 「結論及び考察」

223 種のリンゴ品種・系統・交雑実生の褐変程度および褐変する速さの品種間差情報が得られた。さらに、クラスタリングによって品種・系統が褐変の特徴から大まかにグループ分けされたことで、交雑育種親の選択がより具体的な視点から可能となり、難褐変性を褐変程度、褐変の速さ、褐変前後の果肉色から細分化して育種ターゲットとすることができるようになった。

### 第3章. リンゴの果肉褐変に関連する遺伝的要因の探索

#### 「序論及び目的」

リンゴでは、葉切片からの簡易 DNA 抽出法が既に確立されており、対象の表現形質と連鎖する遺伝変異を用いることで、幼苗の時点で目的の形質を選抜することが可能となっている。果肉の難褐変性は果実の形質であることから、結実まで早くても5年を要するリンゴにおいて幼苗選抜を実現できれば、交雑実生が結実するまでの間の養成に係る用地やコストを削減して、難褐変リンゴ新品種開発を加速することにつながる。

本章では、褐変程度および褐変する速さと連鎖する遺伝的要因を探索するため、交雑集団を必要とせず、目的の形質と連鎖する遺伝変異を直接検出できるゲノムワイド関連解析 (GWAS) による遺伝解析を行った。さらに、解析で検出された遺伝変異が DNA マーカーとして使用可能であることを、2 組合せの交雑実生集団を用いて検証した。

#### 「材料及び方法」

第2章で評価を行ったリンゴ品種・系統 141 種の褐変関連形質の測定値と Apple 20K Infinium BeadChip によって検出され、リンゴのリファレンスゲノムである GDDH13 v1.1 上にマッピングされた一塩基多型 (SNPs) を用いて、各形質についてそれぞれ rrBLUP と MLMM の2つの線形混合モデルで GWAS を行った。検出された SNPs については、交雑実生 2 集団 81 個体の対立遺伝子型と各形質の測定値との対応関係を確認して、DNA マーカーとして選抜に用いた際の効果を検証した。

#### 「結果」

褐変程度の GWAS では第16染色体上に、褐変する速さの GWAS では第17染色体上に、それぞれ各形質との連鎖が予想される SNPs が検出された。これらの SNPs の対立遺伝子型は解析に用いた品種・系統群の表現形質値と対応していた。さらに、遺伝解析に用いていない交雑実生集団の表現形質値と対立遺伝子型から、これらの SNPs を DNA マーカーとして用いた場合の選抜効果について検証を行ったところ、一定の選抜効果が確認された。

#### 「結論及び考察」

検出された SNPs の染色体上の位置はそれぞれ過去に別の解析集団を用いて検出された QTL の至近に存在していた。交雑実生集団を用いた検証試験でも褐変程度と褐変する速さの両形質を選抜可能であったことから、本研究で開発した褐変程度評価法が信頼性の高いものであること、また今回検出された SNPs が DNA マーカーとしての汎用性の高い QTL であることが示された。

### III. 総合考察

画像からの色彩値抽出法とリンゴ果肉ディスクの簡易で迅速な調整法を組み合わせる

ことで効率的な褐変程度の測定方法が開発され、さらに評価に適する指標についての検討から  $\Delta BI_{max}$  が褐変程度の評価に適していることを示した。リンゴ 210 種の褐変程度と褐変する速さの品種間差を解析し、リンゴ品種・系統群を褐変関連指標から分類したことで、難褐変品種開発に向けた交雑親品種選択のための重要な情報を得た。褐変程度および褐変する速さにそれぞれ連鎖する遺伝子多型が、リンゴ品種・系統を用いた GWAS によって検出された。これらの QTL を DNA マーカーとして使用した際の選抜効果を、交雑実生を用いて検証し、リンゴの果肉褐変および褐変の進行する速さを遺伝子型から選抜可能であることを示した。以上のように、本研究を通して果肉難褐変性を有するリンゴ品種を早期に育成するための基盤を整えることができた。

※注1 博士論文要約はインターネットの利用により公表されるので、記載内容については十分注意してください。

※注2 公表できない「やむを得ない事由」(特許、知的財産等に係る部分)は記載しないでください。

※注3 全体で4頁～5頁程度を目処にしてください。