

	シズク
氏名	清水 拓
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 809 号
学位授与年月日	令和 3 年 9 月 2 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学位論文題目	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 (Development of efficient evaluation and selection method for flesh browning in apple breeding)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 小森 貞男 副査 岩手大学助教 渡邊 学 副査 山形大学教授 村山 秀樹 副査 弘前大学教授 荒川 修

論文の内容の要旨

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たものである。

褐変程度の効率的な評価方法を開発するため、画像解析手法を用いて複数サンプルの色彩値を同時に定量評価する方法の検討を行った。次に、この方法を用いてリンゴの褐変を評価するのに適したサンプル調製法および指標についての検討を行った。さらに、難褐変品種の育成に向けた知見を得るため、日本国内の栽培品種・系統の褐変程度の品種間差を解析した。加えて、褐変程度の経時変化データから褐変の進行速度を指標化する方法の検討を行い、これについても品種間差の解析を行った。最後に、得られた品種間差情報を用いて遺伝解析を行い、検出された遺伝子多型による効果を検証した。その結果、以下のことが明らかとなった。

第 1 章. リンゴ果肉褐変の効率的な定量評価系の開発

1. 色彩値の校正のためのモデルを安価な色標本を用いて多点で作成し、画像ごとにモデルを適用することで、撮影した画像中の複数領域の色彩値測定を色彩計と同程度の精度で簡便かつ効率的に行うことが可能となった。
2. 上記の手法を用いてリンゴ果肉の褐変程度を評価するための方法として、サンプルに果肉ディスクを用い、経時的に撮影を行う方法を開発した。このことにより、サンプル調製に要す

る時間が 1/10 以下にまで短縮され、色彩計を用いる場合と比較して実験自体の拘束時間も短くなり、他の育種選抜調査との両立が実現された。

3. **BI**および**ΔBI**を用いることで、リンゴ果肉の絶対的な褐色程度および褐変程度を定量的に評価できることが示された。しかしながら、赤果肉やみつ入り領域の多い果肉の場合には黄白色の果肉の場合と色彩値の変化の傾向が異なり、測定値が定まらず、うまく評価できない場合があることが示された。

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

4. 品種・系統・交雑実生 223 種のサンプルの経時的な色彩値変化を測定した。このデータを用いて回帰分析を行うことで、褐変進行速度が指標化された。

5. 褐変程度、褐変進行速度の品種間差情報を用いて、クラスター分析による品種・系統群のグループ分けを行った。4 つの褐変関連指標によってクラスタリングを行ったことで、品種・系統の褐変特性が大まかに 4 つに分類され、交雑育種における親品種選択の目安として有益な情報が得られた。

第3章. リンゴの果肉褐変に関連する遺伝的要因の探索

6. 得られた褐変程度・褐変進行速度の情報を用いた GWAS を実施した結果、4 つの SNPs が各形質に関連する QTL 候補として検出された。この内 2 つの QTL 候補は過去の研究と一致しており、1 つの SNP は新規な QTL 候補であると推測された。

7. 上記の SNPs を用いて、交雑実生 79 個体のデータを用いた仮想的な DNA マーカー選抜を実施した。褐変程度が低く、褐変時の絶対的な褐色程度も小さい個体を選抜する効果、および褐変進行速度が緩やかな個体を選抜する効果が確認でき、DNA マーカーとして利用可能であることが示された。

8. 一定の効果が確認された 2 SNPs を併用した仮想的な選抜の結果、単独で選抜を行った場合と比較して選抜漏れの確率が増加したものの、褐変程度がより小さく、褐変進行速度もより遅い個体を選抜することが可能であった。

論文審査の結果の要旨

リンゴ果実の褐変程度の効率的な評価方法を開発するため、画像解析手法を用いて複数サンプルの色彩値を同時に定量評価する方法、褐変を評価するのに適したサンプル調製法および指標についての検討を行った。次に、難褐変品種の育成に向けた知見を得るため、褐変程度の経時変化データから褐変の進行速度を指標化する方法の検討を行い、日本国内の栽培品種・系統の品種間差の解析を行った。さらに、得られた品種間差情報を用いて遺伝解析を行い、検出された遺伝子多型による効果を検証した。

1. リンゴ果肉褐変の効率的な定量評価系の開発

(1) 色彩値の校正のためのモデルを安価な色標本を用いて多点で作成し、画像ごとにモデル

を適用することで、撮影した画像中の複数領域の色彩値測定を色彩計と同程度の精度で簡便かつ効率的に行うことが可能となった。

(2) 上記の手法を用いてリンゴ果肉の褐変程度を評価するための効率的な方法として、サンプルに果肉ディスクを用い、経時的に撮影を行う方法を開発した。

(3) *BI* (Browning Index) および ΔBI (褐変程度指標：最大褐変値-初回測定値) を用いることで、リンゴ果肉の絶対的な褐色程度および褐変程度を定量的に評価できることが示された。

2. 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

(1) 品種・系統・交雑実生 223 種のサンプルの経時的な色彩値変化を測定した。このデータを用いて回帰分析を行うことで、褐変進行速度が指標化された。

(2) 褐変程度、褐変進行速度の品種間差情報を用いて、クラスター分析による品種・系統群のグループ分けを行った。最大褐色値、最大褐変値、褐変する速さ、および最低褐色値の 4 指標によってクラスタリングを行ったことで、品種・系統が 4 つに分類され、交雑育種における親品種選択の目安として有益な情報が得られた。

3. リンゴの果肉褐変に関連する遺伝的要因の探索

(1) 得られた褐変程度・褐変進行速度の情報を用いた GWAS を実施した。結果、4 つの SNPs が各形質に関連する QTL 候補として検出された。この内 2 つの QTL 候補は過去の研究と一致しており、1 つの SNP は新規な QTL 候補であると推測された。

(2) 上記の SNPs を用いて、交雑実生 79 個体のデータを用いた仮想的な DNA マーカー選抜を実施した。褐変程度が低く、褐変時の絶対的な褐色程度も小さい個体を選抜する効果、および褐変進行速度が緩やかな個体を選抜する効果が確認でき、DNA マーカーとして利用可能であることが示された。

以上より、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Taku Shimizu, Kazuma Okada, Shigeki Moriya, Sadao Komori and Kazuyuki Abe. (2021)
A High-Throughput Color Measurement System for Evaluating Flesh Browning in Apples.
Journal of the American Society for Horticultural Science. 146(4):241-251.
doi.org/10.21273/JASHS0527-20.

参考論文

1. Kazuma Okada, Masato Wada, Yumiko Takebayashi, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Masaru Nakayasu, Masaharu Mizutani, Masatoshi Nakajima, Shigeki Moriya, Taku Shimizu and Kazuyuki Abe. (2020)
Columnar growth phenotype in apple results from gibberellin deficiency by ectopic expression of a dioxygenase gene.
Tree Physiology 40(9):1205-1216.

