

自家和合性ニホンナシ新品種の育成に関する研究

田辺賢二*・田村文男*・板井章浩*

緒 言

‘二十世紀’は1888年に偶発実生として発見され、1898年に命名されて以来現在まで約100年の間ニホンナシの主要な品種として栽培されてきた。さらに大正時代以降の系統的な育種の親品種として用いられており、‘幸水’、‘豊水’などを代表とする現在の主要品種はそのほとんどが‘二十世紀’の血を受け継いだ品種である(梶浦・佐藤, 1991)。このように‘二十世紀’が栽培品種としてまた遺伝資源としてニホンナシの中で重要な位置を占めている原因は、歯触りの良い特有の肉質と糖・酸のバランスのとれた味、さらには美しい外観に代表されるような優れた果実品質があげられる。また‘二十世紀’は極めて豊産性であり、収量が安定していること並びに中生品種のなかでは最も日持ちが良いという栽培と流通の面においても優れた品種である。これらの特性を具備していることから‘二十世紀’は唯一海外に輸出されるくだものとして高い評価を得ている。

しかしながら‘二十世紀’は黒斑病に罹病性であることから、年間20回にもおよぶ薬剤散布を必要とするという欠点も合わせ持っている。一方、‘幸水’と‘豊水’はいずれも黒斑病抵抗性であるが、前者は収量が極めて不安定であること、後者は糖度の年次差・園地差が著しいという難点を抱えている(田辺, 1991)。さらに近年育成されたニホンナシ品種はほとんどが‘幸水’と‘豊水’を親品種としているものの、これらを越すような品種は育成されていないのが現状である。以上の点に加えニホンナシは自家不和合性であるため、人工授粉に多くの労力を必要とし、個々の栽培者の面積の拡大が妨げられてきた。さらに近年のナシ栽培者の高齢化にともない主産地である鳥取県においても‘二十世紀’を含めたニホンナシの栽培面積は減少しつつある。そのため前述のような問題を解消する新しい品種への転換がナシ産地の最も大きな課題となっている。

‘おさ二十世紀’は鳥取県泊村の長昭信氏園で発見された‘二十世紀’の枝変わりでありニホンナシの中で唯一自家和合性を有する品種である。‘おさ二十世紀’は花柱部に突然変異が生じたために自家和合性を獲得したものと思われ(町田ら1985)、果実等の形質は‘二十世紀’と全く変わりが無い。さらに、‘おさ二十世紀’の持つ自家和合性は後代にも遺伝することが確認されていることから貴重な遺伝資源といえる。一方、黒斑病に対する抵抗性・罹病性を決定する遺伝は一对の主遺伝子が関与しており、罹病性が優性、抵抗性が劣性形質であること、‘おさ二十世紀’は‘二十世紀’と同様ヘテロ個体であることが知られている(小崎, 1973)。従って‘おさ二十世紀’を育種親とすれば自家和合性と黒斑病抵抗性を合わせ持つニホンナシ系統が育成できる。

* 鳥取大学農学部生物生産学講座園芸学分野

このような観点から著者らは‘おさ二十世紀’を育種親として自家和合性・黒斑病抵抗性を有するニホンナシ系統の育成を昭和54年より進めその過程で得られた知見を前報（1991）で報告した。

その後著者らは前述のような問題を解決できる新たなニホンナシ品種の育成を目指し主に果実品質の面からこれらの系統の選抜を進め、有望な系統については品種登録を行い公表した。一方、遺伝資源としてこれらの系統を評価するため不和合性因子と糖蓄積機構について検討を加えてきた。本報は、これらの成果を取りまとめたものである。

第1章 有望系統の生育ならびに果実の特性

著者ら(1991)の研究により, 'おさ二十世紀'を母・父本としたニホンナシ交雑第1代の系統の中には既存の品種にはない黒斑病抵抗性でしかも自家和合性という優れた形質を持つ系統が多数見いだされている。しかしながら, 生育や果実の特性の詳細は明らかになっておらず, 今後品種として実用化してゆく上でこれらの点を明らかにする必要がある。

本章では, 各系統の果実品質と樹体生育とを既存の品種と比較し, 実用性を評価することにより最終的な選抜を行なおうとした。

第1節 果実の特性による有望系統の選抜

I 材料及び方法

鳥取大学農学部附属農場並びに鳥取県内各地区の代表的な園で栽培された 'おさ二十世紀' 後代系統を供試した。供試系統は全て黒斑病抵抗性である(田辺ら, 1991)。1994から96年までの3年間各系統の成熟期に果実を収穫し形態及び品質調査した。食味調査は20名のパネラーによって5点法(5:最も優れる~1:最も劣る)で行なった。これらの3年間にわたる調査結果を総合的に評価し選抜を行った。

II 結果及び考察

成熟期に収穫した果実品質を調査した結果を第1表に示した。これらの中で特に食味が優れており有望系統と判断されたものについては詳細に果実調査を行い, その結果を第2表に, それらの代表的な外観を第1図に示した。以下にそれぞれの有望系統の果実の特性について調査した結果を述べる。

- (1) TH32 完全青ナシの外観を持つ系統であり, 果面にサビは発生しない。果形はやや扁平であり, 果重は280g程度であった。肉質は緻密であり, 糖度は11度程度と青ナシとしては高い部類である。自家和合性ではないが, 黒斑病抵抗性であり, 早生の青ナシとして有望な系統と思われる。
- (2) TH37 TH32とほぼ同時期の完全青ナシであり, 果重は360g程度とTH32より大果である。肉質は緻密でしかも歯触りが良く, 糖酸のバランスが取れており, '二十世紀'に近い食味を示す。8月下旬には糖度も11度以上となる。日持ちは室温で約7日程度とみられた。TH32と同様自家和合性ではないが, 黒斑病抵抗性であり, 早生の青ナシとして有望な系統と思われる。このため今後, 植調剤の使用による早期出荷の可能性を調査する必要があると考えられた。
- (3) TH6 果色は青であり, ほぼ円形の果形である。'二十世紀'と同様無袋栽培果実では果面にサビを生じる。成熟期は'二十世紀'よりやや遅いと思われる。肉質は極めて緻密であり, 果汁に富んでいる。また, 糖度も'二十世紀'と同等かそれ以上であり, 食味に優れることから中生から晩生の青ナシとして有望と思われる。今後果実袋の使用方法等についての調査が必要と思われる。

- (4) TH9 早生の完全赤ナシであり、‘新水’とやや似かよった外観を持つ。果重は280g前後と早生としては中程度である。高糖度でしかも緻密で歯触りのある肉質を有し、早生系統の中で最も高い食味と評価された。有望な早生の赤ナシ系統と考えられることから植調剤の使用による早期出荷・果実肥大促進の可能性を調査する必要があると考えられた。
- (5) TH17 完全赤ナシであり、‘豊水’とやや似かよった外観を持つが、果点が‘豊水’より大きいことで判別が可能である。また、‘豊水’と異なり果皮が極めて硬いためこの点でも判別が可能である。一方、果実の変形は少なく、種子数も8個以上であるため安定した果形が得られるものと判断された。果重は350g程度と大きく、また、高糖度でしかも緻密で歯触りのある肉質を有し、果汁に富んでおり調査系統及び品種中最も高い食味と評価された。さらに日持ちも‘豊水’より優れ

第1-1表 各系統の果実品質 (1994~96)

系統名 (果皮色)	調査年月日	果重 (g)	糖度 (Brix ^o)	食味点
TH32 (青)	94. 8.21	207	11.3	2.9
	95. 8.18	228	11.8	3.1
	96. 8.26	278	11.1	2.9
TH37 (青)	94. 8.21	303	12.0	3.0
	95. 8.18	304	12.8	2.6
	96. 8.26	360	11.7	2.9
TH19 (青)	94. 8.31	455	12.9	3.4
	95. 8.30	334	11.4	2.3
	96. 8.26	330	11.0	2.9
TH29 (青)	94. 8.31	287	11.3	2.9
	95. 8.30	352	11.7	1.9
	96. 8.26	330	11.0	2.1
TH34 (青)	94. 8.31	287	11.3	2.9
	95. 9. 6	260	12.3	3.3
	96. 9.10	421	13.0	2.8
TH3 (青)	94. 9.25	267	12.0	2.4
	95. 9. 6	240	10.3	2.3
	96. 9.10	261	11.0	2.1
TH6 (青)	94. 9.25	339	13.2	3.4
	95. 9.16	355	11.6	3.3
	96. 9.18	380	11.8	3.6
二十世紀	94. 8.31	329	11.3	3.0
	95. 9. 2	352	11.7	3.0
	96. 8.29	330	11.0	3.0

れていることから最も有望な中生の赤ナシ系統と考えられる。一方、成熟期後半にはみつ症の発生が認められ、特にジベレリン処理を行った果実で顕著であったことから詳細な調査が必要と思われる。

以上の点からこれらの有望系統はいずれも高い実用性があるものと判断された。中でもTH17は現在の‘豊水’及び‘幸水’に無い自家和合性という優れた形質を持ち、また日持ちも‘二十世紀’とほぼ同程度と優れていること、さらに両品種より明らかに高い食味を示したことから、次代のナシ産業を支える最も有望な品種として期待される。今後高品質・高収量を目的としたTH17の適正な栽培技術の開発と、栽培現場への普及が望まれる。

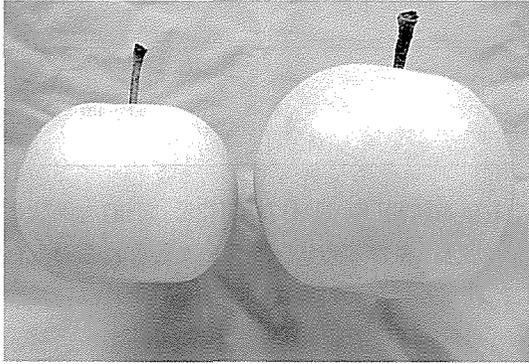
第1-2表 各系統の果実品質 (1994~96)

系統名 (果皮色)	調査年月日	果重 (g)	糖度 (Brix°)	食味点
TH9 (赤)	94. 8.21	198	15.4	3.9
	95. 8.18	242	15.1	3.4
	96. 8.12	295	14.1	3.2
TH17 (赤)	94. 8.31	356	14.8	4.1
	95. 9. 1	328	13.8	4.5
	96. 8.29	349	13.4	3.9
TH42 (赤)	94. 8.31	380	14.0	3.6
	95. 9. 1	308	12.9	3.2
	96. 8.29	321	11.8	2.3
TH7 (赤)	94. 9.25	385	12.9	2.9
	95.10. 1	348	13.6	3.6
	96. 9.29	416	11.8	2.8
TH11 (赤)	94. 8.25	396	14.2	3.1
	95.10. 1	455	15.1	3.9
	96. 9.29	328	13.8	2.8
TH35 (赤)	94. 8.31	487	14.9	3.6
	95.10. 1	614	13.4	3.2
	96. 9.29	328	13.8	4.1
幸 水	94. 8.21	326	13.4	3.0
	95. 8.18	325	13.1	3.0
	96. 8.12	306	12.7	3.0
豊 水	94. 8.31	352	14.0	3.0
	95. 9. 1	341	13.9	3.0
	96. 8.29	375	13.1	3.0

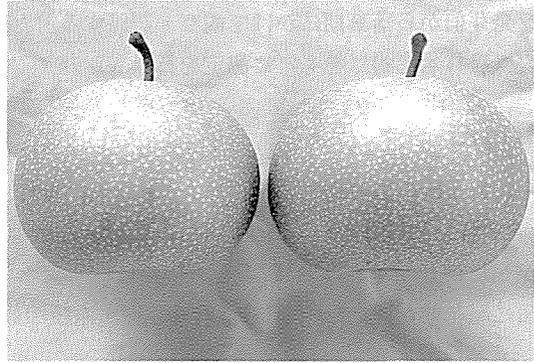
第2表 有望系統の果実特性

品 種	調査日	果 重 (g)	果実径(mm)		果肉硬度 (ポンド)	糖 度 (Brix °)	酸 度 (pH)
			縦	横			
T H 6	9月20日	355.5	75.8	91.1	1.15	11.6	5.0
T H 9	8月21日	290.1	63.5	86.3	1.23	14.2	4.6
T H 17	9月5日	356.3	77.4	89.7	1.16	14.8	4.9
T H 32	8月25日	277.2	69.5	83.5	1.32	11.3	5.0
T H 37	8月25日	361.4	78.0	88.7	1.21	11.4	4.4
新 水	8月25日	286.5	66.5	84.0	1.35	14.3	4.6
幸 水	8月31日	328.0	72.6	86.2	1.10	14.4	5.1
豊 水	9月5日	352.0	77.2	87.7	0.98	14.5	4.5
二十世紀	9月5日	320.9	74.5	86.0	1.20	11.4	4.5

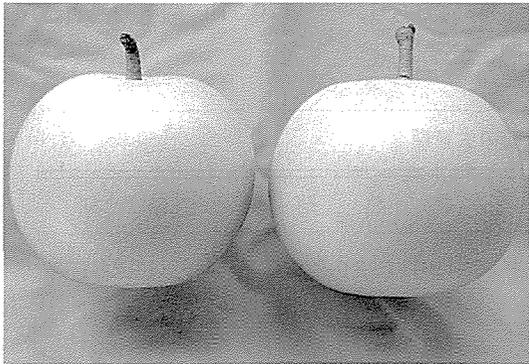
品 種	果実の形	果皮の色	有てい果 (%)	心 室 数	種 子 数
T H 6	円 形	黄 緑 色	23.3	6.3	10.2
T H 9	偏 円 形	赤 褐 色	5.0	5.0	7.9
T H 17	円 形	赤 褐 色	10.0	5.0	9.4
T H 32	円 楕 円 形	緑 黄 色	70.0	5.1	6.7
T H 37	円 卵 形	緑 黄 色	35.0	5.0	6.1
新 水	偏 円 形	黄 褐 色	10.0	5.0	7.6
幸 水	偏 円 形	黄 赤 褐 色	0.0	6.0	5.7
豊 水	円 形	赤 褐 色	0.0	5.0	9.0
二十世紀	円 形	黄 緑 色	10.0	5.0	8.5



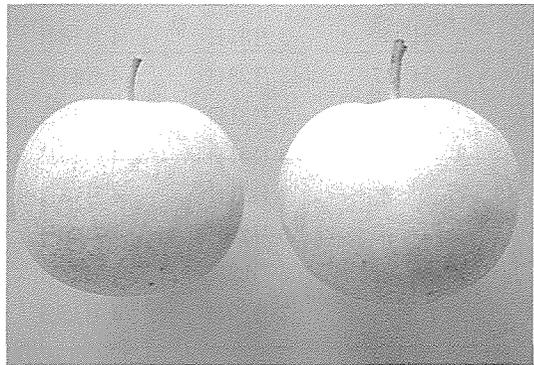
▲TH6



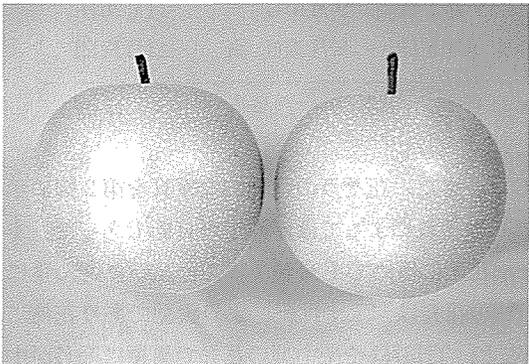
▲TH9



▲TH37



▲TH32



▲TH17

第1図 成熟期における供試系統の果実

第2節 各系統の生育特性

I 材料及び方法

鳥取大学農学部附属農場の‘豊水’樹に高接された有望系統TH6, TH17, TH32, TH37を供試した。また、既存の対照品種には‘二十世紀’, ‘新水’, ‘幸水’及び‘豊水’を用いた。これらの生育を発芽前から落葉期にかけて観察・記録するとともに、花器及び葉の特性についてそれぞれ品種特性表(農林水産省)をもとに測定を行なった。

II 結 果

1. 各系統の生育期

生育の状況を観察した結果は第3表に示した通りである。発芽期には系統間で大きな差はみられなかったが、開花期はTH17が最も早くほぼ‘豊水’と同時期であり、それ以後TH9, TH32, TH37の順に開花期を迎えた。TH6は調査品種・系統中最も開花が遅かった。

第3表 有望系統の生育期

品 種	発 芽 期	開 花 期	成 熟 期	落 葉 期
T H 6	3月31日	4月22日	9月10日 ~ 9月25日	11月22日
T H 9	3月31日	4月18日	8月15日 ~ 8月25日	11月15日
T H 17	3月28日	4月17日	8月20日 ~ 9月5日	11月22日
T H 32	3月31日	4月18日	8月15日 ~ 8月30日	11月15日
T H 37	3月31日	4月19日	8月20日 ~ 9月1日	11月16日
新 水	3月31日	4月18日	8月10日 ~ 8月20日	11月18日
幸 水	3月28日	4月20日	8月20日 ~ 8月30日	11月16日
豊 水	3月28日	4月16日	9月1日 ~ 9月10日	11月20日
二十世紀	3月30日	4月19日	9月5日 ~ 9月20日	11月17日

2. 花器及び葉の特性

花器及び形態的な調査を行った結果を第4表に示した。また、花そうの代表的な写真を第2図に示した。各系統とも花器及びどん葉の形態は特徴的であり、それによってほぼ同定が可能であった。すなわち、TH6は花弁数が9枚程度と著しく多くまた、花梗に極めて毛じが多いこと並びにどん葉に赤みが全く現われないことがその特徴であった。TH17の花弁は‘二十世紀’より大型であり花梗にほとんど毛じがみられないこと、TH32は花梗が短いこと、TH37はやや中型の花弁で果梗に毛じが中程度であることがその特徴であった。

一方、成葉の形は全て卵形であった。また、大きさはTH6, TH32が‘二十世紀’と同程度とやや小型であり、他はそれらより大きく、‘豊水’と同等かそれ以上の大きさであった。

第4-1表 有望系統の花器及び葉の特性

品 種	1花そう の花数	花 弁			雄ずいの数	果梗の毛じ
		数	大 き さ	切れ込み		
T H 6	8.5	8.8	中	小	35.7	多
T H 17	8.3	5.5	大	中	21.8	極めて小
T H 32	7.3	5.0	大	小	23.0	多
T H 37	7.5	5.1	中	小	22.5	中
新 水	7.5	5.3	中	中～多	23.8	中
幸 水	8.4	5.9	大	小	25.8	多
豊 水	8.1	5.3	大	中～多	23.6	小
二十世紀	7.9	5.2	中～大	中	23.6	多

第4-2表 有望系統の花器及び葉の特性

品 種	ど ん 葉		成 葉				葉 柄	
	色	毛 じ	形	先端の 角 度 (°)	長さ (cm)	幅 (cm)	長さ (cm)	太さ (mm)
T H 6	黄緑色	多	卵形	23.1	12.4	8.6	3.9	2.2
T H 17	黄緑色	中～多	卵形	26.2	14.0	8.8	4.5	2.0
T H 32	褐 色	中	卵形	36.6	12.2	8.5	4.6	1.6
T H 37	赤褐色	中	卵形	34.0	13.9	8.4	2.6	2.1
新 水	赤褐色	小	卵型	35.4	13.4	8.7	2.7	2.4
幸 水	褐 色	小	卵型	30.5	14.8	8.8	3.2	2.2
豊 水	褐 色	小	卵型	45.6	13.5	8.2	3.1	2.0
二十世紀	赤褐色	多	卵型	28.5	12.8	7.7	3.1	2.4



▲TH6



▲TH9



▲TH17



▲TH32



▲TH37

第2図 供試系統の花そうの形態

第2章 アイソザイム分析並びにDNA分析による 有望系統の同定

前章の結果により‘おさ二十世紀’後代のなかから有望系統を選抜するとともに、その形態的な特性を明らかにすることが出来た。一方、ナシにおいてもバイオテクノロジーの発達により品種の大量増殖が容易に行える状況となっている。従って、育成された品種を保護するためには形態的な特性以外にも個体を確実に同定する技術の開発が必要であるといえる。

そこで本章では品種同定を行う方法としてナシ属植物の同定に有効であるアイソザイム分析 (Jangら1991) 並びにDNA分析 (寺本ら1994) を行い、有望系統並びにその親品種相互の同定を行おうとした。さらに得られた結果により有望系統の交配親について確認を行った。

第1節 成葉のペルオキシダーゼ分析による有望系統の同定

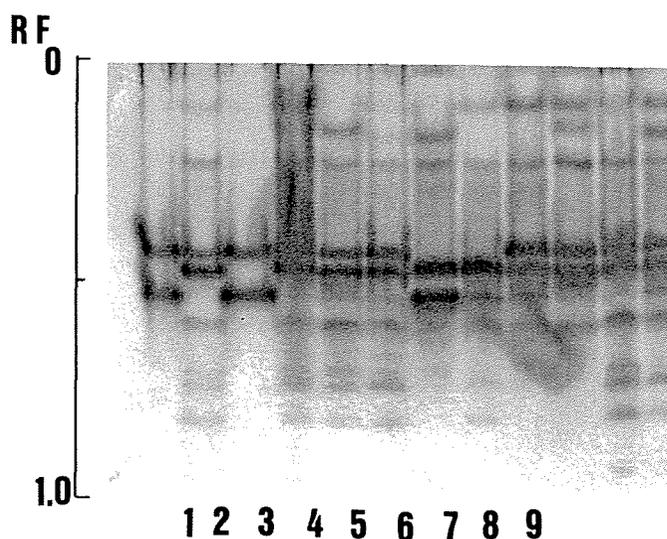
I 材料及び方法

TH5, TH7, TH11, TH17, TH32及びTH42並びにその親品種である‘おさ二十世紀’, ‘新水’及び‘幸水’の成葉を採取し, Jangら(1991)の方法により酵素の抽出, 電気泳動並びにペルオキシダーゼの活性染色を行った。

II 結果及び考察

得られた泳動像を第3図に示した。供試した全系統並びに品種はそのバンドパターンによりそれぞれ同定することが可能であった。すなわち, ‘おさ二十世紀’×‘新水’の交配系統TH7, TH11及びTH32は両親に由来したRf0.338, Rf0.377及びRf0.423の主要なバンドの有無によって両親並びに系統間での識別が可能であった。また, ‘おさ二十世紀’×‘幸水’の交配系統であるTH17及びTH42についてもこれらのバンド並びにRf0.093, Rf0.138及びRf0.192のバンドの有無によって明確に識別された。

従って供試した有望系統とその親品種はそれぞれ固有のペルオキシダーゼアイソザイムのバンドパターンを持ち, これによって同定が可能であるといえる。



第3図 優良系統並びに親品種のペルオキシダーゼアイソザイムバンドパターン (Native PAGE 7.5%)

1 : おさ二十世紀 2 : 新水 3 : 幸水
 4 : TH5 5 : TH7 6 : TH11 7 : TH17
 8 : TH32 9 : TH42 10 : おさ二十世紀

第2節 DNAフィンガープリント法による品種同定

I 材料及び方法

材料として鳥取大学農学部大塚附属農場に植栽されているニホンナシ品種‘おさ二十世紀’，‘新水’，‘幸水’，‘豊水’，TH1（‘おさ二十世紀’×‘二十世紀’），TH3（‘おさ二十世紀’×‘おさ二十世紀’），TH5（‘おさ二十世紀’×‘おさ二十世紀’），TH10（‘おさ二十世紀’×‘新水’），TH11（‘おさ二十世紀’×‘新水’），TH17（‘おさ二十世紀’×‘幸水’），TH19（‘幸水’×‘おさ二十世紀’），TH21（‘幸水’×‘おさ二十世紀’），TH30（‘豊水’×‘おさ二十世紀’），TH32（‘おさ二十世紀’×‘新水’），TH41（‘おさ二十世紀’×‘おさ二十世紀’），TH42（‘おさ二十世紀’×‘幸水’），TH43（‘おさ二十世紀’×‘豊水’）を供試した。

各個体より新葉を採取し，液体窒素で凍結し -80°C に保存した。これらの葉を液体窒素中で組織を粉碎して，改変SDS法による抽出後，フェノール抽出，エタノール沈殿により精製した（第7図）。

各個体より抽出したDNA $10\mu\text{g}$ を制限酵素*EcoRI*で完全消化した。制限酵素処理後，0.7%アガロースで電気泳動を約12時間，1xTAEバッファを用いて行なった。泳動後DNAをアルカリ変性液

-80℃で凍結保存したナシ葉
|
液体窒素で粉碎

←40ml洗浄液(0.1M HEPES buffer, 0.1%PVP, 2%β -melcapthethenol, pH8.0)を混合

12.000rpm 5分 4℃で遠心
|
沈殿
|
洗浄液を加え、沈殿の塊がなくなるまでよく混合

←5ml S.D.W
沈殿の塊をほぐす

←10ml 抽出バッファ-(0.1M Tris-HCl pH8.0, 50mM
EDTA pH8.0, 0.5M NaCl)を加え、緩やかに混合
←2ml 20%SDS
70℃で10分間時々攪拌しながらインキュベート

←10ml 3M酢酸カリウム
氷冷 20分
|
12.000rpm 30分 4℃で遠心
|
キムワイプで上清を濾過してファルコンに注ぎ込む

←6/10vol Isopropyl Alcohol
緩やかに転倒混和
|
竹ぐしでDNAを巻きとり、ファルコンに移し100%冷エタノールを入れる
|
エタノール洗浄
3.000rpm 3分 遠心
|
沈殿
| ←30ml 75%冷エタノール
3.000rpm 3分 遠心
|
沈殿
|
真空乾燥

←5ml TE(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)に溶解

RNase溶液(10mg/ml)を10~20μg/mlになるようにDNA溶液
に加え、37℃で30分から2時間インキュベート
|
4℃で保存

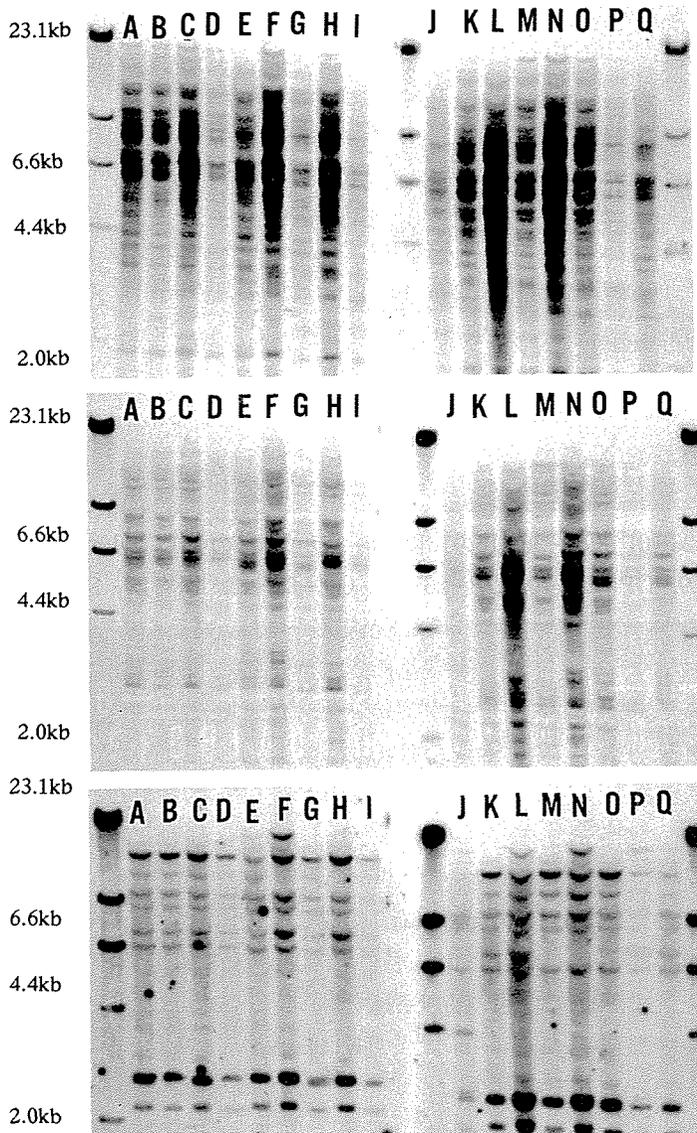
第4図 ニホンナシ新葉からのDNA抽出法

(0.1M NaOH, 1.5M NaCl) により変性し, キャピラリートランスファーよりナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N; Amersham) に転写した。転写後のフィルターは, 80°Cで2時間静置しDNAを固定した後, 42°Cのプレハイブリダイゼーション液 (0.05M リン酸バッファーpH7.4/40%ホルムアミド/5×デンハルツ溶液/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム/0.1%ブロッキングリジェント) 中に4時間以上放置した。プローブとしてヒトミオグロビン遺伝子に由来する2種類のDNA (probe A, B) とハナモモ ‘寿星桃’ のMADS BOX geneを用い, ³²Pで標識してハイブリダイゼーション液 (プレハイブリダイゼーション液と同じ) に加え, 42°Cで一晩サザンハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーション後, フィルターを0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む2×SSC, 0.2×SSCを用い, それぞれ室温で15分間3回洗浄した後, -80°Cでオートラジオグラフィーを行ない, X線フィルム上に感光させバンドを検出した。

II 結果及び考察

サザンハイブリダイゼーションの結果, 用いたプローブそれぞれで低分子域から高分子域までバンドが認められた。ヒトミオグロビン由来probe A, Bを用いた場合, 約20本のバンドが観察され (第5図), 一方MADS BOX geneをプローブとして用いた場合7~8本のバンドが観察された (第4図)。probe Aを用いた場合, 親品種である ‘おさ二十世紀’, ‘新水’, ‘幸水’, ‘豊水’ の間で多型がみられた。しかし, ‘おさ二十世紀’ と ‘おさ二十世紀’ selfの後代系統であるTH3, TH41は判別不可能であった。また, ‘おさ二十世紀’ × ‘新水’ の組み合わせであるTH10とTH11も判別不可能であった。probe Bを用いた場合 ‘おさ二十世紀’ self, ‘おさ二十世紀’ × ‘幸水’, ‘おさ二十世紀’ × ‘豊水’ それぞれの組み合わせの兄弟間においてDNA多型が非常に類似したが, バンドの組み合わせに基づいたパターン違いから供試したすべての系統で識別は可能であった。MADS BOX geneをプローブに用いた場合, 6 kbp以上の高分子領域に明確な多型がみられたが, 検出されるバンド数が少なかったため, TH3, TH5, TH10, TH19, TH41の判別が不可能であり, すべての品種系統を類別することはできなかった。

以上のことからヒトミオグロビン遺伝子由来probe Bは, 血縁関係の濃いニホンナシ品種, 系統の識別に有効なプローブであることが示された。さらにprobe A, MADS BOX geneといった他のプローブを組み合わせることにより, より確実な識別が可能になり, これらをプローブとして用いることにより有望系統のDNA指紋 (DNA Fingerprint) を得ることが出来た。



第5図 DNAフィンガープリント法による有望系統の識別

上段：ヒトミオグロビン由来 porbe Aによる識別

中段：ヒトミオグロビン由来 porbe Bによる識別

下段：ハナモモ '寿星桃' 由来 MADS BOX geneによる識別

A : おさ二十世紀, B : TH 3, C : TH41, D : TH 5, E : TH17,
 F : TH42, G : TH19, H : TH21, I : 幸水, J : TH 1, K : TH10,
 L : TH32, M : TH11, N : TH43, O : TH30, P : 新水, Q : 豊水

第3節 RAPD法による品種同定

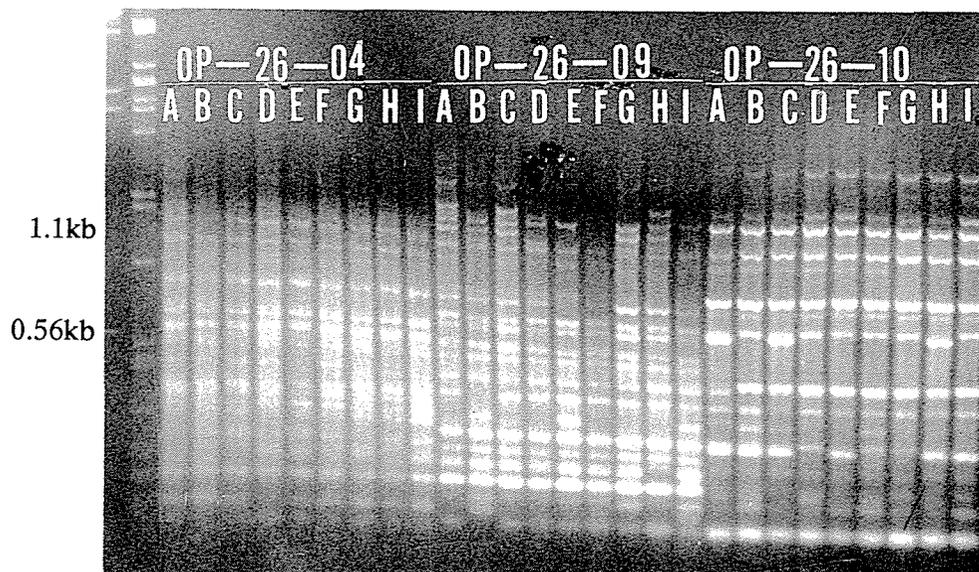
I 材料及び方法

前節と同様に‘おさ二十世紀’、‘新水’、‘幸水’、‘豊水’、TH11（‘おさ二十世紀’×‘新水’）、TH17（‘おさ二十世紀’×‘幸水’）、TH32（‘おさ二十世紀’×‘新水’）、TH42（‘おさ二十世紀’×‘幸水’）、‘TH43’（‘おさ二十世紀’×‘豊水’）を実験に供試し、前節と同様にDNAを抽出した。抽出したDNAは、20ng/ μ lに調製した。この鋳型DNA1 μ lに、10merのランダムプライマー(OP-26-01~OP-26-16) (OPERON, USA) を20pmol, 2 mM dNTP溶液 2 μ l, rTaqポリメラーゼ (ニッポンジーン) を2.5Uに加え最終的に20 μ lにした。PCR反応は、熱変性94 $^{\circ}$ C 1分, アニール37 $^{\circ}$ C 2分, 伸長72 $^{\circ}$ C 2分で行い、これを40サイクル繰り返した。増幅したDNAは、2%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、UV照射下でバンドの観察を行った。

II 結果及び考察

今回用いたOP-26-01~OP-26-16の16種類のプライマーの中で、明確な多型を示したのはOP-26-04, OP-26-09, OP-26-10, OP-26-11, OP-26-13, OP-26-14の6種類であった(第6図)。これらのプライマーでは10~20本のバンドが観察された。プライマーOP-26-09, OP-26-10, OP-26-11, OP-26-13, OP-26-14で親品種である‘おさ二十世紀’、‘新水’、‘幸水’、‘豊水’の識別が可能であった。プライマーOP-26-09をもちいたPCRでは、とくに約1.5kb以上の領域で多型がみられ、‘おさ二十世紀’ではこれらの領域のバンドが欠失していた。しかしこのプライマーではTH11とTH32を識別できなかった。プライマーOP-26-10では700bp以下の領域で多型が観察された。約700bpの位置に‘新水’特有のバンドがみられ、このバンドは‘新水’を父親とするTH11とTH32に受け継がれていた。このプライマーでは供試したすべての品種系統で識別可能であった。プライマーOP-26-11では、1.7kbp~200bpの広範な領域で多型が観察され、すべての品種系統で識別が可能であった。プライマーOP-26-13では、特に約500bpと約300bpの領域で、特異的なバンドの出現や欠失がみられた。またTH42は他の品種系統でみられる800bp以上の長さのバンドすべて欠失していた。さらにこのプライマーでは、‘新水’とTH11の判別は不可能であった。プライマーOP-26-14では、親品種においては識別可能であったが、すべての系統の識別は不可能であった。

以上の結果よりプライマーOP-26-10を用いた場合、すべての雑種個体の識別が可能であった。他のプライマーでは一部の個体識別が不可能であった。しかしプライマーの種類を組み合わせることによりすべての系統識別は可能であり、各有望系統固有のRAPDマーカーを得ることに成功した。



第6図 RAPD法による有望系統の識別

上段：OP-26-04, OP-26-09, OP-26-10 各primerによる識別

下段：OP-26-11, OP-26-13, OP-26-14 各primerによる識別

A：TH11, B：TH17, C：TH32, D：TH42, E：TH43, F：おさ二十世紀,

G：幸水, H：新水, I：豊水

第3章 有望系統の不和合性因子（S 遺伝子）型の推定

前章までの結果により有望系統の諸形質を明らかにすると同時に遺伝子マーカーを用いることで簡易にこれらの同定を行うことが可能となった。一方、これらの系統を基にさらに育種を行う場合にはその効率化のため不和合性因子を明らかにしておく必要がある。

これまでの研究によりニホンナシの和合性に関与するS 遺伝子の因子型は多くの品種について明らかにされており、‘二十世紀’のS 因子型は S_2S_4 であることが示されている。さらに、‘おさ二十世紀’は S_4 が突然変異し因子型識別能力を失った S_4^{sm} となったものと推定され、 $S_2S_4^{sm}$ の因子型をもつとみなされる。

本章では黒斑病抵抗性で自家和合性を有しさらに果実品質が優れている10系統を用い、他品種との交配を行うことでそれらのS 因子型を推定しようとした。

I 材料および方法

鳥取大学農学部圃場に植栽されている‘おさ二十世紀’後代10系統を供試し、開花期に葯を採取し、乾燥後直ちに定法に従い花粉の発芽率を調査した。これらの花粉を予め開花前に除雄し袋を掛けた‘長十郎’、‘二十世紀’、‘新水’にそれぞれ交配し直ちに再度袋を掛け他花粉を遮断した。5月中旬に結実を調査し、結実率31%以上の組み合わせを和合性と評価した。

II 結果および考察

(1) ‘おさ二十世紀’自殖第一世代系統のS 因子型

‘おさ二十世紀’は‘二十世紀’の芽条突然変異によって生まれた自家和合性品種である。自家不和合性が自家和合性に変異した他は、黒斑病感受性、果実品質などの品種特性はいずれも‘二十世紀’と同じである。‘二十世紀’のS 因子型は S_2S_4 である。‘おさ二十世紀’は S_4 が突然変異し因子型識別能力を失った S_4^{sm} となったものと推定され、 $S_2S_4^{sm}$ の因子型をもつとみなされる。

‘おさ二十世紀’の自殖によって得られた第一世代の系統について因子型を推定すると第5表のようになる。

‘おさ二十世紀’自殖第一世代の系統は $S_2S_4^{sm}$ か $S_4^{sm}S_4^{sm}$ のいずれかを有するものと考えられる。

‘おさ二十世紀’の自殖第一世代系統より選抜した有望系統の花粉を‘長十郎’(S_2S_3)、‘二十世紀’(S_2S_4)、‘新水’(S_4S_5)に交雑し、結実率と完全種子含有率を調査した結果は第6表のとおりであった。

TH 3は‘長十郎’との間には78%の結実率を示したが、‘二十世紀’、‘新水’のいずれも結実率は10%前後ときわめて低い値であった。従ってTH 3は $S_4^{sm}S_4^{sm}$ の因子型を有するものと推定された。TH 6は‘二十世紀’

第5表 ‘おさ二十世紀’自殖第一代のS 遺伝様式

		♀	
		おさ二十世紀	
		S_2	S_4^{sm}
♂		-----	
おさ二十世紀	S_2	—	—
	S_4^{sm}	$S_2S_4^{sm}$	$S_4^{sm}S_4^{sm}$

sm : stylar-part mutant

との間の結実率が低いことから $S_2S_4^{sm}$ と推定された。またTH41は‘長十郎’、‘新水’と交雑した場合にきわめて高い結実率を示し、‘二十世紀’に対しては完全な不和合性を示した。したがってTH41は $S_2S_4^{sm}$ と推定された。TH3は $S_4^{sm}S_4^{sm}$ とホモの自家和合性因子を有する系統と推定されることから、自家和合性の品種育成を行う場合、きわめて貴重な系統であると認められる。

第6表 ‘おさ二十世紀’ 自殖第一代を花粉親とした場合における結実率、
結実果の完全種子含有率、及び各系統における推定S遺伝子型

花粉親 系統 (♂)	♀			推定 S遺伝子型
	長十郎 (S_2S_3)	二十世紀 (S_2S_4)	新水 (S_4S_5)	
TH 3	77.8	10.0	11.1	$S_4^{sm}S_4^{sm}$
	—	18.8	0.0	
TH 6	100.0	27.3	55.6	$S_2S_4^{sm}$
	92.0	63.7	57.1	
TH41	77.8	0.0	100.0	$S_2S_4^{sm}$
	100.0	—	70.0	

上段：結実率(%) 下段：完全種子含有率(%) sm : stylar-part mutant

(2) ‘おさ二十世紀’ と ‘新水’ 及び ‘幸水’ の交雑
第一系統における因子型

‘おさ二十世紀’ を種子親，‘新水’，‘幸水’ を花粉親とした交雑第一代の系統がもつS因子を推定すると第7表のとおりである。自家和合性を示す系統は $S_4S_4^{sm}$ か $S_4^{sm}S_5$ のいずれかと考えられる。

‘長十郎’ (S_2S_3)，‘二十世紀’ (S_2S_4) および ‘新水’ (S_4S_5) を種子親として有望な交雑第一代系統を花粉親として交雑し，結実率を求めたところ，第8表のとおりであった。TH7 およびTH11 (‘おさ二十世紀’ × ‘新水’) は ‘長十郎’，‘二十世紀’ と完全な和合性を示したが，‘新水’ と交雑した場合はいずれも結実率0% となった。従ってTH7は $S_4^{sm}S_5$ と推定された。TH17 (‘おさ二十世紀’ × ‘幸水’)，TH42 (‘おさ二十世紀’ × ‘幸水’) でも ‘新水’ と不和合関係にあることから，これらの因子型も $S_4^{sm}S_5$ とみなされた。

第7表 ‘おさ二十世紀’ × ‘新水’ · ‘幸水’ のS遺伝様式

♀	おさ二十世紀	
	S_2	S_4^{sm}
♂		
新水 及び 幸水	S_4	S_2S_4 $S_4S_4^{sm}$
	S_5	S_2S_5 $S_4^{sm}S_5$

sm : stylar-part mutant

第8表 ‘おさ二十世紀’ × ‘新水’・‘幸水’ を花粉親とした場合における結実率，結実果の完全種子含有率，及び各系統における推定S遺伝子型

花粉親系統 (♂)	♀			推定S遺伝子型
	長十郎 (S ₂ S ₃)	二十世紀 (S ₂ S ₄)	新水 (S ₄ S ₅)	
TH 7 (OxS)	57.1 —	100.0 18.8	0.0 0.0	S ₄ sm S ₅
TH11 (OxS)	100.0 90.0	100.0 86.1	0.0 —	S ₄ sm S ₅
TH17 (OxK)	80.0 —	100.0 78.4	0.0 —	S ₄ sm S ₅
TH42 (OxK)	87.5 95.0	100.0 81.3	10.0 15.4	S ₄ sm S ₅

上段：結実率(%) 下段：完全種子含有率(%) sm : stylar-part mutant
O : おさ二十世紀 S : 新水 K : 幸水

(3) ‘おさ二十世紀’ を花粉親，‘幸水’ を種子親として得られた交雑第一系統における因子型

TH19およびTH22は‘幸水’ (S₄S₅) を種子親，‘おさ二十世紀’ (S₂S₄sm) を花粉親として生まれた自家和合性の系統である。この組み合わせの場合，理論的には第9表に示すように自家和合性を示す系統は生まれぬ。しかし，この2系統は和合性を示すことから，第10表のようにまれにS₄sm因子をもつ花粉が受精した結果生まれた系統ではないかと思われ，S₄S₄smかS₄smS₅の因子型をもっていると思われる。

‘長十郎’，‘二十世紀’ 及び ‘新水’ を種子親としてTH19およびTH22を花粉親として交雑した結果，第11表のような結実率が得られた。いずれの系統とも ‘長十郎’ と ‘二十世紀’ には和合性を示

第9表 ‘幸水’ × ‘おさ二十世紀’ のS遺伝様式

		♀	
		幸	水
		S ₄	S ₅
♂		—	
おさ二十世紀	S ₂	S ₂ S ₄	S ₂ S ₅
	S ₄ sm	—	—

sm : stylar-part mutant

第10表 S₄sm花粉が授精できた場合における‘幸水’ × ‘おさ二十世紀’ のS遺伝様式

		♀	
		幸	水
		S ₄	S ₅
♂		—	
おさ二十世紀	S ₂	S ₂ S ₄	S ₂ S ₅
	S ₄ sm	S ₄ S ₄ sm	S ₄ sm S ₅

sm : stylar-part mutant

したが、‘新水’に対しては、TH19は20%、TH22は0%といずれも低い結実率であった。従って、TH19、22いずれも因子型は $S_4^{sm}S_5$ と考えられる。

第11表 ‘幸水’×‘おさ二十世紀’を花粉親とした場合における結実率、結実果の完全種子含有率、及び各系統における推定S遺伝子型

花粉親系統 (♂)	♀			推定S遺伝子型
	長十郎 (S_2S_3)	二十世紀 (S_2S_4)	新水 (S_4S_5)	
TH19	57.1	100.0	20.0	$S_4^{sm}S_5$
(KxO)	100.0	84.4	28.6	
TH22	50.0	100.0	0.0	$S_4^{sm}S_5$
(KxO)	100.0	59.2	—	

上段：結実率(%) 下段：完全種子含有率(%) sm : stylar-part mutant
O : おさ二十世紀 K : 幸水

(4) ‘おさ二十世紀’と‘豊水’の交雑第一系統の因子型

TH43の花粉を‘長十郎’、‘二十世紀’及び‘新水’に授粉し、結実率を調べた結果、第12表のようであった。

‘長十郎’、‘二十世紀’とは完全に和合性を示したが‘新水’(S_4S_5)に対しては結実率は22%、完全種子率は0%と不和合性を示した。一方、‘豊水’は S_3 因子を持つがもう一方の因子が不明であるため第10表のように‘長十郎’のほか、‘青龍’(S_2S_3)、‘青玉’(S_3S_4)と交雑して結実率を調査した。その結果‘豊水’はこれら3品種のいずれとも完全に和合性を示すことが明らかになった。

第12表 ‘おさ二十世紀’×‘豊水’を花粉親とした場合における結実率、結実果の完全種子含有率、及び各系統における推定S遺伝子型

花粉親系統 (♂)	♀			推定S遺伝子型
	長十郎 (S_2S_3)	二十世紀 (S_2S_4)	新水 (S_4S_5)	
TH43	100.0	100.0	22.2	$S_4^{sm}S_5$
(OxH)	90.0	79.4	0.0	

上段：結実率(%) 下段：完全種子含有率(%) sm : stylar-part mutant
O : おさ二十世紀 H : 豊水

第13表 ‘豊水’を花粉親とした場合における結実率

花粉親系統 (♂)	♀			推定S遺伝子型
	長十郎 (S_2S_3)	青龍 (S_2S_3)	青玉 (S_3S_4)	
豊水	100.0	100.0	100.0	S_3S_5

豊水の花粉発芽率：79.7%

従って、第12, 13表より‘豊水’は S_3S_5 の因子を有している可能性が高いとみなされた。さらにTH 43は自家和合性を示すことから、 $S_4^{sm}S_5$ の因子型であると推定された。

(5) 有望系統のS因子型

有望系統のS因子型を表にまとめると第14表のようである。

第14表 有望系統のS因子型

TH 3 (O self)	$S_4^{sm}S_4^{sm}$
TH 6 (O self)	$S_2S_4^{sm}$
TH41 (O self)	$S_2S_4^{sm}$
TH 7 (O x S)	$S_4^{sm}S_5$
TH11 (O x S)	$S_4^{sm}S_5$
TH17 (O x K)	$S_4^{sm}S_5$
TH42 (O x K)	$S_4^{sm}S_5$
TH19	$S_4^{sm}S_5$
TH22	$S_4^{sm}S_5$
TH43	$S_4^{sm}S_5$

第4章 TH17の果実発育並びに糖蓄積機構の特性

前章までの結果から、TH17は高い糖度と優れた肉質を有しており、親品種である‘幸水’並びにほぼ成熟期を同じにする‘豊水’を上回る食味を示すと評価された。TH17は貯蔵性も‘二十世紀’とはほぼ同等であることから高い実用性があるものと考えられる。果実の食味を決定する要因の一つは糖の含量と組成であり、ニホンナシにおいてはソルビトール、フルクトース、グルコース、スクロースが主な糖成分として知られている。さらに、ナシ果実の糖組成は品種間で大きく異なっており、それぞれの品種の食味を決定する大きな要因であるといえる。ナシ果実においては、主な転流糖であるソルビトールがNAD依存性ソルビトール脱水素酵素 (NSD-SDH) とソルビトール酸化酵素 (SOX) により、それぞれフルクトースとグルコースに転換され、さらにフルクトースとグルコースはスクロース合成酵素 (SS) によりスクロースに合成される (Yamakiら1989)。従ってこれらの酵素の働きの多少によって果実中の糖の蓄積量が異なり、品種による糖組成の差異が生じるといえる。

本章では最も有望な系統であるTH17の優れた食味の原因を明らかにするため糖含量の経時的变化と成熟期の糖組成を親品種である‘幸水’及び‘おさ二十世紀’と比較調査した。さらにTH17の優れた糖蓄積の機構を、糖代謝関連酵素の変化の面から検討し、遺伝資源としての評価を行おうとした。

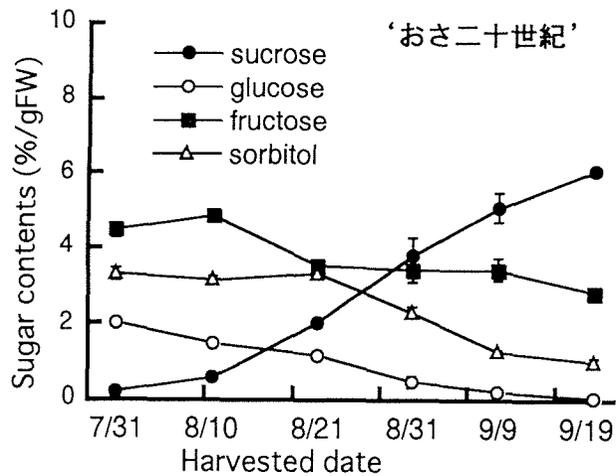
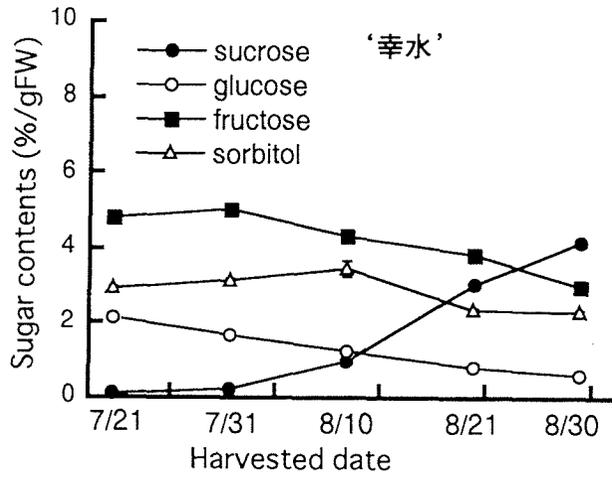
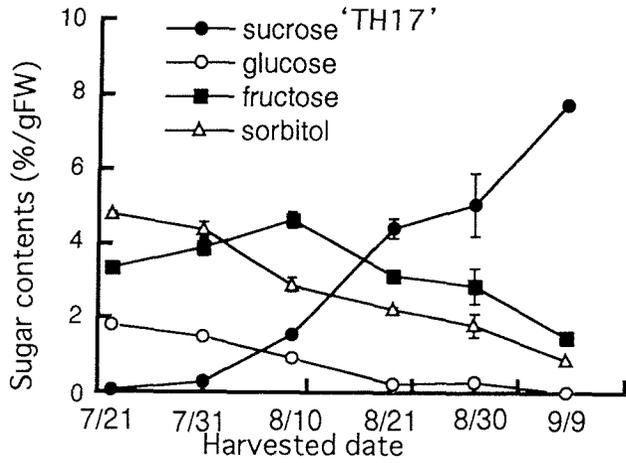
第1節 糖含量の経時的变化並びに成熟期の糖組成

I 材料及び方法

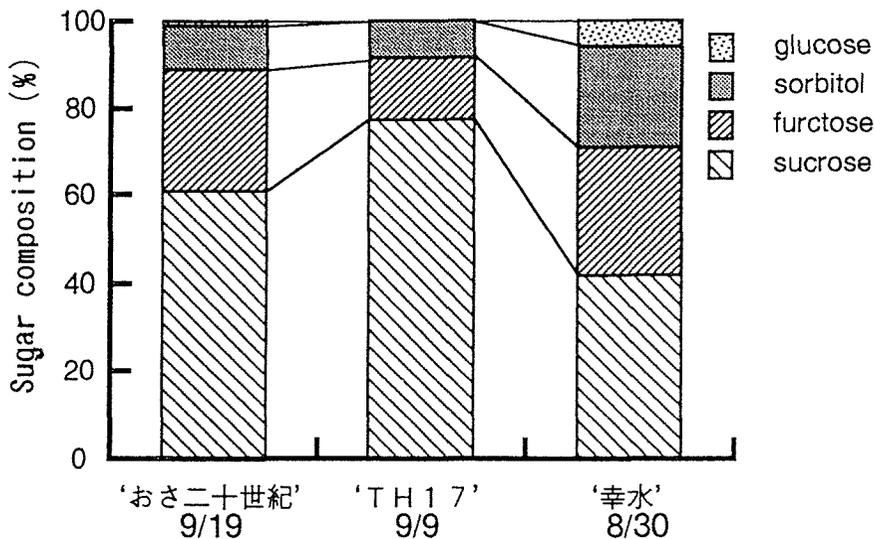
鳥取大学附属農場に栽植されている5年生TH17、17年生‘おさ二十世紀’および16年生‘幸水’を供試した。7月中旬から9月中旬まで果実を経時的に採取し、以下の方法に従って糖を抽出し、果肉中の糖を分析した。果肉10gを電子レンジで約1分間熱処理した後、80%エタノールを加え摩砕した。その後、0.1N NaOHで中和し、遠心分離 (4500xg, 7分間) 後上澄みを回収した。この操作を再度行ない、得られた上澄みを合わせ減圧乾固し、蒸留水で定量した。定量後の試料はメンブレンフィルター (ADVANTEC, Cellulose Acetate 0.45 μ m) でろ過し、分析試料とした。糖の分析は高速液体クロマトグラフィー (カラム; 10.7mm \times 300mm, 充填剤; Wakobeads T-131, カラム温度; 60 $^{\circ}$ C, 移動相; 10-4N NaOH, 流量; 0.25ml/min) により行なった。

II 結 果

供試品種の各糖含量の変化を第7図に示した。いずれの品種も未熟期において、ソルビトールとフルクトースが主な糖成分であった。TH17および‘幸水’では8月10日までフルクトースは増加するものの、いずれの品種とも成熟期には減少した。スクロースは、各品種とも未熟期にはほとんど存在しておらず、TH17および‘幸水’では8月10日頃より、‘おさ二十世紀’では8月21日頃より増加し始めた。その後各品種とも著しくスクロースが増加し、成熟期にはいずれの品種においても糖の中で



第7図 供試品種における各糖含量の経時的变化



第8図 成熟期における供試品種の糖組成

最も高い含量となった。グルコースは未熟期における蓄積量が少なく、さらに成熟するにつれて徐々に減少し、TH17及び‘おさ二十世紀’では、成熟期には検出できないレベルまで低下した。成熟期における供試品種の糖組成を第8図に示した。いずれの品種においてもスクロースが最も多く、次いでフルクトース、ソルビトール、グルコースの順となった。スクロースは、TH17では糖全体の約77%、‘おさ二十世紀’では61%、‘幸水’では41%を占めた。

III 考 察

果実を集積する糖は、その種類や品種により異なることが知られており、リンゴではフルクトースがまた、モモにおいては、スクロースが主たる集積糖であるが、品種・系統で差異がある。ナシにおいては、梶浦ら(1979)はナシでもフルクトース、スクロース及びソルビトール含量は品種により差があることを示している。また梶浦ら(1979)は成熟期の糖組成から、スクロース蓄積型、ソルビトール蓄積型、フルクトース蓄積型、またそれぞれの間を中間型と分類しており、本実験で供試した‘おさ二十世紀’はスクロース蓄積型に、‘幸水’はスクロース蓄積型とソルビトール蓄積型の中間型に分類されている。本研究においても調査した成熟期のスクロース含量は品種間でかなりの差がみられ、TH17は親品種である‘おさ二十世紀’及び‘幸水’のスクロース含量を上回り77%を占めた。またTH17は梶浦ら(1979)が最もスクロース含量が多いと報告した‘長十郎’よりもその含量が多いことから、スクロース蓄積型の典型的な品種であることが示唆され、他の品種となった食味を示す一因と思われた。

第2節 糖代謝関連酵素の経時的变化

I 材料及び方法

本学附属農場に栽植されているTH 17, ‘おさ二十世紀’及び‘幸水’を供試した。7月中旬から9月中旬まで経時的に果実を採取し, Yamakiら(1989)の報告を参考に以下の方法に従って酵素の抽出及び精製を行なった。

(1) NAD-依存性ソルビトール脱水素酵素(NAD-SDH)

果実50g(g. f. w.)を10mM L(+)-Ascorbic Acid, 1mM Dithiothreitol (DTT), 不溶性PVP(0.1g/g. f. w.)を含む0.2M K-phosphate buffer (pH7.8)中で摩砕した。その後遠心分離(30,000xg, 20min, 0℃)し, その上澄みをSephadex G-25カラムを用いてフェノール性化合物を除去した。得られたタンパク質分画に硫酸アンモニウム(80%飽和)を徐々に加えてタンパク質を沈澱させた後, 遠心分離(30,000xg, 20min, 0℃)した。沈澱物は少量の1mM DTTを含む0.01M Tris-HCl buffer (pH7.2)を加え溶解し, 1mM DTTを含む0.01M Tris-HCl buffer (pH7.2)中で4℃で一晩透析した。透析後の試料は0.01M Tris-HCl buffer (pH8.0)であらかじめ平衡化したDEAE-Sephadexに吸着させ, 0.2M KClを含む0.01M Tris-HCl buffer (pH7.2)で溶出させた。得られた酵素分画はセントリコンで濃縮したのち, -80℃で保存し, 分析試料とした。NAD-SDH活性の測定は次の方法に従った。反応液の組成は30mM Tris-HCl buffer (pH9.6), 1mM NAD+, 235mM sorbitolとし, この反応液に試料0.1mlを加え1.5mlとし, 30℃で30分間反応させたのち, 分光光度計(日立U-2000型ダブルビーム分光光度計)で340nmの吸光度を測定した。

(2) ソルビトール酸化酵素(SOX)

果実50g(g. f. w.)を10mM L(+)-Ascorbic Acid, 1mM DTT, 0.3% Triton X-100を含む0.1M K-phosphate buffer (pH7.0)中で摩砕し, その後遠心分離(30,000xg, 20min, 0℃)した。残渣を10mM L(+)-Ascorbic Acid, 1mM DTT, 1M NaClを含む0.1M K-phosphate buffer (pH7.0)中で再び摩砕し, 遠心分離(30,000xg, 20min, 0℃)した。両上澄みを混合し, 硫酸アンモニウム(80%飽和)を徐々に加えてタンパク質を沈澱させ, 遠心分離(30,000xg, 20min, 0℃)した。沈澱物は少量の1mM DTTを含む0.01M Tris-HCl buffer (pH7.0)を加え溶解し, 1mM DTTを含む0.01M Tris-HCl buffer (pH7.0)中で4℃で一晩透析した。透析後の試料は-80℃で保存し, 可溶性SOXの分析試料とした。また遠心分離後の残渣は, 1mM DTTを含む0.01M Tris-HCl buffer (pH7.0)中で4℃で一晩透析した。透析後の残渣は-80℃で保存し, 結合型SOXの分析試料とした。SOX活性の測定は次の方法に従った。反応液の組成は59mM 酢酸buffer (pH4.0), 235mM sorbitolとし, この反応液に試料0.1mlを加え1.5mlとし, 30℃で2時間反応させたのち煮沸して反応を止めた。これを遠心分離し, 上澄み0.2mlに対し, 0.6mM NADP+, 1.4mM ATP, 5.5mM MgCl₂, 9 unit Hexokinase (from Yeast) (オリエンタル酵母), 4.5 unit G 6 PDH (from Yeast) (オリエンタル酵母)を含む28mM Tris-HCl buffer (pH7.5)を加え1.7mlとし, 30℃で30分間反応させたのち, 分光光度計で340nmの吸光度を測定した。

(3) インベルターゼ

果肉50gをSOXと同様の方法で抽出し、透析後の試料を可溶性インベルターゼの分析試料に、残渣を結合型インベルターゼの分析試料とした。インベルターゼ活性の測定は次の方法に従った。反応液の組成は59mM酢酸buffer (pH5.0), 70mM Sucroseで、この反応液に試料0.1mlを加え1.5mlとし、30℃で20分間反応させたのち煮沸して反応を止めた。以下はSOX活性の測定方法と同様に行った。

(4) スクロース合成酵素 (SS)

果肉50g (g. f. w.) を10mM L (+)-Ascorbic Acid, 1mM DTT, PVP(0.1g/gf.w.) を含む0.2 M K-phosphate buffer (pH7.8) 中で摩砕した。その後遠心分離 (30,000xg, 20min, 0℃) し、上澄みを1 mM DTTを含む0.01M Tris-HCl buffer (pH7.0) 中で一晩透析した。透析後の試料は-80℃で保存し、分析試料とした。SS活性の測定はRoeの方法に従い生成されるスクロースを間接的に検出した。反応液の組成は15mM HEPES-KOH buffer (pH8.5), 15mM Fructose 2 mM UDPG, 5 mM MgCl₂で、この反応液に試料0.1mlを加えて1.2mlとし、30℃で20~30分間反応させたのち、0.25 mlに対し0.4N NaOHを0.25ml加え20分間煮沸したのち、0.1%アルコール-レゾルシノール (95% エタノールにレゾルシノール0.1gを溶解) 0.5mlと30%HCl 1.5mlを加え80℃で正確に8分間反応させたのち急水冷し、分光光度計で490nmの吸光度を測定した。

II 結 果

(1) NAD-SDH活性

NAD-SDH活性は、いずれの品種においても未熟期に高い活性を示したが、成熟するにつれて活性は低下した (第9図)。その中で‘幸水’は最も高い活性を示し、TH17と‘おさ二十世紀’は、ほぼ同程度の活性となった。また、‘幸水’では、7月31日を最高にその後8月21日にかけて急激に活性が低下しており、‘おさ二十世紀’においても、生育期間を通じて活性は低下し続けた。しかし、TH17は、7月21日から8月21日まで同程度の高い活性を維持し続け、その後急激に低下した。

(2) SOX活性

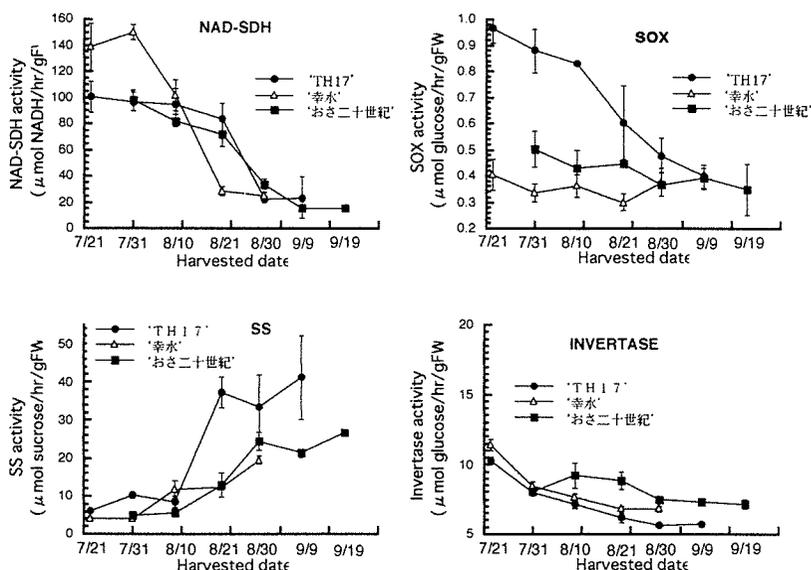
SOX活性は測定した4酵素中最も低い活性を示した (第9図)。「おさ二十世紀」および「幸水」は生育期間を通じて著しい活性の変化はみられず、活性そのものも低く推移した。一方、TH17は、他の2品種とは異なり未熟期に活性が高く、成熟するにつれて低下した。成熟期にはいずれの品種も同程度の活性を示した。

(3) インベルターゼ活性

インベルターゼ活性は、未熟期に高い活性を示した (第10図)。TH17および‘幸水’では成熟するにつれて活性が著しく低下したが、‘おさ二十世紀’は7月31日から8月21日までほぼ同程度の活性を維持し、その後やや低下するものの、他の2品種ほどの著しい活性の低下は認められなかった。成熟期にはTH17が最も活性が低く、‘おさ二十世紀’および‘幸水’と比較し明かな差が認められた。

(4) SS活性

SS活性はいずれの品種とも未熟期に活性は低く、成熟期に高い活性を示した (第10図)。なかでもTH17は、‘おさ二十世紀’および‘幸水’にはみられない著しい活性上昇が認められ、3品種中最も高い活性で成熟期まで推移した。‘おさ二十世紀’はTH17と比較すると生育後期から成熟期のSS活性は低いものの‘幸水’と比較した場合高い活性で推移した。



第9図 供試品種における各酵素活性の経時的変化

III 考 察

ナシの転流糖であるソルビトールは、果実内で糖代謝関連酵素によりフルクトース、グルコース、スクロースなどの糖に転換される。森口ら（1990）は、モモではNAD-SDH活性が弱く、むしろSOX活性が成熟するにつれて上昇することから、この酵素がソルビトールの転流に関して重要な酵素であるとしている。一方ナシにおいてはNAD-SDH活性が高いことから、転流してきたソルビトールはおもにこのNAD-SDHにより優先的にフルクトースに転換されると報告している。またインペルターゼ活性は未熟期に高く、成熟するにつれて減少すること、SS活性は‘長十郎’などのスクロース蓄積型品種では成熟期に上昇することを報告している。本研究においてもNAD-SDH活性は、SOXより高い活性を示しており、また前節でみられたようにフルクトースと比較してグルコースが極めて少ないことからナシ果実においてはソルビトールが主にフルクトースに転換していると思われる。またTH17は他の2品種とは異なり生育後期まで高いNAD-SDH活性を維持しており、果実への糖の取り込み、すなわち高い糖含量を示す一因と思われる。本実験においてインペルターゼ活性は、未熟期に活性が高く成熟するにつれて減少し、逆にSS活性は、成熟するにつれて活性が高くなり、糖組成の変化と一致した動きであった。従って、これらの活性の変化が成熟期にみられたスクロースの蓄積の一因と考えられた。中でもTH17においてインペルターゼ活性が最も低く、SS活性が特異的に高いこと、一方‘幸水’はSS活性の上昇が少ないことが、TH17と‘幸水’との明かな食

味の差の大きな原因と考えられた。以上の結果よりTH17は、自家和合性、黒斑病抵抗性を合わせ持つという優れた形質を持つと同時に、既存の品種にはみられない高いスクロース蓄積能力を持った系統であり、優れた食味を有するニホンナシの貴重な遺伝資源としての評価もできるものと考えられる。

摘 要

本研究は自家和合性・黒斑病抵抗性を有しさらに高い食味を有するニホンナシ新品種を育成するため‘おさ二十世紀’を母父本としたニホンナシ系統選抜を行うため、それらの樹体・果実の特性を明らかにしようとした。また、遺伝子マーカーを用いた同定法によりこれら系統の同定を行った。さらに遺伝資源としての評価を行うため、これら系統のS因子型の判定と果実の糖蓄積機構の検討を行った。得られた結果は以下のとおりである。

1. 果実品質を調査した結果青ナシでは早生のTH32, TH37と中生のTH6が、また赤ナシでは早生のTH9, 中生のTH17が有望な系統と思われた。中でもTH17は‘豊水’及び‘幸水’より明らかに高い食味を示したことから、最も有望な品種と思われた。
2. 各系統のアイソザイム分析並びにDNA分析を行なった結果いずれも同定可能であり、品種保護に有効な手法であると判断された。
3. 各系統を用いた交配試験の結果S因子はTH6が $S_2S_4^{sm}$, TH17が $S_4^{sm}S_5$, TH42が $S_4^{sm}S_5$ と推定された。またTH3は $S_4^{sm}S_4^{sm}$ であり、極めて貴重な遺伝資源であると思われた。
4. TH17は、極めて高いNAD-SDH及びSS活性を持つことがその高いスクロース蓄積能力と優れた食味を示す一因と思われた。またこのことから優れた食味を有するニホンナシの貴重な遺伝資源としての評価もできるものと考えられる。

引 用 文 献

1. 梶浦一郎・佐藤義彦. 1990. ニホンナシの育種及びその基礎研究と栽培品種の来歴及び特性. 果樹試報特別報告. 1
2. 梶浦一郎・山木昭平・大村三男・秋浜友也・町田祐. 1979. 東南アジア産ナシ類の果実中に含まれる糖成分の歴史的变化と糖組成についての主成分分析による品種分類. 育学雑誌. 29: 1-12.
3. 菊池秋雄. 1948. 果樹園芸学. 上巻. p.64-121. 養賢堂. 東京.
4. 小崎 格. 1973. ナシ黒斑病抵抗性に関する育種学的研究. 園試報A12: 17-27.
5. Moriguchi, T., S. Sanada and S. Yamaki. 1990. Seasonal fluctuation of some enzymes relating to sucrose and sorbitol metabolism in peach fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115: 278-281.
6. 田辺賢二・林真二・伴野潔・田村文男. 1991. ニホンナシ‘おさ二十世紀’を用いた自家和合性新品種の育成と自家不和合性に関する研究. 日本梨開発実験室報告. 5: 39-54.
7. 田辺賢二. 1992. ニホンナシ栽培の問題点と展望. 園学平4秋シンポ要旨: 1-11.
8. 町田裕・梶浦一郎・佐藤義彦・壽和夫. 1985. ‘おさ二十世紀’を利用した自家和合性品種の育成・園学要旨. 昭60秋: 98-99.

9. Yamaki, S. and T.Moriguchi. 1989. Seasonal fluctuation of sorbitol related enzymes and invertase activities accompanying maturation of Japanese pear (Pyrus serotina Rehder var. culta Rehder) fruit. J.Japan. Soc. Hort. Sci.