

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14653

研究課題名(和文)ブンタンにおける無核紀州型無核性発現を抑制する遺伝子のマッピングとマーカー開発

研究課題名(英文) Gene mapping of suppression factor of seedless expression and DNA marker development of the gene in pummelo

研究代表者

北島 宣 (KITAJIMA, AKIRA)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70135549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：‘無核紀州’由来の無核性発現は優性形質であるが、ブンタンとの交雑では有核：無核が3：1に分離するため、ブンタンがヘテロで有する無核性発現抑制因子の存在が想定されている。本研究の結果から、無核性発現抑制因子は量的形質であることが示され、SSR解析およびRad-seqにおいていずれも2個のQTLが検出された。このQTLが無核性発現抑制因子と関連すると考えられるが、ブンタンゲノムは高度にホモ化していることが明らかとなり、偽有核判別マーカーの開発は困難であった。

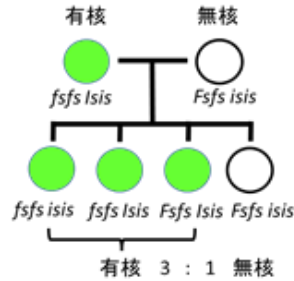
研究成果の概要(英文)：It is supposed that a gene of suppression factor in seedless expression exist in pummelo because segregation ratio of seedy : seedless is 3 : 1 in crossing with pummelos while that is 1 : 1 in crossing with mandarins. In this research, the results indicate that a suppression factor in seedless expression is a quantitative trait and two QTLs are detected. This QTLs would be related to the suppression factors in seedless expression. However, it was difficult to develop DNA marker for selection of seedy progeny since the ratio of homogenous allele in pummelos genome was showed very high.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：園芸学 カンキツ 無核性 マーカー 育種

1. 研究開始当初の背景

(1) カンキツにおいて無核性は重要な果実形質であり、キシユミカンの‘無核紀州’では人工授粉を行っても完全に無核となる。この無核性は突然変異により生じたものであり、マンダリンとの交配では 1:1 にブンタンとの交配では 1:3 に分離する遺伝形質であることから、無核性カンキツの育種親として重要である。この分離比にもとづき、突然変異により生じた無核性遺伝子 *Fs* は優性形質であり、ブンタンでは無核性発現を抑制する遺伝子をヘテロ (*Isis*) で有すると推定されている (第 1 図)。



第 1 図 ブンタンにおける無核性分離

(2) 申請者らはこれまでに‘無核紀州’の無核性発現に関する研究を行っており、‘無核紀州’において受精の阻害はみられないこと、多くの胚は接合子や前胚で发育停止していること、胚乳組織は遊離核の状態に崩壊せず正常ではないこと、種子長は 3mm 程度で種皮は柔らかい可食種子 (仮称: A タイプ種子) を特異的に形成すること (第 2 図) などを明らかにした (Yamasaki・kitajima et al. 2007, 2009)。さらに、‘無核紀州’から育成された無核品種‘サザンイエロー’において、温室栽培では種子が発育することを発見し、‘無核紀州’と‘サザンイエロー’を用いて高温条件と種子発育の関係の詳細に検討した結果、いずれも開花から開花 4 週間後までの高温遭遇により種子が発育し、完全種子が形成されることを明らかにした (Yamasaki・kitajima et al. 2010)。このことは、突然変異で生じた胚の发育停止機構が高温によって解除されることを示しており、その解除機構は胚の发育時期ではなく、胚のうち完成期から受精および胚乳の遊離核分裂期頃に機能していると考えられるが、胚や胚乳の发育停止とその解除機構は不明である。さらに、この高温による解除機能を‘無核紀州’が有していることから、ブンタンがヘテロで有していると推定されている無核性抑制因子の存在を確かめる必要がある。一方、広島県果樹試験場では無核性カンキツ育種のためにブンタンと‘サザンイエロー’の交雑個体を 250 個体程度育成しており、無核性の A タイプ種子を形成するが完全種子も形成する個体が少なからず出現しており、こ



第 2 図 ‘平紀州’と‘無核紀州’種子

の個体の表現型を‘偽有核’と位置づけ、種子形成の表現型を正確に評価して連鎖地図にマッピングすることにより、この抑制因子がブンタンに由来するか否かを明らかにできると考えた。さらに、次世代型シーケンサーを用い、この近傍の塩基配列情報から多型を検出することで、この因子の選抜マーカーを開発できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、広島県果樹試験場で育成されているブンタンと‘サザンイエロー’との交雑実生集団を用い、種子形成に関して‘有核’、‘偽有核’、‘無核’の表現型の定義を明確にして、それらの分離比を明らかにする。また、交雑親である‘サザンイエロー’とブンタン品種の多型マーカーにより連鎖地図を作成するとともに、種子形成表現型に基づく無核性抑制因子を連鎖地図上にマッピングし、その由来を明らかにする。さらに、この因子近傍の塩基配列を調査してこの因子を選抜するマーカーを開発しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

広島県果樹試験場植栽のブンタン‘CRC4422’×‘サザンイエロー’、‘ポメロ白タイプ’×‘サザンイエロー’、‘江上ブンタン’×‘サザンイエロー’などの F1 集団 160 個体を用いた (第 1 表)。

(2) 種子形成表現型

すでに開発されている無核性遺伝子 *Fs* の有無を判別できるマーカーを用い、*Fs* を持たない有核個体を‘有核’、*Fs* を有し A タイプ種子の形成率が 90%を超える個体を‘無核’、*Fs* を有し A タイプ種子の形成率が 90%以下の個体を‘偽有核’として種子形成の表現型を位置づけ、出現個体数を調査した。

(3) Rad-sec による連鎖地図作製と QTL 解析

ブンタン‘CRC4422’×‘サザンイエロー’ F1 の 146 個体について Rad-sec を行い、‘CRC4422’と‘サザンイエロー’の連鎖地図作成を試みた。また、*Fs* を有す個体において、A タイプ種子形成率と完全種子形成率に対する QTL 解析を行った。

(4) SSR 解析による連鎖地図作製

‘CRC4422’×‘サザンイエロー’ F1 の 146 個体と‘ポメロ白タイプ’×‘サザンイエロー’ F1 の 100 個体について SSR マーカー解析を行い、データが得られた 188 マーカーにより連鎖地図作製を試みた。また、*Fs* マーカーを有している個体において SSR アリルの出現頻度が期待値から大きく異なる領域は A タイプ種子形成を抑制する遺伝子と連鎖している可能性があるため、この領域を調査した。

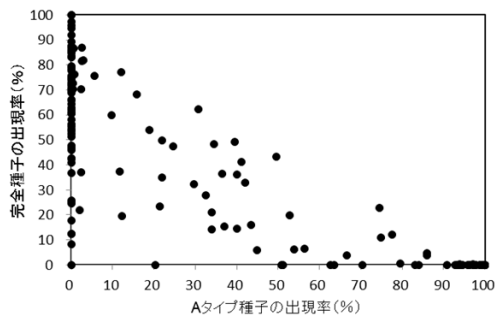
4. 研究成果

種子形成の表現型を調査した結果、核 64

個体、偽有核 55 個体、無核 41 個体となり (第 1 表)、これまで想定されている分離比 2 : 1 : 1 に適合しなかった。また、偽有核個体における A タイプ種子の出現率は連続的に変動していた (第 2 図)。そのため、無核性発現抑制因子は量的形質である可能性が高いと考えられた。

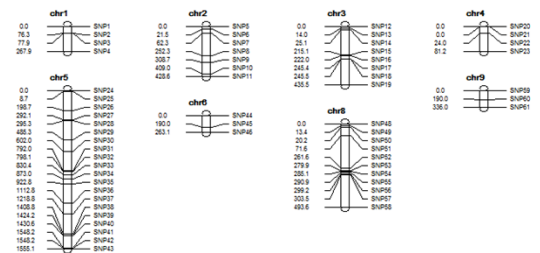
第 1 表 無核性表現型別個体数

表現型	種子親					合計
	CRC	ポメロ白	江上丈目	水晶丈目	その他	
無核 (90% <= 100%)	13	10	9	7	2	41
偽有核 (50% <= 90%)	7	5	2	3	0	17
偽有核 (0% <= 50%)	24	6	7	1	0	38
有核 (=0%)	24	21	12	4	3	64
合計	68	42	30	15	5	160

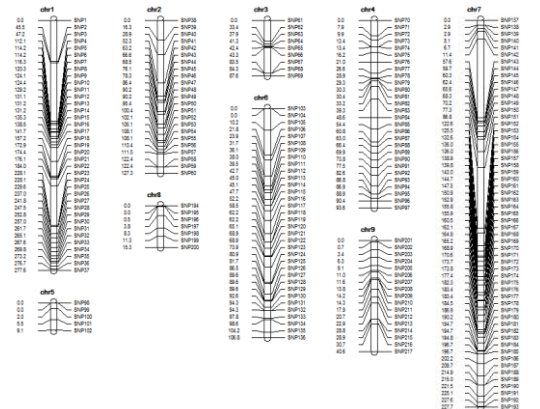


第 2 図 A タイプおよび完全種子出現率の関係

‘CRC4422’ × ‘サザンイエロー’ 後代の 146 個体について Rad-sec を行い、ブント ‘CRC4422’ と ‘サザンイエロー’ の連鎖地図作成を試みた。ブントゲノムは高度にホモ化しており、‘CRC4422’ ヘテロとなる SNP マーカーは 61 個しか検出されなかった (第 3 図)。一方、‘サザンイエロー’ では多くの SNP マーカーが検出され、連鎖地図が作成できた (第 4 図)。

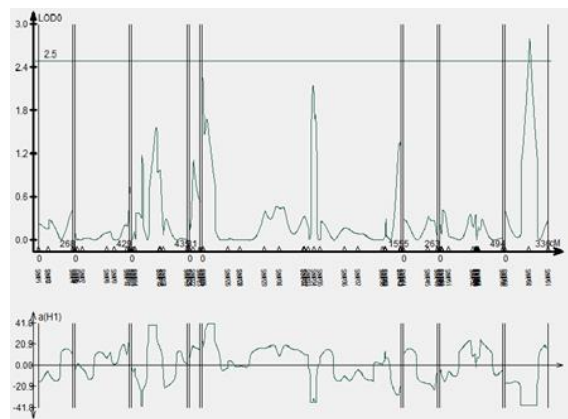
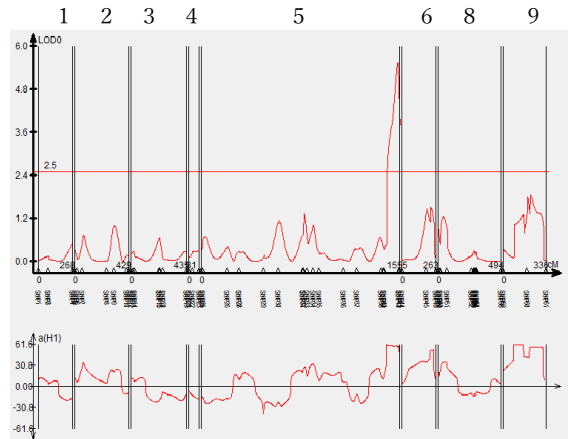


第 3 図 CRC がヘテロでサザンイエローがホモの連鎖地図



第 4 図 CRC がホモでサザンイエローがヘテロの連鎖地図

‘CRC4422’ × ‘サザンイエロー’ 後代で無核性マーカーを有している 34 個体について、A タイプ種子の出現率に基づき QTL 解析を行った結果、「CRC」連鎖地図の第 5 連鎖群と第 9 連鎖群に LOD 値が 2.5 を超える QTL が検出された。これらは、A タイプ種子発現の抑制に関係する遺伝子の可能性があると考えられた。

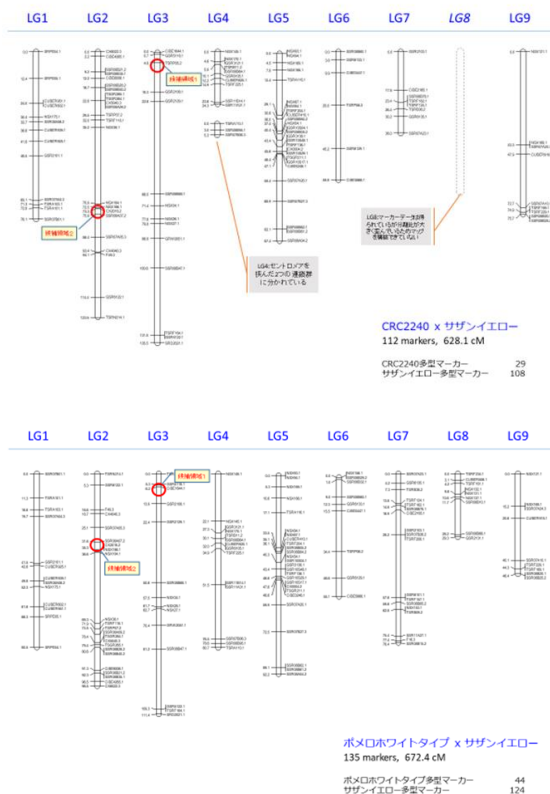


第 5 図 CRC がヘテロでサザンイエローがホモの連鎖地図における QTL 解析 上: A タイプ種子の割合との関係、下: 完全種子の割合との関係

一方、‘CRC4422’ × ‘サザンイエロー’ 後代の 146 個体と ‘ポメロ白タイプ’ × ‘サザンイエロー’ 後代 100 個体について SSR マーカー解析を行い、データが得られた 188 マーカーにより連鎖地図作製を試みた。いずれもブントゲノムは高度にホモ化しており、‘CRC4422’、‘ポメロ白タイプ’ でヘテロとなる SSR 座はそれぞれ 29 座と 44 座であった (第 2 表)。無核性マーカーを有している個体において SSR アリルの出現頻度が期待値から大きく異なる領域が 2 連鎖群で検出され (第 6 図)、この領域に A タイプ種子発現を抑制する遺伝子が存在する可能性がある。

第 2 表 SSR 解析による CRC とポメロ白タイプのヘテロ座数と表現型個体数

♀	♂	♀座数	マーカー有核 (C)	無核・回交型 (A)	無核型 (B)	除外 (D)
CRC2240	サザンイエロー	29	67	38	23	11
ポメロ白タイプ	サザンイエロー	44	38	17	16	29



第6図 SSR解析によるアリル出現頻度が期待値から大きく異なる領域  
上：CRC、下：ホメロ白タイプ

以上のことから、ブントンにおける無核性発現抑制因子は1遺伝子に支配されておらず、量的形質であることが考えられた。QTL解析とSSR解析において、いずれも関連する2領域が検出され、これらが無核性発現抑制因子と密接に関連することが示唆された。一方、ブントンゲノムでは高度にホモ化していることが明らかとなり、偽有核判別マーカーの開発は困難であった。現在、QTL解析とSSR解析の連鎖地図の統合がなされておらず、これらを統合することにより無核性発現抑制因子が座上する位置関係が明らかになるとともに、連鎖地図のマーカー数も増加するため、このことを実施する必要がある。

<引用文献>

- ① Yamasaki, A., A. Kitajima, N. Ohara, M. Tanaka, and K. Hasegawa. 2007. Histological study on the expression of seedlessness in 'Mukaku Kishu' (Citrus kinokuni) and its progenies. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 132: 869-875.
- ② Yamasaki, A., A. Kitajima, N. Ohara, M. Tanaka and K. Hasegawa. 2009. Characteristics of arrested seeds in mukaku kisyu-type seedless citrus. J. Japan. Hort. Sci. 78: 61-67.
- ③ Yamasaki, A., A. Kitajima and J.

Kaneyoshi. 2010. Effects of high temperature period on seed and embryo development in seedless citrus. Proceedings of the International Society of Citriculture, 2010: 697-700.

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 0件)

[学会発表] (計 1件)

- ① 北島 宣、山崎安津、柳本裕子、金好純子、中崎鉄也、無核紀州型無核性品種‘サザンイエロー’後代における無核性評価指標、園芸学会平成28年度秋季大会(平成28年9月11日 名古屋大学)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 宣 (KITAJIMA, Akira)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号： 70135549

(2) 研究分担者

中崎 哲也 (NAKAZAKI, Tetsuya)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号： 60217693

山崎 安津 (YAMASAKI, Atsu)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・研究員  
研究者番号： 70582584

清水 徳朗 (SHIMIZU, Tokuro)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・上席研究員  
研究者番号： 90355404

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

金好 純子 (KANEYOSHI, Junko)  
広島県立総合技術研究所  
農業技術センター・主任研究員

柳本 裕子 (YANAGIMOTO, Yuko)

広島県立総合技術研究所  
農業技術センター・研究員