

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2006~2008
 課題番号： 18380026
 研究課題名 (和文) カンキツ幼樹開花性関連遺伝子の探索とその分子機構および雄性不稔育種への利用
 研究課題名 (英文) Research for genes related to precocious flowering in Citrus, its molecular mechanism and application to male sterile plant breeding
 研究代表者
 若菜 章 (WAKANA AKIRA)
 九州大学・大学院農学研究院・准教授
 研究者番号： 10158579

研究成果の概要：

(1) 珠心胚実生を用いた幼樹開花条件と非幼樹開花条件の確立：4ヶ月齢のグレープフルーツ珠心胚実生を各種温度条件下で生育させた結果、15℃、20℃および10℃(8時間)/20℃(16時間)で幼樹開花が起きた。また、1ヶ月毎に播種したグレープフルーツ珠心胚実生を10℃以下にさがらないように設定した温室で生育させた結果、8月播種の実生が最も高い幼樹開花率を示した。1年生実生は9月に基部に2-3葉を残して切り戻し、腋芽を7-8葉展開させ、野外で冬期の低温に遭遇させることによって2年目の春にも連続して幼樹開花させることができた。以上のことから、11月播種の数ヶ月齢実生では展葉数が6葉以上で昼/夜温が20/10℃が幼樹開花条件(25℃では非幼樹開花条件)、9月切り戻し1年生実生では新梢葉数が6葉以上で冬期の自然外条が幼樹開花条件(25℃では非幼樹開花条件)であることが分かった。

(2) 幼樹開花性に関連する候補遺伝子群の探索：11月播種の数ヶ月齢実生を幼樹開花条件と非幼樹開花条件下で、秋季切り戻し1年生実生を幼樹開花条件と非幼樹開花条件下でそれぞれ生育させ、翌年1月にカンキツ実生の茎頂と葉を供試し、全mRNAを抽出し、逆転写酵素でDNAとした後、多数のランダムプライマーを用いてPCRを行った。ディファレンシャルディスプレイされる候補遺伝子断片は非常に多数あり、しかも発現が不安定なものが非常に多く見られた。このため、幼樹開花実生に特異的なDNA候補断片は見出せなかった。

(3) 幼樹開花性と雄性不稔性の遺伝解析：雑種実生群について幼樹開花実生と雄性不稔実生の分離を調査した。幼樹開花性は劣性ホモで発現すると推察されたが、実生の生育状況に影響される形質であったために正確な遺伝様式は決定できなかった。幼樹開花性関連遺伝子をヘテロに持つ多数のカンキツ品種群を確認した。イヨカン、クレメンティン、河内晩柑、スダチが細胞質稔性回復因子を持つこと、多数のカンキツ品種が雄性不稔核遺伝子に関してヘテロであることが明らかとなった。

(4) 雄性不稔性に関するDNAマーカーの探索：HY16 x グレープフルーツの交配から得た幼樹開花(雄性不稔と雄性稔性)実生を供試して、DNAマーカーを探索した。その結果、雄性不稔遺伝子が座乗するグレープフルーツの相同染色体のそれぞれで連鎖地図を作出した。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2006年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 2007年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |
| 2008年度 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 15,300,000 | 4,590,000 | 19,890,000 |

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 農学・園芸・造園学

キーワード： 果樹、カンキツ、幼樹開花、雄性不稔、DNA マーカー、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

カンキツは初結果までの実生の幼若期間が5年以上と長い。この成木への実生の高接ぎ木によってこの幼若期間は数年短縮されるが、それでも初結果までは3-10年を要する。ことはカンキツにおける遺伝分析や育種の大きな障壁と成っている。筆者らは様々な酢ミカン雑種に雄性不稔個体が分離すること及び雑種実生の一部に播種後半年以内に幼樹開花が起ることを確認した。この幼樹開花のメカニズムを遺伝子、分子および生長レベル及び環境(温度)レベルで明らかにし、同時に幼樹開花雑種実生を活用して雄性不稔と関連する遺伝子群や細胞質因子を極短期間に明らかにすることによって効率的な育種が可能と成ることが期待された。幼樹開花はグレープフルーツ実生、ブンタン、雑柑、タンジェロ実生に知られており、ブンタン類に特異的な現象と推論されていた。筆者らはユズ類やミカン類にも幼樹開花実生が分離することを見だし、ほとんどのカンキツが幼樹開花関連遺伝子をヘテロに有していると推測された。また、筆者らはハナユズ x ユズの交雑実生から幼樹開花実生を分離する単胚性で雄性不稔のHY-16を育成した。この雑種は幼樹開花や雄性不稔の遺伝(連鎖地図)の研究に威力を発揮することが期待できた。花成における初期の形態形成遺伝子であるFT遺伝子を用いた形質転換体と比べて、幼樹開花の仕組みを調べることは育種的にも優れた方法となることも期待された。

2. 研究の目的

(1) カンキツにおける幼樹開花雑種実生はどのような交配組み合わせにどのような葉数や温度条件で出現するのか、幼樹開花関連遺伝子は何個存在し、優性か劣性か、各品種の幼樹開花性に関する遺伝子型はヘテロか、開花制御遺伝子とのどのような関連があるのかを明らかにし、幼樹開花のメカニズムを示唆する。

(2) 細胞質優性不稔はどのような品種の交配組み合わせにどのような割合で出現し、細胞質稔性回復因子や関連核遺伝子は何個存在するのか? ほとんどの品種で優性不稔に関する遺伝子型はヘテロか? について明らかにし、非幼樹開花性雄性不稔雑種実生

の確立の高い極早期選抜法(DNA マーカー)を確立する。

3. 研究の方法

(1) グレープフルーツ珠心胚実生を用いた幼樹開花条件と非幼樹開花条件の確立(若菜・酒井): 幼樹開花に最適な低温条件を各種温度条件に設定した人工気象器内でグレープフルーツ珠心胚実生を生育させて調査する。幼樹開花に最適な実生の月齢および葉数、および1年生実生の切り戻しが幼樹開花に及ぼす影響について反復試験を行う。

(2) 幼樹開花性に関連する候補遺伝子群の特定(尾崎・ポストク): 珠心胚実生をもちいて確立した幼樹開花条件2区と非幼樹開花条件下2区で育成した実生についてそれらの茎頂と展開葉からmRNAを抽出し、逆転写酵素によってDNAを作製した後ランダムプライマーでPCRを行っていずれかの条件のみに出現するDNA断片をスクリーニングする。幼樹開花関連遺伝子候補断片はさらに区間で比較検討して、最も候補遺伝子として可能性の高い断片を切り出し、クローニングし、塩基配列を決定する。既知の遺伝子配列との相同性を参考に、取捨選択を行って候補断片を絞り込み、幼樹開花遺伝子群の候補とする。

(3) 幼樹開花性と雄性不稔の遺伝解析(若菜): カンキツ品種は多胚性の場合花粉親としてHY16と、単胚性の場合には種子親としてフォスターピンクグレープフルーツと交配を行って約60交配から雑種実生群を得、幼樹開花実生の出現割合と雄性不稔個体の分離を調査する。これらの結果を基に、幼樹開花性と雄性不稔性に関連する遺伝子の数と各品種のそれぞれの遺伝子型を推定する。

(4) 不稔性と幼樹開花性に関するDNAマーカーの連鎖分析(酒井; 大学院生): HY16xグレープフルーツのF1についてAFLPとRAPD及びマイクロサテライト多型の連鎖関係を網羅的に調査して、これらのマーカーによる遺伝子地図作成と標的遺伝子のマッピング作業を進める。本研究から得られた知見を基に、カンキツの幼樹開花を利用した迅速な無格品種の育種法の確立を図る。

4. 研究成果

(1) 各種カンキツ品種実生の出蕾頻度と開花条件

人工気象器とファイトトロンを用いて、4ヶ月齢のグレープフルーツ珠心胚実生を各種温度条件下で生育させた結果、15°C、20°C および 10°C（8時間）/20°C（16時間）で幼樹開花が起きた。また、1ヶ月毎に播種したグレープフルーツ珠心胚実生を 10°C以下にさがらないように設定した温室で生育させた結果、8月播種（発芽）の実生が最も高い幼樹開花率を示した。

‘フォスターピンク’グレープフルーツを花粉親とした各交配組合せから得られた数カ月齢の雑種実生における出蕾頻度は 15%以下であった。本研究によって初めて幼樹開花が確認された品種は‘クレメンティン’、‘エレンデール’、‘シシユズ’、‘カオパン’、‘晩生シャムブントン’、‘石頭柚’、‘チャンドラーメロ’、‘麻豆ブントン’、‘平戸ブントン’、長島ブントン収集数系統などであった。本研究において多くのブントン類実生が幼樹開花性を示すことが確認された。

数カ月齢実生における出蕾は1月上旬から6月下旬まで続いたが、特に2月から5月の間で多く、3月に最も多かった。交配組合せによる出蕾時期の違いはないと考えられた。出蕾した実生の到花葉数は6~25葉の間にあり、特に8~16葉を持つ実生が多かった。また、平均葉数は9~18葉の間であった。

一年以上に幼樹開花しなかった実生をそのまま温室内で生育させた二年目の実生における出蕾は‘宮内イヨ’、‘河内晩柑’、シシユズ、‘清見’を種子親として‘フォスターピンク’を交配して得た実生で確認された。いずれも二年目における出蕾率は1%未満であった。今後さらに多くの品種の交配を行い、出蕾率の高い組合せを見つける必要がある。また、生育が進んでいる二年目の実生をそのままの状態に幼樹開花の調査に利用することはできないと考えられた。

グレープフルーツ1年生珠心胚実生を秋に切り戻した場合の春における出蕾は121実生の内35実生（シュート総本数932本中44本）に見られた。秋に発生したシュートが7~11葉を持つ時に出蕾率が高く、13葉で最も高くなった。また、切り戻し後に秋シュートを発生しなかった腋芽が翌春に春シュートを発生し花芽を分化した例もわずかに見られた。数カ月齢の実生においては13葉前後で幼樹開花が最も多く確認されたことから切り戻し実生において秋に発生したシュートでも13葉前後で出蕾率が高くなることが解った。しかし、秋シュートの葉数が0~2枚の時も出蕾が起こっていることから、春シュートの葉も幼樹開花に影響していることが示唆された。春シュートの葉数が0枚、つまり腋芽に花芽のみが分化する直花は発生しなかった。以上の結果と播種後数カ月で開花した実生の最低展葉数が5葉であったこと

から考えると秋シュートの葉数が幼樹開花に必要な展葉数に達していた場合、すなわち5葉以上の場合、花芽分化は新シュートの葉数に関係なく起こっていたことが示唆された。秋シュートが5葉に達していない場合や切り戻した株から直接春シュートを発生している場合は数カ月齢実生における幼樹開花パターンに近く、萌芽伸長を始めている春先の低温が花芽分化に影響していると考えられた。一方、秋シュートの展葉数が5葉以上の場合は成木の花芽分化パターンに近く、冬季の低温により花芽分化が促進されたと考えられた。

(2) 幼樹開花関連遺伝子の発現

18SrRNA由来の増幅産物はすべての条件区でポジティブコントロールのみバンドが見られたことから、ポジティブコントロールにDNAの混入がないことを確認した。各開花・非開花条件の成葉および茎頂から抽出して作成したcDNAをもとに、様々なランダムプライマーを用いて得られたバンドを比較して両条件下のみで特異的に見られるバンドを探したところ、開花または非開花に特異的な多数のバンドが出現したが、いずれも再現性が低いことから幼樹開花関連遺伝子候補断片とは確認できなかった。さらに多くのランダムプライマーを用いて候補断片を探索する必要がある。

(3) 幼樹開花実生を用いた雄性不稔性の遺伝分析

グレープフルーツを花粉親とした各種交配から得た数カ月齢の実生における幼樹開花実生の出現数とそれらにおける雄性不稔

第5表. 各交配組合せから得た数カ月齢の幼樹開花実生(2007年10~11月植付)における雄性不稔の分離

| 交配組合せ | 供試実生数 | 不稔性 | 稔性 | 半稔性 | 幼樹開花実生合計 |
|--------------------------|-------|-----|----|-----|----------|
| イヨカン×FPGF | 213 | | 6 | 3 | 9 |
| シシユズ×FPGF | 535 | 1 | 22 | | 23 |
| カオパン×FPGF ² | 197 | | 7 | | 7 |
| HY-16×FPGF | 303 | 5 | 6 | 2 | 13 |
| 晩生シャムブントン×FPGF | 316 | 1 | 9 | 1 | 11 |
| 石頭柚×FPGF ² | 110 | 1 | 2 | | 3 |
| チャンドラー×FPGF ² | 113 | | 2 | | 2 |
| 清見×FPGF | 1234 | 2 | 13 | 1 | 16 |
| 河内晩柑×FPGF | 148 | 1 | | | 1 |
| 平戸ブントン×FPGF | 337 | | 2 | | 2 |
| クレメンティン×FPGF | 630 | | 2 | | 2 |
| HY-16×河内晩柑 | 133 | 1 | | 1 | 2 |

²: 幼樹開花が初めて確認された交配組合せ

の分離の例を表に示す。雄性不稔実生は7交配組合せの幼樹開花実生に出現した。その中で、シシユズ、‘晩生シャムブントン’、‘石頭柚’および‘清見’で雄性不稔実生を分離することが解った。‘清見’以外の品種はいずれも雄性稔性であることから、シシユズ、‘晩生シャムブントン’、‘石頭柚’はいずれも雄性不稔遺伝子をヘテロで持っていることが示唆された。薬退化による不稔性が知られている‘清見’と‘フォスターピンク’との交配組合せでは2実生に薬退化を伴わない不稔性が分離した。しかし、そのほとんどが稔性であった（稔性：不稔性=30：8）。

‘清見’の雄性不稔性の分離は χ^2 検定の結果、期待比3:1を(確率 $P=0.708$)否定しな

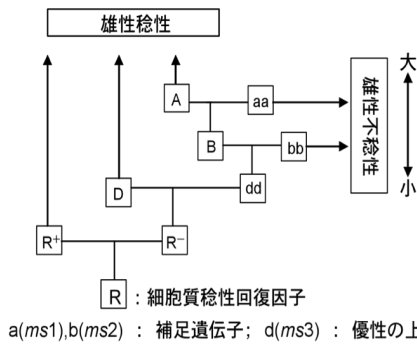


図. 遺伝子型と雄性稔性の関係.

った。このことから‘フォスターピンク’の遺伝子型が $AaBBdd$ もしくは $aaBBdd$ の場合、‘清見’の遺伝子型は $Aabbdd$ 、‘フォスターピンク’の遺伝子型が $aaBbDd$ の場合、‘清見’の遺伝子型は $Aabbdd$ と考えられる。

(4) 雄性不稔性に関する DNA マーカーと連鎖地図の作成

グレープフルーツを花粉親とした各雄性稔性実生および不稔実生のバルク DNA の RAPD における多型を 100 種類のプライマーを供試して調査した結果、CMN-B66 プライマーで約 2600bp 付近に雄性稔性個体のバルクに特異的なバンド(以下 CMN-B66-2600)が見られ、CMN-B19 では約 900bp 付近に雄性不稔個体のバルクに特異的なバンド(以下 CMN-B19-900)が見られた。幼樹開花個体のバルクに特異的に見られるバンドは見つからなかった。

プライマー CMN-B66 を用いた雑種個体および親個体の RAPD 分析の結果、CMN-B66-2600 は雄性稔性個体、雄性不稔個体および親個体のグレープフルーツで観察されたが親個体である HY-16 では観察されなかったことから、CMN-B66-2600 はグレープフルーツ由来であると考えられた。組換え体は雄性稔性個体では 52 個体中 13 個体、雄性不稔個体では 42 個体中 3 個体見られ、組換え頻度は 17.0 パーセントだった。CMN-B66-2600 を持つ個体は全 92 個体中 42 個体で見られた(観察比 42:52)。これは HY-16 とグレープフルーツの交配から得た F₁ 集団の期待比 1:1 と一致した ($\chi^2=1.06, P=0.30$)。

CMN-B19-900 も雄性稔性個体、雄性不稔個体および親個体のグレープフルーツで観察された。種子親個体である HY-16 では観察されなかったことから、CMN-B19-900 もグレープフルーツ由来であると考えられた。組換え体は雄性稔性個体では 52 個体中 14 個体、雄性不稔個体は 42 個体中 4 個体見られ、組換え頻度は 19.1 パーセントであった。CMN-B19-900 を持つ個体は全 92 個体中 52 個体で見られた(観察比 52:42)。これは HY-16 とグレープフルーツの交配から得た F₁ 集団の期待比 1:1 と一致した ($\chi^2=1.06, P=0.30$)。

プライマー CMN-A10 および CMN-A19 を用いた雑種個体の RAPD 分析の結果、グレープフルーツ由来の CMN-A10-1700 に関して、組換え体は雄性稔性個体では 52 個体中 10 個体、雄性不稔個体では 42 個体中 2 個体見られ、組換え頻度は 12.8 パーセントだった。CMN-A19-600 に関して、組換え体は雄性稔性個体では 52 個体中 13 個体、雄性不稔個体では 42 個体中 2 個体見られ、組換え頻度は 16.0 パーセントだった。プライマー CMN-A10、CMN-A19 とともに、目的マーカーバンドの分離比は HY-16 とグレープフルーツの交配から得た F₁ 集団の期待比 1:1 とほぼ一致した (CMN-A10: $\chi^2=0.38, P=0.54$ CMN-A19: $\chi^2=1.53, P=0.22$)。

HY-16 の遺伝子型は $aaBbdd$ で、グレープフルーツの遺伝子型は $AaBBdd, aaBBdd, aaBdDd, aabbDd$ の 4 つのうちのいずれかであることから、CMN-A10-1700、CMN-A19-600、CMN-B66-2600 の 3 つのマーカーはグレープフルーツの A (*Ms1*) または D (*Ms3*) 遺伝子に連鎖していると考えられ、CMN-B19-900 は a (*ms1*) または d (*ms3*) 対立遺伝子に連鎖していると考えられた。

供試個体 94 個体中、マーカーの有無が一致しなかった個体数は CMN-A10-1700 と CMN-A19-600 で 7 個体、CMN-A10-1700 と CMN-B66-2600 で 8 個体そして CMN-A19-600 と CMN-B66-2600 で 1 個体あった。これらの個体は組換え体であると考えられ、組換え頻度はそれぞれ 7.5 パーセント、8.5 パーセント、1.1 パーセントであった。以上の結果をもとに、雄性不稔遺伝子と RAPD マーカーのグレープフルーツにおける遺伝子地図を作成した(図)。

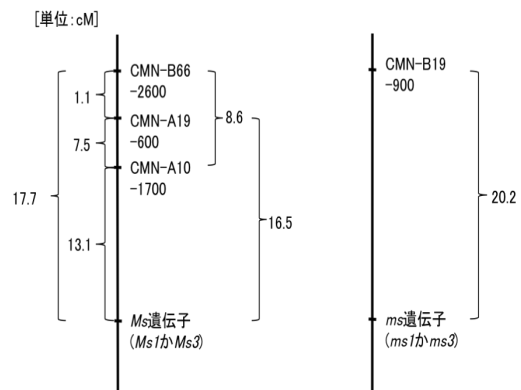


図. 雄性不稔遺伝子と RAPD マーカーの連鎖地図

この図で特筆すべきことは雄性稔性のグレープフルーツにおいて雄性不稔性を支配する劣性対立遺伝子 *ms1* または *ms3* に連鎖する CMN-B19-900 を発見したことである。これらのマーカーを用いることで、グレープフルーツ品種を片親として交配して得た雑種実生において雄性不稔実生の早期選抜が可能になる。

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 3 件)

① Kim, J. H., A. Wakana, T. Sekiya, Y. Tanimoto, B. X. Ngo, K. Sakai. 2009. Precocious flowering of Citrus seedlings and short juvenility of *Poncirus* seedlings: usage for genetic analysis and breeding. 11th International Citrus Congress, in press. (査読有)

② Wakana, A., T. Sekiya, K. Sakai. 2007. Precocious flowering and short juvenility for rapid progress in breeding of *Citrus* and *Poncirus*. Asian Symposium for Pharmaceutical Science in JSPS Asian Core Program in Huis Ten Bosch, pp. 313-317. (査読無)

③ Wakana, A., Y. Fujiwara, T. Sekimoto, J. H. Kim, I. Fukudome, K. Sakai. 2007. Precocious flowering and short juvenility of seedlings for rapid progress in breeding of *Citrus* and *Poncirus*. The 4th International Joint Symposium between Korea and Japan: pp.46-57. (査読無)

[学会発表] (計 4 件)

① Kim, J. H., A. Wakana, T. Sekiya, Y. Tanimoto, B. X. Ngo, K. Sakai. 2008. Precocious flowering of Citrus seedlings and short juvenility of *Poncirus* seedlings: usage for genetic analysis and breeding. International Society of Citriculture. 平成 19 年 10 月 28 日. Wuhan (China).

② 金貞希・若菜章・酒井かおり他 2 名. カンキツ各種雑種実生群における幼樹開花実生および雄性不稔実生の出現頻度. 園芸学会. 平成 20 年 9 月 28 日. 三重大学

③ 若菜章・関谷毅・酒井かおり他 2 名. カンキツ各種雑種実生群における幼樹開花実生および雄性不稔実生の出現頻度. 園芸学会九州支部会. 平成 19 年 8 月 22 日. 鹿児島大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若菜 章 (WAKANA AKIRA)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：10158579

(2) 研究分担者

尾崎 行生 (OZAKI YUKIO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：60253514

酒井かおり (SAKAI KAORI)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：30403976

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：