

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780027

研究課題名（和文）テッポウユリにおける自家不和合・和合性の遺伝・生理メカニズム

研究課題名（英文）Studies on the genetic and physiological mechanisms of self-incompatibility and -compatibility in *Lilium longiflorum*

研究代表者

坂園 聡美 (SAKAZONO SATOMI)

東北大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：00551508

研究成果の概要（和文）：

BC₁ 集団を用いた自家不和合・和合性の遺伝性解析の結果、本種における自家和合性変異は遺伝することが確認された。また、部分的な自家和合性を示す園芸品種を新たに発見した。雌ずいへの BA 処理実験により、自家不和合性を示す品種が自家結実できない原因のひとつは雌ずいの老化である可能性が示唆された。自生集団の遺伝的多様性を調査したところ、自家和合性優占集団と自家不和合性優占集団では遺伝的多様性が異なることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Segregation analysis of self-incompatibility and -compatibility using BC₁ population showed that self-compatibility is an inheritable character in *Lilium longiflorum*. A *L. longiflorum* cultivar showed partial self-compatibility was newly discovered. BA treatment on a pistil in self-incompatible *L. longiflorum* cultivars indicated that one of the factors of the failure of seed set in self-pollination is pistil senescence. There is significant genetic variation between the predominantly self-compatible population and predominantly self-incompatible population.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：テッポウユリ・自家不和合性・自家和合性

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性メカニズムは長年多くの研究者が取り組んでいる研究課題であるが、分子レベルで解明されているメカニズムはわずかである。自家不和合性は自生集団が自殖化することによって失われることがあり(自家和合化)、それゆえ自家不和合性種とされる園芸作物においても、自生地には自家和合性系統が存在する可能性がある。もしも自家和合性系

統が得られれば、自家不和合性系統との比較だけでなく、両系統の交雑後代を材料に用いることで系統間の自家不和合・和合性以外の遺伝的差異を排除し、より信頼性の高い自家不和合性関連遺伝子が選抜できるため、自家不和合性メカニズム解明に要する期間の短縮化につながると考えられた。

2. 研究の目的

テッポウユリは世界中で広く栽培されている園芸作物であるが、その自家不和合性メカニズムは解明されていない。Sakazono ら (2006)は、自家不和合性種とされていたテッポウユリについて自生地全土の集団を網羅的に調査し、自家和合性系統が多数存在することを明らかにした。本研究はその知見を出発点としてテッポウユリの自家不和合性や自家和合化に関するメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)自家不和合・和合性に関する遺伝様式
自家和合性(SC)系統と自家不和合性(SI)系統を交配してF₁集団を得た。さらにそのうちの1個体に、片親の自家不和合性系統を戻し交配することでBC₁集団を得た。BC₁集団の各個体を栽培し、開花個体を用いて自家交配を行い、交配約60日後に朔果を採取し、乾燥後、結実および種子重を調査した。発達した胚と胚乳の両方を有する種子を成熟種子とみなし、1粒以上成熟種子が含まれた朔果を結実と判定した。

(2) 自家不和合性反応強度に関する品種間変異

自家不和合性の強さが報告されていないテッポウユリ3品種(‘ホワイトタワー’, ‘ホワイトエレガンス’, ‘ホワイトトライアンフ’)について、交配実験により自家不和合性の有無および強度を調査した。交配は自家交配、他家交配のほか、花柱を子房上部1cmの部分で切断し、切断面に授粉する花柱切断自家交配を行った。他家交配には‘ジョージア’の花粉を用いた。結実および種子重の調査は前述(1)の方法に準じた。

(3) テッポウユリ自家不和合性反応成立の要因

植物ホルモンの一種であり、老化を阻害する働きをもつサイトカイニン(ベンジルアデニン(BA))を自家授粉後のテッポウユリ雌ずい処理し、自家不和合性反応を観察した。BA処理濃度は(0%, 0.1%, 1.0%, 10%)とし、雌ずい内での自家花粉管停止位置が異なる3品種(‘ひのもと’(自家不和合性強), ‘ジョージア’(自家不和合性中程度), ‘スノークイーン’(自家不和合性弱))を供試した。なお、これら3品種はいずれも通常の自家交配では種子が得られない自家不和合性を示す。また、一部の処理区に関しては交配144時間後に雌ずいを採取し、花粉管伸長観察を行った。

(4)マイクロサテライトマーカーを用いた自生集団における遺伝的多様性解析

①マイクロサテライトマーカーの開発

解析に使用したtotal DNAは園芸品種‘ひのもと’の葉から抽出し、EcoRVで切断したものをライブラリーとした。マイクロサテライトマーカーの開発はLian et al.(2006)のdual suppression PCR法を用いて行った。得られた32個のマイクロサテライト遺伝子座をそれぞれ特異的に増幅するプライマーを設計し、マーカーとしての有用性を確認した。

②自生集団における遺伝的多様性の解析

自生テッポウユリ2集団(屋久島集団(自家和合性個体:多い), 石垣島集団(自家和合性個体:ごく僅か))各22個体を対象に、(3)①にて作成し、多型判定に有用であると判定された10マイクロサテライトマーカーを用いて遺伝的多様性解析を行った。なお、PCRに用いたtotal DNAは各自生集団の個体からサンプリングした葉から抽出した。

4. 研究成果

(1)自家不和合・和合性に関する遺伝様式

F₁およびBC₁集団の開花個体を対象に自家交配を行った。結実の有無を指標として自家不和合・和合性の判別を行い、遺伝様式を調査した。BC₁集団は計33個体中、自家不和合性個体が22個体、自家和合性個体11個体であり、自家不和合性:自家和合性が2:1の割合で出現した(図1)。

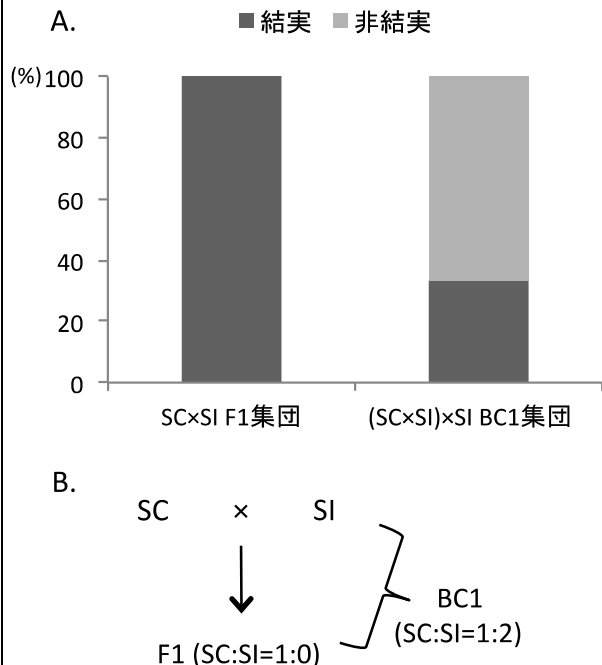


図1. 自家交配による結実・非結実比。
A; 個体比率, B; 遺伝様式模式図

これまでテッポウユリの自家不和合・和合性に関する遺伝様式の調査は行われていな

かった。今回の調査により、テッポウユリで生じている自家不和合性変異は遺伝することが明らかとなった。

(2)自家不和合性反応強度に関する品種間変異

‘ホワイトタワー’は自家結実率が71.4%と高い割合で成熟種子を形成し、自家不和合性打破に有効な花柱切断処理を行うと、自家結実率は100%となった(図2, 3)。しかしながら、自家交配時の平均種子重(0.39g)は他家交配時(0.99g)に比べて低く、本品種は自家不和合性反応が弱い、もしくは部分的な自家不和合性であることが示唆された。一方、‘ホワイトエレガンス’は自家種子を全く形成せず、完全な自家不和合性であると考えられる。‘ホワイトトライアンフ’はテッポウユリとして取り扱われているが、自家交配、他家交配ともに全く結実せず、植物体の形態からも、他のユリ種との交雑によって作出された可能性が考えられた。

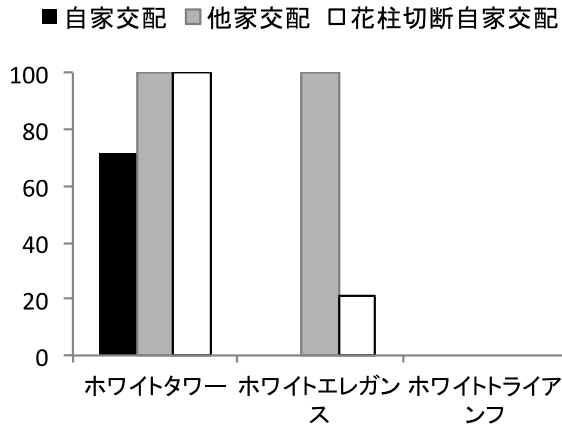


図2. 結実率(%)

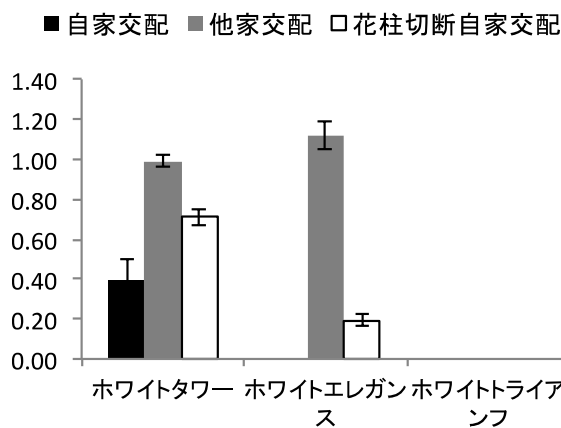


図3. 種子重(g)

(3) テッポウユリ自家不和合性反応成立の要因

‘ジョージア’および‘スノークイーン’では自

家結実率とBA処理濃度が比例し、一方‘ひのもと’は0.1%および10%BA処理でのみわずかに自家結実した(表1)。また、BA処理した花柱内では自家花粉管がより長く伸長しており(図4)、子房内への侵入も観察された。また、BA処理雌ずいは、無処理の雌ずいが萎れる開花後日数を経過したあとも萎れずに植物体上で維持されていた。

以上のことから、テッポウユリにおいて自家結実に至らない原因のひとつとして、雌ずいの老化が考えられた。

表1. テッポウユリ園芸品種の自家結実に対するBA処理効果

品種	BA濃度(%)	処理花数	結実率(%)	成熟種子数	
				平均	最大-最小
ひのもと					
自家交配	0	10	0	-	-
	0.1	14	14.3	105	90-120
	1	15	0	-	-
	10	13	7.7	1	-
他家交配	0	12	83.3	163	96-230
	0.1	12	86.7	35	13-61
ジョージア					
自家交配	0	9	0	-	-
	0.1	10	50	61	1-117
	1	12	58.3	57	6-147
	10	11	72.7	45	6-111
他家交配	0	9	33.3	163	96-230
	0.1	4	100	35	13-61
スノークイーン					
自家交配	0	10	10	117	-
	0.1	10	10	48	-
	1	10	20	12	11-13
	10	10	70	58	3-127
他家交配	0	10	90	177	63-271
	0.1	10	100	174	96-266



図4. 1.0% BA処理した花柱の基部で観察された‘ジョージア’の自家花粉管。□

(4) マイクロサテライトマーカーを用いた自生集団における遺伝的多様性解析

① マイクロサテライトマーカーの開発

本研究により、10個のマーカーを開発することができた(表2)。マイクロサテライトマーカーは自生集団の遺伝的多様性解析のほか、作物育種においても雑種検定用マーカーとして非常に有用である。本研究はテッポウユリのマイクロサテライトマーカーを初めて開発したものであり、世界的に重要な花卉作物であるテッポウユリの育種においても重要な知見である。

表2. テッポウユリ2集団を対象にした10マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝的多様性解析。アスタリスクはハーディ-ワインベルグ平衡からの有意な偏りを示す(*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001)。

遺伝子座	屋久島集団 (N=22)				石垣島集団 (N=22)			
	アリル数	H _a	H _b	F _{IS}	アリル数	H _a	H _b	F _{IS}
Lion001	3	0.591	0.509	-0.138	4	0.591	0.524	-0.105
Lion002	3	0.091	0.368	0.763***	17	0.909	0.896	0.008
Lion003	10	0.455	0.834	0.473***	18	1.000	0.924	-0.060
Lion004	1	0.000	0.000	-	10	0.944	0.856	-0.039
Lion005	1	0.000	0.000	-	6	0.333	0.742	0.416*
Lion006	3	0.318	0.274	-0.140	7	0.545	0.512	-0.041
Lion007	1	0.000	0.000	-	12	0.545	0.715	0.259
Lion008	3	0.182	0.377	0.535**	3	0.636	0.561	-0.112
Lion009	3	0.227	0.408	0.462*	14	0.909	0.895	0.007
Lion010	4	0.591	0.687	0.163	12	0.909	0.830	-0.073
平均	3.2	0.245	0.346	0.303	10.3	0.732	0.745	0.026

②自生集団における遺伝的多様性の解析
対立遺伝子座あたりのアリル数は平均3.2(屋久島集団)および10.3(石垣島集団), 観察されたヘテロ接合度(*Ho*)は0.245(屋久島集団)および0.732(石垣島集団)であった(表3)。また, 遺伝的分化の指標となる固定指数(*Fis*)の平均値は, 石垣島集団では0.026とゼロに近かったのに対し, 屋久島集団では0.303と集団の近親交配の度合いが高いことが示唆された。

以上の結果より, 遺伝的多様性に関して屋久島集団は非常に低い一方, 石垣島集団は高く維持されており, 両集団は繁殖様式が異なることが示唆された。すなわち, 屋久島集団は近親交配が生じている一方, 石垣島集団はランダムな他殖によって維持されている可能性が考えられた。

表2. 開発したテポウユリマイクロサテライトマーカー。下線はreverse primerに付加したPIC-tail配列を示す。

遺伝子座	プライマー配列 (5'-3')	繰り返しモチーフ	増幅サイズ	<i>T_m</i> (°C)
Llon001	F: ACACACACACAGAGAGAGAG R: <u>GTTCCTT</u> GGTAACCCACCTCTGACTT	(AC) ₆ (AG) ₇	115-121	55
Llon002	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: <u>GTTCCTT</u> ATTGGACCTCCAACCTCTCTCA	(AC) ₆ (AG) ₁₈	173-225	55
Llon003	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: <u>GTTCCTT</u> ATCCTCTTCAATGGACTCA	(AC) ₆ (AG) ₆	186-242	58
Llon004	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: <u>GTTCCTT</u> GGCTGGTATCATTTGATGATGTG	(AC) ₆ (AG) ₈	200-224	55
Llon005	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: <u>GTTCCTT</u> GGTACATGCAGCAGGTATG	(AC) ₆ (AG) ₈	128-138	55
Llon006	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: <u>GTTCCTT</u> CGGATCATATTGGTGATGAGG	(AC) ₆ (AG) ₅	171-197	58
Llon007	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: <u>GTTCCTT</u> CTAGTGAGTGAACCAATCTAGG	(AC) ₆ (AG) ₂₀	240-284	55
Llon008	F: ACACACACACACAGAGAGAGAG R: <u>GTTCCTT</u> CAAGTTTGGGGTGTGTATG	(AC) ₆ (AG) ₅	150-154	63
Llon009	F: TCTCTCTCTCTCACACACACAC R: <u>GTTCCTT</u> CCCAATGGAGCAAAAATAC	(TC) ₆ (AC) ₁₀	192-228	55
Llon010	F: TCTCTCTCTCTCACACACACAC R: <u>GTTCCTT</u> TCACATCATGGGTACCTTAGTT	(TC) ₆ (AC) ₁₄	154-176	63

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5件)

① Sakazono, S., M. Hiramatsu, M. Watanabe and H. Okubo. Development and characterization of microsatellite markers for *Lilium longiflorum* Thunb. (Liliaceae). *Applications in Plant Sciences* (accepted). 査読有

② Hiroi, K.***, M. Sone***, S. Sakazono, M. Osaka, H. Masuko-Suzuki, T. Matsuda, G. Suzuki, K. Suwabe and M. Watanabe. Time-lapse imaging of self- and cross-pollinations in *Brassica rapa* L. ***; Contributed equally to this work, *Annals of Botany* (doi:10.1093/aob/mct102). 査読有

③ Hiramatsu, M., J. Masuda, S. Sakazono and H. Okubo. (2012) Evolution of Early Flowering Ability in *Lilium formosanum* from its Progenitor *L. longiflorum*. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6: 21-27. 査読有

④ Okubo H., M. Hiramatsu, J. Masuda and S. Sakazono. (2012) New insight into *Lilium brownii* var. *colchesteri*. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6: 44-52. 査読有

⑤ Sakazono, S., M. Hiramatsu, H. L. Huang, C. L. Huang and H. Okubo. (2012) Phylogenetic Relationship between Degree of Self-compatibility and Floral Traits in *Lilium longiflorum* (Liliaceae). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 81(1): 80-90. 査読有

[学会発表] (計2件)

① Sakazono, S., M. Hiramatsu and H. Okubo. Development of microsatellite markers in *Lilium longiflorum* Thunb. 2nd International Symposium on Genus *Lilium*. Pescia, Italy. 2010/09/01

② Sakazono, S., M. Hiramatsu and H. Okubo. Overcoming self-incompatibility by BA treatment in *Lilium longiflorum*. 28th International Horticultural Congress. Lisbon, Portugal. 2010/08/26

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
記載事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂園 聡美 (SAKAZONO SATOMI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 00551508