

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24688003

研究課題名(和文) ヒュウガナツ‘西内小夏’の非還元花粉形成機構の解明とそのカンキツ育種への利用

研究課題名(英文) Unveiling the mode of unreduced pollen formation in 'Nishiuchi Konatsu' Hyuganatsu and its application for citrus breeding

研究代表者

本勝 千歳 (Honsho, Chitose)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：30381057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒュウガナツ‘西内小夏’の非還元花粉形成に関する知見を獲得し、また非還元花粉を利用した救助培養効率の向上を目的に実験を行った。まず‘西内小夏’より同一染色体上に座乗すると考えられ、かつヘテロ接合となっている6つのSSRマーカーをスクリーニングし、非還元花粉を直接ジェノタイピングすることによって、ヘテロ接合性の遺伝様式を調査した。その結果、‘西内小夏’非還元花粉は第一分裂復旧(FDR)によって形成されている可能性が高いと考えられた。また、救助培養効率の向上のためには、ジベレリンは初期培養時のみ添加すること、サンプルの採取は40-50mmの果実を採取すればよいことなどが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This research object is to gain the knowledge about the mode of unreduced pollen formation of ‘Nishiuchi Konatsu’ Hyuganatsu and to improve the recovery rate of plantlet by the embryo rescue. Six heterozygotic SSR markers, which are located on the same chromosome in ‘Nishiuchi Konatsu’, were screened. Unreduced pollen grains were genotyped for these SSR loci by the single-pollen genotyping. The inheritance of heterozygosity implied the mode of unreduced pollen formation was occurred through first division restitution (FDR). For embryo rescue, it was revealed that gibberellic acid was effective only for the initial culture and the fruit of 40-50 mm in diameter were appropriate for the embryo rescue.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：園芸学 果樹 カンキツ 倍数性 非還元花粉

1. 研究開始当初の背景

ヒュウガナツは約 180 年前に現在の宮崎県宮崎市で偶発実生として発見された晩生カンキツである。このヒュウガナツは強度の自家不和合性を有しており、かつ単為結果性を持たない。そのため受粉樹の混植が必要となり、結実した果実には多量の種子が含まれてしまうのが、果実生産における問題点であった。これまでの研究により、四倍体カンキツの花粉受粉やジベレリン処理によって、栽培技術的に無核果あるいは少核果を得ることは可能となっているが、遺伝的に自家結実性・無核性である品種の導入・育成が望まれている。

ヒュウガナツの品種‘西内小夏’は普通系ヒュウガナツの枝変わり品種である。この品種は、単植で結実し、さらにほとんどの種子がしいな化するという特徴を持っている。このように‘西内小夏’は農業生産上有用な形質を獲得しており、この‘西内小夏’の生殖特性を調査したところ、これまでに‘西内小夏’は生産する花粉の一部が非還元花粉となっていることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

‘西内小夏’は非還元花粉を形成すると考えられるが、この特性は倍数性育種や自家不和合性カンキツからの和合性系統育種に非常に有用である。つまり、‘西内小夏’を自家受粉して得られた正常種子を播種すればそれは四倍体となり、また、しいなを救助培養することにより、三倍体が獲得できる。一方、‘西内小夏’を種子親あるいは花粉親として他のカンキツと交雑して得られた二倍体レベルでの後代では、非還元花粉形成能力が遺伝している可能性が考えられる。これはつまり‘西内小夏’と同様の自家不和合性 S 遺伝子型に依存しない自家和合系統かつ種子がしいな化する少核果系統ということになる。よって、‘西内小夏’を交雑親として用いると、三倍体および四倍体個体の獲得だけでなく、非還元花粉形成能力を持った二倍体の自家和合性個体の獲得が期待できる。

このときに、育種における基本的情報として、非還元花粉の遺伝的構成は重要である。しかしながら、非還元花粉の形成過程が不明であることから、非還元花粉の遺伝的構成、特に親植物におけるヘテロ接合性の遺伝様式については明らかとなっていない。

以上より、本研究の目的は、‘西内小夏’にみられた非還元花粉形成にについて、その形成過程および遺伝的構成について知見を

得ると共に、様々な倍数性・形質を持った交雑後代を多数作出することにより、将来の育種事業への基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) 非還元花粉の形成過程・遺伝的構成の解明

プライマー選抜

‘西内小夏’の葉から DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、Chen ら (2008) の報告した SSR マーカー 47 個から設計したプライマーを用いて Multiplex PCR を行った。

花粉発芽処理と DNA 抽出処理の検討

花粉発芽の有無と抽出 buffer を用いた DNA 抽出処理の有無を組み合わせて 4 処理区を設けた。花粉発芽処理は、花粉発芽培地 (0.04% CaCl_2 , 0.01% H_3BO_3 , 0.0007% KH_2PO_4 , 10% sucrose, 1% agar) に ‘西内小夏’ の花粉を置床し、25℃ で 15 時間インキュベートした。DNA 抽出処理は、抽出 buffer (0.01% SDS, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteinase K, 1× PCR buffer for TaKaRa *Ex Taq*) 2 μL 中に花粉 1 粒を加え、37℃ 60 分・95℃ 10 分処理した。DNA 抽出過程有りの処理区では全反応溶液を、無しの処理区では花粉 1 粒を加え、実験と同様に Multiplex PCR を行った。

発芽時間の検討

‘西内小夏’ の花粉を使用し、花粉発芽培地でのインキュベートを、25℃ で 3, 4, 6, 8 時間および over night の 5 処理区を設けた。インキュベート後は実験と同様に DNA 抽出を行い、実験で選抜したプライマーを用いて Multiplex PCR を行った。各実験における Multiplex PCR 産物は、Applied Biosystems 3500xL Genetic analyzer で分析した後、Gene Mapper[®] v4.0 で解析した。

ヘテロ接合性遺伝様式による、非還元花粉形成過程の推定

‘西内小夏’ の花粉を花粉発芽培地 (0.04% CaCl_2 , 0.01% H_3BO_3 , 0.0007% KH_2PO_4 , 10% sucrose, 1% agar) 上に播き、25℃ で 6 時間培養した。発芽した花粉を実体顕微鏡 (SaAP0-1; Leica microsystems) 下で観察し、‘西内小夏’ 花粉に特徴的にみられる直径が 42 μm 以上の花粉で発芽しているものを選抜した。発芽している花粉を 2 μL 抽出バッファー (0.01% SDS, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proteinase K, 1× PCR *Ex Taq* buffer (TaKaRa bio)) に入れ、37℃ 60 分、95℃ 10 分処理を行った。処理溶液を用いて、Type-it[™]

Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN)で同一連鎖群上に座乗すると考えられている6つの遺伝子座(CX2040, CX3001, CX6F18, CX0029, CX0022, CX0036)(Chen et al., 2008)をターゲットにマルチプレックスPCRを行い,反応溶液をABI 3500xL ジェネティックアナライザおよびGeneMapperで解析した.各非還元花粉の6遺伝子座における遺伝子型を明らかにし,解析した全個体におけるホモ接合性とヘテロ接合性のそれぞれの個体数より,各遺伝子座でのヘテロ接合性伝達度(観測値)を算出した.次にFDRとSDRのそれぞれの場合において,ヘテロ接合性伝達度と遺伝的距離についての関係式を用いて,セントロメア位置を仮想的に0.5cMずつ移動させたときの各遺伝子座のヘテロ接合性伝達度(理論値)を算出した.各マーカーの観測値と理論値の差の二乗を算出し,6マーカーの総和をbest fit値として,これを最小にするセントロメア位置を探索し,あわせて非還元花粉形成過程を推定した.

(2) '西内小夏'花粉を用いた未熟胚の救助培養向上の検討

宮崎県宮崎市清武町十九の丘商業果樹園に植栽されている'西内小夏'および宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センターに植栽されている普通系ヒュウガナツを実験材料としてとして使用した.

植物体再生に最適なジベレリン濃度の調査

開花期に普通系×'西内小夏','西内小夏'×'西内小夏'の受粉を行い,受粉後14,15,16週目の果実を使用した.実体顕微鏡下で胚を摘出し,ジベレリン濃度の異なるMT培地(GA 0 mg·L⁻¹ (0μM),GA 0.5 mg·L⁻¹ (1.4 μM),GA 1.0 mg·L⁻¹ (2.9 μM),GA 1.5 mg·L⁻¹ (4.3 μM))に植え付けた.各週,それぞれのジベレリン濃度において約15個ずつの胚を植え付け,9月下旬に発芽率を,12月下旬に生存率を順次調査した.

発芽率は植え付けた胚のうちで,幼根や幼芽が出ているものを発芽とみなして,発芽した胚の数を調査した.なお,調査時に枯死している個体についても,発芽後に枯死したと思われる個体については,発芽個体として数えた.生存率は発芽した胚の中でその後も成長を続けている個体数を調査し,生存個体数/発芽個体数として算出した.

植物体再生に最適なサンプリング時期の検討

2014年度は5月8日に,2015年度は4月

29日から4月30日にかけて,受粉を行った.受粉組み合わせは,'西内小夏'×'西内小夏','西内小夏'×4x ナツダイダイで,'西内小夏'×ハッサクとした.受粉後,果実径を2週おきに調査した.

2014年度は,受粉後12週,15週,18週で各週数果ずつサンプリングを行った.また,受粉後15週で着果率を調査した.2015年度は,果実径が35~40 mm,40~45 mm,45~50 mmおよび50~55 mmに区分して,受粉後15週から19週の間,各処理区数果ずつサンプリングを行った.

サンプリングした果実から胚を摘出し,クリーンベンチ内に植え付けた.培地はスクロース50 g/L,寒天8 g/L,麦芽抽出物500 mg/Lを添加したMT培地(Murashige and Tucker, 1969)を基本培地とし,この基本培地にGA₃(5.0 μM)を添加した培地を初代培地として用いた.なお,培地は試験管に10 mLずつ分注し,斜面培地とした.また,植え付け後40日後に発芽率を調査し,発芽率を調査後,約40日後に二次培地(GA₃無添加)に植え替えを行い,発芽していた個体において,その後成長しているものを生存しているとみなし生存率を調査した.

(3) 非還元花粉形成関連遺伝子の単離と解析

これまでに非還元花粉形成に関連していると考えられる遺伝子(*AtPSI*, *JASON*)および減数分裂に関与していると考えられている遺伝子(*DYAD*, *OSD*, *SOLO_DANCERS*)について,Phytozomeのクレメンティンゲノムデータベースより,それぞれの最も相同性の高い遺伝子を検索し,これらの配列を元にプライマーを設計した.ヒュウガナツ普通系と'西内小夏'の葉からDNAを抽出し,設計したプライマーを元にPCRで全長を増幅し,ダイレクトシーケンシングによって断片配列を獲得した.獲得した配列はATGCソフトウェア(GENTYX Corporation)によってアセンブルして,それぞれのサンプルでコンティグを作成した.

得られた遺伝子について,FGENESHを用いてエクソン部分を予測し,それに基づき発現解析用プライマーを設計した.ヒュウガナツ普通系および'西内小夏'の花粉形成期の葯よりTotal RNAを抽出し,リアルタイムPCRによってそれぞれの発現を調査した.

4. 研究成果

(1) 非還元花粉の形成過程・遺伝的構成の解明

プライマー選抜

調査した 47 個の SSR マーカーについて、‘西内小夏’で対立遺伝子がヘテロとなっており、増幅ピークが明瞭に判別でき、同一染色体上に座乗していると考えられるマーカーを最終的に 6 個(CX2040, CX3001, CX6F18, CX0029, CX0022, CX0036)選抜した。

花粉発芽処理とDNA抽出処理の検討

花粉発芽処理とDNA抽出処理の両方を行ったときに、最も多くのSSR遺伝子座で増幅を確認できた(第1表)。全体的に花粉発芽させた処理区で多くの増幅が確認できたのは、花粉が発芽して花粉管が伸長したことで、花粉外壁が核酸抽出の障害とならずに、DNA抽出

第1表. 花粉発芽およびDNA抽出過程の有無におけるSSR遺伝子座の増幅割合(%)

		抽出過程	
		無	有
発芽過程	無	4.17	0.00
	有	14.58	47.91

が容易になったためと考えられる。これらより、花粉1粒の遺伝子型決定においては、花粉発芽と抽出bufferを用いたDNA抽出を併用することが最適であると考えられた。

発芽時間の検討

インキュベート3時間の場合には全体の約30%しか増幅が確認できなかったが、それ以降の4, 6, 8時間およびovernightの場合には、それぞれ75%, 87.5%, 62.5%, 83%と6割以上で増幅が確認できた(第2表)。

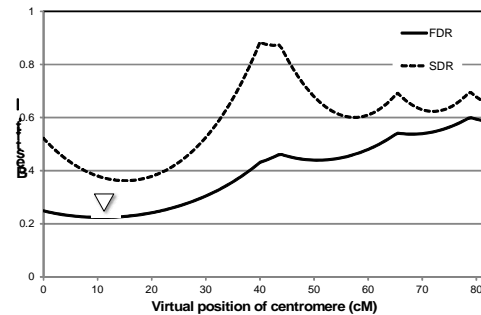
第2表 花粉発芽のインキュベート時間がPCR成功率に及ぼす影響

	Incubation time (h)				
	3	4	6	8	overnight
試験供試花粉数	8	8	9	8	9
PCR増幅成功数	2	3	6	2	5
	25%	38%	67%	25%	56%

ヘテロ接合性遺伝様式による、非還元花粉形成過程の推定

実験に供試した6つの遺伝子座(CX2040, CX3001, CX6F18, CX0029, CX0022, CX0036)におけるヘテロ接合性の伝達度はそれぞれ64.9%, 74.3%, 56.8%, 56.8%, 52.7%, 50.0%であった。次にマップ関数を用いてFDR, SDRのそれぞれにおける、セントロメア位置を仮想的に移動させたときのヘテロ接合性伝達度(理論値)を算出して、best fit値を算出したところ、FDRメカニズムを仮定し、さらにセントロメアが10.5cMの位置にあるときに最小となった(第1図)。また、セントロメア位置を

どのような値に仮定しても常にFDRのbest fit値がSDRのそれを下回ることから、本研究の結果からは‘西内小夏’の非還元花粉形成はFDRによって起こる可能性が高いと考えられた。



第1図 セントロメア位置を仮想的に移動させたときのFDRとSDRにおけるbest fit値。矢頭はbest fit値が最小の点を示している。

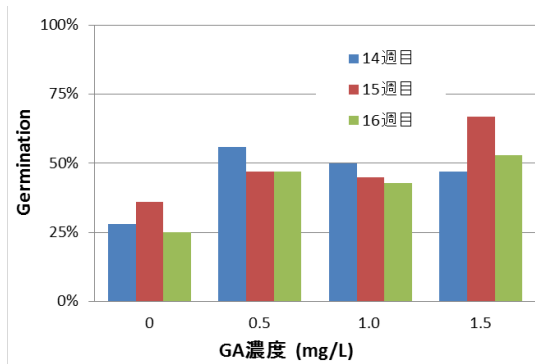
(2) ‘西内小夏’花粉を用いた未熟胚の救助培養向上の検討

植物体再生に最適なジベレリン濃度の調査

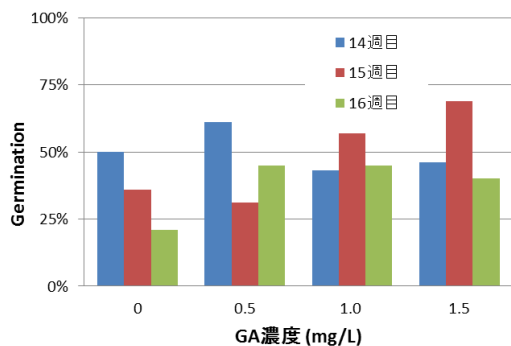
普通系×‘西内小夏’, ‘西内小夏’×‘西内小夏’の受粉後14,15,16週目にサンプリングした果実から得られた種子の胚を摘出し、ジベレリン濃度の異なるMT培地で救助培養を行い、植物体再生に最適なジベレリン濃度を調査した。

胚の発芽率は、普通系×‘西内小夏’ではジベレリン無添加の培地で25-36%であったのに対し、ジベレリン添加培地では43-67%であった。‘西内小夏’×‘西内小夏’はジベレリン無添加培地で21-50%、ジベレリン添加培地で31-69%であった。このことから、胚植え付け時にジベレリンを添加した培地を使用することが発芽率向上に効果的であると考えられた。発芽促進に最適なジベレリン濃度は、普通系×‘西内小夏’, ‘西内小夏’×‘西内小夏’共に、培地のジベレリン濃度が上昇すると発芽率が高くなる傾向がみられた(第2,3図)ことから、1.5 mg·L⁻¹以上であると思われた。一方で、発芽後の生存率は、普通系×‘西内小夏’ではジベレリン無添加培地の20-50%に対し、ジベレリン添加培地では0-33%と低く、‘西内小夏’×‘西内小夏’においても、ジベレリン無添加培地で50-67%、ジベレリン添加培地で0-55%であった。これらのことから、発芽後の植物体の成長には障害となる可能性が考えられた。以上の結果から、胚の救助培養には、植え付け時にはGA

1.5 mg·L⁻¹ (4.3 μM) を添加した培地が有効であるが、植え替え後の培地においてはジベレリンを添加しない方が生存に有効であることが明らかとなった。



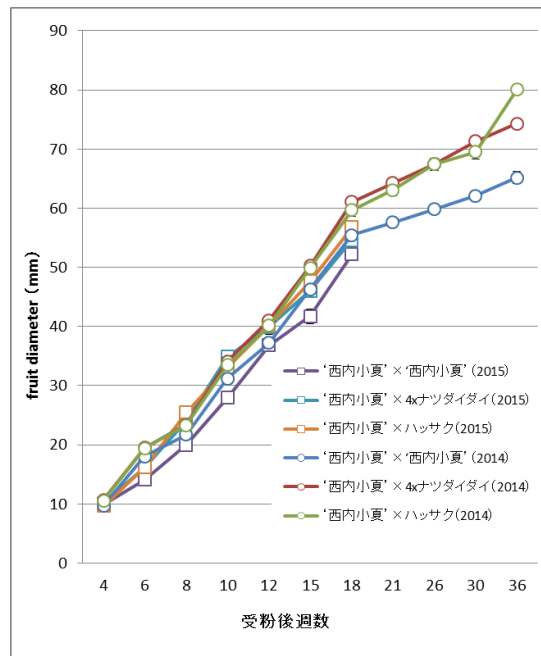
第2図 異なるGA濃度における普通系 x '西内小夏' の発芽率



第3図 異なるGA濃度における'西内小夏' x '西内小夏' の発芽率

植物体再生に最適なサンプリング時期の検討

2014年度の果実径の変化を第4図に示した。6月23日までは品種間に違いは見られなかったものの、その後、'西内小夏' x '西内小夏' の果実の成長が他の交配組み合わせの果実と比べて劣っており、10月以降その違いが顕著となった。異なるサンプリング時期での、救助培養における生存率では、受粉後15週で救助培養を行ったサンプルにおいて優れた結果を示した(第3表)。また、発芽率も考慮すると、受粉後12週から受粉後15週が胚抽出に効果的であると考えられ、この時の果実径は40~50mmであった(第4図)。よって、この大きさの果実が胚の抽出時期として適していると考えられた。なお、このときには魚雷型および心臓型の胚が観察されたが、受粉後18週では胚の退化が顕著にみられた。よって、12週から15週での魚雷型および心臓型の胚を材料に用いると救助培養効率が向上すると考えられた。



第4図 受粉後における果実径の変化(2014, 2015)

2015年度は、果実径を35~40mm, 40~45mm, 45~50mm および50~55mmと区分し、それぞれの大きさの果実から胚の抽出を行った。果実径35~40mmにおいて、胚を観察することが出来なかった。今回の実験では、40~45mm および45~50mmの果実から採取した胚において優れた発芽率を示した(第4表)。この結果は2014年度の実験と一致した。また、50mm以上の果実から採取した胚では発芽率が低下した。生存率についても同様の結果となった。

花粉親	受粉12週後		受粉15週後		受粉18週後	
	発芽率(%)	生存率(%)	発芽率(%)	生存率(%)	発芽率(%)	生存率(%)
西内小夏'	63	83	74	54	37	43
4xナツダイダイ	53	70	68	62	42	63
ハッサク	100	100	100	100	100	100

花粉親	40-45 mm		45-50 mm		50-55 mm	
	発芽率(%)	生存率(%)	発芽率(%)	生存率(%)	発芽率(%)	生存率(%)
西内小夏'	60	66	73	63	47	42
4xナツダイダイ	80	91	86	84	53	38
ハッサク	100	93	100	100	100	100

以上の結果から、2014年度では、受粉後12週から15週において最も優れた発芽率および生存率を示した一方で、2015年度では果実の成長が緩慢であり、17週以降で優れた結果を示した。しかし、果実径で見ると、2014年度および2015年度ともに40~50mmの果実から採取した胚において最も優れた結果を示した。このことから、受粉後の日数によって胚救出時期を決定するよりも果実径によって胚の救出時期を決定することが有効であることが示された。

(3) 非還元花粉形成関連遺伝子の単離と解析

SOLO_DANCERS を除く、各遺伝子について全長のコンティグを獲得することができた。*SOLO_DANCERS* については、全長は獲得できなかったが断片配列をいくつか獲得することができた。これらの遺伝子について、ヒュウガナツと‘西内小夏’の間で配列の違いは見られなかった。また、リアルタイムPCRによる発現解析においても、ヒュウガナツと‘西内小夏’の間で発現差異は確認できなかった。

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. Chitose Honsho, Aisa Sakata, Hikaru Tanaka, Shuji Ishimura and Takuya Tetsumura. 2016. Single-pollen genotyping to estimate mode of unreduced pollen formation in *Citrus tamurana* cv. Nishiuchi Konatsu. Plant Reproduction doi:10.1007/s00497-016-0277-7 査読有

2. Chitose Honsho, Kyoko Tsuruta, Kentaro Ryuto, Aisa Sakata, Shirou Kuroki, Aya Nishiwaki and Takuya Tetsumura. 2015. Characterization of seed and embryo abortion during fruit development in citrus cultivars pollinated by ‘Nishiuchi Konatsu’ (*Citrus tamurana*) and a preliminary trial of embryo rescue in aborting embryos. Acta Horticulturae 1065: 181-186. doi: 10.17660/ActaHortic.2015.1065.18 査読有

3. Honsho, Chitose, Eri Yamamura, Kyoko Tsuruta, Yukako Yoshimaru, Kiichi Yasuda, Asuka Uchida, Hisato Kunitake and Takuya Tetsumura. 2012. Unreduced 2n pollen production in ‘Nishiuchi Konatsu’ Hyuganatsu as inferred by pollen characteristics and progeny ploidy level. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 81: 19-26. doi: 10.2503/jjshs1.81.19 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1. 本勝千歳・坂田秋沙・田中ひかる・石村修司・鉄村琢哉. 花粉一粒の遺伝子型解析によるヒュウガナツ‘西内小夏’非還元花粉形成過程の推測. 園学研 14 別 2. 82. 園芸学会平成 27 年度秋季大会. 徳島大学(徳島県徳島市) 2015 年 9 月 26 日

2. Honsho, Chitose, Aisa Sakata, Hikaru Tanaka, Shuji Ishimura, Takuya Tetsumura. Application of single pollen genotyping for assessing the mode of unreduced pollen formation of ‘Nishiuchi Konatsu’ (*Citrus tamurana* hort. ex Tanaka). The third international symposium on Citrus biotechnology. Shizuoka (Japan). 2014. Nov. 13.

3. 坂田秋沙・佐藤マリナ・石村修司・鉄村琢哉・本勝千歳. ヒュウガナツの単一花粉粒の遺伝子型決定に関する基礎的研究. 園学研 12 別 2. 264. 園芸学会平成 25 年度秋季大会. 岩手大学(岩手県盛岡市) 2013 年 9 月 21 日

4. Honsho C., Tsuruta K., Ryuto K., Sakata A., Kuroko S., Nishiwaki A., Tetsumura T. Characterization of seed and embryo abortion during fruit development in several citrus cultivars pollinated by ‘Nishiuchi Konatsu’ (*Citrus tamurana*) and preliminary trial of embryo rescue of aborting embryos. P.30. XII International Citrus Congress, Valencia (Spain). 2012. Nov. 20.

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

本勝 千歳 (HONSHO, Chitose)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：30381057