

機関番号 : 18001

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20580020

研究課題名 (和文) ツツジ属植物における葉緑体ゲノム父性遺伝機構の細胞学および遺伝学的解明

研究課題名 (英文) Cytological and genetic clarification of paternal inheritance of chloroplast genome in *Rhododendron*.

研究代表者

嬉野 健次 (URESHINO KENJI)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号 : 10333759

研究成果の概要 (和文) : ツツジ属植物における葉緑体 DNA の遺伝性を支配している要因を解明するため葉緑体ゲノム内の *trnL-trnF* 遺伝子間領域について PCR-SSCP 法を用いて解析を行った。まず、オオシマツツジ(F タイプ)とオオヤマツツジ(S タイプ)との正逆交配で得られた F1 実生について解析を行ったところ、以前の報告と同様、オオヤマツツジを種子親にした交配では、葉緑体 DNA が父性遺伝している F1 実生の出現頻度が高かったが、その逆交配では低かった。次に、上記のオオシマツツジとオオヤマツツジとの交配で得られた F1 個体群を種子親にしてタイワンヤマツツジ(F タイプ)と交配したところ、後代における父性遺伝の出現頻度は、種子親の F1 個体群がすべてオオシマツツジ由来(F タイプ)の葉緑体ゲノムを持つ交配間で母性遺伝>> 父性遺伝 ≈ 両性遺伝, 母性遺伝 ≈ 父性遺伝 >> 両性遺伝, および母性遺伝 << 父性遺伝>> 両性遺伝の 3 つのタイプに分離した。また、種子親の F1 個体群がすべてオオヤマツツジ由来(S タイプ)の葉緑体ゲノムを持つ交配間でも同様に分離した。以上の結果より、葉緑体 DNA の遺伝性には、葉緑体ゲノム自身ではなく、核ゲノムが関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文) : The genetic factor controlling the mode of plastid DNA (ptDNA) inheritance in *Rhododendron* was investigated using polymerase chain reaction–single-stranded conformation polymorphism analysis at the *trnL-trnF* intergeneric region. When the reciprocal cross between *R. kaempferi* var. *macrogemma* (MCR) (F type) and *R. transiens* (TRA) (S type) was conducted, a high frequency of paternal ptDNA inheritance was observed in S × F and a low frequency of paternal ptDNA was observed in the reverse cross, as reported previously. When F<sub>1</sub> plants from the cross between MCR and TRA were used as seed parents and crossed with *R. simsii* (SIM) (another F-type species), the pattern of ptDNA inheritance was segregated into 3 types: maternal >> paternal ≈ biparental, maternal ≈ paternal >> biparental, and maternal << paternal >> biparental. This segregation occurred among the cross combinations even though the seed parents and MCR had identical ptDNA. From these results, we conclude that the mode of ptDNA inheritance is controlled mainly by the maternal nuclear gene(s).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：花卉園芸学

科研費の分科・細目：農学・園芸・造園学

キーワード：花卉，ツツジ，ptDNA

1. 研究開始当初の背景

(1) ツツジの園芸品種群の成立

日本には、およそ 40 種のツツジ属植物が自生する。園芸品種群として、クルメツツジ、キリシマツツジ、ヒラドツツジ、リュウキュウツツジなどが成立している。

花色は白、桃～赤紫、花型は小輪、中輪、大輪、二重咲、八重咲、しべ咲きなど多種多様な品種が存在するが、これらは、主に、ツツジ亜属ヤマツツジ列に属する常緑性ツツジ種間の自然および人工交雑（種間交雑）による。

(2) ツツジの育種目標

ツツジの育種目標として、花色では黄色および青色が、また、芳香性があげられる。このうち、黄色に関しては Pentanthera 亜属の落葉性種キレンゲツツジが、芳香性に関しては同亜属の落葉性種ニオイツツジがそれぞれの形質を有しており、有用な育種素材とされている。

(3) 遠縁交雑における問題点

ツツジ亜属と Pentanthera 亜属間のような遠縁交雑では、アルビノ実生出現がもっとも重大な問題である。常緑性ツツジ種とキレンゲツツジとの交配の場合、一側交雑不和合性により常緑性ツツジを種子親とした場合のみしか実生が得られず、得られた実生もほとんどがアルビノ実生である。

(4) アルビノ実生の出現について

アルビノ実生は、母性遺伝した常緑性ツツジ由来の葉緑体ゲノムとキレンゲツツジ由来の核ゲノム間での不和合性により生じる。

葉緑体ゲノムが父性遺伝したキレンゲツツジ由来のときは、緑色実生

となる。

しかしながら、ツツジの葉緑体ゲノムは、高い割合で母性遺伝する。

すなわち、葉緑体ゲノムを高い割合で父性遺伝させることができれば、効率的に緑色実生を獲得できる。

(5) ツツジにおける葉緑体ゲノムの遺伝

常緑性ツツジ 7 種（いずれも交雑親和性が高いもの）を用いた総当たり交配を行い、次のことを明らかにしている。

① 父性遺伝の頻度は、交配組み合わせにより異なるが、常緑性ツツジ種を 3 つのグループに分類できる。F(Fast multiplication)グループ、M(middle multiplication)グループ、S(Slow multiplication)グループ。

② F(種子親)×M、S(花粉親)のグループ間交配では、ほとんど母性遺伝のみ。S(種子親)×M、F(花粉親)のグループ間交配では、父性遺伝の頻度が高くなる。

すなわち、同じ個体の花粉を用いても、種子親が異なれば、花粉親由来の葉緑体ゲノム（父性遺伝）をもつ実生の出現頻度が異なる。

2. 研究の目的

本研究では、ツツジにおける葉緑体ゲノムの父性遺伝の機構を、遺伝学的、細胞学的に明らかにすることを目的とする。細胞学的機構として、細胞学的観察により選択的消化を受ける時期を解明する。遺伝学的機構の解明として、父性遺伝には、種子親の影響を強く受けることから、種子親の核もしくは葉緑体ゲノムのどちらかに花粉親側の葉緑体ゲノムを選択的に消化する遺伝子が存在すると考えられる。そこで、核置換系統（葉緑体ゲノムは同一で核ゲノムを置換した系統）および葉緑体置換系統を用いた

交配で得られた実生の遺伝性を明らかにすることで、遺伝機構を解明した。さらに、Bulk 法による遺伝子の探索を試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) F<sub>1</sub> 世代における葉緑体 DNA の遺伝性

ツツジ属ヤマツツジ列に属する常緑性ツツジから、葉緑体 DNA の複製速度が遅いタイプ (S type) としてオオヤマツツジ (*R. transiens*) (以下 TRA1) 1 個体 (Fig. 1-1. A), 複製速度が速いタイプ (F type) としてタイワンヤマツツジ (*R. simsii*) (SIM1) 1 個体, およびオオシマツツジ (*R. kaempferi* var. *macrogyemma*) (MCR1, 2) 2 個体の計 3 種 4 個体を用いて交配を行なった。

播種 90 日後に発芽率を調査し、得られた実生について PCR-SSCP 法により葉緑体 DNA の遺伝性を調査した。PCR-SSCP 法は、タバコ葉緑体 DNA の塩基配列をもとに設計されたプライマーを用いて *trnL-trnF* 遺伝子間領域について調査した。

#### (2) BC<sub>1</sub> 世代における葉緑体 DNA の遺伝性

S type のオオヤマツツジ 1 系統 (TRA1) と F type のオオシマツツジ 2 系統 (MCR1, 2) との間での正逆交配で得られた F<sub>1</sub> 実生を種子親に用い、葉緑体 DNA の増殖速度が F type のタイワンヤマツツジ (SIM1) 1 系統に交配した。交配で得られた実生を前述の PCR-SSCP 法により葉緑体 DNA の遺伝性を調査した。

#### (3) Bulk 法を用いた葉緑体ゲノム複製速度に関する遺伝子の探索

前述の F<sub>1</sub> 実生について、父性遺伝の出現頻度により 3 つの集団に分類し、核集団における特異的な DNA 増幅断片を RAPD 法により探索した。RAPD 反応には 12mer ランダムプライマー 100 種 (ベックマン社) を用いた。

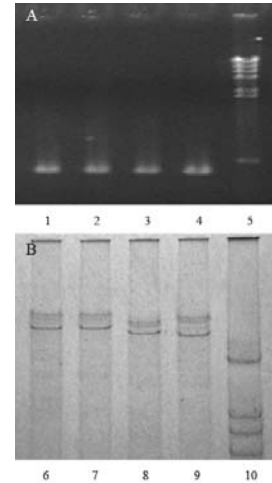
### 4. 研究成果

#### (1) F<sub>1</sub> 世代における葉緑体 DNA の遺伝性

*trnL-trnF* 遺伝子間領域における PCR 増幅産物について、アガロースゲルを用いて電気泳動を行ったところ、いずれも同じ 1 本のバンドパターンを示したが (Fig. 1A), SSCP 法による分析では異なるバンドパターンを示した (Fig. 1B)。F<sub>1</sub> 実生における葉緑体 DNA の遺伝性について、いずれの交配でも母性遺伝の出現頻度が高かった (Table 1)。一方、父性遺伝の出現頻度は交配組み合わせにより異なり、F タイプ×S タイプの交配では 0~7.1%と低かったのに対し、その逆交配では 17.1~33.3%と高かった。F タイプ×F タイプの交配では、MCR

を種子親にした交配で父性遺伝がみられたが、その逆交配では見られなかった。

後述の実験で種子親に用いた F<sub>1</sub> 実生の交配親を種子親にして SIM1 と交配した場合、その後代の父性遺伝の頻度は MCR1 × SIM1 で 2.2%, MCR2 × SIM1 で 33.3%, TRA1 × SIM1 で 33.3%であった。



**Fig. 1** Banding patterns of PCR products (A) amplified for *trnL-trnF* region and the SSCP polymorphism (B) of cross parents. Lanes 1 and 6, MCR1; Lanes 2 and 7, MCR2; Lanes 3 and 8, TRA1; Lanes 4 and 9, SIM1; Lane 5,  $\lambda$  HindIII, Lane 10: ladder marker.

**Table 1** ptDNA inheritance of F<sub>1</sub> progenies from interspecific crosses of *Rhododendron*

Cross combination	ptDNA type of seed parent	No. of progenies tested	ptDNA inheritance in progenies <sup>2</sup>			Frequency of paternal ptDNA <sup>3</sup> (%)
			M	P	B	
<b>(F×S)</b>						
MCR1 × TRA1	MCR	29	29	0	0	0.0
MCR2 × TRA1	MCR	36	35	1	0	2.8
SIM1 × TRA1	SIM	28	26	2	0	7.1
<b>(S×F)</b>						
TRA1 × MCR1	TRA	41	34	5	2	17.1
TRA1 × MCR2	TRA	44	33	9	2	25.0
TRA1 × SIM1	TRA	33	22	11	0	33.3
<b>(F×F)</b>						
MCR1 × SIM1	MCR	45	44	1	0	2.2
MCR2 × SIM1	MCR	54	36	14	4	33.3
SIM1 × MCR1	SIM	39	39	0	0	0.0
SIM1 × MCR2	SIM	25	25	0	0	0.0

<sup>1</sup> M, maternal ptDNA; P, paternal ptDNA; B, biparental ptDNA

<sup>2</sup> Including progenies with both paternal and biparental ptDNA

#### (2) BC<sub>1</sub> 世代における葉緑体 DNA の遺伝性

(MCR1 × TRA1) × SIM1 の交配で、種子親の F<sub>1</sub> 個体と同じ MCR1 由来の葉緑体ゲノムをもつにもかかわらず、父性遺伝の頻度は交配組み合わせにより分離し (Table 2), 父性遺伝の頻度が 6.6~7.7%と低いものが 2 組合せ, 94.4%と高いものが 1 組合せ, 35.8~54.6%と中間のものが 3 組合せであった。次に、(TRA1 × MCR2) × SIM1 の交配では、種子親に用いた 3 つの F<sub>1</sub> 実生が MCR2 由来の葉緑体ゲノムを持っていたが、これらを SIM1 と交配した後代で、父性遺伝の頻度が 5.6%, 64.2%, 72.2%に分離した。

また、6つのF<sub>1</sub>実生はTRA1由来の葉緑体ゲノムを持っていたが、これらをSIM1と交配した後代で、父性遺伝の頻度が0~12.9%と低いものが2組合せ、73.3~88.2%と高いものが3組み合わせ、62.9%と中間のものが1組み合わせ観察された。

以上の結果より、葉緑体ゲノムの遺伝性は、種子親の葉緑体ゲノム自身により決定されるのではなく、核ゲノムにより支配されていることが明らかとなった。

Table 2 ptDNA inheritance in progenies from intrasubgeneric crosses of F<sub>1</sub> plants × *Rhododendron simsii*

Cross combination	ptDNA type of seed parent	No. of progenies tested	ptDNA inheritance in progenies <sup>a</sup>			Frequency of paternal ptDNA <sup>b</sup> (%)
			M	P	B	
<b>(F × S) × F</b>						
(MCR1 × TRA1)-1 × SIM1	MCR	45	42	0	3	6.7
(MCR1 × TRA1)-2 × SIM1	MCR	39	36	2	1	7.7
(MCR1 × TRA1)-3 × SIM1	MCR	53	34	18	1	35.8
(MCR1 × TRA1)-4 × SIM1	MCR	35	16	14	5	54.3
(MCR1 × TRA1)-5 × SIM1	MCR	44	20	22	2	54.5
(MCR1 × TRA1)-6 × SIM1	MCR	36	2	33	1	94.4
<b>(S × F) × F</b>						
(TRA1 × MCR2)-1 × SIM1	MCR	36	34	1	1	5.6
(TRA1 × MCR2)-2 × SIM1	MCR	53	19	32	2	64.2
(TRA1 × MCR2)-3 × SIM1	MCR	36	10	25	1	72.2
(TRA1 × MCR2)-4 × SIM1	TRA	51	6	45	0	88.2
(TRA1 × MCR2)-5 × SIM1	TRA/MCR	30	8	18	4	73.3
(TRA1 × MCR2)-6 × SIM1	TRA	35	13	18	4	62.9
(TRA1 × MCR2)-7 × SIM1	TRA	9	9	0	0	0
(TRA1 × MCR2)-8 × SIM1	TRA	31	27	4	0	12.9
(TRA1 × MCR2)-9 × SIM1	TRA	13	2	10	1	84.6

<sup>a</sup>M, maternal ptDNA; P, paternal ptDNA; B, biparental ptDNA

<sup>b</sup>Including progenies with both paternal and biparental ptDNA

### (3) Bulk 法を用いた葉緑体ゲノム複製速度に關与する遺伝子の探索

前述の実験で種子親として供試したF<sub>1</sub> 個体について、後代の父性遺伝頻度の結果より、低頻度集団(20%以下)、中頻度集団(50%前後)、高頻度集団(80%以上)の3つの集団に分類し、各集団において特異的に出現するRAPD マーカーの探索を試みた。100種類のランダムプライマーを用いて解析したところ、B06 およびC10 の2つのプライマーにおいて集団特異的に出現するバンドが検出された(Fig. 2)。B06 では、1969 および743bp の2本のバンドが低頻度および中頻度集団に特異的に検出され、905 および788bp のバンドが高頻度集団に特異的に検出された。また、C10 では、1777bp のバンドが低頻度および中頻度集団に特異的に検出され、1472bp のバンドが高頻度および中頻度集団に特異的に検出された。これらのバンドは、父性遺伝に關与する遺伝子もしくはその遺伝子に連鎖するマーカーの可能性のあることから、今後、これらのバンドの塩基配列を解読する予定である。

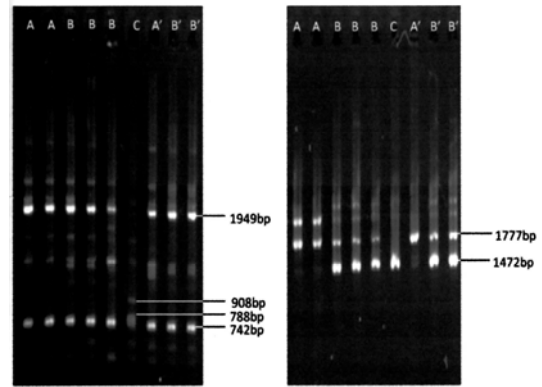


Fig. 2 RAPD markers detecting polymorphisms among bulks. Left: B06, Right: C10.

A and A': paternal inheritance was less than 20%.

B and B': paternal inheritance was around 50%

C: paternal inheritance was more than 80%..

## 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 3 件)

① 嬉野健次, 島袋裕也, 赤羽 勝, 常緑性ツツジとキレンゲツツジとの交配で得られたF<sub>1</sub> 実生に常緑性ツツジを戻し交配した時のBC<sub>1</sub> 実生の形質, 園芸学会秋季大会, 2010年9月20日, 大分大学.

② 赤嶺さつき, 嬉野健次, 安谷屋信一, ツツジ属植物における葉緑体DNA父性遺伝機構の遺伝学的解明, 園芸学会秋季大会, 2009年9月27日, 秋田大学.

③ 嬉野健次, 阿部 翼, 常緑性ツツジとキレンゲツツジとの同および異倍数体間交配における緑色実生出現頻度の差異について, 園芸学会秋季大会, 2008年9月28日, 三重大学.

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

嬉野 健次 (URESHINO KENJI)  
琉球大学・農学部・准教授  
研究者番号：10333759

### (2) 研究分担者

なし  
( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし  
( )

研究者番号：