

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24年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380027

研究課題名（和文） 幼樹開花を用いたカンキツ自家不和合性関連遺伝子の迅速探索とその分子機構

研究課題名（英文） Quick search for genes related to self-incompatibility in Citrus and its molecular regulation mechanism

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（和文）：

自家不和合性カンキツに蓄自家受粉を行って遺伝子型がホモである 8 種類の実生群 ($S_1S_1, S_2S_2, \dots, S_{11}S_{11}$) を作出し、これらの花粉を多数のカンキツに授粉して、 S_1 から S_{11} までの不和合性対立遺伝子を持つ品種群を明らかにした。ハッサク (S_4S_5) やウンシュウミカン (S_7S_4) が S_4 対立遺伝子を持つクネンボの雑種であることが分かった。交配後 1 年で幼樹開花した実生の不和合性と和合性を基に、S 遺伝子と連鎖する DNA マーカーを決定したが、S 遺伝子のクローニングはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

We carried out self-pollination with young buds of citrus cultivars to produce eight groups of S_1 seedlings homozygous for self-incompatibility gene ($S_1S_1, S_2S_2, \dots, S_{11}S_{11}$), and identified many cultivars with one of the eight S alleles by pollination with these homozygous seedlings. It was found that Hassaku (S_4S_5) and Satsuma mandarin (S_7S_4) are the hybrids of Kunenbo with S_4 allele. With precociously flowered hybrid seedlings showing self-compatibility and incompatibility, DNA markers for S gene were determined, but cloning of the S gene was not successful.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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，自家不和合性遺伝子，S 遺伝子型

1. 研究開始当初の背景

(1) 不和合性の遺伝

カンキツにおける自家不和合性は古くから比較的多数のカンキツ品種で知られていたが、初期の自家不和合性研究は結果率と果実肥

大を向上させるための最適な受粉樹の決定に主眼が置かれていた。Soost (1965 1969) はグレープフルーツなどを用いた交配から得た雑種実生群において自家不和合性個体と自家和合性個体が分離することを基に、カンキツの

自家不和合性が配偶子型自家不和合性であること、複対立遺伝子(*Sn*)の発現には優劣がなくて共優性であること、および自家和合性を支配する対立遺伝子(*Sn*)が有ればヘテロ(*SnSn*)で自家和合(正確には半自家和合)を示すこと、研究に用いたグレープフルーツは半自家和合の遺伝子型(*SnSn*)を持つことを明らかにした。最近、ウンシュウミカンが後代に自家不和合性個体を分離することから、半自家和合性(*SnSn*)であることが報告されている(Valdi et al., 2000)。しかし、カンキツでは交配から得た交雑実生の開花までには長い年月を要するために、*S*対立遺伝子変異に関する遺伝解析は、これら以外の報告がなく、いまだ良く分かっていない。

(2) 不和合性品種

カンキツの自家不和合性品種については、申請者らを含めて、現在までに多くの研究報告がなされた(Binh et al., 2001; Yamamoto et al., 2007 など)。これらによればブントン品種はすべて自家不和合性であり、ミカン品種では九年母、シークワシャ、クレメンティン、ダンシータンジェリンなど、雑柑類ではヒューガナツやハッサク、タンゼロ・タンゴール類ではオーランドやミネオラなどが自家不和合性であった。これらの結果は、パペダ類、シトロン類、ライム類を除けば、カンキツ類の多くの品種・個体が自家不和合性対立遺伝子*Sn*をホモまたはヘテロで保有する可能性を示唆し、対立遺伝子変異がかなり大きいことを示唆している。

(3) 分子マーカー(標識遺伝子)を用いた解析

申請者らはグルタミンオキザロ酢酸アミノ転位酵素(GOT)のアイソザイムを支配する2遺伝子(*Got-3*と*Got-1*)の複対立遺伝子によって作られるアロザイムが一部の交配では雑種実生群において歪み分離する(すなわち、連鎖している)ことに着目した。約80組合せの交配を行って交雑種子を得、発芽後すぐの発芽胚、または、数葉を展開した後の葉を供試して、GOTアイソザイム分析を行い、各雑種実生群における歪み分離からこれらの交配親の自家不和合性遺伝子型を推定した(Wakana et al., 1998)。その結果、自家不和合性に関する8つの複対立遺伝子の存在を予測し、10品種の*S*遺伝子型を推定した。しかし、この方法は分析に多大な時間を要するのが欠点であった。

(4) 幼樹開花性の利用

幼樹開花は秋に播種した種子が発芽した後10-20°Cの低温条件に数カ月間遭遇した後、茎頂に単生花が着き、その後5-10年間花が着か

ない一過性の現象である(Furr et al., Amer.J.Bot., 34:1-9,1947)。初秋に1年生実生を基部まで切り戻して腋芽を発芽・生長させて10葉程度の新梢とすれば2年目の春にも開花させることができる(Iwamasa and Oba, 1972)。申請者らは胚発芽能力(成熟度)、幼樹開花を促進する温度条件、幼樹開花性を示す品種・個体を詳細に調査し(Wakana et al., 2004.など)、最も効率的な幼樹開花促進法を確立した。これらの花を自家受粉して花粉管の行動を観察することにより、自家不和合性を直に判定できる。

(5) *S*遺伝子型がホモの個体群の利用

申請者らは6年前6つの自家不和合性品種(晩白柚、ハッサク、ヒューガナツ、クレメンティン、エレンデールマンダリン、平戸ブントン)に蓄受粉を行って自家交雑実生(*S1*)を作出した(Wakana et al., 2004)。ヒューガナツ*S1*間の交配やヒューガナツの戻し交配により*S*対立遺伝子型がホモである*S1*実生群を同定した(金ら, 2008)。これらはヒューガナツの*S*遺伝子型を*SxSy*とすれば、*SxSx*または*SySy*となり、*Sx*または*Sy*を持つ品種との交配では不和合性を示すことから、*Sx*または*Sy*を持つ品種・個体が同定できるはずである。このことは他の5つの自家不和合性品種の*S1*実生についても同様である。

2. 研究の目的

カンキツの自家不和合性はブントン類や雑柑類を中心に良く知られており、無核品種の育種に有効な形質である。しかし、カンキツは初結果までの交雑実生の幼若期間が5年から10年以上と著しく長く、しかも、多胚性品種が多くて交雑実生を得ることが困難な場合が多い(Cameron & Soost, 1968)。これらの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。このため、自家不和合性に関しても自家不和合遺伝子の数、その複対立遺伝子変異、品種の自家不和合遺伝子型が不明である。そこで本研究では、幼樹開花性、自家不和合性遺伝子型がホモである自家交雑実生群、自家不和合遺伝子の標識遺伝子(分子マーカー)を探索・駆使して効率的に短期間に遺伝解析を行い、自家不和合遺伝子の数、その複対立遺伝子変異および主要品種の自家不和合遺伝子型を明らかにすると共に、遺伝子地図を作成する。さらにこれらの情報を基に、カンキツの自家不和合性反応の分子機構をmRNA(遺伝子)と産物(不和合関連タンパク・酵素)の双方向から追究し解明する。以上の結果を基に、不和合性の進化、*S*遺伝子型の早期診断法および不和合性を利用した無核品種育種の新展開を図る。

3. 研究の方法

本研究はカンキツに広くまた大きな遺伝的多様性をもって存在することが予想される自家不和合性のメカニズムを解明するために、まず、グレープフルーツ (S_nS_f) の花粉を様々な単胚品種に交配して作出した幼樹開花雑種実生群に自家受粉を行って花粉管の行動を観察し、自家和合と自家不和合個体の分離を基に単胚品種の遺伝子型 (仮の推定) や不和合性遺伝子の数を決定する。さらに、これらの分離個体の GOT アイソザイム分析や DNA の分析を行い、自家不和合遺伝子と連鎖するマーカーを選抜して連鎖地図を構築する。一方、すでに作出しているホモの S1 個体 (12 種類) を多胚性や単胚性の多数の品種に交配し、半自家和合品種を同定すると共に、12 種類のそれぞれと共通の S 対立遺伝子を持つ品種・個体を豊富な遺伝資源を用いて探索し、その頻度から S 対立遺伝子の多様性程度 (頻度) を推定する。次に、自家不和合性反応が花蕾の発達段階の特定の時期から始まること (Wakana et al., 2005) からその時期の前後に花蕾から花柱を採取し、mRNA とタンパク (RNase など) を抽出し、不和合反応を持つ花柱に特異的な mRNA (cDNA を合成して PCR 増幅) とタンパクを探索する。特異的な mRNA (cDNA) は配列を決定して類似遺伝子を検索する。以上の結果から、カンキツにおける自家不和合性の進化とメカニズムを明かにすると共に、主要品種の自家不和合性遺伝子型を明かにして、育種の効率化を図る。

(1) 交雑実生の幼樹開花を利用した自家不和合性の解析

幼樹開花関連遺伝子 (群) を持ち半自家和合性であるフォスターピンクグレープフルーツ (S_nS_f) を 100 品種・個体に交配し、10 月にそれぞれ 500 から 1000 種子を採取して種皮を取り除き、胚を 25°C で発芽させて得られた交雑胚実生を幼樹開花最適条件で生育させる (切り戻して 2 年連続開花させ、2 反復する)。開花直前の実生に袋掛けを施して、開花日に自家授粉処理を行い、授粉後 7 日目に花柱を採取して酢酸アルコール液で固定する。固定した花柱の基部を切り取り、水酸化ナトリウム水溶液で軟化した後、アニリンブルー溶液で染色し、花柱基部に到達している花粉管の本数を蛍光顕微鏡下で調査する。

花柱基部における花粉管が 0 本または極少数である場合を自家不和合性、多数の花粉管がある場合を自家和合性とする。このグレープフルーツ (GF) を交配する場合の自家和合性雑種実生と不和合性雑種実生の分離は以下の 5 つのいずれかである: (1) 自家不和合性品種 ($S_n'S_n'$) × GF(S_nS_f) では自家不和合 (S_nS_n' と S_nS_n'): 自家和合 (S_fS_n' と S_fS_n') = 1:1, (2) 1 つの共通な S 対立遺伝子 S_n を持つ自家不和合性品種 (S_nS_n') × GF(S_nS_f)

では自家不和合 (無し): 自家和合 (S_nS_f と S_fS_n') = 0:1, (3) 半自家和合性品種 ($S_n'S_n'$) × GF(S_nS_f) では自家和合 (S_nS_f と S_fS_n') と S_fS_n' : 自家不和合 (S_nS_n') = 3:1, (4) 1 つの共通な S 対立遺伝子 S_n を持つ半自家和合性品種 (S_nS_f) × GF(S_nS_f) では自家和合 (S_nS_f と S_fS_n'): 自家不和合 (無し) = 1:0, (5) 自 GF(S_nS_f) では自家和合 (S_nS_f と S_fS_n'): 自家不和合 (無し) = 1:0 となるはずである。以上の結果を基に、ターゲット品種がグレープフルーツと共通した対立遺伝子を持つのかどうか、半自家和合 (ヘテロ) であるのかどうかを明らかにする。結果を学会で発表し、研究の進展を図る。

(2) ホモの個体群を用いた S 対立遺伝子の探索・同定

6 年前に自家不和合性の 6 品種に蕾受粉を行って自家交雑実生を育成した。開花し始めているこれらの実生群に親品種を戻し交配し、花粉管の伸長が阻害されない交配和合実生 (S 遺伝子型がホモ) を同定し、さらにホモの実生間の交配を行って花粉管の行動を調査し、2 種類のホモ実生をそれぞれ決定する。これらの結果を基に不和合性の遺伝が一遺伝子支配であるのかどうかを χ^2 検定する。また、6 品種の自家交配実生群で識別した S 対立遺伝子型がホモである実生花粉をそれぞれ 100 品種に授粉して 7 日後にそれぞれ 5 花柱を採取して前述の方法により花柱基部の花粉管数を調査し、S 対立遺伝子のいずれかを持つ (花粉管伸長が阻害される) 品種を探索する。この方法は単胚性カンキツのみならず、多胚性カンキツの半自家和合性品種・個体の S 対立遺伝子の探索に優れている。結果は学会発表して批評を得、研究の進展を図る。

(3) 分子マーカーの探索と連鎖地図の作成

この研究は時間を要するためにポストドクを採用する。1 の研究において自家和合性と不和合性が分離した個体群から自家和合性と不和合性個体をそれぞれ 100 個体選び、これらの葉を供試して、DNA を抽出後常法に従って DNA 分析を行う。得られたデータと自家不和合性形質の相関を調べる; 相関が得られれば自家不和合性遺伝子の近くに位置するマーカーが得られたことになる。さらに、これらの DNA マーカーによる連鎖地図の作成を進める。結果は学会発表して批評を得、研究の進展を図る。

(4) S 遺伝子関連 mRNA とタンパクの探索

時間を要するためにポストドクを採用する。自家不和合性反応が花蕾の発達段階の特定のステージ (蕾長が開花前の蕾の二分の一: 'クレメンティン' で 8mm) から始まること (Wakana et al., 2005) からその前後の 'クレメンティン' や 'ヒューガナツ' の花蕾か

ら花柱を採取し、mRNA を抽出し、cDNA を合成してこれを鋳型として PCR 行う。PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動して分離し、不和合反応を持つ花柱に特異的に見い出される PCR 増幅断片を調査する（ディフュゼンシャルディスプレイ法）。この作業は3反復し、安定した候補断片を決定する。次に、候補断片をゲルから切り出し、クローニングし、配列を決定する。また、花蕾の発達段階の特定の時期の前後に花蕾から花柱を採取し、タンパク（RNase など）を抽出し、不和合反応を持つ花柱に特異的なタンパクを電気泳動して比較探索する。特異的なタンパクは精製し、分子の大きさを推定する。

4. 研究成果

(1) 交雑実生の幼樹開花を利用した自家不和合性の解析

フォスターピンクグレープフルーツ (*SnSf*) を約 100 品種・個体に授粉し、それぞれ 100 から 1000 の交雑胚実生を得た。幼樹開花率は 0.0% から 17% であった。これらの実生に自家授粉処理を行って花柱基部における花粉管の伸長阻害を調査した結果、自家不和合性であるブンタン品種群や自家不和合性品種群（河内晩柑など）では自家和合と自家不和合が 1:1 に分離した。自家和合性であるイヨカンでは 3:1 に分離し、雄性不稔である‘清見’でも 3:1 に分離したことから、イヨカンと‘清見’は半自家和合 (*SnSf*) であることが分かった。他の交雑実生群では幼樹開花実生数が少なく、遺伝分析をおこなえなかった。

(2) ホモの個体群を用いた S 対立遺伝子の探索・同定

蕾自家受粉を行って高接ぎ育成し、開花が始まった実生群に親品種を戻し授粉し、花粉管の伸長が阻害されない交配和合 S1 実生 (S 遺伝子型がホモ) を同定し、さらにホモの実生間の交配を行って、2 種類のホモ実生をそれぞれの S1 実生群で決定した。ホモとヘテロの自家不和合性分離 (ホモ:ヘテロ:ホモ=1:1:1) から不和合性の遺伝は一遺伝子支配であることを確認した。S 対立遺伝子型がホモ (*S1S1*, *S2S2*, *S3S3*, *S4S4*, *S5S5*, *S9S9*, *S10S10* および *S11S11*) である実生花粉 (*S1*, *S2*, *S3*, *S4*, *S5*, *S9*, *S10* および *S11*) をそれぞれ約 100 品種に授粉して花柱基部の花粉管数を調査した結果、*S1* 対立遺伝子を持つ品種は 29.9%, *S2* 対立遺伝子を持つ品種は 21.3%, *S3* 対立遺伝子を持つ品種は 16.4%, *S4* 対立遺伝子を持つ品種は 19.4%, *S5* 対立遺伝子を持つ品種は 6.9%, *S9* 対立遺伝子を持つ品種は 11.1%, *S10* 対立遺伝子を持つ品種は 00.0%, *S11* 対立遺伝子を持つ品種は 24.6% であった。また *Sf* を除いた S 対立遺伝子頻度は *S1* 対立遺伝子が 21.3%, *S2* 対立遺伝子が 11.6%, *S3* 対立遺伝子が

11.1%, *S4* 対立遺伝子が 12.5%, *S5* 対立遺伝子が 5.8%, *S9* 対立遺伝子が 5.7%, *S10* 対立遺伝子が 6.2%, *S11* 対立遺伝子が 3.8% であった。本研究によって決定された主要なカンキツ品種の S 遺伝子型は晩白柚 (*S1S2*)、土佐文旦 (*S1S3*)、ハッサク (*S4S5*)、スイートスプリング (*S5S5*)、ウンシュウミカン (*S5S4*)、キヌカワ (*S5S2*)、ナツダイダイ (*S5S2*)、カオパン (*S1S2*)、平戸ブンタン (*S9S10*)、カブス (*S5S9*)、クレメンティン (*S3S11*) などである。また、S 遺伝子型の決定はできなかったが、スイートオレンジと清見が同じ半自家不和合性遺伝子型を持つこと等々、S 遺伝子型決定のための多くの基礎情報を得ている。本研究で特に興味深い品種分化 (進化) に関する結果はクネンボが *S4* 対立遺伝子の特異的に持っており (その起源は東南アジアのブンタンが持つ *S4* にあることが示唆された)、クネンボがタチバナなどの様々な在来カンキツと交雑することにより日本独自の品種群を生み出したことが明らかになってきたことである。

(3) 分子マーカーの探索と連鎖地図の作成

河内晩柑×グレープフルーツから得た幼樹開花実生群において、1:1 に分離した自家和合性と不和合性実生をそれぞれ 10 個体選び、これらをバルクし、DNA を抽出し、RAPD 分析を行って、自家不和合性実生に特異的に見られる DNA 断片 (S 遺伝子の近くに連鎖するマーカー群) を得た。ただし、自家不和合性を確認した両実生群の数が 100 に満たなかったために追って確認実生数を増やして精密な遺伝子地図の構築を図る。

(4) S 遺伝子関連 mRNA とタンパクの探索

‘クレメンティン’の長さ 6-7mm の蕾 (自家和合性) と 8-9mm の蕾 (自家不和合性) から花柱を採取し、全 RNA を抽出し、cDNA を合成し、これを鋳型として PCR 行い、PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動して分離し、不和合反応を持つ花柱に特異的に見出される PCR 増幅断片を探索した。比較的少数の安定した候補断片のみをゲルから切り出し、クローニングし、配列を決定した。配列を検索した結果、比較的ヒットした (相同性の高かった) 報告されている配列は機能不明であった。よって、S 遺伝子の (一部の) クローニングが成功したのかは疑わしい。なお、本研究の遂行に多量の花柱材料と時間を要したために、平行して行う予定であった和合性花柱と不和合性花柱のタンパクの比較研究は中断した。

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5件)

- ① Kim, J. H., T. Mori, A. Wakana, B. X. Ngo, K. Sakai and K. Kajiwara. 2011. Determination of self-incompatible *Citrus* cultivars with S_1 and/or S_2 alleles by pollination with homozygous S_1 seedlings (S_1S_1 or S_2S_2) of 'Banpeiyu' pummelo. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*, 81(4): 404-413. 査読有
- ② Ngo, B. X., J. H. Kim, A. Wakana, S. Isshiki and T. Mori. 2011. Estimation of self-incompatibility genotypes of *Citrus* cultivars with *Got-3* allozyme markers. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science*, 81(3): 284-294. 査読有
- ③ Kim, J. H., A. Wakana, T. Sekiya, Y. Tanimoto, B. X. Ngo and K. Sakai. 2010. Precocious flowering of *Citrus* seedlings and short juvenility of *Poncirus* seedlings: usage for genetic analysis and breeding. In: X. Deng, J. Xu, S. Lin and R. Guan (eds.). *Proc. Int. Soc. Citriculture*, vol. 1. China Agriculture Press, Beijing, pp. 327-334. 査読有
- ④ Kim, J. H., T. Mori, A. Wakana, B. X. Ngo, J. Masuda, K. Sakai and K. Kajiwara. 2010. Production of homozygous S_1 seedlings for S gene in 'Hirado Buntan' pummelo (*Citrus grandis* Osbeck) and determination of the S alleles (S_9 and S_{10}) by pollination with the S_1 seedlings to *Citrus* cultivars. *Journal of Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 55 (2): 239-245. 査読無
- ⑤ Ngo, B. X., A. Wakana, J. H. Kim, T. Mori and K. Sakai. 2010. Estimation of self-incompatibility S genotypes of *Citrus* cultivars and plants based on controlled pollination with restricted number of pollen grains. *Journal of Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 55 (1): 67-72. 査読無

〔学会発表〕(計8件)

- ① Dewi, P. S., Wakana, A., 他3名. Precocious flowering of *Citrus* seedlings and its application in male sterility study. *International Congress on Sexual Plant Reproduction*, 2012, 2,14. メルボルン大学(オーストラリア)
- ② Kim, J. H., Wakana, A., K. Sakai, 他3名. S allele identification, S -genotyping and relationships in self-incompatible *Citrus* cultivars and plants. *International Congress on Sexual Plant Reproduction*, 2012,2,14. メルボルン大学(オーストラリア)
- ③ 宮崎理子・若菜章・酒井かおり他3名. カンキツの自家不和合性遺伝子 S_4 と S_5 を含

む品種群とその関係, 園芸学会, 2012年3月28日. 大阪府立大学(大阪)

- ④ 金貞希・若菜章・酒井かおり. 'クレメンティン' と共通する自家不和合性遺伝子(S_3 と S_{11})を持つ品種個体群の同定, 園芸学会, 2011年9月24日. 岡山大学(岡山)
- ⑤ 森智代・金貞希・若菜章・酒井かおり. '晩白柚' と共通する自家不和合性対立遺伝子 (S_1 と S_2) を持つ品種・個体群, 園芸学会, 2010年9月20日, 大分大学(大分県)
- ⑥ 金貞希・森智代・若菜章・酒井かおり・他2名, 平戸ブントン S 対立遺伝子をホモに持つ S_1 実生を利用した S_9 と S_{10} 対立遺伝子を持つカンキツの探索, 園芸学会, 2010年9月20日. 大分大学(大分県)
- ⑦ 森智代・金貞希・若菜章・酒井かおり. S 遺伝子がホモである '晩白柚' $S_1(S_1S_1, S_2S_2)$ の作出と S_1 または S_2 を持つカンキツの同定, 園芸学会, 2009年9月26日, 秋田大学(秋田県)
- ⑧ 金貞希・森智代・松本渚・若菜章・酒井かおり. S 遺伝子をホモに持つ自家不和合性カンキツ S_1 実生群の作出とその S 対立遺伝子型の同定, 園芸学会, 2009年9月26日, 秋田大学(秋田県)

〔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

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