

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21780024

研究課題名(和文) ヒュウガナツ‘西内小夏’花粉の受粉による自家不和合性打破と種子の矮小化の機構解明

研究課題名(英文) Studies on the break of self-incompatibility and seed abortion by ‘Nishiuchi Konatsu’ Hyuganatsu self-pollination

研究代表者

本勝 千歳 (HONSHO CHITOSE)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：30381057

研究成果の概要(和文): 自家不和合性であるヒュウガナツの枝変わり系統‘西内小夏’の自家和合化および種子のしいな化の発生機構の知見を得るために、花粉発芽率、花粉径測定、フローサイトメトリー分析を行った。その結果、‘西内小夏’の花粉に通常の花粉よりも大きな巨大花粉が見られ、また‘西内小夏’×‘西内小夏’で得られた正常種子由来の実生は全て四倍体であった。これらの結果は、‘西内小夏’が非還元花粉を形成していることを示唆しており、これが‘西内小夏’の自家和合化、種子のしいな化に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文): Hyuganatsu (*Citrus tamurana* hort ex Tanaka) is originally self-incompatible. Its bud mutation ‘Nishiuchi Konatsu’ is self-compatible and seed is aborted during its development when ‘Nishiuchi Konatsu’ is self-pollinated. We assumed the presence of unreduced pollen in ‘Nishiuchi Konatsu’. Thus we studied pollen germination, pollen diameter, and ploidy level of ‘Nishiuchi Konatsu’ and its progenies. In the result of pollen germination test, ‘Nishiuchi Konatsu’ pollen has normal germination ability compared with other varieties. However, it was revealed that ‘Nishiuchi Konatsu’ partially produced giant pollen, which is the proof of the presence of unreduced pollen in many of other plant species. In the flowcytometry analysis for ploidy level, ‘Nishiuchi Konatsu’ itself was diploid. However, all the seedlings from the developed seed of ‘Nishiuchi Konatsu’ self-pollination indicated tetraploidy. These results suggested that ‘Nishiuchi Konatsu’ produced unreduced pollen in part and only unreduced pollen can reach to the ovule to hybridize. Only when ovule fertilized with unreduced pollen was unreduced, seed was successfully developed to be indicated tetraploid by flowcytometry.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：果樹園芸学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：カンキツ，自家不和合性，非還元配偶子

1. 研究開始当初の背景

自家不和合性であるヒュウガナツの枝変わり系統‘西内小夏’は自家和合化しており、かつ自家受粉によって得られた果実内のほとんどの種子がしいなとなる。これは、ヒュウガナツに四倍体カンキツ種の花粉を受粉して得られた果実に見られる種子のしいな化と類似しており、‘西内小夏’の花粉が非還元花粉（非還元配偶子）である可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では宮崎県で一般的に栽培されているヒュウガナツの、自家和合化した枝変わり‘西内小夏’を材料に、倍数性解析や組織学的、分子生物学的手法を用いたアプローチを通じて、ヒュウガナツの自家不和合性および種子のしいな化のメカニズムについて知見を得る事を目的としている。

3. 研究の方法

花粉の発芽試験

和合系ヒュウガナツ、普通系ヒュウガナツ、‘室戸小夏’、‘西内小夏’、‘宿毛小夏’の5系統の花粉発芽率を調査した。各系統の開葯直後の花を採取し、筆を用いて葯についた花粉を寒天培地（BK培地、1.0%寒天、10%スクロース）上に均等に蒔いた。インキュベーター（27℃設定）内に1日置き、顕微鏡で1品種あたり平均300個の花粉観察を3反復した。

花粉径測定

和合系ヒュウガナツ、普通系ヒュウガナツ、‘室戸小夏’、‘西内小夏’、‘宿毛小夏’、‘口之津41号’、ハッサクの7系統の花粉形態を調査した。冷蔵保存している各花粉を0.9Mマンニトールを加えた cell and protoplast washing (CPW) solution 中で1日浸けて吸水させた後、プレパラート上に取り、約500~1000個の花粉を顕微鏡で写真撮影し、画像解析ソフト「フォトメジャー」（ケニス株式会社）を用いて、各品種の花粉直径を測定した。

交雑個体の倍数性分析

‘西内小夏’×‘西内小夏’、‘西内小夏’×ハッサク、ハッサク×‘西内小夏’、ハッサク×普通系ヒュウガナツの2008年度の実験で得た正常種子由来の各実生の葉を供試した。なお、‘西内小夏’×‘西内小夏’は8個体、‘西内小夏’×ハッサクは24個体、ハッサク×‘西内小夏’は110個体、ハッサク×普通系ヒュウガナツは43個体を供試した。

また、比較材料として宮崎大学農学部フィールドセンター木花フィールドの‘西内小夏’、ハッサク、スイートスプリング、タヒチライムの葉を用いた。

葉の先端を1cmほど切り取り、チョッピングバッファー内で刻んだ後ミラクロスでろ過した。測定直前に55μLの500mg・L⁻¹ PI溶液を加えて混合した後、フローサイトメーターで10,000個の核の蛍光強度により倍数性の判定を行った。

4. 研究成果

花粉の発芽試験

普通系、‘宿毛小夏’の花粉発芽率は40%を超え、最も低かったのは‘室戸小夏’であった(第1表)。「西内小夏」の発芽率は、約33%で、他の品種とは有意差はなかった。「室戸小夏」の発芽率は、「宿毛小夏」、普通系と比べて有意に低かった。「室戸小夏」の場合、小さい花粉からの発芽はほとんど見られなかった。

第1表 各品種花粉の発芽率

品種	発芽率(%)
宿毛小夏	44.4±4.2a ^z y
普通系ヒュウガナツ	44.3±4.4a
和合系ヒュウガナツ	37.4±3.2ab
西内小夏	33.3±1.9ab
室戸小夏	21.9±4.6b

z:平均値±標準誤差

y:Tukeyの多重検定法(5% level)より、異なる文字間で有意差があることを示す

花粉径測定

花粉の直径は、‘西内小夏’が平均で33.1μmと最も大きく、‘室戸小夏’が25.3μmと最も小さかった。普通系と‘宿毛小夏’は花粉の直径が、平均では30.2μmと30.7μmと値が近かった(第2表)。最頻値でみると、普通系、‘宿毛小夏’の方が‘西内小夏’よりも大きかった。ヒストグラムを作製したところ、‘西内小夏’は34~36μmの範囲に大きいピークがあり、全体的に花粉が大きかった。また、46~48μmの範囲に小さいピークがあり、割合は低いですが、他品種と比べ巨大花粉を有していた。

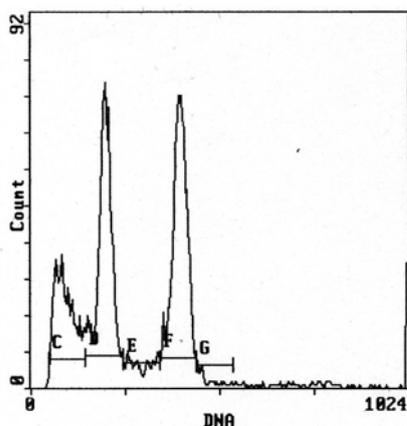
第2表 各品種の花弁直径の平均と最頻値

品種	平均(μm)	最頻値(μm)
西内小夏	33.1a ^z	32
口之津41号	31.7b	30.2
宿毛小夏	30.7c	33.8
普通系ヒュウガナツ	30.2d	32
和合系ヒュウガナツ	29.7e	24.9
ハッサク	27.7f	28.2
室戸小夏	25.3g	19.6

z: Tukeyの多重検定法(5% level)より、異なる文字間では有意差があることを示す

交雑個体の倍数性分析

交雑個体を作成するために使用した親個体(‘西内小夏’、普通系、ハッサク)は全て二倍体であった。また、‘西内小夏’×ハッサク、ハッサク×‘西内小夏’、ハッサク×普通系ヒュウガナツは全て二倍性を示した。一方、‘西内小夏’×‘西内小夏’の交雑後代は、全ての個体が異数性で、‘西内小夏’のDNA含量との相対的な割合を分析した結果、約2倍の位置にピークが現れた(第1図)。よって、‘西内小夏’×‘西内小夏’は四倍性であると思われる。しかし、花粉については残渣の混入が多く、正確な倍数性を明らかにすることはできなかった。



第1図 ‘西内小夏’×‘西内小夏’の実生のフローサイトメトリー分析の結果。二倍体の‘西内小夏’とサンプルを混合して分析しているため、二倍性の位置と四倍性の位置にピークが見られる。

まとめ

自家不和合性であるヒュウガナツの枝変わり系統‘西内小夏’は自家和合化しており、かつ自家受粉によって得られた果実内のほとんどの種子がしいなとなる。これは、ヒュウガナツに四倍体カンキツ種の花弁を受粉して得られた果実に見られる種子のしいな

化と類似しており、‘西内小夏’の花弁が非還元花粉(非還元配偶子)である可能性が示唆されている。また、フローサイトメトリーによって、‘西内小夏’の植物体は二倍体であることが明らかにされたが、花粉自体の倍数性の検証はできていないことから、本研究では、‘西内小夏’が非還元花粉を形成するかどうかを明らかにするため、花粉の発芽実験および花粉径測定、また、人工受粉によって得られた実生のフローサイトメトリーと染色体観察による倍数性測定を行った。

発芽率調査において、普通系、‘宿毛小夏’は40%を超え、最も低かったのは‘室戸小夏’であった。‘西内小夏’は他の品種との間に有意差は見られなかったことから、正常な花粉発芽能力を有していると考えられた。また、‘室戸小夏’の発芽率は、‘宿毛小夏’および普通系ヒュウガナツに比べて有意に低かった。

花粉径測定では、‘西内小夏’が花粉径において大きく、45μm以上の巨大花粉を有することが明らかとなった。逆に‘室戸小夏’は花粉径が小さく、顕微鏡観察からも大小の花弁が混合した特徴を持っていることが明らかとなった。

フローサイトメトリーで、‘西内小夏’×ハッサク、ハッサク×‘西内小夏’、ハッサク×普通系ヒュウガナツ、‘西内小夏’×‘西内小夏’の各実生の葉を分析した。結果として‘西内小夏’×ハッサク、ハッサク×‘西内小夏’、ハッサク×普通系ヒュウガナツは全て二倍体であった。しかし、‘西内小夏’×‘西内小夏’は全て四倍体であった。花粉については残渣の混入が多く、正確な倍数性を明らかにすることはできなかった。一方、染色体観察では、二倍体には18本の染色体が確認できた。四倍体では36本を測定することはできなかったが、二倍体の倍ほどの染色体を有することは観察できた。

以上の結果より、‘西内小夏’自体の倍数性は二倍体であること、また‘西内小夏’の花弁中に巨大花粉が見られたこと、‘西内小夏’×‘西内小夏’で得られた正常種子に由来する交雑後代は全て四倍体であったことから、‘西内小夏’は非還元花粉を一部形成していることが示唆された。ヒュウガナツでは染色体数が倍加した個体は自家不和合性が打破されることが知られており、また四倍体個体の花粉を受粉すると種子がしいな化することも明らかとなっており、実際の栽培現場においても四倍体カワノナツダイダイが受粉樹として使用され、少核生産が行われている。今回の‘西内小夏’は自家受粉が起こっても、非還元花粉が自家不和合性を打破し、受精後の種子をしいな化させていたものと考えられた。

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1件)

Honsho, Chitose, Masami Kotsubo, Yuri Fukuda, Yosui Hamabata, Yoshikazu Kurogi, Aya Nishiwaki, and Takuya Tetsumura. 2009. Reproductive characteristics for self-compatibility and seedlessness in 'Nishiuchi Konatsu', a bud-mutation of Hyuganatsu (*Citrus tamurana* hort. ex Tanaka). HortScience 44(6): 1547-1551.

[学会発表](計2件)

本勝千歳・山村恵梨・鶴田今日子・安田喜一・内田飛香・國武久登・鉄村琢哉・ヒュウガナツ'西内小夏'に見られた非還元花粉形成の可能性. 園学研9別2. 88. 2010. 園芸学会平成22年度秋季大会(大分大学)
Honsho Chitose, Yamamura Eri, Tsuruta Kyoko, Tetsumura Takuya. Occurrence of tetraploid progenies obtained by self-pollination of 'Nishiuchi Konatsu', a bud mutation of diploid and self-incompatible citrus hyuganatsu (*Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka) 28th International Horticultural Congress, Lisbon, Portugal, 2010.

[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

本勝 千歳 (HONSHO CHITOSE)
宮崎大学・農学部・助教
研究者番号：30381057

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：