

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 6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380025

研究課題名（和文） カンキツの果実離脱に関わる分子機構の解明と単為結果性の評価

研究課題名（英文） Study on molecular mechanisms of fruit abscission and evaluation of parthenocarp in citrus

研究代表者

北島 宣（KITAJIMA AKIRA）

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70135549

研究成果の概要（和文）：カンキツ生理落果期の果実離脱の機構を明らかにするうえで、採取果実の寒天挿しによる離脱誘導の手法は有用であることが示された。一次生理落果では離脱誘導後に急速に離層が形成されて離脱したが、二次生理落果では離層は形成されないことが明らかになった。ポンカン、ネーブルオレンジ、イヨカンは単為結果力が弱く、ウンシュウミカン、ヒュウガナツ、‘平戸文旦’は単為結果力が強いと評価できた。自然受粉果実の寒天挿しによる離脱パターンを調査することで、単為結果力の推定が可能と考えられた。二次生理落果における離脱の決定段階では糖代謝関連遺伝子が関与しており、実行段階では β -galactosidase や β -xylosidase が強く関与していると考えられた。内生のエチレンは離脱の進行に直接関与しておらず、ウンシュウミカンの離脱機構は特異的であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The method of detached fruit let incubation on agar medium is useful for induction of fruit abscission to confirm the mechanisms of fruit abscission process during physiological fruit drop in citrus. Abscission layers are rapidly formed in the fruit abscission zone after the induction of abscission and fruit abscission occurs in primary fruit drop system. However, it is confirmed that no abscission layer is formed in the fruit abscission zone and fruit abscission occurs in secondary fruit drop system. It was evaluated that a potential parthenocarpic level is low in ponkan, navel-orange and iyokan, and high in Satsuma mandarin, hyuganatsu and ‘Hirado’ pummel. It would be possible to evaluate a potential parthenocarpic level by a check of the abscission pattern of detached fruitlet on agar medium during secondary fruit drop. It is supposed that sugar metabolism related genes would be associated to fruit abscission “Decision” process and that β -galactosidase and β -xylosidase would be closely associated to fruit abscission “Performance” process in secondary fruit drop system. It is indicated that an endogenous ethylene is not related to a fruit abscission process and the process of Satsuma mandarin is probably unique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,900,000	2,307,000	10,270,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、園芸学・造園学

キーワード：果樹、カンキツ、単為結果、生理落果、果実離脱、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 無核性カンキツ果実の生産において、単為結果性は極めて重要な形質である。カンキツ類では単為結果性に差違がみられるものの、その評価は主観的であり、客観的な評価に基づいて単為結果力の強い種・品種を明らかにする必要がある。

(2) 単為結果性は無核果実の離脱が抑制される形質で、生理落果における果実の離脱と密接に関係している。生理落果は果実への同化産物転流量の減少に起因しており、果実への糖の転流量の減少が、果実の離脱を誘導するものと考えられる。果実の離脱過程の進行は、果実への糖の転流量の減少による“誘導段階”、果実離脱が不可逆となる“決定段階”および実際の離脱が生じるまでの“実行段階”と考えられるが、その機構は明らかではない。

(3) これまで研究代表者は、果実への糖の転流を遮断して果実の離脱を誘導する処理として、採取した果実の果梗部を寒天培地に挿して培養する方法を考案し、‘ソ連タンゼロ’は離脱しやすく、ウンシュウミカンには離脱しにくい特性がみられ、この手法が離脱過程を解明する実験系として有用であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、カンキツの生理落果期に採取した果実の寒天挿しによる離脱が、樹上における果実への同化産物の転流を遮断した離脱と相同であるかを確認すること、採取した果実の寒天挿しにより種々のカンキツにおける離脱特性と単為結果力を評価すること、離脱過程における離脱部位の細胞の形態的变化を明らかにすること、離脱過程におけるエチレン生成と離脱との関係を明らかにすること、マイクロアレイにより離脱過程における発現遺伝子を解析し、離脱に関連する遺伝子を明らかにすることなどにより、生理落果における果実離脱過程の進行(“誘導段階”、“決定段階”、“実行段階”)に関わる分子機構を明らかにするとともに、単為結果性の評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 採取果実と樹上果実の離脱特性

ウンシュウミカンとソ連タンゼロを用い、開花6週間後に果実を採取し、果梗部を1%寒天培地に挿す“寒天挿し”と、樹上果実の果梗部に環状剥皮を行う“樹上環状剥皮”処理を行い、“寒天挿し”と“樹上環状剥皮”の果実離脱パターンの違いを調査した。

(2) 一次生理落果と二次生理落果における果実離脱パターンと離脱組織の形態的变化

ウンシュウミカン、ヒュウガナツ、ポンカ

ン、‘清見’を用い、一次生理落果および二次生理落果期における果実を採取して寒天挿しを行い、継時的に離脱調査を行うとともに果実の離脱部位の組織観察を行った。

(3) 単為結果性の評価

ウンシュウミカン‘宮川早生’、ブンタン‘平戸文旦’、ポンカン、ヒュウガナツ、イヨカン、ネーブルオレンジを用い、防虫ネットまたは柱頭切除による花粉遮断(NP)を行い、他は自然受粉(OP)とした。満開5週間後にNP、OP果実を採取して1%寒天培地に果梗部位を挿し、継時的に離脱を調査するとともに、11月にNPとOP果実の種子数を調査した。

(4) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

満開6週間後にウンシュウミカン、ヒュウガナツ、ポンカンのOP果実を採取し、寒天挿しによる離脱誘導0、12、24、48、72時間後(第2図)に離脱部位を含む果盤組織からRNAを抽出し、農研機構果樹研で開発されたカンキツマイクロアレイ(60K)を用いて発現解析を行い、離脱関連候補遺伝子を選抜した。さらに、それらの遺伝子についてqRT-PCRを行い発現量を調査した。

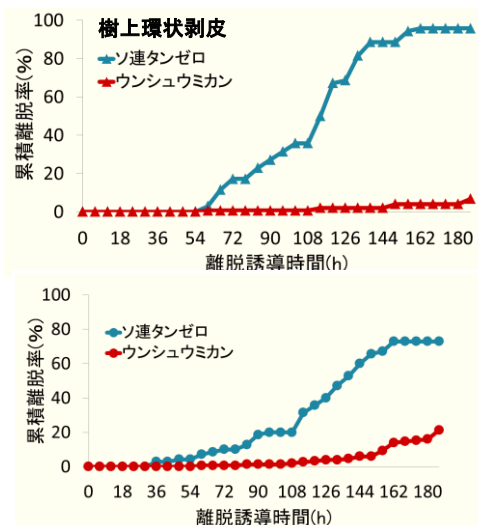
(5) エチレン生成と離脱との関係

満開5週間後にウンシュウミカン、ポンカン、ヒュウガナツのOP果実を採取し、寒天挿しによる離脱誘導後、継時的に離脱を調査するとともに、ガスクロマトグラフィーによりエチレン生成量を測定した。

4. 研究成果

(1) 採取果実と樹上果実の離脱特性

樹上果実の環状剥皮と採取果実の寒天挿しは、いずれもソ連タンゼロで離脱率が高く、ウンシュウミカンで離脱率が低く、樹上果実と採取果実は類似した離脱パターンを示した(第1図)。

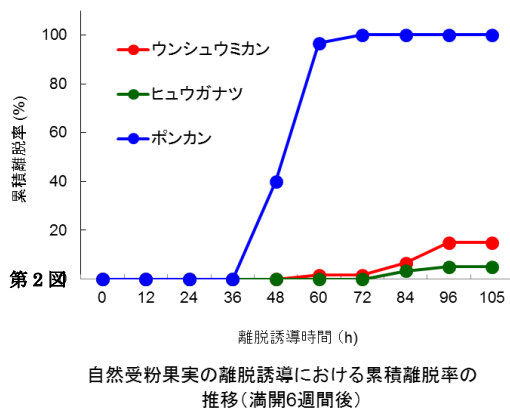


第1図 樹上果実の環状剥皮処理と採取果実の寒天挿しにおける累積離脱率の推移

このことから、採取果実の寒天挿しによる離脱過程は、樹上果実における同化産物の転流を遮断した離脱過程と相同であり、採取果実の寒天挿しは離脱過程の解明に有用な手法であると考えられた。また、ウンシュウミカンには離脱しにくい特性を有していることが確認された。

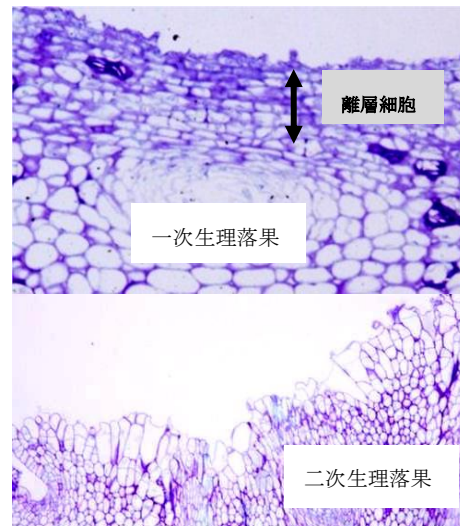
(2) 一次生理落果と二次生理落果における果実離脱パターンと離脱組織の形態的变化

一次生理落果において、いずれも寒天挿し 96 時間後には 80%以上の果実が離脱した。ヒュウガナツでは寒天挿し 12 時間後から離脱が開始し、離脱の進行が速かったが、ウンシュウミカンとポンカンでは離脱開始が寒天挿し 48 時間後からであり、離脱の進行は遅かった。‘清見’はそれらの中間であった。二次生理落果では、ポンカンは寒天挿し 48 時間後から離脱が開始し、累積離脱率が 72 時間後に 100%となったのに対し、ウンシュウミカンとヒュウガナツでは 48 時間後から離脱が開始し、105 時間後の累積離脱率は 20%以下であったことから、ポンカンは離脱しやすく、ウンシュウミカンとヒュウガナツは離脱しにくいことが認められた(第2図)。このように、ヒュウガナツでは一次生理落果において離脱の進行が速いが、二次生理落果では離脱が抑制されることや、ポンカンでは一次生理落果での離脱の進行が遅いが、二次生理落果では離脱の進行が速いなど、同じカンキツ種でも一次生理落果と二次生理落果の特性は異なっており、一次生理落果と二次生理落果では離脱の発現機構が異なるものと考えられた。また、二次生理落果ではポンカンに対してウンシュウミカンとヒュウガナツは離脱が明らかに抑制されており、この離脱パターンの違いは、果実へ糖の転流の遮断に対する応答性の相違による離脱過程の誘導および決定段階の進行の差異に起因する可能性と、実行段階の進行の差異に起因する可能性が考えられた。



一次生理落果では離脱は花梗と花梗枝との接合部位で生じ、二次生理落果では果梗と

果実の接合部である果盤部で生じた。寒天挿しにより離脱が開始する頃において、離脱部位の組織の断面は直線的で、離層組織と思われる数層の小細胞が認められた。これらの小細胞は採取直後には認められなかったことから、離脱過程の進行に伴って離層組織が発達し、離脱に至ることが示された。二次生理落果では、採取時から離脱に至るまで離脱部位に明確な離層組織は認められず、離脱直後の離脱部位の細胞組織は不定形であった(第3図)。寒天挿しにより離脱が開始する頃から、離脱部位の一部の細胞に形態的变化が生じており、時間の経過とともに細胞の形態的变化が内層に向かって拡大していることが観察された。これらのことから、カンキツの二次生理落果では、これまで離脱部位に離層組織が形成されて果実が離脱するとされていたが、離層組織は形成されないことが明らかとなり、細胞の形態的变化が拡大することにより離脱が生じるものと考えられた。

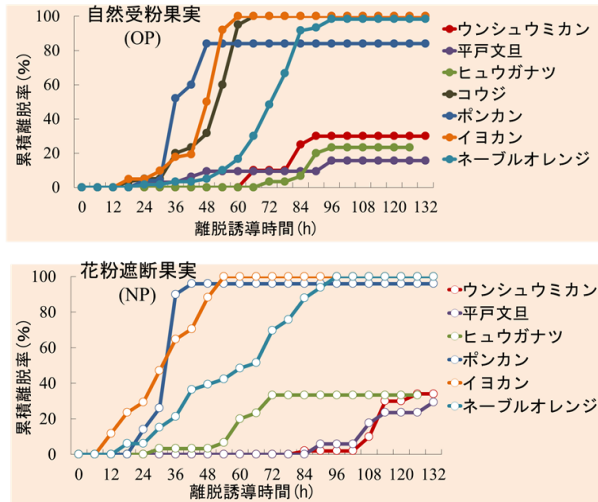


第3図 一次生理落果と二次生理落果における離脱部位の細胞

(3) 単為結果性の評価

自然受粉果実の離脱誘導により、ポンカン、ネーブルオレンジ、イヨカンは累積離脱率が 72h に 80%以上と離脱が多かったのに対し、ウンシュウミカン、‘平戸文旦’、ヒュウガナツは 120h で 40%以下であり、離脱が少なかった(第4図)。花粉遮断果実ではいずれもほぼ無核であり、ポンカン、ネーブルオレンジ、イヨカンは累積離脱率が 72h に 80%以上と離脱が多く、ウンシュウミカン、‘平戸文旦’、ヒュウガナツは 120h の累積離脱率が 40%以下と低かった。ことから、ポンカン、ネーブルオレンジ、イヨカンは単為結果力が弱く、ウンシュウミカン、‘平戸文旦’、ヒュウガナツは単為結果力が強いことが示された。また、同じカンキツ種では有核果実と無核果実の離脱パターンはほぼ同様であるこ

とから、果実への糖の転流の遮断による離脱誘導では、種子の有無は離脱に影響を及ぼさないことが明らかとなり、内生の植物ホルモン含量は離脱の決定段階や実行段階を制御していない可能性が示唆された。また、自然受粉果実の寒天挿しによる離脱を調査することで、その単為結果力をほぼ推定できるものと考えられた。

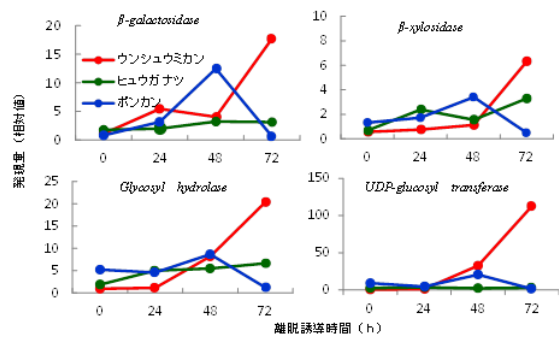


第4図 自然受粉果実と花粉遮断果実の離脱誘導における離脱率の種間差異

(4) マイクロアレイによる遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析において、0hに比べて48hで発現量が2倍以上上昇し、48hにおけるウンシュウミカンとボンカンでの発現量の差が大きい遺伝子や、細胞壁分解酵素関連遺伝子などから候補遺伝子を選抜し、これらの遺伝子について定量PCRによる発現量の推移を調査した結果、*β-galactosidase* と *β-xylosidase* はボンカンで48hにピークが認められたがウンシュウミカンでは低く推移した(第5図)。*β-galactosidase* はボンカンで低く推移した。一方、*UDP-glucosyl transferase* はヒュウガナツ、ボンカンともに低く推移したが、ウンシュウミカンのみで72hに高い値を示した。また、ウンシュウミカンではいずれの遺伝子も72hに急増し、高い値を示した。これらのことから、*β-galactosidase* と *β-xylosidase* は果実の離脱過程に関与する遺伝子であり、果実への同化産物の転流が遮断され、果実離脱が誘導されてから48時間後には細胞壁の分解が開始していることが示唆された。

一方、ウンシュウミカンでは、離脱誘導72時間後に細胞壁分解酵素関連遺伝子が急増しているにもかかわらず、離脱が抑制されていることから、ヒュウガナツの離脱抑制とは異なる機構が働いている可能性が示唆された。



第5図 遺伝子発現量の経時的変化

エチレン合成に関する *ACC oxidase* はボンカンで24時間後から増加し、48時間後にピークを示したが、ウンシュウミカンでは48時間後まで低く推移し、72時間後に急増してボンカンと同様の値を示した。また、*IAA13* は48、72時間後にボンカンがウンシュウミカンより高い値を示した。ボンカンの0、12、24時間後における遺伝子発現の変動が大きい遺伝子について解析した結果、cellular component では cell part および cell 関連遺伝子が40%以上、molecular function では catalytic activity および binding 関連遺伝子が30%以上、biological process では cellular process および metabolic process 関連遺伝子が40%以上含まれていた。KEGG PATHWAY 解析において、0→12→24時間後の発現が増加する遺伝子はUDP-glucoseからα-D-glucoseやβ-D-glucoseへの代謝経路で多かった。

(5) エチレン生成と離脱との関係

寒天挿し後のボンカンの離脱は48時間後から始まり、96時間後には累積離脱率が80%以上になった。ヒュウガナツは72時間後からウンシュウミカンは84時間後から離脱が開始し、いずれも96時間後の累積離脱率は20%以下であった。エチレン発生量は、ボンカンとヒュウガナツでは96時間後まで10nl/fruit/h以下で推移したのに対し、ウンシュウミカンでは48時間後に100nl/fruit/hとなり、その後96時間後の400nl/fruit/hまで増加した。このことから、内生のエチレンは果実の離脱に直接的に関与していない可能性が考えられ、ウンシュウミカンの離脱抑制の機構は特異的であることが示唆された。

まとめ

カンキツの生理落果期に採取した果実の寒天挿しによる離脱が、樹上における果実への同化産物の転流を遮断した離脱と相同であることから、採取果実の寒天挿しによる離脱誘導が離脱機構を解明するうえで有用な手法であることが示された。

一次生理落果と二次生理落果において、離

脱パターンに種特異性が認められた。同一種において一次落果と二次落果の離脱パターンが異なる場合が認められ、一次生理落果と二次生理落果では離脱の機構が異なるものと考えられた。

一次生理落果において、離脱の実行段階において急速に離層組織が形成され、離層細胞間の分離により離脱が生じた。これに対し、二次生理落果では離層組織は形成されないことが認められ、離脱部位の細胞に形態的な不全が生じて細胞間の離脱が生じるものと思われた。

二次生理落果において、種子の有無にかかわらず、ポンカン、ネーブルオレンジ、イヨカンでは離脱が多く、ウンシュウミカン、‘平戸文旦’、ヒュウガナツは離脱が少ないことから、前者は単為結果力が弱く、後者は単為結果力が強いことが示された。また、自然受粉果実の寒天挿しによる離脱を調査することで単為結果性を推定できると考えられた。

離脱の決定段階や実行段階初期では、糖代謝関連遺伝子や cell part および cell 関連遺伝子、catalytic activity および binding 関連遺伝子、cellular process および metabolic process 関連遺伝子が関与している可能性が示唆された。実行段階の進行過程では、*β-galactosidase* や *β-xylosidase* が強く関与していると考えられた。

内生エチレンは果実の離脱に直接的に関係していないと考えられた。また、ウンシュウミカンの離脱抑制機構は特異的である可能性が示唆された。

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 2 件)

- ① 北島 宣・伊勢賢太郎・清水徳朗・羽生剛・李 曦・山崎安津・中崎鉄也. 2012. カンキツにおける二次生理落果の果実離脱に関与する遺伝子の発現解析. 園学研. 11(別 1): 247. (査読無)
- ② 北島 宣・李 曦・羽生剛・野中勝利・小西 剛・友廣教道・文室政彦・中崎鉄也. 2012. 数種カンキツの生理落果期における採取果実の離脱特性. 園学研. 11(別 1): 254. (査読無)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kitajima, A., X. Li, T. Habu, K. Kataoka, T. Nakazaki and K. Yonrmoti. 2012. Evaluations of potential fruit abscission and characteristics of seeded and seedless fruit abscission in several citrus species during physiological fruit

drop. XII International Citrus Congress (Valencia, Spain).

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

北島 宣 (KITAJIMA AKIRA)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：70135549

(2) 研究分担者

羽生 剛 (HABU TSUYOSHI)
愛媛大学・農学部・助教
研究者番号：60335304
清水徳朗 (SHIMIZU TOKURO)
独立行政法人・農業食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・上席研究員

(3) 連携研究者

()

研究者番号：