

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658025

研究課題名(和文)ブドウにおける異倍数体間交雑応答機構の解明

研究課題名(英文)Reproduction barrier in interploidy crosses in Vitis

研究代表者

田尾 龍太郎(Tao, Ryutarō)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10211997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：異倍数体間交雑および高次倍数体間交雑が、ブドウ属(*Vitis*)の種子形成に及ぼす影響を調査した。ヨーロッパブドウ(*V. vinifera*) 'Rosaki' とアメリカ系台木ブドウ(*V. riparia* × *V. berlandieri*) '5BB' の二倍体 およびコルヒチン処理によって作出したそれらの四倍体個体を相互に交雑して種子形成過程を観察した。開花30日後の胚乳細胞に差異が見られ、胚乳中のタンパク質顆粒蓄積が多い交雑組み合わせで、形成された種子の発芽率が高くなる傾向がみられた。また発達途中の種子のRNA-Seq解析を行ったところ、異倍数体間交雑ではストレス応答関連遺伝子の発現が高かった。

研究成果の概要(英文)：Seed formation after inter- and intra- ploidy crosses were investigated in *Vitis*. Crosses were made between a European grape cultivar Rosaki (*V. vinifera*), a rootstock cultivar 5BB (*V. riparia* × *V. berlandieri*), and chromosome doubled clones produced from Rosaki and 5BB by colchicine treatment. Differences in endosperm cells were observed among crosses 30 days after flowering. Accumulation of protein bodies in endosperm at this stage correlated with the seed germination ability after seed maturation. RNA-Seq analysis was performed with developing seeds. Stress related gene expressions were high in interploidy crosses.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸・造園学

キーワード：果樹 ブドウ 倍数性 ゲノムインプリンティング 次世代シーケンシング技術 受粉受精 胚発生
胚乳発生

1. 研究開始当初の背景

ブドウ (*Vitis*) は生食用に利用されるとともにワインの原料となるため、古くから世界的に栽培されている果樹の一つである。現在、世界的に広く生産されている種は、ヨーロッパブドウ (*V. vinifera*) とアメリカブドウ (*V. labrusca*) の 2 種である。我が国においては、主として欧米から導入した品種を交雑して、選抜と改良を重ねて、湿潤な気候に適した様々な品種を育成してきたため、主要な栽培品種の多くはヨーロッパブドウとアメリカブドウの雑種である。また我が国では、生産されたブドウ果実の大部分を生食用として利用するという特殊性があるため、生食用に適した特性をもつ大粒性の品種および無核化栽培できる品種の人気が高く、生産量の多くを占めている。

大粒性品種の多くは二倍体ブドウから生じた四倍体突然変異を起源としている。しかしながら四倍体の枝変わり系統やコルヒチン処理により作出した四倍体系統の樹勢は弱く結実性も劣るため、そのまま栽培品種として利用することは困難である。このため、枝変わりなどにより生じた四倍体を交配親に用いて、品種改良が行われている。‘巨峰’も交雑育種により、四倍体品種同士の交雑により育成された品種である。‘巨峰’は ‘Campbell Early’ の四倍体枝変わり品種である ‘石原早生’ に ‘Rosaki’ の四倍体枝変わり品種 ‘Centenial’ を交雑して育成された。巨峰の果粒はきわめて大きく、食味も優れている。しかしながら結実性と日持ち性に劣ることから、これらの改良を目的として四倍体品種間の交雑が行われ多く品種が育成されている。しかしながら、四倍体同士の交雑、すなわち高次倍数間交雑においては、得られた種子に発達異常がみられ、種子発芽率も二倍体同士の交雑により得られた種子と比較して低く、大粒性品種育成の障壁となっている。

一方で、四倍体と二倍体の交雑により、三倍体無核品種を作出しようとした試みもなされてきた。しかしながら、二倍体と四倍体の交雑で生じた三倍体種子の胚や胚乳の発達は不十分であり、三倍体実生の獲得は困難

である。このため、これまでに育成された三倍体品種はわずかしかない。

2. 研究の目的

ブドウの異倍数間交雑においてみられる種子形成異常は、イネやシロイヌナズナにおける異倍数間交雑による胚発生異常現象に類似している。二倍体と四倍体を交雑して三倍体を得る際、交雑種子の発芽率は交雑の方向によって大きく異なることが植物一般に知られており、二倍体を母本としてこれに四倍体の花粉を交配すると発芽力のある種子はほとんど得られず、この逆交配だけが成功することが多くの作物において報告されている。異倍数体間交雑による種子形成段階においては、しばしば胚乳の異常発達が観察されてきており、ブドウの胚発生機構においても同様の胚乳発達異常が関わっている可能性が考えられる。

また、ブドウ高次倍数間交雑における種子形成異常についても、胚乳発達異常によるものである可能性が考えられる。しかし、ブドウ種子では形態学的構造や二次代謝成分変化に関する報告はいくつかみられるものの、胚乳発生を継時的に追った詳細な組織学的研究は少なく、胚乳発生における各発達ステージの変化は十分に検討されていない。そこで本研究では、*Vitis* 属における種子形成異常の原因解明を目的として、高次倍数間および異倍数間における胚乳発生過程について継時的に詳細な観察を行うとともに、発現解析によって原因遺伝子の検討を行った。

3. 研究の方法

実験 1: 高次倍数間交雑における胚乳発達の観察

2012-13 年の生育期に、京都府立大学附属農場植栽の二倍体アメリカブドウ (*Vitis labrusca*) ‘Niagara’, ‘Portland’ ならびに ‘Campbell Early’, およびコルヒチン処理によって作製したそれら品種の四倍体を、開花前の花房の袋掛けと放任受粉により自家受粉し、開花後約 5, 10, 20, 30, 40 日後 (DAB) に胚乳を光学顕微鏡で観察した。また、2012 年には得られた種子の発芽率も調査した。

さらに 2013 年には、京都大学附属農場植栽のヨーロッパブドウ (*V. vinifera*) ‘Rosaki (2x)’ およびその四倍体 ‘Centenial (4x)’ について、5 - 40DAB に 5 日毎に同様の観察を行った。またあわせて得られた種子の発芽率も調査した。

実験 2：倍数間交雑における胚乳発達の観察および発現解析

2012-13 年の生育期に、京都大学附属農場植栽のヨーロッパブドウ (*V. vinifera*) ‘Rosaki’ と丹波ワイン植栽のアメリカ種間交雑体 (*V. riparia* × *V. berlandieri*) ‘5BB’ の二倍体 (2x) および四倍体 (4x) を用いて、いずれも ‘5BB’ × ‘Rosaki’ の組合せで、2x × 2x, 2x × 4x, 4x × 2x, 4x × 4x の交配を行った。5BB は雄性不稔であるため、除雄の必要がないので、種子親として利用した。これら 4 種類の受粉 (交雑) 後、約 5, 10, 20, 30, 40 日 (days after pollination: DAP) の胚乳の顕微鏡観察を行った。また得られた種子の発芽率の調査も行った。2013 年には 20DAP のサンプルを用いて次世代シーケンズ解析を行い、モデル植物で報告されている遺伝子のブドウにおけるオーソログの解析を試みた。

4. 研究成果

実験 1：高次倍数間交雑における胚乳発達の観察

両年ともに全ての品種において、2x 自家受粉で得られた種子と比較して 4x 自家受粉で得られた種子の重量が大きかった。これまでに種子発芽率は 4x 種子で低いことが報告されている。今回の実験では ‘Niagara’ において 4x 種子の発芽率が有意に低かったが、‘Campbell Early’ および ‘Rosaki’ では 4x 種子の発芽率が高くなる傾向がみられた。また、胚乳発達の観察からは 20-30DAB におけるタンパク質顆粒蓄積の有無と発芽率に相関がみられ、タンパク質顆粒が多く観察された系統で発芽率がより高くなった。タンパク質顆粒の蓄積が発芽率の向上にどのような影響を与えているのかは明確ではないが、タンパク質顆粒の蓄積は種子の充実程度の指標になるものと考えられた。胚乳発達は、

‘Campbell Early’, ‘Niagara’, ‘Portland’ の 3 品種においては 4x の方がやや発達が早い傾向にあったが、タンパク質顆粒の蓄積は発達段階の移行時期に関係なく、‘Campbell Early’ では 4x 種子の方が多かった。しかしながら、‘Niagara’ および ‘Portland’ では 2x 種子の方がタンパク質顆粒の蓄積が多く、一方で Rosaki においてタンパク質顆粒の蓄積に倍数性間による違いはみられなかった。なお ‘Campbell Early’ および ‘Niagara’ では 30DAB の胚乳細胞におけるタンパク質顆粒蓄積の程度が多い方が、種子発芽率が高い傾向が得られている。

倍数間交雑により得られた種子の発芽率は、母本の栄養状態によるところが大きい可能性が考えられた。母本の栄養状態によって 30DAB の種子の胚乳細胞におけるタンパク質顆粒の蓄積に差がみられ、タンパク質顆粒の蓄積量が多い方が発芽率が高くなる傾向が得られた。一般に、高次倍数間交雑により得られた種子の発芽率が低くなるのは、コルヒチン処理などにより作出した高次倍数体の個体は樹勢が弱いことが多く、種子発達に十分な栄養を供給できないためである可能性もある。

実験 2：倍数間交雑における胚乳発達の観察および発現解析

胚乳発達に関しては、2x × 2x および 2x × 4x は 40DAP において細胞サイズが減少し、タンパク質顆粒が多く蓄積していた。一方で、4x × 2x の細胞のサイズは増加しつづけ、タンパク質顆粒の蓄積は観察されなかった。また、2012 年の種子重についても、4x × 2x は 30DAP 以降も大きく増加し続けた。4x × 2x により得られた果実は 2012 年においては 20DAP 以降に全て落果した。2013 年においても、4x × 2x により得られた果実は 30-40DAP の間に全て落果した。これらの結果より、4x × 2x は種子成熟期間がない、あるいは種子成熟が遅延され、種子発達が異常に継続する可能性が考えられた。種子発芽率は両年ともに 2x × 2x が最も高く 2x × 4x および 4x × 4x は低かった。これらの結果は 4x × 2x の種子形成の方が、2x × 4x の種子形成よりも優れるというこれまで一般に言われている倍数間交雑時の種

子形成力とは異なるものであった。今回の次世代シーケンス解析では精度の低いデータしか得られず、インプリンティング遺伝子の解析は行えなかった。これは種子組織より抽出した RNA の質が低かったためであり、今後実験手法の改善の必要があると考えられた。精度の低いデータではあったものの、同倍数間交雑と異倍数間交雑において得られたデータをプールして、発現遺伝子の比較を試みたところ、異倍数間交雑においては 20DAP ですでにストレス応答遺伝子が多く発現しているようであり、胚乳において何らかの異常が生じている可能性が示唆された。このストレス応答遺伝子の発現が胚乳発達異常の原因であるのか、結果なのか、今後解明していく必要がある。

5．主な発表論文等
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

田尾龍太郎 (TAO, Ryutaro)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号：10211997