

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07599

研究課題名(和文)カンキツの倍加半数体を利用した雄性側自家不和合性の自己・非自己認識機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of non-self recognition system of F-box gene for pollen in self-incompatibility using citrus doubled haploids.

研究代表者

國武 久登 (KUNITAKE, HISATO)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80289628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物における雄性側自家不和合性は、柱頭や花柱組織内で起こる複合的な生化学現象のため、機序の解明は困難である。本研究では、成熟花粉の液体培養により、自家不和合関連遺伝子の発現を含めた自己・非自己認識機構について検討した。まず、花粉側S因子の同定や分離を検証するために、晩白柚'の花粉1粒におけるSSR対立遺伝子の分離について調査したところ、7個のプライマーにおいて染色体モデルと同様の分離比を示すことが明らかになった。また、液体花粉培養による自己・非自己認識機構の評価を行い、複数の花粉側因子によって花柱S因子が認識されるという考えに基づいて考察したところ、仮説と一致することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要なカンキツのひとつである'晩白柚'ブンタンの花粉1粒におけるSSR解析技術が確立できたことは、自家不和合性因子の解析だけでなく、様々な有用遺伝子の解析を促進するものである。特に、液体花粉培養による自己・非自己認識機構の評価を行い、バラ科植物のように、複数の花粉側因子によって花柱S因子が認識される可能性が明らかになったことは大きな成果である。これらの成果を活かし、カンキツの自家不和合性の機序が明らかになり、化学的および物理的なストレス付与による自家不和合性への転換機構が確立され、植物生長調節物質等の農業応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mechanism of the pollen S gene expression in flowering plants are difficult to interpret, because of the complex physiological phenomena that occur in the stigma and the style tissue. In this study, we examine about the non-self or self-recognition system using the mature pollen culture in self-incompatibility(SI) of citrus. As a result of investigating the multiple microsatellite (SSR) genotyping of a single pollen grain, for analyzing the element of pollen S gene and its segregation, it was revealed that seven of the 8 segregating loci in the pollen population of 'Banpeiyu' pummelo(*Citrus maxima* (Burm.)Merr.) fit a 1: 1 ratio. In addition, the results of inhibition rate of pollen tube using the mature pollen culture were showed the possibility having non-self recognition by multiple factors SI system.

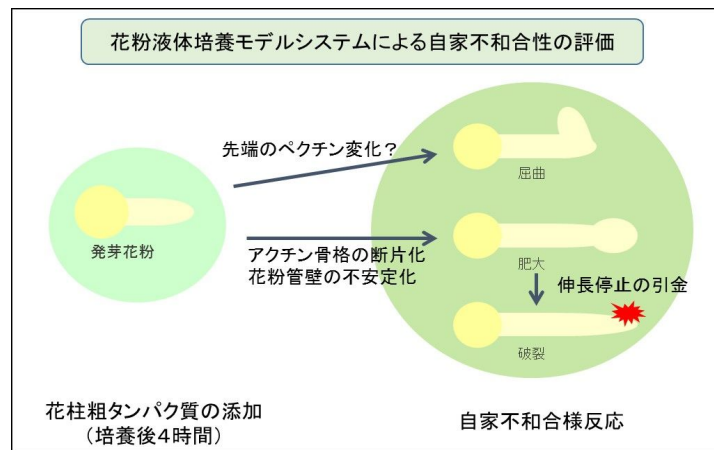
研究分野：園芸学

キーワード：カンキツ 自家不和合性 花粉 SSR 倍加半数体 非自己認識 ハプロタイプ 液体花粉培養

1. 研究開始当初の背景

バラ科において、雌ずい側因子の分子レベルでの研究は、サクラ亜科およびナシ亜科の種で行われてきた (Viera ら, 2010)。サクラ亜科では、自他識別が単一の SFB によって制御されている単因子自己認識モデルが提唱されてきた (Ushijima ら, 2003)。しかし、同じバラ科ナシ亜科のナホンナシおよびリンゴでは複数の SFBB 遺伝子が花粉 S 因子候補として同定されており (Sassa ら, 2007)、変異ハプロタイプ S4Sm の解析 (Okada ら, 2008) や機能喪失した *SFBB1* の遺伝子的分析により、多因子非自己認識モデルが仮定された (Kakui ら, 2010)。したがって、同じバラ科のサクラ亜科とナシ亜科では、S 遺伝子の機能が異なることが明らかとなった。このナシ亜科の多因子非自己認識モデルは、単一の S ハプロタイプに複数存在する SFBB の多くが、花粉 S 因子として働き、それぞれ異なる非自己 *S-RNase* の認識・無毒化に関与していることが示唆された。しかし、配偶体型自家不和合性を示すカンキツでは、自己・非自己の認識機構はまったく明らかになっていない。

我々の研究グループは、花柱内で起こる花粉管の自家不和合現象を視覚化できる液体花粉培養法を確立した (内田ら, 2012)。この液体花粉培養法を利用して、花柱粗タンパク質を添加することにより、自家不和合性様反応を試験管内で再現できる「花粉液体培養モデルシステム」を開発した (Abe ら, 2015) (第 1 図参照)。また、自家不和合性様反応が生じた培養花粉から nano-LC 解析により、自家不和合性関連遺伝子を同定し、花粉管内で発現する遺伝子の発現解析を行った。



第 1 図 花粉液体培養モデルシステムによる自家不和合性様反応

その結果、*copper-zinc superoxide dismutase (Cu/Zn SOD)*、*manganese SOD (Mn SOD)*、*catalase (CAT)*、*cysteine protease (CYP)* が自家不和合性関連遺伝子として同定され、その遺伝子発現は、自家不和合性処理において増加することを明らかにした (Li ら, 2015b)。さらに、カンキツの花粉管内での和合様反応と自家不和合性様反応での ROS (活性酸素種) の変化を調査し、ROS プローブである CM-H2DCFDA の変化を調査したところ、両品種の自家不和合性様反応を示す花粉管内での量は和合様処理や対照区と比較して高かった。本研究で得られた自家不和合性関連遺伝子と深い関係がある ROS はプログラム細胞死 (PCD) の鍵となる誘導要因であり、カンキツ花粉管の自家不和合性様反応を誘導する ROS カスケードは、プログラム細胞死の引き金になっている可能性が高いことを明らかにした (Li ら, 2015a)。

さらに、我々の研究グループは、「晩白柚」(*SIS2*) の雌性配偶子から半数体を育成し、その成長点へのコルヒチン処理により倍加半数体を育成した (Yahata ら, 2015)。また、倍加半数体の遺伝的特性について調査したところ、野生型と同等の花粉稔性を有し、いくつかの品種との交雑試験により、*S1* ハプロタイプをホモにもつ系統であることが明らかとなった (八幡ら, 2014)。本倍加半数体は花粉液体培養でも野生型と同等の発芽率を有することから、当該系統は *S1* ハプロタイプのみ花粉を生産する世界で初めての自家不和合・和合認識モデルと考えられる。

2. 研究の目的

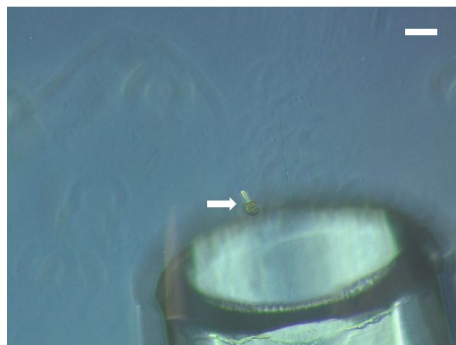
高等植物における雄性側自家不和合性は、柱頭や花柱組織内で起こる複合的な生化学現象のため、機序の解明は極めて困難である。我々は、配偶体型の認識機構を有するカンキツにおいて、世界に先駆けて試験管内で和合/不和合の反応を再現できる花粉液体培養モデルシステムを開発した。しかしながら、自家不和合性の原因遺伝子である S 遺伝子座の自己・非自己認識機構は不明のままである。そこで、本研究では、遺伝子座が単純化されている倍加半数体 (*S1S1*) の成熟花粉の液体培養を行い、S ハプロタイプの異なる花柱粗タンパク質を複数添加して、不和合・和合反応を評価し、自家不和合関連遺伝子の発現を含めて自己・非自己認識機構を明らかにすることを目的とする。そのために、マイクロピペットを利用してカンキツの花粉 1 粒をピックアップし、DNA 抽出、遺伝子増幅を行い、SSR マーカーにより遺伝子型を決定する。また、遺伝子型が異なる遺伝系統の花粉や花柱粗タンパク質を利用して、花粉液体培養を行い、自家不和合性に関する自己・非自己の認識モデルを明らかにする。

3. 研究の方法

実験1. SSR マーカーによる単一花粉の遺伝子型の決定

植物材料には、宮崎大学圃場栽植の‘晩白柚’野生型と半数体ブンタン BX1 の倍加半数体である Doubled Haploid (DH) の蕾を供試した。BX1 は‘晩白柚’ (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) と‘ルビーレッド’グレープフルーツ (*C. paradisi*) との二倍体間交雑で得られた小粒子種子由来の半数体である (Toolapongら, 1996)。

‘晩白柚’単一花粉を用いた Simple Sequence Repeat (SSR) 解析を行うために、まず花粉培養時間が SSR の成功頻度に及ぼす影響について調査した。花粉培養は内田ら (2012) の方法を使用した。カンキツ液体花粉培地 (塩化カルシウム 0.04%, ホウ酸 0.01%, リン酸二水素カリウム 0.0007%, ショ糖 10%, yeast extract 0.02%, pH7) を使用し、25℃、暗黒条件下で 2, 4, 6, 8 および 10 時間培養した。その後、液体培地 3mL に Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (ICI 社 Tween20 相当品) を 1 μ L 加え、倒立顕微鏡下 (Axio Vore, AI, Carl Zeiss) で観察しながら、マイクロピペット (GILSON, 1-10 μ L) を使用して花粉を液体培地 1 μ L と共に採取した (第2図)。花粉からの DNA 抽出は Honshoら (2016) の方法を一部修正して行った。採取した花粉は、花粉 DNA 抽出 Buffer (SDS 0.01%, プロテインキナーゼ K 0.1 μ L \cdot μ L⁻¹, 1 \times PCR Ex Taq Buffer) 2 μ L に移し、30 60 分, 95 10 分で酵素処理を行い、単一花粉から DNA を抽出した。



第2図 単一培養花粉の採取 (bar = 10 μ m)

第1表 カンキツにおける単一花粉の SSR 解析に使用した SSR マーカー

LG	SSRマーカー	Product size	フォワードプライマー配列	リバースプライマー配列	Universal primers
6	SSR08B82.1	169	GTTGTA AAAACGACGGCCAGTTGACAAAAGGGTGAAGGAG	CAACCGTTCAAGAAAGCAT	UnivM13
6	SSR08B29.2	160	CGACGACTCCTGGAGCCCGCTCCTCAGCAAGAGATCAC	GCGGGTACTGATAGTACTG	L11F
6	TSRP06.2	208	CGACGACTCCTGGAGCCCGAACAGCACAACACGCAAA	CAAGTACATGAACACGCAC	L11F

LG	SSRマーカー	Product size	フォワードプライマー配列	リバースプライマー配列	Universal primers
1	TSRA103	188	GTTGTA AAAACGACGGCCAGTTGGAGATGCCTCTAACTTAACATGG	TGTTGTCTACGTTAATCAGACGG	UnivM13
2	TSRP07	161	CGACGACTCCTGGAGCCCGATCACCACCTTATATTGCTCAT	CGACCTATCATAGAAAGCACACA	L11F
4	TSRA108	187	GATTTAGGTGACACTATAGTCAACTTGTTTCACGACTTTTCAC	CTCAGCAGATCCAGAAGGT	SP6
5	CX0004	276	GATTTAGGTGACACTATAGAAACCCCACTTCACAGCAAC	GAAAGCGAGCCTTTGATGTC	SP6
7	GSR6101	248	GTTGTA AAAACGACGGCCAGTAA AAAACAGAGCAAGGAAC	TGCAATCCCAATAATAGCAAAG	UnivM13

次に、培養した花粉から抽出した DNA を用い SSR 解析を行った。SSR プライマーは Shimizuら (2016) の報告より使用したプライマー (第1表) の中から連鎖群 6 に位置する SSR08B82.1、TSRP06.2 および CiBE0447 を使用し、Multiplex PCR を行った。このプライマー Mix は、4 種類の蛍光ラベルされたユニバーサルプライマーである UnivM13, Lambda11RV, L11F, SP6 (Schuelke, 2000; Honshoら, 2012) の配列を 5' 末端に付加した tailed-Forward プライマーならびに Reverse プライマーを用いて調整した。PCR 後、Applied Biosystems 3500xL genetic analyzer (Applied Biosystems) で分析し Gene Mapper®ソフトウェア v4.0 (Applied Biosystems) で解析した。

次に、花粉培養後の花粉管内の核の存在について調査した。前述した方法により培養した花粉を Hoechst 染色した。培養時間は SSR の成功頻度の実験と同様に、2, 4, 6, 8 および 10 時間とした。Hoechst 染色は、液体培地 1mL 当たり 10 μ g \cdot mL⁻¹ Hoechst 溶液 10 μ L と Triton-X 5 μ L を加え、15 分間暗黒条件下に置いた後、落射蛍光顕微鏡 (BX51: Olympus, Tokyo, Japan) を使用し、花粉管内の核の有無を観察した。花粉管長は、ランダムに伸長している単一花粉を 20 個選び、マイクロメーターを用いて測定した。

なお、本実験では、‘晩白柚’野生型と半数体ブンタン BX1 の葉から DNA 抽出し、SSR 解析した結果を対照として使用した (末吉, 2017; 西川ら, 2017)。葉からの DNA は、DNA 抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN) を使用して抽出し、抽出した DNA は 4℃ で保存した。

実験2. 倍加半数体の花粉液体培養による自家不和合性の評価

植物材料として、宮崎県総合農業試験場亜熱帯支場のカンキツ園にて管理されているヒュウガナツ普通系、他 5 品種の開花直前の花蕾を 4 月下旬に採取し、以後の実験に用いた。採取した花蕾から薬をピンセットで摘出し、常法によって開約した。開約後に回収した花粉は実験に供試するまで -40℃ にて保存した。

また、雌ずい粗抽出物の調整は、佐々ら (1996) の方法を使用した。つまり、-40℃ で保存していた雌ずいから花柱のみを切り分け、素早く乳鉢に入れた後にイソプロパノール 0.1% メルカプトエタノールを加え、液体窒素を加えながら粉碎した。その後、エッペンに移し、0、12000rpm、20 分遠心し、ペレットを崩さないように上清を捨て、その後ボルテックスでペレットを崩し、もう一度イソプロパノール 0.1% メルカプトエタノールを 1ml 加え、0、12000rpm、20 分で遠

心し、上清を同様に捨てた。その後、乾燥させ、イソプロパノールパウダーとして-40 で保管した。抽出液を作る際は、1mg のイソプロパノールパウダーに対して、2%Ampholine pH3.5-10、10%glycerol、6.1%2-mercaptoethanol で作製した抽出液を 40 μ l 加え、小型回転培養機ローターRT-5(タイテック社)を用いて転倒混和後、0、12000rpm、10 分間で遠心し、上清を雌ずい粗抽出液として使用した。また濃度は分光光度計(Smart SpecTM plus, BIO-RAD)を使用して Bradford 法に従い測定した。

次に、その抽出した雌ずい抽出物を使用して、液体花粉培養を用いた自家不和合現象を評価した。詳細には、花粉液体培養は安部ら(2010)の方法に従い、2ml の液体花粉培養培地[0.04% (w/v)CaCl₂, 0.01%(w/v)H3BO3, 0.0007%(w/v)KH₂PO₄, 10% (w/v) sucrose, 0.02% (w/v) yeast, pH 7.0]を用いて 25、暗黒条件下で花粉を培養した。培養開始から 4 時間後、内田ら(2011)に従い、調整した雌ずい粗抽出物を 50 μ g 加えた。さらに 2 時間培養した後、花粉の発芽や破裂状況を分析するために、25 粒/1 視野として、ルーチン倒立顕微鏡(Primo Vert, ZEISS)にてシャーレあたり 10 視野をカウントした。また、1 処理区あたり 3 反復(シャーレ)で行った。

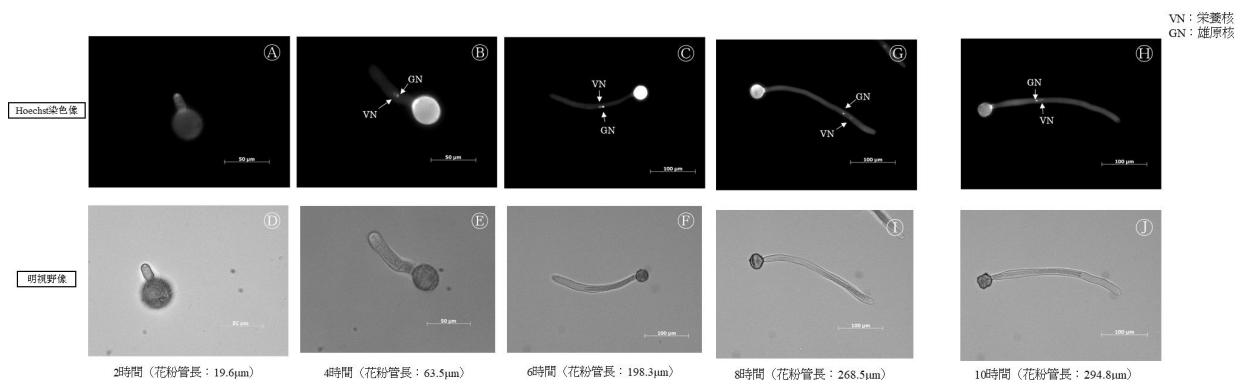
次に、この液体花粉培養を用いて、様々な S ハプロタイプを有するカンキツの花柱粗抽出物により和合/不和合現象を観察した。実験材料は、花粉として‘ヒュウガナツ’普通系を使用し、花柱粗抽出物としては‘バンペイユ’(S2S1)、『土佐ブantan’(S3S1)、『ハッサク’(S4S5)、『ユゲヒョウカン’(S6S7)および‘シシユズ’(S1S6)を供試した。本研究で使用する S ハプロタイプは Ngo ら(2011)が推測したものを使用した。また、対照区として‘ヒュウガナツ’普通系花粉/ヒュウガナツ普通系花柱処理区、ヒュウガナツ普通系花粉/抽出液のみの処理区を計 7 処理区で観察を行った。各処理区はそれぞれ 3 反復ずつ行った。

4. 研究成果

実験 1. SSR マーカーによる単一花粉の遺伝子型の決定

‘晩白柚’野生型の単一花粉 22 個を採取し、各培養時間の SSR 成功頻度について検討した。SSR プライマーは、連鎖群 6 に位置する SSR08B82.1、TSRP06.2 および CiBE0447 を使用した。SSR08B82.1 では、8 時間培養時に単一花粉 16 個においてピークが検出され、成功頻度が 72.7% と最も高かった。TSRP06.2 では、2 時間培養時に単一花粉 13 個においてピークが検出され、成功頻度が 59.1% と最も高かった。CiBE0447 では、どの培養時間でも必ずピークが検出され、成功頻度が 100% を示した。この結果より、SSR プライマーごとに最も高い成功確率を示す花粉培養時間が異なることが分かった。そのため、これ以降では、2 時間培養した後に花粉管が出ているものを採取し、使用することにした。

また、各花粉培養時間における花粉管内の核の有無を確認した。2 時間培養時では、花粉管内に核の存在を確認できなかったが、4 時間培養時では、花粉管内に核の存在を確認できる花粉が数個体存在した。さらに、6 時間培養以降は、高い確率で花粉管内に核の存在を確認でき、栄養核と雄原核の 2 個の核が観察された(第 3 図)。また、培養時間と花粉管長の関係について成熟花粉 20 個の平均を求めた。培養時間が増加するにつれ、平均の花粉管長も増加していた。‘晩白柚’の生長は速く、2 時間培養で 28.85 μ m 4 時間培養で 63.5 μ m 6 時間培養で 188.25 μ m、8 時間培養で 256.75 μ m の平均花粉管長を示した。花粉管は 4~6 時間培養間で最も伸びており、平均 90 μ m 以上の伸長がみられた。培養開始 6~8 時間までにその伸長が緩やかになり、10 時間培養 286.50 μ m と 8 時間培養 256.75 μ m では 1% の有意水準で有意差がみられなかった。



第 3 図 ‘晩白柚’における培養した成熟花粉と核

次に、‘晩白柚’野生型の単一花粉を実験材料とし、Genetic analyzer を用いた分析から獲得したエレクトロフェログラムから、各 SSR プライマーの遺伝子型に対する単一花粉をまとめ、対立遺伝子の分離比を調査した(第 2 表)。それぞれ分離比として SSR08B29. 2 (連鎖群 6) では 34 個の単一花粉を解析したところ、156 : 159 = 21 : 13 であった。2 検定を用いて対立遺伝子の分離比が 1 : 1 になると仮定したときの有意確率である P 値は、SSR08B29. 2 : 0.17 であっ

た。他のマーカーでも同様であり、今回使用した SSR プライマーのうち SSR08B29、SSR08B82.1、TSRP06.2、TSRA103、TSRP07、CX0004、GSR6101 は、有意水準 5% で染色体モデルと同様の分離比を示すことが分かった。

第 2-1 表 ‘晩白柚’ および倍加半数体 BX1-DH の単一花粉における連鎖群 6 の SSR マーカーを使用した際の対立遺伝子の分離

植物材料	遺伝子型 ^z	SSRマーカー					
		SSR08B29.2		SSR08B82.1		TSRP06.2	
	花粉数	156	159	161	176	201	204
‘晩白柚’	花粉数	21	13	19	21	22	13
	花粉合計数	34		40		35	
	P (比)	0.17 (1:1)		0.752 (1:1)		0.128 (1:1)	
倍加半数体 BX1-DH	花粉数	22	0	26	0	0	25
	花粉合計数	22		26		25	

^zSSR遺伝子型はPCR産物のサイズ (bp) を示す

第 2-2 表 ‘晩白柚’ および倍加半数体 BX1-DH の単一花粉における連鎖群 6 以外の SSR マーカーを使用した際の対立遺伝子の分離

植物材料	遺伝子型 ^z	SSRマーカー									
		TSRA103 (連鎖群1) ^y		TSRP07 (連鎖群2)		TSRA108 (連鎖群4)		CX0004 (連鎖群5)		GSR6101 (連鎖群7)	
	花粉数	170	174	154	181	179	182	259	271	237	246
‘晩白柚’	花粉数	27	25	34	24	30	17	15	24	19	27
	花粉合計数	52		58		47		39		46	
	P (比)	0.786 (1:1)		0.189 (1:1)		0.030 (1:1)		0.150 (1:1)		0.238 (1:1)	
倍加半数体 BX1-DH	花粉数	60	0	0	56	0	59	56	0	0	50
	花粉合計数	60		56		59		56		50	

^zSSR遺伝子型はPCR産物のサイズ (bp) を示す

^y() は連鎖群を示す

次に、半数体ブタン BX1 の倍加半数体である DH (BX1-DH) の単一花粉を実験材料とし、Genetic analyzer を用いた分析から獲得したエレクトロフェログラムから、各 SSR プライマーの遺伝子型に対する単一花粉の数を第 2 表にまとめ、対立遺伝子の分離を調査した。なお、倍加半数体である BX1-DH の花粉は 2 時間培養では花粉管伸長が十分ではなかったため、4 時間培養した後に花粉管が出ているものを採取し、使用することにした。それぞれ分離比として SSR08B29.2 (連鎖群 6) では 22 個の単一花粉を解析したところ、156 : 159 = 22 : 0 であり、倍加半数体 BX1-DH がもつ対立遺伝子のみが観察された。他のプライマーでも同様のことが得られ、それぞれの SSR プライマーが示した遺伝子型は、倍加半数体 BX1-DH においてコルヒチン倍加処理の元となった半数体ブタン BX1 の葉の遺伝子型と同様の遺伝子型である。

末吉 (2017) と西川ら (2017) が注目していた連鎖群 6 の SSR プライマーのうち SSR08B82.1 および TSP06.2 は、倍加半数体 BX1-DH においては BX1 と同様の遺伝子型を示し、‘晩白柚’野生型を用いた単為発生前の遺伝子分離比の調査では、減数分裂を介した染色体モデルと同様の 1:1 を示した。

しかしながら、当初目的としていた特定の S 遺伝子座に連鎖した SSR マーカーは見つけれず、花粉の遺伝子型までの成果となった。Lin ら (2019) は ‘Clementin’ や ‘Shatian’ pummelo を材料に自家不和合性に関与する可能性が高い *S-RNase* を 5 つ同定している。今後、この遺伝子に強く連鎖するマーカーを同定し、花粉の S ハプロタイプの同定に繋げたい。

実験 2 . 倍加半数体の花粉液体培養による自家不和合性の評価

普通系ヒュウガナツ花粉におけるいくつかの推定 S ハプロタイプの花柱粗抽出物が花粉発芽率に及ぼす影響について調査した。その結果、すべての処理区においてほとんど同じ花粉発芽率が示され、それぞれについて有意な差は認めることができなかった。有意差は示されなかったものの、ユゲヒョウカン (S6S7) が最も高く (22.5%)、普通系ヒュウガナツ (S1S8) で最も低かった (16.5%)。次に、普通系ヒュウガナツ花粉におけるいくつかの S ハプロタイプの花柱粗抽出物が花粉管破裂率に及ぼす影響について調査した。その結果、コントロールであるヒュウガナツ (S1S8) が最も破裂率が高く (47.9%)、続いて土佐ブタン (S3S1)、バンペイユ (S2S1)、シシユズ (S1S6)、ユゲヒョウカン (S6S7)、ハッサク (S4S5)、抽出液のみとなった。また、今回の用いた実験供試材料の S ハプロタイプは、S1、S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8 でそれぞれ自己の S

ハプロタイプは自己の型と同じタイプの花粉側因子を認識できないため、今回の実験結果を基に考察すると、S1はS1、S2、S3、S8、S2はS1、S2、S3はS1、S3、S4はS4、S5、S5はS4、S5、S6はS1、S6、S7はS1、S7、S8はS1、S8の花粉側因子を認識できないと推測できた。仮定として、ヒュウガナツのSハプロタイプであるS1、S8のどちらとも認識できるSハプロタイプを++(S4、S5、S7)、どちらかを認識できるSハプロタイプは+(S2、S3、S6)、どちらとも認識できないSハプロタイプは-とした(S1、S8)。よってそれぞれの推定S遺伝子型より、対照区であるヒュウガナツのS1およびS8ハプロタイプを認識できる程度について、ヒュウガナツ(S1S8)は--。土佐ブント(S1S3)は+-。バンペイユ(S1S2)は+-。シシユズ(S1S6)は+-。ユゲヒョウカン(S6S7)は+++。ハッサク(S4S5)は++++と推定された。また、非自己花粉を認識することによって和合になると推測されるので、本実験においては、S1、S8ハプロタイプを認識できることで花粉管破裂率が低下すると考える。よって、この推測と今回得たSハプロタイプ実験結果を比較すると、有意差に若干の違いはあるものの、花粉管破裂率のデータと同じ傾向を示した。まだ実験供試材料が少ないためこれから更なる実験が必要であるが、Sハプロタイプによって花粉管破裂率が異なることを観察することができ、ヒュウガナツにおいても複数の花粉側因子が機能していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Characteristics in autotetraploid kumquats (*Fortunella* spp.) induced by colchicine treatment to nucellar embryos and their utilization for triploid breeding. Tsunaki Nukayaa, Miki Sudo, Masaki Yahata, Yoshiyuki Nakajo, Tomohiro Ohta, Kiichi Yasuda, Akiyoshi Tominaga, Hiroo Mukai and Hisato Kunitake, *Scientia Horticulturae* 245 (2019) 210–217. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

ブント倍加半数体の交雑後代におけるSSRマーカーによる遺伝子型解析
河野美樹・西川奈菜・末吉乃梨子・八幡昌紀・清水徳朗・平野智也・國武久登(宮崎大農学部, 静岡大農学部, 農研機構果樹茶部門) 2019.園学研.(Hort. Res. (Japan)) (別) 1: 269.
園芸学会平成31年度春季大会(於: 明治大学)

カンキツにおける単一花粉のSSRマーカーによる遺伝子型解析
河野美樹・西川奈菜・末吉乃梨子・八幡昌紀・清水徳朗・平野智也・國武久登(宮崎大農学部, 静岡大農学部, 農研機構果樹茶部門) 2018.園学研.(Hort. Res. (Japan)) (別) 2: 319.
園芸学会平成30年度秋季大会(於: 鹿児島大学)

〔図書〕(計1件)

Flowering and Fruiting Haploid and Doubled Haploid Pummelos. Masaki Yahata and Hisato Kunitake, *Citrus, Health Benefits and Production Technology* (Edited by Muhammad Sajid), 2019 PP.60-70

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
該当無し

〔その他〕

ホームページ等
http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~abs/plant_breeding/

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 國武 久登

ローマ字氏名: HISATO KUNITAKE

所属研究機関名: 宮崎大学

部局名: 農学部応用生物科学科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 80289628

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 該当無し