

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：16K07600

研究課題名(和文) 倍数性が異なる組織を利用したヒュウガナツ非還元配偶子の遺伝的構成の解明

研究課題名(英文) Research for the genetic composition of unreduced pollen of Hyuganatsu using tissues with different ploidy levels

研究代表者

本勝 千歳 (Honsho, Chitose)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：30381057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は‘西内小夏’の非還元花粉形成過程を明らかにすることを目的に行われた。まず、クレメンティンにおいて報告されている連鎖地図情報、DNAマーカー情報を基にセントロメア付近のSNPマーカーを検索し、定量PCRによって最大六倍体までの対立遺伝子数比を二次元平面上に反映できることを示した。次に、‘西内小夏’受粉果より採取した正常種子の胚と内種皮のSNPジェノタイピングを行い、それぞれの遺伝子型から非還元花粉の遺伝子型を推定した。その結果、非還元花粉の遺伝子型のほぼ全てがヘテロ接合性となっており、非還元花粉の形成がFDR(第一分裂復旧)によるものであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒュウガナツの枝変わり品種である‘西内小夏’は自家不和合性が弱く、種子がしいな化する特徴を持つ。これは非還元花粉の形成に起因すると考えられ、これは無核性品種育種のための三倍体個体の作出や、その親品種としての四倍体作出などに利用可能であるが、その形成過程は明らかでなかった。本研究の結果より‘西内小夏’非還元花粉の形成過程ならびに遺伝的構成に関する知見が得られ、育種において有用な情報を獲得することができた。また、本研究では六倍体までの高次倍数性組織における対立遺伝子数を定量PCRによって計測する手法を確立した。この手法は、他の高次倍数性植物においても応用可能な技術であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research was conducted for getting knowledge about the mode of unreduced pollen formation in ‘Nishiuchi Kontasu’ hyuganatsu. Based on the information of linkage map and DNA markers in clementine mandarin, SNP markers located near the centromere were screened. It was shown that the ratio of the number of alleles up to hexaploid was able to be reflected on the two dimensional plot. SNP genotypings for embryo and tegmen (containing endosperm tissue) from normal seeds obtained by pollination of ‘Nishiuchi Konatsu’ pollen revealed that almost all loci of the unreduced pollen were heterozygous, suggesting that the for unreduced pollen was formed through FDR (First Division Restitution).

研究分野：果樹園芸学

キーワード：園芸学 果樹 カンキツ 倍数性 非還元花粉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒュウガナツ (*Citrus tamurana hort. ex Tanaka*) は自家不和合性を持ち、かつ単為結果性がほとんど無いため、結実には他家受粉を必要とし、その結果形成された果実には多数の種子が含まれる。しかし、このヒュウガナツの枝変わり品種である‘西内小夏’は自家結実し、かつ種子がしいな (発達不全の小粒種子) になるという特徴を持っている (ただし全てがしいなにはならず、1, 2 個正常種子が含まれる事が多い)。よって受粉樹の混植および受粉作業が不要になり、また生産される果実の商品価値が高まることから、近年栽培が広がっている。申請者はこれまでに、この品種の生殖特性について調査してきたが、この‘西内小夏’に見られる結実性は、非還元花粉 (親個体と同数の染色体を持った花粉) の生産によるものであることが明らかにされてきている。現在では、この非還元花粉を倍数性育種への利用が考えられている。そのときに、非還元花粉がどのような遺伝的構成を持つかを明らかにしておくことは重要である。

一般的に非還元配偶子の形成は、減数分裂時のどの過程で異常が生じるかによって、第一分裂復旧 (First Division Restitution, FDR) と第二分裂復旧 (Second Division Restitution, SDR) に分類できる。この時、親個体でヘテロとなっている対立遺伝子は、染色体の乗換えによって生じる遺伝的組換えを考慮しなければ、FDR によってできた非還元配偶子ではヘテロとなり、SDR の場合はどちらか一方のホモとなることが知られている。よって、非還元花粉形成過程を理解することと、非還元花粉の接合性 (zygosity)、すなわち遺伝的構成を明らかにすることは極めて密接に関連している。

接合性を調べるには適当な共優性の DNA マーカーを用いた遺伝解析が最も単純かつ簡便である。しかし‘西内小夏’の場合、非還元花粉が受精した後代個体を獲得することが難しく、このような遺伝解析を困難にしている。すなわち、‘西内小夏’は他のカンキツ属植物に比べ高頻度で非還元花粉を生産する特徴を持つものの、実際には生産する花粉のほとんどは還元花粉 (n) で非還元花粉の割合は 1 割程度でしかないため、‘西内小夏’花粉受粉果の中から非還元花粉が受精した個体を選別することがまず困難である。さらに、非還元花粉は 2n 花粉であることから、通常の還元卵 (n) と受精した場合、接合子は三倍体となり胚が発育途中で退化するため、得られる種子は発芽能力を持たないしいなとなる。よって、非還元花粉が受精した個体を識別することができたとしても、個体を維持するためには救助培養などを行わなくてはならない。

2. 研究の目的

本研究では、その個体獲得の困難さを回避しつつ、非還元花粉の接合性を推定する解析方法を考案した。‘西内小夏’非還元花粉 (2n) と‘西内小夏’非還元卵 (2n) とが受精した四倍体個体は簡単に獲得でき、これを解析に利用する。‘西内小夏’は本質的に自家不和合性を持ち、‘西内小夏’を自家受粉すると還元花粉 (n) は自家不和合性反応によって花粉管伸長を停止させる。一方で、非還元花粉のみ不和合性が打破され、花粉管は花柱内を伸長し受精に至る。雌性側の卵細胞はほとんどが正常に減数分裂した半数体で、これらと受精した場合三倍体となり種子はしいな化するが、まれに形成される非還元卵と受精すると四倍体の正常種子となって果実内で成長する。よって、‘西内小夏’を自家受粉すると、自家不和合性反応により非還元花粉のみが伸長して受精に至るが、非還元卵と受精した場合のみ正常種子として成長する。よって‘西内小夏’果実内に見られる正常種子は、四倍体の非還元花粉が受精した個体であり、これは容易に獲得することができる。ただし、これは DNA マーカーを利用した接合性の解明には不向きな材料である。それは、両親の遺伝子型が同じであることから、マーカーの遺伝をみたときに、どちらの親から由来するものか分からないからである。

ここで、カンキツの種子は胚を二層の種皮に覆われた構造をしている。その中で内側の種皮（内種皮, tegmen）は胚乳組織の残存物である可能性が古くより言われていた(Schneider, 1968)。このことについて、近年柳本ら(2014)は、胚と内種皮の倍数性を測定し、胚が 2x の場合、内種皮は 3x となり、胚が 4x の場合、内種皮は 6x となることを報告した。これは、内種皮が胚乳組織由来であることを強く支持する結果である。申請者はこの内種皮を‘西内小夏’非還元花粉の接合性の解明に利用できるものと考えた。すなわち、‘西内小夏’のある遺伝子座におけるヘテロ接合の対立遺伝子について、‘西内小夏’自家受粉由来四倍体種子の胚(4x)と内種皮(6x)の両方で、遺伝子型を正確にジェノタイピングすることにより、雄性、雌性の両非還元配偶子の遺伝子型を一意的に決めることができる。本研究では、この 4x や 6x の高次倍数性組織における対立遺伝子数の正確な測定を行い、それらの遺伝子型から非還元花粉および非還元卵の形成過程について考察を行った。

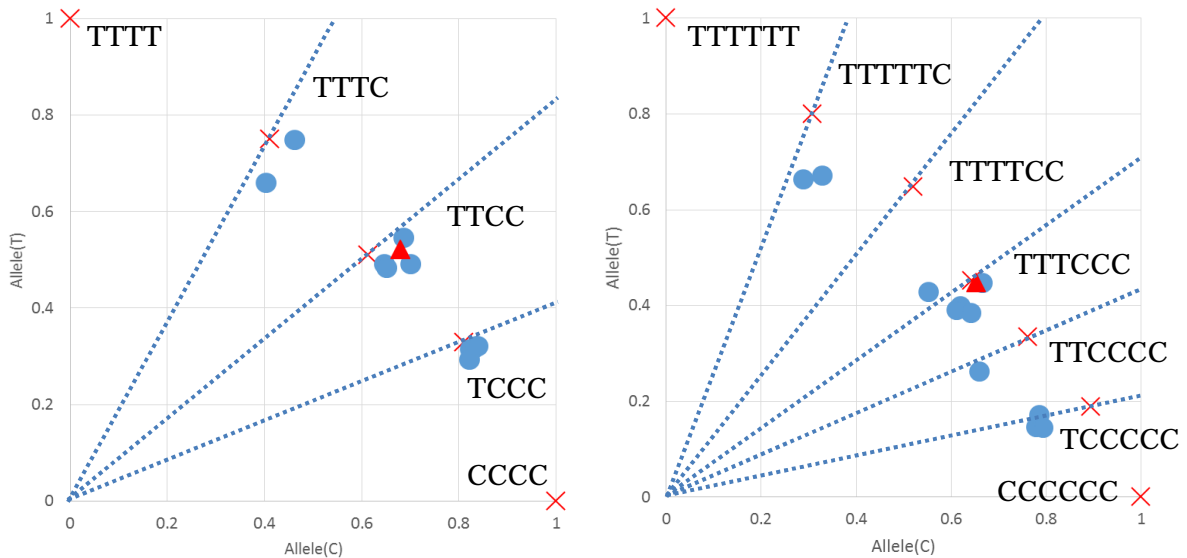
3. 研究の方法

クレメンティンのセントロメア位置情報の報告(Aleza ら, 2015)を参考に、セントロメア付近の SNP およびその周辺配列を含んだ 20 遺伝子座を選抜した。その後、ヒュウガナツおよびハッサクの葉から CTAB 法により DNA を抽出し、選抜した遺伝子座を PCR により増幅した。増幅が確認できた 16 遺伝子座をダイレクトシーケンスによって解析し、両者においてヘテロかつ同じ遺伝子型を持つ SNP 遺伝子座を選抜した。次に、SNP 遺伝子座のゲノム内の存在が一か所のみであるかを確認するために、本研究室所有のヒュウガナツとハッサクの交雑個体 20 個体の各 SNP 遺伝子型をダイレクトシーケンスによって解析し、カイ二乗検定により遺伝子型の分離比がホモ：ヘテロ：ホモ = 1：2：1 に最も適合した SNP 遺伝子座を選抜した。選抜された SNP マーカーのどちらか一方のアリルをホモで持つ個体の DNA をそれぞれ 6:0, 5:1, 3:1, 4:2, 3:3, 2:4, 1:3, 1:5, 0:6 の比で混ぜ合わせ、対立遺伝子数比の変動をシミュレートした標準サンプルセットを作成した。さらに 2017 年 4 月下旬から 5 月下旬に‘西内小夏’×‘西内小夏’、普通系ヒュウガナツ×‘西内小夏’の交配をそれぞれ 200 花ずつ行い、結実した果実から獲得した正常種子 18 個より内種皮を採取し、胚は播種して発芽させた。内種皮と発芽した植物体の葉から DNA を抽出し、標準サンプルセットとともにリアルタイム PCR 装置によって選抜した SNP 遺伝子座のジェノタイピングを行い、同時にフローサイトメーターにより倍数性を測定した。

4. 研究成果

クレメンティンの遺伝地図情報から選抜した 20 遺伝子座のダイレクトシーケンスを行った結果、5 遺伝子座の合計 18 か所においてヒュウガナツ(‘西内小夏’)およびハッサクにおいて同じヘテロ接合遺伝子座となっている SNP マーカーを獲得した。これらのヒュウガナツ×ハッサクの交雑後代への分離を見たところ 2 つの SNP 遺伝子座において有意水準 5% ($\chi^2=5.991$) で期待される分離比に適合した。特に CiC5327 に存在する SNP が最も適合し、以降の実験への使用に最も適当であると判断した。次にヒュウガナツとハッサクの交雑個体で CiC5327(C, T)の遺伝子型がホモとなっているものを選抜し、それらを様々な比で混ぜ合わせた DNA 溶液を作り、リアルタイム PCR 装置でジェノタイピングを行ったところ、二次元平面上に対立遺伝子数比が反映されたプロットを得ることができた。交配によって得られた正常種子 18 個のうち、フローサイトメーターにより内種皮が 6x、実生(胚)が 4x を示したものが 10 個体あり、それらについて CiC5327 のジェノタイピングを行ったところ、全ての個体の遺伝子型情報を獲得することができた(第 1 図)。そのうちの 1 個体では、内種皮の遺伝子型と実生の遺伝子型が矛盾

する結果となり、非還元花粉の遺伝子型を決定できなかったが、残り9個体については、内種皮と実生の遺伝子型から非還元花粉の遺伝子型を決定することができ、8個体がヘテロ接合性、1個体がホモ接合性であることが明らかになった(第1表)。これは、非還元花粉がFDRプロセスにより形成されることを支持する結果であり、‘西内小夏’が新たな品種育種において有用であることが示唆されたと共に、本研究において行った倍数性の差異を利用したリアルタイムPCRによる定量分析は、六倍体までの高次倍数性組織の遺伝子型を明らかにすることができた。



第1図 実生(4x)(左)および内種皮(6x)(右)のCiC5327のジェノタイピング結果。×:標準サンプル, ●:ヒュウガナツ(‘西内小夏’)の遺伝子型(TC), ▲:実生(左)および内種皮(右)サンプル

第1表 各分析個体のCiC5327の遺伝子型解析の結果と想定される非還元配偶子の遺伝子型

受粉組合せ	個体番号	遺伝子型		想定遺伝子型	
		内種皮	葉(実生)	非還元花粉	非還元卵
‘西内小夏’ × ‘西内小夏’	116	TCCCC	TCCC	TC	CC
	121-1	TTTCCC	TCCC	判別不明	
	121-3	TTTTTC	TTTC	TC	TT
	136	TTCCCC	TCCC	CC	TC
	138	TTTCCC	TTCC	TC	TC
	149-1	TTTCCC	TTCC	TC	TC
普通系ヒュウガナツ × ‘西内小夏’	61	TTTTTC	TTTC	TC	TT
	69	TCCCC	TCCC	TC	CC
	83	TCCCC	TTCC	TC	CC

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

坂本龍音・石村修司・鉄村琢哉・本勝千歳. ヒュウガナツ‘西内小夏’の異なる倍数性組織を使用した非還元花粉形成過程の推測. 園学研 17 別 2. 418. 2018. 園芸学会平成 30 年度秋季大会(鹿児島大学)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。