

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06020

研究課題名(和文)カンキツにおける偽受精胚珠培養による効率的な半数体作出と単為発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Efficient haploid production using the pseudo-fertilized ovule culture and clarification of the parthenogenesis mechanism in citrus.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：晩白柚'の半数体作出のために偽受精胚珠培養について検討した。'晩白柚'を種子親、花粉親として'川野夏橙'を供試し、0Gy~500Gyの線量を花粉に照射した。500Gy処理区から発生したカルスは半数体であり、種子親由来の対立遺伝子のみを持ち、雌性由来の半数性カルスであった。また、線量を照射した花粉を交配した40日後の胚珠には発達した胚が形成されており、無照射区と差異はなかった。胚の発達は、交配40日目までは対照区と同様に進行するが、それ以降に発達が停止すると推測された。総合的に判断すると、交配40日後に胚珠培養を開始すると、半数性細胞が発達を続ける可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

半数体は倍加処理によって純系を得られることや、相同ゲノムを1つしか持たないことから遺伝子解析のための重要な材料となる。本研究では、線量を'川野夏橙'の花粉に照射し、'晩白柚'の偽受精胚珠培養を行い、胚の発達を観察した。パラフィン切片法による胚珠の観察の結果、交配40日後の胚珠には発達した胚が形成されており、対照区と処理区間に差異はなかった。しかし、交配60日と80日後では未発達の胚や胚乳のみを持つ胚珠が増加した。このことから、培養時期は交配40日後が適しているものと考えられた。本研究の成果は、カンキツの雌性配偶子からの単為発生制御の可能性が高まり、他の品種への応用もできると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pseudo-fertilized ovule culture was examined for the production of haploid in 'Banpeiyu' pummelo [Citrus maxima (Burm.)]. The pollen of 'Kawano-natsudaidai' was irradiated with rays from 0 Gy to 500 Gy, and crossed with 'Banpeiyu' pummelo as seed parents. Simple sequence repeat (SSR) analysis proved that the callus was a haploid derived from the egg cell, since it had only alleles derived from the seed parent. Forty days after crossing pollen irradiated with -rays, well-developed embryos were formed in the ovule, which did not differ from those in the non-irradiated treatment. Therefore, it was inferred that embryo development in pseudo-fertilized ovule culture progressed similarly to that of the control until 40 days after crossing, but development ceased thereafter. Overall, we consider the possibility that if ovule culture is started after 40 days, haploid cells would normally continue to develop.

研究分野：園芸学

キーワード：カンキツ 半数体 偽受精胚珠培養 SSR 線 バンペイユ 雌性配偶子 カルス

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の中心となる「半数体 (haploid)」とは、細胞当たりの染色体数が通常個体の半分である個体をいう。我々の研究グループは、半数体作出が困難なカンキツにおいて、'晩白柚' (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) と 'ルビーレッド' グレープフルーツ (*C. × paradisi*) との二倍体間交雑から得られた小粒種子を播種し、三倍体を選抜する過程で半数体を獲得し、BX1 とした。また、その腋芽にコルヒチン処理を行い、完全な倍加半数体 (BX1-DH) の育成に成功した。2015 年には開花・結実し、カンキツの完全純系の形態や遺伝学的特性を世界ではじめて確認した (Yahata・Kunitake, 2018, )。しかしながら、小粒種子の選抜では半数体作出頻度が低く、遺伝学的な解析には不十分な技術であった。そこで、軟 X 線 で不活化した花粉との交配果実から得られた胚珠を培養することにより (偽受精胚珠培養)、多くの胚様体や幼植物体の中に半数体が高頻度に得られる現象を発見した (Yahata ら, 2010)。このように卵が受精を経ずに単独に発生を開始する単為発生 (parthenogenesis) の現象は多くの植物で確認されているが、そのメカニズムは十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、線の花粉への照射を利用した偽受精胚珠培養により雌性単為発生の誘導を行い、効率的な半数体作出系を確立する。また、偽受精胚珠培養中のステージごとに胚珠の組織切片を作成し、単為発生過程における卵細胞や中央細胞の分裂を観察する。さらに、前述したシロイヌナズナの単為発生関連遺伝子のブンタン半数体での保存性を詳細に調査する。

## 3. 研究の方法

### 実験 1 胚様体の発生に及ぼす花粉へのガンマ線量の影響

(1) 果実の形態的観察および胚珠培養 植物材料には、二倍体ブンタン'晩白柚' (*C. maxima* (Burm.) Merr.) を種子親として、二倍体ナツミカン'川野夏橙' (*C. natsudaidai*) を花粉親として用いた。

回収した花粉は、薬包紙を広げたガラスシャーレの上に置き、静岡大学理学部附属放射科学教育研究推進センターのコバルト 60 照射装置において、0, 100, 200, 300, 400 および 500Gy で照射された。交雑は、5 月中旬の開花直前の花を除雄し、綿棒で受粉した後に袋をかけた。交雑した果実は、約 40 日後の 6 月下旬に収穫し、果実重を調査した。

また、胚珠培養を行うに際し、まず交配 40 日後に収穫した果実を 70%エタノールに浸して殺菌した後、滅菌した包丁で胎座部分まで刃を入れないように割り、滅菌したピンセットで胚珠を無菌的に取り出した。胚珠は 20~30 mL 培地を分注したシャーレ (105 x 20 mm, フラットシャーレ, アズワン) に、ピンセットを用いて約 20 個置床した。培地には 3.0% スクロース、0.5 g・l<sup>-1</sup> 麦芽抽出物および 3.0 g・l<sup>-1</sup> ジェランガムを添加した 1/2 Murashige and Skoog (MS) 培地 (Murashige・Skoog, 1962) を用いた。培養は、すべて 25℃, 40 μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>, 16 時間連続照明の条件下で行った。調査は、培養 2 か月後から行い、胚珠より再生した胚様体は、上記の培地を分注した平底試験管 (30 x 120 mm, AGC テクノグラス・IWAKI) に移植した。

(2) 胚様体の倍数性解析 得られた胚様体の倍数性解析には、フローサイトメーター (Sysmex 社, CyFlow Ploidy Analyzer) による方法を用いた。また、Ollitrait ら (1994) の方法に従い、内部標準にはタヒチライム (*C. latifolia* Tan.) (2n=3x=18) の成葉を用いた。

(3) 胚様体および幼植物体の SSR 解析 サンプルの DNA は、DNA 抽出用キット (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN) を使用して抽出した。抽出した DNA は 4℃ で保存した。次に、6 対の SSR プライマー対から、プライマー Mix を調整し Multiplex PCR を行った。なお、プライマーの選抜と設計は Shimizu ら (2016) を参考にし、種子親である '晩白柚' と花粉親である '川野夏橙' を区別可能な対立遺伝子を示すものを選んだ。また、Kawano ら (2021) の報告より、半数体 5 系統ですべて同じ対立遺伝子を示した第 6 連鎖群の三つのプライマーを選んだ。

### 実験 2 胚様体の発生に及ぼす胚珠の発達ステージの影響

(1) 胚珠培養後の胚様体発生等の調査 交配 40 日および 60 日後に収穫した果実は 70%エタ

ノールに浸して殺菌した。交配 80 日後に収穫した果実は 70%エタノールをスプレーして殺菌を行った。その後、滅菌した包丁で胎座部分まで刃を入れないように割り、滅菌したピンセットで胚珠を無菌的に取り出した。胚珠は 20~30 mL 培地を分注したシャーレに、ピンセットを用いて 20~30 個置床した。培地には 3.0%スクロース、0.5 g/l 麦芽抽出物および 3.0 g/l ジェランガムを添加した 1/2Murashige and Skoog (MS) 培地を用いた。培養は、すべて 25 °C、40 μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>、16 時間連続照明の条件下で行った。

(2) 胚珠の組織学的観察 胚珠の形態的観察を行うために、胚珠縦断切片の実体顕微鏡による観察とパラフィン切片による観察を行った。胚珠縦断切片の供試材料には、交配 80 日後に得られた完全種子を用いた。パラフィン切片の供試材料には、交配 40 日、60 日後に得られた胚珠および交配 80 日後に得られた不完全種子、未発達胚珠を用いた。

#### 4. 研究成果

##### 実験 1 胚様体の発生に及ぼす花粉へのガンマ線量の影響

###### (1) 果実の形態的観察および胚珠培養

交配 40 日後に収穫した果実から無菌的に取り出した胚珠を培養し、培養 2 ヶ月後から実体顕微鏡による観察を行った。培養した胚珠数は 0Gy で 360 個、100Gy で 241 個、200Gy で 234 個、300Gy で 220 個、500Gy で 250 個となった (第 1 表)。培養後に観察された形態の変化は、胚様体、カルス、胚珠の肥大の三つであった。花粉に照射したガンマ線量が高いほど、このような培養後の形態変化の割合も低くなることが分かった。

Table 1 Fruit sets and ploidy levels of embryoids and calli in the cross of 'Banpeiyu' pummelo with 'Kawanonatsudaidai' pollen irradiated by various doses of gamma ray exposure.

Cross combination	Gamma ray exposure dose (Gy)	Av. fruit wt. (g)	No. of ovules cultured	No. of ovules forming callus (≥5mm)	No. of embryoids formation	X	2X	3X	Unidentified
'Banpeiyu' pummelo x 'Kawanonatsudaidai'	0	83.3ab <sup>2</sup>	360	7	13	0	9	1	10
	100	101.2a	241	4	4	0	3	1	4
	200	75.0ab	234	0	0	0	0	0	0
	300	61.5b	220	1	0	0	1	0	0
	400	60.9b	340	0	0	0	0	0	0
	500	87.5ab	250	1	1	0	0	0	0

<sup>2</sup> Mean separation by Tukey's multiple range test, P = 0.05.

###### (2) 胚様体の倍数性解析

本実験は、交配 40 日後に収穫した果実から無菌的に取り出した胚珠の培養後、胚様体またはカルスを形成した個体のうち、解析に十分なサイズに成長した個体を実験材料としてフローサイトメーターを利用した倍数性の評価を行った。フローサイトメトリーによるヒストグラムを第 1 図に示した。胚様体またはカルスの倍数性を第 1 表に示した。0Gy では合計で 10 個体の胚様体のフローサイトメトリー分析を行い、そのうち 9 個体が二倍体であることが推察され (第 1 図 B)、1 個体が三倍体であると推察された (第 1 図 C)。100Gy では

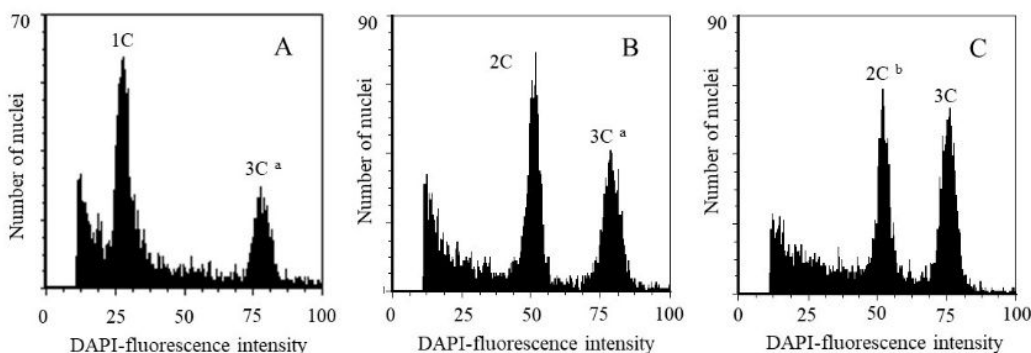


Fig. 1. Flow cytometric analyses of the embryoids and callus of 'Banpeiyu' pummelo after pollination with gamma ray irradiated pollen of 'Kawanonatsudaidai'. (A) 500 Gy-1 Callus ( $2n=x=9$ ) (B) 0 Gy-1 Embryoids ( $2n=2x=18$ ) (C) 0 Gy-4 Embryoid of ( $2n=3x=27$ )

<sup>a</sup> Tahiti lime was used as a control.

<sup>b</sup> 'Banpeiyu' pummelo was used as a control.

合計で4個体の胚様体の分析を行い、そのうち3個体が二倍体であると推察され、1個体が三倍体であると推察された。300Gyでは1個体のカルスの分析を行い、二倍体であると推察された。500Gyでは1個体のカルスの分析を行い、半数体であると推察された(第1図A)。

### (3)胚様体のSSR解析

本実験は、交配40日後に収穫した果実から無菌的に取り出した胚珠の培養後、胚様体またはカルスを形成した個体のうち、解析に十分なサイズに成長した個体を実験材料としてSSRマーカーを利用した遺伝子型解析を行った。半数性のカルスである500Gy-1を除いて、0Gyと100Gyの個体は全て‘晚白柚’由来のSSRアリルと‘川野夏橙’由来のSSRアリルを受け継いでおり、受精した個体であることが明らかになった。一方で半数性カルスの500Gy-1は‘晚白柚’由来のアリルのみを持っており、雌性配偶子由来の半数性カルスであることが分かった。

## 実験2 胚様体の発生に及ぼす胚珠の発達ステージの影響

### (1)胚珠培養後の胚様体発生等の調査

交配40日後、60日後および80日後に収穫した果実から無菌的に取り出した胚珠を培養し、培養1ヶ月後から実体顕微鏡による観察を行った。培養した胚珠数は、交配40日後の0Gyで365個、200Gyで970個、300Gyで1125個、交配60日後の0Gyで580個、200Gyで728個、300Gyで870個、交配80日後の0Gyで907個、200Gyで735個、300Gyで675個であった。培養後に観察された形態の変化は、実験1と同様に胚様体、カルス、胚珠の肥大があったが、今回はそれらに加えて発芽した実生が観察された。観察した胚様体、カルス、実生および胚珠の肥大の総数を月別に合計し、培養開始時期別に見ると、0Gy~300Gyにおいて受粉60日後の培養で形態変化する胚珠の割合が最も高かった。また、受粉80日後では、0Gyと200Gyにおいて形態の変化が見られる胚珠の割合が最も少なかった。

### (2)胚様体および幼植物体の倍数性およびSSR解析

交配40日後の0Gyでは合計で15個体の胚様体のフローサイトメトリー分析を行い、15個体全てが二倍体であることが推察された。交配80日後の0Gyでは合計で6個体の発芽実生の分析を行い、そのうち3個体が二倍体であると推察され、3個体が三倍体であると推察された。

また、0Gyの交配40日後の胚珠から得られた胚様体および交配80日後の胚珠から得られた実生は全て‘晚白柚’由来のSSRアリルと‘川野夏橙’由来のSSRアリルを受け継いでおり、受精した個体であることが明らかになった。交配80日後の胚珠から高頻度で得られた三倍体の個体は全て‘晚白柚’由来のSSRアリルが‘川野夏橙’の二倍の高さで検出されるか、‘晚白柚’由来のSSRアリルをヘテロで持つことから、雌性側が非還元配偶子である三倍体であると確認された。

### (3)胚珠の組織学的観察

交配40日後の胚珠は全て3mm以下の胚珠で、発達した胚を持つ胚珠と、未発達の胚および胚乳を持つ胚珠の二つが観察された。未発達の胚珠は、球状胚や心臓胚の段階で停止しているもので(第2図A-C)、0Gyと200Gyでは約60%、300Gyでは約40%で未発達の胚珠が観察された。交配60日後の胚珠は、3mmより大きいものと3mm以下の胚珠に分類され、3mm以下の場合、交配40日後に観察した胚珠と同様の形態であった。3mm以下では、発達した胚を持つ胚珠が、0Gyで約80%、200Gyと300Gyで約30%であった。3mmより大きい胚珠では、胚乳のみを持つ胚珠も観察した(第2図E)。胚乳のみを持つ胚珠は、0Gyでも約30%観察し、200Gyでは約20%、300Gyでは約60%だった。交配80日後では、完全種子(第2図F)と3mmより大きいしいな、3mm以下の胚珠様種子に分類され、しいなと未発達胚珠はパラフィン切片による観察をした。

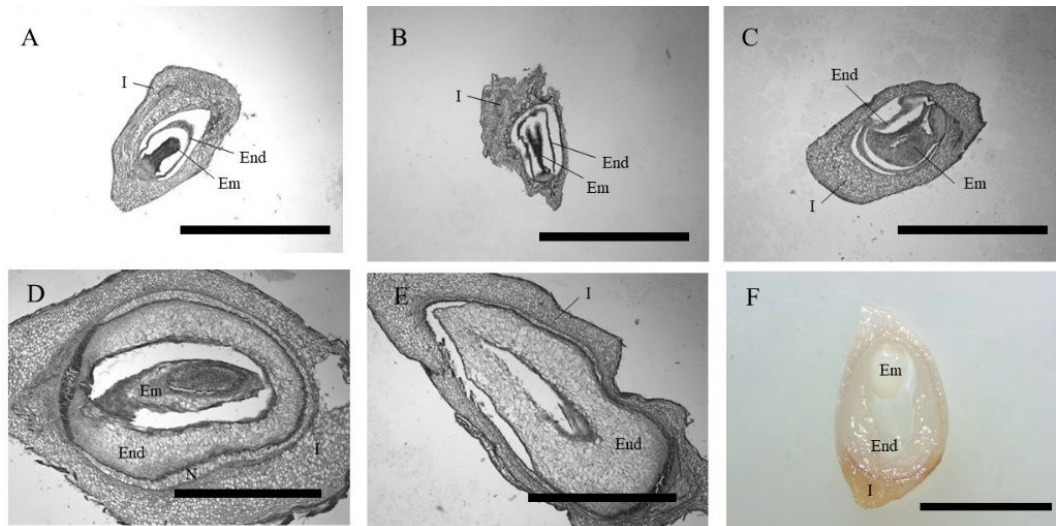


Fig. 2. The ovule sections in 'Banpeiyu' pummelo crossed with 'Kawanonatsudaidai' gamma ray irradiated pollen. (A) Undeveloped ovules with immature development of embryo and endosperm obtained 40 days after pollination with pollen at 0Gy. (B) Undeveloped ovules ( $\leq 3$  mm) with immature development of embryo and endosperm obtained 60 days after pollination with pollen at 200Gy. (C) Undeveloped ovules ( $\leq 3$  mm) with well developed embryo obtained 40 days after pollination with pollen at 200Gy. (D) Undeveloped seed ( $>3$  mm) with well formed embryo obtained 60 days after pollination at 200Gy. (E) Undeveloped seed ( $>3$  mm) only with endosperm obtained 60 days after pollination with pollen at 200Gy. (F) Free-hand longitudinal sections of developed seed obtained after 80 days after pollination at 0Gy. Em, embryo; End, endosperm; I, integument; N, nucellus. Scale bars : A-E= 1 mm; F= 5 mm

本研究では、第一の目的として、'晩白柚'においては試みられていないガンマ線照射花粉の受粉による偽受精胚珠培養による半数体の獲得、そして第二にカンキツ半数体発生メカニズムに関する基礎的な知見を得ることとして、パラフィン切片法による置床時の胚の状態を調査した。まず、ガンマ線照射花粉による偽受精胚珠培養では、ガンマ線の照射線量および胚珠培養開始時期の検討を行った。

その結果として、実験1の照射線量別に行った培養では、500Gyにおいて半数性のカルスを獲得することに成功した。また、培養後の受精した個体の数は200Gy以上では300Gyの1個体のカルスのみで、200Gy以上でガンマ線による花粉内の精核に対するダメージが十分に与えられることが示唆された。胚珠培養開始時期については、実験2において、交配40日、60日および80日後に培養を開始し、培養の4ヶ月以内では半数体を確認することができなかったが、実験1の交配40日後では半数性カルスを獲得したこと、軟X線照射花粉の偽受精胚珠培養において交配40日後が最も半数性胚様体を獲得しやすい報告があること(Yahataら、2010)などから、胚珠培養開始時期は交配40日後が適切であると考えられる。第二のカンキツ半数体発生メカニズムに関する基礎的な知見を得るためのパラフィン切片法による観察では、結果として、ガンマ線照射花粉を受粉させた後の胚珠では、未発達胚珠が多く、60日~80日後の肥大した胚珠でも内部は胚乳のみである割合が高かった。一方で、交配40日後の時点では、発達した胚と胚乳を持つ胚珠の割合は対照区と大きな差は無かった。

このことから、胚珠内の胚の発達は、交配40日目までは対照区と同様に進行するが、それ以降に発達停止する割合が増えると推測され、40日を過ぎて発達停止する前に培養を開始すると、本来発達停止する胚のうちの半数性細胞が発達を続ける可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kiichi Yasuda, Masaki Yahata, Mai Sato, Miki Sudo, Akiyoshi Tominaga, Hisato Kunitake	4. 巻 11(10)
2. 論文標題 Identification of parental genome construction and inherited morphological characteristics in triploid and aneuploid intergeneric hybrids from a diploid-diploid cross between citrus and fortunella .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/agronomy11101988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 八幡 昌紀, 永嶋 友香, 大寺 佑典, 杉浦 颯希, 周藤 美希, 富永 晃好, 向井 啓雄, 國武 久登	4. 巻 20(1)
2. 論文標題 二倍体ブンタン'晩白柚'と三倍体グレープフルーツタイプカンキツ'オロブランコ'との交雑から得られた種子の形態および重さと倍数体との関係	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 29-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hrj.20.29	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 佐藤真衣, 安田喜一, 菊池紘平, 戸村大河, 八幡昌紀, 國武久登	4. 巻 40
2. 論文標題 ウンシュウミカンにおける二倍体と四倍体の 果実品質と抗酸化能の比較	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 東海大学農学部紀要	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Miki Kawano, Masaki Yahata, Tokurou Shimizu, Chitose Honsho, Tomonari Hirano, Hisato Kunitake	4. 巻 277
2. 論文標題 Production of doubled-haploid(DH) selfed-progenies in 'Banpeiyu' pummelo [Citrus maxima (Burm.) Merr.] and its genetic analysis with simple sequence repeat markers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 109782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scienta.2020.109782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------