

## 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24年 3月31日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580030

研究課題名（和文） 三倍体スモモ品種‘貴陽’の配偶子形成と受精後の種子機能に関する研究

研究課題名（英文） Study on gametogenesis and embryo development in the triploid Japanese plum ‘Kiyo’

研究代表者

高木 敏彦（TAKAGI TOSHIHIKO）

静岡大学・農学部・教授

研究者番号：40026612

研究成果の概要（和文）

三倍体スモモ品種‘貴陽’の結実不良、低品質果実（味なし果）発生の原因究明に向けて、雌性配偶子形成及び受精後の種子発達における染色体数（倍数性）の関与について検討した。異数性の高い配偶子では、不完全な胚珠が形成され、受精しても早期に退化して落果に至ることが明らかとなった。また、味なし果では、糖代謝に異常をきたしスクロース、ソルビトールの集積が抑制されたが、これに異数性の関与は認められず、糖代謝遺伝子発現の関わりが示唆された。

研究成果の概要（英文）

It was confirmed that irregularly chromosome behavior concerned with abnormal growth of embryo sac and zygote in triploid cultivar ‘Kiyo’. It is suggested that the abnormalities of embryo sac and zygote growth induced by hetroploidy lead to the poor fruit set of ‘Kiyo’. The low quality fruit ‘Ajinashika’ was lower in sucrose and sorbitol accumulations than the normal fruit, indicating that expression of sugar metabolic genes, not hetroploidy, was concerned.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

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：ニホンスモモ、三倍体、配偶子形成、結実不良、味なし果、糖代謝酵素

## 1. 研究開始当初の背景

ニホンスモモ品種‘貴陽’は従来の品種に比べて極めて大果で且つ高糖含量であり注目されている品種である。しかし、結実不良、裂果、低品質果実の発生など栽培管理面で課題が多い。これまで我々は本品種が‘太陽’を種子親とした三倍体であることを明らか

にしてきた。このことが配偶子形成ならびにその後の種子発達に影響して結実不良ならびに低果実品質の要因ではないかと考え、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

(1) 結実不良の要因解析

- ①配偶子形成における組織学的観察
  - ②受精後の胚発達の組織学的観察
  - ③胚培養による未熟胚～成熟胚由来の実生の倍数性解析
- (2)低品質果実(仮称：味なし果)の発生要因の解析
- ①果実成熟に伴う糖含量の経時的変化
  - ②輪紋発生の組織学的観察
  - ③糖代謝酵素遺伝子の発現

### 3. 研究の方法

#### (1)結実不良の要因解析

##### ①配偶子形成における組織学的観察 (花粉管伸長)

‘貴陽’および‘太陽’のそれぞれの開花時に‘ハリウッド’花粉を授粉し、開花10日後まで2日間隔で10花ずつ採取し、FAAで固定した。その後、常法に従い0.1%アニリンブルー/1N KPO3で染色し、落射蛍光顕微鏡で花粉管の到達部位を観察した。到達部位は柱頭を10とし花柱基部を0とする11段階で評価した。

##### (胚珠組織の観察)

‘貴陽’および‘太陽’のそれぞれの開花時に‘ハリウッド’花粉を授粉し、開花10日後まで2日間隔で50花(果)ずつ採取し、FAAで固定した。その後常法に従い、パラフィン連続切片を作成し、サフランとファーストグリーンで二重染色し、胚のうの発達状態を光学顕微鏡で観察した。胚のうの発達状態を、1核期、2核期、4核期、完成胚のう(8核期)、退化および胚のうが認められない未分化の5段階に分類した。

##### ②受精後の胚発達の組織学的観察

‘貴陽’および‘太陽’のそれぞれの開花時に‘ハリウッド’花粉を授粉し、開花14日後から開花84日後まで7日間隔で果実を採取し、FAAで固定した。また、比較参考のために落果直後の果実を同時期に採取した。上記と同様にパラフィン連続切片を作成し、胚の発達過程を観察した。胚の発達段階を、球状、心臓型、魚雷型および葉原基のみられる成熟胚に、そしてこれら以外のものを異常として分類した。

##### ③胚培養による未熟胚～成熟胚由来の実生の倍数性解析

‘貴陽’‘太陽’両品種に‘ハリウッド’花粉を授粉し、開花後4,6,8,10,12,16,18週目(成熟期)に果実を採取し、胚珠を取り出した。胚珠の赤道面上を切断し、切断面を上にして1/2MS培地に置床した。培養16週後に発芽伸長した個体についてWP培地で継代培養したのち、フローサイトメーター(FCM)による方法で倍数性を検定した。

#### (2)低品質果実(仮称：味なし果)の発生要因の解析

##### ①果実成熟に伴う糖含量の経時的変化

開花時に‘ハリウッド’花粉を授粉し、結実した果実を開花後6週目から2週間ごとに5果採取し、常法に従いHPLCで糖、酸含量を測定するとともに輪紋の発生の有無を観察した。

##### ②輪紋発生の組織学的観察

着色開始である開花後12週目より18週目(収穫期)まで2週間ごとに走査型電子顕微鏡で果実表面を観察した。

##### ③糖代謝酵素遺伝子の発現

葉から、糖代謝に関わる、スクロースシンターゼ遺伝子、スクロースホスフェイとシンターゼ遺伝子、インベルターゼ遺伝子、ソルビトールトランスポーター1遺伝子、ソルビトールトランスポーター2遺伝子の単離を行い、それぞれの塩基配列および推定されるアミノ酸配列についてモモの各遺伝子との相同性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)結実不良の要因解析

##### ①配偶子形成における組織学的観察 (花粉管伸長)

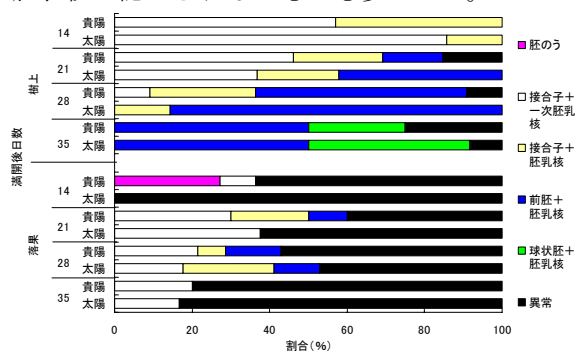
両品種ともに、柱頭で発芽した‘ハリウッド’花粉の花粉管は8日後に花柱基部に達し、品種間に差異は見られなかった。

##### (胚珠組織の観察)

両品種ともに、胚のうが形成されない未分化の胚珠がいずれのステージにおいても半数以上を占めた。また、花粉管が胚珠に到達する開花後8~10日後においても、4核性以下の胚のうが10%程度見られた。両品種間では明確な差異はなかった。

##### ②受精後の胚発達の組織学的観察

両品種ともに、樹上着生している果実では開花14日後には一次胚乳核が、21日後には接合子が分裂を開始したが、‘貴陽’においては分裂しないものも多く見られ接合子や胚乳核が認められないものも多かった。

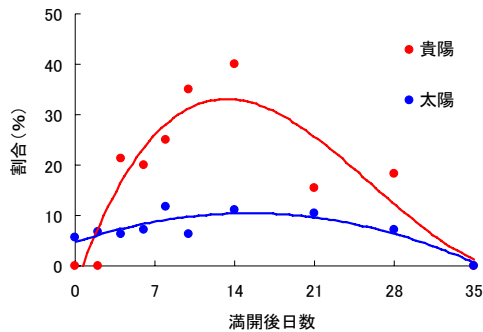


第1図 樹上・落果果実の胚の発達ステージ

一方、落果した果実では、‘太陽’では開花14日後は全て未分化の胚のうであったのに対して、‘貴陽’では未分化に加え胚のうの発達遅延と退化が多くみられた。しかし、

21 日後以降では両品種ともに胚の未分化に加え、接合子の未分裂、胚乳核の未分裂のものがみられた (第 1 図)。

また、胚珠の形態を観察した結果、開花後 35 日まで‘太陽’の 90% 近くの胚珠は珠心が珠皮内を満たしていたのに対し、‘貴陽’では珠皮との間に隙間のある胚珠、いわゆる珠心の委縮したものが 40% 近く観察された (第 2 図)。



第 2 図 珠心の委縮した胚珠の発生割合

その後の胚発達は、両品種ともに開花 42 日後で球状胚、56 日後に心臓型胚、70 日後に魚雷型胚に生長し、84 日後には子葉が種皮内をほぼ満たし、葉原基もみられた。しかし、‘貴陽’では胚乳の未確認、胚・胚乳が確認できない、子葉が複数あるなどの異常胚の発生が发育ステージが進むにつれて増加し、70 日後には約 50% に達した。

### ③ 胚培養による未熟胚～成熟胚由来の実生の倍数性解析

‘貴陽’‘太陽’の成熟果実より採取した種子由来の実生について、その倍数性を検討した結果、‘太陽’では 1 個体を除きすべて 2 倍体であったのに対し、‘貴陽’では正倍数体±1 を含めた異数体が多く発生した (第 1 表)。

第 1 表 成熟果実の種子由来実生の倍数性

‘貴陽’と‘太陽’から得られた実生の倍数性		染色体数別出現数 (%) <sup>2</sup>										
種子親	花粉親	FCM 供試数	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
貴陽	ハリウッド	33	5	7				1	1	11	7	1
			(15.2)	(21.2)				(3.0)	(3.0)	(33.3)	(21.2)	(3.0)
太陽	ハリウッド	20	19	1								
			(95.0)	(5.0)								

<sup>2</sup> FCM による推定染色体数

次に、成熟に至らなかった果実の未熟種子由来の実生の倍数性を検討した結果、未熟果実種子由来の実生ほど、正倍数性より離れた染色体数の異数体が数多く出現した (第 2 表)。これらのことから、正倍数体より、より離れた異数体は、受精するもののその後の胚発達、種子発達に支障をきたし落果することが示唆された。

第 2 表 未熟胚培養より得られた実生の倍数性

‘貴陽’における胚珠培養から得られた実生の倍数性		染色体数別出現数 (%) <sup>2</sup>										
満開後週数	FCM 供試数	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	31
6	7	1							3	2		1
		(14.3)							(42.9)	(28.6)		(14.3)
8	18	1		1		1	3	4	5	3		
		(5.6)		(5.6)		(5.6)	(16.7)	(22.2)	(27.8)	(16.7)		
10	7	1		2			1		1	2		
		(14.3)		(28.6)			(14.3)		(14.3)	(28.6)		
12	23	1	2	1	1		3	2	4	6	3	
		(4.3)	(8.7)	(4.3)	(4.3)		(13.0)	(8.7)	(17.4)	(26.1)	(13.0)	
16 <sup>2</sup>	15	4	6	1				1		2	1	
		(26.7)	(40.0)	(6.7)				(6.7)		(13.3)	(6.7)	

<sup>2</sup> 収穫時

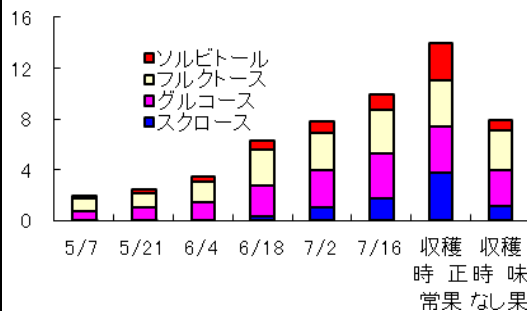
<sup>3</sup> FCM による推定染色体数

### (2) 低品質果実 (仮称：味なし果) の発生要因の解析

#### ① 果実成熟に伴う糖含量の経時的変化

開花後 12 週目より全糖含量が急激に上昇しスクロースの集積が開始した。収穫時においては、正常果ではスクロース、グルコース、フルクトース、ソルビトールいずれもほぼ同程度の糖含量であった。しかし、味なし果においては、グルコースとフラクトース含量は正常果と同程度であったが、スクロースとソルビトール含量は極めて低い含量であった (第 3 図、第 3 表)。

味なし果の外観指標としては、現在のところ、着色時における輪紋の発生有無であるが、開花後 14 週目に果皮着色が開始した。



第 3 図 ‘貴陽’ 果実の糖含量の推移

第 3 表 味なし果、正常果の果実品質

年	果実種類	SSC (Brix)	糖含量 (%)	酸含量 (%)	種子重 (g)
2006	正常果	15.3	10.8	1.3	0.176
	味なし果	11.6	6.9	1.1	0.175
2007	正常果	16.7	11.9	1.6	0.118
	味なし果	11.8	7.7	1.6	0.131
2008	正常果	18.1	14	0.9	0.223
	味なし果	11.4	7.8	0.7	0.224

味なし果と正常果の有胚種子率は年度により多少異なり 70~90% であるが、両形質果実間に差異はなく、また種子揉においても明らかな差異はなかった。また、これらの果実

種子由来の実生の倍数性を検討したが明らかな差異はなかった。

## ②輪紋発生の組織学的観察

開花後 12 週から果梗部の孔辺細胞周辺で裂開が生じ、その後 14 週目には赤道部、果頂部でもみられた。開花後 14 週から裂開の進行は激しく肉眼でも輪紋として確認できた (第 4 図)。



第 4 図孔辺細胞周辺の裂開

一方、味なし果では、果梗部中心で裂開が確認できたものの、それらは孔辺細胞周辺など局在的であった。

## ③糖代謝酵素遺伝子の発現

正常果の糖含量・組成は、味なし果に比べ、スクロース及びソルビトール含量ならびに組成比が高いのが特徴である。これらの糖代謝に関連する酵素遺伝子 (スクロースシンターゼ、スクロースホスフェイトシンターゼ、インベルターゼ、ソルビトールトランスポーター1, 2) を単離し塩基配列を決定した。それらの塩基配列ならびに推定されるアミノ酸配列を既知のモモ遺伝子との相同性を検討した結果、いずれも 95~100%の相同性を示した。

スクロースシンターゼ遺伝子の発現を検討した結果、輪紋が発生する直前にスクロースシンターゼ遺伝子の発現が高まることから、この遺伝子発現の多寡が正常果、味なし果の形成に関与していることが示唆された。その他の遺伝子発現に関しては現在検討中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①大林沙泳子、八幡昌紀、仲條誉志幸、藤井明子、向井啓雄、原田久、高木敏彦、ニホンズモモ‘貴陽’における生殖器官の特徴と倍数性、園芸学会雑誌、査読有、8 : 407-412, 2009 年

[学会発表] (計 5 件)

- ①鈴木謙作、福島鮎美、山本哲也、國武久登、八幡昌紀、成瀬博規、増田幸直、向井啓雄、原田久、高木敏彦、ニホンズモモ‘貴陽’

における果実成熟とネット発生との関係、園芸学研究第 10 巻別冊 1, 平成 24 年度園芸学会春季大会、大阪府立大学、2012 年 3 月 29 日

- ②鈴木謙作、赤池由佳、太田知宏、八幡昌紀、本橋令子、成瀬博規、増田幸直、向井啓雄、原田久、高木敏彦、ニホンズモモとヨーロッパズモモとの種間雑種の作出、園芸学研究第 9 巻別冊 2, P389、平成 23 年度園芸学会秋季大会、岡山大学、2011 年 9 月 24 日
- ③赤池由佳、太田知宏、河合弘恵、佐野史織、糠谷綱希、八幡昌紀、本橋令子、成瀬博規、増田幸直、向井啓雄、原田久、高木敏彦、ニホンズモモとヨーロッパズモモとの正逆交雑から得られた後代の倍数性、園芸学研究第 10 巻別冊 1, 平成 23 年度園芸学会春季大会、宇都宮大学、2011 年 3 月 20 日 (震災により中止)
- ④赤池由佳、大林沙泳子、仲條誉志幸、河合弘恵、望月綾乃、鈴木謙作、堀切亮佑、糠谷綱希、佐野史織、八幡昌紀、加藤雅也、向井啓雄、原田久、高木敏彦、ニホンズモモ‘貴陽’における低品質果実 (味なし果) 発生要因解明のための基礎調査、園芸学研究第 9 巻別冊 2, P392、平成 23 年度園芸学会春季大会、大分大学、2010 年 9 月 19 日
- ⑤河合弘恵、堀切亮佑、赤池由佳、八幡昌紀、成瀬博規、増田幸直、向井啓雄、原田久、高木敏彦、ズモモ亜属における予期せぬ倍数体の出現、園芸学研究第 9 巻別冊 1, 平成 22 年度園芸学会秋季大会、日本大学、2010 年 3 月 20 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高木 敏彦 (TAKAGI TOSHIHIKO)  
静岡大学・農学部・教授  
研究者番号 : 40026612

### (2) 研究分担者

加藤 雅也 (KATOU MASAYA)  
静岡大学・農学部・准教授  
研究者番号 : 10432197

八幡 昌紀 (YAHATA MASAKI)  
静岡大学・農学部・助教  
研究者番号 : 60420353