

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 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580043

研究課題名（和文） マンゴーの交雑特性の解明と育種基盤の確立

研究課題名（英文） Characterization of intervarietal crossing and establishment of base for breeding in mango.

研究代表者

神崎 真哉（KANZAKI SHINYA）

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：20330243

研究成果の概要（和文）：マンゴー交雑実生の効率的な親子識別法を確立するため、多型頻度の高い SSR マーカーの選抜およびマルチプレックス PCR 法の開発を行った。この手法を用いて、'Irwin' と '紅キーツ' が混植されているハウスで得られた自然交雑実生の親子識別を行ったところ、'Irwin' と '紅キーツ' とともに他家受粉が積極的に起こっていることが示された。一方、果皮色に関連する遺伝子としてアントシアニン合成に関わる Myb 転写因子をマンゴーから単離し、その構造を解析した。

研究成果の概要（英文）：To develop an practical method for determining the male parent of mango seedlings, high-polymorphic SSR markers were selected and multiplex PCR method was developed. Progenies obtained from open pollinated 'Irwin' trees and 'Beni-Keitt' trees in a plastic house were used for determining male parents. The results showed that cross-pollinated seedlings were major in both cultivars. In addition, Myb transcription factor associated with anthocyanin biosynthesis were isolated from mango and its structure was analyzed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：DNA マーカー、果皮色、親子鑑定、自家不結実性

1. 研究開始当初の背景

一般的に果樹類の育種の問題点として①幼木期間が長いこと、②雑種性が高いこと、③育苗に広い敷地が必要であること等があげられるが、マンゴーの育種においてはこれらに加えて④1 果から 1 種子しか得られず、さらに⑤人工受粉した際の結実率が極めて低いこと、が大きな問題となっている。人工交雑したときの結実率は 1～3% 程度であるが、ブラジルにおける育種計画では、約

2,000 個体の交雑後代を作出するのに 15 年を要した。また、オーストラリアでは 6 人で一日 6 時間の受粉作業を一ヶ月間行っても、交雑後代は年間約 300 個体程度しか得ることができないという。こうした理由から、放任受粉によって得られた実生から優良個体を選抜する方法が、依然としてマンゴー育種の主流となっている。これまでに我々は、'金煌'（台湾品種）の偶発実生から選抜した個体を日本初のマンゴー登録品種 '愛紅' とし

て 2008 年に品種登録しているが、この品種の登場によって新たな作型の開発や省エネ栽培の可能性が示され、マンゴー育種の重要性を再認識するに至った。

マンゴー育種の効率を改善するためには、受粉・受精効率の向上、あるいは分子マーカーを利用した選抜技術(MAS: Marker Assisted Selection)の確立が必須である。これまで、マンゴーにおいても分子マーカーを用いて品種識別や類縁関係の調査が行われている。しかし、特定の形質に連鎖したマーカー、特に MAS に利用可能な分子マーカーは未だ単離されておらず、分子マーカーを利用した育種は実現していない。本研究は、マンゴー育種の効率化のための基盤を確立することを旨として研究を行うこととした。

2. 研究の目的

現在、国内のマンゴー栽培品種はフロリダから導入された‘アーウィン’に単一化しているが、消費者の多様なニーズに応え、マンゴー産業をさらに発展させるためには、栽培品種の多様化を図ることが不可欠である。そのためには、第一に、海外から優良品種を導入することを検討するべきであるが、我が国の特殊な栽培環境や消費者の嗜好性を考慮すると、国内生産に適したマンゴー品種は自国で育成するのが望ましく、日本においてもマンゴー育種の基盤整備を進める必要性が高まっている。本研究では、マンゴーの交雑特性に関する基礎的研究を行うとともに分子マーカーを利用した育種法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 効率的な親子識別法の確立

これまでに報告されている SSR マーカーを利用して、簡便かつ効率的な親子識別法を検討した。

①簡易 DNA 抽出法の検討

羽生ら(2001)が報告している簡易 DNA 抽出法がマンゴーでも有効であるかどうかを検討した。簡易抽出は以下の手順で行った。葉を乳鉢中で液体窒素を用いて粉碎し、30mg をチューブに移し 400 μ l の抽出バッファー(200mM Tris-HCl(pH7.5), 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)を加えよく混和した。15,000rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を別のチューブに移し、等量のイソプロパノールを加えて室温で 2 分間インキュベートした。さらに、15,000rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を取り除き、沈殿を乾燥して 100 μ l の TE バッファーに溶解し DNA サンプルとした。抽出した DNA は 1%アガロースゲル電気泳動により確認を行った。

②SSR マーカーの選抜と multiplex PCR 法の検討

SSR マーカーの増幅を行う際、複数の遺伝子座を 1 回の PCR 反応で増幅することができれば、解析効率が改善される。そこで、multiplex PCR により 3 種類の SSR マーカーを同時に増幅する方法を検討した。

まず、これまでに報告されているマンゴーの SSR プライマー 4 種類(LMMA10, MIAC-5, MIAC-44, LMMA11)のフォワードプライマーをそれぞれ 6-FAM, NED VIC, PET で蛍光ラベルした。さらに、4 種類の SSR マーカー(MIAC-6, mMiCIR032, MiSHRS-32, MIAC-3)については、フォワードプライマーの 5' 末端にそれぞれ M13, SP6, T7, L11RV の 4 種類のユニバーサルプライマー配列を付加したプライマーを設計し、蛍光標識したユニバーサルプライマーとともに PCR することにより増幅産物を蛍光標識した。このように設計した複数の SSR プライマーを混合して multiplex PCR を行い、増幅産物の確認を行うとともに、親子識別に有効な SSR マーカーの選抜を行った。

(2) ‘Irwin’ と ‘紅キーツ’ の自然交配における自家・他家受粉の割合

‘Irwin’ と ‘紅キーツ’ が混植されているハウス内でミツバチを放ち自然交配を行った。ハウス内には ‘Irwin’ 樹が多く植栽され、花の数も ‘Irwin’ 樹が多く咲いていた。成熟果実から種子を取り出し、発芽させて得られた実生から DNA を抽出し、SSR マーカーにより花粉親の特定を試みた。花粉親の特定には MIAC-6, MiSHRS-32, MIAC-3, LMMA10, MIAC-5, MIAC-44, mMiCIRo18 を用いた。試験は、3 年間に渡って行い、各年度における自家・他家受粉実生の割合を調査するとともに、花粉親の違いが果実形質に及ぼす影響についても調査した。

(3) アントシアニン合成に関与する Myb 転写因子の単離と構造解析

果皮色は果実品質を決定づける重要形質であり、我が国では赤色系のマンゴー品種が好まれる傾向がある。そこで、赤色系品種のマーカー選抜育種を可能にするために、果実の赤色形質に連鎖した分子マーカーの単離を試みた。実験開始当初は AFLP マーカーのスクリーニングにより連鎖マーカーの単離を試みたが、候補となるマーカーが得られなかったため、他の果樹類で果皮の赤色発現に関与している Myb 転写因子をマンゴーから単離し、その構造を解析することによりマーカーとしての利用を検討した。

Myb 転写因子の単離は以下のように行った。これまでに他の植物で単離されているアントシアニン合成を制御する Myb 転写因子の配列に基づき、degenerate プライマーを設計した。赤色発現している ‘Irwin’ 果皮より RNA を抽出し、cDNA を合成した後、設計した

degenerate プライマーを用いて PCR を行った。増幅産物の塩基配列を決定し、Myb 転写因子と相溶性が高いことを確認した後、5' -RACE および 3-RACE 法により転写産物全長を単離した。

一方、マンゴー 'Irwin' 由来のゲノミックライブラリー (fosmid ライブラリー) を作製し、単離した Myb 転写因子をプローブに用いてスクリーニングを行い、Myb 遺伝子を含む fosmid クローンを単離し、遺伝子のプロモーター領域やイントロン領域の塩基配列の一部を解析した。

4. 研究成果

(1) 効率的な親子識別法の確立

①簡易 DNA 抽出法の検討

羽生ら(2001)が報告した DNA 抽出法は、マンゴーにおいても低コスト(約 2 円/サンプル)かつ短時間(2時間以内)で DNA 抽出が可能であることが示された。また、この手法で抽出した DNA は SSR 解析を行うのに十分な品質であることも確認された。これまでマンゴーの DNA 抽出に用いていた市販の抽出キットではコストが約 500 円/サンプルであり、作業時間も 4 時間程度かかることから、この手法が非常に実用的であることが示された。

②SSR マーカーの選抜と multiplex PCR 法の検討

これまでに報告のあるマンゴー SSR マーカーのうち、9 種類のマーカーを用いて個体識別の有効性を調査したところ、'Irwin' と '紅キーツ' の交雑実生の解析に有効なマーカーとして 4 種類のマーカーを選抜することができた。また、これらのマーカーは multiplex PCR により、複数の遺伝子座を同時に増幅可能であることが示された。

(2) 'Irwin' と '紅キーツ' の自然交配における自家・他家受粉の割合

上述の SSR マーカーを用いることで、調査した 'Irwin' 実生の約 70% の花粉親を、また '紅キーツ' 実生の約 90% の花粉親を特定することが可能であった。'Irwin' と '紅キーツ' は近縁であるため、自家・他家受粉の判断が困難な組合せである。それに関わらず、交雑親の確定した実生が 3 年間で 400 個体以上も得られたことは、人工交配の困難なマンゴーにおいては画期的なことといえる。

表 1 花粉親識別の結果

	平成 23 年度、平成 24 年度合計個体数		
	Irwin 実生	紅キーツ実生	合計
他家受粉	138	18	156
自家受粉	90	2	92
判別不能	94	4	98
合計	322	24	344

種子親が 'Irwin' の実生で花粉親が特定できた個体のうち約 60% が他家受粉に由来することが明らかとなり、自家受粉個体数との間に有意な差が認められた。ハウス内には 'Irwin' と '紅キーツ' の 2 品種しか植栽されておらず、'紅キーツ' と 'Irwin' の花の数を比較すると、'Irwin' の花数が圧倒的に多い中で、これだけの高確率で交雑実生が得られたことは、マンゴーが他家受粉を積極的に行っていることを示している。また、'紅キーツ' を種子親とする実生でも約 90% が他家受粉に由来することが示された。このように、他家受粉率が高いことから、育種計画において交雑親に用いる個体を隣接して植栽することにより効率よく交雑実生が得られると考えられた

表 2 他家受粉個体の割合

年度	Irwin 実生	紅キーツ実生
22 年度	56 %	86 %
23 年度	61 %	88 %
24 年度	60 %	92 %

(3) アントシアニン合成に関与する Myb 転写因子の単離と構造解析

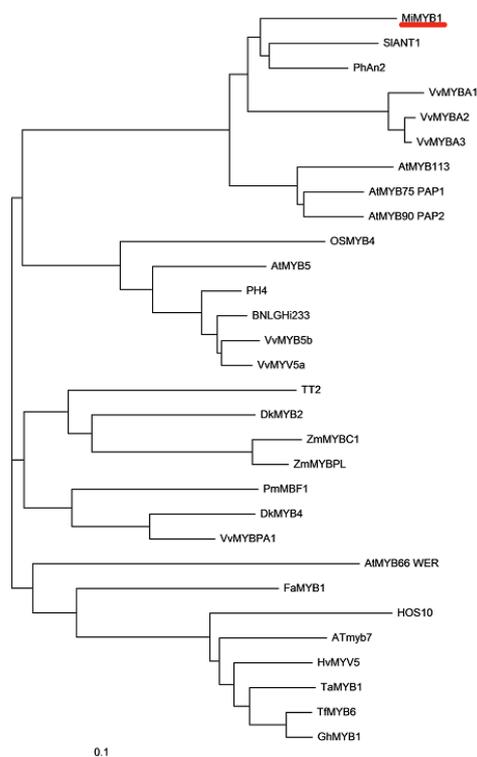


図 1 MiMYB1 (赤線) のアミノ酸配列に基づく分子系統樹

degenerate プライマーによる PCR、およびその後の 5' -RACE, 3' -RACE 法によりマン

ゴ-の Myb 転写因子 (MiMYB1) を単離することができた。MiMYB1 の cDNA の全長は 940bp で 256 アミノ酸残基をコードする翻訳領域を含んでいた。R2R3 領域のアミノ酸配列に基づき系統樹を作製したところ、他の植物でアントシアニン合成を制御している Myb 転写因子との相同性が高いことが確認された。

一方、ゲノムライブラリーから単離した MiMYB1 周辺領域の解析から、この遺伝子が 3 つのエクソンと 2 つのイントロンからなることが判明した。さらに、プロモーター領域と第 2 イントロンに AT 反復配列が存在することが明らかとなった。この反復配列長に品種間で多型が確認されたものの、果皮色との関連を明確にすることはできなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Chitose Honsho, Marie Inada, Ken-ichi Yuji, Masahiro Tojiki, Shigefumi Kurogi, Shinya Kanzaki and Takuya Tetsumura. Efficiency of hybrid formation by open-pollination of two cultivars in a closed plastic house and the effect of the male parent on fruit characteristics in mango. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81: 27-34. 2012.

(1) 研究代表者

神崎 真哉 (KANZAKI SHINYA)
近畿大学・農学部・講師
研究者番号：20330243

(2) 研究分担者

本勝 千歳 (HONSHO CHITOSE)
宮崎大学・農学部・助教
研究者番号：30381057

