

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2013

課題番号：22658009

研究課題名(和文) マンゴスチン果実のアポミクシス機構の解明

研究課題名(英文) Analysis on apomixis processes in mangosteen fruits.

研究代表者

米森 敬三 (Yonemori, keizo)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10111949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 510,000円

研究成果の概要(和文)：マンゴスチンのアポミクシスによる種子形成は、幼果期に子室内の珠皮組織から細胞塊の突起が出現し、この細胞塊が肥大することでおこっていた。また、マンゴスチン果実では、1～3つの子室においてのみ種子形成が認められる。そこで種子形成を引き起こす要因を調査するため、細胞塊が形成される子室内に存在する胚乳液状の液体中の植物ホルモンをGC-MSにより分析し、IAA、ABA、ジャスモン酸の存在を確かめた。また、これらホルモンの経時的変化を定量し、種子形成との関連を検討した。なお、植物ホルモンが種子形成に及ぼす影響を外生的処理により調査したが、処理と種子形成の相関は認められず、検討課題を残した。

研究成果の概要(英文)：The apomictic seed of mangosteen fruit is formed at relatively late stages after anthesis and derive from the inner layer of integument as a cell mass not as a nucellar embryo. Furthermore, despite that mangosteen fruit has 4-7 locules, only 1-3 locules develop well without pollination and the well developed-locules are filled with the liquid of endosperm. So, we speculated an important role of plant hormones in the liquid for apomictic seed development and have tried to analyze plant hormones in this liquid by GC-MS. As a result, we identified IAA, ABA and jasmonic acid, and the fluctuation of these hormone contents during fruit development is determined for considering a role for apomictic seed formation. In addition, the external treatments of these plant hormones didn't show a relationship to apomictic seed formation, indicating the improvement for treatment methods.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：園芸学 組織・細胞 単為生殖

1. 研究開始当初の背景

マンゴスチン (*Garcinia mangostana*) は東南アジア原産の典型的な熱帯果樹であり、同じ東南アジア原産で King of Tropical Fruit と言われているドリアンとともに、Queen of Tropical Fruit と称される重要な熱帯果樹である。日本にも近年、生食用として新鮮果実がタイから輸入され、スーパーマーケットなどで販売されるようになった。このマンゴスチンは果樹園芸学的にみても非常に興味ある実験素材であり、特に興味深い点として、マンゴスチンは雌雄異株であるが、これまでに雄株の存在が確認されておらず、マンゴスチンの大きな特徴である無性生殖による種子形成 (アポミクシス) により生じた種子により現在の栽培品種が形成されている点をあげることが出来る。また、このアポミクシスによって生じたマンゴスチン種子を組織的に観察すると、種子中には胚の存在が認められず、単なる細胞塊としか思えない組織像を呈している。さらに興味深い点は、成熟種子を分割すると、その分割片それぞれから芽と根を形成し、1つの種子を分割することで複数の実生の形成を認めることが出来ることである。これらの事象を考えると、マンゴスチンのアポミクシスはこれまで他の果樹で認められているアポミクシスとは様相をかなり異にしていると思われるが、そのことを明確に調査した報告はほとんど認められていなかった。

2. 研究の目的

マンゴスチンは、アポミクシス (単為生殖) によって形成された種子で繁殖されており、現在栽培されているマンゴスチンは全てクローンであるとされている。これまで果樹で認められているアポミクシスは、カンキツやマンゴーのように、開花期に珠心組織から不定胚形成がおこることにより生じるとされているが、マンゴスチンにみられるアポミクシスはこれらの果樹とは様相を異にしている。すなわち、マンゴスチンでは果実肥大が始まった幼果期に、その子室内に細胞塊が形成され、それが肥大して種子となっている可能性が高い。さらに、アポミクシスで生じたこの種子は、いくつかに分割するとそれぞれから植物体が形成されるという特異な性質を有している。また、アポミクシスによる種子形成は果実内に 6~7 つ存在する子室すべてで生じるわけではなく、1~3 つの子室のみに種子が形成され、その他の子室は退化してしまい、すべての子室に種子が形成され

るわけではない。本研究課題では、マンゴスチンのアポミクシスによる種子形成過程を再確認するとともに、このアポミクシスによる種子形成を促す要因を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 種子形成過程の調査

マンゴスチン果実の子室内でのアポミクシスによる種子形成過程を観察した。マンゴスチン果実は栽培園からさまざまな発育段階にある果実を採取し、果実の生長段階ごとに分類した後、果実の子房部を切り出して FAA で固定し、子房内の子室を実体顕微鏡で観察することで、種子形成過程を調査した。また、その部位をパラフィン包埋後、マイクロトームで切片を作成し、光学顕微鏡でも観察した。

(2) 種子形成を引き起こす要因の調査

アポミクシスによる種子形成を引き起こす要因として植物ホルモン、特にオーキシンを仮定し、アポミクシスによる種子形成が誘起されている子室内でのその存在の有無を調査した。すなわち、幼果内で将来種子となる細胞塊が形成される子室内に存在する胚乳液状の液体を注射器で採取し、有機溶媒での分画、TLC による生成を行い、目的画分を溶出しメチル化した後、GC-MS により目的の植物ホルモン含量を調査した。また、果実の発育段階によるこれら含量の変化も調査した。

(3) 植物ホルモンが種子形成に及ぼす影響

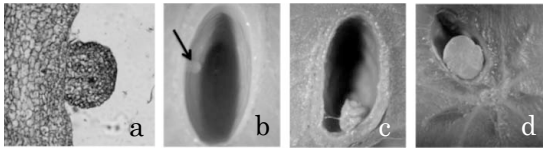
アポミクシスによる種子形成が外的に与えた植物ホルモンによって影響されるかどうかを調査した。すなわち、オーキシンとして 4-CPA の 50、75、100ppm、ジベレリンとして GA₃ の 100、200、300ppm、サイトカイニンとして CPPU の 50、100ppm、および抑制物質として ABA の 400、600、800ppm を開花期と開花 1 週間後の 2 回、花あるいは幼果にスプレーとして処理し、収穫期に果実の縦径と横径、果皮の厚さとともに、形成された種子数を調査した。処理には 5 樹を用い、各処理 50 果とした。

4. 研究成果

(1) 種子形成過程の調査

マンゴスチン幼果の子室内で、将来、種子となると考えられる細胞塊が珠皮部位からの突起として形成されていることを確認し

た(第1図 a, b)。さらに、この細胞塊は果実発育ステージが進むとともに生長してゆき、子室内を満たすまでに肥大し、種子として発達していくことが明らかとなった(第1図 c, d)。



第1図 アポミクシスによる種子形成過程

(2) 種子形成を引き起こす要因の調査

マンゴスチン幼果内の発達した子室を満たされている胚乳液様の液体(第2図)は、生育時期によって子室あたり 60~130 μ l 採取することができた(第1表)。

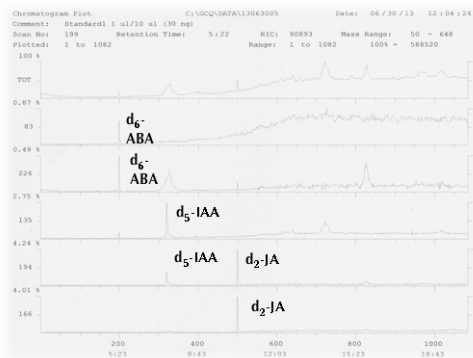


第2図 子室中の胚乳液様の液体

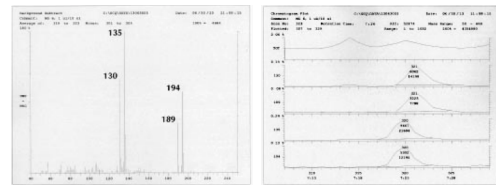
第1表 子室内の胚乳液様の液体の容量

Stage of the fruit	Volume of combined endosperm liquid for GC-MS analysis (ml)	Number of locules collected	Number of fruits collected	Number of the locule per fruit	Volume of endosperm liquid per locule (μ l)	Volume of endosperm liquid per fruit (μ l)
5 weeks after anthesis	6.35	105	68	1.54	60.48	93.38
6 weeks after anthesis	3.80	39	31	1.26	97.44	122.58
7 weeks after anthesis	3.00	27	21	1.29	111.11	142.86
8 weeks after anthesis	3.00	23	19	1.21	130.43	157.89

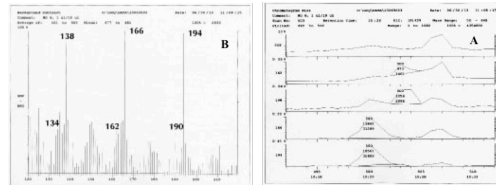
さらに、この液を GC-MS で分析したところ、IAA、ABA、ジャスモン酸 (JA) の存在をそれぞれの重水素でラベルした安定同位体との比較から同定することができた(第3~6図)。



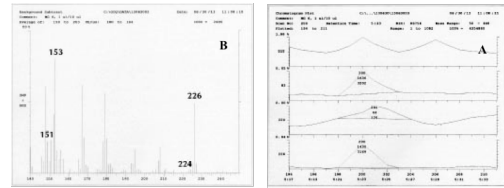
第3図 保持時間の同定のための d_2 -JA-Me、 d_5 -IAA-Me、 d_6 -ABA-Me のマスクロマトグラム



第4図 d_0 -IAA-Me と d_5 -IAA-Me のフラグメントイオンのマスペクトルとピークエリア



第5図 d_0 -ABA-Me と d_6 -ABA-Me のフラグメントイオンのマスペクトルとピークエリア



第6図 d_0 -JA-Me and d_2 -JA-Me のフラグメントイオンのマスペクトルとピークエリア

特に目的とした IAA-Me は非常に顕著なマスペクトルが得られ、その存在が確実となった(第4図)。ただ、JA-Me に関してはスペクトルは得られたものの、顕著なものではなかった(第6図)。

さらに、これらホルモンの含量を開花後、経時的に測定した結果は第2表のようになった。

第2表 胚乳液様の液体のホルモン含量の変化

Stage of the fruit	per endosperm liquid (ng/ml)			per locule (ng/locule)			per fruit (ng/fruit)		
	IAA	ABA	JA	IAA	ABA	JA	IAA	ABA	JA
5 weeks after anthesis	52.32	3.83	2.42	3.17	0.23	0.15	4.90	0.36	0.27
6 weeks after anthesis	51.67	4.66	3.14	5.03	0.45	0.31	6.33	0.57	0.38
7 weeks after anthesis	3.73	32.20	1.28	0.42	3.56	0.14	0.54	4.60	0.18
8 weeks after anthesis	22.88	5.24	7.28	2.98	0.68	0.95	0.83	0.83	1.15

ただ、この結果からは IAA をはじめ、測定したホルモンがアポミクシスによる種子形成にどのような役割を果たしているかに関しては明らかではなかった。

(3) 植物ホルモンが種子形成に及ぼす影響

オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、抑制物質 (ABA) など処理により落果が見られ、収穫期まで着果して処理がアポミクシスによる種子形成に及ぼす影響を調査できた果実数は処理によって 4~20 果とばらついていた。また、種子数にはコントロール (無処理) とそれぞれの処理区間に有意差は認められず、アポミクシスによる種子形成に及ぼ

すホルモンの影響を明らかにすることができなかつた。各植物ホルモンの処理方法および処理濃度の検討など、今後の実験にいくつかの課題を残した。

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)

- ① Keizo Yonemori, Soichiro Nishiyama, Chinawat Yapwattanaphum and Junichi Ueda. Identification of plant hormones in endosperm liquid of mangsteen fruits at young developmental stages. Acta Horticulturae (in press) (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Chinawat Yapwattanaphum, Junichi Ueda, Satoshi Kobayashi, and Keizo Yonemori. 2011. Hormone analysis in the locule of mangosteen fruit during apomictic seed development. International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits. Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand.
- ② Keizo Yonemori, Soichiro Nishiyama, Chinawat Yapwattanaphum and Junichi Ueda. 2013. Identification of plant hormones in endosperm liquid of mangsteen fruits at young developmental stages. XII International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production. Renaissance Orlando, Orlando, Florida, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米森 敬三 (YONEMORI KEIZO)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：10111949