

カンキツ育種における単胚性・多胚性の 識別マーカーの有効性

山本紗綺*・三好沙季**・岡本充智***・旭置桐哉

Effectiveness of molecular marker for identifying monoembryonic/polyembryonic types in citrus breeding

Saki Yamamoto, Saki Miyoshi, Mitsutoshi Okamoto and Toya Hioki

Summary

Citrus varieties are classified into monoembryonic and polyembryonic varieties based on whether they form nucellar embryos or not. As monoembryonic varieties are important as seed parents in order to efficiently obtain hybrid seedlings in cross-breeding, it is necessary to select them preferentially. The DNA marker (P/M marker), which was developed by the National Agriculture and Food Research Organization (NARO), can identify citrus embryonic types based on the genotypes of *CitRKD1*, which plays a principal role in regulating citrus somatic embryogenesis. Therefore, it is expected that this marker will make the investigation of embryonic types more efficiently. In this study, we assessed the effectiveness of the P/M marker for selecting monoembryonic individuals from cross-breeding groups.

1. The P/M marker was applied to fourteen commercial cultivars and nine Ehime breeding lines, whose embryonic phenotypes have been identified. Their genotypes evaluated using the P/M marker matched their embryonic phenotypes.
2. The P/M marker was applied to the hybrid individuals from two cross-breeding groups, whose embryonic phenotypes have not been identified, and their embryonic phenotypes were also investigated by the observation of embryos in seeds of cross-pollination. All predicted embryonic phenotypes based on their genotypes evaluated using the P/M marker corresponded with the results of seed investigation.

These results prove that the P/M marker can accurately identify citrus embryonic types and efficiently select monoembryonic individuals, suggesting that the P/M marker can be used for the citrus breeding program.

Key Words: CAPS markers, smallest marker set, PCR

*現在：農政課農地・担い手対策室

**現在：農産園芸課

***現在：農林水産研究所

I 緒言

交雑育種とは、異なる品種を種子親および花粉親として交配し、優良な交雑個体を選抜する新品種作出に重要な手法の一つである。交雑育種により、愛媛県では‘愛媛果試第28号’（商標：紅まどんな）や‘甘平’など独自に育成した品種が作出されている（重松ら、2005、2008）。

カンキツを交雑育種に用いる課題として種子形成時の胚性が挙げられる（岩政、1976）。カンキツは種子中に両親から遺伝子を受け継いだ胚（交雑胚）を一つ有する単胚性品種と、交雑胚とともに、種子親と同一の遺伝子組成の胚（珠心胚）を一つ以上有する多胚性品種に分けられる。交雑育種は、交雑胚獲得を目的として行うため、珠心胚の存在は交雑胚獲得の障害となる。珠心胚と交雑胚を生じた芽の外観などから区別することは難しいことから、多胚性品種を種子親として用いるのは非効率である。一方で単胚性品種は交雑胚のみを有するため、種子親としても花粉親としても利用することができ、育種親として価値が高い。そのため、種子親（中間母本）として利用することができる単胚性の交雑個体を優先的に選抜することにより、交雑育種の推進・効率化を図ることができる。

胚性の識別は、種子を調査することで行われるが、結実まで長い期間が必要であり効率が悪い。この課題の解決方法として、遺伝子による胚性識別方法の確立が挙げられる。幼苗段階で遺伝子から胚性を識別し、選抜することができれば、育種過程における作業負担や栽培面積を大幅に軽減することが可能となる。また早期の個体選抜は、より多くの交雑個体

を育成・選抜する機会をつくり、新品種作出の可能性を高めることにもつながる。このため、交雑育種の効率を高める方法として遺伝子による胚性識別が求められる。

遺伝子識別を行うには、胚性に関与する遺伝子を特定する必要がある。Shimadaら（2018）によると、カンキツの胚性は2つの対立遺伝子の組み合わせによって決定づけられる。この対立遺伝子はminiature inverted-repeat transposable element (MITE)様の挿入物（以下、MITE挿入物）を持っているか否かで分けられており、MITE挿入物を持つ対立遺伝子を有すると多胚性種子を形成する。すなわちMITE挿入物を持つものが多胚性対立遺伝子で、持たないものが単胚性対立遺伝子である。Shimadaら（2018）はMITE挿入物を検出するために、日本の柑橘類育種プログラムから宮川早生など14の祖先品種で保存された配列から単胚性・多胚性識別マーカーを開発している。

そこで本研究ではこの識別マーカーがカンキツ育種に実用できるか検証するため、胚性が明らかとなっている品種・系統に識別マーカーを適用し、胚性を照合することで正確な胚性識別能力を有しているか調査した。さらに、胚性が明らかでない交雑個体を用いた試験にマーカーを適用し、種子調査の結果と照合することで交雑育種に利用することができるか調査した。

II 材料及び方法

1 胚性識別能力の検討

1) 供試材料

すでに胚性が明らかとなっている品種・系統として既存の14品種（‘愛媛果試第28号’、‘甘平’、‘宮川早生’、‘清見’、‘西之香’、‘今

津ポンカン’、‘媛小春’、‘黄金柑’、‘はれひめ’、‘甘夏’、‘不知火’、‘宮内伊予柑’、‘たまみ’、‘タロッコ’)およびみかん研究所で二次選抜系統として保有している愛媛育成系統9系統(愛媛41号、愛媛43号、愛媛44号、愛媛45号、愛媛46号、愛媛47号、愛媛48号、愛媛49号、愛媛50号)を用いた。

2) PCR

DNA すいすい-R((株)リーゾ)を用いてマーカーのプロトコールに従い、供試材料の葉からDNAを抽出し、10 ng/mLに希釈した。PCRには、TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version(タカラバイオ(株))を使用し、各サンプルの反応液組成は表1に示した。

表1 1サンプル当たりのPCR反応液の組成

reagent	Volume (μ l)
H ₂ O	6.15
10×buffer(10×ExTaq Buffer)	1.0
dNTPs(dNTP Mixture)	0.8
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
Taq(TaKaRa Ex Taq HS)	0.05
DNA	1
Total	10

PCR条件は94℃で20秒間、56℃で30秒間、72℃で1分間の反応ステップを30サイクル繰り返した後に72℃で7分間の伸長反応を実施した。得られた産物を用いて2%アガロースゲルによる電気泳動を行い、トランスイルミネーターでPCR多型を観察することで胚性を識別した。

3) 識別された胚性の確認

既に判明している胚性表現型とマーカーの識別結果を比較し、正確に識別しているか確

認した。

2 交雑個体における胚性識別能力の検討

1) 供試材料

供試材料に使用した交雑個体は、単胚性品種と多胚性品種の交配であること、どちらかの親は愛媛育成系統であることを条件とし、愛媛果試第28号×タロッコの後代12個体およびたまみ×甘平の後代22個体を用いた。これらの個体はみかん研究所で平成21年度に交配、平成24年度には場へ接ぎ木したものである。

2) PCR

試験1と同様の方法で実施した。

3) 種子調査による胚性表現型の確認

交雑個体の胚性表現型は明らかになっていないため、種子調査を実施した。それぞれの交雑個体の花に‘川野ナツダイダイ’の花粉を交配し、果実内で種子が十分形成される10月頃に種子を採取した。種皮を除去して胚性表現型を確認し、識別マーカーによる胚性識別結果と合致しているか確認を行った。

III 結果

1 識別マーカーの胚性識別能力の検討

既存品種のPCR多型による分析結果を図1に示した。‘愛媛果試第28号’と‘甘平’のPCR多型を見ると、‘愛媛果試第28号’は700 bp付近にのみバンドが観察され、‘甘平’は700 bpと1000 bp付近にバンドが観察された。多胚性対立遺伝子は単胚性対立遺伝子が持たないMITE挿入物を持つことから、多胚性対立遺伝子由来のバンドは1000 bp付近に、単胚性対立遺伝子由来のバンドは700 bp付近に観察される。このため、識別マーカーにより‘愛媛果試第28号’は単胚性品種、‘甘

平’は多胚性品種として識別された。

同様に他の既存品種についてみると、‘清見’、‘西之香’、‘はれひめ’、‘宮内伊予柑’、‘たまみ’の5品種が単胚性を示し、‘宮川早生’、‘今津ポンカン’、‘媛小春’、‘黄金柑’、‘甘夏’、‘不知火’、‘タロッコ’の7品種が多胚性であると識別された。このうち、‘黄金柑’は多胚性対立遺伝子のみを持ち、ホモ接合体であることが確認された。マーカー適用による識別結果と実際の胚性表現型を比較すると、すべての品種で一致していた(表2)。

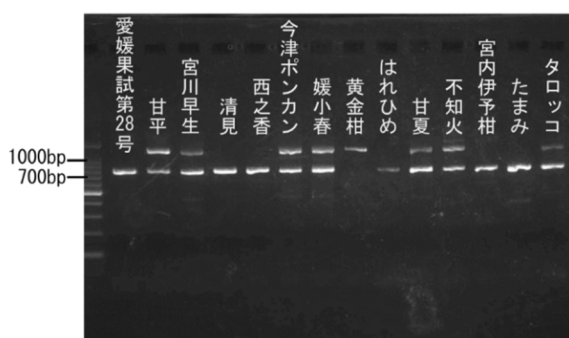


図1 既存品種のPCR多型

注) 愛媛果試第28号と甘平はそれぞれ単胚性、多胚性の対照を示す

愛媛育成系統では、愛媛41号、愛媛43号、愛媛45号、愛媛46号、愛媛47号、愛媛50号の6系統が単胚性、愛媛44号、愛媛48号、愛媛49号の3系統が多胚性として識別された(図2)。また、多胚性と識別されたものすべてヘテロ接合体であることが確認された。愛媛育成系統においても、マーカーで識別された胚性と実際の胚性表現型はすべて一致していた(表3)。

表2 単胚性多胚性識別マーカーを適用した既存品種の胚性、胚性表現型

品種	マーカーで識別された胚性※(遺伝子型)	胚性表現型
愛媛果試第28号	単胚(M/M)	単胚
甘平	多胚(M/P)	多胚
宮川早生	多胚(M/P)	多胚
清見	単胚(M/M)	単胚
西之香	単胚(M/M)	単胚
今津ポンカン	多胚(M/P)	多胚
媛小春	多胚(M/P)	多胚
黄金柑	多胚(P/P)	多胚
はれひめ	単胚(M/M)	単胚
甘夏	多胚(M/P)	多胚
不知火	多胚(M/P)	多胚
宮内伊予柑	単胚(M/M)	単胚
たまみ	単胚(M/M)	単胚
タロッコ	多胚(M/P)	多胚

注) 遺伝子型のうち、Mは単胚性、Pは多胚性の対立遺伝子を示す

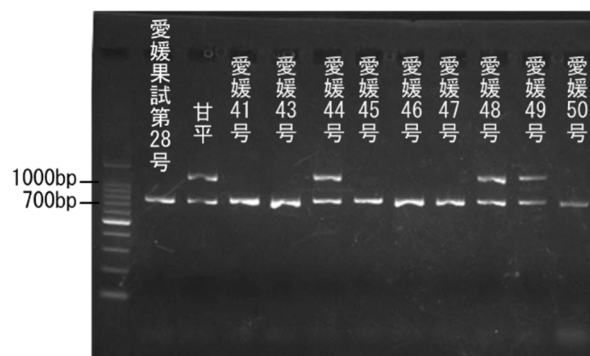


図2 愛媛育成系統のPCR多型

注) 愛媛果試第28号と甘平はそれぞれ単胚性、多胚性の対照を示す

表3 単胚性多胚性識別マーカーを適用した愛媛育成系統の胚性、胚性表現型

系統	マーカーで識別された胚性 ※(遺伝子型)	胚性表現型
愛媛 41 号	単胚 (M/M)	単胚
愛媛 43 号	単胚 (M/M)	単胚
愛媛 44 号	多胚 (M/P)	多胚
愛媛 45 号	単胚 (M/M)	単胚
愛媛 46 号	単胚 (M/M)	単胚
愛媛 47 号	単胚 (M/M)	単胚
愛媛 48 号	多胚 (M/P)	多胚
愛媛 49 号	多胚 (M/P)	多胚
愛媛 50 号	単胚 (M/M)	単胚

注) 遺伝子型のうち、Mは単胚性、Pは多胚性の対立遺伝子を示す

2 識別マーカーの個体選抜能力の検討

愛媛果試第 28 号(単胚)×タロッコ(多胚)

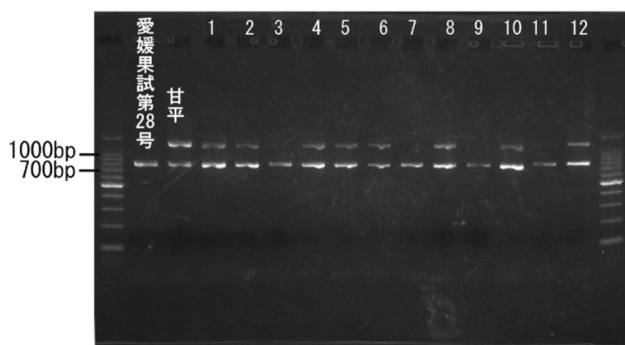


図3 愛媛果試第 28 号×タロッコ後代の PCR 多型

注) 愛媛果試第 28 号と甘平はそれぞれ単胚性、多胚性の対照を示す

表4 交雑個体のマーカーと種子調査による胚性識別

交雑組み合わせ	マーカー適用 個体数	種子調査 個体数	マーカーによる胚性識別 と種子調査結果合致個体数
愛媛果試第 28 号×タロッコ	12	6	6
たまみ×甘平	22	12	12

後代へのマーカー適用結果を図3に示す。PCR多型を見ると、12個体のうち単胚性が4個体、多胚性が8個体であることが確認された。また、本試験から多胚性の個体はすべてヘテロ接合体であると識別された。実際の胚性表現型を、種子を採取することができた6個体で調査したところ、マーカーによる識別結果と一致した(表4)。

同様に、たまみ(単胚)×甘平(多胚)後代のPCR多型を見ると、単胚性が8個体、多胚性が14個体であると識別された(図4)。多胚性個体と識別されたすべての個体はヘテロ接合体であった。種子調査では12個体の果実を使用し、調査した胚性表現型はすべてマーカーによる識別結果と一致した(表4)。

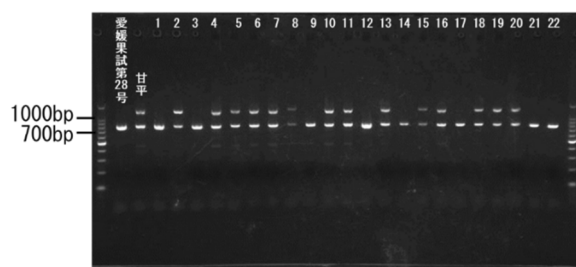


図4 たまみ×甘平後代の PCR 多型

注) 愛媛果試第 28 号と甘平はそれぞれ単胚性、多胚性の対照を示す

IV 考察

既存品種と愛媛育成系統を用いた胚性識別能力の試験において、マーカー適用によって識別された胚性は、実際の胚性表現型とすべて一致していた(表2、3)ことから、識別マーカーは正確に胚性を識別する能力を有することが明らかとなった。また、既存品種の多胚性として用いた品種のうち、‘黄金柑’が多胚性対立遺伝子由来のバンドのみを持つ多胚性ホモ接合体を持つことがマーカー識別により確認された(図1)。Shimadaら(2018)により多胚性対立遺伝子は単胚性対立遺伝子に対して優性を示すことが報告されていることから、‘黄金柑’を花粉親として利用すると、メンデルの法則に則り多胚性個体のみが作出されると考えられる。よって単胚性個体を選抜する場合は、‘黄金柑’を花粉親候補から外す必要がある。このように従来の種子調査が胚性表現型を調査するのみであったのに対し、マーカーによる遺伝子識別は、花粉親候補となる多胚性品種の選抜に用いることで、単胚性個体の選抜をより効率よく行うことができると考えられる。

次に交雑個体の選抜試験としてマーカーを適用したところ、PCR多型からすべての個体でバンドを確認することができ、結実前に胚性を予測することが可能であった(図3、4)。隔年結果・生理落果等で果実ができなかったもの、結実したものの種子が形成されなかったものがあったため、全個体で種子を調査することはできなかったが、調査した個体はすべてマーカーによる識別結果と一致した(表4)ことから、識別マーカーは、愛媛育成品種を親として用いた交雑個体においても結実前に胚性を識別し、個体を選抜するだけの能力を有していることが明らかとなった。

本研究の結果から、単胚性・多胚性識別マーカーは既存品種だけでなく、品種となっていない系統や交雑個体に対しても十分な胚性識別能力・交雑個体選抜能力を有しており、カンキツ育種に実用可能であることが示された。果樹は結実までに長い期間を必要とし、新規の品種を作出するまでの負担が大きい。識別マーカーの実用化による早期選抜の実現を通じて、愛媛県を代表する新たなカンキツがより多く作出されることが望まれる。

V 摘要

農研機構が開発した胚性識別マーカーを既存品種、愛媛育成系統、交雑個体に適用し、交雑育種において単胚性個体選抜に実用可能か検討した。

1) 既存品種14品種と愛媛育成系統9系統にマーカーを適用したところ、すべての品種・系統において胚性を識別する多型が得られた。判明している胚性表現型と照合したところすべて一致し、胚性を正確に識別できることが示された。また、多胚性品種が対立遺伝子をホモ接合体で持つかヘテロ接合体で持つかを識別できることも明らかとなった。多胚性対立遺伝子は単胚性対立遺伝子に対し優性を示すことから、花粉親の候補となる多胚性品種選抜に利用することで、単胚性個体を効率よく作出する手がかりになると考えられる。

2) 交雑個体を用いた試験では、既存品種、愛媛育成系統と同様にすべての個体で胚性を識別する多型が得られた。隔年結果等により種子を得られなかった個体を除き、種子調査を行ったすべての個体でマーカー識別結果と胚性表現型が一致した。この結果から、識別マーカーは結実前に胚性を識別し、個体を選抜できる能力を持つことが示された。

3)以上の結果から、胚性識別マーカーを用いることにより、種子親として利用可能な単胚性の交雑個体を早期に選抜することができ、交雑育種の効率を高める方法として実用可能な能力を有することが明らかとなった。

VI 引用文献

- 岩政正男. 1976. 柑橘の育種に関する諸問題 [2]. 農業および園芸. 51 : 703-706.
- 重松幸典・喜多景治・薬師寺弘倫・石川啓. 2005. カンキツ新品種 ‘愛媛果試第 28 号’ について. 愛媛果樹試研報. 19 : 1-6.
- 重松幸典・喜多景治・薬師寺弘倫・石川啓・井上久雄・中田治人. 2008. カンキツ新品種 ‘甘平’ について. 愛媛果樹試研報. 22 : 1-4.
- Shimada, T., T. Endo, H. Fujii, M. Nakano, A. Sugiyama, G. Daido, S. Ohta, T. Yoshioka and M. Omura. 2018. MITE insertion-dependent expression of CitRKD1 with a RWK-RK domain regulates somatic embryogenesis in citrus nucellar tissues. BMC Plant Biol. 18 : 166.