



Cytoplasmic contribution in interspecific crosses of *Solanum tuberosum* L. ($2n=4x=48$) with a Mexican wild species *S. demissum* Lindl. ($2n=6x=72$) and subsequent backcrosses

Sanetomo, Rena

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Date of Publication)

2013-03-26

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5509

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005509>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 實友 玲奈

専攻・講座 資源生命科学専攻・応用植物学講座

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Cytoplasmic contribution in interspecific crosses of *Solanum tuberosum* L. ($2n=4x=48$) with a Mexican wild species *S. demissum* Lindl. ($2n=6x=72$) and subsequent backcrosses

和訳: *Solanum tuberosum* L. ($2n=4x=48$)とメキシコ原産野生種 *S. demissum* Lindl. ($2n=6x=72$)の種間交雑ならびに戻し交雑後代における細胞質の寄与

指導教員 石井 尊生

種間交雑において、雑種種子の発育異常が数多く観察されている。近年、シロイヌナズナでは分子レベルの研究が進んでおり、受精後の胚乳発育にインプリント遺伝子が関与し、インプリント遺伝子群複合体タンパクである母方の Polycomb repressive complex 2 proteins と父方の AGAMOUS-LIKE Type-1 MADS domain transcription factors の均等な発現が正常な胚乳発育を促し雑種種子の形成に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。一方バレイショでは、それぞれの種がもつ交雑能力のバランスが種間雑種の胚乳形成に大きな役割を果たしていると考えられ、Endosperm Balance Number (EBN) 説として知られている。この概念的仮説はバレイショ育種における種間交雑の可否を予測するため広く受け入れられてきたが、その分子的機構はほとんど理解されていない。種間雑種における種子形成機構の解明を目指し、本研究では普通バレイショ *Solanum tuberosum* L. ($2n=4x=48$) とメキシコ原産野生 6 倍種 *S. demissum* Lindl. ($2n=6x=72$) の一側性不和合性 (以下、UI で表す) を取り上げ、交雑特性の遺伝学的解析および正逆 F_1 雑種の産出する花粉の DNA ならびに mRNA の網羅的解析を行い、雑種種子形成に関わる主要因を明らかにしようとした。

(1) 25 系統群 110 系統の *S. demissum* に普通バレイショの育種系統「西海 35 号」(以下、T で表す) の花粉を授粉すると、488 花から 395 の果実が得られた (着果率 81.2%)。逆交雑では 232 花から 24 果実しか得られず (18.7%)、量的な UI を示した。さらに、*S. demissum* を母親とし T を花粉親として交雑すると異常に大きな種子 (0.94 mg) が得られ、その逆交雑では比較的小さな種子 (0.39 mg) が得られた。これは、*S. demissum* の EBN 値が T に比べてやや低いことを表していると考えられる。*S. demissum* (PI 186551 とその自殖後代、以下 D で表す) を母親とし T を父親として得られた雑種 DT、およびその正逆交雑により得られた雑種 TD、さらにこれらに T および D を交雑して得られた BC_1 植物を用いて交雑試験を行い、着果率、果実当たり種子数および平均種子重を調査した。その結果、正常な種子を得るためには少なくとも 3 つの遺伝的因子が関与すると考えられた。すなわち、1) 細胞質因子、2) 雌性配偶体における核ゲノム因子、および 3) 雄性配偶体 (花粉) における核ゲノム因子である。このうち、細胞質因子が最も大きな影響を及ぼし、T 由来細胞質を持つものは母親として用いても父親として用いても、D 由来細胞質を持つものに比べて平均 2.04 倍の高い着果率を示した。したがって、D 細胞質は雑種種子形成を抑制する効果があるものと類推される。

(2) 種間交雑における正逆雑種の違いはよく見られる現象で、ほとんどは細胞質ゲノムの違いに起因するものである。D に対して TD を花粉親にした時の着果率は 64.9% で、DT を花粉親にすると 24.2% となり正逆雑種間で明らかに異なった。そこで、TD と DT の花粉 DNA について Methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) 分析法を行い、DNA レ

(氏名： 實友 玲奈 NO. 2)

ベルおよび DNA メチル化レベルでの違いを探索した。TD と DT それぞれの混合花粉 DNA サンプルについて、126 プライマー組み合わせで MSAP 分析を行ったところ、57 本のバンドで違いを見つけた。TD の 16 個体と DT の 9 個体で個別に調査したところ、8 本のバンドは TD ないし DT 集団内では共通に見られ、集団間では異なるパターンを示した。これらのバンドの塩基配列を決定したところ、2 組のバンドで同じ塩基配列であったことから 6 本の異なる配列を持つバンドが最終的に TD と DT の違いとして検出された。データベース上の既存配列との相同性を検索したところ、1 本のバンドは葉緑体 DNA の一部で、1 本はミトコンドリア DNA の一部であった。しかし、Band 1 と名付けた 1 本のバンドは、*S. demissum* と DT 集団のみがもつ塩基配列で、既存データベースに相同性を持つ配列はなかった。残る 3 本はいずれも DNA メチル化の違いによるもので、高い相同性を持つ既知配列はなかった。

(3) T、D およびその正逆 F₁ 雑種 TD と DT の花粉 mRNA について、その種類と転写量を次世代シーケンサー-Illumina Genome Analyzer IIx を用いて網羅的に調査した。サンプル当たり 3,035,230 - 3,204,206 千塩基を読み取り、合計 9,366 遺伝子座から 13,020 トランスクリプトを検出した。両親種間では 7,008 トランスクリプト (53.8%) で、また、TD と DT 間では 1,847 トランスクリプト (14.2%) で転写量に有意な差が見られた。TD と DT 間で差を示した 1,847 トランスクリプトのうち、52.5% は両親種の転写量の間ないし両親種のそれと大差は見られなかった。したがって雑種の発現量は、相加的ないし優性/劣性の遺伝的効果によるものと考えられる。一方、34.7% のトランスクリプトでは雑種はどちらの両親種よりも高いかあるいは低い転写量を示した。特に TD の過剰転写が著しかった (19.9%)。正逆雑種間で転写量の差の大きなものから順に選んだ 55 遺伝子座について、1 塩基多型を利用してトランスクリプト変異体を識別し、両親種のそれと比較していずれの親に由来するトランスクリプト変異体であるのか明らかにした。その結果、1 遺伝子座当たり平均 3.1 のトランスクリプト変異体が識別され、少なくとも 0.93 は T 親に由来し、1.36 は D 親に由来していた。雑種における遺伝子座内での各トランスクリプト変異体の転写割合を比較すると、約半数のトランスクリプト変異体は同一遺伝子座内の他のトランスクリプト変異体と比べ明らかに異なる転写量を示し、インプリント遺伝子である可能性が示唆された。しかし、これらのほとんどは TD と DT 間の違いに寄与していなかった。

(4) 栽培種へ疫病抵抗性遺伝子を導入するため、*S. demissum* は母親として頻繁に育種に用いられてきた。しかし、その雑種後代で *S. demissum* 由来細胞質を持つ系統は、豊富な花粉を産出するが花粉親として著しく稔性が低い。TD と DT の違いとして検出された DNA 断片 Band 1 (170 塩基対) について、周辺領域の解読を進め 1,032 塩基対まで明らかにした。しかし、既知配列と相同性は見られなかった。この Band 1 を含む領域にはイントロンが含

(氏名： 實友 玲奈 NO. 3)

まれず、すべてが mRNA に転写されていた。また、D 親、5 個体の DT 雑種、90 個体の (DT)T 戻し交雑集団、およびこれらと T 親、5 個体の TD 雑種、38 個体の (TD)T 戻し交雑集団において Band 1 の有無を調査したが、前者のみに見られ、D から後代へ母系遺伝をすることが明らかとなった。*S. demissum* の 3 系統、栽培種とその近縁野生種 38 種 168 系統、さらに 158 品種・育成系統を調査した結果、Band 1 は *S. demissum* および *S. demissum* 細胞質を持つ品種・系統にのみ特異的に検出されることが明らかとなった。したがって、Band 1 は *S. demissum* 細胞質を識別する有用なマーカーと考えられる。

D 由来細胞質を持つものは母親として用いても父親として用いても、T 由来細胞質を持つものに比べて低い着果率を示した。また、TD と DT を構成する核ゲノムの遺伝子構成は同一と考えられるが、その花粉では少なくとも 6 つの DNA 断片ないし DNA のメチル化に違いが見られ、さらに mRNA については 14.2% で転写量に明らかな違いが見られた。したがって、種間交雑において正常種子の発育には細胞質因子が寄与するものと考えられる。また、Band 1 は *S. demissum* 細胞質を識別する有用なマーカーとなり、育種において効率的な交配組み合わせを策定することができるものと考えられる。

氏名	實友 玲奈		
論文 題目	Cytoplasmic contribution in interspecific crosses of <i>Solanum tuberosum</i> L. ($2n=4x=48$) with a Mexican wild species <i>S. demissum</i> Lindl. ($2n=6x=72$) and subsequent backcrosses <i>Solanum tuberosum</i> L. ($2n=4x=48$)とメキシコ原産野生種 <i>S. demissum</i> Lindl. ($2n=6x=72$)の種間交雑ならびに戻し交雑後代における細胞質の寄与		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	石井 尊生
	副査	教授	伊藤 一幸
	副査	准教授	森 直樹
	副査		
	副査		
要 旨			
<p>近年、シロイヌナズナの種間交雑において、雑種種子形成機構の分子遺伝学研究が進んでいる。一方、パレイショでは、それぞれの種がもつ交雑能力のバランスが種間雑種の胚乳形成に大きな役割を果たしていると考えられ[Endosperm Balance Number (EBN) 説]、パレイショ育種における種間交雑の可否を予測するため広く受け入れられてきたが、その分子的機構はほとんど理解されていない。</p> <p>本研究では普通パレイショ <i>Solanum tuberosum</i> L. ($2n=4x=48$) とメキシコ原産野生 6 倍種 <i>S. demissum</i> Lindl. ($2n=6x=72$) の一側性不和合性を取り上げ、交雑特性の遺伝学的解析および正逆 F₁ 雑種の産出する花粉の DNA ならびに mRNA の網羅的解析を行い、雑種種子形成に関わる主要因を明らかにしようとしている。</p> <p>第 1 章では、<i>S. demissum</i> に普通パレイショの育種系統「西海 35 号」(以下、T で表す) の花粉を授粉すると 488 花から 395 の果実が得られ(着果率 81.2%)、その種子は異常に大きかった(0.94 mg)。逆交雑では 232 花から 24 果実しか得られず(18.7%)、その種子は比較的小さい(0.39 mg) ことを報告している。これは、<i>S. demissum</i> の EBN 値が T に比べてやや低いことを表していると考えられる。<i>S. demissum</i> (PI 186551 とその自殖後代、以下 D で表す) を母親とし T を父親として交雑して得た雑種 DT、およびその正逆交雑により得た雑種 TD、さらにこれらに T および D を交雑して得られた BC₁ 植物を用いて交雑試験を行い、着果率、果実当たり種子数および平均種子重を調査した。その結果、正常な種子を得るためには少なくとも 3 つの遺伝的因子が関与すると考えられた。すなわち、1) 細胞質因子、2) 雌性配偶体における核ゲノム因子、および 3) 雄性配偶体(花粉)における核ゲノム因子である。このうち、細胞質因子が最も大きな影響を及ぼし、T 由来細胞質を持つものは母親として用いても父親として用いても、D 由来細胞質を持つものに比べて平均 2.04 倍の高い着果率を示した。したがって、D 細胞質は雑種種子形成を抑制する効果があるものと推察している。</p> <p>第 2 章では、正逆 F₁ 雑種 TD と DT の花粉親としての能力が異なることに注目し、それぞれの花粉 DNA</p>			

氏名	實友 玲奈
	<p>について Methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) 分析法を行い、DNA レベルおよび DNA メチル化レベルでの違いを探索している。126 プライマー組み合わせで MSAP 分析を行ったところ、6 本の異なる配列を持つバンドが最終的に TD と DT の違いとして検出された。データベース上の既存配列との相同性を検索したところ、1 本のバンドは葉緑体 DNA の一部で、1 本はミトコンドリア DNA の一部であった。しかし、Band 1 と名付けた 1 本のバンドは、<i>S. demissum</i> と DT 集団のみがもつ塩基配列で、既存データベースに相同性を持つ配列はなかった。残る 3 本はいずれも DNA メチル化の違いによるもので、高い相同性を持つ既知配列はなかったと報告している。</p> <p>第 3 章では、T、D およびその正逆 F₁ 雑種 TD と DT の花粉 mRNA について、その種類と転写量を次世代シーケンサー Illumina Genome Analyzer IIx を用いて網羅的に調査している。合計 9,366 遺伝子座から 13,020 トランスクリプトを検出した。このうち 1,847 トランスクリプト(14.2%) について TD と DT 間で転写量に有意な差があることを明らかにしている。次に、正逆雑種間で転写量の差の大きなものから順に選んだ 55 遺伝子座を構成するトランスクリプト変異体の由来を調査したところ、合計 169 トランスクリプト変異体(1 遺伝子座当たり平均 3.1 個) が識別され、少なくとも 51 個は T 親に由来し、75 個は D 親に由来していた。雑種における遺伝子座内での各トランスクリプト変異体の転写割合を比較すると、58.7% のトランスクリプト変異体は同一遺伝子座内の他のトランスクリプト変異体に比べ明らかに異なる転写量を示し、インプリント遺伝子である可能性が示唆された。</p> <p>第 4 章では、TD と DT の違いとして検出された DNA 断片 Band 1 (170 塩基対) について、周辺領域の解読を進め 1,032 塩基対まで明らかにしたが、既知配列と相同性は見られなかった。また、D 親、5 個体の DT 雑種、90 個体の(DT)T 戻し交雑集団、およびこれらと T 親、5 個体の TD 雑種、38 個体の(TD)T 戻し交雑集団において Band 1 の有無を調査し、前者のみに検出されたことから、D から後代へ母系遺伝することを明らかにしている。<i>S. demissum</i> の 3 系統、栽培種とその近縁野生種 38 種 168 系統、さらに 158 品種・育成系統を調査した結果、Band 1 は <i>S. demissum</i> および <i>S. demissum</i> 細胞質を持つ品種・系統にのみ特異的に検出されることを明らかにしている。</p> <p>TD と DT を構成する核ゲノムの遺伝子構成は同一と考えられるが、本研究では、D 由来細胞質を持つものは母親として用いても父親として用いても、T 由来細胞質を持つものに比べて低い着果率を示し、その花粉では少なくとも 6 つの DNA 断片ないし DNA のメチル化に違いが見られ、さらに mRNA については 14.2% で転写量に明らかな違いが見られた。したがって、種間交雑において正常種子の発育には細胞質因子が寄与することは明白で、雑種種子形成機構の解明につながる新たな知見と考えられる。また、<i>S. demissum</i> は栽培種へ疫病抵抗性遺伝子を導入するため母親として頻繁に育種に用いられてきた。しかし、その雑種後代で <i>S. demissum</i> 由来細胞質を持つ系統は、豊富な花粉を産出するが花粉親として著しく稔性が低い。Band 1 は <i>S. demissum</i> 細胞質を識別する有用マーカーとしてパレイショ育種に大きく貢献するものと考えられる。</p> <p>したがって、これらの成果をとりまとめた本論文は、パレイショ種間交雑において雑種種子形成機構に関する基礎的知見を提供するのみならず、応用面においても価値ある研究成果の集積であると考えられる。よって学位申請者の實友玲奈は、博士(農学)の学位を得る資格があると認める。</p>