

ニホンナシ ‘長寿’, ‘君塚早生’, ‘明月’ および ‘市原早生’ の 自家不和合性遺伝子型の再考

平塚 伸・中島正揮・八神暁彦・神山康夫・河合義隆

三重大学生物資源学部 514-8507 三重県津市上浜町 1515

Reexamination of Self-incompatibility Genotypes in the Japanese Pears: ‘Choju’, ‘Kimizukawase’,
‘Meigetsu’, and ‘Ichiharawase’

S. Hiratsuka*, M. Nakashima, A. Yagami, Y. Kowyama and Y. Kawai

Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507

Summary

Self-incompatibility genotypes (S-genotype) were reexamined in the Japanese pear ‘Choju’, ‘Kimizukawase’, ‘Meigetsu’, and ‘Ichiharawase’. The S-genotypes of the former 2 cultivars are designated as S_2S_5 , whereas those of the latter 2 cultivars are S_1S_5 .

‘Choju’ and ‘Kimizukawase’, which are cross-incompatible in both directions, possessed the S_1 - and S_5 -allele associated proteins (S-protein) in their styles. PCR (polymerase chain reaction) amplifications of self-incompatibility genes (S-gene) also revealed the presence of S_1 - and S_5 -gene fragments in both cultivars. Thus, the S-genotypes of ‘Choju’ and ‘Kimizukawase’ were confirmed to be S_1S_5 , but not S_2S_5 .

‘Meigetsu’ and ‘Ichiharawase’ were compatible with ‘Choju’; their styles contained the S_1 -protein but not the S_5 -protein. PCR amplification also suggested the absence of S_5 -gene in both cultivars. These results together with those in the literature on the appearance of F_1 individuals with pollen cross-incompatibility with ‘Meigetsu’ indicate that the S-genotypes of ‘Meigetsu’ and ‘Ichiharawase’ are S_1S_7 or S_1S_x (S_x indicates an allele other than S_1 to S_7).

Key Words: Japanese pears, self-incompatibility, S-gene fragment, S-genotype amendment, S-protein.

緒 言

ニホンナシの自家不和合性遺伝子型 (S遺伝子型) は、受粉樹や人工受粉の花粉品種を決める際の極めて重要な情報である。また、S遺伝子型は品種の交配親の推定にも有効と考えられる。

近年、タンパク質やDNAなどの分子マーカーを使ったS遺伝子型の推定法がニホンナシでも報告されているが (Ishimizu ら, 1998; Hiratsuka ら, 1998; Ishimizu ら, 1999), これらは交配試験によって遺伝子型が確立された品種の遺伝子に対応する分子を検出し、それが未同定品種に存在するか否かによって推定するものである。従って、もしS遺伝子型が確立された品種の中に誤りがあれば、

今後の未同定品種におけるS遺伝子型の同定に際して大きな混乱が生じる。

筆者らは、これまでにS遺伝子型が確定された品種とその交配親の遺伝子型を対応させ、理論的につじつまのあわない数品種が存在することを見つけた (Hiratsuka ら, 1998)。すなわち、‘君塚早生’のS遺伝子型はこれまで S_2S_5 とされているが (大垣, 1958), ‘君塚早生’ \times ‘祇園’ (S_2S_4) および ‘菊水’ (S_2S_4) \times ‘君塚早生’の F_1 品種としてそれぞれ ‘早玉’ (S_1S_2) (梶浦ら, 1969) と ‘新水’ (S_4S_5) (梶浦ら, 1967) があることから、‘君塚早生’は少なくとも S_1 と S_5 遺伝子を有するものと考えられた。一方、‘長寿’は ‘君塚早生’ と ‘旭’ (S_4S_5) の交配によって得られた品種であり、その遺伝子型は S_2S_5 とされているが (安延ら, 1977), もし ‘君塚早生’のS遺伝子型が S_1S_5 であれば、‘長寿’のS遺伝子型が S_2S_5 ということは論理的にあり得ない。さらに、‘君塚早生’のS遺伝子型が S_1S_5 であれば、これまで S_1S_5 とされている ‘明月’ および ‘市原早生’ と ‘君塚早生’ は交雑不和合性を示すはずである。

平成12年2月4日 受付。平成12年8月14日 受理。

*Corresponding author.

本報告は、園芸学会平成10年度秋季大会および11年度秋季大会において発表した。また、本研究の一部は文部省科学研究費 (no. 12660023) の助成によって行われた。

以上の理論的背景に基づき、本実験では‘長寿’、‘君塚早生’、‘明月’および‘市原早生’のSタンパク質解析、PCRによるS遺伝子断片の増幅ならびに受粉試験を行い、これら品種のS遺伝子型の再考を行った。

材料および方法

1. 植物材料

三重大学生物資源学部実験圃場および鳥取大学農学部付属農場栽植の‘長寿’、‘君塚早生’、‘明月’および‘市原早生’を供試した。なお、比較品種として、少なくともこれまでに我々が花柱Sタンパク質の電気泳動パターンを確認している以下の品種を用いた。

受粉試験：独逸 (S_1S_2)、翠星 (S_1S_4)、今村秋 (S_1S_6) (三重大学実験圃場)。

Sタンパク質分析：今村秋 (S_1S_6)、幸水 (S_4S_5) (三重大学実験圃場)；独逸 (S_1S_2)、翠星 (S_1S_4)、晩三吉 (S_5S_7) (鳥取大学付属農場)。

PCR解析：独逸 (S_1S_2)、翠星 (S_1S_4)、今村秋 (S_1S_6)、長十郎 (S_2S_3)、菊水 (S_2S_4)、二十世紀 (S_2S_4)、八幸 (S_4S_5)、幸水 (S_4S_5)、晩三吉 (S_5S_7) (三重大学実験圃場)。

2. 受粉試験

開花約1日前の花を1花そう当たりおよそ3花に調整して除雄し、綿棒を用いて受粉した。受粉後の花そうは直ちにパラフィン袋をかぶせて他の花粉の混入を防ぎ、およそ2週間後に着果率を調査した。なお、各品種の花粉の発芽率は、寒天培地上で50%以上を示し、また、各品種の花は放任受粉区で十分な着果が観察されたことから、用いた花粉と雌ずいは健全であったと考えられる。花托が十分に肥大したものを着果とし、不十分な肥大を示すものや近い将来落果すると予想されるものは不着果とした。受粉後2週間経過した不受精花は黄変したものが多く、一方、十分な花粉を受粉して受精した花は受精後約10日経過しており、その花托は明らかな肥大を示していた。

3. Sタンパク質の同定

前報 (Hiratsuka ら, 1995) に従って花柱からタンパク質を抽出し、100 μ gの可溶性タンパク質を等電点電気泳

動分析した。泳動用のゲルは縦11cm、横20cm、厚さ1mmとし、7.5%アクリルアミドと2%アンフォライン (pH3.5~9.5) を含んだものである。泳動条件は1200 V、30 mA、25 Wで、10℃下で90分行った。泳動後のゲルは、銀染色キット (和光 K. K.) を用いてタンパク質バンドを染色した。既に報告したように (Hiratsuka ら, 1995; Zhang・Hiratsuka, 1999), この方法を用いるとSタンパク質は陰極側から S_1 、 S_7 、 S_6 、 S_4 、 S_2 、 S_5 、 S_3 の順に分離され、S遺伝子型の明確な品種を対照として同時に泳動することにより、S遺伝子型の推定が可能である。但し、 S_6 と S_7 バンドは、それぞれの遺伝子をもつ品種が1品種ずつ (今村秋; S_1S_6 : 晩三吉; S_5S_7) しかないため、陰極電極付近に分離されて他のSタンパク質バンドとは明らかに異なった等電点をもつバンドを、暫定的に S_6 、 S_7 としたものである。

4. S遺伝子のPCR増幅

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen K. K.) を用いて若葉からDNAを抽出し、鋳型DNAとした。また、プライマーはIshimizu (1998) によって報告された S_1 と S_5 遺伝子のDNA配列を基に作成した。すなわち、上流プライマーは保存領域から両遺伝子に共通の配列とし、下流プライマーはそれぞれの変異領域から特徴的な配列を選択した。作成したプライマーは、以下の通りである。

上流プライマー：

3'-CGACGCATTTAACTTTTATTA,

S_1 下流プライマー：

3'-TAAAAGGACGGGGAGGTC,

S_5 下流プライマー：

3'-AATGAGCTTGGGGTCGACCG.

PCRは、LA PCR Kit Ver.2 (宝酒造 K. K.) を用い、500ngの鋳型DNAと100 pmolのプライマーを使用し、PCR kitのマニュアルに従って50 μ lの反応液を作成して行った。反応は、PCR Thermal Cycler 480 (宝酒造 K. K.) を用い94℃、30秒；55℃、1分；72℃、1分とし、40サイクル行った。反応物は1%アーガロースゲル中で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色して紫外線下で写真

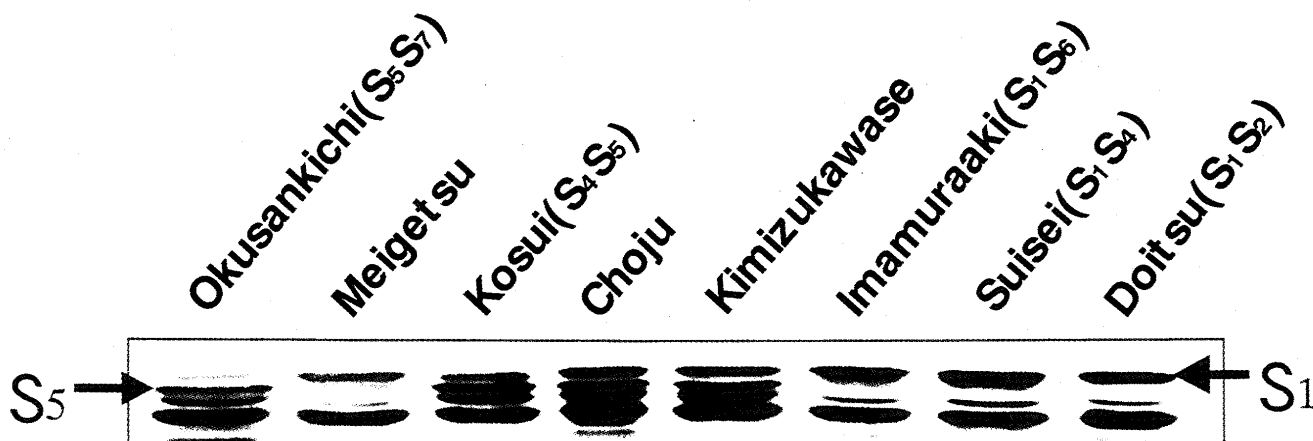


Fig. 1. Gel plate comparing S-protein banding patterns among the Japanese pear cultivars.

撮影した。

結 果

各品種の花柱タンパク質の等電点電気泳動を行ったところ、'長寿'のSタンパク質の電気泳動パターンは'君塚早生'と同一であり、'独逸'(S₁S₂)、'翠星'(S₁S₄)および'今村秋'(S₁S₆)のS₁タンパク質と同位置にバンドが認められた(第1図)。さらに、'長寿'と'君塚早生'は、'幸水'(S₄S₅)と'晩三吉'(S₅S₇)のS₅タンパク質に対応するS₅バンドが確認された。一方、これまでS遺伝子型がS₁S₅とされている'明月'では、S₁バンドは確認されたがS₅バンドは検出できなかった。また、S₃タンパク質は量的に豊富で、他のSタンパク質とは明らかに等電点が異なっているため、本システムで極めて容易に同定できるタンパク質であるが(Hiratsukaら、1995)、'明月'にS₃タンパク質は検出できなかった(データ省略)。

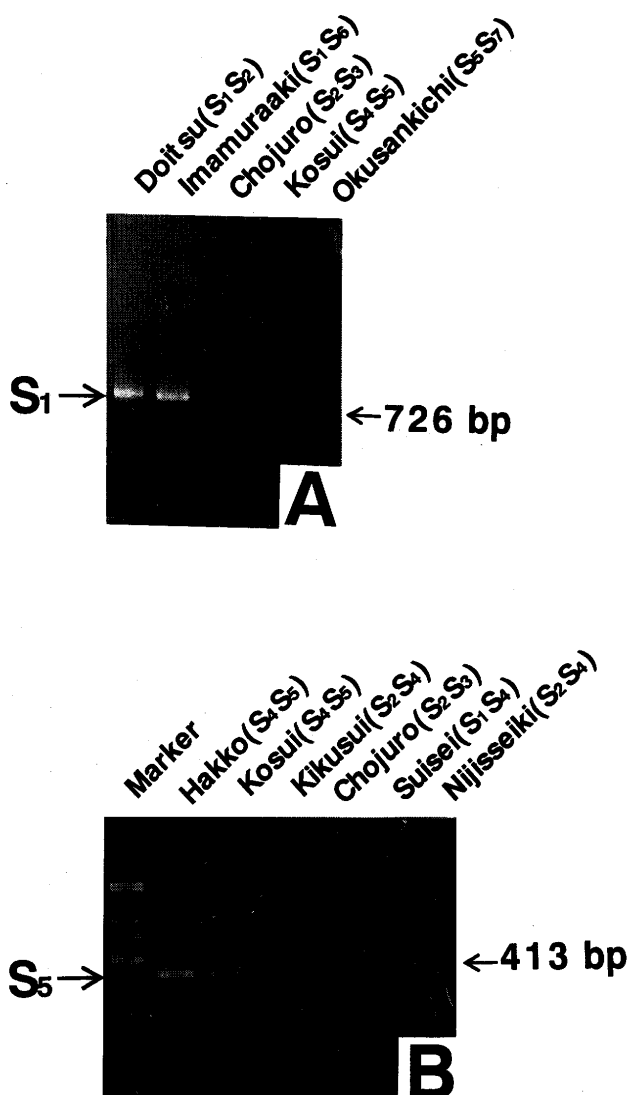


Fig. 2. Gel plate of amplified S₁- (A) or S₅-gene fragment (B) by PCR using genome DNA of the Japanese pear cultivars. Note the specific amplification of S₁- (A) or S₅-gene fragment (B) in each PCR analysis.

S₁およびS₅遺伝子のDNA配列を基に作成したプライマーを用いてPCRを行ったところ、このプライマーで両遺伝子の一部が特異的に増幅可能と判断された。すなわち、S₁プライマーではS₁遺伝子を有する'独逸'(S₁S₂)と'今村秋'(S₁S₆)でのみ約730bpのDNA断片が増幅され(第2図, A), また、S₅プライマーではS₅遺伝子を有する'八幸'(S₄S₅)と'幸水'(S₄S₅)でのみ増幅される約400bpのDNA断片が検出された(第2図, B)。そこで、このシステムで'長寿'、'君塚早生'、'明月'および'市原早生'の若葉DNAを鋳型としてPCRを行った。S₁遺伝子断片は4品種とも明確に検出されたが(第3図, A), S₅断片は'長寿'と'君塚早生'でのみ認められた(第3図, B)。以上の結果から、'長寿'と'君塚早生'のS遺伝子型はS₁S₅であり、'明月'と'市原早生'のそれはS₁S_x(x ≠ 3, 5)と推定された。

以上の分析結果を再確認し、さらに'明月'と'市原早生'の遺伝子型を決定するために交配試験を行った(第1表)。'君塚早生'×'長寿'および逆交配での結実率は、それぞれ0%(1998年)、1.5%(1999年)および21.4%

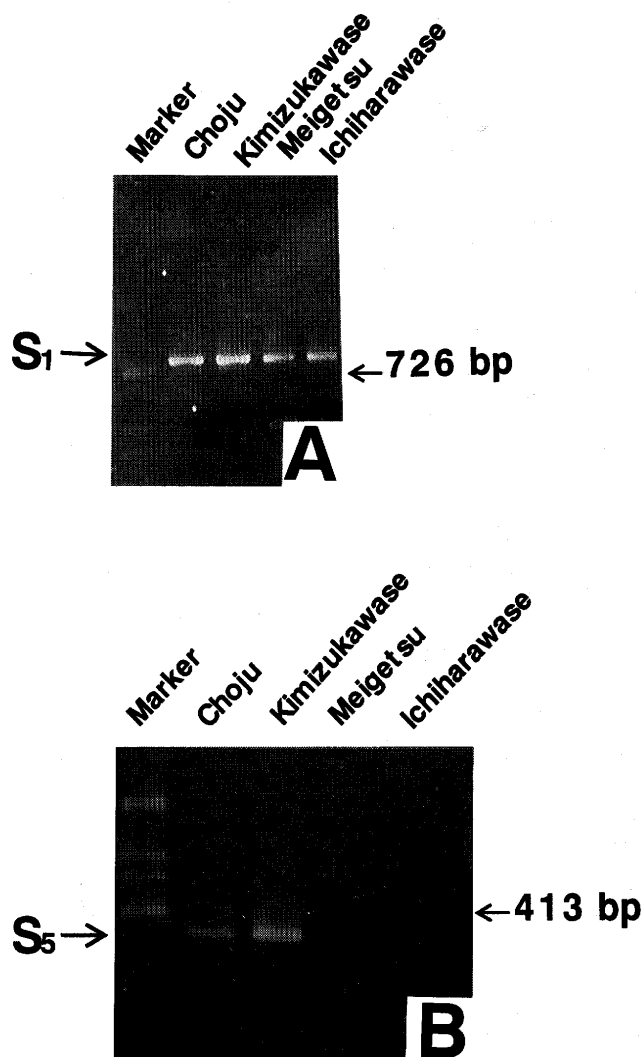


Fig. 3. Gel plate of amplified S₁- (A) or S₅-gene fragment (B) by PCR using genome DNA of the Japanese pear 'Choju', 'Kimizukawase', 'Meigetsu', and 'Ichiharawase'.

Table 1. Fruit set after cross-pollinations between cultivars whose S-genotypes are questionable.

Combination	No. of flowers tested	No. of fruit set	% of fruit set	Year tested
Choju × Kimizukawase	14	3	21.4	1998
	53	1	1.8	1999
Kimizukawase × Choju	27	0	0.0	1998
	63	1	1.5	1999
Choju × Meigetsu	43	39	90.7	1996
Choju × Ichiharawase	41	40	97.6	1996
Ichiharawase × Meigetsu	24	0	0.0	1999
Doitsu (S ₁ S ₂) × Meigetsu	27	13	48.0	1998
Suisei (S ₁ S ₄) × Meigetsu	13	9	69.0	1998
Imamuraaki (S ₁ S ₆) × Meigetsu	28	16	57.0	1998

(1998年), 1.8%(1999年)となった。ただし, 1998年に‘長寿’x‘君塚早生’で認められた着果は1花そうのみであったため, この花そうに異花粉が混入したものと考えられ, 両品種は交雑不和合と判断された。また, ‘長寿’と‘明月’, ‘市原早生’との交配における結実率は, それぞれ90.7, 97.6%と明らかな和合性を示し, 一方, ‘市原早生’と‘明月’は明確に交雑不和合であった。

‘明月’とS₁遺伝子をもつ‘独逸’(S₁S₂), ‘翠星’(S₁S₄)および‘今村秋’(S₁S₆)を交配したところ, 全ての組み合わせで和合性を示した(第1表)。「独逸」x‘明月’と‘今村秋」x‘明月’での着果率が若干低かったが, 全ての花そうで十分肥大した果実が最低1個は認められたことから, 受精後の果そう内での養分競合による落果があったためと考えられた。

以上の結果から, ‘明月’はS₇またはこれまでに同定されていないS_x遺伝子を有するものと考えられたため, S₇遺伝子をもつ‘晩三吉’(S₅S₇)とSタンパク質の泳動パターンを詳細に比較した。しかし, ‘明月’にはS₇バンドと極めて近い等電点に量的に豊富なS₁バンドが存在し, 本手法ではS₁タンパク質とS₇タンパク質との分離・同定が困難であった(データ省略)。なお, Ishimizu(1998)が報告したS₇遺伝子配列からプライマーを作成してPCRを行ったが, S₇遺伝子断片を増幅することはできなかった(データ省略)。

考 察

これまでに, ‘長寿’のS遺伝子型はS₂S₅とされてきたが(安延ら, 1977), 我々は前報(Hiratsukaら, 1998)で, この遺伝子型が誤っている可能性を指摘した。また, 本実験で行った花柱タンパク質分析でもS₅タンパク質とともにS₁タンパク質が検出され(第1図), さらに, PCRによりS₁遺伝子断片とともにS₅断片が増幅された(第3図)。また, ‘長寿’はS₂ホモ接合体と和合性を示すことが報告されており(寺井ら, 1995), S₂遺伝子はないものと考えられる。これらのことから, ‘長寿’のS遺伝子型

はS₁S₅と推定された。しかし, ‘君塚早生’が従来から考えられているようにS₂S₅遺伝子型(大垣, 1958)であるならば, ‘君塚早生’と‘旭’(S₄S₅)の後代品種である‘長寿’(安延ら, 1977)がS₁S₅遺伝子型となることは理論的にあり得ない。そこで, ‘君塚早生’の遺伝子型を再検討してみた。‘君塚早生’の後代品種として, S遺伝子型がS₄S₅の‘新水’[‘菊水’(S₂S₄)x‘君塚早生’](梶浦ら, 1967), また, S₁S₂の‘早玉’[‘君塚早生’x‘祇園’(S₂S₄)](梶浦ら, 1969)それぞれ作出されている。これらF₁品種の遺伝子型から考察すると, ‘君塚早生’のS遺伝子型は‘長寿’と同じS₁S₅と考えられた。本実験において, ‘君塚早生’でも‘長寿’と同様にS₁とS₅タンパク質が検出され(第1図), PCRによってもS₁とS₅DNA断片が増幅された(第3図)。近年, Castilloら(1999)によって報告されたPCR-RFLP分析でも, 両品種がS₁とS₅遺伝子をもつことが示されており, さらに両品種は交雑不和合性を示すことから(第1表), ‘長寿’と‘君塚早生’のS遺伝子型はS₁S₅と結論された。なお, 本実験の‘長寿’のS₅断片は‘君塚早生’のものと比較して増幅効率が悪かったが, 同様に‘幸水’のS₅断片も‘八幸’に比べて増幅され難い傾向があった(第2図)。S₁断片増幅ではこのような傾向が見られなかったことから, 本実験で用いたS₅プライマーによる増幅は, 鋳型DNA溶液などに混入する微量な夾雑物に影響されやすい可能性がある。多糖類などの夾雑物がPCRの効率を落とすことは, 良く知られた事実である。

一方, これまで遺伝子型がS₁S₅とされてきた‘明月’と‘市原早生’は‘長寿’と明らかに和合であり(第1表), さらに‘明月’のSタンパク質分析ではS₁バンドは検出されたがS₅バンドは確認できなかった。また, PCRでも‘明月’のS₅遺伝子は増幅されなかったことから, ‘明月’にはS₅遺伝子が存在しないと結論された。そこで, ‘明月’のS遺伝子型を検討してみた。なお, ‘市原早生’は‘明月’と明確な交雑不和合性を示したことから(第1表), 両者は同一遺伝子型と考えられた。

‘明月’の花柱には、 S_3 タンパク質は明らかに存在しないことから、その遺伝子型は S_1S_2 , S_1S_4 , S_1S_6 , S_1S_7 または S_1S_x と考えられた。しかし、交配試験の結果から(第1表), S_1S_2 , S_1S_4 および S_1S_6 ではないことが判明した。そこで、花柱タンパク質分析によって S_1S_7 の可能性を検討したが、明確にはできなかった。寺見ら(1946)の実験結果では、‘明月’と‘晩三吉’(S_5S_7), ‘今村秋’(S_1S_6)および‘独逸’(S_1S_2)を交配した F_1 に偏父性不親和が現れ、一方、‘明月’と‘二十世紀’(S_2S_4)および‘長十郎’(S_2S_3)との F_1 では現れず、これは‘明月’の S 遺伝子型が S_1S_7 であることを示している。しかし、本実験では S_7 タンパク質、 S_7 遺伝子断片ともに確認できなかった。 S_7 遺伝子が増幅されない原因として、プライマー設計を含めたPCR条件が適切でなかった可能性があるが、‘明月’に S_7 遺伝子型が存在しない可能性も考慮する必要がある。Castilloら(1999)は、PCR-RFLP分析で‘明月’に S_7 遺伝子が検出できなかったことから、その遺伝子型を S_1S_a としている。但し、‘明月’に S_7 遺伝子がないと仮定すれば、上述した寺見ら(1946)の交配試験結果と矛盾することになり、この矛盾を解明する必要がある。このように、‘明月’と‘市原早生’の遺伝子型については、今後さらに検討が必要である。

以上のように、これまで S_2S_5 とされていた‘長寿’と‘君塚早生’の S 遺伝子型は S_1S_5 であり、これまで S_1S_5 とされていた‘明月’と‘市原早生’のそれは S_1S_7 または S_1S_x である。今後、‘長寿’と同じ S_2S_5 遺伝子型のグループに分類されている‘須磨’、‘駒沢’および‘愛宕’の S 遺伝子型を再確認する必要がある。

摘 要

これまで不和合性遺伝子型(S 遺伝子型)が S_2S_5 とされていたニホンナシ‘長寿’と‘君塚早生’、および S_1S_5 とされる‘明月’と‘市原早生’の S 遺伝子型を再考した。

‘長寿’と‘君塚早生’は互いに交雑不和合性を示し、花柱内に S_1 と S_5 タンパク質を有していた。また、両品種のゲノムDNAを鋳型としたPCRにおいて、 S_1 と S_5 遺伝子断片が増幅された。以上の結果から、‘長寿’と‘君塚早生’の S 遺伝子型は S_2S_5 ではなく、 S_1S_5 であると結論された。

‘明月’と‘市原早生’は‘長寿’と交雑和合であり、両品種の花柱に S_1 タンパク質は認められたが、 S_5 タンパク質は検出できなかった。PCRによる S 遺伝子の増幅でも、両品種に S_5 遺伝子は検出できなかった。これらの結果および‘明月’の F_1 における偏父性不親和個体の出現に関する文献情報から、‘明月’と‘市原早生’の S 遺伝子型は S_1S_7 または S_1S_x (S_x は、 S_1 ~ S_7 以外の遺伝子)と推定された。

謝 辞 本実験を遂行するにあたり、快く材料を提供して頂いた鳥取大学農学部田辺賢二教授、および同大学の園芸学研究室の諸氏に感謝の意を表す。

引用文献

- Castillo, C.・高崎剛志・斎藤寿広・N. Gamage・吉村由美・乗岡茂巳・中西テツ. 1999. PCR-RFLPによるニホンナシの S 遺伝子型の同定. 園学雑. 68(別2): 221.
- Hiratsuka, S., T. Kubo and Y. Okada. 1998. Estimation of self-incompatibility genotype in Japanese pear cultivars by stylar protein analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67: 491-496.
- Hiratsuka, S., Y. Okada, Y. Kawai, F. Tamura and K. Tanabe. 1995. Stylar basic proteins corresponding to 5 self-incompatibility alleles of Japanese pears. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 64: 471-478.
- Ishimizu, T. 1998. Structure and function of rosaceous S -RNase associated with gametophytic self-incompatibility. Ph. D. Thesis. Osaka Univ., Suita, Osaka.
- Ishimizu, T., K. Inoue, M. Shimonaka, T. Saito, O. Terai, S. Norioka. 1999. PCR-based method for identifying the S -genotypes of Japanese pear cultivars. Theor. Appl. Genet. 98: 961-967.
- Ishimizu, T., S. Norioka, T. Nakanishi and F. Sakiyama. 1998. S -genotype of Japanese pear ‘Hosui’. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67: 35-38.
- 梶浦 実・金戸橋夫・町田 裕・小崎 格. 1967. 日本ナシの新品種‘新水’について. 園試報 A 6: 69-76.
- 梶浦 実・金戸橋夫・町田 裕・小崎 格・田代俊生・中屋英治. 1969. 日本ナシの新品種‘早玉’について. 園試報 A 8: 7-14.
- 大垣智昭. 1958. 和梨新品種の不稔性因子について. 神奈川農試園芸分場研報. 5: 23-26.
- 寺井理治・佐藤義彦・阿部和幸・斎藤寿広・寿 和夫. 1995. ニホンナシの S 遺伝子ホモ接合体の育成とそれを用いた S 遺伝子型の解析. 園学雑. 64(別1): 150-151.
- 寺見広雄・鳥潟博高・島津裕吉. 1946. 日本梨各品種間の不稔性因子の分析. 京都大学園芸学研究集録. 3: 267-271.
- 安延義弘・大垣智昭・渡部照夫. 1977. 日本梨新品種‘長寿’について. 神奈川園試報. 24: 22-25.
- Zhang, S-L. and S. Hiratsuka. 1999. Variations in S -protein levels in styles of Japanese pears and the expression of self-incompatibility. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 68: 911-918.