

ソメイヨシノの自家不和合性およびサクラ属野生種との交雑親和性に違いが生じる時期

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者名	鶴田,燃海 王,成 向井,謙
発行元	園芸学会
巻/号	11巻3号
掲載ページ	p. 321-325
発行年月	2012年7月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ソメイヨシノの自家不和合性およびサクラ属野生種との交雑親和性に 違いが生じる時期

鶴田燃海^{1*}・王 成²・向井 譲¹

¹ 岐阜大学応用生物科学部 501-1193 岐阜市柳戸1番1

² 岐阜大学大学院連合農学研究科 501-1193 岐阜市柳戸

Self-incompatibility and Stages of a Cross-compatible Difference in the Flowering Cherry, ‘Somei-yoshino’

Momi Tsuruta^{1*}, Cheng Wang² and Yuzuru Mukai¹

¹Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

²United Graduate School of Agricultural Science, Gifu University, Yanagido, Gifu 501-1193

Abstract

Prunus × yedoensis ‘Somei-yoshino’, one of the most famous flowering cherry cultivars in Japan, is self-incompatible. To determine how self-incompatibility and a compatible difference among crossing families occurred, we performed artificial pollination and measured the pollen tube growth and characteristics of the fruit set in ‘Somei-yoshino’. With the self-pollinated treatment, the pollen tube that germinated on the stigma never reached the bottom of the style, even by 10 days after pollination. Hence, the self-incompatibility in ‘Somei-yoshino’ is a result of the arrest of self pollen tube growth in the style. All self-pollinated fruit dropped within 20 days after pollination. In contrast, pollen tube growth to the bottom of the style was observed in almost all of the styles pollinated with inter-specific outcross pollen until 3 days after pollination. There were no differences among the crossing families in pollen tube growth within 10 days after pollination. The compatible differences in families were realized in the fruit set rate around 20 days after pollination. Subsequently, only small fruit dropped until maturation, and most fruit matured within 50 days after pollination, in early June.

Key Words : artificial pollination, fruit set rate, fruit size, inter-specific cross, pollen tube growth

キーワード : 人工交配, 花粉管伸長, 果実サイズ, 結実率, 種間交雑

緒 言

サクラ (サクラ属サクラ亜属; *Cerasus*) は古くより日本で愛されてきた花の一つで、江戸時代以降、観賞用に数多くの品種が作出されてきた。なかでもソメイヨシノ (*Prunus × yedoensis* Matsum. ‘Somei-yoshino’) は花序が大きく花付きもよく、開葉に先駆けて花が咲くことなどから好まれ、現在日本で最も植栽されている園芸品種の一つである。ソメイヨシノは、エドヒガン (*P. pendula* Maxim. f. *ascendens* Ohwi) にオオシマザクラ [*P. lannesiana* (Carr.) Wilson var. *speciosa* (Koidz) Makino] を掛け合わせた雑種であると言われている (Innan ら, 1995; Kaneko ら, 1986; Ohta ら, 2006; Wilson, 1916)。このように、サクラの品種は種間交雑によって作られることも多く、サクラ属は種間交雑の障壁が低い分類群だと考えられる。しかし、品種作出の際に必要な種間の交雑親和性に関する定量的なデータは少なく (岩佐・

伊丹, 1962)、親和性の違いの生理的メカニズムも十分に理解されていない。

これまでに、ソメイヨシノを用いた人工交配の例はいくつか知られている。吉川・渡辺 (1964) は、ソメイヨシノが自家不和合性を示すこと、ソメイヨシノを種子親としてヤマザクラ (*P. jamasakura* Sieb. ex Koidz.)、オオシマザクラおよびエドヒガン系の桜との交配において、花粉親の種により結実率が異なることを報告している。また、鈴木ら (2006) はオウトウ (*P. avium* L.) との正逆交雑において、ソメイヨシノを花粉親としたときのみわずかながらに結実することを確認している。一方、これらの研究においては、不和合性や結実率の低下がどの段階で起こっているかについては調べられていない。また、果実の発達や結実の過程についての生態学的な調査はなされていない。

本研究ではソメイヨシノを種子親とし、自家授粉およびサクラ属野生種を花粉親とした人工交配を行い、花粉親ごとの交雑の親和性の違いを明らかにしようとした。このとき、ソメイヨシノの自家不和合性および他種との交雑親和性の違いがどの段階で起こるのかを同定することを目的と

2011年11月18日 受付. 2012年2月13日 受理.

* Corresponding author. E-mail: m.tsuruta.lfme@gmail.com

し、花柱での花粉管伸長、着果の推移および果実成熟時における花粉親の違いを調べた。

材料および方法

1. 人工授粉処理

岐阜大学構内のソメイヨシノ3株 (CY-a, CY-b, CY-c) を種子親とし、2009年にオオシマザクラ、2011年にエドヒガン、マメザクラ (*P. incisa* Thunb. ex Murray), キンキマメザクラ [*P. incisa* var. *kinkiensis* (Koidz.) Ohwi], ソメイヨシノ CY-b (自家授粉処理) を花粉親とした人工交配を行った。これらのうち、2009年のソメイヨシノ×オオシマザクラの後代は、ソメイヨシノの連鎖地図作成に用いた (未発表)。

それぞれの花粉親種ごとに開花前の枝を採取し、実験室内において開花させた。葯の裂開した花序をヘキサソールに浸け、成熟した花粉を採集した (山田, 2004)。集めた花粉はヘキサソールに浸けたまま常温で保存し、交配当日にヘキサソールを揮発させて人工交配に用いた。交配に用いた花粉は、その日のうちに10%ショ糖を含む1%寒天培地にまき、25°C、12時間インキュベートの発芽試験により、十分に発芽能力があることを確認した。

ポリネーターによる他個体の花粉の混入を防ぐため、花芽の付いた開花前の種子親の枝にナイロン袋を掛けた。1つの袋内にはおよそ30から80の花序が入っており、合計で168袋、7,630個の花序を交配に供した (第1表)。ソメイヨシノが強い自家不和合性を示すことは、先の報告 (吉川・渡辺, 1964) および予備実験において確認されているため、除雄は行わなかった。開花が七分～八分咲きまで進み、雌蕊が十分に成熟した時に、袋内の花序の柱頭に集めた花粉を綿棒で授粉した。未開花のつぼみはこのとき摘花した。授粉処理後再び袋を被せ、花序を隔離した。

2. 花粉管伸長の観察

2011年にソメイヨシノ花柱における自家、エドヒガン、マメザクラおよびキンキマメザクラの花粉管伸長の違いを観察した。授粉から3、6および10日後に自家授粉処理および他家授粉処理をした花序を採取し、雌蕊をFAA [5%ホルムアルデヒド、5%酢酸、45%エタノール (v/v)] で固定した。1規定のNaOHに6時間ほど浸漬して雌蕊を軟化させ、アニリンブルーで染色した後に押しつぶしてプレパラートとした。蛍光顕微鏡で花粉管の伸長を観察し、花粉

管の最長到達部位を柱頭、花柱上部、花柱中央部および花柱基部に分けて記録した。

3. 果実の着果の推移と発達の観察

授粉処理から1週間ほどで花被が落下し、花柄の先に子房が確認できるようになる。ここではこれ以降を果実と呼ぶ。花卉が散ってから数日おきに袋内に落下した果実の数を記録し、花粉親ごとの果実の着果の推移を調べた。2011年にはこれと同時に、落下した果実の直径を計測した。果実落下数の観察は、すべての果実が黒く成熟して落下する6月下旬まで行った。袋ごとに、得られた成熟果実の数から結実率を算出した。袋を反復としてとらえ、それらの平均値を花粉親ごとの結実率とした。

またそれぞれの花粉親ごとに、成熟した果実の直径の測定を行った。2009年には加えて、授粉後20、22、43および48日目に健全な果実を採取し、直径、軸方向の長さおよび新鮮重を記録した。

結 果

1. 花粉管の伸長

ソメイヨシノ雌蕊の観察からは、どの授粉処理においても花粉は柱頭で発芽し、花柱へと花粉管が伸長する様子が確認された。他家授粉処理 (×エドヒガン) では、授粉後3日目までにほとんどの花柱において花柱基部まで花粉管の伸長が観察された。このとき花粉管が花柱基部に達していた花柱の割合は、授粉後3、6および10日目で変わらなかった ($P > 0.05$, Fisher's exact test)。また、授粉後10日目の花粉管伸長においても、花粉親による違いは見られなかった ($P > 0.05$, Fisher's exact test, 第2表)。一方、自家授粉処理では花柱の中央部まで伸長するものも見られたが、花柱基部まで伸長した花粉管はどの時期においても観察されなかった (第2表)。

2. 着果の推移および結実率

2009年、2011年のどちらの年においても、授粉からおよそ1週間後の開花が終わる頃から、すべての交配処理において果実の急激な落果が見られた (第1図)。その後も自家授粉による果実は落果し続け、授粉から20日後にはほぼすべての果実が落果した。この時期に、他家授粉処理における花粉親ごとの果実の生存に差が生じた ($P < 0.05$, Bonferroni)。授粉後20日以降は、どの他家授粉処理におい

Table 1 Fruit set rate on crossing of 'Somei-yoshino'.

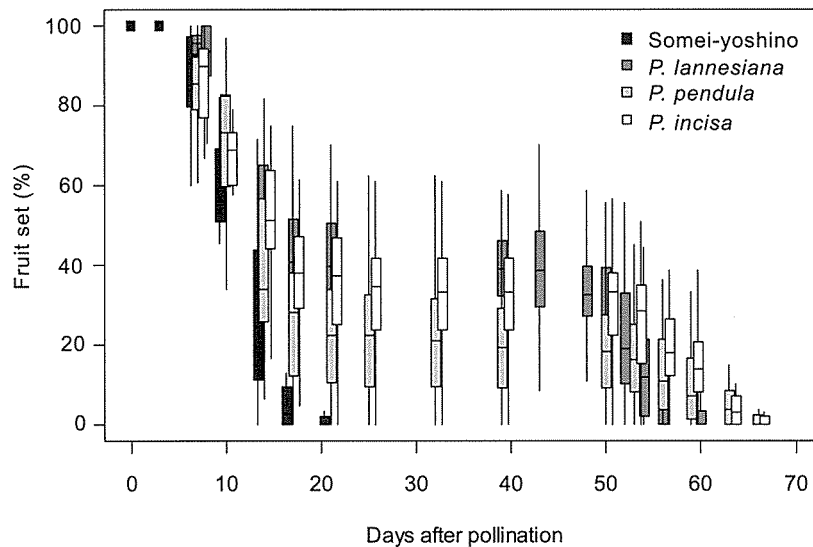
Pollen donor	No. of bags employed	No. of flowers pollinated	No. of fruit set	Fruit set rate (%) ²
Somei-yoshino	13	446	0	0 (0) ^y a
<i>P. lannesiana</i>	84	3,980	1,347	35.3 (15.0) ^d
<i>P. pendula</i>	35	1,697	262	17.7 (13.1) ^b
<i>P. incisa</i>	35	1,443	423	28.8 (15.0) ^c
<i>P. incisa</i> var. <i>kinkiensis</i>	1	64	12	18.8 ⁻

²The fruit set rate was calculated as a mean of the survival rate for each bag. Significant differences at $P < 0.01$ are indicated by different letters (Bonferroni).

^y Standard deviation.

Table 2 Pollen tube growth on self- and outcross-pollination of ‘Somei-yoshino’ in 2011.

Pollen donor	Days after pollination	No. of pistils tested	No. of pistils with the longest pollen tube reaching the:			
			Stigma	Top of style	Middle of style	Bottom of style
Somei-yoshino (self)	3	17	0	9	8	0
	6	23	0	15	8	0
	10	13	1	5	7	0
<i>P. pendula</i>	3	15	0	1	3	11
	6	13	0	2	3	8
	10	7	0	1	1	5
<i>P. incisa</i>	10	3	0	0	0	3
<i>P. incisa</i> var. <i>kinkiensis</i>	10	11	0	0	1	10

**Fig. 1** Time-course of the fruit survival rate of ‘Somei-yoshino’ × ‘Somei-yoshino’ (Self: Black), × *P. lannesiana* (Dark gray), × *P. pendula* (Light gray), and × *P. incisa* (White). The box represents the range from the 1st to 3rd quartile and the line in the box shows the median. Upper and lower whiskers show the most extreme data point which is no more than 1.5 times the length of the box away from the box.**Table 3** Diameters of prematurely dropped fruits on crossing of ‘Somei-yoshino’ in 2011.

Pollen donor	Median fruit diameter [min-max] (mm)				
	April 28	May 02	May 13	May 20	May 31
Somei-yoshino (self)	1.9 [1.5–2.7] (N = 23)	1.9 [1.2–3.7] (N = 17)			
<i>P. pendula</i>	2.2 [1.1–6.3] (N = 32)	2.0 [1.1–5.4] (N = 26)	4.3 [1.5–7.2] (N = 13)	5.2 [2.8–7.2] (N = 25)	6.4 [5.5–7.9] (N = 12)
<i>P. incisa</i>	2.1 [1.2–5.4] (N = 45)	2.2 [1.4–4.1] (N = 24)	5.4 [1.8–8.2] (N = 11)	6.8 [5.4–7.7] (N = 7)	6.7 [5.8–7.9] (N = 23)

てもほとんど落果は見られず、授粉からおよそ50日の6月初頭に果実が黒く成熟した。最終的な結実率はオオシマザクラで35.3%、エドヒガン17.7%、マメザクラ28.8%、キンキマメザクラ18.8%となり、花粉親により有意に異なった ($P < 0.01$, Bonferroni, 第1表)。成熟した果実はその後、授粉からおよそ70日の6月下旬までに順次落下した(第1図)。

3. 果実の発達

開花時、子房の直径は1～2mm弱であった。健全な果

実の直径は、花被が落下した後に急速に肥大し、授粉から20日後にはほぼ成熟時のサイズに達した (10.64 ± 0.46 mm, $N = 25$)。それ以降果実の直径はほとんど増加せず、48日目では 10.67 ± 0.66 mm (×オオシマザクラ, $N = 46$) であり、授粉後20日後と成熟時との違いは見られなかった ($P > 0.05$, t -test)。また果皮や種皮は種子親由来の細胞のため、成熟果実のサイズに×オオシマザクラ、×エドヒガン (10.60 ± 0.36 mm, $N = 19$)、×マメザクラ (10.72 ± 0.62 mm, $N = 25$) との間に、

花粉親による違いは見られなかった ($P > 0.05$, Bonferroni). 果実の軸方向の長さと同様に、授粉後 20 日目にはそれぞれ 9.88 ± 0.41 mm および 0.73 ± 0.08 g に達し、この値は成熟時 (9.78 ± 0.48 mm, 0.77 ± 0.08 g) と変わらなかった (いずれも $P > 0.05$, *t*-test).

授粉から 20 日までに落下した果実の直径は約 2 mm と、ほとんど成長していないものばかりであった (第 3 表). それ以降、他家授粉処理区においてまれに見られた落下果実のサイズも健全な果実に比べて小さく (第 3 表), 多くは病虫害を受けたものや (鶴田, 私信), 物理的な落果であった.

考 察

1. ソメイヨシノの自家不和合性

ソメイヨシノは自然状態ではほとんど着果が見られず、人工交配においても自家不和合であることが示されている (吉川・渡辺, 1964). 本研究においても、自家授粉処理からは健全な果実は全く得られず、これは自家花粉管が花柱において伸長停止していたためであった (第 2 表). サクラ属を含むバラ科植物の多くは、配偶体型の自家不和合を示すことが知られており、花粉側および花柱側の自家不和合性遺伝子 (S 遺伝子) が同定されている. 花粉と花柱の S 遺伝子のハプロタイプが一致すると不和合となり、花粉管の伸長が停止する (Tao・Iezzoni, 2010). 花柱側の決定因子は RNase 活性を示す糖タンパク (S-RNase) といわれ、S-RNase をコードする cDNA は多くのバラ科植物 (Sassa ら, 1996) や、サクラ属の野生種 (加藤ら, 2009), およびソメイヨシノにおいても同定されている (PyS1: AB479465, PyS2: AB479466). このため、ソメイヨシノを含むサクラ属で見られる自家交配における結実の欠如は (Watanabe・Yoshikawa, 1967; 吉川・渡辺, 1964), S-RNase による花柱での厳密な自家花粉管伸長阻害による結果と言えらる.

2. ソメイヨシノにおける種間の交雑親和性の違い

ソメイヨシノを種子親としたとき、自家授粉処理では果実は授粉後 20 日までにすべて落下した (第 1 図). 一方、サクラ属野生種を花粉親とした他家授粉処理では、約 18 ~ 35% の結実率が得られた (第 1 表). また我々は現在、2009 年のオオシマザクラとの交雑による種子から健全な実生を得ている. つまり、ソメイヨシノには生理的な不稔要因は認められない. そして、サクラ属は属内で広く交雑和合性があるといえる. このとき本研究で得られた花粉親種ごとの結実率の傾向は、先行研究とほぼ一致していた. すなわち、オオシマザクラを花粉親としたときに比べ、エドヒガンを花粉親としたときの結実率は低かった (吉川・渡辺, 1964; 第 1 表). ソメイヨシノの両親といわれる両種で、交雑の親和性が異なったのは大変興味深い.

本研究において、花粉親による親和性に違いが見られるようになるのは、授粉からおよそ 20 日目の果実の生存においてであった. この時期は、自家不和合性が働く時期とは明らかに異なる. 自家授粉処理では、授粉後 3 日目と 10 日

目の間で花粉管の伸長に差は見られず、一方、他家授粉処理では授粉後 3 日目にはほとんどの花柱において花粉管が花柱基部まで達していたことから、自家不和合性は授粉から 3 日後には機能していたと考えられる. また、花粉親に用いた野生種個体は、それぞれソメイヨシノの S ハプロタイプとは異なるハプロタイプを持つことを確認しているため (未発表), 花粉親間の親和性の違いは自家不和合性とは異なる機構によるものと言える. 他家授粉における花粉親間の違いは、授粉後 10 日目の花粉管伸長においては確認されなかった (第 2 表). ただし、近縁のアウトウでは花粉管は授粉後 12 時間で花柱の基部に達するとの報告もあり (別府・片岡, 1999), 授粉から数日以内のもっと早い期間において種間の花粉管伸長の違いを調べる必要もある. また、同じサクラ属の甘果および酸果アウトウの品種では、有効な受粉期間は 5 ~ 10 日と言われているが (Sanzol・Herrero, 2001), 気温が高いと胚珠の寿命は短縮され、数日にまで減少するとの報告もある (別府ら, 1997; Postweiler ら, 1985). この胚珠の寿命は、花粉管の伸長能とあわせ、受精割合に影響することが予想される. 授粉後 20 日までの期間、自家授粉による果実はすべて落下しており (第 1 図), また他家授粉処理においてもこの期間に落下した果実の大きさは自家授粉処理と変わらず、ほとんどが未発達のもの 1 ~ 3 mm ほどであった (第 3 表). このため、ソメイヨシノにおける授粉後 20 日までの未成熟果実の落下は、受精の欠如した、あるいは正常に胚が発達しなかった果実の落果と考察される. 今後、実際に落下した果実内の種子の受精の有無を確認し、受精の割合に花粉親による違いがあるのかを明らかにする必要がある.

摘 要

ソメイヨシノは日本のサクラを代表する園芸品種の一つで、自家不和合を示すことが知られている. 本研究は、自家不和合性や花粉親による交雑親和性の違いがどの時期に起こるのかを明らかにすることを目的とし、ソメイヨシノを種子親とした人工交配実験を行い、花粉管伸長および結実の特性を交配処理ごとに調べた. 自家花粉管は、授粉から 10 日経っても花柱の基部に到達しておらず、ソメイヨシノにおいて見られる自家不和合性は、花柱での花粉管伸長抑制による結果であることが確認された. このとき自家授粉処理による果実は、授粉から 20 日後までにすべて落下した. 一方他家花粉管は、授粉後 3 日にはほとんどが花柱の基部まで達しており、また授粉から 10 日後における花粉管が花柱基部に到達している花柱の割合には、花粉親による違いは見られなかった. 花粉親の違いが見られたのは、授粉からおよそ 20 日後の、生存果実の割合においてであった. 授粉から 20 日以降、他家授粉による果実はほとんど落下せず、授粉からおよそ 50 日の 6 月上旬にほぼすべての果実が黒く成熟した.

謝 辞 本研究を完遂させるにあたり、7 千以上ものソ

メイヨシノ花序への人工授粉作業は、岐阜大学森林生態学研究室の多くの同僚の力添えなくしては、完遂することができませんでした。全員の名前を挙げることはできませんが、ここに篤くお礼申し上げます。また、花粉の採集のためのエドヒガンの花序を快く提供いただいた、岐阜県百年公園所長の若林知康氏に、感謝申し上げます。

引用文献

- 別府賢治・片岡郁雄. 1999. 甘果オウトウ (*Prunus avium* L.) 花粉の発芽特性. 香川大農学報. 51: 5–13.
- 別府賢治・岡本茂樹・杉山明正・片岡郁雄. 1997. 開花期前後の温度環境が甘果オウトウ ‘佐藤錦’ の花器の発育と結実に及ぼす影響. 園学雑. 65: 707–712.
- Innan, H., R. Terauchi, N. T. Miyashita and K. Tsunewaki. 1995. DNA fingerprinting study on the intraspecific variation and the origin of *Prunus yedoensis* (Someiyoshino). Japan. J. Genet. 70: 185–196.
- 岩佐亮二・伊丹 清. 1962. サクラ属の種間交雑. 育学雑 (講演要旨). 12: 189.
- Kaneko, T., T. Terachi and K. Tsunewaki. 1986. Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA. II. Restriction analysis of ctDNA of 11 *Prunus* species. Japan. J. Genet. 61: 157–168.
- 加藤珠理・石川啓明・太田泰臣・服部紗代子・向井 譲. 2009. ソメイヨシノ由来のゲノムを検出するマーカー・ツールとしての自家不和合性遺伝子と核 SSR の利用. 日林誌. 91: 354–359.
- Ohta, S., S. Osumi, T. Katsuki, I. Nakamura, T. Yamamoto and Y. Sato. 2006. Genetic characterization of flowering cherries (*Prunus* subgenus *Cerasus*) using *rpl16-rpl14* spacer sequences of chloroplast DNA. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75: 72–78.
- Postweiler, K., R. Stösser and S. F. Anvari. 1985. The effect of different temperatures on the viability of ovules in cherries. Sci. Hortic. 25: 235–239.
- Sanzol, J. and M. Herrero. 2001. The “effective pollination period” in fruit trees. Sci. Hortic. 90: 1–17.
- Sassa, H., T. Nishio, Y. Kowiyama, H. Hirano, T. Koba and H. Ikehashi. 1996. Self-incompatibility (*S*) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T_2/S ribonuclease superfamily. Mol. Gen. Genet. 250: 547–557.
- 鈴木 洋・江頭宏明・山田 拓・藤田真弓・小笠原宣好. 2006. オウトウとサクラ ‘ソメイヨシノ’ との種間交雑. 園学研. 5: 343–349.
- Tao, R. and A. F. Iezzoni. 2010. The S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system in *Prunus* exhibits distinct genetic and molecular features. Sci. Hortic. 124: 423–433.
- Watanabe, K. and K. Yoshikawa. 1967. Notes on variation and self-incompatibility in Japanese flowering cherries. Bot. Mag. Tokyo 80: 257–260.
- Wilson, E. H. 1916. The cherries of Japan. p. 68. University press, Cambridge.
- 山田浩雄. 2004. 広葉樹の花粉の取り扱い. 林木育種技術ニュース. 22: 6–7.
- 吉川勝好・渡辺光太郎. 1964. サクラの自家不和合性について. 第75回日林講. 219–222.