

機関番号:10101

研究種目:基盤研究(B)

研究期間:2008~2010

課題番号:20380014

研究課題名(和文)アスパラガスにおける両性花および単性花形成に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism involved with the formation of hermaphrodite and unisexual flowers in asparagus.

研究代表者

増田 清 (MASUDA KIYOSHI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号:60157203

研究成果の概要(和文): アスパラガスの同型接合雄性は超雄とも呼ばれ、全雄種子生産の花粉親として用いられている。しかし、同型接合雄性(YY)と異型接合雄性(XY)を短期間に判別する方法は確立されていない。そこで、雄性両性同体性アスパラガスの自殖種子から、同型接合雄性および異型接合雄性の遺伝子型をもつ植物体を育成し、両者を識別する方法を検討した。その結果、雄性判別DNA マーカー(AspTaq1)の定量値をもとに判別することが可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文): Homozygous male of asparagus that is called super-male has been used as a pollinator for producing all-male hybrid seeds. However, we do not know a simplified method to discriminate homozygous males (YY) and heterozygous males (XY) in a short period. Then, we grew homozygous and heterozygous male plants from seeds produced by selfing of an andromonoecious line of asparagus and examined the method to identify their genotype. As a result, we found that these genotypes can be identified, based on quantitative analysis of a male-specific diagnostic marker, Asp1-T7.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 農学・園芸学・造園学

キーワード: アスパラガス、超雄性、定量 PCR、雄性判別マーカー、同型接合雄性

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の冷涼地では、越冬した地下茎利用した高品質アスパラガスの生産が行われている。雌雄異株植物であるアスパラガスの栽培では、雄性個体のみを生ずる種子集団(全雄交雑種子)が生産されるようになり、生産の省力化、低コスト化につながった。

(2) 全雄種子の生産には同型の雄性決定因子(MM)を持つ花粉親(超雄性系統)を利用している。超雄性系統は、雄性両性同(andromonoecious)である個体の自殖によって得られる。しかし、食用アスパラガスでは雄性両性同体を生じることは殆どなく、実際にはごく限られた品種(系統)が利用された。

(3) 同型接合雄性の選抜には、交雑による検定が必用であったため、長い年月が必用であった。

2. 研究の目的

(1) 植物体発育の初期段階にあるアスパラガスを用いて、同型接合雄性と異型接合雄性個体を判別する方法を確立することを目的とした。

(2) アスパラガスの単性花は、雌性花器官あるいは雄性花器官の発育不全によって形成される。しかし、発育不全の仕組みは全くわかっていない。雌性花および雄性花の形成には MADS-box 遺伝子が関わっていると想定されたので、'Gold Schatz#2'と野生型アスパラガスを用い、単性花形成過程における、該当するクラス A、クラス C 遺伝子の発現を調べた。

(3) アスパラガスの既存雄性判別マーカー Asp-T7 は、DNA ハイブリダイゼーションによって染色体上の位置を特定するためのプローブとしては十分な長さとはいえない。そこで、Asp1-T7 の DNA 領域を拡張するとともに、顕微鏡標本調製を用いて、プローブを検出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 植物材料の入手と維持

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 'Gold Schatz'、'Mary Washington 500W' ('MW500W')、'Gijnlim' (雄性両性同株系統)、New Jersey (NJ)系 3 品種、WS 系 2 品種を用いた。'Gold Schatz' の 1 系統(GS#2)はホメオティック変異系統である(Asada et al., 2006)。

(2) Asp1-T7 の定量解析

アスパラガス植物体のディプロイド(複相)ゲノムに含まれる Asp1-T7 (Jamsari et al., 2004) の相対量をリアルタイム定量 PCR によって測定し、得られた値を標準化のために作製した組換え DNA、pAODEF-Taql を用いて標準化した。pAODEF-Taql は AODEF 遺伝子(Park et al., 2003)の内部配列と Asp1-T7 の部分配列を1コピーずつ含むプラスミドである。複相ゲノムに含まれる雄性決定因子のコピー数は AODEF-Taql の測定値を基準として推定した。

(3) Asp1-T7 の周辺領域をカセット PCR とインバース PCR により増幅し、クローニングののち塩

基配列を決定した。一方、得られた配列をもと Fluorescence in situ hybridization (FISH)プローブを作成し、単離核における Asp1-T7 の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 雄性両性同株の自殖後代について、性決定遺伝子座と連鎖する分子(DNA)マーカー Asp-T7 を定量した結果、その値は個体によって異なり、およそ2:1:0の比を示した。それらの値を、ゲノムあたりの Asp1-T7 コピー数が測定できるプラスミド DNA の値をもって補正したところ、Asp-T7 は Y ゲノムには1コピー存在することが明らかとなった。さらに、同型接合雄性と異型接合雄性はゲノムに含まれる Asp1-T7 のコピー数によって判別できることがわかった。図1に測定された Asp1-T7 のコピー数を示す。

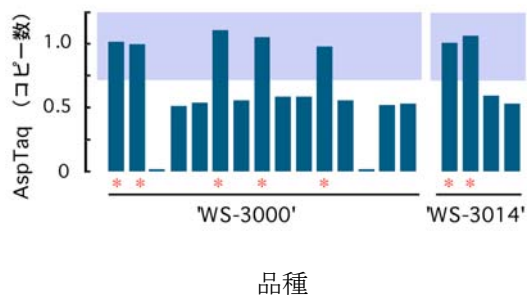


図1 雄性判別マーカーDNA Asp1-T の定解析による超雄性アスパラガス個体の特定。アスタリスクは超雄性、増幅の検出されなかった個体は雌性、他は異型接合雄性であると推定される。

(2) アスパラガス'Gold Schatz #2'におけるクラス B 遺伝子の発現は、野生型('#1')に比べ著しく低下していた。逆に、'#2'のクラス C 遺伝子の発現は、野生型(#1)に比べ、高い値を示した。'MW500W'の雌花、雄花では、クラス B 遺伝子の発現に顕著な違いは認められなかった。しかし、クラス C 遺伝子の発現は雄花に比べ雌花で高い値となった。これらの結果から、'Gold Schatz #2'の変異はクラス B 遺伝子の発現障害によることが確かめられた。一方、雄花と雌花の形成と MADS-box 遺伝子の発現との関連については、クラスによっては発現レベルに差異が認められたものの、今後、より詳細な解析が必要であると考えられた。

(3) インバース PCR およびカセット PCR によって Asp1-T7 両側の塩基配列領域 638bp と 111bp を決定した。これによって Asp1-T7 を含む 1176bp をプローブとして利用できるようになった。図2にアスパラガス超雄性個体(YY)および雄性個体(XY)から単離した核を用いて検出した Asp1-T7 領域の顕微鏡画像を示す。実験の結果、作成したプローブが FISH 法による検出に利用できることがわかったが、安定した技法として確立するには至らなかった。

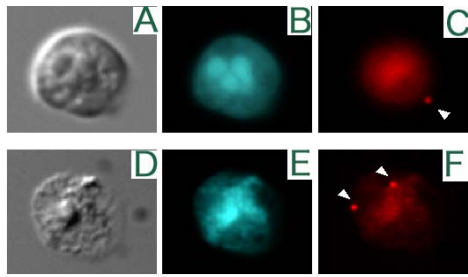


図2 FISH によるアスパラガス単離核における雄性判別マーカーの検出。

A, D: 微分干渉画像、B, E: DAPI 染色画像、C, F: プローブ(鏹)。

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 15 件)

- ① Y. Watanabe, S. Iwai, Y. Ono, S. Hiradate, Y. Fujii and F. Komai. Development of an in vitro system for the evaluation of allelopathic activities of asparagus calluses. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. (in press), 査読有。
- ② S-Y. Kim, M. Endo and A. Kanno (2010). Production of intraspecific hybrids between wild-type and petaloid-sepal cultivars in *Habenaria radiata*. *Scientia Horticulturae* 124, 415-418 (2010), 査読有。
- ③ Y. Kimura, C. Kuroda and K. Masuda (2010). Differential nuclear envelope assembly at the end of mitosis in suspension-cultured *Apium graveolens* cells. *Chromosoma* 119, 195-204, 査読有。
- ④ M. A. I. Khan, K. Ueno, S. Horimoto, F. Komai, T. Someya, K. Inoue, K. Tanaka, K. and Y. Ono (2009). CIELAB color variables as indicators of compost stability. *Waste Management* 29, 2969-2975, 査読有。
- ⑤ K. Kawade and K. Masuda (2009). Transcriptional control of two ribosome-inactivating protein genes expressed in spinach (*Spinacia oleracea*) embryos. *Plant Physiol. & Biochem.* 47, 327-334, 査読有。
- ⑥ T. Kikuchi and K. Masuda (2009). Class II chitinase accumulated in the bark tissue involves with the cold hardiness of shoot stems in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Scientia Horticulturae* 120, 230-236, 査読有。

- ⑦ Y. Akita, Y. Horikawa, A. Kanno (2008). Comparative analysis of floral MADS-box genes between wild type and a putative homeotic mutant in lily. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83:453-461, 査読有。
- ⑧ K. Kawade, T. Ishizaki and K. Masuda (2008). Differential expression of ribosome-inactivating protein genes during somatic embryogenesis in spinach (*Spinacia oleracea*). *Physiol. Plant.* 134, 270-281, 査読有。

[学会発表](計9件)

- ① 堀内 和奈, 皆川 裕一, 笠井 登, 増田 清. 雄性判別マーカーの定量解析を利用した超雄性アスパラガスの系統育成, 北海道園芸研究談話会, 2010年12月13日, 北海道大学。(札幌)
- ② 堀内 和奈, 皆川 裕一, 笠井 登, 増田 清. 雄性判別DNAマーカーの定量解析による実用アスパラガス超雄性系統の選抜, 園芸学会平成22年度秋季大会, 2010年9月19日-20日, 大分大学。(大分)
- ③ Y. Takeuchi, Y. Ozaki, H. Okubo and K. Masuda. Inheritance of female flower homeotic mutation in asparagus (*Asparagus officinalis* L.), 28th International Horticulture Congress, Lisbon, 22-27, August, 2010, Lisbon, Portugal.
- ④ 増田 清, 安達 由美子, 笠井 登. 超雄性アスパラガス判別法としての定量PCRの有効性について, 園芸学会平成20年度秋季大会, 2008年9月27日-29日, 三重大学。(津)

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田 清 (MASUDA KIYOSHI)
北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授
研究者番号: 60157203

(2)研究分担者

塩月(菅野) 明
(SHIOTSUKI(KANNO) AKIRA)
東北大学・大学院生命科学研究所・准教授
研究者番号: 10260449
山岸 真澄 (YAMAGISHI MASUMI)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 40210348
駒井 史訓 (KOMAI FUMINORI)
佐賀大学・農学部・准教授
研究者番号: 10372765
鈴木 正彦 (SUZUKI MASAHIKO)
北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号: 90451418

(3)連携研究者
なし