

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月26日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580033

研究課題名（和文）倍加半数体システムを利用したネギ属高精度染色体地図の開発

研究課題名（英文）Development of an *Allium* high accuracy chromosome map via the use of doubled haploid lines

研究代表者

執行 正義 (SHIGYO MASAYOSHI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：40314827

研究成果の概要（和文）：ネギ属の遺伝学的研究において倍加半数体（DH）システムと分子マーカーを併用することは、*Allium cepa* の育種計画に有益な遺伝学的知見を供給することになる。本研究では、タマネギとシャロットの DH システム間の F₁ 雑種から得た雌性発生個体群を分離集団として用い、*Allium cepa* 連鎖地図の構築を行った。この研究で得られた研究成果としては、S 型細胞質雄性不稔の稔性回復核遺伝子に連鎖する幾つかの DNA マーカーをマッピングしたこと、ならびに、フザリウム属菌の感染で発病する乾腐病に対する抵抗性に関与する遺伝子の座乗染色体を決定したことが挙げられる。

研究成果の概要（英文）：The combined use of doubled haploid (DH) lines and molecular markers in *Allium* genetic study can provide an essential information in *Allium cepa* breeding program. In this study, a gynogenic mapping population was successfully produced from F₁ plants between shallot and bulb onion DH lines, and could be used for constructing the linkage map of *A. cepa*. The successful research outcomes of this study were to map DNA markers linked to the *Ms* nuclear fertility-restoring gene for S-type cytoplasmic male sterility and to determine the chromosomal locations of genes related to *Fusarium* basal rot resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：シャロット、タマネギ、倍加半数体、雌性発生、雄性不稔回復遺伝子、サポニン、QTL、タマネギ乾腐病

1. 研究開始当初の背景

Allium cepa のゲノムは 8 本の染色体からなり、シロイヌナズナの約 107 倍にあたる約 152 億塩基対 (17.9pg/1C) からなる (Havey,

2002)。巨大タマネギゲノムの攻略は非常に困難であるが、他の主要野菜にないユニークな植物材料として、我々は「シャロット由来単一異種染色体を添加したネギ系統シリー

ズ（添加系統シリーズ）」を完成し（Shigyoら, 1996）, 膨大な遺伝情報を 8 本の染色体毎に整理し始めている. 本添加系統シリーズを利用して我々はオランダ Plant Research International とアメリカ The University of Wisconsin-Madison がそれぞれ構築した多数の DNA マーカーからなる連鎖地図が対応するタマネギ染色体を決定し（van Heusdenら, 2000; Martinら, 2006）, さらに, 両地図の統合を後押しした（McCallum, 2007）. また, 新たにゲノム研究に参画したニュージーランド Crop & Food Research と連携し, 我々はタマネギの機能性多糖類（フルクタン）の蓄積に関与する原因遺伝子の座乗部位を第 8 染色体上に特定した（McCallumら, 2006; Yaguchiら, 2008）. 本研究で取り上げる S 型細胞質雄性不稔回復遺伝子座（*Ms*）は, 先に述べたウィスコンシン大の第 2 染色体連鎖地図中にマッピングされており, 最も近傍の RFLP マーカーは 0.9cM に位置付けられている（Gokceら, 2002a）. しかし, *Ms* 遺伝子座と RFLP マーカーは連鎖平衡の状態にあり, この近傍マーカーを用いて同座の遺伝子型を推定することはできなかった（Gokceら, 2002b）. また, タマネギ乾腐病に対する抵抗性の遺伝様式は未だ解明されておらず, 核と細胞質の遺伝子のどちらが支配しているかさえ分かっていない（Cramer, 2007）.

2. 研究の目的

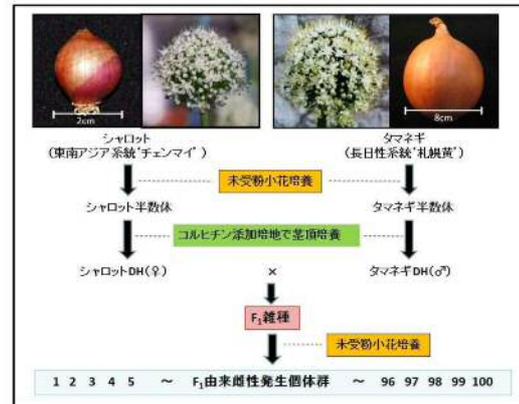
シャロット (*Allium cepa* L. Aggregatum group) は東南アジア諸国で香辛野菜や生食用野菜として利用されている食用作物である. この植物はタマネギ (*A. cepa* L. Common onion group) と生理・生態的形質は著しく異なるが, ゲノム構成は類似しており, 交雑により互いの形質を交換することは容易である. そこで, 本研究ではシャロットが有する S 型細胞質雄性不稔回復遺伝子とタマネギ乾腐病抵抗性遺伝子の染色体上での所在を明らかにして計画的にタマネギへ導入する技術開発を目的とし, 両植物の倍加半数体間の F_1 雑種を用いて未受粉子房培養により倍加半数体系統群を育成する. この系統群をマッピング集団として利用し, 多数の DNA マーカーからなる高密度連鎖地図の作成を行い, 上記の二つの遺伝子の染色体マッピングを行う.

3. 研究の方法

(1) 未受粉小花培養を用いた F_1 由来雌性発生個体群の作出

植物材料として, シャロット DH 系統 (4C-2, 4C-10) とタマネギ DH 系統 (LD-DH) 間の F_1 雑種 (4C-2×LD-DH, 4C-10×LD-DH) の未受粉小花を修正 B5 固形シャーレ培地（山下ら, 2002）上で培養して雌性発生個体の作出を試

みた（第 1 図）. 未受粉小花の培養は恒温恒湿室内（25℃, 日長条件：明期 16 時間, 暗期 8 時間, 3 ヶ月間）で行った. その後, 小花から発生したシュートをホルモンフリー ショ糖 4% (w/v) MS 固形培地に置床して 2 か月間継代培養した後, 順化した植物体をガラス温室内で栽培した.



第 1 図 F_1 由来雌性発生個体群作出の流れ

次に, F_1 雑種の未受粉小花培養に由来する個体の葉身部から抽出した DNA と根端組織を雌性発生の確認試験に供試した. DNA の抽出は, van Heusden (2000) らの微量サンプル用核酸抽出法によった. DNA 多型解析は, タマネギ GI (GIGANTEA; Gene Bank Accn. GQ232756) 配列由来プライマーセットを用いて得られた PCR 産物を電気泳動することにより行った. さらに, 小花培養により得られた個体の根端細胞の染色体数をフォイルゲン染色 - 押しつぶし法により調査した.

(2) シャロット DH とタマネギ DH 間における DNA 多型マーカーの開発

シャロット DH, タマネギ DH および F_1 雑種の葉身部から抽出した DNA を実験に供試した. DNA 多型マーカーのプライマーセット設計に際して, *A. cepa* ゲノム由来 SSR, *A. fistulosum* ゲノム由来 SSR および *A. cepa* ゲノム由来 EST の塩基配列がそれぞれ用いられた.

(3) F_1 由来雌性発生個体群を用いた *Allium cepa* 連鎖地図の構築

連鎖地図構築のための分離集団として, F_1 由来雌性発生個体群を用いた. 各個体の形態特性を観察するとともに, それぞれからの DNA 抽出を行い, 以下の実験に供試した. なお, DNA の抽出は (2) で示した方法に準じて行った. さらに, (2) において, 両親間で DNA 多型が見られたマーカーを用いて遺伝解析ソフト JoinMap ver. 4.0 による連鎖地図の構築を行った.

次に, 構築された連鎖群を染色体への振り分けるために, ネギ - シャロット単一異種染色体添加系統を用いて各 DNA マーカーが座乗する染色体を決定した.

(4) 検定交雑によるシャロット DH 系統の *Ms* 遺伝子型決定および *Ms* 遺伝子座

分離集団の片親であるシャロット ('チェンマイ', 系統番号: '18-5') の雌性発生由来シャロット DH 系統 ('4C-2', '4C-10') の花粉を S 型細胞質雄性不稔系統 (稔性回復遺伝子座における遺伝子型: *msms*) に交雑して得られた後代の花粉稔性を調査した。

さらに, タマネギ S 型細胞質雄性不稔

(CMS-S) の稔性を回復させる核遺伝子 (*Ms*) のゲノム上での所在を明らかにするために, Yang ら (2012) と Park ら (2012) が開発した *Ms* 遺伝子座近傍マーカーを用いて連鎖地図上での集中マッピングを行った。

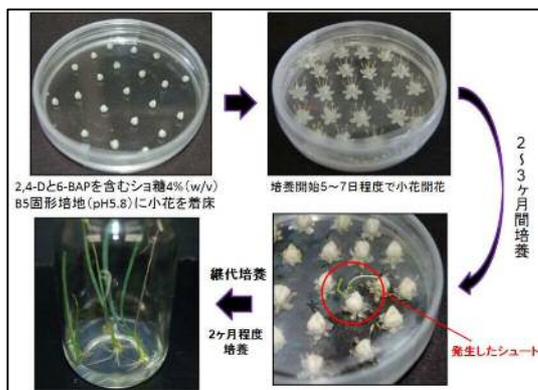
(5) サポニン含量の QTL 解析

最近の研究によりタマネギ乾腐病抵抗性に関与が認められている内生抗菌物質であるサポニン生産に関与する QTL の解析用植物材料として, F₁ 由来雌性発生個体群 30 個体を用いた。各個体の根部より幾つかの溶媒を用いて粗サポニン抽出物を得た後, 分光光度計を用いた比色定量法により総サポニン含量を算出し, 各個体の含量データを QTL Cartographer により解析して QTL の検出を試みた。さらに, サポニン生産の鍵酵素として知られている Squalene synthase の遺伝子配列をもとに設計したプライマーを用いて DNA マーカーを作成してマッピングを行った。

4. 研究成果

(1) 未受粉小花培養を用いた F₁ 由来雌性発生個体群の作出

10,604 個の未受粉小花を培養して 100 個体の植物体を再生することに成功した (第 2 図)。得られた再生個体について染色体調査を行った結果, 46 個体が半数体 (2n=8) であり, 40 個体が正二倍体 (2n=16) であった。その他の個体は高次倍数体等であった。次に, 両親間で多型を示した共優性 DNA マーカーを用い, これらの 100 個体の胚発生の由来を確認したところ, 全個体が雌性配偶子より直接発生していたことがわかった。

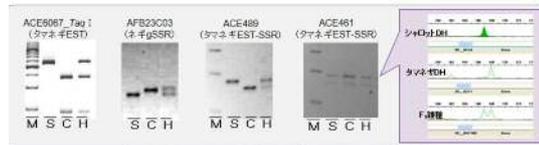


第 2 図 未受粉小花培養の流れ

(2) シャロット DH とタマネギ DH 間におけ

る DNA 多型マーカーの開発

658 種類の DNA マーカーを用いてマッピング集団の親系統において多型検出を行い, 230 種類の多型マーカーを開発することができた。マーカー多型率は 35% であり, 連鎖地図の構築に有用な多数の DNA マーカーを予備選抜することができた (第 3 図, 第 1 表)。



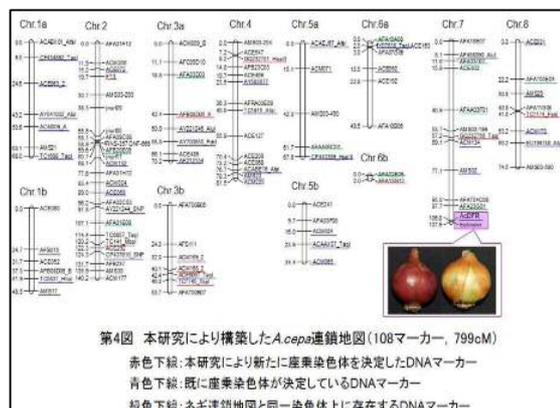
第 3 図 シャロット DH とタマネギ DH 間における多型検出

第 1 表 シャロット DH とタマネギ DH 間で検出された多型マーカー数

マーカータイプ	使用したマーカー数	多型マーカー数	多型率 (%)
タマネギ			
gSSR	32	9	28.1
EST 由来 SSR	203	98	43.3
BAC 由来 SSR	22	5	22.7
EST	95	30	31.6
ネギ			
gSSR	306	88	28.8
合計	658	230	35.0

(3) F₁ 由来雌性発生個体群を用いた *Allium cepa* 連鎖地図の構築

F₁ 由来雌性発生個体群を分離集団として用いて 121 個の DNA マーカーによる連鎖解析を行った結果, 12 連鎖群, 102 マーカーからなる全長 807cM の連鎖地図を構築することができた (第 4 図)。さらに, ネギ-シャロット単一異種染色体添加系統シリーズを用いることにより 12 連鎖群を染色体へ振り分けることができた。また, 鱗茎部の着色性に関する形態マーカーは, 第 7 染色体連鎖地図の末端部にあり, *DFR* 遺伝子と密接に連鎖していることが確認された。



第 4 図 本研究により構築した *A. cepa* の連鎖地図 (108 マーカー, 799cM)

赤色下線: 本研究により新たに座標染色体を決定した DNA マーカー

青色下線: 既に座標染色体が決定している DNA マーカー

緑色下線: ネギ連鎖地図と同一染色体上に存在する DNA マーカー

(4) 検定交雑によるシャロット DH 系統の *Ms* 遺伝子型決定および *Ms* 遺伝子座

検定交雑を行うことによりシャロット DH の *Ms* 遺伝子座の遺伝子型が *msms* であることが確認され, マッピング集団における遺伝子型の分離を予想することが可能になった。また, *Ms* 遺伝子座近傍マーカーを用いて第 2

染色体連鎖地図の集中マッピングを行った結果、DNF-566 および RNS-357 は jnurfl7 と比較して、jnurf05 により密接に連鎖していることが確認できた。

(5) サポニン含量の QTL 解析

F₁ 由来雌性発生個体群を用いたサポニン含量による QTL 解析により、第 1 染色体の 1 領域に QTL を検出することができた。また、染色体添加系統を用いた Squalene synthase 遺伝子の DNA 多型解析により、同遺伝子が第 1 染色体に座乗することが明らかになった。したがって、*A. cepa* の第 1 染色体にはサポニンの生合成に関する重要な遺伝子が存在することが示唆された。

本研究により得られた全ての遺伝分離の情報を整理することで、12 連鎖群、108 マーカーが座乗する全長 799cM となる連鎖地図を構築することができた。本研究の主題とは異なるが、第 7 染色体連鎖地図上の DFR マーカーは鱗茎部の着色性に関する分子マーカーとしてタマネギ育種の選抜過程に利用できることが示された。また、第 2 染色体連鎖地図上に、*Ms* 遺伝子を特定するために有効な DNA マーカーをマッピングできた。今後、タマネギ F₁ 品種の育種において優良な B ライン（雄性不稔維持系統）を選抜する際に活用できる可能性がある。さらに、タマネギ乾腐病の原因菌として知られるフザリウム菌に対する抗菌作用を示すサポニンの生合成遺伝子が座乗する染色体を特定できた。これにより、タマネギ乾腐病抵抗性系統の分子マーカーによる選抜の突破口が開けたといえよう。

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)

[学会発表] (計 件)

①岩田智志・塚崎光・若生忠幸・山内直樹・執行正義、倍加半数体技術の効果的な利用による *Allium cepa* 連鎖地図の構築、園芸学会平成 25 年度春季大会、東京農工大学 (小金井市)、2013 年 3 月 24 日

② Masayoshi Shigyo・Syo Hirata・Abdelrahman Mostafa・Hoa Quynh Vu・Ariyanti Nur Aeni・Satoshi Iwata、Tadayuki Wako・Naoki Yamauchi、Combined use of gene preservation lines and artificially manipulated genetic stocks in omics approach of cultivated *Allium* species、Plant and Animal Genome Conference (PAG) ASIA 2013、Grand Copthorne Waterfront Hotel (Singapore)、2013 年 3 月 17 日～2013 年 3 月 19 日

③ Masayoshi Shigyo、Development of

Aneuploid and Doubled Haploid Genetic Stocks in Cultivated *Allium* Species and Their Application to Omics Approach、Plant and Animal Genome Conference (PAG) ASIA 2013、Grand Copthorne Waterfront Hotel、(Singapore)、2013 年 3 月 17 日

④岩田智志・中島徹也・山内直樹・執行正義、タマネギ S 型雄性不稔細胞質に対する稔性回復遺伝子座の詳細マッピングに適した倍加半数体由来分離集団における DNA マーカー解析、園芸学会平成 23 年度秋季大会、岡山大学 (岡山市)、2012 年 9 月 25 日

⑤西澤秀信・岩田智志・山内直樹・執行正義、タマネギおよびシャロット倍加半数体系統間の F₂ 集団の育成とその遺伝分析、園芸学会中四国支部平成 24 年度大会、岡山大学 (岡山市)、2012 年 7 月 21 日

⑥Satoshi Iwata・Tetsuya Nakajima・Naoki Yamauchi・Masayoshi Shigyo、Development of Novel Mapping Populations of *Allium cepa* via Effective Use of Doubled Haploid Technology、6th International Symposium on Edible Alliaceae、ACROS Fukuoka (Fukuoka)、2012 年 5 月 21 日～2012 年 5 月 22 日

⑦岩田智志・山内直樹・執行正義、タマネギおよびシャロット倍加半数体間の F₁ 雑種に由来する雌性発生個体群の作出、日本育種学会 2012 年春季大会、宇都宮大学 (宇都宮市)、2012 年 3 月 4 日

⑧手島祥貴・Magdi A. El-Sayed・田中秀平・執行正義・鍛冶原寛・伊藤真一、*Allium* 属植物の根に含まれる抗菌性サポニン、平成 23 年度日本植物病理学会大会、東京農工大学 (府中市)、2011 年 3 月 28 日

⑨岩田智志・中島徹也・山内直樹・執行正義、タマネギおよびシャロット倍加半数体系統間における DNA マーカーの開発とそれらの F₁ 雑種を用いたマッピング集団の作出、園芸学会平成 23 年度春季大会、宇都宮大学 (宇都宮市)、2011 年 3 月 20 日

⑩岩田智志、タマネギおよびシャロット倍加半数体系統間の DNA 多型検出とそれらの F₁ 雑種を用いた雌性配偶子由来半数体の作出、第 2 回中国地域育種談話会、鳥取大学 (鳥取市)、2010 年 12 月 18 日

⑪手島祥貴・Hangger G. Mawandha・Magdi A. El-Sayed・田中秀平・執行正義・赤壁善彦・伊藤真一、シャロットに含まれる二次代謝物の抗菌作用、平成 22 年度日本植物病理学会

関西西部会、福井 AOSSA (福井市)、2010 年 9 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

執行 正義 (SHIGYO MASAYOHI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：4 0 3 1 4 8 2 7

(2) 研究分担者

伊藤 真一 (ITO SHINICHI)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：3 0 2 4 3 6 2 9

(3) 連携研究者

()

研究者番号：