

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 24年 9月 20日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658007

研究課題名（和文）トルコギキョウの高密度 RAD マーカーの開発による優性八重咲き遺伝子の解析

研究課題名（英文）Analysis of the dominant double-flower gene using high density RAD markers in *Eustoma grandiflorum*

研究代表者

河鱒 実之（KAWABATA SANEYUKI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10234113

研究成果の概要（和文）：トルコギキョウにおいてみられる優性の八重咲き性形質と連鎖する DNA マーカーを単離することを試みた。八重咲きと一重咲き系統間の F2 世代では、ホール数が 2 以上の八重のほか、花器官に異常がみられる奇形花が見られた。八重咲きの分離比から、八重咲き性には少なくとも 2 遺伝子以上が関与している可能性を示した。両系統間において、総計 80 万の RAD マーカー配列を決定し、その中に 10 万 SNPs があった。これらを用いて、八重咲き性についての連鎖解析をおこなった。

研究成果の概要（英文）：Linkage mapping of dominant double-flower trait was conducted in *Eustoma grandiflorum*. In the F2 population constructed between double-flower and single-flower accessions, double-flower with more than two whorls and flowers with abnormal floral organs were observed. The segregation ratio suggested that more than two genes were involved in the formation of double flowers. A total of 800k RAD tags was determined and 100k SNPs were found in these RAD tags. Linkage analysis was performed using these RAD markers and F2 population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：花卉

1. 研究開始当初の背景

被子植物の花は、原始的な種では不定数で多数の花器官が花軸上にらせん状に配置された構造をとり、進化に従い各花器官の数は少数化、定数化する。トルコギキョウなどより進化した花は、5枚のがく、基部が合生した5枚の花弁、5本の雄蕊と1本の雌蕊から構成される。園芸品種としては、より豪華に

みえる八重咲きと呼ばれる花弁数の多い品種が好まれる。花器官数が定数の植物では一重咲きであり、八重咲きは人為的な選抜がなされた奇形花の一つである。

シロイヌナズナやキンギョソウでは、ある花器官が他のタイプの花器官へと変化したホメオティック変異体が多数確認されており、花の構造を決定する遺伝モデルとして

ABC モデルが提唱されている。それ以降、八重咲きとは、雄蕊、雌蕊などの花器官が変化して花弁となる現象（弁化）によって、本来の花弁数が増加した花（生物学事典）と一般的に考えられるようになった。この説明では、八重咲きはCクラス遺伝子の機能が失われたために生じるもので、雄蕊は形成されず、従って不稔である。しかし、園芸品種には、雄蕊が正常に形成される八重品種もある。バラのようなもともと花器官数不定の種だけでなく、トルコギキョウのように本来花器官数が定数でありながら雄蕊が弁化せずに花弁数が増えるものが存在する。また、トルコギキョウの八重形質は優性であることが報告されている。八重咲き遺伝子の発見は、稔性の八重品種の作出につながるだけでなく、進化の過程でみられる一重咲き化（花弁ホール数が1になる）がどのように獲得されてきたのかを理解するうえでも重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、トルコギキョウにおける八重咲き遺伝子を明らかにすることである。本課題では、次世代シーケンサーを用いたRAD マーカーによるタイピングにより、八重咲き性と強く連鎖するDNA マーカーを見つければいいところまでを目指す。

3. 研究の方法

(1) 材料

八重咲きおよび一重咲きの数種類の園芸品種、および長野県野菜花き試験場において自家交配を繰り返して維持されている八重咲き系統‘620’と一重咲き系統‘503’、およびそのF2集団を用いた。

(2) EST データベースの整備およびゲノム配列の解析

トルコギキョウではESTデータベースやゲノム情報がほとんど全く存在しなかった。八重咲き性遺伝子の解析を容易にするため、次世代シーケンサーを用いて、これらのデータベースの整備をすすめた。八重咲きおよび一重咲きの数種類の園芸品種の様々なステージの花からRNAを抽出し、Roche社のFLXシーケンサーにより決定したEST配列をもとに、ESTデータベースを整理し、Genbankに登録・公開した。

また、八重咲き系統‘620’と一重咲き系統‘503’のゲノムDNA塩基配列を、イルミナ社の次世代シーケンサーHiSeq2000を用いて決定した。各系統につき40Gbを解読し、アセンブルを行った。

(3) 花器官におけるABCE遺伝子の発現解析

作成したEST配列データベースを用い、花器官の形成に関与する遺伝子群を多数単離

した。そのうち、ABCEクラス遺伝子の発現を、八重咲き品種および一重咲き品種の花器官において、半定量PCRにより調べた。

(4) 連鎖マーカーの解析

八重咲き系統‘620’と一重咲き系統‘503’の間のF2世代を展開した。なお、F1は八重咲き形質であった。F2集団を開花まで栽培し、88個体について形質評価を行った。これらから、八重咲き性の判定が困難なものを除いて八重咲き個体と一重咲き個体にわけ、それぞれから抽出したDNAをプールした。これらの八重咲きと一重咲きの2サンプル、および両親系統をあわせた計4サンプルについて、RADタグライブラリーを作成し、そのシーケンシングを、イルミナ社の次世代シーケンサー（HiSeq2000）を用いて行った。両親については、2Gb（片側1000万リードずつ）、一重咲きおよび八重咲きサンプルについては、それぞれ5Gb、6Gbずつペアエンドリードにより決定した。そのデータは、配列の編集後、Stacks (Catchen et al., 2011) により解析した。

4. 研究成果

(1) 花器官形成に関与する遺伝子群の解析

Aクラス遺伝子を2つ、Bクラス遺伝子を4つ、Cクラス遺伝子を2つ、Eクラス遺伝子を4つ得た。これらの花器官における発現を調べたところ、Aクラス遺伝子を除き、シロイヌナズナにおけるABCモデルと一致する発現パターンを示し、一重咲きと八重咲き間で発現パターンに差異は認められなかった。

(2) トルコギキョウゲノム配列の解読

両系統について、40Gbずつ塩基配列を決定し、アセンブルを行った。その結果、総塩基長1.3Gbずつのコンティグが得られた。トルコギキョウのゲノムサイズは1.5Gb程度と見積もられており、全ゲノムのかなりの部分が解読されたと予想される。

(3) F2世代の形質評価

八重咲きと一重咲き系統間のF2世代では、ホール数が明らかに2以上の八重と、ホール数は増えず花弁数が数枚増える花、花器官に異常がみられる奇形花が見られた。花弁数7以上のものを八重咲きとしてカウントすると八重咲きと一重咲きの個体数は53:35であった。この比率は3:1とは有意に異なり、少なくとも2遺伝子以上が関与している可能性を示した。八重咲き性は、温度条件の影響を受けるので、適温でないために一重となった株もあった可能性もあった。

(4) 一重咲き系統と八重咲き系統間におけるDNA多型

八重咲き系統‘620’と一重咲き系統‘503’において、RAD タグを、総計 803,212 個を決定した。これらの中に両親においてヘテロのものを含めて、104,680 個の SNPs がみつけた。これらについて、八重咲きと一重咲きの F2 をそれぞれプールした DNA 由来の RAD タグとマッチングを行った。これらの中から、カバー率が著しく高くリピート配列と思われるもの、カバー率が低く、シークエンスエラーと思われるものや信頼度が十分でないとみなしたものをのぞき、八重咲き性と強い連鎖を示すマーカーを複数選抜した。

(5) まとめ

本研究では、当初の目的であった、八重咲き性と強い連鎖を示す RAD マーカーを複数得るところまで達成した。今後は、これらの RAD タグを、ゲノムデータとマッチングするとともに、F2 個体で個別にタイピングを行い、より精密な連鎖解析を行うことにより、八重咲き性遺伝子が特定されることが期待される。

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 3 件)

- ① Kawabata S, Li Y., Miyamoto K. 2012. EST sequencing and microarray analysis of the floral transcriptome of *Eustoma grandiflorum*. *Scientia Horticulturae* (in print).
- ② Kawabata S, Yokoo M., Nii K. 2011. Three-dimensional formation of corolla shapes in relation to the developmental distortion of petals in *Eustoma grandiflorum*. *Scientia Horticulturae* 132: 66-70.
- ③ Wang Q, Zhang Y, Kawabata S, and Li Y. 2011. Double fertilization and embryogenesis of *Eustoma grandiflorum*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 351-357.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 石森元幸・宮坂昌実・河鱒実之. 2012. トルコギキョウの花器官における MADS-box 遺伝子の発現. 園芸学会平成 24 年度秋季大会
- ② 河鱒実之・宮本健太郎. 2011. トルコギキョウの花弁成長に伴う遺伝子発現プロファイルのマイクロアレイ解析. 園芸学会平成 23 年度春季大会. 宇都宮大学.
- ③ 徐品三ほか 4 名. 2011. 八重咲きトルコギキョウにおける花器官の形成と花器官形成関連遺伝子の発現. 園芸学会平成 22 年度秋季大会大分大学 (大

分県)

- ④ 宮本健太郎・新居加恵子・河鱒実之. 2011. 次世代シークエンサーを利用したトルコギキョウの花における cDNA データベースの構築. 園芸学会平成 22 年度秋季大会. 2010 年 9 月 19 日. 大分大学 (大分県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河鱒実之 (KAWABATA SANEYUKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：10234113

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：