

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658030
 研究課題名（和文） アスパラガスにおける多胚種子出現メカニズムの解明と遺伝・育種学的活用
 研究課題名（英文） Clarification of polyembryonic seed appearance and its application to genetics and breeding in asparagus
 研究代表者
 尾崎 行生 (OZAKI YUKIO)
 九州大学・大学院農学研究院・准教授
 研究者番号：60253514

研究成果の概要（和文）：

播種前に低温湿潤処理を行うことにより、多胚判別率を向上させることができた。SSR マーカーを使った多胚種子の起源解析により「1胚珠内に含まれる1個の胚のうに由来する場合」、「1胚珠内に含まれる2個の胚のうに由来する場合」の両方が認められた。10組20個体の多胚種子の中に3個体の半数体が含まれていたが、四倍体紫色アスパラガス同士の交配にによって得られた多胚種子由来の実生には、二倍体は含まれていなかった。

研究成果の概要（英文）：

Moistened low temperature treatments accelerated the efficiency of the polyembryonic seed selection. Analysis of origin of polyembryonic seeds with SSR markers proved simple and multiple polyembryony in asparagus. Although three haploid plants were identified among ten pairs (20 individuals) of polyembryonic seeds, no gynogenic diploid plants could be obtained from tetraploid purple asparagus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：多胚、アスパラガス、半数体、SSR

1. 研究開始当初の背景

「多胚」は1つの種子の中に複数の胚が含まれる現象であり、カンキツなどではよく知られている。植物の「多胚」は大きく「Simple polyembryony」(=1胚のう内の異なる細胞、たとえば「卵細胞と助細胞」や「卵細胞と珠心細胞」など、の組み合わせで2個の胚が生じるケースで、未受精細胞が胚形成を行う場合を含む)と「Multiple polyembryony」(=1胚珠内に2個以上の胚のうを形成し、それ

ぞれから胚が生じる。こちら未受精細胞が胚形成を行う場合も含む)の2つに分けられる(Johri, 1984)。しかしながら、これらの分類はいずれも顕微鏡を使った組織学的観察に基づいていて、分子マーカーによる詳細な解析が行われている例は「Simple polyembryony」に限られている。

アスパラガスではまれに多胚種子が見られ、この中には半数体が含まれる場合があることが報告されている(Uno ら, 2002)。このこ

とから、アスパラガスで見られる多胚現象は「卵細胞と助細胞」に由来する「Simple polyembryony」であると推察されているが、その詳細については不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では人工交配によって得られた多胚種子の SSR 分析を行って、より高精度に多胚種子の起源について検証するとともに、多胚種子誘導を積極的に行うことにより、これまで作出が困難であった高密度マッピングのための純系ホモ個体育成と四倍体紫色アスパラガスからの雌性配偶子由来二倍体紫色アスパラガスの作出を行うことを目的とする。具体的には、SSR マーカーの構築を行った上で多胚種子のジェノタイプングを行い、1 種子内に含まれる胚同士の間を明らかにすることによって多胚種子の起源について考察を行う。つづいて、外与の植物ホルモン処理によって多胚種子の出現を制御し、多胚種子が出現する処理方法を決定する。これらの結果を基盤として、多胚種子から半数体を選抜し、多数の純系ホモ個体を作出する。一方で紫色アスパラガスを種子親とした交配においても多胚種子誘導処理を施し、その中からフローサイトメーターと SSR 分析により雌性配偶子由来の二倍体を選抜して、多くの二倍体紫色アスパラガスの作出をめざす。

3. 研究の方法

本研究では、アスパラガスを材料として、(1)SSR マーカーの構築、(2)多胚種子の起源調査、(3)多胚種子出現の制御、(4)多胚種子からの純系ホモ個体作出、(5)四倍体紫色アスパラガスからの雌性配偶子由来二倍体の選抜、を行う。

(1) SSR マーカーの構築

二倍体、三倍体、四倍体品種およびこれらの品種内・品種間で交雑した実生集団を供試する。各個体の擬葉から定法により DNA を抽出し、蛍光標識したプライマーを用いて PCR を行った後、シーケンサーにより SSR 分析を行い、メンデル遺伝性の確認と、各品種・個体のジェノタイプングを行うとともに、交配集団の SSR 分析の結果をもとに SSR 領域の連鎖分析を行う。あわせて雌雄性決定遺伝子に密接に連鎖するマーカー Asp1-T7sp 領域も調査し、SSR 領域との連鎖関係を明らかにする。

(2) 多胚種子の起源調査

人工交配により得られた種子に対して播種前に低温湿潤処理を行い、種子の発芽率ならびに多胚出現率（多胚判別率）への影響について調査した。播種 2-3 ヶ月後にフローサイトメーターを用いた倍数性の判定と SSR 分析を行い多胚種子

の起源について検証した。

(3) 高い種子からの半数体の選抜と純系ホモ作出

人工交配ならびに自然交配によって得られた多胚性種子由来の実生から半数体を選抜し、その半数体に対して当研究室で確立しているアスパラガスの倍加処理法(嶺, 2005)を適用する。すなわち、半数体の側芽を MS 培地 (Murashige and Skoog, 1962) にスクロース 70g/l, NAA 0.1mg/l, カイネチン 0.1mg/l, アンシミドール 1.3g/l を含む寒天 (8g/l) 培地に無菌的に置床して多芽体を誘導させる。その後、前述の多芽体誘導培地から寒天を除いた液体培地にオリザリン 0.005%を加えた倍加処理液に 24hr 浸漬する。得られた植物体からシュートを採取し、フローサイトメーターで倍数性を判別して倍加個体(純系ホモ個体)を選抜する。多胚種子から得られた個体のうち、SSR 分析により半数体からの自然倍加個体であることが示された実生については、そのまま純系ホモ個体として取り扱う。

(4) 四倍体紫色品種からの多胚種子の誘導と、雌性配偶子由来二倍体の選抜

四倍体紫色アスパラガスを種子親とし、種々の濃度のオーキシシン (NAA および 4-CPA) を開花前日もしくは開花翌日に雌花の柱頭に滴下した。いずれも開花当日に人工授粉も行い、その後の果実の発育と獲得種子数、多胚出現率を調査した。四倍体紫色アスパラガスから人工交配種子と自然交雑種子の両方を採取し、シャーレ上で発芽させた後に、多胚種子を選抜した。多胚種子については、フローサイトメーターによる分析と SSR 分析を行い、雌性配偶子由来の二倍体の選抜を試みた。

4. 研究成果

6 種類の SSR マーカーについて交雑後代の分離を調査したところ、いずれもメンデル遺伝に適合することが明らかになり、二倍体品種だけでなく三倍体や四倍体品種のジェノタイプングにも適用可能であることを明らかにした。本マーカーならびにフローサイトメーター分析により、二倍体同士の交配で得られた実生集団の中に、低頻度で出現した三倍体個体を明らかにできた。

播種前に低温湿潤処理を行うことにより、種子の発芽率ならびに多胚出現率(多胚判別率)を向上させることができ、多胚種子の選抜に有用であることを明らかにできた。SSR マーカーを使った多胚種子の起源解析により、人工交配によって得られた実生集団内の

多胚種子の起源として 10 種類のパターンの可能性が示唆され、「1 胚珠内に含まれる 1 個の胚のうに由来する場合 [Simple polyembryony]」から、「1 胚珠内に含まれる 2 個の胚のうに由来する場合 [Multiple polyembryony]」などさまざまであった。また前者の場合でも、「異なる 2 個の接合子に由来する場合」と「単一の接合子が胚発生する段階で 2 個の胚に分裂した場合」という複数のケースがみられた。集団交配品種の種子を供試した多胚種子の解析からは、最大 18 種類の多胚種子出現のパターンが予想されたが、交配親の遺伝子型が不明であるため、これらのパターンの中で、実際に起こっているのが何パターンであるのかは確認できなかった。

10 組 20 個体の多胚種子の中に 3 個体の半数体が含まれていた。これらの半数体から多芽体を誘導して倍加処理を行う予定であったが、半数体の生育が悪く、倍加処理を施す段階には至っていない。

四倍体紫色アスパラガス同士の交配において、人為的に多胚種子出現率を高めるために、交配前もしくは交配後の雌ずいへのオーキシン処理を試みたが、多胚種子の出現を高める効果は認められなかった。得られた種子から多胚種子を選抜し、倍数性を調査したが、六倍体もしくは八倍体の高次倍数体が 1 個体認められた以外はすべて四倍体であり、二倍体を選抜することはできなかった。

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 13 件)

元木悟・前田智雄・井上勝広・山口貴之・渡辺慎一・松永邦則・尾崎行生ほか. 2011. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [1] 1. 世界及び日本のアスパラガス生産の動向. 農業および園芸. 86: 775-783. 査読無.

前田智雄・元木悟・井上勝広・園田高広・松永邦則・尾崎行生ほか. 2011. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [2] 2. ホワイトアスパラガス生産の先進国, オランダにおけるアスパラガス生産. 農業および園芸. 86: 874-878. 査読無.

元木悟・渡辺慎一・山口貴之・松永邦則・前田智雄・尾崎行生ほか. 2011. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [3] 3. 急速に拡大するペルーのアスパラガス生産. 農業および園芸. 86: 961-972. 査読無.

元木悟・尾崎行生ほか. 2011. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [4] 4. ペルーとの

国際競争を終えて, 南アメリカのアスパラガス生産. 農業および園芸. 86: 1044-1056. 査読無.

元木悟・尾崎行生ほか. 2012. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [7] 7. 米国との自由貿易協定で拡大したメキシコのアスパラガス生産. 農業および園芸. 87: 102-111. 査読無.

尾崎行生ほか. 2012. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [8] 8. 世界第 1 位のアスパラガス生産国, 中国のゆくえ. 農業および園芸. 87: 262-269. 査読無.

元木悟・浦上敦子・松永邦則・山口貴之・園田高広・甲村浩之・尾崎行生ほか. 2012. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [9] 9. 古参産地「台湾」の盛衰と新興産地「韓国」の戦略, 東アジアのアスパラガス生産. 農業および園芸. 87: 327-345. 査読無.

Takeuchi, Y., Y. Sakaguchi, Y. Ozaki and H. Okubo. 2012. Genotyping of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cultivars with SSR markers. Acta Horticulturae. 950: 165-172. 査読有.

浦上敦子・元木悟・佐藤達雄・荒木肇・前田智雄・尾崎行生ほか. 2012. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [11] 11. 遺伝資源としてのアスパラガス, ポーランドの取り組みと世界各国で行われた国際品種比較試験. 農業および園芸. 87: 536-544. 査読無.

元木悟・北澤裕明・浦上敦子・前田智雄・山口貴之・渡辺慎一・松永邦則・甲村浩之・尾崎行生ほか. 2012. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [12] 12. 国際競争に対応した日本のアスパラガス生産の戦略と方向性. 農業および園芸. 87: 635-641. 査読無.

井上勝広・元木悟・前田智雄・尾崎行生ほか. 2013. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [13] 13. アスパラガスの国内生産および輸入, 消費の動向. 農業および園芸. 88: 4-13. 査読無.

井上勝弘・元木悟・尾崎行生ほか. 2013. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [14] 14. 単収世界一を誇る国内暖地のアスパラガス生産と地球温暖化への対応. 農業および園芸. 88: 252-268. 査読無.

園田高広・元木悟・甲村浩之・尾崎行生ほか. 2013. 世界のアスパラガス生産の現状と展望 [15] 15. 世界および国内各地で問題となる茎枯病対策～発生生態とタイおよび国内産地の対策事例～. 農業及び園芸. 88: 341-349. 査読無.

〔学会発表〕(計 4件)

岩戸美由紀・松元賢・小佐々雅子・竹内陽子・
稲田 稔・尾崎行生・大久保敬. ハマタマボウ
キ(*Asparagus kiusianus* Makino)の茎枯病抵
抗性とアスパラガス(*A. officinalis* L.)と
の雑種 作出. 平成 23 年度園芸学会秋季大会.
2011 年 9 月 25 日. 岡山大学

岩戸美由紀・小佐々雅子・竹内陽子・尾崎行
生・大久保敬. アスパラガス (*Asparagus
officinalis* L.) × ハマタマボウキ (*A.
kiusianus*) 種間交雑後代においてみられた
SSR マーカーの非メンデル遺伝. 平成 24 年度
園芸学会春季大会. 2012 年 3 月 28 日. 大阪
府立大学.

小佐々雅子・竹内陽子・岩戸美由紀・尾崎行
生・大久保敬. RAPD 分析によるアスパラガス
多胚種子の遺伝的同一性. 平成 24 年度園芸
学会春季大会. 2012 年 3 月 28 日. 大阪府立
大学.

岩戸美由紀・松元賢・小佐々雅子・竹内陽子・
稲田稔・尾崎行生・大久保敬. アスパラガス
(*Asparagus officinalis*) × ハマタマボウキ
(*A. kiusianus*) 種間雑種の茎枯病抵抗性., 平
成 24 年度園芸学会秋季大会. 2012 年 9 月 23
日. 福井県立大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 行生 (OZAKI YUKIO)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：6 0 2 5 3 5 1 4

(2) 研究分担者

大久保 敬 (OKUBO HIROSHI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：8 0 1 5 0 5 0 6

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：