

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580060

研究課題名(和文)ネギ細胞質雄性不稔性に対する稔性回復遺伝子座の集中マッピングおよび細胞質型の識別

研究課題名(英文) Intensive mapping of the male fertility restoring gene locus and identification of cytoplasm type in bunching onion

研究代表者

山下 謙一郎 (YAMASHITA, Ken-ichiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所 野菜育種・ゲノム研究領域・主任研究員

研究者番号：80414671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ネギ「金陵」CMS個体と「北京」MF個体とのF2集団を供試し、SSRマーカー等を用いて稔性回復遺伝子座Ms3のマッピングを行った。その結果、Ms3は第3染色体に座乗し、最も近傍のSSRマーカーは同遺伝子座から6.3cMに位置した。6種類のF1品種に由来するCMS個体に稔性回復遺伝子をヘテロに有する「金陵」または「北京」MF個体を交配し、次代集団における稔性回復効果を検証した。その結果、2組合せの後代においてMF個体とMS個体の分離比が期待値である1:1に適合した。このことから、これら2つのF1品種のCMSは「金陵」および「北京」に由来するCMSと遺伝様式が同一であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Linkage analysis of the fertility restoring gene locus, Ms3, was conducted in F2 population between bunching onion 'Kinryo' and 'Pekin' using SSR markers etc. The Ms3 locus was located on the chromosome 3, and the closely linked marker positioned at 6.3cM from the Ms3 locus. Pollen fertility restoration was investigated in progeny produced from crossings between CMS plants of six commercial F1 cultivars and male fertile 'Kinryo' or 'Pekin' with Ms3 gene heterozygously. As the results, segregation ratios of male fertile to male sterile plants fitted to probability of 1 to 1 in the two progeny, which confirms that the inheritance mode of CMS from the two F1 cultivars is identical to those of 'Kinryo' and 'Pekin'.

研究分野：農学

キーワード：ネギ 細胞質雄性不稔性 稔性回復遺伝子 CMS DNAマーカー

1. 研究開始当初の背景

ネギはわが国における重要野菜であり、産出額(1,336億円、2011年)はトマト、イチゴ、キュウリに次ぐ第4位である。1980年代後半以降、細胞質雄性不稔性(CMS)を利用したF₁品種化が急速に進み、現在では発表される新品種の80-90%がF₁品種である。種苗会社が独自にCMS素材を選抜・利用しているが、その種類、由来および稔性回復遺伝子の有無は明らかではない。単一CMSの利用は、T型CMSを利用したトウモロコシF₁品種が、ごま葉枯れ病T-レースにより甚大な被害を被った例から分かるように(Levingth III, 1991)、特定病害に対する脆弱性の観点から回避されるべきであり、複数のCMSの確立が必要である。また、稔性回復遺伝子の有無と細胞質型を判別するDNAマーカーが報告されていない現状では、F₁採種におけるAライン、Bライン育成に用いる系統の遺伝子型判定には検定交配が必要であり、多大な時間、労力および栽培スペースを要する。ネギのF₁育種のさらなる高効率化には、ネギ種内のCMSおよび稔性回復遺伝子を探索し、汎用性の高い連鎖マーカーを開発する必要があると考えられる。

これまでに野菜茶業研究所では、国内外から収集したネギ135品種・系統について雄性不稔個体を検索し、8品種・系統(「章丘」、「広州」、「金陵」、「北京」、「野際合柄」、「晩生葉葱」、「夏ネギ」、「余目」)から雄性不稔個体を見出した。また、品種間および品種内交配により雄性不稔性の遺伝様式を調査し、1)「金陵」、「北京」、「章丘」、「広州」に由来する雄性不稔性はCMSである。2)「金陵」および「北京」に由来するCMSは同一かつ単因子優性の稔性回復遺伝子Ms3により制御される。3)「章丘」、「広州」のCMSは「金陵」および「北京」とは異なる。4)「元蔵」および「金長」が「金陵」、「北京」由来CMSの維持系統として利用できることを明らかにした(山下ら, 2011; Yamashita et al., 2010)。一方、近年ネギにおいてもSimple Sequence Repeat (SSR)マーカーを主とするネギの高密度連鎖地図が構築され、連鎖群とネギ染色体との対応関係も明らかにされた(Tsukazaki et al., 2011; 2008)。したがって、ネギにおいてもCMSにかかる実用的DNAマーカー開発が、素材およびマーカー基盤の両面から可能になった。

2. 研究の目的

本課題では、ネギの重要採種形質であるCMSについて、「金陵」-「北京」間交雑集団(F₂)を用いて稔性回復遺伝子座Ms3近傍領域の集中マッピングを行い、実用的連鎖マーカーを開発すること、市販F₁品種育成に用いられたCMSに対する稔性回復遺伝子Ms3の効果を検証すること、ミトコンドリアDNA多型から「金陵」および「北京」由来CMSに関与する遺伝子領域を推定し、細胞質型識別マーカーを開発

することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) F₂集団の花粉稔性調査およびマーカー解析によるMs3近傍領域の集中マッピング
「金陵」-「北京」間F₂集団について、5-6月の開花期において複数回花粉の放出性を調査し、分離比から遺伝様式を確認した。花粉親個体は稔性回復遺伝子をヘテロ(Ms3/ms3)に有しているため、F₂集団は雄性可稔(MF)個体:雄性不稔(MS)個体が3:1に分離すると想定された。次に、野菜茶業研究所で開発されたネギのゲノムおよびExpressed Sequence Tag (EST)由来SSRマーカー337個について、「金陵」CMS個体と「北京」MF個体との間で多型を示すマーカーを選抜し、F₂集団に展開した。また、520個のランダムプライマー(Operon kit A-Z)を用いて、雄性可稔個体と雄性不稔個体間でバルク解析を行い、雄性可稔バルク特異的マーカーをF₂集団に展開した。解析ソフトウェアJoinMap4.0を用いて連鎖解析を行い、連鎖地図を作成した。

(2) 市販F₁品種由来CMS個体と「金陵」または「北京」MF個体との交配によるMs3の効果の検証

「金陵」または「北京」に由来する稔性回復遺伝子Ms3の既存CMSへの効果を検証するため、市販F₁品種「龍輝」、「ホワイトスター」、「華青楼2号」、「関羽一本太」、「ホワイトタワー」および「夏扇パワー」由来CMS個体を種子親、稔性回復遺伝子をヘテロ(Ms3/ms3)にもつ「金陵」または「北京」MF個体を花粉親として交配を行い、次代集団における花粉稔性の分離を調査した。

(3) ミトコンドリアDNAの多型解析

「章丘」、「広州」、「金陵」および「北京」由来CMS個体および「金陵」、「北京」の維持系統である「元蔵」、「金長」MF個体のミトコンドリアDNAの変異を明らかにするため、タマネギにおいてCMS細胞質と可稔細胞質間で多型が報告されたorf725およびatpI領域(Kim et al., 2009, 2010)についてPCRを行い、1.5%アガロースゲル電気泳動にて多型解析を行った。

4. 研究成果

(1) F₂集団の花粉稔性調査およびマーカー解析によるMs3近傍領域の集中マッピング
「金陵」CMS個体と「北京」MF個体とのF₁1個体の自殖により得られたF₂集団170個体の花粉稔性の分離を調査した結果、雄性可稔個体119個体、雄性不稔個体51個体となり、稔性回復遺伝子が単因子優性と仮定した分離比に適合した(P=0.132)。次に、両親系統間で多型が検出された196個のSSRマーカーおよびバルク解析から選抜した3個のRAPDマーカーをF₂集団に展開し、JoinMap4で連鎖解析を行った。その結果、Ms3はネギの第3

染色体に対応する連鎖群 Chr.3b に座乗し、最も近傍の SSR マーカー AFB04B12 は同遺伝子座から 6.3cM の距離に位置した (図 1)。同マーカーを利用した F₂ 集団における花粉稔性の判別率は 86.5% であった。

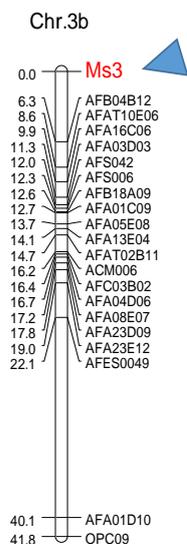


図 1 「金陵」-「北京」間 F₂ 集団を用いて作成した Ms3 近傍連鎖地図

(2). 市販 F₁ 品種由来 CMS 個体と「金陵」または「北京」MF 個体との交配による Ms3 の効果の検証

6 組合せの交雑集団について花粉稔性の分離を調査した結果、「ホワイトスター」および「華青楼 2 号」由来 CMS 個体と「北京」MF 個体との組合せにおいて、雄性可稔個体と雄性不稔個体の比が期待値である 1:1 に適合した (表 1)。「龍輝」と「北京」との交雑次代では、期待値以上に稔性回復個体の割合が高かった。その原因としては、柱頭上で花粉の競合が生じたことによる分離比の偏りが推定される。また、「関羽一本太」、「ホワイトタワー」および「夏扇パワー」との次代においては、稔性回復個体がわずかに分離したが、期待値と大幅に乖離した。したがって、これらの雄性可稔個体は Ms3 の効果により稔性回復したのではなく、環境要因に影響される微働遺伝子が関与したものと推察される。これらの結果から、期待値通りの分離比を示した「ホワイトスター」および「華青楼 2 号」に由来する CMS は、野菜茶業研究所で見出された「金陵」および「北京」由来 CMS と遺伝様式が同一であると考えられる。

表 1 市販 F₁ 品種由来 CMS 個体と北京および金陵 MF 個体との交雑後代における花粉稔性の分離

交配組合せ	調査 個体数	分離比		P (理論値 1:1)
		MS	MF	
龍輝 × 北京	69	15	54	2.665E-06
ホワイトスター × 北京	37	19	18	0.869
華青楼 2 号 × 北京	12	6	6	1.000
関羽一本太 × 北京	64	62	2	6.382E-14
ホワイトタワー × 金陵	21	16	5	0.016
夏扇パワー × 北京	47	41	6	3.303E-07

(3). ミトコンドリア DNA の多型解析

調査したミトコンドリア DNA の ORF725 および *atp1* 領域について、供試した品種・系統間で明確な DNA 多型は検出されなかった。今後、他の遺伝子領域について解析を行い、ネギにおいて細胞質型の判別を可能にするマーカー開発を行う必要がある。

(4) 今後の展望

本研究の結果、ネギにおける稔性回復遺伝子 Ms3 が第 3 染色体に座乗することが明らかになった。これまでに、野生種 *Allium galanthum* を一回親、ネギを反復親とする戻し交雑後代に CMS が発現し、同 CMS に対する稔性回復遺伝子 (*Rf*) は第 5 染色体に座乗することが報告されている (Yamashita et al., 2005)。一方、タマネギにおける S 型 CMS に対する稔性回復遺伝子 Ms は、タマネギの第 2 染色体に座乗する (Martin et al., 2005)。これらの座乗染色体の差異は、ネギ属野菜の種分化あるいは品種・系統分化の観点から極めて興味深い。また、Ms3 近傍マーカーとして、同遺伝子座から 6.3cM に位置する DNA マーカー AFB04B12 が開発されるとともに、市販 F₁ 品種由来 CMS に対する Ms3 の効果の有無が明らかになった。これらの結果は、ネギ市販 F₁ 品種育成に用いられる CMS が、2 種類以上存在することを示すのみならず、素材集団を用いた A ライン、B ラインの育成に、DNA マーカーが有効に利用できる可能性を示唆している。

CMS 発現や稔性回復について、イネでは pentatricopeptide repeat containing protein (PPR protein) をコードする稔性回復遺伝子 *Rf1* が、BT 型のミトコンドリア遺伝子 *orf79* の働きを抑制することで回復効果をもたらすことが明らかになっている (Wang et al., 2006)。また、ダイコンでも PPR protein をコードする *Rf0* が、ミトコンドリア遺伝子 *orf138* の働きを抑制することで稔性を回復することが報告されている (Uyttewaal et al., 2008)。タマネギでは、Kim ら (2009) が S 型、T 型 CMS と N 型のミトコンドリアゲノムを比較し、S 型および T 型特異的に *orf725* が存在し、発現することおよび S 型 CMS の *cox1* に変異が存在することを報告した。これらのミトコンドリア DNA 領域の変異はタマネギにおける細胞質型の判別に有効であるが、CMS 発現と稔性回復のメカニズムは未だ明らかではない。本研究で用いた「金陵」および「北京」由来 CMS 個体および MF 個体は、トランスクリプトーム解析等の網羅的発現解析の素材として、ネギにおける CMS の発現および稔性回復のメカニズムの解明に有効であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

〔学会発表〕(計2件)

山下謙一郎、塚崎光、若生忠幸、ネギ細胞質雄性不稔性に対する稔性回復遺伝子 *M3* と連鎖する DNA マーカーの開発、園芸学会平成 26 年度秋季大会、2014 年 9 月 28 日、佐賀大学本庄キャンパス(佐賀県佐賀市)

山下謙一郎、ネギ類における雄性不稔性の遺伝様式解明および育種利用、平成 25 年度野菜茶業課題別研究会資料 ネギ属野菜の需要の変化に対応した育種・栽培に関する諸問題、2013 年 10 月 31 日、愛知県産業労働センター(ウインクあいち)(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 謙一郎 (YAMASHITA KEN-ICHIRO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所・野菜育種・ゲノム研究領域・主任研究員

研究者番号：80414671