

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 6月 18日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780030

研究課題名（和文） ニラにおける複相大孢子形成遺伝子座の集中マッピングおよび候補遺伝子の検索

研究課題名（英文） Intensive mapping of diplospory gene locus and exploitation of candidate gene for diplospory in Chinese chive

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

研究成果の概要（和文）：ニラ異数性分離集団（BC1）を供試して、AFLP、RAPD、ISSR マーカーを用いた複相大孢子形成遺伝子座（*D*）および単為発生遺伝子座（*P*）のマッピングを行い、連鎖地図を作成した。また、両性生殖性二倍体×アポミクシス性低三倍体（BC1）により作出した二倍体・高二倍体集団（BC2）の複相大孢子形成性および単為発生性を評価し、低頻度の複相大孢子形成値を示す4個体および比較的高頻度の単為発生値を示す1個体を同定した。単為発生性個体について染色体数を調査した結果、同個体がトリソミックであったことから、添加された染色体上に単為発生遺伝子が座乗すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Genetic maps of diplospory (*D*) and parthenogenesis (*P*) gene loci were constructed by linkage analysis with AFLP, RAPD and ISSR markers in the heteroploid population (BC1) in Chinese chive. Degrees of diplospory and parthenogenesis were evaluated in the diploid-hyperdiploid population (BC2) produced by the cross between amphimictic diploid and apomictic hypotriploid BC1 plants. As the results, four plants with low diplospory values and one plant with relatively high parthenogenesis value were identified. By the Feulgen staining of root tip cells in the parthenogenetic plant, it was revealed that this plant was a trisomic ($2n=17, 2x+1$), which indicates that the *P* locus is located on the additional chromosome.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 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：アポミクシス・アリウム・単為発生性・ニラ・複相大孢子形成性

1. 研究開始当初の背景

アポミクシス性は母親の遺伝形質のみが種子を通じて次代へ伝達される植物の繁殖様式であり、「種子によるクローン増殖」といわれる。アポミクシス性を主要作物へ導入することができれば、ハイブリッド品種の育成と増殖の飛躍的な効率化につながり、その経済効果はイネに限っても全世界で 30 億ドル（約 3200 億円）/年を越えると試算されている。ニラ（*Allium ramosum* L.）はほとんどの品種・系統が四倍体（ $2n=32$, $4x$ ）かつ高いアポミクシス性を有し、そのアポミクシス性は前減数分裂期での核内倍加に起因する「複相大孢子形成」と、受精を必要とせず卵細胞から胚を発生する「単為発生」の2つの遺伝的要素に特徴付けられる。これまでに野菜茶業研究所では、両性生殖性二倍体（ $2n=16$ ）94Mo49 とアポミクシス性三倍体 F1（両性生殖性二倍体 94Mo13 とアポミクシス性二倍体 KaD2 との交雑次代より選抜）との交配により、 $2x-3x$ （ $2n=16\sim 24$ ）の異数体を含む分離集団（BC1）を育成し、同集団を用いた遺伝解析から、複相大孢子形成性と単為発生性は単因子優性の異なる遺伝子により制御されること、および単為発生遺伝子の発現には、複相大孢子形成遺伝子の存在が不可欠であることを明らかにした。また、想定される有害劣性遺伝子とアポミクシス遺伝子との連鎖打破を目的として、94Mo49 にアポミクシス性低三倍体（ $2n=21-23$ ）を交配し、二倍体・高二倍体からなる BC2 集団を育成した。

2. 研究の目的

ニラ異数性分離集団（BC1）を供試して、複相大孢子形成遺伝子座に連鎖する DNA マーカーを開発すること、および BC2 集団のアポミクシス性を評価して、高頻度の複相大孢子形

成値を有する個体を選抜し、候補遺伝子を検索することを目的とする。

3. 研究の方法

（1）複相大孢子形成遺伝子座のマッピング
異数性分離集団（BC1）を供試し、複相大孢子形成性および単為発生性について RAPD（1181 種類および 1015 種類）、ISSR（37 種類および 55 種類）、AFLP（各 128 組）プライマーを用いて、両形質の有無についてそれぞれ 8 個体の DNA を混合したバルク解析を行った。複相大孢子形成バルクおよび単為発生バルク特異的マーカーを選抜し、異数性分離集団 145 個体に展開、JoinMap4.0 を用いて連鎖解析を行った。

（2）BC2 のアポミクシス性評価

BC2 の複相大孢子形成性を評価するため、次代検定を行った。個体ごとに四倍体品種「テンダーポール」を交配し、得られた次代の倍数性をフローサイトメーターで調査して、複相大孢子形成が関与して成立した個体の割合を形質値とした。単為発生性は、開花 4 日後の未受粉小花から胚珠を摘出し、Herr's clearing method により胚嚢を透明化した。当該胚嚢を微分干渉顕微鏡で個体当たり 10 個以上観察し、胚発生を示す胚嚢の割合を形質値とした。高頻度のアポミクシス形質を示した個体について、根端細胞のフォイルゲン染色・押しつぶし法により染色体数を確定するとともに、アポミクシス遺伝子座の両側に位置するマーカー遺伝子型を調査した。

4. 研究成果

（1）バルク解析により、複相大孢子形成について 49 個および単為発生について 35 個の計 84 個のマーカーを選抜し、BC1 全体に展開

した。JoinMap ver.4.0 を用いて連鎖解析を行った結果、両形質遺伝子座は異なる連鎖群に座乗し、最も近傍のマーカーは複相大孢子形成遺伝子座および単為発生遺伝子座からそれぞれ 5.7cM(OPD07)および 5.2cM(OPAC17)に位置した(図1)。

(2) BC₂ 集団のうち、69 個体の複相大孢子形成性および 84 個体の単為発生性を評価した。その結果、複相大孢子形成および単為発生を示す個体がそれぞれ 4 個体および 1 個体獲得された(表1、2)。比較的高頻度の単為発生性を示した「94Mo49/57-105」について染色体数を調査した結果、トリソミック(2n=17、2x+1)であることがわかった(図2、3)。当個体は 3 本の相同染色体のうち、1 本は 94Mo49、2 本はアポミクシス性低三倍体から受け継いでいることから、低三倍体に由来する染色体の 1 本にアポミクシス性二倍体親 KaD2 に由来する単為発生遺伝子が座乗すると考えられる。次に、上記形質値を示す 5 個体について、アポミクシス遺伝子座両側のマーカー遺伝子型を調査した。その結果、いずれも複相大孢子形成性連鎖マーカーを有していなかったが、単為発生個体「94Mo49/57-105」は単為発生性について片側のマーカー(OPAC17)を有することが明らかになった(表2)。また、トリソミック個体は 4 倍体品種「テンダーポール」を指標としたフローサイトメトリー分析により、二倍体と区別することが可能であったことから(図4)今後、両性生殖性二倍体に戻し交雑を行った次代から効率的に二倍体を選抜、単為発生性を評価することにより、単為発生遺伝子と有害劣性遺伝子との連鎖打破の可能性を調査することができると考えられる。トリソミック個体の複相大孢子形成性は未評価であるため、今後同形質を評価し、複相大

子形成遺伝子解明への有効性を検討する。

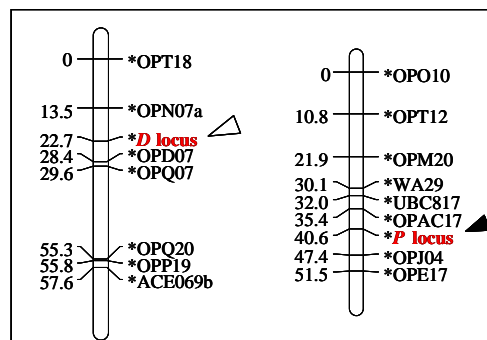


図1 複相大孢子形成遺伝子座(D)および単為発生遺伝子座(P)近傍連鎖地図

表1 BC₂におけるアポミクシス個体数

| 交配履歴 (二倍体 × 低三倍体) | 作出 個体数 | 複相大孢子形成性 | | 単為発生性 | |
|------------------------|-----------|----------|------------|-------|------------|
| | | 検定数 | 同形質 個体数 | 検定数 | 同形質 個体数 |
| 94Mo49 × 19 (49-21-2) | 17 | 6 | 0 | 10 | 0 |
| 94Mo49 × 37 (49-22-13) | 10 | 5 | 0 | 6 | 0 |
| 94Mo49 × 48 (49-22-24) | 16 | 4 | 1 | - | - |
| 94Mo49 × 57 (49-23-9) | 117 | 52 | 3 | 65 | 1 |
| 94Mo50 × 57 (49-23-9) | 5 | 2 | 0 | 3 | 0 |

表2 アポミクシス形質を示すBC₂における連鎖マーカー型

| 系統番号 | 複相大孢子 形成率(%) | 単為 発生率 (%) | 複相大孢子 形成マーカー | | | | 単為発生 マーカー |
|---------------|-----------------|------------------|-----------------|--------|-------|--------|--------------|
| | | | OPD07 | OPN07a | OPJ04 | OPAC17 | |
| 94Mo49/48-11 | 3.6 | 0 | - | - | - | - | |
| 94Mo49/57-6 | 5.3 | 0 | - | - | - | - | |
| 94Mo49/57-69 | 6.3 | 0 | - | - | - | - | |
| 94Mo49/57-102 | 6.9 | 0 | - | - | - | - | |
| 94Mo49/57-105 | 未調査 | 33.3 | - | - | - | + | |

+: マーカー有り, -: マーカー無し

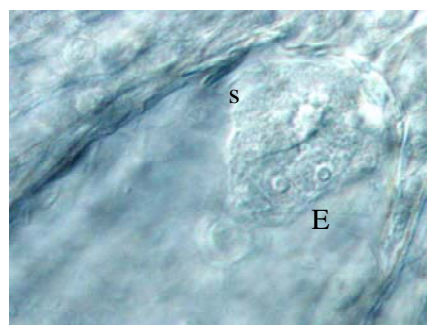


図2 開花4日後の94Mo49/57-105における胚発生

E: 胚(4細胞期) s: 助細胞



図3 (94Mo49/57-105)の体細胞染色体
($2n=17, 2x+1$), bar =10 μ m

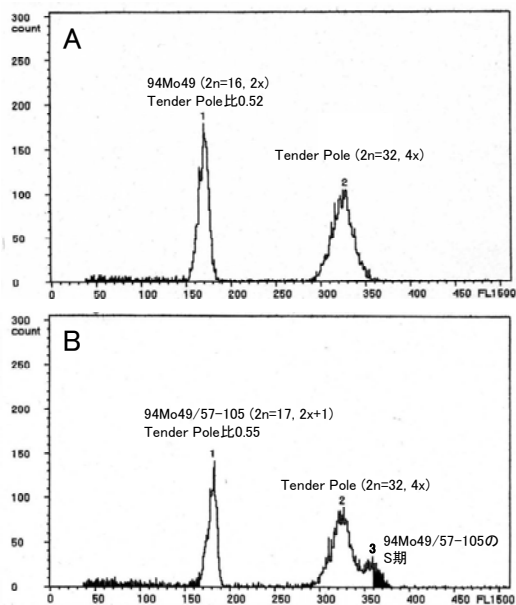


図4 フローサイトメトリー分析における二倍体 (A)およびトリソミック (B)のテンドーポールに対する蛍光強度

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1件)

Yamashita K., Y. Nakazawa, K. Namai, M. Amagai, H. Tsukazaki, T. Wako, A. Kojima. Modes of Inheritance of two apomixis components, diplospory and parthenogenesis, in Chinese chive (*Allium ramosum*) revealed by analysis of the segregating population generated by back-crossing between amphimictic and apomictic diploids. *Breeding Science*. 査読有り. 62, 2012, 160-169.

[学会発表](計5件)

Yamashita, K., Y. Nakazawa, K. Namai, M. Amagai, H. Tsukazaki, T. Wako, A. Kojima. Modes of Inheritance of Two Apomixis Components, Diplospory and Parthenogenesis, in Chinese chive (*Allium ramosum*). 6th International Symposium on Edible Alliaceae, 2012年5月22日, アクロス福岡(福岡県)

山下謙一郎、塚崎光、小島昭夫、谷口成紀、若生忠幸、ニラ両性生殖性二倍体×アポミクシス性低三倍体による単為発生性トリソミックの作出、園芸学会平成24年度春季大会、2012年3月28日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府)

山下謙一郎、塚崎光、若生忠幸、小島昭夫、ニラ異数性分離集団を用いた複相大孢子形成遺伝子座および単為発生遺伝子座のマッピング、園芸学会平成23年度春季大会、2011年3月21日、宇都宮大学農学部(栃木県)

山下謙一郎、塚崎光、小島昭夫、若生忠幸、ニラ両性生殖性二倍体×アポミクシス性低三倍体による正二倍体・高二倍体分離集団の育成、園芸学会平成22年度春季大会、2010年3月22日、日本大学生物資源科学部(神奈川県)

山下謙一郎、塚崎光、若生忠幸、小島昭夫、ニラの複相大孢子形成性に連鎖するDNAマーカーの開発、園芸学会平成21年度秋季大会、2009年9月27日、秋田大

学手形キャンパス(秋田県)

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