

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380025

研究課題名（和文）遺伝子組み換え球根植物作出による球根植物の休眠機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of dormancy in bulbous plants by producing genetically transformed bulbous plants

研究代表者

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：80150506

研究成果の概要：

アサツキとチャイブの後代における最大鱗葉厚を指標とする球根形成指数はアサツキとチャイブ付近にそれぞれピークが出現したが、その中間領域にも多くのBC₁実生が存在したことから、球根形成には、複数の遺伝的な要因が関与しているものと思われた。Bulk法を用いた球根形成に関与するマーカーの探索では調査した100プライマーのうち、9プライマーで球根形成集団と非球根形成集団間で多型が認められ、そのうち、CMN-A71で得られたバンドは、球根形成に関与する遺伝子の一部もしくは隣接しているすなわち連鎖している可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	4,100,000	3,120,000	13,520,000
平成19年度	2,400,000	720,000	3,120,000
平成20年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

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：球根作物，球根形成，休眠

1. 研究開始当初の背景

球根植物はチューリップやユリなどの花卉、タマネギ、ニンニク、ジャガイモなどの野菜、さらには、サツマイモ、タロ、ヤムなどの主食作物をも含む重要かつ大きな作物群である。球根は通常、多少なりともいわゆる「休眠」を有し、この休眠の期間があるからこそ、乾燥状態での輸送や長期間の貯蔵等が可能となっている。しかしながら、球根植物における

休眠導入は常に球根形成を伴って起こるため、球根形成と休眠導入との関係はいまだに明らかではない。球根形成と休眠導入との関係を明らかにすることは、開花の制御、球根肥大促進、球根収量の増加、早期萌芽の抑制等、生長制御法の開発とともに新たな栽培体系の確立を行っていく上で非常に重要であるだけでなく、学問的にもいまだに定義が確定していない「休眠とはなにか」に対する明確な解答を導くためにも、重要な研究対象である。

一方、休眠覚醒に関しても諸説あり、依然混沌としたままである。

我々は、これまで種々の球根植物を対象に休眠と球根形成に関する研究を行い、球根形成の始まり、すなわち、例えば、鱗茎球根植物においては、これから茎葉や花芽を分化していくべき生長点はその方向を転じて球根形成に向かうこと、すなわち、「休眠=生長停止」ではなく、その導入には非常にダイナミックな分化ならびに生長をも含むことが休眠導入であることを主張してきた。

近年、植物の生長過程におけるさまざまな現象を分子レベルで解明する試みがなされているが、多くの場合がモデル植物としてのシロイヌナズナの突然変異を利用して行われている。しかしながら、シロイヌナズナに球根を形成する突然変異体「球根シロイヌナズナ」は存在しないこと、また、球根を形成する植物であっても、その対照として必要な球根を形成しない植物（たとえば、鱗茎球根であれば、葉原基が鱗片として発達せずに、葉となって分化、伸張していく個体であることが必要で、球根形成はしないが、生長も停止してしまうような植物体は対照とは成り得ない）が容易に得られないため、休眠機構の生理学的解明は植物体レベルから分子レベルに至るまで未解明のままである。

上述のような理由から、国内外ともに、球根植物の休眠に関する研究は、特に導入に関する研究は皆無といってよい。温度や日長が球根形成の要因であることがわかっている程度である。一方、休眠打破に関しては、実際栽培における開花調節等の必要性から、その技術は確立されており、利用されている。

休眠現象に限ったことではないが、園芸作物を対象としたこれまでの研究は多くが1種もしくは同一属内の数種に限ったものが多い。このことは、対象とした種については明らかにできても、得られた結果を科学的に理論化、普遍化することは困難である。我々は、球根植物であればすべての球根植物に共通した「休眠」の概念を確立することが重要であると考えている（休眠に限らず、たとえば花成をはじめとするあらゆる現象の説明はuniversalであるべきで、そうなることによってそこから多方面にわたる応用法が導き出せると考えている）。

このような考えから、我々はこれまで様々な種を用いて、個々の研究目的に合致した様々な実験系を確立した上で研究を行っている。

2. 研究の目的

以上のような背景に基づき、本研究では、
1) 単離・同定した球根植物における球根形成制御遺伝子の過剰発現型・発現抑制型形質転換球根植物の作出、および2) 得られた形質転換球根植物の生理・生態反応を解明することにより、球根形成過程の休眠の導入から覚醒までの過程との関係を明らかにすることを目指した。本報告書では、そのうち最も成果があがった *Allium* 属植物を供試した研究成果を述べる。

Allium schoenoprasum L. は、北半球の温帯～寒帯に広く分布し複数の変種が存在する（八畝, 1973）。そのうち、ヨーロッパでハーブとして栽培されているチャイブは *A. schoenoprasum* L. の基本種であり、明確な球根形成を示さず夏季に地上部の枯れがみられない。一方、その変種であるアサツキ (*A. schoenoprasum* var. *foliosum* Regel) は、秋と春に分げつを繰り返した後、夏季に明瞭な球根肥大および地上部が枯れるなどの異なる生態型をもつ。筆者らは、球根形成因子の遺伝子レベルでの解明を目的として、*A. schoenoprasum* の球根形成の遺伝性を調査している。先の報告（細矢ら, 2005）で、これらの F_1 個体は夏季に球根肥大がみられず、地上部が残り、チャイブ型を示すことを明らかにした。本研究では、 F_1 実生にアサツキの戻し交配を行い、得られた BC_1 個体の球根形成の遺伝性について調査した。さらに、 BC_1 集団について Bulk 法を用いた RAPD 分析により、球根形成に関与するマーカーの探索を試みた。

3. 研究の方法

実験1 チャイブとアサツキの F_1 個体にアサツキを戻し交配した実生の球根形成についてチャイブ1系統を種子親にアサツキ1系統と交配した F_1 実生1個体に、アサツキを戻し交配して得られた2年生の BC_1 実生51個体を用いた。これらは、すべて、岩手大学園場内の無加温ビニルハウスで栽培を行った。アサツキおよび一部の BC_1 個体の地上部の枯れがみられた2006、2007および2008年の8月上旬に株を掘り上げ、球根比（葉鞘基部の最大直径/最小直径）を計測した。さらに、2007に掘り上げた球根については、球根形成の様子を組織学的に観察するため、葉鞘基部で最も肥大した位置より横断切片を作製し、トリジンブルーで染色後、実体顕微鏡下で最大鱗葉厚を測定した。

実験2 Bulk法を用いた球根形成に関与するマーカーの探索

実験1で最大りん葉厚が大きかった上位5個体を球根形成個体、小さかった5個体を非球根形成個体として選抜した。全DNAはCTAB法（Murray and Thompson, 1980）を基本として、

Kobayashi et al. (1998)によって改変された改変 CTAB 法を用い抽出した. 約 30ng/ μ l に濃度調節した各個体の DNA を等量ずつ混合し, 球根形成集団および非球根形成集団の 2 つの Bulk 集団を作成した. CMN-A00~A99 までの 100 種類の 12 塩基ランダムプライマー(BEX)を用い, 各 Bulk 集団で RAPD 分析を行った. PCR 反応液は, 30ng の鋳型 DNA, 2.5 μ l の 10 \times PCR バッファー、0.5unit の Taq DNA Polymerase (Amersham), 0.15 μ M のプライマー, 200 μ M の dNTP を混合し最終容量を 25 μ l とした. PCR 反応はプログラムテンプコントロールシステム (PCR Thermal Cycler PERSONAL TP240, TAKARA) 上でを行い, 90 $^{\circ}$ C-30sec の前処理の後, 熱変性 (94 $^{\circ}$ C-30sec)、アニーリング (37 $^{\circ}$ C-2min), 伸長反応 (72 $^{\circ}$ C-3min) を 45 サイクル繰り返し, 72 $^{\circ}$ C-7min の後処理を行う条件下で DNA を増幅させた. 得られた増幅産物を, 1.5%アガロースゲル (SIGMA) で電気泳動 (100V \cdot 40min) 後, エチジウムブロマイドで染色し紫外線照射下で写真撮影を行い, 多型の検出をした. なお, 明瞭な多型が得られたマーカーは両親と各集団形成個体レベルで再増幅させた.

4. 研究成果

実験 1 チャイブとアサツキの F_1 個体にアサツキを戻し交配した実生の球根形成について

① 球根比

いずれの年もアサツキは明瞭な球根形成を示したのに対し, チャイブおよび F_1 個体の球根比は小さく明瞭な球根形成はみられなかった (第 1 表). 3 年間の平均値は, アサツキで 4.52 と大きく, チャイブおよび F_1 個体で約 1.3 と小さかった.

BC_1 各個体における球根比の年次間差は小さかった (データ略). BC_1 個体群の球根比は, 2007 年度のデータで 1.36~4.03 の範囲に分布し, 外見上, 明瞭な球根を形成する個体としない個体がともに出現したが, その変異は連続的であり, 球根比に基づく分類は困難であった (第 1 図).

② 最大リン葉厚

球根の最大肥大部より横断切片を作成したところ, 外見上, 球根肥大が認められた BC_1 個体群は, 球根内で分けつを生じたため肥大したもの (第 2 図 A) と鱗葉そのものが肥大したもの (第 2 図 B) の 2 つに分類された. そこで, 最大鱗葉厚により分類したところ, BC_1 個体群の鱗葉厚は, チャイブ (0.5mm) および F_1 個体 (1.1mm) に近い 1~1.5mm, アサツキ (6.2mm) に近い 4.5~5mm にピークがみられたものの, その中間の 2.5~3.5mm にも多くの個体が分布した (第 3 図).

以上, ①および②の結果から, アサツキとチャイブの後代について球根形成を調査する場

合, BC_1 世代では分けつによる球根肥大が生じていることから, 最大鱗葉厚を指標とする方が望ましいと思われた. また, 最大鱗葉厚を指標にした場合, アサツキとチャイブ付近にそれぞれピークが出現したものの, その中間領域にも多くの BC_1 実生が存在したことから, 球根形成には, 複数の遺伝的な要因が関与しているものと思われた.

実験 2 Bulk 法を用いた球根形成に関するマーカーの探索

Bulk 法により調査した 100 プライマーのうち, 9 プライマーで球根形成集団と非球根形成集団間で多型が認められた. これら 9 プライマーについて個体レベルで調査を行ったところ, CMN-A71 の 1 プライマーについて, 非球根形成個体のみの特異的に出現するバンドが検出された (第 2 表). 他の 8 プライマーについては, 個体レベルで非球根形成個体もしくは球根形成個体に特異的なバンドは検出されなかった. CMN-A71 で得られたバンドについて, 球根形成に関与する遺伝子の一部もしくは隣接しているすなわち連鎖している可能性が考えられる. 本バンドについては, 今後, 塩基配列の解読を行う予定である.

引用文献

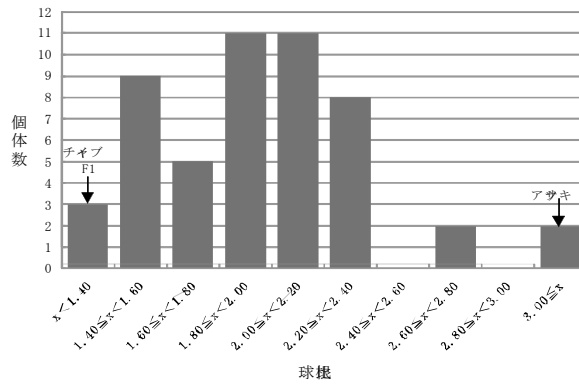
- 細矢美徳・肖靖・嬉野健次・稲田委久子・大久保敬. 2005. In-vitro における *Allium schoenoprasum* L. 実生の球根形成について. 園学雑 74 (別 2): 195
- Kobayashi, N., T. Horikoshi, H. Katsuyama, T. Handa and K. Takayanagi. 1998. A simple and efficient DNA extraction methods for plants, especially woody plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4: 76-80.
- Murray, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4325.
- 八鍬利郎. 1973. ネギ類. 農業技術大系野菜編 8. p417-420. 農文協.

第1表.

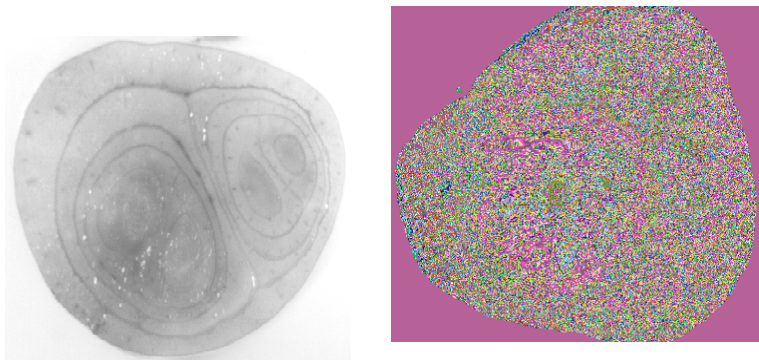
アサツキ, チャイブおよびそれらの交配で得られたF₁個体の球根比

系統	球根比			
	2006年	2007年	2008年	平均 ^z
チャイブ	1.27	1.19	1.47	1.31±0.08
アサツキ	6.01	4.54	3.02	4.52±0.86
F ₁	1.25	1.27	1.38	1.30±0.04

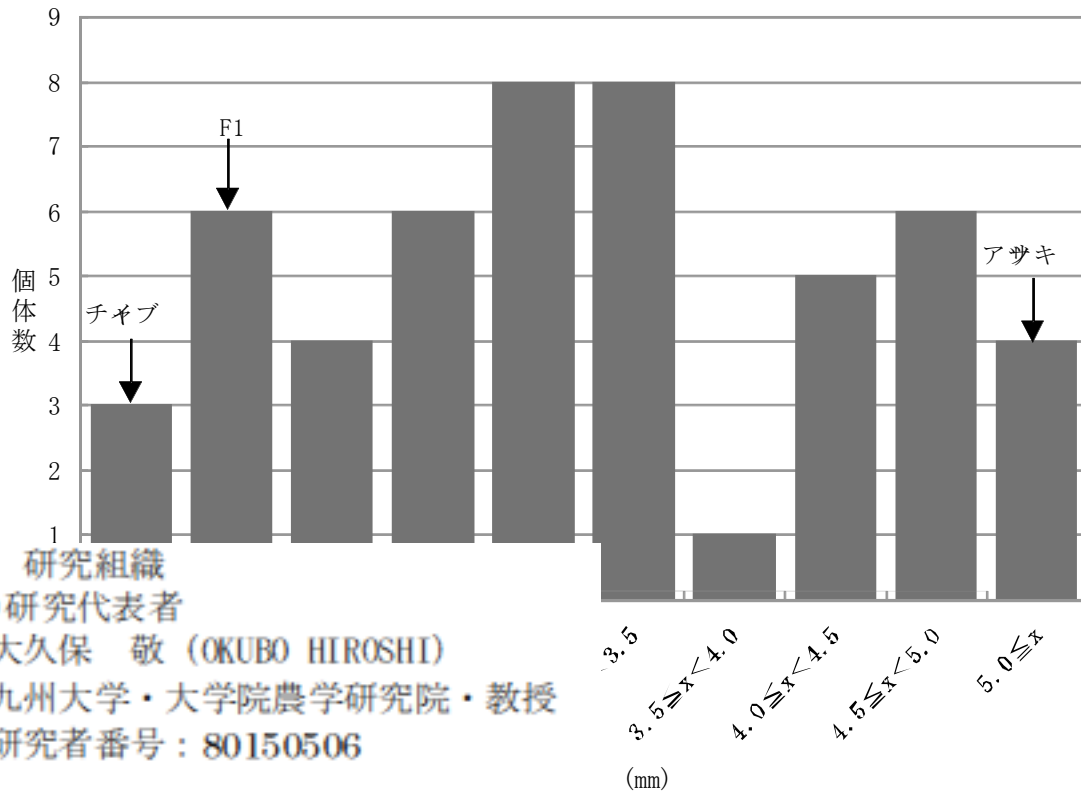
^z平均±S. E.



第1図 BC₁世代における球根比の分離(2007年度)



第2図 BC₁個体における球根の横断切片
 A: 分けつにより球根が肥大した個体 (球根比:2.12, 鱗葉最大厚:1.4mm)
 B: 鱗葉そのものが肥大した個体 (球根比:2.25, 鱗葉最大厚:4.3mm)



6. 研究組織
(1) 研究代表者

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：80150506

第3図 BC₁世代における最大鱗葉厚の分離

第2表 BC₁個体におけるRAPD分析結果

	個体番号	リン葉最大厚 (mm)	球根比	プライマー (CMN-)								
				A15	A33	A42	A48	A58	A62	A68	A71	A73
非球根形成個体	15	0.10	1.39	○	-	○	○	-	-	○	○	○
	16	0.06	1.36	-	-	○	○	-	-	○	○	○
	42	0.05	1.39	-	○	-	○	-	○	-	○	○
	46	0.08	1.42	-	○	○	○	-	-	○	○	○
	48	0.10	1.48	○	○	○	○	○	-	○	○	-
球根形成個体	1	0.70	4.03	-	-	○	-	○	-	-	-	○
	2	0.68	3.32	○	○	○	○	○	○	-	-	-
	25	0.57	2.39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	0.67	1.84	○	○	○	○	○	-	○	-	○
	54	0.48	2.23	-	-	○	-	○	○	-	-	-

○, 特異的バンドあり ; -, 特異的バンドなし ; —, 増幅できず.

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 1 件)

- ① 肖靖・嬉野健次・寿松木章・大久保敬 チャイブとアサツキの F1 個体にアサツキを戻し交配した実生の球根形成について, 平成 20 年度園芸学会秋季大会 (2008) 2008年9月 27 ~ 29 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：80150506

(2) 研究分担者

比良松 道一 (HIRAMATSU MICHIKAZU)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：30264104
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
稲田 委久子 (INADA IKUKO)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：90110650
(平成 18 年度のみ)
嬉野 健次 (URESHINO KENJI)
岩手大学・農学部・講師 (平成 18-19 年度)
琉球大学・農学部・准教授 (平成 20 年度)
研究者番号：10333759

(3) 連携研究者

()