

Brassica rapa ゲノムにおけるマイクロサテライトの特徴とアブラナ科植物の比較ゲノム解析への応用

諏訪部圭太¹⁾・池谷祐幸²⁾・布目 司¹⁾・大山暁男¹⁾・平井正志³⁾・福岡浩之¹⁾

(¹⁾野菜茶業研究所, ²⁾農研機構本部, ³⁾京都府立大学)

Brassica rapa においてマイクロサテライトを単離し、ゲノム内における各コアモチーフの特徴を明らかにするとともに、マイクロサテライトマーカーを開発しその特性について解析を行った。2塩基および3塩基マイクロサテライトを対象にスクリーニングし、228個の独立したマイクロサテライトを単離した。これら単離したクローンにおいては、(GA)_nおよび(CAA)_nが多く含まれ(合計48.2%)、*B. rapa* ゲノムではこれら2つのマイクロサテライトモチーフが優占的に存在すると推測された。また、*B. rapa* ゲノムには少なくとも120Kbに一つマイクロサテライトが存在すると推測された。単離したマイクロサテライトクローンをもとにプライマーを設計し、多型性について解析を行ったところ、2塩基マイクロサテライトのPICの平均値は0.677、3塩基マイクロサテライトのそれは0.404となり、2塩

基マイクロサテライトの方が高い多型性を示した。また、*B. rapa* において増幅可能であったプライマーは、アブラナ属植物(*B. nigra*, *B. oleracea*, *B. napus*, *B. carinata*, *B. juncea*)に90%以上のものが適用可能であり、アブラナ科植物の*Raphanus sativus* および*Sinapis alba*には70%程度、シロイヌナズナには約40%のものが適用可能であった。また、シロイヌナズナに適用可能であったプライマーは、解析に用いたすべての種において適用可能であった。以上のことから、*B. rapa* において開発したマイクロサテライトマーカーは、近縁のアブラナ科植物に広く適用可能なDNAマーカーであり、比較ゲノム解析やシンテニー解析など種間の比較解析を行う際に有効なDNAマーカーになると考えられた。

Breeding Science 54: 85-90 (2004)

コ・トランスフォーメーションによるダイズ遺伝子組換え体の効率的な作出方法

古谷規行¹⁾・日高 操²⁾

(¹⁾京都府農業資源研究センター, ²⁾東北農業研究センター)

遺伝子銃法(パーティクルガン)によるダイズ遺伝子組換え体作出技術確立のため、未熟種子(品種名Jack)からの不定胚の誘導方法と、その増殖方法の検討を行った。また、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子(HPT)とオワンクラゲの発光遺伝子(GFP)をそれぞれ単独で含むプラスミドを混合したものを導入するコ・トランスフォーメーション手法を用いた遺伝子組換え体作出方法を検討した。蛍光顕微鏡で、GFPの遺伝子の一過的な発現程度を指標として、遺伝子導入条件の評価や、形質転換体選抜過程でのGFP遺伝子の発現を観察した。その結果得られた最適な遺伝子導入条件は、以下の通りである。(1)固形培地で未熟種子から不定胚を誘導し、その後少なくとも3週間間隔で5回以上継代し、増殖率が優れた不定胚塊を選抜する。(2)得られた不定胚塊にヘリウム圧1,100psiの強さで、距離を9cm離し、不定

胚塊に2回HPT遺伝子とGFP遺伝子をコ・トランスフォーメーションする。(3)遺伝子導入した不定胚塊は、5日後に液体培地に移し、振とう培養を行う。振とう培養開始、一週間後から液体培地にハイグロマイシンを15mg/lを加え選抜を行う。継代間隔は1週間としハイグロマイシンの濃度を15mgから30mgに順次上げ、約8週間選抜を行い、ハイグロマイシン抵抗性組換え体ダイズを作出する。形質転換体作出効率は、遺伝子導入不定胚塊当たり7%で、得られたハイグロマイシン抵抗性組換え体の約18%ではGFP遺伝子も発現しており、本研究で確立したコ・トランスフォーメーションによるダイズ形質転換体の作出手法は、実用的なレベルの形質転換体作出方法であると言える。

Breeding Science 54: 91-98 (2004)

種間雑種を用いたデルフィニウム赤花系品種の育成

加藤紀夫^{1,2)}・徳弘晃二¹⁾・中林利彦¹⁾・吉田洋之¹⁾・萩森 学¹⁾

(¹⁾日本たばこ産業(株)植物開発センター, ²⁾現:日本たばこ産業(株)植物イノベーションセンター)

赤花系のデルフィニウム品種を育成するために *Delphinium elatum* と *D. nudicaule* または *D. cardinale* との間で種間交雑を行った。雑種植物を得るためには、試験管内で発芽を誘導後培養する方法が有効であった。その結果、800粒の種子から379個体の雑種植物体を得られた。雑種当代植物の花は色素としてデルフィニジンを含み、紫系の花色を呈した。雑種植物の形態は雑種親の中間的なものであり連続的に変化した。得られた雑種

植物の多くは稔性を持ち、自殖及び雑種間の交配により多数の種子が得られた。第二世代において花色形質の分離が認められ、224個体から赤系統の花色を呈する6個体を選抜した。これらの植物体の花にはペラルゴニジンが含まれていることが、薄層クロマトグラフィーにより確認された。

Breeding Science 54: 99-103 (2004)

日本に現存する古典園芸植物センノウは3倍体であった

神戸敏成¹⁾・奥 隆善²⁾・三位正洋²⁾・中田政司¹⁾

(¹⁾富山県中央植物園, ²⁾千葉大学・園芸学部)

センノウ (*Lychnis senno* Siebold et Zucc.) は中国原産のナデシコ科植物で日本へは600年以上前に渡来したと考えられている。室町から江戸時代には盛んに栽培されていたと考えられているが、近年日本では栽培が見られなくなっていた。1996年に島根県で栽培されているセンノウが確認され、これまでに中国、九州地方の9ヶ所で11系統のセンノウが栽培されていることが確認された。富山県中央植物園で系統保存を行っている3系統の染色体観察を行ったところ $2n=36$ の3倍体であることが明らかになった。さらに、核DNA量の測定の結果、日本に現存す

る11系統のセンノウ全てが3倍体であることが明らかになった。花粉形成過程では減数分裂の対合形態の平均は $10.1III + 1.9II + 1.9I$ で、この3倍体センノウが同質3倍体であることが示唆され、染色体橋および遅滞染色体、微小核が観察された。コットンブルーによる花粉の染色性は約70%であったが、日本に現存するセンノウでは発芽能力を有する種子は形成されない。

Breeding Science 54: 105-109 (2004)

Capsicum における L^3 遺伝子に連鎖した SCAR マーカーの開発

杉田 亘¹⁾・山口和典²⁾・杉村幸代³⁾・長田龍太郎¹⁾・湯地健一⁴⁾・木下哲次¹⁾・轟 篤¹⁾

(¹⁾宮崎県総合農業試験場, ²⁾現:宮崎県立農業大学校, ³⁾現:宮崎県庁, ⁴⁾現:児湯農業改良普及センター)

半数体倍数系統 (DH) 集団を用い、バルク法により L^3 遺伝子に連鎖した RAPD マーカーの開発を行った。そこで得られた共優性の RAPD マーカー、E18₂₇₂ および E18₂₈₆ は、クローニング後、塩基配列を決定し、SCAR マーカーに変換した。DH 集団および戻し交配集団を用いた PCR 分析の結果、全ての SCAR マーカー、PMFR11₂₆₉、PMFR11₂₈₃ および PMFR21₂₀₀ は RAPD マーカーと同じ分離を示し、 L^3 遺伝子から 4.0 cM の距離に位

置づけられた。さらに、共優性の SCAR マーカー、PMFR11₂₆₉ および PMFR11₂₈₃ を用いて *Capsicum* 属 18 系統における有効性の検定を行った結果、今回開発した SCAR マーカーは、ピーマン育種における PI159236 (*C. chinense*) 由来 L^3 遺伝子導入のためのマーカー選抜育種に有効なことが示唆された。

Breeding Science 54: 111-115 (2004)

異なる生長段階におけるダイコン (*Raphanus sativus* L.) 根形の遺伝様式岩田洋佳¹⁾・新倉 聡²⁾・松浦誠司²⁾・高野 泰³⁾・鵜飼保雄³⁾

(1)中央農業総合研究センター, 2)(株)トーホク, 3)東京大学大学院・農学生命科学研究科)

生長過程におけるダイコンの根形の変化は容易に観察することができないため、望ましい根形をもつ遺伝子型を選抜するのに最適な時期を決めるのは難しい。最適な選抜時期を明らかにするために、異なる生長段階における根形のダイアレル分析を行い、生長にともなう遺伝様式の変化を評価した。6近交系から得られたダイアレル交配次代について、播種後40日から75日にかけて6生長段階に調査を行った。楕円フリー記述子の主成分として、長幅比 (AP1)、とまりの度合い (AP2)、曲がりの度合い (BP1) が抽出された。分散分析の結果、生長段階、遺伝効果およびそれら交互作用はすべての特徴で有意であった。AP1では、交互作用があっても生長にともなう遺伝様式の変化は小さく、選抜時期の違いはこの形質の選抜に影響しないこと

が示唆された。AP2とBP1では、交互作用によって、生長段階が異なると遺伝子型のランクが変化し、遺伝様式も変化した。AP2では、生育が進むにつれて平均優性度が増加した。BP1では、生長段階によって遺伝パラメータが変化した、明確な傾向は見られなかった。これらの結果から、AP1では、肥大生長開始期のような早い生長段階においても効果的に選抜できると考えられた。また、AP2やBP1では、通常の収穫時期周辺での選抜が推奨される。しかし、通常の収穫時期周辺の2週間の範囲では交互作用が有意でなく、この範囲内での選抜時期の変動は、AP2やBP1の選抜に影響しない。

Breeding Science 54: 117-124 (2004)

イネの穎花数とその構成形質を制御する量的遺伝子座の主効果および栽培年次との交互作用

加藤恒雄

(広島県立大学・生物資源学部, 現: 近畿大学・生物理工学部)

イネの多収性育種において、穎花の登熟程度を高く維持しながら穎花数/穂を増大して多収を達成するためには、登熟能力が異なる穎花の穂内での配置、すなわち穂型を遺伝的に改良する必要がある。本研究では、品種間交雑あそみのり/IR24に由来する68の組換え型自殖系統を、1997, 1998, 2000, 2001年の4年にわたり栽培した。その結果得られた穎花数および穎花の穂内配置に関連する構成形質のデータに対して、本集団での連鎖地図を構成する375DNAマーカーの各々で二元配置の分散分析を行った。算出された系統間偏差平方和のうち、マーカー型間差として説明できるもの(主効果)、および系統×栽培年次偏差平方和のうち、マーカー型間差×年次交互作用として説明できるもの(交互作用)、について有意性を示した地図上の領域(量的遺伝子座を含む)を検出した。そして、異なる形質間における領域の重複状況を検討した。主効果に関しては、穎花数/穂の増

加に関する領域の多くは、登熟能力が劣る2次枝梗上穎花数に関する領域と共通であった。これに対して、染色体3に存在する一領域では、登熟能力が優れる1次枝梗上穎花数に関する領域と穎花数/穂の領域が重複していた。一方、交互作用に関しては、マーカーを考慮しない分散分析ではほぼ全ての形質で有意な系統×年次交互作用が認められなかったのに対して、マーカーを考慮した分散分析では多くの形質で有意な交互作用を示す領域が検出できた。また、上記の染色体3の一領域はどの形質に関しても有意な交互作用を示さなかった。これらの結果から、染色体3の一領域に含まれる量的遺伝子座は、登熟良好な1次枝梗上穎花数の増加によって穎花数/穂を増加させるものであり、多収をもたらす穂型を構築する際の素材として活用されることが示唆された。

Breeding Science 54: 125-132 (2004)

アイソザイムおよび単純反復配列遺伝子座を用いたダイズ硬実性の遺伝解析

坂本晋也・阿部 純・金澤 章・島本義也

(北海道大学大学院・農学研究科)

ダイズの栽培化関連形質の一つである硬実性の遺伝的制御機構を、アイソザイム遺伝子座および単純配列反復 (SSR) 遺伝

子座を用いて解析した。解析には、白毛白目ダイズ系統「十系780号」と北海道鶴川地方で収集されたツルマメ「日高4号」の

交雑 F_2 および F_3 世代と F_4 世代以降の分離家系を用いた。硬実性は、乾燥種子を 12 時間水に浸漬した後の吸水種子率で評価した。吸水種子率の F_2 および F_3 世代間の親子相関は高く、硬実性は遺伝力の高い形質であった。5 アインザイム遺伝子座および 131 の SSR 遺伝子座を用いた解析から、硬実性の遺伝的制御には少なくとも二つの主要な量的遺伝子座 (QTL) と一つの微少な効果を持つ QTL が関与することが示唆された。特に D1b+W 連鎖群上の Satt459 座近傍の QTL の効果が最も高く、 F_2 および F_3 家系平均値で観察された変異のそれぞれ 23.8% および 38.5%

を説明した。また、種子色抑制遺伝子座 (I) または毛茸色遺伝子座 (T) が分離した F_4 から F_6 世代の家系では、硬実性が種皮色と密接に関連して分離した。調査した家系のいずれにおいても、いずれか片方の遺伝子座で優性遺伝子を持つ個体は硬実型となり、両座の劣性ホモ個体は吸水型を示した。これらの結果ならびに以前の研究結果 (Keim *et al.* 1990) から、ダイズの硬実性に関与する QTL の効果や QTL の組み合わせは、交雑に供試した栽培系統および野生系統により異なることが示唆された。

Breeding Science 54: 133-139 (2004)

メロン ‘PMAR No. 5’ × ‘春系 3 号’ 交雑に由来する組換え型自殖系統の特性解析

吹野伸子・國久美由紀・松元 哲

(野菜茶業研究所)

メロン ‘PMAR No. 5’ (うどんこ病およびワタアブラムシ抵抗性の赤肉系統) と ‘春系 3 号’ (うどんこ病およびワタアブラムシ感受性の緑肉品種) との交雑後代から 1 系 1 粒法により組換え型自殖系統 93 系統を育成し、これらの系統のうどんこ病菌レース 1 に対する抵抗性、ワタアブラムシ抵抗性および果肉色を調査した。組換え型自殖系統のうどんこ病抵抗性は、抵抗性、中間型および感受性の 3 種類に分類でき、系統数はそれぞれ 42, 31, 19 であった。これらの数値は ‘PMAR No. 5’ のう

どんこ病抵抗性が 2 個の優性遺伝子支配であると仮定した場合の分離比と適合した。ワタアブラムシ抵抗性は抵抗性:ヘテロ型:感受性が 39:2:52, 果肉色はオレンジ色:緑色が 47:46 であり、ともに優性 1 遺伝子支配と仮定した場合の分離比と適合した。本研究で用いた組換え型自殖系統は病虫害抵抗性などの環境の影響を大きく受ける形質の解析に有用であり、メロンの高密度連鎖地図作成に利用できることを期待される。

Breeding Science 54: 141-145 (2004)

イネにおける穂と花の発生段階

池田恭子・春原英彦・長戸康郎

(東京大学大学院・農学生命科学研究科)

発生過程を制御する遺伝子の機能を解明するためには、野生型の発生過程についての十分な理解が前提となる。イネの幼穂の分化は多くの葉原基に含まれた中で起こり、その時期を特定するのも困難であることから、特に初期発生過程についての知見が乏しい。そこでまず、品種台中 65 号の穂および小穂の発生過程を詳細に観察した。生殖成長への転換直後の分裂組織の動態を観察し、側生器官の相対的な大きさから転換直後の分裂組織 (穂軸分裂組織) を栄養成長分裂組織から区別できること、転換直後から分裂組織は急速に大きくなるが、一次枝梗分化中期

に最大になり、その後は小さくなることを明らかにした。さらに生殖成長全体における発生イベントを詳細に記述するとともに、野生型、変異体の発生過程の記述の標準化のために、発生イベントおよびマーカー遺伝子の発現などに基づき、穂の発生過程を 9 つのステージ In1 ~ In9 に、小穂の発生過程を 8 つのステージ Sp1 ~ Sp8 に分類した。この発生段階の標準化は、変異体や品種間差を解析するのに有用であろう。

Breeding Science 54: 147-156 (2004)

イネの *leaf lateral symmetry 1* 変異体の解析

小原真理・池田恭子・伊藤純一・長戸康郎

(東京大学大学院・農学生命科学研究科)

植物の葉は一般的に左右相称であるが、その制御機構はほとんど明らかにされていない。我々は、葉の左右相称性に異常の

見られる新規のイネ変異体 *leaf lateral symmetry 1* (*lsy1*) を同定、解析した。*lsy1* 変異体の葉の表現型は多様であったが、主に 2

つのタイプの葉が形成された。最も多く見られるタイプは、葉の左または右の片側半分を一部または完全に欠損するものである。もう一つのタイプは、葉先が2つあり、しかもそれぞれの葉先に通じる葉脈が中肋の形態を持っている葉である。葉原基の発生過程の走査型電子顕微鏡観察を行うと、*lsy1* 変異体では、葉原基の中央に形成される本来の中肋となる頂点以外に、2つ目の頂点が片側の葉片に観察された。この葉原基は、将来後者のタイプの葉に成長すると予想され、この葉では葉の片側半分が

新たに一枚の葉としてのアイデンティティを獲得し、中肋を形成したと考えられる。これらのことから、*lsy1* 変異体の葉では左右が協調的に成長していないと考えられた。左右相称性の崩壊は、葉の変形である穎や心皮といった小穂・花器官においても観察された。*LSY1* 遺伝子は葉や葉の器官の左右相称性を制御する重要な役割を果たしているのだろう。

Breeding Science 54: 157-163 (2004)

サツマイモ野生2倍体種における自家不和合性遺伝子座のゲノム領域の分子的解析

Tomita R.N.¹⁾・鈴木 剛²⁾・吉田和生¹⁾・矢野行人¹⁾・土屋 亨³⁾・掛田克行¹⁾・向井康比己²⁾・神山康夫¹⁾

(¹⁾三重大学・生物資源学部, ²⁾大阪教育大学・教養学科, ³⁾三重大学・生命科学支援センター)

サツマイモ野生2倍体種 (*Ipomoea trifida*) は、単一遺伝子座 (S 遺伝子座) の複対立遺伝子によって支配される孢子体型自家不和合性を有している。ポジショナルクローニング法によりこの S 遺伝子座を含むゲノム領域の構造を明らかにするため、約4万個のクローンから成る BAC ライブラリーを構築し、S 遺伝子座と緊密に連鎖する DNA マーカーを用いてライブラリーのスクリーニングを行った。また、ギャップを埋めるためフォスミドやラムダ・ライブラリーのスクリーニングも補足して行った。その結果、S 遺伝子座をカバーし約 600 kb に及ぶゲノミッククローンのコンティグが完成した。S 遺伝子型が分離する集団 (873 個体) の RFLP 分析から、S 遺伝子座は 0.57 cM の範囲内に限定され、この範囲は物理距離として約 300 kb に相当すると

推定された。また、この領域では、遺伝的組換えが顕著に抑制されていることが明らかになった。この領域のゲノムシーケンスを解析した結果、313 kb の塩基配列が明らかになり、このデータ解析からこの領域には 43 個の ORF や 5 個のトランスポゾン因子および多数の反復配列等が存在すると予測された。これら推定 ORF の中には、今までに他の植物で明らかにされている自家不和合性遺伝子と相同性を示すものは認められなかったことから、サツマイモ野生種を含むヒルガオ科植物では他の植物では見られないユニークな自家不和合性機構が関与していることが示唆された。

Breeding Science 54: 165-175 (2004)

サツマイモのマイクロサテライトマーカーの開発とその特徴

胡 景杰¹⁾・中谷 誠²⁾・水野幸一^{3,4)}・藤村達人⁴⁾

(¹⁾筑波大学大学院・農学研究科, ²⁾作物研究所, ³⁾秋田県立大学・生物資源科学部, ⁴⁾筑波大学・農林工学系)

遺伝子解析や育種を効率的に行うためには、サツマイモのゲノム全体をカバーするマイクロサテライトマーカーを大量に開発する必要がある。以下の3つの方法を用いて、102 個のマイクロサテライトマーカーを開発した。(1) 小さいインサートを含むゲノムライブラリーをスクリーニングする、(2) マイクロサテライトを多く含むライブラリー (51 倍) を構築する、(3) EST データベースを検索する。(GA)₂₀ と (CA)₂₀ のプローブを用いて (1) の約 8,000 個のクローンをスクリーニングした結果、42 個のポジティブなクローンを特定した。一方、(GA)₂₀、(CA)₂₀ と (TAA)₁₅ のプローブを用いて (2) からは、122 個のマイクロサ

テライトを含む 800 個のクローンを特定した。なお、32 組のプライマーは (1) から、47 組のプライマーは (2) から設計した。実験に供試したサツマイモの系統では、27 個のマイクロサテライトマーカーに多型が見られた。また、4,153 個の EST 配列の検索を行い、379 個のマイクロサテライトを含む配列を発見した。151 組のプライマーを設計し、PCR を行った結果、120 個の検出可能なマイクロサテライトマーカーを得た。75 個の EST-SSR の遺伝子座は増幅長の多型を示し、71% はいくつかの遺伝子に関連することを示した。

Breeding Science 54: 177-188 (2004)

日本の栽培ダイコン (*Raphanus sativus*) に認められるミトコンドリア *atp6* 3' 領域の4タイプへの分化

山岸 博・佐々木淳子

(京都産業大学・工学部)

我国の栽培ダイコンに見られる多様な品種分化の遺伝的基礎を知る目的で、ミトコンドリアの *atp6* 遺伝子の3'領域における構造と塩基配列の変異を解析した。日本産27、中国産8、韓国産1の計36品種に含まれるダイコン394個体からDNAを単離し、正常型細胞質で明らかにされたシークエンスをもとに作成したプライマーを用いて、3種類のPCRを行った。PCRの結果、DNA断片の増幅の有無および増幅断片の大きさによって、全供試個体は4タイプに分類された。調査した個体の44%と43%はそのうち2つのタイプに集中しており、また供試品種のうち75%は4タイプのいずれか1つに固定していた。主要2タイプ

以外のうち1つのタイプはオグラ型雄性不稔細胞質のダイコンに相当し、他の1つは「黒ダイコンA」に特有のものであった。多数の個体を含む主要2タイプの間で塩基配列を比較したところ、*atp6*の下流約200bpから約500bpまでの範囲で互いに全く異なる塩基配列を有することが明らかになった。更に、今回得られた変異と、著者らが過去に明らかにしたミトコンドリアの *orfB* 領域の変異の間には、一部の例外を除いて対応関係が認められた。これらの結果から、我国の栽培ダイコンの起源は二重構造を基本とすると考えられる。

Breeding Science 54: 189-195 (2004)

ハクサイ根こぶ病菌の病原性分類のための新たな判別品種

畠山勝徳・藤村みゆき・石田正彦・鈴木 徹

(野菜茶業研究所)

ハクサイ産地では、根こぶ病抵抗性(CR)品種が罹病する場合があります問題になっている。罹病化は根こぶ病菌の病原性分化に起因すると考えられるため、日本各地で採取された15種類のハクサイ根こぶ病菌株(No.1~No.15)の病原性について検討した。従来のWilliams法やECD法の判別品種では病原性分類が困難であった。また、ハクサイ根こぶ病菌の判別品種として報告されているCRハクサイF₁品種「うたげ70」は、現在市販されておらず今後の利用が困難である。そこで、新たな判別品種の探索を行った。野菜茶業研究所が保有する標準菌株である結城-01菌と六戸-01菌を用いた接種検定を行い、検定に供試

した市販CRハクサイF₁品種の中から、「うたげ70」と同様に結城-01菌に対して抵抗性、六戸-01菌に対して感受性を示す「スーパーCRひろ黄」を見いだした。「スーパーCRひろ黄」と既報のCRハクサイF₁品種「隆徳」を判別品種に用いることによって、15種類の根こぶ病菌株は、両品種が罹病するグループ1、「隆徳」のみが罹病するグループ2、「スーパーCRひろ黄」のみが罹病するグループ3および両品種が罹病しないグループ4の4グループに分類することができた。

Breeding Science 54: 197-201 (2004)