

リアルタイム PCR を用いたアスパラガス超雄株の迅速な検索法

武藤景子・渡邊洋一・仁井智己・菅野 明*

(福島県農業総合センター・*東北大学大学院生命科学研究所)

A Quick Method of Distinguishing between Male and Super-male Asparagus by Real-time PCR

Keiko MUTOH, Youichi WATANABE, Tomomi NII and Akira KANNO*

(Fukushima Agricultural Technology Centre, *Graduate School of Life Sciences, Tohoku University)

1 はじめに

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は X Y 型の性染色体 (雄 X Y ; 雌 X X) を持つ雌雄異株の植物である。福島県での育種目標の一つに全雄性品種の育成があるが、そのためには花粉親に超雄株 (Y Y) を用いる必要がある。超雄株は結実性雄性株の自殖後代に分離して現れるが、花器の形態では雄株と区別がつかないため、その検索には自殖後代から超雄株を含む雄株を選抜、検定交雑を行い後代の雌雄を観察する必要がある。しかしこの手法では超雄株と判定できるまでに 2 年程度の期間を必要とし、交配や後代の株の栽培といった労力がかかる。

そこで Y 染色体を特異的に検出できるプライマーを基に改変した新規プライマーを利用しリアルタイム PCR 等を行うことで、結実性雄性花の自殖後代から迅速に超雄株を検索する手法を開発したので報告する。

2 試験方法

(1) 供試材料と DNA 抽出

試験にはアスパラガス品種「ハルキタル」を用いた。試験①では性別既知の雄株 6 個体、超雄株 5 個体を、試験②では結実性雄性花の自殖後代より、雌株を除いた 8 個体、及びそれらの交雑後代 88 個体を用いた。

全 DNA の抽出は、ぎ葉 0.1g を液体窒素で凍結粉砕後 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて行った。これを 5ng/ μ l に希釈し以下の試験に供試した。

(2) リアルタイム PCR

iQ SYBR Green Supermix (BioRad 社) を用いたインターカレーター法および検量線法で、MiniOpticon リアルタイム PCR 解析システム (BioRad 社) により、各個体の Y 染色体特異的配列の相対存在量を定量した (1 個体 4 反復)。

(3) 超雄株検索手法の検討 (試験①)

Y 染色体を特異的に増幅するプライマー Asp1-T7spf、Asp1-T7spr²⁾、雌雄に関わらず増幅するコントロール用プライマー AODEFf、AODEFr¹⁾ を用い、雄株から抽出した DNA を鋳型として PCR 反応を行った。増幅断片を精製し塩基配列を決定後、得られた配列内部にリアルタイム PCR 用プライマーを設計した。設計したプライマーを用いてリアルタイム PCR を行った。

(4) 新手法の有用性の検討 (試験②)

リアルタイム PCR を用いて、性別未知のアスパラガスの雄・超雄が判別可能か検討した。また交雑後代について Asp1-T7spf、Asp1-T7spr および AODEFf、AODEFr を用いて雌雄を判定した。

3 試験結果及び考察

(1) 超雄株検索手法の検討 (試験①)

新規リアルタイム PCR 用プライマーを用いてリアルタイム PCR を行うことで、性別既知の雄株と超雄株の判別の可否について調査した。既知超雄株 1 個体で得られた値を 1 としたとき、雄株と超雄株の平均相対値は 0.4 と 1.1 となり、それぞれが持つ Y 染色体の比 1:2 に近いものとなった (図 1)。

このことから、新規プライマーを利用したリアルタイム PCR を行うことで、雄株と超雄株の判別が可能であることが示された。

(2) 新手法の有用性の検討 (試験②)

8 個体についてリアルタイム PCR によりその性別を解析したところ、5 個体を雄株、3 個体を超雄株と判別できた (図 2)。

この判別結果を検証するため、それぞれの個体を花粉親とした交配後代について雌雄を PCR により判定した。

その結果、リアルタイム PCR により雄株と判別された個体の後代には雌雄が混在していた。一方、超雄株とされた個体の後代は全てが雄株であった (表 1)。

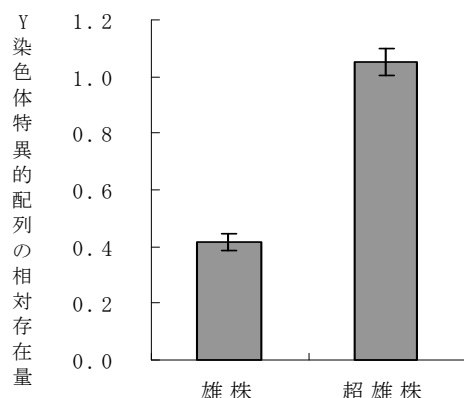


図1 雄株・超雄株でのY染色体特異的配列の相対存在量

注) バーは標準誤差を示す(雄株 n=6 超雄株 n=5)

このことはリアルタイム PCR による雄株・超雄株の判別が正しいことを示しており、従って本手法は有用であると考えられた。

4 まとめ

今回、新規プライマーを用いたリアルタイム PCR を行うことで、迅速に超雄株を検索することが可能となった。

解析に使用する DNA は、播種後 1 ヶ月程度育成した幼苗から抽出するのが、その後の苗の生育に大きな影響を与えず適当であると考えた。そのため従来は 2 年程度かかっていた超雄株の検索期間を大幅に短縮することが可能になる(図 3)。

検索期間の短縮だけではなく、従来の手法で必要だった検定交雑や後代の株の栽培といった労力も軽減できるため、多数の個体を供試することが可能となり得られる超雄株も多くなる。このことにより、従来より高い選抜圧を掛けて得られた超雄株を交配育種の花粉親に供することが可能となり、より優良かつ効率的な全雄性品種の育成に寄与できると考えられる。

引用文献

- 1) Ito, T., Suzuki, G., Ochiai, T., Nakada, M., Kameya, T., Kanno, A. 2005. Genomic organization of the AODEF gene in *Asparagus officinalis* L. Genes Genet. Sys. 80: 95-103.
- 2) Nakayama, H., Ito, T., Hayashi, Y., Sonoda, T., Fukuda, T., Ochiai, T., Kameya, T., Kanno, A. 2006. Development of sex-linked primers in Garden Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Breed. Sci. 56: 327-330.

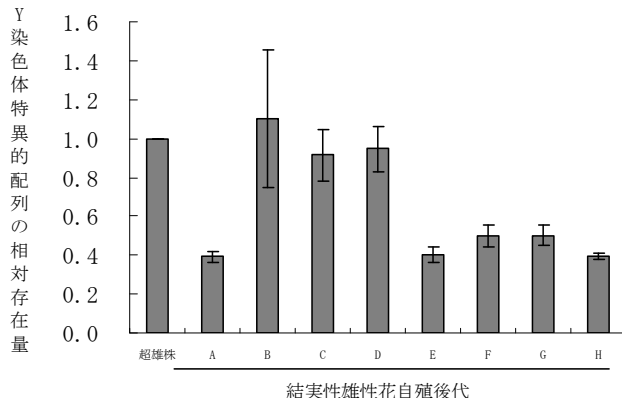


図2 結実性雄性花自殖後代におけるY染色体特異的配列の相対存在量

注) バーは標準誤差を示す (n=4)

表1 検定交雑後代の雌雄判別の結果

結実性雄性花自殖後代	リアルタイムPCRによる性別の判定	後代の雌雄別個体数		
		調査数	雌株	雄株
A	雄	16	9	7
B	超雄	12	0	12
C	超雄	15	0	15
D	超雄	15	0	15
E	雄	14	10	4
F	雄	6	1	5
G	雄	6	4	2
H	雄	4	3	1

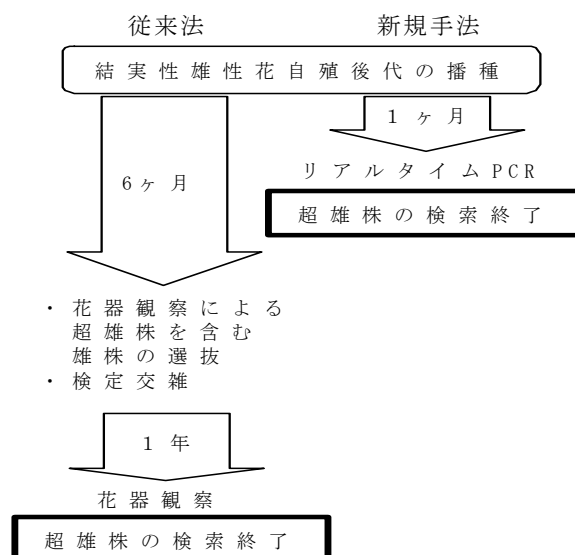


図3 従来法と新規手法での超雄株検索にかかる期間と作業の比較