

# FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法によるアスパラガス 雄性判別 DNA マーカー Asp1-T7 周辺領域の細胞内検出

作物生産学講座 植物機能開発学分野  
横田佳織

(背景と目的) 食用アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) は雌雄異株の植物である。経済栽培では、落下種子による雑草化がないことや、萌芽時期や茎の形状が斉一であることなどから、路地栽培ではもっぱら雄株が利用されている。アスパラガスの性は優性の対立因子によって決定されると考えられているが、性の決定に関わる遺伝子は未だ同定されていない。

アスパラガスの性判別マーカーは数例が報告されているが、広範囲の品種に適用できるものは限られている。Jamsari *et al.* (2004) は、性決定領域を解析する過程で、雄性決定因子と強く連鎖する DNA 領域を増幅する PCR プライマー (Asp1-T7) を見だし、雄性判別に利用できることを報告した。性決定遺伝子と連鎖する領域の *in situ* 検出は、性判別や性の決定に関わる対立遺伝子の組み合わせを知る手段として利用できる。そこで、本研究では Asp1-T7 を含む領域について *in situ* での検出を試みた。

(材料および方法) RNA プローブを用い、FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法により相補的配列を検出した。Asp1-T7 プライマーで増幅される DNA は 434bp であったので、十分な蛍光強度を得るため Asp1-T7 周辺領域の塩基配列の解析を行い、プローブとして利用できる領域を拡張した。そのための DNA には 'Gijnlim' 雄性個体のものを用い、Asp1-T7 に接する未知領域をインバース PCR とカセット PCR により増幅し、塩基配列を決定した。FISH 法には、雌雄混合品種である 'Mary Washington 500W' と 'Welcome', 同型接合雄性系統 'MM' を用い、擬葉組織から EDTA 存在下で単離した細胞核を材料とした。単離した核は、スライドガラスに固定しホルムアルデヒド処理したのち、DIG (Digoxigenin) 標識プローブをハイブリダイズさせた。プローブの検出には抗 DIG 抗体と、Alexa Fluor 標識二次抗体を用い、蛍光顕微鏡下で観察した。

(結果および考察) 本研究によって Asp1-T7 を含む 1176bp の DNA の配列が決定された。この領域をプローブとして用い Asp1-T7 を含む配列を検出したところ、プローブの結合によると推定される輝点が観察された (図 1)。アニーリング温度の上昇により蛍光色素による非特異的反応が低下し、輝点とのコントラストが改善された。今後、プローブの結合および検出の至適条件を検討する必要がある。MW は雌雄混合品種であり、雌雄個体を混合して核を単離する材料としたため、1 個の輝点が観察される核と観察されない核が混在すると想定されたが、実際には複数の輝点を持つ核も観察された。同様に 'MM' で 2 つ以上の輝点を持つ核が観察された。アスパラガスでは生長に伴い核 DNA の倍数が起こることがわかっており、それが輝点数の増加をもたらしている可能性が示唆された。

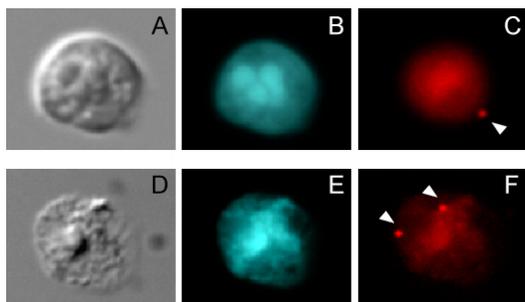


図 1. アスパラガス間期核における Asp1-T7 周辺の DNA 領域の検出

A, B, C は 'Mary Washington 500W'. D, E, F は 'MM'. A と B は微分干渉画像, B と E は DAPI 染色画像, C と F はプローブの分布(矢じりは輝点を示す). A, B, C と D, E, F はそれぞれ同一視野の画像.