

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06016

研究課題名(和文) 四倍体バラ交雑集団を活用した有用形質判別DNAマーカー開発系の確立

研究課題名(英文) Development of the DNA markers associated with the agronomically important traits in rose using a tetraploid population

研究代表者

太田垣 駿吾 (Otagaki, Shungo)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：50597789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、4倍体バラ交雑集団を用いたゲノムワイド相関分析によるトゲ形成関連遺伝子の染色体座乗領域の同定と花弁形状に関する遺伝解析の実施可否の検討を行った。前者については、GRAS-Di法によりゲノムワイドな一塩基多型マーカーを取得し、節間に形成されるトゲの密度との相関分析を実施した結果、節間にトゲを形成する親品種側の遺伝子型に偏った一塩基多型が複数存在するピーク領域を第3染色体上に同定した。後者についてはセミランドマーク法と主成分分析により花弁形状(丸弁と剣弁)の差異を定量可能であることを示すとともに、交雑集団の花弁形状の定量結果から、花弁形状は量的な遺伝形質であることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では交雑集団を用いたアソシエーション解析によりトゲの有無と強い相関を示す染色体領域を見出し、今後の研究の進展によりトゲ形成制御遺伝子の単離と機能解析を達成することができれば研究領域に非常に強いインパクトを与えることができると期待される。また、この染色体領域についてトゲの形成頻度が多い既存バラ品種と形成頻度が非常に少ない既存バラ品種を用いてDNA配列の比較解析を実施することで、トゲなしバラの効率的な育種に繋がるDNAマーカーの開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we performed the genome-wide association analysis (GWAS) of the prickle density. We also investigated whether we can perform the GWAS of the petal shape in rose by using a tetraploid population. For the former, the GWAS showed a peak on chromosome three, and single nucleotide polymorphisms in this region tend to be biased to the prickles-formed 'PEKcougel' allele. For the latter, we demonstrated that the differences in a petal shape (pointed tip and rounded) could be measured by applying a semi-landmark method and the principal component analysis. We speculated that a petal shape could be a quantitative trait from our tetraploid population's segregation analysis of the petal shapes.

研究分野：園芸作物を特徴付ける諸形質の組織化学的・遺伝学的・分子生物学的解析と農業生産への応用

キーワード：バラ トゲ 花弁形状 次世代シーケンサー GRAS-Di アソシエーション解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バラは切り花類においてキクとユリに次ぐ第三の国内産出額を誇る日本を代表する花きであるものの、その出荷量は1999年をピークに減少傾向にある。また、近年では安価な外国産バラ切り花の輸入量も増大しており、本研究を開始した当時は国内バラ産業の維持と活性化を促すような高い商品性を持つ新規バラ品種の育成が強く望まれていた。しかしながら栽培バラの交配親に用いられる個体の大部分は四倍体でゲノムのヘテロ性も高いことから、交配時に後代個体の表現型を予測することは非常に困難であり、新品種の育成は育種家の経験的な勘や偶然に頼っていた。このような問題点はDNAマーカーの活用により解決可能と考えられるが、バラでは多くの有用形質の原因遺伝子が未同定であり、幼植物体期に形質を予測可能なDNAマーカーもごくわずかししか開発されていなかった。そこで本研究では『バラの有用形質をいかに高精度にマッピングし、育種に利用可能なDNAマーカーの開発に繋げていくのか』という課題の解決を目指し、研究分担者が作出した大規模バラ交雑集団を活用したトゲ形成と花卉の形状差異に関する遺伝解析を実施した。

2. 研究の目的

第1の目的として、茎の節間にトゲを形成する切り花用バラ品種‘PEKcougel’と茎の節間にトゲを形成しないノイバラの倍加2倍体‘松島3号’との交雑に由来するバラ交雑集団を用いた塩基多型と表現型(節間に形成されるトゲの密度)の相関分析によるトゲ形成制御遺伝子座乗領域の同定を掲げた。また、‘PEKcougel’と‘松島3号’との間で花卉形状に差異が見られたことから、花卉形状の計測手法の確立と遺伝解析の実施可能性の検討を第2の目的に掲げた。

3. 研究の方法

(1) 節間に形成されるトゲの形態的特徴付け

‘PEKcougel’のシュートをサンプリングし、トゲの徒手切片観察と走査型電子顕微鏡観察を実施した。また、‘PEKcougel’と倍加2倍体‘松島3号’との交雑に由来するF₁個体 No.1のシュートをサンプリングし、葉とトゲの形成位置の関係性を調査した。

(2) ゲノムワイドな一塩基多型マーカーの収集

NucleoSpin Plant II (TaKaRa) を用い、‘PEKcougel’、倍加2倍体‘松島3号’、両者の交雑に由来する2つのF₁個体 (No. 5 と No. 6)、ならびに2つのBC₁F₁集団 (m × 5, 59 個体 ; m × 6, 77 個体) からゲノムDNAを抽出した。続いて得られたDNAを基にGRAS-Diライブラリを作成し、ペアエンド、100サイクルの条件でHiseq4000 (illumina) によるシーケンス判読を実施した。得られたシーケンスデータについてTrimmomaticによるアダプター配列の除去と低クオリティリードのフィルタリングを実施し、Bowtie2を用いてOBDHもしくはRosa chinensis Homozygous Genome v2.0 (以下、RcHm) ヘリッドをマッピングした。その後、samtools mpileup, VarScan2, およびvcftoolsを用いて一塩基多型マーカーを抽出した。

(3) 節間に形成されるトゲの数と一塩基多型マーカーの相関分析

BC₁F₁集団 m × 5 および BC₁F₁集団 m × 6 について、1個体あたり3枝5節、合計15節に形成されたトゲ数を調査し、ngsAssocPolyを用いて1節間あたりの平均トゲ数と前項で抽出したゲノムワイドな一塩基多型マーカーとの相関分析を実施した。

(4) 花卉形状の評価手法の確立

‘PEKcougel’と倍加2倍体‘松島3号’、ならびに花卉形状が異なる10品種から満開期の花器官をサンプリングし、1花あたり最大15枚の花弁の画像を取得した。取得画像のトリミングと向き調整を行った後、ChainCoderを用いた楕円フーリエ変換による輪郭データの取得と主成分分析、もしくはtpsDig2を用いたセミランドマーク法による輪郭データの取得とMorphoJを用いた主成分分析を行った。同様に‘PEKcougel’と倍加2倍体‘松島3号’の交

雑に由来する F₂ 集団と BC₁F₁ 集団についても花卉輪郭データの取得と主成分分析を実施した。

4. 研究成果

(1) 節間に形成されるトゲの形態的特徴付け

‘PEKcougel’ のシュートの節間には大きく鋭いトゲと密集して存在する小さなトゲの2種類が観察された。このうち大きく鋭いトゲについては徒手切片観察により、基部に離層様組織が観察された。一方、走査電子顕微鏡により密集して存在する小さなトゲの形態を観察した結果、トゲの先端部に分泌腺のような構造物が観察された(図1)。これらの結果は、バラのトゲは腺状突起の構造変化により生じるという多くの研究者に支持されてきた通説を覆すような知見に繋がる可能性が高いと考えられた。また、大きく鋭いトゲについては大部分が節間の上位葉を基準に±60 付近に高頻度で形成されていることが明らかとなり、トゲ原基の発生は葉原基の発生と類似した機構により制御されている可能性も示唆された。

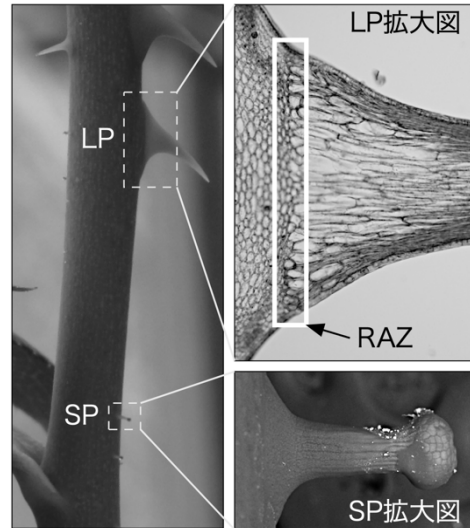


図1 ‘PEKcougel’に形成されるトゲの特徴 (A) ‘PEKcougel’の茎に形成される大きなトゲ(LP)と腺状突起様の小さなトゲ(SP)。右上の画像は大きなトゲの切片写真を、右下の画像は小さなトゲの走査型電子顕微鏡写真を示す。RAZは大きなトゲの基部に存在する離層様組織を示す。

(2) 節間に形成される大きなトゲの密度と一塩基多型マーカーの相関分析

GRAS-Di解析の結果、BC₁F₁ 集団 m×5 では個体平均で約 152 万本、解析全体で約 9,000 万本のリードが、BC₁F₁ 集団 m×6 では個体平均で約 93 万本、集団全体で約 7,130 万本のリードが得られた。2つの参照配列(OBDHとRcHm)の間でフィルタリング後のリードのマップ率に顕著な差は見られず、BC₁F₁ 集団 m×5 では0.83、BC₁F₁ 集団 m×6 では0.87であった。また、前者の集団からは約30,000個、後者の集団からは約38,000個の一塩基多型マーカーが抽出された。続いて節間に形成された平均トゲ数(トゲの密度)とゲノムワイドな一塩基多型マーカーとで相関分析を実施したが、BC₁F₁ 集団 m×6 についてはどちらの参照ゲノムを用いた場合でも半数程度の一塩基多型で $-\log(p)$ 値が10を超え、形質と有意な相関を示す一塩基多型が密集したピーク領域の検出には至らなかった。一方でBC₁F₁ 集団 m×5 については2つの参照配列とともに第3染色体上に形質と有意な相関を示す一塩基多型が密集したピーク領域が検出された(図2)。また、検出されたピーク領域内に存在する一塩基多型の遺伝子型を調査した結果、節間にトゲを形成するBC₁F₁ 個体はトゲあり形質を示す‘PEKcougel’に由来する一塩基多型を有する傾向を示すことが明らかとなった。

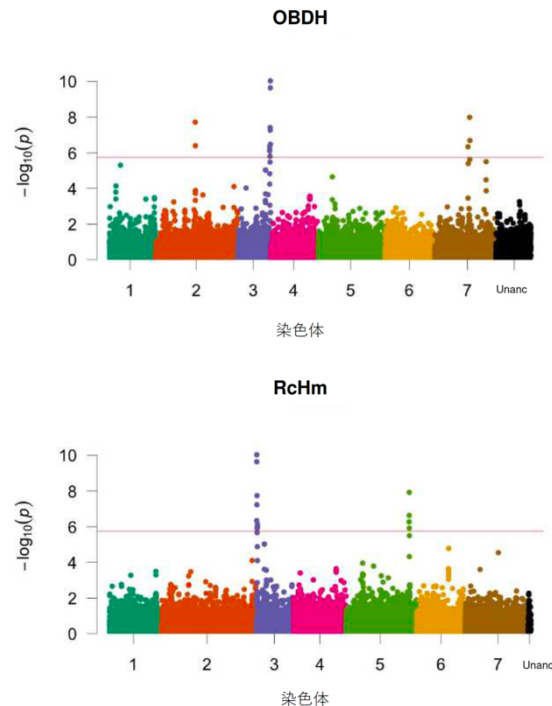


図2 BC₁F₁ 集団m×5を用いた節間に形成されるトゲ密度の相関分析
OBDH: Rosa chinensis Genome v1.0; RcHm: Rosa chinensis 'Old Blush' homozygous Genome v2.0. 第3染色体について、OBDHとRcHmは逆向きにアセンブルされている。

(3) 花卉形状の評価手法の確立

交雑集団の交配親として用いられた倍加2倍体‘松島3号’は丸弁とよばれる花卉外縁部が滑らかな弧を描く花卉形状をとるのに対し、‘PEKcougel’は剣弁とよばれる背軸面側への屈曲により先端が尖って見える花卉形状をとる。本課題ではこの花卉形状の差異が遺伝形質であるか否かを明らかにするため、まず花卉の輪郭形状の定量評価手法の確立を試みた。‘PEKcougel’

と倍加2倍体‘松島3号’，ならびに東山植物園に植栽されていた花卉形状の異なる10種類のバラ品種を用い，楕円フーリエ変換解析により取得した花卉輪郭データに基づく主成分分析を行った結果，寄与率66.1%の第1主成分と寄与率15.1%の第2主成分，寄与率5.3%の第3主成分が検出された．しかしながら，それぞれの主成分から輪郭を再構築した結果，第1主成分は花卉の縦横比の違いを検出していると考えられ，剣弁と丸弁の形状差異の検出には適さないと判断された．一方，セミランドマーク法で取得した花卉輪郭データに基づく主成分分析では丸弁と剣弁の差異に起因すると判断される第1主成分（寄与率68.4%）と第2主成分（寄与率14.4%）が検出された．この結果から，セミランドマーク法による輪郭抽出と主成分分析により花卉形状の差異を定量可能であると判断し， F_2 個体集団と BC_1F_1 集団についてこの手法を適用した結果，全ての集団において第1主成分得点は連続的な分布を示した．このことから，丸弁と剣弁という花卉形状の差異は量的な形質であることが示唆された．バラはどのような環境条件下におかれても開花に至らない幼若性を有しており，本解析を実施した時点では相関解析を実施可能な開花個体数の獲得には至らなかった．今後集団を維持していく過程で開花個体数の増加が見られた場合，トゲの密度と同様に相関分析を行うことで花卉形状を制御する遺伝子が座乗する染色体領域の同定が可能となり，形質判定用 DNA マーカーの開発に繋がると期待された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura N., Hirakawa H., Sato S., Otagaki S., Matsumoto S., Tabata S., Tanaka Y.	4. 巻 1232
2. 論文標題 Identification of the genes that regulate ornamental characters using theRosa multifloragenome database (http://rosa.kazusa.or.jp/)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Horticulturae	6. 最初と最後の頁 111-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17660/ActaHortic.2019.1232.18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wu W., Ochiai M., Nakatsuka T., Yamada K., Fukui H.	4. 巻 90
2. 論文標題 Evaluation of Crown Gall Disease Resistance in Hybrids of Rosa 'PEKcougel' and Tetraploid of R. multiflora 'Matsushima No. 3'	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 122-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.UTD-229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawamura K., Ueda Y., Matsumoto S., Horibe T., Otagaki S., Wand L., Wang G., Oyang LHS., Foucher F., Linde M., Debener T.	4. 巻 9
2. 論文標題 The identification of the Rosa S-locus provides new insights into the breeding and wild origins of continuous-flowering roses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 uhac155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hr/uhac155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林宏輔, 平石昌太郎, 落合正樹, 白澤健太, 磯部祥子, 白武勝裕, 松本省吾, 太田垣駿吾
2. 発表標題 四倍体バラ交雑集団へのゲノムワイド関連解析の適用
3. 学会等名 令和3年度園芸学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平石昌太郎, 長和宏, 落合正樹, 磯部祥子, 白武勝裕, 松本省吾, 太田垣駿吾
2. 発表標題 パラのトゲ形成関連遺伝子同定に向けた形成様式とトゲ原基の探索
3. 学会等名 令和3年度園芸学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林宏輔, 落合正樹, 白武勝裕, 松本省吾, 太田垣駿吾
2. 発表標題 画像解析によるパラ花卉形状の定量評価
3. 学会等名 令和3年度園芸学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	落合 正樹 (Ochiai Masaki) (80755827)	岐阜大学・応用生物科学部・助教 (13701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------