

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850018

研究課題名(和文)キク属野生種を用いた遺伝解析基盤の構築と花序形態の分子遺伝学研究

研究課題名(英文)Molecular basis construction and genetic analysis of wild Chrysanthemum species

研究代表者

中野 道治(Nakano, Michiharu)

広島大学・理学研究科・特任助教

研究者番号：40705159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：二倍体野生ギクを用いた分子遺伝学基盤の構築と形質遺伝子座のマッピングを行った。自家和合性系統AEV2の自殖を進めることで自殖第7代の純系化系統を作出し、SSRマーカー及びRAD-seq解析により純系化が進行していることが確認された。キクタニギクとリュウノウギクの交雑に由来する戻し交雑集団を用いて連鎖地図構築とQTL解析を行った結果、第7連鎖群上に開花日に関連するQTLが検出された。キク属二倍体野生種を用いてRAD-seq解析により系統解析を行ったところ、キクタニギクとリュウノウギクが区分され、更にキクタニギクは産地ごとに概ね区分された。

研究成果の概要(英文)：Molecular genetic tools for diploid Chrysanthemum species were constructed. 1) Self-fertile AEV2 derived model strain was developed by seven generations of selfing. This strain produces high number of seeds by selfing, has almost completely homozygous genotype evaluated by SSR markers and RAD-seq. 2) Genetic linkage map for BC1 population derived from a cross between *C. seticuspe* and *C. makinoi* was constructed by RAD-seq genotyping. By QTL analysis, one QTL relating to flowering day was mapped on linkage group 7. 3) Phylogenetic tree for diploid chrysanthemum species was constructed by RAD-seq. In the tree, *C. seticuspe* strains grouped basically by its locality.

研究分野：園芸育種

キーワード：野生ギク RAD-seq解析 マッピング

1. 研究開始当初の背景

我々のグループでは二倍体野生種のキクタニギクから自家和合性系統 AEV2 を発見し、遺伝解析への活用を試みている。キクタニギクは散房状の花序を持つのに対して、別の二倍体野生種であるリュウノウギクは単生的な花序を持つ。この F1 では中間的な花序の形態となり、F2 世代、リュウノウギク BC1F1 世代では、散房型と単生型の両方が出現することから、単純な遺伝様式であることが推定され、分子遺伝学的研究が可能と考えられた。キクにおいては、本研究の開始時点でゲノム配列、連鎖地図は公開されておらず、分子遺伝学研究基盤の開発とその活用による重要形質遺伝子座の検出を目指した。

2. 研究の目的

栽培ギクは花き生産において最重要品目の一つであるが、自家不和合性・高次倍数性が存在するため遺伝解析の例は少ない。我々はキクタニギク ($2n=2x=18$) の野生集団から自家和合性の二倍体系統 AEV2 を発見したが、遺伝解析に活用するためには基盤構築が必要となる。本研究では、AEV2 の持つ自家和合性遺伝子を利用して純系化を進めた系統を作出すると共に、純系化系統を活用した遺伝解析基盤の構築、重要形質のマッピングを試みる。特に次世代シーケンズを用いた多型解析を行うことで効率的な形質マッピングを目指す。

3. 研究の方法

1) 純系化系統の作出

AEV2 は自家和合性であり、開花時に交配袋をかけて外部の花粉を遮断することで自殖種子を得ることができる。この性質を利用して自殖を進め、自殖第 6 代を得た。自殖第 6 代系統から種子形成能力、形態特性に優れる系統を選抜し、自殖第 7 代においてモデル系統とした。

2) RAD-seq 解析

CTAB 法により抽出したゲノム DNA を用いて EcoRI/BglII ライブラリーを作成し、HiSeq2000 を用いて塩基配列を決定した。各系統に対するバーコード付加、1 ランあたり 96 サンプルの解析によりデータを得た。配列データは、キクタニギク自殖第 5 代系統を用いて解析の進められたゲノム配列 CSE1.0 をリファレンス配列として解析を進めた。Bowtie2 を用いたマッピング、SAMtools を用いて、データ変換の後、mpileup による変異検出を行い、BCFtools を用いてデータファイルを結合した。結合されたファイルから VCFtools 及びエクセルを用いてデータの絞り込みを行った。

AEV2 自殖後代でのヘテロ率の減少

AEV2 及びその後代系統において、AEV2 がヘテロで有し、後代系統 18 系統においてヘテロ型の検出頻度が 80%未滿となる多型を絞り込んだ。抽出データの中から、ヘテロで検出される多型の割合を調べた。同様にキク EST 配列に基づき設計された SSR マーカーを用いてヘテロ率を調べた。

リュウノウギク BC1 集団を用いた連鎖地図構築と形質マッピング

分離集団はリュウノウギク × キクタニギクの F1 系統である X3RU12 と戻し交雑親として用いたリュウノウギク ABP23 の交雑に由来する。そのため、X3RU12 がヘテロ型、ABP23 がホモ型となる遺伝子座を絞り込み、これらをマーカーとして用いた。マーカーとしては、研究期間中に利用可能となった SSR マーカー及び TFL 遺伝子をランドマークとして使用した。マーカーデータは AntMap を用いて、LOD5 を閾値としてグループ化し連鎖地図を構築した。表現型評価は 2014 年度から 3 年間に渡り、花序の形態、開花日を評価した。花序の形態については、達観により単生型と散房型に区分した場合と、分枝当た

りの花数を評価した。作成された連鎖地図を用いて、花数と開花日について R/QTL を用いて single-QTL genome scans による QTL 解析を行った。

キク属二倍体種を用いた系統解析
日本国内より収集されたキクタニギク 9 系統、リュウノウギク 3 系統を解析に用いた。これらの系統において最大のアレル数 2、25%以上の系統で検出された SNP を解析対象とした。VCF ファイルは PGDspder を用いて Phylip 形式に変換し、MEGA5 を用いて NJ 法により系統樹を作成した。

4. 研究成果

1) モデル系統の作出

自家和合性変異体 AEV2 から自殖を繰り返した結果、世代を進めるにつれて種子結実の悪い系統や、葉形態の乱れる系統などが出現し、自殖弱勢と思われる現象が認められた。第 6 代において選抜を行ったところ、形態的特性の優れた 2 系統が最終的な候補となった。この内、頭状花当たり 20 種子程度を形成し、舌状花の形態が良い系統をモデル系統として選び Goj-0 と命名した。



図 1 モデル系統 Goj-0 の形態的特性

2) RAD-seq 解析

AEV2 自殖後代での純系化の評価

AEV2 から自殖が進行するに従いヘテロ率が減少していると考えられる。この検証を SSR マーカー、RAD-seq 法により試みた。SSR マーカーを用いてヘテロ率を調べた結果、AEV2 では 100%、自殖第 1 代で 50%、第 4 代で 28.1%、第 5 代で 12.5%、第 6 代で 6.25%、第 7 代で 0%となっており、世代の進行に伴い純系化が進んでいることが確認された。同様に RAD-seq 解析で調べたところ、AEV2 では 100%、自殖第 1 代で 71%、第 4 代で 40%、第 5 代で 19%、第 6 代で 12%、第 7 代で 4%となっており、SSR マーカーよりは高い値となる傾向があったが、世代の進行に伴ってヘテロ率が低下していることが確認された。これらの結果は、自殖に伴いゲノム全体の純系化が進行していることを示す。

リュウノウギク BC1 集団を用いた連鎖地図構築

分離集団全体では 20207 個の SNP が検出された。この内、X3RU12 がヘテロ、ABP23 がホモとなるマーカーは 458 個あり、これらを用いて連鎖地図構築を行ったところ、LOD=5 を閾値として、8 連鎖群、135 マーカー、455.5cM からなる連鎖地図が作成された。(図 2)。作成された連鎖地図に形質をマッピングするため、花序の形態、開花日について、連鎖解析、QTL 解析を行った。花序の形態については、達観評価、分枝数当たりの花数の両者について関連する遺伝子座を検出することはできなかった。一方、開花日については、集団内で最も早いものから遅いものまで 10 日程度しか差が見られなかったが(図 3)、第 7 連鎖群上に QTL が検出された(図 4)。

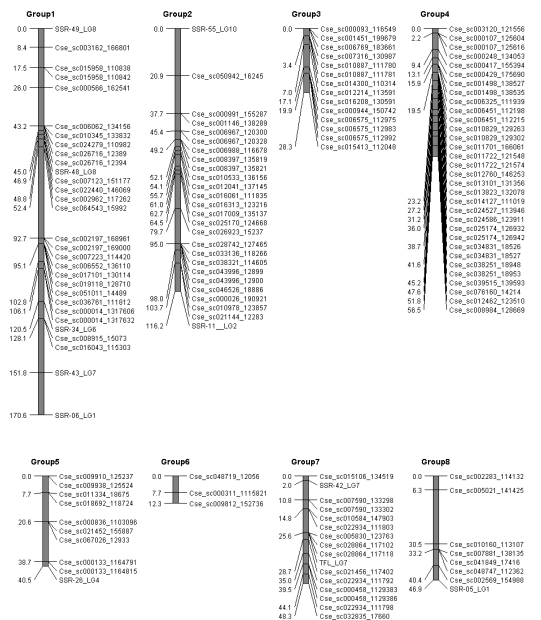


図2 作成された連鎖地図

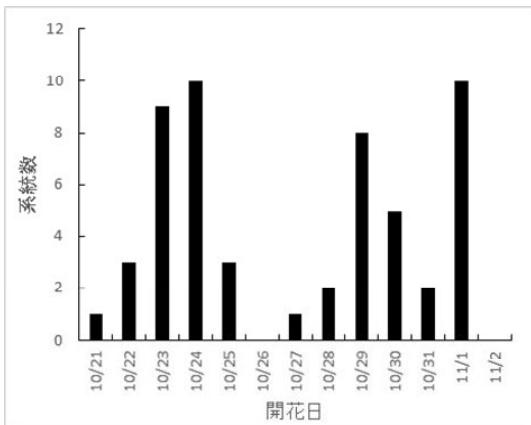


図3 BC1 集団における開花日の分布

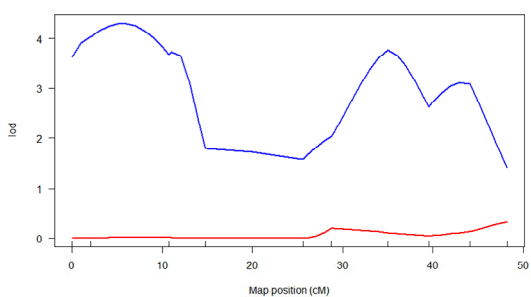


図4 第7連鎖群に検出された開花日に関連するQTL。Single QTL genome scanの結果を青線ですす

キク属二倍体種を用いた系統解析
 日本国内に分布するキクタニギク及びリュウノウギクを用いてRAD-seq解析を行い系統樹を作成した。キクタニギクとリュウノウギクに区別され、キクタニギクは主に山口以西と近畿のクレードに区別された。自家和合性系統である AEV2 が採取された奈良県の産地 (AEV) から採取された 3 系統は、系統樹内において離れて位置し、この産地では遺伝的多様性が高いと考えられた (図5)。

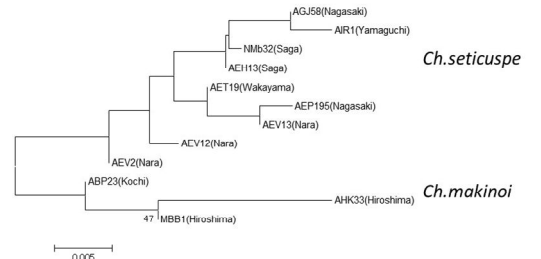


図5 二倍体野生ギクの系統樹

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)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

1. 中野道治・谷口研至・八木雅史・住友克彦・久松完・磯部祥子・草場信、キク属モデル系統の開発とその利用、園芸学会平成 28 年度春季大会、2016-03-26 - 2016-03-27、東京農業大学 (神奈川県・厚木市)

2. Michiharu Nakano, Kenji Taniguchi, Makoto Kusaba A self-fertile diploid Chrysanthemum: a model plant line in Anthemideae released from National Bio-Resource Project Chrysanthemum, ISHS II International Symposium on Pyrethrum, 2015-08-06 - 2015-08-09 京都大学 (京都府・京都市)

3. 中野道治・谷口研至・草場信、自家和合性キクタニギクを用いた分子遺伝学研究リソースの開発、園芸学会平成 27 年度春季大会、2015-03-28 - 2015-03-29、千葉大学 (千葉県千葉市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 道治 (Nakano Michiharu)
広島大学・理学研究科・特任助教
研究者番号：40705159

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()