

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780033

研究課題名(和文)高精度マッピングによるリンゴのカラムナー遺伝子の探索と選抜マーカーの開発

研究課題名(英文) Fine mapping of the Co gene and development of DNA markers controlling columnar growth habit in apple

研究代表者

岡田 和馬 (OKADA, Kazuma)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・リンゴ研究領域・主任研究員

研究者番号：10547722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：リンゴ品種‘McIntosh’の枝変わりとして発見された‘Wijcik’は、節間が短く、側枝がほとんど発生しないため、細長い円柱状の樹形に生長する。この性質はカラムナー性と呼ばれ、単一の優性遺伝子Coに制御される。本研究では、高精度マッピングによりCo遺伝子と完全連鎖する3つのDNAマーカー(Mdo.chr10.12, 10.13, 10.14)を見出し、Mdo.chr10.12と10.14が信頼性の高いカラムナー性選抜マーカーとして利用できることを示した。また、Co遺伝子座乗領域をDNAマーカー11-1と14-3の間に絞り込み、Co遺伝子座乗領域に挿入変異が生じていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Apple cultivar 'Wijcik' is a columnar mutant of 'McIntosh'. Columnar growth habit of 'Wijcik' is characterized by compaction of the internodes and reduced lateral shoot growth, and controlled by a single dominant gene, Co, on linkage group 10. In this study, we identified three SSR markers (Mdo.chr10.12, 10.13 and 10.14) that co-segregated with Co by fine mapping. Mdo.chr10.12 and 10.14 are well suited for marker-assisted selection because the sizes of the alleles linked to Co are different from those found in common ancestors of current apple breeding germplasm. We delimited the Co region between SSR markers 11-1 and 14-3, and identified an insertion mutation in the Co region.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：リンゴ 枝変わり 樹形 カラムナー マッピング BACライブラリー 挿入変異

1. 研究開始当初の背景

リンゴ品種‘McIntosh’の枝変わりとして発見された‘Wijcik’は、節間が短く、側枝がほとんど発生しないため、細長い円柱状の樹形に生長する。この性質はカラムナー性と呼ばれ、樹形が単純でコンパクトになるので、せん定や収穫作業の省力化が可能になると期待されている。

カラムナー性は単一の優性遺伝子 Co に制御されることから、果樹研究所では1987年よりカラムナー性を備えた良食味リンゴの育種を開始し、有望系統を選抜中である。一方、カラムナー性の表現型の評価には播種後3年程度を要することが問題となっており、育種を効率化するためにはカラムナー性の選抜マーカーを開発する必要がある。

我々はこれまでに、 Co 遺伝子を第10連鎖群上部のSSRマーカーCH03d11とHi01a03の間にマッピングするとともに、これらのSSRマーカーを用いたカラムナー個体の幼苗選抜法を開発している (Moriya et al. 2009)。しかし、これらのSSRマーカーは「 Co 遺伝子と離れていて選抜の精度が低い」、‘McIntosh’と‘Wijcik’の染色体を識別できないので、祖先や親に‘McIntosh’を用いた集団には適用できないことが問題となっており、より密接に連鎖したマーカーの開発並びに原因遺伝子の同定が求められている。

2. 研究の目的

リンゴ生産の省力化を可能にすると期待されるカラムナー性を有したリンゴを効率的に選抜・育成するため、 Co 遺伝子のファインマッピングを行い、 Co 遺伝子を探索・同定することにより、精度の高いカラムナー個体の選抜マーカーを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Co 遺伝子のファインマッピング

カラムナー品種・系統 (Co/co) と普通樹形品種・系統 (co/co) の交雑により得られた実生集団を供試した。表現型 (カラムナー樹形 or 普通樹形) は、接ぎ木2年生以上または自根5年生以上に達したところで判定した。

リンゴの公開ゲノム配列から Co 遺伝子近傍にSSRマーカーを設計し、‘ふじ’ (co/co) × 5-12786 (Co/co) の F_1 集団68個体を用いてマッピングを行った。連鎖解析にはJoinMap v4.0を使用し、シュードテストクロス法によって連鎖地図を作製した。

SSRマーカーCH03d11とHi01a03の間で、 Co 遺伝子と相引に連鎖する染色体が組換えを起こした個体 (組換え個体) を、実生集団の中からスクリーニングした。SSRマーカーMdo. chr10.7と10.26の間に位置するSSRマ-

ーカーを用いて、これら組換え個体の遺伝子型を解析し、表現型と対応させた。

(2) Co 遺伝子座乗領域のクローニング

カラムナー品種‘Telamon’ (Co/co) の葉から粗核画分を調製後、高分子量DNAを抽出し、HindIIIで部分消化した後、パルスフィールド電気泳動で分離した。2種類の分画のDNAをゲルから切り出し、それぞれ pIndigoBAC-5 vector (Epicentre) にライゲーションした後、大腸菌株DH10Bに形質転換し、384穴プレートにグリセロールストックした。平均インサートサイズは、BACプラスミドをNotIで切断後、パルスフィールド電気泳動を行い、算出した。

BACライブラリーのスクリーニングには、SSRマーカー11-1を使用した。

(3) Co と co 遺伝子座乗領域のゲノム構造の比較

SSRマーカーCH03d11とHi01a03を用いて、5-12786 (Co/co) × ‘Wijcik’ (Co/co) の F_1 集団から Co 遺伝子座乗領域がホモ型になった個体 (Co ホモ個体) と、‘McIntosh’ (co/co) × ‘きたかみ’ (co/co) の F_1 集団から‘McIntosh’由来の co 遺伝子座乗領域がホモ型になった個体 (co ホモ個体) を選抜した。SSRマーカーとBAC末端配列からプライマーを設計し、 Co と co ホモ個体のゲノムDNAを鋳型にLong PCRを行った。Long PCR断片をクローニング後、プライマーウォーキングにより塩基配列を決定した。

4. 研究成果

(1) Co 遺伝子のファインマッピング

SSRマーカーCH03d11とHi01a03の間に位置するリンゴの公開ゲノム配列から新たに28個のSSRマーカー (Mdo. chr10.1~10.27, 10.34) を設計し、‘ふじ’ × 5-12786 の F_1 集団の連鎖解析を行った。その結果、13個のSSRマーカーを第10連鎖群に位置付けることができ、 Co 遺伝子はSSRマーカーMdo. chr10.7と10.26の間に座乗することが明らかになった (図1)。

Co 遺伝子のファインマッピングを行うため、SSRマーカーCH03d11とHi01a03の間で、 Co 遺伝子と相引に連鎖する染色体が組換えを起こした個体 (組換え個体) を探し、58個体を見出した。Mdo. chr10.7と10.26の間に位置するSSRマーカーを用いて、これら組換え個体の遺伝子型を解析し、表現型と対応させたところ、3つの組換え個体 (9, 7-4121, 7-4189) の情報から、 Co 遺伝子はSSRマーカーMdo. chr10.11と10.15の間に座乗することが明らかになった。 Co 遺伝子の座乗領域をさらに絞り込むため、新たに設計したSSRマーカー11-1と14-3

を用いて、3つの組換え個体（9, 7-4121, 7-4189）の遺伝子型を解析し、表現型と対応させたところ、*Co*遺伝子はSSRマーカー11-1と14-3の間（リンゴの公開ゲノム配列に換算して約180 kb）に座乗することが明らかになった（図2）。

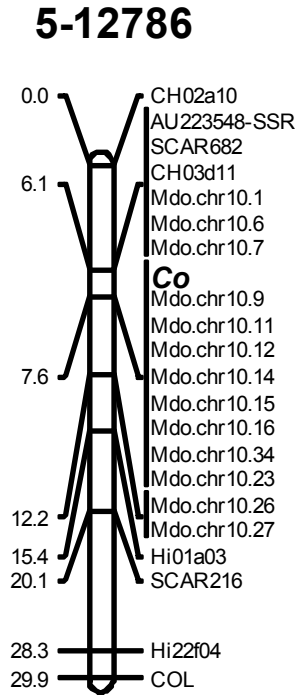


図1 ‘ふじ’ × 5-12786 の F₁ 集団から作成した 5-12786 第10連鎖群の連鎖地図

表現型と完全連鎖する3つのSSRマーカー（Mdo.chr10.12, 10.13, 10.14）のうち、Mdo.chr10.12と10.14において検出される*Co*と相引に連鎖するアリルは、日本のリンゴ品種の祖先である‘Golden Delicious’, ‘Delicious’, ‘Jonathan’, ‘Ralls Janet’, ‘Worcester Pearmain’, ‘Cox’s Orange Pippin’, ‘McIntosh’のうち、‘McIntosh’以外の品種において出現しないため、単独で使用しても信頼性の高いカラムナー性選抜

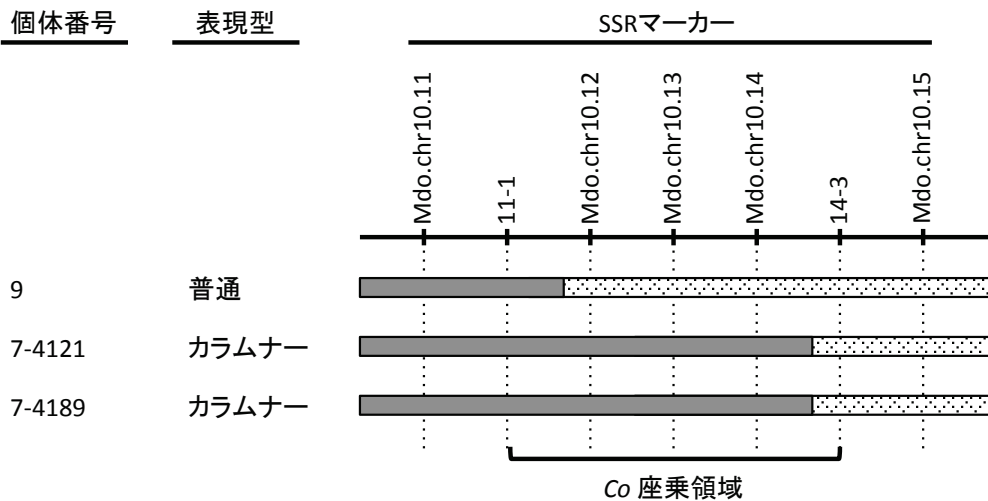


図2 *Co*遺伝子周辺で染色体の組換えを起こした個体の染色体構成
 ■: *Co*と相引に連鎖する染色体, □: *co*と相引に連鎖する染色体

マーカーとして利用できる。

(2) *Co* 遺伝子座乗領域のクローニング

ファインマッピングで絞り込んだ領域をクローニングするため、カラムナー品種‘Telamon’からBACライブラリーを作製した。分画1のDNAから作製したライブラリーは49,152クローン、分画2のDNAから作製したライブラリーは3,840クローンから構成されており、平均インサートサイズは分画1のライブラリーが166 kb、分画2のライブラリーが153 kbであった。リンゴのゲノムサイズは約750 Mbであることから、作成した分画1及び分画2のライブラリーはそれぞれ10.9ゲノムと0.8ゲノムに相当し、リンゴゲノムの99%以上をカバーしていると考えられた。

SSRマーカー11-1を用いてBACライブラリーをスクリーニングした結果、*Co*と相引に連鎖する領域を含むクローンが7個単離された。

(3) *Co*と*co*遺伝子座乗領域のゲノム構造の比較

SSRマーカーとBAC末端配列からプライマーを設計することができた*Co*遺伝子座乗領域内の5つの領域（R1~R5）に対し、*Co*ホモ個体と*co*ホモ個体のゲノムDNAを鋳型にしてLong PCRを行った。R1, R3~R5領域では*Co*ホモ個体と*co*ホモ個体から増幅された断片長に大きな違いは見られなかったが、R2領域では*Co*ホモ個体から約16 kbの断片が、*co*ホモ個体から約8 kbの断片が増幅された。16 kbと8 kb断片の塩基配列を決定し比較したところ、*Co*ホモ個体にはLTR型レトロポゾンと考えられる約8 kbの配列が挿入されていることが明らかになり、この挿入変異がカラムナー性変異の原因である可能性が高いと考えられた。この挿入変異を利用することにより、カラムナー個体を効率的に選抜できるDNAマーカーを開発することができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

- ① Shigeki Moriya, Kazuma Okada, Takashi Haji, Toshiya Yamamoto, Kazuyuki Abe. Fine mapping of *Co*, a gene controlling columnar growth habit located on apple (*Malus x domestica* Borkh.) linkage group 10. Plant Breeding 131: 641-647 (2012)
査読有
DOI:10.1111/j.1439-0523.2012.01985.x

〔学会発表〕（計3件）

- ① 岡田和馬, 森谷茂樹, 藤澤弘子, 呉健忠, 片寄裕一, 藤井浩, 寺上伸吾, 山本俊哉, 阿部和幸. リンゴのカラムナー性を制御する *Co* 遺伝子座乗領域における挿入変異の同定. 園芸学会平成26年度春季大会, 2014年3月29-30日, 筑波大学
- ② 岡田和馬, 森谷茂樹, 藤澤弘子, 呉健忠, 片寄裕一, 寺上伸吾, 山本俊哉, 阿部和幸. リンゴのカラムナー性を制御する *Co* 遺伝子座乗領域のクローニング. 園芸学会平成25年度秋季大会, 2013年9月20-22日, 岩手大学
- ③ 森谷茂樹, 岡田和馬, 土師岳, 山本俊哉, 阿部和幸. リンゴカラムナー性原因遺伝子 *Co* のファインマッピング. 平成24年度果樹バイテク研究会, 2012年10月1-2日, 弘前商工会議所会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 和馬 (OKADA, Kazuma)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・リンゴ研究領域・主任研究員
研究者番号: 10547722