

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07293

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによるピワ連鎖地図の構築と果実形質等を選抜できるマーカーの獲得

研究課題名(英文)Construction of a High-Density Linkage Map for loquat Using RAD-Seq and development of DNA markers on Fruit traits

研究代表者

福田 伸二(Shinji, FUKUDA)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：70503770

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文): '茂木' と78-51を交雑して得られた96個体のBC1集団を供試し, RAD-Seqにより得られたSNPマーカーを基に高密度連鎖地図を作成した. 作成した連鎖地図は793個のSNPマーカー, 166個のSSRマーカーおよびがんしゅ病抵抗性遺伝子Pse-aが座乗し, 17連鎖群に収束する全長1707.4cM, 遺伝子座間の平均距離1.78cMのものであった. ほとんどの連鎖群において, 座乗する多くのSNPマーカーの塩基配列はリンゴのドラフトゲノムと対応関係にあることが明らかとなった. この情報は有用形質の選抜マーカーの開発など, ゲノム情報を利用したDNAマーカー育種やシンテニ 解析への利用が期待される.

研究成果の概要(英文): We constructed a high-density genetic linkage map of bronze loquat for a three-way cross of loquat × 78-51 by using single nucleotide polymorphism markers generated by RAD-Seq, with the combination of simple sequence repeat markers, which have been used in the previous study. The map of bronze loquat consisted of 960 loci including 793 SNPs, 166 SSRs (98 apple, 8 loquat and 60 pear SSRs), and the loquat canker resistance gene Pse-a. This map covered 17 linkage groups over a total length of 1707.4 cM with an average distance of 1.78 cM between markers. The number of linkage groups corresponded to the basic chromosome number. The analysis of the markers that can be anchored to apple draft genome showed that almost all loquat linkage groups were aligned to the apple draft genome. The constructed map will enable us to determine the location of quantitative trait loci and genes of interest, and to analyze genome synteny in the tribe Pyreae, subfamily Spiraeoideae of the family Rosaceae.

研究分野：果樹園芸

キーワード：ピワ 連鎖地図 QTL解析 育種 DNAマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

ビワ(*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.)は、農林水産省政令指定品目の中で、生産量が少ない品目の1つである。その原因として、早生品種～晩生品種までの熟期の幅が狭いことや現在の経済栽培品種は、全てががんしゅ病(*Pseudomonas syringae* pv. *eriobotryae*)に罹病性で、感染による樹勢の低下により単位面積当たりの収量が少ないことが挙げられる。したがって、生産量を増やすには、熟期の拡大や抵抗性品種の育成が喫緊の課題である。熟期の早進化については、施設栽培で可能だが、晩生は既存の遺伝資源では限界がある。そこで、台湾ビワ(*E. deflexa*)の晩熟性を利用する必要がある(この特性を活かした育種を試みるのは、世界初である)。しかしながら、台湾ビワの果実には不良形質が多い。また、がんしゅ病については日本に3グループ菌が存在し、全てのグループ菌に対しての抵抗性検定には数年を要するなど問題点も多い。ビワは播種から結実まで最低でも7年の期間を要するために、新品種の育成には長期間と広大な圃場が必要なことからDNAマーカーによって、様々な遺伝形質を予測し、育種選抜するMarker Assisted Selection (MAS)法が注目されている。

研究代表者の福田伸二はビワの育種家であり、これまでに我々のグループは、ビワの主要病害であるがんしゅ病抵抗性の遺伝様式の解明(Hiehata et al., 2002:2012:2014)や抵抗性個体等を選抜するDNAマーカー(Fukuda et al., 2005:2009:2014)を開発してきた。これらの技術は、現在、長崎県農林技術開発センターのビワ育種事業に実用化され、年間2,000本ほどの選抜に活かされ、新品種の育成(稗圃ら, 2008:2010)にも貢献してきた。我々はビワと近縁のリンゴゲノム情報(Velasco et al., 2010)をもとにビワに適応するSSRマーカーを選抜し連鎖地図の作成を進めているが(投稿準備中)、実用的な選抜マーカーはがんしゅ病Aグループ菌に対する抵抗性選抜マーカー(Fukuda et al., 2014)のみである。また、SSRマーカーを用いる手法では、まずマーカーの開発を行い、次にこのマーカーを用いて連鎖地図を構築するため、研究開発の効率が悪い。これらのことから、高密度の連鎖地図作成には、SSRマーカーに代わる多型性の高い共優性のマーカーが必要であり、その開発を切望している状態にあった。一方、研究分担者の永野幸生の専門は分子生物学で、果樹園芸の面白さに魅せられ、研究対象をモデル生物から果樹に変更した。特に次世代シーケンサーを活用したRAD-Seq法(Restriction Site Associated DNA Sequence)による解析に精力的に取り組んでおり、ライム(*Citrus aurantifolia*)の種内分化などを明らかにした(Penjor et al., 2014)。私たちの知る限り、本論文はRAD-seq法を果樹に適用した最初のものである。この手法は次世代シーケンサーを活用して制限酵素認識サイト近隣領域の

DNA配列を全ゲノムにわたって繰り返し解読する方法であり、前述のライムにおいては、個体間で数万か所のDNAの相違を同定することができた。かつ解析コストも全ゲノム解析に比べて安価であるという利点がある。この手法では、マーカー開発と同時に連鎖地図を構築することが可能なため、研究開発の効率が極めて良い。また、カンキツ数100個体を既にこの方法で解析しており(投稿準備中)、本研究が目的とする多検体の交雑個体を取り扱うための研究準備を既に終えている。このように、本研究に参画する研究者の考えが一致したことから本研究を構想した。

## 2. 研究の目的

供試材料には、ビワ属の台湾ビワとビワ(‘白茂木’)を交雑し、そのF1にビワを戻し交雑したBC1集団を活用する。この集団は、ビワの主要病害であるがんしゅ病Aグループ菌の抵抗性遺伝子座をGenome scanning approach(GSA)法により同定(Fukuda et al., 2014)した時の供試集団であり、近年、果実形質の解析が可能となったものである。果実の大きさ、糖度、酸度、熟期、果肉色、がんしゅ病抵抗性(BおよびCグループ菌)、開花時期などの形質が分離し、諸形質の遺伝解析に適した集団となっている。

本研究では、この集団の各個体からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを活用したRAD-Seq法により、各個体から全ゲノムの0.1~1%に相当するビッグデータを獲得し、SNPs情報から高密度連鎖地図の作成を行う。さらに、BC1集団における果実形質の調査およびQTL解析を行い、果実の大きさ、糖度、酸度、熟期などの果実諸形質およびがんしゅ病抵抗性を制御する連鎖地図の領域決定を行い、有用形質と連鎖するDNAマーカーを開発し実際の育種実生集団において適応性を評価する。特に、現在の経済栽培品種の収穫期間は、非常に短いので別種である台湾ビワの熟期(8月~9月)を導入し、台湾ビワの不良形質である果実の大きさや食味などの特性を排除したいと考えている。

## 3. 研究の方法

1. 次世代シーケンサーによるマーカー開発: DNA精製、次世代DNAシーケンサーによるDNA配列解読、コンピューター解析を効率的に行い、そのビッグデータからSNPsマーカーやRFLPマーカーをできる限り取得し、高密度連鎖地図を作成する。

2. 果実形質に関する遺伝解析: BC1集団における果実形質(果実の大きさ、糖度、酸度、熟期、果肉色)や開花時期の調査を行い、QTL解析を行う。

3. 病害抵抗性の遺伝解析: がんしゅ病には3グループ菌があり、連鎖マーカーが取得されていない2グループ菌(BおよびCグループ菌)の抵抗性検定を行い、遺伝解析を行うとともにビワの高密度連鎖地図にマッピング

グシ、連鎖マーカーを獲得する。

#### 4. 研究成果

RAD-seq 分析の結果、1427 個の SNP 多型マーカーを得た。この SNP マーカーと SSR マーカーの遺伝子型データを供試して解析した結果、合計 966 個 (SNP:795、SSR:170、その他:1) のマーカーが座乗する 17 連鎖群の全長 1724.8 cM の連鎖地図を構築することが出来た。各連鎖群の長さは 63.7~156.0 (cM/本) の範囲にあり、平均のマーカー密度は 1.80 (cM/loci) の高密度であった。

作製した連鎖地図の各マーカーの位置情報に基づき、SNP マーカーの塩基配列とリンゴゲノムとを比較した結果、大部分の SNP マーカーはリンゴゲノムの位置情報と対応していることが明らかとなり、タイワンビワにはリンゴゲノムとの共通配列が高度に保存されていることが示唆された。さらに、一部分の連鎖群については、リンゴ・ナシ間の関係と異なり、ビワ独自の関係性を示した。今後、構築した連鎖地図は、高密度かつビワゲノムの大部分をカバーしていると考えられることから、有用形質の選抜マーカーの開発など、ゲノム情報を利用した DNA マーカー育種への利用が期待される。

表現型評価の結果、出蕾期、開花盛期及び収穫期は、いずれも正規分布を示すデータであり、この 3 つの形質は、QTL に支配されることが示唆された。QTL 解析の結果、出蕾期の QTL は Lo12 において検出された (LOD 値 3.83-5.05 寄与率 19.6-25.0)。近傍マーカーは、SNPEde6538 (LOD 値 4.93 寄与率 24.5) であった。また、開花盛期の QTL は Lo12 及び LoC において検出された (Lo12:LOD 値 5.93-7.71 寄与率 26.7-33.0、LoC:LOD 値 2.94-3.49 寄与率 12.1-14.2)。近傍マーカーは、Lo12 においては SNPEde6538 (LOD 値 6.39 寄与率 28.4) であり、LoC においては SNPEde12773 (LOD 値 3.49 寄与率 14.2) であった。収穫日の QTL は LoA+LoD 及び LoB において検出された (LoA+LoD:LOD 値 3.28-3.80 寄与率 14.9-16.9、LoB:LOD 値 2.08-4.14 寄与率 9.5-17.5 (図 2))。近傍マーカーは、LoA+LoD においては SNPEde15065 (LOD 値 3.66 寄与率 16.4) であり、LoB においては SNPEde2349 (LOD 値 3.16 寄与率 13.8) であった。ビワ連鎖群の LoC 中部から下部はリンゴの第 15 染色体と高い相同性を示し、その第 15 連鎖群下部にはリンゴ‘あかね’の開花期の QTL が存在する。同様に、LoB 中部から下部はナシの第 15 連鎖群上部と高い相同性を示し、その連鎖群にはナシ‘太白’の収穫期の QTL が存在する。

次に果実形質の QTL の解析の結果、糖度の QTL は 2016 年に Lo9 及び LoC において検出された。近傍マーカーは、Lo9 は SNPEde4858 で、LoC は SNPEde497 であった。酸度の QTL は 2015 年に Lo10 及び LoB において検出された。近傍マーカーは、Lo10 は SNPEde8104 で、LoB は SNPEde13906 であった。硬度の QTL

は、2015 年及び 2016 年に Lo6 において検出された。近傍マーカーは、両年において SNPEde3230 であった。果実重の QTL は、2017 年に Lo7 及び Lo10 において検出された。近傍マーカーは、Lo7 は SNPEde12216 で、Lo10 は SNPEde12195 であった。収穫期の QTL は、2016 年及び 2017 年の 2 年間に検出された。2016 年は、Lo4 及び LoB に検出された。近傍マーカーは、Lo4 は SNPEde6102 で、LoB は SNPEde2394 であった。また、2017 年は、Lo1 及び LoB に検出された。近傍マーカーは、Lo1 は SNPEde1858 で、LoB は SNPEde2394 であった。以上の結果から本研究において、世界で初めてビワの果実形質に関する QTL を検出した。また、バラ科果樹のリンゴやナシにおいても同領域に上記形質の QTL が検出されていることから、バラ科果樹間の属を超えた関連性が示唆された。

#### 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 2 件)

1. A high-density genetic linkage map of bronze loquat based on SSR and RAPD markers. S. Fukuda, K. Ishimoto, S. Sato, S. Terakami, N. Hiehata, T. Yamamoto, **Tree Genetics & Genomes**, 12: 80 (doi: 10.1007/s11295-016-1040-9, 13 pages). (2016)
2. Genetic mapping of the loquat canker resistance gene *pse-c* in loquat (*Eriobotrya japonica*). S. Fukuda, K. Ishimoto, S. Terakami, T. Yamamoto, N. Hiehata, **Scientia Horticulturae**, 200: 19-24. (2016)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. RAD-seq 法を用いたビワ高密度連鎖地図の作製 (2017) 松隈公孝・石本慶一郎・稗圃直史・山本俊哉・永野幸生・永野惇・福田伸二
2. ビワの熟期に関する量的形質遺伝子座 (QTLs) (2017) 松隈公孝・中川利嗣・石本慶一郎・稗圃直史・山本俊哉・永野幸生・福田伸二<sup>1</sup>

〔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 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

福田 伸二 (FUKUDA, Shinji)

佐賀大学農学部准教授

研究者番号：70503770

##### (2)研究分担者

永野 幸生 (NAGANO, Yukio)

佐賀大学総合分析実験センター准教授

研究者番号：00263038

##### (3)連携研究者

山本 俊哉 (YAMAMOTO, Toshiya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門上席研究員

研究者番号：60355360