

平成21年 6月18日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780010
 研究課題名 (和文) タマネギとのシンテニーを利用したネギ染色体の集中マッピング
 研究課題名 (英文) Intensive mapping in bunching onion (*Allium fistulosum*) based on chromosomal synteny with bulb onion (*A. cepa*).
 研究代表者 塚崎 光 (TSUKAZAKI HIKARU)
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜茶業研究所・野菜育種研究チーム・主任研究員
 研究者番号：30355622

研究成果の概要：

近年、タマネギおよびネギで DNA マーカーが開発されるとともに連鎖地図が作成されている。また、ネギとシャロットの種間雑種に由来する単一染色体添加／欠失系統（以下添加／欠失系統）が山口大学で育成されている。

本研究では、タマネギとネギのシンテニーを利用して、マーカーの座乗染色体を明らかにするとともに、抽苔時期に関する遺伝子座領域を連鎖地図から明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ネギ、タマネギ、シンテニー、集中マッピング、座乗染色体、SSR マーカー、単一染色体添加／欠失系統、抽苔性

1. 研究開始当初の背景

タマネギおよびネギは、重要な野菜の一つであるものの分子遺伝学的研究が遅れている。近年になり、タマネギでは約1.2万のEST配列およびこれらをマーカーとした染色体地図が海外のグループより公開されるとともに、ネギとシャロットの種間雑種に由来する添加／欠失系統が山口大学で育成されている。一方ネギでは、これまで研究代表者らが1,000以上のSSRを単離し、連鎖地図作成を進めている。

2. 研究の目的

ネギおよびタマネギにおいて、各種DNAマーカーが開発され、連鎖地図が作成される一方、これらの種間雑種より育成された異種染色体添加／欠失系統を用いることで、特定のDNAマーカーの座乗染色体を明らかにすることができ、両種のゲノムシンテニーを利用した比較マッピングが可能になると考えられる。そこで、タマネギとネギのシンテニーを利用して、上記マーカーの座乗染色体を明らかにするとともに、抽苔性等の有用形質に

関する遺伝子座領域を連鎖地図および QTL 解析により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) イネゲノム情報を利用したタマネギ EST マーカーの開発

公開されているタマネギ EST を利用して、単子葉モデル植物であるイネの遺伝子およびゲノム配列情報を用いてイントロン領域を推定し、イントロンを挟み込んだ単一遺伝子座特異的マーカーを作成する。

(2) 添加／欠失系統を用いた座乗染色体の特定

まず、ネギ「九条細」とシャロット「チェンマイ」との間で多型を検索した。ネギ SSR マーカー 1,199 個およびタマネギ EST 由来マーカー 112 個を用いて、3% アガロースゲル電気泳動または DNA シーケンサーを用いてサイズ多型の有無を検索した。また、これとは異なるタマネギ EST マーカー 200 組を用いて、ダイレクトシーケンスによる SNP の有無を検索した。多型が認められたマーカーについて、添加系統および欠失系統を用いてマーカー座の座乗染色体を特定した。また、座乗染色体が特定された SSR マーカーについては、ネギ 12 系統およびタマネギ 7 系統を用いて、種内におけるマーカー座の多型性を調査した。

(3) 抽苔性に関する分離集団の連鎖地図作成および QTL 解析

抽苔性について大きな差異のある両親系統間 F₂ 集団（「北葱」自殖系統×「長悦」自殖系統）134 個体（KiCho 集団）を用いて連鎖地図を作成した。F₃ 121 系統を 16 時間日長（低温処理なし）の条件でプランター栽培し、抽苔日を調査した。QTL Cartographer 2.0 を用いて、不時抽苔性に関する QTL 解析を行った。

4. 研究成果

(1) イネゲノム情報を利用したタマネギ EST マーカーの開発

公開されているタマネギ EST 11,008 クローンより、イネと相同性が高く、かつイネゲノムにおける特異性が高いクローンが 1,090 個選抜された。この中で、イネゲノム配列との比較から 220 組のイントロン領域を挟み込むネギ汎用プライマーを設計した（図 1）。

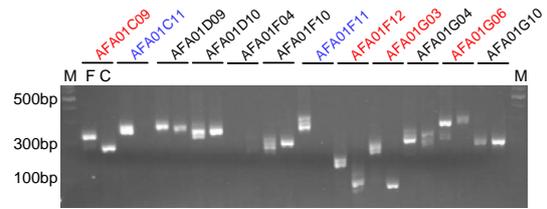


図 1. ネギ SSR マーカーにおけるネギ(F)およびシャロット(C)での増幅

2 レーンごとに異なるプライマーセットで PCR した（左側：ネギ「九条細」、右側：シャロット「チェンマイ」）。3% アガロースゲルによる電気泳動により、異なる増幅サイズ（赤）および増幅の有無（青）による多型マーカーを得た。

(2) 添加／欠失系統を用いた座乗染色体の特定

①ネギ／シャロット特異的マーカー

ネギ SSR では 704 マーカー（58.7%）、タマネギ EST では 60 マーカー（71.4%）で、ネギとシャロット間で異なる増幅パターンを示した（表 1）。またダイレクトシーケンスの結果より 146 座（82.5%）で SNP または InDel が検出された。

表 1. ネギ「九条細」とシャロット「チェンマイ」における PCR 産物のサイズ多型（一次スクリーニングの結果）

プライマー数	両種でサイズが異なる (%)	多型あり				多型なし (%)	多型なし (%)	増幅不安定		
		ネギでのみ増幅 (%)	シャロットでのみ増幅 (%)	両種で増幅 (%)	両種で増幅 (%)					
ネギ SSR	1,199	203	16.9	501	41.8	0	0.0	58.7	368	127
タマネギ EST-SSR ^{a)}	82	32	39.0	8	9.8	20	24.4	73.2	19	3
タマネギ EST ^{b)}	30	17	56.7	3	10.0	0	0.0	66.7	5	5

a)：ネギ SSR については 3% アガロースゲルによる結果。タマネギ EST-SSR およびタマネギ EST については DNA シーケンサーによるフラグメント解析による結果から判断した。
b)：タマネギ EST 由来マーカーは、これまでの解析によりネギ自殖系統「J」とタマネギ「良縁早生」止の間で増幅パターンの異なるものを優先して使用した。

②座乗染色体の特定

ネギとシャロットで多型が認められた 504 マーカーについて、添加系統および欠失系統を用いて解析した結果、351 座の座乗染色体を新たに特定できた（図 2）。

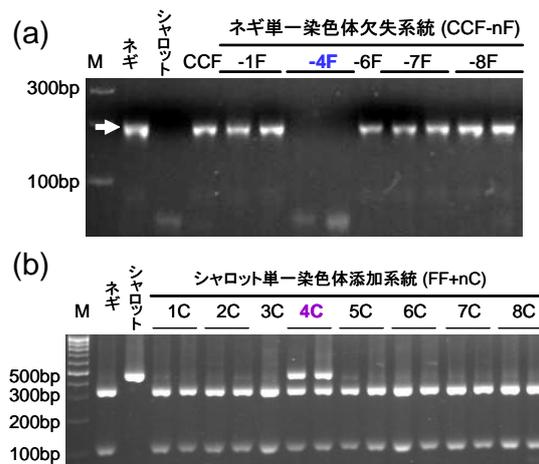


図 2. ネギ欠失系統およびシャロット添加系統を用いたネギ属染色体への振り分け

(a)ネギ SSR マーカー AFAT01B06(4F),

(b)タマネギ EST マーカー TC3270(4C)

PCR 産物を *SspI* で処理した。

ネギ連鎖地図上に位置付けられているマーカー座と合わせて、合計 605 マーカーの座乗染色体が明らかとなった (表 2)。

表2 シャロットおよびネギにおいて座乗染色体が明らかとなったネギSSRおよびタマネギESTマーカーの数

シャロット単一染色体添加系統	解析数	座乗染色体								計
		1C	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	
ネギSSR数	56	2*	2	7	2*	4	4*	1*	0	27
タマネギEST数	201	25	30	17	18*	24	12*	12*	14*	30
ネギ単一染色体欠失系統		1F		4F		6F	7F	8F		計
ネギSSR数	316	57*	-	-	34*	-	34*	33*	19	212
タマネギEST数	69	2	-	-	6*	-	3*	4*	3*	5
計	590**	82*	32	24	54*	28	51*	46*	34*	269
ネギ連鎖地図 (Tsunodaら2009) にマップされているマーカー数	43	43	47	30	7	21	22	27	14	254

座乗染色体が決定されたマーカー数 (ネギ連鎖地図に基き、染色体の対称位置が決定できるものを示す)
 * シャロットとネギの両方で座乗染色体が明らかとなり隣接して座乗染色体が同じであった187マーカーを含む
 ** このうち52マーカーは、シャロット単一添加系統およびネギ単一染色体欠失系統の両方に共通した
 *** その後の研究により、50染色体に対応する連鎖群であると推定された

③座乗染色体が特定されたマーカーの多型性

座乗染色体が特定された SSR マーカーのうち、ネギでは 187 マーカー、タマネギでは 73 マーカーを用いて、種内における多型性について調査した結果、平均アレル数はネギでは 3.9、タマネギでは 2.2 となり、ネギでは 91%、タマネギでは 37% のマーカーにおいて系統間多型が認められた (表 3)。座乗染色体が明らかとなった SSR マーカーを利用することにより、特定の染色体への集中マッピングが可能と考えられる。

表3. ネギおよびタマネギシャロット系統間におけるSSRマーカーの多型性^{a)}

	解析数	アレル数			PIC ^{b)}			多型マーカー率 (%) ^{c)}
		最小	最大	平均	最小	最大	平均	
ネギ (12品種・系統)	187	1	11	3.9	0.00	0.90	0.52	91.4
タマネギシャロット (7品種・系統)	73	1	5	2.2	0.00	0.95	0.28	37.0

a) DNAセンサーを用いたフラグメント解析による結果
 b) 1 - [(各アレルの出現頻度)²]より算出
 c) PIC>0であったマーカーの割合

(3) 抽苔性に関する分離集団の連鎖地図作成および QTL 解析

KiCho 集団について、17 連鎖群、142 マーカーからなる全長 1,132cM の連鎖地図を作成した (図 3)。F₃ 系統群を用いた解析より、「北葱」の不時抽苔性に関する主要な QTL が検出され、シャロット添加系統によりネギ属 2 番染色体に対応することが推定された (表 4)。

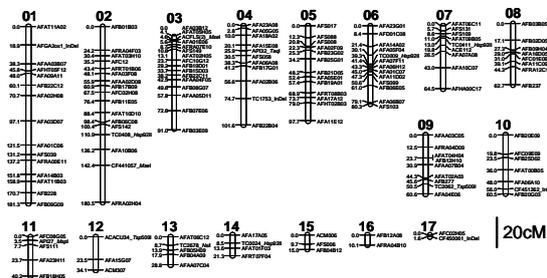


図 3. KiCho 集団における連鎖地図 (17 連鎖群, 142 マーカー, 全長 1,132 cM)

表4. KiCho集団における抽苔性に関するQTLが検出された位置^{a)}

形質	KiCho 連鎖群 ^{b)}	推定ネギ染色体番号	位置 (cM)	マーカー	LOD	相加効果	優性効果	寄与率 (%)
長日抽苔株率(N/2007)	10	Chr 2	23.5	AFB25D02	6.9	19.0	-2.8	10.7
長日平均抽苔日 (北ネギの平均抽苔日と対した差算日)	10	Chr 2	23.5	AFB25D02	6.6	-15.6	-1.4	18.8
長日最終抽苔日 (北ネギの最終抽苔日と対した差算日)	10	Chr 2	23.5	AFB25D02	6.9	-27.8	-16.4	15.9
抽苔時期 (mm)	10	Chr 2	23.5	AFAT05B05	6.6	-1.0	-0.2	21.4

a) 2007年7月10日播種、8月29日プランターに移植、2008年7月まで調査
 b) 連鎖群長の順番で番号を付けた
 c) 連鎖群に座乗するDNAマーカーのネギにおける座乗染色体より推定

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 4 件)

① Yaguchi, S., T.T.M. Hang, H. Tsukazaki, H. (他 8 名) (2009) Molecular and biochemical identification of alien chromosome additions in shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) carrying extra chromosome(s) of bunching onion (*A. fistulosum* L.). *Genes Genet. Syst.*, 84: 43-55. (査読あり)

② Tsukazaki H., K. Yamashita, S. Yaguchi, 他 9 名 (2008) Construction of SSR-based chromosome map in bunching onion (*Allium fistulosum*). *Theor. Appl. Genet.* 117: 1213-1223. (査読あり)

③ Tsukazaki, H., T. Nunome, H. Fukuoka, 他 7 名 (2008) Applications of DNA marker technology in Japanese bunching onion. *Acta Hort.* 770: 153-158. (査読なし)

④ Tsukazaki, H., T. Nunome, H. Fukuoka, 他 5 名 (2007) Isolation of 1,796 SSR clones from SSR-enriched DNA libraries of bunching onion (*Allium fistulosum*). *Euphytica* 157: 83-94. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

① Tsukazaki, H., K. Yamashita, S. Yaguchi, 他 4 名 (2009.1.10-14) Determination of the chromosomal location of bunching onion SSRs and bulb onion EST markers using a complete set of bunching onion-shallot monosomic addition lines and allotriploid-bunching onion single-alien deletion lines. *Plant and Animal Genome XVII Conference.* (San Diego, CA, USA)

② McCallum, J., Y. Deng, 他 6 名 (7 番目) (2009.1.10-14) Determination of the Chromosomal Location of Bunching Onion SSRs and Bulb Onion EST Markers using a Complete Set of Bunching Onion-Shallot Monosomic Addition Lines and

Allotriploid-Bunching Onion Single-Alien Deletion Lines. Plant and Animal Genome XVII Conference. (San Diego, CA, USA)

③ 塚崎光, 山下謙一郎, 谷口成紀, 他 6 名 (2008.9.27-29) ネギ-シャロット単一染色体添加/欠失系統を利用したネギ SSR およびタマネギ EST の座乗染色体特定. 園芸学研究 7(別 2): 204. (園芸学会, 三重大学)

④ Tsukazaki, H., K. Yamashita, N. Matsubara, 他 8 名 (2007. 10. 29-31) Construction of SSR-based chromosome map of bunching onion (*Allium fistulosum*). Isolation of 1,796 SSR clones from SSR-enriched DNA libraries of bunching onion (*Allium fistulosum*). V International ISHS Symposium on Edible Alliaceas (ASEA). (Dronten, The Netherlands).

⑤ Tsukazaki H., T. Nunome, H. Fukuoka, 他 5 名 (2007.10.29-31) Isolation of 1,796 SSR clones from SSR-enriched DNA libraries of bunching onion (*Allium fistulosum*). V International ISHS Symposium on Edible Alliaceas (ASEA). (Dronten, The Netherlands).

[その他]

ホームページ等

野菜 DNA データベース (VegMarks)

<http://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/jsp/index.jsp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚崎 光 (TSUKAZAKI HIKARU)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所・野菜育種研究チーム・主任研究員

研究者番号：30355622