

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月18日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780009

研究課題名（和文）連鎖地図に基づくタマネギとネギのゲノムシンテニーの解明

研究課題名（英文）Synteny between bulb onion and bunching onion based on linkage maps.

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・ゲノム
研究領域・主任研究員

研究者番号：30355622

研究成果の概要（和文）：

ネギとタマネギのゲノムシンテニーを利用した比較マッピングを行うために、タマネギにおいて 11 連鎖群からなる連鎖地図を構築した。地図上のマーカーの座乗染色体推定を通して、10 連鎖群を 8 染色体に対応付け、染色体レベルではネギ連鎖群との矛盾は認められなかった。QTL 解析により、葉身折径および抽苔株率に関する QTL は、対応するネギ連鎖群においても検出されていることから、両種に共通の QTL の存在が示唆された。また、球および蒴の着色に関しては、Chr.7 上に主要な QTL が存在し、同領域に存在するアントシアニン合成に関与する DFR が原因遺伝子である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Linkage maps have been developed for bulb onion (*Allium cepa* L.) and bunching onion (*A. fistulosum* L.). It is considered that a high level of macrosynteny exists between these 2 species since they belong to the section *Cepa* and have the same chromosome number ($2n=16$). However, a detail comparison has not evaluated because there are few common markers onto the maps of both species. The objective of this study was to evaluate synteny at the genome-wide level between bunching onion and bulb onion. As a first step, we developed a basal linkage map in F₂ population between yellow bulb onion and red shallot. Linkage map consists of 11 linkage groups with 164 markers covering 1,040 cM. Ten linkage groups were assigned to eight chromosomes with 65 markers. Although both SNP markers (*F3'H* and *DFR*) were located on the Chr. 7, two trait markers, *Pg* and *Ant1*, were closely linked to *DFR*. A QTL for bulb pigmentation was also detected on the Chr. 7. All individuals homozygous for onion allele at *DFR* loci showed no pigmentation in F₂ individuals. The degree of red pigmentation became significantly darkened by replacing shallot allele at *DFR* in both F₂ and F_{2:3}. Therefore, *DFR* is one of key genes involved in bulb color in this population.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：タマネギ・連鎖地図・ゲノム比較・QTL 解析・着色性

1. 研究開始当初の背景

ネギおよびタマネギにおいて、各種 DNA マーカーの開発および連鎖地図の作成が進んだことから、両種のゲノムシンテニーを利用した比較マッピングへの展開が期待される。

これまで研究代表者らは、SSR マーカーを主としたネギの連鎖地図(Tsukazaki ら 2008, 2011) を作成するとともに、辛味や抽苔性等の QTL を見出してきた(塚崎ら 2009, 2010)。

しかし、タマネギのゲノム研究は国内では行われていないことから、共通の DNA マーカーによる連鎖地図の比較やネギとのゲノム比較は行われていない。

2. 研究の目的

(1) これまでに開発したネギゲノム DNA 由来 SSR マーカーおよびタマネギ EST 由来 SSR マーカー等を用いて、タマネギ連鎖地図を構築する。連鎖地図上のマーカー座の座乗染色体特定を通して、連鎖群と染色体との対応関係を明らかにし、ネギ連鎖地図の比較を行う。

(2) F_2 各個体由来 F_3 ($F_{2:3}$) 系統群を用いて秋まき栽培を行い、着色性や一般形質を調査し、QTL解析を行う。

(3) これらの手法により、共通マーカーを利用してネギとのシンテニーを明らかにするとともに、ネギとタマネギで共通の QTL が明らかとなり、ネギ類に共通な育種形質に関する遺伝学的解明に繋がることを期待される。

3. 研究の方法

(1) タマネギEST-SSR (Kuhlら 2004, Martinら 2005 他) およびネギSSRマーカー (Songら 2004, Tsukazakiら 2007 他) 等を用いて、「早玉」(球外皮色は黄色)とシャロット「チェンマイ」(赤色)との F_2 集団 (135 個体) における多型解析を行い、JoinMap ver. 4.0 を用いて連鎖地図を構築した。Shigyoら (1996) により育成されたシャロット単一染色体添加ネギ系統 ($2n=17$, FF+1C~8C) を用いて、連鎖地図上のマーカー座の座乗染色体を特定することにより、連鎖群と染色体との対応関係を明らかにした。

(2) タマネギ F_2 各個体由来 F_3 ($F_{2:3}$) 系統群 (113 系統, 8 株 3 区) を育成して、2010 年 9 月 24 日に播種、11 月 16 日に所内圃場に定植した(野外マルチ栽培)。2011 年 5 月 24 日に収穫し、葉および球の一般形質を調査するとともに、抽苔株率ならびに球の着色性を評価した。なお着色性に関しては、目視による球外皮の着色程度 (0: 無, 1: 微~4: 濃赤) の評価および最外鱗葉におけるアントシア

ニン含量の定量を行った。

(3) 着色性に関する反復試験として、 $F_{2:3}$ 系統群 (119 系統) を 2011 年 9 月 9 日に播種、同年 11 月 11 日に葉鞘基部の着色株数 (各系統あたり 4~41 株) を調査して、着色株率を算出した。

(4) 各形質について、QTL Cartographer による QTL 解析を行った。各形質の閾値は 1,000 回の permutation test により設定した。また、球外皮の着色に関しては、QTL 近傍の *DFR* 座の遺伝子型に基づく分類により、マーカーの有用性を評価した。

4. 研究成果

(1) 合計 1,698 マーカーを用いて多型解析を行い、両親系統間で多型を示すマーカーを 275 個得た (表 1)。これらのマーカーを用いて、 F_2 分離集団を用いて多型解析を行うとともに、球外皮の着色 (赤) および蒴色 (緑) が 3:1 の比に分離したために、形質マーカー (*Pg* および *Ant1*) とした。

(2) 連鎖解析の結果、11 連鎖群、164 マーカーが座乗する全長 1,040cM の連鎖地図を構築した (図 1)。着色に関わる 2 つの形質マーカー座 (*Pg* および *Ant1*) は、共分離し、連鎖地図においてもごく近傍に位置したために、同一遺伝子による可能性が示唆された。

表1 多型解析に用いたマーカー種、多型率および連鎖地図に位置付けられたマーカー数

| | マーカー数 | 多型マーカー数 | 多型率(%) | マッピングマーカー数 |
|-----------------------------------|-------|---------|--------|------------|
| タマネギ | | | | |
| EST由来SSR | 1345 | 204 | 15.2 | 115 |
| EST由来非SSR | 111 | 29 | 26.1 | 18 |
| BAC末端配列由来SSR | 20 | 9 | 45.0 | 5 |
| ネギ | | | | |
| ゲノム由来SSR | 222 | 33 | 14.9 | 24 |
| 形質マーカー(<i>Pg</i> , <i>Ant1</i>) | | | | 2 |
| 計 | 1698 | 275 | 16.2 | 164 |

(3) 連鎖地図上のマーカーの座乗染色体推定により、65 マーカーの座乗染色体が明らかとなり、10 連鎖群を 8 染色体に対応付けた (図 2)。アントシアニン合成に関与する遺伝子のうち、本解析集団で連鎖地図上に位置付けられたのは *F3' H* および *DFR* のみであった (図 2)。これらはともに Chr. 7 上に位置付けられ、Masuzaki ら (2006, 2007) によるシャロット単一染色体添加ネギ系統を用いた報告と同様であった。

また、ネギ連鎖地図との比較により、染色体 (連鎖群) レベルではネギと矛盾する組合

せはなかったことから、ネギとタマネギの相同性が高いことが示された。

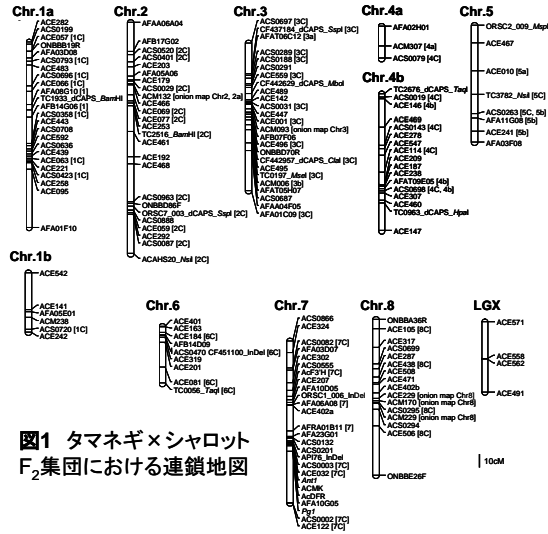


図1 タマネギ×シャロット F₂集団における連鎖地図

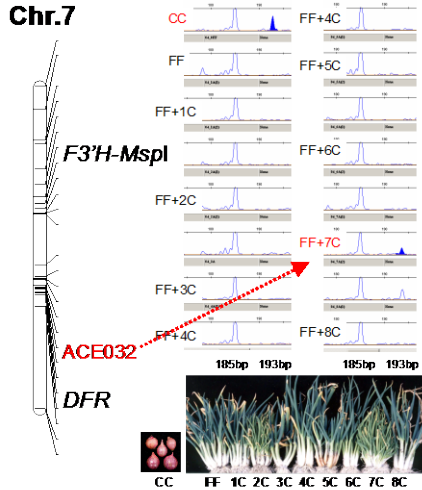


図2 シャロット単一染色体添加系統シリーズを用いた連鎖地図上のマーカーACE032の座乗染色体特定。タマネギ(CC)と同じ増幅産物が、FF+7C系統のみ出現することから、このマーカーは7C染色体に座乗することがわかる

(4) QTL解析により、各形質についてQTLが検出された(表2)。

(5) 球の着色性に関しては、Chr. 7上の形質マーカー座近傍に主要なQTLが検出され、その寄与率は、36.8% (アントシアニン含量)~70.6% (着色程度)であった。アントシアニン合成に関与する遺伝子のうち、DFRが本QTL上に位置した(図3)。

表2 QTLが検出された位置および遺伝効果(2010-11年度)^{a)}

| 形質 | 連鎖群 | 位置(cM) | マーカー | LOD | 寄与率(%) | 相加効果 | 優性効果 |
|---------------------------------------|--------|--------|-------------|------|--------|-------|------|
| 長さに関する形質 | | | | | | | |
| 葉身長(cm) | Chr.1a | 77.9 | ACS0358 | 4.1 | 8.8 | 1.8 | 0.6 |
| | Chr.3 | 76.8 | ACS0687 | 3.9 | 8.3 | -1.6 | -0.4 |
| | Chr.8 | 49.9 | ACE471 | 4.6 | 11.1 | 2.0 | 0.6 |
| 球高(mm) | Chr.1a | 87.6 | ACE439 | 15.7 | 29.2 | 4.0 | 0.4 |
| | Chr.1b | 0.0 | ACE063 | 4.4 | 10.8 | 2.1 | 0.2 |
| | Chr.7 | 47.2 | FAA10D05 | 5.2 | 8.1 | 2.0 | -0.4 |
| | Chr.8 | 64.6 | ACM229 | 9.0 | 14.2 | 2.7 | -0.2 |
| 太さに関する形質 | | | | | | | |
| 葉身折径(mm) | Chr.1a | 48.1 | AFA08G10 | 4.1 | 11.8 | 1.3 | -0.2 |
| | Chr.2 | 44.1 | ACE179 | 7.0 | 19.5 | 2.1 | -0.8 |
| 球径(mm) | Chr.1a | 86.1 | ACS0636 | 7.5 | 16.2 | 5.0 | 0.6 |
| | Chr.5 | 89.7 | AFA03F08 | 5.0 | 13.8 | 4.6 | -0.1 |
| | Chr.7 | 76.8 | API76_InDel | 5.2 | 10.8 | 3.6 | -1.9 |
| | Chr.8 | 60.8 | ACE229 | 6.7 | 14.4 | 4.7 | 0.0 |
| 葉身長径比 (葉身長/葉身折径) | | | | | | | |
| | Chr.2 | 45.1 | ACS0029 | 9.3 | 27.1 | -2.5 | 0.9 |
| 球長径比 (球高/球径) | | | | | | | |
| | Chr.4b | 71.2 | ACE238 | 6.3 | 15.7 | -0.7 | 0.4 |
| 着色性に関する形質 | | | | | | | |
| 着色時点(2011.5) | | | | | | | |
| | Chr.7 | 79.2 | AcMK | 32.5 | 70.6 | -1.4 | -0.3 |
| アントシアニン量(シヤニジン3,5,7-トリメチルエーテル) | | | | | | | |
| | Chr.7 | 78.6 | Anf1 | 12.6 | 36.8 | -1.9 | -0.2 |
| 着色株率(2011.11)^{b)} | | | | | | | |
| | Chr.7 | 80.8 | AFA10G05 | 34.6 | 64.8 | -38.5 | 15.2 |
| 抽苔株率 | | | | | | | |
| | Chr.1a | 93.0 | ACE258 | 9.2 | 26.4 | -21.1 | 4.7 |

a): 2010年9月24日播種、11月16日定植(マルチ)、2011年5月24日収穫調査。
b): 2011年9月9日播種、11月11日定植時に調査。
分球率およびビルビン酸生成量に関しては有意なQTLは検出されず。

Chr.7

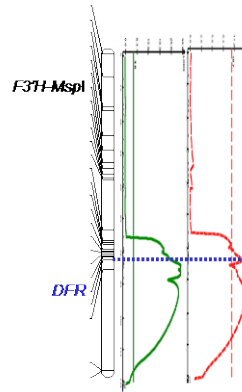


図3 タマネギF_{2:3}系統群における球外皮の着色程度(左)およびアントシアニン含量(右)に関するQTL解析の結果。

(6) F₂個体におけるF3'HおよびDFR座の遺伝子型と、F₂個体における着色程度を比較した結果、DFRの遺伝子型がタマネギ型のF₂個体はすべて着色が認められず、ヘテロ型、シャロット型の順に着色程度が有意に高くなった(表3)。

F_{2:3}系統群を用いた平均着色程度と比較した場合も同様な結果が得られた(表4)。

これらのことから、本分離集団における着色性にはDFRが深く関与していることが示唆された。

その一方で、タマネギ集団においてDFRに強く連鎖するAcMKが、ネギKiC集団ではChr. 4aに位置付けられていることから、詳細な比較により当該領域のシンテニーを明らかにする必要がある。

表3 タマネギF₂個体における球外皮の着色程度と遺伝子型との関係

| 遺伝子座 | F ₂ 個体数 | 平均着色程度 ²⁾ |
|------------|--------------------|----------------------|
| F3H | | |
| タマネギ型 | 28 | 0.75 b ^{y)} |
| ヘテロ型 | 53 | 1.57 a |
| シャロット型 | 27 | 2.00 a |
| DFR | | |
| タマネギ型 | 27 | 0.00 c |
| ヘテロ型 | 50 | 1.70 b |
| シャロット型 | 27 | 2.41 a |

z) 0 (着色無) ~ 4 (濃赤)までの5段階で評価

y) 異なる文字はTukey-KramerのHSD検定により5%レベルで有意

表4 タマネギF_{2,3}系統群における球外皮の着色程度およびアントシアニン含量とF₂における遺伝子型との関係

| 遺伝子座 | F ₂ 個体数 | 平均着色程度 ²⁾ | アントシアニン含量 ^{y)} |
|------------|--------------------|----------------------|-------------------------|
| F3H | | | |
| タマネギ型 | 27 | 0.66 b ^{x)} | 0.91 b |
| ヘテロ型 | 57 | 1.42 a | 2.20 a |
| シャロット型 | 27 | 1.89 a | 2.37 a |
| DFR | | | |
| タマネギ型 | 28 | 0.06 c | 0.15 c |
| ヘテロ型 | 55 | 1.26 b | 1.85 b |
| シャロット型 | 25 | 2.85 a | 4.17 a |

z) 0 (着色無) ~ 4 (濃赤)までの5段階で評価

y) シアニン3,5ジグルコシド等量

x) 異なる文字はTukey-KramerのHSD検定により5%レベルで有意

(7) 着色性以外の形質に関しては、寄与率の低い(8~29%) QTLが複数検出され、量的形質であることが推察された。

このうち、葉身折径(連鎖群 Chr. 2)および抽苔株率(連鎖群 Chr. 1a)に関するQTLは、対応するネギ連鎖群においても検出されていることから、共通のQTLによる可能性が示唆された(図4)。

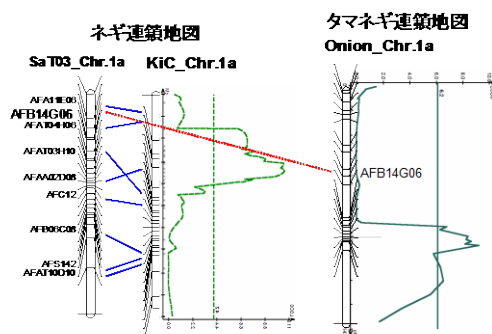


図4. ネギおよびタマネギ連鎖群Chr.1aの比較と抽苔性QTLの位置。SaT03(ネギ基準地図)、KiC(ネギにおいて抽苔性QTLが検出された集団)共通のマーカーは線で結んでいる

(8) しかしながら、これまでのところ、ネギと共通のマーカーが少なく、詳細なQTLの比較はできていない。このため、今後より多くの共通マーカーを位置付け、ネギ類に共通な育種形質に関する遺伝学的解明に繋げる予定である。

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)

[学会発表] (計3件)

① 塚崎光ら、QTL mapping for bulb pigmentation in F₂ population between bulb onion and shallot、6th International Symposium on Edible Alliaceae、2012年5月22日、アクロス福岡(福岡県)

② 塚崎光ら、タマネギ×シャロットF₂集団における着色性ならびに一般形質に関するQTL解析、園芸学会、2012年3月28日、大阪府立大学(大阪府)

③ 塚崎光ら、タマネギ×シャロットF₂集団における連鎖地図作成、園芸学会、2011年3月20日、宇都宮大学(栃木県)

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・ゲノム研究領域・主任研究員

研究者番号：30355622