

ウンシュウミカン品種間交雑における交雑胚を識別できる Indel マーカー の開発

公開されたウンシュウミカンゲノム情報を活用し Indel マーカー を開発した。このマーカーにより多胚性のウンシュウミカン品種間交雑で形成される交雑胚の識別が可能である。

農業研究センター農産園芸研究所バイオ育種研究室(担当者:野田孝博)

Indel マーカー:ゲノムの挿入/欠損(insertion/deletion)を有するヘテロ接合性領域(以下遺伝子型 LS と定義する)を検出できる DNA マーカー

研究のねらい

多胚性種子であるウンシュウミカンの育種手法は、芽条変異等自然に発生する突然変異現象を利用したものや珠心胚実生変異が主流である。

多胚性種子では1個の種子内に数個から多いものは40個程度の胚を形成するが、交配しても交雑胚は1つのみである。その他は珠心胚として種子親と同じ形質のクローンであり、交雑胚よりも生育が早いため、外観等の形質だけで交雑苗を選抜するには多大な労力と時間が必要であり、これまで品種間交雑による育種はほとんど行われていない。

そこで、本研究では簡易で迅速かつ明瞭に交雑胚と珠心胚を識別する技術を開発する。

研究の成果

1. 公開されたウンシュウミカンゲノム情報(「宮川早生」由来)を活用し9本の染色体において各8種以上の Indel マーカーを開発した。得られた Indel マーカーの PCR 増幅断片は簡易なアガロースゲル電気泳動において、ヘテロ2本鎖バンド1本(図1及び図2のバンドLS'及びSL')とホモ2本鎖バンド2本(図1及び図2のバンドLL'とSS')の計3本のバンドとして明瞭に検出可能である。
2. 交雑により遺伝子型が、ヘテロ接合型(LS)からホモ接合性(LL又はSS)に変化した場合、下側2本のホモ2本鎖バンドのいずれか1本として検出される(図2B及び図3)。
3. ウンシュウミカンである両親の遺伝子型はLSであり、交雑により遺伝子型はLL、LS及びSSの個体が1:2:1の出現比率で得られる。開発した Indel マーカーは、両親と異なる遺伝子型LL又はSSの場合のみ検出可能なため、一つのマーカーによる交雑胚検出確率は50%である。しかし複数のマーカーを用いることで検出確率は増し、たとえば異なる染色体由来の独立した4種のマーカーを用いれば93.75%の確率で検出可能となる。

普及上の留意点

1. Indel マーカーは、可視化ソフト IGV を使用して Indel 変異領域ゲノムの可視化を行い、変異有無リード数の比が概ね 1:1 であること PCR 増幅領域(青赤矢印範囲)において Indel 以外の変異がほとんどないこと マッピングされたリード数が20以上あることなどを考慮し、作成した(図1(A))。
2. Indel マーカーによる PCR 増幅産物を酵素(T7 Endonuclease 処理)で切断すると、図2(A)左側レーンのヘテロ2本鎖が中央レーンのようにホモ2本鎖となり、ヘテロ2本鎖は長短の1本鎖が接合したものであることが証明された(図2(A))。
< 投稿中の論文が掲載決定後は、上記2項の留意点を削除し、論文情報を記載する予定 >

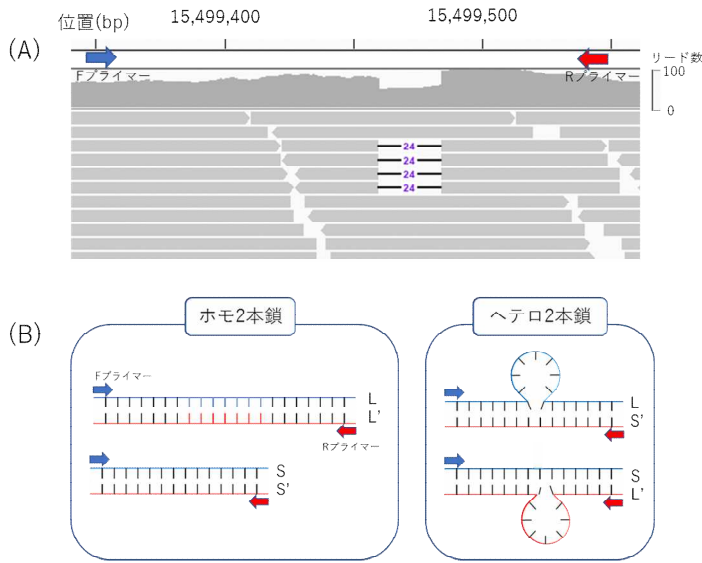


図1. Indel 変異領域ゲノムの可視化による評価 (A) と Indel 領域の想定される PCR 増幅産物 (B)

(A) Indel マーカー (LG5-26) を作成したゲノム領域とマッピングされたショートリード (グレーのバーの部分) の例。
 (B) Indel 領域の PCR 産物はホモ 2 本鎖が 2 種、ヘテロ 2 本鎖が 2 種形成される。

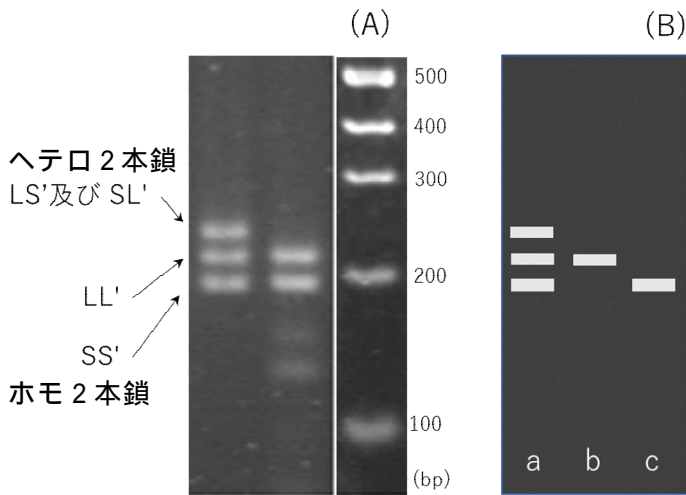


図2. Indel マーカーの PCR 増幅断片のバンドパターン (A) と交雑胚の識別モデル (B)

(A) : Indel マーカー (LG5-26) の PCR 増幅パターン (レーン左側) とヘテロ 2 本鎖を切断する酵素処理後のパターン (レーン中央)。
 (4% アーガロースゲルによる分離)
 (B) : Indel マーカーによる交雑胚の識別モデル。
 交雑によりヘテロ接合性 (a) がホモ接合性 (b 又は c) に変化した場合、交雑胚と判断。

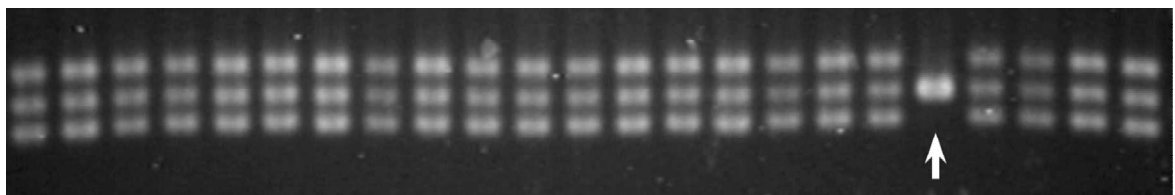


図3. Indel マーカーによる交雑胚の識別例
 図中矢印のサンプルを交雑胚と判定 (4% アーガロースゲルによる分離)