

トーゴーの日シンポジウム2019 ～バイオデータベース:つないで使う～
ユーザー発表②

PGDBjデータベースの利用 「栽培イチゴのゲノム解析・育種用選抜 DNAマーカー開発」



福岡県農林業総合試験場
バイオテクノロジーチーム
和田 卓也



Licensed under a Creative Commons表示4.0国際ライセンス
(c)2019和田 卓也(福岡県農林業総合試験場)

福岡県のイチゴの育種目標

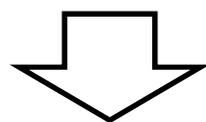
- 「福岡S6号(商標名:あまおう)」の優良形質を引き継ぎつつ、輸送適性に関与する果実硬度、耐病性を改良

- **果実色**

特徴的な濃赤色、つや。
育種過程でなかなか再現しにくい

- **果実硬度**

輸送適性に影響。遺伝率は比較的高いが、多くの遺伝子が関与(門馬・上村 1985、森 2000)。

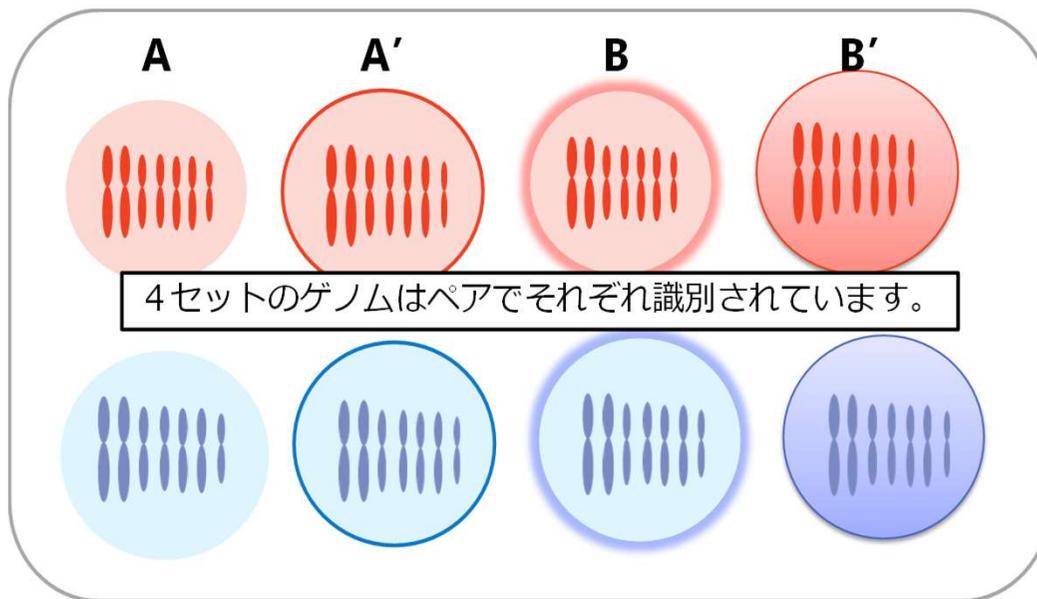
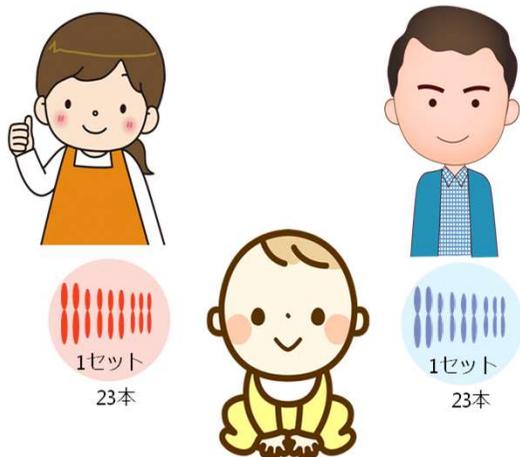


DNAマーカーによる育種選抜の効率化

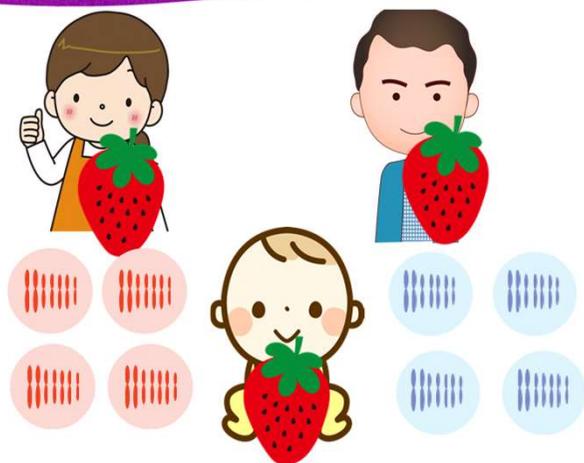
イチゴのゲノム構成

イチゴの謎① 複雑なイチゴゲノム

ゲノム=染色体に含まれる全ての遺伝情報
ヒトは23本の染色体が1セットで両親から1セットずつ受けつぐ



イチゴの謎① 複雑なイチゴゲノム



かずさ

Av

Bi

X1

X2

UCLA

F. vesca *F. iinumae* *F. nipponica* *F. viridis*

Isobe et al. (投稿準備中)

Edger et al. (2019): Nature Genetics

イチゴは両親から4セットずつのゲノムを受けついで8セットのゲノムをもっています

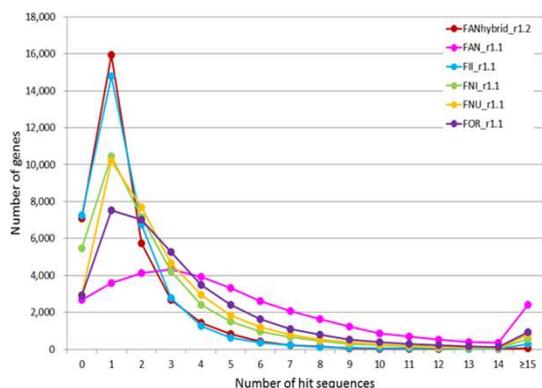
かずさDNA研究所 磯部祥子氏提供

栽培イチゴゲノム情報First Assembly (Hirakawa et al. 2014) ‘麗紅’

Strawberry (*Fragaria × ananassa*) 1st assembly

 FLX Titanium <i>F. × ananassa</i> Cultivar: Reikou	Single-end		2 runs	1,379 Mb	2.0x
	Paired-end	3 Kb	1 run	242 Mb	0.3x
	Paired-end	5 Kb	1 run	290 Mb	0.4x
	Paired-end	8 Kb	1 run	272 Mb	0.4x
	Paired-end	20 Kb	1 run	398 Mb	0.6x
	RNA-seq			1 run	
Total: 3.7x					
 GAIIx	Paired-end (73bp)	600 bp	8 lanes	17 Gb	24.6x
	Paired-end (101bp)	400 bp	8 lanes	33 Gb	47.7x
Total: 72.3x					
 HiSeq1000	Paired-end 101bp (S1)	346~403bp	3 lanes	107 Gb	154.6x
	Paired-end 51bp	419 bp	1 lane	36 Gb	52.0x
	Paired-end (fragment; 101bp)	290 bp	2 lanes	68 Gb	98.3x
	Mate-pair (101 bp)	2 Kb	1 lane	15 Gb	21.7x
	Total: 326.6x				
DRA Accession: DRA001114					
 HiSeq1000 Wild species	<i>F. iinumae</i>	PE 101bp	495 bp	2 lanes	71 Gb
	<i>F. nipponica</i>	PE 101bp	494 bp	2 lanes	72 Gb
	<i>F. nubicola</i>	PE 101bp	468 bp	2 lanes	74 Gb
	<i>F. orientalis</i>	PE 101bp	458 bp	2 lanes	75 Gb
	Gene duplication				

Number of sequences in the *Fragaria* assembled genomes that showed significant similarity to 34,809 *F. vesca* candidate genes by BLAT analysis



Hirakawa et al. (2013) DNA Research

-heterozygous

Newbler



F. × ananassa
(FANhybrid_r1.2)

Sequences	211,588
Total (bases)	173,229,572
Ave. (bases)	819
Max. (bases)	348,406
N50 (bases)	5,137
G+C%	38.4

+heterozygous

SOAPdenovo

F. × ananassa
(FAN_r1.1)

Sequences	625,966
Total (bases)	697,765,214
Ave. (bases)	1,115
Max. (bases)	51,398
N50 (bases)	2,201
G+C%	38.8

Plant Garden・PGDBjで利用可能

 *Fragaria × ananassa*



この種について

科名: Rosaceae

バラ科

属名: *Fragaria*

オランダイチゴ属

学名: *Fragaria × ananassa*

和名: 栽培イチゴ, イチゴ

ゲノム配列をみる

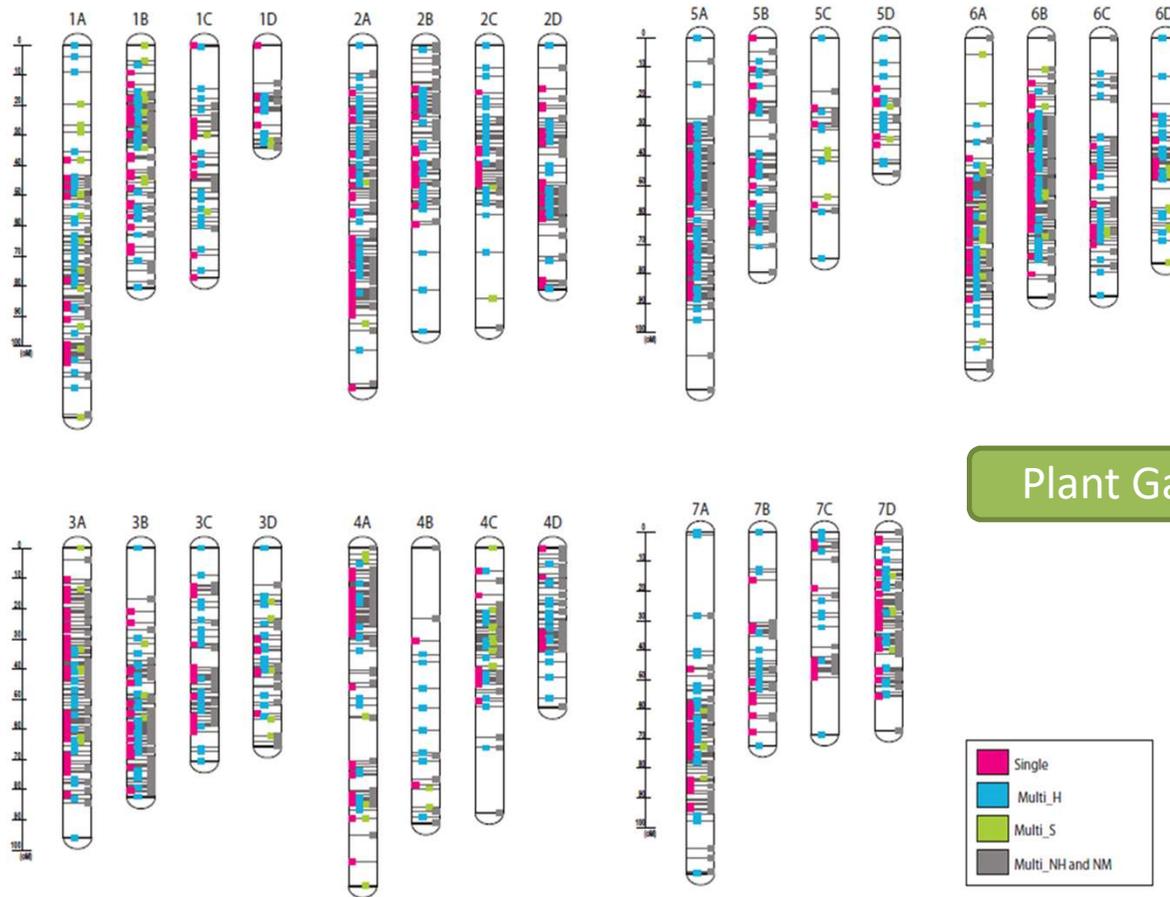
一覧

▶ FANhybrid_r1.2 (Reikou)

アセンブル配列の
高精度化

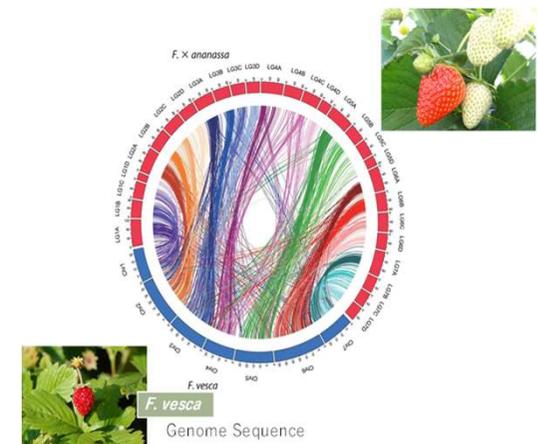
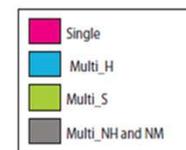
かずさDNA研究所 磯部祥子氏提供

SSR連鎖地図作成



約4000のSSRマーカー
 **マーカーを統合連鎖
 地図上にマップ
 マルチ座が検出される

Plant Garden・PGDBjで利用可能



Isobe et al. (2013) DNA Res

かずさDNA研究所 磯部祥子氏提供

福岡県におけるイチゴDNAマーカー開発

- ・「**福岡S6号(あまおう)**」の特徴をゲノムの面から明らかにして選抜用マーカー開発をしたい！
- ・形質に差のある品種どうしを交配して、後代の遺伝子型と形質を解析
- ・「**福岡S6号**」×「**かおり野**」
F1集団を開発、QTL解析

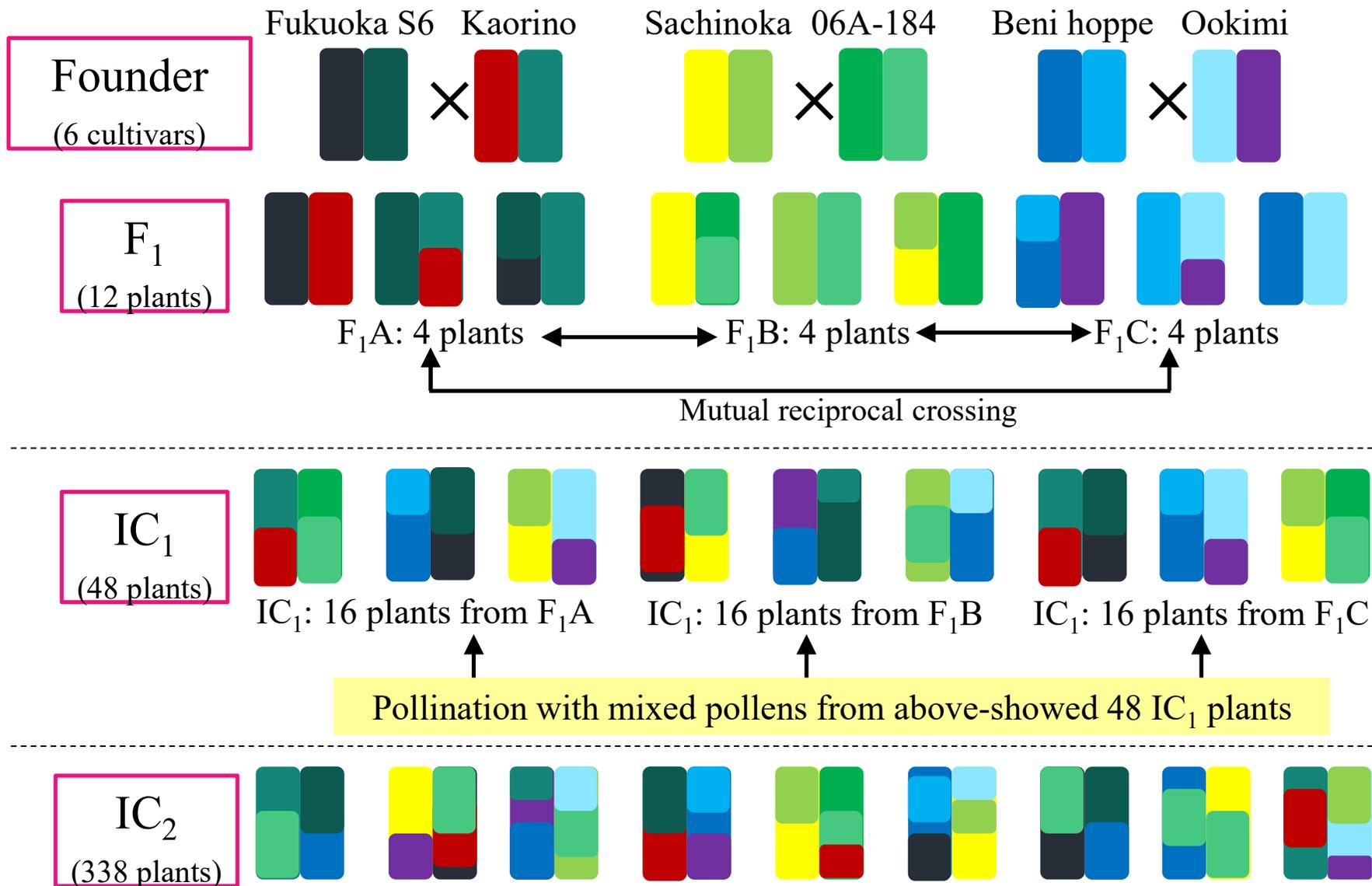


↓

もっと広い遺伝的な多様性を解析できる方法はないか？

形質	あまおう	かおり野
果皮色	濃赤	橙赤
果実肥大	大	中
糖含量	高	低
果実硬度	軟	軟
酸含量	高	低
早晩性	やや晩	早

MAGIC集團育成→GWA解析



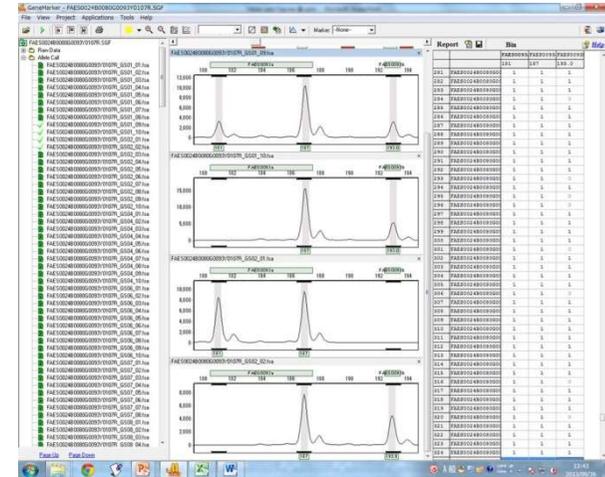
Inter Cross 2nd 世代の338系統育成

解析方法

遺伝子型解析

磁性ビーズを用いてDNA抽出後、
EST-SSRマーカー (Isobe et al. 2013) を
用いてPCR

Genetic Analyzer3730xlによる
蛍光フラグメント解析で親品種系統で650 SSRマーカー、
1659の多型ピークを検出 同マーカーでIC2集団を解析
異なるピークサイズごとに優性マーカーとしてタイピング



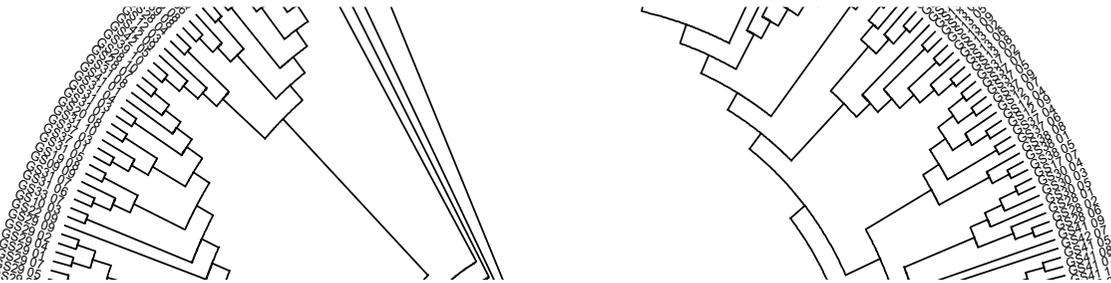
形質評価

実生苗(2013)、ランナー苗(2014~2017)を定植
成熟期に収穫して 果実形質調査
(到花日数-開花期、果重、果実硬度、
果実色、アントシアニン含量、糖度、酸度)

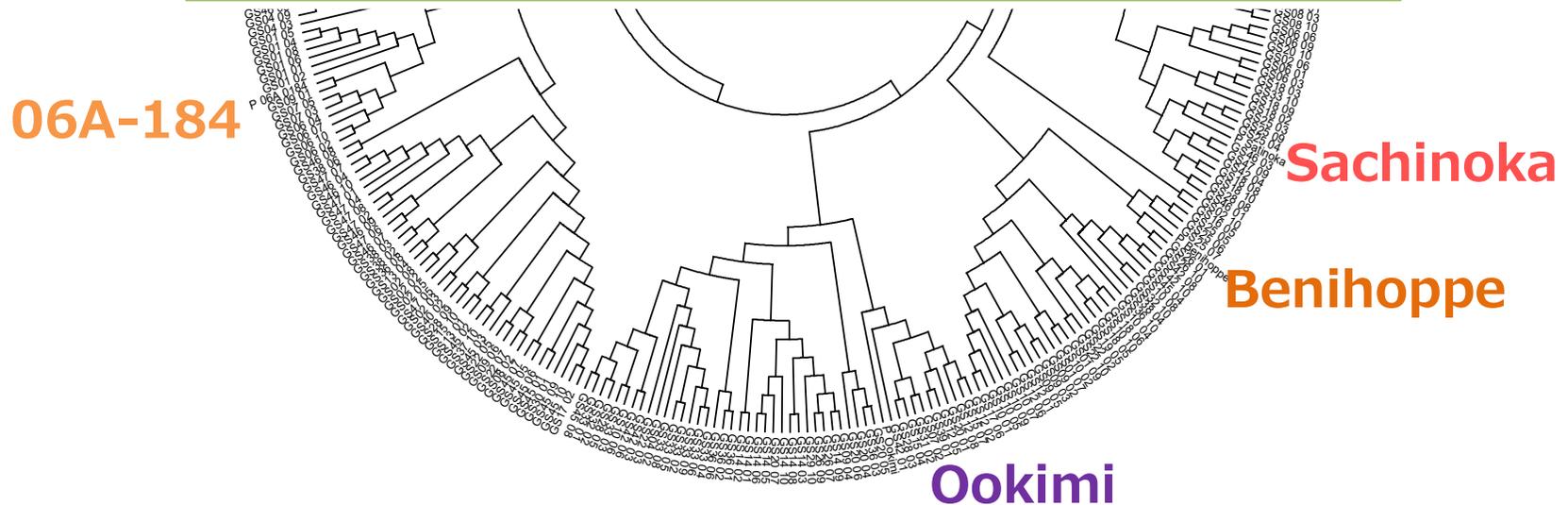


集団構造

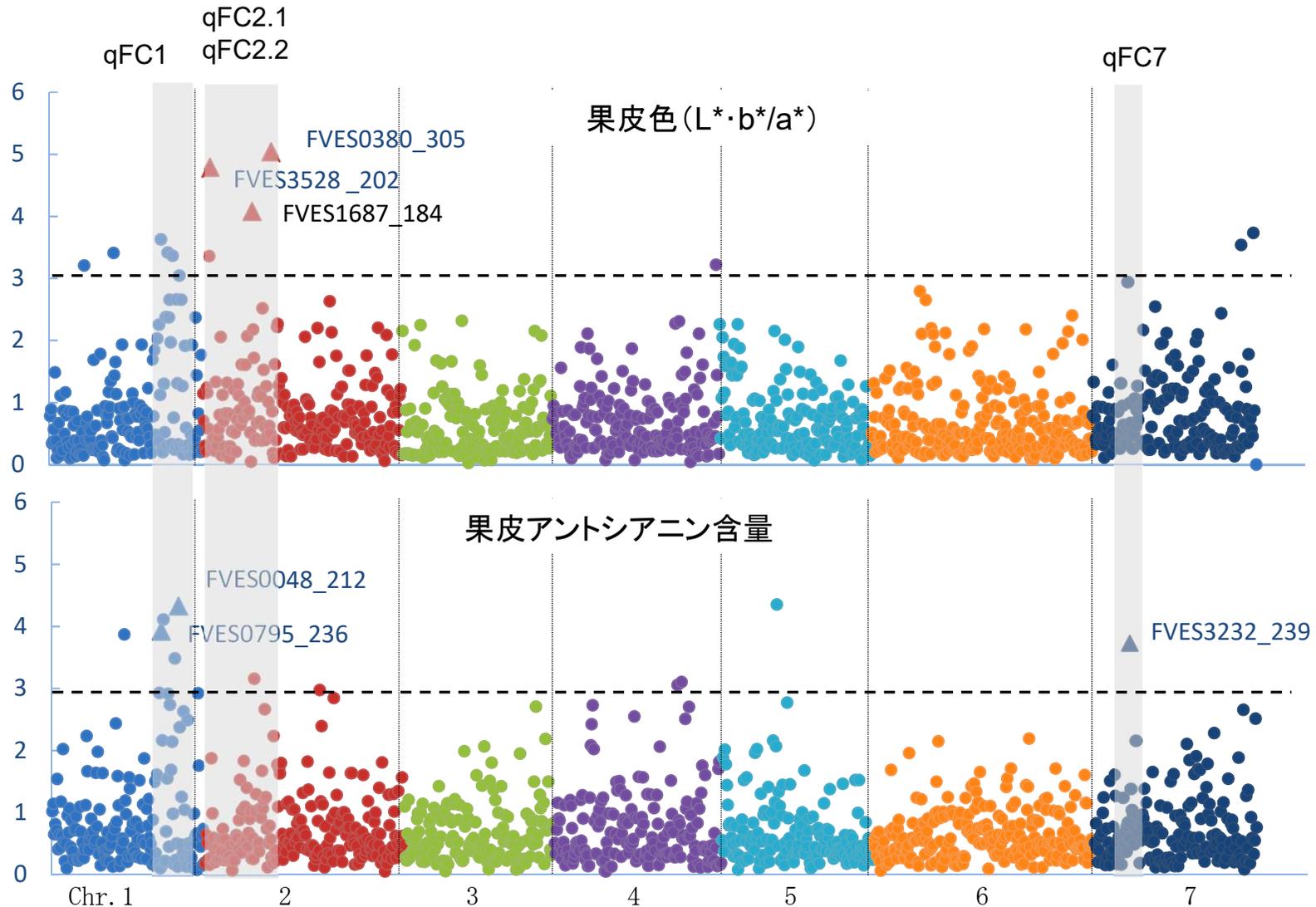
SSRのジェノタイプデータを用いて、クラスター分析と主成分分析で評価



MAGIC集団は元親 (founder) の
ほぼ均等なモザイク集団



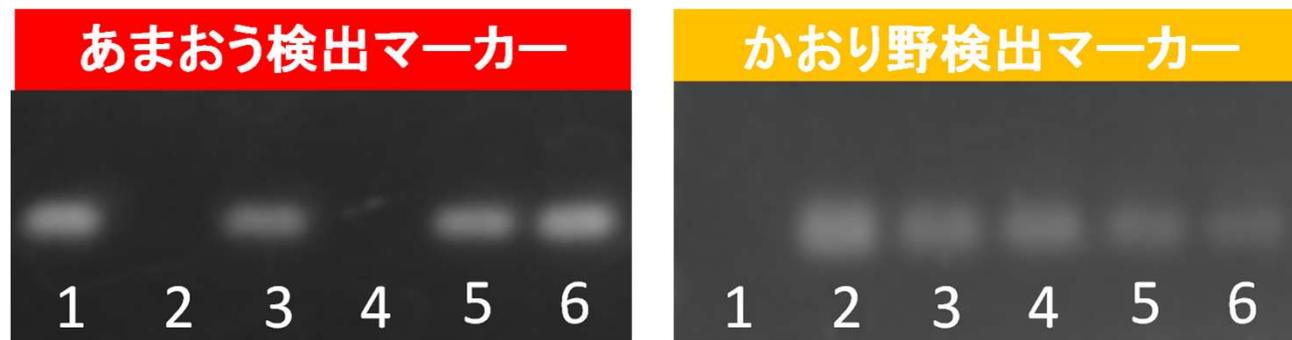
果実色関連QTL



- 1)横軸は染色体番号で、*Fragaria vesca*における座乗染色体番号を示す。
- 2)縦軸は $-\log P$ 値(2013-2016年の4カ年平均)。破線は $-\log P$ 値=3を示す。
- 3)図中の▲印のプロットは、複数年で有意な果皮色QTL近傍マーカーを示す。

選抜用STSマーカーク開発

Plant Gardenの栽培イチゴゲノム情報を利用して、親品種系統の配列を識別するプライマーを作成



1:あまおう、2:かおり野、3:さちのか、
4:06A-184、5:紅ほっぺ、6:おおきみ

qFC2.2 FVES0380のSTSマーカーク

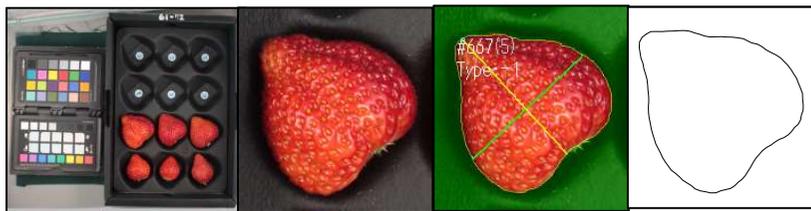
実育種集団で実証中

ゲノム解析・マーカー開発の今後の展望

- 形質

定量化が困難な形質へのアプローチ

イチゴ果実の形状解析



1. 画像二値化: イチゴ画像解析ソフト(林ら2017)で画像を二値化(チェーンコード)
2. フーリエ変換:
チェーンコードをSHAPE on Rでフーリエ変換
3. 主成分分析: 変換後のフーリエ記述子を説明変数とし主成分分析

➡ GWASへ

- 遺伝子型

SSRからSNPへ
ゲノム全体のマーカー数は
SSR : 1,000~1,500箇所



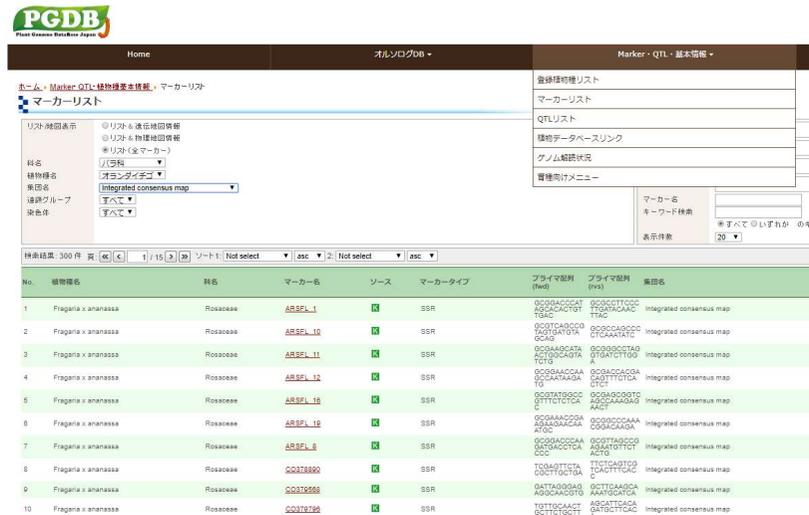
SNP : 10,000~100,000箇所以上

解像度の高い遺伝解析・
マーカー開発が可能

PGDBj・Plant Gardenへリクエスト

■ 現状

ゲノム情報、マーカー情報を整備
形質連関座(QTL情報)を順次追加



No.	種名	科名	マーカー名	ソース	マーカータイプ	プライマー配列 (F/R)	プライマー配列 (F/R)	異名
1	Fragaria x ananassa	Rosaceae	ASSEL_1	IX	SSR	GCGACCCCA TACGACATGT	GCGCCCTCC TTGACACAC	Integrated consensus map
2	Fragaria x ananassa	Rosaceae	ASSEL_10	IX	SSR	GCTTACACG GCTGATGTA	GCGCCACCC CTACATATC	Integrated consensus map
3	Fragaria x ananassa	Rosaceae	ASSEL_11	IX	SSR	GCGAACGCA GCTGACGTA	GCGCCCTAG TTGATGTTG	Integrated consensus map
4	Fragaria x ananassa	Rosaceae	ASSEL_12	IX	SSR	GCGAACGCA GCGAATAAG	GCGCCCTAG GCTTTCTCA	Integrated consensus map
5	Fragaria x ananassa	Rosaceae	ASSEL_16	IX	SSR	GCGTATGCC GTTTCTTCA	GCGCCCTGC GCGAAGAG	Integrated consensus map
6	Fragaria x ananassa	Rosaceae	ASSEL_18	IX	SSR	GCGAACGCA AGAGACACA	GCGCCCAAA CGAGAGA	Integrated consensus map
7	Fragaria x ananassa	Rosaceae	ASSEL_8	IX	SSR	GCGAACGCA GCGACGCTA	GCGCCCTAG AGATGTT	Integrated consensus map
8	Fragaria x ananassa	Rosaceae	CG37880	IX	SSR	TGAGTTCTA GCTTCTCTA	TCTCTAGTG TCTCTTCTC	Integrated consensus map
9	Fragaria x ananassa	Rosaceae	CG37958	IX	SSR	GATGAGGAG AGGAAATGT	GCTTAAACA AAATGCATG	Integrated consensus map
10	Fragaria x ananassa	Rosaceae	CG37236	IX	SSR	TGTTGAACT GCTTCTCTT	AGGATGAG GCGCTTCTC	Integrated consensus map

■ 今後

次世代シーケンサーの開発加速
塩基配列解析コストの低減化
品種間SNP情報の蓄積
トランスクリプトーム情報の収集

静的ゲノム情報

動的ゲノム情報

謝辞

Collaboration

- ◆ かずさDNA研究所 磯部祥子 白澤健太 平川英樹 七夕高也 林篤司
- ◆ 栃木県農業試験場 生井潔 中澤佳子 田崎公久 若柵睦子 岡田香織
大橋隆 飯村一成 鶴見理沙
- ◆ 千葉県農林総合研究センター 渡邊学 津金胤昭 前田ふみ
- ◆ 農研機構野菜花き研究部門 野口裕司 片岡園
- ◆ 大阪大学 中谷明弘 ◆ 香川大学 柳智博

Funding

- ◆ 農林水産・食品産業科学技術研究推進事業（27003A）
- ◆ 実需者等のニーズに対応した園芸作物のDNAマーカーの開発（DHR1）
- ◆ 科学技術研究費補助金（基盤研究C）