

令和2年度侵害対策の推進に資する品種識別手法の開発
検証調査報告書

件名:侵害対策の推進に資する品種識別手法の開発

(受託者)住 所 千葉県木更津市かずさ鎌足2-6-7
公益財団法人かずさDNA 研究所

【概要】

近年の遺伝子技術の大幅な進展のなかで、全ゲノム解読の容易化やゲノム編集技術の確立等を背景に、これまでの交配と選抜の繰り返しによる育種から、遺伝子を活用した育種へと育種方法が変化しており、従来にないスピードでの育種が行われるようになった。UPOVの作業部会においても遺伝子情報活用による植物ごとの品種の類似性・同一性の判別技術の実用化に向けた議論が進められるとともに、オランダを主体とするEUや中国では品種登録における遺伝子情報の積極的な活用に向けた研究開発プロジェクトが進展し、今後、遺伝子情報を活用した技術が確立されれば、UPOVにおいても品種登録等に遺伝子情報を活用する方向へ見直されることも想定される。

我が国においても国際的な議論に資する必要な情報を提示できるようにするために、植物品種保護制度における遺伝子情報の活用に係る技術を確立し、植物ごとの品種の類似性・同一性の判別技術の実用化を図る必要がある。そこで、我が国も国際的な議論に参加するために、オランダが主体となって進めている研究開発プロジェクトに参画し、遺伝子マーカーを活用した品種識別の検証を行う。

● Rad-Seq 法を用いた品種識別マーカーの評価検討

H30 年度及び 31 年度の本事業では、品種識別マーカーとして現在最も利用されている SSR マーカーおよび次世代シーケンサーを用いた Rad-Seq 法および全ゲノムシーケンシング法によって検出された品種間多型の識別能、識別精度、開発コスト等の比較検討、検出された品種間多型についての三手法による検出程度の調査を実施した。その結果、現時点では、Rad-Seq 法によることが最も適当と判断されたところ。

本年度は、ダイコン以外の野菜数品目について、市場流通品種を数品種選定して、Rad-Seq 法による品種識別マーカーの開発と検証を行う。

【目的】

ダイコン以外の野菜数品目について、品目ごとに市場流通品種を数品種ずつ選定する。選定した出所が異なる同一品種から複数サンプル(1品種あたり 12 個体)をサンプル収集し、Rad-Seq 法によって品種内多型検出の有無を確認する。

【方法】

1. 材料

日本種苗協会と協議をし、本事業に作目及び品種について、日本種苗協会で決定することで同意し、日本種苗協会により下記の品種の種子の提供を受けた。

キャベツ:「舞みどり」「未定品種1」「夏玉」「凜」「冬藍」「冬吉郎」

スイカ:「祭りばやし AD」「縞無双 H」「ピノガール」「夏武輝」「マイボーイ」

エダマメ:「とびきり」「いきなまる」「早生黒大豆」「ゆきみどり」「ビアフレンド」「富貴」

2. 実験手法

提供を受けた種子を温室内で播種し、葉サンプルを用いて DNA 抽出装置・oKtopure(LGC Biosearch 社)により1品種当たり 12 個体の DNA 抽出を行った。ddRAD-Seq 解析は Shirasawa et al. (2016)の方法に準じて実施した。すなわち、提供されたゲノム DNA を二種類の制限酵素 (PstI と MspI) で切断した後に、切断末端にアダプターを付加し、未反応の短鎖 DNA を除くために磁気ビーズによる精製を行った。各個体を識別するためのタグ配列を持つプライマーを使用して、精製した DNA を鋳型とした PCR を行い、増幅断片を得た。増幅断片を混合し、自動 DNA 断片ゲル抽出装置 BluePippin (Sage Science)により 300 塩基対から 900 塩基対の長さの DNA を分画して回収した。

配列解析は MGI DNBSeg-G400 により実施し、100 塩基長のペアエンド配列を1レーン取得した。得られた配列を下記の参照ゲノム配列にマッピングした。

キャベツ:Brassica_oleracea.v2.1.31.dna.genome.fa

スイカ:Glycine_max.Glycine_max_v2.1.dna.toplevel.fa

エダマメ:97103_genome_v2.fa

配列データを PRINSEQ (Schmieder and Edwards 2011) 及び fastx_clipper (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit)の各プログラムを使用して品質で精査した。配列のマッピングは Bowtie2 プログラムにより行い、Samtools を用いて変異を検出した。検出した変異を以下の条件でフィルタリングした。

- リファレンスが N でない
- マルチアレルを除く
- Indel を除去しない
- QUAL999 以上
- DP10 以上 500 以下

- max-missing 1.0

検出された変異を用いて GGT2 プログラム (Van Berloo 208) により遺伝距離 (Jaccard 法) を算出し、MEGA により Neighbor Joining 系統樹を作成した。

多型を検出した遺伝子型情報に基づき、系統間の遺伝距離を GGT2 (Van Berloo, R., 1999) により Jaccard 法により算出し、Neighbor-Joining 法により系統樹を作成した。

【結果】

フィルタリング前の候補変異の数はキャベツが 564,215、スイカが 31,354、エダマメが 171,376 だった。フィルタリング後はキャベツが 111、スイカが 107、エダマメが 3,191 となった。フィルタリング後に得られた変異の MAF (Minor Allele Frequency) の平均値はキャベツで 0.245、スイカで 0.213、エダマメで 0.181 だった。MAF の分布を図1に示す。得られた変異で系統樹を作成したところ、以下の結果となった。

キャベツ: 供試した 6 品種はほぼ品種毎のクラスターを形成したが、複数の品種が同一クラスターを形成する場合もあった。同一品種のみのクラスターを形成したのは「凜」、「冬藍」だった(図2)。

スイカ: 供試した 5 品種すべてが品種毎のクラスターを形成し、解析に用いた変異で品種の識別が可能だった(図3)。

エダマメ: 供試した 6 品種のうち 5 品種で品種毎のクラスターを形成した。1 品種(ピアフレンド)は 12 個体のうち 1 個体が本来の品種クラスターと異なる場所に位置した(図4)。

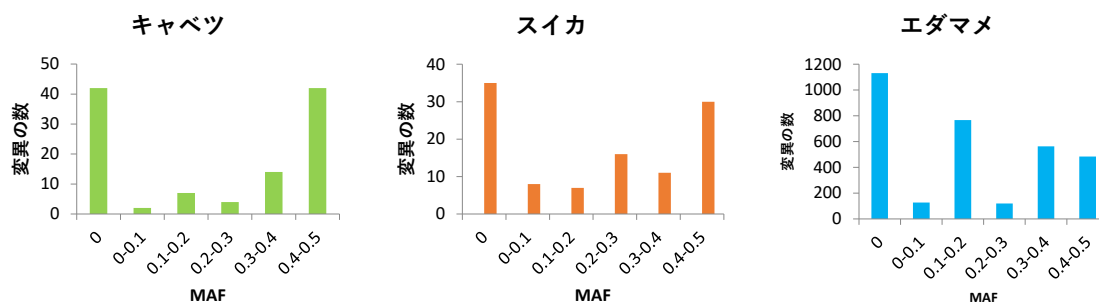


図1 キャベツ、スイカ、エダマメで検出された変異の MAF の分布

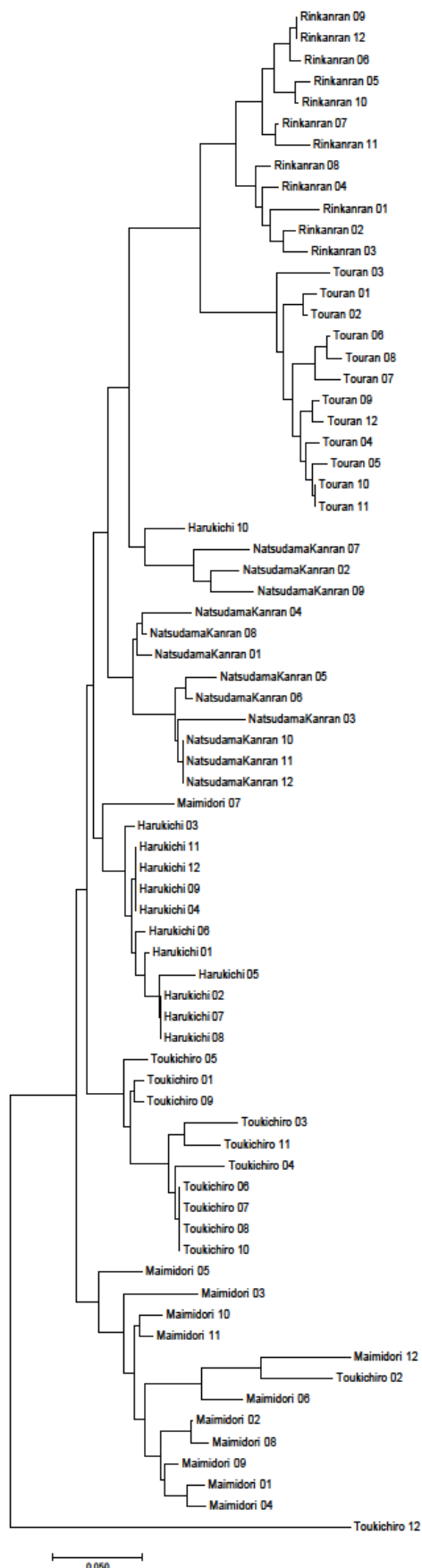


図2 dd-RAD-Seq 法によりキャベツ 6 品種各 12 個体から検出された 111 の SNPs およびIndels により作成された系統樹。品種は「舞みどり」「未定品種1」「夏玉」「凜」「冬藍」「冬吉郎」をアルファベットで表記している。数字は個体番号を示す。

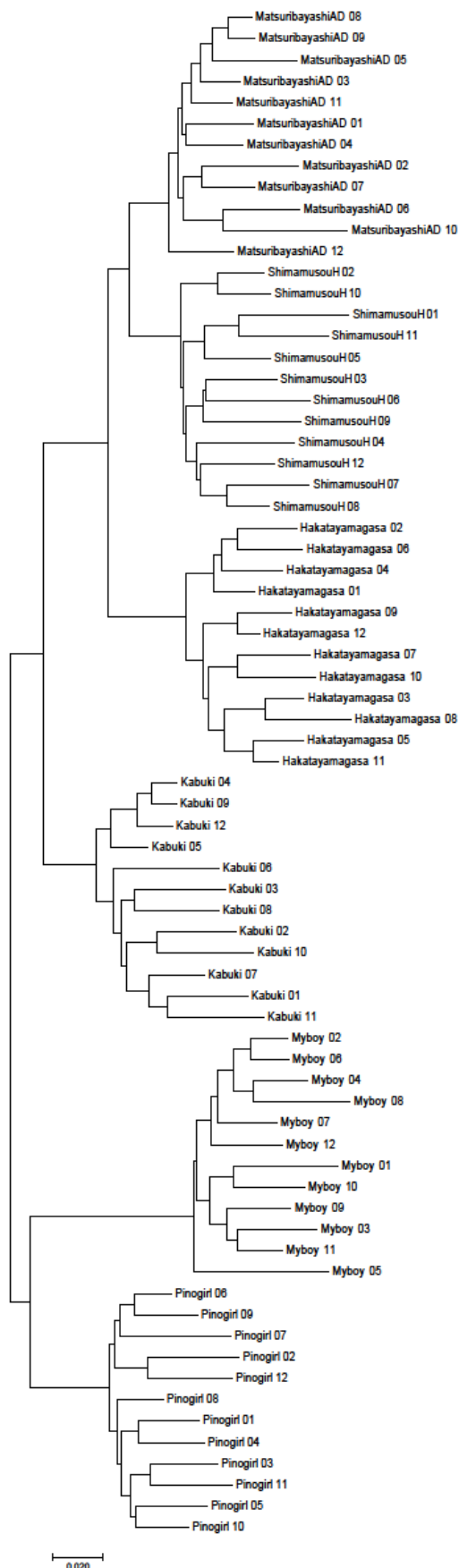


図3 dd-RAD-Seq 法によりスイカ 5 品種各 12 個体から検出された 107 の SNPs およびIndels により作成された系統樹。品種は「祭りばやし AD」「縞無双 H」「ピノガール」「夏武輝」「マイボーイ」をアルファベットで表記している。数字は個体番号を示す。

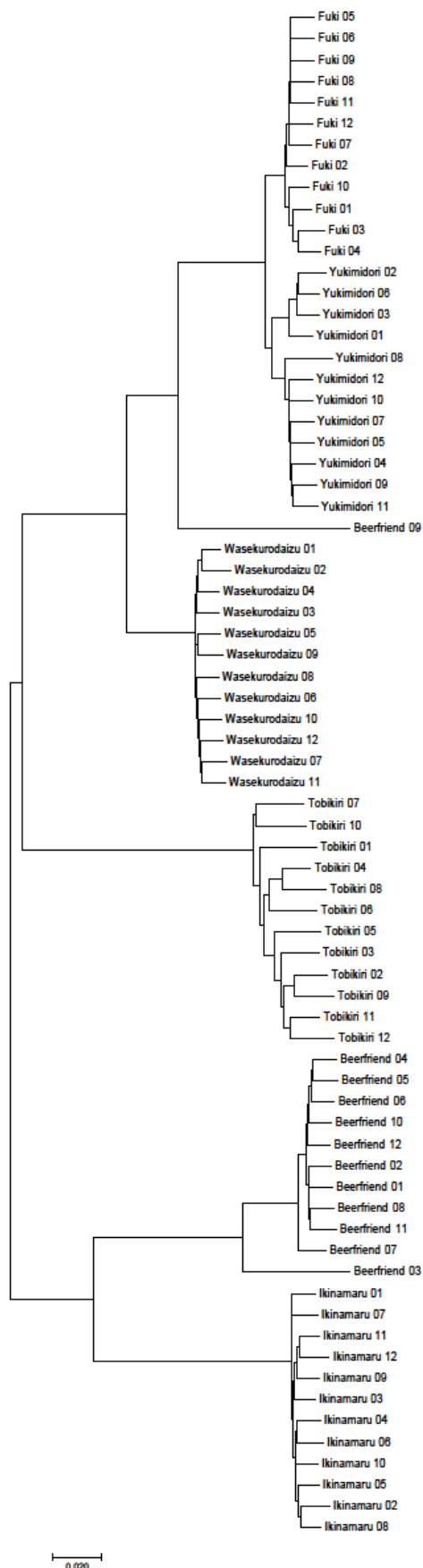


図4 dd-RAD-Seq 法によりエダマメ 6 品種各 12 個体から検出された 3,191 の SNPs およびIndels により作成された系統樹。品種は「とびきり」「いきなまる」「早生黒大豆」「ゆきみどり」「ビアフrend」「富貴」をアルファベットで表記している。数字は個体番号を示す。

【考察】

本検定で行った解析により、スイカ 5 品種全ての識別が可能であり、エダマメでは 6 品種中 5 品種の識別が可能だった。キャベツは本検定では品種識別ができなかったが、クラスタリングに用いる SNPs をより精査することで、識別が可能であると考ええる。