

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Kornlawat Tantivit
審査委員	主査 柳 智博 副査 奥田 延幸 副査 島崎 一彦 副査 西村 安代 副査 片岡 圭子

### 論文名

The accuracy evaluation of linkage map in cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) by direct cycling-primed *in situ* hybridization technique

(直接リサイクリング PRINS 法による栽培イチゴの連鎖地図における正確性の評価)

### 審査結果の要旨

栽培イチゴは、ゲノム構成が AAA'A'BBB'B' の異質八倍体植物である。このような異質倍数体植物は、DNA 配列が非常に類似する同祖染色体を多く持つため、減数分裂時の対合において多価染色体を形成したり、あるいは複雑な分離比を示したりすることがある。従って、異質八倍体の栽培イチゴは、メンデルの法則を基にした遺伝解析が困難であり、また遺伝解析に関する研究がほとんど行われてこなかった。さらに、このことが原因して、栽培イチゴの育種は、理論的な方法がなく、優良品種間での交雑と選抜を繰り返す方法で行われており、極めて非効率で長期間を要するものであった。

しかし、近年における様々な分子生物学的技術の発展により、栽培イチゴ (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) でも、多数の DNA マーカーを用いた連鎖地図が数例公表されている。これらの連鎖地図は、精度が高いものであれば、ゲノム育種を実施する場合、有効であると考えられる。しかし、それらの連鎖地図の精度を評価した研究報告は、ほとんどない。

一方、近年染色体観察の 1 方法として、一本鎖状態の染色体 DNA と蛍光ラベルした DNA マーカーとで分子雑種を形成させ、その部位を蛍光顕微鏡下で観察する技術、すなわち蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法が発展してきた。さらに、FISH 法とポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を応用した Cycling primed *in situ* hybridization (C-PRINS) 法が考案された。この方法は、染色体の DNA と分子雑種を形成した DNA マーカーが伸長反応する時に蛍光ラベルした塩基を取り込ませるというもので、短時間かつ簡便に FISH ができるものである。

そこで、本研究では、栽培イチゴの連鎖地図の精度を評価する方法を確立する目的で、次のような手順を考案した。すなわち、1) イチゴにおける全 28 の連鎖群各々の両端に位置する 2 つの DNA マーカーを選定する、2) C-PRINS 法で片方のマーカーが伸長した部位を赤色で蛍光染色する、3) C-PRINS 法で残りのマーカーが伸長した部位を緑色で蛍光染色する、4) 染色体上で赤および緑色の蛍光部位を蛍光顕微鏡下で特定する、5) もし 1 対 (2 本) の染色体の両端で赤と緑の蛍光が観察できればその連鎖群は正しいと判定する、というシナリオを組み立てて研究を実施した。

第2章では、栽培イチゴを用いた C-PRINS 法を確立する目的で、1) 根端のマセレーション時間、2) 1 次染色で利用する酢酸の濃度、3) スライドサンプルのインキュベーション時間、4) PCR の回数、5) PCR 時の温度の正確性、の各々について検討した。その結果、根端のマセレーション時間は 25 分間、1 次染色で利用する酢酸の濃度は 45%、スライドサンプルのインキュベーション時間は 72 時間、PCR の回数は多い方が良いこと、PCR 時の温度の正確性はカバーガラスをアルミテープで被う方が良いことを、明らかにした。本実験により、イチゴの染色体でも C-PRINS 法でラベルした DNA マーカーの蛍光観察が可能であることが判明した。

第3章では、イチゴの品種識別用に開発された3種類の CAPS DNA マーカー (APX2, F3H3, OLP) を1個および2個を用いて、イチゴの染色体での C-PRINS 法を用いた蛍光染色を検討した。ちなみに、これら3マーカーは連鎖性が高く、同じ染色体上に座上すると考えられるものである。実験結果より、CAPS DNA マーカー1個を用いた場合、どのマーカーでも1対(2本)の染色体で、各々1か所蛍光ラベルされた部分が観察された。一方、CAPS DNA マーカー2個を用いた場合、どの2つのマーカーでも、1対の染色体で各々1か所蛍光ラベルされた部分が観察された。この結果から、2つのマーカーは1本の染色体上の近い位置に座上するため、2つのシグナルが重なって1個に見えたものと考えられた。本実験により、2種類の DNA マーカーを異なる色で蛍光染色を行えば、染色体上で2つのマーカーの位置を明確にできるものと考えられた。

第4章では、多数の SSR マーカーを用いたイチゴの連鎖地図(かずさ DNA 研究所作成)を基に、各連鎖群の両端に位置する1対(2個)のマーカーを選定し、イチゴの染色体で C-PRINS 法を用いた蛍光染色を検討した。その結果、例えば連鎖群 1A では、56本の染色体の内16本で赤色のシグナル、13本で緑色のシグナルが観察できた。その内2本の染色体で赤色のシグナルと緑色のシグナルが観察できた。この結果から 1A 連鎖群は正確であると考えられた。一方、1B 連鎖群は、56本の染色体の内37本で赤色のシグナル、19本で緑色のシグナルが各々観察できた。また、両端に赤と緑のシグナルを持った染色体が3本以上確認できた。この結果から 1B 連鎖群は正確が明確でないと考えられた。これらと同様な方法で、14の連鎖群で正確性が認められた。

以上より、本研究では、1) イチゴの染色体でも C-PRINS 法でラベルした DNA マーカーの蛍光観察が可能であること、2) イチゴの染色体でも2種類の DNA マーカーを異なる色で蛍光染色を行えば、染色体上で2つのマーカーの位置を明確にできること、3) 本手法により連鎖群の正確性を判定できることが、明らかになった。以上の成果は、イチゴの連鎖地図の充実を図るために重要であるだけでなく、多くの異質倍数体植物の連鎖地図の精度を確認する手法として利用できるため、遺伝育種学的な価値も高く、博士(農学)の学位を授与するにあたいするものと考えられた。

2017年8月5日、高知大学農林海洋科学部で開催された学位論文公開審査会で、学位請求論文の口頭発表と質疑応答が行われた。これに引き続き開催された学位論文審査委員会において本論文の内容を慎重に審査した結果、審査委員全員が一致で博士(農学)の学位を授与するに値すると判定した。