



| | |
|--------------|---|
| Title | Characterization and development of the LTR retrotransposon-based DNA markers in a biofuel crop, <i>Jatropha curcas</i> L. |
| Author(s) | Alipour, Atefeh |
| Citation | 大阪大学, 2013, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/34457 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。 |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Synopsis of Thesis

Title:

Characterization and development of the LTR retrotransposon-based DNA markers in a biofuel crop, *Jatropha curcas* L.

(燃料作物*Jatropha curcas* L.におけるLTR型レトロトランスポゾンを利用したDNAマーカーの性質の解明と開発)

Name of Applicant: Atefeh Alipour

In recent years, *Jatropha curcas* L. (jatropha) has attracted global attention for its potential as a source of biodiesel. Although several genetic studies using DNA markers have been conducted, relatively little is known about the genetic variability and population dynamics of this oil crop. Therefore, it is necessary to identify more powerful markers to assess genetic variations. Given the activity of retrotransposons in driving genome diversification, they have recently exploited as more informative molecular markers to assess genetic diversity, gene tagging and the marker-assisted selection of plant species in various ways. However, despite promising features of long terminal repeat (LTR) retrotransposons as ideal genetic tools, retrotransposons have not been characterized in the jatropha genome yet. In an attempt to genotypic characterization of jatropha, two types of LTR retrotransposons (*gypsy* and *copia*) were identified herein for the first time in the jatropha genome. Subsequently, I examined the diversity, evolution, and genome-wide organization of *copia*-type retrotransposons among twelve jatropha populations from Asia, Africa, and the center of origin, Mesoamerica, and introduced the retrotransposon-based marker for this biofuel crop.

In this dissertation, I presented the diversity and chromosomal distribution pattern of *gypsy*-type retrotransposons in Asian accessions of jatropha. A subset of the *gypsy*-type reverse transcriptase (RT) gene was amplified by PCR using degenerate oligonucleotide primers. Analysis of 50 isolated PCR-amplified fragments, showed a range of heterogeneity among predicted amino acid sequences. Comparative phylogenetic analyses of isolated RT fragments together with retrotransposon families from other plants allowed us to identify three families (Jg1-3) of *gypsy*-type retroelements in the genome of jatropha. Jg1 and Jg2 were found as jatropha-specific and belonged to the same lineage which had primer binding sites (PBS) complementary to tRNA^{Arg}. On the other hand, Jg3 of a different lineage included elements of other species and had PBS complementary to tRNA^{Met}. The computer-based data mining of whole-genome of jatropha allowed us to identify a high-copy number *gypsy*-type family R1 of the same lineage as Jg1 and Jg2 that had PBS complementary to tRNA^{Arg}. Further, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis demonstrated that these *gypsy*-type elements are located in the pericentromeric region of jatropha chromosomes.

In this study, the diversity, evolution, and genome-wide organization of *copia*-type retrotransposons in the five African and Asian accessions of jatropha have presented. In total, 157 PCR fragments were amplified using the

degenerate primers for the reverse transcriptase (RT) domain of *copia*-type retro-elements. They were then sequenced and aligned to construct the neighbor-joining tree. Phylogenetic analysis demonstrated that isolated *copia*-type RT sequences were classified into ten families, which were then grouped into three lineages. An in-depth study of the *jatropha* genome for the RT sequences of each family led to the characterization of full consensus sequences of the *jatropha copia*-type families. Estimated copy numbers of target sequences were largely different among families, as were rates of the gene presence in flanking regions for each family. We discovered five *copia*-type families as appealing candidates for the development of DNA marker systems. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of metaphase chromosomes reveals that *copia*-type retrotransposons were scattered across chromosomes, and were mainly located on the distal part regions. These findings provide valuable genetic information for the utilization of *copia*-type retrotransposons as markers of desired genes in breeding programs.

In order to detect sufficient diversity within *J. curcas* around the world for selecting breeding lines, we established the RBIP system for profiling *jatropha* accessions using several recently-retrotransposed elements with completely identical LTR pairs as DNA marker candidates. The PCR analysis of *copia*-type retrotransposons among twelve *jatropha* populations from Asia, Africa, and Mesoamerica, the center of origin, showed that three RBIP markers nominated as *JC7-1*, *JC8-1* and *JC9-1* showed absence of the corresponding retrotransposons in some Mesoamerican *jatropha* accessions. These *copia*-type elements were present in other accessions, including the rest of Mesoamerican accessions and all of Asian and African accessions. These results suggest that the retrotransposition of these marker elements into their loci occurred in Mesoamerica before propagation to other continents. The data presented here revealed that this marker system could provide precise genetic information of *jatropha* genetic resources that is necessary for breeding programs.

This is the first report on the genome-wide analysis and the cytogenetic mapping of LTR retrotransposons of *jatropha*, leading to the discovery of families bearing high potential for DNA markers. We established the RBIP system for profiling *jatropha* accessions using some of *copia*-type retrotransposons as DNA markers. This is a simple technique that can easily be executed by PCR. The data presented here suggests process of *jatropha* distribution from Mesoamerica to the rest of the world. Altogether, the findings in the present study are of great practical importance for *jatropha* breeding programs.

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 (ALIPOUR Atefeh) | | | |
|----------------------|-----|-----|--------|
| | (職) | 氏 名 | |
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教授 | 福井 希一 |
| | 副 査 | 教授 | 仁平 卓也 |
| | 副 査 | 教授 | 村中 俊哉 |
| | 副 査 | 教授 | 原島 俊 |
| | 副 査 | 教授 | 大竹 久夫 |
| | 副 査 | 教授 | 福崎 英一郎 |
| | 副 査 | 教授 | 渡邊 肇 |
| | 副 査 | 教授 | 紀ノ岡 正博 |
| | 副 査 | 教授 | 金谷 茂則 |
| | 副 査 | 教授 | 藤山 和仁 |

論文審査の結果の要旨

Jatropha curcas L. (ジャトロファ)はメキシコから中米にかけての地域を原産とする燃料作物である。乾燥ストレスに強く食糧生産と競合しない次世代の燃料作物として期待されているが、その育種はまだ十分には行われていない。育種を効率的に行うためには信頼性の高い DNA マーカーを作製することが必要である。レトロトランスポゾン(Transposon)は真核生物のゲノムに多く存在する、RNA を中間体として転移する転移因子であるが、その挿入多型を利用した RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism) マーカーは、共優性であり、またその転移反応が不可逆であることから、最も信頼性の高い DNA マーカーのひとつである。さらに本マーカーはレトロトランスポゾンの挿入の全く無い状態を仮想的な祖先系統と定義することができることから、系統分化の歴史を辿る上でもきわめて有用である。しかしジャトロファのレトロトランスポゾンについては、これまでほとんど研究されておらず、RBIP マーカーについても開発されてこなかった。

このような背景に基づき、学位申請者は、ジャトロファにおける LTR 型レトロトランスポゾン(Transposon)を同定してその構造を明らかにし、またそれらの染色体上における分布を明らかにした。また、その結果に基づき RBIP マーカーを作製してジャトロファの系統解析を行い、ジャトロファのアメリカ大陸からの伝播ルートに関する新たな知見を得た。

学位申請者が行った本研究の重要性は二点あげられる。一点目の重要性は、ジャトロファの LTR 型レトロトランスポゾンの構造と染色体上の分布を明らかにしたことである。LTR 型レトロトランスポゾンは copia 型と gypsy 型の 2 種類に大きく分けられるが、本研究によって copia 型の方が gypsy 型より遺伝子の多い領域に分布しており、マーカー作製に適していることが示された。また、LTR 型レトロトランスポゾンは植物ゲノムにおいて最も主要な構成要素のひとつであり、その挿入による突然変異は進化や種分化にも大きく寄与していると考えられている。そのため、その構造と分布を解明することは、ジャトロファのゲノムおよびその分子進化の解析に大きな重要性を持つ。さらに、構造解析から最近活発に転移しているレトロトランスポゾンのファミリーを同定することができるため、本研究の成果は、レトロトランスポゾンの挿入を利用した有用突然変異体の作成やトランスポゾンタギングによる遺伝子同定への応用にも繋がることを期待できる。

二点目の重要性は、ジャトロファにおいて LTR 型レトロトランスポゾンによる RBIP マーカーを開発したことである。RBIP マーカーはどの種類のレトロトランスポゾンを用いても作製することは可能だが、LTR 型レトロトランスポゾンを RBIP マーカーに用いる利点は、そのコピー数の多さと、左右の LTR 配列を比較することで転移年代を推定できるこ

とにある。本研究では、その手法を用いて最近転移した因子を特定し、RBIP マーカーとして用いることによって、ジャトロファ系統間の多型を観察することに成功した。それによって、アメリカ大陸の系統のうち、グアテマラ系統のひとつがアジア・アフリカ系統と最も近年に分岐したことが示され、アジア・アフリカ系統の共通祖先がグアテマラに存在していた可能性が示唆された。

以上のように、本論文は、ジャトロファにおける LTR 型レトロトランスポゾンを同定し染色体上の分布を示した最初の報告であり、それらの結果に基づき信頼性の高い RBIP マーカーの作製に成功したことを述べている。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。