

赤花系イチゴのDNAによる品種識別技術

渡邊 学・石川 正美

キーワード：赤花系イチゴ、品種識別、DNA、CAPSマーカー

I 緒 言

千葉県では2006年に、観賞用の赤花系イチゴ新品種「紅香」及び「桜香」を品種登録出願した。これまでの観賞用イチゴの果実は、ほとんどの品種で品質が悪く食用に適さなかったため、果実品質を向上させた観賞用品種を育成したことにより、花を楽しむだけでなく、果実を食べて楽しめるイチゴとして普及が期待されている。

一方、植物の新品種の保護に関する国際条約 (International Convention for the Protection of New Varieties of Plants, 略称：UPOV条約) の改正に伴い、1998年に種苗法が全面改正された。この中で植物の新たな品種を育成した者は、その新品種を登録することで利用する権利 (育成者権) を占有することができる定められている。近年、育成者権保護のために、一部の作物でDNA分析による品種識別技術が開発されており、権利侵害防止の効果を上げている例もある。

イチゴは栄養繁殖が可能であることから、赤花系新品種の育成者権を保護するために、DNAマーカーによる品種識別技術の開発が求められている。これまでに生食用の白花系イチゴでは、CAPSマーカー (Kunihisa et al., 2003, 2005) 及びRAPD-STCマーカー (田崎ら, 2008a, b; 野村ら, 2005) による品種識別技術が報告されている。特にCAPSマーカーによる識別は、国産主要品種を含む65品種が識別可能であり、インターネットでマニュアルが公開されている (独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 (以下 (独) 野菜茶業研究所), 2007)。一方、赤花系イチゴの品種識別技術に関する報告はない。

本研究では、白花系イチゴで開発されたCAPSマーカー (Kunihisa et al., 2005) を適用して、赤花系イチゴの品種識別技術を確立したので報告する。

本研究は新品種開発スピードアップ事業「新品種現地定着スピードアップ技術の開発」の一環として実施された。

II 材料及び方法

1. 供試品種及び材料

新品種「紅香」、「桜香」及び経済流通している赤花系イチゴ品種「紅春妃」、「桃春妃」、「F1フラグー」を供試した。さらに、千葉県農林総合研究センター育種研究所で育成中の赤花系イチゴ5系統「05-09」、「05-13」、「6SRS124」、「05-40」、「02-19」を併せて供試した。同研究所で栽培している各品種・系統から展開直後の葉を切り取り、DNA抽出用サンプルとした。そしてCAPSマーカーによる多型解析には、白花系イチゴで遺伝子型が既知である育種研究所に保存されていた「とちおとめ」と「ふさの香」を対照品種として供試した。

2. DNAの抽出

DNA抽出用サンプル約100mgを液体窒素下で凍結させながら乳鉢で粉砕した。その後の抽出操作はこれを試料とし、抽出キット (QIAGEN社 DNeasy Plant Mini Kit) を用いてDNAを抽出し、最終的に全量200 μ LのDNA溶液を得た。

このDNA溶液5 μ LをTAE緩衝液中の1.2%アガロースゲルを用いて100V、35分間電気泳動を行った。ゲルをエチジウムブロマイド溶液 (500ng/mL) に10分間浸した後、紫外線照射下で抽出したDNAを確認した。

3. CAPSマーカー

白花系イチゴで開発された25種類のCAPSマーカー ((独) 野菜茶業研究所, 2007) のうち、国際基準に則った妥当性確認済みの15種類の中から、千葉県農林総合研究センター生物工学部植物工学研究室が保有する制限酵素切断を行う13種類のマーカーを使用した。

4. PCR反応及び制限酵素反応

(独) 野菜茶業研究所 (2007) に準じて次のように行った。PCRは反応液量20.0 μ Lにおいて、イチゴ葉から抽出したDNA約5 ng (得られたDNA溶液を滅菌水で10倍希釈したものを2.0 μ L) を鋳型にして、各プライマー (200nM)、0.8mMのdNTP (AmpliTaq Gold付属)、そして1ユニットの耐熱性DNAポリメラーゼとして AmpliTaq

Gold (Applied Biosystems社) で行った。PCR反応は、サーマルサイクラー (Applied Biosystems社 GeneAmp® PCR System 9700) を用い、94°Cで10分間処理した後、94°Cで30秒間、55°Cで30秒間、72°Cで30秒間を1サイクルとして35サイクル行い、72°Cで7分間保温した。このPCR増幅溶液を4°Cで保存した。

PCR増幅溶液5.0μLを用いて、反応液量10.0μLにおいて各制限酵素4ユニット使用し、各制限酵素の最適温度で2時間インキュベートして制限酵素反応溶液を得た。

5. アガロースゲルを用いた電気泳動

制限酵素反応溶液の全量をTAE緩衝液中の2.0%アガロースゲルにおいて100V、35分間電気泳動した。ゲルをエチジウムブロマイド溶液 (500ng/mL) に10分間浸した後、紫外線照射下でバンドパターンを確認・撮影した。

III 結果及び考察

1. DNAの抽出

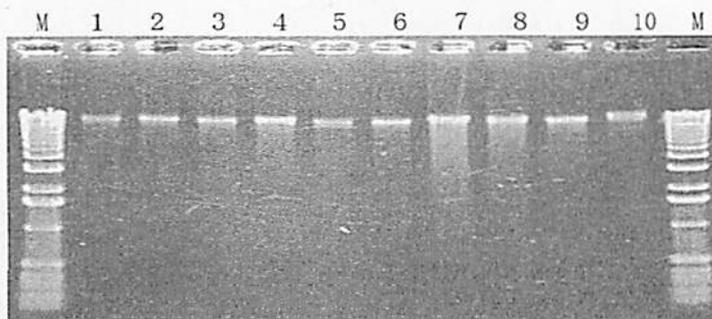
供試した赤花系イチゴの品種・系統から、抽出キット

のプロトコルを変更することなくDNAが抽出でき (第1図)、白花系イチゴで確立された方法が赤花系イチゴにも適用可能であることが確認された。

2. CAPSマーカーによる多型解析

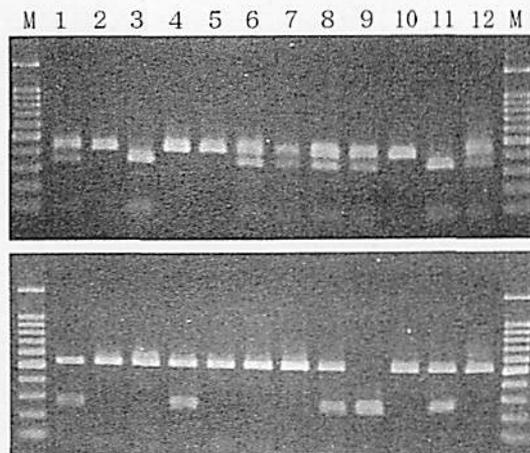
CAPSマーカーF3H-Eam1104I (N) 及びMSR-AluIを用いて得られたバンドパターンは明瞭であり、多型が確認できた (第2図)。同様に他の11種類のCAPSマーカーにおいても、多型が確認された (データ省略)。これらの結果から、バンドパターン別に遺伝子型を解析した結果、使用した13種類のCAPSマーカーにより、供試した10品種・系統を識別することができた (第1表)。また、白花系イチゴの「とちおとめ」及び「ふさの香」は (独) 野菜茶業研究所の報告と同一の遺伝子型を示した。

このことから、用いたCAPSマーカーは赤花系イチゴに適用可能であることが判明し、白花系イチゴと同様の領域を増幅することが示唆された。また、赤花系イチゴに特異的な遺伝子型が確認されなかったことから、これらの遺伝子座が赤花の表現型とは連鎖していないことが推測された。



第1図 赤花系イチゴから抽出したDNAの電気泳動像

M: サイズマーカー (1 kb ラダー)、1: 「紅香」、2: 「05-09」、3: 「05-13」、4: 「6SRS124」、5: 「紅春妃」、6: 「桜香」、7: 「05-40」、8: 「02-19」、9: 「桃春妃」、10: 「F₁フラグラー」



第2図 F3H-Eam1104 (N) と MSR-AluI による電気泳動バンドパターン

写真上: F3H-Eam1104I (N)、写真下 MSR-AluI

M: サイズマーカー (200bp ラダー)、1: 「紅香」、2: 「05-09」、3: 「05-13」、4: 「6SRS124」、5: 「紅春妃」、6: 「桜香」、7: 「05-40」、8: 「02-19」、9: 「桃春妃」、10: 「F₁フラグラー」、11 「とちおとめ」、12 「ふさの香」

第1表 赤花系イチゴの遺伝子型

品種・系統	CAPSマーカー												
	APX-MluI	CHI-PvuII	F3H-Eam1104I (N)	F3H2-HpaII (N)	MSR-AluI	PGPA-RsaI (N)	PGPB-RsaI	APX2-DraI	APX3-DraI (N)	APX4-TaqI (N)	CYT-BsaBI (N)	PYDA-HaeIII	PYDB-HaeIII (N)
「紅香」	BB	A	H	X	H	X	X	X	H	H	B	A	A
「05-09」	BB	A	A	A	A	X	X	X	A	A	B	A	A
「05-13」	BB	A	B	X	A	X	X	X	H	H	B	A	A
「6SRS124」	BB	A	A	X	H	X	X	A	H	H	B	A	A
「紅春妃」	BB	H	A	X	A	A	X	A	A	A	H	A	A
「桜香」	BB	A	H	X	A	X	X	X	A	H	H	A	A
「05-40」	BB	A	H	X	A	X	X	X	H	B	B	A	A
「02-19」	AB	A	H	X	H	X	X	A	H	H	H	H	H
「桃春妃」	BC	H	H	X	B	A	A	A	A	A	H	H	H
「F ₁ フラグー」	AB	B	A	X	A	X	X	A	H	A	B	A	H

注) 表中のアルファベットは遺伝子型 ((独) 野菜茶業研究所, 2007) を示す

IV 摘 要

1. 白花系イチゴで開発された25種類のCAPSマーカーのうち、13マーカーが赤花系イチゴ品種の識別に適用可能であることを確認した。
2. 千葉県が育成した新品種「紅香」及び「桜香」を含む10品種・系統の赤花系イチゴのDNA品種識別技術を確立した。

V 引用文献

Kunihisa M., N. Fukino and S. Matsumoto (2003).
Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica*. 134 : 209-215.

Kunihisa M., N. Fukino and S. Matsumoto (2005).

CAPS markers improved by cluster-specific amplification for octoploid strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) cultivar identification, and their disomic inheritance. *Theor. Appl. Genet.* 110 : 1410-1418.

野村貴浩・天谷正行・田崎公久・楠本憲一・浅尾浩史 (2005). マルチプレックスPCRによるイチゴ品種「アスカルビー」の識別. *近畿中国四国農研究*. 7 : 37-40.

田崎公久・天谷正行・柏谷祐樹・小林俊一 (2008a). イチゴ品種「とちおとめ」および「とちひめ」識別用プライマーセットの開発. *DNA多型*. 16 : 119-128.

田崎公久・柏谷祐樹・小林俊一・天谷正行 (2008b). 日本の主要イチゴ品種を識別するマルチプレックスPCRプライマーセットの開発. *育種学研究*. 10 : 111-115.

Cultivar Differentiation by DNA in Red Flower Strawberry

Manabu WATANABE and Masami ISHIKAWA

Key words : red flower strawberry, identification of cultivars, DNA, CAPS marker

Summary

It was confirmed that 13 CAPS markers are applicable in distinction of red flower strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) variety from 25 CAPS markers of developed with white flower strawberry.

We established a CAPS marker method of distinguishing each of 10 red flower strawberry variety, that is including Chiba Prefecture had breded new cultivars 'Benika' and 'Ouka'.