

イチジクの雌雄を判別するためのSNPマーカーの開発

津金胤昭・渡邊 学・戸谷智明・深見正信

キーワード：イチジク，雌雄判別，DNAマーカー，SNP，PCR

I 緒 言

イチジク (*Ficus carica* L.) は、栽培が容易で生育が早く、比較的短期間で成園化できることから、近年県内全域で栽培されるようになってきている。千葉県における2015年の栽培面積は、31.6haで（農林水産省，2018），主要な品種は「榊井ドーフィン」である。「榊井ドーフィン」は、1908年にアメリカから日本に導入された古い品種で（池上，2015），大果で収量が多いが、糖度等の果実品質が低く（栗村ら，1996；栗村ら，1997），果実がアザミウマの加害を受けやすいなどの欠点があることから（野方・栗村，2005），これに代わる新品種の育成が求められている。

イチジク品種の育成では交雑育種を行うが、交配から結実までは数年を要する。また、イチジクは雌雄異株であるため、育種においてはフィッグ型（雌株）品種を種子親とし、カプリフィッグ型（雄株）品種を花粉親として交配を行う。イチジクの雌雄性を支配する対立遺伝子座は、フィッグ型が劣性ホモであり、カプリフィッグ型は優性ホモもしくはヘテロである（Stover and Aradhya, 2007）。そのため、カプリフィッグ型で雌雄性の遺伝子型がヘテロの個体を花粉親とした場合、後代ではフィッグ型とカプリフィッグ型が1:1に分離し、商品性がある果実を着ける雌株は後代の全株のうちの50%しか得られない。雌雄性があることで、雌雄の判別が可能となる結実まで、商品性が無い雄株のために圃場の半分を要することが、イチジクの育種の効率を低下させる要因となっている。このため、育苗段階での雌雄判別を可能とする遺伝子診断技術の開発が必要とされてきた。

イチジクでは、2017年に品種「蓬萊柿」のゲノム解読が行われ、ゲノム全長の約70%にあたる248Mbの塩基配列とゲノム構造が明らかとなった（Mori et al., 2017）。また、Mori et al. (2017) では、イチジクの性決定に関わる遺伝子の候補として *RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1* (*RANI*) オルソログを同定した。さらに、*RANI* オルソログ遺伝子上の一塩基多型（以下SNPとする）を利用したCAPSマーカーを作出し、122品種・系統について調査した結果、性表現型と遺伝子型が完全に一致したことから、開発したCAPSマ-

ーカーは雌雄判別に利用できると報告している。しかし、CAPS法はPCR後に制限酵素によるDNAの切断を行うため、時間やコストがかかる。また、制限酵素による切断が不十分だった場合、実験結果の判定を誤る可能性がある。一方、深見ら（2009）は、水稻においてイネツマグロヨコバイ抵抗性CAPSマーカーをHayashi et al.(2004)の方法を用いてSNPマーカーに改変し、これにより、1回のPCRで結果が得られるため、簡便に、低コストで抵抗性を判定できると報告している。そこで、本研究ではMori et al.(2017)のCAPS法を改良し、SNPをPCRで検出し、雌雄を判別する方法を開発したので報告する。

本研究を実施するに当たり、イチジクのゲノム配列の提供をいただいた公益財団法人かずさ DNA 研究所白澤健太主任研究員に感謝の意を表す。

II 材料及び方法

1. イチジク雌雄判別用 SNP マーカーの作製

(1) SNP マーカーに用いるプライマーの設計

イチジクの性決定に関与する *RANI* 遺伝子の SNP seq000259_12314 は、雌株ではCのホモ、雄株ではCとTのヘテロである（Mori et al., 2017）。そこで、seq000259_12314 が雄株特異的なTの場合にPCR産物を増幅できるプライマーを設計した。Hayashi ら（2004）の方法に従い、3'末端を雄特異的なSNPの塩基に、3'末端から3塩基目をミスマッチとしたプライマーFigFM_MSf (5'-AAGTCATTCTTGAATAAGGATTAGCAAAAT-3') 及び FigFM_MSr (5'-AAGTAGCGGAAGGTTTAAATTC CA-3') の2種類を作製し、実験に用いた（第1図）。

(2) 植物材料

実験には、フィッグ型（雌株）品種「榊井ドーフィン」とカプリフィッグ型（雄株）系統「M-B11-m51」を用いた。「M-B11-m51」は、フィッグ型品種「榊井ドーフィン」を種子親にカプリフィッグ型系統「B-11」（フィッグ型品種「バナーネ」を種子親に、カプリフィッグ型系統「カプリフィッグ 6085」を花粉親にして育成した系統）を花粉親にして育成した系統である。

(3) DNA抽出とPCR増幅反応

ゲノムDNAは、「榊井ドーフィン」と「M-B11-m51」の

受理日 2018年8月8日



第 1 図 RAN1 遺伝子の配列と雌雄判別 SNP マーカー用プライマーの結合位置

- 注 1) アレル 1: 雌株及び雄株 (ヘテロ) がもつアレル. 塩基の 12314 番目は C, 12389 番目は G. アレル 2: 雄株特異的なアレル. 塩基の 12314 番目は T, 12389 番目は A.
 2) 矢印はプライマーが結合する配列と DNA 合成の方向を示す.
 3) 各プライマーの Tm 値は, FigFM_f が 63.2°C, FigFM_r が 63.5°C, FigFM_msf が 64.6°C, FigFM_msr が 64.4°C. Tm 値は, Na+濃度 50mM, DNA 濃度 0.5µM とし, Nearest Neighbor 法で算出した.

成葉100mgから, DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社製) を用いて抽出し, 滅菌蒸留水で20分の1に希釈してPCRに用いた.

PCRプライマーには, SNPの周辺配列を増幅するために既報のFigFM_f (5'-CAATACCAAAATGATATGCACGA-3') 及びFigFM_r (5'-TGGCATATACAGTGAGATGGATG-3') を使用した (Mori et al., 2017). また, 両プライマーに加えてSNPを検出するためのプライマーFigFM_MSfまたはFigFM_MSrのどちらか一方を用いた.

PCR反応液は, 1.5µLのゲノムDNA, 0.375UのHot start Taq polymerase (タカラバイオ社製), 1.5µLの10x PCR バッファー, 1.2µLの2.5mM dNTPs, 各1µLの10µM FigFM_fプライマー, 10µM FigFM_rプライマー, 及び10µM FigFM_MSfもしくは10µM FigFM_MSrプライマー, を含む15µLの液とした. 反応温度条件は, 95°Cで3分間の熱変性後, 95°Cで30秒間, アニーリング30秒間, 72°Cで30秒間を35サイクル繰り返し, 最後に72°Cで5分間の伸長反応を行うものとした. アニーリング温度は, 45°Cから67°Cまで2°C毎に12段階設定した.

PCR 産物は, 4%のアガロースゲル (SIGMA 社製, Cat.No.A9539) で電気泳動し, DNA 多型を調査した.

2. SNP マーカーと CAPS マーカーの比較

(1) 植物材料

「榊井ドーフィン」と「M-B11-M51」を交配して作出した F1 世代 132 個体を試験に用いた.

(2) DNA 抽出と PCR 増幅反応

ゲノムDNAは, 約5mm角の成葉から, ガラス繊維濾紙チップ法 (Watanabe and Fukami, 2016) を用いて抽出した. 抽出したDNAは, 希釈せずにPCRに用いた.

SNPマーカーでは, PCRプライマーにはFigFM_f, FigFM_r及びFigFM_MSrを用いた. PCRの反応液及び反応条件は前述の試験1と同様とし, アニーリング温度は57°Cとした. PCR産物は, 3%のアガロースゲルで電気泳動し, DNA多型を調査した.

CAPS 法に用いるプライマーと制限酵素は, Mori et al. (2017) の方法に従った. CAPS マーカーでは, PCR 反応液は, 5µLのゲノムDNA, 1.25UのHot start Taq polymerase (タカラバイオ社製), 5µLの10x PCR バッファー, 4µLの2.5mM dNTPs, 各3µLの10µM FigFM_fプライマー及び10µM FigFM_rプライマーを含む50µLの液とした. 反応温度条件は, 95°Cで3分間の熱変性後, 95°Cで30秒間, 57°Cで30秒間, 72°Cで30秒間を35サイクル繰り返し, 最後に72°Cで5分間の伸長反応を行うものとした. 制限酵素切断の反応液は, 45µLのPCR反応液をエタノール沈殿して得たDNA, 0.4Uの制限酵素Pci I (New England Biolabs社製), 2µLのNEBuffer 3.1, を含む20µLの液とした. 反応温度条件は, 37°C, 15~17時間とした. 反応液は, 10%アクリルアミドゲルで電気泳動し, DNA多型を調査した.

III 結果及び考察

1. イチジク雌雄判別用SNPマーカーの開発

イチジク雌雄判別用SNPマーカーのためのプライマー FigFM_MSf及びFigFM_MSrを用い、それぞれ最適なPCR反応条件の検討を行った結果を第2図に示す。

FigFM_MSfを用いた場合、雄株ではアニーリング温度 45～59℃で塩基配列から予想される雌雄共通の315bpと雄特異的な215bpの産物が明確に認められた（第2図A）。

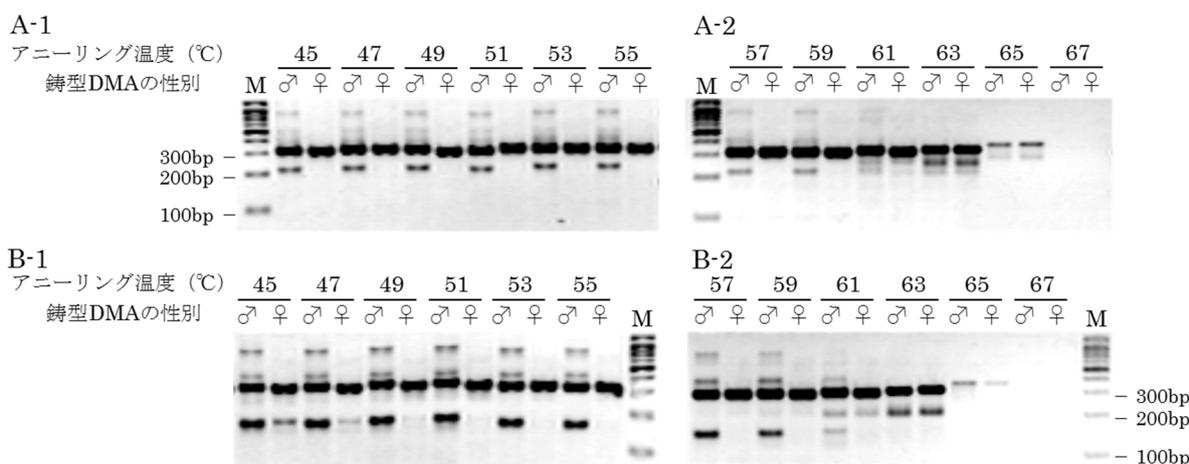
FigFM_MSrを用いた場合、雄株ではアニーリング温度 45～59℃の間で、塩基配列から予想される雌雄共通の315bpと雄特異的な153bpの産物が明確に認められた（第2図B）。

FigFM_MSfとFigFM_MSrのPCR産物を比較すると、FigFM_MSrで得られる雄株特異的PCR産物の方が、合成量が多く、また、雌雄共通のPCR産物との長さの差が162bpと大きいことにより、バンドを明確に確認できた。

以上のことから、イチジクの雌雄判別には FigFM_MSrを用い、アニーリング温度 51～59℃の間で反応することが適切であると判断した。

2. イチジク雌雄判別用SNPマーカーの実用性の検証

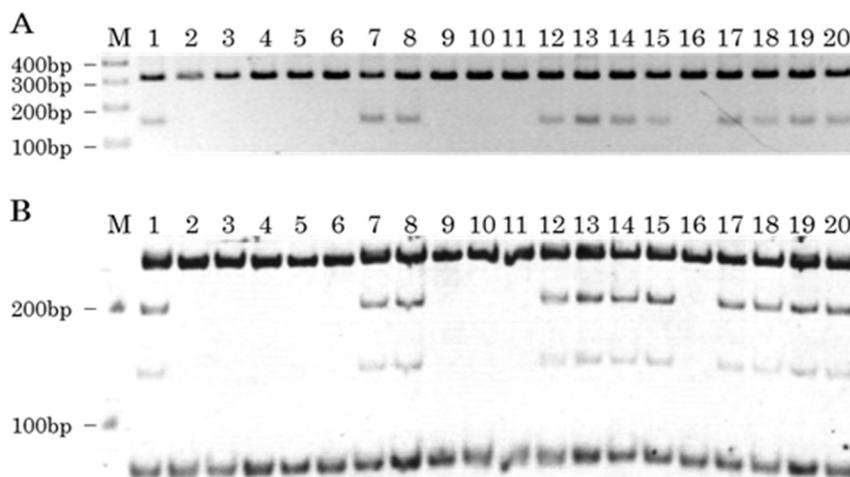
「榊井ドーフィン」と「M-B11-M51」を交配して作出したF1世代の個体についてSNPマーカーを用いて雌雄判別を行った結果、アレルがホモの雌型は69個体、ヘテロの雄型は63個体あった。同じDNAを用いて、Mori et al. (2017) のCAPSマーカーで雌雄判別を行ったところ、結



第2図 異なるアニーリング温度で反応させた雌雄判別 SNP マーカーの PCR 産物

注 1) A: プライマー FigFM_MSf を用いた場合の PCR 産物. A-1: アニーリング温度 45～55℃, A-2: アニーリング温度 57～67℃. B: プライマー FigFM_MSr を用いた場合の PCR 産物. B-1: アニーリング温度 45～55℃, B-2: アニーリング温度 57～67℃

2) M: 分子量マーカー



第3図 「榊井ドーフィン」と「M-B11-M51」を交配して得られた F1 個体の雌雄判別

注 1) F1 個体の一部 (20 個体分) の実験結果を表す。

2) A: アレル特異的 PCR マーカー. B: Mori et al. (2017) の CAPS マーカー. No.2～6, 9～11, 16 が雌型の, No.1, 7, 8, 12～15, 17～20 が雄型のパターンを示す。

3) M: 分子量マーカー. 1～20 の数字は, 個体番号を表す。

果は一致した(第3図)。Mori et al. (2017)において、本CAPSマーカーによりイチジクの雌雄判別が可能であることが示されていることから、CAPSマーカーが判別に利用しているSNPを検出できるSNPマーカーも同様にイチジクの雌雄判別に利用可能であると考えられる。

また、イチジクにおいて、ガラス繊維ろ紙を用いてDNAを粗抽出する簡易な方法で得た全DNAを鋳型にしても、PCRが可能であることが明らかとなった。本技術は、多数の個体について短期間で雌雄判別することが求められる育種の現場で利用が可能であると考えられる。

イチジクの雌雄を決定する遺伝子座は、雌型がホモ、雄型がヘテロとなっているため、F1世代の個体は1:1に分離すると期待される。判別結果について、期待値1:1としてカイ二乗検定を行った結果、有意差は認められなかった($p=0.60$)。今回試験に使用したF1個体の雌雄の分離には、異常な偏りは発生していないと考えられた。

以上のことから、今回開発したSNPマーカーは、イチジクの雌雄判別に利用可能であることが示された。本マーカーは、1回のPCRで雌雄を判別できることから制限酵素による切断を要するCAPSマーカー(Mori et al., 2017)よりも実験に要する時間とコストの面で優れている。本マーカーを用いることで苗の段階で雌雄を判別することが可能となるため、イチジクの品種改良における選抜の効率化が期待できる。

IV 摘 要

イチジクは雌雄異株であるため、雌雄の判別が可能となる結実まで雌雄両株を栽培する必要があり、このことが育種の効率を低下させる要因となっている。そこで、本研究では苗の段階でイチジクの雌雄を判別するため、PCR法によるSNPマーカーを開発した。*RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1* オルソログ遺伝子の配列を用いて、雄に特異的なSNPを検出できるプライマーを設計した。イチジクの雌雄判別にはプライマーFigFM_f, FigFM_r及びFigFM_MSrを用い、アニーリング温度51~59°Cの間でPCRを行うことが適当であると考えられた。本手法を用いることで、イチジクの育種における選抜の効率化が期待できる。

V 引用文献

- 栗村光男・正田耕二・矢羽田二郎(1996)．イチジクの交雑育種における種子親の違いが単為結果性をもつ後代の出現頻度に及ぼす影響．園学雑．65(1):21-26.
- 栗村光男・矢羽田二郎・正田耕二(1997) イチジク交雑実生における果重と果汁の可溶性固形物含量の雌雄および夏秋果間差．園学雑．66(1):77-84.
- 深見正信・西川康之・青木孝一(2009) イネのツマグロヨコバイ抵抗性のDNAマーカー選抜のためのSNP判別PCRの利用．千葉農林総研研報．1:51-54.
- Hayashi,K., N.Hashimoto, M.Daigen and I.Ashikawa (2004) Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. Theor. Appl. Genet.108:1212-1220.
- 池上秀利(2015) イチジク (*Ficus carica* L.) の分子マーカー育種に向けた基礎的研究．京都大学博士論文.
- Mori,K., K. Shirasawa, H. Nogata, C. Hirata, K. Tashiro, T. Habu, S. Kim, S. Himeno, S. Kuhara and H. Ikegami (2017) Identification of RAN1 orthologue associated with sex determination through whole genome sequencing analysis in fig (*Ficus carica* L.). Sci. Rep.7:41124.
<<http://www.nature.com/articles/srep41124>> 最終アクセス2018年6月27日.
- 農林水産省(2018) 平成27年産特産果樹生産動態等調査.
<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/index.html#r>最終アクセス2018年7月28日.
- 野方仁・栗村光男(2005) イチジク新品種'H156-70'の育成．福岡農総試研報．24:104-107.
- Stover, E. and M. Aradhya (2007) The fig:overview of an ancient fruit. Hort. Sci.42(5):1083-1087.
- Watanabe, M. and M. Fukami (2016) Modification of the filter-inserted tip method for simple and rapid DNA extraction from strawberry. Plant Biotech.33:133-136.

Development of an SNP marker for sex determination of figs using PCR

Taneaki TSUGANE, Manabu WATANABE, Tomoaki TOYA
and Masanobu FUKAMI

Key words: fig, *Ficus carica* L., sex determination, DNA marker, SNP

Summary

The fig (*Ficus carica* L.) has sex differences. To distinguish between them, breeders must cultivate both male and female plants until they fruit, which reduces the efficiency of fig breeding. To determine sex of figs at the seedling stage, we have developed a PCR-based SNP marker. A set of PCR primers for male-specific SNP detection was designed based on the sequence of the *RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1* orthologue gene, which is associated with the sex determinants of figs. PCR reaction using the primers FigFM_f, FigFM_r, and FigFM_MSr at an annealing temperature at 51 - 59 °C showed favorable results. The PCR protocol developed in this study has significant potential for assisting the breeding of figs.