

試験研究成果普及情報

| 部門 | 果樹 | 対象 | 研究 |
|---|---------------|------------|---------|
| 課題名：イチジクの雌雄を簡易に判別できる DNA マーカーの開発 | | | |
| 〔要約〕開発したプライマーセットを用いた PCR により、増幅される DNA 断片長の違いからイチジクの雌雄を簡易に判別できる。これにより、育種選抜の初期段階で雌株を効率的に選抜できる。 | | | |
| キーワード イチジク、雌雄判別、DNA マーカー、育種 | | | |
| 実施機関名 | 主 査 | 農林総合研究センター | 生物工学研究室 |
| | 協力機関 | 農林総合研究センター | 果樹研究室 |
| 実施期間 | 2017年度～2018年度 | | |

〔目的及び背景〕

イチジクは雌雄異株の果樹である。そのため、育種選抜を行う場合には雌雄の判別が可能となる結実まで雌雄両株を2～3年栽培する必要がある、このことが育種の効率を低下させる要因となっている。一方、イチジクの雌雄判別法として近年 CAPS 法が開発されているが、この方法は多大なコストと労力を要する。そこで、PCR 法のみで簡易にイチジクの雌雄を判別できる DNA マーカーを開発する。

〔成果内容〕

- 1 イチジクは雌雄判別に利用可能な遺伝子 *RAN1* orthologue を2個保有しており、一方の DNA 配列が雄型の場合に雄株となる。そこで、雄型の DNA 配列を特異的に検出できるプライマー FigFM_MSr を含むプライマーセットを開発した（表1）。
- 2 調査対象株から一般的な方法によって DNA を抽出し、表1に記載したプライマーセットを用いて、表2の反応液組成で PCR を行う。PCR 産物を、4%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、DNA 断片長を測定する（図1）。DNA 断片長から雄型の DNA 配列の有無を検出でき、調査対象株の性別を判別することができる。
- 3 雌雄の株が含まれる選抜集団を材料に用いた、従来の雌雄判別法（CAPS 法）と新たに開発した方法による雌雄判別の結果が完全に一致したことから、新たに開発した方法はイチジクの雌雄判別に使用できる（表3）。
- 4 従来の雌雄判別法（CAPS 法）に比べ、新たに開発した方法は試薬代を約70%、実験に要する時間を約87%削減できる（表4）。
- 5 従来の CAPS 法では制限酵素による PCR 産物の切断が必要であったが、今回開発した方法では制限酵素を用いた切断の作業が不要なため、コストと時間を削減できる。

[留意事項]

DNA を末端から分解する 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA 合成酵素を使用した場合、プライマーが分解されて DNA マーカーによる判別ができなくなる可能性があるため、本実験には同活性を保有しない酵素を使用する。

[普及対象地域]

イチジクの育種担当者

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表 1 イチジク雌雄判別マーカーの PCR に用いるプライマー

| プライマー名 | 塩基配列 | 塩基数 (bp) |
|-----------|--------------------------|----------|
| FigFM_f | CAATACCAAAAATGATATGCACGA | 23 |
| FigFM_r | TGGCATATACAGTGAGATGGATG | 23 |
| FigFM_MSr | AAGTAGCGGAAGGTTTAAATTCCA | 24 |

表 2 イチジク雌雄判別マーカーの PCR 反応液組成

| 成分 | 量 (μl) |
|-----------------|--------|
| 滅菌蒸留水 | 7.725 |
| 10×PCRバッファー | 1.5 |
| 2.5mM dNTPs | 1.2 |
| 10 μM FigFM_f | 1.0 |
| 10 μM FigFM_r | 1.0 |
| 10 μM FigFM_MSr | 1.0 |
| 5U/μl DNA合成酵素 | 0.075 |
| 鋳型DNA | 1.5 |
| 合計 | 15.0 |

注) 反応温度条件は、95℃ 3 分間の熱変性後、95℃ 30 秒間・57℃ 30 秒間・72℃ 30 秒間を 35 サイクル繰り返し、72℃ 5 分間の反応を行う

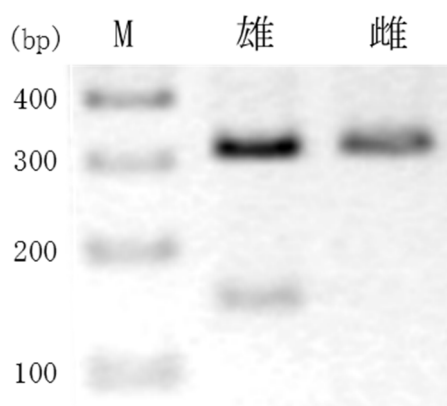


図 1 イチジク雌雄判別マーカーの電気泳動像

注 1) M: DNA サイズマーカー
 雄: 雄株を用いた実験では、315bp と 153bp の DNA 断片が検出される。153bp が雄株特異的な DNA 断片である。
 雌: 雌株を用いた実験では、315bp の DNA 断片が検出される。

表3 イチジク雌雄判別マーカーを用いた選抜集団の雌雄判別の結果

| | 雌型 | 雄型 | 合計 |
|----------------------|----|----|-----|
| イチジク雌雄判別マーカー | 69 | 63 | 132 |
| Moriら(2017)のCAPSマーカー | 69 | 63 | 132 |
| 両方法で雌雄判別の結果が一致した個体の数 | 69 | 63 | 132 |

注) 両マーカーとも雌雄判別に利用可能な遺伝子 *RANI* orthologue を標的としたものである

表4 イチジクの雌雄判別に必要な試薬代及び時間

| | 作業 | 試薬名 | 試薬代 (円) | 時間 (分) | |
|----------------------|----------------------|-----------|---------|--------|--------|
| イチジク雌雄判別マーカー | PCR | プライマー | 315 | 150 | |
| | | PCR酵素 | 3,643 | | |
| | 電気泳動 | アガロース | 886 | 61 | |
| | | サイズマーカー | 48 | | |
| | 計 | | | 4,892 | 211 |
| | (CAPSマーカーに対する比率 (%)) | | | (31.5) | (13.4) |
| Moriら(2017)のCAPSマーカー | PCR | プライマー | 628 | 150 | |
| | | PCR酵素 | 12,144 | | |
| | 電気泳動 | アガロース | 443 | 33 | |
| | | サイズマーカー | 48 | | |
| | エタノール沈殿 | エタノール | 93 | 240 | |
| | 制限酵素切断 | 制限酵素 | 2,028 | 970 | |
| | 電気泳動 | アクリルアミド | 48 | 177 | |
| | | ビスアクリルアミド | 17 | | |
| | | TEMED | 21 | | |
| | | サイズマーカー | 48 | | |
| | 計 | | | 15,518 | 1570 |

注) 96株のDNAを用いて実験した場合に必要な主要な試薬の代金と実験に要する時間を示した

[発表及び関連文献]

- 1 津金ら、イチジクの雌雄を判別するためのSNPマーカーの開発、千葉県農林総合研究センター研究報告、第11号、2019年
- 2 Moriら、Identification of *RANI* orthologue associated with sex determination through whole genome sequencing analysis in fig (*Ficus carica* L.)、Scientific Reports、第7号、2017年

[その他]

プロジェクト研究事業「千葉県の新たな時代を切り開くオリジナル品種の開発」
(平成29～令和3年度)