

ナス品種‘サラダ紫’のF₁純度検定用SSRマーカーの選定と品種判別

久保深雪・聖代橋史佳・吉田誠

SSR Molecular Markers that can detect the Genetic Purity and Variety Determination in a F₁ Variety of Eggplant ‘Sarada Murasaki’.

Miyuki KUBO, Fumika MIYOHASHI, Makoto YOSHIDA

摘 要

本県で育成したナス品種‘サラダ紫’は、F₁品種である。F₁品種においては、母親系統の自殖種子に由来する個体の混入が、種子の品質を低下させる要因となる。そこで、‘サラダ紫’のF₁純度検定用のDNAマーカーの開発を行い、併せて、品種識別できるSimple Sequence Repeat (SSR)マーカーセットを選定した。選定したSSRマーカーは、増幅反応後に蛍光色素で標識するポストラベル法を用いたPCRで検出することができた。

キーワード：ナス、品種識別、SSRマーカー、ポストラベル法

Summary

A F₁ hybrid eggplant cultivar, ‘Sarada Murasaki’, had been developed and released by Kanagawa Agricultural Technology Center. In the F₁ hybrid seed production system, contamination of seeds from the female parents leads to loss of seed purity. For this reason, we developed a F₁ purity test cultivar discrimination system using Simple Sequence Repeat (SSR) DNA markers. These markers were detected by DNA sequencer after Polymerase Chain Reaction (PCR) with post-labeling method.

Key words: eggplant, cultivar diagnosis, SSR marker, post-labeling method

緒 言

神奈川県では、地場で生産される野菜をその地で販売する「地産地消」を推進している。品種の育成は「地産地消」を推進する上で極めて有効な手段となる。近年、生で食べられるサラダ用品目の需要が伸び、従来、加熱や漬物など加工調理して食べるのが普通であった野菜類も新たにサラダ用として利用されるようになってきている。そこで、生食用として利用できる多汁質なナス品種の育成に取り組み、F₁品種‘サラダ紫’を育成した(北ら2009)。F₁品種においては、交配時の除雄が不完全な場合には、F₁種子に母親系統の自殖種子が混入してしまうため、適切な管理と評価が重要であり、

純度検定法を確立する必要がある。また、‘サラダ紫’の花粉親は、大阪府茨木市で栽培されていた在来の‘水茄子’の一系統から分離・選抜した‘M06’、種子親は‘ネパール在来種’に‘黒十全’を交雑し、さらにその後代に‘和泉水茄子’を交雑して得られた系統から分離・選抜した‘E5806’である(北ら2009)。このため、‘サラダ紫’の果実は巾着型で‘水茄子’に良く似ている。

水稻では、品種識別については複数の民間企業による識別サービスが早くから行われ、分析キットも販売されている(癸生川ら2013)。野菜においてもDNAマーカーによる品種識別法開発が進められている(大澤2004)。なかでも、Simple Sequence Repeat (SSR)

マーカーは共優性マーカーとして使うことができ、複数のアレルの識別や再現性の高さから、F₁種子の純度検定、品種識別やマーカー利用選抜に利用されている(塚崎 2010, Honjo ら 2011, Tanaka ら 2014). 最近では、ナスについても分子マーカーが開発され、SSR マーカーが公開されていることから(布目 2005, Fukuoka ら 2012), SSR マーカーを用いた品種識別技術が開発されている(谷本ら 2006). SSR マーカーは再現性が高いが、数塩基の違いを検出する高い解像度が必要となる. このため、蛍光色素で標識したオリゴDNAプライマーを利用してDNAシーケンサーで多型を分析する手法が広く利用されている. しかし、高価な蛍光標識プライマーをDNAマーカーごとに合成する必要があり、導入をためらう要因となっている. 一方、増幅反応後に蛍光色素で標識するポストラベル法は、高精度で低コストなDNAマーカー分析法として開発されてきた(癸生川ら 2013, Schuelke 2000, Shimizu and Yano 2011).

そこで、本県で育成した‘サラダ紫’についてF₁検定と併せて品種識別できるSSRマーカーセットを選定するとともに、汎用的で経済性に優れたポストラベル法について検討した.

材料及び方法

1. 供試材料

F₁種子の純度検定に、‘サラダ紫’、‘M06’(花粉親)及び‘E5806’(種子親)を供試した. また、品種識別には、‘サラダ紫’、‘泉州絹皮水茄子’、‘泉州水茄子’、‘山科ナス’、‘美男’、‘太助大丸’、‘新潟黒十全’、‘SL紫水’、‘みず茄’および‘千両二号’の計10品種を用いた. 供試組織として、葉身を用いた.

2. DNA抽出

供試した材料の葉身を用いて、全DNAをCetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)法(Murray and Thompson 1980, 島本・佐々木 1997)により抽出した. 凍結した葉身0.1gは、1.5 ml マイクロチューブに入れ、そこに直径5 mmのステンレスビーズ1個を入れ、破砕機シェイクマスター(バイオメディカルサイエンス社)を用いて破砕した後、350 µlのCATBバッ

ファーを加えてDNA抽出を行った. CTAB法で抽出したDNAは、TEバッファー(10mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0)に溶解して分光光度計により濃度を測定し、PCR反応に供試した.

3. 供試プライマー

プライマーは、VegMarks (http://vegmarks.nivot.affrc.go.jp/VegMarks/jsp/index_j.jsp)で公開されている品種間の多型が比較的大きい33種類のSSRマーカーを選定した(表1). ただし、ポストラベル法では、シーケンサーによって多型検出を行うため、Shimizu and Yano (2011)の方法に従い、SSRマーカーのフォワードプライマー配列の5'末端に16bpのタグ配列(BStag), F9GAC: 5'-CTAGTATCAGGACGAC-3', または F9GTC: 5'-CTAGTATCAGGACGTC-3', を付加して使用した. また、BStagプライマーとして、付加したBStagと対応するオリゴプライマーに蛍光標識をして使用した.

表1 選定したナスのSSRマーカー

連鎖群	マーカー名			
E_01	emg11M09	emh05B02	eme03H10	
E_02	emf11G04	emj05M23		
E_03	emk01C06	emk01J09	emh11E08	
E_04	emh11I06	emj03E23		
E_05	ecm040	emh05H12		
E_06	emk03O04	emg01B17	emf01O04	
E_07	emf11K21	emh11H03		
E_08	eme08D09	emg21J23	emi05G09	emf21H22
E_09	emf11H23	emj02F08		
E_10	emh11L01	emi02I01		
E_11	emi02E03	emi04H10	emk02K24	emi04J02
	emf21K08	emh02A04		
E_12	emj02M05	emi03B14		

4. PCR方法および増幅産物の検出

PCR反応液組成は、1 × Reaction Buffer, 0.2 mM dNTP mix, 0.125 µM フォワードプライマー, 0.125 µM リバースプライマー, 0.5 U の ExTaq Polymerase (Takara 社) と CTAB 法で抽出した 500 ng の鋳型

DNAを加え20 µlの液量とした。反応条件は94°C・3分の後、94°C・30秒、60~50°C・30秒、72°C・30秒を40回繰り返した後、72°C7分とし、アニーリング温度は60°C、58°C、56°C、50°Cの4段階に設定した。PCR産物はアガロースゲルを用いて電気泳動し解析を行った。

5. ポストラベル法による増幅産物の検出

ポストラベル法では、PCR反応液組成は、1 × Reaction Buffer, 0.2 mM dNTP mix, 0.05 µM フォワードプライマー, 0.2 µM リバースプライマー, 0.05 µM BStag プライマー, 0.5 U の ExTaq Polymerase, 100 ng の鋳型 DNA を加え 10 µl の液量とした。反応条件は94°C3分の後94°C20秒, 55°C30秒, 72°C30秒を35サイクルの増幅反応後に引き続き94°C20秒, 49°C10秒, 72°C5秒を3サイクルの反応を追加した後、72°C10分とした。PCR産物は30倍に希釈し、1µlの希釈液に10µlの1/1000 GeneScan™ Size Standard 500Liz (Applied Biosystems 社)を含むホルムアミドを加えた後、3130 GeneticAnalyzer (Applied Biosystems 社)で泳動した。泳動結果は、GeneMapper (Applied Biosystems 社)で解析した。

結 果

1. F₁ 検定

(1) SSR マーカーの選抜

供試した33組のプライマーのうち emf21K08, emh02A04, を除いた31組について‘サラダ紫’, 花粉親系統‘M06’及び種子親系統‘E5806’を用いてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動を用いて増幅産物を検出した。emi04J02をアニーリング温度50°Cで増幅したところ、‘サラダ紫’及び花粉親系統‘M06’では、100から200bpの間に1本のバンドが検出された。一方で、種子親系統‘E5806’ではバンドの増幅は認められなかった(図1)。また、アニーリング温度が高いと‘サラダ紫’及び花粉親系統‘M06’でもバンドが検出されなかった。

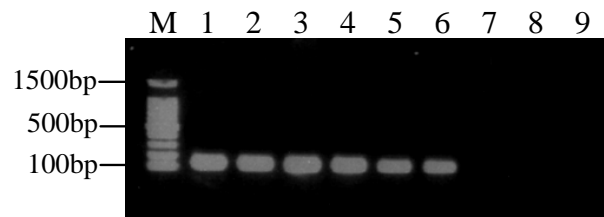


図1 電気泳動によるSSR マーカーemi04J02の検出

M:分子マーカー、1~3:‘サラダ紫’、4~6:‘M06’(花粉親)、7~9:‘E5806’(種子親)

(2) 純度検定

選定したemi04J02を用いて2008年産‘サラダ紫’50個体の純度検定を行った結果、供試した全ての個体でバンドが検出され、F₁交雑種子であることが明らかになった。供試した採種ロットは、遺伝的に純度の高いことがわかった。

2. 品種判別

(1) 品種識別用 SSR マーカーの選抜

F₁検定に供試した31組のプライマーについて、10品種を用いてPCRを行い、アガロースゲル電気泳動を用いて増幅産物を検出した。その結果、品種間多型が検出されたが、アガロースゲル電気泳動による検出では、多型バンドのサイズ差が小さいため10品種すべての判別はできなかった。そこで、品種間多型が検出されたSSRマーカーのうち4組についてポストラベル法により蛍光色素で標識して多型分析を行った。emi04J02については、蛍光が検出できなかったため、近傍のemf21K08及びemh02A04を増幅するプライマーを追加し、計5組のプライマーについてポストラベル法による検出を行った。その結果、emc040及びemf21H22では3アレルが、emg11M09及びemf21K08では4アレルが、emh02A04では5アレルが検出された(表2)。「サラダ紫」と供試した9品種とはemf21H22で判別ができた(表2, 図2)。また、emg11M09及びemf21K08の2組のマーカーを用いると、「泉州絹皮茄子」と「泉州水茄子」間を除く供試ナス品種を識別することができた(表2)。

品種名	マーカー名及びマーカーサイズ					
	emg11M09	ecm040	emf21H22	emi04J02	emf21K08	emh02A04
サラダ紫	272/284	294/299	141/145	-	236/247	128/134
泉州絹皮水茄子	272	276/294	145	-	247	128/134
泉州水茄子	272	276/294	145	-	247	128/134
山科ナス	284	276/294	143	-	236	128/143
美男	282	294/299	143	-	236	128/136/140
太助大丸	280	294/299	143	-	236/249	128/140
新潟黒十全	282	276/294	143	-	245	128/136
SL紫水	272/284	294/299	143/145	-	247	128/136/140
みず茄	282	299	143/145	-	236/247	128/134/140
千両二号	282	294/299	143/145	-	236/249	128/134/140
蛍光標識/BStag	FAM/F9GAC	NEX/F9GTC	NEX/F9GTC	NEX/F9GTC	FAM/F9GAC	NEX/F9GTC
検出アレル数	4	3	3	0*	4	5

表2 SSRマーカーによるポストラベル法を用いた多型検出結果

*ポストラベル法では蛍光検出できなかった

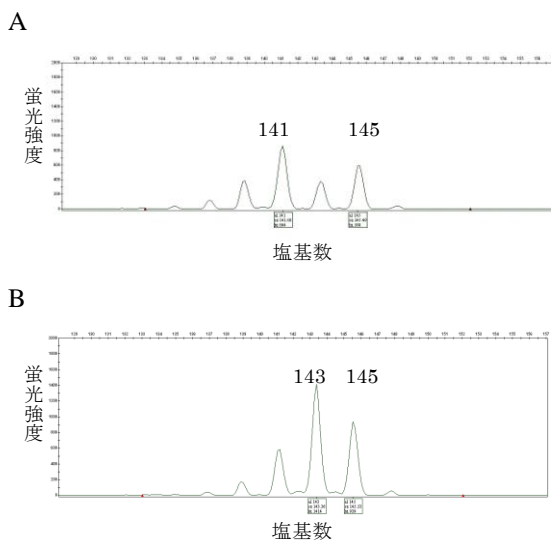


図2 SSRマーカーemf21H22による多型検出結果

A:サラダ紫、 B:みず茄

(2)PCRのマルチプレックス化

Shimizu and Yano (2011)の方法では、BStag毎に異なる蛍光標識を用いることができる。そこで、供試ナス品種を識別できるemg11M09及びemf21K08のマーカー対を同時に使用するマルチプレックス化について

検討した。その結果、異なる蛍光標識であれば1チューブにemg11M09とemf21K08の複数のマーカーを加えて同時に標識してもそれぞれ目的の蛍光色素でのみ標識され識別可能であった。

考察

F₁品種の純度検定は、実際の栽培では時間がかかるが、種子に含まれるDNAを利用した方法では短期間で検査することができる。今回選定したF₁検定用マーカーemi04J02は、アガロースゲルでの検出が可能であり、簡便な方法である(図1)。また、品種識別では、供試したナス9品種と‘サラダ紫’とはSSRマーカーemf21H22で判別ができた(表2)。最も多型が認められたemh02A04では5アレルが検出された(表2)。ナスにおいてもSSRマーカーの多型検出頻度の高さを反映した結果となり、品種の識別におけるSSRマーカーの有用性が示された。ポストラベル法は、増幅反応後に蛍光色素で標識するため、ナス以外の品種識別でも蛍光標識プライマーを共用できる。また、マルチプレックス化によって異なる色素で同時に標識することが可能であり、コスト削減の有効な手法であること

が示唆された。一方, emi04J02 は, ポストラベル法では蛍光が検出されなかった。ポストラベル法は, アニーリング温度 55°Cでの通常の PCR とアニーリング温度 49°Cでのポストラベル用 PCR の組み合わせで構成されている。emi04J02 は, 高いアニーリング温度で増幅が起こらないため, ポストラベル法で蛍光が検出されなかったと考えられる。

最近, ナスの全ゲノム配列が解読され, 同時に, DNA マーカーの位置を細かく示した「染色体地図」が構築された (Hirakawa ら 2014)。今後, 特定の形質を導入する等の品種改良や品種判別に DNA マーカーの利用がますます進むことが予想される。

謝 辞

本研究を実施するにあたり, 材料を提供していただいた神奈川県農業技術センター生産技術部野菜作物研究課の方々に厚くお礼申しあげる。

引用文献

Fukuoka, H., K. Miyatake, T. Nunome, S. Negoro, K. Shirasawa, S. Isobe, E. Asamizu, H. Yamaguchi and A. Ohyama. 2012. Development of gene-based markers and construction of an integrated linkage map in eggplant by using *Solanum* orthologous (SOL) gene sets. *Theor Appl Genet* 125(1):47-56

Hirakawa, H., K. Shirasawa, K. Miyatake, T. Nunome, S. Negoro, A. Ohyama, H. Yamaguchi, S. Sato, S. Isobe, S. Tabata, and H. Fukuoka. 2014. Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the representative solanum species indigenous to the old world. *DNA Res.* 2014 Sep 18

Honjo, M., T. Nunome, S. Kataoka, T. Yano, H. Yamazaki, M. Hamano, S. Yui and M. Morishita. 2011. Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. *Breed Sci.* 61(4):420-5.

癸生川真也・中澤佳子・天谷正行・生井 潔. 2013. ポストラベル法を用いた栃木県水稲奨励品種を識別する SSR マーカーセットの開発. *栃木農試研報.* 71 : 55~61

北宜裕・北浦健生・曾我綾香・池上隆之. 2009. ナス一代交雑品種‘サラダ紫’の育成. *神奈川農技セ研報.* 151:1-7

Murray, M., G., and Thompson, W., F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325.

布目司. 2005. ナスの分子遺伝マーカー開発と有用形質との連鎖解析に関する研究. *野茶研研報* 4:39-69

大澤 良. 2004. 野菜育種における DNA マーカーの利用. *園学研.* 3: 1-6.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.

島本功・佐々木卓治. 1997. 新版植物の PCR 実験プロトコール. 秀潤社 :pp. 34-37.

Shimizu, T. and K. Yano. 2011. A post-PCR labeling method for multiplexed and multicolored genotyping study of SSR, indel and SNP markers in single tube with bar-coded split tag (BStag). *BMC Research Notes* 4, 161

Tanaka, H., Y. Takenoshita, K. Mukoyoshi and K. Hatakeyama. 2014. Cross-genera amplification of brassica rapa L. microsatellite markers in ‘Sakurajima daikon’ (*Raphanus sativus* L.) and its application in the F1 purity test. *Hort. Res. (Japan)* 13 (1) : 27-33.

谷本秀夫・古川 真・布目 司・福岡浩之. 2006. SSR マーカーによるナス品種識別法の開発. *大阪食とみどり技セ研報.* 42:5-10

塚崎 光. 2010. ネギ(*Allium fistulosum*) の育種における SSR マーカーの応用. *野茶研研報* 9: 137 ~ 188