

## 短報

ダイコン‘湘白’F<sub>1</sub>純度検定マーカー

上西愛子・聖代橋史佳・吉田 誠

RSS marker for the detection of F<sub>1</sub> hybrid Radish cultivar ‘Shohaku’.

Aiko KAMINISHI, Fumika MIYOHASHI and Makoto YOSHIDA

## 摘 要

本県で育成した白首総太りの一代雑種ダイコン品種‘湘白’のF<sub>1</sub>純度検定に有効なDNAマーカーの選定を行った。ダイコン用に開発されているSSR(simple sequence repeat)マーカーであるRSSマーカー (*Raphanus sativus* EST-derived SSR)を‘湘白’とその両親系統を用いてスクリーニングしたところ、アガロースゲル電気泳動で4マーカーにDNA多型が認められ、多型性調査により3つのマーカーがF<sub>1</sub>純度検定に利用可能であることが示された。

キーワード：ダイコン，F<sub>1</sub>純度検定，RSSマーカー

## Summary

We selected SSR markers for assessment of genetic purity of F<sub>1</sub> hybrid radish ‘Shohaku’. Four markers derived from *Raphanus sativus* EST-derived SSR showed polymorphism which able to detect on agarose gel electrophoresis between ‘Shohaku’ and the parents. Among them, RSS3172 showed some polymorphism between the parental lines maintained mass selection. Consequently, three SSR markers, RSS0171, RSS3174 and RSS1661, were available for ‘Shohaku’ F<sub>1</sub> purity test.

**Key words:** F<sub>1</sub> purity test, radish, RSS marker

## 緒 言

新鮮で安全・安心な食料等の供給と都市農業の持続的発展のために地産地消を推進している神奈川県では、そのけん引役となる県オリジナル品種の育成に取り組み、これまでにカラシナ‘さがみグリーン’、カンキツ‘湘南ゴールド’、根深ネギ‘湘南一本’等の固定品種、および生食用ナス‘サラダ紫’、生食調理加工兼用トマト‘湘南ポモロンレッド’及び‘湘南ポモロンゴールド’、白首総太りダイコン‘湘白’のF<sub>1</sub>品種を育成してきた(藤代ら 1998, 保谷ら 2013, 河田ら 2005, 北ら 2009, 北浦ら 2015, 真子ら 2004)。これらの育成品種のうち‘湘白’は、‘大蔵’と‘晩野路’の交雑後代から集団選抜法により育成した花粉親系統と民間種苗会

社保有の雄性不稔の種子親系統による一代交雑品種として育成された(北浦ら 2015)。そのため、F<sub>1</sub>採種にあたっては、得られたF<sub>1</sub>種子の純度を高いレベルで保つ必要があり(大澤 2004)、『湘白’についてもその純度検定法の確立が求められている。

これまで野菜育種において品種識別や純度検定のため様々なDNAマーカーが開発されてきたが(大澤 2004)、数塩基を単位とする縦列反復配列(simple sequence repeat: SSR)を利用したDNAマーカーはSSRマーカーと呼ばれ、すでに多くの実用作物で開発されており、アブラナ科野菜では個体・系統の識別に広く用いられている(白澤 2016, 諏訪部 2012, 田中ら 2014)。本県においてもナス‘サラダ紫’のF<sub>1</sub>純度検定及び品種識別用SSRマーカー

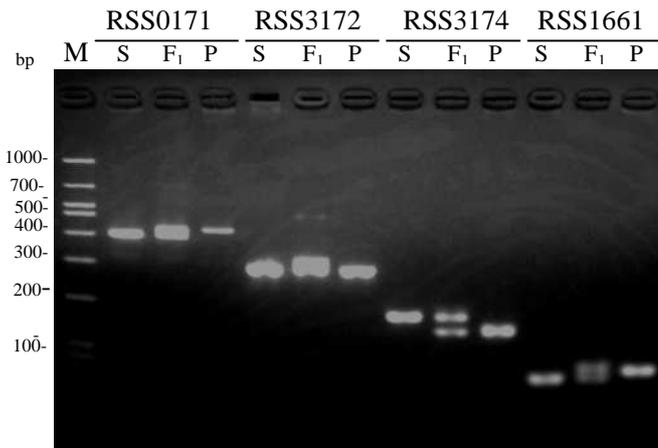


図1 ‘湘白’とその交配親系統間にDNA多型を示したRSSマーカーのアガロース電気泳動像  
S:種子親系統WML12, F<sub>1</sub>:交雑品種‘湘白’, P:花粉親系統ON

の選定を行っている(久保ら 2014)。

そこで本研究では、多型性や再現性が高く、操作も容易なSSRマーカーを用いて‘湘白’の親子間多型解析を行い、F<sub>1</sub>種子の純度検定のためにアガロースゲル電気泳動で検出可能なSSRマーカーを選定したので報告する。

## 材料及び方法

### 1. 供試材料

F<sub>1</sub>品種の‘湘白’(当所)22個体, その種子親系統(WML12)(横浜植木(株))19個体, 花粉親系統(ON)(当所)19個体を用いた。

### 2. DNA抽出およびPCR条件

供試組織として, 葉身を1.5 mLチューブに入れ直径5 mmステンレスビーズ1個と共に-85℃で凍結し, 破砕機(シェイクマスター, バイオメディカルサイエンス(株))で破砕した後, Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)法(Murray・Thompson 1980)により全DNAを抽出し, 1%アガロースゲル電気泳動によりその濃度と純度を確認した。PCR組成液は*Ex Taq*ポリメラーゼ0.5U, dNTP Mixture 0.2mM, 1×*Ex Taq* Buffer(タカラバイオ(株))に鋳型として全DNA 100ng, プライマー対0.25 μMを滅菌蒸留水で20 μLとなるよう調製した。PCR反応はGeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems(株))を用いて94℃・1分間の予備変性の後, 熱変性94℃・30秒, アニール55℃・30

秒, 伸長反応72℃・1分間を35サイクル繰り返し, 72℃・1分間の後処理を行った。得られた増幅DNA産物は4%アガロースゲル電気泳動によりサイズ分画し, 多型分析を行った。

増幅断片長決定のため, PCR増幅産物をNucleoSpin Gel and PCR Clean-up(タカラバイオ(株))で精製し, DNA Ligation Kit Ver.2.1(タカラバイオ(株))でpT7Blue T-Vector(Novagen(株))に挿入後, 大腸菌DH5(タカラバイオ(株))にクローニングした。BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Thermo Fisher Scientific(株))により増幅後, Genetic Analyzer 3130(Applied Biosystems(株))で塩基配列を決定した。

## 結果及び考察

ダイコン用SSRマーカーとしてShirasawaら(2011)のRSS(*Raphanus sativus* EST-derived SSR)マーカー3800個から, ‘湘白’とその両親系統で多型が認められることと簡易なアガロースゲル電気泳動で検出可能とするため, RSSマーカー構築時の連鎖解析で用いたF<sub>2</sub>集団の組換え近交系の両親系統間で多型が認められ, かつ増幅断片長が100bp以上となる46プライマー対を選択した。それらを用いて‘湘白’とその両親系統各1個体について全DNAを鋳型にPCRを行い, 増幅DNA産物の多型を確認した。その結果, 増幅DNA断片は46プライマー対中42プライマー対では‘湘白’と両親系統ともに同じサイズで多型は認められなかったが, 4プライマー対(RSS0171, RSS3172, RSS3174, RSS1661)で多型が認められた(図1)。すなわち, RSS0171の場合, 種子親系統(WML12)は412bp, 花粉親系統

表1 ‘湘白’とその親系統で系統間多型が認められたRSSマーカー<sup>2</sup>

マーカー名	プライマー対塩基配列(5'-3')	増幅断片サイズ(bp)		
		WML12	‘湘白’	ON
RSS0171	CACACTCATCATCTCGCCTC ACTTGGCGTACCTTGTGGAG	412	412/435	435
RSS3172	TGAGATGCAAGCCAACAGAC TGCAGCATTACGGAGTTGAG	297	297/306	297
RSS3174	ACAGCTGCTTCGGACAGATT TGGAAGTCGAGAGGAATGCT	186	186/160	160
RSS1661	GCGACGTCATAACCAGAACA GTCGATTAGATGCACAGCGA	89	89/98	98

<sup>2</sup>RSS(*Raphanus sativus* EST-derived SSR)マーカー: Shirasawaら(2011)により公表済み

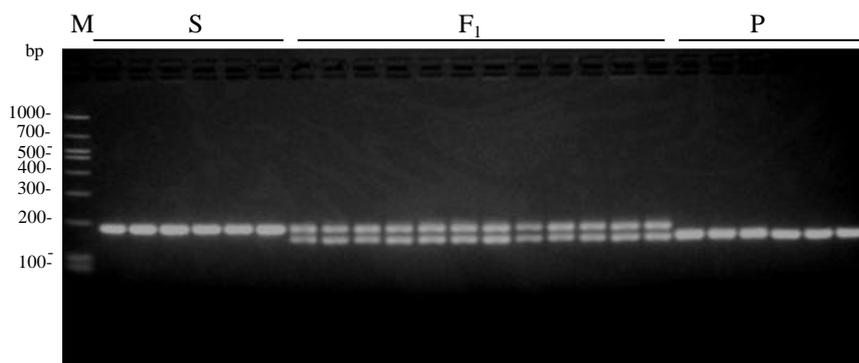


図2 RSS3174マーカー座における‘湘白’とその交配親系統個体間でDNA多型を示したRSSマーカーのアガロース電気泳動像

S:種子親系統WML12 n=6, F<sub>1</sub>:交雑品種‘湘白’ n=12, P:花粉親系統ON n=6

(ON)は435bpのそれぞれ単一の断片のみが増幅されたが、その交雑系統である‘湘白’ではその両方の断片が増幅された。同様にRSS3174では、種子親186bp及び花粉親160bp, RSS1661では種子親89bp及び花粉親98bpの単一断片のみ増幅されたが、‘湘白’では両方の断片が増幅された。RSS3172では、両親系統ともに297bpの断片が増幅され多型がみられなかったものの、‘湘白’では297bpに加え306bpの断片も増幅された(表1・図2)。

これら4対のRSSマーカーについて、種子親系統(WML12)19個体、花粉親系統(ON)19個体、‘湘白’22個体について多型性を調査した。その結果、RSS0171, RSS3174及びRSS1661では、‘湘白’のすべての個体で2本のバンドが検出された。しかしRSS3172は22個体中8個体で両親系統と同じ297bpのバンドのみが検出された。また、花粉親系統(ON)では、RSS3174及びRSS1661については‘湘白’と同じサイズのバンド2本が検出された個体がそれぞれ1個体存在したが、RSS3172については3個体に297bpと306bpの2本のバンドが、2個体に306bpの1本のバンドがそれぞれ検出された(表2)。

ダイコンは虫媒を主とする他殖性作物である(鶏飼 2003)。他殖性作物では、F<sub>1</sub>品種の両親系統で

も近交弱勢を防ぐ意味から、通常ヘテロ性を残していることが多く、F<sub>1</sub>純度検定を行う際のマーカー利用に制限がある(大澤 2004)。その点について塚崎ら(2003)は、他殖性植物育種において両親系統について任意に選んだ少数のSSRマーカー座についてはホモ接合になるように選抜しそれ以外の座では多様性を容認することで近交弱勢を避けて純度検定および品種識別が可能なF<sub>1</sub>品種育成が可能となるという品種育成手法を提案している。

本研究の結果、マーカーにより花粉親系統集団内の遺伝的均一性が異なることが明らかになった。その均一性程度を考慮して‘湘白’の純度検定マーカーを考察すると、RSS0171については系統集団内で均一であり検定マーカーとして採種場面での利用が可能である。RSS3174及びRSS1661については花粉親系統内に種子親と同じマーカー型を有する個体が存在するものの、その頻度は19個体中1個体で集団内の均一性は比較的高いことから、採種栽培時にTsukazakiら(2006)の手法によるRSSマーカー選抜が可能と考えられる。一方、RSS3172については種子親と同じマーカー型を示す個体頻度が高いことから、RSSマーカー選抜に際しては多数個体を用い自殖弱勢を回避してマーカー座の選抜を行うことが重

表2 ‘湘白’とその親系統での各RSSマーカー増幅断片長パターンごとの個体数<sup>2</sup>

品種/系統名	RSS0171			RSS3172			RSS3174			RSS1661		
	412bp	412bp/435bp	435bp	297bp	297bp/306bp	306bp	160bp	160bp/186bp	186bp	89bp	89bp/98bp	98bp
WML12	19	0	0	19	0	0	0	0	19	19	0	0
湘白	0	22	0	8	14	0	0	22	0	0	22	0
ON	0	0	19	14	3	2	18	1	0	0	1	18

<sup>2</sup>供試個体数:WML12およびON n=19, 湘白n=22

要と推察された。

F<sub>1</sub>品種純度検定精度の向上には複数のマーカーの組合せ利用が重要と考えられる。‘湘白’の花粉親系統の種子更新においては近交弱勢回避を考慮した集団採種を行っており（北浦ら 2015），その際にマーカー座の遺伝的均一性を考慮した選抜を同時に実施することが重要と考えられる。

### （謝 辞）

本報告を作成するにあたり，日本大学生物資源科学部生命農学科立石亮准教授にはご校閲の労をとっていただいた。ここに深謝の意を表する。

### 引用文献

- 藤代岳雄・林英明・法月靖生. 1998. カラシナ新品種‘さがみグリーン’の育成経過及び播種適期と栽植密度. 神奈川農総研報. 139: 1-6.
- 保谷明江・北浦健生・吉田誠・曾我綾香・北宜裕. 2013. トマト一代雑種品種・‘湘南ポモロン・レッド’及び‘湘南ポモロン・ゴールド’の育成. 神奈川農技セ研報.157: 1-6.
- 河田隆弘・野路 稔・曾我綾香・北 宜裕. 2005. ネギ良食味品種‘湘南一本’の育成経過と特性. 神奈川農技セ研報.147: 14-21.
- 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.
- 北浦健生・太田和宏・吉田 誠・曾我綾香・野路稔・伊藤智司・岡田英考・北 宜裕. 2015. ダイコン白首総太り品種‘湘白’の育成. 神奈川農技セ研報. 160: 1-6.
- 久保深雪・聖代橋史佳・吉田誠. 2014. ナス品種‘サラダ紫’のF<sub>1</sub>純度検定用SSRマーカーの選定と品種判別. 神奈川農技セ研報. 159: 10-14.
- 真子正史・鈴木伸一・鈴木誠・浅田真一・佐々木皓二・牛山鉄司・広部誠・片木新作・伊康部有
- 一・真壁敏明・香川陽子・簗島恒樹. 2004. カンキツ新品種‘湘南ゴールド’ 神奈川農総研報.145: 35-41.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4326.
- 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.
- Shirasawa, K., M. Oyama, H. Hirakawa, S. Sato, S. Tabata, T. Fujioka, C. Kimizuka-Takagi, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Kato, Y. Kishida, M. Kohara, C. Takahashi, H. Tsuruoka, T. Wada, T. Sakai and S. Isobe. 2011. An EST-SSR linkage map of *Raphanus sativus* and comparative genomic of Brassicaceae. DNA Research. 18: 221-232.
- 白澤健太.2016.野菜類のゲノム解析とゲノム育種技術の開発. 育学研.18:124-129.
- 諏訪部圭太.2012.アブラナ科植物における分子遺伝学の変遷.育学研.14:114-120.
- 田中義弘・竹之下佳久・向吉健二・畠山勝徳. 2014. ‘桜島大根’における*Brassica rapa*由来マイクロサテライトマーカーの属間増幅とそのF<sub>1</sub>純度検定への応用. 園学研. 13: 27-33.
- Tsukazaki, H., H. Fukuoka, Y. S. Song, K. Yamashita, T. Wako and A. Kojima. 2006. Considerable heterogeneity in commercial F<sub>1</sub> varieties of bunching onion (*Allium fistulosum*) and proposal of breeding scheme for conferring variety traceability using SSR markers. Breed. Sci. 56: 321-326.
- 塚崎光・福岡浩之・Y. S. Song・山下謙一郎・小島昭夫. 2003. 他殖性植物における品種識別ならびにF<sub>1</sub>純度検定に適した品種育成法の提案：ネギを事例として. 育学研(別2): 196.
- 鵜飼保雄. 2003. 植物育種学. p.145-195. 東京大学出版会. 東京.