

DNA マーカーを利用したモモの形質判定

滝田雄基

(福島県農業総合センター果樹研究所)

Estimation of characteristics in peach using DNA marker

Yuki TAKITA

(Fukushima Agricultural Technology Centre Fruit Tree Research Centre)

1 はじめに

生産者や消費者のニーズに対応した果樹育種を進める上で、播種から初結実までに3年以上の年月がかかること、多数の個体の中から形質の良い系統を選抜するのに多くの労力を要すること、多数の個体を植栽できる広大なほ場が必要となることなどが課題として挙げられている。

一方、DNA マーカーを利用することで、幼苗の段階から選抜を行い、果樹育種にかかる年月を短縮しながら効率的に進めることが可能となってきている。本試験では深松ら¹⁾によるモモの果肉色マーカーと、大橋ら²⁾によるモモの酸度マーカーを利用し、福島県育成の系統を交雑した後代個体の果実形質について検証を行ったので報告する。

2 試験方法

モモ福島14号(71-26×不明、71-26は‘川中島白桃’×モモ福島1号、以下14号)を種子親、モモ福島12号(‘ゆうぞら’×‘ちよひめ’)×‘ちよひめ’、以下12号)を花粉親として、2011年に交雑し獲得した後代32個体(以下後代)を、翌年播種し、これらを供試系統とした。両親の果肉色と酸度の表現形質はいずれも白色及び低酸であった(表1)。

親系統及び後代32個体の葉からDNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を使用してDNAを抽出した。そのサンプルを5ng/mLに希釈したもの1μLを果肉色、酸度の各マーカーのプライマー1μL、Go Taq Polymerase 5μLと混合し、MilliQを加えて10μLとなるように調製してGeneAmp® PCR System 9700(Applied Biosystem)で目的の断片を増幅させた。反応温度は94°Cで1分、55°Cで1分、72°Cで1分とし、35サイクルの反応を行った。果肉色マーカーはCCD4とRT-fを混合したもの、SSR、酸度マーカーはMA026aを利用した。各マーカーのプライマーの配列は表2に記載した。

PCRの反応後、得られた増幅物を20倍に希釈した液1.5μLと、Hi-Di(ホルムアミド)及400HD[Rox](サイズスタンダード)を1mL:2.5μLで混合した液8.5μLを96穴プレートに入れ、94°C 5分、氷上で2分静置した。その後にDNAシーケンサー(Applied Biosystem)にて36cmキャピラリー、POP7ポリマー、Buffer(10×)を用い、Gene Mapper(Applied

Biosystem)で解析を行った。CCD4の増幅物は色素液と混合し、10μLを1/10TAE Bufferで満たした1.5%アガロースゲルに乗せ、100Vで30~40分電気泳動を行った。果肉色は2つの解析結果から白色、黄色を判断した(表3)。SSRの判定において、200/202のヘテロである‘白秋’と200のホモである‘金桃’のDNAを指標とした。酸度は大橋らの報告におけるクラス3(pH4.10~4.39)を境に、194bpのバンドを有するものが高pH(低酸)、それ以外のバンドを有するものが低pH(高酸)と判断した。

3 試験結果及び考察

果肉色についてマーカーにより判定を行ったところ、図1右のようなSSRの波形が見られた。指標とした‘白秋’及び‘金桃’の波形図(図1左)から、両親、後代すべての個体で200のホモであると判定した。CCD4については、両親はいずれも594/729のヘテロであり、後代は594/594:594/729:729/729=8:15:9と分離した(図2)。この分離比は χ^2 検定において1遺伝子支配の分離比1:1に適合した(p=0.1875)。両親の表現形質はいずれも白色であるということで、判定に矛盾はなかった。表3の判定基準により、後代は594のホモ8個体と594/729のヘテロ15個体の合計23個体が白色、729のホモ9個体が黄肉と判定した(表4)。

酸度についてMA026aマーカーにより判定を行ったところ、交雑親の波形は図3のように見られ、14号は190/194のヘテロ、12号は194/194のホモと判定した。後代は図4のように見られ、190/194と194/194にそれぞれ16個体ずつに分離した。この分離比は χ^2 検定において1遺伝子支配の分離比1:1に適合した(p=0)。両親はいずれも194bpのバンドを持ち、表現形質はいずれも低酸であるということで判定に矛盾はなかった。後代は32個体すべての波形図で194bpのバンドが見られたため、表現形質はすべて低酸であると判定した(表5)。

4 まとめ

14号と12号を交雑した後代32個体についてDNAマーカーを利用して形質判定を行った。果肉色は白色が23個体、黄色は9個体と判定し、酸度はすべて低酸であると判定した。今後、結実した後代について、判定結果と一致するかを検証し、その結果を踏まえて

幼苗段階での選抜に利用する。

引用文献

1)Yosuke FUKAMATSU; Takayuki TAMURA; Seisuke HIHARA; Kenji ODA. 2013. “Mutations in the CCD4 Carotenoid Cleavage Dioxygenase Gene of

Yellow-Fresh Peaches”. Biosci. Biotechnol. Biochem., 77(12):2514-2516

2)大橋義孝, 小野勇治, 木幡栄子, 岡田初彦, 佐藤守, 山口正己, 西谷千佳子, 山本俊哉. 2012. 「モモの形質に関連した SSR マーカーの取得」. 福島県農業総合センター研究報告第 4 号:39-52

表 1 モモ福島 14 号とモモ福島 12 号の果実形質

系統	収穫		果重 (g)	果肉色	糖度 (° Brix)	pH
	始	終				
モモ福島14号	8月20日	8月26日	282	白	17.5	4.8
モモ福島12号	8月8日	8月15日	266	白	14.5	4.8

※2009~2013年平均

表 3 果肉色の形質判定基準

SSR	CCD4, RT-f (bp)	判定基準		
		594/594	594/729	729/729
	200/200	白	白	黄
	200/202	白	黄	—

表 2 形質判定に用いたマーカー

判定する形質	SSR Locus (SSR Name)	Primer sequence (5'-3')	
		Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
酸度	MA026a	CGATCGGAAGTGACGGGAAG	TGAAGAAAATACGGCTAAA
	CCD4	ACCACCTGTTTGACGGAGAC	TGCTCATGAAGAGCTTGCCA
果肉色	RT	TACCTGAGAGCTTCTCGTGC	
	SSR	CCCATTTGCAGTGAAGGGC	GCTGTGGTGCTTTTGTGGA

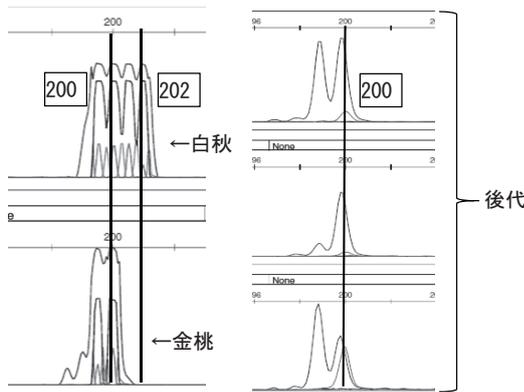


図 1 SSR 波形図 (右はすべて後代)

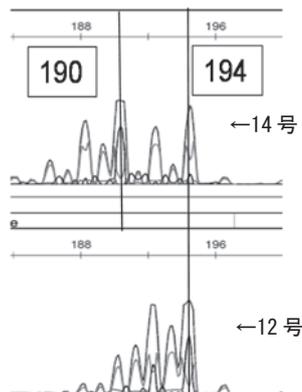


図 3 交雑親の MA026a 波形図

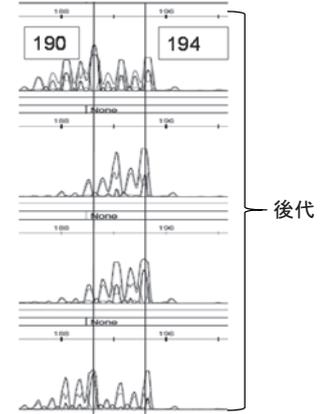


図 4 後代の MA026a 波形図

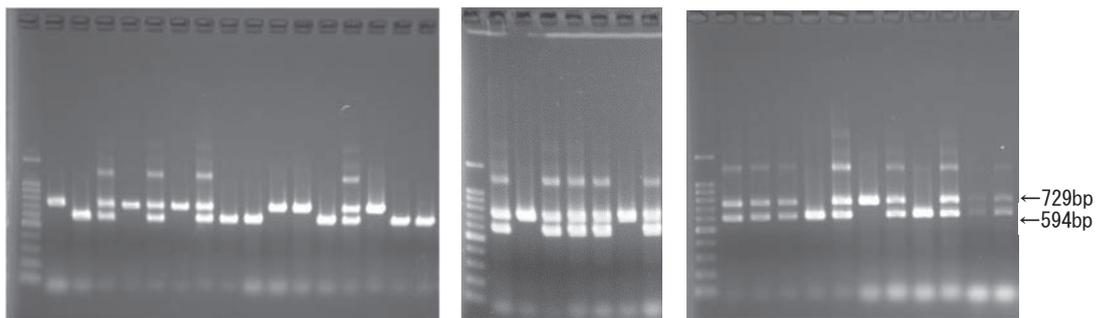


図 2 後代個体及び交雑親の CCD4 電気泳動図
左から後代 1~16、後代 17~23、後代 24~32 及び 14 号、12 号

表 4 マーカー-CCD4 による果肉色の判定

	594/594	594/729	729/729
	白	白	黄
モモ福島14号	-	○	-
モモ福島12号	-	○	-
後代個体数	8	15	9
表現形分離比		23	9

表 5 マーカー-MA026a による酸度の判定

	190/190	190/194	194/194
	高酸	低酸	低酸
モモ福島14号	-	○	-
モモ福島12号	-	-	○
後代個体数	0	16	16
表現形分離比	0		32