

DNAマーカーによる愛知県育成キク品種「白粹」の品種識別

誌名	愛知県農業総合試験場研究報告 = Research bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center
ISSN	03887995
著者名	吉川,友紀 水上,優子 竹内,良彦 大竹,良知
発行元	愛知県農業総合試験場
巻/号	40号
掲載ページ	p. 29-33
発行年月	2009年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



DNAマーカーによる愛知県育成キク品種「白粋」の品種識別

吉川友紀*・水上優子*・竹内良彦**・大竹良知***

摘要：白一輪ギク品種「白粋」（愛知県育成品種）の識別を、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)法により試みた。10塩基のランダムプライマー4種類を用いることにより、「白粋」を国内主要流通品種・系統など12種類から識別することができた。

キーワード：輪ギク、品種識別、DNAマーカー、RAPD法、白粋

Identification of Chrysanthemum Cultivar "Hakusui" Bred in Aichi Agricultural Research Center Using DNA Marker

YOSHIKAWA Yuki, MIZUKAMI Yuko, TAKEUCHI Yoshihiko and OOTAKE Yoshisato

Abstract: We tried to identify the chrysanthemum cultivar "Hakusui" bred in Aichi Agricultural Research Center from other major commercial varieties by the RAPD (random amplified polymorphic DNA) method. Out of 50 random primers screened, 4 primers gave reproducible polymorphic bands. Using those 4 primers, "Hakusui" was able to be identified from 8 commercial varieties and 4 breeding lines.

Key Words: Chrysanthemum, Identification, DNA marker, RAPD, "Hakusui"

緒言

近年、農作物の産地偽装や品種の虚偽表示の事例が増加している。そのため産地のブランド品種を保護することを目的とした品種の識別が重要視されている。また、優れた形質を持つ新品種を育成しても、他の品種がその品種名を偽って流通することが育成者の利益侵害に当たるとして問題となっている¹⁾。育成者権の侵害防止のため、2003年1月に農林水産省が「植物のDNA品種識別についての基本的留意事項」を取りまとめ、以降、農作物の外観や加工に左右されないDNAマーカーによる品種識別が多く利用されるようになった²⁾。DNAマーカーを用いた品種識別は多くの作物で利用されている。イネについては、黒柳ら³⁾により愛知県内の育成品種・系統についての品種識別技術が開発されている。また、キクの品種では、白一輪ギク品種の「新神」のDNAマーカーを用いた品種識別技術が開発されている⁴⁾。

2006年の愛知県のキクの農業産出額は254億円に上り⁵⁾、全国一のキクの主産地である。そのため、愛知県農業総合試験場においてもキク品種の育成の研究を進めている。白一輪ギクについては、2004年に「夏雲」⁶⁾、2006年には、秋系白一輪ギク品種「白粧」を育成した⁷⁾。この品種は従来品種に比べて高温下における花卉の伸展異常や、蕾の小型化等の障害が少なく、生育の揃いが良い等の優れた形質を持っており、2006年には、タイ国際園芸博覧会で輪ギク部門最高位の「金賞一席」を受賞した。「白粧」は、県内で産地形成を行い、ブランド品種として取り上げられつつある。この品種の知的財産権の保護と県内園芸産地の振興に役立てるため、「白粧」を他の主要な流通白一輪ギク品種と確実に識別できるDNAマーカーを開発したので報告する。

材料及び方法

1 供試材料

「白粧」との比較対象品種・系統として、以下の12品種・系統を用いた。

2006年に日本花普及センターがまとめた花き品種別流通動向分析調査結果のうち、白一輪ギク流通量上位5品種である「神馬」、「精興の誠」、「岩の白扇」、「フローラル優香」、「精の波」、及び「神馬」に由来する品種として「吉良の馬」、「新神」の2品種、系統として「神馬無側枝系統」、「神馬2号」の2系統、さらに愛知県育成の白一輪ギク品種「夏雲」、及び知名度の高い白一輪ギク品種「金丸富士」、「秀芳の力」を用いた(表1)。

2 DNA抽出

DNAは、葉長2~3cmに展開したキクの幼葉を100mg採取し、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社)により抽出

表1 実験に用いた白一輪ギク品種・系統

品種	選定根拠
白粧	
神馬	全国キク流通量上位10品種から選定
精興の誠	全国キク流通量上位10品種から選定
岩の白扇	全国キク流通量上位10品種から選定
フローラル優香	全国キク流通量上位10品種から選定
精の波	全国キク流通量上位10品種から選定
吉良の馬	神馬の枝変わり品種
新神	神馬の枝変わり品種
神馬無側枝系統	神馬の枝変わり系統
神馬2号	神馬の枝変わり系統
夏雲	愛知県育成品種
金丸富士	かつての有白一輪ギク品種
秀芳の力	かつての有白一輪ギク品種

した。

幼葉から抽出したDNAは滅菌水で希釈し、DNA濃度を約5ng/ μ lに調整して用いた。

3 PCR増幅断片による識別

品種識別には、ランダムプライマーによるPCRで増幅されるDNA断片の違いを比較するRAPD法⁸⁾を用いた。プライマーはオペロン社製の10塩基ランダムプライマーから、OPA1~10、OPC1~20、OPG1~20の計50種類を使用した。PCR反応組成液は10×Buffer (Taqポリメラーゼに標準添付) 1.0 μ l、2mM dNTP Mixture 1.0 μ l、20 μ M RAPDプライマー0.5 μ l、Ampli Taq Gold DNA polymerase (5U/ μ l、Applied Biosystems社製) 0.1 μ l、鋳型DNA 1.0 μ l、滅菌水6.4 μ lを混合し全量10.0 μ lとした。サーマルサイクラーは、PC-320 (アステック社製)を用いた。PCR条件は、初期活性化ステップを94℃10分、次に変性 94℃1分、アニーリング36℃1分、伸長72℃2分を1サイクルとし、これを45反復し、最終伸長を72℃7分とした。

増幅したDNA断片を含む反応液5 μ lを2.0%アガロースゲル (Agarose STANDARD 01 プロテックメディカル社製)を用いて100Vで25分間電気泳動した。

結果及び考察

「白粧」を含む13種類の供試品種・系統についてランダムプライマーを用いたPCRを行った結果、50種類の供試プライマーのうち、45種類のプライマーで明確なDNA増幅が見られた。また、そのうちの15種類のプライマーで品種系統間で異なるバンドパターンを示し、24種類のバンドで多型が認められた。使用したプライマーと多型の認められたバンドについて表2にまとめた。「白粧」のみに現れるバンドは供試した50種類のプライマーによる多型の中には認められなかった。一方、OPG5で増幅される200bpのバンドは、他の12品種・系統

では検出されたものの「白粋」では認められなかった。正確に品種識別を行うためには、いくつかの多型パターンを組み合わせて判断することが望ましい。確実に「白粋」と比較品種・系統を識別するため、多型が認められた15種類のプライマーによるRAPD解析のバンドの再現性を確認した。供試品種間で多型が認められたプライマーでも、バンドが不明瞭である、再現性に乏

しい等の問題があった。その結果、高い再現性を持つ4つのプライマーを選定した。これらのプライマーによる電気泳動像を図1に、識別に用いたバンドの有無を表3に示した。

「白粋」は、OPA10の550bp、OPG6の200bp、OPG19の700bpのバンドが有り、OPG5の250bpのバンドが無いという多型を示し、これは他の比較供試品種・系統の示

表2 白一輪ギク品種・系統間に多型が表れたランダムプライマー名・バンドサイズとそのバンドパターン
品種・
系統名

系統名	プライマー名(バンドサイズ: bp)																									
	OPC						OPG 5		OPG 6		OPG 9		OPA		OPA 4		OPA									
	7						8		12		18		19		2		3									
	(900)	(550)	(580)	(650)	(800)	(1100)	(800)	(200)	(250)	(200)	(600)	(800)	(250)	(450)	(900)	(350)	(700)	(800)	(650)	(350)	(450)	(800)	(500)	(550)		
白粋	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+		
神馬	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
新神	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
吉良の馬	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
神馬無側枝系統	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
神馬2号	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
精興の誠	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	
岩の白扇	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
フローラル優香	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	
精の波	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	
夏雲	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
金丸富士	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	
秀芳の力	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	

注) +:バンド有り、-:バンド無し。

表3 DNAマーカーによる各白一輪ギク品種・系統の識別パターン

品種・系統名	由来	プライマー名(バンドサイズ)			
		OPA10	OPG5	OPG6	OPG19
		(550bp)	(250bp)	(200bp)	(700bp)
白粋	00-JM-01*×神馬	+	-	+	+
神馬		+	+	-	+
吉良の馬	神馬の枝変わり品種	+	+	-	+
新神	神馬の枝変わり品種	+	+	-	+
神馬無側枝系統	神馬の枝変わり系統	+	+	-	+
神馬2号	神馬の枝変わり系統	+	+	-	+
精興の誠		+	-	+	-
岩の白扇		+	+	+	-
フローラル優香		-	+	+	+
精の波		+	-	+	-
夏雲		-	+	-	-
金丸富士		+	+	+	+
秀芳の力		+	+	+	+

注) *は愛知県育成系統。

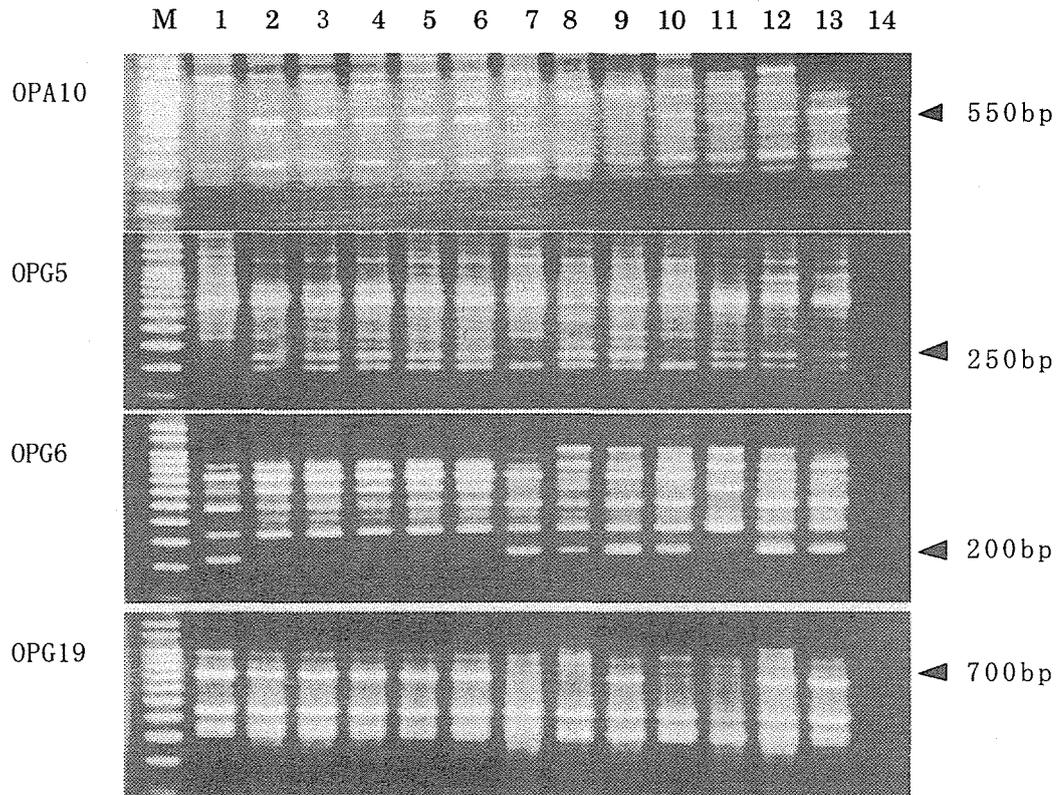


図1 OPA10、OPG5、OPG6、OPG19を用いた白一輪ギクにおけるPCR産物の泳動図

注) M: 100bpLadder 1: 白粋 2: 神馬 3: 吉良の馬 4: 新神 5: 神馬無側枝系統
6: 神馬2号 7: 精興の誠 8: 岩の白扇 9: フローラル優香 10: 精の波 11: 夏雲
12: 金丸富士 13: 秀芳の力 14: ブランク (滅菌水)

すバンドパターンとは一致しなかった。従って、これらのプライマーを「白粋」を主要流通品種から識別するDNAマーカーとして用いることができた。

今回の研究は「白粋」の知的財産権を保護するため、全国で流通している主要品種から「白粋」を識別する技術を開発することを目的としている。本研究における供試品種・系統に「神馬」由来のものを多く選定しているのは、「神馬」が現在の主力流通系統であり、育種系統としてもよく用いられ、比較品種・系統として確実に識別する必要があるからである。さらに、「白粋」は神馬を親として育成されており、遺伝的に類似した神馬系統から識別できることが必要であるためである。

本研究で供試した品種・系統は2006年において白一輪ギクの流通量の86%を占める。これ以外のマイナー品種や新たに育成された品種との間で識別を行うためには、再度解析が必要となる。

RAPD法による品種識別は、バンドの再現性に乏しいとの指摘もあるが、RAPD法によるDNAマーカーの利用事例として、キクの遺伝変異系統の識別⁹⁾や、ナスの品種識別¹⁰⁾や、ハゼノキの品種識別¹¹⁾について報告されている。また、ボタンの品種識別に用いられた成果情

報では、「RAPDから作成したSCARマーカーが再現性の面から品種識別に有効であったが、RAPDマーカーすべてをSCARマーカー化するには膨大な手間と時間がかかることが分かった」との指摘があり、「不明な品種の決定や確認にはRAPDマーカーとRAPDパターンを併用することにより、省力、費用の軽減が可能であった」との報告がある¹²⁾。

本研究で用いたRAPD解析では多型の再現性は確保されている。しかし、この識別技術をより簡易かつ確実にするために、今後マーカーのSTS (Sequence Tagged Site) 化、e-RAPD¹³⁾によるマーカーの改良等の研究を行う必要がある。

引用文献

1. 農林水産省知的財産戦略チーム. 農林水産省の知的財産戦略について. (2007)
2. 農林水産省生産局種苗課. DNA品種識別技術検討会事務局. 植物のDNA品種識別についての基本的留意事項. (2003)

3. 黒柳悟, 水上優子, 大矢俊夫. DNAマーカーによるイネの品種識別. 愛知農総試研報. 38, 19-26(2006)
4. 鹿児島バイオ研, 理化学研究所・仁科センター, 中央研. 秋輪ギク品種「新神」のDNAマーカーによる品種識別. 平成18年度九州沖縄農業研究センター研究成果情報. p. 245(2006)
5. 動向調査資料. No. 139 農業の動き2008 p. 28(2008)
6. 奥村義秀, 大石一史, 田中英樹, 酒井広蔵, 西尾譲一. 一輪ギク品種「清流の朝」の育成と特徴. 愛知農総試研報. 37, 127-133(2005)
7. 奥村義秀, 加藤博美, 石川高史, 青木献, 西尾譲一. 一輪ギク新品種「白粋」の育成. 愛知農総試研報. 38, 87-93(2006)
8. 島本功, 佐々木卓治. 新版 植物のPCR実験 プロトコール. 秀潤社. 東京. p. 27(1997)
9. Sudhir, K., Prasad, K. V. and Choudhary, M. L. Detection of genetic variability among chrysanthemum radiomutants using RAPD markers. Current Science. 90, 8(2006)
10. 古川真, 谷本秀夫. DNA多型によるナス品種識別法の開発. 育種学研究. 第6巻 別冊1号 p. 221(2004)
11. 後藤晋, 渡辺敦史, 池田浩一. RAPDマーカーによるハゼノキの品種識別. 日本林學會誌. 79, 229-233(1997)
12. 杉山万里. RAPDマーカーによるボタン主要品種の識別. 島根県農業試験場研究報告. 35, 53-66(2004)
13. 野菜茶研・茶業研究部・育種素材開発チーム. 不鮮明なRRAPDバンドを鮮明なバンドに変換するe-RAPD法の開発. 平成14年度野菜茶業研究成果情報. (2002)