

PCR法によるウメ品種のS遺伝子型

誌名	和歌山県農林水産総合技術センター研究報告
ISSN	13455028
巻/号	5
掲載ページ	p. 67-73
発行年月	2004年3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



PCR 法によるウメ品種の *S* 遺伝子型

林 恭平・根来圭一・岩本和也¹・細平正人・菅井晴雄

和歌山県農林水産総合技術センター 暖地園芸センター

Typing of *S*-RNase gene in Japanese apricot (*Prunus mume*) by PCR

Kyohei Hayashi, Keiichi Negoro, Kazuya Iwamoto¹, Masato Hosohira and Haruo Sugai

Horticultural Experiment Center

Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries

緒言

和歌山県内のウメ栽培の約 70%を占める‘南高’は自家不和合性であるため、20~30%他品種との混植が必要であり、結実量はその年の気象条件等により変動する。そのため、‘南高’の特性を持つ自家不和合性品種の育成が望まれている。

ウメの自家不和合性は他のバラ科果樹と同様に *S*-RNase によって影響を受ける配偶体型自家不和合性を示し、近年 PCR 法により自家不和合性個体を判別する有効な分子マーカーが開発された (Tao et al 2000)。この分子マーカーは各品種の *S*-RNase 遺伝子型の判定に有効であることも報告され (八重垣ら, 2000)、*S* 遺伝子型は自家不和合性を示す *Sr* と *S1*~*S10* の 11 の遺伝子座が知られている (Tao et al., 2002, 田尾ら, 2003)。

そこで、本研究では PCR 法により、ウメにおける効率的な育種の基礎データを得るため 50 品種の *S* 遺伝子型を識別し、和歌山県ウメ主要品種である‘南高’3 系統および受粉樹によく使われる‘小粒南高’5 系統の *S* 遺伝子型を判別する。また、この分子マーカーを利用して、自家不和合性の‘南高’交雑個体を選抜する。

¹ 現在：農林水産総合技術センター 企画普及部

材料および方法

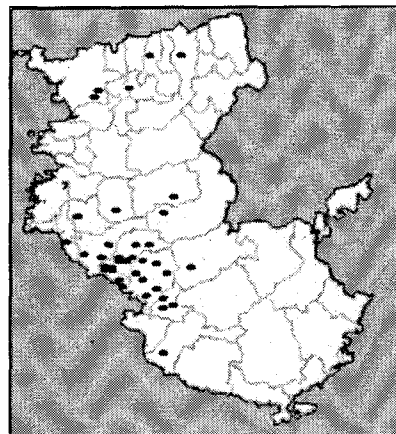
第1表に示すウメ50品種、'南高'の3系統と原木および'小粒南高'の5系統を供試した。

第1表 供試した品種と系統の採取場所

採取場所	品種と系統	
		小梅類
暖地園芸センター	'南高'、'地藏'、'NZ46'('南高'x'地藏')、'白加賀'、'古城'、'加賀地藏'('白加賀'x'地藏')、'白玉'、'皆平早生'、'改良内田'、'薬師'、'八郎'、'鶯宿'、'紅さし'、'養青'、'青軸'、'児玉'、'谷口紅梅'、'東地紅梅'、'花香味'、'林州'、'玉英'、'奥野梅'、'西洋梅'、'太平'、'豊後'、'伊奈豊後'、'二青梅' (台湾梅)、'白粉梅' (中国梅)、'南高'の系統C、'小粒南高'の系統C	'白王'、'織姫'、'前沢'、'竜峡小梅'
南部川村ウメ21研究センター	'新平太夫'、'登一'、'金熊寺'、'十郎'、'福寿'、'節田'、'天神'、'ジャンボ高田'、'南高'の系統B、'小粒南高'の系統A	'甲州最小'、'信濃小梅'、'光陽小梅'
福井県園芸試験場	'稻積'、'越の梅'、'藤五郎'、'剣先'、'南高'の系統A	
西牟婁郡内のウメ園		'紅王'、'パープルクイーン'
日高郡内のウメ園	'南高'の原木、'小粒南高'の系統B,D,E	

試験1 ウメ50品種のS遺伝子型

S遺伝子型の分析は供試したウメ50品種からDNAを抽出して、PCR法で行った。4月中旬に幼葉を採取しサンプル0.1gからDNA抽出キット〔DNAeasy Plant Mini(キアゲン社)〕を用い、定法に従いDNAを抽出した。PCR反応は抽出したDNAを鋳型とし、Tao(2000)やYaegaki(2001)の方法を参考にした。使用したプライマーはPrU-C2(5'-CTATG GCCAA GTAAT TA TTC AAACC-3')、PrU-C5(5'-TACCA CTTCA TGTA CAAC T GAG-3')、PrU-C4R(5'-GGATG TGGTA CGATT GAAGC G-3')の3種類でC2-C4R及びC2-C5の二つのプライマーセットでS遺伝子型の識別を行った。反応溶液は20 ng 鋳型DNA、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、200 μM dNTP混合液、400 nM プライマー、0.25 U TAKARA Ex Taq polimerase (宝酒造)、最終容量20 μlにした。反応条件はC2-C4Rのプライマーのセットが94℃で1分、56℃で1分、72℃で1分30秒の35サイクルで、C2-C5のプライマーセットは94℃1分、51℃で2分、72℃で2分の35サイクルで行った。PCR増幅断片は1.0%アガロースゲルで電気泳動後、EtBrに染色し、310nmの励起照射下で確認した。



第1図 供試した「南高」の採取地
試験2で供試した「南高」79樹の採取地(37園地)を黒丸で示す。

試験2 '南高'3系統の判定と小粒南高5系統のS遺伝子型

和歌山県各地(39園地79樹)の'南高'について試験1と同様にPCR法でS遺伝子型を調べた。'南高'3系統と小粒南高5系統のS遺伝子型をPCR法により調べた。また、'小粒南高'の系統Eと系統Aの花粉を'南高'に受粉して結実の有無を調べた。

試験3 実生苗の自家和合性の選抜

‘南高’ ($S_1 S_7$) を種子親にした自家和合性の優良個体を育成するため、‘剣先’ ($S_7 S_7$) との交雑実生 57 個体、‘地藏’ ($S_3 S_7$) との交雑実生 63 個体を作った。これらの個体について S 遺伝子型を調べ、一部の有望な F1 個体 (‘南高’ × ‘地藏’ 25 個体、‘南高’ × ‘剣先’ 17 個体) について結果枝に袋掛けし、自家受粉するかどうか調べた。

結果および考察

試験1 ウメ 50 品種の S 遺伝子型

PCR 反応によって増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分画すると、S 遺伝子座の中で S_6 は C2-C4R のプライマーの組み合わせで検出されず (第2図-A)、C2-C5 の組み合わせで検出された (第1図-B, Yaegaki et al)。また、‘薬師’ では C2-C5 のプライマーの組み合わせで約 2500 bp 付近にバンドがあり (第2図-B)、『信濃小梅』、『登一』、『十郎』、『天神』にも 2500 bp 付近でバンドが検出され、これらは仮に S_{11} とした (第1表)。S 遺伝子は単一遺伝子座で複対立することが認められているが (八重垣, 2000)、『紅王』、『稻積』、『ジャンボ高田』、『二青梅』では、一つの遺伝子座しか確認できなかった (第2表)。PCR 法によりウメ 50 品種で S 遺伝子は 10 の遺伝子座を認識し、22 の遺伝子型を示した。また、小梅の系統はすべて S_f の遺伝子座があるため、自家和合性であることが判別でき、 $S_1 S_7$ の遺伝子型を示したのは‘南高’だけであった。最近、田尾ら (2003) によると、2002 年 (Tao et al) に報告した‘林州’、『新平太夫』、『地藏』の S_3 遺伝子座はサザンプロット分析の結果、 S_3 ではなく別の新しい S 遺伝子座であるとし、『林州』のそれを S_9 、『新平太夫』及び‘地藏’のそれを S_{10} とした。本研究ではサザンプロット分析を行ってないため、PCR 法では S_3 、 S_9 、 S_{10} 遺伝子座を判別できず、全て S_3 で表記した。このように、PCR 法は S 遺伝子型の判定に簡便であるが、そのみでは限界がある。そのため今後はサザンプロット分析や塩基配列を読むことも必要であり、分子レベルで得られた結果を受粉試験で実際に確かめることも必要と思われる。

(A) C2-C4R プライマーの組み合わせ

(B) C2-C5 プライマーの組み合わせ

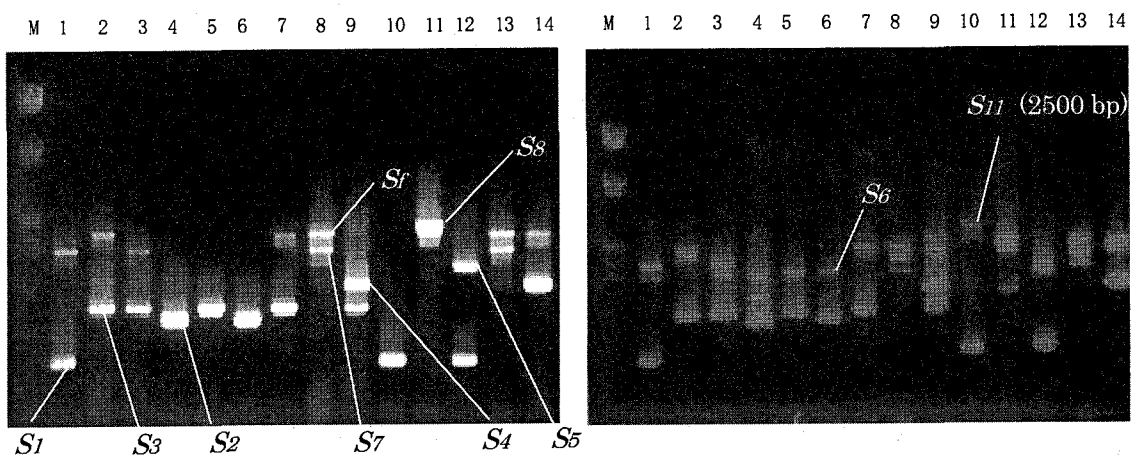


図2 PCR法によるS遺伝子型の決定 lane1 ‘南高’ ($S_1 S_7$) 2: ‘地藏’ ($S_3 S_7$)
 3: ‘NZ46’ ($S_3 S_7$) 4: ‘白加賀’ ($S_2 S_6$) 5: ‘加賀地藏’ ($S_3 S_6$) 6: ‘古城’ ($S_2 S_6$)
 7: ‘白玉’ ($S_3 S_7$) 8: ‘皆平早生’ ($S_7 S_7$) 9: ‘改良内田’ ($S_3 S_4$) 10: ‘薬師’ ($S_1 S_{11}$)
 11 ‘八郎’ ($S_8 S_7$) 12: ‘鶯宿’ ($S_1 S_5$) 13: ‘紅さし’ ($S_7 S_7$) 14: ‘白王’ ($S_4 S_7$)
 M: サイズマーカー-M/HindIII+EcoRI

第2表 ウメ 50 品種の S 遺伝子型

品種名	S 遺伝子型	品種名	S 遺伝子型	品種名	S 遺伝子型
‘南高’	<i>S1 S7</i>	‘パープルクイーン’ (小梅)	<i>S4 S7</i>	‘谷口紅ウメ’	<i>S8 S7</i>
‘地藏’	<i>S3 S7</i>	‘前沢’ (小梅)	<i>S6 S7</i>	‘東地紅ウメ’	<i>S5 S8</i>
‘NZ46’ (南高 X 地藏)	<i>S3 S7</i>	‘竜峡小梅’ (小梅)	<i>S8 S7</i>	‘花香味’	<i>S7 S7</i>
‘白加賀’	<i>S2 S6</i>	‘紅王’ (小梅)	<i>S7</i>	‘節田’	<i>S2 S3</i>
‘古城’	<i>S2 S6</i>	‘信濃小梅’ (小梅)	<i>S11 S7</i>	‘剣先’	<i>S7 S7</i>
‘加賀地藏’	<i>S3 S6</i>	‘光陽小梅’ (小梅)	<i>S2 S7</i>	‘天神’	<i>S7 S11</i>
‘白玉’	<i>S3 S7</i>	‘養育’	<i>S7 S7</i>	‘林州’	<i>S7 S7</i>
‘皆平早生’	<i>S7 S7</i>	‘新平太夫’	<i>S3 S7</i>	‘玉英’	<i>S2 S6</i>
‘改良内田’	<i>S3 S4</i>	‘登一’	<i>S4 S11</i>	‘奥野梅’	<i>S2 S6</i>
‘薬師’	<i>S1 S11</i>	‘金熊寺’	<i>S5 S7</i>	‘ジャンボ高田’	<i>S7</i>
‘八郎’	<i>S8 S7</i>	‘青軸’	<i>S2 S5</i>	‘西洋梅’	<i>S2 S7</i>
‘鶯宿’	<i>S1 S5</i>	‘稻積’	<i>S7</i>	‘太平’	<i>S2 S7</i>
‘紅さし’	<i>S7 S7</i>	‘越の梅’	<i>S3 S7</i>	‘豊後’	<i>S2 S5</i>
‘白王’ (小梅)	<i>S4 S7</i>	‘十郎’	<i>S6 S11</i>	‘伊奈豊後’	<i>S2 S7</i>
‘甲州最小’ (小梅)	<i>S4 S7</i>	‘藤五郎’	<i>S3 S7</i>	‘二青梅’	<i>S1</i>
‘衣笠’ (小梅)	<i>S8 S7</i>	‘福寿’	<i>S2 S6</i>	‘白粉梅’	<i>S3 S7</i>
‘織姫’ (小梅)	<i>S5 S7</i>	‘児玉’	<i>S5 S7</i>		

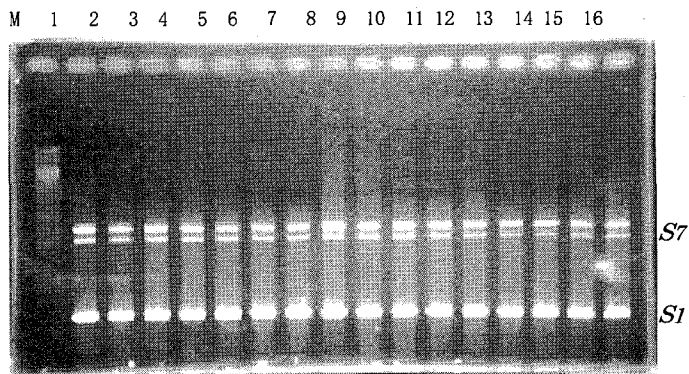
(注) 田尾らによると *S3* 遺伝子型はサザンプロット分析により更に3つに分けられ、新しく *S9*, *S10* の S 遺伝子座を報告している。本試験は PCR 法のみしかおこなっていないため *S9*, *S10* の識別はしておらず、以前のように *S3* として扱った。

試験2 ‘南高’ 3 系統と小粒南高 5 系統の S 遺伝子型

和歌山県各地の 39 園地 79 樹の ‘南高’ について S 遺伝子型を調べたところ、すべての ‘南高’ が原木と同じ *S1 S7* の遺伝子型を示した(第3図)。次に、他の ‘南高’ 3 系統の S 遺伝子型を調べたところ、2 系統(系統 B, C)が原木と違う S 遺伝子型を示した(第4図)。これら 2 系統は原木由来で接ぎ木増殖した系統ではないと思われ、‘南高’ では遺伝的に異なる系統があると考えられる。

また、‘南高’ の受粉樹としてよく利用されている ‘小粒南高’ 5 系統について S 遺伝子型を調べると、各系統が違う S 遺伝子型を示した(第4図)。今回調べた 5 系統はそれぞれ別の系統個体であると考えられ、‘小粒南高’ は多様な系統が存在するように思われる。また、‘小粒南高’ の系統 A と系統 C では 1500 bp にこれまで報告されていないバンドが検出された(第4図)。このバンドを仮に *S12* とした。本研究では試験 1 でも *S11* のバンドが検出されたが、これらは non-specific なバンドである可能性も考えられ、新しい S 遺伝子型であるかどうかサザンプロット分析や塩基配列を読むことも必要であろう。

枝に筋が入る特徴があり ‘小粒南高’ の枝変わりと考えられている系統 E は、‘南高’ と同じ *S1 S7* の遺伝子型を示した。そして、‘小粒南高’ の系統 E と系統 A の花粉を ‘南高’ に受粉したところ、系統 A は結実したが系統 E は結実せず、系統 E は ‘南高’ の受粉樹に利用できないことがわかった(第3表)。林(2003)によると、系統 E は AFLP 法による DNA 解析から作成した樹形図で、‘南高’ 系統 A と ‘小粒南高’ 系統 E は ‘南高’ 原木に近い関係にある(第5図)。この関係は枝変わりの関係にある ‘パープルクイーン’ と ‘白王’ の関係(廣畑 1996)よりも近縁であることから、‘南高’ 系統 A と ‘小粒南高’ 系統 E は ‘南高’ の原木由来の系統であると考えられる。

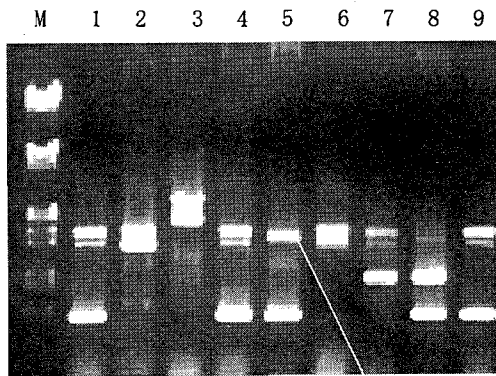


第3図 和歌山県各地の「南高」樹S遺伝子型判別

lane1: 「南高」原木(S1 S7)

2~16: 和歌山県各地の「南高」樹(S1 S7)

M: サイズマーカー λ /HindIII+EcoRI



S12(1500 bp)

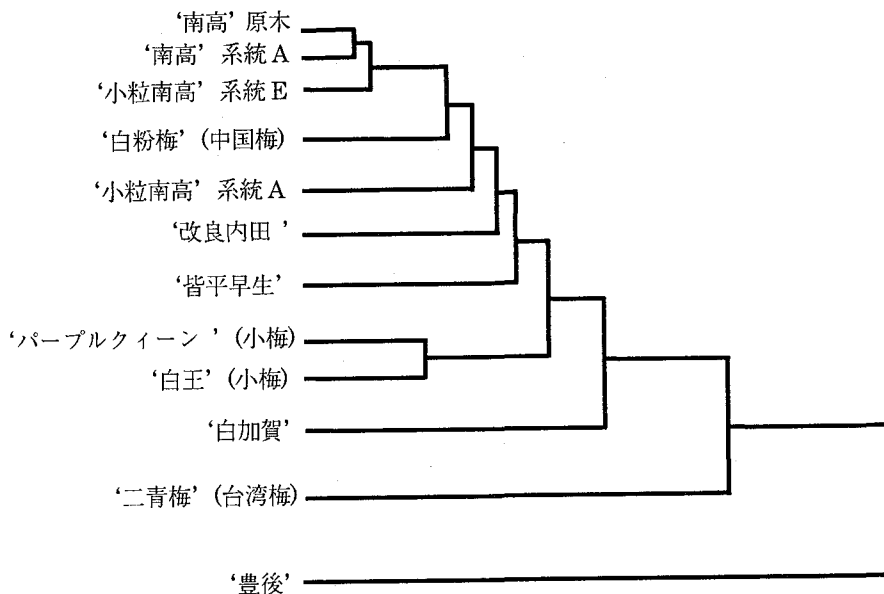
第4図 「南高」3系統、「小粒南高」5系統のS遺伝子型判別

「南高」
 lane1: 系統 A (S1 S7)
 2: 系統 B (S5 S7)
 3: 系統 C (Sf S9)
 4: 原木 (S1 S7)

「小粒南高」
 lane5: 系統 A (S1 S12)
 6: 系統 B (S7 S12)
 7: 系統 C (S3 S7)
 8: 系統 D (S1 S3)
 9: 系統 E (S1 S7)

第3表 「南高」(S1 S7)に対する結実

花粉親	受粉数	結実数	結実率 (%)
「小粒南高」系統 E (S1 S7)	340	0	0
「小粒南高」系統 A (S1 S12)	434	64	14.7



第5図 AFLP法から導いたウメ12系統の樹形図

試験3 実生苗の自家和合性の選抜

‘南高’ ($S_1 S_7$) を種子親にした ‘剣先’ ($SrSr$) との交雑実生 57 個体および ‘地蔵’ ($S_3 Sr$) との交雑実生 63 個体を、PCR 法で S 遺伝子型を判別し、第 4 表に示した。また、一部の有望な F1 個体 (‘南高’ × ‘地蔵’ 25 個体, ‘南高’ × ‘剣先’ 17 個体) について自家受粉したところ、 Sr 遺伝子を持つ個体は全て結実し、 Sr 遺伝子を持たない個体は結実しなかった。このように $SrNase$ 分子マーカーを使えば、自家和合性個体を選抜するのに利用できる。

第 4 表 「南高」交雑個体の S 遺伝子型の分離

種子親	x	花粉親	交雑個体数			
‘南高’($S_1 S_7$)	x	‘剣先’($SrSr$)	22(SrS_1)	35(SrS_7)		
‘南高’($S_1 S_7$)	x	‘地蔵’(SrS_3)	17(SrS_1)	6(SrS_7)	20($S_1 S_3$)	20($S_3 S_7$)

()内は S 遺伝子型を示す。

摘 要

本研究はウメ品種の S 遺伝子型を PCR 法により識別した。

1. 供試したウメ 50 品種から少なくとも 10 の遺伝子座を識別し、22 以上の遺伝子型があることを認識した。
2. 和歌山県各地の ‘南高’ 79 樹の S 遺伝子型は $S_1 S_7$ であったが、異なる S 遺伝子型を示す ‘南高’ が 2 系統あった。
3. ‘小粒南高’ 5 系統の S 遺伝子型はそれぞれが違う遺伝子型を示し、‘小粒南高’ は遺伝的に様々な系統があると考えられた。
4. ‘南高’ と自家和合性個体 (‘地蔵’ と ‘剣先’) の交雑個体の中で、自家和合性個体を Sr 遺伝子の有無で識別することができたことから、 $SrNase$ 遺伝子は自家和合性個体判別の分子マーカーとして利用できることがわかった。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、ウメのサンプルを提供して下さった福井県園芸試験場、南部川村うめ 21 研究センター並びに和歌山県のウメ生産者、ウメに関する情報の提供と生産者に取り次いでくださった日高・西牟婁地域農業改良普及センターの諸氏に感謝の意を表す。

引用文献

- 田尾龍太郎・難波梓・山根久代・冬廣吉朗・渡邊毅・羽生剛・杉浦明. 2003. ウメ(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)の *Sr*-RNase 遺伝子特異的な PCR 増幅のためのプライマーセットの開発. 園学研 (Hort. Res. (Japan))2(4):237-240.
- 林恭平. 2003 ウメの DNA 検定による系統解析. 平成 14 年度農業技術成果発表会要旨 和歌山県 27-28
- 廣畑治. 1996 品種登録 第 4842 号 http://www.hinsyu.maff.go.jp/TourokuhinsyuData/entry_t.nsf/pagename/toppage
- 八重垣秀明・島田武彦・羽山裕子・森口卓哉・三宅正則・土師岳・山口正己. 2000. PCR 法によるウメ品種の自家不和合成遺伝子型の判定. 園芸学会雑誌別冊 2 69: 294
- 山本俊哉・小野勇治・八重垣英明・土師岳・山口正己・林 健樹(2003) モモのゲノムマッピング その 9 果肉色, 核の粘離性, 酸度に連鎖する DNA マーカー. 園芸学会雑誌別冊 2 72: 260
- Tao R, Habu T, Namba A, Yamane H, Fuyuhiko F, Iwamoto K, Sugiura A (2002) Inheritance of *Sr*-RNase in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. Theor Appl Genet 105:222-228
- Tao R, Habu T, Yamane H, Iwamoto K, Sugiura A (2000) Molecular Markers for compatibility in Japanese Apricot (*Prunus mume*) HortScience35(6):1121-1123.2000.
- Yaegaki H, Shimada T, Moriguchi T, Hayama H, Haji T, Yamaguchi M (2001) Molecular characterization *Sr*-RNase and *S* genotype in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) Sex Plant Reprod 13:251-257

Summary

The *Sr*-RNase genotype of Japanese apricot (*Prunus mume*) was typed by PCR.

1. The PCR analysis suggested that 50 Japanese apricot species have at least 10 *Sr*-RNase alleles and over 22 genotypes.
2. In Wakayama prefecture, the *Sr*-RNase genotype of 79 "Nankou" cultivars is *S1 S7*, and that of another 2 is different from *S1 S7*.
3. PCR analysis of the *Sr*-RNase of 5 "Kotubu-nankou" cultivars revealed that each one has a distinct genotype, suggesting that "Kotubu-nankou" cultivars are genetically different.
4. PCR analysis of the *Sr*-RNase gene of "Nankou" x Self-compatible cultivars ("Jizou" and "Kensaki") showed a distinct difference between self-compatible from self-incompatible ones. The result suggested that in actual breeding, self-compatible cultivars can be selected by their *Sr*-RNase molecular marker.