

リンゴの複数形質を同時判定するマルチプレックス PCR 法の開発

ー遺伝子検査を取り入れた次世代リンゴ新品種の効率的作出技術に関する研究ー

Development of multiplex PCR methods for selection of apple seedlings

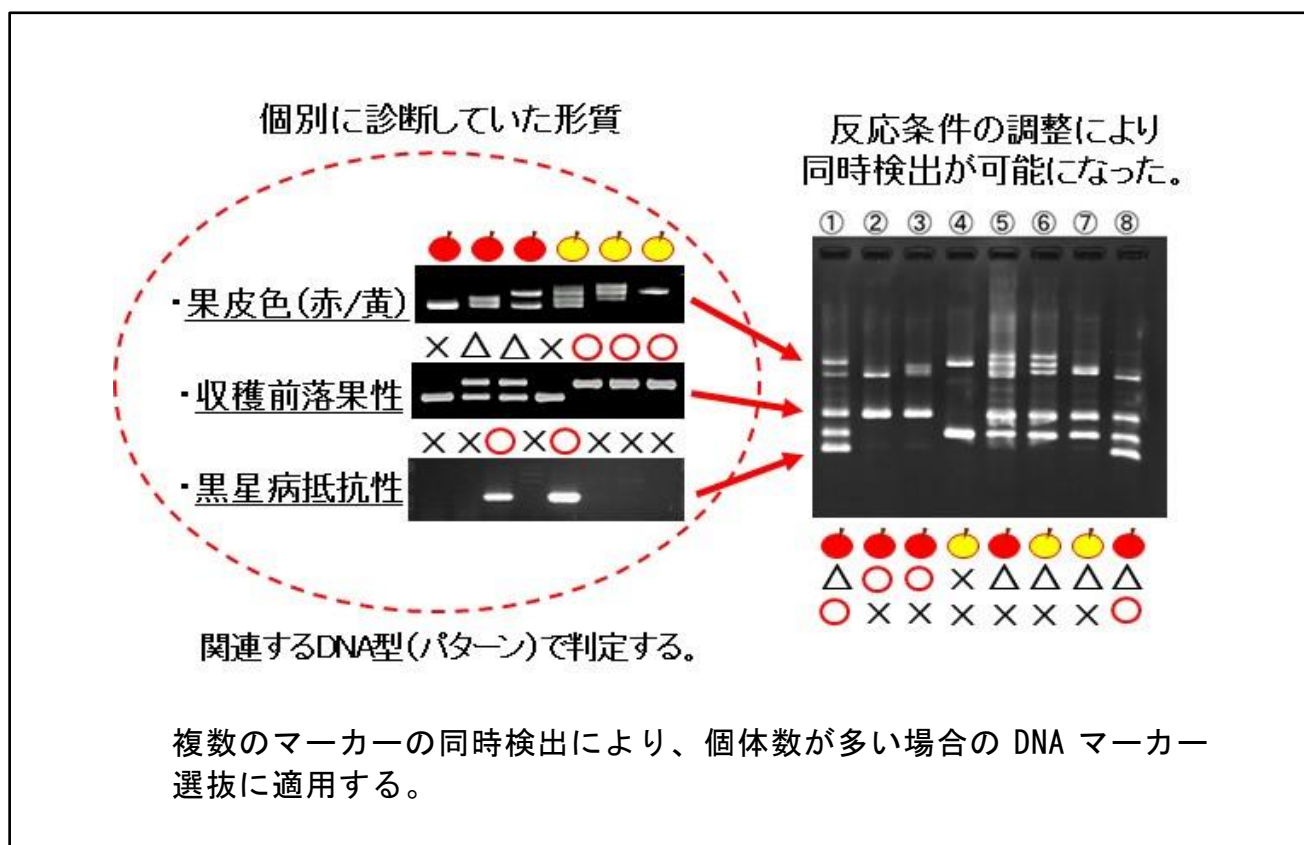
-Study on genotyping technique for efficient apple breeding-

五十嵐 恵、赤田朝子*、初山慶道

(*りんご研究所)

青森県では食味、栽培特性、貯蔵特性等の優れたリンゴ新品種の育成に取り組んでいるが、リンゴでは品種レベルの実生の選抜率が非常に低いために、スタート時の実生数（母集団）を大きくする必要があります。果樹の育種では、幼苗段階で形質を予測して目的としない個体を淘汰できる DNA マーカーが利用されるようになり、後の栽培管理にかかる労力及び栽培に必要なほ場スペースを効果的に利用することができるようになってきた。しかし、スタート時に大きな母集団を扱うためには、DNA マーカー選抜自体の効率化も重要である。

そこで、現在青森県で使用している 3 マーカー（果皮色（赤・黄）、収穫前落果性、*M. floribunda* 由来の黒星病抵抗性を判定するマーカー）について遺伝子型判定操作を同時に行うことを目標として、現場で行う簡易抽出 DNA を鋳型とした場合も適用できる PCR 増幅及び電気泳動条件の検討を行い、諸条件を決定した。



1. 背景

幼若期が長い果樹の育種では、幼苗段階で形質を予測できる遺伝子（DNA）マーカーが利用されるようになってきた。青森県では食味、栽培特性、貯蔵特性等の優れたリンゴ新品種の育成に取り組んでいるが、リンゴでは交雑実生集団内に品種レベルの果実形質等を有する個体の割合が非常に低いために、スタート時の実生数（母集団）を大きくする必要がある。DNA マーカーを利用して幼苗の段階で大部分を淘汰できれば、スタート時の母集団を大きくした場合でもその後の栽培管理にかかる労力及び栽培に必要なほ場スペースに適した個体数で効果的な選抜が可能となる。しかし、最初の母集団を増やすことで DNA 解析にかかる負担の軽減も考慮する必要がある。果皮色（赤・黄）、収穫前落果性、*M. floribunda* 由来の黒星病抵抗性を判定するマーカーは、リンゴ育種において交雑親の選択や実生選抜において既に実用化されている。これらのマーカーはいずれも PCR 法を用いて増幅したバンドの有無又はバンドパターンにより形質を判定するものであるが、それぞれ増幅条件が異なる。そのため、マーカー毎に増幅反応、電気泳動による検出を行い、判定する必要がある。従って、対象となる実生数が非常に多い場合、複数のマーカーを同時に判定することができれば、必要な時間及び費用の削減が期待できる。

本試験では、現在青森県で主に使用している 3 マーカーについて遺伝子型判定操作を同時に行うことを目標として、それに適した増幅条件及び電気泳動条件の検討を行った。

2. 実験概要

2. 1 DNA サンプル

2. 1. 1 精製 DNA

改変 CTAB 法^{1)、2)}で抽出した DNA（プリマ、あおり 25、国光、未希ライフ、デリシャス、印度、ハック 9 又は北斗、トキ、選抜系統 A、メロー）。約 0.1g の若葉を材料とし、最終的に 1ml の TE 又は 0.1xTE に溶解したものを滅菌水で 10 倍希釈して鋳型とした。

2. 1. 2 未精製 DNA

簡易法（Edwards 法³⁾、酸化防止剤として 20mM DTT 使用）で抽出した DNA（あおり 25、国光、ふじ、印度、北斗、メロー、選抜系統 A、選抜系統 B）。凍結保存葉から約 0.5cm 角分を採取して材料とし、最終的に 100 μ l の TE に溶解したものを滅菌水で 10 倍希釈して鋳型とした。

2. 2 対象マーカー

形質判定マーカーは、PCR 及びアガロースゲル電気泳動のみで判断可能で、既に実用化されている以下の 3 形質を対象とし、既報の配列に従って合成したプライマーを使用した。

2. 2. 1 収穫前落果性

Sunako ら（1999）⁵⁾及び Sato ら（2004）⁶⁾が報告した、収穫前落果性に関連する MdACS1（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid 合成酵素遺伝子）の遺伝子型（1 型と 2 型）を識別する ACS1-5' F/ACS1-5' R プライマーセットを使用した。

2. 2. 2 果皮色

Cheng ら（1996）⁷⁾が報告した Rf マーカー遺伝子型（a1、a2、A 型）を検出する BC226-1/2 プライマーセットを使用した。

2. 2. 3 *M. floribunda* 由来黒星病抵抗性

Xu ら（2001）⁴⁾が報告した、Vf 領域に 0cM で連鎖する ACS9 マーカーを検出するプライマーセットを使用した。

2. 3 反応条件検討

増幅反応は全て鋳型 DNA を $2\mu\text{l}$ 含む $10\mu\text{l}$ 反応液で行った。従来単独で用いている増幅条件（表 1）を参考に、まず、増幅反応のアニーリング温度を 52°C 、30 サイクル、 $0.025\text{U}/\mu\text{l}$ TaKaRa TaqTM polymerase を初期条件とし、結果に応じてプライマーの量及び電気泳動条件を調節した。予測される PCR 産物のサイズからは、同時に泳動した場合でもそれぞれの識別が可能と考えられたが、MdACS1 の 1 型と Vf マーカーのサイズが比較的近いため、通常用いている 2%よりもこの領域ではやや分離に優れる 1.75%濃度のアガロースゲルも使用した。PCR 反応終了後に $2\mu\text{l}$ の泳動用色素バッファーを加えて全量（ $12\mu\text{l}$ ）を電気泳動した。全体の分離を明瞭にするために泳動時間をやや長めとし、泳動用色素のプロモフェノールブルー（BPB）がゲル末端に到達したところで終了とした。増幅バンドは、EtBr 染色及び UV 照射により検出した。

表 1 各マーカーを単独で用いる場合の増幅条件及び検討初期条件

参考文献記載上の条件を示したが、既に独自で改変・使用していた条件については下部に括弧付で記載した。Vf マーカーの使用酵素量及びプライマー濃度は文献記載無しのため、実施条件のみ。

形質	マーカー (プライマー)	増幅サイズ	アニーリング 温度※ ¹	サイクル 数	酵素量※ ²	プライマー 濃度	参考文献
果皮色	Rf (BC226-1/2)	1.2~1.5kb	45°C (50°C)	40	$0.02\text{ U}/\mu\text{l}$	$0.3\mu\text{M}$	Cheng ら (1996) ⁷⁾
収穫前落果性	MdACS1 (ACS1-5' F / ACS1-5' R)	1 型 : 0.5kb 2 型 : 0.7kb	58°C (55°C)	35 (40)	$0.05\text{ U}/\mu\text{l}$ ($0.03\text{ U}/\mu\text{l}$)	$0.2\mu\text{M}$	Sunako ら (1999) ⁵⁾
<i>M. floribunda</i> 由来 黒星病抵抗性	Vf (ACS9-F/R)	0.47kb	65°C (55°C)	35	($0.05\text{ U}/\mu\text{l}$)	($0.4\mu\text{M}$)	Xu ら (2001) ⁴⁾
同時増幅検討の条件		各々上記	52°C	30	$0.025\text{ U}/\mu\text{l}$	条件検討	-

※ 1 : 各マーカーは、調整した温度においても特異的バンドが増幅される。

※ 2 : 増幅酵素は全て TaKaRa TaqTM ($5\text{ U}/\mu\text{l}$) を使用した。

3. 結果及び考察

改変 CTAB 法で抽出した既知 8 品種の DNA を鋳型として、初期条件（アニーリング温度 52°C 、30 サイクル、 $0.025\text{U}/\mu\text{l}$ rTaq pol.）で各マーカーの単独プライマーセット（各 $0.2\mu\text{M}$ ）による増幅を行ったところ、正しい遺伝子型判定が可能であった（データ略）。そこで、増幅効率が比較的良好でサイズの短い MdACS1 及び Vf プライマー濃度を $0.1\mu\text{M}$ 、増幅サイズの長い Rf プライマーを $0.2\mu\text{M}$ として、3 組のプライマーセットを含む反応液を調製し、上記 PCR 条件で反応を行った。その結果（図 1 a）、Rf 及び MdACS1 については、マーカー型判定可能なバンドが検出されたが、Vf マーカーについては、相当する増幅バンドが Vf 遺伝子を持つ「プリマ」、「あおり 25」で検出されなかった。

そこで、Vf プライマー量を $0.2\mu\text{M}$ に増加して反応を行ったところ、両品種で Vf に相当するサイズの増幅バンドが検出できた（図 1b）。通常、当実験室で汎用している 2%アガロース濃度では、各バンドの分離は良好であったが、この濃度では泳動用色素のキシレンシアノール（XC）が Rf マーカーと重なり、バンドの明瞭さを損なう結果となった（図 1c）。そのため、2%アガロース

を使用する場合は、泳動用色素としては BPB のみを使用するか、XC の濃度を薄めて使用することが考えられた。

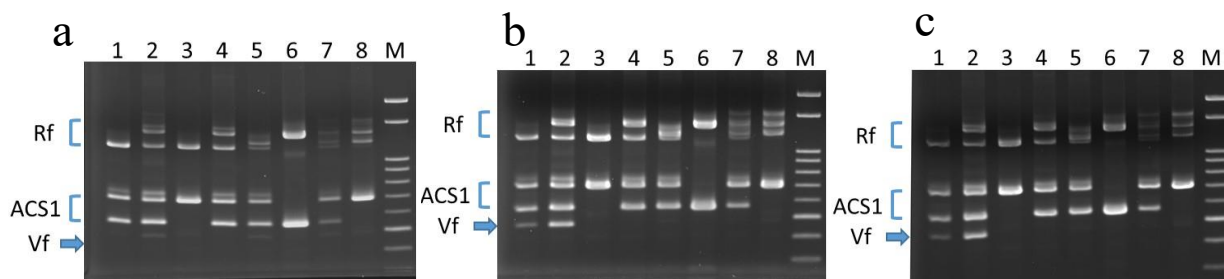


図1 3種類のプライマーによるマルチプレックス PCR 検出方法の検討

a: 0.1 μ M ACS1 primer, 0.2 μ M Rf primer, 0.1 μ M Vf-ACS9 primer, 1.75% LE agarose、

b: 0.1 μ M ACS1 primer, 0.2 μ M Rf primer, 0.2 μ M Vf-ACS9 primer, 1.75% LE agarose、

c: 0.1 μ M ACS1 primer, 0.2 μ M Rf primer, 0.2 μ M Vf-ACS9 primer, 2% LE agarose

レーン1: プリマ、2: あおり 25、3: 国光、4: 未希ライフ、5: デリシャス、6: 印度、7: ハック 9 (a) or 北斗 (b, c)、8: トキ、M:100bp ladder

設定した各条件を使用し、精製度が CTAB 法よりも低い Edwards 法による簡易抽出 DNA を鋳型とした場合への適用を調査した。その結果(図2)、改変 CTAB 法で抽出した DNA を鋳型とした場合と同様、各品種・系統について3マーカーの検出が可能だった。得られた増幅バンドによって判定される遺伝子型はあらかじめ調査済みのものと一致し(図2内の表)、本条件が精製度の低い DNA を鋳型とした場合にも適用できた。

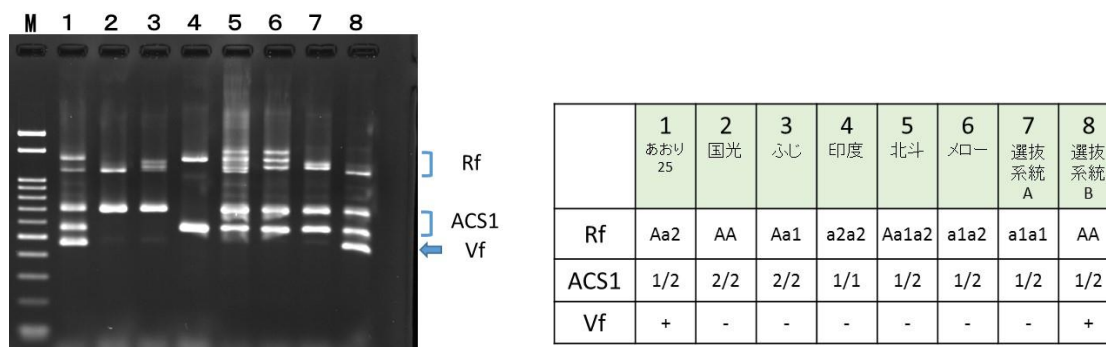


図2 簡易抽出 DNA を鋳型とした場合のマルチプレックス PCR 検出確認

図1c (0.1 μ M ACS1 primer, 0.2 μ M Rf primer, 0.2 μ M Vf-ACS9 primer, 2% LE agarose) の条件で増幅反応及び電気泳動を実施した。

1: あおり 25、2: 国光、3: ふじ、4: 印度、5: 北斗、6: メロー、7: 選抜系統 A、8: 選抜系統 B、M:100bp ladder

4. まとめ

リンゴ育種において選抜に実用化されている3個の重要形質関連マーカーについて、検出作業の効率化を目的として同時検出条件の検討を行った。本報告によって特定した3マーカーのマルチプレックス PCR 条件は、精製度の高い DNA だけでなく簡易抽出による精製度の低い DNA を用いた場合にも適用できたため、実際の育種現場での使用も期待できる。

ただし、今回検討した8品種・系統ではマーカーの検出に大きな差異は生じなかったが、現場で行う複数の作業による短時間かつ多数の DNA 抽出作業では、個別サンプルの DNA 濃度及び夾

雑物の残留量に大幅な違いが生じうる。しかし、現場で全てのサンプル濃度を測定し、一定に合わせることは効率的ではないため、実際の使用の場面では諸条件の確認及び調整が必要になると考えられる。

5. 参考文献

- 1) Wanger D. B., Furnier G. R., Sanghai-Marroof M. A., Williams S. M., Dancik B. P. and Allard R. W. (1987) Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2097-2100.
- 2) Bousquet J., Simon L. and Lalonde M. (1990) DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction. *Can. J. For. Res.* 20: 254-257.
- 3) Edwards K., Johnstone C. and Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19: 1349.
- 4) Xu M., Huaracha E. and Korban S. S. (2001) Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the Vf gene in apple. *Genome* 44: 63-70.
- 5) Sunako T., Sakuraba W., Senda M., Akada S., Ishikawa R., Niizeki M. and Harada T. (1999) An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol.* 119: 1297-1303.
- 6) Sato T., Wakasa Y., Kudo T., Akada T., Niizeki M. and Harada T. (2004) Allelotype of a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene defines the rate of fruit drop in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129: 32-36.
- 7) Cheng F. S., Weeden N. F. and Brown S. K. (1996) Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple. *Theor. Appl. Genet.* 93: 222-227.