

DNA マーカーを利用したメロン ‘イバラキング’ F₁ 純度検定法の開発

大寺宇織・石川友子¹⁾・加藤謙司²⁾・葛谷真輝

(茨城県農業総合センター生物工学研究所)

要約

良食味として普及が進んでいる茨城県育成メロン F₁ 品種 ‘イバラキング’ の種子品質維持のためには、その種子の遺伝的斉一性（純度）を検査し、混種のない種子を供給していくことが必要である。そこで本研究では、メロンの細胞質が父性遺伝することを利用し、ミトコンドリアゲノム上に設計したマーカーを用いることによって、複数のサンプルをバルク（混合）分析する効率的な ‘イバラキング’ 種子の純度検定法を開発した。さらに、普及拡大に伴う種子増産に対応するため、より効率的に検定できるようダイレクト PCR を利用することにより、迅速・大量に純度検定を行う手法を確立した。

キーワード：メロン、純度検定、DNA マーカー、バルク法、ダイレクト PCR

1. はじめに

茨城県育成メロン品種 ‘イバラキング’ は、2010 年に品種登録され、良食味品種として市場の評価も高く、県内産地に普及が進んでおり、2020 年には栽培面積 39.0ha となっている。‘イバラキング’ は F₁ 品種であり、遺伝的に固定した両親系統の交配によって種子を生産している。F₁ 種子を採種するためには、種子親である雌性系統と、花粉親である雄性系統を交雑する必要があり、確実に雌性系統の受粉能を有する花粉を除去する手法として、雄性不稔系統（ニンジン、タマネギ）の利用や、熱処理による物理的な雄蕊の不活化（水稻）などが行われる（新倉，2007）。メロンではこうした手法が開発されておらず、メロンの交配は、開花前日に種子親の両性花の葯をピンセット等で物理的に除去し、開花当日に花粉親の花粉を種子親の両性花の雌蕊に授粉させることによって行う。このため、メロンの F₁ 種子作成では人為的なミスが発生する可能性があり、このとき花粉の除去が不完全であると、種子親由来花粉で受粉してしまい、目的の F₁ 種子以外に種子親の自殖種子が混入することになる。このような混種を含む種子が生産現場へ供給された場合、生産現場での混乱・減収や消費者の低評価を招き、品種のブランド力低下につながる恐れがある。また混種が多い場合、種苗供給者から生産者への補償問題になる可能性があり、種苗供給者の安定供給にとっても重要なリスクとなる。このため F₁ 種子の供給にあたっては、種子の遺伝的斉一性、すなわち F₁ 種子の純度を検定したうえで、混種のない種子を供給していくことが必要である。

種子の純度検定法にはいくつかの手法があるが、近年広く利用されているのが、DNA の塩基配列の違い（多型）をマーカーとして用いる手法である。DNA マーカーは、栽培試験やアイソザイム解析といった手法と比べ、短時間かつ大量にサンプルを処理でき、両親系統が遺伝的に近縁でも適用できる。DNA マーカーを用いた分析法として、RAPD 法を用いたカブ（吉秋，2003）、RFLP 法を用いたキュウリ（Matsuura et al., 1994）、SSR 法を用いたナス（久保ら，2014）など、様々な純度検定法が開発が図られ、より近縁な系統を識別でき、かつ簡便な手法への改良が進んでいる（大澤，2004）。

加藤（2007）は、メロンの F₁ 種子の純度検定に適用できる mtIRDP（Mitochondrial Inter Repetitive DNA Polymorphism）マーカーを開発した。このマーカーは純度検定において、複数サンプルを混合したバルク分析を行うことができる。これまで品種識別に用いられてきた DNA マーカーの多くは核ゲノム上に設計されており、F₁ 種子では花粉親と種子親双方由来の多型をもち、種子親自殖種子では種子親由来の多型のみを持つ。このため、F₁ 種子の純度検定において、従来のマーカーでは 1 個体ずつ分析していけば混種を検出できるが、複数個体のサンプル DNA を混合してバルク検定を行った場合、F₁ 種子と自殖種子の多型を判別できず、混種を検出することはできない。しかし、メロンのゲノムについて、核ゲノムは両親由来であるが、細胞質（ミトコンドリア、

1) 現 茨城県農業総合センター鹿島地帯特産指導所

2) 国立大学法人岡山大学環境生命科学学域

葉緑体) ゲノムは花粉親のみに由来する父性遺伝であることが知られている (Lilly and Havey, 2001)。このため、ミトコンドリアゲノムの多型が、父性遺伝する DNA マーカーとして利用できる。mtIRDP マーカーはミトコンドリアゲノム上に設計されたマーカーであることから、F₁ 種子では花粉親由来の多型のみをもち、種子親自殖種子では種子親由来の多型のみを持つため、バルクでも混種の検出が可能で、検定を効率化できると考えられた。

本研究では‘イバラキング’の種子純度検定手法の開発・実用化を目的に、mtIRDP マーカーの‘イバラキング’種子純度検定への適用性を検討した。次に mtIRDP マーカーを用い、検査精度を保ったうえで効率的にバルク検定を行う条件について検討し、純度検定法を開発した。また、さらなる効率化のため、DNA 抽出の工程を省いたダイレクト PCR の利用について検討し、手法の改良を行った。

2. 材料および方法

2. 1 マーカー候補の選抜

加藤 (2007) の開発した mtIRDP マーカー 2 組み合わせについて、F₁ ‘イバラキング’、種子親 ‘P2’、花親 ‘P32’ の多型解析を行い、父性遺伝するマーカーとして利用可能なマーカーを選抜した。DNA 抽出は房安ら (2006) の方法を改変して行った。メロン葉 0.5g に DNA 抽出 buffer (0.1M Tris-HCl (pH8.0)、0.5M NaCl、0.05M EDTA) 300 μ L を添加し、組織を磨砕した。65 $^{\circ}$ C、10 分間加熱した後、5M 酢酸カリウム 100 μ L を添加し、氷上で 10 分間静置した。15000rpm、4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心分離した後、上清 300 μ L を採取した。上清にイソプロパノール 300 μ L を添加した後、転倒混和し、15000rpm、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心分離した。上清を捨て、70%エタノール 300 μ L を添加し、15000rpm、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心分離した。上清を捨て 56 $^{\circ}$ C、2 分間加熱乾燥した後、1 \times TE 100 μ L に溶解して、DNA 抽出液とした。以降の DNA 抽出は全て同様の方法で行った。抽出した DNA を鋳型に、Taq DNA Polymerase (シグマアルドリッチ) を用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動によって多型を判別した。

2. 2 バルク検定法の検討

バルク検定法の効率化と種子親 ‘P2’ 混入時の検出精度を明らかにするため、抽出 DNA を混合してバルクにする手法と、子葉を混合して DNA 抽出を行う手法について、‘P2’ の混入率を変えて検出を試みた。

2. 2. 1 抽出 DNA バルク法

‘イバラキング’ と ‘P2’ の各個体から DNA を抽出した。抽出 DNA を体積比で ‘イバラキング’ : ‘P2’ = 4:1、9:1、14:1 となるように混合した (バルク化)。混合 DNA を鋳型に、GoTaq $\text{\textcircled{R}}$ Colorless Master Mixes (プロメガ (株)) と mtIRDP マーカーを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動による多型解析で、‘P2’ 混入の検出の可否を確認した。以降の PCR については、ダイレクト PCR を除き、同様の方法で行った。

2. 2. 2 子葉バルク法

メロン幼苗子葉を個体数比で ‘イバラキング’ : ‘P2’ = 2:1、4:1、9:1、14:1 となるように混合 (バルク化) し、DNA を抽出した。バルク抽出した DNA について、mtIRDP マーカーを用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動による多型解析で、‘P2’ 混入の検出の可否を確認した。

2. 3 ダイレクト PCR を用いた検定手法の改良

Ohta et al. (2013)、堀井ら (2018) の方法を参考に、mtIRDP マーカーについて、Ampdirect Plus ((株) 島津製作所) を用いたダイレクト PCR を行い、抽出 DNA を用いた従来の PCR と、アガロースゲル電気泳動による多型解析で結果を比較した。ダイレクト PCR は 2 \times Ampdirect $\text{\textcircled{R}}$ Plus ((株) 島津製作所) 10 μ L、BIOTAQ TM HS DNA Polymerase ((株) 島津製作所) (5U/ μ L) 0.1 μ L、10 μ M 5'-Primer 1 μ L、10 μ M 3'-Primer 1 μ L、10% Polyvinylpyrrolidone 5.9 μ L、滅菌水 5.9 μ L を混合した 20 μ L の反応液を調整し、つまようじで子葉を軽く 5 回つついてサンプリングし、つまようじを反応液中に浸して DNA を溶解して行った。以降のダイレクト PCR について、反応液の組成は同様のものとした。また、ダイレクト PCR を用いたバルク分析を検討するため、メロン幼苗子葉を ‘イバラキング’ 2 個体+ ‘P2’ 1 個体、以下同 5 個体+1 個体、8 個体+1 個体を 1 本つまようじで各個体 2 回つついてバルクサンプリングし、ダイレクト PCR を行った。さらにバルク規模 (混合サンプル数) 3 個体で ‘イバラキング’ のみのバルクと ‘P2’ を 1 個体混入させたバルクについて、各 96 バルクのダイレクト PCR を行い、偽

陰性・偽陽性の発生を確認した。また、バルク検定法と、ダイレクト PCR を用いた方法で、作業時間と検定費用を試算し、比較した。

3. 結果および考察

3. 1. マーカー候補の選抜

mtIRDP マーカーについて、‘P32’ と ‘イバラキング’ で同じ多型を示し、父性遺伝するマーカーを 1 組み合わせ選抜した (図 1)。なお、‘P32’、‘イバラキング’ では約 800bp、‘P2’ では約 600bp にバンドが検出され、アガロースゲル電気泳動で両バンドの判別が可能であった。

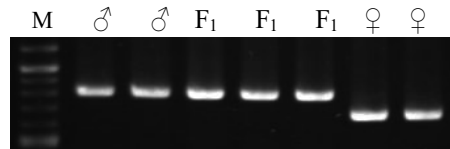


図 1 mtIRDP マーカーによる ‘イバラキング’ および両親系統の多型解析

M : 100bp DNA ladder, ♂ : P32 (イバラキング花粉親), F₁ : ‘イバラキング’, ♀ : P2 (イバラキング種子親)

3. 2 バルク検定法の検討

mtIRDP マーカーについて、バルク検定を検討した。DNA 抽出液を混合 (バルク) して PCR、ゲル電気泳動を行った結果、全てのバルク規模において ‘P2’ の混入を検出できた (表 1)。

各個体の子葉をバルク化して DNA 抽出および PCR を行った場合、‘P2’ の混入割合が、1/3、1/5 では判定可能であったが、混入割合が 1/10、1/15 では検出バンドは薄く、目視での確認では見落とす危険性があった。したがって、子葉バルクにおいては、抽出 DNA バルクよりもバルク規模 (混合サンプル数) を小さくする必要があると判断した。

バルク手法としては DNA 抽出を個別に実施し、その抽出液を混合した方が PCR 反応およびそれに続くゲル泳動のバルク規模を大きくすることが可能である一方、検定において最も時間・労力を必要とするのは DNA 抽出作業である。作業性を考慮した場合、バルク規模は小さくても DNA 抽出を集団で行う子葉バルクは、大量のサンプル解析により適すると判断した。

表 1 バルク分析における ‘P2’ 検出精度

検定法	‘P2’ 混入率			
	1/3	1/5	1/10	1/15
抽出 DNA バルク法	ND	+	+	+
子葉バルク法	+	+	±	±

+ : 検出, ± : バンドが薄く検出不安定, ND : データなし

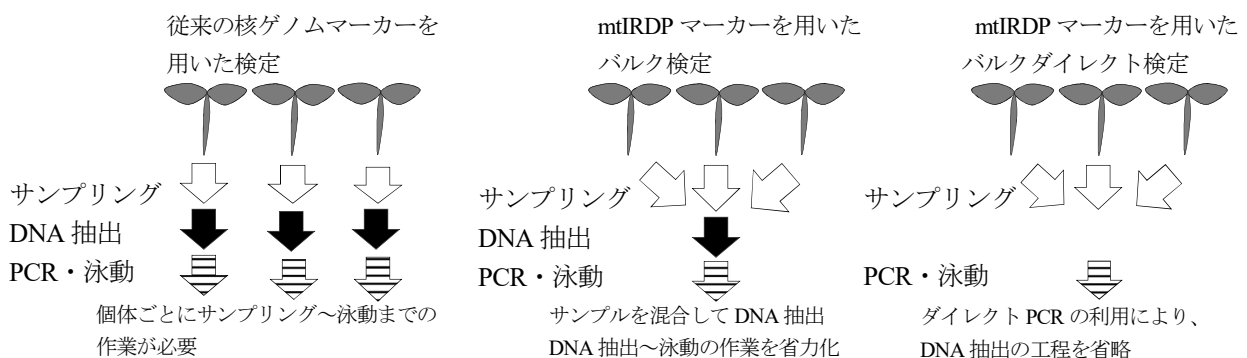


図 2 各 F₁ 検定手法の流れ

※矢印は 1 工程を示す

以上の結果から、純度検定は mtIRDP マーカーを用い、子葉を 3 個体分バルクにして DNA 抽出を行い、PCR・電気泳動を行うこととした（図 2 中央）。本方法ではバルク中の異種混入数は把握できないものの、迅速に種子ロット中の混種の有無を判定できた。

3. 3 ダイレクト PCR を用いた検定手法の改良

mtIRDP マーカーを用いてダイレクト PCR を行うことで、従来の抽出 DNA をテンプレートとした PCR と同様の結果が得られた（図 3）。

ダイレクト PCR でもバルク分析が可能であるか確認したところ、バルク規模 3 および 6 個体ではバルクでも安定して‘P2’のバンド検出が可能であった。バルク規模 9 個体では検出が不安定で、15 バルク中 1 バルクで偽陰性が発生した（表 2）。

つまようじによるサンプリングは、子葉の生育状態、つつきの順番、つつきの個人差等によりサンプリング量の振れ幅が大きいことが予想される。このため、バルク検査において適切なバルク規模は 1 バルクあたり 3 個体であると考えられた。

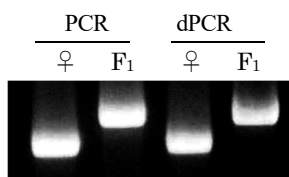


図 3 mtIRDP マーカーのダイレクト PCR への適用性

PCR：抽出 DNA をテンプレートとした PCR、dPCR：ダイレクト PCR、
♀：P2（‘イバラキング’種子親）、F₁：‘イバラキング’

表 2 ダイレクト PCR における‘P2’検出精度

検定	‘P2’混入率別の 検出数（バルク）		
	1/3	1/5	1/9
検定数	15	15	15
陽性数	15	15	14
偽陰性数	0	0	1

また、バルク規模 3 個体で‘イバラキング’のみバルクと‘P2’1 個体混入バルクを用い、それぞれ 96 回の繰り返し試験を行ったところ、偽陰性・偽陽性は発生せず、正確な検出が可能であった。

以上の結果から、つまようじを用いて子葉を 3 個体分バルクにするダイレクト PCR 法による改良純度検定法を開発した（図 2 右、図 4）。



図 4 改良純度検定法のダイレクト PCR 手順

A：播種 7 日後、1 バルクにつき 3 個体の子葉を採取し、並べる。数字はサンプリングの順番。

B：図 A に記した順番で、1 本のみつまようじで子葉を計 6 回軽くつつく。

C：PCR プレート中の反応液につまようじを入れ、軽く 10 回攪拌する。機器にセットし PCR 開始。

改良の結果、ダイレクト PCR 法の活用により DNA 抽出を省略することができた。1800 バルク（5400 個体）あたりの作業時間および検定費用は、改良したバルクダイレクト検定法ではそれぞれ 225 時間・人、537 千円で

バルク法の 982 時間・人、1303 千円のそれぞれ、23%、41%であり、検定の効率化を図れることが明らかになった (表 3)。

表 3 各検定法の作業時間・検定費用試算比較 (1800 バルクあたり)

	バルク検定法 (A)	バルクダイレクト 検定法 (B)	対比 (B/A)
実作業時間 (時間・人)	982	225	23%
検定費用 (円)	1,303,421	537,405	41%
内訳 消耗品費 (円)	190,285	282,312	
労 賃* (円)	1,113,136	255,093	

* : 時給 1,133 円で算出

3. 4. 純度検定の活用と今後の展開

‘イバラキング’の種子供給においては、茨城県農林振興公社園芸振興部園芸種苗センターが種子生産と供給を行い、茨城県農業総合センター生物工学研究所では両親系統の原種の供給と、生産された種子の純度検定を行っている。本研究で開発した検定法を活用し、2011 年から 2019 年まで各年 450~600 バルクの種子純度検定を行い、年間 0~4 バルクの混種を検出した (図 5)。検定の抽出個体数は 1 ロット (1500 粒程度) あたり、6 バルク (18 粒) 検定している。手法を改良した 2020 年には 1800 バルクの純度検定を行い、12 バルクの混種を検出した。混種が検出された種子ロットについては廃棄し、混種が検出されなかったロットのみ出荷することで、純度が高い種子を供給している。

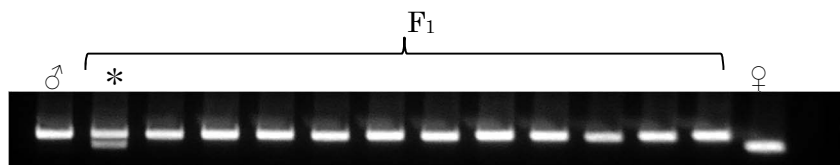


図 5 純度検定における混種検出

♂ : P32 (イバラキング花粉親)、F₁ : イバラキング、♀ : P2 (イバラキング種子親)、* : 混種バルク

また、ミトコンドリアゲノムは核ゲノムに比べて変異しやすい傾向にある。マーカーの設計領域に変異があった場合、形質に影響がなくても純度検定の判定に影響するため、種子生産を行う両親系統についても抽出検査で検定を行い、変異がないことを確認してから種子生産を行っている。

本研究により迅速な純度検定が可能となったが、‘イバラキング’は今後も普及拡大が見込まれていることに加え、赤肉品種の育成も進めており、いずれは検定数の増加に対応して、更なる効率化が必要とされる。本研究では最終的な PCR 産物の確認はアガロースゲル電気泳動で行ったが、シーケンサーを用いたフラグメント解析であればより微量な産物も識別できる。このため、純度検定においてもフラグメント解析によりバルク規模を引き上げられる可能性があり、今後はフラグメント解析の適用を経済性も含めて検討していく必要がある。

摘要

本研究では、F₁ メロン品種 ‘イバラキング’の種子純度検定手法を開発した。細胞質の父性遺伝を利用した ‘イバラキング’の両親を判別できる mtIRDP マーカーを 1 組み合わせ選抜した。検定におけるサンプルの適切な混合方法を明らかにするため、抽出した DNA を混合して PCR を行う手法と、子葉組織を混合して DNA 抽出・PCR を行う手法で、バルク規模 (混合サンプル数) を変えて検定を行った。抽出 DNA の混合では自殖種子 DNA 混入割合が 1/15 でも検出できたが、子葉組織の混合では明確に検出できたのは混入割合が 1/5 までだった。作業性等を考慮し、子葉 3 個体分をバルクにして DNA 抽出を行い、PCR・電気泳動を行うこととした。更なる効率化の検討として、ダイレクト PCR の利用を試みた。つまようじでサンプリングするダイレクト PCR を行うことで、自殖種子混入割合 1/6 までは安定して自殖種子混入を検出できた。つまようじによるサンプリング量の振れ幅を考慮し、子葉 3 個体分をバルクにしてダイレクト PCR・電気泳動を行うこととした。mtIRDP マーカー

でダイレクト PCR を行うことで、迅速かつ大量に純度検定を行うことができる。

引用文献

- 堀井 学・葛谷真輝・久保山 勉・白澤健太・八城和敏 (2018) レンコンの品種識別に用いるダイレクト PCR 手法の検討. 園学研 17 別 2 : 259.
- 房安聡司・佐藤哲二・清水宏昭 (2006) カンキツグリーンング病菌 (*Candidatus Liberobacter asiaticum*) の LAMP 法による検定方法の検討. 植防研報 42 : 75-81.
- 加藤鎌司 (2007) 他殖性野菜の品種識別、平成 19 年度課題別研究会資料・ネギ属野菜の育種と栽培・品質に関する諸問題. 24-31.
- 久保深雪・聖代橋史佳・吉田 誠 (2014) ナス品種サラダ紫の F₁ 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.
- Lilly J W and M J Havey (2001) Small, repetitive DNAs contribute significantly to the expanded mitochondrial genome of cucumber, *Genetics* 159: 317-328.
- Matsuura S, Saito A and Fujita Y (1994) An approach for rapid checking of seed purity by RFLP analysis of nuclear DNA in F₁ hybrid of cucumber (*Cucumis sativus* L.), *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 63 (2): 379-383.
- 新倉 聡 (2007) アブラナ科野菜における生殖形質の遺伝学的研究とその育種への展開 育種学研究 9 (4) : 153-160.
- 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.
- Ohta S, Yano K, Kurita Y, Kita M, Shimizu T and Nesumi H (2013) A sample preparation method for direct and non-direct PCR in woody plants, *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.* 82 (1): 14-21.
- 吉秋 斎 (2003) PCR によるカブ F₁ 品種加賀清姫の純度検定法. 石川農総セ研報 25 : 27-28.

Development of an F₁ Purity Checking Method for ‘Ibaraking’ Melon Using DNA Markers

Takaori ODERA¹, Tomoko ISHIKAWA, Kenji KATO, and Maki KUZUYA

Summary

In order to maintain the seed quality of the Ibaraki Prefecture F₁ melon cultivar ‘Ibaraking’, which is becoming increasingly popular for its good quality, it is necessary to check the seed purity and supply seeds without self-pollination. In this study, taking advantage of the fact that melon cytoplasm was paternally inherited, we developed an efficient purity test method for the ‘Ibaraking’ seed for bulk (mixed) analysis of multiple samples by using DNA markers designed on the mitochondrial genome. Furthermore, in order to respond to the increase in seed production due to widespread cultivation, we established a method for rapid and large-scale purity testing by using direct PCR.

Keywords: melon, purity checking method, DNA marker, bulk method, direct PCR

¹ Address: Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3165-1 Ago, Kasama, Ibaraki 319-0292, Japan