

試験研究成果普及情報

部門	花植木	対象	研究
課題名：千葉県育成カラー品種の DNA 鑑定による品種識別技術の開発			
[要約]開発した 15 個のプライマーセットを用いた DNA 鑑定により、千葉県育成品種「アクアホワイト」及び「千葉 C2 号 (Brilliant・Bell)」を含むカラー10 品種を識別できる。			
キーワード カラー、品種識別、DNA マーカー、品種育成者権、千葉 C2 号			
実施機関名	主 査 農林総合研究センター 生物工学研究室 協力機関 (公財) かずさ DNA 研究所 農林総合研究センター 暖地園芸研究所 野菜・花き研究室		
実施期間	2017 年度～2019 年度		

[目的及び背景]

千葉県で生産される湿地性カラーの多くは大きな白い苞が特徴であり、主に切花として販売されている。県ではこれまでに「アクアホワイト」と「千葉 C2 号」を育成しているが、外観だけで従来の品種と正確に区別することは困難である。そのため種苗生産や一般栽培における混種の発生が危惧される。また、育成者権の保護のためにも明確な品種識別法の確立が求められている。そこで、DNA マーカーを用いたカラーの品種識別法を開発する。

[成果内容]

- 1 湿地性カラーの発現遺伝子の塩基配列から反復配列 (SSR) を含む領域を増幅するための PCR 用プライマーを設計した。さらにその中から安定して結果が得られ、品種識別に使用可能な 15 プライマーセットを選定した (表 1)。
- 2 調査対象から一般的な方法によって DNA を抽出し、表 1 に記載したプライマーセットを用いて、表 2 の反応液組成と図 1 の反応条件で PCR を行う。得られた PCR 産物の DNA 断片長を DNA フラグメントアナライザー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer 等) で測定する (図 2)。さらに、DNA 断片長から遺伝子型 (表 3、表 4) を特定することで品種を識別できる。
- 3 本手法を用いることで、千葉県育成品種や主要な栽培品種を含む 10 品種を識別することができる (表 3)。これらの品種の識別に必要な最少プライマーセットは、AZTS0014、AZTS0079、AZTS0565b の 3 種である。

[留意事項]

ここに示した品種・系統以外の一部の系統では系統内で DNA 多型が確認された。実験の精度を確保するためにも信頼のおけるサンプルをポジティブコントロールとして使用

する必要がある。

[普及対象地域]

カラーの遺伝子診断機関及び種苗生産担当者

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表 1 カラー品種識別用プライマーセット

プライマー セット	塩基配列	
	フォワード側	リバース側
AZTS0014	AAGCAAACCCAAAACAAGA	TTTGATGCAGAGACAAGGTTAGA
AZTS0035	TCTCACACCTCCTTCCATCC	CGAGCGCCCTATGTAATCAT
AZTS0079	AGGAAGCAGAAGGGGAGGT	CTCAGCTCAACAGACCCCAT
AZTS0186	TGACCAGATGTTCGAGTCCA	AGGAAGAAGCTACGCCAACA
AZTS0207	CAGACAGAGATCCACGCTCA	CGTACGCATCCTACAGCAA
AZTS0238	ACGGAGAGCAGAACAGCCT	GGTCCAGGAACGCAATACTC
AZTS0242	AGAGGAGAGGAGAGAACC	ACAGCAGCAGAAGGAGGAAG
AZTS0244	TCTTCTCCTCCTCCTTGTCG	GGAAGATGACAGCGACGAAT
AZTS0250	AACCAGCTTTGACGTGATCC	AAGCAGGCAGACAAGGAAGA
AZTS0259	ACAAAGGCTGCCAAGTTGTT	CTGGAGCCCGTGTAAATGAT
AZTS0516	TGCCATAAATGAGACCAGGC	TTTGATTCCTCCGCTACCC
AZTS0565b	GAAAGGCTGACTTCTGCTGG	GTCCCTCCTACCAACTCTCG
AZTS0643	ACGCTCAGATCCACAATTCC	CTTTC TGCGTCTCAAGAGC
AZTS0750	GGATCCTCCACGCAGAAAC	CGTAGGAAGATGGCGAAGAG
AZTS1043	GTCTCCTTCCCTCCACCTCC	CCACACACAACAGCAAGAGG

注) ユニバーサルプライマーは、5'末端に蛍光色素 (FAM、VIC、PET、NED) をラベルして使用する

表 2 PCR 反応液組成

成分	量 (ul)
滅菌蒸留水	11.7
鋳型DNA溶液	2
10×PCRバッファー	2
2.5mM dNTPs	1.6
10 μM フォワード側プライマー	1.3
10 μM リバース側プライマー	1.3
5U/μl DNA合成酵素 (TaKaRaTaq HS)	0.1
合計	20

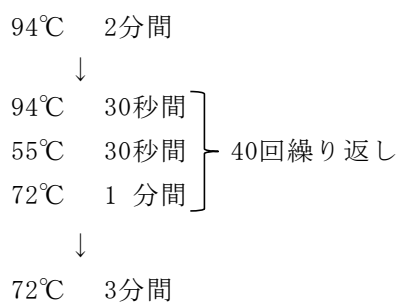


図 1 PCR 反応条件

表3 識別可能なカラー品種・系統

品種・系統	苞色	特性	備考
アクアホワイト	白	湿地性	千葉県育成品種 品種登録第10578号
千葉C2号	白	湿地性	千葉県育成品種 品種登録出願中
マジョリーホワイト	白	湿地性	
ウェディングマーチ	白	湿地性	
チルドシアーナ	白	湿地性	
ブレナ	白	湿地性	
アルボマキュラータ	白	畑地性	
グリーンゴッデス	緑	湿地性	
ミルクィウェイ	緑	湿地性	
レーマニーカーミネア	桃	畑地性	

表4 カラー品種識別用プライマーセットで検出される各品種の遺伝子型

品種・系統	DNAマーカー														
	AZTS 0014	AZTS 0035	AZTS 0079	AZTS 0186	AZTS 0207	AZTS 0238	AZTS 0242	AZTS 0244	AZTS 0250	AZTS 0259	AZTS 0516	AZTS 0565b	AZTS 0643	AZTS 0750	AZTS 1043
アクア ホワイト	b	b	c	e	cd	c	de	c	bc	b	af	bd	ab	bc	ab
千葉C2号	b	b	a	e	d	ab	de	b	c	b	a	bd	a	bc	a
マジョリー ホワイト	b	bc	a	e	d	ab	de	b	c	b	a	d	a	b	a
ウェディング マーチ	b	bc	ac	e	d	ac	e	ac	bc	b	af	bd	a	bc	ab
チルド シアーナ	b	bc	bc	be	cd	c	cd	bc	b	b	bf	d	b	bc	a
ブレナ	c	c	a	e	d	b	e	bc	c	b	ae	bd	a	c	a
アルボマ キュラータ	a	a	d	c	ab	c	b	c	a	a	cd	bc	c	b	c
グリーン ゴッデス	b	b	ab	ab	c	ac	ce	b	bc	d	b	bc	a	b	a
ミルクィ ウェイ	ab	bc	b	ab	bcd	c	ce	bc	bd	bc	b	bc	a	b	a
レーマニー カーミネア	a	c	d	d	b	c	ab	c	a	a	d	a	d	ad	d

注) 表中のアルファベットは、各品種の遺伝子型をあらわす (表5参照)

表5 各遺伝子型と各プライマーセットで増幅する DNA 断片長の対応

(単位 bp)

遺伝子型	DNAマーカー															
	AZTS 0014	AZTS 0035	AZTS 0079	AZTS 0186	AZTS 0207	AZTS 0238	AZTS 0242	AZTS 0244	AZTS 0250	AZTS 0259	AZTS 0516	AZTS 0565b	AZTS 0643	AZTS 0750	AZTS 1043	
a	165	175	264	231	235	225	182	243	172	179	175	164	182	183	219	
b	169	177	266	249	237	234	185	246	181	202	178	172	192	186	223	
c	177	178	268	251	240	252	202	249	187	210	180	174	198	192	230	
d			272	256	242		208		190		181	176	202	223	232	
e				257			214				184					
f											187					

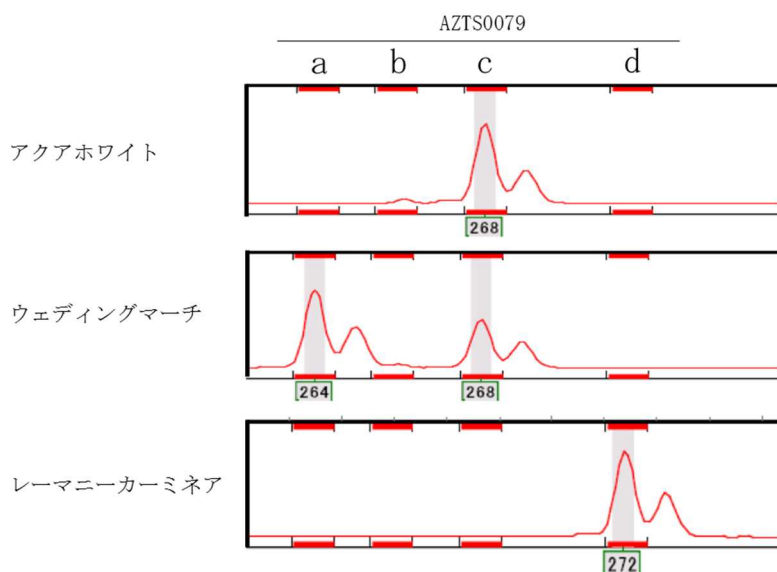


図2 DNAフラグメントアナライザーで検出した DNA 断片の例

- 注1) プライマーセット AZTS0079 を用い、「アクアホワイト」、「ウェディングマーチ」、「レーマニーカーミネア」を比較した
 2) 増幅された DNA 断片の長さから遺伝子型 (a~d) を判定し、品種を識別する

[発表及び関連文献]

令和3年度試験研究成果発表会 (花植木部門)

[その他]

- 1 平成28年度品種保護に向けたDNA品種識別技術確立事業 (農林水産省)
- 2 平成29年度植物品種等保護環境整備委託事業 (農林水産省)