

Indel マーカーによるカンキツの遺伝子型判定に基づく品種識別技術

農研センターで開発したカンキツ Indel マーカー28種を使用し、カンキツ31品種の識別において、3遺伝子型分類法では最小で6種のマーカーによって、また、より簡易な2遺伝子型分類法でも最小で7種のマーカーを使用し個々の品種識別が可能である。

農業研究センター農産園芸研究所野菜研究室 (担当者: 野田孝博)

研究のねらい

新規育成品種における育成者権の保護や違法な栽培防止のため品種識別技術の開発は重要である。カンキツでは複数のDNAマーカーシステムが開発されており、例えば一塩基多型や単純反復配列等のDNAマーカーは高精度な分析手法として普及している反面、分析に高度な技術や機器を要求し、実施可能な機関は限定される。また、簡易なアガロースゲルで分析が可能なCAPSマーカーは多くの研究機関で分析が可能である反面、分析に比較的長時間を要するとともに遺伝子型の判別性が低いなどの課題がある。

このような中、農産園芸研究所では簡易なアガロースゲルで容易かつ明瞭にカンキツの遺伝子型判定が可能なIndelマーカーを開発した(農業研究成果情報 No. 892)。

そこで、開発したIndelマーカーを応用しカンキツの品種識別技術を開発する。

研究の成果

1. Indelマーカーの簡易なアガロースゲルによる分離パターンは、検出する遺伝子領域がヘテロ接合性の場合3本のバンド(遺伝子型LS)、ホモ接合性の場合是对立関係にある2種(中央(遺伝子型LL)と最下位のバンド(遺伝子型SS))のうちいずれかが検出される(図1)。つまり、Indelマーカーによって3種類の遺伝子型に分類することが可能である。
2. 3種の遺伝子型に分類する場合、31品種の識別に最小6種のマーカーで可能であり、その組み合わせは32種存在する(表1に最小6種マーカーの一つ組合せを例記)。
3. 3種類に遺伝子型を分類する際に、ホモ接合性の場合には遺伝子型判定にLSのバンドと比較が必要であるが、その比較の必要がない2遺伝子型分類法(ヘテロ接合型(LS; 3本バンド)とホモ接合型(LL又はSS; 1本バンド)の2種類)では、最小マーカー数は3遺伝子型分類法より1種増加するのみの7種で可能であり、その組み合わせは19種存在する(データ省略)。
4. 28種Indelマーカーの遺伝子型の組み合わせが偶然一致する品種が存在する確率は非常に低く、3遺伝子型分類法で 1.2×10^{-4} (0.012%)以下、より簡易な2遺伝子分類法においても 1.8×10^{-4} (0.018%)以下である(表2)。

普及上の留意点

1. 本技術は交雑育成品種の識別が可能であり、枝変わり等突然変異により育種された系統間の識別には適応できない。

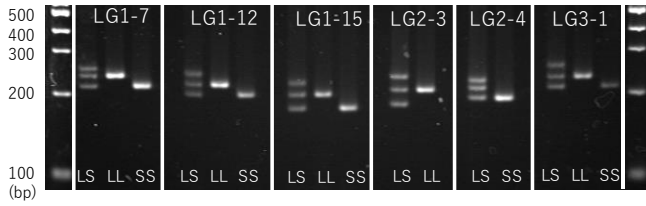


図1 アガロース電気泳動による Indel マーカー遺伝子型判定の例

使用した 28 種の Indel マーカーのうち、6 種のマーカーによる遺伝子型判定の結果を例示。
遺伝子型のコンセプト以下のとおりである。

LS ; 3 本バンドとして検出される場合 (ヘテロ接合型の領域であり、対立関係にある 2 本の理論サイズの増幅断片 (3 本の内下側 2 本) と同じ遺伝子座由来の 1 本のヘテロ鎖バンド (3 本のうち最上位) の計 3 本)

LL ; 対立する 2 種の理論サイズの断片のうち大きい方のみが検出される場合 (ホモ接合型)

SS ; 対立する 2 種の理論サイズの断片のうち小さい方のみが検出される場合 (ホモ接合型)

なお、マーカー-LG2-3 及び LG2-4 において本試験で供試した品種では両種のホモ接合性遺伝子型を有する品種が存在しなかったため、一方のみを示した。

各マーカーにおける鋳型 DNA は以下のとおりである: LG1-7 (ウンシュウミカン, 「はれひめ」, 「ありあけ」), LG1-12 (ウンシュウミカン, 「あすき」, 「璃の香」), LG1-15 (ウンシュウミカン, 「璃の香」), LG2-3 (ウンシュウミカン, 「あすき」), LG2-4 (ウンシュウミカン, 「ありあけ」), LG3-1 (ウンシュウミカン, 「ありあけ」, 「大橋」)。

表1 6種の Indel マーカーによる
遺伝子型判定^aに基づく品種識別

No.	品種	Indel マーカー					
		LG1-7	LG1-12	LG2-4	LG4-1	LG5-26	LG8-11
1	熊本 EC10	LS	LL	SS	LS	LS	LL
2	熊本 EC12	LS	LS	SS	LL	SS	LL
3	肥の豊	LL	LL	SS	LL	LS	LS
4	あすき	LS	LL	SS	LL	SS	LL
5	あすみ	LS	LL	SS	LS	SS	LL
6	ありあけ	SS	LS	SS	LS	LS	LL
7	イヨカン	LS	LS	SS	LS	LS	LS
8	ウンシュウミカン	LS	LS	LS	LS	LS	LS
9	大橋	LS	SS	LS	LS	LL	LL
10	河内晩柑	LS	LS	SS	LS	LL	LL
11	クネンボ	SS	LS	LS	LS	LS	LS
12	スイートオレンジ	LS	LS	SS	LS	LS	LL
13	スダチ	LS	SS	SS	LL	LS	LL
14	西南のひかり	LL	LL	LS	LS	SS	LL
15	せとか	LS	LS	SS	SS	SS	LL
16	タンカン	LL	LS	SS	LS	SS	LL
17	津之輝	LL	LS	SS	LS	LS	SS
18	津之望	LS	LS	SS	LS	SS	SS
19	ナツミカン	LS	LS	LS	LS	LS	LL
20	南香	LS	LL	SS	LS	LL	LS
21	はるか	LS	LS	LS	LS	LL	LS
22	はれひめ	LL	LS	SS	SS	LS	LS
23	バンベイユ	LS	SS	SS	SS	LL	LL
24	ヒュウガナツ	LL	LS	LS	LS	LL	LS
25	べにばえ	LS	LS	SS	LL	LS	LL
26	ボンカン	LS	LL	SS	LL	LS	LL
27	マイヤーレモン	SS	LL	SS	SS	LL	LS
28	ラフレモン	LL	N.D.	SS	LL	LL	LL
29	麗紅	LS	LS	SS	LS	SS	LS
30	璃の香	LL	SS	SS	SS	LL	LS

^a: 3 遺伝子型分類による判定 (図 1 参照)。
6 種のマーカーの組合せは 32 種存在するが、そのうち 1 種の組合せを例として示した。品種識別には表に示した 30 種に加え非公開 1 品種を含む計 31 品種を供試。
N. D. は PCR 増幅が認められないマーカー。

表2 28種の Indel マーカー遺伝子
型の組み合わせが一致する品
種が存在する確率

No.	品種	遺伝子型分類法	
		3遺伝子型分類 ^a	2遺伝子型分類 ^b
1	熊本 EC10	1.2×10^5	5.8×10^5
2	熊本 EC12	6.2×10^6	1.8×10^4
3	肥の豊	1.2×10^7	5.4×10^6
4	あすき	4.5×10^8	2.8×10^5
5	あすみ	2.0×10^6	4.3×10^5
6	ありあけ	1.8×10^7	1.9×10^5
7	イヨカン	6.4×10^8	2.5×10^6
8	ウンシュウミカン	1.5×10^{10}	1.5×10^{10}
9	大橋	1.0×10^{14}	1.3×10^8
10	河内晩柑	6.2×10^9	6.3×10^6
11	クネンボ	2.1×10^9	4.4×10^8
12	スイートオレンジ	7.2×10^6	2.0×10^5
13	スダチ	5.1×10^8	1.2×10^6
14	西南のひかり	1.3×10^8	9.1×10^7
15	せとか	1.5×10^8	2.4×10^6
16	タンカン	7.3×10^8	8.1×10^6
17	津之輝	2.0×10^9	1.5×10^6
18	津之望	1.2×10^7	4.0×10^4
19	ナツミカン	3.0×10^6	4.3×10^6
20	南香	1.3×10^8	2.2×10^7
21	はるか	2.5×10^8	1.5×10^6
22	はれひめ	1.2×10^8	2.7×10^7
23	バンベイユ	$10^{30} >$	2.1×10^7
24	ヒュウガナツ	1.1×10^7	2.7×10^6
25	べにばえ	9.2×10^9	1.3×10^6
26	ボンカン	1.0×10^{10}	1.4×10^7
27	マイヤーレモン	9.7×10^{10}	3.6×10^7
28	ラフレモン	5.4×10^8	3.8×10^5
29	麗紅	1.8×10^6	3.4×10^5
30	璃の香	6.1×10^{10}	1.7×10^6

^a: ヘテロ接合型 (LS) と 2 種のホモ接合型 (LL と SS) の 3 種類に分類。

^b: ヘテロ接合型 (LS) とホモ接合型 (LL 又は SS) の 2 種類に分類。