

鹿児島県に適した品質優秀なカンキツ新品種開発の効率化

山本雅史¹・小磯良平¹・西口奈月¹・中村一英²

¹鹿児島大学農学部

〒890-0065 鹿児島市郡元一丁目21番24号

TEL : 099-285-8553

²鹿児島県農業開発総合センター果樹部

〒891-2112 垂水市本城1452

TEL : 0994-32-0179

要 旨

カンキツにおける交雑育種による新品種開発の効率化を図るため、DNA分析の一つであるsimple sequence repeat (SSR)分析を実施した。まず、簡易的なSSR分析法を確立するため、アガロースゲル電気泳動、染色法およびDNA抽出法を検討した。その結果、3.5%のAgarose LE1200（ピーエイチジャパン）による電気泳動およびGelRed（Biotium）による染色で明瞭なDNAバンドが確認できた。また、葉からのDNAの簡易抽出法では、Plant DNA Isolation Reagent（タカラバイオ）が最も優れていた。続いて多胚性のタンカン‘垂水1号’を種子親とした4組み合わせ57個体を供試して、SSR分析法により珠心胚実生と交雑実生の識別を実施した。この結果、‘垂水1号’×‘リー’では13個体中7個体、‘垂水1号’×ポんカン‘大谷山選抜’では12個体中11個体、‘垂水1号’×‘アンコール’では13個体中7個体、‘垂水1号’×‘はるみ’では19個体中10個体が交雑実生であることが判明した。

1 緒 言

鹿児島県では温暖な気候に適したカンキツ類が生産されているが、近年、消費の減少傾向が著しい。そのため、鹿児島県農業開発総合センター果樹部（以下、果樹部と略）では、他県および海外

のものよりも高品質で生産性が高い、消費者のニーズに合致したカンキツ新品種の開発を実施している。

タンカン (*Citrus tankan*)は品質の優れた果実生産に高熱量を要求するため、鹿児島県の生産量が最も多い。そのため、離島も含めた鹿児島県における特産カンキツ新品種を開発する上での育種親としての価値は非常に高い。しかしながら、タンカンは雄性不稔性のため花粉親（父親）とすることは困難である¹⁾。そのため、果樹部ではタンカンの‘垂水1号’を種子（母）親として、他の優秀なカンキツ品種の‘はるみ’、ポンカンの‘大谷山選抜’、‘リー’、‘アンコール’などを花粉親とした交雑育種を実施している。但し、タンカンは種子親として用いた場合にも様々な問題がある。雌性不稔性が強い²⁾ため種子が獲得しづらいことに加え、多胚性であるので^{2,3)}、育成した多数の実生は珠心胚実生（無性生殖の一種、種子親のクローン）であり、交雑実生は限られた割合でしか得られない。

果実が結実すれば珠心胚実生と交雑実生の区別は容易であるが、カンキツは永年性の果樹であるため、圃場に定植してから初結実までに5～10年を要する⁴⁾。交雑育種においては不要な珠心胚実生を結実させるまで管理することは、圃場、管理労力、肥料、農薬等の有効利用の点で大きな問題があり、定植前に交雑実生だけを選抜することが育種の効率化を図る上では極めて重要である。しかしながら、開花結実前の幼若実生において形態的な面から確実に交雑実生と珠心胚実生を識別することは困難であり、迅速で確実な技術開発が急務となっている。

本研究は果樹部が開発した前述のタンカン‘垂水1号’を種子親とした実生群の中から、交雑実生を確実に選抜する技術を開発することを目的として実施した。特に本研究においてはDNA分析の適用による迅速識別法の開発に主眼をおいた。既にカンキツにおいても多数のDNA分析に関する研究が実施されているが、そのほとんどが研究室における煩雑な実験技術を駆使するものであり、実際の育種現場で実施することを念頭においた研究は少ない。

本研究は育種現場で利用可能な分析法の確立を目指して、DNA分析の中でも親子鑑定に適していると考えられているsimple seaquence repeat (SSR)⁵⁾分析を用いて、簡便で多数のサンプルが容易に扱える葉からのDNA分析法や簡便でDNAシーケンサーなど高額な機器を必要としないDNA検出法の開発を主眼として実施した。

2 実験

2.1 SSR分析の簡便化

タンカン‘垂水1号’、‘はるみ’、‘リー’、‘アンコール’およびポンカンの‘大谷山選抜’を供試した。

Isoplant II (ニッポンジーン) を用いて使用説明書に従って葉からDNAを抽出した。

Mupid-2plus (Advance) を用いたアガロースゲル電気泳動に使用するアガロースとして4%のAgarose SFR (Amresco)と3.5%のAgarose LE1200 (ピーエイチジャパン) を比較した。

電気泳動が終了したアガロースゲルの染色には、Mupid-STAINeye (Advance)、ViewaBlue Stain KANTO (関東化学) またはGelRed (Biotium) を用いた。いずれも使用説明書の記載通りの染色工程を実施した。出現バンドはMupid-STAINeyeとViewaBlue Stain KANTOでは可視光で、GelRedではUVで確認した。なお、GelRedはゲル50mLあたり5 μ Lをあらかじめゲルに添加した。

いずれにおいてもPCRの条件は1点当たり滅菌水8.83 μ L、PCR 10 \times Buffer1.25 μ L、dNTPs0.8 μ L、プライマー各0.5 μ L、Prime taq DNA polymerase (Genet Bio) 0.12 μ L、鋳型DNA0.5 μ Lとした。PCRの反応条件は、はじめに94 $^{\circ}$ Cを3分間、続いて94 $^{\circ}$ C20秒、それぞれのプライマーに合わせた温度 (54~64 $^{\circ}$ C : プライマーにより異なる) 30秒を34サイクル、94 $^{\circ}$ C20秒、49 $^{\circ}$ C10秒、72 $^{\circ}$ C5秒を3サイクル、最後に72 $^{\circ}$ C10分とした。プライマーは清水 (未発表) がカンキツ用に開発したものをを用いた。

2.2 簡易DNA抽出法の開発

シトロン‘丸仏柑’、ブンタン‘紅まどか’、ハッサク、カブス、クレオパトラ、スンキ、シクワサー‘興津系’、ウンシュウミカン‘大津4号’、ポンカン‘吉田ポンカン’および薩州並びにスイートオレンジ‘ハムリン’の12品種を供試し、葉からDNAを抽出した。

Isoplant II を標準法として種々の簡易抽出法がカンキツに適用可能か否かについて検討した。以下が検討した方法である : KOD FX Neo (東洋紡) 用のワンステップ法、PCR用イネゲノムDNA

単離法⁶⁾ およびPlant DNA Isolation Reagent (タカラバイオ)。いずれも使用説明書および実験書の記載通りに実施した。

PCRの条件は「2. 1」と同様であるが、KOD FX Neoにおいては1点あたり2×Buffer for KOD FX Neo5μL、滅菌水2.3μL、2mMdNTPs1μL、プライマー各0.5μL、鋳型DNA0.5μL、KOD FX Neo0.2μLとし、はじめに94°Cを2分間、続いて98°C10秒、アニーリング温度(54~64°C)60秒を35サイクル、最後に10°C連続のPCRを行った。

その後、3.5%のAgarose LE1200による電気泳動およびGelRedによる染色を行いUVによりバンドを確認した。

2. 3 タンカン種子親とした組み合わせにおける交雑実生の識別

タンカン‘垂水1号’を種子親とし、‘はるみ’、‘リー’、‘アンコール’およびポンカンの‘大谷山選抜’を花粉親とした実生群を供試した。個体数はそれぞれ13、12、12および19個体の計57個体である。

DNAはIsoplant IIにより葉から抽出し、予備試験の結果から両親間で多型の得られたプライマーを用いてSSR分析を行った。PCRの条件は「2. 1」と、電気泳動および染色は「2. 2」と同じである。

バンドパターンから両親と各実生の遺伝子型を決定し、その結果から交雑実生と珠心胚実生を識別した。

3 結果

3. 1 SSR分析の簡便化

2種類のアガロースのうち、Agarose SFRは融点が低く、電気泳動中にわずかにゲルが融解することがあった。Agarose LE1200ではそのような現象は認められなかった。そのため、その後の実験ではAgarose LE1200を用いた電気泳動を行った。

Mupid-STAINeyeおよび ViewaBlue Stain KANTOによる染色では、電気泳動後のDNAバンドが極めて淡く、バンドパターンの判別が困難であった。一方、GelRedでは常に鮮明なバンドを確認することができた。したがって、その後の実験では染色液としてGelRedを用いた。

3. 2 簡易DNA抽出法の開発

KOD FX Neo (東洋紡) 用のワンステップ法およびPCR用イネゲノムDNA単離法⁶⁾によるDNAを鋳型とした場合には、標準としたIsoplant IIで抽出したDNAを用いたSSR分析とは異なるバンドパターンしか観察できなかった。一方、Plant DNA Isolation Reagentで抽出したDNAを用いたSSRでは、余分なバンドが出現することもあったが、基本的には標準法と同じバンドパターンが確認可能であった (Fig. 1)。

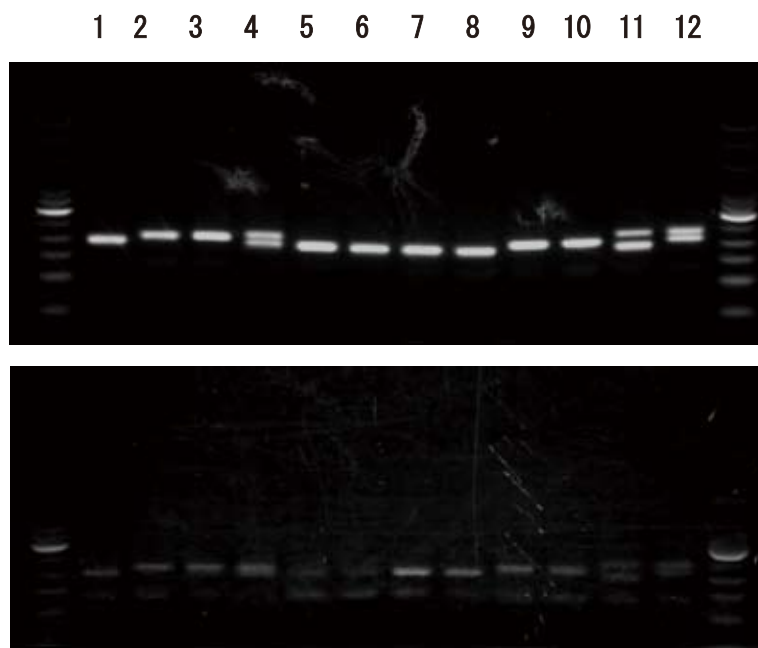


Fig. 1. Results of SSR analysis of citrus. 1: citron 'Maru busshukan', 2: pummelo 'Benimadoka', 3: Hassaku, 4: Kabusu, 5: Cleopatra, 6: Sunki, 7: Shiikuwasha 'Okitsu strain', 8: satsuma mandarin: 'Otsu 4 go', 9: ponkan 'Yoshida ponkan', 10: ponkan 'Sasshu', 11: tankan 'Tarumizu 1go' and sweet orange 'Hamlin'. Primer: F5/R5.

3.3 タンカンを種子親とした組み合わせにおける交雑実生の識別

各プライマーを用いたSSR分析の結果、確認できたDNAバンドは塩基サイズの大きい順にA、B、Cとし、バンドパターンから両親および各実生個体の遺伝子型を決定した。

Table 1. Genotype of SSR analysis of parents and seedlings in each primer

Primer	Genotype	
	Parents	Seedlings ^z
Tarumizu 1 go × Lee		
F5/R5	AC BB	<u>AB</u> <u>BC</u> <u>AB</u> <u>AB</u> <u>BC</u> AC AC AC <u>AB</u> <u>BC</u> AC <u>AC</u> <u>AC</u>
Tarumizu 1 go × Otaniyama senbatsu		
F5/R5	AC BB	<u>AB</u> <u>BC</u> <u>AB</u> <u>BC</u> AC <u>AB</u> <u>AB</u> <u>BC</u> <u>AB</u> <u>AB</u> <u>BC</u> <u>BC</u>
Tarumizu 1 go × Encore		
F5/R5	AB AA	AB AB AB AB AB <u>AA</u> <u>AA</u> AB AB AB AB AB
F10/R10	AB AA	AB AB AB AB AB <u>AA</u> <u>AA</u> <u>AA</u> AB AB AB AB AB
F11/R11	AB AB	AB <u>AA</u> AB AB AB AB <u>AA</u> <u>AA</u> AB AB AB AB AB
F14/R14	AB AB	<u>BB</u> AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB <u>BB</u>
F16/R16	AB AB	AB <u>BB</u> AB AB AB AB AB AB <u>BB</u> AB AB AB AB
Tarumizu 1 go × Harumi		
F5/R5	AC AB	AC <u>AB</u> <u>AB</u> AC AC AC AC AC <u>AB</u> <u>AB</u> AC AC AC AC AC <u>AB</u> AC
F11/R11	AB BC	<u>BC</u> AB AB AB AB AB AB AB <u>AC</u> AB <u>BC</u> <u>BC</u> AB AB AB <u>BC</u> AB AB AB
F14/R14	AB BC	AB AB <u>AC</u> <u>BC</u> AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB <u>BC</u> AB AB AB
F16/R16	AB BC	<u>BC</u> AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB AB
F25/R25	AB BC	<u>BB</u> <u>BC</u> AB AB AB AB AB AB <u>BC</u> <u>BC</u> <u>BC</u> <u>BC</u> AB AB AB <u>BC</u> AB <u>BC</u> AB

^z The underlined genotype is distinguished from that of 'Tarumizu 1 go'.

プライマーをF5/R5とした場合、‘垂水1号’の遺伝子型はAC、‘リー’および大谷山選抜はBBであった。この場合、B遺伝子を備える個体が交雑実生である。‘垂水1号’×‘リー’では13個体中7個体、‘垂水1号’×‘大谷山選抜’では12個体中11個体が交雑実生であった（Table 1）。

一方、‘はるみ’およびアンコールでは多型の得られたプライマーでも、常に1個の遺伝子型が‘垂水1号’と同じであったため、5種類のプライマーを用いてSSR分析を実施した。その結果、‘垂水1号’×‘はるみ’では19個体中10個体、‘垂水1号’×‘アンコール’では13個体中7個体が交雑実生であると推定された（Table 1）。

4 考察

多胚性はカンキツの交雑育種の進展を阻害する大きな問題である。多胚性品種を種子親とした交雑を実施した場合、実生植物を定植する前に雑種実生と珠心胚実生を識別することが望ましいが、葉の形態が似通った2品種間の交雑では形態的な識別は困難である。そのため、植物に含まれる種々の成分を用いた識別法が検討されてきたが、精度の面での問題があるものが多く、実用化されていない。

一方、近年のDNA分析技術の進展は著しく、品種識別や類縁関係の解明等の研究が一挙に進んだ。親子鑑定もDNA分析技術が有効な分野であり、特に共優性マーカーであるSSR分析は極めて効果的である⁵⁾。カンキツにおける雑種実生と珠心胚実生との識別も一種の親子鑑定であると考え、本研究を実施した。

ただし、精度の高い手法であっても高価な機械、高度な技術、煩雑な実験操作が必要であれば、実際の品種開発現場での利用は困難である。したがって、本研究では高価な機械を用いず、簡便な操作によるSSR分析の開発を目的とした。

一般にDNA分析では、液体窒素を用いてサンプルを摩砕するが、この操作は極めて煩雑であり、多数のサンプルの分析においての障害となる。そのため、本研究では液体窒素を用いることなくSSR分析を実施することを目指した。その結果、Plant DNA Isolation Reagentの利用により、その目的をほぼ達成できた。液体窒素を用いる標準法と比較すると、不要なバンドが出現することも

あったが、基本的なバンドパターンは標準法と同じであり、両親の遺伝子型（バンドパターン）が既にわかっている雑種実生と珠心胚実生との識別には十分利用可能であると判断した。

また、SSR分析の結果はDNAシーケンサーやポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて検出することが一般的であるが、高価な機械や煩雑な実験操作が必要である。そのため、アガロースゲル電気泳動の適用を試みた。種々のアガロースで実験したところ、Agarose LE1200を用いることで実用可能なバンドパターンの識別が可能であった。

さらに、DNA分析のバンドパターンは、通常エチジウムブロマイドで染色して検出されるが、エチジウムブロマイドは非常に毒性の強い物質であり、品種開発の現場において用いる試薬としては不適である。その解決のため本研究では、安全性の高い試薬による染色を実施した。まず、可視光で検出可能な2種類の試薬による染色を実施したが、染色性が低く、実用化は困難であると考えられた。続いて紫外線でDNAバンドを検出するGelRedを用いたところ、明瞭なバンドパターンが検出できた。

以上の結果から、Plant DNA Isolation Reagentを用いて葉からDNAを抽出し、PCRにより増幅したDNA断片をAgarose LE1200を用いたアガロースゲル電気泳動法によって分離し、GelRed染色によって検出する雑種実生と珠心胚実生との簡便な識別法を確立することができた。

DNA抽出にはIsoplant IIを用いたものの、他の条件は前述の簡便法を用いて、鹿児島県農業開発総合センター果樹部で開発したタンカンを種子親とする4組み合わせにおいて、実生集団の中から雑種実生を選抜した。本実生集団はまず植物体の形態から雑種実生の可能性があるものを1次選抜した。本研究に用いた植物材料はこの1次選抜実生集団である。その結果、いずれの組み合わせでも珠心胚実生が確認できた。これは、SSR分析による雑種実生と珠心胚実生との識別が形態的な観察よりも優れていることを示しているものである。

これらの選抜された雑種実生は、果樹部の圃場に定植されて現在育成中である。果樹の品種開発は1個体当たりの専有面積が大きいことが問題であるが、本研究によりタンカンを種子親とする雑種実生のみを選抜できたので、珠心胚実生を圃場で栽培する無駄を排除することが可能となり、圃場の利用効率を向上させることにも貢献できた。

さらに、鹿児島県の気候特性を活かしたオリジナル新品種の開発には、高温に適したタンカンの利用が必要になると考えられる。本研究によって、タンカンを種子親とした複数の実生集団から確実に雑種実生を選抜できたことは、他品種を花粉親とした場合にも本法が適用できることを示したものであり、本研究の結果は鹿児島県の果樹産業の発展に資すると考えられる。

5 謝 辞

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただいたサンケイ科学振興財団に深く感謝いたします。また、SSRプライマーに関する情報をご提供いただいた（独）農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所の清水徳朗博士にも感謝の意を表します。

6 引用文献

- 1 Yamamoto, M., Kubo, T. and Tominaga, S.: Self- and cross-incompatibility of various *Citrus* accessions. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75, 372-378 (2006)
- 2 上野 勇・岩政正男・西浦昌男：カンキツ属および近縁属の胚数. 園芸試験場報告, B7, 11-21. (1967)
- 3 Yamamoto, M., Matsumoto, R. and Yamada, Y.: Relationship between sterility and seedlessness in citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64, 23-29 (1995)
- 4 吉田俊雄：カンキツの交雑実生における初着花までの期間と樹の生長との関係. 果樹試験場報告, B7, 1-13.
- 5 Sawamura, Y., Saito, T., Takada, N., Yamamoto, T., Kimura, T., Hayashi, T. and Kotobuki, K.: Identification of parentage of Japanese pear 'Hosui'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73, 511-518 (2004)
- 6 川崎 努: PCR解析用の簡便なイネゲノムDNAの単離法. 新版植物のPCR実験プロトコール. 秀潤社. p. 67-68.

Development of effective methods for breeding new citrus cultivar with high fruit quality adapted to Kagoshima prefecture

Masashi Yamamoto¹, Ryohei Koiso¹, Natsuki Nishiguchi¹ and Kazuhide Nakamura²

¹ Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
1-21-24, Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

²Department of Fruit Tree, Kagoshima Prefectural Institute for Agricultural Development
1452, Honjo, Tarumizu 891-2112, Japan

Abstract

The present study was conducted for development of efficiency method in citrus cross breeding. Simple sequence repeat (SSR) analysis was applied to distinguish hybrid seedlings from nucellar seedlings. First, we established simple and easy methods for SSR analysis; clear DNA bands were observed by electrophoresis using 3.5% Agarose LE1200 (PH Japan) and staining using GelRed (Biotium). DNA which can be used for PCR was isolated by Plant DNA Isolation Reagent (Takara Bio), which is simple DNA isolation kit. Next, hybrid seedlings were distinguished from nucellar seedlings by SSR analysis in seedlings derived from polyembryonic tankan (*Citrus tankan*) 'Tarumizu 1 Go' was used as a seed parent. Seven out of 13 in 'Tarumizu 1 Go' X 'Lee, 11 out of 12 in 'Tarumizu 1 Go' X ponkan 'Otaniyama senbatsu', seven out of 13 in 'Tarumizu 1 Go' X 'Encore' and ten out of 19 in 'Tarumizu 1 Go' X 'Harumi' were judged as hybrid seedlings, respectively.