

新たな DNA マーカーによるあじさい八重咲き性個体選抜技術の確立

1. 成果の要約

あじさいの八重咲き性を識別するため新たに 2 つの DNA マーカーを日本大学、かずさ DNA 研究所、福岡県と共同で開発した。本マーカーは、2015 年度に開発した八重咲き性識別マーカー（STAB045「栃木県農業試験場成果集 35 号」）と比較して、多くの育種素材に適合し、多様な系統間の交配実生の選抜に利用できる。これらのマーカーを用いて八重咲き性実生個体を迅速に多検体検定できる選抜技術を確立した。

2. キーワード

あじさい、八重咲き性、DNA マーカー、墨田の花火、城ヶ崎

3. 試験のねらい

あじさいは開花に約 2 年を要するため、DNA マーカーを用いて、八重咲き性個体を幼苗選抜することにより育種の効率化を図ることができる。当场が八重咲きあじさいの育種素材として活用している遺伝資源には、墨田の花火由来と城ヶ崎由来があり、これらは、異なる遺伝子に制御されている。これまでに、墨田の花火由来の八重咲き性連鎖 SSR（Simple Sequences Repeat）マーカー STAB045 を作出している（成果集 35 号）が、STAB045 は一部の城ヶ崎由来の八重咲き品種や一重咲き品種からも検出され、汎用性がやや低かった。そこで日本大学、かずさ DNA 研究所、福岡県と共同で、墨田の花火由来と城ヶ崎由来の八重咲き性に連鎖する 2 つの新たな八重咲き性連鎖 SNP（Single Nucleotide Polymorphism）マーカーを作出し、育種選抜へ導入する。

4. 試験方法

八重咲き性分離集団（きらきら星×フラウヨシミ F₂ 集団：栃木県材料）および、（グレース×マナスル F₂ 集団：福岡県材料）を用いた RAD-seq 解析を行い、墨田の花火由来の SNP マーカー（S01）および、城ヶ崎由来の SNP マーカー（J01）を開発した。両マーカーの育種選抜における汎用性を確認するため、品種・系統でのマーカーの保有状況を調査した。また、育種現場へこれらの SNP マーカーを導入するため、迅速に多検体の八重咲き性を検定できる手法について検討した。

5. 試験結果および考察

- (1) 新たな八重咲き性識別マーカー S01 は、STAB045 と比較して多くの育種素材に適合し、汎用性が高い。しかし、コサージュは墨田の花火由来の八重咲き性遺伝子を保有していないにもかかわらず、ヘテロ型と判定されたことから、コサージュへの適合性はない（表-1）。
- (2) 新たな八重咲き性識別マーカー J01 は、多くの育種素材に適合し、育種選抜における汎用性が高い（表-1）。
- (3) 迅速に多検体の検定を行う手法として、HRM（High Resolution Melting）分析を CTAB 法で抽出した DNA を用いて検討したところ、八重咲き性個体、一重咲き性ホモ個体、一重咲き性ヘテロ個体を識別することができた。
- (4) HRM 分析に適した DNA が得られる簡易 DNA 抽出法（TPS 法、ダイレクト PCR 法、アルカリポイル法）について検討したところ、CTAB 法と同様の結果が得られたのは、TPS（Template preparation solution）法のみであった（表-2）。
- (5) 新たな八重咲き性識別マーカー S01 と J01 を用いて、TPS 法と HRM 分析を組み合わせることによって、1 か月間で 1,333 個体の検定が可能であった（2019 年実績）。しかし、HRM 分析に用いる試薬は高価であるため、今後、安価な手法への改良が必要である。

（担当者 研究開発部 生物工学研究室 阿久津翠、田口久美子*、中澤佳子、花き研究室 菊地直美**）

* 現宮城県仙台地方振興事務所、** 現経営技術課

表-1 あじさい品種・系統における表現形質と STAB045、S01、J01 マーカー型

八重咲き性の由来	品種・系統	表現形質	マーカー判定 ^{注1)}		
			墨田の花火由来		城ヶ崎由来
			STAB045	S01	J01
隅田の花火	墨田の花火	八重	A	A	B
	きらきら星	八重	A	A	B
	HK01	八重	A	A	B
	HK02	八重	A	A	B
城ヶ崎	グレース	八重	-	B	A
	筑紫ルビー	八重	A	B	A
	フェアリーアイ	八重	H	B	A
	城ヶ崎	八重	H	B	A
不明	コサージュ ^{注2)}	八重	H	H	A
伊豆の華	ダンスパーティ ^{注3)}	八重	B	H	A
	伊豆の華	八重	-	A	A
	マナスル	一重	-	B	B
	カヌマブルー	一重	B	B	B
	清澄沢	一重	B	B	B
	アナベル	一重	B	B	B
	ウズアジサイ	一重	B	B	B
	トキメキ	一重	B	B	B
	ピコティ	一重	B	B	B
	フラウマリコ	一重	H	B	B
	ボーデンゼー	一重	H	B	B
	フラウヨシコ	一重	A	B	B
	グリーンシャドウ	一重	A	B	B

注1) マーカー判定はCTAB法で抽出したDNAを用いて、CAPS法で行った。

A：八重咲き性ホモ型(八重咲き)、H：ヘテロ(一重咲き)、B：一重咲き性ホモ(一重咲き)、-：未検定

■ は、表現形質および推定遺伝子型とマーカー型が一致しないもの。

注2) コサージュは過去の交配結果から、城ヶ崎由来の八重咲き遺伝子のみを保有していると推定。

注3) ダンスパーティは過去の交配結果から、墨田の花火由来の八重咲き遺伝子がヘテロ、城ヶ崎由来の八重咲き遺伝子をホモで保有していると推定。

表-2 DNA 抽出法の違いによる各マーカーの HRM 分析判定結果

品種・系統	隅田の花火由来 (S01)				品種・系統	城ヶ崎由来 (J01)			
	CTAB法	TPS法	ダイレクト PCR法	アルカリポイル法		CTAB法	TPS法	ダイレクト PCR法	アルカリポイル法
きらきら星	A	A	Aor-	A	城ヶ崎	A	A	A	A
フラウヨシミ	B	B	A	H	フラウヨシミ	B	B	-	-
HY11-01-2	H	H	H	H	HY13-09-46	H	H	-	H

*A：八重咲き性ホモ型(八重咲き)、H：ヘテロ(一重咲き)、B：一重咲き性ホモ型(一重咲き)、-：分類できない