

## ナス品種「とげなし輝楽」及び「試交17-22」に対する F<sub>1</sub>純度検定用DNAマーカーの開発

稲垣怜那<sup>1)</sup>・都築雅美<sup>1)</sup>・水上優子<sup>2)</sup>

**摘要:** 愛知県(以下、本県)と国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構が共同開発したナス品種「とげなし輝楽」、及び本県で2021年に育成され、今後普及拡大が見込まれる「試交17-22」について、F<sub>1</sub>種子供給時に自殖種子や他品種混入の有無を効率的に判別することを目的に、NGS解析技術を用いてF<sub>1</sub>純度検定用DNAマーカーを開発した。

キーワード: ナス、F<sub>1</sub>純度検定、DNAマーカー、NGS解析

### 緒言

本県と国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構が共同開発したナス品種「とげなし輝楽」<sup>1)</sup>、及び本県で2021年に育成され今後普及拡大が見込まれる「試交17-22」<sup>2)</sup>は、優良固定系統を交配したF<sub>1</sub>品種である。F<sub>1</sub>種子供給にあたっては、交配時の除雄が不完全な場合に生じる種子親系統の自殖種子の混入、交配時の親系統の取り違えの発生などのリスクがあるため、種子生産時の適切な管理と、生産された種子の評価が重要とされている。これまでF<sub>1</sub>純度検定には、実際に種子から栽培し果実を確認する方法が用いられてきたが、栽培に時間がかかり、検定数も限られる。一方で、DNAマーカーを用いれば、短時間で多数のF<sub>1</sub>種子の検定が可能になるが<sup>3-6)</sup>、愛知県で育成したナス品種にはF<sub>1</sub>純度検定用マーカーは開発されていない。

そこで本研究では、膨大な量の塩基配列を読み取ることが可能な次世代シーケンサーを利用したNGS解析技術を用いることで、「とげなし輝楽」及び「試交17-22」に対するF<sub>1</sub>純度検定に利用可能なDNAマーカーを開発したので報告する。

### 材料及び方法

#### 1 DNAの抽出

「試交17-22」の親系統(SRP11-4、SRPIV-3)及び「とげなし輝楽」の親系統(PASL-2、PASL-13)の計4系統の葉からDNeasy Plant mini kit(株式会社Qiagen、東京)によりDNAを抽出し、ゲノムシーケンスデータ取得用のサンプルとした。F<sub>1</sub>純度検定用のDNAの抽出は、破碎した「試交17-22」の幼苗の葉からDNAすいすい-P(株式会社リーゾ、つくば市)を用いて、基本のプロトコルからフェノール・クロロホルム処理を省略した手順で行った。

#### 2 ゲノムシーケンスデータの解析

「試交17-22」及び「とげなし輝楽」の両親系統についてG RAS-Di<sup>7)</sup>によりゲノムシーケンスデータ (SRP11-4:981 Mbp、SRPIV-3:968 Mbp、PASL-2:1,096 Mbp、PASL-13:893 Mbp) を取得した。得られたデータについて、以下のNGS解析用ツールを用いて塩基配列解析を行った。Trimmomatic (v0.39)を用いてアダプター配列を除去し、BWA-MEM(v0.7.17-r1188)の基本設定でマッピングした。リファレンスゲノムには、Plant GARDEN(<https://plantgarden.jp/ja/>)上で公開され

表1 各系統に特異的なIndelを絞り込んだ結果(Number of variants)

count	試交 17-22		とげなし輝楽	
	SRP11-4	SRPIV-3	PASL-2	PASL-13
Variant	88718		94317	
After filtering (SNP+Indel)	15044		16487	
Indel only	369		443	
Sample specific indel	37	48	33	45

<sup>1)</sup>環境基盤研究部 <sup>2)</sup>環境基盤研究部(現研究戦略部)

ているEggplant\_V4.1を使用した。各マッピングデータについて、BCFtools(v1.16)のmpileupでリファレンス配列に対するバリエーションコール(変異抽出)を行った。さらに、VCFtools(v0.1.16)を用いてminQ 100, max-missing 1.0, min-meanDP 5の条件でフィルタリングし、keep -only-indelsオプションで最終的に各系統固有のIndel(塩基配列の挿入・欠損部位)を50以下まで絞り込んだ(sample specific Indel; 表1)。

### 3 F<sub>1</sub>純度検定用DNAマーカの開発

絞り込んだIndel周辺の塩基配列をゲノムビューワIGV(Integrative Genomics Viewer)を用いて目視で精査し、Primer3Plus(<https://www.primer3plus.com/>)を用いて「試交17-22」及び「とげなし輝楽」の各親系統間で特異的検出が可能なプライマーを計12セット設計した。PCR反応は2×GoTaq® Green Master Mix (Promega株式会社、東京)を用いて、初期変性95°C2分の後、変性95°C30秒・アニーリング62°C30秒・伸長72°C30秒を40サイクル実施し、最終伸長は72°C7分を行った。反応液の組成についてはプロトコルに準じ、プライマーは終濃度各0.5 µMになるよう添加した。F<sub>1</sub>純度検定においては、終濃度各0.5 µMになるよう2セットのプライマーを混合して用いた。反応系は10 µLとした。

### 4 DNAマーカの有用性検証

設計したDNAマーカを用いて、国外の採種ほ場で採集された「試交17-22」の種子106個体についてF<sub>1</sub>純度検定

を行い、その有用性を検証した。

## 結果及び考察

### 1 DNAマーカの開発

設計した12セットのプライマーセットを用いて親系統のDNAを鋳型にPCRを行い、各品種の親系統間でどちらか片方に明瞭なバンドが出るプライマーセットを選抜した。さらに、F<sub>1</sub>純度検定において各親系統由来のバンド識別が容易にできるよう、選抜したプライマーセットの中から約200 bpのサイズ差が出る2セットの組み合わせ(表2; 「試交17-22」の親系統識別用Chr9-9及びChr6-6、「とげなし輝楽」の親系統識別用Chr3-3及びChr9-4)を検定に用いることにした(図1-a,b)。なお、「試交17-22」の親系統識別用Chr9-9及びChr6-6の組み合わせでは、850 bp付近に非特異的なバンドが生じるが、遺伝子型の判定には支障がないと判断した。

### 2 DNAマーカの有用性検証

1で開発したDNAマーカの有用性を検証するため、「試交17-22」の種子106個体の葉からDNAを抽出し、PCRをおこなった。その結果、すべての個体で親系統SRPII-4とSRPIV-3由来の特異的なバンドを持つヘテロ状態になっていることが確認できた。そのため、開発したDNAマーカは問題なく

表2 各系統特異的なプライマー配列とPCR産物のサイズ

試交 17-22				
Primer name		Sequence (5'-3')	SRPII-4	SRPIV-3
Chr9-9	Forward	ATGGGTTGTGCCAGTTTGT	○	
	Reverse	AGCGCCTTTAACAAGGCTAAATC	624bp	-
Chr6-6	Forward	GCAACAATCATAACGTGAGGAA		○
	Reverse	GCACTTGACTAGAGCTGCC	-	437bp
とげなし輝楽				
Primer name		Sequence (5'-3')	PASL-2	PASL-13
Chr3-3	Forward	TATCCAAAGTCAGGGTCACGC	○	
	Reverse	TGGGTCTATTGCTGACTGTTCT	313bp	-
Chr9-4	Forward	GTACCACCGAGCCACCTAGA		○
	Reverse	GACTCGATGGTATCGAAGGACG	-	514bp

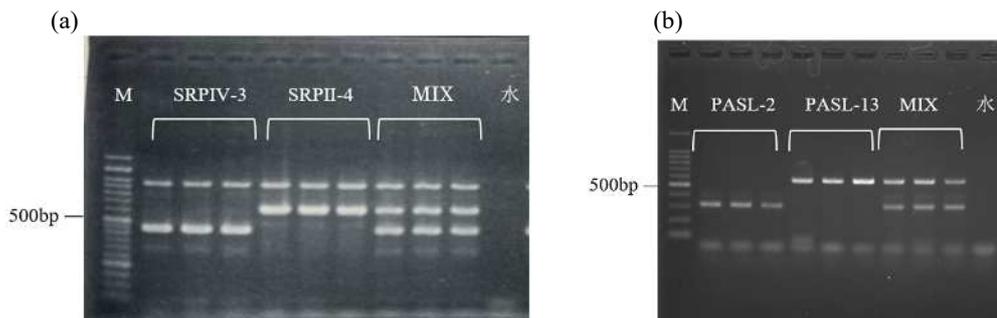


図1 各品種の両親をそれぞれ検出できる2セットのDNAマーカを混合して用いた場合のPCR結果 (a)試交17-22, (b)とげなし輝楽 ※「MIX」は両親のDNAを1:1で混合し鋳型にしたもの

使用できると判断した。

同様に、「とげなし輝楽」についてはF<sub>1</sub>種子を想定し両親のDNAを1対1に混合したものを鋳型にしたPCRにおいて、2つのバンドが明瞭に観察でき区別も容易であったため(図1-b)、実際のF<sub>1</sub>純度検定においても同様の結果が得られると考えられた。

これまで、両品種のF<sub>1</sub>純度検定は栽培による形質評価で確認されてきたが、本技術により、数百の種子を3時間程度で一度に検定でき、時間と労力が大幅に削減できる。また、従来F<sub>1</sub>純度検定に利用されるDNAマーカーの開発では、対象作目において報告されている多数の繰り返し配列(SSR; simple sequence repeat)の中からF<sub>1</sub>純度検定に適用可能なDNAマーカーを選定することが多く<sup>6,8)</sup>、親系統の多型確認に多くの時間を要していた。NGSデータを活用した本研究の方法は、従来の方法に比べ煩雑な実験操作を省力化し、両親系統のゲノム上の多型を高精度で抽出できる<sup>9)</sup>。そのためIndelやSNP(1塩基多型)などDNAマーカー設計に適した領域を効率的な探索が可能となり、F<sub>1</sub>純度検定用DNAマーカーの短期間かつ簡易な開発に有用であると考えられる。

開発した本技術は、今後のF<sub>1</sub>純度検定で活用されることにより、種子の遺伝的斉一性が確保され、種子品質の安定につながることを期待される。

## 引用文献

1. 穴井尚子, 久野哲志, 田中哲司, 番喜宏, 榊原政弘, 山下文秋, 矢部和則, 齊藤猛雄, 吉田建実, 松永啓, 佐藤隆徳, 斎藤新, 山田朋宏. 単為結果性ととげなし性を併

せ持つナス「試交05-3」の育成. 愛知農総試研報. 41, 67-75(2009)

2. 宇佐見仁, 野田沙織, 関間さおり, 恒川靖弘, 番喜宏, 大藪哲也, 大川浩司. 多収性及び漬物加工特性を持つ単為結果性とげなしナス品種「試交17-22」の育成. 愛知農総試研報. 54, 63-70(2022)
3. Smith, J.S.C. and Register III, J.C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: A company perspective. *Seed Science Research*. 8(02), 285–294(1995)
4. 大寺宇織, 石川友子, 加藤謙司, 葛谷真輝. DNA マーカーを利用したメロン「イバラキング」F<sub>1</sub>純度検定法の開発. 茨城県農業総合センター研究報告. 4, 1-6(2022)
5. 上西愛子, 聖代橋史佳, 吉田誠. ダイコン「湘白」F<sub>1</sub>純度検定マーカー. 神奈川県農業技術センター研究報告. 161, 43-46(2017)
6. 久保深雪, 聖代橋史佳, 吉田誠. ナス品種「サラダ紫」のF<sub>1</sub>純度検定用 SSR マーカーの選定と品種判別. 神奈川県農業技術センター研究報告. 159, 10-14(2014).
7. Enoki, H. and Takeuchi, Y. New genotyping technology, GRAS-Di, using next generation sequencer. In *Proceedings of the Plant and Animal genome conference. XXVI*, San Diego, CA, USA, 13–17(2018)
8. 谷本秀夫, 古川真, 布目司, 福岡浩之. SSRマーカーによるナス品種識別法の開発. 大阪食とみどりの総合技術センター研究報告. 42, 5-10(2006).
9. 渡辺敦史, 田村美帆, 泉湧一郎, 山口莉未, 井城泰一, 田端雅進. DNAマーカーを利用した日本に現存するウルシ林の遺伝的多様性評価. *日本森林学会誌*. 101, 298-304(2019).