

(技術名) DNAマーカーを用いた島ニンジンの黄色系個体の選抜技術							
(要約) 島ニンジンの黄色系と橙色系個体における根色関連遺伝子の塩基配列を比較し、根色形質と連鎖するDNAマーカーを開発した。本マーカーを活用することで、黄色系島ニンジン個体を選抜することができる。							
農業研究センター・研究企画班					連絡先	098-840-8513	
部会名	野菜・花き	専門	バイテク	対象	島ニンジン	分類	指導
普及対象地域							

[背景・ねらい]

中城村では、特産品目の一つとして島ニンジンのブランド化を進めている。ニンジンの根色是一对の対立遺伝子 Y_2y_2 で制御され、遺伝子型が Y_2Y_2 または Y_2y_2 であると黄色、 y_2y_2 であると橙色の根色となり、黄色系根色は橙色系根色に対して優性形質であることが報告されている。島ニンジンは黄色の根色を特徴としているが、増殖種子に橙色の根色を持つ個体が混在することが特産化の観点から問題となっている。

本課題では島ニンジンの安定種子生産に寄与するため、DNA マーカーを活用した黄色系島ニンジンの選抜（固定化）技術を開発する。

[成果の内容・特徴]

1. 黄色系島ニンジン 166 個体の若葉から抽出した DNA を材料に、根色関連遺伝子（ β -カロテンの蓄積に関与する遺伝子）を増幅するプライマーセット 4144c (Ellison *et al.*2017) を用いて PCR を行うと、全個体から 635 bp の増幅産物が得られる（表 1、図 a）。
2. 4144c で増幅した遺伝子領域の塩基配列を比較すると、一塩基多型を持つ個体が存在する。この部位を認識する制限酵素 *BssSI* を用いて PCR 産物を 37°C で 1 時間消化し、アガロースゲル電気泳動によりバンドを検出することで DNA マーカー (4144c_*BssSI*) が開発できる（表 1、図 b）。
3. 黄色系島ニンジン集団 166 個体を解析すると、A、B、C の 3 種類のバンドパターンが確認され、A が 88 個体、B が 68 個体、C が 10 個体得られる（図 b、表 2）。
4. バンドパターン A の遺伝子型を Y_2Y_2 と仮定すると、DNA マーカーと表現型の正答率は、94% (156/166) であり連鎖が認められる（表 2）。
5. 橙色系島ニンジン個体を用いても同様に連鎖が確認される（データ省略）。

[成果の活用面・留意点]

1. バンドパターン A (Y_2Y_2) の個体を採種用として選抜することで、黄色系島ニンジンの遺伝的な固定化が効率的にできる。
2. 本技術は中城村において、品質安定のための親株の管理および種子生産に活用する。
3. 供試材料は、中城村が黄色系と橙色系ニンジンが混在する集団から、黄色系のみを選抜して世代を進めている F_3 世代の黄色系島ニンジン集団である。
4. DNA の抽出は DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)、PCR 酵素は KOD FX (TOYOBO) を用いる。約 1 週間で 100 個体の解析が可能である。

[具体的データ]

表1 黄色系島ニンジンの遺伝子型判定に用いたDNAマーカー

マーカー名	プライマーセット ¹⁾		増幅サイズ (bp)	制限酵素
	プライマー名 ²⁾	塩基配列 (5'→3')		
4144c_ <i>Bss</i> SI	4144c F	GGGAAGAATTCCACGTCTGA	635	<i>Bss</i> SI
	4144c R	CACGACACCGATTTTGTAC		

¹⁾Ellison *et al.* (2017) G3. 7: 2665-2675.

²⁾Fはフォワードプライマー、Rはリバースプライマーを表す。

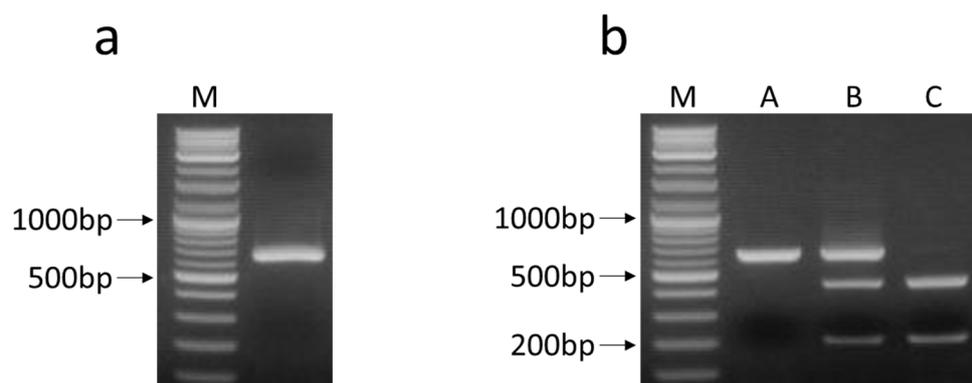


図 黄色系島ニンジンの根色関連遺伝子領域の増幅と DNA マーカーを用いた電気泳動結果

a: プライマーセット 4144c を用いた根色関連遺伝子領域の増幅。b: 制限酵素 *Bss*SI で処理後、A (635 bp)、B (635 bp、430 bp、205 bp)、C (430 bp、205 bp) の3種類のバンドパターンを持つ個体が得られる。M は 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs) を示す。

表2 DNAマーカーを用いた黄色系島ニンジンのバンドパターン別出現個数および遺伝子型の判定

供試個体数 (個)	バンド パターン	出現個数 (個)	遺伝子型	マーカー型から 推定される表現型	正答率 ¹⁾ (%)
166	A	88	Y_2Y_2	黄色	94.0
	B	68	Y_2y_2	黄色	
	C	10 ²⁾	y_2y_2	橙色	

¹⁾正答率= (バンドパターンA+バンドパターンB) / 供試個体数×100

²⁾組み換えを生じた黄色系島ニンジンを示す。

[その他]

課題 ID : 2018 農 011

研究課題名 : 島ニンジンの根色関連遺伝子の解析

予算区分 : 受託 (島ニンジン栽培研究事業)

研究期間 : 2018~2019 年度

研究担当者 : 伊礼彩夏、太郎良和彦

発表論文等 : なし