

りんどう遺伝資源における花色関連遺伝子の解析

1. 成果の要約

栃木農試が保有するりんどう遺伝資源 18 系統の花色関連遺伝子を解析した結果、17 系統の遺伝子型が明らかとなり、DNA マーカーで花色遺伝子型を識別する技術を確立した。

2. キーワード

フラボノイド 3',5'水酸化酵素、MYB3、遺伝子型、DNA マーカー

3. 試験のねらい

ピンクや白のりんどうは希少性から有利な販売が可能なため、栃木農試においても新品種の育成に取り組んでいる。岩手生物工学研究センター（岩手生工研）の研究から、りんどうの白花はアントシアニン合成酵素（ANS）遺伝子または転写因子 MYB3（*GtMYB3*）遺伝子、ピンク花はフラボノイド 3',5'水酸化酵素（*F3',5'H*）遺伝子の変異に起因し、劣性遺伝であることが明らかとなっている。そこで、当社が保有するりんどう遺伝資源について、花色関連遺伝子の遺伝子型を明らかにし、効率的な交配組合せを明らかにすることで、育種の効率化に貢献する。

4. 試験方法

岩手生工研が開発した 6 種類のりんどう花色識別 DNA マーカー（表-1）を供試し、各供試系統の遺伝子型を解析した。供試材料は、栃木農試が保有するりんどう遺伝資源 18 系統を用いた。花色と遺伝子型が一致しない系統は、供試マーカーで検出できない変異の存在が示唆されたため、*F3',5'H* 遺伝子全長を増幅するプライマーを用いて PCR 増幅し、塩基配列を解析した。その結果、明らかとなった変異について、花色識別 DNA マーカーを設計した。

5. 試験結果および考察

- (1) 白花を識別する 4 種類の DNA マーカーを供試し、各系統の遺伝子型を解析した結果、白花である系統キ 13、リ 6 はマーカー GW-2 で変異型ホモの遺伝子型を示し、表現型と一致した（表-2）。
- (2) 系統キ 11 の花色は白色の覆輪を持つ紫であるが、マーカー GW2 で変異型・野生型ヘテロの遺伝子型を示したため（表-2）、今後ヘテロ遺伝子型と覆輪の関係について解析する必要がある。
- (3) ピンク花を識別する DNA マーカー Gp-2 は、系統ピ 2、ピ 5、リ 1 で変異型ホモの遺伝子型を示し、ピンク花の表現型と一致した。また、他のピンク花系統については、ピ 6、リ 2、リ 3 は変異型・野生型ヘテロ、ピ 1、キ 12 は野生型ホモの遺伝子型で表現型と一致しなかった（表-2）。
- (4) マーカー Gp-2、Gp-5 の解析結果から、両マーカーでは検出できないピンクの変異があると推定されたため、*F3',5'H* 遺伝子の全長を PCR 増幅した（図-1）。得られた増幅産物の塩基配列を解析した結果、既知の 1 塩基（T）挿入による変異が認められた。
- (5) (4)の結果から 1 塩基挿入の変異型を検出するプライマーと野生型を検出するプライマーをそれぞれ設計し、マーカー Gp-6 とした（図-2）。
- (6) マーカー Gp-6 で遺伝資源各系統の遺伝子型を解析した結果、系統ピ 1 は変異型ホモ、ピ 6、リ 2、リ 3 は変異型・野生型ヘテロであり、マーカー Gp-2 の結果とあわせて表現型と一致した。また、紫のム 9 と白のキ 13 は、変異した遺伝子をヘテロで有していた（表-2）。
- (7) ピンク花の表現型と遺伝子型が一致していない系統キ 12 は、図-1 の結果から未知の変異をホモで有することが示唆されたため、現在遺伝子の塩基配列を解析中である。

（担当者 研究開発部 生物工学研究室 生井潔、若樹睦子）

表-1 供試 DNA マーカーの概要

DNAマーカー名 ¹⁾	識別花色	標的遺伝子 ²⁾	検出変異
Gw-1	白	<i>ans1</i>	4bp欠失
Gw-2	白	<i>gtmyb3-1</i> or <i>gtmyb3-3</i>	<i>hAT</i> (280bp) or 290bp挿入
Gw-3	白	<i>gtmyb3-2</i>	6kb挿入
Gw-4	白	<i>gtmyb3-4</i>	1bp挿入
Gp-2	ピンク	<i>f3',5'h1</i> ^{GtMITE1}	<i>GtMITE1</i> (350bp)挿入
Gp-5	ピンク	<i>f3',5'h1</i> ^{GsTRIM1}	<i>GsTRIM1</i> (500bp)挿入

- 1) 分かりやすくするために栃木農試で便宜的に付した名称。
 2) 花色変異の原因遺伝子で、野生型の遺伝子はそれぞれ *ANS* (アントシアニン合成酵素遺伝子)、*GtMYB3* (リンドウ MYB3 遺伝子)、*F3',5'H* (フラボノイド 3',5'水酸化酵素遺伝子)。

表-2 栃木農試が保有するりんどう遺伝資源における花色関連遺伝子の遺伝子型解析結果

供試材料		花色	花色識別マーカー						
番号	系統名		Gw-1	Gw-2	Gw-3	Gw-4	Gp-2	Gp-5	Gp-6
ム1	TOV02	紫	W	W	W	W	W	W	W
ム9	TOV01	紫	W	W	W	W	W	W	H
チ103	TOIM103_14号	紫	W	W	W	W	W	W	W
チ105	TOIM105_14号	紫	W	W	W	W	W	W	W
チ106	TOIM106_14号	紫	W	W	W	W	W	W	W
リ4	TOIM106_道南	紫	W	W	W	W	W	W	W
リ5	TOIM103_道南	紫	W	W	W	W	W	W	W
キ11	TOVW	紫(白覆輪)	W	H	W	W	W	W	W
リ6	TOW(たかえ)_パイプ東	白	W	M	W	W	W	W	W
キ13	TOW(H・Y)	白	W	M	W	W	W	W	H
ピ1	那須の乙女01_タイプ2	ピンク	W	W	W	W	W	増幅無	M
ピ2	那須の乙女01_タイプ1	ピンク	W	W	W	W	M	W	W
ピ5	那須の乙女02_タイプ1	ピンク	W	W	W	W	M	W	W
ピ6	那須の乙女02_タイプ2	ピンク	W	W	W	W	H	W	H
リ1	那須の乙女No.1_パイプ東	ピンク	W	W	W	W	M	W	W
リ2	那須の乙女No.2_パイプ東	ピンク	W	W	W	W	H	W	H
リ3	那須の乙女No.5_パイプ東	ピンク	W	W	W	W	H	W	H
キ12	TOSP	ピンク	W	W	W	W	W	W	W

W : 野生型ホモ、 H : ヘテロ、 M : 変異型ホモ

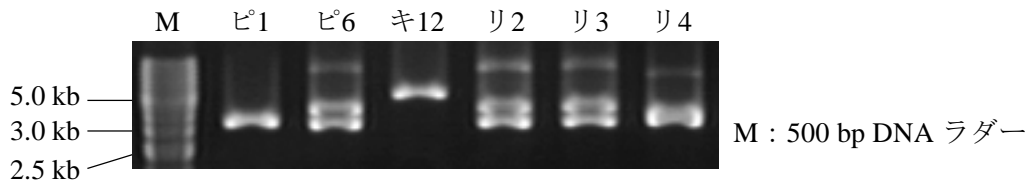


図-1 F3',5'H 遺伝子全長を増幅する PCR の結果

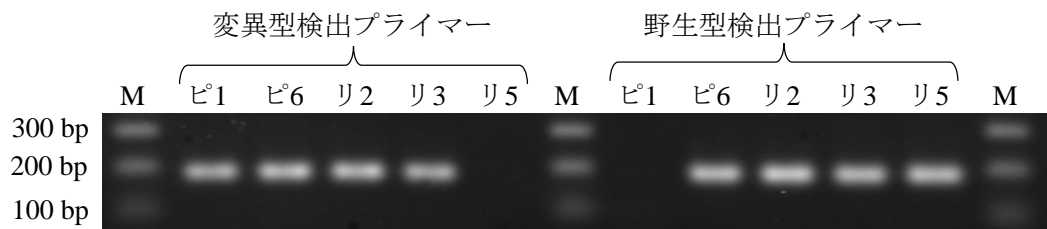


図-2 1塩基 (T) 挿入変異を検出するマーカーGp-6 の PCR 結果

- 変異型検出プライマーのみ増幅 : T 挿入変異遺伝子をホモで持つ
 変異型検出・野生型検出両プライマーとも増幅 : T 挿入変異遺伝子と野生型の遺伝子をヘテロで持つ
 野生型検出プライマーのみ増幅 : 野生型の遺伝子をホモで持つ
 M : 100 bp DNA ラダー