

リアルタイム PCR を用いたカキの甘渋性制御遺伝子型の推定

辻本誠幸・杉村輝彦*

Real-time PCR Analysis for Estimating Quantitative Genotypes of the Astringency Locus in Persimmon

Tomoyuki TSUJIMOTO and Teruhiko SUGIMURA

Key Words: persimmon, real-time PCR, astringency, quantitative genotyping, breeding, polyploid

カキ (*Diospyros kaki*) は果実生育期における自然脱渋のパターンにより、「完全甘ガキ」、「不完全甘ガキ」、「不完全渋ガキ」および「完全渋ガキ」の4種類に分類される⁸⁾。このうち、完全甘ガキについては種子の有無に関わらず樹上で自然に脱渋することから、カキの育種目標の1つとされてきた。これまでの研究から、完全甘ガキとそれ以外の3種類(以下「非完全甘ガキ」とする)の間には脱渋機構の点で質的な差異が存在し¹¹⁾、この違いは1つの遺伝子(甘渋性制御遺伝子、以下「AST 遺伝子」)により支配されることが明らかにされてきた⁷⁾。また、完全甘ガキが遺伝学的に劣性形質であることから、完全甘ガキの育種においては主に完全甘ガキ品種間での交配が行われてきた¹⁰⁾。

一方、カキ品種の多くは非完全甘ガキであり、在来完全甘ガキにない形質を備えているものも多いと考えられる⁹⁾。そのため、今後は非完全甘ガキを育種親として用いて新たな完全甘ガキ品種の作出を行う方法についても検討する必要がある。育種親として用いる非完全甘ガキの遺伝子型によって完全甘ガキ個体の獲得率は変化すると考えられるが、Akagiらはリアルタイム PCR を用いた AST 遺伝子座のジェノタイプング方法を確立した¹⁾。この方法によってこれまでに非完全甘ガキ 60 品種の AST 遺伝子型が明らかにされている²⁾が、在来の非完全甘ガキは 200 品種以上存在しており⁶⁾、完全甘ガキ品種との交雑を行った場合に、次世代に高い割合で完全甘ガキ個体を獲得しうる非完全甘ガキ品種に目処をつけておく必要がある。

本研究では、これまでに解析が行われていない在来の非完全甘ガキ 10 品種を供試し、リアルタイム PCR を用いてカキの AST 遺伝子座のジェノタイプングを行い、効率的な完全甘ガキ個体獲得の観点から、

育種親としての評価を試みた。

材料および方法

植物材料

奈良県果樹振興センターに植栽されている非完全甘ガキのうち、(1)奈良県原産であるもの、(2)豊産性であるもの、(3)外観が良好であるもの、の観点から 10 品種を選定し、解析に供試した(第 1 表)。また対照品種として、完全甘ガキである「富有」および「米田御所」⁴⁾についても供試した。2012 年または 2013 年の春季に幼葉を採取し、液体窒素中で破碎後、CTAB 法⁵⁾または DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。

リアルタイム PCR 解析

検量線作成に用いる「富有」および「米田御所」の DNA については、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)を用いて濃度を測定し、TE を用いて 40ng/ μ l に調製後、0.020ng/ μ l まで段階希釈を行った。また非完全甘ガキの DNA については、40ng/ μ l または 20ng/ μ l に調製した。

第 1 表 本実験に供試した非完全甘ガキ品種

Table 1. Tested cultivars for this research

品種	甘渋性	特徴 ²⁾	原産地 ²⁾
ナガラ	完全渋	日持ち性良い	奈良
栃原柿	不完全甘	早生	奈良
法蓮坊	完全渋	豊産性	奈良
紅御所	不完全甘	果皮色良好, 中生	福島
宝生丸	不完全渋	果皮色・果形良好, 豊産性	新潟・山形
久保	不完全甘	豊産性, 甘み濃い	京都
大和百目	完全渋	豊産性, 甲州百目に似る	山梨
蓮台寺	不完全甘	豊産性, 中生	三重
舍谷柿	完全渋	果皮色・果形良好, 豊産性, 強い甘み	韓国
台湾正柿	完全渋	豊産性, 甘み濃厚	台湾

²⁾: 文献⁶⁾に記載されている特徴および原産地を示す

リアルタイム PCR 解析に用いる反応溶液は、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 12.5 μ l, 滅菌水 10 μ l, プライマー (20 μ M) 各 0.25 μ l, およびテンプレート DNA 1.5 μ l を混合し、計 25 μ l としたものをを用いた。

解析は Akagi らの方法²⁾に従い、ABI 7500 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) を用いて行った。なお PCR のサイクル数は 42~45 とした。また、本実験では完全甘ガキタイプのアレルの検出を行うこととし、カキゲノム中でアレル数が 6 であることが確認されている領域 (リファレンスサイト) として、L5R および *DkANR* の二種類を用いた。

完全甘ガキの段階希釈サンプルの DNA 濃度 (対数値) と Ct 値から、各 DNA マーカーの検量線を作成した。解析対象のサンプルについては、検量線を用いて Ct 値から DNA 濃度への変換を行い、リファレンスとして用いたマーカーの値との比較から、完全甘ガキタイプのアレル数を推定した。なお検量線は測定毎に作製した。また反復数は、検量線については 2 以上、解析対象のサンプルについては 3~6 とした。

結果および考察

リアルタイム PCR による解析結果を第 2 表に示す。カキはその多くが六倍体 ($2n=6x=90$) であり、非完全甘ガキが持つ完全甘ガキタイプのアレル数としては 0~5 が想定される。本解析に用いた品種の中では‘紅御所’が、完全甘ガキタイプのアレルを 5 つ有することが推定され、完全甘ガキ品種との交配を行った場合に後代において高い確率 (50%) で完全甘ガキ個体を獲得できる可能性が示唆された。‘富有’や‘次郎’といった在来の完全甘ガキ品種のほとんどが関東以西原産であるのに対し、‘紅御所’は福島県原産の品種とされている⁶⁾ことから、‘紅御所’を育種親に用いることで遺伝的背景の大きく異なる完全甘ガキ品種の作出が期待される。また‘ナガラ’については、リファレンスサイトを *DkANR* とした場合に *AST* 遺伝子型が AAAaaa であると推定された一方で、リファレンスサイトとして L5R を用いた場合には、遺伝子型は AAAAAa であると推定された。このような食い違いが生じた原因については不明であるが、リファレンスサイトに変異があり正しい結果が得られなかった可能性も考えられる。そのため、正

確な遺伝子型の判定には他のリファレンスサイトを用いた検証が必要であると考えられた。

今回供試したその他の品種については、完全甘ガキタイプのアレル数は 2 以下であると推定された。カキの遺伝様式としては同質六倍体様である可能性が示されており³⁾、完全甘ガキタイプのアレル数が 2 以下となると、完全甘ガキとの交配を行った雑種第一代において、完全甘ガキの出現は望めないと想定される。そのため、今回供試した品種のうち‘紅御所’以外については、完全甘ガキとの交配を行ったとしても、次世代で完全甘ガキを獲得することは困難であると考えられた。

今回調査した品種以外にも、完全甘ガキタイプのアレルを多く持つ品種が存在している可能性がある。そのため、望ましい形質を有する品種を中心にリアルタイム PCR 解析を行うことが、新たな完全甘ガキの育種を進める上で有効であると考えられる。

第 2 表 リアルタイム PCR 解析に基づく *AST* 遺伝子型の推定結果

Table 2. Estimated genotypes of *AST* based on the results of real-time PCR analysis

品種	完全甘ガキタイプのアレル数		推定遺伝子型 ^{a)}
	L5R	<i>DkANR</i>	
紅御所	4.53 ± 0.40	5.54 ± 0.48	Aaaaaa
ナガラ	1.24 ± 0.24	3.21 ± 0.24	AAAAAa or AAAaaa
宝生丸	2.34 ± 0.16	1.70 ± 0.12	AAAAaa
栃原柿	2.06 ± 0.11	1.17 ± 0.07	AAAAaa or AAAAAa
久保	1.02 ± 0.00	0.71 ± 0.00	AAAAAA
大和百目	0.52 ± 0.18	0.31 ± 0.11	AAAAAa or AAAAAA
蓮台寺	0.37 ± 0.06	0.56 ± 0.05	AAAAAA or AAAAAa
舎谷柿	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00	AAAAAA
法蓮坊	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	AAAAAA
台湾正柿	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	AAAAAA

^{a)}: Aは非完全甘ガキタイプ, aは完全甘ガキタイプのアレルを示す。

^{b)}: 平均値 ± 標準誤差を示す。

引用文献

1. Akagi, T., S. Kanzaki, M. Gao, R. Tao, D.E. Parfitt and K. Yonemori. 2009. Quantitative real-time PCR to determine allele number for the astringency locus by analysis of a linked marker in *Diospyros kaki* Thunb. *Tree Genet. Genomes*. 5: 483-492.
2. ———, Y. Takeda, K. Yonemori, A. Ikegami, A. Kono, M. Yamada and S. Kanzaki. 2010. Quantitative genotyping for the astringency locus in hexaploid persimmon cultivars using quantitative real-time

- PCR. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 135: 59-66.
3. ———, R. Tao, T. Tsujimoto, A. Kono and K. Yonemori. 2012. Fine genotyping of a highly polymorphic *ASTRINGENCY*-linked locus reveals variable hexasomic inheritance in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) cultivars. Tree Genet. Genomes. 8: 195-204.
 4. 岩本和彦・山中康弘. 2006. 奈良県内のカキ古木分布と多様性. 奈良農技セ研報. 37: 39-45.
 5. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
 6. 広島県果樹試験場. 1979. 昭和 53 年度種苗特性分類調査報告書 (カキ). 広島県果樹試験場. 広島. 91-419.
 7. Ikeda, I., M. Yamada, A. Kurihara and T. Nishida. 1985. Inheritance of astringency in Japanese persimmon. J. Japan Soc. Hort. Sci. 54: 39-45.
 8. 梶浦 実. 1946. 柿の品種と品種改良. 育種と農芸. 1: 175-182.
 9. Yamada, M.. 1993. Persimmon breeding in Japan. Japan Agr. Res. Quart. 27: 33-37.
 10. 山田昌彦. 2011. 果樹の交雑育種法. 養賢堂. 東京. 164.
 11. 米森敬三・松島二良. 1985. カキ果実のタンニン細胞の発達過程と自然脱渋の関連について. 園学雑. 54: 201-208.