

FTA®カードを用いた簡便なウメ DNA 固定および長期保存

沼口孝司・北村祐人

和歌山県果樹試験場うめ研究所

A Simple Method Using FTA® Card for Fixation and Long-term Storage of DNA in Japanese Apricot

Koji Numaguchi and Yuto Kitamura

Japanese Apricot Laboratory, Fruit Tree Experiment Station, Wakayama Prefecture

緒 言

果樹では大きな個体サイズ、長い幼若期が育種上の大きな障壁となる。それゆえ着果を待たずして有用形質に関する選抜を可能にする DNA マーカー選抜の重要性は草本作物と比較してはるかに大きく (Luby・Show, 2001), 育種現場においても数多く利用されている。ウメ (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) でも *S* 遺伝子座において自家和合性に関与する *S^f* 対立遺伝子 (Tao ら, 2000, 2002) を保有する交雑実生の選抜に DNA マーカーが用いられ, ‘橙高’, ‘NK14’ (根来ら, 2007, 2009) および ‘星高’ (北村ら, 2017) のような自家和合性の優良品種が育成された。このように高い利便性をもつ DNA マーカーであるが, 育種規模が拡大するにつれ, 植物体からの DNA 抽出にかかる労力および時間が無視できないものとなっており, これまでに多くの作物において簡易抽出法が開発されている。特に簡単なものでは TE バッファ中に葉の汁液を溶出させるのみの方法 (Ikeda ら, 2001; Ohta ら, 2013) があり, ウメでの適用例が報告されている (Habu ら, 2006 ; Ohta ら, 2013) 。しかし葉の採取後すぐに抽出操作ならびに PCR を行う必要がある点や, 保存性などの点で課題が残る。そこで本稿では, 種々の生物由来の核酸を迅速・簡便に固定することができ, 常温での長期保存性にも定評があるろ紙である FTA カード (Ishii ら, 2011 ; Maina ら, 2017 ; Orn ら, 2015) を用いたウメ DNA の固定, PCR による *S* 遺伝子型判別および長期保存について検討したので報告する。

材料および方法

1. 植物材料およびサンプリング

1) FTA カードを用いた *S* 遺伝子座の PCR 条件およびカードの保存性の検討

FTA カードを用いた *S* 遺伝子座の PCR 条件の検討には, 2017 年 11 月 9 日にサンプリングしたうめ研究所内植栽の ‘南高’, ‘古城’, ‘改良内田’, ‘織姫’, ‘東地紅梅’, ‘前沢’, ‘信濃小梅’, ‘二青梅’, ‘露茜’, ‘鶯宿’, ‘八郎’, ‘竜峡小梅’, ‘白加賀’, ‘橙高’ および ‘剣先’ の 15 品種を用いた。FTA カードの保存性の検討には 2017 年 4 月 10 日にみなべ町内現地ほ場でサンプリングした ‘南高’ 5 個体を用いた。サンプリングした葉は直ちに FTA プラントセーバーカード (GE ヘルスケア) の一区画へ, ラップを被せた上から小型ハンマーで打ちつけ,

汁液を浸透させた（第1図）。カードは風乾させたのち、PCRに供するまで常温で保管した。なお、11月9日にサンプリングした葉の一部については対照として DNeasy plant mini kit（キアゲン）を用いた DNA 抽出も行った。すべてのサンプルについて、11月13日に PCR による *S* 遺伝子型判別に供試した。

2) FTA カードを用いた自家和合性交雑後代の選抜（利用例）

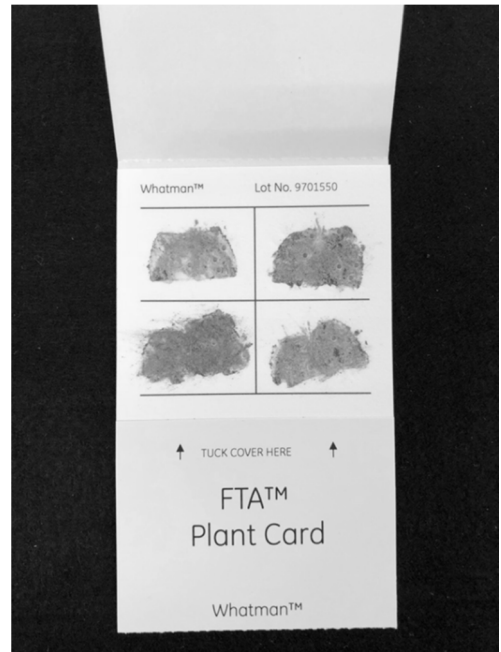
試験には EN80 集団（2年生）37 個体を用いた。なお EN80 集団は、‘二青梅’ × ‘南高’ の F₁ 「EN8」を種子親に、‘織姫’を交雑して得られた集団である。全個体について 2017 年 10 月 16 日に FTA カードへのサンプリングを行い、11 月 20 日に PCR による *S* 遺伝子型判別を行った。

2. FTA カードの前処理

PCR に先立ち、FTA カードはマニュアルの通り前処理に供した。すなわち、φ1.25 mm のパンチでカードの汁液が浸透した部分をくり抜いて PCR チューブに入れ、200 μl の FTA 精製試薬（GE ヘルスケア）で 5 分 × 2 回、続いて 200 μl の TE（10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0）バッファで 5 分 × 2 回洗浄を行った。ディスクに葉緑素が残る場合はさらにイソプロパノール 200 μl による洗浄を行った。洗浄後のディスクは風乾により完全に水分を取り除いた。

3. PCR 反応条件

標準的な PCR キットである Quick Taq HS DyeMix（以降 Quick Taq）（東洋紡）および高効率キットである KOD-FX Neo（東洋紡）を用いて、各キットのマニュアルに記載の手順に従い、全量を 25 μl として PCR を行った。プライマー（終濃度 0.4 μM）にはウメの *S* 遺伝子座を増幅する既報の Pru-C2 および Pru-C5（Tao ら、2000）を使用した。反応条件は 95℃・2 分、（95℃・30 秒、50℃・30 秒、68℃・2 分）×40 回、68℃・7 分とした。PCR 産物は 1% アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色により可視化した。

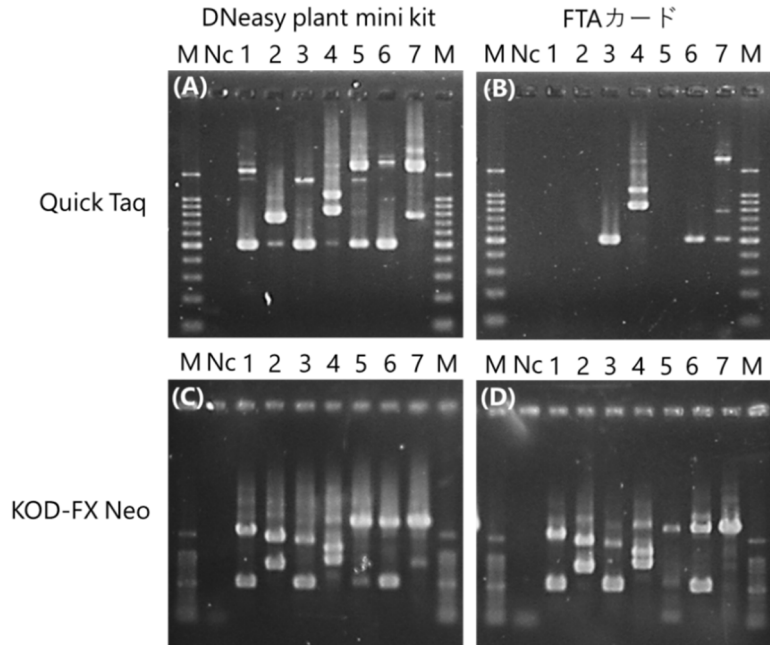


第1図 ウメ葉の汁液を浸透させた FTA カード

結果および考察

FTA カードに適した PCR 条件

DNeasy plant mini kit を用いて抽出した DNA では、Quick Taq および KOD-FX Neo とともに良好な増幅を示した（第2図 A, C）。一方、FTA カードを用いて固定した DNA は、Quick Taq では増幅が安定しなかったものの、KOD-FX Neo では良好な結果が得られた（第2図 B, D）。さらに、FTA カードにサンプリングした 12 品種のウメについて、KOD-FX Neo を用いた *S* 遺伝子座の PCR 分析を行ったところ、供試したすべての品種について DNeasy plant mini kit を用いて抽出した DNA と同等の明瞭なバンドが得られた（第3図 A, B）。うち、自家和合性品種である‘織姫’、‘前沢’、

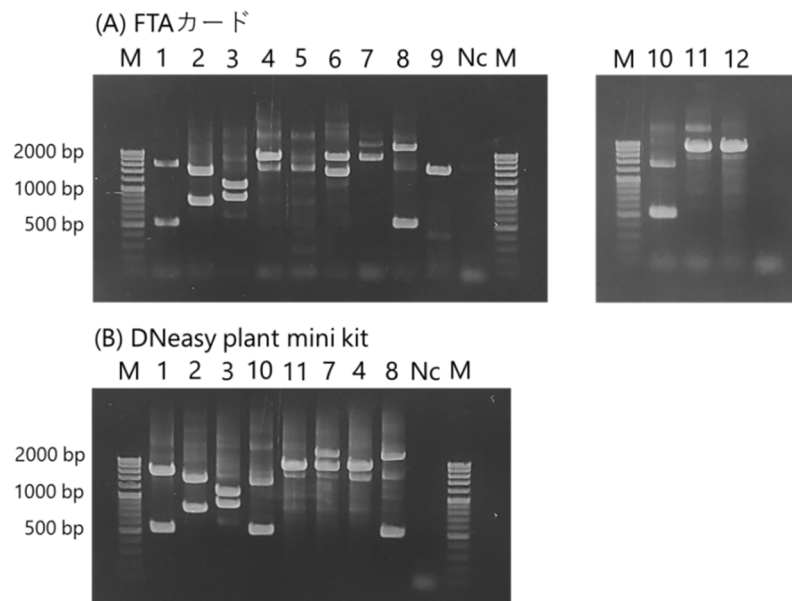


第2図 2種類のキットによるFTAカードからのPCR効率の違い

抽出(固定)法 (A), (C): DNeasy plant mini kit (対照), (B), (D): FTAカード

PCRキット (A), (B): Quick Taq HS DyeMix, (C), (D): KOD-FX Neo

M: 100 bp ladder, Nc: ネガティブコントロール, 1: '南高', 2: '白加賀', 3: '鶯宿', 4: '改良内田', 5: '竜峡小梅', 6: '橙高', 7: '剣先'



第3図 12品種のウメにおけるS遺伝子座のPCR分析

(A) FTAカード, (B) DNeasy plant mini kit (対照)

M: 100 bp ladder, Nc: ネガティブコントロール, 1: '南高', 2: '古城', 3: '改良内田', 4: '織姫', 5: '東地紅梅', 6: '前沢', 7: '信濃小梅', 8: '二青梅', 9: '露茜', 10: '鶯宿', 11: '八郎', 12: '竜峡小梅'

‘信濃小梅’，‘八郎’および‘竜峡小梅’からは S^f 対立遺伝子 (2000 bp 付近) が安定して検出された (第3図A)．これらのことから，KOD-FX Neo を用いることで，FTA カードによる方法でも PCR による S 遺伝子型判別が十分可能であると考えられた．

なお FTA カードにおいて Quick Taq による増幅が安定しなかったのはウメ葉中に含まれる PCR 阻害物質の影響によるものと考えられる．一般に，木本作物の葉は草本作物と比較してポリフェノールや多糖類等の PCR 阻害物質を多く含む (Tibbits ら，2006) が，KOD-FX Neo ではそれら阻害物質の存在下でも安定した PCR が可能であることが示された．

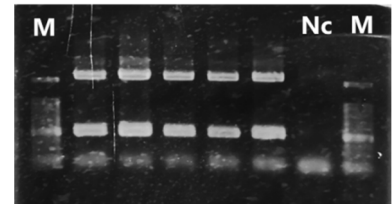
FTA カードに固定されたウメ葉由来 DNA の保存性

2017年4月10日に FTA カードに固定した‘南高’5個体の DNA サンプルについて，11月13日に KOD-FX Neo を用いた方法により PCR を行った結果，すべてのサンプルで良好な増幅結果が得られた (第4図)．このことから，FTA カードに固定したウメ葉由来の DNA は，少なくとも10か月間は常温で保存可能であることが示唆された．

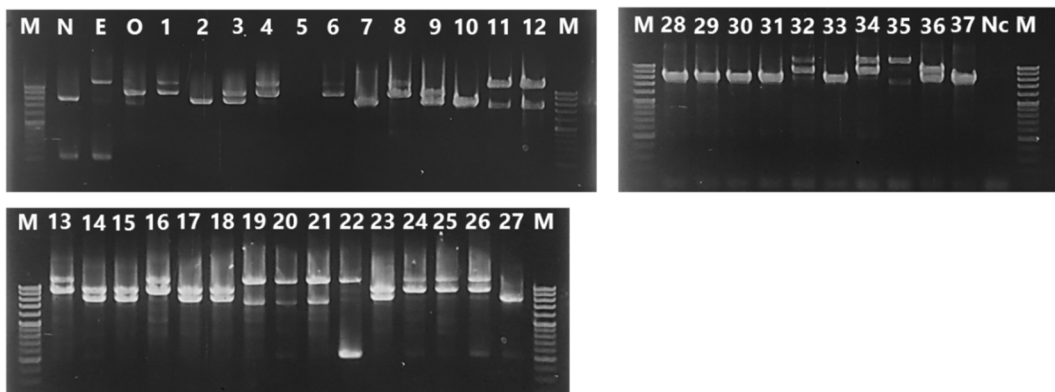
FTA カードの実用性

供試した EN80 集団 37 個体のうち，5 を除く 36 個体において良好な増幅結果が得られた (第5図)．うち 1, 3, 4, 6, 8, 9, 13~18, 23~26, 32, 34 および 36 の 19 個体が自家和合性を示す S^f 対立遺伝子を保有していたため，これらを育種素材の候補として選抜した．なお，37 個体の葉の FTA カードによるサンプリングはわずか1時間程度で完了でき，その後のサンプル保管に冷凍庫を要しないため，極めて簡便であった．このように，FTA カードによるサンプリングと KOD-FX Neo による PCR を用いることで，ウメでもキットによる DNA 抽出を経ず，極めて省力的に交雑後代の選抜ができた．

FTA カードはその運搬性から，現地調査におけるサンプリングにも広く利用される (Ishii ら，2011；Orn ら，2015)．またサンプリング対象は植物体のみならず，感染している病原体にまで及び，固定する核酸の種類を問わない (Maina ら，2017)．そのため，ウメでも現地における病害診断技術やクローン識別法としての利用など，育種利用に留まらない実用性が期待できる．



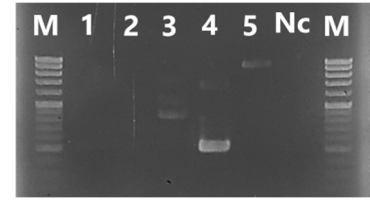
第4図 約10か月保存後の FTA カードを用いた PCR
M: 100 bp ladder, Nc: ネガティブコントロール



第5図 FTA カードを用いた EN80 交雑実生集団からの自家和合性個体の選抜 (実施例)

M: 100 bp ladder, Nc: ネガティブコントロール, N: ‘南高’, E: ‘二青梅’, O: ‘織姫’, 1-37: EN80 集団

しかし利用には留意すべき点がある。例えば FTA カードへの過剰な汁液の採取は、かえって PCR 効率の低下につながる。特にカード上に残さが付着した状態では PCR が失敗しやすい傾向にあるため (第 6 図), サンプリングの際はカードに葉を打ちつける強度を、汁液が浸透する最小限度に留めるべきである。また、葉緑素も PCR 阻害物質として報告されている (Schrader ら, 2012) ため、FTA ディスクの洗浄は緑色が抜けるまで丁寧に行うことが重要である。さらに、パンチを用いたくり抜きの際、クロスコンタミネーションを防止するために、カードは十分乾燥させておく必要がある (藤井ら, 2011)。



第 6 図 汁液を過剰採取したカードを用いた PCR
M: 100 bp ladder, Nc: ネガティブコントロール, 1: '南高', 2: '白加賀', 3: '改良内田', 4: '鶯宿', 5: '竜峡小梅'

摘 要

本稿では、ウメの DNA 分析の省力化のため、核酸を迅速・簡便に固定することができ、常温での長期保存が可能とされるろ紙、FTA カードの利用を検討した。

1. 高効率 PCR 酵素である KOD-FX Neo を用いることで、FTA カードに固定したウメ葉の DNA からの安定した PCR が可能であった。
2. FTA カードに固定したウメ葉由来の DNA は、少なくとも 10 か月間は常温で安定に保存することが可能であった。
3. FTA カードへのサンプリングの際は、葉を打ちつける強度をカードに汁液が浸透する最小限度に留め、残さを付着させないよう留意する必要がある。

引用文献

- 藤井宏治・北山哲史・中原弘明・水野なつ子・関口和正. 2011. STR 型検査のために FTA カードをパンチする際のクロスコンタミネーションの程度について. 法科学技術. 16: 67-72.
- Habu, T., F. Kishida, M. Morikita, A. Kitajima, T. Yamada and R. Tao. 2006. A simple and rapid procedure for the detection of self-compatible individuals in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) using the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. HortScience 41: 1156-1158.
- Ikeda, N., N. S. Bautista, T. Yamada, O. Kamijima and T. Ishii. 2001. Ultra-simple DNA extraction method for marker-assisted selection using microsatellite markers in rice. Plant Mol. Biol. Rep. 19: 27-32.
- Ishii, T., T. Hiraoka, T. Kanzaki, M. Akimoto, R. Shishido and R. Ishikawa. 2011. Evaluation of genetic variation among wild populations and local varieties of rice. Rice 4: 170-177.
- 北村祐人・武田知明・沼口孝司・土田靖久・根来圭一・林 恭平・岩本和也・菱池政志・中 一晃・島津 康. 2017. 黒星病抵抗性ウメ '星高' の育成および減農薬栽培の可能性の評価. 園学研. 16 (別 2) : 388.
- Luby, J. J. and D. V. Show. 2001. Does marker-assisted selection make dollars and sense in a fruit breeding program? HortScience 36: 872-879.
- Maina, S., B. A. Coutts, O. R. Edwards, L. de Almeida, M. A. Kehoe, A. Ximenes and R. A. C. Jones. 2017. Zucchini yellow mosaic virus populations from East Timorese and northern Australian cucurbit crops:

- molecular properties, genetic connectivity, and biosecurity implications. *Plant Dis.* 107: 1236-1245.
- 根来圭一・林 恭平・岩本和也・大江孝明. 2007. ‘南高’と‘地蔵’の交雑によるβ-カロテン含量の高い自家和合性ウメ品種の育成. *園学研.* 6 (別2) : 469.
- 根来圭一・林 恭平・岩本和也. 2009. 自家和合性ウメ新品種‘NK14’の育成. *園学研.* 8 (別1) : 311.
- Ohta, S., K. Yano, Y. Kurita, T. Shimizu and H. Nesumi. 2013. A sample preparation method for direct and non-direct PCR in woody plants. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 82: 14-21.
- Orn, C., R. Shishido, M. Akimoto, R. Ishikawa, T. M. Htun, K. Nonomura, Y. Koide, M. Sarom, S. Sophany, O. Makara and T. Ishii. 2015. Evaluation of genetic variation among wild rice populations in Cambodia. *Breed. Sci.* 65: 430-437.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. Johne. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113: 1014-1026.
- Tao, R., T. Habu, H. Yamane and A. Sugiura. 2000. Molecular markers for self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). *HortScience* 35: 1121-1123.
- Tao, R., T. Habu, A. Namba, H. Yamane, F. Fuyuhiko, K. Iwamoto and A. Sugiura. 2002. Inheritance of *S*¹-RNase in Japanese apricot (*Prunus mume*) and its relation to self-compatibility. *Theor. Appl. Genet.* 105: 222-228.
- Tibbits, J. F. G., L. J. McManus, A. V. Spokevicius and G. Bossinger. 2006. A rapid method for tissue collection and high-throughput isolation of genomic DNA from mature trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 24: 81-91.

Summary

In this study, we tested the availability of FTA card to simplify the procedure of DNA analysis in Japanese apricot.

1. A highly efficient PCR kit, KOD-FX Neo showed good results of PCR from mume leaf DNA fixed on FTA cards.
2. Mume leaf DNA fixed on FTA card was shown to be stored for at least 10 months at room temperature.
3. When sampling, FTA cards should be minimally saturated with leaf extracts to prevent PCR inhibition by leaf residue.