

RAPD法による佐賀県産タマネギの品種判別

日野まど香・木戸聡子・内山りつか・吉田千冬・武富和美・波多野昌二

(西九州大学健康福祉学部)

(平成15年10月30日受理)

Identification of Onion Cultivars by RAPD Method with Small-Scale Isolation of the Total DNA

Madoka HINO, Satoko KIDO, Ritsuka UCHIYAMA,
Chifuyu YOSHIDA, Kazumi TAKEDOMI, Shoji HATANO

(Faculty of Health and Social Welfare Science, Nishikyushu University)

(Accepted October 30, 2003)

Abstract

RAPD (random amplified polymorphic DNA) method was applied to identify six onion cultivars produced in Saga Prefectural Agriculture Research Center Shiroishi Branch. Each DNA was extracted by CTAB (cetyl-trimethyl-ammoniumbromide) method and amplified by PCR method using 10 mer random primers and 24 mer random long primers. The band patterns among six onion cultivars were compared by electrophoresis of the PCR products. The PCR method using B-12, B-15, B-17 and Long-1 random primers revealed to identify four onion cultivars (Tabo, Satsuki, Momiji No.3 and Tazan) among the six onion cultivars. Further researches with some more random primers are necessary for the full identification.

Key words : PCR 複製連鎖反応

RAPD 増幅多型DNA

electrophoresis 電気泳動

1. 緒言

佐賀県は北海道、兵庫県に次ぐタマネギの生産量を誇っている¹⁾。地域により気象条件が異なるため作型が分化し、それに対応して栽培品種もさまざまである。佐賀県産タマネギは、秋に種を播き春に収穫する秋播きが一般的であり、栽培極早生栽培の「プレスト」「アーリートップ」「A-32」「スパート」、早生栽培の「七宝7号」「アドバンズ」、中生栽培の「ターボ」「ターザン」「アース」「アトン」「さつき」、晩生栽培の「もみじ3号」の計12品種がある。特に、もみじ3号は、食味、貯蔵性に優れており、流通の主流を占めている。これら佐賀県産タマネギを他県産のものと差別化し、全国にアピールするためには品種の判別方法を確立することが必要である。そこで、私たちは、最近品種判別への利用が拡大しているRAPD法に着目した。

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法は、Williamsら²⁾によって開発された方法であり、ゲノム遺伝子を鋳型としてランダムプライマーの存在下でPCR (Polymerase Chain Reaction) 法によって遺伝子を増幅し、その電気泳動パターンによって遺伝子の塩基配列の相違を検出し、品種判別を行う方法である。従来、馬鈴薯³⁾、大麦⁴⁾、稲の幼葉⁵⁾等で適用例があり、最近では、一部であるが国内産精米⁶⁾や食肉及び食肉製品⁷⁾の識別が可能になり、実用化に向けた品種用キット⁸⁾の開発も進んでいる。さらに、RAPD法を応用した方法として、水稻の幼苗の試料とした細胞質雄性不稔回復遺伝子⁹⁾や病害抵抗性遺伝子¹⁰⁾のマッピングを行った研究も報告されている。

本研究では、迅速かつ簡便に品種判別が可能であるRAPD法を用いて佐賀県産タマネギの品種判別を試みた。

2. 実験方法

2.1 試料

佐賀県農業試験研究センター白石分場で平成13年度に生産されたターボ、ターザン、アース、アトン、さつき、もみじ3号の計6品種をご分与頂き、試料とした。

2.2 DNAの抽出

細切りした試料タマネギを凍結乾燥した後、ミキサー(イワタニ社製)で粉碎し、タマネギ粉末試料を得た。DNAの抽出は、セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)法¹¹⁾に従って行った。すなわち、タマネギ粉末試料1gを滅菌した三角フラスコに採取し、70℃の1.5%CTAB溶液20mlを加え穏やかに攪拌後、56℃の恒温槽中で60分間振とうしDNAを抽出した。抽出後遠沈管に移し、タンパク質の除去のためクロロホルム/イソアミルアルコール(24/1, v/v)20mlを加え、ロータリーシェーカー(タイテック社製)で20分間混和した。混和後、遠心分離(3000g, 20分間)を行い、上清を採取し、

これに70℃の10%CTAB溶液2mlとクロロホルム/イソアミルアルコール(24/1, v/v)20mlを添加して緩やかに30分間回転振とうした。遠心分離(3000g, 20分間)後、上清を採取し、CTAB-DNA沈殿溶液(1%CTAB, 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH8.0)30mlを加え、CTABと結合したDNAを析出させた。遠心分離(4000g, 30分間)により沈殿物として回収後、その沈殿物に1M NaCl5ml及び10mg/ml RNase10 μ lを添加し反応させた。次いで、99.5%及び70%エタノールで洗浄しCTABを取り除き、真空乾燥後、TE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)500 μ lを加え4℃で一晩DNAを溶解させた。得られた溶液をタマネギDNA溶液とした。

2.3 PCRによるDNAの増幅

前項の方法に従ってタマネギから調製したDNAを鋳型として、常法²⁾に従ってDNAの増幅を行った。DNAポリメラーゼとして、*Ex Taq*ポリメラーゼ(タカラバイオ社製)を使用し、プライマーとしてはランダムプライマー(10mer)40種類及びロングランダムプライマー(24mer)3種類(オペロン社製)(表1)を用いた。反応溶

表1 使用ランダムプライマーの塩基配列

ランダムプライマー(10mer)			
プライマー	塩基配列	プライマー	塩基配列
A-1	CAGGCCCTTC	B-1	GTTCGCTCC
A-2	TGCCGAGCTG	B-2	TGATCCCTGG
A-3	AGTCAGCCAC	B-3	CATCCCCCTG
A-4	AATCGGGCTG	B-4	GGACTGGAGT
A-5	AGGGGTCTTG	B-5	TGCGCCCTTC
A-6	GGTCCCTGAC	B-6	TGCTCTGCC
A-7	GAAACGGGTG	B-7	GGTGACGCAG
A-8	GTGACGTAGG	B-8	GTCCACACGG
A-9	GGGTAACGCC	B-9	TGGGGGATCT
A-10	GTGATCGCAG	B-10	CTGCTGGGAC
A-11	CAATCGCCGT	B-11	GTAGACCCGT
A-12	TCGGCGATAG	B-12	CCTTGACGCA
A-13	CAGCACCCAC	B-13	TCCCCCGCT
A-14	TCTGTGCTGG	B-14	TCCGCTCTGG
A-15	TTCCGAACCC	B-15	GGAGGGTGTT
A-16	AGCCAGCGAA	B-16	TTTGCCCGGA
A-17	GACCGCTTGT	B-17	AGGGAACGAG
A-18	AGGTGACCGT	B-18	CCACAGCAGT
A-19	CAAACGTCGG	B-19	ACCCCGGAAG
A-20	GTTGCGATCC	B-20	GGACCCTTAC

ランダムロングプライマー(24mer)	
プライマー	塩基配列
Long-1	AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG
Long-2	ACCGACGTCGACTATCCATGAACG
Long-3	AGGCAACTGTGTATCCGAGGGAG

液の組成は使用マニュアルに従って、鋳型DNA25ngにプライマー15ng, ポリメラーゼ0.5unit, 100 μ MのdNTP(デオキシリボヌクレオチド3リン酸混合液)溶液1.0

μl, 10倍希釈緩衝液 (Mg²⁺濃度20 mM) 5 μlを加え, 滅菌水で反応系の全量が50 μlになるようにした。DNAの増幅は, サーマルサイクラー (アステック社製PC701, 0.5 μlブロック) を使用し, 94°Cで1分, 36°Cで1分, 72°Cで2分の条件で45サイクル行い, 最終伸長反応は72°C, 10分とした。

2. 4 DNAの電気泳動

PCR終了後の反応液10 μlにローディングバッファー (グリセリン30%, ブロモフェノブルー0.25%, 滅菌水69.75%) 1 μlを混和後, 1%アガロースゲル (フナコシ社製, アガロース36GU) に注入し, ミニ水平電気泳動システム (バイオ社製) を用いて100Vで40分間泳動した。泳動終了後, DNAをエチジウムブロマイド溶液で染色し, 泳動図をトランスイルミネーター (フナコシ社製) で観察した。

3. 実験結果及び考察

3. 1 10 merプライマーによるRAPD解析

佐賀県産タマネギ6品種についてランダムプライマーA及びB (各20種類) を用いてRAPD解析を行った結果, A組の1, 7, 10, 11, 14, 16番, B組の1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19番の計20種類のプライマーで多型 (複数の遺伝子増幅) が認められた。その中でもB-1プライマーによる解析では, アース, アトン, さつきの3品種に3000 bpの特異的なバンドが見られた (データは掲載せず)。B-15ではターボのみに800 bpのバンドが現れ (図1-A), B-17では, さつきのみに1900 bpの特異的なバンドが得られた (図1-B)。また, B-12ではターザン, もみじ3号の2品種に500 bpのバンドがみられ (図1-C), 特異的な遺伝子の増幅を確認することができた。以上の結果から, ターボ, さつきの2品種についてはB-15, B-17プライマーを用いたRAPD解析により識別できることがわかった。

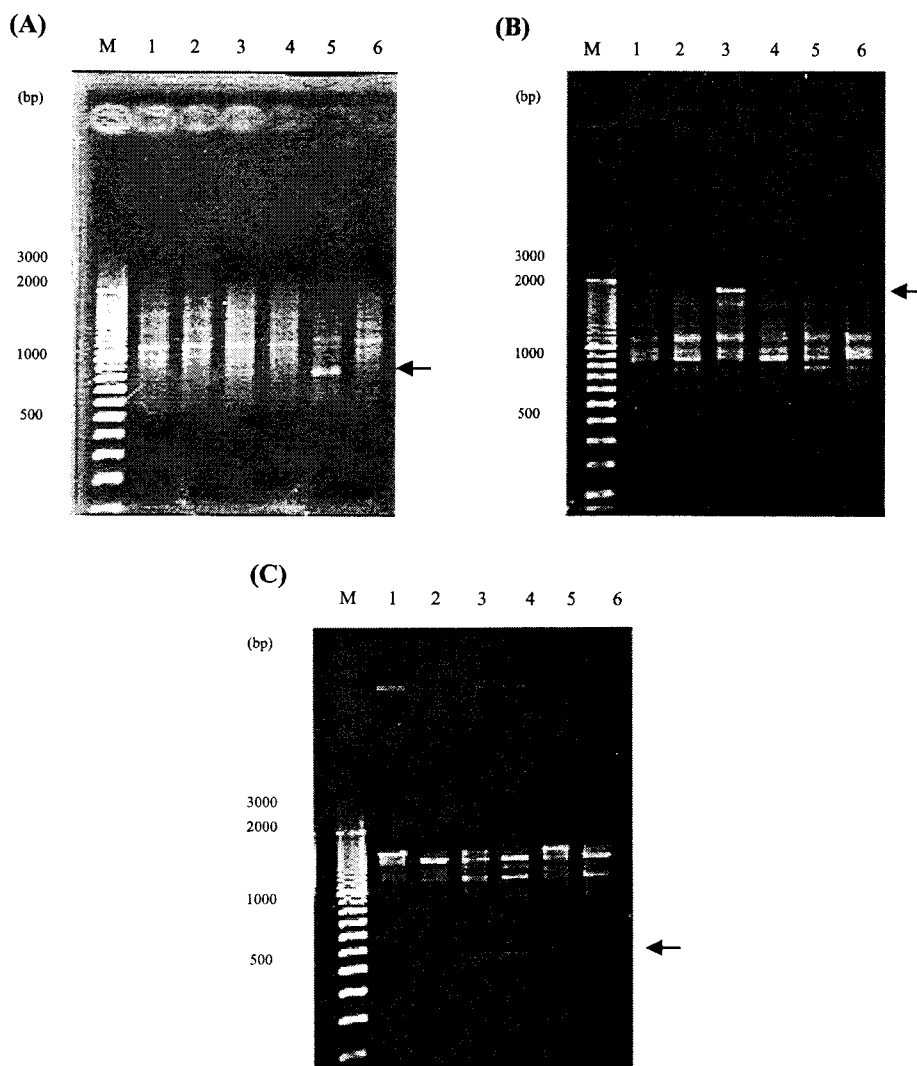


図1 各種プライマーで増殖したタマネギDNAの電気泳動結果

(A) : B-15 プライマー, (B) : B-17 プライマー, (C) : B-12 プライマー

1, アース: 2, アトン: 3, さつき: 4, ターザン: 5, ターボ: 6, もみじ3号

3. 2 24 merプライマーによるRAPD解析

先のRAPD解析ではターボ、さつきの2品種については識別できたが、アース、アトン、ターザン、もみじ3号の4品種についてはそれぞれバンドパターンが類似しており品種を識別するには不十分であった。そこで、判別範囲を広げるためロングランダムプライマー (Long) 3種を用いてさらにRAPD解析を行った。

その結果、Long-1を用いた解析にだけバンドパターンに差がみられた。つまり、ターザンのみ500 bpのバンドを有していなかったことから、Long-1による解析によりターザンを識別できることがわかった(図2)。また、先のB-12プライマーを用いた解析により、ターザン、もみじ3号の2品種を他の品種から識別できるため、このLong-1を用いた解析結果と合わせて考えると、もみじ3号の識別も可能であることも明らかとなった。

以上のことから、ひとつのプライマーで6種類すべて

の識別はできなかったが、10 merのランダムプライマー B-12, 15, 17と24 merのロングランダムプライマー Long-1の4種類を用いることにより、ターボ、さつき、ターザン、もみじ3号の4品種について判別することができた。また、残りの2品種についてもプライマーの種類を増やすことによって判別できる可能性は高い。今後、実用化に向けた再現性の高い明確な判別をするためにプライマーをSTS (Sequence Tagged Sites) 化する必要がある。

また、柳下ら¹²⁾の研究によりRAPD法は、有用形質に連鎖したDNAマーカーの開発に有効な手段であることが報告されていることから、今後、色素生産や球形等の有用形質の遺伝解析を進めるとともにRAPDマーカーの育種選抜の有効性についても検討していきたいと考えている。

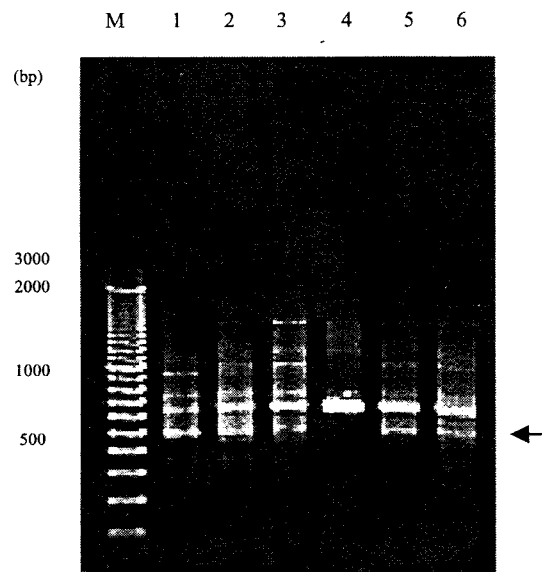


図2 ロングランダムプライマー(Long-1)で増殖したタマネギDNAの電気泳動結果

1, アース: 2, アトン: 3, さつき: 4, ターザン: 5, ターボ: 6, もみじ3号

4. 謝辞

本研究を行うにあたり、貴重なタマネギ試料を佐賀県農業試験研究センター白石分場より御分与いただきました。厚くお礼を申し上げます。

5. 要約

迅速かつ簡便に品種判別が可能であるRAPD法を用いて佐賀県産タマネギ(ターボ、ターザン、アース、アトン、さつき、もみじ3号の計6品種)の品種判別を試みた。CTAB法によりDNAを抽出後、これらDNAを鋳型として10 mer (A-1~B-20の計40種類)と24 mer (Long 1~3の計3種類)のランダムプライマー存在下でPCRを行った。PCR後、増幅された遺伝子の電気泳動パターンを比較検討した。その結果、B-12, B-15, B-17, Long-1ランダムプライマーにより佐賀県産タ

マネギ4種類(ターボ、ターザン、さつき、もみじ3号)の品種判別が可能であった。

6. 文献

- 1) 津志田藤二郎: “地域農産物の品質・機能性成分総覧”, p. 126, (2000), (サイエンスフォーラム)
- 2) J. E. K. Williams: *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531 (1990)
- 3) 矢野 博: 農業及び園芸, 68, 25 (1993)
- 4) U. M. Barua, K. J. Chalmers, C. A. Hackett, W. T. Thomas, W. Powell, R. Waugh: *Heredity*, 71, 177 (1993)
- 5) S. Fukuoka, K. Hosaka, O. Kamijima: *Japan J. Genet.*, 67, 243 (1992)

- 6) 大坪研一, 藤井剛, 橋野陽一, 豊島英親, 岡留博司, 中村澄子, 布施隆, 川崎信二: 日本食品科学工学会誌, 46, 117 (1999)
- 7) 松永孝光, 柴田清弘, 山田順一, 新村裕: 日本食品科学工学会誌, 46, 187 (1999)
- 8) 大坪研一, 中村澄子, 今村太郎: 日本食品科学工学会誌, 76, 388 (2002)
- 9) G. Zhng, T. S. Bharai, Y. Lu, S.S. Virmani, N. Hung: *Theor. Appl. Genet.*, 94, 27 (1997)
- 10) G. Zhng, E. R. Angeles, M. L. p. Abenes, G. S. Khush, N. Hung: *Theor. Appl. Genet.*, 93, 65 (1996)
- 11) 島本功, 佐々木卓治: “新版 植物のPCR実験プロトコール”, p. 34 (1997), (秀潤社)
- 12) 柳下良美, 北宜裕, 藤代岳雄, 本澤安治, 笹隈哲夫, 真子正史, 矢吹駿一: 育種学雑誌 別冊 1, 48, 123 (1998)