

RAPD マーカーを利用した ボタン主要品種の識別

杉山 万里*

Discrimination of main kind Cultivars in tree Peony (*Paeonia suffruticosa*)
by RAPD marker

Mari Sugiyama*

I 緒 言

島根県の県花に指定されているボタンは、1955年頃シャクヤクの苗にボタンの芽を接ぎ木する方法が開発されてから量産が始まった。県内のボタン生産のほとんどを占める八束町は、国内最大のボタン産地として年間約180万本の苗木を生産し、海外にも輸出している。しかしながら近年、原産国である中国の低価格ボタン苗の輸出増加や、国内では新潟県産ボタンの台頭など、八束町の独壇場であったボタンのシェアが脅かされつつあり、それに対抗するための対策が急務となっている。低価格化、高品質、新品种の開発等、様々な対応が求められるなか、品種の信頼性の付与も商品の付加価値の一つと考えられる。

現存するボタンの国産品種は約300品種以上とされているが、1990年、日本ばたん協会発刊の「現代日本の牡丹・芍薬大図鑑」により品種の整理がなされるまで、新潟・島根それぞれの産地で同名異種など品種名の混乱があった。今後八束町、新潟県ともに品種育成が続けられるので、品種は増加し続けると考えられる。

ボタン品種の識別は、主に花色や花形などの違いによって行われている。しかしながら、ボタンの品種数は数百におよび、花色、花形が類似しているものも多いため、品種の識別は非常

に難しく卓越した眼が要求される。また、花色花形等は、栽培、環境条件により違いがでることがあり、識別を更に難しいものとしている。花、茎葉の諸形質の形態的な差異に基づくボタン品種の分類（浜田ら、1989）、あるいは花の色素による分類（細木ら、1985）なども行われているが、いずれも個々の品種の同定には至っていない。近年急速に発達したDNAの塩基配列を基にした識別方法は、ボタンのように同一品種はすべて遺伝的に均一（クローンである）な作物には適した方法である。筆者らはPCR-RFLPによるボタン品種の識別を試みている（杉山ら、1996）が、シャクヤク間、種間の識別の可能性は示されたものの、品種間の識別には、多型が得られる増幅部位の検討が必須であり、簡易でないため実用化には不向きであった。

近年、その扱い易さからRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)法(Williamsら、1990)による品種の同定や系統識別が様々な作物で行われてきた。これは、10塩基程度のランダムプライマーを用いたPCRにより塩基配列の違いを検出する方法で、当场でも、今までにワサビ（杉山ら、1995）、ユリ（春木、2000）でRAPDを利用した遺伝子レベルでの系統識別を行っている。ボタンにおいては、RAPD法によりボタン、キボタン及びシャクヤク品種、種間交雑が区別できることが確認されている（細木ら、1997）。そこで本試験では、商品として多く流通している八束町のボ

* 作物部 生物工学科

タン主要45品種について、RAPDマーカーを利用した品種識別と、その実用化に向けての可能性について検討したのでその結果を報告する。

II 現地農家における実態調査

ボタンは同一品種でも花色、花形等に微妙な違いがあり、これが遺伝的なものか環境によるものかは明らかではない。また同一品種を複数購入した場合、他品種が混入している例が時々みられるが、実際どの程度混入しているかを明らかにしておく必要がある。そこでRAPD法を用いて、ボタン苗における混種の実態を把握するため、また同一品種における花色、花形等の微妙な違いを確認するための現地調査を行った。

1. 材料及び方法

供試品種は、‘花王’ ‘連鶴’ ‘島錦’ とし、‘花王’ については14戸 (A~N) , ‘連鶴’ は14戸 (A~N) , ‘島錦’ は12戸 (A~K, M) の農家を選定して分析材料を採取した。最盛期

のボタン成葉細胞中にはDNAの抽出を阻害するフェノール物質、多糖類等が多く存在するため、供試部位は細胞の活動が停止している冬芽とした。各農家あたり3株の採穂用母樹からそれぞれ1個の冬芽を採取した。さらに、14農家の内4戸(D, G, I, J)からはそれぞれの品種とも10株より各1芽ずつ採取した。このほか、‘花王’ については島根大学内の栽培個体を比較に用いた。また、ここで調査した‘花王’ は農家によって花形が異なる株、‘島錦’ については絞りが白色と赤色、桃色と赤色のそれぞれ花色の異なる株を含んでいた。

PCRのテンプレートとなる全DNAはボタンの冬芽の芽鱗を除いた中心部2~5mm程度(5~20mg)から、HEPES, PVPによる洗浄とCTABminiprep (Nealら, 1993) を組み合わせ、若干の修正を加えた方法(図1)で抽出した。抽出した全DNAはTEバッファー(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0) に溶解し、濃度を50ng/ μ lに調整した後、-30°Cで保存しそれぞれ試験に供した。

抽出したボタンの全DNAをテンプレートとして、10塩基のランダムプライマー(図2)を用

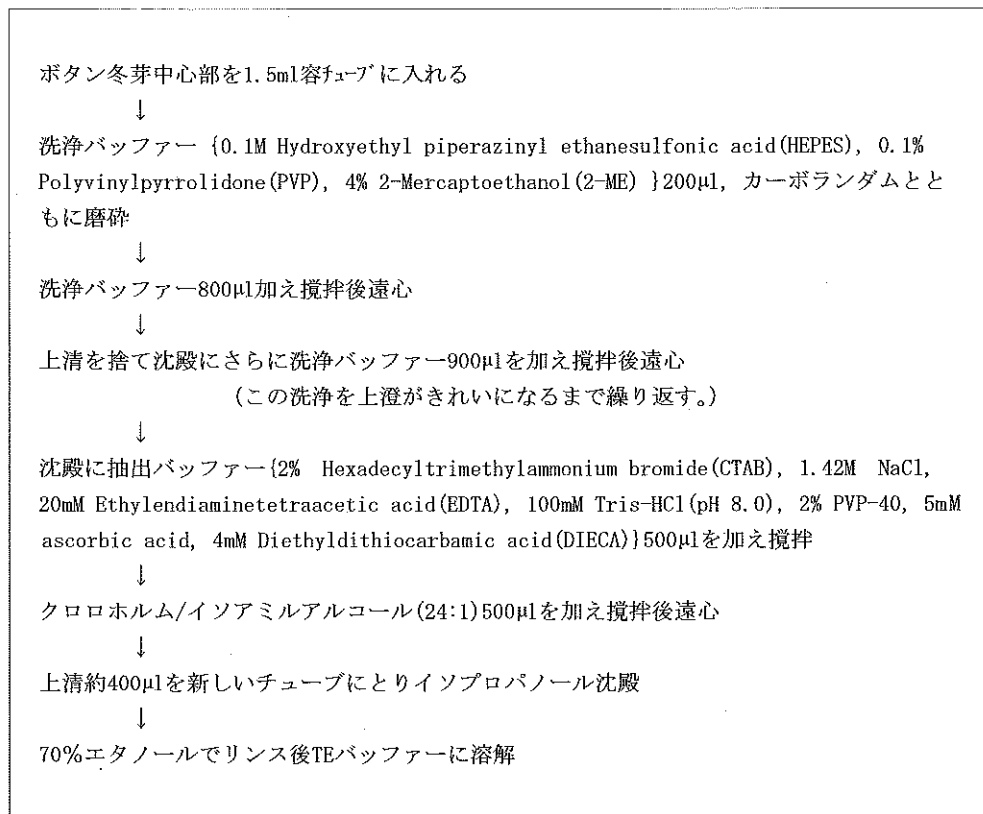


図1 洗浄法とCTABminiprepを併用した全DNA抽出方法

#110 :5'-TGTGAAACCC-3', #121 :5'-ATGGCCACTC-3', #122 :5'-ATGTCGACGC-3'
 #123 :5'-TCGACGCCGG-3', #124 :5'-AGAAGCACGC-3', #126 :5'-GTCGGGTGAA-3'
 #127 :5'-GTTGCCATTG-3', #128 :5'-AGCGACGCTG-3', #129 :5'-CTGCGGTCGT-3'
 #130 :5'-TCGCCTTAAC-3', #131 :5'-ACCACCTGGC-3', #133 :5'-CAGGAAACAG-3'
 #135 :5'-TCTCCGCTTG-3', #136 :5'-CCGAACACGG-3', #139 :5'-CCTCTCGACA-3'
 #140 :5'-CATACCGTGG-3', #141 :5'-TGAGCCTCAC-3', #142 :5'-AAGCCCGAGG-3'
 #143 :5'-ACTCTGCGA-3', #144 :5'-GTCCCGTGGT-3', #145 :5'-CCACACTACC-3'
 #151 :5'-GGACACCACT-3', #152 :5'-AAGCGGCCTC-3', #158 :5'-CGGGTCCCAA-3'
 #163 :5'-AGGCCAGACC-3', #165 :5'-AGCCGCCCAA-3', #167 :5'-GCGGATTGAG-3'
 #169 :5'-GAGTCCTGTC-3', #179 :5'-GGGCTGGTCCA-3', #180:5'-GGGTTGGGGA-3'

図2 使用したプライマーの塩基配列

いてPCRを行った。PCR反応液組成は、テンプレートDNA 50ng, 10×PCRバッファー 2.5μl, 25mM MgCl₂ 2.5μl, 各25mM dNTPs溶液 0.25μl, 0.1μMプライマー 0.5μl, rTaqDNAポリメラーゼ (TOYOBO) 0.2μl, 最終容量を25μlとした。サーマルサイクラーは、PJ2000 (PERKIN ELMER) と TP3000 (TaKaRa) を用いた。反応は94℃ 2分を1サイクル後、94℃45秒, 42℃ 1分, 72℃ 1分を45サイクル, 最後に72℃ 5分を1サイクル行い4℃で保持した。

増幅したPCR産物は、5%のポリアクリルアミドゲルを用いてTAEバッファー (40mM Tris-acetate pH8.0, 1mM EDTA) で電気泳動後、100μg/lのエチジウムブロマイドを含むTAEバッファーで染色し、UVにより検出した。

2. 結果

冬芽は細胞が小さいため、少量のサンプルから大量のDNAを得ることができた。図3に抽出したDNAの吸収スペクトルを示した。260nmが核酸, 280nmがタンパク質, 230nmは多糖類など不純物による吸光であるが, 280nm, 230nmの吸光度とも260nmの吸光度のほぼ2分の1であった。

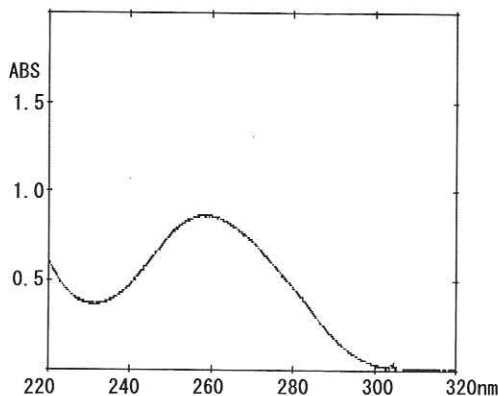


図3 抽出したDNAの吸収スペクトル

また、図4に示すとおり、DNAの分解、RNAバンドの検出とも認められず、このサンプリング部位と抽出方法により、安定して比較的純度の高い約20~300μgの全DNAが得られた。

RAPD分析の結果、再現性がないプライマーとバンドが検出できなかったプライマーを除き、‘花王’は22 (#110, #121, #122, #124, #128, #130, #131, #133, #136, #139, #140, #141, #142, #143, #144, #145, #152, #163, #165, #169, #179, #180), ‘島錦’では16 (#121, #122, #123, #124, #126, #127, #129, #130, #131, #136, #141, #144, #145, #151, #152, #158, #163, #165) のプライマーで、すべての農家からサンプリングした個体で同一のパターンを示した (図5)。同一農家でサンプリング個体数を増やして調べた結果も同様で、‘花王’ ‘島錦’の2品種とも株毎に差はみられなかった。このことから‘花王’ ‘島錦’にみられた花型, 花色の違いは品種の違いによるものではなく, 栽培・環境条件等に由来するものか, または枝変わりなどの突然変異の可能性が高いと考

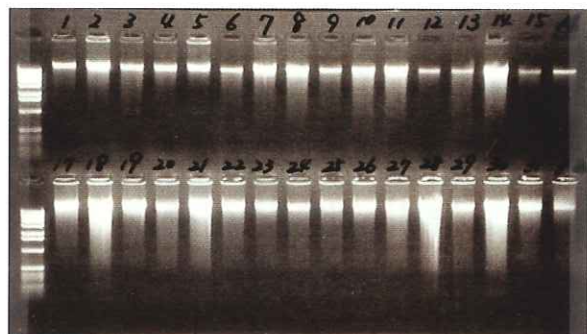


図4 抽出したDNAの電気泳動写真

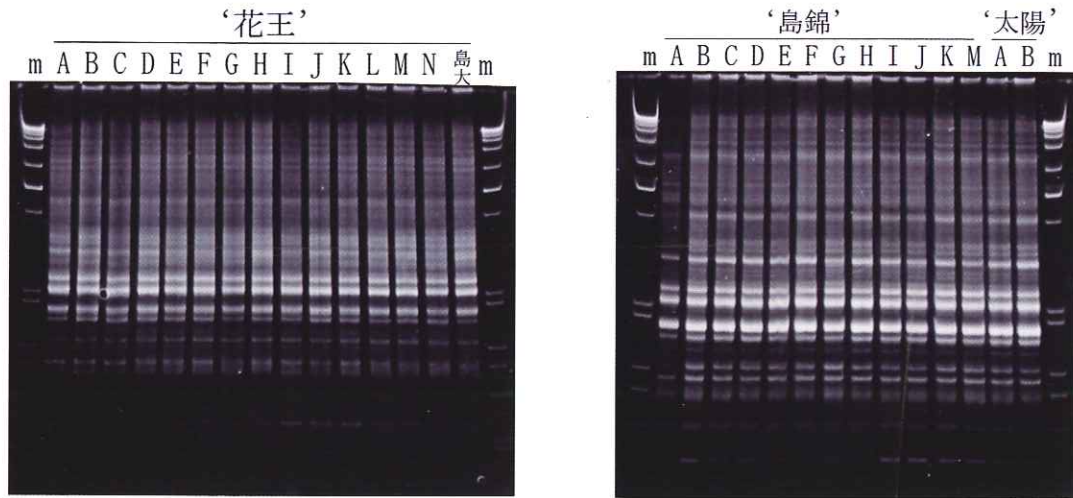


図5 '花王', '島錦'の農家別 RAPD パターン(プライマー#136)
m は分子量マーカー (TOYOBO 1kbp ラダー)

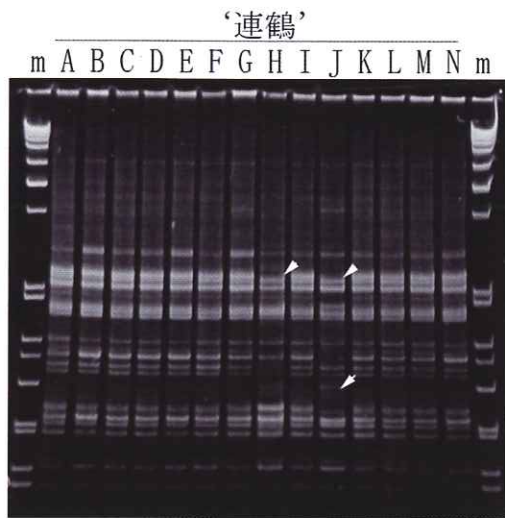


図6 '連鶴'の農家(A~N)別 RAPD パターン
(プライマー#136)
m は分子量マーカー

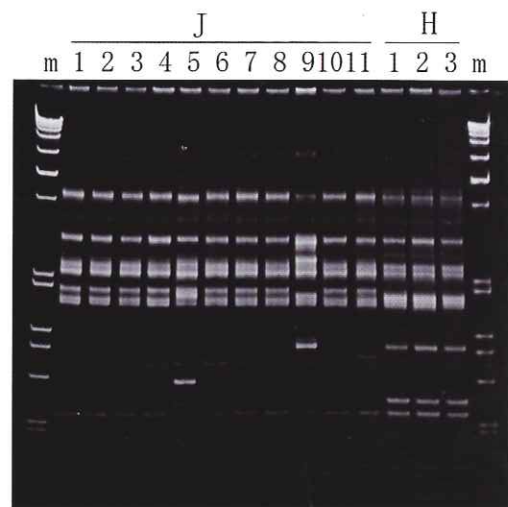


図7 '連鶴' J農家, H農家個体毎(J-1~11, H-1~3)の RAPD パターン(プライマー#136)
m は分子量マーカー

えられた。

図6に'連鶴'のRAPD分析の結果を示した。14戸の農家の内, H, Jの2戸で異なったパターンを示した。Jについて, さらに個体を増やして調べた結果, J-9は12戸の農家の'連鶴'と同じパターン, J-5では別のパターンが現れた。Hで残りの2個体を調べた結果いずれもH-1と同様のパターンを示した(図7)。このことは, H農家では異なる品種を'連鶴'として栽培し, J農家では'連鶴'の中に異なる品種が混ざっていた可能性を示している。'連鶴'のように花色の白い品種では特に品種間の区別が付きにくいから, 品種の取り違えが起りやすいと考えられる。

III 主要45品種識別のための RAPDマーカー検索

流通現場でのRAPDマーカーによる品種識別の可能性を調査するために, 現在流通しているボタン45品種について, 市販のランダムプライマーを利用してマーカー検索を行った。

1. 材料及び方法

供試したボタンは, 八束町ホームページに記載されているものを参考に, 販売上重要だと思われる45品種(図10)を選定した。サンプリングは, 八束町の品種参照圃場として展示栽培されている圃の個体から行い, テンプレートDNAは, 冬芽を用いて洗浄を加えたCTABminiprep

(図1) で抽出した. 抽出した全DNAはTEバッファに溶解し, 260nmの吸光度により濃度測定後, 50ng/μgに調整した. それを, -30°Cで保存しそれぞれ試験に供試した.

PCR反応液組成は, テンプレートDNA 50ng, 10×PCRバッファ 2.5μl, 25mM MgCl₂ 2.5μl, 各25mM dNTPs溶液 0.25μl, 0.1μMプライマー 0.5μl, Taqポリメラーゼ (TOYOBO) 0.2μl, 最終容量を25μlとした. PCR反応は94°C 2分を1サイクル後, 94°C45秒, 42°C 1分, 72°C 1分を45サイクル, 最後に72°C 5分を1サイクル行い4°Cで保持した. ここで用いたランダムプライマーは, オペロン社製ランダムプライマーキット OPA, OPB, OPC, OPD計80個を用いた.

検出はエチジウムブロマイド25ng/mlを含む1×TAEバッファ2.0%アガロース (sigma Type 1) ゲルで電気泳動後, UVにより行った. 電気泳動用ゲルは, 煩雑なポリアクリルアミドに換えて, 取り扱いの容易なアガロースゲルを用いた.

RAPDマーカーは, 検出を2回以上反復するこ

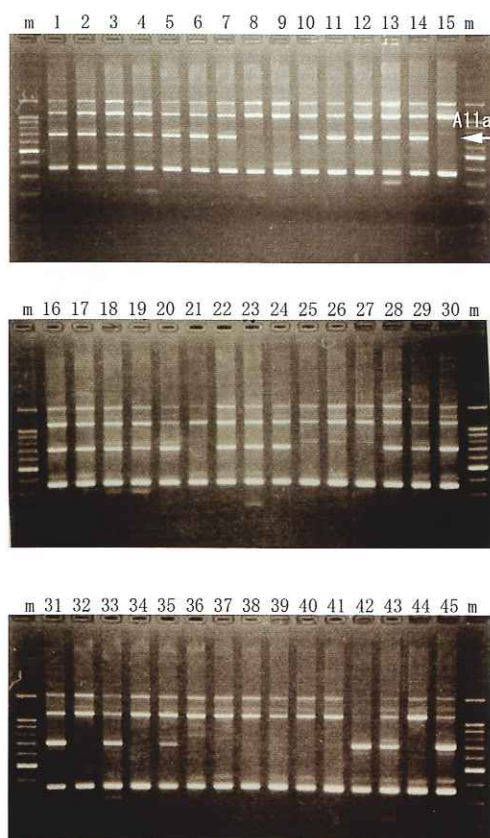


図8 主要45品種のRAPDパターンの例 (プライマー OPA11)
mは分子量マーカー

とにより再現性のよいバンドを選定した.

2. 結果

図8に例を示すとおり, プライマー80本から得られたバンドのうち約60本のバンドで品種毎の多型を検出した. それら多型を示すプライマーの中から, 再現性のよい19プライマー33本のバンドを選定しRAPDマーカーとした. 図8と図9に示した11種類のプライマー (A07, A11, A16, A19, B11, B13, C06, C09, C12, C13, C14) から選抜した14本のRAPDマーカーによって, 44品種を識別することができた. そのうち‘太陽’とその枝変わり品種である‘島錦’は, 一つのグループとして他の品種との識別が可能であった (図10). マーカーNo.は, プライマーの番号にアルファベットをバンドの長い方から順に付記し, バンドが検出できたものを+と表示した.

IV RAPDマーカーのSCARマーカー化

再現性のよいマーカーを選定しているとはいえ, RAPD検出のためには, テンプレートDNAの純度や濃度の斉一化, ピペッティング操作等の熟練などにより再現性の確保が重要である. そのため, 実験を反復して行う必要があり, そのことが煩雑化の一因となっている. 20塩基程度の特異的なプライマーを用いた通常のPCRでは再現性がよく, DNAの状態 (濃度, 純度) に影響されない簡易なバンドの検出が可能となる. SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) マーカー化 (Paranら, 1993) は, ランダムプライマーにより増幅された品種特異的なRAPDマーカーの塩基配列を決定後, その内部配列を増幅できるような20mer程度の新たなプライマー (nestedプライマー) を作成し, PCR反応により目的とするDNAマーカーを増幅できるようにしたもので, RAPDマーカーにはない高い再現性を持たせることができる. そこで, 今回の実験で検出したRAPD断片の塩基配列をもとに特異的プライマーを再デザインし, それを用いたSCARマーカーによる品種識別の可能性を検討した.

1. 材料及び方法

合成プライマー#143 (5'-ACTCCTGCGA-3') を用い, テンプレート‘玉簾’の全DNAにより増幅

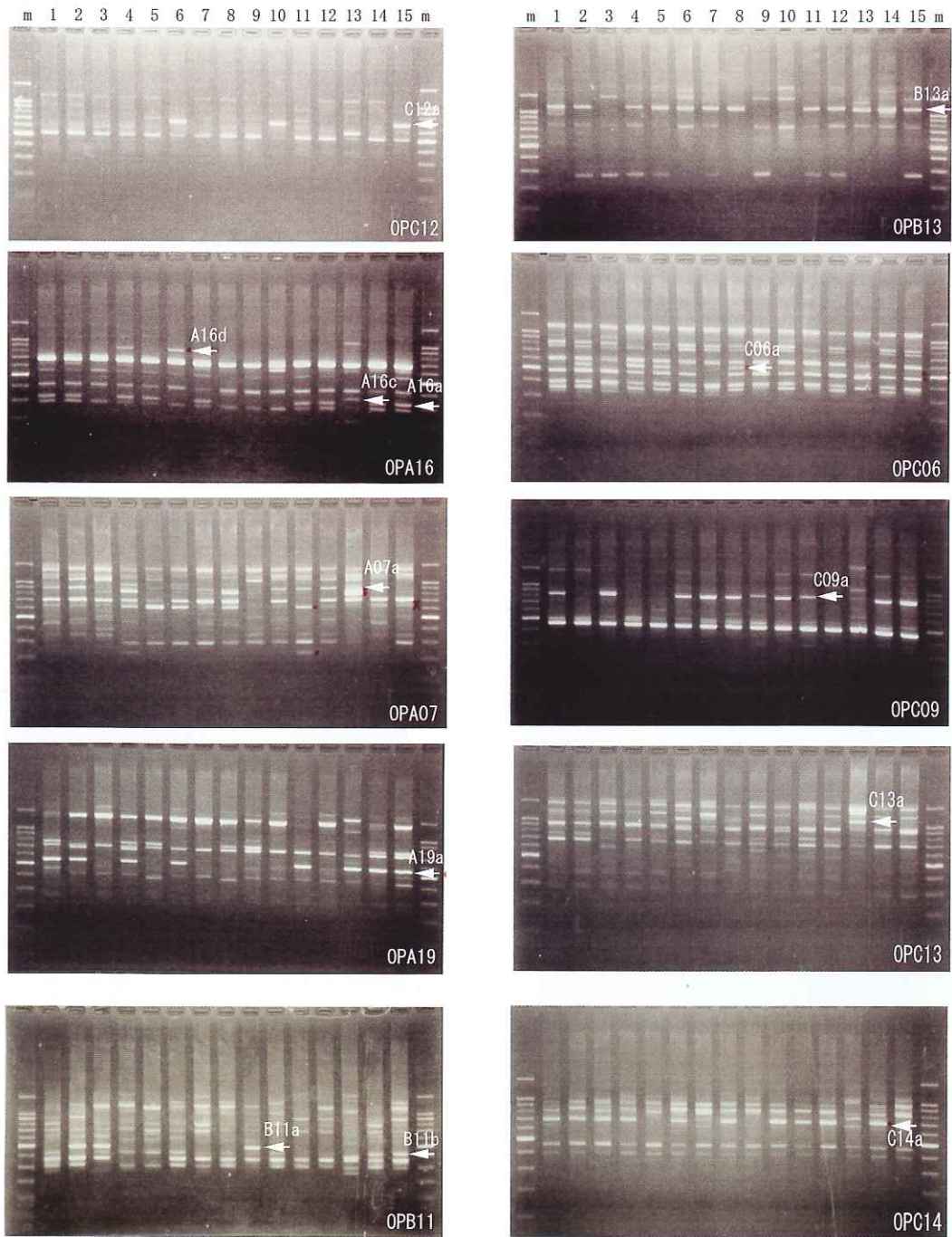


図9 選定したRAPDマーカー

1: '島錦' 2: '八束獅子' 3: '島輝' 4: '島娘' 5: '光輝獅子' 6: '島の夕映'
 7: '新島輝' 8: '豊麗' 9: '八雲' 10: '天衣' 11: '花王' 12: '花競' 13: '金閣'
 14: '太陽' 15: '吉野川' mは分子量マーカー

マーカーNo.	A11a	B13a	C14a	C09a	A16a	A19a	B11a	B11b	C12a	C06a	C13a	A16c	A16d	A07a
1 太陽	+	+	+	+	+	+	+	+						
2 島錦	+	+	+	+	+	+	+	+						
3 日暮	+	+	+	+	+	+	+							
4 花王	+	+	+	+	+	+								
5 新桃園	+	+	+	+	+									
6 島の夕映	+	+	+	+		+		+	+		+		+	
7 朝日港	+	+	+	+			+	+	+					
8 島娘	+	+	+		+	+	+			+			+	+
9 八千代椿	+	+	+		+	+		+	+					
10 八東獅子	+	+	+		+	+				+				
11 新七福神	+	+	+		+		+				+			
12 花競	+	+	+		+									
13 新島輝	+	+		+	+		+							
14 連鶴	+	+		+		+	+				+			
15 世々の誉	+	+		+										+
16 紅輝獅子	+	+			+					+				
17 金閣	+	+				+	+				+	+		+
18 金鷄	+	+				+	+				+	+		
19 白王獅子	+		+	+	+	+	+		+	+	+			
20 月世界	+		+	+	+	+	+			+				
21 扶桑の司	+		+	+	+	+	+							
22 御所桜	+		+	+	+	+		+	+					
23 玉芙蓉	+		+	+	+	+		+						
24 玉簾	+		+	+	+			+	+					+
25 島根聖代	+		+	+		+								
26 天衣	+		+	+				+	+					
27 島輝	+		+	+										
28 八重桜	+		+		+			+	+					
29 島の藤	+				+	+	+			+				
30 麟鳳		+	+	+	+	+								
31 豊麗		+	+	+			+	+		+				+
32 鎌田藤		+	+	+			+	+		+				
33 群鳥		+	+	+							+			
34 ハイヌーン		+	+	+								+		
35 初鳥		+	+	+									+	
36 日月錦		+	+	+										
37 芳紀		+	+		+									
38 皇嘉門		+	+											
39 吉野川		+		+	+	+		+	+	+				
40 島大臣		+		+	+									
41 金晃		+		+						+		+		+
42 黒光司		+		+										
43 鎌田錦			+	+										
44 八雲				+										
45 黒竜錦														

図 10 RAPD マーカーによるボタン品種の DNA タイピング

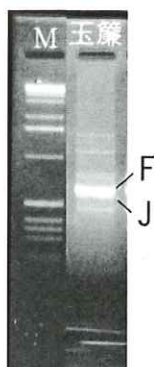


図11 SCAR マーカー化のために選定した RAPD マーカー F, J (テンプレート‘玉簾’,プライマー#143) Mは分子量マーカー

したPCR産物をMCカラム(ミリポア)で回収し、Tベクター(pT7Blue, TaKaRa)に連結(ライゲーションligation)した(Ligation Kit ver.2, TaKaRa). そのプラスミドをE. coli JM109に形質転換し、ユニバーサルプライマーを用いたダイレクトPCRによりプラスミドに挿入されたPCR産物の長さを確認した。クローニングできたPCR産物の内、品種間差を示す断片の塩基配列を決定し、その配列をもとにしてnestedプライマーを設計した。ボタン各品種の全DNAをテンプレートにして、合成したnestedプライマーを用いてPCRを行った。

PCR反応液組成は、テンプレートDNA 50ng, 10×PCRバッファー 1μl, 25mM MgCl₂ 1μl, 各25mM dNTPs溶液 0.05μl, 0.01μMプライマー 各3μl, Taqポリメラーゼ(TOYOBO) 0.05μl, 最終容量を10μlとした。PCR反応は、94℃45秒, 55℃1分, 72℃1分を25サイクル, 最後に72℃

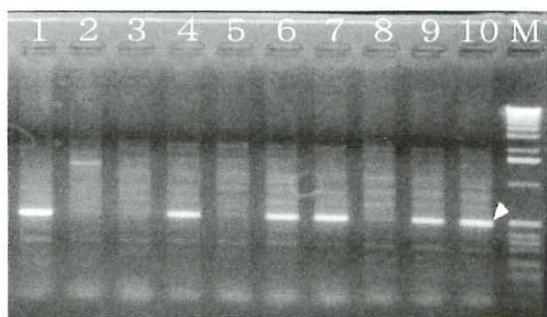


図13 プライマー#116+#117により増幅したバンド

- 1: ‘玉簾’ 2: ‘金晃’ 3: ‘出雲の誇’
4: ‘白峰’ 5: ‘初日’ 6: ‘戸川寒’
7: ‘新花大臣’ 8: ‘鎌田錦’ 9: ‘新桃園’
10: ‘吉野川’ M:分子量マーカー

143J	
sense	#112 5'-CCTGCGAATGAAGTCGTCTGATC-3'
	#113 5'-CTTGGTGTGATGCTTGCGTGC-3'
antisense	#114 5'-CATGGTCTCGATTAGTCTCATTGGG-3'
143F	
sense	#115 5'-GTAAGGAAGAGCATGGGGAGTATC-3'
	#116 5'-CATTGTGGAGCATATTGGGAGG-3'
antisense	#117 5'-CAGATCTCCAGGTCGGTCAGGG-3'
	#118 5'-CCGAGCATCACCTAACCTCC-3'
	#119 5'-CATTGGTCACTCCTGTAACGCC-3'

図12 RAPD マーカー F, J のシーケンスから設計した nested プライマー (テンプレート‘玉簾’,プライマー#143由来)

5分を1サイクル行い4℃で保持した。検出はエチジウムブロマイド25ng/mlを含む1×TAEバッファー1.5%アガロースゲルで電気泳動後、UVにより検出した。

2. 結果

合成プライマー#143と‘玉簾’の全DNAをテンプレートにしたRAPD分析の結果を図11に示した。そのPCR産物から、300bp~1.5kbpまでの14本のバンドがクローニングされ、その中の2本のDNA断片(約700bp) F, J (図11)を対象にSequencer (Pharmacia A. L. F. DNasequencerII)により塩基配列を決定した。

図12に、約700bpのRAPDマーカー#143F, Jの塩基配列をもとに設計したnestedプライマーを示した。Jのバンド由来の特異的プライマー3本(センス#112, #113, アンチセンス#114), Fのバンド由来の特異的プライマー5本(センス#115, #116, アンチセンス#117, #118, #119)それぞれを組み合わせPCRを行った。組み合わせによっては、すべての品種でバンドが検出されるもの、いずれの品種もバンドが検出できなかったもの、バンドの有無は確認できるが極めて薄いもの等があった。その中で、図13に示した#116+#117のプライマーの組み合わせでのみ安定してバンドが確認され、バンドの有無により品種の識別が可能であった。以上の結果から、SCARマーカーは品種の識別において有効な方法であることが明らかとなった。

V 簡易検定法の開発

RAPDにより増幅したPCR産物の塩基配列をもとに設計したSCARプライマーが、検出の簡易さの面から識別の実用化に有効であることが認められたが、すべてのRAPDマーカーをSCARマーカー化するためには莫大な労力と費用がかかるため、実際の利用にはRAPDが適していると考えられた。そこで、さらなるRAPDの省力化・費用の軽減をめざし、RAPDの回数を減らすための品種・プライマーの選定と、あらかじめ反応液を混合したもの（プレミックス）を利用することにより再現性の向上と操作の簡略化を検討した。

また、検出に用いるエチジウムブロマイドは発ガン性が指摘されているため、廃液等の処理が煩雑である。危険な試薬等が使えない場合を想定し、エチジウムブロマイドに代わる試薬として安全性の高いSYBER GOLD (TaKaRa) を検討した。

1. 材料及び方法

1) 品種・プライマーの選定とプレミックス利用の検討

44品種の識別が可能なRAPDマーカーをすべて含むように、‘島娘’ ‘ハイヌーン’ ‘白王獅子’ ‘島の夕映え’ ‘太陽’ ‘吉野川’ ‘黒竜錦’ ‘金晃’ ‘島の藤’ の9品種を選定した。供試44品種を区別するためのRAPDマーカーが検出できる11種類それぞれのプライマー毎に、プライマー、rTaqバッファー、MgCl₂、dNTPsを含むプレミックスを作り-30℃に保存した。使用時に解凍し、rTaqDNAポリメラーゼ (TOYOBO) を加え、サンプル毎に分注後、テンプレートを加えPCRを行った。

さらに上記プレミックスからプライマーを除いたものをあらかじめ作成し、rTaqDNAポリメラーゼ、テンプレートを加えサンプル毎に分注した後、プライマーを加えPCRを行った。

PCR反応液組成は、テンプレートDNA 50ng, 10×PCRバッファー 2.5μl, 25mM MgCl₂ 2.5μl, 各25mM dNTPs溶液 0.25μl, 0.1μMプライマー 0.5μl, rTaqDNAポリメラーゼ (TOYOBO) 0.2μl, 最終容量を25μlとした。PCR反応は94℃ 2分を1サイクル後、94℃45秒, 42℃ 1分, 72℃ 1分

を45サイクル、最後に72℃ 5分を1サイクル行い4℃で保持した。

検出はエチジウムブロマイド25ng/mlを含む1×TAEバッファー2.0%アガロースゲルで電気泳動後、UVにより行った。

2) 染色試薬SYBR GOLD (TaKaRa) の検討

PCR反応液組成は、テンプレートDNA 50ng, 10×PCRバッファー 2.5μl, 25mM MgCl₂ 2.5μl, 各25mM dNTPs溶液 0.25μl, 0.1μMプライマー 0.5μl, Taqポリメラーゼ (TOYOBO) 0.2μl, 最終容量を25μlとした。PCR反応は94℃ 2分を1サイクル後、94℃45秒, 42℃ 1分, 72℃ 1分を45サイクル、最後に72℃ 5分を1サイクル行い4℃で保持した。

増幅したPCR産物は染色液を含まないTAEバッファー2%アガロースゲルで電気泳動し、20μlのSYBR GOLDを含むTAEバッファー200ml中で20分振とうし染色後、UVで検出した。

2. 結果

1) 品種・プライマーの選定とプレミックス利用の検討

プレミックスを用いて、名称不明の品種を含む10品種からプライマーOPA11を使いRAPDマーカーを検出した例を図14に示す。ここで識別したい不明品種はA11aのマーカーがない‘ハイヌーン’ ‘吉野川’ ‘黒竜錦’ ‘金晃’ のいずれか、あるいは未知品種ということになる。これをRAPDマーカーが検出できる11個のプライマーすべてについて行い、あらかじめタイピングした品種とのマーカーを比較することにより、43品種のいずれか、またはそれ以外の品種

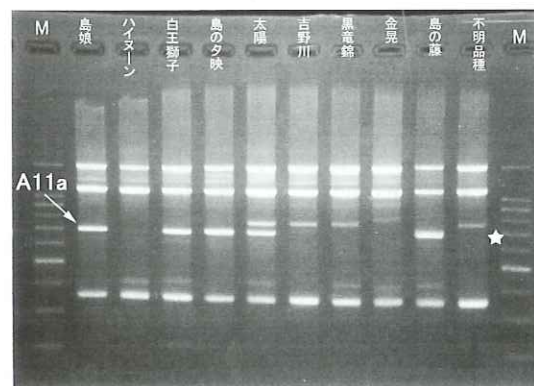


図14 マスターミックスAを利用したRAPDマーカー検出
Mは分子量マーカー

I : A08 A11 B01 B05 B08 B11 B17 B20 C06 C12 C16 D01D06 D14 D20
 II : A07 A16 A17 A19 B04 B09 B13 B18 C07 C09 C13 C14 D12 D15 D16

図15 品種確認用プライマーセット

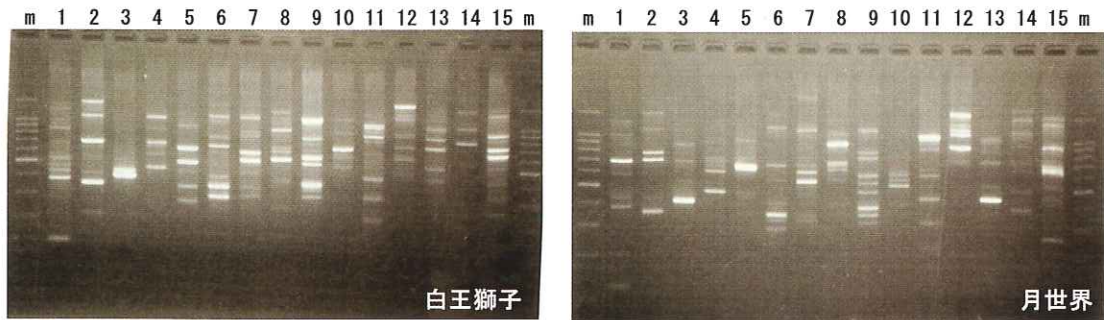


図16 プライマーセットIによるRAPDパターン(テンプレート‘白王獅子’‘月世界’)

1:A08, 2: A11, 3: B01, 4: B05, 5: B08, 6: B11, 7: B17, 8: B20, 9: C06,
 10: C12, 11: C16, 12: D01, 13: D06, 14:D14, 15: D20, m:分子量マーカー

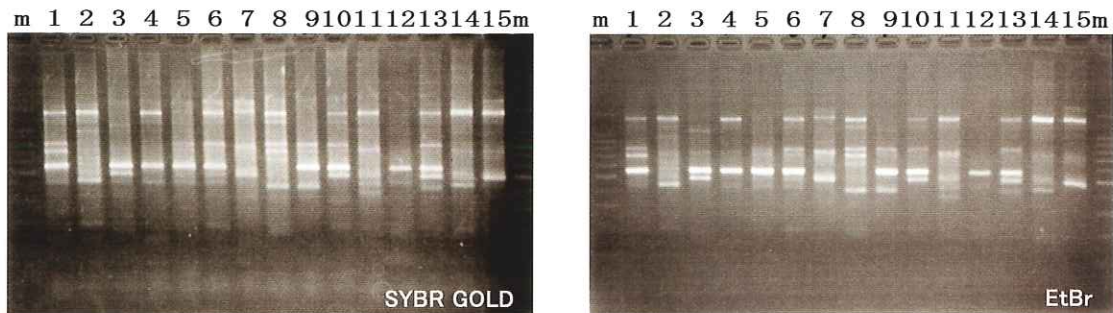


図17 染色試薬の違いによるRAPDパターン

1: ‘島娘’, 2: ‘ハイヌーン’, 3: ‘白王獅子’, 4: ‘島の夕映え’, 5: ‘太陽’
 6: ‘吉野川’, 7: ‘黒竜錦’, 8: ‘金晃’, 9: ‘島の藤’, 10: ‘御所桜’, 11: ‘鎌田藤’
 12: ‘金閣’, 13: ‘月世界’, 14: ‘島輝’, 15: ‘皇嘉門’, m:分子量マーカー

かの識別が可能であった。さらに、あらかじめRAPDのパターンがわかりやすいプライマーを選定し(図15)、それを用いて作成したプレミックスによりRAPDを検出した(図16)。ここで、マーカーで推測される品種と識別したい個体を、マーカーのバンドだけでなく、検出したすべてのバンドを濃淡も含めたパターンとして比較することにより、品種の確定はより確かなものにできた。RAPDマーカー及びRAPDパターンの検出とともに、常法とプレミックスを利用した場合のバンドの違いは認められず、これらRAPDの検出は、あらかじめ酵素、DNAを除いた反応液を作成しておくことによって、操作の簡易化が実現できると同時に、ピペッティング操作等実験従事者に起因する誤差の軽減により再現性が向上した。また、マーカーをすべて網羅した上で

比較品種を絞ることと、プライマーの選定により、RAPDの回数を減らし費用の軽減が可能であった。これら操作に要する時間は、DNA抽出の濃度調整までがサンプル24~48個で1日。サーマルサイクラー1台につき検出まで1日(反応液調整30分、反応4.2時間、検出1~2時間)となった。

2) 染色試薬SYBR GOLD (TaKaRa) の検討

SYBR GOLDを後染色に用いると、エチジウムブロマイド染色に比べ、レーン毎のバックグラウンドは高い傾向にあったが、DNA多型の検出は可能であった。また、泳動パターンに違いは認められず(図17)、常法に代えて、マーカーの検出、RAPDパターンの染色に使えることが明らかとなった。

VI 考 察

RAPD, RFLP分析をはじめとするDNAの塩基配列を利用した品種・系統識別は、栽培環境やサンプリング部位に影響されないことなどから、近年果樹、野菜をはじめとして様々な作物に利用されている(羅ら, 1995, 藤本ら, 1996, 田中ら, 2000, 徳永ら, 1996)。花卉においても、ユリ(春木, 2000), リンドウ(城守ら, 2000), スイートピー(花田ら, 2000), シヤクヤク(細木ら, 1997)等, RAPD分析による系統解析が行われているが、現在のところその利用のほとんどは育種への基礎的知見を得るに止まっている。

これまでボタンでは花色, 花形, 葉の形などの形態による多変量解析(浜田ら, 1989)や, 花の色素(細木ら, 1985)により品種分類等が行われてきた。しかしながら, これらの方法では遺伝的差異を数値化することは可能でも, 個々の品種を明確に識別することはほとんど不可能である。そのため現状では, 熟練者による識別に頼らざるを得ないが, 今後品種の増加に伴い, 類似した品種の花色, 花形, 葉の形などの形態等による識別はますます困難になると予想される。DNAを利用した識別は, ボタンのように遺伝的に多様, かつクローンが品種となっているような作物では特に威力を発揮する。また, DNAを抽出する部位を選ばないため, 開花を待たずに識別が可能であること, 栽培・環境条件に左右されないこと, 経験を必要としないこと等のメリットがある。

RAPD法によるボタンの品種比較の可能性は, 細木らにより品種の区別と相互間の類似値が明らかにされているが, 本試験では実用化を踏まえ, 流通品種のボタンについてRAPDマーカーを利用した品種識別を試みた。

これまで八束町が独占的に行ってきたボタン苗販売も, 他産地の台頭が顕著になってきている。苗販売の優位性を保つためには, 苗の品種の正確さは最も大きな要素と考えられる。今回, 現地における品種管理の実態を調査したところ, ‘連鶴’で農家により異なるパターンが検出された。これは, 同じ名称でも異なる品種

が混入している可能性を示すものである。また, ‘花王’‘島錦’でみられた花色, 花形の違いは, 栽培環境等の条件の違いか, 突然変異による可能性が高いものと推察された。今後, ボタン苗の品種の正確さを期すためには, 接木時の穂木の採り違いやその後の混種による混乱を防ぐための対策, 生産者の意識改革等も必須である。

本試験で, 流通対象となっているボタン45品種について, 14本のRAPDマーカーにより, 枝変わり品種を除く44品種の識別が可能となり, これらRAPDマーカーの有効性が明らかとなった。特に, ‘吉野川’と‘御所桜’のように目視による識別が難しいとされる, 外観が酷似した品種も容易に識別が可能であり, また外観上差異が少ない苗段階での識別も容易であった。逆に, 同一品種とされていながら, 花形, 花色が異なる個体について, 別品種であるか, 同一品種ないしは突然変異であるかを検定できる可能性があった。このことから, RAPD法がボタンの品種識別に非常に有効であると考えられる。今後, 状況に応じて新たに識別したい品種が発生した場合も, マーカーを増やすことにより対応が可能である。本実験で使用したランダムプライマーでは‘太陽’とその枝変わり品種とされる‘島錦’は他品種との区別はできるものの, それぞれの識別はできなかった。枝変わり品種については, これまでに, パナナ(Kaemmerら, 1992), レモン(Yangら, 1995)などの突然変異体がRAPD分析により識別可能であることが報告されている。RAPD法が枝変わりにより生じた品種の識別にも有効である可能性は否定できないが, 遺伝子レベルでの大きな違いが期待できない両品種間を識別できるランダムプライマー探索のためには, 過大な労力が必要である。とはいえ, 枝変わり品種の識別のみならず, 前述の‘花王’‘島錦’など, 今後このような問題に対応するためには, 遺伝的差異が小さくても識別可能な技術の開発が必要である。

RAPD法の再現性の不安定さはこれまでも幾度となく指摘されてきた。それに変わるマーカーとしてリンドウ属の識別にSCARマーカー利用の可能性が検討されている(城守ら, 2000)。本試験で, RAPDのSCARマーカー化を試

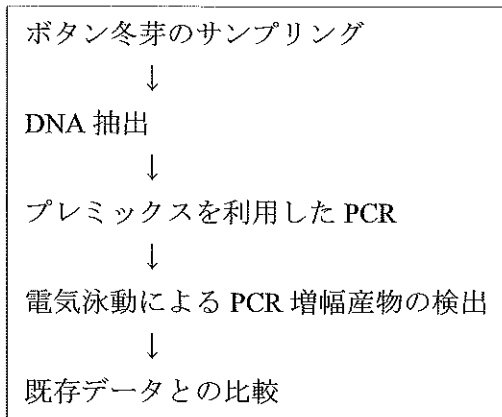


図18 RAPD法によるボタン品種識別手順

みた結果、検出の簡易さの面からはSCARプライマーが識別の実用化に有効であることがわかった。しかしながら、すべてのRAPDマーカースCARマーカ化するために膨大な労力とコストがかかることから、この方法は現実的といえない。今後、表現形とリンクしたRAPDマーカ等が見出されるならば、そのSCARマーカ化は育種の現場において実用的なものとなるであろう。

SCARマーカに代わるものとして検討したプレミックスの利用は、クロスコンタミネーションの防止や、ピペッティング誤差の軽減、操作の簡略化を図る有効な手段となり得た。さらに、マーカ検出による品種の選定、パターン検出による品種の確定とケース分けすることにより、手間、試薬の節約が可能となった。常法の代わりに、SYBR GOLDをDNAの染色に用いることにより、RAPDマーカ及びパターンが検出できたため、コストはかさむものの、発ガン性の指摘、廃液処理等の問題に対応可能であった。

RAPD法による識別の可能性は実用化に向けて一歩近づいた感はあったものの、PCRの手法に特許が取られていることや、コストの面から考えても実用化は簡単とはいえない。しかしながら、今回の試験において、RAPD法によるボタンの品種識別が、今後、混種や品種登録など問題が起きた場合の一つの解決方法として、図18の手順に従って誰でも利用できる方法である可能性が示された。

VII 摘 要

1) ‘花王’, ‘連鶴’, ‘島錦’の3品種について生産現場での実態調査を行い, ‘連鶴’で他品種の混入を確認した。

2) ボタンの主要品種45品種について市販のランダムプライマーkitを用いてRAPDを行い, 11プライマー14本のRAPDマーカにより枝変わり品種‘島錦’を除く44品種を識別することができた。

3) RAPDから作成したSCARマーカが再現性の面から品種識別に有効であったが, RAPDマーカすべてをSCARマーカ化するには膨大な手間と時間がかかることが分かった。

4) 不明な品種の決定や確認にはRAPDマーカとRAPDパターンを併用することにより, 省力, 費用の軽減が可能であった。あらかじめ酵素, DNAを除いた反応液を作成しておくことにより, 操作の簡易化を図るとともにオペレーターの熟練度に起因する結果のバラツキを抑えることができた。また, 検出にはエチジウムブロマイドの代わりに毒性の弱いSYBR GOLDを後染色に用いることができた。

引用文献

- 日本ばたん協会編著 (1990) 現代日本の牡丹・芍薬大図鑑 講談社
- 浜田守彦・細木高志・稲葉久仁雄 (1989) 多変量解析によるボタン品種の形態的分類. 園学雑58(3), 697-704.
- 杉山万里・春木和久・山田員人 (1996) PCR-RFLPを利用したボタンの系統解析の可能性. 園学雑65別1, 358-359.
- Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- 春木和久 (2000) ササユリの培養による増殖及びPCR-RFLP/RAPD分析と育種. 島根農試研報 33, 1-70.
- 杉山万里・春木和久・山田員人 (1995) RAPD-PCRを利用したワサビクローン間の識別. 島根農試研報29, 109-123.

- Hosoki, T., D. Kimura, R. Hasegawa, T. Nagasako, K. Nishimoto, K. Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki (1997) Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Japan Soc. Hort. Sci* 66(2), 393-400.
- C. Neal Stewart, Jr. and Laura E. Via (1993) A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting and Other PCR Applications.
- Paran, I. and R. W. Michelmore (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85, 985-993.
- 羅正栄・米森敬三・杉浦明 (1995) カキの品種同定のためのRAPD分析. *園学雑* 64(3), 535-541.
- 藤本卓矢・山岸博 (1996) RAPD分析による‘スグキナ’のカブ品種との類縁関係の解析. *園学雑* 65(3), 609-614.
- 田中繁男・馬金霞・松下恵介・蓬原雄三 (2000) アブラナ科油糧品種でのRAPD法による種及び品種の同定. *名城大農学報* 36, 39-45.
- 徳永忠士・竹中美香・赤井昭雄 (1996) RAPDマーカーによるスダチとレモンの交雑実生の識別. *徳島果試研報* 24, 13-17.
- 城守寛・中村郁郎・亀谷七七子・高畑義人 (2000) ササリンドウ (*Gentiana scabra*) およびエゾリンドウ (*G. triflora*) のRAPD法およびSCARマーカーによる系統識別. *育種学研究* 2, 81-87.
- 花田裕美・平井正志 (2000) スイートピーと宿根スイートピーのRAPD分析による類縁関係の解析. *園学雑* 69(6), 758-763.
- Hosoki, T., T. Nagasako, D. Kimura, K. Nishimoto, R. Hasegawa, K. Ohta, M. Sugiyama and K. Haruki (1997) Classification of herbaceous peony cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Japan Soc. Hort. Sci* 65(4), 843-849.
- 細木高志・浜田守彦・稲葉久仁雄 (1985) ボタンの花卉色素に基づく品種分類. *園学雑* 55別 2, 304-305.
- Kaemmer, D., R. Afza, K. Weising, G. Kahi and F. J. Novak (1992) Oligonucleotide and amplification fingerprinting of wild species and cultivars of banana (*Musa* spp.). *Bio/Technol.* 10, 1030-1035.
- Yang, H. and H. Schmidt (1994) Selection of a mutant form adventitious shoots formed in X-ray treated cherry leaves and differentiation of standard and mutant with RAPDs. *Progress in temperate fruit breeding*. Kluwer Academic Publishers, 287-290.

Summary

1. Actual condition survey of mixing up within each cultivars in the production spot was performed about three cultivars of peony, 'Kao', 'Renkaku' and 'Shimanishiki', and mixing of other cultivars was confirmed at 'Renkaku'.
2. By making use of 14 markers (from 11 primers), random primer, a commercially available kit, was able to identify 44 kinds of tree peony cultivars out of 45 kinds, which are major cultivars on the market. On the other hand, the kit failed to identify the 'shimanishiki', which had mutated buds.
3. While SCAR markers were reliable in identifying cultivars, SCAR markers from all RAPD were found to take too much time and effort to be practical.
4. Reduction in cost and effort was achieved by the simultaneous adoption of RAPD patterns and markers. The variation of results from operators' skills was minimized by preparing reaction mixture beforehand without adding enzyme and DNA. For the detection, SYBR GOLD that was lower toxicity was able to be used for staining instead of Ethidium Bromide.