

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法による タマネギ品種間内多型の検出

山元義久*・松本純一*・玉木克知*・塩飽邦子*

要 約

DNA 解析法として RAPD 法を用いて、兵庫県作付品種を中心とした33品種を対象に多型検出を行い、タマネギの品種識別の可能性を検討した。

- 1 16種のプライマーによる27マーカーで品種間多型が検出できた。
- 2 各品種5個体ずつを供試した結果、いずれの品種にも品種内多型が認められた。
- 3 8品種については他の全ての品種と区別できたが、その他の品種はいくつかの品種と明確には区別できなかった。

Detection of Intra- and Inter-cultivar Polymorphisms in Onion (*Allium cepa* L.) Evaluated by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis

Yoshihisa YAMAMOTO, Jun-ichi MATSUMOTO, Katsutomo TAMAKI and Kuniko SHIWAKU

Summary

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis was carried out to detect polymorphisms among 33 onion cultivars mainly cultivated in Hyogo Prefecture, and the followings were turned out:

1. Using 16 primers, 27 RAPD markers were detected among 33 cultivars.
2. Intra-cultivar polymorphisms were found in all cultivars using five individuals.
3. Eight out of 33 cultivars were specifically distinguished from others by RAPD markers.

キーワード: Intra- and Inter-cultivar Polymorphism, Onion, RAPD

緒 言

兵庫県淡路島で生産されるタマネギは良食味で全国的に知られている。また、JAS法の改正によりタマネギも産地の表示が義務づけられたが、その表示の適正さを検証する手法は確立されておらず、輸入品を国産と表示するなど産地偽装の恐れが指摘されている。

タマネギはそれぞれの産地に適した品種が作付けされるため、表示内容の疑わしいサンプルの品種を特定することができれば、それが表示の産地のものかどうかを判断する指標の一つになると考えられる。現在のところ、農産物の産地を特定する手法としては、生産物に含まれる成分の分析が主となっているが、PCRを利用したDNA解析の方が操作が簡便であり、それが可能になれば有用性が高いと考えられる。

DNA解析によるタマネギの品種判別については、RAPDマーカーのほかESTマーカーの開発を行った報告²⁾もあるが、今回は、プライマーの入手しやすさ等を考慮して足立と杉村の報告¹⁾にあるRAPDマーカーを中心に検討した。

材料及び方法

1 供試材料

2002年秋に農協から生産者に種子出荷された28品種に、北海道の主要品種である「かむい」と「スーパー北もみじ」の2品種、佐賀県の主要品種である「七宝早生7号」と「ターザン」の2品種、かつて淡路島で生産されていた「淡路中甲高1号」、「淡路中甲高2号」、「淡路中甲高3号」の3品種を加えて供試した。佐賀県の主要品種として取り上げた2品種は兵庫県産の品種にも含まれており、品種数としては計33品種であったが、結果を示した表3では同一品種であっても兵庫県産と佐賀県産とは別

2004年8月31日受理

*兵庫県立農林水産技術総合センター部長(生物工学担当)

に記載した。

2 DNAの抽出

球が入手できた品種については、中心近くの若い鱗片約100mgからDNAを抽出した。球が入手できなかった品種は、実生の子葉を用いた。各品種5個体ずつを供試し、個体毎に抽出を行った。抽出には植物ゲノムDNA抽出キット Nucleon Phytopure (Tepnel社製)を用い、図1に示す方法で行った。

3 DNA増幅断片解析

プライマーは足立と杉村の報告¹⁾にある16種を用いた。PCR反応液は足立と杉村¹⁾の組成を改変し、表1に示す組成で行った。DNAポリメラーゼにはAmpliTaq Gold (パーキンエルマー社)を用いた。PCRにはパーキンエルマー社製 GeneAmp PCR System 9600を用い、そのプログラムを表2に示した。PCR産物は、2~1.5%アガロースゲルを用いて0.5×TBEバッファー中で電気泳動することによりバンドの確認を行った。

- ①球の中心近くの鱗片約100mg または実生の子葉1枚を乳鉢・乳棒で磨砕する。乳鉢・乳棒は-20℃程度に冷やしておく。
- ② Reagent 1 を600 μ l 添加してさらに磨砕し、溶融してから1.5ml マイクロチューブに移す。
- ③ RNase (20mg/ml) を8 μ l 添加する。
↓ボルテックス
↓インキュベート (37℃, 30min)
- ④ Reagent 2 を200 μ l 添加する。
↓転倒混和 (またはボルテックス)
↓振盪しながらインキュベート (65℃, 10min)
↓静置 (氷上, 20min)
- ⑤冷クロロホルムを500 μ l 添加する。
- ⑥ PhytoPURE Resin を100 μ l 添加する。
↓振盪 (室温, 10min)
↓遠心 (14,000rpm, 10min)
- ⑦上清約650~800 μ l を新しいチューブに移す。
- ⑧冷イソプロパノールを700 μ l 添加する。
↓転倒混和
↓遠心 (14,000rpm, 5 min)
- ⑨上清を捨て、沈澱を冷70%エタノールで洗浄する。
↓遠心 (14,000rpm, 5 min)
- ⑩上清を捨てる。
↓スピンドウン
- ⑪ピペットで上清 (ごく少量) を捨てる。
↓真空乾燥 (1~2 min)
- ⑫ TE 100 μ l に溶かす。

図1. Phytopure によるタマネギ DNA 抽出法

結果

RAPD解析の結果を表3に示した。各品種5個体ずつを供試し、全個体でマーカーが確認された場合に+、全個体で現れなかった場合に-、マーカーを持つ個体と持たない個体が混在する場合に△と表記した。また、バンドの濃度が微妙で判断に迷う個体を含む場合は、(+) または (-) と表記した。

足立と杉村の報告¹⁾では16プライマーで28個のマーカーを検出し品種識別に使用していたが、本研究ではそれらの中にはバンドが確認できないか、全個体でバンドが出て多型性の認められないものが10マーカーあった。しかし、足立と杉村の報告¹⁾にはないマーカーが9種検出されたので、計27マーカーが品種間多型を示し品種判別に利用可能であった。

品種内での変異 (品種内多型) が多く認められ、最も多かった「浜育」では27マーカーのうち18マーカー、次いで「スーパーリニア」と「淡路中甲高1号」で17マーカーであった。最も少なかった「ターザン」でも1種、「アース」で2種のマーカーについて品種内多型が認められた。1品種当たり平均8.1種のマーカーについて品種内多型が認められた。

今回の試験結果から、「アース」、「七宝甘70」、「ターザン」、「ターボ」、「もみじ3号」、「T-448」、「ニューセブン」、「緋だまり」の8品種については他のすべての品種と区別できた。残りの品種はいくつかの品種と明確には区別ができなかった。

表1 タマネギ RAPD 反応液の組成

試薬等	液量
10× Buffer II	2.5 μ l
25mM MgCl ₂	1.5 μ l
2 mM dNTP	2.5 μ l
5 U/ μ l DNA Polymerase *	0.25 μ l
10pmol/ μ l Primer	1.25 μ l
5 ng/ μ l DNA 溶液	1.0 μ l
滅菌蒸留水	16.0 μ l
計	25.0 μ l

* AmpliTaq Gold を使用

表2 PCR のプログラム

行程	温度	時間	サイクル数
予熱	95℃	9分	} ×45
熱変性	94℃	1分	
アニーリング	37℃	2分	
	↓	1分40秒	
	47℃		
伸長反応	72℃	3分	}
最終伸長反応	72℃	5分	

考 察

これまでにDNAマーカーによるタマネギの品種識別を行った報告^{1,2,3)}では、いずれも品種間での多型のみ注目し、個体による差(品種内多型)が存在する可能性を考慮せずに品種の識別が可能であると報告していた。本研究では各品種5個体ずつを供試して、個体毎にマーカーの検出を行うことによって品種間多型と同時に品種内多型の検出を行った。ある品種で品種内多型を示すマーカーがあると、そのマーカーはその品種の識別には利用できない。あるマーカーについて全個体でマーカーを有する品種は全個体でマーカーのない品種と区別ができる。そこで、各品種が他の品種と区別できるかどうかを検討すると、27種のマーカーでは前述の8品種は他の全ての品種と区別ができたが、残りの品種は他のいくつかの品種と区別ができず、完全な品種識別にはより多くのマーカーが必要であることが明らかになった。

品種内多型が多く見られた原因は、タマネギは自殖弱勢が強いため、目的の形質について選抜を行いながら集団で品種を維持しているため固定度が低いことによると考えられる。

「七宝早生7号」と「ターザン」は兵庫県産と佐賀県産の5個体ずつを供試したが、どちらか一方の1~2個体だけで品種内変異が見られた場合があり、比較的低頻度の多型の存在が示唆される。従って、今回の調査で品種内多型が認められなかった場合でも、さらに多数の個体について調査を行うと品種内多型が見つかる可能性があり、DNAマーカーによる品種の特定は相当困難と考えられる。

また、本研究ではRAPD解析によって品種識別を試みたが、RAPDはDNAマーカーの中では簡便な方法である

反面、バンドの出現や濃淡が比較的不安定であり、再現性に問題がある。今回の調査でも、足立と杉村¹⁾とほぼ同様の方法で行ったにもかかわらず、10種のマーカーが検出できず、9種のマーカーが新たに得られた。DNA抽出の際の精製度やDNAポリメラーゼの種類、さらにはPCRを行う機種の違いも再現性に影響を及ぼす。将来、今回の結果を利用して普及センターや農協で品種識別を行おうとした場合、いくつかのマーカーを検出することができなければ、供試できるマーカー数が少なくなり品種識別がより困難になる。再現性を高めるためには得られたRAPDバンドのDNAの塩基配列を決定し、特異的なプライマーを設計しなおす(STS化)必要がある。

謝辞

材料の提供・収集などご協力いただいた淡路農業技術センター農業部小林尚司主任研究員、あわじ島農業協同組合の関係者の方々に深く感謝いたします。

引用文献

- (1) 足立静香・杉村豊裕(2000):タマネギのRAPD法による品種識別及び原産地推定:農林水産消費技術センター研究報告 24, 29-39
- (2) McCallum, J., D. Leite, M. Pither-Joyce and M. J. Havey (2001): Expressed sequence markers for genetic analysis of bulb onion (*Allium cepa* L.): *Theor. Appl. Genet.* 103, 979-991
- (3) Tanikawa, T., M. Takagi and M. Ichii (2002): Cultivar identification and genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) as evaluated by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis: *園学雑* 71 (2), 249-251

表3 RAPD マーカーによるタマネギ品種間内多型の検出

(1) 足立と杉村 (2000) の報告のうち今回採用した RAPD マーカー

品 種	アース	アドバンス	アーリーレッド鈴木平	アンサー	くれない	さつき	七宝甘70	七宝草生7号(佐賀)	七宝草生7号(兵庫)	湘南レッド	ターザン(佐賀)	ターザン(兵庫)	ターボ	もみじ3号	A36	OP黄	T-357	T-448	ニューセブン	アトン	アポロ	オメガ	かむい(北海道)
OPF06-770	+	-	-	+	△	△	+	-	-	-	+	+	△	+	-	△	-	+	-	△	△	-	-
OPF06-870	+	+	△	+	△	△	+	+	+	△	+	+	△	+	△	△	△	+	△	+	+	△	+
OPL07-530	-	-	+	-	-	-	△	-	△	-	-	-	-	-	△	△	△	-	-	△	△	-	-
OPM01-450	+	-	-	+	-	△	-	△	-	-	+	+	△	+	-	-	-	+	+	△	△	-	-
OPM01-700	-	△	+	△	+	△	-	△	△	△	-	-	-	-	-	-	△	-	-	-	-	-	(-)
OPM02-400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPM02-1000	△	-	△	△	-	△	△	-	-	△	+	+	△	△	-	-	-	△	+	-	△	-	-
OPM04-550	+	+	△	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPM10-880	-	-	(+)	-	△	△	-	△	-	△	-	-	(-)	-	(-)	(-)	-	(-)	△	-	△	-	△
OPN05-500	-	-	-	△	-	-	-	-	-	△	+	+	-	△	-	-	-	-	+	-	-	-	+
OPN10-400	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	△	+	+	+	+	+	△
OPN10-650	+	△	△	△	△	△	+	△	-	△	+	+	+	+	-	+	△	+	(-)	+	△	△	+
OPN18-300	-	(+)	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	-	+	△	△	+	-	+	△	+	△	+
OPN18-540	-	-	-	△	-	△	-	-	-	-	-	-	-	△	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
OPN18-580	-	△	-	-	-	-	△	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	△	-	△
OPN19-750	-	-	-	-	+	△	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	△	-	△	-	-
OPN20-350	-	-	△	-	+	△	-	-	-	△	-	-	-	-	-	-	-	-	△	-	△	-	-
OPR02-1100	-	+	+	+	+	+	△	+	+	△	+	+	+	+	+	+	△	-	+	△	△	+	-

(2) 足立と杉村 (2000) は採用していなかったが、今回新たに採用した RAPD マーカー

品 種	アース	アドバンス	アーリーレッド鈴木平	アンサー	くれない	さつき	七宝甘70	七宝草生7号(佐賀)	七宝草生7号(兵庫)	湘南レッド	ターザン(佐賀)	ターザン(兵庫)	ターボ	もみじ3号	A36	OP黄	T-357	T-448	ニューセブン	アトン	アポロ	オメガ	かむい(北海道)
OPH07-420	-	+	-	△	-	-	△	△	+	△	△	△	△	△	△	+	△	-	△	-	+	+	△
OPH07-470	-	△	-	+	-	△	△	△	△	△	-	-	-	+	△	△	△	△	△	-	△	-	-
OPH07-610	+	△	+	+	△	△	+	+	+	-	+	+	+	-	△	-	+	-	+	-	+	+	-
OPM02-890	+	+	-	-	-	-	+	△	△	△	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	△
OPN05-1100	+	-	△	△	△	+	+	-	-	△	+	+	△	△	△	-	+	+	+	△	(+)	△	△
OPN10-410	-	△	-	△	-	-	-	△	△	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPN18-450	-	-	-	△	-	-	△	△	-	△	-	-	-	-	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-
OPN18-480	-	△	-	-	-	-	△	-	-	-	-	-	-	-	-	(-)	-	-	△	-	△	-	△
OPN20-650	△	+	+	△	-	△	-	+	+	△	-	-	△	-	+	△	+	△	-	-	△	+	△

注) 各品種5個体ずつ調査し、次の記号により結果を示した。+: マーカー有, -: マーカー無, △: 品種内変異有, (): 不明瞭個体含む

七宝早生2号	スーパードルフィン北海道	スーパードルフィン	ソニック	浜育	アールトップ	貴錦	緋だまり	ホーム	淡路中甲高3号	淡路中甲高2号	淡路中甲高1号	十品種数	一品種数	△品種数	備考
-	-	-	-	-	-	-	-	+	△	-	-	8	20	7	明瞭なバンド。見分けやすい。
+	△	△	+	+	+	+	+	+	+	△	△	21	0	14	明瞭なバンド。時に薄くなるが判別可。
-	-	△		△	△		△		△	△	△	1	18	13	やや薄いバンドでさらに薄くなることも。直上(約5~10bp大きい位置)に紛らわしい薄いバンドが出ることもある。
-	-	-	-	-	-	-	-	+	(-)	-	-	8	21	5	やや薄いバンドでさらに薄くなりやすい。
△	-	△	-	△	△	△	△	-	-	△	-	2	18	14	比較的明瞭なバンドだが、一の個体でもほぼ同位置にやや明瞭なバンドが有り、まれに判別困難。
-	-	-	-	△	-	-	-	-	-	-	-	0	34	1	M2-400か?明瞭なバンドであるが、「浜育」の一部の個体でのみ+。
-	-	△	-	(-)	-	-	-	-	-	-	-	3	20	11	やや薄いバンドであるが比較的明瞭。
+	+	△	+	△	+	△	+	+	+	+	+	31	0	4	約510bp。明瞭なバンドであるが頻度高く、全個体一の品種はなし。
△	-	△	-	(-)	△	(-)	△	-	(-)	(-)	△	0	14	12	M10-800か?比較的明瞭であるが、薄いものがあり判別困難な個体が多い。
△	△	-	-	△	-	-	-	-	△	△	△	4	22	9	明瞭なバンドであるが、頻度低い。
△	+	△	+	△	△	+	+	+	△	△	△	26	0	9	約420bp。明瞭なバンドであるが、頻度高い。全個体一の品種はなし。
△	△	△	△	-	△	-	△	+	-	-	△	11	6	17	明瞭なバンド。品種内変異が多い。
△	+	-	△	+	+	+	+	+	+	+	△	22	4	7	明瞭なバンド。
-	-	△	-	△	-	△	-	△	-	△	△	0	25	9	明瞭なバンドであるが、頻度低い。全個体+の品種はない。
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	30	4	明瞭なバンドであるが、頻度低い。全個体+の品種はない。
-	-	△	-	△	+	△	-	-	-	-	△	3	25	7	明瞭なバンドであるが、頻度低い。
-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2	28	5	明瞭なバンド。
△	△	+	+	△	+	△	+	+	△	△	△	20	3	12	このバンド自体は明瞭であるが、直下(約50bp小さな位置)にはほぼ全個体で出現するバンドがあり、見にくい。

七宝早生2号	スーパードルフィン北海道	スーパードルフィン	ソニック	浜育	アールトップ	貴錦	緋だまり	ホーム	淡路中甲高3号	淡路中甲高2号	淡路中甲高1号	十品種数	一品種数	△品種数	備考
△	△	△	+	△	△	-	△	△	△	-	-	6	9	20	薄いバンド。品種内変異が多い。
△	△	△	△	△	△	+	-	+	△	-	-	4	12	19	明瞭なバンド。品種内変異が多い。
+	△	△	+	△	△	△	-	△	△	△	△	15	7	13	明瞭なバンドであるが、頻度高い。
-	△	△	-	△	-	△	-	-	△	-	△	9	16	10	明瞭なバンドであるが、ほぼ同位置に全個体で現れる細いバンドがある。
+	(+)	△	-	△	(+)	△	-	△	△	-	△	9	7	16	比較的明瞭なバンドであるが、時にやや薄くなる。品種内変異が多い。
+	-	-	-	△	-	-	-	-	-	-	△	1	28	6	バンドが薄くなることもある。頻度が低く、全個体で出現するのは七宝早生2号のみ。
-	-	△	-	△	-	△	△	-	△	△	△	0	23	11	明瞭なバンドであるが、頻度低い。全個体+の品種はない。
-	△	-	-	△	△	-	-	△	△	-	△	0	23	11	明瞭なバンドであるが、頻度低い。全個体+の品種はない。
+	+	△	+	△	△	△	+	-	△	△	△	11	8	16	明瞭なバンド。品種内変異が多い。