

## RAPD マーカーによるニラ品種の識別

天谷正行

摘要：ニラ育種への利用を目的とし、RAPD マーカーによる品種識別条件を確立した。38 のニラ遺伝資源の葉身から CTAB 法により抽出した tDNA に対し、34 種の合成プライマーを用いて PCR を行った。この結果、22 種のプライマーから 236 個の RAPD マーカーが得られた。このうち 19 種のプライマーから得られた 181 個の RAPD マーカーを用いてクラスター分析を行ったところ、エステラーゼ多型分析では識別できなかった 26 品種を識別することができた。また、この同一のエステラーゼ多型を持ったグループのうち 24 品種は 2 つのクラスターを形成することが明らかになった。不抽だい性品種である大分在来と小山在来は非常に類似していることが明らかになった。

キーワード：ニラ, PCR, RAPD, 品種識別

### Discrimination of Chinese Chive (*Allium tuberosum* SPR.) Cultivars by RAPD Markers

Masayuki AMAGAI

Summary: Random amplified polymorphic DNA(RAPD)analysis was applied to 38 of Chinese Chive (*Allium tuberosum* SPR.) cultivars in order to define a relationship between the cultivars and utilize RAPD analysis for the breeding program. Genomic DNA were extracted from leaf blade of the each cultivars by CTAB methods and 34 primers were used for RAPD analysis. 236 amplified polymorphic DNA fragments were observed in 22 primers out of 34 used for polymerase chain reactions with the genomic DNA fragments obtained from 19 primers.

Using these RAPD marker, it was possible to discriminate 36 cultivars from the polymorphism, In which 26 cultivars showed the identical zymogram pattern of esterase isozyme. The cluster Analysis showed that two nonbolting landraces, Oita-zairai and Oyama-zairai, were closely related each other and were not related with another bolting cultivars.

Key words: Chinese Chive, *Allium.tuberosum*. ROTTL, PCR (polymerase chain reaction), RAPD (random amplified polymorphic DNA), Cultivar Discrimination

## I 緒言

現在我が国におけるニラの主力品種のほとんどが集団からの選抜育種法によって育成されているが、この理由はニラが高度に単為生殖を行う形質を持つことによる<sup>1,8)</sup>。このため、近年の品種は草型や特性の類似したものが多く、新たな遺伝子の導入をはかる上では限界があった。

栃木県農業試験場では昭和61年よりニラの交配育種に取り組んでおり、平成4年に「きぬみどり」を育成した<sup>9)</sup>。しかし、交雑率が他の作物に比べてかなり低く、しかもF<sub>1</sub>実生集団中に単為生殖個体が混在した状態で選抜を行わなければならないなど、育種法には改良すべき問題があった。そこで我々はF<sub>1</sub>交雑個体を効率よく選抜する手法として、エステラーゼ酵素の多型を利用し、酵素多型の異なる両親間であれば選抜効率をあげられることを明らかにした。また38の遺伝資源についてエステラーゼ酵素の多型を調査したところ、8の異なる酵素多型の存在が認められた。しかし、最も主要なタイプには全体の68%が集団して含まれていることがわかり、交雑育種への利用の点からは、より精度の高い品種の識別法を確立する必要性が指摘された<sup>2)</sup>。

1990年にWilliamsら<sup>17)</sup>によって提唱されたRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法による遺伝子分析は、現在までに様々な植物の品種識別<sup>4,5,10)</sup>、親子鑑別<sup>15,18)</sup>、F<sub>1</sub>純度検定<sup>11)</sup>などに幅広く利用されている。本方法の優れている点は、それまで育種に長年携わったエキスパートのみに可能であったよう

な判定が迅速かつ客観的に行えるようになったことである。加えて、DNAを対象としたことで環境に影響されない結果を得ることができることも上げられる。また、任意に合成されたプライマー (arbitrary primer) を利用して遺伝子増幅を行うことで、あたかも無選抜状態にある形質を比較するような効果が得られるため、ニラのように遺伝的背景の全くわかっていないものを対象にしても客観的な判断を下すことができる。

これらのことから、本研究では当場の有するニラ遺伝資源のうち特に海外等から導入された品種を材料に用いて、RAPD法による品種識別および、その類縁関係の推定の可能性について検討した。

## II 材料及び方法

### 1. 供試材料

1986年より収集し、当場の慣行法により野菜部圃場で栽培されたニラ遺伝資源38品種(第1表)の葉身を材料とした。各品種とも交配母本として選抜保存された代表株から1996年8月～9月にかけて採取した。

### 2. 高分子DNAの抽出方法

まず高分子DNAの抽出条件を検討するため、遺伝資源のうち主要な4品種(グリーンベルト:GB, 小山在来:OZ, 大分在来:OT, きぬみどり:Kin)より採取した葉身約2gを液体窒素を用いて乳鉢で粉碎し、様々な植物で用いられているCTAB法<sup>12,14)</sup>を

第1表 供試品種

品種名	略号	導入先(導入年度)	品種名	略号	導入先(導入年度)
グリーンベルト	GB	武蔵野種苗(s59)	岡山在来B	OKB	岡山市(s61)
小山在来	OZ	石橋町(上古山s60)	黄ニラA	KNA	台湾(東北種s60)
大分在来	OT	大分市(s63)	黄ニラB	KNB	台湾(東北種s61)
きぬみどり	Kin	栃木農試育成(h4)	中国ニラA	TNA	日本タネ(s60)
成都	ST	中国(南京大s61)	中国ニラB	TNB	日本タネ(s60)
漢中冬ニラA1	KFA	日本タネ(s60)	漢中冬ニラ西安系	KFS	日本タネ(s60)
漢中冬ニラA2	KFA2	日本タネ(s60)	漢中冬ニラ西安A	KFSA	日本タネ(s60)
漢中冬ニラB1	KFB	日本タネ(s60)	南京791	NK791	南京大(s61)
漢中冬ニラB2	KFB2	日本タネ(s60)	台湾	TW	群馬園試(s60)
朝鮮	TS	群馬園試(s60)	岩舟在来	IWZ	岩舟自生(s61)
漢中広葉A	KHA	日本タネ(s60)	石橋在来	ISZ	石橋町(上古山s60)
漢中広葉B	KHB	日本タネ(s60)	呼和浩特	Hu	東北大(内モンゴルs63)
東北小口山形	TKO	山形自生(s63)	食用花ニラ(広巾)	SH	武蔵野種苗(s63)
津南青ニラA	TAA	南京大(s61)	満州	MS	群馬園試(s60)
津南青ニラB	TAB	南京大(s61)	抗州ニラ	KN	中国(抗州市H2)
耐寒大葉	TO	渡辺採種(s61)	キングベルト	KB	前川種苗(s62)
津引1号(中国)	TB1	南京大(s61)	モウコ	MK	福島農試(s61)
年花ニラ	HN	台湾(千葉大s61)	ネギニラ	NN	栃木農試育成(h5)
岡山在来A	OKA	岡山市(s61)	たいりょう	TR	渡辺採種(s61)

若干改変した方法により抽出を行った(第1図)。また、多糖類の除去を目的として同4品種の葉身約0.1gをNucleocon phytopure(Scot lab社) DNA抽出キットにより抽出を行い、CTAB法との比較を行った。得られた各DNA溶液を吸光度分析(日本分光:UVIDEC-660)により定量し(Abs<sup>260</sup>)、さらにmpid-2(コスモバイオ社)によりアガロースゲル電気泳動(0.5%/0.5X TBE buffer, 100V const)を行い、エチジウムブロマイドで染色し、写真撮影して分子量を推定した。また、エチジウムブロマイド染色による輝度から、濃度既知のDNA試料との比較により収量を推定した。

### 3. 遺伝子増幅(PCR)条件

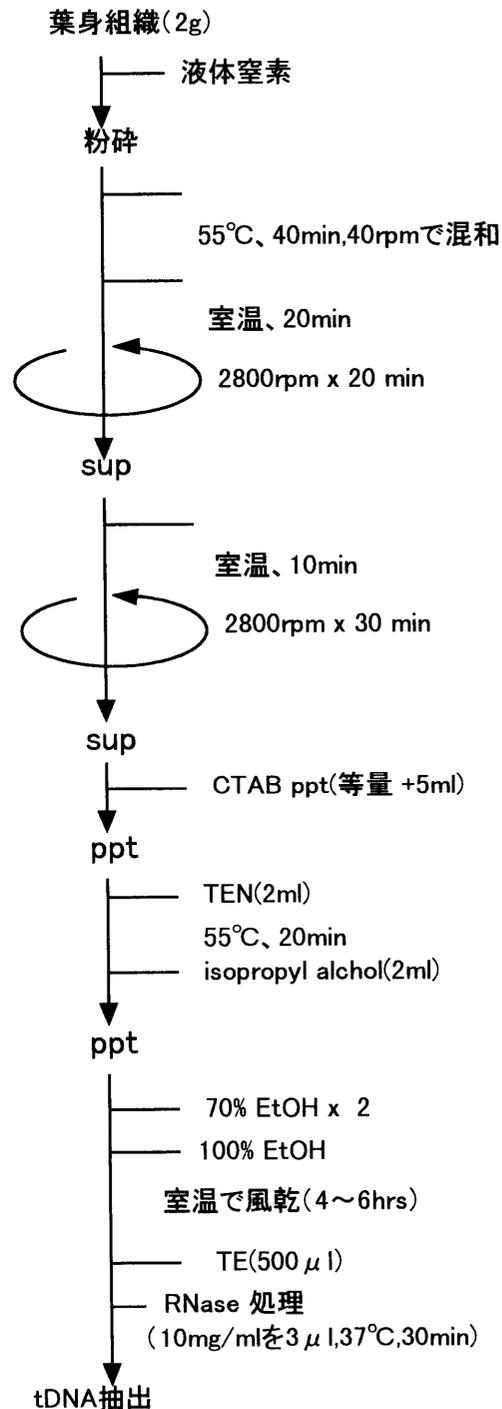
Taq polymeraseは宝酒造、プライマーはニッポンジーン12mer(A-1,2,3,4シリーズ48種)および、オペロン10mer(OPAシリーズ20種)の68種類を単独で使用し、反応溶液を最終容量25μlとなるように調製した(第2表)。PCR装置はPTC-100-96V+hotbonnet(MJ Research社)を使用し、8連チューブでPCR反応を行い(第2図)、mpid-2によりアガロースゲル電気泳動(1.5%/0.5X TBE buffer/100V const)を行い、エチジウムブロマイドで染色後写真撮影して増幅多型を検出した。試験はすべて2反復で行い、結果が異なった場合は再度行い再現性を確認した。

### 4. 品種識別および統計解析

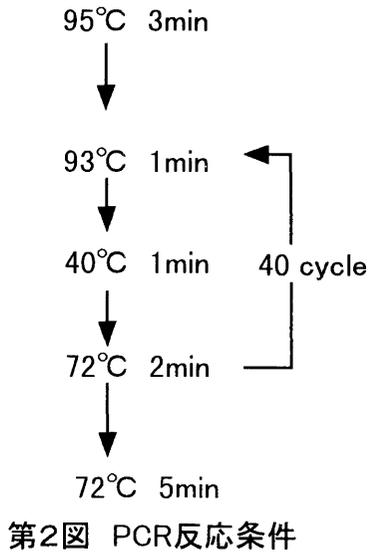
供試全品種のDNAを調製し、主要品種間で明確な増幅バンドの認められたプライマー34種(ニッポンジーン:A-07,08,09,11,21,23,24,25,27,28,29,30,31,32,41,42,43,44,46,48,51,52,61,62,63,65,67 OPERON:OPA-02,05,06,07,10,12,14)を単独で用いてPCRを行った。このときのDNAの抽出方法はCTAB法で行い、PCRの条件は先に検討を行った方法に従った。反応液はフォーラックサブマリン泳動槽(日本エイドー社:NB-1078)によりアガロース電気泳動(1.5%アガロース/0.5X TBE/150V const)を行い、エチジウムブロマイドで染色後写真撮影して増幅多型を検出した。各増幅バンドは分子量ごとにRAPDマーカーとして同定し、マーカーの存在、非存在をそれぞれ1,0と表し、解析ソフトsystat ver5.1.2 for macintosh(apple co,LTD)を用いてnearest neighbor methodによりクラスター分析を行った。

第2表 PCR反応溶液組成

成分	容量	終濃度
10 X PCR buffer	2.5μl	1 X
dNTP mix(2.5mM)	2.0μl	0.2mM
Taq enzyme(5unit/μl)	2.0μl	1 u
template DNA(50~100ng/μl)	1.0μl	50~100ng
primer DNA (7.8μM)	1.6μl	0.5 μM
total volume	25.0μl	



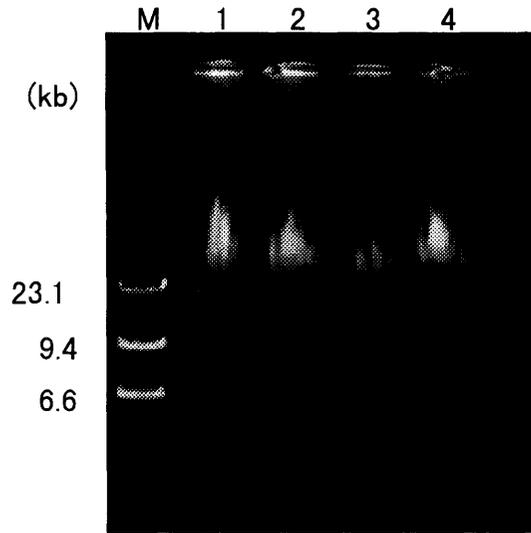
第1図 ニラ葉身からの高分子DNA抽出方法



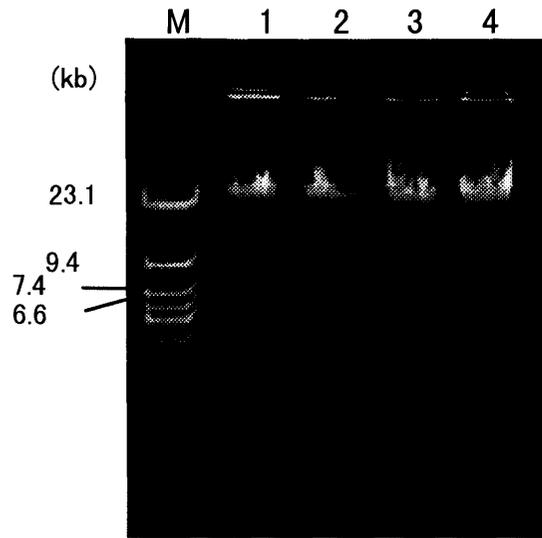
### III 結果

CTAB 法によって得られた DNA の分子量は約 40kb 以上と推定され、収量も各品種とも葉身 1g あたり約 200  $\mu$ g 程度であった (第3表, 第3図) . 一回の PCR に必要な鋳型 DNA 量は 0.5  $\mu$ g なので、400 回以上の供試量が得られたことになる。また、ニラは多糖類の含量が高く PCR に影響する可能性があったため、抽出の過程で silica-borate 担体により多糖類の除去を行える Nucleocon phytopure kit による抽出を行ったところ、CTAB 法と同様な分子量の DNA を抽出することができた (第4図) . また、CTAB 法から得られた DNA に比べて高分子領域のスミアな産物が少ないという特徴があった。また、この市販 kit は操作に要する時間が CTAB 法に比べて 1/3 程度で済むことがわかったが、反面高価なため多量のサンプルを扱うには適さないと考えられた。

この2つの方法によって抽出した DNA を鋳型とし、68 種類のプライマーを用いて PCR を行ったところ、48 種類のプライマーにおいて増幅バンドが検出された。懸念されていた糖の混入による多型像の差は認められなかったため、CTAB 法による DNA 抽出の有用性が確認された。増幅バンドが検出されなかったプライマーの内訳は、増幅がほとんど認められなかったものが 14 種 (A-21, 23, 26, 27, 28, 47, 49, 50, 64, 66, 69, 70, 71, 72) , 非特異的な増幅が多くバンドが不鮮明なプライマーが 4 種 (A-68, OPA-05, 09, 13) , 主要品種間で多型の認められなかったプライマーが 2 種 (A-01, OPA-15) であった。このうち増幅が認められなかったプライマーグループは、A-50 以外は GC 含量が 42% 以下のグ



第3図 CTAB法により抽出したニラ全DNA  
M:  $\lambda$ -Hind III  
1: GB 2: OZ 3: OT 4: Kin



第4図 nucleocon kitにより抽出したニラ全DNA  
M:  $\lambda$ -EcoRI +  $\lambda$ -Hind III  
1: GB 2: OZ 3: OT 4: Kin

第3表 CTAB法により抽出したニラtDNAの  
収量および分子サイズ

品種名	葉身重(g)	収量( $\mu$ g)	$\mu$ g/g	サイズ(kb)
GB	1.8	390	217	42<
OZ	2.7	727	269	42<
OT	2.6	535	206	38<
Kin	2.0	467	234	42<

## IV 考察

第4表 品種識別に用いたプライマーと  
検出されたRAPDマーカー数

primer No.	size (mer)	Resource	RAPD数	サイズ (bp)
A-07	12	nippon gene	3	640-740
A-08	〃	〃	8	520-1780
A-29	〃	〃	7	700-1400
A-30	〃	〃	9	350-1380
A-31	〃	〃	9	430-1200
A-42	〃	〃	10	450-1550
A-43	〃	〃	11	350-1980
A-44	〃	〃	6	370-1130
A-46	〃	〃	9	410-1080
A-48	〃	〃	16	400-1750
A-51	〃	〃	13	810-1600
A-52	〃	〃	10	275-1050
A-61	〃	〃	9	590-1750
A-62	〃	〃	9	510-2250
A-65	〃	〃	6	450-1350
A-67	〃	〃	14	480-1800
OPA-02	10	operon	9	430-1580
OPA-07	〃	〃	11	520-1750
OPA-10	〃	〃	12	430-1800

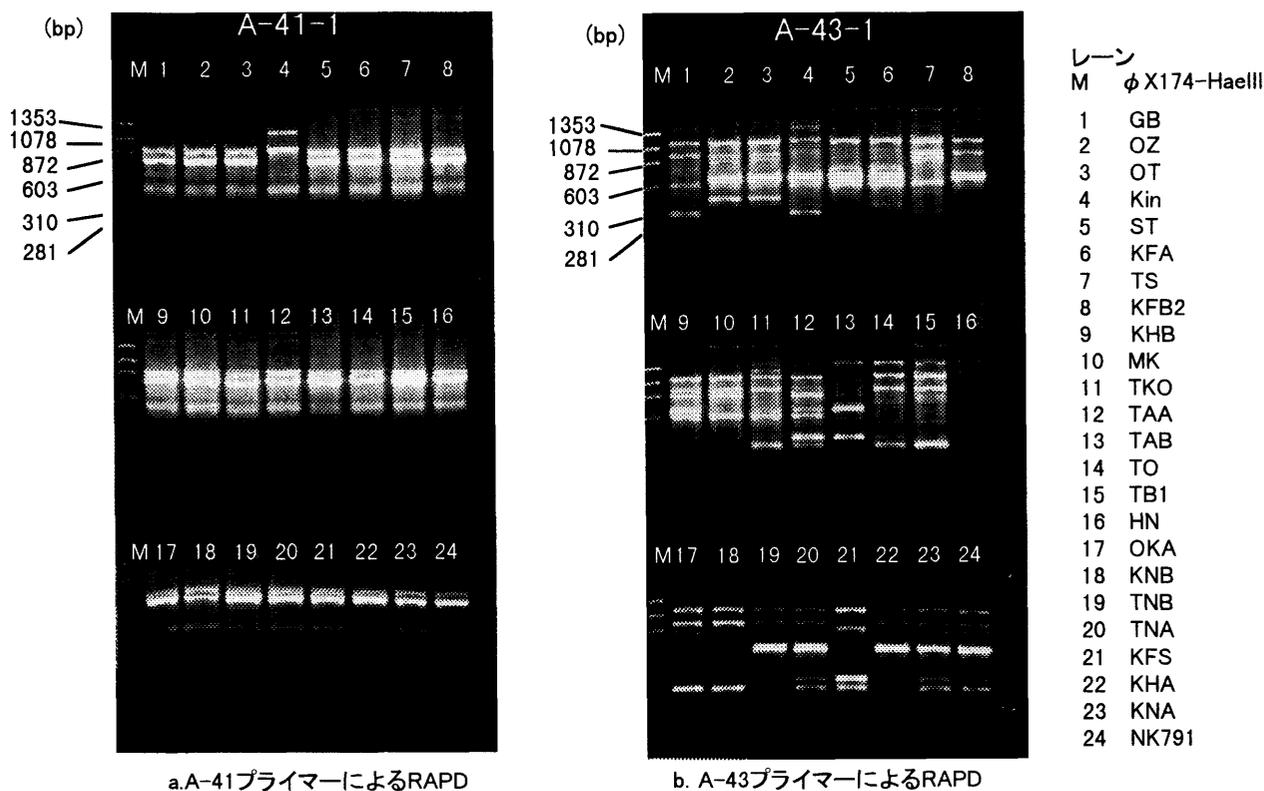
ループであり、適切なアニーリング温度は供試条件の 40°C よりも低いものであった。反対に非特異的なバンドが多く増幅したグループはアニーリング温度が高いグループであった。

これらの予備試験の結果から、半陽性に良好な RAPD を検出した 34 種のプライマー（試験方法参照）を用いて、ニラ 38 品種（うち 1 品種はネギとニラの種間雑種）に対する PCR を行ったところ、22 種のプライマーにおいて 236 個の RAPD マーカーを確認することができた。この段階では 1 つのプライマーから得られたマーカーは平均すると約 10 本であったが、不鮮明なものも含まれていた。また、プライマーによって品種間で大きく異なるマーカーが得られたものもあれば、ほとんど差の認められなかったプライマーもあった（第 5 図 a, b）。尾崎ら<sup>13)</sup>は RAPD 法によるウメの親子鑑別の報告において、再現性の高い RAPD マーカー分子量としては 0.3~2.2kbp の範囲にあるものを利用することが望ましいと指摘している。そこで、得られたマーカーのうちこの範囲内にあるものを検索したところ、プライマーとして 19 種、RAPD マーカーとして 181 個が選抜されたので（第 4 表）、この結果からクラスター分析を行い系統図の作製を試みた。この結果、遺伝資源は多様性に富んでおり、小山在来と大分在来を除けば RAPD マーカーを組み合わせてほとんどの品種で識別が可能であると考えられた（第 6 図）。

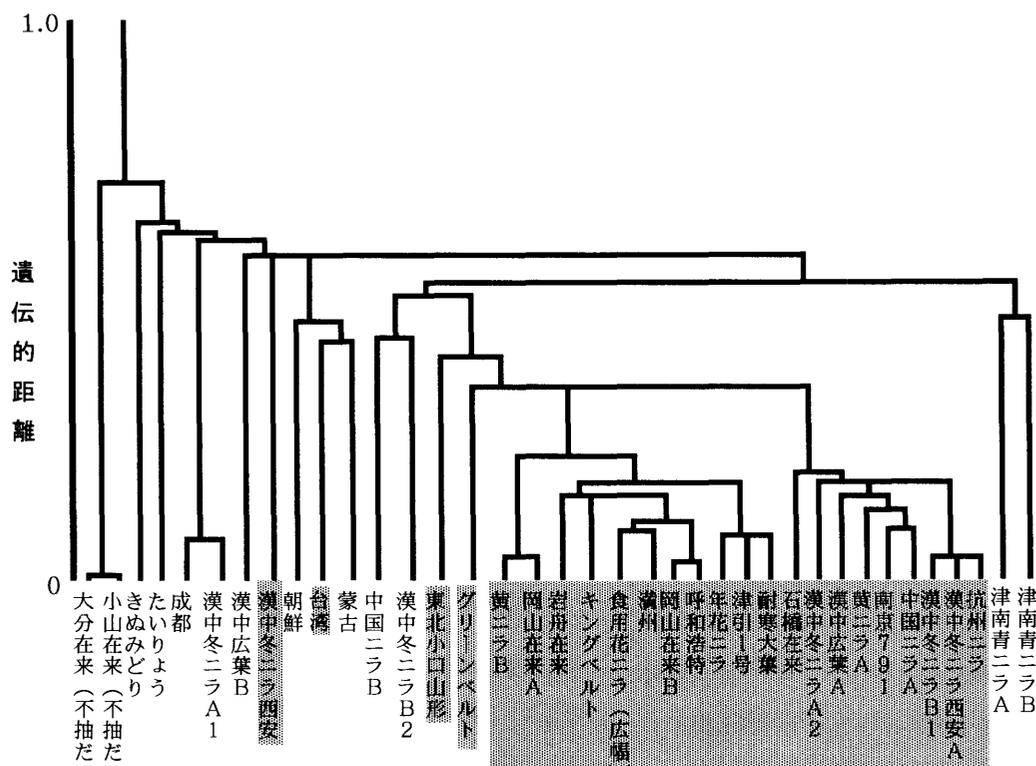
これまでにニラについて遺伝的背景について言及した報告が無かったのは、交配によって遺伝的変異の拡大をしてこなかったことがその最大の理由であろうと思われる。この点に関して、RAPD マーカーは無選抜な形質を比較することと同義であり、全く類縁関係のわかっていない集団を客観的に把握するには最も有効な手段である。また遺伝的類縁関係を論じる場合に問題なのがニラ品種の固定度についてであるが、ほとんどの品種が未固定であろうと考えられる。実際いくつかの F<sub>1</sub> 集団を RAPD マーカーでスクリーニングしたところ、分離するマーカーの存在を確認している（未発表）。しかしこれは交配したごく一部の個体についてであり、ほとんどの後代実生は高度な単為生殖によって同一の遺伝子型が保存されていくので、固定種としての扱いが可能である。また DNA マーカーは表現型とは異なり、たとえ分離しても後代へは必ず伝わる（消失するものも当然ある）ものなので、交配雑種が保存される

限り普遍的な意味を持つものである。以上のような理由で、今回の一連の結果は RAPD によりニラ種内にも遺伝的多様性が存在していることを明らかにした最初の報告であり、今後育種を進めるうえで大きな意義を持つものであると考える。

本試験で行った RAPD 分析とクラスター分析から得られた品種間の遺伝的距離を表す系統図により、先に報告したエステラーゼ酵素多型分析の結果、最もメジャーな型に属する品種のほとんどは（第 6 図中のグレーの網掛け）同一のグループを形成しており、中で 2 つのクラスターを形成していることが明らかとなった。このことは、本手法による品種類縁関係の推定の正当性を示唆するものである。また、このグループには栽培品種であるグリーンベルトやその系統であるキングベルトが含まれており、現在の日本における主力品種もこのグループに多く含まれてくるものと推察された。これらとは異なる位置に属する台湾と漢中冬ニラ西安については、エステラーゼ分析に供試した株と今回遺伝資源母本として保存した株の遺伝子型が異なっていた可能性もある。大分在来と小山在来は RAPD マーカーではほとんど多型が認められず、極めて類似したあるいは同一のものであることが示唆された。この 2 品種は草型も極めて類似しており、株元のアントシアニン色素の出方に若干の違いがある程度しか区別性は無かった。この品種の最大の特徴は自然状態では抽だしいない点であり、このため現地でも株分けによって維持されていたものである。地理的な距離を考えるとどうして大



第5図 RAPDマーカーによるニラの品種間差異



第6図 RAPDマーカーから推定されたニラ遺伝資源の遺伝的距離  
DISTANCE METRIC IS 1-PEARSON CORRELATION COEFFICIENT  
SINGLE LINKAGE METHOD(NEAREST NEIGHBOUR)  
SAMPLE=37,RAPD marker=181(19primers)  
の品種は同一のエステラーゼ酵素多型を持つグループ

分市と小山市なのかはわからないが、人為的に導入されたことは間違いないであろう。これについては国内で不抽だい性の在来種をさらに収集することで、導入の経路を明らかにすることができる可能性があるものと思われる。また、たいりょうや成都、漢中冬ニラ A1 などが *tuberosum* 種としては遺伝的に離れた品種であることがわかった。きぬみどりについては、蒙古×たいりょうという交配で育成された経過があることからたいりょうに近い品種として位置づけられた。小島ら(1994)<sup>9)</sup>は一連の単為生殖に関する報告の中で、*Allium .tuberosum* と *ramosum* が容易に交雑を起こすことを指摘している。この 2 つの種については現在のところ開花期間や花被の長さで区別をしているに過ぎないが、雑種が遺伝資源の中に混入している可能性は高い(小島私言)と考えられており、今後 *ramosum* 種についての試験を行うことで、更に詳細な遺伝的関係を明らかにできるものと考えられる。その他に導入先や抽だい期、草丈等の特性と関連したような一定の傾向は今回の遺伝資源材料の間には認められなかった。

今後は以上の結果をふまえ、RAPD マーカーを利用した F1 個体の早期選抜法の確立を行い、両親が未固定である場合に有効な bulk 法を用いて育種上有用な形質に連鎖した DNA マーカーの検索を行う予定である。

## V 謝辞

本報告をまとめるにあたり、農林水産省野菜茶業試験場ユリ科作物育種研究室小島昭夫室長より貴重な助言を頂いた。また、栃木農試野菜部木村部長、丹羽技師、普及教育課室井専技よりニラ遺伝資源材料及び特性調査結果等の協力を頂いた。ここに記して厚く感謝の意を表するものである。

## VI 引用文献

1. 天谷正行・大橋一夫・木村栄・小栗尚子・小島昭夫 (1995) ネギとニラの種間雑種植物の育成. 栃木農研報(43):87-94
2. 天谷正行(1996)エステラーゼ酵素多型を利用したニラ交雑個体の選抜: 栃木農研報, 44号:(in printing)
3. 天谷正行(1997)ネギニラ「なかみどり」の品種特性と栽培の基本: 施設園芸, 39(5):64-68
4. 藤本卓矢, 山岸博(1996)RAPD 分析による'スグキナ'のカブ品種との系統関係の解析: 園学雑 65 卷(3):609-614
5. Hosoki, T., Nagasato, T., Kimura, D and Nishimoto, K(1997) Classification of herbaceous Peony cultivars by random amplified polymorphic DNA(RAPD)analysis: J. JAPAN. Soc. Hort. Sci., 65(4):843-849
6. 木村栄(1995)「きぬみどり」: 野菜園芸技術, 22(7):39
7. Kojima, A and Nagato, Y and Hinata, K(1991)Degree of apomixis in chinese chive(*Allium tuberosum*)estimated by esterase isozyme analysis: Japan. J. Breed., 41:73-83
8. Kojima, A and Nagato, Y(1992)Pseudogamous embryogenesis and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum*. Sexual Plant Reproduction., 5:78-85
9. Kojima, A., Kozono, T., Nagato, Y and Hinata, K. (1994)Non-parthenogenetic plants detected in Chinese chive, a facultative apomict: Breeding Science. 44:143-149
10. 木村鉄也, 小曾納野規則, 伴義之(1997)品種識別に有効なブライマーの選抜: 育雑 47 (別1):131
11. Matsuura, S., Saito, A and Fujita, Y(1994)An approach for rapid checking of seed purity by RFLP analysis of nuclear DNA in F1 hybrid of Cucumber(*Cucumis sativas L.*): J. JAPAN. Soc. Hort. Sci., 63(2):379-383
12. Murray, M.G. and Thompson, W.F(1980)Rapid isolation of high molecular weight plant DNA.: Nuc. Acid Res., 8(19):4321-4325
13. Ozaki, T., Shimada, T., Nakanishi, T., Yamamoto, J and Yoshida, M. (1995)RAPD analysis for parentage determination in *Prunus mume Sieb. et Zucc.*: J. JAPAN. Soc. Hort. Sci., 64(2):235-242
14. 島本功, 佐々木卓治(1995)植物の PCR 実験プロトコール: 秀潤社
15. Tashiro, Y., Oyama, T., Iwamoto, Y., Noda and Miyazaki, S(1995)Identification of maternal and parental plants of *Allium wakegi* Araki by RFLP analysis of chloroplast DNA: J. JAPAN. Soc. Hort. Sci., 63(4):819-824
16. 寺本さゆり, 村上(嘉納)ゆり子, 保里昌彦, 神山 清文(1994)DNA フィンガープリント法によるニホンナシの品種および親子鑑定: 園学雑 63 卷(1):17-21
17. Williams, J. G. K., 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: Nuc. Acid Res., 18(22):6531-6535