

# RAPD マーカーを用いたにら交雑個体の選抜技術の確立

## 1. 試験のねらい

にらは高頻度に単為生殖を行うため、交雑育種上の問題となっている。にら交雑育種では、圃場に展開された株の大部分は母親と同じ遺伝子型を持つ個体（単為生殖個体）であり、定植前の幼苗段階で交雑個体を選抜することはにらの交雑育種の効率化につながり極めて重要である。そこで、現行のにら交雑育種法に導入が可能な、簡易で経済的な DNA 抽出方法を選定し、さらに父親に特異的な RAPD マーカーを利用して交雑個体を早期に選抜するシステムを確立する。

## 2. 試験方法

- (1) 複数の DNA 抽出方法（CTAB 法、改変 SDS 法、NaOH 法）を比較し、得られた DNA の分子量や、RAPD マーカーの再現性、簡易性に優れる方法を検討した。
- (2) 平成 9 年～平成 15 年の 7 年間に、栃木県農業試験場の慣行法により交配を行った 2 組合せ 2,673 個体のにら実生を交雑検定に供した。採種された種子は交配した翌年 3 月に播種し、1～2 か月間の育苗期間中に幼苗の葉身を約 10mg 採取し、鋳型 DNA を抽出して PCR 反応に用いた。各組合せにおいて、花粉親（父親）に特異的に存在する RAPD マーカーを選抜し、これを指標として交雑判定を行った。判定は最低 3 個のマーカーを用い、交雑率が 5% 以下の組合せではさらにマーカーを追加して検定した。交雑の確認は再現性を確かめるため、2 度実施した。

## 3. 試験結果および考察

- (1) 改変 SDS 法が交雑育種での交雑個体選抜に用いる DNA 抽出法として適していると判断した（図-1）。CTAB 法は熱変性や液体窒素による磨砕が必要であるが、NaOH 抽出法と改変 SDS 法ではその必要がなく、その後の操作も改変 SDS 法の RNase 処理以外は室温で行えた。18 個の検体処理にかかる時間は、CTAB 法が約 6 時間、NaOH 法が約 1 時間、改変 SDS 法は 3 時間であった。試薬にかかる費用は NaOH 法が最も低く、次いで改変 SDS 法であった。抽出した DNA の純度は、NaOH 法では RNase 処理を行わないため RNA の混入が認められ、高分子 DNA が壊れたため不鮮明な泳動結果が得られた。また、PCR の結果を比較したところ、NaOH 法は改変 SDS 法や CATB 法と比較して高分子領域マーカーの再現性が劣った（図-2、図-3）。
- (2) 22 交配組合せ、2673 個体のにらについて交雑検定を行った結果、平均交雑率は約 11.4% で、304 個体が交雑個体と判定された（表-1）。交雑検定は、全ての年度において予定した定植前に終了することができた。この結果、RAPD マーカーによる交雑個体選抜は、現行の育種ルーチンに組み込むことが可能であった。また、無選抜で栽培し検定を行っていた従来の方法に比較して定植個体数は約 1/10 に減少し、育種にかかる労力を大幅に軽減化できることが示された（図-4）。

## 4. 成果の要約

にらの交雑育種の過程に、簡易な DNA 抽出と花粉親に特異的な DNA マーカーによる交雑個体選抜を組み込むことにより、交雑個体を約 1 / 10 に絞り込むことができ、育種効率の大幅な向上を図ることができた。

（担当者 生物学部遺伝子工学研究室 中澤佳子、天谷正行） 現河内農業振興事務所

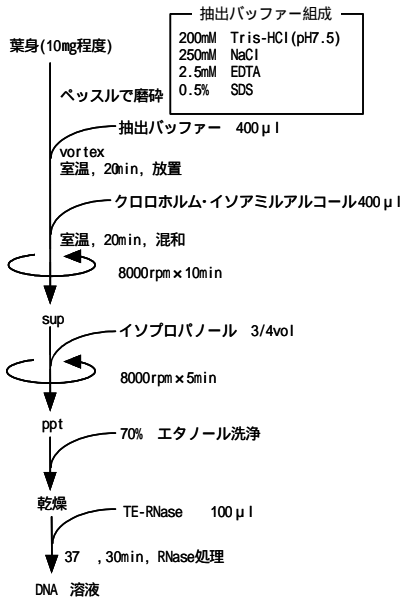


図-1 変更SDS法によるニラの簡易DNA抽出条件

表-1 交雑検定結果

交配組合せ	使用マーカー数	供試個体数	交雑確認数	交雑率(%)
中国ニラa/成都	4	107	27	25.2
成都/中国ニラa	4	115	18	15.7
中国ニラa/朝鮮	5	66	12	18.2
朝鮮/中国ニラa	4	13	1	7.7
南京791/成都	4	22	0	0.0
成都/南京791	4	105	14	13.3
南京791/朝鮮	5	71	4	5.6
朝鮮/南京791	5	140	4	2.9
たいいよう/朝鮮	7	31	8	25.8
漢中冬ニラA/朝鮮	4	20	4	20.0
漢中冬ニラA/成都	3	21	2	9.5
成都/漢中冬ニラA	3	24	5	20.8
成都/台湾	4	139	17	12.2
漢中冬ニラ西安a/大分在来	4	75	13	17.3
津南青ニラa/大分在来	7	116	0	0.0
大分在来/中国ニラa	4	832	120	14.4
津南青ニラa/中国ニラa	4	214	3	1.4
津南青ニラa/漢中冬ニラ西安a	11	31	0	0.0
94-1-106/大分在来	6	26	1	3.8
スーパーグリーンベルト/漢中冬ニラ西安	5	219	27	12.3
スーパーグリーンベルト/大分在来	6	145	0	0.0
スーパーグリーンベルト/中国ニラa	4	141	24	17.0
合計		2673	304	11.4

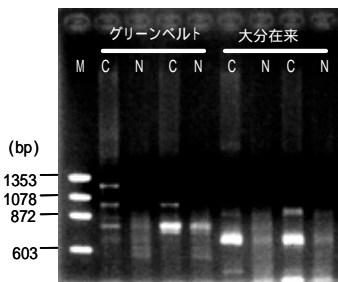


図-2 NaOH法とCTAB法により抽出したDNAを用いたRAPDパターンの比較  
M: 分子量マーカー, C: CTAB法, N: NaOH法  
プライマー: A-43

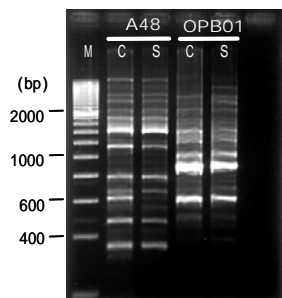


図-3 変更SDS法とCTAB法により抽出したDNAを用いたRAPDパターンの比較  
M: 分子量マーカー(200bp ladder) C: CTAB法  
S: 変更SDS法, プライマー: A48, OPB01  
鑄型DNA: テンダーボール

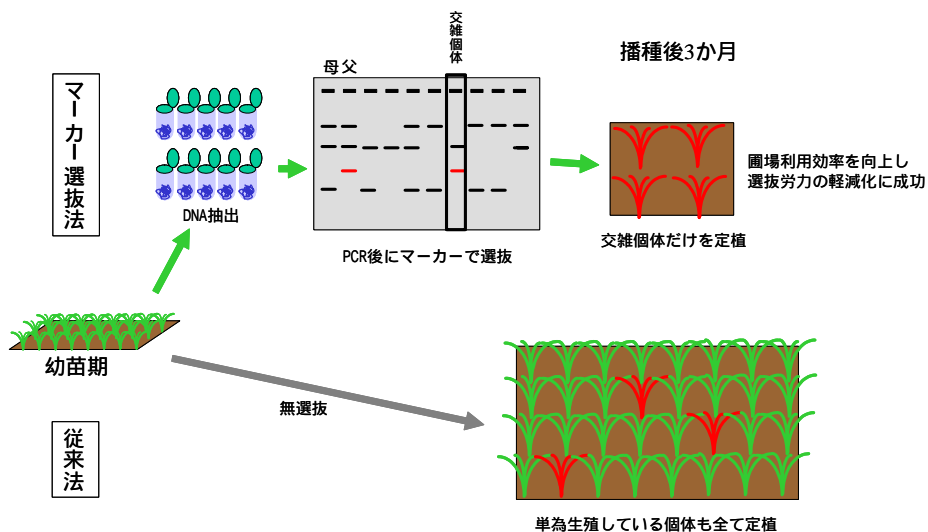


図-4 RAPDマーカーを用いた選抜法と従来法の比較

は交雑個体を意味する