

## 坊主不知ネギのDNAによる品種識別

室田 有里・渡邊 学・桑田 主税\*

キーワード：坊主不知ネギ、「足長美人」、品種識別、PCR、RAPD-STSMーカー

### I 緒 言

千葉県は根深ネギの主産地であり、作物統計によれば作付面積が2,510ha、収穫量は67,300tで全国第一位の生産量である。千葉県の特産である坊主不知ネギは雌抽台性の栄養繁殖性根深ネギであり、通常の種子繁殖性根深ネギの端境期にあたる5～6月に出荷され根深ネギの周年安定生産に寄与している。千葉県農業試験場（現千葉県農林総合研究センター）では坊主不知ネギの品種開発に取り組み、2000年には病害に強く安定して抽台の少ない品種「夏婦人」及び「五月姫」を、2004年には「足長美人」を育成した（町田、2003；桑田ら、2006）。今後、「千葉ブランド」の1つとして高品質の坊主不知ネギの栽培が期待される。

近年、世界的な産地間競争の激化に合わせて地域独自の品種開発やブランド化が進展する一方で、品種の不正流通や偽装表示を抑止し、品種の育成者権を保護する必要性が高まってきた。このため、形態的特徴のみに頼るのではなく客観的・科学的かつ高精度に品種を判別する方法として、遺伝情報を利用したDNAマーカーによる品種識別技術が重要視されるようになった。2003年には農林水産省品種登録情報ページにおいて「植物のDNA品種識別についての基本的留意事項」が公開され、イネ（大坪ら、2005）を始め多くの作物においてDNAマーカーが開発された。千葉県においても「千葉ブランド」として県産品のブランド化を進めるにあたり、DNAによる品種識別技術を重要視し、新品種開発と同時に品種識別技術の開発を進めている（小原ら、2007）。中でも、10塩基程度の短いランダムプライマーを用いて多型を探索するRAPD法により品種間多型を検出し、さらにプライマーを延長する（以下、STS化とする）ことにより再現性を高めたDNAマーカーであるRAPD-STSMーカーは、開発が比較的容易であることからしばしば品種識別に利用されている（足立、1999）。

栄養繁殖性である坊主不知ネギについてもDNAマーカーを有することにより品種の不正流出の防止効果が期待される。そこで、「足長美人」及びその他の坊主不知ネギのRAPD-STSMーカーによる識別技術を開発したので報告する。

本研究は新品種開発スピードアップ事業「新品種現地定着スピードアップ技術の開発」の一環として実施した。

本研究を遂行するに当たり、育種研究所野菜緑化育種研究室の鈴木秀章氏には材料の提供とともに多くの助言をいただいた。ここに記して深く感謝の意を表する。

### II 材料及び方法

#### 1. 供試材料

材料として新品種「足長美人」を含む坊主不知品種3品種、在来系統及び交雑育成系統12系統を農林総合研究センター育種研究所から譲り受け供試した（第1表）。比較として、種子繁殖性ネギ「吉蔵」（武蔵野種苗園）を植物工学研究室の網室で栽培し供試した。DNAを抽出する直前にこれらのネギの葉身を0.5g、また、根及び総包（「吉蔵」のみ）0.1gを採取しDNA抽出に用いた。

#### 2. DNA抽出の容易な部位の選定と抽出方法の改良

ネギは、葉内部のゼリー状物質に見られるように、植物体または組織内に多糖類を非常に多く含み、この多糖類によるDNAの抽出阻害が予想された。このため、あらかじめ「吉蔵」を用いて、葉身、根、総包の中からDNA抽出に適した組織を選定した。これまでにネギのDNA抽出には、DNA抽出キット「Nucleon Phytopure」（GEヘルスケア社、以下、Phytopureとする）が用いられ、良好な結果が得られたことから（Ohara et al, 2005）、Phytopureを用い、以下のようにしてDNAを抽出した。

葉身0.5g、根及び総包0.1gを、洗浄用緩衝液（0.35M ソルビトール、10% ポリエチレングリコール（6000）、2% 2-メルカプトエタノール、0.1M トリス塩酸（pH 8.0））1mLとともにベッスルですりつぶし、これを遠心分離して水溶性多糖類を含む上澄み液を除去することで組織を洗浄した。洗浄回数は1回または2回とし、DNAの純度から適当な洗浄回数を決定した。この洗浄した組織からPhytopureによりDNAの沈殿を得た。なお、洗浄

\*現山武農林振興センター

受理日2008年9月30日

本報の一部は、日本育種学会第113回講演会（2008年3月、川崎市）において発表した

第1表 供試した坊主不知ネギの品種・系統

品種・系統		交雑組合せ
交配品種	足長美人 夏婦人, 五月姫	山口系×五月姫 流山系×葉折れ系
在来系統	落合ジャンボ系, 小金系, 風早黒系, 逆井早生系 ジャンボ82系, 手賀黒系, 流山系, 葉折れ系 藤心晩生系, 向小金系, 山口系	
育成系統	RH22	

した組織にも多糖類が多く含まれるので、それらを分解するために、Phytopure付属の抽出緩衝液には0.5%ペクチナーゼ(SIGMA-ALDRICH社)及び0.25%耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ(SIGMA-ALDRICH社)を添加した。

抽出したDNAの沈殿を10mg/mL RNase(ニッポンジーエー社)を含む10倍希釈したTE(10mM トリス塩酸(pH8.0)、1mM EDTA) 30 $\mu$ Lに溶解し、37°C30分間加熱した。これをDNA原液とし、さらにDNA原液1 $\mu$ Lを純水により40倍希釈してPCR反应用DNA溶液を得た。

このDNA原液1 $\mu$ Lと既知濃度の $\lambda$ ファージDNA 5ng及び10ngを0.8%アガロースゲルにより電気泳動(ミュラービッド、アドバンス社)を行い、DNAの収量とDNAの純度を確認した。抽出時の作業性及びDNAの収量、純度を考慮し、抽出に適した部位を選定した。

「吉蔵」以外の供試材料については、葉身0.5gを上記の方法により洗浄してDNAを抽出し、PCR反应用DNA溶液を調整した。

### 3. PCRによる品種間多型の検出とプライマーのSTS化

品種間多型の検出にはランダムプライマーセット(BEX社)から79種類を用いた(以下、コモンプライマーとする)。PCR反应用DNA溶液1 $\mu$ Lに、10 $\mu$ Mコモンプライマー 0.38 $\mu$ L、r-Taq(タカラバイオ社)付属のPCR緩衝液1.5 $\mu$ L、2.5mM dNTP 1.2 $\mu$ L、25mM 塩化マグネシウム 0.9 $\mu$ L、耐熱性DNAポリメラーゼ(r-Taq、タカラバイオ社)0.125ユニットを氷上において混合し、純水を加えて全量を15.0 $\mu$ Lに調整した。TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice(タカラバイオ社)を用い、95°C30秒間、42°C30秒間、72°C1分間を1サイクルとして30サイクルの

増幅プログラムによりPCRを行った。

得られたPCR産物を、1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後、1 $\mu$ g/mLエチジウムブロマイドにより10分間染色した。染色後、ゲルをプリントグラフ(アトー社)により紫外線照射して多型を検出した。多型の認められたDNA断片を切り出し、QIAEX II Gel Extraction kit (150)(QIAGEN社)を用いて精製した。

精製したDNA断片をDNA Ligation Kit Ver.2及びpT7Blue-2 T-Vector(タカラバイオ社)を用いてクローニングし、ABI PRISM 377 DNA Sequencer(ABI社)により塩基配列を決定した。塩基配列をもとにプライマーのSTS化を行い、より特異性の高いプライマーペアに改変した。

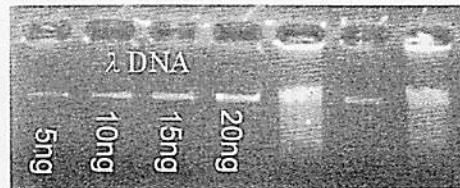
### 4. STS化プライマーペアの選抜

PCR反应用DNA溶液1 $\mu$ Lに、20 $\mu$ M STS化プライマーペア 0.1 $\mu$ L、r-Taq(タカラバイオ社)付属のPCR緩衝液1.5 $\mu$ L、2.5mM dNTP 1.2 $\mu$ L、25mM 塩化マグネシウム 0.9 $\mu$ L、耐熱性DNAポリメラーゼとしてTaq Polymerase(NEB社)0.125ユニットを氷上において混合し、純水を加えて全量を15.0 $\mu$ Lに調整した。TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice(タカラバイオ社)を用い、95°C30秒間、64°C30秒間、72°C1分間を1サイクルとして30サイクルの増幅プログラムによりPCRを行った。

得られたPCR産物を、前述のコモンプライマーを用いたPCR産物の場合と同様にして、品種間多型を検出した。STS化前と同じ品種間多型が認められ、かつ、再現性の高い結果の得られるプライマーペアを品種識別マーカーとして選抜した。



第1図 洗浄1回のDNA原液の電気泳動画像  
DNA抽出組織は、左から、葉身、根、総包  
 $\lambda$  DNAの発光強度と比較してDNA抽出量を推定した



第2図 洗浄2回のDNA原液の電気泳動画像  
DNA抽出組織は、左から、葉身、根、総包  
 $\lambda$  DNAの発光強度と比較してDNA抽出量を推定した

III 結果及び考察

1. DNA抽出の容易な部位の選定と抽出方法の改良

「吉蔵」の葉身、根、総包の3組織間でDNA抽出量及び、DNA溶液中の不純物を比較したところ、葉身、総包、根の順にDNA抽出量も不純物も多かった(第1図)。根はすりつぶしが困難であるために、DNA抽出量及び不純物量が少なかったと考えられた。洗浄時、総包及び根をすりつぶした場合には粘りが見られなかったが、Phytopure抽出緩衝液を加えて加温すると、葉身、根、総包、すべての試料に多糖類によると考えられる粘りが観察され、DNA原液にも粘りとネギ特有の臭気が残った。このことから、粘りと臭気の点において3組織間に試料としての優劣はないと判断した。電気泳動画像の各組織のDNAのバンドは幅広で、波状になった。これは、多糖類の粘りによりDNA溶液がウェル中に均一に広がらなかったためであると考えられた。また、粘度が高いためにDNA原液の一部がウェル中に残った。Phytopure抽出液にペクチナーゼを添加してDNAを抽出したにも関わらず、多糖類を完全には除去できなかったことから、ネギに含まれるセルロース、ヘミセルロース等、ペクチン以外の多糖類が十分に除去できなかったと考えられた。

そこで、洗浄用緩衝液による洗浄回数を1回から2回に増やし、水溶性多糖類及び臭気成分の洗い流しを試みたところ、臭気成分は感じられない程度まで少なくなった。葉身及び総包の電気泳動画像のDNAのバンドは第1図と同様に波状に広がり、多糖類が残留していると考えられたが、洗浄が1回であった場合と比較して改善が見られた(第2図)。ヘミセルラーゼ等、水に不溶の多糖類の分解酵素処理を追加すると改善される可能性があったが、追加処理を行わない場合でも実用上は支障がないこと、追加処理を行うと抽出作業が煩雑になり技術の実用性が低下することから、これ以上の酵素処理は行わないこととした。

以上の結果から、DNA抽出組織は最も入手しやすくDNAが多量に抽出可能な葉身部分とし、洗浄用緩衝液で2回洗浄した後、ペクチナーゼ及び $\alpha$ -アミラーゼを添加したPhytopure抽出緩衝液により抽出する方法を採用した。

2. 品種間多型の探索とRAPD-STSMarkerの選抜

坊主不知ネギの品種間多型を探索するために、PCR反応用DNA溶液を使用してコモンプライマー79種によるPCRを行ったところ、23のコモンプライマーにおいて600~2000kbpsの間で多型が認められた(第2表)。残り

第2表 多型が見られたコモンプライマーの塩基配列

番号	塩基配列
A12	CTC CTG CTG TTG
A17	GGT TCG GGA ATG
A18	GAC CTG CGA TCT
A19	AAG GCG CGA ACG
A22	TTC AAG CTA CCA
A25	GGT CAG GCA CCA
A26	GGT GAG GAT TCA
A28	TAC CCT CAA GCT
A30	CCT TTC CGA CGT
A32	CTT GTC ATG TGT
A33	GAC TGC TAT ACA
A34	CCT GCG GGA GGA
A37	AGC GCG GCA AAA
B42	GCT ATG GCA ACG
B45	GGA TCC GAC GGC
B55	TGG CTT CAT CAC
C01	GAG TGG AAA CAT
C07	TTC AAG CGT ATC
C11	AGG TAC GCC CGA
C12	CCG GAG TGG ATG
C14	CTG CCT GTA CCA
C24	AAC GAG CAG AAC
C26	CAC GTT ATC GCA

第3表 選抜したRAPD-STSMarker

プライマー番号	配列
BL1-F	ACGAGCAGAACGCTGAAAC
BL1-R	GAGCAGAACCAACATATGTTTCAG
BL2-F	GGCTTCATCGTACTTTTCG
BL2-R	CAGGAGAGCTGAAACAGCC
BL3-F	CCGACGTTTCATCATTTCCTCG
BL3-R	GACGGAAGAGATACGATGCG
BL4-F	CAAGCTACCAGACGACCTAAC
BL4-R	TCCAAGCTACCATGCCATT
BL5-F	TACAAAAGCTCATTCCGGCATC
BL5-R	ACTGTACAAATGCACCTCCATG

注) F:ForwardとR:Reverseを一組としてPCR反応に使用する

56のコモンプライマーでは、明らかな多型は認められなかった。

多型の観察されたDNA断片を切りだして精製した後、クローニングされた12断片について塩基配列を解析し、得られた塩基配列情報をもとに15ペアのSTS化プライマーを作成した。これらのプライマーから、PCRによる増幅が比較的安定している5ペアを品種識別用RAPD-STSMarkerとして選抜した(第3表)。ただし、RAPD-STSPライマーペアによる増幅はDNAの純度の影響を非常に強く受けることが知られている。本実験においても、多

第4表 RAPD-STSマーカーを使用した識別結果

BL1	BL2	BL3	BL4	BL5	識別品種・系統
-	+	+	+	-	足長美人
+	+	+	+	-	向小金系
-	-	+	-	-	手賀黒系
-	-	+	-	+	葉折れ系
-	+	+	-	+	RH22
-	+	+	-	-	小金系, 風早黒系, 夏婦人
-	+	-	+	-	山口系, ジャンボ82系
-	+	+	+	+	落合ジャンボ系, 逆井早生系, 藤心晩生系, 流山系, 五月姫
+	-	-	+	+	吉蔵

注) +: 検出 - : 未検出

糖類の影響でDNAの純度が低いためPCR反応で増幅が不十分な場合が認められたため、品種識別の際には3回PCRを実施した結果から判定を行った。

### 3. RAPD-STSマーカーによる品種識別

選抜したRAPD-STSマーカーによって、新品種「足長美人」、現在の主力系統「向小金系」の他、「葉折れ系」、「手賀黒系」、「RH22」、栄養繁殖性ネギ「吉蔵」が識別された(第4表)。その他の坊主不知ネギ10品種・系統は、「落合ジャンボ系」、「逆井早生系」、「藤心晩生系」、「流山系」及び「五月姫」が含まれるグループと、「小金系」、「風早黒系」及び「夏婦人」が含まれるグループ、「山口系」と「ジャンボ82系」が含まれるグループに分類された。

坊主不知ネギの生産は主に東葛飾地域、印旛地域において1935年ごろに始まり、現在の坊主不知系統は1965年ごろに成立した(湯橋, 1985)。あまり大きくない集団をもとに、突然変異系統の選抜を中心に品種改良が進められたことから、坊主不知ネギにはDNAマーカーによる品種識別が困難な系統が多いと予想された。実際、「五月姫」は「流山系」と「葉折れ系」を交雑して育成した品種であるが、両親系統間にはBL2とBL4にしか多型がなく、「五月姫」と「流山系」には多型が見出せなかった。

以上の結果から新品種「足長美人」を含む5品種の識別が可能になった。しかし、DNAの純度がPCR精度に及ぼす影響が大きく、PCR反応を3度繰り返す必要があった。今後、より高純度でかつ簡易にDNAを抽出する方法の開発が課題となる。

## IV 摘 要

坊主不知ネギ新品種「足長美人」を含む15品種・系統についてRAPD-STSマーカーによる品種識別技術の開発を試みた。

- 5つのプライマーペアからなる、坊主不知ネギ品種識別用RAPD-STSマーカーを開発した。
- 「足長美人」、「向小金系」、「葉折れ系」、「手賀黒系」、「RH22」及び「吉蔵」が識別可能となった。
- その他の2品種8系統は、「落合ジャンボ系」、「逆井早生系」、「藤心晩生系」、「流山系」、「五月姫」のグループ、「小金系」、「風早黒系」、「夏婦人」のグループ、及び「山口系」と「ジャンボ82」のグループに分類された。

## V 引用文献

- 足立静香(1999). RAPD法によるタマネギの品種識別及びRAPDマーカーのSTS化. 農林水産消費安全技術センター調査研究報告. 23 : 17-31.
- 湯橋 勤(1985). 千葉県野菜園芸発達史 一生産技術の変遷: ねぎ・葉ねぎ一. pp.680-683. 千葉県. 千葉.
- 桑田主税・町田剛史・湯橋 勤・本居聡子(2006). 坊主不知ネギ新品種「足長美人」の育成とその特性. 千葉農総研研報. 5 : 33-40.
- 町田剛史(2003). 蔬菜の新品種一ネギ・ワケギ「夏婦人」、「五月姫」. 15 : 160. 誠文堂新光社. 東京.
- Ohara, T., Y. S. Song, H. Tsukazaki, T. Wako, T. Nunome and A. Kojima (2005). Genetic mapping of AFLP markers in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum*). Euphytica 144 : 255-263.
- 小原麻里・鎌形民子・大越一雄(2007). 千葉県水稲奨励品種のDNAによる識別方法. 千葉農総研研報. 6 : 117-124.
- 大坪研一・中村澄子・今村太郎(2002). 米のPCR品種識別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発. 日本農芸化学会誌. 76 : 388-397.

## Molecular Identification of Bolting-less Bunching Onion Cultivars

Yuri MUROTA, Manabu WATANABE and Chikara KUWATA\*

Key words : bolting-less bunching onion, "Ashinagabijin", cultivar identification, PCR, RAPD-STS markers

### Summary

We developed the identification method of bolting-less bunching onions by RAPD-STS markers consist of 5 primer pairs.

"Ashinagabijin", "Mukaikogane", "Haore", "Tegaguro", "RH22", and "Yoshikura" (welsh onion) were identified by these RAPD-STS markers. The others divided into 3 groups: "Ochiai-jumbo", "Nagareyama", "Satsukihime", "Sakasai-wase" and "Fujigokoro-bansei"; "Kogane", "Kazehayaguro" and "Natsufujin"; "Yamaguchi" and "Jumbo 82".

\* Present Address: Chiba Prefectural Sanbu Agriculture and Forestry Promotion Center