

アブラナ科野菜の S 遺伝子変異の簡易検出技術の開発

Simple method for detecting the polymorphism
of S allele in cruciferous vegetables

種子繁殖性作物の突然変異育種においては、照射当代(M₁世代)の花粉稔性が低下するため、外来花粉による受精が起こりやすい。そのため、後代で得られた変異が突然変異によるものか交雑によるものかを判別できなければならない。アブラナ科野菜のように他殖性が高い作物ではこの点が特に重要である。自家不和合性に関与する S 遺伝子座は極めて多様性が高く、多数の複対立遺伝子が存在する。S 遺伝子の DNA の変異を簡易に検出できれば、個体判別が可能となり、突然変異体と雑種が識別できる。

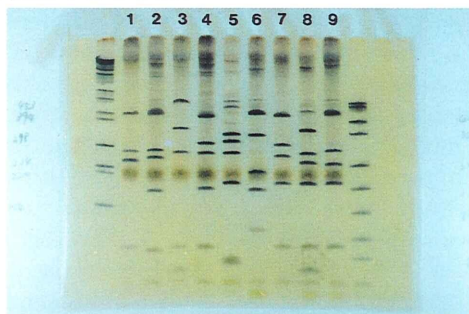
近年の分子遺伝学的研究により、S 遺伝子座は複雑な構造をしており、多数の遺伝子の複合体となっていることが明らかにされてきた。その中で、最初に発見された S 糖タンパク質の遺伝子(SLG)は、約1.3kbのコード領域を有するイントロンのない遺伝子で、これまでいくつかの S 遺伝子について SLG の塩基配列が明らかにされている。SLG に特異的でかつ多くの SLG 間で相同性が高い領域の塩基配列を有する一対のプライマーを用いて PCR 法により SLG を増幅し、制限酵素で切断して得られる DNA 断片の大きさを電気泳動分析することにより、SLG の多型を簡易に検出できる PCR-

RFLP 法を開発した。

SLG はクラス I とクラス II の二つのタイプに分けることができ、クラス内では互いに約90%の相同性を有し、クラス I とクラス II の間で約70%の相同性があることが知られている。SLG の増幅に用いるプライマーを多種検討したところ、PS 5 または PS18 と PS15 の組合せ(表1)でクラス I の SLG が増幅でき、PS 3 と PS21 の組合せでクラス II SLG が増幅できることが分かった。増幅した DNA を Mbo I, Afa I, Msp I 等の 4 塩基認識の制限酵素で切断し、5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、銀染色法で DNA を検出することにより、SLG の多型が検出できた。Brassica oleracea と B. campestris のクラス I の SLG はこれまで44種類の S 遺伝子で増幅できたが、それぞれ互いに異なる電気泳動パターンを示した。クラス II の SLG においても多型がみられた。F₁雑種は両親の DNA 断片を合わせもつパターンを示した。

本方法は、アブラナ科野菜の突然変異育種において外来花粉による雑交のチェックに利用できるだけでなく、F₁品種の純度検定法としても利用可能と考えられる。

(西尾 剛)



第1図. PCR-RFLP 法による *Brassica oleracea* の S ホモ系統における SLG 遺伝子の多型分析

1 : S¹S¹, 2 : S³S³, 3 : S⁶S⁶, 4 : S⁷S⁷, 5 : S¹⁷S¹⁷,
6 : S⁹S⁹, 7 : S¹²S¹², 8 : S¹³S¹³, 9 : S¹⁴S¹⁴

Fig. 1. Polymorphism of SLG in S homozygous lines in *Brassica oleracea* detected by PCR-RFLP

1 : S¹S¹, 2 : S³S³, 3 : S⁶S⁶, 4 : S⁷S⁷, 5 : S¹⁷S¹⁷,
6 : S⁹S⁹, 7 : S¹²S¹², 8 : S¹³S¹³, 9 : S¹⁴S¹⁴

表1. PCRによるSLG遺伝子増幅のためのプライマー
Table 1. Primers used for amplification of SLG by PCR.

プライマー Primers	塩基配列 Nucleotide sequence
PS 3	ATGAAAGGGGTACAGAACAT
PS 5	ATGAAAGGCGTAAGAAAAACCTA
PS 15	CCGTGTTTTATTTTAAGAGAAAGAGCT
PS 18	ATGAAAGGTGTACGAAACATCTA
PS 21	CTCAAGTCCCCTGCTGCGG

Simple method for detecting the polymorphism of S allele in cruciferous vegetables

In mutation breeding of seed-propagated crops, fertilization by foreign pollen happens frequently because of the decrease of pollen viability in mutagenized plants (M_1 generation). Therefore, it is necessary to distinguish mutation from out-crossing. This is especially important for out-breeding crops such as cruciferous vegetables. The *S* locus, which controls self-incompatibility, is highly polymorphic and has many alleles (haplotypes) in each species. The method for detecting DNA polymorphism of *S* alleles makes it possible to identify each plant and to distinguish the mutants from the hybrids.

Recent molecular genetic study has revealed that the *S* locus has a complex structure with some expressed genes. *SLG*, which was first found among them, has a coding region of about 1.3 kb without introns. The nucleotide sequence of the *SLG* was reported in several *S* haplotypes. A simple method of PCR-RFLP for detecting *SLG* polymorphism was developed, an electrophoretic analysis of restriction fragments of *SLG*-DNA amplified by polymerase chain reaction (PCR) with *SLG*-specific primers.

SLG can be classified into two types, class I and class II. Similarity of their nucleotide sequences was about 90% within the classes and about 70% between the classes. In

the screening of primers, a combination of PS 5 and PS 15 and that of PS 18 and PS 15 (Table 1) were found to be suitable for specific amplification of class I *SLG*s, and a combination of PS 3 and PS 21 were suitable for class II *SLG*s. Cleavage of the PCR products by a restriction endonuclease which recognizes tetranucleotide sequence such as *Mbo* I, *Afa* I, or *Msp* I followed by polyacrylamide gel electrophoresis using 5% gel and visualization of DNA by silver staining showed high polymorphism of *SLG*. DNA fragments of class I *SLG* were amplified from 44 different *S* homozygotes in *Brassica oleracea* and *B. campestris*, and they all showed different electrophoretic profiles from each other. Polymorphism of class II *SLG* was also found. The F_1 hybrid between inbred lines had the sum of the bands from both parents.

The present method can be used not only for identifying the contamination of foreign pollen in M_1 generation but as a purity test of F_1 seeds in cruciferous vegetables.