

RAPD 法によるイグサの品種識別

飯牟禮和彦・中澤芳則・宮崎 力¹⁾・斎藤 彰²⁾
 (熊本県農業研究センター¹⁾・科学技術振興事業団²⁾九州農業試験場)

Kazuhiko IMURE, Yoshinori NAKAZAWA, Chikara MIYAZAKI and Akira SAITO :
 Identification of Mat Rush cultivars by RAPDs

イグサの栽培品種は形態的特徴が少ないことから、肉眼観察による品種識別は非常に困難である。栄養繁殖性作物であるイグサは株分けによって品種の維持・増殖がなされ、この株分け作業は1年に苗段階で2回、本田へ移植する際に1回行われ、人為的混入の発生する機会が比較的多い。また、交配育種においてイグサの花は約1.5mmと非常に小さく実顕微鏡による除雄を行っているが、得られた実生がF₁なのかそれとも除雄不完全による自殖であるのかは確定できない。

以上の問題点を解決するために、制限酵素断片長多型(RFLP)と比較して簡便かつ迅速にDNA変異を検出できる無作為複製多型DNA(RAPD)法による品種識別の可能性について検討し、これまでに若干の知見を得たので報告する。

1. 材料および方法

イグサ栽培種 (*Juncus effusus*) 10品種およびイグサ近縁種1系統 (*J.setchuensis*, 系統保存名:「熊本細い」) を供試した。

DNA抽出は各品種の比較的若い健全な茎約5gを用いた。抽出方法の詳細はここでは省略するが、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)という界面活性剤によってDNAを抽出する方法で行った。

DNA濃度推定は試料に雑物質としてRNAがあるため分光光度計は用いず、アガロースゲルで既知量のλDNA(5~20ng)をエチジウムブロマイドで染色し、紫外線で発光する明るさを目測して行った。イグサ茎約5gから約200μgのDNAが抽出できた。これを20ng/μlに調整し合成酵素連鎖反応(PCR)に供試した。

PCR反応液は25μlでその組成は、DNA20ng、プライマー5pmole、基質であるdATP、dCTP、dGTP、dTTP各0.2mMおよびTaq DNAポリメラーゼ0.625unit、Tris-HCl(pH8.3)緩衝液10mM、KCl50mM、MgCl₂1.5mMとした。Taq DNAポリメラーゼ、基質、10×バッファーは宝酒造製を、プライマーは10塩基の任意配列からなるオペロン社製を用いた。PCRの1サイクルは熱変性(94℃, 30秒)、アニーリング(40℃, 2分)および伸長反応(72℃, 3分)からなり、これをバイオオープン(Perkin Elmer社製)で45サイクルを行った。

PCRによるDNA増幅後、反応液20μlをエチジウムブロマイドを含むTAE溶液(0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA)中で、1.2%アガロースゲル(Seakem Typel-A: Low EEO)による電気泳動を行った。分離された

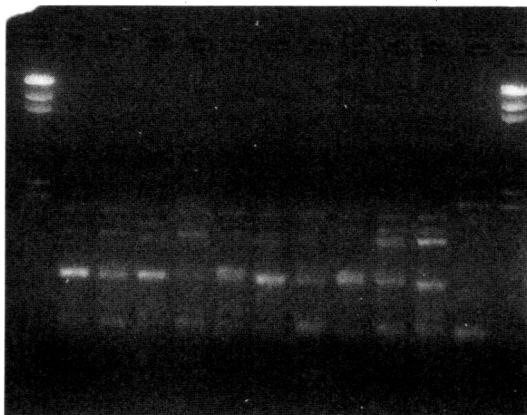
DNA断片の電気泳動パターンは、紫外線照射下でポロイドカメラを用いて撮影した。

2. 結果および考察

供試した80種類のほとんどのプライマーで増幅DNA断片が認められた。増幅DNA断片が認められたプライマーでは「熊本細い」のバンドパターンは他のイグサ栽培品種とは明らかに異なった。また、増幅DNA断片が認められたうちの3種のプライマーでイグサ栽培品種間で増幅DNA断片の多型が認められた。第1図はプライマーAB-08を供試したときのバンドパターンである。これらのバンドの中で、あるプライマーについて品種固有のバンドを探すことによって、あるいは特定バンドの有無の組み合わせによって品種識別が可能になると考えている。

今後の課題としては、今まで多型を示したプライマーに関して再現性のチェックを行うことと、プライマーの種類を増やし多型を示すバンドをさらに探索し、品種識別だけでなく遺伝的な類縁関係の解明にも利用することを検討している。熊本県農業研究センターい業研究所には約600のイグサ遺伝資源があり国内・国外のイグサの自生種・在来種がある。これらの遺伝的類縁関係を調査することによって、交配親の選定や遺伝資源の整理についての判断材料になると考えている。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



第1図 プライマー(AB-08)で増幅されたDNA断片のバンドパターン

注) 1・13: λ Hind III, 2: くまがわ, 3: 岡山3号, 4: 岡山みどり,
 5: しらぬい, 6: さざなみ, 7: きよなみ, 8: いそなみ,
 9: ふくなみ, 10: せとなみ, 11: あさなぎ, 12: 熊本細い