

PCR法を用いたギニアグラスの親子鑑定

山内洋志・齋藤 彰¹⁾・宮崎 力²⁾・入江 浩・牧野雄二・井上茂敏・松岡秀道¹⁾
(家畜改良センター熊本牧場・¹⁾九州農業試験場・²⁾科学技術振興事業団)

Hiroshi YAMAUCHI, Akira SAITOH, Chikara MIYAZAKI, Hiroshi IRIE, Yuji MAKINO, Sigetoshi INOUE and Hidemichi MATSUOKA: Parentage diagnosis of Guinea grass cultivar (*Panicum maximum* JACQ.) by PCR method

品種等の遺伝子の塩基配列を標識として識別できるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法によるDNAフィンガープリント法は迅速に、かつ少量のサンプルによって品種・系統の鑑定が行われることが知られている。本試験ではこの方法を事後検定に活用することを目的とし、その取りかかりとしてギニアグラスの親子、品種・系統間の識別を試みた。

1. 試験方法

供試品種・系統はタンザニアからの導入系統のGR297(2n = 16, 有性生殖), GR297をコルヒチン倍加したギニアグラス中間母本1号(2n = 32, 有性生殖), GR297をもとに育成されたナツカゼ(2n = 32, アポミクシス)の3品種・系統を用いた。GR297と中間母本1号は個体間差違を考慮し、5反復供試した。

PCR反応はDNAの乖離を94℃で30秒, プライマーのアニーリングを40℃で2分, DNAの合成を72℃で3分の反応条件で45サイクル行った。プライマーはOperon社のOPG-01~20の20種類を用いた。得られたPCR産物をアガロースゲル上で電気泳動し、ポラロイド写真撮影によってバンドの解析を行った。

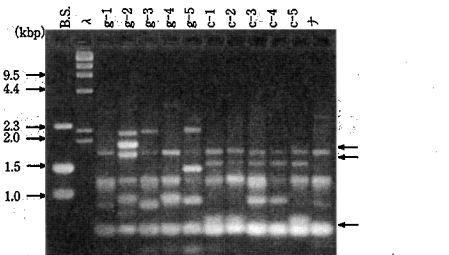
2. 結果および考察

DNA増幅に用いたプライマーのうち、品種・系統間差が顕著に見られたOPG-13とOPG-14について解析する。OPG-13を用いたPCR産物の電気泳動結果では(第1図), 500bp(以下13-500と示す)のバンドが全ての個体で認められた。1800bp(以下13-1800)のバンドは中間母本1号とナツカゼには全ての個体に見られたが, GR297ではバンドが認められない個体もあった。また, 1500bp(以下13-1500)のバンドは中間母本1号で見られたが, GR297とナツカゼでは見られなかった。OPG-14を用いたPCR産物では(第2図), 1100bp, 1000bp(以下14-1100, 14-1000)のバンドが全ての個体で認められた。

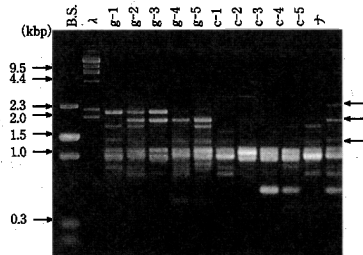
上記で得られた13-500, 14-1100, 14-1000は供試した3品種・系統の全ての個体に見られたことから, これらの親子鑑定を行う際のDNAマーカーとして活用可能と思われる。また, 13-1800は中間母本1号とナツカゼの全ての個体とGR297の一部に見られることから, 中間母本1号やナツカゼがGR297から育成される際に13-1800を有する個体から選抜されたことを反映していると考えられる。さらに13-1500は中間母本1号のみに見られたことから, 今後血縁関係のない異品種・系統との比較によってその特異性が認められれば, 中間母本1号を同定できるDNAマーカーとしての活用も可能である。

一方, 同一系統内のすべての個体に共通ではないものの, OPG-14を用いた際の2200bpや2000bp(14-2200, 14-2000)のバンドはいずれかがGR297に見られ, 3つのバンドパターンを示した(14-2200と14-2000の両方があるもの, 14-2200のみのもの, 14-2000のみのもの)。また, 14-2000のマーカーはナツカゼにも見られることから, 14-2000を持ったGR297の個体がナツカゼの育成過程において片親となっているものと考察される。このように, 親子関係にある品種・系統に共通するDNAマーカーを検索することによって, 品種育成にあたり遺伝子レベルでどのように選抜されてきたかを確認することも可能である。しかし, 有性生殖であるGR297に実際にどれほどのグループが存在するのかは, 今回扱った個体が5個体と限られているため結論づけるのは困難である。有性生殖を行う品種・系統の識別に必要な個体数の検討は今後の課題であろう。

また, 今後品種・系統の鑑定を行うには, 複数のプライマーを用いたタイピングの実施とともに, DNAマーカーとなるバンドをより安定的に得るためのSTS化による長鎖プライマーの構築も必要である。



第1図 プライマーOPG-13を用いたGR297, 中間母本1号, ナツカゼのPCR産物のアガロース電気泳動結果
注) B.S.: サイズマーカー-Bluescript Fok I, λ: サイズマーカー-Hind III, g: GR297, c: 中間母本1号, ナ: ナツカゼ



第2図 プライマーOPG-14を用いたGR297, 中間母本1号, ナツカゼのPCR産物のアガロース電気泳動結果
注) B.S.: サイズマーカー-Bluescript Fok I, λ: サイズマーカー-Hind III, g: GR297, c: 中間母本1号, ナ: ナツカゼ