

野田孝博・飯牟礼和彦
(熊本農研セ)

【目的】

近年、育成者権を無視した不法な栽培や不正な店頭表示により販売されるなどの問題がある。そこで、消費者の安心と育成者権の保護のため熊本県育生の長ナス品種「ヒゴムラサキ」を他の長ナス系の品種と識別することを目的とした。ここでは、広範囲なゲノム領域の検索を行うための手段として、様々な植物においてその有効性が示されている ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat: 単純反復配列間) -PCR 法を利用し、ナスの品種識別への適用を検討した。

【材料及び方法】

1. 供試品種

熊本県農業研究センター採種の「ヒゴムラサキ」を使用し、対照として独立行政法人 農業生物資源研究所ジーンバンクより配布された長ナス系品種「佐土原長 (JP番号33219)」、「熊本長 (JP番号33304)」、「熊本中長 (JP番号33306)」、「河辺長 (JP番号33126)」、「南部長 (JP番号33218)」、「仙台長 (JP番号33222)」、「大阪中長 (JP番号33274)」について各 4 個体を供試した。

2. DNA の抽出

キアゲン社製の DNA 抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit) を使用し、ナスの葉 (50mg) から全 DNA を抽出し、ISSR 多型検索のためのサンプルとした。

3. プライマー

ブリティッシュコロロンビア大学で開発された ISSR-PCR 用プライマー (100 種: UBC SSR-primer set) No.801 ~ No.900 を使用した。

4. PCR 反応液

鋳型 DNA 約 2 ~ 20ng を用い、1 μ M のプライマー、1Unit の rTaq DNA ポリメラーゼ (タカラ)、1.5mMMgCl₂、0.2mM dNTPs を滅菌水で 10 μ l の

反応系に調整した。PCR 反応は PCR サーマルサイクラー (GeneAmp PCR system 7900; PE Applid Biosystems) を用い、94 °C 5 分、94 °C 30 秒-56 °C 30 秒-72 °C-30 秒 (35 サイクル)、72 °C-7 分、で実施した。

5. 検出

PCR 産物は 1.5 % アーガロースゲル電気泳動後エチジウムブロマイド染色で DNA バンドを検出した。

【結果及び考察】

1. 供試した 100 種類の ISSR-PCR 用プライマーのうち 55 種のプライマーにおいて ISSR 領域を検出できた。しかし、No.802、803、804、805、806、814、819、824、831、832、833、837、838、839、843、844、845、852、853、854、857、860、864、870、871、872、873、874、875、876、877、879、882、883、887、892、893、894、895、896、897、898、899、900 の 45 種のプライマーにおいては ISSR 領域の増幅が確認できなかった。今回の PCR 条件はバックのノイズを減らすためアニリング温度を 56 °C と高く設定したのも原因の一つと考えられる。

2. 供試した長ナス系の 7 品種において同一品種の個体間 (4 個体) で多型を示さず、品種の違いで多型を示す DNA バンドが 6 種のプライマーで 7 種得られた (第 1 表)。

3. 多型を示したバンドの有無に基づき DNA タイピングを行ったところ、供試した 7 品種相互間の識別が可能であった (第 1 表)。

4. 「ヒゴムラサキ」においては No816 のプライマーにおける PCR で 1014bp の ISSR マーカーの有無により「佐土原長」、「熊本長」、「熊本中長」、「河辺長」、「南部長」、「仙台長」、「大阪中長」との識別が可能であった (第 1 表)。

第 1 表 ISSR マーカーによる主要長ナス品種のタイピング

プライマーNo	サイズ(bp)	佐土原長	熊本長	熊本中長	河辺長	南部長	仙台長	大阪中長	ヒゴムラサキ
816	1014	+	+	+	+	+	+	+	-
816	619	+	+	+	-	+	+	+	+
822	729	-	-	+	-	-	-	-	-
823	1058	-	-	-	-	+	-	-	-
836	550	-	+	+	+	+	+	+	+
851	1593	+	-	+	-	+	+	-	-
885	678	-	-	-	-	-	+	+	-

+: バンド有り, -: バンドなし