

スグキナを含む *Brassica rapa* における マイクロサテライト DNA の種内変異

山 岸 博

1. はじめに

アブラナ科の植物には世界的に重要な作物が多数含まれ、食用、油料用、香辛料、飼料用として栽培されている。このうち *B. rapa* においては、ハクサイ、カブ、ツケナなど多様な形態を持つ野菜が特に東アジアで発達した。その一方でヨーロッパでは主として飼料用のカブ品種が発達し、南アジアでは極めて抽苔の早い油料用のナタネが分化した。

このように、*B. rapa* の種内には作物としての用途の点からも、形態的特性の点からも、非常に大きい種内変異が存在する。このためこの種における品種・系統間の類縁関係の解明及びそれに基づく種内分類に関しては、今日まで数多くの研究があるにも関わらず、明確な結論は得られていない。

B. rapa には日本の各地で古くから栽培されてきた在来品種が多数含まれているが、その代表的な例がスグキナである。スグキナは京都上賀茂地域の特産作物で、酸茎漬の原料となる。上賀茂地域においては400年以上の栽培の歴史を持つとされている（高嶋・成田、1970）。この作物は形態的な特徴から、*B. rapa* のうちカブに分類されているが、栽培の歴史が長いため、どのような植物が基になって成立し、今日までどのような育種の手が加えられたかについては十分に研究が進んでいない。

このような *B. rapa* の種内変異およびスグキナの来歴に関する研究の現状を背景に、本研究ではスグキナを含む *B. rapa* の多数の品種・系統を用いて、マイクロサテライト DNA を用いた種内変異の解析を試みた。マイクロサテライトは1~4塩基をコアとする反復配列 DNA であり、生物のゲノム中に多数存在する。この反復配列の数に関しては、同一種の生物においても高い多型性が見られることから、生物個体間の遺伝的關係を解析する際の DNA マーカーとして利用されている。本研究では、今までに開発された多数のマイクロサテライトマーカーから、*B. rapa* での利用が可能なものをスクリーニングすると共に、それらを用いて *B. rapa* 内の品種・系統間多型を検出し、それに基づいて、スグキナと他の野菜との遺伝的類縁関係を推定しようとした。

2. 材料及び方法

(1) 植物材料

実験に用いた *B. rapa* の品種・系統を表-1に示した。上述のように同種内の分類に関しては、現

表-1 マイクロサテライト DNA による変異の解析に用いた *Brassica rapa* の品種・系統

グループ	品種・系統
chinensis	雪白体菜、菜心、チンゲンサイ
japonica	白茎千筋京水菜、丸葉壬生菜
narinosa	如月菜、タアサイ-1、タアサイ-2
oleifera	菜の花、白茎畑菜、Sarson、Torja、C-120
pekinensis	広島菜、彦島春菜、花心白菜、野崎2号、晩生真菜、大晩生白菜黄葉系
rapifera	新晩生小松菜、金町小カブ、日野菜カブ、切葉天王寺カブ、聖護院大丸カブ、野沢菜、スグキナ (9201、9203、9212、9214)
(対照)	
<i>B. nigra</i>	Ni-103
<i>B. oleracea</i>	カイラン

在まで定説はないが、同表においては、我国の園芸学会で採用されている同種作物の種内分類（園芸学会、1979）に従って、供試品種・系統をグループ分けした。同表中‘9201、9203、9212、9214’の4系統は上賀茂地域で収集されたスグキナの系統である。また *B. rapa* に対する外群として、これとは異なる種の *B. nigra* および *B. oleracea* に属する品種・系統をそれぞれ1つずつ実験に加えた。

(2) 植物体からの DNA の単離

供試品種・系統の種子をポットに播種して育苗し、生育した幼苗の本葉から DNA を単離した。本葉を液体窒素中でパウダー状になるまで粉碎した後、自動核酸抽出装置 (MFX-2000、東洋紡) を用いて DNA を単離した。本葉の粉碎から DNA 単離までの作業は、抽出装置使用のプロトコールに従った。得られた DNA の確認は、DNA 抽出液の一部を 1% アガロースゲル内で 100V・30分間電気泳動した後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、紫外線をあてて行った。

(3) マイクロサテライトマーカーのスクリーニング

Suwabe ら (2002) が開発したマイクロサテライトマーカーのうちから26種類のプライマーペアを設計して、PCR を行った。PCR は前変性 94°C 3分の後、変性 94°C 1分、アニーリング 52°C 1分、伸長 72°C 2分のサイクルを30回繰り返すことによって行い、得られた PCR 産物を電気泳動して、DNA の増幅の有無を確認した。用いたプライマーペアのうち、PCR によって *Brassica* 属3種の品種・系統で DNA の増幅が認められるものを選択し、さらにそれを用いて以下のスクリーニングを行った。

供試品種のうち‘チンゲンサイ’、‘タアサイ’、‘野崎2号’について各20個体を用いて上と同様の条件で PCR を行った。得られた PCR 産物を電気泳動したパターンから、3品種間で DNA バンドの

サイズに差が見られ、かつ各品種内ではサイズがそろっているものを選んだ。そのようにして選ばれたプライマーペアを用いることによって、*B. rapa* において安定して品種間差を生ずる DNA マーカーが得られると判断して、供試品種全体の解析を行った。

(4) *B. rapa* における品種・系統間変異の解析

上記の過程でスクリーニングされた DNA マーカーを用いてより鋭敏に品種間変異を検出するために、ALF 泳動装置を用いた電気泳動を行った。まず供試品種・系統の DNA を鋳型として、変性 94°C 1 分、アニーリング 60°C 1 分、伸長 72°C 1 分で 30 サイクルの PCR を行った後、得られた PCR 産物を ALF 専用のアクリルアミドゲル (8%) を用いて 270 分間泳動した。

各プライマーペアについて得られた泳動パターンから、増幅 DNA バンドの有無を、バンドのサイズごとに 1-0 データとして得た。全てのプライマーペアにわたるこの 1-0 データを用いて、SAS プログラムを用いてクラスター分析を行った。

3. 結果および考察

(1) マイクロサテライトマーカーのスクリーニング

用いた 26 種類のマイクロサテライトマーカーのうち 23 種類は、*B. rapa* において 1、2 本の特異的なバンドを増幅したが、他の 3 種類では明確なバンドの増幅が認められなかった。更に 23 種類のうち 16 種類は *B. nigra*、*B. oleracea* など他の *Brassica* 属植物でも特有のバンドを生じたため、この 16 種類を用いて更にスクリーニングを行った。

Brassica 属で有効と判断された上記 16 種類のマーカーについて、‘タアサイ’、‘チンゲンサイ’、‘野崎 2 号’ の 3 品種間で安定して多型を示すマーカーを検索したところ、最終的に表-2 に示す 10 種類のマーカーを選び出すことができた。

得られたマーカーを用いた PCR パターンを総合して、‘チンゲンサイ’、‘タアサイ’、‘野崎 2 号’ の 3 品種における品種内の個体間の類似度と、異なる品種に属する個体間の類似度を算出した結果を表-3 に示す。

同表より明らかなように、選抜したマイクロサテライトマーカーによる PCR パターンは、品種内では 0.70 (‘チンゲンサイ’、‘野崎 2 号’) 又は 0.84 (‘タアサイ’) という高い個体間類似度を示したのに対して、品種間では ‘タアサイ’ と ‘チンゲンサイ’ の間で 0.59 とやや高い値を示したものの、他の組み合わせでは 0.45 又は 0.33 と低くなった。更にこれらのマーカーによるデータから得た 3 品種各 20 個体のクラスター分析の結果 (図-1) は、3 品種が明瞭に 3 つのクラスターに分かれることを示した。これらのことから、今回得られたマイクロサテライトマーカーは *B. rapa* における品種・系統間変異を解析するために有効であると判断された。そこでこれらのマーカーを用いて、種内変異の解析

表-2 *B. rapa* の種内変異の解析用にスクリーニングされたマイクロサテライトのプライマー

プライマー	繰り返し単位	プライマー配列 (5'-3')
BRMS 005F⇔005R	(GA)13	ACCTCCTGCAGATTCGTGTC GCTGACCTTTCTTACCGCTC
BRMS 019F⇔019R	(GT)10	CCCAAACGCTTTTGACACAT GGCACAATCCACTCAGCTTT
BRMS 027F⇔027R	(GA)17	GCAGGCGTTGCCTTTATGTA TCGTTGGTCGGTCACTCCTT
BRMS 030F⇔030R	(CT)14	TCAGCCTACCAACGAGTCATAA AAGGTCTCATACGATGGGAGTG
BRMS 034F⇔034R	(GA)18	GATCAAATAACGAACGGAGAGA GAGCCAAGAAAGGACCTAAGAT
BRMS 036F⇔036R	(CA)10, (GA)4	GGTCCATTCCCTTTTTGCATCTG CATGGCAAGGGGTAACAAACAT
BRMS 042-2F⇔042-2R	(GA)4, (CT)26	GGATCAGTTATCTGCACCACAA TCGGAATTGGATAAGAATTCAA
BRMS 043F⇔043R	(A)21, (T), 14, (GT)16	GCGATGTTTTTTTCTTCAGTGTC TTAATCCCTACCCACAATTTCC
BRMS 046F⇔046R	(GA)8, (CA)1, (GA)6	TTGGCCTTGCTATTACGAGCTG ATGCGCAAACCCTAATTTTCAC
BRMS 056F⇔056R	(GA)13	GATCAAGGCTACGGAGAGAGAG CGTGACGCTAGAGTAATCGAGT

表-3 ‘タアサイ’、‘チンゲンサイ’、‘野崎2号’における品種間および品種内個体間の類似度

	タアサイ	チンゲンサイ	野崎2号
タアサイ	0.84	0.59	0.33
チンゲンサイ		0.70	0.45
野崎2号			0.70

を行った。

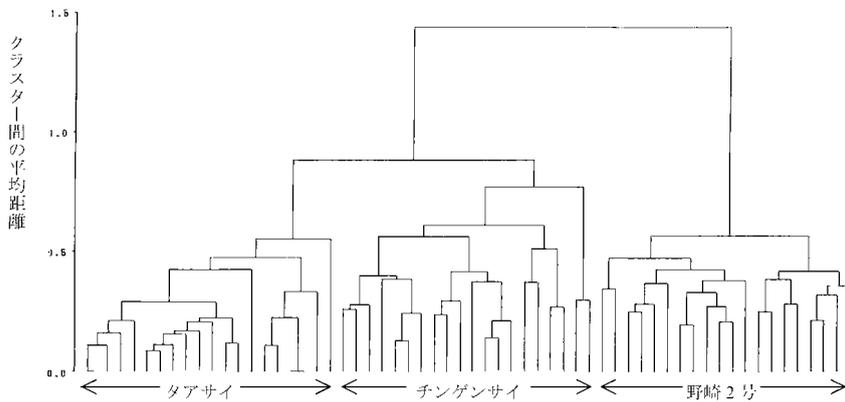


図-1 マイクロサテライト DNA による 'タアサイ'、'チンゲンサイ'、'野崎2号' のクラスター分析

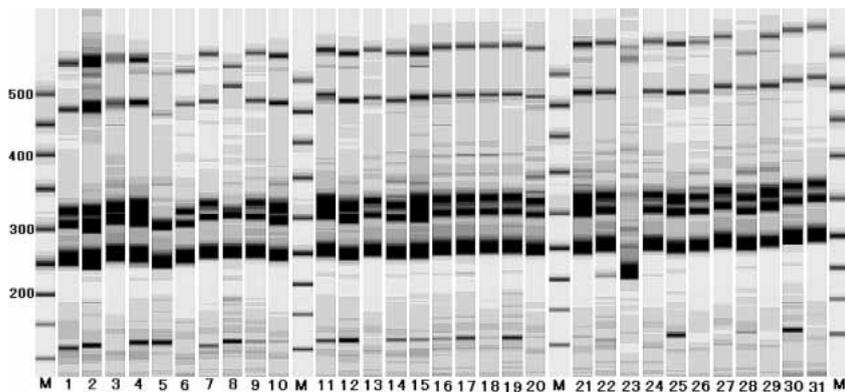


図-2 調査品種・系統間の PCR パターンの差
(プライマーペアは019F⇔019R)
M; 分子量マーカー、1~31; 供試品種・系統

(2) *B. rapa* におけるマイクロサテライトの種内変異

選抜されたマイクロサテライトマーカーのうち、019F⇔019R のプライマーペアにおける PCR パターンを図-2 に、また10個のマーカーによるパターンを総合して得られたクラスター分析の結果を図-3 に示した。図-2 に示したように、PCR パターンには供試した品種・系統間で明確な多型が認められた。これらの多型に基づくクラスター分析の結果からはまず *B. rapa* 以外の2種に属する 'カイラン' と 'Ni-103' が明らかに他の品種・系統と異なるクラスター (D) を形成し、用いたマーカーが *Brassica* 属の種間変異の解析にも有効であることが示唆された。

次に *B. rapa* においては '花心白菜' が単独に存在して、他の品種系統と同一のクラスターに属しなかった。また調査した大多数の品種・系統が A 又は C のどちらかのグループに含まれたのに対し

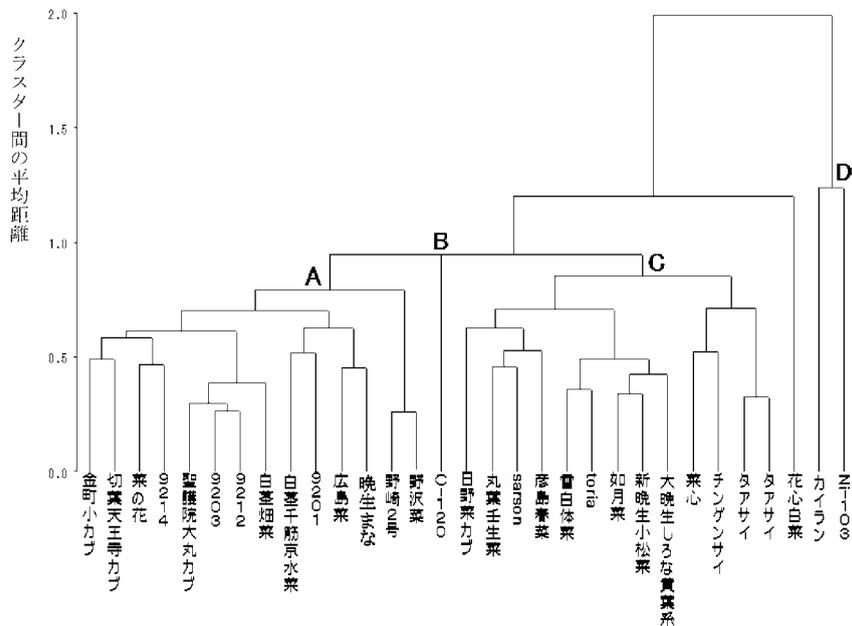


図-3 マイクロサテライト DNA による *B. rapa* の種内変異のクラスター分析

て、‘C-120’は1系統のみで両グループの中間（B）に位置した。これらクラスター上で他の大多数の品種・系統と異なる特徴を示した‘花心白菜’と‘C-120’については、今後より詳細な検討が必要であろう。とりわけ‘C-120’は2つの大きいグループの中間にあるため、両グループ間の分化のメカニズムを知る上で貴重な材料となる。

今回用いたスグキナの4系統は、多くの品種・系統を含む上記のAとCの2つのグループのうち、Aグループに含まれた。このグループには‘日野菜’を除くカブの品種が全て含まれており、スグキナと‘カブ’との類縁関係の深さが推測された。とりわけ‘9203、9212’の2系統は‘聖護院大丸カブ’と同一のクラスターに含まれた。このことは、高嶋・成田（1971）による「スグキナの発達には‘聖護院カブ’が遺伝的影響を与えた」とする推定を裏付けるものであると考えられる。しかし、その一方で、同図からはスグキナ系統は必ずしも全てが互いに類似した遺伝的特性を持つものではないことがうかがえる。すなわち、‘9214’は‘聖護院カブ’とは異なる、‘切葉天王寺カブ’や‘菜の花’と同一のクラスターに含まれ、更に‘9201’は‘白茎千筋京水菜’と近い関係にあることが示された。

以上、マイクロサテライトマーカーを用いた今回の解析によって、上賀茂地域のスグキナが *B. rapa* 内で占める分類学的な位置についていくつかの知見が得られた。すなわち、まず *B. rapa* が種内で大きく2群に分類される中で、スグキナはカブ品種の大多数が含まれるグループに属することが明らかになった。しかし、同グループ内でのスグキナの位置については差異が認められ、特にカブと

は異なる ‘水菜’ と極めて近い関係にあることをうかがわせる系統も存在した。これらのことはスグキナが主としてカブと共通の遺伝的特徴を保持しつつも、系統によっては他の種類の野菜の遺伝子を受け継いで発達してきたことを示しており、この作物における遺伝的な多様性の存在をうかがわせる。今後更にスグキナの調査系統数をふやすことによって、同作物の包含する遺伝的変異及びそれと *B. rapa* 内の他の野菜との関係についての解明が進むものと期待される。

参考文献

- 1) 園芸学会 (1979) 園芸学用語集 園芸作物名編 pp.82 (養賢堂、東京)
- 2) Suwabe, K., Iketani, H., Nunome, T., Kaga, T., Hirai, M. (2002) Theor. Appl. Genet. 104:1092-1098.
- 3) 高嶋四郎・成田直泰 (1970) 京都府立大学学術報告 農学22; 1-8
- 4) 高嶋四郎・成田直泰 (1971) 京都府立大学学術報告 農学23; 29-33

