

カーネーション培養変異選抜のための ISSR-PCR 法

新井正善

(秋田県生物資源総合開発利用センター)

Identification of Somaclonal Variations by ISSR-PCR Analysis in Carnation
(*Dianthus caryophyllus* L.)

Masayoshi ARAI

(Akita Prefectural Center for Biological Resources Development)

1 はじめに

カーネーションは主に交配及び枝変わりの選抜によって品種育成されているが、類似する品種が数多くあり、品種識別が難しい。また、ウイルスフリー化を目的とした茎頂培養及び組織培養による増殖が一般化しているものの、増殖中の突然変異による枝変わりも懸念される。近年、PCR法の発展に伴い、RFLP法やRAPD法など様々なDNA鑑定法が確立されている。一方、種々の植物にマイクロサテライトと呼ばれるDNAの1～数塩基の単純繰り返し配列が存在していることが知られている。この部位はその構造から組み替えが起こりやすいことが指摘されており、品種や系統間の識別に有効であることがイネ、ダイズ、アブラナなどで報告されている。そこで、DNA多型による品種識別及び培養変異個体の識別を目的として、単純繰り返し配列に相当するプライマーを用いるISSR-PCR法について検討した。

2 試験方法

(1) 供試品種系統

市販の6品種(ノラ、フランセスコ、アニー、ユーコン、ツンドラ、バーバラ)、実生系統30種、及び、ノラの培養変異である4系統を用いた。

(2) 供試材料

鉢植え植物の葉及び培養植物の葉をDNAの抽出材料とした。培養植物は茎頂培養後、MS培地で2ヶ月ごとに継代培養し、供試材料とした。

(3) DNA抽出

分析に用いたDNAは供試材料の葉からDoyle & Doyle¹⁾(1987)の簡易CTAB法(図1)により抽出した。

(4) PCR条件

PCRはGeneAmp9600(Perkin Elmer社)を用い、10ngのテンプレートDNA、dNTPを各200μg、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、2mM MgCl₂、50mM KCl、primer 0.5μM、Taq DNA Polymerase (Promega社) 1 unitを、それぞれ含む20μlの反応液で行った(表1)。PCR条件は95℃、5分間の初期変成後、95℃で45秒

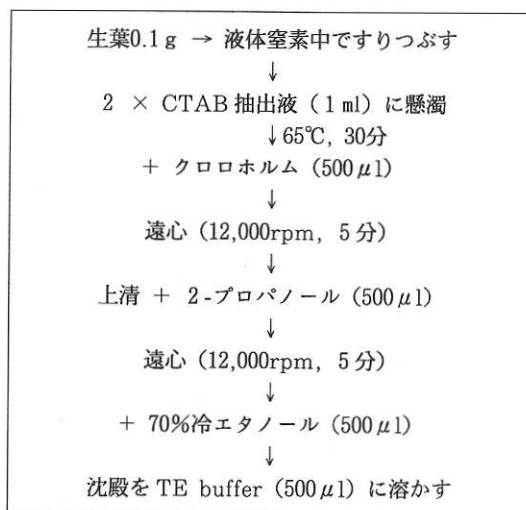


図1 生葉からのDNA抽出工程
(Doyle & Doyle 1987)

表1 反応液の組成

DNA	10ng
dNTP	各200μg
Tris-HCl (pH 8.3)	10mM
MgCl ₂	2mM
KCl	50mM
Primer	0.5μM
Taq DNA Polymerase	1unit

*各反応液は20μl

間の変成、48℃又は50℃で45秒間のアニール、72℃で2分間の伸長反応を1サイクルとし、40サイクル反応させた後、72℃で7分間の最終伸長反応を行った。

(5) DNA多型解析

PCR産物はTBE buffer (pH 8.0)で作成した7.5%ポリアクリルアミドゲルで300V、90分間電気泳動し、銀染色後、バンドの観察及び撮影を行った。

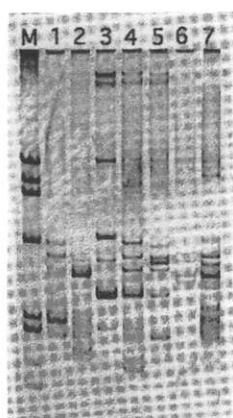


図2 DNA鑑定による品種識別の1例

M: 分子量マーカー
1: ノラ
2: ポーレッド
3: フランセスコ
4: アニー
5: ユーコン
6: ツンドラ
7: パーバ



図3 DNA鑑定による系統識別の1例

M: 分子量マーカー
1: 培養変異系統ILY
2: ノラ
3: 培養変異系統DC3
4: 培養変異系統N1
5: 培養変異系統N5

3 試験結果及び考察

(1) 市販の品種及び実生系統の識別

供試品種系統のうち市販の6品種及び実生系統30種では、供試した14種類の primer のうち、AC 及び AG を8反復持つ8種類で7.5%ポリアクリルアミドゲルで分離する増幅 DNA 断片多型が得られ、各品種及び系統間で容易に識別ができた(表2)。

(2) 培養変異系統の識別

ノラとその培養変異系統は市販の品種及び実生系統の識別で有効であった8種類の primer を用いても、多くの場合、すべての系統を識別することはできなかった。しかし、AG を8反復持ち、3' 末端に TG 又は TT を付加した primer を用いた場合、すべての系統間で増幅 DNA 断片の多型が認められた。ノラとその培養変異系統の主な形質

表2 本試験に用いた primer と DNA 鑑定結果

primer	市販 6品種	実生系 30系統	培養変異 4系統	評価
ACACACACACACACTA	○	○	△	
ACACACACACACACTC	○	○	△	
ACACACACACACACTG	○	○	△	
ACACACACACACACTT	○	○	△	
AGAGAGAGAGAGAGTA	○	○	△	
AGAGAGAGAGAGACTC	○	○	△	
AGAGAGAGAGAGACTG	○	○	○	◎
AGAGAGAGAGAGAGTT	○	○	○	◎
GTGTGTGTGTGTGTGA	—	—	—	
GTGTGTGTGTGTGTGC	—	—	—	
GTGTGTGTGTGTGTGT	—	—	—	
CTCTCTCTCTCTCTA	—	—	—	
CTCTCTCTCTCTCTG	—	—	—	
CTCTCTCTCTCTCTTT	—	—	—	

注. ○は判別可能, △は一部可能, —は判別不可を示す。

表3 供試培養変異系統の各形質の比較

系統	花色	花径	草丈	その他
ノラ	ピンク	中	中	
ILY	赤	中	中	
DC3	ピンク	中	中	時に赤斑
N1	ピンク	中	中	萼割離
N5	ピンク	大	低	葉幅広

の違いは表3に示すが、これらの系統間では通常の交配育種よりも DNA の塩基配列の違いが少ないことが示唆された。

4 ま と め

AG を8反復持ち、3' 末端に TG 又は TT を付加した primer を用いた ISSR-PCR 法により、本試験の条件で、カーネーションの品種及び培養変異系統の識別が可能であることが示された。

引用文献

- 1) Doyle, J.J. ; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.