

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 荒 木 直 幸

題目: 野菜におけるDNAマーカーの開発とその植物個体識別への応用
(Development of DNA Markers in Vegetable Crops and Their Application
to Plant Individual Recognition)

本研究では、様々な野菜における核由来と葉緑体由来のDNAマーカーの開発を目的とし、可食部を用いたDNA抽出法を確立するとともに、得られた抽出DNAを用いて幾つかの多型検出手法の適用を試みた。また、DNAマーカーを利用してネギ属植物の品種・系統識別や類縁関係について解析を行った。

33種類の野菜可食部から微量サンプル抽出法で得られたDNA中のタンパク質混入度(A260/A280)は何れも1.8以上となりPCRに適する値が得られた。しかし、リーフレタスとゴボウから得られたDNA溶液は褐色を呈してPCR阻害がみられた。このような場合、最終濃度10mMの2-メルカプトエタノールをDNA溶液に添加し、Nucleon PhytoPure Kitで精製することで着色がなくなり、PCR阻害もみられなくなった。増幅可能となったDNAを用いて6プライマー組合せについて蛍光AFLP分析を行ったところ、各材料で総数65~249のピークがそれぞれ得られた。野菜の種類ごとに適したプライマー組合せを選択することで、AFLP分析は品種識別を効率的に行う手段になり得るものと考えられた。さらに、他殖性の野菜における品種識別の可能性を検討するために、ネギ16品種・系統においてそれぞれ16個体を混合して作製したDNAサンプルを用いたAFLP分析を行った。その結果、得られたDNAフィンガープリントを比較することにより、用いた品種・系統を相互に識別することが可能となった。

ChungとStaub(2003)のユニバーサルプライマーセットを用いて野菜34種類の葉緑体DNA上SSR領域の分析を行ったところ、種間多型解析への有効性が確認できた。また、ネギ属栽培種と野生種において、詳細な多型解析を試みたところ、雑種起源の植物とその種子親の関係にあるワケギとネギを除く全ての種間においてDNAマーカーのサイズが明確に区別でき、本法がネギ属植物の種間多型検出に有効であることが明らかとなった。

ワケギ5品種から構成される9系統（ウイルスフリー系統；広島1号～広島9号）を用いて16通りのプライマー組み合わせについて、AFLP分析を行って品種・系統識別の可能性を検討した。その結果、以下の1～3の成果が得られた。

1. ワケギのAFLP分析には、16通りのプライマー組み合わせのうち12通りが有効で、用いた9系統において総数678本のピークが観察された。

2. ワケギ栽培系統を識別するために利用できる11種類のAFLPマーカー（総数の1.62%）が得られた。これらのマーカーの有無により、広島1号（‘下関’）と広島2号（‘寒知らず’早生系）の識別はできなかったが、他の系統間の識別は可能であった。

3. ワケギの祖先種であるネギおよびシャロットを用いて同じ12プライマー組み合わせによる分析を行ったところ、ワケギ9系統から得られた総ピーク698本は、26.3%がネギに、23.5%がシャロットにそれぞれ由来していると考えられた。さらに、11種類のワケギAFLPマーカーに関しては、5種類がネギに、3種類がシャロットにそれぞれ由来していることが推定された。これらの結果は、ネギとシャロットがワケギの祖先種であるとする以前の報告を支持するものであった。

この様に、AFLPマーカーはワケギ栽培系統の識別に利用でき、異品種もしくは異系統の混同防止に役立つものと考えられた。

ネギ属栽培種 (*Allium cepa*, *A. fistulosum*) とそれらの近縁野生種 (*A. altaicum*, *A. galanthum*, *A. oscaninii*, *A. roylei*, *A. vavilovii*) を用いて、核由来のマイクロサテライトマーカーの有効性を評価した。77種類（29種類がタマネギ由来；46種類がネギ由来；1種類がタマネギEST由来）のプライマーセットを用いてPCR増幅を行ったところ、いずれの種においても1つないし複数の増幅産物が全てのプライマーセットで得られ、7種のネギ属植物間で多くのDNAマーカーが得られた。いくつかのDNAマーカーは、シャロットとタマネギのF₁雑種の同定のみならず、そのF₂集団における遺伝解析に有効であった。また、得られた全てのマーカーをネギ属 *Cepa* 節と *Phyllodolon* 節の2つの栽培種と4つの野生種の類縁関係の推定に利用したところ、これまでの分子マーカーや形態形質により得られた解析結果を概ね支持していた。タマネギ由来とネギ由来のプライマーセットにおいて、複合病害抵抗性を有する絶滅危惧種 *A. roylei* の系統図中の位置が異なっていたため、本種のネギ属における分類を明確にすることはできなかった。

以上より、本研究において数多くの野菜由来のDNAマーカーが得られ、今後、育種や品種・系統識別への応用が期待される。