

RAPD分析による 'スグキナ'のkabu品種との類縁関係の解析

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者名	藤本,卓矢 山岸,博
発行元	園藝學會
巻/号	65巻3号
掲載ページ	p. 609-614
発行年月	1996年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



RAPD 分析による 'スゲキナ' のカブ品種との類縁関係の解析

藤本卓矢*・山岸 博

京都産業大学工学部 603 京都市北区上賀茂

Investigation on the Phylogenetic Relationship between 'Sugukina' and Turnip (*Brassica campestris* L.)
by RAPD Analysis

Takuya Fujimoto and Hiroshi Yamagishi

Faculty of Engineering, Kyoto Sangyo University, Kamigamo, Kita, Kyoto 603

Summary

RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis was applied to strains of 'Sugukina' and turnip varieties (*Brassica campestris* L.), to clarify the phylogenetic relationship between the two. 'Sugukina' is cultivated traditionally in Kyoto district. DNA fragment patterns of the nine 'Sugukina' strains and the twelve turnip varieties were compared and their relationships were estimated by cluster analysis.

Total DNA was isolated from a leaf of each of the twelve plantlets of the respective strains and varieties, and used as a template of the polymerase chain reactions (PCR). For the PCRs, four kinds of decamer primers were used. Sixty-nine DNA fragments showed the definitive polymorphisms among the 252 plants analyzed, of which 50 bands were selected for comparison. More than 50% of the plants in at least one strain or variety possessed the 50 bands, whereas less than 50% of the plants in another strain or variety had the same bands.

Similarity ratios of the DNA fragment patterns of each 'Sugukina' strain with the other eight strains ranged from 0.40 to 0.56, the average being 0.49. On the other hand, the average similarity ratio value of the 'Sugukina' with the turnip varieties was 0.30. By cluster analysis, all nine 'Sugukina' strains formed a cluster clearly isolating them from another cluster containing all the turnip varieties. In the cluster of the 'Sugukina', seven out of the nine strains were included in two subclusters, but the other two strains possessed the different positions from them.

These results indicate that the 'Sugukina' is a unique group of vegetables, containing large genetic variations and having different genetic characteristics from the turnip varieties growing in Japan.

緒 言

'スゲキナ'は京都特産の漬物である'酸茎'の材料で、京都上賀茂地域を中心にして300年以上前から栽培されてきた。'スゲキナ'はカブ(*Brassica campestris* L. *rapifera* group)の一種とされているが、栽培化当時の'スゲキナ'の原種がすでに絶滅していること(高嶋・成田, 1970)や、現在でも種苗会社等の育種機関ではなく個々の栽培農家によって採種が行われて、多様な

系統に分化していること等の理由によって、'スゲキナ'の分類学的位置づけは歴史的に混乱してきた。そうした中、高嶋・成田(1970, 1971, 1972)は上賀茂地域より'スゲキナ'の系統を大規模に収集し主として形態学的な特性の調査を行って'スゲキナ'の系統分化について考察した。その中で彼らは明治時代以降の'スゲキナ'の発達過程において'聖護院カブ'の遺伝子が積極的に導入されたとしている。しかし'スゲキナ'とこれらカブ品種との遺伝的な関係を明らかにする研究は今日までなされていない。

一方、植物の遺伝学的類縁関係に関しては、従来の

1996年2月19日 受付. 1996年6月12日 受理.

*現在: (社)淡水生物研究所

形態的特性やアイソザイムに基づく分析にかわって、近年 DNA における変異に注目した解析が盛んに行われるようになってきた。特に PCR 法 (Polymerase chain reaction) の開発 (Saiki ら, 1985) によって、それまで主として用いられていた RFLP の解析に比べてはるかに容易に DNA の比較が行われるようになった。この PCR 法、とりわけ 10 塩基前後のランダムプライマーを用いて PCR を行い DNA の多型を検出する RAPD 法 (random amplified polymorphic DNA; Williams ら, 1990) の利用は、豊富な多型を生ずるために各種植物の品種・系統間比較に活発に用いられている。

我々は京都上賀茂地域で栽培されている 'スグキナ' の種子を収集し、それらの遺伝的変異を調査している (山岸・米澤, 1992) が、その一環として収集 'スグキナ' 系統およびカブの地方品種について RAPD 法による類縁関係の解析を行った。その結果、'スグキナ' の系統間には大きい変異が存在することならびに 'スグキナ' はカブの品種とは異なる独自の遺伝的特性を有する一群の作物であることを認めた。

材料および方法

1. 植物材料

1992 年および 1994 年に上賀茂地域を中心として、可能な限り多くの 'スグキナ' の栽培農家から 'スグキナ' 系統を収集した。これらのうち実際に栽培して形態的特性が明らかになっている 9 系統を本実験に供試した。また近畿地方を中心に栽培されている我国のカブの地方品種 12 品種の種子をタキイ種苗より購入して材料とした (第 4 表)。供試品種・系統を温室で播種・育苗して、各幼苗個体の葉身から DNA を抽出した。DNA の抽出には各品種・系統当り 12 個体を供試した。

2. DNA の抽出および PCR

DNA の抽出は SDS 法 (Dellaporta ら, 1983) に準じて行った。すなわち各個体の葉身 0.3 g を液体窒素中で凍結粉碎し、これを 2 ml の Extraction buffer に懸濁した後、SDS 水溶液 (10% w/v) 200 μ l を加えて 68°C で 30 分間インキュベートした。その後 550 μ l の酢酸カリウム水溶液を加えてすばやく混合し、氷中で急冷した。これを 4°C で 2750 g で 10 分間遠心し、細胞残渣およびタンパク質を SDS と共沈澱させた。上清はミラクロスでろ過して 1 ml のフェノール/クロロフォルムを加えて 10 分間静かに混合した後、遠心分離 (室温, 2750 g, 10 分間) を行った。水層を取

り、2.5 倍量のエタノール (99.5%, -20°C) を静かに加えてゆっくりと混合して DNA を沈澱させた。これを一度 70% エタノールで洗い、沈澱を回収して 500 μ l の TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) に溶解して PCR の鋳型とした。

PCR のプライマーにはオペロン社の OPA2 とそれを 1 塩基置換した 3 種、合計 4 種を用いた。これらのプライマーの塩基配列は第 1 表に示した。PCR は Promega 社の TaqDNA ポリメラーゼキットを用いて行った。PCR の反応は 1 サイクルにつき変性 94°C 1 分、アニーリング 2 分、伸長 72°C 2 分で行った。

PCR の最適条件を検討するために第 2 表に示すように buffer のマグネシウム濃度、アニーリング温度および PCR のサイクル数をそれぞれ 5, 4, 2 段階に設定して反応を行った。その結果、安定して RAPD マーカーを得られる条件として、マグネシウム濃度を 2.5 mM、アニーリング温度を 40°C とし、PCR を 30 サイクル行うことに決めた。得られた PCR 産物は 3% ヌシーブゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。

3. DNA 多型の検出および統計的解析

PCR と電気泳動によって生ずる DNA 断片のうち、供試 12 品種・9 系統 252 個体 (1 品種・系統当り 12 個体) の間で存在の有無に関して多型を生ずる断片を選び出した。これらの断片の多くは同一品種・系統内の個体間でも多型を示した。一方、著者らのカブ品種を

Table 1. The primers used for the amplifications of DNA in the 'Sugukina' strains and turnips.

Name	Sequence
OPA2	5' -TGCCGAGCTG-3'
OPA2'	5' -TGCCGCGCTG-3'
OPA2''	5' -TGCCGTGCTG-3'
OPA2'''	5' -TGCCGGGCTG-3'

Underlines show the nucleotides substituted from the original sequence of OPA2.

Table 2. Selections of the suitable conditions for the PCRs of the 'Sugukina' strains and turnips.

Factor	Conditions
Concentration of Mg (mM)	0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5
Annealing temperature (°C)	34, 37, 40, 43
Number of PCR cycles	<u>30, 40</u>

Underlines indicate the conditions selected for the PCRs.

用いた予備実験 (藤本ら, 1994) において, カブの地方品種における RAPD の品種内均一度は平均して 56% 程度であることが認められている. そこで供試品種・系統間の多型を評価する断片の選定に当たっては, 12 個体中過半数の個体 (58%) に存在するか否かを基準とした. すなわち, 供試品種・系統のいずれかで過半数の個体に存在する一方で, 他のいずれかの品種・系統では過半数の個体には断片を選び, それらを品種・系統間で多型を示す DNA とした. その上で各品種・系統について 12 個体中過半数の個体はその DNA 断片をもつかもたないかを判別して, 品種・系統の RAPD 特性とした.

得られた品種・系統間の多型に基づきクラスター分析を行って類縁関係を推定した. クラスター分析における品種・系統間の近縁度は類似比, すなわち 2 つの品種・系統に共通する断片の数を両品種・系統のいずれかに存在する断片数の和で除した値によって定義した. またクラスター間の距離は群平均を指標とした.

結 果

実験に供した 252 個体の中で, 存在の有無に関して多型を示した DNA 断片は 4 種のプライマーを合わせて 69 であった (第 3 表). この 69 断片のうち供試 21 品種・系統のいずれでも固定している断片, すなわち品種・系統内の全個体とその断片をそろって持っているか, もっていないかで固定しているような断片は 1 本も存在せず, 69 断片はどれもいずれかの品種・系統内において個体間でも多型を示した (第 1 図). またある特定の 1 品種・系統のみで全個体に認められる DNA 断片は 11 個存在したが, これらも他の品種・系統内では個体間で存在の有無に関して多型を示した. このため個々の品種・系統を特異的に特徴づける

DNA 断片を見出すことはできなかった. 更に, いずれかの品種・系統では全個体に存在する一方, 他のいずれかの品種・系統には全く存在しない DNA 断片は 69 断片中 30 断片と半数以下に留まった. このように, 本実験で供試したカブ品種および 'スゲキナ' 系統においては, DNA 断片の有無に関して遺伝的に固定した品種・系統は極めて少ないことが示唆された. このため, 品種・系統内の個体間多型を考慮に入れた上で類縁関係の解析を進める必要があると判断された.

そこで個体間で多型を示す 69 断片の中から, ある品種・系統では供試 12 個体中過半数の 7 個体以上に存在するものの, 他のいずれかの品種・系統では半数以下の個体にしか存在しない断片を選びだしたところ, 4 プライマー合わせて 50 の断片が得られた (第 3 表). この 50 の断片について各品種・系統を評価した. すなわち, 50 断片のそれぞれが品種・系統内の過半数の個体に存在するか否かを判定し, 存在する場合には品種・系統としてその断片をもつと評価し, 逆に過半数個体に存在しない場合にはその品種・系統には存在しないと評価した.

上述の方法によって得られた品種・系統間の DNA

Table 3 Number of DNA bands showing polymorphisms among individual plants and among the varieties or strains.

Primers	Polymorphic among the individuals	Polymorphic among the varieties/strains ^z
OPA2	19	15
OPA2'	20	11
OPA2''	14	11
OPA2'''	16	13
Total	69	50

^z More than 50% of the plants of at least one variety or strain possess DNA which are polymorphic among the individuals, whereas less than 50% of the plants have the same DNA in another variety or strain.

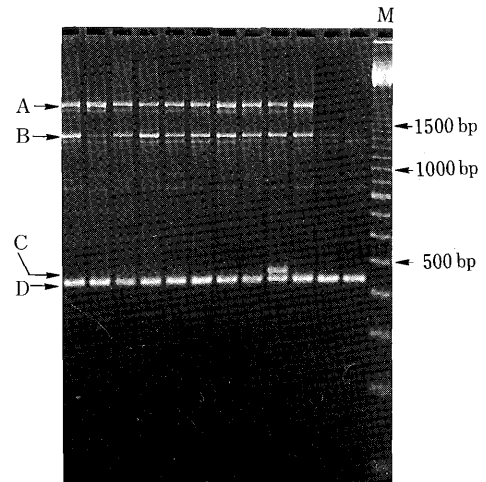


Fig. 1. Gel electrophoresis pattern showing polymorphisms of DNA fragments, amplified by PCR with OPA2', among the individual plants of one strain of 'Sugukina' (9201). Although all twelve plants possessed bands B and D, band B shows the differences in density. Furthermore, two plants lack band A, whereas only one has band C. M: Molecular weight marker (100bp ladder).

多型に基づき各品種・系統間の類似比を算出した。各品種・系統ごとに得られた、他のカブ品種および‘スグキナ’系統との類似比の平均値を第4表に示した。個々のカブ品種が他のカブ11品種との間に示す平均的類似比は、低いものでは‘本紅赤丸蕪’、‘聖護院大丸蕪’の0.43であり、高いものでは‘切葉天王寺蕪’の0.58であった。これらのカブ品種間の類似比の平均値は全体で0.50であり、カブ品種と‘スグキナ’系統との類似比の平均値0.30より明らかに高かった。またカブの中で‘スグキナ’系統と最も高い類似比を示したものは‘切葉天王寺蕪’であったが、その値は0.38であり上述のカブ品種間の類似比の最低値に及ばなかった。

一方、各‘スグキナ’系統が他の‘スグキナ’との間に示す類似比は0.40~0.56と変異したが、その平均値は0.49となりカブ品種間の平均的類似比とほぼ同等であった。また‘スグキナ’系統がカブ品種との間に示す類似比は平均では0.30であったが、系統により

Table 4. Similarity of RAPD among the ‘Sugukina’ strains and turnip varieties.

Strain or Variety	Similarity to turnip varieties	Similarity to Sugukina strains
Sugukina		
9401	.33	.53
9201	.42	.50
9203	.24	.44
9204	.27	.48
9208	.32	.56
9209	.28	.51
9210	.33	.56
9212	.19	.40
9214	.29	.41
(Average of Sugukina)	(.30)	(.49)
Turnip		
Hinokuchi-kokabu	.52	.27
Hinona-kabu	.49	.30
Honbeni-akamaru-kabu	.43	.26
Kanamachi-kokabu	.47	.34
Kireba-Tennoji-kabu	.58	.38
Maruba-Tennoji-kabu	.51	.32
Nozawana	.49	.21
Oonobeni-kabu	.55	.28
Shougoin-Oomaru-kabu	.43	.27
Tsuda-kabu	.48	.26
Yorii-kabu	.54	.36
Yurugi-akamaru-kabu	.47	.30
(Average of turnip)	(.50)	(.30)

0.19~0.42と、カブ品種の場合に比べて幅広い類似比の変異が認められた。以上の、個々のカブ品種が他のカブ品種との間に示す類似比と‘スグキナ’系統が他の‘スグキナ’系統との間に示す類似比の差、ならびに個々の‘スグキナ’系統が他の‘スグキナ’系統との間に示す類似比とカブ品種との間に示す類似比の差に関してt検定を行った。その結果、カブ品種における類似比の差のt値は4.38、‘スグキナ’系統における差のt値は3.54となり、いずれの差とも極めて高い統計的有意性を示した。

このような、品種・系統間の類似比を指標としてクラスター分析を行い、第2図に示すような関係を得た。前述したカブ品種間および‘スグキナ’系統間の類似比とカブと‘スグキナ’の間の類似比の差を反映して、カブの品種と‘スグキナ’の系統は明瞭に2つのグループに分けられた。2つのグループのうちカブ品種においては‘本紅赤丸蕪’が最も他の品種から離れた位置にあり、次いで‘金町小蕪’、‘聖護院大丸蕪’が他の大半の品種から離れた位置に分布した。次に‘スグキナ’系統のグループにおいては、‘9401, 9201, 9209, 9210’の4系統および‘9203, 9204, 9208’の3系統がそれぞれ1つのクラスターを形成した一方で、‘9214’および‘9212’は共にこれらのクラスターとは異なる位置に存在した。このうち‘9212’は‘スグキナ’の中でも特に独自の位置を占め、他とは大きく異なる遺伝子をもっていることを示唆していた。

考 察

Brassica 属の A ゲノム種 (*B. campestris* L.) にはハクサ・カブ・ツケナと総称される野菜が含まれており、日本各地に在来品種が数多く発達している。‘スグキナ’もこれら在来品種の1つであるが、同種内での‘スグキナ’の位置づけは歴史的に必ずしも明確でなかった。こうした中で、渋谷・岡村 (1954) や青葉 (1981) は *B. campestris* の多数の品種について種皮の表面構造を調査し、‘スグキナ’が我国に古くから存在するいわゆる和種系カブや、ツケナのうち京葉群と呼ばれる品種と同様に A 型の種皮をもつことを認めた。このことは矢澤ら (1986) の簡易識別法によっても確認されている。一方、高嶋・成田 (1970) および成田 (1993) は‘スグキナ’の分類学的な位置づけに関する従来の諸説を検討した。彼らは分類学上の主要な論争点で、‘スグキナ’を江戸時代から栽培されてきた原始的な系統とみるか、明治期以降にカブとの交雑によって発達してきた新しい系統とみるかの違いによって生

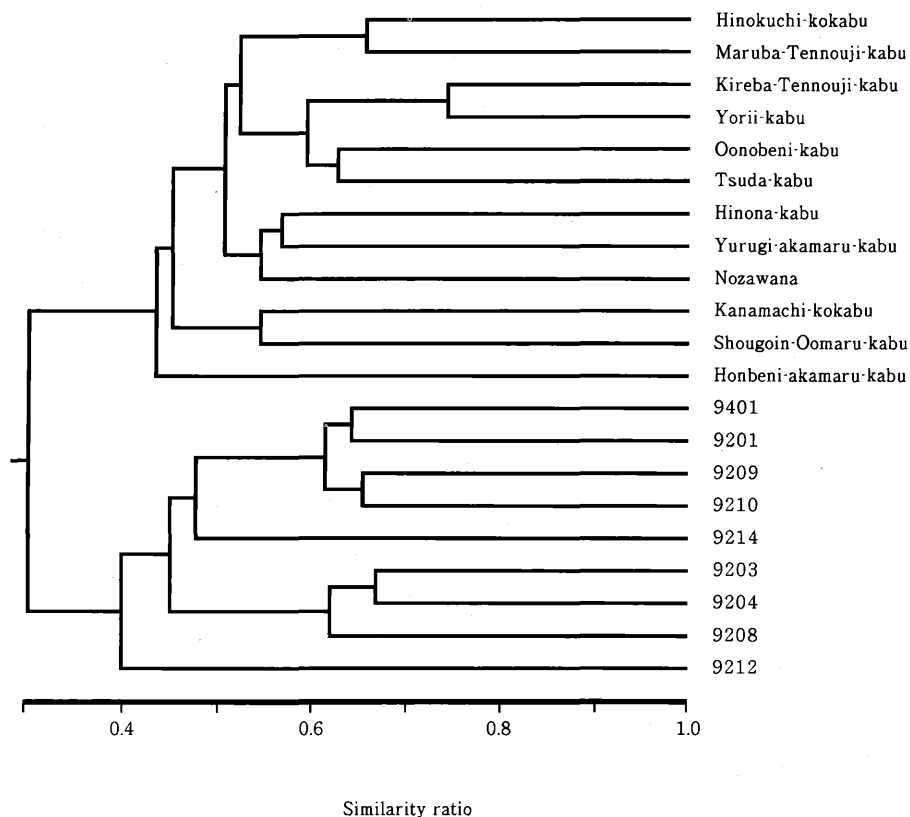


Fig. 2. The dendrogram showing the relationship among the 'Sugukina' strains and turnip varieties obtained by the cluster analysis of RAPD.

じていると推定した。その上で、昭和初期に'スグキナ'の原種が絶滅した後は、'スグキナ'をカブの一種と位置づけることで最終的な決着を見ることになったとしている。

これら従来の植物分類学的な研究は主として形態的な特性に基づいてなされてきた。しかし近年はDNAにおける変異に基づき植物の系統関係を明らかにする試みが行われている。とりわけRAPD法(Williamsら, 1990)は最近非常に活発に用いられており、*Brassica*属植物でも*B. napus* (Mailerら, 1994), *B. juncea* (Jainら, 1994), *B. rapa*等(Thormannら, 1994)で、同一種内における品種・系統間の遺伝的関係の推定に有効であることが示されている。

本実験で行ったRAPD分析とクラスター分析の結果得られた品種・系統間の関係を表す系統図(第2図)から、調査した'スグキナ'には他の系統と比較的類似したDNAをもつ数系統と、これらの系統群とは大きく異なる2系統が存在すること、ならびに'スグ

キナ'は全体として、本実験で供試したカブ品種とは全く異なる1つの群を形成することが認められた。これらのことは'スグキナ'の系統間にはカブ品種間と同等の大きい遺伝的変異が存在する一方で、全体としてカブからは明瞭に区別され得る遺伝的特性を共有していることを示している。

'スグキナ'はその発達の過程でカブの遺伝的影響を強く受けてきたとされる(高嶋・成田, 1971)。しかしながら本実験の結果は'スグキナ'がカブ以外の作物の遺伝的特性を依然として強く受けついでいることを示唆している。今後更に分析の範囲を広げて調査することにより、それがいかなる作物であるかを明らかにする必要があるだろう。そのことにより、すでに絶滅したとされる'スグキナ'の原種を推定する手がかりが得られる可能性がある。

摘 要

京都特産の漬物用野菜である'スグキナ'の分類学的位置を明らかにすることを目的として、'スグキナ'系

統とカブ品種の RAPD 分析を行った。京都上賀茂地域で収集した 'スグキナ' 9 系統およびカブの地方品種 12 品種を用いて、各品種・系統の幼苗 12 個体それぞれより DNA を単離し、PCR の鋳型とした。PCR のプライマーにはオベロン社の OPA 2 ならびにその 1 塩基を置換した 3 種類の 10 塩基合計 4 プライマーを用いた。

PCR の結果、供試した 252 個体において、4 プライマー合わせて 69 の DNA 断片で個体間多型が認められた。このうち 50 断片を品種・系統間で多型を示す断片として選びクラスター分析を行った。品種・系統間で DNA 多型の類似比を算出したところ、各 'スグキナ' 系統が他の 'スグキナ' との間に示す類似比は系統により 0.40~0.56 となったが、各 'スグキナ' 系統が示すカブ 12 品種との類似比は 0.19~0.42 となり、両者の間には明瞭な差が存在した。このような 'スグキナ' とカブの明確な差異はクラスター分析によって作成された系統図においても、'スグキナ' 系統とカブ品種が明確に区別される 2 つのクラスターに分かれたことから示された。また 'スグキナ' 系統のクラスター内では他の多くの系統とは異なる特性を示す 2 系統が存在することが認められた。

これらのことから 'スグキナ' は我国のカブ品種とは遺伝的特性を異にする一群の作物であることが示唆された。

謝 辞 本研究のクラスター分析にあたっては、京都産業大学の野村哲郎博士の協力を頂いた。また原稿の作成にあたっては川上景子さんの助力を得た。記して謝意を表する。

引用文献

- 青葉 高. 1981. 野菜—在来品種の系譜—. p. 199-224. 法政大学出版局. 東京.
- Dellaporta, S. J., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA mini-preparation; version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- 藤本卓矢・寺地 徹・山岸 博. 1994. アブラナ科植物における RAPD 分析 II. スグキナを中心としたカブの類縁関係について. *育種*. 44 (別冊 1): 131.
- Jain, A., S. Bhatia, S. S. Banga, S. Prakash and M. Lakshmikumaran. 1994. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theor. Appl. Genet.* 88: 116-122.
- Mailer, R. J., R. Scarth and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* 87: 697-704.
- 成田道泰. 1993. 『賀茂社家日記』にみる酸茎の贈答慣習について—伝承と史実の邂逅—. 賀茂文化研究. 3: 13-45.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β globin genomic sequences and restriction-site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- 渋谷 茂・岡村知政. 1954. 種子の表皮型による本邦蕪菁品種の分類. *園学雑*. 22: 235-238.
- 高嶋 四郎・成田道泰. 1970. 京都特産酸茎菜の系統分化に関する研究 I. 京都府立大学学術報告, 農学 22: 1-8.
- 高嶋 四郎・成田道泰. 1971. 京都特産酸茎菜の系統分化に関する研究 II. 京都府立大学学術報告, 農学 23: 29-33.
- 高嶋 四郎・成田道泰. 1972. 京都特産酸茎菜の系統分化に関する研究 III. 京都府立大学農学部農場報告. 5: 8-17
- Thormann, C. E., M. E. Ferreira, L. E. A. Camargo, J. G. Tivang and T. C. Osborn. 1994. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor. Appl. Genet.* 88: 973-980.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nuc. Acid Res.* 18: 6531-6535.
- 山岸 博・米澤勝衛. 1992. スグキナ系統の開花日および花器とサヤのサイズに見られる遺伝変異. *園学雑*. 61: 353-357.
- 矢澤 進・上山 博・並木隆和. 1986. *Brassica campestris* L. の種皮型の簡易識別法. *農業および園芸*. 61: 556-558.