

宮崎在来野菜「佐土原」ナスにおける RAPD-PCR 法による品種鑑別

陳 蘭 荘 (庄)^{1,2*}, 石井修平¹, 田中佑樹¹, 西村佳子¹, 富永 寛³

¹大学院園芸学・食品科学研究科; ²生物工学研究室; ³元宮崎県総合農業試験場

2011年10月13日受付; 2012年1月26日受理

Variety detection of Miyazaki conventional vegetable of “Sadowara” egg plant using RAPD-PCR method

Lanzhuang Chen^{1,2*}, Shuhei Ishii¹, Yuki Tanaka¹, Yoshiko Nishimura¹, Hiroshi Tominaga³

¹Grad. Sch. Horti. & Food Sci., Minami Kyushu University; ²Laboratory of Biotechnology, Faculty of Environ. & Horti. Sci., Minami Kyushu University, 3764-1, Tatenochi, Miyakonojo-shi, Miyazaki 885-0035, Japan;

³Miyazaki Prefecture Agricultural Experiment Station, Sadowara, Miyazaki, 880-0212, Japan

Received October 13, 2011; Accepted January 26, 2012

Solanum melongena L. var. “Sadowara” egg plant, is a conventional vegetable of Miyazaki prefectural region, and it has been used as the crossing parent in egg plant bred in Japan, for example, “Enpitsunasu”, “Kubonasu”, and so on. One of the most important characteristics of “Sadowara” is the delicious taste when eating as Yakinasu (a grilled egg plant fruit). However, “Sadowara” had already been disappeared from the market for over 30 years. As a purpose of promoting Miyazaki prefectural economy and reviving the conventional vegetable, the “Sadowara” is a good choice as a model material. First of all, which “Sadowara” is the real “Sadowara” should be clarified for the merged new Miyazaki city, as the “Sadowara” has been kept respectively in old Sadowara town and old Miyazaki city since it disappeared from the market. In this study, RAPD-PCR method has been used to detect the varieties of “Sadowara” provided respectively from old Sadowara town and old Miyazaki city. The results of RAPD-PCR products indicated that 1) there were no significant difference between the two “Sadowara” varieties based on DNA band patterns, 2) they showed similarity of near 92% in DNA band patterns, and 3) as the controls, the other kinds of egg plant “Chikuyo-naganasu” and guinea grass (N68/96-8-O-11) used showed different DNA band patterns from the two “Sadowara”, when the same 12 primers were used. From these results, it is clear that the both “Sadowara” should be the same one and they should be considered as the conventional vegetable and original “Sadowara” variety of Miyazaki prefectural region. And in addition, a method for green house cultivation of “Sadowara” egg plant could be established based on the protocol carried out in this study. We hope the results of variety detection based on RAPD-PCR method and the cultivation method in this study, play a main role for the reviving of “Sadowara”, as a Miyazaki prefectural traditional vegetable, and development of local economy.

Key words: DNA, primer, RAPD-PCR, “Sadowara” egg plant.

諸 言

ナス (*Solanum melongena* L.) は、トマト、トウガラシ、ジャガイモ、タバコ等が属するナス科 (*Solanaceae*) 植物の一種である。ナスの原産地は、インド東部の

熱帯性アジアと考えられる。日本には1200年以上前に中国から渡来したものと考えられ、ヨーロッパは15世紀ごろに伝播し、17世紀になって初めて多くの人々に知られるようになったと言われる。日本でのナスの栽培は1000年以上歴史を持ち、中国と並んで多彩な品種を有している。果形は様々で、果実の大きさも20g以下から400g以上のものまで千差万別である。それぞれの地域に独特の地方品種が存

*連絡著者: E-mail, lzchen@nankyudai.ac.jp

在することもナスの特徴の一つとも言える（斉藤隆，1983）。

その中でも宮崎県在来野菜の「佐土原」ナスは、長ナスで暖地を中心に露地栽培用の重要な品種として位置づけられており、九州以外にも焼きナスとして最高の肉質が評価され、「鉛筆ナス」、「久保ナス」、「ヤキナス」等といった地方在来品種のルーツとも言われている。

「佐土原」の名については、大正の終わりにはその名がすでにある。現在の旧佐土原町、新富町、西都市および宮崎市の一部は、江戸時代から島津氏の流れをくむ佐土原藩があったところで、昔からナス栽培が盛んであり、その中心的な産地であった藩の名から取られたものと思われる。宮崎県における戦後までの品種は、ほとんどが「佐土原」であったと思われる、小ナスで収穫したものは一夜漬けに、成熟したものは焼きナスや煮付けにするなど、一品種を使い分けて利用していたと考えられている（富永寛，2002）。

しかし、「佐土原」は果実の色ムラが出来やすく、赤紫色であるため濃黒紫色のものが好まれるようになるにつれ、次第に敬遠されるようになった（富永寛，2002）。この傾向に追い打ちをかけたのは、1960年代から一般的となった一代雑種の普及である。さらに高度成長期には単品・大量生産・大量供給の要求に対応して、収量性に加えて形状や外観が重要視されるようになり、ナスの標準規格に外れる「佐土原」は生産現場から消えていった。

2009年度に旧宮崎市と旧佐土原町との合併が成立したことに伴い、新生宮崎市は在来野菜の復活、地産地消、有機野菜の潮流に乗じて宮崎在来野菜の目玉として「佐土原」の復活・振興に力を入れはじめた。市役所の予備調査によると、「佐土原」は30年以上市場から消えていた。しかし、幸いにその間旧宮崎市と旧佐土原町のそれぞれで保存または栽培されていた「佐土原」があったことが判明した。しかし、「佐土原」は種苗会社では取り扱われていないので、市場形成のためには統一した種子の生産や供給が喫緊の課題となっている。そこで新生宮崎市の依頼により、本研究は両者の「佐土原」の品種鑑別を行うこととなった。これまでの一般的な品種鑑別や一代雑種などの確認などでは、特定の遺伝子情報やゲノム情報がない場合、特定のプライマーのデザインができないため、RAPD-PCR法がよく使われる（Chen et al. 2002）。本研究では、旧宮崎市と旧佐土原町で30年以上別々に栽培していた「佐土原」の成長した本葉からそれぞれDNAを抽出し、12種類のオペロンテクノロジー社の10塩基プライマーを用いたRAPDPCR法により、「佐土原」の品種鑑定を行った。

材料および方法

1. 植物材料および栽培方法

本実験で、ナス「佐土原」(*Solanum melongena* L.)のDNAを抽出するために使用した材料は、それぞれ佐土原町の合沢氏らがずっと家庭農園で自家採種しながら維持してきていたものと、旧宮崎市の外山氏が、数年前に宮崎県総合農業試験場から種子を得て、ハウス

内で栽培していたものであった。2010年9月中旬に、外山氏のハウス栽培農場と合沢氏の家庭菜園それぞれから、若い葉を採集して保冷ボックスに入れて持ち帰った。外山氏が譲渡された県農業試験場の種子は30年前の種子を冷蔵庫で保存していたものである。これらの材料は以下、それぞれ合沢ナスと外山ナスと呼称する。対照としては、南九州大学園芸学部附属農場で育成中のイネ科牧草ギニアグラス系統(N68/96-8-O-11)（以下、ギニアグラスと呼ぶ）と、同じナス科ナス属の「築陽長ナス」を用いた。

一方、ナス「佐土原」を栽培するため、外山氏と合沢氏よりそれぞれの種子を分譲してもらい、本学附属農場の温室内で栽培実験を行った。播種用土には、パーミキュライト：パーライト：ピートモス：焼土(1:1:2:3)をプラ船で調合し、均一になるように移植小手で攪拌したものをを用いた。次に、調整した土を播種用36穴のセルトレイに充填し、ピンセットでセルの中央に穴を開け、種子を1粒ずつ入れて覆土をした。播種後のセルトレイには新聞紙を3~4枚被せ、気温25℃に設定した人工気象器内に置いた。出芽までは、スプレーで水を噴霧して、土が乾燥しないようにした。3日後に出芽を確認した後、徐々に新聞紙の枚数を減らして少しずつ光を与えた。出芽率は播種後30日に調査した。播種2~3週間後に本葉が2枚展開してから温室に持ち込んで、セルから市販の野菜培養(N:P:K=8:8:8)を入れた3号ポリポットに鉢上げをした。鉢上げまでの温度と灌水管理は出芽期と同様に行った。育苗期間中の灌水は、毎日行い、気温は昼15℃以上、夜10℃以上に保った。定植は、長さ9m、幅80cmのベッドにオール15(N:P:K=15:15:15)を18kg/10aの基準で施肥した後、株間30cm、条間40cmの2条植えで行った。翌日に開花しそうな蕾には、結実促進剤として“トマトーン”をスプレーで噴霧した。灌水は土の表面が乾いたら行うが、できるだけ水分蒸発を防ぐため、中耕した。追肥は株当たり7~8個果実を収穫した後に1回、オール15を9kg/10a施用した。害虫防除については、コナジラミ類、ダニ類は5月中旬~9月中旬に多く発生したので、ハチハチ乳剤(2000倍)、コロマイト水和剤(1500倍)及びウララDF(2000倍)を2週間に1回程度で交替に施用した。一方、病気については、10月以降に灰色かび病とうどん粉病の発生があったので、随時アミスター20フロアブル(2000倍)を施用した。結実部位が上がるにつれて古くなった葉を摘葉し、光の透過性を高めるとともに、病害虫の繁殖・発生源となりうるものを無くした。

2. DNAの抽出およびPCR解析

外山氏と合沢氏より得た「佐土原」の葉を液体窒素で凍らせ、50ml容チューブに入れて-70℃で保存した。10月上旬に、新鮮重100mgのそれぞれの葉を、液体窒素で冷却しながら乳鉢と乳棒で粉碎した。粉碎した試料全量から、DNAをDNA抽出キット(DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN)を用いて抽出した。合沢ナスの葉と外山ナスの葉から抽出された核酸の収量はそれぞれ76μgと96μgであった。対照であるギニアグラスと「築陽長ナス」も、同じ手法でDNA抽出を行い、PCRに

表1. RAPD-PCR を用いた「佐土原」ナスの品種鑑別に使用されたプライマー¹⁾

Primers	Nucleotide sequences
OPA-3	5'-AGT CAG CCA C-3'
OPA-4	5'-AAT CGG GCT G-3'
OPA-5	5'-AGG GGT CTT G-3'
OPA-6	5'-GGT CCC TGA C-3'
OPB-1	5'-GTT TCG CTC C-3'
OPB-2	5'-TGA TCC CTG G-3'
OPB-3	5'-CAT CCC CCT G-3'
OPB-4	5'-GGA CTG GAG T-3'
OPB-5	5'-TGC GCC CTT C-3'
OPB-6	5'-TGC TCT GCC C-3'
OPB-7	5'-GGT GAC GCA G-3'
OPB-8	5'-GTC CAC ACG G-3'

1) Operon 10 mer Kit, Operon Technology.



図1. 南九州大学附属農場温室で栽培している「佐土原」ナス



図2. 同温室で栽培した「佐土原」ナスの果実

よる分析に供した。

PCR 解析には表1に示したランダムプライマー (Operon 10-mer kit, オペロンテクノロジー社) を用いた。

1) PCR 反応

PCR 反応液および反応条件は、以下のとおりである。

i) 合沢ナスの DNA 溶液 (0.038 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 外山ナスの DNA 溶液 (0.048 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) をそれぞれ 1 μl 用意する。対照のギニアグラスと「築陽長ナス」も 1 μl ずつ用意した。

ii) それぞれの溶液に、表1に示したランダムプライマーを 1 μl 添加した。

iii) 上記のそれぞれの溶液に 0.1 μl の Ex Taq (5U / μl , TAKARA) を入れ、バッファーを適量添加し、最後に超純水で 25 μl とし、反応液を作製した。

iv) これらのチューブを 9800 Fast Thermal Cycler (ABI 社) にセットし、ホットスタートで反応を始めてから 94°C で 1 分間, 36°C で 1 分間, 72°C で 2 分間の反応を 45 サイクル行った。

2) 電気泳動

反応液 10 μl と試料緩衝液 2 μl を混合し、1.4% アガロースゲルの試料溝に注ぎ、50 V で 60 分間電気泳動した。また、分子量マーカー溶液 (λ /HindIII, NIPPON GENE, 0.05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 3 μl と試料緩衝液 2 μl を混合して、試料と共に電気泳動した。電気泳動後のゲルを臭化エチジウムの TAE 溶液で 20 分間染色し、紫外線照射して、増幅された DNA 断片のパターンを分析した。

結果および考察

1. 栽培実験

外山氏と合沢氏から譲渡してもらった種子を使って「材料及び方法」で記述したように栽培した結果、市販されている「佐土原」の色や重さとはほぼ同じであった。本実験で実施した栽培用プロトコルを表2にまとめた。今後、宮崎県における「佐土原」の普及の参考になればと考えている。一方、形態的観察では、果実の形や、色、大きさなどは、両氏の間で差異が認められなかった (図1と図2)。両者の品種鑑定は DNA レベルでの検定に委

表2. 本実験で実施した「佐土原」の施設栽培方法

項目	技術	目的・期待される効果
育苗方法	セルトレイに播種; 36穴セルトレイ (深型: 深さ 58mm 程度) 使用; 30日後に3号ポリポットへ移植, 育苗日数: 45日前後	活着の安定化
栽培様式	ベッド幅 80 cm, 条間 40cm 程度が望ましい。株間 30 cm, 2条植え。	基本的に施設内で立体栽培を想定するので、収量と品質の安定化
定植方法	従来の定植方法に準じる。	活着の安定化
整枝方法	主枝一本仕立て, わき芽は3葉 (花の下1枚, 上2枚) で摘心。	採光がよくなり, 生育よくなり, 収量・品質が良くなる
施肥方法	施肥量は従来の施肥標準量と同様とする。	果実肥大期の生育量確保
収穫方法	開花日を記録し, 名札を付けてできるだけ同じ成長期間で収穫する。	過早または過晩の収穫を防止し, 収量・品質の確保ができる。また株に過大な負担をかけない。
病虫害防除	灰色かび病とうどん粉病に対する薬散の実施。ダニ類・コナジラミ類に対する薬散の実施。	効果的に病虫害の発生の防止

ねるしかない。

2. PCR 解析

図3と図4にそれぞれ表1のプライマーによるPCR産物の電気泳動の結果の写真を示した。合沢ナスと外山ナスおよび対照としたギニアグラスと「筑陽長ナス」の間で、違ったDNAバンドパターンが見られた。全部で12種類のプライマーを用いてPCRを行った結果から、1) 合沢ナスのDNAと外山ナスDNAは、別の種

であるギニアグラスとの類似性は0%であった(表3); 2) 異なる品種である「筑陽長ナス」については、合沢ナス及び外山ナスとの類似性が66.7%であった(表3); 3) 合沢ナスと外山ナスの間では1種類のプライマー(OPA4)だけで違うバンドが現れ、類似性は91.6%を示した(表4); 4) 別の1種類のプライマーについて、バンドのパターンは同じであったが、1本のバンド(図3のOPB5)で濃さが違うことが分った。

以上の結果から推察すると、合沢ナスと外山ナスと

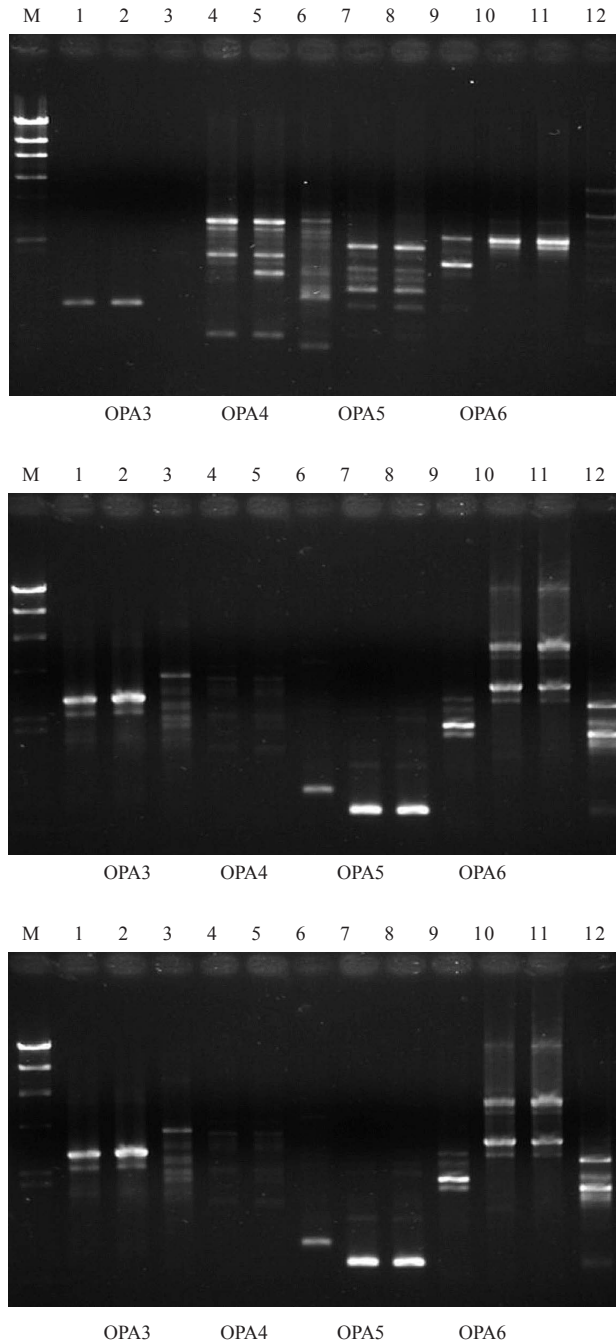


図3. 12種類のプライマーによるPCR産物の電気泳動結果。レーンM: λ /HindIII; レーン1, 4, 7, 10: 合沢ナス; レーン2, 5, 8, 11: 外山ナス; レーン3, 6, 9, 12: 対照区のギニアグラス N68/96-8-O-11。

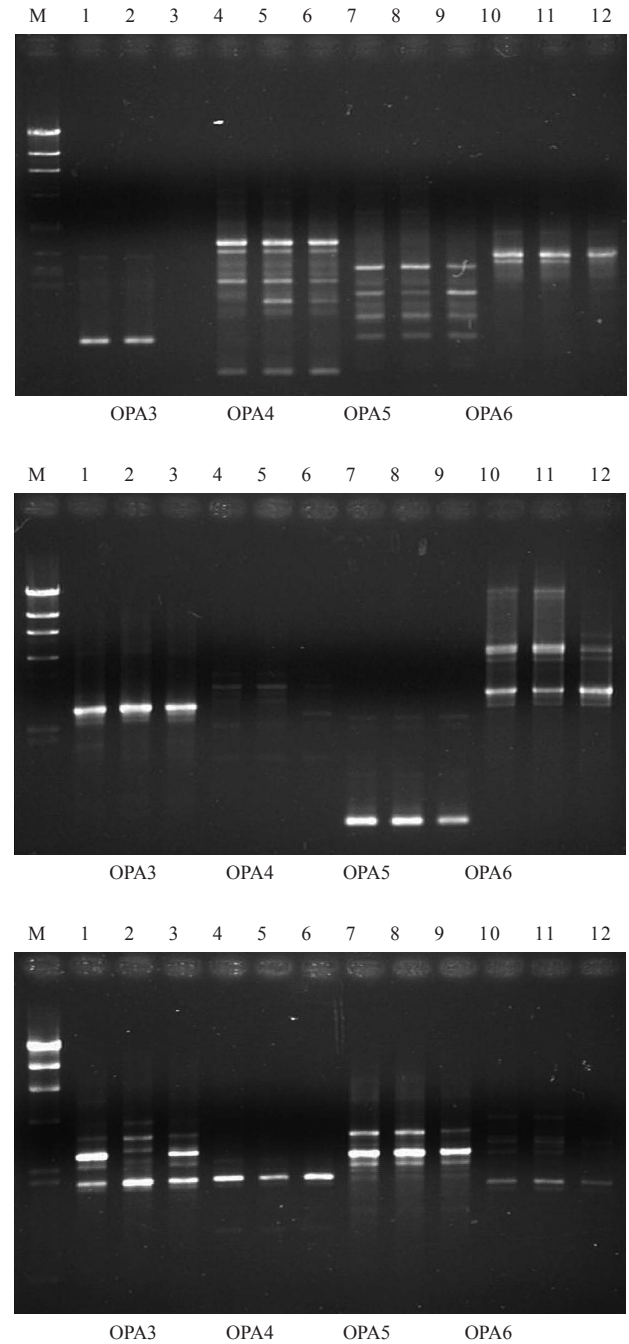


図4. 12種類のプライマーによるPCR産物の電気泳動結果。レーンM: λ /HindIII; レーン1, 4, 7, 10: 合沢ナス; レーン2, 5, 8, 11: 外山ナス; レーン3, 6, 9, 12: 対照区の「築陽長ナス」。

表3. PCR 産物における合沢ナスと外山ナスに対するギニアグラスと「筑陽長ナス」の DNA バンドパターンの違い¹⁾

対照区	合沢ナス及び外山ナス ²⁾		類似度 ³⁾ (A/12) × 100%
	(A)	(B)	
ギニアグラス	0	12	0
築陽長ナス	8	4	66.7

- 1) 本実験で 12 種類の Operon プライマーを使用した。
- 2) (A)は対照区の植物が合沢ナス及び外山ナスと相同バンドパターンを示したプライマーの数を指す；(B)は対照区の植物が合沢ナス及び外山ナスと相違バンドパターンを示したプライマーの数を指す。
- 3) (A/12) × 100% は 12 種類の Operon プライマーを使用した DNA バンドパターンの中で、対照区の植物が合沢ナス及び外山ナスとの類似度を示す。

表4. PCR 産物における合沢ナスと外山ナスとの DNA バンドパターンの違い¹⁾

対照区	合沢ナス及び外山ナス ²⁾		類似度 ³⁾ (A/12) × 100%
	(A)	(B)	
外山ナス	11	1	91.6

- 1) 本実験で 12 種類の Operon プライマーを使用した。
- 2) (A)は外山ナスが合沢ナスと相同バンドパターンを示したプライマーの数を指す；(B)は外山ナスが合沢ナスと相違バンドパターンを示したプライマーの数を指す。
- 3) (A/12) × 100% は 12 種類の Operon プライマーを使用した DNA バンドパターンの中で、外山ナスが合沢ナスとの類似度を示す。

の間に、増幅された DNA 断片のパターンからは明らかな差異が認められず、両者は約 92% の確率で遺伝的に同一であると考えられた。また、両者の株は F1 ではなく、遺伝的に固定していないので、今後、より多くの株を用いて、それぞれの集団内の変異幅を確認すべきであると考えている。

要 約

新生宮崎市の誕生に伴い、宮崎県在来野菜の復活と地域経済の振興を目的に、「佐土原」ナスがモデル材料に選ばれた。しかし、「佐土原」ナスは 30 年以上市場から消えていた。幸いにその間別々に旧宮崎市と旧佐土原町で保存されていた「佐土原」ナスがあった。新生宮崎市の依頼を受け、それぞれの「佐土原」ナスを用いて RAPD-PCR 法による品種鑑別を行った。

「佐土原」ナスの DNA 比較による品種同定実験を行うため、旧佐土原町の合沢氏宅と旧宮崎市の外山氏宅から採集した「佐土原」の葉から DNA 抽出をして 12 種類のプライマーによる RAPD-PCR を行った。その結果、PCR で増幅された DNA 断片のバンドパターンから、対照のギニアグラス (N68/96-8-O-11) 及び「築陽長ナス」と、両「佐土原」ナスの間には明らかな違いが認められたのに対し、両「佐土原」ナス間には明らかな差異は見られず、約 92% の確率でほぼ遺伝的に同一であると認められた。よって旧宮崎市と旧佐土原町で保存さ

れていた「佐土原」ナスは同一のものであり、ともに宮崎在来野菜であることが確認できた。この結果と本実験で実施した栽培方法が、新生宮崎市の宮崎在来野菜「佐土原」ナスの復活・普及の一助になることを期待したい。

引用文献

- 1) 雨宮圭一, 八木聡明, 岡部健 (1994) 培養変異を利用したナス青枯病抵抗性個体の選抜 山梨県総合農業試験研究所報告第 6 号: 31-40.
- 2) Chen, L.Z., Murai, K., Inoue, M., Kaneko, Y., Sato, Y. and Adachi, T. (2002) Somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Lycopersicon chmielewskii*. *Plant Biotechnology* **19**: 389-396.
- 3) Kikuchi, S., Taketa, S., Ichii, M. and Kawasaki, S. (2003) Efficient find mapping of the naked caryopsis gene (nua) by HEGS (High Efficient Genome Scanning /AFLP in barley. *Theor. Appl. Genet.* **108**: 73-78.
- 4) 川里宏, 矢板孝晴 (1975) トマトの越冬長期栽培における着果ホルモン剤の処理と花令の関係 栃木農試研報 No. **20**.
- 5) 松添直隆 (1999) 熊本長ナスの果実品質 (味覚成分・機能性成分) について 平成十一年度熊本県立大学地域貢献研究事業「研究成果概要」
- 6) 斉藤隆 (1983) ナス=植物としての特性「野菜全書 ナス ピーマン シシトウ トウガラシ カボチャ」17-132 第 2 版第 1 刷 社団法人農山漁村文化協会
- 7) 西貞夫 (2006) 第 2 節 ナス「新編野菜園芸ハンドブック」第 3 刷 西貞夫 監修 571-588 株式会社養賢堂発行
- 8) 鈴木芳夫, 八楸利郎, 中村俊一郎, 高野泰吉, 斎藤隆, 藤重宣昭, 岩田 隆 (1996) 「新野菜園芸学」株式会社朝倉書店
- 9) 富永寛 (2002) 佐土原ナス「都道府県別地方野菜大全」第 1 刷 芹澤正和監修 307 タキイ種苗 (株) 出版部
- 10) 恒川靖弘, 堀田行敏, 菅原眞治, 矢部和則, 今川正弘, 長屋浩治 (2004) とげなし性ナス F1 品種試交 04 (仮称) の育成経過と特性 愛知県総試研報 **36**: 7-16.
- 11) 山川邦夫 (2006) 「野菜の生態と作型 起源からみた生態特性と作型分化」農文協
- 12) 斎藤 隆 (2008) 「野菜の生理・生態」発育の基本と環境・肥培管理による影響 農文協