

RAPD マーカーによる鹿児島県産スギ精英樹の分類

九州大学農学部 エンシソ マヌエル
 松田 学・白石 進
 林木育種センター九州育種場 西村 慶二

1. はじめに

九州地域ではこれまでに数多くのスギさし木品種が育成されている。従来これらの品種の分類は外部形態形質を指標として行われてきた。しかし、形態形質は環境要因の影響を受け、変化するものがあり、品種の中には遺伝的に同一のものが誤って分類されたり、逆に異なるものが同一品種となっている可能性も考えられる。

本研究では遺伝情報本体であるDNAを直接調査できるRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法^{3,4)}を用いて鹿児島県で選抜されたスギ精英樹のクローン分析を行った。

2. 材料と方法

(1) 供試材料

農林水産省林木育種センター九州育種場に植栽されている鹿児島県産スギ精英樹92クローンを用いた(表-1)。

(2) 全DNA抽出

スギ当年葉150mgを使用し、Murray and Thompson⁵⁾のCTAB法を改良して行った。

(3) RAPD分析

RAPD分析はWilliamsらの方法に従った³⁾。PCR反応は、50mM Tris-HCl, pH8.5, 5mM MgCl₂, 500μg/ml BSA, 2.5mM dNTP, 2.0% (W/V) Ficoll 400, 4mM Tartrazine, 0.1mM EDTA, 0.4units/10μl Tth DNA polymerase, 0.25μM プライマー, 15ng/10μl 鋳型DNAの溶液組成で、94℃・1分(熱変性), 94℃・10秒(変性) - 36℃・30秒(アニール) - 72℃・1分(伸長)を60サイクル, 72℃2分(伸長)の条件で行った。使用したプライマーは6種類(A-08: GTGACGTAGG, B-16: TTTGCCCGGA, D-17: TTTCCACGG, C-10: TGCTCTGGGTG, Z-0.4: GCCCTACGCG, Z-07:

ACGTAGCGTC)である。PCR増幅産物は1%アガロースゲル電気泳動を行った後、エチジウムブロマイド染色し、UVトランスイルミネーター上で観察した。

表-1 供試精英樹(鹿児島県産)

精		英		樹		名	
県始良	1号	県始良	31号	県肝臓	1号	県鹿児島	1号
県始良	2号	県始良	33号	県肝臓	2号	県鹿児島	3号
県始良	3号	県始良	34号	県肝臓	3号	県伊佐	2号
県始良	4号	県始良	35号	県肝臓	4号	大根占	1号
県始良	5号	県始良	42号	県肝臓	5号	大根占	2号
県始良	6号	県始良	49号	県肝臓	6号	大口署	1号
県始良	8号	県始良	52号	県肝臓	7号	大口署	2号
県始良	9号	県薩摩	1号	県肝臓	8号	大口署	3号
県始良	10号	県薩摩	3号	県肝臓	9号	大口署	4号
県始良	11号	県薩摩	4号	県川辺	1号	大口署	5号
県始良	12号	県薩摩	5号	県川辺	2号	大口署	6号
県始良	13号	県薩摩	6号	県川辺	6号	川内署	1号
県始良	14号	県薩摩	7号	県川辺	8号	川内署	2号
県始良	16号	県薩摩	8号	県川辺	13号	川内署	3号
県始良	17号	県薩摩	9号	県川辺	14号	鹿屋署	1号
県始良	18号	県薩摩	11号	県日置	1号	鹿屋署	2号
県始良	19号	県薩摩	13号	県日置	2号	出水署	1号
県始良	20号	県薩摩	15号	県日置	3号	出水署	2号
県始良	23号	県薩摩	16号	県日置	4号	出水署	5号
県始良	25号	県薩摩	17号	県日置	5号	出水署	6号
県始良	27号	県指宿	1号	県日置	6号	出水署	7号
県始良	29号	県指宿	2号	県日置	7号	出水署	8号
県始良	30号	県壱岐	1号	県日置	8号	鹿児島署	2号

計 92

3. 結果と考察

92クローン全てをまずプライマー-A-08を使用し、RAPD分析を行った(図-1)。プライマー-A-08では6つのPCR産物(バンド)が確認され、これらのバンドの有無により、各クローンのDNAを整理した。このA-08によるRAPD分析で得られた6バンド(遺伝子座)におけるDNA型により、92クローンは22タイプのDNA型に分けることができた。このうち6クローンは固有のDNA型を示し、プライマー-A-08のみで分類、同定が可能であることが明らかとなった。残りの86クローンについては同一のDNA型を示すクローンが複数あり、さらに他のプライマーによるRAPD分析を行う必要性があった。そのためプライマー-B-16, D

- 17, C-10, Z-04, Z-07によりRAPD分析を逐次行い、この結果を用いて段階的にクローンの分類を行った。

最終的に6プライマーによるRAPD分析から92クローンのうち65クローンが固有のDNA型を示した(表2)。残り27クローンは5つのグループに分類された(表3)。県始良42号、県始良49号、県鹿兒島1号、県薩摩16号からなるBグループはこれまですべて従来の在来品種名がメアサとしての分類されており¹⁾、RAPD分析の結果からも同一のクローンであることが明らかとなった。同様に在来品種がオビアカとなっているEグループの県始良3号と県始良4号についても同じことが言える。在来品種名が明らかとなっていない県肝属6号、県肝属7号、県肝属9号、県始良23号から構成されるCグループも同一のDNA型を示した。在来品種名の異なる精英樹(県始良2号(タノアカ)、川内署3号と大根占署1号(オビアカ)が同じグループに含まれたDグ

ループ、これまで少なくとも3在来品種に分類されていた14クローンが同じDNA型を示したAグループについても同一クローンである可能性が高い。これは今回と同じく6プライマーを用いたRAPD分析において、 10^{-7} オーダーの危険率でクローン同定が可能であることが示されており(未発表)、確率的には同一クローンと考えられる。

引用文献

- (1) 九州地区林業試験研究機関協議会育種部会：スギ精英樹特性一覧表，1987
- (2) MURRAY M. G., Thompson W. F.: Nucleic Acid Res., 8, 4321 - 4325, 1980
- (3) WELSH J., Petersen C., Mc Clelland M.: Nucleic Acids Res. 19,303 - 306,1991
- (4) WILLIAMS J. G. K., etc.: Nucleic Acids Res, 18,6531 - 6535,1990

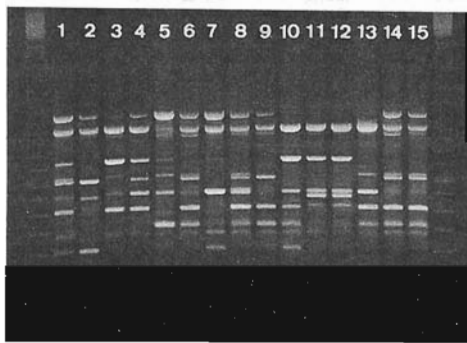


図-1 プライマー A-08 による RAPD 分析の結果

表-3 6プライマーのRAPD分析で同一DNA型を示した精英樹

A	県始良 9号 (ヒキ)	県日置 5号 (ヤブクグリ)
	県始良 10号	県日置 6号 (ヤブクグリ)
	県始良 11号 (ヒキ)	県日置 7号 (ヤブクグリ)
	県始良 12号 (ヒキ)	県薩摩 9号 (ヤブクグリ)
	県始良 35号 (メアサ)	県薩摩 15号
	県鹿兒島3号	鹿兒島署 2号
	大口署 2号	県川辺 6号 (ヤブクグリ)
B	県始良 42号 (メアサ)	県鹿兒島1号 (メアサ)
	県始良 49号 (メアサ)	県薩摩 16号 (メアサ)
C	県肝属 6号	県肝属 9号
	県肝属 7号	県始良 23号
D	県始良 2号 (タノアカ)	大根占署 1号 (オビアカ)
	川内署 3号 (オビアカ)	
E	県始良 2号 (オビアカ)	県始良 4号 (オビアカ)

表-2 6プライマーのRAPD分析で特異的なDNA型を示した精英樹

精 英 樹 名		
県始良 1号 (タノアカ)	県川辺 1号	県日置 2号
県始良 5号 (トサアカ)	県川辺 2号 (ヤノカミ)	県日置 3号
県始良 6号 (トサアカ)	県川辺 8号	県日置 4号
県始良 8号	県川辺 13号 (トサアカ)	県日置 8号
県始良 13号	県川辺 14号 (トサアカ)	大口署 1号
県始良 14号 (タノアカ)	県肝属 1号 (キジン)	大口署 3号
県始良 16号 (ハアラ)	県肝属 2号 (キジン)	大口署 4号
県始良 17号	県肝属 3号	大口署 5号
県始良 18号	県肝属 4号	大口署 6号
県始良 19号 (ハアラ)	県肝属 5号	出水署 1号
県始良 20号	県肝属 8号 (ハライカワ)	出水署 2号
県始良 25号	県薩摩 1号 (ハアラ)	出水署 5号
県始良 27号	県薩摩 3号 (ハアラ)	出水署 6号
県始良 29号	県薩摩 4号 (ハアラ)	出水署 7号 (オビアカ)
県始良 30号	県薩摩 5号 (ハアラ)	出水署 8号
県始良 31号	県薩摩 6号 (オビアカ)	鹿屋署 1号
県始良 33号	県薩摩 7号	鹿屋署 2号
県始良 34号	県薩摩 8号	川内署 1号
県始良 52号	県薩摩 11号 (メアサ)	川内署 2号
県柳宿 1号	県薩摩 13号	伊佐署 2号
県指宿 1号 (イッポンスキ)	県薩摩 17号 (メアサ)	大根占署 2号
県指宿 2号 (イッポンスキ)	県日置 1号	

()内は在来品種名

計 65クローン