

## RAPD マーカーを利用したクロマツの連鎖地図の作成

九州大学農学部 深田 俊武・松田 学  
宮崎 和弘・白石 進

## 1. はじめに

林木の品種改良において、林木は一代が非常に長く、形質発現までに長年月を要するため、これまで林木育種の急速な進展が阻まれ、栽培作物に比べて立ち遅れているのが現状である。今後、林木育種を効率よく行うためにはできるだけ早い時期に個体のもつ遺伝情報を検定できる技術の確立が求められている。すべての遺伝情報はDNA上にあるので、これを分析し、連鎖関係を利用することによって従来より著しく早い時期の検定が可能となる。

本研究ではDNA分析法の一つであるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を応用して考案されたRAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法<sup>1)</sup>とクロマツの胚乳(雌性配偶体)が半数体である特徴を利用して、早期検定技術の基盤となる連鎖地図の作成を試みた。

## 2. 材料と方法

## (1) 供試家系

牝鹿101号(クロマツ精英樹)より採取した種子126粒を用いた。

## (2) DNAの抽出

種子からそれぞれ胚乳を取り出し、DNA抽出用緩衝液(1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH9.0, 0.5% 2-メルカプトエタノール) 400 $\mu$ l中でホモジナイズし、65 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートした。これに7.5M 酢酸アンモニウム(200 $\mu$ l)を加えて混合し、30分間氷上で静置した。遠心分離後、上層を回収し、インプロパノール(700 $\mu$ l)を加えて混合し、15分間室温で放置した。これを遠心分離して上層を除去し、70%エタノール(1ml)で洗浄した。最後に遠心分離して上層を除去し、減圧乾燥して滅菌水(200 $\mu$ l)を加え、55 $^{\circ}$ CでDNAを溶解した。

## (3) RAPD分析

PCR反応における反応溶液組成は、50mM Tris-

HCl, pH8.5, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM KCl, 500 $\mu$ g/ml BSA, 0.5mM dNTP, 2.5% Ficoll, 1mM tartrazine, 0.4units/10 $\mu$ l *Tth* DNA Polymerase, 0.25 $\mu$ M Primer, 10ng/10 $\mu$ l 鋳型DNAである。PCR増幅は第一段階; 94 $^{\circ}$ C 60秒(変性), 第二段階: 94 $^{\circ}$ C 10秒(変性), 36 $^{\circ}$ C 30秒(アニーニング), 72 $^{\circ}$ C 60秒(伸長)を1サイクルとし60サイクル, 第三段階; 72 $^{\circ}$ C 120秒(伸長)で行った。PCR産物は1%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、UVトランスイルミネーター上で観察した。

## (4) 連鎖解析

RAPDマーカーのほとんどは優性マーカーとされている。<sup>2)</sup> このため母樹の遺伝子型がヘテロ接合型である遺伝子座(A遺伝子座)において、雌性配偶体レベルでは、PCR産物の有無(A+, A-)がメンデルの法則に従い、1:1で分離する。両者が共にヘテロ接合型である2遺伝子座間(A, B)ではA+B+: A+B-: A-B+: A-B-の4つの遺伝子型が出現する。連鎖検定は2遺伝子座の遺伝子型の分離比(1:1:1:1)の歪みについて $\chi^2$ 検定<sup>3)</sup>を用いて行った。さらにこの各遺伝子型の出現個体数から親型及び組換型を算出し、次式により組換価を求めた。

組換価 = 組換型の数 / 全体のサンプルの数

## (5) 連鎖地図の作成

地図作成においては、連鎖関係が認められた遺伝子座をもとに連鎖群にグループ化した。各連鎖群における遺伝子座の配列順序は三点実験<sup>3)</sup>より決定した。

## 3. 結果と考察

今回、RAPD分析の結果、96の遺伝子座で遺伝子型の分離が明らかになった(図中の矢印の部分)。その結果の一部を図-1に示す。これらの各遺伝子座での分離比(1:1)について $\chi^2$ 検定を行った。その結果、15の遺伝子座で有意差が認められたため今回の解析から除外した。次に2遺伝子座間の遺伝子型の分離比(1:1:

1:1) について $\chi^2$ 検定を行った。この結果、206の組合せで連鎖していることが認められ、67遺伝子座が17連鎖群にグループ化された。さらに三点実験により、染色体上での遺伝子座の配列順序を決定し、作成した連鎖地図を図-2に示す。今回は連鎖群数が17個となったがクロマツの染色体数は $n=12$ なので、さらに遺伝子座を増やすことによって12連鎖群に集束されるものと思われる。さらに高密度の連鎖地図を作成することによって、林木育種を効率よく行う上で役立つ多くの遺伝情報を得ることができるものと考えられる。

参考文献

- (1) WILLIAMS J. G. K, etc: Nucleic Acids Res, Vol 18, 6531 - 6535, 1990
- (2) J. F. クロー著, 木村資生・太田朋子 共訳: クロー遺伝学概説, 278 - 284, 培風館, 1992
- (3) 常脇恒一郎ほか: 植物遺伝学実験法, 144 - 145, 共立出版, 1982

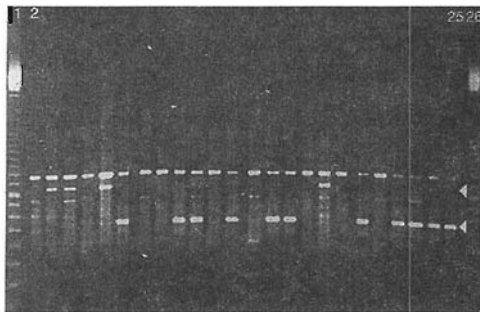


図-1 プライマーA-17によるRAPD分析の結果  
 レーン, 2~25: 胚乳DNA  
 レーン, 1, 26: サイズマーカー  
 プライマー: 5'-GACCCGCTTGT-3'

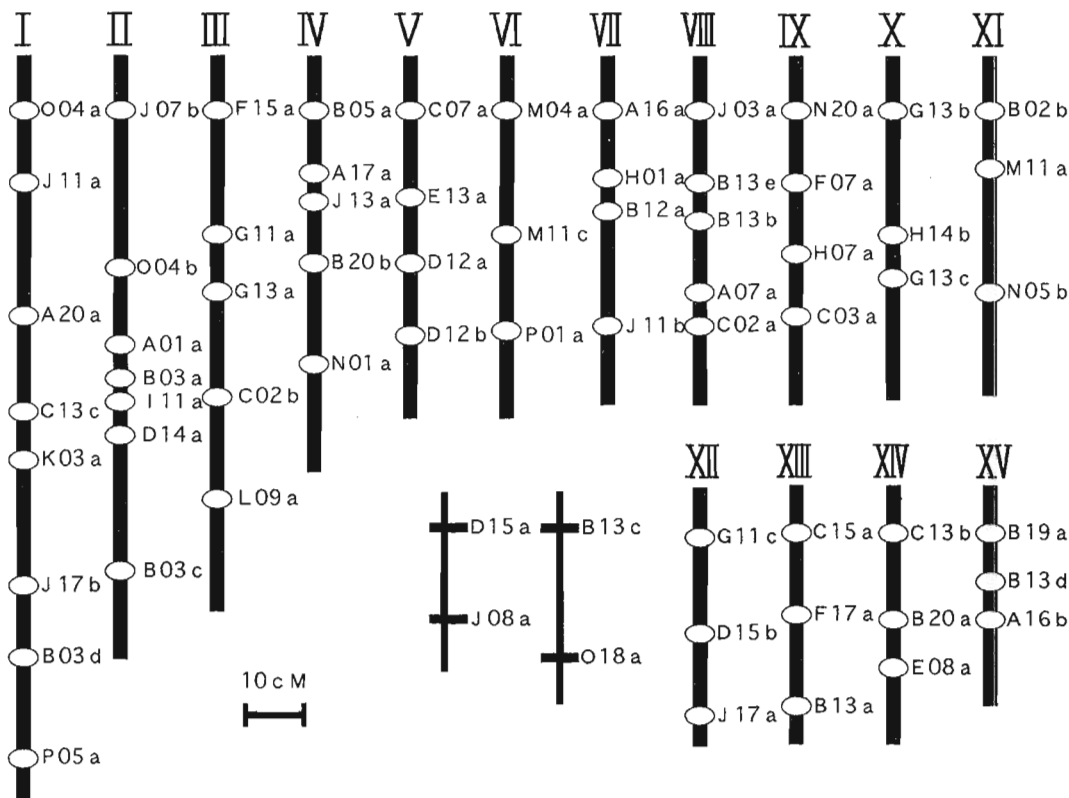


図-2 RAPD マーカーを用いて作成したクロマツの連鎖地図