

DNA分子マーカーによる大分県産スギさし木品種の クローン構成の解明

九州大学農学部 高田 克彦・白石 進
大分県林業試験場 佐々木義則

1. はじめに

スギさし木品種の多くは限られた造林上の特性によってグルーピングされたものであり、その中には複数のクローンによって構成されている品種があるとされている²⁾。さし木品種を構成するクローン数については、アイソザイム分析によって一部の品種に関して明らかにされている^{3,5,6)}が、アイソザイム手法では識別に利用できる遺伝的情報が限られており、未だ完全な識別法を確立するには至っていない。

本研究ではDNAを直接分析できるRAPD法を用いて、大分県産のスギさし木品種のクローン構成について調査した。RAPD法を用いたさし木品種構成クローン数についての研究は、宮原ら⁹⁾、著者ら⁷⁾によってすでに福岡県産のスギ在来品種について実施されており、ホンスギ他14品種についてクローン構成が明らかにされている。

2. 材料と方法

(1) 供試材料

実験には、大分県林業試験場内の見本園、試験林及び天ヶ瀬川に設定されているスギ優良品種現地適応試験林のアオスギ9本、アヤスギ16本、ヤブクグリ21本、リュウノヒゲ5本を用いた。供試材料の概要を表-1に示す。なお、各供試木には品種に関係なくランダムに固体番号を付し実験に供した。

表-1 供試材料の概要

新種名	本数	内 訳	個 体 番 号
アオスギ	9	現(津江)	12
		現(竹田)	14
		見	19, 23, 31, 37, 38, 47, 60
		現	2, 17, 28, 32, 39, 41, 42, 49, 51
		見	3, 5, 9, 11, 24, 35, 43
アヤスギ	16	現	1, 6, 18, 21, 25, 26, 27, 40, 45
		現(小国)	20, 22, 30, 33, 34, 36, 44, 46, 48
		見	8, 10, 29
		現	1, 6, 18, 21, 25, 26, 27, 40, 45
		見	8, 10, 29
リュウノヒゲ	5	実	4, 7, 13, 15, 16

内訳 現：現地適応試験林、見：見本林、実：実験林

(2) 実験方法

DNAの抽出は、当年葉150mgを使用し、CTAB法⁸⁾を改良して行った。RAPD分析は、Williamsら⁹⁾の方法を改良して行った。

3. 結果と考察

(1) 特定バンドによる分類

供試51サンプルを2種類のプライマー(B-16, Z-07)を用いてRAPD分析した。その結果、極めて増

表-2 4種類の特定バンドによるグルーピング

RAPD分析の結果					特定バンドによるソート結果					DNA型
sample No.	A	B	C	D	sample No.	A	B	C	D	
1	○	-	-	○	4	-	-	-	○	I
2	-	-	○	-	7	-	-	-	○	
3	-	-	○	-	13	-	-	-	○	
4	-	-	○	-	15	-	-	-	○	
5	-	-	○	-	16	-	-	-	○	
6	-	-	○	-	2	-	-	-	○	II
7	○	-	-	○	3	-	-	-	○	
8	○	-	-	○	5	-	-	-	○	
9	○	-	-	○	9	-	-	-	○	
10	○	-	-	○	11	-	-	-	○	
11	○	-	-	○	17	-	-	-	○	
12	○	-	-	○	24	-	-	-	○	
13	○	-	-	○	28	-	-	-	○	
14	○	-	-	○	32	-	-	-	○	
15	○	-	-	○	35	-	-	-	○	
16	-	-	-	-	39	-	-	-	○	
17	-	-	-	-	41	-	-	-	○	
18	○	-	-	○	42	-	-	-	○	
19	○	-	-	○	43	-	-	-	○	
20	○	-	-	○	49	-	-	-	○	
21	○	-	-	○	51	-	-	-	○	
22	○	-	-	○	6	○	-	-	○	III
23	○	-	-	○	8	○	-	-	○	
24	-	-	-	-	10	○	-	-	○	
25	○	-	-	○	14	○	-	-	○	
26	○	-	-	○	18	○	-	-	○	
27	○	-	-	○	20	○	-	-	○	
28	○	-	-	○	21	○	-	-	○	
29	○	-	-	○	22	○	-	-	○	
30	○	-	-	○	25	○	-	-	○	
31	○	-	-	○	26	○	-	-	○	
32	○	-	-	○	27	○	-	-	○	
33	○	-	-	○	29	○	-	-	○	
34	○	-	-	○	30	○	-	-	○	
35	○	-	-	○	33	○	-	-	○	
36	○	-	-	○	34	○	-	-	○	
37	○	-	-	○	36	○	-	-	○	
38	○	-	-	○	40	○	-	-	○	
39	○	-	-	○	44	○	-	-	○	
40	○	-	-	○	45	○	-	-	○	
41	○	-	-	○	46	○	-	-	○	
42	-	-	-	-	48	○	-	-	○	
43	-	-	-	-	44	○	-	-	○	
44	○	-	-	○	12	○	-	-	○	IV
45	○	-	-	○	19	○	-	-	○	
46	○	-	-	○	23	○	-	-	○	
47	○	-	-	○	31	○	-	-	○	
48	○	-	-	○	37	○	-	-	○	
49	○	-	-	○	38	○	-	-	○	
50	○	-	-	○	47	○	-	-	○	
51	-	-	-	-	50	○	-	-	○	

○：バンド有り、-：バンド無し

Katsuhiko TAKATA, Susumu SHIRAISHI (Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812) and Yoshihiro SASAKI (Oita Pref. Forest Exp. Stn., Hita, Oita 877-13)

(Analysis of clone composition in) Sugi cutting cultivars from Oita prefecture by DNA molecular marker

幅効率のよい4種類のPCR産物(特定バンド)が確認された(図-1)。これらの特定バンドの有無によって各供試サンプルのDNA型を整理した結果、4グループ(グループI, II, III及びIV)に分類された(表-2)。

(2) DNAフィンガープリント分析

4種類のPCR産物による分類を行った結果、51サンプルが4つのDNA型に分類された。これらの同一DNA型を示すサンプルが同一遺伝子型の個体であるかどうか確認するために、さらに3種類のプライマー(A-11, S-04, U-01)を用いてDNAフィンガープリント分析を行った。

図-2にグループIを対象にした3種類のプライマーのDNAフィンガープリント分析の結果を示す。図より明らかなように、グループIはすべて同一遺伝子型の個体で構成されていた。またグループII及びIVについてもDNAフィンガープリント分析の結果、それぞれ同一の遺伝子型の個体によって構成されていることが明らかになった。

図-3にグループIIIを対象にしたプライマーS-04のDNAフィンガープリント分析の結果を示す。左端の1サンプル(個体番号:14)を除いて同一の泳動像が得られた。プライマーA-11及びU-01でも同様の結果を得ており、グループIIIは二つの遺伝子型(III-a, III-b)に分類された。

(3) 品種のクローン構成状態

表-3は、各サンプルの遺伝子型を品種名ごとに整理し、各品種のクローン構成を示したものである。アヤスギ、ヤブクグリ及びリュウノヒゲは単一の遺伝子型によって構成されていた。アオスギは竹田地方から採取された1個体(個体番号:14)と他の地域の個体が異なる遺伝子型を示したことから、同一品種内で特定地域ごとに遺伝子型が異なる可能性が高い。

4. おわりに

今回の実験で得られた結果は当該品種を対象としたアイソザイム手法による解析結果⁹⁾と必ずしも一致しない。特にヤブクグリについては複数の地域のサンプルが同一遺伝子型を示したことから、単一クローン品種の可能性が高いと考えられる。今後、公的機関に植栽・保存してあるサンプルの調査を進めると共に、各品種を整理する上からも品種ごとに標準サンプルの指定を進める必要がある。

引用文献

(1) 宮原文彦ほか:日林講要旨集, 707, 1994
 (2) 宮島 寛:九州のスギとヒノキ, pp.275, 九州大学出版, 福岡, 1989
 (3) 宮崎安貞, 宮島 寛:第17回IUFRO世界大会論文集, 214~217, 1981

(4) MURRAY, M. G., THOMPSON, W.F.:Nucleic Acids Res., 8: 4321~4325, 1980
 (5) OKUIZUMI, H.: J. Jpn. For. Soc., 75, 293~302, 1993
 (6) 奥泉久人, 大庭喜八郎:日林試, 72, 501~507, 1993
 (7) 高田克彦ほか:木材学会九州支部講演集, 1, 46~47, 1994
 (8) WILLIAMS, J. G. et al.:Nucleic Acids Res., 18: 6531~6535, 1990

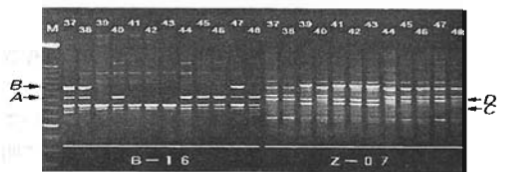


図-1 特定バンドによるグループピング
(プライマー: B-16, Z-07)

M: サイズマーカー, 37~48: 個体番号
A, B, C, D: 特定バンド

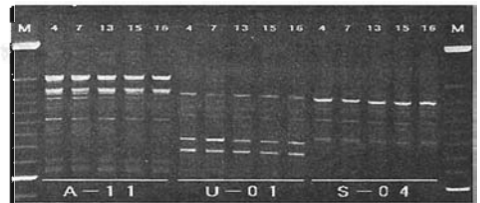


図-2 グループIに対するフィンガープリント
(プライマー: A-11, U-01, S-04)

M: サイズマーカー
4, 7, 13, 15, 16: 個体番号

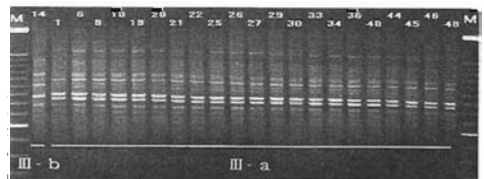


図-3 グループIIIに対するフィンガープリント
(プライマー: S-04)

M: サイズマーカー
1~48: 個体番号

表-3 4品種のクローン構成

品 種 名	遺 伝 子 型	ク ロ ン 構 成
ア オ ス ギ	III - b, IV	複 合
ア ヤ ス ギ	II	単 一
ヤ ブ ク グ リ	III - a	単 一
リ ユ ウ ノ ヒ ゲ	I	単 一