

RAPD法によるモミ・ウラジロモミ識別マーカーのスクリーニング

九州大学農学部 磯田 圭哉・白石 進

1. はじめに

モミ (*Abies firma* SIEB. et ZUCC.) とウラジロモミ (*A. homolepis* SIEB. et ZUCC.) は、我が国の本州、四国、九州にかけて、広い地域に分布する針葉樹である¹⁾。

分類学にはいくつかの見解があり、LIU²⁾ はモミを *Momi* 節、ウラジロモミを *Homolepides* 節と異なる節に、FARJON³⁾ は2種を *Momi* 節の中の異なる亜節(それぞれ *Firmae* 亜節、*Homolepides* 亜節)に分類している。

これら2種は、水平分布はオーバーラップしているが、垂直分布はほとんどの分布地で完全に住み分けを行っている。しかし、いくつかの地域(秩父山系三峯山、十文字峠など)では混交林を形成しており、種間雑種 (*A. ×umbellata* MAYR emend. LIU) がみられ、浸透交雑が起こっていると言われている^{2,3)}。

今回、モミとウラジロモミ間での雑種形成と浸透交雑を DNA レベルで解明するための DNA マーカーのスクリーニングを RAPD(random amplified polymorphic DNA)法を利用して行った。

2. 材料と方法

表-1に示したモミ4個体、ウラジロモミ4個体の針葉から、改良 CTAB 法⁴⁾により全 DNA を抽出した。抽出した全 DNA を GENECLEAN III Kit(BIO 101, Inc.) を用いて精製し、以下の実験の鋳型 DNA として使用した。

表-2に示した18種類の10-mer プライマーを用い

て、RAPD 分析を行った。PCR は、10mM Tris-HCl (pH8.3)、10mM KCl、3mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.5unit AmpliTaq DNA polymerase stoffel fragment (Perkin Elmer)、0.5 μM primer、10ng 鋳型 DNA の反応液 10 μL を 95℃ 1分間変性した後、95℃ 30秒 - 37℃ 30秒 - 72℃ 1分30秒を1サイクルとし、45サイクル行い、さらに72℃で7分間伸長反応を行った。PCR 産物は1.2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行い、302nm UV トランスイルミネーター上で観察した。この電気泳動像からバンドの有無を読み取った。

3. 結果と考察

表-3に RAPD 分析の結果得られたバンドの数を示した。18種類のプライマーを用いて、計178のバンドが得られた。このうち、118(約66%)のバンドでバンドの有無による多型が見られた。両種に共通して出現する多型バンドが約26%(全多型バンドの約39%)見られ、約40%(全多型バンドの約61%)のバンドはどちらか一方の種にしか出現しない多型バンドであった(モミ32本、ウラジロモミ40本)。

どちらか一方の種にしか出現しないバンドの中には、種内で変異の認められなかったバンドが存在した。図-1にプライマー OPW-10による RAPD 分析の結果を示した。図中、矢印 a で示したバンドは、モミ4個体全てに出現し、ウラジロモミ4個体には出現しなかった。ま

表-1 供試個体一覧

個体番号	種名	出所
AF01	<i>A. firma</i>	林木育種センター東北育種場
AF02	<i>A. firma</i>	森林総合研究所
AF03	<i>A. firma</i>	森林総合研究所
AF04	<i>A. firma</i>	森林総合研究所
AH01	<i>A. homolepis</i>	信州大学農学部
AH02	<i>A. homolepis</i>	林木育種センター東北育種場
AH03	<i>A. homolepis</i>	東京大学北海道演習林
AH04	<i>A. homolepis</i>	東京大学北海道演習林

表-2 RAPD 分析に用いたプライマー一覧

Primer	Sequence	Primer	Sequence
OPA-10	GTGATCGCAG	OPR-16	CTCTGCGCGT
OPA-19	CAAACGTCCG	OPT-20	GACCAATGCC
OPB-02	TGATCCCTGG	OPU-02	GTGAGGTCTC
OPB-07	GGTGACGCAG	OPU-13	GGCTGGTTCC
OPC-20	ACTTCGCCAG	OPU-16	CTGCGCTGGA
OPG-11	TGCCCGTCCT	OPV-02	AGTCACTCCC
OPJ-16	CTGCTTAGGG	OPV-05	TCCGAGAGGG
OPW-05	GGGAACGTGT	OPW-03	GTCCGGAGTG
OPP-17	TGACCCGCCT	FB-10	ATCTTCCGCC

Keiia ISODA and Susumu SHIRAIISHI (Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812 - 8581)

Screening of RAPD markers for discrimination two *Abies* species, *A. firma* and *A. homolepis*

た、矢印bとcで示したバンドは、ウラジロモミ4個体全てに出現し、モミ4個体には出現しなかった。このようなバンドを全18プライマーについて選抜したところ、モミに出現するものが15本(全バンドの約8%, 全多型バンドの約13%), ウラジロモミに出現するものが17本(全バンドの約10%, 全多型バンドの約14%)見られた(表-4)。これらのバンドは種特異的なバンドである可能性がある。今後、これらのバンドが真に種特異的であるかどうか、より多くの個体を分析することによって確認する必要がある。その結果得られる種特異的RAPDマーカーは、モミとウラジロモミの識別に利用できる。

種特異的RAPDマーカーは樹種識別だけでなく、雑種のゲノム構成を調べるのに有用である。RAPDマーカーは優性マーカーであるので、子供は両親のホモ接合型のバンドを全て、ヘテロ接合型のバンドを1/2の確率で保有する。種特異的マーカーは種内での変異が無い、もしくは、極めて少ないと思われる、ほぼホモ接合型であると考えられる。したがって、雑種は両親種の種特異的バンドのほぼ全てを保有することが予想される。このことから、RAPD法を利用した雑種性の確認が可能である。さらに、雑種個体の雑性が高いのであれば、親種との戻し交雑や雑種同士での交配が行われる可能性がある。このような場合、種特異的RAPDマーカーの保有数は変動することが予想される。戻し交雑が起こった場合、交雑により形成された個体は戻し親となった種の種特異的マーカー全て、また他方の種の種特異的マーカーの1/2を保有することが予想される。

雑種同士の交配が起こった場合、両種の種特異的マーカーを、それぞれ1/2ずつ保有すると予想される。両種間に浸透交雑が起こっている場合には、種特異的マーカーの保有数は様々な割合となり、浸透交雑の方向により種特異的マーカーの保有状況に偏りが生ずると思われる。今後、多くの個体の種特異的マーカーの出現頻度を調査することにより、ゲノム組成を推定し、浸透交雑の実態を明らかにすることができると思われる。

引用文献

- (1) 林 弥栄:林試報, 48, 1-64, 1951
- (2) Liu, T. S.: A monograph of the genus *Abies*, pp. 608, National Taiwan Univ., Taipei, 1971
- (3) FARJON, A.: Pinaceae, pp. 330, Koeltz Scientific Books, Konigstein, Germany, 1990
- (4) 白石 進・渡辺敦史:日林誌, 77, 429-436, 1995

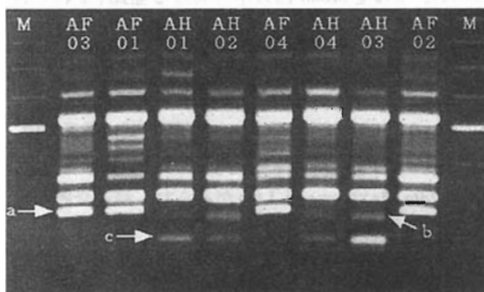


図-1 プライマーOPW-03によるRAPD分析結果

表-3 モミ・ウラジロモミにおける種識別バンドのスクリーニング結果

プライマー	全バンド数	多型バンド数	両種に出現した多型バンド数	一方の種のみ出現したバンド数			
				出現個体数<4		出現個体数=4	
				モミ	ウラジロモミ	モミ	ウラジロモミ
OPA-10	11	8	3	2	1	0	2
OPA-19	12	9	3	3	2	0	1
OPB-02	10	8	2	2	2	2	0
OPB-07	8	5	1	1	2	0	1
OPC-20	11	7	3	2	1	0	1
OPG-11	10	8	6	0	1	0	1
OPJ-16	11	7	2	2	2	1	2
OPM-05	11	6	2	0	1	3	2
OPP-17	7	3	2	0	1	0	2
OPR-16	8	7	5	0	1	0	1
OPT-20	9	6	1	0	2	2	1
OPU-02	10	8	2	1	1	2	2
OPU-13	10	4	0	0	3	0	1
OPU-16	12	7	4	1	1	1	0
OPV-02	5	4	2	1	1	0	0
OPV-05	9	7	3	1	0	2	1
OPW-03	11	6	2	1	0	1	2
FB-10	13	8	3	0	1	1	3
合計	178	118 (66%)	46 (26%)	17 (10%)	23 (13%)	15 (8%)	17 (10%)

() はバンド数に対する割合