

# MuPS (Multiplex-PCR of SCAR markers) 分析を用いた 九州産スギ精英樹の識別<sup>\*1</sup>

— 佐賀・長崎県産スギ精英樹について —

久枝 和彦<sup>\*2</sup> ・ 白石 進<sup>\*2</sup> ・ 栗延 晋<sup>\*3</sup>

## 1. はじめに

九州地方では、古くからスギのさし木造林が行われており、多数のさし木品種が成立している。また、精英樹選抜事業により、多数の精英樹クローンが選ばれている。しかし、表現型は、環境や樹齢の影響を受けやすいため、さし木品種や精英樹クローンを正確に同定することは困難であった(3)。形態によらない識別法としては、染色体の核型分析やアイソザイム分析が用いられてきたが(3, 4)、近年、環境要因に左右されないDNA分子マーカーが利用されるようになってきた。DNA分子マーカーには、1つの遺伝子座で多くの情報が得られる simple sequence repeat (SSR) や1度に多く遺伝子座の情報が得られる amplified fragment length polymorphism (AFLP) などの手法もあるが、これらの分析には、シークエンサーなどの非常に高価な機器が必要である。DNA分子マーカーの1つである random amplified polymorphic DNA (RAPD) (8) は、polymerase chain reaction (PCR) とアガロースゲル電気泳動だけの簡便な操作で分析できることから、多くの植物種の個体識別や品種識別に用いられ、スギにおいても高田・白石(7)、後藤ら(2)によって報告されている。しかし、RAPDで高い再現性を得るには、同時にPCR反応を行い、同一のアガロースゲル上で電気泳動する必要があるため、分析可能なサンプル数に制約がある。また、再現性の高いフラグメントのみを使用すると、1回の分析で得られる情報が少なく、分析にかかる労力、費用が大きくなる。

Sequence characterized amplified region (SCAR) (5) は、RAPDなどのフラグメントをシークエンスし、その塩基配列情報をもとに、より長いプライマーを設計し、PCRを行うDNA分子マーカーである。このマーカーは、PCRとアガロースゲル電気泳動を行うだけでよく、しかも再

現性が高い。植物においても抵抗性遺伝子を保有する個体の早期検定などに多く用いられている。一方、異なる複数のプライマー対を一つのチューブで反応させ、複数の遺伝子座の情報を1回のPCRで得るための Multiplex-PCR法(1)が開発されている。我々は、このSCARマーカーと Multiplex-PCR法を結合し、効率よく品種鑑定を行う MuPS (Multiplex-PCR of SCAR markers)法を開発した(未発表)。今回は、この手法を用いて、佐賀県・長崎県産スギ精英樹および佐賀県産スギ在来品種であるイワオスギのDNA型を決定した。

イワオスギの針葉を提供いただいた大分県林業試験場に厚くお礼申し上げる。

## II. 材料と方法

材料には、林木育種センター九州育種場に植栽されている佐賀県産スギ精英樹53クローン、長崎県産スギ精英樹33クローンおよび大分県林業試験場のイワオスギ2個体を用いた。それぞれの針葉から、改変CTAB法(6)によりDNAを抽出し、これを鋳型DNAとした。また、抽出したDNA溶液の純度の低いものについては、GENE CLEAN III KIT (BIO 101)を用いて精製したものを鋳型DNAとした。

PCR反応は、6対のプライマー(未発表)を、混合して行った。PCR反応溶液(10 $\mu$ l)の組成は、10mM Tris-HCl, pH8.3, 50mM KCl, 2.25mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001% (w/v) gelatin, 0.2mM 各 dNTP, 0.25unit AmpliTaq Gold™ DNAポリメラーゼ(PERKIN ELMER), プライマー(S32, 0.35 $\mu$ M; S18, 0.6 $\mu$ M; S26, 0.05 $\mu$ M; S45, 0.075 $\mu$ M; S44, 0.2 $\mu$ M; S31, 0.3 $\mu$ M), 20ng 鋳型DNAである。PCRの温度条件は、95 $^{\circ}$ C・10分の後、95 $^{\circ}$ C・30秒、65 $^{\circ}$ C 3分を35サイクル、最後に65 $^{\circ}$ C 10分とした。得られたPCR産物をGelMate (TOYOBO)を用い、1.2%アガロース

<sup>\*1</sup> Hisaeda, K., Shiraishi, S., and Kurinobu, S.: Discrimination of Sugi (*Cryptomeria japonica* D. DON) plus tree clones in Saga and Nagasaki prefectures using MuPS (Multiplex-PCR of SCAR markers)

<sup>\*2</sup> 九州大学農学部 Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

<sup>\*3</sup> 林木育種センター九州育種場 Kyushu Regional Breed. Office, Forest Tree Breed. Center, Nishigooshi, Kumamoto 861-1102

ゲルで電気泳動した。エチジウムブロマイドで染色後、UVトランスイルミネーター(302nm)で観察した。各供試個体は2回分析した。

### III. 結果および考察

それぞれのクローンについて異なる6個のマーカー(S32, 約1,050bp; S18, 920bp; S26, 757bp; S45, 527bp; S44, 435bp; S31, 343bp)においてフラグメントの有るものを“1”、無いものを“0”とし、S32, S18, S26, S45, S44, S31のマーカー順に6桁の数値として表記した(表-1)。フラグメントの有無が不明瞭な箇所については“2”と表記した。2と表記した12箇所のうち、11箇所がS18マーカーであり、現在のMuPS分析で使用しているS18マーカーには改良の余地のあることが示された。S18マーカーについては、プライマーの再設計、PCR条件の再検討さらには他のマーカーとの置き換え等が必要である。今回分析した86クローン中、1もしくは0のみで表された74クローンは、29通りのDNA型に識別された。

今回、精英樹に加えて佐賀県産在来品種イワオスギについても分析を行った。2個体を分析した結果、2個体とも同一のDNA型を示した。また、分析した精英樹86クローンのうち、従来より同一クローンとされてきた佐賀3号とイワオスギは同一DNA型を示した。

異なるPCRおよび電気泳動であるにも関わらず、2回の繰り返し実験で、DNA型が明確となった74精英樹クローンとイワオスギ2個体はいずれも同じDNA型を示した。このことは、MuPSの信頼性の高さを示唆してい

る。

今回のMuPS分析は、6種類のマーカーから構成された1セットのみのDNA型情報であることから、これにより識別できるDNA型は、理論的には $2^6 (= 64)$ 通りである。このMuPSのセット数が2セットのときの識別可能なDNA型は、4,096通り、3セットのときは約26万通りである。より多くのマーカーのセットを開発することで、より信頼性の高い識別が可能である。九州産スギ精英樹数は約600クローン、全国のスギ精英樹数は約4,000クローンであることを考えると、3セットあれば信頼性の高いスギ品種識別が可能であると考えられる。今後、さらに2セット(計3セット)のマーカーを開発するとともに、より信頼性の高い分析システムの構築に向けて、検討を行う必要がある。

### 引用文献

- (1) Chamberlain, J.S. et al : Nucl. Acids Res., 16, 11141~11156, 1988
- (2) 後藤 晋ほか: 日林誌 81, 187~193, 1999
- (3) 宮島 寛: 九州のスギとヒノキ, pp. 275, 九州大学出版会, 福岡, 1989
- (4) Okuizumi, H. : J. Jpn. For. Soc. 75, 293~302, 1993
- (5) Paran, I., Michelmore, R.W. : Theor. Appl. Genet., 85, 985~993, 1993
- (6) 白石 進・渡辺敦史: 日林誌 77, 429~436, 1995
- (7) 高田克彦・白石 進: 九大演報 75, 1~14, 1996
- (8) Williams, J.G.K. et al : Nucl. Acids Res., 18, 6531~6535, 1990

表-1 佐賀県および長崎県産スギ精英樹クローンのDNA型

精英樹名	DNA型	精英樹名	DNA型	精英樹名	DNA型	精英樹名	DNA型
(佐賀県産精英樹)		佐賀2	121110	藤津21	011000	長崎署1	001111
伊万里1	101111	佐賀3	101010	藤津22	120111	長崎署2	110110
伊万里2	110111	佐賀4	110110	藤津24	120110	長崎署3	110111
唐津1	110111	佐賀5	110111	藤津25	120110	長崎署4	110110
唐津2	011110	藤津1	010100	藤津26	110111	長崎署5	011101
唐津3	110111	藤津2	110010	藤津27	120110	長崎署6	110010
唐津4	111010	藤津4	021110	藤津28	111001	南高来1	010111
唐津5	110110	藤津5	111000	藤津29	010110	南高来2	110110
唐津6	111110	藤津6	110010	(長崎県産精英樹)			
唐津7	111111	藤津7	110110	諫早1	011010	南高来3	111010
唐津8	111110	藤津8	110110	諫早2	111100	南高来4	110111
唐津10	111110	藤津9	111010	諫早3	010010	南高来5	110110
唐津11	110010	藤津10	100110	大村1	110110	南高来6	000011
神埼1	121111	藤津11	110100	北高来1	111000	南高来7	000011
神埼2	010010	藤津12	010110	対馬2	111110	南高来8	111001
神埼3	110001	藤津13	110101	対馬3	110010	南高来9	110011
神埼4	110100	藤津14	111110	対馬4	100110	南高来10	010011
神埼5	010110	藤津15	120010	対馬5	111100	南高来11	011010
神埼6	110111	藤津16	120110	対馬6	110110	南高来12	011010
神埼7	110100	藤津17	110100	長崎1	010111	南高来13	100111
杵島1	111110	藤津18	120110	長崎2	100111	南松浦1	100100
杵島2	100110	藤津19	100011	長崎3	200111	南松浦2	110110
佐賀1	110100	藤津20	120110			南松浦3	011000
						(佐賀県産在来品種)	
						イワオスギ	101010