

速報

RAPD マーカーによるスギザイノタマバエ抵抗性クローンの個体識別^{*1}佐々木峰子^{*2} ・ 平岡裕一郎^{*2} ・ 藤澤 義武^{*2}

I. はじめに

スギザイノタマバエ (*Resseliella odai* Inouye) の被害に対する育種的な対応の一環として、幼虫の人工接種による試験を実施し、皮紋の形成が少ないスギ個体を抵抗性個体として選抜した(3)。しかし、抵抗性個体は実生林分だけではなく、さし木林分からも選抜されており、同一の林分から複数の個体が選抜された場合もある。このことは、同一クローンから複数の個体が選抜された危険性を示唆するとともに、在来品種から選抜された可能性をも示唆するものである。

そこで選抜された個体の中に同一クローンがあるか否かをチェックするため、抵抗性個体として選抜した40個体のうち38個体、在来品種で抵抗性の高いゴウセスギ、計39個体を対象としてRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーによる個体の識別を行った。

II. 材料と方法

抵抗性であると評価された40個体のうち、林木育種センター九州育種場内に保存されている38個体及びゴウセスギ(県精英樹日田24号)を供試材料として使用した。表-1に抵抗性個体が選抜された林分の所在地及び実生・さし木の区分を示した。

実生の激害林分から選抜されたのは、佐賀県の9個体、熊本県の12個体、大分県の4個体であった。このうち、佐賀県産の個体は同一林分から選抜されている。また、熊本県では異なる林分から選抜されたものの、一つの地域(五木村)に集中していた。一方、大分県の選抜林分は3地域に分散していた。宮崎及び鹿児島県の2県の抵抗性個体は、宮崎15を除いてさし木林分から選抜されたが、その林分は比較的広い地域に分散していた。

これらの抵抗性個体はさし木によってクローン増殖され、九州育種場内に保存されている。5月に各クローンの針葉を採取して-20℃で冷凍保存し、それぞれ約1gを用いて全DNAの抽出を行った。DNAの抽出には、針葉に含まれる多量の多糖類を除くため、ポリエチレングリコールで処理する方法を用いた(1)。

PCR反応液の組成は、15μl中に×10バッファー1.4μl、50mM塩化マグネシウム0.6μl、10mM dNTP 0.1μl、5μM プ

ライマー0.6μl、Taqポリメラーゼ(GIBCO BRL製)0.3U、滅菌水10μl、15ng/μlに調整した鋳型DNA2μlである。反応には96穴のポリカーボネート製のプレートを用い、サーマルサイクラーはアステック社のPC-800を使用した。PCRは、最初に94℃1分の熱変性を行った後、94℃・1分で熱変性、45℃・1分でアニーリング、72℃・2分で伸長反応のサイクルを45回繰り返し、最後に72℃・1分で処理した。得られた増幅産物は、エチジウムブロマイドを含む2%のアガロースゲルを用いて電気泳動した後、UVトランスイルミネーター上でDNA多型を検出した。

個体識別に使用したマーカーは、近藤らがヤクスギの個体識別(2)に用いた10プライマーに加え、新たにオペロン社製の37プライマーからスクリーニングした。

III. 結果と考察

プライマーのスクリーニングの結果、3回の異なるPCRにおいて明瞭なバンドとして検出され、多型が確認された11種類のプライマー・15本のバンドをマーカーとして使用した。

表-1に示した39の抵抗性個体について、使用したRAPDマーカーの出現パターンを調査した。バンドが出現する個体は1、出現しない個体は0として表記し、15マーカーの組み合わせを各個体のDNA型とした。今回用いた15マーカーの39個体における出現率は、最大で90%、最小で15%、平均49%であった。

実生林分から選抜された抵抗性個体のうち、佐賀の9個体及び熊本の12個体は全て異なるDNA型を示した。佐賀県では同一林分、熊本県では狭い地域から抵抗性個体を選抜しているため、比較的近縁の個体が存在する可能性が高いと考えられたが、今回のRAPD法で全て識別できた。一方、大分県が選抜した4個体のうち、日田市から選抜された大分20、同23が同一のDNA型(以下type A)を示した。選抜台帳によると、この2個体は実生の異なる林分から選抜されていた。しかし林分の所有者は同一人物であることや、日田市がさし木林業地帯であることから、同じ系統かクローンを植栽していた可能性があり、このことが大分20と同23が同一のDNA型に区分されたことに影響したと考えられる。

宮崎県及び鹿児島県から選抜された13の抵抗性個体は、ほとんどがさし木林分から選抜されていた。このうち同じDNA型を示

^{*1} Sasaki, M., Hiraoka, Y. and Fujisawa, Y.: Clone identification of resistant individuals of Sugi (*Cryptomeria japonica*) to pest damage of *Resseliella odai* using RAPD markers

^{*2} 林木育種センター九州育種場 Kyusyu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Kumamoto 861-1102

したのは、宮崎1, 同4, 同9, 同10, 同18 (Type B), 宮崎8, 同12 (Type C), 鹿児島8, 同13 (Type D) であった。宮崎・鹿児島ともに広い地域に分布している林分から選抜されているにも関わらず、同一のDNA型が確認されたことは、Type B～Dは汎用されている在来品種である可能性を示すものであり、今後この3タイプと在来品種との関係を検討する必要があると考えられる。

以上の結果、選抜された38の抵抗性個体は、11プライマー、15バンドによるRAPD分析により、30のDNA型に分類できた。ま

た、在来品種であるゴウセスギは、他の全ての個体と異なるDNA型を示した。

引用文献

- (1) 河原孝行ほか (1995) 日本植物分類学会報 11: 13 - 32.
- (2) 近藤禎二ほか (2001) 日林九支研論 54: 57 - 58.
- (3) 佐々木峰子ほか (2001) 日林九支研論 54: 53 - 54.

表-1. 抵抗性個体の品種系統とマーカーの出現状況

個体名	品種系統	マーカー 選抜地	G10		G11		O20		P10		P14		P17		Q20		R 8		R 9		R16		S07		DNA Type
			500	600	600	900	500	550	1100	800	850	1000	950	1600	1700	580	720								
佐賀3	実生*	藤津郡太良町*	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
佐賀5			1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	
佐賀6			0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
佐賀13			1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	
佐賀16			0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
佐賀23			1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	
佐賀28			1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
佐賀35			1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
佐賀36			1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	
熊本29	精英樹自然**	球磨郡五木村	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0		
熊本33	精英樹自然**	球磨郡五木村	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0		
熊本35	実生	球磨郡五木村	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0		
熊本37	実生	球磨郡五木村	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0		
熊本38	実生	球磨郡五木村	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1		
熊本39	実生	球磨郡五木村	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0		
熊本42	実生	球磨郡五木村	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1		
熊本44	実生	球磨郡五木村	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1		
熊本46	実生	球磨郡五木村	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0		
熊本48	実生	球磨郡五木村	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0		
熊本51	実生	球磨郡五木村	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0		
熊本53	実生	球磨郡五木村	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0		
大分14	実生	玖珠郡九重町	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0		
大分19	実生	直入郡直入町	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
大分20	実生	日田市	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	A	
大分23	実生	日田市	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	A	
宮崎1	さし木	北諸県郡三股町	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	
宮崎4	さし木	北諸県郡三股町	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	
宮崎8	オビスギ系	西都市	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	C	
宮崎9	オビスギ系	西都市	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	
宮崎10	オビスギ系	東臼杵郡南郷村	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	
宮崎11	オビスギ系	児湯郡木城町	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	
宮崎12	オビスギ系	児湯郡木城町	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	C	
宮崎13	オビスギ系	東臼杵郡西郷村	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
宮崎15	混交***	東臼杵郡西郷村	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
宮崎18	オビスギ系	東臼杵郡諸塚村	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	B	
鹿児島8	オビスギ系	出水市	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	D	
鹿児島11	さし木	指宿市	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
鹿児島13	メアサ	薩摩郡入来町	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	D	
日田24号	ゴウセスギ		1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0		
出現頻度			0.72	0.49	0.44	0.90	0.87	0.15	0.79	0.33	0.64	0.62	0.15	0.15	0.33	0.54	0.23								

*: 同一林分から選抜 ** : 精英樹の自然交雑による実生 *** : さし木と実生の混交林分

(2001年11月26日 受理)