

RAPDマーカーによるケヤキ優良形質個体の識別

高橋大輔・千木 容

要旨：石川県内外より選抜されたケヤキ優良形質個体10個体の識別が可能となるRAPDマーカーの開発を試みた。その結果、7種類のプライマーより得られた11個のRAPDマーカーによって8個体の識別が可能となり、その識別率は80%であった。識別能力を高めるためには、RAPD法だけではなくSSRマーカーなど他の手法を援用することが有効であると考えられた。

I はじめに

これまでに県内外各地から優れた性質を有するケヤキ優良形質個体が収集、選抜され、組織培養技術を取り入れたさし木によるクローン苗の育成技術の開発が行われてきた(千木2004)。クローン苗は母樹の遺伝的素質を直接引き継ぐことになり、種苗生産現場には確実に優良形質個体由来の苗木を提供しなくてはならない。その為にも、母樹となりうる優良形質個体を認識し、確実な個体管理を実施できるような個体識別法の実用化が必要である。

近年、個体識別や品種識別に対し、樹木の外部形態などではなく、DNA分子マーカーの利用が盛んに行われている。特にRAPDマーカーは操作が非常に簡便であり、スギ(後藤ら1999)やヒノキ(家入ら2000)のさし木品種、ハゼノキの品種(後藤ら1997)や、マツノザイセンチュウ抵抗性クローン(GOTO1998)、スギカミキリ抵抗性個体(西山ら2002)などの識別に応用され、その有効性は広く認められている。

梁ら(2001)はRAPD法によるケヤキの個体識別を試み、RAPD法の有効性を報告している。本研究では、RAPD法を用い、梁らによって分析された個体も含めこれまでに選抜されたケヤキ優良形質個体10個体の識別を行い、個体管理に利用可能なRAPDマーカーの開発を試みた。

なお本研究は、「有用林木遺伝資源植物のバイオテクノロジーによる保存と増殖技術の開発(バイオテクノロジー実用化型事業): H8~H15」の一環として実施した。

II 材料と方法

1 供試材料

供試材料は、県内外各地から収集し、組織培養

により増殖可能となった優良形質個体10個体である。サンプル名ならびに母樹の所在地は表-1のとおりである。実際の分析には、組織培養により増殖させた個体を場内で養生したものを使用した。

表1 サンプル名と母樹所在地

No.	サンプル名	母樹所在地
A	KHJ	金沢市笠舞本町
B	FN	羽咋郡志賀町福野
C	SM	金沢市笠舞
D	KY	珠洲市北山
E	TY	輪島市寺山
F	3K	福井県三方町
G	TD	鳳至郡柳田村北河内
H	FM	金沢市二侯
I	11	金沢市十一屋町
J	TD2	鳳至郡柳田村北河内

2 DNAの抽出

各さし木個体から小枝を採取し、洗浄後、外樹皮を削りとり内樹皮を取り出した。この内樹皮0.5gからDNAの抽出を行った。DNAの抽出にあたっては、細かく刻んだ内樹皮を冷却した乳鉢上ですりつぶし、DNA抽出用試薬キット(ISOPLANT II: ニッポンジーン社)を用いておこなった。内樹皮から得られたDNAは、葉から抽出したDNAに比べ多糖類など不純物の混入が少なかったことから、抽出されたDNAを希釈し、そのままRAPD分析における鋳型DNAとした。

3 RAPD法

RAPD法における反応溶液組成ならびにPCR反応条件に関しては梁ら(2001)の手法を参考にした。反応溶液量は15μlで反応溶液組成は、20mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、2.0mM MgCl₂、0.2mM dNTPs、0.4μM Primer、0.5U EXTaq polymerase(宝酒造製)、20ng鋳型DNAとした。PCR反応は、サーマルサイクラー

表2 RAPDマーカーによる個体識別結果

No	sample	A89		B19		C58		A12		B41	D01	D80
		750	500	1,500	800	850	400	500	300	800	1,100	500
A	KHJ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B	FN	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C	SM	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
D	KY	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1
E	TY	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
F	3K	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
G	TD	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H	FM	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
I	11	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
J	TD2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0

0：フラグメント非出現 1：フラグメント出現

(iCycler：BioRad社)を用いて行った。増幅条件は、最初に94℃5分間変性処理を行った後、94℃1分(変性)・45℃1.5分間(アニーリング)・72℃1.5分間(伸長)の3行程を35サイクル行った。増幅産物は2%のアガロースゲルで電気泳動し、UVトランスイルミネーター上で増幅されたDNA断片(RAPDマーカー)の検出を行った。

III 結果と考察

1 RAPD法による個体識別

プライマーとして12塩基(ベックス社製)のランダムプライマー15種類を使用した。まず、多型的なバンドパターンを得るためにスクリーニングを実施し、8種類のプライマーを選抜した。これらのプライマーを用いて2回の反復試験を行い、再現性の確認された7種類のプライマーより得られた11個のRAPDマーカーを個体識別に用いた。表2にRAPDマーカーによる個体識別の結果を示す。

今回選抜されたマーカーによって、梁ら(2001)の報告では識別不可能であったKHJとSMを識別することが可能となった(図1~4)。しかしながら、FMと11の2個体を識別することはできなかった(図1~4)。そこで、当該2個体の識別を可能とすべくさらに5種類のプライマーを供試したが両者の識別は不可能であった(図5)。

2 RAPDマーカーの識別能力

金山ら(2002)によると、RAPD法はこれまでのアイソザイム法などに比べ格段に識別能力は高いが、供試プライマーの数を増やしても、RAPD法単独での識別率(供試個体に対する識別された個体数)は85%程度であったと報告している。

本研究における識別率は80%であったことから今回の結果はRAPD法単独での識別限界に近い結果であったと考えられる。

また、RAPDマーカーは優性遺伝マーカーであるため、個体間での交配などが生じていた場合、バンドありのホモ接合体とヘテロ接合体の区別がつかず、厳密な個体識別には限界があると言われている(種生物学会2001)。梁ら(2001)によると、RAPDマーカーはケヤキの個体識別に有効ではあるが、遺伝的に近縁な個体の識別には限界があるとしている。今回識別できなかった2個体の母樹はともに金沢市内に位置しており、両者は遺伝的に近縁な関係にあったとも考えられる。しかしながら、当該2個体の樹齢は古く、現在に至っては両者に血縁関係があったかどうかは不明である。

3 識別能力を高める為の方策

遺伝的に近縁であっても個体を識別することが可能なDNA分子マーカーとしてSSRマーカーなどがあげられる。SSRマーカーは非常に感度の高い共優性マーカーであり、樹木の更新過程や家系構造解析などにも利用されている(種生物学会2001)。

DNA情報を利用したより厳密な個体識別を行っていくためには、ケヤキに利用できるSSRマーカーなど感度の高いDNA分子マーカーの開発が必要である。しかしながら、SSRマーカーの開発には時間と手間がかかってしまう上、分析にはシーケンサーなど大型の設備が必要となってくる。簡便性を重視するのならばRAPD法のみでも実用的であると思われるが、より高い精度を求めるのならば、今回識別できなかった2個体などに対

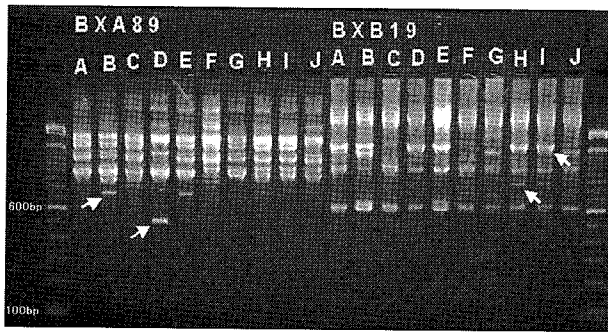


図1 プライマーA89とB19を用いた場合の電気泳動像 (A:KHJ, B:FN, C:SM, D:KY, E:TY, F:3K, G:TD, H:FM, I:11, J:TD2) 図中の矢印は個体識別に用いたRAPDマーカーを示す。両端は100bpラダー。

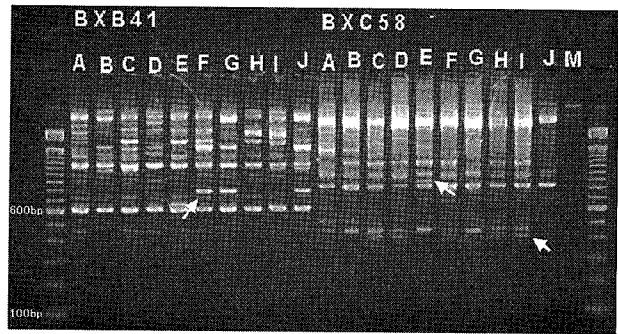


図2 プライマーB41とC58を用いた場合の電気泳動像 (A:KHJ, B:FN, C:SM, D:KY, E:TY, F:3K, G:TD, H:FM, I:11, J:TD2) 図中の矢印は個体識別に用いたRAPDマーカーを示す。両端は100bpラダー。

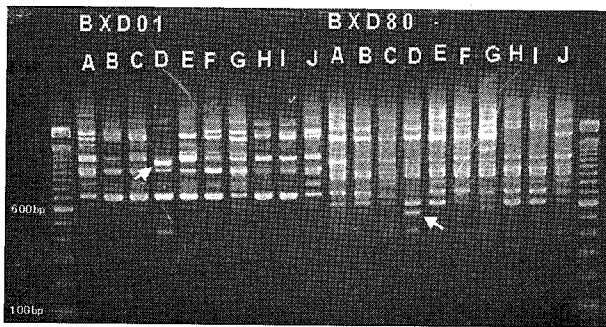


図3 プライマーD01とD80を用いた場合の電気泳動像 (A:KHJ, B:FN, C:SM, D:KY, E:TY, F:3K, G:TD, H:FM, I:11, J:TD2) 図中の矢印は個体識別に用いたRAPDマーカーを示す。両端は100bpラダー。

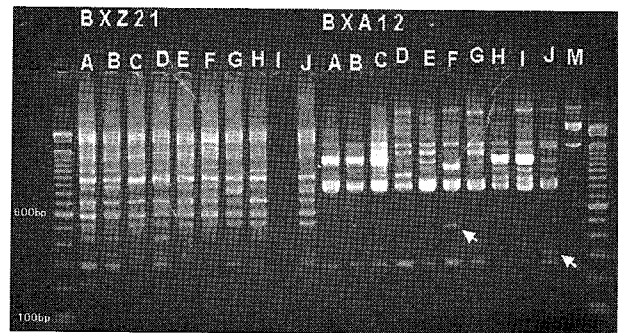


図4 プライマーA12を用いた場合の電気泳動像 (A:KHJ, B:FN, C:SM, D:KY, E:TY, F:3K, G:TD, H:FM, I:11, J:TD2) 図中の矢印は個体識別に用いたRAPDマーカーを示す。両端は100bpラダー。

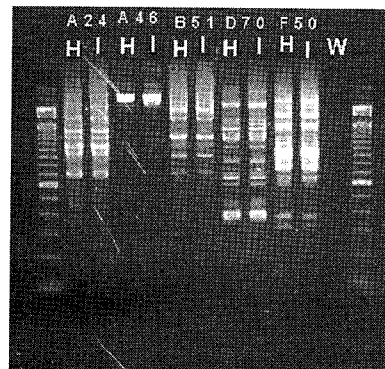


図5 H (FM) とI (11) がしめすRAPDマーカーの類似性 5種類のプライマーを追加してRAPD分析を行った際の電気泳動像。両端は100bpラダー。

して、RAPD法だけではなくSSRマーカーなど他の手法を援用することも有効な手段であると考えられた。

本研究を行うにあたり、分析全般に関してご協力いただいた南部春美さんにこの場を借りて厚くお礼申し上げます。

V 引用文献

- 1) 後藤 晋・渡辺敦史・池田浩一：RAPDマーカーによるハゼノキの品種識別、日林誌79 (4)、229-233 (1997).
- 2) 後藤 晋・家入龍二・宮原文彦：福岡県におけるスギさし木品種と精英樹のRAPD分析、日林誌81 (3)、187-193 (1999).
- 3) 家入龍二・宮島淳二：RAPDマーカーによるヒノキサシ木品種ナンゴウヒのクローン識別、日林誌82 (1)、98-100 (2000).
- 4) 金山央子・後藤陽子・近藤禎二：関東育種基本区のスギ精英樹のクローン識別におけるRAPD法の有効性、日林誌84 (2)、100-103 (2002).
- 5) 西山和美・渡辺敦史・久保田正裕：RAPDマーカーによるスギカミキリ抵抗性個体の識別、日林誌84 (4)、262-266 (2002).
- 6) 梁 守倫・三浦 進・千木 容：RAPD法によるケヤキのクローン識別、石川県林試研報32、19-21 (2001).
- 7) Susumu GOTO：Genetic Fingerprinting of Nematode-Resistant Clones of Japanese Black Pine (*Pinus thunbergii* Parl.) Using RAPD Markers, *J.For.Res* 3, 127-130 (1998).
- 8) 種分子生物学会編：森の分子生態学—遺伝子が語る森林のすがた—、303pp、文一総合出版 (2001).
- 9) 千木 容：ケヤキの組織培養技術を利用したさし木による苗木育成、石川県林試研報36、(2004)；印刷中.