RAPDマーカーによる鹿児島県産スギ精葉樹の分類

九州大学 農学部 エンシモンマス酵素
松田 学・白石 進
林木育種センター九州育種場 西村 慶二

1. はじめに

九州地域ではこれまでに数多くのスギ及び木品種が育成されている。従来これらの品種の分類は外部形態形質を指標として行われてきた。しかし、形態形質の環境要因の影響を受け、変化するものであり、品種の中には遺伝的に同一のものが誤って分類されたり、逆に異なるものが同一品種となっている可能性も考えられる。

本研究では遺伝情報の本体であるDNAを直接調査できるRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法を用いて鹿児島県で選抜されたスギ精葉樹のクローニング分析を行った。

2. 材料と方法

(1) 供試材料

農林水産省林木育種センター九州育種場に栽培されている鹿児島県産スギ精葉樹92クローンを用いた（表-1）。

(2) 全DNA抽出

スギ当量葉150mgを使用し、Murray and ThompsonのCTAB法を改良して行った。

(3) RAPD分析

RAPD分析はWilliamsらの方法に従った。PCR反応は、50mM Tris-HCl pH8.5、5mM MgCl₂、500μg/mlBSA、2.5mM dNTP、2.0％（W/V）Ficoll、40mM Tartrazine、0.1mM EDTA、0.4units/μl Tth DNA polymerase、0.25μMプライマー、15ng/μlキニントープロダクトの溶液組成で、94℃×1分（変性）、94℃×10秒（変性）×36℃×30秒（アニール）×72℃×1分（伸長）を60サイクル、72℃×2分（伸長）の条件で行った。使用したプライマーは6種類（A-08: GTGACGTAGG、B-16: TTTGCCGGGA、D-17: TTTCCCAACGG、C-10: TGCTCTGGTG、Z-04: GCCCTACCGC、Z-07: ACGTACGCCT）である。PCR増幅産物は1％アガロース電気泳動を行った後、エチジウムブルーマイド染色し、UVトランスミルニューター上で観察した。

表-1 供試精葉樹（鹿児島県産）

| 品種代 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 供試品 | 埼玉産 | 1号 | 2号 | 3号 | 4号 | 5号 | 6号 | 7号 | 8号 | 9号 | 10号 | 11号 | 12号 | 13号 | 14号 | 15号 | 16号 | 17号 | 18号 | 19号 | 20号 | 21号 | 22号 | 23号 | 24号 | 25号 | 26号 | 27号 | 28号 | 29号 | 30号 |
| 産地 | 1号 | 2号 | 3号 | 4号 | 5号 | 6号 | 7号 | 8号 | 9号 | 10号 | 11号 | 12号 | 13号 | 14号 | 15号 | 16号 | 17号 | 18号 | 19号 | 20号 | 21号 | 22号 | 23号 | 24号 | 25号 | 26号 | 27号 | 28号 | 29号 | 30号 |

3. 結果と考察

92クローン全てをまずプライマーA-08を使用し、RAPD分析を行った（図-1）。プライマーA-08では8つのPCR産物（バンド）が確認され、これらのバンドの有無により、各クローンのDNAを整理した。このA-08によるRAPD分析で得られた8バンド（遺伝子型）におけるDNA型により、92クローンは22タイプのDNA型に分けることができた。このうち6クローンは固有のDNA型を示し、プライマーA-08のみで分類、同定が可能なものが明らかとなった。残りの86クローンについては同一のDNA型を示すクローンが複数あり、さらに他のプライマーによるRAPD分析を行う必要があった。そのためプライマーB-16、D

Manuel Enciso, Manabu Matsuda, Susumu Shiraishi (Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812)
Keiji Nishimura (Kyushu Regional Tree Breeding Inst., Nishigooshi Kumamoto 861-11)
Clones analysis of sugi plastree from Kagoshima Prefecture using RAPD Markers.

105
17，C－10，Z－04，Z－07によりRAPD分析を
逐次行い，この結果を用いて段階的にクローンの分類
を行った。
最終的に6プライマーによるRAPD分析から92ク
ローンのうち65クローンが固有のDNA型を示した（表
2）。残り27クローンは5つのグループに分類された
（表3）。県始良42号，県始良49号，県鹿児島1号，県
薩摩16号からはBグループはこれまですべて従来の
在来品種名がメアサとしての分類されており，RAPD
分析の結果からも同一のクローンであることが明らか
となった。同様に在来品種がオピアカとなっているEグ
ループの県始良3号と県始良4号についても同じことが
言える。在来品種名が明らかでない県肝属5号，県
肝属7号，県肝属9号，県始良23号から構成される
Cグループも同一のDNA型を示した。在来品種名の異
なる精種（県始良2号（クノアカ），川内署3号と大
根占寄1号（オピアカ）が同一グループに含まれたDグ
グループ，これまで少なくとも3在来品種に分類されてい
た14クローンが同じDNA型を示したAグループにつ
いても同一クローンである可能性が高い。これは今回
と同じく6プライマーを用いたRAPD分析において，
10^-7オーダーの危険率でクローン同定が可能であるこ
とが示されており（未発表），確率的には同一クローン
と考えられる。

引用文献
(1) 九州地区林業試験研究機関協議会知育部会：スギ
精種樹性一覧表，1987
(2) MURRAY M. G., Thompson W. F.: Nuclear Acid
Res., 8, 4321－4325, 1980
(3) WELSH J., Petersen C., Mc Clodland M.: Nuclear
Acids Res. 19, 303－306,1991
(4) WILLIAMS J. G. K., etc. : Nuclear Acids Res, 18,6531－
6535,1990

表－3 6プライマーのRAPD分析で同一DNA型を示
した精種樹

<table>
<thead>
<tr>
<th>県始良</th>
<th>9号（ヒキ）</th>
<th>霞日隈</th>
<th>6号（ヤブザギ）</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>10号</td>
<td>霞日隈</td>
<td>6号（ヤブザギ）</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>11号（ヒキ）</td>
<td>県日隈</td>
<td>7号（ヤブザギ）</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>12号（ヒキ）</td>
<td>県日隈</td>
<td>8号（ヤブザギ）</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>35号（メアサ）</td>
<td>县薩摩</td>
<td>16号</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>3号</td>
<td>县薩摩</td>
<td>2号</td>
</tr>
<tr>
<td>大根占寄</td>
<td>2号</td>
<td>县川辺</td>
<td>6号（ヤブザギ）</td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>县薩摩</th>
<th>49号（メアサ）</th>
<th>县薩摩</th>
<th>16号（メアサ）</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>县薩摩</td>
<td>6号</td>
<td>县肝属</td>
<td>0号</td>
</tr>
<tr>
<td>县肝属</td>
<td>7号</td>
<td>県始良</td>
<td>23号</td>
</tr>
</tbody>
</table>

<table>
<thead>
<tr>
<th>川内署</th>
<th>2号（オピアカ）</th>
<th>大根占寄</th>
<th>1号（オピアカ）</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>川内署</td>
<td>3号（オピアカ）</td>
<td>県始良</td>
<td>4号（オピアカ）</td>
</tr>
</tbody>
</table>

表－2 6プライマーのRAPD分析で特異的なDNA型を示した精種樹

<table>
<thead>
<tr>
<th>県始良</th>
<th>1号（タノアカ）</th>
<th>霞川辺</th>
<th>1号</th>
<th>县日隈</th>
<th>2号</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>5号（タノアカ）</td>
<td>霞川辺</td>
<td>2号（ヤマノカミ）</td>
<td>县日隈</td>
<td>3号</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>6号（タノアカ）</td>
<td>霞川辺</td>
<td>8号</td>
<td>县日隈</td>
<td>4号</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>8号</td>
<td>霞川辺</td>
<td>13号（タノアカ）</td>
<td>县日隈</td>
<td>8号</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>13号</td>
<td>霞川辺</td>
<td>14号（タノアカ）</td>
<td>大根占寄</td>
<td>1号</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>14号（タノアカ）</td>
<td>霞川辺</td>
<td>1号</td>
<td>大根占寄</td>
<td>3号</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>16号（ハマイ）</td>
<td>县肝属</td>
<td>2号（キシノ）</td>
<td>大根占寄</td>
<td>4号</td>
</tr>
<tr>
<td>県始良</td>
<td>17号</td>
<td>县肝属</td>
<td>3号</td>
<td>大根占寄</td>
<td>5号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>18号</td>
<td>县肝属</td>
<td>4号</td>
<td>大根占寄</td>
<td>6号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>19号（ハマイ）</td>
<td>县肝属</td>
<td>5号</td>
<td>大根占寄</td>
<td>8号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>20号</td>
<td>县肝属</td>
<td>8号（ハライカワ）</td>
<td>大根占寄</td>
<td>2号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>21号</td>
<td>县肝属</td>
<td>1号（ハマイ）</td>
<td>大根占寄</td>
<td>5号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>27号</td>
<td>县肝属</td>
<td>3号（ハマイ）</td>
<td>大根占寄</td>
<td>6号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>29号</td>
<td>县肝属</td>
<td>4号（ハマイ）</td>
<td>大根占寄</td>
<td>7号（オピアカ）</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>30号</td>
<td>县肝属</td>
<td>5号（ハマイ）</td>
<td>大根占寄</td>
<td>8号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>31号</td>
<td>县肝属</td>
<td>5号（オピアカ）</td>
<td>霞川辺</td>
<td>1号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>33号</td>
<td>县肝属</td>
<td>7号</td>
<td>霞川辺</td>
<td>2号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>34号</td>
<td>县肝属</td>
<td>8号</td>
<td>霞川辺</td>
<td>3号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>51号</td>
<td>县肝属</td>
<td>11号（メアサ）</td>
<td>霞川辺</td>
<td>2号</td>
</tr>
<tr>
<td>县肝属</td>
<td>1号</td>
<td>县肝属</td>
<td>13号</td>
<td>县日隈</td>
<td>2号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>1号（イボスギ）</td>
<td>县始良</td>
<td>17号（メアサ）</td>
<td>大根占寄</td>
<td>2号</td>
</tr>
<tr>
<td>县始良</td>
<td>2号（イボスギ）</td>
<td>县日隈</td>
<td>1号</td>
<td>大根占寄</td>
<td>2号</td>
</tr>
</tbody>
</table>

( ) 内は現在品種名 計 65クローン