

## 新たなSSRマークターの追加によるヒノキ精英樹のクローニング識別

三浦真弘・渡邊敦史（林育セ）

### I はじめに

林木育種事業を推進する上で、系統管理やクローニング識別は適切かつ厳密に行う必要がある。適切な系統管理やクローニング識別が行われていないと、採種園産種子の信頼性の低下や精英樹の特性評価の精度の低下、精英樹の次世代化における選抜の効果の低下などが起こり、期待される育種の効果が發揮できないおそれがある。系統やクローニングのミスを正す方法の一つとして分子マークターによるクローニング識別があり、近年この手法を用いた採種園の管理や改良が提案されている(3, 6)。また、分子マークターによる全精英樹の遺伝子型の識別は、精英樹の特性評価と結びつけることで、採種園の改良や、次世代精英樹の開発などの育種事業を推進するうえでメリットが大きいと考えられ、スキやブナ、ケヤキでは既に行われている(1, 2, 9)。

ヒノキ精英樹のクローニング識別の可能性について、昨年の関東支部大会では既報の3 SSRマークター(7)を用いて試みた結果、個体識別が可能なクローニングは全体の41%にとどまり、系統管理や採種園の花粉動態の研究に使用するには解像度が低いことがわかった(5)。そこで本年は新たに報告された5 SSRマークターを加えて(4), 実験、解析を行った。そこで5 SSRマークターが加わった場合のヒノキクローニングの個体識別率、コンタミの検出力の程度について議論を行う。

### II 材料と方法

精英樹クローニングの識別には、林木育種センターのヒノキ交配園に植栽されている関東育種基本区から選抜された366精英樹クローニングを用いた。交配園には枯れているもの除去各クローニングと同じ列に8本ずつ植栽されている。今回はクローニングの識別と各クローニングのコンタミネーションを検出するためバルク法を用い、同じクローニングの列の全ラメートから針葉を採取し1サンプルとした。

DNAの抽出は改変CTAB法で行った(8)。抽出したDNAは、分光光度計GeneQuant Pro (Amersham Biosciences社)を用いて濃度測定を行い、10ng/ulに調整し、PCRの錆型DNAに供した。

PCRは、Cos1761, Cos2126, Cos2224, Cos2590, Cos2610, Co69, Co93の7つのSSRプライマーを用い

て行った。PCRは複数のプライマーを同時にPCR増幅可能な、Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen社)を用いて行った。PCRの反応液の組成は1サンプル(10ul)あたりQiagen Multiplex PCR kit 5.0ul, プライマーはForward, Reverse側ともに0.25uM, 錆型DNA20ngとした。PCRの反応はPTC-200 (MJ Research社製)を用い、反応条件はタッチダウン方式で行い、アニーリング温度を最初の1サイクルを60°Cで30秒間行い、以降のサイクルは1°Cずつアニーリング温度を下げて50°Cになるまで行い、それ以降のサイクルはアニーリング温度を50°Cにしてから19サイクルPCR反応を行った。

増幅したPCR産物はABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem社製)で解析しGenotyper3.7 (Applied Biosystem社製)で遺伝子型を決定した。

本研究はバルク法を用いたため、コンタミネーションがないサンプルは遺伝子型がすぐ決定できるが、コンタミネーションがあった場合はそのクローニングは1ラメートずつサンプルを採取し、それを上記同様にDNAを抽出し、PCRで増幅し、遺伝子解析器でラメートごとに遺伝子型を決定した。

### III 結果と考察

**1. SSRマークターの特性** Cos1761, Cos2126, Cos2224, Cos2590, Cos2610の5 SSRマークターは、対立遺伝子がそれぞれ15, 23, 13, 22, 16存在した(表-1)。各座の対立遺伝子頻度は、Cos1761では158, 170という対立遺伝子が28~35%, Cos2126では186という対立遺伝子が22%, Cos2590では146という対立遺伝子が44%をしました。ヘテロ接合度の期待値(He)はCos1761, Cos2126, Cos2224, Cos2590, Cos2610はそれぞれ、0.775, 0.908, 0.777, 0.774, 0.837だが、ヘテロ接合度の観察値(Ho)は0.304, 0.603, 0.739, 0.56, 0.823となり、Cos1761, Cos2126, Cos2590の3座ではHeとHoの違いが大きく、Hardy-Weinberg平衡から有意にずれており、これらの結果より今回使用したSSRマークターには精英樹クローニングの識別能力が高い物と低い物が混在していることが示唆された。

**2. クローニングの個体識別** 関東育種基本区内の366精英樹クローニングのうちコンタミネーションのなかったクロー

MIURA, Masahiro. & WATANABE, Atsushi. (Forest Tree Breeding Center, Ibaraki 319-1301).

Clone identification of Hinoki cypress plus-tree using 7 SSR markers and detection of contaminated clones in a breeding orchard.

ンは312クローンだった。そのうち7座すべてにおいて解析可能だったクローンは282個体だった。282個体のうち、識別可能だったクローンは228精英樹で、全体の80%だった(図-1)。すべての座において解析できなかった29クローンについても24クローンが識別可能であり、解析できた座が多いほう個体の識別能力は上がった(表-2)。識別できなかったクローン54精英樹は26の遺伝子型に分かれ、同じ遺伝子型をもつ判別できないクローンは最多でも3個体だった。隣接に植栽されているクローンや同じ旧営林署選抜のクローン、同じ県選抜のクローンで同じ遺伝子型を持つため判別できないクローンは73%で、それ以外の要因で判別できないクローンが27%を占めた(図-2)。個体の識別率が上昇したのは、使用マーカーが増えたことや、識別能力の高いマーカーの使用のためであると考えられた。それにもかかわらず識別できないクローンがあり、交配園設定時における植栽位置の間違いや選抜後の移動に伴う誤りが実際には非常に多いことが示唆された。

**3. コンタミネーションの検出** ヒノキ交配園に植栽されている366クローンのうち、異なる遺伝子型のラメートを含んだクローンは54クローン存在した。これは全体の14.7%に相当し、3マーカーのときの5.2%に比べると大きく上昇した。これらは使用マーカーの増加や識別能力の高いマーカーの使用によりコンタミネーションの検出力が上昇したと考えられた。

今後これらのマーカーを用い、精英樹の遺伝子型の識別を進め、採種園の管理や、次代検定林における分子マーカーの利用を進めることを検討したい。

#### IV 引用文献

(1) 武津英太郎・高橋誠・磯田圭哉・渡邊敦史

表-1 SSRマーカーの特性

遺伝子座	N	対立遺伝子数	Ho	He	HW
1761	296	15	0.304	0.775	**
2126	302	23	0.603	0.908	**
2224	303	13	0.739	0.777	NS
2590	293	22	0.560	0.774	**
2610	311	16	0.823	0.837	NS
69	311	10	0.511	0.547	NS
93	308	12	0.662	0.689	NS
7座	282	15.86	0.758	0.732	
昨年の3座	366	10.7	0.594	0.64	

表-2 コンタミネーションのなかった311個体の個体識別

	サンプル数	1個体に識別可能
7座解析可能	282	228 (80.8%)
6座解析可能	21	20 (95.2%)
3座解析可能	8	4 (50.0%)

- (2005) ケヤキのSSRマーカーの開発と優良形質候補木のクローン識別. 林育年報: 68-70.
- (2) 金山央子・後藤陽子・近藤禎二 (2002) 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: 100-103.
- (3) 川内博文・後藤晋 (1999) 鹿児島県のマツノザイセンチュウ抵抗性クローン採種園におけるクローン管理のモニタリング. 日林誌81: 338-340.
- (4) MATSUMOTO, A., TANI, N., LI, Xin-Guo., NAKAO, Y., TOMARU, N. and TSUMURA, Y (2006) Development and polymorphisms of microsatellite markers for hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) Mol. Eco. Notes. 6, 310-312.
- (5) 三浦真弘・久保田正裕・栗延晋・渡邊敦史 (2006) SSRマーカーによるヒノキ精英樹のクローン識別 第57回日林関東支論: 135-136.
- (6) 森口喜成・後藤晋・高橋誠 (2005) 分子マーカー情報に基づく採種園の遺伝的管理. 日林誌87: 161-169.
- (7) NAKAO, Y., IWATA, Y., MATSUMOTO, A., TSUMURA, Y. and TOMARU, N. (2001) Highly polymorphic microsatellite markers in *Chamaecyparis obtusa*. Can. J. For. Res. 31: 2248-2251.
- (8) 白石進・渡辺敦史 (1995) *rbcL*遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. 日林誌77: 429-436.
- (9) 高橋誠・津村義彦 (2002) マイクロサテライトDNAとアイソザイムを用いたブナ (*Fagus crenata* Blume) 精英樹クローンの識別. 林育研報18: 5-12.

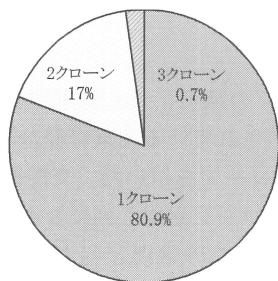


図-1 関東育種基本区内のヒノキ精英樹  
288個体の個体識別の結果

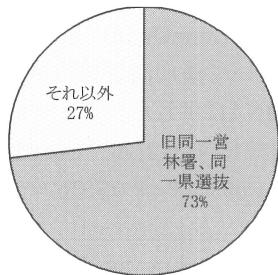


図-2 識別不能な4精英樹について識別不能と考えられる原因