

ユーカリの交雑性と ISSR マーカーによる雑種の検証

石井克明・細井佳久・篠原健司 (森林総研)・清水秀男 (熱川バナナワニ園生物研究所)

Abstract: We tried to hybridize the different subgenous species of Eucalyptus to assess the crossability of this species. There was no hybrid formation between *E. ficifolia* (*Corymbia ficifolia*) (*Corymbia* subgenera) and *E. viminalis* (*Symphomytus* subgenera). Species-specific ISSR markers were found with *E. ficifolia* and *E. camaldulensis*.

Key words: Eucalyptus, hybridization, ISSR

要旨: 組換え樹木の野外植栽で問題になる、近縁種との交雑性の知見を得るために、ユーカリの近縁樹種との交雑性を調べた。ユーカリ属の亜属間 (*E. ficifolia* (*Corymbia ficifolia*) (*Corymbia* 亜属) と *E. viminalis* (*Symphomytus* 亜属)) での交雑試験では種子は得られなかった。交雑性の簡易な検定に利用可能な、樹種特異的な DNA マーカーとして、ISSR マーカーにより、*E. ficifolia* や *E. camaldulensis* の樹種特異的なバンドを特定した。

キーワード: ユーカリ、交雑、ISSR

I はじめに

ユーカリは、海外植林で最も利用されている広葉樹である。近年、*Eucalyptus camaldulensis* 等で遺伝子組換え体が作出されている (4)。今後、組換え体の野外植栽を進める中で、その野生樹種に対する交雑による遺伝子の拡散が懸念されるので、近縁樹種との交雑性の検定が必要になっている。そこで、文献情報によるユーカリの交雑性についての情報収集と交配試験、簡易な DNA マーカーの活用を試みた。

II 実験方法

1. ユーカリの交雑性 ユーカリ属は約 700 種あるといわれる。交雑性についてのこれまでの報告によると、亜属内では交雑が可能で、多くの雑種がある (3)。しかし、亜属間では、*E. cloeziana* (*Idiogenes* 亜属) x *E. acmenoides* (*Monocalyptus* 亜属) (5) のみであった。そこで、同じふともも科のアデク

(*Syzygium buxifolium*) との交雑性を、*E. grandis* の花粉を交配して調べた。温室で栽培したアデクに順次咲いた花の雌しべに受粉した。4月に16雌しべ、5月に5, 12雌しべ、6月に10, 10雌しべ8月に6, 7雌しべに交配を行った。次に、*E. ficifolia* (*Corymbia ficifolia*) (*Corymbia* 亜属) と *E. viminalis* (*Symphomytus* 亜属) との交配試験を行った。2006年6月に森林総合研究所樹木園 (茨城県つくば市) に植栽の *E. viminalis* の花粉を採取し、-20°C に保存した。2006年7月22日に伊豆熱川バナナワニ園 (静岡県東伊豆町) に植栽の *E. ficifolia* の10花の除雄後、雌しべに *E. viminalis* の花粉を受粉した後、交配袋をかけた。2006年8月22日に交配袋をはずした。

2. DNA マーカー 簡易な交雑性の検定に利用可能な、樹種特異的な DNA マーカーが望まれるので、

Katsuaki ISHII, Yoshihisa HOSOI, Kenji SHINOHARA (For. And Forest Prod. Res. Inst., Matsunosato 1, Tsukuba, Ibaraki 305-8687), and Hideo SHIMIZU (Atagawa Banana Wani Bio. Institute, Shizuoka, 413-0300)

Hybridization of Eucalyptus and ISSR marker for detection.

ISSR(Inter-Simple-Sequence-Repeat) マーカーを数種のユーカリに応用した。調べたプライマーは、T(GT)₉; CGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGT TA(CAG)₄; AGGTT CAGCAGCAGCAG UBC842; GAGAGAGAGAGAGATG (GT)₈R; GTGTGTGTGTGTGTGTATAT である (1)。

ユーカリは、*E. viminalis*(6 個体), *E. camaldulensis* (7 個体), *E. grandis* (2 個体), *E. citriodora* (1 個体), *E. ficifolia* (7 個体), *E. grandis* x *E. camaludulensis* (6 個体) を用い、それぞれ葉生重 100mg より、キアゲン社の DNeasy Plant Mini Kit により核 DNA を抽出した。PCR の条件は、94°C で 3 分処理後、94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 1 分を 35 回繰り返して処理し、72°C で 10 分間恒温に保った。増幅した DNA 断片は、2% のアガロースゲルにより 50V で電気泳動させ、エチジウムブロマイド処理した後、UV 照射下でバンドパターンを解析した。

III 結果と考察

1. ユーカリの交雑性 *E. ficifolia* (*Corymbia ficifolia*) (*Corymbia* 亜属) と *E. viminalis* (*Symphomytus* 亜属) との交配試験、アデクと *E. grandis* の交配試験では、結実は認められなかった。この結果は、ユーカリ属では、亜属間の交雑、属間の交雑が困難なことを表している。

2. DNA マーカー T(GT)₉, TA(CAG)₄, UBC842, (GT)₈R の 4 つのプライマーで核 DNA を鋳型にしての PCR 反応を行ったところ、T(GT)₉, (GT)₈R で、*E. ficifolia* の樹種特異的なバンドが得られた。(GT)₈R でのバンドパターンを図 1 に示した。この場合、*E. ficifolia* に特異的な 1400bp 近辺のバンドが観察され、*E. camaldulensis* と *E. ficifolia* の雑種の判定の場合に利用可能と思われた。同様に、T(GT)₉ では、*E. ficifolia* で 1500bp 近辺に、樹種特異的なバンドが認められた。

E. camaldulensis において、樹種特異的なバンドの候補として、文献では T(GT)₉ の場合で 813bp のバンドをあげている(1)。今回我々が調べた個体では、

2 個体で 800bp 近辺にバンドがみられた。そこで、雑種性の判定に使えるかを *E. grandis* x *E. camaludulensis* で比較したところ、図 2 のように、雑種 4 個体の内 3 個体で 800bp 近辺のバンドが認められ、このバンドは *E. grandis* には生じず、また 1000bp 近辺のバンドは *E. grandis* 由来と推察されることから、雑種性の判定に利用可能と思われた。

IV おわりに

遺伝子組換え樹木の野外植栽時には、周囲の環境への影響評価が重要であり、カルタヘナ条約では在来野生種への影響を厳しく評価する必要がある。ユーカリは日本では外来種であり、日本に自生するユーカリはないので、属間の雑種ができない限り、カルタヘナ条約には抵触しない。ふともも科内の近縁の属として今回、アデクについて交配を試みたが、種子は形成されなかった。しかし、組換えユーカリを天然林のある豪州やパプアニューギニア等で植栽する場合は、他のユーカリとの交雑性を確認する必要がある。ユーカリは虫媒であり、その有効交雑距離は約 200m なので (2)、少なくとも組換えユーカリと同亜属のユーカリを 200m 以上離しておく必要があるだろう。また、今回開発された ISSR マーカーは、簡易に種子の雑種性を判定するのに役立つと思われる。

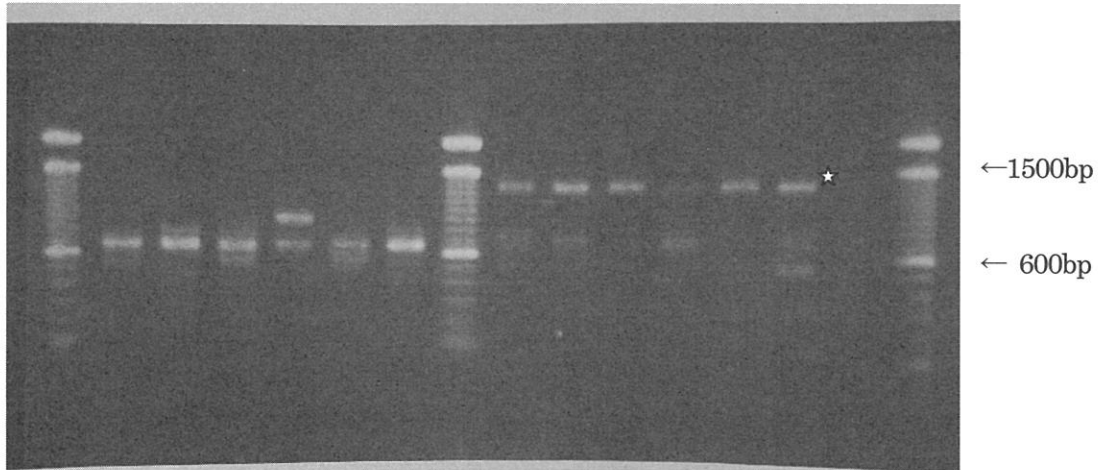
引用文献

- (1) Balasaravanan T, Chezian P, Kamalakannan R, Yasodha R, Varghese M, Gurumurthi K, Ghosh M (2005) Identification of species-diagnostic ISSR markers for six *Eucalyptus* species. *Silvae Genetica* 55: 119-122
- (2) Barbour RC, Potts BM, Vaillancourt RE (2005) Pollen dispersal from exotic eucalypt plantations. *Conservation Genetics* 6:253-257
- (3) Eldridge K, Davidson J, Hardwood C, van Wyk G (1994) *Eucalypt domestication and breeding*. Oxford University Press, Oxford, 288p
- (4) Kawaoka A, Nanto K, Ishii K, Ebinuma H (2006) Reduction of lignin content by suppression of

expression of the LIM domain transcription factor in *Eucalyptus camaldulensis*. *Silvae Genetica* 55:269-277

RJ (2001) Natural inter-subgeneric hybridization between *Eucalyptus acmenoides* Schauer and *Eucalyptus cloeziana* F. Muell (Myrtaceae) in southeast Queensland. *Annals of Botany* 88:563-570

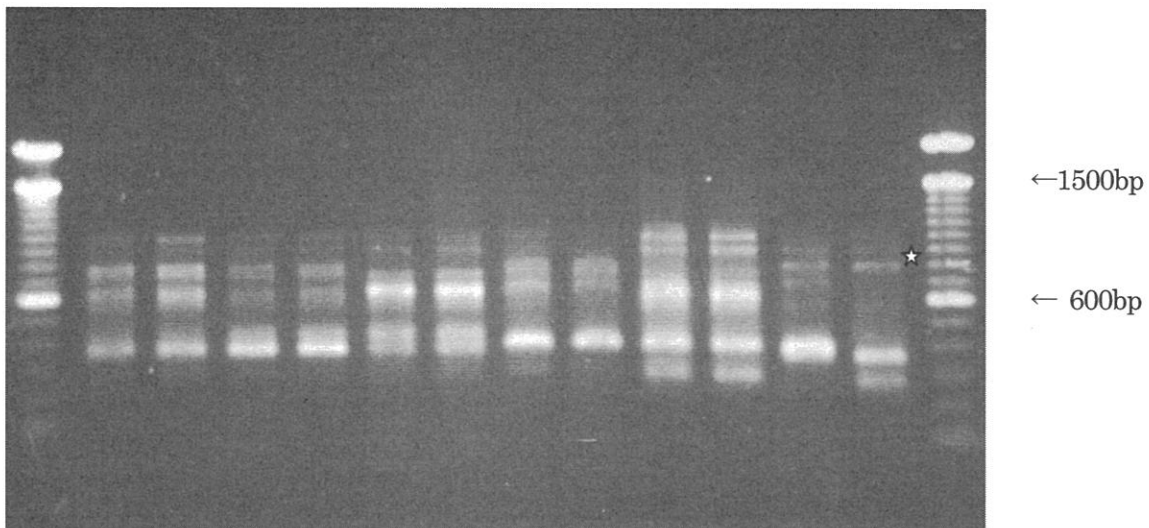
(5) Stokoe RL, Shepherd M, Lee DJ, Nikles DG, Henry



M C1 C2 C3 C4 C5 C6 M F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 M

図-1. ユーカリの樹種特異的な ISSR バンド ((GT)_nR プライマー)

M: サイズマーカー, C1-6; *E. camaldulensis*, F1-7; *E. ficifolia*
☆: 種特異的バンド



M H1 H1 H2 H2 H3 H3 H4 H4 G1 G1 C1 C2 M

図-2. ユーカリの交雑性判定に有効な ISSR バンド (T(GT)_n プライマー)

M: サイズマーカー, H1-4; *E. grandis* x *E. camaldulensis* G1; *E. grandis*
C1-2; *E. camaldulensis* ☆: 種特異的バンド

