

## バビショウのクローン識別のための SCAR マーカーの開発

磯田圭哉 (森林総研森林バイオ研究センター)・徐六一 (安徽省マツノザイセンチュウ抵抗性育種センター)

要旨：中国では 1982 年に南京市のクロマツ (*Pinus thunbergii*) 枯損木でマツノザイセンチュウが発見されて以来、クロマツのみならずバビショウ (台湾アカマツ, *Pinus massoniana*) の林にまでマツ材線虫病の被害が拡大している。2001 年より安徽省マツノザイセンチュウ抵抗性育種が実施され、251 家系 1209 個体の抵抗性候補木が選抜された。今後、これらを母材料としてさらなる育種や造林用種苗の生産を行うにあたり、正確なクローン管理技術の開発が求められている。そこで今回、クローン識別・同定に有用な DNA マーカーとして、SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) マーカーの開発をおこなった。RAPD フラグメントの塩基配列を決定し、新たなプライマーを設計することにより 14 種類の SCAR マーカーを開発することに成功した。さらに、マルチプレックス分析 (MuPS) を行うことにより効率的な分析を可能とした。開発したマーカーを用いて 96 個体の抵抗性候補木のタイピングを行った結果、83 種類の MuPS 型に識別することが出来た。

キーワード：バビショウ, *Pinus massoniana*, マツノザイセンチュウ抵抗性育種, SCAR, MuPS

## I はじめに

我が国のアカマツ・クロマツ林に甚大な被害をもたらしたマツ材線虫病は、中国においても多くのバビショウ林に被害を与えている。最初の被害といわれているのは南京市内のクロマツで (5)、瞬間間に主要造林樹種であるバビショウへも被害が及んだ。被害対策として現在広い地域で薬剤散布と被害木の伐倒除去などが行われているとともに、2001 年より「安徽省マツノザイセンチュウ抵抗性育種」が行われている (6)。このプロジェクトでは、安徽省内 10 産地の被害林分において生存している 323 母樹から種子を採取し、実生後代を選抜母集団としている。選抜方法は、2 回の接種検定で抵抗性候補木を選抜し、さらにつぎ木クローンを用いたクローン検定で抵抗性個体を選抜することとしている。現在、抵抗性候補木の選抜が完了したところで、251 家系 1029 個体の抵抗性候補木が選抜されている。今後、クローン検定により抵抗性個体を確定し、採種園を造成して抵抗性苗の生産を行う予定である。

抵抗性バビショウの普及を行っていく上で重要なことのひとつに採種園構成クローンの適切な管理がある。採種園におけるクローンの植栽ミスなどがあると、交配の状況にもよるが、生産される苗木の抵抗性に大きく影響することが予想される。特に、バビショウは主要造林樹種であり、採種園の規模が大きくなるため、植栽ミスや抵抗性でないクローンの混入などが起る可能性が高くなる。これまでにも、多くの採種園において、植栽ミスが

あることが報告されており、クローン管理の重要性が指摘されている (3)。したがって、バビショウの採種園管理を行うためのクローン識別技術の開発を行った。

クローン識別には、近年では、多型性の高いマイクロサテライトマーカーが多く用いられているが (1)、この手法は高価な設備や試薬が必要であり、今回のような現場に近い場所での利用には合わない。そこで、より簡単な設備で分析可能なマーカーである SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) マーカー (4) を利用することとした。今回、RAPD 分析により得られた多型バンドから SCAR マーカーを開発し、MuPS (Multiplex PCR of SCAR) システム (2) による簡便なクローン識別技術を開発したので報告する。

## II 材料と方法

安徽省マツノザイセンチュウ抵抗性育種で選抜された抵抗性候補木から、家系の異なる 96 個体をランダムに選び針葉を採取し乾燥保存した。乾燥した針葉約 30mg を液体窒素で凍結した後、Shake Master 2.0 (バイオメディカルサイエンス) で破砕し、改良 CTAB 法により DNA を抽出した。抽出した DNA のうち、8 サンプルを MagExtractor (TOYOBO) により精製し、SCAR マーカーの開発に用いた。MuPS 分析には精製していない粗抽出液を滅菌水で 10 倍希釈して使用した。

RAPD 分析には 98 種類の 10-mer プライマー (Operon Technologies) を用いた。10 $\mu$ l の PCR 反応液の組成は、

Keiya ISODA (Forest Bio-Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 3809-1 Ishi, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301) and Xu LUYI (Anhui Province Breeding Center of Resistance to Pine Wood Nematodes, China) Development of SCAR markers for discrimination of clones in *Pinus massoniana*.

caggcccttcTTTGAAAATAAACATAGATTTACATGTGCTTTTGTAAAC  
 ATTCTACATACCTCGACCCATCACTGCTTCCTTTCTACGCCGCATCATAT  
 CTATAAAGTAATCAATTGTTGCCAAAAGTTTCTTGTATCAAGAAATGAGC  
 TTACAGAGTGCATAACTATTTCTAAGCTTTTGTCACACTCTCTGTAGTGAGC  
 TCCAAACTTTGAAGATCTTTATTCAATTTTGAAAAATTACCTATGCACCT  
 TTGTAACGTACATCATTGGACGTTTGTTCCTCCCAAGGAAGATCATTAGGAA  
 TATCAAATGGATAGGTGGTAGTTGGCGTACAATCTTCTCTTTGGATTGCC  
 CTACTTTGCTTACATTTACTTTGTTCAACATTTTTCACCCCCCGTGTAGA  
 GTCACCTCTTTACATCCCTTCGTCAGAGATCATTCTCTTATTGCATTTCA  
 TTTTTTAGGTGTCATACAGTTTCATTTCATTTCGATTCCGTTAGGGAGCA  
 TGCCATAGTCTGACGgaagggcctg

図-1. pmscar007の塩基配列とプライマー設定部位  
 小文字イタリック: RAPDプライマー部位; 下線: プライマー設定部位;  
 二重下線: 内部プライマー設定部位

1 x PCR Buffer (ABI), 3mM MgCl<sub>2</sub>, 200μM each dNTP, 0.25μM Primer, 0.5unit Taq DNA polymerase Stoffel Fragment (ABI), 10ng 鋳型 DNA とした。PCR 反応は PTC-200 (バイオラッド) により, 94°C・1 分間熱変性した後, 94°C・30 秒-37°C・30 秒-72°C・90 秒を 40 サイクル行い, 最後に 72°C で 10 分間伸長反応を行った。PCR 産物は 1.2% アガロースゲルで電気泳動し, サイバーセーフ (インビトロジェン) で染色後, 青色トランスイルミネーター上で検出した。

RAPD 分析により検出された多型バンドは, ピペットチップの先でゲルとともに回収して滅菌水 20μl を加え, DNA フラグメントを溶出させた。これを鋳型として再度同一プライマーで PCR を行った。長さの異なる再増幅産物を混合して, TOPO TA クローニングキット (インビトロジェン) を用いてクローニングした。得られたコロニーは, コロニーPCR を行って, 長さによるスクリーニングを行った。各 RAPD フラグメント由来の 1~2 クローンについて BigDye ver3.1 (ABI) と ABI 3100 Genetic Analyzer により塩基配列を決定した。

得られた RAPD フラグメントの塩基配列の両端には RAPD プライマーの配列がある。SCAR プライマーは, 基本的に RAPD プライマーの 3' 端を 14 塩基伸ばして設計した。また, フラグメントの中程にもプライマーを設計して, 効果的な増幅が見られるプライマー組合せをスクリーニングした。最終的に, 安定した増幅が見られるように, プライマーの長さを調節して, SCAR マーカーとした。

開発した SCAR マーカーはマルチプレックス分析 (MuPS 分析) するために, 長さの異なる 7 マーカーが

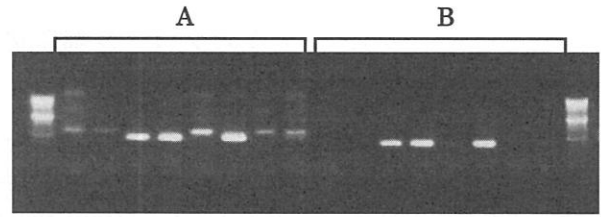


図-2. pmscar007 の電気泳動像  
 A: RAPD プライマーを延長したプライマー同士による増幅; B: RAPD を延長したプライマーと内部に設計したプライマーによる増幅

組になるような 2 セットに分けた。各プライマーを最終濃度が 0.2μM になるように混合して QIAGEN Multiplex PCR Kit を用いて PCR を行った。PCR 反応条件はキット付属のプロトコールに従った。アニーリング温度は 60°C とした。PCR 産物は, 1.5% アガロースゲルで電気泳動し, 検出した。

### III 結果

スクリーニングに使用した 98 種類の RAPD プライマーのうち, 24 プライマーにより増幅された 64 の多型 RAPD フラグメントの塩基配列を決定した。これらについて, まず, RAPD プライマーの 3' 端側を 14 塩基伸ばしたプライマーを設計 (図-1) して, 変異の有無を検出した (図-2)。その結果, 15 プライマー対で, 変異が検出された。次いで, より明瞭な変異が得られるようにプライマーの長さを調節するとともに, フラグメントの内部に設計したプライマー (図-1) を用いて, 多型が保持されるかどうかを検討した (図-2)。その結果,

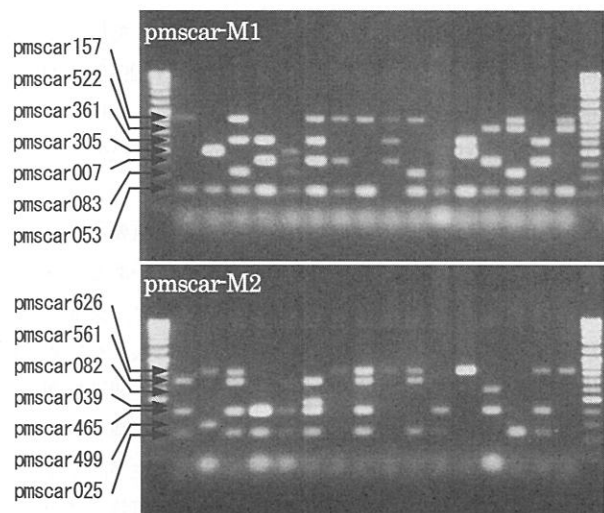


図-3. pmscar-M1 (上段) および pmscar-M2 (下段) の 2 種類の MuPS による, バビショウ 16 個体の分析で得られたアガロースゲル電気泳動像  
 左側に各バンドに対応する SCAR マーカーを示した

14 の RAPD フラグメントについて多型を保持したまま安定的に PCR 増幅可能なプライマー対が得られた。なお、1 マーカーについては、安定的な増幅が出来なかったため、以後の分析から除外した。

次に、マルチプレックス PCR を行うためのプライマーセットについて検討した。まず、混合するマーカー数についてであるが、アガロースゲルで検出するため、50 から 100 塩基程度は各マーカーの長さを変える必要があり、また、今回得られた RAPD フラグメントは約 800 塩基が最長であったため、7 マーカーずつ混合するのが適当であると考えた。そのため、フラグメントサイズにより各マーカーを 2 群に分け、さらに、必要に応じてプライマーを再設計した。その結果、7 マーカーが一度に検出できる 2 種類の MuPS システム (pmscar-M1, pmscar-M2) を作成することに成功した (表-1, 図-3)。

開発した MuPS システムを用いて、バビショウの抵抗性候補木 96 個体の識別を試みた。その結果、96 個体が 89 種類の MuPS 型に識別された。このうち、83 MuPS 型は 1 個体にユニークなもので、5 MuPS 型は 2 個体に検出された。また、1 MuPS 型は 3 個体に検出された。

IV 考察

1. SCAR マーカーの開発 64 の RAPD フラグメントの塩基配列を決定し、SCAR プライマーを設計する際、RAPD プライマーを 3' 端側に 14 塩基伸ばす方法を用いた。これは、渡邊・西山 (7) により、フラグメント内部に新たなプライマーを設計した場合よりも、RAPD プライマーを延長したほうが多型を保持する確率が高いことが示されていたためである。いくつかの SCAR については、内部にもプライマーを設計したが、多くの場合、多型が消失する結果となり、渡邊・西山の結果を支持す

表-1 バビショウクローン識別のための MuPS システム, SCAR マーカー名およびプライマー配列

MuPS	SCAR 名	産物長 (bp)	プライマー名	プライマー配列 (5'→3')	塩基長 (bp)	プライマー設計 *
pmscar-M1						
	pmscar053	206	pmscar053-f	TGGAACGCTGAGTATCGAAGTTTTG	26	内部
			pmscar053-r	TCCGCGATAGTTAATATAATTATTAAGG	29	RAPD+19 塩基
	pmscar083	334	pmscar083-f	TAGATGAAGGGTTTATGGATTGATTTG	27	内部
			pmscar083-r	GACCGCTTGTAATATTATTGGCT	24	RAPD+14 塩基
	pmscar007	425	pmscar007-f	CAGGCCCTTCTTTGAAATTAACA	24	RAPD+14 塩基
			pmscar007-r	CTGACGAAGGGATGTAAAGAGTGA	24	内部
	pmscar305	507	pmscar305-f	CTTCCCAAGCAACATATTTTTGG	24	RAPD+14 塩基
			pmscar305-r	CTTCCCAAGAGTTCTTGATTTTC	24	RAPD+14 塩基
	pmscar361	620	pmscar361-f	TGCGCCCTTCCATGGATTCTACA	24	RAPD+14 塩基
			pmscar361-r	TGCGCCCTTCACTTACTACTTCCC	24	RAPD+14 塩基
	pmscar522	700	pmscar522-f	CCTTGACGCGAGTATTACATTGAA	24	RAPD+14 塩基
			pmscar522-r	CCTTGACGCACTTTATAGGTGTAG	24	RAPD+14 塩基
	pmscar157	887	pmscar157-f	CCTTGACGCATAAGAGAGATTAT	24	RAPD+14 塩基
			pmscar157-r	CCTTGACGCAGAGATGGGTGCATA	24	RAPD+14 塩基
pmscar-M2						
	pmscar025	237	pmscar025-f	GCTAGGTGGTTTTTATTATTATGCCACT	28	内部
			pmscar025-r	TCCTCAGTCATTGGAATCTGGTA	24	内部
	pmscar499	298	pmscar499-f	CCTTGACGCGGGTTTATTCGAAA	24	RAPD+14 塩基
			pmscar499-r	CCCTTTGTAAAATTGTAATCCCAATG	27	内部
	pmscar465	404	pmscar465-f	CCATCGTTCAAGCTAGTTTCTTTCC	25	内部
			pmscar465-r	CAGGCCCTTCTTTGACTGCAT	21	RAPD+11 塩基
	pmscar039	481	pmscar039-f	CAATCGCCGTAAGAAATTTT	20	RAPD+10 塩基
			pmscar039-r	AAGAAGTCCAAGAATCCATGAAGG	24	内部
	pmscar082	606	pmscar082-f	GACCGCTTGACTTTGGAACATAG	24	RAPD+14 塩基
			pmscar082-r	GACCGCTTGTAAGGGAGTTCTAA	24	RAPD+14 塩基
	pmscar561	700	pmscar561-f	TTCCCCCGCATGACAAATAGA	21	RAPD+11 塩基
			pmscar561-r	TTCCCCCGCAATTTCCATGA	20	RAPD+10 塩基
	pmscar626	825	pmscar626-f	TGATGGCGTCGAAAATTGTCCATA	24	RAPD+14 塩基
			pmscar626-r	TGATGGCGTCATAGGTACGATGAG	24	RAPD+14 塩基

\* プライマーを設計した部位

るものとなった。

さらに今回は、片側だけ内部のプライマーを用いた場合にどのような結果が得られるかも検討した。その結果、多くの場合、少なくとも一方の組合せで多型が保持されることが明らかとなった。このようなマーカーについては、変異の有無に関与しない側のプライマーを内部へ再設計することにより増幅産物長を調整することが可能となった。今回、この方法によってマルチプレックス分析を行うための増幅産物長の調節を行うことにより、7マーカーを一度に分析することが可能となった。

**2. MuPSによる個体識別** 14種類のSCARマーカーを含む2セットのMuPSシステムにより、96個体のバビショウを89タイプ(92.7%)に識別することができた。これは、12SCARマーカーでスギを分析した場合の66.7%(7)と比較して高い値となった。今回開発したSCARマーカーの中には、96個体中1個体のみでバンドが出現するマーカーが1つ含まれていた。また、いくつかのマーカーはバンドの出現頻度に偏りがあり、識別能力がそれほど高くなかった。これらのマーカーを除き、10種類の識別能力の高いマーカーを用いた場合でも84タイプ(87.5%)に識別可能であった。今後、新たなマーカーを開発したときには、識別能力の低い4マーカーと入れ替えることにより、より識別能力の高いMuPSシステムになる。

**3. 抵抗性バビショウのクローン管理** バビショウは、安徽省をはじめとする周辺各省における重要な造林樹種であるため、抵抗性種苗に対する期待も大きく、大量の需要が見込まれる。これに伴い比較的規模の大きい採種園や多数の採種園を造成することが必要となり、抵抗性個体の大規模なクローン増殖を行うことになる。作業規模が大きくなるにつれて、ミスラベリングや台木の立ち上がりなどに由来する植栽ミスが多くなることが予想される。これは採種園の抵抗性種苗の生産能力を低下させる原因となるため、今回開発したMuPSシステムを利用して管理していく必要がある。

今回開発したMuPSシステムは比較的高い識別能力を示したものの、全てのクローンを識別できるものではない。特に、本抵抗性育種では、同一家系から5本前後の抵抗性候補木を選抜しており、遺伝的に類似した個体が含まれるため、識別能力はさらに下がると推定される。したがって、このMuPSシステムは、全てのクローンを正確に管理するには適しているとは言えない。

そこで我々は、MuPSシステムを抵抗性ではない個体の混入を防ぐために用いることを考えている。植栽ミスには異なる抵抗性クローンを植栽してしまう場合と、非

選抜個体すなわち抵抗性ではない個体を植栽してしまう場合が考えられる。前者の場合は、近縁なクローンを含めて、かなり正確にクローンを識別・同定しなければならないため、現在のMuPSシステムの識別能力では完全に管理することは出来ない。一方、後者の場合、識別対象は血縁関係のない個体であるとともに、抵抗性個体のMuPS型とは異なるものを判定するだけでよく、混入個体をかなり高い確率で検出できると考えられる。非選抜個体の混入の方が採種園産種苗の抵抗性に与える影響は大きいと考えられるので、このような利用に的を絞ることで、効率的に採種園管理ができると思われる。

#### 引用文献

- (1) 平尾知士・渡邊敦史・福田陽子・近藤禎二・高田克彦(2006) SSRマーカーを利用したスギ精英樹のクローン識別. 日森林誌 88: 202~205
- (2) 久枝和彦・白石進・栗延晋(2000) MuPS (Multiplex PCR of SCAR markers) 分析を用いた九州産スギ精英樹の識別. 一佐賀・長崎県産スギ精英樹について. 日林九支研論文集 53: 55~56.
- (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マツ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) PARAN, I. and MICHELMORE, R. W. (1993) Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85: 985-993.
- (5) 孫永春(1982) 江蘇林業科技 7: 47.
- (6) 戸田忠雄(2005) 安徽省におけるマツ材線虫病抵抗性育種の現状. 海外林木育種技術情報 14: 4~8.
- (7) 渡邊敦史・西山和美(2007) スギ精英樹クローン識別のためのSCARマーカーの開発. 林育研報 23: 53~62.