

クロマツにおけるマツバノタマバエ抵抗性と連鎖した RAPD マーカー*

近藤禎二⁽¹⁾・寺田貴美雄⁽²⁾・林 英司⁽³⁾・倉本哲嗣⁽³⁾・岡村政則⁽¹⁾・河崎久男⁽²⁾

Teiji Kondo⁽¹⁾, Kimio Terada⁽²⁾, Eiji Hayashi⁽³⁾, Noritsugu Kuramoto⁽³⁾,
Masanori Okamura⁽¹⁾ and Hisao Kawasaki⁽²⁾

RAPD Markers Linked to the Resistance to Pine Needle Gall Midge in Japanese Black Pine (*Pinus thunbergii*)

要旨:クロマツのマツバノタマバエ抵抗性は単一の優性遺伝子で支配されることからこの遺伝子と連鎖したRAPDマーカーの検出を試みた。材料には抵抗性個体の耐虫東奥育17号と感受性である被害木6号との交雑後代62個体を用いた。1160種類のプライマーをバルク法でスクリーニングし最終的に3つのプライマーを選び出した。これらのプライマーによって抵抗性と連鎖したOPC-06580, OPD01700およびOPAX-192100の3つのマーカーが得られ、抵抗性遺伝子との連鎖地図上の距離はそれぞれ5.1cM, 6.7cM, 13.6cMで、OPC-06580のみが抵抗性遺伝子と相引で、あとの2つは相反であった。つぎに、耐虫東奥育17号の自然交雑種子から抽出した96個の大配偶体を用いて連鎖地図を作成した。多型のみられた92プライマーによって127の多型なマーカーが得られ、そのうち98が17連鎖群と6対のグループに属した。連鎖地図の全長は1469.8cMで、マーカー間の平均距離は15.6cMであった。ゲノムの全長は2138.3cMと推定され、作成した連鎖地図はそのうちの67.5%をカバーしていた。抵抗性と連鎖した3つのマーカーは同じ連鎖群に属したが、OPC-06580とOPD01700については連鎖地図上の正確な位置が決定できなかった。

1 はじめに

林木は収穫までが長期であることから検定に時間を要すること、他殖性であること、遺伝的な情報が少ないことなどの林木育種推進上の大きな障害をもつ。しかしながら、DNA解析技術の進展によりこれらの障害を解消することが出来る。現在、林木育種への利用が最も期待されるDNA解析技術は、有用形質と連鎖したDNAマーカーによる選抜である。この選抜法はMarker Assisted SelectionあるいはMarker Aided Selection、省略形でMASといわれ

(1) 林木育種センター九州育種場 〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町大字須屋2320

Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
2320 Suya, Nishigoshi, Kikuchi, Kumamoto 861-1102 Japan

(2) 林木育種センター東北育種場 〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字大崎95番内

Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0173 Japan

(3) 林木育種センター 〒319-1301 茨城県多賀郡十王町大字伊師3809-1

Forest Tree Breeding Center

3809-1 Ishi, Juo, Taga, Ibaraki 319-1301 Japan

* 本論文は、Springer-Verlag社から刊行されているTheoretical and Applied Genetics第100巻に掲載されたものである⁶⁾。

る。林木でのMASの研究についてはすでによくつか報告がある。サトウマツの発疹サビ病抵抗性²⁴⁾、ドイツトウヒのシダレ型になる樹型異常⁸⁾、ニレのblack leaf spot 抵抗性¹⁾では、これらの形質と連鎖したDNAマーカーが検出されている。以上はいずれも質的形質で、それぞれの形質は1個の遺伝子に支配されているので連鎖したDNAマーカーの検出が容易であり、その利用も簡単である。

マツバナタマバエ (*Thecodiplosis japonensis*) は、クロマツおよびアカマツの主要害虫であり、一時被害が激しかったことから抵抗性育種が開始され抵抗性個体が選抜されている。また、寺田の研究により、抵抗性が1個の優性遺伝子で支配され、選抜した抵抗性個体は抵抗性遺伝子をヘテロで保持していることが明らかとなっている¹⁴⁾。そこで、マツバナタマバエ抵抗性と連鎖したDNAマーカーの検出を試みた。DNAマーカーには数種類あるが、簡便に出来ることからRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーを用いた。

2 材 料

マツバナタマバエ抵抗性個体の耐虫東奥育17号と感受性である被害木6号との交雑後代62個体を用いた。これらは1985年に秋田県秋田市の海岸近くの激害林分の中に植栽された。被害調査は1988年と1989年の2カ年行われ、その結果抵抗性が35個体、感受性が27個体あると判定された。交雑後代全個体の針葉を1994年7月に採取し、冷凍保存した後DNAを抽出した。また、大配偶体を用いた連鎖地図作成のために、耐虫東奥育17号の自然交雑種子を1995年10月に採種した。

3 方 法

3.1 DNA抽出

約5gの針葉を液体窒素で凍結させた後、家庭用粉碎机 (イワタニミルサー IFM-150) を用いて粉末にし、できた粉末を冷アセトン20mlを入れた50ml容のファルコンチューブに入れ数回攪拌した後、水道水で吸引しながらろ過した (東洋ろ紙 No. 2)。これ以降は通常のCTAB法¹⁰⁾の手順に従ってDNAを抽出した。種子の大配偶体からのDNAの抽出は、種子を7%過酸化水素水で15分間スターラーで攪拌しながら滅菌した後、2晩滅菌水に浸漬した種子から実体顕微鏡下で大配偶体を摘出し、Tsumuraらの方法¹⁵⁾に従ってSDSを用いてDNAを抽出した。

3.2 RAPD分析

DNAを増幅するためのPCR (Polymerase Chain Reaction) 反応はオペロン社の10merのプライマー1160種類を用いた。25 μ lのPCRの反応液の組成は、テンプレートDNAを針葉では25ng、大配偶体では10ng、トリス塩酸 (pH8.4) 20mM、塩化カリウム 50mM、塩化マグネシウム 1.5mM、各dNTP 0.2mM、プライマー 0.2mM、TaqDNAポリメラーゼ 1U (Gibco BRL) である。PCR反応はアステック社 (福岡) のPC-800を用い、以下の2つの温度条件で実行した。当初用いた温度条件は、最初に94°Cで3分間1回、つぎに94°C 1分間、36°C 1分間、72°C 2分間を45回、最後に72°Cを2分間で、この条件をPCR-1とした。この条件で一通り連鎖マーカーの検出を試みたが、連鎖マーカーが1個しか検出できなかったため、さらにもう一つの温度条件でDNAを増幅した。その温度条件は、最初に94°Cで1分間1回、つぎに94°C 1分間、45°C 1分間、72°C 2分間を35回、最後に72°Cを2分間で、こ

の条件を PCR-2 とした。増幅した DNA は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し、トランスイルミネーター上で紫外線を照射してバンドを検出し、ポラロイドカメラあるいはビデオカメラを用いて記録した。また、PCR-2 で増幅した DNA はアガロースゲルに加え、ポリアクリルアミドゲルでも泳動した。これは、分子量の小さいバンドについても検出するためである。

プライマーの選抜は、まず交配した子供の中から無作為に抵抗性 3 個体、感受性 3 個体を選び、抵抗性および感受性ごとに DNA を等量ずつ混ぜてバルクサンプルとし⁹⁾、抵抗性と感受性とで異なるバンドがみられるプライマーを選び出した。つぎに抵抗性 4 個体と感受性 4 個体を用いて選び出したプライマーで個別に DNA を増幅し、バルクサンプルと同じバンドがみられるかどうか確認するとともに、そのバンドが抵抗性あるいは感受性に特異的にみられるかどうか調べた。ここでの基準は、バンドの出現が 2 個体まで違っていても可として選び出し、最後に交雑後代全個体、62 個体について個別にバンドの出現を調べた。

大配偶体については、まず無作為に選んだ 8 個の大配偶体を用いて 1160 種類のプライマーを用いて多型性とバンドの分離比が 1 : 1 に近いかどうか検定した。選び出されたプライマーについて、96 個の大配偶体でバンドの出現を調べ、バンドの分離比が 1 : 1 に近いものだけを採用した。大配偶体のデータから Hulbert ら⁵⁾ の方法によってゲノムの全長を推定した。連鎖分析は MAPMAKER 第 3 版⁷⁾ により、用いたパラメーターは LOD スコア > 4、地図距離 < 50cM の条件を満たすものである。

4 結 果

4.1 マツバノタマバエ抵抗性と連鎖した RAPD マーカー

温度条件 PCR-1 において、バルクサンプルにより 1160 プライマーのうち 258 プライマーが選び出され、そのうち 8 個体の個別の検定によって 14 プライマーが残った。それを子供の全個体で検定したところ、プライマー OPC-06 で増幅したバンドだけが抵抗性と連鎖した分離を示した。図 1 に示すように、白い矢頭で示す約 580bp の分子量のバンドが、35 の抵抗性個体のうち 32 個体で見られ、27 個体の感受性個体ではすべてにみられなかった。温度条件 PCR-2 においては、アガロースゲルを用いた検定では、バルクサンプルにより 68 プライマーが選び出され、そのうち 8 個体の個別の検定によって 7 プライマーが残った。それを子供の全個体で検定したところ、プライマー OPC-06 と OPAX-19 で増幅したバンドだけが抵抗性と連鎖した分離を示した。このうちプライマー OPC-06 で増幅したバンドは温度条件 PCR-1 において増幅したものと同一分子量であり、子供の個別でも同じ分離を示したので、それと同じと考えられた。もう一つのプライマー OPAX-19 では 35 の抵抗性個体のうち 6 個体しかバンドがみられず、27 個体の感受性個体のうち 25 個体でバンドがみられたことから相反の状態にあった。ポリアクリルアミドゲルでも 1 個のプライマー OPD-01 で増幅したバンドが連鎖していた。これも相反の状態にあり、35 の抵抗性個体のうち 4 個体しかバンドがみられず、27 個体の感受性個体のすべてでバンドがみられた。以上の 3 つのプライマーで増幅したバンドは抵抗性遺伝子を *R* とするとその近傍にあり、*R* との距離は OPC-06₅₈₀ が 5.1 cM と最も近く、OPD01₇₀₀ が 6.7 cM とそのつぎに近く、OPAX-19₂₁₀₀ が 13.6 cM と最も遠かった。また、これらのマーカーはすべて *R* に対して同じ側にあった (図 2)。

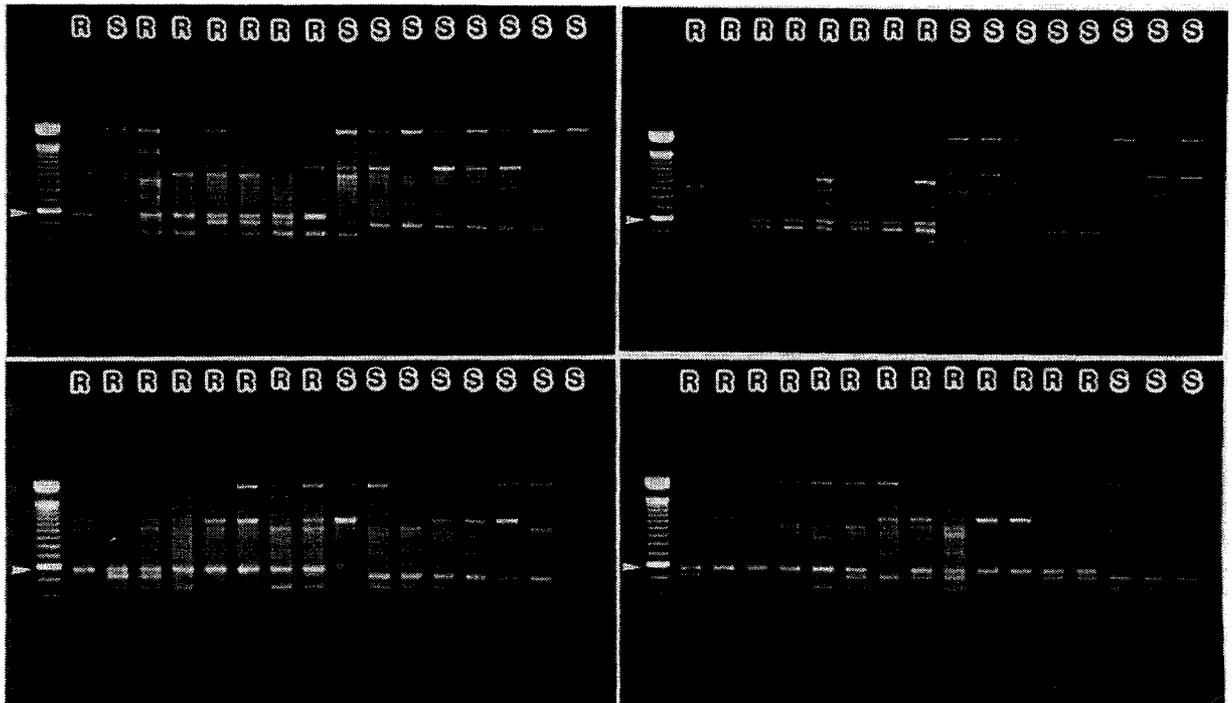


図1. マツバナタマバエ抵抗性と連鎖したRAPDマーカー

プライマーOPC06で得られた矢頭で示す約580 bpのバンドが抵抗性個体 (Rr) と感受性個体 (rr) との交雑後代の抵抗性35個体中32個体に見られ、すべての感受性個体ではみられなかった。

M: 100 bp ラダーマーカー、RB: 抵抗性3個体をバルクにしたサンプル、

SB: 感受性3個体をバルクにしたサンプル、R: 抵抗性個体、S: 感受性個体

(Theor Appl Genet⁶⁾ より引用した)

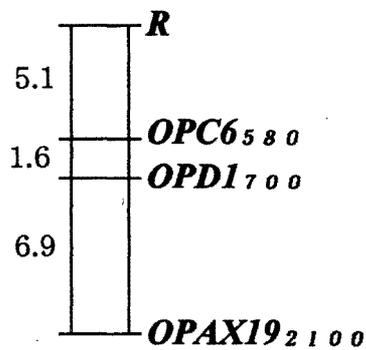


図2. マツバナタマバエ抵抗性遺伝子 R の近傍の連鎖地図

縦の軸の左側は遺伝的距離 (cM) を示す。

(Theor Appl Genet⁶⁾ より引用した)

4.2 抵抗性個体耐虫東奥育 17 号の連鎖地図

温度条件 PCR-1 によって 8 個の大配偶体を用いて 1160 プライマーの多型性と分離比の検定を行ない 208 プライマーを選び出した。これに温度条件 PCR-2 において連鎖がみられた 2 つのプライマー, OPD-01 と OPAX-19 も加えて, 96 個の大配偶体全部を用いてバンドの出現を調べたところ, 92 プライマーにおいて 1 : 1 の分離比に適合した 127 の多型なバンドを見出した。MAPMAKER を用いた連鎖分析の結果, 115 のバンドに連鎖関係がみられ, 17 連鎖群と 6 対のグループが形成され, 17 マーカーについては地図上の位置が不明確であった (図 3)。この連鎖地図の全長は 1469.8 cM で, マーカー間の平均距離は 15.0 cM であった。推定したゲノムの全長は, LOD スコア 3.0 で 2138.3 cM, LOD スコア 4.0 で 2175.5 cM, LOD スコア 5.0 で 2101.2 cM であった。このことから今回作成した連鎖地図はゲノムの 68.7% をカバーした。抵抗性遺伝子と連鎖した 3 つのマーカーは同じ連鎖群に属したが, *OPC-06₅₈₀* と *OPD01₇₀₀* の 2 つについては地図上の正確な位置が分からなかった。

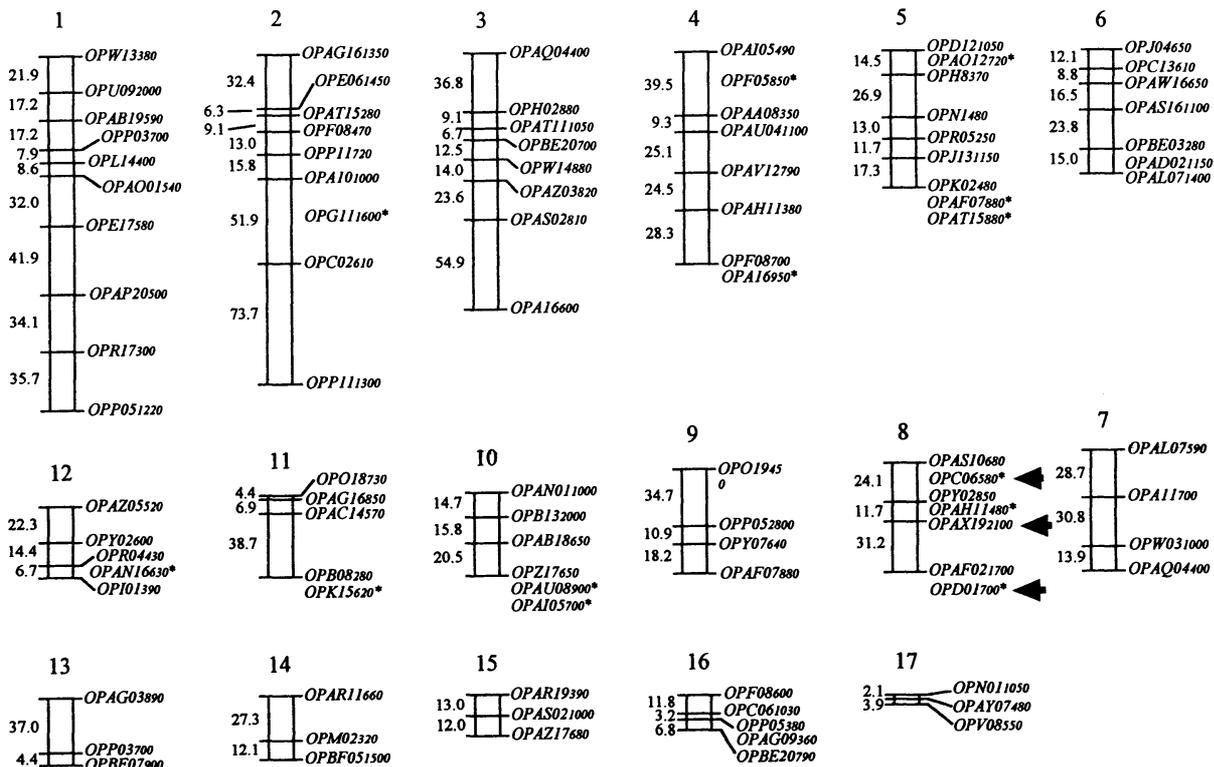


図 3. マツバナタマバエ抵抗性個体, 耐虫東奥育 17 号の大配偶体を用いた RAPD マーカーの連鎖地図
 矢印: 抵抗性遺伝子と連鎖したマーカー, *: 地図上の位置が決まらないマーカー, 連鎖群の左側の数字は遺伝的離 (cM) を示す
 (Theor Appl Genet⁶⁾ より引用した)

5 考 察

Benet ら¹⁾ はニレで Black leaf spot 病と 4.3 cM の距離で連鎖した RAPD マーカーを, Lehner ら⁸⁾ はドイツトウヒでシダレ型になる樹型異常と 4.6 cM の距離で連鎖した RAPD マーカーを見出した。われわれが今回見出した RAPD マーカーも抵抗性遺伝子との距離が 5.1 cM と同程度の距離であった。林木の連鎖マーカーでこれまで報告された中

で最も距離が短いのはサトウマツの発疹サビ病抵抗性と連鎖したRAPD マーカーで距離は1cM未満である²⁾。われわれもより強く連鎖したマーカーを今後見出すとともに連鎖地図をより詳細にするためにAFLPなどの他のマーカーの導入を図る必要がある。

今回見出した3つのマーカーのうち1つが相引で、他の2つが相反であった。マツバナタマバエ抵抗性個体は60個体選抜されており、連鎖マーカーを選抜に利用するには今回用いた耐虫東奥育17号以外の個体が連鎖マーカーを保持しているかどうか、保持している場合には相引か相反かについて明らかにする必要がある。

ゲノムの全長についてはhard pineの数種で推定されている。これまでの報告では、フランスカイガンショウで2000 cM³⁾あるいは1860 cM¹³⁾、スラッシュマツで2880-3360 cM¹¹⁾、ダイオウショウで2612-2656 cM¹²⁾となっている。今回クロマツで推定した2176cMはhard pineの中では中間かやや小さい方にあたった。

謝 辞

材料の採取において秋田県森林技術センターの伊藤精二氏はじめ職員の方に大変お世話いただいた。DNAの実験では瀬島則子氏に熱心に協力いただいた。森林総合研究所の津村義彦博士、東北大学の陶山佳久博士には助言いただいた。以上の方々に厚くお礼申し上げる。

引用文献

- 1) Benet, H., Guries, R. P., Boury, S. and Smalley, E. B. : Identification of RAPD markers linked to a black leaf spot resistance gene in Chinese elm. *Theor Appl Genet* 90, 1068-1073 (1995)
- 2) Devey, M. E., Delfino-Mix, A., Kinloch Jr., B. B. and Neale, D. B. : Random amplified polymorphic DNA markers tightly linked to a gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2066-2070 (1995)
- 3) Gerber, S. and Rodolphe, F. : An estimation of the genome length of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) . *Theor Appl Genet* 88, 289-292 (1994)
- 4) Harkins D. M., Johnson, G. N., Skaggs, P. A., Mix, A. D., Dupper, G. E., Devey, M. E., Kinloch, B. B. and Neale, D. B. : Saturation mapping of a major gene for resistance to white pine blister rust in sugar pine. *Theor Appl Genet* 97, 1355-1360 (1998)
- 5) Hulbert, S., Ilott, T., Legg, E. J., Lincoln, S., Lander, E. and Michelmore, R. : Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction length polymorphism. *Genetics* 120, 947-958 (1988)
- 6) Kondo, T., Terada, K., Hayashi, E., Kuramoto, N., Okamura, M. and Kawasaki, H. : RAPD markers linked to a gene for resistance to pine needle gall midge in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *Theor Appl Genet* 100, 391-395 (2000)
- 7) Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E. and Newburg, L. : MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181 (1987)

- 8) Lehner, A., Campbell, M. A., Wheeler, N. C., Poykko, T., Glossl, J., Kreike, J. and Neale, D. B. : Identification of a RAPD marker linked to the pendula gene in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst. f. pendula) . Theor Appl Genet 91, 1092-1094 (1995)
- 9) Michelmore, R. W., Paran, I. and Kesseli, R. V. : Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9828-9832 (1991)
- 10) Murray, M. G. and Thompson, W. F. : Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8, 4321-4325 (1980)
- 11) Nelson, C. D., Nance, W. L. and Doudrick, R. L. : A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. 'elliottii') based on random amplified polymorphic DNAs. Theor Appl Genet 87, 145-151 (1993)
- 12) Nelson, C. D., Kubisiak, T. L. and Nance, W. L. : A genetic linkage map of longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) based on random amplified polymorphic DNAs. J. Hered. 85, 433-439 (1994)
- 13) Plomion, C., Bahrman, N., Durel, C. E. and O'Malley, D. M. : Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. Heredity 74, 661-668 (1995)
- 14) 寺田貴美雄 : クロマツのマツパノタマバエ抵抗性育種に関する研究, 林育研報 10, 1-32 (1992)
- 15) Tsumura, Y., Ohba, K. and Strauss, S. H. : Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) . Theor Appl Genet 92, 40-45 (1996)

RAPD Markers Linked to the Resistance to Pine Needle Gall Midge in Japanese Black Pine (*Pinus thunbergii*)

Teiji Kondo ⁽¹⁾ , Kimio Terada ⁽²⁾ , Eiji Hayashi ⁽³⁾ , Noritsugu Kuramoto ⁽³⁾ ,
Masanori Okamura ⁽¹⁾ and Hisao Kawasaki ⁽²⁾

Summary : Linkage of RAPD markers to a single dominant gene for resistance to pine needle gall midge was investigated in Japanese black pine (*Pinus thunbergii*) . After screening 1160 primers using bulked segregant analysis, 3 primers produced three linked markers. The distances between the resistance gene, *R*, and marker genes *OPC06580*, *OPD01700*, and *OPAX192100* . *OPC06580* were 5.1 cM, 6.7 cM and 13.6 cM, respectively. *OPC06580* was in coupling phase, and *OPD01700* and *OPAX192100* were in repulsion phase to *R*. Linkage map of the resistant tree was constructed using 96 macrogametophytes. In linkage analysis, 98 out of 127 polymorphic markers were assigned to 17 linkage groups and 6 linked pairs. The total length of this map was 1469.8 cM with an average marker density of 15.6 cM. Genome length was estimated 2138.3 cM and this linkage map covered 67.5 % of the genome. Although the linked markers, *OPC06580*, *OPAX192100* and *OPD01700*, belonged to same linkage group, no unique positions were found for *OPC06580* and *OPD01700*.

-
- (1) Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center,
2320 Suya, Nishigoshi, Kikuchi, Kumamoto 861-1102 Japan
 - (2) Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center,
95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0173 Japan
 - (3) Forest Tree Breeding Center,
3809-1 Ishi, Juo, Taga, Ibaraki 319-1301 Japan