

RAPD分析によるビワ品種・系統の識別

誌名	園藝學會雜誌
ISSN	00137626
著者	福田, 伸二 長門, 潤 山本, 俊哉 ほか2名,
巻/号	71巻6号
掲載ページ	p. 826-828
発行年月	2002年11月

RAPD分析によるビワ品種・系統の識別

福田伸二^{1*}・長門 潤^{1**}・山本俊哉²・稗圃直史¹・寺井理治¹¹長崎県果樹試験場 856-0021 大村市鬼橋町²農業技術研究機構果樹研究所 305-8605 つくば市藤本

Cultivar Identification in Loquat Assessed by RAPD Analysis

Shinji Fukuda^{1*}, Jun Nagato^{1**}, Toshiya Yamamoto², Naofumi Hiehata¹ and Osamu Terai¹¹Nagasaki Fruit Tree Experiment Station, Onibashi, Omura 865-0021²National Institute of Fruit Tree Science, Fujimoto, Tsukuba 305-8605

Summary

Sixty-nine loquat accessions, including 27 Japanese varieties, 23 from China, 7 from Israel, 4 from Greece, 3 from Mexico, 3 from USA and the other 2 *Eriobotrya* species, were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Of the 60 primers screened, 28 primers yielded a total of 135 fragments that were reproducibly amplified. Polymorphism was observed in 108 of the 135 bands. All varieties were successfully distinguished by at least 1 band. RAPD analysis could be efficiently applied to distinguish loquat cultivars.

Key Words: *Eriobotrya*, loquat, RAPD.

緒言

ビワは東アジア等の温暖な地帯を中心に栽培されている果樹で我が国では初夏を代表する果物として人気が高い。ビワ属植物の中ではビワ (*Eriobotrya japonica* Lindl.)が唯一の栽培種である。日本にも古くから自生していたが、大果のものがなかったために本格的な栽培には至らなかった。現在栽培されているビワは江戸時代末頃に中国から持ち込まれた果実の種子から実生が育成され広まったと考えられている。現在のビワの代表的な品種‘茂木’および‘田中’はそれ以降に選抜されたものである。日本の品種はこの2品種を中心に交配や枝変わり等で増加し、現在に至っている。それに対して中国をはじめイスラエル、ギリシャ、メキシコおよびアメリカから導入された品種・系統には来歴が不明なものが多い。今後、これらの品種・系統を育種素材として利用するには、日本の品種を含めて遺伝的差異を明らかにすることが重要である。

ビワの品種・系統の識別は樹姿、葉、果皮色等の形態的特徴に基づき行われてきたが、形態的特徴は環境的要因の影響を受けやすく、近縁の系統間では識別が難しい。

また、アイソザイム分析では表現型が少ない(長門ら, 1997)。近年, RAPD マーカー (Williamsら, 1990)は様々な果樹において, 品種の同定, 識別, 連鎖地図の作成等に広く使われている。しかしながら, ビワではDNAマーカーを用いた研究報告はない。

そこで, 本研究ではRAPD法を用いてビワ69品種・系統の識別の可能性を検討したので報告する。

材料および方法

1. 材料およびDNA抽出

海外導入品種・系統および日本品種を含むビワ69品種・系統を供試した(第1図)。なお, 供試材料はすべて長崎県果樹試験場に植栽されているものを用いた。

幼葉切片約0.2gからDoyle・Doyle(1987)の方法に従い, 全DNAを抽出した。これを滅菌蒸留水に溶解し, λ -*Hind* III digestとともに0.7%アガロースゲルで電気泳動し, エチジウムブロマイドでのバンドの発色強度を比較することで10 ng/μlになるように調整し, テンプレートDNAとした。

2. RAPD分析

PCRは20 μl反応液で行い, 10 ng テンプレートDNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 unit Taq polymerase (宝酒造), 200 μM dNTPsおよび20 μMプライマーを添加した。ラン

2001年12月11日 受付。2002年5月10日 受理。

*Corresponding author.

**現在:長崎県東北農業改良普及センター平戸支所

ダムプライマーはオペロン社製の 60 種類 (OPA1-20, OPB1-20, OPC1-20) を用いた。PCR の反応条件は始めに 93 °C で 1 分間の熱変性を行った。続いて 93 °C で 20 秒の熱変性, 37 °C で 20 秒のアニーリング, 72 °C で 1 分間の伸長反応を 45 サイクル行い, さらに 72 °C で 10 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物は 1.5% アガロースゲルを用いて TAE 緩衝液中で電気泳動を行った後, エチジウムブロマイドで染色を行った。ポラロイドフィルムで撮影後, バンドの観察を行った。

3. データ解析

再現性のある RAPD バンドの有無をスコアした。得られたデータをもとに Sokal・Michener (1958) の方法に従い, 品種・系統間の非類似度係数 [2 品種間あるいは系統間で異なるバンド数 (多型バンド数) / 総バンド数] を求め, PHYLIP ver. 3.57 (Felsenstein, 1993) を用いて

UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) 法により系統樹を作成した。

結果および考察

1. RAPD 分析

60 種類のランダムプライマーを用いて PCR 反応を行った結果, 28 種類のプライマーで明確なバンドの増幅が確認された (第 1 表)。これは使用したプライマーの 47% に相当する。Conner ら (1997) は同じバラ科植物のリンゴの 3 品種を用いて分析した結果, 使用した 82% のプライマーでバンドの増幅を確認しており, ビワでは増幅したプライマーの割合が少なかった。

135 本の再現性のあるバンドが得られ, 増幅したプライマー当たり約 5 本のバンドが得られた。増幅バンドのうち 108 本は供試した 69 品種・系統間で多型を示した。また, *E. japonica* 間では 54 本が多型を示した。Shimada ら (1994) は小梅の 16 品種について 36 種類のプライマーを用いて分析した結果, 969 本のバンドが検出され, そのうち 60 本が多型を示したと報告している。さらに, リンゴでは 1 プライマー当たりのバンドは 5 本であったと報告 (Conner ら, 1997) されていることから, ビワの RAPD 分析で得られた 1 プライマー当たりのバンド数は少ない傾向が見られた。栽培品種間の 1 プライマー当たりの多型バンドの頻度を比較するとビワは 1.9 本 (54/28) で小梅の 1.7 本 (60/36) と同様に低いレベルであった。

2. ビワ 品種 識別

本実験では供試したすべての品種・系統を 1 本以上のバンド差で識別することが可能であった (第 1 図)。なお, 本系統樹は品種識別を目的として作製したもので, 類縁関係を正確に反映したものではないと考えられる。

69 品種・系統間の多型バンド数は 1 本から 77 本の範囲にあった。'田中' とその交雑実生である '福原早生' 間の多型バンド数が最も少なく, 1 本であった。さらに, '田中' とその交雑実生である '大房' や '津雲' とは 6 本, '房光' とは 5 本, '瑞穂', '大竜' および '能重早生' とは 3 本の多型バンドが検出された。日本の主要品種である '茂木' と '田中' を比較した場合, 11 本の多型バンド数であった。一方, *E. japonica* 間で最も多くの多型バンドが検出されたのは 'マメビワ' と 'G87-68' の 26 本であった。海外から導入した品種・系統ではメキシコ導入系統の 'Mexican Loquat No. 2' と中国品種の 'Jiajiao' や 'Huabao 2 Hao' との多型バンド数が導入地の差異に関わらず 5 本と少なかった。これらのことから *E. japonica* 間では多型バンド数が少なく, DNA レベルで近いことが確認された。それに対して *E. deflexa* と *E. japonica* では 66 本から 77 本と多くの多型バンドが検出された。*E. deflexa* はビワがんしゅ病抵抗性を有しており, 抵抗性育種素材として重要な遺伝資源である。RAPD 分析は *E. deflexa* のがんしゅ病抵抗性に連鎖するマーカー開発や *E. japonica* への抵抗性

Table 1. Characters of RAPD fragments obtained by 28 RAPD primers.

Primer	No. of amplified fragments	No. of polymorphic fragments	No. of polymorphic fragments in <i>E. Japonica</i>
OPA-01	8	7	2
OPA-02	4	3	1
OPA-03	4	3	0
OPA-04	5	4	2
OPA-07	6	6	3
OPA-08	2	2	2
OPA-09	2	2	1
OPA-11	4	4	3
OPA-13	8	6	1
OPA-14	2	2	2
OPA-15	12	10	6
OPA-17	2	2	1
OPA-19	2	2	2
OPA-20	2	2	0
OPB-01	5	3	1
OPB-06	4	4	1
OPB-07	6	5	1
OPB-08	4	3	0
OPB-11	5	4	4
OPB-12	6	3	3
OPB-15	6	2	2
OPC-04	8	7	3
OPC-05	9	5	0
OPC-08	5	5	5
OPC-09	6	6	2
OPC-13	4	3	3
OPC-14	3	2	2
OPC-18	1	1	1
Total	135	108	54

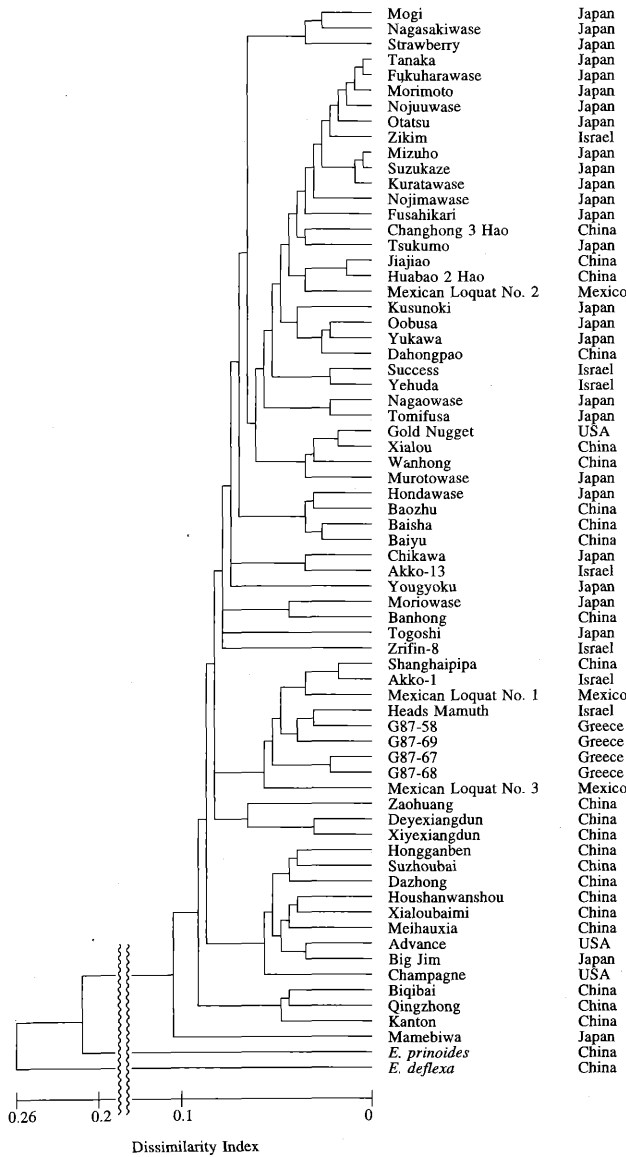


Fig. 1. Dendrogram of 69 loquat accessions identified by RAPD generated by the UPGMA method. Variety name and origin are indicated.

導入にも利用できる可能性があると考えられた。

得られた多型バンドの中には品種特異的バンドも存在した。例えば OPA-11 の 2.0 kbp のバンドは ‘Hongganben’, OPA-15 の 1.0 kbp のバンドは ‘Akko-13’, OPB-15 の 1.1 kbp のバンドは ‘G87-58’, OPC-9 の 0.5 kbp のバンドは ‘マメビワ’ のみで得られた。さらに多数の種特異的バンドも検出された。

長門ら (1997) が報告したアイソザイム分析によるビワ品種の識別では、供試した日本の 38 品種・系統を SkDH

(シキミ酸デヒドロゲナーゼ)アイソザイム分析で 4 タイプにしか識別することができず、*E. japonica* 内の識別は難しいと報告している。本実験では 60 種類のプライマーを用いることにより 1 本以上のバンド差で全品種・系統の識別が可能であった。このことは多くのプライマーを使用することによって、形態的特徴では識別が難しいビワ品種の同定に RAPD 分析が有効であることを示唆するものである。

摘 要

60 種類のオペロンプライマーを用いて、RAPD 法によりビワ 69 品種・系統の識別の可能性を検討した。再現性良く増幅がみられた 28 種類のプライマーから合計 135 本のバンドが得られた。そのうち、多型バンドは 108 本で、*E. japonica* 間では 54 本の多型バンドが得られた。供試した品種・系統すべてを 1 本以上のバンド差で識別することができた。

謝 辞 本試験を行うにあたり、終始ご教示を賜った佐賀大学農学部草場基章博士と農林水産省技官池谷祐幸博士に深甚なる感謝の意を表します。

引用文献

Conner, P. J., S. K. Brown and N. F. Weeden. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA-based genetic linkage maps of three apple cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122: 350-359.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bul.* 19: 11-15.

Fellsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.

長門 潤・松下由紀子・佐藤義彦. 1997. ビワ品種のアイソザイム分析. *長崎果樹試研報.* 4: 51-61.

Shimada, T., T. Haji, M. Yamaguchi, T. Takeda, K. Nomura and M. Yoshida. 1994. Classification of Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) by RAPD assay. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 63: 543-551.

Sokal, R. R. and C. D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38: 1409-1438.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.