

DNA 検定によるウメ‘南高’の樹勢の違いの解析

林恭平・岩本和也¹

農林水産総合技術センター果樹試験場うめ研究所

Detection of Difference of Tree Vigor in Japanese Apricot (*Prunus mume*) Cultiver ‘Nanko’ by DNA Analysis

Kyohei Hayashi and Kazuya Iwamoto

*Laboratory of Japanese Apricot, Fruit Tree Experiment Station
Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries*

緒 言

和歌山県で育成された‘南高’は、収量が多く梅干加工に適していることから、栽培面積を拡大してきた。‘南高’は他の果樹同様、遺伝形質を引き継ぐため接木増殖（クローン増殖）で増やされ、現在 100 万本以上が県内で植栽されている。接木増殖で増えた個体は遺伝的に同じで、個体差はないはずである。しかし、同一園地内に植栽されている‘南高’でも、個体間で樹勢の違いが認められる。このことから、接木増殖の過程で系統分化が起こり遺伝形質に違いを生じたことが、樹勢の違いに影響している可能性がある。そこで、本研究では、本県のウメ産地であるみなべ町及び田辺市の乾燥害発生園、湿害発生園及び多収園で樹勢の違う‘南高’樹を穂木部と台木部に分けて DNA 検定で調べ、それぞれについて遺伝的な差異があるかどうか検討した。

材料および方法

1 供試材料

‘南高’供試樹はみなべ町、田辺市の 18 園地（乾燥害発生園 No. 1~6, 湿害発生園 No. 7~12, 多収園 No. 13~18,）からそれぞれ健全樹と樹勢低下樹（樹齢 10~15 年生）36 樹を選んだ。DNA 検定の試料は、穂木部では 4 月下旬に伸長した幼葉を採取し、台木部では 4 月下旬に根の周りにパーライト：ピートモス（9:1）を施用し、一ヶ月後に伸長した新根を採取した。また、系統分化について調べるため、‘南高’原木、二代目、三代目及び葉が薄くなった変異個体の枝の葉も供試した。

参考として、他品種との遺伝的な差を調べるため、‘二青梅（台湾梅）’、‘パープルクィーン（小梅）’、‘白王（小梅）’、‘白加賀’、‘小粒南高’、‘改良内田’、‘皆平早生’と‘豊後’の葉も供試した。

2 DNA の抽出

約 0.2 g の試料を液体窒素で凍らせ乳鉢で粉状になるまで粉碎し、キアゲン社の DNeasy Plant Mini で定法に従い抽出した。抽出した DNA 溶液は 1.0%アガロースゲルで電気泳動後、紫外線照射して DNA の存在を確認した。

3 S 遺伝子型の判別

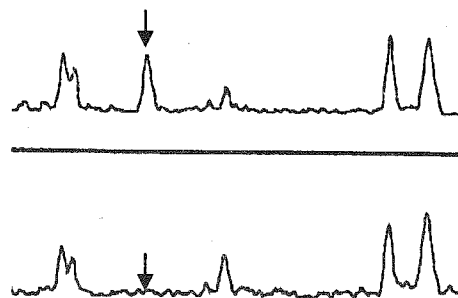
S 遺伝子型の分析は抽出した DNA を鋳型とし、PCR 法で行った。使用したプライマーは Pru-C2, Pru-C5 及び Pru-C4R の 3 種類で C2-C4R 及び C2-C5 の二つのプライマーセットで S 遺伝子型の識別を行った (Tao (2000), Yaegaki (2001))。反応溶液は 20 ng 鋳型 DNA, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2mM dNTP 混合液, 400 nM プ

¹現在：農林水産総合技術センター企画普及部普及課

ライマー, 0.25 U TAKARA Ex Taq polimerase (宝酒造)で調整し, 最終容量を 20 μ l にした. 反応条件は C2-C4R のプライマーのセットが 94°C1分→56°C1分→72°C1分 30秒の 35 サイクルで, C2-C5 のプライマーセットは 94°C1分→51°C2分→72°C2分の 35 サイクルで行った. 増幅産物は 1.0%アガロースゲルで電気泳動後, EtBr で染色し, 310nm の励起照射下でバンドを確認し, その高さによって S 遺伝子型の判別を行った.

4 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法による DNA 分析

AFLP 解析は Applied Biosystems 社の AFLPTM Plant Mapping Kit のプロトコールに準拠した. 抽出した全 DNA を *EcoRI* および *MseI* の二つの制限酵素で二重消化し, アダプターをライゲーションした後, Preservative プライマーで一次選抜し, *MseI* +3 塩基 (CAA, CAC, CAG, CAT, CTA, CTC) 6 種類のプライマーと *EcoRI* +3 塩基 (ACT, AAC, AAG, ACA, AGC, ACC, AGG, ACG) 8 種類のプライマーを使用し, 30 組み合わせで定法に従い, Selective PCR を行った. Selective PCR 反応産物は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて検出し, 内部標準の蛍光ラベル DNA マーカーを指標にして, Gene Scan ソフト (ABI 社) で解析した (第 1 図).



第 1 図 Gene Scan による AFLP 法の解析
波形のピーク場所の違いが差異を示し, ピークをシグナルと呼ぶ. 矢印は違いを示し, 違いのあったピークを多型のシグナルと呼ぶ.

5 SSR (Simple Sequence Repeat) 分析

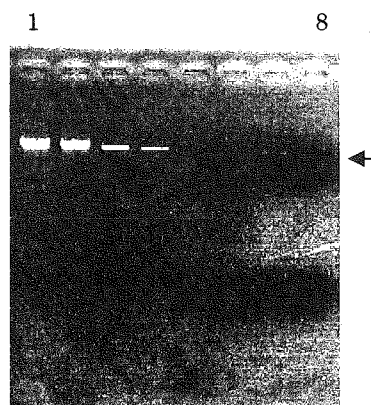
SSR 分析は台木部のみ行った. 抽出した DNA を鋳型とし, 10 種類の SSR プライマー (Ma-7, 10, M-7 (Yamamoto et al. 2002), ssr-7, 23 (Cipriani et al. 1999), D-37, 38, 40, 46, 49 (Lopes et al. 2002)) を用いた. 反応溶液は 10 ng 鋳型 DNA, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP 混合液, 500 nM プライマー, 0.5 U Taq polimerase で調整し, 最終容量を 20 μ l にした. 反応条件は 94°C1分→57°C1分→72°C2分の 30 サイクルで行った. 増幅産物は, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI 社) を用いて検出し, 内部標準の蛍光ラベル DNA マーカーを指標にして, Gene Scan ソフト (ABI 社) で解析した.

結 果

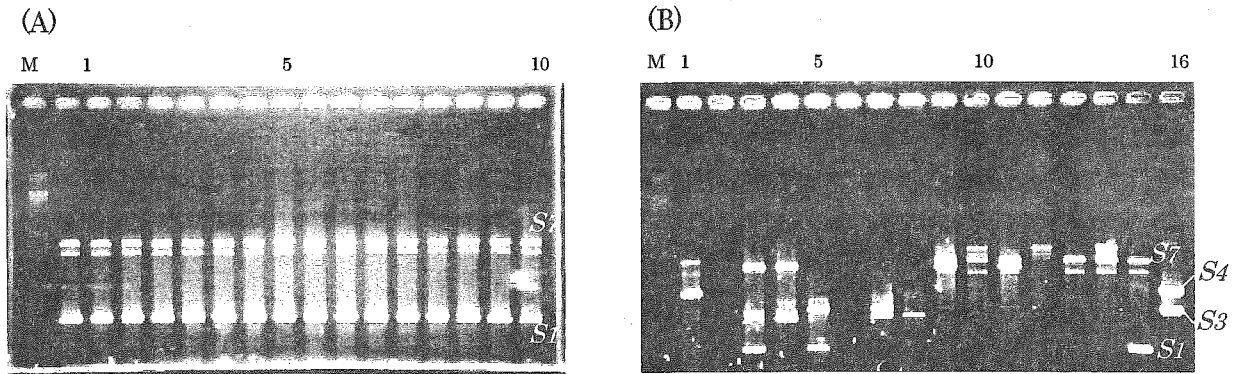
試験 1 S 遺伝子型の判別

抽出した DNA 溶液を電気泳動した結果, バンドは薄く少量であったが全ての供試個体で DNA の存在を確認した (第 2 図). 抽出した DNA から PCR 法により S 遺伝子型を判別した結果, '南高' 36 樹の穂木部 (健全樹 18, 樹勢低下樹 18 個体) と, 原木, 二代目, 三代目及び変異個体は全て *S1S7* の遺伝子型を示した (第 3 図-A). 台木部では供試した 36 個体中 23 個体で 2 遺伝子型を, 5 個体で 1 遺伝子型を判別でき, 8 個体ではまったく判別できなかった (第 3 図-B). 判別できた 22 個体の遺伝子型は *S4S7*, *S2S5*, *S3S7*, *S1S3*, *S5S7*, *S2S3*, *S7Sf*, *S1Sf*, *S1S2*, *S1S4*, *S1S5*, *S3Sf*, *S3S4* の 13 種類であった (第 1 表).

また, 田尾ら (2003) によると *S3* 遺伝子型はサザンプロット分析により更に 3 つに分け, 新しく *S9*, *S10* の S 遺伝子座を報告している. 本試験は PCR 法のみしかおこなっていないため *S9*, *S10* の識別はしておらず, 以前のように *S3* として扱った.



第 2 図 電気泳動による抽出した DNA の確認
lane1~4: λ DNA 左から 300, 100, 30, 10 μ g
lane5, 6: 穂木部の DNA lane7, 8: 台木部の DNA
矢印は DNA のバンドを示す.



第3図 PCR法によるS遺伝子型の判別

(A) 穂木部 lane 1~11: ‘南高’の穂木 12:原木 13:二代目 14:三代目 15:枝変わりの枝
 (B) 台木部 lane 1~14: ‘南高’の台木 15:原木穂木(対照) 16: ‘改良内田’穂木(対照)
 M: サイズマーカー λ/HindIII・EcoRI

第1表 判別した‘南高’36樹台木部のS遺伝子型

	園地 No.	健全樹	樹勢低下樹	園地 No.	健全樹	樹勢低下樹
湿害発生園	1	S4 S7	-	4	S1 Sf	S3 S4
	2	S2 S5	S1 S5	5	S1 Sf	S1 Sf
	3	S3 S7	S1 Sf	6	-	-
乾燥害発生園	7	S1 S3	S3	10	-	-
	8	S5 S7	S7 Sf	11	S1 S2	S1 S4
	9	S5 S7	Sf	12	S1 S4	S1 Sf
多収園	13	S2 S3	S2 S5	16	S1	S3
	14	S7	-	17	S3 Sf	S1 S4
	15	S7 Sf	S5 S7	18	-	-

試験2 AFLP法によるDNA分析

供試した‘南高’36樹の穂木部と、原木、二代目、三代目及び変異個体の40個体についてAFLP法でDNA分析を行った。その結果、30種類のプライマーの組み合わせから798のシグナルが検出され、そのうち多型のシグナルは17であった。多型シグナルの割合は2.1%で、調査した40個体の類似度は0.995であった(第2表)。また、台木部についてもAFLP分析したが、様々な波形が検出され明瞭な解析ができなかった。

‘南高’の原木を含む9品種で21種類のプライマーを用いてAFLP分析を行った結果、21種類のプライマーの組み合わせから735のシグナルが検出され、多型を示したシグナルは251で、その割合は34.1%であった(第3表)。検出された品種間のAFLPシグナルから、類似度係数を用いて計算し、系統間の類似度表を作表した。白王とパープルクィーンの類似度が0.973で最も高く、豊後と二青梅が0.857と最も低かった(第4表)。得られた類似度からUPGMA法により樹形図を作成した(第4図)。

第2表 AFLP法により‘南高’40個体で検出されたシグナル数

検出シグナル数	多型シグナル数(多型割合%)	類似度
798	17(2.1%)	0.995

*プライマーは30種類の組み合わせで行った。

第3表 AFLP法によりウメ9品種で検出されたシグナル数

検出シグナル数	多型シグナル数(多型割合%)
735	251(34.1%)

*プライマーは21種類の組み合わせで行った。

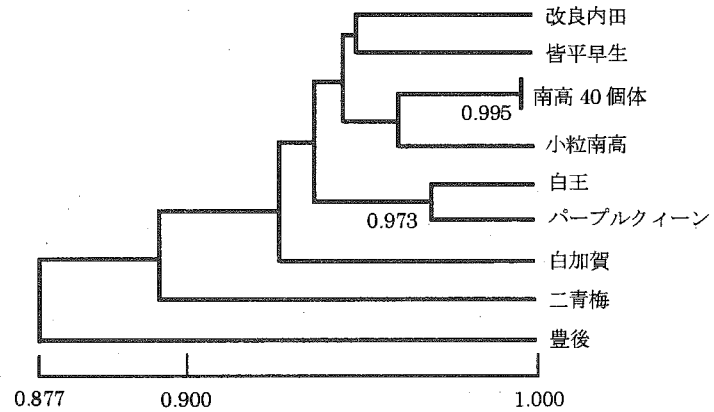
第4表 AFLP 解析から算出した系統間の類似度

	二青梅	白王	白加賀	南高	小粒南高	改良内田	皆平早生	パープルクィーン	豊後
二青梅	1.000								
白王	0.905	1.000							
白加賀	0.906	0.939	1.000						
南高	0.910	0.949	0.941	1.000					
小粒南高	0.906	0.943	0.942	0.965	1.000				
改良内田	0.910	0.942	0.930	0.957	0.956	1.000			
皆平早生	0.903	0.937	0.927	0.945	0.947	0.955	1.000		
パープルクィーン	0.904	0.973	0.933	0.950	0.949	0.946	0.944	1.000	
豊後	0.857	0.905	0.884	0.902	0.899	0.904	0.904	0.914	1.000

* 類似度は次のとおりで算出した。類似度 = $2N_{ab} / (N_a + N_b)$, N_{ab} : 系統 a 及び系統 b に共通に検出されたシグナル数, N_a : 系統 a に検出されたシグナル数, N_b : 系統 b に検出されたシグナル

試験3 ‘南高’ 台木部の SSR 分析

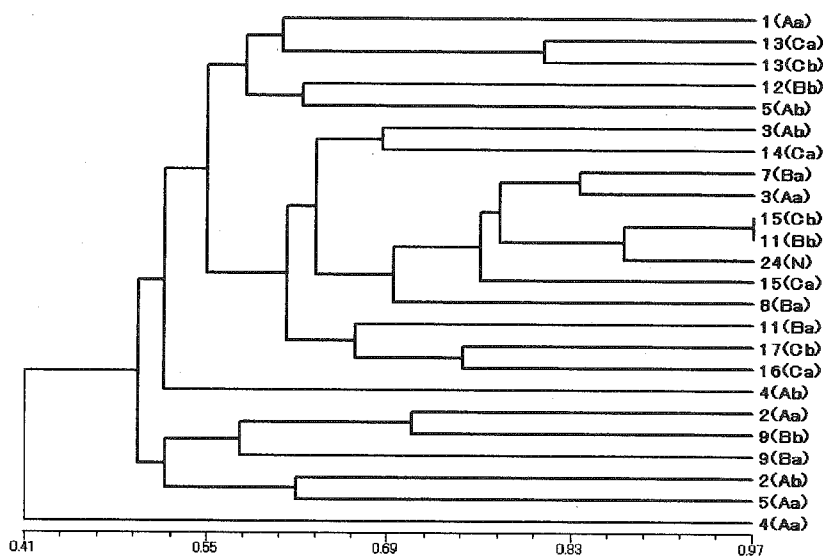
台木部について SSR 分析した結果, 36 個体中 23 個体で明確に 10SSR 座の遺伝子型を判定できた (第5表)。その結果をもとに, UPGMA 法により樹形図を作成した (第5図)。樹形図では, 台木部 23 個体は 22 系統に分類され, No. 11 園の樹勢低下樹と No. 15 園の樹勢低下樹は同系統であった。



第4図 AFLP 分析結果から得られたウメ9品種の樹形図

第5表 台木部の SSR 遺伝子型

	樹勢	No.	Ma7	Ma10	M7	ssr7	ssr23	D37	D38	D40	D46	D49
(A) 湿害発生園	(Aa) 健全樹	1	114/116	106/116	154/156	117/131	194/194	168/176	131/131	238/260	143/157	116/116
		2	98/114	106/110	154/156	117/131	194/194	158/158	131/131	236/236	135/151	116/124
		3	116/116	106/106	150/154	117/131	194/194	160/176	131/131	236/238	133/157	116/120
		4	98/96	106/106	150/156	131/131	194/194	154/158	131/131	240/244	135/135	126/126
		5	112/116	106/106	150/150	131/131	198/198	154/176	131/131	244/244	135/135	124/124
(B) 乾燥害発生園	(Ab) 樹勢低下樹	2	98/114	106/106	154/156	117/131	194/198	160/162	131/131	244/260	133/151	120/124
		3	114/116	106/116	154/154	131/131	194/198	160/176	131/131	242/244	133/135	120/124
		4	98/98	106/106	150/156	117/131	180/194	160/160	131/131	242/258	143/151	120/126
		5	112/116	106/106	150/154	117/131	180/194	158/178	118/131	242/242	143/157	116/120
		7	116/116	106/116	154/156	117/117	194/198	154/160	131/131	238/244	133/151	120/130
(C) 多収園	(Ba) 健全樹	8	114/116	106/106	150/154	131/131	194/194	160/162	131/131	236/236	133/157	116/120
		9	114/114	106/106	156/156	117/131	194/194	160/176	131/131	236/258	157/157	116/116
		11	112/112	106/106	154/154	117/117	194/194	154/162	131/131	236/242	133/135	120/124
		9	112/116	106/106	150/154	117/131	194/194	176/176	131/131	236/236	135/151	116/124
		11	114/116	106/116	150/156	117/131	194/194	158/160	131/131	236/244	133/157	116/120
南高(N)	(Ca) 健全樹	12	112/116	106/106	156/156	117/117	180/194	158/160	131/131	246/246	143/143	116/124
		13	112/116	106/116	150/156	117/135	180/194	160/176	131/131	234/238	135/143	116/120
		14	114/114	106/106	154/156	131/131	194/194	158/160	131/131	236/258	133/151	120/120
		15	114/116	106/106	150/156	117/117	194/194	160/176	131/131	236/260	133/133	116/120
		16	112/116	106/106	154/156	117/117	194/198	154/160	131/131	242/244	143/157	116/116
南高(N)	(Cb) 樹勢低下樹	13	112/114	106/116	150/156	117/131	180/194	160/176	131/131	234/238	157/157	116/120
		15	114/116	106/106	154/156	117/131	194/198	160/162	131/131	238/244	157/157	116/116
		17	114/116	106/116	150/156	117/131	194/198	158/160	131/131	236/244	133/157	116/120
南高(N)		24	114/116	106/106	154/156	117/131	194/198	160/160	131/131	236/244	133/157	116/120



第5図 SSR分析結果から得られた台木部の樹形図

* 算用数字は圃地番号を示す。()内の英大文字は、A:湿害発生圃, B:乾燥害発生圃, C:多収圃, N:‘南高’原木穂木を表し、英小文字は、a:健全樹, b:樹勢低下樹を示す。

考 察

田尾ら(2000, 2003)は‘南高’の*S*遺伝子型は*SIS7*と報告している。今回調べた‘南高’樹40個体の穂木部は全て同じ*SIS7*であったことから、穂木部は接木増殖で増えてきたことによる‘南高’原木のクローンであることが裏付けられた。これに対し、台木部は23個体が13種類の*S*遺伝子型に判別された。このことから、‘南高’の台木には様々な系統が用いられていることがわかり、台木の遺伝的な違いが樹勢に大きく影響している可能性が示唆された。

しかし、‘南高’では葉色が薄いものや枝に筋のはいる変異が知られていることから、穂木部で系統分化が起こり、樹勢の違いに影響している可能性も考えられる。そこで本試験では、穂木部のDNAを詳しく調べるため、多型シグナルが出やすいAFLP法でDNA分析を行った。この方法で、‘南高’樹40個体で比較したところ、16個体で多型のシグナルが検出された。このことから、‘南高’穂木部に遺伝的な差異があり系統分化が起こっていると考えられた。ただし、多型シグナルの割合は2.1%と低く、類似度は0.995と高かった。これは、枝変わりの関係にある‘白王’と‘パープルクィーン’の0.973よりも高く、今回調べた‘南高’の系統分化は遺伝的には小さいことを示し、この分化が樹勢の違いに影響する可能性は低いと思われた。

台木部のAFLP法によるDNA分析では、様々な波形が検出され明瞭な解析が行えなかった。この原因は、除去しきれなかった根表面の微生物が混入したことによると考えられた。AFLP法は*S*遺伝子型やSSRの分析のように標的とした特定のDNA配列領域を分析するのではなく、ランダムな領域を分析する。そのため、抽出したDNAにウメ台木だけでなく他の微生物のDNAが混在し、多様な生物の波形が検出されたと推測された。また本試験では、台木部の供試個体の一部で、PCR反応が阻害され*S*遺伝子型やSSRの分析が不可能であった。根をDNA抽出するとき不純物が多く析出されたため、フェノール・クロロホルム法、エタノール沈殿法やDNA精製カラムを用いて精製したが、これらの処理によっても不純物を十分に除去できなかったことがPCR反応を阻害した原因と考えられた。

次に台木部の遺伝的形質と樹勢の関係について詳細に検討するため、SSR分析を行った。SSRはDNA配列で単純な配列が繰り返している部分のことで、品種によってその反復回数が違う。近年、SSRは普遍性や再現性が高い評価を得ており、品種識別や遺伝子地図作成に多く用いられている(林2003)。また、核果類果樹で開発されたSSRマーカーは他の核果類で汎用性があり利用できることが報告されている(山

本 2004). この方法で、台木部 36 個体のうち分析可能であった 23 個体について樹形図を作成すると、22 系統に分類された。このことから、‘南高’樹の台木は多様な系統が用いられていることが明らかになった。しかし、3 種類の特徴を持つ園（湿害発生園、乾燥害発生園、多収園）での樹勢の違いと台木の遺伝的な関係は判然としなかった。

以上のことから、本研究では DNA 配列の解析から遺伝的形質の調査結果と樹勢の違いとの間に関連を見出すことはできなかった。しかし、遺伝的形質に由来する‘南高’樹の樹勢の違いには、台木部の遺伝的な多様性が大きく影響していると考えられた。

摘 要

本研究は‘南高’樹の樹勢の違いと遺伝的形質の関係について DNA 分析により検討した。

1. ‘南高’樹穂木部 40 個体の S 遺伝子型を PCR 法で調べたところ、全て SIS7 を示した。台木部 36 個体を同様に調査した結果、23 個体で 2 遺伝子型を分析可能で、13 種類の遺伝子型を示した。
2. ‘南高’樹穂木部 36 個体、原木、二代目、三代目及び変異個体について AFLP 解析を行った。30 種類のプライマーの組み合わせから 798 のシグナルが検出され、多型のシグナルは 17 で、割合は 2.1%であった。
3. ウメ 8 品種を AFLP 解析すると、21 種類のプライマーの組み合わせから 735 のシグナルが検出され、多型を示したシグナルは 251 で、割合は 34.1%であった。
4. 台木部は 36 個体のうち 23 個体で SSR 分析でき、同系統に分類されたのは 2 系統だけで、他はそれぞれ別の系統に分類された。
5. 以上のことから、遺伝的形質と樹勢の違いとの関係は判然としなかったが、‘南高’に用いられている台木の遺伝的な多様性が関係している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、AFLP 法による DNA 分析を御指導いただいた花田裕美氏、SSR 分析の御指導とプライマーなどの試薬を提供して下さった山本俊哉氏と林健樹氏に感謝の意を表す。また、サンプルを提供して下さったみなべ町及び田辺市のウメ生産者、園地を紹介していただき生産者に取り次いでくださった日高地域及び西牟婁地域農業改良普及センターの諸氏に深謝する。

引用文献

- 田尾龍太郎・難波梓・山根久代・冬廣吉朗・渡邊毅・羽生剛・杉浦明. 2003. ウメ (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) の S-RNase 遺伝子特異的な PCR 増幅のためのプライマーセットの開発. 園学研 (Hort. Res. (Japan))2(4):237-240.
- 林建樹.(2003) 少し詳しい果樹ゲノム 果樹のゲノムをマップする道具-DNA マーカーと連鎖分析. 果実日本 vol.58:68-69
- 山本俊哉・小野勇治・八重垣英明・十師岳・山口正己・林 健樹(2003)モモのゲノムマッピング その9 果肉色, 核の粘離性, 酸度に連鎖する DNA マーカー. 園芸学会雑誌別冊 2 72:260
- 山本俊哉.(2004) 核果類における DNA 品種識別の現状 果樹種苗第 93 号 (冬季号) 14-16
- Cipriani G., G. Lot, W.-G. Huang, M. T. Marrazzo, E. Peterlunger and R. Testolin(1999)AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica*(L) Batsch] : isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. Theor Appl Genet99:65-72
- Lopes M. S., K. M. Sefc, M. Laimer and A. Da Camara Machado(2002) Identification of microsatellite loci

- in apricot. *Molecular Ecology Notes* 2:24-26
- Tao R, Habu T, Yamane H, Iwamoto K, Sugiura A (2000) Molecular Markers for compatibility in Japanese Apricot (*Prunus mume*) *HortScience*35(6):1121-1123.2000.
- Yaegaki H, Shimada T, Moriguchi T, Hayama H, Haji T, Yamaguchi M (2001) Molecular characterization *S*-RNase and *S*-genotype in the japanese apricot(*Peunus mume* Sieb. Et Zucc.) *Sex Plant Reprond* 13:251-257
- Yamamoto T., K. Mochida, T. Imai, Y. Z. Shi, I. Ogiwara and T. Hayashi(2002) Microsatellite markers in peach [*Prunus persica*(L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. *Molecular Ecology Notes* 2:298-301

