

リンゴ無配合生殖性野生種の後代個体における雑種の判別

石山 正行・佐藤 耕作*・原田 竹雄**

(青森県畑作園芸試験場・*青森県りんご試験場・**弘前大学農学部)

Identification of Zygotic Seedlings of Apple in the Progenies
from a Cross of an Apomictic Species with *M. robusta*

Masayuki ISHIYAMA, Takashi SATO* and Takeo HARADA**

(Aomori Field Crops and Horticultural Experiment Station・*Aomori Apple
Experiment Station・**Faculty of Agriculture, Hirosaki University)

1 はじめに

一般的に、リンゴの台木は栄養的に繁殖されている。繁殖の観点からは、栄養繁殖より種子繁殖ははるかに効率的であるが、種子からは遺伝的に均一な実生が得られない。

リンゴの野生種には、無配合生殖をするものがあり、種子から遺伝的に均一な実生が得られる。無配合生殖性野生種から得られた実生を台木として利用することは、欧米や中国で試みられてきた^{2, 6)}。しかし、樹が大きくなり過ぎたり、ウイルス病に弱かったりで、普及しなかった。

無配合生殖性の *Malus hupehensis* Rehd.¹⁾ に、わい性台木を交雑し、わい性でウイルスに強い無配合生殖性台木を育成する場合に、*M. hupehensis* × *M. 9* から得られた実生は、葉の形態が *M. hupehensis* に類似し、葉の形態から雑種個体を識別することが困難であった。雑種を的確に判別する方法が、育種の効率をあげるうえで必要である。

M. hupehensis に、本質部に赤い色素をもつ *M. robusta* Rehd. を交雑し、得られた赤い色素をもつ後代個体を用いて、雑種を判別する二、三の方法について検討した。

2 試験方法

(1) 供試実生

1987年に、*M. hupehensis* に *M. robusta* を交雑して36個体の実生を育成した。これらの実生のなかで、本質部に赤い色素をもつ明らかな雑種を6個体、色素をもたない雑種性不明な4個体を選んだ。これらの3年生実生から穂木を取り、鉢に植えた実生台に3本ずつ接ぎ木した。

(2) 葉及び本質部の形質

7月下旬に、80cm前後に伸びた新しょう中央部から、各個体20葉ずつ採取し、葉の形質を調査した。本質部の色は、休眠枝で調査した。

(3) パーオキシダーゼアイソザイム

試料1gをリン酸バッファー (pH6.0) 5ml、石英砂1g、PVPP-400 5gとともに乳鉢で摩砕し、12,000rpmで10分間遠心分離した。上澄液に40%相当のショ糖を溶かした。泳動は、ポリアクリルアミドゲル (7.5%) を支持体とするデスク電気泳動をもちい、80Vで30分、更に160Vで90分行った。

(4) PCR法によるDNAフィンガープリント

5月上旬に若葉を採取し、-85℃に保存しておいたものを用いた。葉から抽出した約50ngの全DNAを鋳型として、PCR法で行った。94℃で1.5分の熱変性、37℃で2.5分のアニール、72℃で4分のポリメラーゼ反応を42サイクル繰り返した。プライマーは、OPA20 (5' - GTTGCGA TCC-3') である。増幅したDNAは、PAGE (5%) で電気泳動後、EtBrで染色し、UV照射下で写真撮影した。

3 試験結果及び考察

(1) *M. hupehensis* と *M. robusta* の葉形質で明らかに異なるのは、葉の先端、托葉及びきょ歯の形状である (図1)。供試実生 (HR) をこれらの形質に従って分類すると、すべての実生が、葉の先端、托葉、きょ歯のいずれの形質とも *M. hupehensis* に類似し (表1)、葉の形質による雑種の判別はできなかった。

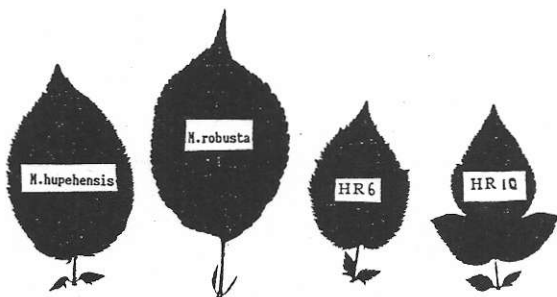


図1 葉の形態

交雑に用いた *M. hupehensis* は三倍体で³⁾、卵細胞は、珠心胚起源の3nである。*M. robusta*との交雑で得られた実生は、四倍体あるいは五倍体と考えられ、これらの実生が持つ染色体の3/4あるいは3/5は、卵細胞起源である。実生の葉の形質が *M. hupehensis* に似る傾向が強いのは、この理由によると考えられる。

(2) パーオキシダーゼのアイソザイムでは、*M. robusta* に特有のAバンドあるいはDバンドをもつ個体 (図2) は、色素がある6個体中2個体のみで、この方法では、雑種を

表1 木質部の色、葉の形態、アイソザイム及びDNAによる判定

種 類	木 質 部		葉 形		質		ア イ ソ D N A	
	色・濃さ	判 定	先端の形	托 葉	きょ 菌	判 定	ザイム判定	判 定
<i>M. hupehensis</i>	緑黄	h	h	h	h	h	h	h
<i>M. robusta</i>	赤・+3	r	r	r	r	r	r	r
HR 1	赤・+1	hr	h	h	h	h	h	hr
HR 3	赤・+3	hr	h	h	h	h	hr	hr
HR 4	赤・+1	hr	h	h	h	h	h	hr
HR 5	赤・+2	hr	h	h	h	h	h	hr
HR 6	赤・+2	hr	h	h	h	h	h	hr
HR 8	赤・+3	hr	h	h	h	h	hr	hr
HR 2	緑黄	h	h	h	h	h	hr	hr
HR 7	緑黄	h	h	h	h	h	hr	hr
HR 9	緑黄	h	h	h	h	h	hr	hr
HR10	緑黄	h	h	h	h	h	h	不明

注. h=*M. hupehensis*, r=*M. robusta*, hr=*M. hupehensis*×*M. robusta*

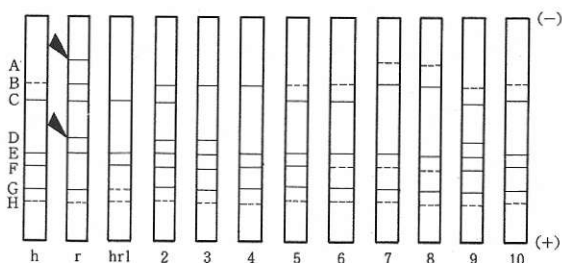


図2 パーオキシダーゼアイソザイム

的確に判別することができなかった。

パーオキシダーゼのアイソザイムは、M系統やMM系の台木分類に用いられているが⁴⁾、品種の判別では、パーオキシダーゼアイソザイムのみでは、十分でないことが報告されている⁵⁾。

(3) DNAフィンガープリント(図3)では、色素のある6個体全てが、*M. robusta*に特有のAバンドあるいはBバンドを持ち、雑種と判定された。No.10の個体は、当初のサンプル量が少な過ぎたためか、明瞭なフィンガー

プリントが得られなかった。この個体を除いて、本質部に色素がなく、葉の形質からも雑種と認められない3個体が、すべて雑種と判定された。葉の形態が *M. hupehensis* に類似する個体の中にも、雑種がかなりの割合で存在することが明らかになった。PCR 方法によるフィンガープリントは、雑種の判別に有効であった。

4 ま と め

無配合生殖性の *Malus hupehensis* に *M. robusta* を交雑して得られた実生の雑種性の判別には、PCR 法による DNA フィンガープリント法が有効であった。

引 用 文 献

- 1) 石山正行, 佐藤耕, 瀬川一衛, 1987. リンゴ属植物の結実様式. 東北農業研究 40: 241-242.
- 2) Luckwill, L. C.; Campbell, A. I. 1954. The use of apomictic seeding rootstocks for apple. Annu. Rep. long Ashton Res. Sta. for 1953: 47-52.
- 3) 齊藤健一, 新関稔, 原田竹雄, 石川隆二. 1993. 自家結実性品種育成母本としての *Malus hupehensis* の特性. 弘大農報 53: 1-13.
- 4) Vinterhalter, D. V.; James, D. J. 1986. The use of peroxidase polymorphism in the identification of Malling and Malling Merton apple rootstocks. J. Hort. Sci. 61(2): 147-152.
- 5) Weeden, N. F.; Lamp, R. C. 1985. Identification of apple cultivars by isozymes phenotypes. J. Am. Soc. Hort. Sci. 110: 509-515.
- 6) 楊進, 章祖函, 司清. 1981. 苹果砧木生物学特性研究. 園芸学報 8(3): 1-10.

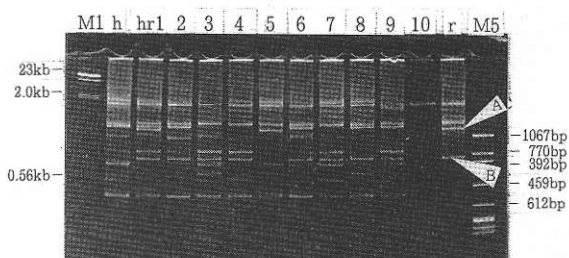


図3 *M. hupehensis*×*M. robusta* の実生 DNA フィンガープリント

注. M1=Marker1, M5=Marker5, h=*M. hupehensis*, r=*M. robusta*, hr=*M. hupehensis*×*M. robusta* 実生