

DNA マーカーのチャ育種への利用に関する研究[†]

田中 淳一

(平成 17 年 12 月 14 日受理)

Study on the Utilization of DNA Markers in Tea Breeding

Junichi TANAKA

Synopsis

For the DNA marker detection system for tea (*Camellia sinensis*), an efficient DNA extraction method and the original 'e-RAPD' system were developed. Maternally inherited RAPDs were then detected using a set of F1 populations derived from reciprocal crosses. In addition, other types of DNA markers were developed, and these markers could be used for genetic diversity evaluation, parentage test and marker-assisted selection.

Key Words : marker-assisted selection (MAS), DNA extraction, maternal inheritance, interspecific hybrid, RAPD, e-RAPD, SSR

目 次	
略語表	114
I 緒 言	114
1 植物としてのチャ	114
2 飲用作物としてのチャの歴史	115
3 現代日本におけるチャの栽培と課題	115
4 チャ育種の現状と問題意識	116
5 主要作物における育種の成果と育種の基本原理	116
6 木本性であるが故の困難さ	116
7 木本性作物育種近代化のためのキーテクノロジー	117
8 DNA マーカーの MAS 以外の育種的利用	117
9 本研究の目的と概要	117
II 珪藻土とスピンフィルターを用いた迅速で広範な植物種に適応可能な DNA 抽出法の開発	118
1 目的	118
2 材料および方法	119
a 植物材料	119
b プロトコル	119
3 結果および考察	120
4 摘要	122
III 不鮮明な RAPD バンドを鮮明なバンドに変換する簡易で強力な e-RAPD 法の開発	122
1 目的	122
2 材料および方法	123
a 植物材料と DNA 抽出	123
b オリジナルの RAPD プライマーと e-RAPD 用プライマーの設計	123
c PCR 条件	123

〒898-0087 鹿児島県枕崎市瀬戸町87

茶業研究部

[†] 本論文は愛媛大学大学院連合農学研究科学学位審査論文を編集・加筆したものである。本論文の一部は、育種学研究3:43-48(2001), Journal of Hort. Sci. & Biotech. 76(5) 557-563(2001), Breed. Sci. 52: 151-155(2002), 農業および園芸77:959-961(2002), Breed. Sci. 52: 225-229(2002), 育種学研究4:215-222(2002), 育種学研究5:149-154(2003)において発表した。

3 結果	124	2 材料および方法	144
4 考察	126	a 植物材料	144
5 摘要	127	b RAPD および e-RAPD の検出	144
IV 正逆交雑集団を用いたチャの母性遺伝 RAPD		c SSR マーカーの検出	145
の検出	127	3 結果および考察	145
1 目的	127	a ‘ 炉開き ’ の雑種性の確認	145
2 材料および方法	128	b ‘ 炉開き ’ の後代の獲得と育種への利用の可能性	147
a 植物材料	128	4 摘要	148
b 実験方法	128	VIII チャ品種 ‘ さやまかおり ’ 由来のクワシロカイ	
3 結果	129	ガラムシ抵抗性に連鎖する DNA マーカーの開発	
4 考察	130	と MAS	149
5 摘要	134	1 目的	149
V RAPD および AFLP によるチャ種遺伝資源		2 材料および方法	149
およびその近縁野生種の遺伝的多様性の評価	134	3 結果および考察	149
1 目的	134	4 摘要	150
2 材料および方法	135	IX 総合考察	150
a 植物材料および DNA の抽出	135	引用文献	152
b RAPD 分析	135	Summary	155
c AFLP 分析	135		
d データ解析	137		
3 結果および考察	137		
4 摘要	138		
VI 耐虫性, 耐寒性チャ品種 ‘ さやまかおり ’ の			
花粉親の検索	138		
1 目的	138		
2 材料および方法	139		
a 供試材料	139		
b DNA 抽出並びに RAPD 分析	139		
3 結果	140		
a 形態的特性による ‘ さやまかおり ’ の花粉			
親のスクリーニング	140		
b スクリーニングされた栄養系による親子鑑定			
.....	140		
4 考察	140		
5 摘要	143		
VII ツバキ園芸品種 ‘ 炉開き ’ がヤブツバキ×チャ			
の種間交雑種であることの RAPD および SSR			
マーカーによる確認とチャ育種への利用の可能性			
.....	143		
1 目的	143		

略 語 表

NaCl-TE	5M NaCl, Tris-HCl(10mM), EDTA(1mM) buffer pH8.0
AFLP	amplified fragment length polymorphism
CAPS	cleaved amplified polymorphism
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide
EDTA	ethylenediamine tetra-acetic acid
e-RAPD	emphasized-RAPD
LOD	logarithm of odds
MAS	marker-assisted selection
PCR	polymerase chain reaction
QTL	quantitative trait loci
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment length polymorphism
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNPs	single nucleotide polymorphisms
SSR	simple sequence repeat
STS	sequence tagged site
TAE	tris-acetate(4mM), EDTA(0.1mM) buffer pH8.0
TE	Tris-HCl(10mM), EDTA(1mM) buffer pH8.0

I 緒 言

1 植物としてのチャ

チャ(*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) はツバキ科ツバキ属に属する中国原産の常緑性の木本である。変種とし

て *var. sinensis* および *var. assamica* が認められており、前者は中国中南部を中心に、後者は中国南部からインドにかけて自生している。紅茶生産で有名なスリランカにはチャの自生は認められていない。*var. sinensis* は、葉が小さく先端は丸くあまり尖らない低木である、耐寒性が強い等の特徴があり、反対に *var. assamica* は葉が大きく先端が尖り、喬木性で耐寒性が弱く、*var. sinensis* に比べて鋸歯が多いことが特徴とされる。中国南部では両者の間の交雑に由来すると思われる中間的な形態も多く存在するが、典型的な *var. sinensis* と典型的な *var. assamica* を比較すると、同種とは思えないほどの形態的相違がある。しかしながら両者の間には明瞭な生殖的隔離はなく自由に交雑できるとともに、その後代も十分な稔性がある。日本在来のチャは葉が小さな耐寒性の強い灌木であり、*var. sinensis* に分類される。台湾山岳部に自生するタイワンヤマチャは葉が大型であり、鋸歯も多いことから、*var. assamica* とされているが、耐寒性は他の *var. assamica* よりも格段に強い他、毛茸がない、茶樹自体が特有の臭いを有する等、際立った特徴がある（武田，2004）。

チャが日本に自生するかどうかは議論があるが、松下（2002）はその著書の結論として、人の手の入っていない山林からはチャが発見できないことから、日本にチャは自生しないとしている。また、DNAマーカーを用いた分析の結果、日本在来のチャは変異の幅が中国のチャと比べてきわめて小さいこと（MATSUMOTO ら，1994；山口ら，1999）から、人が大陸から持ち込んだチャの一部が全国（主に関東地方以南）に広がったものと判断するのが合理的であろう。

2 飲用作物としてのチャの歴史

チャの葉を煎じて飲用にする習慣は中国に起源し、紀元前より多くの記録があり、少なくとも三国時代には庶民の飲用として定着していたと考えられている。16世紀、イギリスが当時植民地であったインドに中国からの種子（*var. sinensis*）を導入し、栽培を始めた。当時は中国風の緑茶の生産であった。1823年にアッサム州で野生の大木（*var. assamica*）が発見され、その後、多くの自生があることが明らかとなり、その種子が茶園の造成に利用されるようになった。また、中国風緑茶より発酵の進んだ紅茶がヨーロッパで人気が高まったことから、インドでの茶生産は徐々に紅茶へと転換した。スリランカにおける紅茶の生産の歴史は比較的新しく、19世紀中頃からである。現在、チャは緑茶や紅茶として中国の

みならず世界中で広く飲用に利用されている。主要な生産国は中国、インド、ケニア、スリランカであり、中国以外の主要生産国では主要な輸出品であり、外貨獲得源となるきわめて重要な作物となっている。

日本におけるチャの歴史をたどると、空海・最澄が中国より種子を持ち帰ったとされるのが記録として残る最初の導入である。しかし、それ以前にすでに導入されていた可能性を否定するものではない。日本で“茶”が飲用として定着するのは、鎌倉時代の僧、栄西が中国よりチャの種子を導入するとともに『喫茶養生記』を記し、“茶”を飲用することの効能を説いた後である。また、安土桃山時代には千利休が現れ、抹茶をたてて飲用する習慣が主に貴族や武士の間に盛んになった。その一方、一般庶民の間ではチャを枝ごと収穫し茹でて火に干したものを煎じて飲用とする、いわゆる日干番茶が徐々に定着した。江戸中期には永谷宗円が蒸した新芽を揉みながら乾かして製造する蒸し製緑茶の製造法を確立し、好評を博した。これが現在の日本の蒸し製緑茶の原点となった。明治に入ると外貨獲得のため政府は殖産興行政策を押し進め、明治期“茶”は生糸と並ぶ重要輸出品となった。当時、輸出品として作られた“茶”は釜炒り茶や紅茶であり、主な輸出先は北米であったが、明治後期には品質問題が浮上し、輸出量は急速に減退した。日本の“茶”の輸出は現在ではごく僅かであるが、国内の緑茶の需要に支えられ、産業として安定した状態を維持している。

一方栽培現場では、チャの栽培が始まって以来、茶園と言えば種子を播いて作られるものであったが、1960年代以降、栄養系品種に急激に置き換わった。これはチャの収穫方法の変化と密接な関係がある。それまでチャの芽は人間の手で収穫されるものであったのが、鋏より大型の機械によって収穫されるようになった。種子を播いて作られるいわゆる実生茶園は各個体、収穫の適期が不均一であり、人間の手による収穫であれば適期が訪れた個体から収穫すればよいが、機械摘採であれば作業効率上、個体ごとに収穫時期を変えることは不可能である。この点、栄養系品種の茶園は摘採期や新芽の熟度が均一で、機械摘採であっても高い品質が維持できる。

3 現代日本におけるチャの栽培と課題

輸入農作物による価格の低下、担い手不足とその高齢化により、日本の多くの農作物が国際競争力を失う中、茶業経営は比較的安定した状態を維持している。これは、蒸し製緑茶に代表される国際的に珍しい製造法や食生活への密着等、日本の茶業の特殊性と、製茶工場・製茶技

術、そして品種等、海外移転に時間がかかる要因を日本の茶業が多く含んでいるためと考えられている。しかし、国際的にも高い価格の日本の茶市場をめざして、東アジアの茶産国では日本からの技術移転や研究開発を進めている。将来にわたり低価格でも安定して高品質の茶を生産できる、そんな産業としての競争力を確保できるかどうか、日本の茶業の存亡がかかっていると言える。

現在の日本の茶業は同時に、窒素肥料の過剰施用による地下水汚染の深刻な問題を抱えている。また、大量の農薬が使用されている現状に対する消費者の目もきびしい。特にクワシロカイガラムシに対しては他の病害虫に対する場合の数倍の薬剤が使用されており、消費者心理への影響のみならず生態系への影響も危惧される。環境負荷の問題は今後の日本の茶業の競争力を足元から大きく揺るがしかねない問題である。

上記、競争力の問題と環境負荷の問題を根本的に解決してゆくためには、育種において品質優良で多収、かつ耐病虫性で吸肥能力の優れた品種を育成してゆけるかどうかが鍵になる。

4 チャ育種の現状と問題意識

日本におけるチャの育種は長い歴史があり、江戸後期には民間育種家により在来茶園からの選抜が開始されている。1932年には国による組織的な交雑育種が開始され、その後、多くの紅茶用、緑茶用品種が育成されてきた。しかしその一方、明治時代に実生茶園から民間育種家によって選抜された一つの栄養系品種‘やぶきた’が品種栽培面積の約85%を占めるという現状がある。実際に‘やぶきた’が普及したのは1970年代以降であった。それまでの実生による萌芽期が不均一で生産性の低い在来茶園が、‘やぶきた’を中心とした萌芽期が均一で生産性の高い栄養系品種茶園へと急激に置き換わった。この時、‘やぶきた’の他にも栄養系品種は存在したが、品質と収量の両面で‘やぶきた’の比較対象ではなかった。やがて‘やぶきた’の名は品種名というよりもブランドとして知られるようになった。最近になって、‘さえみどり’（武田ら、1991）、‘山の息吹’（倉貫ら、1997）、‘りょうふう’（近藤ら、1999）、‘さきみどり’（古野ら、1999）、‘香駿’（中村ら、1999）、‘はるみどり’（武田ら、2002）、‘そうふう’（近藤ら、2003）、‘つゆひかり’（小柳津ら、2003）等の優良な品種が育成されるようになったが、‘やぶきた’の名はすでにブランド名としての地位を確立しており、これらの品種が‘やぶきた’のブランド名を覆すほどのアドバンテージがあるとは現時

点では考えにくい。今後、‘やぶきた’のブランド名を突き崩す品種を育成してゆくためには、育種の基本原理に帰って戦略を練り直す必要がある。

5 主要作物における育種の成果と育種の基本原理

この百年ほどの間に世界の主要作物の収量は軒並み2倍以上の増加を実現し、人口が増加し続ける世界の食糧を支えてきた。その間、草型や肥料に対する反応等、主要作物は形態的、生理的に劇的に改変された。50年前の品種では今日の地球の人口は到底支えきれない。育種が20世紀の主要作物の劇的な収量増の主要な立て役者であることは議論の余地がないであろう。確かに主要作物は草本であり、チャは木本である。しかしそこには育種を成功させるためのヒントや育種の基本原理があり、それを学び取り育種戦略の基礎に据える必要がある。主要作物の育種の成果はなにも収量だけに限られたことではない。耐病性や耐虫性、不良環境適応性等の収量の安定性、収穫物の成分含有量、品質等においても著しい改善がなされてきた。このような著しい改善はどのようにしてなされてきたのであろうか。イリノイ大学の DUDLEY ら（1992）はトウモロコシの含油量やタンパク含量について90世代にもわたり選抜を繰り返すという実験結果を報告している。90世代の間に低含油量の選抜実験においては当初4%台であった含油量はほとんど0%となった。一方、高含油量の選抜実験においては、約20%に達し、90世代を経た後でも増加傾向にある。これらの実験は遺伝的組換えを伴う世代を繰り返しながら適切な淘汰圧を加えることが、大幅かつ持続的に作物の形質を改変し得ることを示している。『遺伝的組換えを伴う世代の回転』そしてその間の『適切な淘汰圧』が育種のキーであり、育種の進捗状況を示すパラメーターでもある。

6 木本性であるが故の困難さ

木本性作物は文字通り“木”であり、ライフサイクルが長く、開花結実までに長期間を要する。また一般に草本と比べて生育が遅く、チャのように収穫対象が果実でない場合でも、収穫開始までの期間も当然長くなる。

このような作物の交雑育種では、人為交雑等により得られた種子を播種した後、数年～数十年間かけて養成し、各個体の生育の良否や収穫物の品質等の形質を評価した上で、優秀性が確認されたものを系統比較、系統適応性検定試験を経て品種（栄養系品種）とするのが一般的である。多くの場合、この品種が交配母樹園に定植養成さ

れ、数年～数十年後以降、交配に使用され、次の世代が展開されることになる。遺伝的組換えを伴う世代を1回転させるには数十年を要し、この間の適切な淘汰圧も集団としてみれば1回加えられるに過ぎない。

『遺伝的組換えを伴う世代の回転』そしてその間の『適切な淘汰圧』という視点から見れば、木本性であるが故の育種の困難さは、

- (1) 世代の回転に長期間を要する
- (2) 適切な淘汰圧を加えるための形質評価が可能になるまでに長い年月を要する

この2点に集約される。木本性作物はまだ、世代の回転と淘汰を基礎とする近代育種の恩恵に浴していないと言える。

7 木本性作物育種近代化のためのキーテクノロジー

上記2点の木本性作物育種の困難性は克服し得ないものだろうか。上記『(1) 世代の回転に長期間を要する』という問題に対して、世代の回転を早めること、つまり世代促進は木本性作物育種の効率化の絶対条件である。一部の木本性作物では接木、冬期の加温、化学物質の処理等の技術で2～4年で1世代回転させることは技術的には可能である。世代促進が可能な作物を増やすことや、世代の回転に必要な年月の更なる短縮は必要不可欠である。しかし実際には、世代促進が可能な木本性作物においても、1世代を数年で回転させることは現在までのところ特殊な目的に限られており、木本性作物の育種で数年1世代という例はほとんどない。つまり、技術的には世代促進が可能であっても、どの個体の世代を促進する価値があるのか判断できなければ、実際には現行の育種どおり長期間を要する形質評価を待たなければならず、その後次の世代を回転させる準備をすることになってしまう。特に木本性作物を世代促進する場合、極めて小さな個体（幼木）や小枝に開花結実させるので、評価可能な実用形質は極めて限定的にならざるを得ない。世代促進技術だけで、上記『(2) 適切な淘汰圧を加えるための形質評価が可能になるまでに長い年月を要する』という問題が解決できなくては、どの個体を世代促進の対象とすべきかが判断できず、世代の回転と淘汰を基礎とする近代育種の恩恵を得ることはできない。

一部の耐病性等の形質については、生育の初期に適切な評価を下すことは木本性作物においても可能である。しかしほとんどの重要形質については、長期間をかけて調査を行っても、環境の不均一に由来する誤差のうえに、

木本であるが故の反復数の不足が重なり正確な評価ができるとは限らない。本質的に誤差を含む表現型の調査において反復数が確保できないことは致命的とも言える。一方、DNAマーカーを用いれば遺伝子型を推定することにより生育のごく初期に評価できる。DNAマーカーによる選抜MASは現在主に北米における主要作物育種の場面に急速に普及しつつあるが、表現型の評価が困難な木本性作物におけるその効果は主要作物以上のものがある。もちろんDNAマーカーによる選抜が可能な形質は現在のところ限られた形質であるが、木本性作物育種の近代化を実現するための絶好の手法と言える。

8 DNAマーカーのMAS以外の育種利用

DNAマーカーは遺伝的多様性の調査や親子鑑定にも効果的である。特に育種による遺伝子の集積が進んでいない作物の育種においては、その作物の遺伝資源や交配母本がいかなる遺伝的背景をもつ素材であるかを知ることが育種戦略上きわめて重要である。DNAマーカーは集団や各品種・系統・個体の遺伝的背景を忠実に反映することが期待できる有用性がある。また、ある程度育種の進んだ他殖性作物においても近親交雑による弱勢を避けるため、品種間の親子関係を把握しておくことは育種の基本である。DNAマーカーは特定の座の塩基配列の違いを可視化したものであるとも換言でき、そのマーカーの座のアレルとその遺伝を正確に知ることができ、親子鑑定のための極めて有用なツールである。

9 本研究の目的と概要

本研究の最終的な目標は、チャにおいてMASを実現し世代促進技術と組み合わせることによりチャ育種、そして木本性作物育種の近代化へ大きく貢献することに置いている。また、その過程で得られるDNAマーカーは、遺伝的多様性の評価、親子鑑定、品種鑑定等、MAS以外でも様々な育種利用が可能である。DNAマーカーの検出にはまず、効率的なDNAの抽出法が必要になるが、チャはカテキン等のポリフェノール類や多糖類を多く含み、高品質のDNAを抽出するためには高価なキットを使用するか煩雑な操作と時間が必要であった。この問題を解決するために近年大腸菌からのプラスミド抽出に頻用されるようになった珪藻土を用いた効率的なDNA抽出法を開発した(第2章)。次に、DNAマーカーとして植物でよく利用されているRAPD(WILLIAMSら、1990)は再現性や信頼性の点で問題があった。この問題を解決するために特定のバンドを容易に鮮明で安定なメ

ジャーバンド (e-RAPD) に変換し、バックグラウンドバンドを消去する方法を開発した (第3章)。これにより有用な形質に連鎖したマイナーな RAPD バンドが見出された場合、これを e-RAPD に変換し、安定して MAS に利用することを可能にした。更に正逆交雑集団を用いて母性遺伝する RAPD を見出した (第4章)。これによりチャの細胞質の類型化が可能になり、育種における細胞質の多様性の確保への重要なツールを得た。なお、“母性遺伝”という言葉には『核内の遺伝子によって産生された物質が細胞質に貯えられ、それが母親の卵を通じて子に伝わり、子の形質として現れる現象』という定義と、『父親からは遺伝せず、母親側からのみ遺伝する。(反意語：父性遺伝)』という定義があるが、本論文では後者の定義で用いている。次に DNA マーカーによるチャの遺伝資源の多様性の評価を行い、各国のチャがどれほどの多様性があるのか、そしてそれらの類縁関係について評価を行った (第5章)。また、チャ育種においてきわめて重要な育種素材である‘さやまかおり’の花粉親の検索 (第6章)、そしてチャとユキツバキの自然交雑に由来すると考えられているツバキ園芸品種‘炉開き’についての親子鑑定を実施した (第7章)。また、クワシロカイガラムシ抵抗性を選抜できる DNA マーカーを開発した (第8章)。このように DNA マーカーは育種的に実に多くの情報を提供する。しかし、QTL の検出やその連鎖マーカーについて極めて多くの報告があるにも関わらず、実際に MAS が行われている事例は非常に少ない。最終章の総合考察では、これら DNA マーカーの有用性を再確認するとともに、連鎖マーカーの獲得と実用的な MAS の間の“見えないハードル”について検証し、チャ育種の近代化のための残された課題について考察する。

著者が本論文を取りまとめるにあたり、まず構成論文の共著者の方々へ謝意を表したい。中でも現野菜茶業研究所茶業研究官、元同部育種素材開発チーム長の武田善行博士からはチャ育種の先輩の立場から多くの貴重なご助言をいただき、現在に至っている。太田 (目徳) さくら女史は、本論文の骨子に関わる初期の実験を時にアシスタントとして、時に共同研究者として精力的に遂行してくださった。学生時代からお世話になっている香川大学遺伝子実験施設の池田滋先生はいつも新しい知識を与え、著者の知的好奇心を刺激し続けていただき、現在に至っている。また、宮崎県総合農業試験場茶業支場の水田隆史博士には、クワシロカイガラムシ抵抗性の評価で多大なる協力をいただいた。そして、著者のアシスタン

トや圃場における技術専門職として、実験をともに遂行していただいた多くの方々の協力の上に、本論文は成り立っていることも忘れてはならない。特に岩田美和女史は長きにわたり献身的に著者を支えてくださり、現在に至っている。ここに感謝の意を表す。また、愛媛大学農学部山口聡助教授には著者が野菜・茶業試験場 (金谷) に在籍した時代から今日に至るまで、職場の研究室長として、また少し離れた視点から、何度も貴重なご助言や実に時を得た激励を受けてきた。また著者の家族は、帰りが遅い著者をいつもしっかりと支えてくれた。最後に香川大学農学部長の一井眞比古教授は、学生時代から多くの叱咤激励を通じて私に多くの成長の機会を与えてくださった。ここに深く感謝の意を表す。

科学は人類共通の利益のための活動である、というのが著者の持論である。お世話になったことへの研究者としての恩返しは、研究成果で社会へ貢献することにより果たされると理解している。著者の今後の目標としたい。

Ⅱ 珪藻土とスピンフィルターを用いた迅速で広範な植物種に適応可能な DNA 抽出法の開発

1 目 的

ゲノムライブラリーの構築、サザン分析、Long-PCR 等、分子生物学的実験において高品質な DNA の抽出は避けて通れない。CTAB 法 (MURRAY ら, 1980) は植物からの DNA の抽出に最も一般的に用いられてきた。CTAB 法で得られる DNA は極めて純度が高いが、全工程を終了するのに長い時間を要し、植物種によっては抽出がうまくゆかない問題点があった。抽出の困難な植物のための改変法 (WAGNER ら, 1987) もあるが、多くの行程が必要であり、より長い時間を要する。一方、育種現場における DNA マーカーによる選抜 (MAS) の実用化のためには、簡便迅速で安全かつ安価な DNA 抽出法が不可欠である。多くの農業上重要な形質に連鎖する DNA マーカーが得られているが、実際に MAS に使用されているものは極めて少ない。この最大の理由は、各サンプルから DNA を抽出し DNA マーカーを検出するのに比べて、表現型による選抜の方が、安価で、安全で、より簡単に多くのサンプルを選抜できるからに他ならない。MAS の実現のため、PCR の鋳型としての DNA のきわめて簡便な抽出法 (Liu ら, 1995; 池田ら, 2000) が開発・利用されているが、特に多糖やポリフェノール類の多い植物種には不向きであり、PCR の結果が安定せず、

DNA の保存がきかない等の問題がある．植物 DNA 専用の抽出キットも販売されているが，1 検体あたりの抽出コストが高く，多検体を対象とする場合には費用がかさむ．ここでは，植物からの高品質な DNA を短時間に抽出する方法を詳述する．

チャで MAS を実現するための実用的な DNA 抽出法として本方法を設計するにあたり，以下の 2 つのコンセプトが必要と考えた．(1) 抽出に手間がかからず多くのサンプルを短時間に処理でき，(2) 抽出コストが安いことである．CTAB 法では遠心分離によるペレットを溶解するのに長い時間がかかるため，ペレットをつくらない珪藻土とスピンフィルターを利用することが最も効果的と考えた．珪藻土とスピンフィルターは大腸菌からのプラスミド抽出キットを流用すればコストもさほどかからない．次に，組織の破碎の後，珪藻土に吸着させるまでにある程度の精製が必要である．有機溶媒による除タンパクが一般的であるが，有機溶媒は毒性が強い問題があった．そこでクロロフォルムやフェノールを使わない植物からの DNA 抽出法(MARECHAL-DROUARD ら，1995) で用いられる塩析による除タンパクを採用した．

2 材料および方法

a 植物材料

Table1 に記した 48 種の植物の葉を実験に供試した．

b プロトコル

下記のプロトコルに従い DNA を抽出した．

1) 準備すべき試薬類

A) DNA 抽出バッファー

DNA 抽出バッファーの組成は 500mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH8.0, 300mM NaCl, 8% (v/v) SDS, 1 μ g/l of RNaseA および 0.2% s-mercaptoethanol である．1M Tris-HCl pH8.0, 0.5M EDTA および 5 M NaCl の 3 種類のストック溶液を準備し，50ml の 1M Tris-HCl pH8.0 と 10ml の 0.5M EDTA を混合しこれに 8g の SDS を溶解する．SDS が完全に溶解した後，6ml の 5M NaCl を加える．一時的に沈澱が生じるが，これを完全に溶解し，100ml にメスアップする．必要に応じて RNaseA およびメルカプトエタノールを加えて調製する．

B) 4M potassium acetate pH4.8

23.55g の酢酸ナトリウムを 66ml の水に溶解する．28.5ml の氷酢酸を加え，濃塩酸で pH を 4.8 にあわせ

Table 1. Performance of the DNA extraction method using diatomaceous earth and a spin filter

Scientific name	Common name
Plant species to which this method could be successfully applied	
<i>Equisetum arvense</i>	field horsetail
<i>Athyrium niponicum</i>	Japanese painted fern
<i>Cycas revoluta</i>	Japanese sago palm
<i>Ginkgo biloba</i>	ginkgo
<i>Laurus nobilis</i>	laurel
<i>Camellia sinensis</i>	tea
<i>Camellia chrysantha</i>	yellow camellia
<i>Camellia japonica</i>	camellia
<i>Brassica oleracea</i>	broccoli
<i>Eruca sativa</i>	arugula
<i>Lobularia maritima</i>	sweet alyssum
<i>Luffa cylindrica</i>	sponge gourd
<i>Hydrangea macrophylla</i>	hydrangea
<i>Prunus persica</i>	peach
<i>Prunus mume</i>	Japanese apricot
<i>Trifolium repens</i>	clover
<i>Glycine max</i>	soybean
<i>Citrus natsudaidai</i>	natsumikan
<i>Oxalis corniculata</i>	yellow oxalis
<i>Sapium sebiferum</i>	Chinese tallow tree
<i>Ficus benjamina</i>	benjamin fig
<i>Portulaca oleracea</i>	summer purslane
<i>Ipomoea batatas</i>	sweet potato
<i>Pharbitis nil</i>	morning glory
<i>Quamoclit pennata</i>	star-glory
<i>Phlox subulata</i>	moss phlox
<i>Lycopersicon esculentum</i>	tomato
<i>Ocimum basilicum</i>	sweet basil
<i>Perilla frutescens</i>	perilla
<i>Coffea arabica</i>	coffee
<i>Tagetes patula</i>	marigold
<i>Artemisia princeps</i>	mugwort
<i>Erigeron canadensis</i>	horseweed
<i>Solidago altissima</i>	tall goldenrod
<i>Commelina communis</i>	common spiderwort
<i>Musa cross paradisiaca</i>	banana
<i>Crocsmia crocosmiflora</i>	montbretia
<i>Chlorophytum comosum</i>	spider plant
<i>Epipremnum aureum</i>	golden pothos
<i>Cymbidium goeringii</i>	
<i>Oryza sativa</i>	rice
<i>Sorghum vulgare</i>	sorghum
<i>Digitaria ciliaris</i>	
<i>Miscanthus floridulus</i>	giant silver grass
Plant species to which this method could not be applied	
<i>Feijoa sellowiana</i>	feijoa
<i>Podocarpus macrophyllus</i>	Japanese yew
<i>Fragaria ananassa</i>	strawberry
<i>Actinidia deliciosa</i>	kiwi fruit

た後，100ml にメスアップ．

C) 8M グアニジン塩酸塩溶液 (Wako 071-02891)

D) スピンフィルター

Quantum Prep Mini Spin Filters (BioRad 732-6027)

E) 珪藻土懸濁液

Quantum Prep Matrix (BioRad 732-6110)

F) 洗浄液

Quantum Prep Wash Buffer (BioRad 732-6024) に等量のエタノールを混和.

G) TE

Quantum Prep Miniprep Kit (BioRad 732-6100) は D) Quantum Prep Mini Spin Filters, E) Quantum Prep Matrix および F) Quantum Prep Wash Buffer を含む.

2) 手順

抽出は以下の手順で行った.

1) 乳鉢で液体窒素を用いて 50~200mg の植物組織を粉末状にする^{a)}.

2) 500 μ l の抽出緩衝液を 65℃ に暖めておき, 粉末状にした植物組織を冷却した葉さじを用いて緩衝液に加えてよく混和する.

3) 65℃ にて 15 分間インキュベートする^{b)}.

4) 12,000x g, 室温にて 10 分間遠心分離する.

5) 上清約 350 μ l を新しいマイクロチューブに移す^{c)}.

6) 0.45 量の 4M 酢酸カリウム pH4.8 を加え緩やかかつ十分に混和する.

7) 氷上で 30 分間放置する.

8) 12,000x g, 4℃ にて 20 分間遠心分離する.

9) スピンフィルターを 2ml マイクロチューブにセットし, 上層約 400 μ l をスピンフィルター上に移す^{c)}.

10) 0.6 量の 8M グアニジン塩酸塩溶液を加える.

11) 0.4 量の珪藻土懸濁液を加えた後, 十分に混和する.

12) 2ml マイクロチューブとスピンフィルターを 12,000x g 室温にて 30 秒遠心分離した後^{d)}, 2ml マイクロチューブに溶出された廃液を捨てる.

13) スピンフィルターをもとの 2ml マイクロチューブに戻し, 500 μ l の洗浄液をスピンフィルターに加え, 12,000x g 室温にて 1 分間遠心分離した後, 2ml マイクロチューブに溶出された廃液を捨てる.

14) ステップ13)を, 遠心時間を2分に伸ばして繰り返す^{e)}.

15) スピンフィルターを新しい 1.5ml マイクロチューブに移す.

16) 100 μ l の TE または滅菌水をスピンフィルターに加え^{f)}, 緩やかに混和して珪藻土を完全に再懸濁させる.

17) 1.5ml マイクロチューブとスピンフィルターを

12,000x g 室温にて 1 分間遠心分離し, 溶出した DNA 溶液を回収する.

ノートおよびトラブルシューティング

サンプルにより, 4) から 6) のステップは 0.45 量の 4M 酢酸カリウム pH 4.8 を加えて完全に混和するだけで工程を簡便化できる. この簡便化はチャ, キンカチャ, ツバキ, イネおよびソルガムの葉からの DNA 抽出において有効であったが, ダイズおよびシロツメクサの葉からの DNA 抽出には適用できなかった.

a) DNA の品質に神経質になる必要がない実験では, 液体窒素を用いず, 抽出緩衝液とともにサンプルをすり潰しても良い.

b) インキュベーション後のサンプルは -20℃ で少なくとも 1 年間保存可能である.

c) 上層の回収の際, できるだけ下層が混入しないようにする. 上層の容量が不足する場合は, 緩衝液を追加して再度抽出すると良い.

d) 遠心時間を 2~3 分に伸ばしてもスピンフィルター上に液体が残る場合は, スピンフィルターを交換し, 再度遠心分離することで解決する場合がある.

e) 珪藻土がきれいな白色になるまで繰り返す. チャの葉からの DNA 抽出では洗浄液による洗浄は通常 2 回である.

f) 加える TE または滅菌水は 65℃ に暖めておいた方が DNA の回収率が良い.

3 結果および考察

新鮮重 200mg チャの葉より 7~30 μ g の DNA が得られ, その OD260/OD280 比は 1.70~1.82 であった. 得られた DNA は long-PCR, 制限分解, 制限分解産物へのアダプターのライゲーション, PCR ベースの DNA マーカーの検出等に問題なく使用でき, 長期間の保存にも耐える品質であった (Fig.1 a, b, c). また, 約 2000 のチャの葉のサンプルより, 本方法で DNA 抽出を行い, MAS 等に用いたが, RAPD 等, PCR ベースの DNA マーカー検出に問題がある DNA サンプルが得られた例はほとんど皆無であった (Fig.1 d).

本方法を用いて, DNA 抽出が困難な植物種を多く含む 48 の植物種 (Table 1) からの DNA 抽出を試みた. その結果, オランダイチゴ, イヌマキ, フェイジョア, キウイフルーツを除く 44 の植物種から問題なく DNA が得られ, 得られたすべての DNA サンプルは RAPD の検出に問題なく使用できた. Fig.2 にその結果の一部を示

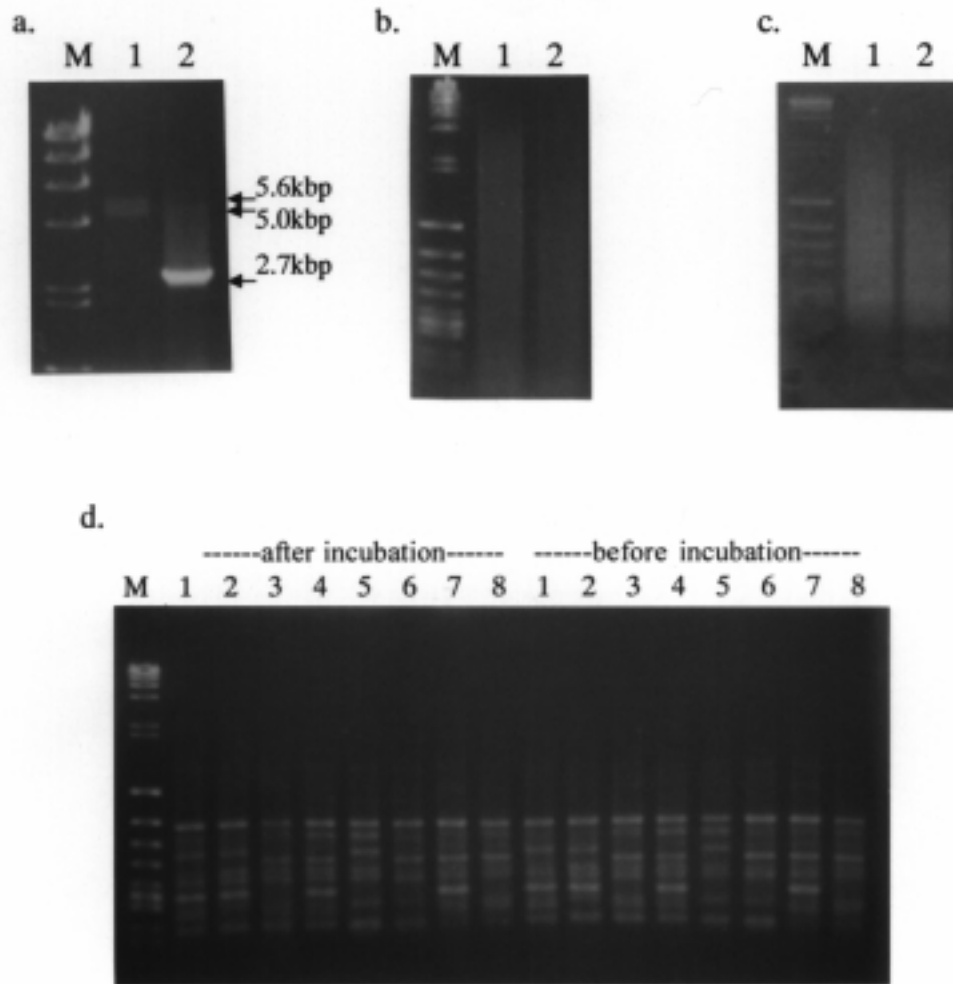


Fig. 1 Quality of extracted DNA samples using diatomaceous earth and a spin filter from tea leaves.

M: DNA size marker (Mixture of λ HindIII digest and ϕ X174/*Hinc*II digest)

a: Results of electrophoresis of long-PCR products using the extracted DNA as a template. 1: amplified fragments (5.6 and 5.0kb) of dihydroflavonol 4-reductase gene including the introns, 2: amplified fragment (2.7kb) of sequence-tagged site.

b: Results of electrophoresis of the extracted DNA digested with restriction enzymes. 1: *Hinc*II, 2: *Sau*3AI.

c: *Hinc*II or *Sau*3AI digest of the extracted DNA was ligated with *Hinc*II or *Sau*3AI adapter, respectively. Results of electrophoresis of PCR products using the ligation products of *Hinc*II (lane 1) or *Sau*3AI (lane 2) adapter as a template.

d: Effect of incubation on the quality of the extracted DNAs. Results of electrophoresis of products of RAPD analysis of 8 different individuals (1-8) in a segregating population before or after incubation of the extracted DNAs for one month at room temperature

す。

当方法は以下の利点がある。(1)得られるDNAが種々の実験や長期保存に耐え得る品質である,(2)遠心分離によるペレットを溶解する工程がないため迅速である,

(3)一般的なプラスミド抽出キットに近い費用で抽出可能である,(4)クロロフォルムやフェノール等の危険な有機溶媒を使用しない,これらの特性により,本方法はDNA抽出が困難な植物種における分子生物学実験を容

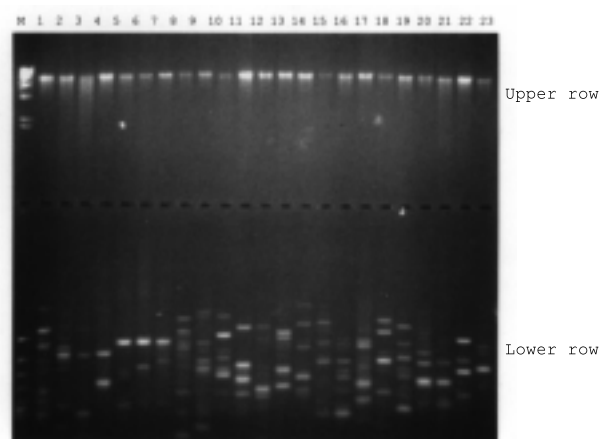


Fig. 2 Results of electrophoresis of DNA extracted from plant species using diatomaceous earth and a spin filter (upper row) and RAPD PCR products generated with the extracted DNA (bottom row).

M: DNA size marker (upper row: λ HindIII digest, bottom row: ϕ X174/HincII digest), 1: field horse tail (*Equisetum arvense*), 2: Japanese painted fern (*Athyrium niponicum*), 3: Japanese sago palm (*Cycas revoluta*), 4: laurel (*Laurus nobilis*), 5: tea (*Camellia sinensis*), 6: yellow camellia (*Camellia chrysantha*), 7: camellia (*Camellia japonica*), 8: broccoli (*Brassica oleracea*), 9: hydrangea (*Hydrangea macrophylla*), 10: peach (*Prunus persica*), 11: clover (*Trifolium repens*), 12: soybean (*Glycine max*), 13: natsumikan (*Citrus natsudaidai*), 14: Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum*), 15: morning glory (*Pharbitis nil*), 16: star-glory (*Quamoclit pennata*), 17: moss phlox (*Phlox subulata*), 18: tomato (*Lycopersicon esculentum*), 19: coffee (*Coffea arabica*), 20: marigold (*Tagetes patula*), 21: montbretia (*Crocsmia crocosmiiflora*), 22: rice (*Oryza sativa*), 23: sorghum (*Sorghum vulgare*).

易にするにとどまらず、多くの作物においてDNAマーカー選抜を実用化する上でも有効である。

野菜茶業研究所茶業研究部育種素材開発チームでは、以前は改変 CTAB 法が用いられてきた。この改変 CTAB 法や MARECHAL-DROUARD ら (1995) の方法では金花茶 (*C. chrysantha*) やヤブツバキ (*C. japonica*) から DNA を抽出することができなかったが、本 DNA 抽出法は有効であった。また、同チームでは、チャの MAS についてこれまで約 2000 のサンプルより当方法を用いて DNA 抽出を行ってきたが、ほとんど全てのサンプルが DNA マーカーの検出に問題なく使用できた。

従来の改変 CTAB 法では、高品質のチャの DNA を抽出するのに 2~3 日を要していた。特に遠心分離による

DNA のペレットを完全に溶解するのに半日以上を要していた。本 DNA 抽出法は DNA のペレットを溶解するステップを行わないことで、大幅な時間短縮を実現した。本方法を用いれば、チャのような DNA 抽出が困難な植物種においてもサンプリングから DNA の抽出を経て PCR ベースの DNA マーカーの検出まで 1 日の間に終了させることができ、MAS の実用化に大きく寄与した。

本 DNA 抽出法は DNA 抽出が困難な植物種においても、分子生物学実験や MAS のためのハイスループットな DNA マーカー検出に有効である。

4 摘 要

分子生物学の実験において高品質な DNA の抽出は避けて通れない。一方、育種現場における DNA マーカーを用いた選抜の実用化のためには、簡便迅速で安全かつ安価な DNA 抽出法が不可欠である。本報は珪藻土とスピンフィルターを用いた汎用性の高い植物 DNA 抽出法の詳述である。本方法により得られたチャの DNA は Long-PCR、制限分解、その後のアダプターの連結、それを鋳型にした PCR に使用でき、かつ長時間の保存にも耐え得る品質であった。また、チャやツバキ等、DNA 抽出が困難な植物種を含む 48 の植物種の葉を対象に、本方法による抽出実験を行った結果、44 の植物種より分解の少ない DNA サンプルが得られ、得られたすべての DNA サンプルは RAPD の検出に問題なく使用することができた。本方法には以下の利点がある。(1) 得られる DNA が種々の実験や長期保存に耐え得る品質である、(2) 遠心分離によるペレットを溶解する工程がないため迅速である、(3) 一般的なプラスミド抽出キットに近い費用で抽出可能である、(4) クロロフォルムやフェノール等の危険な有機溶媒を使用しない、これらの特性により、本方法は DNA 抽出が困難な植物種における分子生物学実験を容易にするにとどまらず、多くの作物において DNA マーカー選抜を実用化する上で有効である。

Ⅲ 不鮮明な RAPD バンドを鮮明なバンドに変換する簡易で強力な e-RAPD 法の開発

1 目 的

育種現場で実用的に使用できる MAS を確立するためには目的形質に密接に連鎖し、アレル特異性が高く、検出が容易な鮮明な DNA マーカーが必要である。目的とする形質に密接に連鎖したマーカーを得るには連鎖地図

上のマーカーの密度が重要である。AFLP や RAPD 等の優性マーカーは、共優性のマーカーに比べて安価かつ容易に数多くのマーカーが得られるので、選抜用マーカーの開発を目的とした連鎖地図の作成に多く用いられてきた。しかし、AFLP マーカーをそのまま MAS に使用することは実用的とはいえず、STS 化のプロセスが必要になる。しかし、実際には AFLP バンドの DNA 量は微量であり、その STS 化は容易ではない。一方、RAPD バンドは、鮮明で再現性の高いバンドであればそのまま MAS に使用可能な場合もあるが、不鮮明ないわゆるマイナーバンドの場合は、再現性と信頼性に問題を残すこととなる。このような場合、やはり STS 化が不可欠であるが、AFLP のバンドと同様、DNA が微量であり AFLP 同様やはり容易ではない。ターゲットバンドをクローニングして塩基配列を決めても、その配列をプライマーに用いた PCR、さらにその配列中に多型が検出できない場合、本来目的としていたバンド以外の配列をクローニングしてしまっている場合もあり、選抜用マーカーの開発は容易ではない。マイナーバンドを鮮明にし、バックグラウンドとなるバンドを消去できれば直接 MAS に使用することが可能であるとともに STS 化も容易になる。ここに容易かつ短時間で不鮮明な RAPD バンドを鮮明なバンドに変換し、バックグラウンドバンドを生じさせない方法について詳述する。

2 材料および方法

a 植物材料と DNA 抽出

チャ栄養系品種‘さやまかおり’を親品種 A として、栄養系統‘金-Ck17’を親品種 B として使用した。親品

種 A と親品種 B の正逆交雑に由来する F_1 集団を pseudo-testcross (GRATTAPAGLIA ら, 1994) 分離集団として用いた。親品種および集団を構成する各系統の成葉をサンプリングし、DNA を抽出した。DNA 抽出は第 2 章に記述の方法を用いた。

b オリジナルの RAPD プライマーと e-RAPD 用プライマーの設計

オリジナルの RAPD プライマーとして OPU-06 (塩基配列: ACCTTTGCGG) (Operon, Alameda, CA) を使用した。e-RAPD バンドを得るためにオリジナルプライマーの 3' 末端に A, T, G または C を付加した配列のオリゴマーを合成し使用した。オリジナルの RAPD プライマーが 10 塩基長であるので、e-RAPD 用のプライマーは 11 塩基長となる。e-RAPD 用のプライマーはそれぞれ + A (塩基配列: ACCTTTGCGGA), + T (塩基配列: ACCTTTGCGGT), + G (塩基配列: ACCTTTGCGGG) および + C (塩基配列: ACCTTTGCGGC) プライマーと定義した。同様に + G プライマーの 3' 末端に 1 ヌクレオチド (A, T, G または C) を更に付加したプライマーを合成し、それぞれ + GA (塩基配列: ACC TTTGCGGGA), + GT (塩基配列: ACCTTTGCGGGT), + GG (塩基配列: ACCTTTGCGGGG) and + GT (塩基配列: ACCTTTGCGGGC) と定義した。

c PCR 条件

PCR は反応溶液量 $10 \mu\text{l}$, 0.5 units の Ampli-Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Branchburg NJ, USA), 2.5mM MgCl_2 , それぞれ 0.125mM の dNTP, 2 ng/ μl

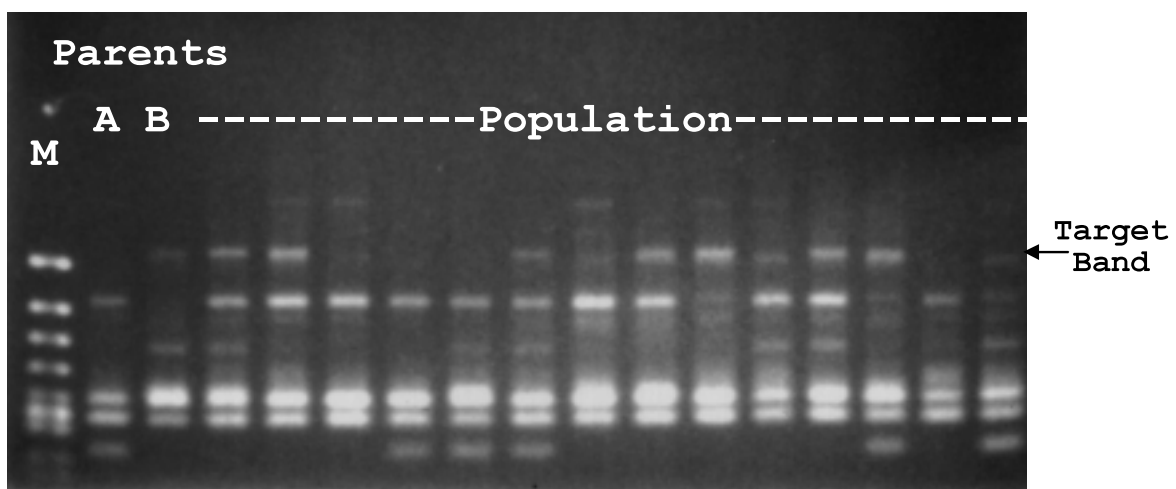


Fig. 3 Original RAPD patterns in the F_1 segregating population of tea.
M: DNA size marker (ϕ X174/*Hinc*II digest).

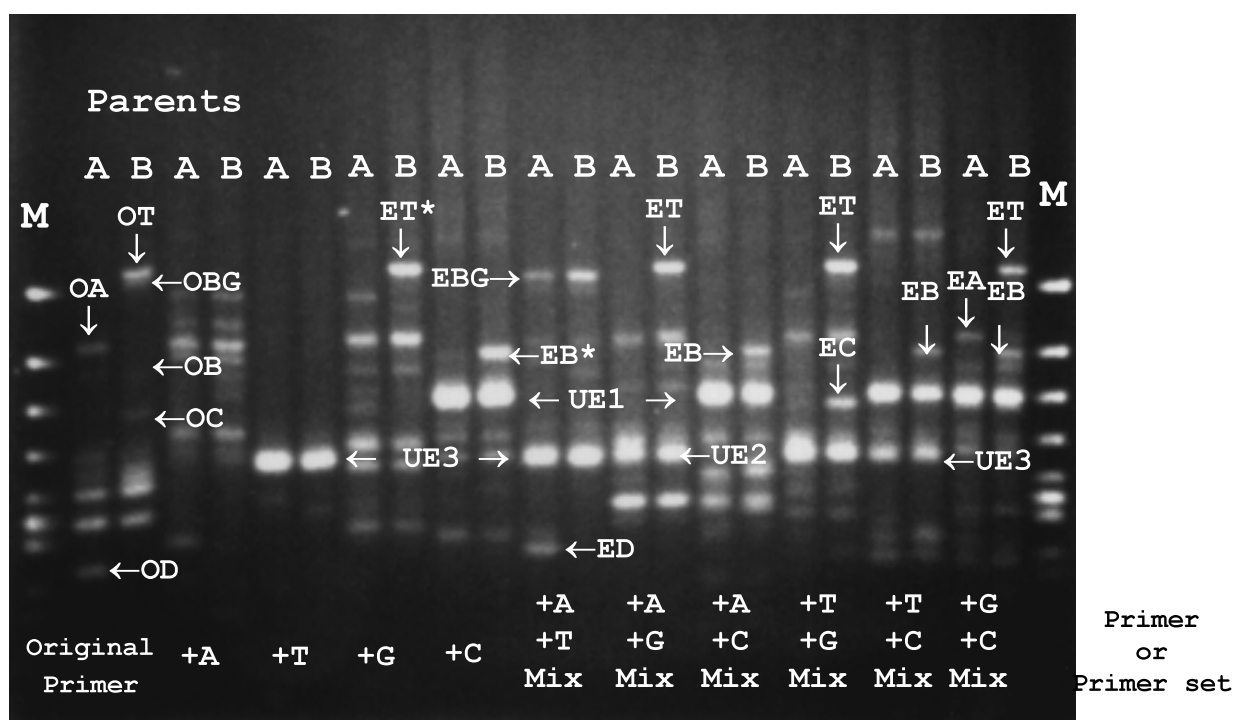


Fig. 4 Electropherogram of PCR products used for the search for e-RAPD.

M: DNA size marker (ϕ X174/*HincII* digest), OT: original target band, ET: emphasized target band, OX: original polymorphic band X, EX: emphasized polymorphic band X, UE1-3: bands that unexpectedly became very clear.

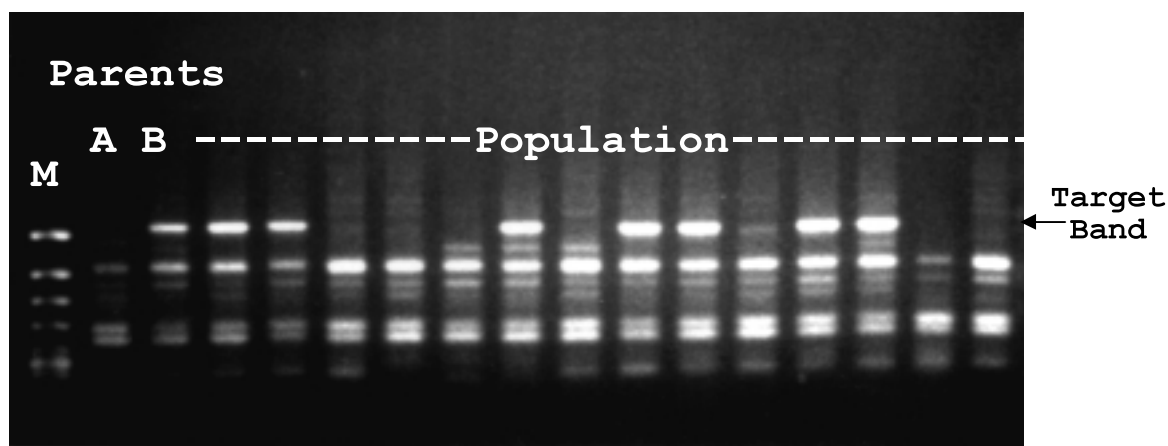


Fig. 5 RAPD pattern obtained by using the +G e-RAPD primer in the F_1 segregating population of tea.

M: DNA size marker (ϕ X174/*HincII* digest).

の鋳型 DNA および $2 \mu\text{M}$ プライマー DNA の条件で実施した。温度条件は熱変性が 93°C で 1 分、アニーリングが 42°C で 1 分 30 秒、鎖伸長が 72°C で 1 分で 40 サイクル行った。熱変性を完全にするために温度サイクルの前に 93°C で 5 分間、温度サイクルの後に鎖伸長反応を完全にして完全な 2 本鎖にするために 72°C で 10 分間の反応を行った。

3 結 果

チャの F_1 分離集団におけるオリジナルのプライマーを用いた RAPD の分離を Fig.3 に示す。矢印はターゲットバンドを示す。このバンドは不鮮明な上にバックグラウンドとなるバンドも存在した。このターゲットバンドをより鮮明にし、バックグラウンドバンドを消去で

Table 2. Emphasis and elimination of RAPD bands by using the e-RAPD technique

Band name in Figure 2.	Estimated band size(bp)	Accession number of sequence	Polymorphism and band origin	Primers or primer sets for the search for the e-RAPD band											
				Original primer	+ A	+ T	+ G	+ C	+ A/ + T	+ A/ + G	+ A/ + C	+ T/ + G	+ T/ + C	+ G/ + C	
T (target)	1120	AB085608	B	+			++			++		++		+	
BG (background)	1110		B	+					+						
A	800		A	+										+	
B	760		B	±				++			+		+	+	
UE1	610	AB085607	Non-poly morphic	?				+++			+++		++	++	
C	580		B	+								+			
UE2	375		Non-poly morphic	±						+++					
UE3	370		Non-poly morphic	±		+++			+++			+++	+		
D	190		A	+					+						

-, ±, +, ++ and +++ indicate the absence or presence and the strength of the band where. -: band was not observed, ±: faint band was observed, +: band was observed, ++: clear band was observed, +++: very clear band was observed.
*:Polymorphism was lost by using a mixture of +A and +T primers.

きる e-RAPD 用のプライマーまたはその組み合わせを検索した。すなわち、オリジナルプライマー、4 種類の 3' 側に 1 ヌクレオチドを付加したプライマー(+ A, + T, + G または + C primer)およびそれらのうち 2 種類のプライマーの混合で PCR を行い、オリジナルのターゲットバンドがどのプライマーまたはその組み合わせでより鮮明に検出できるかを調査した。Fig.4 に e-RAPD 検索の電気泳動像を示す。Table 2 は Fig.4 のバンドの有無と配列のアクセションナンバーを整理したものである。Fig.4 中の 'OT' はオリジナルのターゲットバンドを示している。オリジナルのターゲットバンドと同じサイズの多型バンドが + G プライマー単独または + G プライマーと他のプライマーを混合した場合に検出され、Fig.4 中で 'ET' と記した。+ G プライマーを単独で用いた場合、他のプライマーと混合で用いた場合よりも明らかに鮮明であり、Fig.4 中で 'ET*' と記した。F₁ 分離集団中における 'ET' の分離が一致したことにより、+ G プライマーで得られたバンド 'ET' がオリジナルのターゲットバンドと同じものであることを確認した (Fig.5)。オリジナルのターゲットバンドは、+ G プライマーを単独で使用した場合増幅量が増して強調 (emphasize) され、鮮明で再現性の高い e-RAPD バンドに変換された。同時に、Fig.4 中のバンド 'OA' は + G および + C を混合して用いた場合に強調 (Fig.4 中 'EA') された。オリジナルプライマーによる RAPD では無視されていた多型バンド 'OB' は + C プライマーを用いた場合に強調 (Fig.4 中 'EB') され、同じくオリジナルプラ

イマーによる RAPD では無視されていた多型バンド 'OC' および 'OD' は、それぞれ + T プライマーおよび + G プライマーの混合、+ A プライマーおよび + T プライマーの混合を用いた場合に強調された (Fig.4 中それぞれ 'EC', 'ED')。オリジナルのプライマーを使用した場合には極めて薄いか検出が困難であったが、e-RAPD 検索の過程で、予期せず非常に鮮明なバンドとして表れる例 (Fig.4 中 'UE1', 'UE2' および 'UE3') があった。強調されたターゲットバンド 'ET' のアニーリング温度について検討したが、オリジナルの 42℃ から 46℃の間では明確な違いは認められなかった (データは示していない)。

e-RAPD 化されたターゲットバンド (Fig.4 中 'ET') をクローニングし、塩基配列を決定した。配列は 1124塩基長で両端にプライマーの配列を含んでいた。Fig.6 に e-RAPD 化されたターゲットバンドの構造を示す。+ G プライマーの配列の 3' 末端側に隣接するヌクレオチド

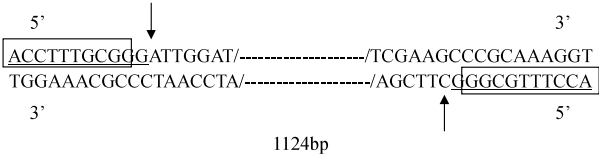


Fig. 6 Structure of the emphasized target RAPD band (e-OPU6G-1124, AB085608). The sequences in the boxes indicate the original primer sequences. The parts underlined indicate the + G primer sequences. The arrows indicate the 3'-flanking nucleotides of the +G primer.

はそれぞれ A と C であった。+ G プライマーの 3' 末端側に更に 1ヌクレオチド付加したプライマー(+ GA, + GT, + GG および + GC)を用いて調査した結果, + GA プライマーおよび + GC プライマーを混合して用いた場合, オリジナルバンドが出現した (Fig.7)。

予期せず非常に鮮明に表れたバンド (Fig.4 中 'UE1') をクローニングし塩基配列を決定した。配列は 608 塩基長で両端にプライマーの配列を含み, 明確な反復配列は含まなかった。

4 考 察

e-RAPD はプライマーのアニーリング部位の 3' 隣接塩基の違いを利用して, 目的バンドの選択的増幅を可能にするものである。マイナーなバンドを e-RAPD 化することにより, バックグラウンドバンドを生じさせずにターゲットバンドの強調が容易に行える。+ C, + G プライマーまたはその混合を用いた場合は, + A, + T プライマーまたはその混合を用いた場合よりも T_m 値は高くなる。従って強調効率も + G, + C またはその混合を用いた方が + A, + T プライマーまたはその混合を用いた場合よりも高くなるはずである。一般的に, e-RAPD バンドはオリジナルの RAPD バンドよりも高い再現性と安定性を持ち, バックグラウンドとなるバンドより少なくなることが期待できる。プライマーの T_m 値が上昇することにより, PCR プログラムのアニーリング

温度も上昇させることができる。プライマーアニーリング部位の 2 つめのヌクレオチドの違いを利用し, 再度 e-RAPD 化することでより鮮明なバンドを得ることもできる。オリジナルの RAPD バンドが 1 種類のプライマーによるものである場合, 4 種類のプライマーを新たに準備する必要がある。もし, オリジナルの RAPD バンドが 2 種類のプライマーによるものである場合は, 両端, 計 8 種類のプライマーを新たに準備する必要がある。

e-RAPD 法は RAPD バンドをより鮮明にするのに効率的な方法であるが, プライマーの二量体形成, バックグラウンドバンドと 3' 隣接部位のヌクレオチドの一致, 予期しないバンドの強調等の問題もあり, 常に成功するわけではない。しかしながら当方法には以下の利点がある。

- (1) 確立された e-RAPD バンドはそのまま MAS に用いることができる。
- (2) ターゲットとなるバンドの DNA 量が増すことにより, 必要な場合は STS 化も容易になる。
- (3) STS 化に比べて多型を喪失する危険性が小さい。
- (4) プライマー合成の後には PCR と泳動のみの作業であり, 複雑な工程を必要とせず数時間で作業が完了する。

最近では RAPD の遺伝解析への利用は将来性がない (鵜飼, 2000) という意見が多い。確かに多くの RAPD バンドは再現性や信頼性が悪い。特にマイナーな RAPD バンドは, 鋳型 DNA の品質, プライマーの濃度, アニー

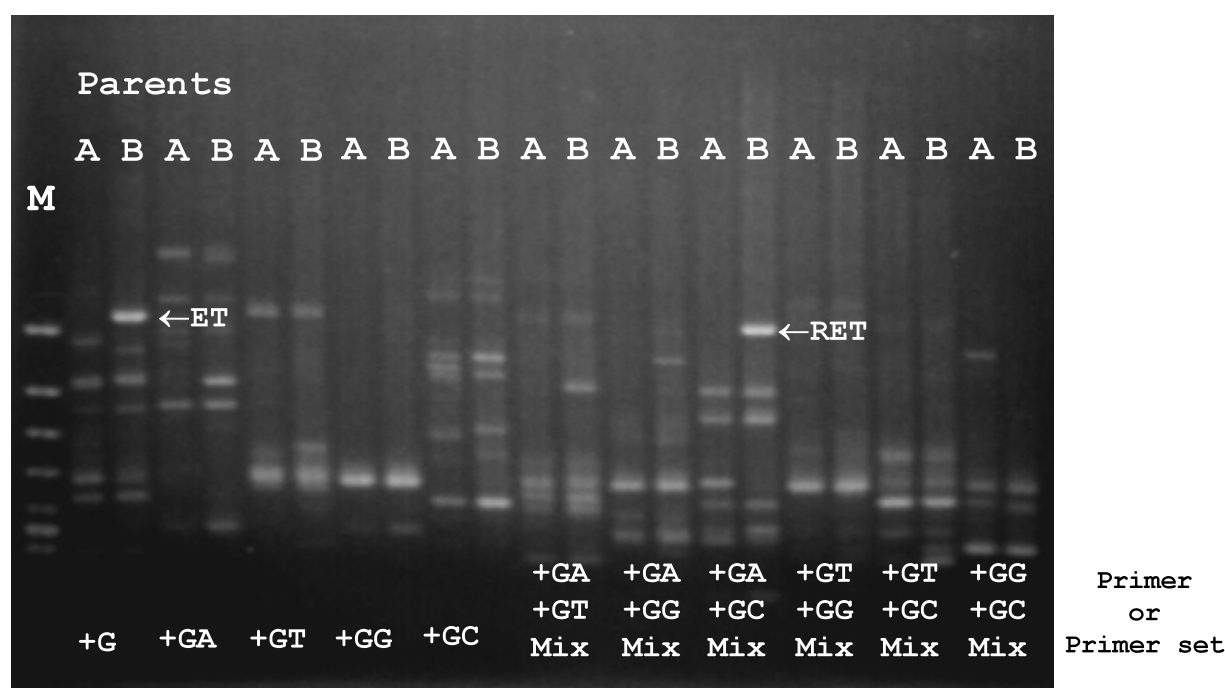


Fig. 7 Electropherogram of PCR products used for repeat search for e-RAPD.

M: DNA size marker (ϕ X174/*HincII* digest), ET: emphasized target band, RET: re-emphasized target band.

リング温度やPCRに使う装置によって結果が左右されるほど不安定である。一般にRAPDの低い信頼性はマイナーバンドを利用することにある。e-RAPDのシステムはRAPDのこの欠点を補完するものである。

MASに適するマーカーを得るために、RAPDでマッピングを行い連鎖マーカーをe-RAPD化する方法は、AFLPを用いて連鎖マーカーを得てそれをSTS化するよりも簡素かつ容易である。

5 摘 要

RAPDは連鎖地図の作成やQTL解析等の遺伝解析、親子鑑定、遺伝的多様性の評価等に広く利用されてきた。しかし、マイナーなRAPDバンドは再現性や信頼性が低いという問題があった。マイナーなRAPDバンドを鮮明で信頼性の高いバンドに変換する簡易で強力な方法を詳述した。まず、オリジナルのプライマーの3'末端にそれぞれA、T、GおよびCを付加したプライマー4種類を新たに合成する。次にそれらのプライマー単独(4種類)、およびこのうち2プライマーの混合(6組合せ)を用いてオリジナルのプライマーとともにPCRを行う。そしてそれら産物を同時に泳動する。オリジナルのプライマーによって得られるバンドが、他のプライマーやその組合せで増幅されることが確認できる。そして、バックグラウンドであったバンドが消去されるとともに、ターゲットのバンドはより鮮明になる。当方法には以下の利点がある。(1)確立されたe-RAPDバンドはそのままMASに用いることができる。(2)ターゲットとなるバンドのDNA量が増すことにより、必要な場合はSTS化も容易になる。(3)STS化に比べて多型を喪失する危険性が小さい。(4)プライマー合成の後にはPCRと泳動のみの作業であり、複雑な工程を必要とせず数時間で作業が完了する。育種現場においてMASを実用化するためには、簡易かつ安価で、短時間で完了する検出システムが不可欠である。実用的なMASのために、RAPDを用いて連鎖マーカーを得てそれをe-RAPD化する方法は、AFLPを用いて連鎖マーカーを得てそれをSTS化するよりも簡素かつ容易である。

IV 正逆交雑集団を用いたチャの母性遺伝RAPDの検出

1 目 的

細胞質雄性不稔、耐病性、アブラナ科における除草剤耐性(BEVERSDORFら、1980)、テンサイの放射線感受性

(八戸ら、1981)等、細胞質が農業上、また育種上重要な形質に影響を与える例が知られている。また、分離比に細胞質が深く関わる例(SCHMITZら、1988)も報告されている。このため、育種においては細胞質と各形質との関連性に配慮する必要がある。トウモロコシのT型雄性不稔細胞質に依存した北米のハイブリッドコーン栽培が、ゴマ葉枯病菌の新たなレースの出現によって大打撃を受けた事例(COMSTOCKら、1972)を踏まえ、細胞質の多様性にも配慮することが望まれる。木本性の作物では、品種の更新に長期間と多大な労力を要するためその必要性はさらに高い。多くの作物の場合と同様、チャでは、品種の細胞質がどれほどの多様性を持つのか、また各品種・系統間の細胞質の類似性についての情報は、親子関係から推定できる場合を除けば今のところない。細胞質DNAの多型を検出するDNAマーカーが整備され、チャ品種における細胞質のタイピングが可能になれば、細胞質の多様性の拡大のための戦略に役立つ。

多くの高等植物において細胞質は母性遺伝し、チャもその例外ではないと考えられる。チャの種子は親品種にもよるが1粒あたり1g前後と種子としてはかなり大型で(TANAKAら、2002)、かつ有毒なサポニンを含有している(石舘ら、1952)ので、野生動物が食料として集積・保存する可能性は小さい。チャの花は虫媒花であり、花粉が昆虫による長距離の移動が可能であるのに対し、種子の移動は自然状態では極めて限定的である。これは核ゲノムが花粉を介して長距離の地理的拡散が可能であるのに対し、種子のみを介して移動する細胞質に存在するオルガネラゲノムは自然状態における地理的拡散が非常に限定的であることを意味している。従って、チャの細胞質DNAの多様性は核DNAのそれに比べて集団の起源をより色濃く反映し、細胞質DNAに由来するマーカーは集団の起源を考察する上で核DNAに由来するマーカー以上に有用であると推測できる。チャの集団の由来や起源を探る上でも、細胞質DNAの多型を検出するDNAマーカーの利用価値はきわめて大きい。

細胞質DNAを標識するDNAマーカーを作成するためには、葉緑体やミトコンドリア等、オルガネラゲノム上にコードされる遺伝子をプローブとしたRFLPやそのPCRによる増幅産物のSNPsを利用する方法、またはオルガネラのDNAを精製した後、AFLPやRAPD等の多型を検索するのが一般的である。しかし、チャの集団を用いてRAPDの分離を調査する中で、正逆交雑集団を用いた場合、母親からのみ後代に遺伝するRAPDバンド(以下、母性遺伝RAPD)が全DNAを用いた場合で

も高頻度で検出されることが確認された。母性遺伝 RAPD はオルガネラ DNA の精製，プロットングやハイブリダイゼーション等の RFLP 検出に伴う煩雑な行程，また塩基配列決定等の煩雑な処理や高額な機器を必要とせず，短時間のうちに簡易に検出できる点で利用価値が大きい。これら母性遺伝 RAPD の検出の過程，品種・系統間における母性遺伝の確認，そしてその利用の可能性について考察した。

2 材料および方法

a 植物材料

母性遺伝 RAPD の検索にはチャ品種‘さやまかおり’（‘やぶきた’実生選抜（淵之上ら，1972））と中国からの導入系統‘金-Ck17’の正逆交雑に由来する F₁ 集団を用いた。同集団は，‘さやまかおり × 金-Ck17’ F₁ 分離集団 41 系統および‘金-Ck17 × さやまかおり’ F₁ 分離集団 13 系統，計 54 系統より構成される。‘さやまかおり’の種子親である‘やぶきた’由来の母性遺伝 RAPD の後代への遺伝の確認には以下の品種・系統を供試した。

- (1) ‘さやまかおり’および‘金-Ck17’（上記集団の親）
- (2) ‘やぶきた’（‘さやまかおり’の種子親，静岡県在来実生より選抜）
- (3) 来歴より細胞質が‘やぶきた’由来である以下の 5 品種・系統
 - ‘さえみどり’（‘やぶきた × あさつゆ’（武田ら，1991）），めいりよく（‘やぶきた’ × ‘Z-1’（田中ら，1996）），NN27（‘やぶきた × 静-在16’），さきみどり（‘NN27 × ME52’（古野ら，1999）），おくみどり（‘やぶきた’実生選抜（LIANG ら，2000））
- (4) (3) の品種・系統の花粉親
 - ‘あさつゆ，Z-1，静-在16’および‘ME52’
- (5) ‘さやまかおり’を種子親に育成された種間交雑種
 - ‘茶中間母本農1号（チャツバキ）’（‘さやまかおり’ × ヤブツバキ（武田ら，1987））
- (6) ヤブツバキ

また，‘金-Ck17’に由来する母性遺伝 RAPD の後代への遺伝の確認には，母性遺伝 RAPD を検出した分離集団の親にあたる‘さやまかおり’および‘金-Ck17’，分離集団中の系統‘KM8’（‘金-Ck17 × さやまかおり’），‘やぶきた’由来の細胞質を有する‘さきみどり’およびその KM8 との交雑後代

‘KM8 × さきみどり’の F₁ 集団 8 個体を用いた。

b 実験方法

全 DNA の抽出には改変 CTAB 法（後述），珪藻土とスピンフィルターを用いる方法（第2章に記載）または，Nucleon PHYTOPURE（Amersham）を使用した。改変 CTAB 法は CTAB 法（MURRAY ら，1980）を改変した。葉片 200mg（新鮮重）を秤量し，液体窒素を用いて乳鉢にて粉末状になるまで完全に破碎した。得られた凍結粉末を 50℃ に加熱した抽出緩衝液 500 μ l に懸濁し，約 30 分間 50℃ にて加温した。これにクロロフォルム/イソアミルアルコール 24:1 による抽出を 2 度行った。得られた溶液に 10% CTAB 溶液を加えて良く混和した後，低塩濃度緩衝液を加えて CTAB・核酸複合体を析出させた後回収し，NaCl-TE に溶解した。得られた溶液に RNase 処理を行った後，クロロフォルム/イソアミルアルコール 24:1 による抽出を行った。これに等量のイソプロパノールを加え DNA 沈澱を得た。得られた DNA の沈澱は 70% エタノールにて洗浄後，TE に溶解し PCR の鋳型として使用した。PCR は液量 10 μ l，酵素には Ampli-Taq DNA Polymerase（Applied Biosystems）0.5 Unit および添付の緩衝液を用い，MgCl₂ 2.5mM，dNTP それぞれ 0.125mM，鋳型 DNA 2ng/ μ l に行った。プライマーには Operon 社の 10mer KIT-A ~ AZ（1040種類）を濃度 2 μ M，e-RAPD 検索中に見出された母性遺伝 RAPD（TMIR-12Y）検出のためのプライマーセットとして OPG03CA: GAGCCCTCCCA および OPG03TAG: GAGCCCTCCTAG をそれぞれ 1 μ M を用いた。反応には GeneAmp9700（Applied Biosystems）を用い，反応温度は熱変性 93℃ 1 分，アニーリング 42℃ 1 分 30 秒，鎖伸長 72℃ 1 分で 40 サイクル行った。なお，上記 40 サイクルの前処理として，93℃ 5 分間と上記 40 サイクルの後に 72℃ 10 分の反応を加え，熱変性と 2 本鎖化を促進した。得られた PCR 産物を 2% アガロースゲルにて電気泳動後，エチジウムブロマイド，もしくはメチレンブルーにて染色した。RAPD バンドのクローニングには，メチレンブルー染色後，対象のバンドを切り出し，EASYTRAP Ver.2（宝酒造）を用いて DNA を精製した後，The Original TA Cloning KIT（Invitrogen）を用いて pCR2.1 ヘクローニングした。得られたクローンは，その挿入配列の長さが目的バンドと等しいことを泳動により確認した後，最低 5 クローンよりプラスミドを抽出し塩基配列を決定した。塩基配列の決定には DNA Sequencing Kit，BigDye Terminator Cycle Sequenc-

ing Ready Reaction (Applied Biosystems) および ABI Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems) を使用した。

3 結 果

1040 種類のプライマーによる RAPD 分析において、‘さやまかおり’ と ‘金-Ck17’ 間で 1245 の RAPD バンドを検出した。‘金-Ck17 × さやまかおり’ の交配に由来する F₁ 3 系統、‘さやまかおり × 金-Ck17’ の交配に由来する F₁ 5 系統、計 8 系統の正逆交雑小集団を用いて、得られた RAPD バンドの中から由来親を種子親に用いた場合のみ検出される RAPD バンドすなわち母性遺伝の可能性のある 22 の RAPD バンドをスクリーニングした。また、e-RAPD 検索中に見出された母性遺伝が疑われた 1 バンド (TMIR-12Y) についても、以下の実験に加えた。これら 23 の RAPD バンドは更に同じ組合せの F₁ 正逆交雑集団 46 系統中における分離を調査した。その結果、‘さやまかおり’ に由来する RAPD バンドで、‘さやまかおり’ を種子親に用いると必ず検出されるが、‘金-Ck17’ を種子親に用いると全く検出されない RAPD バンドが 12、同様に、‘金-Ck17’ に由来

する RAPD バンドで、‘金-Ck17’ を種子親に用いると必ず検出されるが、‘さやまかおり’ を種子親に用いると全く検出されない RAPD バンドが 7、合計 19 の母性遺伝 RAPD が検出された。Table 3 に検出された母性遺伝 RAPD の一覧を示し、Fig.8 にその例 (TMIR-C2, TMIR-Y10 および TMIR-Y11) を示す。e-RAPD 検索中に見出された 1 RAPD を除いた場合、1 プライマーあたりの母性遺伝 RAPD 検出率は約 1.7% であり、58 プライマーあたり 1 母性遺伝 RAPD の頻度で母性遺伝 RAPD が得られた計算になる。特に OPAW-05 をプライマーとした場合、同時に 2 つの母性遺伝 RAPD (TMIR-Y10 および TMIR-Y11) が得られた (Fig. 8 下段)。

検出された ‘さやまかおり’ 由来の全ての母性遺伝 RAPD はその種子親である ‘やぶきた’ から検出された。同時に、‘さやまかおり’ 由来の全ての母性遺伝 RAPD は、来歴より ‘やぶきた’ 由来の細胞質を持つと推定された品種 ‘さえみどり、めいりよく、NN27、さきみどり’ および ‘おくみどり’ さらに種子親に ‘さやまかおり’ を用いて育成されたヤブツバキとの種間雑種である ‘茶中間母本農 1 号 (チャツバキ)’ から検出された。‘さやまかおり’ 由来の母性遺伝 RAPD の後代への遺伝の例を Fig.9 に示す。また ‘金-Ck17’ 由来の母性遺伝 RAPD も、‘KM8 (‘金-Ck17 × さやまかおり’) × さきみどり’ の F₁ 集団 8 個体全てから検出された。‘金-Ck17’ 由来の母性遺伝 RAPD の後代への遺伝の例を Fig.10 に示す。

検出された母性遺伝 RAPD の塩基長を推定したところ、TMIR-4Y (4000bp) (Fig.11a), TMIR-6Y (2500bp) (Fig.11 b, Table 3) という極めて長いものが含まれた。母性遺伝 RAPD の平均塩基長は 1.29kbp であり、共通のランダムプライマーで増幅された他の主要な RAPD バンドの平均塩基長の 0.62kbp より長く、その差は Mann-Whitney 検定において有意であった (Table 4)。

Table 3. The maternally inheritable RAPDs detected in the F₁ populations derived from reciprocal crossing between tea clones ‘Sayamakaori’ and ‘Kana-Ck17’

Marker name	Primer or primer sets	Estimated length of amplicon (bp)	Original tea clone	Accession number of the sequence	Actual length of amplicon (bp)
TMIR-Y1	OPG-07	900	Sayamakaori	AB086854	922
TMIR-Y2	OPG-13	1800	Sayamakaori		
TMIR-Y3	OPL-07	650	Sayamakaori		
TMIR-Y4	OPL-13	4000	Sayamakaori		
TMIR-Y5	OPM-17	320	Sayamakaori		
TMIR-Y6	OPT-11	2500	Sayamakaori		
TMIR-Y7	OPY-01	500	Sayamakaori		
TMIR-Y8	OPAH-18	1300	Sayamakaori		
TMIR-Y9	OPAS-16	1000	Sayamakaori		
TMIR-Y10	OPAW-05	450	Sayamakaori	AB086856	435
TMIR-Y11	OPAW-05	900	Sayamakaori	AB087679	914
TMIR-Y12	OPG3-CA and OPG3-TAG	270	Sayamakaori		
TMIR-C1	OPE-20	2100	Kana-Ck17		
TMIR-C2	OPG-05	650	Kana-Ck17	AB086853	659
TMIR-C3	OPH-09	1600	Kana-Ck17		
TMIR-C4	OPL-15	1300	Kana-Ck17		
TMIR-C5	OPR-15	1200	Kana-Ck17		
TMIR-C6	OPX-09	1300	Kana-Ck17		
TMIR-C7	OPAI-08	750	Kana-Ck17	AB086855	738

Table 4. Length comparison between the maternally inheritable RAPDs detected and the other major bands derived from the same random primers

Kind of bands	Number of bands	Estimated length (kb)		
		Average	±	Standard Error
Maternally inherited RAPD bands	18	1.29	±	0.89
The other major bands derived from same random primers	91	0.62	±	0.38

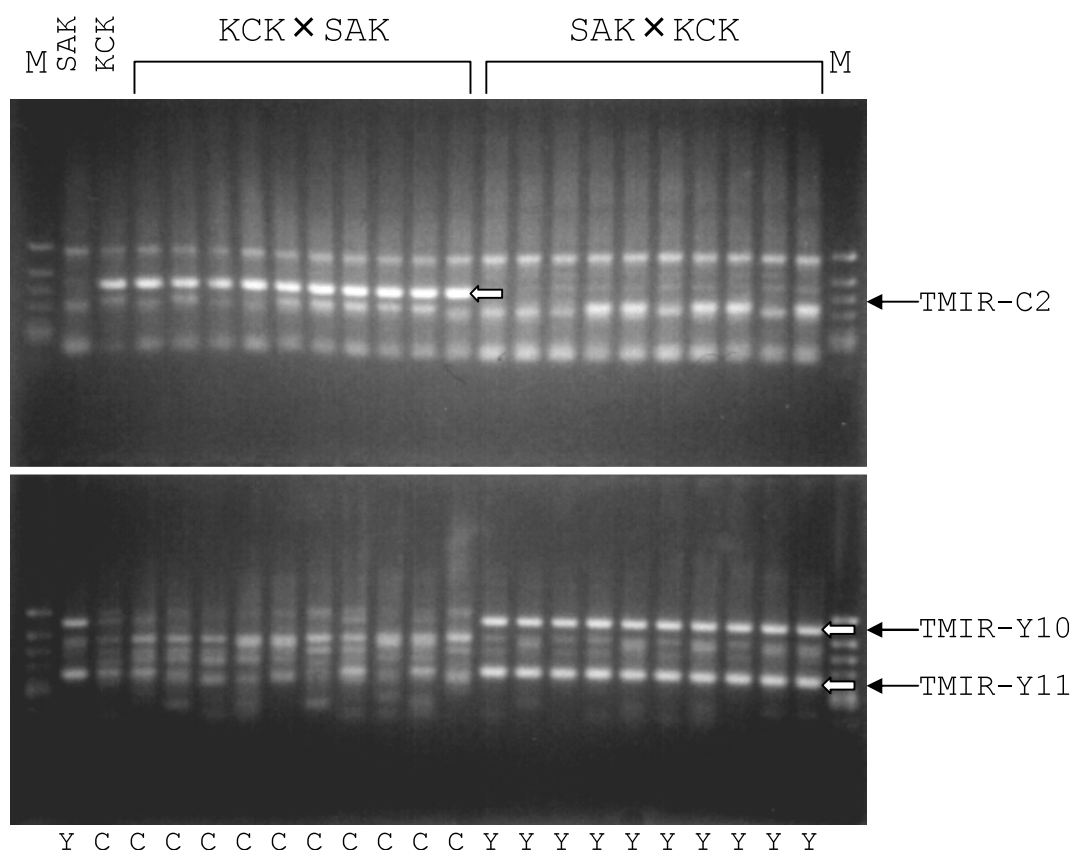


Fig. 8 Maternally inheritable RAPD of tea in the segregating population derived from reciprocal cross between 'Kana-Ck17' and 'Sayamakaori'. M: DNA size marker (ϕ X174/*HincII* digest), SAK: 'Sayamakaori', KCK: 'Kana-Ck17'. Symbols of Y and C at the bottom of the photograph indicate the clones considered to be same cytoplasm to 'Yabukita' and 'Kana-Ck17' from their histories, respectively.

得られた母性遺伝 RAPD バンドの一部 (TMIR-2C, TMIR-1Y, TMIR-7C, TMIR-10Y および TMIR-11Y) をクローン化し、塩基配列決定を行った。決定された塩基配列のアクセッション番号を Table 3 中に示す。TMIR-10Y と TMIR-11Y は同じプライマー (OPAW-05) に由来するが、プライマーアニーリング部位以外に配列の共通点は見出せなかった。得られた配列の相同性を GenBank 登録配列に対して BLASTN にて検索した。TMIR-7C にアラビドプシスのミトコンドリア DNA との高い相同性が認められた以外は、一般的な多くの RAPD バンドと同様、母性遺伝 RAPD には他の配列との高い相同性は検出できなかった。また、母性遺伝 RAPD の得られた配列間にも相同性は認められなかった。

4 考 察

チャの正逆交雑集団を用いて高頻度に母性遺伝 RAPD が得られた。特に OPAW-05 をプライマーとした場合、同時に 2 つの母性遺伝 RAPD が得られたことは母性遺

伝 RAPD が一般的な予想を越える頻度で出現することを象徴するものであった。DNA マーカー検出頻度は、交雑に用いた両親品種の細胞質 DNA の類縁度の影響を大きく受ける。チャは分類学上、*var. sinensis* と *var. assamica* に大別されるが、'さやまかおり、金-Ck17' とともに *var. sinensis* に分類され、チャという一つの種の中では比較的近縁である。片親に *var. assamica* 等の材料を用いれば更に高い多型検出率が得られる可能性が高い。

分離集団による遺伝学的解析では、単一の交雑組合せに由来する集団を用いることが多いので、細胞質が異なる個体が混在した集団を対象とすることは希である。F₁ pseudo-testcross 集団 (GRATTAPAGLIA ら, 1994) を用いた解析においては、正逆交雑集団を用いない限り、母性遺伝する優性マーカーは F₁ 集団中において (1) 親がホモに有するため分離しない、または (2) 親は有するが子供には遺伝しない (結果としてヘテロ 2 本鎖バンド (DAVIS ら, 1995) であること等が疑われる) マーカーと

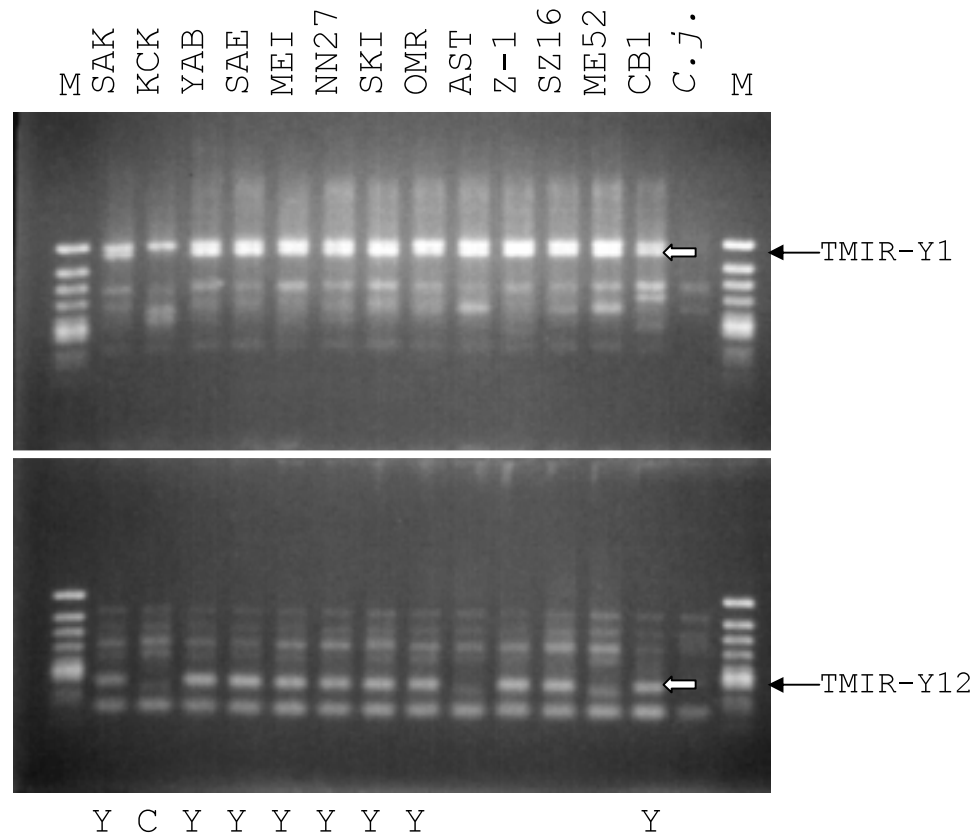


Fig. 9 Genetic inheritances of the maternally inheritable RAPD derived from tea clonal cultivar 'Yabukita'. M: DNA size marker (ϕ X174/*HincII* digest), SAK: 'Sayamakaori', KCK: 'Kana-Ck17', YAB: 'Yabukita', SAE: 'Saemidori', MEI: 'Meiryoku', NN27: 'NN27', SKI: 'Sakimidori', OMR: 'Okumidori', AST: 'Asatsuyu', Z-1: 'Z-1', SZ16: 'Shizu-zai16', ME52: 'ME52', CB1: 'Chatsubaki-1gou', C. j: *Camellia japonica*. Symbols of Y and C at the bottom of the photograph indicate the clones considered to be same cytoplasm to 'Yabukita' and 'Kana-Ck17' from their pedigree records, respectively.

して認識される．従って正逆交雑集団を用いない限り， F_1 集団中で母性遺伝 RAPD を識別することは困難である．PCR ベースのマーカー，特に優性のマーカーを用いて連鎖解析を行う場合，ヘテロ 2 本鎖バンドや複数のアレルに由来するバンド等，分離比が極端に歪み連鎖解析に使用できない“怪しい”マーカーを除く必要がある．多くの作物で優性マーカーを用いて連鎖地図が作成され，優性マーカーの分離が調査されているが，多くの母性遺伝する優性マーカーが“怪しい”マーカーとして無視されていることが想像される．

得られた全ての母性遺伝 RAPD は，その来歴から同一の細胞質を持つことが想定される品種・系統・個体・種間雑種からも検出された．この結果は得られた母性遺伝 RAPD が品種育成の過程で安定して後代へ母性遺伝してきたこと，母性遺伝 RAPD の再現性が高いことを意味している．

得られた母性遺伝 RAPD の分子量が大きかったことは，母性遺伝 RAPD が 1 細胞内にコピー数の多いオルガネラゲノムが増幅した結果生じたものであると考察された．葉緑体，ミトコンドリアといったオルガネラは細胞内に多数存在し，その上，1 オルガネラ内に多数のコピーが存在している．染色体ゲノム内の配列が通常二倍体であれば 2 コピー存在するのに対し，オルガネラゲノム内の配列は (1 細胞あたりの葉緑体またはミトコンドリアの数) $\times$ (オルガネラ内のコピー数 (一般的に数十～数百)) の数だけ存在することになる．組織から抽出された全 DNA 中のオルガネラ由来の配列は染色体ゲノムに由来する配列と比べて，下記の 2 つの特徴があると言える．

- (1) 全 DNA 中における配列の多様性の占める割合がごく小さい．
- (2) 1 種類の配列についてみると多数のコピーが存在

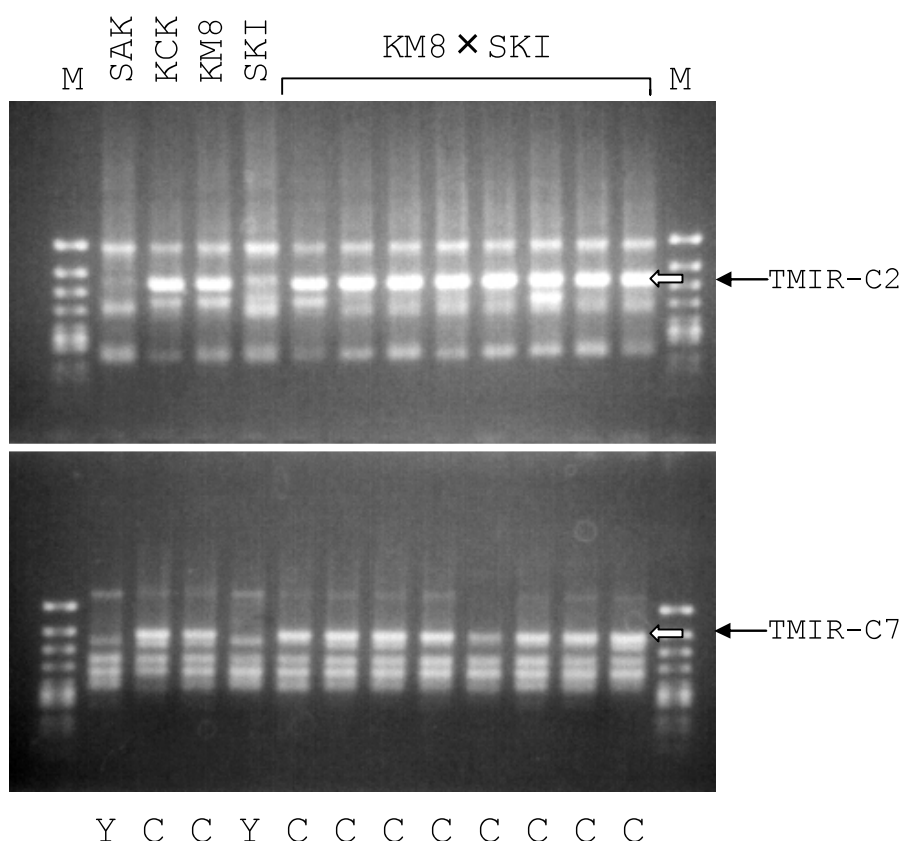


Fig. 10 Genetic inheritances of the maternally inheritable RAPD derived from tea clonal strain 'Kana-Ck17'. M: DNA size marker (ϕ X174/*HincII* digest), SAK: 'Sayamakaori', KCK: 'Kana-Ck17', KM8: 'KM8', SKI: 'Sakimidori'. Symbols of Y and C at the bottom of the photograph indicate the clones considered to be same cytoplasm to 'Yabukita' and 'Kana-Ck17' from their pedigree records, respectively.

する。

RAPD バンドはプライマーとアニーリングできる配列に挟まれた部分が増幅された結果である。(1)の特徴は、RAPD において使用されるプライマーとアニーリングできる配列に挟まれた部分が少ないことを意味している。プライマーとアニーリングできる配列間の長さに制限がなければ多数の箇所が想定できるが、実際にはプライマーのアニーリング部位間の距離が大きくなると PCR による増幅に不利になる。一方、(2)の特徴は、増幅産物中の母性遺伝 RAPD 産物分子の比率を増す結果に結び付き、泳動後の RAPD バンドとしての検出に有利になる(1)と(2)の特徴により、オルガネラ中のプライマーのアニーリング部位間の距離が大きくなり、本来増幅しにくい PCR 産物が、鋳型中のコピー数が多いため RAPD バンドとして検出されたものと考察された。

5 母性遺伝 RAPD について塩基配列決定とその相溶性検索を行った結果、1 つの母性遺伝 RAPD の配列がアラビドプシスのミトコンドリア DNA と高い相溶性が認め

られたが、他の 4 配列には他の配列との高い相溶性は認められなかった。葉緑体ゲノムの全塩基配列はすでに多くの植物において決定されており、植物間における相溶性が高いことが知られている。従って、母性遺伝 RAPD が葉緑体ゲノムに由来するものであれば、これらと何らかの相溶性が検出されるはずである。相溶性検索の結果、他の配列との高い相溶性が認められなかったことは、他の 4 母性遺伝 RAPD もミトコンドリアゲノムに由来する可能性が高いことを強く示唆するものであった。葉緑体ゲノム内の配列は非常に保守的である一方、ミトコンドリアゲノムは葉緑体ゲノムと比較して一般的に巨大で、その配列やサイズが植物間で大きく異なる(LEVINGS, 1983)。DNA マーカー、すなわち DNA 多型が多く見いだされる領域は、一般に生物の生存に重要な進化的に保守的な領域ではなく、生物の生存上意味を持たない進化的に変化しやすい領域である。ミトコンドリアゲノムは核外にあって、進化的に変化しやすい領域を豊富に含む(LEVINGS, 1983)ため DNA 多型が生じやすい。検出され

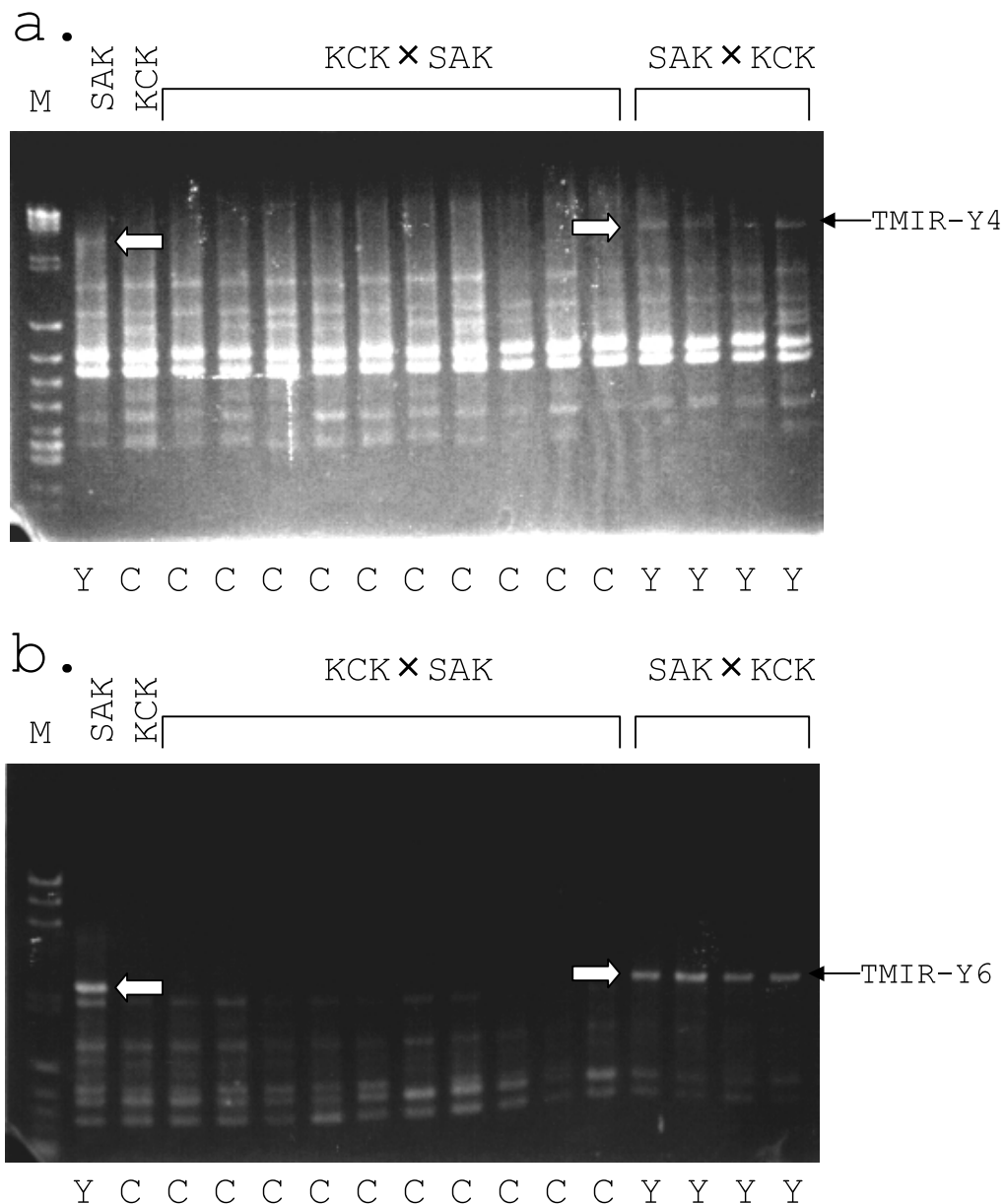


Fig. 11 Large size maternally inheritable RAPD of tea. a: TMIR-Y4 (4000bp). b: TMIR-Y6 (2500bp). M: DNA size marker (Mixture of λ /HindIII digest and ϕ X174/HincII digest), SAK: 'Sayamakaori', KCK: 'Kana-Ck17'. Symbols of Y and C at the bottom of the photograph indicate the clones considered to be same cytoplasm to 'Yabukita' and 'Kana-Ck17' from their pedigree records, respectively.

た母性遺伝 RAPD のような正逆交雑集団を用いて検出される DNA 多型の大半は、このミトコンドリアゲノムに由来するものと推測される。

検出された母性遺伝 RAPD はチャの(1)細胞質の多様性評価、(2)チャ集団の起源や伝播の調査に有効である。他の作物における、細胞質の多様性の低下が特定病害の激発を引き起こした例を踏まえ、チャ育種においても、長期的展望に立ち、細胞質と品質収量等、実用形質との

関係に留意しつつ、海外からの導入系統等を種子親として使用することにより、細胞質の多様化を図ってゆることが望ましい。母性遺伝 RAPD はチャ品種における細胞質の多様性評価に有効であり、細胞質の多様性の拡大のための戦略に有用である。また、一般に種子は花粉に比べて遺伝子拡散のスピードが遅い。チャの種子は大型で有毒物質を含むため動物による移動も限定的である。花粉の飛散による移動がないことで、チャの細胞質

DNA は集団の起源をより色濃く反映していると推測できる。このため母性遺伝 RAPD はチャ集団の起源や伝播の調査にきわめて有効である。

細胞質 DNA の多型を検出する DNA マーカーを作成するためには、葉緑体やミトコンドリア等のオルガネラゲノム DNA の RFLP や SNPs を利用する方法(KATO, 2001), またはオルガネラの DNA を精製した後、多型を検索する方法(NAKAJIMA ら, 1998)が一般的である。本研究ではチャの正逆交雑集団を用いた場合、高頻度に母性遺伝 RAPD が検出された。細胞質 DNA に由来する RAPD はコムギ(NAKAMURA ら, 2000), テンサイ(LORENZ ら, 1997), ニンジン(NAKAJIMA ら, 1997)での報告がある。品種の細胞質の多様性評価や系統分類学的解析に有効な母性遺伝する優性マーカー作成の手法の1つとして、正逆交雑集団を用いることが有効であった。母性遺伝 RAPD はオルガネラ DNA の精製、プロットングやハイブリダイゼーション等の RFLP 検出に伴う煩雑な行程、また塩基配列決定等の煩雑な処理や高額な機器を必要とせず、短時間のうちに簡易に検出できる点で利用価値が大きい。

5 摘 要

チャの正逆交雑に由来する F_1 集団 (54 個体) に由来する栄養系) から、種子親からのみ遺伝する RAPD バンド (以下、母性遺伝 RAPD) を検出した。1040 のランダムプライマーから18、e-RAPD 検出中に見出した1、計19の母性遺伝 RAPD を得た。親子関係の明らかな品種・系統・種間雑種間において母性遺伝を確認するとともに、母性遺伝の安定性とマーカーとしての再現性を確認した。検出した母性遺伝 RAPD の PCR 産物はそれ以外の RAPD PCR 産物と比較して分子量が大きい傾向が認められた。この傾向は、ミトコンドリアや葉緑体の1細胞あたりのコピー数の多い DNA が増幅して母性遺伝 RAPD が生じた結果であると推察された。5の母性遺伝 RAPD をクローン化し塩基配列を決定した。そのうち、1クローンにはアラビドプシスのミトコンドリアゲノム上の配列と高い相同性が認められたが、他の4クローンには既知の配列との高い相同性は認められなかった。一般的に高等植物の葉緑体ゲノムはミトコンドリアゲノムと比べて保守的であり、既にその全配列がいくつかの植物で決定されている。一方、ミトコンドリアゲノムは葉緑体ゲノムよりサイズが大きく、かつ多型性に富むことから、高い相同性が確認された以外の母性遺伝 RAPD もミトコンドリアゲノム由来である可能性が高い。育種

においては、細胞質の各形質への影響に留意しながら、耐病性等の観点から、細胞質の多様性を確保しておくことが望まれる。母性遺伝 RAPD は検出が容易であり、育種において、細胞質の多様性確保のための有力な手段である。また、チャの種子は1g内外で高等植物の種子としては大きく、かつ有毒なサポニンを多量に含有するため動物による移動も考えにくい。従って、自然状態における細胞質の拡散は非常に限定される。このためチャの細胞質 DNA は集団の起源を考察する上で核 DNA 以上に有用であり、検出が容易な母性遺伝 RAPD の利用価値は大きい。

V RAPD および AFLP によるチャ種遺伝資源およびその近縁野生種の遺伝的多様性の評価

1 目 的

従来、チャは採集した種子を播いて茶園を作り、そこで収穫される葉が加工・利用されてきた。しかし、栄養系品種の概念が定着し、挿し木が容易であることも手伝って、近年、どの生産国においても栄養系品種への改植が著しい。このことは同時に遺伝的多様性の喪失を意味し、現在、世界的規模で極めて急速にチャの遺伝的多様性が失われつつあると言っても過言ではない。

このため、世界の主要な茶生産国においては積極的な遺伝資源の収集と保存が精力的に行われている。チャの起源地と考えられる中国西南部やその隣接地域では、遺伝資源が現地保存されている(Yu ら, 1999)。中国の遺伝資源保存園における保存では、浙江省の杭州 (Hangzhou) や雲南省の孟力海 (Menghai) 等において総計約10,000件の遺伝資源を登録している(Yu ら, 1999)。インドのトクライ (Toclai) の試験場には2,532件、ケニアのカリチョ (Kericho) の試験場には299件、日本のジーンバンク事業では約4,400件の遺伝資源が登録され遺伝資源保存園に保存されている。チャの種子は常温では長期の保存ができないが、種子の低温保存が検討されている(安間ら, 1983)。世界の主要な茶生産国は積極的な遺伝資源の保存を行っているが、その国際的な協力は十分とはいえない現状にある。

遺伝資源は育種の出発点であり、どのような遺伝資源を交雑の母本として利用してゆくかは、その後の育種の成否を大きく左右する。育種は多様な遺伝資源からの有用遺伝子の集積作業である。このため、育種においてはその素材の確保のために急速に失われつつある遺伝資源

を効率よく収集保存する必要がある。収集されたそれぞれの遺伝資源については、それらがどれだけの遺伝的多様性を有するのかを評価することが、効率的な遺伝資源の収集に必須であるとともに、育種家は自らが使用する交配母本の遺伝的多様性の大きさとそれらの類縁関係を適切に把握しておく必要がある。

これまでの遺伝的多様性の評価は主に生理・形態的形質に注目して行われてきた(武田ら, 1980, 鳥屋尾ら, 1999, SEALY, 1958, WICKREMARATNE, 1981, BANERJEE, 1988, BANERJEE, 1992)。しかし生理・形態的形質は、同じ環境では異なる遺伝的な背景のものが、環境によって似た形質へと進化する、いわゆる収斂進化の問題がある。例えば日本海側の豪雪地帯のチャの群落には、葉が小さく着葉角度が大きい個体が目立つことが一般に知られており、冬期の積雪に適応した結果と考えられる。DNAマーカーはこの収斂進化の問題を排除できる点がすぐれている。チャではこれまでも RFLP (MATSUMOTO ら, 1994), RAPDs (Lee ら, 1995; WACHIRA ら, 1995; WACHIRA ら, 1997; KAUNDUN ら, 2000), AFLPs (PAUL ら, 1997)による解析がなされてきたが、対象とされるアレルの数が限られるか、対象とする材料が偏っていた。本研究においては、緑茶用、紅茶用の系統を含む世界各国の多様な材料をより多くのアレルについて調査し、その遺伝的多様性を評価した。

2 材料および方法

a 植物材料および DNA の抽出

野菜茶業研究所枕崎茶業研究拠点に現存する世界各地からの収集系統 40, ケニア国内で収集された The Tea Research Foundation of Kenya のケニア国内からの収集系統を実験に供試した。供試材料とその分類を Table 5 に示した。サンプリングされた葉は抽出まで -30℃ で保存した。DNA 抽出は改変 CTAB 法(第4章に記載), または Nucleon Phytopure Plant DNA extraction kit (Amersham Life Science, UK) を使用した。抽出された DNA はアガロースゲル電気泳動で品質とおおよその濃度, 分光光度計(model GeneQuant 11; Pharmacia Biotech; Cambridge, UK)で濃度を計測した。

b RAPD 分析

抽出して得られた DNA 溶液を TE で希釈し, 100ng/ μ l のストック溶液を調製した。PCR は液量 10 μ l, DNA 20 ng, dNTP それぞれ 125mM, arbitrary primer (with 50-70% GC content -Operon technologies, Inc,

USA) 200nM, 酵素に添付の緩衝液を用い, 0.5unit の taq DNA polymerase (Amplitaq Gold, Perkin Elmer, USA) の条件で行った。反応には Takara 480 thermal cycler (宝酒造)を用い, 反応温度は熱変性 93℃ 1 分, アニーリング 42℃ 1 分 30 秒, 鎖伸長 72℃ 1 分で 40 サイクル行った。なお, 上記 40 サイクルに先立ち熱変性を完全にするため, 93℃ 5 分, 上記 40 サイクルの後に 2 本鎖化を完全にするための 72℃ 10 分の反応を加え, 反応後は 4℃ に保存した。得られた PCR 産物は緩衝液に TAE を用い, 2% アガロースゲルにて電気泳動後, エチジウムブロマイドにて染色, 312nm 波長の紫外線を照射, 可視化して写真撮影した。

c AFLP 分析

AFLP の概要は ZABEAU (1993)の方法を改変した方法で行った。制限酵素分解, アダプターのライゲーション, 第 1 回目の増幅は PAUL ら(1997)の方法にしたがった。第 2 回目の増幅(選択的増幅)は放射性同位元素によるラベルしていない *Eco*RI 側のプライマー(2 または 3 塩基の選択塩基を付加), *Mse*I 側のプライマー(3 または 4 塩基の選択塩基を付加)を使用した。PCR 反応液は液量 10 μ l で, 第 1 回目の PCR 産物 2 μ l, *Eco*RI 側のプライマー 30ng, *Mse*I 側のプライマー 30ng, dNTP 2.5mM, 添付の緩衝液を用い, 酵素には Ampli-Taq DNA Polymerase 0.5Unit (Perkin Elmer 社)を用いた。反応には GeneAmp9700 (Perkin Elmer 社)を用い, 反応温度は熱変性 93℃ 1 分, アニーリング 42℃ 1 分 30 秒, 鎖伸長 72℃ 1 分で 40 サイクル行った。なお, 上記 40 サイクルに先立ち熱変性を完全にするため, 93℃ 5 分, 上記 40 サイクルの後に 2 本鎖化を完全にするための 72℃ 10 分の反応を加えた。サンプルは 4℃ に保存し, PCR 産物 5 μ l を等量のホルムアミドベースのローディング用緩衝液(98%ホルムアミド, 10mM EDTA, 0.005% キシレンシアノール, 0.005% ブロムフェノールブルー)と混和し, 90℃ に 5 分間インキュベートすることにより熱変性した。このうち 5 μ l のサンプルをプレキャストゲル(Excel Gel 48S DNA analysis kit, Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden)を用い, multiphor II electrophoresis system (Pharmacia, Sweden)を使用し電圧 200V にて泳動を行った。AFLP フラグメントは Pharmacia Biotech DNA silver staining kit (Pharmacia Biotech, Sweden)により銀染色した。6 組の AFLP 選択的増幅用プライマーセットを実験に使用した。

Table 5. List of the tea clones and Camellia species evaluated, their sources and types

Clone name	Source ^{a)}	Variety type ^{b)}
1. Ai9	India, Assam	var. <i>assamica</i>
2. Ai16	India, Assam	var. <i>assamica</i>
3. Ai26	India, Assam	var. <i>assamica</i>
4. Ai37	India, Assam	var. <i>assamica</i>
5. Ak220	India, Darjeeling	var. <i>assamica</i>
6. Ak226	India, Darjeeling	var. <i>assamica</i>
7. PKS161	India, (East India), Sylhet	var. <i>assamica</i>
8. PKS224	India, (East India), Sylhet	var. <i>assamica</i>
9. Ace37	Sri-lanka, Tarawakele	var. <i>assamica</i>
10. SRL9	Sri-lanka, Tarawakele	var. <i>assamica</i>
11. SRL34	Sri-lanka, Tarawakele	var. <i>assamica</i>
12. SRL37	Sri-lanka, Tarawakele	var. <i>assamica</i>
13. Kana-Ck17	China, Anhuisheng, Qimen	var. <i>sinensis</i>
14. Makura-Ck20	China, Anhuisheng, Qimen	var. <i>sinensis</i>
15. Makura-Cp28	China, Zhejiangsheng, Shaoxingxian	var. <i>sinensis</i>
16. Makura-Cp29	China, Zhejiangsheng, Shaoxingxian	var. <i>sinensis</i>
17. Makura-Cm25	China, Jiangxisheng, Dongxiangxian	var. <i>sinensis</i>
18. Makura-Cm26	China, Jiangxisheng, Dongxiangxian	var. <i>sinensis</i>
19. Makura-Cn38	China, Jiangxisheng, Dongxiangxian	var. <i>sinensis</i>
20. Makura-Cn91	China, Jiangxisheng, Dongxiangxian	var. <i>sinensis</i>
21. Taiwan-yamacha76	Taiwan, Kaoshiung, Mt Nan Feng	var. <i>assamica</i>
22. Taiwan-yamacha77	Taiwan, Kaoshiung, Mt Nan Feng	var. <i>assamica</i>
23. Taiwan-yamacha78	Taiwan, Kaoshiung, Mt Nan Feng	var. <i>assamica</i>
24. Taiwan-yamacha79	Taiwan, Kaoshiung, Mt Nan Feng	var. <i>assamica</i>
25. Makura-zai-15-2	Japan, Shizuoka	var. <i>sinensis</i>
26. Makura-zai-66-29	Japan, Mie	var. <i>sinensis</i>
27. Makura-zai-74-4	Japan, Kagoshima	var. <i>sinensis</i>
28. Makura-zai-80-19	Japan, Kyoto	var. <i>sinensis</i>
29. Makura-zai-116-6	Japan, Nigata	var. <i>sinensis</i>
30. Makura-zai-128-9	Japan, Nara	var. <i>sinensis</i>
31. Makura-zai-135-9	Japan, Kochi	var. <i>sinensis</i>
32. Makura-zai-2763-13	Japan, Miyazaki	var. <i>sinensis</i>
33. ASH	Vietnam	var. <i>assamica</i>
34. Hazan-1	Vietnam	var. <i>assamica</i>
35. Sonkau-1	Vietnam	var. <i>assamica</i>
36. Soizan-4	Vietnam	var. <i>assamica</i>
37. KAG-4	Kenya, Kericho	var. <i>assamica</i>
38. 6/8	Kenya, Kericho	var. <i>assamica</i>
39. 31/8	Kenya, Kericho	var. <i>assamica</i>
40. TN14-3	Kenya, Kericho	var. <i>sinensis</i>
41. D99/10	Kenya, Kericho	var. <i>assamica</i>
42. S15/10	Kenya, Kericho	var. <i>assamica</i>
43. 1 Nan. T	Kenya, Kericho	var. <i>assamica</i>
44. 1 EP	Kenya, Kericho	var. <i>assamica</i>
45. <i>C. irrawadiensis</i>	Unknown, imported from Australia	Unknown
46. <i>C. taliensis</i>	Unknown, imported from Australia	Unknown (Red bud type)
47. <i>C. sasanqua</i>	Japan, Kagoshima	Sasanqua 4
48. <i>C. japonica</i>	Japan, Niigata	var. <i>decumbens</i>

a: Country and site of population origin

b: Varietal classification based on morphological traits

d データ解析

鮮明な RAPD および AFLP の多型バンドの有無を、バンドありを“(1)”，バンドなしを“(0)”，欠測を“.”としてスコアした．48 栄養系の遺伝的多様性系統樹作成のためには、コンピュータプログラム PHYLIP 3.5c (FELSENSTEIN, 1993)において DOLLO の最節約法を用いて行った．RAPD と AFLP の両マーカーシステムは POWELL ら(1996)の方法で比較した．材料を導入元でグルーピングし、そのグループの遺伝的多様性の評価は NEI (1973)の遺伝的多様性(H)を計算して評価した．

3 結果および考察

チャは生理・形態的特性(BANERJEE, 1992; 鳥屋尾ら, 1999; SEALY, 1958), また生化学的形質(NAGATA ら, 1985; OWUOR ら, 1987; TAKEDA, 1994)から var. *assamica* と var. *sinensis* の2変種に大別されるが、これらの形質は環境による収斂進化の影響を受けやすく、変種内多型等の問題を含んでおり、対象の形質もおのずから限界がある．これに対し DNA 多型は事実上その数が無限で、短期間のうちに結果が得られるばかりか、環境要因や環境による収斂進化の影響を受けない．RAPD および AFLP の明確な 266 の多型バンドを選定し、チャとその近縁種 48 栄養系についてスコアした．最節約法による遺伝的多様性の系統樹は以下の3のグループに大別できた．(1) var. *assamica*, (2) var. *sinensis*, (3) var. *assamica* に分類される台湾、ベトナムの材料と他の近縁種 (Fig.12)．48 全ての栄養系はそれぞれ RAPD と AFLP においてユニークなプロファイルを示した．一部の材料(アスタリスクを付した)以外、ほとんどの材料が分類学上の変種と大きな矛盾がないクラスターに分類された．本来のクラスターに入らず例外となった栄養系は、他の変種に分類される材料との雑種である可能性が想定された．台湾ヤマチャ(図中 Tyc)は台湾の高地に自生し、供試した栄養系は系統樹の最も中心から遠い位置に配置された (Fig.12)．台湾ヤマチャは芽の伸長パターンが他のチャと異なる、毛茸を持たない等、その他のチャとは明らかに形態的特性が異なる．台湾ヤマチャについては、var. *assamica* に分類され、花器の形態的特徴も var. *sinensis* よりも var. *assamica* に近い(鳥屋尾ら, 1999)と報告されてきたが、本実験結果は台湾ヤマチャの遺伝的背景は var. *assamica* と var. *sinensis* とともに明らかに異なることを示唆していた．台湾ヤマチャは他に、木そのものがコーヒー様の香気を放ち、この特性は *Camellia fufuracea* と共通であ

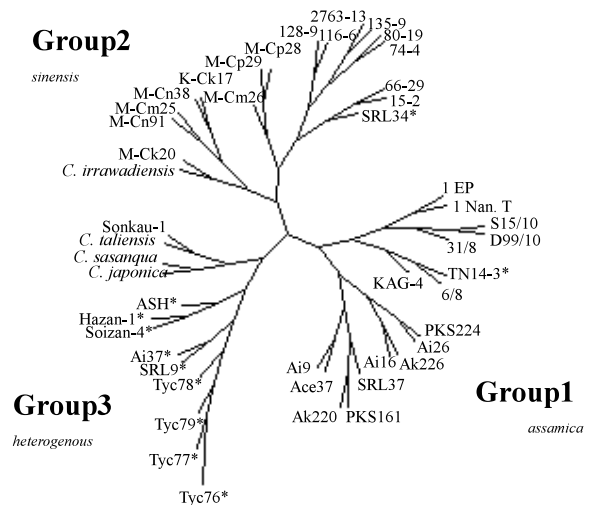


Fig. 12 Genetic diversity tree of tea clones based on RAPD and AFLP data generated by dollo parsimony method (PHYLIP). *Denotes clones that did not cluster in their defined racial groups.

ることから、チャ以外の *Camellia* 属他種からの移入交雑 (introgression) の結果である可能性も想定される．

得られた RAPD および AFLP バンド 266 中で、var. *assamica* と var. *sinensis* の両変種特異的なものは皆無であった．インドダージリンの var. *sinensis* 等、両変種の雑種が想定されるものを除いても、やはり変種特異的なバンドは見出されなかった．形態的特性においても、典型的な var. *sinensis* や典型的な var. *assamica* が存在する一方、変種特異的なバンドは見出されないことは、2つの変種の間で高頻度に自然交雑があり、遺伝子の交換がなされていることを強く示唆していた．特定の近縁野性種のみから検出されたバンドや、一部の var. *sinensis* のみから検出されたバンドが存在した．しかし本実験で供試した材料の数は48と限られており、特異的なバンドと定義するためにはより多くの材料について調査する必要がある．また、266中14のバンドは特定の栄養系のみから検出されたものであり、他は材料中、2～数栄養系から検出されたものであった．

続いて NEI (1973)のアルゴリズムに基づき、遺伝資源のそれぞれの導入元国と近縁野性種をグループと見做し、グループ内の多様性(H)を計算した (Table 6)．グループ内の変異の大きさは降順で、チャの近縁種、インド、中国、ケニヤ、スリランカ、ベトナム、日本、台湾(台湾ヤマチャ)であった．チャの近縁種は複数の種を含み、その多様性が大きいことはある意味当然であった．インドおよびケニヤの材料は var. *assamica* と

Table 6. Estimation of genetic variation as determined by Nei's (1973) gene diversity measure (H) in populations of tea and related species sampled from different countries and sites

Country	N(sample size of population)	H(standard error)
ia	8	0.260(0.014)
China	8	0.217(0.016)
Taiwan	4	0.108(0.020)
Japan	8	0.169(0.018)
Kenya	8	0.201(0.016)
Sri-Lanka	4	0.199(0.017)
Vietnam	4	0.194(0.018)
Wild* Camellia	4	0.270(0.013)

* : Some Camellia species related to tea

var. *sinensis* またはその雑種と想定されるものを含むことが、高い遺伝的多様性(H)の原因であると推測できる。少なくとも本研究で用いたタイワンヤマチャはその多様性は極めて小さかった。注目すべきは中国の材料である。中国の材料は全て日本のチャと同じ var. *sinensis* であり、なおかつ大きな遺伝的多様性を有している。これまでも、おくひかり(中村ら, 1986)、あさのが(重ら, 1996)等の中国導入系統の後代にあたる緑茶用品種が育成されてきたが、これらは緑茶用品種のごく一部である。特に最近の緑茶用品種の来歴を見ると、多くの品種が‘やぶきた’の子供にあたる等、今後の育種を進めてゆく上で交配母本の近交化による遺伝的脆弱性が懸念される。緑茶用品種の交配母本における遺伝的多様性の確保は至上命題であり、大きな変異をもつ中国の材料は貴重な育種素材であることを認識し、その利用と保全に力を注ぐべきであろう。

4 摘 要

RAPD と AFLP を用い、チャ(*Camellia sinensis*)とその近縁野生種の遺伝的多様性を調査し、系統樹を作成した。多数の多型バンドが検出されたが、明瞭な 266 のバンドを使用した。系統樹では、主要な 3 グループが認められた。第1および第2のグループはそれぞれ *C. sinensis* var. *assamica* と *C. sinensis* var. *sinensis* に対応した。残る第3のグループは var. *assamica* に分類されているタイワンヤマチャと一部の var. *assamica* に分類される栄養系および近縁野生種から構成された。タイワンヤマチャの遺伝的背景は var. *sinensis* と var. *assamica* とともに明らかに異なった。タイワンヤマチャは生理形態的特性も他のチャと異なり、近縁他種からの移入交雑(introgression)の結果である可能性が示唆された。ま

た、var. *sinensis* または var. *assamica* 特異的なバンドは皆無であり、両変種間では自然交雑による遺伝子のやりとりがあることを示唆していた。遺伝資源のそれぞれの導入元国と近縁野生種をグループと見做し、グループ内の多様性を評価した。その結果、グループ内の変異の大きさは降順で、チャの近縁種、インド、中国、ケニヤ、スリランカ、ベトナム、日本、台湾(タイワンヤマチャ)であった。緑茶用品種の育成を考えた場合、var. *sinensis* であり大きな変異をもつ中国の材料は貴重な育種素材と言える。

VI 耐虫性、耐寒性チャ品種‘さやまかおり’の花粉親の検索

1 目 的

実生によって作られた在来茶園は萌芽期が不均一で生産性が低く、1970年代以降、‘やぶきた’を中心とした萌芽期が均一で生産性の高い栄養系品種茶園へと急激に置き替わってきた。やがて‘やぶきた’の名は品種名というよりもブランドとして知られるようになった。‘やぶきた’は緑茶としての品質が優れ、当時としては多収な品種であったが、耐病性、耐虫性等に明らかな欠点があった。‘やぶきた’による茶園の寡占は摘採期の集中にとどまらず、特定病虫害の激発、それに伴う薬剤散布回数の増加等の問題を引き起こしてきた。近年、‘さえみどり’(武田ら, 1991)、『ふうしゅん’(山口ら, 1992)、『りょうふう’(近藤ら, 1999)、『さきみどり’(古野ら, 1999)、『香駿’(中村ら, 1999)等、多くの優れた品種が育成されてきたが、今のところ‘やぶきた’のブランド力に打ち勝つまでには至っていない。チャ育種には収量および品質において‘やぶきた’を凌ぐのみならず、耐病性、耐虫性を有しクリーンな製品を生産できる品種が求められている。

チャ品種‘さやまかおり’は良質多収な緑茶品種として1971年に埼玉県茶業試験場において育成された(淵之上ら, 1972)。その後、この品種が‘やぶきた’には見られない強度の耐寒性、耐霜性を有し、カンザワハダニの寄生が少なく、近年になって特に小雨の年を中心に激発するようになったクワシロカイガラムシに対する抵抗性を有する(重ら, 1993)ことが明らかとなり、チャ育種における耐寒性耐虫性交配母本としての重要性が見直されている。さらに、‘さやまかおり’は接葉角度が小さく立葉である。立葉であることは多収の要因と考えられ(HADFIELD, 1968)、育種による収量増を目指す上でも重

要な交配母本であると言える。農林水産省による最近のチャの系統適応性検定連絡試験における系適第7群および系適第8群においても、‘さやまかおり’を片親とするF₁中より選抜された栄養系統が、21中7系統、全体の1/3を占めている。

重要な交配母本の来歴を知ることが育種の基本である。特にチャのような自家不和合性を有する(塘ら, 1956)殖性作物は一般に近交弱勢が出やすいと考えられ、近交弱勢回避のためにも品種や系統の来歴を知ることが重要である。‘さやまかおり’は埼玉県茶業試験場において静岡県茶業試験場から取り寄せて播種した‘やぶきた’の自然交雑種子の実生中より選抜されている(淵之上ら, 1972)。換言すれば種子親は‘やぶきた’であるが花粉親が明らかでない。‘さやまかおり’の花粉親が明らかになれば、‘さやまかおり’の交配母本としての扱いに影響を与えるのみならず、その花粉親自体も交配母本として見直されるはずである。

幸い‘さやまかおり’は極端な立葉、際立って濃い葉色等日本在来のチャにはほとんど見られない形態形質をもっている。これらの特性は‘さやまかおり’のF₁世代においてすべての個体の形態形質に大きな影響を与える。長年チャの育種に携わったものであれば、その後代を見ればすぐに‘さやまかおり’の血を引いていることが判るほどである(根角厚司, 私信)。これらの形態形質はその後代の形態形質に大きな影響を与えることが再確認され、優性効果の大きな遺伝子に支配されていることが推定された。これらの特徴的な形態特性を‘さやまかおり’の種子親である‘やぶきた’が有していない以上、‘さやまかおり’のもう片方の親、すなわち花粉親に由来しているであろう。これらの特徴的な形態形質に基づいて、静岡県茶業試験場内において形態的特性から

‘さやまかおり’の花粉親として疑われる栄養系統を全てピックアップし、‘さやまかおり’の花粉親候補とした。チャにおいて品種の親子鑑定がRAPDにて行われた例(田中ら, 1996)がある。選ばれた花粉親候補と‘やぶきた’および‘さやまかおり’を用いてDNAマーカーによる親子鑑定を行った。

2 材料および方法

a 供試材料

形態的特性による‘さやまかおり’の花粉親候補のスクリーニングには、‘さやまかおり’のもととなった種子が採集された1947年以前から静岡県茶業試験場内に存在した可能性のある遺伝資源を含むチャ *Camellia sinensis* の全ての栄養系品種・系統約1500を対象にした。‘さやまかおり’特異的なマーカーの検索には‘さやまかおり’(var. *sinensis*)、‘やぶきた’(var. *sinensis*、日本在来チャより選抜)、『静-印雑131』(var. *assamica* と var. *sinensis* との雑種)、『金-Ck17』(var. *sinensis*、中国からの導入系統)を用いた。得られたマーカーの分離比の確認には、‘さやまかおり’を種子親に、『金-Ck17』、おくゆたか’および‘さえみどり’を花粉親にしたF₁個体群を供試した。DNAマーカーによる親子鑑定には形態形質によりスクリーニングされた栄養系に加え、栄養系品種‘さやまかおり、やぶきた’を用いた。

b DNA抽出並びにRAPD分析

全DNAは第4章に記述の改変CTAB法によって抽出した。PCRは液量10μl、酵素にはAmpli-TaqDNA Polymerase 0.5Unit および添付の緩衝液を用い、MgCl₂ 2.5mM、dNTPそれぞれ0.125mM、鋳型DNA 2ng/μl、10塩基長のランダムプライマー(Operon社) 2μMの条件に



Fig. 13 Picture shows morphological trait of Sayamakaori and its progeny. From left to right, Yabukita (seed parent of Sayamakaori), Sayamakaori, progeny derived from cross between Sayamakaori and Kana-Ck17 and Kana-Ck17 (rightmost).

て行った．反応には GeneAmp 9700 (Perkin Elmer 社) を用い，反応温度は熱変性 93℃ 1分，アニーリング 42℃ 1分 30秒，鎖伸長 72℃ 1分で 40 サイクル行った．

3 結 果

a 形態的特性による‘さやまかおり’の花粉親のスクリーニング

‘さやまかおり’の特徴的な形態形質は‘さやまかおり’の F₁ 世代各個体の形態形質に大きな影響を及ぼす．Fig. 13 にその例を示す．‘さやまかおり’×‘金-Ck17’の交雑に由来する F₁ 集団においても，葉の裏側が見えるほど極端な立葉である，濃い葉色，特徴的な鋸歯の形態等の‘さやまかおり’特有の形態形質が各 F₁ 個体に大きな影響力を持って遺伝することが再確認された．

これらの特徴的な形態形質を指標にした判断により‘さやまかおり’の花粉親のスクリーニングを行った．1950 年代以前より静岡県茶業試験場内に存在する可能性のある遺伝資源を含めた約 1500 の栄養系を対象にスクリーニングを行い，1999 年 5 月，‘さやまかおり’の花粉親として特に疑われる 16 系統を選定し‘さやまかおり’の花粉親 1 次候補とした．同 1999 年 7 月にさらに‘さやまかおり’の花粉親として多少なりとも疑われる 62 系統を選定し，‘さやまかおり’の花粉親 2 次候補とした．選定された計 78 系統とその来歴を Table 7 に示す．このうち‘静-10-2-28’および‘静-15-1-16’，特に‘静-15-1-16’は葉色，葉の大きさ，接葉角度，鋸歯の形態，茎部の太さ等において‘さやまかおり’に酷似した形質を備えており‘さやまかおり’の花粉親として特に強く疑われた．選定された系統は全て海外，特にそのほとんどが中国からの導入系統またはその後代であった．

b スクリーニングされた栄養系による親子鑑定

まず最初に，Operon 社のランダムプライマーセット A～T，計 400 種類の 10 塩基長のランダムプライマーを用いた RAPD と，2 種類の PCR-RFLP により，‘さやまかおり’特異的 DNA マーカーを検索した．RAPD マーカーはある程度鮮明なもののみを対象とした．‘さやまかおり’，‘やぶきた’，‘静-印雑 131’および‘金-Ck17’のうち，‘さやまかおり’のみから検出されるマーカーを‘さやまかおり’特異的マーカーと定義した．4 種類の RAPD (OPA-8-700，OPE-13-650，OPL-6-400 および OPP-1-490) が‘さやまかおり’特異的マーカーとしてスクリーニングされた．さらにスクリーニングさ

れたこれら RAPD は，‘さやまかおり’×‘金-Ck17’ (54 個体)，‘さやまかおり’×‘おくゆたか’ (21 個体) および‘さやまかおり’×‘さえみどり’ (18 個体) の各 F₁ 集団において理論上の分離比 1:1 に適合した分離を示すことを確認した (Table 8)．形態的特性によるスクリーニングにおいて得られた‘さやまかおり’の花粉親候補について，上述の RAPD を用いて親子鑑定を行った結果，1 次候補 2 次候補からもこれらを全て検出できる栄養系は得られなかった．特に‘さやまかおり’以外に OPP-1-490 が検出される栄養系はなく，さやまかおりの花粉親として合致するものは見出せなかった．Fig. 14 に OPP-1-490 による親子鑑定の例の一部を示す．

4 考 察

‘さやまかおり’は埼玉県茶業試験場において，静岡県茶業試験場より取り寄せた茶品種‘やぶきた’の 1947 年産自然交雑種子中より選抜されている．‘さやまかおり’が‘やぶきた’と同じタイプの細胞質 DNA を有すること (田中ら，1999)，フェニルアラニンアンモニリアアーゼ遺伝子をプローブとした RFLP において親子関係に矛盾がないこと (MATSUMOTO ら，1994) および輪斑病抵抗性の遺伝解析の結果にも矛盾がないこと (TAKEDA，1988) から，‘さやまかおり’の種子親が‘やぶきた’であることはほぼ間違いないと考えられる．‘さやまかおり’は極端な立葉，際立って濃い葉色等日本在来のチャにはほとんど見られない形態的特性をもっている．これらの特性は‘さやまかおり’の F₁ 世代各個体の形態形質に大きな影響を与える．チャの育種家であれば，‘さやまかおり’の後代を見ただけでそれと解る (根角厚司，私信) ほどである．‘さやまかおり’×‘金-Ck17’ F₁ 集団においても，‘さやまかおり’の特徴的な形態形質が F₁ 各個体の形態形質に大きな影響力を持って遺伝することが再確認された (Fig. 13)．このことは‘さやまかおり’のこれらの形態形質は優性効果の大きな複数の遺伝子に支配されていることを示していた．これらの形態形質を‘さやまかおり’の種子親である‘やぶきた’が有していない以上，もう片方の親，すなわち花粉親に由来している．したがって‘さやまかおり’のこれら特徴的な形質を指標に‘育種家の目’によって‘さやまかおり’の花粉親をスクリーニングすることは極めて効果的であると考えられた．

静岡県茶業試験場内には日本国内より収集した多くの系統があるにもかかわらず，‘さやまかおり’の花粉親として選定された 78 の栄養系は全て海外，特にそのほと

Table 7. Candidates for the pollen parent of 'Sayamakaori' and their history

Clone	history
Primary candidate	
Shizu-8-1-43	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-9-1-8	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-9-1-24	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-10-1-2	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-10-2-1	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-10-2-28	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-11-1-18	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-11-1-42	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-11-2-15	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-12-2-24A	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-12-2-24B	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-14-1-4	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-14-1-37	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-15-1-16	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-16-1-27	Introduced from China, Hubei, Yangludong in 1933
Shizu-20-2-13	Introduced from China, Hunan, Ningzhou in 1937
Secondary candidate	
Shizu-5-1-1	Introduced from China, Hunan, Anhua in 1933
Shizu-6-1-1	Introduced from China, Hunan, Anhua in 1933
Shizu-6-1-30	Introduced from China, Hunan, Anhua in 1933
Shizu-6-1-43	Introduced from China, Hunan, Anhua in 1933
Shizu-7-1-5	Introduced from China, Zhejiang, Pingshui in 1937
Shizu-7-1-14	Introduced from China, Zhejiang, Pingshui in 1937
Shizu-7-1-19	Introduced from China, Zhejiang, Pingshui in 1937
Shizu-8-1-1	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-8-1-17	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-8-1-28	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-9-1-3	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-9-1-26	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-9-1-34	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-10-1-5	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-10-1-18	Introduced from China, Anhuisheng, Qimen in 1916or 1937
Shizu-11-1-40	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-11-2-4	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-11-2-19	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-11-2-30	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-12-1-2	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-12-1-37	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-12-1-39	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-13-1-9	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-13-1-29	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-13-1-30	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-13-1-45	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-13-2-24	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-14-1-1	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-14-1-16	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-14-1-39	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-15-1-26	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-15-1-37	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-15-2-9	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-16-1-30	Introduced from China, Hubei, Yangludong in 1933
Shizu-16-2-19	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-16-2-8	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-17-1-6	Introduced from China, Hubei, Yangludong in 1933
Shizu-17-1-42	Introduced from China, Hubei, Yangludong in 1933
Shizu-17-2-35	Introduced from China, Hubei, Yangludong in 1933
Shizu-17-2-36	Introduced from China, Hubei, Yangludong in 1933
Shizu-18-2-15	Introduced from China, Hubei, Yangludong in 1933
Shizu-18-2-20	Introduced from China, Hubei, Yangludong in 1933
Shizu-19-1-5	Introduced from China, Hunan, Ningzhou in 1937
Shizu-19-1-37	Introduced from China, Hunan, Ningzhou in 1937
Shizu-19-2-24	Introduced from China, Hunan, Ningzhou in 1937
Shizu-20-1-23	Introduced from China, Hunan, Ningzhou in 1937
Shizu-20-1-30	Introduced from China, Hunan, Ningzhou in 1937
Shizu-20-2-19	Introduced from China, Hunan, Ningzhou in 1937
Shizu-29-2-2	Offspring of introduced tea from India by M. Tada in 1877
Shizu-29-2-14	Offspring of introduced tea from India by M. Tada in 1877
Shizu-30-2-9	Offspring of introduced tea from India by M. Tada in 1877
Shizu-30-2-20	Offspring of introduced tea from India by M. Tada in 1877
Shizu-31-2-7	Offspring of introduced tea from India by M. Tada in 1877
Shizu-31-2-10	Offspring of introduced tea from India by M. Tada in 1877
Shizu-60-1-9	Introduced from Chin, or their offspring
Shizu-CH.30-1-4	Introduced from China, Hubei in 1890
Shizu-CH.31-1-5	Introduced from China, Hubei in 1890
Shizu-CH.30-1-13	Introduced from China, Hubei in 1890
Shizu-K.12-2-1	Introduced from China, Jiangxi, Wuyuan in 1937
Shizu-K.12-2-15	Introduced from China, Hunan, Yinzhen in 1940
Shizu-T.30-1-20	Offspring of introduced tea from Hubei in 1890

Table 8. Segregation of Sayamakaori-specific RAPD in F₁ population

Cross combination	OpA-8-700			OpE-13-650			OpL-6-400			OpP-1-490		
	+	—	P	+	—	P	+	—	P	+	—	P
Sayamakaori × Kana-Ck17	26	28	0.7-0.8	25	29	0.5-0.6	27	27	1	23	31	0.2-0.3
Sayamakaori × Okuyutaka	13	8	0.2-0.3	12	9	0.5-0.6	7	14	0.1-0.2	11	10	0.8-0.9
Sayamakaori × Saemidori	8	10	0.6-0.7	7	11	0.3-0.4	11	7	0.3-0.4	8	10	0.6-0.7
Total	47	46	0.9-1.0	44	49	0.6-0.7	45	48	0.7-0.8	42	51	0.3-0.4

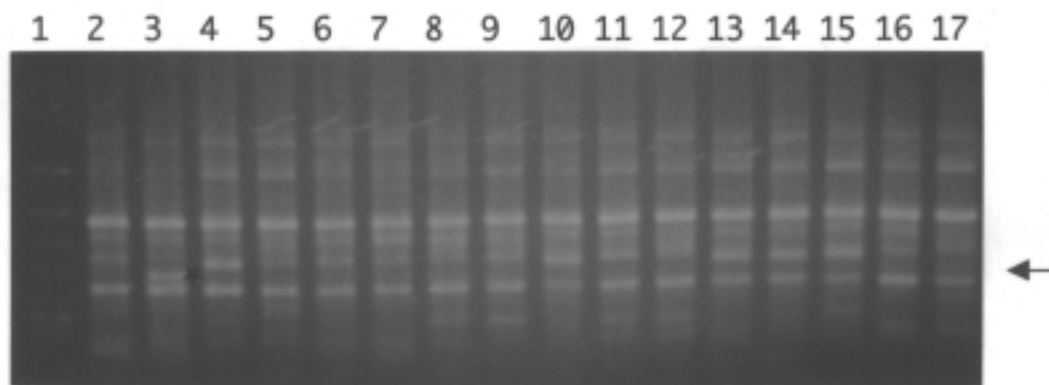


Fig. 14 Parentage test of the candidates of pollen parent of Sayamakaori using RAPD marker OpP-1-490. 1: DNA size marker (ϕ X174/*HincII* digest), 2: Yabukita, 3: Sayamakaori, 4: Shizu-15-1-16, 5: Shizu -8-1-43, 6: Shizu -9-1-8, 7: Shizu -9-1-24, 8: Shizu -10-1-2, 9: Shizu -10-2-1, 10: Shizu -10-2-28, 11: Shizu -11-1-18, 12: Shizu -11-1-42, 13: Shizu -11-2-15, 14: Shizu -12-2-24A, 15: Shizu -14-1-4, 16: Shizu -14-1-37, 17: Shizu -16-1-27. Arrow indicates OpP-1-490.

んどが中国からの導入系統またはその後代であった。このことは‘さやまかおり’の花粉親が試験場周囲の在来茶園に存在したものである可能性は低く、海外特に中国からの導入系統である可能性の高いことを強く示唆しているものと考えられた。

親子鑑定に用いられた RAPD は、‘さやまかおり’を種子親とする複数の組み合わせの F₁ 集団において、理論上の分離比に適合した分離を示し、ヘテロ2本鎖バンド (DAVIS ら, 1995) である可能性は低いと判断された。これらの RAPD は ‘さやまかおり’ (var. *sinensis*), ‘やぶきた’ (var. *sinensis*, 日本在来チャより選抜), ‘静-印雑 131’ (var. *assamica* と var. *sinensis* との雑種) および ‘金-Ck17’ (var. *sinensis*, 中国からの導入系統) の中で ‘さやまかおり’ のみから検出されたものである。‘さやまかおり’ の種子親は ‘やぶきた’ であるので、‘さやまかおり’ はこれらの RAPD をヘテロに有していることになる。これらの RAPD は、採取地が異なり遺伝的に多様なものを含む 7 種類 (4 栄養系 × 2 倍体-1 (‘やぶきた’ と ‘さやまかおり’ に共通)) のアレルのうち ‘さやまかおり’ の花粉親由来のアレルのみから検出された

ものであり、‘さやまかおり’ の花粉親に由来するアレルに特異性の高いマーカーであると考えられた。形態的特性によるスクリーニングにおいて得られた ‘さやまかおり’ の花粉親候補についてこれら RAPD を用いて親子鑑定を行ったところ、これら全ての RAPD が検出される花粉親候補はなく、‘さやまかおり’ の花粉親として適合するものは見出だせなかった。特に OPP-1-490 を有する栄養系は皆無であり、OPP-1-490 は今後 ‘さやまかおり’ 特異的なマーカーとして利用可能であろうと考えられた。

‘さやまかおり’ の花粉親を検出できなかった理由として、以下の 3 点が考えられた。

- (1) ‘さやまかおり’ の花粉親は静岡県茶業試験場周辺の在来実生茶園等の中にあったものであった (現在、静岡県茶業試験場周辺の茶園は ‘やぶきた’ がほとんどであり、これらは現存しない可能性が高い。)
- (2) ‘さやまかおり’ の花粉親は静岡県茶業試験場内に現存するが今回の形態的特性によるスクリーニングからは漏れてしまった。

(3) ‘さやまかおり’の花粉親は1947年当時、静岡県茶業試験場内に生存したが、枯死したか移植の際に廃棄され現存しない。

まず、(1)の可能性について考察する。‘さやまかおり’の元になった種子が採種されたのは1947年のことである。1954年の栄養系品種の普及率は3.4%であり、1940年代の栄養系品種の普及率はさらに低かったことは間違いない。静岡県茶業試験場の周囲においてもそのほとんどが在来実生茶園であったと推定される。しかし、極端な立葉である、大型の葉、濃い葉色、特徴的な鋸歯の形態等の‘さやまかおり’様の形態を有するチャは在来茶園実生茶園にはほとんど見あたらない。事実、‘さやまかおり’の花粉親としてスクリーニングされた栄養系は全て海外からの導入系統であった。一方、1930年代には中国より多数の種子が導入され1947年当時には遺伝資源として保存されていた。このことから‘さやまかおり’の花粉親が試験場周囲の在来茶園に存在したものであるとする(1)の可能性は低いと考えられた。仮に‘さやまかおり’の花粉親が試験場周囲の在来茶園に存在したものであったとしても、静岡県茶業試験場周辺の茶園のほとんどが‘やぶきた’園に改植された現在、これが現存する可能性は極めて低い。

次に(2)の可能性についてである。DNAマーカーによる親子鑑定の結果、チャ品種‘めいりょく’の花粉親が登録上の‘やまとみどり’ではなく‘Z-1’であることが明らかとなった(田中ら、1996)のは、複数の育種家がその形態的特性において登録上の来歴に疑問を提起したことに端を発している。さらに多くの育種家が実際の花粉親として‘Z-1’を名指ししていた。複数の特徴的な形質について総合的に判断できる“育種家の目”は、品種の親子鑑定という側面においても信頼に値することが証明されたわけである。前にも記した通り、特に‘さやまかおり’の特徴的な形態形質は優性効果の大きな遺伝子に支配されていると考えられ、“育種家の目”によるスクリーニングにおいて見落としは考えにくい。従って(2)の可能性も低いと考えられた。

残る可能性は(3)である。静岡県茶業試験場において、中国導入の栄養系保存園は少なくとも1970年以降だけでも2度移植されている。この際、圃場面積の制限等の理由から全ての栄養系が完全に移植されたわけではなかった。‘さやまかおり’の花粉親はこれらの移植の際に廃棄されたか枯死した可能性が高く、現存しない可能性が高いと判断された。

‘さやまかおり’の花粉親を検出し、‘さやまかおり’

の交配母本としてのチャ育種上の位置付けを明確化するとともに、その花粉親をあらためて耐寒性と耐虫性を有する利用価値の高い交配母本とすることが本研究の目的であった。後に‘さやまかおり’となった種子が採取されて50年以上が経過した現在、現存する栄養系からはついに花粉親を見出すことができず、残念ながら『‘さやまかおり’の花粉親は現存しない可能性が高い』と判断せざるを得なかった。

5 摘 要

緑茶品種‘さやまかおり’は茶の重要害虫であるカンザワハダニ、クワシロカイガラムシに対して抵抗性を持ち、かつ寒害、霜害にも強く緑茶育種の抵抗性育種素材として極めて重要な存在である。‘さやまかおり’は埼玉県茶業試験場において、静岡県茶業試験場より取り寄せた茶品種‘やぶきた’の1947年産自然交雑種子中より選抜されている。‘さやまかおり’は極端な立葉、際立って濃い葉色、特徴的な鋸歯等々、一般的な日本在来のチャにはほとんど見られない特徴的な形態形質を有している。これらはその後代の形態形質に大きな影響を与えることが再確認され、優性効果の大きな遺伝子に支配されていることが推定された。従って‘やぶきた’がそのような形質を有していない以上、‘さやまかおり’の花粉親に必須の条件と考えられた。これらの特徴的な形態形質を指標に静岡県茶業試験場内より‘さやまかおり’の花粉親としての可能性が多少なりとも疑われる全ての栄養系を選定した。選定された78栄養系はいずれも海外、特にそのほとんどが中国からの導入系統であり、日本在来のチャは含まれなかった。これらを‘さやまかおり’の花粉親候補とし、‘やぶきた’および‘さやまかおり’を用いてDNAマーカーによる親子鑑定を行った。その結果、‘さやまかおり’の花粉親として合致するものはなく、‘さやまかおり’の花粉親はすでに現存しない可能性が高いと判断された。

VII ツバキ園芸品種‘炉開き’がヤブツバキ×チャの種間交雑種であることのRAPDおよびSSRマーカーによる確認とチャ育種への利用の可能性

1 目 的

ヤブツバキ(*C. japonica*)は低温耐性、耐虫性、耐病性等においてチャ(*C. sinensis*)と比較して優れた形質を持っており、チャ育種にとって近縁種からの有用遺伝子

の導入を考えた場合に重要な存在である。この目的で、チャとツバキの種間交雑種としては人為交配によりチャツバキが育成された(武田ら, 1987)が、交配母本としての利用にはその稔性に重大な問題を抱えている。チャを種子親、チャツバキを花粉親に育成されたとされる個体も存在したが、形態的特性やDNAマーカーを用いた解析結果に矛盾があり、混入した他のチャの花粉に由来するものと判断されている。一方、ツバキの園芸品種‘炉開き’は、その形態形質、発見された地域(新潟県栃尾市)の環境から、ヤブツバキの変種ユキツバキとチャの交雑種と考えられてきた(萩屋ら, 1981)。すなわち、新潟県栃尾市は豪雪地帯であり、栽培のチャ(本来秋咲き)の花蕾が積雪下で越冬し翌春に開花、現地に多く自生のユキツバキ(春咲き)との交雑が想定できる、というものである。なお、ユキツバキはヤブツバキとは別種(*C. rusticana*)とする記載もある(田村ら, 1989)が、生殖隔離も認められず現在ではヤブツバキの変種(*C. japonica* var. *decumbens*)とされる(津山, 1989)ことが一般的で、本論文ではこの分類法に従い、“ヤブツバキ”をユキツバキ(var. *decumbens*)を含む *C. japonica* の種名として用いている。その後、‘炉開き’の葉がチャに特有なテアニンやカフェインを含む(NAGATAら, 1985)ことが明らかとなり、‘炉開き’がヤブツバキとチャの交雑種であることの有力な傍証となった。しかし、以前はヤブツバキからの高品質なDNAの抽出が困難であったこともあり、‘炉開き’の雑種性が分子遺伝学的に検討されたことはなかった。最近になって、ヤブツバキからも高品質DNAを効率的に抽出可能な方法(TANAKAら, 2002)が開発されたことを受け、RAPDおよび単純反復配列領域を標的としたPCR多型SSRマーカー(WEBERら, 1989)を用いた解析を行った。その結果、‘炉開き’が両者の種間雑種であること、さらに細胞質はチャではなくヤブツバキであり、ヤブツバキが自然交雑の際の種子親であったことを確認した。また、チャを種子親、‘炉開き’を花粉親にした交雑により、チャと‘炉開き’の雑種1個体を得るとともにその雑種性を確認し、チャ育種への‘炉開き’のヤブツバキの遺伝子導入のための橋渡し親としての利用に可能性を拓く結果を得た。

2 材料および方法

a 植物材料

RAPDによる‘炉開き’の雑種性の確認には‘炉開き’とともに、チャ(*C. sinensis*)品種・系統‘やぶきた’および‘S-24’(いずれも var. *sinensis*)を、ヤブツ

バキとして野菜茶業研究所枕崎茶業研究拠点の遺伝資源より、系統‘ヤブツバキ1(var. *japonica*)’および‘ユキツバキB(var. *decumbens*)’を、それぞれ実験に供試した。

RAPDによる‘炉開き’の後代1個体(以下、‘炉開き後代-1’)の雑種性の調査には、‘炉開き後代-1’とともに、‘炉開き’、同様にチャとツバキの人為交雑種‘茶中間母本農1号(チャツバキ)’(チャ品種‘さやまかおり’×ヤブツバキ, 武田ら 1987)、ヤブツバキとして‘ヤブツバキ1, ユキツバキA(var. *decumbens*)’および‘ユキツバキB’の3栄養系統、チャとして‘インドネシア251, やぶきた, さやまかおり, きょうみどり, さみどり, ゆたかみどり, ME52, Z-1, 静-在16, さやまみどり, あさざり, たかちほ, 金-Ck17’および‘こまかげ’の14品種・系統を供試した。14品種・系統のうち、‘インドネシア251’のみが var. *assamica*, ‘ゆたかみどり’が var. *assamica* と var. *sinensis* との雑種(田中ら, 1996)、他の12品種・系統は var. *sinensis* に分類される。SSRマーカーによる調査では、上記に加え、ヤブツバキとして‘ヤブツバキ3, ヤブツバキ4, 朝顔, 坪井の春, 日月星(いずれも var. *japonica*)’および‘ユキバタツバキA(var. *intermedia*, var. *japonica* と var. *decumbens* の雑種)’の6栄養系を、計9のヤブツバキ栄養系を供試した。

第4章に記述の母性遺伝RAPDによる‘炉開き’の細胞質の調査には、‘炉開き’とともにヤブツバキとして‘ユキツバキB’, 日本在来チャの細胞質を持つチャ品種・系統として‘さやまかおり, きょうみどり, さみどり, ゆたかみどり, ME52, Z-1, 静-在16, さやまみどり, あさざり, たかちほ’, チャとヤブツバキの人為交雑種‘茶中間母本農1号(チャツバキ)’(チャ品種‘さやまかおり’が種子親, 武田ら, 1987)、中国導入系統で母性遺伝RAPD, TMIR-Y7を有しない‘金-Ck17’を供試した。母性遺伝RAPDのe-RAPDへの変換の確認には‘さやまかおり’および‘金-Ck17’の正逆交雑集団20個体を用いた。

b RAPDおよびe-RAPDの検出

チャの全DNAの抽出には、第4章に記述の改変CTAB法または第2章に記述の珪藻土とスピンフィルターを用いる方法を用いた。ヤブツバキ、‘炉開き’および‘チャツバキ’の全DNAの抽出には珪藻土とスピンフィルターを用いる方法またはNucleon PHYTO-PURE(Amersham)を使用した。PCRは液量10μl、酵

素には Ampli-Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems) 0.05unit/ μ l および添付の緩衝液を用い, $MgCl_2$ 2.5mM, dNTP それぞれ 0.125mM, 鋳型 DNA 2ng/ μ l にて行った。プライマーには Operon 社の 10mer KIT-H ~ Q (200種類)を濃度 2 μ M にて使用した。母性遺伝 RAPD 検出のためのプライマーは, TMIR-Y1 は OPG-07, TMIR-Y3 (第4章を参照) およびその e-RAPD への転換のために, OPL-07 およびその配列の 3' 末端に A, T, G および C を加えたプライマー (+ A プライマー: AGGCGGGAACA, + T プライマー: AGGCGGGAAC T, + G プライマー: AGGCGGGAACG, + C プライマー: AGGCGGGAACC) 計 4 種類を使用した。反応液は, 反応原液を作成・分注し, これに鋳型 DNA を加える方法で調製した。反応には GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) を用い, 反応温度は熱変性 93 $^{\circ}C$ 1分, アニーリング 42 $^{\circ}C$ 1分 30秒, 鎖伸長 72 $^{\circ}C$ 1分 で 40 サイクル行った。なお, 上記 40 サイクルに先立ち熱変性を完全にするため, 93 $^{\circ}C$ 5分, 上記 40 サイクルの後に 2 本鎖化を完全にするための 72 $^{\circ}C$ 10 分の反応を加えた。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲルにて電気泳動後, メチレンブルー, もしくはエチジウムブロマイドにて染色し, 得られた RAPD パターンを比較した。

c SSR マーカーの検出

全 DNA の抽出は上記 RAPD の検出に準じた。チャ由来の SSR マーカー TMSLA-45 (配列のアクセッションナンバー: AB099630) の検出にはプライマー TMSLA-45F: GTGCATGTGAGTATGTGTAGGGTGAG (蛍光標識 NED) を付加) および TMSLA-45D: TTTTCACATGGCAACTATCAATGGA を用いた。PCR は液量 20 μ l, 酵素には Ampli-Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems) 0.05Unit/ μ l および添付の緩衝液を用い, $MgCl_2$ 2.5mM, dNTP それぞれ 0.1mM, 鋳型 DNA 2ng/ μ l にて行った。反応には GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) を用い, 各サイクルの熱変性, アニーリング, 鎖伸長の時間は全て 30 秒, 反応温度は熱変性 94 $^{\circ}C$, 鎖伸長 72 $^{\circ}C$ で, アニーリングは最初 1 サイクル目から 14 サイクル目まで 62 $^{\circ}C$ から 55.5 $^{\circ}C$ まで 0.5 $^{\circ}C$ ずつ低下させ, この後, 55 $^{\circ}C$ で 20 サイクル計 34 サイクル行った。なお, 上記サイクルに先立ち熱変性を完全にするため, 94 $^{\circ}C$ 5 分, 上記サイクルの後に 2 本鎖化を完全にするための 72 $^{\circ}C$ 5 分の反応を加えた。得られた PCR 産物 1 μ l, 蛍光標識分子量マーカー GeneScan 500 ROX Size Stan-

dard (Applied Biosystems) 0.3 μ l, 脱イオン化ホルムアミド 13.7 μ l を混和し, 95 $^{\circ}C$ 10 分間の熱処理の後氷上にて急冷することにより 1 本鎖に変性させた。泳動には Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems) を使用し, 解析には 310 GeneScan 3.1 (Applied Biosystems) を使用した。

3 結果および考察

a ‘炉開き’の雑種性の確認

‘やぶきた’および‘ヤブツバキ1’の DNA を鋳型に用いて, Operon 社のランダムプライマー H ~ Q, 計 200 種類中より, チャーヤブツバキ間で単独または複数の多型バンドを生じる 33 種類のプライマー (Table 9) を 1 次スクリーニングした。次にこの 33 種類のプライマーを用いて, ‘炉開き’に加え, チャ品種・系統として ‘やぶきた’ および ‘S-24’, ヤブツバキ系統として ‘ユキツバキ B’ および ‘ヤブツバキ1’ の DNA を鋳型に用いて, RAPD 解析を行った。

最初に, 種内の多型と種間の多型を比較した。ヤブツバキの 2 栄養系 (‘ヤブツバキ1’ - ‘ユキツバキ B’) 間の鮮明な多型バンドが 4, チャの 2 栄養系 (‘やぶきた’ - ‘S-24’) 間の鮮明な多型バンドが 6 であったのに対し, ヤブツバキの 2 栄養系に共通だがチャの 2 栄養系からは検出されなかった鮮明な多型バンドは 33, 逆にチャの 2 栄養系に共通だがヤブツバキの 2 栄養系からは検出されなかった鮮明な多型バンドは 53 であった。ヤブツバキの 2 栄養系間およびチャの 2 栄養系間の違いは, ヤブツバキとチャの種間の違いに比べると僅かであったと言える。RAPD による ‘ヤブツバキ1’ と ‘ユキツバキ B’ の間の違いが僅かであったことは, ユキツバキとヤブツバキは表現型には明確な差が認められるも

Table 9. The preliminary selected RAPD primers that generated polymorphic bands between *Camellia sinensis* and *C. japonica*

Name of Operon kit	Primers
KIT-H	OPH-10, OPH-11
KIT-I	OPI-10
KIT-J	OPJ-01, OPJ-03, OPJ-05, OPJ-06, OPJ-07, OPJ-13
KIT-K	OPK-09, OPK-10
KIT-L	OPL-03, OPL-04, OPL-06, OPL-09
KIT-M	OPM-15
KIT-N	OPN-03, OPN-06, OPN-09, OPN-13
KIT-O	OPO-03, OPO-05, OPO-08, OPO-10, OPO-20
KIT-P	OPP-04, OPP-11
KIT-Q	OPQ-01, OPQ-05, OPQ-08, OPQ-09, OPQ-13, OPQ-20

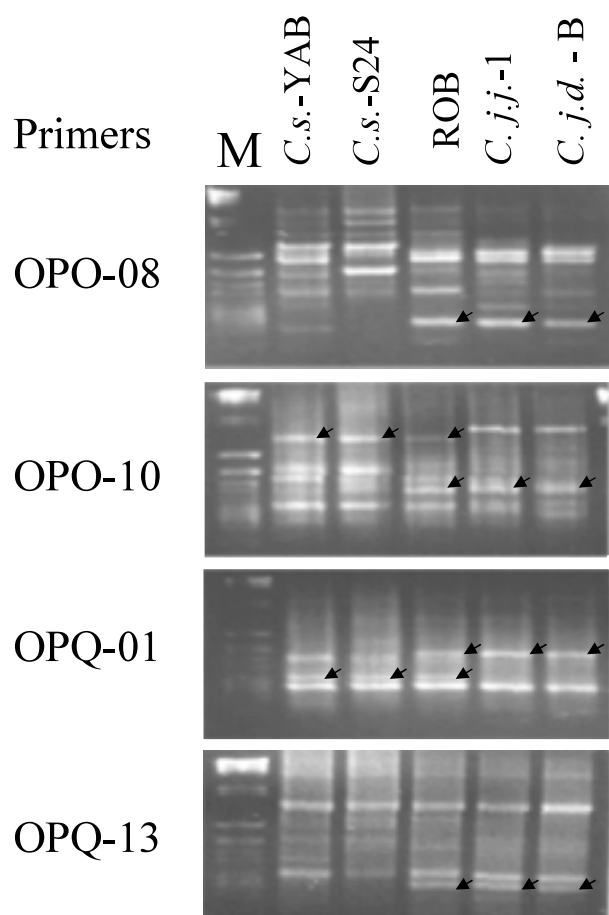


Fig. 15 Comparison of RAPD band patterns between tea (*Camellia sinensis*), garden-variety camellia 'Robiraki' and camellia (*C. japonica*). The arrows indicate tea- or camellia-specific RAPD bands. M: DNA size marker (Mixture of λ /HindIII digest and ϕ X174/HincII digest), C.s.-YAB: tea clone 'Yabukita', C.s.-S24: tea clone 'S-24', ROB: 'Robiraki', C.j.j.-1: camellia clone 'Yabutsubaki-1' (var. *japonica*), C.j.d.-B: camellia clone 'Yukitsubaki-B' (var. *decumbens*).

の、両者の遺伝的背景の差はチャとヤブツバキの種間の差に比べると極めて小さいことを示唆していた。

次いでチャとヤブツバキ両種と「炉開き」とを比較した。チャと「炉開き」を比較した場合、チャからは検出されず、「炉開き」にのみ検出される鮮明なRAPDバンド35本のすべてが、ヤブツバキ2栄養系の両方または片方から検出された。反対に、ツバキと炉開きを比較した場合、ヤブツバキからは検出されず、「炉開き」にのみ検出される鮮明なRAPDバンド61本のすべてが、チャ2栄養系の両方または片方から検出された。Fig. 15に「炉開き」がチャおよびヤブツバキ由来のRAPDバンドを共有する例を示す。調査した範囲においてチャおよび

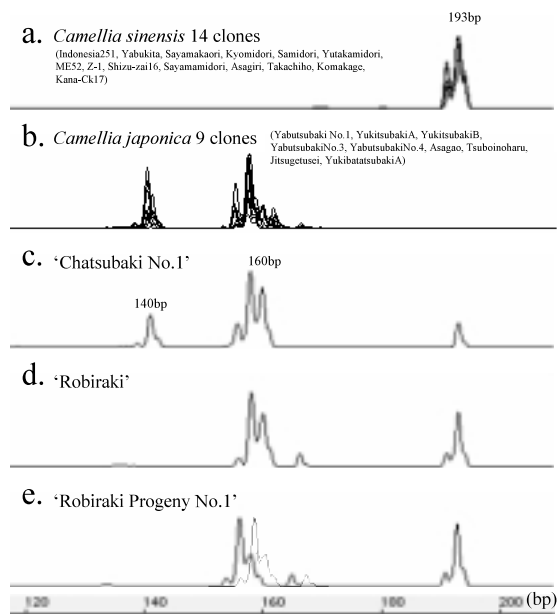


Fig. 16 Amplified fragment patterns of SSR marker TMSLA-45 in tea (*Camellia sinensis*, a), camellia (*C. japonica*, b) and their interspecific hybrids(c, d, e).

ヤブツバキに対して「炉開き」固有なバンドは認められず、いずれもチャとヤブツバキから遺伝したバンドとして説明できる範囲内であった。このことは、「炉開き」がチャとヤブツバキの種間雑種であることを強く支持していた。

その一方で、チャの中では多型が検出されないチャのSSRマーカー TMSLA-45 による調査を行った。供試した14全てのチャ品種・系統からは193bpの増幅産物のみが得られた(Fig. 16a)。同様に供試した9全てのヤブツバキの栄養系から160bpの増幅産物が得られ、140bpの増幅産物については検出されるものと検出されないものとがあった。一方、チャから検出された193bpの増幅産物が検出されるヤブツバキ栄養系は皆無であった(Fig. 16b)。このTMSLA-45を用いて「炉開き」および「茶中間母本農1号(チャツバキ)」を調査した結果、140bpの増幅産物は得られなかったもののヤブツバキ由来と推定される160bpおよびチャ由来と推定される193bp双方の増幅産物が検出された(Fig. 16c, d)。「炉開き」は「茶中間母本農1号(チャツバキ)」同様、チャ由来の193bpとヤブツバキ由来の160bpの増幅産物を共有することは、RAPDの結果と同様、「炉開き」がチャとヤブツバキの種間雑種であることを強く支持していた。TMSLA-45は今後、チャとヤブツバキを識別できるマ

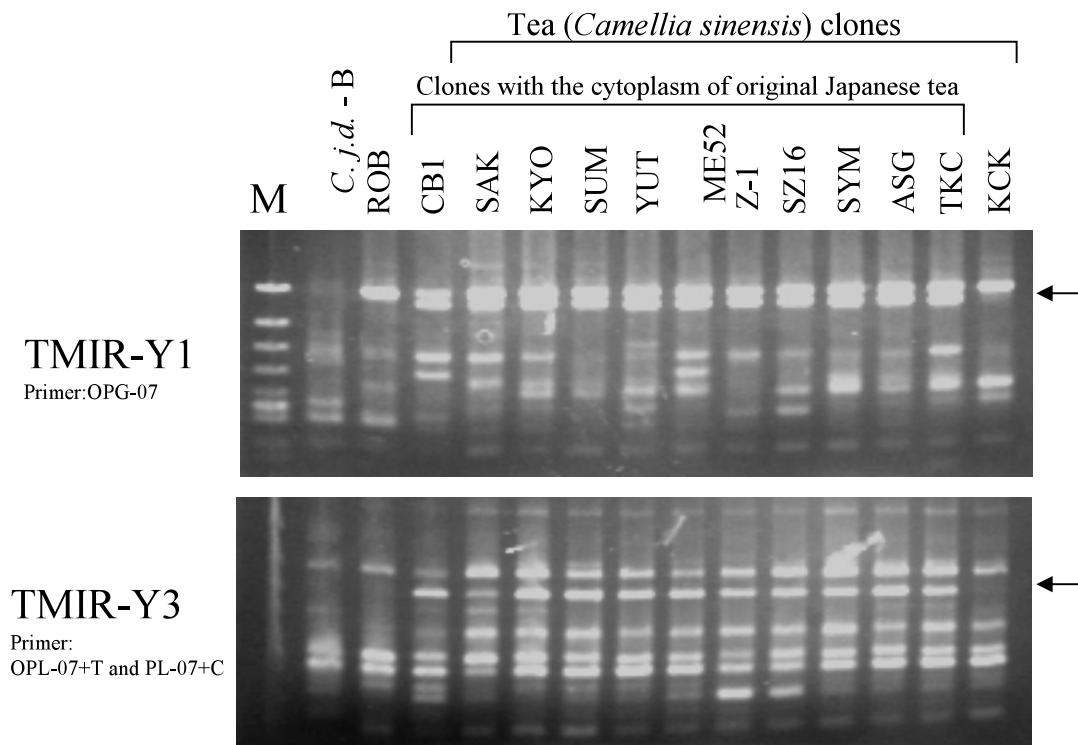


Fig. 17 Maternally inherited RAPD (TMIR - Y1) and e - RAPD (TMIR - Y3) band patterns of *C. japonica* var. *decumbens*, 'Robiraki' and *C. sinensis* (tea) clones that have the cytoplasm of original Japanese tea. M: DNA size marker (ϕ X174/*HincII* digest), *C. j. d. -B*: *C. japonica* var. *decumbens* clone 'Yukitsubaki - B', ROB: 'Robiraki', CB1: 'Chatsubaki No.1' (*C. sinensis* $\times$ *C. japonica*), SAK: 'Sayamakaori', KYO: 'Kyomidori', SUM: 'Samidori', YUT: 'Yutakamidori' ME52: 'ME52', Z-1: 'Z-1', SZ16: 'Shizu - zai16', SYM: 'Sayamamidori', ASG: 'Asagiri', TKC: 'Takachiho', KCK: 'Kana - Ck17'.

カーとしての有用性が高い。

次にチャとヤブツバキのどちらが種子親でどちらが花粉親であるかに興味に移る。萩屋らはこの点については言及していない(萩屋ら, 1981)が, チャの細胞質DNAをタイピングできる母性遺伝RAPDを利用すればこれを解明できる。ほとんどの日本在来チャより検出される母性遺伝RAPDとしてTMIR-Y1およびTMIR-Y3を用いて「炉開き」の細胞質を調査した。TMIR-Y3はやや不鮮明であったので, e-RAPD化し, 正逆交雑に由来するF₁分離集団を用いてその確認を行った。その結果, +Tおよび+Cプライマーを混合して用いることにより, より鮮明なバンドが得られることが判明し, 解析にはこれを用いた。TMIR-Y1, TMIR-Y3とも, 供試した10の全ての日本在来チャ品種・系統より検出されたが, 「炉開き」からはいずれも検出されなかった(Fig. 17)。両母性遺伝マーカーは, 日本在来チャの細胞質を広く標識していると考えられたが, 「炉開き」からはいずれも検出されず, 「炉開き」の細胞質は日本在来チャに由来するものではないと判断された。「炉

開き」の種子親が日本在来チャのものでないとすると, 「炉開き」の細胞質はもう一方の親のヤブツバキであり, 「炉開き」の自然交雑の際の種子親はヤブツバキ側であったと推測できる。これはチャツバキの細胞質がチャであることとは対称的であり, 「炉開き」は言わば『ツバキチャ』であると言える。

b 「炉開き」の後代の獲得と育種への利用の可能性

チャ系統「インドネシア253」を種子親に「炉開き」を花粉親に約200花の交雑実験を行い, 1個体(以下, 「炉開き後代-1」)を得た。「炉開き後代-1」の形態的形質はヤブツバキよりもチャに酷似したが, 詳細に観察するとヤブツバキに似た葉の光沢や淡いピンク色の花を咲かせる等, 「炉開き」経由と思われるヤブツバキの形態的特徴も同時に色濃く反映していた(Fig. 18)。この個体の種子親「インドネシア253」は残念ながら現存しないが, 収集源が共通であることが期待できる「インドネシア251」を比較材料に加え, ヤブツバキ由来で「炉



Fig. 18 Flower of 'Robiraki Progeny No.1'

開き' 経由で '炉開き後代-1' へと遺伝している RAPD を検索した。その結果、種子親の遺伝子型は不明ではあるが、OPO-20 を用いた場合にチャからは検出されずヤブツバキ由来と判断できる RAPD が '炉開き' 経由で '炉開き後代-1' へと遺伝している例が確認された (Fig. 19)。また、'炉開き後代-1' は供試したヤブツバキ 9 系統全てが有する SSR マーカー TMSLA-45 の 160bp の増幅産物を '炉開き' 経由でヤブツバキより引き継いでいることが確認された (Fig. 16e)。

以上より、'炉開き後代-1' はヤブツバキにチャを戻し交雑したものとも見做すことができる。ヤブツバキは

チャと比べて低温耐性、耐虫性、耐病性等において優れている。チャへのこれらの形質の交雑による導入が期待されてきたが、チャとの接木親和性が低い等、チャとヤブツバキは同属ではあるもののやや遠縁と言える。チャ育種にヤブツバキの有用な形質を導入する目的で数多くの人為交雑が実施され、いくつかのチャツバキが育成されてきたが、いずれも稔性が極めて低く、中間雑種であるチャツバキが得られてもその後代が得られない問題があった。今回、比較的少ない交配数で '炉開き' の後代が得られたことは、単なる偶然なのか、'炉開き' の花粉稔性がチャツバキより高いのか、もしそうであれば、それは '炉開き' がチャツバキではなくツバキチャであったためであるのか、あるいは雑種成立から長年経過した結果であるのか等々、多くの疑問が残る。しかし少なくとも、本実験の結果は '炉開き' および '炉開き後代-1' ヤブツバキが有する有用な形質をチャ育種に導入するための有望な橋渡し親となり得る可能性があることを強く示唆するものであった。

4 摘 要

ツバキの園芸品種 '炉開き' はその形態的特徴、発見された地域や状況等から、ヤブツバキの変種ユキツバキとチャの種間交雑種であると考えられてきた。これを検証するため、'炉開き' について、RAPD および SSR マー

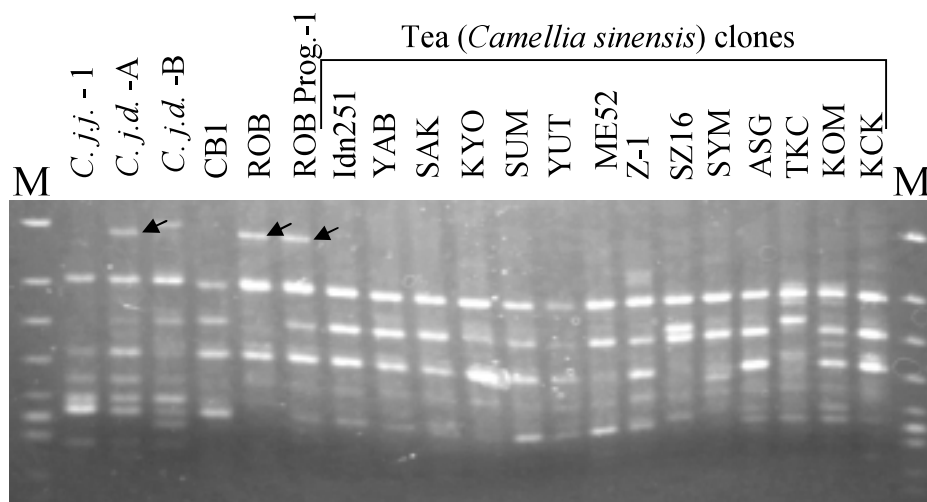


Fig. 19 Genetic inheritance of the RAPD band from *C. japonica* to 'Robiraki Progeny No.1' via 'Robiraki' (indicated by arrows) produced by OPO-20. M: DNA size marker (ϕ X174/*Hinc*II digest), *C.j.j.-1*: *C. japonica* var. *japonica* clone 'Yabutsubaki-1', *C.j.d.-A*: *C. japonica* var. *decumbens* clone 'Yukitsubaki-A', *C.j.d.-B*: *C. japonica* var. *decumbens* clone 'Yukitsubaki-B', CB1: 'ChatsubakiNo.1' (*C. sinensis* $\times$ *C. japonica*), ROB: 'Robiraki', ROB Prog.-1: 'Robiraki Progeny No.1', Idn251: 'Indonesia251', YAB: 'Yabukita' SAK: 'Sayamakaori', KYO: 'Kyomidori', SUM: 'Samidori', YUT: 'Yutakamidori' ME52: 'ME52', Z-1: 'Z-1', SZ16: 'Shizu-zai16', SYM: 'Sayamamidori', ASG: 'Asagiri', TKC: 'Takachiho', KOM: 'Komakage', KCK: 'Kana-Ck17'.

カーによる解析を行った．RAPD による解析においては，‘炉開き’から検出された RAPD バンドの全てがチャ，ヤブツバキのいずれかより検出された．さらに，チャでは多型が全く検出されなかったチャの SSR マーカー (TMSLA-45) についてヤブツバキを調査したところ，チャとは異なる増幅産物が検出され，‘炉開き’はチャとヤブツバキの増幅産物を共有していることが確認された．これらの結果は‘炉開き’が種間交雑種であることを強く支持するものであった．続いて母性遺伝 RAPD またはそれを e-RAPD 化したものを用いて‘炉開き’の細胞質を調査し，日本在来チャの細胞質とは異なることを確認した．これらの結果より，‘炉開き’は種子親がヤブツバキ，花粉親がチャの種間交雑種であると結論された．また，チャと‘炉開き’を交雑し，両者の形態的特徴を色濃く反映する1個体を得た．この個体について調査し，ヤブツバキ由来の RAPD および SSR マーカーが‘炉開き’を経由してこの個体へと遺伝していることを確認し，チャ育種における‘炉開き’のヤブツバキの遺伝子の導入のための橋渡し親としての利用に道を拓く結果を得た．

VIII チャ品種‘さやまかおり’由来のクワシロカイガラムシ抵抗性に連鎖する DNA マーカーの開発と MAS

1 目 的

近年，降水量が少ない年を中心に茶園に激発するようになったクワシロカイガラムシ (*Pseudaulacaspis pentagona* Targioni) は，枝枯れ，個体の枯死等，深刻な被害を与えつつ，その発生面積を拡大し続けている．クワシロカイガラムシは樹冠内部の木質化した枝に寄生するため薬剤がかかりにくく，効果的な防除時期がふ化幼虫期に限られる等の典型的な難防除害虫となっている．当害虫の流行は単一の栄養系品種‘やぶきた’と薬剤散布に過度に依存した現在の茶栽培が受けた手痛いしっぺ返しとも言える．抵抗性を有しかつ良質多収な品種の開発が急務である．

クワシロカイガラムシに抵抗性を有する素材は，var. *assamica* またはその後代では散見されるが，var. *sinensis* 中ではきわめて限られている．このような中，緑茶用品種‘さやまかおり’がクワシロカイガラムシに抵抗性を有することが早くから報告されてきた (重ら，1993)．‘さやまかおり’は製品にした時の外観が黒みを帯びる，チャの最重要病害とされる炭疽病に極めて弱

い等の欠点はあるものの，var. *assamica* やその後代に比べて製茶品質が格段に優れ，収量性，耐寒性にも優れており，チャ育種における交配母本としても多く使用されてきた．また，‘さやまかおり’の花粉親は中国導入系統である可能性が示される (第 6 章) 等の理由から，ヘテロ接合度が高く多くの DNA マーカーがその F₁ 世代において分離することが期待できる．本章では，‘さやまかおり’の後代を用いたクワシロカイガラムシ抵抗性に連鎖する DNA マーカーの開発について報告する．

2 材料および方法

‘さやまかおり’と遺伝資源保存系統で炭疽病に抵抗性の‘金-Ck17’の正逆交雑集団 62 系統を実験に供試した．当集団を材料に pseudo-testcross (GRATTAPAGLIA ら，1994) 理論に基づく連鎖地図作成が進行中であり，データの一部は太田ら (1999) に発表されている．連鎖地図作成で得られた DNA マーカーのうち，‘さやまかおり’がヘテロに有する 633 の DNA マーカー (内訳は RAPD : 583, CAPS : 7, SSR : 43) の情報を利用した．DNA の抽出は第 2 章の方法，RAPD の検出は第 3 章と同様に行った．抵抗性選抜マーカー MSRS8E の検出にはライマーとして OPAX11A (塩基配列：5'-TGA TTGCGGGA-3') および OPAX11TG (塩基配列：5'-TG ATTGCGGGTG-3') を使用した．

クワシロカイガラムシ抵抗性の評価は，野菜茶業研究所枕崎茶業研究拠点の圃場内の 3 地点の自然発生程度に加えて，宮崎県総合農業試験場茶業支場における接種法による評価法 (水田，2003) を参考にした．3 地点において自然発生がほとんどない系統を抵抗性，発生がある系統を感受性とし，中間的で判断のつけにくいものについては，宮崎県総合農業試験場茶業支場における接種法による評価値を参照し決定した．宮崎県総合農業試験場茶業支場における接種法による評価値も中間的であったものについては，中間型とした．

3 結果および考察

クワシロカイガラムシ抵抗性の評価より，中間型のデータを除き， χ^2 乗検定にて連鎖関係の認められる DNA マーカーを検索した．その結果，17 の RAPD との間で有意な連鎖が認められ，特に Operon 社のランダムプライマー OPAX-11 により得られた約 300bp のバンドの有無とクワシロカイガラムシ抵抗性の評価は完全に一致した．さらにこのバンドを e-RAPD 化 (第 3 章) し，MSRS8E とした．F₁ 分離集団における MSRS8E と抵抗

性の評価との関係を Table 10 に示す。クワシロカイガラムシ抵抗性と MSRS8E は相引の関係であった。MSRS8E は他の主な交配母本から検出されないで、極めて広い交雑組み合わせで利用できる。2002 年の MAS では、品種育成事業において、‘さやまかおり’の後代にあたる 1,250 個体について DNA マーカー選抜を実施し、約 47% にあたる 583 個体を抵抗性と評価した。また、チャ系統適応性検定試験への供試系統のクワシロカイガラムシ抵抗性について両マーカーを調査した結果、両マーカーを用いた判定は抵抗性と完全に一致した (Table 11)。

‘さやまかおり’および‘金-Ck17’の正逆交雑集団より、クワシロカイガラムシ抵抗性の MSRS8E による後代の MAS が可能で、チャの主要な病害である炭疽病および輪斑病に抵抗性、かつ緑茶としての製茶品質の優れた系統として‘KM8’ (中生) および‘KM62’ (晩生) を選抜し、中間母本登録登録した (田中ら, 2004)。両系統の後代は輪斑病、炭疽病に抵抗性の個体も出現することが確認されている他、MSRS8E によるクワシロカイガラムシ抵抗性の MAS が可能である。両系統の種子親は日本の多くのチャ品種と異なる細胞質を持つ‘金-Ck17’ (第4章参照) であり、両系統を種子親として交雑母本に用いれば、日本のチャ品種の細胞質の多様化に効果がある。

近年、品質・収量が優れる多くの新品種が育成されるようになったが、耐病性耐虫性の問題をクリアしているとは言い難い。上記中間母本等、耐病性耐虫性の素材を交雑に用い、クワシロカイガラムシ抵抗性の MAS をはじめ早期選抜を実施し世代を重ねながら、品質・収量が優れ耐病性耐虫性のチャ品種の育成を目指す必要がある。

4 摘 要

チャのクワシロカイガラムシ抵抗性品種‘さやまかおり’の後代を用いて抵抗性に連鎖する RAPD を検出し、e-RAPD (MSRS8E) 化することで、クワシロカイガラムシ抵抗性の MAS を実用化した。クワシロカイガラムシ抵抗性と MSRS8E は相引の関係であり、他の主な交配母本から検出されないで、‘さやまかおり’の後代であれば、交雑組み合わせを選ばず利用できる。

IX 総合考察

本研究の最終的な目標はチャにおいて MAS を実現し、世代促進技術と組み合わせることによりチャ育種の近代

Table 10. Segregation of mulberry scale resistant and DNA markers for MAS in progeny derived from a reciprocal cross between Sayamakaori and Kana-Ck17

Clone	Judgment of mulberry scale resistant	MSR1-S1	MSR1-S8
Sayamakaori	R	+	+
Kana-Ck17	S	—	—
KM1	R	+	+
KM2	R	—	+
KM3	R	+	+
KM4	R	+	+
KM5	S	—	—
KM6	S	—	—
KM7	R	+	+
KM8	R	+	+
KM9	R	+	+
KM10	S	—	—
KM11	R	+	+
KM12	M	—	+
KM13	R	+	+
KM14	S	—	—
KM15	S	—	—
KM16	S	—	—
KM17	M	+	+
KM18	R	+	+
KM19	S	—	—
KM20	R	+	+
KM21	R	+	+
KM22	R	+	+
KM23	R	—	+
KM24	M	—	—
KM25	R	+	+
KM26	R	+	+
KM27	M	+	+
KM28	S	—	—
KM29	S	—	—
KM30	M	—	—
KM31	R	+	+
KM32	R	—	+
KM33	R	+	+
KM34	S	—	—
KM35	S	—	—
KM36	R	+	+
KM37	R	+	+
KM38	S	—	—
KM39	R	+	+
KM40	S	—	—
KM41	R	—	—
KM42	S	—	—
KM43	R	+	+
KM44	S	—	—
KM45	S	—	—
KM46	S	—	—
KM47	S	—	—
KM48	S	—	—
KM49	R	+	+
KM50	R	+	+
KM51	R	+	+
KM52	S	—	—
KM53	S	—	+
KM54	R	+	+
KM55	S	—	—
KM56	R	+	+
KM57	R	+	+
KM58	S	—	—
KM59	R	+	+
KM60	S	—	—
KM61	S	—	—
KM62	R	+	+

R:Resistant, M: medium, S: susceptible

Table11. Correspondence between mulberry scale resistance and DNA markers for MAS in the local adaptability test in tea

Strain	Cross combination	Mulberry scale resistance	MSR1-S1	MSR1-S8
Miyazaki 17-gou	Sayamakaori × ME52	Resistance	+	+
Miyazaki 23-gou	Sayamakaori × Miyazaki 8-gou	Resistance	+	+
Miyazaki 24-gou	Sayamakaori × Shizu-Inzatsul31	Resistance	+	+
Makukrazaki 20-gou	Sayamakaori × Yaeho	Susceptible	—	—
Makukrazaki 21-gou	Sayamakaori × Makuzai-87-7	Resistance	+	+
Makukrazaki 22-gou	Sayamakaori × Kuritawase	Susceptible	—	—
Makukrazaki 24-gou	Sayamakaori × ME52	Resistance	+	+
Kanaya 23-gou	Sayamakaori × Z-1	Resistance	+	+

化を実現することに置きながら、そこで得られる DNA マーカーを遺伝的多様性の評価や親子鑑定にも利用してきた。本研究では、チャの DNA マーカー検出の効率化のために、迅速 DNA 抽出法の開発、得られた RAPD の安定化のための e-RAPD を開発した。また、母性遺伝 RAPD の検出や連鎖地図の作成等で得られたマーカーを用いた遺伝的多様性の評価や親子鑑定を行った。実際に QTL 解析の材料の親として用いた‘さやまかおり’に加えて、ヤブツバキが有する有用な形質をチャ育種に導入するための橋渡し親として、ツバキの園芸品種‘炉開き’およびその後代が有望であることを見出した。クワシロカイガラムシ抵抗性については、実用的な選抜マーカーが得られ、MAS を実現した。DNA マーカーを得ることはゲノムの一部にタグをつけることができたことを意味する。DNA マーカーは環境や材料となる組織に左右されず親から子への遺伝等を詳細かつ適切に把握できる育種にとって極めて有用なツールである。

第8章では実用的な MAS のための DNA マーカーが得られたが、多くの作物において多数の実用形質に関与する QTL が得られているにも拘わらず、実際の育種事業で MAS が実施されている例は極めて少ない。いったい何が“見えないハードル”となっているのか、考察しておく必要がある。

MAS 実用化への第1のハードルを著者は“マーカー開発と利用のジレンマ”と呼んでいる。すなわち、よいマーカーを得ようとするれば、形質評価が重要であることは多くの QTL 解析の経験のある研究者なら知っている。すなわち QTL 解析はあくまでも統計的手法によるものであり、それゆえ形質評価の誤差は QTL の LOD を下げる最大の敵である。このため、より精度良く QTL を検出しようとするればより正確で再現性があり、可能であれば反復が可能な形質評価法が必要になる。そしてついに QTL、そして連鎖マーカーが得られ、それを育種現場へ、

という段階になる。ところが育種現場では、開発された DNA マーカーは、そのマーカー開発の前提となった、より正確で再現性があり可能であれば反復が可能な形質評価法と、評価のためのコスト、労力、時間、安全性、正確さ、親しみやすさ等々の点で競争しなければならない。“マーカー開発と利用のジレンマ”の解決のためには、MAS の対象になる育種的に価値の高い QTL の検出が重要である。『育種的に価値の高い QTL』とは、一般的な形質評価法による評価が困難であり、その形質が重要かつ遺伝力が高く、かつ作用力が大きな QTL である。結局、育種目標の適切な設定と、育種素材・遺伝資源から優良形質を決定する QTL とそのアレルを検出することが MAS の実現においてもきわめて重要であり、これは古くから説かれてきた育種の基礎の基礎と何ら変わることがない。

MAS 実用化への第2のハードルは“マーカー選抜適用範囲の制限”である。あるいはマーカーの“アレル特異性の問題”とも言える。有用な QTL が検出されその連鎖マーカーが得られたとしても、有用と判断される QTL のアレルと相引で連鎖するアレルが実際にありふれたアレルであれば、実際に使用でき交雑組み合わせが極めて限定されてしまう。つまり、交雑相手がもしそれと同じアレルをもっていれば、交雑相手のアレルから検出されるバンドがバックグラウンドとなり、そのマーカーは実際にはその集団では使用できない。アレル特異性についてはアレルの数が多い SSR マーカー等、共優性のマーカーが一見有利であるが、それは一般論にすぎない。『目的とする形質と相引に連鎖するアレルがどれほど特異的か』という個々のマーカーの事情に依存するところが極めて大きい。たとえ SSR マーカーであっても抵抗性にリンクするアレルがありふれたアレルであれば、選抜に利用可能な範囲が大きく制限されることになる。重要なことは“マーカーの種類”ではなく“アレル特異性”

である。MSR1-S8は優性の RAPD でありながらも“アレル特異性”が高く相引に連鎖しているため、利用可能範囲が広く、‘さやまかおり’の次世代はもちろん、連鎖が切れない限り‘さやまかおり’の子々孫々まで利用が可能であった。

チャのクワシロカイガラムシ抵抗性の MAS 実用化には“マーカー選抜適用範囲の制限”の解決のためのヒントがある。ポイントを以下のように整理することができる。

- (1) 第6章の結果を受けて、中国導入系統が片親と思われる、多くのマーカーをヘテロに持つことが予想された‘さやまかおり’を解析の材料に用いた。
- (2) RAPD から e-RAPD への変換を前提に検出コストの低い RAPD をマーカーの中心にした。
- (3) 1000 を越えるマーカーの数を確保した。
- (4) クワシロカイガラムシ抵抗性の QTL がマーカーの密集する部位に検出された。
- (5) 多くの連鎖マーカーの中からアレル特異性の高いマーカーをスクリーニングすることができた。

このうち(4)は偶然の産物であるが、‘さやまかおり’を解析に用いたことにより、多くのマーカーが F_1 集団中分離し、RAPD を用いたこともあり、低コストで多数のマーカーを確保することができた。このことは次に述べるアレル特異的マーカーの獲得に重要な役割を果たした。また、実際に MAS を開始する際には、珪藻土とスピンフィルターを用いた DNA 抽出法の開発(第2章)と RAPD によるコストの低さが鍵であった。

本研究において、最終的にクワシロカイガラムシ抵抗性の MAS を実用化した。確かにクワシロカイガラムシ抵抗性は極めて重要な育種目標ではあるが、同時に重要な育種目標の一つにすぎない。他の育種目標についても適切な材料の選択と効率的なマーカーの検索により、MAS の実用化を急ぐ必要がある。また、チャ育種の近代化のためには世代促進技術の開発と利用が極めて重要であることも忘れてはならない。

チャの栽培現場へ足を運ぶと、栽培されている品種の大半が‘やぶきた’であり、まだチャ品種と言えば‘やぶきた’の時代が続いていることを思い知らされる。適切な戦略に基づいた緑茶品種のレベルの向上により、時代を切り拓いてゆく必要がある。

引用文献

- 1) 安間 舜・渡邊 明(1983): チャの有用生殖質の長期保存。茶試研報, 19, 29-57。
- 2) BEVERSDORF, W. D., J. WEISS-LERMAN, L. R. ERICKSON and V. S. MACHADO (1980): Transfer of cytoplasmically-inherited triazine resistance from bird's rape to cultivated oilseed rape (*Brassica campestris* and *B. napus*). Can. J. Genet. Cytol., 22, 167-172.
- 3) BANERJEE, B. (1988): Cup that cheers. Nature, 332, 580.
- 4) BANERJEE, B. (1992): Botanical classification of tea. In Tea Cultivation to consumption, (Wilson, K.C. and Clifford, N. M., Eds.), Chapman and Hall London, UK, 25-51.
- 5) COMSTOCK J. C. and R. P. SCHEFFER (1972): Production and relative host-specificity of a toxin from helminthosporium maydis race T. Plant Dis. Rep., 56, 247-251.
- 6) DAVIS, T. M., H. YU, K. M. HAIGIS and P. J. MCGOWAN (1995): Template mixing: a method of enhancing detection and interoretation of codominant RAPD markers. Theor. Appl. Genet., 91, 582-588.
- 7) DUDLEY, J. W. and R. J. LAMBERT (1992): Ninety generations of selection for oil and protein in maize. Maydica, 37, 81 - 87.
- 8) FELSENSTEIN, J. (1993): Phylogeny. Inference package version 3.5c: Distributed by author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, USA.
- 9) 淵之上康元・田中万吉・船越昭治・岡野信雄(1972): 煎茶用新登録品種「さやまかおり」。茶研報, 37, 12-23.
- 10) 古野鶴吉・吉留 浩・間曾龍一・佐藤邦彦・上野貞一・平川今夫・安部二生(1999): 煎茶用品種「さきみどり」の育成。茶研報, 87, 67-76.
- 11) GRATTAPAGLIA, D. and R. SEDEROFF (1994): Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: Mapping strategy and RAPD markers. Genetics, 137, 1121-1137.
- 12) 八戸三千男・永田信彦・関村 潔・三上哲夫・木下俊郎(1981): 細胞質型の異なるテンサイ系統間に見られた放射線感受性の差異。てん菜研究会報, 23, 33-40。
- 13) HADFIELD, W. (1968): Leaf temperature, leaf pose and productivity of the tea bush. Nature, 219, 282-284.
- 14) 萩屋 薫・甲 政治(1981): ユキツバキとチャの自然雑種・「炉開き」。椿, 21, 2-8。
- 15) HANSEN, N. J. V., P. KRISTENSEN, J. LYKKE, K. K. MORTENSEN and B. F. C. CLARK (1995): A fast, economical and efficient method for DNA purification by use of a homemade bead column. Biochem. Mol. Biol. Int., 35, 461-465.
- 16) 池田延行・山田哲也・上島脩志・石井尊生(2000): イネ Wild QTL 解析6. イネにおけるマイクロサテライトマーカーを利用した効率的な marker-assisted selection のための超簡単 DNA 抽出法。育種学研究, 2(別2), 134。
- 17) 石舘守三・上田 陽(1952): 茶種子中のサポニンの研究(第一報)。薬学雑誌, 72, 1523-1524。
- 18) KATO, M. (2001): Analysis of differentiation of teas uses DNA markers in evergreen forest. Proceedings of 2001 international conference on O-CHA (tea) culture and science, I, J, 8-12.
- 19) KAUNDUN, S. S., A. ZHYVOLOUP and Y. G. PARK, (2000): Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) genotypes using RAPD markers. Euphytica, 115, 7-16.
- 20) KIM, K. S. and C. K. PALLAGHY (1996, modified 1997): Purification of plasmid DNA (miniprep) with high yields using diatomaceous earth. U.S. Dept. Commerce/ NOAA/ NMFS/NWFSC/Molecular Biology Protocols, <http://www.nwfsc.noaa.gov/protocols/dna-prep.html>.
- 21) 近藤貞昭・池田奈実子・田中淳一・武田善行・武弓利雄・

- 渡邊 明・安間 舜・勝尾 清・増田清志・築瀬好充・山口敏(1999): 煎茶用中晩生品種‘りょうふう’の育成. 茶研報, 87, 21-38.
- 22) 倉貫幸一・青野(柴田)真理子・永谷隆行・中村順行・日高 保(1997): 煎茶用の新しい早生品種‘山の息吹(やまのいぶき)’. 静岡茶試研報, 21, 1-11.
- 23) LEE, S. H., H. S. CHOI, R. S. KIM, H. Y. LEE and I. S. NOU (1995): Identification of Korean wild tea plants and Japanese green tea cultivars using RAPD markers. Journal of Korean Tea Science, 1(1), 129-48.
- 24) LEVINGS, C. S. (1983): The plant mitochondrial genome and its mutants. Cell, 32, 659-661.
- 25) LIANG, Y., J. TANAKA and Y. TAKEDA (2000): Parentage analysis of tea clone "Okumidori" with RAPD method. Journal of Tea Science, 20(1), 22-26.
- 26) LIU, Y. G., N. MITSUKAWA, T. OOSUMI and R. F. WHITTIER (1995): Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J, 8, 457-463.
- 27) LORENZ, M., A. WEIHE and T. BORNER (1997): Cloning and sequencing of RAPD fragments amplified from mitochondrial DNA of male-sterile and male-fertile cytoplasm of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet., 94, 273-278.
- 28) MARECHAL-DROUARD, L. and P. GUILLEMAUT (1995): A powerful but simple technique to prepare polysaccharide-free DNA quickly and without phenol extraction. Plant Mol. Biol. Rep., 13, 26-30.
- 29) MATSUMOTO, S., A. TAKEUCHI, M. HAYATSU, S. KONDO (1994): Molecular cloning of phenylalanine ammonia-lyase cDNA and classification of varieties and cultivars of tea plants (*Camellia sinensis*) using the tea PAL cDNA probe. Theor. Appl. Genet., 86, 671-675.
- 30) 松下 智(2002): ヤマチャの研究. 日本茶の起源・伝来を探る. 岩田書院, 東京, 242p.
- 31) 水田隆史(2003): チャ樹におけるクワシロカイガラムシ *Pseudaulacaspis pentagona* Targioni の発育と増殖の品種間差異. 応動昆, 47, 91-96.
- 32) MURRAY, M. G. and W. F. THOMPSON (1980): Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res., 8, 4321-4325.
- 33) NAGATA, T. and S. SAKAI (1985): Caffeine, flavanol and amino acid contents in leaves of hybrid and species of the section *Dubiae* in genus *Camellia*. Japan. J. Breed., 35, 1-8.
- 34) NAKAJIMA, Y., K. OEDA and T. YAMAMOTO (1998): Characterization of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus* varieties by RAPD and AFLP. Plant Cell Rep., 17, 848-853.
- 35) NAKAJIMA, Y., T. YAMAMOTO and K. OEDA (1997): Genetic variation of mitochondrial and nuclear genomes in carrots revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Euphytica, 95, 259-267.
- 36) NAKAMURA, C., M. KATSUTA, T. TAKESHITA, N. ASAKURA, S. TAKUMI and N. MORI (2000): Detection of plasmon-specific RAPD markers using the alloplasmic hybrids of common wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chinese Spring. Wheat Inf. Serv., 90, 31-36.
- 37) 中村順行・松浦建雄・日高 保・倉貫幸一・大石貞男・伊藤英史(1986): 煎茶用新品種「おくひかり」. 静岡茶試研報, 12, 23-32.
- 38) 中村順行・永谷隆行・倉貫幸一・日高 保・青野(柴田)真理子(1999): 香味豊かな煎茶用新品種「香駿」. 静岡茶試研報, 22, 23-33.
- 39) NEI, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 70, 3321-3323.
- 40) 太田さくら・田中淳一(1999): チャ品種「さやまかおり」と育成系統「金-Ck17」のF₁集団を用いたRAPDベースの連鎖地図の作成. 育種学研究, 1(別1)), 16.
- 41) OWUOR, P. O., T. TAKEO, H. HORITA, T. TSUSHIDA and T. MURAI (1987): Differentiation of clonal teas by Terpene Index. J. Sci. Food Agri., 40, 341-5.
- 42) 小柳津勤・倉貫幸一・中村順行・日高 保・青島洋一(2003): 新しい煎茶用品種「つゆひかり」. 茶研報, 95, 1-15.
- 43) PAUL S., F. N. WACHIRA, W. POWELL and R. WAUGH (1997): Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. Theor. Appl. Genet., 94, 255-63.
- 44) POWELL, W., M. MORGALITE, C. ANDRE, M. HANAFEY, J. VOGEL, S. TINGEY and A. RAFALSKL (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2, 225-38.
- 45) SCHMITZ, U. K. and G. MICHAELIS (1988): Dwarfism and male sterility in interspecific hybrids of *Epilobium*. 2. Expression of mitochondrial genes and structure of the mitochondrial DNA. Theor. Appl. Genet., 76, 565-569.
- 46) SEALY, J. R. (1958): A revision of genus *Camellia*. The Royal Hort. Soc.). London, UK.
- 47) 重 光雄・野中寿之・永友 繁・田中敏弘(1993): クワシロカイガラムシ抵抗性のチャ品種間差異と検定法. 茶研報, 78(別), 10-11.
- 48) 重 光雄・田中敏弘・花田十矢(1996): 煎茶用新品種「あさのか」. 鹿児島県茶試研報, 11, 1-10.
- 49) TAKEDA, Y. (1988): Genetic analysis of tea gray blight (*Pestalotia longiseta* SPEGAZZINI) resistance in tea plant. Proceeding of the International Symposium on Recent Development in Tea Production, 205-212.
- 50) TAKEDA, Y. (1994): Differences in caffeine and tannin contents between tea (*Camellia sinensis*) cultivars, and application to tea breeding. JARQ, 28, 117-123.
- 51) 武田善行(2004): 台湾山茶の不思議. 茶のサイエンス—育種から栽培・加工・喫茶まで. 初版 pp.18, つくば書房, 東京, 205p.
- 52) 武田善行・根角厚司・和田光正・佐波哲次・大前 英・田中淳一・近藤貞昭・武弓利雄・池田奈実子・八戸三千男(2002): 煎茶用新品種「はるみどり」の育成. 野茶研報, 1, 1-13.
- 53) 武田善行・鳥屋尾忠之(1980): 花器形態による緑茶用品種の識別と分類. 茶研報, 52, 1-6.
- 54) 武田善行・和田光正・根角厚司・池田奈実子・近藤貞昭・八戸三千男・築瀬好光(1991): 煎茶用早生品種「さえみどり」の育成. 野茶試研報, B4, 1-15.
- 55) 武田善行・築瀬好充・安間 舜(1987): チャとヤブツバキのF₁雑種の育成とその特性について. 野茶試研報, B1, 11-21.
- 56) 田村輝夫・萩屋 薫・箱田直紀(1989): ツバキ属, “園芸植物大辞典(3)”, 相賀徹夫編, 小学館, 東京, 267-275.
- 57) 田中淳一(2002): 世代促進とDNAマーカーによる早期選抜が木本性作物育種を変える. 農業および園芸, 77, 959-961.
- 58) TANAKA, J. and S. IKEDA (2002): Rapid and efficient DNA extraction method from various plant species using diatomaceous earth and a spin filter. Breed. Sci., 52, 151-155.

- 59) TANAKA, J., D. KURIHARA and S. YAMAGUCHI (2002): Seed and pollen parents affect the weight of F1 seeds and the number of days until emergence in tea. JARQ, 36, 189-193.
- 60) 田中淳一・太田(目徳)さくら(2002): 正逆交雑集団を用いたチャの母性遺伝 RAPD の検出. 育種学研究, 4, 215-222.
- 61) 田中淳一・太田(目徳)さくら・武田善行(2003): ツバキ園芸品種「炉開き」がヤブツバキ(*Camellia japonica*)×チャ(*C. sinensis*)の種間交雑種であることの RAPD および SSR マーカーによる確認とチャ育種への利用の可能性. 育種学研究, 5, 149-154.
- 62) TANAKA, J. and F. TANIGUCHI (2002): Emphasized-RAPD (e-RAPD): a simple and efficient technique to make RAPD bands clearer. Breed. Sci., 52, 225-229.
- 63) 田中淳一・谷口郁也・吉田克志・荻野暁子・武田善行(2004): 後代の DNA マーカー選抜が可能なクワシロカイガラムシ抵抗性茶育種素材の開発と利用. 育種学研究, 6(別1), 317.
- 64) 田中淳一・山口信雄・中村順行(2001): 耐虫性, 耐寒性チャ品種「さやまかおり」の花粉親は現存しない可能性が高い. 育種学研究, 3, 43-48.
- 65) 田中淳一・山口聡(1996): RAPD によるチャ品種の親子関係の検定. 野茶試研報, B9, 31-36.
- 66) 塘二郎・淵之上康元・淵之上弘子(1956): 茶樹の自家受粉に関する研究. 茶研報, 7, 14-20.
- 67) 鳥屋尾忠之・武田善行(1999): チャの花器形態の地理的変異と数値分類. 茶研報, 87, 39-57.
- 68) 津山 尚(1989): ツバキ属, “日本の野生植物木本 I”, 佐竹義輔・原 寛・亘理俊次・富成忠夫編, 平凡社, 東京, 138-141.
- 69) 鵜飼保雄(2000): ゲノムレベルの遺伝解析: MAP と QTL. 東京大学出版会, 東京. 350p.
- 70) VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. LEE, M. HORNES, A. FRUITERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER and M. XABEAU (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nuc. Ac. Res., 23, 4407-4414.
- 71) WACHIRA, F. N., W. POWELL and R. WAUGH (1997): An assessment of genetic diversity among *Camellia sinensis* (cultivated tea) and its wild relatives based on randomly amplified polymorphic DNA and organelle specific STS. Heredity, 78, 603-611.
- 72) WACHIRA, F., J. TANAKA and Y. TAKEDA (2001): Genetic Variation and differentiation in tea germplasm revealed by RAPD and AFLP variation. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 76(5), 557-563.
- 73) WACHIRA, F. N., R. WAUGH, C. A. HACKETT and W. POWELL (1995): Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. Genome, 38, 201-210.
- 74) WAGNER, D. B., G. R. FURNIER, M. A. SAGHAI-MAROOF, S. M. WILLIAMS, B. P. DANCIG and R. W. ALLARD (1987): Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 2097-2100.
- 75) WEBER, J. K. and P. E. MAY (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet., 44, 388-397.
- 76) WICKREMATNE, M. R. (1981): Variation in some leaf characteristics in tea (*Camellia sinensis* L.) and their use in the identification of clones. Tea Quarterly, 55, 183-189.
- 77) 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. Nuc. Ac. Res., 18, 6531-6535.
- 78) 山口信雄・田中淳一(1999): チャの母性遺伝 RAPD からみた日本在来チャ集団の特徴. 育種学研究, 1(別2), 295.
- 79) 山口聡・武弓利雄・池田奈実子・武田善行・渡邊明・築瀬好充・安間舜(1992): 煎茶用新品種「ふうしゅん」の育成. 野茶試研報, B5, 1-13.
- 80) YU, F. and N. XU (1999): Tea germplasm resources of China. In: *Global advances in tea science*. (Jain, N. K., Ed.). Aravali Books International, New Delhi, India, 393-412.
- 81) ZABEAU, M. (1993): Selective restriction fragment amplification: a general method for fingerprinting. European Patent Application of 9229 (Publ. No. 0534-858 A1).

Study on the Utilization of DNA Markers in Tea Breeding

Junichi TANAKA

Summary

The final goal of this study is the modernization of tea (*Camellia sinensis*) breeding by the practical marker-assisted selection (MAS). DNA markers were available to evaluate genetic diversity and parantage tests. For DNA marker detection, an efficient DNA extraction method is necessary. The method described in this paper is simple, rapid, low-cost and applicable to the extraction of DNA from polysaccharide- and polyphenol-rich plants, like tea. Based on the technique, the emphasized-RAPD (e-RAPD) system described in this paper could make minor RAPD bands clearer. Maternally inherited RAPDs were detected in F_1 populations derived from reciprocal crosses. The maternally inherited RAPDs can be used for typing the cytoplasmic DNAs and determining which was the seed parent. DNA polymorphisms linked to murberry scale resistance gene *MSR-1* were detected and some allele-specific markers for the gene were developed. By the combination of an efficient DNA extraction system and the highly allele-specific markers, the MAS system for murberry scale resistance was established in tea.