

RAPD法によるマンシュウマメナシ台木における ひこばえ多発生系統の探索

山本 洋子・深見 正信・児嶋 正敏*

キーワード：ニホンナシ、台木、マンシュウマメナシ、ひこばえ、RAPD法

I 緒 言

ニホンナシ主要品種「幸水」は、千葉県で一般栽培が開始されてから40年以上経過し、老木化現象による生育衰退、収量減が顕著になり、改植時期にさしかかっている。速やかな圃の若返りには、改植に当たって植え付けた苗木の初期生育の確保が極めて重要である。苗木の初期生育を左右する要因は、植え付け方法や初期管理方法のほかに、苗木の素質が重要で、接ぎ木に用いられる台木の種類が苗木の素質に大きく影響すると考えられる。苗木の植え付け方法や初期管理方法については、多くの研究があるが、ナシ台木については、リンゴやブドウと比較して少なく、苗木向上へ向けた優良台木の早急な選定が求められている。

ニホンナシの台木には、ヤマナシ(*Pyrus pyrifoliae*)、マンシュウマメナシ(*Pbeturaefolia*)、マメナシ(*Pca-lleryana*)などが使われている。なかでも、マンシュウマメナシは耐寒性が強く、耐湿性も比較的に強い(阿部、1995)、近年台木として利用されることが多くなった。マンシュウマメナシは、このような優良な特性を有している。しかし、これを台木に用いると、苗木にひこばえの発生するケースが多い。しかも、「幸水」より「豊水」での発生が多い。また、ひこばえ多発生樹は、ひこばえを放置すると、小発生樹や無発生樹に比べ生育が劣る傾向が観察される。また、マンシュウマメナシを台木を用いた成圃を観察すると、樹によってひこばえの発生量に差がみられ、ひこばえ発生に関与する遺伝子の存在が推察された。

現在、農業総合研究センター・育種研究所・果樹苗木育種研究室では、配布用ニホンナシ苗木の台木として、マンシュウマメナシ6系統を母樹とし、その実生を用いている。この6系統からひこばえ多発生系統を探し出し、その系統を種子採取樹から除くことで、ひこばえ発

生の少ない苗木の育成が可能になると考えられた。そこで、本研究では多発生台木のひこばえのDNAを解析することで、ひこばえ多発生の親系統の探索を試みた。

研究を遂行するに当たり、旧原種農場千葉分場長の上遠野富士夫博士にはご助言、ご指導を賜った。また、旧千葉県農業試験場・生物工学研究室の方々には多大なご協力をいただいた。また、旭市のナシ生産者や旧農業改良普及センター等の関係機関の皆様には、材料の提供や圃場試験でご協力いただいた。これらの皆様方に感謝の意を表します。

II 材料及び方法

1. マンシュウマメナシ系統を識別可能なプライマーの探索

(1) 材料

材料として育種研究所(千葉市)で、ナシ台木としてこれまで用いられてきたマンシュウマメナシの「京大根挿し」、「タキイ」、「奈良赤花」、「満州」、「平塚」、「兵庫東」の6系統を用いた。

(2) 材料のテンプレートDNA抽出方法

4月下旬から6月下旬にかけて、各系統の新梢先端の幼葉0.1gから、ISOPLANT II ((株)ニッポンジーン)を用いてDNAを抽出した。DNA抽出液にそれと等量のクロロホルム液を混合し、攪拌した後、遠心分離して上澄み液を取り、再度アルコール抽出した。

(3) プライマーと反応液及び反応条件

プライマーとしてベックス社のCMN-B30~CMN-B79 (12mer)、PCR用の酵素としてTakara Taq(タカラバイオ(株))を用いた。RAPD法の反応液及び反応条件は、以下のとおりである。

1) 反応液

酵素に添付の10×PCRBuffer 2.5μl

MgCl₂ (25mM) 2.5μl

dNTP Mixture (各2.5mM) 2μl

ベックス社プライマー (8.2μM) 1μl

テンプレートDNA+TE 2 μ l

Takara Taq (5 U/ μ l) 0.2 μ l、ミリQ水14.8 μ l

2) PCRの反応条件

①94 $^{\circ}$ C、2分/1回、②94 $^{\circ}$ C、30秒 \rightarrow 37 $^{\circ}$ C、1分 \rightarrow

72 $^{\circ}$ C、2分/45回、③72 $^{\circ}$ C、5分/1回、④4 $^{\circ}$ C、保持

PCR産物は、エチジウムブロマイドの入った1.5%のアガロースゲルで30分泳動後染色し、UV照射下で写真撮影した。

(4) STS化とSCAR化

6系統のマンシュウマメナシをCMN-B44で増幅した400bpと、CMN-B50で増幅した400bpのバンドをクローン化して塩基配列を調べ、STS化及びSCAR化を行った。

2. 人工交配による実生の親の推定

2003年に以下の組み合わせで人工交配を行い、これらから得られた実生を育成し、その幼葉からDNAを抽出した。

交配組み合わせ	満州 \times 平塚	MH
	兵庫東 \times 平塚	HH
	京大根挿し \times 平塚	KH1、KH2
	奈良赤花 \times 兵庫東	NH1、NH2
	平塚 \times 奈良赤花	HN

人工交配した実生のDNAは、RAPD法と作製したSTSマーカー (B44-400-1、B44-400-2)、SCARマーカー (nasiscar400-3、nasiscar400-5) で分析し、現れたバンドによる交配親系統の推定の可能性を検討した。RAPD法のプライマーは、ベックス社のCMN-B30、B32、B50、B52、B54、B60、B65及びB73を用いた。

STSマーカー及びSCARマーカーの反応液と反応条件は以下のとおりである。

<STSマーカー>

・反応液

酵素に添付の10 \times PCRBuffer 2.5 μ l

MgCl₂ (25mM) 3 μ l

dNTP Mixture (各2.5mM) 0.5 μ l

10 μ M 5'プライマー 1.25 μ l

10 μ M 3'プライマー 1.25 μ l

テンプレートDNA+TE 2 μ l

Takara Taq (5 U/ μ l) 0.125 μ l

ミリQ水14.375 μ l

・PCR反応条件

①95 $^{\circ}$ C、5分/1回、②95 $^{\circ}$ C、1分 \rightarrow 57 $^{\circ}$ C、30秒 \rightarrow

72 $^{\circ}$ C、2分/30回、③72 $^{\circ}$ C、2分/1回、④4 $^{\circ}$ C、保持

<SCARマーカー>

・反応液

酵素に添付の10 \times PCRBuffer 1 μ l

MgCl₂ (25mM) 0.8 μ l

dNTP Mixture (各2.5mM) 1 μ l

10 μ M 5'プライマー 0.5 μ l

10 μ M 3'プライマー 0.5 μ l

テンプレートDNA+TE 1 μ l

Takara Taq (5 U/ μ l) 0.05 μ l

ミリQ水5.15 μ l

・PCRの反応条件

①94 $^{\circ}$ C、5分/1回、②94 $^{\circ}$ C、1分 \rightarrow 57 $^{\circ}$ C、1分 \rightarrow

72 $^{\circ}$ C、2分/30回、③72 $^{\circ}$ C、7分/1回、④4 $^{\circ}$ C、保持

3. ひこばえ多発生樹における台木の親の推定

(1) DNA解析による親の推定

旧千葉県原種農場で生産されたマンシュウマメナシ台の「豊水」で、ひこばえ多発生樹10樹 (17年生、旭市) と、同様の「幸水」でひこばえ多発生樹7樹 (16年生、旭市) を用いた。採取した園でのひこばえ多発生樹の割合は、「豊水」で約10%、「幸水」で約5%であった。これらのひこばえの幼葉からDNAを抽出し、RAPD法とSTSマーカー (B44-400-1、B44-400-2)、SCARマーカー (nasiscar400-3、nasiscar400-5) で分析した。RAPD法のプライマーは、人工交配した実生試験と同じものを用いた。

(2) 圃場でのひこばえ発生状況

1998年にマンシュウマメナシ6系統の実生台へ「豊水」を、2001年に「幸水」を接ぎ木し、苗木を育成した。その「豊水」苗木は、1998年に各系統9本を圃場へ定植し、「幸水」苗木は2001年に各系統9本を圃場へ定植し、2004年にひこばえの発生状況を調査した。

III 結果及び考察

1. マンシュウマメナシ系統を識別可能なプライマーの探索

(1) RAPD法によるDNA解析

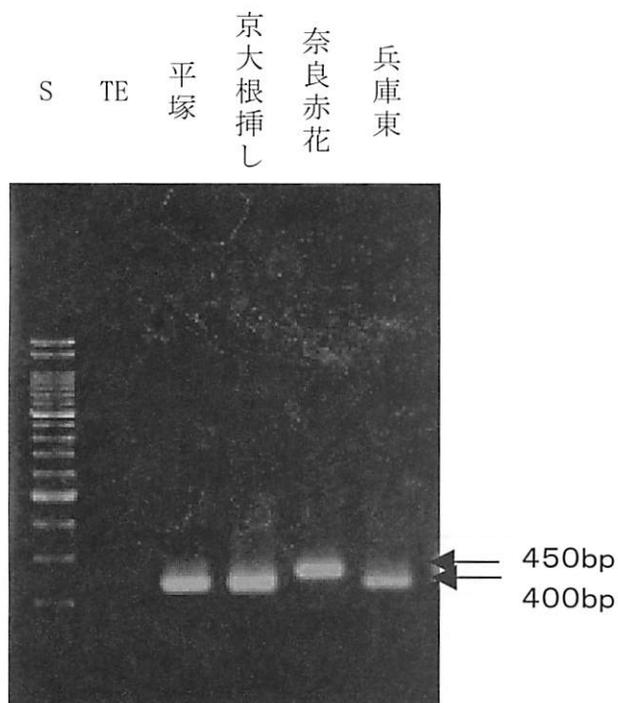
CMN-B30からCMN-B79の50種類のプライマーを使ってマンシュウマメナシの解析を試みた結果、13種類のプライマー (CMN-B30、B32、B39、B44、B47、B50、B52、B54、B59、B60、B65、B73、B77) で多型が現れ、23の特異的バンドが得られた (第1表)。このうち「京大根挿し」と「タキイ」、及び「奈良赤花」と「満州」では、全てのプライマーで同じ位置にバンドが現れ、両者の識別できなかった。また、「平塚」と「兵庫東」は、CMN-B44の1800bpと400bp、B50の400bp、B65の1500bp及びB77の1400bpでバンドが同じ位置に現れたが、一部異なる位置にバンドが見られた。

第1表 親系統のDNA解析結果

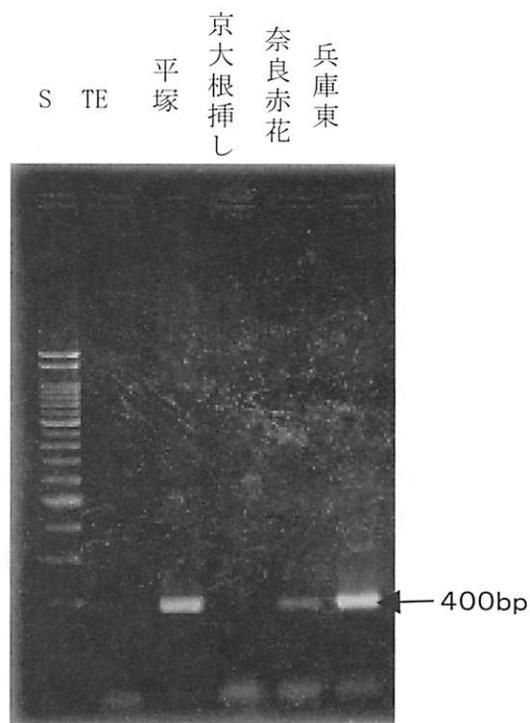
プライマー	バンドの位置bp	グループA		グループB		C 1 平塚	C 2 兵庫東
		京大根挿し	タキイ	奈良赤花	満州		
B44-400-1, 2 (STSマーカー)	450			◎	◎		
	400	◎	◎			◎	◎
nasiscar400-3, 5 (SCARマーカー)	400					◎	◎
CMN-B30	1500	◎	◎				
CMN-B32	600	◎	◎			◎	
CMN-B39	1800	◎	◎				
CMN-B44	1800			◎	◎	◎	◎
	450			◎	◎		
	400	◎	◎			◎	◎
CMN-B47	1200	◎	◎				
CMN-B50	1600						◎
	1400	◎	◎				
	800			◎	◎	◎	
	600	◎	◎				
	400					◎	◎
CMN-B52	1800	◎	◎				
	1300	◎	◎				
CMN-B54	1200			◎	◎	◎	
CMN-B59	1200	◎	◎	◎	◎		◎
	800			◎	◎		
CMN-B60	1800	◎	◎				
CMN-B65	1500			◎	◎	◎	◎
	1100	◎	◎				
CMN-B73	1100	◎	◎				
	900					◎	
CMN-B77	1400			◎	◎	◎	◎

注1) ◎はバンドが現れたことを示す。

2) バンドが現れなかったプライマーは省略。



第1図 作成したSTSマーカーによるマンシュウマメナシのPCR結果
注1) Sはサイズマーカー



第2図 作成したSCARマーカーによるマンシュウマメナシのPCR結果
注1) Sはサイズマーカー

第2表 交配実生のDNA解析結果

プライマー	バンドの位置bp	実生系統							バンドの現れる親グループ
		MH	HH	KH1	KH2	NH1	NH2	HN	
B44-400-1, 2 (STSマーカー)	450	◎				◎	◎		B
	400	◎	◎	◎	◎	◎	◎		A, C
nasiscar400-3, 5 (SCARマーカー)	400	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	C
	1500			◎	◎				A
CMN-B39	1800								A
CMN-B50	1600					○	○	○	C2
	400	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	C
CMN-B52	1800								A
	1300		○	◎	◎				A
CMN-B54	1200	◎	◎		◎			◎	B, C1
CMN-B60	1800				◎				A
CMN-B65	1500					◎			B, C
	1100								A
CMN-B73	1100			◎	◎				A
	900		◎					◎	C1

注1) ◎はバンドが現れたことを示す。○は薄いバンドが現れたことを示す。

2) グループAは「京大根挿し」と「タキイ」、グループBは「満州」と「奈良赤花」、グループCは「平塚」(C1)と「兵庫東」(C2)。

以上の結果から、マンシュウマメナシ6系統は大きく3グループ(Aグループ:「京大根挿し」と「タキイ」、Bグループ:「奈良赤花」と「満州」、Cグループ:「平塚」と「兵庫東」)に区分されると思われる。しかし、Cグループは、一部のバンドが異なったため、「平塚」をC1、「兵庫東」をC2と区分することにする。

(2) STS化とSCAR化

CMN-B44の400bpをSTS化してプライマー(B44-400-1、B44-400-2)を作製し、これを用いてマンシュウマメナシ4系統のDNAをPCRで増幅した(第1図)。その結果、CMN-B44と同様に「奈良赤花」は、450bpにバンドが現れ、「平塚」、「京大根挿し」及び「兵庫東」は、400bpにバンドが現れた。従って、これら3者を明確に区別することができた。作製したプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

B44-400-1 :CCTTGGAACT CGAGGAGACA

B44-400-2 :CCTTGGAACT CGTTACAAAT

TCCTA

また、CMN-B50の400bpのマーカーからプライマー(nasiscar400-3、nasiscar400-5)を作製し、これらの断片が安定的に増幅できるようにした(第2図)。その結果、CMN-B50と同様にグループCの「平塚」と「兵庫東」は、400bpの位置にバンドが現れ、グループAの「京大根挿し」やグループBの「奈良赤花」を明確に区別できた。作製したプライマーの塩基配列は、以下のとおりである。

nasiscar400-3 :GTGCACGTATGGCTCACTGACT

nasiscar400-5 :GTGCACGTATGGAAGGAAGAGA

2. 人工交配で得られた実生のバンド

6系統を用いて系統間交雑し、それから得られた実生

について、STSマーカーやSCARマーカー、また8個のプライマーを使ったRAPD法でDNAを解析した。第2表はその解析結果を示したものである。実生MH、NH1及びNH2は、B44-400-1、B44-400-2によって450bpにバンドが現れた。このバンドはグループBの「奈良赤花」と「満州」に特異的なことから、実生MH、NH1及びNH2は、グループBを片親に持つものと推定できる。また、7系統全てで、nasiscar400-3、400-5によって400bpにバンドが現れ、これらのバンドはグループCである「平塚」と「兵庫東」に現れたことから、片親はグループCと推定できる。さらに、実生KH1とKH2は、CMN-B30によって1500bpに、CMN-B52によって1300bpに、CMN-B73によって1100bpにそれぞれバンドが現れ、これらのバンドはグループAの「京大根挿し」と「タキイ」に特異的なことから、実生KH1とKH2は、グループAを片親にもつと推定できる。さらに、実生HHとHNは、CMN-B73によって900bpにバンドが現れ、このバンドはC1に特異的なことから、実生HHとHNは「平塚」を片親にもつと推定できる。

第3表 DNA解析による実生の親の推定

実生系統	推定されるグループまたは系統		交配した親	
	B	C	種子親	花粉親
MH	B	C	満州	平塚
HH	平塚	?	兵庫東	平塚
KH1	C	A	京大根挿し	平塚
KH2	C1	A	京大根挿し	平塚
NH1	B	C	奈良赤花	兵庫東
NH2	B	C	奈良赤花	兵庫東
HN	平塚	?	平塚	奈良赤花

注) グループAは「京大根挿し」と「タキイ」、グループBは「満州」と「奈良赤花」、グループCは「平塚」と「兵庫東」。

?は推定できなかったことを示す。

第4表 「豊水」のひこばえ多発性台木のDNA解析結果

プライマー	バンド の位置 bp	ひこばえ多発樹										バンドの 現れる親 グループ	
		2-4	3-2	3-6	3-10	3-17	4-2	4-5	4-6	4-14	4-15		
B44-400-1, 2 (STSマーカー)	450 400				◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	B A, C
nasiscar400-3, 5 (SCARマーカー)	400												C
CMN-B30	1500						◎			◎			A
CMN-B39	1800						◎						A
CMN-B50	1600												C2
	400	◎	◎	◎	◎	◎					◎		C
CMN-B52	1800		◎			◎	◎	◎	◎				A
	1300	◎	◎	◎		◎		◎	◎				A
CMN-B54	1200	◎	◎			◎		◎	◎				B, C 1
CMN-B60	1800		◎			◎							A
CMN-B65	1500			◎		◎	◎						B, C
	1100										◎	◎	A
CMN-B73	1100										◎		A
	900	◎	○	○								◎	C1

注1) ◎はバンドが現れたことを示す。○は薄いバンドが現れたことを示す。

2) グループAは「京大根挿し」と「タキイ」、グループBは「満州」と「奈良赤花」、グループCは「平塚」(C1)と「兵庫東」(C2)。

第5表 「幸水」のひこばえ多発性台木のDNA解析結果

プライマー	バンド の位置 bp	ひこばえ多発樹								バンドの 現れる親 グループ
		6-5	7-1	10-6	11-10	12-13	13-2	13-11		
B44-400-1, 2 (STSマーカー)	450 400									B A, C
nasiscar400-3, 5 (SCARマーカー)	400									C
CMN-B30	1500				◎				◎	A
CMN-B39	1800				◎			◎		A
CMN-B50	1600									C2
	400	◎	◎	◎	◎				◎	C
CMN-B52	1800				◎				◎	A
	1300	◎			◎			◎	◎	A
CMN-B54	1200									B, C 1
CMN-B60	1800						◎		○	A
CMN-B65	1500									B, C
	1100									A
CMN-B73	1100									A
	900			◎				◎		C1

注1) ◎はバンドが現れたことを示す。○は薄いバンドが現れたことを示す。

2) グループAは「京大根挿し」と「タキイ」、グループBは「満州」と「奈良赤花」、グループCは「平塚」(C1)と「兵庫東」(C2)。

第6表 DNA解析によって推定される親のグループ

ひこばえ多発樹		2-4	3-2	3-6	3-10	3-17	4-2	4-5	4-6	4-14	4-15
豊水	推定される親グループ	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A
		C1	C1	C	C	C1	?	BまたはC1	BまたはC1	C1	?
ひこばえ多発樹		6-5	7-1	10-6	11-10	12-13	13-2	13-11			
幸水	推定される親グループ	A	C1	A	C	A	C	A			
		C	?	C	?	C1	?	?			

注) ?は推定できなかったことを示す。

第7表 圃場でのひこばえ発生状況

品種	グループ	系統名	供試樹数 (本)	発生樹数 (本)	発生率 (%)	平均ひこばえ数 / 発生樹(本)
豊水 7年生	A	京大根挿し	8	3	37.5	10.3
	A	タキイ	8	3	37.5	9.0
	B	奈良赤花	8	4	50.0	10.3
	C	平塚	8	0	0	0
	C	兵庫東	8	3	37.5	3.3
幸水 4年生	A	京大根挿し	8	1	12.5	2.0
	A	タキイ	8	2	25.0	9.0
	B	奈良赤花	9	1	11.1	1.0
	B	満州	5	1	20.0	1.0
	C	平塚	5	0	0	0
C	兵庫東	7	0	0	0	

以上のように実生のDNA解析によって推定されたグループまたは系統と、実際の交配親を第3表に示した。その結果、両者はグループとしてはほぼ一致した。

3. ひこばえ多発樹の台木から得られたバンド

(1) DNA解析による親の推定

10個のプライマーによる「豊水」のひこばえ多発樹のDNA解析結果をまとめて第4表に示した。3-10は、グループBに特異的なB44-400-1とB44-400-2による450bpのバンドが現れたことから、グループBを片親にもつと推定できる。2-4、3-2、3-6、3-17、4-2、4-5及び4-6では、グループAに特異的なCMN-B30の1500bp、B39の1800bp、B52の1800bpと1300bp、B60の1800bp及びB73の1100bpの中でいずれかでバンドが現れたので、これらの片親はグループAであると推定できる。同様な方法で「豊水」のひこばえ多発樹10樹の台木の親を、第6表に示したように推定できた。

「幸水」のひこばえ多発樹のDNA解析結果を第5表に示した。6-5、10-6、12-13及び13-11では、グループAに特異的なCMN-B30の1500bp、B39の1800bp、B52の1800bpと1300bp、B60の1800bpの中のいずれかでバンドが現れたことから、これらの片親は、グループAと推定できる。同様な方法で「幸水」のひこばえ多発樹7樹の台木の親を、第6表に示したように推定できた。

第6表から、ひこばえ多発樹の台木の親は、グループAとグループCのものが多かった。

(2) 圃場試験でのひこばえの発生状況

実生台木に接いだ「豊水」(7年生)と「幸水」(4年生)のひこばえの発生状況を第7表に示した。「豊水」では、グループA、BとグループCのうちC2「兵庫東」で発生樹率が37.5~50%と高かったが、「平塚」は全く発生しなかった。「兵庫東」では発生樹当たりのひこばえ数はグループA、Bに比べ1/3と少なかった。

「幸水」では、グループAとBで11.1~25.0%の発生樹率であった。グループCではいずれの系統ともひこばえの発生がみられなかった。発生樹当たりのひこばえ数は、グループAの「タキイ」では9.0本と多かったが、他の台木では少なかった。

ひこばえ多発樹台木の探索法として、DNA解析、主にRAPD法による親子判定の方法を利用した。RAPD法では、PCR増幅したDNAの長さを比較することによって、品種の識別、親子鑑定やF1種子の純度検査などが可能である(矢野、1995)。

日本ナシ、中国ナシ及び西洋ナシのほとんど全ての品種は実用的には自家不和合性で(中川、1978)、マンシュウマメナシも同様である。そのため、実生の遺伝子型はヘテロで、DNA解析においては親に特異的なバンドがF1に現れる確率は1/2である。F1でグループAに特異

的なバンドAが現れれば、F1の親はグループAであることが明らかとなるが、バンドAが現れないからグループAが親でないとは言えない。このことから、F1の親を知るためには、親に特異的なバンドが多数必要であり、親を識別できる多数のプライマーが不可欠である。

山下ら(1997)はベックス社のコモンプライマー CMN-B41~B47を用いてナシ台木の系統判別を行った。また、池谷ら(1995)は、ナシ属のRAPD遺伝マーカーの解析を、CMN-B40~B69で行った。本試験ではこれらを参考に、ベックス社のコモンプライマー CMN-B30~B79を用いた。これらのプライマーの中で、マンシュウマメナシ6系統は、13種類のプライマーで23種類の特異的なバンドが現れ、識別が可能であった。また、作製したSTSマーカーやSCARマーカーは、鮮明なバンドが現れ、系統の識別を容易にした。13種類のコモンプライマーとSTSマーカー、SCARマーカーによるバンドの現れ方によって、当場の保有するマンシュウマメナシ6系統は、3グループに分けられた。その内の1グループは、2系統に識別できた。

本試験のDNA分析で識別できなかった「京大根挿し」と「タキイ」、「奈良赤花」と「満州」は互いに不和合であり、開花期や収穫期が同時期で、果実や種子の大きさ、色、形などが酷似している。伴野ら(1997)は、「二十世紀」とその突然変異種である「おさ二十世紀」や「ゴールド二十世紀」を識別するため、プライマー CMN-B40~B69を用いたが成功しなかった。本試験結果からも、伴野らの結果と類似し、「京大根挿し」と「タキイ」、「奈良赤花」と「満州」は同じ系統かいずれかの突然変異系統であると考えられる。

6系統間で人工交配した実生を作り、そのDNAをSTSマーカーやSCARマーカー、さらに8個のコモンプライマーを使ったRAPD法で解析した。その結果、推定した実生の親またはグループと、実際の親はほぼ一致した。このことから、ひこばえのDNAを解析することで、台木の親がどのグループに属する系統かを推定できると考えられた。

以上の方法で、現地圃場のひこばえが多発している台木からDNAを抽出し、分子生物学的解析を行った。その結果と圃場試験の結果から、グループAは親の台木からのひこばえの発生が多いことが明らかとなり、「京大根挿し」と「タキイ」は、ひこばえ多発生系統と考えられた。また、グループBが親の台木は、圃場試験におけるひこばえの発生が多かったが、DNA解析の結果ではグループBが多発樹の親である例が少なく、ひこばえ多発との関連が明らかでなかった。グループCは、DNA解析の結果では多発樹の親である例が多いが、圃場試験ではひこばえ

の発生は少なかった。そこで、「京大根挿し」と「タキイ」の両系統の母本を台木用種子の採種圃場から取り除くことにより、ひこばえの発生が少なく、樹勢の低下がしにくい優良苗木の供給が可能となると考えられた。

IV 摘 要

農業総合研究センター育種研究所で、ナシの台木として使用しているマンシュウマメナシ6系統（「京大根挿し」、「タキイ」、「奈良赤花」、「満州」、「平塚」及び「兵庫東」）の中から、ひこばえ多発生で樹勢が低下しやすい系統を、現地圃場で多数発生しているひこばえを用いたDNA解析による方法で探索した。

1. CMN-B30~CMN-B79の50種類のプライマーを用いて、マンシュウマメナシ6系統をRAPD法で分析したところ、13種類で6系統に23の特異的なバンドが現れた。

2. CMN-B40の400bpのバンドにSTS化を行い、またCMN-B50の400bpのバンドにSCAR化を行い、バンドの再現を安定化した。

3. 23種のバンドと作製したSTSマーカーやSCARマーカーによって、マンシュウマメナシ6系統は、グループA（「京大根挿し」、「タキイ」）、グループB（「奈良赤花」、「満州」）、グループC（「平塚」C1、「兵庫東」C2）の3グループに分けられた。その内のグループCは、2系統に識別できた。

4. 10種類のプライマーを用いて、マンシュウマメナシ6系統の人工交配した実生をDNA解析し、実生の親をグループとして識別できた。

5. 上記のプライマーを用いて、ひこばえ多発樹の台木のDNAを解析し、その親がグループAとグループCが多いことが判明した。また、圃場試験でのひこばえ多発生台木は、グループAとグループBであった。

6. 両試験の結果から、ひこばえ多発生の台木親は、グループA（「京大根挿し」、「タキイ」）であることが判明した。両系統を採種圃場から除去することにより、ひこばえの発生が少なく、樹勢の低下しにくい台木の供給が可能になると考えられた。

V 引 用 文 献

- 阿部和幸(1995). 果樹台木の特性と利用. 260-261. 農文協. 東京.
- 池谷祐幸・柳澤直子・松田長生・秋濱友也・林建樹(1995). 種間交雑個体群を用いてのナシ属におけるRAPD遺伝マーカー解析の試み. 園学雑. 64別2:

- 146-147.
- 中川昌一 (1978). 果樹園芸原論. 142. 養賢堂. 東京.
- 伴野潔・中野真一・濱渦康範 (1997). RAPDマーカーによるニホンナシの品種識別とその遺伝分離. 園学雑. 66別2 : 124-125.
- 山下聡 (1997). RAPD法によるナシ台木系統の分類. 平成9年度近畿中国農業試験研究推進会議生物工学推進部会資料. 29-30.
- 矢野博(1995). 植物のPCR実験プロトコール. 124. 秀潤社. 東京.

The Search for Lines with Many Root Suckers in *Pyrus beturaefolia* using RAPD

Yoko YAMAMOTO, Masanobu FUKAMI and Masatosi KOJIMA*

Key words : Japanese pear, rootstock, *Pyrus beturaefolia*, root sucker, RAPD

Summary

DNA analyses of root suckers, which were abundant in the field, were performed to search for lines of manshumamenashi (*Pyrus beturaefolia*) that were low in tree vigor due to many root suckers among the following six lines used as rootstocks at Crop Breeding Institute of Chiba Prefectural Agriculture Research Center: Kyodainezashi, Takii, Naraakabana, Manshu, Hiratsuka, and Hyogohigashi.

1. The six lines were analyzed by RAPD using 50 different kinds of primers from CMN-B30 to CMN-B79, 13 of which produced 23 peculiar bands in the lines.
2. The 400bp band produced by CMN-B40 and the 400bp band by CMN-B50 were converted to STS and SCAR, respectively, for the stable reproduction of the two bands.
3. The STS and SCAR markers produced and the 23 bands were used to divide the six lines into three groups: A, Kyoudainezashi and Takii; B, Naraakabana and Manshu; and C, Hiratsuka and Hyogohigashi. Group C was further divided into two identifiable lines.
4. DNA analyses of seedlings bred by artificially crossing the six lines were performed using 10 different kinds of primers. The parents of the seedlings were identified as distinct groups.
5. DNA analyses of the rootstocks of trees with abundant root suckers using the above primers showed many of the parents belonged to groups A and C. Rootstocks with large numbers of root suckers in the field belonged to groups A and B.
6. From the results of the two tests, rootstock parents with abundant root suckers were found to belong to group A: Kyoudainezashi and Takii. Elimination of the two lines from a seed farm was deemed likely to supply rootstocks that are small in the number of root suckers and do not lose tree vigor easily.

*Present Address : Chiba Prefectural Fire, Earthquake and Disaster Prevention Division