1 ヒエ属雑草のマイクロサテライト flanking 領域における変異

○赤坂真由美・中山祐一郎・山口裕文（大阪府立大・院・農学生命科学）

雑草の防除を目的としてさまざまな除草剤が開発されているが、研究に使用される材料が不均一で研究者間でも統一されていないため実験結果が同等に評価できない問題を生んでいる。これを解消するには、種の地理的変異、生育地の環境条件、生態的特徴などを考慮した少数の実験系統を育成する必要がある。ヒエ属 Genus *Echinochloa* 植物の実験系統の確立を目的として、マイクロサテライトプライマーをタイヌビエの DNA より開発し、アジア地域の水田の強害雑草であるイヌビエ *E. crus-galli* (L.) Beauv. とタイヌビエ *E. oryzicola* (Vasing.) Vasing. についてマイクロサテライト (SSR) の多様性と個体識別能力を調査、評価した。開発された SSR マーカーは、特定の系統を識別・同定できたので、地理的変異や生態的特徴を考慮した系統の選抜に有効と考えられた。しかし、設計したプライマーでは、断片を検出できない場合や、断片サイズによっては検出が不安定である場合があるため、SSR を含む断片の塩基配列を特定し、その汎用性を調査した。SSR マーカーの一つである Ecor04 の例を以下に示す。

イヌビエとタイヌビエ種内における SSR 領域の変異を確認するため、イヌビエ 3 系統とタイヌビエ 2 系統について、また、ヒエ属植物の種間における汎用性を調べるため、コヒメビエ *E. colonum* 2 系統、*E. crus-pavonis* 1 系統、*E. obtusiflora* 1 系統について分析した。PCR 法によって SSR を含む断片を増幅し、フラグメント解析した後、サイクルシーケンス法によって SSR プライマー間の塩基配列を決定した。2 本以上のフラグメントを検出するサンプルについては、サブクローニングした後、サイクルシーケンスした。

フラグメント解析の結果、イヌビエ 1 系統とタイヌビエ 2 系統で 2 本のフラグメントを検出した。他の系統では 1 本のフラグメントを検出した (表 1)。これまでの研究から、SSR プライマー Ecor04 では、イヌビエとタイヌビエにおいて 2 遺伝子座を検出し、それぞれ独立した同祖遺伝子座に座乗していると推定されている。この領域では SSR のほかに 11 カ所の塩基置換と 4 カ所の挿入／欠失があり、この二つの座に対応した変異が見られた (図 1)。また、Ecor04・1 座では、flanking 領域にイヌビエとタイヌビエの種間で 1 カ所の塩基置換と 1 カ所の挿入／欠失がみられ、Ecor04・2 座でも、イヌビエの 3 系統で計 5 カ所の塩基置換がみられ、同じ遺伝子座内でも SSR の繰り返し以外の変異が確認された (図 1)。両遺伝子座において、イヌビエとタイヌビエに含まれる SSR の繰り返し数の変異は、フラグメント解析で検出された断片長を種内で比較した場合に長さの違いとして表れていた。また、ヒエ属 5 種では塩基配列に、27 カ所の塩基置換と 11 カ所の挿入／欠失が見られ、種間に大きな差異が見られた (図 1)。

イヌビエとタイヌビエにおいて、同じ遺伝子座の対立遺伝子には、挿入／欠失のようなフラグメント解析の断片長の検出に影響する flanking 領域の変異は見られなかったため、種内や個体群内の多様性解析には有用である。しかし種間では SSR flanking 領域に多くの変異があるため、ヒエ属では SSR は種間比較に適していない。ヒエ属植物のように倍数性の植物に対して SSR マーカーを用いる際には、同祖遺伝子座を推定するために後代検定や SSR 断片の塩基配列決定を行い、信頼性を確認する必要がある。他の SSR について詳細に述べる。

Akasaka, M., Y. Nakayama & H. Yamaguchi: Variation of microsatellite flanking region in weedy *Echinochloa*.

表 1. Ecor04 プライマーで検出された SSR 断片長

コード	系統番号	種名	倍数性	産地	Ecor04	
					(04-1座)	(04-2座)
CG1	Ec/99-J-194	イヌビエ	6X	日本		226
CG2	Ec/99-J-316	イヌビエ	6X	日本	237	246
CP1	PI237129	イヌビエ	6X	アルゼンチン		238
OR1	Ec/00-J-024	タイヌビエ	4X	日本	238	215
OR2	Ec/97-C-59	タイヌビエ	4X	中国	248	217
CO1	Ec/99-T-02	コヒメビエ	6X	タイ		257
CO2	Ec/00-V-01	コヒメビエ	6X	ベトナム		262
CP2	Ec/81-Ni-01	<i>E. crus-pavonis</i>	2X	ナイジェリア		230
OB1	Ec/81-Ni-02	<i>E. obtusiflora</i>	2X	ナイジェリア		262

図 1. Ecor04 SSR 領域の塩基配列