

rbcL遺伝子を指標としたマツノザイセンチュウ抵抗性クローンの樹種判定

九州大学農学部 渡辺 敦史・川瀬 英治
白石 進
林木育種センター九州育種場 戸田 忠雄

1. はじめに

これまでにアカマツとクロマツの識別は困難な場合が多く、確実な樹種同定ははまだ確立されていない。葉緑体DNA上のrbcL遺伝子(リブローズ2リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ・大サブユニットをコード)の制限断片長多型(RFLP)分析により2樹種の区別が可能であることを既に報告したが、今回はこのDNA分子マーカーを用いてマツノザイセンチュウ抵抗性クローン全個体の樹種判定を行った。また、樹脂道指数による分類結果との比較を行った。

2. 材料と方法

(1) 供試個体

農林水産省林木育種センター九州育種場のクローン集積所に植栽されているマツノザイセンチュウ抵抗性アカマツ92, クロマツ16計108クローン個体を用いた。

(2) 抽出およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

全DNA抽出は当年葉130mgよりCTAB法を改良して行った²⁾。抽出によって得られた全DNAを鋳型としてrbcL遺伝子(1309bps)をPCR増幅した。PCR反応は反応溶液(10mM Tris-HCl(pH8.4), 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10μg/mlゼラチン, dNTP各200mM, DNA polymerase 0.25units/10μl, プライマー各0.5μM)中で、94°Cで1分間変性した後、1サイクルを94°C・30秒, 55°C・30秒, 72°C・90秒とし計30サイクル行った³⁾。

(3) 制限断片長多型(RFLP)分析

PCRで増幅したDNAはTHE GENE CLEAN KIT II (BIO 101 Inc.)を用いて精製した後、Hae IIIを使って切断した。DNA1μgに対して10units酵素を加え37°Cで4時間インキュベートした。酵素を65°Cで失活させ、2%アガロースゲルを用いて電気泳動(70V4時間)を行った。染色はエチジウムブロマイドで行い、UVトランスイルミネーター上でゲルを観察した。

3. 結果と考察

アカマツとクロマツのrbcL遺伝子(1309bps)をAlu I, Hae III, ScrF I, Cfr13 Iで切断したときに得られるフィジカルマップを図-1に示した。フィジカルマップ中の太い線はアカマツのみで切断され、クロマツでは切断されない制限酵素認識部位(サイト)である。このことから上記4制限酵素のどれかを用いてrbcL遺伝子DNAを切断することにより、容易にクロマツとアカマツの判定が可能である。本研究ではHae IIIのみを使用し全クローンについてRFLP分析した。この酵素の処理によって得られるアカマツのDNA型(以下アカマツ型)は4本のバンドより、またクロマツのDNA型(以下クロマツ型)は3本のバンドより構成される(図-2)。供試した108クローンのうち92クローンのrbcL遺伝子がアカマツ型であり、残りの16クローンがクロマツ型を示した(表1)。

現在、精英樹に付けられている樹種名と今回のDNA型が異なっていたのは、小浜24号と備前143号の2クローンのみであった。小浜24号は外部形態からクロマツに分類されているが、今回の結果からこのクローンの葉緑体ゲノムはアカマツ型であることが判明した。また、逆に備前143号は形態からアカマツとされているがRFLP分析ではクロマツ型となった。今回供試したクローンについては既に樹脂道指数が調査されており、アカマツ(0.000~0.469)、アイグロマツ(0.529~1.404)、クロマツ(1.518~2.000)に区分されている³⁾。DNA型がクロマツ型となったクローンは、全て樹脂道指数が1.8以上であった(表-1)。この結果から樹脂道指数における樹種区分と今回のDNA型による判定の間に高い相関関係があることが判明した。現在樹脂道指数においてクロマツとアイグロマツとを区分する境として用いられている1.5という値に関しては再考する必要があると思われる。

引用文献

- (1) ERLICH, H. A. : PCR TECHNOLOGY, pp. 246, Stokin Press, NY, 1989
- (2) MURRAY, M. G., THOMPSON, W. F. : Nucl. Acids. Res. 8, 4321~4325, 1980
- (3) 戸田忠雄ほか: 林木育種センター研究報告, 11, 37 ~88, 1993

クロマツ



アカマツ



	297	181	Hae III	
	366	462		Mu I
	233	698	Cp-131	
	413	249		Srf-PI

図-1 アカマツとクロマツの4制限酵素によるフィジカルマップ

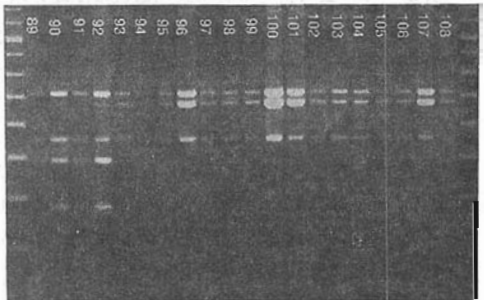
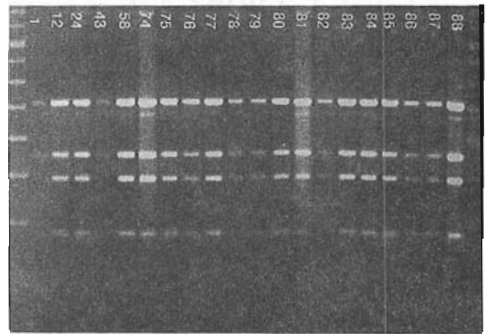


図-2 Hae IIIによるRFLP分析の結果
図中の番号は表-1のクローンに対応

表-1 樹脂道指数とDNA型の比較

クローン名	樹脂道指数	DNA型	クローン名	樹脂道指数	DNA型	クローン名	樹脂道指数	DNA型
1. 樹脂道指数による区分: アカマツ			2. 樹脂道指数による区分: アイグロ					
1. アカマツ 松島58	0.000	アカマツ型	38. アカマツ 佐賀関170	0.059	アカマツ型	75. アカマツ 久留米79	0.529	アカマツ型
2. アカマツ 南国	0.000	アカマツ型	39. アカマツ 大分204	0.059	アカマツ型	76. アカマツ 大分137	0.549	アカマツ型
3. アカマツ 田辺52	0.000	アカマツ型	40. アカマツ 高松1	0.074	アカマツ型	77. アカマツ 備前137	0.599	アカマツ型
4. アカマツ 真備70	0.000	アカマツ型	41. アカマツ 佐賀関165	0.075	アカマツ型	78. アカマツ 松島70	0.748	アカマツ型
5. アカマツ 熊本16	0.000	アカマツ型	42. アカマツ 佐賀関126	0.078	アカマツ型	79. アカマツ 佐賀関134	0.809	アカマツ型
6. アカマツ 赤坂88	0.000	アカマツ型	43. アカマツ 西条8	0.079	アカマツ型	80. アカマツ 笠岡178	0.970	アカマツ型
7. アカマツ 岡山88	0.003	アカマツ型	44. アカマツ 宇和島39	0.080	アカマツ型	81. アカマツ 本渡1	0.993	アカマツ型
8. アカマツ 宇和島18	0.003	アカマツ型	45. アカマツ 赤坂163	0.084	アカマツ型	82. アカマツ 備前140	1.046	アカマツ型
9. アカマツ 佐賀関113	0.005	アカマツ型	46. アカマツ 阿南34	0.084	アカマツ型	83. アカマツ 国見53	1.098	アカマツ型
10. アカマツ 総社39	0.008	アカマツ型	47. アカマツ 国見17	0.088	アカマツ型	84. アカマツ 大分167	1.110	アカマツ型
11. アカマツ 須崎32	0.011	アカマツ型	48. アカマツ 山陽6	0.094	アカマツ型	85. アカマツ 金光25	1.176	アカマツ型
12. アカマツ 大分168	0.011	アカマツ型	49. アカマツ 久留米18	0.101	アカマツ型	86. アカマツ 久留米78	1.283	アカマツ型
13. アカマツ 太宰府4	0.012	アカマツ型	50. アカマツ 岡山85	0.104	アカマツ型	87. アカマツ 佐賀関108	1.319	アカマツ型
14. アカマツ 阿南55	0.012	アカマツ型	51. アカマツ 有田49	0.106	アカマツ型	88. アカマツ 小浜24	1.404	アカマツ型
15. アカマツ 新居浜7	0.013	アカマツ型	52. アカマツ 赤坂216	0.111	アカマツ型			
16. アカマツ 岡山82	0.016	アカマツ型	53. アカマツ 由岐25	0.118	アカマツ型			
17. アカマツ 大分198	0.017	アカマツ型	54. アカマツ 国見31	0.133	アカマツ型			
18. アカマツ 大分203	0.017	アカマツ型	55. アカマツ 真備58	0.147	アカマツ型	3. 樹脂道指数による区分: クロマツ		
19. アカマツ 金光13	0.018	アカマツ型	56. アカマツ 宇和島50	0.149	アカマツ型	89. アカマツ 備前66	1.518	アカマツ型
20. アカマツ 久留米144	0.020	アカマツ型	57. アカマツ 熊本25	0.158	アカマツ型	90. アカマツ 備前21	1.527	アカマツ型
21. アカマツ 赤坂179	0.021	アカマツ型	58. アカマツ 延岡219	0.185	アカマツ型	91. アカマツ 佐賀関93	1.662	アカマツ型
22. アカマツ 有明7	0.022	アカマツ型	59. アカマツ 佐賀関132	0.187	アカマツ型	92. アカマツ 大分142	1.739	アカマツ型
23. アカマツ 熊山119	0.023	アカマツ型	60. アカマツ 須崎31	0.210	アカマツ型	93. クロマツ 夜須37	1.852	アカマツ型
24. アカマツ 岡山132	0.024	アカマツ型	61. アカマツ 新居浜10	0.213	アカマツ型	94. クロマツ 土佐清水63	1.887	アカマツ型
25. アカマツ 佐賀関162	0.024	アカマツ型	62. アカマツ 笠岡124	0.215	アカマツ型	95. クロマツ 小浜30	1.920	アカマツ型
26. アカマツ 備前150	0.026	アカマツ型	63. アカマツ 佐賀関90	0.222	アカマツ型	96. クロマツ 波方37	1.947	アカマツ型
27. アカマツ 宇和島21	0.028	アカマツ型	64. アカマツ 大分269	0.237	アカマツ型	97. クロマツ 瀬い425	1.947	アカマツ型
28. アカマツ 姫路82	0.029	アカマツ型	65. アカマツ 大分111	0.270	アカマツ型	98. クロマツ 田辺54	1.956	アカマツ型
29. アカマツ 大分173	0.033	アカマツ型	66. アカマツ 太良122	0.301	アカマツ型	99. クロマツ 大瀬戸12	1.965	アカマツ型
30. アカマツ 大分186	0.033	アカマツ型	67. アカマツ 吉備77	0.333	アカマツ型	100. クロマツ 波方73	1.969	アカマツ型
31. アカマツ 須崎27	0.040	アカマツ型	68. アカマツ 鴨方29	0.382	アカマツ型	101. クロマツ 吉田2	1.976	アカマツ型
32. アカマツ 備前40	0.041	アカマツ型	69. アカマツ 久留米142	0.418	アカマツ型	102. クロマツ 川内290	1.976	アカマツ型
33. アカマツ 熊本63	0.048	アカマツ型	70. アカマツ 大分166	0.433	アカマツ型	103. クロマツ 備前143	1.984	アカマツ型
34. アカマツ 久留米118	0.053	アカマツ型	71. アカマツ 佐賀関118	0.433	アカマツ型	104. クロマツ 志摩64	1.985	アカマツ型
35. アカマツ 佐賀関117	0.054	アカマツ型	72. アカマツ 日生35	0.438	アカマツ型	105. クロマツ 三豊103	1.985	アカマツ型
36. アカマツ 熊山39	0.055	アカマツ型	73. アカマツ 久留米29	0.466	アカマツ型	106. クロマツ 三崎90	1.987	アカマツ型
37. アカマツ 宮島54	0.056	アカマツ型	74. アカマツ 佐賀関84	0.469	アカマツ型	107. クロマツ 大分8	1.993	アカマツ型
						108. クロマツ 津屋崎50	2.000	アカマツ型