

アカマツ・クロマツ混交林のDNA分類学的研究

九州大学農学部 渡辺 敦史・白石 進
鳥取大学農学部 橋詰 隼人

1. はじめに

外部形態の特徴においてアカマツからクロマツへの変異は連続的であり^{2,3,10,11)}、このような現象は高頻度の雑種形成によって起こっていると考えられていた。しかし、DNA分子マーカーを用いた研究の結果、両樹種間には大きな遺伝的差異があり、雑種形成はそれほど行われていないことが明らかとなった(未発表)。一方、アカマツ、クロマツおよび両樹種の雑種が混在するような状況において、雑種形成がどの程度起こっているかを解明するため、鳥取大学農学部付属演習林内のアカマツ、クロマツ混交林⁹⁾に調査プロットを設定した。

これまでの研究からDNA分子マーカー(RAPD・RFLP)を用いて、両樹種とその雑種を正確に同定することは可能となっている。本研究では、アカマツ・クロマツ混交林における遺伝子交換の実態を把握するための、基礎データとして、構成個体の葉緑体ゲノム型を明らかにした。

2. 材料と方法

(1) 調査プロットおよびDNA抽出: 鳥取大学溝口演習林および蒜山演習林内に調査プロットを設定し、溝口演習林の49個体(図-1)、蒜山演習林の43個体を対象としてそれぞれ針葉を採取した。調査プロット内の全個体調査を目指したが、樹高が高く針葉の採取ができなかったものは除外した。

(2) DNA抽出: CTAB法⁹⁾を改良したもの⁷⁾を用いた。

(3) SSCP分析: 調査したDNA領域は葉緑体DNA上にある*rbcL*遺伝子のうち385bp⁷⁾(プライマー1: 5'-CATGGTATCCAAGTAGAAAGAGA-3', プライマー2 5'-CGGTGGATGTGAAGAAGTAG)とスペーサー領域(プライマー1: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3', プライマー2: 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3')であり、これらの領域をPCR増幅した。増幅後、PCR産物(8μl)は1×TBE(11μl)および水酸化メチル水銀溶液(1μl)と混合し、94℃で5分間熱変性を行った後、氷冷した⁹⁾。電気泳動は10%ポリアクリルアミドゲルを使用し、泳動条件を10℃、250Vで11.5時間行った。検出はエチジウムブロマイド染色で行った。

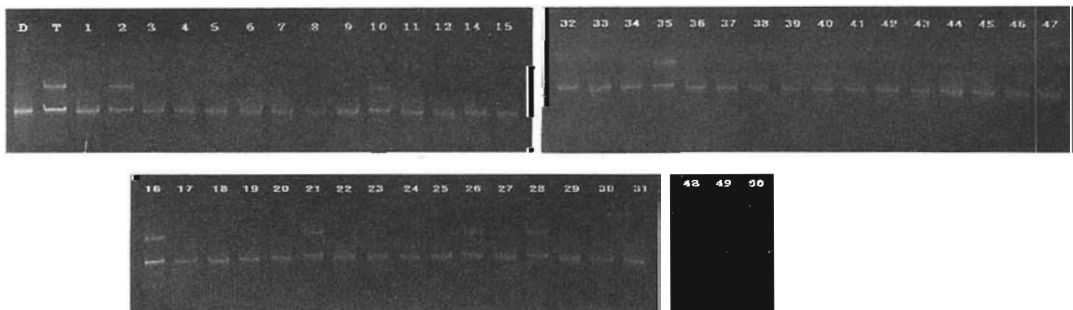


図-1 溝口演習林全49個体の葉緑体DNAスペーサー領域を用いたSSCP分析
D: アカマツ T: クロマツ

3. 結果と考察

本研究で使用した SSCP 分析は RFLP 分析と比較して、変異（塩基置換）の検出能力が著しく高く、簡便に行えるため、サンプルが多い場合、分析容易な手法である。そこで、これまで用いられてきた *rbcL* 遺伝子の RFLP 分析に代え、SSCP 分析を行った。

調査したスペーサー領域は、機能的制約のない領域のため、遺伝子に比べ進化速度が早く、種間だけでなく種内変異も観察できる可能性がある。今回の、SSCP 分析（図-1）にはすでに樹種決定がなされている2個体、アカマツ（図中：D）、クロマツ（図中：T）の各1個体を含めて行った。その結果、アカマツでは1本のバンドが、クロマツでは2本のバンドが検出できた。溝口演習林の49個体は、41個体がアカマツ型であり、8個体がクロマツ型であった。また、蒜山演習林の43個体は、38個体がアカマツ型であり、5個体がクロマツ型であった。

さらに *rbcL* 遺伝子のうちの 385bp を対象として SSCP 分析を行った。その結果、スペーサー領域を分析して得られた結果と一致した。

溝口演習林について2領域で行った分析結果を調査プロットに落としたものを図-2に示した。針葉樹では葉緑体 DNA が父性遺伝するといわれる^{1,4,9,12,13}。本研究から、各個体の葉緑体 DNA 型は明らかとなった。しかし、この両樹種において、形成される雑種の識別には葉緑体 DNA のみの分析では不十分である。そこで、主として核ゲノムの変異をとらえることのできる RAPD マーカーを利用して調査を進める必要がある。

引用文献

- (1) DONG J., WAGNER D.B., YANCHUNK A.D., CARLSON M.R., MAGNUSSEN S., WANG X. R. and SZMIDT A. E. (1992) *J. Hered* 83 : 419~422
- (2) 平吉功・林石根 (1962), 72回日林講 : 203~205
- (3) 平吉功・熊沢茂則 (1963), 74回日林講 : 246~247
- (4) NEAL D.B., MARSHALL K.H., HARRY D. E. (1990) *Can. J. For. Res.* 21 : 717~720
- (5) MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. (1980) *Nucleic Acids Research* 8 : 4321~4325
- (6) 佐藤敬二 (1961) 日本のマツ I, 全国林業普及協会 : pp39
- (7) 白石進・渡辺敦史 日林誌 投稿中
- (8) HONGYOU T., GREGORY S. *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res.* 21 : 3637~3642
- (9) SUTTON B. C. S., FLANAGAN D. J., GAWLEY J.R. NEWTON C. H. LESTER D.T. and EL KASSABY Y.A. (1991) *Theor. Appl. Genet.* 82 : 242~248
- (10) 遠山富太郎・三宅登 (1963) 74回日林講 : 248~249
- (11) 吉川賢・重松真二・永森通雄 (1991) 高知大学農学部演報 18 : 1~9
- (12) WAGNER D.B. (1992) *Can. J. For. Res.* 22 : 683~689
- (13) WAGNER D.B., GOVINDARAJU D.R., YEATMAN C.W., PITEL J.A. (1989) *J. Hered* 80 : 483~485

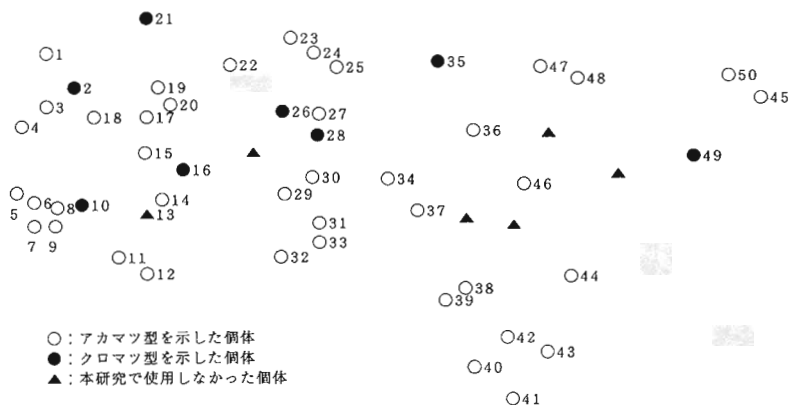


図-2 SSCP 分析の結果による調査プロットの樹種構成
鳥取大学溝口演習林