

RAPD マーカーを用いた福岡県のマツノザイセンチュウ 抵抗性クロマツ採種園母樹のクローン分析*1

宮原 文彦*2 · 森 康浩*2 · 後藤 晋*3

I. はじめに

近年、マツノザイセンチュウ抵抗性採種園産の抵抗性種苗が事業的に生産されるようになってきた。しかし、採種園の遺伝的な改良が必要であるため、後藤ら (2) は採種園における交配実態を把握する目的で、田辺54号を母樹とした自然交雑実生苗について花粉親の推定を試みた結果、2%余の割合で採種園構成16クローン以外の母樹による花粉汚染を明らかにした。そして、海外の報告例 (4) に比べて非常に少なかった原因として、採種園がスギ林で囲まれていることや、その周囲に他のマツがほとんどないことなどを掲げているが、一方で採種園内部の母樹の汚染も考えられた。

そこで、RAPD マーカーを用いて、採種園内全母樹のクローン分析を行い、汚染個体の検出を試みたのでその結果を報告する。

II. 材料と方法

対象とした採種園は、福岡県小郡市所在の県営抵抗性クロマツ採種園で、1987年度に造成後、枯損木は逐次補植するとともに、1999年2月には、アカマツとの雑種である小浜24号を伐採して、そのほとんどを備前143号に改植した。

各母樹はギルティッヒ法により5m×5mの正方形植えて配置され、1993年秋よりある程度まとまった量の種子が採れ始め、1999年秋には本園から約2kgの種子が採取された。

クローン分析には、2000年2月時点で生存していた194個体 (造成当時の植栽母樹162個体、補植母樹32個体、図-1) から個体別に生葉を採取し、分析に供するまで-20℃で保存した。

各個体の針葉約200mgから白石・渡辺 (3) の改良CTAB法で全DNAを抽出し、Elu-Quik DNA 精製キッ

ト (Schleicher & Schuell 製) で精製した後、PCR (Polymerase Chain Reaction) 反応を行った。PCR 反応の諸条件はGoto (1) の方法に従った。RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーは米国オペロン社製の326プライマーの中から、12プライマー・計16マーカーを用いた (表-1)。なお、マーカーバンドの再現性は異なる5回のPCR反応での明瞭なバンドの出現で確認しておいた。また、今回の各母樹のクローン分析では2回以上のPCR反応で再現性を確認した。

III. 結果と考察

194個体のRAPD分析結果を表-2に示した。表の左端に示した分析個体数は、マーカーバンドの有無が基準個体と一致した個体数を表している。

194個体中異常が検出されたのは、表-2で黒く示した3個体だけであった。すなわち、波方73号として植栽されたNo.1-135は、土佐清水63号のミスラベル個体であり、No.9-139とNo.12-8の2個体は、どの抵抗性クロマツクローンとも一致せず、かつ互いに異なる遺伝的汚染 (以下、コンタミと称す) 個体であった。

これら3個体の採種園内での配置を図-1で見ると、ミスラベル個体 (割付番号3) は同一クローンとは隣接

表-1 クローン識別に用いたプライマーの塩基配列とマーカーバンド

プライマー名	塩基配列		マーカーバンド(bp)
	5'	3'	
OP A-19	CAAACGTCGG		900
G-14	GGATGAGACC		380
G-17	ACGACCGACA		590
P-14	CCAGCCGAAC		900, 800
S-18	CTGGCCGAAC		700
U-03	CTATGCCGAC		700
U-09	CCACATCGGT		610
U-13	GGCTGGTTCC		580
A-17	GACCGCTTGT		750, 950
F-05	CCGAATTCC		710
I-10	ACAACGCGAG		530, 750, 800
F-03	CCTGATCACC		720

*1 Miyahara, F., Mori, Y. and Goto, S.: Clone identification of ramets of a pine wood nematode resistant Japanese black pine seed orchard in Fukuoka Prefecture using RAPD markers.

*2 福岡県森林林業技術センター Fukuoka Pref. Forest Res. and Exten. Center, Kurume, Fukuoka 839-0827

*3 東京大学北海道演習林 Univ. Forest in Hokkaido, The Univ. of Tokyo, Furano, Hokkaido 079-1561

していなかったのに、自家受粉による充実種子収量の低下はそれほど深刻なものではないと思われた。コンタミ個体内、No.12-8は採種園の東端にあり、かつ雌雄花の着生が少なかったことから、コンタミの影響は少ないと思われたが、もう一方のNo.9-139は、採種園のやや中央寄りに存在すること、雌雄花の着生が田辺54号並みに多いこと、開花フェノロジーが他のクローンとほぼ同調していること（未発表）等から、本採種園産種子にある程度の影響を及ぼしている可能性が示唆された。

今後、これらのコンタミ個体、特にNo.9-139が前述の田辺54号自然交雑実生苗で見つかった花粉汚染の原因個体であるかどうかの確認と、コンタミ個体そのもののマツノサイセンチュウ抵抗性やコンタミ個体と交配したF₁苗の抵抗性の低下程度等を把握した上で、改植を検討していく予定である。

また一方で、このNo.9-139を遺伝的なマーカーとすることにより、本採種園における花粉の飛散方向や飛散距離、母樹1個体の次世代への影響率推定等が可能になると考えられるので、後藤ら(2)の手法によりコンタミ個体から採取した種子の胚(2n)と胚乳(n)の遺伝様式を明らかにしていく計画である。

引用文献

- (1) Goto, S.: J. Forest Res., 3, 127 ~ 130, 1998
- (2) 後藤 晋ほか: 第111回日林学術講, 233 ~ 234, 2000
- (3) 白石 進・渡辺敦史: 日林誌, 77, 429 ~ 436, 1995
- (4) Wheeler, N. C. and Jech, K. S.: New Forests, 6, 311 ~ 328, 1992

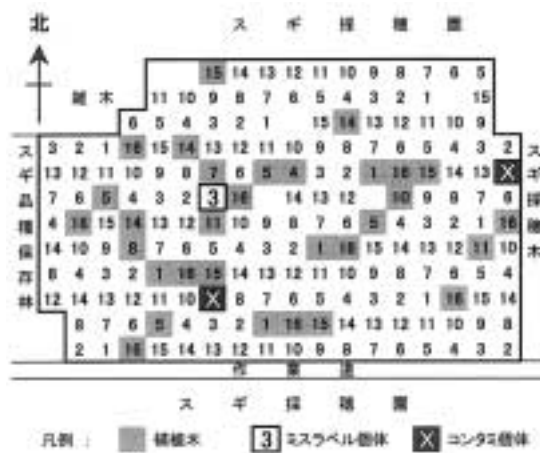


図-1 福岡県小郡市所在 抵抗性クロマツ採種園のクローンチェック結果

表-2 抵抗性クロマツ母樹194個体の RAPD 分析結果表

割付 番号	分析 個体数	(Primer) クローン名 (bp)	A-19	G-14	G-17	P-14	S-18	U-03	U-09	U-13	A-17	F-05	I-10	F-03	結果				
			900	380	590	900	800	700	700	610	580	750	950	710		530	750	800	720
1	10	波方-73	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	土佐清水-63		
1-135			1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1			
2	13	小浜-30	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1		0	
3	12	土佐清水-63	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0		1	
4	13	大分-8	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1		0	
5	12	頼娃-425	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0		0	
6	13	津屋崎-50	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1		1	
7	12	三崎-90	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1		0	
8	13	大瀬戸-12	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0		0	
9	11	波方-37	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1		
9-139			0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	コンタミ	
10	13	田辺-54	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0		
11	11	夜須-37	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0		
12	12	志摩-64	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0		
12-8			0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	コンタミ
13	12	吉田-2	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0		
14	13	川内-290	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0		
15	11	三豊-103	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0		
16	10	備前-143	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1		
16'	0	小浜-24	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1		