

速報

マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツの RAPD 分析^{*1}倉本哲嗣^{*2}・佐々木峰子^{*2}・岡村政則^{*2}・平岡裕一郎^{*2}・藤澤義武^{*2}

キーワード：クロマツ，マツノザイセンチュウ抵抗性，RAPD，類似度

I. はじめに

マツノザイセンチュウ抵抗性育種事業は1978年より進められ、現在までに抵抗性個体としてアカマツ92クローン，クロマツ16クローンが選抜されている。抵抗性に優れた実生苗を確実に生産するには、母材料となる抵抗性クローンを識別し、確実なクローン管理が重要である。また、クロマツでは近交弱勢が生じることが報告されており（斉藤ら，1986）、様々な遺伝マーカー等による類縁関係の推定が重要である。これまでにクロマツの抵抗性クローンの識別について宮原ら（2001）が行い、合計16RAPDマーカーを使用することで識別が可能になっているが、遺伝的変異や類縁関係を推定するには十分ではない。以上のような理由から、本研究ではクロマツ抵抗性クローンについて RAPD 分析法により新たな DNA マーカーを検出し、そのマーカーを用いて抵抗性個体間のクローン識別と類縁関係の推測を試みた。

II. 材料および方法

1. 材料

DNA 解析に使用したクロマツは、表-1に示す抵抗性クロマツ16個体，およびアカマツの抵抗性個体として選抜されたもののクロマツと考えられている備前143，ならびに精英樹15個体である。これらの個体から、バイオジェンバイオテック社製の DNA 抽出キット「Plant Genomic DNA Extraction Mini」を用いて DNA を抽出し、TE バッファーで25ng/μlの濃度に調整後、PCR の鋳型 DNA として用いた。

2. RAPD の分析法について

RAPD の分析は、Kondo *et al.* (2000) の条件を一部改変した条件を用いた。なお、反応液量は15μlで、鋳型 DNA 量は25ng、DNA 合成酵素の量は Invitrogen 社製 Taq DNA Polymerase 0.3unit である。PCR 反応には、MJR 社製の PTC-200 を使用した。バンドパターンの再現性を確認するため、3 回反応を行い、

安定して出現したマーカーについてのみ解析に使用した。なお、RAPD マーカーの検出に使用したプライマーは、オペロン社製の OPE-01~20, OPJ-01~20, OPR-01~20, OPAK-01~20, OPAL-01~20, OPAN-01~20 の合計120プライマーである。多型であるバンドパターンのスクリーニングには、抵抗性クローンおよび精英樹それぞれ4個体を用いて行った。

3. データ解析

本研究では、明瞭な多型バンドについて個体ごとにその有無を調査し、バンドがある場合には1を、無い場合には0として1-0 データマトリクスを作成した。その結果を基に抵抗性個体の識別を行った。

次に作成したマトリクスから各個体間の類似度 (Sokal and Michener, 1958) を、

$$S_{ij} = (a + d) / (a + b + c + d)$$

(a: 2 個体でともに観察されるバンド数, b: 個体 i にのみ観察されるバンド数, c: 個体 j にのみ観察されるバンド数, d: 2 個体ともに観察されないバンド数) により算出した。

さらに、検出したマーカーについて、抵抗性クローン、精英樹で群分けを行い、各群間でマーカーの出現頻度に差があるのかを χ^2 検定によって検討した。この場合、あるマーカーについて、全ての個体をプールした場合の出現頻度が、各群で出現頻度に差がない場合には同様の出現頻度になると仮定して検定を行った。

III. 結果および考察

1. RAPD マーカーの探索結果と個体識別

多型 RAPD マーカーの探索を行った結果、50プライマーから80マーカーを検出した。1プライマーあたりの多型バンドの出現数は1.6マーカーであった。そのうち、もっとも多くの多型バンドが出現したプライマーは OPJ-01 および OPR-16 で、各6マーカーを検出した。各個体のマーカーの DNA 型決定には、検出したマーカー数が多い8プライマー (OPE-02, 12, 17, 19, 20, OPJ-01, OPR-16, OPAL-11) から得られる37マー

^{*1} Kuramoto, N., Sasaki, M., Okamura, Y., Hiraoka, Y. and Fujisawa, Y.: Genetic variation of the nematode resistance individuals in Japanese black pine by RAPD markers

^{*2} 林木育種センター九州育種場 Kyushu Regional Breed. Office, Forest Tree Breed. Center, Nishigoshi Kumamoto 861-1102

カーを用いた。得られたDNA型から抵抗性クローンの識別を行ったところ、全ての個体を識別できた。なお、これまでに福岡県でクロマツの抵抗性クローンについてRAPDマーカーを用いて識別を行っており(宮原ら, 2001), 今回も同様の結果となった。一方, RAPDマーカーは遺伝子増幅装置やPCRの反応条件が異なると全く異なるバンドパターンを示すことがあるといわれている。したがって, 福岡県の報告に使用したRAPDマーカーおよび本研究で明らかになったRAPDマーカーは, 遺伝的変異の比較や, 採種園内の各抵抗性個体が次世代にどの程度寄与しているかを推定する上でも重要であることから, これらのRAPDマーカーのSCARマーカー化を図り, 異なる遺伝子増幅装置でも確実に使用可能なマーカーとする必要がある。

2. マツノザイセンチュウ抵抗性クローンの遺伝的変異

抵抗性クローンの類縁関係を推測するため, 類似度を求めた結果, 類似度が最も大きかったのは土佐清水63(高知)と吉田2(愛媛)の組み合わせ(類似度0.784)であった。また, 類似度が0.7以上の組み合わせは比較的選抜地点間の距離が近い抵抗性個体間であった。さらに, 類似度が最も低かったのは顎娃425(鹿児島)・田辺54(和歌山)の組み合わせ(類似度0.405), ついで小浜24(長崎)・田辺54(和歌山)の組み合わせ(類似度0.459)であった。同様に, 地理的距離が大きい組み合わせでは比較的類似度が小さかった。そこで, 全ての抵抗性クローンの類似度と抵抗性クローンの採取地点間の距離について重回帰分析を行ったところ, $R^2=0.1168$ となった(図-1)。回帰係数について分散分析を行った結果有意な差が見られ, 地理的距離が大きいほど抵抗性クローン間の遺伝的な相違が大きくなる傾向があると推測された。これまでに宮田(1996)は, クロマツの天然林の集団遺伝学的研究を行った結果, 地理的距離が大きくなると遺伝距離が大きくなることを示しているが, 今回の結果は宮田の報告を支持する結果となった。

次に, 抵抗性クローンと抵抗性を有しない精英樹間でのマーカーの出現頻度について χ^2 検定を行ったところ, *OPE02-750*, *OPE12-500*, *OPJ01-300*, *OPR16-900*の4つのマーカーで有意な差が観察された。比較に用いた精英樹は九州産の精英樹のみであり, また, 解析に使用したサンプル数が十分ではないが, マーカーの分離比に違いがみられたことは, 抵抗性クローンと精英樹ではいくつかのマーカーでは, その出現頻度に違いがある可能性を示唆している。

以上のように, 採取地点間の地理的距離が大きいほど抵抗性クローン間の遺伝的な相違が大きくなると推測されたこと, 抵抗性クローンと精英樹間ではいくつかの遺伝マーカーの分離頻度に有意な差が存在することがわかった。今回の研究では供試材料が少ないことから, 今後は九州・関西両育種基本区内の全ての精英樹

ならびに新たに選抜されてきているマツノザイセンチュウ抵抗性個体群について, より多くのマーカーを検出し, 詳細な遺伝的変異の解析を行うことが必要であろう。

引用文献

- Kondo, T. *et al.* (2000) *Theor. Appl. Genet.* 100: 391-395.
 宮原文彦ほか(2001) *日林九支研論* 54: 47-48.
 宮田増男(1996) *林育研報* 14: 1-98.
 齊藤幹夫ほか(1986) *林試研報* 339: 23-36.
 Sokal, R. R. and Michener, C. D. (1958) *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38: 1409-1438.

表-1. 分析に使用した抵抗性クローンと精英樹

マツノザイセンチュウ抵抗性クローン		クロマツ精英樹	
クローン名	選抜県	クローン名	選抜県
田辺ク54	和歌山県	国東104	大分県
備前ク143	岡山県	国東127	大分県
三豊ク103	香川県	国東128	大分県
波方ク37	愛媛県	佐伯4	大分県
波方ク73	愛媛県	中津署101	大分県
三崎ク90	愛媛県	日出109	大分県
吉田ク2	愛媛県	五島署102	長崎県
土佐清水ク63	高知県	出水1	鹿児島県
夜須ク37	高知県	指宿4	鹿児島県
志摩ク64	福岡県	指宿7	鹿児島県
津屋崎ク50	福岡県	鹿児島署5	鹿児島県
大分ク8	大分県	鹿児島署8	鹿児島県
小浜ク24	長崎県	鹿児島署9	鹿児島県
小浜ク30	長崎県	川辺68	鹿児島県
顎娃ク425	鹿児島県	薩摩2	鹿児島県
川内ク290	鹿児島県		

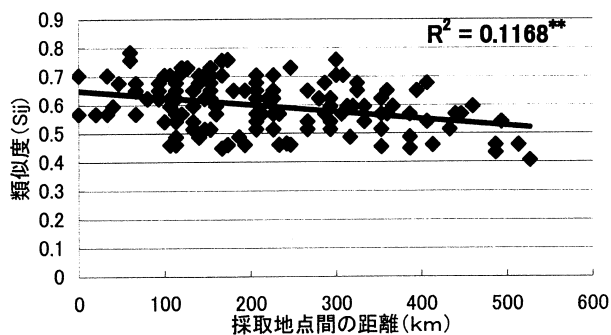


図-1. マツノザイセンチュウ抵抗性クローンの類似度と採取地点間の相関

(2002年12月17日 受理)