

速報

花粉親が異なる田辺ク-54自然交配家系における
マツ材線虫病進展経過の比較*1倉本哲嗣*2 · 佐々木峰子*2 · 岡村政則*2 · 平岡裕一郎*2 · 柏木 学*2
井上祐二郎*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、田辺ク-54、花粉親、RAPD

I. はじめに

クロマツやアカマツのマツノザイセンチュウ抵抗性育種を進める上で、抵抗性遺伝子を集積していくことは、今後の重要な育種戦略の1つと考えられる。このことを実現するためには、クロマツやアカマツでのマツ材線虫病の枯損メカニズムならびに抵抗性に関する遺伝様式が明らかでなければならない。そこで本研究では、抵抗性の遺伝様式解明の一環として、抵抗性クロマツの交配組み合わせによってF₁世代におけるマツ材線虫病の発病や枯損のパターンがどのように変異するか調査した。

II. 材料および方法

1. 材料

供試材料は、林木育種センター九州育種場にある抵抗性クロマツ採種園から平成13年に採種され、平成14年3月に播種、平成15年7月23日および24日にマツノザイセンチュウ接種試験に供した田辺ク-54の自然受粉家系一年生苗128個体である。これらから、バイオジー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10ng/μlの濃度に調整後、PCRの鋳型DNAとして用いて、RAPDマーカーによる花粉親の同定を行った。

2. RAPDマーカーの検出

RAPDマーカーの検出は、Goto *et al.* (2002) の条件を用いた。なお、反応液量は15μlで、鋳型DNA量は10ng、DNA合成酵素量はABI社製AmpliTaq DNA Polymerase Stoffel Fragment 0.75unit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回反応を行った。なお、RAPDマーカーの検出に使用したプライマーおよびマーカー数は、Goto *et al.* (2002) に使用されたオペロン社製の合計21プライマーから得られる28マーカーである。これらのバンドパターンから花粉親を同定した。

3. 枯損調査

本研究では、線虫接種後、経験上針葉の退色が始まるとされる14日目から観察を開始し、殆どの発病個体が枯死に至った40日まで2日おきに調査を行った。なお、針葉の退色がみられた時を発症日、針葉全体が赤褐色に変色した時を枯死日とした。この調査結果をRAPDマーカーに基づく花粉親毎に、すなわち交配組み合わせ毎に、1) 枯死率、2) 発症率(全発症個体に対する調査日における発症個体の割合)、を求めた。

III. 結果および考察

1. 田辺ク-54自然受粉家系における花粉親の同定

調査に供した田辺ク-54自然受粉家系128個体の花粉親について同定を行ったところ、6抵抗性クロンの花粉親の寄与が88%を占めていた(表-1)。特に小浜ク-30(50個体:39%)、三崎ク-90(38個体:30%)、波方ク-37(14個体:11%)の3クロンの花粉親の寄与が大きかった。これらの3クロンは田辺ク-54の隣接木、あるいは近接木であった(表-1)。Goto *et al.* (2002) は、隣接クロン、あるいは花粉生産量の多いクロンが花粉親としての寄与が大きいとしているが、今回の結果も同様の結果となった。なお、全体の12%(15個体)については、花粉親が同定できなかった。これは採種園外からの花粉の混入が原因と考えられる。

表-1. 田辺ク-54自然受粉家系の花粉親の割合

花粉親	個体数	割合 (%)	位置関係*
小浜ク-30	50	39	隣接
三崎ク-90	38	30	隣接
波方ク-37	14	11	近接
大分ク-8	4	3	近接
夜須ク-37	4	3	やや近接
穎娃ク-425	3	2	遠隔
未同定	15	12	
計	128		

*採種園上での田辺ク-54との配置関係

*1 Kuramoto, N., Sasaki, M., Okamura, M., Hiraoka, Y., Kashiwagi, M., Inoue, Y. and Fujisawa, Y.: Comparison of symptom development of pine wilt disease in half-sib progeny of the Tanabe-t54 open family line

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

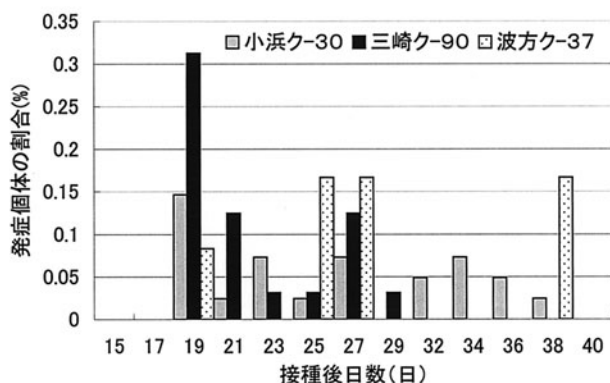


図-1. マツノサイセンチュウ接種後の発症の推移

また、今回の結果では自殖苗が同定されなかった。これまでの研究例をみても、1997年に採種した田辺ク-54自然受粉家系の花粉親を同定した報告 Goto *et al.* (2002) では自殖個体が1個体のみであり、また2000年に採種した宮原ら (2002) では自殖個体が同定されていない。このように、田辺ク-54自然受粉家系で、自殖個体が殆ど得られないのは、1) 自家不和合性の存在、2) 雄雌開花時期の差異、3) 致死遺伝子の存在、4) 自殖苗は成長が悪いため床替え時に排除された、等が原因と考えられる。

2. 枯死率

花粉親の同定の結果、個体数が多かった小浜ク-30、三崎ク-90、波方ク-37を花粉親とする集団（以後花粉親の名称で家系を示す）の交配組み合わせ家系について、観察データをまとめた。枯死率は、三崎ク-90、波方ク-37では50%、小浜ク-30は59%であった。波方ク-37と三崎ク-90はサイセンチュウ抵抗性の5段階評価（九州地区林業試験機関連絡協議会、1999）がランク4、小浜30はランク3であり、今回の結果は、交配組み合わせによって花粉親の抵抗性が反映されている可能性を示唆している。

3. 発症個体数の推移

図-1に、調査日における発症個体数の推移を家系毎に示した。発症は接種後19日以降に観察され、三崎ク-90では初期段階において発症する個体が多く、かつ32日以降に発症した個体はなかった。小浜ク-30は、ほぼ全観察期間を通して発症する個体がみられ、波方ク-37は小浜ク-30と同様の傾向であった。

このように、発症パターンは花粉親によって異なり、花粉親の抵抗性のランクが同じで、かつ枯死率が同じであった三崎ク-90と、波方ク-37においてその発症のパターンが異なった。そこで、実際にどのように発症から枯死に至るのか、発症から枯死に至る

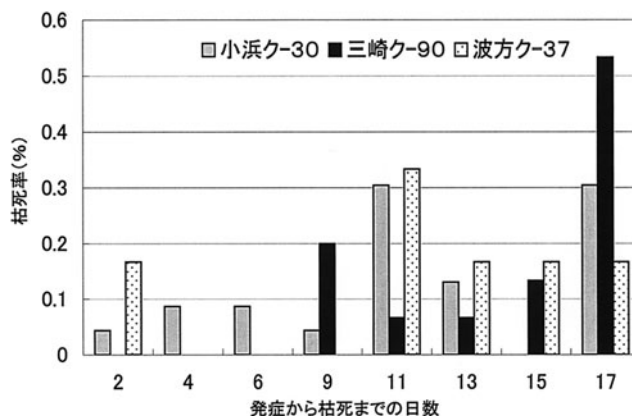


図-2. 発症から枯死までの日数に対する枯死率の頻度分布

日数で比較した（図-2）。その結果、波方ク-37、小浜ク-30では発症後2日で枯死する個体が観察されたのに対し、三崎ク-90では早くとも発症後9日目以降から枯死が観察された。なお、発症から枯死に至る日数の平均は、三崎ク-90で14.7日、波方ク-37では11.4日、小浜ク-30で11.7日であった。そこで、発症から枯死までの日数について *t*-検定を行ったところ、三崎ク-90と波方ク-37、三崎ク-90と小浜ク-30で、5%レベルで有意差が検出され、波方ク-37と小浜ク-30は有意差がなかった。以上の結果から、波方ク-37、小浜ク-30は三崎ク-90に比べて発症後短い期間で枯死に至ることが明らかになった。

以上のことから、波方ク-37と小浜ク-30および三崎ク-90を花粉親とする田辺ク-54自然交配家系では枯死率、発症パターン、病徴進展速度に違いがあると示された。特に抵抗性の評価では同じランク4である三崎ク-90と波方ク-37でのマツノサイセンチュウ接種後の病徴進展の違いは、各花粉親の持つ抵抗性に関する遺伝的な要因を反映していると考えられる。すなわち、今回の結果を踏まえて交配家系に対する接種試験を複数年行うことで、抵抗性の差による枯死率と病徴進展の違い、ならびにそれらの遺伝様式が明らかになるものと考えられる。

引用文献

- Goto, S. *et al.* (2002) *Breeding Science* 52: 71-77.
九州地区林業試験機関連絡協議会育種部会 (1999) ヒノキ精英樹・抵抗性マツ特性表, 35-58.
宮原彦彦ほか (2002) *日林講* 113: 639.
(2003年10月31日 受付; 2003年12月22日 受理)