

ITS領域を利用したマツ属・ヒノキ属植物における雑種識別*1

渡辺 敦史*2 · 白石 進*2

I. はじめに

近縁な2種が接する地域には形態的に中間型を示す個体がしばしば見いだされており、雑種形成や浸透交雑が頻繁に行われていると考えられてきた。しかし、DNA分析の結果から、このような中間型個体が必ずしも雑種ではないことが明らかとなっている(7)。

針葉樹において、DNA分析を利用することで雑種個体を明らかにする試みは、オルガネラゲノム分析(9)やRAPD (random amplified polymorphic DNA)分析(10)を利用する方法(7)が既に報告されている。しかし、葉緑体とミトコンドリアの両オルガネラゲノムを利用する方法は、雑種形成の影響を最も受ける核ゲノムからの情報については全く得ることができないため、雑種識別は全て間接的な情報に依存して行われている。また、RAPD分析は全ゲノムからランダムに遺伝情報を得ることができるため、雑種個体を確実に識別できるが、多大の分析量を必要とし、分析個体数には限界がある。

一方、Quijada *et al.* (1996)は、核ゲノムに存在するITS (internal transcribed spacer)を利用する雑種識別法について報告した(6)。ITS領域は、進化速度がきわめて速く、近縁種間や種内においてさえ、多くの多型を得ることができると期待される。本研究では、ITS領域のPCR (polymerase chain reaction) - RFLP (restriction fragment length polymorphism)分析(1)を用いて、マツ属とヒノキ属における雑種識別を試みたので報告する。

II. 材料と方法

供試樹種 本研究では、雑種を形成することが知られている8種(ハイマツとキタゴヨウ、アカマツとクロマ

ツ、コントルトマツとバンクスマツ、ヒノキとサワラ)からそれぞれ2個体、計16個体を分析に供試した。さらに、形態的にヒノキとサワラの中間型を示す2個体も本研究に含めた。

PCR-RFLP分析 本研究では、ITS領域中の、ITS1全体を対象とした。PCR増幅はDNAポリメラーゼに*TaKaRa Ex Taq™* DNA polymerase (TAKARA SHUZO)を用いたほかは、既に報告している方法(8)に従った。プライマーは、5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3'、5'-GCAACTTGCGTTCAAAGACTCG-3'である。PCR増幅産物は、直接、4塩基認識の6制限酵素(*Afa* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mbo* I, *Msp* I, *Tth* HB8 I)で処理した後、1.5%アガロースゲル電気泳動により、各断片を分画した。

III. 結果と考察

ITSはrDNAの18s-5.8s、5.8s-26sのコード領域間に挿入されたスペーサー領域であり、ITS1とITS2の2つの領域に分けることができる(図-1)。ITS1は、変異性に富んでおり、塩基置換だけでなく塩基配列長も異なる。また、565-700bpの塩基配列長を示す被子植物のITS1に対し、裸子植物のITS1は、1000-3000bpときわめて長い(2)。PCR増幅を行った結果、マツ属の6種では、約3,500bp、ヒノキ属の2種は約900bpのPCR増幅産物が得られた。

マツ属の6種に対してRFLP分析を行った結果(図-2)、制限酵素処理によって切断された多数のフラグメントを検出することができた。亜節間ではそれぞれ大きく異なるフラグメントパターンを示し、塩基配列上に大きな差異があることを示唆した。しかし、亜節内には雑種識別に利用可能な大きな差異は認められなかった。

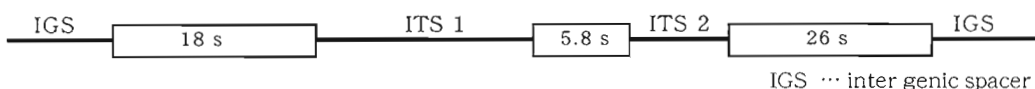


図-1 rDNAの模式図

*1 Watanabe, A. and Shiraishi, S.: The ITS region as a marker to detect hybrids of related species in the genus *Pinus* and *Chamaecyparis*.

*2 九州大学農学部 Fac. of Agric, Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

ヒノキ属の2種と形態的に両種の間型を示す2個体(中間型個体AとB)についても同様にRFLP分析を行った。その結果、*Mbo* Iと*Hae* IIIで処理した泳動像に、ヒノキとサワラの2種間で明瞭な差異が認められた(図-3)。*Mbo* Iでは、ヒノキに4本のフラグメントが認められたのに対し、サワラは3本のフラグメントが検出された。また、*Hae* IIIでは、サワラに制限酵素認識配列がなかったのに対し、ヒノキでは2本のフラグメントが認められた。形態的中間型2個体のうちA個体は、*Mbo* Iと*Hae* IIIで共にヒノキと同一のフラグメントパターンを示したことから、ヒノキであることが示唆された。一方、B個体はヒノキとサワラに特異的であるフラグメントを共に保有しており(図-3, 矢印の部分)、この個体は両種の雑種であることが明らかとなった。

本研究では、ヒノキとサワラの雑種識別がITS1のRFLP分析により、可能であることを示した。榑崎ら(1996)は、RAPD法を利用することによってヒノキとサワラの雑種個体を識別する方法を提示していたが(4)、本研究は厳密かつ多大な分析を必要とするRAPD法と比較してより簡便であると言える。一方、マツ属亜節内の近縁種間には雑種識別に利用可能な多型を見つけることが

できなかった。針葉樹において、ITS1の全塩基配列は*Pinus pinea*の1種で決定されているのみであり(3)、被子植物と比較して未だ十分な塩基配列情報の集積はなされていない。ITSを利用した雑種識別に、今後より検出感度の高いSSCP分析(5)を導入する上で、全塩基配列情報の蓄積が不可欠である。

引用文献

- (1) Liston, A. : Amer. J. Bot., 79, 953-961, 1992
- (2) Liston, A. et al. : Sys. Bot., 21, 109-120, 1996
- (3) Marrocco, R. et al. : DNA sequence, 6, 175-177, 1996
- (4) 榑崎康二ほか : 日林誌, 78, 157-161, 1996
- (5) Orita, M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 86, 2766-2770, 1989
- (6) Quijada, A. et al. : Mol. Eco., 6, 995-996, 1997
- (7) 渡辺敦史ほか : 日林誌, 78, 293-300, 1996
- (8) 渡辺敦史ほか : 日林誌, 79, 155-156, 1997
- (9) Watano, Y. et al. : J. plant Res., 109, 403-408, 1996
- (10) Williams, J. G. K. et al. : Nuc. Acids Res., 18, 6531-6535, 1990

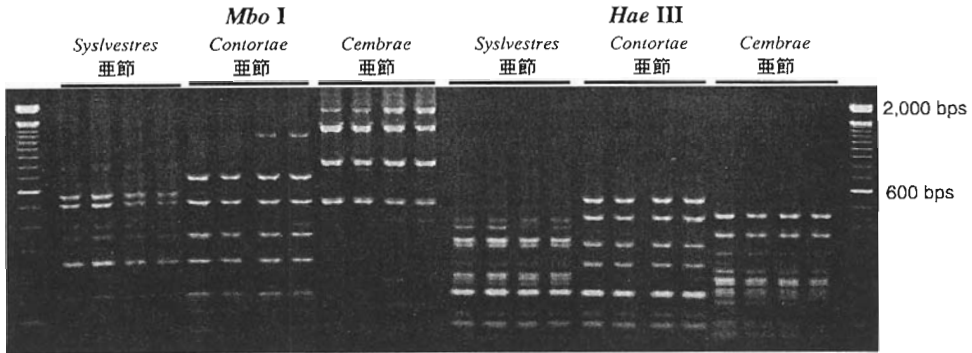


図-2 RFLP分析の結果

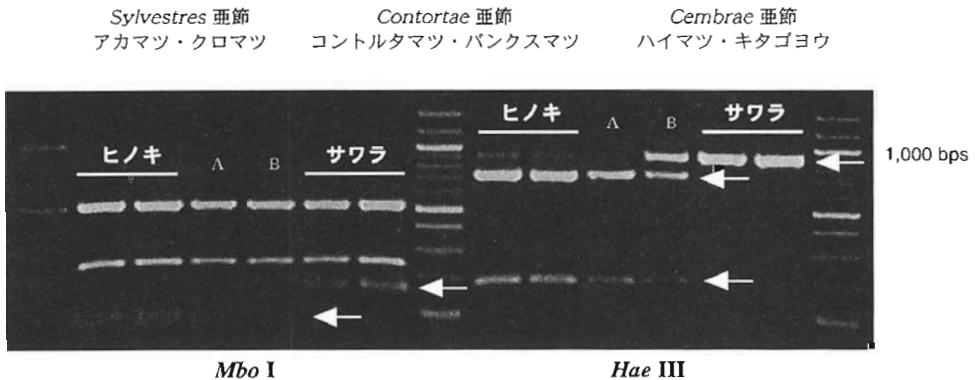


図-3 ITS1のRFLP分析から明らかとなったヒノキとサワラに雑種個体