

会津桐の栽培技術体系化に関する研究

— キリ胴枯性病害抵抗性の検定法 —

(県単課題 平成6年～平成10年)

古川 成治
青野 茂

目 次

要 旨	77
I 緒 言	78
II 材料及び方法	78
1. 抵抗性育種の可能性	78
2. キリのクローン構成の把握	79
III 結果と考察	82
1. 抵抗性育種の可能性	82
2. キリのクローン構成の把握	84
IV 参考文献	90

要 旨

キリ胴枯れ性病害抵抗性育種の可能性について検討し、次のような結果が得られた。苗畑による接種試験の結果、病斑の大きさにばらつきがあり、見かけ上は抵抗性の選抜ができるような結果が得られた。しかし、切った幹及び枝の接種試験から、生理機能が低下している時期に病斑が拡大すること及び樹体の活動期にしか病原菌の侵入を阻止できないことが明らかになり、抵抗性育種を進めるのは困難であると思われた。

キリのクローン構成の把握を行うためにDNA分析を行い、次のような結果が得られた。

会津地方には、葉緑体DNAで分類される2つのタイプがあり、全DNAのRAPD分析の結果と一致したことから、DNAで識別できる2つの系統があることが明らかになった。しかし、ニホンギリ・チョウセンギリの分類の基準となる花の形態による分類とは一致しなかった。会津全域の220個体の分類を行った結果、この2系統は15クローンにしか分類されず、変異の幅が狭いことが判明した。また、I型の由来の数がII型の由来の数より少ないことから、会津地方に元々存在していたのは、葉緑体DNAで分類されるII型のキリではないかと推察された。関東及び東北地方のキリを材料に分析した結果、会津地域と若干クローン構成に違いは見られるものの2系統15クローンに分類されること

1999年4月5日 受理

が明らかになった。しかも、分析した70%の個体が3クローンで占められており、変異の幅が非常に狭いことが判明した。

I 緒 言

本県で生産される桐は会津桐の名で全国に名声を博している。会津桐栽培の歴史は古く、約350年前から始まったと言われており¹⁾、現在まで会津地域の林業短期収入源として大きな役割を果たしてきた。しかし、昭和35年頃から胴枯れ性病害の発生が多くなり以前のような大径木が育ちにくくなっている。林業試験場ではこの対策として、施肥試験、植栽方法別試験、樹勢回復試験、桐優良品種選抜試験、桐樹体質劣化の解明に関する試験等を実施してきたが病害の発生は年々増加する傾向にある²⁾。桐を健全に育てるには土壌が深くて肥沃な土地に植栽し、十分な管理が必要であるが近年の農山村における高齢化や人手不足から管理が十分にできない状況にある。このため、キリ胴枯れ性病害抵抗性育種を進めているが、そもそも抵抗性育種が可能なのか検討する。また、キリの苗木生産の大部分を無性繁殖の分根法で行っているため、遺伝的に均一な構造をしていると考えられるが、会津地方のキリのクローン構成を明らかにする研究は行われていない。そこで、キリのクローン構成を把握するためにDNA分析を行った。

II 材料及び方法

1. 抵抗性育種の可能性

(1) 要因試験

① 目 的

病斑の拡大はどのような要因に左右されるのか確かめるために苗畑での接種試験を行った。

② 材 料

キリは苗畑で育成した1年生分根苗で17個体を材料に用いた。腐らん病菌(バルサ菌)は、森林総合研究所東北支所より分譲していただいたVP-1を利用した。この菌株は継代を繰り返しても病斑形成能力を失わなかった菌株である。

③ 試験方法

要因としては、系統(17個体)、接種時期(10、12月)、方位(南、北)の3つとした。接種方法は、各系統、時期、方位別に5mmのコルクボーラーで形成層に達するように付け傷し、そこにPDA培地培養菌糸を詰め込みビニールテープでまいた。繰り返しは1系統につき2本とした。調査方法は、4月上旬にはく皮して形成層部の褐変の大きさ(長径+短径)/2を測定した。

(2) 交互作用確認試験

① 目 的

苗畑による要因試験の結果、系統及び接種時期に交互作用が見られたがなぜこのようなことが起こったのか、室内実験で明らかにする。

② 材 料

太さ2～3 cm、長さ20cmに切断した1年生幹及び枝を用いた。両側の切断面をパラフィンでかため乾燥を防いだ。個体数は2個体とした。木質化した1年生の材料を使用するために秋季接種には枝を、冬季及び春季接種には幹を用いた。

③ 試験方法

秋(生育活動期)、冬(生育休止期)、早春(生育休止期)の枝または幹の中央に7mmのコルクボーラーで形成層に達するように付け傷し、PDA培地培養菌糸詰め込み、ビニールテープで巻きポリ袋に入れて乾燥を防いだ。温度条件は5、10、20℃とし、各試験区ともに2個体とし1個体あたり各5本とした。接種後4週間後にはく皮して形成層部の褐変の大きさ(長径+短径)/2を測定した。

(3) 病斑拡大の確認試験

① 目 的

休眠初期(12月上旬)に病原菌を接種した場合に、病斑拡大はどのような要因に左右されるのか確かめるために苗畑での接種試験を行った。

② 材 料

キリは苗畑で育成した1年生分根苗でDNAで明確に識別できる4系統を材料に用いた。

腐らん病菌(バルサ菌)は、森林総合研究所東北支所より分譲していただいたVP-1を利用した。この菌株は継代を繰り返しても病斑形成能力を失わなかった菌株である。

③ 試験方法

要因としては、系統(系統A、Bと系統C、Dは葉緑体DNAで識別できる個体で、AとB及びCとDは全DNAにより識別されることから、4系統はDNAで明確に識別できる個体である。また、96年接種試験の結果、系統Aは病斑の一番小さかった個体、系統Cは病斑の一番大きくなった個体で、系統BとDは病斑の中程度の個体である。)、年度(平成8、9年)、方位(南、北)の3つとした。接種方法は、12月中旬に、各系統、方位、接種位置別に5mmのコルクボーラーで形成層に達するように付け傷し、そこに米糠・ふすま培養菌糸を詰め込みビニールテープでまいた。繰り返しは1系統につき2本とした。調査方法は、4月上旬にはく皮して形成層部の褐変の大きさ(長径+短径)/2を測定した。

2. キリのクローン構成の把握

(1) 会津地方の桐の系統判別

① 目 的

会津地方には、ニホンギリ・チョウセンギリの2種が存在すると言われているが、全DNA及び葉緑体DNAの分析を行い、この2種の識別が可能なのか検討した。

② 材 料

福島県林業試験場会津桐見本園及び会津地方全域より花卉の形質に基づき分類された、ニホンギリとチョウセンギリを各24個体ずつ計48個体を選び実験に用いた。6月初旬に各個体より成葉約5gを採取し実験に供した。

③ 全 DNA の単離

成葉からの全 DNA の単離は、MURRAY and THOMPSON³⁾の CTAB 法を改良して行った。成葉 5 g を液体窒素で凍らせてからミキサーで破碎した後、20ml の 2 × CTAB 溶液 (20mM Na₂ EDTA、100mM Tris-HCl、pH8.0、1.4M NaCl、2% CTAB、1% PVP、0.4% メルカプトエタノール) に入れ、室温で 15 分間振とう器で混和した後、3,000rpm (室温) で 15 分間遠心分離し、上層液を回収した。この溶液の 2/3 容量の冷イソプロパノール (-20℃) を加えた後、ゆっくり攪拌して DNA を沈殿させ、使い捨てピペットの先で巻き取り回収した。RNase 処理をした後、フェノール抽出を数回繰り返し上層液を回収し、この溶液の 1/10 容量の 3 M NaOAc と 2.5 倍容量の 99.5% 冷エタノール (-20℃) を加え DNA を沈殿させた。その後、減圧乾燥機を用い 20 分間乾燥した。得られた DNA ペレットは適量の TE 溶液で溶解し、以下の実験に供した。

④ RAPD 分析

得られた全 DNA を鋳型 DNA として RAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析⁴⁾を行った。PCR 反応溶液組成は、50ng/μl の鋳型 DNA、20mM Tris-HCl、pH8.3、50mM KCl、2 mM MgCl₂、0.1mM 各 dATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.2 μM Primer、0.5 unit/μl Taq DNA Polymerase (LIFE TECHNOLOGIES 社) である。反応処理は、最初に 94℃ で 3 分間変性処理を行った後、変性 (94℃、1 分)、アニーリング (36℃、1 分)、伸長 (72℃、2 分) の 3 行程を 40 サイクル繰り返し、最後に 72℃ で 5 分間伸長反応を行った。得られた PCR 産物は、2% アガロースゲルを用い 50V で 1 時間電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色し、UV トランスイルミネーター上で観察した。

⑤ 葉緑体 DNA の塩基配列分析

ニホンギリ・チョウセンギリから各 2 個体ずつ選抜し、得られた全 DNA を鋳型とし、表-1 のプライマーを用いて PCR を行い、葉緑体 DNA の一部 (スパーサー領域 3ヶ所及び matK 遺伝子コード領域 1ヶ所の計 4ヶ所) を増幅した。PCR 反応溶液組成は、50ng/μl の鋳型 DNA、20 mM Tris-HCl、pH8.3、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.1mM 各 dATP、dCTP、dGTP、dTTP、各 0.25 μM Primer、0.5 unit/μl Taq DNA Polymerase (LIFE TECHNOLOGIES 社) である。反応処理は、最初に 94℃ 2 分間変性処理を行った後、変性 (94℃、40 秒)、アニーリング (50℃、100 秒)、伸長 (72℃、2 分) の 3 行程を 30 サイクル繰り返し、最後に 72℃ で 5 分間伸長反応を行った。得ら

表-1 matK コード領域及びスパーサー領域 (3ヶ所) の PCR に利用したプライマーの塩基配列

機能	プライマー	塩基配列	参照
matK 遺伝子	AF	5'-CTATATCCAATTATCTTTCAGGAGT-3'	Ooi et al (8)
	BF	5'-TCAGAGGGATTTGCGTTTATTGTGG-3'	
	R	5'-CTGCATATACGCCCAAATCGGTCAA-3'	
	8R	5'-AAAGTTCTAGCACAAAGAAAGTCGA-3'	
スパーサー領域	trnR	5'-GCCTGTAGCTCAGAGGATTA-3'	Yoshimura et al (unpublished)
	trnN	5'-TCCTCAGTAGCTCAGTGGTA-3'	
	4.5S	5'-ATAGGTGTCAAGTGGAAAGTG-3'	Yoshimura et al (unpublished)
	5S	5'-TATCGTCACCGCAGTAGAGT-3'	
	5S	5'-TCTACTGCGGTGACGATAC-3'	Suyama et al (9)
trnR	5'-CACGTGCTCTAATCCTCTG-3'		

れた PCR 産物は、MicroSpin S-400HR Columns(Pharmacia Biotech 社)を用いて精製した後、ABI PRISM 377DNA Sequencer(Perkin-Elmer 社)を用いて、Dye Terminator 法により塩基配列を決定した。

⑥ PCR-RFLP 分析

上記の matK 遺伝子コード領域の PCR 産物を用いて、Alu I 及び EcoR V の 2 種類の制限酵素により RFLP(restriction fragment length polymorphism)分析を行った。添加酵素量は 5 unit/ $\mu\text{g} \cdot \text{DNA}$ とし、Alu I は 10mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgCl₂、1 mM DTT、EcoR V は 50mM Tris-HCl、pH7.5、10mM MgCl₂、1 mM DTT、100mM NaCl の条件で、37°C で 1 時間インキュベートした。制限酵素により消化した DNA 断片は、2% アガロースゲルで 50V 1 時間電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し UV トランスイルミネーター上で観察した。

⑦ 類似比の算出

RAPD 分析により得られたデータから、各供試個体間の遺伝的組成の似かよりの程度を表す類似比を算出した。比較しようとする 2 個体間の全多型的遺伝子座におけるバンドのデータをもとに、NEI and LI⁵⁾ の F 値を算出し、これを類似比として用いた。

$$F = 2nXY / (nX + nY)$$

ここで、nXY は比較する 2 個体(X、Y)が共有しているバンド数、nX は X 個体が保有しているバンド数、nY は Y 個体が保有しているバンド数である。

(2) 会津桐のクローン構成の把握

① 目的

220 個体のキリを材料に、会津地方に存在するキリのクローン構成の把握を行った。

② 材料

会津地方全域より 220 個体を選び実験に用いた。6 月初旬に各個体より成葉約 5g を採取し実験に供した。

③ 全 DNA の単離

全 DNA の単離は、会津桐の系統判別と同様に行った。

④ RAPD 分析

RAPD 分析は、会津桐の系統判別と同様に行った。

⑤ PCR-RFLP 分析

Alu I 及び EcoR V の 2 種類の制限酵素により RFLP 分析を行った。RFLP 分析は、会津桐の系統判別と同様に行った。

(3) 東日本地域のキリのクローン構成の把握

① 目的

320 個体のキリを材料に、東日本に存在するキリのクローン構成の把握を行った。

② 材料

東日本(青森、秋田、岩手、山形、宮城、新潟、群馬、栃木、茨城)より 320 個体を選び実験に用いた。6 月中下旬に各個体より成葉約 5g を採取し実験に供した。

③ 全 DNA の単離

全 DNA の単離は、会津桐の系統判別と同様に行った。

④ RAPD 分析

RAPD 分析は、会津桐の系統判別と同様に行った。

⑤ PCR-RFLP 分析

Alu I 及び EcoR V の 2 種類の制限酵素により RFLP 分析を行った。RFLP 分析は、会津桐の系統判別と同様に行った。

Ⅲ 結果と考察

1. 抵抗性育種の可能性

(1) 要因実験

表-2 に分散分析表を示した。表にあるとおり系統、接種時期については 1% の危険率で有意差が、方位については 5% の危険率で有意差があった。系統に有意差をつける上で影響を与えた 4 個体の、接種時期と病斑長の関係について調べた(図-1)。この図を見ると、10月に病斑の大きかったものは、12月には小さくなり、逆に10月に病斑の小さかったものは、12月には大きくなる傾向が見られた。系統と接種時期に交互作用が認められたが、このためではないかと考えられた。

表-2 分散分析表

要因	平方和	自由度	分散	F値
A(系統)	34518.3	16	2157.4	4.17**
B(時期)	6183.0	1	6183.0	11.95**
C(方位)	2909.1	1	2909.1	5.62*
A*B	18866.6	16	1179.2	2.28**
A*C	10001.0	16	625.1	1.21
B*C	122.4	1	122.4	0.24
A*B*C	7211.8	16	450.7	0.87
R(ABC)	35195.5	68	517.6	

** 1% 有意; * 5% 有意.

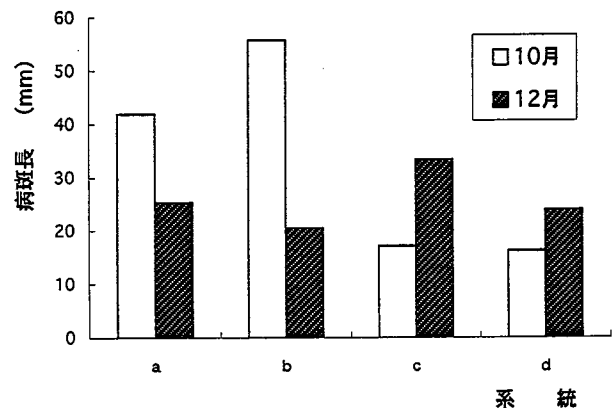


図-1 接種時期と病斑長の関係

系統に有意差をつける上で影響を与えた上位 4 系統のグラフ

(2) 交互作用確認試験

採取時期と病斑長の関係を図-2 に示した。この結果を見ると生育期と 3 月下旬の休眠後期では低温期の病斑が大きくなり、5℃ の培養条件では 20℃ の 2 倍程度に病斑が大きくなった。これとは逆に 12 月上旬接種区では高温側で病斑が大きくなり、20℃ の培養条件では 5℃ の 2 倍程度に病斑が大きくなった。生育期及び休眠後期の枝や幹では、温度を高くすると切り口にカルスが形成され病斑の拡大は阻止されたが、この現象は枝や幹の活動する温度条件下での病原菌の侵入阻止を示す一例と思われた。逆に、休眠初期には生理機能が完全に低下していると思われ温度を高くしてもカルスは形成されず、病斑は拡大する一方であった。同じ休眠期でも少しの時期の差でカルス形成能が変化してしま

うことが明らかになった。苗畑での要因試験の結果、10・12月という少しの接種時期の差で病斑長が異なったが(図-1)、このような影響を受けているものと思われた。また、苗畑では生育期に病原菌を接種しても病斑が拡大せず、冬の間(休眠期)にしか罹病しないが⁶⁾、生育期の枝でも5℃の条件では病斑が拡大することがわかり、生理機能を低下させれば生育期でも病気にかかることが判明した。以上のことから、病原菌の生活組織への侵入には、樹体側の生理機能の低下が必要な条件であると思われた。さらに、生理機能が完全に低下している時期には、温度の高低により病斑の大小が決まるのではないかと考えられた。

(3) 病斑拡大の確認試験

表-3に分散分析表を示した。系統による差はなく、接種年度及び方位について1%の危険率で有意差があった。交互作用については接種年度と方位に5%の危険率で有意差があった。この系統

表-3 分散分析表

要因	平方和	自由度	分散	F値
A(系統)	746.1	3	248.7	2.63
B(時期)	4608.0	1	4608.0	48.70**
C(方位)	3280.5	1	3280.5	34.67**
A*B	842.1	3	280.7	2.97
A*C	233.6	3	77.9	0.82
B*C	552.7	1	552.7	5.84*
A*B*C	50.4	3	16.8	0.18
R(ABC)	151.4	16	94.6	

**1%有意; *5%有意.

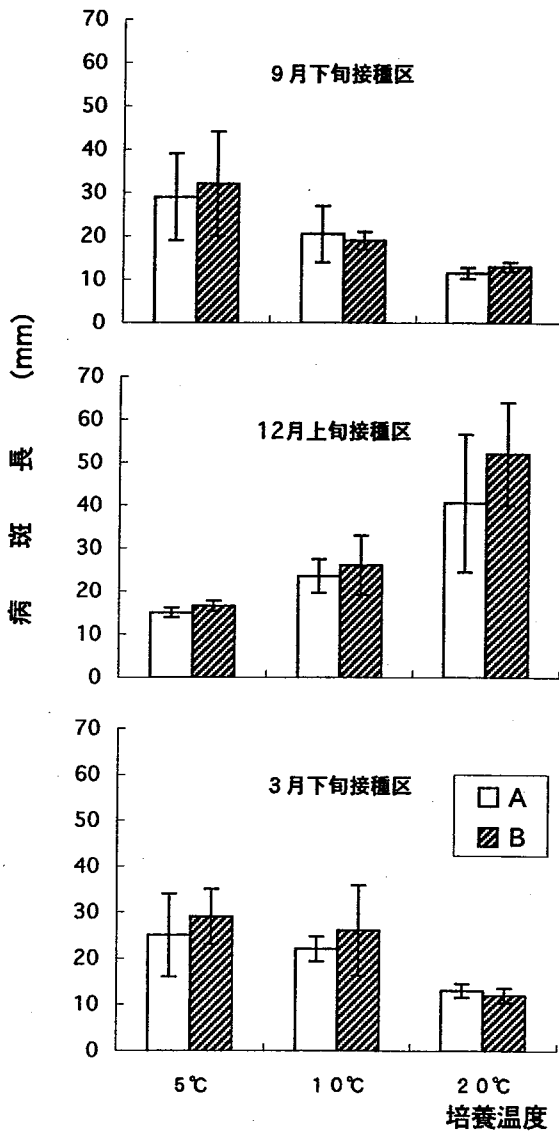


図-2 採取時期と病斑長の関係

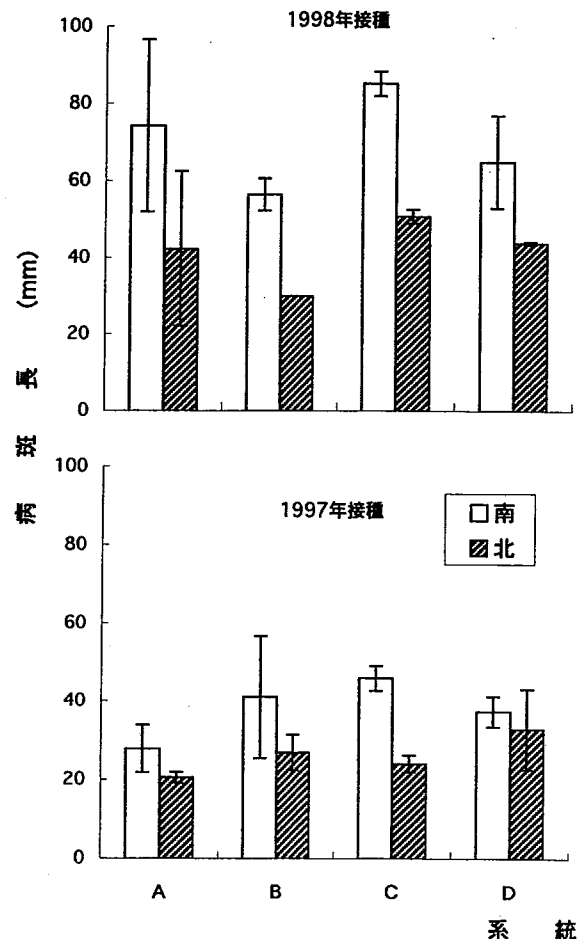


図-3 年度及び方位別接種と病斑長の関係

別の接種試験結果をグラフにしたのが図-3である。1997年よりは1998年の方が大きく、北向きよりは南向きで病斑が大きくなった。図-4に1997年、1998年の11月から4月までの平均気温のグラフを示したが、1998年は1997年より平均気温で1～2℃高く冬暖かい年であった。また、岩手で樹体温度が計られているが南側の温度が北側の温度より2～3℃高いことが示されている⁶⁾。時期別切り枝及び幹の接種試験のとおり、生理機能が完全に低下している休眠期に接種した場合には、気温の高低で病斑の大きさが決まることが示された。

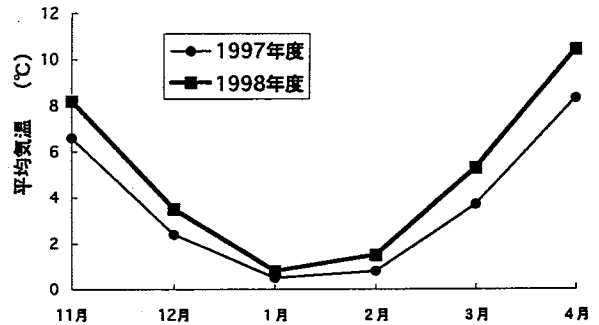


図-4 1997年度及び1998年度の11月から4月までの平均気温

生理機能が低下しているときに罹病すること及び樹体の活動期にしか病原菌の進入を阻止できないことをあわせて考えると抵抗性育種を進めていくのは非常に難しいと思われ、病斑拡大防止のための薬剤防除等を進める方法が効率的であると思われた。

2. キリのクローン構成の把握

(1) 会津地方の桐の系統判別

① RAPD 分析

ニホンギリ24個体、チョウセンギリ24個体、合計48個体を用いて、RAPD分析を行った。13プライマー、15個の仮想的遺伝子座について明瞭な多型が観察された(表-4、写真-1)。多型的座位におけるバンドの有無に基づき、各表現型を識別した(表-5)。ニホンギリでは、A-1からA-8の8タイプ、チョウセンギリがB-1からB-9の9タイプに分類された。このうちニホンギリのA-6、7、8はチョウセンギリのB-7、8、9と同一の表現型であったので両種あわせて14タイプに分類され、限られたクローン型に分類されることが確認された。ニホンギリではA-1タイプが最も多く12個体、チョウセンギリではB-9タイプが最も多くて8個体であった。また、RAPD分析の類似比を元にクラスター分析をした結果、A-1、2、3及びB-1からなるクラスターとそれ以外の表現型からなるクラスターに2分された(図-5)。各クラスター内でもいずれかの種がサブクラスターをつくるような傾向は認められなかった。

表-4 RAPD分析に使用したプライマーと多型的遺伝子座数

OPJ-4	(1)	OPS-3	(1)	OPR-4	(1)
OPJ-16	(1)	OPI-1	(1)	OPR-19	(1)
OPJ-17	(1)	OPQ-20	(1)	OPAC-13	(1)
OPH-19	(1)	OPM-2	(1)		
OPS-1	(3)	OPO-9	(1)		

()内は多型的遺伝子座数

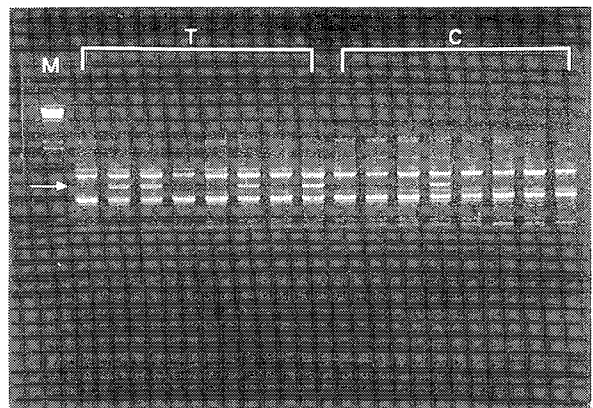


写真-1 RAPD分析の結果(OPS-3)

T, ニホンギリ; C, チョウセンギリ; M, DNA サイズマーカー。

表-5 RAPD 分析による供試材料の分類

番号	種*	RAPD バンドとその位置**														個体数	
		J-16	J-17	H-19	S-3	Q-20	R-19	S-1			I-1	R-4	M-2	J-4	O-9		AC-13
		1420	660	1400	1050	1500	2200	840	950	1750	1220	1250	550	1550	1040		940
A-1	T	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	12
A-2	T	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	1
A-3	T	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	1
A-4	T	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	1
A-5	T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	1
A-6(B-7)	T(C)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	2(2)
A-7(B-8)	T(C)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	4(4)
A-8(B-9)	T(C)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	2(8)
B-1	C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	1
B-2	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	1
B-3	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	3
B-4	C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	1
B-5	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	3
B-6	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	1

*T, ニホンギリ; C, チョウセンギリ. **+, バンドあり; -, バンドなし.

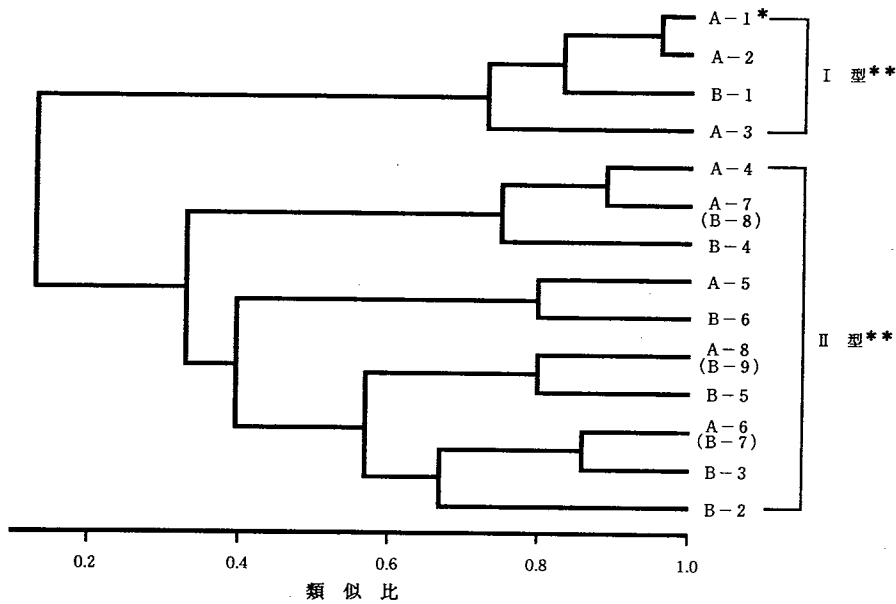


図-5 会津キリの RAPD データによるクラスター分析

*A, ニホンギリ; B, チョウセンギリ; **葉緑体 DNA 型

② 葉緑体 DNA の塩基配列分析

葉緑体ゲノム上の遺伝子 matK 領域は rbcL に比べて進化速度が速く、塩基配列による種間や属間の分子系統解析に有効⁷⁾であると考えられている。また、遺伝子間のスペーサー領域は、変異が許容されるため置換、挿入、欠失などの変異が起りやすいと考えられていることから、matK 遺伝子コード領域1ヶ所及びスペーサー領域3ヶ所計4ヶ所の塩基配列の検索を行った。trnR-trnN、4.5S-5S、5S-trnR の各スペーサーの塩基配列は、それぞれ679bps、362bps、296bps、matK の部分配列は1,222bps であり、調べられたすべての個体で挿入・欠失による長さの変異はなかった(表-6)。matK 遺伝子上で2ヶ所の塩基置換が確認され、この配列の一部を図-6に示してある。1,222bps の中央部分511番目と763番目であった。この2ヶ所の塩基置換は、それ

それピリミジン塩基どうし、プリン塩基どうしの転移であり、2ヶ所ともにアミノ酸置換を伴わない同義置換であった。図-6の塩基配列の上側をI型、下側をII型とした。スペーサー部分では塩基置換による多型もなかった。

表-6 塩基配列の長さ及び塩基置換数

機能	領域	塩基の長さ	塩基置換数
matK 遺伝子	matK 領域の一部	1,222bps	2
スペーサー領域	trnR-trnN	679bps	0
	4.5S-5	362bps	0
	5S-trnR	296bps	0

```

501                                                                    550
CAAAGAAAGC CAGTTCCTCT TTTTCAAAAA GAAATCAAAG ATTATTTTTA
********** T********** ***** *****
                A l u I
551                                                                    600
TTCTTATATA ATTCTCATGT ATGTGAATAC GAATCCATTT TCGTCTTTCT
***** ***** ***** ***** *****
601                                                                    650
ACGTAACCAA TCTTCTCATT TACGATCAAC CTTTCTGGA ATTCTTTTGT
***** ***** ***** ***** *****
651                                                                    700
AACGAATCTA TTTCTATGGA AAAATAGAAC GTCTTGTGAA TGTCTTTGTT
***** ***** ***** ***** *****
701                                                                    750
AAGGTTAAGG ATTTTCAGGC AAACCTATGG TTGGTCAAGG AACCTTGCAT
***** ***** ***** ***** *****
751                                                                    800
GCATTATATT AGGTATCAA GAAAATCCAT TTTGGCCTCA AAAGGGACGT
***** **A********** ***** *****
                E c o R V
    
```

図-6 会津キリの matK 遺伝子(一部分)の塩基配列の2つの型とそれらを識別する制限酵素の認識部位
上部, I型;下部, II型.

③ PCR-RFLP 分析

今回供試した48個体について、上記のI型、II型のどちらの型の matK 遺伝子を保有するか PCR-RFLP 分析を行った。先に述べた2ヶ所の塩基置換のうち、511番目の塩基置換では Alu I 制限酵素(認識配列:AGCT)の認識部位に、763番目の塩基置換では EcoR V 制限酵素(認識配列:GATATC)の認識部位に差が生じるため、これを利用することによりどちらの型か判定が容易に行える。すなわちプライマー組み合わせ AF-8R によって増幅される1,222bpsのPCR産物はI型では認識部位がないので1本のバンドとして検出され、II型では認識部位が共にあるため2本のバンド(Alu Iは、511bpsと711bps、EcoR Vは、459bpsと763bps)として検出される(写真-2)。RFLP分析の結果を表-7に示した。ニホンギリの場合、供試した24個体のうちI型が14個体、II型が10個体となり、チョウセンギリの場合は、24個体のうち1個体のみがI型となり23個体がII型となった。この結果を図-5のクラスター分析のグラフに重ねるとA-1、2、3及びB-1がI型、A-4、5、6、7、8及びB-2、3、4、5、6、7、8、9がII型となり、葉緑体DNAの2つのタイプとRAPD分析の結果は非常によく一致したが、従来

分類に用いられてきた花の形態とは一致しなかった。

花の形態で分けられる種ごとに、類似比の算出を行ったところ、ニホンギリ内及びチョウセンギリ内の供試個体間の類似比の平均値がそれぞれ0.510、0.572であった(表-8)。これに対しニホンギリとチョウセンギリ間の平均類似比は、0.553となり種内・種間共に有意差はなく、ニホンギリとチョウセンギリの遺伝的差異は検出できなかった。次に、葉緑体DNA分析を行ったところ花の形態と一致しない2つのタイプに分類されることがわかり、さらにクラスター分析の結果と一致したことから、類似比の計算を葉緑体DNAの2つのタイプ別に行った(表-9)。I型内及びII型内の類似比の

平均値が0.839、0.627であり、これに対しI・II型間の平均類似比は0.261と小さな値を示し、両者の核ゲノム組成には大きな差異があり、遺伝的分化が進んでいることが示された。また、今回調査した全遺伝子座の40%にあたる6遺伝子座(J-16/1420bp、J-17/660bp、H-19/1400bp、S-3/1050bp、Q-20/1500bp、R-19/2200bp)において、I型とII型で異なる遺伝子が固定されており、この点からもI・II型間での遺伝的分化が示された。このことより、この地域には、由来の違う2つのタイプ(I・II型)のキリが存在することがわかった。また、類似比及びクラスター分析の結果から、I型の由来の数がII型の由来より少ないのではないかと推察された。

表-7 RFLP 分析の結果

種	供試数	matK タイプ	個体数
ニホンギリ	24	I型	14
		II型	10
チョウセンギリ	24	I型	1
		II型	23

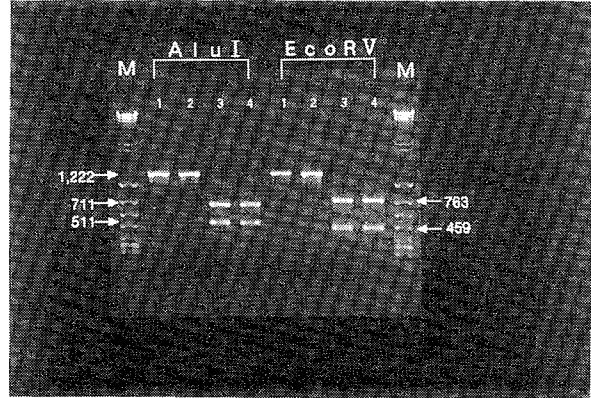


写真-2 I型とII型間の2制限酵素処理による泳動像の違い

1, A-1; 2, B-1; 3, A-4; 4, B-2
1~2, I型; 3~4, II型; M, DNAサイズマーカー。

表-8 ニホンギリとチョウセンギリ及び両種間のRAPDバンドの類似比

	最高	最低	平均値±標準誤差
種内			
ニホンギリ	0.960	0.235	0.510±0.048
チョウセンギリ	0.889	0.118	0.572±0.042
種間			
ニホンギリとチョウセンギリ	1.000	0.118	0.553±0.034

表-9 I型とII型及びI・II型間のRAPDバンドの類似比

	最高	最低	平均値±標準誤差
型内			
I型	0.960	0.750	0.839±0.032
II型	0.889	0.118	0.627±0.030
型間			
I型とII型	0.429	0.133	0.261±0.013

(2) 会津桐のクローン構成の把握

① RAPD 分析

明瞭な多型を示した表-4の13プライマーを用いることにした。会津地域より選抜した220個体を用いてRAPD分析を行った結果、15個の仮想的遺伝子座について明瞭な多型が観察された。

多型的座位におけるバンドの有無に基づき、各表現型を識別した結果、220個体が15タイプに分類された(表-10)。

② PCR-RFLP 分析

今回供試した220個体について、I型、II型のどちらの型の matK 遺伝子を保有するか PCR-RFLP 分析を行った。RFLP 分析の結果を地域別に示した(図-7)。供試した220個体のうち I型が75個体、II型が145個体となった。また、地域により I型、II型の出現状況が違うことが明らかになった。

以上の結果、福島県内には葉緑体 DNA が分類される2つの系統があることがわかった。さらに、全 DNA を分析するとこの2系統が15クローンにしか分類されず、変異の幅が狭いことが判明した。また、会津地方の桐の系統判別の試験結果と同様に、I型の由来の数がII型の由来の数より少ないのではないかと推察された。このことから会津地方に元々存在していたのは、葉緑体 DNA で分類されるII型のキリではないかと推察された。

(3) 東日本地域のキリのクローン構成の把握

① RAPD 分析

明瞭な多型を示した表-4の13プライマーを用いることにした。東日本地域より選抜した320個体を用いて RAPD 分析を行った結果、15個の仮想的遺伝子座について明瞭な多型が観察された。多型的座位におけるバンドの有無に基づき、各表現型を識別した結果、320個体が15タイプに分類された(表-11)。

② PCR-RFLP 分析

今回供試した320個体について、I型、II型のどちらの型の matK 遺伝子を保有するか PCR-RFLP 分析を行った。RFLP 分析の結果を地域別に示した(図-8)。地域により、I型、II型の出現状況が違うことが示された。特に、関東地方にI型が多く、東北地方の日本海側にII型が多

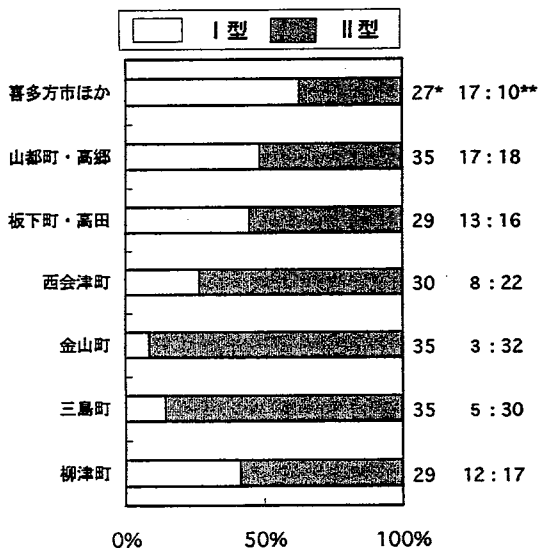


図-7 会津地方のキリのI・II型の割合
*調査個別数, **I・II型の割合

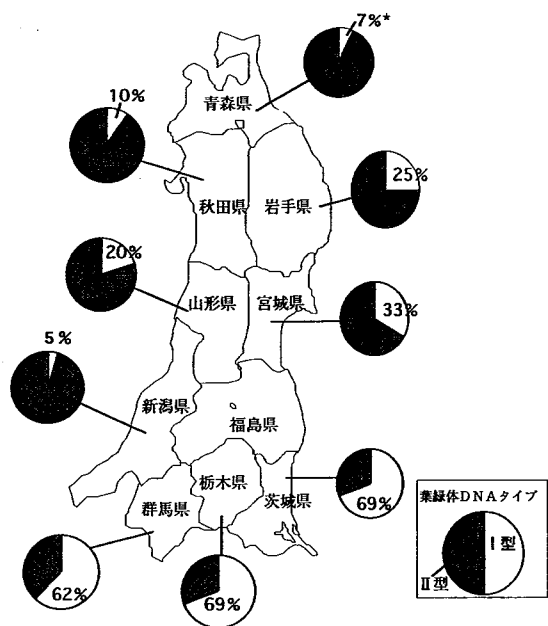


図-8 東日本地域のキリのI・II型の割合
*I型の割合

表-10 RAPD 分析による供試材料の分類

番号	mat-K 遺伝子	RAPD バンドとその位置*														個体数	
		J-16	J-17	H-19	S-3	Q-20	R-19	S-1		I-1	R-4	M-2	J-4	O-9	AC-13		
		1420	660	1400	1050	1500	2200	840	950	1750	1220	1250	550	1550	1040		940
C-1	I	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	51
C-2	I	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	12
C-3	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	7
C-4	I	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	5
C-5	II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	3
C-6	II	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	17
C-7	II	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	37
C-8	II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	41
C-9	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	3
C-10	II	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	4
C-11	II	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	16
C-12	II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	5
C-13	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	1
C-14	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	7
C-15	II	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	11

*+, バンドあり; -, バンドなし。

表-11 RAPD 分析による供試材料の分類

番号	mat-K 遺伝子	RAPD バンドとその位置*														個体数	
		J-16	J-17	H-19	S-3	Q-20	R-19	S-1		I-1	R-4	M-2	J-4	O-9	AC-13		
		1420	660	1400	1050	1500	2200	840	950	1750	1220	1250	550	1550	1040		940
D-1	I	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	49
D-2	I	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	4
D-3	I	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	9
D-4	I	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	2
D-5	II	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	18
D-6	II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	4
D-7	II	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	19
D-8	II	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	93
D-9	II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	81
D-10	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	7
D-11	II	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	11
D-12	II	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	2
D-13	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	1
D-14	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	8
D-15	II	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	12

*+, バンドあり; -, バンドなし。

い傾向にあった。

以上の結果、関東及び東北地方には会津地域と同時に、葉緑体 DNA で分類される 2 つの系統があることがわかった。さらに、全 DNA を分析すると会津地域とクローン構成は若干異なるが 15 クローンに分類されることが判明した。しかも、分析した 70% の個体が 3 クローンで占められており、変異の幅が非常に狭いことが明らかになった。今後、キリの育種を進めていく上で、この変異の幅の狭い理由が、分根というキリの苗木の育成方式によるものか、元々もっているキリの特性なのかどちらに由来するのか明らかにする必要がある。

IV 参 考 文 献

- 1) 福島県林務部：会津桐の沿革について. 6 pp(1954).
- 2) 青野 茂ほか：会津桐の栽培技術体系化に関する研究. 福島県林業試験場報告29：75-87, 1997
- 3) MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F.(1980)Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8 : 4321-2325.
- 4) WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R. LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V.(1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531-6535.
- 5) NEI, M. and LI, W. H.(1979)Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*76 : 5269-5273.
- 6) 農林水産技術会議事務局：リンゴ腐らん病を中心とする胴枯性病害の発生生態の解明と防除技術の確立. 162 : 81-85(1984).
- 7) Steele K. P. and Vilgalys R.(1994)Phylogenetic analyses of Polemoniaceae using nucleotide sequences of the plastid gene matK. *Syst. Bot.* 19 : 126-142.
- 8) Ooi, K. Endo, Y. Yokoyama, J and Murakami, N.(1995)Useful primer designs to amplify DNA fragments of the plastid gene matK from angiosperm plants. *J. Jpn. Bot.* 70 : 328-331.
- 9) Suyama, Y. Kawamuro, K. Kinoshita, I. Yoshimura, K. Tsumura, Y and Takahara, H.(1996)DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat. *Genes Genet. Syst* 71 : 145-149.