DNA分子マーカーによるアカクロマツ(Pinus × densi-thunbergii)のゲノム解析

その雑種性の検証

誌名	日本林學會誌 = Journal of the Japanese Forestry Society
ISSN	0021485X
著者名	渡辺,敦史 白石,進 川瀬,英治 戸田,忠雄 那須,孝
発行元	日本林學會
巻/号	78巻3号
巻号補足	
掲載ページ	p. 293-300
発行年月	1996年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

論　文

DNA分子マーカーによるアカクロマツ（*Pinus*×*densi-thunbergii*）のゲノム解析
——その雑種性の検証——*1

渡辺敦史*2・白石　進*2・川瀬英治*2,*5
戸田忠雄*3・那須　孝*4

渡辺敦史・白石　進・川瀬英治・戸田忠雄・那須　孝：**DNA分子マーカーによるアカクロマツ（*Pinus*×*densi-thunbergii*）のゲノム解析－その雑種性の検証－　日林誌 78：293～300，1996**　DNA分子マーカーを用いて，アカマツ，クロマツおよび形態的に両種の中間型を示す個体（アカクロマツ）の核および葉緑体ゲノム構成を調べ，その雑種性についての検証を行った。まず，葉緑体ゲノム解析を行った結果，樹脂道指数（RDI）が，1.8付近を境に葉緑体ゲノムがアカマツ型（<1.8）とクロマツ型（>1.8）に明確に分かれた。また，核ゲノム構成を調べた結果，アカマツ型の葉緑体ゲノムを保有する個体の中で，RDIが1.4～1.8の範囲のものだけが，アカマツとクロマツ両種の核ゲノムを保有した雑種個体であった。このことから，雑種形成の頻度は従来考えられていたよりもはるかに低く，アカクロマツなどの名称で呼ばれる中間型個体の多くはアカマツであることが判明した。また，雑種個体の葉緑体ゲノムはすべてアカマツ型であった。針葉樹において葉緑体DNAは父性遺伝することから，雑種形成は，クロマツを母樹とし，これにアカマツ花粉が受精することによってのみ起こっており，両種間に強い生殖隔離が存在することが明らかとなった。
キーワード：アカクロマツ，RAPD，RFLP，種間雑種，DNA分類

WATANABE, A., SHIRAISHI, S., KAWASE, E., TODA, T., and NASU, T.: **Genome analysis of *Pinus*×*densi-thunbergii* UYEKI using DNA molecular markers.—Verification of its hybridity—. J. Jpn. For. Soc. 78: 293～300, 1996**
Genome compositions of the morphological crosses called Akakuro-matsu (*Pinus*×*densi-thunbergii* UYEKI) which were regarded as the hybrids between *P. densiflora* SIEB. et ZUCC. and *P. thunbergii* PARL. were investigated using DNA molecular markers, and compared with the genome composition of *P. densiflora* and *P. thunbergii*. As the result of chloroplast DNA analysis using RFLP, chloroplast genome type separated into *P. densiflora* type and *P. thunbergii* type at 1. 8 of resin duct index (RDI). Nuclear DNA analysis using RAPD, revealed that crosses with 1.4-1.8 RDI possessed the genomes of the two species, and they were hybrids between *P. densiflora* and *P. thunbergii*. The frequency of hybridization, however, was lower than it has been considered, and it was clarified that most of morphological crosses were *P. densiflora*. All of these natural hybrids had *P. densiflora*'s chloroplast genome. Since chloroplast DNA is inherited from pollen parent in conifers, the hybrids cause only in the combination of *P. thunbergii*×*P. densiflora*. This indicates that the reproductive isolation exists between the two *Pinus* species which had been considered to be nearly related phylogenetically.
Key words: DNA systematics, inter species hybrid, *Pinus*×*densi-thunbergii*, RAPD, RFLP

I．はじめに

形態的にアカマツ（*P. densiflora* SIEB. et ZUCC.）とクロマツ（*P. thunbergii* PARL.）の中間型を示す個体は，非常に広く分布し，アカクロマツ，アイノコマツ，アイグロマツ，アイアカマツ等の名称で呼ばれている（便宜上，本論文中では，アカクロマツに統一した）。このような個体がアカマツからクロマツにかけて連続的に分布している現象は，アカマツとクロマツの両樹種間での浸透交雑によって引き起こされているとされている（*3*，*14*）。しかし，このような中間型がアカマツとクロマツの種間雑種形成によって生じているとする説は，遺伝学的には立証されていない。

アカマツ，クロマツおよびその中間型を分類する方法として，針葉横断面における樹脂道の分布パターンを数値化した樹脂道指数（resin duct index；RDI）が，これまで最もよく用いられてきた。アカマツ，中間型，クロマツのRDIは0から2に連続的に分布しており，これらの値を三つに分けて樹種区分を行う方法（3分法）や中間型をさらに細かく分け，全部で五つに区分する方法（5分法）などが提案されている（*3*，*4*，*14*，*17*，*18*，*23*）。しかし，これらの区分法の理論的根拠は乏しい。また，外部形態的特徴等を用いて判定する試みも行われてきたが，判断基準は必ずしも明確でなく（*1*，*13*，*22*），アカマツ，クロマツおよび中間型個体の確実な分類方法はいまだ確立されていない。

本研究では，形態的にアカマツ，クロマツ両樹種の中間型を示すアカクロマツ（*Pinus*×*densi-thunbergii* UYEKI

*1 本研究の一部は第105回日本林学会大会で口頭発表した。
*2 九州大学農学部　Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-81
*3 林木育種センター九州育種場　Kyushu Breed. Stat., Nat. For. Tree Breed. Ctr., Kumamoto 861-11
*4 林木育種センター東北育種場　Tohoku Breed. Stat., Nat. For. Tree Breed. Ctr., Iwate 020-01
*5 現勤務先：山梨県庁　Yamanashi Pref. Off., Kofu 400

表-1. 全マツノザイセンチュウ抵抗性クローンの樹脂道指数(RDI)と葉緑体ゲノム型
The RDIs and chloroplast genome types of 108 resistance clones to Pine-wood nematode.

クローン名	RDI*	葉緑体ゲノム**(実験Ⅰ)	実験Ⅱの供試個体 a	実験Ⅱの供試個体 b	クローン名	RDI*	葉緑体ゲノム**(実験Ⅰ)	実験Ⅱの供試個体 a	実験Ⅱの供試個体 b	クローン名	RDI*	葉緑体ゲノム**(実験Ⅰ)	実験Ⅱの供試個体 a	実験Ⅱの供試個体 b
松島ア 58	0.000	D	A-1	A-1	宮島ア 54	0.056	D	B-4		久留米ア 29	0.466	D		
南国ア 5	0.000	D	A-2	A-2	佐賀関ア 170	0.059	D			佐賀関ア 84	0.469	D		
田辺ア 52	0.000	D			大分ア 204	0.059	D			久留米ア 79	0.529	D		
真備ア 70	0.000	D			高松ア 1	0.074	D			大分ア 137	0.549	D		
熊本ア 16	0.000	D	A-3	A-3	佐賀関ア 165	0.075	D			備前ア 137	0.599	D		
赤坂ア 88	0.000	D			佐賀関ア 126	0.078	D			松島ア 70	0.748	D		
岡山ア 88	0.003	D			西条ア 8	0.079	D			佐賀関ア 134	0.809	D		
宇和島ア 18	0.003	D	A-4		宇和島ア 39	0.080	D			笠岡ア 178	0.970	D	D-1	
佐賀関ア 113	0.005	D			赤坂ア 163	0.084	D			本渡ア 1	0.993	D	D-2	
総社ア 39	0.008	D			阿南ア 34	0.084	D			備前ア 140	1.046	D	D-3	
須崎ア 32	0.011	D			国見ア 17	0.088	D			国見ア 53	1.098	D	D-4	
大分ア 168	0.011	D			山陽ア 6	0.094	D			大分ア 167	1.110	D		1
太宰府ア 4	0.012	D			久留米ア 18	0.101	D			金光ア 25	1.176	D		2
阿南ア 55	0.012	D			岡山ア 85	0.104	D			久留米ア 78	1.283	D		3
新居浜ア 7	0.013	D			有田ア 49	0.106	D			佐賀関ア 108	1.319	D		4
岡山ア 82	0.016	D			赤坂ア 216	0.111	D			小浜ク 24	1.404	D		5
大分ア 198	0.017	D			由岐ア 25	0.118	D			備前ア 66	1.518	D	E-1	
大分ア 203	0.017	D			国見ア 31	0.133	D			備前ア 21	1.527	D	E-2	
金光ア 13	0.018	D			真備ア 58	0.147	D			佐賀関ア 93	1.662	D	E-3	
久留米ア 144	0.020	D			宇和島ア 50	0.149	D			大分ア 142	1.739	D	E-4	E-4
赤坂ア 179	0.021	D			熊山ア 25	0.158	D			夜須ク 37	1.852	T		6
有明ア 7	0.022	D			延岡ア 219	0.185	D			土佐清水ク 63	1.887	T		7
熊山ア 119	0.023	D			佐賀関ア 132	0.187	D			小浜ク 30	1.920	T		8
岡山ア 132	0.024	D			須崎ア 31	0.210	D			波方ク 37	1.947	T		9
佐賀関ア 162	0.024	D			新居浜ア 10	0.213	D			顎娃ク 425	1.947	T		10
備前ア 150	0.026	D			笠岡ア 124	0.215	D			田辺ク 54	1.956	T		11
宇和島ア 21	0.028	D			佐賀関ア 90	0.222	D			大瀬戸ク 12	1.965	T		12
姫路ア 232	0.029	D			大分ア 269	0.237	D			波方ク 73	1.969	T		13
大分ア 173	0.033	D			大分ア 111	0.270	D			吉田ク 2	1.976	T		14
大分ア 186	0.033	D			太良ア 122	0.301	D			川内ク 290	1.976	T		15
須崎ア 27	0.040	D			吉備ア 77	0.333	D	C-1		備前ア 143	1.984	T		16
備前ア 40	0.041	D			鴨方ア 29	0.382	D	C-2		志摩ク 64	1.985	T	F-1	
熊本ア 63	0.048	D			久留米ア 142	0.418	D	C-3		三豊ク 103	1.985	T		
久留米ア 118	0.053	D	B-1		大分ア 166	0.433	D	C-4		三崎ク 90	1.987	T	F-2	F-1
佐賀関ア 117	0.054	D	B-2		佐賀関ア 118	0.433	D			大分ク 8	1.993	T	F-3	F-2
熊山ア 39	0.055	D	B-3		日生ア 35	0.438	D			津屋崎ク 50	2.000	T	F-4	F-3

* この表のRDI値は，戸田ら(*17*)から引用した。 ** D，アカマツ型；T，クロマツ型。

(*2*)) の成因を明らかにするために，葉緑体DNAのRFLP (restriction fragment length polymorphism) 分析(*5*)および核DNAのRAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析(*21*)の結果から，RDIとゲノム構成の関係を解明し，その雑種性について検証した。

II. 材料と方法

1. 供試材料

林野庁林木育種センター九州育種場に植栽されているマツノザイセンチュウ抵抗性クローン108個体（表-1），同東北育種場保有のアイグロマツとして天然生林から選抜された自然種間雑種7個体およびクロマツ(♀)×アカマツ(♂)の人工交配によって作出された人工種間雑種2個体を使用し，次に示す4種の実験を行った。

［実験I］ マツノザイセンチュウ抵抗性クローン全108個体を使用し，これらのクローンの葉緑体ゲノム型を決定した。

［実験II］

（a） 既に戸田ら(*17*)によって報告されているマツノザイセンチュウ抵抗性クローンのRDIをもとに，6グループ（A～F）に分け，1グループ当り4個体（計24個体（表-1の実験IIa））を用いて核ゲノム構成を調査した。各グループのRDIに基づく樹種区分（ここでは，吉川らの5分法(*23*)と戸田らの3分法(*17*)を用いた）は表-3のとおりである。

（b） さらに，マツノザイセンチュウ抵抗性クローンのうち，RDIが1.1以上の16個体（表-1の実験IIb）について，核ゲノム構成を調査した。なお，実験IIaで用いた個体の中から，アカマツおよびクロマツの標準個体としてそれぞれ3個体（A-1，A-2，A-3，F-2，F-3，F-4）と，雑種と判定された大分ア142（E-4）を使用した。各個体のRDIに基づく樹種区分は表-3のとおりである。

［実験III］ 自然種間雑種とされている7個体を用いて，葉緑体ゲノム型判定と核ゲノム構成を調査した。なお，アカマツ，クロマツの標準個体としてそれぞれ3個体（実験IIaのA-1，A-2，A-3，F-2，F-3，F-4）を使用した。

［実験IV］ 人工種間雑種2個体を用いて，葉緑体および核のゲノム構成を調べた。なお，アカマツ，クロマツの標準個体として，実験IIIと同じ6個体を使用した。

2. DNA分析およびデータ解析

1) 全DNAの単離

1個体当り1本の当年枝を採取し，−20℃で冷凍保存した。全DNAの抽出は，当年葉約100 mgを液体窒素下で粉砕し，CTAB法(*6*)を改良した方法(*15*)で行った。

2) 葉緑体DNAのRFLP

得られた全DNAを鋳型としてPCR (polymerase chain reaction) により*rbc*L遺伝子（1,309 bps）を増幅した。PCR産物はGENE-CLEAN Kit II (BIO 101 Inc.) で精製し，*Hae*IIIで切断した後，アガロースゲルで電気泳動し，多型を検出した(*15*)。

表-2. RAPD分析に使用したプライマー
The primers used in each RAPD analysis.

プライマー					
A-07[b]	D-05	I-15[b]	O-13[b]	S-10	W-19
A-09	D-09	J-08[a]	O-14[b]	S-18	X-04
A-12[a]	D-12	M-04[a]	O-16	S-20	X-20
A-17	G-01[a]	M-11	O-18	T-02	FB 01*[1]
B-11	G-08	M-14	P-04[a]	T-09	FB 02*[2]
B-13	G-13	N-01	P-05	U-06	FB 03*[3]
B-16[a]	H-02	N-11[a]	R-06	U-09	FB 09*[4]
C-06	H-14	O-01	R-10[a]	U-11	FB 10*[5]
C-13	H-16[a]	O-08	S-06	W-15[a]	

[a] 実験IIでのみ使用したプライマー。[b] 実験III，実験IVでのみ使用したプライマー。
[1] 5′−CCACCGCCAG−3′；[2] 5′−CAGTTCTGGC−3′；
[3] 5′−CCTGGCGAGC−3′；[4] 5′−CTCGGTGATC−3′；
*[5] 5′−ATCTTCCGCC−3′。

3) 核DNAのRAPD分析

全DNAを鋳型DNAとして，表-2に示したプライマーを用いてRAPD分析を行った(*8*)。なお，A～Xシリーズのプライマーは Operon Technologies 社の市販品であり，FBシリーズの5種類は，DNAシンセサイザーで新たに合成した。その塩基配列は表-2欄外に示すとおりである。各プライマーによって増幅されたPCR産物（バンド）の中から明瞭なバンドのみを選び，供試各個体のバンド保有の有無を調べた。

4) RAPDデータの解析

RAPD分析によって得られたデータをもとに，供試個体間の遺伝的類似度(F)をNEI and LI(*11*)の方法により算出した。さらに，実験I～IVにおいて，供試個体の核ゲノム構成を比較するために，Aグループの個体をアカマツの標準個体，Fグループの個体をクロマツの標準個体として，次式により，各個体(i)のアカマツ度（d_{Di}），クロマツ度（d_{Ti}）を求めた。

$$d_{Di}=1-(F_d-F_{di})/(F_d-F_{dt})$$
$$d_{Ti}=1-(F_t-F_{ti})/(F_t-F_{dt})$$

ここで，F_{di}：i個体とアカマツ標準個体との類似度の平均値，F_{ti}：i個体とクロマツ標準個体との類似度の平均値，F_d：アカマツ標準個体間の類似度の平均値，F_t：クロマツ標準個体間の類似度の平均値，F_{dt}：アカマツ標準個体とクロマツ標準個体間の類似度の平均値である。

III. 結果

1. マツノザイセンチュウ抵抗性クローンの葉緑体DNA分析（実験I）

葉緑体DNA上にある*rbc*L遺伝子をRFLP分析することによって葉緑体ゲノムをアカマツ型とクロマツ型に識別することが可能である(*15*)。マツノザイセンチュウ抵抗性クローン全108個体の，*Hae*IIIを用いたRFLP分析結果を表-1に示した。松島ア58から大分ア142までの92個体（RDI：0.000～1.739）の葉緑体ゲノムはアカマツ

型，夜須ク37から津屋崎ク50までの16個体（RDI：1.852～2.000）はクロマツ型であった。

2. マツノザイセンチュウ抵抗性クローンにおけるRDIと核ゲノム構成の対比（実験II）

（a） RDIを異にする6グループ，24個体（表-1）をRAPD分析した結果，217本の多型バンドが観察された。これらのバンド保有データから各供試個体のゲノム構成を表す指数として算出したアカマツ度，クロマツ度は，図-1のとおりである。この結果から，A～Dグループの16個体のうち，笠岡ア178を除く15個体の遺伝的組成には大きな差異はなく，アカマツ標準個体（Aグループ）と同じ（以下，アカマツ型）核ゲノム構成を示した。クロマツ標準個体としたFグループの4個体間には，アカマツ度およびクロマツ度に大きな違いはなく，その核ゲノム構成はすべてクロマツ型であった。Eグループの4個体はすべて，アカマツ度とクロマツ度がともに中間の値を示した。また，このEグループの4個体は，RAPD分析で観察された多型バンドのうちで，アカマツ，クロマツに種特異的であると思われるバンドの両方を保有していた（図-2，レーン5，12，18，20の＊印）。

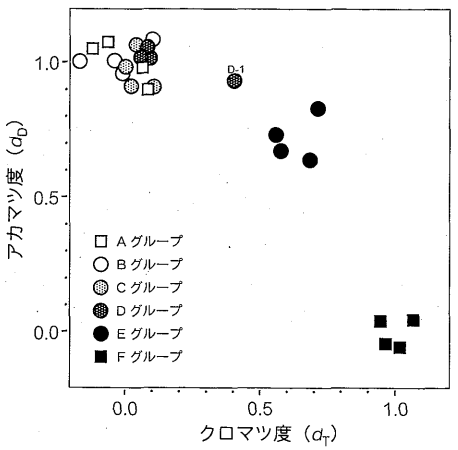


図-1. マツノザイセンチュウ抵抗性クローンのアカマツ度・クロマツ度（実験IIa）
The proportions of *P. densiflora* and *P. thunbergii* elements in nuclear genome of resistance clones to Pine-wood nematode.

（b） さらに，雑種とRDIの関係を詳細に調べるために，RDIが1.1以上の16個体のRAPD分析を行った結果，得られた多型バンド数は191であった。各供試個体のアカマツ度，クロマツ度を算出し，その結果を図-3に示した。大分ア167（No.1），金光ア25（No.2），久留米ア78（No.3），佐賀関ア108（No.4）の4個体（RDI：1.110～1.319）はアカマツ型の核ゲノム構成を，夜須ク37（No.6）から備前ア143（No.16）までの11個体（RDI：>1.8）はクロマツ型の核ゲノム構成を示している。また，RDIが1.404の小浜ク24（No.5）は，両者の中間にプロットされた。

3. 天然生林から選ばれた中間型個体のゲノム解析（実験III）

自然種間雑種7個体について，葉緑体ゲノム型判定のためのRFLP分析と核ゲノム構成を解明するためのRAPD分析を行った。この実験で供試した13個体のRAPD分析結果（188本の多型バンドデータ）をもとに，各個体のアカマツ度，クロマツ度を求めた（図-4）。種間雑種7個体のうちの1個体は，クロマツ標準個体（Fグループ）と一緒にプロットされたが，残る6個体はアカマツ標準個体（Aグループ）とクロマツ標準個体（Fグループ）の中間にプロットされた。また，これらの6個体の葉緑体ゲノムは，*rbc*L遺伝子のRFLP分析の結果，すべてアカマツ型であった（図-5のレーン8～13）。

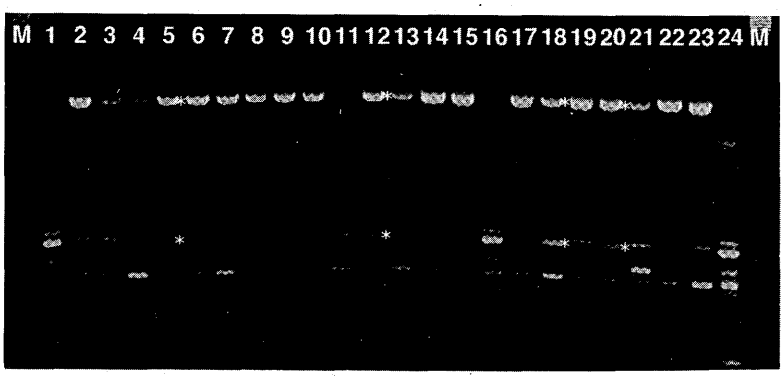


図-2. プライマーU-11によるRAPD分析の結果（実験IIa）
The profile resulted from RAPD analysis using primer U-11.

1, 津屋崎ク50；2, 佐賀関ア117；3, 南国ア5；4, 本渡ア1；5, 大分ア142；6, 吉備ア77；7, 笠岡ア178；8, 松島ア58；9, 久留米ア142；10, 久留米ア118；11, 志摩ク64；12, 佐賀関ア93；13, 熊本ア16；14, 鴨方ア29；15, 国見ア53；16, 大分ク8；17, 宮島ア54；18, 備前ア21；19, 備前ア140；20, 備前ア66；21, 宇和島ア18；22, 熊山ア39；23, 大分ア166；24, 三崎ク90。

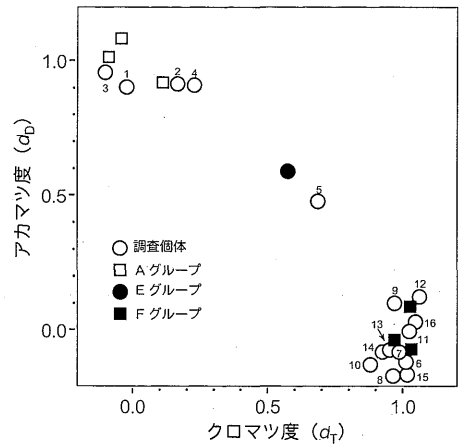


図-3.　マツノザイセンチュウ抵抗性クローンのアカマツ度・クロマツ度(実験 IIb)

The proportions of *P. densiflora* and *P. thunbergii* elements in nuclear genome of resistance clones to Pine-wood nematode.

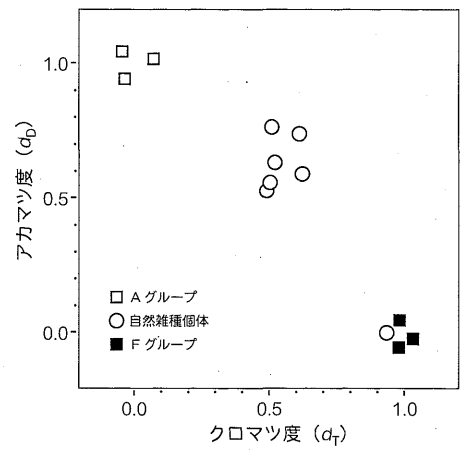


図-4.　天然生林より選抜された中間型個体のアカマツ度・クロマツ度(実験 III)

The proportions of *P. densiflora* and *P. thunbergii* elements in nuclear genome of crosses between these two species.

4.　人工交配によって作出された種間雑種のゲノム解析(実験 IV)

クロマツ(♀)×アカマツ(♂)の人工交配家系（2個体）のゲノム構成を実験 III と同様に調べた（図-6)。139本の多型バンドデータから算出した供試2個体のアカマツ度，クロマツ度は，アカマツ標準個体（A グループ)，クロマツ標準個体（F グループ）の中間にプロットされた。なお，*rbc*L 遺伝子の RFLP 分析の結果，この2個体の葉緑体ゲノムは，花粉親と同じアカマツ型であった（図-5 のレーン 14，15)。

Ⅳ．考　　察

マツノザイセンチュウ抵抗性クローン（108クローン）を用いた葉緑体 DNA 分析（実験 I）の結果，RDI が 1.8 以下の 92 個体はアカマツ型の葉緑体ゲノムを，また，RDI が 1.8 以上の 16 個体はクロマツ型の葉緑体ゲノムを保有していることが明らかとなった（表-1)。この結果は，RDI が 1.8 前後を境にして，葉緑体ゲノムはアカマツ型とクロマツ型に明確に分けられることを示している。

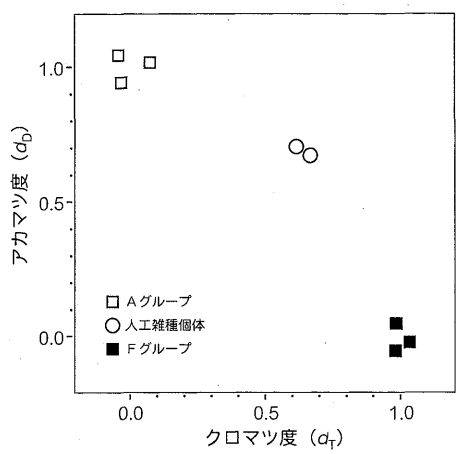


図-6.　人工交配によって作出された雑種個体のアカマツ度・クロマツ度(実験 IV)

The proportions of *P. densiflora* and *P. thunbergii* elements in nuclear genome of artificial hybrids.

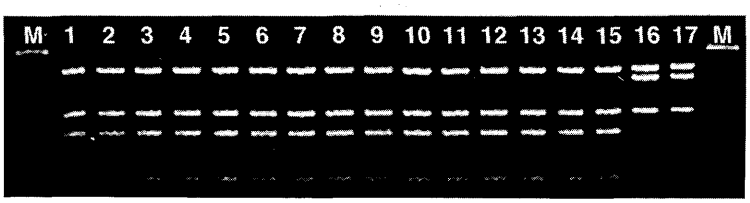


図-5.　種間雑種個体における葉緑体 DNA(*rbc*L)の RFLP 分析結果(実験 II，III，IV)

*Hae*III restriction fragment patterns of *rbc*L gene in hybrids.

1, 南国ア 5(A-2)；2, 熊本ア 16(A-3)；3, 小浜ク 24(5)；4, 備前ア 66(E-1)；5, 備前ア 21(E-2)；6, 佐賀関ア 93(E-3)；7, 大分ア 142(E-4)；8, 自然雑種 1；9, 自然雑種 2；10, 自然雑種 3；11, 自然雑種 4；12, 自然雑種 5；13, 自然雑種 6；14, 人工雑種 1；15, 人工雑種 2；16, 大分ク 8(F-3)；17, 津屋崎ク 50(F-4)。M, サイズマーカー。

しかし，葉緑体DNAは，細胞質遺伝し，片親のみから遺伝するため，雑種個体の判定はできない。そこで，メンデル（両性）遺伝する核DNAについて調査した。実験IVにおいて，クロマツ×アカマツの人工交配家系（2個体）のアカマツ度，クロマツ度は，アカマツ標準個体，クロマツ標準個体の中間にプロットされ（図-6），アカマツ，クロマツおよび雑種個体の核ゲノム構成を，今回用いたアカマツ度，クロマツ度によって評価できることが証明された。

そこで，マツノザイセンチュウ抵抗性クローンの中から40クローンを選び，RAPD分析を用いて核ゲノム構成を調査した（実験II）。図-1，3に示すように，RDIが1.4以下の個体のアカマツ度，クロマツ度は，笠岡ア178を除き同程度の値を示し，アカマツ型の核ゲノム構成を有していることが判明した（表-3）。また，葉緑体ゲノムもすべてアカマツ型であった（表-1）。一方，RDIが1.8以上の個体は，クロマツ標準個体と同等のクロマツ度，アカマツ度を示し（図-1，3），これらの個体の核ゲノム構成はクロマツ型であることが明らかとなった（表-3）。これらの個体の葉緑体ゲノムもクロマツ型であり（表-1），核と葉緑

表-3. 実験IIにおける各供試個体の樹脂道指数(RDI)とRAPD分析に基づく分類結果の比較
The comparison of RDI and unclear genome type.

供試個体番号 IIa	供試個体番号 IIb	クローン名	樹脂道指数による分類 RDI*	5分法(*23*)	3分法(*17*)	RAPD分析からの分類結果
A-1	A-1	松島ア58	0.000	アカマツ	アカマツ	アカマツ
A-2	A-2	南国ア5	0.000	〃	〃	〃
A-3	A-3	熊本ア16	0.000	〃	〃	〃
A-4		宇和島ア18	0.003	〃	〃	〃
B-1		久留米ア118	0.053	〃	〃	〃
B-2		佐賀関ア117	0.054	〃	〃	〃
B-3		熊山ア39	0.055	〃	〃	〃
B-4		宮島ア54	0.056	〃	〃	〃
C-1		吉備ア77	0.333	アイアカ[a]	〃	〃
C-2		鴨方ア29	0.382	〃	〃	〃
C-3		久留米ア142	0.418	〃	〃	〃
C-4		大分ア166	0.433	〃	〃	〃
D-1		笠岡ア178	0.970	アイノコ[b]	アイグロ[c]	?
D-2		本渡ア1	0.993	〃	〃	アカマツ
D-3		備前ア140	1.046	〃	〃	〃
D-4		国見ア140	1.098	〃	〃	〃
	1	大分ア167	1.110	〃	〃	〃
	2	金光ア25	1.176	〃	〃	〃
	3	久留米ア78	1.283	アイグロ[c]	〃	〃
	4	佐賀関ア108	1.319	〃	〃	〃
	5	小浜ク24	1.404	〃	〃	種間雑種
E-1		備前ア66	1.518	〃	クロマツ	〃
E-2		備前ア21	1.527	〃	〃	〃
E-3		佐賀関ア93	1.662	〃	〃	〃
E-4	E-4	大分ア142	1.739	〃	〃	〃
	6	夜須ク37	1.852	クロマツ	〃	クロマツ
	7	土佐清水ク63	1.887	〃	〃	〃
	8	小浜ク30	1.920	〃	〃	〃
	9	波方ク37	1.947	〃	〃	〃
	10	頴娃ク425	1.947	〃	〃	〃
	11	田辺ク54	1.956	〃	〃	〃
	12	大瀬戸ク12	1.965	〃	〃	〃
	13	波方ク73	1.969	〃	〃	〃
	14	吉田ク2	1.976	〃	〃	〃
	15	川内ク290	1.976	〃	〃	〃
	16	備前ア143	1.984	〃	〃	〃
F-1		志摩ク64	1.985	〃	〃	〃
F-2	F-2	三崎ク90	1.987	〃	〃	〃
F-3	F-3	大分ク8	1.993	〃	〃	〃
F-4	F-4	津屋崎ク50	2.000	〃	〃	〃

* この表のRDI値は，戸田ら(*17*)から引用した。 [a] アイアカマツ，[b] アイノコマツ，[c] アイグロマツ。

体の両ゲノム型は完全に一致した。

RDIが1.4～1.8の個体は，アカマツ度，クロマツ度ともアカマツ標準個体，クロマツ標準個体の中間の値を示した（図-1，3)。また，これらの個体は，アカマツ，クロマツに種特異的であると思われるバンドの両方を保有しており（図-2)，これらがアカマツとクロマツの核ゲノムを合わせ持った種間雑種であることが判明した。なお，笠岡ア178（図-1のD-1）のクロマツ度はアカマツと雑種と判定されたEグループとの中間値を示し，この個体が雑種とアカマツの交配によって生じた可能性が示唆された。

これまで，RDIは，アカマツ，クロマツおよび両種の形態的な中間型の分類の指標として最もよく利用されてきており，今回の結果からも，RDIはゲノム構成を強く反映していることが裏付けられた。しかし，これを利用した分類の区分基準には大きな誤りがあり（表-3)，見直しが必要である。RDIをはじめとした形態的指標はすべて，アカマツからクロマツにかけて連続的に変異しているのに対し，今回のDNA分析によって得られた結果は，不連続的であった。今後，DNA分子マーカーを用いることによって，アカマツ，クロマツおよび両種間の雑種を確実に識別することが可能である。

細胞質遺伝する葉緑体DNAは，針葉樹においては，花粉親（父親）から遺伝することが数多く報告されている(*9*，*10*，*12*，*20*)。今回分析した，クロマツを母親，アカマツを花粉親として作出された人工雑種2個体の葉緑体ゲノムも花粉親と同じアカマツ型であった（実験IV)。このことから，わが国の二葉松類においても葉緑体DNAが父性遺伝することは確実であると考えられる。今回，実験IIで種間雑種と判定されたマツノザイセンチュウ抵抗性クローン(5クローン)および，実験IIIにおいて，天然生林から選抜され，種間雑種であることがDNA分析によって確認できた6個体の葉緑体ゲノムは，すべてアカマツ型であり，クロマツ型は全く出現しなかった（図-5のレーン3～13)。葉緑体DNAが父性遺伝することを考慮すると，これらの自然雑種は，クロマツ母樹（雌花）にアカマツ花粉が受粉・受精して形成されたことを意味している。アカマツとクロマツの開花時期は雌花，雄花ともクロマツの方がアカマツより早く(*16*)，このため，先に飛散するクロマツ花粉がアカマツの雌花に受粉する機会の方が，逆の組合せよりもはるかに多いとされている。しかし，今回確認された雑種はすべてクロマツ(♀)×アカマツ(♂)の交配組合せによって生じたものであった。これまでのアカマツとクロマツ間の人工交配試験においても，クロマツを母親，アカマツを花粉親にした場合には，比較的稔性のある種子が得られるのに対し，逆の交配組合せでは困難であることが報告されている(*19*)。このように，自然界で容易に起こりうるアカマツ(♀)×クロマツ(♂)の交配組合せに対しては，受粉から種子形成・発芽・生育のいずれかの過程で非常に強い生殖隔離機構が存在していることを示唆する結果が得られた。

これまで，アカマツとクロマツ間には高頻度で雑種形成が起こっており，形態的形質に見られるアカマツからクロマツにかけての連続的な変異は，その結果生じたものであると考えられてきた（*3*，*14*)。しかし，純粋なアカマツおよびクロマツはほとんど存在しておらず，中間型を示す個体はすべてアカクロマツであるとする考え方に疑問を呈する研究者もいた(*7*)。本研究において，アカマツ，クロマツおよび両種の中間型個体について，DNAレベルでのゲノム解析が行われた結果，従来アカクロマツなどの名称で呼ばれていた中間型個体の大多数は，アカマツであることが判明した。このことは，アカマツは従来考えられてきたよりもはるかに大きな形態的変異を保有していることを意味している。

また，本研究において，両樹種間に雑種形成が起きていることがDNAレベルで初めて確認されたが，その頻度は，従来考えられていたよりもはるかに低いものであった。しかも，両種間の雑種形成は，クロマツの雌花にアカマツ花粉が受粉し，受精することによってのみ起こっており，自然界では起こりにくい交配組合せでのみ雑種が形成され，容易に起こりうる交配組合せでの雑種形成は確認できなかった。このことから，アカマツとクロマツ両種間における強い生殖隔離の存在が明らかとなった。既に，アカマツとクロマツの葉緑体DNA上の*rbc*L遺伝子（一部）の塩基配列にかなり大きな違いのあることが報告されている(*15*)。さらに，今回，両種間に強い生殖隔離が存在することが明らかになったことからも，両樹種がきわめて近縁もしくは種分化の過程にあるとする従来の説は再検討する必要がある。

本研究を進めるにあたり，林野庁林木育種センター九州育種場の田島正啓前育種課長（現：林木育種センター育種課長）および東北育種場の佐々木研前育種課長，河野耕蔵育種第一研究室長のご援助をいただいた。ここに深く感謝いたします。また，本研究は平成4～6年度文部省科学研究費(No. 04304018)の助成を受けて行われたものである。

引用文献

(*1*) 福田英比古（1963）アイノコマツに関する研究(第3報）自然交雑ダネによる形質分離について(2)．74回日林講：255-257.
(*2*) 林　弥栄（1965）有用樹木図説(林木編)．472 pp, 誠文堂新光社, 東京.
(*3*) 平吉　功・林　石根（1961）三河東南部におけるアイグロマツ集団の分布．71回日林講：220-224.
(*4*) 平吉　功・林　石根（1962）濃尾平野から越中平野に至る高山線沿線地域におけるアイグロマツ集団の分布．72回日林講：203-205.
(*5*) LISTON, A. (1992) Variation in the chloroplast genes *rpo*C1 and *rpo*C2 of the genus *Astragalus* (*Fabaceae*): Evidence from restriction site mapping of a PCR-amplified fragment. Am. J. Bot. 79: 953-961.
(*6*) MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant. Nucl. Acids Res. 8: 4321-4325.
(*7*) 中村賢太郎（1974）遺伝か環境かー形態品種および雑種に関

する疑問－．林木の育種 87：6-8.
(8) 楢崎康二・渡辺敦史・冨田啓治・佐々木義則・白石　進 (1996)ヒノキとサワラの種間雑種および園芸品種のDNA分析．日林誌 78：157-161.
(9) NEALE, D. B. and SEDEROFF, R. R. (1989) Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. Theor. Appl. Genet. 77：212-216.
(10) NEALE, D. B., WHEELER, N. C., and ALLARD, R. W. (1986) Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas-fir. Can. J. For. Res. 16：1152-1154.
(11) NEI, M. and LI, W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation interms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76：5269-5273.
(12) OHBA, K., IWAKAWA, M., OKADA, K., and MURAI, M. (1971) Paternal transmission of a plastid anomaly in some reciprocal crosses of Sugi, *Cryptomeria japonica*. Silvae Genet. 20：101-107.
(13) 小沢準二郎(1962)針葉樹のタネ－生産と管理－．451 pp，地球出版，東京.
(14) 佐藤敬二 (1961) 日本のマツ 第1巻 人工造林編．274 pp，全国林業改良普及協会，東京.
(15) 白石　進・渡辺敦史 (1995) *rbc*L遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別．日林誌 77：429-436.
(16) 戸田忠雄・西村慶二・田島正啓 (1994) マツノザイセンチュウ抵抗性クローンの諸特性(IX)－抵抗性クローンの開花時期－．日林九支研論 47：53-54.
(17) 戸田忠雄・田島正啓・西村慶二・竹内寛興 (1993) 九州におけるマツノザイセンチュウ抵抗性育種－抵抗性クローンの選抜後の研究経過－．林育研報 11：37-88.
(18) 遠山富太郎・三宅　登 (1963) 中国地方西部におけるアカマツ・クロマツおよびアイノコマツの分布について．74回日林講：248-249.
(19) 和田克之・柴田　勝・川崎政治 (1968) アイグロマツ育成に関する研究(II)人工交雑アイグロマツにおける雑種強勢の出現について．79回日林講：186-188.
(20) WAGNER, D. B., FURNIER, G. R., SAGHAI-MAROOF, M. A., WILLIAMS, S. M., DANCIK, B. P., and ALLARD, R. W. (1987) Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84：2097-2100.
(21) 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. Nucl. Acids Res. 18：6531-6535.
(22) 横山　緑・築地録太郎・伊藤守夫 (1964) 苗畑で選抜したアイノコマツについて(第1報)．75回日林講：199-202.
(23) 吉川　賢・重松真二・永森通雄 (1991) アカマツ，クロマツの雑種に関する研究(II)－アカマツ，クロマツおよびその雑種の空間分布－．高知大学農学部演報 18：1-9.

(1996年5月28日受理)