

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 後 藤 晋

本研究は、DNA分子マーカーの1つであるRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) マーカーを用い、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園の遺伝子管理技術の確立を図ったものである。

まず、対象とした抵抗性クロマツ16クローンを識別できる、10個のRAPDマーカーをプライマーのスクリーニングおよびRAPD産物の多型性の検討により取得した。一般にRAPDマーカーは他のマーカーに比較して再現性が低いとされるが、得られたマーカーは、反復実験により、安定して検出される信頼性の高いものであることを確認した。すなわち、これにより遺伝マーカーによるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツクローンの完全な識別をはじめて可能にした。

次に、採種園への不正規なクローンの混入を簡便に検出する方法として、複数個体のサンプルを混合して一度に分析を行うバルク分析法を開発した。異なるクローンの針葉を人為的に混合したサンプルについて分析を行った結果、単一クローンの場合とは異なるRAPDマーカーの出現パターンを示し、混合の事実を検出することができた。採種園は多数の個体によって構成されており、全個体の分析には多大な労力を必要とするが、本法はクローン確認のための分析を大幅に省略することを可能にした。

さらに、取得したマーカーを花粉親の識別に応用した。RAPDマーカーは優性マーカーであり、通常個体の遺伝子型を決定できず、両親の特定には不適とされる。しかし、本研究では、針葉樹の雌性配偶体が母親由来の半数体であることを利用し、これにおけるマーカーの分離を調べ、遺伝子型の決定を可能にした。さらに、この結果を母樹別実生苗や人工交配苗に適用し、それらの花粉親を特定することに成功した。これにより、これまで主として花粉親の分析に用いられてきた、アイソザイムマーカーに比べ、各段に識別力の高い方法が確立された。

また、開発した手法を実際の採種園に適用して、その応用可能性を検討した。鹿児島県と福岡県の2つの採種園においてRAPDマーカーを用いた採種園構成個体の遺伝組成の調査を行い、2%~20%の個体が実際の配置が設計と異なっていることを明らかにした。また、バルク分析を適用した場合、個別分析の場合に比べ約3分の1の検査量で、採種園を構成する全個体のクローン識別が可能であることを示した。

次いで、母樹家系別実生苗648個体の分析を行い、各実生苗におけるRAPDマーカーの表現型と採種園クローンの遺伝子型を比較することにより、苗木の花粉親識別を試みた。その結果、87.6%の苗の花粉親を識別することができ、取得したRAPDマーカーが花粉親識別マーカーとして有効であることを示した。また、この結果から、クローンごとの交配への寄与、花粉汚染や自殖等の実態を明らかにした。

さらに、採種園の遺伝的改良に資するため、各クローンの母親あるいは花粉親としての種子生産や次

世代抵抗性への寄与を明らかにした。まず、各クローンが生産する球果数と球果当たりの充実種子数を計測し、各クローンの母親としての寄与率を求めた。次いで、母樹別に採種育苗した苗木の花粉親をRAPDマーカーによって識別し、各クローンの花粉親としての交配寄与率を求めた。さらに、花粉親を識別した実生苗に対してマツノザイセンチュウを接種することにより、各クローンの母親および花粉親としての次世代集団の抵抗性への寄与を明らかにした。

以上の結果から、マツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園における遺伝子管理として、1) 採種園産種子における母樹家系の偏りを修正するための球果採取量の調整。2) 母親、花粉親として次世代抵抗性への寄与度の低いクローンの除去。3) 花粉親としての交配寄与度の著しく低いクローンへの着花促進処理の実施。4) クローンのランダムな配置。などを提案した。

以上、本研究ではマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園において、採種園構成クローンを完全に識別できるRAPDマーカーを探索取得し、それらを用いたクローン識別法および生産された種苗の両親、特に花粉親の識別法を確立した。さらに、それらを現実の採種園に適用し、はじめて採種園全体の交配の実態を明らかにした。また、採種園クローンの種子生産性や種苗の抵抗性に対する花粉親としての寄与の程度をはじめて評価し、それらに基づき採種園の遺伝子管理の具体的提案を行った。すなわち本研究の成果は、抵抗性種苗の遺伝的改良に直接利用可能であるばかりでなく、採種園一般のクローン管理や交配実態の解明、針葉樹の繁殖生態の解明などにも幅広く応用できるものであり、学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。