【38】

氏　名(本　籍)	モハマド・ナイム（インドネシア）
学位の種類	博　士（農　学）
学位記番号	博　甲　第　961　号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審査研究科	農　学　研　究　科
学位論文題目	INHERITANCE AND LINKAGE OF ALLOZYME OF MEGAGAMETOPHYTE OF JAPANESE RED PINE PLUSTREE CLONES SELECTED FROM NATURAL STANES IN JAPAN （日本における天然林から選抜されたアカマツ精英樹クローンの雌性配偶体のアロザイムの遺伝および連鎖）

主　査	筑波大学教授	農学博士	大　庭　喜八郎
副　査	筑波大学教授	農学博士	菊　池　文　雄
副　査	筑波大学教授	理学博士	藤　伊　　正
副　査	筑波大学助教授	農学博士	荒　木　眞　之

論　文　の　要　旨

アカマツ，*Pinus densiflora* Sieb. *et* Zucc.は日本在来の針葉樹の一種であり，その天然分布範囲も広い。そのため多様な気候，土壌条件に対して広い適応性をもっていると考えられている。すなわちアカマツの集団内および集団間には大きな遺伝変異が存在するものと推定される。また現在精英樹選抜育種が実施されている。そのため本研究はアカマツにおいて利用可能な十分な数のアロザイム標識遺伝子を探索し，アカマツの育種および遺伝資保存のための基礎資料をえることを目的とした。

まず，天然林から選抜されたアカマツ精英樹クローンの雌性配偶体について18酵素種のアイソザイムの遺伝子分析をした。第二に，調査した18酵素種の中で変異がみられた12酵素種の22遺伝子座を用いて，日本の 8 地域ごとの精英樹群のアロザイム変異量を推定した。第三に，18酵素種の観察により検出された29遺伝子座の連鎖関係を分析した。

天然林から選抜された精英樹308クローン，すなわち東北地方70クローン，関東地方66クローン，関西地方60クローン，四国地方50クローンおよび九州地方62クローンの自然受粉種子をアイソザイム分析に供した。クローン採種園から 3 年次（1986，1988および1989）にわたり，秋に球果を採集した。種子を球果から取り出し，風乾した後，4 ℃で貯蔵し，逐次，電気泳動に供した。

アイソザイム分析のため，種子を 3 %のH_2O_2に 4 ℃で48時時浸漬した。その後 3 週間の低温湿層処理をした。この低温湿層処理をした種子から半数体の雌性配偶体を取り出し，200μ l の抽出緩衝

液（0.05M Tris-HCI buffer, pH 7.5；4mM Dithiothreitol(DTT);2mM β－Nicotinamide adenine dinucletide(NAD)；2mM β－Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADP))で摩砕した。個々の雌性配偶体の抽出物を0℃で40分間10,000rpmで遠心した。上澄液10μlを電気泳動し，各酵素を検出した。

Davis（1964）およびOrnstein（1964）が記載した方法を主体としてポリアクリルアミド垂直平板電気泳動法を用いた。濃縮ゲル（3.75%）と分離ゲル（7.5%）を用い，4℃，12.3mA/㎠で140～150分間電気泳動した。ゲルは津村ら（1990）の処方に従い染色した。

この研究で分析した酵素は次の18酵素種である。すなわちアラニンアミノペプチダーゼ（AAP），酸性ホスファターゼ（ACP），アルコール脱水素酵素（ADH），アミラーゼ（AMY），ジアホラーゼ（DIA），エステラーゼ(EST)，グルタミン酸脱水素酵素(GDH)，グリセリン酸脱水素酵素(G2DH)，アスパラギン酸アミノ転移酵素（GOT），グルコース－6－リン酸脱水素酵素（G6PD），グルタチオンレダクターゼ(GR)，ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)，リンゴ酸脱水素酵素(MDH)，6－ホスホグルコン酸脱水素酵素(6PGD)，ホスホグルコースイソメラーゼ(PGI)，ホスホグルコムターゼ（PGM），シキミ酸脱水素酵素（Sh DH），およびソルビトール脱水素酵素（SoDH）

酵素の遺伝子型がヘテロ接合型である延べ379家系における雌性配偶体の分析結果，18酵素種を支配する延べ31遺伝子座とそれらを構成する120個の対立遺伝子を検出した。これらの家系のうち期待されるメンデル分離比1：1から有意な偏りをしめしたのは、調査した延べ家系数の2.90%にあたる次の11家系であった。すなわち，八戸104(*Aap－1*)，二戸102(*Aap－1, Aap－2*および*Aap－3*)，浜松101（*Amy*），水沢101と久慈104および栗原102（*Dia－1*），九戸103と盛岡101（*Got－3*）ならびに九戸105（*6Pg－2*）であった。検出した31遺伝子座の大多数は少なくとも2個あるいはそれ以上の対立遺伝子をもった多型遺伝子座であった。*Mdh－1*および*Mdh－3*のみが単型遺伝子座であり，5戸以上の対立遺伝子をもった遺伝子座は*Lap－2, 6Pg－2, Pgm*および*Shd－2*の4遺伝子座であった。

12酵素種で検出された22遺伝子座を用いてアロザイムの遺伝変異量を推定した。その目的のため，天然林から選抜されたアカマツ精英樹308クローンを，すでに育種区として設定されている8地域に区分した。すなわち，東北太平洋側地区49クローン，東北日本海側地区21クローン，関東平野地区26クローン，関東高地地区40クローン，関西太平洋側地区36クローン，関西日本海側地区24クローン，四国地区50クローンおよび九州地区62クローンに区分した。

次のような各種の遺伝的統計量を用い各地区のアカマツ精英樹群の遺伝特性を調べた。すなわち，多型遺伝子座（Pℓ）の百分率の範囲，73.7～84.2%，総平均Pℓ；80.2%，遺伝子座当たりの対立遺伝子数(Na)の範囲2.95～3.79個で総平均Na；3.21個であった。また，観察されたヘテロ接合度（Ho）の範囲は0.276～0.364で，総平均*Ho*；0.314であった。16遺伝子座について対立遺伝子のG検定をしたところ，*Adh, Dia－1, Lap－2, 6pg－2*および*Pgm*以外では地区別の精英樹群間で有意差がなかった。

遺伝的近縁度の範囲は0.974～1.000で，総平均は0.989となり，群間での差はきわめて小さかっ

た。調査したアカマツ精英樹には相当量の遺伝変異が検出されたが，それらはいずれも各精英樹群内で同じ程度の変異であった。しかし，多遺伝子座の同時解析手法を用いた正準判別分析の結果，関東高地の精英樹群は他地区の精英樹群と識別されることが判明した。

精英樹308家系について検出した29遺伝子座間の連鎖関係を調査した。308家系のうち12家系がより多いヘテロ遺伝子座をもっていたため，これらを連鎖研究の材料とした。それは次の12家系である。すなわち，上小102，吾妻106，吾妻107，浜松101，浜松103，福島108，岩手(B)101，二戸101，平101，上伊那101，高橋101，水沢101であった。この連鎖分析には全体で217組の遺伝子座の組合せを利用した。この217組のなかから86組は2家系以上のヘテロ家系があった。一方，残りの131家系はそれぞれ1家系のみがヘテロ家系であった。

連鎖の可能性を検定するため，x^2－検定および赤池情報量基準(AIC)を用い，19組の組合せで連鎖を検出した。それらの連鎖のなかで，強固な組換価（$0 \leqq r \leqq 0.1$）のものは*Est－2,3 : Acp－2, 3*の*0.06±0.02*,*Dia－1 : Acp*の0.05±0.02, *Shd－1 : Got－1*の0.07±0.04であった。次の3対の連鎖は強い組換価($0.1 < r \leqq 0.2$)をもち，それらは*Est－2,3 : Dia－1*の0.16±0.03，*Est－2,3 : Acp*の0.15±0.04，*Acp－2,3 : Dia*の0.14±0.03あった。同様に*Got－2 : Lap－1*の0.14±0.02，*Pgm : Aap－1*の0.124±0.02の組換価の強い連鎖が検出された。0.2より大きいの組換価（$0.2 < r \leqq 0.3$）の場合は中程度の連鎖と判定し，それらに*Adh : Sod, Adh : Pgi－1,2,Adh : Lap－1, G2d : G6p*および*Dia－2 : Amy*の5組合わせがあった。残りの6組合わせ*6Pg－1 : Est－2, 3, 6Pg－1 : Acp, Est－1 : Acp, Est－2, 3 : Shd－1, Sod : Pgi－1, 2*および*Adh : Got－2*では0.3より大きい組換価（$0.3 < r$）の弱い連鎖であった。以上の19組の連鎖分析対象の22遺伝子座は5つの連鎖群にまとめられた。さらに，このアカマツ連鎖群を用いて，マツ属の他の数種の連鎖群との関係を対比検討した。

審　査　の　要　旨

本研究はアカマツ精英樹選抜育種の将来の方向付けのため，アロザイムを利用してアカマツ精英樹の地域別の類縁関係を調べ，さらに連鎖関係を調査・分析したものである。雌性配偶体の分析結果，18酵素種を支配する総計31遺伝子座とそれらを構成する120個の対立遺伝子を検出した。また8地域，合計308クローンについて12酵素種，計22遺伝子座のアロザイムを用いて集団遺伝学的解析を行った結果，全体として遺伝的分化がきわめて低いことを示した。一方正準判別分析により標高の高い関東地域の精英樹群は特異な対立遺伝子$Adh-2^{\ell}$，$6Pg-1^{a}$，$6Pg-2^{a}$，$6Pg-2^{d}$，$Dia-1^{a}$で識別できることを示した。また22遺伝子座を5つの連鎖群にまとめた。以上はわが国で初めての研究成果であり，アカマツ精英樹の遺伝研究上，さらに将来のアカマツの育種実行，また計画立案上きわめて高く評価されるものである。

よって，著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。