

# 北海道におけるトドマツのオルガネラ DNA 多型の遺伝的分化\*

林 英司<sup>(1)</sup>, 生方 正俊<sup>(1)</sup>, 飯塚 和也<sup>(1)</sup>, 板鼻 直榮<sup>(1)</sup>

Eiji Hayashi<sup>(1)</sup>, Masatoshi Ubukata<sup>(1)</sup>, Kazuya Iizuka<sup>(1)</sup> and Naoei Itahara<sup>(1)</sup>

## Genetic Differentiation of Organelle DNA Polymorphisms in Saghalin Fir from Hokkaido

**要旨:** トドマツ (*Abies sachalinensis* Mast.) の全 DNA を制限酵素 (*Bam*H I と *Eco*R I) で消化後, ビートのミトコンドリア DNA のチトクロム酸化酵素サブユニット II 遺伝子 (*cox*II) およびトドマツ葉緑体 DNA のアデノシントリフォスファターゼ アルファサブユニット遺伝子 (*atp*A) とハイブリダイゼーションすることにより, オルガネラ DNA の制限断片長多型分析を行った。まず, 交配家系を用いて, ミトコンドリア DNA が母性遺伝し, 葉緑体 DNA が父性遺伝することを確認した。つぎに, 北海道内の 19 集団を代表する精英樹を含む 264 個体について分析を行い, 酵素-プローブ組合せ *Bam*H I / *cox*II で 3 種, *Eco*R I / *atp*A で 2 種の変異型を検出した。Nei の集団間の遺伝子多様度 ( $D_{ST}$ ) は, それぞれ 0.232 と 0.002 であった。父性遺伝の葉緑体 DNA マーカーを用いるよりも, 母性遺伝のミトコンドリア DNA マーカーを用いたほうが, 遺伝的な分化の程度が高く検出された ( $G_{ST}=0.715$ )。特に南西部集団は, 他の集団と比較して遺伝的に異なっていた。このことは, ミトコンドリアゲノムで高頻度に起きている構造変異と, 種子散布のみに依存した遺伝子流動の結果であると考えられる。本報告で得られた結果は, トドマツの系統地理を解明し, 遺伝子保存計画を立案する際に有益な情報になるであろう。

### 1 緒言

森林に対するニーズが多様化するなかで, 優良な品種を適切に開発していくために, 森林の多様性を維持しながら優良な遺伝子を育種素材として保存し利用することが重要である。そのためには, さまざまな形質に関する情報を集積することにより遺伝的変異を評価し, 遺伝子保存計画の立案における根拠を得る必要がある。トドマツ (*Abies sachalinensis* Mast.) は, 冷温帯, 汎針混交林, 亜高山帯, 高山帯の優占する樹種として, 北海道, サハリン, 南千島列島で, 広く分布している。冷温帯ではブナ (*Fagus crenata* Blume) に代表される広葉樹と, 亜高山帯ではエゾマツ (*Picea jezoensis* Carr.) とアカエゾマツ (*Picea glehnii* Mast.) に代表される他の針葉樹とともに生育しており, しばしば純林を形成する。トドマツは, 庭木, 建築材料, そして遺伝資源として, 北海道の最も重要な樹木のひとつであり, これまで種子や苗の形態や生理学的性質等の遺伝的変異に関する研究が行われてきた<sup>7) 10) 17)</sup>

(1) 林木育種センター

〒 319-1301 茨城県多賀郡十王町大字伊師 3809-1

Forest Tree Breeding Center

3809-1 Ishi, Juo, Taga, Ibaraki 319-1301 Japan

\* この報告は, 2000 年 3 月 Forest Genetics Vol. 7<sup>(1)</sup> に掲載された。

22) 23)。また Tsumura らは、モミ属数種においてミトコンドリア (mt) DNA の *coxI* 遺伝子および *coxIII* 遺伝子を用いて制限断片長多型 (RFLP) 分析を行い、トドマツの北海道東部 2 集団に遺伝的変異を検出した<sup>36)</sup>。このようにいくつかの形質でトドマツの天然集団内、集団間での遺伝変異の検討がなされ一定の知見が得られたが、明確な根拠にもとづいた遺伝子保存に役立てるため、一層詳しい情報が必要である。そのためには、これまで精英樹選抜育種事業で得られた精英樹の母集団の多様性と地理的分化を把握した上で、計画を立てることが望ましい。

アメリカトガサワラ (*Pseudotsuga menziesii* Franco)<sup>20)</sup> とマツ属<sup>19) 38)</sup>、カラマツ属<sup>34)</sup>、トウヒ属<sup>33) 35)</sup>、モミ属<sup>41)</sup>、そして、ヒノキ属<sup>12)</sup> 等多くの針葉樹で種内交配あるいは種間交雑家系を用いて葉緑体 (cp) DNA の遺伝様式が調査されており、一般にマツ科樹種では cpDNA が父性遺伝すると考えられている。これに対して、mtDNA は母性遺伝する<sup>5) 19) 33)</sup> ため、RFLP 分析により集団レベルの遺伝子の多様性や地理的分化の程度を検出することができる<sup>6) 32) 36)</sup>。ミトコンドリアゲノムでは、高頻度で構造変異<sup>24) 26)</sup> が起きているとともに、その遺伝子流動は種子分散だけに依存しているからである。したがって、トドマツにおいても、他のマツ科樹種と同様の遺伝様式であると仮定すれば、オルガネラを用いて集団遺伝学的解析を行うことによって、遺伝子保存に対して重要な知見が得られると考えられる。しかし、トドマツのオルガネラの遺伝様式に関しては未だ報告がなく、マツ科樹種の一部で mtDNA の父性遺伝<sup>37)</sup> が報告されているため、まずトドマツの遺伝様式を確かめた上で集団遺伝学的解析を行うことが望ましい。

本報告では、RFLP 分析を用いオルガネラ DNA の遺伝様式の確認を行い、さらに精英樹における mtDNA と cpDNA の遺伝子多様度を解析した。その結果、2 つのオルガネラ DNA の多様性と地理的分化の差を検出したのでこれについて述べる。

## 2 材料と方法

### 2.1 供試材料

1995 年 5 月北海道江別市の西部 (東経 141 度 31 分, 標高 50m; 北緯 43 度 04 分) に位置する北海道育種場内の育種素材保存園で精英樹 210 個体の針葉を採取した。これらの精英樹は、選抜された天然林 19 集団を代表する個体群と見なした (図 1)。集団の個体数を補うために、1996 年 5 月精英樹が選抜された 3 つの天然林 (岩内, 倶知安, 俄虫) から計 54 個体を採取した。さらに、1997 年 5 月育種場内の遺伝試験林において、RFLP 分析で多型を示す精英樹親を用いた相互交配家系の針葉を採取した。

### 2.2 RFLP 分析

試料 1 g から改変 CTAB 法<sup>16)</sup> により全 DNA を抽出した。その手順を以下に示す。液体窒素で凍結した試料を、乳鉢で粉碎し 4 ml CTAB 溶液 [100 mM Tris-HCl (pH.8.0), 2% CTAB, 2% PVP, 0.1%メルカプトエタノール, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA] に入れ、65°C で 1 時間反応した。この後、等量のクロロホルム-イソアミルアルコール (24:1, CIA) で 2 回抽出し、3 M 酢酸ナトリウム (pH. 5.2, 最終濃度 0.3 M)、および等量のイソプロパノールを加えることによって粗 DNA を沈殿させた。4°C、16000 g で 20 分間の遠心分離により DNA を回収後、2 ml の TE に再溶解し、RNase (20 μg/ml) で 37°C、1 時間の反応を行った。その後フェノール処置を 2 回、CIA 抽出を 1 回行い精製した。エタノール沈殿後得られた DNA は、乾燥後 TE に再溶解した。

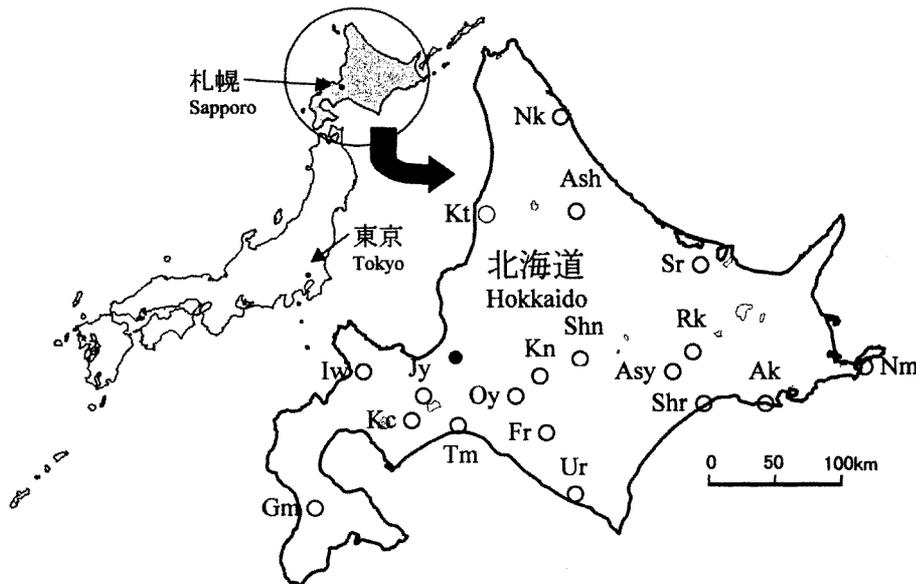


図1. 供試したトドマツ精英樹集団の位置

白丸は精英樹が選抜された集団，黒丸は北海道育種場の位置を示す。

略語は，Nk，中頓別；Kt，古丹別；Ash，朝日；Sr，佐呂間；Nm，根室；Ak，厚岸；Asy，足寄；Rk，陸別；Shr，白糠；Shn，Oy，大夕張；Kn，金山；Fr，振内；Ur，浦河；Tm，苫小牧；Jy，定山溪；Iw，岩内；Kc，倶知安；Gm，俄虫。

DNA 5  $\mu$ g を 4 制限酵素種，*Bam*HI, *Eco*RI, *Dra*I, *Hind* III で消化し，この産物を 0.8% のアガロースゲル上で電気泳動し分画した。DNA は，ナイロン膜へ転写し，80°C オープン中で固定した。プローブの標識とバンドの検出に，ECL Gene Detection System (アマシャム・ファルマシア) を用い，サザンハイブリダイゼーション法<sup>30)</sup>によって制限断片を検出した。cpDNA プローブを得るために，トドマツ精英樹である俄虫 106 の DNA を鋳型として，5'-AGACGGAAATACCCACATTA-3' と 5'-TCAAGTAGGAGATGGCATTG-3' (森林総合研究所吉村氏提供，クロマツの *atpA* 塩基配列から設計) のプライマー対を用いて遺伝子増幅を行った。mtDNA プローブを得るために，ビート (sugar beet, *Beta vulgaris* L.) 由来のチトクロム酸化酵素サブユニット I (*cox*I, 1.6 kb, *Eco*RI 断片)<sup>27)</sup>，チトクロム酸化酵素サブユニット II (*cox*II, 0.4 kb, *Sal*I-*Hind* III 断片)<sup>27)</sup>，NADH 脱水素酵素 (*nad* 9)<sup>13)</sup>，マメ (pea, *Pisum sativum*) 由来のアデノシントリフォスファターゼ  $\alpha$ -サブユニット (*atpA*, 1.4 kb, *Eco*RI-*Hind* III 断片)<sup>28)</sup>，アデノシントリフォスファターゼ-サブユニット 9 (*atp* 9, 1.3 kb, *Hind* III-*Bam*HI 断片)<sup>15)</sup> のインサートを含む pUC ベクターから下記のプライマー対を用いてそれぞれ遺伝子増幅を行った：5'-CGACGTTGTAACGACGCGCCAGT-3'，5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3'。得られた増幅産物を，フェノール処置と CIA 抽出によって精製した後，等量のポリエチレングリコール溶液 [13% (v/w), 1.6 M の NaCl] を加えることによって沈殿した。得られた沈殿物を 70% エタノールで洗浄後乾燥しプローブとして用いた。本報告では混乱を避けるため，ビート mtDNA 由来の *cox*II プローブとトドマツ cpDNA 由来の *atpA* プローブをそれぞれ「*cox*II (mt)」と「*atpA* (cp)」と略記する。

### 2.3 遺伝的統計量

coxII遺伝子の分析において、北海道南西部の4集団とそのほかの集団の間で観察された変異型の頻度の違いが統計的に有意であるか検定するため、フィッシャーの独立性の検定を行った<sup>20)</sup>。遺伝子多様性に関する統計量は、変異型の頻度を用いて算出した<sup>21)</sup>。集団全体の遺伝子多様度 ( $H_T$ ) は、集団内の平均遺伝子多様度 ( $H_S$ ) と集団間の平均遺伝子多様度 ( $D_{ST}$ ) の和である。集団間の遺伝子分化の係数である  $G_{ST}$  は式  $G_{ST} = D_{ST} / H_T$  ( $D_{ST} = H_T - H_S$ ) を使って算出した。また、コンピュータ・ソフト Fstat<sup>9)</sup> を使用して、Weirの方法による標準偏差<sup>39)</sup> と、固定指数  $\theta$ <sup>40)</sup> を推定した。

## 3 結果

### 3.1 オルガネラ DNA の遺伝様式

RFLP 分析に適した酵素-プローブ組合せを選抜するために、精英樹 30 個体について予備的な分析を行った。*Bam*HI / *cox*II (mt) および *Eco*RI / *atp*A (cp) の 2 組合せがもっとも明白な多型を示した。その他の酵素-プローブ組合せを用いた際には、しばしば単型的なバンドパターンを示すか、ハイブリダイゼーション後に行うメンブレンの洗浄の程度に対してシグナル強度が著しく敏感なため、再現性良く多型を得ることが難しかった。次に、オルガネラ DNA の遺伝様式を調べるのに適当な交配家系を検討するために、上記の酵素-プローブ組合せを用いて交配親の RFLP 分析を行った。いずれの分析においても、岩内 106 と俄虫 106 が互いに異なるバンドパターンを示した。そこで、これら 2 個体を親とする相互交配家系の各 14 個体について *Bam*HI / *cox*II (mt) による RFLP 分析を行ったところ、全ての個体が母樹と同一のバンドパターンを示した (図 2, A)。これに対して、*Eco*RI / *atp*A (cp) を用いたとき、全ての個体が花粉親と同一のバンドパターンを示した (図 2, B)。

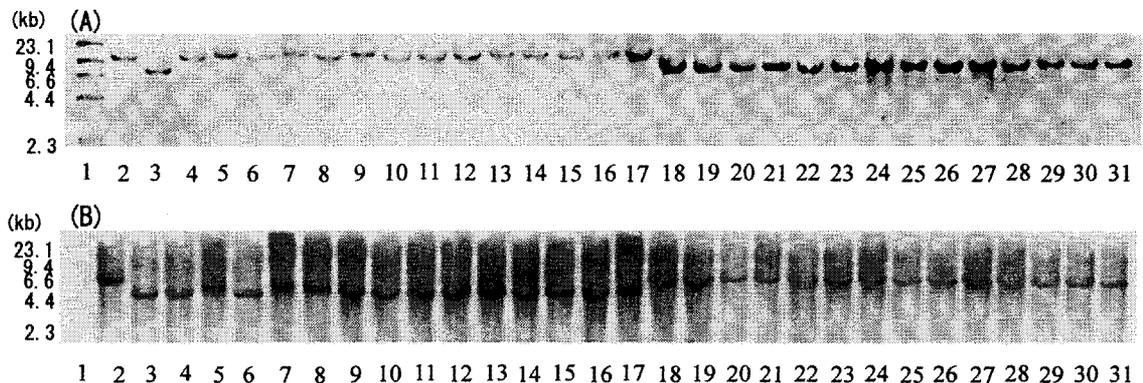


図 2. トドマツのオルガネラ DNA の遺伝

(A) トドマツ相互交配家系におけるミトコンドリア DNA 制限断片の母性遺伝。交配親とその後代を *Bam*HI で消化後、チトクロム酸化酵素サブユニット II 遺伝子とハイブリダイズした。(B) トドマツ相互交配家系における葉緑体 DNA 制限断片の父性遺伝。交配親とその後代を *Eco*RI で消化後、アデノシントリフォスファターゼ  $\alpha$ -サブユニット遺伝子とハイブリダイズした。

レーン 1, *Hind* III /  $\lambda$  DNA サイズマーカー; レーン 2, 岩内 106; レーン 3, 俄虫 106; レーン 4-17, 岩内 106 (母樹) x 俄虫 106 (花粉親)  $F_1$  後代; 18-31, 俄虫 106 (母樹) x 岩内 106 (花粉親)  $F_1$  後代。

### 3.2 集団内および集団間の多様性

天然集団における制限断片の変異型の出現頻度を表1に示す。酵素-プローブ組合せごとに、1個の断片が検出されたため、プローブと相補的な配列が1コピーずつ存在すると推察された。*Bam*HI / *cox*II (mt) を用いた分析では、3個の変異型が検出された。北海道北部および東部の集団では、主として11.7 kbの断片が検出された。これとは対照的に、2つの南西部集団では9.1 kbの断片が多く検出された。また、足寄と新得の集団では、他の集団には見られない7.7 kbの断片が検出された。北部の3集団（中頓別、古丹別、朝日）、東部の3集団（根室、厚岸、陸別）、中央部の1集団（金山）と南部の3集団（振内、浦河、苫小牧）では、集団内変異が検出されなかった。フィッシャーの独立性の検定<sup>29)</sup>を行った結果、南西部半島部の4集団（定山溪、岩内、倶知安、俄虫）と他の集団との間の変異型頻度に有意な差があった ( $P < 0.02$ )。 *Eco*RI / *atp*A (cp) を用いた分析では、2つの変異型が検出され、全ての集団が集団内変異を示した。こうして得られたオルガネラ DNA の遺伝子多様度<sup>21)</sup> を表2に示す。集団間における *cox*II 遺伝子の多様度 ( $D_{ST}=0.232$ ) は、 *atp*A 遺伝子のそれ ( $D_{ST}=0.002$ ) より大きく、その結果集団間の遺伝子分化係数 ( $G_{ST}$ ) が高かった。

## 4 考察

### 4.1 ビートに由来する *cox*II 遺伝子プローブ

本報告ではトドマツのmtDNAの塩基配列に関する情報があらかじめ得られなかったため、分類学的には遠いビートに由来する *cox*II プローブを用いて RFLP 分析を行った。一般に、遺伝子の塩基配列は、近縁種ほど保存性が高い

表1. トドマツ 19 集団におけるオルガネラ DNA 制限断片の変異型頻度

集団	個体数	<i>Bam</i> HI / <i>cox</i> II (mt)			<i>Eco</i> RI / <i>atp</i> A (cp)	
		11.7	9.1	7.7	6.6	4.9
中頓別	5	1.00	0.00	0.00	0.40	0.60
古丹別	14	1.00	0.00	0.00	0.79	0.21
朝日	11	1.00	0.00	0.00	0.45	0.55
根室	7	1.00	0.00	0.00	0.57	0.43
厚岸	14	1.00	0.00	0.00	0.64	0.36
陸別	17	1.00	0.00	0.00	0.53	0.47
佐呂間	20	0.85	0.15	0.00	0.65	0.35
白糠	17	0.94	0.06	0.00	0.53	0.47
足寄	20	0.95	0.00	0.05	0.40	0.60
新得	18	0.94	0.00	0.06	0.67	0.33
金山	10	1.00	0.00	0.00	0.50	0.50
振内	9	1.00	0.00	0.00	0.78	0.22
浦河	6	1.00	0.00	0.00	0.33	0.67
苫小牧	8	1.00	0.00	0.00	0.50	0.50
大夕張	13	0.92	0.08	0.00	0.54	0.46
定山溪	6	0.83	0.17	0.00	0.50	0.50
岩内	15	0.93	0.07	0.00	0.53	0.47
倶知安	20	0.15	0.85	0.00	0.55	0.45
俄虫	34	0.21	0.79	0.00	0.59	0.41
計	264	0.80	0.19	0.01	0.56	0.44

と考えられるため、異種植物に由来するプローブを用いるよりも、今回の分析対象であるトドマツに由来する遺伝子をプローブとして用いたほうが、信頼できる結果を与えると予想される。しかし、広葉樹由来の mtDNA プローブが針葉樹の mtDNA とハイブリダイゼーションすることを示した例が多数報告されていることや<sup>5) 19) 33) 37)</sup>、植物の mtDNA の塩基置換率は極端に低いという報告もある<sup>24) 26)</sup> ことから、ピート由来の *coxII* 遺伝子をプローブとして用いてトドマツを解析しても結果に大きな影響はないと考えられる。

表2. 遺伝様式の異なるオルガネラの遺伝的統計量

オルガネラ (プローブ遺伝子)	$H_S$	$H_T$	$G_{ST}$	$\theta$ (S.D.) <sup>a</sup>
ミトコンドリア ( <i>coxII</i> )	0.092	0.324	0.715	0.609***(0.116)
葉緑体 ( <i>atpA</i> )	0.491	0.493	0.003	-0.028***(0.017)

<sup>a</sup> $\theta$ はライトの固定指数。\*\*\* 0.1%水準で有意。

#### 4.2 mtDNA の母性遺伝と cpDNA の父性遺伝

一般に被子植物では、ミトコンドリアおよび葉緑体の伝達者は母方の個体である。これに対して、裸子植物では伝達者が種により異なることが、電子顕微鏡での詳しい研究によって明らかになっている<sup>4)</sup>。ヒノキ科とスギ科では、この2つのオルガネラは父性遺伝する。これに対し、マツ科、イヌガヤ科、マキ科とイチイ科では、ミトコンドリアが母樹から、葉緑体が花粉親から遺伝することが明らかにされている。さらに、近年多くの RFLP 分析によりこれらの細胞学的な研究が支持されている<sup>1) 12) 18) 20) 31) 33) 34) 37) 41)</sup>。本報告でも、RFLP 分析によりトドマツの相互交配家系を用いてオルガネラ DNA の遺伝様式を検証したところ、他のマツ科樹種と同様にトドマツの mtDNA は母樹から、cpDNA は花粉親から遺伝することが示唆された。ここで注意しなくてはならないのは、検討された個体数である。本報告のオルガネラ DNA の調査では2つの交配家系各14個体が分析されたのみである。cpDNA の母樹からの遺伝や実際マツ属で報告されているような mtDNA の父方からの遺伝<sup>37)</sup> が、統計学的に否定されたわけではない。この観点から、オルガネラ DNA が完全に母性遺伝するという仮説と一つの家系内に両方のオルガネラが存在するという仮説を区別する実験の信頼性を推測する二項モデルが考案されている<sup>14)</sup>。これにあてはめると、本研究のように14個体を分析して父性遺伝するオルガネラを全く見いだせなかったとしても、父性遺伝の程度が28% ( $P < 0.01$ ) 以下であることを説明できるにすぎない。オルガネラ DNA が両親から遺伝すると仮定すると、多様性や分化の評価に影響があるため<sup>1) 2) 3)</sup>、本報告で示した遺伝パラメータはこの点に注意して取扱われるべきである。

#### 4.3 オルガネラ DNA の多様性と分化

酵素-プローブ組合せ *BamHI* / *coxII* を用いた RFLP 分析における変異型の出現頻度について、フィッシャーの独立性の検定<sup>31)</sup> を行った結果、南西部集団と他の集団との間で有意な違いが認められたことから、集団間の著しい分化が南西部集団の多型だけに起因すると考えられる。Tsumura らは、北海道内の5集団について RFLP 分析を行い、中央部と東部の集団における遺伝子の多様性を報告した<sup>36)</sup>。われわれは東部の集団のみならず南西部の集団においても変異を検出し、遺伝子多様性についてはより高い値を推定した。この多様性の違いは、以下の理由によ

て説明できると考えられる。第一に、Tsumuraらが調査したのは5集団で、本報告よりも著しく少ない点である。少数の遺伝子座を用いて遺伝子多様性を測定するためには、集団内の個体数を多くするよりもむしろ、集団の数を多くすることの方が重要である<sup>25)</sup>。第二に、ミトコンドリアゲノム上でのプローブ遺伝子の場所の違いも重要な要因であるかもしれない。前述のように、ミトコンドリアゲノムでは構造上の変異が高頻度で起きているが<sup>24) 26)</sup>、この頻度が場所により不均一であることを示唆している可能性がある。

ミトコンドリアDNAと葉緑体DNAとの間の多様度の違いには、ミトコンドリアゲノムの頻繁な組換えと構造変異のみならず葉緑体の遺伝子流動の速さが影響していると考えられている。Ennosは、 $F_{ST}$ を用いて花粉の集団間の相対移動率を算出する方法を定義している<sup>8)</sup>。この方法を、本報告のミトコンドリアの11.7 kbおよび葉緑体の6.6 kbの遺伝子型の場合にあてはめた値は11.96であった。この値は、トドマツの遺伝子流動に種子散布のみが関与するときよりも、種子散布および花粉飛散の両方が関与するときの方が、流動速度がはるかに大きくなること如実に示している。

本報告で検出されたmtDNAの変異は、トドマツの遺伝子保存を行う上で重要な情報であるとともに、本種のみならず *Abies* 属の系統進化に関する研究においても重要である。Tsumuraらは、同じ節に分類されるトドマツとシラベ (*A. veitchii* Lindl.) の mtDNA の分析を行い、RFLPの主要なハプロタイプがあることおよび *rbcL* 遺伝子の塩基配列が同じであることから、これらの種が遺伝的に近い関係を持つことを示した<sup>36)</sup>。本報告も含めた mtDNA と塩基配列の分析結果は、最終氷期の分布とこれらの種の間を反映している可能性がある。このため、千島列島やサハリンの集団にも調査の手を広げ、これらの種の天然分布をカバーすれば、種間および種内の系統関係の解明に役立てることができる。

## 謝 辞

北海道大学農学部の三上哲夫教授と三浦清元教授には、ミトコンドリアの遺伝子プローブを提供していただいた。吉村研介主任研究官（森林総合研究所）には、*atpA* 遺伝子のPCRプライマーを提供していただいた。森林総合研究所の津村義彦博士、林木育種センターの近藤禎二博士には、取りまとめに際し丁寧なご助言を頂いた。ここに心より感謝を申し上げる。

## 引用文献

- 1) Birky, C.: Evolution and population genetics of organelle genes mechanisms and models, *In* Evolution at the molecular level (eds. R. K. Selander, A. G. Clark and T. S. Whittam), Sinauer, Sunderland, MA., pp. 112-134 (1991)
- 2) Birky, C., Fuerst, P. and Maruyama, T.: Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes, *Genetics* 121, 613-627 (1989)
- 3) Chapman, R. W., Stephens, J. C., Lansman, R. A. and Avise, J. C.: Models of mitochondrial DNA transmission genetics and evolution in higher eucaryotes, *Genetical Research* 40, 41-57 (1982)

- 4) Chesnoy, L. and Thomas, M. J.: Electron microscopy studies on gemetogenesis and fertilization in Gymnosperms, *Phytomorphology* 21, 50-63 (1971)
- 5) Deverno, L. L., Charest, P. J. and Bonen, L.: Inheritance of mitochondrial DNA in the conifer *Larix*, *Theor. Appl. Genet.* 86, 383-388 (1993)
- 6) Dong, J. and Wagner, D. B.: Taxonomic and population differentiation of mitochondrial diversity in *Pinus banksiana* and *Pinus contorta*, *Theor. Appl. Genet.* 86, 573-578 (1993)
- 7) 栄花 茂: 北海道におけるトドマツの耐凍性に関する生態遺伝学的研究, *林育研報* 2, 61-107 (1984)
- 8) Ennos, R. A.: Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations, *Heredity* 72, 250-259 (1994)
- 9) Goudet, J.: FSTAT. Vers. 1.2. A computer program to calculate F-statistics, *J. Hered.* 86, 485-486 (1995)
- 10) 畠山末吉: トドマツの産地間変異の地域性に関する遺伝育種学的研究, *北林試報* 19, 1-19 (1981)
- 11) Hayashi, E., Ubukata, M., Iizuka, K. and Itahana, N.: Genetic differentiation of organelle DNA polymorphisms in saghalin fir from Hokkaido, *For. Genet.* 7, 31-28 (2000)
- 12) Kondo, T., Tsumura, Y., Kawahara, T. and Okamura, M., Paternal inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in interspecific hybrids of *Chamaecyparis* spp., *Breed. Sci.* 48, 177-179 (1998)
- 13) Kudo, T., Mikami, T. and Kinoshita, T.: The sugar beet mitochondrial genome contains an ORF sharing sequence homology with the gene for the 30 kDa subunit of bovine mitochondrial complex I, *Mol. Gen. Genet.* 241, 479-482 (1993)
- 14) Milligan B. G.: Is organelle DNA strictly maternally ingerited? Power analysis of a binomial distrinution, *Amer. J. Bot.* 79, 1325-1328 (1992)
- 15) Morikami, A. and Nakamura, K.: The pea mitochondrial ATPase subunit 9 gene is located upstream of the ATPase  $\alpha$ -subunit gene, *Nucleic Acids Res.* 15, 4692 (1987)
- 16) Murray, M. G. and Tompson, W. F.: Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325 (1980)
- 17) Nagasaka, K., Wang, Z. M. and Tanaka, K.: Genetic variation among natural *Abies sachalinensis* populations in relation to environmental gradients in Hokkaido, *For. Genet.* 4, 43-50 (1997)
- 18) Neale, D. B., Marshall, K. A. and Harry, D. E.: Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*), *Can. J. For. Res.* 21, 717-720 (1990)
- 19) Neale, D. B., and Sederoff, R. R.: Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine, *Theor. Appl. Genet.* 77, 212-216 (1989)
- 20) Neale, D. B., Wheeler, N. C. and Allard, R. W.: Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas-fir, *Can. J. For. Res.* 16, 1152-1154 (1986)
- 21) Nei, M.: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics* 89, 583-590 (1978)
- 22) 岡田 滋: 北海道におけるトドマツ (*Abies sachalinensis* Mast.) の変異について, *林育研報* 1, 15-92 (1983)
- 23) Okada, S. and Sakai, A.: Genetic variation in saghalin fir from different areas of Hokkaido, *Silvae Genetica* 22, 24-29

(1973)

- 24) Palmer, J. D.: Mitochondrial DNA in plant systematics: application and limitations, *In: Molecular systematics of plants* (eds. P. S. Solitis, D. E. Solitis and J. J. Doyle), Chapman and Hall, New York, pp. 36-49 (1992)
- 25) Pons, O. and Petit, R. J.: Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. I. Haploid locus, *Theor. Appl. Genet.* 90, 462-470 (1995)
- 26) Sederoff, R. R.: Molecular mechanisms of mitochondrial-genome evolution in higher plant, *Am. Nat.* 130, s30-s45 (1987)
- 27) Senda, M., Harada, T., Mikami, T., Sugiura, M. and Kinoshita, T.: Genomic organization and sequence analysis of the cytochrome oxidase subunit II gene from normal and male-sterile mitochondria in sugar beet, *Curr. Genet.* 19, 175-181 (1991)
- 28) Senda, M., Mikami, T. and Kinoshita, T.: The sugarbeet mitochondrial gene for the ATPase alpha-subunit: sequence, transcription and rearrangements in cytoplasmic male-sterile plants, *Curr. Genet.* 24, 164-170 (1993)
- 29) Sokal, R. R. and Rohlf, F. J.: *Biometry*, W.H. Freeman And Company, New York, pp.859 (1981)
- 30) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis, *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975)
- 31) Stine, M., Sears, B. B. and Keathley, D. E.: Inheritance of plastids in interspecific hybrids of blue spruce and white spruce, *Theor. Appl. Genet.* 78, 768-774 (1989)
- 32) Strauss, S. H., Hong, Y.P. and Hipkins, V.D.: High levels of population differentiation for mitochondrial DNA haplotypes in *Pinus radiata*, *muricata*, and *attenuata*, *Theor. Appl. Genet.* 86, 605-611 (1993)
- 33) Sutton, B. C. S., Flanagan, D. J., Gawley, J. R., Newton, C. H., Lester, D. T. and El-Kassaby, Y. A.: Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in *Picea* and composition of hybrids from introgression zones, *Theor. Appl. Genet.* 82, 242-248 (1991)
- 34) Szmidt, A. E., Aldén, T. and Hällgren, J. E.: Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix*, *Plant Mol. Biol. Rep.* 9, 59-64 (1987)
- 35) Szmidt, A. E., El-Kassaby, Y. A., Sigurgeirsson, A., Aldén, T., Lindgren, D. and Hällgren, J. E.: Classifying seedlots of *Picea sitchensis* and *P. glauca* in zones of introgression, using restriction analysis of chloroplast DNA, *Theor. Appl. Genet.* 76, 841-845 (1988)
- 36) Tsumura, Y. and Suyama, Y.: Differentiation of mitochondrial DNA polymorphisms in populations of five Japanese *Abies* species, *Evolution* 52, 1031-1042 (1998)
- 37) Wagner, D. B., Dong, J., Carlson, M. R. and Yanchuk, A. D.: Paternal leakage of mitochondrial DNA in *Pinus*, *Theor. Appl. Genet.* 82, 510-514 (1991)
- 38) Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Marouf, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P. and Allard, R. W.: Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2097-2100 (1987)
- 39) Weir, B. S.: *Genetic data analysis: methods for discrete population genetics data*, Sinauer, Sunderland, MA. (1990)
- 40) Wright, S.: The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating, *Evolution*

tion 19, 395-420 (1965)

- 41) Ziegenhagen, B., Kormuták, A., Schauerte, M. and Sholz, F.: Restriction site polymorphism in chloroplast DNA of silver fir (*Abies alba* Mill.), For. Genet. 2, 99-107 (1995)

## Genetic Differentiation of Organelle DNA Polymorphisms in Saghalin Fir from Hokkaido

Eiji Hayashi<sup>(1)</sup>, Masatoshi Ubukata<sup>(1)</sup>, Kazuya Iizuka<sup>(1)</sup> and Naoei Itahana<sup>(1)</sup>

Summary : The investigation of genetic differentiation among saghalin fir (*Abies sachalinensis* Mast.) populations was carried out with genetic markers of contrasting mode of inheritance. The expected mode of inheritance for the two organelle genomes was also confirmed. Restriction fragment length polymorphisms were analyzed among 264 individuals, including plus trees, representing 19 natural populations. Total genomic DNAs was digested with two restriction endonucleases (*Bam*H I and *Eco*R I) and hybridized with a cytochrome oxidase subunit II, *cox* II, probe from mitochondrial DNA of sugar beet and an ATPase  $\alpha$ -subunit, *atpA*, probe from chloroplast DNA of Saghalin fir. Three variants were observed in *Bam*H I / *cox* II, and two in *Eco*RI / *atpA*. Nei's gene diversity between populations ( $D_{ST}$ ) was 0.232 and 0.002 respectively. Genetic differentiation is higher when using a maternally inherited mitochondrial DNA marker ( $G_{ST}=0.715$ ), than using a paternally inherited chloroplast DNA marker ( $G_{ST}=0.003$ ). Especially southwestern populations have genetically different from the rest. The high differentiation of *cox* II gene might be the result of high evolutionary rate and low migration rate of mitochondrial genome. These results provide information for elucidating phylogeography and consequently for an application to conservation purpose of this fir.

---

<sup>(1)</sup> Forest Tree Breeding Center  
3809-1 Ishi, Juo, Taga, Ibaraki 319-1301 Japan