

RAPD法を用いたカラマツ属3種の分類

九州大学農学部 磯田 圭哉・白石 進

1. はじめに

ニホンカラマツ (*Larix kaempferi*) はわが国における重要な造林樹種のひとつであり、北海道や東日本などで広く造林されている。しかし、その天然分布は狭く、ほとんど本州中央部の亜高山帯に限られている。カラマツ属植物は北半球に広く分布している。このうち日本に天然に植生するものは、前述のニホンカラマツの他に、グイマツ (*L. gmelinii* var. *japonica*) がある。この種は択捉、色丹、樺太に分布している。

今研究では、ニホンカラマツ、グイマツに加え、グイマツ同様、ダフリアカラマツ (*L. gmelinii*) の変種であり、朝鮮半島、中国東北部に分布しているチョウセンカラマツ (*L. gmelinii* var. *olgensis*) の3樹種についてRAPD (random amplified polymorphic DNA) 法³⁾を用い、各樹種のゲノム上の差異を解析した結果、樹種間の分類、系統についての基礎的知見を得たので報告する。

2. 材料と方法

1) DNAの抽出・精製

供試材料はニホンカラマツ3個体 (LK1, LK2, LK3)、チョウセンカラマツ3個体 (L01, L02, L03)、グイマツ4個体 (うち、チシマ系2個体 (LJ1, LJ2)、カラフト系2個体 (LJ3, LJ4)) の計10個体である。DNAは針葉組織からCTAB法³⁾を改良して抽出し、ELU-QUIK (Schleicher & Schuell) により精製した。

2) RAPD分析

RAPD分析はWilliamsらの方法に従って行った。PCR反応は、50mM Tris-HCl, pH8.5, 5mM MgCl₂, 500μg/ml BSA, 0.5mM dNTP, 2.0% (w/v) Ficoll, 4mM Tartrazine, 0.1mM EDTA, 0.4units/10μl *Tth* DNA polymerase, 0.25μM プライマー, 10ng/10μl 鋳型DNAの組成の溶液を用いて、94°Cで1分間熱変性したのち、94°C10秒 (変性) - 36°C30秒 (アニーリング) - 72°C1分 (伸長) を60回繰り返す、最後に72°C2分間の伸長を行った。36種類のプライマーの塩基配列は表-1のとおりである。PCR増幅産

物は1%アガロースゲル電気泳動、エチジウムブロマイド染色をし、UVトランスイルミネーター上で観察した。

3) データ解析

RAPD法で得られた泳動像から供試個体間で出現の有無が認められたバンド (多型バンド) のみを解析に供した。得られたデータよりNei and LiのF値⁴⁾ ($F = 2M_{xy} / (M_x + M_y)$, (M_{xy} ; 2個体に共通のバンド数, M_x , および M_y ; それぞれのもつバンド数) を算出した。

表-1 RAPD分析に使用したプライマーの塩基配列

No	プライマー	塩基配列	No	プライマー	塩基配列
1	A-12	5'-TCGGCGATAG-3'	19	D-15	5'-CATCCGTGCT-3'
2	B-01	GTTTCGCTCC	20	E-02	GGTCCGGGAA
3	B-02	TGATCCCTGG	21	E-08	TCACCACGGT
4	B-05	TGCGCCCTTC	22	F-09	CCAAGCTTCC
5	B-08	GTCCASACGG	23	F-15	CCAGTACTCC
6	B-12	CCTTGACGCA	24	F-17	AACCCGGGAA
7	B-13	TTCCTCCGCT	25	F-18	TTCCGGGGTT
8	B-14	TCCGCTCTGG	26	G-01	CATCGGAGGA
9	B-16	TTTGCCCGGA	27	G-03	GAGCCCTCCA
10	B-19	ACCCCCGAAG	28	G-08	TCACGTCCAC
11	C-03	GGGGTCTTT	29	H-01	GGTCGGAGAA
12	C-10	TGCTGGGGTG	30	J-01	CCCGGCATAA
13	C-14	TGCGTGCTTG	31	J-15	TGTAGCAGGG
14	C-17	TTCCTCCGAG	32	K-16	GAGCGTCGAA
15	C-19	GTTGCCAGCC	33	K-19	CACAGGCGGA
16	D-06	ACCTGAACGG	34	L-06	GAGGGAAGAG
17	D-10	GGTCTACACC	35	L-09	TGCGAGAGTC
18	D-14	CTTCCCAAG	36	FB-01	CCACCCGCGA

1-35はOperon社のもの
36は本研究室で合成したもの

3. 結果および考察

今回DNA分子マーカーとして用いたRAPDマーカーは分析が容易・迅速で、かつ得られる情報量も多く、その情報はゲノム全体を対象としているため、1990年にWilliamsらによって考案されて以来、広く用いられている^{1,2)}。

3樹種計10個体を36種類のプライマーでRAPD分析をした結果、180の多型バンドが得られた。得られたバンドのうち、最も短いものは350bpsで最も長いものは1400bpsであった。このうち特定の樹種のみ出現するバンド (遺伝子に対応) を表-2に示す。ニホンカ

ラマツで特異的な遺伝子は10個、チョウセンカラマツでは1個、グイマツでは5個であった。またグイマツのうちチシマ系のみで現われるものが4個、カラフト系のみのもものが5個あった。これらの遺伝子は、今後、樹種識別を行う上で有用な指標として利用可能である。また、ニホンカラマツにおいて、種特異的な遺伝子が多く観察されたことから、この種が他の2種とゲノム構成において大きな差異のあることが認められた。

RAPD分析によって得られたデータから供試個体間の遺伝的距離(1-F)を算出したものを表-3に示した。最も遺伝的距離が小さかったのはLK1とLK2(いずれもニホンカラマツ)の0.196で、最も大きかったのはLJ4(グイマツ;カラフト系)とLK3(ニホンカラマツ)の0.620であった。さらに樹種単位にまとめて、遺伝的距離を比較したものが表-4である。これによると、ニホンカラマツ内の個体間の遺伝的距離の平均値は0.236と最も小さく、他の樹種とは0.518と大きな値を示した。他の樹種についても同様に、同種内において小さく、樹種間で大きかった。なお、各樹種間における遺伝的距離はニホンカラマツとグイマツで0.529と比較的大きく遠縁であることが示唆された。

今回、カラマツ属3樹種についてRAPD分析を行ったが、その結果3樹種間でゲノム構成に差異のあること、および種特異性を示したRAPDマーカーによる樹種分類が可能であることが明らかとなった。

参考文献

(1) GOODWIN P. H., ANNIS S. L. : Appl Environ Microbiol, 57, 2482 - 2486, 1991

(2) KAZAN K., MANNERS J. M., CAMERON D. F. : Theor Appl Genet, 85, 882 - 888
 (3) MURRAY M. G., THOMPSON W. F. : Nucleic Acids Res, 8, 4321 - 4325, 1980
 (4) NEI M., LI W. : Proc Natl Acad Sci USA, 76, 5269 - 5273, 1979
 (5) WILLIAMS J. G., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RAFALSKI J. A. and TINGEY S. V. : Nucleic Acids Res, 18, 6531 - 6535, 1990

表-2 種特異的な出現が認められたRAPDマーカー(遺伝子)

樹種	+	-	計
ニホンカラマツ	B-13: 670bps G-03: 690 H-01: 690 J-15:1000 K-16: 800 L-06: 580	B-16:1100bps F-15: 600 H-01: 750 J-15: 450	10
チョウセンカラマツ	Z-01: 920		1
グイマツ	B-13: 550 C-10: 790 K-19:1400	B-05: 900 D-15: 750	5
(チシマ系)	B-08: 950 C-14: 580 D-15: 790 H-01: 880		4
(カラフト系)	A-12: 890 C-03:1300 D-06: 590 J-01:1100	B-02: 650	5

+ ; 1樹種の全個体でバンドが現れ、他樹種の個体では現れないもの
 - ; 1樹種の全個体でバンドが現れず、他樹種の個体では現れるもの

表-3 供試個体間の遺伝的距離(1-F)

樹種	供試個体	LK1	LK2	LK3	L01	L02	L03	LJ1	LJ2	LJ3	LJ4
ニホンカラマツ	LK1	-									
ニホンカラマツ	LK2	0.196	-								
ニホンカラマツ	LK3	0.231	0.291	-							
チョウセンカラマツ	L01	0.532	0.548	0.592	-						
チョウセンカラマツ	L02	0.560	0.460	0.584	0.351	-					
チョウセンカラマツ	L03	0.424	0.399	0.430	0.325	0.389	-				
グイマツ	LJ1	0.520	0.514	0.551	0.506	0.535	0.427	-			
グイマツ	LJ2	0.464	0.517	0.490	0.510	0.568	0.401	0.277	-		
グイマツ	LJ3	0.552	0.509	0.589	0.554	0.545	0.455	0.474	0.503	-	
グイマツ	LJ4	0.503	0.521	0.620	0.444	0.532	0.480	0.527	0.489	0.449	-

表-4 カラマツ属3樹種における種内および種間の平均遺伝的距離

	1. 同種内(平均)	2. 他種間(平均)	3. 各種間(平均)		
			ニホンカラマツ	チョウセンカラマツ	グイマツ
ニホンカラマツ	0.236	0.518	-		
チョウセンカラマツ	0.355	0.499	0.496	-	
グイマツ	0.378	0.492	0.529	0.503	-

1. 同一種の個体間の遺伝的距離の平均値
2. 他の種の個体間の遺伝的距離の平均値
3. 各樹種間での個体間の遺伝的距離の平均値