

Dryobalanops 属 5 樹種の DNA 分類・系統学的解析

九州大学農学部 スリ ダナルト・白石 進

1. はじめに

近年、熱帯地域における森林伐採が急速に進んでおり、熱帯林のバイオダイバシティの減少が問題となっている。しかし、熱帯林の遺伝資源に関する研究はあまり行われていない。そのため、熱帯樹種を対象とした資源植物的研究の必要性が叫ばれている。

本研究では熱帯林樹種であるフタバガキ科 (*Dipterocarpaceae*) *Dryobalanops* 属の 5 樹種について系統関係を調べた。分析には葉緑体ゲノム (*rbcl* 遺伝子) の RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 分析および核ゲノムの RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分析³⁾ を用いた。

2. 調査材料及方法

(1) 供試材料および DNA 抽出

供試材料は *D. oblongifolia* (2 個体), *D. lanceolata* (2 個体), *D. aromatica* (4 個体), *D. rappa* (4 個体), *D. beccarii* (2 個体) である。DNA は Murray and Thompson の CTAB 法¹⁾ を改良し、成葉から抽出した。

(2) RFLP 分析

PCR 反応は、10mM Tris-HCl, pH8.9; 1.5mM MgCl₂; 80mM KCl; 500μg/ml BSA; 0.1% コール酸ナトリウム; 0.1% TritonX-100 の組成の溶液で、0.4units/10μl *Tth* polymerase と 1ng/10μl 鋳型 DNA を使用した。PCR 反応は 94°C (変性) 30 秒, 55°C (アニーリング) 30 秒, 72°C (伸長) は ELU-Quick (schleicher & Schuell) で精製した。

RFLP 分析に使用した制限酵素は 4 塩基認識の *MspI*, *HhaI*, *RhaI*, *AluI*, *SrfI*, *NdeI*, *AccI*, *HinfI*, *TthHB8I*, *HaeIII*, *Cfr13I* (合計 11 種類) を使った。酵素反応は DNA 1μg に対し 10unit 使用して、37°C で 4 時間インキュベートした後、2% アガロースゲルを用いて、70V で 2 時間電気泳動した。

(3) RAPD 分析

PCR 反応は 10ng DNA を反応液 (50mM Tris-HCl,

pH8.5; 5mM MgCl₂; 500μg/ml BSA; 0.5mM dNTP; 2% (W/V) Ficoll; 4mM Tartrazine; 0.1mM EDTA; 0.4units/10μl *Tth* DNA polymerase; 0.25 μM プライマー) を用いて、94°C (変性) 10 秒, 36°C (アニーリング) 30 秒, 72°C (伸長) 60 秒を 60 サイクル行った。今回の RAPD 分析には全部で 31 プライマーを使用した。PCR 増幅産物は 1% アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV トランスイルミネーター上で観察した。

3. 結果と考察

表 1 に *rbcl* 遺伝子の RFLP 分析における各制限酵素の切断サイト数を示した。制限酵素によってサイト数に違いが見られたが、*HinfI* を除く 10 制限酵素では樹種間で多型は見られなかった。*HinfI* では、多型的バンドが得られ、供試個体のうち *D. rappa* の 2 個体だけが異なるバンドパターンを示した。このことから、*D. rappa* は *rbcl* 遺伝子の塩基配列に他の 4 樹種と差異のあることが明かとなり、この樹種と他の樹種とはかなり早い時期に分化したことが示唆された。しかし、RFLP 分析では他の樹種間の差異が検出できなかったことから、次に示す RAPD 分析を行った。

RAPD 分析では、使用した全 31 プライマーで計 206 本の多型的バンドが得られた。樹種間の関係を調べるため種特異的に出現するバンド (表 2) と特定の樹種間で共通したバンド (表 3) を調査した。*D. rappa* には種特異的なバンドが 25 本確認された。一方、*D. oblongifolia* および *D. lanceolata* は種特異的なバンドがそれぞれ 4 本と 2 本であり、非常に少なかった (表 2)。しかし、この 2 樹種に共通して出現するバンドは多かった (表 3)。したがって *D. oblongifolia* と *D. lanceolata* は近縁な関係にあることが明かとなった。さらに、表 4 に供試個体間の遺伝的距離²⁾ を算出した結果を示した。*D. oblongifolia* と *D. lanceolata* の 2 樹種間の遺伝的距離の平均値は 0.244 と小さな値となった。また、この 2 樹種と他の 3 樹種間における遺伝的距離は大きかった。このこ

とから *D. oblongifolia* と *D. lanceolata* は他の3樹種とは遠縁な関係にあることが明かとなった。

このデータをもとにUPGMA法により作成した系統樹を図1に示す。*D. oblongifolia* と *D. lanceolata* は、同一のクラスターを作り、他の3樹種とは早い時期に分化したことが示された。*D. lanceolata* と *D. oblongifolia* はクラスターの中で混在しており、これらの2樹種は非常に近縁であることが明かとなった。また、この系統樹から *D. rappa* と *D. beccarii*, *D. aromatica* はそれぞれ種

分化が非常に進んでいることも明かとなった。

引用文献

- (1) MURRAY, M. G., THOMPSON, W. F.: Nucleic Acid Research 8 : 4321 - 4325, 1980
- (2) NEI, M., LI, W - H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 5269 - 5273
- (3) WILLIAM, J. G. K. *et al.* Nucleic Acid Research 18 : 6531 - 6535, 1990

表1 各制限酵素のサイトの数

| 制限酵素 | サイト数 | 制限酵素 | サイト数 |
|----------------|------|---------------|-----------|
| <i>HaeIII</i> | 1 | <i>AccI</i> | 3 |
| <i>AluI</i> | > 5 | <i>MspI</i> | 3 |
| <i>NdeI</i> | 4 | <i>SacI</i> | 3 |
| <i>HhaI</i> | 1 | <i>Cfr13I</i> | 1 |
| <i>TthHB8I</i> | 2 | <i>HinfI</i> | 4 |
| <i>RsaI</i> | 5 | | 5 (rappa) |

表2 種特異的なバンド (遺伝子)

| 樹種 | 種特異バンド | |
|------------------------|--------|----|
| | + | - |
| <i>D. oblongifolia</i> | 1 | 3 |
| <i>D. lanceolata</i> | 2 | 0 |
| <i>D. aromatica</i> | 13 | 2 |
| <i>D. rappa</i> | 17 | 8 |
| <i>D. beccarii</i> | 10 | 11 |

表3 2樹種間で共通な遺伝子数 (バンド数)

| 樹種 | O | L | A | R | B |
|----------------------------|----|---|----|---|---|
| <i>D. oblongifolia</i> (O) | - | | | | |
| <i>D. lanceolata</i> (L) | 29 | - | | | |
| <i>D. aromatica</i> (A) | 3 | 0 | - | | |
| <i>D. rappa</i> (R) | 4 | 0 | 9 | - | |
| <i>D. beccarii</i> (B) | 1 | 0 | 14 | 9 | - |

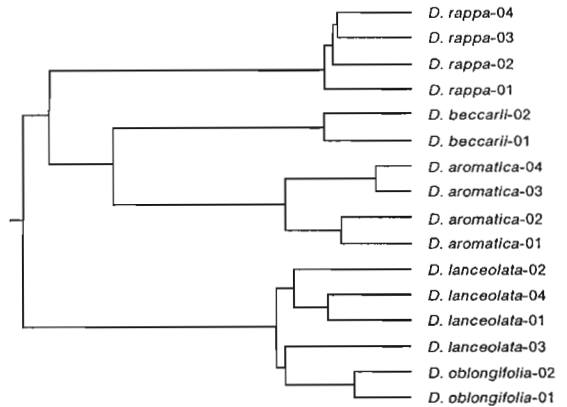


図-1 RAPD分析によるDryobalanops属5樹種の系統樹

表4 供試個体間の遺伝的距離

| | 0-1 | 0-2 | L-1 | L-2 | L-3 | L-4 | A-1 | A-2 | A-3 | A-4 | R-1 | R-2 | R-3 | R-4 | B-1 | B-2 |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0-1 | 70 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 0-2 | 104 | 68 | | | | | | | | | | | | | | |
| L-1 | 203 | 252 | 79 | | | | | | | | | | | | | |
| L-2 | 259 | 324 | 216 | 72 | | | | | | | | | | | | |
| L-3 | 228 | 234 | 240 | 213 | 80 | | | | | | | | | | | |
| L-4 | 292 | 229 | 141 | 208 | 245 | 78 | | | | | | | | | | |
| A-1 | 643 | 676 | 669 | 655 | 673 | 616 | 73 | | | | | | | | | |
| A-2 | 686 | 706 | 683 | 710 | 723 | 644 | 127 | 73 | | | | | | | | |
| A-3 | 710 | 730 | 720 | 707 | 711 | 709 | 252 | 224 | 81 | | | | | | | |
| A-4 | 692 | 712 | 703 | 676 | 693 | 691 | 228 | 241 | 067 | 65 | | | | | | |
| R-1 | 708 | 714 | 704 | 704 | 693 | 721 | 682 | 697 | 650 | 644 | 64 | | | | | |
| R-2 | 724 | 765 | 734 | 750 | 723 | 752 | 664 | 696 | 631 | 625 | 165 | 57 | | | | |
| R-3 | 731 | 766 | 712 | 712 | 688 | 743 | 647 | 691 | 631 | 612 | 143 | 143 | 69 | | | |
| R-4 | 727 | 711 | 708 | 708 | 712 | 739 | 657 | 701 | 655 | 635 | 161 | 145 | 141 | 65 | | |
| B-1 | 760 | 769 | 754 | 754 | 742 | 786 | 575 | 638 | 576 | 585 | 592 | 727 | 669 | 681 | 58 | |
| B-2 | 672 | 677 | 655 | 669 | 688 | 671 | 485 | 529 | 489 | 496 | 651 | 697 | 631 | 672 | 157 | 68 |