

## RAPD法によるヤクタネゴヨウの遺伝変異評価の試み

林木育種センター九州育種場 千吉良 治

## 1. はじめに

ヤクタネゴヨウの *Pinus Armandi Franchet var. amamiana Hatusima* 別名アマミゴヨウは屋久島、種子島に分布する五葉松である。台湾、中国には学名上の基本種タカネゴヨウ (*Pinus Armandi Franchet var. Masteriana Hayata*) が分布する。華山松 (*Pinus Armandi Franchet var. Armandii*) をタカネゴヨウの変種として区別する見解もある<sup>2)</sup>。

「原色日本植物図鑑・木本編II」<sup>3)</sup> はヤクタネゴヨウの球果の遺体が京都の東山の洪積世から報告されていることを記載している。このことは過去に現在より広い地域に分布していたことを示唆している。しかし現在では屋久島に3小集団が隔離分布し、種子島に単本的に散在するのみである。また小数ではあるが植栽木として鹿児島県内に散見される。山本らは現存本数を屋久島1,000~1,500個体、種子島100個体程度と推定し種の永続的な保全には最小限の個体数としている<sup>2)</sup>。

当育種場では本樹種の保全のため、隔離集団間の交配による遺伝変異の拡大や近縁種との種間交雑等を計画している。基礎資料として本樹種の遺伝変異及び近縁種との遺伝的距離の把握をしておく必要がある。

遺伝情報の本体であるDNAを直接調査できるRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法<sup>4)</sup> は分析が容易かつ迅速なため現在様々な用途に用いられている。RAPD法を用い、ヤクタネゴヨウの遺伝変異を評価するための予備試験を行ったので報告する。なお本実験の実施にあたっては九州大学農学部 白石進助教授はじめ木本植物学研究室のみなさまに適切な御指導、御協力を頂いた。ここに謝辞を表す。

## 2. 材料と方法

試験に用いた個体は、屋久島の2小集団からの各5個体ずつの計10個体である。

DNA抽出は当年葉150mgを用いてCTAB法<sup>5)</sup> を改良して行った。

PCR反応は2種類の反応溶液を用いた。表-1に反応溶液の組成及び用いたプライマーの塩基配列を示す。

表-1 PCR反応溶液の組成

	濃度
Tris - HCl, pH9.0	10 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
dNTP	0.4 mM
Tth DNA polymerase	0.5 units
プライマー	2 μM
鋳型DNA	25 ng
(使用プライマーの配列)	C-10:5'-TGTCTGGGTG-3' H-01:5'-GGTCCGAGAA-3')
Tris - HCl, pH8.0	10 mM
KCl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM
Gelatin	0.01(w/v)
dNTP	0.4 mM
Tth DNA polymerase	0.5 units
プライマー	2 μM
鋳型DNA	25 ng
(使用プライマーの配列)	J-08:5'-CATACCGTG-3' Z-04:5'-GCCCTACGCG-3')

PCR反応は94℃で1分間の熱変性、35℃で2分間のアニーリング、72℃で2分間の伸長を39回繰り返し行い40サイクルめの72℃は10分間とした。

PCR増幅産物は、エチジウムブロマイドを含むTBE緩衝液中で1%アガロースゲルを用いて電気泳動した。アガロースゲルはUVトランスイルミネーター上で観察した。

## 3. 結果と考察

それぞれのプライマーで1本ずつのバンドを観察した。そのうち供試個体により出現の有無が認められたバンド(以下多型バンドと記す)はプライマーZ-04のみだった。この結果DNA型は一方の小集団の内2個

体と残り2集団の8個体の2グループに分類された。このグルーピングだけでは2小集団の遺伝的差異を明らかに出来ない。しかし、さらに多くの多型バンドを検出することで小集団間の評価が可能だと考えられる。RAPD法を用いカラマツ属3樹種を分類した報告<sup>9)</sup>はプライマーあたり平均5個の多型バンドを検出している。同様にDryobalanops属5樹種を分類した結果は平均6.6個の多型バンドを検出している<sup>9)</sup>。今回の実験は、これらの報告に比べ明らかに多型バンドの検出が少ない。通常RAPD法に於けるPCR反応液中のプライマー濃度は0.15  $\mu$ M~0.25  $\mu$ Mが用いられている。今回もちいたPCR反応溶液は、プライマーの濃度を2  $\mu$ Mとした。この反応溶液は通常多型バンドが得られるプライマー濃度より10倍程度高かった。高濃度のプライマーは非特異的にアニールすると考えられている<sup>9)</sup>。プライマーの濃度を0.15  $\mu$ M~0.25  $\mu$ M程度に下げること得意的な増幅が行われ、より多くのバンドが検出できると考えられる。増幅スケジュールは熱変性、アニール、伸長の各段階で繰り返し数を再検討する余地がある。この実験で使用したプライマーはスギ精英樹92クローンを分類した報告<sup>1)</sup>で用いた6種類の内の2種類が含まれている。しかしヤクタネゴヨウで効率よく多型バンドが検出できるか定かではない。PCR反応液の組成、増幅温度スケジュールを再検討した上で効率よく多型バンドを検出するプライマーの探索が必要である。今後、反応溶液、増幅スケジュール、プライマーを再検討しヤクタネゴヨウの遺伝変異を明らかにする予定である。

#### 引用文献

- (1) エンシソ マヌエルほか：日林九支研論，47，105～106，1994
- (2) 北村四郎・村田 源：原色日本植物図鑑・木本編II，pp.429，保育社，大阪，1979
- (3) 磯田圭哉・白石 進：日林九支研論，47，103～104，1994
- (4) MURRAY M. G., THOMPSON W. F. : Nucleic Acids Res, 8, 4321~4325, 1980
- (5) スリ ダナルト・白石 進：日林九支研論，47，109～110，1994
- (6) 高木康敬編：遺伝子診断マニュアル，pp.85，講談社，東京，1991
- (7) 山本千秋・明石孝輝：未発表
- (8) WILIAM, J.G. K., etc : Nucleic Acids Res, 18, 6531~6535, 1990