

RAPD分析を用いた東アジア産マツの系統関係の解明

九州大学農学部 渡辺 敦史・白石 進

1. はじめに

これまで葉緑体 DNA 上の塩基配列情報をもとに、マツ属植物の系統関係について推定を試みてきた。作成した系統樹から、東アジアに分布するマツ属植物の中に極めて近縁な樹種群が存在するということが明らかとなった。これらの樹種群は決定した塩基配列を比較するとほとんど差異が観察されなかった(未発表)。

極めて近縁であると考えられる樹種群は、複雑管束亜属(*Pinus* 亜属)の東アジアに分布する二葉松類で、クロマツ、リュウキュウマツ、タイワンマツといった島嶼に分布する樹種群とインドシナから中国にかけて分布しているマンシュウクロマツ、ウンナンマツ、カシアマツの6種である。これらの樹種は Little and Critchfield の分類体系¹⁾では *Sylvestres* 亜節に分類されている(表-1)。単維管束亜属(*Strobus* 亜属)のシベリア、中国、日本に分布する五葉松類でハイマツ、ヒメコマツ、チョウセンゴヨウ、カザンマツも同様に近縁な関係にあった。これらの樹種は前述の分類体系では2つの亜節、*Strobi* 亜節と *Cembrae* 亜節に分けられている(表-1)。

これらの種間は前述したように塩基配列の相同性が極めて高く、近縁であるということ以外、詳細な系統関係については全く不明である。そこで、本研究では

これら近縁種間の系統関係を明らかにするため、RAPD(random amplified polymorphic DNA)分析²⁾を行った。

2. 材料と方法

供試個体は前述した東アジアに分布する複雑管束亜属から6種11個体、単維管束亜属から4種3変種12個体を用いた(表-1)。

全DNA抽出は既に報告している方法³⁾に従って行った。得られた全DNAはGENECLEAN III Kit (Bio 101社)によって精製を行い、以後の分析における鋳型DNAとした。RAPD分析は10mM Tris-HCl(pH8.3), 10mM KCl, 3.0mM MgCl₂, 0.2mM 各dNTP, 0.5unit/10 μl AmpliTaq DNA polymerase, stoffel fragment(Pekin Elmer社), 0.25uMプライマー, 10ug/10 μl鋳型DNAの反応液組成で行った。増幅条件は94℃1分で処理した後、94℃30秒, 37℃30秒, 72℃90秒を45サイクル行い、最後に72℃7分で反応させた。得られた増幅産物は1%アガロースゲルにより電気泳動を行い、302nmトランスイルミネーター上で検出した。

プライマーは複雑管束亜属(二葉松類)で56プライマー、単維管束亜属(五葉松類)で52プライマーを用いた。得られた泳動像から、多型を示し、増幅が良好であ

表-1 供試樹種

亜属	節	亜節	学名	和名	分布地域	個体数
<i>Pinus</i>	<i>Pinus</i>	<i>Sylvestres</i>	<i>P. thunbergii</i> parl.	クロマツ	日本	3
			<i>P. luchuensis</i> Mayr.	リュウキュウマツ	沖縄	2
			<i>P. tabulaeformis</i> Carr.	マンシュウクロマツ	中国中央~西部	3
			<i>P. taiwanensis</i> Hayata	タイワンマツ	台湾	1
			<i>P. khasya</i> Royle	カシアマツ	東南アジア	1
			<i>P. yunnanensis</i> Franch.	ウンナンマツ	中国南部	1
<i>Strobus</i>	<i>Strobus</i>	<i>Cembrae</i>	<i>P. koraiensis</i> Sieb. et Zucc.	チョウセンゴヨウ	日本, 中国東北部, 朝鮮半島	2
			<i>P. pumila</i> (Pall.) Regel.	ハイマツ	日本, 中国北部~シベリア	2
	<i>Strobi</i>		<i>P. armandii</i> Franch.	カザンマツ	中国南部, 中央, 西部	2
			<i>P. a. var. amamiana</i> (Koidz.) Hatusima	ヤクタネゴヨウ	屋久島, 種子島	1
			<i>P. a. var. masteriana</i> Hayata	タカネゴヨウ	台湾	1
			<i>P. parviflora</i> Sieb. et Zucc.	ヒメコマツ	日本	2
			<i>P. p. var. pentaphylla</i> Henry	キタゴヨウ	日本	2

Atsushi WATANABE and Susumu SHIRAIISHI (Fac. of Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812 - 8581)
The Phylogenetic relationships of genus *Pinus* distributed in east Asia using RAPD analysis

った DNA フラグメントを選抜した。解析は Nei and Li の式により類似度 (F 値) を算出した後、 $D=1-F$ の式から遺伝距離を求め、UPGMA 法によってデンドログラムを作成した。

3. 結果と考察

RAPD 分析を行った結果、複維管束亜属では 56 プライマー中 50 プライマーで、単維管束亜属では 52 プライマー中 48 プライマーで多型的なフラグメントが観察された。このうち、複維管束亜属では 162、単維管束亜属では 152 で多型を示し、増幅が良好であったフラグメントを選抜することが出来た。これらのフラグメント情報をもとに、複維管束亜属と単維管束亜属のデンドログラムを UPGMA 法により作成した (図-1、図-2)。

RAPD 分析の結果から、日本に分布するクロマツとリュウキュウマツは非常に近縁な関係にあることが明らかとなった (図-1)。また、両種はタイワンマツとも近縁な関係にあり、この 3 種が一つのクラスターを形成した。また、マンシュウクロマツはウンナンマツやカシアマツと一つのクラスターを形成した。塩基配列レベルでは極めて近縁であることが示されていた複維管束亜属の樹種群は RAPD 分析の結果から、本州、四国、九州、沖縄、台湾といった島嶼に分布する種群とインドシナ半島から中国大陸にかけて分布する種群の 2 つのグループに分かれた。そのため、複維管束亜属の 6 種は系統進化上、島嶼と大陸という 2 つの地域でそれぞれに種分化してきたことが示唆された。

一方、単維管束亜属のデンドログラムでは 4 種 3 変種の中でチョウセンゴヨウが最も離れた関係にあることが示唆された。これと同じ亜節に属しているハイマツ

はむしろヒメコマツ、キタゴヨウと近い関係にあることが明らかとなった (図-2)。

これまで単維管束亜属の *Strobus* 節は、種子翼の有無や球果が成熟した際に、開裂するかしないかという根拠によって、*Strobi* 亜節と *Cembrae* 亜節の 2 亜節に分類されていた¹⁾が、葉緑体 DNA の分子系統学的研究からは、否定され、従来の分類を再考する必要性が指摘されている²⁾。本研究の結果、東アジアに分布する単維管束亜属のより詳細な系統関係が明らかとなったが、RAPD 分析による核 DNA 情報からも系統進化上、2 亜節を区分することは出来なかった。

本研究では、RAPD マーカーを用いて、東アジアに分布するマツ属植物を対象として、系統関係について明らかにすることを試みた。その結果、RAPD 分析がマツ近縁種間における系統進化を解明する上で有効であることが確認された。マツ属植物の系統関係については、葉緑体 DNA の塩基配列情報からだけでは十分解明することが出来ない (未発表)。今後 RAPD 分析をマツ属植物の系統研究に用いることにより、詳細な系統関係が解明できるものとする。

引用文献

- (1) LITTLE, E. L., and W. B. CRITCHFIELD. : U. S. Dept. Agric. Misc. Publ. 1144, Washington, D. C., 1969
- (2) WILLIAMS, J. G. K. *et al.*: Nucleic Acids Res., 18, 6531 ~ 6535, 1990
- (3) 白石進・渡辺敦史 : 日林誌, 77, 429 ~ 436, 1995
- (4) WATANABE, A., and S. SHIRAIISHI. : J. For. Res., 1997 (投稿中)

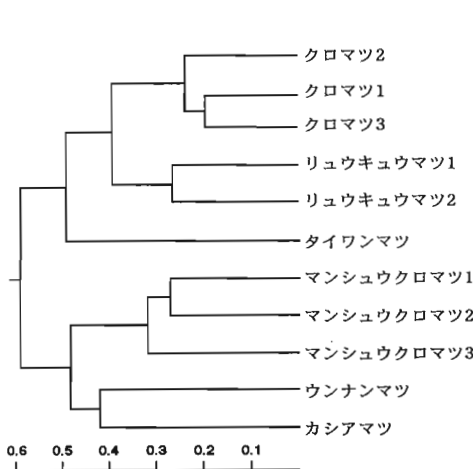


図-1 アジアに分布する複維管束亜属 6 種の系統関係

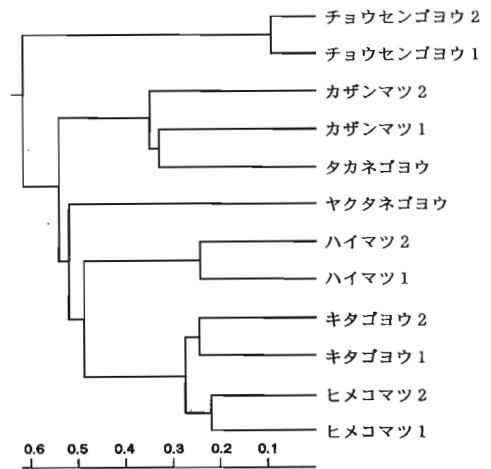


図-2 アジアに分布する単維管束亜属 4 種 3 変種の系統関係