

RAPDマーカーを用いた九州に分布するセンダン (*Melia azedarach* Linn.)の遺伝変異の解析

金谷, 整一
九州大学農学部林学科

渡辺, 敦史
九州大学農学部林産学科

白石, 進
九州大学農学部林産学科

玉泉, 幸一郎
九州大学農学部林学科

他

<https://doi.org/10.15017/10927>

出版情報：九州大学農学部演習林報告. 76, pp.1-9, 1997-03-28. 九州大学農学部附属演習林
バージョン：
権利関係：

RAPD マーカーを用いた九州に分布するセンダン (*Melia azedarach* Linn.) の遺伝変異の解析*

金谷 整一**・渡辺 敦史***・白石 進***
玉泉 幸一郎**・齋藤 明**

抄 録

九州内の6地域に分布するセンダンの遺伝的変異を明らかにするために、RAPD マーカーを用いて解析を行った。プライマーのスクリーニングを行ったところ、40プライマーで92個の多型性を示すバンドが得られた。R-12/300 bpのバンドは、九州本土の4地域に特異的に出現し、またT-20/650 bpのバンドは、屋久島以外の5地域に出現した。一方、地域内の遺伝的変異は、種子島と大淀川の2地域で大きかった。さらに、各地域間の遺伝距離と地理的距離との間に有意な相関が認められた。しかし、九州本土内の4地域間には遺伝距離と地理的距離に有意な相関はなかった。各地域間の遺伝距離をもとにクラスター分析を行った結果、九州本土の4地域と種子島・屋久島の2地域の間に遺伝的差異が認められた。

キーワード：センダン，RAPD，遺伝的多様性，地域間変異，クラスター分析

1. はじめに

近年、人間活動による熱帯雨林の伐採や化石燃料の消費に伴う炭酸ガスの大量放出は、地球上の炭酸ガス濃度を増加し、地球の温暖化を促進しているといわれている。この地球温暖化の抑止は、地球上の生活環境保全に不可欠なこととして、広く一般に認識されるようになってきた。今後、この問題の解決を図るには、炭酸ガスの放出を削減し、様々な方法で炭酸ガスを吸収・固定する方策を講じていかなければならない(大山, 1993)。

地球上の炭素循環で、大きな役割を果たしているのが光合成を行う植物である。陸上植物は光合成を行うことにより、食料や木材などの人間活動に有用な物質を生産する。陸上植物の中でも木本植物は、一般的に草本植物と比べ個体サイズが非常に大きく、長寿命であるため大量の炭酸ガスを吸収・固定することが可能である。したがって、今後、炭酸ガス固定能力の高い樹種を選抜し、さらに炭酸ガス固定能力を向上させることは、地球温暖化の抑止を図る上で重要であると考えられる。

本報告で用いたセンダン (*Melia azedarach* Linn.) は、高木ら (1994) によると、48種

* KANETANI, S., WATANABE, A., SHIRAIISHI, S., GYOKUSEN, K. and SAITO, A. : Study on Genetic Variation of *Melia azedarach* Linn. Populations in Kyushu Area Using RAPD Markers.

** 九州大学農学部林学科

Department of Forestry, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81

*** 九州大学農学部林産学科

Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81

の広葉樹と比較した結果、成長が早く、葉面積当たりあるいは葉乾重当たりの最大光合成速度が大きい樹種であると報告されている。また本種は、庭園樹や街路樹として植栽され、材はケヤキ材やキリ材と類似し、葉は肥料や殺虫剤、外果皮は薬用、核は数珠に用いられている（林，1969）。

以上のことからセンダンは、炭酸ガス固定能力に優れており、かつ経済的利用価値も高い樹種の一つと考えられる。今後、本種を有効利用していくためには、炭酸ガス固定能などの樹木生理および遺伝的変異などの知見を集積することが必要である。

これまでにセンダンに関する研究は、樹幹の形質や生育状況（山下ら，1993）、樹皮と萌芽発生の関係（LEV-YADUN and ALONI, 1993）、萌芽特性（家入・玉泉，1994）、成長量とガス交換速度との関係（高木ら，1994）、組織培養（家入・玉泉，1995；家入ら，1996）などが挙げられるだけである。以上のようにセンダンに対しては、生態、生理および育種に関する報告が行われてはいるが、遺伝的変異を解析した報告はみられない。

従来、木本植物の遺伝的変異の解析には、アイソザイムや RFLP（制限酵素断片長多型：Restricted Fragment Length Polymorphisms）分析などが用いられてきた。最近、WILLIAMS *et al.*（1990）によって開発された RAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）マーカーは、前述した 2 つのマーカーと比較して多量の DNA 情報を迅速かつ容易に得ることが可能である。これまでに、RAPD マーカーを用いて木本植物の遺伝的変異を解析した研究は、*Gliricidia sepium* と *G. maculata*（CHALMERS *et al.*, 1992）、*Pinus resinosa*（MOSSELER *et al.*, 1992）などにみられる。

そこで本報告では、将来のセンダンの有効利用を図る上で、遺伝的変異に関する基礎的な知見を得るために、RAPD マーカーを用いて九州内に分布するセンダンの遺伝的変異を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2.1. 供試材料

供試個体は、九州本土の主要河川である筑後川、緑川、川内川および大淀川の下流域と、種子島および屋久島を含めた 6 地域（以下、各地域は河川名あるいは島名で記す）において、天然に生育していると考えられる個体を選択した（図 1）。種子島では中種子町と南種子町、屋久島では屋久町内の平内と斐生のそれぞれ 2 地点から供試個体を選択した。両島における 2 地点間の距離はそれぞれ約 10 km であった。供試個体数は各地域 4 個体ずつ、合計 24 個体とした（表 1）。供試個体より採取した約 20 cm の生枝を供試材料とし、RAPD 分析に供試するまで -40°C のフリーザー内に冷凍保存した。

2.2. 全 DNA の抽出・精製

全 DNA の抽出は、生枝から切り出した内樹皮約 140 mg を使用し、CTAB 法（MURRAY and THOMPSON, 1991）を改良（白石・渡辺，1995）して行った。粗抽出 DNA の精製は、Bio Mag（PerSeptive Diagnostics 社）を用いて行った。

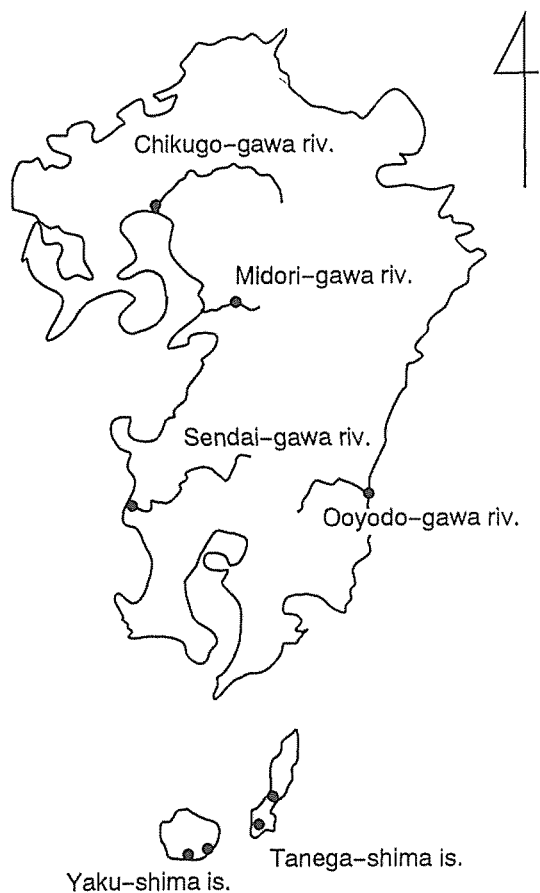


Fig. 1 Location of *Melia azedarach* analyzed in this study. Each dot indicates populations were sampled.

図1 供試個体の採取地域

表1 各地域における採取個体数

Table 1 The number of samples were collected from each population.

Population	Location	Number of samples
Chikugo-gawa riv.	Kawasoe town, Saga pref.	4
Midori-gawa riv.	Kashima town, Kumamoto pref.	4
Sendai-gawa riv.	Sendai city, Kagoshima pref.	4
Ooyodo-gawa riv.	Miyazaki city, Miyazaki pref.	4
Yaku-shima is.	Hirauchi, Yaku town, Kagoshima pref.	2
	Mugio, Yaku town, Kagoshima pref.	2
Tanega-shima is.	Nakatane town, Kagoshima pref.	3
	Minamitane town, Kagoshima pref.	1
Total		24

2.3. RAPD 分析

精製した全 DNA を鋳型 DNA とし RAPD 分析 (WILLIAMS *et al.*, 1990) を行った. RAPD 分析には Operon Technologies 社の市販品のプライマーを用いた.

PCR 反応は, 反応溶液組成の鋳型 DNA 濃度を 10 ng/10 μ l とし, サーマサイクラーの変性 (93 $^{\circ}$ C, 10 秒)・アニーリング (36 $^{\circ}$ C, 30 秒)・伸長 (72 $^{\circ}$ C, 60 秒) 条件およびサイクル数 (60 サイクル) を変更した以外は, 白石・渡辺 (1995) に従った. 得られた PCR 増幅産物は, 1% アガロースゲルを用いて電気泳動を行った後, エチジウムブロマイドで染色し, 302 nm UV トランスイルミネーター上で DNA 多型を観察した.

2.4. 遺伝距離の算出

RAPD 分析により得られたデータをもとに, 各供試個体間の遺伝的組成の違いを表すため遺伝距離を求めた. 比較しようとする 2 個体の全多型的遺伝子座におけるバンドの保有データをもとに, Nei and Li (1979) の遺伝的類似度 (F) を用い, 次式により遺伝距離 (D) を算出した.

$$D = 1 - F = 1 - 2n_{XY} / (n_X + n_Y)$$

ここで, n_{XY} は比較する 2 個体 (X, Y) が共有しているバンド数, n_X は X 個体が保有しているバンド数, n_Y は Y 個体が保有しているバンド数を示す. 上記の式により各個体間の遺伝距離を求め, それをもとに各地域内および地域間の平均遺伝距離を求めた.

3. 結果と考察

3.1. 有用プライマーのスクリーニング

本研究を効率よく行っていくために, 多型性が高く, バンドの判読が容易なプライマーを選抜する必要があった. スクリーニングには, 採取地域の異なる任意の 4 個体を選択し, 132 種類のプライマーを用いてスクリーニングを行った. これにより 40 種類のプライマーに多型性を示すバンド (推定遺伝子座) が認められ (表 2), RAPD 分析に供した.

表 2 RAPD 分析に使用したプライマーと多型的遺伝子座数
Table 2 Primers used in RAPD analysis and number of polymorphic loci for each primer.

Primer	Number of polymorphic loci	Primer	Number of polymorphic loci	Primer	Number of polymorphic loci
A-19	4	I-02	1	R-09	2
B-06	1	J-05	1	R-12	3
C-02	3	L-01	2	R-16	1
C-04	1	L-02	2	R-19	2
C-11	3	M-15	4	S-10	3
C-15	1	N-07	6	T-14	1
C-16	3	N-11	3	T-16	2
C-20	2	O-03	4	T-20	4
D-19	1	O-10	4	U-10	3
E-01	1	O-16	1	V-01	2
E-10	2	Q-05	5	V-17	3
G-08	2	Q-07	1	W-02	1
H-08	1	Q-14	2		
H-13	1	R-04	3	Total 40	92

3.2. 遺伝変異の解析

選抜したプライマーを用いて全供試個体について RAPD 分析を行った結果、それぞれのプライマーで 1～6 個の多型性を示すバンドが確認できた。確認できた多型性を示すバンド数は合計 92 個で、1 プライマー当たりのバンド数は平均して 2.3 個であった。

図 2 に RAPD 分析の結果の一部を示した。九州本土の筑後川、緑川、大淀川および川内川の 4 地域のすべての個体は、R-12/300 bp のバンド（図中の矢印）を保有したが、種子島および屋久島の 2 地域の個体にはそのバンドは出現しなかった。また T-20/650 bp（図中の右側の矢印）のバンドは、屋久島以外の 5 地域のすべての個体にみられ、T-20/640 bp（図中の左側の矢印）のバンドは、屋久島にのみ出現した。これらのバンド以外、各地域で特異的に出現するバンドはみられなかった。MOSSELER *et al.* (1992) は、北アメリカ大陸と Newfoundland 島に分布する red pine (*Pinus resinosa* Ait.) は、分布地によって出現しないバンドがあることを示した。また CHALMERS *et al.* (1992) は、*Gliricidia sepium* の RAPD 分析の結果、ある集団に特異的に出現したバンドで、他の集団と識別できることを確認している。したがって、R-12/300 bp は九州本土の個体に、T-20/640 bp は屋久島の個体に特異的に出現するバンドであることから、これらのバンドは九州内のセンダンの分布地域を識別できるバンドと考えられる。また白石ら (1996) は、中部山岳地域に分布するニホンカラマツ (*Larix kaempferi*) と蔵王山系馬ノ神岳に分布するカラマツを RAPD 分析した結果、109 個の多型的遺伝子座のうちそれぞれに異なる遺伝子座が 7 個あることを確認し、ニホンカラマツと馬ノ神岳カラマツの遺伝的分化が進んでいると考察している。白石ら (1996) の結果と比較すると、九州内のセンダンは、地域特異的に出現したバンドが 3 個と少なく、各地域に分化してからの時間的経過が比較的短いものと考えられる。

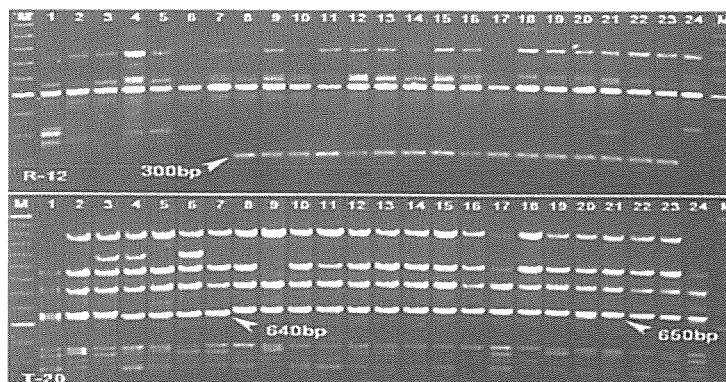


Fig. 2 Electrophoresis patterns in RAPD analysis.

1～3 : Tanega-shima is. (Nakatane town). 24 : Tanega-shima is. (Minamitane town). 4,5 : Yaku-shima is. (Hirauchi). 6,7 : Yaku-shima is. (Mugio). 8～11 : Chikugo-gawa riv. 12～15 : Midori-gawa riv. 16～19 : Ooyodo-gawa riv. 20～23 : Sendai-gawa riv. M : DNA size marker.

An arrow in R-12 indicates 300 bp. Right and left arrows in T-20 indicate 650 bp and 640 bp, respectively.

図 2 RAPD 分析の結果 (一部)

次に各地域内における平均遺伝距離および多型的遺伝子座数を示した(表3)。遺伝距離は0.201～0.341の範囲を示し、その平均値は0.254であった。遺伝距離で最も大きな値を示したのは種子島で0.341であった。次に大きな値を示したのは九州本土の大淀川で0.292であり、以下筑後川、川内川、屋久島の順になり、最小値は緑川の0.201であった。種子島と大淀川以外の地域は、平均値以下の値を示した。次に多型的遺伝子座数をみると、種子島で60個と最も多くの多型的遺伝子座が確認された。その他の地域の多型的遺伝子座数は、大淀川で56個、筑後川で48個、川内川で44個、屋久島で39個、緑川で36個となった。多型的遺伝子座を多く保有する地域と遺伝距離の大きな地域の順序は同じであった。種子島の供試材料の採取範囲は、九州本土内の4地域に比べ広がったことから(図1)、同島の遺伝的変異を過大評価をしている可能性がある。しかし、同じ程度の採取範囲であった屋久島(図1)は、九州本土内の各地域の遺伝距離および多型的遺伝子座数とほとんど差はみられず(表3)、採取範囲の広さは余り影響しないと考えられた。したがって種子島や大淀川の遺伝的変異は、他の地域内のそれに比べて若干大きいと考えられる。

表3 各地域内間の平均遺伝距離と多型的遺伝子座数

Table 3 Average of genetic distance and number of polymorphic loci within each population.

Population	Average of genetic distance	Number of polymorphic (%)
Chikugo-gawa riv.	0.246	48 (52.2)
Midori-gawa riv.	0.201	36 (39.1)
Sendai-gawa riv.	0.225	44 (47.8)
Ooyodo-gawa riv.	0.292	56 (60.9)
Yaku-shima is.	0.220	39 (42.4)
Tanega-shima is.	0.341	60 (65.2)

表4 各地域間の平均遺伝距離(左下)と地理的距離(右上, km)

Table 4 Average of genetic distances (below diagonal) and geographic distance in kilometer (above diagonal) among populations.

Population	1	2	3	4	5	6
1. Chikugo-gawa riv.	—	60	150	180	330	310
2. Midori-gawa riv.	0.216	—	115	120	280	250
3. Sendai-gawa riv.	0.239	0.261	—	120	180	165
4. Ooyodo-gawa riv.	0.274	0.357	0.254	—	200	170
5. Yaku-shima is.	0.357	0.368	0.324	0.349	—	40
6. Tanega-shima is.	0.406	0.412	0.357	0.382	0.334	—

表4に各地域間の平均遺伝距離と地理的距離を示した。平均遺伝距離は、0.216～0.412の範囲の値を示した。すべての組み合わせの遺伝距離の平均値は0.326であった。九州本土内で地理的距離が一番近い筑後川と緑川間の遺伝距離は0.216を示し、全地域間の中で最も小さい値であった。緑川と大淀川間の遺伝距離は0.357を示し、九州本土内の地域間で最も大きな遺伝的差異が認められた。今回の報告で地理的距離が最も近かった種子島と屋久島間の遺伝距離は0.334であり、その値はすべての組み合わせの遺伝距離の平均値を上回った。屋久島および種子島と九州本土の各地域との遺伝距離は、すべての組み合わせにおいて0.3以上と高い値を示した。とくに種子島と筑後川および緑川間の遺伝距離は、それぞれ0.406、0.412であり、今回の報告の中で大きな値を示した。6地域間の遺伝距離と地理的距離を回帰分析した結果、正の相関関係 ($n = 15, r = 0.623, p < 0.01$) が認められた。日本全国に分布するクロマツもアイソザイム分析の結果、地理的距離と遺伝距離の正の相関が認められている(宮田・生方, 1994)。したがって、九州内のセンダンもクロマツと同様に地理的に距離が遠くなるほど、遺伝距離も大きくなる傾向があるといえる。しかし九州本土内の4地域間では、地理的距離と遺伝距離には有意な相関は認められなかった ($n = 6, r = 0.276, p > 0.05$)。これらのことから九州本土内のセンダンの遺伝的分化は、あまり進んでないと考えられる。

表4の各地域間の平均遺伝距離をもとにUPGMA法(SNEATH and SOKAL, 1973)によりクラスター分析した結果を図3に示した。九州内のセンダンは大きく分けて、2つのクラスターを形成した。1つのクラスターには九州本土の4地域が属し、もう一方は種子島と屋久島の島嶼部であった。種子島と屋久島は同じクラスター内ではあるが、九州本土内の各地域間に比べ大きな遺伝的差異が認められた。これらの結果は、隣接する種子島と屋久島の両島間、およびそれらの島と九州本土間に存在する海洋が、遺伝子流動を妨げているためと考えられた。

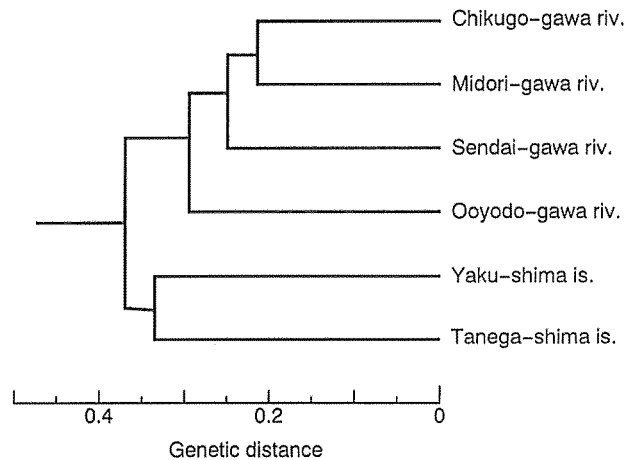


Fig. 3 UPGMA dendrogram based on average of genetic distances among populations.

図3 各地域間の平均遺伝距離をもとにしたクラスター分析

4. お わ り に

本研究において、RAPD分析によって九州内に分布するセンダンの遺伝的変異について解析した結果、遺伝的変異が大きかった地域は種子島と大淀川であった。また、九州本土と種子島および屋久島の間には、大きな遺伝的差異が認められたが、九州本土内での遺伝的変異は小さいことが明らかとなった。

将来、九州本土内のセンダンをを用いた炭酸ガス吸収・固定のための優良個体選抜を行う場合、遺伝的変異の小さかった大淀川以外の地域での選抜は、比較的難しいと考えられる。しかし、九州本土と大きな遺伝的差異が認められた種子島と屋久島のセンダンは、九州本土の個体とは異なる炭酸ガス吸収・固定に関与する遺伝子資源を保有している可能性がある。このことから、これらの地域においては、地域内の遺伝的変異を詳細に解析していく必要があると考えられる。

今後は、九州内に分布するセンダンの炭酸ガス固定能について、地域内および地域間で成長量ならびにガス交換速度を調査し、遺伝的変異の結果と合わせて総合的に評価していくことが必要である。その後、炭酸ガス固定能に優れた個体を選抜できれば、組織培養の技術（家入・玉泉, 1995; 家入ら, 1996）により、優良個体の大量増殖を行うことで地球温暖化に対する一つの解決策につながるものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、九州大学造林学教室の高木正博氏には供試材料の採取に、また九州大学木本植物学教室の榎崎康二氏にはRAPD分析の際に多大なる協力をいただきました。ここに厚く謝意を表します。

引 用 文 献

- CHALMERS, K. J., WAUGH, R., SPRENT, J. I., SIMONS, A. J. and POWELL, W. (1992) : Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69 : 465-472
- 林 弥栄 (1969) : 有用樹木図説 林木編. 誠文堂新光社, 東京, 472pp.
- 家入龍二・玉泉幸一郎 (1994) : 広葉樹の萌芽特性. 日林九支研論 47 : 77-78
- 家入龍二・玉泉幸一郎 (1995) : 組織培養によるセンダン成木からの幼植物体再生. 日林九支研論 48 : 59-60
- 家入龍二・玉泉幸一郎・齋藤 明 (1996) : 組織培養によるセンダン成木からの幼植物体再生 (II) - 根を利用した増殖 -. 日林九支研論 49 : 59-60
- LEV-YADUN, S. and ALONI, R. (1993) : Bark structure and mode of canopy regeneration in trees of *Melia azedarach* L. *Trees* 7 : 144-147
- 宮田増男・生方正俊 (1994) : クロマツ天然林におけるアロザイム変異. 日林誌 76 : 445-455
- MOSSELER, A., EGGER, K. N. and HUGHES, G. A. (1992) : Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Can. J. For. Res.* 22 : 1332-1337

- MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. (1980) : Rapid isolation of high molecular weight plant. Nucl. Acid Res. 8 : 4321-4325
- NEI, M. and LI, W. H. (1979) : Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 5269-5273
- 大山莞爾 (1993) : 環境保全と炭酸ガス固定能の改良. 植物細胞工学 5 : 72-73
- 白石 進・渡辺敦史 (1995) : *rbc L* 遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. 日林誌 77 : 429-436
- 白石 進・磯田圭哉・渡辺敦史・河崎久男 (1996) : 蔵王山系馬ノ神岳に生存するカラマツの DNA 分類学的解析. 日林誌 78 : 175-182
- SNEATH, P. H. and SOKAL, R. R. (1973) : Numerical taxonomy. W. H. Freeman and Co., San Francisco, 573pp.
- 高木正博・玉泉幸一郎・家入龍二・齋藤 明 (1994) : 広葉樹種の成長量とガス交換速度との関係. 日林九支研論 47 : 119-120
- WILLIAMS, J. G., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. Nucl. Acid Res. 18 : 6531-6535
- 山下裕史・宮島淳二・福山宣高・久保園正昭・古閑清隆・大野和人 (1993) : 圃場における広葉樹の生育に関する研究 (I) - 早成樹種の検索 -. 日林九支研論 46 : 83-84

(1996年12月13日受付; 1997年1月27日受理)

Summary

Melia azedarach is an effective tree species for absorbing and fixing atmospheric carbon dioxide. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis were performed to reveal genetic variation and differentiation of *Melia azedarach* species within and among 6 populations in Kyushu area. As the result of primers screening, forty primers were selected. A total of 92 putative polymorphic loci was obtained. One of them identified, R-12/300bp, distinguished four Kyushu-mainland populations from two other populations, Tanega-shima and Yaku-shima islands. The other marker, T-20/650 bp, was not found in one population, Yaku-shima island. Tanega-shima island and Ooyodo-gawa river populations had more genetic variation within each population compared to others. Positive correlation was observed between the geographic and genetic distance among all *Melia azedarach* populations in this study, but was not observed within four Kyushu-mainland populations. The genetic differentiation were found between four Kyushu-mainland populations and other populations, Tanega-shima and Yaku-shima islands, based on genetic distances using UPGMA method.

Key words : *Melia azedarach* ; RAPD ; genetic diversity ; genetic variation among populations ; cluster analysis.