

RAPD 法を用いた稀少樹種ヤクタネゴヨウの天然生林分内の 遺伝的構造の分析

千吉良 治⁽¹⁾

Osamu Chigira⁽¹⁾

Analysis of the Spatial Genetic Structure of *Pinus armandii* var. *amamiana* in Natural Stands by RAPD Markers

要旨: ヤクタネゴヨウの効率的な遺伝資源の収集方法を明らかにするために、天然生林分内の遺伝的構造についてRAPDマーカーを用いて分析した。その結果、156m²～625m²程度の広がり度で遺伝的に近縁な個体が集中分布する構造の存在が示唆された。この遺伝的に近縁な個体が集中分布する構造の広がり度の推定値は種子の形態等から考えて、アイソザイムを用いて推定されたアスナロの家系の広がり度と比較して妥当なものであった。また、この推定値は本報告と同一林分内の個体別充実種子率と林分周囲の個体の胸高直径ならびに密度との関係の解析によって推定された近縁個体が集中分布する面積とほぼ同じであった。これらのことからヤクタネゴヨウのつぎ木用穂木の収集に際しては、個体間距離を14m程度あけることで互いに近縁な個体を収集する確率は少なく、遺伝変異を大きく減少させることなく収集できると考えられた。

1 はじめに

ヤクタネゴヨウ (*Pinus armandii* var. *amamiana*) は屋久島と種子島の上に天然分布し⁽¹⁾、環境庁の植物版レッドリストでは絶滅危惧IB類と位置づけられている。レッドリストにおける絶滅危惧IB類の定義からすれば、ヤクタネゴヨウは近い将来野生での絶滅の危険性が高いことになり⁽¹⁰⁾、緊急に保全対策を講じる必要性が指摘されている。

林木育種センター九州育種場は、ジーンバンク事業の一環として研究小課題「ヤクタネゴヨウの現地内外の保存に関する研究」を設け平成4年度からヤクタネゴヨウの保全及び保存に取り組んでいる。ところでヤクタネゴヨウの現地林分は急激な個体数の減少が指摘されているため、現地外での保存の必要が認められる。そこで九州育種場では効率的な遺伝資源収集方法を含めたヤクタネゴヨウの現地外保存技術の確立を急いでいる。遺伝資源を効率的に収集するには、事前に集団間や、集団内の個体間での遺伝的変異の量や分布の情報が必要であり⁽¹⁵⁾、生物多様性の保全の観点からも種内変異の維持に留意した現地外保存のための方策を立てる必要がある。

ヤクタネゴヨウは不連続的に分布しており、生殖的に隔離された複数の集団に区分することができる。現在確認されている範囲では屋久島で3集団が、種子島では100個体程度が散在することが知られている⁽²¹⁾。ヤクタネゴヨウの遺伝変異は、種子島に散在する個体を一つの集団とみなして屋久島の3集団とあわせた4集団間について報告

(1) 林木育種センター九州育種場

〒861-1102 熊本県菊池郡西合志町大字須屋2320

Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center

2320 Suya Nishigoshi, Kikuchi, Kumamoto 861-1102 Japan

されている^{9) 11)}。また、ヤクタネゴヨウは尾根筋に集中分布するが、同一集団内でも異なる尾根筋に生育する小集団間に遺伝的な差異があることが報告されている^{5) 6)}。しかし、アスナロ (*Thujopsis dolabrata*) やトドマツ (*Abies sachalinensis*) で行われているような家系分析^{13) 17)} によって林分内の遺伝的構造を調べた例はみあたらない。

ところで近年、分析試料の採取時期を選ばず、簡易に遺伝子型の多型が得られるRAPD法¹⁹⁾ が木本植物の分析に用いられ、天然林分内の遺伝的構造の解明¹⁸⁾ や樹種間の遺伝的距離の推定⁷⁾ などに用いられている。本報告では、遺伝資源の効率的な収集を行うために、既存の報告よりさらに小さい単位の遺伝的な構造を明らかにするために一つの尾根筋に分布する個体群の遺伝的構造をRAPD法により分析した。

2 材料と方法

供試した個体は屋久島の3集団の内の1つの集団の主な分布域である屋久島森林管理署管内破沙岳国有林48林班内の南向き斜面の尾根の一つに設けた100m×300mの矩形調査区内51個体である。

DNAの抽出は生葉150mgを用いCTAB法¹⁴⁾ を改良した手法で行った。RAPD分析におけるPCR (polymerase chain reaction) 反応組成液は、10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.2 μM プライマー, 0.63units/25 μl Taq DNA polymerase (TAKARA), ならびに25ng/25 μl 鋳型DNAである。温度条件は、94℃で2分30秒熱変性したのち、94℃・30秒 (変性), 36℃・30秒 (アニーリング), 72℃・1分 (伸長) を45回繰り返す、最後に72℃で2分の伸長を行った。なお、PCR反応にはASTEC社のPC800を用いた。PCR反応は、プライマー毎に同じPCR装置を用いて同時に全ての供試試料を増幅した。

増幅産物は1.2%のアガロースゲル中を100Vで1時間電気泳動し、エチジウムブロマイド染色し、UVトランスイルミネーター上で観察した。なお、ゲルの泳動スロット数は19個であったために1回のPCR反応で得られた増幅産物を泳動するためには複数のゲルが必要であった。そこで、ゲル間でのバンドの同定ミスを防ぐために、3個体分のPCR産物が、常にゲル間で重複するように電気泳動を行った。

検出した多型バンドのデータをもとに、Nei and Li¹⁶⁾ のF値を用い、次式により全ての個体間の遺伝距離 (D) を求めた。

$$D = 1 - F = 1 - 2 n_{xy} / (n_x + n_y)$$

n_{xy} : 比較する2個体 (X, Y) が共有しているバンド数

n_x : X個体が保有しているバンド数

n_y : Y個体が保有しているバンド数

さらに、調査区内を9.8m²～10,000m²の異なる6段階の大きさの面積の等しい方形区にそれぞれ分割し (この等面積の方形区をこれ以降メッシュと記述する)、各メッシュ内に含まれる個体を個体群とした (図1)。次に、全ての個体群内と個体群間の遺伝距離の平均値を算出し、6段階のメッシュの大きさ別に個体群内の平均値と個体群間の平均値を比較した。

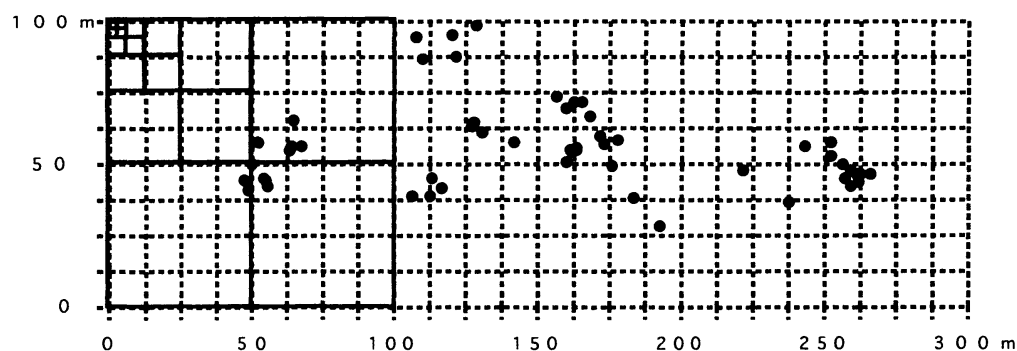
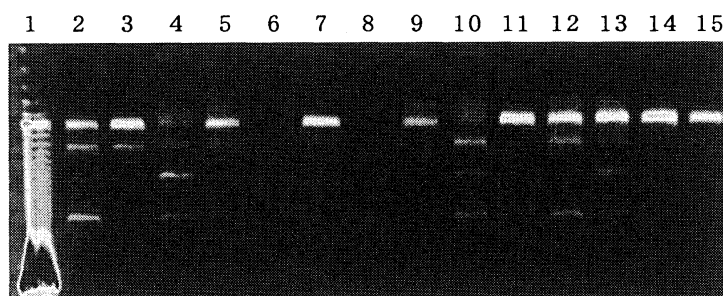


図1. RAPD 分析に用いた個体の林分内の配置図

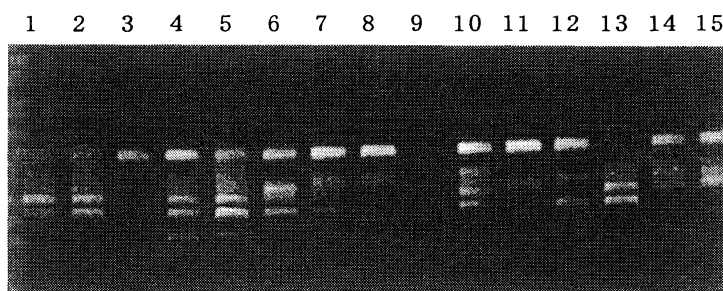
注：図中の実線はメッシュの大きさを表す

3 結果と考察

RAPD 分析の結果、6 種類のプライマーで合計27本の多型バンドが検出され(図2)、これを以後の解析に用いた。



1：サイズマーカー，2～4：泳動用コントロール，5・7・9～15：供試サンプル，
6・8：鋳型DNAの代わりに滅菌水を用いたコントロール



1～3：泳動用コントロール，4～8・10～15：供試サンプル，
9：鋳型DNAの代わりに滅菌水を用いたコントロール

図2. RAPD 分析によって得られた多型バンド

(使用したプライマーは，上：OPA-08，下：OPA-11)

個体間の遺伝距離は0.00～0.67の間にあり、総平均値は0.19であった。

個体群内及び個体群間の遺伝距離の平均値は、メッシュの大きさが39m²でそれぞれ最大値を示したが一定の傾向は認められなかった（図3）。

個体群内と個体群間の遺伝距離の平均値の関係はそれぞれ、メッシュの大きさが39m²までは個体群内＞個体群間、メッシュの大きさが156m²で個体群内＝個体群間、及びメッシュの大きさが625m²以上では個体群内＜個体群間であった（図3）。メッシュの大きさ毎の個体群内と個体群間の遺伝距離の平均値の比率はメッシュの大きさが9.8m²～156m²まで急激に増加し156m²でほぼ1を示し、それ以降緩やかに増加し、10,000m²で若干減少した（図4）。

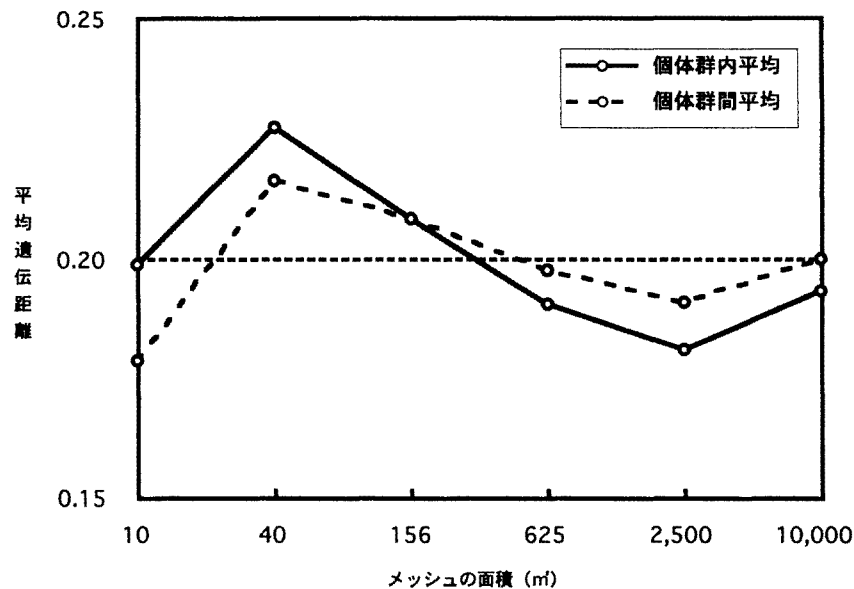


図3. メッシュの大きさ別の個体群間及び個体群内の平均遺伝距離

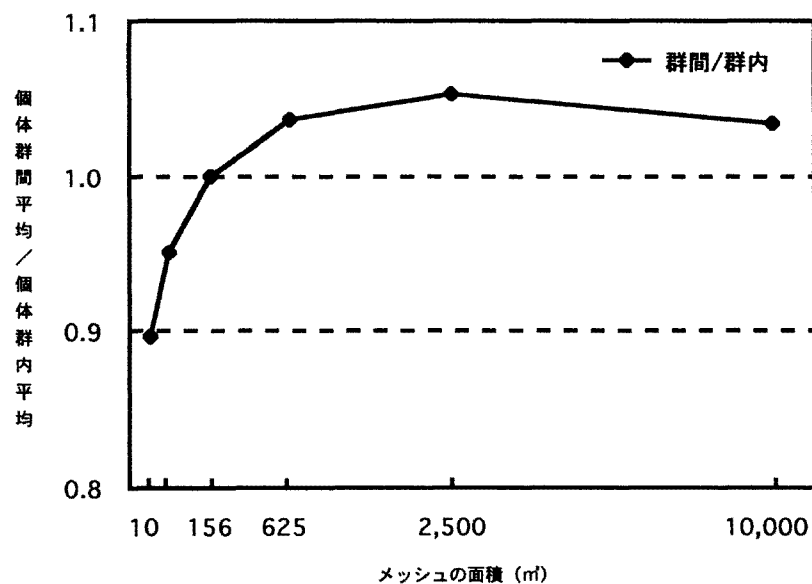


図4. メッシュの大きさ別の個体群間及び個体群内の平均遺伝距離比率

このことから調査区内において $156\text{m}^2 \sim 625\text{m}^2$ 程度の広さの遺伝的なパッチ構造が存在することが示唆された。渡辺ら¹⁸⁾ はアカシデの林分を RAPD 法を用いて分析し、個体群内と個体群間の遺伝距離の平均値を比較し、個体群間の遺伝距離が個体群内の遺伝距離に比べ大きいことから弱い家系構造を認めている。このように近縁個体が集中分布する家系構造はヤクタネゴヨウ以外でも、アスナロ¹⁷⁾、トドマツ¹³⁾ などの多くの針葉樹の天然林分でアイソザイム分析により確かめられている。

分析に用いたヤクタネゴヨウの林分で示唆された遺伝的構造の最小の広さと考えられる $156\text{m}^2 \sim 625\text{m}^2$ を、アイソザイム分析によって確認されているアスナロ¹⁷⁾ (400m^2) の家系の広がりと比較すると、アスナロの家系の広がりを含む値である。ところで、花粉の $1n$ に対し $2n$ の遺伝子を持つ種子の散布距離は遺伝的構造の広がりを決める重要な因子である²⁰⁾ が、アスナロ及びヤクタネゴヨウの種子の重量及び形態は以下に述べるとおりである。ヤクタネゴヨウの種子の重さは $145\text{g}/1,000$ 粒¹⁾ であり、アスナロの $4.2\text{g}/1,000$ 粒と比べ明らかに重い。またヤクタネゴヨウは種子に翼を持たないので種子の散布範囲はほとんどが樹冠下に集中するとされており⁸⁾、散布様式は重力散布といえる。一方、アスナロは翼をもつため¹²⁾、散布様式は風散布と考えられる。これらのことから、ヤクタネゴヨウの種子の散布範囲はアスナロに比べ狭いと考えられる。ところで、アスナロは種子による更新以外に伏条更新も行うために、種子のみで更新を行うヤクタネゴヨウとは更新様式は異なる。今回示唆されたヤクタネゴヨウの遺伝的構造の最少の広さは、他の方法で評価されたアスナロの家系構造の広さの推定値と大きく異なるものではなかった。

また、今回示唆された、ヤクタネゴヨウの遺伝的構造の最小の広さは、同一の林分内の 14 個体から採種した自然交雑種子の充実種子率と周囲の個体の胸高直径ならびに密度との関係の解析によって推定した近縁個体が集中する広さの値²⁾ とほぼ同様であった。つまり異なる 2 つの方法で示された遺伝的に近縁な個体が集中分布する構造の広さはお互いに矛盾するものではなかった。

河原ら¹¹⁾ および金谷⁹⁾ は集団間での遺伝的な差異を報告している。さらに、林^{5) 6)} はアイソザイムを用いた分析で、集団内の異なる尾根筋に生育する個体群間で遺伝的な分化を認めている。今回の分析ではさらに小さい範囲での遺伝的な構造が示された。

現地外保存では可能な限り多くの遺伝的変異を保存することが必要である。したがって、遺伝資源の収集は全個体を対象にすることが最も望ましいが、実際には様々な制約により不可能である。そのため、可能な作業量の中で遺伝的変異を効率的に収集する必要がある。一般に遺伝的な多様性の確保では実生が有利であるが、ヤクタネゴヨウは着果している個体の割合が低い⁹⁾ ため、現在は主につぎ木による収集保存を行っている。今回の分析から、近縁な個体が $156\text{m}^2 \sim 625\text{m}^2$ 程度の広がり分布していると考えられたことから、面積が 625m^2 の円の半径である 14m 程度の個体間距離を目安に採穂すれば、互いに近縁な個体を収集する確率は少なく、遺伝変異を大きく減少させることなく収集できると考えられる。

引用文献

- 1) 千吉良 治：(未発表)
- 2) 千吉良 治：(日林誌に投稿中)
- 3) 大日本山林会，本多静六原著：森林家必携<改訂新版>，731pp，林野弘済会，東京（1993）
- 4) 林 重佐・馬田英隆・高橋泰子：ヤクタネゴヨウマツの絶滅抑止に関する森林育種学的研究，鹿児島大演習林報，12，67-77（1984）
- 5) 林 重佐：ヤクタネゴヨウの遺伝的分化，(屋久島生物保護区の動態と管理に関する研究)，「環境科学」研究報告集，B335-R12-12，75-85（1985）
- 6) 林 重佐：ヤクタネゴヨウ（アマミゴヨウ）の保護と保存，林木の育種，147：11-13（1988）
- 7) 磯田圭哉・白石 進：RAPD法を用いたカラマツ属3種の分類，日林学会九州論集，47，103-104（1994）
- 8) 金谷整一・細山田三郎・玉泉幸一郎・斉藤 明：寺山自然研究教育施設におけるヤクタネゴヨウの種子散布，鹿大教育学部研究紀要自然科学編，49，95-104（1998）
- 9) 金谷整一：絶滅危惧種ヤクタネゴヨウの保全に関する研究，九州大学学位論文，245pp（1999）
- 10) 環境庁自然保護局野生生物課：植物版レッドリスト作成について，80pp，環境庁，東京（1997）
- 11) 河原孝行・金指あや子・吉丸博志・西村慶二：稀少植物ヤクタネゴヨウの遺伝的変異，日林学会講要，106，421（1995）
- 12) 北村四郎・村田 源：原色日本植物図鑑・木本編Ⅱ，545pp，保育社，大阪（1979）
- 13) 松浦 堯：トドマツ天然林の家系分析，北海道の林木育種，24，15-20（1981）
- 14) Murray,M.G. and Thompson,W.F.：Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, Nucleic Acids Res., 8, 4321-4325（1991）
- 15) 中島哲夫監修・櫛渕欽也：新しい植物育種技術，バイオテクノロジーの基礎として，507PP，養賢堂，東京（1991）
- 16) Nei,M. and Li,W.：Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, Proc.natl.acad.Sci., U.S.A., 76, 5267-5273（1979）
- 17) Sakai,K., Miyazaki,Y. and Matsuura,T.：Genetic studies in natural populations of forest trees I.Genetic variability on the enzymatic level in natural forests of *Thujaopsis dolabrata*, Silvae Genet., 20, 168-173（1971）
- 18) 渡辺敦史・白石 進・伊藤 哲：DNA分子マーカーを用いたアカシデ個体群における繁殖構造の解明，日林学会九州論集，48，89-92（1995）
- 19) Willams,J.G., Kubelik,A.R., Rafalski,J.A., Tingey,S.V.：DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucleic Acids Res., 18, 6531-6536（1990）
- 20) Wright,W.J.：Introduction to forest genetics, 463pp, Academic Press, New York（1976）
- 21) 山本千秋・明石孝輝：希少樹種ヤクタネゴヨウの分布と保全について（予報），日林学会講要，105，750（1994）

Analysis of the Spatial Genetic Structure of *Pinus armandii* var. *amamiana* in Natural Stands by RAPD Markers

Osamu Chigira⁽¹⁾

Summary : The genetic structure size of *Pinus armandii* var. *amamiana* in a natural stand was analyzed by using RAPD markers. Twenty seven bands produced by 6 primers were used to estimate genetic distance among 51 sample trees in a sample plot (100m × 300m). The plot was divided into same size of square (mesh). Average genetic distance between the mesh and that within the mesh were compared each six different size of mesh. The average genetic distance between the mesh was smaller than that within the mesh when the size of mesh was less than 156m², whereas it became greater immediately until the mesh size exceeded to 625m². Meanwhile average genetic distance between the mesh was larger than that within the mesh constantly when the size of mesh were larger than 625m². This indicates that closely related (genetically similar) trees were distributed in cluster with around 156m² to 625m² in size. This cluster size was well agreed with the genetic structure size, which estimated from multiple linear regression technique where filled seed rate of sample tree was explained by the population densities of surrounding trees in the plot. Thus the finding here suggests that the collecting propagation material for ex situ gene conservation should be conducted with spacing at least 14m for this species.

(1) Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
2320 Suya Nishigoshi, Kikuchi, Kumamoto 861-1102 Japan