

岩木山におけるミチノクコザクラの葉緑体ゲノム
trn L (UAA) 3' exon – trn F (GAA) 領域の遺伝変異

○澤田円・我妻尚広・岡本吉弘・森志郎
(酪農学園大学大学院)

キーワード：ミチノクコザクラ、遺伝的多様性、個体群保全

ミチノクコザクラ (*Primula cuneifolia* var. *heterodonta*) はサクラソウ科サクラソウ属の多年生草本で、青森県岩木山の固有種である (図 1)。ミチノクコザクラは環境省レッドリスト 2015 において、絶滅危惧Ⅱ類に分類されており、絶滅が危惧されている。固有種であるミチノクコザクラを保全するには岩木山の環境保全に努めるとともに、異なる場所で遺伝資源を保存しておく必要がある。その際、遺伝的多様性に配慮する必要がある。しかし、これまでの研究ではミチノクコザクラの地域的な遺伝的多様性の把握には至っていない。一方、ミチノクコザクラは北海道に自生するエゾコザクラの亜種で、形態上はハクサンコザクラと類似点が多くハクサンコザクラの変異内と位置づけられることもある。しかし、藤井ら (1995、1999) は系統地理学的な視点で亜種を含めたエゾコザクラの遺伝解析をした。その結果、岩木山のミチノクコザクラの葉緑体ゲノム *trn L (UAA) 3' exon – trn F (GAA)* 領域の塩基配列は大雪山周辺や日高山脈のエゾコザクラと同一であると報告し、ミチノクコザクラはエゾコザクラと近縁であることを示唆した。

そこで、本調査では岩木山におけるミチノクコザクラの葉緑体ゲノム *trn L (UAA) 3' exon – trn F (GAA)* 領域の遺伝変異の有無を調べ、遺伝的多様性の把握を試みた。加えて、ミチノクコザクラの分子系統学上の位置を検証した。

【材料および方法】材料は 2016 年 6 月 24 日に岩木山 (図 2) の 9 合目付近、鳳鳴ヒュッテから種蒔苗代までの登山道周辺に自生するミチノクコザクラとした。20 個体を選び、各個体から 1 枚の葉を採取、-80℃で保存した。SNET と Proteinase K を混合した溶液に浸漬させ、加温抽出した。抽出した DNA は Wizard SV Gel and PCR Clean Up System を用いて精製し、鋳型 DNA とした。この鋳型 DNA を用いて *trn L (UAA) 3' exon – trn F (GAA)* 領域 (表 1) を PCR 法により増幅した。増幅した PCR 産物はアガロースゲル電気泳動法にて分離した。精製後、Big Dye Terminator ver1.1 Cycle Sequencing KIT を用いてシーケンス反応を行い、ABI 310 Genetic Analyzer で塩基配列を決定し、MEGA4 で遺伝変異の有無を調べた。

【結果】本調査で採取したミチノクコザクラ 20 個体のうち 13 個体で塩基配列を決定することができた (表 2)。その結果、葉緑体ゲノム *trn L (UAA) 3' exon – trn F (GAA)* 領域には遺伝変異を確認することはできず、これらの塩基配列は藤井ら (1995、1999) の報告で示された塩基配列 (D85738) に一致した。

以上の結果、ミチノクコザクラの遺伝的多様性は低いことが明らかになった。また、ミチノクコザクラの分子系統学上の位置に関しては藤井らの報告を支持した。



図 1. ミチノクコザクラ

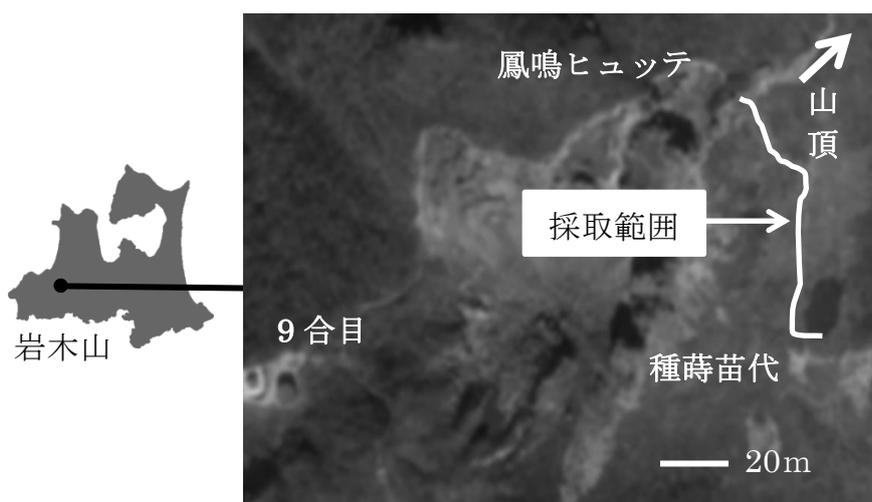


図 2. ミチノクコザクラの調査地

表 1. PCR に用いた葉緑体ゲノム領域とプライマー配列

領 域	プライマー配列 (5' → 3')
<i>trn</i> L (UAA) 3' exon	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC
<i>trn</i> F (GAA)	ATTTGAACTGGTGACACGAG

表 2. ミチノクコザクラの *trn* L (UAA) 3' exon – *trn* F (GAA) 領域の塩基配列

1	CTCCCTAACT	ATGTATCCTA	TCTATATCTT	TTTCGTTAGC
41	AGTTATAAAT	TAGGTATTTT	TCTGATTCAC	TTTACTATTT
81	GACAAATGGA	TCTGAACAGA	AATGCTTTCT	CTTATTATCA
121	GTTTTGCGGT	ATTATGCTAT	TTAATACATG	TACAAATGAA
161	CATCTTTGAG	CAAGAAATCC	CCGTGTGAAT	GATTTTCGGT
201	CCATATTATT	CGTACTGAAA	CTTACATAGT	TTTCCTTTTT
241	TTGAAAATCC	AAGAAATTAC	AGGGCCCTCA	GAAGACTTTA
281	ATAATACCTT	TTTGTTTTTT	AATTGACATA	GACTCAATTT
321	ATTGACATAG	ACTCACTAGT	AAAATGAGTA	GGATGTATCG
361	GGAGTGGTCG	GGATAGCTCA	GCTGGTAGAG	