

サゴヤシ (*Metroxylon* spp.) 乾燥小葉からの DNA抽出とRAPD分析

*江原 宏・小阪 幸子・服部 束穂¹・森田 脩
(三重大学生物資源学部・¹三重大学遺伝子実験施設)

DNA Extraction from Dried Leaflets of Sago Palm (*Metroxylon* spp.) for RAPD Analysis

Hiroshi EHARA, Sachiko KOSAKA, Tsukahō HATTORI¹ and Osamu MORITA
(Fac. Bioresources, Mie Univ., ¹Ctr. Mol. Biol. Genet., Mie Univ.)

サゴヤシ生育地では試料の凍結保存、凍結乾燥処理は極めて困難である。本研究では、RAPD分析に供する試料の保存方法を検討するため、サゴヤシ乾燥小葉からのDNA抽出とRAPD PCRを試みた。

材 料 と 方 法

インドネシアBengkalisで採取したSago Berduri (トゲサゴ) とMumai (ホンサゴ) の小葉を室温 (27℃) で乾燥した。一部は中肋を除き、長軸方向に細断後室温乾燥した。採取1, 2, 4週間後に粉碎し、一部は直ちに、残りは1, 2, 3週間後にISOPLANT (日本ジーン) でDNAを抽出した。対照にマレーシアBatu Pahatのホンサゴ実生 (有刺: BP-S, 無刺: BP-N) の生葉, Batu Pahat, インドネシアBogorで採取凍結保存したもの (BP, BG), Kairatu, Suli, Pokaで採取したトゲサゴTuni (Tn-K, Tn-S, Tn-P), Ihur: Ih, ホンサゴMolat: Mlの凍結乾燥試料を用いた。PCRは*Taq*ポリメラーゼ (Ampli*Taq* Gold: パーキンエルマー), プライマー (ATGACGACGG) を用いて、前報¹⁾の方法をホットスタートとして行った。

結 果 と 考 察

乾燥、細断乾燥試料のDNA収量は保存期間が異なっても有意差がなく、平均でSago Berduri 527, 582 $\mu\text{g/g}$, Mumai 335, 466 $\mu\text{g/g}$ であり、保存状態の別でも有意差はみられなかった (第1表)。対照試料の収量は32~646 $\mu\text{g/g}$ であり (第2表), 全試料での変異は51%と大きかったが、収量と個小葉の生重との間に正の相関関係 ($r=.89, P<.01$) が認められたことから、DNA収量は個体の生育ステージにより異なるものと考えられた。DNAのA260/280はSago Berduriの保存期間が異なるもので有意差がみられたが、一定の傾向はなく、保存状態の違いによる有意差がみられたのはMumaiの採取1週間後粉碎・3週間後抽出のみであった。また、個小葉の生重とA260/280の間には一定の関係は認められなかった。さらに、PCRの結果、変種間で多型を確認することができた (第1図)。以上から、室温乾燥した小葉からも比較的良好のDNAが抽出でき、RAPD PCRに供試できることが明らかになった。そして、試料採取後1ヶ月の間に分析を行うなら、保存方法は室温乾燥で十分であるものと考えられた。

第1表 乾燥小葉からのDNA収量

呼称	保存状態	1週間後粉碎		2週間後粉碎		4週間	F	
		抽出	1週間後抽出	3週間後抽出†	抽出	2週間後抽出†		後粉碎抽出†
----- DNA収量 ($\mu\text{g/g}$) ³⁾ -----								
Sago	室温乾燥 ¹⁾	339	439	640	292	859	591	1.43 ^{NS}
Berduri	細断後乾燥 ²⁾	484	388	676	644	773	545	0.40 ^{NS}
(4.79g)	平均	412	414	658	468	816	568	1.85 ^{NS}
	F			0.09 ^{NS}		0.66 ^{NS}	2.24 ^{NS}	
Mumai	室温乾燥	343	209	509	416	333	201	3.88 ^{NS}
(3.15g)	細断後乾燥	347	653	459	384	620	333	2.56 ^{NS}
	平均	345	431	485	401	477	267	1.78 ^{NS}
	F			0.32 ^{NS}		0.88 ^{NS}	1.48 ^{NS}	
----- A _{260/280} -----								
Sago	室温乾燥	1.82	1.92	1.60	1.76	1.53	1.65	8.68*
Berduri	細断後乾燥	1.86	1.73	1.51	1.63	1.70	1.60	2.73 ^{NS}
	平均	1.84	1.82	1.56	1.69	1.61	1.63	4.81**
	F			0.11 ^{NS}		1.13 ^{NS}	0.38 ^{NS}	
Mumai	室温乾燥	1.57	1.75	1.68	1.57	1.72	1.79	2.72 ^{NS}
	細断後乾燥	1.63	1.52	1.45	1.69	1.58	1.61	2.31 ^{NS}
	平均	1.60	1.63	1.57	1.63	1.65	1.70	2.02 ^{NS}
	F			53.21*		4.94 ^{NS}	0.75 ^{NS}	

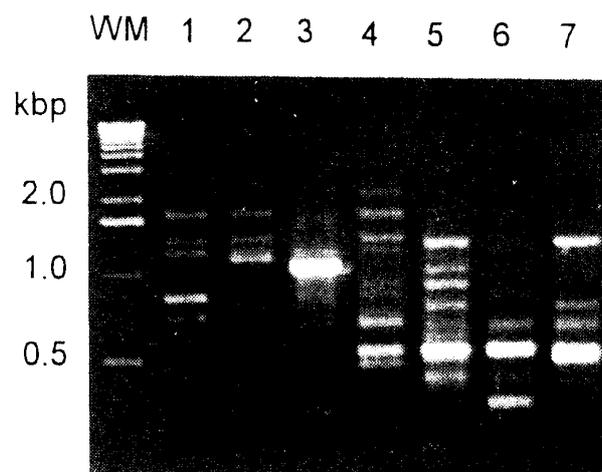
()内は個小葉生重。 †: 3反復の平均。 *, **: 5%, 1%で有意。

1) 室温(27°C)にて乾燥。 2) 細断後室温にて乾燥。 3) 乾燥小葉1g当りのDNA収量。

第2表 生葉、凍結および凍結乾燥試料からのDNA収量

試料	(個小葉生重)	DNA	A
		収量 ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	260/ 280
生葉 BP-S	(0.32g)	32	1.70
生葉 BP-N	(0.53g)	42	1.59
凍結 BP	(2.36g)	285	1.67
凍結 BG	(2.39g)	244	1.64
凍結乾燥 Tn-K	(4.38g)	537	1.42
凍結乾燥 Tn-S	(5.17g)	430	1.50
凍結乾燥 Tn-P	(5.02g)	534	1.56
凍結乾燥 Ih	(4.32g)	646	1.24
凍結乾燥 MI	(4.38g)	352	1.50

1) 乾燥小葉1g当りとしたDNA収量。



1:Tn-S, 2:Ih, 3:MI, 4:BG, 5:BP, 6:Sago Berduri, 7:Mumai

第1図 RAPD PCRの増幅産物

引用文献

1. 江原 宏・小阪幸子・服部東穂・森田 脩 1996 日作紀65 (別2): 285-286.