

RAPD 法によるケヤキのクローン識別

梁 守倫*、三浦 進、千木 容

1 緒 言

ケヤキは材が硬く、木目が美しいことから、昔から神社や仏閣などの建築材や家具材、椀木地として用いられてきた。特に心材の赤味が濃く、空が見られる大径木は銘木とされる。一方通直な樹幹に広い樹冠をもつ姿は美しく、街路樹や庭園樹として用いられる¹⁾。

広葉樹用材の資源の減少により、人工造林による広葉樹の資源増殖が各地で行われるようになり、ケヤキの多雪地帯における人工造林においても、大苗やぼう芽の活用により生育が可能であることが示された²⁾。

ケヤキの人工造林や緑化のニーズに対応した苗木を供給していくためには、目的に応じた優良形質品種の育種を行っていく必要がある。そのためにはクローンの識別法の確立と遺伝構成の解明など、遺伝資源に関する調査を進める必要がある。そこでケヤキのクローン識別法の確立を目的に、RAPD 法の検討を行った。

2 材料と方法

2.1 供試試料

異なる母樹から茎頂培養を経て養成した挿し木苗、5 個体³⁾の葉を試料とした。これらの個体は、外部形態や心材色から優良形質である可能性の高いものである。母樹の樹齢と所在地は次の通りである。3 K : 樹齢約400年、所在地福井県三方町、TD : 樹齢約120年、所在地石川県柳田村、KHJ : 樹齢推定350年、所在地金沢市、SM : 樹齢推定250年、所在地金沢市、FM : 樹齢推定400年、所在地金沢市。

2.2 全 DNA の抽出

採集した葉 (0.1g~0.2g) を乳鉢で凍結粉砕し、ISOPLANT II (ニッポンジーン) で全 DNA を単離した。

2.3 PCR の反応条件

反応液の量は15 μ l で組成は次の通り。20mM Tris(pH8.3), 50mM KCl, 2.0mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.4 μ M プライマー, 1.0unit *Taq* DNA ポリメラーゼ, 20ng 鋳型 DNA。プライマーは12塩基のオリゴヌクレオチド (ベックス) 15種類を使用した。

反応温度及び時間は次の通り。熱変性は最初に94 $^{\circ}$ C 5 分間行い、各サイクルで94 $^{\circ}$ C 1 分間行った。アニーリングは45 $^{\circ}$ C 1.5 分間行い、伸長反応は72 $^{\circ}$ C 1.5 分間行った。反応サイクルは35回とした。

2.4 DNA 多型の検出

PCR の増幅産物を2.0% アガロースゲルで電気泳動し、EtBr 染色により可視化した。鮮明で多型を示すバンドを RAPD マーカーに選定し、2 回の繰り返しにより再現性を確認した。

RAPD マーカーの有無により DNA 型を決定した。

3 結果と考察

3.1 全 DNA の単離

試料からの全 DNA の単離は、塩化ベンジル法による ISOPLANT II を用いて行った。単離された DNA 量は表 1 の通りであった。表中の収率は葉生重量 1 mg あたりの DNA 収量 (ng) を示した。ISOPLANT II を用いた全 DNA の単離法は、CTAB 法と比較して収率や純度は大差無いものの、多糖類やポリフェノールの除去が容易で、時

表 1 全 DNA の収率

試料番号	葉の生重量 (mg)	全 DNA 収量 (μ g)	収 率
3 K	240	17.40	72.5
K H J	190	18.48	97.3
T D	130	6.47	49.8
S M	110	26.73	243
F M	120	21.33	178

収率 = 全 DNA 収量 / 葉の生重量 \times 1000

*平成12年度石川県自治体職員協力交流研修員。現中国山西省林業科学研究院。

間の短縮に効果的であった。

試料間での収率の差は、葉の性状の違いが原因と考えられる。TDの葉は小さな若葉で水分が多かったことが、また3KやKHJは黄化葉であったことが、収率の低下につながったのであろう。

3.2 RAPDマーカーの検索

9種類のプライマー(表2)から16個のRAPDマーカーが得られた(表3)。このうち4マーカーは3Kに、1マーカーはTDに特異的な発現を示した。他のプライマーからもバンドは多数得られたが、今回の試料間で多型を示すものは無かった。

16個のRAPDマーカーで異なるクローンのDNA型が偶然一致し、同一クローンと誤認する危険率の最大値は、0.00281であった。

3.3 ケヤキのクローンの同定

16個のRAPDマーカーを用いて、5試料のDNA型の同定を行った(表4)。マーカーの獲得数は、KHJとSMが9個、3Kが8個、TDが4個、FMが3個であった。

3K、TD、FMの3試料は異なるDNA型に分類され、3クローンに識別された。またKHJとSMは同一のDNA型となった。

両者が同一のDNA型を示した原因は次の3つの可能性が考えられる。1. 両者が同一母樹由来の挿し木クローンであった。2. 同一母樹または遺伝的に近縁な母樹由来の実生苗であり、今回用いたRAPDマーカーでは分離ができなかった。

3. マーカーの識別能力が低く、偶然DNA型が一致した。

ケヤキは実生繁殖であり、挿し木も困難であることを考慮すると、クローンの可能性は小さいと考えられる。一方、両個体の採取地は市街地に存在する神社の境内で、両者の直線距離は400mである。天然散布の実生か植栽木か不明なため、両者がクローンであることを否定する歴史的根拠も無い。

また今回のマーカーの組み合わせでKHJとSMのDNA型を偶然に示す確率は0.00027で、マーカーは十分な識別能力を持つ。両者のDNA型が偶然一致したとは考えられないことから、KHJとSMがクローンあるいは遺伝的に非常に近縁な個体であることを示唆した結果と考えられる。

KHJとSMがクローンであるか否かは、今後RAPDマーカーの数を更に増やすと共に、神社周辺の個体を含めてマイクロサテライト等他の解析手法を組み合わせ、調査することにより結論を出したい。

4 まとめ

ケヤキのクローン識別を目的に、RAPD法をおこなった。15種類のプライマー中9種類のプライマーで多型が検出され、16個のRAPDマーカーが得られた。これらマーカーの危険率の最大値は、0.00281であった。

表2 プライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列 (5'-3')
A-12	CTCCTGCTGTTG
A-67	GGCGTGGTTGTA
A-89	GTCGGTTCGTGAA
B-19	GTCGACGCATCA
B-41	GACAGCGTCCTA
C-58	GGAAAGGAAGGC
D-01	TTCCAGCGGCTA
D-80	GGTGACGATGCA
Z-21	AGTTTCGGTCCAC

表3 RAPDマーカーの検出数

プライマー	A12	A67	B19	C58	D01	D80	Z21	A89B41	A12B19
マーカー数	3	2	1	1	2	2	2	2	1

表4 ケヤキのDNAタイピング

RAPDマーカー	試料名				
	3K	KHJ	TD	SM	FM
C58-350	+	-	-	-	-
D80-1100	-	+	-	+	-
D80-1800	+	+	+	+	-
D01-550	-	-	+	-	+
D01-700	+	-	-	-	+
A67-700	+	-	-	-	-
A67-900	-	+	-	+	-
A12-800	+	+	+	+	-
A12-1100	+	-	-	-	-
A12-1250	-	+	-	+	+
B19-1600	-	+	-	+	-
Z21-700	+	-	-	-	-
Z21-800	-	-	+	-	-
A89B41-500	-	+	-	+	-
A89B41-1000	+	+	-	+	-
A12B19-800	-	+	-	+	-

5 試料の DNA 型を同定した結果、3 K、TD、FM の 3 試料は異なる DNA 型に分類され、KHJ と SM は同一の DNA 型となった。KHJ と SM の DNA 型を偶然に示す危険率は 0.00027 であり、同一クローンあるいは遺伝的に非常に近縁な個体であることを示唆する結果と考えられる。従って今回用いた RAPD マーカーはケヤキの個体識別に有効なもの、遺伝的に非常に近縁な個体の識別には、更に RAPD マーカーの数を増やすか、

他の分析手法の導入が必要である。

5 参考文献

- 1) 橋詰隼人, 中田銀佐久, 新里孝和, 染郷正孝, 滝川貞夫, 内村悦三: “図説実用樹木学”, 朝倉書店, 東京, 1993, p83.
- 2) 小谷二郎: 石川県林試研報28, 15-20, (1996).
- 3) 千木 容: 石川県農林水産研究成果集報 2, 22-23, (2000).