

## RAPD法を用いた行者スギのクローン分析

九州大学農学部 戸川 拓也・白石 進  
富田 啓治・檜崎 康二  
林木育種センター九州育種場 千吉良 治

## 1. はじめに

福岡県朝倉郡小石原村大字小石原字宿平国国有林内に通称行者スギといわれる一群の老齢スギがある。行者スギの成立についてはあきらかではないが、鎌倉時代以降、筑前方面より英彦山に入山する修験者たちが、この地でミソギしたときに信仰上の理由から奉納植栽したものと伝えられている。なお植栽は直挿によって行われたとされている。

本研究では、DNA分子マーカーの一つであるRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法<sup>2,3)</sup>を用いて行者スギ37個体のクローン判定を行い、行者スギの成立の過程を再検討した。

## 2. 材料と方法

## (1) 材料

行者スギの中で最も老齢木とされる4個体(大王杉、靈験杉、境目杉、鬼杉)とその周辺のスギの一団から計37個体を使用した。

## (2) DNA抽出

DNAは針葉組織からCTAB法<sup>4)</sup>を改良して抽出しELU-QUIKにより精製した。

## (3) RAPD分析

RAPD分析はWilliamsらの方法に従って行った。PCR反応は、50mM Tris HCl, pH 8.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 500μg/ml BSA, 0.5mM dNTP, 2.0% (W/V) Ficoll 400, 4mM Tartrazine, 0.01mM EDTA, 0.4units/10μl *Tth* DNAPolymerase, 0.25μM プライマー, 10ng/10μl 鋳型DNAの溶液組成で、93°C・1分(熱変性), 93°C・10秒(変性) - 36°C・30秒(アニール) - 72°C・1分(伸長)を60サイクル, 72°C・2分(伸長)の条件で行った。使用したプライマーは9種類(A-08:GTGACGTAGG, A-11:CAATCGCCGT, B-13:TTCCCCCGCT, B-16:TTTGCCCGGA, O-02:ACGTAGCGTC, O-08:CCTCCAGTGT, S-04:

CACCCCTTG, Z-02: TGATCCCTGG, Z-04: GCCCTACGCG)である。

PCR増幅産物は1%アガロースゲル電気泳動を行った後、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。

表-1 胸高直径 (cm)

サンプルNo.	胸高直径	サンプルNo.	胸高直径
2	151.2	37	49.8
3	80.7	38	56.5
4	59.4	39	41.5
5	89.1	40	47.0
21	246.0	41	95.2
22	234.5	42	67.0
23	258.0	43	128.6
24	205.0	44	73.0
25	100.0	45	76.0
26	111.0	46	56.5
27	139.0	47	64.0
28	107.0	48	55.7
30	131.0	49	79.0
31	39.5	50	48.5
32	68.0	51	54.0
33	47.0	52	193.1
34	87.0	53	146.0
35	21.0	55	85.0
36	85.9		

## 3. 結果と考察

全37個体をまず5種類のプライマー(A-08, A-11, B-16, O-08, Z-04)を用いてRAPD分析を行った。この分析で得られたPCR産物(バンド)の中から6つのバンドを選びこれらのバンドの有無によって37個体のDNA型を決定した。37個体は20タイプのDNA型に分類された。12個体はそれぞれ独自の12タイプのDNA型を示し、それぞれ単独のクローンであることが明らかとなった。残りの8タイプ(表中A~H)については同一のDNA型を示す複数の個体が存在した。これらの複数からなるグループが同一クローンであるかを明らかにするため、8タイプ計25個体について全PCR

産物（バンドパターン）によるDNAフィンガープリント解析を行った（図-1）。使用したプライマーはZ-04, B-16, O-02, S-04, B-13, Z-02, A-11の6プライマーである。これらの分析の結果、最終的に表-2に示す4タイプ8個体が全てのプライマーで同一のバンドパターンを示し、同一クローンであると認められた。同一クローンと判定された個体は比較的近い位置に存在していた。34, 35は非常に近接しており、根が癒合していることから、同一個体であると思われる。また、老齢木である大王杉、笠験杉、境目杉、鬼杉はそれぞれ異なるクローンであることが明らかとなった。本研究では行者スギ37個体中、近隣な位地にある3グループ6個体が栄養繁殖されたものであることが半明したが、その数は予想よりはるかに少なく、残りの大多数は種子繁殖等の有性繁殖を経て成立したものであると思われる。

行者スギは直挿により植栽された林分であると伝えられてきた。しかし、今回、直挿が行われていた事をうかがわせる結果を得ることはできたが、それは例外とも言える規模であり、この通説は再考が必要があると思われる。

引用文献

- (1) MURRAY M.G., THOMPSON W.F.: Nucleic Acids Res., 8, 4321 - 4325, 1980
- (2) WELSH J., PETERSEN C., McCLELLAND M. : Nucleic Acids Res., 19, 303 - 306, 1991
- (3) WILLIAMS J. G. K., et al. : Nucleic Acids Res., 18, 6531 - 6535, 1990

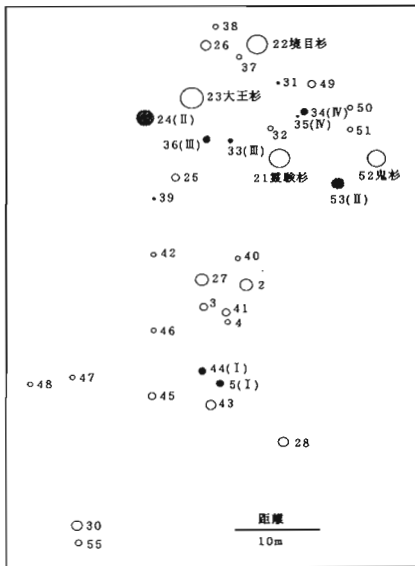


図-2 同一クローンと認められた個体間の位置関係

表-2 DNA型による分類

グループ	サンプルNo.	A-08-1	A-08-2	A-11	B-16	O-08	Z-04
	23	-	-	-	+	-	+
	47	-	-	+	+	-	+
	46	-	-	+	+	+	+
	52	-	+	-	-	-	+
	32	-	+	+	-	+	+
A	22	-	+	-	+	-	+
	24	-	+	-	+	-	+
	53	-	+	-	+	-	+
B	4	-	+	-	+	+	+
	5	-	+	-	+	+	+
	44	-	+	-	+	+	+
C	27	-	+	+	+	+	+
	40	-	+	+	+	+	+
	42	-	+	+	+	+	+
	45	-	+	+	+	+	+
	39	+	-	-	-	+	+
D	21	+	-	-	-	-	-
	2	+	-	-	+	-	+
	34	+	-	-	+	-	+
	35	+	-	-	+	-	+
	48	+	-	-	+	-	+
	50	+	-	-	+	-	+
E	38	+	-	+	+	+	+
	31	+	-	-	-	+	+
	3	+	-	+	+	+	+
	25	+	-	+	+	+	+
F	41	+	-	+	+	+	+
	33	+	+	+	-	-	+
	36	+	+	+	-	-	+
G	55	+	+	+	+	+	-
	30	+	+	-	+	-	+
	37	+	+	-	+	-	+
H	43	+	+	-	+	-	+
	26	+	+	+	+	-	+
	49	+	+	+	+	-	+
	51	+	+	-	+	+	+
	28	+	+	+	+	+	+

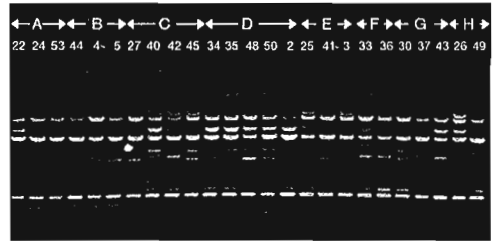


図-1 プライマーZ-04によるフィンガープリント

表-3 同一DNA型を示した個体

グループ	サンプルNo.	胸高直径 (cm)
I	5	89.1
	44	73.0
II	24	205.0
	53	146.0
III	33	47.0
	36	85.9
IV	34	87.0
	35	21.0