

速報

RAPD マーカーによる株立ち状ケヤキ巨木のクローン鑑定*¹管 蘭華*² · 白石 進*³ · 矢幡 久*⁴ · 伊東伴尾*⁵ · 梶原宏幸*⁵

管 蘭華・白石 進・矢幡 久・伊東伴尾・梶原宏幸：RAPD マーカーによる株立ち状ケヤキ巨木のクローン鑑定 九州森林研究 62：124-125, 2009 福岡銀行の創業130周年記念樹として植栽されたケヤキ巨木（推定樹齢370年）は株立ち状を呈し、24本の幹で構成されている。この株立ち状ケヤキが単一個体か複数個体の合体木であるか否かを検証するため、RAPD マーカーを用いてクローン鑑定を行った。個体識別に有効と思われる24プライマーを用いたRAPD 分析の結果、その配置を考慮して調査した9本の幹は全て同一 RAPD 型を示した。これらの結果から、この株立ち状巨木の24本の幹は極めて高い確率で単一個体と思われた。

キーワード：ケヤキ, 巨木, 株立ち, RAPD, クローン鑑定

I. はじめに

ケヤキ (*Zelkova serrata* (thunb.) Makino) はニレ科ケヤキ属の落葉高木である。日本では本州、四国、九州に分布している。ケヤキは大木（巨木）になるため、全国各地に天然記念物が存在している。

福岡銀行の創業130周年記念樹として新本部ビル（福岡市中央区大手門）に植栽されたケヤキ巨木（推定樹齢370年）は株立ち状を呈し、24本の幹で構成されている（図-1, 2）。このような株立ち状になったのは、2回の伐採による結果と推測されたが（図-3）、複数個体の合体木という可能性も否定できなかった。このような複数個体の合体木の場合、本来の個体とは異なる個体の存在が考えられるため、この株立ち状ケヤキのクローン性を検証する目的で、近年、個体識別やクローン鑑定に対し、その簡便性と有効性が広く認められている DNA 分析法の一つである RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法 (1-4, 6-8) を用いて調査した。

II. 材料と方法

DNA 分析試料の採取は、久留米市に植栽された移植前の個体から行った。一次株（図-3）の位置を考慮して、9本の幹を選び（図-2）、その冬芽を採取した。対照として、同所に植栽された実生4個体と九州大学農学部構内の実生3個体を用いた。冬芽からの全DNA単離は、改良CTAB法(5)を用いて行い、Magnesil (Promega) で精製して、PCRの鋳型DNAとした。PCR反応溶液組成(10 μ l)は、2.5mM MgCl₂, 0.2mM各dNTP, 0.5 μ Mプライマー, 0.025U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 1X PCR buffer (Invitrogen), 20ng鋳型DNAである。PCR反応は、サーマルサイクラー (Biometra T1) を用いて行った。増幅は、はじめに94 $^{\circ}$ C 1分間の変性処理を行った後、

94 $^{\circ}$ C 30秒(変性)・37 $^{\circ}$ C 30秒 (アニーリング)・72 $^{\circ}$ C 60秒 (伸長) の3行程を40サイクル、最後に72 $^{\circ}$ C 120秒の伸長を行った。PCR産物を1.2%アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色し、トランスイルミネータ上でRAPD型を観察した。

RAPD分析に用いたプライマーは、Operon社の144種類のプライマー(10塩基)である。調査木からの4サンプルと対照個体の4サンプル、計8サンプルを用い、144種類のプライマーのスクリーニングを行った。



図-1. 移植前の調査対象木

*1 Guan, L.H., Shiraishi, S., Yahata, H., Ito, T. and Kajiwaru, H.: Clone analysis of an old multi-forked *zelkova* using RAPD makers.

*2 九州大学大学院生物資源環境科学府 Grad. Sch. Biores. and Bioenvir. Sci., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

*3 九州大学大学院農学院 Fac. Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

*4 九州大学熱帯農学研究センター Inst. Tropical Agric., Kyushu Univ., Fukuoka 812-8581

*5 内山緑地建設株式会社 Uchiyama Landscape Construction Co., LTD, Fukuoka 812-0012

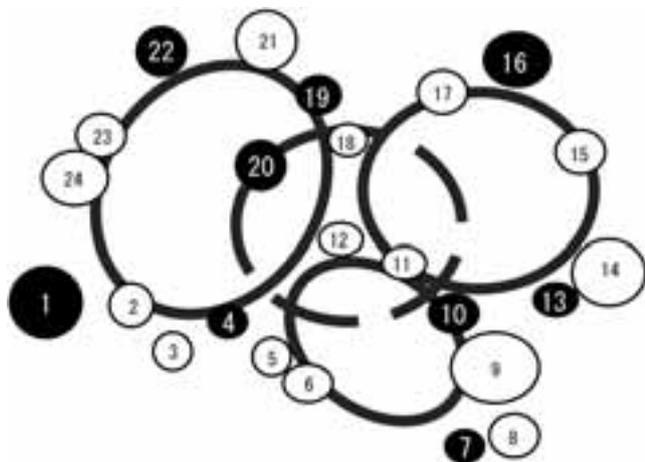


図-2. 根元付近の断面模式図 (伊東・梶原, 未発表)

1-24: 幹番号; ●: 調査幹
破線の円は, 推測された単幹の位置
実線の円は, 推測された一次株の位置



図-3. 株立ち状ケヤキ巨木の成立過程 (伊東・梶原, 未発表)

Ⅲ. 結果と考察

使用プライマーのスクリーニング結果をもとに, 増幅がよく, 再現性が高く, かつ個体間変異が認められた24プライマーを選んだ(表-1)。これらのクローン分析に有効と評価されたプライマーを用い, 調査木の9サンプルと対照個体の7サンプルのRAPD分析を行った。なお, 調査木の保有マーカー数は133マーカーであった(表-1)。

RAPD分析結果の一部を図-4に示した。分析した24プライマーにおいて, 実生由来の対照7個体(図-4, 10~16)では個体間でRAPD型に違いが認められたのに対し, 調査木の9サンプル(図-4, 1~9)間では差異が認められず, 全サンプルが同一RAPD型を示した。これらの結果から, 株立ち状ケヤキから採取した9サンプルは極めて高い確率で同一個体由来である。また, この巨木を構成している24本の幹は, 9サンプルの採取位置(図-2)を考慮すると, 全て単一個体由来である可能性が高い。さらに, 今回使用したプライマー等の情報は, ケヤキの天然記念物や巨木などの遺伝資源を取り扱う際の基礎情報として利用可能である。

表-1. 24プライマーの塩基配列(5'→3')ならびに使用したマーカー数

Primer	塩基配列	マーカー数	Primer	塩基配列	マーカー数
OPA04	AATCGGGCTG	5	OPE16	GGTACTGTG	7
OPA07	GAAACGGGTG	6	OPF14	TGCTGCAGGT	4
OPA09	GGGTAACGCC	7	OPF18	TTCCCGGGTT	3
OPA13	CAGCACCCAC	5	OPG03	GAGCCCTCCA	6
OPA16	AGCCACGGAA	2	OPG05	CTGAGACGGA	7
OPB08	GTCCACACGG	6	OPG08	TCACGTCCAC	7
OPC02	GTGAGGCGTC	6	OPG16	AGCGTCTCC	7
OPC19	GTTGCCAGCC	7	OPH04	GGAAGTCGCC	4
OPD08	GTGTGCCCCA	7	OPQ06	GAGCGCCTTG	8
OPD11	AGCGCCATTG	6	OPT07	GGCAGGCTGT	7
OPE13	CCCGATTCGG	3	OPU06	ACCTTTGCGG	5
OPE15	ACGCACAACC	4	OPV14	AGATCCCGCC	4

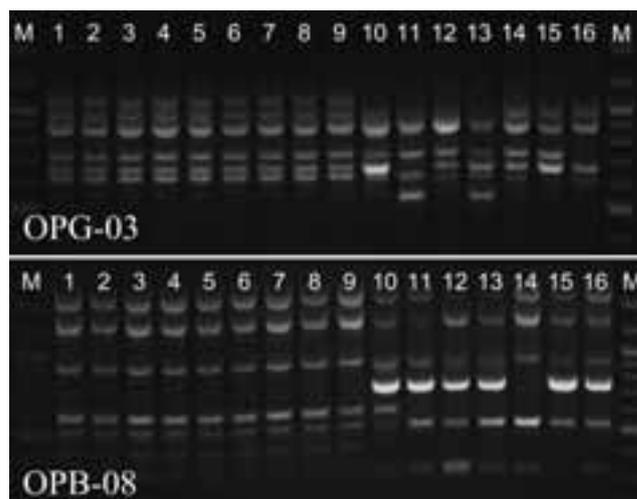


図-4. プライマー OPG-03と OPB-08による RAPD 分析の結果
M, 100bp ラダー; 1~9: 調査木; 10~16: 対照個体

引用文献

- (1) 後藤晋ほか (1997) 日林誌 79 : 229-233.
- (2) 家入龍二・宮島淳二 (2000) 日林誌 82 : 98-100.
- (3) 西山和美ほか (2002) 日林誌 84 : 262-266.
- (4) 梁守倫ほか (2001) 石川県林試研報 32 : 19-21.
- (5) 白石進・渡辺敦史 (1995) 日林誌 77 : 429-436.
- (6) 高橋大輔・千木容 (2004) 石川県林試研報 36 : 17-20.
- (7) Williams, J.G.K. et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.
- (8) 張変香ほか (2004) 九州森林研究 57 : 219-220.

(2008年12月6日受付; 2009年1月23日受理)