

RAPDマーカーを用いた九州地方のスギさし木品種の 分類

高田, 克彦
九州大学農学部林産学科

白石, 進
九州大学農学部林産学科

<https://doi.org/10.15017/10923>

出版情報：九州大学農学部演習林報告. 75, pp.1-14, 1996-12-26. 九州大学農学部附属演習林
バージョン：
権利関係：

RAPD マーカーを用いた九州地方のスギさし木品種の分類*

高田 克彦**・白石 進**

抄 録

九州地方のスギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) さし木品種を対象に, RAPD マーカーを利用して決定される DNA 型 (DNA type) に基づいた分類・同定を行った. 本研究の目的は, 1) 遺伝情報の本体であるゲノムを直接分析することによる正確な品種の分類法を確立し, 2) 各品種内の構成クローン数を明らかにすると共に, 3) 得られた遺伝情報を基に各々のさし木品種を代表する基本遺伝子型個体 (或いは個体群) を指定することである. 実験に用いたさし木品種は九州 4 県 (福岡, 大分, 宮崎, 鹿児島) の公立の試験研究機関に育種母材料として集積されている 84 品種で, 総供試個体数は 549 個体である. RAPD プライマーのスクリーニングの結果, 4 種類のプライマーから増幅効率が良くかつ再現性が高い 7 本の増幅産物 (特定バンド) が確認された. これらの特定バンドを用いて分類した結果, 全供試個体は 36 の DNA 型に分類された. さらに, 同一さし木品種で同じ DNA 型に含まれた個体群に対して, 6 種類のプライマーを用いた DNA フィンガープリント法によってクローン同定を行った. その結果, 今回供試した 84 さし木品種のうち, 53 品種がモノクローン品種であり, 31 品種が複合クローン品種であった. また, モノクローン品種の 53 品種と一部の複合クローン品種について基本遺伝子型個体の指定を試みた.

キーワード: さし木品種, スギ, RAPD, DNA 型, クローン同定

1. はじめに

スギ (*Cryptomeria japonica* D. Don) は我が国を代表する針葉樹の一つであり, 広く日本全国各地に植栽されている. 平成 6 年のデータによれば, わが国の針葉樹丸太生産量 19,090,000 m³ の約 50% にあたる 9,451,000 m³ をスギが占めており, その内の約 97%, 9,134,000 m³ が製材用丸太として生産されている (林業白書, 1996). このように, スギは非常に大きな木材供給能力を有しているにもかかわらず, 木材工業側からの期待はその供給能力に見合うほど大きいものではないのが現状である. この原因の一つに, 工業原材料としての品質の「不均一性」が指摘できる. この「不均一性」の原因の大部分は, 植栽される種苗の遺伝的不均一性に起因するものと考えられ, その克服が強く望まれている.

一般に, スギには 2 種類の品種が存在することが知られている. すなわち, 特定の地域の気候条件や土地条件による自然淘汰作用によって天然に成立した「地域品種 (天然品種)」と, 育成林業の結果として成立した「栽培品種」である. 前者には, 「秋田スギ」, 「吉野ス

* TAKATA, K. and SHIRAISHI, S. : Discrimination of Japanese Cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) Cutting Cultivars in Kyushu Region with RAPD Markers.

** 九州大学農学部林産学科

Department of Forest Products, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81

ギ」,「屋久スギ」等が含まれ,後者には「サンブスギ」,「ボカスギ」,「ホンスギ」,「オビスギ」等が含まれるが,これらの「栽培品種」のほとんどすべては複数個体或いは単一個体からさし木によって増殖された分生個体群,すなわち「さし木品種」と考えられている(宮島,1989).

九州地域におけるスギさし木造林は長い歴史をもっており,現在では各地に数多くの「さし木品種」が成立している.その中には,成長の速さや病虫害に対する抵抗性などで優れた性質を持ち,現在でも優良造林品種として高く評価されているものも少なくない.一般に「さし木品種」は,成立の歴史が古い「在来品種」と比較的近年に各地の林業地域で成立した「育成品種」に大別できる.しかしながら,これらの中には同名異品種或いは異名同品種のものもあるとされ,正確な「さし木品種」の分類及びそのクローン構成の把握は今後の造林事業を考える上で重要な課題の一つといえる.

スギ「さし木品種」の分類には,従来,針葉の形態的特徴の他,枝条,樹皮及び樹幹の形態的特徴,さし木の発根性,結実性,成長型などの諸特性が用いられてきた(石崎,1965;宮島,1989).しかしながら,これらの諸特性は同一の「さし木品種」においても植栽環境或いは樹齡による変異が認められることから,正確な識別・分類には限界があった.また近年では,アイソザイムマーカーを用いた「さし木品種」の分類及びクローン分析が試みられてきている(奥泉・大庭,1990;Okuizumi,1993a;1993b).その結果,品種の識別・分類の正確性は形態形質によるそれに比べ格段に向上した.しかしながら,9酵素種,12遺伝子座の遺伝子型情報を利用しても,同一遺伝子型を有する品種が多数出現する(Okuizumi,1993b)など,遺伝子マーカーとしての能力不足から完全な品種識別法を確立するには至っていない.アイソザイム手法においても,原理的には,酵素種数を増すことにより識別能力を向上させることは可能であるが,針葉中に含まれる多量のフェノール様物質,樹脂成分等が酵素活性を失活させることから,新たな酵素種の検出は難しい状況にある.

一方,近年のDNA分析技術のめざましい進歩によって,遺伝情報の本体であるゲノムを直接解析することが可能となった.1990年に発表されたRAPD(random amplified polymorphic DNA)法は,きわめて簡便な実験によりゲノム中の変異を検出することを可能にした(Welsh and McClelland,1990;Williams *et al.*,1990).すなわち,ポリメラーゼ連鎖反応(PCR,polymerase chain reaction)によって増幅されたDNAフラグメントは,エチジウムブロマイド染色によって容易に検出が可能であり,遺伝子型間で検出される多型はゲノムの遺伝的差異を直接反映すると考えられる.また,ランダムプライマーの塩基配列を変えることにより,マーカーとなる遺伝子数も容易に増やすことが可能である.RAPD法を植物の品種識別及びクローン同定に用いた例としては,Wilde *et al.*(1992),Howell *et al.*(1994),Mailer *et al.*(1994),Schnell *et al.*(1995)等があり,林木に対してはKiel and Griffin(1994),Wilhelmina and McNicol(1995)によって試みられている.

以上のような見地から,筆者らはDNA分析技術の一つであるRAPD法を利用して決定されるDNA型(DNA type)に基づく新しい「さし木品種」の分類・同定システムの確立を進めている.本研究では,現在までに明らかになった九州地域の「さし木品種」に関するDNA型のデータを整理すると共に,それらを基に「さし木品種」の基本遺伝子型個体(或いは個体群)の指定を試みたので報告する.

2. 材料と方法

2.1. 材 料

実験は、九州地域各地に成立している 84 品種について行った。供試木は福岡、大分、宮崎、鹿児島各県の公立の林業試験場に育種母材として或いは見本林として保存されている個体を用いた。総供試木本数は 549 本である。供試木の概要を表 1 に示す。

2.2. DNA の抽出

DNA の抽出は当年葉を使用し、CTAB 法 (Murray and Thompson, 1980) を改良して行った (白石・渡辺, 1995)。針葉約 150mg を乳鉢を用いて液体窒素中で摩砕した後、1 ml の抽出用緩衝液 (100mM Tris-HCl, pH9.0, 2% CTAB (hexadecyl trimethylammonium bromide), 2% PVP (polyvinyl pyrrolidone), 0.1% β -メルカプトエタノール, 1.4M NaCl, 20mM EDTA) を加え、65°C で 1 時間インキュベートした。これに等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液 (24:1) を加え、20 分間穏やかに混和した後、12,000 $\times g$ (室温) で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。この溶液に、再度等量のクロロホルム/イソアミルアルコール混合液を加え、上記の操作を繰り返した。得られた溶液に等量のイソプロパノールを加えた後、16,000 $\times g$ (室温) で 5 分間遠心し、上清を除去した後、70% エタノールを加え、再度遠心して DNA を集めた。70% エタノールをできる限り除去した後、遠心式エバポレータを用いて 2 分間減圧乾燥した。得られた DNA ペレットは滅菌した純水 (300 μ l) で溶解し、以下の分析に用いた。なお、得られた DNA 溶液の純度が低い場合には、ELU-QUIK™ DNA 精製キット (米国 Schleicher & Schuell 社) を用いて精製した。

2.3. PCR conditions (DNA amplification)

RAPD 分析は、Williams *et al.* (1990) の方法に従った。PCR (polymerase chain reaction) は、50mM Tris-HCl, pH8.5, 5mM MgCl₂, 500 μ g/ml BSA, 0.5mM dNTP, 2.0% (W/V) Ficoll, 4mM Tartrazine, 0.1mM EDTA, 0.4units/10 μ g *Tth* DNA polymerase, 0.25 μ M プライマー, 10ng/10 μ l 鋳型 DNA の反応溶液を用いて、94°C で 1 分間熱変性した後、94°C 10 秒 (変性) —36°C 30 秒 (アニーリング) —72°C 1 分 (伸長) を 1 サイクルとし、これを 60 回繰り返し、最後に 72°C 2 分間の伸長を行った。PCR 増幅産物は 1% アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後、UV トランスイルミネーター上で観察した。

2.4. 分析方法

本研究では、以下に示すような 2 段階の分析方法を用いた。

(1) 特定バンドによる分類

RAPD 分析に先立ち、プライマーのスクリーニングを行った。その結果、4 種類のプライマーから極めて増幅効率が良くかつ再現性が高い 7 本の増幅産物 (特定バンド) を得た (図 1)。そこでこれらの特定バンドの有無から各供試個体の DNA 型 (DNA type) を決定

表1 本研究に用いた「さし木品種」の県別供試木本数
Table 1 Number of cutting cultivars used in this study.

	福岡	大分	宮崎	鹿児島	計	福岡	大分	宮崎	鹿児島	計	
1. アオシマアラカワ	—	—	5	—	5	43. チリメントサ	—	—	5	—	5
2. アオスギ	—	9	5	—	14	44. ツエスギ	8	—	—	—	8
3. アオバ	2	—	—	—	2	45. テイゾウアオバ	1	—	—	—	1
4. アカバ	6	—	—	—	6	46. トサアカ	—	—	5	—	5
5. アヤスギ	—	16	5	8	29	47. トサグロ	—	—	5	—	5
6. アラカワ	3	—	4	—	7	48. ナガエダ	5	—	—	—	5
7. イズミスギ	—	1	—	—	1	49. ナカマ	8	—	5	—	13
8. イタシチ	6	—	—	—	6	50. ナカムラ	5	—	—	—	5
9. イッポンスギ	—	—	—	10	10	51. ニンジンバ	4	—	—	—	4
10. イナズマ	5	—	—	—	5	52. ハアラ	—	—	5	—	5
11. イボアカ	—	—	5	—	5	53. ハライガワ	3	—	5	4	12
12. イワオ	2	—	—	—	2	54. ハングロ	—	—	5	—	5
13. ウラセバル	5	1	1	5	12	55. ヒキ	—	—	5	—	5
14. エダナガ	—	—	5	—	5	56. ヒコサン	1	—	—	—	1
15. オトヘイ	2	—	—	—	2	57. ヒタアカスギ	—	1	—	—	1
16. オドリスギ	—	—	5	9	14	58. ヒダリマキ	—	—	4	—	4
17. オビアカ	3	—	4	7	14	59. ヒノデ	2	1	—	—	3
18. カゾウ	4	—	—	—	4	60. フネサコ	4	—	—	—	4
19. カミスギ	8	—	—	—	8	61. ホッシンアオバ	2	—	—	—	2
20. カラツキ	—	—	5	—	5	62. ホンコウスギ	—	1	—	—	1
21. ガリン	—	—	5	—	5	63. ホンスギ	11	1	—	—	12
22. カワシマ	4	—	—	—	4	64. マタサン	7	—	—	—	7
23. キウラ	6	—	4	—	10	65. マツコガスギ	—	1	—	—	1
24. キジン	4	—	5	10	19	66. ミゾロギ	—	—	5	—	5
25. キナバ	4	—	—	—	4	67. メアサ	14	—	5	20	39
26. クマント	3	1	—	—	4	68. モトエスギ	—	2	—	—	2
27. クモトオシ	4	—	5	2	11	69. ヤイチ	6	—	5	—	11
28. クラキスギ	—	1	—	—	1	70. ヤクシドウ	3	—	—	—	3
29. クロ	—	—	5	—	5	71. ヤクノシマ	3	—	—	—	3
30. クロアヤ	—	1	—	—	1	72. ヤブクグリ	4	21	5	6	36
31. ゲンベエ	—	—	5	—	5	73. ヤベシチ	1	—	—	—	1
32. コガボ	5	—	—	—	5	74. ヤマグチ	4	—	5	—	9
33. コバノウラセバル	4	—	—	—	4	75. ヤマダスギ	—	—	—	5	5
34. サカモトスギ	—	1	—	—	1	76. ヤマトスギ	—	—	—	8	8
35. ジオンスギ	—	1	—	—	1	77. ヤマノカミスギ	—	—	—	4	4
36. シチゾウボ	1	—	5	—	6	78. ユウヤケ	—	1	—	—	1
37. シママスギ	—	—	—	13	13	79. ヨシダスギ	—	—	—	5	5
38. シャカイン	2	—	5	—	7	80. リュウスギ	2	—	—	—	2
39. ゼンダ	7	—	—	—	7	81. リュウノヒゲ	—	5	—	—	5
40. タケノサコスギ	—	1	—	—	1	82. リョウクロウアオバ	4	—	—	—	4
41. タノアカ	—	—	5	—	5	83. ワカスギ	—	1	—	—	1
42. チョウスギ	—	3	—	—	3	84. ワカツ	13	—	—	—	13

した。特定バンドの選抜基準は次の三点とした。すなわち、1) UVトランスイルミネーター上で強い吸収が認められること、2) 近傍に読み間違いの原因となる増幅産物がないこと、3) 少なくとも3回以上の異なるPCR反応において再現性があること、の三点である。表2に特定バンドによる分類に用いたプライマーを示す。

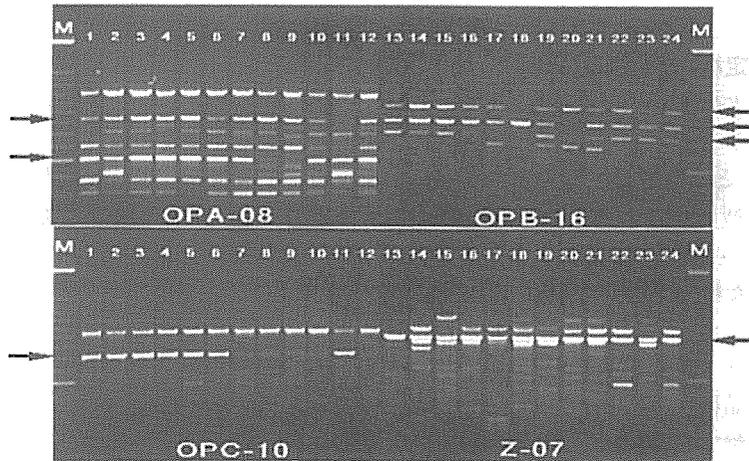


Fig. 1 Specific bands utilized in claddification of DNA types.
図1 DNA 型の分類に用いた特定バンド

表2 特定バンドによる分類に用いた RAPD プライマー
Table 2 RAPD primers utilized in specific band analysis.

プライマー	シーケンス	特定バンド数 (分子量)	GC 含量 (%)
OPA-08*	GTGACGTAGG	2 (610, 910)	60
OPB-16*	TTTGCCCGGA	3 (810, 910, 1020)	60
OPC-10*	TGTCTGGGTG	1 (800)	60
Z-07	ACGTAGCGTC	1 (940)	60

*Operon primer

表3 DNA フィンガープリントに用いられる RAPD プライマー
Table 2 RAPD primers utilized in DNA finger printing.

プライマー	シーケンス	GC 含量 (%)
OPA-08*	GTGACGTAGG	60
OPA-11*	CAATCGCCGT	60
OPN-19*	GTCCGTACTG	60
OPO-08*	CCTCCAGTGT	60
OPS-04*	CACCCCTTG	70
Z-01	CCACCGCCAG	80

*Operon primer

(2) DNA フィンガープリント

同一 DNA 型を示した個体群に対して、RAPD 分析によって得られる全情報を利用した DNA フィンガープリント法によるクローン同定を行った。DNA フィンガープリント法に用いたプライマーを表 3 に示す。

3. 結 果

3.1. 特定バンドによる分類

特定バンドによる分類結果を表 4 に示す。表中、特定バンドはプライマー名と分子量 (base pairs) を用いて表し (例えば, A08-600), バンドのあるものは {1}, バンドのないものは {0} として標記した。特定バンドによる分類の結果, 84 「さし木品種」, 549 個体は 36 の DNA 型に分割された。本実験で用いた「さし木品種」の平均 DNA 型数は 1.5 であった。供試 84 品種中, 55 品種はそれぞれ単一の DNA 型個体で構成されていた。なお, ここで確認された単一 DNA 型品種には, 供試サンプルが 1 個体にすぎない「さし木品種」も 13 品種含まれており, これらの「さし木品種」については今後サンプルを増やして品種を構成するクローン数を再度確認する必要がある。一方, 複数の DNA 型の個体で構成されていた「さし木品種」は 29 品種であった。この複合 DNA 型品種の数は全供試品種の 35% にあたる。本実験で供試した「さし木品種」の中で最も多くの DNA 型が検出された品種は鹿児島県のハライガワで, 5 タイプの DNA 型が確認された。また, 宮崎県のアラカワ (キタゴウアラカワ), 福岡県のキウラ, 鹿児島県のメアサにおいてそれぞれ 4 タイプの DNA 型が確認された。図 2 にハライガワ 12 個体の RAPD 分析の結果を示す。図中, レーン番号 1 から 12 まではプライマー OPO-08, 13 から 24 までは Z-01 を用いた泳動像である。テンプレート DNA のオーダーは両プライマーで同じである。1 から 12 までのレーン番号を使ってハライガワで確認された 5 タイプの DNA 型の個体を表すと, type I : 1, type II : 2, 3, type III : 4, 5, 7, type IV : 6, type V : 8, 9, 10, 11, 12 である。

同一 DNA 型に含まれる最大品種数は, DNA 型 No. 33. (1111011) における 15 品種で, 以下, 含まれる品種数が多かった DNA 型とその品種数は, DNA 型 No. 13. (0111011) における 14 品種, DNA 型 No. 20. (1011011) における 9 品種であった。ここで, それぞれの DNA 型に含まれる品種に地域的な偏りは認められなかった。一方, 含まれる品種数が 1 品

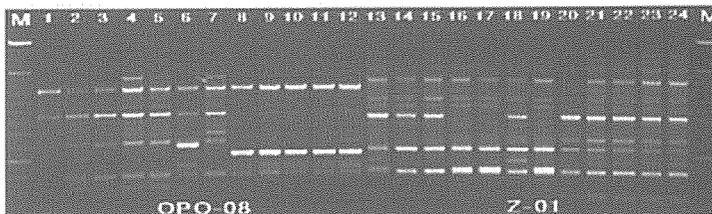


Fig. 2 Five genotypes in Haraigawa cutting cultivar.

図 2 ハライガワで確認された 5 タイプの遺伝子型個体
 Type I : 1 (13), Type II : 2, 3 (14, 15), Type III : 4, 5, 7 (16, 17, 19)
 Type IV : 6 (18), Type V : 8, 9, 10, 11, 12 (20, 21, 22, 23, 24)

表4 7 特定バンドによって決定された 84 品種の DNA 型
 Table 4 DNA types detected at 7 specific bands in 84 cutting cultivars.

DNA 型	アラカワ							カ																										
	A 08-600	A 08-900	B 16-810	B 16-910	B 16-1100	C 10-800	Z 07-940	アオシマ	アオスギ	アオバ	アカバ	アヤスギ	アラカワ	イズミスギ	イタシチ	イッポンスギ	イナズマ	イボアカ	イワオ	ウラセバル	エダナガ	オトヘイ	オドリスギ	オビアカ	カゾウ	カミスギ	カラツキ	ガリン	カワシマ	キウウラ	キジン	キナバ		
1.	0	0	0	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	
2.	0	0	1	0	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3.	0	0	1	0	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4.	0	0	1	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5.	0	0	1	1	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6.	0	0	1	1	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	3	2	-	-	-	
7.	0	0	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8.	0	1	0	1	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9.	0	1	1	0	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10.	0	1	1	0	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11.	0	1	1	0	1	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12.	0	1	1	1	0	0	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	
13.	0	1	1	1	0	1	1	-	-	-	-	1	1	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	
14.	0	1	1	1	1	0	1	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15.	1	0	0	0	0	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16.	1	0	0	1	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17.	1	0	1	0	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18.	1	0	1	0	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19.	1	0	1	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20.	1	0	1	1	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	
21.	1	0	1	1	1	1	1	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	
22.	1	1	0	1	0	1	1	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23.	1	1	0	1	0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24.	1	1	0	1	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25.	1	1	0	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26.	1	1	1	0	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27.	1	1	1	0	0	1	0	-	-	-	5	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28.	1	1	1	0	0	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29.	1	1	1	0	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30.	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31.	1	1	1	1	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32.	1	1	1	1	0	1	0	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	
33.	1	1	1	1	0	1	1	5	-	-	-	1	-	6	-	-	2	-	-	1	-	7	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
34.	1	1	1	1	1	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	19	-	-	-
35.	1	1	1	1	1	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
36.	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	5	-	-	-	-	-	3	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA 型数								1	3	2	2	1	4	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	4	1	1	
個体数								5	14	2	6	29	7	1	6	10	5	5	2	12	5	2	14	14	4	8	5	5	4	10	19	4		

(表4 続き)

DNA型	クマント	クモトホシ	クラキスギ	クロ	クロアヤ	ゲンベエ	コガボ	コバノウラセバル	サカモトスギ	ジオンスギ	シチゾウボ	シママスギ	ジャカイン	ゼンダ	タケノサコスギ	タノアカ	チヨウスギ	チリメントサ	ツエスギ	テイゾウアオバ	トサアカ	トサグロ	ナガエダ	ナカマ	ナカムラ	ニンジンバ	ハアラ	ハライガワ	ハンダグロ	ヒキ	ヒコサン	ヒタアカスギ	
1.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4.	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	
5.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	
10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	
11.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	
12.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13.	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	
18.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
19.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24.	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	5	-	-	-	-	
25.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	5	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	
26.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27.	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
28.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31.	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	
33.	-	11	-	-	-	-	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	1	-	
34.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	7	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	
35.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
36.	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	5	1	1	1	1	
	4	11	1	5	1	5	5	4	1	1	6	13	7	7	1	5	3	5	8	1	5	5	5	13	5	4	5	12	5	5	1	1	

(表4 続き)

DNA型	ヒダリマキ	ヒノデ	フネサコ	ホッシンアオバ	ホンコウスギ	ホンスギ	マタサシ	マツコカスギ	ミノロギ	メアサ	モトエスギ	ヤイチ	ヤクシドドウ	ヤクノシマ	ヤブクグリ	ヤベシチ	ヤマグチ	ヤマダスギ	ヤマトスギ	ヤマノカミススギ	ユウヤケ	ヨシダスギ	リュウスギ	リュウノヒゲ	リュウタロウアオバ	ワカスギ	ワカツ	品種数	個体数
1.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
2.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5
3.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1
4.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	3	21
5.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	11
6.	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	23
7.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	11
8.	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
9.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	4	18
10.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	11
11.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	3	4
12.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	6	
13.	-	3	4	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	31	
14.	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	6	
15.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6	
16.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	4	8	
17.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	
18.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	2	8	
19.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	7	
20.	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	36	-	-	-	-	-	-	-	5	1	-	-	1	9	56	
21.	-	-	-	-	-	-	-	-	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	43	
22.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	
23.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	
24.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	15	
25.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5	
26.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	14	
27.	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	45	
28.	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	
29.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5	
30.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	6	
31.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	13	
32.	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	3	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	20	
33.	-	-	-	-	-	2	1	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	15	52	
34.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	6	42	
35.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	11	
36.	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	32	
	1	1	1	1	1	3	3	1	1	4	2	2	2	1	1	1	2	1	2	3	1	1	2	1	1	1	3		
	4	3	4	2	1	12	7	1	5	39	2	11	3	3	36	1	9	5	8	4	1	5	2	5	4	1	13	549	

種の DNA 型は 11 タイプ確認された。これらの中で品種固有の DNA 型，すなわち単一 DNA 型品種のみから構成される DNA 型は 6 タイプ存在していた。DNA 型 No.2. (0010011) のヤマダスギ，DNA 型 No.3. (0010111) のユウヤケ，DNA 型 No.23. (1101010) のテイゾウアオバ，DNA 型 No.25. (1101111) のトサグロ，DNA 型 No.29. (1110101) のトサアカ及び DNA 型 No.30. (1111000) のシチゾウボがそれらにあたる。残りの 5 タイプの DNA 型はすべて特定の品種固有の DNA 型ではなく，複数の DNA 型から構成される複合クローン品種の DNA 型であった。すなわち，DNA 型 No.1. (0010001) は 4 タイプの DNA 型からなる複合クローン品種：キウラの DNA 型の一つであり，DNA 型 No.5. (0011010) はシママスギ，DNA 型 No.17. (1010011) はヤマノカミスギ，DNA 型 No.22. (1101011) はアラカワ，DNA 型 No.35. (1111110) はウラセバルの DNA 型の一つであった。なお，DNA 型に含まれる平均「さし木品種」は 3.5 品種であった。

3.2. さし木品種のクローン構成 (clone mixture)

同一 DNA 型を示した個体群に対して，DNA フィンガープリント法によるクローン同定を行った。その結果，単一 DNA 型品種に分類された 55 品種のなかでアヤスギ，ホッシンアオバの 2 品種は同一 DNA 型に含まれている個体が異なる遺伝子型個体であることが判明した。残りの 53 品種については，同一 DNA 型を示した個体群は 6 種のプライマーを用いた DNA フィンガープリント分析において全く同一の泳動パターンが得られた。

「さし木品種」の中には同一クローンが異なる品種名で保存されている可能性が指摘されている(宮島, 1989)。図 3 に DNA 型 No.33. (1111011) に含まれるコバノウラセバル 4 個体とヒコサン 1 個体について行った分析結果を示した。図中，レーン番号 1 から 5 までは OPA-08 をプライマーとして用いた泳動像で，テンプレート DNA はレーン番号 1 から 4 まではコバノウラセバル，レーン番号 5 がヒコサンである。レーン番号 6 から 20 まではテンプレート DNA の順序は OPA-11 をプライマーとして用いた場合と同じで，5 レーン毎に OPA-11, OPN-19, OPS-04 をそれぞれプライマーとして用いた泳動像を示した。これらの結果，コバノウラセバル 4 個体はすべてのプライマーにおいて全く同一の泳動パターンが得られていることから，同一遺伝子型の個体である可能性が高い。また少なくとも今回の供試木に関する限り，ヒコサンはコバノウラセバルとは異なる遺伝子型個体であることが示された。また，「さし木品種」ナカムラとワカツに関しては両品種について外部形態や



Fig.3 DNA fingerprinting for Kobanourasebaru and Hikosan cutting cultivars.

図3 コバノウラセバルとヒコサンに対する DNA フィンガープリント分析
 コバノウラセバル：1～4, 6～9, 11～14, 16～19
 ヒコサン : 5, 10, 15, 20

針葉のザイモグラムによる比較から同一クローンの可能性が指摘されている（熊本営林局，1971）。DNA 型による分類では，ワカツは複合 DNA 型品種に，ナカムラは単一 DNA 型品種に分類されたが，ワカツの供試 13 本中 11 本の DNA 型はナカムラのそれと同じであった。そこで，同一 DNA 型に含まれるナカムラ，ワカツ両品種の個体に対して DNA フィンガープリントによる分析を行った結果，これらの個体群は同一クローンと判定された。同様に，アヤスギの一部とアカバ，ニンジンバおよびキナバに対する DNA フィンガープリントによる分析の結果，これらの個体群は同一クローンの可能性が非常に高いことが明らかになった。

図 4 にナカマに対してプライマー OPA-08（レーン番号 1 から 13）および Z-01（レーン番号 14 から 26）を用いて行った分析結果を示す。ナカマは福岡県と宮崎県からそれぞれ 8 個体と 5 個体が供試木として用いられた。図中，レーン番号 1 から 8 及び 14 から 21 までが福岡県において保存されていた個体，レーン番号 9 から 13 及び 22 から 26 までが宮崎県において保存されていた個体である。図より，福岡，宮崎各県の個体はそれぞれ同一遺伝子型の個体と考えられ，県ごとに異なる遺伝子型個体が「さし木品種」ナカマとして保存されていることが判明した。このように県ごとに異なる遺伝子型個体が保存されている「さし木品種」には，宮崎，鹿児島両県から供試木を得たオドリスギがあった。



Fig. 4 DNA fingerprinting for Nakama cutting cultivar.

図 4 ナカマに対する DNA フィンガープリント分析

福岡：1～8，14～21

宮崎：9～13，22～26

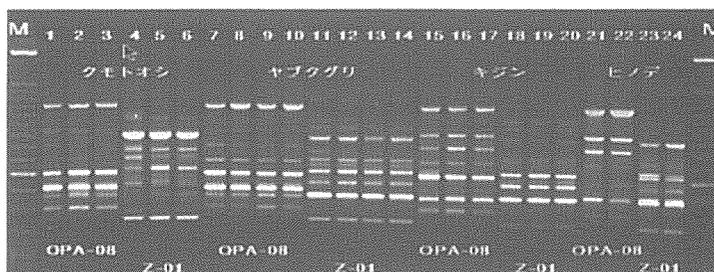


Fig. 5 DNA fingerprinting for Kumotooshi, Yabukuguri, Kijin and Hinode cutting cultivar.

図 5 クモトオシ，ヤブクグリ，キジン及びヒノデに対する DNA フィンガープリント分析

クモトオシ：1，4：福岡，2，5：大分，3，6：鹿児島

ヤブクグリ：7，11：福岡，8，12：大分，9，13：宮崎，10，14：鹿児島

キジン：15，18：福岡，16，19：大分，17，20：鹿児島

ヒノデ：21，23：福岡，22，24：大分

さし木品種の DNA 型数の変動に関連して当該品種の針葉を採取した県数との関係を調べてみたところ、両者の間には有意な相関関係は認められなかった。図 5 は複数の県から供試木を採取したクモトオシ、ヤブクグリ、キジンおよびヒノデを対象にしたプライマー OPA-08 及び Z-01 を用いたフィンガープリント分析の結果である。ヤブクグリは福岡、大分、宮崎、鹿児島県の 4 県から、クモトオシ及びキジンは福岡、宮崎、鹿児島県の 3 県から、ヒノデは福岡及び大分の 2 県から供試サンプルを採取したが、いずれの品種の場合も 1 品種 1 遺伝子型であった。また、供試 12 個体中 11 個体が品種固有の DNA 型 (DNA 型 No. 35. (1111110)) に含まれたウラセバルについてフィンガープリント分析を行った結果、4 県から得られたこれらの 11 個体は同一遺伝子型であった。

4. 考 察

本研究では、2 段階の分析方法を用いて「さし木品種」の分類、構成クローン数の解明を行った。第一段階で行った特定バンドによる分類は、本研究で扱ったような大量の供試個体の遺伝子型を迅速かつ確実に分類するためには非常に有効な手段と考えられる。大量の供試個体を対象とする場合、異なる PCR 間で生じる増幅産物の再現性の問題や異なるゲル上のバンドの読み間違いなどに起因する過ちが起こる恐れが大きくなる。今回用いた、極めて増幅効率が良くかつ再現性の高い特定バンドによる分類は、これらの過ちを防ぐ上で効果的であるばかりでなく、供試個体を DNA 型を同じくする小集団に分割することによって、効率的なクローン分析を可能にするものである。すなわち、1 つの集団に含まれる個体数を 1 度の PCR 増幅によって分析可能な範囲まで少なくすることで、RAPD 分析で得られる全情報を利用したバンドパターンの比較を効率的に行うことが可能になった。

本研究の目的の一つに「さし木品種」に対する基本遺伝子型個体 (或いは個体群) の指定がある。先に述べたように、スギ材の利用拡大にとって大きな障害となっているのは利用材質の「不均一性」と考えられる。その根本的な原因が植栽される種苗の遺伝的不均一性であることを考えると、基本遺伝子型個体に関する知見は今後の造林事業にとって非常に重要な情報となる。本研究で対象とした 84 品種の中で基本遺伝子型個体の指定の可能性が高い「さし木品種」としては、まず、単一 DNA 型品種であり、同時に他の品種と DNA 型を共有しないヤマダスギ、ユウヤケ、テイゾウアオバ、トサグロ、トサアカ及びシチゾウボの 6 品種を挙げることができる。これらの内、ユウヤケ及びテイゾウアオバは 1 品種 1 個体のみ供試ではあるが、いずれの個体も両品種が「さし木品種」として指定された県の研究機関から得た供試木であることから、基本遺伝子型個体としての信頼性は高いと考えられる。また、ウラセバルも基本遺伝子型の指定の可能性が高い「さし木品種」と考えられる。ウラセバルは後述のヒノデとともに、3 倍体品種であり (松田・宮島, 1977)、種子の稔性が低く、実生による繁殖は困難とされている。このことは、両「さし木品種」が比較的クローン性の高い品種であることを意味するものであろう。今回、4 県の研究機関から得た供試 11 個体が同一遺伝子型であったこと、これらの個体の属する DNA 型には他の「さし木品種」の個体が含まれないことを考え合わせると、これらの個体を基本遺伝子型個体とみなして良いと考えられる。また、複数の県から複数の供試木を採取した「さし木品種」の内、1 品種 1 遺伝子型の品種であったクモトオシ、ヤブクグリ、キジンおよびヒノデ

についても当該個体群の遺伝子型を基本遺伝子型と考えても良いであろう。

今後は、本実験において研究対象としなかった「さし木品種」も含めて広くその構成クローン数の正確な把握につとめると共に、分類・同定された「さし木品種」についてクローン単位で成長等の造林特性や材質等の利用特性を再整理し、データベースの構築を行う必要がある。これによって、これまで問題となっていた利用特性の品種内のバラツキが解決され、木材工業サイドから要求される「原材料の均一性」を保証されるとともに、林業サイドにとって次期植栽品種の選択の際の有益な情報を提供することができると考える。

謝 辞

本研究を行うに当たり福岡県森林林業技術センター（旧福岡県林業試験場）、大分県林業試験場、宮崎県林業総合センター及び鹿児島県林業試験場から供試材料の提供を受けた。ここに記して厚くお礼申し上げる。なお、本研究は平成6～8年度文部省科学研究費（No. 06556024）の助成を受けて行われた。

引用文献

- HOWELL, E. C., NEWBURY, H. J., SWENNEN, R. L., WITHERS, L. A. and FORD-LLOYD, B. V. (1994) : The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. *Genome*. **37** : 328-332
- 石崎厚美 (1965) : 九州におけるおもなスギさし木品種の形態, 生理, 造林上の特性. *林試研報* **180** : 1-303
- KEIL, M. and GRIFFIN, A. R. (1994) : Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theor. Appl. Genet.* **89** : 442-450
- 熊本営林局 (1971) : 九州地方におけるスギ在来品種とその特性に関する調査研究報告書. 熊本, p. 293
- MAILER, R. J., SCARTH, R. and FRISTENSKY, B. (1994) : Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. Appl. Genet.* **87** : 697-704
- 松田 清・宮島 寛 (1977) : スギさし木品種の染色体数. *日林誌* **59** : 148-150
- 宮島 寛 (1979) : スギさし木地帯の再選抜対象集団の特性に関する研究. 文部省科研費試験報告, 東京, p. 185
- 宮島 寛 (1989) : 九州のスギとヒノキ. 九州大学出版会, 福岡, p. 275
- MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. (1980) : Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* **8** : 4321-4325
- 奥泉久人・大庭喜八郎 (1990) : アイソザイムの4遺伝子座の遺伝子型による集植されたオビスギ系14品種, ヤブクグリおよびメアサのさし木品種内クローン数の推定. *日林誌* **72** : 501-507
- OKUIZUMI, H. (1993a) : Clone analysis of collected Sugi-cutting cultivars of the Kyushu Region by the multilocus genotypes of twelve isozyme loci. *J. Jpn. For. Soc.* **75** : 293-302
- OKUIZUMI, H. (1993b) : Clone analysis of collected Sugi-cutting Cultivars from the Sanbu area, Chiba prefecture, by the multilocus genotypes of twelve isozyme loci. *J. Jpn. For. Soc.* **75** : 398-404
- 社団法人日本林業協会 (1996) : 林業白書 (林業の動向に関する年次報告), p. 251

- SCHNELL, R. J., RONNING, C. M. and KNIGHT, R. J. Jr. (1995) : Identification of cultivars and validation of genetic relationships in *Mangifera indica* L. using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90 : 269-274
- 白石 進・渡辺敦史 (1995) : *rbcL* 遺伝子多型を利用したアカマツとクロマツの葉緑体ゲノム識別. 日林誌 77 : 429-436
- WELSH, J. and MCCLELLAND, M. (1990) : Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids. Res.* 18 : 7213-7218
- WILDE, J., WAUGH, R. and POWELL, W. (1992) : Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83 : 871-877
- WILHELMINA, T. G. V. and MCNICOL, R. J. (1995) : The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. *Heredity* 75 : 126-132
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S. V. (1990) : DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18 : 6531-6535

(1996年7月23日受付 ; 1996年9月20日受理)

Summary

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to discriminate cutting cultivars of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) in Kyushu. 549 individuals from 84 cutting cultivars, collected as breeding stock by four prefectural forestry institutes (Fukuoka, Oita, Miyazaki and Kagosima prefectures), were investigated. Based on the data of seven high-reproductive specific bands amplified with four arbitrary 10-mer primers, these individuals were subdivided into 36 DNA types. Using another six primers, DNA fingerprint analyses were carried out for individuals of the same DNA type. It indicated that 31 cutting cultivars consisted of several genotypes. On the other hand, for 53 cutting cultivars, there was no difference within each cultivar in DNA fingerprint. This result suggests the high probability that these cultivars were monoclonal. It was concluded that RAPD markers are useful for cultivar-discrimination and clonal identification of Japanese cedar.

Key words : cutting cultivar; *Cryptomeria japonica*; RAPD; clonal identification; DNA typing.