

RFLP マーカーを用いた *Eucalyptus camaldulensis* の 産地間識別法の応用

藤家葉子、日尾野隆*、伊藤一弥*、柴田 勝*、永田 洋

Application of RFLP Markers to Provenances Variation of *Eucalyptus camaldulensis*

Yoko Fujiie, Takashi Hibino, Kazuya Ito, Masaru Shibata, Hiroshi Nagata

Eucalyptus has been classified about 500 species by morphological aspects. In plantation, as suitable eucalypts are planted, classification of *Eucalyptus* species or provenances is necessary. However, the classification often can not be performed only with morphological aspects. Thus, an improved classification method using RFLP analysis was established. Total DNA was isolated by modified CTAB method that yield highly purified and high molecular weight nucleic acid. Results from seven provenances in *E. camaldulensis* showed that these six provenances were classified using their own RFLP markers, although there were several polymorphic patterns in a provenances. In this study, RFLP markers were shown to be useful for classification of species or provenances more rapidly or exactly than the morphological classification method.

Key word : RFLP, *Eucalyptus camaldulensis*

ユーカリは植林対象木として世界的に注目されている。ユーカリ属には種が500種以上も存在し、種の中でも産地によってさらに細かく分類されている。ユーカリを植林する場合、利用目的および植林地に適合する種あるいは産地の選抜が必要である。従来の選抜法では、主に形態的特徴を基準に分類しており、産地によっては差異が微妙であるため判定を誤る可能性がある。また、種間雑種の存在により適合樹種の判定が困難である場合が認められる。これらの問題点を解決するために、本研究ではDNA分析法の一つであるRFLPを用いることによって、産地間識別法の確立を検討した。その結果、*Eucalyptus camaldulensis*種6産地のRFLP解析によって個体ごとに林木特有のヘテロ性に由来する、異なる多型パターンが得られ、いくつかの産地特異的RFLPバンドの存在が認められた。樹木の場合、形態的特徴による識別ができるまで多大な時間を要するが、RFLPマーカーを識別基準として用いることにより、迅速かつ正確な産地間あるいは種間判定が可能であることが示唆された。

キーワード : RFLP, *Eucalyptus camaldulensis*

* : 王子製紙森林資源研究所

I はじめに

天然林減少の問題が深刻になってきている今日、天然林に依存することなく、大量の木材チップを短期間に生産する計画的な植林事業が重要である。パルプ用材として植林事業に利用されている樹木の中でもユーカリの占める割合は年々増加している。その理由としては種が豊富であり、その分布域も非常に広範囲なため、地域の環境に適した種を選択が容易であること、成長も極めて早く、萌芽更新することなどがあげられる。主にブラジル、オーストラリア、インドネシア、南アフリカなど、暖帯、亜熱帯地域で大規模に植林が行なわれ、大きな成果をあげている。植林に用いられている代表的な種に *Eucalyptus grandis*, *E. urophylla*, *E. globulus*, *E. nitens* があげられる。これらの種はユーカリの中でも成長が早く、材質も優れている (6)。

植林事業を展開するにあたり、その地域に適した種、産地を選択するために、既存林の調査、もしくは試験植林を行い、植林に適すると判定されたユーカリの種、もしくは産地を選抜する。選抜形質としては、一般に樹高、幹形質 (通直)、枝習性 (細い)、耐病虫性等10~15項目の形質が使用される。パルプ材育種の場合は、成長性に加えて、容積重、パルプ収率、リグニン含有量などを選抜基準に加えている (7)。ここで問題となるのは植林地における適木の種、もしくは産地を明らかにするために、従来は表現形質の差異を基準にしてきた点である。ユーカリはオーストラリア全土に分布し、種の数は500以上にのぼる。それぞれの種の中でも樹皮、葉、花、果実などの形態上の特徴 (表現形質) から産地間ごとにさらに細かく分類されている (4)。このようにユーカリ属は多様であり、早生樹ではあるが、表現形質の差異が確認できるまでに、少なくとも3~4年は必要である。また、表現形質の差異が環境条件などの影響を無視できない場合や、雑種性を示し、判定が微妙である場合などは形態上の特徴を用いた識別は困難になる。この問題を解決するため、ユーカリの種、産地を明確に識別することが可能な、新たな判定基準の開発が望まれていた。

現在様々な分析法が開発されているが、本研究では RFLP (Restriction enzyme Fragment Length Polymorphism) 法を用いてユーカリの産地間識別法の確立を目指した。産地間識別法を確立するため、まず、DNA 抽出法についての検討を重ねてきた。そして産地間識別を可能にする RFLP マーカーの探索を行った。今回はDNA抽出法、*E. camaldulensis* 種6産地における RFLP マーカーの獲得について報告する。

II 供試試料

E. camaldulensis の6産地、Gibb river, Katherine river, Bullock creek, Petford, Gilbert river, Kennedy river を材料に用いた。これら6産地を図-1に示した。播種および種苗の育成は王子製紙株式会社森林資源研究所亀山研究室圃場で行った。DNA 抽出材料としては2年生木の新葉を用いた。

III 実験方法

1. DNA 抽出法 佐藤らの方法 (5) に基づいて行った。葉1gを液体窒素下で乳鉢、乳棒を用いて粉

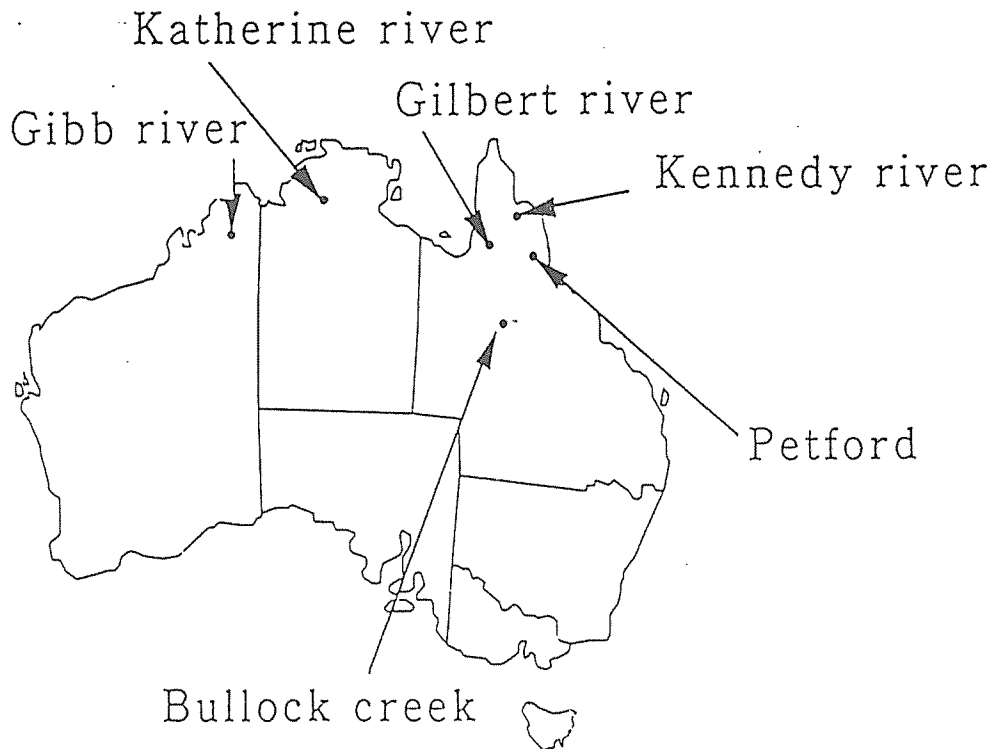


図-1. 材料に用いた *Eucalyptus camaldulensis* 種, 6産地の地理的位置

状になるまで破碎した。抽出緩衝液(50mM Tris - HCl(pH8.0), 35mM ソルビトール, 5mM EDTA, 10% (w/v) ポリエチレングリコール4000, 5% (w/v) PVP, 2% (v/v) メルカプトエタノール) を 5ml加え、よく混合した後10ml遠沈管に移した。ホモジナイザーを用いてさらに細かく破碎し、3重のガーゼで濾した。12,000×g で10分間遠心後、上清を除いた。沈殿を洗浄緩衝液(50mM Tris - HCl(pH 8.0), 35mM ソルビトール, 25mM EDTA, 0.4% (v/v) 2-メルカプトエタノール) 1mlを用いて懸濁した。10%サルコシル溶液 120 μ l, 5M NaCl 160 μ l, 8.6%CTAB・0.7M NaCl 溶液 130 μ lを順に加え、よく混合し、65°Cで20分間、加温した。2mlのクロロホルム：イソアミルアルコール=24:1 混合液を加えた後、12,000×g、10分間遠心し、上清を回収した。上清に2/3量のイソプロパノールを加えて、室温に30分間放置後、12,000×g、10分間遠心した。沈殿を70%エタノール溶液で洗浄後、乾燥し、TE200 μ lに溶かした。

2. RFLP 解析 ユーカリ DNA (3 μ g) を *StyI*, *EcoRI* により消化した後、1%アガロースゲルを用いて電気泳動した。泳動された DNA をアルカリ変性させ、ナイロンフィルターに転写した。ペーリンガー社製 DIG DNA 標識および検出キット添付の説明書に従いハイブリダイゼーション実験を行った。プローブとしてはユーカリ cDNA ライブラリー由来の cDNA 断片を用いた。

IV 結 果

1. DNA 抽出 幼葉 1g から約100 μ gの DNA を抽出することができた。DNA の収量および精製度は葉の採取時期に左右されることなく安定していた。また、一般的なほかの DNA 抽出法に比べても迅速に

抽出することが可能であった。

2. RFLP 解析 実験に用いた *E. camaldulensis* の6産地について60種類のプローブと *StyI*, *EcoRI* を用いて各産地の任意の1個体ずつについて予備試験を行った結果、10種類のプローブを選抜した。これらを用いて各産地10個体について RFLP 解析を行った結果、個体間において数種類の多型が検出された。図-2では#4プローブおよび、*EcoRI* の解析結果、図-3では#119プローブおよび *EcoRI* の解析結果を示した。図-2、3から明らかであるように各産地での RFLP パターンは2~5種類にわたり、同一産地内での個体間差が確認された。また、各 RFLP バンドのほとんどが産地間において共通に存在した。しかし、図-2に示した7.7kbの RFLP バンド(黒色)は Katherine river に特有であった。一方、図-3からも同様に1.4kbの Gilbert river に特有と考えられる RFLP バンドが確認できた。今回用いた6産地の解析において、#4プローブおよび *EcoRI* を用いて解析を行うことによって Katherine river を、#119プローブおよび *EcoRI* の解析によって Gilbert river を識別することが可能であることが示された。

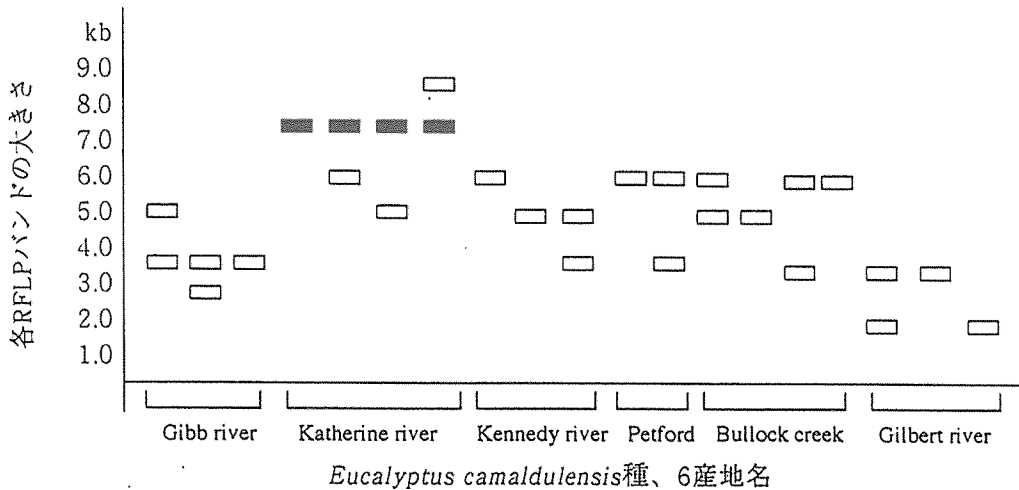


図-2. #4 および *EcoRI* を用いた RFLP 解析

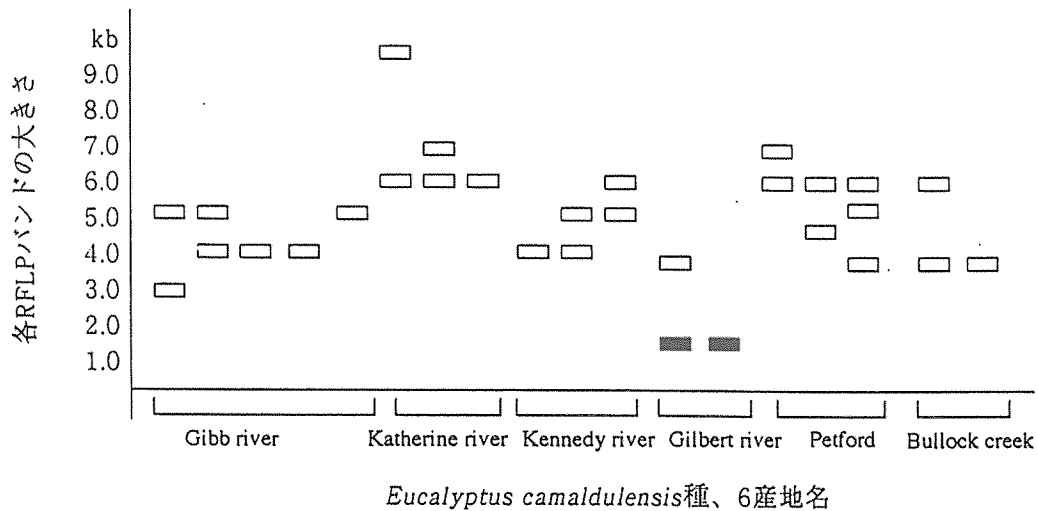


図-3. #119 および *EcoRI* を用いた RFLP 解析

V 考 察

1. DNA 抽出 CTAB 法 (3) に従い、ユーカリから DNA 抽出を行ったが、多量に含まれる核酸以外の物質 (タンパク質、多糖類、二次代謝産物など) のために、i) DNA 収量が低い ii) ポリフェノール化合物の酸化褐変、といった問題点が認められた。検討を重ねた結果、有機溶媒抽出による前処理の併用により高品位かつ高収率に DNA を抽出することに成功した。しかし、秋季以外に採取を行った試料では、多量のゼリー状の夾雑物を完全に取り除くことはできなかった。30% エタノールによる洗浄法 (1) など を参考にし、抽出方法を検討したが、問題点を解決することができなかった。平衡密度勾配遠心法 (2) を導入することで DNA を精製することが可能であったが、操作が煩雑であり、抽出効率の向上にはつながらなかった。

核分画と抽出の障害となる夾雑成分とを抽出の初期過程でおおまかに分離するために、核 (クロマチン) 分画処理を行った結果、ゼリー状物質およびフェノール物質などの夾雑物を含まない DNA の獲得が可能になった。また、収量的にも改良された。この前処理によって、ゼリー状物質が上清とともに除去され、その後の抽出過程におけるロスが少なかったと考えられた。

2. RFLP 解析 個体間においても複数のバンドパターンが確認されたが、その中でも産地特有のバンドが存在した。これを用いることによって産地を識別することが可能である。今回用いた 6 種類の産地は、オーストラリア北部に分布する産地に限定されている。*E. camaldulensis* 種には数百の産地の存在が確認されている。本研究においては Katherine river, Gilbert river のそれぞれに特有のバンドが確認されたが、他の産地について解析を行った場合に Katherine river, Gilbert river の特有バンドと同じバンドを示す可能性は否定できない。正確な産地識別マーカーを獲得するためにも、さらに詳細に RFLP 解析を行うことが必要であると考えられる。樹木の場合、作物品種とは異なり、形態的特徴による識別ができるまでに多大な時間を要するので、RFLP マーカーを用いることにより、迅速かつ正確な産地間判定が可能であることが示唆された。この新たな識別法を確立し、植林事業に応用することによって事業の効率化をはかることが期待される。

引 用 文 献

- (1) CATHERINE T. and MICAEL E.V. (1991) Method For the Isolation of High-Quality RNA from Grape Berry Tissues without Containing Tannin or Carbohydrates, *Plant Mol. Bio, Reporter* 9(3), 242 ~ 251
- (2) MATTHEW M., FRANKLIN W.S. and JEROME V. (1957) Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradient, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 43, 581 ~ 588.
- (3) MURRAY, M. G. and THOMPSON, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nuc. Acids Res.*, 8, 4321 ~ 4326
- (4) 西村弘行 (1987) 未来の生物資源ユーカリ. 274, 内田老鶴圃、東京.
- (5) 佐藤了編 (1972) 細胞分画法. 422, 岩波書店、東京.
- (6) 柴田勝 (1994) 木材学会誌 林木の育種 40, No.7, 681~686
- (7) 柴田勝 (1996) 紙パルプ技術協会誌 第50巻海外植林とバイオテクノロジー, 152, 東京.

Received October 25, 1996.