

天然記念物ケヤキの保存木クローンの識別および冬芽形状

原口雅人 (埼玉県農林総研)・武津英太郎 (森林総研林育セ九州)

要旨: 埼玉県指定のケヤキ天然記念物3個体から、腋芽培養でクローン増殖した保存木を機関の移転に伴い移植した。ところが、一部のクローンにおいて、保存木のフェノロジーや樹形が揃っていないことが観察された。このため、天然記念物の母樹および移植された保存木から緑葉を採取し、4つのマイクロサテライト (SSR) マーカーによるクローン識別をおこなった。この結果、3クローンのうち、2クローンで天然記念物の母樹と一致しない個体が認められた。1クローンの1個体は異なる母樹と遺伝子型が一致し、もう一つのクローンの1個体は3母樹のいずれとも異なる遺伝子型であった。また、残りの保存木は、ラベルどおり、いずれかの母樹の遺伝子型と一致した。一方、3月に保存木各個体の枝を採取し、冬芽の長さおよび幅を測定し、それぞれの個体の長さ・幅および長さ/幅比について平均値の多重比較検定をおこなった。3指標のうち、各個体の長さ/幅比の平均値の有意差判定による区分がSSRマーカーによるクローン識別の結果に最も近かった。

キーワード: ケヤキ, 天然記念物, クローン識別, マイクロサテライトマーカー, 冬芽形状

Abstract: Preservation trees propagated through axillary bud culture of three Saitama Prefecture *Zelkova serrata* Makino Natural Monuments were transplanted. However, we observed that some of the clones did not retain their phenology and shape. Therefore, we gathered green leaves from the mother natural monuments and the cloned preservation trees, and identified clones by the four simple sequence repeat (SSR) markers for *Zelkova*. The results showed that the genotype of one cloned preservation tree was similar to that of the other mother tree, whereas the genotype of another clone differed from any of the three mother trees. In addition, the genotype of each clone was similar to that of its mother tree, thus validating the information reflected in its label. The mean length, width, and length/width ratio of the March winter buds of the cloned trees were examined using the Tukey HSD test, and the test identified significant inter-individual differences in their length/width ratios, reflecting most nearly of the three indexes their identity based on the SSR makers.

Keywords: *Zelkova serrata*, natural monument, clone identification, microsatellite marker, winter bud shape

I はじめに

埼玉県農林総合研究センター内に保存されている埼玉県指定天然記念物の「大久保の大ケヤキ」、「清河寺の大ケヤキ」および「城山稲荷神社の大ケヤキ」のクローン保存木は、1995年に腋芽培養(5)によって得られた。これらの培養苗は、旧埼玉県森林研究所内の苗畑に天然記念物以外のケヤキのクローン苗木と一緒に列状に植栽されていたが、機関の移転に伴い、2005年に荷札でラベルリングされ、仮植地に移植された。さらに、2006年にそれぞれ2本ずつが現在の植栽地に定植された。この移動の間に、保存した個体のラベルが離脱し、仮のラベルリングがおこなわれた。

定植後、同一クローンのラベルが表示されている個体間でフェノロジーや樹形などの形質に明らかな違いがあ

る場合や異なるラベルで類似の形質が観察された。すなわち、一部の個体では新葉の展開や紅葉の進捗、幹の通直性・曲がりや枝の広がり角、また隣接木からの忌避性などの特性の一致・不一致がラベルと異なった(原口, 未発表)。しかし、これらの指標は定量化には高度な機器を要し、簡易に客観的・確実なクローンを識別することは困難であった。

一方、有用広葉樹であるケヤキでは、Fukatsuら(2)によってマイクロサテライトマーカー(以下「SSRマーカー」)が開発され、クローン識別への適用例が報告されている(1)。

このようなことから、天然記念物母樹およびその保存木を対象にSSRマーカーによるクローン識別をおこなった。また、上記の観察の中で長期間に渡って定量的にク

Masato HARAGUCHI (Saitama Pref. Agric. and For. Res. Ctr., 784, Sugahiro, Kumagaya, Saitama 360-0102) and Eitaro FUKATSU (Kyushu Regional Breeding Off. For. Tree Breeding Ctr., FFPRI, 2320-5, Suya, Koshi, Kumamoto 861-1102) Identification of clones derived from three *Zelkova serrata* Makino Natural Monuments and the shapes of their winter buds

ローン間差をとらえると考えられた冬芽の形状について、SSR マーカーによるクローン識別の結果と比較したので報告する。

II 材料と方法

1. クローン識別 埼玉県指定天然記念物の3個体(表-1, 以下, 「大久保」・「清河寺」および「城山稲荷」), 並びに, これらの個体を母樹として腋芽培養(5)によってクローンとして増殖された個体(以下, 「保存木」)を対象とした。保存木は母樹ごとに2本(以下, 各 a, b)が埼玉県農林総合研究センターに保存されている。

これらから, 2010年10月中旬に緑葉を採取し, 各個体のゲノムDNAを改良CTAB法により抽出した。bczs186a(2)およびbczs549a・bczs551a・bczs557a(武津ら, 未発表)の4座のSSRマーカーを用いて, Multiplex PCR Kit(Qiagen社)を用いてDNA Engine PTC-200(MJ Research)によりPCR反応をおこない, 目的フラグメントを増幅した。反応液組成およびPCR反応条件はMultiplex PCR Kitのプロトコールに従った。また, アニーリング温度は最初の10サイクルで63°Cから57°Cへと下げ, 残り20サイクルは57°Cで固定とした。得られたフラグメントのサイズをABI PRISM 3130 ジェネティックアナライザ(ABI社)により決定した。得られた4座のフラグメントサイズの組合せをDNA型として母樹と保存木で比較を行い, クローンを識別した。

2. 冬芽の形状 2011年3月中旬に, 上記の6本の保存木について樹冠の西面のおよそ3mの高さから梢端枝を5本ずつ採取した(図-1)。採取した各小枝の頂芽および次の冬芽を除いた基部方向の3・4芽, 1個体につき計20芽の長さ・最大幅をノギスでmm単位小数点以下2位まで測定した。冬芽の長さ, 幅および長さ/最大幅について分散分析し, Tukeyの多重検定法で平均値の有意差

表-1. クローン増殖された埼玉県指定天然記念物ケヤキの母樹

Table 1. Saitama Prefecture Zelkova Natural Monuments used as mother trees for cloning

| 個体名 | 所在地 | 幹周(m) | 樹高(m) | 推定樹齢(年) |
|-----------|-------|-------|-------|---------|
| 大久保の大ケヤキ | さいたま市 | 9.4 | 20 | 1000 |
| 清河寺の大ケヤキ | さいたま市 | 8.5 | 32 | 650 |
| 城山稲荷の大ケヤキ | 本庄市 | 6.8 | 30 | 450 |

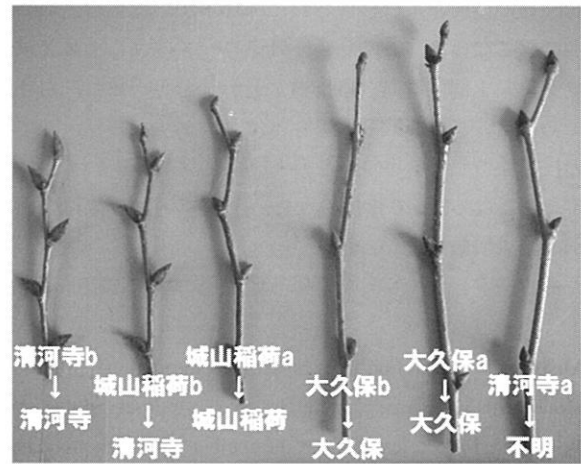


図-1. 埼玉県指定天然記念物からクローン増殖された保存木から採取した冬芽
図中の文字は, 「ラベル名→識別されたクローン名」

Fig.1. Winter buds collected from a preservation tree cloned from Saitama Natural Monument
The Japanese words in the figure translate to 'clone name according to label → clone name identified by SSR markers'

を求め, 各個体の冬芽の平均値の有意差による区分とクローン識別の結果を比較した。

III 結果と考察

1. クローン識別 SSR マーカーによる識別の結果を表-2に示した。「大久保」は, 母樹と2本の保存木で4

表-2. 埼玉県指定天然記念物母樹および保存木のSSRマーカーによるクローン識別

Table 2. Identification of mother trees and their trees for preservation of Saitama Natural Monuments using SSR markers

| 区分 | 保存木のラベル表示 | SSRマーカー | | | | | | | | 判定 | SSRマーカーで識別されたクローン |
|--------|-----------|----------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|-----|----|-------------------|
| | | bczs186a | | bczs549a | | bczs551a | | bczs557a | | | |
| 大久保母樹 | — | 228 | 235 | 190 | 204 | 190 | 198 | 142 | 148 | ○ | 大久保 |
| 保存木 | 大久保a | 228 | 235 | 190 | 204 | 190 | 198 | 142 | 148 | ○ | 大久保 |
| 保存木 | 大久保b | 228 | 235 | 190 | 204 | 190 | 198 | 142 | 148 | ○ | 大久保 |
| 清河寺母樹 | — | 236 | 236 | 198 | 211 | 190 | 198 | 130 | 148 | ○ | 清河寺 |
| 保存木 | 清河寺a | 233 | 233 | 202 | 211 | 182 | 192 | 130 | 150 | × | 不明 |
| 保存木 | 清河寺b | 236 | 236 | 198 | 211 | 190 | 198 | 130 | 148 | ○ | 清河寺 |
| 城山稲荷母樹 | — | 226 | 235 | 202 | 202 | 196 | 198 | 136 | 146 | ○ | 城山稲荷 |
| 保存木 | 城山稲荷a | 226 | 235 | 202 | 202 | 196 | 198 | 136 | 146 | ○ | 城山稲荷 |
| 保存木 | 城山稲荷b | 236 | 236 | 198 | 211 | 190 | 198 | 130 | 148 | × | 清河寺 |

遺伝子座のDNA型がすべて一致し、ラベルの付け違いは生じていないと推定された。一方、「清河寺」は、母樹とDNA型がすべて一致したのは「清河寺b」のみであった。

「清河寺a」は4つの遺伝子座の8つの対立遺伝子のうち5つがその他の個体の3母樹のいずれのDNA型とも一致しなかった。つまり、「清河寺b」は母樹のクローンと推定されたが、「清河寺a」は3つの天然記念物のクローンではないと考えられた。また、「城山稲荷神社」では、母樹と「城山稲荷a」のDNA型が一致したが、「城山稲荷b」は「清河寺」のDNA型と一致した。つまり、「城山a」は母樹のクローンと推定されたが、「城山b」のラベルが着いた個体は「清河寺」のラメットだと推定された。

武津ら(1)は100クローンを対象に4マーカーで検討をおこない、5種類の組み合わせのすべてで完全に識別することが可能と報告しており、今回の調査で同一遺伝子型を示した個体群は高い確率で同一クローンと考えられる。

「城山b」は「清河寺」であったことから、移送中に生じたラベルの離脱後の付け違いが考えられた。一方、3つの天然記念物のクローンでなかった「清河寺a」は、天然記念物でないケヤキ苗木も一緒に植えられていた苗畑において、クローン境界の他のケヤキも清河寺として誤って掘り取ったことと、ラベルの付け違いの二重錯誤ではないかと推定された。

2. 冬芽の形状 冬芽形状を肉眼で観察すると、保存木のラベル表示の「清河寺b」と「城山稲荷b」が他の保存木に対し、一見して細長かった(図-1)。そこで、SSRマーカーによる識別結果と各保存木の冬芽の形状の各指標の平均値を比較した(表-3)。冬芽の長さ・幅の平均値については「大久保」・「清河寺」のラメット間に有意差が認められた。一方、冬芽の長さ/幅の比では、保

存木のラベルの「清河寺b」と「城山稲荷b」が平均値に有意差がなく、「清河a」と「清河寺b」に有意差が認められた。つまり、「清河寺」内と「大久保」内のラメットで有意差が認められず、「清河寺」・「大久保」間のラメットでは有意差があり、多重比較検定による平均値の区分がSSRマーカーによるクローン識別結果に近かった。一方、「大久保」と「城山稲荷」・「不明」では有意差は明白でなかった。

冬芽の形状では長さや幅などの大きさは同一クローン内のラメット間でも大きく異なり、生育地点の環境や樹齢などが影響しており、クローンの表現型形質とみることには難しいと考えられた。

一方、冬芽の長さ/幅の比では、今回のようなラベルの離脱によるラメットの混乱のような場合、一部ではあるもののクローンを識別できる指標となる可能性が認められた。また、このことはクローンの表現型形質ととらえることも可能と考えられた。ケヤキの冬芽は測定可能期間が長く、また他の樹種のように葉芽・花芽の区別がないことから、形状評価を工夫することでより精度の高いクローン識別が可能となると考えられた。

IV おわりに

新葉・紅葉および樹形の観察によりラベル表示との不一致が疑われた保存木は、SSRマーカーによるクローン識別により、1個体が離脱したラベルの付け違いと推定できた。もう1個体は、ラベルの付け違いに加え、苗畑でのクローン境界の誤りによって3母樹と異なるクローンであることが推定された。

クローン管理上の錯誤は、各個体の管理期間が長い樹木では単年生作物に比べ起こりやすいと考えられ、近年ではスギの在来品種での調査が報告されている(4)。こ

表-3. 埼玉県指定天然記念物の保存木の冬芽の形状特性と分散分析の結果

Fig. 3 Shape properties of their winter buds in their trees for preservation of Saitama Natural Monuments and the result of ANOVA

| 保存木のラベル表示 | SSRマーカーで識別されたクローン | 長さ(mm) | 幅(mm) | 長さ/幅比 | 長さ | | | | |
|-----------|-------------------|---------|---------|----------|-------|---------|-----|--------|-----------|
| | | | | | 要因 | 偏差平方和 | 自由度 | 不偏分散 | 分散比 |
| 大久保a | 大久保 | 4.17 b | 2.46 c | 1.692 ab | 全体 | 321.859 | 119 | | |
| 大久保b | 大久保 | 2.94 a | 1.70 a | 1.752 b | 保存木間 | 264.189 | 5 | 52.840 | 104.447** |
| 清河寺b | 清河寺 | 7.13 d | 2.51 c | 2.859 c | 誤差 | 57.670 | 114 | 0.506 | |
| 城山稲荷b | 清河寺 | 5.77 c | 2.03 ab | 2.868 c | 幅 | | | | |
| 城山稲荷a | 城山稲荷 | 3.70 ab | 2.42 c | 1.554 ab | 要因 | 偏差平方和 | 自由度 | 不偏分散 | 分散比 |
| 清河寺a | 不明 | 3.21 a | 2.30 bc | 1.400 a | 全体 | 21.301 | 119 | | |
| | | | | | 保存木間 | 9.771 | 5 | 1.950 | 19.322** |
| | | | | | 誤差 | 11.530 | 114 | 0.101 | |
| | | | | | 長さ/幅比 | | | | |
| | | | | | 要因 | 偏差平方和 | 自由度 | 不偏分散 | 分散比 |
| | | | | | 全体 | 52.616 | 119 | | |
| | | | | | 保存木間 | 44.084 | 5 | 8.820 | 117.817** |
| | | | | | 誤差 | 8.531 | 114 | 0.075 | |

Tukey のHSD 検定法 異符号間で1%レベルの有意差
Means with different letters are significantly different according to the Tukey HSD test

のため、新葉・紅葉および樹形など簡易な方法により、錯誤を識別できれば都合が良いが、1個体でも樹冠の位置や周辺の環境により差異が認められ、定量的・客観的なクローン識別は難しかった。一方で、開葉フェノロジーのクローン間差が報告されており(6)、2011年4月中旬におこなった調査(原口,未発表)では、①「大久保a, b」および「清河寺a」の開葉が遅く、②「城山稲荷a」は樹冠部位による差が大きく、③「城山稲荷b」および「清河寺b」の開葉が早かった。この結果はクローンとの整合性において矛盾がないが、樹冠部位による開葉の差をどう捉えるか、また調査期間が限定されるなどの課題もある。

冬芽の形状によるクローン識別の可能性が示されたが、より効率的な形状による識別法として、Iwata(3)の作成したフーリエ記述子を用いた解析ソフトのSHAPE Ver. 1.3の利用が考えられる。また、フーリエ記述子が閉曲線を対象としているのに対し、鄭ら(7)は、開曲線を分析できるP型フーリエ記述子を用いたハマナス花卉先端部の輪郭線による品種識別も報告されており、この手法では冬芽と枝の接着部の処理を考慮する必要がないという利点がある。

さらに、冬芽基部の節部での枝の屈曲もクローンの表現型形質ではないかと考えている。これらの容易に調査できる、多くの表現型形質を見出すことによって簡便なクローンチェックを実施し、問題のあったものだけをSSRマーカーで判別することも考えられる。

この研究を実施するにあたり、供試材料の採取に御協力いただいた天然記念物関係者の方々にお礼申し上げる。

引用文献

- (1) 武津英太郎・高橋誠・磯田圭哉・渡辺淳史(2004) ケヤキのSSRマーカーの開発と優良形質候補木のクローン識別. 2004 林育七年報: pp. 68-70
- (2) FUKATSU E, ISODA K, HIRAO T, TAKAHASHI M, WATANABE A (2005) Development and characterization of simple sequence repeat DNA markers for *Zelkova serrata*. Molecular Ecology Notes: 5, pp.378-380
- (3) Iwata H (2006) SHAPE Ver. 1.3. A Software Package for Quantitative Evaluation of Biological Shapes Based on elliptic Fourier descriptors. <http://lbm.ab.a.u-tokyo.ac.jp/~iwata/shape/>
- (4) 松井由佳里・家入龍二・森口喜成・松本麻子・高橋誠・津村義彦(2013) 九州における主要なスギ品種のクローン識別および遺伝的類似性の評価. 日林誌: 95, pp. 220-226
- (5) 中村雅志(1998) ケヤキ天然記念物の腋芽培養. 日林論: 109, pp. 347-350
- (6) 高橋誠・福田陽子・武津英太郎(2006) 関東育種基本区から選抜されたケヤキ優良形質候補木の開葉フェノロジーの遺伝性とクローン間差. 57 回日林関東支論: pp. 147-149
- (7) 鄭澤宇・田村義保(2005) P型フーリエ記述子を用いたハマナス花卉先端部の輪郭線による品種識別. 園学研: 4 (4), pp. 385-390