



# RAPD分析及びサザンブロット解析によるニホングリの品種識別と系統分類について

守本, 裕美子  
島田, 武彦  
尾崎, 武

---

**(Citation)**

神戸大学農学部研究報告, 22(2):63-69

**(Issue Date)**

1997-01-30

**(Resource Type)**

departmental bulletin paper

**(Version)**

Version of Record

**(JaLCD0I)**

<https://doi.org/10.24546/00178071>

**(URL)**

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00178071>



## RAPD 分析及びサザンブロット解析による ニホングリの品種識別と系統分類について

守本裕美子\*・島田武彦\*・尾崎 武\*\*・野村啓一\*・荒木 斉\*\*\*・吉田雅夫\*

### Identification and Relationship of Japanese Chestnut Varieties by RAPD and Southern Blot Analysis

Yumiko Morimoto, Takehiko Shimada, Takeshi Ozaki, Keiichi Nomura,  
Hitoshi Araki and Masao Yoshida

#### Abstract

Japanese chestnuts (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) were used for RAPD (random amplified polymorphic DNA) and Southern blot analysis to estimate genetic variation. RAPD analysis provided enough DNA polymorphisms to identify all varieties. Both dendrogram and scattergram indicated Japanese and Chinese chestnut varieties were distantly related. Though some variations were found in native chestnut, "shibaguri", we could not characterize shibaguri and cultivars.

In Southern blot analysis only two RFLPs were yield in 18 endonuclease-probe combinations, indicating that there were small variation of chloroplast DNA (cpDNA) in Japanese chestnut. The sufficient results were not obtained here to discuss the relationship between cultivars and shibaguri.

#### 緒 言

ブナ科に属するクリ属植物は、アジア、ヨーロッパ、北アフリカ及び北アメリカなどの温帯地域に原生分布し、12種が知られている。これらのうち果実を利用するものとして重要なものは、ニホングリ、チュウゴクグリ、ヨーロッパグリ、アメリカグリの4種である。

ニホングリ (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) は、原産が日本・朝鮮半島である。自家結実率は品種間で若干の差異が認められるが、実用的には全品種が自家不和合性と考えられている。きゅう果の大きさは変異が著しいが、他の栽培種に比べて最も大型である。渋皮は他の栽培種に比べて繊維質で厚く、剥離は困難である。

シバグリはその基本種として知られており、古くから日本に自生している。栽培品種と比較した場合、葉や果実の大きさはかなり小さく外見的には識別可能である。しかし葉型や果実の渋皮剥離が困難であるなどその他の特徴は類似している。また栽培品種に比べて寒さに強く、育種素材として注目されている。しかし栽培品種間あるいはシバグリと栽培品種間の類縁関係は、ほとんど解明されていない。加えてシバグリの遺伝的特性も不明である。またこれまでニホングリでは品種・系統間の類縁関係について主に生態・形態的な特徴で分類されてきたが、これらの特徴は環境的な影響を受けたり類縁関係の近いものでは識別できないなどの問題があり、より有力な分類法が要望されていた。

近年、分子生物学のめざましい発達により、多くの分析法が開発されてきた。RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) によるサザン解析は標的ゲノムを制限酵素により切断し、断片化された DNA をメンブレンに転写した後プローブを用いて DNA 多型を検出するものであり、カンキツ

\* 神戸大学

\*\* 神戸大学附属農場

\*\*\* 兵庫中央農業技術センター

属・キンカン属・カラタチ属の識別<sup>1)2)</sup>、トマト<sup>3)</sup>トウモロコシ<sup>4)</sup>オオムキ<sup>5)</sup>などの RFLP 連鎖地図作成等に利用されている。

最近になって、williams ら(1990)<sup>6)</sup>は任意の短鎖配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を行い、得られた増幅産物を電気泳動することにより、DNA 多型を検出する方法を開発した。この方法は RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) 分析法と呼ばれ、手法は簡便で比較的近縁な品種間においても十分な多型を供給するため、カンキツでは品種識別<sup>7)</sup>、連鎖マーカー<sup>8)</sup>、リンゴでは花粉親鑑定<sup>9)</sup>、モモでは連鎖地図作成<sup>10)</sup>等に利用されている。

本研究ではニホングリの栽培品種 (Fig.1) とシバグリ (Fig.2) について、RAPD 分析法とサザンブ

ロット解析法により、品種の識別、ゲノムの類似性と葉緑体 DNA の変異の調査・解明を試みた。

## 材料及び方法

兵庫県神崎郡大河内町・多紀郡西紀町に自生するシバグリ 8 系統と、兵庫県中央農業技術センター・神戸大学附属農場で収集・保存されている栽培品種 16 品種を供試した (Table 1)。試料の生葉から改変 CTAB 法<sup>11)</sup>により全 DNA を抽出した。

RAPD 分析はコモンプライマー (BEX Co. Ltd.) によりバイオオープンで PCR を行い、電気泳動を行った後エチジウムブロマイドで染色した。PCR の各サイクルは、予備反応として 94°C で 1 分間の熱変性、40°C で 1 分間のアニーリング、74°C で 1 分間の伸長反応を 1 サイクルとしこれを 10 サイクル行っ

Table 1 Material plants

Code	Varieties	Sampling place	Sampling date
1	Sibaguri #1	Oukouchi, Mineyama	1995/6/12
2	Sibaguri #2	Oukouchi, Mineyama	1995/6/12
3	Sibaguri #3	Oukouchi, Mineyama	1995/6/12
4	Sibaguri #4	Oukouchi, Mineyama	1995/6/12
5	Sibaguri #5	Oukouchi, Mineyama	1995/6/12
6	Ginyose	Nishiki	1995/6/12
7	Sibaguri #6	Nishiki	1995/6/12
8	Sibaguri #7	Nishiki	1995/6/12
9	Sibaguri #8	Nishiki	1995/6/12
10	Otomune	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
11	Imakita	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
12	Kanotume	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
13	Kinseki	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
14	Gora	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
15	Konisiki	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
16	Ogawateteuchi	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
17	Nakatetanba	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
18	Bonguri	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
19	Choukouji	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
20	Matabei	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
21	Hyougo shinaguri	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
22	Hyougo Rinshi 20	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
23	Arima	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
24	Kunimi	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22
25	Ginyose	Kasai, Kobe Exp.Farm	1995/6/22

た。続いて94°Cで15秒間の熱変性、40°Cで30秒間のアニーリング、74°Cで1分間の伸長反応を30サイクル行い、さらに74°Cで5分間の伸長反応を行った。得られたデータをもとに品種・系統間の非共有バンド数の距離行列を求め、ウォード法によりクラスター分析<sup>12)</sup>を行い、デンドログラムを作成した。また数量化理論第3類により個体数量を求め、二次元配置で散布図を作成した<sup>13)</sup>。

サザンプロット解析では3組の STS プライマーにより増幅した葉緑体 DNA の特定領域 (psbA 遺伝子領域・atpB-rbcL 遺伝子間領域・rbcL-ORF106 遺伝子間領域) を Dig 標識してプローブとして用いた。ゲノミック DNA は6種類の制限酵素 (*EcoR* I, *EcoR* V, *Hind* III, *Pst* I, *BamH* I, *ScrF* I) によって消化し、電気泳動を行った。その後プレハイブリダイゼーション・ハイブリダイゼーションを行い、Dig-CDP-Star により検出した。

## 結 果

### 1. RAPD 分析法

40種類のコモンプライマーを検討した結果、31種類のプライマーから総数49個の再現性のある RAPDs が得られた (Fig.3)。得られたデータをもとにウォード法によりクラスター分析を行いデンドログラムを作成した (Fig.5)。次に数量化理論第3類により散布図を作成した (Fig.6)。

デンドログラムにおいては供試した全てのシバグリ・栽培品種について少なくとも4個の RAPDs で識別が可能であった。また兵庫県西紀町で実際に栽培されている‘銀寄’ (6)と、兵庫県中央技術センター・神戸大学附属農場で収集・保存されている‘銀寄’ (25) では RAPD パターンが相同であり、全く差が見られなかった。チュウゴクグリの系統である‘兵庫支那栗’ (21)、‘兵庫林試20号’ (22) は他のシバグリ、栽培品種と大きく異なっているが、その他の系統では有意な差がみられず、シバグリと栽培品種を明確に分類することはできなかった。

散布図における寄与率は約30%であった。チュウゴクグリの系統は他のニホングリとはかなり離れた位置にプロットされた。加えて兵庫県大河内町でサンプリングされた‘シバグリ1’ (1)は他のシバグリ・栽培品種とはかなり離れた位置にプロットされた。しかしその他のニホングリの栽培品種・シバグリは密接にプロットされ、両者を明確に分類することはできなかつ

た。

### 2. サザンプロット解析法

6種類の制限酵素に3種類のプローブを用いて実験を行った結果、制限酵素 *Bam* HI・プローブ *atpB-rbcL* 遺伝子間領域の組み合わせでは‘シバグリ1’ (1)、制限酵素 *EcoR* I・プローブ *rbcL-ORF106* 遺伝子間領域の組合せでは‘シバグリ3’ (3)、‘シバグリ9’ (10) に特異的な多型が検出された (Fig.4)。しかしその他の組み合わせでは品種・系統に多型は得られず、ニホングリの葉緑体 DNA における多型の出現頻度はかなり低いと考えられた。得られた多型に種や分布地域などの特異性を関連づけることはできず、シバグリと栽培品種の類縁関係は明らかにすることができなかった。

## 考 察

RAPD 分析法においてはデンドログラムによって供試したすべてのシバグリ、栽培品種について識別が可能であった。また採集地の異なる‘銀寄’ (6)、(25) で相同な RAPD が得られたことにより品種同定が可能であった。ニホングリの栽培品種は来歴のはっきりしないものも多く、RAPD 分析法はニホングリの品種識別に有効であるものと思われる。

またチュウゴクグリの系統である‘兵庫支那栗’ (21)、‘兵庫林試20号’ (22) はデンドログラム・散布図の双方において他のニホングリと大きく異なっており、ニホングリとチュウゴクグリは遺伝的にも大きく異なるものと考えられた。また散布図における‘シバグリ1’ (1)の変異は比較的大きく、すべてのシバグリが異なる系統として識別されていることからシバグリの中にも変異があるのではないかと推察される。

一方シバグリと栽培品種はその形態的な差異から遺伝的にも大きく異なるものと予想したが、今回供試した材料ではデンドログラム・散布図の双方において明確に分類することはできず、遺伝的には比較的近似しているものと推察される。

サザンプロット解析においては、18組み合わせで得られた RFLPs は2組みで極めて高い相同性がみられた。また検出した多型は系統特異的であると考えられた。ニホングリの葉緑体 DNA における遺伝的差異は極めて小さく、遺伝的に近似しているものと推察される。サザンプロット解析法では近縁な種間において十分な成果が得られず、葉緑体 DNA の構造差を直接比較する手法を適用することが妥当であると考え

える。

ニホングリの変異を十分に把握するためには、品種・系統を増やし、さらにアメリカ、ヨーロッパグリなどの他種との類縁関係を調査することが望まれる。

## 摘 要

ニホングリの類縁関係を明らかにするために RAPD 分析法・サザンブロット解析法を適用した。RAPD 分析法では得られた多型をもとにクラスター分析によりデンドログラム・数量化理論第3類により散布図を作成した。すべてのニホングリを識別することができた。ニホングリとチュウゴクグリの系統において、デンドログラム・散布図の双方にかなりの差が見られた。また‘シバグリ’(1)の変異は比較的大きくシバグリ内にも変異があるものと思われた。シバグリと栽培品種の類縁関係を明確にすることはできず、今後はさらに多くの品種・系統を供試していく必要があると考えられた。

サザンブロット解析でも今回供試した酵素・プローブの組み合わせでは多型はほとんど得られず、シバグリと栽培品種の類縁関係を明らかにすることはできなかった。またわずかに得られた多型に種や分布地域などの特異性を関連づけることはできず、ニホングリにおける葉緑体 DNA の変化は小さいものと思われた。

## 文 献

- 1) Nybom H., S.H.Rogstar and B.A.Schaal : Theor. Appl. Genet. 79 : 153-156, 1990.
- 2) 山本雅史、小林省蔵、中村ユリ、山田彬雄 : 育学雑 (別2) : 308-309, 1992.
- 3) Bernatzky, R. and S.D.Tanksley : Genetics 112 : 887-898, 1986.
- 4) Helentjaris, T : Trend Genet 35 : 217-222, 1987.
- 5) Nialan R.A : Agric Can Biocrop Network RFLP Workshop. P : 5, 1990.
- 6) Williams, J.G.K., A.R.Kubelik, K.J. Livak, J.A.Rafalski and S.V.Tingey : Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535, 1990.
- 7) 松山知樹、本橋令子、大村三男、秋濱友也 : 育学雑 41 (別1) : 306-307, 1992.
- 8) 大村三男 : 第36集育種学最近の進歩 : 37-40. (編) 日本育種学会, 1994.
- 9) 原田竹雄、石川隆二、新関稔、齊藤健一 : 育学雑 41 (別2) : 122-123, 1992.
- 10) Chaparro, J.X., D.J.Werner, D.O.Malley, R.R.Sederoff : Theor. Apple. Genet. 87 : 805-815, 1994.
- 11) Wagner, D.B., G.R.Furnier, M.A.Saghai-MarooF, S.M. Williams, B.P.Dancik and R.W.Allard : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 : 2097-2100, 1987.
- 12) Lance, G.N. and W.T.William : Hierarchical Systems, Comp. J. 9 : 373-380, 1967.
- 13) Hayashi, C : Ann. Inst. Statist. Math. 2 : 35-47, 1950.



Fig.1 Leaves and flowers of Japanese chestnut cultivar "Ginyose"

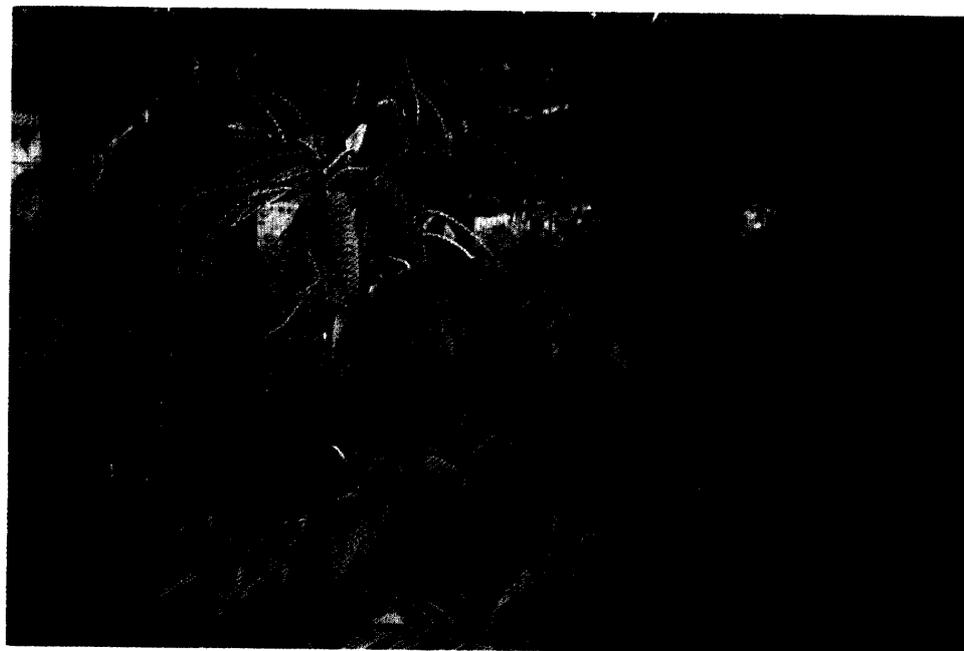


Fig.2 Leaves and flowers of shibaguri

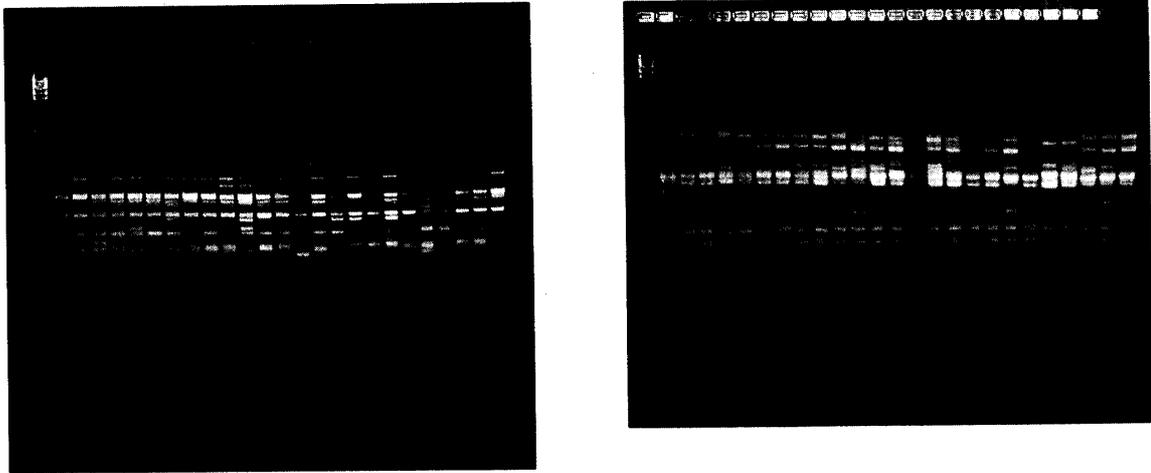


Fig.3 RAPD patterns of 25 chestnut cultivars and accessions  
1:Primer A25 2:Primer A26

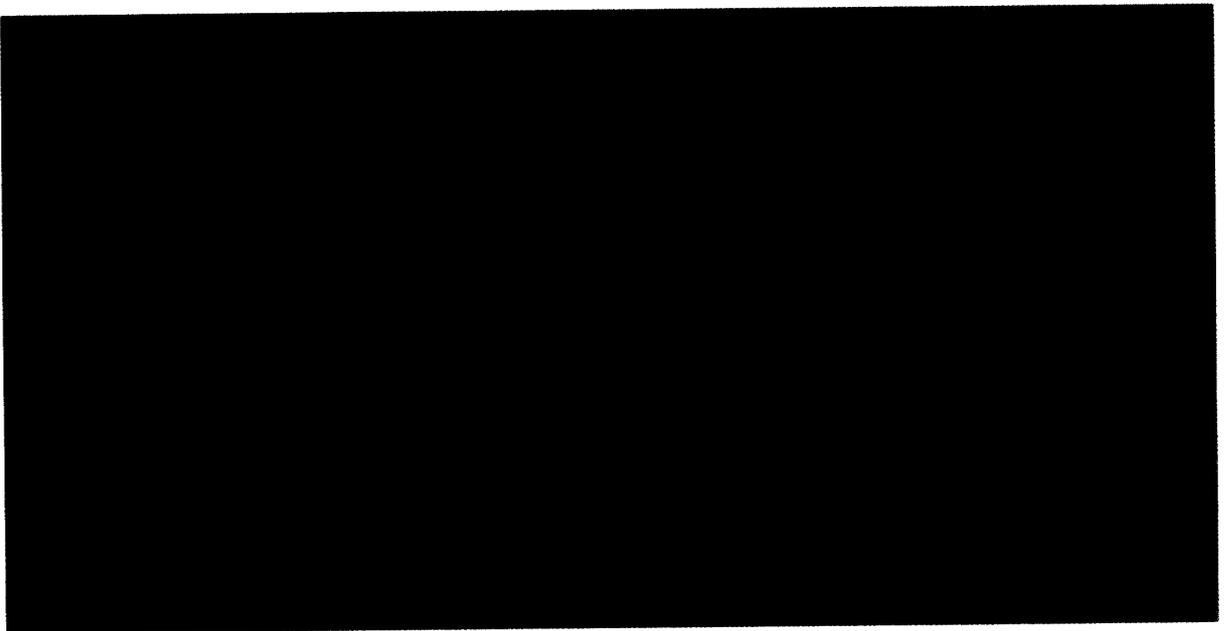


Fig.4 Southern hybridization patterns  
(*Bam* HI, *atpB-rbcL*)

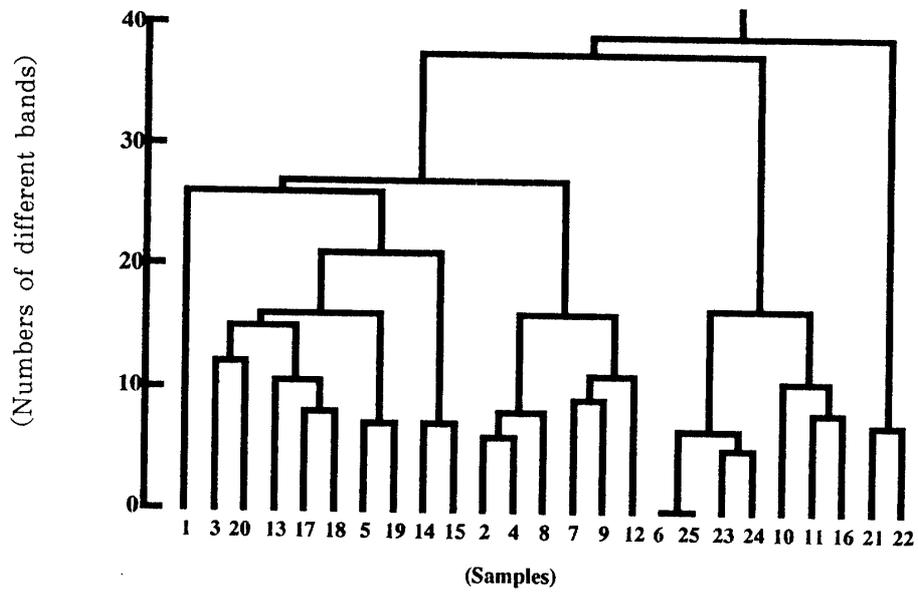


Fig.5 Dendrogram of chestnuts by cluster analysis using Ward method

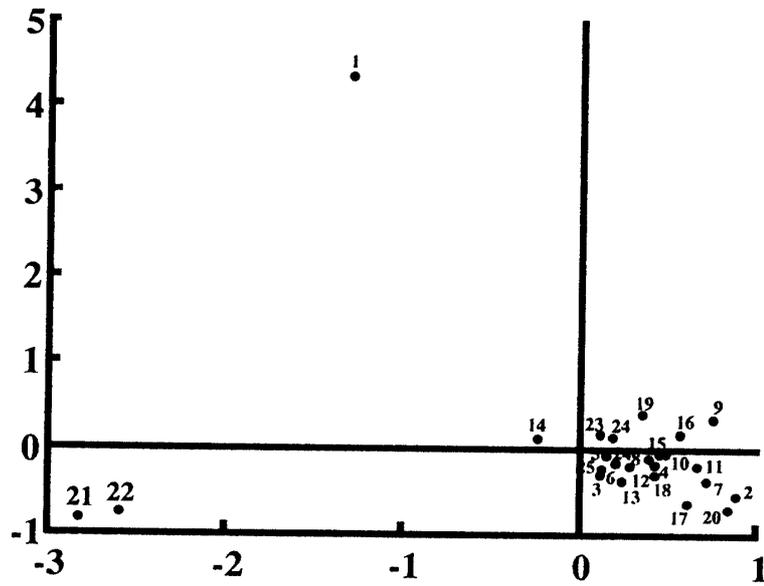


Fig.6 Scattergram of chestnuts with Quantification method by third type