

# 静岡県における広葉樹の遺伝的構造 (I) †<sup>1</sup> — 葉および冬芽を用いた DNA 抽出法の検討 —

山田晋也<sup>1)</sup>・片井秀幸<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>農林技術研究所 森林・林業研究センター

## Genetic Structure of a Broad Leaf Tree in Shizuoka Prefecture - Examination of DNA Extraction from Leaf and Winter Bud Tissue -

Shinya Yamada<sup>1)</sup> and Hideyuki Katai<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Forestry and Forest Products Research Center / Shizuoka Res.Inst.of Agric.and For.

### Abstract

In order to find an effective extraction method of DNA from four broad-leaf tree species grown in Shizuoka, we compared the quality and quantity of the DNA extracted from the winter buds or leaves of these trees, with three DNA extraction kits. Compared with two other extraction kits, the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) showed a smaller amount of extracted DNA but better stability of extraction among the four tree species. Moreover, DNA extracted with the DNeasy Plant Mini Kit exhibited stable PCR amplification. From these results, this extraction kit is considered well suited for broad-leaf tree species.

キーワード：広葉樹 DNA 抽出 DNA 抽出キット

## I 緒 言

静岡県は、県土の64%に当たる50万haは森林であり、そのうち民有林の65%に当たる262千haは針葉樹、31%に当たる124千haは広葉樹である<sup>†2</sup>。しかし、近年では放置された荒廃森林が増加し、緊急に整備が必要な森林が増加している。そのため、静岡県では森林の多面的機能の回復を目的として、平成18年度から「森林づくり県民税」の導入と、「森の力再生事業」をスタートし、針・広混交林や広葉樹林造成を進めている。また、静岡県レッドデータブックが作成され、絶滅の恐れのある地域固有の広葉樹種の保全に向けた地域ボランティア等の活動が行われている。

その一方、近年、無秩序な種苗の導入による遺伝子の攪乱や環境不適応等の問題が提起されている<sup>14)15)</sup>。スギ、ヒノキなど主要造林用の針葉樹種苗は林業種苗法により種苗の配布区域が設定されているが、広葉樹の種苗は配布区域が設定されていない。そのため遺伝的な違いを無視した植栽が、その地域における進化の過程で獲得された遺伝子の攪乱を招く恐れがある。また、遺伝的に離れた地域への植栽は、環境不適応により造林不成績となる可能性もある。このような背景から、静岡県の広葉樹について、種苗の移動地域等の策定や生育環境に適した育林、および絶滅危惧種の保全を進めるために、それらの遺伝的構造を明らかにする必要がある。

近年、木本類の遺伝的構造を把握する系統地理学の研

† 1 本報告の一部は平成20年度第119回日本森林学会（府中市）で発表した

† 2 静岡県（2008）：平成19年度静岡県森林・林業統計要覧

究分野では、DNA マーカーを使用した解析方法が主流になりつつある。その方法による広葉樹関連の研究では、Fujii et al. は日本全国のブナに13の葉緑体 DNA の遺伝子型が存在していることを明らかにしている<sup>3)</sup>。また、Kanno et al. は韓国と日本において、コナラ属 (コナラ、ミズナラ、カシワ、ナラガシワ) に、韓国から日本にかけて2種類の葉緑体 DNA の遺伝子型が存在し、一方が韓国や日本に幅広く分布しているのに対し、他方は東日本に限定していることを明らかにしている<sup>6)</sup>。また、DNA マーカーによる解析には対象物より DNA を効率良く抽出する必要があるが、植物にはポリフェノール類などの夾雑物が多いため、CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) によって多糖類を不溶化させ、遠心によって沈澱させる CTAB 法<sup>8)</sup>や改変 CTAB 法<sup>2)</sup>が用いられている。特に林木の場合、ポリフェノールや多糖類等が大きく DNA 抽出に影響するため、村上ら<sup>10)</sup>や向井ら<sup>9)</sup>は木本等からの抽出法を検討している。しかし、対象林木毎に DNA の抽出を阻害する夾雑物の種類や程度が異なるので、試薬の調整等が必要となる場合が多い。

一方、近年、複数種の DNA 抽出キットが市販されている。これらは、添付の試薬を用いることで簡便に DNA が抽出できるため、遺伝的構造解析など多検体の実験に適している。しかし、キット付属のプロトコールで、DNA 抽出が確認されているのはシロイヌナズナなどのモデル植物、野菜および果樹などが多く、林木の抽出確認例はほとんど示されていない。また、林木における抽出キットの比較検討は、モクレン科の樹木 (シデコブシ、タムシバおよびコブシ) で実施されている<sup>11)</sup>のみである。本研究では、静岡県内に生育する広葉樹5樹種の遺伝的構造を効率良く調べるのに適した数種の DNA 抽出キットについて比較検討した。

## II 材料及び方法

### 1. 植物材料

対象林木は、静岡県レッドデータブックで絶滅危惧II類に指定されているジゾウカンバ (*Betula Globispica* Shrai), その近縁種であるミズメ (*Betula grossa* Sieb. et Zucc.), 主要広葉樹のブナ (*Fagus crenata* Blume), ケヤキ (*Zelkova serrata* (Thunb.) Makino), カツラ (*Cercidiphyllum japonicum* Sieb. et Zucc.) である。2007年4月下旬と9月下旬に、対象林木の生葉および冬芽を採取した。それらは、70%エタノールで汚れを取り除いた後、約50mg ずつポリ袋に小分けをして実験に供するまで-20℃で保存した。

### 2. 林木 (ジゾウカンバ, ミズメ, ブナ, ケヤキ, カツラ) からの DNA の抽出

各植物体 (約50mg) を液体窒素で冷却した乳棒、乳鉢を用いて粉砕した。粉砕後、冷却した状態で2ml チューブにスパーテルで粉砕物を移し、氷上に静置し、それぞれのキットを用いて付属のプロトコールに準じて DNA 抽出を行った。DNA の最終溶出容量は全て 200  $\mu$  l とした。DNA 抽出は、中島ら<sup>11)</sup>がモクレン科植物から DNA の抽出を確認している、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan), ISOPLANT II (NIPPONGENE, Tokyo, Japan), Nucleon Phytopure (Amersham Biosciences UK Ltd, Buckinghamshire, England) の市販 DNA 抽出キット3種類を用いた。以下にそれらの DNA 抽出方法の概要を記す。

DNeasy Plant Mini Kitは、グアニジウム塩酸塩によって細胞内の膜構造を破壊した後、タンパク質の変性・遠心によって夾雑物を沈澱させ、DNA が含まれる上清をシリカメンブレンに透過させることで、DNA をメンブレン上に吸着させ、洗浄・精製により DNA を抽出する。

ISOPLANT II は、緩衝液中に含まれる塩化ベンジルによって細胞内の膜構造を破壊し、DNA を水相に溶出し、エタノール沈澱によって DNA を抽出する。

Nucleon Phytopure は、SDS-KCl 存在下で DNA を水相に溶解させ、レジン-クロロホルムで多糖類などを除去し、イソプロパノール沈澱によって DNA を抽出する。

### 3. アガロースゲル電気泳動による DNA 性状の確認と分光光度計による DNA 濃度計測

各キットから抽出した DNA 溶液の 1/20 量 (10  $\mu$  l) を 2% アガロースゲルで電気泳動 (100V, 20分) し、エチジウムブロマイドで染色後、UV230nm の波長を照射し DNA の性状を確認した。各キットで抽出した DNA 濃度は、原液を 10 倍希釈して分光光度計 (U-2000, 日立製作所) を用いて計測した。濃度は、吸光度 = 1.0 の DNA 濃度を 50ng/ $\mu$  l とし<sup>13)</sup>、260nm の吸光度 (以下、A260) から 320nm の吸光度 (以下、A320) を引いた値を用いて、濃度 (ng/ $\mu$  l) = (A260-A320)  $\times$  50  $\times$  10 で算出した。また、A260/A280 比を調べ、タンパク質、エタノール、RNA の混入程度を判断し、DNA 純度の指標とした。

### 4. ユニバーサルプライマーを用いた PCR 増幅確認

抽出した DNA が解析に使用できるかについて、葉緑体 DNA 用ユニバーサルプライマー<sup>5)</sup>を用いて、PCR 増幅により確認した。プライマーとして、*trnQ* (UUG)-*rpS16*, *rpS16*-*trnK* (UUU), *psbD*-*trnT* (GGU), *trnV* (UAC)-*ndhC* の4領域を増幅するセットを用いた (表1)。PCR は

10  $\mu$  l の反応系で、以下の組成で行った。鋳型 DNA 5ng, DNA ポリメラーゼ (Go Taq; Promega Co. Ltd, Wisconsin, USA) 0.75unit, dNTPs (25mM) 1  $\mu$  l, MgCl<sub>2</sub> (50mM) 0.6  $\mu$  l, 10  $\times$  緩衝液 1  $\mu$  l を用いた。PCR 条件は 94°C 3 分, (94°C 45 秒, 50°C 45 秒, 72°C 1 分) 25 サイクル, 72°C 7 分で行った。PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動 (100V, 20 分) し、エチジウムブロマイドで染色後、UV230nm の波長を照射し DNA 増幅を確認した。

表 1 プライマーの塩基配列

葉緑体 DNA 領域		塩基配列 (5' $\rightarrow$ 3')
<i>trnQ</i> (UUG)- <i>rpS16</i>	(forward)	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC
	(reverse)	GTTGCT TTYTACCACATCGTTT
<i>rpS16</i> - <i>trnK</i> (UUU)	(forward)	AAAGTGGGTTTTATGATCC
	(reverse)	TTAAAAGCCGAGTACTCTACC
<i>psbD</i> - <i>trnT</i> (GGU)	(forward)	CTCCGT ARCCAGTCATCCATA
	(reverse)	CCCTTTAACTCAGTGGTAG
<i>trnV</i> (UAC)- <i>ndhC</i>	(forward)	GTCTACGGTTCGARTCCGTA
	(reverse)	TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC

### III 結 果

#### 1. DNA 抽出における各キットの特徴

DNeasy Plant Mini Kit では、タンパク質等を沈澱させて上精を回収する工程で、ジゾウカンバとミズメの葉からは少量しか回収できず、下層は粘性の高い液体状となり分離ができなかった。その他のサンプルは問題なく回収できた。

ISOPLANT II では、エタノール沈澱の工程で、ブナの冬芽と葉およびカツラ葉以外は沈澱物に色素沈着がみられた。

Nucleon Phytopure では、イソプロパノール沈澱の工程で、ジゾウカンバ、ミズメ、ケヤキおよびカツラの葉、ジゾウカンバおよびカツラの冬芽で沈澱物に色素沈着がみられた。

#### 2. アガロースゲル電気泳動による DNA 性状の確認

DNeasy Plant Mini Kit の場合、ジゾウカンバとミズメの葉から抽出した産物は、他のサンプルに比べ薄い DNA バンドであった (図-1 A) 1, 3 レーン)。ISOPLANT II の場合、カツラ葉および冬芽からの産物からは DNA バンドが確認できなかった (図-1 B) 9, 10 レーン)。また、その他のサンプルは、アガロースゲルのウェル部分から下にかけて不明瞭な DNA バンドが確認できた。Nucleon Phytopure の場合、ブナ冬芽の DNA バンドは他のサンプルに比べ薄かったが (図-1 C) 6 レーン)、その他のサンプルは明瞭な DNA バンドが確認できた。ま

た、ジゾウカンバ、ミズメおよびケヤキの葉、カツラ冬芽は、アガロースゲルのウェル部分から下にかけて不明瞭な DNA バンドがあった (図-1 C) 1, 3, 7, 10 レーン)。

#### 3. 分光光度計による DNA 濃度計測

DNeasy Plant Mini Kit で抽出した場合、ミズメ葉の 2.2ng /  $\mu$  l からケヤキ冬芽の 17.5ng /  $\mu$  l の範囲で、平均 7.0 ng /  $\mu$  l であった。ISOPLANT II で抽出した場合、ブナ葉の 146.0ng /  $\mu$  l からカツラ冬芽の 376.3ng /  $\mu$  l で、平均 254.1 ng /  $\mu$  l であった。Nucleon Phytopure で抽出した場合、ブナ冬芽の 5ng /  $\mu$  l からカツラ冬芽の 170.3ng /  $\mu$  l で、平均 53.8 ng /  $\mu$  l であった (表 2)。これらの結果より、DNA 収量は DNeasy Plant Mini Kit が最も少なく、ISOPLANT II が最も多かった。

#### 4. PCR 増幅確認

*trnQ* (UUG)-*rpS16*, *rpS16*-*trnK* (UUU), *psbD*-*trnT* (GGU), *trnV* (UAC)-*ndhC* の 4 領域のうち、*trnQ* (UUG)-*rpS16* の 1 領域について増幅が認められた。DNeasy Plant Mini Kit を用いて抽出した DNA の場合、ミズメ葉から抽出した DNA を用いた PCR 産物からは DNA バンドが確認できなかった (図-2 A) 3 レーン)。また、その他のレーンからは明瞭なバンドが確認できたが、ブナ冬芽の DNA バンドは他と比較すると薄かった (図-2

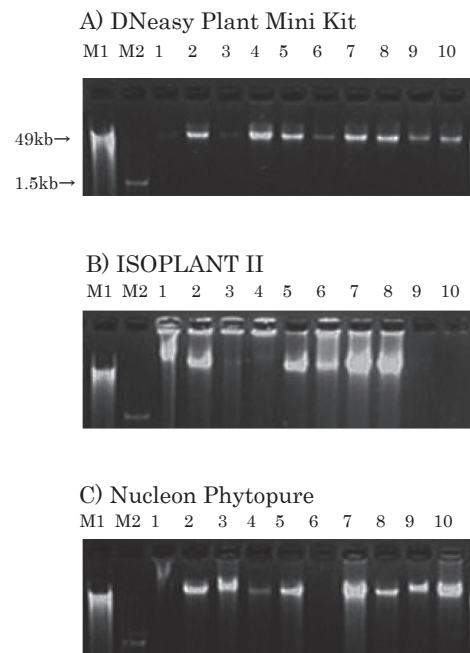


図1 アガロースゲル電気泳動による抽出DNAの確認

M1 :  $\lambda$  DNA M2 : マーカー 1: ジゾウカンバ葉  
 2: ジゾウカンバ冬芽 3: ミズメ葉 4: ミズメ冬芽  
 5: ブナ葉 6: ブナ冬芽 7: ケヤキ葉  
 8: ケヤキ冬芽 9: カツラ葉 10: カツラ冬芽

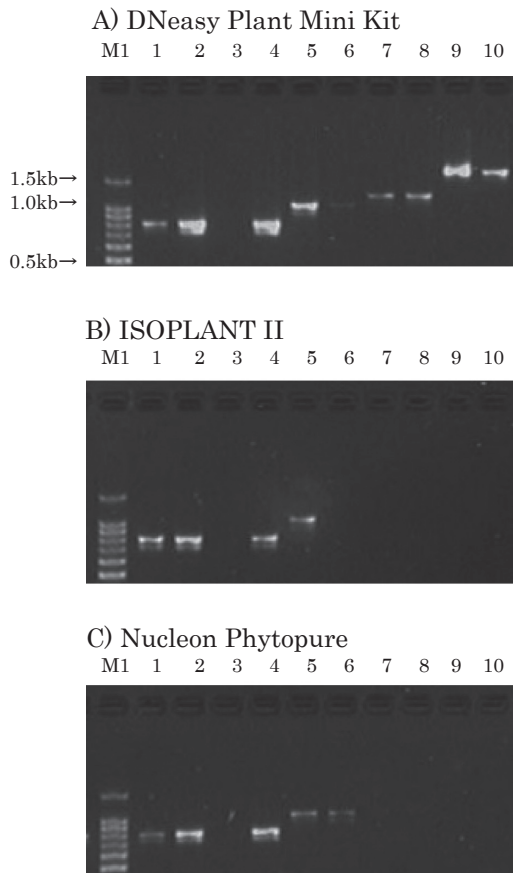


図2 PCRを用いた葉緑体DNAの *trnQ* (UUG)-*rps16*領域の増幅  
M: マーカー 1: ジゾウカンバ葉 2: ジゾウカンバ冬芽  
3: ミズメ葉 4: ミズメ冬芽 5: ブナ葉 6: ブナ冬芽  
7: ケヤキ葉 8: ケヤキ冬芽 9: カツラ葉 10: カツラ冬芽

A)6 レーン). ISOPLANT II の場合, ジゾウカンバ葉および冬芽, ミズメ冬芽, ブナ葉では明瞭な DNA バンドが確認できた (図-2 B)1, 2, 4, 5 レーン). しかし, その他のサンプルからは DNA バンドを確認することはできなかった. Nucleon Phytopure の場合, ジゾウカンバ葉および冬芽, ミズメ冬芽, ブナ葉および冬芽で明瞭な DNA バンドが確認できた (図-2 C)1, 2, 4, 5, 6 レーン). しかし, その他のサンプルでは DNA バンドを確認することはできなかった.

## IV 考 察

DNA 抽出法は, 遺伝的解析をする際の基本方法であることから, 対象物に対応した様々な方法が開発されてきた. 対象物の破碎方法のみでも, 物理的, 酵素的, 化学的がある. 更に物理的破碎は加熱, 凍結+融解, 液体窒素による凍結+粉碎など, 酵素的破碎にはリゾチームなど, また, 化学的破碎には界面活性剤および塩化ベンジルなどによる方法が用いられる<sup>4)</sup>. 本研究では, まず液体窒素による凍結+粉碎を行った. これは, 植物細胞壁などの影響で試料が破碎されにくいことが考えられるためである.

次に, DNeasy Plant Mini Kit はグアニジウム塩酸塩, ISOPLANT II は塩化ベンジル, Nucleon Phytopure は界面活性剤を用いた化学的破碎を実施した. DNeasy Plant Mini Kit の化学的破碎では, ジゾウカンバ葉およびミズメ葉が, タンパク質分離工程で上清が少量しか得られ

表2 DNA 濃度測定結果

抽出キット名	DNeasy Plant Mini Kit		ISOPLANTIII		Nucleon Phytopure	
	濃度 (ng/ $\mu$ l)	$A_{260}/A_{280}$	濃度 (ng/ $\mu$ l)	$A_{260}/A_{280}$	濃度 (ng/ $\mu$ l)	$A_{260}/A_{280}$
検体名						
ジゾウカンバ葉	2.8	2.9	215.5	1.9	60.7	1.6
ジゾウカンバ冬芽	5.7	2.3	228.2	2.1	37.8	1.8
ミズメ葉	2.2	1.5	364.7	1.8	48.2	1.6
ミズメ冬芽	10.0	2.1	246.8	2.0	29.2	1.9
ブナ葉	4.7	2.1	146.0	2.1	21.0	2.0
ブナ冬芽	4.0	1.8	190.8	2.1	5.0	2.2
ケヤキ葉	10.3	1.9	170.5	2.0	41.0	1.9
ケヤキ冬芽	17.5	2.2	343.7	2.0	26.0	1.8
カツラ葉	8.7	1.8	258.5	0.9	99.2	1.3
カツラ冬芽	4.3	2.0	376.3	1.1	170.3	1.2
平均	7.0	2.1	254.1	1.8	53.8	1.7

濃度計算 =  $\{(O.D260) - (O.D320)\} * 50$  (O.D260 = 50ng/  $\mu$  l) \* 10 (10 倍希釈)

1) 各数値は 3 回繰り返し平均値

2) グレーの背景は夾雑物の混入の可能性のあるサンプル ( $A_{260}/A_{280}$  の値が 1.8 以下)



ず、下層は粘性の高い液体状になり DNA 抽出が困難な状態にあった。これは、葉に含まれる多糖類等の含有率が高いために起きたと考えられる。その他のキットでは、化学的破碎は問題なく次の工程に進むことができた。

最終的な DNA 抽出物は、DNeasy Plant Mini Kit ではいずれの試料ともに無色透明の良質であった。これは、細胞から溶出した DNA をスピニングカラム上のメンブレン上に吸着した後に、エタノールを含む緩衝液による洗浄工程があるため、DNA と共にメンブレン上へ吸着された多糖類などの夾雑物が除かれたことから色素沈着が生じなかった要因と考えられる。一方、ISOPLANT II による最終的な DNA 抽出物はブナ冬芽および葉、カツラ葉以外に色素沈着、Nucleon Phytopure はジゾウカンバ、ミズメ、ケヤキおよびカツラの葉、ジゾウカンバおよびカツラの冬芽に色素沈着がみられた。ISOPLANT II および Nucleon Phytopure は、多糖類等を除くための試薬が含まれているが、植物体によっては各キットの許容範囲を超える夾雑物が存在したため色素沈着が起り、また、同じ植物でも冬芽と葉で差が生じたのは、葉に含まれるポリフェノール量は年間をとおして変動する<sup>1)</sup>ため、葉や冬芽に含まれる成分量が異なる理由が考えられる。仮に、DNA 抽出に供試する植物体量を 50mg 以下にすると、夾雑物の影響による DNA 性状の低下を抑えられることが考えられる。

抽出した DNA の電気泳動の結果、DNeasy Plant Mini Kit の場合、ジゾウカンバとミズメの葉からの抽出物は、薄い DNA バンドであった。これらの試料は、結果 1 で示した抽出の際に粘性の高い溶液が認められた試料と一致することから、タンパク質を分離する工程で多糖類と共に DNA が失われた可能性が高いと推定される。ISOPLANT II と Nucleon Phytopure の場合、アガロースゲルのウェル部分から DNA バンド部分にかけて尾を引くような筋が確認できた。これは、抽出した DNA に何かしらの夾雑物が混在していたためと考えられる。また、DNA バンドから下にかけて尾を引くような筋が確認できたのは、DNA が細かく切断されたことが要因と考えられる。

電気泳動後に、DNA 濃度測定のため分光光度計を使用して A260 を測定した結果、平均収量は Nucleon Phytopure、ISOPLANT II、DNeasy Plant Mini Kit の順に多く、DNeasy Plant Mini Kit の収量が最も少ない結果となった。なお、ISOPLANT II においては、電気泳動で DNA バンドが確認できなかったカツラ葉および冬芽などは A260 が確認された。これは、夾雑物による吸収であることが考えられる。DNA の精製度の指標となる A260 / A280 の比は、タンパク質などが混入すると 1.8 以下

となるが<sup>13)</sup>、DNeasy Plant Mini Kit では 3 つ、ISOPLANT II では 3 つ、Nucleon Phytopure では 6 つのサンプルで 1.8 以下を示した。また、A260 / A280 の平均値は、DNeasy Plant Mini Kit で 2.1 と最も大きく、ISOPLANT II で 1.8、Nucleon Phytopure で 1.7 であった。そのため、DNeasy Plant Mini Kit は、純度が高い DNA が得られやすいと考えられる。ただし、同キットでは 2.0 以上のものも含まれており、これらは RNA の混入が考えられるため、RNA の除去を十分に行う必要が考えられた。また、1.8 以下のサンプルは、夾雑物の影響により算出した DNA 濃度は正確でない可能性も考えられる。これらの DNA 濃度や性状の結果から、DNeasy Plant Mini Kit を用いて抽出した DNA が最も良質であると考えられた。

葉緑体 DNA 用ユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅をした結果、4 領域のうち *trnQ*(UUG)-*rpS16* 領域は、ISOPLANT II と Nucleon Phytopure で抽出したケヤキとカツら並びに各キットで抽出したミズメ葉を除く DNA から増幅が確認できた。他の領域が増幅しなかった原因として、①プライマーがこれらの樹種には適合しなかった、②アニーリング温度が最適でなかったことが考えられる。また、*trnQ*(UUG)-*rpS16* 領域の増幅が確認できなかった ISOPLANT II と Nucleon Phytopure で抽出したケヤキとカツら並びに各キットで抽出したミズメ葉の DNA は、夾雑物による PCR の反応阻害が起きて増幅されなかったと考えられる。

DNeasy Plant Mini Kit の場合、DNA の収量こそ少ないが各試料間で大差なく抽出できた。また、抽出した DNA 量も他の抽出法と比べてばらつきが少なく、PCR 反応も各試料ともに比較的安定していた。今回、増幅ができなかった DNA は、鋳型 DNA の濃度を変更すると PCR で増幅することが報告されている<sup>12)</sup>ことから、DNA の至適濃度の検討を行えば PCR で増幅すると考えられる。しかし、今後、静岡県の広葉樹の遺伝構造を解析する場合、多くの試料から DNA 抽出が必要であり、各試料に適した至適濃度の検討は作業効率を低下させる。このため、DNA 抽出や PCR 増幅の方法は付属のプロトコールのとおり実施することが簡潔かつ最短と考えられた。

以上の実験結果から総合的に判断して、5 樹種の広葉樹の DNA 抽出をするにあたり 3 種類の DNA 抽出キットを用いた実験では、DNeasy Plant Mini Kit を用いることが最適と判断されたので、今後、静岡県内の広葉樹の遺伝的構造解析は同キットを用いて、調査する予定である。

## V 摘 要

静岡県内に生育する広葉樹（ジゾウカンバ、ミズメ、ブナ、ケヤキ、カツラ）について、DNAを効率良く抽出するのに適した方法を探るため、3種類のDNA抽出キットを用いて、冬芽および葉から抽出したDNAの収量および品質を比較検討した。

その結果、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した場合、他のキットと比べてDNA収量は少なかったが、各試料間で大きな収量差がなく抽出できることがわかった。さらに、DNeasy Plant Mini Kitを使用して抽出したDNAは、他のキットと比較して、安定的にPCRによって増幅することが判明したことで、同キットは供試した広葉樹のDNA抽出に適すと考えられた。

## VI 謝 辞

本研究を実施するにあたり、山根のり恵氏には実験の補助をしていただいた。ここに感謝の意を表す。

## 引用文献

- 1) Balsa, C., Alibert G., Brulfert J., Queiroz O. and Boudet A.M. (1979) : Photoperiodic control of phenolic metabolism in *Kalanchoe Vlofeldiana*. *Phytochemistry* 18: 1159-1163.
- 2) Dumolin, S., Demesure, B., and Petit, R. J. (1995) : Inheritance of chloroplast and mitochondria genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 1253-1256.
- 3) Fujii, N., Tomaru, N., Okayama, K., Koike, T., Mikami, T., and Ueda, K (2002) : Chloroplast DNA phylogeography of *Fagus crenata* (Fagaceae) in Japan. *Plant Syst. Evol.* 232: 21-33.
- 4) Hoshino, Y.T., Hasebe, A (2005) : DNA extraction from soil. *Journal of Environmental Biotechnology* 5:1:43-53.
- 5) Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. and Small, R.L. (2007) : Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: *American Journal of Botany* 94(3): 275-288.
- 6) Kanno, M., Yokoyama, J., Suyama, Y., Ohya, M., Itoh, T. and Suzuki, M (2004) : Geographical distribution of two haplotypes of chloroplast DNA in four oak species (*Quercus*) in Japan. *J. Plant Res* 117:311-317.
- 7) 河原孝行・村上哲明・瀬戸口浩彰・津村義彦 (1995) : 野生植物からDNA抽出と解析への道. *日本植物分類学会報*. 11 : 13 ~ 32.
- 8) Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) : Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acid. Res.* 10; 8(19) : 4321-4325.
- 9) 向井謙・山本直樹 (1995) : 木本植物のDNA・RNA単離法. *植物のPCR実験プロトコール*, 秀潤社, 東京, 54 ~ 58.
- 10) 村上哲明・瀬戸口浩彰・河原孝行・津村義彦 (1995) : PCR法の植物系統学への応用. *植物のPCR実験プロトコール*. 秀潤社, 東京, 147 ~ 152.
- 11) 中島美幸・坂井至通 (2004) : モクレン科植物 (シデコブシ, コブシ, タムシバ) の葉組織を用いたDNA抽出法の検討. *岐阜県森林研報*. 第33号 : 39 ~ 43.
- 12) 陶山佳久 (2004) : 母方由来組織のマイクロサテライト分析による樹木種子・果実・実生の種子親特定. *日林誌*. 86 (2) : 177 ~ 183.
- 13) 田村隆明 (2006) : パイオ実験法&必須データポケットマニュアル. 羊土社, 東京, 43.
- 14) 津村義彦 (2008) : 広葉樹林の遺伝的攪乱. *林木の育種*. 第227号 : 31 ~ 33.
- 15) 吉丸博志 (2004) : 林業技術. No. 748 : 3 ~ 7.