静岡県における広葉樹の遺伝的構造（1）

葉および冬芽を用いたDNA抽出法の検討

誌名	静岡県農林技術研究所研究報告 = Bulletin of the Shizuoka Research Institute of Agriculture and Forestry
ISSN	18828264
著者名	山田,晋也 片井,秀幸
発行元	静岡県農林技術研究所
巻/号	2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 63-68
発行年月	2009年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

静岡県における広葉樹の遺伝的構造（Ⅰ）[†1]
－葉および冬芽を用いたDNA抽出法の検討－

山田晋也[1)]・片井秀幸[1)]

[1)]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 [1)] and Hideyuki Katai [1)]

[1)] 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[†2]．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[14)15)]．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[3]．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[6]．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[8]や改変CTAB法[2]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[10]や向井ら[9]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[11]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 μl とした．DNA抽出は，中島ら[11]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，エタノール沈殿によって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殿によって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 μl）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/ μl とし[13]，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／μl）=（A260-A320）× 50 × 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[5]を用いて，PCR増幅により確認した．プライマーとして，*trn*Q(UUG)-*rp*S16，*rp*S16-*trn*K(UUU)，*psb*D-*trn*T(GGU)，*trn*V(UAC)-ndhCの4領域を増幅するセットを用いた（表1）．PCRは

10 μ l の反応系で，以下の組成で行った．鋳型DNA5ng，DNA ポ リ メ ラ ー ゼ（Go Taq; Promega Co.Ltd, Wisconsin, USA）0.75unit，dNTPs（25mM）1 μ l，MgCl2（50mM）0.6 μ l，10 ×緩衝液 1 μ l を用いた．PCR 条件は94℃ 3 分，(94℃ 45 秒，50℃ 45 秒，72℃ 1 分) 25 サイクル，72℃ 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' → 3')
*trn*Q(UUG)-*rp*S16	(forward)	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC
	(reverse)	GTTGCT TTYTACCACATCGTTT
*rp*S16-*trn*K(UUU)	(forward)	AAAGTGGGTTTTTATGATCC
	(reverse)	TTAAAAGCCGAGTACTCTACC
*psb*D-*trn*T(GGU)	(forward)	CTCCGT ARCCAGTCATCCATA
	(reverse)	CCCTTTTAACTCAGTGGTAG
*trn*V(UAC)-*ndh*C	(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．

ISOPLANTII 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 / μ l からケヤキ冬芽の 17.5ng/ μ l の範囲で，平均 7.0 ng / μ l であった．ISOPLANT Ⅱ で抽出した場合，ブナ葉の 146.0ng/ μ l からカツラ冬芽の 376.3ng/ μ l で，平均 254.1 ng/ μ l であった．Nucleon Phytopure で抽出した場合，ブナ冬芽の 5ng/ μ l からカツラ冬芽の 170.3ng/ μ l で，平均 53.8 ng/ μ 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

*trn*Q(UUG)-*rp*S16，*rp*S16-*trn*K(UUU)，*psb*D-*trn*T(GGU)，*trn*V(UAC)-*ndh*C 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

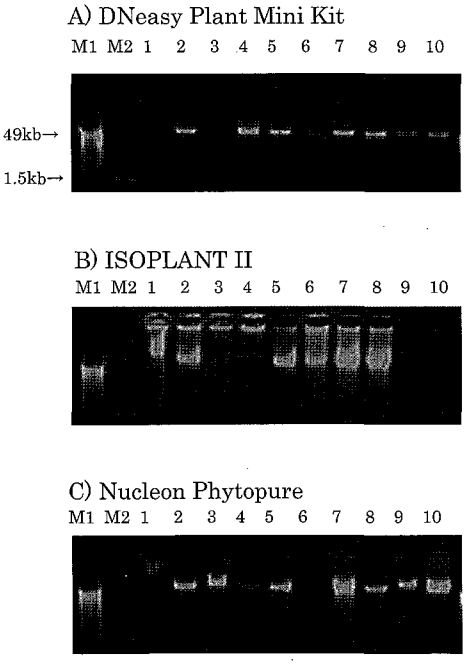

図1　アガロースゲル電気泳動による抽出DNAの確認

M1：λDNA　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

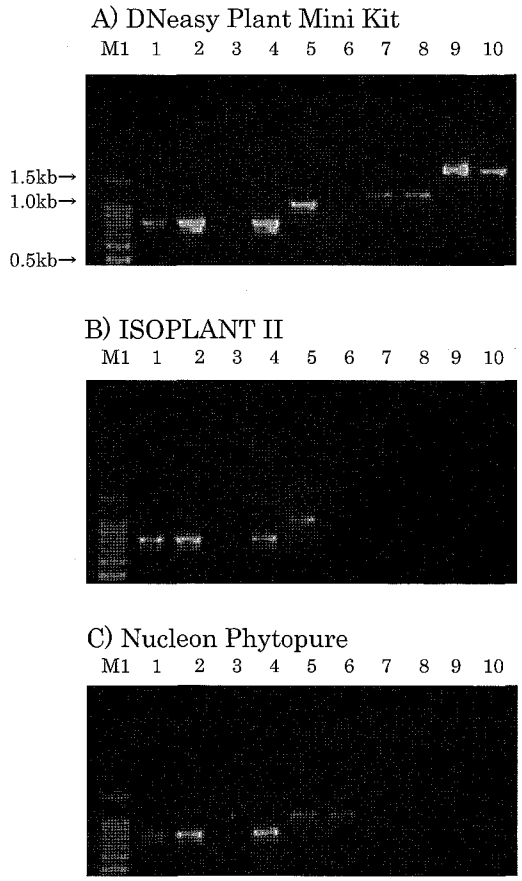

図2　PCRを用いた葉緑体DNAの*trn*Q(UUG)-*rp*S16領域の増幅
M：マーカー　1：ジゾウカンバ葉　2：ジゾウカンバ冬芽
3：ミズメ葉　4：ミズメ冬芽　5：ブナ葉　6：ブナ冬芽
7：ケヤキ葉　8：ケヤキ冬芽　9：カツラ葉　10：カツラ冬芽

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．対象物の破砕方法のみでも，物理的，酵素的，化学的がある．更に物理的破砕は加熱，凍結＋融解，液体窒素による凍結＋粉砕など，酵素的破砕にはリゾチームなど，また，化学的破砕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[4]．本研究では，まず液体窒素による凍結＋粉砕を行った．これは，植物細胞壁などの影響で試料が破砕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砕を実施した．DNeasy Plant Mini Kit の化学的破砕では，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		ISOPLANTII		Nucleon Phytopure	
	濃度（ng/ μ l）	A_{260}/A_{280}	濃度（ng/ μ l）	A_{260}/A_{280}	濃度（ng/ μ 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/ μ l）＊10（10倍希釈）
1）各数値は3回繰り返しの平均値
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（A260／A280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，化学的破砕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をスピン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，ISOPLANTII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．ISOPLANTⅡ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こり，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[1)]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．ISOPLANTⅡ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，ISOPLANTⅡ，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，ISOPLANTⅡ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[13)]，DNeasy Plant Mini Kitでは3つ，ISOPLANTⅡ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，ISOPLANTⅡ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*trn*Q(UUG)-*rp*S16領域は，ISOPLANTⅡとNucleon Phytopureで抽出したケヤキとカツラ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，*trn*Q(UUG)-*rp*S16領域の増幅が確認できなかったISOPLANTⅡとNucleon Phytopureで抽出したケヤキとカツラ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[12)]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抽出に適すると考えられた．

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る．

引 用 文 献

1) Balsa, C.,Alibert G.,Brulfert J., Queiroz O. and Boudet A.M. (1979): Photoperiodic control of phenolic metabokism in Kalanchoe Vlosfeldiana. 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., Yokoyam, J., Suyama, Y., Ohyama, 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) 向井譲・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）：バイオ実験法＆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.