

# ISSR、AFLPおよびRAPD分析によるハゼノキ優良候補個体のクローン識別と遺伝的類縁関係の推定

誌名	日本森林学会誌
ISSN	13498509
著者名	平岡,裕一郎 倉本,哲嗣 岡村,政則 大平,峰子 谷口,亨 藤澤,義武
発行元	日本森林学会
巻/号	91巻4号
掲載ページ	p. 246-252
発行年月	2009年8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



## ISSR, AFLP および RAPD 分析によるハゼノキ優良候補個体の クローン識別と遺伝的類縁関係の推定

平岡裕一郎<sup>\*1</sup>・倉本哲嗣<sup>2</sup>・岡村政則<sup>3</sup>・大平峰子<sup>2</sup>・谷口 亨<sup>1</sup>・藤澤義武<sup>1</sup>

(独)森林総合研究所林木育種センター九州育種場と福岡県で選抜されたハゼノキ優良候補個体について、9プライマーによる31のISSRマーカーと、2プライマー対による26のAFLPマーカーの併用によるクローン識別を行った。供試した77個体のクローン識別の結果、45クローンに分類され、そのうち主要在来品種と同一となった個体数は、昭和福が9個体、伊吉が24個体、王が2個体であった。大矢野1号と鹿屋1号はISSR分析において同一のDNA型を示したが、AFLP分析では異なるDNA型を示し、この2個体は異なるクローンと判断された。これらのクローンの遺伝的類縁関係を把握するため、ISSR, AFLP および RAPD 分析で得られた、合計204マーカーの情報に基づき、クラスター分析および主成分分析を行った。その結果、大きく二つのクラスターに分かれたが、分岐のブーツストラップ確率は高くなかった。また個体間の遺伝的関係と選抜地の地理的な関連性は見出されなかった。このことはハゼノキ栽培の普及に伴う、人為的な移動や在来品種等に由来する実生個体の混在が要因と推察された。本研究結果は、ハゼノキの交雑育種を進める上での基礎情報となると考えられる。

キーワード：AFLP分析, ISSR分析, クローン識別, ハゼノキ, RAPD分析

Yuichiro Hiraoka,<sup>\*1</sup> Noritsugu Kuramoto,<sup>2</sup> Masanori Okamura,<sup>3</sup> Mineko Ohira,<sup>2</sup> Toru Taniguchi,<sup>1</sup> and Yoshitake Fujisawa<sup>1</sup>: Clone Identification and Genetic Relationship among Candidates for Superior Trees in *Rhus succedanea* L. Using ISSR, AFLP, and RAPD Markers. *J. Jpn. For. Soc.* 91: 246-252. Clone identification was carried out with the combined method of ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) analysis (31 markers with 9 primers) and AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analysis (26 markers with 2 primer pairs) concerning the superior candidate individuals of *Rhus succedanea* L. selected by Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute and Fukuoka Prefectural Government. As the result of the clone identification, 77 individuals are classified into 45 clones, included local cultivars, 9 of Showafuku, 24 of Ikichi and 2 of Oh. In process of identification analysis, although 2 individuals showed identical band pattern but were different from known local cultivars in the ISSR analysis, these 2 individuals showed different fragment patterns in the AFLP analysis were judged as separate genotypes. Cluster analysis and principal component analysis based on the information of the total 204 markers of ISSR, AFLP, and RAPD was also carried out. However there were two genetic groups with low bootstrap probabilities, it was obscureness the relationship between the similarities and geographical distances among selection area of clones. It was considered that artificial transfer of *R. succedanea* cultivars or mating among cultivated individuals have occurred. The knowledge from this study will help carrying forward *R. succedanea* breeding program.

Key words: AFLP analysis, clone identification, ISSR analysis, RAPD analysis, *Rhus succedanea* L.

### I. はじめに

ハゼノキ (*Rhus succedanea* L.) は、日本では九州、四国、関東以西の本州などの暖地に、また朝鮮、中国からブータン、ネパールに至る広い分布域をもつウルシ科 (*Anacardiaceae*) の落葉高木であり、一般に雌雄異株植物とされるが、雌雄同株個体も確認されている (平岡ら, 2004)。ハゼノキの雌個体が生産する果実からは蠟燭やびん付け油の原料として利用される木蠟が採取できるため、各地で古くから栽培が行われてきた。現在では口紅等の高級化粧品やコピーのトナー、その他さまざまな工業製品の原材料としても用いられている。

独立行政法人森林総合研究所林木育種センター九州育種

場 (以下、九州育種場と称する) では、ハゼノキの新たな優良品種を開発する目的で、西日本各地において優良候補個体の選抜事業を行った。まず、福岡県と九州育種場が共同で行った「地域特性品種育成事業 (1990~1997年度)」において、52個体が選抜された (池田, 1991, 1992, 1993, 1994) (以下、福岡県選抜と称する)。これとは別に、九州育種場が独自に進めた選抜事業 (1996~1998年度) によって32個体を選抜し (田村ら, 1997, 1998; 山野邊・伊藤, 1999) (以下、育種場選抜と称する)、そのうちクローン増殖に成功した30個体を保存した (山野邊・伊藤, 2000)。

もともとハゼノキには在来品種が多数存在し、これらは一般につぎ木により増殖され、西日本各地に広く植栽されている。このため、各地で選抜された異なる名称の選抜個

\* 連絡先著者 (Corresponding author) E-mail: yhiraoka@affrc.go.jp

<sup>1</sup> 独立行政法人森林総合研究所林木育種センター 〒319-1301 日上市十王町伊師 3809-1 (Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 3809-1 Ishi, Juo, Hitachi 319-1301, Japan)

<sup>2</sup> 独立行政法人森林総合研究所林木育種センター九州育種場 〒861-1102 合志市須屋 2320-5 (Kyushu Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 2320-5 Suya, Koshi 861-1102, Japan)

<sup>3</sup> 独立行政法人森林総合研究所林木育種センター関西育種場 〒709-4335 岡山県勝田郡勝央町上月中 1043 (Kansai Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 1043 Uetsukinaka, Shoo, Katsuta, Okayama 709-4335, Japan) (2007年3月26日受付; 2009年3月26日受理)

体が同一クローンである可能性がある。実際、後藤ら(1997)は福岡県選抜の一部の個体について、DNA分析の一手法であるRAPD (random amplified polymorphic DNA) 分析によるクローン識別を行い、いくつかの個体で在来品種と同じDNA型の個体を見いだしている。このため、未だ分析に供されていない選抜個体にも在来品種が含まれている可能性は高いが、これまでに選抜個体群を網羅したDNA型によるクローン分類は行われていないため、選抜集団を基にした育種を進める上でDNA型による分類をしておく必要がある。また、一般に近縁個体同士の交雑を行うことにより近交弱勢などが起こることがある等の理由から、交雑育種を進めるにあたっては、遺伝マーカーを用いて育種素材の遺伝的背景を推定することは重要である。

クローン鑑定や遺伝的背景の推定には、これまで種々のDNAマーカーが利用されてきた。たとえば、優性マーカーとしてRAPDマーカー (Williams *et al.*, 1990), ISSR (inter simple sequence repeat) マーカー (Zietkiewicz *et al.*, 1994), AFLP (amplified fragment length polymorphism) マーカー (Vos *et al.*, 1995) や、共優性マーカーであるSSR (simple sequence repeat) マーカー (Tautz, 1989), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) マーカー (Konieczny and Ausubel, 1993) 等が挙げられる。優性マーカーは共優性マーカーと比較して、対象生物種の塩基配列情報を必要とせず、マーカー開発にそれほど手間がかからないため、ハゼノキのようにマーカー開発がなされていない樹種を対象とした分析にも容易に利用できる。中でもRAPDマーカーは他のDNAマーカーと比較して特に低コストで操作が簡便であるため、多くの植物種に用いられてきた (Weising *et al.*, 1995; Harris, 1999)。RAPDマーカーは再現性を問題にされることもあるが (Ellsworth *et al.*, 1993), 繰り返し実験によって再現性が確認されたマーカーを選抜する方法を採ることでこの問題を回避できる (たとえば後藤ら, 1997)。AFLPマーカーは分析手法が複雑な上に、フラグメントの検出に分解精度の高いゲルシステムを使用する必要があるが、再現性が高く、RAPDマーカーより多数の情報を一度に得られる利点がある (Vos *et al.*, 1995)。ISSRマーカーは、マイクロサテライト部位にアニーリングするプライマーを用いる方法であり、RAPD法と同様に操作が簡便であり、RAPD法と比較して長いプライマーを使用するため、PCRの再現性が高い (Tsumura *et al.*, 1996)。これらの優性マーカーはゲノム中からランダムに情報を引き出すことが可能であり、品種同定 (Prevost and Wilkinson, 1999; Fernández *et al.*, 2002; Fang and Roose, 1997) や近縁分類群間の遺伝的多様性 (Kantety *et al.*, 1995; Métais *et al.*, 2000) の推定に用いられている。したがって、これらのマーカーを用いることにより、ハゼノキ選抜個体群のクローン識別や遺伝的類縁関係の把握を容易に行うことができると考えられる。

本研究では、ハゼノキの選抜個体群を育種素材として利用する上で重要な基礎情報を得るために、ISSR, AFLP, RAPDの各分析法を用いた。まず再現性が高く、操作が簡

便なISSRマーカーを用いて、1) ハゼノキのクローン識別を行い、その後同一DNA型となった個体同士をAFLP分析で確認した。さらに2) RAPDマーカーの情報を加え、選抜個体間の遺伝的類縁関係の推定を行った。

## II. 材料と方法

### 1. 供試材料

供試材料は、つぎ木増殖された福岡県選抜個体と育種場選抜個体のうち、サンプル採取が可能であった選抜時の名称が異なる77個体である (表-1, 2)。サンプル採取は、福岡県選抜個体は熊本県水俣市内に設定された3箇所の試験地において、育種場選抜個体は同市長崎所在の水俣ハゼノキ試植検定林 (山野邊・伊藤, 2000) で行った。なお、これらの選抜個体の一部は、在来品種から選抜されている (表-1)。供試材料とはラメートが異なるものの、後藤ら (1997) によって、これら由来品種をはじめとする選抜個体についてRAPD分析が行われており、DNA型が決定されている (表-1, 2)。

### 2. DNA抽出とISSRおよびRAPD分析

供試個体の新葉約100mgからバイオジェンバイオテック社製のDNA抽出キット Plant Genomic DNA Extraction Miniを用いてDNAを抽出し、TEバッファーで25ng/ $\mu$ Lの濃度に調整したものを、PCR (Polymerase Chain Reaction) の鋳型DNAとして用いた。

ISSRマーカーの検出におけるPCR反応液の組成はGoto *et al.* (2002) の条件に準じた。ただし、反応液量は15 $\mu$ Lとし、10 $\times$  Stoffel bufferを1.5 $\mu$ L、鋳型DNA量を25ng、DNA合成酵素量をABI社製AmpliTaq DNA Polymerase Stoffel Fragment 0.75 unitとした。PCRにはMJR社製のPTC-200を使用した。PCRの反応条件は94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1分間の熱変性後、94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 40秒間:アニーリング45 $^{\circ}$ C $\cdot$ 45秒間:伸長72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1.5分間を1サイクルとして35回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5分間の伸長を行った。ISSRプライマーはUniversity of British Columbia (UBC) プライマーセットの中から選んで使用した。RAPDマーカーの検出におけるPCR反応液の条件および使用したサーマルサイクラーは上記のISSR分析と同様とし、プライマーはオペロン社製のものを用いた。両分析とも、PCR増幅産物の泳動には2%アガロースゲルを用い、観察はUVトランスイルミネーター上で行った。AFLP分析は、GIBCO BRL<sup>®</sup> のAFLP<sup>™</sup> Core Reagent Kitでアダプターライゲーションを行い、ABI社のAFLP<sup>™</sup> Amplification Core Mixを用いてPCR増幅を行った。PCR反応にはGeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (ABI社製) を用いた。フラグメントの検出にはABI 3100 Genetic Analyzer (ABI社製) を使用し、Genotyper<sup>™</sup> ソフトウェアでフラグメントサイズを決定した。

### 3. 類似度の算出とクラスター分析

個体間の遺伝的類縁関係を表す指標として、ISSR, AFLPおよびRAPD分析で得られたマーカーの有無に基づき、遺伝的距離 (Nei and Li, 1979) を算出し、MEGA4 (Tamura *et*

表-1. ISSR および AFLP 分析で在来品種と一致した選抜個体

判定品種名 (原産地#)	選抜個体名	選抜地 (現在の地名)	選抜時の 在来品種名	クラスター分析 供試個体	クラスター分析に おけるクレード
伊吉 (福岡県)	甘木 1 号*	福岡県朝倉市下瀬			
	有明 3 号	長崎県島原市有明町			
	木部 2 号*†	熊本県熊本市御幸木部			
	久留米 1 号*	福岡県久留米市山本町			
	久留米 2 号	福岡県久留米市山本町			
	久留米 3 号	福岡県久留米市山本町			
	久留米 4 号*†	福岡県久留米市山本町			
	久留米 5 号*	福岡県久留米市山本町			
	久留米 6 号*	福岡県久留米市山本町			
	黒木 3 号*	福岡県八女郡黒木町		伊吉	
	筑後 1 号*	福岡県筑後市蔵敷		伊吉	
	筑後 2 号*	福岡県筑後市蔵敷		伊吉	
	筑後 3 号	福岡県筑後市蔵敷			
	鳥栖 1 号*	佐賀県鳥栖市立石町		伊吉	
	鳥栖 2 号	佐賀県鳥栖市立石町			
	鳥栖 3 号*	佐賀県鳥栖市立石町		伊吉	
	鳥栖 4 号	佐賀県鳥栖市立石町			
	鳥栖 5 号*	佐賀県鳥栖市立石町		伊吉	
	中原 1 号	佐賀県三養基郡みやき町			
	中原 2 号*	佐賀県三養基郡みやき町		伊吉	○
中原 3 号*	佐賀県三養基郡みやき町		伊吉		
水俣 6 号	熊本県水俣市月浦				
菊池 1 号 <sup>†</sup>	熊本県菊池市豊間				
南関 1 号 <sup>†</sup>	熊本県玉名郡南関町				
昭和福 (長崎県)	有明 1 号*	長崎県島原市有明町	昭和福		
	有明 2 号*	長崎県島原市有明町	昭和福	○	B
	有家 2 号*	長崎県南島原市有家町	昭和福		
	黒木 1 号*	福岡県八女郡黒木町	昭和福		
	黒木 2 号*	福岡県八女郡黒木町	昭和福		
	黒木 4 号	福岡県八女郡黒木町			
	黒木 5 号	福岡県八女郡黒木町			
	水俣 3 号	熊本県水俣市月浦			
水俣 4 号	熊本県水俣市月浦				
王 (愛媛県)	丹原 1 号*	愛媛県西条市丹原町	王		
	丹原 3 号*	愛媛県西条市丹原町	王	○	A
上 (不明)	高田 1 号*	福岡県みやま市高田町	上	○	A
葡萄 (和歌山県)	八女 1 号*	福岡県八女市今福	葡萄	○	A
松山 (福岡県)	甘木 4 号*	福岡県朝倉市矢野竹	松山	○	B

\* 後藤ら (1997) が分析した個体。† 後藤ら (1997) では異なる遺伝子型に分類された個体。<sup>†</sup> 育種場選抜個体, その他は福岡県選抜個体。<sup>#</sup> 正木 (1938) による。

al., 2007) を用いてデンドログラムを作成した。さらに PHYLIP v3.66 (<http://evolution.gs.washington.edu/phytip.html>) を用いて 100 回のランダムサンプリングによる各分岐のブーツストラップ確率を算出した。またマーカーの有無を 1/0 データとし, 主成分分析を行った。主成分分析には統計パッケージ R (R Development Core Team, 2007) を用いた。

### III. 結 果

#### 1. スクリーニング

表-3 に, 各 DNA 分析法において使用したプライマー (対) 数と得られたマーカー数を示す。ISSR プライマーのスクリーニングは, 8 個体を用いて, 72 プライマーについて行い, 多型的かつ 2 回の異なる分析によって再現性のあったフラグメントを有する 9 プライマーから 31 マーカーを選定した。AFLP 分析は 2 種類の *EcoRI*+3 塩基と 8 種類の *MseI*+3 塩基のプライマーによる 16 組み合わせについて,

16 個体を用いて 2 回の再現性を確認した結果, 13 組み合わせから得られた 99 マーカーを選定した。RAPD 分析については, 130 プライマーから, 8 個体において多型性の認められたフラグメントを有する 46 プライマーを選定した。さらにこれら 46 プライマーを用いて, 4 個体の葉サンプルから 2 回繰り返して抽出した計 8 個の DNA サンプルを対象とし, 再度 PCR を行い, 再現性のあるフラグメントを絞り込んだ。その結果, 39 プライマー・74 マーカーを選定した。

#### 2. クローン識別

供試した 77 個体に対して ISSR 分析を行った結果, 在来品種である昭和福と同一の DNA 型を持つ個体が 9 個体, 伊吉と同一のものが 24 個体, 王と同一のものが 2 個体あり, また大矢野 1 号と鹿屋 1 号が同じ DNA 型を示した。これらを除く他の個体では DNA 型が異なった。ISSR 分析で同一 DNA 型を示した個体に対して, AFLP 分析を行った。マーカー数の多い 2 プライマー対 (*EcoRI*+ACA と *MseI*+CAG, *MseI*+CAT の各組み合わせ) で PCR を行った結果, ISSR 分

表-2. 在来品種とは異なる DNA 型を示した選抜個体

選抜個体名	選抜地 (現在の地名)	古い個体*	クラスター分析におけるクレード
<b>福岡県選抜</b>			
甘木 2 号	福岡県朝倉市下瀬	○	B
甘木 3 号*	福岡県朝倉市小原		A
有家 1 号*	長崎県南島原市有家町		A
木部 1 号	熊本県熊本市御幸木部	○	A
木部 3 号	熊本県熊本市御幸木部		B
木部 4 号	熊本県熊本市御幸木部	○	A
高田 3 号	福岡県みやま市高田町		A
丹原 2 号	愛媛県西条市丹原町		A
戸島 1 号*	熊本県熊本市戸島		A
保内 1 号	愛媛県八幡浜市保内町		B
水俣 1 号*	熊本県水俣市月浦		B
水俣 2 号	熊本県水俣市月浦		A
水俣 5 号	熊本県水俣市月浦	○	B
<b>育種場選抜</b>			
天草 1 号	熊本県天草市天草町		A
天草 3 号	熊本県天草市天草町		A
天草 5 号	熊本県天草市天草町		A
有明(育)1 号†	熊本県天草市有明町		A
育種場 1 号	熊本県合志市須屋		B
宇土 2 号	熊本県宇土市		B
大矢野 1 号	熊本県上天草市大矢野町		A
鹿屋 1 号	鹿児島県鹿屋市永小原町		A
河浦 4 号	熊本県天草市河浦町		A
桜島 1 号	鹿児島県鹿児島市桜島横山町		A
佐多 2 号	鹿児島県南大隅町佐多		A
佐多 3 号	鹿児島県南大隅町佐多		A
佐多 4 号	鹿児島県南大隅町佐多		A
佐多 6 号	鹿児島県南大隅町佐多		A
玉名 2 号	熊本県玉名市小浜	○	B
玉名 3 号	熊本県玉名市小浜	○	A
長洲 1 号	熊本県玉名郡長洲町	○	A
根占 3 号‡	鹿児島県肝属郡南大隅町根占	○	A
根占 7 号	鹿児島県肝属郡南大隅町根占		A
根占 8 号	鹿児島県肝属郡南大隅町根占		A
根占 9 号	鹿児島県肝属郡南大隅町根占		A
松島 1 号	熊本県上天草市松島町		A
本渡 1 号	熊本県天草市志柿町		B
本渡 2 号	熊本県天草市志柿町		B
水俣(育)1 号†	熊本県水俣市月浦	○	B
水俣(育)3 号†	熊本県水俣市月浦		B

\* 後藤ら (1997) が分析した個体。† 福岡県選抜と同名であったため、区別のため「(育)」を付した。‡ 選抜個体ではないが、対照個体として保存されているもの。\* 選抜時の胸高直径が 40 cm 以上、もしくは地際直径が 50 cm 以上の個体。

析で昭和福、伊吉、王と同一 DNA 型であった個体は AFLP 分析でも同一遺伝子型であったが、大矢野 1 号と鹿屋 1 号は遺伝子型が異なった。その結果、今回供試した 77 個体は、45 クローンに分類された (表-1, 2)。後藤ら (1997) は、甘木 3 号を伊吉に分類し、木部 2 号と久留米 4 号を伊吉でないとしたが、本研究の結果では甘木 3 号は伊吉でなく、木部 2 号と久留米 4 号は伊吉に分類され、この 3 個体について両研究の結果が異なった。以後の解析では、本識別結果に基づき、同一の DNA 型を有する個体を同一クローンとして扱うこととした。また、在来品種に同定されたクローンは、以後選抜個体名でなく、在来品種名で称することとした。

表-3. 解析に用いた ISSR, AFLP, RAPD プライマーとマーカー数

ISSR		AFLP		RAPD	
プライマー	マーカー数	プライマー対	マーカー数	プライマー	マーカー数
		<i>EcoRI</i> +	<i>MseI</i> +		
(AC) <sub>8</sub> CG	1	ACA	CAA	A-16	3
(AC) <sub>8</sub> TG	5	ACA	CAC	E-05	2
(AG) <sub>8</sub> CC	3	ACA	CAG	E-06	2
(AG) <sub>8</sub> TC	2	ACA	CAT	I-10	2
(CA) <sub>8</sub> GC	4	ACA	CTA	J-05	4
(CT) <sub>8</sub> CG	5	ACA	CTC	J-07	1
(CT) <sub>8</sub> GC	3	ACA	CTG	R-02	2
(GA) <sub>8</sub> CC	7	ACA	CTT	R-03	2
(GACA) <sub>4</sub>	1			R-04	2
		ACC	CAC	R-06	1
		ACC	CAT	R-11	2
		ACC	CTC	R-13	2
		ACC	CTG	X-04	3
		ACC	CTT	AK-08	1
				AK-09	2
				AK-10	2
				AK-11	2
				AK-19	2
				AK-20	2
				AL-03	3
				AL-04	2
				AL-06	2
				AL-11	2
				AL-12	3
				AL-14	1
				AL-16	2
				AL-18	1
				AM-20	1
				AN-05	1
				AN-08	1
				AN-12	1
				AP-01	2
				AP-04	3
				AP-08	2
				AP-16	2
				AP-19	1
				AQ-05	2
				AQ-12	1
				AS-19	2
計	9	31	13	99	74

### 3. クラスター分析と主成分分析

ISSR, AFLP および RAPD 分析で得られた、合計 204 マーカーの情報から算出した遺伝距離を基にしたクラスター分析の結果を図-1 に示す。45 クローンは、二つの大きなクレードに分かれた (A 群と B 群)。しかし、両クレードのブーツストラップ確率はそれぞれ 21, 20 であり、高い値を示さなかった。在来品種 (表-1) および選抜時の胸高直径が 40 cm 以上、あるいは地際直径が 50 cm 以上のクローン (表-2) のみを用いて、再度クラスター分析を行った結果、分岐パターンは大きく変化しなかったが、ブーツストラップ確率はやや高くなった (図-2)。さらにマーカーの 1/0 情報を基に、クラスター分析に供した 45 クローンについて主成分分析を行った。第 1 主成分の寄与率は 9.2%、第 2 主成分は 5.3% となり、各クローンにおける第 1, 第 2 主成分値

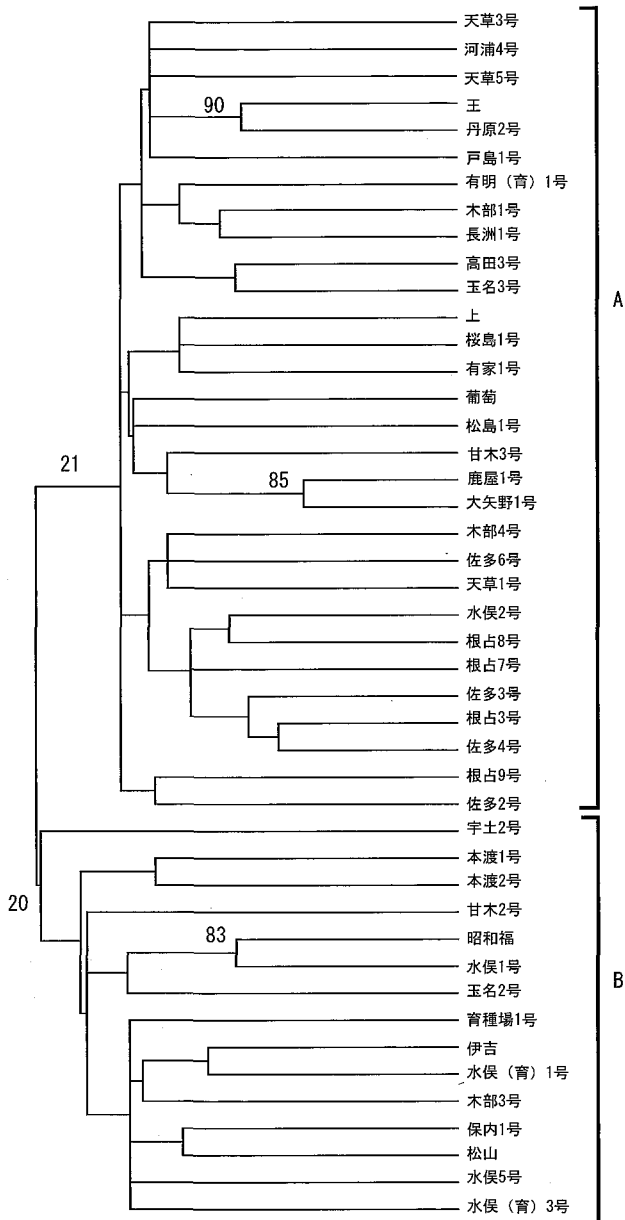


図-1. ハゼノキクロンのクラスター分析結果 (1)  
 図の右端にある大文字のアルファベットはクラスターの群名を、図中の数字は分岐におけるブートストラップ確率を示す。表記したブートストラップ確率は、最も大きな分岐における値と50以上であったもののみとした。

を基にした散布図では、第1主成分に沿って大きく2群に分かれ、第1主成分値が-1より大きい群と、-1より小さい群がそれぞれクラスター分析のA, B群と一致した(図-3)。天草3号は他のクロンからやや離れて位置した。

IV. 考 察

1. ISSR, AFLP および RAPD 分析の比較

ハゼノキ選抜個体群に対して本研究で用いた三つのDNA分析手法には、それぞれ特徴がみられた。1プライマー(対)当たりの得られたマーカー数については、ISSR分析が

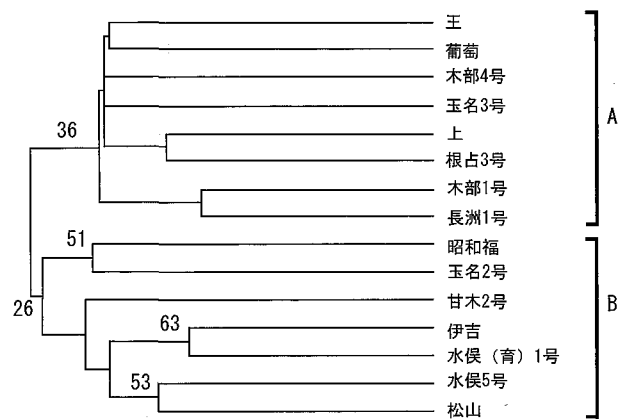


図-2. ハゼノキクロンのクラスター分析結果 (2)  
 在来品種および選抜時の胸高直径が40 cm以上、あるいは根元直径が50 cm以上のクロンについての結果を示す。表記の方法は図-1と同様とした。

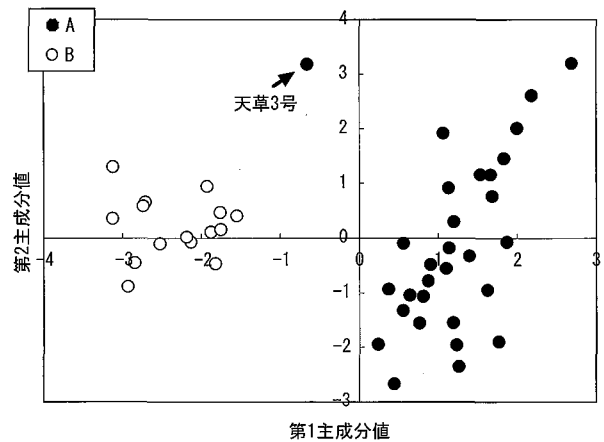


図-3. 各クロンのマーカー情報に基づく主成分分析結果  
 凡例のアルファベットは図-1および2で使用した群名を表す。

3.4. AFLP分析では7.6, RAPD分析は1.9であり、AFLP法が最も効率よくマーカーが得られる手法であった。

RAPD分析ではこれまで指摘されてきたように、本研究でも異なるPCR間における再現性に問題があったため除外されるマーカーが他の手法と比較して多く認められた。しかし、本研究の解析の過程で、RAPD法、AFLP法でおのおの決定されたマーカーを用いてそれぞれクラスター分析を行ったところ、互いに似通った結果となった(データ掲載なし)。このことからRAPD法は、再現性が確認されたマーカーを用いれば遺伝的関係の推定には十分利用可能な手法であるといえる。

Archak et al. (2003) はカシュー (*Anacardium occidentale* L.) の遺伝的解析のためのDNA分析法の検討で、本研究と同様にRAPD, ISSRおよびAFLP法を比較し、1マーカー当たりのコスト、信頼性、再現性の点でAFLP法が最も優れているとしている。しかし、AFLP法は設備の制約等があるのに対して、ISSR法はRAPD法と同様に実験操作が容易

である上に、再現性が高く、1プライマー当たり得られるマーカー数も比較的多いことから、十分な研究用設備が整っていない環境では ISSR 法は利便性の高いマーカーと考えられる。

## 2. ISSR および AFLP 分析によるクローン識別

今回のクローン識別は、まず ISSR 分析で整理し、その後マーカー数が多いプライマー対を用いて AFLP 分析を行い再確認するという、両分析を併用する方法で行った。その結果、ISSR 分析で、昭和福もしくは伊吉、王と同一とされたすべての個体は AFLP 分析でも同じ結果を示し、同一クローンであることが支持された。すでに後藤ら (1997) によって在来品種と同一クローンである選抜個体がいくつか示されていたが、本研究ではさらに多くの選抜個体で在来品種との一致が確認された。鹿屋 1 号と大矢野 1 号は、ISSR 分析では同一 DNA 型を示したものの、AFLP 分析では両者が異なる結果となった。クラスター分析において、これら 2 クローンの遺伝的類縁関係はきわめて近縁であった (図-1)。本研究におけるクローン分類結果は、再現性の高い複数の手法によるため一定の成果ととらえて良いと考えるが、今後さらなる信頼性、解像度のともに高い識別システムの構築には、多型性のきわめて高い SSR マーカー等の導入の検討が必要かもしれない。

本研究と後藤ら (1997) の報告の間でクローン同定の結果が異なったものが 3 個体あった。そのうち、後藤ら (1997) によって伊吉と同定された甘木 3 号は、伊吉と近縁であるために RAPD 分析では DNA 型が区別されなかった可能性が考えられる。しかし、クラスター分析では甘木 3 号と伊吉は異なるクレードに属し (図-1)、両者は近縁でないことが示唆された。さらに、甘木 3 号と昭和福、伊吉、王を、後藤ら (1997) が使用したものと同様の RAPD プライマーを用いて分析したところ、4 個体は異なるフラグメントパターンを示した (データ掲載なし)。これらから、甘木 3 号は後藤ら (1997) と本研究では供試サンプルのクローンが異なるものと考えられる。

これまでに、採種園などのクローン植栽地で、ミスラベルや植栽ミス、あるいはつぎ木台木の立ち上がりにより、誤ったクローンが配置されていたという報告がある (Wheeler and Jech, 1992; 川内・後藤, 1999)。本研究と後藤ら (1997) の結果の不一致は、これらの報告と同様に増殖・植栽過程でのミスラベルや台木の立ち上がりが主因と考えられるため、今後は DNA マーカーを利用し、保存している各クローンのラメート管理が必要である。

## 3. DNA マーカーによるクローン間の遺伝的類縁関係

クラスター分析の結果、在来品種である 6 クローンのうち、王・上・葡萄が一つのクレード (A 群) に、伊吉・松山・昭和福がもう一つのクレード (B 群) に含まれた。これらは後藤ら (1997) がクラスター分析で供試した 7 在来品種のうち、利太治以外の 6 品種で、両研究の結果は非常に似通ったものとなった。さらに本研究において、他のクローンもそれら二つのクレードにまとまった。クラスター

分析と主成分分析の結果が一致したことから、選抜個体群は遺伝的に二つに分化したことが示唆された。ただし、クラスター分析におけるブーツストラップ確率は低いいため、分化の程度は弱いと考えられる。九州などの西日本では、在来品種等の植栽木由来と考えられるハゼノキの実生個体が多数みられ、これらは比較的樹齢が低く、幹直径が小さな個体であると考えられる。それらを除いた解析を行うため、選抜時の幹直径が大きいクローンと在来品種のみをクラスター分析に供した結果、ブーツストラップ確率がやや高くなり、分化がより明瞭になった (図-2)。このことから、本研究で供試した個体は、在来品種や古くからの植栽木に由来する実生個体が含まれている可能性がある。また天草 3 号はクラスター分析では A 群に属したが、主成分分析では B 群に近い位置に分布したことから、両群の交雑を経た個体かも知れない。それとは別に、ハゼノキは中国あるいは沖縄 (琉球) から持ち込まれたとの説があり (野口, 1977)、これが遺伝的分化に影響を及ぼしている可能性も考えられる。今後は本研究で把握した遺伝的関係の情報に、さらに SSR のような共優性マーカーによる分析を加えることで、血縁関係のより詳細な情報を得ることが可能となる。

後藤ら (1997) は、七つの在来品種がクラスター分析で二つに分かれた原因として原産地の違いを挙げ、それぞれ九州原産と本州・四国原産と考察した。本研究では、クラスター分析における A 群は鹿児島、熊本、福岡、長崎、愛媛、和歌山の各県において選抜されたクローンや在来品種で構成され、B 群は、愛媛、福岡、長崎、熊本の各県で選抜されたクローンや在来品種で構成されていた (表-1, 2)。このように、後藤ら (1997) の結果に対して、本結果ではさまざまな地域から選抜された個体が同じクレードを形成し、クレードと地域との関連性は明瞭でなかった。ハゼノキは栽培植物として江戸時代以来、多くの人為的な移動を経ている (野口, 1977)。本研究で供試したクローンには、上述の通り古くに植栽された個体由来の実生個体が含まれている可能性があり、それが今回の結果に反映したと考えられる。

## 4. ハゼノキの育種における DNA マーカー情報の利用

ハゼノキから採取される木蠟は、現在さまざまな工業製品に利用されており、その安定供給が望まれていることから、九州育種場において木蠟生産に適したハゼノキの 2 品種 (木部 1 号と水俣 (育) 1 号) が開発された (平岡ら, 2007)。この 2 クローンは、本研究に先立って行われた RAPD 分析により、既知の在来品種と異なる DNA 型であることを確認した上で選抜されたものである (倉本, 2007)。本研究では、上記の 2 新品種をはじめとするほぼすべての選抜個体を対象とした信頼性の高いクローン分類が完了し、新品種が在来品種とは異なるものであることを再確認した。今後は、本研究の分類情報を用いることで既存の品種とは異なる形質を備えたクローンの選定を効率的に行うことができる。

また交雑育種を進める上で、近交弱勢などの問題を回避するためには、交雑個体間の遺伝的類縁関係を考慮した人工交配の計画を行う必要がある。その際、本研究で得られたDNAマーカーに基づく情報は有用であろう。ハゼノキは一般に雌雄異株であるので、人工交配の花粉親には優良形質をもつ雌個体の実生から得た雄個体を用いる方法が考えられる。また両性を示す王のような個体を用いることで、両親の木蠟生産関連の形質が分かった上での交雑も可能である(平岡ら, 2004)。今後は、本研究で得られた遺伝的類縁関係の情報と、果実生産量や果実含蠟率等の目的形質の情報を併せて利用した交雑育種を進めることができると考える。

本研究でサンプル採取を行った試験地は、水俣市はぜ振興会会長の緒方道義氏をはじめハゼノキ生産者の方々の所有および管理の下にあり、実験材料の収集に多大な協力をいただいた。また、本研究の実験およびデータ解析には渡邊敦史博士の貴重な助言をいただいた。ここに感謝の意を申し上げる。

### 引用文献

- Archak, S., Gaikwad, A.B., Gautam, D., Rao, E.V.V.B., Swamy, K.R.M., and Karihaloo, J.L. (2003) Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. *Genome* 46: 362-369.
- Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D., and Honeycutt, R.L. (1993) Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 14: 214-217.
- Fang, D.Q. and Roose, M.L. (1997) Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408-417.
- Fernández, M.E., Figueiras, A.M., and Benito, C. (2002) The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.* 104: 845-851.
- Goto, S., Miyahara, F., and Ide, Y. (2002) Identification of the male parents of half-sib progeny from Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl.) clonal seed orchard using RAPD markers. *Breed. Sci.* 52: 71-77.
- 後藤 晋・渡辺敦史・池田浩一 (1997) RAPD マーカーによるハゼノキの品種識別. 日林誌 79: 229-233.
- Harris, S.A. (1999) RAPDs in systematics — a useful methodology? In *Molecular systematics and plant evolution*. Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., and Gornall, R.J. (ed.), Taylor and Francis, London, 211-228.
- 平岡裕一郎・倉本哲嗣・佐々木峰子・岡村政則・藤澤義武 (2004) ハゼノキの「雑居性」雌雄異株の可能性. 九州森林研究 57: 213-214.
- 平岡裕一郎・大平峰子・岡村政則・倉本哲嗣・谷口 亨・藤澤義武 (2007) 木蠟生産に適したハゼノキ品種の開発. 林木育種センター平成 17 年度年報: 100-103.
- 池田浩一 (1991) 地域特性品種育成事業. 平成 2 年度福岡県林試業報: 70-71.
- 池田浩一 (1992) 地域特性品種育成事業. 平成 3 年度福岡県林試業報: 76-77.
- 池田浩一 (1993) 地域特性品種育成事業 1) ハゼ. 平成 4 年度福岡県林試業報: 74-75.
- 池田浩一 (1994) 地域特性品種育成事業 — (1) ハゼ—. 平成 5 年度福岡県林試業報: 56-57.
- Kantety, R.V., Zeng, X.P., Bennetzen J.L., and Zehr, B.E. (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1: 365-373.
- 川内博文・後藤 晋 (1999) 鹿児島県のマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園におけるクローン管理のモニタリング. 日林誌 81: 338-340.
- Konieczny, A. and Ausubel, F.M. (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 403-410.
- 倉本哲嗣 (2007) 小研究課題: ④ DNA 標識を利用したハゼノキ等の分類同定に関する技術開発. 林木育種センター 事業及び研究課題の成果報告 (2001~2005 年度): 203-207.
- 正木八十八 (1938) 日本の榧と木蠟. 168pp, 明文堂, 東京.
- Métais, I., Aubry, C., Hamon, B., and Jalouzot, R. (2000) Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 1207-1214.
- Nei, M. and Li, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- 野口喜久雄 (1977) 榧樹栽培の発達と優良品種の伝播. 歴史学・地理学年報 1: 1-24.
- Prevost, A. and Wilkinson, M.J. (1999) A new system of comparing RCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- R Development Core Team (2007) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna.
- 田村 明・榎木野俊昭・田中文浩・山野遼太郎 (1998) 山菜, ハゼノキ等優良個体(株)の選抜及び諸特性解明に関する研究 — ハゼノキ優良個体の選抜—. 九青年報 26: 127-131.
- 田村 明・塚元徳男・園田一夫・浅尾純治・江島裕一・榎木野俊昭 (1997) 山菜, ハゼノキ等優良個体(株)の選抜及び諸特性解明に関する研究 — ハゼノキ優良個体の選抜—. 九青年報 25: 119-123.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Tsumura, Y., Ohba, K., and Strauss, S.H. (1996) Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92: 40-45.
- 山野遼太郎・伊藤克郎 (1999) 山菜, ハゼノキ等優良個体(株)の選抜及び諸特性解明に関する研究 — ハゼノキ優良個体の選抜—. 九青年報 27: 67-71.
- 山野遼太郎・伊藤克郎 (2000) 山菜, ハゼノキ等優良個体(株)の選抜及び諸特性解明に関する研究 II — 水俣ハゼノキ 1 号試植検定林の設定—. 九青年報 28: 112-114.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reifans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., and Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., and Meyer, W. (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Fla. P, 322.
- Wheeler, N.C. and Jech, K.S. (1992) The use of electrophoretic markers in seed orchard research. *New Forests* 6: 311-328.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.