

## 石戸カバザクラにおけるクローンの同一性についての SSR 分析

宮本尚子(森林総研林育セ)・山田浩雄(森林総研林育セ関西)・

高橋 誠・板鼻直栄(森林総研林育セ)

要旨：埼玉県北本市の石戸宿のカバザクラ(*Prunus*×*media* cv. *Media*)は形態からエドヒガンとヤマザクラの自然雑種と推定されており、国の天然記念物に指定されている。このサクラは主幹と側幹から成るが、側幹は萌芽枝だとする考えと実生由来の個体が癒合したものだとする考えがある。これらの幹のクローンの同一性を明らかにする目的で DNA 分析を行ったので報告する。分析には、マイクロサテライト 4 マーカーを用い、これらのマーカーの多型性を明らかにするために、エドヒガン 17 個体、ヤマザクラ 21 個体、エドヒガンとヤマザクラの雑種と推定される個体 1 個体を対照として使用した。分析の結果、4 マーカーを用いた  $D_L$  はエドヒガン集団においては 0.993、ヤマザクラ集団においては 0.996 となり、分析に用いた 4 マーカーにより、個体識別に十分な多型性が得られていることが示された。カバザクラの主幹と側幹ならびに組織培養個体は同一の遺伝子型を示し、主幹と側幹は非常に高い確率で同一クローンであると考えられた。

キーワード：サクラ、エドヒガン、ヤマザクラ、クローン識別、SSR

## I はじめに

石戸カバザクラ(写真-1)は埼玉県北本市の東光寺境内に古くから生育するサクラで、日本五大桜の一つとされており、大正 11 年に国の天然記念物の指定を受けている。形態から、エドヒガンとヤマザクラの自然雑種 (*Prunus*×*media* cv. *Media*)と考えられており、現在、主幹と側幹の 2 本の幹から成る。天然記念物指定時には側幹は存在せず、現在の主幹を含む数本の幹から成っていた。その後樹勢が衰え、現在の主幹を残して他の幹は枯死し、枯死した幹の根元から側幹が発生して現在の形になったとされている。側幹は萌芽枝とする考えと実生由来の個体が癒合したものという説があり、天然記念物の保全を進める上では、保存対象を明確にする意味でそのいずれであるかを明らかにする必要がある。北本市教育委員会からこれらの幹の同一性についての DNA 分析の依頼を受け、SSR マーカーを用いたクローンの同一性の分析を行ったので報告する。

## II 材料と方法

クローンの同一性を明らかにするためには、対象としているサンプルについて、遺伝マーカーを用いて分析を行い、得られた遺伝子型データに基づいて判断する。異なった遺伝子型が得られた場合、それらの個体は異なるとみなせるが、同一の遺伝子型が得られた場合には、異なる個体間で偶然そのような同一の遺伝子型が得られる確率を考慮した上で、同一個体であるか否かを検討しなければならない。後者の場合、異なる個体が偶然同一の遺伝子型を示す確率を算出する際に、任意の参照集団(reference population)での遺伝子頻度データが必要となる。カバザクラはエドヒガンとヤマザクラの雑種と推定されているので、参照集団として国・県・市町村指定天然記念物、優良個体等を中心に、森林総合研究所林木育種センターに保存されているエドヒガン 17 個、ヤマザクラ 21 個体、およびカバザクラと同様に形態からエドヒガンとヤマザクラの雑種と推定されている個体 1 個体を使用した。2 樹種の雑種と推定

Naoko MIYAMOTO (Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Hitachi, Ibaraki 319-1301), Hiroo YAMADA (Kansai Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 1043 Uetsukinaka, Sho-oh, Katsuta, Okayama 709-4335), Makoto TAKAHASHI, and Naoei ITAHANA (Forest Tree Breeding Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Hitachi, Ibaraki 319-1301)

Clone identification of the Ishido-Kabazakura (*Prunus*×*media* cv. *Media*) using SSR markers



写真-1. 石戸カバザクラ(右が主幹, 左が側幹)

されている個体のもつ各対立遺伝子については、それぞれの種について 1/2 個ずつ寄与するものとしてエドヒガンとヤマザクラ参照集団における各対立遺伝子頻度を計算した。DNA マーカーにはスモモ (*Prunus cerasus*) とモモ (*Prunus persica*) で開発されたマイクロサテライト各 2 マーカー (1, 4, 6, 7)、合計 4 マーカーを用いた。また、各マーカーの特性を明らかにするため、マーカーの多様性の程度を示す対立遺伝子数 ( $N_a$ ) およびヘテロ接合体率の期待値 ( $H_e$ )、マーカーの識別能力を表す  $D_L$  (Discriminating Power) ( $d$ ) を算出した。 $D_L$  は集団からランダムに選んだ 2 個体が遺伝子型によって識別が可能である確率を表す指標である。 $D_L$  は 0 から 1 までの値をとり、0 はすべての個体が同じ遺伝子型を示し識別が不可能、1 はすべての個体が識別可能であることを意味する。また、過去に石戸カバザクラから増殖された組織培養個体についても、クローン同一性の分析に含めた。

### III 結果と考察

まず、解析に用いたマイクロサテライト 4 マーカーの特性を表-1 に示す。4 マーカーを用いることによってエドヒガンで 0.993、ヤマザクラで 0.996 という高い  $D_L$  が得られたが、主幹・側幹・培養個体ともに 4 マーカー全てで同一の遺伝子型を示した。その遺伝子型のデータを表-2 に示す。また、カバザクラが保持していた対立遺伝子のエドヒガンとヤマザクラ集団における頻度を表-3 に示す。

高い識別能力をもつ 4 マーカーを用いて解析した結果、主幹と側幹は遺伝子型が全てのマーカーにおいて一致したので、主幹と側幹は同一クローンである可能性が考えられるが、偶然別個体が同一の遺伝

子型を示す以下の 3 つのケースについて、そうした事象が生じる確率を計算した。

A. 側幹は主幹と全く由来の異なるエドヒガンとヤマザクラの交雑による実生個体である場合

B. 側幹は主幹とエドヒガン、もしくはヤマザクラの交雑による実生後代である場合

C. 側幹は主幹の自殖による実生後代である場合  
カバザクラの遺伝子型は 4 遺伝子座中、3 座でヘテロ接合であった。A の場合、一方の対立遺伝子をエドヒガンから、もう一方の対立遺伝子をヤマザクラから受け取る。主幹が保持しているのと同じの遺伝子型が現れる組み合わせとして、エドヒガン×ヤマザクラ (左は母樹, 右は花粉親を意味する、以後同様とする) の組み合わせが  $2^3=8$  通り、ヤマザクラ×エドヒガンの組み合わせが  $2^3=8$  通りの合計 16 通りが考えられる。そのそれぞれの確率は(カバザクラ

表-1. 解析に用いた SSR マーカーのエドヒガンおよびヤマザクラの参照集団における多型性

マーカー名	$N_a$		$H_e$		$D_L$	
	エドヒガン	ヤマザクラ	エドヒガン	ヤマザクラ	エドヒガン	ヤマザクラ
Pchgms1	13	20	0.876	0.910	0.971	0.978
UPD96-005	3	13	0.054	0.881	0.216	0.976
Sour1	2	4	0.054	0.352	0.210	0.554
Sour2	5	13	0.557	0.882	0.693	0.968
Pooled					0.993	0.996

表-2. 4 マーカーにおけるカバザクラ主幹・側幹・培養個体の遺伝子型

マーカー名	Pchgms1	UPD96-005	Sour1	Sour2
遺伝子型	200/201	115/149	294/298	309/309

表-3. カバザクラが保有していた対立遺伝子のエドヒガンとヤマザクラ集団における頻度

		エドヒガン		ヤマザクラ	
		対立遺伝子	頻度	対立遺伝子	頻度
Pchgms1	対立遺伝子	200	201	200	201
	頻度	0.129	0.014	0.035	0.081
UPD96-005	対立遺伝子	115	149	115	149
	頻度	0.972	0.014	0.068	0.102
Sour1	対立遺伝子	294	298	294	298
	頻度	0.028	0.972	0.795	0.068
Sour2	対立遺伝子	309		309	
	頻度	0.041		0.034	

が保有する一方の対立遺伝子のヤマザクラ集団における対立遺伝子頻度)×(カバザクラが保有する他方の対立遺伝子のエドヒガン集団における対立遺伝子頻度)を4座について掛け合わせた値となる。これらの値を足すことによって、偶然別個体の交雑によってカバザクラと同一の遺伝子型をもつ個体が生じる確率を計算したところ、 $2.36E-06$  という非常に低い確率を得た。さらに、これにエドヒガンとヤマザクラの2種が交雑する確率を掛け合わせる必要があることから、実際にはこの値よりもさらに低い確率となる。

次にBの場合について検討する。交配の組み合わせには、エドヒガン×カバザクラ、カバザクラ×エドヒガン、ヤマザクラ×カバザクラ、カバザクラ×ヤマザクラの4つがある。さらに、どちらの親からどの遺伝子を受け取るかの場合分けが、交配組み合わせごとに $2^3=8$ 通りずつあるので、合計32通りとなる。具体的な確率計算はAの場合とほぼ同様だが、カバザクラに由来する対立遺伝子については、カバザクラがホモ接合で保有している遺伝子については1、ヘテロ接合で保有している遺伝子については0.5を代入する。カバザクラと別個体との交雑によって偶然カバザクラと同一の遺伝子型をもつ個体が得られる確率は $1.59E-03$ となった。ここに雑種個体がエドヒガンあるいはヤマザクラと戻し交雑する確率を掛け合わせる必要があるため、Bにより同一の遺伝子型個体が得られる確率はさらに小さい値になる。

Cの場合、自殖によって親と同じ遺伝子型をもつ個体が出現する確率は $(1/2)^3=0.125$ であるが、この場合はカバザクラにおいて自殖が起こる確率を掛け合わせる必要がある。しかし、サクラにおいては自家不和合性が機能することがよく知られており、基本的に自殖はおこらないとされている(2, 3)。よってこの確率も非常に低いと考えられる。

通常、帰無仮説の棄却には棄却率は5%または1%を用いるが、今回の場合、偶然別個体が4遺伝子座で同一の遺伝子型となる確率はいずれも1%より低い。このため、今回の結果から主幹と側幹は同一個体であるとみなすのが妥当と考えられる。このため、主幹の保全を行うことは必要であるが、加えて、側幹も保全の対象範囲に含めることが穏当であ

ると判断された。また今回の解析には培養個体を含めたが、分析の結果培養個体はカバザクラから増殖されたものであることが確認できた。

#### 引用文献

- (1) CIPRIANI G., LOT G., HUANG W. G., MARRAZZO M. T., PETERLUNGER E., and TESTOLIN R. (1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 65-72.
- (2) KAO TEH-HUI and MCCUBBIN ANDREW G. (1996) How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 12059-12065.
- (3) 向井謙・加藤珠理・服部紗代子・長瀬綾子 (2006) サクラの自家不和合性遺伝子の多様性—そのメカニズム, 多様性および進化—. *森林科学*48: 60-64.
- (4) SOSHINSKI B., GANNAVAPU M., HAGER L. D., BECK L. E., KING G. J., RYDER C. D., RAJAPAKSE S., BAIRD W. V., BALLARD R. E. and ABBOTT A. G. (2000) Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] *Theor. Appl. Genet.* 101: 421-428.
- (5) TESSIER C., DAVID J., THIS P., BOURSQUOT J. M. and CHARRIER A. (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98: 171-177.
- (6) YOO S. D., GAO Z., CANTINI C., LOESCHER W. and VAN N. S. (2001a) NCBI, ACCESSION No. AF448467.
- (7) YOO S. D. and VAN N. S. (2001b) NCBI, ACCESSION No. AF3509.

