

氏名	こう けんせい 黄 建 成
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	甲第342号
学位授与年月日	平成16年 9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	分子マーカーによるハスの品種識別とその分類ならび に遺伝的多様性に関する研究 (Cultivar Identification, Classification and Assessment of Genetic Diversity of Lotus ( <i>Nelumbo</i> ) with Molecular Markers)
学位論文審査委員	(主査) 田 邊 賢 二 (副査) 細 木 高 志      中 田   昇      田 村 文 男 執行正義

## 学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究では、ISSR (Inter-simple sequence repeat) 法による DNA 多型を利用し、ハス品種の識別および交雑品種の親子鑑定についてはじめて検討した。さらに、遺伝的な資源として非常に重要な日本在来古ハス品種のゲノムの遺伝的多様性および中国に野生している紅蓮は、ハスの原始的な遺伝情報をもつ DNA とみなされる。資源品種の間における遺伝的な多様性を解析し、現在の品種の地理・歴史的情報などと合わせて考察し、アジアハスの起源に関する検討と評価を行った。

### 現代におけるハスの分布および利用

ハスは双子葉植物 *Ranales* (キンポウゲ) 目 *Nymphaea* (スイレン) 科 *Nelumbo* (ハス) 属の植物である。赤、白色およびその中間色花系の *Nelumbo nucifera* Gaertn. および黄色花系の *N. pentapetala* Pers. の両種がある。前者はオーストラリア北部からインドネシア、インド、パキスタン、イランのカスピ海南岸、トルキスタン、中国東北部の北緯 48 度付近から日本の北海道に至る広範囲に生育し、後者は北アメリカのミシシッピ川流域から東南方、中米から南米北部におよぶ赤道付近の間に分布、生育している。今日、ハスの多数の商業品種が人工栽培され、食用・薬用・観賞用などに広く利用されている。

### ハナハスの品種識別

*N. nucifera* として中国、日本およびインド在来の観賞蓮 78 品種、食用蓮 2 品種の計 80 品種、

アメリカ自生種由来の *N. pentapetala* 1 品種および種間の交雑品種 4 品種を含むハス 85 品種を供試し、ISSR マーカーによるハス品種の DNA フィンガープリントを作成し、品種識別を行った。5 種類の ISSR プライマー (UBC811, 818, 840, 855, 857) から品種固有の 49 本のバンドパターンが得られた。うち、UBC855 では最高の計 19 品種、UBC811 計 17 品種、UBC840 により計 15 品種、UBC857 により計 14 品種、UBC818 では最少の計 7 品種を個別に識別することができた。その結果、5 種類のプライマーから得られた 20 本の ISSR マーカーを用いて 85 品種の識別が可能となり、各品種に特異的な DNA フィンガープリントが得られた。

#### ハス品種の親子鑑定および花粉親の推定

8 交雑品種を供試し、11 種類の ISSR プライマーで得られたバンドパターンは個々の品種により異なり、花粉親品種候補として、70 品種を鑑定対象としてそれぞれの同位対立バンド (有・無) バンドの一致・不一致で遺伝的に矛盾するか否かを解析した。

F<sub>1</sub> 品種の“中日友誼蓮”および“舞妃蓮”について検討し、両親品種との親子間にそれぞれ 16、81 本の有効多型性を示すマーカーが得られ、遺伝的に矛盾がない親子関係を明らかにした。F<sub>1</sub> 品種の“白光蓮”は品種解説書によると“白君子小蓮”と“金輪蓮”、または“アメリカ白蓮”と“清月蓮”の F<sub>1</sub> であるとされているが、本解析によって 2 組合せともに親子間に遺伝的に矛盾のあることが示され、親子関係は認められなかった。また、種間雑種“美中紅”、“小舞妃”および自然交雑による種内雑種“紛碗蓮”、“玫紅川台”の合計 4 つの F<sub>1</sub> の品種では、花粉親候補 69 品種を対象に検討した結果、それぞれ親子間で遺伝的に矛盾がないことから花粉親を推定した。

これらのことから、ISSR マーカーはハスの種内交雑と種間交雑によって育成された後代品種の親子鑑定および花粉親を推定するのに、有効であることが認められた。

#### 日本在来古ハス品種の遺伝的多様性の評価

*N. nucifera* の重要な遺伝資源として、日本在来の 200 年以上の歴史をもつ残存古ハスは 32 品種もある。これらは形態学的分類により 4 つの系群に区分できた。選択された 11 プライマーで 66 本多型性マーカーが得られ、多型バンド数は 32 品種間で様々な分布 (34 本から 52 本まで) を示すことが認められた。紅色系群内の品種間で遺伝距離に大きな差異が存在し、品種間の類似性が最高で 0.93 (“妙蓮”と“大賀蓮”) で、最低は 0.46 (“妙蓮”と“蜀紅蓮”) であった。白色系群の 9 品種の間においては遺伝距離が比較的近く、品種間の類似性の値が最低の値を示すものでも 0.64 (“漢蓮”と“清月蓮”) であった。白色系群内の類似性平均数 (0.76) は紅色系群との間でみられる類似性平均数 (0.73) と比べて少し高いが、系統樹の上で紅色系群の品種の中に混在して分布したことより、白色系群の品種は紅色系群の品種から進化したものとみなされたが、非単一の祖先品種より生じたものと認められた。爪紅色系群内の品種間の遺伝距離は紅色系群との間より低い、白色系群とよりもさらに低かった。斑色系群は非常に高い同源性 (類似性平均数が 0.97) を呈し、他の各系群との間でもすべて比較的高い類似性を示した。

これらの品種を A および B の 2 つの主グループに大別することができた。A 主グループの 3 品種はすべての紅色系群に入る品種であり、B 主グループの紅色系群の品種と遠い距離に隔たっていたが、起源および花弁型で大きな差異が認められる。B 主グループには他の 29 品種が含まれ、

系統樹枝の進化に基づいて 3 つの段階子群グループに区分することができた。各子群グループ内の品種の間に様々の遺伝的な類縁関係が認められた。

宗教的、歴史的な背景および遺伝的な関係からみると、これらの古品種は“大賀蓮”のような例外を除き、歴史の中でそれぞれ中国から導入されたものとその交雑種と考えられる。

#### ISSR マーカーによる *N. nucifera* の起源の推定

*N. nucifera* の原始的な形質を持つ 18 品種のうち、インド在来の本種は 3 品種、中国在来の野生紅蓮が 15 品種ある。これらの品種間の類似性が最も近縁のものは 0.97、最も遠縁は 0.25 を示すことが認められた。これらの品種は 3 つの主グループに区分され、中国在来の 8 野生紅蓮は第 I グループおよび第 II グループを形成した。他の中国在来の野生紅蓮 7 品種およびインドの 3 品種が第 III グループを構成した。品種間の遺伝距離の差異は第 I グループが 0.26、第 II グループが 0.15、第 III グループが 0.32 程度存在することが認められた。また、グループ内の遺伝的変異性は、第 II グループが小さく、第 III グループが大きい傾向にあることが認められた。分析より、第 I グループと第 II グループとの間における遺伝距離が遠いことが示されたが、しかし、特異的なグループのゲノムマーカーは観察されなかった。

中国在来の品種はインドのものより変異に富むことが示唆された。また中国には古くからレンコンや種子が薬用および食用として発達・利用され、観賞用ハスの品種類型もいろいろ多様なものが存在している。したがって総合分析すると、*N. nucifera* は中国起源と推定するのが妥当であると考えられた。

#### 分子マーカーによる *Nelumbo* 属品種の遺伝的關係

それぞれの中国、日本、インド、韓国、アメリカおよびロシア在来の *Nelumbo* 属 116 品種は *N. nucifera*, *N. pentapetala* および種間雑種の 3 つのグループに大別することができた。多型を示した 117 本マーカーの中で、種間における 43 本の多型マーカーが種特異的であることが観察され、きわめて大きな遺伝的差異の存在することが認められた。しかし、*N. nucifera* 種内における豊かな遺伝的多様性が存在していることに比べて、*N. pentapetala* はそれに比較して著しく低かった。また、種間交雑により育成された品種では、*N. nucifera* の間における平均遺伝距離は比較的近く 0.68 であり、*N. pentapetala* との平均遺伝距離は前者より比較的遠く 0.59 であった。増幅したバンドはそれぞれの 2 種から引継がれたものとなり、種間雑種グループで特異的なマーカーは観察されなかった。

さらに、*N. nucifera* 内では原始的な品種の分析と同じように 3 つの子グループに区分することができ、インド在来の品種および仏教との関係が強い品種はすべて同じグループに含まれ、各グループ間における遺伝的多様性は著しい差異の存在することが認められた。

## 論文審査の結果の要旨

ハス (*Nelumbo* spp.) はキンボウゲ (*Ranales*) 目 *Nymphaea* (スイレン) 科 *Nelumbo* (ハス) 属の植物で、東アジアを中心に古代より観賞用および食用・薬用として栽培される水生の園芸作物である。しかし歴史的に古い作物であるにもかかわらずその原産地や品種の成立過程、品種間の遺伝的な遠近関係など不明な点が多い。さらに近年観賞用花ハスの品種保護の面からフィンガープリントの重要性が増し、一方では品種鑑定のための識別技術の確立が急がれている。

本研究は作動遺伝子間の反復配列遺伝子を分析する ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) 法を解析手段としてハス品種の識別、品種間の類縁関係、品種の親子関係の鑑定、日本在来の古品種の遺伝的特性等について検討と考察・評価を行った。

### 1) ハナハスの品種識別

*N. nucifera* (アジアハス) に分類されている中国、日本およびインド在来の観賞用品種 78、食用品種 2 の計 80 品種、*N. pentapetala* (アメリカハス) 1 品種、両者の種間交雑品種 4 品種の合計 85 品種について、ISSR マーカーによる各品種の DNA フィンガープリントを作成し、品種識別の可能性を検討した。カナダのブリジッシュコロンビア大学で開発された 5 種類の ISSR プライマー (UBC811, 818, 840, 855, 857) を使用することによって、85 品種をそれぞれ識別することが可能となった。

### 2) ハス品種の親子鑑定および花粉親の推定

11 種類の ISSR プライマーによって得られたバンドパターンを解析し、両親品種の記載がある交雑品種の親子鑑定および種子親は判明しているものの花粉親の不明な交雑品種の花粉親の推定を行った。F<sub>1</sub> 品種の‘中日友誼蓮’および‘舞妃蓮’は両親品種との親子間に有効多型性を示すマーカーが得られ、遺伝的に矛盾しないことを認めた。同じく F<sub>1</sub> 品種の‘白光蓮’は品種解説書によると‘白君子小蓮’と‘金輪蓮’の交雑による F<sub>1</sub> 品種か、または‘アメリカ白蓮’と‘清月蓮’の F<sub>1</sub> であるとされているが、本解析によってこれら 2 組合せとも親子間に遺伝的に矛盾のあることが示され、親子関係は否定された。

一方、種間雑種‘美中紅’、‘小舞妃’および自然交雑による種内雑種‘紛碗蓮’、‘玫紅川台’の計 4 つの F<sub>1</sub> の品種では、不明な花粉親候補 69 品種を対象に検討し、それぞれ遺伝的に矛盾しない花粉親を推定することができた。

これらのことより、ISSR マーカーはハスの種内交雑と種間交雑によって育成された F<sub>1</sub> 品種の親子鑑定および花粉親の推定に有効であることを認めた。

### 3) 日本在来古ハス品種の遺伝的多様性の評価

*N. nucifera* に属する日本在来の 200 年以上の歴史を有する古品種は 32 品種も存在する。これらについて 11 種類の ISSR プライマーを用いて解析を行った。紅色系品種群に属する品種間で遺伝的距離に大きな差異が認められ、類似性の高いものは 0.93 (‘妙蓮’と‘大賀蓮’)、最も低いものは 0.46 (‘妙蓮’と‘蜀紅蓮’) であった。

白色系品種群に属する品種間の平均類似性は 0.76 とあまり高くなかったが、いずれの品種も系統樹の中では紅色系品種のクラスター内に混在分布したことより、白色系品種は紅色系品種群より分化したものと推察された。斑色系品種群に属する品種はそれぞれの類似性がきわめて高く (0.97)、同源性の強い品種群であることがうかがわれた。これらの品種について系統樹を作成すると、A および B の 2 つの主グループに大別することができた。

#### 4) ISSR マーカーによる *N. nucifera* の起源の推定

*N. nucifera* の原始的な形質を持つ 18 品種のうち、インド在来の本種は 3 品種、中国在来の野生紅蓮が 15 品種ある。これらの品種間の類似性が最も近縁なものは 0.97、遠縁なものは 0.25 を示した。これらの品種は大きく 3 つの主グループに区分され、中国在来の野生紅蓮 8 品種が第 I グループおよび第 II グループを形成した。残りの中国在来の野生紅蓮 7 品種およびインド在来の 3 品種が第 III グループを構成した。品種間の遺伝距離の差異は第 I グループが 0.26、第 II グループが 0.15、第 III グループが 0.32 であり、第 II グループは遺伝的変異性が最も小さく、第 III グループがやや大きい傾向にあった。また第 I グループと第 II グループの間における遺伝的距離が遠いことが認められた。

中国在来の品種はインドのものより遺伝的変異に富むことが示唆され、また中国には古くからレンコンや種子が薬用および食用として発達、利用され、一方では観賞用のハス品種も多様性に富んでいる。したがって総合的にみて、*N. nucifera* は中国起源と推定するのが妥当と考えられた。

以上のように ISSR 法による DNA 多型の解析を行った結果、品種の識別や類縁関係、親子関係の鑑定、花粉親の推定、起源の推定や遺伝的多様性の評価など、これまで詳細が不十分であった内容の多くが明らかとなった。これらの成果はハス属品種の保護や新品種の育種を行う上できわめて有益な成果であり、学位論文を授与するに値するものと認められる。