

マイクロサテライト DNA とアイソザイムを用いたブナ (*Fagus crenata* Blume) 精英樹クローンの識別

高橋 誠⁽¹⁾・津村 義彦⁽²⁾

Makoto Takahashi⁽¹⁾ and Yoshihiko Tsumura⁽²⁾

Clone Identification of Japanese Beech (*Fagus crenata* Blume) Clones Using Isozyme and Microsatellite DNA Markers

要旨：アイソザイムとマイクロサテライト DNA を遺伝マーカーに用いてブナ (*Fagus crenata* Blume) 精英樹 38 クローンの識別を試みた。分析にはアイソザイム 11 遺伝子座とマイクロサテライト DNA 2 遺伝子座の合計 13 遺伝子座を用いた。解析の結果、アイソザイム 11 遺伝子座によるクローン識別率は 60.5% であった。マイクロサテライト DNA 2 遺伝子座については 35 種類の multi-locus genotype が認められ、33 クローンがクローン独自の multi-locus genotype を保有しており、これら 33 クローン (86.8%) についてはクローン識別が可能であった。アイソザイムとマイクロサテライト DNA を合わせた 13 遺伝子座を用いた場合、クローン識別率は 100% に達した。完全なクローン識別を達成するための最小の遺伝子座の組み合わせについて検討したところ、アイソザイム 2 座とマイクロサテライト DNA 2 座の合計 4 座のデータを用いることで、完全なクローン識別が可能であることが明らかになった。

1 はじめに

系統の厳密な管理は、林木育種の推進と精度の高い遺伝情報の獲得のために満たされるべき必要条件のひとつである。このため、これまでもアイソザイムや RAPD, AFLP などを用いたクローン識別が行われてきた。アイソザイムを用いたクローン識別の試みは、スギ (戸丸, 1992) やマツ属 (Adams and Joly, 1980), ポプラ属 (Rajora, 1989) などで行われた。しかし、アイソザイムでは、分析可能な遺伝子座数に制約があり、林木の場合、分析可能な遺伝子座数は雌性配偶体を用いた分析の場合でも 30 座以上の遺伝子座についてデータを得ることは難しい。その後、RAPD や AFLP を用いたクローン識別が行われた (Keil and Griffin, 1994; Van de Ven and McNicol, 1995; 後藤ら, 1997;)。これらの遺伝マーカーでは、技術的には分析可能なマーカー数にほとんど制約がなく、多くのマーカーを用いることが可能である。しかし、これらのマーカーは優性マーカーであるため、1 マーカー当たりの情報量は共優性マーカーの場合に比べて少ない。その後、1 ~ 6 塩基のモチーフが連続的に反復している領域がゲノム

(1) 林木育種センター東北育種場

〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字大崎 95

Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center

95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0173 Japan

(2) 森林総合研究所

〒305-8687 茨城県稲敷郡茎崎町

Forestry and Forest Products Research Institute

Kukizaki, Ibaraki 305-8687 Japan

内に存在することが知られ、マイクロサテライト DNA (あるいは SSR (Simple Sequence Repeat), 以後マイクロサテライト遺伝子座あるいは単にマイクロサテライトと記す) と呼ばれている (Hancock, 1999)。マイクロサテライトは真核生物に広くみられ (Charlesworth *et al.*, 1994), 共優性で, なおかつ高い水準の多型性を有しているため (Litt and Luty, 1989; Weber and May, 1989; Tautz, 1989), マイクロサテライトはアイソザイムや RAPD, AFLP などのマーカーよりも優れた解像度を持つマーカーであり, クローン識別や個体識別のために最適のマーカーと考えられる。

ブナ (*Fagus crenata* Blume) においては, 精英樹選抜育種事業によって精英樹が選抜されており, その内の 38 個体については, つぎ木によりクローン増殖が行われ, 育種素材保存園と実験交配園が林木育種センター東北育種場の場内に設定された。これらの育種素材について遺伝マーカーを用いて簡便かつ正確にクローン識別を行うことを目的として, これまでにアイソザイムを遺伝マーカーとしてクローン識別を試みてきたが, 識別率は 60.5% に留まった (高橋, 2000)。そこで, 本研究では, アイソザイムの他にマイクロサテライトを遺伝マーカーに加えて再度ブナ精英樹 38 クローンのクローン識別を試み, 38 クローンを完全にクローン識別することができたので, その結果を報告する。

2 材料と方法

ブナ精英樹クローンのクローン識別について解析するため, 東北育種場においてクローン保存がなされているブナ精英樹 38 クローンを分析に用いた (表 1)。

表 1. 分析に供試したブナ精英樹 38 クローンのクローン名

鯉ヶ沢 101	横浜 102	水沢 102	古川 102
鯉ヶ沢 102	三本木 101	水沢 103	古川 103
鯉ヶ沢 103	三本木 102	水沢 104	古川 104
鯉ヶ沢 104	三本木 103	水沢 105	古川 105
深浦 101	三本木 104	北上 104	中新田 101
深浦 102	田山 102	久慈 101	古口 102
弘前 101	田山 103	岩泉 102	米内沢 101
弘前 102	田山 104	岩泉 103	米内沢 102
弘前 103	田山 105	遠野 101	
横浜 101	水沢 101	古川 101	

分析のための遺伝マーカーにはアイソザイムと Tanaka *et al.* (1999) が開発したマイクロサテライト DNA を用いた。アイソザイム分析は, 以下の 8 酵素種を支配する 11 遺伝子座について行った。すなわち, リンゴ酸脱水素酵素 (*Mdh-2*, *Mdh-3*), 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (*6Pg-2*), ジアホラーゼ (*Dia-1*, *Dia-2*), アスパラギン酸アミノ転移酵素 (*Got*), アミラーゼ (*Amy-3*), アラニンアミノペプチダーゼ (*Aap-1*, *Aap-2*), フマラーゼ (*Fm*), ホスホグルコースイソメラーゼ (*Pgi-1*) である。分析試料には冬芽を用いた。分析の方法は津村ら (1990) にほぼ従った。ただし, 1 個体当たりのサンプル量は 30mg とし, 1 個体当たりの抽出液と Polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP) の分量は 0.6mL, 30mg とした。マイクロサテライト DNA マーカーの分析には, *mfc5* と *mfc12* の 2 遺伝子座を用い

た。分析試料には 100mg の冬芽を用いた。DNA の抽出には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 社製) を用い、キットに添付されている実験方法書に従って抽出を行った。抽出後に、分光光度計、GeneQuant (Pharmacia 社製) により抽出した DNA の濃度と純度を測定した。マイクロサテライトのフラグメントの PCR による増幅は以下の条件によった。PCR 反応液 (10 μ L) の組成は、20 mM Tris-HCl (pH8.4), 50 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 1 mM dNTP とした。マイクロサテライトを特異的に増幅するプライマーはフォーワード側とリバース側それぞれについて 200nM とした。*mfc5* と *mfc12* のプライマーの塩基配列を表 2 に示した。なお、フォーワード側のプライマーは蛍光色素でラベリングした。反応液中の Taq DNA Polymerase (Gibco BRL 社製) と鋳型 DNA の分量は 0.25U および 1ng とした。PCR の反応には PTC-100 (MJ Research 社製) を用いた。反応条件は以下の通りである。あらかじめ 94℃まで上昇させてからサンプルを挿入し、94℃で 5 分間反応させた。その後、94℃で 30 秒間、58℃で 30 秒間、72℃で 30 秒間という一連の反応を 35 回繰り返し、その後 72℃で 5 分間反応させた。マイクロサテライトの遺伝子型は Gene Scan 310 とそれに付属したソフトウェア、Genotyper (いずれも Perkin Elmer 社製) によって決定した。

表 2. マイクロサテライト DNA 遺伝子座, *mfc5* と *mfc12* のフラグメントを PCR 反応によって増幅するために用いたプライマーセットの塩基配列

遺伝子座	フォーワード側	リバース側
<i>mfc5</i>	ACTGGGACAAAAAACAAAA	GAAGGACCAAGGCACATAAA
<i>mfc12</i>	ACACCTCACAATCCACGAAA	CCCAATAACTAAGAATACCA

分析を行った 13 遺伝子座で検出された遺伝変異の特性を把握するために、1 遺伝子座当たりの対立遺伝子数 (N_a), 1 遺伝子座当たりの有効な対立遺伝子数 (N_e ; Kimura and Crow, 1964), 平均ヘテロ接合体率の観察値 (H_o) と期待値 (H_e) を算出した。平均ヘテロ接合体率の期待値は、 $H_e = 2n(1 - \sum p_i^2) / (2n-1)$ によって求めた (根井, 1990)。ここで、 p_i は i 番目の対立遺伝子の頻度であり、 n はサンプル数である。また、近交係数 (F_{is}) を $F_{is} = 1 - H_o / H_e$ により算出した。

3 結果

ブナ精英樹 38 クローンについて、アイソザイム遺伝子 11 遺伝子座とマイクロサテライト 2 遺伝子座の遺伝子型を解析した。その結果、アイソザイム 11 遺伝子座においては 24 対立遺伝子が、マイクロサテライト 2 遺伝子座においては 26 対立遺伝子が検出され、検出された対立遺伝子の総数は 50 対立遺伝子であった。分析した 38 クローンの遺伝子型を表 3 に示した。分析した 13 遺伝子座について、検出された遺伝変異の特性を把握するために遺伝的多様性を表す指標と近交係数を算出した (表 4)。アイソザイム遺伝子座においては、 N_a は 1 ~ 6 の範囲で平均値は 2.2 であった。マイクロサテライト遺伝子座においては、 N_a の範囲は 6 ~ 20 で、平均値は 13.0 であった。同様に N_e の範囲と平均値を順に示すと、アイソザイム遺伝子座ではそれぞれ 1.00 ~ 2.51 と 1.28 で、マイクロサテライト遺伝子座では 1.65 ~ 15.89 と 8.27 であった。 H_o は、アイソザイムで 0.000 ~ 0.684 と 0.158, マイクロサテライトで、0.263 ~ 0.974 と 0.618 であった。 H_e は、アイソザイムで 0.000 ~ 0.609 と 0.159, マイクロサテライトで 0.400 ~ 0.945 と 0.673 であった。 F_{is} については、13 遺伝子座で -0.124 ~ 0.369 の範囲にあった。

13遺伝子座の遺伝子型データ全てを用いてクローン識別を試みた結果、38クローンを完全に識別することができた。

表3. アイソザイム11遺伝子座とマイクロサテライトDNAの2遺伝子座における
ブナ精英樹38クローンの遺伝子型

No. クローン名	アイソザイム											Microsatellite	
	Mdh-2	Mdh-3	6Pg-2	Dia-1	Dia-2	Got	Amy-3	Aap-1	Aap-2	Fm	Pgi-1	mfc5	mfc12
1 鎌ヶ沢101	a/a	b/c	c/c	b/b	b/b	c/c	e/e	b/b	b/b	b/b	c/c	282/284	297/297
2 鎌ヶ沢102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/c	274/298	297/297
3 鎌ヶ沢103	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	c/e	b/b	b/b	a/b	c/c	286/310	297/297
4 鎌ヶ沢104	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	a/c	a/d	b/c	b/b	a/b	c/c	272/274	297/299
5 深浦101	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/c	292/304	297/297
6 深浦102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	a/b	c/c	278/282	299/299
7 弘前101	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	b/c	280/304	297/299
8 弘前102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/c	298/302	295/297
9 弘前103	a/a	b/c	c/c	b/b	b/b	c/c	c/e	b/b	b/b	a/b	c/c	276/304	297/297
10 横浜101	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	a/b	c/c	288/304	297/299
11 横浜102	a/a	b/c	c/c	a/b	b/b	c/c	e/e	b/b	b/b	a/a	c/c	278/298	297/297
12 三本木101	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	e/e	b/b	b/b	a/b	c/c	302/304	297/297
13 三本木102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	b/b	c/c	280/286	297/297
14 三本木103	a/a	b/c	c/c	b/b	b/c	c/c	b/e	b/b	b/b	a/a	c/c	302/304	297/297
15 三本木104	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/d	276/288	297/297
16 田山102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/c	272/292	297/299
17 田山103	a/a	b/b	c/c	b/b	b/c	c/c	b/e	b/b	b/b	a/b	c/c	295/306	297/297
18 田山104	a/a	b/b	c/c	a/a	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	a/b	c/c	272/302	297/297
19 田山105	a/a	b/b	c/c	b/b	b/c	c/c	e/e	c/c	b/b	a/a	c/c	274/278	297/297
20 水沢101	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	e/e	b/b	b/b	b/b	c/c	272/278	270/270
21 水沢102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	a/b	c/c	272/295	283/297
22 水沢103	a/a	b/c	c/c	b/b	b/b	c/c	c/e	b/b	b/b	a/b	c/c	274/306	297/297
23 水沢104	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/c	288/295	297/299
24 水沢105	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	c/e	b/c	b/b	b/b	c/c	272/276	297/297
25 北上104	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	a/b	c/c	304/306	299/299
26 久慈101	a/a	c/c	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	a/b	c/c	288/304	297/297
27 岩泉102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/b	b/b	b/b	a/b	c/c	290/310	297/297
28 岩泉103	a/a	b/c	c/c	b/b	b/b	c/c	e/e	b/b	b/b	a/b	c/c	290/295	297/297
29 遠野101	a/a	b/b	c/c	a/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/c	272/292	297/297
30 古川101	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	e/e	b/b	b/b	a/b	c/c	302/320	297/313
31 古川102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/c	b/b	b/b	b/b	c/c	292/312	297/297
32 古川103	a/a	b/c	c/c	a/b	b/b	c/c	c/e	b/b	b/b	b/b	c/c	286/290	297/297
33 古川104	a/a	b/b	c/c	a/b	b/c	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/c	297/310	297/297
34 古川105	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/c	b/b	a/b	c/c	274/288	297/297
35 中新田101	a/a	b/b	c/c	b/b	b/c	c/c	e/e	b/b	b/b	b/b	c/c	286/297	295/297
36 古口102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/e	b/b	b/b	b/b	c/c	272/302	297/297
37 米内沢101	a/a	b/c	c/c	b/b	b/b	c/c	c/e	b/b	b/b	b/b	c/c	292/292	283/297
38 米内沢102	a/a	b/b	c/c	b/b	b/b	c/c	b/f	b/b	b/b	a/b	c/c	272/302	297/297

表4. アイソザイム11遺伝子座とマイクロサテライトDNAの2遺伝子座における
遺伝的多様性を表す指標と近交係数

	アイソザイム											マイクロサテライト	
	Mdh-2	Mdh-3	6Pg-2	Dia-1	Dia-2	Got	Amy-3	Aap-1	Aap-2	Fm	Pgi-1	mfc5	mfc12
<i>N_a</i>	1	2	1	2	2	2	6	2	1	2	3	20	6
<i>N_e</i>	1.00	1.30	1.00	1.17	1.14	1.03	2.51	1.14	1.00	1.73	1.05	14.89	1.65
<i>H_e</i>	0.000	0.232	0.000	0.147	0.125	0.026	0.609	0.125	0.000	0.428	0.052	0.945	0.400
<i>H_o</i>	0.000	0.211	0.000	0.105	0.132	0.026	0.684	0.079	0.000	0.447	0.053	0.974	0.263
<i>F_{IS}</i>		0.092		0.288	-0.057	0.000	-0.124	0.369		-0.047	-0.007	-0.030	0.345

4 考察

1 から 6 塩基のモチーフが反復して現れるマイクロサテライト DNA は真核生物に広くみられ (Charlesworth *et al.*, 1994), 共優性でなおかつ高い変異性を保持している (Jarne and Lagoda, 1996)。このため、マイクロサテライト DNA マーカーは集団遺伝などの遺伝学の分野で広く用いられるようになってきている。森林樹木についてもブナ, *Fagus crenata* (Tanaka *et al.*, 1999) やヤブツバキ, *Camellia japonica* (Ueno *et al.*, 1999), フタバガキ科の *Shorea curtisii* (Ujino *et al.*, 1998) などの樹種で豊富な遺伝変異が検出されてきたが、今回の解析結果においてもそれらと同様の結果が得られた。 N_a や N_e , H_e , H_o といった遺伝的多様性を表す統計量を分析した 13 遺伝子座について算出し、アイソザイム遺伝子座とマイクロサテライト遺伝子座で比較したが、いずれの統計量についてもマイクロサテライト遺伝子座は高い値を示した。特に、 N_e と H_o は任意のクローンの識別に用いた場合の有効性と密接に関係していると思われる。マイクロサテライト遺伝子座の *mfc5* については、 H_o が 0.974 で N_a は 14.89 と特に高い値を示した。38 クローンで 33 種類の遺伝子型が検出され、29 クローンがクローン固有の遺伝子型を有しており、これら 29 クローン (76.3%) の識別が可能であった。同様に、*mfc12* については、7 種類の遺伝子型が検出され、独自の遺伝子型を保有していたクローンは 2 クローン (5.3%) に留まった。また、38 クローン中任意の 2 クローンを取り出し、その 2 クローンが異なるクローンであることを識別できる確率は、*mfc5* 遺伝子座のデータを単独で用いた場合には 96.5% (722 組み合わせ中 697 組み合わせにおいてクローンの違いを識別できた) であった。同様に *mfc12* については、722 組み合わせ中 412 組み合わせ (57.1%) においてクローンの違いを識別できた。このように、今回解析を行ったマイクロサテライト遺伝子座 2 座ではクローン識別のための有効性が座間で異なった。これは、*mfc12* 遺伝子座における対立遺伝子数 (6) が *mfc5* (20) より少なく、さらに *mfc12* においてはホモ接合体の観察値が期待値より明らかに高いことによるものと思われる ($F_{IS} = 0.345$)。また、*mfc12* の N_a は 6 であるにもかかわらず、 N_e (1.65) はアイソザイム遺伝子座と同水準に留まっていることから、クローン識別のためのこの遺伝子座の有効性が低い水準にあることが分かる。

アイソザイム遺伝子座のみによるクローン識別については、識別率は 60.5% であった (高橋, 2000)。マイクロサテライト遺伝子座 2 座によるクローン識別を試みたところ、35 種類の multi-locus genotype が認められ、33 クローンが独自の multi-locus genotype を保有しており、これら 33 クローン (86.8%) についてはクローン識別が可能であった。このように、多型的なアイソザイム遺伝子座 8 座を用いた場合のクローン識別率 (60.5%; 高橋, 2000) と比べるとマイクロサテライトを用いた場合には 2 遺伝子座で 86.8% という高いクローン識別率を示したが、完全なクローン識別には至らなかった。これは、さきにも記したように、*mfc12* 遺伝子座の変異性がマイクロサテライトとしては低い程度に留まっているためであり、今後マイクロサテライト遺伝子座の分析座数を増やすことによって、マイクロサテライトのみによる完全なクローン識別が可能になると考えられる。

13 遺伝子座の内、最も少ない遺伝子座数で完全なクローン識別を行うためには、どの遺伝子座の組み合わせにすればよいかについて検討した。この際、 N_e の値が高い遺伝子座を優先的に用いることとし、様々な遺伝子座の組み合わせでクローン識別率を吟味した。その結果、 N_e の値の大きな遺伝子座から上位 4 座 (*mfc5*, *mfc12*, *Amy3*, *Fm*) を用いた場合が、完全なクローン識別を可能にするための最小数の遺伝子座の組み合わせであることが分かった。完全なクローン識別のための最小の遺伝子座数についても、共優性であり高い多型性を示すマイクロサテライトについての情報を今後さらに蓄積するに従って、より少ない座数で完全なクローン識別を実現できるものと思われる。

謝 辞

本研究の実施にあたって、マイクロサテライト DNA の実験法については小沼明弘氏（新潟大学）と高橋友和氏（新潟大学大学院）に、その全般にわたってご指導いただいた。Gene Scan 310 の操作法については松本麻子氏（森林総合研究所）に、Genotyper を用いた遺伝子型の決定については上野真義氏（名古屋大学）に多くのご教示をいただいた。DNA の抽出および調整には、千葉勢津子氏（林木育種協会）にご協力いただいた。以上の方々に心から感謝いたします。

引用文献

- 1) Adams, W. T. and Joly, R. J. : Allozyme studies in loblolly pine seed orchards: clonal variation and frequency of progeny due to self-fertilization. *Silvae Genetica*, 29, 1-4 (1980)
- 2) Charlesworth, B., Sniegowski, P. and Stephan, W. : The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371, 215-220 (1994)
- 3) 後藤晋・渡辺敦史・池田浩一 : RAPD マーカーによるハゼノキの品種識別. *日本林学会誌*, 79, 229-233 (1997)
- 4) Hancock, J. M. : Microsatellites and other simple sequences : genomic context and mutational mechanisms. In *Microsatellites: evolution and applications*, Goldstein, D. B. and Schlötterer, C. eds., 1-9pp, Oxford University Press, Oxford, New York (1999)
- 5) Jarne, P. and Lagoda, P. J. L. : Microsatellites, from molecules to population and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 424-429 (1996)
- 6) Keil, M. and Griffin, A. R. : Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 442-450 (1994)
- 7) Kimura, M. and Crow, J. F. : The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49, 725-738 (1964)
- 8) Litt, M. and Luty, J. A. : A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44, 397-401 (1989)
- 9) 根井正利 : “分子進化遺伝学” 初版 五条堀孝・斎藤成也訳, 培風館, 433pp. (1990)
- 10) Rajora, O. P. : Characterization of 43 *Populus nigra* L. clones representing selections, cultivars and botanical varieties based on their multilocus allozyme genotypes. *Euphytica*, 43, 197-206 (1989)
- 11) 高橋誠 : アイソザイムによるブナ精英樹38クローンのクローン識別と実生家系における花粉親の同定. *東北森林科学会誌*, 5, 53-57 (2000)
- 12) Tanaka, K., Tsumura, Y., and Nakamura, T. : Development and polymorphism of microsatellite markers for *Fagus crenata* and the closely related species, *F. japonica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 11-15 (1999)
- 13) Tautz, D. : Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, 17, 6463-6471 (1989)
- 14) 戸丸信弘 : アイソザイムによるスギの人工林および精英樹の遺伝的変異に関する研究. 筑波大学大学院博士課程農学研究科学位論文 (1992)

- 15) 津村義彦・戸丸信弘・陶山佳久・モハマド＝ナイム・大庭喜八郎：アイソザイム実験法，筑波大学農林技術センター演習林報告，6，63-95 (1990)
- 16) Ueno, S., Yoshimaru, H., Tomaru, N., and Yamamoto, S.: Development and characterization of microsatellite markers in *Camellia japonica* L. *Molecular Ecology*, 8, 335-336 (1999)
- 17) Ujino, T., Kawahara, T., Tsumura, Y., Nagamitsu, T., Yoshimaru, H., and Ratman, W. : Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity*, 81, 422-428 (1998)
- 18) Van De Ven, W. T. G. and McNicol, R. J. : The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. *Heredity*, 75, 126-132 (1995)
- 19) Weber, J. L. and May, P. E. : Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44, 388-396 (1989)

Clone Identification of Japanese Beech (*Fagus crenata* Blume) Clones Using Isozyme and Microsatellite DNA Markers

Makoto Takahashi ⁽¹⁾ and Yoshihiko Tsumura ⁽²⁾

Summary : We examined clone identification of 38 Japanese beech (*Fagus crenata* Blume) plus-tree clones using isozyme and microsatellite DNA markers. For the identification, 11 isozyme and two microsatellite DNA loci, in total of 13 loci, were used. Clone identification rate was 60.5 % in the case of using 11 isozyme loci. Thirty-five multi-locus genotypes were detected in the two microsatellite DNA loci, and 33 plus-tree clones possessed unique multi-locus genotype. Therefore, clone identification was possible for those 33 clones (86.8 %) using only two microsatellite DNA loci. Thirty-eight plus-tree clones were completely identified, when data of both isozyme and microsatellite DNA loci were used. It is concluded that complete clone identification was possible using only four loci, consisting of two isozyme and two microsatellite DNA loci.

(1) Tohoku Regional Breeding Office, Forest Tree Breeding Center
95 Osaki, Takizawa, Iwate 020-0173 Japan

(2) Foresutry and Forest Products Research Institute
Kukizaki, Inashiki, Ibaraki 305-8687 Japan