福岡水技セ研報　第15号　2005年３月
Bull. Fukuoka. Fisheries. Mar. Technol. Res. Cent. No15. March 2005

AFLP 法による養殖ノリ品種の系統分類

福澄　賢二・岩淵　光伸
（研究部）

Classification of laver cultivars by AFLP analysis

Kenji FUKUZUMI and Mitsunobu IWABUCHI*1
（Research Depertment）

養殖ノリの新品種開発について，福岡県ではプロトプラスト再生系を利用した変異体の選抜による育種手法を確立し，[1] 生長が優れた品種や低塩分に強い品種等を開発してきた。しかし2000年漁期の大規模な色落ち被害を契機に，低栄養に強い品種の開発を望む声が強まるなど，求められる品種特性は時代とともに変化している。

一方，ノリには極めて多くの養殖品種が存在するが，これらは系統別に整理されておらず，それぞれの特性も十分に把握されていない。したがってプロトプラスト再生系を利用した新しい育種技術を用いても，望まれる品種の開発にはかなりの時間を要することが予想される。形態的な特徴が少なく環境変異が大きいノリの場合，DNA 解析データをもとに系統別に整理，分類し，その上で特性評価を行う必要がある。本研究では，ノリ品種の識別に有効であることが示された AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）法[2] を用い，普及している養殖品種や保存株の整理，分類を試みたので報告する。

なお，ノリ養殖における”品種”とは，公立の研究機関，大学，種苗会社などが開発した株の通称であり，一部を除き，種苗法で定められた品種とは意を異にする。これら”品種”には，確実に純系化されたフリー糸状体で保存されているものは少なく，”系統”とするのが適当な場合もあるが，本報告では漁業者が使用しているものは全て”品種”とした。

方　法

表1に示す18種の品種や保存株を解析対象とした。DNA 抽出用の材料には，フリー糸状体から分離した殻胞子を室内培養で育成し，葉長10cm 程度に生長した葉状体を用いた。サンプル数は原則として複数とし，十分な生長が見られなかった種については複数の葉状体をまとめて1サンプルとした。解析用の DNA は，パパインとアルカリヘミセルラーゼ処理によりプロトプラストを単離後，ISOPLANT Ⅱで抽出し，RNase 処理後，キアゲンチップ20を用いて精製した。AFLP 解析は Applied Biosystems 社の AFLP Microbial Fingerprinting Kit を用いて行った。プライマーペアは EcoRI-MseI に0-A, 0-T，0-C，0-G の4通りの組み合わせを用いた。解析結果から18種全ての組み合わせの多型バンド数と共有バンド数を求め，次式により増幅バンドの共有度（BSI）[3] を求めた。1-BSI の値からクラスター分析（UPGMA 法）

表1　解析対象

番号	品種・株名	系統	入手先	解析個体数
1	スサビ	スサビノリ	有明海研究所	2
2	FA89	〃	〃	5
3	福岡１号	〃	〃	1
4	ナラワB	〃	〃	2
5	ナラワC	〃	〃	3
6	スサビ野生	〃	〃	複数プール1
7	ナラワ赤芽	〃	〃	2
8	低塩分耐性株	〃	〃	2
9	タカラ9号	〃	〃	2
10	TU-1	〃	北海道大学	3
11	アオクビ	〃	有明海研究所	2
12	HG-1	〃	兵庫県水産技術センター	4
13	HG-4	〃	〃	4
14	ミノミアサクサ	アサクサノリ	有明海研究所	2
15	サシキ	〃	〃	複数プール2
16	ユノウラアサクサ	〃	〃	2
17	有明１号	〃	〃	2
18	オオバグリーン	〃	〃	3

*1現有明海研究所

により樹状図を作成した。

BSI ＝2× Nab ／（Na ＋ Nb）
　Nab：個体 a および b に共通な増幅バンド数
　Na，Nb：個体 a および b にみられた増幅バンド数

また，供試した品種・株について，PCR-RFLP 分析によってスサビノリ系統，アサクサノリ系統の判別を行った。分析方法は Niwa et al. [*2]の手法に従い，抽2出，精製した。DNA の ITS 領域を PCR 法で増幅後，制限酵素 Dra Ⅰ及び Hae Ⅲで処理し，電気泳動で断片を検出して判別した。

結　果

AFLP 解析により得られた増幅バンド数を表2に示した。

4通りのプライマーペアで計327本の増幅バンドが得られた。増幅バンドの大きさは51-446bp であった。このうち302本が多型を示し，各プライマーペアの多型バンドの割合は91-96%であった。品種・株に特異なバンドは合計140本あり，多型バンドの42%を占めた。

18種全ての組み合わせでの多型バンド数の合計を表3に示した。

品種・株間の多型バンド数に差が認められた。特にアサクサノリ系とされている有明1号では他品種・株に対して102本以上，同じくオオバグリーンでは101本以上，サシキでは対ユノウラアサクサを除けば86本以上の多型バンド数があり，これらは他との差が顕著であった。これに対し，同じくアサクサノリ系とされているミノミアサクサとユノウラアサクサのスサビノリ系品種・株に対する多型バンド数は，スサビノリ系間のバンド数と大きく変わらず，アサクサノリ系品種のなかでスサビノリ系との類似度に差があった。また，HG-1と HG-4間の多型バンドは1本，ナラワ B とナラワ C 間では3本と極端に少なく，これらの遺伝的類似度は極めて高いと判断された。

18種全ての組み合わせでの BSI を表4に，BSI をもとに UPGMA 法によって作成した樹状図を図1に示した。

18種の品種・株は，サシキ，オオバグリーン，有明1号以外の15種のグループⅠと，これら3種のグループⅡに大きく分けられた。グループⅡ内に比べてグループⅠ内の距離は極めて小さかった。

品種別には，これまでアサクサノリ系とされていたミノミアサクサとユノウラアサクサがスサビノリ系のグループに属している点が注目された。また，多型バンド数からも明らかであったが，HG-1と HG-4，ナラワ B とナラワ C は遺伝的に極めて近いグループを形成し，これらに次いでスサビと FA89，ナラワ赤芽とアオクビが遺伝的に近いグループを形成した。

PCR-RFLP 分析結果を図2，図3に示した。

アサクサノリ系とされている5種のうち，サシキ，オオバグリーンは Dra Ⅰで1. 1kbp 付近にバンドがみられ，Hae Ⅲで640bp 及び440bp 付近にバンドがみられたためアサクサノリ系と判別された。一方，ミノミアサクサ，ユノウラアサクサ，有明1号は Dra Ⅰで860bp 及び220bp 付近にバンドがみられ，Hae Ⅲでは1. 1kbp 付近のバンドのみであり，スサビノリ系と判別された。スサビ系とされている13種は全てスサビノリ系のパターンを示した。

表2　4プライマーペアで得られた増幅バンド数

プライマーペア	0-A	0-T	0-C	0-G	計
総断片数	110	75	73	69	327
共通断片数	9	7	6	3	25
%	8.2	9.3	8.2	4.3	7.6
多型断片数	101	68	67	66	302
%	91.8	90.7	91.8	95.7	92.4
品種特異断片数	49	31	27	31	138
%	44.5	41.3	37.0	44.9	42.2

*2Niwa K，Kikuchi N and Aruga Y：Morphological and molecular analysis of the endangered species Porphyra tenera（Bangiales, Rhodophyta），Journal of Phycology （2005）（in press）

表3　4プライマーペアによる品種・株間の多型バンド数
（網掛けはアサクサノリ系とされている品種）

	品種・株名	スサビ	FA89	福岡1号	ナラワB	ナラワC	スサビ野生	ナラワ赤芽	低塩分耐性	タカラ9号	TU-1	アオクビ	HG-1	HG-4	ミノミアサクサ	サシキ	ユノウラアサクサ	有明1号	オオバグリーン
1	スサビ																		
2	FA89	19																	
3	福岡1号	38	39																
4	ナラワB	20	19	28															
5	ナラワC	21	20	29	3														
6	スサビ野生	51	54	47	49	50													
7	ナラワ赤芽	22	19	38	20	21	41												
8	低塩分耐性	26	29	42	32	33	49	24											
9	タカラ9号	35	40	47	33	36	60	35	41										
10	TU-1	53	60	67	61	62	84	59	67	46									
11	アオクビ	21	24	39	19	20	50	19	29	32	52								
12	HG-1	30	37	48	36	39	55	38	44	49	59	39							
13	HG-4	29	36	47	35	38	54	37	43	48	58	38	1						
14	ミノミアサクサ	36	41	56	40	41	51	32	42	45	61	23	54	53					
15	サシキ	94	93	104	90	89	103	86	90	97	115	89	98	99	102				
16	ユノウラアサクサ	57	56	69	51	52	76	49	59	60	86	48	71	70	61	117			
17	有明1号	107	110	111	107	108	124	103	103	112	126	102	129	128	107	143	118		
18	オオバグリーン	115	116	123	111	110	124	101	117	112	130	106	123	122	111	107	104	160	

表4　4プライマーペアによる品種・株間のBSI
（網掛けはアサクサノリ系とされている品種）

	品種・株名	スサビ	FA89	福岡1号	ナラワB	ナラワC	スサビ野生	ナラワ赤芽	低塩分耐性	タカラ9号	TU-1	アオクビ	HG-1	HG-4	ミノミアサクサ	サシキ	ユノウラアサクサ	有明1号	オオバグリーン
1	スサビ																		
2	FA89	0.89																	
3	福岡1号	0.80	0.79																
4	ナラワB	0.88	0.89	0.85															
5	ナラワC	0.88	0.88	0.84	0.98														
6	スサビ野生	0.73	0.72	0.76	0.74	0.73													
7	ナラワ赤芽	0.87	0.89	0.79	0.88	0.87	0.78												
8	低塩分耐性株	0.85	0.83	0.77	0.81	0.80	0.74	0.86											
9	タカラ9号	0.80	0.78	0.75	0.81	0.79	0.69	0.80	0.77										
10	TU-1	0.74	0.70	0.68	0.69	0.68	0.61	0.70	0.66	0.77									
11	アオクビ	0.88	0.87	0.79	0.89	0.88	0.74	0.89	0.83	0.82	0.74								
12	HG-1	0.85	0.81	0.76	0.81	0.79	0.73	0.80	0.77	0.75	0.73	0.80							
13	HG-4	0.85	0.81	0.77	0.81	0.80	0.74	0.80	0.77	0.76	0.73	0.80	1.00						
14	ミノミアサクサ	0.81	0.79	0.72	0.78	0.78	0.75	0.83	0.78	0.77	0.72	0.88	0.74	0.74					
15	サシキ	0.48	0.49	0.45	0.49	0.49	0.47	0.51	0.49	0.47	0.44	0.51	0.51	0.50	0.47				
16	ユノウラアサクサ	0.72	0.73	0.68	0.75	0.74	0.65	0.75	0.71	0.71	0.63	0.77	0.68	0.68	0.72	0.44			
17	有明1号	0.51	0.50	0.51	0.50	0.49	0.46	0.51	0.52	0.49	0.48	0.53	0.45	0.45	0.54	0.35	0.52		
18	オオバグリーン	0.47	0.47	0.46	0.48	0.48	0.46	0.52	0.46	0.49	0.46	0.51	0.48	0.48	0.52	0.52	0.58	0.38	

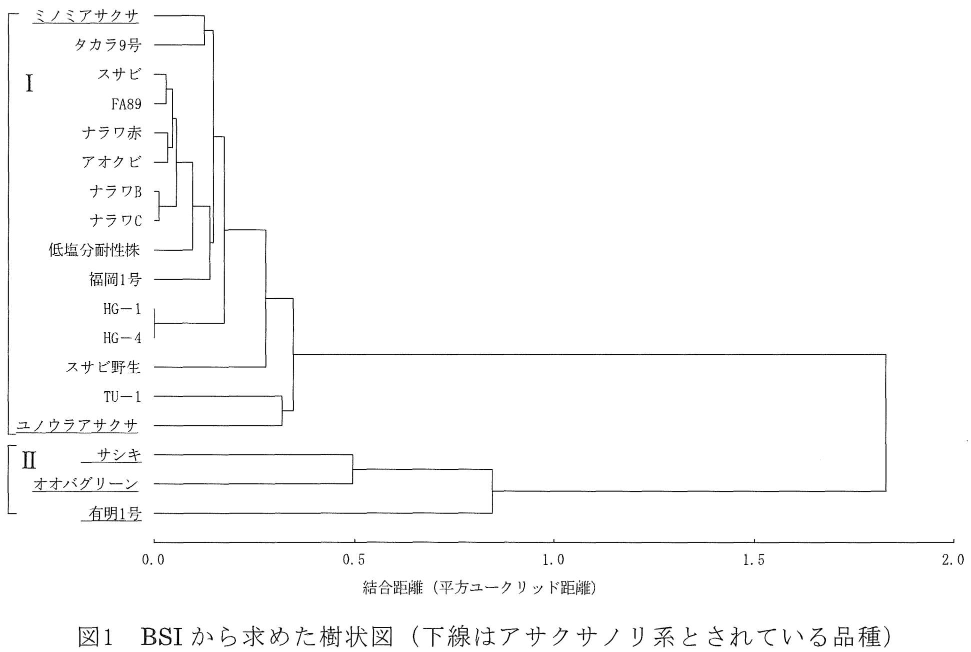

図1　BSIから求めた樹状図（下線はアサクサノリ系とされている品種）

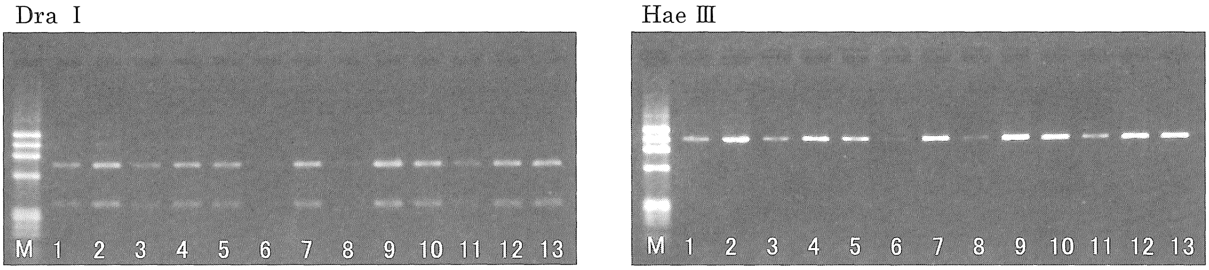

図2　スサビノリ系とされる品種・株のPCR-RFLP結果
(Mはマーカー4，品種・株は表1の番号に対応)

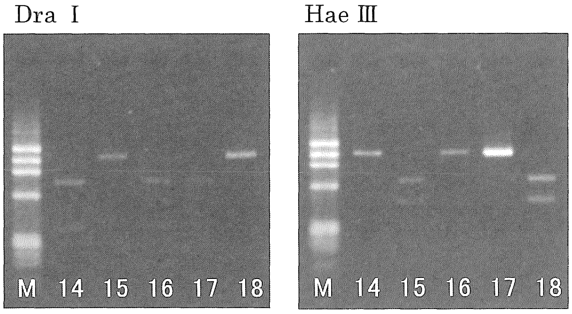

図3　アサクサノリ系とされる品種・株の
PCR-RFLP結果
(Mはマーカー4，品種・株は表1の番号に対応)

考　察

ノリの養殖品種は約1000種存在し[4)]，その多くは突然変異を利用した選抜育種によって開発されたものである。ノリのDNA変異の検出方法として，RFLP法，RAPID法，PCR-SSCP法，AFLP法等が検討されている。そのうちAFLP法は，形態に顕著な差が認められない養殖品種間でも識別が可能であり，また，品種の系統解析にも有効と考えられていることから，[2)]今回の系統分類にも本手法を用いた。

AFLP法で得られた増幅バンド327本のうち，全18種に共有のバンドは25本とごくわずかで，多型を示したバンドが大多数であったが，これはスサビノリ系とアサクサノリ系間で差異が大きかったことによるものである。一方でスサビノリ系間では多型バンドが数本の例もあるなど，品種・株間での差が大きかったことから，AFLP法がノリ品種レベルでの系統分類に有効であることがあらためて示された。

クラスター分析の結果，供試した品種・株は大きく2つのグループに分けられた。グループⅠ，Ⅱ間の距離はこれ以下の階層に対して突出して大きく，また，グループⅡは全てアサクサノリ系とされる品種であることや，ノリ養殖品種がつくられてきた経緯を考慮すると，グループⅠはスサビノリ系の品種・株，グループⅡはアサクサノリ系の品種とするのが適当と考えられた。また，グループⅡ内に比べてグループⅠ内の距離は大幅に小さかったことから，スサビノリ系品種・株の起源は，アサクサノリ系に比べて少数の株であることが示唆された。

クラスター分析によるスサビノリ系，アサクサノリ系のグループ分けとPCR-RFLP法の判別結果を比べると，有明1号を除く17種は一致しており，クラスター分析結果は例外はあるものの，妥当であったといえる。有明1号はクラスター分析ではアサクサノリ系グループとされたが，PCR-RFLPではスサビノリ系と判別された。有明1号が他のスサビノリ系の品種・株と遺伝的な差異が大きかった理由は不明であり，その出自も含めてさらなる検討が必要である。従来アサクサノリ系とされている品種2種がスサビノリ系のグループに属し，これらはPCR-RFLP法でもスサビノリ系と判別されており，スサビノリ系品種に改める必要があろう。なお，二羽ら[*3]によるPCR-RFLP結果でもアサクサノリ系とされる7種中，5種がスサビノリ系と判別されていることから，従来の系統分けを特にアサクサノリ系とされている品種については見直す必要があることが考えられた。

今回解析，分類したものは養殖品種のごく一部にすぎない。同様の手法によりさらに多くの品種・株について解析，分類を行っていく必要がある。また，品種として分離した際の履歴が明らかである品種や，ウップルイノリ等，種の異なるノリを解析することで，さらに細かいグループ分けや各グループ間の距離の意味付けが明らかになり，それぞれの類縁関係がより明確となることが期

*3二羽恭介，有賀祐勝：PCR-RFLP法による養殖アサクサノリの再発見，平成16年度日本水産学会大会講演要旨集，144 (2004)

待される。また，養殖品種が系統別に分類，整理され，さらにそれぞれの特性を把握することによって，新たなニーズに応じた新品種開発の効率化や，養殖現場における品種の適切な選択が可能となることが期待される。

要　約

1)ノリ養殖品種や保存株18種からDNAを抽出し，AFLP法による系統分類及びPCR-RFLP法による系統の判別を行った。

2)AFLP法では4プライマーペアで計327本の増幅バンドが得られた。このうち302本が多型を示し，各プライマーペアの多型バンドの割合は91-96%であった

3)各品種・株間のBSIからUPGMA法によって樹状図を作成したところ，品種・株は大きく2つのグループに分けられ，それぞれスサビノリ系統，アサクサノリ系統とするのが適当と考えられた。

4)スサビノリ系グループ内の距離はアサクサノリ系グループ内に比べて大幅に小さく，スサビノリ系品種・株の起源は，アサクサノリ系に比べて少数の株であることが示唆された。

5)AFLP法によるグループ分けとPCR-RFLP法によるスサビ系，アサクサ系の判別結果は，1種を除いて一致し，従来アサクサノリ系とされている品種2種がスサビノリ系グループに属していたことから、従来の系統分けを見直す必要があることが考えられた。

文　献

1)岩渕光伸：体細胞変異の利用によるストレス耐性株の作出，月刊海洋，27(11)，671-676 (1993)

2)岩渕光伸：AFLP法によるノリ養殖品種の識別，福岡県水産海洋技術センター研究報告，13，21-25 (2003)

3)万年英之ら：ABRI，19，39-44 (1991)

4)川村嘉応，鷲尾真佐人：海苔の生態学(能登谷正浩編)，成山堂書店，105-113 (2000)