

DNA 分析による奄美群島在来シクワサー (*Citrus depressa*) の多様性の解明

山本雅史

Elucidation of Diversity of Shiikuwasha (*Citrus depressa*) Grown on the Amami Islands by DNA Analysis

YAMAMOTO Masashi

鹿児島大学農学部
Faculty of Agriculture, Kagoshima University

要旨

奄美群島の在来シクワサーを供試し、CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) 法および SRAP (sequence related amplified polymorphisms) 法によって核の DNA 分析を実施した。CAPS 分析では奄美群島在来のシクワサー各系統はすべて同一の遺伝子型を示した。沖縄在来のほとんどのシクワサーも奄美群島のもとの区別できなかったが、イシクニブのみは他と異なった遺伝子型を示した。一方、SRAP 分析では一部の例外を除いて各系統を識別することが可能であり、シクワサーの多様性を明らかにすることができた。

緒言

有史以前に我が国に自生していたカンキツはタチバナ (*Citrus tachibana*) およびシクワサー (*C. depressa*) のみであり、後者は南西諸島に広く分布している。特にシクワサーは果実健康増進・維持に有効な機能性成分が含まれており (十一, 2005) 需要が多い。シクワサーは系統間における果実特性等の多様性が高く、利用の面からも各系統の特性を明らかにする必要がある。

る。そのため、DNA分析による系統識別・同定、多様性の解明は極めて重要であり、著者はこれらに関する研究を進めてきた（山本ら，1998; Yamamoto *et al.*, 2011, 2013）。しかし、これらの研究においては主に沖縄のシクワサーを供試しており、奄美群島在来シクワサーについては供試点数が十分でなかった。

前報（山本，2016）では奄美群島に分布する5島の在来シクワサーを供試して、結果の信頼性が高いCAPS（cleaved amplified polymorphic sequence）法によって葉緑体DNA分析を実施し、その多様性について報告した。本研究においては、前報と同様の植物材料を用いて核の遺伝子についてのDNA分析を実施した。その際、CAPS分析だけでなく、再現性および品種・系統の識別能が高いSRAP（sequence related amplified polymorphisms）分析も併せて実施した。

方法

奄美大島、加計呂麻島、徳之島、沖永良部島および与論島で収集した奄美群島在来シクワサー13系統を供試した。対照として、沖縄在来シクワサー3系統およびシクワサー以外のマンダリン6系統も供試した（第1表）。

DNAはISOPLAN II（ニッポンジーン）を用いて葉から抽出した。

CAPS分析：Shimada *et al.*（2014）の開発したプライマーを用いて特定の領域をPCRを用いて増幅した。増幅したDNAを所定の制限酵素を用いて切断してアガロースゲル電気泳動を実施した。ゲルはGelRedで染色し、紫外線照射下で出現バンドを確認した。プライマーと制限酵素は以下の9組み合わせである。Tf0001/MspI、Tf0235/HaeIII、Tf0420/HaeIII、Tf0419/PvuII、Cp0506/HindIII、Gn0029/Hinfl、Cp1143/HhaI、Tf0003/DraI および Tf0042/HhaI。

SRAP分析：Uzun *et al.*（2009）に準拠して実施した。特定の領域をPCRを用いて増幅した。増幅したDNAを用いてアガロースゲル電気泳動を実施した。ゲルはGelRedで染色し、紫外線照射下で出現バンドを確認した。プライマーは以下の16組み合わせである。Me1/Em14、Me3/Em3、Me3/Em9、Me4/Em1、Me5/Em4、Me6/Em4、Me6/Em6、Me16/Em15、Me8/Em2、Me9/Em7、Me10/Em5、Me10/Em15、Me11/Em9、Me11/Em10、Me12/Em5 および Me12/Em16。

結果と考察

9種類のプライマーを用いてCAPS分析を実施したところ、奄美群島在来シクワサー13系統の遺伝子型はすべて同一であった。沖縄在来シクワサーも一つの例外を除いて、奄美群島在来シクワサーと同じ遺伝子型であった。イシクニブのTf0419/PvuIIの遺伝子型だけは他のシクワサーと異なった。

一方、シクワサーはタチバナ、スンキ、クレオパトラ、キシウミカン、ウンシュウミカンおよびポンカンといった他のマンダリンとは区別できた。

SRAP 分析ではシクワサーは他のマンダリンとは明確に区別できた。シクワサー系統内では奄美群島在来シクワサーは 2 群に大別できた。沖縄在来シクワサーでは大宜見クガニーと伊豆見クガニーは比較的近縁で、イシクニブはいずれのシクワサーとも近縁でなかった。奄美群島在来シクワサーではシクワサー #14 およびキンカン #13 は大宜見クガニーおよび伊豆見クガニーと近縁であった。一方、シクワサー #11、シークニン (辛)、シーククリブの 3 系統、#13 以外のキンカン 4 系統は、大宜見クガニーおよび伊豆見クガニーとの間に遺伝的差異が認められた。

以上の結果、シクワサーは形態的に似通っている小果のマンダリンであるタチバナやスンキとは遺伝的に区別できることを DNA レベルで明らかにすることができた。さらに、シクワサー種内における多様性の存在も解明できた。この核 DNA レベルでの類縁関係の結果は、前報 (山本ら, 2016) で報告した葉緑体 DNA の多型と対応した。葉緑体 DNA には 2 種類のタイプが存在し、一方は日本自生のタチバナと同じタイプであり、もう一方は中国原産のスンキおよびインド原産のクレオパトラと同じである。SRAP 分析で大宜見クガニーおよび伊豆見クガニー並びにこれらと近縁系統はタチバナタイプであり、それ以外はスンキタイプであった。母系由来の葉緑体 DNA に 2 種類あることは、シクワサーが単一の祖先を由来とするものでなく、複数起源の可能性を示唆するものである。シクワサーの起源や分化については不明な点が多く、今後のさらなる研究が必要である。

引用文献

- SHIMADA, T., FUJII, H., ENDO, T., UEDA, T., SUGIYAMA, A., NAKANO, M., KITA, M., YOSHIOKA, T., SHIMIZU, T., NESUMI, H., IKOMA, Y., MORIGUCHI, T., OMURA, M. 2014. Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10: 1001–1013.
- 十一元晴. 2005. カンキツ類の化学成分とがん予防物質に関する研究. *薬学雑誌*, 125: 231–254.
- UZUN, A., YESILOGLU, T., AKA-KACAR, Y., TUZCU, O., GULSEN, O. 2009. Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Scientia Horticulturae*, 121: 306–312.
- 山本雅史. 2016. 奄美群島在来シクワサー (*Citrus depressa*) における葉緑体 DNA の多型. *南太平洋海域調査研究*, 57: 19-21.
- YAMAMOTO, M., KOUNO, R., NAKAGAWA, T., USUI, T., KUBO, T., TOMINAGA, S. 2011. Isozyme and DNA analyses of local *Citrus* germplasm on Amami Islands, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 80: 268–273.

- 山本雅史・松尾洋一・國賀 武・松本亮司・山田彬雄 1998. シイクワシヤ類のアイソザイム及びRAPD分析. 果樹試験場報告, 30/31: 339-351.
- YAMAMOTO, M., TSUCHIMOCCHI, Y., NINOMIYA, T., KOGA, T., KITAJIMA, A., YAMASAKI, A., INAFUKU-TERAMOTO, S., YANG, X., YANG, X., ZHONG, G., NASIR, N., KUBO, T., TOMINAGA, S. 2013. Diversity of chloroplast DNA in various mandarins (*Citrus* spp.) and other citrus demonstrated by CAPS analysis. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 82: 106-113.

第1表 供試した奄美群島の在来シイクワサーおよび対照系統

系 統	学 名	分 布
奄美群島在来シイクワサー		
シイクワサー#14	<i>Citrus depressa</i> Hayata	奄美大島
シイクワサー#15	<i>C. depressa</i> Hayata	奄美大島
シイクワサー#11	<i>C. depressa</i> Hayata	加計呂麻島
シークニン(甘)	<i>C. depressa</i> Hayata	徳之島
シークニン(辛)	<i>C. depressa</i> Hayata	徳之島
シークリブ(上城)	<i>C. depressa</i> Hayata	沖永良部島
シークリブ(余多)	<i>C. depressa</i> Hayata	沖永良部島
シークリブ(屋子母)	<i>C. depressa</i> Hayata	沖永良部島
キンカン#4	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島
キンカン#7	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島
キンカン#13	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島
キンカン#15	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島
キンカン#17	<i>C. depressa</i> Hayata	与論島
対照系統: 沖縄在来シイクワサー		
大宜味クガニー	<i>C. depressa</i> Hayata	沖縄
伊豆見クガニー	<i>C. depressa</i> Hayata	沖縄
イシクニブ	<i>C. depressa</i> Hayata	沖縄
対照系統: その他マンダリン		
タチバナ	<i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka	日本
スンキ	<i>C. sunki</i> (Hayata) hort. ex Tanaka	中国
クレオパトラ	<i>C. reshni</i> hort. ex Tanaka	インド
キシウミカン	<i>C. kinokuni</i> hort. ex Tanaka	中国
ウンシュウミカン	<i>C. unshiu</i> Marccow.	日本
ポンカン	<i>C. reticulata</i> Blanco	インド