

シロサポテ (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex.) における葉緑体 DNA の均一性

山本雅史^{1,*}・富田貴浩¹・遠城道雄²・米本仁巳³・石畑清武^{2,**}
久保達也¹・富永茂人¹

¹鹿児島大学農学部果樹園芸学研究室 890-0065 鹿児島市郡元
²鹿児島大学農学部附属農場指宿植物試験場 891-0402 指宿市十町
³国際農林水産業研究センター沖縄支所 907-0002 石垣市真栄里

Uniformity of chloroplast DNA in white sapote (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex.)

Masashi Yamamoto^{1,*}, Takahiro Tomita¹, Michio Onjo², Yoshimi Yonemoto³,
Kiyotake Ishihata^{2,**}, Tatsuya Kubo¹ and Shigeto Tominaga¹

¹Laboratory of Fruit Science, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065

²Ibusuki Experimental Botanical Garden, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Ibusuki, Kagoshima 891-0402

³Okinawa Subtropical Station, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ishigaki, Okinawa 907-0002

Summary

Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) analysis of chloroplast (cp) DNA in 31 cultivars of white sapote (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex.) was conducted. There were no polymorphisms of cpDNA in any of the 45 cross combinations derived from five primer pairs (*rbcL*-ORF106, *trnK2-trnQr*, *trnH-trnK*, *trnD-trnT* and *trnV-rbcL*) and nine restriction endonucleases (*Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hind*III, *Hinf*I, *Kpn*I and *Pst*I). These findings indicated the uniformity of cpDNA in white sapote.

Key Words: CAPS, chloroplast, DNA, white sapote

キーワード : CAPS, DNA, シロサポテ, 葉緑体

緒言

シロサポテ (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex.) はメキシコ地方原産のミカン科の亜熱帯果樹である。糖度が高く、200 g 以上の比較的大きな果実が生産できるので、その商品性は高い。そのため、カリフォルニア、フロリダ、オーストラリア、イスラエル等で経済栽培されている。亜熱帯果樹の中では耐寒性が比較的に強い¹²⁾、わが国においても新規の暖地果樹として期待されており、多数の品種がカリフォルニアから導入され¹⁰⁾、その花や果実特性が明らかにされつつある¹⁸⁾。これらの品種の大半はカリフォルニアおよびフロリダで選抜されたものであるが、来歴や品種の遺伝的背景が明確でないものが多い。しかし最近になってアイソザイム分析¹⁴⁾およびDNA分析^{15,17)}により、系統分類および品種識別に関する知見が得られ始めている。

細胞質 DNA 分析は系統分類に極めて有効な手法である。シロサポテと同じミカン科に属するカンキツ類ではこの分析法により系統分類に関する重要な結果が得られ

ている^{8,13)}。これらの分析法はミトコンドリアまたは葉緑体 DNA のプローブを用いた restriction fragment length polymorphism (RFLP) であった。RFLP 法は信頼性は高いものの、時間、費用等がかかる欠点がある。これに替わる方法として polymerase chain reaction (PCR) を利用した cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 法が開発された¹⁾。本法は信頼性が高く、時間、費用が節約できる方法として既に各種果樹類の系統分類に適用されている^{2,11,16)}。

本研究においては、シロサポテの多数品種を用いて cpDNA の CAPS 分析を実施し、その結果から類縁関係の検討を試みる計画であったが、品種間における多型は全く認めることができなかった。言い換えれば、シロサポテにおける cpDNA の遺伝的均一性を明らかにすることができた。この結果もシロサポテの類縁関係・分類研究にとって重要な知見であると判断し、ここに報告する次第である。

材料および方法

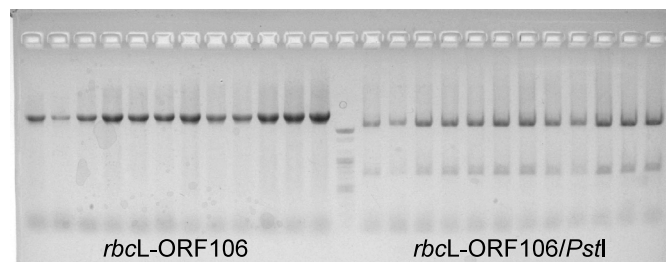
鹿児島大学農学部附属農場指宿植物試験場 (鹿児島県指宿市) で露地栽培されているシロサポテ31品種を用いた (Table 1)。約10年生の接木樹を供試し、葉から SDS

Table 1. White sapote cultivars used in this study.

Cultivar
Cate
Charles Early
Chestnut
Cuccio
Edgehill
Fallbrook
Florida
Fournoy
Golden Globe
Gwin
Lammertz
Lamsey Large
Malibue No. 1
Malibue No. 3
Maltby
Max Golden
McDill
Mexico
Michele
Nies
Ortega
Pike
Rainbow
Rixford
Salad
Selk
Vernon
Vista
Walton
White
Yellow

Table 2. Pairs of cpDNA primers used in this study.

Primer 1	Primer 2	Reference
<i>rbcL</i> (5'-ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGT-3')	ORF106(5'-ACTACAGATCTCATACTACCCC-3')	Arnold et al. 1991 ¹⁾
<i>trnK2</i> (5'-TAAAGCCGAGTACTCTACCGTTG-3')	<i>trnQr</i> (5'-CTATTCGGAGGTTGGAATCCTTCC-3')	Dumokin-Lapegue et al. 1997 ⁷⁾
<i>trnH</i> (5'-ACGGGAATTGAACCCGCGCA-3')	<i>trnK</i> (5'-CCGACTAGTTCGGGTTTCCA-3')	Denesure et al. 1995 ⁸⁾
<i>trnD</i> (5'-ACCAATTGAACTACAATCCC-3')	<i>trnT</i> (5'-CTACCACCTGAGTTAAAAGGG-3')	Denesure et al. 1995 ⁸⁾
<i>trnV</i> (5'-CGAACCGTAGACCTTCTCGG-3')	<i>rbcLr</i> (5'-GCTTTAGTCTCTGTTTGTGG-3')	Dumokin-Lapegue et al. 1997 ⁷⁾

Fig. 1. Fragment pattern of white sapote cultivars amplified with universal primer *rbcL*-ORF106, and it digested with *Pst*I.

法により DNA を抽出した⁹⁾.

5 か所の cpDNA 領域, すなわち *rbcL*-ORF106, *trnK2*-*trnQr*, *trnH*-*trnK*, *trnD*-*trnT* および *trnV*-*rbcL* をプライマー^{1,6,7)} (Table 2) とした PCR を行った. PCR 反応にはアステック社の PC320 を用いた. 条件は以下の通りである. 94 1 分, その後 94 1 分, 47.5-62 1 分 (プライマーにより温度が異なる), 72 2 分を 35 回, 最後に 72 10 分である. アニリングの温度はそれぞれ *rbcL*-ORF106 で 55, *trnK2*-*trnQr* で 47.5, *trnH*-*trnK* で 62, *trnD*-*trnT* で 54.5, *trnV*-*rbcL* で 57.5 であった. 増幅産物は制限酵素 (*Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hind*III, *Hinf*I, *Kpn*I, *Pst*I) で 37 4 時間処理した. 制限処理後, 1.5% アガロースゲル電気泳動によりフラグメントを分離し, ミュービッドブルー (株式会社アドバンス) で染色した.

結果および考察

5 種類いずれのプライマーを用いても, 同一のプライマーによる PCR の増幅産物は電気泳動では差異が認められなかった. これらのプライマーと 9 種類の制限酵素を用いた 45 組み合わせの CAPS 分析においても, プライマーと制限酵素との組み合わせが同じ場合, 全品種はすべて同一のフラグメントパターンを示した. 一例とし

て *rbcL*-ORF106 をプライマーとした増幅産物と, それを *Pst*I で処理したときの電気泳動の結果を Fig. 1 に示した.

Yamamoto et al.¹⁵⁾ は本研究で供試した 31 品種を用いて inter simple sequence repeat (ISSR) 分析を行い, 'Cuccio' と 'Florida' 以外の全品種の識別に成功している. Yonemoto et al.¹⁷⁾ も本研究に含まれる多数の品種を random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法および amplified fragment length polymorphism (AFLP) によって識別している. これらの結果から, 本研究で供試した品種は一般の DNA 分析では識別可能である.

一方, 本研究の cpDNA の CAPS 分析では全く多様性を認めることができなかった. cpDNA の全領域を調べたわけでもなく, 5 か所の DNA 領域についても塩基配列を調べたわけでもないので, これだけで供試品種間の cpDNA が同一か否かを決定することはできないものの, 45 種類もの多数の組み合わせによる CAPS 分析で差異が認められなかったことから, 供試品種の cpDNA の均一性は高いものと推察できた. ISSR, RAPD および AFLP 分析では多様性が認められたものの cpDNA の CAPS 分析で差異が認められなかったことは, シロサポテの各品種が同一の遺伝的背景を備える品種間の交雑によって誕生してきたことを示すものかもしれない.

シロサポテの品種のうち, 葉に毛じを備える, 'Max Golden' 等を *C. tetrameria* Millsp. と一般のシロサポテと

は別種とする説があるが³⁾、本研究における cpDNA の CAPS 分析では差異が認められなかった。ISSR, RAPD および AFLP 分析においてもこれらの品種が他品種群と区別されることはなかった。従って、Morton¹²⁾のように、毛じを備えるものは *C. edulis* 内における変異であると考えることが適切である。

以上、本研究ではシロサボテ内の葉緑体 DNA に多様性を認めることは出来なかった。これは、本研究で供試した品種の多数はカリフォルニアおよびフロリダで育成されたものであり、品種間の遺伝的な背景が限定されていたことによるものかもしれない。また、今後は CAPS 法以外の cpDNA 分析法⁴⁵⁾を行い、シロサボテ品種間における cpDNA の多型の有無について精査する必要がある。

要 約

シロサボテ (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex.) 31品種を供試して、葉緑体 DNA の cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 分析を実施した。5種類のプライマー (*rbcL*-ORF106, *trnK2-trnQr*, *trnH-trnK*, *trnD-trnT*, *trnV-rbcL*) および9種類の制限酵素 (*Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hind*III, *Hinf*I, *Kpn*I, *Pst*I) による45組み合わせのいずれにおいても供試品種間で多型は認められず、シロサボテの種内における葉緑体 DNA の均一性が明らかとなった。

文 献

- 1) Arnold, M. L., Bucker, C. M. and Robinson, J. J.: Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1398-1402 (1991)
- 2) Asadi Abkenar, A., Isshiki, S. and Tashiro, Y.: Phylogenetic relationships in the "true citrus fruit trees" revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. *Sci. Hort.*, **102**, 233-242 (2004)
- 3) Brooks, R. M. and Olmo, H. P.: Register of new fruit and nut varieties. 2nd edition. Univ. Calif. Press, Berkeley, Los Angeles, London. (1972)
- 4) Chase, M. W., Morton, C. M. and Kallunki, J. A.: Phylogenetic relationships of Rutaceae: A cladistic analysis of the subfamilies using evidence from *rbcL* and *atpB* sequence variation. *Amer. J. Bot.*, **86**, 1191-1199 (1999)
- 5) Cheng, Y., de Vincente, Meng, M. C., H, Guo, W., Tao, N. and Deng, X.: A set of primers for analyzing chloroplast DNA diversity in *Citrus* and related genera. *Tree Physiol.*, **25**, 661-672 (2005)
- 6) Demesure, Sodji, B., N. and Petit, R. J.: A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Mol. Ecol.*, **4**, 129-131 (1995)
- 7) Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M. H. and Petit, R. J.: An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Mol. Ecol.*, **6**, 393-397 (1997)
- 8) Green, R. M., Vardi, A. and Galun, E.: The plastome of *Citrus*. Physical map, variation among *Citrus* cultivars and species and comparison with related genera. *Theor. Appl. Genet.*, **72**, 170-177 (1986)
- 9) Honda, H. and Hirai, A.: A simple and efficient method for identification of hybrids using nonradioactive rDNA as probe. *Japan. J. Breed.*, **40**, 339-348 (1990)
- 10) 石畑清武・遠城道雄・野村哲也・福留紘二・福村和則・長野幸男: シロサボテの栽培. 1. 導入と増殖法について. *鹿大農場研報*, **20**, 21-33 (1995)
- 11) Mohanty, A., Martin, J. P. and Aguinalgalde, I.: Chloroplast DNA diversity and distinguishing sweet cherry cultivars: A new approach. *Acta Hort.*, **546**, 463-469 (2001)
- 12) Morton, J. F.: Fruits of warm climate. p. 191-196, Creative Resource Systems, Inc., Winterville, North Carolina (1987)
- 13) Yamamoto, M. and Kobayashi, S.: Polymorphism of chloroplast DNA in citrus. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **65**, 291-296 (1996)
- 14) Yamamoto, M., Nakagawa, T., Onjo, M., Yonemoto, Y., Ishihata, K., Kubo, T. and Tominaga, S.: Isozyme analysis of white sapote (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex). *Bull. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **56**, 15-18 (2005)
- 15) Yamamoto, M., Tomita, T., Onjo, M., Ishihata, K., Kubo, T., Tominaga, S. and Yonemoto, Y.: Genetic Diversity of White Sapote (*Casimiroa edulis* La Llave & Lex.) Demonstrated by ISSR Analysis. *HortScience*, **42**: 1329-1331 (2007)
- 16) Yonemori, K., Kanzaki, S., Parfitt, D. E., Utsunomiya, N., Subhadrabamdhru, S. and Sugiura, A.: Phylogenetic relationship of *Diospyros kaki* (persimmon) to *Diospyros* spp. (Ebenaceae) of Thailand and four temperate zone *Diospyros* spp. From an analysis of RFLP variation in amplified cpDNA. *Genome*, **41**, 173-182 (1998)
- 17) Yonemoto, Y., Chowdhury, A. K., Kato, H., Macha, M. M. and Okuda, H.: Characterization of white sapote (*Casimiroa edulis* Llave & Lex.) germplasm using floral morphology, RAPD and AFLP markers. *Sci. Hort.*, **112**: 366-375 (2007)
- 18) 米本仁巳・樋口浩和・石畑清武・池田 稔・富田栄一: シロサボテ (*Casimiroa edulis* Llave and Lex.) の花器および果実形態における品種間差異. *熱帯農業*, **45**, 38-44 (2001)