

ベトナムから導入したアセロラ (*Malpighia glabra* L.) のSRAP分析

山本雅史^{1*}・原田和彦²・中西 結¹・勘米良祥多³・富永 輝⁴・石畑清武⁵

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 株式会社ニチレイスーコ 〒104-0045 東京都中央区築地

³ 鹿児島大学農学部附属農場指宿植物試験場 〒890-0402 鹿児島県指宿市

⁴ 鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園 〒890-0081 鹿児島市唐湊

⁵ 鹿児島大学名誉教授

SRAP analysis of acelora (*Malpighia glabra* L.) introduced from Vietnam

Masashi Yamamoto^{1*}, Kazuhiko Harada², Yui Nakanishi¹,
Shota Kanmera³, Akira Tominaga⁴ and Kiyotake Ishihata⁵

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

² Nichirei Suco Inc., Tsukiji, Chuo-Ku, Tokyo 104-0045

³ Ibusuki Experimental Botanical Garden, Experimental Farm, Faculty of Agriculture,
Kagoshima University, Ibusuki, Kagoshima 890-0402

⁴ Toso Orchard, Experimental Farm, Faculty of Agriculture, Kagoshima University,
Toso, Kagoshima 890-0081

⁵ Professor emeritus of Kagoshima University

Summary

Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) analysis of ten acerola (*Malpighia glabra* L.) accessions includes three cultivars introduced from Vietnam was conducted. Three Vietnamese cultivars were distinguished from each other. In addition, they were distinguished from control accessions. Results of SRAP indicate a relationship between, both Vietnamese cultivars, 'Go Cong' and 'Ben Tre', and slight relationship among them and 'Florida Sweet' and 'Hawaiian Queen'. Vietnamese cultivar 'High Vitamin C' was clustered with 'Maunawili' and 'Rehnborg'. The present study demonstrated the usefulness of SRAP analysis for identification of cultivars introduced from Vietnam.

Key Words: acelora, cultivar identification, DNA, genetic resources, Vietnam

キーワード：アセロラ, DNA, 品種識別, 遺伝資源, ベトナム

緒言

アセロラ (*Malpighia glabra* L.) は中央アメリカ原産の熱帯果樹である。果実には機能性成分として知られるアスコルビン酸やポリフェノール類が豊富に含まれることから (Asenjo・Guzman, 1946; Moscoco, 1956; Hanamuraら, 2005, 2008), 健康の維持・増進に役立つ果樹として消費者の好評を博している。アセロラ栽培の歴史は主要果樹に比べると短いものの, 様々な品種が選抜されてきた (Ledin, 1956; Brooks・Olmo, 1972; Clark・Finn, 2006; Cavalcanteら, 2007)。従来, これら選抜系統・品種の遺伝的関係については不明な点が多かったが, 近年,

DNA分析によってそれらの関係を解明する研究が開始されている (Sallaら, 2002; Chowdhuryら, 2005)。

筆者らは前報 (Itoら, 2014) において, 日本で収集・保存されている19品種・系統を供試し, 実験操作が簡単で結果の信頼性が高いsequence-related amplified polymorphism (SRAP) 分析 (Li・Quiros, 2001) を実施することによりそれらの遺伝的関係を解明した。その後, アジアにおけるアセロラの主要生産国であるベトナム社会主義共和国から主要3品種を導入したが, これらの遺伝的背景については不明である。今後, 品種の権利の保護等のためには, DNA分析によって他品種と区別できることが必要である。これらの観点から, 本研究においてはベトナムの主要3品種と前報 (Itoら, 2014) で用いた代表的な品種・系統 (以下, 品種と略) を供試してSRAP分析を実施したので, その結果を報告する。

2015年10月22日 受付日

2015年11月30日 受理日

*Corresponding author. E-mail: yamasa@agri.kagoshima-u.ac.jp

材料および方法

ベトナムにおける主要3品種および対照の7品種はTable 1に示した。いずれも鹿児島大学農学部附属農場唐湊果樹園の加温硬質プラスチックハウスおよび指宿植物試験場の加温ガラス室で保存されている。

DNAはIsoplant II (ニッポンジーン) を用いて葉から抽出した。SRAP分析に用いたプライマーおよびその組み合わせは、Itoら(2014)に準拠した(Table 2, 3)。PCRの反応液は1点当たり12.5 μ Lであり、10ngのDNA, 10pmolの各プライマー, 0.2mMのdNTP, 0.5unitのPrime Taq DNA polymerase (ジェネットバイオ), 1/10量の10 \times Bufferを含んだ。PCR反応にはサーマルサイクラーPC320 (アステック) を用い、はじめに95 $^{\circ}$ Cで3分、続いて94 $^{\circ}$ C 1分, 35 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1分を5サイクル, その後94 $^{\circ}$ C 1分, 50 $^{\circ}$ C 1分, 72 $^{\circ}$ C 1分を35サイクル, 最後に72 $^{\circ}$ C 5分とした。増幅したDNAは、1.5%アガロースゲル電気泳動を実施し、GelRed (Biotium) で染色して紫外線照射下で出現バンドを確認した。

バンドは出現を「1」、出現しないものを「0」と評価し、各品種間の共有バンド率 (Dice, 1945) を計算して、MEGA4.1 (Tamuraら, 2007) を用いて最尤推定

Table 1. Acerola (*Malpighia glabra* L.) accessions used in the present study.

No.	Accession	Origin
1	Go Cong	Vietnam
2	Ben Tre	Vietnam
3	High Vitamin C Variety	Vietnam
4	Sanmi-kei (Hosoba)	-
5	Flor Branca	Brazil
6	Florida Sweet	Florida
7	Hawaiian Queen	Hawaii
8	Tropical Ruby	Hawaii
9	Maunawili	Hawaii
10	Rehnborg	Hawaii

Table 2. Forward and reverse SRAP primer information for the present study.

Forward primer	Reverse primer
Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	Em1: GACTGCGTACGAATTAAT
Me3: TGAGTCCAAACCGGAAT	Em2: GACTGCGTACGAATTTGC
Me4: TGAGTCCAAACCGGACC	Em3: GACTGCGTACGAATTGAC
Me5: TGAGTCCAAACCGGAAG	Em4: GACTGCGTACGAATTTGA
Me6: TGAGTCCAAACCGGACA	Em5: GACTGCGTACGAATTAAC
Me8: TGAGTCCAAACCGGACT	Em6: GACTGCGTACGAATTGCA
Me9: TGAGTCCAAACCGGAGG	Em7: GACTGCGTACGAATTCAA
Me11: TGAGTCCAAACCGGAAC	Em9: GACTGCGTACGAATTCAG
Me12: TGAGTCCAAACCGGAGA	Em10: GACTGCGTACGAATTCAT
	Em11: GACTGCGTACGAATTCTA
	Em13: GACTGCGTACGAATTCTG
	Em14: GACTGCGTACGAATTCTT

(ME) 法により系統樹を作成した。

結果および考察

SRAP分析に用いたプライマー13組み合わせの何れにおいても供試品種間で多型が確認できた。‘Florida Sweet’ と ‘Hawaiian Queen’ は常に同一のバンドパターンを示したが、他品種は独自のバンドパターンを示したので、相互に区別できた。例としてFig. 1にEm1/Me4およびEm2/Me3の結果を示した。得られた多型から作製した系統樹をFig. 2に示した。系統樹はAからDの4つに大別できた。Aには‘Florida Sweet’, ‘Hawaiian Queen’並びにベトナムから導入した‘Go Cong’および‘Ben Tre’が、Bには‘Tropical Ruby’, ‘Maunawili’, ‘Rehnborg’およびベトナム導入の‘High Vitamin C’が、Cには‘Flor Branca’のみが、Dには‘酸味系(細葉)’のみが属した。

ベトナム導入品種以外の系統樹における位置はItoら(2014)とほぼ一致した。但し、Itoら(2014)らの結果では‘Florida Sweet’および‘Hawaiian Queen’は極めて近縁であったが区別されていたのに対し、本研究では両者を区別できなかった。これは、用いたプライマーはItoら(2014)と本研究では同じであるが、Taq DNA polymerase等の反応液の組成が異なり、本研究では多型評価の際に強く発現しているバンドのみを選んだことによるものと考えられた。しかしながら、各々異なる年次で個別に実験を実施したにも関わらず、両者でほぼ一致する結果が

Table 3. SRAP primer combinations in the present study.

Primer combination	
Em1/Me4	Em7/Me9
Em2/Me3	Em9/Me3
Em2/Me8	Em10/Me11
Em3/Me3	Em11/Me1
Em4/Me5	Em13/Me4
Em5/Me12	Em14/Me1
Em6/Me6	

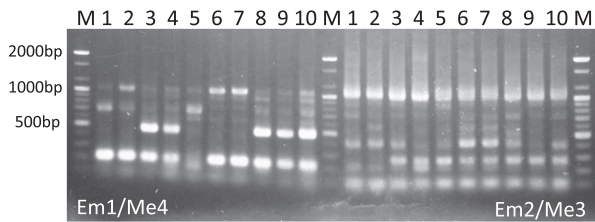


Fig. 1 DNA amplifications of acerola accessions using SRAP primers. M: molecular markers, 1-10: see Table 1.

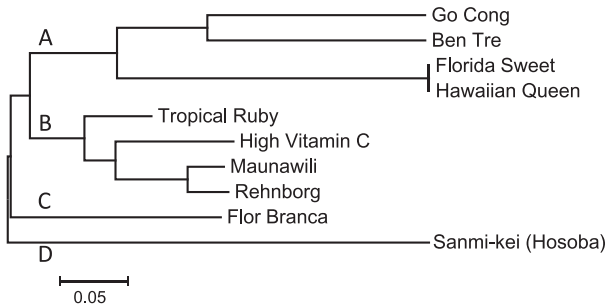


Fig. 2 Genetic relationships of acerola accessions estimated by maximum likelihood estimation method cluster analysis of SRAP data.

得られたことから、SRAP分析の再現性の高さを確認できた。

ベトナム導入品種のうち、‘Go Cong’および‘Ben Tre’は風味が良く、前者はアスコルビン酸含量の多い加工用品種で、後者はアスコルビン酸含量はやや少ないが食味が良く糖度が高い生食用品種である。一方、‘High Vitamin C’はブラジルからタイ王国を経由して導入された品種で、アスコルビン酸含量は非常に高いものの酸味が強くて生食には適さない（原田，私信）。SRAP分析の結果、‘Go Cong’および‘Ben Tre’は相互に近縁で、甘味系品種の‘Florida Sweet’および‘Hawaiian Queen’とやや近縁であることが明らかになった。‘High Vitamin C’は酸味系品種の‘Maunawili’および‘Rehnborg’と近縁であり、ブラジル原産の‘Flor Branca’とは近縁でなかった。以上の結果、今回供試したベトナム導入の3品種は、対照の主要品種と遺伝的に明瞭に区別することが可能で、3品種間でも相互に区別できた。ベトナムはアセロラの出産地ではないため、‘Go Cong’および‘Ben Tre’またはその祖先品種は過去に導入されたものである。本研究の結果から、この両者には何らかの遺伝的関係があるものと推定できた。

‘Go Cong’と‘High Vitamin C’の2品種はベトナム現地において主に加工用として利用されている。生食用品種の‘Ben Tre’は加工用原料として不適だとされているが、その混入の可能性は排除できない（原田，私信）。筆者らは既にアセロラ加工品であるピューレから抽出されたDNAを用いたSRAP分析にも成功している（山本ら，未発表）。この成果と本研究の成果とを組み合わせることで、加工原料に用いられたアセロラ品種の推定も可能となるものと考えられる。また、本研究の結果は今後の品種の権利保護にも有効である。

要約

ベトナムから導入した3品種を含むアセロラ (*Malpighia glabra* L.) 10品種・系統を供試して sequence-related amplified polymorphism (SRAP) 分析を実施した。ベトナム導入の3品種は相互に、また対照品種と区別できた。ベトナムから導入した‘Go Cong’および‘Ben Tre’は相互に近縁で、‘Florida Sweet’および‘Hawaiian Queen’とやや近縁であることが明らかになった。ベトナム導入の‘High Vitamin C’は‘Maunawili’および‘Rehnborg’と近縁であった。本研究の結果、SRAP分析はベトナム導入品種の品種識別に有効であることが確認できた。

参考文献

- Asenjo, C. F. and A. R. F. Guzman. 1946. The ascorbic acid content of the West Indian cherry. *Science* 103: 219.
- Brooks, R. D. and H. P. Olmo. 1972. Register of new fruit and nut varieties. University of California Press (Los Angeles) USA pp. 156-157.
- Cavalcante, I. H. L. C., M. Z. Beckmann, A. B. G. Martins, and M. C. C. Campos. 2007. Preliminary selection of acerola genotype in Brazil. *Fruits* 62: 27-34.
- Chowdhury, A. K., Y. Yonemoto, H. Kato, and M. M. Macha. 2005. Classification of some acerola (*Malpighia glabra* Linn.) cultivars using morphometric descriptors and RAPD markers. *Jpn. J. Trop. Agr.* 49: 255-263.
- Clark, J. R. and C. F. Finn. 2006. Register of new fruit and nut cultivars List 43. *HortScience* 41: 1101-1133.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- Hanamura, T., T. Hagiwara, and H. Kawagishi. 2005. Structural and functional characterization of polyphenol isolated from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *Biosci. Biotech. Biochem.* 69: 280-286.
- Hanamura, T., E. Uchida, and H. Aoki. 2008. Skin-lightening effect of a polyphenol extract from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit on UV-induced pigmentation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 72: 3211-3218.
- Ito, A., Y. Kajiwara, S. Kanmera, K. Ishihata, K. Harada, T. Ogata, T. Kubo, S. Tominaga and M. Yamamoto. 2014. Identification of acerola (*Malpighia glabra* L.) accessions by SRAP markers. *Trop. Agr. Develop.* 58: 30-32.
- Ledin, R. B. 1956. A comparison of three clones of Barbados cherry and the importance of improved selections for commercial plantings. *FL Agr. Exp. Stn. J. Ser.* 538: 293-297.
- Li, G. and C. F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103: 455-

461.

- Moscoco, C. G. 1956. Wset Indian cherry - richest known source of natural vitamn C. *Econo. Bot.* 10: 280-294.
- Salla, M. F. S., C. A. Ruas, P. M. Ruas, and E. V. Carpentieri-Pipolo. 2002. The use of molecular markers in the genetic variability analysis of acerola (*Malpighia emarginata*). *Rev. Bras. Frutic.* 24: 15-22.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.