

与路島および中之島のカンキツの分類

富永茂人・山本雅史・久保達也・福田麻由子・土持 由

鹿児島大学農学部

Classification of Citrus in Yorojima and Nakanoshima Using Gene Analysis

TOMINAGA Shigeto・YAMAMOTO Masashi・KUBO Tatsuya・FUKUDA Mayuko・
TUCHIMUCHI Yui

Faculty of Agriculture, Kagoshima University

Abstract

Twenty-one citrus samples from Yorojima of Setouchi-cho in Amamiyoshima-island were classified into seven types that were further grouped into roughly two major ones by cluster analysis (UPGMA methods) based on the band pattern of RAPD analysis. On the other hands, 14 citrus samples from Nakanoshima in Toshimma-mura were divided into three patterns by the existence of the bands of 380bp and 550bp using Mariner like elements (MLE) gene analysis.

はじめに

鹿児島県の南西諸島は北緯27°(与論島)～北緯31°(三島村)の南北500kmの間に200以上の連続した島しょが存在し、それぞれの島が個別的でありながら、文化的、生物地理学的には連続しており、それらの島しょに分布する植物も各島固有でありながら、一方では遺伝的に連続している。筆者らは、これらの島しょに分布するカンキツ類を対象に、主としてDNA分析を用いた分類を行っている。同時に、鹿児島県の島しょのうち特に奄美群島やトカラ列島の各島と文化的な連続性が認められるミクロネシアのカンキツ類についてもDNA分析を行っている。

本報告では、奄美大島の与路島および十島村の中之島に存在するカンキツ類についてDNA分析を行い、両島のカンキツ類について分類を試みた。

調査方法

1. 与路島のカンキツ類の分類

平成19年6月18日～6月22日に多島圏研究センターが水産学部練習船南星丸を利用して行った「道の島々」研究において、奄美群島与路島のカンキツ類の葉21サンプルを6月21日に採取し、ポリ袋に入れて鹿児島大学農学部果樹研究室に持ち帰り、それらの類縁関係(品種識別)についてRAPD分析により明らかにしようとした。RAPD分析は以下の通りに行った。対照品種として勝山クガニー(シイクワーサー)、クネンボ、ブン

タンの3品種を供試し、プライマーはオペロン社のプライマーの中からカンキツ類で差異が認められやすいOPA04, OPA09, OPA12, OPA17, OPB09, OPB11, OPB17の計7種類を供試した。葉からのDNA抽出はISOPLANT IIを用いて行い、抽出後冷蔵・保存した。滅菌水 9.33 μ l, PCR10 \times Buffer 1.25 μ l, dNTPs 0.8 μ l, プライマー 0.5 μ l, Taqポリメラーゼ 0.12 μ lに、抽出したDNAを0.5 μ l加えて混合した後、PCR反応を行った。その後、サンプル溶液12 μ l, BPB 2 μ l, EDTA 1 μ lを混合した計15 μ lを100Vで約30分間電気泳動を行った。電気泳動のゲルはAgarose Gel (1.5% Seakem GTG Agarose, TAE)を用い、ゲルの端には分子サイズの比較対照としてDNAマーカーを入れた。電気泳動は100Vで約30分間行った。電気泳動後、ゲルを染色液 (Mupid-Blueを超純水で50倍希釈) に1分間浸して染色し、ゲルを取り出して70%エタノールに浸して完全に脱色した後、蛍光灯上でバンドを確認した。さらに、泳動パターンから再現性のあるDNA断片をもとにして、各個体間の類似度係数を求め、Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 3.1によるクラスター分析 (UPGMA法)を行った。

2. 中之島のカンキツ類の分類

平成21年8月29日および30日に、中之島の14箇所からカンキツ葉サンプルを採取した。採取した葉サンプルはポリ袋に入れて研究室に持ち帰り、ISOPLANT IIを用いてDNA抽出を行った後、高等植物のMLE遺伝子プライマー (Feschotteら, 2002) のMLE 3 A (5'-GCATTRTCYTG YTG DAT) とMLE 5 A MLE 5 A ('-ATHGATGARAARTGGTTC)を用いてPCR反応をさせ、増幅産物溶液10 μ L, EDTA 1 μ L, BPB 2 μ Lを混合し、100Vで約30分の電気泳動 (ゲルはAgarose Gel (1.5% Seakem GTG Agarose), TAE)を行った。ゲルの端には分子サイズの比較対照としてDNAマーカー (100bp DNA Ladder, BIONEER社)を入れた。電気泳動後、ゲルを染色液 (Mupid-STAIN eye) に約2分間浸し染色した後、ゲルを取り出し、蒸留水に約2分間浸し振とう脱色し、蛍光灯上でバンドを確認した。

結果および考察

1. 与路島のカンキツ類の分類

与路島で葉を採取したカンキツ21種類を供試し、7種類のプライマーを用いてRAPD分析を行った結果、6種類のプライマーで350bp ~ 1250bpの多型バンドを確認することができた (写真1)。RAPD分析の結果は写真1-1 ~ 1-6に示した。個体間差異

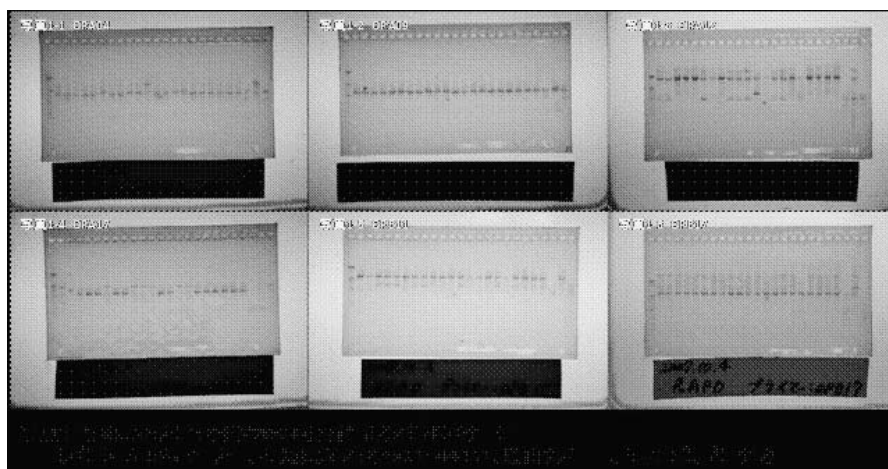


写真1 与路島のカンキツ類のRAPD分析によるバンドパターン

(バンド: 左からマーカー, 与路島カンキツNO. 1 ~ NO.21, 勝山クガニー, クネンボ, プンタン)

を確認できる有効総バンド数は12本で、プライマー1種類当り平均2本の有効バンドが得られ、有効バンドが最も多く検出されたのはNO. 2, NO.12, クネンボの3種類の6本で、最も有効バンドが少なかったのはブンタンの3本であった。有効バンドが最も多く検出されたプライマーはOPA04, OPA17の2種類の3本であり、有効バンドが最も少なかったプライマーはOPA09, OPB17の1本であった。増幅されたDNAバンドは350bpから1250bpのサイズであった。

バンドの有無を数値化し、共有バンド率を算出した後クラスター分析（UPGMA法）を行った結果を図1に示した。与路島で採取した21種類のカンキツは、RAPD分析のバンドパターンにより7種類に分類可能で、さらにそれらは大きく2つのグループに分類することができた。しかし、NO.3,4,5,7,8,16,18,19,20,21の10種類ではバンドパターンが完全に一致しており、区別することができなかった。また同様に、NO.1,6,9,10,14,15の6種類も区別することができなかった。これらのバンドパターンが完全に一致したことは、これらが同一の種類であるか、または遺伝的に非常に近いものであることを示唆している。また、NO.11とクネンボ、NO.13とNO.17はそれぞれ共有バンド率が高く、これらは近縁であると考えられた。また、NO. 1, 6, 9, 10, 14, 15もクネンボと比較的近いところに位置していた。一方、ブンタンのバンドパターンは与路島のいずれのカンキツとも全く異なり、遠縁であることが示唆された。

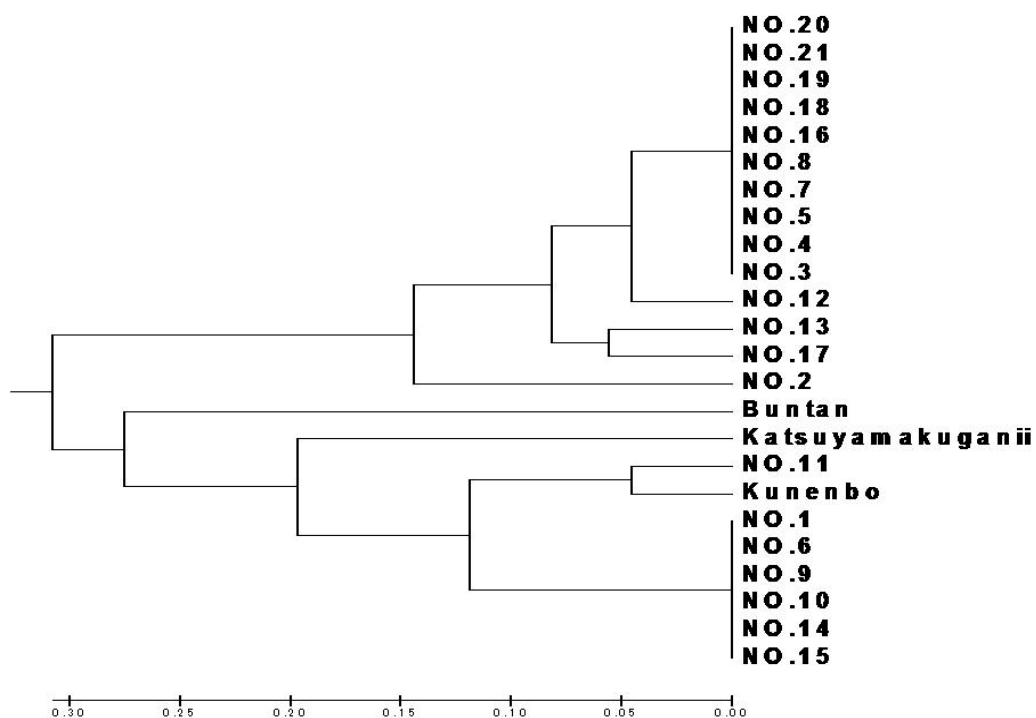


図1 RAPD分析による与路島のカンキツのクラスター分析

2. 中之島のカンキツ類の分類

中之島で採取した14種類の葉サンプルについて、MLE遺伝子による分類識別を試みた結果、MLE遺伝子のプライマーでは、380bpと550bpの2箇所のバンドの出現に差異

が認められた（写真2，表1）。380bpと550bpのバンドの有無により，中之島で採取したカンキツ類を分けると，380bpにバンドが有り550bpにバンドを示さないものは無く，それ以外の3パターンに分けられた（表2）。

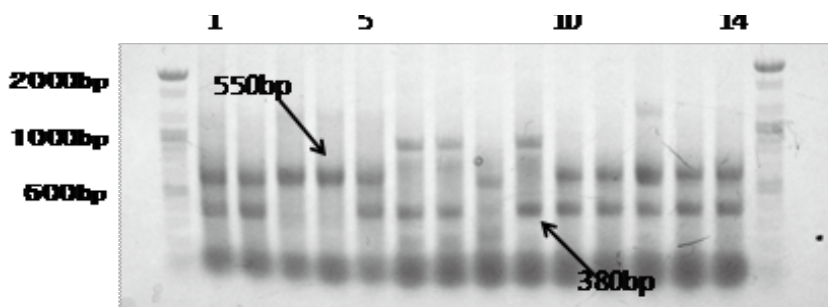


写真2 中之島のカンキツ類のMLE遺伝子のバンドパターン

表1 中之島のカンキツ類のMLE遺伝子のバンドパターン

番号	島での呼称	380bp	550bp
1	ボンカン	+	+
2	しょうこう	+	+
3	ダイダイ	-	+
4	ダイダイ	-	+
5	ショウコウ	+	+
6	くろしま	-	-
7	くろしま	-	-
8	赤みかん	-	-
9	名称不明	-	-
10	しょうこう 酸	+	+
11	しょうこう 甘	+	+
12	ダイダイ	+	+
13	しょうこう 酸	+	+
14	しょうこう (早香)	+	+

表2 MLE遺伝子のバンドパターンによる中之島カンキツ類の分類

380bp	550bp	
	+	-
+	1, 2, 5, 10, 11, 12, 13, 14	無
-	3, 4	6, 7, 8, 9

まとめ

鹿児島大学水産学部練習船‘南星丸’を利用して平成19年6月18日～22日に奄美大島瀬戸内町与路島からカンキツ葉21サンプルを採取し，RAPD分析のバンドパターンをもとに，各個体間の類似度係数を求め，Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 3.1によるクラスター分析（UPGMA法）を行った。次いで，平成21年8月29日および30日に，中之島からカンキツ葉14サンプルを採取し，採取した葉についてトランスポゾンMariner like elements（MLE）遺伝子分析による分類を行った。その結果，与路島のカンキツは7種類に分類可能で，さらにそれらは大きく2つのグループに分類することができた。一方，中之島のカンキツは380bpと550bpのバンドの有無により3パターンに分けられた