

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2012～2015

課題番号：24405025

研究課題名(和文)海のカンキツロードの解明

研究課題名(英文)Investigation of sea road in citrus

研究代表者

北島 宣 (Kitajima, Akira)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70135549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本の本土および沖縄・南西諸島、中国の雲南省、広東省、台湾、ベトナム、フィリピン、タイ、インドネシア、ミクロネシア等の在来カンキツ調査を行い、東シナ海および南シナ海地域をほぼカバーする地点での調査を行うことができた。その結果、これまで調査した日本、中国浙江省、江西省、広西チワン族自治区、重慶等の在来カンキツおよび保存している世界のカンキツ種・品種と近縁属を含め、862個体のDNAを蒐集・保存し、細胞質DNAおよびゲノムDNA解析によりカンキツ種の分化が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, native citrus of Main land and South West Islands in Japan, Yunnan and Guangdong in China, Taiwan, Vietnam, Philippines, Thailand, Indonesia and Micronesia were investigated which were almost covered around West China Sea and South China Sea regions. As the results, 862 individual citrus DNA including native citrus of Zhejiang, Jiangxi, Guangxi and Chongqing in China and Japan investigated already and world citrus species and cultivars and the relatives planted in our field were reserved. By SSR analysis of genome DNA and Chloroplast DNA sequence analysis, citrus species developments were cleared.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 カンキツ 起源 種分化

1. 研究開始当初の背景

日本の在来カンキツの多くは、古代から近世にかけて中国や東南アジアから導入されたものとそれらの交雑により生じたものであるが、それらの起源や伝播ルートは明らかでない。申請者らは、すでに日本本土と奄美・沖縄地域および中国、台湾などの在来カンキツの調査を行い、DNA解析により、それらの類縁関係が明らかになりつつある。本研究では、東シナ海・南シナ海沿岸地域諸国の在来カンキツを調査し、これらとすでに調査した在来カンキツを含めた全体の類縁関係を明らかにする。さらに、特徴的な DNA 配列をキーとして、東シナ海・南シナ海を介したカンキツの伝播ルートである「海のカンキツロード」を解明し、日本の在来カンキツの起源と伝播ルートを明らかにするとともに、カンキツの起源や種分化の過程を推定する。

2. 研究の目的

東シナ海・南シナ海沿岸地域の先島諸島、中国、台湾、ベトナム、フィリピン、タイ、インドネシア等を調査地とし、当地の在来カンキツの形態的特徴と果実形質を調査し、DNAを抽出して SSR 解析と cpDNA 解析を行う。cpDNA 解析では、マンダリン、プンタン、シトロン、パペダ、ライムの識別に有効な新たなマーカーを開発する。申請者らがすでに調査した在来カンキツを含め、これら解析により全体の類縁関係を明らかにする。また、特徴的な cpDNA 配列や SSR アレルを抽出し、それらを共通に持つカンキツの地理的分布図を作成するとともに、日本本土や西南諸島の在来カンキツとの関係を詳細に検討する。これらの結果をもとに、これら地域における在来カンキツの起源や伝播ルートである「海のカンキツロード」を推定するとともに、カンキツ種の起源や種分化の過程を考察する。

3. 研究の方法

(1) 在来カンキツ探索・収集・調査

日本の先島諸島、台湾、中国雲南省、広東省、ベトナム、フィリピン、タイ、インドネシアなどに赴き、在来カンキツを探索して収集し、形態調査を行った。

(2) DNA 解析

ゲノム DNA の SSR 解析のための有効なマーカー開発と、細胞質 DNA 解析のための有効なクロロプラスト (Cp) DNA 配列の検討を行った。収集した在来カンキツから DNA を抽出し、これまで収集した在来カンキツを含めて SSR 解析と CpDNA 解析を行った。

(3) DNA 解析に基づき、在来カンキツの類縁関係を解析し、種分化の過程を考察した。

4. 研究成果

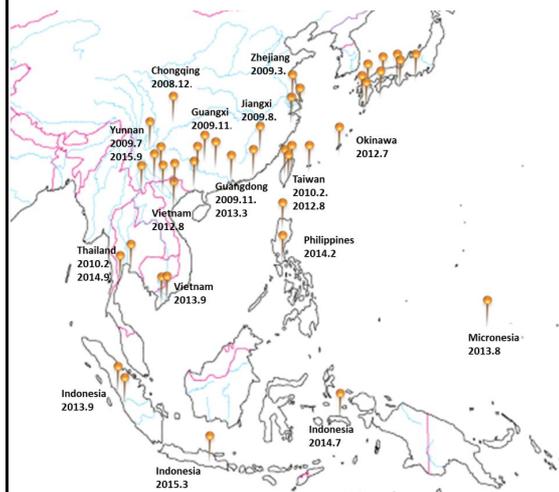
(1) 在来カンキツ探索・収集・調査

収集・調査した在来カンキツの採取地点は第1図の通りである。これまで収集した在来カンキツを含め、合計 862 個体の在来カンキツ

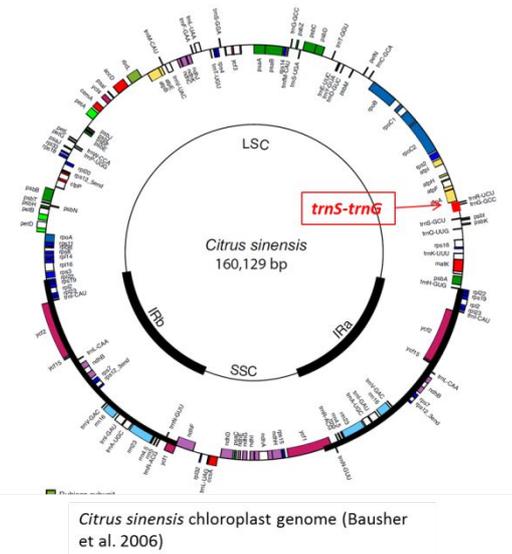
ツの DNA を採取・保存できた。

(2) DNA 解析

ゲノム DNA 解析のための有効な SSR マーカーを検討し、多様なカンキツ種に共通する 55 マーカーを選別した (Shimizu et al. in press)。細胞質 DNA 解析のための有効なクロロプラスト (Cp) DNA 配列の検討を行った結果、多型が比較的多い TrnS-TrnG 領域が適当であると考えられた (第2図)。



第1図 在来カンキツの調査地点



第2図 TrnS-TrnG spacer 領域点

年度別成果は以下の通りである。

平成 24 年度は奄美諸島、沖縄本島、先島諸島、台湾、ベトナム東北部などの在来カンキツ調査を行い、103 サンプルを収集した。これまでに収集したサンプルも含め、葉緑体 DNA 解析とゲノム DNA 解析を行った。

葉緑体 DNA 解析では、TrnS-TrnG spacer 領域について 347 サンプルのシークエンスを行った。その結果、16 種類の多型が出現し、この領域は類縁関係の解析に極めて有効であることが認められた。一方、シークワサーはスunki型に含まれ、タチバナ型とは異なった (Nagano, Yamamoto et al. 2014)。シ

ークワサーのスンキ型は南西諸島に広く分布していた (Yamamoto, Kitajima et al. 2013)。台湾の山中に自生しているシークワサーを確認したが、これも一致した。ベトナムや台湾ではヒメレモンが一般的にみられた。これらの細胞質はスンキ型と区別することができた (中野・北島ら、2012)。タチバナ型は、奄美大島から与那国島にわたる範囲で検出された。

一方、ゲノム DNA 解析では 20 種類の SSR マーカーを用いて 161 サンプルのアレル解析を行った。その結果、マンダリングループ、タチバナ・シークワサーグループ、プンタングループ、シトロソ・ユズグループに大きく分けることができた。マンダリングループ内では、コミカン、クネンボ、ポンカン、中国在来のクラスターに分けられた。

これらの結果から、タチバナの伝播やシークワサーの種分化に関する重要な知見が新たに得られた。タチバナの細胞質は、現在のところ日本以外の在来カンキツでは確認されていないため、今後、台湾や南シナ海沿岸の詳細な調査を行う必要がある。また、ヒメレモンの細胞質タイプの分布を南シナ海地域で調査する必要がある。

平成 25 年度はミクロネシア、ベトナム南部、インドネシアスマトラ島、与論島、フィリピンルソン島の在来カンキツ調査を行い、それぞれ 28、27、23、20、33 サンプルを採取した。平成 25 年 3 月に中国広東省潮州市で採取した 18 サンプルに加え、平成 26 年 3 月にフィリピンで採取した 33 サンプルを除き、118 サンプルについて CpTrnS-TrnG spacer 領域のシークエンス解析を行い、ターゲット配列の全長を読めたものは、中国潮州市が 8 サンプル、ベトナムが 14 サンプル、インドネシアが 10 サンプル、与論島が 12 サンプルであり、合計 62 サンプルについて細胞質型を特定することができた。

ミクロネシアでは、ヒメレモン型、プンタン型、ダイダイ型、メキシカンライム型、のものが比較的多く見られた。メキシカンライム型のはライムタイプのものであった。また、ダイダイ型が多く見られたのも特徴であった。インドネシアでは、メキシカンライム型とポンカン型が多く見られた。ベトナム南部の *C. nobilis* はポンカン型であり、前年のベトナム北部の結果と一致した。ベトナムの小型レモンはいずれもヒメレモン型であり、調理用カンキツのなかにシキキツ型のもも存在した。ベトナム小型レモンよりやや大型の無核レモンはダイダイの細胞質であり、交雑によって生じたものと考えられた。庭園樹のミクロシトラス様のカンキツは細胞質が他のカンキツと大きく異なる塩基配列であった。与論島ではシークワサーの採取を行い、1 個隊はタチバナの細胞質を有していたが、他はすべてシークワサーの細胞質であった。中国潮州市で台木用に育成しているカラタチ様の三出葉を有する個体の細

胞質はポンカンであり、雑種由来であった。台木に利用されている「江西紅橘」はポンカン型であった。サンキツやタンカンはシークワサーと同型で、これまでの結果と一致しており、スンキ型であった。

平成 26 年度は、タイ南部、インドネシアのジャワ島およびアンボン島の在来カンキツの調査を行い、それぞれ 17、40、29 サンプルを採取した。SSR 解析において、マーカーの詳細なスクリーニングを行い、カンキツの多様な種において共通して利用可能な 55 マーカーを厳選した。このマーカーを用いて、これまで採取した 288 個体の在来カンキツおよびカンキツ類の標準種の解析を行った (第 3 図)。その結果、カンキツ類はカラタチ、キンカン・シキキツ、パペダ・シトロソ、プンタン・ダイダイ、マンダリンの 5 グループに大きく分類された。パペダ・シトロソグループにはライム、レモン、ヒメレモンが含まれた。プンタン・ダイダイグループには日本の雑柑類、スイートオレンジ、クネンボ、ウンシュウミカンが含まれた。マンダリングループでは、コミカン、中国系マンダリン、ポンカン、タンカン、キングマンダリン、タチバナ、シークワサー、ケラジの小グループに分類された。また、この結果からカンキツの親子鑑定が可能となり、ウンシュウミカンはコミカンとクネンボの雑種であることが判明し、その成果は Plant & Animal Genome XXIII 国際会議で発表した (Shimizu, Kitajima et al. 2015)。



第 3 図 SSR 解析による在来カンキツ類縁関係

また、cpDNA の trnS-trnG 領域の塩基配列解析では、これまで採取した 124 個体の解析から 22 種類の多型が検出され、それらの遺伝的距離からマンダリンの細胞質はカンキツ起源種に最も近いこと、ヒメレモンの細胞質はスンキに極めて近いこと、シトロソに比べクリメニアがポンカンに近いこと、パペダはプンタンに比較的近く、いずれもポンカンやシトロソから遠いことなどが示された

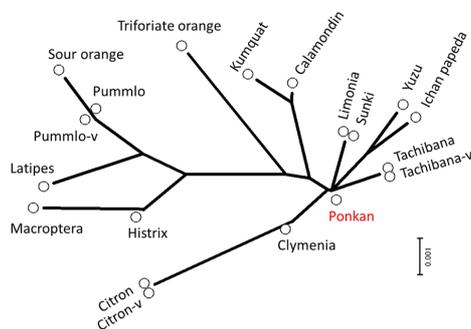
(第4図)。これらの結果は Citrus Biotechnology III 国際シンポジウムで発表した (Kitajima et al. 2014)。

平成 27 年度は、これまで蒐集したカンキツ類の総合的な解析を行った。SSR 解析において、多様な種・品種で増幅が認められた 417 点から既知の親子関係において矛盾なく遺伝する 188 点を選抜し、マンダリンを対象に親子鑑定を行った。その結果、ウンシュウミカンの親はキシウミカンとクネンボであること、クネンボの親はキシウミカンであること、ヒュウガナツの親はタチバナであること、レモンの親はダイダイであることカボスの親はクネンボであることなどが明らかとなった (清水・北島ら、2016)。

また、43 種・品種の香酸カンキツ類を SSR 解析した結果、レモンはシトロン類縁カンキツとダイダイとの交雑によって生じたことや、スダチ、カボス、ヘベスなどの日本在来香酸カンキツはその成立にユズとクネンボが関与していることなどが示唆された。

一方、雲南における在来カンキツ調査を行い、クロロプラスト分析を行った結果、ユズと類似する在来カンキツ現地名称「棒」はスンキ型であり、雲南檸檬はヒメレモン型であったが、紅河大翼橘と富民枳は新たな型であった。紅河大翼橘はマンダリンとブントンの中間的な配列を示しており、以前採取したベトナムの 1 個体と配列が類似した。富民枳はカンキツの配列とは大きく異なった。フィリッピンの Lemonsito、Dalayap、Bayao kambing、インドネシアの Asam Sundai、Lemon Suanggi、Lemon Nipis およびベトナムのフィンガーライムは新たなクロロプラスト型であった。Dalayap、Asam Sundai、Lemon Suanggi、Lemon Nipis、Bayao kambing はライムと配列が類似していたが、ベトナムフィンガーライムや Lemonsito の配列は他のカンキツと大きく異なった。

これまで、日本の本土および沖縄・南西諸島、中国の浙江省、江西省、広東省、広西自治区および雲南省、台湾、ベトナム、フィリッピン、タイ、インドネシア、ミクロネシアの在来カンキツ調査を行い、東シナ海および南シナ海地域をほぼ網羅する地点での調査を行うことができた。その結果、カンキツ属およびその近縁属を含め、862 個体の DNA を蒐集・保存し、SSR マーカー解析および cpDNA 解析の手法が確立され、代表的な 200 ~ 300 個体を用いた細胞質 DNA およびゲノム DNA 解析結果が蓄積され、細胞質 DNA およびゲノム DNA に基づく在来カンキツの類縁関係が明らかにされた。また、これらの結果をもとにカンキツ属の起源種や種分化および東シナ海・南シナ海を介した伝播ルートの内容が解明されつつある。しかしながら、シトロンとパペダは分布域が中国南西部・インド東北部と東南アジアと遠く離れており、細胞質 DNA も大きく異なるにもかかわらず、ゲノム DNA では近い関係にあることや、イ



第4図 TrnS-TrnG 領域の多型に基づく系統樹

ーチャンパペダは形態的にパペダに近いにもかかわらず中国南西部に自生していることなどから、中国南西部の在来カンキツをさらに詳細に調査する必要がある。また、クリメニア属はシトロンやブントんに比べカンキツ属の起源に近いと推定されることから、クリメニア属が自生するニューギニアの調査を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

Shimizu, T., A. Kitajima, E. Kaminuma, et al.、A Genomic Approach to Select Robust and Versatile SNP Sets from NGS Data Towards GWAS Analysis of Citrus. *Acta Horticulturae*. (in press). (査読有)

Kitajima, A., M. Yamamoto, A. Yamasaki, M. Nakano, T. Shimizu, T. Nakazaki, K. Yonemori, et al 2014. Investigation of phylogeny and species differentiation in citrus by chloroplast DNA analysis. 3rd International Symposium on Citrus Biotechnology: 31-32. (査読無)

Nagano, Y., S. Inafuku-Teramoto, M. Hashimoto, T. Mimura, R. Matsumoto and M. Yamamoto. 2014. Characterization of chloroplast *matK* sequences of *Citrus tachibana* and *Citrus depressa*, two indigenous species in Japan. *Advances in Horticultural Science*. 28: 95-99. (査読有)

Yamamoto, M., A. Kitajima, A. Yamasaki, S. Inafuku-Teramoto, X. Yang, X. Yang, G. Zhong, N. Nasir, T. Kubo and S. Tominaga. 2013. Diversity of Chloroplast DNA in Various Mandarins (*Citrus* spp.) and Other Citrus Demonstrated by CAPS Analysis. *J. Japan. Hort. Sci.* 82: 106-113. (査読有)

[学会発表](計 2件)

清水徳朗・北島 宣・野中圭佑・吉岡照高・太田智・後藤新悟・神沼英理・中村保一. 2016. 高精度 DNA マーカー分析による在来カンキツ品種の類縁関係の推定. 園学研. 15 別 : 52. (査読無)

中野道治・清水徳朗・須川 瞬・金好純子・喜多正幸・吉岡照高・北島 宣. 2012. 核 SSR 及び葉緑体 DNA 配列によるレモンおよび香酸カンキツ類の多様性解析. 園学研. 11(別2):

312. ( 査読無 )

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北島 宣 (KITAJIMA Akira)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：7 0 1 3 5 5 4 9

### (2) 研究分担者

山本 雅史 (YAMAMOTO Masashi)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号：0 0 3 0 5 1 6 1

清水 徳朗 (SHIMIZU Tokuro)

(独) 農研機構・果樹研究所・上席研究員

研究者番号：9 0 3 5 5 4 0 4

山崎 安津 (YAMASAKI Atsu)

(独) 農研機構・果樹研究所・研究員

研究者番号：7 0 5 8 2 5 8 4

米森 敬三 (YONEMORI Keizo)

龍谷大学・農学部・教授

研究者番号：1 0 1 1 1 9 4 9

### (3) 連携研究者

なし。