ブータン王国における在来カンキツ類の調査とその葉緑体 DNA 分析

Tshering Penjor^{1,2}・永野幸生³・三村高史¹・松本亮司^{1a}・山本雅史^{4*}

¹ 佐賀大学農学部 840-8502 佐賀市本庄町

² Renewable Natural Resources Research Centre Wengkhar, Mongar, Bhutan

³ 佐賀大学総合分析実験センター 840-8502 佐賀市本庄町

⁴ 鹿児島大学農学部 890-0065 鹿児島市郡元

Exploration of Local Citrus Genetic Resources in Bhutan and their Chloroplast DNA Analysis

Tshering Penjor^{1,2}, Yukio Nagano³, Takashi Mimura¹, Ryoji Matsumoto^{1a} and Masashi Yamamoto^{4*}

¹ Faculty of Agriculture, Saga University, Honjo-machi, Saga 840-8502

² Renewable Natural Resources Research Centre Wengkhar, Mongar, Bhutan

³ Analytical Research Center for Experimental Sciences, Saga University, Honjo-machi, Saga 840-8502

⁴ Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima 890-0065

Abstract

Exploration of local citrus genetic resources grown in the Kingdom of Bhutan was conducted in September 2007, Mongar and Trashigang in the east region, Wangdue Phodrang and Thimphu in the west region, and Tsirang in the south region. Among 14 accessions investigated, all accessions belonged to genus *Citrus* except one Bael (*Aegle marmelos*). Among them, eleven accessions were native and/or local *Citrus* genetic resources; one Ichang papeda relative, four Lime relatives, two Acidless limes, two Citron relatives, one Rough lemon relative, and one unidentified accession. Ichang papeda relative was found at elevations of around 2,000 m. In Bhutan, places at that altitude are normally too cold for any citrus tree to survive especially in winter where the temperature drops to below freezing, occasionally with snowfalls. Analysis of *matK* sequences revealed that chloroplast DNA of Bhutanese Ichang papeda relative and a preserved tree of Ichang papeda in Faculty of Agriculture, Saga University was different. *MatK* sequence of Bhutanese Ichang papeda relative was identical with that of a preserved tree of Khasi papeda in Saga University. Diversity was found in *matK* sequence among lime relatives. Precise accession identification could be conducted from the results of *matK* sequences in conjunction with morphological traits.

Key Words : *Aegle*, cpDNA, ichang papeda, lime, *matK*

キーワード : *Aegle*, cpDNA, イーチャンパペダ, *matK*, ライム

緒 言

ブータン王国はヒマラヤ山脈東端近くの南斜面に位置し、中華人民共和国のチベット自治区、インドのアルチャナル・プラデシュ、西ベンガル、アッサムおよびシッキム州に隣接している。面積は約4万km²と九州とほぼ同程度である。

インドのアッサム地方はカンキツ類の起源地と推測されており (Tanaka, 1959; 田中, 1959), そこに連なるブータン王国は、カンキツ類の遺伝資源研究を進める上で重要な地域であると考えられるが、在来遺伝資源の計画的な調査は行われてこなかった。これは、ブータン王国が近年まで

ほぼ鎖国状態であり、海外からの学術調査を許可しなかったこと、全土のほとんどが急峻な山岳地域であり、環境保全も考慮して、道路交通網の開発が進まなかったことなどによる。しかしながら、最近になってそれらの状況も徐々に変化をはじめており、独立行政法人国際協力機構 (JICA) の協力のもと、ブータン王国の Renewable Natural Resources Research Centre と佐賀大学農学部は、2007年にブータン王国において在来カンキツ類の遺伝資源の調査をする機会に恵まれた。調査は東部のモンガルに位置する Renewable Natural Resources Research Centre を拠点としたため、東部地域が中心であったが、従来不明であったブータン王国に自生するカンキツ類についての知見を得ることができた。

また、近年の DNA 分析技術の進展によって、遺伝資源調査で収集した系統の遺伝的特性や多様性を解明することが可能となった (奥野, 1999; Ueda・Higuchi, 2012)。本研

2013年7月12日 受付。2014年4月24日 受理。

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

^a 現在: (株) 果豊研究所

究においては、種々の DNA 分析のうち、植物の進化・分化を研究する際に良く用いられる葉緑体の *matK* 遺伝子(村上ら, 1997) を分析した. *matK* は葉緑体 DNA のリジン t-RNA 遺伝子のイントロンに存在するマチュラーゼをコードする遺伝子である. 進化速度が速いので、近縁植物間の類縁関係の解明に有効である (Hilu • Liang, 1997; Hilu ら, 2003; Olmstead • Palmer, 1994). 筆者ら (Tshering Penjor ら, 2013) は、カンキツ類が含まれるミカン亜科植物において、本遺伝子の塩基配列を分析することにより、属内の類縁関係を詳細に解明した. さらに、他の単一葉緑体遺伝子の解析では困難であったワンビ連とカンキツ連との識別にも成功した.

本研究では、佐賀大学農学部で保存しているミカン亜科植物を対照として *matK* 遺伝子の DNA 分析を行い、収集した遺伝資源の評価の一助とした.

以上のように、本研究においてはブータン王国全土の調査は実施しておらず、分析した遺伝子も葉緑体 DNA のみであるが、従来知られることのなかったブータンの自生・在来カンキツ類についての重要な知見を得ることができた. これはカンキツ類の遺伝資源研究の進展に貢献するものと考え、以下に報告する.

材料および方法

1. ブータン王国における遺伝資源調査

2007 年 9 月 3 ~ 23 日の間、ブータン王国に滞在した. カンキツ類の遺伝資源調査は、東部のモンガルおよびタシガン、西部のワンデュ・ポダンおよびティンブーならびに南部のチランで実施した. 自生・在来カンキツ類の調査を

主としたが、試験場での保存樹、市場での販売果実も調査した. 同タイプの樹が複数存在する場合には最も大きな個体または結実している個体を調査樹とした. 結実している中から代表的な果実と枝葉を採取し、それらの写真を撮影し、果実の主要特性を記録した.

2. DNA 抽出および分析

収集した果実から採種し、直ちに播種した. それら実生植物は Renewable Natural Resources Research Centre Wengkhar, Mongar で育成し、それらの葉を材料とした.

DNA は DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて製品マニュアルに従って抽出した. ただし、400 μ L の Buffer AP1 に 8 μ L の β -メルカプトエタノールおよび 4 mg のポリビニルポリピロリドンを加えた. *matK* 遺伝子の解析に使用したプライマーは Tshering Penjor ら (2013) に準拠した. 遺伝子は KOD FX DNA ポリメラーゼ (Toyobo) を用いて PCR で増幅した. 増幅された DNA は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL) で精製した. 精製された DNA 断片は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction キット v. 3.1 (Applied Biosystems) (Platt ら, 2007) を用いて酵素反応を行い Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した. なお、対照系統 (第 1 表) の塩基配列は既報 (Tshering Penjor ら, 2013) のデータを利用した. 対照系統は佐賀大学農学部で保存しているカンキツ類からパペダを含む主要カンキツ属 13 種、キンカン 2 種およびカラタチ 1 種を選んだ. 今回新たに配列を決定した *matK* 遺伝子の配列は、アクセシオンナンバー AB830114 ~ AB830120 として DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した.

Table 1. Control accessions used in the *matK* analysis.

Latin name	Accession ^z No.	Introduction	
		Origin ^y	Statue
<i>Citrus hystrix</i> DC	7003	1	Scion
<i>C. ichangensis</i> Swingle	7009	1	Scion
<i>C. latipes</i> (Swingle) Tanaka	7000	1	Scion
<i>C. macroptera</i> Montr.	7006	1	Scion
<i>C. micrantha</i> Wester	7004	1	Scion
<i>C. aurantifolia</i> (Cristm.) Swingle	5115	2	Scion
<i>C. aurantium</i> L.	JP117365	3	Scion
<i>C. junos</i> Siebold ex Tanaka	5403	4	Scion
<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	5207	5	Scion
<i>C. grandis</i> (L.) Osbeck 'Suisho Buntan'	3301	6	Scion
<i>C. medica</i> var. <i>sarcodactylis</i> (Hoola van Nooren) Swingle 'Fingered Citron'	5008	4	Scion
<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck 'Valencia'	2200	7	Scion
<i>C. unshiu</i> Marcow. 'Imamura Unshu'	1403	8	Tree
<i>Fortunella japonica</i> (Thunb.) Swingle	8002	7	Tree
<i>F. polyandra</i> (Rindl.) Tanaka	8005	1	Seed
<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Raf. 'Standard'	8100	7	Scion
<i>Clymenia polyandra</i> (Tanaka) Swingle	8280	7	Tree

^z Accession number of Faculty of Agriculture, Saga University.

^y 1: University of California, USA. 2: Indonesia. 3: Sicilia, Italy. 4: Tokushima Prefectural Fruit Tree research Station, Japan. 5: T. Takeuchi of Hiroshima Prefecture, Japan. 6: Wakayama Prefectural Fruit Tree Reserch Station, Japan. 7: Fruit Tree Research Station, MAFF, Japan, 8: K. Yoshioka of Fukuoka Prefecture, Japan.

Fig. 1. Photographs of *Citrus ichangensis* and *C. latipes* preserved at Faculty of Agriculture, Saga University.

Fig. 2. Collection sites of *Citrus* and its relatives' genetic resources in Bhutan. 1–16: see Table 2.

3. 系統樹の作製

系統樹はMEGA v. 5.2.1 (Tamura ら, 2011) を用いて最尤(ML)法によって作成した. 各グループの信頼性は1,000反復のブートストラップ分析で得た. *Clymenia polyandra* (Retz.) Correa を外群とした.

4. 種の同定

調査系統の種を決定するにあたっては, ブータン国内において葉および果実の形態を詳細に観察した. その際, 「Citrus Industry Vol. 1」 (Swingle・Reece, 1967) の記載を参考にした. 特に B07001 に関しては, Renewable Natural Resources Research Centre Wengkharr, Mongar で保存しているその実生樹と佐賀大学農学部ガラス温室で保存しているカラタチ台のイーチャンパペダおよびカシーパペダ (第1図) も供試し, 検討した.

結果および考察

調査系統の一覧および調査場所を第2表および第2図に, 果実および葉の写真を第3図に, 果実特性を第3表に示した. 当初, 16系統を調査したが, ワンピ (*Clausena*) とみなした2系統 (B07002, B07003) がミカン亜科植物では

なかったため除外したので, 最終的には14系統の調査となった. このうち B07011 のみはカンキツ近縁属であるベルノキ (*Aegle marmelos* (L.) Corr.) で, 他の13系統はカンキツ属植物であった. 自生・在来植物の調査を原則としたが, B07014 はタイ王国からの導入系統であり, B07016 は市場で入手したインド産スイートオレンジであった.

従って, 自生・在来カンキツは11系統となった. B07001 は, 大きな翼葉, 種子の大きさなどの果実形質が, 「Citrus Industry Vol. 1」 (Swingle・Reece, 1967) のイーチャンパペダ (*C. ichangensis* Swingle) の記載とほぼ一致した. B07005 および B07013 は形態的特性が, 無酸ライム (*C. limettioides* Tanaka) と同じであった. B07004 および B07015 は果皮の厚さなどの果実形質および葉の特性は, シトロネ (*C. medica* L.) に酷似していたが, 多胚性である点がシトロネとは異なった. B07006 ~ B07009 は, 果実の香りなど, 特性はライムに良く似ていたが, B07006 は果皮の厚さ, B07007 は果面の粗滑, B07008 は果実の大きさ, 果面の粗滑および果皮の厚さならびに B07009 は果面の粗滑の点が, メキシカンライムとは異なった. B07012 はラフレモン (*C. jambhiri* Lush.) とは果頂部の形状 (ラフレモンと異なり乳

Table 2. List of investigated genetic resources of *Citrus* and its relatives in Bhutan.

No.	Accession No.	Accession and Latin name	Place	
			Administrative area (Zhonqkhaq)	Place name
1	B07001	Ichang papeda (<i>Citrus ichangensis</i> Swingle) relative	Mongar	Yakpugang
4	B07004	Citron (<i>C. medica</i> L.) relative	Trashigang	Rongthong, Naktshang
5	B07005	Acidless lime (<i>C. limettioides</i> Tanaka)	Trashigang	Rongthong, Naktshang
6	B07006	Lime (<i>C. aurantifolia</i> (Cristm.) Swingle) relative	Trashigang	Naktshang
7	B07007	Lime (<i>C. aurantifolia</i> (Cristm.) Swingle) relative	Mongar	Yadhi, Pakharolang
8	B07008	Lime (<i>C. aurantifolia</i> (Cristm.) Swingle) relative	Tsirang	
9	B07009	Lime (<i>C. aurantifolia</i> (Cristm.) Swingle) relative	Tsirang	
10	B07010	Hybrid (<i>C. sp.</i>)	Wangdue Phodrang	Wangdi-Tsirang, Highway side
11	B07011	Bael (<i>Aegle marmelos</i> (L.) Corr.)	Mongar	Lingmethang, Lhakhay
12	B07012	Rough Lemon (<i>C. jambhiri</i> Lush.) relative	Wangdue Phodrang	Wangdi-Tsirang, Highway side
13	B07013	Acidless lime (<i>C. limettioides</i> Tanaka)	Mongar	Korilla
14	B07014	Thai tangerin (<i>C. reticulata</i> Blanco)	Mongar	Lingmethang
15	B07015	Citron (<i>C. medica</i> L.) relative	Trashigang	Rongthong, Naktshang
16	B07016	Indian orange (Mosambi?) (<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck)	Thimphu	Vegetable market, Thimphu

No. 2 and 3: Missing number.

Fig. 3. Photographs of *Citrus* and its relatives' genetic resources in Bhutan. 1–16: see Table 2. Bar indicates 5 cm.

頭状突起がない), 果実の締め (中心柱がラフレモンと異なって小で密) や果皮の厚さなどが異なった. B07010 の翼葉は痕跡, 果皮は黄緑色で果面の粗滑の程度は中, 種子の胚は白色で多胚であった. 主要なカンキツ類のいずれとも類似性が低く, 分類できなかった (第3図, 第3表).

このうち, イーチャンパペダに似る B07001 は他のカンキツが生育していない標高 2,000 m 付近で発見された. この場所は水源地に近接し, 樹高の高い他の樹木が伐採されており, 比較的光照条件に恵まれていた. 周囲にも同種の樹が生育しており, 群落を形成していた. しかし, 結実が確認できたものは1樹だけだったため, それを調査樹とした. 調査樹の樹高は約 5 m であった. 葉の形態に群落内の

樹間で明瞭な差異は認められなかった. ライム類縁種も *C. aurantifolia* (メキシカンライム) と同様の芳香を備えていたが, 果皮の厚さや果面の粗滑などの果実形質が *C. aurantifolia* とは異なるため, 類縁種とした. シトロネ類縁種とした 2 系統ともに形態的には *C. medica* L. (シトロネ) に類似していたが, いずれも多胚性を示したことから, 単胚性のシトロネと多胚性系統との雑種であると考えた.

続いて, イーチャンパペダに似る B07001 ならびに雑種起源と考えられるライムおよびシトロネ類縁種について, *matK* 遺伝子の塩基配列を解析し, その結果に基づき系統樹を作製した (第4図). これら 7 系統のうち, B07001 を除く 6 系統はすべて多胚性であり, 形態的に珠心胚実生と

Table 3. Some fruit characteristics of investigated genetic resources of *Citrus* and its relatives in Bhutan.

No.	Accession No.	Fruit size	Skin color	Rind texture	Skin thickness	Aroma	Flesh color	Puffing	Granulation	Seediness	Embryony	Note
1	B07001	Small	Yellowish green	Medium	Medium	—	Cream	None	None	Medium	Mono	1,981 m, N 27.15, E 91.16
4	B07004	Medium	Green	Medium	Thick	—	Cream	None	None	Medium	Poly	—
5	B07005	Small	Green	Slightly smooth	Thin	Lime	Yellowish green	None	None	Few	Poly	Acidless
6	B07006	Small	Green	Smooth	Medium	Lime	Yellowish green	None	None	Few	Poly	Juicy
7	B07007	Small	Green	Slightly smooth	Thin	Lime	Yellowish green	None	None	Medium	Poly	1,625 m, Juicy
8	B07008	Medium	Green	Slightly coarse	Medium	Lime	Yellowish green	None	None	Many	Poly	—
9	B07009	Small	Green	Slightly smooth	—	Lime	—	None	None	—	Poly	—
10	B07010	—	Yellowish green	Medium	—	—	—	—	—	—	Poly	—
11	B07011	Medium	Green	Smooth	Medium	—	—	—	—	—	Mono	—
12	B07012	Medium	Green	Coarse	Medium	—	Orange	None	None	Medium	Poly	—
13	B07013	Small	Green	Smooth	—	Lime	Yellowish green	None	None	Few	Poly	Acidless
14	B07014	Slightly small	Orange	Smooth	Thin	—	Orange	None	None	Medium	Poly	—
15	B07015	Large	Yellowish green	Medium	Thick	—	Cream	None	None	Many	Poly	—
16	B07016	Medium	Green	Smooth	—	—	—	None	None	—	Poly	Low acid
Control ^z												
	Khasi papeda	Medium	Yellowish green	Smooth	Medium	—	Yellow	None	None	None	—	—
	Ichang papeda	Small	Green	Coarse	Medium	—	Cream	None	None	Few	—	—

^z Preserved trees at Faculty of Agriculture, Saga University.

判断したものを供試した。B07001のみは単胚性で、元の植物と実生の遺伝子型は一致しないが、分析した遺伝子が母性遺伝する葉緑体DNA (Asadi Abkenar ら, 2004) であるので、珠心胚実生を用いていないが問題はない。

matK 分析の結果、供試したカンキツはブンタングループ (ライム, カシーパペダ, レモン, ダイダイ, ブンタン およびスイートオレンジなど), シトロングループ (シトロロン) およびマンダリン (イーチャンパペダ, ユズおよびウンシュウミカンなど) に大別でき、これは既報の結果 (Tshering Penjor ら, 2013) と一致した。ブータン王国における調査系統では、B07001 は、佐賀大学農学部保存のイーチャンパペダでなく、*C. latipes* (Swingle) Tanaka (カシーパペダ) と同じ結果を示した。ライム類縁種のうち、B07006, B07007 および B07009 はマンダリンの *C. unshiu* Marcow. と、B07008 は *C. sinensis* (L.) Osbeck (スイートオレンジ) と同じ塩基配列で、いずれも *C. aurantifolia* とは異なった。シトロロン類縁種では、B07015 は *C. medica* と極めて相同性が高く、B07004 は *C. limon* (L.) Burm. f (レモン) と区別できなかった。

Fig. 4. Maximum likelihood tree of the *matK* genes from Bhutanese *Citrus* and their control accessions. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (% over 1000 replicates). The scale bar shows the number of substitutions per site.

Table 4. Leaf characteristics of B07001 and its control accessions.

Accession	Leaf blade		Wing		Length of leaf blade/ Length of wing
	Length (mm)	Width (mm)	Length (mm)	Width (mm)	
B07001 ^z	38.4 ± 2.7 ^x	18.5 ± 0.9	36.5 ± 1.5	18.3 ± 0.7	1.05 ± 0.04
Control ^y					
Khasi papeda	90.2 ± 4.3	49.1 ± 1.6	46.4 ± 3.1	33.9 ± 3.1	1.96 ± 0.07
Ichang papeda	59.2 ± 2.0	33.9 ± 0.7	40.9 ± 1.5	26.5 ± 1.4	1.46 ± 0.09

^z A preserved seedling pot plant at Renewable Natural Resources Research Centre Wengkhar, Mongar, Bhutan.

^y Preserved pot plants grafted onto trifoliate orange at Faculty of Agriculture, Saga University.

^x Standard error.

供試系統のうち B07001 は形態的にはイーチャンパペダの特性を備えるものの、*matK* 遺伝子ではカシーパペダと一致したため、佐賀大学農学部保存のイーチャンパペダおよびカシーパペダ（第 1 図、第 1 表）と比較したところ、カシーパペダと B07001 は果実の形態および香りが全く異なった。一方、イーチャンパペダと B07001 の果実形態は似通っており、同様の香りも備えていた。さらに、葉の形態（第 4 表）においても B07001 の葉身長と翼葉長の比は、カシーパペダよりもイーチャンパペダに近かった。これらの形態的特性の結果からは、B07001 をカシーパペダとすることは困難で、イーチャンパペダとすることが相応しいと考えられた。しかし、B07001 とイーチャンパペダの *matK* 遺伝子は明らかに異なるため、本研究では B07001 をイーチャンパペダ類縁種とした。

この結果、11 系統はイーチャンパペダ類縁種が 1 点、ライム類縁種が 4 点、無酸ライムが 2 点、シトロネ類縁種が 2 点、ラフレモン類縁種が 1 点、未同定種が 1 点となった（第 2 表）。

B07001 がイーチャンパペダ (*C. ichangensis*) であるか否かは、カンキツの遺伝資源研究において重要な問題である。ブータン王国で生育する植物を網羅した「Flora of Bhutan」のミカン科 (Grierson, 1991) においてもイーチャンパペダの記述はなく、B07001 がイーチャンパペダであればブータン王国における本種の最初の発見となる。

イーチャンパペダは中国で発見された耐寒性の非常に強いカンキツ類で、当初、中国にしか自生していないと考えられていたが、その後、インドのアッサム州のナガ高原にも自生していることが報告された (田中, 1959)。いずれの地域においても高地で生育が認められている (Gmitter • Hu, 1990; Sharma ら, 2004)。今回の調査におけるイーチャンパペダ類縁種とした B07001 も標高約 2,000 m と他のカンキツの栽培適地よりも高地で自生を認めた。なお、B07001 の生育場所の気温は不明であるが、ほぼ同緯度の場所における標高と最寒月である 1 月の平均最低気温との関係は以下のとおりである。約 1,200 m のプナカで 4.2°C、約 2,000 m のトンサで -0.2°C および約 2,300 m のパロで -5.8°C。また、一般のカンキツは標高約 1,500 m ~ 1,600 m 以下で生育している。このことから標高 2,000 m 以上の地

域では最低極温が一般のカンキツの生育温度よりも低くなる可能性があることが推察される。以上のことから B07001 はイーチャンパペダと同様、低温に対する適応性が強いものと判断できた。

イーチャンパペダは翼葉が極めて大きく、果実は食用に適さない。種子は極めて大きく単胚性であるなど、他のカンキツとは容易に区別できる特性を備える。今回、確認した B07001 も、中国のイーチャンパペダと備える形態的特徴 (Swingle • Reece, 1967) がほぼ一致しており、当初はこれをイーチャンパペダだと判断した。しかし、葉緑体 DNA の分析の結果ではこの B07001 は佐賀大学農学部で保存している中国原産のイーチャンパペダではなくカシーパペダと一致した。カシーパペダはインド北東部のカシー高原で発見されたカンキツで、イーチャンパペダ同様に大きな翼葉を備えるが、種子が果実に占める割合はイーチャンパペダよりも明らかに低く、果皮も滑らかである (Swingle • Reece, 1967)。従って、形態的な面から B07001 をカシーパペダとみなすことは困難である。さらに、佐賀大学農学部保存のイーチャンパペダおよびカシーパペダ（第 1 図、第 1, 4 表）と比較したところ、カシーパペダと B07001 は葉の形態、果実の形態および香りが異なった。一方、イーチャンパペダと B07001 の葉および果実形態は似通っており、同様の香りも備えていた。これらのことから B07001 はイーチャンパペダに遺伝的に極めて似通ったものであるものと推測できた。

また、カシーパペダの発見されたカシー高原はインドアッサム地方に属し、イーチャンパペダの自生地はナガ高原と近接している。さらに、ブータン王国においても中部地域においてカシーパペダ発見の記録があり (Grierson, 1991)、両種の自生域は重複している可能性が高い。本調査では自生のカシーパペダを認めることはできなかったが、B07001 が生育している東部にも自生している可能性もあり、ブータン王国のイーチャンパペダとカシーパペダとの間には何らかの形で遺伝的な関係が存在する可能性もある。ただし、イーチャンパペダおよびカシーパペダともに広範囲に自生するカンキツであるが、本研究では佐賀大学農学部保存の各 1 系統を対照種としてブータン王国のイーチャンパペダ類縁種 1 系統を供試したのみである。経

済栽培品種と異なり、自生果樹類には遺伝的多様性が認められる (Hirai ら, 1990) ことから、佐賀大学農学部保存系統のみで各種の遺伝子型を代表することは困難であると考えられる。従って、今後ブータン王国、アッサムから雲南までの広範囲に自生するイーチャンパペダおよびカシーパペダ系統群を供試して、これらの遺伝的特徴や多様性について検討することが必要である。これらの結果が明らかにできれば、B07001 の分類上の位置も解明できると考えられる。

DNA 分析の結果、ライム類縁種は 2 群に分けることができた。マンダリン型の葉緑体 DNA を備える B07006, B07007 および B07009 は東部および南部で生育していたものであり、スイートオレンジ型葉緑体 DNA の B07008 は南部で生育したものである。このことから、ブータン王国に自生するライム類縁種は葉緑体 DNA の面から少なくとも 2 種類に大別でき、前者はブータン王国内で広汎に分布すること、同一地域にも両タイプの系統が存在することが解明できた。これらは形態的な特徴からだけでは解明できない点であり、遺伝資源調査と DNA 分析の両者を実施することの有用性を示すことができた。

なお、形態的特徴および葉緑体 DNA 分析の結果、B07006 ~ B07009 の 4 系統が純粋な *C. aurantifolia* (メキシカンライム) でないことは明らかであるが、いずれもライム特有の芳香を備えており、これらの系統の発生にはライムが関与した可能性が極めて強い。さらに、これらは香酸カンキツとしてライム同様に利用されている。従って、これらライム類縁種間、またはメキシカンライムとの特性を比較して、優良系統を選抜することも必要になってくるものと考えられる。

シトロン類縁種と推定した 2 系統も葉緑体 DNA は相互に異なった。B07004 はレモンと同じ塩基配列を示し、シトロンとは異なった。形態的特性から本系統の発生にシトロンが関与したことは確実である。葉緑体 DNA は母性遺伝するので (Asadi Abkenar ら, 2004)、シトロンは花粉親となったものと考えられる。種子親については、レモンの *matK* 遺伝子が他種と異なること (Tshering Penjor ら, 2013)、B07004 の多胚性は多胚性のレモンを親とすることに矛盾がないことから、レモンが種子親になった可能性がある。自生のレモンはブータン王国では見つかっていないが、小規模に栽培されている (Grierson, 1991)。また、レモンの細胞質を備える未知の系統が種子親となった可能性も否定できない。一方、B07015 は葉緑体 DNA 分析だけからではシトロンに含めても問題ないが、種子が多胚性であることからシトロン類縁種と推定される。B07004 とは異なり、シトロンが種子親となった可能性が強い。前述のライム類縁種の場合と同様、形態的特徴と DNA 分析の結果を組み合わせることで、有効な知見を得ることが可能となった。

以上のように、本遺伝資源調査によって、ブータン王国には独自のイーチャンパペダ、ライムおよびシトロン類縁種が分布していることを明らかにできた。また、一部では

あるが調査系統の DNA 分析を実施することにより、形態面だけの調査からよりも多くの情報を得ることができ、より正確な系統の同定が可能となった。ただし、本研究においては、同一地域において同種の複数個体が存在する場合、1 個体のみしか調査しなかった。そのため、通常自生・在来カンキツ類に存在する種内の多様性については解明することができなかった。今後はそれらの点についても DNA 分析も含めて検討していく必要がある。

摘 要

2007 年 9 月にブータン王国において自生・在来カンキツ類の遺伝資源を調査した。調査は東部のモンガルおよびタシガン、西部のワンデュ・ポダンおよびティンブーならびに南部のチランで実施した。調査した 14 系統のうち No. 11 のみはカンキツ近縁属のベルノキ (*Aegle marmelos*) で、他の 13 系統はカンキツ属植物であった。このうち自生・在来カンキツは 11 系統であった。内訳はイーチャンパペダ類縁種が 1 点、ライム類縁種が 4 点、無酸ライムが 2 点、シトロン類縁種が 2 点、ラフレモン類縁種が 1 点、未同定種が 1 点であった。イーチャンパペダ類縁種は冬季の低温のため他のカンキツが生育していない標高 2,000 m 付近で生育していた。調査した数点について葉緑体遺伝子の *matK* の塩基配列を解明して主要カンキツ類との類縁関係を調査したところ、ブータン王国のイーチャンパペダ類縁種は佐賀大学農学部保存のイーチャンパペダではなく、カシーパペダと同一の配列であることが確認できた。ライム類縁種の *matK* の塩基配列には多様性が認められた。DNA 分析を実施することにより、形態面の調査だけよりも正確に供試系統を同定することができた。

謝 辞 本研究の実施にご協力いただいた独立行政法人国際協力機構ブータン東部 2 県農業生産技術開発・普及支援計画プロジェクト (当時) の富安裕一氏に感謝します。また、技術的補助をして頂いた佐賀大学農学部の坂井明子氏にも感謝します。

引用文献

- Asadi Abkenar, A., S. Isshiki and Y. Tashiro. 2004. Maternal inheritance of chloroplast DNA in intergeneric sexual hybrids of “true citrus fruit trees” revealed by PCR-RFLP analysis. *J. Hort. Sci. Biotech.* 79: 360–363.
- Gmitter, F. G. and X. Hu. 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary *Citrus* species (Rutaceae). *Economic Bot.* 44: 267–277.
- Grierson, A. J. C. 1991. Family 86. Rutaceae. p. 6–22. In: A. J. C. Grierson and D. G. Long. (eds.). *Flora of Bhutan Volume 2 Part 1*. Royal Botanic Garden, Edinburgh, UK.
- Hilu, K. W. and H. Liang. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. *Amer. J. Bot.* 84: 830–839.

- Hilu, K. W., T. Borsch, K. Müller, D. E. Soltis, P. S. Soltis, V. Savolainen, M. W. Chase, M. Powell, L. A. Alice, R. Evans, H. Sauquet, C. Neinhuis, T. A. B. Slot, J. G. Rohwer, C. S. Campbell and L. W. Chatrou. 2003. Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *Amer. J. Bot.* 90: 1758–1776.
- Hirai, M., S. Mitsue, K. Kita and I. Kajiura. 1990. A survey and isozyme analysis of wild mandarin, tachibana (*Citrus tachibana* (Mak.) Tanaka) growing in Japan. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 59: 1–7.
- 村上哲明・瀬戸口浩彰・河原孝行・津村義彦. 1997. PCR法の植物系統学への応用. p. 189–196. 島本 功・佐々木卓治監修. 新版 植物のPCR実験プロトコール—核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解析法—. 秀潤社. 東京.
- 奥野員敏. 1999. 農林水産省における植物遺伝資源の現地調査と収集—植物遺伝資源の多様性をめざして—. *育種学研究*. 1: 97–103.
- Olmstead, R. G. and J. D. Palmer. 1994. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. *Amer. J. Bot.* 81: 1205–1224.
- Platt, A. R., R. W. Woodhall and A. L. George. 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques* 43: 58–62.
- Sharma, B. D., D. K. Hore and S. G. Gupta. 2004. Genetic resources of *Citrus* of north-eastern India and their potential use. *Genet. Resour. Crop Evol.* 51: 411–418.
- Swingle, W. T. and P. C. Reece. 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives. p. 190–430. In: W. Reuther, H. J. Webber and L. D. Batchelor (eds.). *The citrus industry*, vol. 1. University of California, Berkeley.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Tanaka, T. 1959. A revision of Assam citrus. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B* 9: 29–39.
- 田中長三郎. 1959. ヒマラヤ地帯と柑橘の発現. *園学雑*. 28: 71–75.
- Tshering Penjor, M. Yamamoto, M. Uehara, M. Ide, N. Matsumoto, R. Matsumoto and Y. Nagano. 2013. Phylogenetic relationships of *Citrus* and its relatives based on *matK* gene sequences. *PLOS ONE* 8: e62574.
- Ueda, Y. and H. Higuchi. 2012. Mango resources left on Okinawa island and their diversity. *Trop. Agr. Develop.* 56: 1–8.