



サクラ属植物の系統分類と進化に関する研究

島田, 武彦

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Date of Publication)

2013-10-21

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1540

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3116889>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001540>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博 士 論 文

サクラ属植物の系統分類と進化に関する研究

平成8年1月9日

神戸大学大学院自然科学研究科

島 田 武 彦

博 士 論 文

サクラ属植物の系統分類と進化に関する研究

**Studies on phylogeny and phyletic evolution
in *Prunus* species**

島 田 武 彦

目次

緒言	1
第1章 系統分類学的研究へのDNAマーカーの適用	3
第1節 RAPD分析法	3
目的	3
材料及び方法	3
結果及び考察	5
摘要	9
第2節 Dig-ELISA及びCDP-Starによるサザンブロット解析	22
目的	22
材料及び方法	22
結果及び考察	26
摘要	27
第3節 オルガネラDNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法	36
目的	36
材料及び方法	36
結果及び考察	36
摘要	38
第2章 スモモ亜属の系統分類	44
第1節 ウメの系統分類	44
目的	44
材料及び方法	44
結果	44
考察	46
摘要	48
第2節 アンズの系統分類	57
目的	57
材料及び方法	57
結果	57
考察	58
摘要	59
第3節 スモモの系統分類	68
目的	68
材料及び方法	68

	結果	69
	考察	71
	摘要	73
第4節	ウメ-アズ種間雑種の系統分類	84
	目的	84
	材料及び方法	84
	結果	84
	考察	85
	摘要	86
第5節	スモモ-アズ、及びスモモ-ウメ種間雑種の系統分類	94
	目的	94
	材料及び方法	94
	結果	94
	考察	95
	摘要	96
第3章	モモ亜属の系統分類	104
第1節	モモの系統分類	104
	目的	104
	材料及び方法	104
	結果	104
	考察	105
	摘要	107
第2節	アーモンドの系統分類	117
	目的	117
	材料及び方法	117
	結果	117
	考察	118
	摘要	118
第4章	サクラ亜属の系統分類	127
第1節	サクラとアウトウの系統分類	127
	目的	127
	材料及び方法	127
	結果	127
	考察	128
	摘要	130
第5章	サクラ属植物の系統分類と進化	142

第1節	形態的特性によるサクラ属植物の系統分類	142
	目的	142
	材料及び方法	142
	結果	143
	考察	143
	摘要	144
第2節	ランダムプライマー及びデザインプライマーによる サクラ属植物の系統分類	148
	目的	148
	材料及び方法	148
	結果	149
	考察	150
	摘要	153
第3節	葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLPによる サクラ属植物の系統分類	164
	目的	164
	材料及び方法	164
	結果	164
	考察	165
	摘要	166
第4節	サザンプロット解析によるサクラ属植物の系統分類	174
	目的	174
	材料及び方法	174
	結果	174
	考察	175
	摘要	176
総合考察		182
総摘要		185
謝辞		189
引用文献		190
英文要約		197

緒言

モモ、スモモ、ウメ、アンズ、オウトウなどの果樹は核果類と呼ばれ、いずれもサクラ属果樹(*Prunus*)の仲間である。サクラ属はバラ科に属し、約200種(species)がある。染色体の基本数は $n = 8$ である。Bailey(1914)、Rehder(1954)、北村(1979)らは、形態的特性により、サクラ属植物の分類を試み、3から5種類の亜属に分類している。Rehderはサクラ属をスモモ亜属(*Prunophora*)、モモ亜属(*Amygdalus*)、サクラ亜属(*Cerasus*)、ウワミズザクラ亜属(*Padus*)、バクチノキ亜属(*Laurocerasus*)の5つに分類しているが、現在ではこの分類が広く用いられている。

スモモ亜属にはスモモ、アンズ、ウメがある。スモモは種数が多く、2倍体、4倍体、6倍体のものがあり、アジア、ヨーロッパ、北アメリカなど北半球に広く分布している(Weinberger、1975)。アンズは中国を中心にユーラシア大陸に広く分布しているが、ウメは東アジアの南部に分布範囲が限られている。

モモ亜属にはモモとアーモンドがある。モモは中国を中心に東アジアから西方へ、アーモンドはユーラシア大陸の乾燥地に広く分布している。

サクラ亜属には、野生種のサクラ、観賞用の花サクラ、果樹として利用されているオウトウがある。野生種であるユスラウメ、ニワウメ、サンドチェリーなどはユーラシアから北アメリカに分布しており、これらは*Microcerasus*植物と呼ばれている。観賞用の花サクラはアジアに、オウトウは中国からヨーロッパに分布している。

ウワミズザクラ亜属はウワミズザクラ、イヌザクラなど、バクチノキ亜属はバクチノキ、リンボクなどがあり、いずれもユーラシア大陸に分布している。

近年、遺伝資源の重要性が認識され、世界各国で、資源の探索、収集が行われ、その評価と利用に力が入られている。育種の成果を上げるには、変異の拡大が必要であり、そのためには多様な遺伝資源が必要である。また、果樹栽培では通常、台木に高品質の品種を接ぎ木して生産力を高めているが、台木には環境適応性に優れた野生種が有用である(Okie、1987)。交雑育種を推進するためには、種内及び種間の交雑和合性を確認する必要があり、接ぎ木繁殖を行う場合にも種間の接ぎ木親和性を検討しなければならない。ここではサクラ属相互の類縁関係を明らかにし、育種・栽培の基礎資料を得たい。

これまで、花、葉、果実、核などの形態的特性(兪、1979、大井、1983、北村、1979)、接木親和性(田中、1934)、交雑和合性(Yoshida・Yamanishi、1988)などによって種・品種を分類してきたが、これらの方法は環境的要因に影響を受けたり、類縁関係の近いものでは相互の差異を識別できない場合があり、より有力な分類法が要望されていた。

近年、分子生物学のめざましい発達により、多くの分析法が開発されてきた。特に、DNAの構造解析、遺伝情報の発現のメカニズム解明、DNA組換え技術確立など遺伝子工学の発展により、遺伝情報の大半を担う核DNAを直接比較するDNAフィンガープリント法(Jeffreyら、1985)が注目されるようになった。RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphisms)によるサザン解析は標的ゲノムを制限酵素により切断し、断片化された

DNAをメンブレンに転写した後プローブを用いてDNA多型を検出するものである。RFLPによる研究報告は数多く、トマト(Bernatzkyら, 1986)、トウモロコシ(Helentjarisら, 1987)、オオムギ(Nilan, 1990)、などではRFLP連鎖地図の作成が報告されている。果樹の分野ではユニバーサルプローブ(M13, rDNA, テロメア領域などのminisatellite DNA)を用いて、カンキツ属、キンカン属、カラタチ属の識別に利用されている(Nyboomら, 1990、山本ら 1992)。リンゴではエンドウ由来の葉緑体DNA断片をプローブとして用いることにより、系統を診断したり、進化の推定を行っている。サクラ属果樹ではEldregeら(1992)がモモのRFLPを調査し、系統分類及び連鎖地図の作成を行った。Kanekoら(1986)はサクラを中心とした11品種について*Bam* HI、*Hin* dIII、*Sma* Iの3種類の制限酵素を用いて系統分類を試みたが、サクラ属果樹全体の類縁関係については解明できなかった。

最近になって、Williamsら(1990)は任意の短鎖配列からなるオリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)を行い、得られた増幅産物を電気泳動することにより、DNAの多型を検出する方法を開発した。この方法はRAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)分析法と呼ばれている。RAPD分析法は実験手順がアイソザイム分析と同程度の簡便さで、しかもプライマーの塩基配列を変えるだけで多型の検出が無限に行える。このため、RAPD分析法は比較的近縁な品種間においても十分な多型を供給し、品種識別、系統分類、連鎖地図作成に利用されている。カンキツでは品種識別(松山ら 1992)や連鎖マーカー(大村ら, 1994)、リンゴでは花粉親鑑定(原田ら, 1992)、モモでは連鎖地図作成(Chaparro, 1994)に適用されている。さらに、データベースやインターネットの普及に伴い、目的の遺伝子の塩基配列の情報入手が容易になり、またLongPCR(Schwarzら, 1990)の開発により、それらの領域の増幅がより簡便になった。Saikiら(1985)はこの増幅断片の制限酵素認識部位を調査したことから、PCR-RFLP法と呼ばれ、バラ科植物(寺地ら, 1993、武内ら, 1995)、カキ属植物(米森ら, 1994)、サクラ属植物(BadenesとParfitt, 1995)の系統分類などに利用されている。また、葉緑体DNAにコードされる進化速度が比較的速い*rbcL*や核DNAにコードされる比較的変異の大きいITS領域をPCRにより増幅し、直接構造解析を行うダイレクトシーケンスにより系統解析が行われている(Morganら, 1993、Hsiaoら, 1995)。サクラ属植物においても上述のような報告が見られるが、これらは全て栽培品種を中心に扱ったものが多く、各亜属の遺伝的変異、サクラ属植物の進化の過程を検討する上で十分とはいえない。

本研究では、サクラ属植物の多種多系統についてRAPD分析法、PCR-RFLP分析法、サザンブロット解析法、シーケンス解析法などの分析法により、サクラ属植物の分類と系統解析を試みた。第1章では系統分類学的研究へのDNAマーカーの適用、第2章ではスモモ亜属の系統分類、第3章ではモモ亜属の系統分類、第4章ではサクラ亜属の系統分類、第5章ではサクラ属植物の系統分類と進化について、それぞれ検討を行った。

第1章 系統分類学的研究へのDNAマーカー法の適用

第1節 RAPD分析法

目的

これまで、形態的特性では識別困難な種、品種の分類にはアイソザイム分析、M13ミニサテライト(Rogstadら、1988)やrDNAのスペーサー領域(Long・Dawid、1980)などの繰り返し配列をもつDNA断片をプローブとするサザンブロット解析などが用いられてきた。しかし、これらの方法でも、近縁な品種間では十分な多型を検出することができなかつた。Williamsら(1990)が開発したrandom amplified polymorphic DNA (RAPD)分析法はプライマーの塩基配列を変えるだけで増幅される領域が異なるため、簡便な手順で効率良くDNA多型を検出できると考えられる。そこでサクラ属果樹の品種・系統分類にRAPD分析法が有効であるか否かを検討する。

材料及び方法

1). 試料の採集

供試した葉は品種ごとに樹を選び、数本の新梢から5-10枚摘み取り、全体で約10g採取した。RAPD分析法の有効性を検討するために、種ごとに代表的な品種・系統を選び、供試した。品種・系統名はTable 1-1-9からTable 1-1-17に示した。

2). 試料の調整

採取した幼葉は水道水でよく洗浄し、水滴をふき取ってから、DNA抽出のための調整を行った。なお、予備のサンプルは、-20℃で冷凍保存した。

3). DNAの抽出

DNAの抽出はDoyle & Doyle(1987)の方法に従った。調製した0.5 gの試料は速やかに液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒により十分に粉碎した。この粉末に少量の石英砂と2×CTABバッファー(Table 1-1-1)を加えた後、60℃で30分間保温した。溶液に2 mlの水飽和フェノール-クロロホルム混合液(1:1 v/v)を加え、両層が穏やかに混合するように攪拌させた後、10分間 15,000 rpmで遠心分離(TOMY MC-150)を行った。タンパク質を含む中間層を入れぬように上層(水層)を静かに取り出した。さらに等量のクロロホルム-イソプロピルアルコール混合液(24:1)を加え、両層が穏やかに混合するように攪拌させた後、15,000 rpm、4℃、10分間で遠心分離(TOMY MC-150)を行った。タンパク質を含む中間層を入れぬように上層(水層)を静かに取り出した。この上澄み液に200 μ lの3 Mの酢酸ナトリウムと2 mlのイソプロパノールを加えてよく混ぜ、-80℃で30分間放置し、15,000 rpm、4℃、10分間、遠心分離してDNAを沈殿させた。沈殿したDNAを800 μ lのAAエタノール(99% Ethanol : 7.5 mM Ammonium Acetate = 6:1)で30

分間、さらに800 μ lの75%エタノールで洗浄した。洗浄したDNAを風乾した後に100 μ lのTEバッファー[50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA]と2 μ lのRNase[10mg / ml RNase, 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 15 mM NaCl]を加えて冷蔵庫に保存した。スモモ、サクラ、オウトウ、ユスラウメは、モモ、ウメ、アンズと比較すると、DNA収量が低く不純物が多かったため、一部については、フェノールを加えて不純物を除去した。CTAB法のフローチャートをFig.1-1-1に示した。また、RAPD分析法の再現性を確かめるためにSDS法(Dellaportaら、1983)により‘紅サシ’のゲノミックDNAを抽出した。上述の粉末を1mlの抽出バッファー (0.1 M Tris-HCl, 0.05 M EDTA: pH 8.0, 0.5 M NaCl)を加え、十分にホモジナイズし、20 % (V/W)のSDSを50 μ l、プロテイナーゼKを0.1 mg加えて、50 $^{\circ}$ Cで一晩保温した。翌日、溶液に3M KoAcを250 μ l加え、氷上で1時間放置した後、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、20分間で遠心分離を行った。上層（水層）を静かに取り出し、150 μ lの3 Mの酢酸ナトリウムと1.5 mlのイソプロパノールを加えてよく混ぜ、-80 $^{\circ}$ Cの冷凍庫で30分間静置した後、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、10分間、遠心分離し、DNAを沈殿させた。沈殿したDNAを800 μ lのAAエタノール(99% Ethanol : 7.5 mM Ammonium Acetate = 6 : 1)で30分間、さらに800 μ lの75%エタノールで洗浄した。洗浄したDNAを風乾した後に100 μ lのTEバッファー[50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA]と2 μ lのRNase [10 mg / ml RNase, 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 15 mM NaCl]を加えて冷蔵庫に保存した。SDS法のフローチャートをFig.1-1-2に示した。

4). 鋳型DNAの濃度調整

ポリメラーゼ連鎖反応をさせるために、抽出したDNAを滅菌水で3 ng / μ l の濃度になるまで希釈した。まず、1 μ lのDNAをサンプルと7 μ l TEとdye markerの混合液(6 \times dye : TE = 1 : 5)に混ぜ、1%のアガロースゲルで電気泳動を行った。あらかじめゲルと泳動液には2 μ lのエチジウムブロマイド(10 mg / ml)を加えておき、DNAの染色率を高めた。およそのDNAの濃度判定はミニゲル法(Sambrook、1989)により判定し、 λ DNAのスタンダードシリーズ(100, 200, 300, 500 ng / 8 μ l)と肉眼で比較して、抽出した鋳型DNAを3 ng / μ lの濃度に希釈した。希釈した溶液のDNA濃度を正確に測定するために、 λ DNAのスタンダードシリーズ(14, 12, 10, 8, 6 ng / μ l)と2 μ lのDNAを肉眼で比較しながら調製した。濃度調整したDNA溶液は使用するまで冷凍保存した。濃度が濃いと高分子側に増幅断片が検出され、濃度が低いと再現性が低下するなどの現象が見られた。このように、濃度によりバンドパターンが多少異なるので、濃度調整は重要であると考えられた。

5). ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

濃度調整を行った鋳型DNA 2 μ lを0.5 mlチューブの底に入れ、チューブの側面にマスターミックス(Table 1-1-4) 8 μ lを加え、反応液の濃縮を防ぐため、1滴のミネラルオイルを滴下して、反応液の表面を覆い、バイオオープン(Biotherm Co.)でPCRを行った。

Taq DNA ポリメラーゼ(Perkin Elmer Ceyus)は希釈溶液(Table 1-1-3)で1 U/ μ lの濃度に希釈した。PCRの各サイクルは、オペロンプライマーを用いる場合、94 °Cで1分間の熱変性、37 °Cで1分間のアニーリング、73 °Cで2分間の伸長反応を1サイクルとしこれを20サイクル行った後、94 °Cで30秒間の熱変性、40 °Cで30秒間のアニーリング、73 °Cで1分間の伸長反応の1サイクルを25サイクル行い、さらに73 °Cで5分間のサイクルを1サイクル行った。コモンプライマーではこれらのサイクルのアニーリング温度をすべて40 °Cに変更して行った。

6). プライマー

分析には主に10ベースからなるランダムプライマーを用いた。プライマーはオペロン(Table 1-1-5)、BEX社(Table 1-1-6)、安芸津計測、TOYOBO (Table 1-1-7)から購入し、検討した。プライマーはGC含量が40-70%の範囲のものを使用し、塩基配列GC含量をまとめた。実験効率を上げるため、アンズ、スモモ、モモについては総数で225種類オペロンプライマーの中から、各々についてスクリーニングを行った。プライマーの選抜基準は、1)プライマー当たり複数のDNA多型を供給すること、2)その評価が容易であること、による。またモモ、サクラ、オウトウ、アーモンドではセミランダムな配列を持ち、12ベースからなるコモンプライマー(A00-A39、Bex Co. Ltd.)を適用した。

7). 電気泳動・染色・写真撮影

ミニゲル電気泳動槽(Mupid)で電気泳動を行った。SEAKEMアガロース(FMC)と60 μ l 50×TAEを蒸留水中で加熱溶解し、1%のアガロースゲル(20 ml / ゲル)を作成した。泳動液にはTAE緩衝液[40 mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA]を用い、DNA染色効率を高めるためにあらかじめ3 μ lのEtBr(エチジウムブロマイド)を加え、30分以上放置した。PCRの済んだサンプルに、2 μ lの6×dye markerを加え、攪拌した後、注意深く各試料溝に入れた。分子量マーカーは、 λ DNAをPst I またはHind IIIでダイジェストしたものを用いた。試料溝側に-、反対側に+の電源を接続し、50Vで1時間通電した。泳動後1時間、振盪しながらEtBrで十分にDNAを染色した。トランスイルミネーター上でゲルに紫外線を照射し、ポラロイド665あるいは667で写真撮影を行った。

8). データ解析

泳動により可視化されたDNAフィンガープリントは、バンドの有無をもとに0-1型でスコアされた(多型を示す位置にバンドがみられる場合=1, 見られない場合=0)。得られたデータをもとに品種・系統間の非共有バンド数の距離行列を求め、群平均化法によりクラスター分析(Lance・Williamas, 1967)を行いデンドログラムを作成した。また数量化理論第3類によりダミー変数を求めて、2成分を抽出し、二次元配置でプロットした(Hayashi, 1950)。解析には多変量解析ハンドブックハル坊及び統計解析for Winを用いた。

結果及び考察

1).RAPD分析の再現性と遺伝様式

まずはじめに、ウメでRAPD分析法の再現性、RAPDマーカーの遺伝様式、多型の出現頻度などについて調査した。供試材料には福井県園芸試験場で採取したウメ4品種、F₁雑種18個体を用いた。RAPD分析はゲノムDNAにプライマーが結合する際に、それらが向かい合い、約3kbp以内のサイズの断片のみを増幅するために、ゲノムDNAが2次構造をとり増幅されない、また、鋳型DNAとプライマーとのミスマッチなどにより人工産物などが増幅される可能性があり、再現性の問題が問われることが多い。そのため、‘紅サシ’を供試材料とし、SDS法とCTAB法などDNA抽出方法の差異による再現性とサンプルした葉の差異による再現性とを調査し、この実験を3回繰り返した。どの組み合わせにおいても同じRAPDパターンが得られ、上記の差異については再現性が見られた(Fig. 1-1-3)。鋳型DNAの濃度差でバンドのサイズにばらつきが見られた。このため、濃度チェックは分析を行う上で非常に重要な要因の一つであると考えられた。

次にプライマーのGC含量と増幅断片数、DNA多型の数、そしてそれらのサイズを調査した。上述の30種類のプライマー；A1-A7、T1-T20 (Table1-1-7) 及び1-3(Table1-1-5)、を用いた結果、平均で40%では約8.2バンド、50%では約21.1バンド、60%では約24.1バンドとGC含量が増加するにつれて増幅断片数は増加した。この傾向はWilliamsら(1990)の実験結果と同じであり、この原因はグアニンとシトシンの水素結合の手がアデニンとチミンの組み合わせよりも、1本多いため、増幅が安定するものと推察された(Fukuoka、1992)。Fritschら(1993)は安定した増幅反応を得るためにはプライマーのGC含量が指標となると報告している。DNA多型とプライマーの塩基配列には相関が見られなかった。0.3kbpから2.2kbpの範囲で増幅断片の出現数を調査した結果、1.0kbpから1.5kbpの範囲で出現数が多く、その分布は正規分布に類似していた(Fig. 1-1-4)。カイ2乗検定の結果、これらの分布は正規分布に適合しなかったが(0.2、 $P<0.5$)、この結果はTaqポリメラーゼがこれらのサイズまで比較的安定して配列を読むのではないかと推察した。300bp以下や2kbp以上の断片は再現性が低かったので、多型の評価にはこれらの断片を除いた。

‘紅サシ’と‘竜峡小梅’、及びそのF₁雑種9系統、また‘剣先’と‘鶯宿’、及びそのF₁雑種9系統を供試し、RAPDが雑種後代に遺伝しているかどうかを確かめた(Fig. 1-1-5)。親品種間の識別は容易であり、親系統に特異的な増幅断片がF₁系統において確認された。またF₁雑種間においてもDNA多型が検出されたことにより本法の識別能力が高いことが確かめられた。以上の結果から、ウメの親子鑑定は可能であると考えられた。F₂系統が用意できなかったため、‘剣先’と‘紅サシ’に特異的なDNA断片(OP-1、及びOP-2)をゲルから切り取り、プローブとして第2節で記すサザンブロット解析を行った。F₁個体でOP-1とOP-2が見られた位置にシグナルが見られたことから、こ

これらのバンドが親品種から遺伝し、人工産物ではないことが確かめられた(Fig. 1-1-6)。雑種後代が欠除しているため、分離比などを求めることはできなかったが、F1個体の識別が容易であること、両親品種にみられるバンドについてもF1でも分離がみられることから、ウメのゲノムはヘテロ接合性が高いと推察した。

以上のようにRAPD分析法の再現性と遺伝様式が確かめられたので、種ごとに得られたDNA多型が品種・系統を反映するものかどうかを検討した。

2).ウメについて

和歌山県果樹園芸試験場と福井県園芸試験場で採取したウメ代表11品種(Table 1-1-8)を選び、選別した17種類のプライマー(コード番号; 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 21, 22, 23, 26)によりRAPD分析を行った(Table 1-1-5)。総数で203個の増幅断片が得られ、49個の再現性のあるRAPDsが得られた。どの品種間においても少なくとも1.5バンドで識別が可能であった。各系統間の非共有バンド率を求めた結果(Table 1-1-9)、『豊後』と『李梅』は他の品種と類似性が低かった。品種間で得られた多型を0-1型で評価し、群平均化法によりクラスター分析を行い、デンドログラムを作成した(Fig. 1-1-7)。得られた分類結果はこれまでの形態的特性、生態的特性、アイソザイムマーカーによる分類結果(田中、1936、吉田・京谷、1971、青木ら、1972)と類似していたためRAPD分析法がウメの系統分類に有効であると考えられ、第2章第1節のウメの系統分類に適用した。

3).アンズ

果樹試験場千代田圃場で採取した9品種・系統を供試した(Table 1-1-10)。形態的に大きく異なる品種・系統として、『新潟大実』、『鏡台丸』、『小笠原』、『ネパールアンズ85241』、『Early Orange』を選抜し、GC含量が40%から70%の225種類のプライマー(Table 1-1-5)についてスクリーニングを行った。その結果、18種類のプライマーを選抜し、この中からさらに15種類のプライマー(コード番号 ; 41, 42, 44, 46, 48, 59, 60, 68, 75, 77, 79, 89, 101, 120, 163)を用いてRAPD分析を行い、系統分類を試みた。総数で120本の増幅DNA断片が得られ、再現性のある30個のRAPDsが検出された。全ての品種・系統間の識別が最低で5個のRAPDsで可能であった。各系統間の非共有バンド率を求めた結果、『山杏』は他の系統と類似性が低かった(Table 1-1-11)。これらのデータをもとに各系統間の距離行列を求め群平均化法により、クラスター分析を行い、デンドログラムを作成した(Fig. 1-1-8)。デンドログラムは大きく野生種と日本の在来品種の系統に分かれた。このようにRAPD分析による分類結果は従来分類(Yoshida・Yamanishi, 1988)と異なるものではなく、RAPD分析法がアンズの系統分類に有効であると考えられ、第2章第2節のアンズの系統分類に適用した。

4).スモモ

果樹試験場で採取した9品種・系統を供試した(Table 1-1-12)。形態的に大きく異なる

る5品種・系統、‘ミロバラン420-2-2’、‘万左衛門’、‘チェアーン’、‘花螺李’、‘クリコンダムソン’、を選抜し、GC含量が40%から70%の225種類のプライマーについてスクリーニングを行った(Table 1-1-5)。その結果、34種類のプライマーを適用した。‘スピノーサスモモ’、‘スタンレー’、‘小池李’、‘メスレー’の4品種をさらに追加し、34種類のプライマーのうち15種類のプライマー(プライマー番号；22, 43, 46, 83, 107, 108, 113, 137, 152, 153, 164, 168, 171, 172, 184)を用いてRAPD分析を行い、系統分類を試みた。総数で197本の増幅DNA断片が得られ、再現性のある21個のRAPDsが検出された。全ての品種・系統間の識別は最低でも5個のRAPDsで可能であった。各系統間の非共有バンド率を求めた結果、スモモは相互に類似性が低かった(Table 1-1-13)。これらのデータをもとに系統間の距離行列を求め群平均化法により、クラスター分析を行い、デンドログラムを作成した(Fig. 1-1-9)。デンドログラムは大きくニホンスモモ(*P. salicina*)とヨーロッパスモモの2つに分かれた。このようにRAPD分析による分類結果は従来分類(Hedrick, 1911)と異なるものではなく、RAPD分析法がスモモの系統分類に有効であると考えられ、第2章第3節のスモモの系統分類に適用した。

5). モモ、アーモンド

果樹試験場で採取した8品種・系統を供試した(Table 1-1-14)。225種類の任意の塩基配列からなる10merプライマーについてスクリーニングを行った。多型の出現頻度は*P. persica*内では低いものの、プライマーを選択することにより系統分類が可能と思われた。この中から多型の出現頻度が高く、識別容易なプライマーを選択した。アーモンドを含む合計8系統について選択した12種類のプライマー(プライマー番号；21, 27, 43, 73, 153, 167, 169, 171, 177, 210, 215, 222)を用いてRAPD分析を行った。各系統間の距離行列を求め、群平均化法によりクラスター分析を行った(Fig. 1-1-10)。デンドログラムは*P. persica*とその近縁野生種のグループに大別された。*P. persica*の‘白桃’、‘長野野生桃’、‘天津水蜜桃’、‘上海水蜜桃’、‘レイトクロフォード’はバンドの共有率が高く、*P. persica*の類似性は高いことが示唆された(Table 1-1-15)。それに対し、モモの近縁野生種はバンドの共有率が低く遺伝的変異に富んでおり、*P. persica*とゲノムの類似度が明らかに異なっていた。光核桃はチベット、ブータン、ネパールなどの高地に自生しており、野生種の中でも特に他の種と異なった。このようにRAPD分析による分類結果は従来分類(Scorza, 1990)と異なるものではなく、RAPD分析法がモモの系統分類に有効であると考えられ、第3章第1節の系統分類に適用した。

6). サクラ・オウトウ

山形県園芸試験場で採取した8品種・系統を供試した(Table 1-1-16)。20種類のコモンプライマー(プライマー番号；A00-A019)を用いてRAPD分析を行った。各系統間の距離行列を求め、群平均化法によりクラスター分析を行った。デンドログラムはオウトウとサクラの2つのグループに大別できた(Fig. 1-1-11)。ユスラウメ、ニワザクラなどの

*Microcerasus*グループはこれらのクラスターと類似性が低かった。各系統の類似度はスモモと同様に大きく、サクラの変異は大きいものと推察された(Table 1-1-17)。このようにRAPD分析による分類結果は従来分類(Iezzoni, 1990)と異なるものではなく、RAPD分析法がサクラ亜属の系統分類に有効であると考えられ、第4章第1節のサクラ・オウトウの系統分類に適用した。

摘 要

サクラ属果樹の品種・系統分類にRAPD分析法が有効であるか否かを検討した。RAPD分析法の再現性、RAPDマーカーの遺伝様式、多型の出現頻度など調査した。実験の再現性には増幅反応における鋳型DNAの適切な濃度調整が必要であった。検出された増幅DNA断片のサイズは主に2.2kbpから0.3kbpで、このサイズ以外のものは再現性が低く、実用性がないものと考えられた。

‘竜峡小梅’、‘紅サシ’、‘剣先’、‘鶯宿’の4品種とそれらのF1個体についてRAPD分析法を適用した。親品種間でDNA多型は容易に検出でき、それらの多くはF1個体で分離していた。F1個体で検出された増幅DNA断片はすべて親品種から由来していた。またサザンハイブリダイゼーションにより、これらの増幅断片は親個体から遺伝したことが確認できた。さらに形態的特性が非常に類似し、相互の識別が困難である同じ交配のF1集団についても、この手法により相互の識別が可能であった。

次にRAPD分析法がウメ、アンズ、スモモ、モモ、サクラ・オウトウなど各種の品種・系統の識別と分類に有効であるか否かを検討した。モモでは栽培品種内で多型の出現頻度は低かったが、全ての種で品種・系統の識別が可能であり、得られた多型をもとに作成したデンドログラムはこれまでの分類と矛盾していなかった。

以上の結果より、RAPD分析法はDNA多型の検出感度が高く、品種レベルでの識別が可能であり、親子鑑定や系統分類に有効であると推察された。

Table 1-1-1. Composition of 2 × CTAB isolation buffer (100 ml)

Component		Final
2.0 M Tris-HCl (pH 8.0)	5ml	100mM
0.5 M EDTA (pH 8.0)	4ml	20mM
NaCl	8.182g	1.4M
CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide)	2.0g	2.00%
2-mercaptoethanol	0.2ml	0.20%

Table 1-1-2. Composition of 10 × PCR buffer (1 ml)

Component		1×	Final(10×)
1 M Tris-HCl (pH 8.3)	100 μ l	10mM	100mM
1 M KCl	500 μ l	50mM	500mM
1M MgCl ₂	20 μ l	2mM	20mM
10 mg/ml gelatin	10 μ l	0.001%	0.01%
Sterilized H ₂ O	370 μ l		

Table 1-1-4. *Taq* DNA polymerase dilution buffer (20 ml)

Component		Final
Glycerol	10ml	50%
1 M KCl	2ml	100mM
2 M Tris-HCl(pH 8.0)	200 μ l	20mM
0.5 M EDTA(pH 8.0)	4 μ l	0.1mM
Tween 20	100 μ l	0.50%
H ₂ O	20ml	

Table 1-1-4. Composition of master mix

Component	1×
10 × PCR buffer	1.0 μ l
2 μ M Primer	1.0 μ l
2 mM dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.5 μ l
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.2 μ l
Sterilized H ₂ O	5.3 μ l

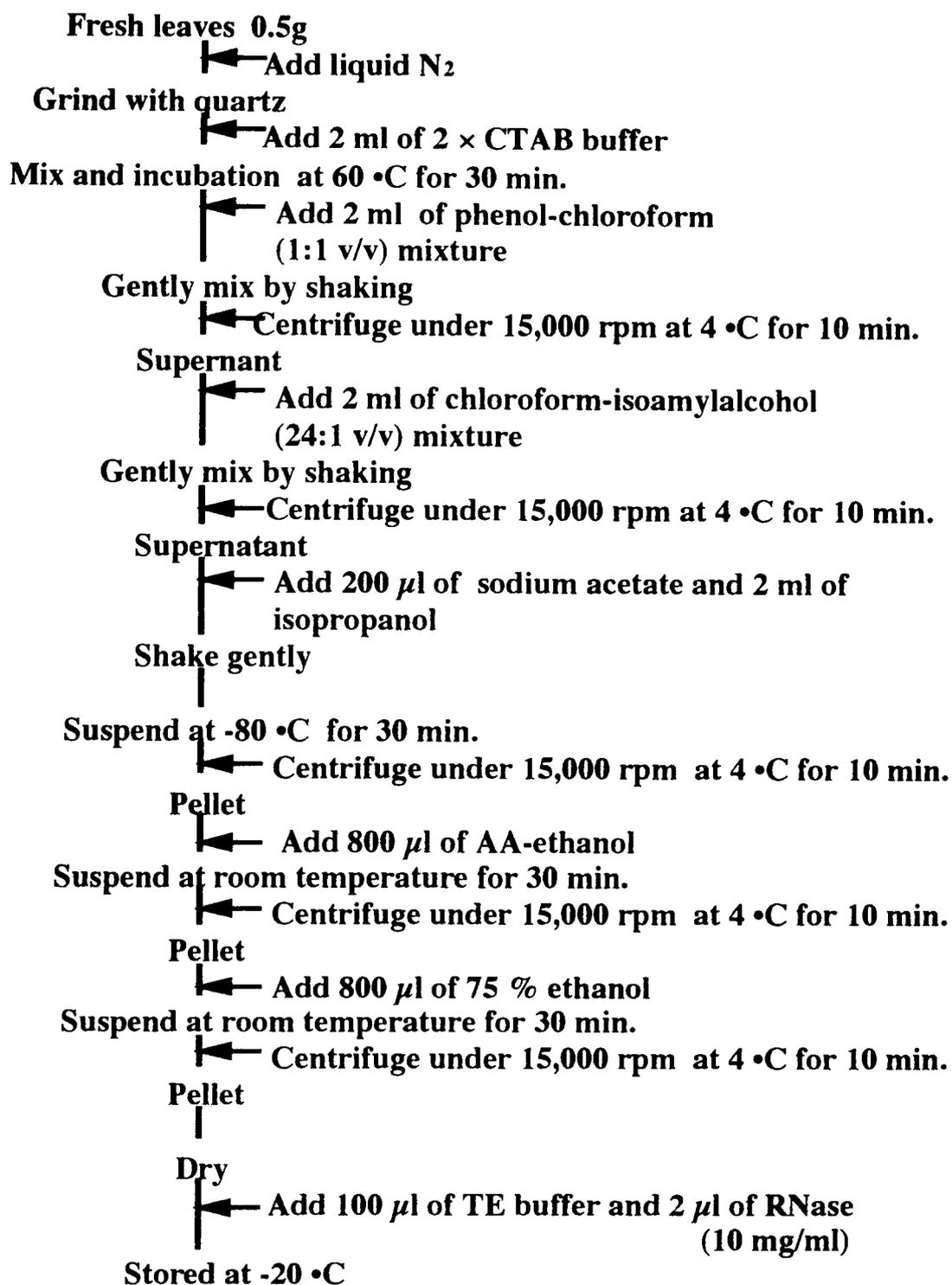


Fig. 1-1-1 DNA isolation by CTAB method.

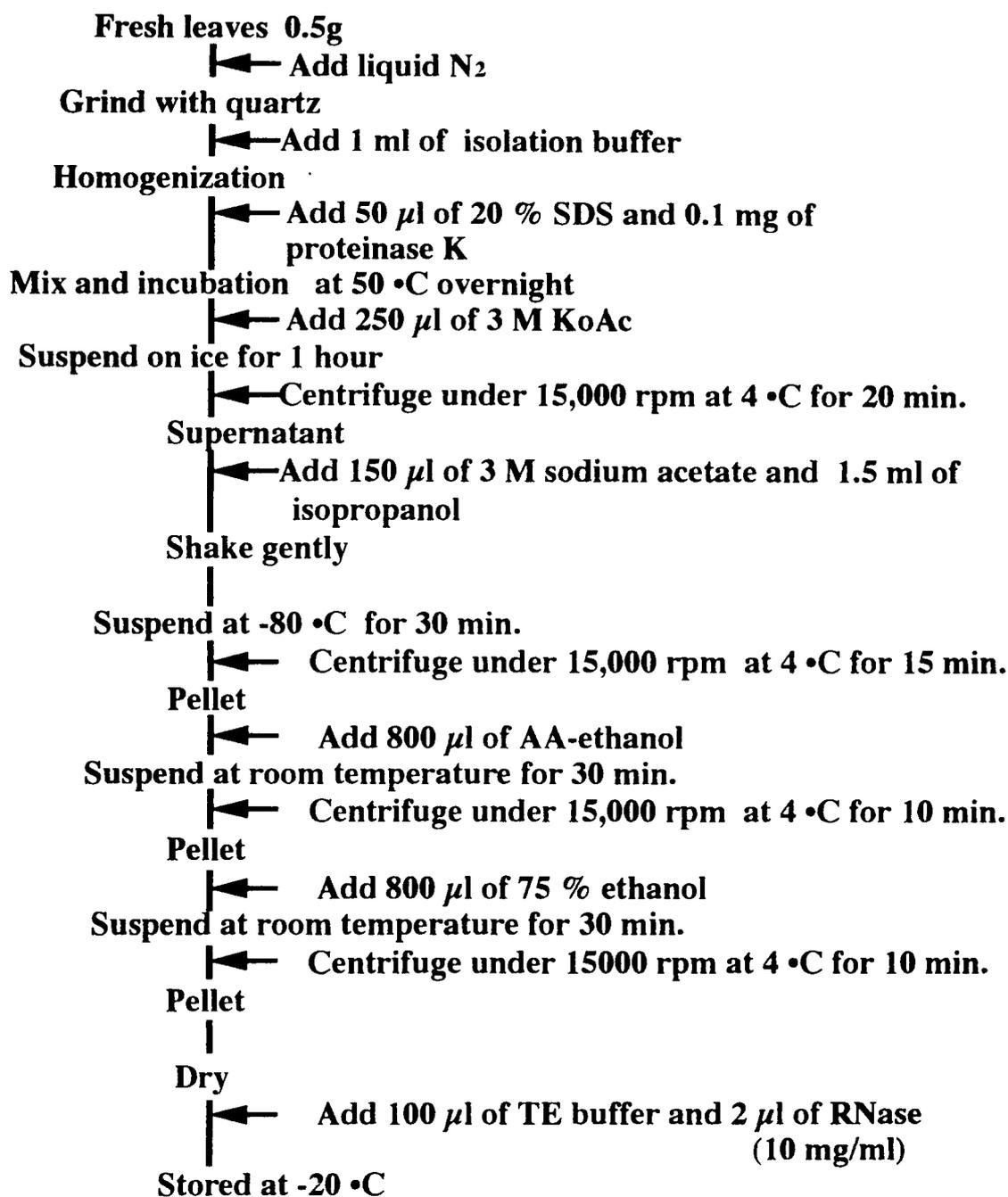


Fig. 1-1-2. DNA isolation by SDS method.

Table 1-1-5. Sequences and GC contents of Operon primers

Code	Sequence	G+C contents(%)
1	5'-TGCTCACTGA-3'	50
2	5'-TGGTCACTGA-3'	50
3	5'-TGGTCTCTGA-3'	50
4	5'-TGGTCCCTGA-3'	60
5	5'-TGGTCCCTGA-3'	60
6	5'-TGGTAACTGA-3'	40
7	5'-TGGTACTGA-3'	40
8	5'-TGGACTGA-3'	50
9	5'-TGGCCACTGA-3'	60
10	5'-TGGGCACTGA-3'	60
11	5'-TGCTCACTGA-3'	50
12	5'-TGATCACTGA-3'	40
13	5'-TGTTCACTGA-3'	40
14	5'-TGGTCACTGA-3'	50
15	5'-TAGTCACTGA-3'	40
16	5'-TTGTCACTGA-3'	40
17	5'-TGGTCACTGA-3'	50
18	5'-TGGTCAATGA-3'	40
19	5'-TGGTCAATGA-3'	40
20	5'-TGGTCACTGA-3'	50
21	5'-TGGTCACTGA-3'	60
22	5'-TGGTCACTGA-3'	60
23	5'-TGGTCACTGA-3'	50
24	5'-TGGTCACTGA-3'	40
25	5'-TGGTCACTGA-3'	40
26	5'-TGGTCACTGA-3'	50
27	5'-TGGTCACTGA-3'	60
28	5'-TGGTCACTGA-3'	60
29	5'-TGGTCACTGA-3'	70
30	5'-TGGTCACTGA-3'	60
31	5'-TGGTCACTGA-3'	60
32	5'-TGGTCACTGA-3'	70
33	5'-TGGTCACTGA-3'	60
34	5'-TGGTCACTGA-3'	70
35	5'-TGGTCACTGA-3'	70
36	5'-TGGTCACTGA-3'	70
37	5'-TGGTCACTGA-3'	60
38	5'-TGGTCACTGA-3'	60
39	5'-TGGTCACTGA-3'	60
40	5'-TGGTCACTGA-3'	60

Code	Sequence	G+C contents(%)
41	5'-TGGTCACTGA-3'	60
42	5'-TGGTCACTGA-3'	60
43	5'-TGGTCACTGA-3'	60
44	5'-TGGTCACTGA-3'	70
45	5'-TGGTCACTGA-3'	60
46	5'-TGGTCACTGA-3'	70
47	5'-TGGTCACTGA-3'	60
48	5'-TGGTCACTGA-3'	70
49	5'-TGGTCACTGA-3'	70
50	5'-TGGTCACTGA-3'	70
51	5'-TGGTCACTGA-3'	60
52	5'-TGGTCACTGA-3'	60
53	5'-TGGTCACTGA-3'	60
54	5'-TGGTCACTGA-3'	70
55	5'-TGGTCACTGA-3'	70
56	5'-TGGTCACTGA-3'	60
57	5'-TGGTCACTGA-3'	60
58	5'-TGGTCACTGA-3'	60
59	5'-TGGTCACTGA-3'	60
60	5'-TGGTCACTGA-3'	70
61	5'-TGGTCACTGA-3'	60
62	5'-TGGTCACTGA-3'	60
63	5'-TGGTCACTGA-3'	60
64	5'-TGGTCACTGA-3'	60
65	5'-TGGTCACTGA-3'	60
66	5'-TGGTCACTGA-3'	60
67	5'-TGGTCACTGA-3'	70
68	5'-TGGTCACTGA-3'	70
69	5'-TGGTCACTGA-3'	70
70	5'-TGGTCACTGA-3'	60
71	5'-TGGTCACTGA-3'	60
72	5'-TGGTCACTGA-3'	60
73	5'-TGGTCACTGA-3'	60
74	5'-TGGTCACTGA-3'	60
75	5'-TGGTCACTGA-3'	60
76	5'-TGGTCACTGA-3'	60
77	5'-TGGTCACTGA-3'	60
78	5'-TGGTCACTGA-3'	60
79	5'-TGGTCACTGA-3'	60
80	5'-TGGTCACTGA-3'	70

Code	Sequence	G+C contents(%)
81	5'-TGGTCACTGA-3'	70
82	5'-TGGTCACTGA-3'	60
83	5'-TGGTCACTGA-3'	60
84	5'-TGGTCACTGA-3'	60
85	5'-TGGTCACTGA-3'	60
86	5'-TGGTCACTGA-3'	60
87	5'-TGGTCACTGA-3'	60
88	5'-TGGTCACTGA-3'	60
89	5'-TGGTCACTGA-3'	60
90	5'-TGGTCACTGA-3'	60
91	5'-TGGTCACTGA-3'	70
92	5'-TGGTCACTGA-3'	70
93	5'-TGGTCACTGA-3'	60
94	5'-TGGTCACTGA-3'	60
95	5'-TGGTCACTGA-3'	60
96	5'-TGGTCACTGA-3'	60
97	5'-TGGTCACTGA-3'	60
98	Not used	
99	Not used	
100	5'-TGGTCACTGA-3'	70
101	5'-TGGTCACTGA-3'	70
102	5'-TGGTCACTGA-3'	60
103	5'-TGGTCACTGA-3'	60
104	5'-TGGTCACTGA-3'	60
105	5'-TGGTCACTGA-3'	70
106	5'-TGGTCACTGA-3'	60
107	5'-TGGTCACTGA-3'	70
108	5'-TGGTCACTGA-3'	70
109	5'-TGGTCACTGA-3'	60
110	5'-TGGTCACTGA-3'	60
111	5'-TGGTCACTGA-3'	60
112	5'-TGGTCACTGA-3'	70
113	5'-TGGTCACTGA-3'	60
114	5'-TGGTCACTGA-3'	60
115	5'-TGGTCACTGA-3'	60
116	5'-TGGTCACTGA-3'	60
117	5'-TGGTCACTGA-3'	60
118	5'-TGGTCACTGA-3'	60
119	5'-TGGTCACTGA-3'	60
120	5'-TGGTCACTGA-3'	60

Code	Sequence	G+C contents(%)
121	5'-TGGTCACTGA-3'	60
122	5'-TGGTCACTGA-3'	70
123	5'-TGGTCACTGA-3'	60
124	5'-TGGTCACTGA-3'	70
125	5'-TGGTCACTGA-3'	70
126	5'-TGGTCACTGA-3'	70
127	5'-TGGTCACTGA-3'	70
128	5'-TGGTCACTGA-3'	70
129	5'-TGGTCACTGA-3'	70
130	5'-TGGTCACTGA-3'	60
131	5'-TGGTCACTGA-3'	60
132	5'-TGGTCACTGA-3'	70
133	5'-TGGTCACTGA-3'	70
134	5'-TGGTCACTGA-3'	60
135	5'-TGGTCACTGA-3'	60
136	5'-TGGTCACTGA-3'	60
137	5'-TGGTCACTGA-3'	60
138	5'-TGGTCACTGA-3'	70
139	5'-TGGTCACTGA-3'	60
140	5'-TGGTCACTGA-3'	60
141	5'-TGGTCACTGA-3'	60
142	5'-TGGTCACTGA-3'	60
143	5'-TGGTCACTGA-3'	60
144	5'-TGGTCACTGA-3'	60
145	5'-TGGTCACTGA-3'	60
146	5'-TGGTCACTGA-3'	60
147	5'-TGGTCACTGA-3'	60
148	5'-TGGTCACTGA-3'	60
149	5'-TGGTCACTGA-3'	60
150	5'-TGGTCACTGA-3'	60
151	5'-TGGTCACTGA-3'	60
152	5'-TGGTCACTGA-3'	60
153	5'-TGGTCACTGA-3'	60
154	5'-TGGTCACTGA-3'	60
155	5'-TGGTCACTGA-3'	60
156	5'-TGGTCACTGA-3'	60
157	5'-TGGTCACTGA-3'	60
158	5'-TGGTCACTGA-3'	60
159	5'-TGGTCACTGA-3'	60
160	5'-TGGTCACTGA-3'	60

Code	Sequence	G+C contents (%)
161	5'-GGCACTGAGG-3'	70
162	5'-GAGCCCTCCA-3'	70
163	5'-AGCGTGTCTG-3'	60
164	5'-CTGAGACGGA-3'	60
165	5'-GTGCTAAACC-3'	60
166	5'-GAACTTCGG-3'	70
167	5'-TCACGTCCAC-3'	60
168	5'-AGGCGCTCT-3'	70
169	5'-AGGCGCTCT-3'	70
170	5'-TGCCCGTCT-3'	70
171	5'-CAOCTCACA-3'	60
172	5'-CTCTCCGCCA-3'	70
173	5'-GGATGAGACC-3'	60
174	5'-ACTGGGACTC-3'	60
175	5'-AGCGTCTCC-3'	70
176	5'-ACGACCGACA-3'	60
177	5'-GGCTCATGTG-3'	60
178	5'-GTCAAGGCAA-3'	60
179	5'-TCTCCTCAG-3'	60
180	5'-GTTCCGGAGA-3'	60
181	5'-TCGGACGTGA-3'	60
182	5'-AGACGTCCAC-3'	60
183	5'-GGAAGTCGCC-3'	70
184	5'-ATGTCCTCCC-3'	70
185	5'-ACGCATCGCA-3'	60
186	5'-CTGCATCTGT-3'	60
187	5'-GAAACACCCC-3'	60
188	5'-TGTAGCTGG-3'	60
189	5'-CCTACGTCA-3'	60
190	5'-CTTCCGAGT-3'	60
191	5'-ACCGCATGT-3'	60
192	5'-GACCCACAC-3'	70
193	5'-ACCAAGTTGG-3'	60
194	5'-AATGGCCAG-3'	60
195	5'-TCTCAGCTGG-3'	60
196	5'-CACTCTCCTC-3'	60
197	5'-GAATCGGCA-3'	60
198	5'-CTGACCAACC-3'	70
199	5'-GGGAGACATC-3'	60
200	5'-ACCTGGACAC-3'	60

Code	Sequence	G+C contents (%)
201	5'-GGAGGAGAGG-3'	70
202	5'-CAGAAGCCCA-3'	60
203	5'-CCGCTATGC-3'	70
204	5'-TGTCCACGG-3'	60
205	5'-AAGCGCGAG-3'	70
206	5'-CAGCGACAAG-3'	60
207	5'-TTGCCCGGT-3'	60
208	5'-TGGAGAGCAG-3'	60
209	5'-ACAAACGAG-3'	60
210	5'-ACATGCCGTG-3'	60
211	5'-AGAGGGACA-3'	60
212	5'-CTGGGGCTGA-3'	70
213	5'-TGACGGCGGT-3'	70
214	5'-TCATCCGAGG-3'	60
215	5'-TCTCCGCCCT-3'	70
216	5'-GGTGGTGATG-3'	60
217	5'-TGCCAGCCT-3'	70
218	5'-AATGGGGAG-3'	60
219	5'-AAAGTGGGG-3'	60
220	5'-CCCGCATAA-3'	60
221	5'-CCCGTTGGGA-3'	70
222	5'-TCTCCGCTTG-3'	60
223	5'-CCGAACACGG-3'	70
224	5'-CTCCATGGGG-3'	70
225	5'-TCGTCCGCA-3'	60

Table 1-1-6. Sequences and GC contents of COMMON primers

Code	Sequence	G+C contents (%)
A00	5'-ATCAGCGCCCA-3'	58
A01	5'-AGCAGCGCCTCA-3'	67
A02	5'-GCCAGCTGTACG-3'	67
A03	5'-TGCCCTGCACCA-3'	67
A04	5'-GCCCGTTAGCA-3'	75
A05	5'-CCGCAAGTTAGAT-3'	50
A06	5'-ACTGCGCGAGGG-3'	75
A07	5'-GATGGATTTGGG-3'	50
A08	5'-TTCGACGAATA-3'	42
A09	5'-AGAATTGGACGA-3'	42
A10	5'-GCCTGCCTCACG-3'	75
A11	5'-ACTGACCTAGTT-3'	42
A12	5'-CTCCTGCTGTTG-3'	58
A13	5'-CTCAGCGATACG-3'	58
A14	5'-ACTGAGAAAATA-3'	25
A15	5'-ATCGCGGAATAT-3'	42
A16	5'-ATTTGATAGGG-3'	42
A17	5'-GTTTCGGGAATG-3'	58
A18	5'-GACCTGCATCT-3'	58
A19	5'-AAGCGCGAACG-3'	67
A20	5'-TTGCCGGACCA-3'	67
A21	5'-GTGACCGATCCA-3'	58
A22	5'-TCCAAOCTACCA-3'	50
A23	5'-AAGTGGTGGTAT-3'	42
A24	5'-GACGGTTCAAGC-3'	58
A25	5'-GGTCAGGCACCA-3'	67
A26	5'-GGTGAGGATTCA-3'	50
A27	5'-GAGGTGATATTA-3'	33
A28	5'-TACCCTCAAAGCT-3'	50
A29	5'-ATCTTCAAAGAT-3'	25
A30	5'-CCTTCCGACGT-3'	58
A31	5'-GGTGGTGGTATC-3'	58
A32	5'-CTTGTCTATGTT-3'	42
A33	5'-OACTOCTATACA-3'	42
A34	5'-CCTGCGGAGGA-3'	75
A35	5'-CCTATCCCAACA-3'	50
A36	5'-ACAAAGAGATAT-3'	25
A37	5'-AGCCCGCAAAA-3'	58
A38	5'-ATCTTCTCATCT-3'	33
A39	5'-CCTGAGGTAGCT-3'	58

Table 1-1-7. Sequences and GC contents of primers purchased from Akitzu Keisoku and TOYOBO

Code	Sequence	GC content	Resource
A1	5'-TGGTCACTGA-3'	50%	A
A2	5'-TGGTCACTGA-3'	50%	A
A3	5'-TGGTCTCTGA-3'	50%	A
A4	5'-TGGTCCCTGA-3'	60%	A
A5	5'-TGGTCCCTGA-3'	60%	A
A6	5'-TGGTAACTGA-3'	40%	A
A7	5'-TGGTAACTGA-3'	40%	A
T1	5'-TGGACACTGA-3'	50%	T
T2	5'-TGGCACTGA-3'	60%	T
T3	5'-TGGCACTGA-3'	60%	T
T4	5'-TGCTCACTGA-3'	50%	T
T5	5'-TGATCACTGA-3'	40%	T
T6	5'-TGTTCACCTGA-3'	40%	T
T7	5'-TGTTCACCTGA-3'	50%	T
T8	5'-TAGTCACTGA-3'	40%	T
T9	5'-TTGTCACTGA-3'	40%	T
T10	5'-TGGTCACTGA-3'	50%	T
T11	5'-TGGTCAATGA-3'	40%	T
T12	5'-TGGTCAATGA-3'	40%	T
T13	5'-TGGTCACAGA-3'	50%	T
T14	5'-TGGTCACCGA-3'	60%	T
T15	5'-TGGTCACCGA-3'	60%	T
T16	5'-TGGTCACTCA-3'	50%	T
T17	5'-TGGTCACTAA-3'	40%	T
T18	5'-TGGTCACTTA-3'	40%	T
T19	5'-TGGTCACTGT-3'	50%	T
T20	5'-TGGTCACTGC-3'	60%	T

Resource
A Akitzu Keisoku
T TOYOBO

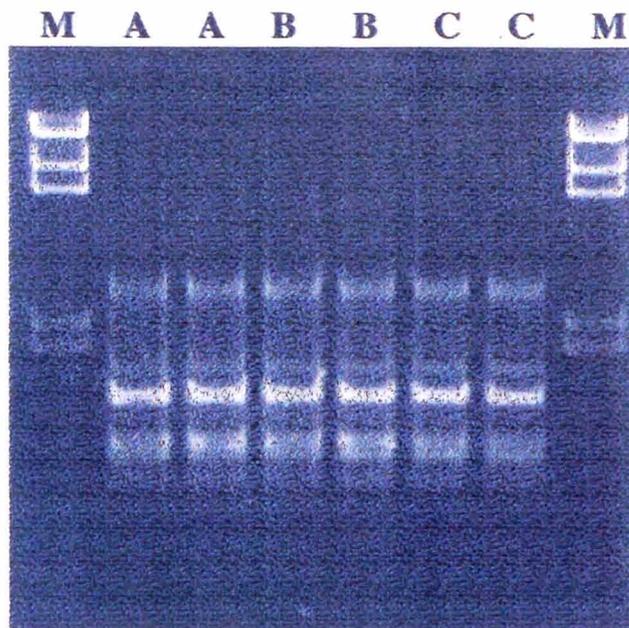


Fig. 1-1-3 Experiments of reproducibility. A ; repeating the same experiment using the same template DNA and primer ; B ; left ; genomic DNA extracted by CTAB method ; right ; genomic DNA extracted by SDS method ; C ; genomic DNA extracted from different leaves of the same plant. The genomic DNA of 'Benisashi' was used for these experiments. M; *Hin d III* digested lambda DNA and all PCR were performed by using the primer 3.

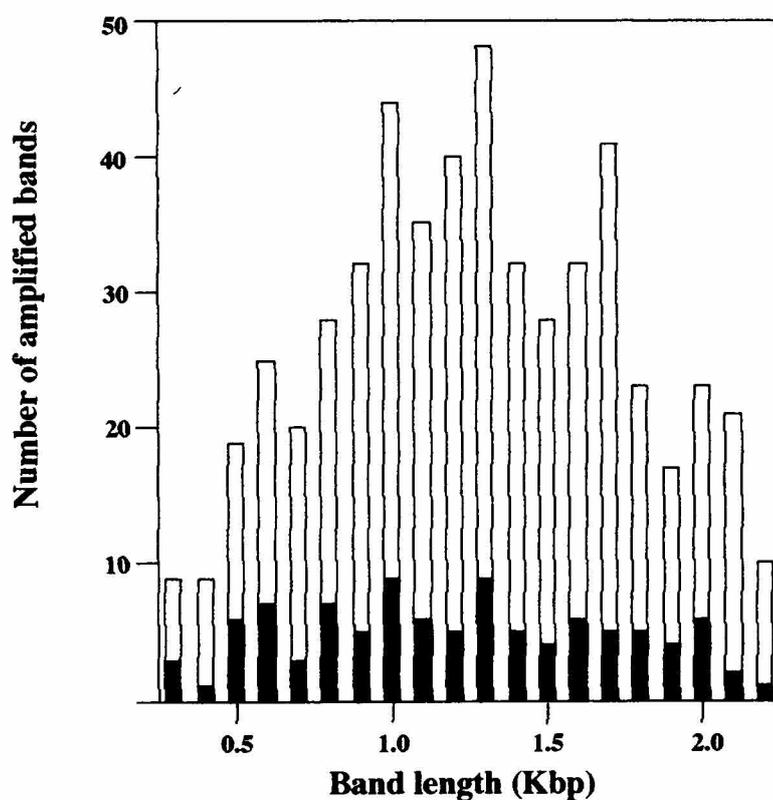


Fig. 1-1-4. The distribution of amplification products. The number of polymorphic bands are represented by solid columns.

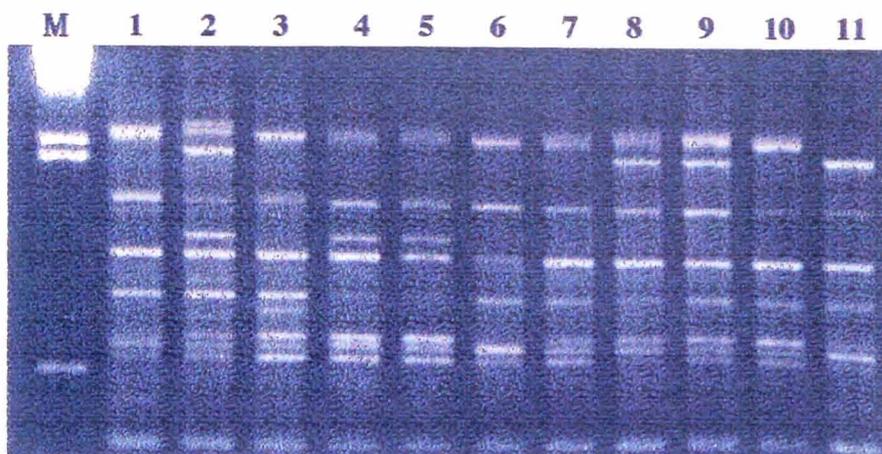


Fig.1-1-5. DNA polymorphisms detected by amplification using the primer A5. M; *Hin* d III digested lambda DNA, lane 1; 'Benisashi'(♀), lane 2; 'Ryukyokoume'(♂), lane 3-11 ; F₁ plants between them.

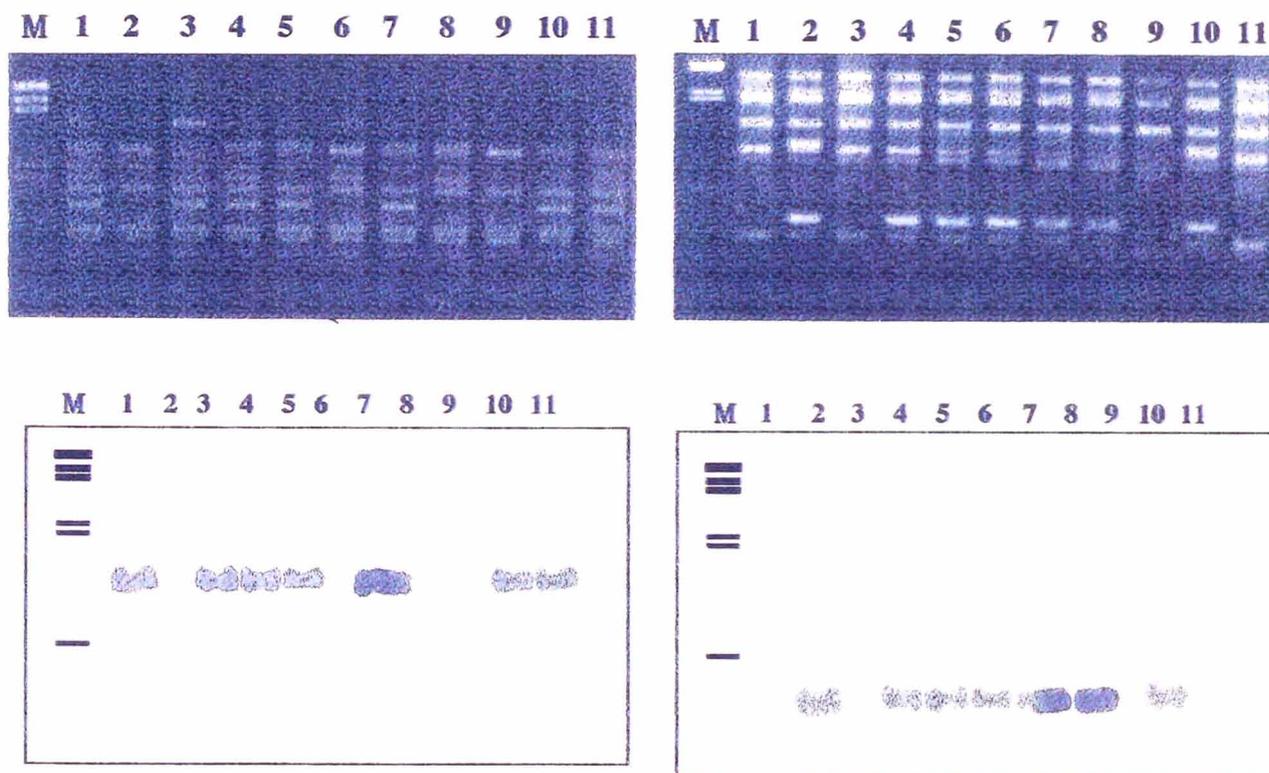


Fig.1-1-6. RAPD patterns and Photo and imaging analysis of Southern hybridization patterns. A1: RAPD patterns obtained by amplification using the primer 16. M; *Hin* d III digested lambda DNA, lane 1; 'Kensaki'(♀), lane 2; 'Benisashi'(♂), lane 3-11 ; F₁ plants between them. OP-1 was excised from the gel for probe. B 1 : RAPD patterns obtained by amplification using the primer 17. M; *Hin* d III digested lambda DNA, lane 1; 'Benisashi'(♀), lane 2; 'Kensaki'(♂), lane 3-11 ; F₁ plants between them. OP-2 was excised from the gel for probe. A2 ; hybridized with an OP-1 probe. B2 ; hybridized with an OP-2 probe.

Table 1-1-8. Material plants in mume

Code	Varieties	Scientific name
1	Riukyoukoume	<i>P. mume</i>
2	Benisashi	<i>P. mume</i>
3	Shinheidayu	<i>P. mume</i>
4	Oushuku	<i>P. mume</i>
5	Kensaki	<i>P. mume</i>
6	Nankouume	<i>P. mume</i>
7	Sumomoume	<i>P. mume</i>
8	Gojiro	<i>P. mume</i>
9	Gyokuei	<i>P. mume</i>
10	Rinshiu	<i>P. mume</i>
11	Bungo	<i>P. mume</i>

Table 1-1-9. Dissimilarity index between each pair of varieties

Code	Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Riukyoukoume		.408	.286	.347	.469	.449	.449	.347	.388	.327	.388
2	Benisashi			.367	.184	.224	.286	.327	.347	.347	.245	.447
3	Shinheidayu				.265	.347	.327	.571	.306	.306	.204	.388
4	Oushuku					.163	.224	.469	.224	.224	.143	.367
5	Kensaki						.265	.469	.286	.286	.265	.449
6	Nankouume							.367	.429	.388	.245	.477
7	Sumomoume								.551	.551	.449	.469
8	Gojiro									.122	.224	.367
9	Gyokuei										.224	.367
10	Rinshiu											.306
11	Bungo											

Table 1-1-10. Material plants in apricots

Code	Varieties	Scientific name
1	Niigataoumi	<i>P. armeniaca</i>
2	Ogasawara	<i>P. armeniaca</i>
3	Nodokukuri	<i>P. armeniaca</i>
4	Kyoudaimaru	<i>P. armeniaca</i>
5	Shinshuoumi	<i>P. armeniaca</i>
6	Bai-xing	<i>P. armeniaca</i>
7	Siberian apricot	<i>P. sibirica</i>
8	Nepal apricot	<i>P. armeniaca</i>
9	Early Orange	<i>P. armeniaca</i>

Table 1-1-11. Dissimilarity index between each pair of varieties

Code	Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Niigataoumi		.267	.333	.233	.167	.267	.467	.500	.433
2	Ogasawara			.267	.233	.367	.400	.533	.567	.567
3	Nodokukuri				.300	.433	.267	.333	.367	.433
4	Kyoudaimaru					.333	.300	.500	.600	.533
5	Shinshuoumi						.300	.633	.600	.400
6	Bai-xing							.400	.433	.300
7	Siberian apricot								.300	.500
8	Nepal apricot									.333
9	Early Orange									

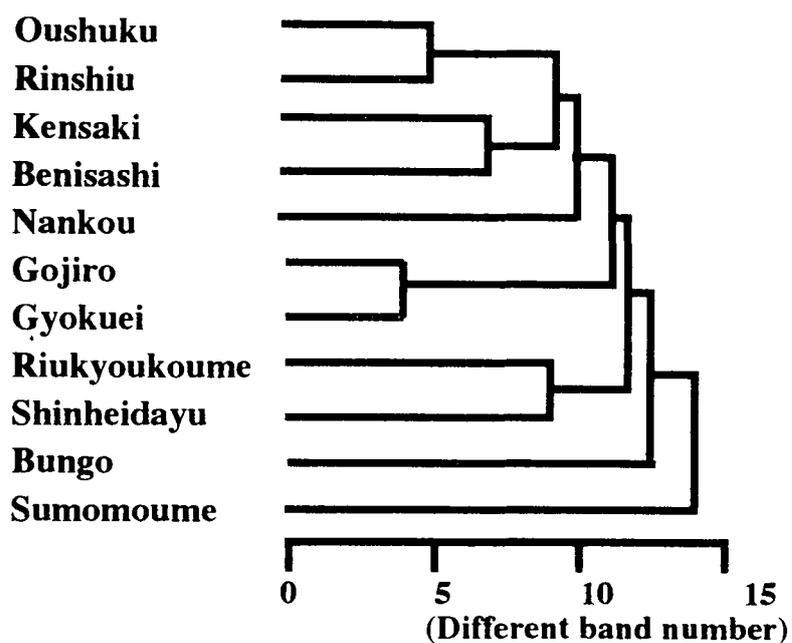


Fig. 1-1-7. Dendrogram of representative mume cultivars.

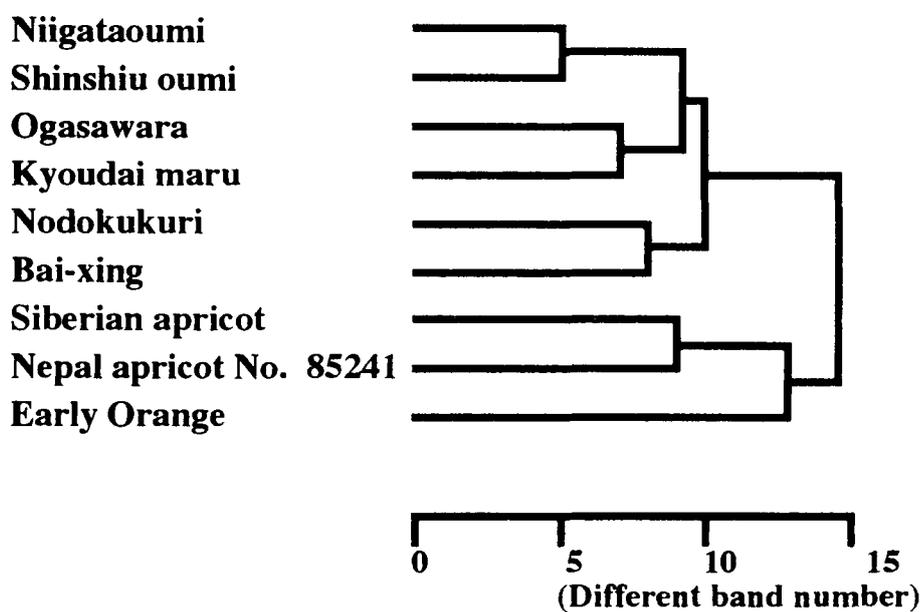


Fig. 1-1-8. Dendrogram of representative apricot varieties.

Table 1-1-12. Representative plum varieties for RAPD analysis

Code	Varieties	Scientific name
1	Mylobalan plum420-2-2	<i>P. cerasifera</i>
2	Manzaemon	<i>P. salicina</i>
3	Chairn	<i>P. domestica</i>
4	Karari (Hua-la-li)	<i>P. salicina</i>
5	Krikon Damson	<i>P. insititia</i>
6	Koike sumomo	<i>P. salicina</i>
7	Methley	<i>P. salicina</i> × <i>cerasifera</i>
8	Stanley	<i>P. domestica</i>
9	Spinosa Plum	<i>P. spinosa</i>

Table 1-1-13. Dissimilarity index between each pair of plum varieties

Code	Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Mylobalan plum420-2-2		.667	.476	.524	.571	.524	.524	.571	.714
2	Manzaemon			.476	.238	.286	.238	.429	.476	.429
3	Chairn				.524	.286	.429	.524	.286	.524
4	KARARI (Hua-la-li)					.429	.286	.381	.619	.476
5	Krikon Damson						.333	.619	.381	.429
6	Koike sumomo							.381	.524	.381
7	Methley								.524	.381
8	Stanley									.333
9	Spinosa Plum									

Table 1-1-14. Representative peach varieties for RAPD analysis

Code	Varieties	Scientific name
1	Nagano Yaseitou (Late)	<i>P. persica</i>
2	Hakuton	<i>P. persica</i>
3	Chinese Cling	<i>P. persica</i>
4	Chinese Blood	<i>P. persica</i>
5	Late Crawford	<i>P. persica</i>
6	Tibetan peach	<i>P. mira</i>
7	David peach	<i>P. davidiana</i>
8	Almond 85124	<i>P. amygdalus</i>

Table 1-1-15. Dissimilarity index between each pair of peach varieties

Code	Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8
1	Nagano Yaseitou (Late)		0.44	0.52	0.4	0.32	0.48	0.4	0.36
2	Hakuton			0.8	0.04	0.68	0.04	0.04	0.08
3	Chinese Cling				0.76	0.44	0.76	0.76	0.8
4	Chinese Blood					0.64	0.08	0	0.04
5	Late Crawford						0.64	0.64	0.6
6	Tibetan peach							0.08	0.12
7	David peach								0.04
8	Almond 85124								

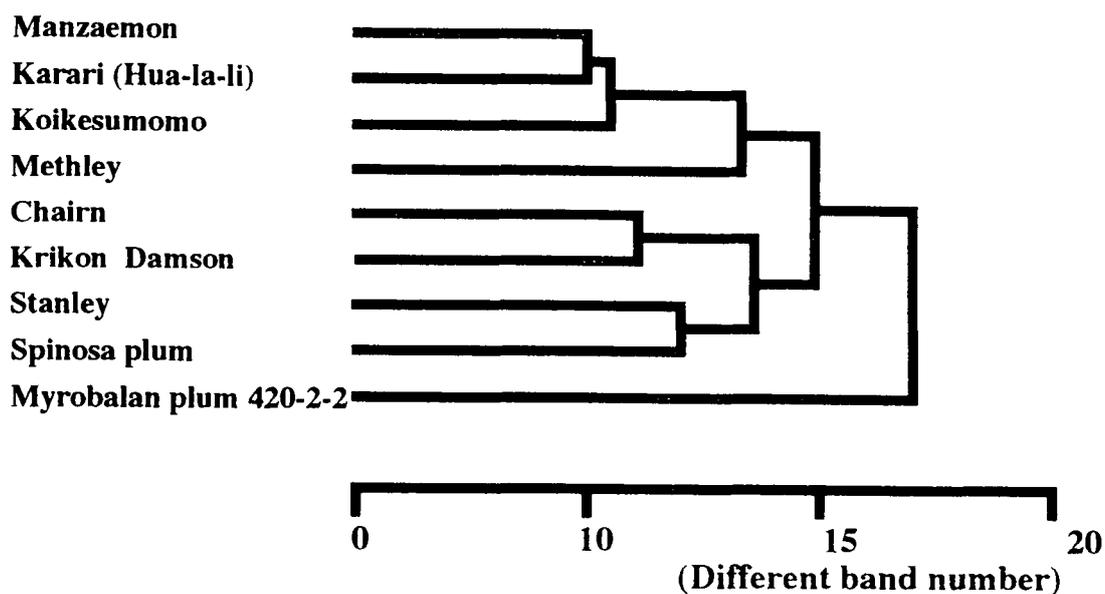


Fig. 1-1-9. Dendrogram of representative plum varieties.

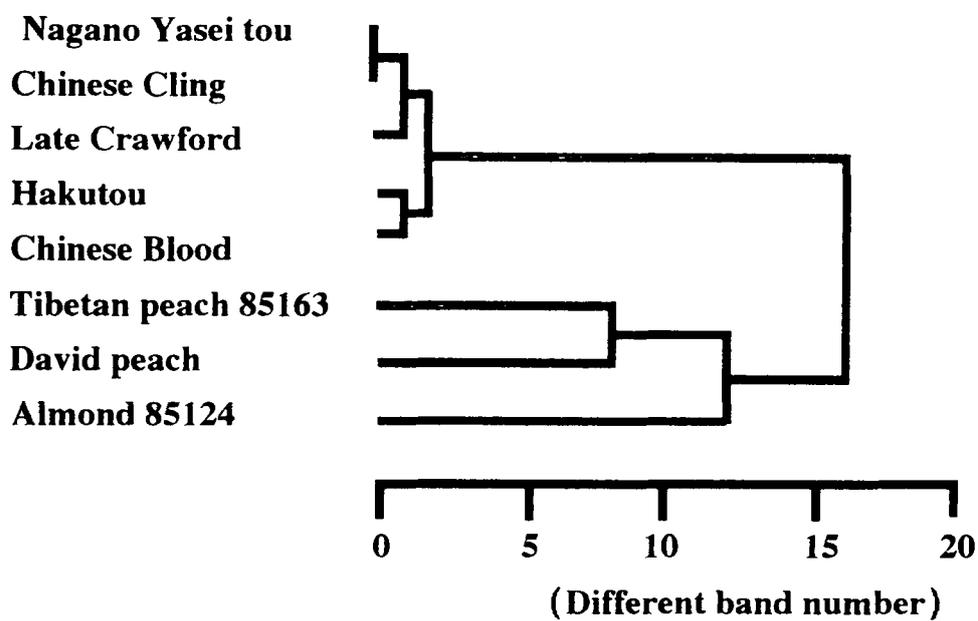


Fig. 1-1-10. Dendrogram of representative peach varieties.

Table 1-1-16. Representative cherry varieties for RAPD analysis

Code	Varieties	Scientific name
1	English Morello	<i>P. cerasus</i>
2	Aobazakura	<i>P. lannesiana</i>
3	Fujizakura	<i>P. incisa</i>
4	Chinese cherry	<i>P. pauciflora</i>
5	Napoleon	<i>P. avium</i>
6	Fruticosa	<i>P. fruticosa</i>
7	Mont Morency	<i>P. cerasus</i>
8	Niwazakura	<i>P. glandulosa</i>

Table 1-1-17. Dissimilarity index between each pair of cherry varieties

Code	Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8
1	English Morello		.500	.407	.430	.314	.198	.105	.512
2	Aobazakura			.233	.349	.465	.395	.512	.477
3	Fujizakura				.256	.349	.349	.395	.407
4	Chinese cherry					.372	.372	.419	.453
5	Napoleon						.395	.233	.500
6	Fruticosa							.209	.430
7	Mont Morency								.523
8	Niwazakura								

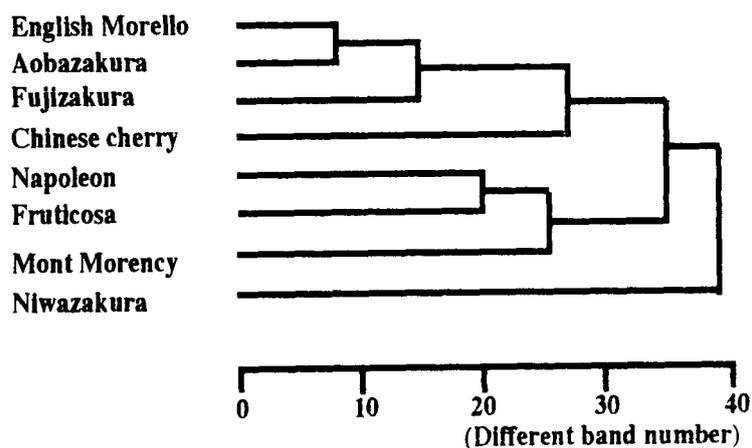


Fig. 1-1-11. Dendrogram of representative cherry varieties.

第2節 Dig-ELISA及び CDP-Starによるサザンブロット解析

目的

RAPD分析法はゲノムの不特定部位からプライマーに挟まれる領域を増幅するために、得られたDNA多型は表型的で、それらによる解析は広義のゲノムの類似性を推定するものと考えられる。これまで、系統解析の分野においては個体間の距離となる尺度をFitch-Margoliash法(Fitch・Margoliash, 1967)、UPG法(Nei, 1975)、MF法(Farris, 1972)などの、分子レベルでのデータ比較を基本とした方法で行われてきた。木村(1986)は、中立遺伝子の進化速度は時間に対して一定であり、その値は中立遺伝子の突然変異率に等しいと述べ、系統解析の分野においては、この説は分岐時間の推定を行う基本概念となっている。アルファルファなどの一部の植物を除き、細胞質遺伝するオルガネラDNAは自然淘汰に対して中立で母系の推定などに有効である。このため、葉緑体、ミトコンドリアを組織から分画し、そこからDNAを抽出して、適当な制限酵素で処理して制限酵素の認識部位の有無を調査する方法が行われてきたが、この方法はかなり時間がかかり、解析に多量のDNAを必要とした。ゲノミックDNAを用いたサザンブロット解析法は供試するプローブを変えることにより、それぞれ対象とするゲノムを調査することができるので非常に便宜な方法である。これまで、プローブの標識には ^{32}P や ^{35}S などの放射性物質が利用されてきたが、安全性の面において、実験環境と廃棄処理などの問題がある。近年、ECLやDigなどの蛍光ラベルを主体とした方法が開発され、検出効率は前述の方法と同等のものとなってきた。そこで、Dig標識のプローブを用いたサザンブロット解析に着目し、この方法がサクラ属植物の系統分類に有効であるか否かを検討する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場で保存されているウメ3品種、アンズ4品種、スモモ、4品種・系統を供試した(Table 1-2-1)。

2).試料の採集、試料の調整

第1章第1節の方法に従って行った。

3).DNAの抽出

DNAの抽出はWargnerら(1987)が開発した改変CTAB法に従った。調整した5 gの試料は速やかに液体窒素で凍結し、乳鉢と乳棒により十分に粉碎した。この粉末に氷の上で冷却したに50 mlのIBバッファー(Table 1-2-2)を加え、溶液が均一になるように氷の上で攪拌した。15,000 rpm、4℃、5分間で遠心分離(KUBOTA KR-20000T)を行い、沈澱物に25 mlのLBバッファー(Table 1-2-3)を加え、溶液が均一になるように攪拌した。60℃で30分間保温した後、溶液に25 mlのフェノール・クロロホルム(1:1v/v)混合液を加え、両層が穏やかに混合するように攪拌させた後、15,000 rpm、4℃、10分間で遠心分離(KUBOTA KR-20000T)を行った。タンパク質を含む中間層を入れぬように上層(水

層)を静かに取り出し、25 mlのクロロホルム・イソプロピルアルコール混合液(24:1v/v)を加え、両層が穏やかに混合するように攪拌させた後、15,000 rpm、4 °C、10分間で遠心分離を行った。タンパク質を含む中間層を入れぬように上層(水層)を静かに取り出し、この上澄み液に2.5 mlの3 Mの酢酸ナトリウムと25 mlのイソプロパノールを加えて、ゆっくりと混ぜ、-80 °C、30分間放置した。15,000 rpm、4 °C、10分間で遠心分離を行い、DNAの沈殿を行った。沈殿したDNAを30 mlのAAエタノール(99 % Ethanol : 7.5 mM Ammonium Acetate = 6 :1)で30分間、さらに30 mlの75 %エタノールで洗浄した。洗浄したDNAを風乾した後に2 mlのTEバッファー[50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA]と40 μ lのRNase[10 mg / ml RNase, 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 15 mM NaCl]を加えて冷蔵庫に保存した。スモモ、サクラ、オウトウ、ユスラウメなど、多糖類やポリフェノールが多く含まれていると考えられるものについては、IBバッファーによる洗浄、フェノール・クロロホルム混合液によるタンパク質の除去、75 %エタノールによる洗浄を繰り返した。改変CTAB法のフローチャートをFig.1-2-1に示した。

4).制限酵素処理

酵素処理には、1サンプル当たり3 μ gのゲノミックDNAを供試した。第1章第1節の方法で100 ng/ μ lに濃度調整した30 μ lのDNA溶液に50 μ lのマスターミックス(各制限酵素3 μ l、8 μ lの10 \times バッファー、39 μ lの滅菌水)をさらに加え、80 μ lスケールで消化反応を行い、37°C・1晩で処理した。制限酵素には*Bam* HI と*Hin* dIIIの2種類の制限酵素を用いた。10 \times バッファーの組成表をTable 1-2-4に示した。

5).電気泳動・染色・写真撮影

実験 1.の方法 7.に従って行った。ただし、泳動槽にはアトーのAE6110を用い、1.2 g SEAKEMアガロースゲル(FMC)と2.4 mlの50 \times TAEを蒸留水中で加熱溶解し120 mlにフィルアップした1 %のアガロースゲルを使用し、100 Vで4時間の電気泳動を行った。

6).プローブ断片の作成とクローニング

PCR断片をプローブとして利用するために、第1章第3節の方法により、スモモの‘万左衛門’の鋳型DNAから*atpB-rbcL*遺伝子間領域の増幅を行った。増幅反応液を2 %のアガロースゲルで電気泳動し増幅産物の有無を確かめた。増幅産物が認められた反応液は第1章第3節の方法により精製し、ミニゲル法により、100 ng/ μ lに希釈し、ラベリング反応に供試した。東京大学の平井篤志教授、東北大学遺伝子生態研究センターの菅野明助手に分譲していただいたイネ葉緑体のDNA断片P4(14,356 bps Insert/puc19)を複製するために、クローニングを行った。100 μ lのコンピテントセル(大腸菌DH5、TOYOBO)と2 μ lのプラスミド(50 ng/ μ l)を500 μ lチューブにに入れ、氷上で30分間静置し、42 °C、2分間のヒートショックを行った。反応後、1分間氷上に置き、SSC液体培地で37°C、1時間、振盪培養した。培養液200 μ lを選択マーカーと構成物質を含むLB培地(Table 1-2-5)にプレーティングし、37°C、1晩培養した。翌日、培地上の白色コロニーを滅菌した爪楊枝で回収し、抗生物質アンヒシリン(終濃度:50 μ g/ml)を含む50mlの2 \times YT培地(Table 1-2-6)に加え、37°Cで、1晩、振盪培養した。分光光度計(BECKMAN、DU[®] 640UV Spectorophotometer)により、 $\lambda = 600$ の波長で吸光度(OD)を

測定し、培養液のOD数が0.5以上になるまで振盪培養を続けた。吸光度を確認した後、2.5 mlクロラムフェニコール(34 mg/ml in ethanol)を加え、さらに37℃、1晩、振盪培養し、大腸菌当たりのプラスミドのコピー数を増加させた。プラスミドの抽出はアルカリSDS法(Birnboim・Doly, 1979)により行った。培養液を4℃、5分間 15,000 rpmで遠心分離(KUBOTA KR-20000T)を行い、沈殿した大腸菌を20 mlのGTE溶液(Table 1-2-7)を加え、氷の上で十分に懸濁し4℃、5分間 15,000 rpmで遠心分離し、沈殿した大腸菌に5 mlのリゾチーム溶液(10 mg/ml in GTE solution)を加え、ボルテックスで十分に混合し溶菌を行った。5分間静置したのち、10mlのアルカリ溶液(Table 1-2-8)を加えてゆっくりと混和し、溶液が透明になるのを確認し、10分間氷の上で静置した。さらに7.5 mlの3Mの酢酸ナトリウム(pH6.0)を加えて氷の上で静置した。この混合液を15,000 rpm、4℃、10分間で遠心分離し、上澄み液を取り、25 mlのクロロホルム-イソアミルアルコール混合液(24:1)を加え、両層が穏やかに混合するように攪拌させた後、4℃、10分間 15,000 rpmで遠心分離(KUBOTA KR-20000T)を行った。タンパク質を含む中間層を入れぬように上層(水層)を静かに取り出し、25 mlのイソプロパノールを加え、ゆっくりと混和したのち、15分間室温で放置した。室温で30分間、15,000 rpmで遠心分離し、DNAの沈殿を行った。沈殿したDNAを30 mlの75%エタノールで洗浄した。洗浄したDNAを4℃、10分間 15,000 rpmで遠心分離(KUBOTA KR-20000T)を行い、風乾した後に100 μ lのTEバッファ[50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA]と2 μ lのRNase[10mg / ml RNase, 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 15 mM NaCl]を加えて冷蔵庫に保存した。なお、アルカリSDS法のフローチャートをFig. 1-2-2に示した。

7).プローブの作成

上述のDNAをプローブ化するために、Dig-labelingキット(Boehringer Mannheim)を適用した。DNA断片を94℃、10分間、ボイリング方式で熱変性させ、直ちに氷中に移し冷却した。熱変性後のDNA 1 μ g、0.5 M Tris-HCl 2 μ l、dNTPラベリング混合液(Table 1-2-9)、蒸留水 10 μ lをチューブに入れ、最後に2 U Klenow酵素を泡立てないように静かに加え混合した。37℃、1晩インキュベーションし、Klenow酵素によってDig-dUTPを取り込ませ、2 μ lの0.2M EDTA溶液(pH 8.0)を加えて反応を停止させた。2 μ lの4 M LiClと60 μ l冷エタノールを加えて十分混合し、標識されたDNAを沈殿させ、-80℃で30分間静置した。次に、12,000 rpm、10分間遠心分離(TOMY MC-150)を行い、70%冷エタノールで沈殿を洗浄し、乾燥させ、1 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl(pH 8.0)に溶解させた。

8).アルカリブロットティング

電気泳動後、ゲルのサンプルコウム部分を0.25 M HClに1分間浸漬し、泳動されなかった巨大分子のDNAを切断した。次に、1 M NaClを含む0.5 M NaOHに15分浸漬し、液を切る。これを数回繰り返す、脱プリン反応を行い、DNA断片を変性させた。ゲル上のDNA断片をハイボンドNあるいはN+(Amersham)のナイロンメンブレンへ一晩、アルカリブロットティングした。ブロットティング溶液はメンブレンにより異なり、ハイボンドNでは1.5 Mの水酸化ナトリウムと0.25 Mの水酸化ナトリウムを含む溶液、ハイボンドN⁺では0.4 Mの水酸化ナトリウム溶液を用いた。ブロットティング後、メンブレンを2×

SSCバッファー(0.3 M NaCl, 0.03 M Na-citrate, pH 7.0)で15分間浸漬し、これをもう一度繰り返した。

9).ハイブリダイゼーション

バックグラウンドを抑えるためにメンブレンをシールドバックに入れ、メンブレン100 cm²当たり20 mlのハイブリダイゼーション溶液を加えシールドし、42 °Cで4時間シェークしながらプレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション溶液はメンブレンの種類により異なり、ハイボンドNではTable 1-2-10に記す溶液を、ハイボンドN⁺ではTable 1-2-11に示し溶液を使用した。

次に、プレハイブリダイゼーションで使用した溶液を除去し、直前に94 °C・10分間ポイリング方式で熱変性させたブローブ(50 ng /ml)を1 ml当たり5 μl加えたハイブリダイゼーション溶液をメンブレン100 cm²当たり約2.5 ml加え、シールドバック中に泡が入らないよう注意しながらシールドした。42 °Cで6時間シェークしながらインキュベーションした。

インキュベーション後、室温で100 cm²当たり50 ml以上の0.1 % SDSを含む2×SSCでメンブレンを5分間2回洗浄し、続いて、42 °Cで0.1 % SDSを含む0.1×SSCで15分間2回洗浄した。

10).Dig-ELISAによる検出

ハイブリダイゼーションの終わったメンブレンをバッファー1(Table 1-2-12)で1分間洗浄した後、バッファー2(Table 1-2-12)に移し、30分間インキュベーションした。次に、再度、バッファー1で簡単に洗浄した。バッファー1で750 U /mlの酵素標識抗体(Dig-AP抗体；ポリクローナル羊抗ジゴキシゲニンFabフラグメントにアルカリ性フォスファターゼを結合させたもの)を150 mU /ml(1:5000)に希釈した。この希釈標識抗体溶液約20 mlにメンブレンを浸漬し、30分間インキュベーションした。インキュベーション後、100 mlのバッファー1でメンブレンを15分間2回洗浄して未反応の標識抗体を除去し、20 mlのバッファー3(Table 1-2-12)に移して2分間で平衡化させた。

発色反応は暗所において行われ、シールドバックにメンブレンを入れ約10 mlの発色液を加えてインキュベーションした。発色液は、10 mlバッファー3、45 μl NBT溶液(75 mg /ml nitroblue tetrazolium salt in 70 % dimethylformamide)、35 μl Xリン酸(50 mg /ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidinium salt in dimethylformamide)を混合したものを使用した。発色反応中は、発色沈澱物が散りやすいためシールドバックを動かさないよう注意した。バンドが検出されたら、50 mlのバッファー4(Table 1-2-12)で5分間メンブレンを洗浄し発色反応を停止させた。

11).Dig-CDP-Starによる検出

ハイブリダイゼーションの終わったメンブレンをバッファー1で5分間洗浄し、100 mlのバッファー2に移し30分間インキュベーションする。メンブレンを20 mlの希釈溶液(バッファー1で抗Dig-AP抗体を75 U/mlになるように希釈したもの)で30分間インキュベーションする。100 mlの洗浄バッファーで15分間2回激しく洗浄し、20 mlのバッファー3で2分間平衡化する。発光基質溶液(Table 1-2-)を100 mlメンブレンを5分間浸し、余分な基質溶液を除き、サランラップでメンブレンを包み、暗室でメンブレンとRX-X

線フィルム(富士写真フィルム)を重ね、その上に感光板(Amersham)を載せ、カセット(Amersham)で挟んだ状態で30分間露光した。露光したXフィルムはRENFIX(富士写真フィルム)で5分間攪拌しながら現像し、水で洗浄した後、RENDOR(富士写真フィルム)で5分間攪拌しながら定着させ、水洗後風乾させた。

12). 脱色反応

Dig-ELISAにより検出が終了したメンブレンを再利用するために、メンブレンに付着する色素の脱色を行った。検出後のメンブレンをウォーターバスで60℃に加熱したジメチルホルムアミドに浸漬し、色素が脱色されるまでインキュベーションを行った。

13). プロブの除去と再ハイブリダイゼーション

メンブレンを滅菌蒸留水で1分間洗浄し、Probe-stripping solution(Table 1-2-13)に入れ、75℃で1時間インキュベーションし、プロブの除去を行った。メンブレンを滅菌蒸留水で簡単に洗浄し、50 mlの2×SSCで15分間3回洗浄を行い、再ハイブリダイゼーションを行った。なお、プロブを除去したメンブレンは使用するまでバッファー4を加えシールドバック中で保存した。

14). データ解析

系統間で認められた多型を0-1型でスコアーし、各系統間ごとに Nei & Li(1979)の計算式により遺伝距離を求めた。計算式を以下に記した。

$$\hat{F} = 2m_{xy} / (m_x + m_y) \quad \hat{d} = - (2 / r) \log_e \hat{G}$$

$$\hat{G} = [\hat{F} (3 - 2\hat{G}^{1/4})]^{1/4} \quad d = \text{Ave.} (\hat{d})$$

遺伝距離は制限酵素の認識塩基数ごとに分けて計算し、求めた値を平均して最終値とした。 m_x と m_y はそれぞれX個体、Y個体にみられるバンドの数を表し、 m_{xy} はX個体とY個体に共通なバンドの数を表している。また、 r は供試した制限酵素が認識する塩基数を、 G は $F^{1/4}$ を表している。計算式のGの数値が安定するまで5回繰り返した。求められた遺伝距離をもとに解析ソフトUPNJ-SSにより、UPGMA法(Sneath・Sokal、1973)で系統樹を作成した。

結果及び考察

1). DNA多型とシグナル強度

11品種・系統を *Bam* HIと *Hin* dIIIで消化し、電気泳動したところ、複数の葉緑体DNA断片が確認され、3 μ gのゲノミックDNAで十分に分析が行えると考えられた。atpB-rbcL遺伝子間領域から増幅したDNA断片(プローブF)とイネの葉緑体DNA断片(プローブP2)をプローブにして、2種類のメンブレンと検出方法を試みた(Fig. 1-2-3)。AはプローブFとハイボンドN⁺を用い、Dig-ELISA法により検出した図、BはプローブFとハイボンドNを用い、Dig-CDP-Star法により検出した図、CはプローブFとハイボンドN⁺を用い、Dig-CDP-Star法により検出した図、DはプローブP2とハイボンドN⁺を用い、Dig-CDP-Star法により検出した図である。Aではプローブがハイブリダイズしたところ

に青色のシグナルが見られ、B、C、Dでは黒色のシグナルが見られた。これら4つの図を比較したところ、ナイロンメンブレンはハイボンドN⁺の方がハイボンドNよりシグナルが強く、良い結果が得られた。検出能力は主観的に化学発光基質CDP-Starを用いた方がELISA法より高いと推察された。Dig-ELISA法では直接メンブレンに色素が付着するために、プローブを除去しても色素が残り、脱色反応に時間を要するが、Dig-CDP-Star法では1時間で十分であり、プローブの除去が簡便であった。メンブレンを再利用した結果、ハイボンドNでは3回から4回の使用でシグナル強度が減少するのに対し、ハイボンドN⁺では5回以上の使用でもシグナル強度は変わらず、再ハイブリダイゼーションにはハイボンドN⁺が有効であった。ハイボンドN⁺は陽の電荷を帯電しDNAと共有結合するために、転写したDNAはメンブレン上で非常に安定した状態になるので、帯電していないハイボンドNより、再利用の回数が増加するものと考えられる。以上のことから、メンブレンの再利用、プローブの除去、シグナル強度などの点を考慮すると、ハイボンドN⁺とDig-CDP-Star法の組み合わせが簡便でしかも能力的に高いと考えられた。

プローブは今回、サクラ属果樹から作成したプローブとイネ由来のプローブを比較したが、シグナル強度は予想通り、前者の方が強かった。このため、イネのプローブを用いる際は少し長めの露光を行った。解析にイネのプローブが利用できることから植物における葉緑体DNAの保存性の高さが推察された。多型の出現数は断片長の長いイネのプローブの方が多かった。プローブの断片長が長ければ、プローブに相補的な領域が長くなり、制限酵素認識部位が増加するので多型が出現しやすくなると考えられ、イネの葉緑体断片が有効であると考えられた。

2). サザンブロット解析の有効性

得られた多型をもとに遺伝距離を求め(Table 1-2-14)、系統樹を作成した(Fig. 1-2-4)。
 ‘南高’、‘豊後’、‘李梅’、‘平和’、‘仁杏’、‘アルパインブラム’、‘万左衛門’、ミロバランスモモの品種・系統間ではRFLPが検出されなかった。‘山杏’、‘クリコンダムソン’と‘スピノーサスモモ’は他の系統と大きくことなり、遺伝的に遠縁であった。*Prunophora* 内は遺伝的に非常に近縁であるため、今回のプローブと制限酵素の組み合わせだけでは、十分な多型が得られないと考えられた。得られた系統樹が示す類縁関係は、これまでの分類と矛盾しなかった(菊池、1948)。サクラ属果樹では、これまでM13プローブや、イネのミトコンドリアの遺伝子プローブによりサザンブロット解析が試みられた(Nybohmら、1990、池谷ら、1992)が、これらのプローブではRFLPデータから直接遺伝距離を求めることは困難である。保存性の高い葉緑体DNAでのRFLPの検出は容易ではないと推察されるが、Uematsuら(1991)はサクラ属植物の葉緑体DNAにおいて種を十分に識別するほどの変異は存在すると報告している。このため、遺伝的多様性が高い種を用いて、多くのプローブと制限酵素を組み合わせることで分析することにより、十分な多型の検出が期待できるので第5章第3節のサクラ属果樹の系統分類にDig-CDP-Star法を適用した。

摘 要

葉緑体DNA断片をプローブとしたサザンブロット解析により、サクラ属果樹の間で十分なDNA多型を検出し、それらの系統分類が有効であるか否かを検討した。実験の安全性を考慮して、プローブの標識には蛍光物質のジゴキシゲニンを用い、メンブレン、プローブの種類及び検出方法の組み合わせについて検討した。メンブレンではプラスチャージしているハイボンドN+の方がチャージしていないハイボンドNよりシグナル強度が強く、さらにメンブレンの再利用の効率が良かった。プローブではサクラ属果樹からPCRにより作成した増幅DNA断片とイネ由来の葉緑体DNA断片とを比較した。シグナル強度は予想通り、増幅DNA断片が強かったものの、多型の出現効率はイネ由来の葉緑体DNA断片をプローブとした方が高かった。検出方法はDig-ELISA法とDig-CDP-Star法を比較した。Dig-ELISA法では直接メンブレンに色素が付着するために、プローブを除去しても色素が残り、脱色反応に時間を要するが、Dig-CDP-Star法では1時間で十分であり、プローブの除去が簡便であった。検出能力もDig-CDP-Star法を用いた方がDig-ELISA法より高いと推察された。ハイボンドN+とDig-CDP-Star法により、代表的なサクラ属果樹についてサザンブロット解析を行った。系統樹を構築するための多型は十分に得られ、これらをもとに作成した系統樹はこれまでの分類結果と矛盾していなかった。以上のことから葉緑体DNAをプローブとしたサザンブロット解析はサクラ属果樹の系統分類に有効であると考えられた。

Table 1-2-1. Material palts for Southern blot analysis

Code	Accession	Type	Scientific name
1	Nankou	Mume	<i>P.mume</i>
2	Bungo	Mume	<i>P.mume</i>
3	Sumomoume	Mume	<i>P.mume</i>
4	Heiwa	Aprioct	<i>P.armeniaca</i>
5	Ren-xing	Apricot	<i>P.armeniaca</i>
6	Siberian apricot	Apricot	<i>P.sibirica</i>
7	Alpine plum	Apricot	<i>P.brigantina</i>
8	Manzaemon	Plum	<i>P.salicina</i>
9	Krikon Damson	Plum	<i>P.insititia</i>
10	Myrobalan plum	Plum	<i>P.cerasifera</i>
11	Spinosa plum	Plum	<i>P.spinosa</i>

Table 1-2-2. Composition of IB buffer

Component		
Polyethylene glycol #6,000	10%	(W/V)
Sorbitol	0.35 M	
Tris-HCl (pH 8.0)	0.1 M	
Spermidine	0.50%	(W/V)
Spermine	0.50%	(W/V)
β -mercaptoethanol	2%	(W/V)

Table 1-2-3. Composition of LB buffer

Component	10 \times buffer	
Sorbitol	0.35 M	
Tris-HCl (pH 8.0)	0.1 M	
Spermidine	0.50%	(W/V)
Spermine	0.50%	(W/V)
L-sarcosine	1.00%	(W/V)
β -mercaptoethanol	2%	(W/V)

Table 1-2-4. Composition of restriction enzyme buffers

Component	High buffer (<i>Eco</i> RI)	Medium buffer (<i>Hin</i> dIII)
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM	10 mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Dithiothreitol	1 mM	1 mM
NaCl	100 mM	50 mM

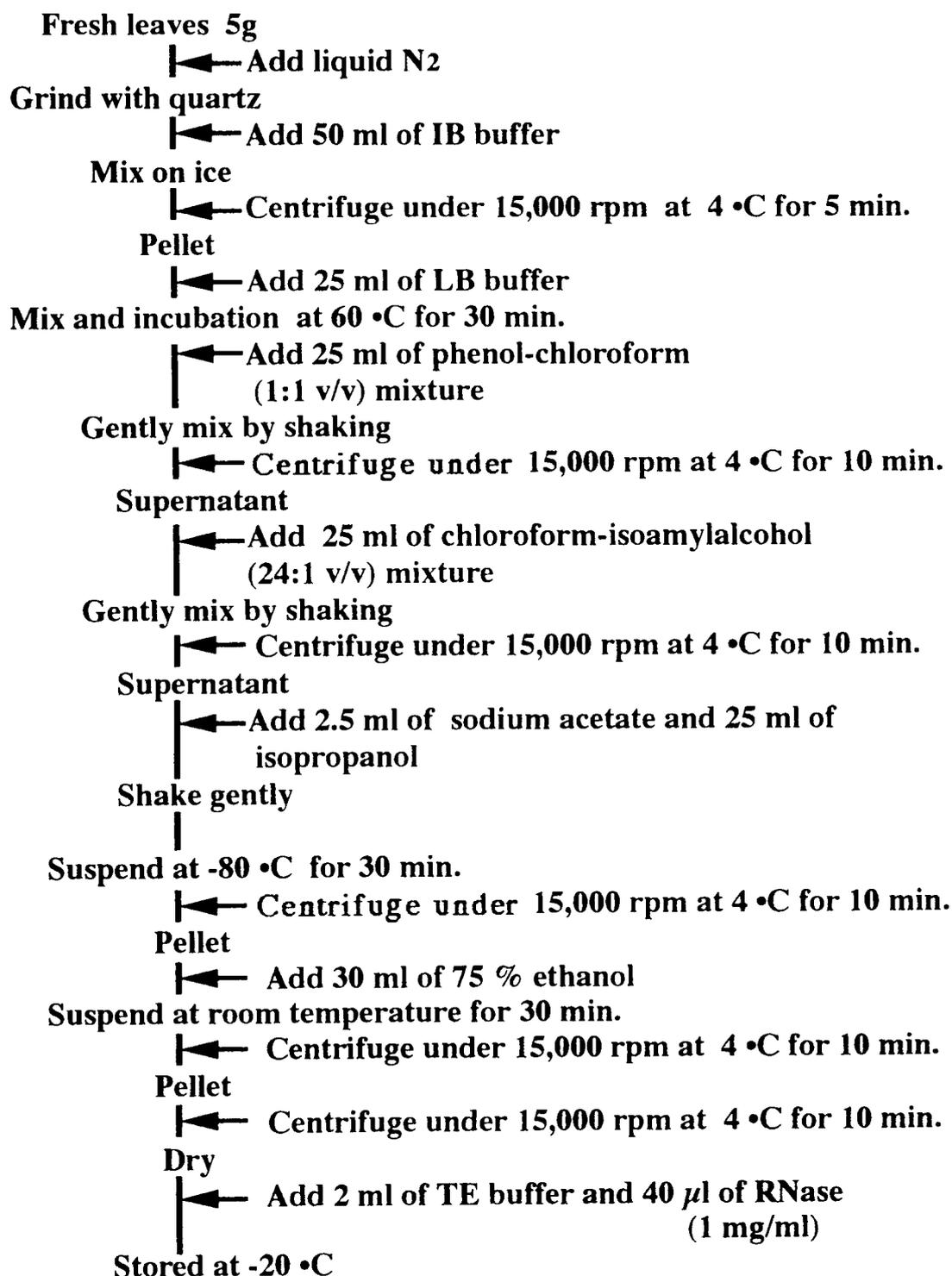


Fig. 1-2-1 DNA isolation method for RFLP analysis.

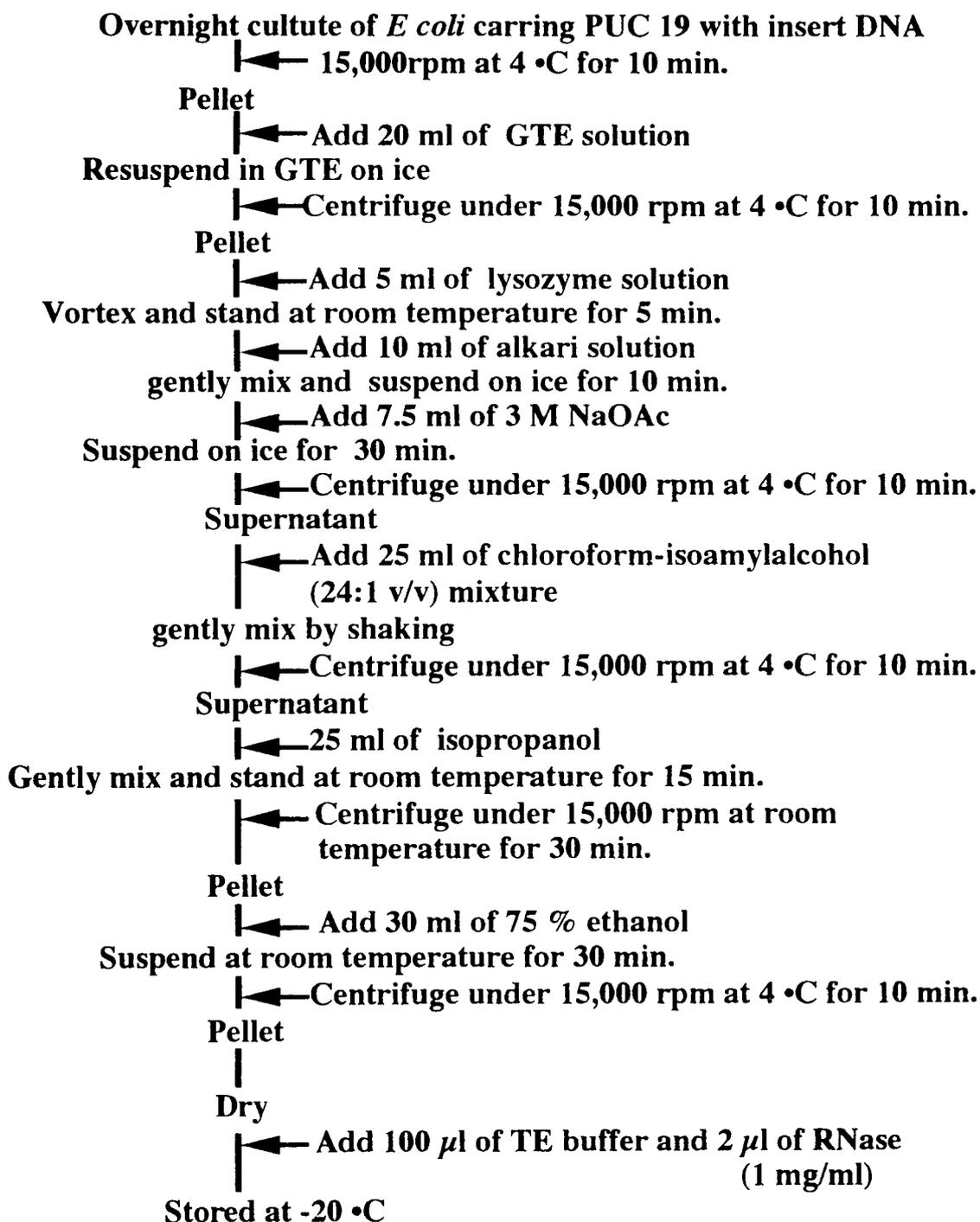


Fig. 1-2-2. Plasmid isolation method for preparation of probes.

Table 1-2-5 . Composition of 1.5 % selection medium

Component		
Bacto tryptone	1%	(W/V)
Bacto yeast extract	0.5%	(W/V)
NaCl	0.2%	(W/V)
Bacto agarose	1.5%	(W/V)
X-Gal	2.0%	(W/V)
IPTG	0.2%	(W/V)
Ampicillin	5.0%	(W/V)

Table 1-2-6 . Composition of 2 x YT

Component		
Bacto tryptone	1.60%	(W/V)
Bacto yeast extract	1.00%	(W/V)
NaCl	0.50%	(W/V)

Table 1-2-7 . Composition of GTE solution

Component	
Glucose	0.05 M
EDTA	0.01 M
Tris-HCl(pH 8.0)	0.25 M

Table 1-2-8 . Composition of alkali solution

Component	
NaOH	0.05%
SDS	1% (W/V)

Table 1-2-14. Genetic distance between each accessions

Code	Varieties	*	6	9	11
	* Group A		0.007523846	0.00811714	0.021521192
	6 Siberian apricot			0.016687619	0.023830071
	9 Krikon Damson				0.033348301
	11 Spinosa plum				

**Group A : Nankou, Bungo, Sumomoume, Heiwa, Ren-xing,
Alpine plum, Manzaemon, Myrobalan plum.**

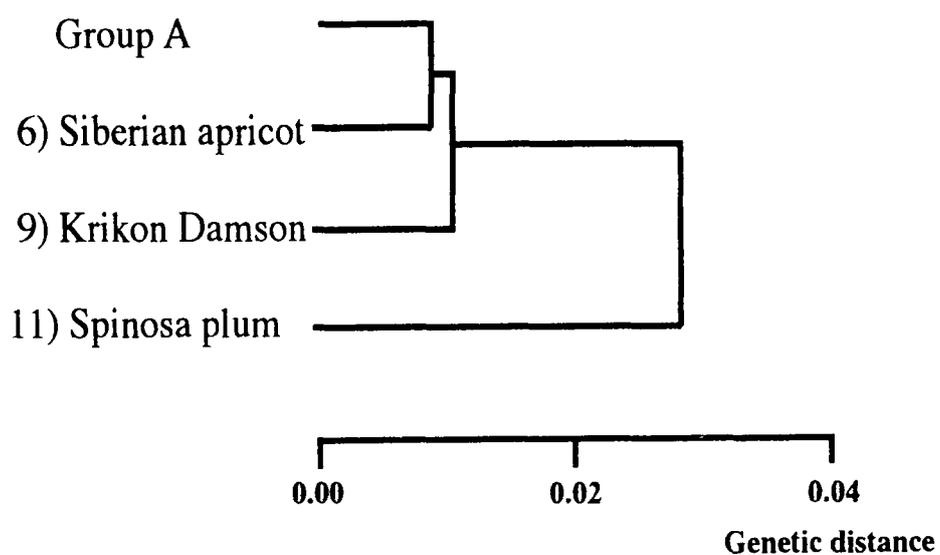
**Fig. 1-2-4. Phylogenetic tree by UPGMA.**

Table 1-2-9. Composition of mixture labeling dNTP(pH 6.5)

Component	
dATP	1 mM
dGTP	1 mM
dCTP	1 mM
dTTP	0.65 mM
Dig-dUTP	0.35 mM

Table 1-2-10. Composition of hybridization solution for Hybond N

Component	
NaCl	0.75 M
Na-citrate(pH 7.0)	0.075 M
Formamide	50% (W/V)
Blocking reagent	5.00% (W/V)
N-lauroylsarcosine	0.10% (W/V)
NaCl	0.10% (W/V)
SDS	0.02% (W/V)

Table 1-2-11. Composition of hybridization solution for Hybond N⁺

Component	
NaCl	0.75 M
Na-citrate(pH 7.0)	0.075 M
Sodium phosphate(pH7.0)	50 mM
Formamide	50% (W/V)
Blocking reagent	2.00% (W/V)
N-lauroylsarcosine	0.10% (W/V)
NaCl	0.10% (W/V)
SDS	7.00% (W/V)

Table 1-2-12. Composition of detection buffers

Components		buffer 1	buffer 2	buffer 3	buffer 4
Tris-HCl	(m mol/l)	100	100	100	10
NaCl	(m mol/l)	150	150	100	—
MgCl ₂		—	—	50	—
Bial 11 (Blocking reagent)	(W/V)	0.50%	—	—	1
EDTA	(m mol/l)	7.5	—	9.5	—

Table 1-2-13. Probe-stripping solution

Component	
Formamide	60% (W/V)
Tris-HCl	50 mM
SDS	1% (W/V)

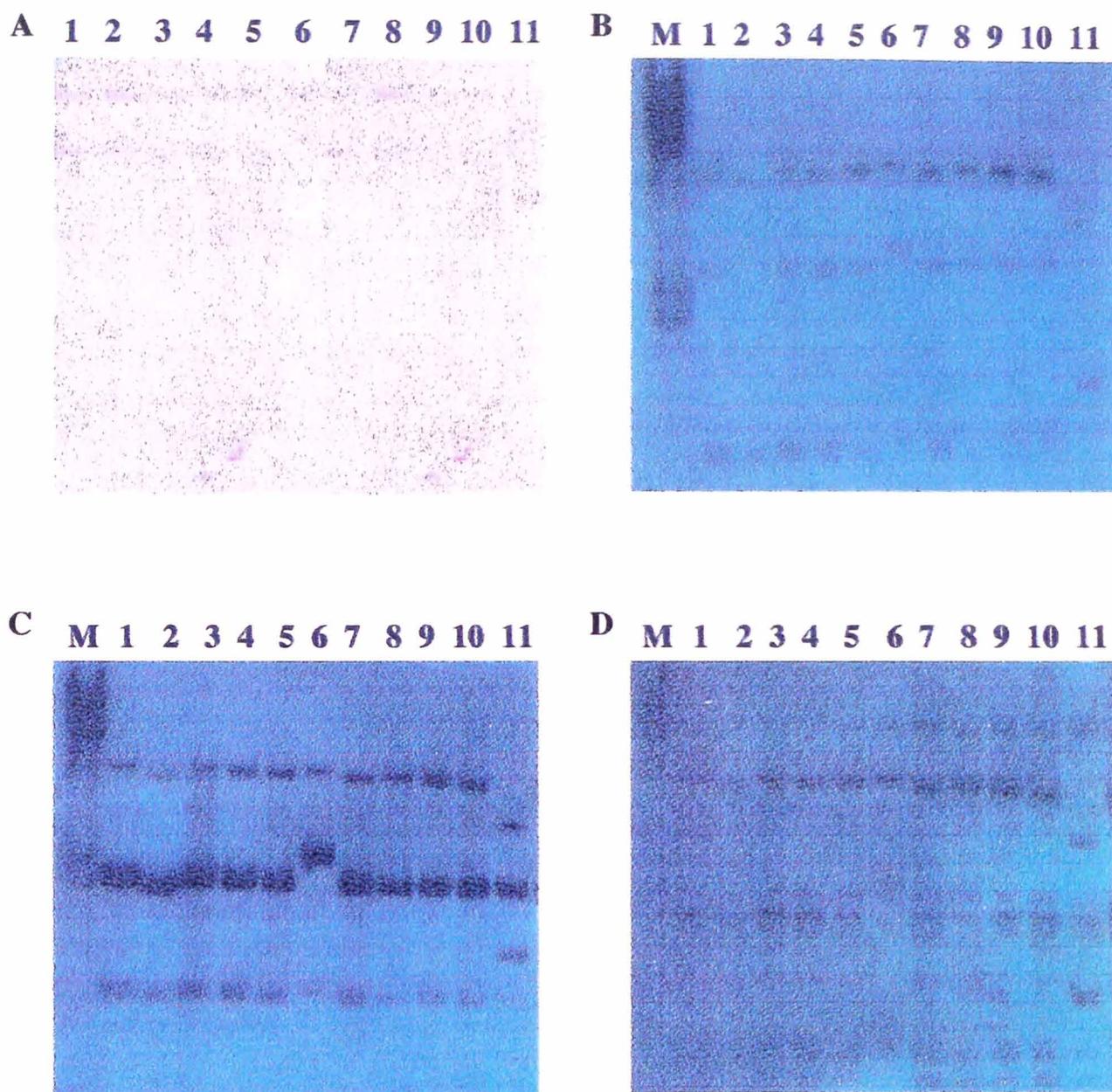


Fig. 1-2-3. Southern hybridization pattern between each probe and genomic DNA digested by *Bam* HI. Probe PF was used for A, B, and C, and P2 were for D. Hybond N⁺ was used all experiments except B. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA. Detection of A was according to Dig-ELISA and others were according to Dig-CDP-Star. The above numbers were listed in Table 1-2-1.

第3節 オルガネラDNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法

目的

オルガネラDNAの遺伝様式はアルファルファや針葉樹(Nealeら、1986)などの例外を除き一般的に、細胞質遺伝するため、母系の推定など系統進化学的研究に適切であると考えられている。これまで、葉緑体DNAやミトコンドリアDNAの遺伝的変異を調査するために、RFLP解析やサザンブロット解析などの解析法が適用されてきた。しかしながら、これらの方法は供試するDNA量が多く必要であること、実験手順が煩雑であること、多型はプローブと制限酵素の組み合わせに依存し、比較的近縁な種間においては多型の検出は困難であることなど、多数の系統を扱う上で必ずしも便宜であるとはいえない。Saikiら(1985)が報告したPCR-RFLP法は目的の領域をPCRで増幅し、そのRFLPパターンを調査するために、上述の問題を克服すると考えられ、しかも、4塩基認識制限酵素を使用してもその評価が容易であると推察される。STS(Sequence Tagged Site)(Tragoonrungrら、1992)化されたプライマーを用い、サクラ属果樹のオルガネラDNAの特定領域の変異を調査した。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場と山形県園芸試験場で保存されているウメ、アンズ、スモモ、モモ、アーモンドをそれぞれ1品種・系統とサクラ2品種・系統を供試した(Table 1-3-1)。

2).試料の採集、試料の調整、DNAの抽出、鋳型DNAの濃度調整

第1章第1節の方法に従って行った。

3).STSプライマー

葉緑体DNAにコードされているpsbA遺伝子領域、rbcL-ORF106遺伝子間領域、atpB-rbcL遺伝子間領域、matK遺伝子領域、また、ミトコンドリアDNAにコードされているmat遺伝子、及びcox遺伝子を対象として、これらの領域を増幅するためにTable 1-3-2にしるす、1-12のSTSプライマーを受諾合成した。これらのプライマーのアニーリングサイトの模式図をFig. 1-3-1に示した。

4).ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

濃度調整を行ったDNA 20 μ lを0.5 mlチューブの底に入れ、マスターミックス 80 μ lを加え、ミネラルオイル1滴を滴下し、バイオオープン(Biotherm Co.)でPCRを行った。PCRは、94 $^{\circ}$ Cで1分間の熱変性、55 $^{\circ}$ Cで30秒間のアニーリング、73 $^{\circ}$ Cで30秒間の相補伸長反応を1サイクルとして3サイクル、続いて、94 $^{\circ}$ Cで15秒間の熱変性、55 $^{\circ}$ Cで15秒間のアニーリング、73 $^{\circ}$ Cで15秒間の相補伸長反応を1サイクルとして30サイクル、次に、73 $^{\circ}$ Cで2分間の伸長反応により行った。

5).ペレットの回収

PCRで増幅した後、反応液のミネラルオイルをヒヘットマンで除去し200 μ lのエタノールで沈殿し、遠心分離(15,000 rpm、5分)を行った。ペレットを50 μ lのTEで溶解

し、50 μ lのフェノール；クロロホルム1；1混合液で抽出して、再び前記の作業を繰り返した。

6).制限酵素処理

PCRで増幅した断片を5種類の4塩基認識制限酵素、2種類の5塩基認識制限酵素、3種類の6塩基認識制限酵素(Table1-3-3)で消化した。PCRを行った後、制限酵素を10×バッファ(Table1-3-4)によって希釈した制限酵素希釈液50 μ lをさらに加え、37 $^{\circ}$ C・2時間で処理した。

7).電気泳動・染色・写真撮影

実験 1.の方法 7.に従って行った。ただし、0.9 g SEAKEMアガロースゲル(FMC)と0.6 ml 50×TAEを蒸留水中で加熱溶解した3 %のアガロースゲル(30 ml/ゲル)を使用した。

8).プローブの作成

東京大学の平井篤志教授に分譲していただいたイネ葉緑体のDNA断片の中で、psbA遺伝子領域、rbcL-ORF106遺伝子間領域、atpB-rbcL遺伝子間領域、matK遺伝子領域をコードしていると考えられるB-7(4.9 kbp)、P1-1(1.8 kbp)、P-14(7.5 kbp)、E10(2.4 kbp)をプローブとして利用するために、Dig-labelingキットをもちいた。ラベリング方法については第1章第2節の方法に従った。

9).アルカリブロットイング

1-8のセンスプライマー、アンチセンスプライマーを使用してPCRを行い、増幅産物を50Vで1時間電気泳動した。

ゲルのサンプルコウム部分を0.25 M HClに1分間浸漬し、泳動されなかった巨大分子のDNAを切断した。次に、1 M NaClを含む0.5 M NaOHに15分浸漬し、液を切る。これを数回繰り返す、DNA断片を変性させた。ゲル上のDNA断片をナイロンメンブレン(ハイボンドN)へ一晩、アルカリブロットイングした。ブロットイング後、メンブレンを2×SSCバッファ(0.3 M NaCl, 0.03 M Na-citrate, pH 7.0)で15分間浸漬し、これをもう一度繰り返した。

10).ハイブリダイゼーション

第1章第2節の方法に従った。

11).検出

第1章第2節に記したDig-ELISA法によって検出した。

12).データ解析

第1章第2節の方法に従った。

結果及び考察

1). STSプライマーによる特定領域の増幅

葉緑体にコードされているpsbA遺伝子、rbcL-ORF106遺伝子間領域、atpB-rbcL遺伝子間領域、及びmatK遺伝子領域を増幅するSTSプライマー4組と、ミトコンドリアにコードされているmat-r, cox II遺伝子を増幅するSTSプライマー2組を用いて供試材料のゲノミックDNAを鋳型に6領域の増幅を試みた。葉緑体では、それぞれpsbA遺伝子領域

で約1.1 kb、*rbcL*-ORF106遺伝子間領域で約3.2 kb、*atpB*-*rbcL*遺伝子間領域で約2.1 kb、*matK*遺伝子領域で約1.5 kbpの大きさの増幅断片が得られた(Fig. 1-3-2)。しかし、ミトコンドリアでは、*mat-r*については増幅断片が検出されなかった、また、*cox II*については複数の増幅断片が検出されたため、分析には使用しなかった(Data not shown)。STSプライマーはバラ科植物(寺地ら、1993、遠藤ら、1995)、コムギ(Wahleithner、1990)、アイリス(Arnoldら、1991)などのオルガネラDNAにコードされる遺伝子部位の配列の一部をデザインされたものである。葉緑体DNAのこれらの領域の増幅は、比較的遠縁である植物の遺伝子配列を持つプライマーを用いたにも関わらず、単一のバンドが得られた。このことは植物の葉緑体DNAの保存性は比較的高いことを示唆しているものと考えた。ミトコンドリア遺伝子領域の増幅については、増幅パターンが予想した結果と異なり、これらのプライマーはサクラ属果樹に適用できなかった。ミトコンドリアDNAは分子内組み替えのため、種内変異がしばしば生じると報告されていることから(Sederoff、1987)、これが原因で、進化速度が速いとされる葉緑体DNAよりミトコンドリアDNAの方がよく分化しているものと推察した。以上のことから、葉緑体DNAの4領域について実験を進めた。

PCRの鋳型にゲノミックDNAを用いたため、得られた4種類の増幅断片が葉緑体由来のものかどうかを確かめた。東大、平井篤志先生、東北大遺伝生態研究センターの菅野明氏に分譲していただいたイネの葉緑体断片の中から、上述の4種類の領域をコードすると考えられるB-7、P-14、P1-1、E10をDig標識し、サザンハイブリダイゼーションを行った。増幅産物が見られた位置にシグナルが検出された(Fig. 1-3-3)。イネの遺伝子プローブによるサザンハイブリダイゼーションで増幅断片とプローブの間にシグナルが形成されたことにより、これらは相互に70%以上の相同性があると考えられた

検出された4種類の増幅産物の断片長は系統間で全て相同で、欠損挿入などの変異は認められなかった。このため増幅産物をフェノールクロロホルム1:1混合液で抽出し、エタノールで沈殿、精製した。ベレットはTEでとかし、6種類の4塩基認識制限酵素、2種類の5塩基認識制限酵素、3種類の6塩基認識制限酵素でこれを処理した。消化物を3%のシーケムアガロースゲルで電気泳動し各制限酵素の認識部位の有無を調査した。供試材料の組み合わせでは、検出した多型のうち、サクラに特異的なRFLPパターンをFig. 1-3-4に示した。多型の出現頻度は4塩基認識制限酵素が高く、また構造遺伝子内領域よりもイントロンを含む遺伝子間領域の方が高かった(Data not shown)。Bades・Parfitt(1995)は特に*rbcL*-ORF106遺伝子領域は変異に富んでいると述べ、本実験でも多数の変異がみられた。得られたRFLPsをもとに、Nei&Li(1979)の計算式から遺伝距離を求め(Tabel 1-3-5)、UPGMAにより系統樹を作成した(Fig. 1-3-5)。サクラは他の品種系統と遺伝的に遠縁であり、早期に分化したのではないかと推察した。以上のようにPCR-RFLP分析法は、葉緑体DNAをプローブとしたゲノミックサザンプロット解析法と同程度、あるいはそれ以上のDNA多型を簡便に供給するものと思われ、多種多系統を扱う系統分類に有効であると考えられたので第2章から第5章の解析に適用した。

摘 要

一般に細胞質遺伝するオルガネラDNAの遺伝的変異を簡便に調査するために特定領域を増幅してそれらの制限酵素の認識部位の変異を調査するPCR-RFLP分析法を検討した。葉緑体DNAにコードされているpsbA遺伝子領域、rbcL-ORF106遺伝子間領域、atpB-rbcL遺伝子間領域、matK遺伝子領域、また、ミトコンドリアDNAにコードされているmatK遺伝子、及びcox遺伝子を対象として、これらの領域を増幅するSTSプライマーを用いて供試材料のゲノミックDNAを鋳型に6領域の増幅を試みた。葉緑体では、それぞれpsbA遺伝子領域で約1.1 kb、rbcL-ORF106遺伝子間領域で約3.2 kb、atpB-rbcL遺伝子間領域で約2.1 kb、matK遺伝子領域で約1.5 kbpの大きさの増幅断片が得られた。しかし、ミトコンドリアでは、mat-rについては増幅断片が検出されなかった、また、cox IIについては複数の増幅断片が検出されたため、分析には使用しなかった。得られた4種類の増幅産物の断片長は系統間で全て相同で、欠損挿入などの変異は認められなかった。このため増幅産物を12種類の制限酵素でこれを処理し、各酵素の認識部位の有無を調査した。多型の出現頻度は4塩基認識制限酵素が高く、また構造遺伝子内領域よりもイントロンを含む遺伝子間領域の方が高かった。

以上のことから、PCR-RFLP分析法は、葉緑体DNAをプローブとしたゲノミックサンブロット解析法と同程度、あるいはそれ以上のDNA多型を簡便に供給するものと思われ、多種多系統を扱う系統分類に有効であると考えられた。

Table 1-3-1. Material plants for PCR-RFLP analysis

No.	Variety name	Type	Scientific name
1	Nankou	Mume	<i>P. mume</i>
2	Heiwa	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
3	Manzaemon	Plum	<i>P. manzaemon</i>
4	Hakutou	Peach	<i>P. persica</i>
5	Almond 85124	Almond	<i>P. amygdalus</i>
6	Chinese bush cherry	Cherry	<i>P. tomentosa</i>
7	Napoleon	Cherry	<i>P. avium</i>

Table 1-3-2. Sequences of STS primers

No.	Gene	Origin	Sequences (5' - 3')	Base number
1	psbA	cpDNA	ATGACTGCAATTTAGAGAGACG	23
2	psbA	cpDNA	CATTACGTTTCATGCATAACTCC	23
3	rbc L	cpDNA	ATGTCACCACAAACAGAAAAGTAAAGCAAGT	30
4	ORF106	cpDNA	ACTACAGATCTCATACTACCCC	22
5	atpB	cpDNA	CCATCTGTAGCACTCATAGC	20
6	rbc L	cpDNA	TTGTAACGATCAAGACT	17
7	matK-AF	cpDNA	CTATATCCACTTATCTTTCAGGAGT	25
8	matK-8R	cpDNA	AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGA	24
9	mat1	mtDNA	GAAGGATCCGACAAAAGTACGA	23
10	mat2	mtDNA	TGGTCGACAATCGTTCGGACTT	22
11	cox2E1	mtDNA	GGGTATTAGTAGATCCAGCCAT	22
12	coxR2	mtDNA	TCATCGGAACTGTTATAGTCCG	22

Table 1-3-3. Restriction enzymes and 10x buffer

Type	Enzyme	10 × buffer
4 base cutter	<i>Alu</i> I	M
	<i>Hae</i> III	M
	<i>Hha</i> I	M
	<i>Msp</i> I	M
	<i>Nla</i> III	M
	<i>Rsa</i> I	M
5 base cutter	<i>Hinf</i> I	H
	<i>Srf</i> I	H
6 base cutter	<i>Mbo</i> II	L
	<i>Eco</i> RI	H
	<i>Eco</i> RV	H
	<i>Sau</i> 3AI	M

* H buffer ; high buffer
M buffer ; medium buffer
L buffer ; low buffer

Table 1-3-4. Composition of restriction enzyme buffers

Component	High buffer	Medium buffer	Low buffer
Tris-HCl (pH 7.5)	50mM	10mM	10mM
MgCb	10mM	10mM	10mM
Dithiothreitol	1mM	1mM	1mM
NaCl	100mM	50mM	—

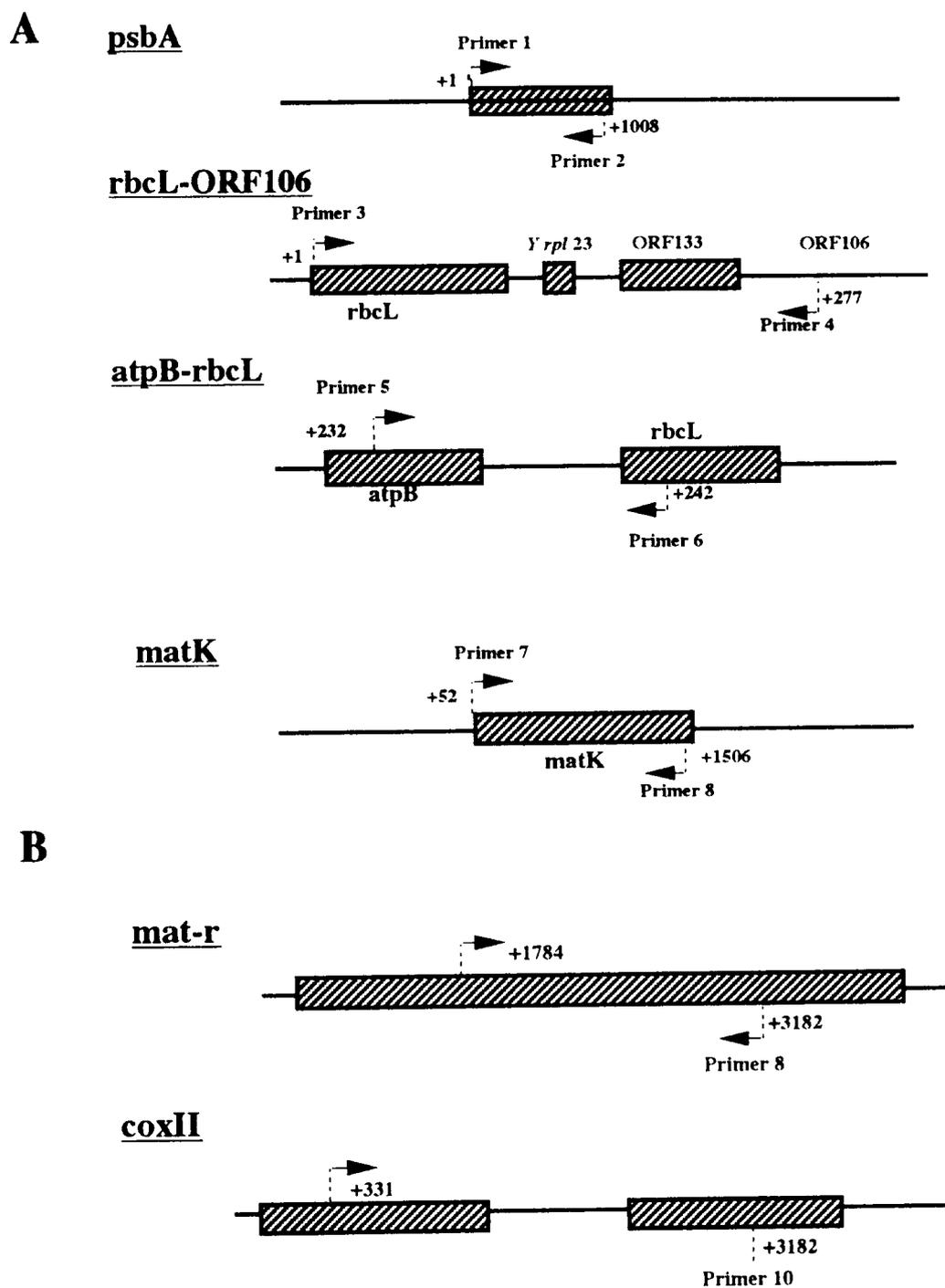


Fig. 1-3-1. Illustration of annealing sites for 4 sets of STS primers.

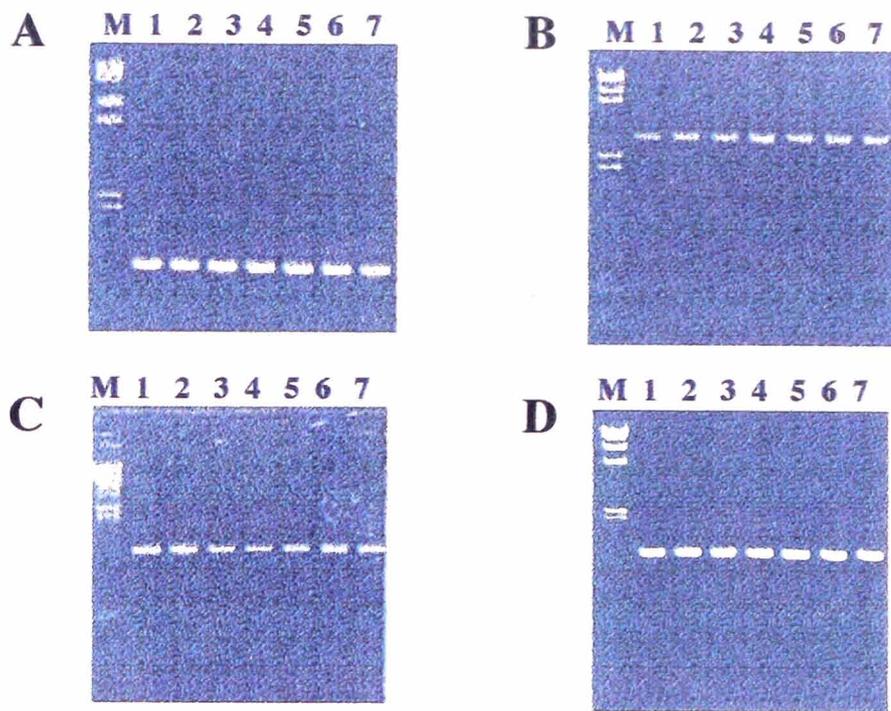


Fig. 1-3-2. DNA fingerprints of representative varieties. 1 ; 'Nankou'(mume), 2 ; 'Heiwa'(apricot), 3 ; 'Manzaemon'(plum), 4 ; 'Hakutou'(peach), 5 ; Almond 85124 (almond), 6 ; Chinese bush cherry (cherry) and 7 ; 'Napoleon'(cherry). A ; psbA, B ; rbcL-ORF106, C; atpB-rbcL and D ; matK. M; *Hin* d III digested lambda DNA.

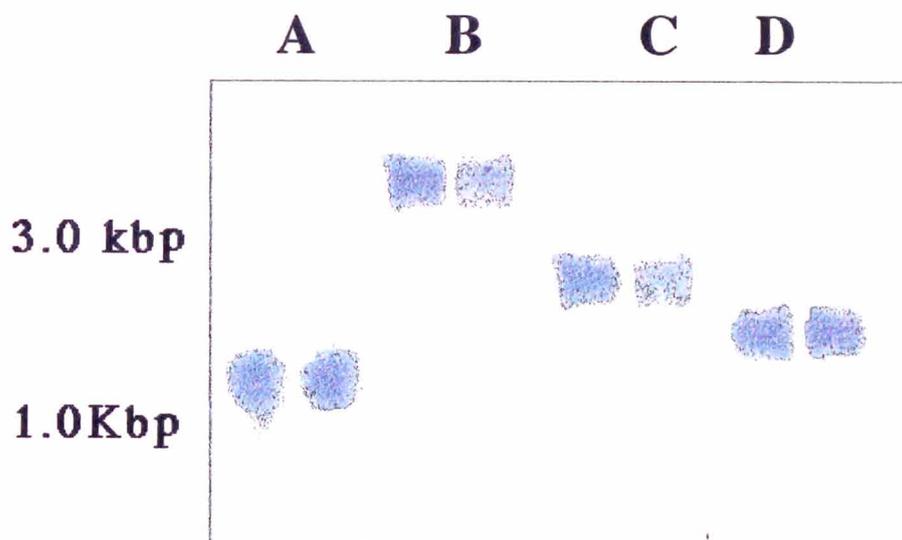


Fig. 1-3-3. Southern hybridization with rice chloroplast DNA fragment probe. A; B-7 (4.9kbp) for psbA, B; P-14 (1.8kbp) for rbcL-ORF106, C; P1-1 (7.5kbp) for atpB-rbcL and D ; E-10 (2.4 kbp) for matK.

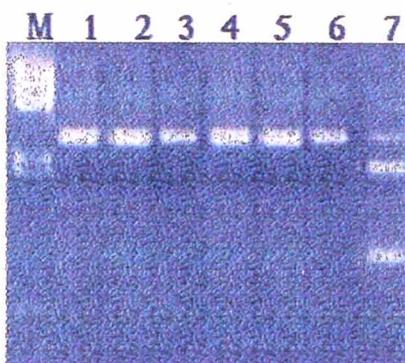


Fig.1-3-4. RFLP pattern obtained from *Eco* RV digestion of *rbcl*-ORF160 region.
M : *Hin* d III digested lambda DNA.

Table1-3-5 . Genetic distance between each group classified on the base of RFLPs

Code	Group and variety name	1	2	3	4
1	Group A		0.002	0.0009	0.0145
2	Hakutou			0.0011	0.0168
3	Almond 85124				0.0154
4	Napoleon				

Group A : Nankou, Heiwa,
Manzaemon, Chinese bush cherry

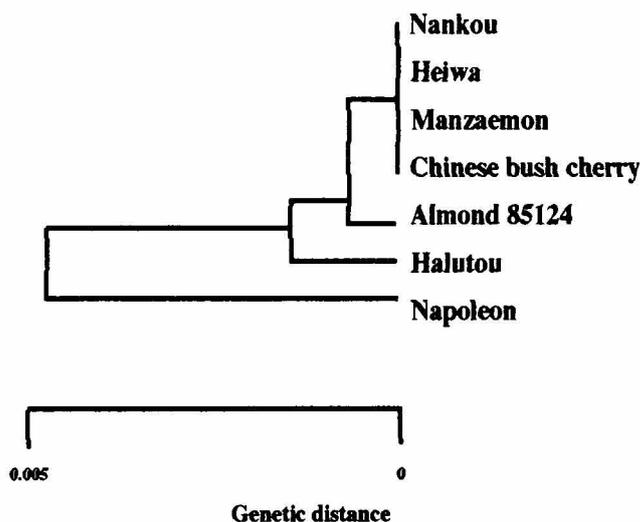


Fig. 1-3-5. Phylogenetic tree constructed by UPGMA.

第2章 スモモ亜属の系統分類

第1節 ウメの系統分類

目 的

ウメの品種分類はこれまで形態的特性(田中、1936、吉田・京谷、1971、Yoshida・Yamanishi、1988)、交雑和合性(吉田、1975)、アイソザイム分析(青木、1972、土方、1983、氏家、1991)などにより行われ、実梅は大きく小梅、中梅、大梅、杏梅の4群に分類されてきた。また、豊後などの系統はアンズとの自然交雑により生じたのではないかとされており、実梅の中には交配育種によりアンズの形質がみられる品種がしばしばみられる。ウメは栽培の歴史が古く、形態的には識別が難しい同名異品種や異名同品種が存在し、育種を進める上で混乱を生じている。このため、品種の識別、同定が要求されるが、アイソザイム分析では、近縁な品種間の識別は困難である。Williamsら(1990)が開発したRAPD分析法は近縁な品種間においても十分なマーカーを供給するので、品種の識別が可能であると考えられる。また、実梅と花梅の類縁性、ウメとアンズの類縁性、台湾に分布するウメと日本で栽培されているウメとの類縁性に関する十分な知見は、これまで得られていない。そこで、RAPD分析法とPCR-RFLP法によりウメの品種識別と類縁関係を検討する。

材料及び方法

1).材料

果樹試験場千代田圃場で収集、保存している53品種、育成中のウメとアンズの種間雑種5系統、及び対照品種のアンズ2品種を採取した(Table 2-1-1)。代表的な品種の花、果実、核の形状をFig. 2-1-1に示した。

2).方法

材料の中から小梅群、中梅群、大梅群、杏梅群に属する品種を選び、対照品種を加え、それぞれの群について検討した。RAPD分析法は第1章第1節の方法に、また、PCR-RFLP法は第1章第3節の方法に従った。但し、PCR-RFLP分析では、Table 1-3-1に示す *Nla* III と *Sau* 3AIを除く10種類の酵素を使用した。

結 果

1).小梅・台湾梅品種群の分類

小梅及び台湾梅に属する12品種と、対照品種を4品種選び(Table 2-1-2)、36種類のプライマー(プライマー番号; 1, 2, 3, 4, 9, 14, 18, 21, 22, 23, 27, 41, 42, 43, 44, 45, 49, 55, 56, 64, 67, 68, 70, 77, 78, 81, 83, 85, 86, 88, 92, 182, 183, 184, 185, 187)を用いて分類を試みた。再現性のある60個のRAPDsが得られ、これらの品種間では最低で8個、最高で31個のRAPDsを検出し、全ての品種の識別が可能であった。クラスター分析によりデンドログラムをまた、数量化理論第3類により散布図を作成した(Fig.

2-1-2)。第1及び第2成分の寄与率は約40%であった。デンドログラムは、小梅と台湾梅の2グループに分類された、散布図も同様に小梅のクラスターと台湾梅のクラスターの2群が形成されていることが確認できた。対照品種の‘豊後’は両図においてもこれら2群と類似度が低かった。18の‘硬枝青梅’は散布図において‘豊後’と同様に2群と離れてプロットされた。

2). 中梅品種群の分類

中梅品種群では11品種と対照の5品種を選び(Table 2-1-3)、31種類のプライマー(プライマー番号; 1, 8, 16, 18, 21, 23, 24, 26, 27, 36, 43, 51, 52, 53, 60, 61, 64, 65, 67, 76, 77, 85, 87, 88, 91, 94, 96, 183, 184, 185, 186)を用いて分析を行った。再現性のある48個のRAPDsが得られ、これらの品種間では最低で0個、最高で32個のRAPDを検出した。‘室谷’、‘稲積’、‘藤之梅’は相互の識別が不可能であった。クラスター分析によりデンドログラムを、また、数量化理論第3類により散布図を作成した(Fig. 2-1-3)。第1及び第2成分の寄与率は約42%で、小梅・台湾梅品種群と同程度であった。デンドログラムは大きく北陸地方のウメ品種群と和歌山県を中心としたウメ品種群の2群に分類された。しかし、これらの差は小さくなく、散布図においてはグループ間の識別は不可能であった。花梅である14の‘冬至’は他の品種と大きく離れてプロットされた。24の‘台湾野生梅’と14の‘冬至’などクラスター分析の結果と異なる傾向が見られた。

3). 大梅品種群の分類

大梅品種群では12品種と対照の4品種を選び(Tabel 2-1-4)、28種類のプライマー(プライマー番号; 9, 14, 21, 22, 44, 45, 46, 47, 48, 51, 52, 56, 58, 60, 68, 75, 76, 81, 83, 84, 91, 92, 94, 95, 96, 97, 184, 186)を用いて、分析を行った。再現性のある55個のRAPDsが得られ、これらの品種間では最低で0個、最高で38個のRAPDsを検出した(表16)。「古城」と「小向」、「鈴木白」と「太平」の品種間では相互の識別は不可能であったが、その他の品種については識別が可能であった。クラスター分析によりデンドログラムを、また、数量化理論第3類により散布図を作成した(Fig. 2-1-6)。第1及び第2成分の寄与率は約60%とかなり高い値を示した。デンドログラムは「古城」を代表とするグループと「花香実」を代表とするグループの2つのグループに分類された。散布図においても同様に2グループに分けることができ、「古城」のグループの類似性が高かった。対照品種である46の「高田梅」は両図において、クラスターを形成せず、これらのグループと類似性が低かった。

4). 杏梅品種群の分類

杏梅品種群について12品種と対照の4品種を選び(Table 2-1-5)、19種類のプライマー(プライマー番号; 5, 10, 21, 22, 41, 46, 47, 56, 60, 62, 68, 75, 79, 73, 84, 95, 91, 96, 93)を用いて分類を行った。再現性のある31個のRAPDsが得られ、これらの品種間では最低で0個、最高で21個のRAPDsを検出した。大梅品種群の分類結果と同様に「鈴木白」と「太平」の品種間では相互の識別は不可能であった。その他の品種・系統については全て識別が可能であった。アンズとウメの種間交雑種であるAM系統は雑種第1代において相互の識別が可能であった。クラスター分析によりデンドログラムを、また、数

量化理論第3類により散布図を作成した(Fig. 2-1-7)。第1及び第2成分の寄与率は約49%と小梅、中梅群より少し高い値を示した。デンドログラムは豊後系統のグループとアンズ系ウメのグループの2つのグループに分類された。散布図においては、49と50の‘豊後’2系統と人工交雑種AM系統がクラスターを組み、これを中心に他の系統がプロットされた。‘麦黄準杏’が‘地藏梅’の近傍にプロットされた。

5)葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析

葉緑体DNAにコードされるpsbA、rbcL-ORF106、atpB-rbcLの3種類の領域について10種類の制限酵素認識部位について調査したところ、全ての品種・系統間において全く変異が検出されなかった(Data not shown)。

考 察

1).小梅・台湾梅品種群の分類

小梅・台湾梅品種は日本の小梅品種と台湾の品種に大別された。両者は比較的形態的に類似しているため、近縁であると予想されたが、結果は異なり、相互の類似性は低かった。このため、日本のウメは台湾のウメとは交雑することなく発達したのではないかと推察した。また、対照品種の‘豊後’はこれら両グループと類似性が極めて低くかったが、これは小梅はアンズの形質の移入を受けず、純粋なウメであるという報告(吉田・京谷、1971)を支持するものと考えられた。デンドログラムでは台湾梅のクラスターに属していた18の‘硬枝青梅’は散布図において両クラスターと離れてプロットされた。第1及び第2成分の寄与率が約40%であったため、2次元配置の散布図に変換する際、データ欠如、あるいは歪みにより、これらの差が生じたのではないかと推察した。

2).中梅品種群の分類

相互に識別できなかった‘室谷’、‘稻積’、‘藤之梅’は形態的にも非常に類似しており、DNAの増幅バンドパターンも相同であったことから、これらは、異名同品種の可能性が高いと考えられた。デンドログラムは大きく北陸地方のウメ品種群と和歌山県を中心としたウメ品種群の2群に分類されたが、これらのクラスター間の差異は少なく、変異が連続しているように考えられた。これらの品種群は改良品種が含まれ、変異の不連続性がないものと推察された。花梅である14の‘冬至’は他の品種と大きく離れてプロットされた。24の‘台湾野生梅’や14の‘冬至’などクラスター分析の結果と異なる傾向が見られたが、これらは前述のようにデータ欠如、あるいは歪みにより、生じたのではないかと推察した。‘冬至’を除く他の花梅はそれぞれ別々に実梅とクラスターを組んでいるので、ウメの栽培歴史を考慮すると、両者は類縁性が高く、花梅から生じた実梅が多く存在しているのではないかと推察した。

3).大梅品種群の分類

中梅品種群と同様に‘古城’と‘小向’、‘鈴木白’と‘太平’の品種間では相互の識別は不可能であった。これらは、形態的に相互の識別が困難であり、異名同品種の可能性が高いと考えられた。その他の品種については相互の識別が可能であった。第1及び第2成分の寄与率は約60%と高く、外的基準をもたないRAPD分析のデータにおいては、かなり信頼性の高い散布図であると考えられた。デンドログラムでは‘古城’を代

表とするグループは類似性が比較的高く、花梅である‘花香実’はこれらの品種と異なった。対照品種である46の‘高田梅’は大きく大梅品種群と異なった。‘高田梅’はFig. 2-1-7のデンドログラムでアンズとクラスターを組んでいることからこの非類似度の高さが推定される。

4). 杏梅品種群の分類

異なるPCR反応で実験を行ったが、‘鈴木白’と‘太平’の品種間では大梅品種群の結果と同様に相互の識別は不可能であった。その他の品種・系統については全て識別が可能であった。特に、雑種第1代である、アンズとウメの種間交雑種であるAM系統において相互の識別が可能であったことから、RAPD分析法の識別能力と、F₁で分離が頻繁にみられるウメのゲノムのヘテロ接合性の高さが確認できた。クラスター分析によりデンドログラムを、また、数量化理論第3類により散布図を作成した結果、供試した‘豊後’2系統は類似性が高く、人工交雑種AM系統と非常に近いクラスターを形成したことから、豊後がウメとアンズの自然交雑種である説を証明するものと考えられた。‘麦黄準杏’が‘地蔵梅’の近傍にプロットされたがこれらは、前述のようにデータ欠如、あるいは歪みにより、生じたのではないかと推察した。

5) 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析

種内、種間ともに、RFLPが検出できなかつた。これらの品種・系統は非常に近縁で、得られた結果は予想通りのものであった。rbcL-ORF106遺伝子間領域は非常に変異が高い領域と報告されているが(Arnoldら、1991)、このように、種内変異を調査するには、種内変異が多いとされるミトコンドリア特定領域を調査するか、あるいはLong PCRにより増幅したより長い領域を調査する必要があると考えられた。

以上のように、異名同品種の可能性が高いと考えられる品種以外については全て識別が可能であった。アイソザイム分析で識別できなかつた品種についてもRAPD分析では識別ができた。RAPD分析はプライマーの塩基配列を変えるだけで、容易に異なるDNA多型を供給することができるので、酵素ごとに染色法を変える必要があるアイソザイム分析法よりも簡便に分析が行えると考えられる。このため、ウメの品種識別にRAPD分析法が有効であると考えられた。RAPD分析で得られた多型の中身について塩基配列を決定してホモロジー検索をしなければ、由来不明なままであるが、カンキツでは、識別マーカーのうち、偶然にレトロポゾンが座乗していることが明らかにされている例もある(大村ら、1995)。このように、有用と考えられるマーカーについて、塩基配列を決定し、STS化を図れば、連鎖解析や品種同定などの遺伝子診断に有効なマーカーを供給できると思われる。

ウメとアンズは比較的近縁で、ゲノムの類似性においても小梅から杏梅と変異が連続していると考えられる。また、花梅と実梅は比較的近縁で、諸特性から見て中梅品種群、大梅品種群、杏梅品種群のいずれかに属するものと思われる。以上の分類結果を考慮すると、実梅は以下の7つの品種群に分類された。1)台湾梅品種群、2)小梅品種群、3)中梅品種群、4)大梅品種群(白花)、5)大梅品種群(紅花)、6)杏梅品種群、7)李梅品種群。ウメは同亜属のスモモ、アンズと遺伝的に近縁で李梅や豊後などの自然交雑種と考えられている系統が存在している。特に、アンズとウメは近縁であり、現在のウメの品種は

アンズの遺伝的影響を受けているものが少なくないと思われる。

摘 要

供試材料のウメをあらかじめ4品種群に大別し、品種群ごとに分類を行った。小梅からアンズ系のウメに近づくとともに遺伝的多様性が増し、品種群のゲノムの類似性が低下した。台湾系のウメは小梅、中梅、アンズ系のウメと遺伝的に遠縁で現在の日本のウメは独自の発達体系を有するものと考えられた。‘室谷’、‘稻積’と‘藤之梅’、古城’と‘小向’、‘鈴木白’と‘太平’の品種間ではDNA多型は検出できず、これらの品種は形態的特性も極めて類似していることから、異名同品種ではないかと推察された。花梅は実梅と遺伝的特性は近いと考えられ、諸特性から見て中梅品種群、大梅品種群、杏梅品種群のいずれかに属するものと思われる。葉緑体DNAにコードされる psbA、rbcL-ORF106、atpB-rbcLの3種類の領域について12種類の制限酵素認識部位について調査した。全ての品種・系統間において全く変異が検出できず、これらの領域の保存性は高いものと推察された。以上の分類結果を考慮すると、実梅は以下の7つの品種群に分類された。1)台湾梅品種群、2)小梅品種群、3)中梅品種群、4)大梅品種群(白花)、5)大梅品種群(紅花)、6)杏梅品種群、7)李梅品種群。ウメは同亜属のスモモ、アンズと遺伝的に近縁で李梅や豊後などの自然交雑種と考えられている系統が存在している。特に、アンズとウメは近縁であり、現在のウメの品種はアンズの遺伝的影響を受けているものが少なくないと思われる。

Table 2-1-1. Mume varieties for RAPD and PCR-RFLP analyses

Code	Varieties	Species		Origin
1	Nankou	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Wakayama
2	Sumomoume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Wakayama
3	Gojirou	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Wakayama
4	Rinshiu	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
5	Riukyoukoume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Nagano
6	Benisashi	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Fukui
7	Oushuku	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
8	Kensaki	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Fukui
9	Benisashi × Riukyoukoume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Fukui
10	Orihime	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Saitama
11	Koume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
12	Koushiushinkou	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Nara
13	Koushiusaishou	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Nara
14	Tamaume × Koushiusaishou	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	FTRS
15	Tamaume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Nara
16	Koushiuoujiku	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Nara
17	Bungo(single) × Koushiuoujiku	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	FTRS
18	Ying-zhi-qin-mei	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Taiwan
19	Ruan-zhi-qin-mei	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Taiwan
20	Yian-zhi-mei	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Taiwan
21	Taiwan ume 86061	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Taiwan
22	Taiwan ume 86060	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Taiwan
23	Qing-gong-mei	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Taiwan
24	Taiwan yasei ume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Taiwan
25	Yakushi ume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Wakayama
26	Kairyuu uchida ume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Wakayama
27	Jizou ume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Wakayama
28	Muroya	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Toyama
29	Touno ume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Ishikawa
30	Inazumi	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Toyama
31	Jiurou	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Kanagawa
32	Naniwa	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
33	Issunbal	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
34	Touji	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
35	Kankoubal	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
36	Koubai	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
37	Shirokaga	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
38	Balgou	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Tokyo
39	Gyokuei	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Tokyo
40	Sugita	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Kanagawa
41	Natsuka	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Aichi
42	Shimosukeume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
43	Komukai	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
44	Yourou	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Wakayama
45	Hanakami	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
46	Takadaume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
47	Shirokaga	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Tokyo
48	Taihei	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
49	Bungo(single)	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
50	Bungo(double)	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Unkown
51	Selyoubal	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Hokkaido
52	Ishikawa oumume	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Ishikawa
53	Suzukishiro	<i>P. mume</i>	Sieb. et Zucc.	Tokyo
54	AM2-1	<i>P. armeniaca</i>	× <i>mume</i>	FTRS
55	AM2-2	<i>P. armeniaca</i>	× <i>mume</i>	FTRS
56	AM2-4	<i>P. armeniaca</i>	× <i>mume</i>	FTRS
57	AM4-3	<i>P. armeniaca</i>	× <i>mume</i>	FTRS
58	MA1-2	<i>P. mume</i>	× <i>armeniaca</i>	FTRS
59	Mal-huang-zhuan-xing	<i>P. armeniaca</i>		
60	Heiwa	<i>P. armeniaca</i>		

AM2-1,2,4: Heiwa × Jizou ume

AM4-3: Mal-huang-zhuan-xing × Jizou ume

MA1-2: Shirokaga × Heiwa

FTRS: Fruit Tree Research Station

A-1



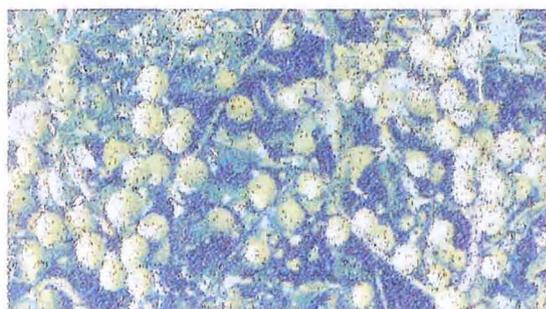
A-2



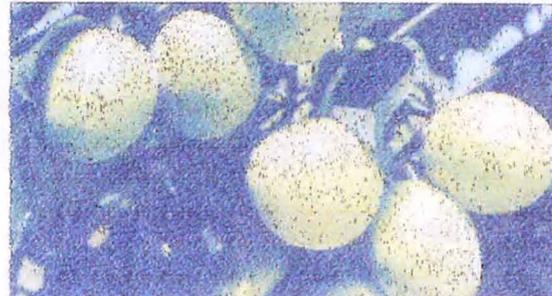
A-3



B-1



B-2



C-1

C-2

C-3

C-4

C-5

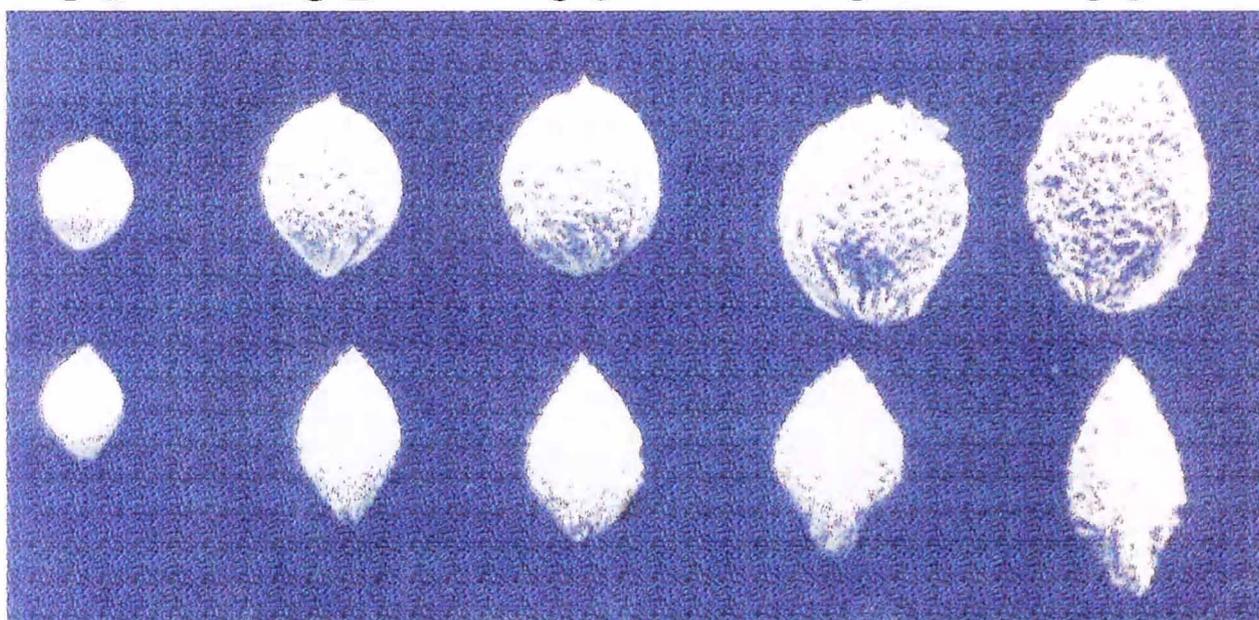


Fig. 1-1-1. Flowers and fruits of representative mume cultivars. A-1 : 'Riukyoukoume' A-2 : 'Kankoubai', A-3 : 'Bungo', B-1 : 'Riukyoukoume', B-2 : 'Nankou'. Stone shapes of small fruit mume (C-1), medium fruit mume (C-2 and C-3), Large fruit mume (C-4), and apricot -mume hybrid (C-5).

M 10 5 11 12 13 14 15 16 17 49 18 19 20 21 22 23

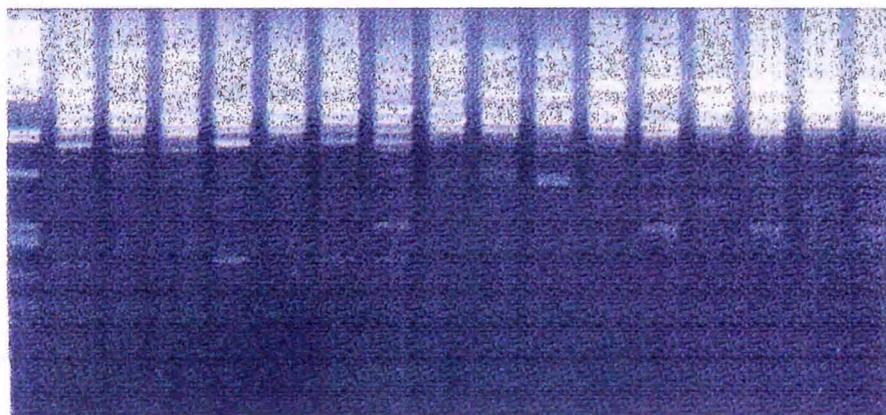


Fig. 2-1-2. DNA fingerprint amplified from genomic DNA of small fruit mumes and Taiwan mumes by primer 21. M indicates *Pst* I digested lambda DNA.

M 1 25 26 27 8 28 29 30 6 31 32 33 24 34 35 36

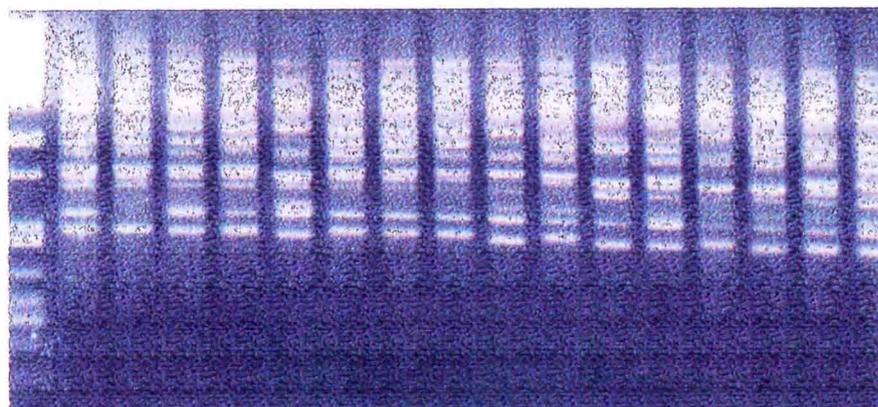


Fig. 2-1-3. DNA fingerprint amplified from genomic DNA of medium fruit mumes by primer 9. M indicates *Pst* I digested lambda DNA.

Table2-1-2. Dissimilarity index among "small fruit mume" group

No.	Cultivar name	10	5	11	12	13	14	15	16	17	49	18	19	20	21	22	23
10	Orihime		.27	.30	.30	.27	.26	.35	.27	.37	.35	.38	.38	.43	.43	.38	.42
5	Riukyoukoume			.27	.23	.22	.30	.38	.27	.37	.38	.40	.37	.40	.43	.28	.35
11	Koume				.27	.15	.37	.35	.27	.30	.35	.43	.43	.47	.47	.42	.45
12	Koushiushinkou					.15	.27	.35	.27	.30	.48	.43	.40	.40	.37	.38	.42
13	Koushiusaishou						.28	.40	.18	.32	.37	.42	.45	.45	.42	.37	.47
14	Tamaume × Koushiusaishou*							.15	.27	.37	.38	.37	.33	.40	.33	.38	.35
15	Tamaume*								.38	.42	.37	.35	.35	.42	.35	.43	.37
16	Koushiuoujiku									.23	.38	.40	.40	.47	.37	.42	.42
17	Bungo × Koushiuoujiku*										.25	.50	.47	.47	.47	.45	.45
49	Bungo (single)*											.48	.45	.52	.52	.50	.50
18	Ying-zhi-qin-mei					Average		.35					.22	.27	.17	.22	.18
19	Ruan-zhi-qin-mei					Max.		.52						.23	.23	.25	.18
20	Yian-zhi-mei					Min.		.13							.33	.25	.25
21	Taiwan ume 86061															.28	.28
22	Taiwan ume 86060																.13
23	Qing-gong-mei																

* : Control cultivar

Table2-1-3. Dissimilarity index among "medium fruit mume" group

No.	Cultivar name	1	25	26	27	8	28	29	30	6	31	32	33	24	34	35	36
1	Nankou		.23	.23	.10	.25	.33	.33	.33	.25	.33	.31	.27	.52	.35	.29	.29
25	Yakushiume			.33	.25	.27	.31	.31	.31	.23	.35	.42	.29	.46	.33	.31	.31
26	Kaiyouuchidaume				.21	.27	.40	.40	.40	.27	.31	.25	.25	.58	.38	.31	.35
27	Jizoume					.21	.35	.35	.35	.27	.27	.29	.25	.54	.25	.27	.23
8	Kensaki						.25	.25	.25	.17	.33	.19	.31	.48	.29	.29	.33
28	Muroya							.00	.00	.25	.29	.31	.27	.52	.35	.29	.42
29	Tounoume								.00	.25	.29	.31	.27	.52	.35	.29	.42
30	Inazumi									.25	.29	.31	.27	.52	.35	.29	.42
6	Benisashi		Average			.32					.31	.23	.27	.52	.35	.33	.29
31	Jiurou		Max.			.67						.35	.31	.48	.27	.29	.33
32	Naniwa		Min.			.00							.38	.50	.29	.31	.40
33	Issumbai*(F)													.67	.38	.31	.27
24	Taiwan yasei ume*														.54	.60	.52
34	Touji*(F)															.19	.31
35	Kankoubai*(F)																.29
36	Koubai*(F)																

* : Control cultivar

(F) : Flowering mume

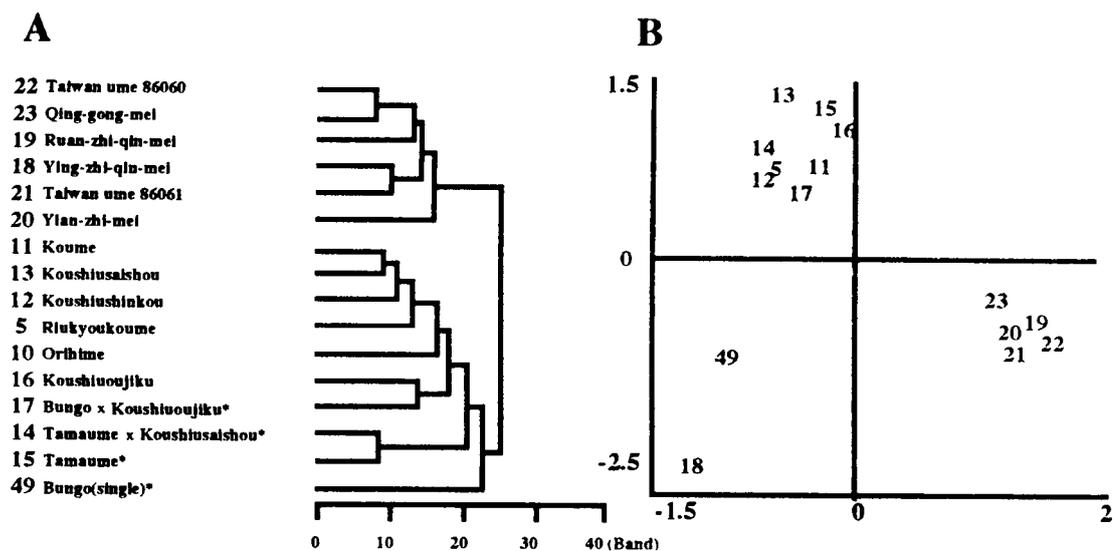


Fig. 2-1-4. Dendrogram (A) and scattergram (B) of small fruit ume.

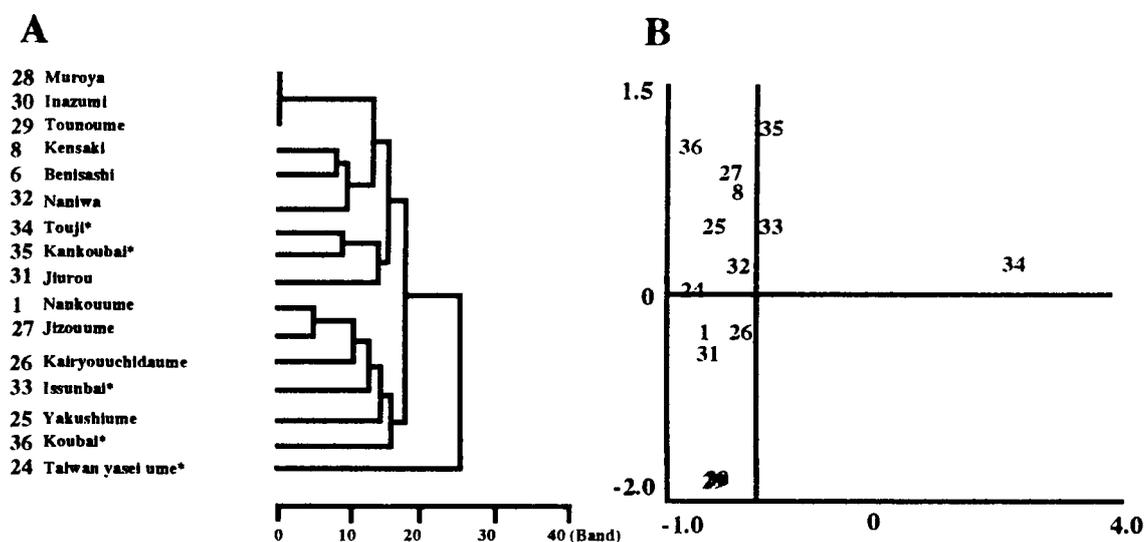


Fig. 2-1-5. Dendrogram (A) and scattergram (B) of medium fruit ume.

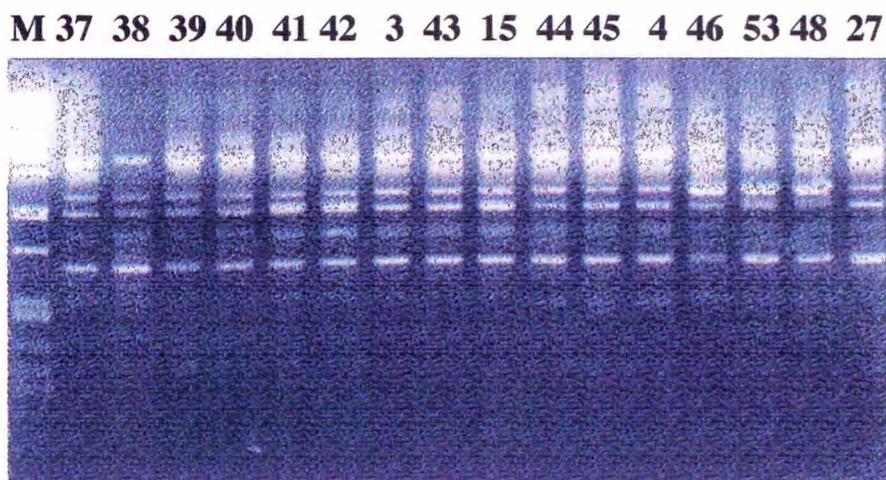


Fig. 2-1-4. DNA fingerprint amplified from genomic DNA of large fruit mumes by primer 21. M indicates *Pst* I digested lambda DNA.

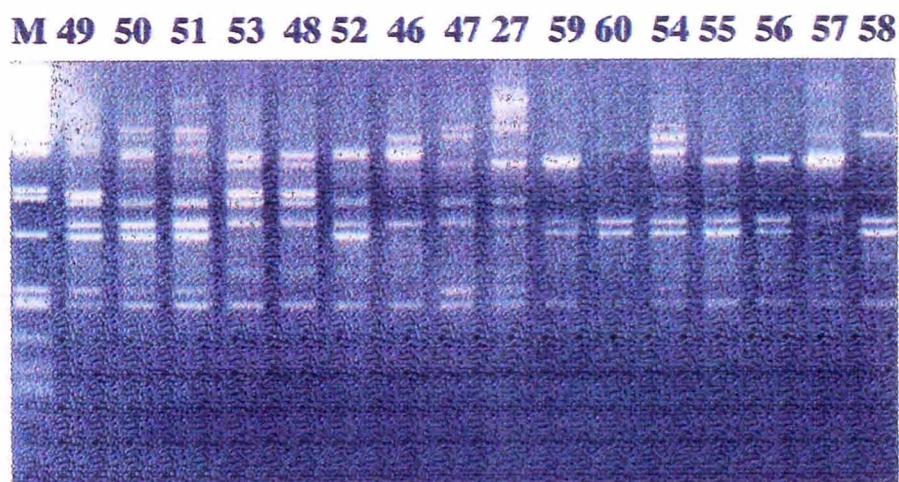


Fig. 2-1-5. DNA fingerprint amplified from genomic DNA of apricot-mume hybrids by primer 22. M indicates *Pst* I digested lambda DNA.

Table2-1-4. Dissimilarity index among "large fruit mume" group

No.	Cultivar name	37	38	39	40	41	42	3	43	15	44	45	4	46	53	48	27
37	Shirokaga (W)	.18	.04	.16	.24	.22	.02	.02	.18	.33	.25	.29	.62	.29	.29	.33	
38	Baigou (W)		.18	.20	.20	.18	.16	.16	.18	.33	.22	.25	.65	.18	.18	.36	
39	Gyokuei (W)			.16	.20	.22	.05	.05	.18	.36	.25	.29	.62	.25	.25	.33	
40	Sugita (W)				.29	.27	.15	.15	.24	.35	.20	.27	.60	.27	.27	.27	
41	Natsuka (W)					.02	.22	.22	.16	.35	.35	.35	.56	.27	.27	.35	
42	Shimosukeume (W)						.20	.20	.18	.33	.33	.33	.58	.29	.29	.33	
3	Gojirou (W)							.00	.16	.35	.24	.31	.60	.27	.27	.35	
43	Komukai (W)								.16	.35	.24	.31	.60	.27	.27	.35	
15	Tamaume (W)		Average	.31						.36	.33	.36	.58	.25	.25	.44	
44	Yourou (P)		Max.	.69							.22	.22	.69	.36	.36	.22	
45	Hanakami (P)		Min.	.00								.15	.69	.29	.29	.22	
4	Rinshu (P)												.65	.29	.29	.18	
46	Takadaume*(P)													.62	.62	.64	
53	Suzukishiro*(W)														.00	.44	
48	Taihei*(W)																.44
27	Jizouume*(W)																

* : Control cultivar

(W) : White flower

(P) : Pink flower

Table 2-1-5. Dissimilarity index among "mume-apricot hybrid" group

No.	Cultivar name	49	50	51	53	48	52	46	47	27	59	60	54	55	56	57	58
49	Bungo (single)	.16	.13	.45	.45	.19	.48	.32	.39	.35	.42	.26	.32	.26	.39	.48	
50	Bungo (double)		.23	.35	.35	.10	.39	.42	.35	.39	.45	.10	.16	.23	.42	.39	
51	Seiyoubai			.52	.52	.32	.35	.39	.39	.29	.35	.32	.39	.32	.39	.48	
53	Suzukishiro				.00	.32	.48	.26	.32	.55	.55	.32	.26	.32	.52	.42	
48	Taihei					.32	.48	.26	.32	.55	.55	.32	.26	.32	.52	.42	
52	Ishikawaoumume						.35	.45	.45	.42	.42	.19	.19	.26	.52	.35	
46	Takadaume							.61	.55	.32	.32	.42	.42	.45	.61	.39	
47	Shirokaga*								.13	.61	.68	.39	.39	.32	.45	.68	
27	Jizouume*		Average	.38						.68	.68	.32	.39	.39	.45	.68	
59	Mai-huang-zhuan-xing*		Max.	.68						.26	.42	.35	.35	.42	.32		
60	Heiwa*		Min.	.00							.42	.42	.42	.61	.19		
54	AM2-1												.06	.13	.39	.35	
55	AM2-2													.06	.39	.35	
56	AM2-4														.32	.35	
57	AM4-3															.55	
58	MA1-2																

* : Control cultivar

AM2-1,2,4 : Jizouume × Heiwa

AM4-3 : Mai-huang-zhuan-xing × Jizouume

MA1-2 : Shirokaga × Heiwa

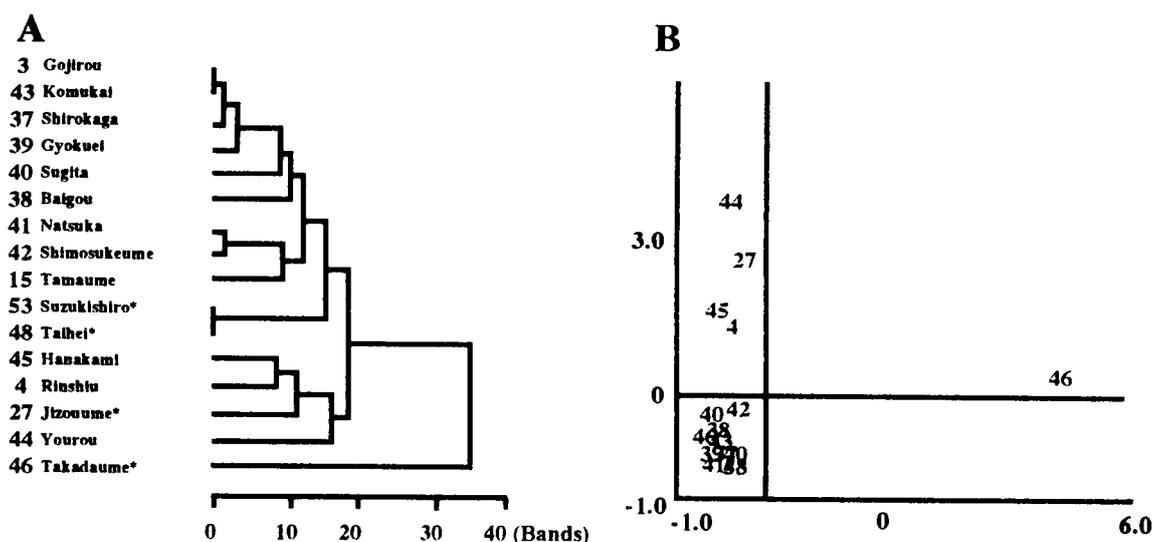


Fig. 2-1-6. Dendrogram (A) and scattergram (B) of large fruit mume.

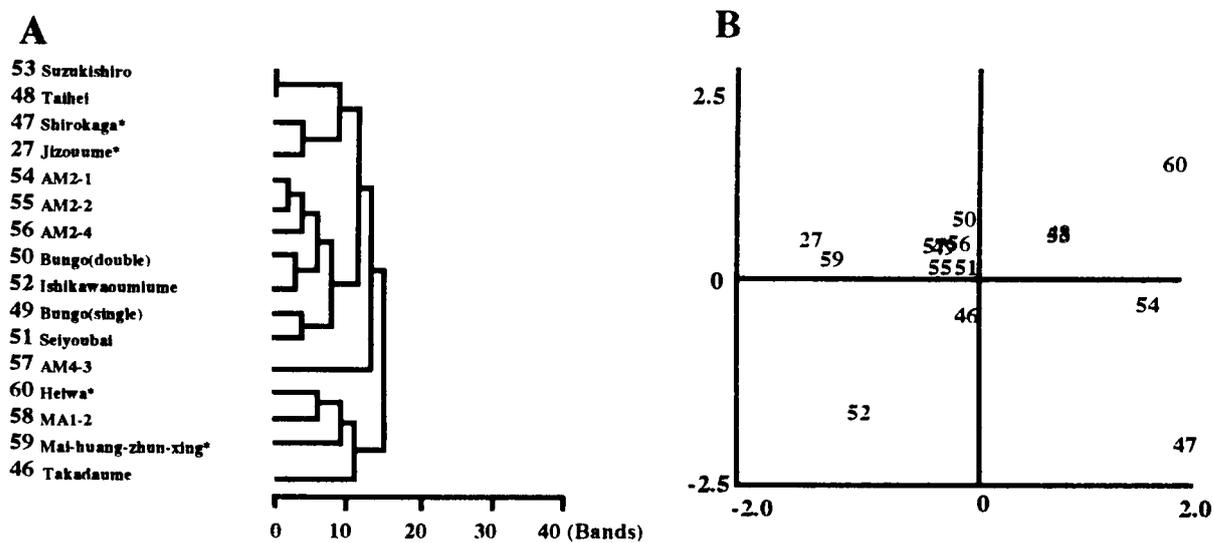


Fig. 2-1-7. Dendrogram (A) and scattergram (B) of apricot-mume hybrids.

第2節 アンズの系統分類

目的

アンズは *P. armeniaca* L. を中心に、近縁種の *P. mandshurica* Koehne、*P. sibirica* L.、及び *P. brigantina* Vill. などの種から構成されている。主に *P. armeniaca* L. が栽培品種として利用され、ユーラシア大陸に広く分布している。また、*P. mandshurica* Koehne、*P. sibirica* L.、及び *P. brigantina* Vill. などの近縁野生種は耐寒性、耐病性をもつため、育種素材として着目されている(Bailey・Hough、1975)。これまで菊池(1948)、Bailey・Hough(1975)、及びYoshida・Yamanishi(1988)などは形態的、生態的特性によりアンズの分類を行ってきた。Bailey・Hough(1975)は花色、開花時期などの差異から、大きくヨーロッパアンズと中国東部のアンズに分け、それぞれ、*P. armeniaca* と *P. ansu* に大別し、さらにヨーロッパ、中央アジア、中国北部、イラン・コーカサス、ズンガル・ザイリ、中国東部などの6つの生態型に分類している。日本アンズはこの東中国のグループに属し、その分布地域はウメと隣接しているため、発達過程においてウメの遺伝子移入があったと考えられる品種が多くみられる。このため、田中(1936)、麓(1972)、吉田ら(1971)、青木ら(1972)は、ウメとアンズの類縁関係を形態的特性やアイソザイム分析で調査し、ウメ系アンズ、アンズ系ウメの存在を示している。しかしながら、これらの方法では品種レベルでの識別は困難で、非常に近縁なこれら品種の類縁関係を明らかにできない。そこで、RAPD分析法と葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法により、アンズと近縁野生種を中心に遺伝的変異を調査し、これまで分類されてきたアンズとこれら品種・系統の類縁性を検討する。

材料及び方法

1). 材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場で収集、保存されているアンズ35品種・系統を供試した(Table 2-2-1)。代表的な特性の形態をFig. 2-2-1に示した。

2). 方法

RAPD分析法は第1章第1節の方法に、また、PCR-RFLP法は第1章第3節の方法に従い、アンズの系統分類を行った。但し、PCR-RFLP分析では、Table 1-3-1に示す *Nla* III と *Sau* 3AIを除く10種類の酵素を使用した。

結果

1). RAPD分析法によるアンズの系統分類

アンズの35品種・系統をRAPD分析法により、18種類のプライマー(プライマー番号；41, 42, 44, 46, 48, 59, 60, 68, 75, 77, 79, 89, 101, 120, 163, 165, 184, 211)を用いて分類を行った。各プライマーにより、RAPDパターンが異なり、品種・系統に特異的な増幅断片が見られた(Fig. 2-2-2)。18種類のプライマーによって再現性のある58本のRAPDsが得られた。最高で、'Goldcot' と 'アルハインプラム' (*P. brigantina*) 間、

‘梅桃杏’と‘アルパインプラム’間、‘信州大実’と‘アルパインプラム’間でそれぞれ38本のRAPDsが検出され、特に‘アルパインプラム’と‘山杏’(*Siberian apricot*; *P. sibirica*)は他のアンズと類似性が低かった(Table 2-2-2)。「Hajihaliloulou」と‘Hasanbay’では異なるバンドを検出することができなかった。これらのRAPDsの非共有バンドの距離行列をもとに、クラスター分析によりデンドログラムを作成した(Fig. 2-2-3)。デンドログラムは主に中国西部からヨーロッパに分布している系統で構成される“西方グループ”と、日本と中国東部に栽培されているアンズ品種によって構成される“東方グループ”の2群に大別された。‘アルパインプラム’、‘山杏’、‘仁杏’(Ren-xing)、‘白杏’(Bai-xing)の4つの系統はこの2グループとクラスターを形成せず、他のアンズと類似性が低かった。“西方グループ”は、‘Hajihaliloulou’、‘Hasanbay’、‘Tilton’、‘Blenheim’、‘Early Orange’、‘Alexander’などのヨーロッパアンズと中国西部に分布する‘麦黄準杏’、ヒマラヤ西部で採取したネパールアンズの2系統から構成されていた。“東方グループ”は、本実験に供試した全ての日本アンズと中国アンズの‘梅桃杏’と‘李小杏’から構成されていた。両グループにおいて、低次でのクラスタリングしているものは形態的に類似している品種間で行われていると考えられた。供試した中国アンズ4品種は、別々に“西方グループ”と“東方グループ”に分類され、相互の類似性は低かった。

クラスター分析では、高次でクラスターを形成したグループ間の類縁関係が不明確であったため、数量化理論第3類により、第一成分、第二成分をもとに二次元配置で散布図を作成した。第1及び第2成分の寄与率は約40%であったが、デンドログラムと類似した結果が得られた。散布図でも同様に供試材料は大きく2グループに分類でき、‘アルパインプラム’、‘山杏’、‘仁杏’、‘白杏’の4つの系統はこの2つのグループと離れてプロットされた。相互の類似性は低く、中国アンズは相互の類似性が低く、それぞれ別々のグループにプロットされた。

2). 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によるアンズの系統分類

葉緑体DNAにコードされるpsbA、rbcL-ORF106、atpB-rbcLの3種類の領域について12種類の制限酵素認識部位について調査したところ、atpB-rbcL遺伝子間領域のHinf Iの認識部位で‘アルパインプラム’に変異がみられ、また、psbA遺伝子領域のRsa Iの認識部位で‘山杏’に変異がみられた(Fig. 2-2-5、及びFig. 2-2-6)。これらの多型は種間で得られたものだけで、3種類の領域と制限酵素の組み合わせでは、他の供試材料が全て相同なバンドパターンを示し、*P. armeniaca*の種内変異は認められなかった。

考 察

1). RAPD分析法によるアンズの系統分類

本実験で検出されたRAPDsは野生種と栽培種との間で検出されたものが多く、栽培品種内ではDNA多型の出現頻度はあまり高くなかった。トルコの栽培品種の‘Hajihaliloulou’と‘Hasanbay’は形態的特性も非常に類似しており、また18種類のプライマーで得られたRAPDパターンは全て相同であった。これらの品種はウメと同様に

異名同品種の可能性が高く、さらに多くのプライマーを用いて検討する必要がある。これら2品種を除く他の系統については相互の識別が可能であり、アンズの品種識別においてRAPD分析法が有効であると推察された。

供試材料は“西方グループ”と“東方グループ”の2群に大別でき、構成している品種の地理的分布と一致した。BaileyとHough(1975)らはアンズを6つのグループに分類したが、DNAレベルではこのような分類を行えるほどの明確な差異は認められなかった。菊池(1948)は中国に分布するアンズは形態的に変異が大きく、アンズの原因は中国であると述べており、DNAレベルにおいても、中国アンズの変異の大きさは認められた。

‘仁杏’は1房当たりの花数が2-3と形態的にアンズとスモモの種間雑種ではないかと推定される品種であり、また、‘山杏’は低木で果実は小さく、モウコアンズとも呼ばれる野生種で、これらの系統は、中国アンズの変異を拡大している原因と考えられた。以上のことから、アンズの原因は中国であるという説は否定できず、開花期や花色で分類されたヨーロッパアンズと中国東部のアンズは中国のアンズを考慮すると、それらの変異が連続しているものと推察された。日本のアンズにもヨーロッパアンズと類似しているものも存在し、有意な不連続性が認められなかったため、これらを*P. armeniaca*と*P. ansu*に分類する必要はないと考えられた。ByrneとLittleton(1989)はアイソザイム分析によりヨーロッパアンズは近交交配集団であり、イラン・コーカサスと中央アジアのアンズを異系交配集団と述べているが、中国西部を境界として分類した“西方グループ”と“東方グループ”それぞれのグループ内の類似度の差には有意性が認められなかった。しかしながら、‘仁杏’や‘小笠原’などスモモやウメとの種間雑種と考えられる品種・系統が多く存在し、東アジアのアンズは異系交配集団であると推察された。

2). 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によるアンズの系統分類

‘アルパインプラム’と‘山杏’に特異的なRFLPが得られたが、これらは全て種間で得られたもので、これらは系統進化学的に予期できるものであった。栽培アンズの葉緑体DNAは比較的高い保存性を持つと報告されている(Kaneko et al., 1986)。Uematsuらは(1991)‘山形3号’と‘Blenheim’の葉緑体DNAでRFLPを検出し、日本のアンズとヨーロッパのアンズでは分化がみられていると報告している。しかしながら、前述のように形態的特性や生態的特性に有意な不連続性は認められず、栽培アンズを*P. armeniaca*と*P. ansu*に分類するための十分な証拠となるデータであるとは考えられない。また、西方アンズと東方アンズは交雑和合性が高く、雑種後代の花粉の稔性も高いと報告されている(吉田ら、1975)ことから、あえて両者を別の種に分ける必要はない。

以上のことから、供試した35品種系統のアンズは大きく“西方グループ”と“東方グループ”の2グループに分類できた。近縁野生種の‘アルパインプラム’と‘山杏’はこれらと類縁性は低かった。中国アンズは遺伝的変異が大きいものと推察され、これはアンズの原因説を支持するものと考えられた。

摘 要

RAPD及び葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLPにより、日本アンズを中心に代表的な35品種・系統の系統分類を試みた。形態的に非常に類似した‘Hajihaliloulu’と‘Hasanbay’以外の品種・系統については相互の識別が可能であり、RAPD分析法がアンズの品種識別に有効であることが確かめられた。各品種間で検出されたRAPDsをもとにクラスター分析と数量化理論第三類を用いてデータの解析を行った。本実験で供試した*P. armeniaca*の品種・系統は中国西部からヨーロッパにかけて分布する“西方品種群”(A)と中国東部、日本などに分布する“東方品種群”(B)の2群に大別された。近縁野生種の*P. sibirica*と*P. brigantina*、中国の‘白杏’と‘仁杏’はこれらの群に属さなかった。中国の品種はA群及びB群の両方に属しており、遺伝的変異が大きいものと推察した。

葉緑体DNAにコードされるpsbA、rbcL-ORF106、atpB-rbcLの3種類の領域についてPCR-RFLP法によりアンズ35品種・系統の葉緑体DNAを調査した。*P. armeniaca*の種内変異は全く認められず、*P. armeniaca*と*P. brigantina*、及び*P. sibirica*との種間でDNA多型が検出された。これらは進化学的に予期できるもので、アンズの葉緑体DNAの保存性は高いと推察された。

Table 2-2-1. Apricot varieties for RAPD and PCR-RFLP analyses

Code	Varieties	Species	Origin
1	Siberian apricot	<i>P.sibirica</i>	China
2	Hajihaliloulu	<i>P.armeniaca</i>	Turkey
3	Hasanbay	<i>P.armeniaca</i>	Turkey
4	Tilton	<i>P.armeniaca</i>	Europe
5	Goldcot	<i>P.armeniaca</i>	USA
6	Blenheim	<i>P.armeniaca</i>	Europe
7	Harcot	<i>P.armeniaca</i>	Canada
8	Early Orange	<i>P.armeniaca</i>	Europe
9	Alexander	<i>P.armeniaca</i>	Russia
10	Mei-tao-xing	<i>P.armeniaca</i>	China
11	Hiroshima koanzu	<i>P.armeniaca</i>	Hiroshima
12	Mochi anzu	<i>P.armeniaca</i>	Hiroshima
13	Kyoudai maru	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
14	Mai-huang-zhun-xing	<i>P.armeniaca</i>	China
15	Bai-xing	<i>P.armeniaca</i>	China
16	Shimizugou	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
17	shinshiu oumi	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
18	Ren-xing	<i>P.armeniaca</i>	China
19	Koushiu oumi	<i>P.armeniaca</i>	Yamanashi
20	Niigata oumi	<i>P.armeniaca</i>	Nigata
21	Jinshirou	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
22	Heiwa	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
23	Yamagata 3	<i>P.armeniaca</i>	Yamagata
24	Ogasawara	<i>P.armeniaca</i>	Aomori
25	Akita oumi	<i>P.armeniaca</i>	Akita
26	Wase oumi	<i>P.armeniaca</i>	Akita
27	Li-zi-xing	<i>P.armeniaca</i>	China
28	Alpine plum	<i>P.brigantina</i>	Alpus
29	Mame-anzu	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
30	Takanomanjiu	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
31	Mikanmomo	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
32	Aomorisan anzu	<i>P.armeniaca</i>	Aomori
33	Nodokukuri	<i>P.armeniaca</i>	Nagano
34	Nepal apricot No.85247	<i>P.armeniaca</i>	Nepal
35	Nepal apricot No.85260	<i>P.armeniaca</i>	Nepal

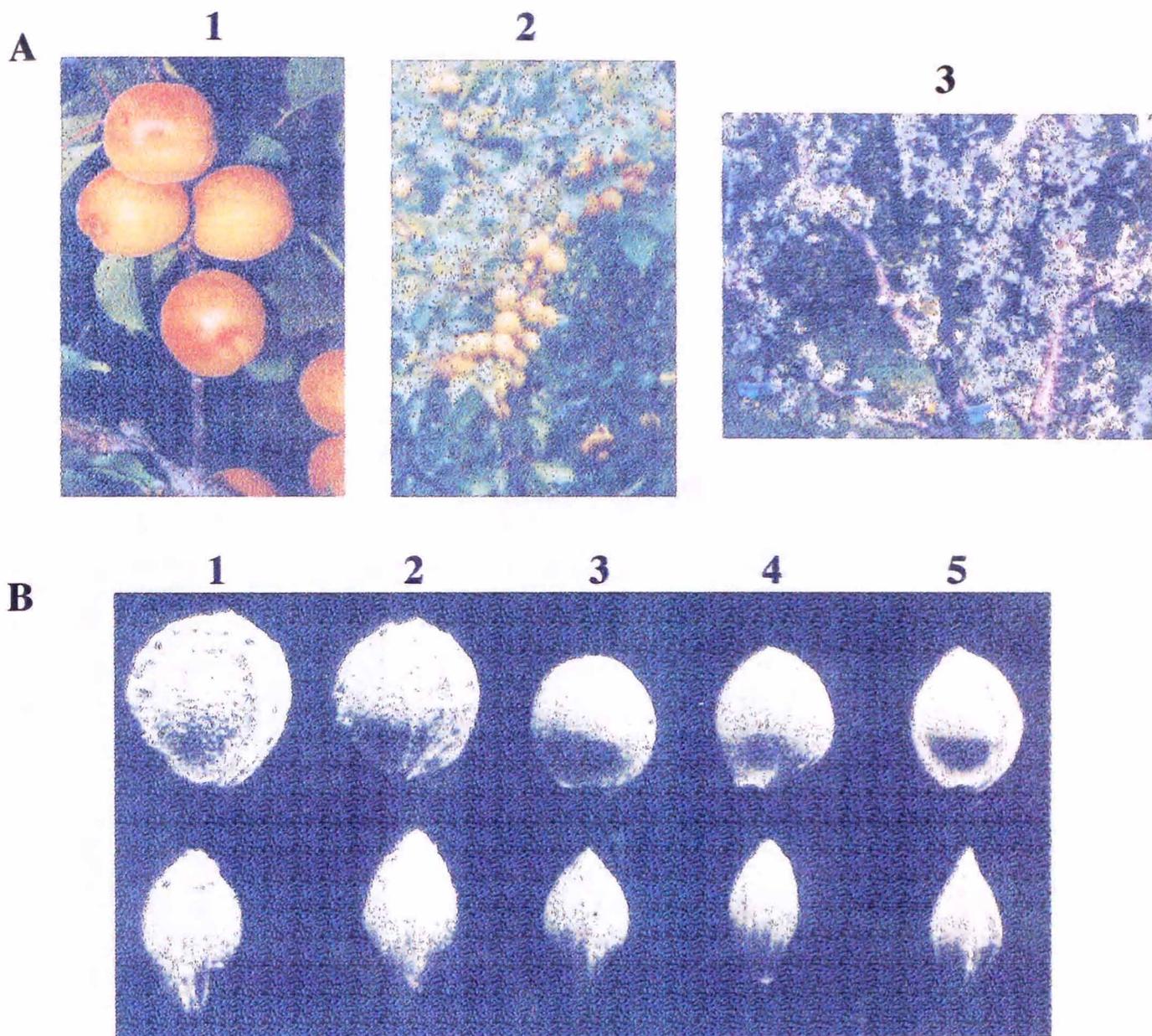


Fig. 2-2-1. Representative morphological characteristics of apricots. A indicated fruits and flower. 1 : fruits of Japanese apricot, 2 : fruits of European apricot and 3 : flower of European apricot. B indicated stone shapes. 1 : apricot-mume hybrid, 2 : Japanese apricot, 3 : Chinese apricot, 4 : hybrid apricot between Japanese and European, 5 : European apricot .

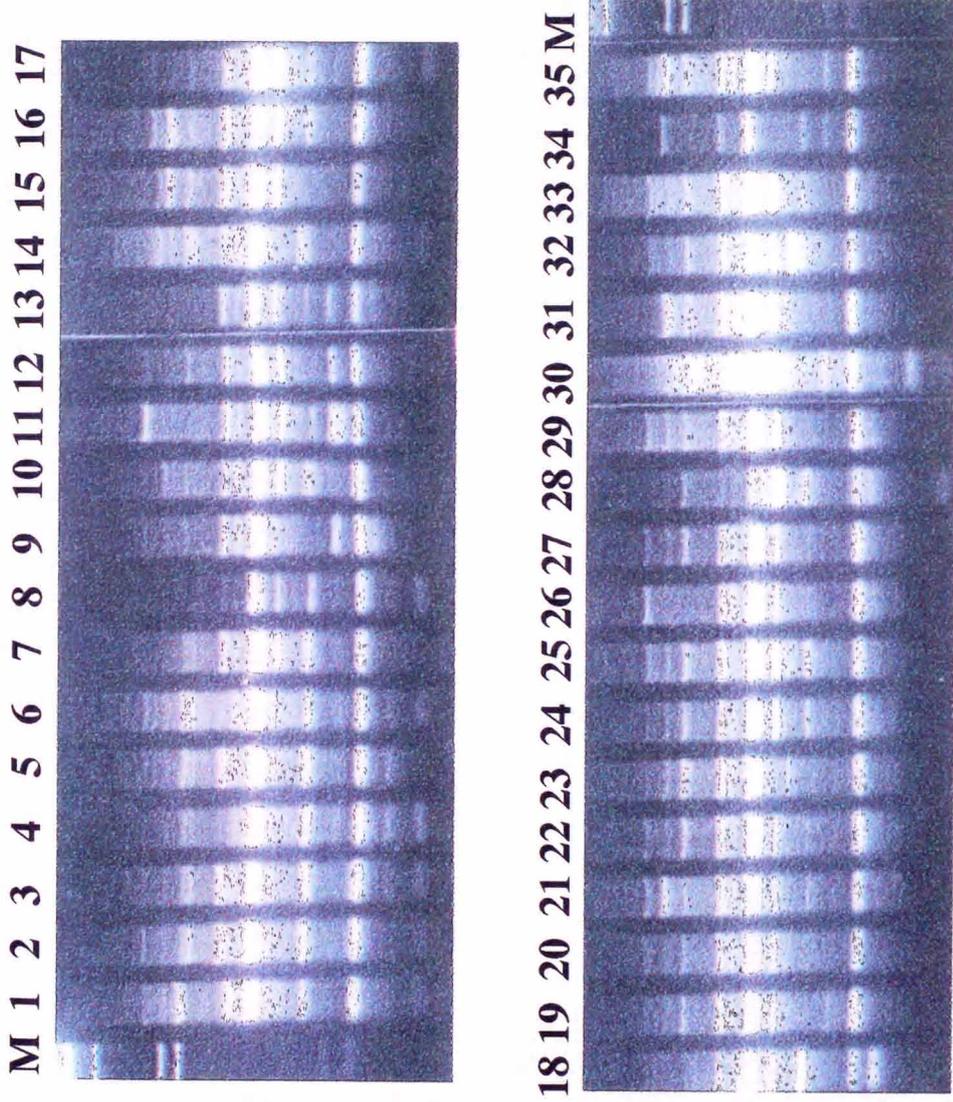


Fig. 2-2-2. RAPD patterns of 35 apricot varieties by primer 48. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

Table 2-2-2. Dissimilarity index between each pair of apricot varieties

Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35				
1 Siberian apricot	.45																																					
2 Hajhaltoeba	.00	.21																																				
3 Hasanbay		.21	.17																																			
4 Tiltou			.17	.05																																		
5 Goldcot				.22	.14																																	
6 Blehheim					.16	.24																																
7 Harcot						.16	.21																															
8 Early Orange							.16	.26																														
9 Alexander								.24																														
10 Mei-tao-xing									.12																													
11 Hiroshima koanzu										.05																												
12 Mochi anzu											.09																											
13 Kyoedal maru												.24																										
14 Mei-tuang-zhen-xing													.33																									
15 Bai-xing														.33																								
16 Shimizugou															.36																							
17 shinshite oumi																.19																						
18 Ren-xing																	.38																					
19 Koushite oumi																		.29																				
20 Niigata oumi																			.09																			
21 Jinshiro																				.14																		
22 Itewa																					.14																	
23 Yamagata 3																						.10																
24 Ogasawara																							.24															
25 Akita oumi																								.24														
26 Wase oumi																									.16													
27 Li-zi-xing																										.24												
28 Alpine plum																											.03											
29 Mame-anzu																																						
30 Takanomajju																																						
31 Mikannomo																																						
32 Aomorisau anzu																																						
33 Nodokukuri																																						
34 Nepal apricot No.85247																																						
35 Nepal apricot No.85260																																						

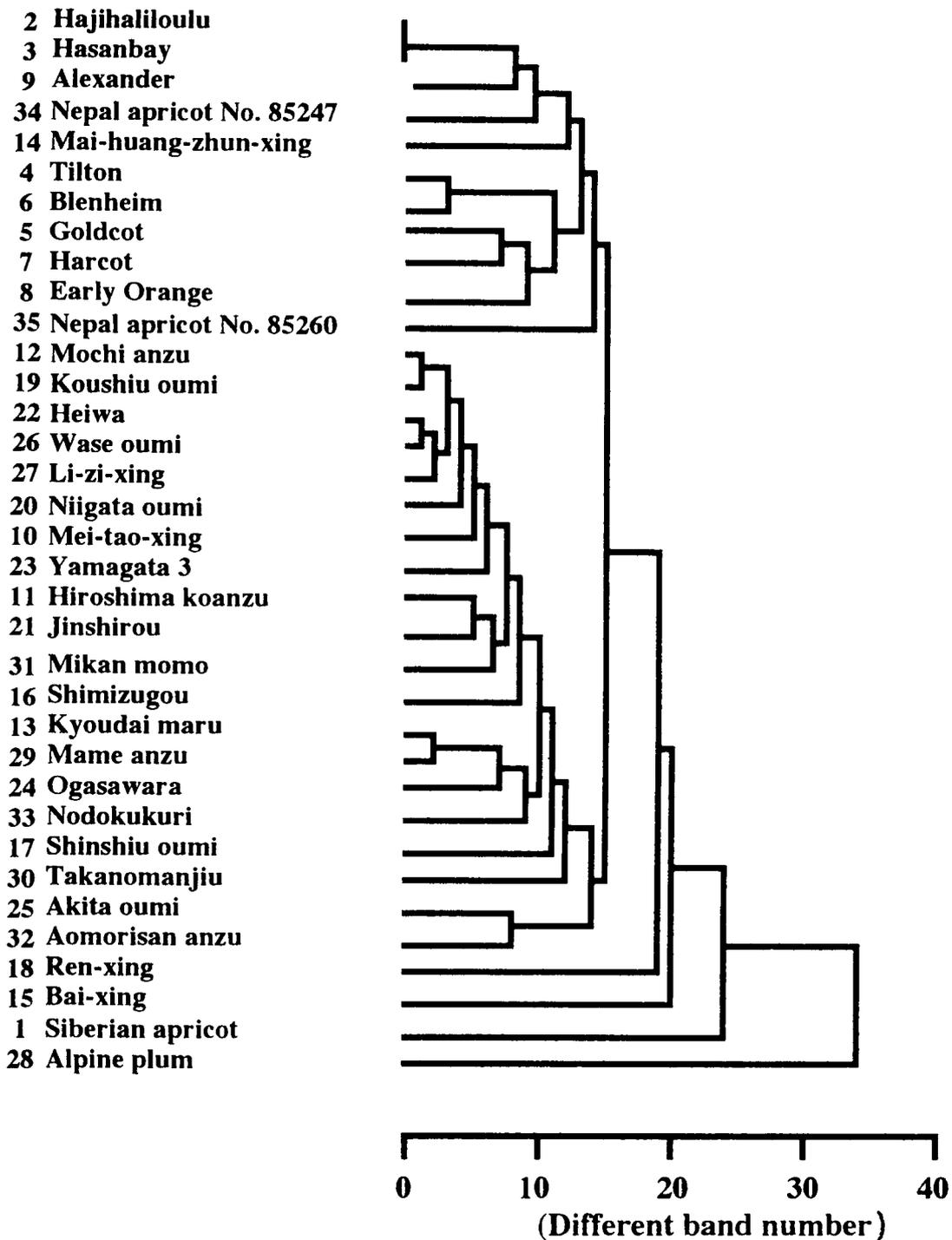


Fig. 2-2-3. Dendrogram of 35 apricot varieties by cluster analysis using group average method.

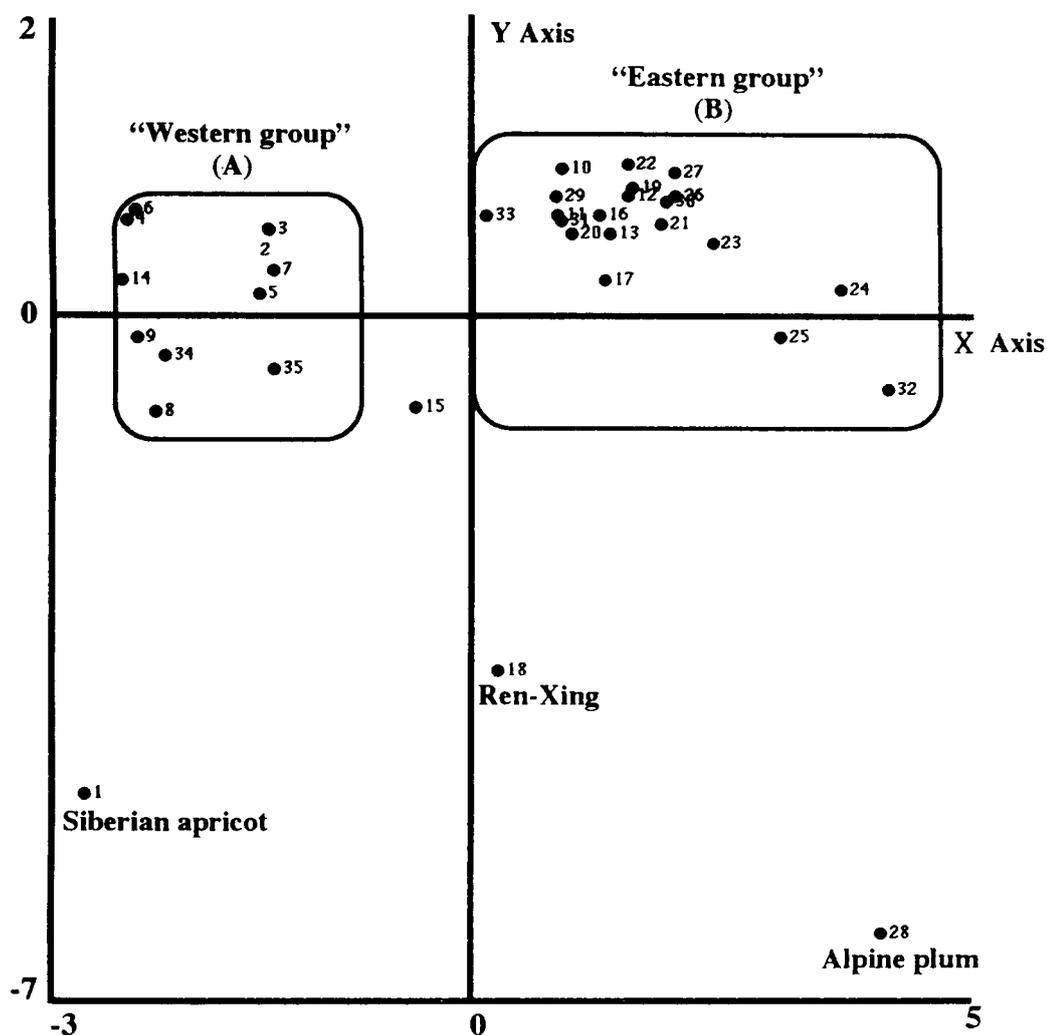


Fig. 2-2-4. Scattergram of 35 apricot varieties by quantification method of the third type. Every material plant was plotted according to each principal component score. X axis : first component, Y axis : second component.

M1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35

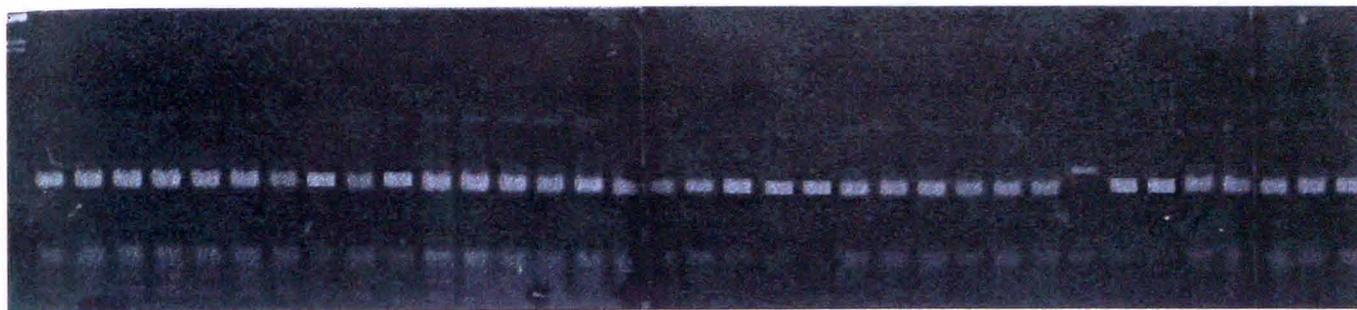


Fig. 2-2-5. RFLPs of *rbcL*-ORF106 regions amplified from genomic DNA of 35 apricot varieties digested by *Hinf* I. M indicated *Hin* d III digested lambda DNA.

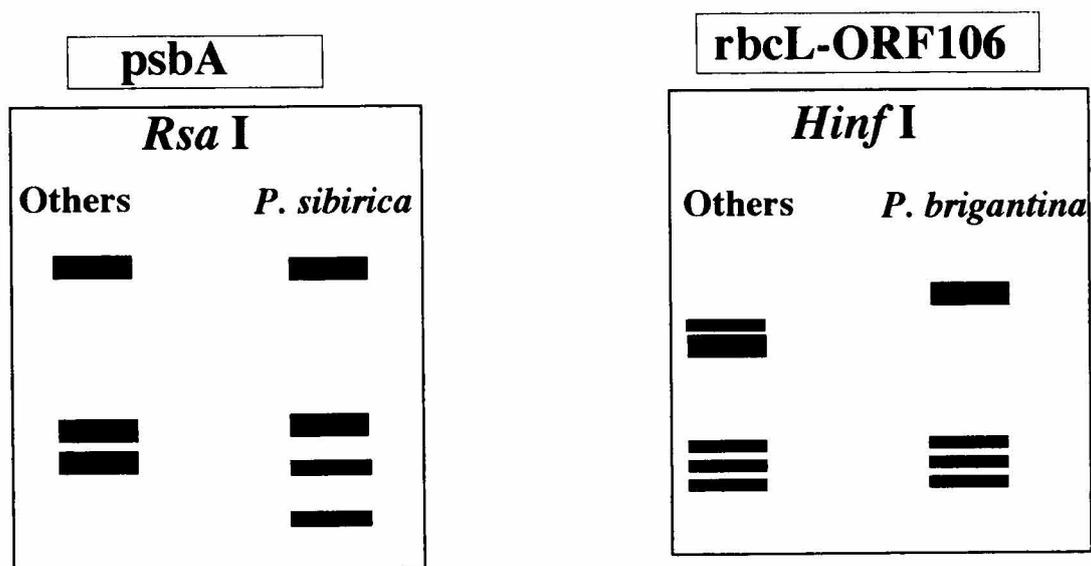


Fig. 2-2-6. RFLP patterns obtained in this experiment. *P. sibirica* and *P. brigantina* indicates DNA polymorphisms in each region.

第3節 スモモの系統分類

目的

スモモは東アジア系、ヨーロッパ系、北アメリカ系の3群に大別され、この中で果樹として栽培されているものは、東アジア原産のニホンスモモ(*P. salicina* Lindl.)、西アジアからヨーロッパ原産のヨーロッパスモモ(*P. domestica* L., *P. insititia* L.)である(Hedrick, 1911)。スモモには染色体数が $2n=16$ 、 32 、 48 の倍数体があり、ニホンスモモ系は2倍体、ヨーロッパスモモ系は6倍体である(Weinberger, 1975)。この6倍体は、4倍体のスピノーサスモモ(*P. spinosa* L.)と2倍体のミロバランスモモ(*P. cerasifera* Ehrh)との種間交雑に由来するといわれている(Crane・Lawrence, 1952)。現在のニホンスモモの中には、Burbankがニホンスモモにミロバランスモモ、サイモンズモモ(*P. simonii* Carr.)、アメリカナスモモ(*P. americana* Marsh.)など数種のスモモやアンズを交雑して育成した品種が存在している(Jones, 1928)が、これらは親品種の不明なものが多い。またスモモには自家和合性のものと自家不和合性のものが混在しており、さらに同亜属のウメ、アンズと遺伝的に近縁で自然条件下においても相互の交雑が可能である。このようにスモモには種数が多く、育種背景も不明な点があり、さらに分布範囲も幅広いために系統・品種分類が困難である。スモモの系統分類学的研究はこれまで主に形態的特性やGDH、MDHやPGMなどのアイソザイム分析(Parfittら、1985、Byrneら、1988)によって行われてきた。しかし、これらのマーカーは環境的要因の影響を受けることや近縁な品種間において識別能力が低いことなどの欠点が挙げられ、育種研究において更に進んだ技術が要望されている。そこで、RAPD分析法、葉緑体の特定領域を用いたPCR-RFLP分析法、アイソザイム分析法を用いて、スモモ品種・系統の類縁関係を検討する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場にて収集・保存されているスモモ42品種と、長野県果樹試験場で栽植されているユスラウメ(*P. tomentosa* Thunb.)1系統と‘ホワイトプラム’を採集し、実験に供試した。RAPD分析、及びPCR-RFLP分析に供試した42品種・系統はTable 2-3-1、アイソザイム分析に供試した11品種・系統はTable 2-3-2に示した。

2).方法

RAPD分析、及びPCR-RFLP分析は第1章第1節、及び第2節の方法に従った。PCR-RFLP分析では、Table 1-3-1に示す*Nla* IIIと*Sau* 3AIを除く10種類の酵素を使用した。パーオキシデース(E.C.1.11.1.7; POX)アイソザイムの分析方法は以下のとおりである。

1).酵素の抽出

採集した生葉1gに、5mlの抽出液と、0.01gのpolyvinylpolypyrrolidone(PVPP)を加え、予冷した乳鉢を4℃に保ち、少量の石英砂とともに磨砕した。抽出液の調整は、RooseとGottlieb(1980)の処方を変更したMartinez-ZapaterとOliver(1984)の処方に従った。抽出液は、0.014 M 2-mercaptoethanolと10 % glycerolを含む 0.1 M Tris-HCl (pH 7.3)である。

磨砕物は、4 °C、12,000 rpmで15分間遠心分離にかけた。そして、この上澄み液をアイソザイム分析の試料とした。

2).電気泳動

電気泳動は、不連続バッファースystemによるホリアクリルアミドゲル(PAGE)を使用した Hosakaら(1985)の方法に従った。分離ゲル(85×70×1)は7.5 %、濃縮ゲル(85×10×1)は3.75 %のものを用いた。各ゲルを作成するために、保存液A, B, C, D, E(Table 2-3-3)を準備した。分離ゲルは、保存用溶液A, Cと蒸留水の混合液(A:C:distilled H₂O=1:2:5) 10 mlにN,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) 1 μl, 過硫酸アンモニウム(APS) 15 mgを加え攪拌し、直ちにゲル作成板に注入した。n-ブタノールを重層し、25 °C、2.5-3.0時間で重合させた。次に、濃縮ゲルは、保存用溶液B, D, Eと蒸留水の混合液(B:D:E:distilled H₂O=1:2:1:4) 5 mlを分離ゲルの上部に注入し、サンプルコウムを入れ、n-ブタノールを重層し、約30分で重合させた。

分析する酵素によって注入する試料の量は異なり、各ウェルには10 μlずつ注入した。陽極と陰極の電極液には、Tris-glycine (pH 8.6, 0.6g Tris, 2.88 g glycine / 1,000 ml)を使用し、フロントマーカーとして bromophenol blue (BPB)を使用した。ただし、MDHとGPIの場合には、分離ゲル、濃縮ゲル、電極液に0.0012 M disodium ethylenediamine tetraacetate (2Na-EDTA)を添加した。泳動は、4 °C、200 V一定で行い、フロントマーカーが分離ゲルから流出し始めた時点で終了した。

3).染色

パーオキシダーズの染色方法は、YamamotoとMomotani(1971)の処方の一部改変した Hosakaら(1985)の方法に従った。染色液は、0.84 ml 酢酸に100 mg o-dianisidineを溶かし、70 mlの冷えた蒸留水で希釈し、よく攪拌した後、冷えた0.2 M 酢酸バッファ(pH 4.9)で100 mlにし、最後に、30 % 過酸化水素水を2滴加える。染色は、ゲルを染色液に浸漬し、4 %で15分間染色液に入れ、シェークした後、30 % 過酸化水素水を含む冷えた1/15 M リン酸バッファ(pH 7.0) 100 mlに移し、バンドパターンが見えるまで室温で、5-20分間静置した。反応停止は、酢酸を数滴滴下することによって行った。

結 果

1).RAPD分析法によるスモモの品種・系統分類

スクリーニングによって選抜した34種類のプライマー(プライマー番号; 16, 21, 22, 23, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 60, 62, 65, 68, 69, 70, 73, 77, 83, 94, 101, 107, 108, 113, 137, 152, 153, 159, 163, 164, 168, 171, 172, 184)を用いて分析を行った。プライマー164で増幅したRAPDパターンをFig. 2-3-2に示した。総数で68個の再現性のあるRAPDsが検出された。各系統間の非共有バンド数を求めると、最小で‘牡丹杏’と‘ケルシー’、‘チェーアン’と‘トレジデイ’の系統間で相互の差異を示す増幅DNA断片は検出できなかった。最大で‘マチレイ’と‘グロー’で29個のRAPDsが検出された(Table 2-3-4)。その他の品種・系統においては相互の識別が可能であった。‘ソルダム’の枝変り品種である‘レートソルダム’及び‘晩生ソルダム’と枝変りの元親である‘ソルダム’とは相互に識別が可能であった。

これらのデータをもとに各系統間の非共有バンドの距離行列を求め、群平均化法によりクラスター分析を行い、デンドログラムを作成した(Fig. 2-3-3)。デンドログラムはニホンスモモのグループとヨーロッパスモモのグループに大別された。更に、バンドの差異が10本でクラスターを形成しているグループを次にまとめた。

- A) ‘牡丹杏’ ~ ‘フォーモサ’、B) ‘フロンティア’ ~ ‘七郎’
- C) ‘レートソルダム’ ~ ‘サルタン’、D) ‘82055 黄柑李’ ~ ‘花螺李’
- E) ‘マチレイ’ ~ ‘メスレイ’、F) ‘チェーアン’ ~ ‘サンジュリアン A’
- G) ‘神産桃’ ~ ‘サンプルーン’

A、B、Cグループはニホンスモモ品種群で、純粹のニホンスモモとそれをもとに改良された品種で成り立っている。Dグループは台湾スモモ品種群、Eグループはニホンスモモとミロバランスモモの種間雑種群(*P.salicina* × *P.cerasifera*)、Fグループはヨーロッパスモモ品種群、Gグループは2、4、6倍体の倍数体が混在するグループとなった。‘ス台’、‘マリチマ’ (別名; ビーチスモモ)、‘グロー’はこれら7つのクラスターに属さず、遺伝的変異の大きい種であった。

数量化理論第3類により成分を2個抽出し、二次元配置で散布図を作成した(Fig. 2-3-4)。第1及び第2成分の寄与率は約30%とかなり低い値を示した。‘マリチマ’と‘グロー’は他のスモモと類似性が低く、かなり離れた位置にプロットされた。供試材料はデンドログラムと同様にニホンスモモとヨーロッパスモモの2群に大別されたが、これら両グループを明瞭に区別することは難しく、様々な種、あるいは交配種が入り組んでいた。ニホンスモモは変異が大きく、台湾系スモモである‘黄柑李82055’や‘花螺李’は日本在来のスモモと異なるクラスターを形成した。

2). Peroxidase アイソザイム分析による倍数体の類縁関係の推定

倍数体の類縁関係を調査するために、POXアイソザイムを調査した結果、I-Vの5本のバンドが検出された(Fig. 2-3-5/ 2-3-6)。バンドⅡはスピノーサスモモとユスラウメ(Chinese bush cherry)に、バンドⅢはユスラウメにのみ特異的に存在し、これらの2品種は他品種と異なるバンドパターンを示した。バンドⅣは全品種に共通であった。得られたアイソザイムパターンを検討した結果、これら11品種はA-Fの6グループに分類された。

- A) ‘クリコンダムソン’ (6x)、‘ミロバラン373-1-1’ (2x)、
‘ミロバラン420-2-2’ (2x)、‘米桃’ (2x)
- B) ‘スタンレー’ (6x)、‘ビクトリア’ (6x)
- C) ‘メスレー’ (2x)、‘ホワイトプラム’ (2x)
- D) スピノーサスモモ(4x)
- E) ユスラウメ(2x)
- F) ‘花螺李’ (2x)

Bグループは*P.domestica*のみから成立し、*P.cerasifera*の2品種は同じAグループに属した。スピノーサスモモ、ユスラウメ、‘花螺李’はそれぞれ独立したグループを形成した。POXによる分類はRAPD分析の分類結果と矛盾せず、ニホンスモモ系3品種は全て異なるグループに属し、変異の大きい種であった。

3). 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析による遺伝的変異の推定

葉緑体にコードされている *psbA* 遺伝子、*rbcL*-ORF106 遺伝子間領域、及び *atpB*-*rbcL* 遺伝子間領域を増幅し、10種類の制限酵素についてこれらの増幅断片における認識部位の有無を調査した。30通りの組み合わせで多型を示したものは、*psbA* 遺伝子領域の *Mbo* II 処理で、‘スピノーサスモモ’に、*rbcL*-ORF106 遺伝子領域間の *Alu* I 処理で‘花螺李’に、*rbcL*-ORF106 遺伝子領域間の *Eco* RV 処理で‘マリチマ(別名：ビーチスモモ)’と‘グロー’(Fig. 2-3-7)にみられただけである。他のプライマーと制限酵素の組み合わせでは、供試した26品種・系統のスモモ全てが同じRFLPパターンを示す結果となった(Fig.2-3-8)。

考 察

1).RAPD分析法によるスモモの品種・系統分類

‘ケルシー’と‘牡丹杏’、‘トレジディ’と‘チェーアンは’、形態的に非常に類似しており、また分析の結果、RAPDパターンが相同でこれらの品種の識別が不可能であった。RAPD分析法により‘ソルダム’の晩生枝変り品種である‘レートソルダム’と‘晩生ソルダム’など枝変り品種を識別することができた。このことを考慮すると、識別できなかった品種については異名同品種である可能性が強いと考えられた。これらの品種を除いて他の全てについて相互の識別が可能であったため、RAPD分析法がスモモの品種識別に有効であると推察された。

デンドログラムと散布図ではヨーロッパスモモとニホンスモモに大別できたが、台湾スモモを含めニホンスモモの変異が大きいいため、散布図において変異の連続性が確認できた。これはBurbankが育成した種間雑種個体により、この現象が生じていると考えられた。‘黄柑李’と‘花螺李’などの台湾スモモはニホンスモモと類似性が高いと予想していたが、純粋なニホンスモモと類似性はあまり高くないため、台湾スモモはニホンスモモと交雑することなく独自に発達したものと推察された。‘メキシコプラム84’と‘メキシコプラムオータム’は品種名が類似しているがゲノムの類似度は低く、両者は品種の育成過程においてあまり関わりのないものと思われる。アメリカスモモの‘グロー’と‘ビーチスモモ’はヨーロッパスモモやニホンスモモと極めて類似性が低く、アメリカスモモの発達過程はこれらのスモモと関連なく、独自に分化してきたものと推察した。来歴不明の‘ス台’はヨーロッパスモモ群に分類され、ミロバランスモモに類似していると推察した。

Gグループは6倍体の‘クリコンダムソン’(*P.insititia*)と‘サンプルーン’(*P.domestica*)、4倍体のスピノーサスモモ(*P.spinosa*)、2倍体のミロバランスモモ(*P.cerasifera*)が混在しているが、これらの品種において比較的類似性はみられたが、RAPD分析による分類の基本概念は広義のゲノムの類似性に基づいているため、これらのデータだけではCraneとLawrenceの倍数体仮説を十分考察することはできなかった。

2).Peroxidaseアイソザイム分析による倍数体の類縁関係の推定

パーオキシデース以外に、リンゴ酸脱水素酵素(E.C.1.1.1.37; MDH)、エステレーズ(E.C.3.1.1.1; EST)、フォスフォグルコムテース(E.C.5.4.2.2; PGM)、グルコースリン酸イソメレーズ(EC. 5.3.1.9; PGI)の酵素について予備的に検討したが、酵素活性が低い、あ

るいは酵素が失活してしまったため、全品種の明瞭なバンドパターンが検出されず、品種分類に適用することができなかった。*Prunus* 属では、種あるいは品種の分類にアイソザイムマーカーが利用されている。Arusekarら(1986)はモモ290品種についてデンブengelを用い、リンゴ酸脱水素酵素(MDH)のアイソザイム分析を行ったところ、そのザイモグラムはI、II、IIIのグループに分類され、IIIのグループは6品種のみから成り、この6品種は全て中国原産の品種であった。また、アミノペプチデース(AAT)、グルコースリン酸イソメラーズ(GPI)、ロイシンアミノペプチデース(LAP)、フォスフォグルコムテース(PGM)、6-フォスフォグルコン酸脱水素酵素(6-PGD)のアイソザイムパターンでは、モモとアーモンドはかなり異なることが示された(Arusekar et al. 1986b)。アーモンドでは、Hauaggeら(1987)がAAT、GPI、LAP、PGMについてアイソザイム分析を行い、76品種を40グループに分類した。アンズについては、ByrneとLittleton(1989)により、GPI、PGM、6-PGDのアイソザイムパターンから69品種が15グループに分類された。スモモに関しては、ByrneとLittleton(1988)がMDH、GPI、LAP、PGM、パーオキシデース(POX)、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)の6酵素についてデンブengel電気泳動法によるアイソザイム分析を行った結果、ニホンスモモ29品種は19グループに分類された。また、ParfittとArusekar(1985)はスモモとモモのGPIとPGMのアイソザイムから、それぞれ異なるバンドパターンを検出し、さらに、この種間雑種は両親のバンドを合わせ持つことからアイソザイム分析によりスモモとモモの種間雑種の同定が可能であることを示している。これら4種の*Prunus* 属植物では、アイソザイムの変異はアーモンド、スモモで大きく、モモはかなり小さく、アンズではその中間レベルであることが示された。本実験においても、2倍体のスモモではアイソザイム変異が大きいことが確かめられた。

RAPD分析では個体レベルで識別を行うため、種の特異性を調査する際に、個体差が分析の妨げとなると考えられた。このため、連鎖マーカーなど染色体の移入などの調査などに用いられているアイソザイム分析により、倍数体の発達過程を検討した。これまで*P. domestica*、及び*P. insititia*のような6倍体のヨーロッパスモモは、4倍体のスピノーサスモモ(*P. spinosa*)と2倍体のミロバランスモモ(*P. cerasifera*)との種間交雑に由来するといわれている(Crane・Lawrence, 1952)。6倍体で見られるバンドはミロバランスモモ、あるいはスピノーサスモモのいずれかに存在し、CraneとLawrenceの説は否定することは不可能であったが、バンドIIのドナーとなる種はミロバランスモモ以外でも存在した。Eryomine(1991)は*P. spinosa* × *cerasifera*の雑種後代が得にくいなどの理由から、両者の交雑によって生じた3倍体が倍加して6倍体ができたと、考えにくく、得られた3倍体あるいは4倍体にサクラが交雑し、6倍体が生じたのではないかと述べている。一方、Eremin(1985)はスピノーサスモモの核型を調べ、スピノーサスモモは*P. microcarpa* C.A. Mey. とミロバランスモモの交雑により得られたものではないかと述べている。この他にも、Salesses(1970)はスピノーサスモモにはミロバランスモモと相同性の高いゲノムがあることを報告し、これはスピノーサスモモとミロバランスモモにコードされるrDNAの物理地図により確かめられた(Reynders・Salesses, 1991)。対照品種のユスラウメは*Microcerasus*に属しており、比較的POXパターンも類似しており、スピノーサの変異は*Microcerasus*によるものと推察した。*P. domestica*の核型に*P. microcarpa*の遺伝子移入が認められること、また、スピノーサスモモにミロバランスモモと相同性の高いゲノムがあることから、これらの見解を述べているが、スピノーサスモモとミロバランスモモが交雑した後、6倍体になる過程が不明のままで、

このことについては更なる研究が必要であると思われる。

3). 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析による遺伝的変異の推定

PCRでの増幅による断片長の多型が検出できず、ポイントミューテーションを検出するために、増幅断片を10種類の制限酵素で切断した。検出された多型のうち、6塩基認識の制限酵素Eco RV処理(rbcL-ORF106遺伝子領域間)で得られた‘マリチマ’、‘グロー’のRFLPは、進化学的にこれら2品種が他のスモモと比べて、早期に分化したことを示していると考えられる。このことはRAPD分析の結果と同様であった。‘花螺李’で検出された変異は単に地理的隔離による特殊化に起因しているのか、あるいはニホンスモモが東アジア起源ではないのかのどちらかによるものと考えられた。スピノーサスモモで変異が認められたことから、CraneとLawrenceの倍数体仮説が正しいとすると、ミロバランスモモが母系でスピノーサスモモが父系であると予想された。この組み合わせによる雑種後代についてはあまり、報告がなく今後、研究していく必要がある。今回の実験は葉緑体DNAのわずか一部から得られたデータであるために、実験をスケールアップして再検討する必要がある。

摘 要

RAPD分析法、葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法、アイソザイム分析法により、スモモの品種・系統の類縁関係を検討した。分類を行うために、RAPD(Random amplified polymorphic DNA)分析法を適用した。‘牡丹杏’と‘ケルシー’、‘チェーアン’と‘トレジデイ’の品種間では相互の識別はできなかったが、その他の品種・系統においては相互の識別が可能であった。‘ソルダム’の枝変り品種である‘レートソルダム’と‘晩生ソルダム’と枝変りの元親である‘ソルダム’は相互に識別が可能であった。このことはRAPD分析法がスモモの品種識別に有効であることを示す。また‘牡丹杏’と‘ケルシー’、‘チェーアン’と‘トレジデイ’は異名同品種の可能性が高いと推察された。クラスター分析の結果、42種類の品種・系統はニホンスモモとヨーロッパスモモの2グループに分類されたが、両者には変異の連続性がみられた。アメリカスモモの‘グロー’と‘マリチマ’はこれらのスモモと類似性が極めて低かった。

倍数体の類縁関係を解明するために、代表的な種のPOXアイソザイムを調査した。POXでは5本のバンドI-Vが検出され、バンドIIはスピノーサスモモとユスラウメに、バンドIIIはユスラウメにのみ特異的に存在し、これらの2品種は他品種とはかなり異なるバンドパターンを示した。得られたアイソザイムパターンを検討した結果、これら11品種は6グループに分類された。ニホンスモモ系の3品種は全て異なるグループに属し、変異の大きい種であった。‘スタンレー’、‘ビクトリア’(*P.domestica*)にみられるバンドはミロバラン373-1-1、ミロバラン20-2-2(*P.cerasifera*)とスピノーサスモモ(*P.spinosa*)のいずれかに存在した。

3種類の葉緑体DNAにコードされているpsbA遺伝子領域、rbcL-ORF106遺伝子間領域、atpB-rbcL遺伝子間領域を増幅し、10種類の制限酵素についてRFLPの有無を調査した。psbA遺伝子領域のMbo II処理で、スピノーサスモモに、rbcL-ORF106遺伝子領域間

の *Alu I* 処理で ‘花螺李’ に、*rbcL*-ORF106 遺伝子領域間の *Eco RV* 処理で ‘マリチマ’ と ‘グロー’ にみられた。他のプライマーと制限酵素の組み合わせでは、供試した26品種・系統のスモモ全てが同じRFLPパターンを示す結果となった。‘マリチマ’ と ‘グロー’ は他のスモモと比べて、早い時期に分化したと考えられた。このことは第1章のRAPD分析の分類結果と類似していた。本実験で検出したスピノーサスモモの変異は、CraneとLawrenceの倍数体仮説に基づいて考慮すると、ミロバランスモモは母系でスピノーサスモモは父系であると示唆される。

Table 2-3-1. Plums used for RAPD and PCR-RFLP analyses

Code	Varieties		Origin
1	82055 Oukanri	<i>P. salicina</i>	Taiwan
2	84506	<i>P. salicina</i>	Nepal
3	Late Santa Rosa	<i>P. salicina</i> × ?	USA
4	Frontier	<i>P. salicina</i> × ?	USA
5	Formosa	<i>P. salicina</i>	USA
6	Late Sordum	<i>P. salicina</i>	Japan
7	Beauty	<i>P. salicina</i> × ?	USA
8	Sordum	<i>P. salicina</i>	Japan
9	Jinsantou	<i>P. salicina</i>	Japan
10	Methley	<i>P. salicina</i> × <i>cerasifera</i>	SouthAfrica
11	King	<i>P. salicina</i>	Japan
12	Yonemomo	<i>P. salicina</i>	Japan
13	Karari(Hua-luo-li)	<i>P. salicina</i>	Taiwan
14	Shichirou	<i>P. salicina</i>	Japan
15	Bansei Sordum	<i>P. salicina</i>	Japan
16	Manzaemon	<i>P. salicina</i>	Japan
17	Nishida	<i>P. salicina</i>	Japan
18	Koikesumomo	<i>P. salicina</i>	Japan
19	Ichinari	<i>P. salicina</i>	Japan
20	Botankyous	<i>P. salicina</i>	Japan
21	Kelsey	<i>P. salicina</i>	Japan
22	Mex. Plum 84	<i>P. salicina</i>	Mexico
23	Matilai	<i>P. salicina</i> × <i>cerasifera</i>	SouthAfrica
24	Mex. Plum Autumn	<i>P. salicina</i> × <i>cerasifera</i>	Mexico
25	Metaeley	<i>P. salicina</i> × <i>cerasifera</i>	SouthAfrica
26	Sultan	<i>P. salicina</i>	USA
27	Sun Prune	<i>P. domestica</i>	Japan
28	Sudai	Unknown	Unknown
29	Myrobalan 373-1-1	<i>P. cerasifera</i>	USA
30	Myrobalan 420-2-2	<i>P. cerasifera</i>	USA
31	Hollywood	<i>P. pissardi</i> × <i>salicina</i>	USA
32	Beach plum	<i>P. maritima</i>	USA
33	Spinosa plum	<i>P. spinosa</i>	Central Asia-Europe
34	St. Julien A	<i>P. insititia</i>	Europe
35	Krikon Damson	<i>P. insititia</i>	Europe
36	Victoria	<i>P. domestica</i>	Europe
37	Yellow Egg	<i>P. domestica</i>	Europe
38	Stanley	<i>P. domestica</i>	Europe
39	Glow	<i>P. americana</i> × <i>maritima</i>	USA
40	Chairm	<i>P. domestica</i>	Europe
41	Hungarian	<i>P. domestica</i>	Europe
42	Tragedy	<i>P. domestica</i>	Europe

Table 2-3-2. Plums used for Peroxidase isozyme analysis

Code	Variety	Pedigree	Polyploidy	Sampling place
A-1	Krikon Damson	<i>P. insititia</i>	6	C
A-2	Myrobalan 373-1-1	<i>P. cerasifera</i>	2	C
A-3	Stanley	<i>P. domestica</i>	6	C
A-4	Victoria	<i>P. domestica</i>	6	C
A-5	Methley	<i>P. salicina</i> × <i>cerasifera</i>	2	C
A-6	Yonemomo	<i>P. salicina</i>	2	C
A-7	Myrobalan 420-2-2	<i>P. cerasifera</i>	2	C
A-8	Spinosa	<i>P. spinosa</i>	4	C
A-9	Yusuraume	<i>P. tomentosa</i>	2	N
A-10	White Plum	<i>P. salicina</i>	2	N
A-11	Karari (Hua-lou-li)	<i>P. salicina</i>	2	C

Sampling place : C : Fruit Tree Res. Stn. Chiyoda Farm

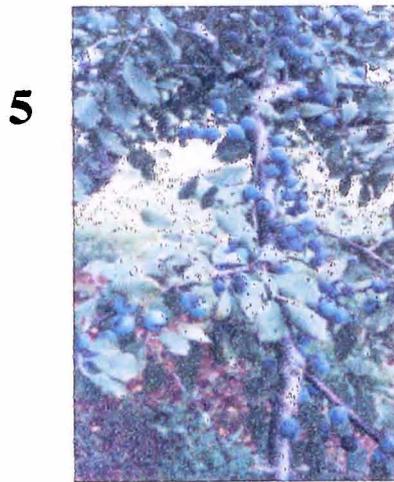
N : Nagano Fruit Tree Exp. Stn.

Table 2-3-3. Composition of separation and condensing gel stock solution

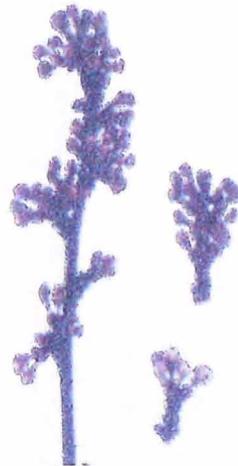
Component	A solution	B solution	C solution	D solution	E solution
1N HCl	48 ml	48 ml	—	—	—
Tris-HCl	36.6 g	5.98 g	—	—	—
TEMED	0.23 ml	0.46 ml	—	—	—
Acrylamide	—	—	29.2 g	12.5 g	—
BIS	—	—	0.8 g	2.5 g	—
Riboflavin	—	—	—	—	4.0 mg

* All solution were filled up to 100 ml by aqueous solution

A



B



C



Fig. 2-3-1. Morphological characteristics as fruits (A) of 1 : Myrobalan 373-1-1, 2 : 'Stanley', 3 : 'Cassel man', 4 : St. Julien A and 5 : Spinosa plum, and flower(B) and stone (C) of plums.

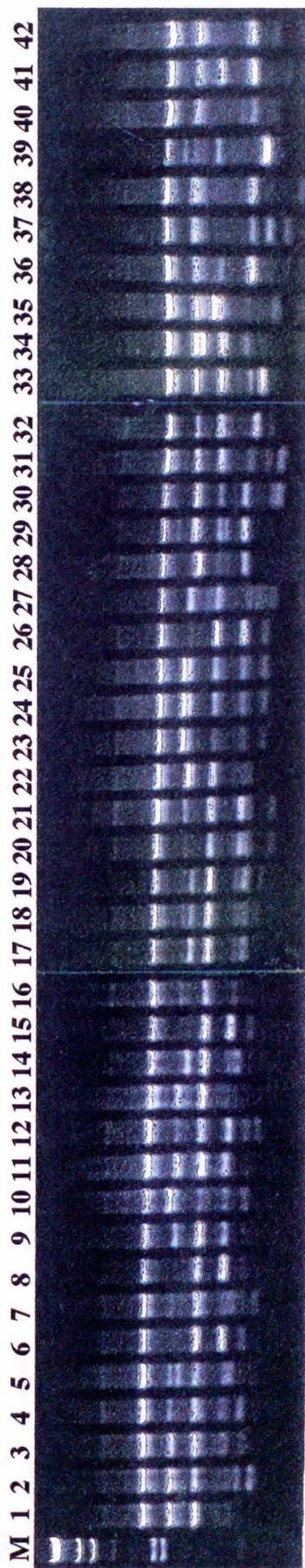


Fig. 2-3-2. RAPD patterns of 42 plum varieties by primer 164 . M indicates *Hin d* III digested lambda DNA.

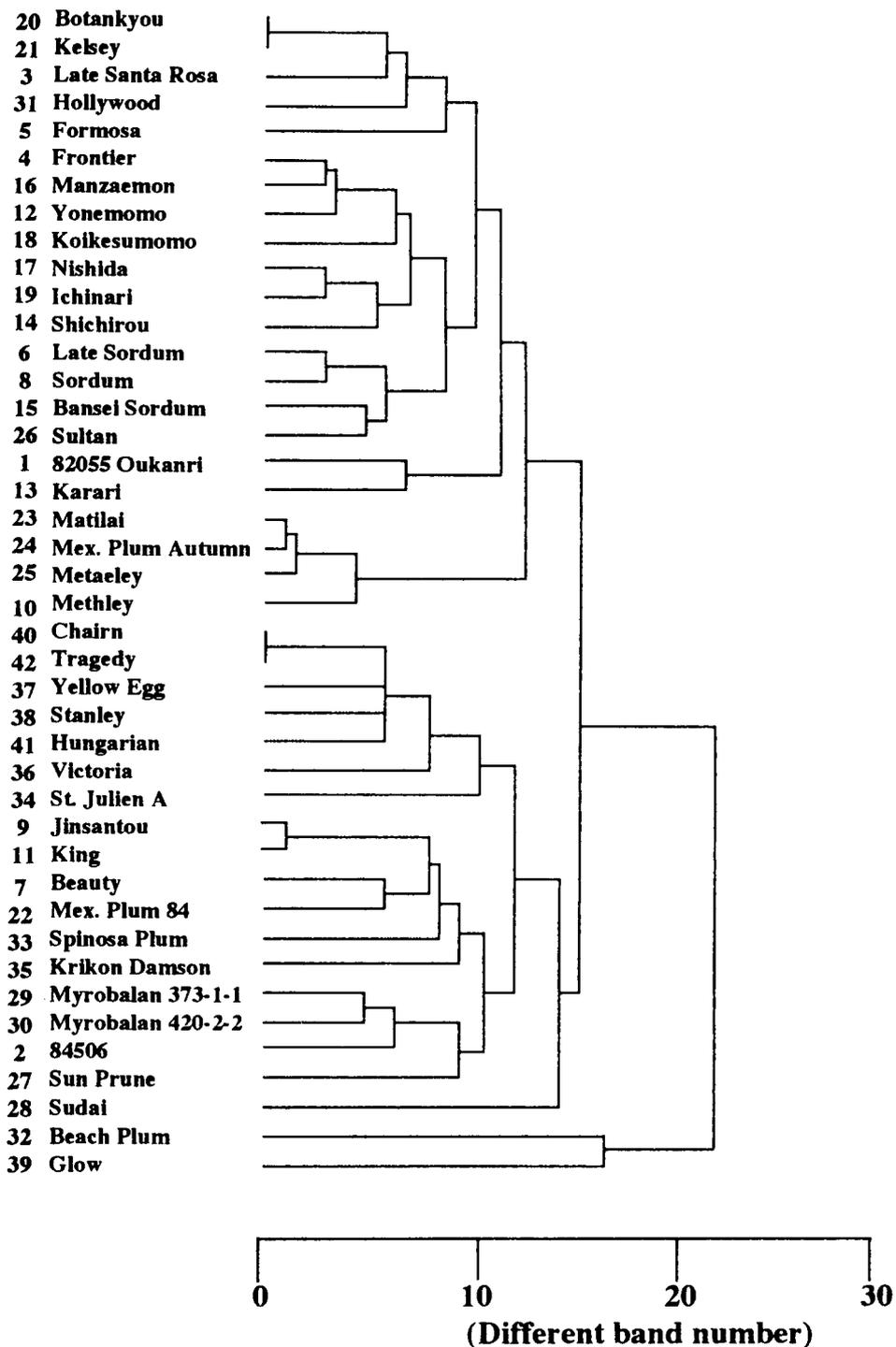


Fig. 2-3-3. Dendrogram of 42 plum varieties by cluster analysis using group average method.

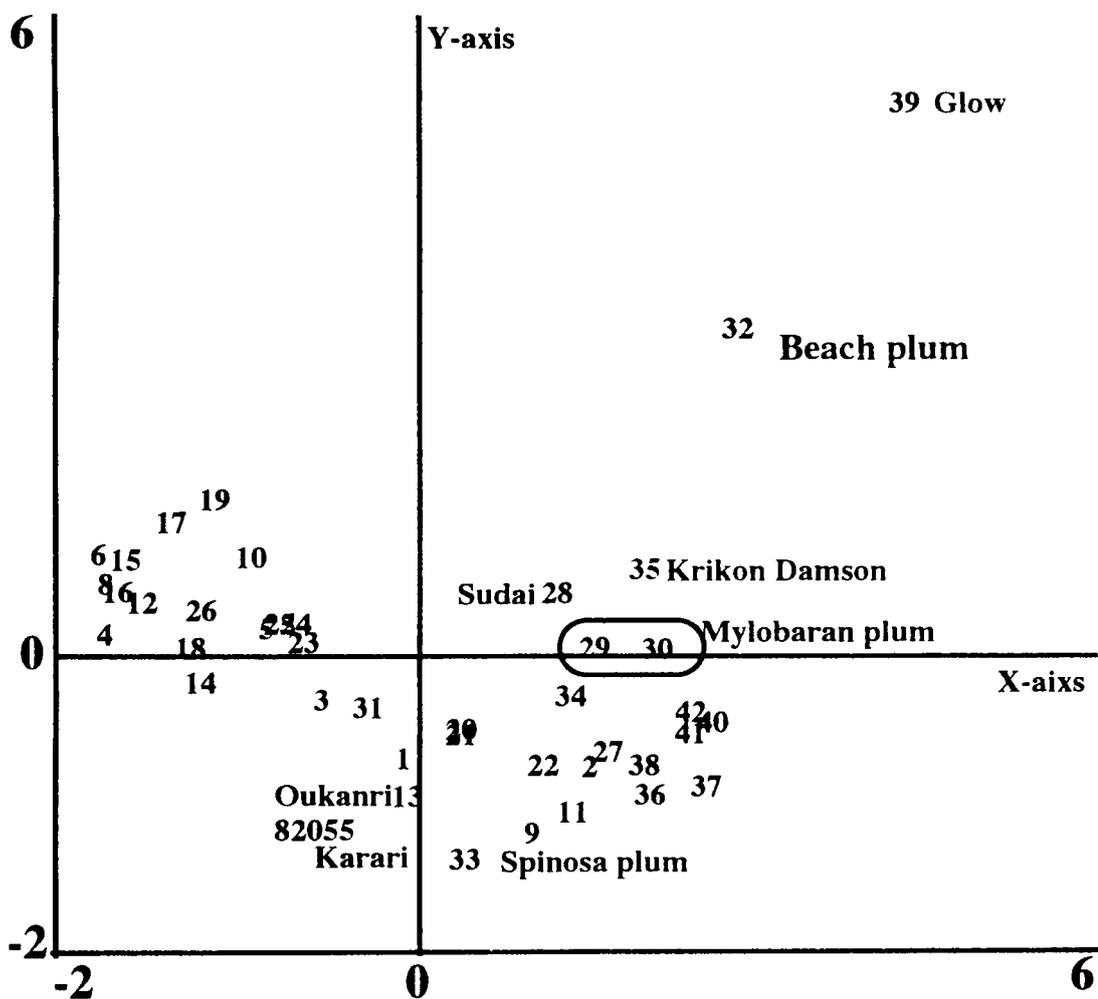


Fig. 2-3-4. Scattergram of 42 plum varieties by quantification method of the third type. Each material was plotted according to its principal component score. X-axis : first principal component, Y-axis : second principal component.

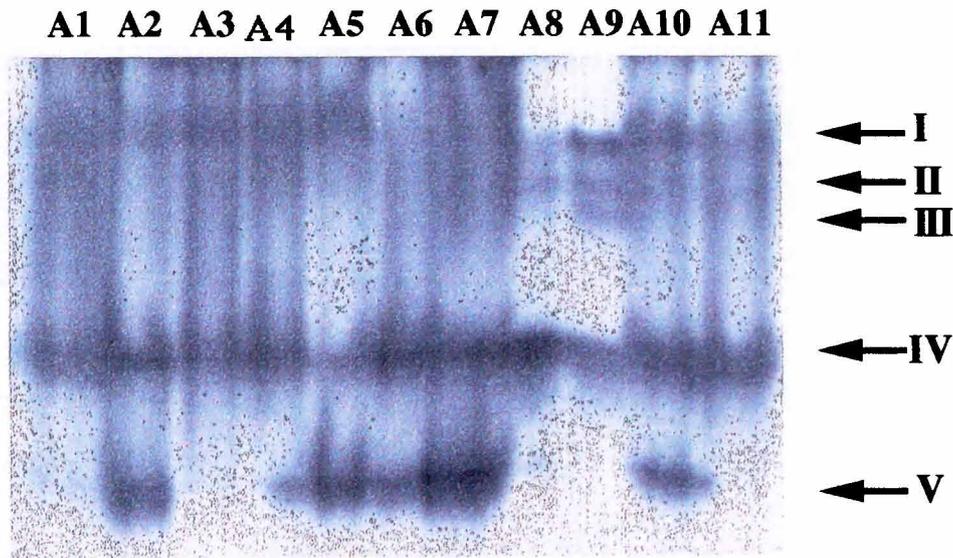


Fig. 2-3-5. Peroxidase (POX) isozyme patterns.
Arrows indicate polymorphic bands.

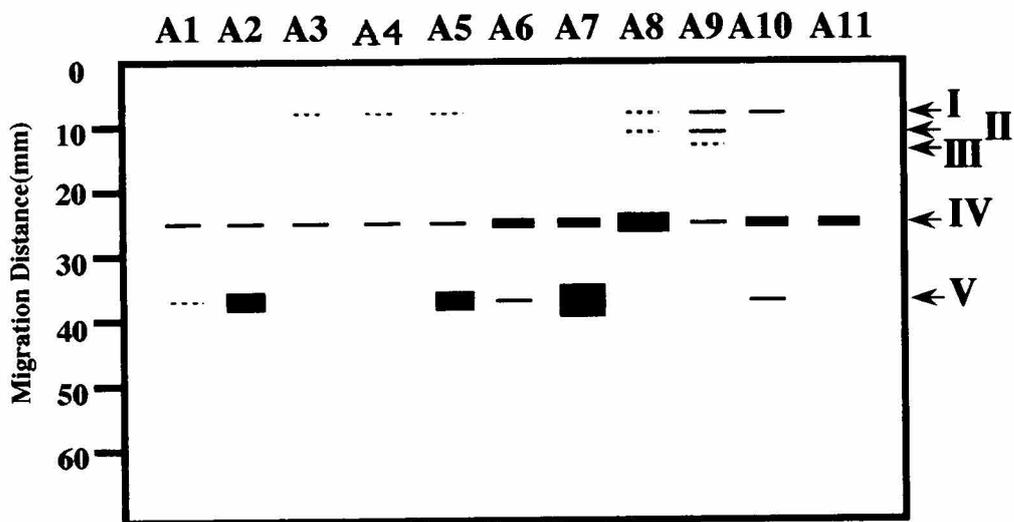


Fig. 2-3-6. Peroxidase (POX) zymogram.
Arrows indicate polymorphic bands.

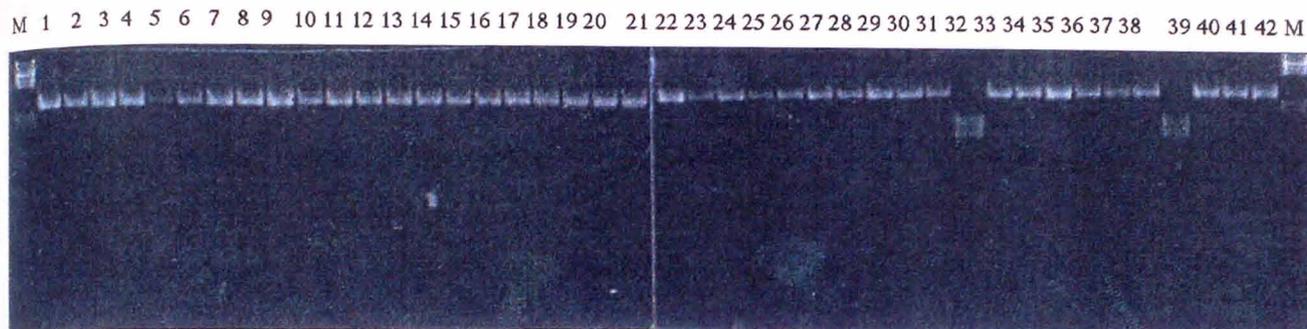


Fig. 2-3-7. RFLPs of rbcL-ORF106 regions amplified from genomic DNA of 42 plum varieties digested by *Eco* RV. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

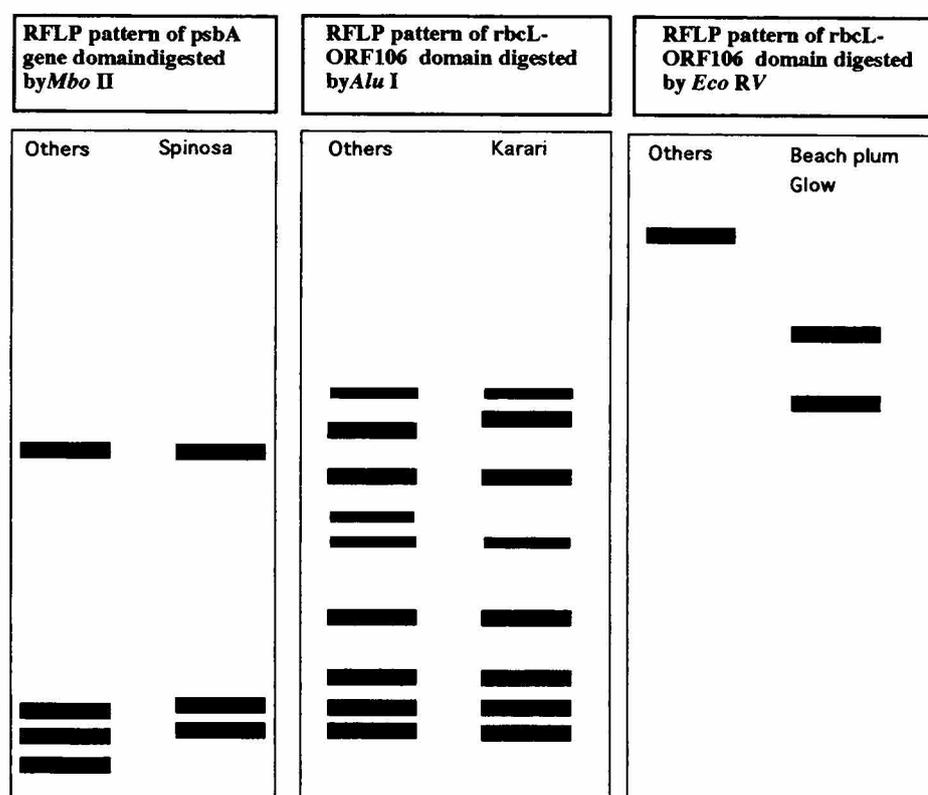


Fig. 2-3-8. RFLP patterns obtained in this experiment. 'Spinosa plum', 'Karari(Hua-luo-li)', 'Glow' and 'Beach plum' indicate polymorphisms in each regions.

第4節 ウメ・アンズ種間雑種の系統分類

目 的

ウメとアンズは遺伝的に近縁で、両者が混在して栽培される我が国では、‘豊後’のように、相互の自然交雑により生じたと考えられる雑種系統が多数存在している。これまでアンズの形質がみられる大梅と杏梅に属する品種については、麓(1972)や青木ら(1972)が核型分析やアイソザイム分析などを行い、形態的特性ではアンズに類似しているが、種子タンパクやアイソザイムの泳動パターンなどを調べるとウメに特異的な形質を持っていると述べている。そこで、ウメとアンズの交雑により育成された人工種間雑種と自然交雑種と考えられるこれらの系統を供試して、ゲノムの類似性を比較し、雑種系統がウメとアンズの交雑により誕生したものであるか否かを検討する。

材料及び方法

1). 材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場で収集・保存されているウメ8品種とアンズ5品種、それに育成中のウメとアンズの人工交雑種7系統を供試した(Table 2-4-1)。これらの形態的特性及び生態的特性をTable 2-4-2に、花、果実、及び核の形態写真をFig.2-4-1とFig.2-4-2に示した。

2). 方法

第1章第1節の方法に従い、RAPD分析を行った。形態と生態の特性調査は農林水産省の品種特性調査法に従った。

結 果

1).ウメ・アンズ雑種個体の形態的、生態的特性

ウメ、アンズと両者の雑種と思われる品種を供試し、葉身とたく葉の形状、花色、開花期、花粉稔性、果肉色、核の粘離、核の形状などを吉田が調査したので、その結果をTable 2-4-2に示した。ウメは開花期が早く、アンズは晩い。雑種と思われる品種は中間の時期に開花し、花粉の稔性が低かった。純粋なウメは葉身の形状は細長く、たく葉は刀型を示す。これに対してアンズは葉身の形状はまるく、たく葉は掌状を示し、雑種品種と思われるものは両者の中間を示した。花卉の色はウメは白色で、東アジア系のアンズは淡桃色を示すものが普通である。大梅や杏梅といわれる品種には淡桃色を示すものが多かった。果肉色はウメは黄緑、アンズは黄から橙色を示す。核と果肉の離れ具合は、ウメは粘核で離れにくく、アンズは離核で離れやすい。ウメの形質を含むアンズは‘小笠原’は中間の半離核である。核表面の模様は、ウメは点状で浅く、滑らかだが果実が大粒で、アンズの形質を含むものは刻が深く、粗で、杏梅といわれるグループは特に刻が深かった。アンズは一般にあわ粒状で平滑だが、ウメの形質を含む‘小笠原’などは表面の刻は網目状で深く、粗であった。このように、ウメとアンズは形態的、生

態的に差異が認められたが、中間の性質を示すものがあり、変異は連続していた。

2).ウメ・アンズ雑種個体の遺伝的特性

24種類のプライマー(プライマー番号; 39, 42, 45, 46, 48, 52, 57, 59, 60, 65, 68, 75, 77, 79, 101, 108, 145, 152, 163, 164, 168, 172, 184, 197,)を用いてRAPD分析法により、ウメ、アンズ、と雑種個体を調査した。プライマー69と77により作成した電気泳動図をそれぞれFig. 2-4-3、及びFig. 2-4-4に示した。総数71個のRAPDsを検出することができ、最も少ないもので、‘平和’と‘甲州大実’の間の5個、最高で、‘麦黄準杏’と人工雑種‘AM1-11’の間の52個、のRAPDsを検出した(Table 2-4-3)。ウメに分類されている‘高田梅’はウメよりアンズと類似性が高く、第2章第1節で得られた結果と一致した。また、アンズの‘平和’とウメの‘地蔵梅’とを交雑して育成した人工雑種、‘AM2-1’、‘AM2-2’、‘AM2-4’は、相互の識別が可能であった。

上記の各品種・系統間の非共有バンド数のデータを基にクラスター分析を行い、デンドログラムを作成した(Fig. 2-4-5)。デンドログラムはアンズとウメの2つのグループに大別された。アンズグループでは、‘高田梅’がこのグループに属し、ウメとアンズの雑種と推定される‘小笠原’や日本アンズの‘平和’などが、このグループに分類された。第2章第2節の結果と同様に、これらのグループ内では中国アンズの‘麦黄準杏’とヨーロッパアンズの‘ブレンハイム’が、また、日本アンズの‘平和’と‘甲州大実’がクラスターを形成した。人工交雑により作成したAM2とAM3の種間雑種系統と自然交雑種‘豊後’の2系統と‘西洋梅’は、同じクラスターを形成した。

数量化理論第3類により、散布図を作成した結果、第1及び第2成分の寄与率が約46%と全分散の半分を占めた。(Fig. 2-4-6)。この図では‘甲州最小’や‘地蔵梅’のような純粋な小梅から‘小笠原’や‘平和’などの日本アンズまで比較的連続的な変異がみられた。ヨーロッパアンズの‘ブレンハイム’や中国アンズの‘麦黄準杏’はこれら、日本在来のアンズやウメと類似性が低く、離れた位置にプロットされた。デンドログラムと同様に、AM2とAM3の系統は‘西洋梅’や‘豊後’と同じグループを形成した。‘高田梅’はこれらの杏梅よりもさらに日本アンズのグループに近いところにプロットされた。

考 察

1.ウメ・アンズ雑種個体の形態的、生態的特性

種間雑種は一般的に、花粉の稔性が低下する。両親の形態や生態の特性に差異がみられる場合、雑種後代ではその特性に変異がみられる。‘西洋梅’、‘豊後’(平塚)、『高田梅』、などのウメとアンズの種間雑種と推定される品種は花粉の稔性が低く、葉や核の形状、果実の大きさ、核の粘離に基本となる種と異なっていることが確かめられた。特に、花粉の稔性、果実の大きさ、葉形指数、核の形状(Fig. 2-4-2)などは連続的な変異がみられた。人工交雑したAMとMA系統についてはあまり、調査できなかったが、このように一部の形態的、生態的特性についてはウメから、アンズにかけて変異の連続性がみられた。

2).ウメ・アンズ雑種個体の遺伝的特性

ウメ、アンズ及びウメとアンズの人工交雑系統と自然交雑品種と考えられる系統のゲノムの類似性を比較した結果、‘豊後’、‘西洋梅’、‘高田梅’は人工交雑系統と類似性が高かった。散布図の累積寄与率は約46%となり、この値は数量化理論第3類の分析において、かなり信頼できる数値であると考えられる。これまでの経験で、雑種の系統はその両親の中間地点にクラスターを形成する傾向がみられ、‘豊後’、‘西洋梅’はAM2とAM3の系統が形成したクラスターにプロットされている。‘高田梅’や人工交雑系統については形態的特性が十分調査できていないが、土師ら(1993)はスモモ亜属の花柄の長さを調査し、それらは、比較的、種特異的であり、‘高田梅’はアンズのグループに属していると報告した。RAPD分析でも同じ結果が得られているので、‘高田梅’はアンズ系のウメというよりは、ウメ系アンズではないかと推察された。

‘豊後’の2系統と‘西洋梅’は、人工雑種のAMの5系統とともに、ウメのグループ内でサブグループを形成している。‘豊後’と‘西洋梅’は枝が太く、花が桃色で、‘豊後’の久留米系統と‘西洋梅’はたく葉が掌型であるなどアンズに似た形質を多く持っているが、形態的な特性はウメにより近いものである。しかし、花粉稔性が低いことから考えても、ウメとアンズの自然交雑種であると推察された。

麓(1972)は種子タンパクの、アイソザイム分析で‘豊後’の泳動パターンはウメに類似していることを述べている。‘豊後’などの雑種系統はウメとアンズの交雑により派生したものと考えられたが、母系の推定は不明であるため、細胞質に関する研究が必要であると思われた。対照品種として供試したその他のアンズ、ウメの栽培品種は本章第1節、及び第2節で得られた結果と矛盾せず、ウメとアンズの種間雑種にはヨーロッパアンズは関与していないと推察された。

摘 要

‘豊後’などウメとアンズの自然交雑種と考えられている系統と人工交雑で得られた系統について形態的・生態的特性を調査し、またそれらのゲノムの類似度をRAPD分析法により比較した。

開花期、花色、葉形指数、花粉の稔性、核の粘離、核の性状など形態及び生態的特性を調査した結果、これらの系統で変異が認められた。果実の大きさと核の形状については、ウメからアンズにかけて連続した変異がみられた。

RAPD分析の結果、‘豊後’と‘西洋梅’は人工交雑系統のAMと類似度が高く、デンドログラム、散布図で1つのクラスターを形成した。‘高田梅’は日本のアンズと類似性が高く、供試した品種・系統では最もアンズの影響を受けているものと考えられた。

ヨーロッパアンズと中国アンズはこれらの系統と類似性が低く、交雑には関与していないものと推察された。以上のことより、‘豊後’などの雑種系統はウメとアンズの交雑により派生したものと考えられた。

Table 2-4-1. Material plants for RAPD analysis

Code	Cultivars & hybrids	Species
1	Koushiusaishou	<i>P. mume</i>
2	Jizouume	<i>P. mume</i>
3	Shirokaga	<i>P. mume</i>
4	Taihei	<i>P. mume</i>
5	Bungo(Hiratsuka)	<i>P. mume</i>
6	Bungo(Kurume)	<i>P. mume</i>
7	Seiyoubai	<i>P. mume</i>
8	Takadaume	<i>P. mume</i>
9	MA1-2	<i>P. mume</i> × <i>armeniaca</i>
10	AM1-11	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>
11	AM2-1	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>
12	AM2-2	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>
13	AM2-4	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>
14	AM3-1	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>
15	AM4-3	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>
16	Ogasawara	<i>P. armeniaca</i>
17	Heiwa	<i>P. armeniaca</i>
18	Koushiuoumi	<i>P. armeniaca</i>
19	Mai-huang-zhun-xing	<i>P. armeniaca</i>
20	Blenheim	<i>P. armeniaca</i>
	MA1=	Shirokaga × Heiwa
	AM1=	Koushiuoumi × Jizouume
	AM2=	Heiwa × Jizouume
	AM3=	Ogasawara × Jizouume
	AM4=	Mai-huang-zhun-xing × Jizouume

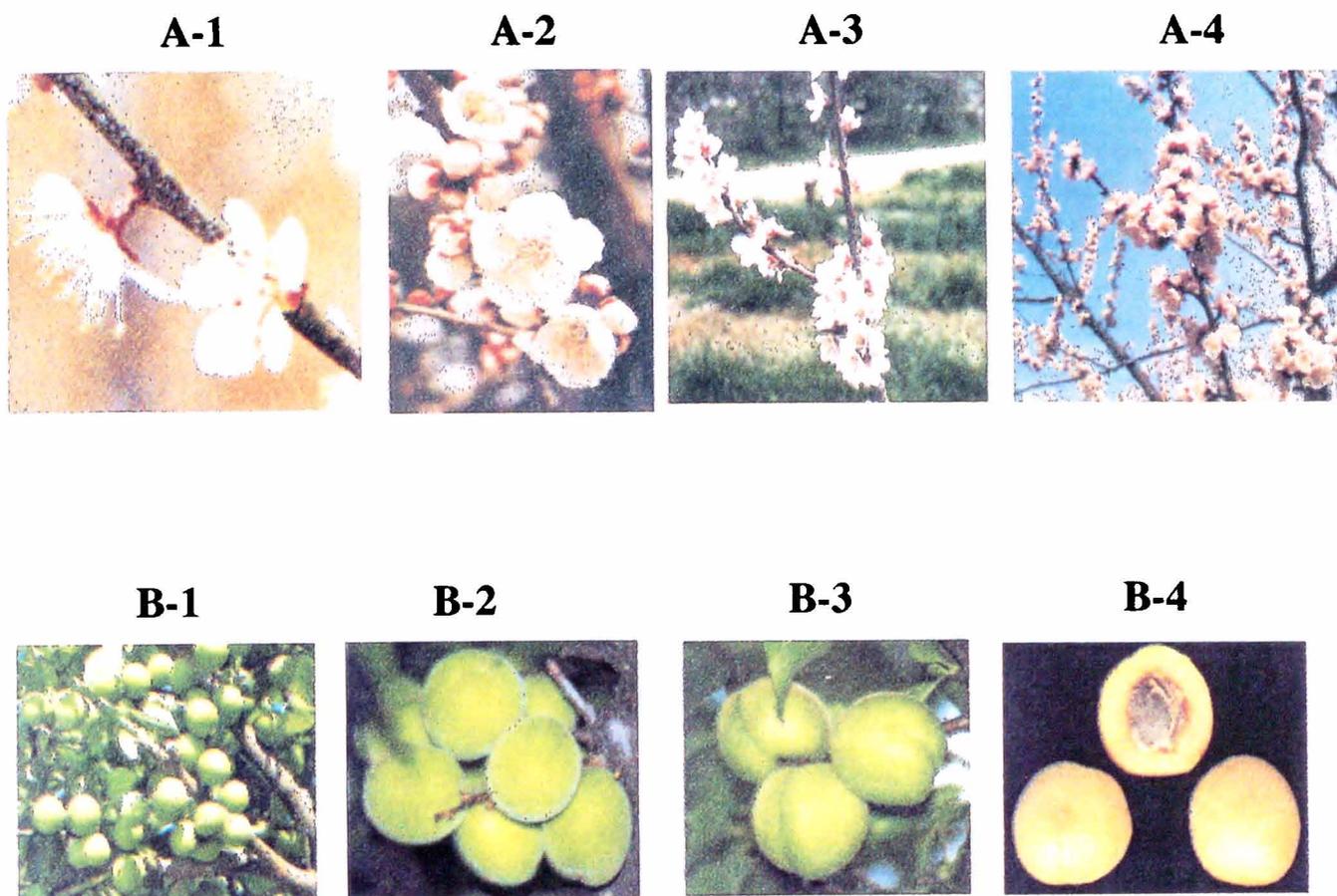


Fig. 2-4-1. Morphological characteristics of mume, apricot and their hybrids. A-1 : flower of 'Jizoume', A-2 : flower of 'Bungo', A-3 : flower of AM-2, A-4 : flower of 'Satsuki'. B-1 : fruit of 'Ryukyokoume', B-2 : fruit of 'Bungo', B-3 : fruit of 'Takadaume', and fruit of B-4 : 'Heiwa'.

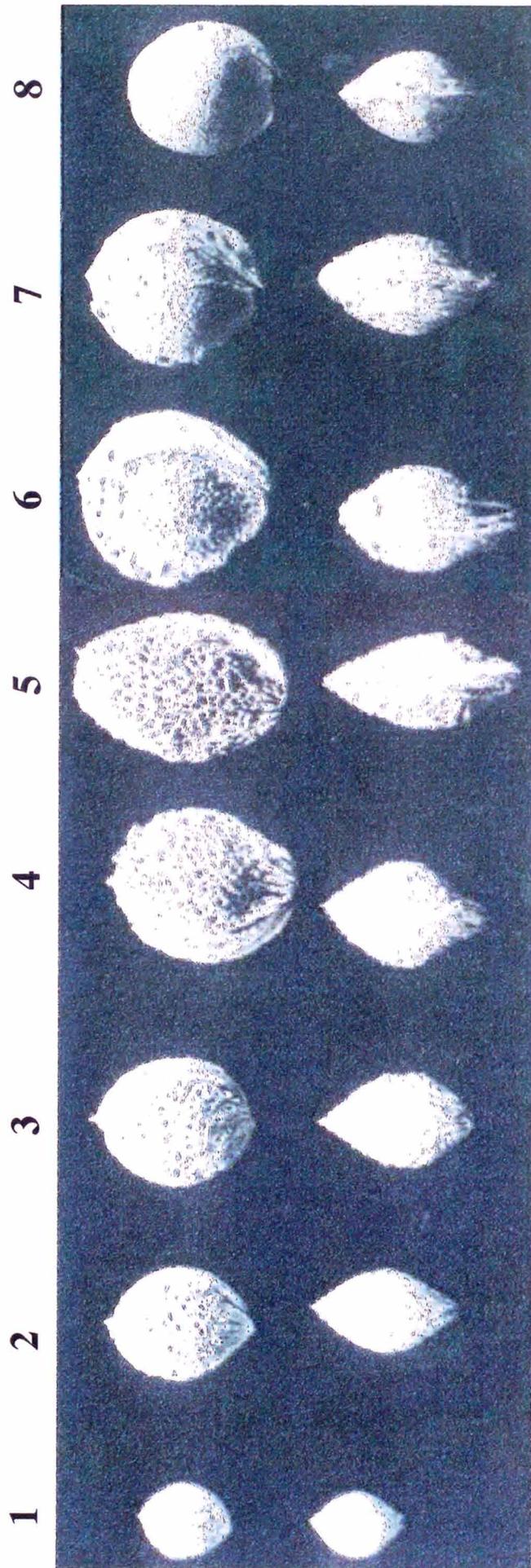


Fig. 2-4-2. Stone shapes of mumes, apricots and their hybrid plants. 1 : small fruit mume, 2, 3 : Medium fruit mume, 4 : large fruit mume, 5 : mume-apricot hybrids, 6 : apricot-mume hybrids. 7 : Japanese apricot and 8 : Chinese apricot.

Table 2-4-2. Some morphological and ecological characteristics of material plants

Code	Cultivars & hybrids	Species	Flowering time	Pollen fertility (%)	Flower color	Flesh color	Stone freeness	Type of stipule
1	Koushūsalshou	<i>P. mume</i>	Ear.-Mar.	43.7	White	Yellow green	Cling	Sword
2	Jizoume	<i>P. mume</i>	Ear.-Mar.	92.2	White	Yellow green	Cling	Sword
3	Shirokaga	<i>P. mume</i>	Ear.-Mar.~Mid-Mar.	10.1	White	Green	Cling	Sword
4	Taihei	<i>P. mume</i>	Mid.-Mar.~Late-Mar.	0	White	Yellow green	Cling	Sword
5	Bungo(Hiratsuka)	<i>P. mume</i>	Mid.-Mar.	0	Pink	Yellow green	Cling	Sword
6	Bungo(Kurume)	<i>P. mume</i>	Mid.-Mar.	56.8	Pink	Yellow green	Cling	Sword~Palm
7	Seyoubai	<i>P. mume</i>	Mid.-Mar.~Late-Mar.	25.1	Pink	Yellow green	Cling	Palm
8	Takadaume	<i>P. mume</i>	—	—	—	—	Cling	Sword
9	MA1-2	<i>P. mume</i> × <i>armeniaca</i>	—	—	Milky white	—	Cling	—
10	AM1-11	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>	—	—	—	—	—	—
11	AM2-1	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>	—	—	—	—	—	—
12	AM2-2	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>	—	—	—	—	—	—
13	AM2-4	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>	—	—	—	—	—	—
14	AM3-1	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>	—	—	Milky white	—	—	—
15	AM4-3	<i>P. armeniaca</i> × <i>mume</i>	—	—	Pale pink	—	—	—
16	Ogasawara	<i>P. armeniaca</i>	Mid.-Mar.~Late-Mar.	65.7	Pale pink	Yellow orange	Semi-Free	Sword
17	Heiwa	<i>P. armeniaca</i>	Late-Mar.	84.9	Deep pink	Orange	Free	Palm
18	Koushiuomi	<i>P. armeniaca</i>	Late-Mar.	87.5	Pink	Orange	Free	Palm
19	Mai-huang-zhun-xing	<i>P. armeniaca</i>	Late-Mar.	95.7	Pale pink	Yellow orange	Free	Palm
20	Blenheim	<i>P. armeniaca</i>	Ear.-Apr.	91	Pale pink	Yellow	Free	Palm

MA1= Shirokaga × Heiwa

AM1= Koushiuomi × Jizoume

AM2= Heiwa × Jizoume

AM3= Ogasawara × Jizoume

AM4= Mai-huang-zhun-xing × Jizoume

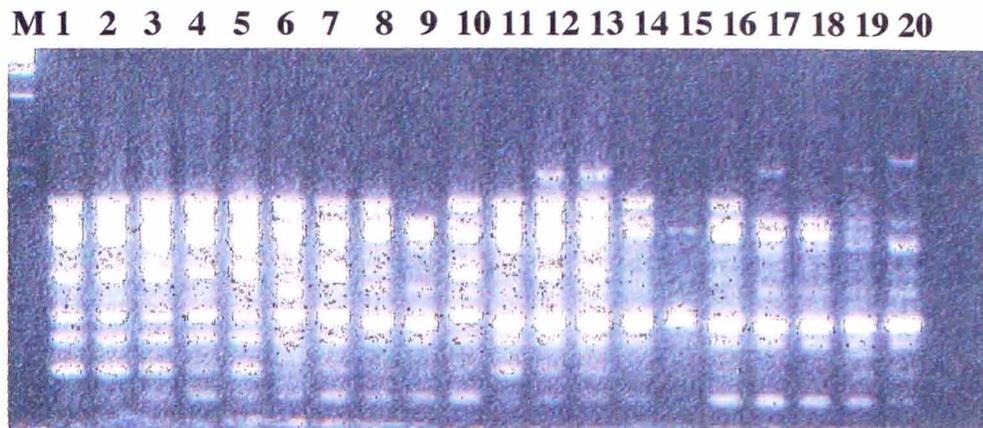


Fig. 2-4-3. DNA fingerprint amplified from genomic DNA of mums, apricots and their hybrids by primer 60. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

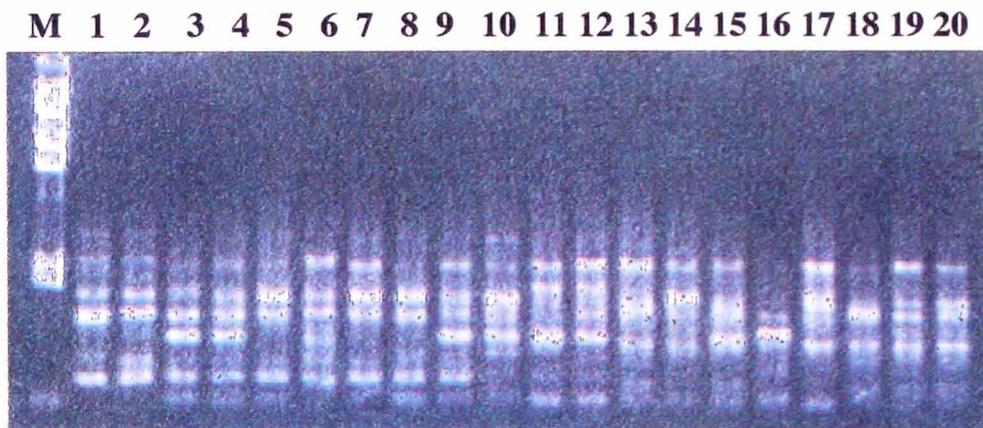


Fig. 2-4-4. DNA fingerprint amplified from genomic DNA of mums, apricots and their hybrids by primer 77. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

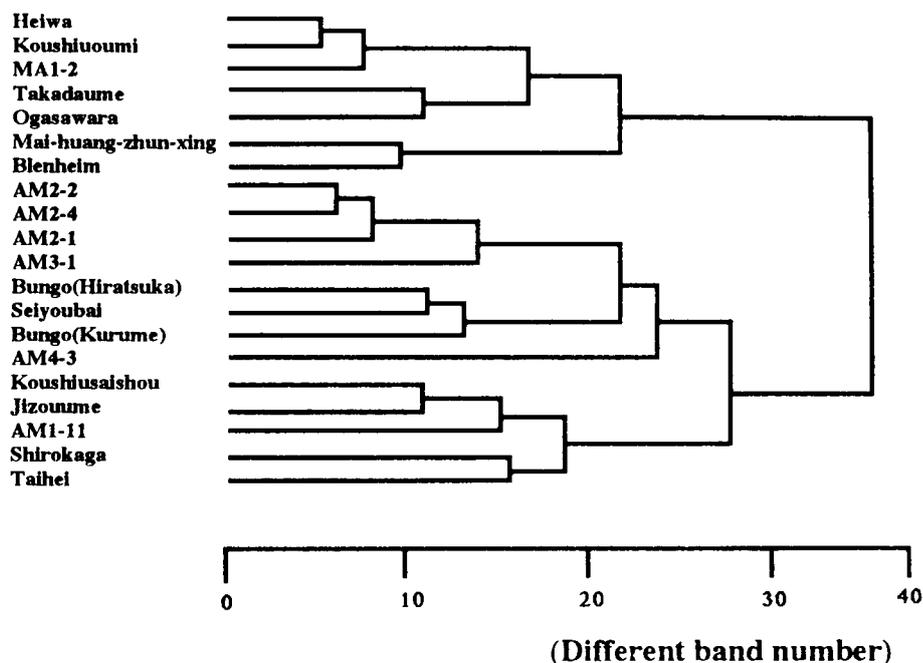


Fig. 2-4-5. Dendrogram of material plants by cluster analysis using group average method.

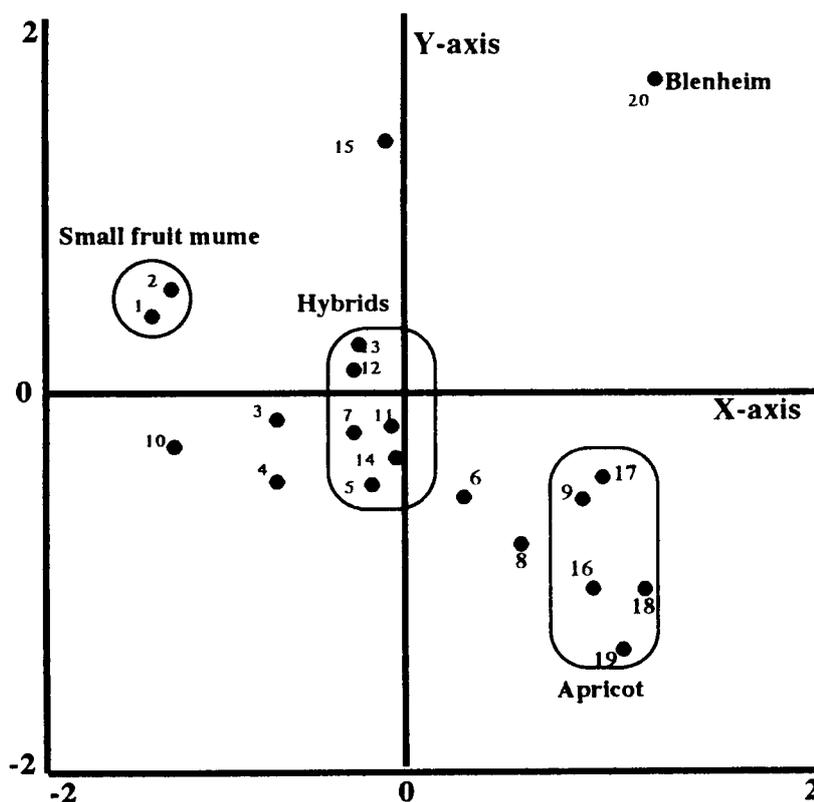


Fig. 2-4-6. Scattergram by quantification of the third type. Each material was plotted according to its principal component score. X axis : first principal component, Y axis : second principal component.

第5節 スモモ-アンズ及びスモモ-ウメ種間雑種の系統分類

目的

‘李梅’、‘仁杏’ (Ren-xing)、‘梅桃杏’、は形態的にみてウメ、スモモ、アンズの自然交雑種ではないかといわれている(上林、1927、吉田、1987)。果樹試験場の育種計画においても、スモモ亜属内での種間交雑が試みられ、すももうめ中間母本農1号の‘PM1-1’及び同2号の‘PM1-4’などの系統が育成されている(京谷ら、1988)。このようにスモモ、アンズ、ウメは遺伝的に近縁であり、自然条件下でも十分に交雑が可能であると考えられるので、‘李梅’、‘仁杏’、‘梅桃杏’は種間交雑により派生したものではないかと推定される。そこで、人工交雑により得られたPM系統、及びPA系統とこれら自然交雑種と思われる3品種の形態的、生態的特性、及び遺伝的特性を調査し、どのような親植物から由来したかを検討する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場にて収集・保存されているウメ3品種、スモモ2品種、アンズ4品種、それに育成中のスモモとウメの種間雑種6系統、スモモとアンズの種間雑種5系統の葉を採集し、実験に供試した(Table 2-5-1)。

2).方法

第1章第1節の方法に従ってRAPD分析を行った。形態と生態の特性調査は農林水産省の品種特性調査法に従った。

結果

1). ‘李梅’、‘仁杏’、及び‘梅桃杏’の形態的特性、生態的特性

スモモとウメの自然交雑による品種といわれる‘李梅’と両者を人工交雑して育成したPM系統、スモモとアンズの自然交雑によるものといわれる‘仁杏’、‘梅桃杏’と両者を人工交雑して育成したPA系統を供試した。葉形、1花房中の花数、花卉の色、開花期、花粉稔性、果皮の毛じ、果肉色、核の粘離、核の形状などを吉田が調査したので、その結果をTable 2-5-2に示した。スモモとウメの花は白色、アンズの花は桃色である。1花房中の花数はスモモは2~3花、ウメとアンズは1花である。PM系統と‘李梅’は1花房中1~3花と変異があり、花卉はいずれも白色であった。PA系統と‘仁杏’は1花房中1から3花と変異があり花卉は紅色から淡桃色を示したが、‘梅桃杏’は1花房中1花で、花卉の色も濃桃色を呈した。スモモ、ウメ、アンズの親品種は高い花粉稔性を示したが、PM系統と‘李梅’はいずれも花粉の稔性が低く、PA系統も‘PA2-16’を除き、稔性の低いものが多かった。

果皮の毛じはウメとアンズは有毛、スモモは無毛である。PM系統と‘李梅’、PA系統と‘仁杏’、‘梅桃杏’はいずれも有毛であった。しかし、‘仁杏’は毛じが短く、発生密度は極めて少ない。果肉と核の離れやすさはスモモとウメが粘核、アンズが離核である。PM系統と‘李梅’はいずれも粘核であり、離核を示したのは‘平和’、‘甲

州大実’と‘PA3-1’だけであった。‘仁杏’は粘核、‘梅桃杏’は半粘核を示した。核表面の紋様はスモモは平滑、ウメは点状で浅く、アンズはあわ状で滑らかである。しかし、ウメとアンズの種間雑種といわれている‘豊後’と同じように、PM系統と‘李梅’は核の刻が深く、粗であった。形態的特性からみて‘李梅’はスモモとウメの両方の形質を有しており、‘仁杏’もスモモとアンズの両方の形質を有していた。‘梅桃杏’は形態的特性と生態的特性だけでは識別が難しかった。

2). ‘李梅’、‘仁杏’、及び‘梅桃杏’の遺伝的特性

‘李梅’、‘仁杏’、‘梅桃杏’と人工交雑で得られたPM、PA両系統のRAPDパターンを比較し、その遺伝的背景を15種類のプライマーを用いて検討した。総数で174本の増幅DNA断片が得られた。供試した15種類のプライマー(プライマー番号; 16, 42, 45, 48, 60, 65, 70, 77, 79, 101, 137, 145, 152, 163, 183)のうち、15種類のプライマーから再現性のある50個のRAPDSが検出された。(3.3RAPDS/primer)。プライマー70と183で作成した電気泳動図をそれぞれFig. 2-5-3、Fig. 2-5-4に示した。第1章第1節の結果と同様にF1個体にみられたバンドは各両親にみられ、増幅DNA断片が遺伝していることが確かめられた。各系統間の非類似度を求めた結果、最小で、PM1-1とPM1-4の間で0.04、また最高で‘PM1-1’と‘梅桃杏’の間で0.72を示した(Table 2-5-2)。これらのデータをもとにクラスター分析によりデンドログラムを作成した(Fig. 2-5-5)。デンドログラムは、1)スモモ、2)スモモとウメの種間雑種、3)ウメ、4)アンズとスモモの種間雑種、5)アンズの5つのグループに大別された。PA1-3とPM1-9を除く他の人工交雑系統は‘李梅’及び‘仁杏’とクラスターを形成した。グループ間は比較的類似性が低く、これらの類似性は低いと考えられた。数量化理論第3類により2成分を抽出し、第一成分をX軸に、第二成分をY軸にして2次元配置でプロットした(Fig. 2-5-6)。これら2成分で全分散の43%の寄与率を示した。親系統である‘甲州最小’と‘地蔵梅’、‘万左衛門’と‘ソルダム’、そして‘平和’と‘甲州大実’がウメ、スモモ、アンズのグループを形成し、それらの交雑種であるPM系統及びPA系統は一部を除きそれらの中間にプロットされた。‘李梅’はPM系統のグループにプロットされた。‘仁杏’はスモモとアンズの中間的な位置にプロットされたものの、PA系統とは少し異なる位置であった。‘梅桃杏’はアンズのグループの近縁にプロットされた。

考 察

1). ‘李梅’、‘仁杏’、及び‘梅桃杏’の形態的、生態的特性

種間雑種は一般的に花粉稔性が低い傾向がみられる。‘李梅’は花粉の稔性が低く、果色が赤色で、1花房当たりの花数が2から3とスモモと同じ形質を示した。実際ウメとスモモは交雑が可能であるために‘李梅’はスモモとウメの交雑種と推察された。また、‘仁杏’は1花房当たりの花数が2から3とスモモと類似しており、果皮の毛じも短く、粗なのでスモモの形質を受け継ぐものであると思われる。しかし、‘梅桃杏’は花粉の稔性が比較的高く、しかも1花房中1花であり、形態的にはスモモとの関連性は評価できない。

2). ‘李梅’、‘仁杏’、及び‘梅桃杏’の遺伝的特性

クラスター分析及び、数量化理論第3類で分析した結果、グループ間の類似性が低いため、その分類群が明瞭に与えられた。これまでの経験から、散布図では交雑種は両親の中間地点にプロットされる傾向がみられている。スモモとウメの人工交雑で得られたPM系統では、PM1-9以外のすべての系統は散布図においてウメグループとスモモグループの中間地点にプロットされた。PM1-9はサンプリングした時点でにすでに枯死しており、台木品種をサンプリングしたことが確かめられ、この結果はサンプリングミスにより生じた。‘李梅’は花粉稔性も低く、また、PM系統とクラスターを形成しており、スモモとウメの種間雑種と考えられる。‘仁杏’、‘梅桃杏’はPA系統とは離れた位置にプロットされたが、‘仁杏’はスモモグループとアンズグループの中間地点にプロットされたことから、スモモとアンズの種間雑種である可能性が強いと考えられた。形態的に検討すると、1花房当たりの花数はスモモとアンズの中間値を示し、核の性状はスモモと同じ粘核性であるが、開花期はアンズと同時期であるなど、スモモとアンズ両方の形態的特性を受け継いでいると思われた。本章第3節の結果が示すようにスモモは変異が大きいので、交雑親の選抜が実際の親系統と異なれば、これらの差異が生じることは十分に考えられる。偶然に、コムギの核DNAにコードされている5SRNA遺伝子間領域であるNTS領域(Non transcribed spacer)を増幅するユニバーサルプライマーでフィンガープリントを作成したところ、‘仁杏’に特異的なバンドがミロバランスモモ420・2・2に検出された(Fig. 5-2-10)。このことから‘仁杏’がスモモとアンズの種間雑種であると仮定すれば、親系統はニホンスモモではなく、ミロバランスモモであると推定している。

‘梅桃杏’はアンズグループの近くにプロットされた。また、果色や核の性状がスモモとアンズの中間形質を持つものの、1花房当たりの花数、開花期、葉形指数、毛じの有無に関しては、アンズの形質を示すことから‘梅桃杏’はアンズに極めて近いことが示唆された。データからは遺伝学的に‘梅桃杏’がアンズとスモモの種間雑種であるという見解を支持することは難しく、むしろ、アンズから分化した、あるいは、アンズより古い時代の植物である可能性が考えられた。

以上のことから、‘李梅’、‘仁杏’はスモモとウメやアンズとの交雑により派生したものと考えられたが、本章第4節で述べたように母系の推定は不明であるため、細胞質に関する研究が必要があると考えらる。

摘 要

‘李梅’、‘仁杏’、‘梅桃杏’はスモモとウメ、あるいはスモモとアンズの自然交雑種ではないかといわれている。その真偽を確かめるために人工交雑により得られたPM系統、及びPA系統とこれら自然交雑種の可能性の高い3系統の形態的特性、生態的特性と遺伝的特性を調査した。

人工種間雑種であるPA系統やPM系統は、花粉の稔性が低い傾向が見られ、親個体間で形質に差異が見られた場合、その形質に対して多様性が見られた。‘李梅’、‘仁杏’、‘梅桃杏’においてもいくつか形質においての多様性が見られた。

スモモとウメ、スモモとアンズの自然交雑品種であると考えられる‘李梅’、‘仁

杏’、‘梅桃杏’と人工交雑で得られたPM、PA系統のRAPDパターンを比較し、その遺伝的特性を検討した。デンドログラムでは、PA1-3とPM1-9を除く他の人工交雑系統は‘李梅’及び‘仁杏’とクラスターを形成した。グループ間は比較的類似性が低く、これらの表的距離は長いと考えられた。散布図では、親系統である甲州最小’と‘地蔵梅’、‘万左衛門’と‘ソルダム’、そして‘平和’と‘甲州大実’がウメ、スモモ、アンズのグループを形成し、それらの交雑種であるPM系統及びPA系統は一部を除きそれらの中間にプロットされた。‘李梅’はPM系統とグループを形成しており、花粉稔性も低いことからスモモとウメの種間雑種と考えられる。‘仁杏’はPA系統と群を形成しなかったがスモモグループとアンズグループの中間地点にプロットされたことから、スモモとアンズの種間雑種である可能性が高いと考えられた。‘梅桃杏’はアンズのグループの近縁にプロットされ、アンズとスモモの種間雑種であるという見解を支持することは難しいと推察した。

Table 2-5-1. Material plants for RAPD analysis

Code	Cultivars & hybrids	Species
1	Koushiusaishou	<i>P. mume</i>
2	Jizouume	<i>P. mume</i>
3	Sumomoume	<i>P. mume</i>
4	PM1-1	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>
5	PM1-4	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>
6	PM1-9	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>
7	PM1-12	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>
8	PM1-13	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>
9	PM1-24	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>
10	Sordum	<i>P. salicina</i>
11	Manzaemon	<i>P. salicina</i>
12	PA1-3	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>
13	PA2-5	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>
14	PA2-16	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>
15	PA2-20	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>
16	PA3-1	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>
17	Ren-xing	<i>P. armeniaca</i>
18	Baitoukyou	<i>P. armeniaca</i>
19	Heiwa	<i>P. armeniaca</i>
20	Koushiuoumi	<i>P. armeniaca</i>

PM1=Sordum × Jizouume

PA1=Sordum × Heiwa

PA2=Sordum × Koushiuoumi

PA3=Red June × Heiwa

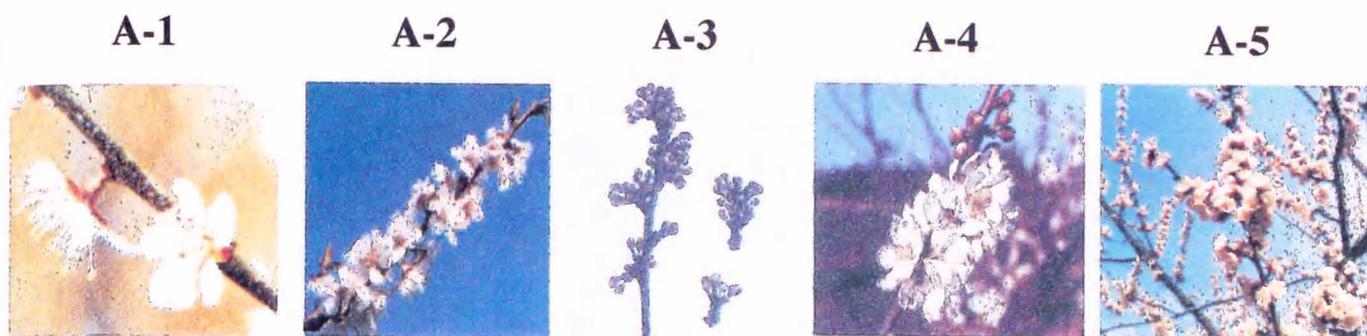


Fig. 2-5-1, Flowers of 'Jizouume' (mume) (A-1), PM 1-1 (A-2), 'Sordum' (plum) (A-3), PA2-20 (A-4), and 'Satsuki' (apricot) (A-5).

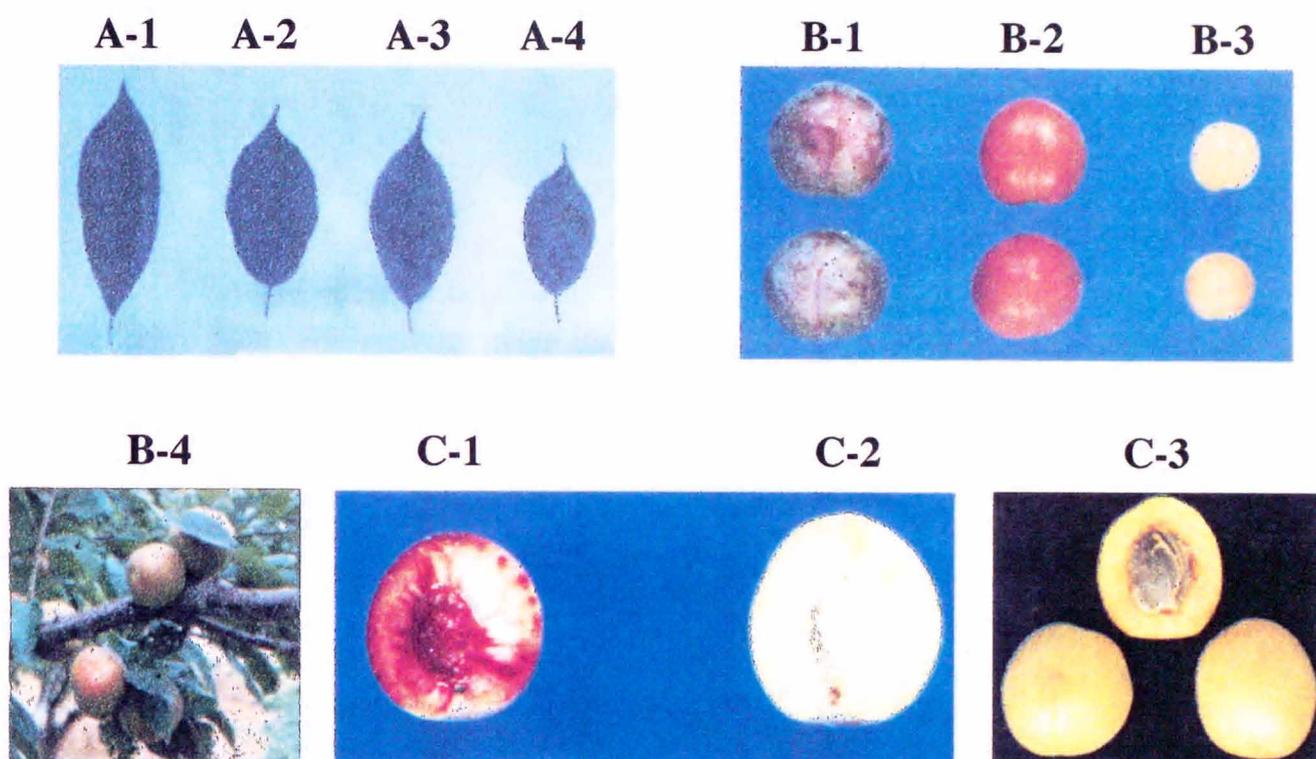


Fig. 2-5-2, Leaves of 'Sordum' (A-1), PM 1-1 (A-2), PM1-4 (A-3) and 'Jizouume' (A-4), fruits of 'Sordum' (B-1), PM 1-1 (B-2), 'Jizouume' (B-3), PA2-21(B-4), and fleshes of PM1-1(C-1), PM1-4(C-2) and Heiwa(C-3).

Table 2-5-2. Some morphological and ecological characteristics of material plants

Code	Cultivars & hybrids	Species	No. of flower per cluster	Flowering time	Pollen fertility (%)	Leaf (W/L)	Flesh color	Stone freeness	Skin pubescence
1	Koushinsashou	<i>P. mume</i>	1	Ear.-Mar.	44	0.45	Yellow green	Cling	Presence
2	Jizoume	<i>P. mume</i>	1	Ear.-Mar.	92	0.47	Yellow green	Cling	Presence
3	Sumomoume	<i>P. mume</i>	2~3	Mid.-Mar.	23	0.47	Red	Cling	Presence
4	PM1-1	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>	2~3	Late-Mar.~Ear.-Apr.	0	0.45	Red	Cling	Presence
5	PM1-4	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>	2~3	Late-Mar.~Ear.-Apr.	0	0.45	Yellow	Cling	Presence
6	PM1-9	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>	1~3	Late-Mar.~Ear.-Apr.	35	0.5	—	—	—
7	PM1-12	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>	—	—	—	—	—	—	—
8	PM1-13	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>	1~12	Late-Mar.~Ear.-Apr.	29	0.49	Yellow	Cling	Presence
9	PM1-24	<i>P. salicina</i> × <i>mume</i>	2~3	Late-Mar.~Ear.-Apr.	44	0.47	Red	Cling	Presence
10	Sordum	<i>P. salicina</i>	3	Ear.-Apr.	83	0.4	Red	Cling	Absence
11	Manzaemon	<i>P. salicina</i>	3	Ear.-Apr.	63	0.43	Red	Cling	Absence
12	PA1-3	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>	2~1	Ear.-Apr.	—	0.52	—	—	—
13	PA2-5	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>	2~3	Late-Mar.	57	0.54	Orange~Red	Cling	Presence
14	PA2-16	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>	1~3	Late-Mar.~Ear.-Apr.	80	0.56	Red	Cling	Presence
15	PA2-20	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>	2	Late-Mar.~Ear.-Apr.	45	0.51	Red	Semi-cling	Presence
16	PA3-1	<i>P. salicina</i> × <i>armeniaca</i>	2~1	Late-Mar.~Ear.-Apr.	37	0.45	Yellow	Cling	Presence
17	Ren-xing	<i>P. armeniaca</i>	2~1	Late-Mar.	—	—	Yellow	Cling	Trace
18	Baitoukyou	<i>P. armeniaca</i>	1	Late-Mar.	—	0.78	Orange~Red	Semi-cling	Presence
19	Heiwa	<i>P. armeniaca</i>	1	Late-Mar.	82	0.68	Orange	Free	Presence
20	Koushiuoumi	<i>P. armeniaca</i>	1	Late-Mar.	85	0.63	Orange	Free	Presence

PM1=Sordum × Jizoume

PA1=Sordum × Heiwa

PA2=Sordum × Koushiuoumi

PA3=Red June × Heiwa

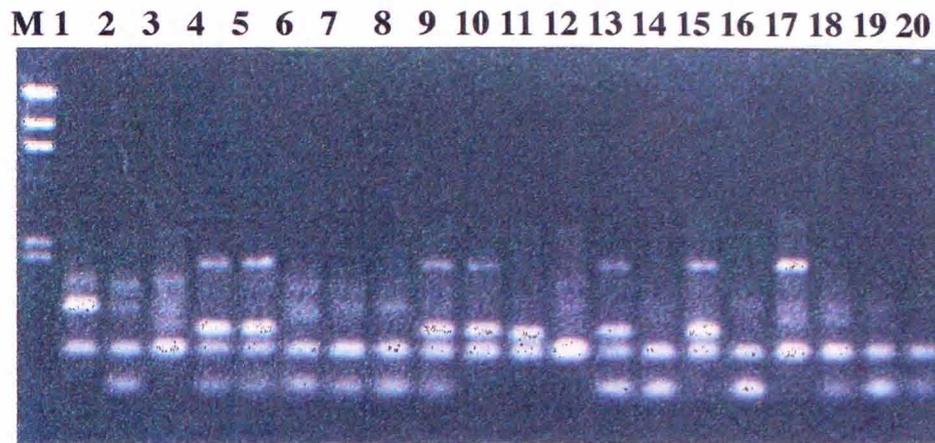


Fig. 2-5-3. DNA fingerprint amplified from genomic DNA of mumes, apricots, plums and their hybrids by primer 70. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.



Fig. 2-5-4. DNA fingerprint amplified from genomic DNA of mumes, apricots, plums and their hybrids by primer 183. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

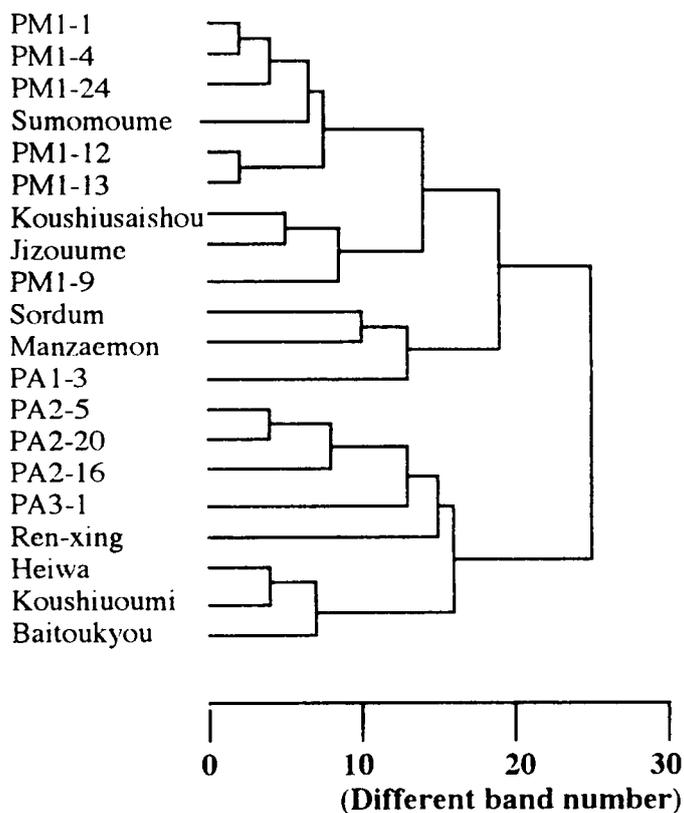


Fig. 2-5-5. Dendrogram of material plants by cluster analysis using group average method.

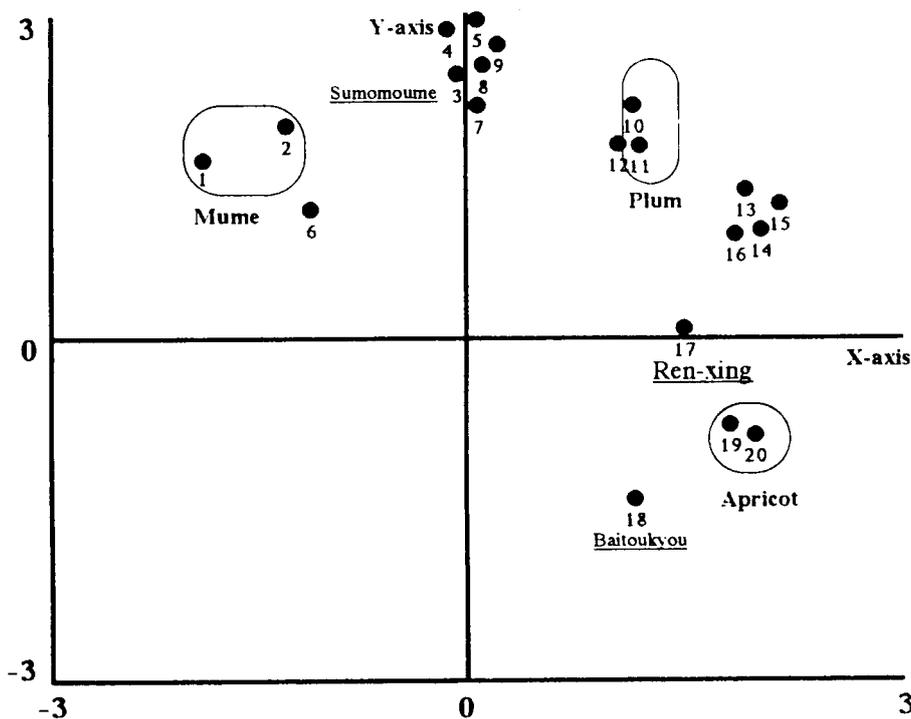


Fig. 2-5-6. Scattergram of material plants by quantification of the third type. Each material was plotted according to its principal component score. X-axis : first component, Y-axis : second component.

第3章 モモ亜属の系統分類

第1節 モモの系統分類

目 的

モモはモモ亜属に属し、原産は中国とされ、モモ(*P. persica* Batsch)、山桃(*P. davidiana* Carr.), 甘肅桃(*P. kansuensis* Rehd.), 光核桃(Tibetan peach; *P. mira* Koehne)、新疆桃(*P. ferganensis* Kost)などの種からなり、アーモンド(*P. amygdalus* Batsch)、オヒヨモモ(*P. triloba* Lindl.)などの近縁野生種が知られ、中国を中心にユーラシアに広く分布している。モモで栽培されているものは*P. persica* 1種で、他は台木などに利用されている。これまで、モモは主に形態的特性と生態的特性により分類されてきた(Hedrickら、1917、Kikuchi、1948、Hesse、1975、Wang、1990)。*P. persica* については研究が進んでおり、多くの遺伝子の表現型と遺伝子型が決定され(Knight、1968、吉田、1989)、また、アイソザイム分析(Arysekarら、1986)、RFLP分析(Eldredgeら、1992)、RAPD分析(Chaparroら、1994)など新しい手法により、品種識別、連鎖地図が報告されている。しかし、近縁野生種との類縁関係については報告例が少ない。そこで、RAPD分析法、葉緑体の特定領域を用いたPCR-RFLP分析法により、栽培種の*P. persica*と近縁野生種の*P. mira*を中心にモモの品種・系統の類縁関係を検討する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場で収集・保存されているモモとアーモンド49品種・系統の葉を採集し、実験に供試した(Table 3-1-1)。光核桃は1958年果樹試験場の山口正己らがネパール西部を探索し、標高2,300mから3,000mの地域で採集したものとイギリスのキュー植物園がブータンで採集したものを供試した。モモの代表的な形態をFig. 3-1-1、及びFig. 3-1-2に示した。また、近縁野生種の分布地域をFig. 3-1-3に示した。

2).方法

RAPD分析、及びPCR-RFLP分析は第1章第1節、及び第2節の方法に従った。但し、PCR-RFLP分析では、Table 1-3-1に示す*Nla* IIIと*Sau* 3AIを除く10種類の酵素を使用した。

結 果

1).RAPD分析法によるモモの系統分類

40種類のコモンプライマー(A00-A39)を用いて分析を行った。コモンプライマーA09で増幅した電気泳動図をFig. 3-1-4に示した。40種類のプライマーについて調査し

たところ総数で110個の再現性のあるRAPDsが検出された。各系統間の非共有バンド率を求めると、最小で‘光核桃85193’と‘光核桃85210’、‘光核桃84441’と‘光核桃85174’の系統間で2個のRAPDsが検出された(Table 3-1-2)。最大で‘オヒヨモモ’とブータンのモモ‘R-42-1’で83個のRAPDsが検出され、全ての品種・系統においては相互の識別が可能であった。得られた多型は栽培品種と近縁野生種の間で検出されたものが多く、栽培品種内での多型の出現頻度は比較的少なかった。

これらのデータをもとに系統間の距離行列を求め、群平均化法によりクラスター分析を行い、デンドログラムを作成した(Fig. 3-1-5)。デンドログラムは大きく近縁野生種と栽培種の2つのグループに分類された。*P. persica*及び、*P. mira*内の変異は比較的小さい。ブータンの光核桃である‘R-43-1’は地理的に他のネハールの光核桃と異なるがその変異は比較的小さい。ユスラウメ(Chinese bush cherry; *P. tomentosa* Thunb.)、オヒヨモモ、アーモンドはモモ栽培品種、光核桃、山桃と類似性が低かった。栽培品種内でのクラスタリングは分布地域による分類と類似していた。‘ネマガード’は山桃の実生といわれているが、山桃(David peach)とクラスターを形成しなかった。

数量化理論第3類により散布図を作成した(Fig. 3-1-6)。第1及び第2成分の寄与率は約65%で全変数の6割以上を説明し、非常に信頼度の高い散布図となった。散布図はクラスター分析の結果と同様に、大きく*P. persica*と*P. mira*のグループに分類され、ユスラウメ、オヒヨモモはこれらのグループと類似性がきわめて低かった。山桃は*P. persica*と類似性が高かった。アーモンド85124とネハールのモモは*P. persica*と*P. mira*の中間にプロットされた。

2).葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によるモモの系統分類

葉緑体にコードされているpsbA遺伝子、rbcL-ORF106遺伝子間領域、及びatpB-rbcL遺伝子間領域を増幅し、10種類の制限酵素についてこれらの増幅断片における認識部位の有無を調査した。アーモンド85214で検出されたRFLPパターンをFig. 3-1-7に示した。30通りの組み合わせで多型を示したものは、atpB-rbcL遺伝子間領域のMbo II処理でアーモンド85214に、Hinf I処理で全ての光核桃(R-43を含む)に、rbcL-ORF106遺伝子間領域のAlu I処理で*P. persica*にRFLPsが検出された(Fig. 3-1-8)。検出された変異はRAPD分析の結果と同じ傾向を示した。*P. persica*内の変異は検出できず、得られたRFLPsは種に特異的なものが多かった。

考 察

1).RAPD分析法によるモモの系統分類

これまでモモの栽培品種は、形態や用途により、普通モモ、油桃、蟠桃、小果の野生桃、観賞用の花桃などの品種群に分けられ、形態的には大きな変異がみられる。しかしながら、モモはゲノムの相同性が高く、ゲノムサイズがシロイヌナズナ(*Arabidopsis*

thaliana L.)の約2倍程度と小さいこと(Arumugana・Earle, 1991)から、アイソザイム(Arusekarら, 1986)やサザンプロット解析(Eldredgeら, 1992)では多型の出現頻度は極めて低く、品種識別が困難であった。RAPD分析によってChaparroら(1994)が連鎖地図の作成に成功したので、同方法によれば品種の識別が可能と予想された。このため、スクリーニングによって有効と認められたオヘロンプライマーを用いて分類を行ったが、栽培品種内の多型を十分に検出できず、実験を遂行することが困難であった。そのため、セミランダム塩基配列を持つコモンプライマーを適用し、品種、系統について分類を試みた。DNA多型の出現頻度は高く、栽培品種内の識別も可能であった。これはプライマーの塩基配列がグリセロリン酸カイネースの活性部位を参照して作成されたため、アニーリングの際、鋳型DNAとプライマーの会合率が増加するものと推察された。また、得られたDNAフィンガープリントは比較的安定したバンドパターンを示した。これはプライマーのベース数が増加し、 T_m 値が上昇した結果、設定温度を高くできたために生じたのではないかと推察した。栽培品種内の多型の出現頻度は低かったが、全ての品種・系統について相互の識別が可能であったので、スモモ亜属と同様にRAPD分析法がモモの品種識別に有効であると推察した。クラスター分析の結果、栽培品種(*P. persica*)と野生種及び近縁種のグループに分類され、栽培品種内と光核桃内の類似性はきわめて高く、そのゲノム特性が他の*Prunus*植物と大きく異なるものであると確かめられた。デンドログラムでは栽培種グループに‘光核桃85190’が分類されているがこの1系統だけが栽培品種と近縁であると考え難く、サンプリングの際、台木の品種と間違えたために生じたのではないかと推察した。台木として利用される‘ネマガード’は*P. davidiana*と*P. persica*の雑種ではないかといわれている(Brookら 1972)が、山桃とは類似度が低く、純粋なモモであると考えられた。散布図では寄与率が65%と非常に高く、これまでの分類結果で最高となった。デンドログラムと同様に供試材料は大きく2分され、*P. mira*グループと*P. persica*グループの変異が小さいことが確かめられた。アーモンド85124は由来が定かでない、データからは*P. persica*との雑種ではないかと推測した。オヒヨモモはモモと接ぎ木親和性が高く、形態的特性からみてもモモに近縁であると考えていたが、データからはこの推測は不可能と思われた。同様にユスラウメはモモの台木に利用されているがモモ亜属とは類似性が低く、その類縁性は低いと推察した。

2). 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によるモモの系統分類

30通りの組み合わせで検出したRFLPsは、ほとんどが種に特異的であり、偶発的に検出したと考えられるものは含まれていない。これらの結果はRAPD分析と矛盾しておらず、*P. persica*を基準に考えると近縁野生種は全て、遺伝的に遠縁であると考えられる。特にアーモンドはモモと比較してこれらの領域で変異に富んでおり、遺伝的に遠縁であると推察している。

以上の結果、栽培種内と光核桃内の遺伝的変異は小さいことが推察され、これまで

の結果と比較するとそのゲノム特性が他の*Prunus*植物と大きく異なるものであると確かめられた。対照的に種間においては十分な変異が見られ、これらの種特異性は育種体系、地理的要因、生殖機構が関連していると考えられる。

摘 要

RAPD分析法、葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法により、モモの品種・系統の類縁関係を検討した。40種類のコモンプライマーについて調査したところ、全ての品種・系統について相互の識別が可能であった。得られた多型のほとんどは栽培品種と近縁野生種の間で検出されたものが多く、栽培品種内の多型は比較的少なかった。クラスター分析の結果、デンドログラムは近縁野生種と栽培種の2つのグループに大別された。*P. persica*及び、*P. mira* 内の変異は比較的小さかった。ユスラウメ、オヒヨモモ、アーモンドはモモ栽培品種、光核桃、山桃(*P. davidiana*)と類似性が低かった。栽培品種内でのクラスタリングは分布地域を反映していた。数量化理論第3類により散布図を作成した結果、散布図の寄与率は約65%で全変数の6割以上を説明し、非常に信頼度の高い散布図となった。散布図はクラスター分析の結果と同様に、大きく*P. persica* と *P. mira* のグループに分類されユスラウメ、オヒヨモモはこれらのグループと類似性がきわめて低かった。山桃は*P. persica* と類似性が高かった。

葉緑体にコードされているpsbA遺伝子、rbcL-ORF106遺伝子間領域、及びatpB-rbcL遺伝子間領域を増幅し、12種類の制限酵素についてこれらの増幅断片における認識部位の有無を調査した。30通りの組み合わせで多型を示したものは、apB-rbcL遺伝子間領域のMbo II処理でアーモンド85214に、Hinf I処理で全ての光核桃(R-43を含む)に、rbcL-ORF106遺伝子間領域のAlu I 処理で*P. persica* にRFLPsが検出された。検出された変異はRAPD分析の結果と同じ傾向を示した。*P. persica* 内の変異は検出できず、得られたRFLPsは種に特異的なものが多かった。

栽培種と光核桃内の遺伝的変異は小さいことが推察され、これまでの結果と比較するとそのゲノム特性が他の*Prunus*植物と大きく異なるものであると確かめられた。対照的に種間においては十分な変異が見られ、これらの種特異性は育種体系、地理的要因、生殖機構が関連していると考えられる。

Table 3-1-1. Peaches for RAPD and PCR-RFLP analyses

Code	Varieties	Species	Origin
1	Ohiyomomo	<i>P. triloba</i>	China
2	Gower	<i>P. persica</i>	Asia
3	Harrow Blood	<i>P. persica</i>	Siberia
4	Nagano yasei tou (Early)	<i>P. persica</i>	Japan
5	Chichibu yasei tou No.1	<i>P. persica</i>	Japan
6	Chinese Blood	<i>P. persica</i>	China
7	Ohastumomo	<i>P. persica</i>	Japan
8	Tibetan peach 85193	<i>P. persica</i>	Nepal
9	Tibetan peach 85210	<i>P. persica</i>	Nepal
10	Tibetan peach 84441	<i>P. persica</i>	Nepal
11	Akita yasei tou No.2	<i>P. persica</i>	Japan
12	Almond 84444	<i>P. persica</i>	Nepal
13	Fei-cheng-tao	<i>P. persica</i>	China.
14	Paloro	<i>P. persica</i>	Europe
15	Chinese bush cherry 84019	<i>P. tomentosa</i>	China, Japan
16	Tibetan peach 85174	<i>P. mira</i>	Nepal
17	Tibetan peach 85164	<i>P. mira</i>	Nepal
18	Tibetan peach 84489	<i>P. mira</i>	Nepal
19	Peach seedling	<i>P. tomentosa</i>	Japan
20	Tibetan peach 85163	<i>P. mira</i>	Nepal
21	Late Crawford	<i>P. persica</i>	Europe
22	France peach	<i>P. persica</i>	Europe
23	Chinese bush cherry 84020	<i>P. tomentosa</i>	China, Japan
24	Tibetan peach 85058	<i>P. mira</i>	Nepal
25	Hakutou	<i>P. persica</i>	Japan
26	Almond85124	<i>P. amygdalus</i>	?
27	Tibetan peach 85054	<i>P. mira</i>	Nepal
28	Tibetan peach 85123	<i>P. mira</i>	Nepal
29	Tibetan peach 85176	<i>P. mira</i>	Nepal
30	Xiao-qing-pan-tao	<i>P. persica</i>	China
31	Elberta	<i>P. persica</i>	USA
32	Nemaguard	<i>P. persica</i>	USA
33	R-43	<i>P. mira</i>	Bhutan
34	R-42	<i>P. persica</i>	Bhutan
35	Mexican peach No.43	<i>P. persica</i>	Mexico
36	Noto yasei touNo.6	<i>P. persica</i>	Japan
37	Tibetan peach 85156	<i>P. mira</i>	Nepal
38	Hakuhou	<i>P. persica</i>	Japan
39	Okinawa	<i>P. persica</i>	Japan
40	Nagano yasei tou (Late)	<i>P. persica</i>	Japan
41	Kutou No.5	<i>P. persica</i>	Taiwan
42	Chichibu yasei tou No.4	<i>P. persica</i>	Japan
43	Akita yasei tou No.1	<i>P. persica</i>	Japan
44	Thai yasei tou	<i>P. persica</i>	Thailand
45	Chinese Cling	<i>P. persica</i>	China
46	Noto zairai tou No.9	<i>P. persica</i>	Japan
47	David peach	<i>P. davidiana</i>	China
48	Juseitou (single)	<i>P. persica</i>	China
49	Juseitou (double)	<i>P. persica</i>	China

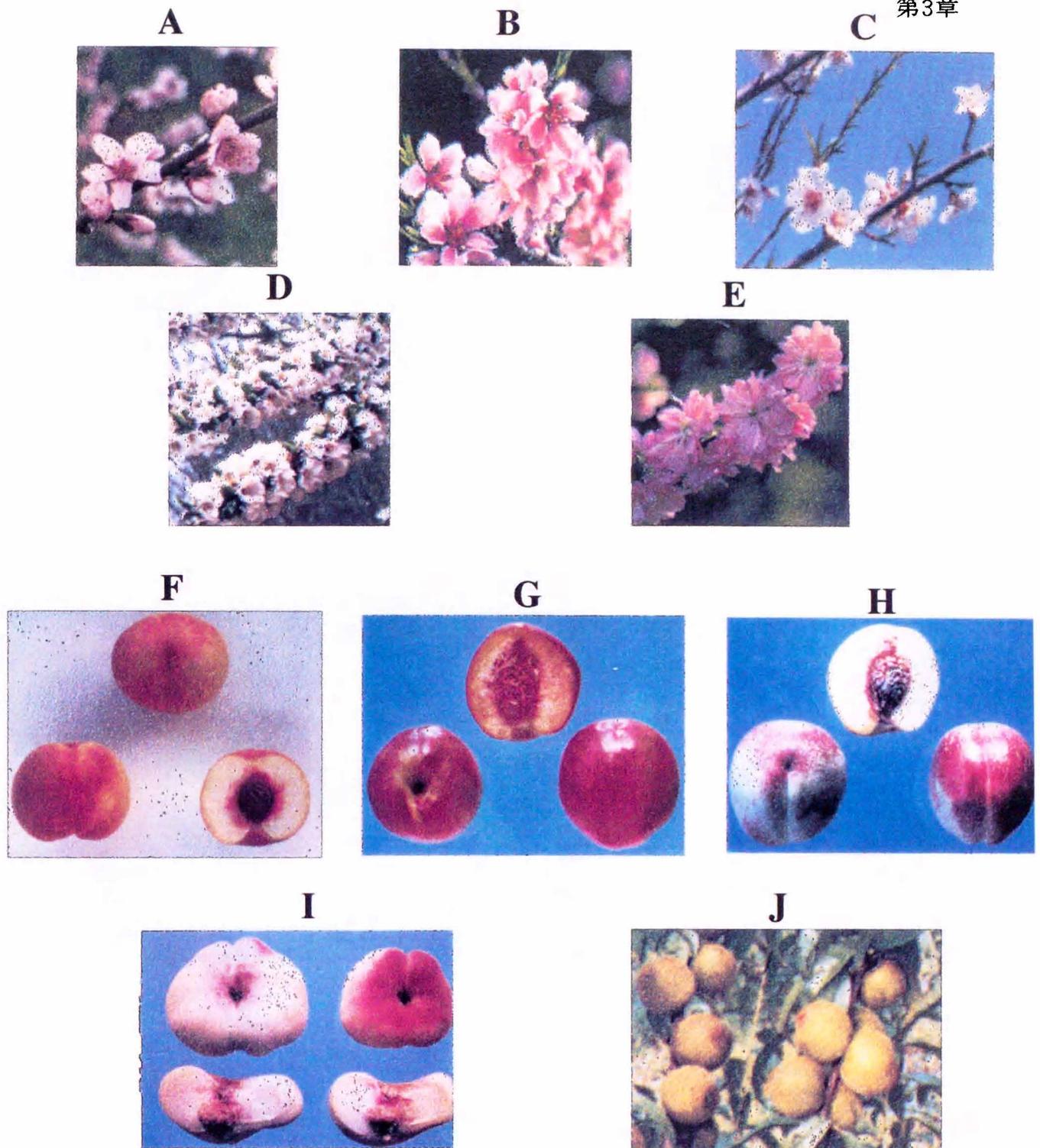


Fig. 3-1-1. Flowers and fruits of peaches. *P. persica* (A, B), *P. mira* (C) *P. tomentosa* (D), *P. triloba* (E). White peach (F), Yellow Nectarine (G), White Nectarine (H), Peento (I), Native peach (J).

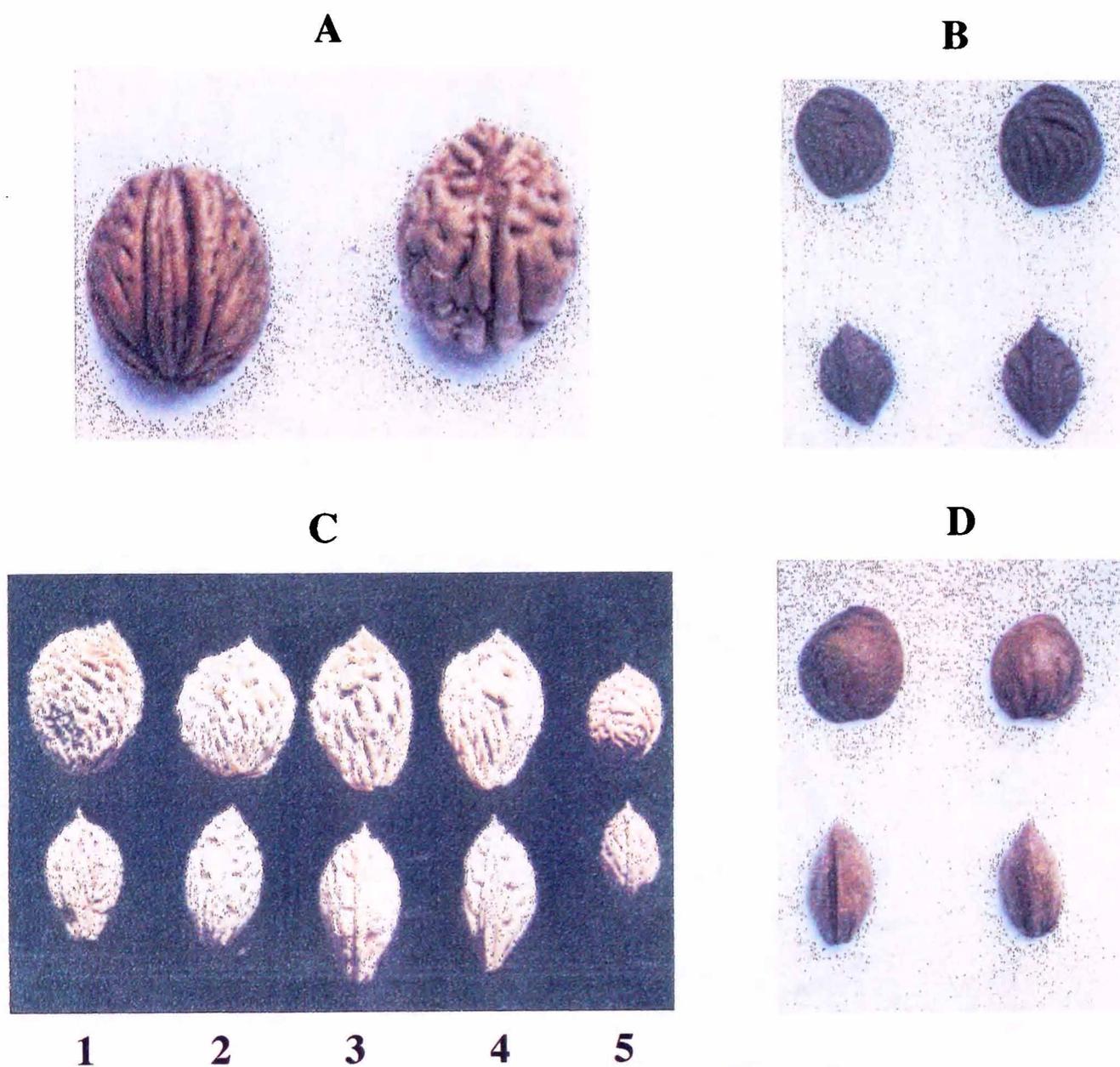


Fig. 3-1-2. Stone shapes of *P. davidiana* (A), *P. kansuensis* (B), *P. persica* (C) and *P. mira* (D).

(C) 1 ; European yellow peach, 2-3 ; Hybrid cultivars, 4 ; Chinese white peach, 5 ; Native peach.

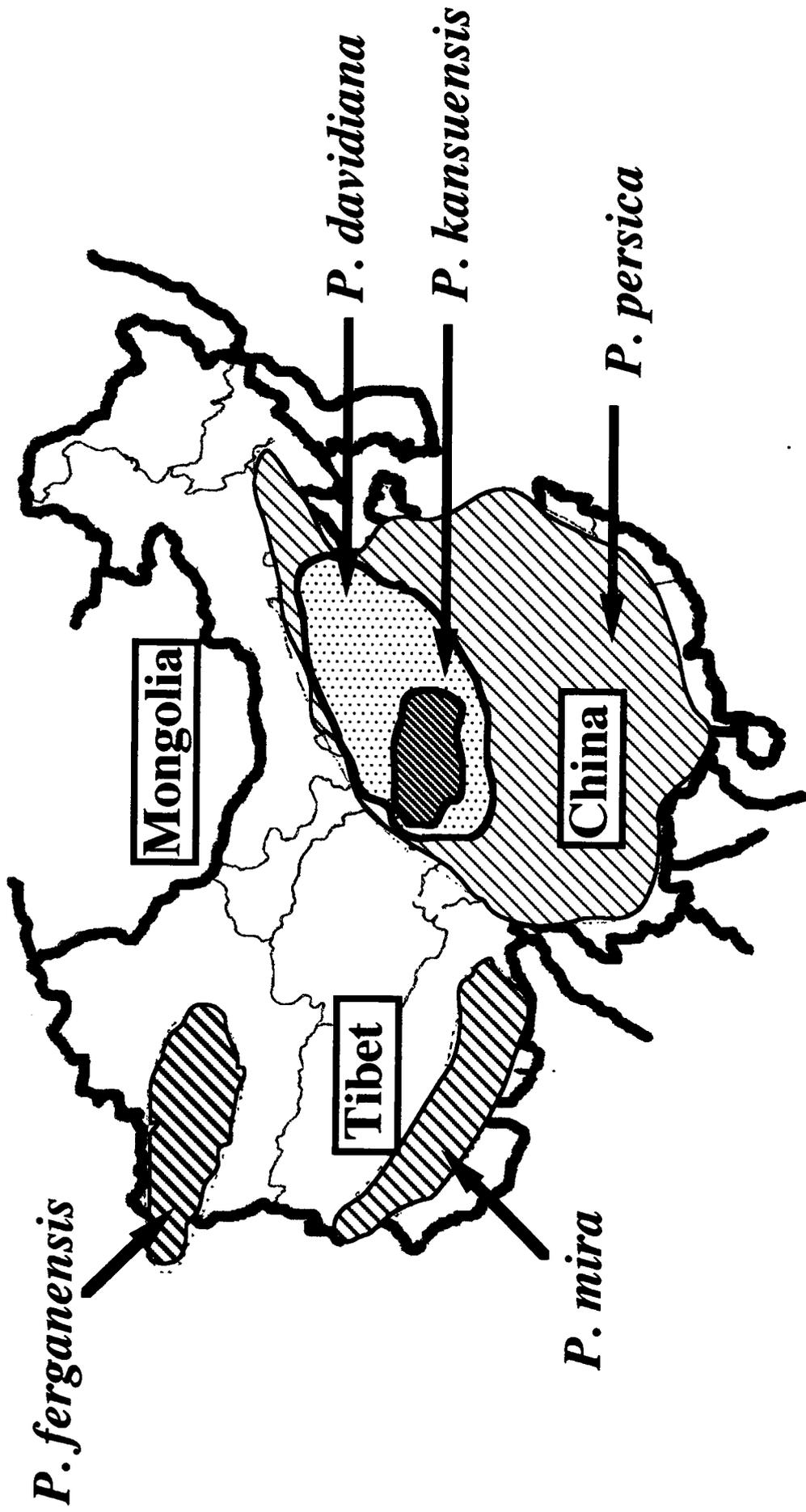


Fig. 3-1-3. Distribution of peach species.

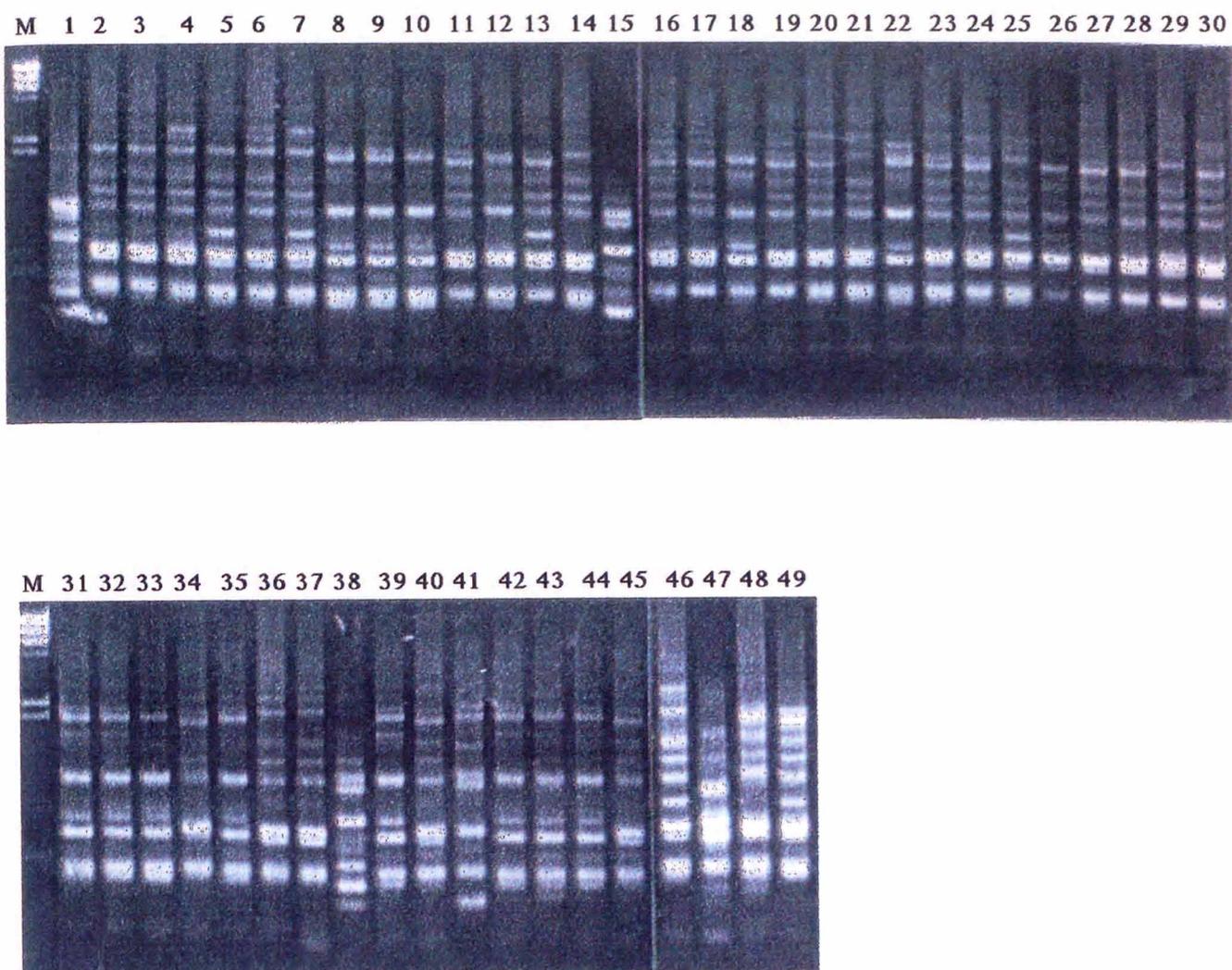


Fig. 3-1-4. RAPD patterns of 49 peach varieties by primer A09. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

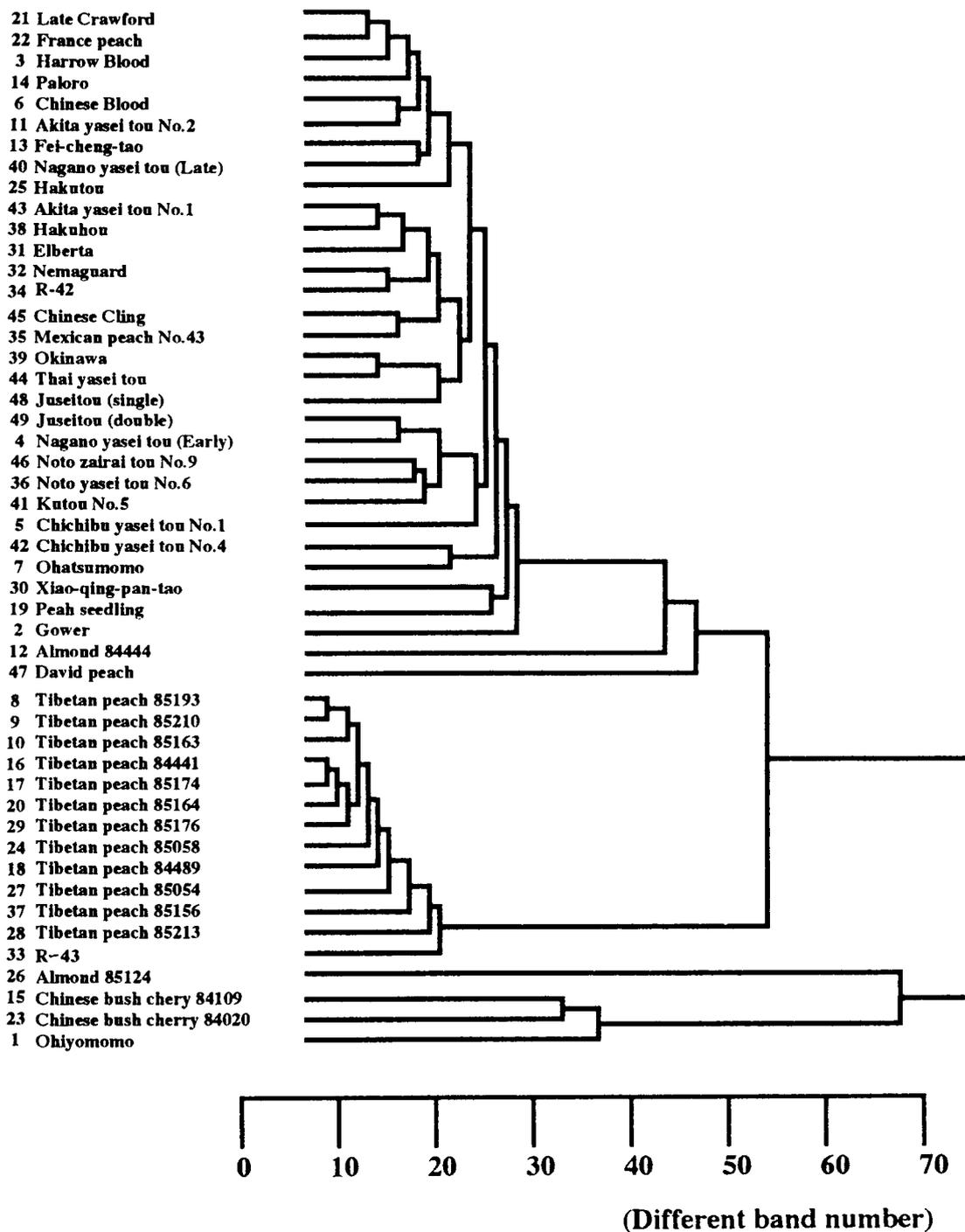


Fig. 3-1-5. Dendrogram of 49 peach and almond varieties by cluster analysis using group average method.

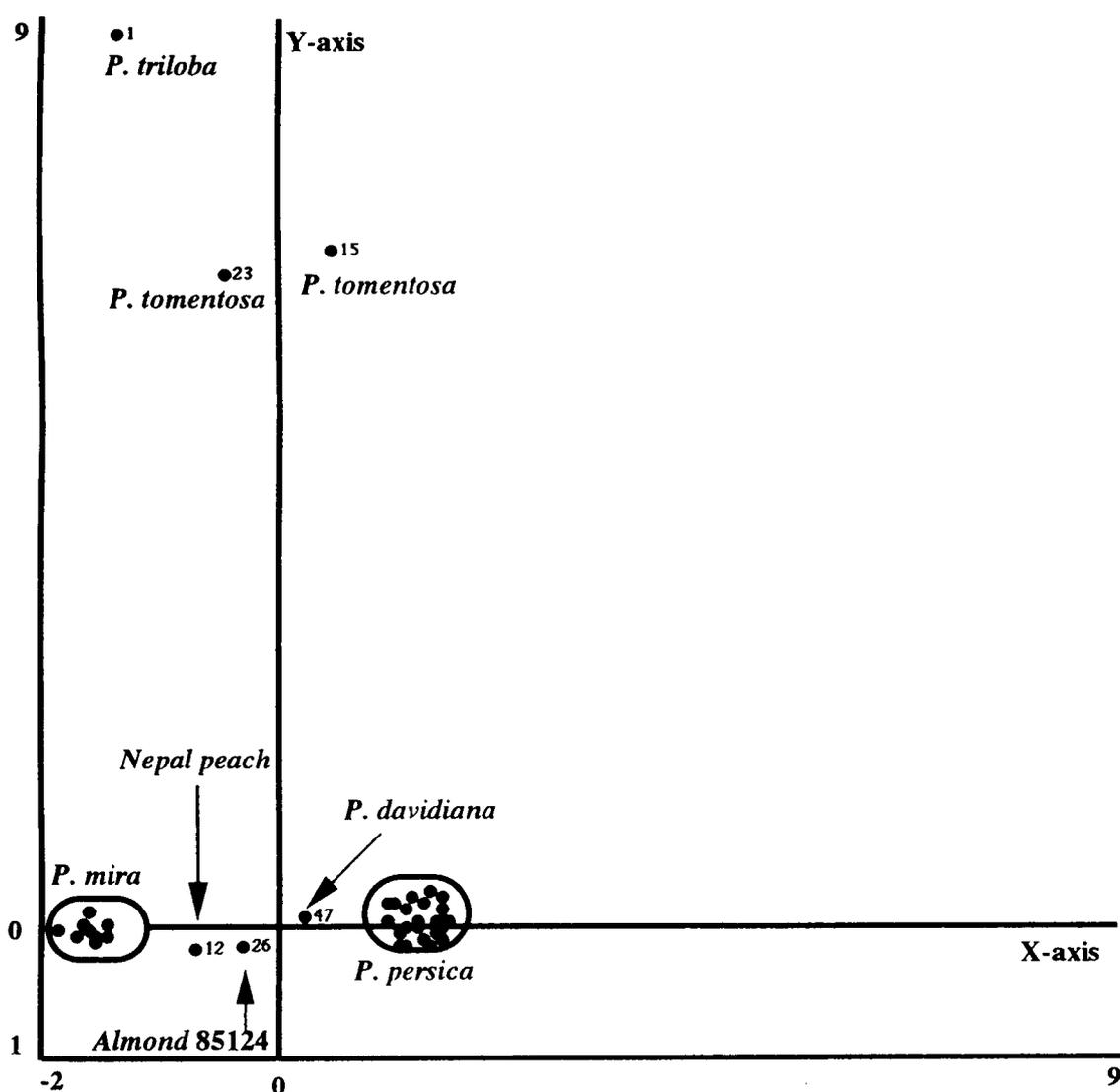


Fig. 3-1-6. Scattergram of peach and almond varieties by quantification of the third type. Each material was plotted according to its principal component score. X-axis : first component, Y-axis : second component.

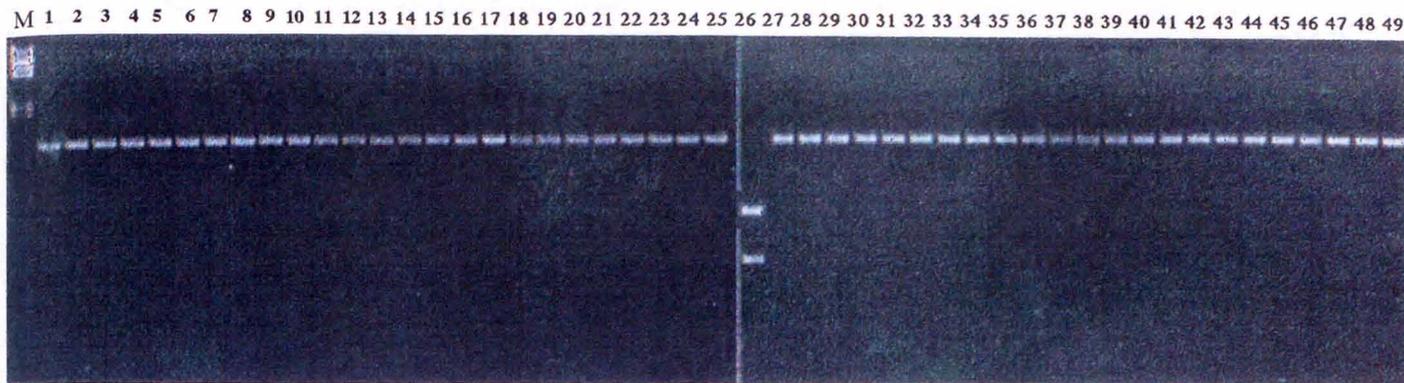
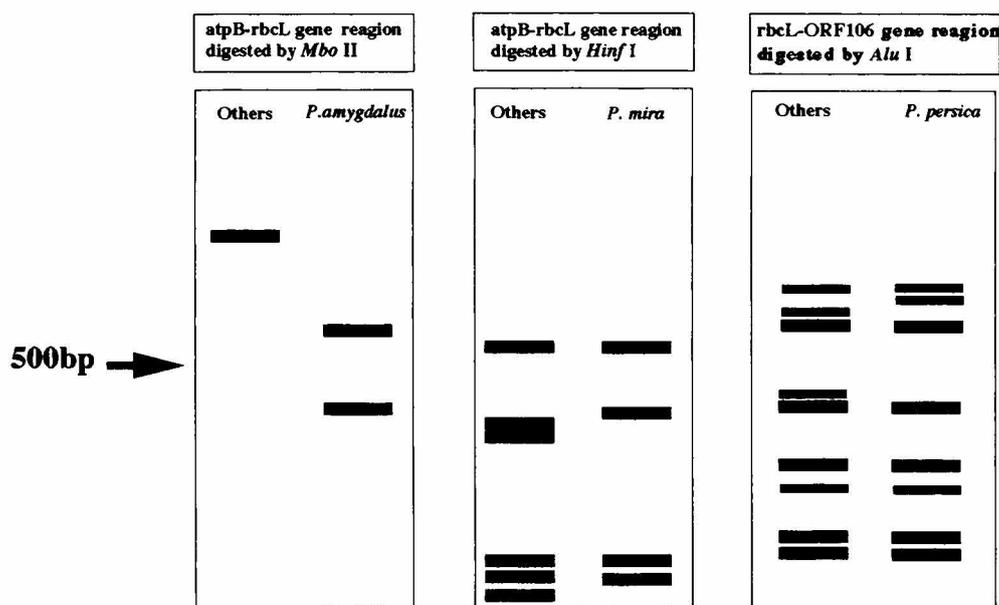


Fig. 3-1-7. RFLPs of atpB-rbcL regions amplified from genomic DNA of 42 plum varieties digested by *Mbo* II. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.



RFLP patterns of amplified fragments in peaches

Fig. 3-1-8. RFLP patterns obtained in this experiment.

第2節 アーモンドの系統分類

目 的

アーモンドは中央アジアが原産とされ、中央アジア、地中海沿岸、カリフォルニア、スペインなど乾燥地域で栽培化が進んでいる。日本は雨が多く、栽培が難しいので、その情報は極めて少ない。Kester・Asay(1975)はアーモンドは自家不和合性であり、形態的変異が大きい種であると述べている。また、アイソザイムの変異も同様に大きいと報告されている(Arulsekaraら、1986、Hauaggeら、1987)。前節でアーモンドを供試し、系統間の変異が大きいことが確かめられたが、供試数が少ないため集団としての変異を十分に把握できなかった。そこで、RAPD分析法、葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によりアーモンドの集団変異を調査する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場で収集・保存されているアーモンド49系統の葉を採集し、実験に供試した(Table 3-2-1)。これらは1995年果樹試験場の土師岳らがパキスタンで採集したものである。アーモンドの花、果実、核の形態をFig. 3-2-1に示した。また、供試材料の播種前の核の形状をFig. 3-2-2に示した。

2).方法

RAPD分析、及びPCR-RFLP分析は第1章第1節、及び第2節の方法に従った。但し、PCR-RFLP分析では、Table 1-3-1に示す *Nla* III と *Sau* 3AIを除く10種類の酵素を使用した。

結 果

1).RAPD分析法によるアーモンドの系統分類

22種類のコモンプライマー(A00-A04、A06、A07、A09、A10、A13、A15、A17、A21、A26、A30、A31、A32-A35、A37、A39)を用いて分析した。コモンプライマーA09で増幅した電気泳動図はFig. 3-2-3に示した。22種類のプライマーについて調査したところ総数で56個の再現性のあるRAPDsが検出された。各系統間の非共有バンド数を求めると、最小で025-1と025-2の系統間で2個、最大で032-3と0324で31個のRAPDsが検出され、全ての品種・系統において相互の識別が可能であった。これらのデータをもとに系統間の非共有バンド距離行列を求め、群平均化法によりクラスター分析を行い、デンドログラムを作成した(Fig. 3-2-4)。デンドログラムは野生種と栽培種の2つのグループに分類された。同じ系統内においても相互の類似性は高くなく(Table 3-2-2)、デンドログラムにおいても低次のクラスタリングは比較的少なかった。数量化理論第3類によ

り散布図を作成した(Fig. 3-2-5)。第1及び第2成分の寄与率は約26%で全変数の3割以下と少なく、データに一様性がみられなかった。散布図でもクラスター分析の結果と同様に、大きく野生種と栽培品種のグループに分類され、グループ内の変異は大きかった。系統番号が、031、032、033、036は現地で“kono”と呼ばれる野生種である。形態的に光核桃に類似した核を持っているが、変異の程度は栽培種と同程度で、特に変異に富んでいることはなかった。対照系統の002、008、035は全て栽培種で、デンドログラムと散布図で栽培種のグループに分類された。

2).葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によるモモの系統分類

葉緑体にコードされているpsbA遺伝子、rbcL-ORF106遺伝子間領域、及びatpB-rbcL遺伝子間領域を増幅し、10種類の制限酵素についてこれらの増幅断片における認識部位の有無を調査した。ウメと同様に供試材料内の変異は検出されず、全て、相同なRFLPパターンを示した。

考 察

1).RAPD分析法によるアーモンドの系統分類

アーモンドは国内で栽培がされておらず、品種・系統の入手は極めて困難で、これまで、解析が不可能であった。本実験では、果樹試験場の土師岳らがバキスタンで採集したものを供試し、RAPD分析法により、それらの変異と類縁関係を調査した。栽培品種と野生種ともに変異は大きく、同系統内の個体間の類似性は低かった。経済価値の高い栽培品種を加えることができなかつたため、系統間の類縁関係については検討できなかった。現地で“kono”と呼ばれる野生種は核の形態が他のアーモンドと異なり光核桃に類似していたが、遺伝的には栽培種と大きな差異はみられなかった。

2).葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によるモモの系統分類

30通りの組み合わせについて調査したところ、供試材料内の変異は全く検出されなかった。本実験で得られたRFLPパターンは前節のアーモンド85124と相同であった。これらの領域では、RAPDの結果と対照的に変異が見られず、保存性が高かった。Fig. 3-2-1に示したように核の形状など形態的変異が極めて大きく、またDNAレベルでも同様に変異が大きいことが確かめられた。アーモンドは異系交配集団であると報告されていることから、これらの変異は核依存ではないかと類推された。

摘 要

RAPD分析法、葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法により、アーモンド49系統の遺伝的変異と類縁関係を検討した。22種類のコモンプライマーを用いて調査したところ、全ての系統で相互の識別が可能であり、同系統内の個体間でさえ、相互の類似性は高くなかつた。クラスター分析、数量化理論第3類の結果、供試材料は大きく栽培

型と野生型にわかれ、各グループ内の変異は大きかった。

葉緑体にコードされているpsbA遺伝子、rbcL-ORF106遺伝子間領域、及びatpB-rbcL遺伝子間領域を増幅し、10種類の制限酵素についてこれらの増幅断片における認識部位の有無を調査した。全ての組み合わせにおいて、供試材料はみな相同なRFLPパターンを示し、これらの領域では保存性が高いことが確かめられた。形態的及び遺伝的変異は極めて大きく、異系交配集団であることが確かめられたので、アーモンドの変異は核依存ではないかと類推した。

Table 3-2-1. Almonds for RAPD and PCR-RFLP analyses

Code	Accession name	Type
1	003-3	Cultivated type
2	003-4	Cultivated type
3	007-1	Cultivated type
4	007-2	Cultivated type
5	007-5	Cultivated type
6	009-3	Cultivated type
7	009-4	Cultivated type
8	009-6	Cultivated type
9	009-8	Cultivated type
10	009-9	Cultivated type
11	015-1	Cultivated type
12	015-2	Cultivated type
13	015-3	Cultivated type
14	025-1	Cultivated type
15	025-2	Cultivated type
16	025-4	Cultivated type
17	025-5	Cultivated type
18	025-6	Cultivated type
19	027-1	Cultivated type
20	027-2	Cultivated type
21	027-4	Cultivated type
22	027-5	Cultivated type
23	027-8	Cultivated type
24	030-1	Cultivated type
25	030-4	Cultivated type
26	030-5	Cultivated type
27	030-6	Cultivated type
28	035-1	Cultivated type
29	035-3	Cultivated type
30	035-5	Cultivated type
31	031-2	Wild type
32	031-3	Wild type
33	032-2	Wild type
34	032-3	Wild type
35	032-4	Wild type
36	032-5	Wild type
37	032-7	Wild type
38	033-2	Wild type
39	033-8	Wild type
40	036-7	Wild type
41	036-9	Wild type
42	036-10	Wild type
43	036-18	Wild type
44	036-20	Wild type
45	002-1	Control
46	002-7	Control
47	008-1	Control
48	008-2	Control
49	035-2	Control

A



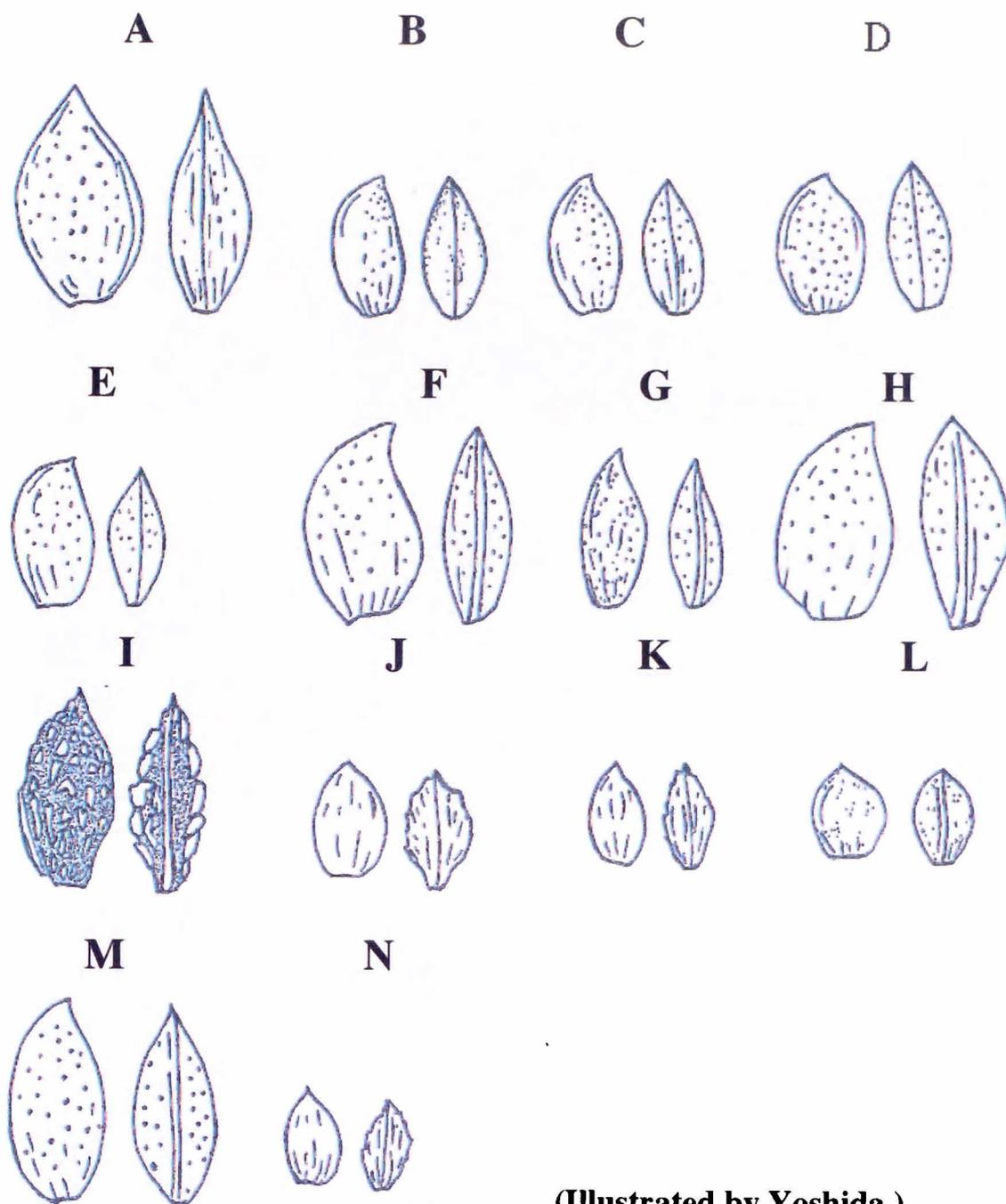
B



C



Fig. 3-2-1. Flower(A), fruit(B) and stone shapes(C) of almond.



(Illustrated by Yoshida)

**Fig. 3-2-2. Stone shapes as follows ;
 J, K, L, N = wild type 'Kono',
 B, C, D, E, F, G, H, I = cultivated type,
 A, M = cultivar.**

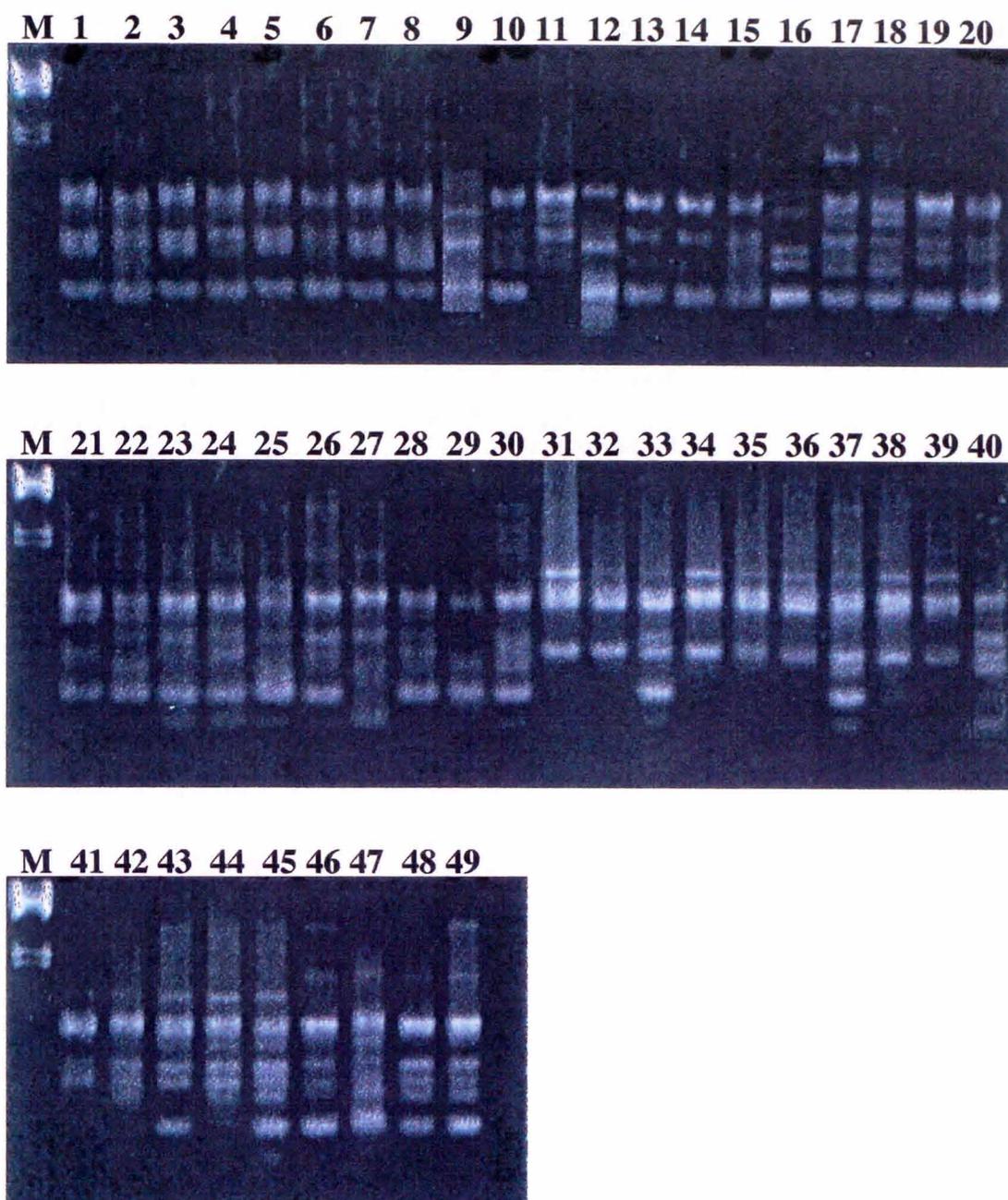


Fig. 3-2-3. RAPD patterns of 49 almond accessions by primer A30. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

Table 3-2-2. Dissimilarity index between each pair of almond accessions

Code	Accession name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	3	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
1	003-3		.11	.16	.18	.23	.30	.27	.29	.21	.29	.38	.25	.25	.43	.27	.21	.23	.30	.25	.29	.29	.32	.34	.32	.27	.21	.23	.41	.45	.36	.38	.46	.54	.39	.39	.43	.45	.27	.34	.29	.36	.32	.39	.34	.38	.27						
2	003-4			.27	.21	.21	.23	.27	.23	.29	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	.29	.43	.30	
3	007-1				.16	.13	.25	.32	.29	.30	.34	.30	.20	.20	.38	.29	.20	.32	.29	.30	.30	.27	.23	.30	.32	.32	.23	.23	.32	.36	.30	.32	.38	.45	.38	.34	.34	.39	.25	.39	.30	.38	.34	.38	.34	.38	.36	.32	.36				
4	007-2					.14	.27	.27	.27	.29	.36	.38	.21	.21	.39	.27	.21	.34	.38	.36	.32	.29	.29	.36	.23	.25	.23	.29	.34	.41	.46	.50	.38	.43	.43	.41	.46	.50	.38	.43	.43	.41	.46	.50	.38	.43	.43	.41	.46	.50	.38	.43	.43
5	007-5						.23	.30	.27	.29	.32	.29	.34	.18	.18	.36	.27	.18	.30	.34	.36	.29	.32	.29	.32	.34	.25	.27	.21	.23	.30	.34	.29	.34	.50	.36	.36	.39	.38	.23	.34	.29	.32	.36	.36	.23	.20	.30					
6	009-3							.07	.07	.20	.16	.16	.20	.32	.16	.20	.23	.21	.23	.18	.25	.30	.27	.20	.30	.25	.23	.29	.27	.18	.39	.39	.30	.32	.41	.41	.34	.34	.38	.36	.29	.32	.30	.34	.30	.27	.32	.36	.25				
7	009-4								.11	.13	.16	.20	.20	.27	.36	.23	.27	.23	.25	.30	.25	.32	.34	.21	.27	.25	.30	.18	.43	.30	.36	.45	.41	.30	.38	.45	.41	.30	.38	.45	.41	.30	.38	.45	.41	.30	.38	.45	.41	.30	.38	.45	
8	009-6									.21	.21	.14	.27	.18	.18	.21	.30	.29	.27	.38	.29	.32	.29	.25	.32	.27	.29	.27	.29	.23	.41	.39	.34	.36	.45	.41	.38	.41	.36	.32	.32	.34	.41	.27	.27	.36	.36	.25					
9	009-8										.11	.18	.30	.18	.21	.21	.27	.29	.20	.25	.29	.18	.18	.32	.27	.25	.23	.29	.20	.45	.41	.39	.34	.46	.46	.46	.46	.39	.43	.34	.38	.36	.43	.39	.36	.41	.41	.30	.38	.45			
10	009-9											.18	.34	.18	.21	.21	.30	.29	.20	.27	.32	.29	.21	.25	.32	.34	.29	.27	.25	.20	.41	.34	.29	.30	.39	.36	.29	.36	.41	.23	.25	.29	.32	.29	.34	.45	.34						
11	015-1												.20	.18	.25	.27	.29	.36	.29	.29	.36	.29	.39	.34	.25	.30	.25	.20	.34	.34	.29	.27	.36	.39	.32	.32	.34	.30	.29	.32	.36	.29	.38	.34	.34	.34	.34	.34	.34	.34			
12	015-2													.20	.18	.25	.27	.29	.36	.29	.29	.36	.29	.39	.34	.25	.30	.25	.20	.34	.34	.29	.27	.36	.39	.32	.32	.34	.30	.29	.32	.36	.29	.38	.34	.34	.34	.34	.34	.34	.34		
13	015-3														.23	.38	.29	.34	.36	.39	.38	.38	.38	.38	.38	.36	.30	.36	.38	.32	.39	.43	.38	.32	.45	.41	.45	.41	.41	.43	.36	.39	.38	.41	.34	.34	.46	.43	.46				
14	025-1															.04	.21	.20	.18	.23	.29	.25	.21	.18	.32	.23	.14	.27	.29	.23	.30	.30	.29	.27	.36	.39	.36	.32	.32	.34	.25	.29	.32	.25	.30	.30	.30	.30	.30				
15	025-2																.25	.16	.18	.27	.27	.25	.21	.18	.32	.23	.18	.27	.29	.23	.30	.34	.32	.27	.36	.39	.36	.36	.32	.30	.23	.34	.21	.32	.32	.29	.34	.30	.30				
16	025-4																	.34	.32	.34	.25	.25	.29	.25	.39	.30	.29	.34	.32	.30	.45	.38	.36	.34	.39	.39	.36	.32	.04	.38	.34	.36	.36	.36	.32	.38	.41	.41					
17	025-5																		.13	.21	.29	.23	.20	.23	.30	.29	.23	.25	.30	.21	.36	.43	.34	.36	.41	.45	.34	.41	.45	.43	.32	.36	.27	.34	.23	.20	.29	.29	.25				
18	025-6																			.20	.20	.21	.18	.18	.21	.23	.21	.23	.25	.20	.38	.41	.36	.38	.43	.46	.36	.39	.43	.38	.30	.34	.29	.32	.21	.20	.20	.20	.20				
19	027-1																			.25	.30	.16	.20	.27	.36	.27	.29	.23	.21	.36	.39	.34	.39	.41	.45	.41	.41	.41	.46	.39	.39	.38	.41	.30	.23	.29	.36	.25					
20	027-2																			.27	.27	.20	.27	.30	.25	.23	.39	.34	.29	.43	.36	.41	.43	.38	.38	.41	.38	.38	.36	.36	.36	.38	.34	.30	.36	.32	.36	.32					
21	027-4																			.18	.21	.29	.43	.30	.36	.34	.32	.27	.45	.41	.43	.38	.43	.46	.36	.39	.43	.38	.30	.34	.29	.32	.21	.20	.20	.20	.20	.20					
22	027-5																			.21	.29	.29	.30	.16	.20	.27	.36	.27	.29	.23	.21	.36	.39	.34	.39	.41	.45	.41	.41	.46	.39	.39	.38	.41	.30	.23	.29	.36	.25				
23	027-8																			.14	.29	.27	.29	.34	.32	.23	.41	.34	.36	.38	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36			
24	030-1																			.18	.20	.21	.23	.29	.23	.38	.41	.36	.41	.43	.39	.39	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38	.38		
25	030-4																			.27	.25	.30	.29	.34	.32	.23	.41	.34	.36	.38	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36	.36		
26	030-5																			.27	.27	.20	.27	.30	.25	.23	.39	.34	.29	.43	.36	.41	.43	.38	.43	.46	.36	.39	.43	.38	.30	.34	.29	.32	.21	.20	.20	.20	.20	.20			
27	030-6																			.20	.20	.21	.18	.18	.21	.23	.21	.23	.25	.20	.38	.41	.36	.38	.43	.46	.36	.39	.43	.38	.30	.34	.29	.32	.21	.20	.20	.20	.20	.20			
28	035-1																			.20	.20	.21	.18	.18	.21	.23	.21	.23	.25	.20	.38	.41	.36	.38	.43	.46	.36	.39	.43	.38	.30	.34	.29	.32	.21	.20	.20	.20	.20	.20			
29	035-3																			.25	.30	.16	.20	.27	.36	.27	.29	.23	.21	.36	.39	.34	.39	.41	.45	.41	.41	.46	.39	.39	.38	.41	.30	.23	.29	.36	.25						
30	035-5																			.13	.38	.41	.29	.34	.39	.46	.29	.36	.43	.41	.30	.36	.32	.29	.30	.30	.36	.32	.29	.29	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30			
31	031-2																			.36	.39	.23	.32	.41	.45	.30	.38	.41	.32	.29	.25	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30	.30				
32	031-3																			.14	.27	.14	.13	.20	.18	.23	.20	.39	.29	.39	.30	.41	.52	.41	.36	.36	.36	.36															

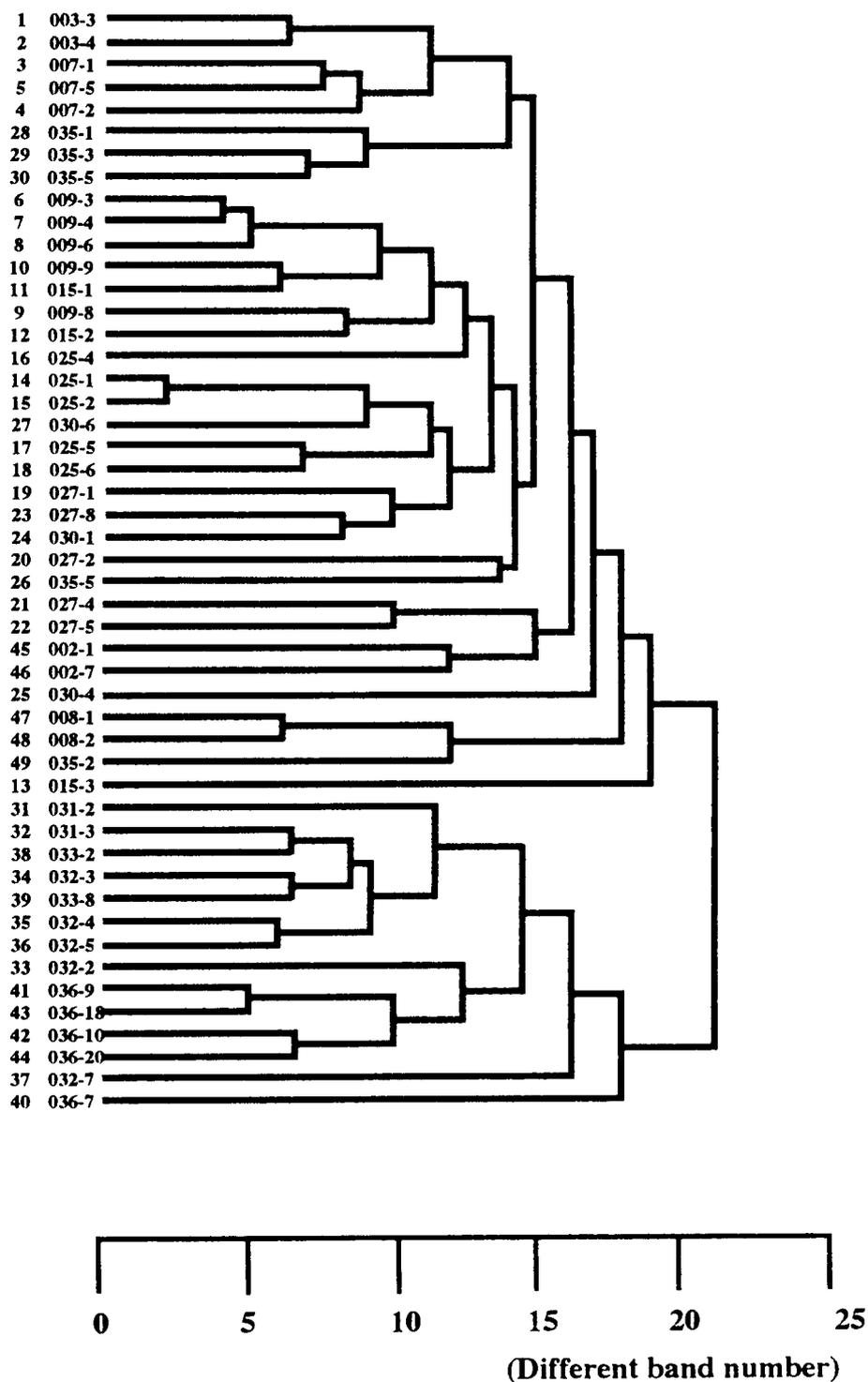


Fig. 3-2-4. Dendrogram of 49 almond accessions by cluster analysis using group average method.

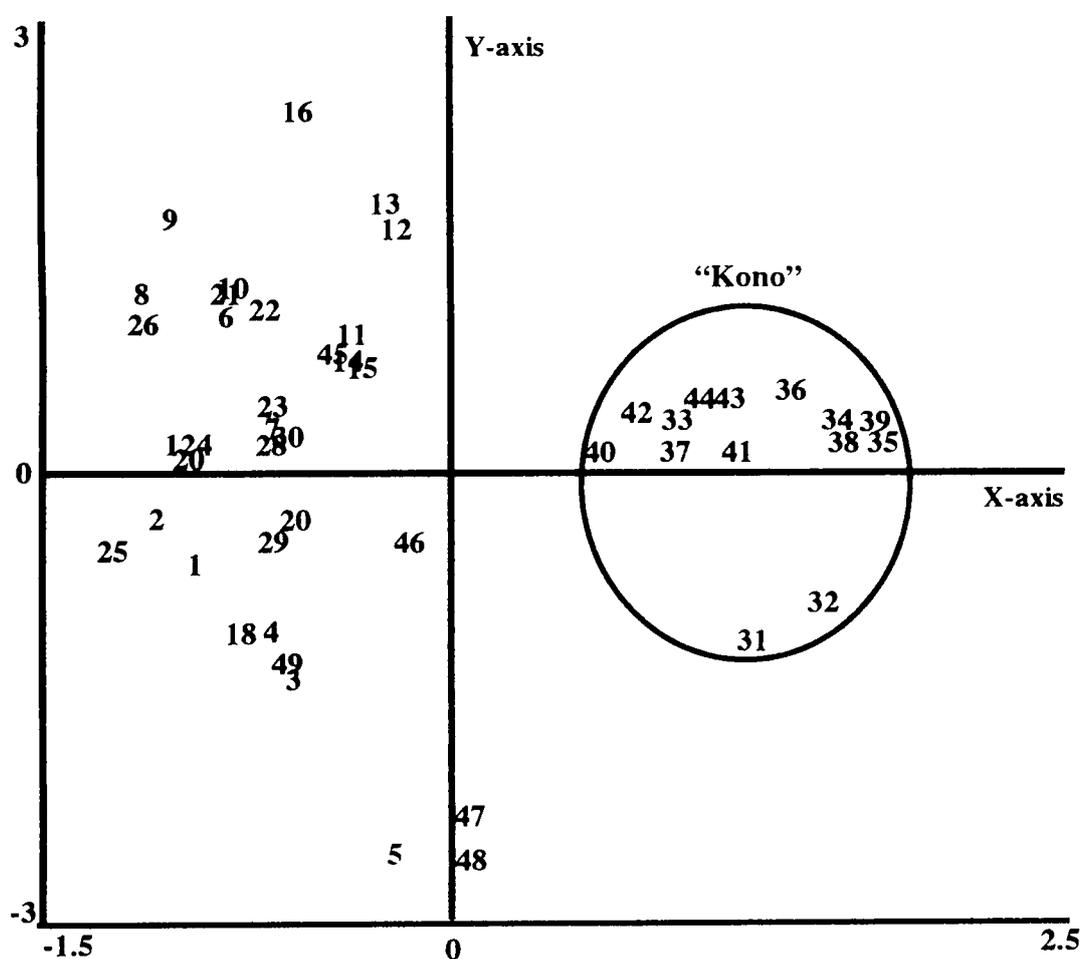


Fig. 3-2-5. Scattergram of almond accessions by quantification of the third type. Each material was plotted according to its principal component score. X-axis : first component, Y-axis : second component.

第4章 サクラ亜属の系統分類

第1節 サクラとオウトウの系統分類

目的

サクラ亜属にはサクラとオウトウをはじめ多くの種が存在している。オウトウの中にはスモモと同様に2倍体、4倍体の倍数体が存在し、甘果オウトウは2倍体、酸果オウトウは4倍体が基本種となっている。サクラには果樹の台木や庭木として有用なユスラウメ、ニワウメなど*Microcerasus*に属する植物や、ヤマザクラなど観賞用として栽培されるサクラがあり、これらサクラ亜属の植物は形態的変異や遺伝的変異が多様なので品種、さらには種の類縁関係にはまだ不明な点が多い。これまで、サクラ・オウトウの品種識別は主に形態的特性(菊池、1948、大井、1953、北村、1979、Iezzoni、1990)やアイソザイム分析(Mowrey・Werner、1990、Granger、1993)などによって行われてきたが、これらの方法では近縁なものを識別するのが困難であった。近年、DNAレベルでの分析が可能となり、葉緑体DNAのRFLPパターン(Kanekoら、1986)や*rbcL*遺伝子のシーケンス(印南ら、1994)による分析も行われてきたが、いずれもエドヒガン、ソメイヨシノなどサクラを中心に検討したものであった。そこで、ミザクラ(オウトウ)を中心に、RAPD分析法と葉緑体の特定領域を用いたPCR-RFLP法により、サクラ・オウトウの品種・系統の類縁関係を検討する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場、山形県園芸試験場、長野県果樹試験場、に収集、保存されている、サクラ、オウトウの11種57品種を供試した(Table 4-1-1)。代表的なサクラの花、果実をFig. 4-1-1に示した。

2).方法

RAPD分析、及びPCR-RFLP分析は第1章第1節、及び第2節の方法に従った。但し、PCR-RFLP分析では、Table 1-3-1に示す*Nla* IIIと*Sau* 3AIを除く10種類の酵素を使用した。

結果

1).RAPD分析法によるサクラ・オウトウの系統分類

29種類のCommonプライマー(プライマー番号:A00-A28)を用いた。プライマーA21で作成した電気泳動図をFig. 4-1-2に示した。各プライマーから複数のDNA多型がみられ、容易に全ての品種・系統を識別することができた。総数で116個の再現性のあるRAPDsが検出された。最小で、'ヒメフジザクラ'と'アカネヤマザクラ'の間で2個、最高でニワウメ(長野)と'ナポレオン'の間で58個のRAPDsが検出され、57系統すべてについて個体識別が可能であった。これらのデータをもとに系統間の距離行列を求

め、群平均化法によりクラスター分析を行い、デンドログラムを作成した(Fig. 4-1-3)。デンドログラムは台木品種や観賞用のサクラを含むサクラと甘果オウトウや酸果オウトウなどのミザクラに大別された。さらにミザクラのグループは甘果オウトウと酸果オウトウに、サクラのグループは観賞用サクラ等のグループと *Microcerasus* のグループに分類された。SL64はこれらのグループとクラスターを形成しなかった。甘果オウトウ内の類似性は他のグループと比較すると高いものと推察された。数量化理論第3類により成分を2個抽出し、第1成分をx軸、第2成分をy軸として、個体数量を2次元プロットした(Fig. 4-1-3)。散布図の寄与率は30%弱で、スモモと同様に全体的にサンプルが連続してプロットされていた。座標軸の原点付近には *P. cerasus* を中心としたグループが散在し、*P. avium* は、かなり密集してグループを形成していた。ユスラウメ、ニワウメなどはこれらサクラ、オウトウとも類似性が低く、離れた位置にプロットされた。本実験で供試した、ユスラウメ3系統は相互の類似性が低かった。

2). 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によるサクラ・オウトウの系統分類

葉緑体にコードされている *psbA* 遺伝子領域、*rbcL*-ORF106 遺伝子間領域、*atpB*-*rbcL* 遺伝子間領域、及び *matK* 遺伝子領域を増幅し、10種類の制限酵素についてこれらの増幅断片における認識部位の有無を調査した。サクラ・オウトウではこれらの領域において遺伝的変異が大きく、多数のRFLPsを検出した。典型的な例として、*rbcL*-ORF106 遺伝子間領域を *EcoRV* で消化して得られたRFLPsをFig. 4-1-5に示した。これはユスラウメやニワウメなど、*Microcerasus* と呼ばれるグループに特異的であった。40通りの組み合わせで得られた多型をFig. 4-1-6にまとめた。これらの4領域では、*rbcL*-ORF106や*atpB*-*rbcL* 遺伝子間領域が変異に富んでおり多くの多型が検出された。

プライマーと制限酵素の組み合わせについて、全く多型を示さなかったものを1つのグループにまとめた結果、AからLの12のグループに分類できた(Table 4-1-3)。これらのグループ間の遺伝距離を求めた。最小のものはAの甘果オウトウとEの中国オウトウなどのグループで0.0009、最高のものはFの *Microcerasus* のグループとHの‘ヒメフジザクラ’で0.0258、FとDのグループは一樣に他のグループと遺伝距離に大きな差があり、遺伝的に遠縁であった。これらのデータをもとにUPGMAにより系統樹を作成した。*Microcerasus* のグループとSL64は他のオウトウ、サクラと遺伝的に遠縁であった。

考 察

1). RAPD分析法によるサクラ・オウトウの系統分類

比較的多くの種を用いてサクラとオウトウの類縁関係の解明を試みた。これらの供試材料では、*Microcerasus*、サクラ、オウトウの3グループに分類できた。サクラとしてはチシマザクラ(*P. nipponica* Matsum.)、チョウジザクラ(*P. apetala* Fr. et SAV.)、マメザクラ(*P. incisa* Thunb.)、シナオウトウ(*P. pseudocerasus* Lind.)など、林(1970)が報告した現在のサクラの基本種となる6種類の野生種のうち、4種類を供試した。この中で、マメザクラを代表とする *P. incisa* は小高木のサクラで一重咲きと八重咲き、がく色、花着きなど形態に多くの変異があり、貴重な園芸品種とされている。この *P. incisa* に属する

品種はデンドログラムにおいてもチョウジザクラ(*P. apetala*)、アオバザクラ(*P. lannesiana* Miyos.)など他の種とクラスターを形成するなど、DNAレベルでも変異の大きい種と推察された。このようにサクラの品種間の類似性は高くなく、サクラは一様に変異に富んでいるものと推察された。これまで、サクラの分類はFogle(1975)、Ingram(1948)など多くの研究者が行っているが、その分類は混沌としている。これは品種レベルで大きな変異がみられるために種を反映できなかったのではないかと考えている。RAPD分析でも個体差が大きい種を反映することができず、サクラ内の類縁関係は明らかにできなかった。

オウトウのグループは甘果オウトウと酸果オウトウに分類され、これらは散布図において明瞭に区別できた。また、オウトウは品種間の識別も容易であった。石黒ら(1991)はパーオキシダーゼ(POD)とリンゴ酸脱水素酵素(MDH)のアイソザイムバンドパターンから両者は比較的近縁ではないかと推察している。また、Sauer(1993)は*P. cerasus*は*P. fruticosa* × *avium*の交雑から生じたのではないかと推定している。第2章第3節で人工の種間雑種とその親系統を比較した結果、散布図においては、一部の例外を除き、種間雑種は親系統の中間にプロットされる傾向があった。酸果オウトウは‘ホウキザクラ’(*P. fruticosa* Pall.)と酸果オウトウの中間地点にプロットされていることから、経験的にこのデータはこの説を支持するものではないかと推察した。

*Microcerasus*のグループはこれらサクラ・オウトウのグループと類似性が低く、散布図においても離れた位置にプロットされた。ユスラウメの系統は変異が大きく、さらに多くの系統について検討する必要がある。ニワウメはこれに対し変異が小さいと考えられた。現在の分類で*Microcerasus*に属する品種・系統はこのほかにもニワザクラ(*P. glandulosa* Thunb.)、ウェスタンサンドチェリー(*P. besseyi* Bailey)などがあり、いずれも台木として注目を集めている。*Microcerasus*は分類上サクラ亜属に属すると記載されているが、これらはサクラよりもスモモの方が接木親和性が高いと報告していること(田中、1934)などから、サクラ亜属よりもむしろスモモ・モモ亜属に近いのではないかと推察した。

2). 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法によるサクラ・オウトウの系統分類

サクラ亜属では供試した4領域で予想以上に変異がみられたため、遺伝距離を求め、系統樹を作成した。系統樹はRAPD分析と同様に*Microcerasus*のグループとサクラ・オウトウのグループに分かれ、これらは遺伝的に遠縁であった。*Microcerasus*のグループのSL64はマハレブザクラ(*P. mahaleb* L.)で台木として利用されており、54のマハレブと異なっていた。また、サクラグループでは、AとEのグループが大きな集団を形成し、

ホウキザクラ、酸果オウトウ、フジザクラなどが分化していた。*P. incisa*には多くの種内変異がみられ、サクラの変異を拡大している一因と推察した。前述のSauer(1993)の説では‘ホウキザクラ’が酸果オウトウの母系になり、本実験のデータをみれば酸果オウトウとホウキザクラは遺伝的に近縁であり、RAPD分析の結果と合わせて考えるとこの説は有力であると考えられた。サクラの変異については、これまでの研究報告などを考慮してもその評価は難しく、ここではサクラは遺伝的変異が大きい集団であるとしか

述べられない。

このように、葉緑体のこれらの領域においてもRAPD分析の結果と類似した傾向がみられた。特に、*Microcerasus* のグループは他のサクラから遺伝的に大きく異なることが確かめられ、現在の分類は再検討する余地があると考えられた。Watkins(1976)は接ぎ木親和性、形態的特性などを考慮し、*Microcerasus* 植物はサクラ属の進化過程の中心となった植物ではないかと推察しており、スモモ・モモ亜属とサクラ亜属が分化する過程で重要な鍵を握る植物ではないかと推測している。

摘 要

RAPD分析法、葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法により、サクラ・オウトウの品種・系統の類縁関係を検討した。29種類のコモンプライマーについて調査したところ、全ての品種・系統を相互に識別することが可能であった。クラスター分析の結果、デンドログラムは、サクラとオウトウに大別された。さらにオウトウのグループは甘果オウトウと酸果オウトウに、サクラのグループは観賞用サクラ等のグループと *Microcerasus* のグループに分類された。数量化理論第Ⅲ類により散布図を作成した結果、寄与率は30%弱となり、スモモと同様に全体的にサンプルが連続してプロットされていた。ユスラウメ、ニワウメなどの *Microcerasus* はこれらのサクラやオウトウと類似性が低く、離れた位置にプロットされた。

葉緑体にコードされている *psbA* 遺伝子、*rbcL*-ORF106 遺伝子間領域、及び *atpB*-*rbcL* 遺伝子間領域を増幅し、12種類の制限酵素についてこれらの増幅断片における認識部位の有無を調査した。サクラ・オウトウではこれらの領域において遺伝的変異が大きく、多数のRFLPsを検出した。プライマーと制限酵素の組み合わせについて、全く多型を示さなかったものを1つのグループにまとめた結果、AからLの12のグループに分類できた。これらのデータをもとにUPGMAにより系統樹を作成した。*Microcerasus* のグループとSL64は他のオウトウやサクラと遺伝的に遠縁であった。

以上のように、葉緑体のこれらの領域においてもRAPD分析の結果と類似した傾向がみられた。特に、*Microcerasus* のグループは他のサクラから遺伝的に大きく異なることが確かめられ、現在の分類は再検討する余地があると考えられた。

Table 4-1-1. Cherry varieties for RAPD and PCR-RFLP analyses

Code	Varieties	Scientific name
1	Bing	<i>P. avium</i>
2	Compact Stella	<i>P. avium</i>
3	Governor Wood	<i>P. avium</i>
4	Early Purple Guigne	<i>P. avium</i>
5	Bigarreau Jaboulay	<i>P. avium</i>
6	Summit	<i>P. avium</i>
7	Vic	<i>P. avium</i>
8	Van	<i>P. avium</i>
9	Schatten Morello	<i>P. cerasus</i>
10	Early Richmond	<i>P. cerasus</i>
11	Ulster	<i>P. avium</i>
12	<i>P. cerasus</i> × <i>pin</i>	<i>P. cerasus</i> × <i>pin</i> ?
13	SatouNishiki	<i>P. avium</i>
14	Rockport Bigarreau	<i>P. avium</i>
15	English Morrello	<i>P. cerasus</i>
16	SL64	<i>P. mahaleb</i>
17	Hokkou	<i>P. avium</i>
18	Chinese bush cherry	<i>P. tomentosa</i>
19	Chinese cherry (Buzen Branch)	<i>P. pauciflora</i>
20	Aobazakura	<i>P. lannesiana</i>
21	Niwaume	<i>P. japonica</i>
22	Mazzard 79067F	<i>P. avium</i>
23	Colt	<i>P. avium</i> × <i>pseudocerasus</i>
24	Chishimazakura	<i>P. nipponica</i>
25	Fujizakura	<i>P. incisa</i>
26	Meteor	<i>P. cerasus</i>
27	Chinese cherry (Akitsu)	<i>P. pauciflora</i>
28	Karamizakura	<i>P. pauciflora</i>
29	Immil	<i>P. incisa</i> × <i>serrula</i>
30	Nanyou	<i>P. avium</i>
31	Napoleon Bigarreau	<i>P. avium</i>
32	Fruticosa cherry	<i>P. fruticosa</i>
33	Maraska	?
34	Mont Morency	<i>P. cerasus</i>
35	Koutou	?
36	20-10	?
37	Sapikisa	<i>P. avium</i>
38	Chinese cherry (Tenkouen)	<i>P. pauciflora</i>
39	Shousei Nishiki	<i>P. avium</i>
40	May Duke	<i>P. avium</i> × <i>cerasus</i>
41	Himefujizakura	<i>P. incisa</i>
42	Akaneyaezakura	<i>P. incisa</i>
43	Chinese bush cherry (Nagano)	<i>P. incisa</i>
44	Oshidorizakura	<i>P. incisa</i>
45	Midorizakura	<i>P. incisa</i>
46	Kohiganzakura	<i>P. incisa</i> × <i>spachiana</i>
47	Yaefujizakura	<i>P. incisa</i>
48	Odorikozakura	?
49	Choujizakura	<i>P. apetala</i>
50	Fujizakura	<i>P. incisa</i> × <i>verecunda</i>
51	Taizanzakura	?
52	Mikizakura	?
53	Aohada	<i>P. lannesiana</i>
54	Mahaleb cherry	<i>P. mahaleb</i>
55	Niwaume (Nagano)	<i>P. japonica</i>
56	Niwaume (Arakawaoki)	<i>P. japonica</i>
57	Chinese bush cherry (Okayama Univ.)	<i>P. tomentosa</i>

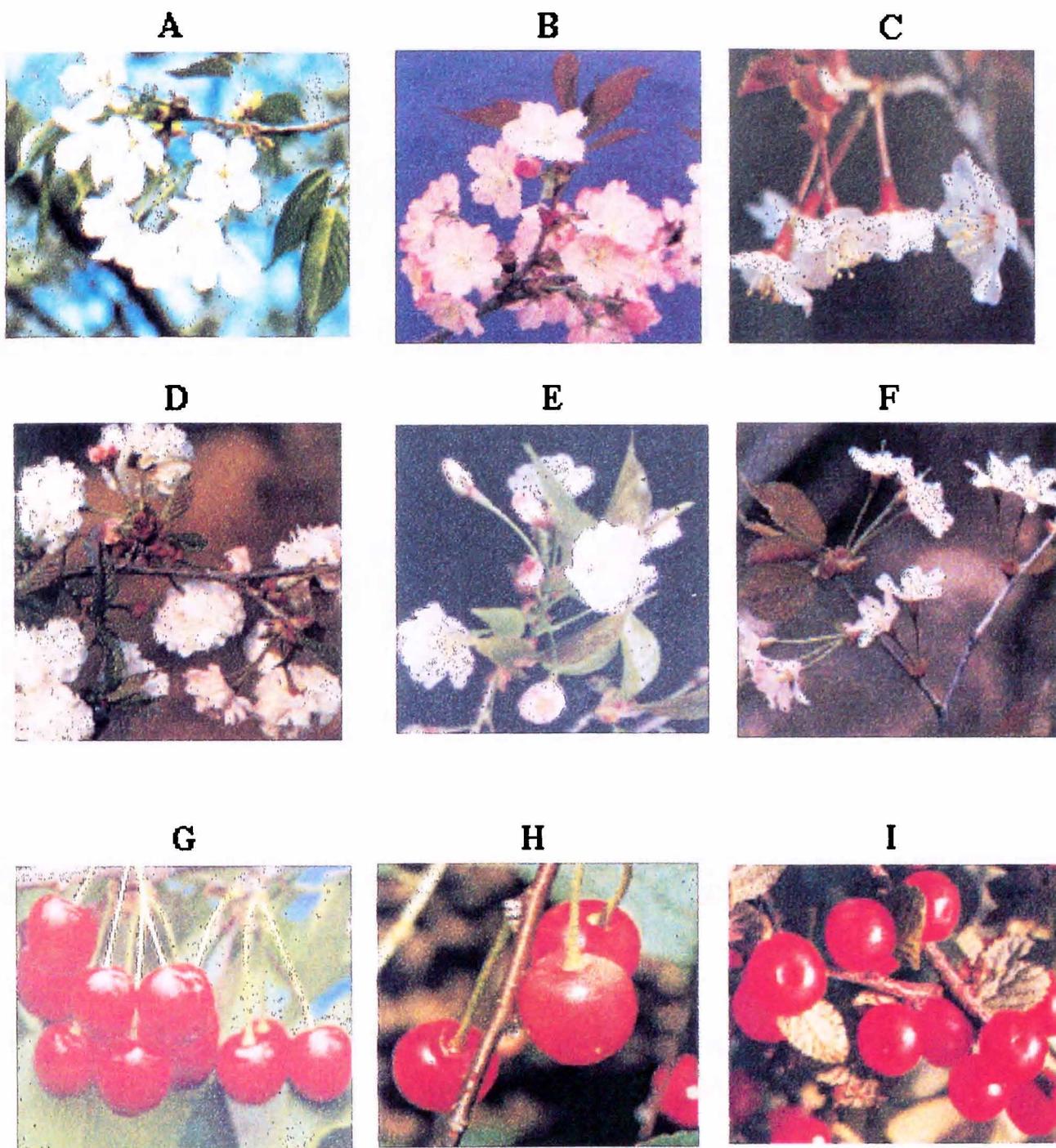


Fig. 4-1-1. Flowers of *P. lannesiana* (A and B), *P. incisa* (C), *P. apetala* (D), *P. jamasakura* (E) and *P. nipponica* (F). Fruits of *P. avium* (G), *P. cerasus* (H) and *P. tomentosa* (I).

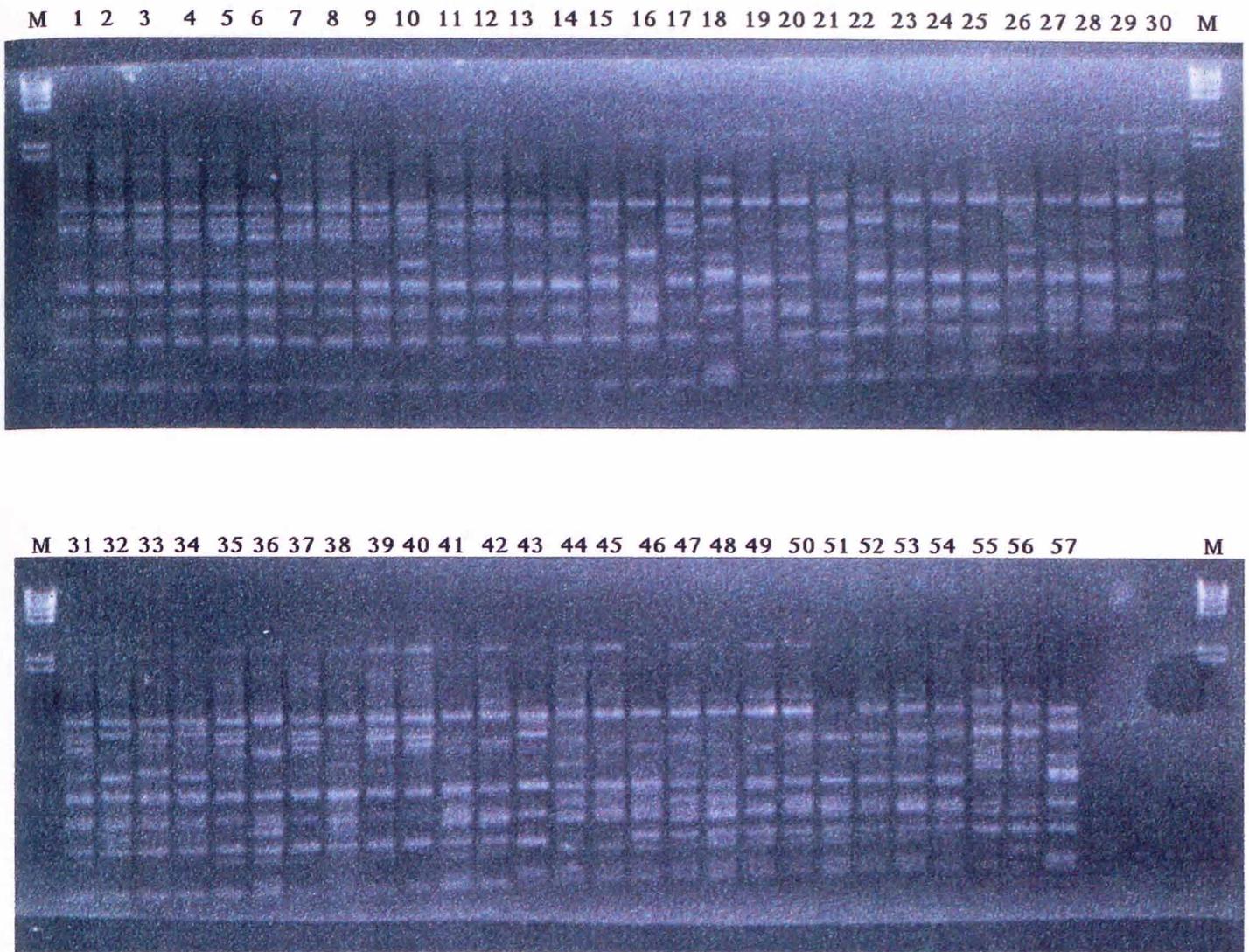


Fig. 4-1-2. RAPD patterns of 57 cherry varieties by primer A21. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

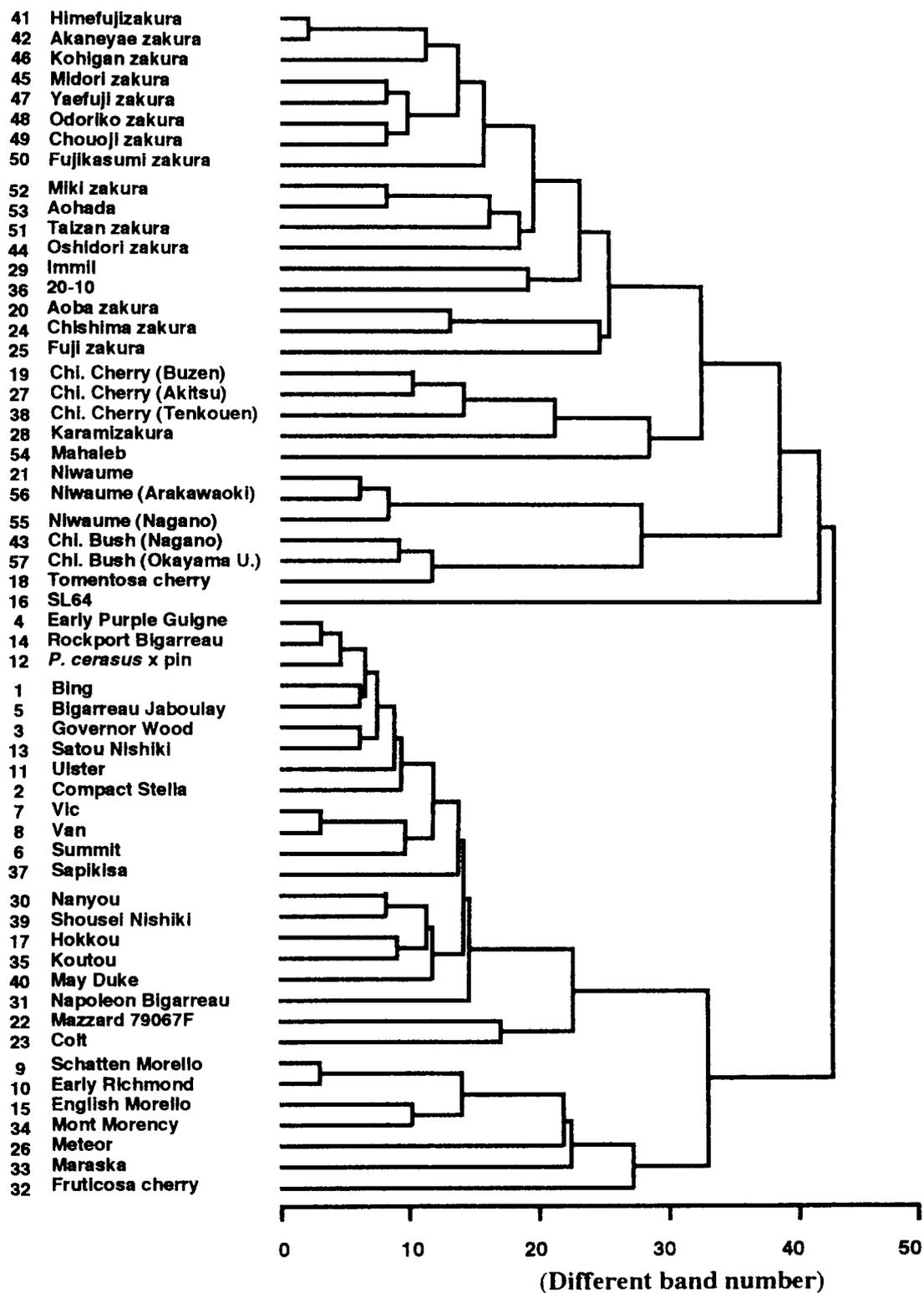


Fig. 4-1-3. Dendrogram of 57 cherry varieties by cluster analysis using group average method.

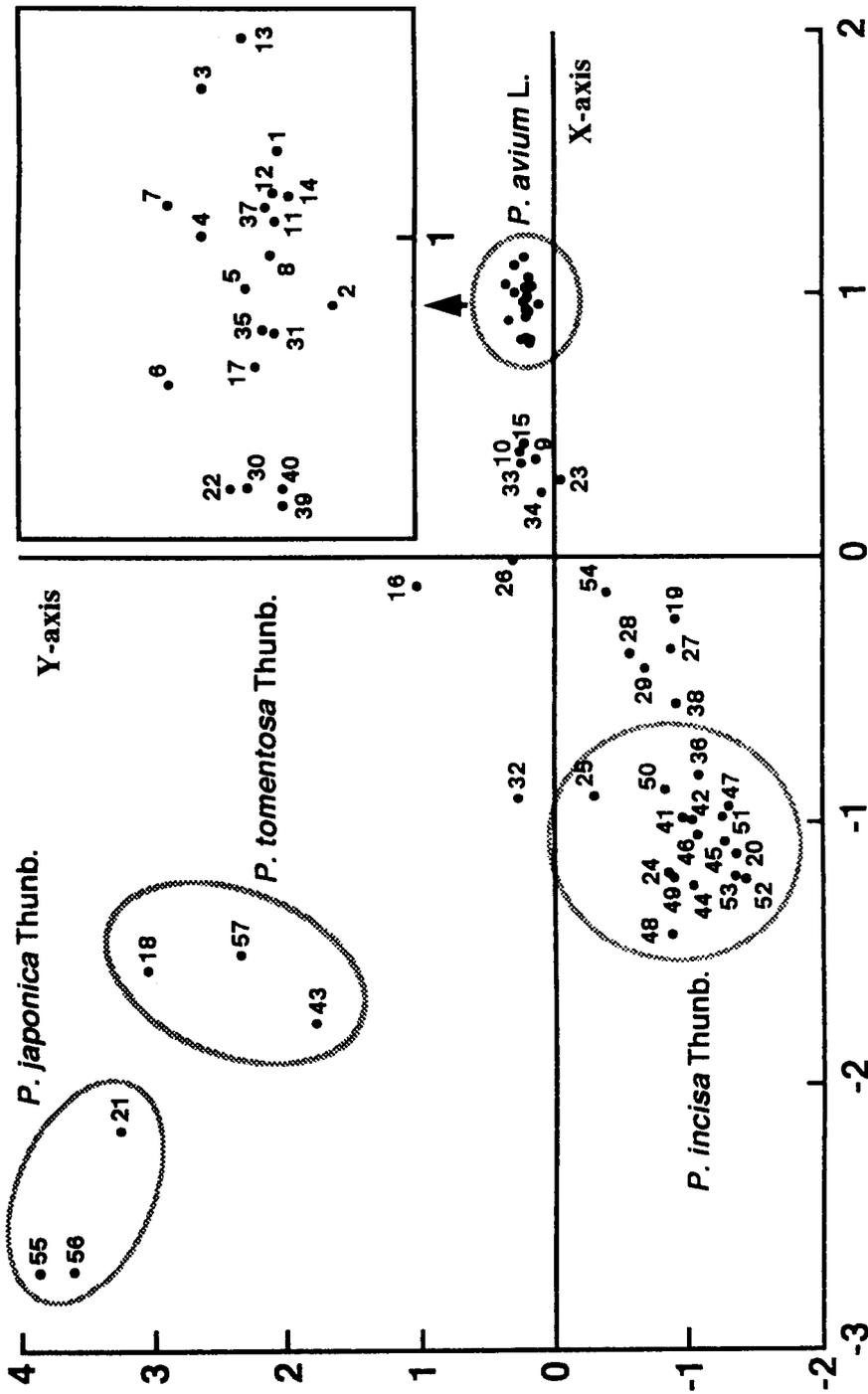


Fig. 4-1-4. Scattergram of 57 cherry varieties by quantification method of the third type. Each material was plotted according to its principal component score. X-axis : first principal component, Y-axis : second principal component.

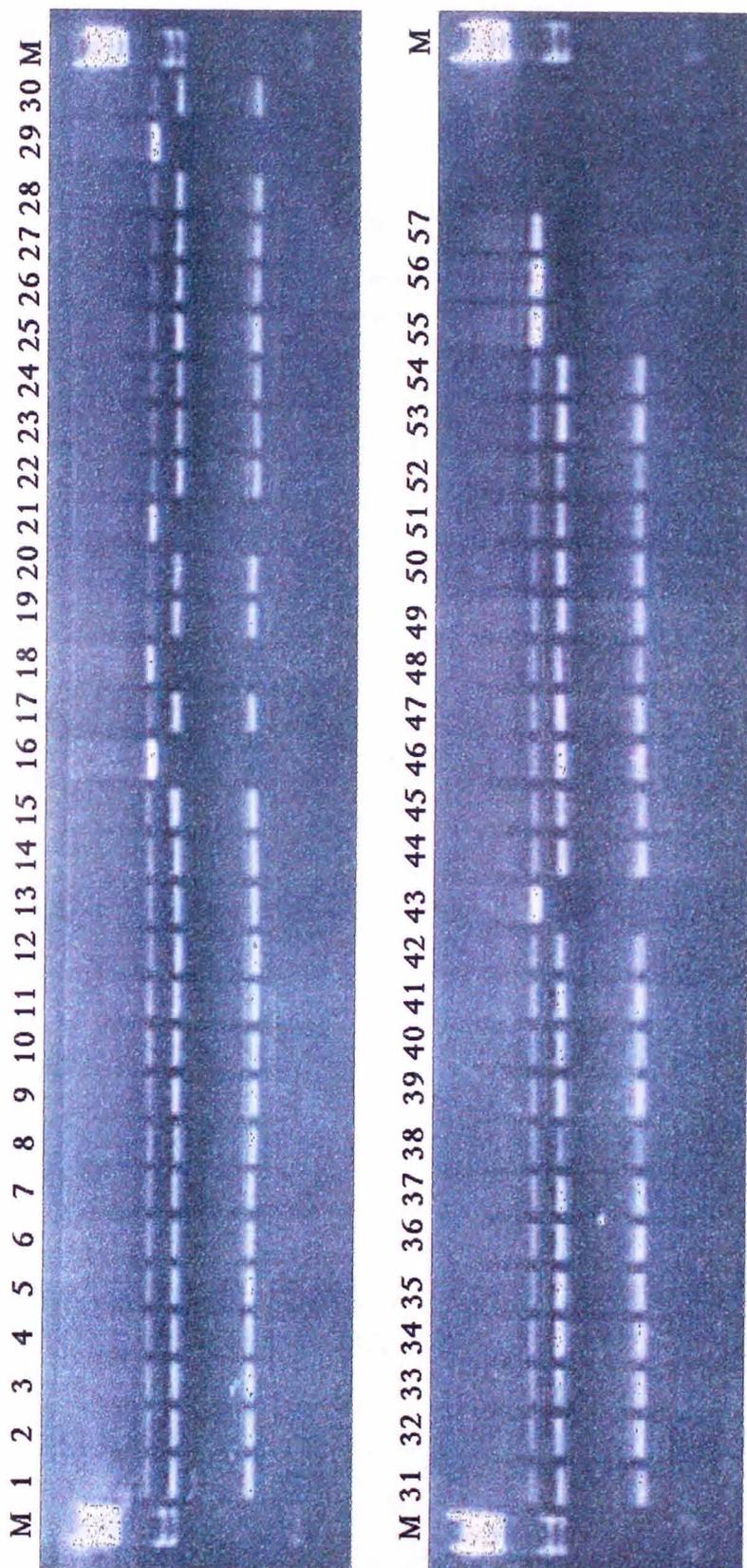


Fig. 4-1-5. RFLPs of *rbcL*-ORF106 regions amplified from genomic DNA of 57 cherry varieties digested by *Eco* RV. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

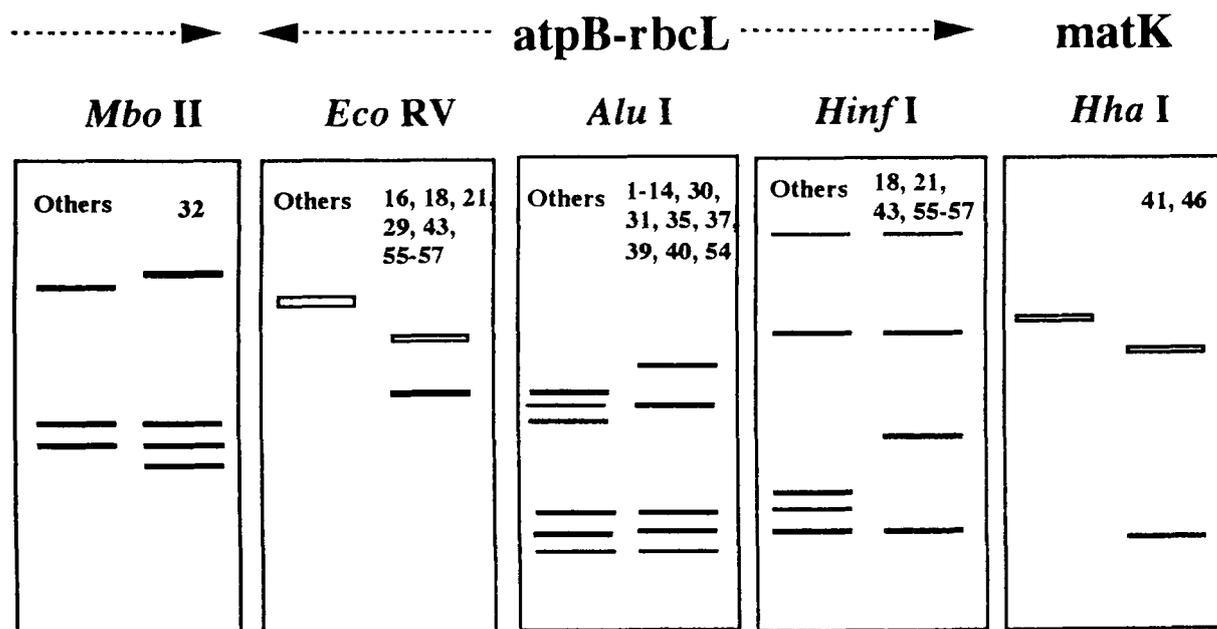
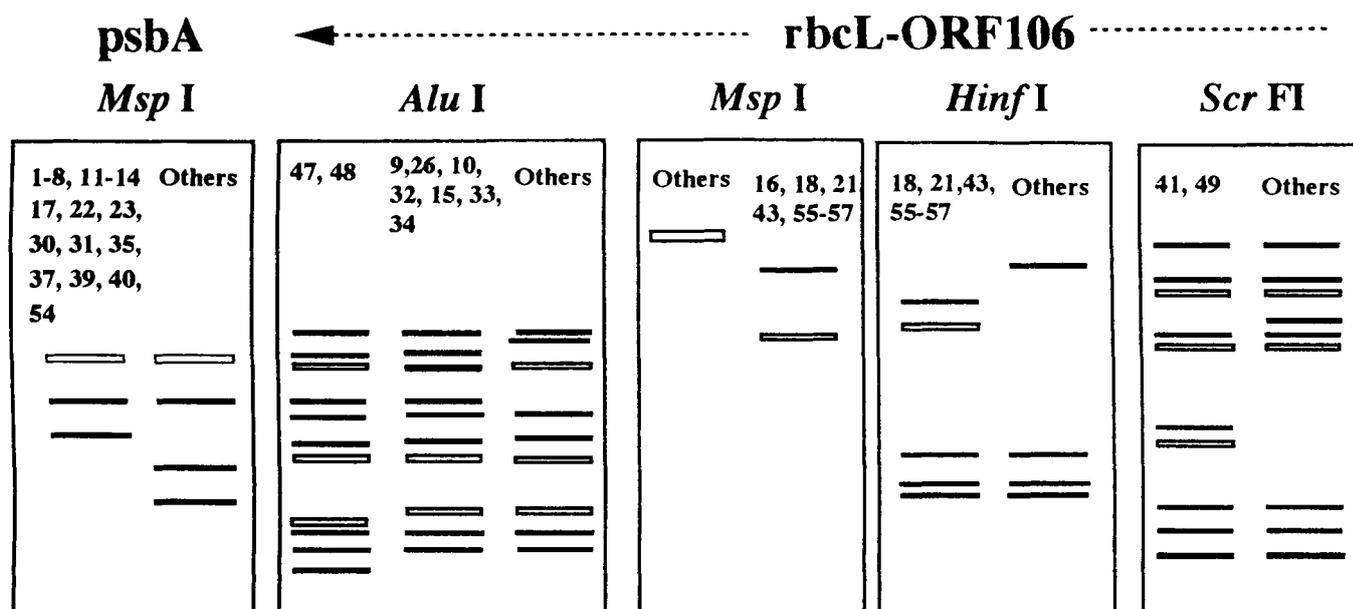


Fig. 4-1-6. RFLP patterns from digestion of four regions by each restriction enzyme.

Table 4-1-3. Grouping of cherry varieties divided by PCR-RFLP analysis

Group Code	Varieties	Group Code	Varieties	
A	1 Bing	19	Chinese cherry (Buzen Branch)	
	2 Compact Stella	20	Aobazakura	
	3 Governor Wood	24	Chishimazakura	
	4 Early Purple Guigne	25	Fujizakura	
	5 Bigarreau Jaboulay	27	Chinese cherry (Akitsu)	
	6 Bigarreau Summit	28	Karamizakura	
	7 Vic	36	20-10	
	8 Van	38	Chinese cherry (Tenkouen)	
	11 Ulster	42	Akaneyaezakura	
	12 <i>P. cerasus</i> × <i>pin</i>	44	Oshidorizakura	
	13 SatouNishiki	45	Midorizakura	
	14 Rockport Bigarreau	50	Fujizakura	
	23 Colt	51	Taizanzakura	
	29 Immil	52	Mikizakura	
	30 Nanyou	53	Aohada	
	31 Napoleon Bigarreau	F 18	Chinese bush cherry	
	35 Koutou	21	Niwaume	
	37 Sapikisa	55	Niwaume (Nagano)	
	39 Shousei Nishiki	56	Niwaume (Arakawaoki)	
	40 May Duke	57	Chinese bush cherry (Okayama Univ.)	
	54 Mahaleb cherry	43	Chinese bush cherry (Nagano)	
	B	9 Schatten Morello	22	Mazzard 79067F
		10 Early Richmond	G 32	Fruticosa cherry
	C	15 English Morrello	H 41	Himefujizakura
		26 Meteor	I 46	Kohiganzakura
		33 Maraska	J 47	Yaefujizakura
		34 Mont Morency	48	Odorikozakura
	D	16 SL64	K 49	Choujizakura
		17 Hokkou	L 50	Fuzizakura

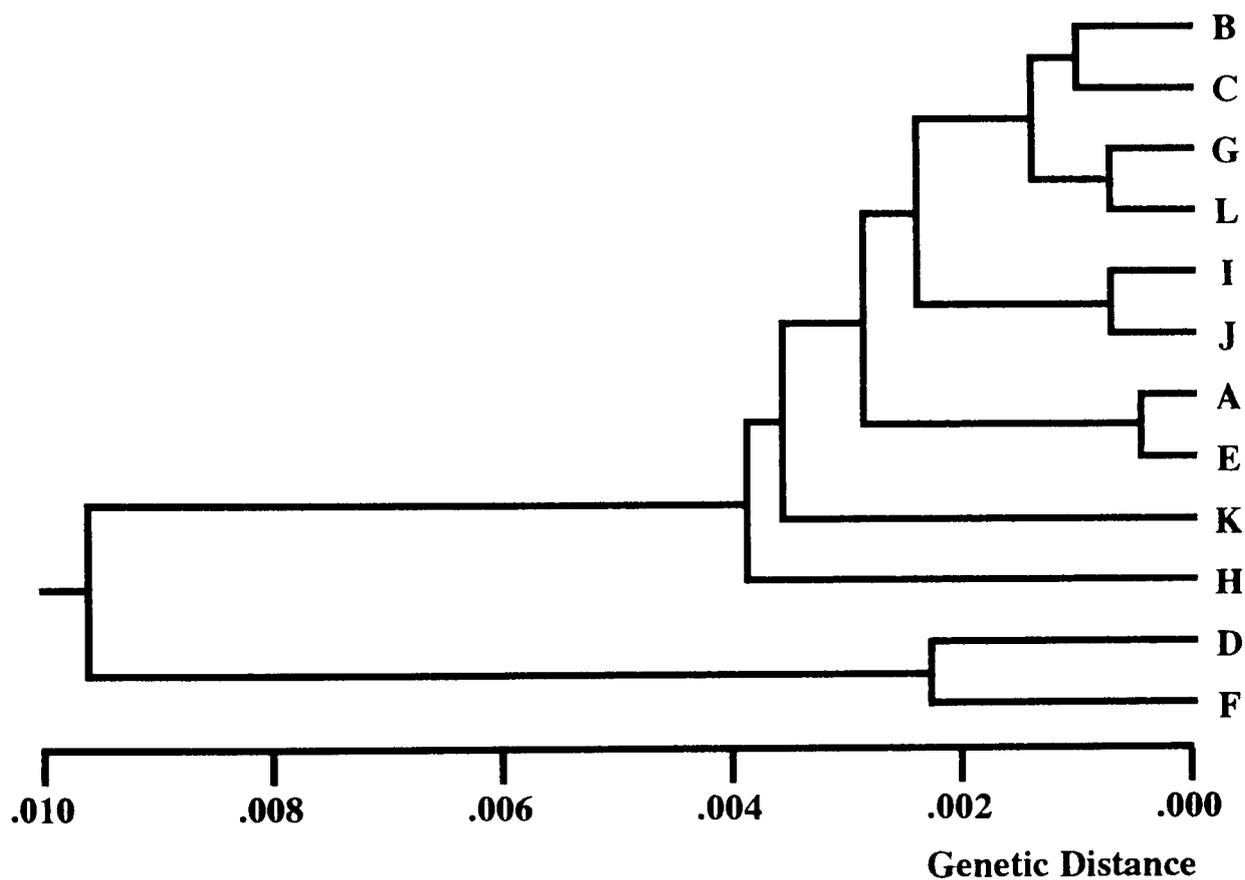


Fig. 4-1-7. Phylogenetic tree by UPGMA. Each group was according to the groups listed in table 4-1-3.

第5章 サクラ属植物の系統分類と進化

第1節 形態的特性によるサクラ属植物の系統分類

目的

これまでサクラ属の分類は菊池(1948)、兪(1979)、大井(1983)などが形態的特性を中心に検討し、これが現在のサクラ属植物の分類の基本となっている。各種がもつ特性に対して多様で中間的な形質を示す野生種については、形態的特性だけでは分類が困難であるため、それらの分類には主観的な要素も加わっている。本論文では第2章から第4章にかけて、種類ごとにゲノムの類似性を調査し、それらの分類を試みた。大部分の品種・系統は、形態的特性などにより推定された類縁関係と合致したが、一部の近縁野生種は遺伝的変異が極めて大きく、現在の分類と合致しない点が生じた。このため、分類が困難であった近縁野生種はサクラ属植物のどの位置に存在するか再検討する必要がある。そこで、サクラ属植物に共通する形態的特性を幾つか選択し、これらの形質に関するデータをもとに類縁関係を調査する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場、長野県果樹試験場、群馬県園芸試験場、京都府立大学で収集、保存されているウメ3系統、アンズ4系統、スモモ9系統、モモ4系統、アーモンド2系統、ユスラウメ1系統、ニワウメ1系統、ニワザクラ2系統、オウトウ5系統、サクラ6系統、の合計30種37系統を実験に供試した(Table 5-1-1)。

2).方法

形態的特性については、1)樹高、2)枝の毛じ、3)葉形指数、4)葉上面の毛じ、5)花色、6)1花房中の花数、7)花梗・果梗の長さ、8)果皮の毛じ、9)核の刻、の9項目について調査した。これらの項目はカテゴリー型と連続型の2種類のデータ様式にわかれ、それぞれの項目の分類基準を以下に記した。

1)樹高についてはⅠ：低、Ⅱ：中、Ⅲ：高、の3種類のカテゴリーに分類した。

2)枝の毛じの程度については、Ⅰ：無、Ⅱ：有、の2種類のカテゴリーに分類した。

3)葉形指数は連続型データとして扱い、葉身の長さを葉身の幅で割った値を指標とした。

4)葉上面の毛じ程度については、Ⅰ：無、Ⅱ：有、の2種類のカテゴリーに分類した。

5)花色については、Ⅰ：白色、Ⅱ：桃色、の2種類のカテゴリーに分類した。

6)花梗・果梗の長さの程度については、Ⅰ：短、Ⅱ：中、Ⅲ：長

の3種類のカテゴリーに分類した。これらの分類基準は果実の大きさと果梗の長さの組み合わせたデータを判断するために数値による境界は明記できなかった。

7)1花房中の花数は1から5花と変異がみられ、Ⅰ：1花、Ⅱ：2-3花、Ⅲ：4花以上の3種類のカテゴリーに分類した。

8)果皮の毛じの程度については、Ⅰ：無、Ⅱ：粗、Ⅲ：密、の3種類のカテゴリーに分類した。

9)核の刻の程度については、Ⅰ：滑、Ⅱ：中、Ⅲ：粗の3種類のカテゴリーに分類した。

なお、調査の一部は中国果樹分類学(兪、1979)を参照した。

調査結果は多変量解析ソフト“統計解析ハンドブック for Win”で相関係数行列による主成分分析を行い、第1主成分をY軸に、第2主成分をX軸にして2次元配置で散布図を作成した。

結 果

代表的な37種類のサクラ属植物について9項目の形態的特性を調査した(Table 5-1-2)。花房中の花数はサクラ、スモモなどでは、2から5花と多く、ウメ、アンズ、モモでは1花であった。果皮の毛じはサクラ、スモモでは無毛、ウメ、アンズ、モモなどでは有毛と認められた。核表面の刻はサクラ、スモモなどでは平滑なものが多かったが、ウメ、アンズ、モモなどでは種特異的な模様が認められ、特に、モモは刻が深かった。花梗・果梗はサクラ、スモモが長く、ウメ、アンズ、モモは短い。葉形指数はモモが細長い葉を持つために大きく、反対にアンズは卵状の葉を持つために小さくなった。その他のものについてはアンズとモモの間に位置した。花卉の色はスモモとサクラは白色のものが多く、モモとアンズは桃色のものが多かった。低木、小高木のものに、葉上面の毛じ、枝の毛じがみられる傾向があった。これらのデータをもとに主成分分析を行い、散布図を作成した。第1及び第2主成分の寄与率は約60%と高く、全分散の半分以上を説明することができた。

供試材料はY軸で大きく2分され、スモモ・サクラのグループとウメ・アンズ・モモのグループに大別された。光核桃、‘アルパインプラム’、など現在の分類群で形態が異なった品種・系統は散布図においてもクラスターを形成しなかった。スモモ・サクラのグループではスモモを中心とするクラスターと、サクラを中心とするクラスターに分かれた。前者にはニワウメ、ウェスタンサンドチェリーなどの*Microcerasus*のグループも含まれていた。

考 察

サクラ属植物の分類は、形態的特性に基づいているが、調査基準に対して多様で中間的な特性を示す近縁野生種などは主観的に要素が加わり、その真偽が問われる品種・系統が存在している。第2章から第4章で、ゲノムの類似度をもとに多くの品種・系統について分類を試み、形態的、生態的特性による分類とDNAレベルでの分類結果が一致していることが確かめられた。しかしながら、光核桃、‘アルパインプラム’、オヒヨモモ、*Microcerasus* 植物 については、現在それらが属するグループでは遺伝的変異が大きく、再検討の余地があった。このため、これらの品種・系統がサクラ属植物のどの位置に存在しているか客観的に調査する必要がある。

サクラ属植物の分類基準は決められているが、亜属間の分類に耐えうるような分類

基準は比較的少ないので、本章では9項目を選び類縁性を検討した。調査結果を客観的に処理するため、また、データ様式が連続型、カテゴリー型と異なるタイプのものを同時に扱うために主成分分析を適用し散布図を作成した。その結果、光核桃、‘アルパインプラム’、オヒヨモモ、は現在の分類群とは異なったところにプロットされた。*Microcerasus* 植物はユスラウメを除き、スモモとサクラのいずれかと同じクラスターを形成しており、形態的に変異が大きいものと考えられた。このように散布図ではスモモや*Microcerasus* 植物を中心にサクラ属植物が点在していることが確認できた。データ収集の際、多少の主観的判断を要したこと、調査項目、1種当たりの個体数などデータ数が十分とはいえないなど、得られたデータはまだ不完全であるが、これらの傾向は接ぎ木親和性(田中、1934、Okie、1987)などによる分類などとも非常に一致していた。Watkins(1976)は同様に形態的、接ぎ木親和性、交雑和合性などの諸特性からスモモ、*Microcerasus* がサクラ属植物の中心植物であろうと提言しているのので、このような傾向がDNAレベルにおいても確認できるか否かを調査する必要がある。

摘 要

サクラ属植物に共通する形態的特性を幾つか選択し、これらの形質に関するデータをもとに類縁関係を調査し、主成分分析により散布図を作成した。第1及び第2主成分の寄与率は約60%と高く、全分散の半分以上を説明することができた。

供試材料はY軸で大きく2分され、スモモ・サクラのグループとウメ・アンズ・モモのグループに大別された。光核桃、‘アルパインプラム’、など現在の分類群で形態が異なった品種・系統は散布図においてもクラスターを形成しなかった。スモモ・サクラのグループではスモモを中心とするクラスターと、サクラを中心とするクラスターに分かれた。*Microcerasus* 植物はユスラウメを除き、スモモとサクラのいずれかと同じクラスターを形成しており、形態的に変異が大きいものと考えられた。このように散布図ではスモモや*Microcerasus* 植物を中心にサクラ属植物が点在していることが確認できた。これらの傾向は接ぎ木親和性(田中、1934、Okie、1987)などによる分類などともよく一致した。

Table 5-1-1. Representative varieties for principal component analysis

Code	Varieties	Type	Species
1	Nankou	Mume	<i>P. mume</i>
2	Bungo	Mume	<i>P. mume</i>
3	Sumomo ume	Mume	<i>P. mume</i>
4	Heiwa	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
5	Ren-xing	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
6	Siberian apricot	Apricot	<i>P. sibirica</i>
7	Alpine plum	Apricot	<i>P. brigantina</i>
8	Manzaemon	Plum	<i>P. salicina</i>
9	Karari (Hua-lou-li)	Plum	<i>P. salicina</i>
10	Krikon Damson	Plum	<i>P. insititia</i>
11	White Plum	Plum	<i>P. salicina</i>
12	Myrobalan plum 420-2-2	Plum	<i>P. cerasifera</i>
13	Spinosa plum	Plum	<i>P. spinosa</i>
14	Sun Prune	Plum	<i>P. domestica</i>
15	Beach plum	Plum	<i>P. maritima</i>
16	Western sand cherry	Plum	<i>P. besseyi</i>
17	Hakutou	Peach	<i>P. persica</i>
18	Tibetan peach85054	Peach	<i>P. mira</i>
19	Ohatsumomo	Peach	<i>P. persica</i>
20	David peach	Peach	<i>P. davidiana</i>
21	Almond85124	Almond	<i>P. amygdalus</i>
22	Ohiyomomo	Almond	<i>P. toriloba</i>
23	Chinese bush cherry	Cherry	<i>P. tomentosa</i>
24	Niwaume	Cherry	<i>P. japonica</i>
25	Napoleon	Cherry	<i>P. avium</i>
26	Mont Morency	Cherry	<i>P. cerasus</i>
27	Mahaleb cherry	Cherry	<i>P. mahaleb</i>
28	Chinese cherry (Akitsu)	Cherry	<i>P. pauciflora</i>
29	Chinese cherry (Tenkouen)	Cherry	<i>P. pseudocerasus</i>
30	Fujizakura	Cherry	<i>P. incisa</i>
31	Houkizakura	Cherry	<i>P. fruticosa</i>
32	Aobazakura	Cherry	<i>P. lannesiana</i>
33	Choujizakura	Cherry	<i>P. apetala</i>
34	Colt	Cherry	<i>P. avium</i> × <i>pseudocerasus</i>
35	Chishimazakura	Cherry	<i>P. nipponica</i>
36	Niwazakura (White)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>
37	Niwazakura (Pink)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>

Table 5-1-2. Some morphological characteristics of material plants

Code	Varieties	Type	Tree height	Branch pubescent	Leaf	Leaf blade		Flower color	Pedicuncle Length	No. of flower /cluster	Skin pubescence	Stone Surface
						pubescent	pubescent					
1	Nankou	Mume	Mid.	Absent	1.967	Absent	Absent	White	Short	1	High	Mid.
2	Bungo	Mume	Mid.	Absent	1.733	Present	Present	Pink	Short	1	High	Mid.
3	Sumomo ume	Mume	Mid.	Absent	1.967	Absent	Absent	White	Mid.	1	High	Mid.
4	Heiwa	Apricot	High	Absent	1.448	Present	Present	Pink	Short	1	High	Mid.
5	Ren-xing	Apricot	High	Absent	2.024	Absent	Absent	Pink	Short	1	High	Mid.
6	Siberian apricot	Apricot	Mid.	Absent	1.537	Absent	Absent	White	Short	1	High	Mid.
7	Alpine plum	Apricot	High	Absent	1.614	Absent	Absent	Pink	Mid.	1	High	Mid.
8	Manzameon	Plum	Mid.	Absent	2.000	Absent	Absent	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
9	Karari (Hua-lou-li)	Plum	Mid.	Absent	2.139	Absent	Absent	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
10	Krikon Damson	Plum	Mid.	Present	1.587	Present	Present	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
11	White Plum	Plum	High	Absent	1.882	Absent	Absent	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
12	Myrobalan plum 420-2-2	Plum	High	Absent	1.636	Absent	Absent	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
13	Spinosa plum	Plum	Mid.	Present	1.459	Present	Present	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
14	Sun Prune	Plum	High	Present	1.745	Present	Absent	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
15	Beach plum	Plum	Low.	Absent	1.340	Absent	Absent	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
16	Western sand cherry	Cherry	Low.	Absent	2.040	Absent	Absent	White	Mid.	2-3	Absent	Smooth
17	Ilakutou	Peach	High	Absent	4.000	Absent	Absent	Pink	Short	1	High	Rough
18	Tibetan peach 85054	Peach	High	Absent	3.526	Absent	Absent	Pink	Short	1	High	Smooth
19	Ohatumomo	Peach	High	Absent	3.333	Absent	Absent	Pink	Short	1	High	Rough
20	David peach	Peach	High	Absent	3.875	Absent	Absent	Pink	Short	1	High	Rough
21	Almond 85124	Almond	High	Absent	3.385	Absent	Absent	Pink	Short	1	High	Mid.
22	Ohiyomomo	Almond	Low	Absent	1.878	Present	Present	Pink	Short	1	High	Mid.
23	Chinese bush cherry	Cherry	Low	Present	2.467	Present	Present	Pink	Short	1	High	Mid.
24	Niwaume	Cherry	Low	Absent	2.308	Absent	Absent	Pink	Long	2-3	Absent	Smooth
25	Napoleon	Cherry	High	Absent	2.833	Absent	Absent	White	Long	4-5	Absent	Smooth
26	Mont Morency	Cherry	Mid.	Absent	2.122	Absent	Absent	White	Long	4-5	Absent	Smooth
27	Mahaleb cherry	Cherry	High	Absent	1.864	Absent	Absent	White	Long	4-5	Absent	Smooth
28	Chinese cherry (Akitsu)	Cherry	Low	Absent	1.632	Absent	Absent	Pink	Long	4-5	Absent	Smooth
29	Chinese cherry (Tenkouen)	Cherry	Low	Absent	1.902	Absent	Absent	Pink	Long	4-5	Absent	Smooth
30	Fujizakura	Cherry	Low	Absent	2.000	Present	Present	Pink	Long	4-5	Absent	Smooth
31	Houkizakura	Cherry	Low	Absent	2.571	Absent	Absent	White	Long	4-5	Absent	Smooth
32	Aohazakura	Cherry	High	Absent	1.667	Absent	Absent	White-Pink	Long	4-5	Absent	Smooth
33	Choujizakura	Cherry	Mid.	Absent	2.067	Present	Present	Pink	Long	4-5	Absent	Smooth
34	Colt	Cherry	High	Absent	2.324	Absent	Absent	White	Long	4-5	Absent	Smooth
35	Chishimazakura	Cherry	Mid.	Absent	1.579	Absent	Absent	Pink	Long	4-5	Absent	Smooth
36	Niwazakura (White)	Cherry	Low	Absent	2.833	Absent	Absent	White	Long	2-3	Absent	Smooth
37	Niwazakura (Pink)	Cherry	Low	Absent	2.832	Absent	Absent	Pink	Long	2-3	Absent	Smooth

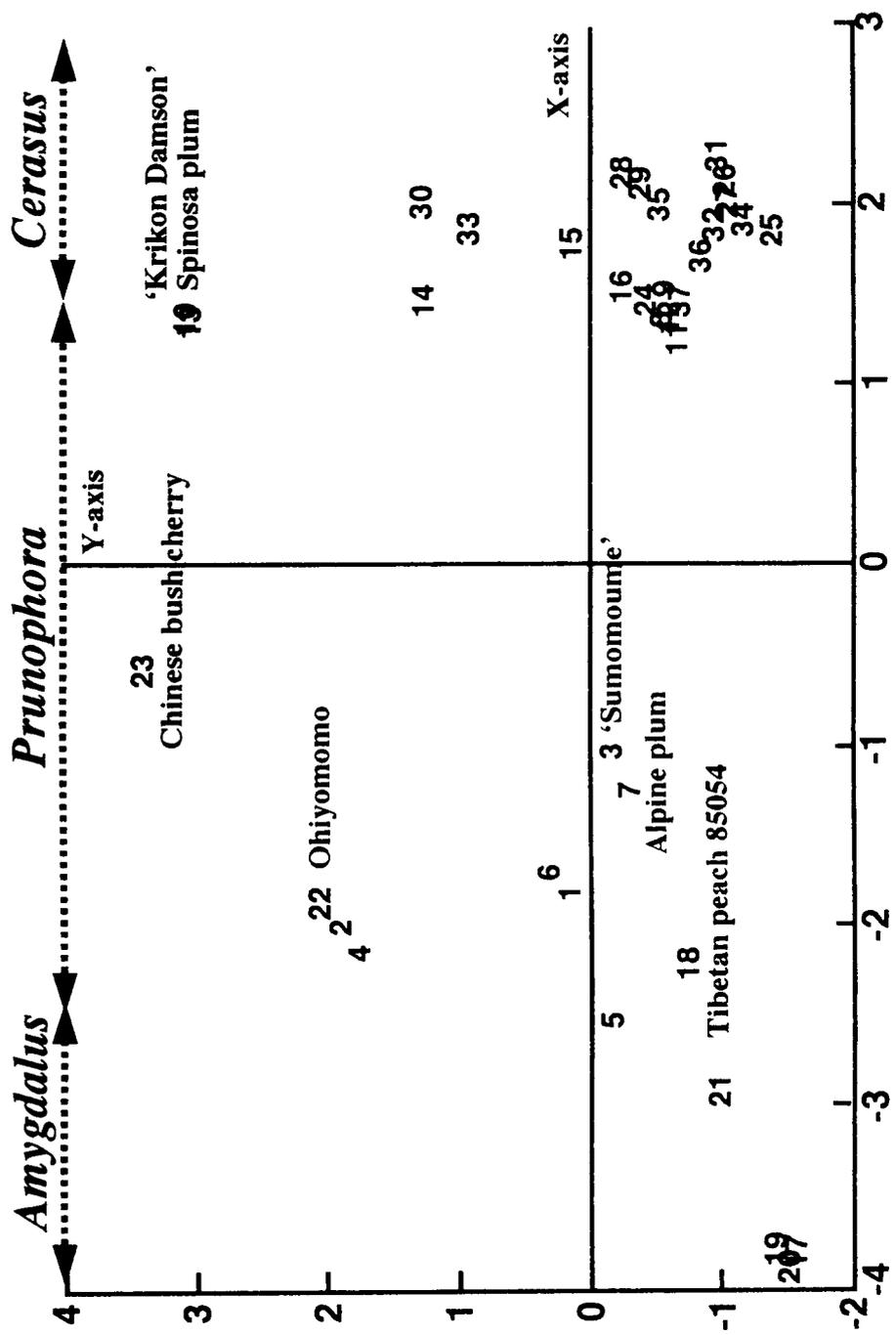


Fig. 5-1-1. Scattergram of 37 representative varieties by principal component analysis. Each material was plotted according to its principal component score. X-axis : first principal component, Y-axis : second principal component.

第2節 ランダムプライマー及びデザインプライマーによるサクラ属植物の系統分類

目 的

サクラ属植物の進化を検討する上で、種間、及び亜属間の類縁関係と遺伝的特性を検討することは重要である。サクラ属植物の分類は、菊池(1948)、Rehder(1954)、北村(1979)、などが形態的特性により分類を行ってきたが、これらの基準に対して多様で、中間の形質を示す植物を客観的に分類するのは難しい。それは、ユスラウメ(Chinese bush cherry)、アルパインプラムなどの野生種の位置づけが分類する研究者によって異なることから推察される。また、本章第1節で、亜属間の分類に耐えうる形態的マーカーを選抜し、分類を試みたが、これらのマーカーの数には限界があり十分な手法とは言えない。このため、DNAレベルでの調査が行われるようになり、葉緑体DNAのRFLPパターン(Uematsu et al, 1991、Kaneko et al, 1986)、ミトコンドリアDNA断片をプローブとしたサザンブロット解析(池谷ら、1993)などにより、栽培品種を中心としたサクラ属植物の系統分類が試みられた。しかしながら、これらは限られたわずかな種の品種・系統数について検討しただけで十分とは言えず、それらの類縁関係は曖昧なままである。第2章から本章第1節にかけて、RAPD分析法、葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法により各種の識別と分類を試み、それらの遺伝的特徴づけを行ってきた。その結果、サクラ属植物におけるユスラウメやアルパインプラムなど野生種の分類を行うために、真偽を確かめる必要があると考えた。そこで、スモモ亜属、モモ亜属、サクラ亜属の中から代表的な品種・系統を選び、RAPD分析法、核DNAにコード存在する5SrDNAの非転写スペーサー(nontranscribed spacer : NTS)領域の増幅パターンによる分類、及び、Per遺伝子のミニサテライト領域、テロメア領域を参照してデザインされたプライマーによるALPHA法により、これらの類縁関係を検討する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場、長野県果樹試験場、群馬県園芸試験場、京都府立大学で収集、保存されているウメ3品種、アンズ4品種・系統、スモモ8品種・系統、モモ4品種・系統、アーモンド3系統、サクラ21品種・系統の合計27種44品種・系統を供試した。これらの品種系統名は実験の都合上、Table 5-2-1とTable 5-2-2、及びTable 5-2-5に重複して記した。

2).方法

RAPD分析は、第1章第1節の方法に従った。スモモ・モモ亜属とサクラ亜属のRAPDパターンは類似性が低く、DNAの評価が困難であったため、それぞれの中から代表的な品種・系統を選択し、分析を行った(スモモ・モモ亜属 ; Table 5-2-1、サクラ亜属 ; Table 5-2-2)。ランダムプライマーでは全品種・系統を同一のDNA多型から分析できなかつたので、コムギ(*T. aestivum* L.)の核DNAにコード存在する5SrDNAの非転写ス

ペーサー(nontranscribed spacer ; NTS)領域(Long ・ Dawid、1980)を増幅するSTSプライマー(Alexander、1991)により増幅した。PCRの条件は第1章第3節の方法に従った。また、*Per* 遺伝子のミニサテライト領域の反復配列とヒトのテロメア領域の反復配列を参照にデザインされたプライマー(松山ら、1992)を用いてALPHA法(中村、1990)法により増幅を行った。実験には、Table 5-2-5に記した36品種・系統を供試した。また、これらのプライマーの塩基配列をTable 5-2-6に、NTS領域の模式図をFig. 5-2-9に示した。PCRの条件は第1章第1節の方法に記載したコモンプライマーによるPCRの条件に従った。

結 果

1).スモモ、モモ亜属の分類

これまでの系統分類に有効であった、プライマー13種類(プライマー番号 ; 15, 17, 21, 23, 26, 43, 45, 59, 68, 140, 145, 147, 224)を用いて分類を行った。プライマー21とプライマー146で増幅した電気泳動図をそれぞれFig. 5-2-1とFig. 5-2-2に示した。これらの電気泳動図では各品種・系統に特異的なバンドパターンが確認された。総数で74個の再現性があるRAPDが得られた。各系統間でのRAPDを比較すると、最低でアンズの‘平和’とチベットアンズ’の間で4個のRAPDが検出され、最高では‘平和’、‘アーモンド85124’間で38個のRAPDが検出された(Table 5-2-3)。本実験で供試した材料の約6割は種が異なるために、これらのRAPDsは種間で検出されたものが大半を占めていた。各種ごとの非バンド共有率の平均値はウメが 0.234 ± 0.109 、アンズが 0.153 ± 0.073 、スモモが 0.293 ± 0.076 、モモが 0.248 ± 0.107 であった。この値を基準にしてそれぞれと比較すると、スモモの平均非類似度が最大で、次いでモモ、ウメの順でアンズが最も平均非類似度が小さくなった。品種・系統間で距離行列を求め、群平均化法によりデンドログラムを作成した(Fig. 5-2-3)。デンドログラムはウメ、アンズ、のグループ、モモのグループ、スモモのグループの3群に分類された。クラスタリングは非共有バンドすなわち、RAPDをもとに階層的に行ったために、低次でのクラスタリングにおいては信頼度が高いものの、高次のクラスタリングにおいてはデータの反映様式が曖昧であるためにさらに数量化理論第3類を適用し、散布図を作成した(Fig. 5-2-4)。その結果、第1及び第2成分で約32%の寄与率を示した。クラスター分析と同様にウメ・アンズ、スモモ、モモの3種類のグループに分類できた。それらのグループ以外にプロットされた系統は、‘李梅’、‘仁杏’(Ren-xing)、山杏(Siberian apricot)、‘麦黄準杏’(Mai-huang-zhun-xing)、‘花螺李’、光核桃(Tibetan peach)、ユスラウメ、オヒヨモモ、アーモンド85124で‘李梅’と‘仁杏’はウメとスモモ、アンズとスモモの種間雑種であると考えられる品種で、両者の中間にプロットされた。山杏と‘麦黄準杏’は、中国に分布しているアンズで日本のアンズと発達過程が異なり、アンズ、ウメのグループから少し離れてプロットされた。光核桃は核の模様などの形態的形質を含めてスモモに類似していると思われる点がいくつか見られ、モモ、スモモと離れた位置にプロットされた。今回供試したアーモンド2系統は、形態的に大きく異なるために、その分類がおおきく駆け離れていた。この原因は、アーモンドの遺伝的変異が大きいのか、あるいはアーモンド85124が雑種であるためかのどちらかであると推察された。オヒヨモモとユ

スラウメはスモモグループの近縁にプロットされた。

2). サクラ亜属の系統分類

サクラ亜属の系統分類にはコモンプライマーA00からA11とA13 からA19の19種類のコモンプライマーを用いて分類を行った。プライマーA18とプライマーA19で増幅した電気泳動図をそれぞれFig. 5-2-5とFig. 5-2-6に示した。これらの電気泳動図では各品種・系統に特異的なバンドパターンが確認された。19種類のプライマーについて調査した結果、再現性のある100個のRAPDsが得られた。各品種・系統間のRAPDを比較すると最低でニワザクラ(白)とニワザクラ(紅)の間で6個のRAPDsが検出され、最高では、‘モンモレンシー’と長野・荒川沖のニワウメ2系統間で48個のRAPDsが検出された。非共有バンド率を各種でまとめると、*Microcerasus* が 0.206 ± 0.111 、オウトウが 0.280 ± 0.125 、サクラが 0.291 ± 0.07 であった。この値を基準にしてそれぞれを比較すると、サクラの平均非類似度が最大で次いでオウトウ、*Microcerasus* の順であった(Table 5-2-4)。品種・系統間での非共有RAPDsの距離行列を求め、クラスター分析によりデンドログラムを作成した(Fig. 5-2-7)。デンドログラムは大きく*Microcerasus*、オウトウ、サクラの3グループに分類された。これらのグループ間の類似性は低く、低次においてクラスタリングがみられた。数量化理論第3類により散布図(Fig. 5-2-8)を作成した結果、第1及び第2成分で約33%の寄与率を示し、この値はスモモ・モモ亜属で得られたものと同程度であった。クラスター分析と同様に供試材料は*Microcerasus*、オウトウ、サクラの3グループに分類された。ユスラウメ2系統はこれらのグループとは類縁性が低く、これらの中間付近にプロットされた。

3). NTS領域の増幅とデザインプライマーを用いたALPHA法による系統分類

RAPD分析では全ての供試材料について同一のDNA多型で分析できないため、核DNAにコードされ、種特異的であると考えられる領域を対象として、それらの増幅を試みた(Fig. 5-2-10)。NTS領域では約2.0kbpから約200bpの大きさの増幅断片が認められ、500bpの増幅断片はほとんどの供試材料に認められた。‘仁杏’に特異的な200bpの増幅断片はミロバランスモモにも認められた。同様にスピノーサスモモに特異的な約300bpの増幅断片が‘サンプルーンにも’認められた。スモモ、モモ亜属に属する供試材料の増幅断片数は1から2本であるのに対し、*Microcerasus*を除くサクラ亜属に属する供試材料の増幅断片数は1から3本であった。Per 遺伝子のミニサテライト領域をモチーフしたプライマーで得られた電気泳動図では、光核桃85054、おはつもも、オヒヨモモは約1.0kbp付近の位置にみられる2本の増幅断片が多型を示していた。ミロバランスモモとスピノーサスモモでみられる200bpのサイズの増幅断片は‘アオバザクラ’‘チシマザクラ’で認められた。ヒトのテロメア領域の反復配列をモチーフしたプライマーで得られた電気泳動図では、約300bpの位置に供試材料の半数以上でみられる増幅バンドが認められた。しかしながら、各品種・系統の持つバンドパターンは様々で、再現性の低い増幅断片もしばしばみられた。

考 察

1). スモモ、モモ亜属の分類

これまでスモモ、モモ亜属間での系統分類は、葉緑体DNAのRFLPパターンによる分類(Uematsu et al,1991、Kaneko et al、1986)、ミトコンドリアDNA断片をプローブにしたサザン解析(池谷ら、1992)などが行われてきた。しかし、これらは細胞質遺伝するオルガネラDNAを対象としているために、核DNA の情報が得られない。果樹において、核にコードされている信頼性のある遺伝子プローブが少なく一般にM13などの反復配列領域をプローブとしたサザン解析(Nybomら、1990)などが利用されているが、多重遺伝子であるために、シグナルが煩雑であり、その評価が難しいと思われる。RAPDマーカー法はウメなどにおいて近縁な品種間においても識別が可能であるが、プライマーの選抜が適切であれば、亜属間の分類にも適用できると考えられたので、スモモ、モモの分類に適用した。

分析の結果、平均非類似度はスモモが最大で、次いでウメ、モモの順でアンズが最も平均非類似度が小さくなった。この傾向はアイソザイム分析でもみられ、スモモは異系交配集団であるために、その変異が増加していると報告されている。この原因以外に、種数が多く、倍数体が存在し、その分布地域が広範囲に及んでいることなどが関与していると考えられる。次いでウメが高いのは、ウメの品種にはアンズ、スモモの形質がみられるものが多く、種間雑種が大半を占めている種で、これらにより変異が増加していると考えられる。モモ亜属ではアーモンド、オヒヨモモ、山桃など種数が多いために平均非類似度がアンズよりも高くなったと思われる。しかし、これまでの研究結果より、*P.persica*、*P.mira*での種内におけるDNA多型の出現頻度は低く、単一種内においてはむしろモモの方が相同性が高いと思われる。散布図ではスモモを中心にして供試材料が点在している事が確認できた。スモモの接ぎ木親和性は高いことが知られていることから(田中、1934)、これらの亜属が派生する過程において、スモモは重要であったのではないかと推察している。ユスラウメがスモモのグループと比較的類似性が高いこと、光核桃が遺伝的に特異的であることなどの結果は非常に興味深く今後、検討する必要がある。

2).サクラ亜属の系統分類

サクラの系統分類はハナザクラ、即ち、観賞用のサクラを中心としたものが多く、果樹として利用されているオウトウ、台木品種などの類縁関係については山口ら(1993)などが接ぎ木親和性を中心に検討しておりそれらの系統関係に関する知見は限られている。Mowrey・Werner(1990)、石黒ら(1991)はアイソザイム分析により種間の類縁関係の推定を行い、甘果オウトウと酸果オウトウは遺伝的に近縁で、ユスラウメ、ニワザクラなどは原生種ではないかと述べている。本実験では、供試材料は大きくオウトウ、サクラ、*Microcerasus* の3グループに分類でき、これらの結果と一致していた。各グループの平均非類似度はサクラ、オウトウ、*Microcerasus* の順に大きかったが、本実験では*Microcerasus* の供試数を増加すれば後者2グループは入れ代わっていたと予想する。各グループはさらに低次でクラスターを組んでおり、サクラのグループではアオハダを代表とするクラスターと中国オウトウを代表とするクラスターに分かれた。オウトウのグループは予想通り、甘果オウトウと酸果オウトウに分類された。*Microcerasus* はユスラウメとその他の系統に分かれ、供試したユスラウメ2系統は相互に類似性が低かった。

ユスラウメの接ぎ木親和性はスモモ、モモ、オウトウでもみられ、さらにゲノムの類似度がスモモと類似していることから、サクラ亜属とスモモ亜属が分岐する過程において重要な植物であったのではないかと推察している。

3).NTS領域の増幅とデザインプライマーを用いたALPHA法による系統分類

現在のサクラ属植物は、主に核交雑と自然淘汰の繰り返しにより派生してきたと考えられるため、系統進化を検討する上で核DNAの類似性を調査する必要がある。細胞質DNAのサイズが一般的に合計約700bp前後と核DNAと比較すると極めて小さく、また、それらは閉環状2本鎖の構造であるため、RAPD分析法で増幅されるDNA断片は、核DNAに依存しているものと推察した。このため、核DNAの類似性を検討するには有効であると考えられたが、サクラ亜属とスモモ、モモ亜属は類似性が低いため、全ての供試材料を同一のDNAフィンガープリントで分析することは不可能であった。このため、全ての供試材料にみられ、それらが核DNAに存在している領域を増幅することが望ましいと考えられた。今回、対象とした3領域は核DNAに存在し、遺伝的に不安定で欠損、挿入などの変異がみられやすい縦列型反復配列を含んでいる。NTS領域の増幅では1から3本の増幅断片が得られ、約500bpの位置に全ての品種・系統に共通な増幅断片が得られた。コムギにおいても同様に250bpや500bpに増幅断片がみられ、系統間に特異的なバンドパターンが確認されている。増幅の由来先についてはシーケンス、あるいはサザンブロット解析などで確認する必要があったが、比較的アニーリング温度が高い条件でStringencyが高いこと、配列数の長いプライマーと鋳型DNAのアニーリングサイトの会合率が限られていることなどから経験的に正確に増幅しているものと判断した。結果で記したように幾つかの特異的な増幅断片がみられたが、この中で‘仁杏’とミロバラン スモモ、同様にスピノーサスモモと‘サンプルーン’にみられた増幅断片は実際にこれらの品種・系統間で核DNAの移入が生じたことを示唆しているものと推察している。

このことについては塩基配列を決定し、真偽を検討する必要がある。また、サクラでは1から3本の増幅断片がみられ、この領域においてスモモ、モモ亜属と大きく異なった。

Per 遺伝子のミニサテライト領域やヒトのテロメア領域の反復配列をモチーフとしたプライマーを用いてALPHA法によりDNAフィンガープリントを作成したが、PCRの条件を多少のミスマッチを生じる程度で行っているため、正確にこれらの領域を増幅していない可能性があるかと推察された。*Per* 遺伝子をモチーフとしたプライマーでは、全供試材料で比較的類似したパターンが得られた。ミロバラン スモモ、スピノーサスモモ、‘アオバザクラ’、‘チシマザクラ’に共通してみられた約200bpの増幅断片はこれまでの見地からは解釈できず、今後検討する必要がある。ヒトのテロメア領域をモチーフとしたプライマーでは約300の位置に供試材料の半分以上でみられる増幅バンドが認められたが、それ以外については種特異的であり、多くのDNA多型を供給した。高等植物の染色体末端のテロメア領域の性状については不詳であるため、増幅ハターンの解釈はできず、これらのプライマーは系統分類に適用できるものとは考えられなかった。このように、核DNAにコードされてる領域を扱う場合、STS化などがなされ、その由来が定かである場合、断片長によるDNA多型、RFLP解析、塩基配列の決定により系統分類に利用できると考えられた。*Per* 遺伝子のミニサテライト領域やヒトのテロメア領域の反復

配列をモチーフしたプライマーはカンキツの識別に有効であると報告されており(松山ら、1992)、これらのプライマーは品種識別には有効であると推察された。

以上ように、スモモ亜属、モモ亜属、サクラ亜属では明瞭な分化がみられ、各実験において点在していた系統やスモモと類似していたユスラウメなどはサクラ属果樹の進化の過程を検討する上で重要な植物と考えられた。トータルDNAによるRAPD分析法から得られる情報は、ゲノムを構成している各DNAの比率によりプライマーとDNA間で競合が生じるために主に核DNAに依存していると考えられる。進化を検討する上で、さらに遺伝様式の異なるオルガネラの情報も必要であると思われる。

摘 要

系統進化を検討する上で核DNAの類似性を調査することは重要であり、RAPD分析法と核DNAにコード存在する5SrDNAの非転写スペーサー(nontranscribed spacer ; NTS)領域の増幅、及び、*Per* 遺伝子のミニサテライト領域、テロメア領域参照にデザインされたプライマーを用いたALPHA法により、サクラ属植物の類縁関係について検討した。RAPD分析では、スモモ、モモ亜属とサクラ亜属がはっきりと分化しているために、2群に分けて分析を行った。スモモ、モモ亜属では、ウメとアンズ、スモモ、モモの3グループに分類され、スモモのグループは変異が大きく、供試したユスラウメはスモモと高い類似性を持っていた。光核桃とアーモンドは他の品種・系統と大きく異なった。サクラ亜属ではオウトウ、サクラ、*Microcerasus* の3グループに分類され、ユスラウメは変異が大きかった。

NTS領域の増幅では約2.0kbpから約200bpのサイズの増幅断片が認められ、500bpの増幅断片はほとんどの供試材料にみられた。‘仁杏’とミロバランスモモ、また、スピノーサスモモと‘サンプルーン’にみられた増幅断片は実際にこれらの品種・系統間で核DNAの移入が生じたことを示唆しているものと推察した。サクラ亜属では1から3本の増幅断片がみられ、この領域においてスモモ、モモ亜属と大きく異なった。*Per*遺伝子のミニサテライト領域やヒトのテロメア領域の反復配列をモチーフしたプライマーを用いてALPHA法によりDNAフィンガープリントを作成した結果、品種・系統の識別に有効であったが、増幅断片の由来が定かでなくデータの解釈が困難であるため、系統分類には不適であった。

スモモ亜属、モモ亜属とサクラ亜属の間では明瞭な分化がみられ、スモモと類似しているユスラウメなどは進化を検討する上で重要な植物と考えられた。

Table 5-2-1. Representative plants in *Prunophora* and *Amygdalus* for RAPD analysis

Code	Varieties	Type	Species
1	Nankou	Mume	<i>P.mume</i>
2	Bungo (single)	Mume	<i>P.mume</i>
3	Sumomoume	Mume	<i>P.mume</i>
4	Heiwa	Apricot	<i>P.armeniaca</i>
5	Nepal apricot	Apricot	<i>P.armeniaca</i>
6	Ren-xing	Apricot	<i>P.armeniaca</i>
7	Siberian apricot	Apricot	<i>P.sibirica</i>
8	Mai-huang-zhun-xing	Apricot	<i>P.armeniaca</i>
9	Manzaemon	Plum	<i>P.salicina</i>
10	Spinosa plum	Plum	<i>P.spinosa</i>
11	Sun Prune	Plum	<i>P.domestica</i>
12	Karari (Hua-lou-li)	Plum	<i>P.salicina</i>
13	Myrobalan 420-2-2	Plum	<i>P.cerasifera</i>
14	Hakutou	Peach	<i>P.persica</i>
15	Ohatsumomo	Peach	<i>P.persica</i>
16	Tibetan peach	Peach	<i>P.mira</i>
17	Chinese bush cherry	Cherry	<i>P.tomentosa</i>
18	David peach	Peach	<i>P.davidiana</i>
19	Almond 85289	Almond	<i>P.amygdalus</i>
20	Ohiyomomo	Almond	<i>P.triloba</i>
21	Almond 85124	Almond	<i>P.amygdalus</i>

Table 5-2-2. Representative varieties in *Cerasus* for RAPD analysis

Code	Varieties	Type	Species
1	Bing	Cherry	<i>P. avium</i>
2	English Morello	Cherry	<i>P. cerasus</i>
3	Chinese bush cherry (Yamagata)	Cherry	<i>P. tomentosa</i>
4	Aobazakura	Cherry	<i>P. lannesiana</i>
5	Niwaume (Yamagata)	Cherry	<i>P. Japonica</i>
6	Colt	Cherry	<i>P. avium</i> × <i>pseudocerasus</i>
7	Chishimazakura	Cherry	<i>P. nipponica</i>
8	Fujizakura	Cherry	<i>P. incisa</i>
9	Chinese cherry (Akitou)	Cherry	<i>P. pauciflora</i>
10	Napoleon	Cherry	<i>P. avium</i>
11	Fruticosa	Cherry	<i>P. fruticosa</i>
12	Mont Morency	Cherry	<i>P. cerasus</i>
13	Chinese cherry (Tenkouen)	Cherry	<i>P. pauciflora</i>
14	Choujizakura	Cherry	<i>P. apetala</i>
15	Aohada (Aobazakura)	Cherry	<i>P. lannesiana</i>
16	Mahaleb cherry	Cherry	<i>P. mahaleb</i>
17	Niwaume (Nagano)	Cherry	<i>P. Japonica</i>
18	Niwaume (Arakawaoki)	Cherry	<i>P. Japonica</i>
19	Chinese bush cherry (Okayama Univ.)	Cherry	<i>P. tomentosa</i>
20	Niwazakura (White)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>
21	Niwazakura (Pink)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>



Fig. 5-2-1. RAPD patterns of 21 representative varieties in *Prunophora* and *Amygdalus* by primer 145 .

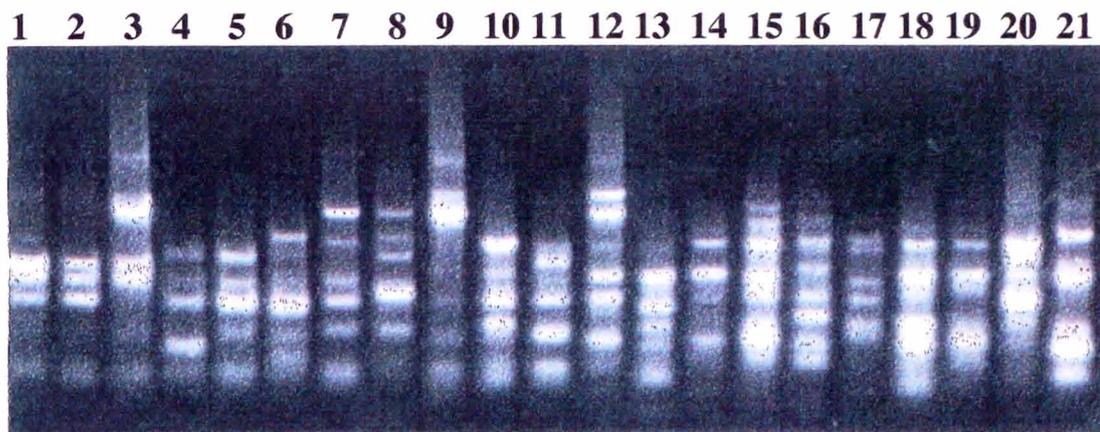


Fig. 5-2-2. RAPD patterns of 21 representative varieties in *Prunophora* and *Amygdalus* by primer 146 .

Table 5-2-3. Dissimilarity index between each pair of varieties in *Prunophora* and *Amygdalus*

Code	Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	Nankou		.14	.22	.20	.27	.20	.27	.24	.41	.39	.41	.45	.38	.39	.41	.35	.30	.43	.43	.36	.47
2	Bungo (single)			.35	.20	.22	.31	.24	.22	.46	.45	.49	.47	.35	.36	.41	.41	.30	.43	.43	.28	.50
3	Sumomoume				.31	.35	.30	.35	.32	.27	.34	.32	.34	.32	.45	.46	.46	.35	.41	.43	.36	.47
4	Heiwa					.05	.24	.15	.09	.36	.41	.39	.46	.36	.38	.41	.42	.31	.42	.42	.32	.51
5	Nepal apricot						.26	.14	.14	.41	.39	.41	.45	.30	.34	.35	.38	.30	.38	.38	.28	.47
6	Ren-xing							.20	.20	.31	.41	.34	.35	.31	.32	.36	.42	.26	.34	.36	.35	.41
7	Siberian apricot								.05	.38	.39	.38	.39	.35	.28	.30	.30	.30	.35	.38	.31	.45
8	Mai-huang-zhun-xing									.35	.39	.35	.36	.32	.31	.32	.35	.30	.38	.38	.28	.47
9	Manzaemon									.36	.32	.20	.35	.36	.38	.38	.46	.31	.41	.38	.39	.50
10	Spinosa plum										.18	.38	.20	.41	.42	.45	.28	.36	.39	.35	.46	
11	Sun Prune											.28	.27	.42	.41	.41	.41	.32	.38	.38	.31	.45
12	Karari (Hua-lou-li)												.36	.22	.23	.45	.36	.28	.26	.32	.46	
13	Myrobalan 420-2-2													.36	.41	.41	.24	.35	.35	.31	.42	
14	Hakutou														.07	.31	.23	.12	.15	.30	.38	
15	Ohatsumomo															.27	.24	.16	.11	.28	.36	
16	Tibetan peach																.30	.38	.32	.28	.42	
17	Chinese bush cherry																	.22	.24	.28	.31	
18	David peach																		.08	.28	.31	
19	Almond 85289																				.23	.34
20	Ohiyomomo																					.38
21	Almond 85124																					

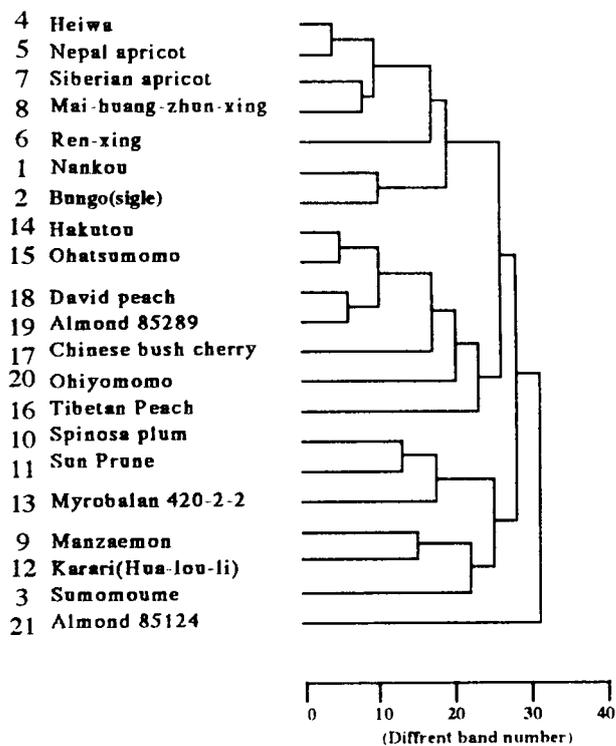


Fig. 5-2-3. Dendrogram of representative varieties in *Prunophora* and *Amygdalus* by cluster analysis using group average method.

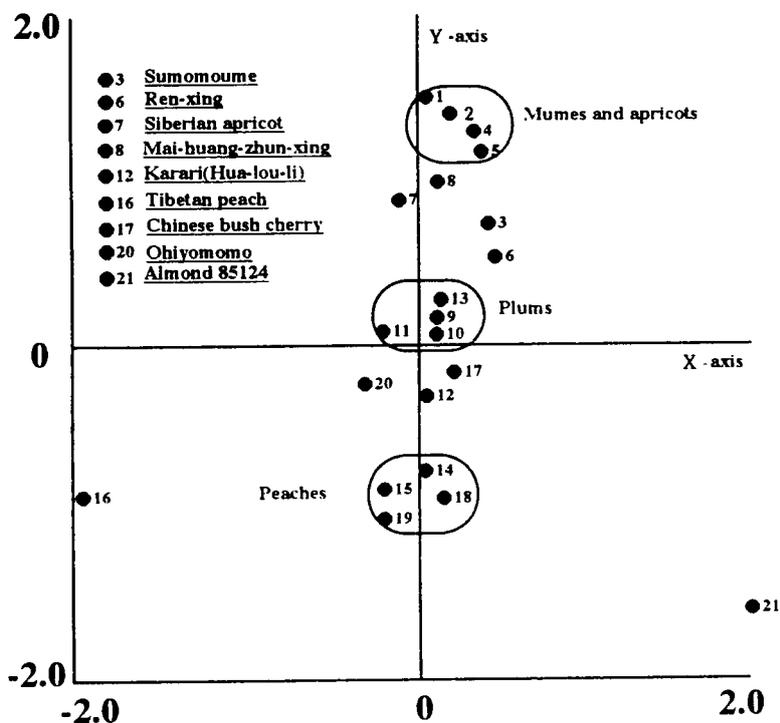


Fig. 5-2-4. Scattergram of representative varieties in *Prunophora* and *Amygdalus* by quantification of the third type. Each material was plotted according to its principal component score. X-axis : first component, Y-axis : second component.

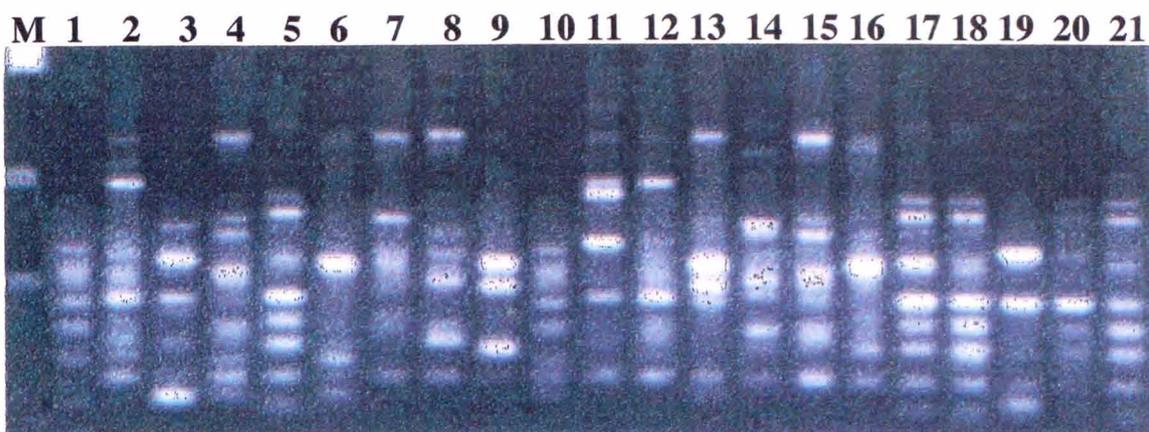


Fig. 5-2-5. RAPD patterns of 21 representative varieties in *Cerasus* by primer A 18 . M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

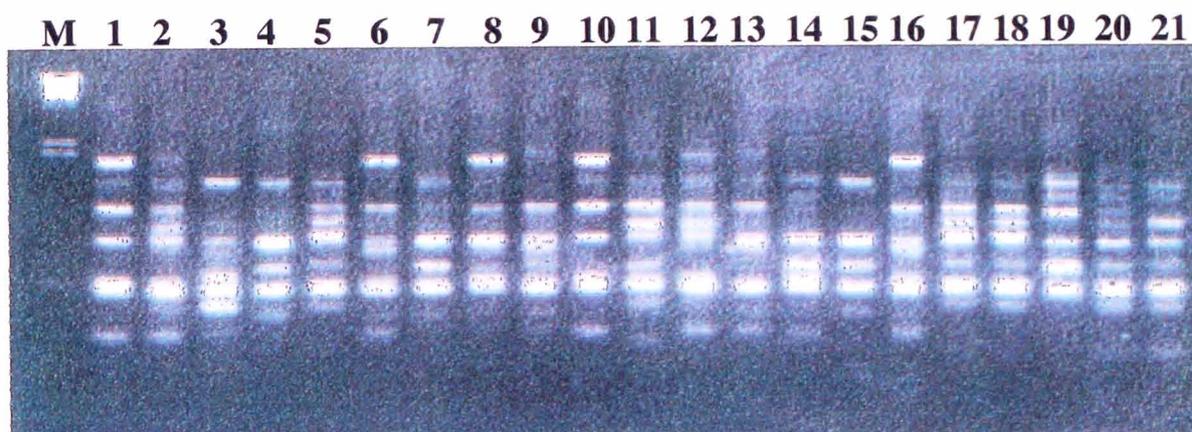


Fig. 5-2-6. RAPD patterns of 21 representative varieties in *Cerasus* by primer A 19. M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

Table 5-2-4. Dissimilarity index between each pair of varieties in *Cerasus* for RAPD analysis

Code	Varieties																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	Bing	.20	.34	.35	.34	.17	.38	.29	.31	.13	.31	.25	.30	.31	.36	.18	.43	.39	.38	.40	.44
2	English Morello		.36	.43	.38	.27	.42	.35	.37	.27	.17	.09	.32	.35	.42	.28	.47	.45	.44	.44	.44
3	Chinese bush cherry			.45	.30	.35	.42	.33	.27	.37	.39	.39	.32	.35	.42	.34	.37	.33	.28	.38	.36
4	Aobazakura				.39	.38	.17	.20	.30	.40	.34	.44	.29	.22	.09	.39	.42	.42	.39	.41	.43
5	Niwaume					.41	.40	.33	.39	.43	.37	.43	.40	.41	.42	.42	.17	.13	.39	.18	.22
6	Colt						.37	.28	.24	.18	.34	.28	.25	.30	.39	.09	.50	.46	.41	.47	.47
7	Chishimazakura							.19	.25	.35	.35	.04	.28	.21	.16	.34	.41	.39	.36	.38	.38
8	Fujizakura								.22	.30	.30	.34	.23	.24	.17	.27	.38	.36	.33	.35	.35
9	Chinese cherry									.32	.32	.36	.15	.22	.31	.23	.42	.40	.29	.39	.39
10	Napoleon										.34	.20	.33	.34	.35	.19	.46	.44	.39	.43	.45
11	Fruticosa											.18	.33	.36	.35	.35	.40	.38	.41	.37	.39
12	Mont Morency												.33	.36	.39	.27	.48	.48	.45	.45	.45
13	Chinese cherry													.19	.30	.26	.45	.41	.36	.42	.40
14	Choujizakura														.23	.29	.48	.46	.37	.47	.47
15	Aohada															.34	.41	.43	.38	.40	.40
16	Mahaleb cherry																.45	.43	.36	.40	.42
17	Niwaume																	.10	.29	.13	.15
18	Niwaume																		.27	.09	.13
19	Chinese bush cherry																			.26	.26
20	Niwazakura																				.06
21	Niwazakura																				
	Minimum																			.06	
	Maximum																			.50	
	Average																			.35	

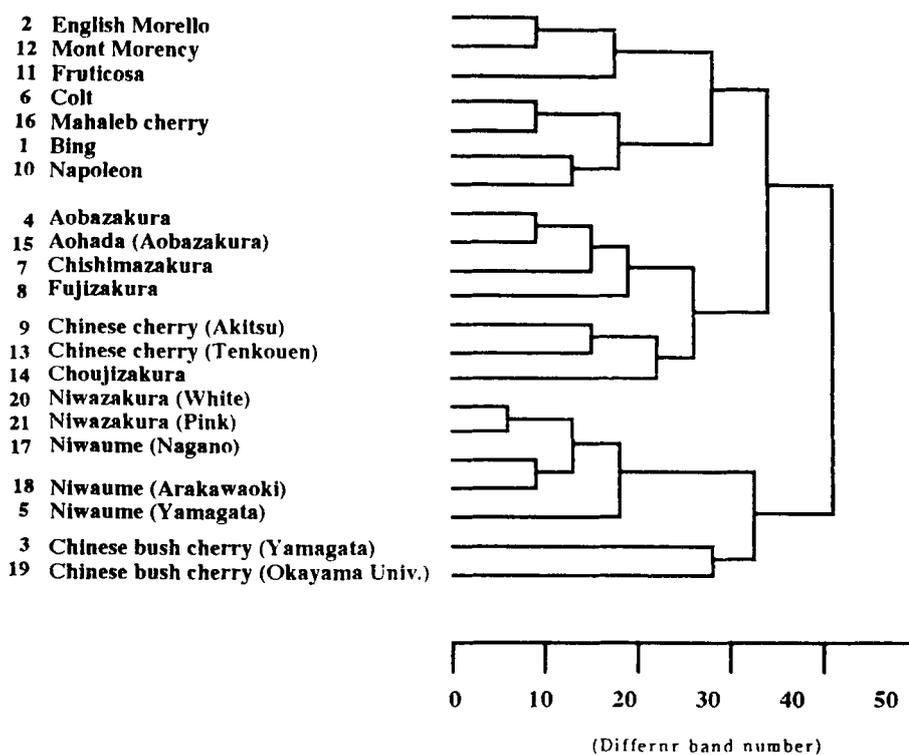


Fig. 5-2-7. Dendrogram of representative varieties in *Cerasus* by cluster analysis using group average method.

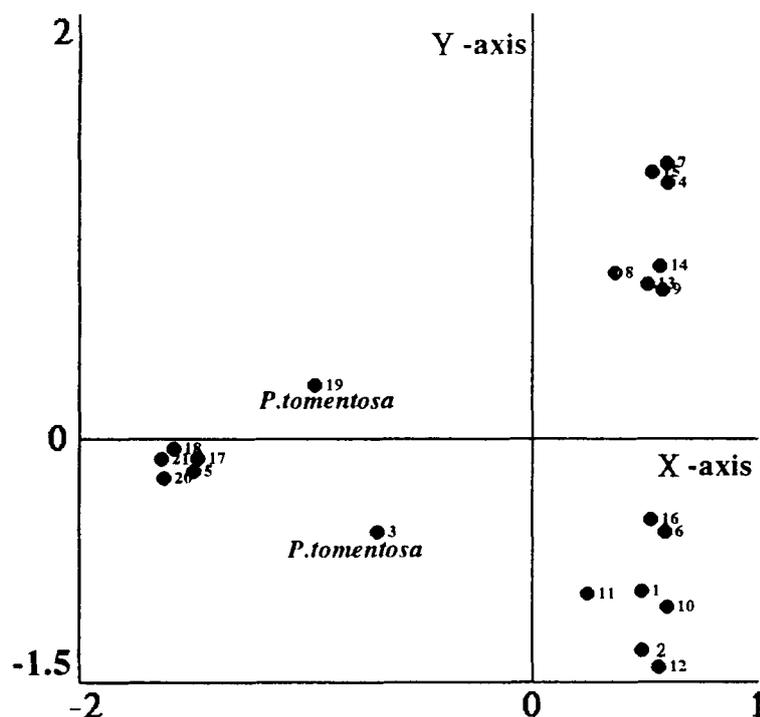


Fig. 5-2-8. Scattergram of representative varieties in *Cerasus* by quantification of the third type. Each material was plotted according to its principal component score. X-axis : first component, Y-axis : second component.

Table 5-2-5. Representative plants for PCR by designed primers

Code	Varieties	Type	Species
1	Nankou	Mume	<i>P. mume</i>
2	Bungo	Mume	<i>P. mume</i>
3	Sumomo ume	Mume	<i>P. mume</i>
4	Heiwa	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
5	Ren-xing	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
6	Siberian apricot	Apricot	<i>P. sibirica</i>
7	Alpine plum	Apricot	<i>P. brigantina</i>
8	Manzaemon	Plum	<i>P. salicina</i>
9	Krikon Damson	Plum	<i>P. insititia</i>
10	White Plum	Plum	<i>P. salicina</i>
11	Myrobalan plum 420-2-2	Plum	<i>P. cerasifera</i>
12	Spinosa plum	Plum	<i>P. spinosa</i>
13	Sun Prune	Plum	<i>P. domestica</i>
14	Beach plum	Plum	<i>P. maritima</i>
15	Western sand cherry	Plum	<i>P. besseyi</i>
16	Hakutou	Peach	<i>P. persica</i>
17	Tibetan peach85054	Peach	<i>P. mira</i>
18	Ohatsumomo	Peach	<i>P. persica</i>
19	David peach	Peach	<i>P. davidiana</i>
20	Almond85124	Almond	<i>P. amygdalus</i>
21	Ohiyomomo	Almond	<i>P. triloba</i>
22	Chinese bush cherry	Cherry	<i>P. tomentosa</i>
23	Niwaume	Cherry	<i>P. japonica</i>
24	Napoleon	Cherry	<i>P. avium</i>
25	Mont Morency	Cherry	<i>P. cerasus</i>
26	Mahaleb cherry	Cherry	<i>P. mahaleb</i>
27	Chinese cherry (Akitsu)	Cherry	<i>P. pauciflora</i>
28	Chinese cherry (Tenkouen)	Cherry	<i>P. pseudocerasus</i>
29	Fujizakura	Cherry	<i>P. incisa</i>
30	Houkizakura	Cherry	<i>P. fruticosa</i>
31	Aobazakura	Cherry	<i>P. lannesiana</i>
32	Choujizakura	Cherry	<i>P. apetala</i>
33	Colt	Cherry	<i>P. avium</i> × <i>pseudocerasus</i>
34	Chishimazakura	Cherry	<i>P. nipponica</i>
35	Niwazakura (White)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>
36	Niwazakura (Pink)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>

Table 5-2-6. Sequences of designed primers used in this study

Code	Primer	Gene	Origin	Sequences (5' - 3')	Designed by
1	Primer 1	5S rDNA	Nuclear DNA	TTTAGTGCTGGTATGATCGC	Alexander
2	Primer 2	5s rDNA	Nuclear DNA	TGGGAAGTCCTCGTGTGCA	Alexander
3	Primer 3	Per	Nuclear DNA	(ACAGGC) ³	Matsuyama
4	Primer 4	Telomere region	Nuclear DNA	(TTAGGG) ³	Matsuyama

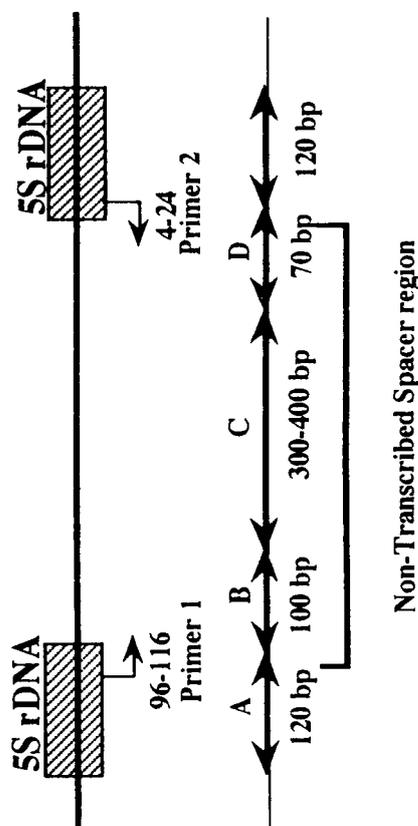


Fig. 5-2-9. Annealing Sites of the designed primers for Non-Transcribed Spacer (NTS) region. A ; 5S rDNA, B ; 3' flanking regions, C ; variant region and D ; 5' flanking region.

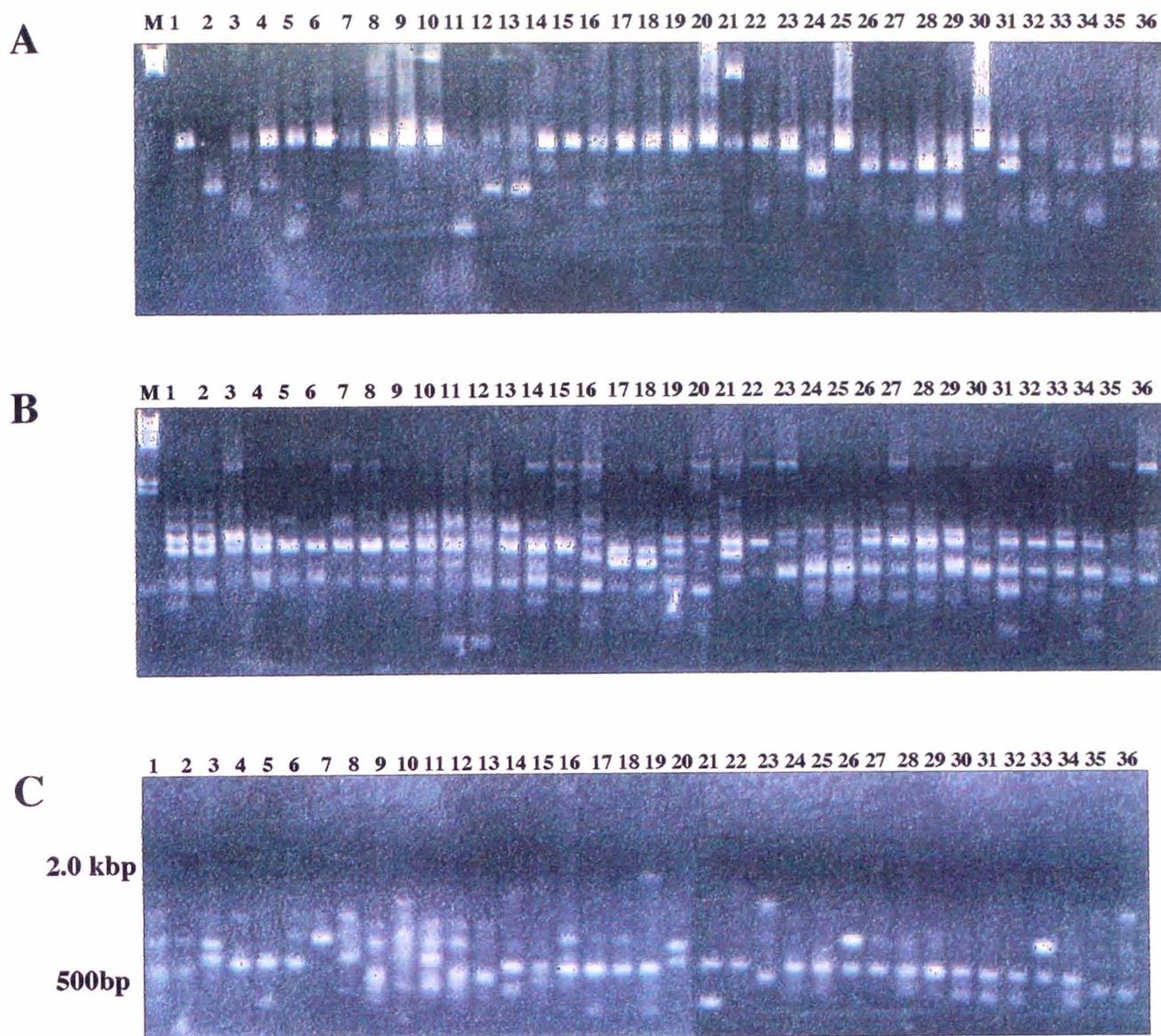


Fig. 5-2-10. DNA fingerprints amplified by designed primers for NTS region (A), minisatellite region of *Per* gene (B) and minisatellite region of telomere region (C). M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

第3節 葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLPによるサクラ属植物の系統分類

目 的

本章第2節で、ゲノムの類似性による系統分類を行い、ユスラウメ(Chinese bush cherry)、光核桃(Tibetan peach)、スモモなどの品種・系統がサクラ属植物の進化過程において重要であることが推察された。しかしながら、進化過程を考察する上で、これらの方で得られたデータは、交雑による変異を含むため、その評価は非常に困難である。そこで一般的に細胞質遺伝し、保存性の高い葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法を適用し、その領域におけるサクラ属植物の遺伝的変異を調査する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場、長野県果樹試験場、群馬県園芸試験場、京都府立大学で保存されているウメ3系統、アンズ4系統、スモモ9系統、モモ4系統、アーモンド2系統、ユスラウメ1系統、ニワウメ1系統、ニワザクラ2系統、オウトウ5系統、サクラ6系統、の合計30種37系統を実験に供試した(Table 5-3-1)。

2).方法

第1章第3節の方法に従った。

結 果

1).STSプライマーによる特定領域の増幅とDNA多型

葉緑体にコードされているpsbA遺伝子領域、rbcL-ORF106遺伝子間領域、及びatpB-rbcL遺伝子間領域、matK遺伝子領域を4組のSTSプライマーにより増幅した結果、psbA遺伝子領域では約1.1kb、rbcL-ORF106遺伝子間領域で約3.2kb、atpB-rbcL遺伝子間領域で約2.1kb、matK遺伝子領域では約1.5kbpの増幅断片が得られ、これらの増幅産物の断片長は系統間で全て相同で、欠損挿入などの変異は認められなかった(Fig. 5-3-1)。このため増幅産物6種類の4塩基認識制限酵素(*Alu* I, *Hae* III, *Hha* I, *Msp* I, *Nla* III, *Rsa* I)、2種類の5塩基認識制限酵素(*Hinf* I, *Sac* FI)、4種類の6塩基認識制限酵素(*Mbo* II, *Eco* RI, *Eco* RV, *Sau* 3AI)で消化した。消化物を3%のシーケムアガロースゲルで電気泳動し、各制限酵素の認識部位の有無を調査した。

12種類の制限酵素について各増幅断片のRFLPパターンを調査したところ、psbA遺伝子領域では*Mbo* II処理でスピノーサスモモ、及びコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、*Msp* I処理で‘ナポレオン’、‘マハレブ’、‘コルト’(Fig. 5-3-2)、*Rsa* Iで‘山杏’(Siberian apricot)に特異的な多型が検出された。rbcL-ORF106遺伝子間領域では*Alu* Iで‘白桃’、‘おはつもも’、‘花螺李’に、*Eco* RV処理で‘マリチマ’(Beach plum)とコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、*Hinf* I処理でコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、*Mbo* II処理で‘ホウキザクラ’に、*Msp* I処理で

コード番号25から35番のサクラ品種・系統に(Fig. 5-3-3)、Sau 3AI処理でコード番号16から21番のモモとアーモンドに、Scr FI 処理で‘チョウジザクラ’に多型が検出された。atpB-rbcL遺伝子間領域ではAlu I 処理で‘ナポレオン’、‘マハレブ’‘コルト’に、Hinf I処理で光核桃と‘アルバインブラム’、及びコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、Mbo II処理でアーモンド5124に多型が検出された。これらの多型の模式図をFig. 5-3-4にまとめた。

得られた多型の中で、スモモ、モモ亜属とサクラ亜属に分かれるパターンが3種類の処理で検出された。12種類の制限酵素について、全く多型を示さなかったものを1つのグループにまとめた結果、AからNの14のグループに分類できた(Fig. 5-3-5)。グループAとグループNはそれぞれスモモ亜属の集団、サクラ亜属の集団で、ユスラウメ、ニワウメ、ウェスタンサンドチェリーやニワザクラなどの*Microcerasus* 植物はAのグループに属する他のスモモ亜属植物とRFLPパターンが相同であった。得られた多型をもとにNei&Li(1979)の計算式で遺伝距離を求めた(Table 5-3-2)。最小でグループAとグループBの間で0.0006、最高で、グループHとグループKの間で0.0159であった。サクラ亜属植物とスモモ、モモ亜属植物の亜属間の遺伝距離は大きかった。各グループ間の遺伝距離をもとにUPGMAで系統樹を作成した(Fig. 5-3-6)。系統樹は大きくサクラとスモモ・モモの2グループに分かれた。スモモ・モモのグループでは‘マリチマ’、‘アルバインブラム’及び光核桃、モモ・アーモンドの順に遺伝的に遠縁であった。サクラのグループでは甘果オウトウはサクラ及び酸果オウトウと遺伝的に遠縁であった。

考 察

1).STSプライマーによる特定領域の増幅とDNA多型

増幅の結果、得られた断片長に多型が検出できなかったため、これらの領域におけるRFLPsを検出するために12種類の制限酵素で増幅断片を処理した。制限酵素の認識部位数が増加するにつれてDNA多型の出現頻度は低下し、切断が起こらないものもあった。一方、4塩基認識や5塩基認識の制限酵素では認識部位が比較的少ないことから切断は起こりやすく、DNA多型の出現頻度もそれにつれて増加した。検出された多型のうちサクラ亜属とスモモ・モモ亜属に分ける多型がみられ、これらの集団は比較的早期に分岐したと推察している。Rehder(1945)、田中(1948)は形態的特性により‘ウェスタンサンドチェリー’、‘ユスラウメ’、‘ニワウメ’、‘ニワザクラ’をサクラ亜属に分類しているが、これらの品種・系統はスモモの集団と近縁であった。これらの接ぎ木親和性はスモモ亜属、モモ亜属の植物で高く、オウトウでは低いという調査報告がなされている(私信)ことから、‘ユスラウメ’、‘ニワウメ’などはスモモ亜属、モモ亜属に近縁で、スモモ亜属に属すると考えられた。また‘マリチマ’、‘光核桃’はRAPD分析の分類、結果と同様にスモモ、モモ亜属内でも変異の大きい植物で、地理的環境を考慮すると独自に進化したのではないかと推察される。‘マリチマ’はサクラと同様にrbcL-ORF106遺伝子間領域においてEco RVの認識部位を持っていた。アメリカスモモの‘グコー’にも同じ結果がみられたため、アメリカスモモはスモモ亜属の中で比較的遠縁であるものと推察した。この変異は単なる並行進化で、あるいはアメリカスモモがサクラに近縁

であるために生じたと推察されるが、アメリカスモモについての知見が少ないために検討できなかった。スピノーサスモモが示した変異について第2章第3節で考察したように、倍数体仮説において‘ミロバランスモモ’が母系で‘スピノーサスモモ’が父系であると予想された。

葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法はカキノキ科の*Diospyros*属(米森ら、1994)やバラ科(武内ら、1995)の分類に用いられ、同手法が系統分類学上有効であると述べている。サクラ属植物においてはBadenesとParfitt(1995)が9種の*rbcL*-ORF106遺伝子間領域のRFLPパターンを調査しており、その結果は本実験で得られたものと矛盾していなかった。Uematsuら(1991)は葉緑体DNAのRFLPパターンからアンズがサクラ属果樹の祖先型であると述べているが、BadenesとParfittと同様に、RAPD分析及び本節で得られた結果からは推定できず、むしろ近代において派生したものと考えられた。*P. cerasus* は*P. fruticosa* × *avium* の交雑により生じたと考えられている(Sauer、1993)が、本研究ではこれを支持する結果が得られた。Watkins(1976)は*Prunophora*植物あるいは*Microcerasus*植物がサクラ属の進化過程の中心となったのではないかと提言し、BadenesとParfittはこの説を支持できないと述べている。Badenesらは単に、*Prunophora*植物のRFLPsの出現頻度が*Cerasus*植物などと比較して少ないことから支持できないと述べているが、基準とする種を変えればこれらの変異は正逆になり、この考察は評価できないと考える。

サクラ属植物の葉緑体DNAの全長は約135kbp前後と報告されていることから、本実験では葉緑体DNAの約20分の1の領域しか扱っておらず、進化を論じる上でデータの信頼性にかけるものと考えている。偶発的に検出された多型はなく、データに信頼性があると考えられるが、得られた傾向については、葉緑体DNA全域を対象とした実験手法で再検討する必要がある。

摘 要

葉緑体にコードされている*psbA* 遺伝子領域、*rbcL*-ORF106 遺伝子間領域、及び*atpB*-*rbcL* 遺伝子間領域、*matK* 遺伝子領域を増幅する4組のSTSプライマーにより、4領域の増幅を行った結果、*psbA* 遺伝子領域では約1.1kb、*rbcL*-ORF106 遺伝子間領域で約3.2kb、*atpB*-*rbcL* 遺伝子間領域で約2.1kb、*matK* 遺伝子領域では約1.5kbpの大きさの増幅断片が得られ、これらの増幅産物の断片長は系統間で全て相同で、欠損挿入などの変異は検出できなかった。12種類の制限酵素について各増幅断片のRFLPパターンを調査したところ、*psbA* 遺伝子領域では*Mbo* II処理でスピノーサスモモ、及びコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、*Msp* I処理で‘ナホレオン’、‘マハレブ’ ‘コルト’、*Rsa* Iで‘山杏’に特異的な多型が検出された。*rbcL*-ORF106 遺伝子間領域では*Alu* Iで‘白桃’、‘おはつもも’、‘花螺李’に*Eco* RV処理で‘マリチマ’とコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、*Hinf* I処理でコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、*Mbo* II処理で‘ホウキザクラ’に、*Msp* I処理でコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、*Sau* 3AI処理でコード番号16から21番のモモとアーモンドに、*Scr* FI 処理で‘チョウジザクラ’に多型が検出された。*atpB*-*rbcL* 遺伝子間領域では*Alu* I 処

理で‘ナポレオン’、‘マハレブ’‘コルト’に、*Hinf* I処理で光核桃と‘アルパインプラム’、及びコード番号25から35番のサクラ品種・系統に、*Mbo* II処理でアーモンド5124に多型が検出された。

得られた多型の中で、スモモ、モモ亜属とサクラ亜属に分かれるパターンが検出された。12種類の制限酵素について全く多型を示さなかったものを1つのグループにまとめた結果、AからNの14のグループに分類でき、グループAとグループNはそれぞれスモモ亜属の集団、サクラ亜属の集団で、ユスラウメ、ニワウメ、ウエスタンサンドチェリーやニワザクラなどの植物はAグループに属し、他のスモモ亜属植物とRFLPパターンが相同であった。各グループ間の遺伝距離をもとにUPGMAで系統樹を作成した。系統樹はサクラとスモモ・モモの2グループに分かれ、これらの集団は比較的早期に分岐したと推察される。

Table 5-3-1. Representative plants for PCR-RFLP analysis

Code	Varieties	Type	Species
1	Nankou	Mume	<i>P. mume</i>
2	Bungo	Mume	<i>P. mume</i>
3	Sumomo ume	Mume	<i>P. mume</i>
4	Heiwa	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
5	Ren-xing	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
6	Siberian apricot	Apricot	<i>P. sibirica</i>
7	Alpine plum	Apricot	<i>P. brigantina</i>
8	Manzaemon	Plum	<i>P. salicina</i>
9	Karari (Hua-lou-li)	Plum	<i>P. salicina</i>
10	Krikon Damson	Plum	<i>P. insititia</i>
11	White Plum	Plum	<i>P. salicina</i>
12	Myrobalan plum 420-2-2	Plum	<i>P. cerasifera</i>
13	Spinosa plum	Plum	<i>P. spinosa</i>
14	Sun Prune	Plum	<i>P. domestica</i>
15	Beach plum	Plum	<i>P. maritima</i>
16	Western sand cherry	Plum	<i>P. besseyi</i>
17	Hakutou	Peach	<i>P. persica</i>
18	Tibetan peach 85054	Peach	<i>P. mira</i>
19	Ohatsumomo	Peach	<i>P. persica</i>
20	David peach	Peach	<i>P. davidiana</i>
21	Almond 85124	Almond	<i>P. amygdalus</i>
22	Ohiyomomo	Almond	<i>P. triloba</i>
23	Chinese bush cherry	Cherry	<i>P. tomentosa</i>
24	Niwaume	Cherry	<i>P. japonica</i>
25	Napoleon	Cherry	<i>P. avium</i>
26	Mont Morency	Cherry	<i>P. cerasus</i>
27	Mahaleb cherry	Cherry	<i>P. mahaleb</i>
28	Chinese cherry (Akitsu)	Cherry	<i>P. pauciflora</i>
29	Chinese cherry (Tenkouen)	Cherry	<i>P. pseudocerasus</i>
30	Fujizakura	Cherry	<i>P. incisa</i>
31	Houkizakura	Cherry	<i>P. fruticosa</i>
32	Aobazakura	Cherry	<i>P. lannesiana</i>
33	Choujizakura	Cherry	<i>P. apetala</i>
34	Colt	Cherry	<i>P. avium</i> × <i>pseudocerasus</i>
35	Chishimazakura	Cherry	<i>P. nipponica</i>
36	Niwazakura (White)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>
37	Niwazakura (Pink)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>

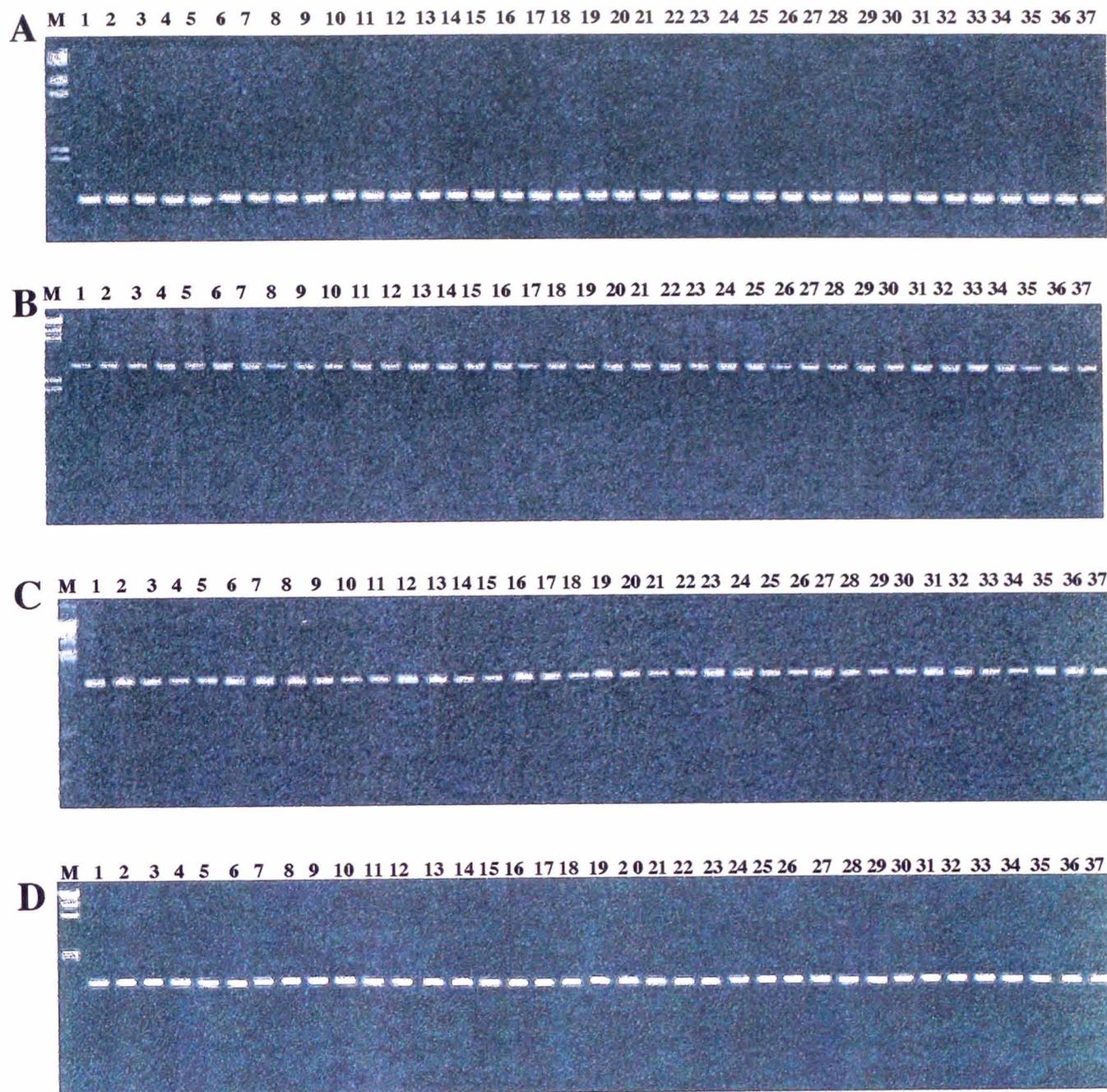


Fig. 5-3-1. Amplifications of *psbA* (A), *rbcL-ORF106*(B), *atpB-rbcL*(C) and *matK*(D) regions from genomic DNA of 37 representative varieties.

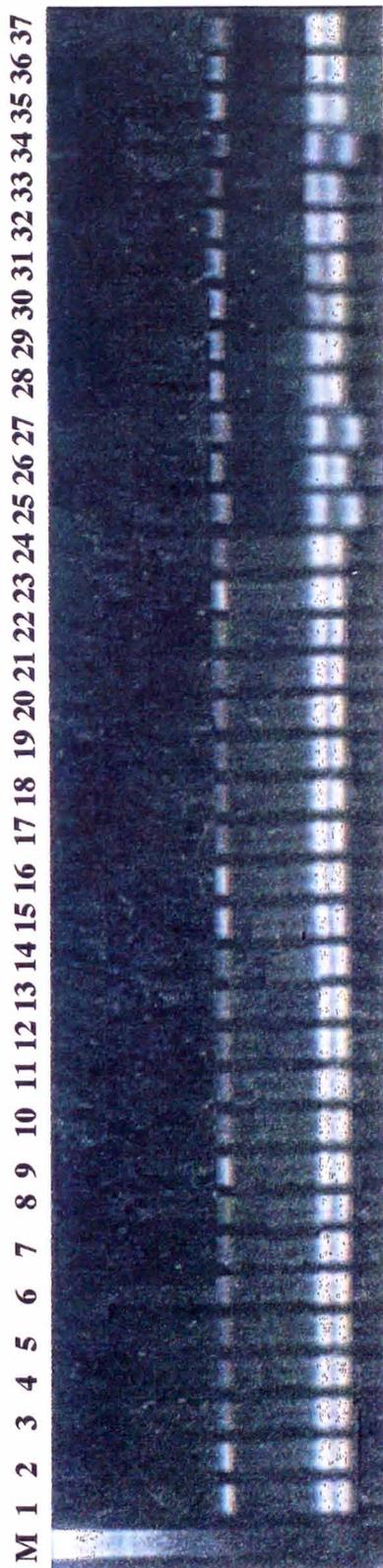


Fig. 5-3-2. RFLPs of *psbA* regions amplified from genomic DNA of 37 representative varieties digested by *Msp* I, M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

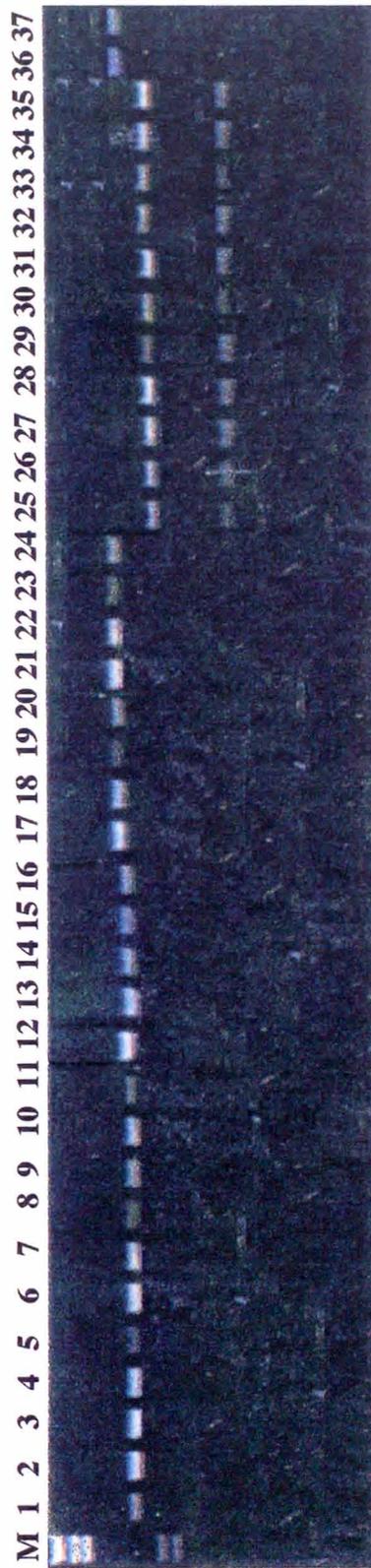


Fig. 5-3-3. RFLPs of *rbcL*-ORF106 regions amplified from genomic DNA of 37 representative varieties digested by *Msp* I, M indicates *Hin* d III digested lambda DNA.

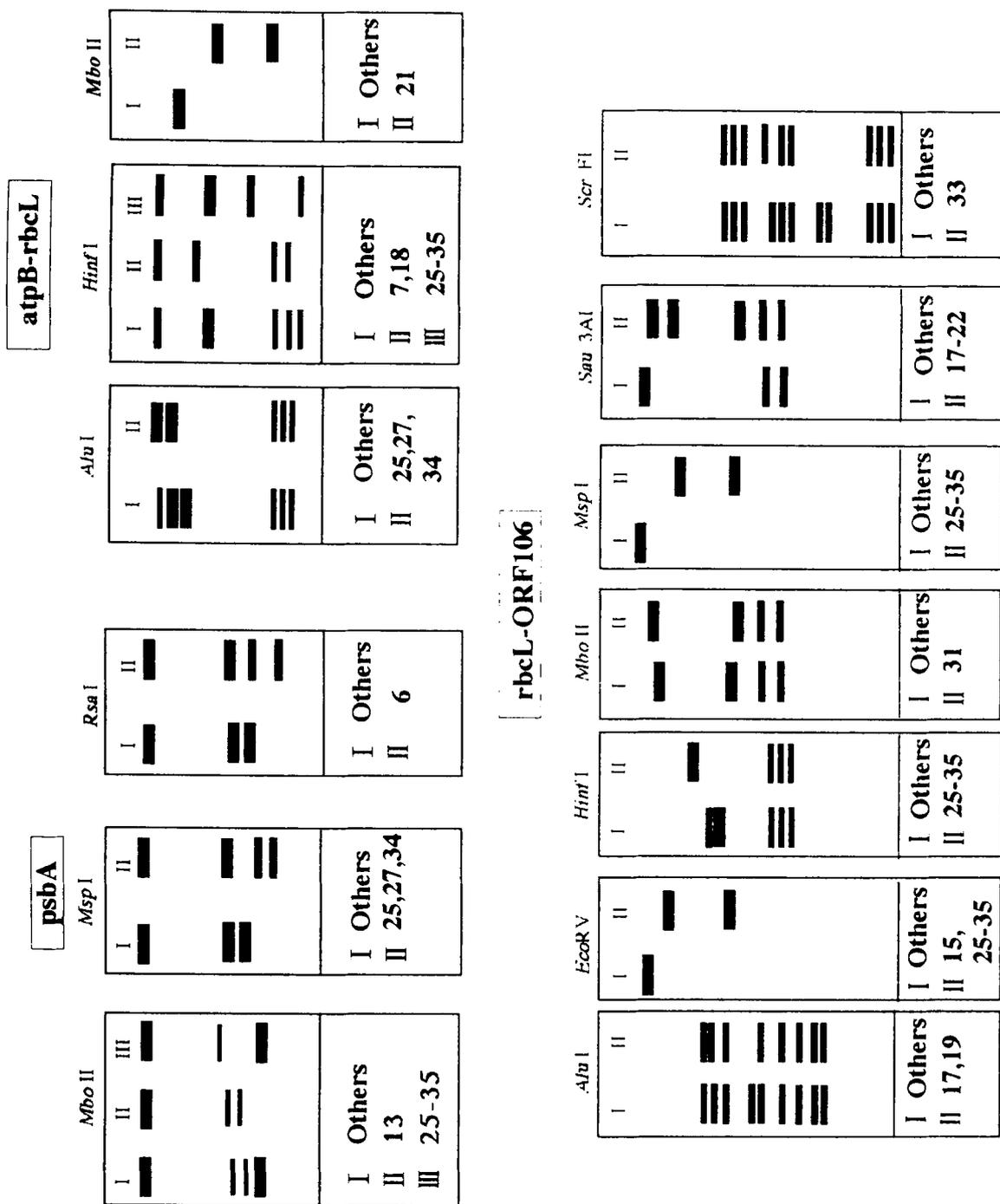


Fig. 5-3-4. RFLP patterns from digestions of four regions by each restriction enzyme.

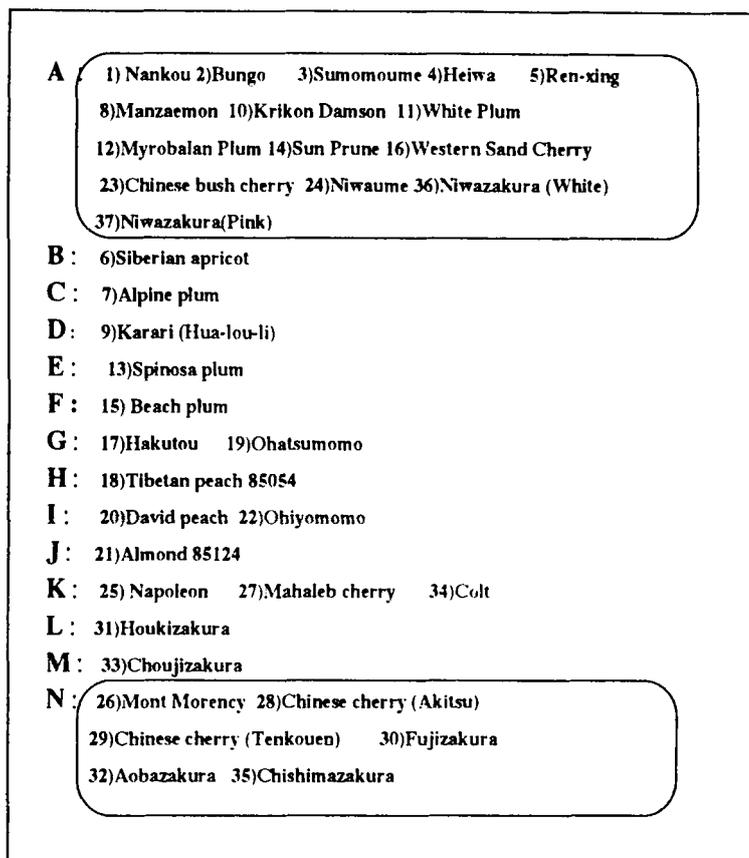


Fig. 5-3-5. Grouping of varieties based on the RFLP patterns of amplified DNA fragments.

Table 5-3-2. Genetic distances between each group classified on the base of RFLPs

Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 Group A		.0006	.0022	.0012	.0009	.0025	.0020	.0030	.0008	.0017	.0104	.0124	.0104	.0033
2 Group B			.0028	.0017	.0014	.0031	.0025	.0036	.0014	.0023	.0109	.0130	.0109	.0039
3 Group C				.0034	.0031	.0047	.0042	.0008	.0030	.0039	.0128	.0148	.0128	.0055
4 Group D					.0020	.0037	.0020	.0042	.0020	.0030	.0116	.0137	.0116	.0045
5 Group E						.0035	.0029	.0039	.0017	.0026	.0142	.0138	.0118	.0044
6 Group F							.0045	.0055	.0033	.0043	.0092	.0094	.0073	.0059
7 Group G		Minimum		.0006				.0034	.0012	.0038	.0147	.0145	.0124	.0035
8 Group H		Maximum		.0159					.0022	.0047	.0159	.0157	.0136	.0045
9 Group I		Average		.0006						.0025	.0134	.0133	.0112	.0023
10 Group J											.0144	.0143	.0122	.0050
11 Group K												.0038	.0017	.0150
12 Group L													.0021	.0085
13 Group M														.0064
14 Group N														

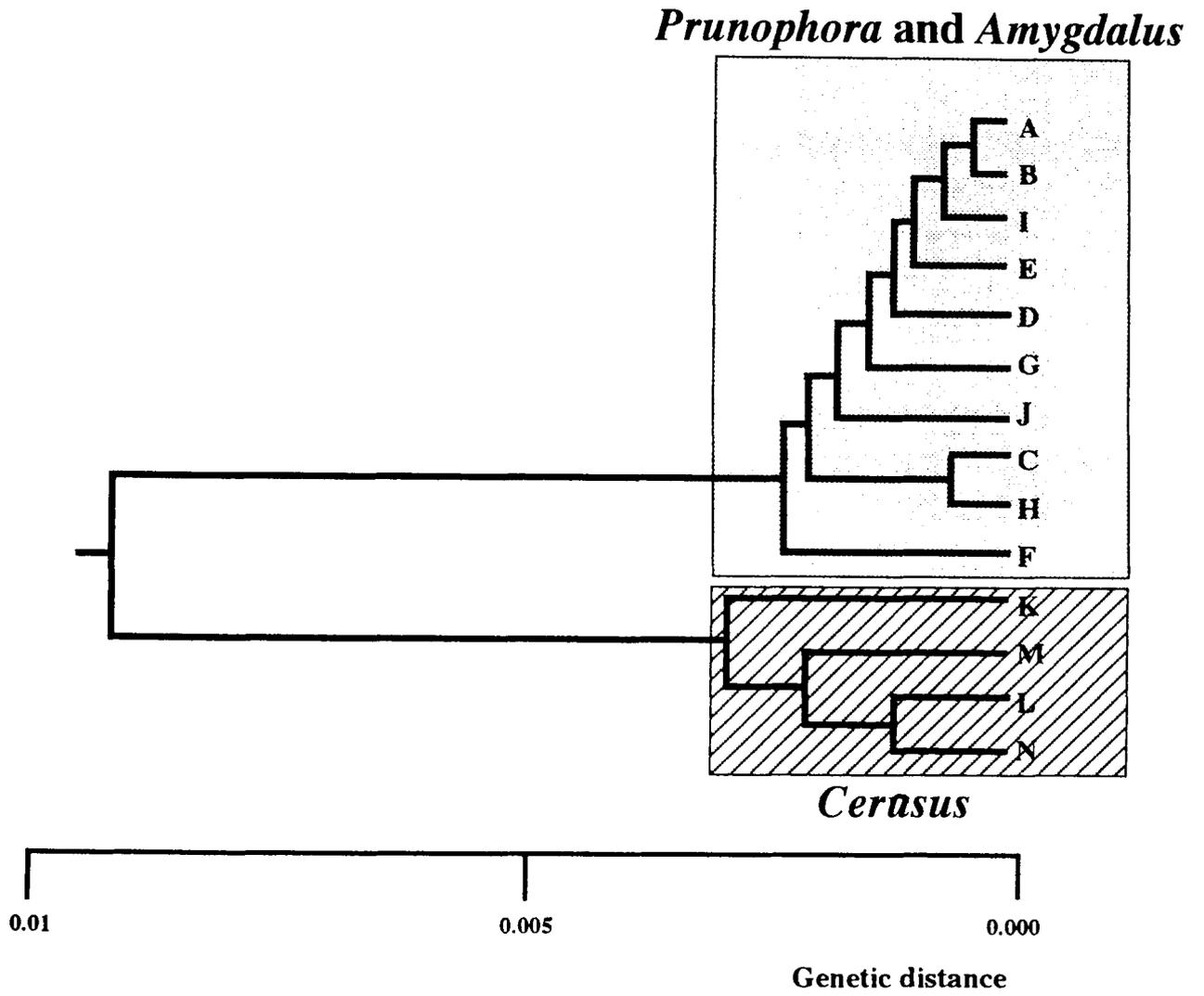


Fig. 5-3-6. Phylogenetic tree constructed by UPGMA.

第4節 サザンプロット解析によるサクラ属植物の系統分類

目 的

本章第3節で、4種類の葉緑体DNA特定領域について遺伝的変異を調査し、多くの知見を得たが、これらは葉緑体DNAのごくわずかな領域を対象としているため、得られた傾向については異なる手法で再検討する必要がある。葉緑体DNAのRFLPパターンによりサクラ(Kanekoら、1986)、スモモ、モモ亜属(Uematsuら、1991)を中心に系統分類が行われているが、亜属間の類縁関係は不明であり、供試数も少ないため得られた成果は少なかった。そこで葉緑体DNA断片をプローブとしたサザンプロット解析により多数のサクラ属植物の遺伝的変異を再度調査し、それらの系統分類と進化過程を検討する。

材料及び方法

1).材料

農林水産省果樹試験場千代田圃場、長野県果樹試験場、群馬県園芸試験場、京都府立大学で収集、保存されているウメ3系統、アンズ4系統、スモモ7系統、モモ4系統、アーモンド2系統、サクラ7系統、の合計22種27品種・系統を供試した(Table 5-4-1)。

2).方法

第1章第2節の方法に従った。但し、制限酵素には*Bam* HI、*Eco* RI、*Eco* RV、*Hin* dIII、*Xba* Iの5種類の制限酵素(ROYOBO, Co.Ltd.)を用い、消化反応はマニュアルに従って添付のバッファーを希釈し、37℃で1晩処理した。また、プローブにはTable 5-4-2に示す6種類のDNA断片を用いて分析した。データ解析にはUPGMA法(Sneath・Sokal、1973)とNJ法(Saitou・Nei、1987)により系統樹を作成した。

結 果

5種類の制限酵素と6種類のプローブで調査した結果、*Eco* RIを除く全ての酵素処理でDNA多型が検出された。*Bam* HI処理でプローブP6、*Eco* RVでプローブP6、*Xba* IでプローブP2を用いて作成したサザンハイブリダイゼーションパターンをFig. 5-4-1のA、B、Cに示した。*Bam* HIでは山杏、スピノーサスモモ、‘白桃’、‘おはつもも’、チベットピーチ85054、山桃(David peach)、アーモンド85124でRFLPsが検出された。*Eco* RVでは、‘李梅’、‘山杏’ (Siberian apricot)、‘万左衛門’、‘クリコンダムソン’、‘マリチマ’ (Beach plum)、‘白桃’、‘おはつもも’、アーモンド85124、マハレブ、中国オウトウにRFLPsが検出された。*Hin* dIIIでは、‘李梅’、山杏、‘万左衛門’、ウエストサンサンドチェリー、オヒヨモモ、ユスラウメ(Chinese bush cherry)、*Xba* Iでは、‘李梅’、山杏、‘万左衛門’、‘白桃’、‘おはつもも’、アーモンド85124、ユスラウメでRFLPsが検出された。

これらの多型をもとに識別できなかった品種・系統を1つのグループにまとめた結果、AからKの11個のグループに分類することができた(Table 5-4-3)。Aのグループは最も大きい集団で、主に*Prunophora* と*Cerasus*から構成されている。Bでは‘李梅’と‘万左衛門’が、Dでは‘クリコンダムソン’、‘マリチマ’、中国オウトウが同一の

グループに分類された。これらのデータをもとに Nei&Li(1979)の計算式で遺伝距離を求めた(Table 5-4-4)。最小でグループAとグループBの間で0.00049、最高で、グループCとグループEの間で0.02776の数値を示した。各グループ間の遺伝距離行列をもとにUPGMAで系統樹を作成した(Fig. 5-4-2)。系統樹は階層的にクラスタリングしており、山杏とスピノーサスモモが他の品種・系統と遺伝的に遠縁であった。NJ法により系統樹を作成した結果、グループAを中心に山杏とスピノーサスモモなどの変異に富んでいる品種・系統が放射状に分岐した(Fig. 5-4-3)。

考 察

葉緑体DNA断片をプローブとしたサザンブロット解析により、前節で得られた結果の真偽を検討した。サクラ亜属植物はDNAの抽出が困難であり、多くの系統を供試することができなかつた。このため *Microrocerasus* 植物が中心となり、サクラ亜属とスモモ・モモ亜属は明瞭に分ることができず、グループAに混在していた。グループBでは‘李梅’と‘万左衛門’が相異なるRFLPパターンを示し、第2章第5節の結果と併せると、‘李梅’は *P. salicina* × *mume* の交雑により生じた種間雑種であることが考えられた。スピノーサスモモが示した変異について第2章第3節及び第5章第3節で考察したように、倍数体仮説が正しいとすればミロバランスモモが母系でスピノーサスモモが父系であると予想された。このスピノーサスモモは山杏と同じように遺伝的変異が極めて大きかった。これらの品種・系統は優位に多型が検出され、制限酵素認識部位の変異だけでは説明することが難しく、サイズなど直接的な構造の差が影響しているのではないかと考える。グループDとグループFの組み合わせについてはこれらの品種・系統の接点は見あたらず、今後検討すべき課題となった。

ニワザクラとニワウメはセイヨウバクチノキ(Common cherry laurel)と同じように、*Prunophora* と、大きな集団を形成した。変異が見られた種は諸特性を考慮しても相互に接点が見られず、これまで得られてきた知見を併せると、これらの集団は変異が見られた種の母集団になっていると考えざるを得ない。現在、*Microrocerasus* 植物はサクラ亜属に分類されているが、RAPD分析法、PCR-RFLP分析、サザンブロット解析の結果から、これらはスモモ亜属に属すると考えられる。このように、スモモ亜属と *Microrocerasus* 植物が同じグループに属していると仮定すると、遺伝的変異、形態的変異、接ぎ木親和性、交雑和合性などから得られる類縁関係は全て矛盾することなく、これらのグループがサクラ属果樹の中心植物であることを示唆している。ハナザクラは遺伝的変異が大きいため、サクラから現在のスモモ、モモ亜属が誕生したと推定している報告例が多く、これらの考え方からはWatkins(1976)のサクラ属果樹の進化説は受け入れられていない。進化過程において核交雑がもたらすものは大きいですが、現段階では核交雑による遺伝的変異の蓄積過程を推定することは不可能である。このため、オルガネラなど交雑の影響を受けにくいDNAの突然変異をもとに進化過程を類推する手段が取られているが、針葉樹のように必ずしも合致するとは限らない。サクラ属果樹は、スモモ亜属、モモ亜属、サクラ亜属の3つに大別されるが、ゲノム全体での遺伝的変異を検討すると、*Microrocerasus* 植物を含むスモモ亜属が大きく、サクラ属果樹の進化過程で母集

団となったのではないかと類推された。

PCR-RFLP分析法では、認識部位の少ない酵素を利用できるため、多型の出現頻度が高く、断片長に差が見られない場合、その評価が容易であったのに対し、サザンブロット解析では、供試材料の葉緑体DNAの構造差が直接影響し、サイズが異なると考えられるものについては多型が優位に出現し、多少のデータの偏りがあると推察された。このため、さらに多くのプローブと制限酵素を加えて、信頼度の高いデータを築き上げていく必要がある。

摘 要

葉緑体DNA断片をプローブとしたサザンブロット解析により、サクラ属植物の類縁関係を調査した。5種類の制限酵素と6種類のプローブで調査を行った結果、Eco RIを除く全ての酵素処理でDNA多型が検出された。供試したサクラ亜属植物は*Microcerasus* が中心となったため、サクラ亜属とスモモ・モモ亜属は明瞭に分けられず、同一のグループに混在していた。‘李梅’と‘万左衛門’は相同なRFLPパターンを示し、‘李梅’は*P. salicina* × *mume*の交雑により生じた種間雑種であると考えられた。スピノーサスモモは遺伝的変異が極めて大きく、倍数体仮説が正しいとするとミロバランスモモが母系でスピノーサスモモが父系であると予想された。ニワザクラなどの*Microcerasus* 植物はスモモ亜属と大きな集団を形成し、サクラ属果樹の進化過程で母集団となったのではないかと類推された。

Table 5-4-1. Representative varieties for Southern blott analysis

Code	Varieties	Type	Species
1	Nankou	Mume	<i>P. mume</i>
2	Bungo	Mume	<i>P. mume</i>
3	Sumomo ume	Mume	<i>P. mume</i>
4	Heiwa	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
5	Ren-xing	Apricot	<i>P. armeniaca</i>
6	Siberian apricot	Apricot	<i>P. sibirica</i>
7	Alpine plum	Apricot	<i>P. brigantina</i>
8	Manzaemon	Plum	<i>P. salicina</i>
9	Krikon Damson	Plum	<i>P. insititia</i>
10	Myrobalan plum 420-2-2	Plum	<i>P. cerasifera</i>
11	Spinosa plum	Plum	<i>P. spinosa</i>
12	Sun Prune	Plum	<i>P. domestica</i>
13	Beach plum	Plum	<i>P. maritima</i>
14	Western sand cherry	Plum	<i>P. besseyi</i>
15	Hakutou	Peach	<i>P. persica</i>
16	Tibetan peach85054	Peach	<i>P. mira</i>
17	Ohatsumomo	Peach	<i>P. persica</i>
18	David peach	Peach	<i>P. davidiana</i>
19	Almond85124	Almond	<i>P. amygdalus</i>
20	Ohiyomomo	Almond	<i>P. triloba</i>
21	Chinese bush cherry	Cherry	<i>P. tomentosa</i>
22	Niwaume	Cherry	<i>P. japonica</i>
23	Mahaleb cherry	Cherry	<i>P. mahaleb</i>
24	Chinese cherry	Cherry	<i>P. pauciflora?</i>
25	Niwazakura (White)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>
26	Niwazakura (Pink)	Cherry	<i>P. glandulosa</i>
27	Common cherry laurel	Cherry	<i>P. laurocerasus</i>

Table 5-4-2. Characteristics of Dig-labeled probes used in this experiment

Code	Portion	Type	Fragment size	Origin
A	psbA	PCR fragment	#1.1 kbp	<i>P. salicina</i>
E	rbcL-ORF106	PCR fragment	#3.2 kbp	<i>P. salicina</i>
F	atpB-rbcL	PCR fragment	#2.2 kbp	<i>P. salicina</i>
P2	ORF62 - rpo C2	PUC 19 insert	16,192 bp	<i>O. sativa</i>
P4	pet D - rps 7	PUC 19 insert	14,356 bp	<i>O. sativa</i>
P6	atpH - IRF107	PUC 19 insert	10,092 bp	<i>O. sativa</i>

; Approximate size.

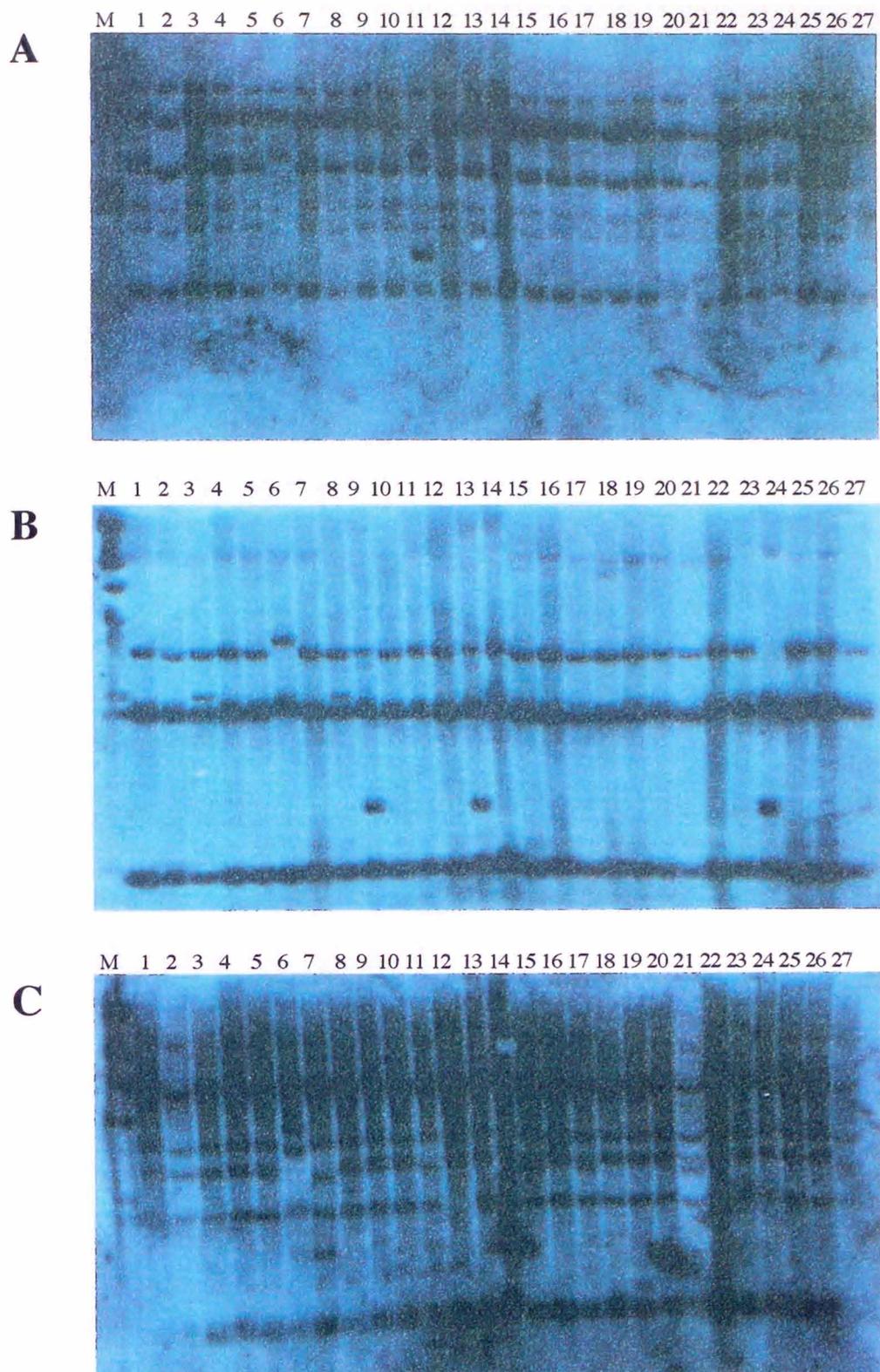


Fig. 5-4-1. Southern hybridization patterns between genomic DNA of representative varieties and Dig labeled probes. Each combinations between restriction enzyme and probe is shown as follows, A ; *Bam* HI / probe P6, B ; *Eco* RV/ P6, C ; *Xba* I / P2. M is *Hin* d III digested lambda DNA size marker.

Table 5-4-3. Grouping based on the Southern hybridization patterns

Group	Code	Variety	Code	Variety	Code	Variety
A	1)	Nankou	2)	Bungo	4)	Heiwa
	5)	Ren-xing	7)	Alpine plum	10)	Myrobalan plum 420-2-2
	12)	Sun Prune	22)	Niwaume	25)	Niwazakura (White)
	26)	Niwazakura (Pink)	27)	Common cherry laurel		
B	3)	Sumomo ume	8)	Manzaemon		
C	6)	Siberian apricot				
D	9)	Krikon Damson	13)	Beach plum	24)	Chinese cherry
E	11)	Spinosa plum				
F	14)	Western sand cherry	20)	Ohiyomomo		
G	15)	Hakutou	17)	Ohatsumomo		
H	19)	Almond85124				
I	16)	Tibetan peach85054	18)	David peach		
J	23)	Mahaleb cherry				
K	21)	Chinese bush cherry				

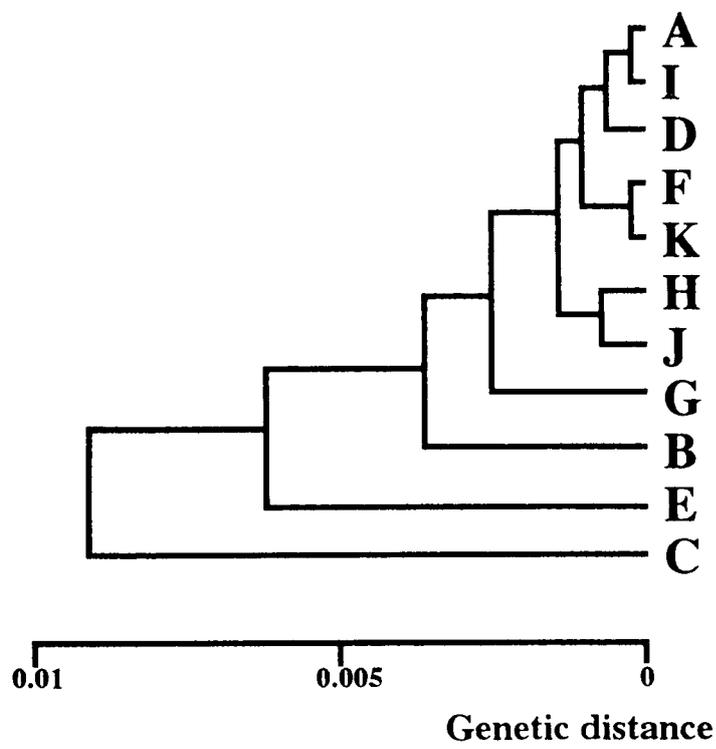


Fig. 5-4-2. Phylogenetic tree constructed by UPGMA.

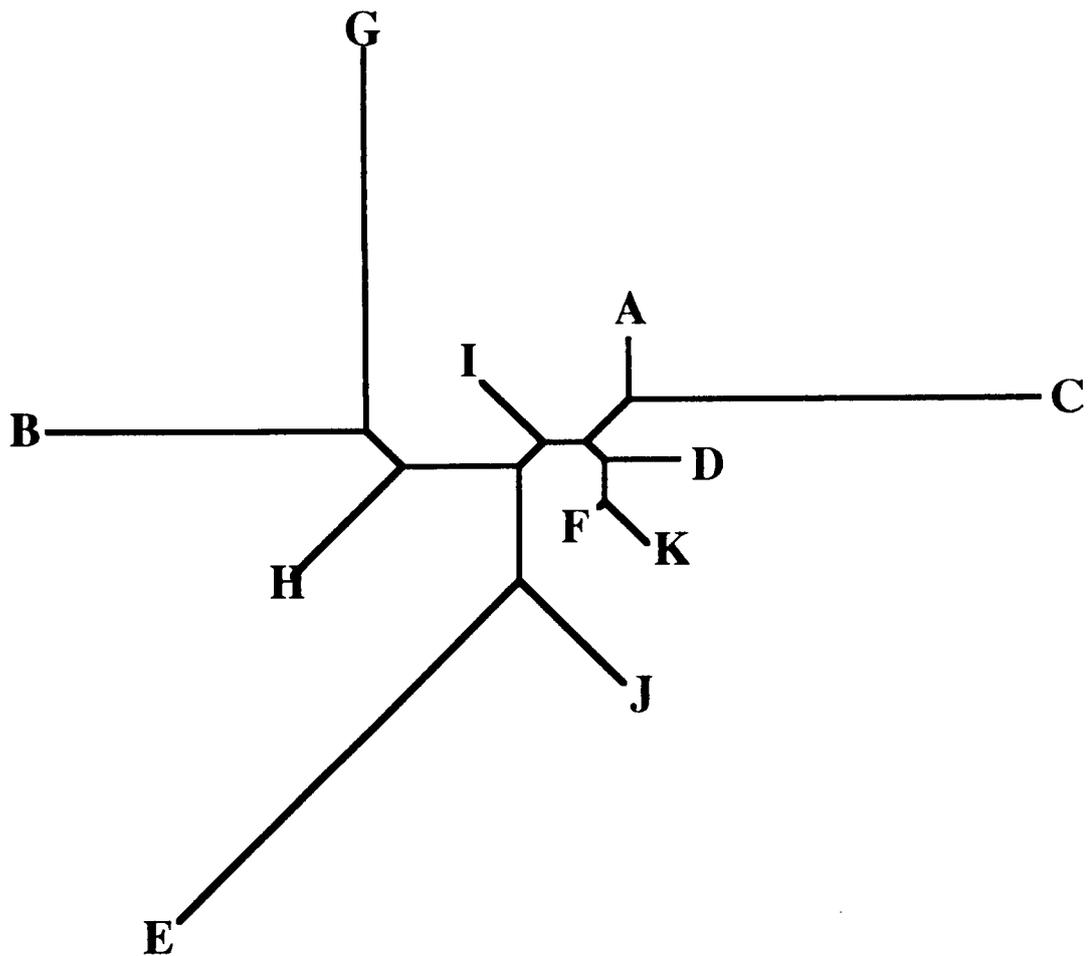


Fig. 5-4-3. Phylogenetic tree constructed by NJ method.

総合考察

植物の系統進化を検討する場合、進化過程を評価しやすい葉緑体DNAが対象とされる場合が多い。制限酵素の認識部位の変異や特定遺伝子の塩基配列を調査し、DNAの突然変異率などから、遺伝距離や遺伝子頻度を求め、これらを指標として祖先種などを推定している。サクラ属においても、Uematsuら(1986)やKanekoら(1991)は葉緑体DNAのRFLPパターンにより、スモモ・モモ亜属の分類と、サクラの系統分類を行い、前者は変異の蓄積率からアンズがサクラ属植物の進化の中心となった種であると推論している。しかし、これら遺伝的変異の大きい種あるいは集団は、世代を多く積み重ねてきた古代植物、あるいは原生種であると考えても、直接の祖先種であると結論づけることはできない。進化過程において、核DNAの交雑がもたらすものは大きく、現在分化した種は核交雑を繰り返すことによって編成されたゲノムを持つため、交雑を行わないオルガネラDNAの遺伝的変異だけをみて進化過程を検討することは、偏った見解を導くものと考えられる。しかしながら、核交雑による進化過程を解明するには、ゲノムの変化速度が極めて早いため、その評価が困難である。このため、多くの視点から進化過程を検討し、矛盾のない結論を導くことが最も妥当な方法であると考えられる。本論文では、形態的特性、生態的特性、核DNAを主とする遺伝的変異、細胞質遺伝する葉緑体DNAの遺伝的変異など、これまでの研究成果を参考にして、サクラ属植物の進化過程を考察してみた。サクラ属は多くの種が存在するので、進化に重要であると思われる種を特別とりあげて推察することは難しく、スクリーニングを行う必要があると考えた。このため、実験手順が簡便で多くの品種・系統を扱う場合に有効なRAPD分析法と葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP分析法により、グループごとに種・品種の遺伝的特性を調査した。

スモモ亜属では、ウメ、アンズ、スモモはいずれも近縁であり、相互の交雑により生じた雑種個体‘仁杏’や‘豊後’など多くみられた。ウメはアンズの影響を受け、現在の栽培品種の多くは種間雑種が大半を占めている種でその変異は比較的大きいものと考えられた。アンズは栽培種その他、山杏、アルハインプラムなどの近縁野生種が存在し、山杏とアルハインプラムの遺伝的変異は大きかった。スモモは分布地域が広く、種数も多いため、DNAレベルでも遺伝的多様性がみられた。スピノーサスモモ、マリチマ、‘グロー’は遺伝的変異が極めて大きく他のスモモと大きく異なっていた。後者のアメリカスモモは葉緑体DNAの特定領域でサクラと共通した変異がみられた。形態的に原生種に近いミロバランスモモは他種と接ぎ木親和性が高く、種内の変異が大きいと予想されることから鍵植物ではないかと推察している。スモモの起源地は特定しがたいが、ウメは中国の雲南、四川、チベットなど中国の西南部に起源し、アンズは中国のチベット、パキスタンなどヒマラヤの西北部から北部に起源したといわれる。遺伝的変異の大きさから、ウメとアンズはスモモの集団から分化してきたものと推察される。

モモ亜属はモモとアーモンドの2つがあり、モモは揚子江、黄河流域に発達し、アーモンドは乾燥気候のヒマラヤ西部から北部、ヨーロッパ、ソ連、中国東北部へと進展している。光核桃、山桃など、ヒマラヤから中国の山地に分布し、モモ栽培種とは異なっ

た分布を遂げている。モモの栽培種には多くの生態型がみられたが、種内の遺伝的変異は小さく、野生種の光核桃 においても同じ結果が認められた。これに対して種間の変異は極めて大きく、モモは自殖率が高いことなどからみても発達過程においてそれらの間で核の移入が生じたとは考えがたい。アーモンドは個体差が大きく遺伝的に多様であると考えられた。葉緑体DNAでは栽培種と野生種の間で大きな変異は認められず、自家不和合性であることから、これらの変異は異系交配などの交雑により生じたものと推察した。オヒヨモモは現在アーモンドに分類されているが、ゲノムの類似性が低く再検討の余地がある。Watkins (1979)はモモとアーモンドは同一の祖先種からヒマラヤを中心に分化したと推定している。モモとアーモンドはともに核の形状、葉形などサクラ属植物内では特異で、早期にスモモ亜属とモモ亜属が分化したと考えられる。集団としての変異はアーモンドが大きいいため、モモやそれらの近縁野生種はこれらの集団から分化したものと推察している。

サクラ亜属は観賞用のサクラ、野生のサクラ、オウトウに分類されるが、観賞用のサクラは種数が多く、その入手が困難であったため幅広く検討することはできなかった。これまで多くの研究者が観賞用のサクラを分類してきたが、分類基準の設定が合致せず、類縁関係には曖昧な点がみられる。本論文においても葉緑体DNAと核DNAともに遺伝的変異が大きく、その類縁関係は明らかにすることはできなかった。ユスラウメ、ニワウメなどの *Microcerasus* 植物は観賞用のサクラとオウトウと類似性はあまり高くなく、これらと遺伝的に遠縁であると考えられた。これらの接ぎ木親和性はサクラ亜属よりスモモ亜属とモモ亜属の方が高いこと(田中、1934)などから、*Microcerasus* 植物の分類は再検討の余地があると考えられる。

このように3亜属の遺伝的特性を調査したが、スモモ、サクラを除く他のサクラ属果樹では、交雑育種など人工的に手を加えられた栽培種の遺伝的変異は大きくなかった。対照的に、光核桃、アルパインプラム、*Microcerasus* 植物などの野生型の種は遺伝的に多様で中間的形質を示すものが多かった。これらの種のサクラ属植物における位置については議論されておらず、進化過程において非常に興味深い植物である。このため、これらの品種・系統を含め、形態的、生態的、遺伝的変異の3面からサクラ属植物の類縁関係と進化過程の推定を試みた。

形態的にはスモモとサクラが類似していたが、特に *Microcerasus* 植物とスモモ亜属が類似しており、これらの集団はサクラ属植物の中間的な位置を占めていた。RAPD分析では、ユスラウメがスモモの集団に類似し、サクラとオウトウと類似性が低いことが示唆された。このことは葉緑体DNAにおいてもみられた。スモモの中で原生種に近いとみなされるミロバランスマモは形態的にも遺伝的にも *Microcerasus* 植物と非常に近縁であった。接ぎ木親和性などからみても *Microcerasus* 植物の現在の分類は正しいとは考えられず、スモモ亜属に属する方が妥当と思われる。遺伝的変異が大きかったスピノーサスマモはミロバランスマモと *P. microcarpa* の組み合わせで生じた(Eremin, 1985)、またスモモの倍数体もミロバランスマモとスピノーサスマモの交雑により生じた(Crane・Lawrence, 1952)と報告されていることから、スモモ・*Microcerasus* 植物の交雑能力の高さは多くの種の発達に貢献してきたと思われる。

サクラ属の進化過程について、スモモ、モモ亜属はサクラ亜属から生じたという見解がしばしばみられる。変異の連続した蓄積により現在の網目状分化に至ったと仮定すると、多くのサクラ属植物と交雑和合性や接ぎ木親和性が高い植物が存在していることは不自然で、それは支持しにくいものと考える。Watkins(1976)はこれらのことからサクラ属植物の進化には*Microcerasus* 植物とスモモ亜属が中心となってきた推察している。*Microcerasus* 植物やスモモ亜属が持つ集団としての葉緑体DNAの変異は小さいため、この見解は支持しがたいとされている。しかし、変異の蓄積の連続によって網目状に種が分化してきたと考えるよりは、ミロバランスモモ、ユスラウメなどの原生種に近いスモモと*Microcerasus* 植物が現在の種の祖先的母集団になり、ここから多くの種が分化し、特殊化していったのではないかと推察する方が妥当である。現存の品種・系統においても、この母集団から生じたとされるものが存在すること、形態的特性、生態的特性、遺伝的特性など異なる視点から得られる見地と合致していること、ゲノム全体ではこれらの集団に十分な変異が認められること、幅広い分布地域を持つことから、この集団がサクラ属植物の進化過程において中心的役割を果たしたという仮説は正当性をもち、サクラ属植物のルーツはこれら原生種の出産地とされる中央アジアからヒマラヤ西部の地域ではないかと考える。

総摘要

モモ、スモモなど核果類果樹の育種と台木研究に資するため、分子生物学的手法を用いてサクラ属植物の類縁関係を明らかにし、進化の過程についても考察を加えた。サクラ属(*Prunus*)はスモモ亜属、モモ亜属、サクラ亜属、ウワミズザクラ亜属、バクチノキ亜属の5群に分類されているが、本論文では果樹として重要なスモモ、モモ、サクラの仲間を中心に研究を進めた。

供試材料には農林水産省果樹試験場、山形県立園芸試験場、長野県果樹試験場、福井県園芸試験場、和歌山県果樹園芸試験場、京都府立大学などで収集保存している来歴が明らかな品種・系統を用いた。系統分類学的研究には従来の形態的分類を基礎として、RAPD分析法、サザンプロット解析法、葉緑体DNAの特定領域を用いたPCR-RFLP法などの方法による分類を試みた。これらの手法は第1章で報告したとおり、サクラ属果樹の系統関係の推定に有効と認められたので種類ごとに分類を試み、サクラ属果樹全体の進化過程を検討した。

主な結果は以下の通りである。

1. ウメは用途によって実梅と花梅に、実梅は果実の大きさなどによって小梅、中梅、大梅、杏梅などに分類されている。RAPD分析法によってウメ58品種・系統の分類を試みたところ、形態やアイソザイム分析では検定できない品種の識別、同定が可能になった。観賞用の花梅は実梅と遺伝的に近いこと、我が国で栽培されているウメ品種は台湾のウメ品種とは遺伝的に遠縁で中国大陸から直接渡米したものか、我が国で独自に発達したものと推定された。小梅から大梅、杏梅とアンズ系のウメに近づくにつれて遺伝的多様性が増し、品種群のゲノムの類似性が低下した。一方、葉緑体DNAの特定領域ではいずれの品種においても変異は検出できず、これらの領域の保存性は高いものと推察された。以上の結果から果樹として栽培されているウメは、1)台湾梅品種群、2)小梅品種群、3)中梅品種群、4)大梅品種群(白花)、5)大梅品種群(紅花)、6)杏梅品種群、7)李梅品種群の7グループに大別された。ウメはアンズ、スモモと近縁であり、両者の雑種とみられる‘豊後’、‘李梅’などがある。特にアンズの遺伝的影響は大きく、アンズの形質をもつウメ品種が数多くみられた。

2. アンズ35品種・系統についてRAPD分析を試みた結果、*P. armeniaca*に属する栽培種は中国西部からヨーロッパにかけて分布する“西方品種群”と中国東部、日本などに分布する“東方品種群”の2グループに大別された。野生種の山杏(*P. sibirica*)とアルバインプラム(*P. brigantina*)、中国の‘白杏’と‘仁杏’はこれらの群には属しなかった。中国のアンズ品種は遺伝的変異が大きかった。葉緑体DNAの特定領域では*P. armeniaca*、*P. brigantina*、*P. sibirica*の種間でDNA多型が検出されたが、*P. armeniaca*の種内では変異は認められず、アンズの葉緑体DNAの保存性は

高いと推察された。

3. スモモには多数の種があるが、42種類の品種・系統を供試してRAPD分析を行ったところ、ニホンスモモとヨーロッパスモモの2群に大別されたが、両者の種間雑種などが多数存在し変異の連続がみられた。アメリカスモモの‘グロー’と‘マリチマ’ (*P. maritima*) はこれらのスモモと類似性が低かった。ニホンスモモ (*P. salicina*)、ミロバランスモモ (*P. cerasifera*) などは2倍体 ($2n=16$)、スピノーサスモモ (*P. spinosa*) は4倍体 ($2n=32$)、ヨーロッパスモモの *P. domestica* と *P. insititia* は6倍体 ($2n=48$) である。これらの類縁関係を解明するため、パーオキシデース (POX) アイソザイム分析を行った。ニホンスモモ系の3品種は全て異なるグループに属し、変異が大きいことが認められた。

P. domestica の‘スタンレー’、‘ビクトリア’に見られる *P. cerasifera* のバンドはミロバラン373-1-1、ミロバラン420-2-2と *P. spinosa* のいずれかに存在した。葉緑体DNAの特定領域では、スピノーサスモモ、‘花螺李’、‘マリチマ’、‘グロー’にDNA多型が検出された。‘マリチマ’と‘グロー’は他のスモモと比べて、早い時期に分化したのではないかと推察され、RAPD分析の結果とよく似ていた。本実験で検出したスピノーサスモモの変異は、CraneとLawrence(1952)の倍数体仮説に基づいて考慮すると、ミロバランスモモは母系でスピノーサスモモは父系ではないかと推察された。

4. ウメとアンズは近縁なために相互に交雑して生じたと思われる雑種が多数存在する。本実験では両者を人工的に交雑して育成したAM系統とMA系統、それに自然交雑種と思われる品種を形態的特性とRAPD分析により比較検討した。開花期、花色、葉形指数、花粉稔性、核の粘離、核の性状でウメとアンズの両方の特性を示した。RAPD分析の結果は、‘豊後’と‘西洋梅’はAM系統と類似度が高く、デンドログラム、散布図で1つのクラスターを形成した。‘高田梅’は日本のアンズと類似度が高く、アンズに最も近い品種とみなされた。ヨーロッパアンズと中国アンズはこれらの系統と類似性が低く、交雑に関与していないと思われる。以上の結果から、‘豊後’などの雑種品種はウメとアンズの交雑により派生したものであることを証明した。

5. スモモ、ウメ、アンズはいずれも近縁で相互に交雑可能である。スモモにウメを人工交雑して育成したPM系統と自然交雑によって生じたとされる‘李梅’、またスモモにアンズを人工交雑して育成したPA系統と自然交雑種といわれる‘仁杏’と‘梅桃杏’を形態的特性とRAPD分析により比較検討した。‘李梅’は形態的にスモモとウメの中間の性質を示し、花粉稔性が低く、PM系統とも形態的、生態的によく似ている。RAPD分析の結果もPM系統と同じクラスターを形成した。‘仁杏’はスモモとアンズの中間的特性を示し、PA系統とも似た性質を示した。RAPD分析の結果、PA系統とクラスターを形成しなかったが、スモモとアンズの中間の位置にあり、両者の雑種ではないかと推察された。しかし、‘梅桃杏’は形態的にも、RAPD分析の結果からもアンズのグループに属し、スモモとアンズの雑種とは認められなかった。

6. モモの栽培種は*P. persica*のみで、近縁野生種には山桃(*P. davidiana*)、光核桃(*P. mira*)などがある。アーモンド(*P. amygdalus*)やオヒヨモモ(*P. triloba*)はモモ亜属に属しており、*Microcerasus*のユスラウメ(*P. tomentosa*)はモモのわい性台木として利用されているので、これらの49品種・系統の類縁関係を調査した。RAPD分析の結果、モモは栽培種(*P. persica*)と野生種の2つに大別され、栽培種と光核桃の種内変異は小さかった。ユスラウメ、オヒヨモモ、アーモンドは栽培品種、光核桃、山桃と類似性が低かった。栽培品種内でのクラスタリングは分布地域を反映していた。葉緑体DNAの特定領域ではアーモンド85214、光核桃、*P. persica*にDNA多型が検出された。栽培種と光核桃内の遺伝的変異は小さく、ゲノム特性が他の*Prunus*植物と大きく異なるものとみなされた。種間では十分な変異が見られ、これらの種の特異性は繁殖法、地理的要因などが関与していると思われる。

7. アーモンドは、パキスタンで採集した49系統を供試した。形態的特性とRAPD分析の結果から栽培型と野生型に大別され、各グループ内の変異は大きかった。葉緑体の特定領域ではいずれも相同なRFLPパターンを示し、これらの領域では保存性が高いことが確かめられた。アーモンドは自家不和合性を示し異系交配集団であることから、アーモンドの変異は核依存ではないかと類推した。

8. サクラ亜属には野生種、観賞用のサクラ、オウトウなど多数の種が存在しているが、オウトウを中心に57品種・系統を供試した。RAPD分析の結果、サクラ、オウトウ、*Microcerasus*植物に大別された。サクラは遺伝的変異が大きく類縁関係に不明な点が見られたが、オウトウは遺伝的変異が小さく、甘果オウトウと酸果オウトウが区別できた。ユスラウメ、ニワウメなどの*Microcerasus*はこれらのサクラやオウトウと類似性が低かった。葉緑体DNAの特定領域では遺伝的変異が大きく、多数のRFLPsを検出した。*Microcerasus*植物とSL64は他のオウトウやサクラと遺伝的に遠縁で、RAPD分析の結果と類似した傾向がみられた。このため、現在の分類は再検討する余地があると考えられる。

9. サクラ属植物に共通にみられる形態的特性を調査し、主成分分析により代表的な37品種・系統の類縁関係を推定した。スモモ・サクラのグループとウメ・アンズ・モモのグループに大別され、光核桃、アルパインプラム、など特異的な品種・系統はいずれともクラスターを形成しなかった。スモモ・サクラのグループではスモモを中心とするクラスターと、サクラを中心とするクラスターに分かれ、*Microcerasus*植物はいずれかのクラスターに属し、形態的に変異がみられた。

10. RAPD分析法と核DNAに存在する5SrDNAの非転写スペーサー(nontranscribed spacer; NTS)領域の増幅、及び、*Per*遺伝子のミニサテライト領域、テロメア領域を参照にデザインされたプライマーを用いたALPHA法により上述の37品種・系統の類縁関係を推定した。スモモ亜属とモモ亜属では、スモモのグループは集団として大きな変異を持ったが、光核桃とアーモンドなどの特異的な系統は極めて類似性が低かった。サク

ラ亜属ではオウトウ、サクラ、*Microcerasus* の3グループに分類され、ユスラウメはスモモと高い類似性を示した。NTS領域の増幅では約2.0kbpから約200bpとサイズに変異がみられ、約500bpの増幅断片は多くの品種・系統で認められた。‘仁杏’とミロバランスモモ、またスピノーサスモモと‘サンプルーン’では特異的な増幅断片を共有し、これらの中で核DNAの移入が生じたことを示唆していると推察した。サクラ亜属では1から3本の増幅断片がみられ、この領域でスモモ、モモ亜属と大きく異なった。*Per* 遺伝子のミニサテライト領域とヒトのテロメア領域の反復配列をモチーフしたプライマーによるALPHA法は品種・系統の識別に有効であったが、系統分類には不適であった。

11. 葉緑体DNAの特定領域のRFLPパターンを調査した結果、多数の種特異的なRFLPパターンが得られた。変異が生じにくい6塩基認識酵素で、スモモ、モモ亜属とサクラ亜属に分かれるRFLPが検出された。12種類の制限酵素について全く多型を示さなかったものを1つのグループにまとめた結果、AからNの14のグループに分類できた。グループAとグループNはそれぞれスモモ亜属の集団、サクラ亜属の集団で、ユスラウメニワウメ、ウェスタンサンドチェリーやニワザクラなどの*Microcerasus*植物はスモモのグループに属した。各グループ間の遺伝距離をもとにUPGMAで系統樹を作成した。系統樹は大きくサクラとスモモ・モモの2グループに分かれ、これらの集団は比較的早期に分岐したと推察した。

12. 葉緑体DNA断片をプローブとしたサザンブロット解析により、代表的なサクラ属植物27品種・系統の類縁関係を調査した。5種類の制限酵素と6種類のプローブで調査を行った結果、*Eco* RIを除く全ての酵素処理でDNA多型が検出された。‘李梅’と‘万左衛門’が相同なRFLPパターンを示し、‘李梅’は*P. salicina* × *P. mume*の交雑により生じた種間雑種であることが考えられた。スピノーサスモモと山杏は遺伝的変異が極めて大きく、倍数体仮説においてミロバランスモモが母系でスピノーサスモモが父系であることが確かめられた。ニワザクラなどの*Microcerasus*植物はスモモ亜属と大きな集団を形成し、この集団はサクラ属植物の進化過程において現在の種の祖先となる母集団の役割をはたし、ここから多くの種が網目状に分化してきたものと推察された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始懇篤なご指導を賜った神戸大学大学院自然科学研究科教授、吉田雅夫博士に謹んで感謝の意を表します。また、御校閲を賜りました同大学院自然科学研究科教授、上島脩志博士、土田廣信博士、清水晃博士に深く感謝いたします。

実験遂行上、貴重な試料と有益なご意見を賜った農林水産省果樹試験場育種部育種第三研究室室長、山口正己氏、同研究室、土師岳氏、山形県立園芸試験場育種部、西村幸一氏、長野県果樹試験場、宮澤孝幸氏、和歌山県果樹園芸試験場紀北分場、藤本欣司氏、福井県園芸試験場、山本仁氏、群馬県園芸試験場、松波達也氏、京都府立大学農学部助教授、中野幹夫博士に厚く感謝いたします。また、本実験を着手するにあたり懇切な実験のご指導とご助言を賜った神戸大学附属農場助教授、保坂和良博士に心から厚く御礼を申し上げます。

本研究は神戸大学大学院自然科学研究科、同大学農学部において実施したものであり、研究期間中、あたたかいご協力をいただきました同大学院自然科学研究科、加賀秋人氏、同大学院農学研究科修了生、武田敏秀氏、豊福政子さん、同大学院博士前期課程、白鳥利治氏をはじめ、同大学農学部果樹科学研究室の皆様にも深く感謝いたします。

引用文献

- Alexander, K., M. Kolesnikova and E. Ananiev. 1991. "Portraying" of plant genomes using polymerase chain reaction amplification of ribosomal 5S genes. *Genome*. 34 : 1028-1031.
- 青木二郎, 外崎武範, 藤田稔. 1972. アイソザイムによるウメとアズキの品種間類縁関係について. 弘前大学農学部学術報告. 18 : 107-113.
- Arnold, M.L., C.E. Buckner and J.J. Robinson. 1991. Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88 : 1398-1402.
- Arulsekhar, S., D.E. Parfit, W. Beres and D.E. Kester. 1986. Genetics of malate dehydrogenase isozyme in the peach. *J. Hered.* 77 : 49-51.
- Arulsekhar, S., D.E. Parfit and D.E. Kester. 1986 b. Comparison of isozyme variability in peach and almond cultivars. *J. Hered.* 77 : 272-274.
- Arumuganathan, K. and K.E. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Planta Mol. Biol. Rep.* 9 : 208-218.
- Badenes, M.L. and D.E. Parfitt. 1995. Phylogenetic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplasts DNA variation. *Theor. Appl. Genet.* 90 : 1035-1041.
- Bailey, C.H. and L.F. Hough. 1975. Apricots. *Advanced in Fruit Breeding* (ed. J. Janick et al.), P. 367-383. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Ind.
- Bernatzky, R. and S.D. Tanksley. 1986. Toward a genetic map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics*. 112 : 887-898.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 : 1513-1523.
- Byrne H. D. and T.G. Littleton. 1988. Electrophoretic characterization of diploid plums of the southeastern United States. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113 : 918-924.
- Byrne, D.H. and T.G. Littleton. 1989. Characterization of isozyme variability in apricot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 114 : 674-678.
- Crane, M. B. and W. J. Lawrence. 1952. The genetics of garden plants. MacMillan and Co., Ltd., London.
- Chaparro, J.X., D.J. Werner, D.O. Malley, R.R. Sederoff. 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. *Theor Appl Genet.* 87 : 805-815.

- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant. Mol. Biol. Reporter*, 1 : 19-21.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19 : 11-15.
- Eldredge, L., R. Ballard, W. V. Baird and A. Abbott. 1992. Application of RFLP analysis to genetic linkage mapping in peaches. *HortScience*. 27 : 160-163.
- Eryomine, G.V.. 1991. New data on origin of *Prunus domestica* L.. *Acta Horticulturae* 283 : 27-29.
- Farris, J.S.. 1972. Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Am. Nat.* 106 : 645-668.
- Fitch, W.M. and E. Margoliash. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 155 : 279-284.
- Fogle, H.W.. 1975. Cherries. . In : Janick J. J. Moore J. (eds) *Advance in fruit breeding*. P : 348-366 Purdue University Press West Lafayette, Indiana.
- Fritsch, P., M. A. Hanson, C. D. Spore, P. E. Pack and H. Rieseberg. 1993. Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. *Plant. Mol. Biol. Reporter*. 11 : 10-20.
- Fukuoka S., K.Hosaka and O.Kamijima. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Japan. J.Genet.* 67 : 243-252.
- 麓次郎. 1972. アンズとウメの類縁生に関する研究. 京都大学博士論文.
- Granger, A.R., G.R. Clarkle and J.F. Jackson. 1993. Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 86 : 458-464.
- 原田竹雄, 石川隆二, 新関稔, 斉藤健一. 1992. PCR法を用いたDNAフィンガープリントによるリンゴ栽培品種の花粉親の判定. *育学雑*. 41(別2) : 122-123.
- Hauagge, R. , D.E. Kester, S. Arulsekar, D.E. Parfitt, and L. Liu. 1987. Isozyme variation among California almond cultivars : II. Cultivar characterization and origins. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* 112 : 693-698.
- 林弥栄. 1970. 最新園芸大事典 5 : 2403-2434. 養賢堂.
- Hayashi, C. 1950. On the quantification of qualitative data from the mathematico-statistical point of view. *Ann. Inst. Statist. Math.* 2 : 35-47.
- Hedrick, U. P. 1917. *The peaches of New Yourk*. J. B. Lyon Co,

- Printers Albany, New York.
- Hedrick, U.P. 1911. The plum of New York. N.Y. Agr. Expt. Sta. 18th Ann. Rpt. 3, Pt. II. J.B. Lyon Co., Albany, N.Y.
- Helentjaris, T. 1987. A genetic linkage map for maize based upon RFLPs. *Trend Genet.* 35 : 217-22
- Hesse C..1975. Peaches. In : Janick J. J. Moore J. (eds) *Advances in fruit breeding*. P : 285-335. Purdue University Press West Lafayette, Indiana.
- 土方智, 吉田雅夫, 京谷英寿. 1983. 核果類種間交雑成否の生化学的判定法. 昭和58年度園芸学会春季大会研究発表要旨. P : 52-53.
- Hosaka, K., M. Matsubayashi and O. Kamijima. 1985. Peroxidase isozyme in various tissues for discrimination of two tuberous *Solanum* species. *Japan. J. Breed.* 35 : 375-382.
- Hsio, C., N.J. Chatterton, K.H. Asay and K.B. Jensen. 1995. Molecular phylogeny of the Pooideae (Poaceae) based on nuclear rDNA (ITS) sequences. *Theor. Appl. Genet.* 90 : 389-398.
- 池谷祐幸, 林建樹, 松田長生. 1993. 核果類ミトコンドリアDNAのRFLPs. *育学雑.* 42(別2) : 264-265
- Ingram, C..1948. *Ornamental cherries*. London.
- 印南秀樹, 寺地良平, 宮下直彦, 常脇恒一郎. 1994. DNAフィンガープリンティング法によるソメイヨシノの種内変異と起源に関する研究. *育学雑.* 44(別1) : 136.
- 石黒亮, 山口正己, 佐藤功. 1991. 果樹系統適応性特性研究寒冷地果樹試験成績検討会. (編)農林水産省果樹試験場.
- Jeffreys A.J., A. Macleod, K. Tamaki, D.L. Neil and D.G. Monkton. 1985. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. *Nature.* 354 : 204-209.
- Jones, D. F. 1928. Burbanks results with plums. *J. Hered.* 19 : 359-371.
- Kaneko T., T. Terauchi and K. Tsunewaki. 1986. Studies on the origin of crop species by restriction endonuclease analysis of organellar DNA. II Restriction analysis of ctDNA of 11 *Prunus* species. *Jpn. J. Genet.* 61 : 157-168.
- Kester, D.E. and R. Asay. 1975. Almond breeding. In : *Advances in fruit breeding* (ed. J. Janick and J.N. Moore). P : 382-419. Purdue University Press West Lafayette, Indiana.
- 菊池秋雄. 1948. 果樹園芸学上巻. 養賢堂. 東京.
- Knight, R.L. 1969. Abstract bibliography of fruit breeding and genetics to 1965. *Prunus*. Eastern Press, London.
- 北村四郎. 1979. 原色日本植物図鑑. 木本(編). 保育社. 大阪.

- 木村資生. 1986. 分子進化の中立説. 紀伊国屋書店. 東京.
- 京谷英寿, 吉田雅夫, 山口正己, 石澤ゆり, 小園照雄, 西田光夫, 金戸橋夫.
1988. スモモウメ中間母本農1号PM1-1及び同農2号PM1-4の育成について. 果樹試験場報告A第15号 : 1-10.
- 土師岳, 山口正己, 吉田雅夫, 島田武彦. 1993. ニホンスモモウメアング野類縁生に関する研究(第1報)花柄の長さの種間差異と種内変異. 園学雑62(別1) : 90-91.
- Lance, G.N. and W.T. William. 1967. A general theory of classificatory sorting strategies I. Hierarchical Systems, Comp. J. 9 : 373-80.
- Lezzoni, A., H. Schmidt and A. Albertini. 1990. Cherries (*Prunus*).
In : Moore, J. N. & J. R. Ballington Jr. 9 (eds) Genetic resources of temperate fruit and nut crops. Acta Horticultura. 290. P : 111-173.
- Long, E.O. and I.B. David. 1980. Repeated genes in eukaryotes. Annu. Rev. Biochem. 49 : 727-764.
- 松山知樹, 本橋令子, 大村三男, 秋濱友也. 1992. PCRを利用しDNAフィンガープリントによるカンキツ栽培品種の識別. 育学雑. 41(別1) : 306-307.
- Martinez-Zapater and J.L.Oliver.1984.Genetic analysis of isozyme loci in tetraploid potatoes(*Solanum tuberosum* L.). Genet.108 : 669-679.
- Morgen, D.R. and D.E. Soltis. 1993. Phylogenetic relationships among members of Saxifragaceae a.l. bsased on rbcL sequence data. Annals of the Missouri Botanical Garden. 80 : 631-660.
- Mowery, B.D. and D.J. werner. 1990. Phylogenetic relationships among species of *Prunus* as inferred by isozyme markers. Theor. Appl. Genet. 80 : 129-133.
- 中村郁郎. 1990. 新しいフィンガープリント法-ALPHA. 育学雑. 40(別2) : 456-457.
- Nei, M. 1975. Molecular population genetics and evolution. North-Holland.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuceases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.. 76 : 5269-5273.
- Nialan R.A.1990. The north American barley genome mapping project. Agric Can Biocrop Network RFLP Workshop. Manitoba, Canada, P : 5.
- Nybom H., S.H.Rogstar and B.A.Schaal. 1990. Genetic variation detected by use of the M13 "DNA fingerprint" probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosaceae). Theor. Appl. Genet. 79 : 153-156.
- Okie, W.R..1987. Olum rootstocks. in Rootstocks for Fruit Crops. (ed) Rom, R.C. and R.F. Carlson. A Wilkey-Interscience Publication : 321-360.

- 大井次三郎. 1983. 新日本植物誌. 至文堂. 東京
- 大村三男. 1994. 果樹特にカンキツにおけるDNAマーカーの作出とその育種的利用. 第36集育種学最近の進歩 : 37-40. (編)日本育種学会.
- 大村三男, 森口卓哉, 久田素, 根角博久, 吉田俊雄, 中村郁郎. 1995. COMMONS プライマーによる温州ミカンのPCRマーカーの特性. 園学雑. 64(別2) :
- Parfitt, D. E., S. Arulsekar, and D. W. Ramming. 1985. Identification of plum × peach hybrids by isoenzyme analysis. HortScience. 20 : 246-248.
- Reder A.. 1954. Manual of cultivated trees and shrubs. 2nd ed. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Reynders, S. and G. Salesses. study on the relationships within the subgenus *Prunophora*. Restriction maps of the ribosomal genes in *P. cerasifera* and *P. spinosa*. Acta Horticulturae 283 : 27-29.
- Rogstad, S.H., J.C. Patton, B.A.Schaal. 1988. M 13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angiosperms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 9176-9178.
- Roose, M.L. and L.D.Gottlieb. 1980. Alcoholdehydrogenase in the diploid plant *Sttphanomeria exigua*. Genet. 95 : 171-186.
- Saiki, K.R., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science. 230 : 1350-1354.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4 : 406-425.
- Salesses, G.. 1970. Sur le phenomene de cytomixie chez des hybrides triploides de prunier. Consequences genetiques possibles. Ann. Amelior. Plantes. 20.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis 1989. Molecular cloning, Second Ed.6.14-6.15. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A..
- Sauer, J.D.. 1993. Historical geography of crop plants. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Schwarz, K., T. Hansen-Hagge and C. Bartran. 1990. Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. Nucleic Acids Res. 18 : 1079.
- Scorza, R. and W. R. Okie. 1990. Peaches (*Prunus*). In : Moore, J. N. & J. R. Ballington Jr. 9 (eds) Genetic resources of temperate fruit and nut crops. Acta Horticulturae. 290 : 175-231.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Comapny, San Francisco.
- 武内俊介, 内山寛, 米田和夫, 鈴木省三. 1995. DNAマーカーを用いたバラ野生種及

- び園芸種の識別と系統(第2報)PCR増幅した葉緑体DNA断片の制限サイト多型. 園学雑. 64(別1):46-47.
- 田中諭一郎. 1934. 薔薇科果樹及び其の近縁植物相互の接木の親和関係に関する研究. 農業及び園芸 9(12) : 2592-2616.
- 田中諭一郎. 1936. 実梅の品種に関する研究. 臺北帝國大學理農學部園芸學教室寄興.15 : 1-41.
- 寺地徹, 向藤原吉豊, 清水建美. 1993. PCRを用いたDNA多型分析とその植物系統分化研究への適用. 育学雑. 43(別2) : 215.
- Teramoto, S., Y. Murakami, M. Hori, and K. Kamiyama. 1994. DNA fingerprinting to distinguish cultivar and parental relation of Japanese pear. J.Japan. Soc. Hort. Sci. 63(1) : 17-21.
- Tragoonrung, S., V. Kanazin, P.M. Hayes and T.K. Blake. 1992. Sequence-tagged-site-facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. 84 : 1002 - 1008.
- 氏家達, 志村勲, 京谷英寿. 1991. アイソザイムバンドパターンによるウメの品種分類. 園学雑. 60(別2) : 166-167.
- 上林諭一郎. 1927. 梅と李の自然雑種スモモウメに就いて. 農及園. 2 : 31-34.
- Uematsu, C., T. Sasakuma, and Y. Ogiyama. 1991. Phylogenetic relationships in the stone fruit group of *Prunus* as revealed by restriction fragment analysis of chloroplast DNA. Jpn. J. Genet. 66 : 59 -69.
- Wagner, D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghai-MarooF, S.M. Williams, B.P. Dancik and R.W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphism in lodgepole and jack pines and their hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84 : 2097-2100.
- Wang Z. 1990. Peach varieties. Agriculture Press, Beijing. Natl. Acad. Sci. 84 : 2097-2100.
- Watkins R. 1976. Cherry, plum, peach, apricot and almond. In : Simmonds NW(ed) Evolution of crop plants. Longman, London, P : 242-247.
- Weinberger, J. H.. 1975. Plums. In : J. Janick and J. N. Moore (eds.). Advances in fruit breeding. P : 336-347. Purdue Univ. Press, West Lafayette, Ind.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acids Res. 18 : 6531-6535.
- 山口正己, 石黒亮, 西村幸一, 佐藤功. 1993. オウトウ亜属の種間雑種に関する試験. 園学雑. 62(別2) : 144-145.
- 山本雅史, 小林省蔵, 中村ユリ, 山田杉雄. 1992. ミトコンドリアDNAのRFLPからみたカンキツ類縁関係. 育学雑. (別2) : 308-309.

- Yamamoto, T. and Y. Momotani. 1971. Staining of peroxidase isozyme activity. *Shokubutu no Kagakushousetsu* 6 : 187-189.
- 米森敬三, D.E., Parfitt, 神崎真哉, 杉浦明, 宇都宮直樹. 1994. カキ植物の系統分類-cpDNA領域を利用したPCR-RFLP法の有効性の検討. *園学雑*. 63(別1) : 78-79.
- 吉田雅夫. 1987. スモモ・ウメ・アズノの種間雑種. *果樹種苗* 25(冬季号) P : 1-5.
- 吉田雅夫. 1989. モモ. *植物遺伝資源集成*, (編) 松尾孝嶺. P : 1152-1159. 講談社. 東京.
- 吉田雅夫, 京谷英寿. 1971. ウメ・アズノ栽培品種の分類(第1報)形態的 분류. 昭和46年度園芸学会春期大会研究発表要旨. P : 12-13
- 吉田雅夫, 京谷英寿, 安野正純. 1975. *Prunus* 属の種間交雑に関する研究 I. 交配親和性について. *育学雑*. 25 : 17-23.
- 吉田雅夫, 京谷英寿. 1972. ウメ・アズノ栽培品種の分類(第2報)生理・生態的 분류. 昭和47年度園芸学会春期大会研究発表要旨. P : 136-137
- Yoshida, M. and H. Yamanishi. 1988. Apricot cultivars in Japan. *Acta Horticulturae*. 209 : 69-81.
- 俞德浚. 1979. *中国果樹分類学*. 農業出版社. 北京.

英文要約

We made clear the relationships among *Prunus* species for breeding and the tracing phyletic evolution of stone fruits. We pursued the new knowledge by RAPD analysis, PCR-RFLP method using special regions of chloroplast DNA, Southern blot analysis referring the relationships established by morphological characteristics. We confirmed these techniques were suitable for identification of varieties and phylogenetic studies by previous survey, we classified each *Prunus* species and estimated the phyletic evolutions.

We could identify 58 mume varieties which were not in the past experiments and classified them into 7 groups. Japanese mume had large dissimilarity to Taiwanese mumes indicating that they had different way of development. Flowering mume and fruiting mume had similar genetic bases. Many cultivars existed which were derived by intraspecific hybrid with apricots and plums. 35 apricots were classified into "Western group" and "Eastern group", but their distance was not so large. Siberian apricot (*P. sibirica*), Alpine plum (*P. brigantina*), 'Ren-xing' and 'Bai-xing' were genetically distant to other cultivated apricots. Plums have many species and polyploidy, indicating high genetic diversity. 42 plums were divided into "European and Japanese, but discrimination between these groups was difficult due to the hybrids between them. Beach plum and 'Glow', American plums, were genetically distant to those two groups. In polyploidy hypothesis of Crane and Lawrence (1979?), RFLP of chloroplast DNA specific to Spinosa plum suggested it may be pollen parent of hexaploids such as *P. domestica* and *P. insititia*. 'Ren-xing', 'Bungo', 'Sumomoume' were demonstrated to be the natural hybrids among plum, mume and apricot comparing RAPD patterns of artificial hybrid lines such as AM, PA, PM.

In peaches, it was confirmed that interspecific dissimilarity was small but, intraspecific ones was high. Identification of peach species were feasible, because each species was well characterized. *P. amygdalus*, *P. triloba* and *P. tomentosa* were greatly distant to cultivated peaches (*P. persica*). Almond have high heterogenous genome

considering wide variations even in F₁ plants.

Cerasus species were classified into “Flowering cherry”, “Fruiting cherry”, “*Microcerasus*”. The relationships within “Flower cherry” were confusing due to the frequent interspecific variation. “Fruit cherry” was consisted of *P. avium* and *P. cerasus* and the genetic base of it was the narrowest in subgenus *Cerasus*. *Microcerasus* plants were distant to other two groups. Thus the most relationships within each subgenus were clarified and important species with large genetic diversity or intermediate characteristics were presented.

In order to characterize importance of these interesting plants in *Prunus* species, we will establish the reliable relationships of *Prunus* species comparing morphological and genetic investigations.

Principal components analysis based on the morphological characteristics common to them showed *Prunus* species were divided “Plum and cherry” and “Peach, mume and apricot”. *Microcerasus* plants were so variant to have characteristics both of plum and cherry. RAPD analysis also indicated that flower cherry and plums have large diversities and they were center plants in *Prunophora* and *Cerasus*. *Microcerasus* plants were genetically similar to plums. Wild species showed their own speciality which made difficult to consider that they had connection with other species in development. The significant differences of chloroplast DNA among *Microcerasus* and *Prunophora* were not obtained by PCR-RFLP and Southern blot analysis.

These results indicated that *Microcerasus* and *Prunophora* have genetically close relationships and are center plants for *Prunus* evolutions and most wild species were divided from them.