

カンキツ属4種とキンカン属5種を用いた カンキツ類の遺伝解析に有用な SSR マーカーの選定

安田喜一¹・戸村大河^{1,2}・佐藤真衣¹・富永晃好³・八幡昌紀³・國武久登⁴

Selection of useful SSR markers for genetic analysis of citrus
using 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species

Kiichi YASUDA, Taiga TOMURA, Mai SATO,
Akiyoshi TOMINAGA, Masaki YAHATA and Hisato KUNITAKE

(Received 25 November 2021; accepted 24 December 2021)

Abstract

SSR genotyping of the 9 citrus species using by public SSR markers and polyacrylamide electrophoresis was performed for screening useful DNA marker to genetic analysis in citrus. As a result, 18 markers were primary selected from a total of 281 markers because of high polymorphism and difference of amplified fragment length between their alleles, and then, 8 markers with high reproducibility and distinguishability were selected from these ones. In these SSR loci, many polymorphisms were detected among the closely related 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species, and these species could be identified by a minimum of two Markers, GSR3138 and CiBE3936. On the other hand, the direct-sequencing of bands different from the previously expected fragment length suggested that multiple alleles might exist for one SSR marker in some species. In the future, using the selected SSR markers, we plan to analyze genetic background of the tetraploids and hybrid strains produced in previous studies, and at the same time, proceed with the design of SSR markers based on the public genomic information.

緒 言

カンキツ類は、一般にカンキツ (*Citrus*) 属, カラタチ (*Poncirus*) 属およびキンカン (*Fortunella*) 属の3属を示す。これらの植物群はインド, 東南アジア, 中国, フィリピン, 台湾, 日本, マレー諸島およびメラネシアの島々に分布する (1)。カンキツは生食用をはじめ加工用まで幅広く利用されており, それらに利用される品種では, 食べやすさ, 扱いやすさから, 無核 (種無し) のものが多い。そのためカンキツ類では, 無核性は極めて重要な形質である。

無核性カンキツの育成手法の一つとして, 三倍体を利用した育種が挙げられる (2-5)。三倍体では, 減数分裂時に異常な染色体数を持つ配偶子が高頻度で形成される

ため, 開花時に正常な受精が阻害され, 無核果が生じやすい。これまでに, カンキツ属やキンカン属では, 四倍体を用いた交雑によって多くの三倍体が得られており, 四倍体は無核性品種育成のための重要な育種素材であると言える (6-10)。従来, カンキツ類の同質四倍体は, 偶発的に出現する珠心胚実生から獲得されてきたが, その頻度は極めて低く, 効率的な方法とはいえない (11)。そのため, 近年ではコルヒチンやオリザリンなどの紡錘糸形成阻害剤を種子や腋芽に処理する方法が主流となっており, これまでに様々なカンキツ類で同質四倍体の作出に成功している (7, 9, 12-14)。しかし, 種子への紡錘糸形成阻害剤処理方法では, 有性胚由来の実生が混入している可能性があるため (15), 発生起源を確認する必要がある。

¹ 東海大学農学部応用植物科学科

² 静岡大学大学院総合科学技術研究農学専攻

³ 静岡大学大学院農学領域

⁴ 宮崎大学農学部応用生物科学科

連絡先: 安田喜一 e-mail: yk964422@tsc.u-tokai.ac.jp

もう一つの無核性カンキツの育成手法として、雄性・雌性不稔性を有する品種を母本とした交雑育種がある。その代表的な育種母本として、‘宮川早生’ウンシュウミカン (*C. unshiu* Marcow.) と‘トロビタ’スイートオレンジ [*C. sinensis* (L.) Osbeck] の交雑より育成された‘清見’タンゴールが挙げられる (16)。当品種は、後代に遺伝する核・細胞質型の葯退化タイプの雄性不稔性 (17, 18) を有しており、種子親として‘不知火’、‘はるみ’および‘はれひめ’などの多くの少核性・無核性品種の育成に寄与している (19)。育種年限の長い果樹において、戦略的かつ効率的な交雑育種を推進するためには、交雑実生の早期雑種性解析は必要不可欠である。また、近年では、植物の育成者権保護の関心が高まっており、DNA マーカーによる品種識別により交雑親の間違い事例が発生している。例えば、愛媛県育成品種‘甘平’は、2007年の品種登録時には‘西之香’と‘不知火’の雑種とされていたが、7年後にDNA 解析によって花粉親がポンカンであることが判明した (20)。

これまでにカンキツ類の珠心胚における有性胚と珠心胚の判別方法には、アイソザイム分析やCMA 染色体核型分析が用いられてきたが (21-24)、最近の主流としてRandom Amplified Polymorphic DNA (RAPD) や Simple Sequence Repeat (SSR) 分析のような分子生物学的手法が用いられている (11, 15, 25-28)。一方、カンキツ類の品種・種識別では、その他にも restriction fragment length polymorphism (RFLP) (29)、cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) (30)、single nucleotide polymorphism (SNP) (31) などのDNA マーカーが利用されており、交雑育種の雑種性解析に応用できる。そのなかでも、SSR は多型性・再現性が高く、共優性の遺伝様式を示し、ゲノム中に豊富に存在するため、信頼性の高いDNA マーカーとして様々な遺伝解析に用いられている。カンキツ属では、これまでにOllitrault ら (32) や Shimizu ら (33) などによって多くのSSR マーカーが設計・公開されており、それらの情報に基づいた蛍光プライマーとキャピラリーシークエンサーを利用したフラグメント解析が主流となっている (33-35)。しかしながら、この手法では高価な機械や蛍光試薬が必要であり、その利用は限定的である。

そこで本研究では、カンキツ類における同質四倍体の発生源や交雑実生の雑種性の解析などに有用なDNA マーカーの探索を目的として、既に設計・公開されているSSR マーカーから、比較的安価かつ容易なポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) を用いた分析により選定を試みた。

材料および方法

植物材料

静岡大学農学部附属地域フィールド科学教育研究センター植栽のウンシュウミカン‘宮川早生’ (英名: Satsuma mandarin) (*Citrus unshiu* Marcow.), ポンカン‘太田ポンカン’ (Ponkan mandarin) (*C. reticulata* Blanco), タチバナ (Tachibana) [*C. tachibana* (Makino) Tanaka], シキキツ (Calamondin) (*C. madurensis* Lour.), ニンボウキンカン (Meiwa kumquat) (*Fortunella crassifolia* Swingle), マルキンカン (Round kumquat) [*F. japonica* (Thunb.) Swingle], マメキンカン (Hongkong kumquat) [*F. hindsii* (Champ. ex Benth) Swingle], チョウジュキンカン (Changshou kumquat) (*F. obavata* hort. ex Tanaka), ナガハキンカン (Malayan kumquat) [*F. polyandra* (Ridl.) Tanaka] のカンキツ属植物4種とキンカン属植物5種の計9種を供試した。なお、マメキンカンに関しては二倍体の変種 (*F. hindsii* var. *chintou*), マルキンカンについては、宮崎大学農学部植栽の実生を用いた。

ゲノムDNAの抽出

供試植物の成葉から改変CTAB法 (36) によりゲノムDNAを抽出した。すなわち、2 mL チューブに成葉約200mg とクラッシャーを入れ、液体窒素とSKミル (SK-100, Tokken, Inc.) を用いて凍結・粉碎した。そこに予熱したCTAB溶液1 mL とメルカプトエタノール10 μ L を加えて混和、ブロックインキュベーター (PowerBLOCK Shaker, ATTO) で65℃, 600rpm, 30分間振とう、その間にRNaseを4 μ L 添加した。その後、室温, 14,000rpm, 5分間遠心分離して得られた上清について、フェノール/クロロホルムとクロロホルム/イソアミルアルコール抽出およびイソプロパノール沈殿を実施し、DNAペレットをTE buffer 100 μ L に溶解した。微量分光光度計 (NanoDrop2000c, ThermoFisher Scientific K.K.) でDNA溶液の濃度を測定後、5 ng/ μ L に調整してPCRに用いた。

SSR マーカーの一次選抜

Ollitrault ら (32) がクレメンティン (*C. clementina* cv. Nules) のゲノム配列データより設計した526個のSSR マーカーより選抜した79個、Shimizu ら (33) がクレメンティン、ウンシュウミカンおよびスイートオレンジ [*C. sinensis* (L.) Osbeck cv. Ridge Pineapple] のゲノム配列データより設計した202個のSSR マーカーを対象とした。これらのマーカーのうち、多型性の指標である多型

情報含有量 (PIC) 値が高く、アレル間の増幅断片長の差異が約10bp 以上であるものを各連鎖群より最低1個以上選抜した。

SSR 分析および遺伝子型決定

0.5ng/ μ L ゲノム DNA, 0.2 μ M forward/reverse プライマー, 2.5 μ L GoTaq[®] Green Master Mix (Promega) を含む計5 μ L を PCR 反応溶液とした。サーマルサイクラー (Thermal Cycler Dice Touch, Takara) を用いて PCR 反応を行った。なお、ポリメラーゼの違いなどにより期待された増幅が得られなかった場合は、PCR 条件を再検討した。最適化された PCR 反応後、反応溶液を100bp DNA Ladder (Bioneer) と20bp DNA Ladder (Takara) とともに12% ポリアクリルアミドゲル上にアプライし、電気泳動用電源装置 (PowerStation Ghibli I, ATTO) を用いて200V, 80分間電気泳動を行った。泳動後、ポリアクリルアミドゲルを0.1 μ g/mL のエチジウムブロマイドを含む TBE バッファーで30分染色後、紫外線照射下で可視化した。デジタル画像を Microsoft PowerPoint (Microsoft) を用いて簡易処理し、100bp DNA Ladder 間の直線を基準として増幅バンドの多型性により遺伝子型を決定した。

ダイレクトシーケンスおよび塩基配列決定

タチバナの NSX02 遺伝子座における PCR 産物について、4% アガロースで電気泳動し、異なる3つの断片長のバンドを含むゲル部分をカミソリで切り出し、GENECLEAN kit (MP Bio Japan K.K.) と GEL/PCR Purification Column (FAVORGEN Biotech Co.) を用いてゲル抽出を行った。抽出した増幅産物は、ExoSAP-IT[™] Express PCR Product Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific K.K.) により精製し、増幅産物13.36 μ L と10 pmol のプライマー0.64 μ L を混合・調整後に、FASMAC Ltd. ヘシーケンス分析を委託した。Forward/reverse リード配列のオーバーラップ領域で配列を決定し、比較した。

結 果

SSR マーカーの一次選抜の結果、Table 1 に示した18 マーカーを本試験に用いることとした。それらのプライマーペアを用いたカンキツ属4種とキンカン属5種の PCR では、期待される増幅が得られなかったマーカーが多かったため、グラジエント PCR によりアニール温度を中心に条件の最適化を行った (Table 2)。その結果、再現性が良く、増幅断片間の識別性が高い CiBE3936、

Table 1. Information on SSR markers used in the present study with their linkage groups, primer sequences, repeat motifs, annealing temperatures, amplified fragment length, accession IDs, and bibliographic references.

Locus	Linkage group	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Motif	Annealing temperature (°C)	Amplified fragment length (bp)	Accession ID	Reference
CiBE3936	1	GTAATGATAGCCGTTGGCTCTT	TATGAGATGCTTCTTATTTGCT	(TC) ¹⁶	55	251	ET104698	
CiBE1644	3	ACAGAAGAGGAGCCATTATTT	CAGAGAGAACCCGGAAGAAG	(GTT) ¹¹	55	360	ET097780	
CiBE4796	5	GATGAGAACGCTGATGCT	TTCAACCCACACTGACGATAA	(AG) ¹⁰	55	194	ET110437	Ollitrault <i>et al.</i> , 2010
CiBE0447	6	CACAAAGAGAGTAACCCACA	CGTCAAGAGAGAGAAATGATG	(TTC) ¹⁴	55	303	ET091388	
CiBE2165	7	AATCCACTCTCAACACCCAG	AATGCCAAATACTACCATTC	(TG) ⁹	55	263	ET102021	
CiBE2227	8	AGAACCAAGTCACCTCACAG	AGAGAAGGATAGGGATGGAA	(AAC) ⁷	55	153	ET100673	
NSX175	1	GAGCTTACTAATAGGATACGCTG	ATTGTAAGGCGAATTGGATGG	(AAGA) ⁿ (AAT) ⁿ	56	214	scaffold_64	
GSR2101	1	AAATGAATTGTAAATAACGGAGAT	GAGATCTTATTAATTGAAAGCTCTC	(TA) ⁿ (GA) ⁿ	54	113	BUZY106502.b1	
TSGR264	2	TAACACACCTCTCAATTCCCA	GGCAAACTATTAGACCTCCGT	(AAT) ⁿ	58	140	scaffold_2	
TSGR265	2	AACAGTCGGACTAATTCATCC	TATCTCAAGACTCCCAACCT	(TA[GCA]) ⁿ (CAA) ⁿ	56	165	scaffold_2	
NSX02	3	ACATCACATCGCCAAATACCC	ACTCGTGGCACTCATGACTC	(TA) ⁿ (CA) ⁿ	54	143	scaffold_3	
NSX165	3	GTTCTTCTTGTATGAAGGGTACAG	TTTGTCTTCTCTTGGCTTGTCT	(AT) ⁿ , (AGA) ⁿ	56	289	scaffold_57	Shimizu <i>et al.</i> , 2016
TSRA107	4	GGATTAGAGAAAGTAGAGCAACCA	TTTGAGAACCCAGCACTATACC	(TGAAGA) ⁿ	56	200	scaffold_6	
NSX43	5	TTCTGGATCAAACTAGCTTCGT	AACCTTAAACCTCAATACAGCC	(TTCATGA) ⁿ	58	158	scaffold_1	
GSR3138	5	GCTTTGTCTAACTGGAAAGTC	CATAAGCTTGGCTTGTGTGT	(AAT) ⁿ	54	135	BUZY63372.g1	
NSX156	6	CAGGTAGGTGGCTTTAAGG	GGAGTTTGACAGTTTGAACCA	(TTCCT) ⁿ (TAT) ⁿ (TCT) ⁿ	56	216	scaffold_42	
GSR6101	7	AAAAACAGAGCAGGAAGAAC	TGCAATCCCATATAGCAAG	(CCGGCA) ⁿ	60	248	BUZY128935.g1	
SSR07B25	9	AGGCTATCTCTAATCCATTGCT	GCCATTGCTGTTCACTTACTC	(GA) ⁿ	54	211	CX074011	

Table 2. Optimization of PCR conditions for 18 SSR markers.

Locus	PCR condition [temperature · time (°C · sec)]			
	Denaturation	Annealing	Elongation	Cycle
CiBE0447				
CiBE1644				
CiBE2227	94 · 60 [*]	58 · 30	72 · 30	30
CiBE3936				
CiBE4796				
CiBE2165		60		
SSR07B25		56	· 25	
GSR3138		54		
NSX02	· 20			
TSGR265		56 · 35	· 35	
NSX175				32
TSGR264	94	58	72	
NSX156		55		· 60
NSX43		56 · 25		· 35
TSRA107	· 60	55 · 45	· 45	
GSR2101		52		
GSR6101		53 · 60	· 60	35
NSX165		55 · 45	· 45	

^{*} Bold letters indicate modified conditions.

Table 3. The range of the amplified fragment length by PCR with 8 SSR markers.

Locus	Linkage group	Amplified fragment length (bp)							
		80~100	101~120	121~140	141~160	161~180	181~200	201~300	301~400 401~500
CiBE3936	1							1A / 1B / 1C / 1D / 1E	
NSX175						1A	1B / 1C	1D	
TSGR264	2	2A	2B / 2C	2D					
NSX02	3		3A / 3B	3C					
NSX165								3A / 3B / 3C	3D / 3E
GSR3138	5		5A / 5B	5C	5D / 5E	5F / 5G			
GSR6101	7					7A	7B	7C	
SSR07B25	9					9A	9B / 9C		

NSX175, TSGR264, NSX02, NSX165, GSR3138, GSR6101およびSSR07B25の8マーカーを選抜できた。

8マーカーを用いたカンキツ属4種とキンカン属5種のPCRとPAGEを行ったところ、すべての遺伝子座で既報の期待される断片長を有する明瞭なバンドが得られた (Table 3)。しかしながら、GSR3138 (Fig. 1a) を除く7マーカーでのPCRでは、それら以外にも複数のバンドが検出されたため、既報の断片長かつ明瞭な強いシグナルを有するバンドを本研究における遺伝子型決定に用いた (Fig. 1b, Fig. 2)。供試した9種の8遺伝子座における遺伝子型をTable 4に示した。最も多くの種間多型が得られたのは第5連鎖群に座上するGSR3138であり、ウンシュウミカン、シキキツおよびチョウジキンカンの3種間、ナガハキンカンとマルキンカンの2種間において同じ遺伝子型を示した。また、ニンポウキンカンを除く8種でヘテロ接合であった。第1連鎖群に座上するCiBE3936は9種中4種でホモ接合であったものの、種間多型は多く観察され、ウンシュウミカンとナガハキ

ンカンの2種間、ポンカン、マルキンカンおよびマメキンカンの3種間において同じ遺伝子型を示した。さらに、GSR3138で識別できなかった2組の種間では、それぞれまったく異なる遺伝子型を示した。一方、その他の5遺伝子座では、ホモ接合も多く、比較的多型性は低かった。興味深いことに、第2連鎖群に座上するTSGR264のPCRでは、キンカン属5種のみバンドがまったく検出されなかった (Fig. 1b)。

既報の期待される断片長以外のバンドがSSRであるかどうかを確認するため、代表として第3連鎖群に座上するNSX02におけるタチバナで増幅された3本のバンドのダイレクトシーケンスを実施した。最も長い鎖長のバンド (l) は技術的な問題で明瞭な波形が得られなかったが、残り2本のバンドでは一部の配列を決定することができ、中間の鎖長のバンド (m) は既報と同様の断片長を有するバンド (s) と少なくとも19塩基の差異があるSSR遺伝子座 [(TA)_n(CA)_n] であることが明らかとなった (Fig. 2)。

Table 4. SSR genotyping of 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species by using 8 markers.

Locus	Linkage group	<i>Citrus</i>				<i>Fortunella</i>				
		Satsuma mandarin 'Miyagawa-wase'	Ponkan mandarin 'Ota-ponkan'	Tachibana	Calamondin	Changshou	Malayan kumquat	Meiwa kumquat	Round kumquat	Hongkong kumquat
GtBE3936	1	1D/1D	1B/1C	He	1B/1E	He	1A/1A	He	1B/1C	He
NSX175		1A/1A	1C/1D	He	1C/1C	He	1C/1C	He	1B/1B	He
TSGR264	2	2D/2D	2A/2A	He	2D/2D	He	n.d. ^y	-	n.d.	n.d.
NSX02	3	3C/3C	3A/3C	He	3C/3C	He	3C/3C	He	3A/3B	He
NSX165	5	3A/3E	3B/3E	He	3D/3E	He	3D/3E	He	3C/3E	He
GSR3138		5B/5C	5A/5G	He	5B/5C	He	5C/5F	He	5D/5D	He
GSR6101	7	7B/7C	7A/7B	He	7B/7B	He	7B/7B	He	7A/7B	He
SSR07B25	9	9B/9B	9B/9C	He	9B/9C	He	9B/9B	He	9C/9C	He

^x Ho: homozygosity, He: heterozygosity in SSR allele.
^y n.d.: not detected.

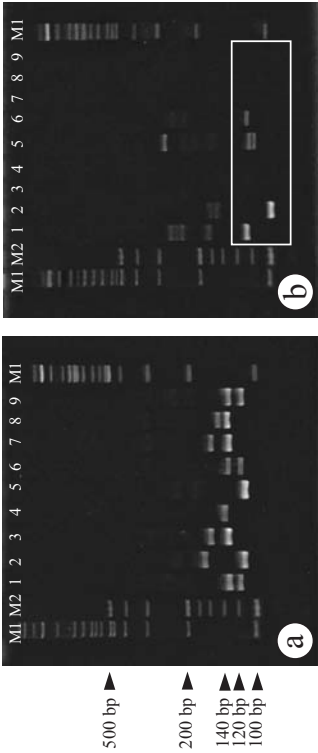


Fig.1. SSR analysis of 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species with PAGE in GSX3138 (a) and TSGR264 (b) loci.
M1: 100bp ladder, M2: 20bp ladder, 1: Satsuma mandarin 'Miyagawa-wase', 2: Ponkan mandarin 'Ota-ponkan', 3: Malayan kumquat, 4: Meiwa kumquat, 5: Tachibana, 6: Calamondin, 7: Round kumquat, 8: Hongkong kumquat, 9: Changshou kumquat. Gating: locus used for SSR genotyping.



Fig. 2. SSR analysis of 4 *Citrus* and 5 *Fortunella* species with PAGE in NSX02 locus (left) and the sequence of Tachibana's amplified fragments (above).
M1: 100bp ladder, M2: 20bp ladder, 1: Satsuma mandarin 'Miyagawa-wase', 2: Ponkan mandarin 'Ota-ponkan', 3: Malayan kumquat, 4: Meiwa kumquat, 5: Tachibana, 6: Calamondin, 7: Round kumquat, 8: Hongkong kumquat, 9: Changshou kumquat.
Gating: locus used for SSR genotyping, white arrowhead: bands used for direct sequencing.

考 察

本研究では、*TaKaRa Taq*™ (*TaKaRa*, 約27.5円/10μL PCR 混合液) や *rTaq DNA Polymerase* (TOYOBO, 約9.5円/10μL PCR 混合液) などより比較的安価で操作性の良い *GoTaq® Green Master Mix* (約7.8円/10μL PCR 混合液) を用い、供試したプライマーペアのアニール温度を最適化できた。汎用性を重視して PAGE による増幅産物の分離を試みたため、一次選抜した18マーカーのうち遺伝解析に有用なものは8個であった。これらの SSR 遺伝子座において、供試9種には3～7つのアレルが存在し、近縁であるカンキツ属とキンカン属の属間および属内で多くの遺伝子多型を確認することができた。Yasuda ら (37) は、チョウジュキンカン、ナガハキンカンおよびシキキツがカンキツ属とキンカン属の属間雑種であることを明らかにしている。そのため、本研究でキンカン属が TSGR264 のアレルを有していなかったことから、これらのうちキンカン属2種は当遺伝子座にキンカン属由来のホモ接合、シキキツはカンキツ属由来のホモもしくはヘミ接合であることが示唆された。

明らかとなった8マーカー9種の SSR 遺伝子型により、これらの種は GSR3138 と CiBE3936 の最少2マーカーで種の識別が可能であることが明らかとなった。カンキツ類の珠心胚における有性胚と珠心胚の判別には、いくつかの遺伝子座における同一性ととともに、周囲に植栽している別種・品種の遺伝子混入がないことを証明する必要がある。Sudo ら (38) は、ウンシュウミカンの珠心胚より偶発的な倍加個体を獲得し、本研究で選定した NSX165 と GSR3138 を用いた遺伝解析により、この系統が珠心胚由来の同質四倍体であることを明らかにしている。一方、本研究では、すべての種において遺伝解析のために有用であるヘテロ接合のアレルを観察できた。Yasuda ら (39) は、一部の種でのみ明確なバンドが得られた NSX43 と CiBE2227 (データ省略) を用いて、‘清見’タンゴールとニンポウキンカンとの二倍体間交雑より得られた三倍体と異数体の雑種における SSR 解析により、これらの倍数体化がニンポウキンカンの非還元配偶子に由来することを明らかにしている。これらのように、本研究で選定した SSR マーカーは、同質四倍体や雑種の発生起源のような遺伝解析に有用であると言える。

既報の期待される断片長以外のバンドの塩基配列決定により、一部の種において1つの SSR マーカーに対して複数のアレルが存在する可能性が示唆された。このような場合、系統分類学や集団遺伝学的な研究では高い多型性より有用なマーカーとなり得るが、優良個体の選抜

や品種識別などにはしばしば混乱を生じさせる。近年、カンキツ類と一部の近縁野生種の全ゲノム解読が進められており、スイートオレンジ (40)、クレメンティン (*C. clementina* hort. ex Tanaka) (41)、ウンシュウミカン (42)、ブンタン (*C. maxima* Merr.)、パペダ、シトロネおよびアタランティア (43)、でゲノム配列が公開されている。また、農研機構は、カンキツの DNA マーカーの開発を支援するデータベース「ミカンゲノムデータベース (MiGD)」(<https://mikan.dna.affrc.go.jp/>) を開発・公開している。そのため、このような公開情報を利用して、将来的に単一遺伝子座かつ特異性の高い SSR マーカーの設計を行う必要があると考えられた。

本研究において、特に有用な GSR3138 と CiBE3936 を含む8つの SSR マーカーを選定し、カンキツ属4種とキンカン属5種におけるそれらの遺伝子型を明らかにすることができた。これまでに、共同研究機関である宮崎大学と静岡大学では、種子へのコルヒチンやオリザリン処理により多くの四倍体カンキツ類を作出している。一部の四倍体系統については RAPD 分析 (11, 15) および CMA 核型分析 (7) による発生起源の解析が行われているが、未解析の四倍体系統が多く残されている。今後、本研究で選定した SSR マーカーを用いて同質四倍体の発生起源を明らかにするとともに、雑種性などの遺伝解析に有用な SSR マーカーの選定・設計を進める予定である。

要 約

カンキツ類における遺伝解析に有用な DNA マーカーの探索を目的として、カンキツ類9種および既に構築された SSR マーカーを供試し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による遺伝子型決定を行った。その結果、合計281マーカーについて、多型性が高く、アレル間の増幅断片長差が大きい18マーカーを一次選抜し、さらにその中から再現性と識別性の高い8マーカーを選定することができた。これらの SSR 遺伝子座において、近縁であるカンキツ属とキンカン属の9種間に多くの多型を確認することができ、GSR3138 と CiBE3936 の最少2つのマーカーで供試した種を識別することができた。一方で、既報の期待される断片長以外のバンドの塩基配列決定により、一部の種において1つの SSR マーカーに対して複数のアレルが存在する可能性が示唆された。今後、選定した SSR マーカーを用い、これまでに作出した四倍体や雑種系統の遺伝解析を実施するとともに、公開されているゲノム情報を利用した SSR マーカーの設計を進

める予定である。

引用文献

- 1) 岩政正男, 1999, カンキツ総論, 養賢堂, 東京, 115-117, ウンシュウミカンの来歴と品種分化, 岩堀修一, 門屋一臣.
- 2) Soost, R. K. and Cameron, J. W., 1980, Oroblanco a new grapefruit hybrid, *HortScience*, **15**, 667-669.
- 3) Soost, R. K. and Cameron, J. W., 1985, 'Melogold', a new pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience*, **20**, 1134-1135.
- 4) 徳永忠士, 新居美香, 津村哲宏, 尾山正実, 2005, スダチにおける四倍体と二倍体との交雑による三倍体雑種の作出および無核品種「徳島3X1号」の育成, *園学研*, **4**, 11-25.
- 5) 吉田俊雄, 根角博久, 吉岡照高, 家城洋之, 伊藤祐司, 中野睦子, 上野 勇, 山田彬雄, 村瀬昭治, 瀧下文孝, 2003, キンカン新品種「ぶちまる」, *果樹研報*, **2**, 9-16.
- 6) Esen, A., Soost, R. K. and Geraci, G., 1978, Seed set, size, and development after $4x \times 2x$ and $4x \times 4x$ crosses in *Citrus*, *Euphytica*, **27**, 283-294.
- 7) 糠谷綱希, 太田知宏, 安田喜一, 八幡昌紀, 國武久登, 小松春喜, 新居直祐, 向井啓雄, 原田 久, 高木俊彦, 2011, ニンボウキンカン珠心胚へのコルヒチン処理によって得た倍数体の特性とそれらの三倍体育種への利用, *園学研*, **10**, 1-8.
- 8) 金好純子, 加納徹治, 桑田祐二, 平尾 晃, 中谷宗一, 小林省蔵, 1997, カンキツ類の三倍体品種の育成(第1報) ウンシュウミカンと四倍体ポンカンの交雑による雑種三倍体の作出, *園学雑*, **66**, 141-146.
- 9) 金好純子, 吉田貴音, 蔵尾公紀, 山口 聡, 2008, 単胚性カンキツにおけるコルヒチン処理による四倍体の作出とその種子親としての利用による三倍体の獲得, *園学研*, **7**, 5-10.
- 10) 八幡昌紀, 岡 信孝, 國武久登, 山口清二, 小松春喜, 2003, 「晩白柚」と四倍体の正逆交雑から得られた種子の重さと倍数性との関係, *園学研*, **2**, 47-252.
- 11) 河瀬憲次, 八幡昌紀, 中川匠子, 原口加奈, 國武久登, 2005, ニンボウキンカンにおける同質四倍体の選抜とその特性, *園学研*, **4**, 141-146.
- 12) Barrerr, H. C. and Hutchison, D. J., 1978, Spontaneous tetraploidy in apomictic seedlings of *Citrus*, *Econ. Bot.*, **32**, 27-45.
- 13) 津村哲宏, 山尾正実, 徳永忠士, 2002, カンキツ「清見」をコルヒチン処理して得られた個体の特性, *徳島果研報*, **2**, 6-12.
- 14) Wakana, A., Hanada, N., Park, S. M., Fukudome, I., and Kajiura, K., 2005, Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine, *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **1**, 93-102.
- 15) 八幡昌紀, 柏原夕希子, 黒木宏憲, 國武久登, 小松春樹, 2004, ニンボウキンカン種子へのコルヒチン及びオリザリン処理が四倍体植物誘導に及ぼす影響, *園学研*, **3**, 11-16.
- 16) 西浦昌男, 七條寅之助, 上野 勇, 岩政正男, 木原武士, 山田彬雄, 吉田俊雄, 岩崎藤助, 1983, カンキツ新品種「清見」について, *果樹研報*, **10**, 1-9.
- 17) Nakano, M., Nesumi, H., Yoshioka, T. and Yoshida, T., 2001, Segregation of plants with undeveloped anthers among hybrids derived from the seed parent, 'Kiyomi' (*Citrus unshiu* $\times$ *C. sinensis*). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **70**, 539-545.
- 18) Yamoto, M., Matsumoto, R., Okudai, N. and Yamada, Y., 1997, Aborted anthers of *Citrus* result from gene-cytoplasmic male sterility. *Scientia Horticulturae*, **70**, 9-14.
- 19) 吉田俊雄, 2003, 高品質・単胚性カンキツ品種「清見」の育成, *育種学研究*, **5**, 103-107.
- 20) 二宮泰造, 島田武彦, 遠藤朋子, 野中圭介, 大村三男, 藤井 浩, 2015, CAPS マーカーによるカンキツの品種識別法の開発と親子鑑定, *園学研*, **14**, 127-133.
- 21) Hirai, M., Kozaki, I. and Kajiura, I., 1986, The rate of spontaneous inbreeding of trifoliate orange and some characteristics of the inbred seedlings, *Japan. J. Breed.*, **36**, 138-146.
- 22) Yahata, M., Kunitake, H., Yabuya, T., Yamashita, K., Kashiara, Y. and Komatsu, H., 2005, Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **130**, 899-903.
- 23) Yamamoto, M and Tominaga, S., 2004, CMA banding pattern of chromosomes is useful for the identification of chromosome doubling in haploid citrus, *Breed. Sci.*, **54**, 351-354.
- 24) Yamamoto, M., Kouno, R., Nakagawa, T., Usui, T.,

- Kubo, T. and Tominaga, S., 2011, Isozyme and DNA analyses of local *Citrus* germplasm on Amami islands, Japan, J. Japan. Soc. Hort. Sci., **80**, 268–275.
- 25) Oliveira, A. C., Garcia, A. N., Cristofani, M. and Machado, M. A., 2002, Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers, Euphytica, **128**, 397–403.
- 26) Rao, M. N., Soneji, J. R., Chen, C., Huang, S. and Gmitter Jr., F. G., 2008, Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers, Tree Genet. Genomes, **4**, 113–124.
- 27) Singh, J., Dhaliwal, H. S., Thakur, A., Sidhu, G. S., Chhuneja, P. and Gmitter Jr., F. G., 2020, Optimizing recovery of hybrid embryos from interspecific citrus crosses of polyembryonic rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.), Agronomy, **10**, 1940.
- 28) Tan, M. L., Song, J. K. and Deng, X. X., 2007, Production of two mandarin × trifoliate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis, Euphytica, **157**, 155–160.
- 29) Matsuyama, M., Motohashi, R., Akihama, T. and Omura, M., 1992, DNA fingerprinting in citrus cultivars, Japan. J. Breed., **42**, 155–159.
- 30) Ueda, T., Ikeda, F., Kita, M., Shimada, T., Endo, T. and Omura, M., 2003, Evaluation of a CAPS method based on ESTs in *Citrus*, Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr., **2000**, 116–117.
- 31) 大村三男, 藤井 浩, 島田武彦, 遠藤朋子, 上田高則, 清水徳朗, 2004, カンキツにおける SNPs マーカーの作成と品種判別への利用, 園学雑, **73** (別 1), 184.
- 32) Ollitrault, F., Terol, J., Pina, J. A., Navarro, L., Talon, M. and Ollitrault, P., 2010, Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in *Citrus*, Am. J. of Bot., **97**, e124–129.
- 33) Shimizu, T., Kitajima, A., Nonaka, K., Yoshioka, T., Ohta, S., Goto, S., Toyoda, A., Fujiyama, A., Mochizuki, T., Nagasaki, H., Kaminuma, E. and Nakamura, Y., 2016, Hybrid origins of *Citrus* varieties inferred from DNA marker analysis of nuclear and organelle genomes, PLOS ONE, **11**, e0166969.
- 34) Passaro, M., Cirilli, M., Ottone, L., Rustioni, L., Barbante, A., Bassi, D. and Geuna, F., 2020, Phenotypic and genotypic characterization of 'Chinotto di Savona' *Citrus* accession, Sci. Hort., **261**, 108917.
- 35) Woo, J. K., Park, Y. C., Lee, J. W., Yun, S. H., Kim, M., Park, S., Lee, Y., Song, K. J. and Kim, H. B., 2019, Evaluation of polyembryony for genetic resources and efficacy of simple sequence repeat markers for the identification of nucellar and zygotic embryo-derived individuals in citrus, Appl. Biol. Chem., **62**, 30.
- 36) Doyle, J. and Doyle, J. L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities fresh leaf tissue, Phytochem. Bull., **19**, 11–15.
- 37) Yasuda, K., Yahata, M. and Kunitake, H., 2016, Phylogeny and classification of kumquats (*Fortunella* spp.) inferred from CMA karyotype composition, Hort. J., **85**, 115–121.
- 38) Sudo, M., Yasuda, K., Yahata, M., Sato, M., Tominaga, A., Mukai, H., Ma, G., Kato, M. and Kunitake, H., 2021, Morphological characteristics, fruit qualities and evaluation of reproductive functions in autotetraploid Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marcow.), Agronomy, **11**, e2441.
- 39) Yasuda, K., Yahata, M., Sato, M., Sudo, M., Tominaga, A. and Kunitake, H., 2021, Identification of parental genome construction and inherited morphological characteristics in triploid and aneuploidIntergeneric hybrids from a diploid – diploid cross between *Citrus* and *Fortunella*, Agronomy, **11**, e1988.
- 40) Xu, Q., Chen, L.-L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., Bertrand, D., Jiao, W.-B., Hao, B.-H., Lyon, M. P., Chen J., Gao, S., Xing, F., Lan, H., Chang, J. W., Ge, X., Lei, Y., Hu, Q., Miao, Y., Wang, L., Xiao, S., Biswas, M. K., Zeng, W., Guo, F., Cao, H., Yang, X., Xu, X.-W., Cheng, Y.-J., Xu, J., Liu, J.-H., Luo, O. J., Tang, Z., Guo, W.-W., Kuang, H., Zhang, H.-Y., Roose, M. L., Nagarajan, N., Deng, X.X. and Ruan, Y., 2013, The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). Nat. Genet., **45**, 59–66.
- 41) Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., Perrier, X., Ruiz, M., Scalabrin, S., Terol, J., Takita, M. A., Labadie, K., Poulain, J., Couloux, A., Jabbari, K., Cattonaro, F., Fabbro, C. D., Pinosio, S., Zuccolo, A., Chapman, J., Grimwood, J., Tadeo, F. R., Estornell, L. H., Muñoz-Sanz, J. V., Ibanez, V., Herrero-Ortega, A., Aleza, P., Pérez-Pérez, J., Ramón, D., Brunel, D., Luro, F., Chen, C., Farmerie, W. G., Desany, B.,

- Kodira, C., Mohiuddin, M., Harkins, T., Fredrikson, K., Burns, P., Lomsadze, A., Borodovsky, M., Reforgiato, G., Freitas-Astúa, J., Quetier, F., Navarro, L., Roose, M., Wincker, P., Schmutz, J., Morgante, M., Machado, M. A., Talon, M., Jaillon, O., Ollitrault, P., Gmitter, F. and Rokhsar, D., 2014, Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 656–662.
- 42) Shimizu, T., Tanizawa, Y., Mochizuki, T., Nagasaki, H., Yoshioka, T., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kaminuma, E. and Nakamura, Y., 2017, Draft sequencing of the heterozygous diploid genome of Satsuma (*Citrus unshiu* Marc.) using a hybrid assembly approach, *Front. Genet.*, **8**, e180.
- 43) Wang, X., Xu, Y., Zhang, S., Cao, L., Huang, Y., Cheng, J., Wu, G., Tian, S., Chen, C., Liu, Y., Yu, H., Yang, X., Lan, H., Wang, N., Wang, L., Xu, J., Jiang, X., Xie, Z., Tan, M., Larkin, R. M., Chen, L.-L., Ma, B.-G., Ruan, Y., Deng, X. and Xu, Q., 2017, Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction, *Nat. Genet.*, **49**, 765–772.