

富津岬のハマダイコン (*Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroides*) 自生集団のPCR-RFLPに基づく葉緑体DNA変異

辻 耕治^{1)*}・柳田萌花²⁾・大迫敬義³⁾

¹⁾千葉大学・教育学部

²⁾千葉大学・教育学部・学部学生

³⁾京都府立大学・生命環境科学研究科

Chloroplast DNA Variability in Cape Futtsu Populations of Wild Radishes *Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroides* Based on PCR-RFLP

TSUJI Koji^{1)*}, YANAGITA Moeka²⁾ and OHSAKO Takanori³⁾

¹⁾Faculty of Education, Chiba University, Japan

²⁾Undergraduate Student, Faculty of Education, Chiba University, Japan

³⁾Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University, Japan

千葉県富津岬に自生するハマダイコン6集団について、葉緑体DNAの3領域を対象にPCR-RFLPに基づく変異を調査した。供試したハマダイコン集団と栽培ダイコンの間の遺伝的交流の可能性についても考察するため、同様の手法で栽培ダイコン10集団も調査した。その結果(1)ハマダイコンの集団内変異に着目すると、5集団は単型、1集団は多型であること(2)単型5集団のうち、岬の付け根に近い地域の4集団と岬の先端付近の1集団は異なるハプロタイプで構成されていること(3)多型1集団は、岬の先端付近の1集団と同じハプロタイプと、いずれの単型ハマダイコン集団にも存在しないハプロタイプの2種類で構成されていること(4)これら岬の先端付近の1集団と多型1集団に共通で存在するハプロタイプと、多型1集団にのみ存在するハプロタイプは、いずれも栽培ダイコンにも存在することなどが明らかとなった。

キーワード：ハマダイコン (Wild radish), 富津岬 (Cape Futtsu), 葉緑体DNA (Chloroplast DNA), 変異 (Variability), PCR-RFLP (PCR-RFLP)

1. 緒 論

ハマダイコン *Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroides* は日本、韓国など東アジアの海岸域に自生するアブラナ科越年生草本である。ハマダイコンは栽培型ダイコンと同種に分類され、交雑可能である。ハマダイコンと栽培ダイコンの関係については、ハマダイコンは栽培ダイコンが逸出したものであるという説と、ハマダイコンは純然たる野生植物であり栽培ダイコンと同時にあるいは前後してヨーロッパないし西アジアから伝播してきたとする説がある。ハマダイコンには栽培ダイコン品種にはほとんど見られない雄性不稔細胞質ならびに核ゲノムにコードされる稔性回復遺伝子が高頻度で観察される (Yamagishi and Terachi 1996; Yamagishi 1998) ことから、ハマダイコンは栽培ダイコンとは起源を異にする変種であるという考え方が近年では優勢である (山岸2006)。

ハマダイコンの遺伝的多様性についてはこれまで形態形質 (Yamaguchi 1987), アロザイム (Huh and Ohnishi 2001), AFLP (Huh and Ohnishi 2002), 葉緑体DNAの

PCR-RFLP (Ohsako and Ohnishi 2007), マイクロサテライト (Ohsako et al. 2010; Han et al. 2015), 葉緑体ゲノムならびに核ゲノム遺伝子塩基配列 (Han et al. 2015; Han et al. 2022), ddRAD-Seq (Kobayashi et al. 2020), SSR-Seq (Li et al. 2021) などの手法により明らかにされてきた。これらの研究から、ハマダイコン自然集団内に遺伝的変異が維持されていること、集団間では一定程度の遺伝子流動が生じながらも全体としては空間遺伝構造が保持されていることが明らかとなってきた。

近年のゲノムデータの解析からは、東アジアの栽培ダイコンはヨーロッパの栽培ダイコンよりハマダイコンと遺伝的に近縁であり (Han et al. 2022), ハマダイコンと東アジアの栽培ダイコンとの間で遺伝子流動が起こっていたこと (Li et al. 2021) が示されており、ハマダイコンが東アジアの栽培ダイコンの多様性に寄与した可能性がある。さらに、細胞質雄性不稔ならびにその原因遺伝子の解析から、小瀬菜ダイコンや佐波賀ダイコンといった日本の在来品種がハマダイコン起源であることが示されており (山岸2003; 山岸2006), ハマダイコンと東アジアのダイコン品種群の間には密接な関係が認められる。ハマダイコンからの栽培化は現代においても試みられており、例えば出雲半島に自生するハマダイコンを基にし

*連絡先著者：辻 耕治 tsujikoji684@chiba-u.jp

た選抜育種により新品種が作出されている（伴ら2009）。

これまでに、日本国内のハマダイコン自生集団のDNAマーカーに基づく遺伝的変異についての報告は、前出の引用文献の他にも複数あるが（Yamagishi et al. 1998; Yamane et al. 2005; Yamane et al. 2009; 瀬戸口2017）、千葉県内の自生集団を調査対象の主眼とした報告は見あたらない。千葉県は、三方を海に囲まれ長い海岸線を持つことから、ハマダイコンの自生に適した環境が広域に広がっている地域と言える。そこで本研究では、千葉県全域のハマダイコン自生集団の遺伝的変異の調査の端緒として、千葉県富津市の富津岬の自生地に焦点をあてて調査を行うこととした。また本研究では、栽培ダイコンも供試することで、富津岬に自生するハマダイコンと栽培ダイコンの間の遺伝的交流の可能性についても考察することとした。

2. 材料と方法

2-1. 供試サンプル

供試したハマダイコンと栽培ダイコンを表1に示した。ハマダイコンは、千葉県富津市の富津岬に自生する6集団を用いた。2021年5月に各自生地で任意の5個体について種子を収集した。収集した種子は、個体ごとに鉢で播種・栽培し、個体ごとに若葉からトータルDNAを抽出した。栽培ダイコンは、農研機構遺伝資源研究センタージーンバンクのコレクションのうち10集団を用いた。ハマダイコンと同様に、各集団5個体について若葉からトータルDNAを抽出した。すなわち、ハマダイコンについては合計6集団30個体、栽培ダイコンについては合計10集団50個体をPCR-RFLPの調査対象とした。

2-2. PCR-RFLP

PCR-RFLPは、Ohsako and Ohnishi (2007) を一部改変して行った。具体的には以下のとおりである。

各個体からのトータルDNAの抽出にはCTAB法を用いた。PCRのプライマーには、Ohsako and Ohnishi (2007) で報告されているもののうち、*rps4-trnL*、*psaA-ycf3*および*trnL-ndhJ*の葉緑体DNAの3領域それぞれに対応したものを用いた。PCR反応液の組成は、総量50 μ L、DNA 100 ng、プライマー各500 nM、KOD-Multi & Epi（東洋紡、日本）1 unit、dNTPs 1 mMとした。PCRサイクルは、94 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C 15秒、72 $^{\circ}$ C 3分を28サイクルとした。PCR産物の制限酵素処理には、*rps4-trnL*および*trnL-ndhJ*領域のPCR産物については*MboI*、*psaA-ycf3*領域のPCR産物については*DdeI*を用いた。制限酵素反応液の組成は、いずれの場合も総量20 μ L、PCR産物16 μ L、制限酵素20 unitsとした。PCR-RFLP産物の電気泳動による検出には、2.0%のAgarose21（ニッポンジーン、日本）と1xTAEバッファーを用いた。検出用の蛍光試薬にはミドリグリーンダイレクト（日本ジェネティックス、日本）を用いた。100 Vで30分の電気泳動の後、波長500 nmのLED照射下で検出を行った。

2-3. データ分析

各PCR産物と制限酵素の組合せについて、アガロースゲル電気泳動で検出されたバンドパターンを目視で分類した。検出されたそれぞれのバンドパターンを対立遺伝子、3つの対立遺伝子の組合せをハプロタイプとして取り扱った。各集団に存在する対立遺伝子およびハプロタイプの種類・頻度に基づき、集団内・集団間の遺伝的多様性、集団の分化、ハマダイコンと栽培ダイコン間の遺伝子流動の可能性について考察した。

表1. 供試集団

集団	アクセッション番号 No.	アクセッション番号 またはJP番号**	収集地点		品種和名	原産地
			緯度	経度		
ハマダイコン	1	20210529-1	35 $^{\circ}$ 18' 52" N	139 $^{\circ}$ 48' 11" E		
	2	20210529-2	35 $^{\circ}$ 18' 49" N	139 $^{\circ}$ 47' 55" E		
	3	20210529-4	35 $^{\circ}$ 18' 49" N	139 $^{\circ}$ 47' 42" E		
	4	20210529-5	35 $^{\circ}$ 18' 47" N	139 $^{\circ}$ 47' 24" E		
	5	20210529-6	35 $^{\circ}$ 18' 45" N	139 $^{\circ}$ 47' 14" E		
	6	20210529-7	35 $^{\circ}$ 18' 24" N	139 $^{\circ}$ 48' 48" E		
栽培ダイコン*	1	27094			松本地ダイコン	日本（長野）
	2	27150			三浦（三浦分場系）	日本（神奈川県）
	3	27248			沖縄在来	日本（沖縄）
	4	27254			赤ダイコン	日本（熊本）
	5	43239			中生聖護院大根	日本（京都）
	6	76692			仙台地大根	日本（宮城）
	7	80938			RED RADISH ELONGATED	ロシア
	8	80941			桜島大根	日本（桜島）
	9	86225			PAK-10431	パキスタン
	10	103519			秋艶	中国

*農研機構遺伝資源研究センタージーンバンクのコレクション

**ハマダイコンについてはアクセッション番号、栽培ダイコンについてはJP番号

3. 結 果

アガロースゲル電気泳動像の例を図1～3に示した。

*rps4-trnL*領域のPCR産物を*Mbo*Iで処理した産物について、各集団の個体No.1についての電気泳動像が図1である。この領域・制限酵素の組合せで検出された対立遺伝子は3種類であった。具体的には、図1中のハマダイコン集団No.1, 2, 3, 6を対立遺伝子A、ハマダイコン集団No.4, 5と栽培ダイコン集団No.3, 5, 6, 9を対立遺伝子B、栽培ダイコン集団No.1, 2, 4, 7, 8, 10を対立遺伝子Cとした。

*psaA-ycf3*領域のPCR産物を*Dde*Iで処理した産物について、各集団の個体No.1についての電気泳動像が図2で

ある。この領域・制限酵素の組合せで検出された対立遺伝子は2種類であった。具体的には、図2中のハマダイコン集団No.1, 2, 3, 4, 5, 6と栽培ダイコン集団No.3, 5, 6, 9を対立遺伝子D、栽培ダイコン集団No.1, 2, 4, 7, 8, 10を対立遺伝子Eとした。

*trnL-ndhF*領域のPCR産物を*Mbo*Iで処理した産物について、各集団の個体No.1についての電気泳動像が図3である。この領域・制限酵素の組合せで検出された対立遺伝子は2種類であった。具体的には、図3中のハマダイコン集団No.1, 2, 3, 6と栽培ダイコン集団No.1, 2, 4, 7, 8, 10を対立遺伝子F、ハマダイコン集団No.4, 5と栽培ダイコン集団No.3, 5, 6, 9を対立遺伝子Gとした。

検出された各個体の対立遺伝子の組合せ、すなわちハ

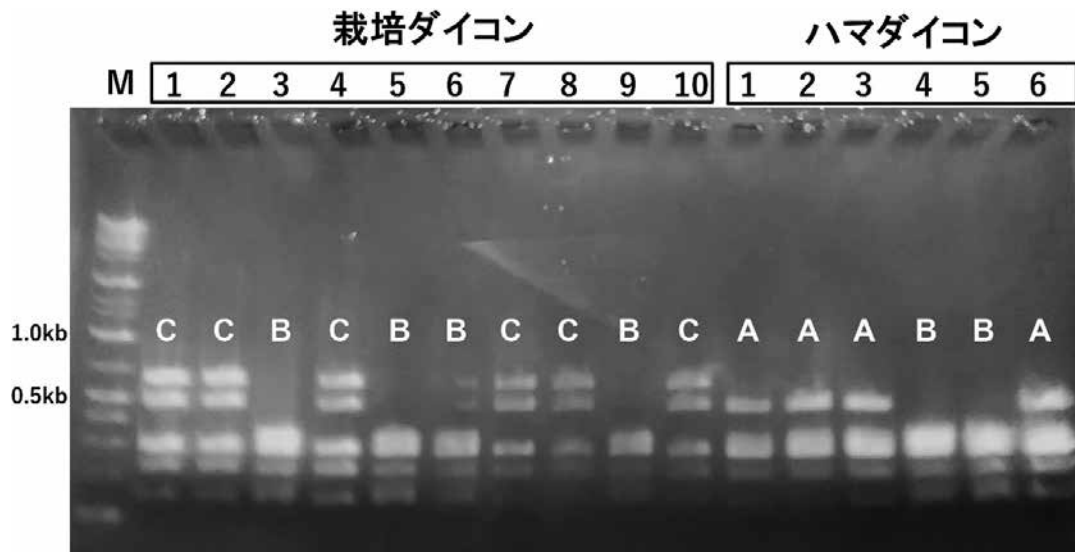


図1. PCR-RFLPの電気泳動像の例 (*rps4-trnL*/*Mbo*Iについて)

各集団の個体番号No.1についての電気泳動像。

各レーンの番号は表1の集団No.と対応。

各レーンのアルファベットは、バンドパターンに基づく対立遺伝子のタイプ。

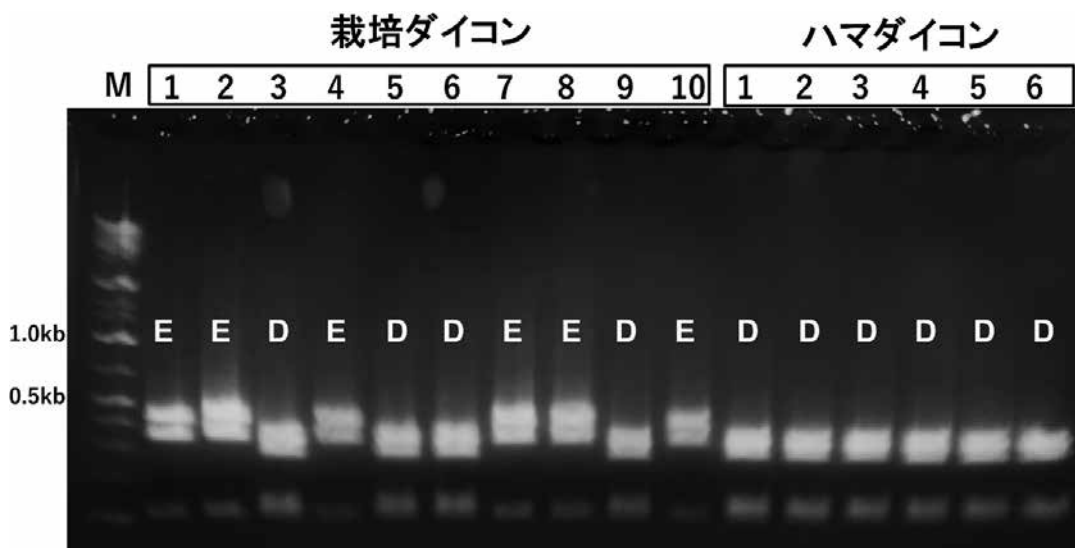


図2. PCR-RFLPの電気泳動像の例 (*psaA-ycf3*/*Dde*Iについて)

各集団の個体番号No.1についての電気泳動像。

各レーンの番号は表1の集団No.と対応。

各レーンのアルファベットは、バンドパターンに基づく対立遺伝子のタイプ。

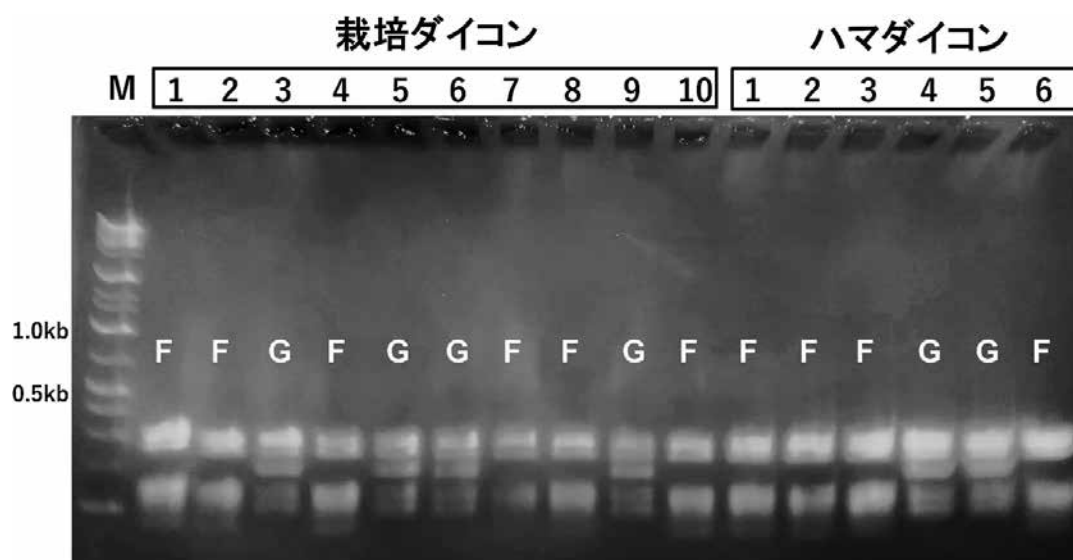


図3. PCR-RFLPの電気泳動像の例 (*trnL-ndhJ/Mbol*について)

各集団の個体番号No.1についての電気泳動像。

各レーンの番号は表1の集団No.と対応。

各レーンのアルファベットは、バンドパターンに基づく対立遺伝子のタイプ。

プロタイプを表2に示した。まずハマダイコンの集団内変異に着目すると、5集団は単型、1集団は多型であった。そして単型5集団のプロタイプに着目すると、集団No.1, 2, 3, 6はADF, 集団No.5はBDGであった。また多型1集団すなわち集団No.4は、集団No.5と同じプロタイプBDGと、いずれの単型ハマダイコン集団にも存在しないプロタイプCEFの2種類で構成されていた。次に栽培ダイコンの集団内変異に着目すると、9集団は単型、1集団は多型であった。そして単型9集団のプロタイプに着目すると、集団No.1, 2, 7, 8, 10はCEF, 集団3, 5, 6, 9はBDGであった。また多型1集団すなわち集団No.4は、各単型集団のプロタイプCEFとBDGの2種類で構成されていた。

4. 考 察

4-1. 富津岬におけるハマダイコン集団のプロタイプの構成と地理的分布

ハマダイコン各集団のプロタイプの構成を地図上にプロットした(図4)。集団内の多型が検出されたのは集団No.4のみで、集団No.1, 2, 3, 5, 6は単型であった。各集団の所在地とプロタイプに着目すると、岬の付け根に近い地域の単型集団No.1, 2, 3, 6のプロタイプはADF, 岬の先端付近の地域の単型集団No.5のプロタイプはBDGであった。そして、地理的にこれら2つのグループの中間に位置する多型集団No.4のプロタイプは、集団No.5と共通のBDGといずれの単型ハマダイコン集団にも存在しないCEFの2種類で構成されていた。すなわち、(1)富津岬のハマダイコン集団には3つのプロタイプが存在すること、(2)それら3つのプロタイプは地理的な位置と関係して分化していること、(3)集団No.4と集団No.5の間には遺伝的交流の可能性があるとなどが明らかとなった。

4-2. 栽培ダイコン集団のプロタイプの構成

栽培ダイコンのうち集団内の多型が検出されたのは集団No.4のみで、その他の集団No.1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10は単型であった。単型であった9集団のプロタイプに着目すると、集団No.1, 2, 7, 8, 10はCEF, 集団No.3, 5, 6, 9はBDGであった。一方多型集団No.4のプロタイプは、集団No.1, 2, 7, 8, 10と共通のCEF, 集団No.3, 5, 6, 9と共通のBDGの2種類で構成されていた。すなわち、(1)供試した栽培ダイコン集団には2種類のプロタイプが存在すること、(2)多くの集団は単型でどちらか一方のプロタイプで構成されていること、(3)中には多型で両方のプロタイプで構成されている集団もあることなどが明らかとなった。

4-3. ハマダイコンと栽培ダイコン間の遺伝的交流

富津岬のハマダイコン集団で検出されたプロタイプは、ADF, BDG, CEFの3種類であった。一方、供試した栽培ダイコン集団で検出されたプロタイプはBDG, CEFの2種類であった。すなわち、栽培ダイコン集団で検出されたプロタイプBDG, CEFは富津岬のハマダイコン集団にも存在することが明らかとなった(図5)。この結果は、富津岬のハマダイコン集団と栽培ダイコンの間には遺伝的交流があり得ることを示すものと考察する。

4-4. 保全の重要性

本研究により、富津岬に自生するハマダイコンは遺伝的多様性を含むとともに、栽培ダイコンとの間での遺伝的交流をうかがわせる興味深い集団であることが明らかとなった。貴重な自生集団として、その保全の重要性を提言したい。

表2. 各個体の葉緑体DNA 3領域についてのハプロタイプ

	集団No.	個体No.				
		1	2	3	4	5
ハマダイコン	1	ADF	ADF	ADF	ADF	ADF
	2	ADF	ADF	ADF	ADF	ADF
	3	ADF	ADF	ADF	ADF	ADF
	4	BDG	CEF	CEF	BDG	BDG
	5	BDG	BDG	BDG	BDG	BDG
	6	ADF	ADF	ADF	ADF	ADF
栽培ダイコン	1	CEF	CEF	CEF	CEF	CEF
	2	CEF	CEF	CEF	CEF	CEF
	3	BDG	BDG	BDG	BDG	BDG
	4	CEF	BDG	CEF	BDG	CEF
	5	BDG	BDG	BDG	BDG	BDG
	6	BDG	BDG	BDG	BDG	BDG
	7	CEF	CEF	CEF	CEF	CEF
	8	CEF	CEF	CEF	CEF	CEF
	9	BDG	BDG	BDG	BDG	BDG
	10	CEF	CEF	CEF	CEF	CEF

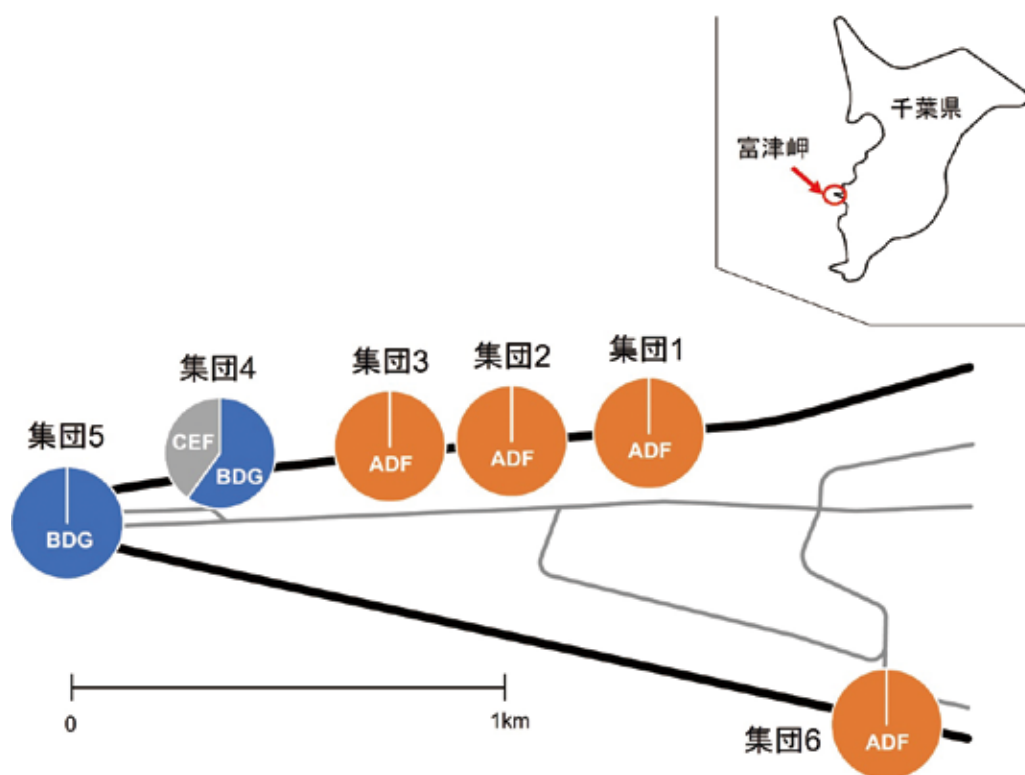


図4. 富津岬のハマダイコン6集団の収集地点と各集団のハプロタイプの構成

5. 謝 辞

本研究に供試した栽培ダイコン10集団は、農研機構遺伝資源研究センターから農業生物資源ジーンバンク事業により配布いただきました（配布通知書「3遺伝第0302001号」）。感謝申し上げます。

6. 引用文献

伴塚也, 小林伸雄, 本谷宏志, 門脇正行, 松本真悟 (2009) ハマダイコンの栽培化と利用について. 園学研 8, F 413-417.
 Han Q., Higashi H., Mitsui Y., Setoguchi H. (2015) Distinct phylogeographic structures of wild radish (*Raphanus sativus* L. var. *raphanistroides* Makino) in Japan. PLoS ONE 10, e0135132.

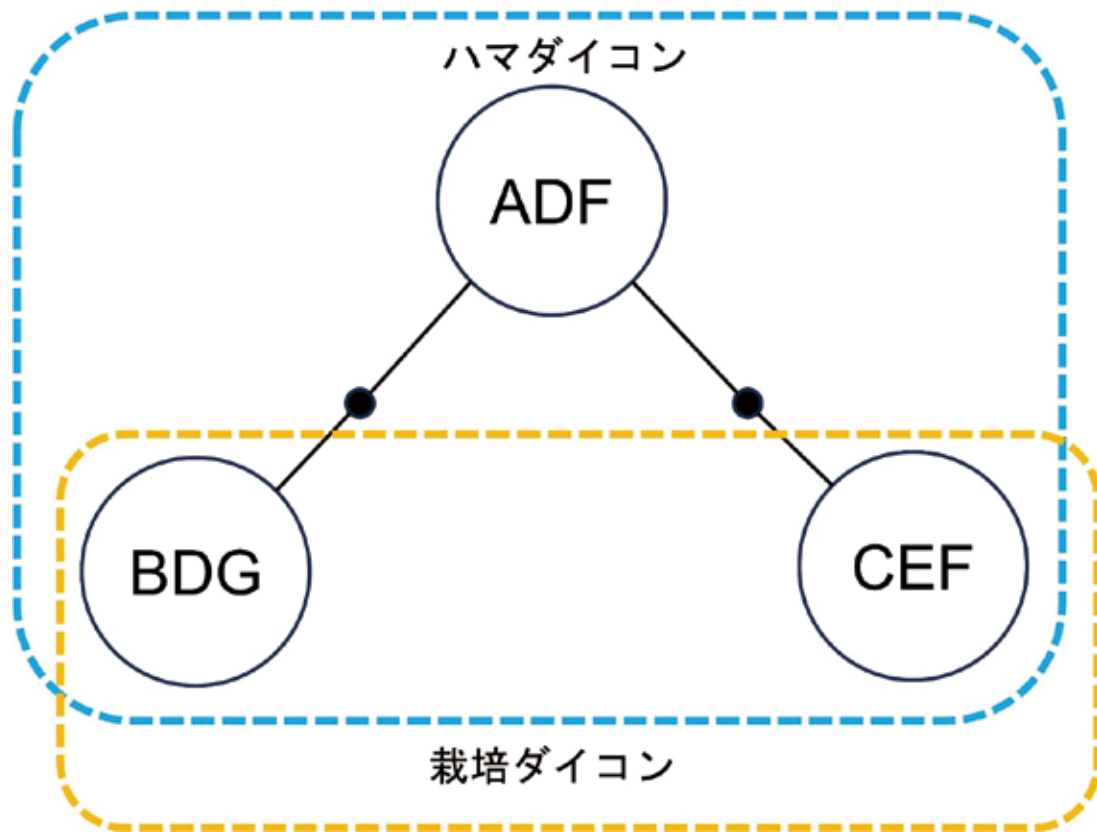


図5. ハプロタイプに基づくハマダイコンと栽培ダイコンの関係

- Han Q., Li J., Shen H., Sakaguchi S., Isagi Y., Setoguchi H. (2022) Genetic diversity and population structure of wild radish in east Asia. *J. Animal Plant Sci.* 32, 1110-1119.
- Huh M.K., Ohnishi O. (2001) Allozyme diversity and population structure of Japanese and Korean populations of wild radish, *Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroides* (Brassicaceae). *Genes Genet. Syst.* 76, 15-23.
- Huh M.K., Ohnishi O. (2002) Genetic diversity and genetic relationships of East Asian natural populations of wild radish revealed by AFLP. *Breeding Sci.* 52, 79-88.
- Kobayashi H., Shirasawa K., Fukino N., Hirakawa H., Akanuma T., Kitashiba H. (2020) Identification of genome-wide single-nucleotide polymorphisms among geographically diverse radish accessions. *DNA Res.* 27, 1-8.
- Li X., Wang J., Qiu Y., Wang H., Wang P., Zhang X., Li C., Song J., Gui W., Shen D., Yang W., Cai B., Liu L., Li X. (2021) SSR-sequencing reveals the inter- and intraspecific genetic variation and phylogenetic relationships among an extensive collection of radish (*Raphanus*) germplasm resources. *Biology* 10, 1250.
- Ohsako T., Ohnishi O. (2007) Chloroplast DNA variability in Japanese and Korean populations of wild radishes *Raphanus sativus* var. *hortensis* f. *raphanistroides* (Brassicaceae). 京都府立大学学術報告 人間環境学・農学 59, 27-34.
- Ohsako T., Hirai M., Yamabuki M. (2010) Spatial structure of microsatellite variability within and among populations of wild radish *Raphanus sativus* L. var. *hortensis* Backer f. *raphanistroides* Makino (Brassicaceae) in Japan. *Breed. Sci.* 60, 195-202.
- 瀬戸口浩彰 (2017) 海浜植物群落の保全と復元について：系統地理学と集団遺伝学からの提言. *景觀生態学* 22, 43-51.
- Yamagishi H., Terachi T. (1996) Molecular and biological studies on male-sterile cytoplasm in toe Cruciferae. III. Distribution of Ogura-type cytoplasm among Japanese wild radishes and Asian radish cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 93, 325-332.
- Yamagishi H. (1998) Distribution and allelism of restorer genes for Ogura cytoplasmic male sterility in wild and cultivated radishes. *Genes Genet. Syst.* 73, 79-83.
- 山岸博 (2003) ミトコンドリアの遺伝子が示す‘小瀬菜’ダイコンの起源. *農業および園芸* 78, 1056-1059.
- 山岸博 (2006) 栽培, 野生ダイコンにおける系統分化とオグラ型雄性不稔細胞質の起源. *育種学研究* 8, 106-112.
- Yamagishi H., Tateishi M., Terachi T., Murayama S. (1998) Genetic relationships among Japanese wild radishes (*Raphanus sativus* f. *raphanistroides* Makino), cultivated radishes and *R. raphanistrum* revealed by RAPD analysis. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 67, 526-531.
- Yamaguchi H. (1987) Latitudinal cline and intrapopulation differentiation in leaf shape of wild radish in Japan. *Japan.*

- J. Breed. 37, 54-64.
- Yamane K., Lu N., Ohnishi O. (2005) Chloroplast DNA variations of cultivated radish and its wild relatives. Plant Sci. 168, 627-634.
- Yamane K., Lu N., Ohnishi O. (2009) Multiple origins and high genetic diversity of cultivated radish inferred from polymorphism in chloroplast simple sequence repeats. Breeding Sci. 59, 55-65.