

葉緑体 DNA の制限酵素断片長多型 (RFLP) を利用した サトイモとその近縁種の類縁関係分析

落合 利紀・田原 誠・吉野 熙道

(生物機能開発学講座)

Phylogenetic Relationships of Taro and Allied Species Based on Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) of Chloroplast DNA

Toshinori Ochiai, Makoto Tahara and Hiromichi Yoshino

(Department of Biological Function)

Phylogenetic relationships among 51 accessions of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott), *C. gigantea* Hook, *Alocasia macrorrhiza*, *A. odora*, *Xanthosoma sagittifolium* and *Schismatoglottis* spp. were investigated using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of chloroplast DNA. The phylogenetic tree using the Neighbor Joining (NJ) method revealed that *Xanthosoma* and *Schismatoglottis* genera were distantly related to *Colocasia* and *Alocasia* genera. Among *Colocasia* and *Alocasia* accessions, *C. esculenta* accessions formed a single cluster. However *C. gigantea* accessions were related to *Alocasia* species more closely than taro. The variations in chloroplast DNA among taro accessions were found to be too small to establish significant grouping of the accessions. However, four accessions of taro, which were thought to be inter-generic or inter-specific hybrids, formed an independent cluster. Based on the banding pattern of the RFLP, the plant in genus *Colocasia* appeared to be the maternal parent of these four accessions.

Key words : *Colocasia esculenta*, chloroplast DNA, RFLP analysis, phylogeny

緒 言

サトイモ (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) は、有史以前から栽培されており、東南アジアやオセアニアなどで、主食あるいは野菜として利用されている重要な作物である¹²⁾。サトイモの起源地は、野生型の分布及び形態的な多様性によりインドからマレー半島にかけての熱帯地域とされているが、ネパール・中国・オセアニア・沖縄などの地域にも野生型サトイモや、野生化したと思われるサトイモが広く自生している^{7,15,18)}。これらの野生型サトイモは、貴重な遺伝資源であるが¹⁴⁾、栽培種や野生種との類縁関係については不明な点が多い。

近年、DNA 塩基配列やアミノ酸配列などに存在する多型を分析する分子生物学的手法が発達し、これ

らの情報をもとに、生物の進化過程や類縁関係を推定する統計学的手法が開発されている。その一環として、葉緑体 DNA に存在する塩基配列の変異をもとに、類縁関係の分析を行う試みが多数の植物で実施されている¹⁷⁾。葉緑体 DNA の多型が植物の進化や類縁関係の調査に利用される理由として、(1) 葉緑体は原核生物由来であり、すべての植物の葉緑体は単一の共通祖先から分岐したと仮定できること、(2) 多くの植物において葉緑体は母系遺伝をし、交配による遺伝子の組換えがないので、変異は母方の祖先種に生じたものが蓄積されたものとみなせること、(3) 葉緑体 DNA の進化速度は核やミトコンドリア DNA より遅く、種や属レベルでの分類に適している

Received October 1, 1999

ことなどがあげられる。サトイモの葉緑体 DNA の多型については、Yoshino による制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析¹⁸⁾や、Tahara らによる遺伝子非コード領域の塩基置換にもとづく類縁関係の調査¹³⁾が行われている。Yoshino は、ネパールで収集した系統の一部は、*Alocasia macrorrhiza* と同型の葉緑体ゲノムを持ち、これらの系統が属間雑種の可能性があることを報告している。Tahara らは、調査した2領域のうち、リボソームタンパク質 *rpl16* と *rpl14* のリンカー領域では、塩基配列の変異が全く見られず、別の *trn L* と *trn F* の遺伝子間領域では、属間レベルでの有意な変異を観察している。特定の遺伝子領域における塩基配列の調査は、系統間などに存在する変異を正確に定量することが可能であるが、塩基配列の決定は、多大な労力と費用を必要とするので、多くの遺伝子領域を対象とするのは困難である。一方、RFLP は利用するプローブと制限酵素の組合せにより、比較的簡易に多くの遺伝子領域における塩基配列の変異やゲノムそのものの構造変異を検出することが可能である。

そこで、本研究では東アジアで収集されたサトイモとその近縁種について、葉緑体 DNA の RFLP 分析を行い、それらの類縁関係を調査した。

材料および方法

供試材料

本研究では、サトイモ連 (Tribe *Colocasieae*) に属する *C. esculenta* (42系統)、*C. gigantea* (3系統)、*Alocasia odora* (1系統)、*A. macrorrhiza* (2系統)、カラジウム連 (Tribe *Caladieae*) の *Xanthosoma sagittifolium* (2系統) およびスキスマトグロティス連 (Tribe *Schismatoglottideae*) の *Schismatoglottis* spp. (1系統) を材料として使用した (Table 1)。これらは1973年から1996年にかけてネパール・タイ・中国などで収集され、岡山大学農学部において栽培及び維持されている。これらの植物学的分類は、主に、Hotta による分類⁴⁾に従い、一部の系統に関しては、Engler and Krause の分類²⁾に従った。

葉緑体 DNA を含む total DNA の抽出は、Ramser の CTAB (Cethylmethylammonium bromide) 法¹⁴⁾を用いた。DNA 抽出後、分光光度計で DNA 溶

液の濃度及び純度を計測した。

制限酵素による Total DNA の切断およびサザンブロットティング

サトイモの total DNA の切断には、*Bam*HI, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind* III, *Xba*I 及び *Xho*I (New England Biolabs, Lnc.) の7種類の制限酵素を用いた。DNA 10 μ g, 制限酵素25U, 10 \times buffer 3 μ l を 0.5ml チューブに取り、滅菌水で30 μ l に調整し、37 $^{\circ}$ C で一晩インキュベーションした。なお、*Bam*HI \cdot *Eco*RV \cdot *Xba*I \cdot *Xho*I には100 \times BSA 0.3 μ l を加え、上記と同様の処理を行った。酵素処理した DNA 溶液 3 μ l をミニゲルで泳動し、DNA が切断されたことを確認した。

消化が確認された DNA 溶液 9 μ l を取り、0.8% アガロースゲルで35V (0.8V/cm)、20時間泳動した。泳動後、ゲルを0.1 μ g/ml エチジウムブロマイドで染色し、泳動した距離を確認して、ブロットティングを行った。ブロットティングは、Maniatis らの方法⁹⁾を使用し、ゲル中の DNA をナイロンメンブレンに移動させた。その後、メンブレンを洗浄・乾燥させオーブンで120 $^{\circ}$ C、15分間の焼き付けを行い、DNA をメンブレンに固定した。

プローブの作成及びサザンハイブリダイゼーション

Terauchi ら¹⁶⁾により、制限酵素地図が明らかにされたヤマノイモ (*Dioscorea bulbifera* および *D. opposita*) の葉緑体 DNA の *Bam*HI 断片 (B 5, B 6) および *Sal*I 断片 (S 4, S 5, S 7) の5断片をプローブとして用いた。これらの5断片は、pUC 19のマルチクローニングサイト (*Bam*HI, *Sal*I サイト) に組み込まれた状態であったため、大腸菌 (XLI-Blue 株) の形質転換を行い、LB (Luria-Bertani) 液体培地で増殖した。大腸菌からのプラスミド DNA の回収は、アルカリ法⁵⁾により行った。プラスミドに組み込まれた葉緑体 DNA は、B 5, B 6については *Bam*HI で、S 4, S 5, S 7については *Sal*I で消化し、0.8% 低融点アガロースゲルによる電気泳動で、葉緑体 DNA 断片を分離した。この葉緑体 DNA 断片を含むゲルの部分から、葉緑体 DNA 断片を回収し、プローブとして使用した。プローブの DIG (Digoxigenine) 標識・サザンハイブリダイゼーション・検出には、DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用い、用法に従った¹¹⁾。

Table 1 Plant materials used for RFLP analysis of chloroplast DNA in *Colocasia* and allied species

NO.	Accession	Species	Type	Origin	Ploidy level	NO.	Accession	Species	Type	Origin	Ploidy level
1	C81005	Cea	W	N	2x	27	TC8601	Cee	CV	T	2x
2	C81019	Cea	W	N	2x	28	C87001	Cea	W	S	2x
3	C81023	Cea	W	N	2x	29	C93100	Cee	CV	E	3x
4	C81027	Cea	W	N	2x	30	C95503	Cee	CV	J	3x
5	C81045	Cea	W	N	2x	31	CN95002	Cea	W	CN	2x
6	C81073	Ce	W	N	2x	32	CN95003	Ce	W	CN	3x
7	C81079.3	Cea	W	N	2x	33	CN95004	Cee	CV	CN	3x
8	C81080.1	Cea	W	N	2x	34	CN95005	Cee	CV	CN	2x
9	C81081	Cea	W	N	2x	35	CN95011	Cea	W	CN	2x
10	C81101	Cee	CV	N	3x	36	CN95015	Cee	CV	CN	3x
11	C81111	Cee	CV	N	3x	37	CN95031	Cee	CVT	CN	2x
12	C81113	Cee	CV	N	3x	38	NG9502	Cee	CV	PNG	2x
13	C81125	Cee	CV	N	2x	39	NG9504	Cee	CVT	PNG	2x
14	C81126	Ce	W	N	2x	40	C96005	Cee	CV	VN	3x
15	C81135	Cea	W	N	2x	41	C96006	Cee	CV	VN	3x
16	C81142	Cee	CV	T	3x	42	C96007	Cee	CV	VN	3x
17	KUYE373	Ce	W	N	3x	43	C95101	Cg	CV	J	2x
18	KUYE474	Ce	W	N	2x	44	CN95036	Cg	W	CN	2x
19	CL8203	Cea	W	RJ	2x	45	C96004	Cg	CV	VN	2x
20	CL83006	Cee	CV	RJ	3x	46	A9516	Ao	W	-	-
21	CL83019	Cea	W	RJ	2x	47	A9519	Ao	W	-	-
22	CL83022	Cea	W	RJ	2x	48	NG9503	Am	W	PNG	-
23	CL83027	Cea	W	RJ	2x	49	J9508.2	Xs	CV	I	-
24	TC83013	Cea	W	T	2x	50	C96003	Xs	CV	VN	-
25	TC83014	Cea	W	T	2x	51	TC83021	S	W	T	-
26	C84001	Cee	CV	I	2x						

Abbreviations:

Species:

Ce: *C. esculenta*,
 Cea: *C. esculenta* var. *aquatilis*,
 Cee: *C. esculenta* var. *esculenta*,
 Cg: *C. gigantea*,
 Am: *Alocasia macrorrhiza*,
 Ao: *A. odora*,
 Xs: *Xanthosoma sagittifolium*,
 S: *Schismatoglottis* spp.

Type:

CV: Cultivar,
 CVT: Cultivated type,
 W: Wild.

Origin:

CN: Yunnan (China),
 E: Ethiopia,
 I: Indonesia,
 J: Japan,
 N: Nepal,
 PNG: Papua New Guinea,
 RJ: The Ryukyu Islands (Japan),
 S: Seychelles,
 T: Thailand,
 V: Vietnam.

ブロッキングしたメンブレンをハイブリバッグに入れ、Hybridization buffer (5× SSC, 1% Blocking reagent, 0.1% N-Lauroylsarcosine, 0.02% SDS) 40mlに浸漬して、68℃で12時間プレハイブリを行った。Hybridization buffer を新しい Hybridization buffer 7mlと交換し、直前に変成したプローブ溶液を10μl加え、68℃、16時間インキュベーションした。余分なプローブを取り除くため、

50mlの0.1% SDS を含む2× SSC 溶液により室温で5分間、2回洗浄し、さらに、50mlの0.1% SDS を含む0.1× SSCにより68℃で15分間、2回洗浄した。

続いて、メンブレンを Washing buffer (0.3% Tween-20を含む buffer 1 (0.1M マレイン酸バッファー, pH 7.5)) で1分間簡単に洗浄し、100mlの buffer 2 (1% Blocking reagent を含む buffer 1)

で30分間インキュベーションした後、前述の buffer 2 と抗体溶液 (20ml buffer 2 に 2 μ l Anti-DIG-Alkaline phosphatase を添加) を入れ替え、30分間インキュベーションした。非結合抗体を取り除くため、100ml Washing buffer で、15分間、2回、洗浄し、20ml の Buffer 3 (0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1 M NaCl, 50mM MgCl₂) に5分間浸し、pH 7.5 から pH 9.5 に平衡化した。ラップフィルムの上にメンブレンを置き、Lumi-Phos 530 (和光純薬) 1 ml を均一になるよう滴下し、Alkaline phosphatase の反応物質による発光をX線フィルムに6~12時間感光させ、DIG プローブとハイブリダイズした葉緑体 DNA を検出した。

遺伝距離の推定と系統樹の作成

RFLP の結果から、Nei and Li²⁾の公式を用いて、各系統間の制限酵素認識サイトあたりの塩基置換数 (遺伝距離) を推定した。系統学解析ソフトウェア PHILIP ver. 3.5³⁾ を用いて、前述の遺伝距離から、近隣接合法 (NJ 法) により、系統樹を作成した。この際、*Schismatoglottis* spp. をアウトグループとして使用した。

結果および考察

7種類の制限酵素と5種類のプローブとの35組合せのうち、24組合せではバンドの検出が可能であったが、他の組合せではメンブレンのバックグラウンドが強かったため、ハイブリダイズしたシグナルの検出が困難であった (Table 2, Fig. 1)。また、今回行った RFLP 分析では、約 1 Kb 以下の DNA 断片についてはバンドの正確な位置の記録が難しく、

Table 2 Combinations of chloroplast DNA probes and restriction endonucleases used for RFLP analysis

Restriction endonuclease	Probe				
	S4	S5	S7	B5	B6
<i>Bam</i> HI	+ ^{a)}	+	+	+	+
<i>Dra</i> I	+	+	+		
<i>Eco</i> RI			+	+	+
<i>Eco</i> RV	+		+	+	
<i>Hind</i> III			+	+	+
<i>Xba</i> I	+		+	+	+
<i>Xho</i> I			+	+	+

a) + shows probe and endonuclease combination with distinctive hybridization bands

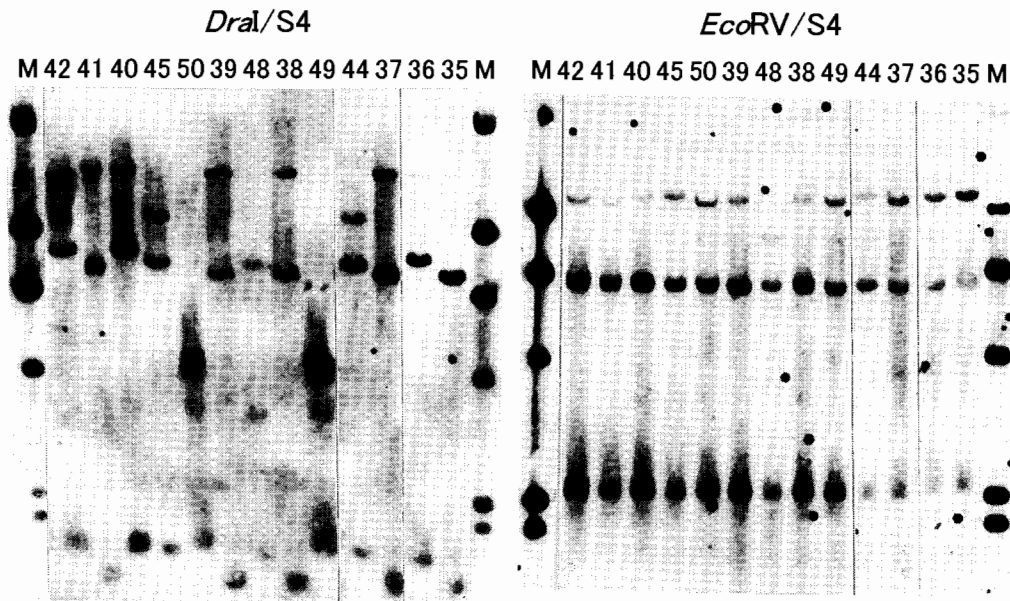


Fig. 1 Restriction fragment patterns of chloroplast DNA for taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, and allied species. Combinations of the restriction endonuclease and probe are *Dra*I/S4 (left) and *Eco*RV/S4 (right). The number over each lane indicates the number of plant materials in Table 1, and M indicates the lane for molecular size markers, λ DNA *Hind*III cut.

遺伝距離の推定には用いなかった。記録可能な24組合せについて、合計222のDNA断片が観察された。これらの断片のパターンは属間においてその差異が著しいが、*C. esculenta* 種内では多型があまりみられなかった。

NJ 法により作成した系統樹では、Tribe *Colocasieae* に属する系統は1個のクラスターを形成し、このクラスターは Tribe *Caladieae* や Tribe *Schismatoglottideae* の系統と遺伝的に離れていた (Fig. 2)。

Tribe *Colocasieae* のクラスターにおいては、*C. esculenta* が1個のクラスターを形成したが、*C. gigantea* については、*C. esculenta* の系統に含まれず、*Alocasia* 属の系統との遺伝距離が近いことが示された。これは、ミトコンドリアDNAのRFLPをもとにした調査⁷⁾やエステラーゼアイソザイムをもとにした類縁関係の調査¹⁰⁾の結果と一致している。また、過去における *C. gigantea* の分類学的位置付けは、必ずしも一定ではなく^{2,7)}、この種の分類学上の位置については、再検討する必要があるものと考えられる。

X. sagittifolium の2系統は、系統樹上では他の系統と最も離れた位置に存在している。これは、*X. sagittifolium* が新大陸起源の作物で、19~20世紀初頭にかけて、南太平洋から東南アジアに伝播したものの¹⁴⁾、アジアを中心とする *C. esculenta* とは独立的に進化したことを裏付けるものである。

C. esculenta の系統について推定された系統樹の樹型と、種内の変種・地域・倍数性などの特性の間特定の関係を見いだすことはできなかった。

Alocasia を母本とする *Colocasia* との属間雑種とされている KUYE474¹⁸⁾ と KUYE373, C81073 および C81126 の4系統は、独立した小クラスターを形成した。しかしこの小クラスターは *Alocasia* 属のクラスターではなく、*C. esculenta* のクラスターに含まれる形となり、Yoshino による葉緑体DNA分析¹⁸⁾の結果とは異なっていた。この原因として、今回の研究で用いた *Alocasia* 属の系統が Yoshino の使用したものと異なることと、用いた葉緑体DNAプロンプが異なることが考えられる。しかし、Viet によるアイソザイム分析⁹⁾では、これらの系統は *A. macrorrhiza* との属間雑種ではなく、*C. gigantea* との種間雑種の可能性が示されている。これら4系統

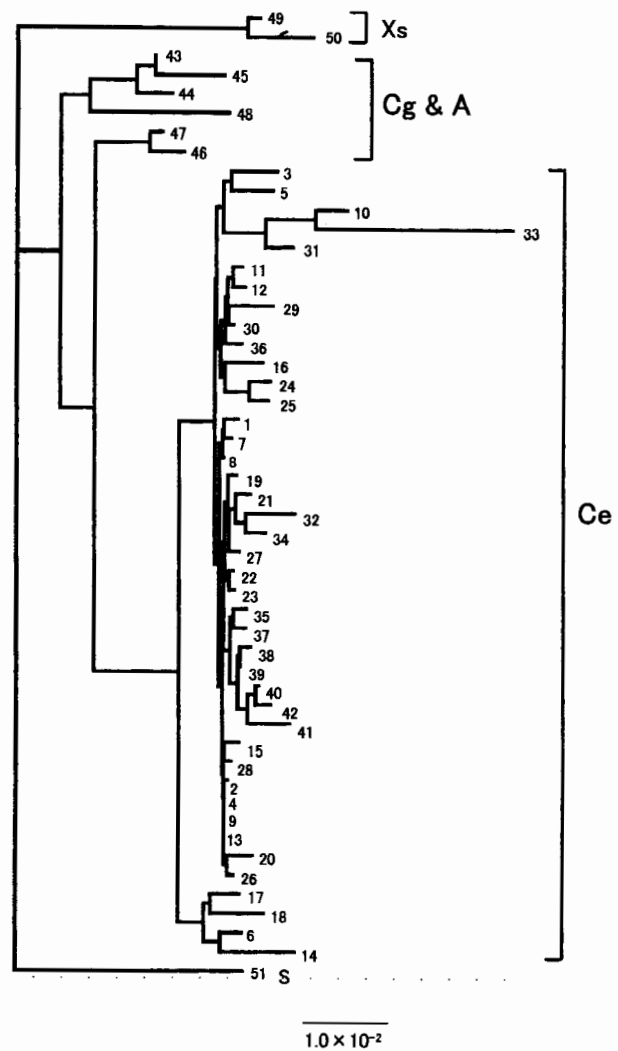


Fig. 2 Phylogenetic tree for accessions of taro and allied species obtained by the Neighbor Joining method based on the RFLP patterns of chloroplast DNA. Numbers indicate the number of plant materials in Table 1. Ce, Cg & A, Xs and S stand for *Colocasia esculenta*, *C. gigantea* and genus *Alocasia*, *Xanthosoma sagittifolium* and *Schismatoglottis*, respectively.

における断片のパターンは、制限酵素・プローブの24組合せのうち、20組合せでは、他の *C. esculenta* と類似したパターンを示していたが、4組合せにおいて、*C. esculenta* と *C. gigantea* との中間型のようなパターンを示した (Fig. 3)。このため、これらの系統が種間または属間雑種であるとすれば、*Colocasia* 属植物を母親にした交雑により生じたものと推測できる。

本研究では、葉緑体DNAのRFLP分析により、サトイモとその近縁種の類縁関係を調査した。その

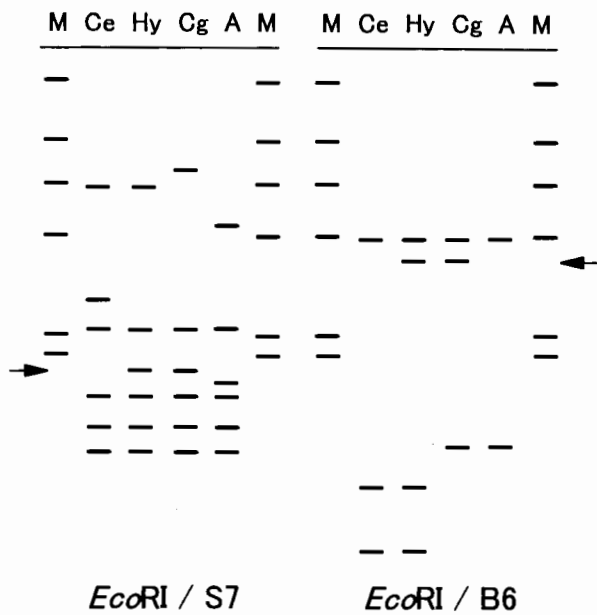


Fig. 3 Restriction fragment patterns of chloroplast DNA of *C. esculenta* accessions (Ce), putative hybrids (Hy), *C. gigantea* (Cg) and *Alocasia* species (A). Combinations of the restriction endonuclease and probe are *EcoRI*/S7 (left) and *EcoRI*/B6 (right). Arrows indicate the shared bands between hybrids and *C. gigantea*. M indicates the lane for molecular size markers, λ DNA *HindIII* cut.

結果、本研究で用いたプローブと制限酵素の組合せの範囲においては、属間の分類は可能であるが、*C. esculenta* 種内の変種の調査には、不十分であることが明らかとなった。*C. esculenta* 種内の分析には葉緑体 DNA よりも、より多くの変異が期待される核ゲノム DNA を対象とした Random amplified polymorphic DNA などの分析が必要であると考えられる。

摘 要

本研究では、サトイモ (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) とその近縁種である *Alocasia* 属、*Xanthosoma* 属および *Schismatoglottis* 属の植物51系統について、ヤマノイモ (*Dioscorea bulbifera* および *D. opposita*) の5種の葉緑体 DNA 断片をプローブとした RFLP 分析を行い、得られた RFLP をもとに、各系統間の遺伝距離 (制限酵素認識サイト当たりの塩基置換数) を推定し、近隣結合法により系統樹を作成した。

その結果、遺伝距離をもとにした系統樹において、*Xanthosoma* 属および *Schismatoglottis* 属の植物は、*Colocasia* 属および *Alocasia* 属の植物とは遺伝的に離れていることが示され、形態をもとにした従来の分類とよく一致していた。このことから、葉緑体 DNA の RFLP 多型による分類は、属以上のレベルで有効であることが示唆された。なお、*C. gigantea* は、同属の *C. esculenta* より *Alocasia* 属の系統との遺伝距離が近いことが示され、この種に関して、分類の見直しの必要性が示唆された。

今回の研究では、*C. esculenta* 種内に多型があまりみられず、*C. esculenta* 種内の変種・地域・倍数性などに関する解析は困難であった。しかし、属間あるいは種間雑種と思われる KUYE474 を含む4系統が、他の *C. esculenta* 系統とは異なるクラスターを形成した。これらの4系統における RFLP のパターンは、*C. esculenta* のものと類似しているが、*C. gigantea* の特徴も見受けられるので、これらの系統の母親は、少なくとも *Colocasia* 属の植物であることが示された。*C. esculenta* 種内の類縁関係調査には、葉緑体よりも多くの変異が見込まれる核ゲノム DNA を対象とした分析が必要である。

謝 辞

本研究を行うにあたり、プローブとして使用したヤマノイモの葉緑体 DNA 断片を快く提供していただいた岩手県生物工学研究所寺内良平博士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) ジゴキシゲニン-dUTP を用いたランダムプライムシステムによる DNA 標識, ELISA によるハイブリッド検出法 (DIG DNA Labeling and Detection Kit), Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Mannheim, Germany (1993)
- 2) Engler, A. and K. Krause: Araceae-Colocasiodeae. Das Pflanzenreich, pp. 41-115, Wilhelm Engelmann, Leipzig (1920)
- 3) Felsenstein, J.: PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle (1993)
- 4) Hotta, M.: A system of Family Araceae in Japan and adjacent areas I. Memoirs of the Faculty of Science, Kyoto University, Series of Biology, 9 (1), 72-96,

- (1970)
- 5) Maniatis, T., J. Sambrook, and E.F. Fritsch : Extraction and purification of plasmid DNA. Molecular Cloning 1. A laboratory manual. (Second edition), pp. 1.21-1.28, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
 - 6) Maniatis, T., J. Sambrook, and E.F. Fritsch : Analysis of genomic DNA by Southern Hybridization. Molecular Cloning 2. A laboratory manual. (Second edition) , pp. 9.45-9.46, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989)
 - 7) Matthews, P.J. : The origins, and dispersal and domestication of taro. Doctor thesis, the Australian National University (1990)
 - 8) Nei, M. and W.-H. Li : Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 5269-5273 (1979)
 - 9) Nguyen, V.X. : Isozyme variation and phylogenetic relationships in taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott, and related taxa. Doctor thesis, Okayama University, Japan (1998)
 - 10) Nguyen, V.X., H. Yoshino and M. Tahara : Phylogenetic analyses of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) and related species based on esterase isozymes. Sci. Rep. Fac. Agr. Okayama Univ., **87**, 133-139 (1997)
 - 11) Ramser, J. : A protocol for oligonucleotide DNA fingerprinting of plant species. (Personal communication), Plant molecular biology group, Frankfurt Univ., Germany (1992)
 - 12) 佐々木高明 : 照葉樹林文化の道, 日本放送出版協会, 東京 (1982)
 - 13) Tahara, M., S. Suefuji, T. Ochiai and H. Yoshino : Phylogenetic relationships of taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott and related taxa by non-coding chloroplast DNA sequence analysis. Aroideana, (in press)
 - 14) 高柳謙治 : 日本人とさといも. 日本人のための生物資源のルーツを探る (中川原捷洋ら共著), pp. 95-121. 筑波書房, 東京 (1986)
 - 15) 谷本忠芳 : 本邦および台湾における野生サトイモ (*Colocasia esculenta* Schott) の分布および形態的特性. 育種学雑誌, **40**, 233-243 (1992)
 - 16) Terauchi, R., T. Terachi and K. Tsunewaki : Physical map of chloroplast DNA of aerial yam, *Dioscorea bulbifera* L. Theor. Appl. Genet., **77**, 1-9 (1989)
 - 17) 常脇恒一郎, 遠藤 隆 : 細胞質遺伝. 植物細胞遺伝学 I 細胞分裂と細胞遺伝 (木原 均監修), pp. 531-570, 裳華房, 東京 (1980)
 - 18) Yoshino, H. : Studies on the phylogenetic differentiation in taro, *Colocasia esculenta* Schott. Doctor thesis., Kyoto University, Japan (1994)