

CAPSマーカによるカンキツの品種識別法の開発と親子鑑定

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者	二宮, 泰造 島田, 武彦 遠藤, 朋子 野中, 圭介 大村, 三男 藤井, 浩
巻/号	14巻2号
掲載ページ	p. 127-133
発行年月	2015年4月

訂 正

第14巻第2号 p.127-133 原著論文「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」(二宮泰造・島田武彦・遠藤朋子・野中圭介・大村三男・藤井 浩)におきまして、誤りがありましたので、下記のとおり訂正いたします。

園芸学研究 第14巻第2号 p.129

(誤)

第2表 品種識別に用いた CAPS マーカー

CAPS マーカー名	Forward プライマー	Reverse プライマー	PCR 条件	増幅サイズ (bp)
Cp0089/ <i>Hind</i> III	TGAAGCCCAACAGCAATACGA	AGGCTTCAGGAAGCGGTTTA	Touch Down	800
Tf0353/ <i>Nde</i> II ²	ATGTACTTCCCTACCCGTAAT	GAGGGTAAAGACTCGGAAGC	64°C	800

² 親子鑑定のために使用

(正)

第2表 品種識別に用いた CAPS マーカー

CAPS マーカー名	Forward プライマー	Reverse プライマー	PCR 条件	増幅サイズ (bp)
Cp0089/ <i>Hind</i> III	CGGGCACTTCAATAATCGT	CAATTCAGGCCTCCGCTTTC	Touch Down	800
Tf0353/ <i>Nde</i> II ²	ATGTACTTCCCTACCCGTAATGCTTATGGTCTT	CATTGAACTCCCAAGTTCCTCTGAGGGT	64°C	800

² 親子鑑定のために使用

なお、J-STAGE にて掲載中のオンラインジャーナルでは修正済です。

園芸学研究編集委員会

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

二宮泰造¹・島田武彦²・遠藤朋子²・野中圭介³・大村三男^{4a}・藤井 浩^{2*}

¹ 愛媛県農林水産研究所果樹研究センターみかん研究所 799-3742 宇和島市吉田町

² 農研機構果樹研究所カンキツ研究興津拠点 424-0292 静岡市清水区興津中町

³ 農研機構果樹研究所カンキツ研究口之津拠点 859-2501 長崎県南島原市口之津町

⁴ 静岡大学大学院農学研究科 422-8529 静岡市駿河区大谷

Development of Citrus Cultivar Identification by CAPS Markers and Parentage Analysis

Taizo Ninomiya¹, Takehiko Shimada², Tomoko Endo², Keisuke Nonaka³, Mitsuo Omura^{4a} and Hiroshi Fujii^{2*}

¹Institute for Citrus Fruits, Fruit Tree Research Center, Ehime Research Institute of Agriculture, Forestry and Fisheries, Yoshida, Uwajima, Ehime 799-3742

²Cirus Research Division Okitsu, NARO Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture and Food Research Organization, Okitsu, Shimizu, Shizuoka 424-0292

³Cirus Research Division Kuchinotsu, NARO Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture and Food Research Organization, National Agriculture and Food Research Organization, Kuchinotsu, Minamishimabara, Nagasaki 859-2501

⁴Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, Ohya, Suruga, Shizuoka 422-8529

Abstract

The establishment of a method for citrus cultivar identification is required to protect domestic citrus producers and breeders' rights. In order to establish a scientific method for citrus cultivar identification with marked reliability, it is necessary to develop appropriate DNA markers. Accordingly, this study aimed to establish such a method based on CAPS markers to realize expedient cultivar identification. Thirty-three citrus cultivars and breeding lines were genotyped using nine CAPS markers and the results obtained. The data constitute a source of basic information for the identification of domestic citrus cultivars. Using the genotyping data, we computed the smallest marker set that can distinguish between all 33 cultivars and breeding lines. This showed that all cultivars and breeding lines could be identified using eight CAPS markers. The genotyping data were also used to perform parentage analysis of seven cultivars bred in Japan. This analysis revealed that 'Shiranuhi' was not the male parent of 'Kanpei'. Further analysis strongly suggested that ponkan was the male parent of 'Kanpei'.

Key Words : breeders' rights, DNA, genotype, 'Kanpei'

キーワード : DNA, 遺伝子型, 育成者権, '甘平'

緒 言

カンキツは国内の果樹の中で最も重要な品目のひとつであり、その生産量の多くをウンシュウミカン (*Citrus unshiu* Marcow.) が占めている。しかし、ウンシュウミカンの消費量は減少傾向にあり、今後ともこの傾向が継続すると見込まれている。一方、ウンシュウミカン以外のカンキツは、産出額ではウンシュウミカンの約10%程度であるものの、我が国で育成された '不知火' や 'はるみ', 'せとか', '甘平' など、高糖系で寛皮性の中晩柑の消費量の増加が期待されている。従って、新たに育成されたカンキツ品種の海外流出およびその生産物の海外からの流入は、

今後の国内のカンキツ生産に大きな影響を与える可能性があるため、生産者や育成者権の保護に向けてカンキツの品種識別技術の確立が求められている。

植物の育成者権への関心は国際的にも高まっている。植物新品種保護国際同盟 (UPOV ; <http://www.upov.int/portal/index.html.en>) は植物品種の保護のための効率的なシステムの開発を進めており、UPOV の技術作業部会は植物の育成者権保護のために DNA 鑑定技術を確立することになっている (Shoda ら, 2012)。DNA 鑑定技術は信頼度の高い品種識別法として、我が国でも開発が進められ、イネ (*Oryza sativa* L.), インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.), アズキ (*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi.), イチゴ (*Fragaria × ananassa* Duchesne), スイートチェリー (*Prunus avium* L.), ニホンナシ (*Pyrus pyrifolia* Nakai) などで DNA 分析による品種識別法が農林水産省品種登録ホームページ (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/hogo.html>) から公開されている。

我が国のカンキツ品種を対象とした DNA 分析による品

2014年10月20日 受付。2014年11月26日 受理。
本報告の一部は、平成26年度園芸学会春季大会で発表した。

* Corresponding author. E-mail: hfujii@affrc.go.jp

^a 現在 : 静岡大学名誉教授

第1表 CPAS 分析に供試した33品種・系統

品種・系統名	交雑組み合わせ	学名	起源	保存場所 ^x	育成者 ^w	育成品種論文
はれひめ	E-647 (清見 × オセオラ) × 宮川早生	((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × (<i>C. clementina</i> × (<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>))) × <i>C. unshiu</i>		a	a	吉田ら, 2005
せとか	(清見 × アンコール) -No.2 × マーコット	((<i>Citrus unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. nobilis</i> × <i>C. deliciosa</i>) × <i>C. sp.</i>		a	a	松本ら, 2003a
はるみ	清見 × ポンカン	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>		a	a	吉田ら, 2000
天草	(清見 × 興津早生) -No.14 × ベージ	((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. unshiu</i>) × ((<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>) × <i>C. clementina</i>)		a	a	松本ら, 1999
南香	三保早生 × クレメンティン	<i>C. unshiu</i> × <i>C. clementina</i>		a	a	奥代ら, 1991
清見	宮川早生 × トロビタ	<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>		b	a	西浦ら, 1983
西之香	清見 × トロビタ	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. sinensis</i>		a, b	a	松本ら, 2003b
不知火	清見 × ポンカン	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>		a, b	a	松本, 2001
ボンカン(太田ボンカン)		<i>C. reticulata</i> Blanco	インド	a, b		
甘平	西之香 × 不知火	((<i>Citrus unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. sinensis</i>) × ((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>)		a, b	b	重松ら, 2008a
媛小春	清見 × 黄金柑	((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. sp.</i>		b	b	重松ら, 2008b
愛媛果試第28号 (紅まどんな ^z)	南香 × 天草	(<i>C. unshiu</i> × <i>C. clementina</i>) × (((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. unshiu</i>) × ((<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>) × <i>C. clementina</i>))		b	b	重松ら, 2005
愛媛27号 ^y	不詳			b	b	
愛媛41号 ^y	(清見 × ミネオラ) × ((アンコール × 平紀州) × 上野早生)	((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × (<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>)) × (((<i>C. nobilis</i> × <i>C. deliciosa</i>) × <i>C. kinokuni hort. ex Tanaka</i>) × <i>C. unshiu</i>)		b	b	
愛媛42号 ^y	はれひめ × (アンコール × 平紀州)	(((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × (<i>C. clementina</i> × (<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>))) × <i>C. unshiu</i>) × ((<i>C. nobilis</i> × <i>C. deliciosa</i>) × <i>C. kinokuni hort. ex Tanaka</i>)		b	b	
愛媛43号 ^y	(清見 × ミネオラ) × (アンコール × 不知火)	((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × (<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>)) × ((<i>C. nobilis</i> × <i>C. deliciosa</i>) × ((<i>C. unshiu</i> × <i>C. sinensis</i>) × <i>C. reticulata</i>))		b	b	
ミネオラ	ダンカン × ダンシー	<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>		b		
イヨ(宮内伊予)		<i>C. iyo hort. ex Tanaka</i>	日本	b		
河内晩柑		<i>C. sp.</i>	日本	b		
キシユウミカン(平紀州)		<i>C. kinokuni hort. ex Tanaka</i>	中国	b		
ウンシュウミカン (宮川早生)		<i>C. unshiu Marc.</i>	日本	a		
キングマンダリン		<i>C. nobilis Lour.</i>	米国	a		
ダンシー		<i>C. tangerina Tanaka</i>	インド	a		
スイートオレンジ (トロビタ)		<i>C. sinensis Osbeck</i>	米国	a		
アンコール	キングマンダリン × 地中海マンダリン	<i>C. nobilis</i> × <i>C. deliciosa</i>		a		
クレメンティン		<i>C. clementina hort. ex Tanaka</i>	アルジェリア	a		
セミノール	ダンカン × ダンシー	<i>C. paradisi</i> × <i>C. tangerina</i>		a		
ヒュウガナツ		<i>C. tamurana hort. ex Tanaka</i>	日本	a		
平戸ブندان		<i>C. grandis Osbeck</i>	日本	a		
川野ナツダイダイ		<i>C. natsudaikai Hayata</i>	日本	a		
ハッサク		<i>C. hassaku hort. ex Tanaka</i>	日本	a		
グレープフルーツ (ダンカン)		<i>C. paradisi Macf.</i>	米国	a		
ユズ		<i>C. junos hort. ex Tanaka</i>	中国	a		

^z 全農愛媛登録商標

^y 愛媛県未登録系統

^x a: 農研機構果樹研究所カンキツ研究興津拠点, b: 愛媛県みかん研究所

^w a: 農研機構果樹研究所, b: 愛媛県

第2表 品種識別に用いた CAPS マーカー

CAPS マーカー名	Forward プライマー	Reverse プライマー	PCR 条件	増幅サイズ (bp)
Cp0089/ <i>Hind</i> III	TGAAGCCCAACAGCAATACGA	AGGTCTTCAGGAAGCGGTTTA	Touch Down	800
Cp0635/ <i>Dra</i> I	GGCCTGGTGCAATCAT	TGCAAGCTGCCATCTTACAAC	Touch Down	1000
Tf0001/ <i>Msp</i> I	AAAAGTTCACAAGTACGAGGG	AGCAATCCTTGAGAATACGCA	Touch Down	650
Tf0013/ <i>Rsa</i> I	GTTCTATGCGTTGTTAAGGTT	GCCCTGAAGTTGAACGAGAC	Touch Down	1200
Tf0293/ <i>Hind</i> III	CTTCTTTCCGGTTATCTAA	TGCAGCAGAAGGCCTCTTATA	Touch Down	1000
Tf0318/ <i>Hinc</i> II	GACGACTACCGCTACTACTAC	ACAGCCAGGAACAAGCTTT	Touch Down	600
Tf0386/ <i>Msp</i> I	GACAAGAAAATTACTATACGG	GGAATCAACCATGAGTGACA	Touch Down	550
Tf0419/ <i>Pvu</i> II	GGTGTATGAGAAGCCAATTAT	ATCTTGATCATGGCGAAAT	Touch Down	700
Tf0420/ <i>Hae</i> III	TGGAGGCCATTCTTATTAGA	CTCTGACCACGGGATCA	Touch Down	400
Gn0029/ <i>Hinf</i> I ²	ACCCAATAACAAAGGAGGCC	TGAAAAACATCGGGCAAGTAAGGT	56°C	450
Tf0353/ <i>Nde</i> II ²	ATGTACTTCCCTACCCGTAAT	GAGGGTAAAGACTCGGAAGC	64°C	800

² 親子鑑定のために使用

種識別は、これまでに、restriction fragment length polymorphism (RFLP) マーカー (Matsuyama ら, 1992) や randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) マーカー (Sugawara ら, 2002), cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカー (Ueda ら, 2003), single nucleotide polymorphism (SNP) マーカー (大村ら, 2004) などを利用した先駆的な研究が行われてきた。これらの研究によって、DNA マーカーによるカンキツの品種識別の可能性が示されてきたが、国内の主要な経済栽培品種を識別するための DNA マーカー情報とそのマーカーを適用した多型情報は公開されていない。DNA マーカーを利用した品種識別では、再現性のある複数の DNA マーカーの多型情報を組み合わせて使用する必要がある。そのため、多数の DNA マーカーを多数の品種に適用した遺伝子型データを得る必要がある。近年、Shimada ら (2014) により、連鎖地図を構成する 708 の CAPS マーカーが開発され、これらのマーカー情報から品種識別のための CAPS マーカーを選抜することが可能になった。CAPS マーカーはイチゴの品種識別に用いられ (Kunihisa ら, 2003; Kunihisa, 2011), 国際的な育成者権の侵害を阻止する事例に貢献しており (國久ら, 2005; Shoda ら, 2012), 品種識別マーカーとして有効である。

そこで、本研究では、Shimada ら (2014) が開発した CAPS マーカーを生産の増加が期待される品種を含む主要なカンキツ品種・系統に適用して、CAPS 遺伝子型データを蓄積し、CAPS マーカーによるカンキツ品種識別技術の確立をめざした。また、得られた CAPS 遺伝子型データを利用してカンキツ育成品種の親子鑑定を行った結果、愛媛県育成品種の来歴について新たな知見を得たので、その結果を報告する。

材料および方法

1. 供試材料と DNA の抽出

品種識別の試料として、農研機構果樹研究所カンキツ研究興津拠点 (以下、農研機構果樹研興津; 静岡県静岡市) で保存している 22 品種および愛媛県農林水産研究所果樹

研究センターみかん研究所 (以下、愛媛県みかん研; 愛媛県宇和島市) で保存している重複を含む 15 品種・系統、合わせて 33 品種・系統を供試した (第1表)。ゲノム DNA は 7 月に採取した各品種の当年葉から、DNA すいすい-R ((株) リーズ, つくば市) を用いて抽出した。

2. CAPS 分析法

Shimada ら (2014) が開発した 708 個の CAPS マーカーおよび、その研究過程で開発し、未公表となっている CAPS マーカーの中から、品種識別への利用が期待できる 9 種類のマーカー (第2表) を 33 品種・系統 (第1表) に適用した。また、これとは別に 2 種類のマーカーを育成品種の親子鑑定のために用いた (第2表)。

3. 遺伝子型データ分析方法

CAPS における多型は制限酵素部位の有無によって判定されるため、本研究では制限酵素部位のないアレルを a とし、有るアレルを b とし、品種の遺伝子型 aa, ab および bb を決定した (第1図)。与えられた遺伝子型データにおいて、すべての品種を識別することができる最も少ない数の DNA マーカーで構成されるマーカーセット (最少マーカーセット) を選抜するために、最少マーカーセット検出ソフトウェア MinimalMarker (Fujii ら, 2013a) を用いた。

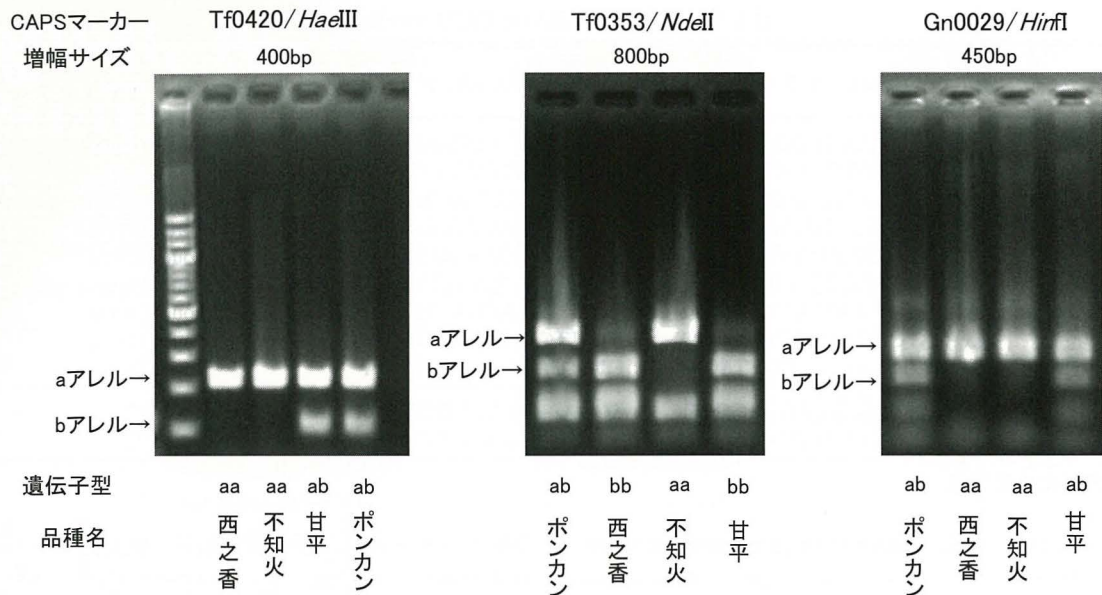
4. SNP による親子鑑定と親子推定

Fujii ら (2013b) が報告した 256 種類の SNP マーカーをカンキツの 96 品種・系統に適用した遺伝子型データについて、親子関係推定プログラム MARCO (藤井ら, 2010) を用いて、親子関係にある品種について親子鑑定を行った。また、親子関係に矛盾が見られた品種について、正しい親子の推定にも MARCO を用いた。

結 果

1. CAPS 遺伝子型分析

カンキツの 33 品種・系統 (第1表) を対象に、9 種類 CAPS マーカー (Cp0089/*Hind*III, Cp0635/*Dra*I, Tf0001/*Msp*I, Tf0013/*Rsa*I, Tf0293/*Hind*III, Tf0318/*Hinc*II, Tf0386/*Msp*I, Tf0419/*Pvu*II, Tf420/*Hae*II) を用いて、得られた電気泳動図



第1図 CAPS分析による‘甘平’の親子鑑定

Tf0353/NdeII: ‘西之香’と‘甘平’の遺伝子型がbbであるのに対し, ‘不知火’がaaであることから, ‘不知火’を片親とすると矛盾する
 Tf0420/HaeIIIとGn0029/HinfI: ‘西之香’と‘不知火’の遺伝子型がともにaaであるのに対し, ‘甘平’の遺伝子型がabであることから, 両親組み合わせに矛盾がある
 いずれの場合も, 両親の組み合わせを‘西之香’とポンカンとすると矛盾はない

第3表 9種類のCAPSマーカーを33品種・系統に適用した結果得られたCAPS遺伝子型

品種・系統名	CAPS マーカー								
	ヘテロ接合度 (Ho) / 多型情報含有値 (PIC)								
	Cp0089/HindIII	Cp0635/DraI	Tf0001/MspI	Tf0013/RsaI	Tf0293/HindIII	Tf0318/HincII	Tf0386/MspI	Tf0419/PvuII	Tf0420/HaeIII
0.424/0.278	0.606/0.363	0.636/0.375	0.606/0.375	0.212/0.172	0.273/0.290	0.576/0.351	0.394/0.290	0.333/0.290	
はれひめ	aa	ab	ab	aa	aa	aa	aa	aa	aa
せとか	aa	bb	bb	aa	aa	aa	ab	aa	aa
はるみ	aa	bb	ab	ab	ab	aa	ab	aa	aa
天草	ab	bb	bb	ab	aa	aa	ab	ab	aa
南香	ab	ab	ab	ab	ab	aa	ab	ab	aa
清見	aa	ab	ab	aa	ab	aa	ab	aa	aa
西之香	aa	ab	ab	ab	aa	ab	aa	ab	aa ²
不知火	aa	bb	ab	ab	ab	aa	ab	ab	aa ²
ポンカン	aa	ab	aa	bb	aa	aa	ab	ab	ab
甘平	aa	ab	ab	bb	aa	ab	ab	aa	ab ²
媛小春	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa	aa	aa
愛媛果試第28号(紅まどんなり)	ab	bb	ab	ab	aa	aa	ab	ab	aa
愛媛27号	ab	bb	aa	aa	aa	aa	ab	aa	aa
愛媛41号	ab	ab	ab	aa	aa	aa	aa	aa	ab
愛媛42号	aa	ab	ab	ab	aa	aa	aa	aa	ab
愛媛43号	ab	ab	ab	ab	aa	aa	aa	aa	aa
ミネオラ	ab	ab	ab	ab	aa	aa	ab	ab	aa
イヨ(宮内伊予)	aa	ab	aa	ab	aa	aa	aa	ab	bb
河内晩柑	ab	ab	bb	ab	aa	ab	ab	aa	aa
キシウミカン(平紀州)	ab	aa	aa	bb	aa	ab	aa	aa	bb
ウンシュウミカン(宮川早生)	ab	aa	ab	ab	aa	aa	aa	aa	ab
キングマンダリン	aa	ab	ab	ab	aa	aa	ab	ab	ab
ダンシー	ab	ab	aa	bb	aa	aa	aa	ab	ab
スイートオレンジ(トロビタ)	aa	bb	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa
アンコール	aa	ab	ab	bb	aa	aa	bb	aa	aa
クレメンティン	aa	ab	aa	bb	ab	aa	ab	bb	ab
セミノール	aa	ab	ab	ab	aa	aa	aa	ab	ab
ヒュウガナツ	aa	ab	ab	ab	aa	bb	ab	aa	aa
平戸ブンタン	aa	bb	bb	aa	aa	bb	bb	aa	aa
川野ナツダイダイ	aa	ab	ab	ab	aa	ab	ab	aa	ab
ハッサク	ab	bb	ab	aa	aa	ab	ab	aa	ab
グレープフルーツ(ダンカン)	aa	bb	bb	ab	aa	ab	ab	ab	aa
ユズ	ab	aa	bb	ab	aa	bb	aa	aa	aa

² 甘平の両親を従来の記載(重松ら, 2008)どおり西之香と不知火とすると矛盾する

³ 全農愛媛登録商標

第4表 CAPS マーカーおよび SNP マーカー (Fujii ら, 2013b) による ‘甘平’ の親子鑑定
 ‘西之香’ とポンカンを ‘甘平’ の両親とすると、いずれの DNA マーカーでも矛盾がない

DNA マーカーの種類	CAPS マーカー			SNP マーカー													
	DNA マーカー名	Tf0420/HaeIII	Tf0353/NdeII	Gn0029/HinfI	SI039	SI110	SI118	SI129	SI145	SI155	SI161	SI180	SI207	SI213	SI217	SI344	SI353
品種	西之香	aa	bb	aa	GG	AG	AA	AA	TT	GG	AG	AA	AA	GG	AA	CC	GG
	不知火	aa	aa	aa	GG	GG	GG	AA	TT	GG	AA	AA	AA	GG	AA	CC	GG
	甘平	ab	bb	ab	AG	AA	AA	AG	AT	AG	GG	AG	AG	AG	AG	AC	AG
	ポンカン	ab	ab	ab	AG	AG	AG	AG	AT	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AC	AG
矛盾の内容	y	z	y	y	z	z	y	y	y	z	y	y	y	y	y	y	

z: ‘不知火’ を ‘甘平’ の片親とすると矛盾する

y: ‘西之香’ と ‘不知火’ を ‘甘平’ の両親とすると矛盾する

から各品種・系統について、増幅断片における制限酵素切断部位の有無により、各品種の遺伝子型を決定した。得られた遺伝子型データを第3表に整理するとともに、各マーカーのヘテロ接合度と多型含有情報値を求め、多型性の確認を行った。

第3表の遺伝子型データについて MinimalMarker を適用して最少マーカーセットを検出したところ8種類の CAPS マーカーから構成される2組の最少マーカーセット [Cp0089/HindIII, Cp0635/DraI, Tf0001/MspI, Tf0013/RsaI, Tf0293/HindIII, Tf0318/HincII, Tf0386/MspI, Tf0419/PvuII] と [Cp0635/DraI, Tf0001/MspI, Tf0013/RsaI, Tf0293/HindIII, Tf0318/HincII, Tf0386/MspI, Tf0419/PvuII, Tf420/HaeIII] が検出された。このことから、8種類の CAPS マーカーで遺伝子型を決定することにより、33品種・系統すべての識別が可能であることが明らかとなった。

2. 育成品種の親子鑑定

1) CAPS 分析による親子鑑定

供試した33品種のうち、我が国で育成された ‘はるみ’、‘南香’、‘清見’、‘西之香’、‘不知火’、‘甘平’、‘愛媛果試第28号’ (全農登録商標: 紅まどんな) の7品種について、第3表の遺伝子型データを用いて親子鑑定を行った。その結果、‘甘平’ の両親を従来記載されていた ‘西之香’ と ‘不知火’ (重松ら, 2008a) とすると、共優性のメンデル遺伝を仮定した場合に、CAPS マーカー Tf0420/HaeIII で、親子関係が矛盾していた (第3表)。この真偽を検証し、さらに正しい親子関係を推定するために、以下の解析を行った。

当初供試した ‘甘平’、‘西之香’ および ‘不知火’ のゲノム DNA は、農研機構果樹研興津 (静岡市清水区) に保存されている樹から採取したものであることから、より厳格な親子鑑定を行うため、愛媛県みかん研 (愛媛県宇和島市) に保存されている ‘甘平’、‘西之香’ および ‘不知火’ から採取したゲノム DNA を対象に、前述の Tf0420/HaeIII と追加した2種類の CAPS マーカー Tf0353/NdeII と Gn0029/HinfI (第2表) を用いて、CAPS 分析を行った。その結果、これらの供試 DNA においても親子関係が矛盾することが示された (第1図)。CAPS マーカー Tf0353/NdeII では ‘西之香’ と ‘甘平’ の遺伝子型が bb であるのに対し、‘不知

火’ が aa であることから、‘不知火’ は交配の片親とすると矛盾した (第1図)。また、Tf0420/HaeIII と Gn0029/HinfI では、‘西之香’ と ‘不知火’ の遺伝子型がともに aa であるのに対し、‘甘平’ の遺伝子型が ab であることから、交配組み合わせに矛盾すると判断された (第1図)。

2) SNP マーカーによる親子関係の検証

CAPS 分析により示された ‘甘平’ の交配親の組み合わせの矛盾を検証するため、256種類の SNP マーカーをカンキツの98品種・系統に適用した SNP データ (Fujii ら, 2013b) を親子関係推定ソフトウェア MARCO を用いて解析し、‘甘平’ の親子鑑定を行った。その結果、‘西之香’ と ‘不知火’ を ‘甘平’ の両親と仮定すると10種類の SNP マーカー (SI039, SI129, SI145, SI155, SI180, SI207, SI213, SI217, SI344, SI353) (Fujii ら, 2013b) で交配組み合わせに矛盾が見られ、3種類の SNP マーカー (SI110, SI118, SI116) (Fujii ら, 2013b) で ‘不知火’ を片親とすると矛盾が見られた (第4表)。以上のことから、‘不知火’ が ‘甘平’ の片親でないという CAPS マーカーの結果を SNP マーカーでも確認することができた。

3) ‘甘平’ の由来の確認

‘甘平’ の由来を確認するため、SNP データ (Fujii ら, 2013b) を親子関係推定ソフトウェア MARCO を用いて解析し、98品種・系統の中から ‘甘平’ の両親として矛盾のない交配組合せを検索したところ、‘西之香’ とポンカンの組み合わせのみが検出された。検索方法を変えて、‘甘平’ の片親が ‘西之香’ または ‘不知火’ またはポンカンであると仮定した場合に、残りの片親として可能性のある品種を98品種・系統から探索したところ、やはり ‘西之香’ とポンカンの組み合わせ以外に矛盾のない交配組み合わせは存在しなかった。以上のことから、‘甘平’ の花粉親はポンカンであると推定された。

考 察

本研究により、8種類の CAPS マーカーを用いることにより、我が国の主要なカンキツを含む33品種・系統を識別可能であることが明らかになった。これは、我が国で流通するすべてのカンキツ品種を対象にしたものではないが、これまでに、我が国のカンキツ主要品種を識別する

DNA マーカーデータは公表されておらず、今回得られた CAPS 遺伝子型データ (第 3 表) は、国内のカンキツの品種識別のための基盤的な情報となる。CAPS マーカーは、高価な解析装置や高度な技術を必要とせず、植物においても容易に安定な結果が得られるという利点がある (Kunihisa ら, 2003) ことから、簡易な方法での品種識別技術を求める研究現場や小規模な品種識別を必要とする研究現場での普及性が高いと考えられる。

また、本研究では得られた CAPS 遺伝子型データを用いて 7 種類の育成品種について親子鑑定を行い、従来記載されていた‘甘平’の親子関係と矛盾するデータを発見した。この結果は、SNP マーカーによる検証と一致した。以上のことから、‘不知火’は‘甘平’の親ではないことが明らかになるとともに、CAPS マーカーがカンキツの親子鑑定にも有効であることが示された。

さらに、256 種類の SNP マーカーを 96 品種・系統に適用した SNP データを親子推定ソフトウェアで解析することにより、‘甘平’の交配組合せは‘西之香’とボンカンであることが推定された。品種の来歴を解明するには、多くの遺伝子型データが必要であることから、CAPS マーカーよりも、ハイスループットなシステムが利用可能な SNP マーカーが有効であると考えられた。

果樹において、DNA マーカーを用いた親子鑑定により、交配組合せが訂正された例は少なくなく、ニホンナシ (Sawamura ら, 2004, 2008) やリンゴ (五十嵐ら, 2010; Kitahara ら, 2005; Moriya ら, 2011) などでも報告されている。このため、品種登録の前に品種識別技術を用いた親子鑑定を行うべきである。

今後は、育種研究においても、品種識別技術はさらに重要になると考えられる。例えば、育種特性の解析研究において遺伝子機能や塩基配列の品種間差異を比較する場合や遺伝統計学的研究における交配集団の親品種個体について、供試する各品種個体の品種識別による品種の同一性の確認は、研究の科学性や再現性を保証するための基本的な条件になると考えられる。

品種識別技術の確立のためには、高精度で安定した DNA マーカーを開発するとともに、多数の品種に適用して、その結果を蓄積する必要がある。次に、それらの結果を整理した DNA マーカー遺伝子型データの一覧表を作成し、共有する必要がある。各研究者は共有化された遺伝子型データを用いることで品種の同一性を確認することが可能となる。また、平行して、新品種の遺伝子型の確認や在来品種の同名異物の問題 (池谷ら, 2005, 2007) の解消など、遺伝子型データの不断の改訂を行うことが求められる。

カンキツでは、CAPS マーカー (Shimada ら, 2014)、SSR マーカー (Ollitrault ら, 2010)、SNP マーカー (Fujii ら, 2013b; Ollitrault ら, 2012) で、大量のマーカー情報が利用可能となっている。各マーカーには長所と短所があるので、それぞれの遺伝子型データの充実を図ることにより、さま

ざまな研究場面での品種識別のニーズに対応が可能になるとともに、クロスチェックによる品種識別の正確性の向上にもつながると考えられた。

摘 要

生産者や育成者権の保護に向けてカンキツの品種識別技術の確立が求められている。信頼度の高い科学的手法である DNA マーカーによる品種識別技術の開発は、正確なカンキツの品種識別のために必須である。そこで、簡易な方法での品種識別が可能な CAPS マーカーによるカンキツの品種識別技術の確立をめざした。その結果、9 種類の CAPS マーカーを 33 品種・系統に適用した遺伝子型を整理した CAPS 遺伝子型データが得られた。このデータは、国内のカンキツの品種識別のための基盤的な情報となる。また、CAPS 遺伝子型データから、最少マーカーセットを検出した結果、8 種類の CAPS マーカーで 33 品種・系統のすべてを識別できることが判明した。さらに、遺伝子型データを利用して 7 種類の育成品種について、親子鑑定を行った。その結果、‘甘平’の花粉親は‘不知火’ではないことが明らかとなった。さらに解析を進めたところ、‘甘平’の花粉親はボンカンであることが強く推察された。

謝 辞 本論文を作成するにあたり協力いただいた農研機構果樹研究所吉岡照高上席研究員に感謝します。

引用文献

- Fujii, H., T. Ogata, T. Shimada, T. Endo, H. Iketani, T. Shimizu, T. Yamamoto and M. Omura. 2013a. Minimal marker: an algorithm and computer program for the identification of minimal sets of discriminating DNA markers for efficient variety identification. *J. Bioinform. Comput. Biol.* 11: 1250022.
- Fujii, H., T. Shimada, K. Nonaka, M. Kita, T. Kuniga, T. Endo, Y. Ikoma and M. Omura. 2013b. High-throughput genotyping in citrus accessions using an SNP genotyping array. *Tree Genet. Genom.* 9: 145–153.
- 藤井 浩・山下浩之・保坂ふみ子・寺上伸吾・山本俊哉. 2010. 品種識別用 DNA マーカー型データから親子関係を推定するソフトウェア MARCO の開発. *園学研.* 9(別 1): 34.
- 五十嵐恵・初山慶道・松本和浩・塩崎雄之輔. 2010. DNA 鑑定による赤肉系リンゴ新品種‘紅の夢’の親の推定. *弘前大農生学報.* 13: 7–13.
- 池谷祐幸・片山寛則・植松千代美・羽生 剛・間瀬誠子・澤村 豊・高田教臣・佐藤明彦・平林利郎・山本俊哉・佐藤義彦. 2007. 在来品種・野生種遺伝資源を研究材料として利用するためには同名異物等の問題を考慮しなければならない. —ナシを例にして—. *育学研.* 9(別 1): 231.
- 池谷祐幸・間瀬誠子・佐藤義彦・山口正己・山本俊哉.

2005. 在来品種を研究材料として利用するためには同名異物の問題を考慮しなければならない：ウメを例にして. 園学雑. 74 (別 2): 265.
- Kitahara, K., S. Matsumoto, T. Yamamoto, J. Soejima, T. Kimura, H. Komatsu and K. Abe. 2005. Molecular characterization of apple cultivars in Japan by S-RNase analysis and SSR markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 885–892.
- Kunihisa, M. 2011. Studies using DNA markers in *Fragaria* × *ananassa*: Genetic analysis, genome structure, and cultivar identification. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80: 231–243.
- Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto. 2003. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134: 209–215.
- 國久美由紀・松元 哲・吹野伸子. 2005. DNA 品種識別技術を用いた韓国産イチゴ果実の分析. 野茶研報. 4: 71–76.
- 松本亮司. 2001. 晩生カンキツ ‘不知火’. 果樹試報. 35: 115–120.
- 松本亮司・奥代直己・山本雅史・山田彬雄・浅田謙介・生山 巖・池宮秀和・村田広野・小泉銘册・岩波 徹. 1999. カンキツ新品種 ‘天草’. 果樹試報. 33: 37–46.
- 松本亮司・山本雅史・國賀 武・奥代直己・山田彬雄・高原利雄・生山 巖・石内傳治・村田広野・浅田謙介・池宮秀和・七條寅之助・吉永勝一・内原 茂・家城洋之. 2003b. カンキツ新品種 ‘西之香’. 果樹研報. 2: 17–23.
- 松本亮司・山本雅史・國賀 武・吉岡照高・三谷宣仁・奥代直己・山田彬雄・浅田謙介・池宮秀和・吉永勝一・内原 茂・生山 巖・村田広野. 2003a. カンキツ新品種 ‘せとか’. 果樹研報. 2: 25–31.
- Matsuyama, M., R. Motohashi, T. Akihama and M. Omura. 1992. DNA fingerprinting in citrus cultivars. *Japan. J. Breed.* 42: 155–159.
- Moriya, S., H. Iwanami, K. Okada, T. Yamamoto and K. Abe. 2011. A practical method for apple cultivar identification and parent-offspring analysis using simple sequence repeat markers. *Euphytica* 177: 135–150.
- 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. 果樹試報 B. 10: 1–9.
- 奥代直己・松本亮司・生山 巖・高原利雄・石内伝治・浅田謙介・村田広野. 1991. カンキツ新品種 ‘南香’. 果樹試報. 20: 71–77.
- Ollitrault, P., J. Terol, A. Garcia-Lor, A. Bérard, A. Chauveau, Y. Froelicher, C. Belzile, R. Morillon, L. Navarro, D. Brunel and M. Talon. 2012. SNP mining in *Citrus clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics* 13: 13.
- Ollitrault, F., J. Terol, J. A. Pina, L. Navarro, M. Talon and P. Ollitrault. 2010. Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in *Citrus*. *Am. J. Bot.* 97: e124–e129.
- 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.
- Sawamura, Y., T. Saito, N. Takada, T. Yamamoto, T. Kimura, T. Hayashi and K. Kotobuki. 2004. Identification of Parentage of Japanese Pear ‘Housui’. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 73: 511–518.
- Sawamura, Y., N. Takada, T. Yamamoto, T. Saito, T. Kimura and K. Kotobuki. 2008. Identification of parent-offspring relationships in 55 Japanese pear cultivars using S-RNase allele and SSR markers. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 77: 364–373.
- 重松幸典・喜多景治・薬師寺弘倫・石川 啓・井上久雄. 2005. カンキツ新品種 ‘愛媛果試第 28 号’ について. 愛媛果試研報. 19: 1–6.
- 重松幸典・喜多景治・薬師寺弘倫・石川 啓・井上久雄・中田治人. 2008a. カンキツ新品種 ‘甘平’ について. 愛媛果試研報. 22: 1–4.
- 重松幸典・喜多景治・薬師寺弘倫・石川 啓・中田治人. 2008b. カンキツ新品種 ‘媛小春’ について. 愛媛果試研報. 22: 5–8.
- Shimada, T., H. Fujii, T. Endo, T. Ueda, A. Sugiyama, M. Nakano, M. Kita, T. Yoshioka, T. Shimizu, H. Nesumi, Y. Ikoma, T. Moriguchi and M. Omura. 2014. Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers. *Tree Genet. Genom.* DOI 10.1007/s11295-014-0738-9.
- Shoda, M., N. Urasaki, S. Sakiyama, S. Terakami, F. Hosaka, N. Shigeta, C. Nishitani and T. Yamamoto. 2012. DNA profiling of pineapple cultivars in Japan discriminated by SSR markers. *Breed. Sci.* 62: 352–359.
- Sugawara, K., T. Wakizuka, A. Oowada, T. Moriguchi and M. Omura. 2002. Histogenic identification by RAPD analysis of leaves and fruit of newly synthesized chimeric *Citrus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 104–107.
- Ueda, T., F. Ikeda, M. Kita, T. Shimada, T. Endo and M. Omura. 2003. Evaluation of a CAPS method based on ESTs in *Citrus*. *Proc. Intl. Soc. Citricult. IX Congr.* 116–117.
- 吉田俊雄・根角博久・吉岡照高・中野睦子・伊藤祐司・村瀬昭治・瀧下文孝. 2005. カンキツ新品種 ‘はれひめ’. 果樹研報. 4: 37–45.
- 吉田俊雄・山田彬雄・根角博久・上野 勇・伊藤祐司・吉岡照高・日高哲志・家城洋之・七條寅之助・木原武士・富永茂人. 2000. カンキツ新品種 ‘はるみ’. 果樹試報. 34: 43–52.