

# SNPマーカーを用いた香酸カンキツの品種識別技術の確立

誌名	園芸学研究
ISSN	13472658
著者名	新見, 恵理 藤井, 浩 太田, 智 岩倉, 拓哉 遠藤, 朋子 島田, 武彦
発行元	園芸学会
巻/号	21巻1号
掲載ページ	p. 111-122
発行年月	2022年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## SNP マーカーを用いた香酸カンキツの品種識別技術の確立

新見恵理<sup>1</sup>・藤井 浩<sup>2</sup>・太田 智<sup>2</sup>・岩倉拓哉<sup>3</sup>・遠藤朋子<sup>2</sup>・島田武彦<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>徳島県立農林水産総合技術支援センター 779-3233 徳島県名西郡石井町

<sup>2</sup>農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究領域 424-0292 静岡市清水区興津中町

<sup>3</sup>和歌山県果樹試験場 643-0022 和歌山県有田郡有田川町

### Development of Acid Citrus Cultivar Identification System by SNP Markers

Eri Niimi<sup>1</sup>, Hiroshi Fujii<sup>2</sup>, Satoshi Ohta<sup>2</sup>, Takuya Iwakura<sup>3</sup>,  
Tomoko Endo<sup>2</sup> and Takehiko Shimada<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Tokushima Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Support Center, Ishii-cho, Myozai, Tokushima 779-3233

<sup>2</sup>Institute of Fruit Tree & Tea Science, NARO, Okitsunaka-cho, Shimizu, Shizuoka 424-0292

<sup>3</sup>Wakayama Fruits Tree Experiment Station, Aridagawa-cho, Arida, Wakayama 643-0022

#### Abstract

The development of a cultivar identification system for fresh and processed fruits is required to protect breeder's rights regarding acid citrus cultivars and for the appropriate management of nursery plants for acid fruit cultivars because their fruits are mainly utilized for cooking and processing. A new set of 10 single nucleotide polymorphism (SNP) markers, which can be used to evaluate the allelic genotype on either locus of 9 citrus chromosomes, has been developed to reinforce the cultivar identification of major acid citrus by improving the previous system for fresh market cultivars. The new set of 10 SNP markers can discriminate the 85 examined citrus cultivars from each other, comprising 10 conventional acid citrus cultivars, 2 acid citrus cultivars released by Tokushima Prefecture and the National Agriculture and Bio-oriented Research Organization (NARO), and 73 fresh market cultivars. The parentage analysis of 10 SNP markers revealed no discrepancy in parent-offspring relationships of 43 combinations in the 85 examined citrus cultivars. They are applicable to SNP genotyping of fresh, and processed fruits such as peel, juice, squeezed vinegar and dry fruit of major acid citrus cultivars. The renewed cultivar identification system is a practical technology that is applicable to the rapid inspection at customs for goods infringing on intellectual property rights and will help protect breeder's rights pertaining to the registered cultivars.

**Key Words** : Cultivar protection, DNA marker, processed food, Sudachi, Yuzu

キーワード : DNA マーカー, 品種保護, 加工食品, スダチ, ユズ

#### 緒 言

カンキツでは栄養繁殖された優良品種の種苗が海外へ不正に流出し、海外で産地化が行われ、第3国への輸出や我が国への逆輸入が懸念されている。このような事態を受け、農林水産省は令和2年12月に種苗法の一部を改正し、登録品種の生産者の自家増殖は許諾に基づき実施すること、種苗の証紙に登録品種である旨、海外への持ち出し禁止、栽培地域の制限などの表示が義務化され、登録品種の取扱制限（海外持出し、国内栽培地域）は令和3年4月1日に施行、登録品種の許諾に基づく増殖は令和4年4月1日に施行される予定となっている（農林水産省、2021）。今後、より実効的に新品種を保護していくうえで、育成者権を保護する取り組みが必要であり、育成者権の権利侵害

を立証するDNAマーカーによる品種識別技術の開発が様々な作物で進められている。カンキツでは、これまでに Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) マーカー (Fujiiら, 2019) と Single Nucleotide Polymorphism (SNP) マーカー (Endoら, 2020a) を用いた品種識別技術が開発され、国内で流通する9割以上の品種を対象に、DNA多型が親子間で矛盾なく遺伝していること、DNA多型に基づいて相互に品種識別が可能であることが確認されている。さらに、国際標準化機構 (ISO) 13495の基準に準拠した妥当性評価試験により安定性と再現性が確認された「CAPSマーカーによるカンキツ22品種のDNA品種識別技術マニュアル」が公開され (農研機構, 2019)、国内で流通する品種について、種苗の流通の適正化や知的財産保護に貢献している。これらのDNAマーカーの研究対象は出荷量の多い品種に着目していたため、対象品種は主に生食用カンキツであった。しかし、近年、香酸カンキツは、地域の特産農産物として着目されており、農林水産省の地理的表示 (GI)

2021年2月20日 受付. 2021年5月20日 受理.

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

保護制度の登録産品として、木頭ゆず（徳島県那賀郡那賀町）、物部ゆず（高知県香美市）、大分かぼす（大分県）、辺塚だいたい（鹿児島県肝属郡肝付町、南大隅町）が登録されている（農林水産省，2020a）。また、‘璃の香’（太田ら，2014）、‘阿波すず香’（中嶋ら，2015）といった交雑育種による香酸カンキツが育成されるなど、香酸カンキツの品種識別の必要性は高まっている。

香酸カンキツの果実は、酸含有量が強く優れた香りを有することから、料理や食品への酸味づけや風味づけなど調理に利用されている。平成28年度の香酸カンキツに分類される国産カンキツの出荷量とその内に占める加工向けの割合は、ユズ（*Citrus junos* Siebold ex Tanaka）は24,297.2t（85.9%）、スダチ（*C. sudachi* hort. ex Shirai）は4,195.9t（52.4%）、カボス（*C. sphaerocarpa* hort. ex Tanaka）は3,665.2t（87.5%）、シクワサー（*C. depressa* Hayata）は3,057.8t（94.0%）、ダイダイ（*C. aurantium* L.）は967.9t（44.5%）などとなっている（農林水産省，2020b）。ウンシュウミカン（*C. unshiu* Marcow.）を除くカンキツ類の出荷量は278,354.5tで、そのうち加工向けは19.1%であることから、香酸カンキツが加工用途に多く使われていることが統計からも明らかである。従って、香酸カンキツの育成者権の保護を強化するためには、加工食品への適用も考慮した品種識別技術の確立が必須となる。

育成者権の保護は加工食品の原材料にも及ぶので、輸入加工食品も育成者権保護の検査の対象となりうるが、生果実のように果実形質の調査ができないため、DNAマーカーを用いた品種識別技術による検査が必要である。また、このことは、輸入加工食品に限らずジュースなどの加工食品における品種の偽装表示の確認においても同様である。しかしながら、加工食品の品種識別は葉や生果実を対象にした場合と比べて難しい。これは、加工食品の加工過程やその後の保存期間中にDNAが分解され断片化し、DNAによる品種識別技術において必須となるPCR増幅が困難になるためである。既往の研究では、2～3時間加熱したニホングリ（*Castanea crenata* Siebold & Zucc.）の甘露煮ではDNAのサイズが1500 bp以下、10時間加熱したマロングラッセでは300 bp以下に断片化され、DNAの断片化が加熱時間と関連することが報告されている（山本ら，2012）。また、オウトウ（*Prunus avium* L.）のシロップ漬けでは、DNAのサイズが130～150 bp以下、ドライフルーツでは183 bp以下に断片化されていたことが報告されている（高品ら，2008）。加工食品から得られるDNAの断片化の程度は、加工の方法や加熱時間により影響を受けると考えられる。また、断片化したDNAサンプルでは400 bp以上のPCR増幅断片の増幅が不安定になることが報告されている（山本ら，2012）。これらのことから、安定した遺伝子型判定を得るためには、PCRの増幅断片長が100 bp以下が望ましい。

これまでに我々は香酸カンキツを対象にしたCAPSマーカーによる品種識別技術を確立している（新見ら，2021）。

CAPSマーカーは分析に高価な機器を必要とせず、安定した遺伝子型判定が実現できるという点で優れているが、PCR増幅断片を制限酵素により消化して塩基配列多型を検出するため、ある程度の長さのPCR増幅断片長を必要とする。分析に使用した26種類のCAPSマーカーのPCR増幅断片長も、最短300 bp、最長2,200 bp、平均863 bpであり、加工食品では安定したジェノタイピングが困難となる可能性が予想される。一方、Endoら（2020a，2020b）は48品種の生食用カンキツを対象にTaqMan-MGB SNPジェノタイピングアッセイによる8種類のSNPマーカーを用いて、PCR増幅断片長が100 bp以下でも判定可能な品種識別技術を確立するとともに、生食用カンキツ24品種の果実とジュース、缶詰、ドライフルーツ、砂糖漬けなどの加工食品を識別に適用できることを報告した。SNPマーカーは短い増幅断片長でもジェノタイピングが可能であるという点において、CAPSマーカーやSimple Sequence Repeat (SSR)マーカーよりも、加工品の品種識別手法として優位性がある。

そこで本研究では、Endoら（2020a）が開発した生食用カンキツを主な対象としたSNP品種識別技術を基に、主要な香酸カンキツの品種識別に適用できるようにSNPマーカーを新たに設計し、カンキツの9本の染色体の遺伝子型が評価できる10種類のSNPマーカーからなる品種識別用のマーカーセットを開発した。新たなマーカーセットの利用により、香酸カンキツの10品種と農研機構および徳島県で育成された香酸カンキツ2品種、生食用カンキツの73品種の合計85品種を相互に識別できること、43組合せの親子関係においてSNPの遺伝に矛盾がないことを確認した。また、主要香酸カンキツの果皮、果汁、搾汁酢およびドライフルーツにもこれらのSNPマーカーが適用できることを示した。本研究により、香酸カンキツを含む我が国の主要なカンキツの生果実および加工食品にも対応する品種識別技術を確立したので報告する。

## 材料および方法

### 1. 供試材料とDNAの抽出

我が国で加工向け出荷量の多い香酸カンキツ（出荷量+輸入量）の95%を占める10品種（農林水産省，2020b）、レモン（*C. limon* (L.) Burm. f.）、ユズ、スダチ、シクワサー、カボス、タヒチライム（*C. latifolia* Tanaka）、ダイダイ、ユコウ（*C. yuko* hort. ex Tanaka）、ジャバラ（*C. jabara* hort. ex Tanaka）、辺塚だいたい（*C. sp.*）および、交雑育種によって得られた香酸カンキツとして徳島県育成品種の‘阿波すず香’（スダチ速見本田四倍体×ユズ山根系）と農研機構果樹茶業研究部門の育成品種‘璃の香’（‘リスボン’レモン×ヒュウガナツ（*C. tamurana* hort. ex Tanaka））を供試材料に利用した（第1表）。これらに加えて、生食用の73品種も品種識別の対象とした。これらのうち、レモン、ユズ、スダチ、カボス、タヒチライム、ダイダイ、ユコウ、

ジャバラ, キシュウミカン (*C. kinokuni hort. ex Tanaka*), ヒュウガナツについては, 命名の異なる系統間での遺伝的変異を確認するため, それぞれ, 3, 7, 11, 3, 2, 2, 3, 4, 3, 5 品種・系統を供試した. これら 85 品種からなる合計 118 品種・系統は, 農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究拠点 (静岡県静岡市清水区), 徳島県立農林水産総合技術支援センター (徳島県石井町), 和歌山県果樹試験場 (和歌山県有田川町) で保存されている品種・系統と, 徳島県神山町で採取したスダチ, 和歌山県北山村で採取したジャバラから得た (第 1 表). ゲノム DNA は各品種・系統の葉から CTAB 抽出法 (Dellaporta ら, 1983) により抽出した.

## 2. 果実や加工品のサンプル調整とゲノム DNA 抽出

ユズ, スダチ, ユコウ, ‘阿波すず香’ の果皮, 果汁, ドライフルーツ (熱風乾燥, 凍結乾燥, 糖置換法) および市販の搾汁酢を供試材料として用いた.

搾汁酢を除くサンプルは, 下記の方法により作成した. 果皮は, 2020 年 11 月 6 日に徳島県立農林水産総合技術支援センターで採取した果実から削り取った外果皮を供試した. 果汁は, 2020 年 11 月 6 日に同センターで採取し, 2020 年 12 月 8 日に果実から果皮と種子を取り除き, ハンドジューサーを用いて得られたものを供試した. ドライフルーツは, 約 5 mm の厚さでそれぞれの果実を輪切りにし, 熱風乾燥, 凍結乾燥, 糖置換法により乾燥処理を行った. 熱風乾燥は, 輪切りにした果実を網状のプラスチックトレイに重ならないように並べ, 多目的電気乾燥機 (DSK-20-3, 静岡製機(株)) を用いて常圧, 熱風温度 45°C, 乾燥時間 40 時間の条件で乾燥させた. 凍結乾燥は, 輪切りにした果実をアルミトレイに重ならないように並べ, プラステチラー & ショックフリーザー (HBC-6A3, ホシザキ(株)) で庫内温度 -30°C の条件下で 30 分以上凍結させた. 凍結した果実を真空凍結乾燥機 (FZ-4.5, ラブコンコ社) にアルミトレイごと入れ, 真空度 0 Pa, 冷却温度 -50°C, 乾燥時間 4 日間の条件で乾燥させた. 糖置換法は, 輪切りにした果実を水の入った真空包装用フィルム (L-1420H, (株)メイワボックス) に入れ, 真空包装機 (HPS-300A-HP, ホシザキ(株)) を用いて真空度 99.9% で処理した. 処理後の果実を 20% ショ糖液の入った真空包装用フィルムに移し, 同条件で処理したのち, 果実を 40% ショ糖液の入った真空包装用フィルムに移し, 再び同条件で処理した. 真空包装された状態の果実を冷蔵庫で一晩静置し, 糖置換した. 翌日, 果実を網状のプラスチックトレイに重ならないように並べ, 多目的電気乾燥機 (DSK-20-3, 静岡製機(株)) を用いて, 常圧, 熱風温度 50°C, 乾燥時間 10 時間の条件で乾燥させた. 搾汁酢は, JA 名西郡で製造されている非加熱のユズ酢, スダチ酢, ユコウ酢を購入したものを使用した. 製造方法は, 搾汁後に振動ろ過機の 60 メッシュおよび 80 メッシュでろ過した後, タンクに貯蔵され, 再び 60 メッシュおよび 80 メッシュのパイプをとおして瓶詰めされたものである.

これらのサンプルからゲノム DNA を抽出するために, 果汁および搾汁酢については (6000×g), 10 分間の遠心分離によりペレットを回収し, 液体窒素で粉砕した. 果皮およびドライフルーツは全体をそれぞれ液体窒素で粉砕した. 粉砕したサンプルから, CTAB 抽出法 (Dellaporta ら, 1983) によりゲノム DNA を抽出し, DNeasy plant mini kit ((株)キアゲン) を用いて精製した.

## 3. SNP ジェノタイピング

SNP 解析には, 我が国の主要な生食用カンキツの品種識別を目的に開発された 8 種類の SNP マーカー (Endo ら, 2020a) と新たに設計した SNP マーカーを適用した. 新たな SNP マーカーは, Fujii ら (2013) が開発した 384 種類の SNP マーカーの配列情報および Mikan Genome Database (MiGD) (Kawahara ら, 2020) に搭載されているカンキツ多型情報を利用して, Primer Express™ Softwear v3.0.1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)) により TagMan minor groove binder (TaqMan MGB) プローブとプライマーセットを設計した. これらの SNP マーカーの設計に当たり, 多型が多く得られること, シングルコピーであること, 分解が少なく高品質の DNA 抽出が困難である加工品での利用を想定して, PCR 増幅断片長が 100 bp 未満であることを条件とした. 得られた SNP マーカーを 118 品種・系統 (第 1 表) および香酸カンキツの果実や加工品サンプルの SNP ジェノタイピングに適用して, SNP 遺伝子型を得た. SNP 分析は Endo ら (2020a) の手順に従い, PCR のサイクル数を 50 サイクルの条件で実施した. PCR 反応は, TaqMan™ Genotyping Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)), TaqMan MGB プローブおよびプライマー (ユーロフィンジェノミクス(株)) の試薬を用いて, QuantStudio™ 3 リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)) で実施した.

## 4. 遺伝子型データの解析

SNP マーカーで検出された遺伝子型の信頼性を評価するために, 親子関係を持つ供試品種の遺伝子型データを基に親子関係推定ソフトウェア MARCO version 1.0 (藤井ら, 2010) を用いて, 親子関係において正しく遺伝しているか否かを評価した (以下: トリオ解析). さらに, すべての供試品種の遺伝子型データを基に最少マーカーセット検出ソフトウェア MinimalMarker version 1.0 (Fujii ら, 2013) を用いて, 最少のマーカー数で供試したすべての品種を識別することができる最少マーカーセットを算出した. また, 育成者権が存続している品種については, 他の品種から識別するための最少マーカーセットを算出した.

## 結 果

### 1. 香酸カンキツの品種識別に利用可能な SNP マーカーのスクリーニング

Endo ら (2020a) が報告した 8 種類の SNP マーカー, SI312, SI001, SI322, SI149, SI306, SI201, SI210, SI381 を

第1表 SNP分析に供試した118品種・系統

分類	名称(学名)[商標名]	サンプル 番号	JP番号 <sup>z</sup>	系統名・品種名 <sup>y</sup>	保存場所・ 採集場所 <sup>x</sup>
香酸カンキツ	レモン ( <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.)	1	117289	リスボン	A
		2	113247	ユーレカ	A
		3	171497	ピラフランカ	A
	ユズ ( <i>C. junos</i> Siebold ex Tanaka)	4	117380	カンキツ研究拠点保存系統	A
		5	113187	多田錦	A
		6		山根系	B
		7		海野系	B
		8		要系	B
		9		藤田木頭	B
		10		平の香	B
	スダチ ( <i>C. sudachi</i> hort. ex Shirai)	11	117383	カンキツ研究拠点保存系統	A
		12	113189	本田系	A
		13	113191	新居系	A
		14	169659	大東スダチ(大スダチ)	A
		15		本田系	B
		16		速水本田四倍体	B
		17		新居系	B
		18		緑香系	B
		19		神山4号	B
		20		勝浦1号	B
		21		200年生古木(2代目)	C
シクワーサー ( <i>C. depressa</i> Hayata)	22	117514	大宜味クガニー	A	
カボス ( <i>C. sphaerocarpa</i> hort. ex Tanaka)	23	117381	カンキツ研究拠点保存系統	A	
	24	115752	祖母の香	A	
	25	115753	香美の川	A	
タヒチライム ( <i>C. latifolia</i> Tanaka)	26	117356	カンキツ研究拠点保存系統	A	
	27	113216	リマオタイチ	A	
ダイダイ ( <i>C. aurantium</i> L.)	28	117365	カブス	A	
	29	117369	回青橙	A	
ユコウ ( <i>C. yuko</i> hort. ex Tanaka)	30	203330	無核	A	
	31		有核	B	
	32		無核	B	
ジャバラ ( <i>C. jabara</i> hort. ex Tanaka)	33		原木複製樹A(20年生)	D	
	34		原木複製樹B(40年生)相須七色	E	
	35		原木複製樹C(40年生)相須パイロット	E	
	36		10年生の流通苗木	E	
辺塚だいたい	37	117475		A	
阿波すず香	38			B	
璃の香	39			A	
生食用カンキツ (交雑育種で育成 された品種を除く)	イヨ ( <i>C. iyo</i> hort. ex Tanaka)	40	117373		A
	ウンシュウミカン ( <i>C. unshiu</i> Marcow.)	41	117351		A
	黄金柑 ( <i>C. sp</i> )	42	172148		A
	河内晩柑 ( <i>C. sp</i> )	43	117412		A
	キシユウミカン ( <i>C. kinokuni</i> hort. ex Tanaka)	44	171490	カンキツ研究拠点保存系統	A
		45		無核紀州	A
		46		平紀州	A
	キング ( <i>C. nobilis</i> Lour.)	47			A
	クネンボ ( <i>C. nobilis</i> Lour. var knep Tanaka)	48			A
	グレープフルーツ ( <i>C. paradisi</i> Macfad.)	49	168864		A
	クレメンティン ( <i>C. clementina</i> hort. ex Tanaka)	50			A
	三宝柑 ( <i>C. sulcata</i> hort. ex I. Takah)	51	117315		A
	スイートオレンジ ( <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck)	52	172154		A
	スイートライム ( <i>C. limettioides</i> Tanaka)	53	113217		A
	タチバナ ( <i>C. tachibana</i> (Makino) Tanaka)	54	117381		A
	タンカン ( <i>C. tankan</i> Hayata)	55	113507	T-132	A
	ダンシータンジェリン ( <i>C. tangerina</i> Tanaka)	56			A
	地中海マンダリン ( <i>C. deliciosa</i> Tenore)	57			A
ナツダイダイ ( <i>C. natsudaikai</i> Hayata)	58	117297		A	
ハッサク ( <i>C. hassaku</i> hort. ex Tanaka)	59	117286		A	

第1表 (続き)

生食用カンキツ (交雑育種で育成 された品種を除 く)	ヒュウガナツ ( <i>C. tamurana hort. ex Tanaka</i> )	60	カンキツ研究拠点保存系統	A
		61	オレンジ日向	A
		62	井原系	A
		63	室戸小夏	A
		64	白鳥日向	A
	ブンタン ( <i>C. grandis</i> Osbeck)	65	土佐ブンタン	A
	ボンカン ( <i>C. reticulata</i> Blanco)	66	171505	A
	マーコット ( <i>C. sp</i> )	67		A
生食用カンキツ (交雑育種で育成 された品種)	安芸タンゴール	68		A
	朱見	69		A
	あすき	70		A
	あすみ	71	245233	A
	あまか	72		A
	天草	73		A
	ありあけ	74		A
	アンコール	75		A
	ウィルキング	76		A
	愛媛果試第28号 [紅まどんな]	77		A
	オーランド	78		A
	オセオラ	79		A
	カラマンダリン	80		A
	かんきつ中間母本農5号	81		A
	かんきつ中間母本農6号	82		A
	甘平	83		A
	清見	84	115521	A
	佐賀マンダリン	85		A
	サザンイエロー	86		A
	サザンレッド	87		A
	サマーフレッシュ	88		A
	不知火 [デコボン]	89	117159	A
	スイートスプリング	90		A
	西南のひかり	91		A
	清峰	92		A
	せとか	93	118842	A
	せとみ	94		A
	セミノール	95		A
	たまみ	96		A
	津之香	97		A
	津之輝	98		A
	津之望	99		A
	南香	100		A
	西之香	101		A
	ノバ	102		A
	はるひ	103	237599	A
	はるみ	104	117468	A
	早香	105		A
	はれひめ	106		A
	はれやか	107		A
	フェアチャイルド	108		A
	フォーチュン	109		A
ページ	110		A	
べにばえ	111		A	
ミネオラ	112		A	
みはや	113	251815	A	
ミホコール	114		A	
陽香	115		A	
麗紅	116		A	
リー	117		A	
ロビンソン	118		A	

<sup>z</sup> 農研機構遺伝資源センター農業生物資源ジーンバンクの記述による <[https://www.gene.affrc.go.jp/index\\_j.php](https://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php)>

<sup>y</sup> Tanaka (1969) の分類による

<sup>x</sup> A : 農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究拠点, B : 徳島県立農林水産総合技術支援センター, C : 徳島県神山町, D : 和歌山県果樹試験場, E : 和歌山県北山村

用いて、レモン、ユズ、スダチ、シクワーサー、カボス、ヒュウガナツ、タヒチライム、ダイダイ、ユコウ、ジャバラ、辺塚だいだいの11品種の香酸カンキツについて、試験的にSNP分析を実施したところ、すべての香酸カンキツでSNP遺伝子型を得ることができた。しかしながら、レモンとタヒチライム、ヒュウガナツと辺塚だいだいの2つの組合せでは、供試した8種類のSNPマーカーの遺伝子型がすべて同一であったことから、これらの香酸カンキツを識別できる新たなSNPマーカーを開発する必要が生じた。新たなSNPマーカーの候補は、Fujiiら(2013)が報告したゴールデンゲートアレイ(イルミナ(株))に搭載した384種類のSNPマーカーの中から、SNPマーカーの配列情報を用いてMikan Genome Database (MiGD) (Kawaharaら, 2020)に搭載されている比較ゲノムブラウザ TASUKE version 1.5.3 (Kumagaiら, 2013)を利用してSNPサイトの周辺配列の変異を確認し、Primer Express™ Softwear v3.0.1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック(株))により新たに36種類のTagMan MGBプローブとプライマーセットを設計した。新たに設計したSNPマーカーのうち、レモンとタヒチライム、ヒュウガナツと辺塚だいだいを識別できること、Endoら(2020a)が報告した8種類のSNPマーカーが座上していないクレメンティンゲノム ver. 1.0 (Wuら, 2014)で構築されたカンキツの9本の染色体に対応するスクャフォールド3および5由来のSNPを得ること、のいずれかの条件を満たす4種類のSNPマーカーSI2042, SI145, SI281, SI2711を追加した。新たに開発したSI2042, SI145, SI281, SI2711は、それぞれ、スクャフォールド3のbHLH型転写因子の遺伝子座(Ciclev10021941m.g)、スクャフォールド6のRNA結合タンパク質の遺伝子座(Ciclev10010976m.g)、スクャフォールド5の基本転写因子TFIIAサブユニットタンパク質の遺伝子座(Ciclev10002917m.g)、スクャフォールド2の9-cis-エポキシカロテノイドジオキシゲナーゼの遺伝子座(Ciclev10014639m.g)のコーディング領域内にあるSNPを検出するDNAマーカーである。

合計で12種類のSNPマーカーを用いて、Endoら(2020a)が解析した48品種と上記の11の香酸カンキツのSNP遺伝子型を取得し、MinimalMarker version 1.0 (Fujiiら, 2013)により、すべての品種を識別するために必要最少マーカーセットを算出したところ、SI312(スクャフォールド1)、SI2042(スクャフォールド2)、SI145(スクャフォールド3)、SI322(スクャフォールド4)、SI281(スクャフォールド5)、SI2711(スクャフォールド6)、SI306(スクャフォールド7)、SI201(スクャフォールド7)、SI381(スクャフォールド9)の9種類のSNPマーカーから構成される最少マーカーセットの組合せが得られた。この最少マーカーセットには、スクャフォールド8に由来するSNPマーカーが存在しないため、ゲノムワイドにSNP遺伝子型を検出するために、既報のSI210(スクャフォールド8)を加えて、合計10種類のSNPマーカーをカンキツのSNP品種識別用

のマーカーセットとした(第2表)。

## 2. カンキツのSNP品種識別マーカーセットを用いた118品種・系統のSNPジェノタイプング

香酸カンキツの品種識別にも適用可能な10種類のマーカーセットを用いて、第1表に記された85品種からなる合計118品種・系統の葉から抽出した全DNAを用いてSNPジェノタイプングを実施したところ、すべての品種・系統から良好なシグナルが検出され、各品種・系統のSNP遺伝子型を決定することができた。118品種・系統には、43組合せ(第3表)で親子関係がみられることから、43組合せのSNP遺伝子型データを用いてMARCO(藤井ら, 2010)によるトリオ解析を行い、10種類のSNPマーカーで検出されたSNP遺伝子型の妥当性を評価した。親子関係を持つ品種間では、子供にみられるアレルはいずれかの親から受け継いでいることが確認でき、すべての親子組合せにおいて、親子関係に矛盾は見られなかった。一例として、徳島県育成品種‘阿波すず香’はスダチ速水本田四倍体とユズ山根系の組合せで得られた三倍体品種である。本研究で用いた10種類のSNPマーカーのうち、両親で多型を示すマーカーは3種類あり、‘阿波すず香’は両親のいずれかのアレルを受け継いだ遺伝子型を有していた。これまでのCAPS解析による報告(新見ら, 2021)と同様に、中島ら(2015)の記載どおり‘阿波すず香’はスダチ速水本田四倍体とユズ山根系の交配で得られたとして矛盾はみられなかった。

10種類のSNPマーカーの遺伝子型を整理したところ、枝変わりや珠心胚実生で生じた品種間で同一のSNP型を示すことが明らかとなった。レモンでは、‘リスボン’、‘ユーレカ’、‘ピフランカ’の3品種で、すべての遺伝子型が一致していた。ユズでは、カンキツ研究拠点保存のユズ、多田錦、山根系、海野系、要系、藤田木頭、‘平の香’の7品種・系統で、すべての遺伝子型が一致していた。スダチでは、カンキツ研究拠点保存のスダチ、本田系(2系統)、新居系(2系統)、大東スダチ、速水本田四倍体、緑香系、神山4号、勝浦1号、200年生古木の11系統で、すべての遺伝子型が一致していた。ユコウでは、無核(2系統)、有核の3系統ですべての遺伝子型が一致していた。ジャバラでは、20年生原木複製樹、相須七色で採取した40年生の原木複製樹、相須パイロットで採取した40年生の原木複製樹、10年生の流通苗木の4系統で、すべての遺伝子型が一致していた。この他、カボスの3品種・系統(カンキツ研究拠点保存系統、‘祖母の香’、‘香美の川’)、タヒチライムの2系統(カンキツ研究拠点保存系統、リマオタイチ)、キシウミカンの3系統(カンキツ研究拠点保存系統、無核紀州、平紀州)ヒュウガナツの5品種・系統(カンキツ研究拠点保存系統、オレンジ日向、井原系、‘室戸小夏’および‘白鳥日向’)において、品種・系統間の遺伝子型がすべて同一であった。これらの結果から、上記の品種・系統は珠心胚由来あるいは栄養繁殖体である可能性が高いことが

第2表 品種識別に用いたSNPマーカー

マーカー名	Clementine genome ver. 1.0 <sup>z</sup>				SNP遺伝子型	増幅断片サイズ (bp)	スキマフォールド	ScaffoldにおけるSNPの位置	遺伝子座
	フォワードプライマー	リバースプライマー	TAQMAN-MGBプロローブ (FAM 標識)	TAQMAN-MGBプロローブ (HEX 標識)					
S1312 <sup>z</sup>	ACGTTCCGAAAGTGTAATACG	ATTCCTTCTCAATGATCCTTGTG	AAGCAGGTGATGACAG	AAGCAGGTGATGACAG	C/G	91	1,071,861	C1clev10008222m.g	
S12042	TTGTTCTGTAGTTTGTATTACAG	GAATGCTACCTACAAGACAAAGCTACA	TAGCTATCTAGTTTTTAAGGAA	CTAGTTTTTACCGAACCAAG	A/C	94	35,237,648	C1clev10014639m.g	
S1145	GATCTTGCCAACTGTTGGT	CAGTATGGAGAAAGATGGCAAAG	TTTAGGACTCTTAATGG	TAGGACTCTTAATAGC	A/T	68	2,108,308	C1clev10021941m.g	
S1322 <sup>z</sup>	TGGTGCCTACTACTCTGTGATGT	CAATTCCTCGGCACCTCATCAT	TGATAATGAATTTTCAGCCC	TGATAATGAATTTTCAGCCC	A/T	71	643,477	C1clev10031860m.g	
S1281	CAAAAATTTGCAACACAAATGA	CTGATGGATGCTTACTTTATGCA	TACAATATGATGCAACCT	TACAATATGATGCAACCT	A/G	69	35,359,180	C1clev10002917m.g	
S12711	GAAGGTGTATATCTGAACTGCAA	GGTCAACTTACACACAACAACCTGTT	AGAATGCTGAATAATCCCAAG <sup>y</sup>	ATGCTGAATAATCCCAAG <sup>y</sup>	A/C	77	11,709,857	C1clev10010970m.g	
S1306 <sup>z</sup>	TTATGTGGTGGAGATGATGAGGA	GCACTAAATCTTTCAGCTGATAGC	CGCCAAAATAT	CGCCAAAATAT	A/G	60	24,082,980	C1clev10011780m.g	
S1201 <sup>z</sup>	GCAGTTGAGATCAATGGTGCTT	TGATCGGCTGGTGATCCA	CTGATAGATACATCGACC	CTGATAGATACATCGACC	C/T	80	5,045,779	C1clev10024949m.g	
S1210 <sup>z</sup>	TGCTTTGGAGATGGATCAGACT	TCAGCCACTTTCGGCTTTCAGA	ACTTGTCTCGAATCAC	CACTTGTCTCGAATCAC	A/G	76	2,836,770	C1clev10027999m.g	
S1381 <sup>z</sup>	CCCTTGTTAGTTAAGTCCAAITTTCC	CATGACGTGGCCTTCAAAGTAT	TAAACAAGCCCTATCTTA	ATAACAAGCCCTATCTT	C/T	99	4,116,514	C1clev10006006m.g	

<sup>z</sup> Endo ら (2020a) からの引用<sup>y</sup> Phytozome (<<https://phytozome-next1.jgi.doe.gov/>> のクレメンティンのゲノム情報を参照)<sup>x</sup> プロローブは相補鎖の配列から設計

明らかとなった。このため、以降の解析では代表する1品種のみ遺伝子型を記載し、これまでSNPジェノタイピングを行っていない33種類のカンキツおよび既報の生食用カンキツの遺伝子型 (Endo ら, 2020a) と合わせて第3表に示した。このデータセットにおけるヘテロ接合度期待値 ( $H_E$ )、ヘテロ接合度観察値 ( $H_O$ )、および多型情報量 (PIC) の平均値は、それぞれ、0.46, 0.53, 0.35 であり、供試材料間で高い多様性がみられた。

さらに、このSNP遺伝子型データを用いて、MinimalMarker version 1.0 (Fujii ら, 2013) により育成者権が有効な23品種をSNP遺伝子型で鑑定できる最少マーカーセットを計算し、第4表に示した。23品種は2から4種類のSNPマーカーの遺伝子型を比較することで、第3表に記す他の品種と識別することが可能であった。

### 3. 香酸カンキツの果実・加工品のSNPジェノタイピング

香酸カンキツは加工品への利用が多いことから、加工品の品種識別、あるいは加工品の品種識別が困難である場合、加工品の原材料を特定する必要がある。そこで、香酸カンキツの品種識別に適用可能な10種類のSNPマーカー (第2表) を用いて、ユズ、スダチ、ユコウ、'阿波すず香' の果実や加工品のSNPジェノタイピングを実施した。第1図に示した生鮮果実の果皮、生鮮果実の果汁、搾汁酢、および凍結乾燥、糖置換法、熱風乾燥したドライフルーツから抽出したDNAを用いて、SNP分析を行った結果、熱風乾燥したドライフルーツ以外の果実や加工品では、安定したSNP遺伝子型が検出され (第2図)、葉から抽出したゲノムDNAから検出されたSNP遺伝子型と一致した (第5表)。以上のことから、本研究に使用したSNPマーカーが、果皮や果汁、凍結乾燥および糖置換法で作られたドライフルーツ、非加熱の搾汁酢などの加工品においても適用できることを確認した。一方、45°C 40時間の熱風乾燥で作られたドライフルーツについては、安定したSNPが検出できなかった。

## 考 察

本研究では、主要な香酸カンキツの品種を相互に識別できる新たなマーカーを追加し、カンキツの染色体9本すべてを評価できる10種類のSNPマーカーを選定した。カンキツでは、限られた在来種の相互交雑により品種が育成されていることから、9本の染色体に分散したSNPマーカーの利用により、ゲノムワイドに安定した多型検出が可能になると考えられる。供試した85の品種における10種類のSNPマーカーの平均PICは0.35で、既報の48品種における8種類のSNPマーカーのPIC値 (Endo ら, 2020a; Distefano ら, 2013) と同程度であり、10種類のSNPマーカーの多型頻度は、品種識別に十分であると考えられる。また、10種類のSNPマーカーの変異場所は、非コード領域ではなく、カンキツおよび関連種の間で高度に保存されているコード領域内に位置しており、多様性の高いカンキツの品種間で

第3表 供試した香酸カンキツおよび生食用カンキツの85品種における10種類のSNPマーカーの遺伝子型

番号	名称 [商標名]	JP 番号 <sup>z</sup>	両親の 組合せ	SNP マーカー <sup>y</sup>										
					SI312	SI2042	SI145	SI322	SI281	SI2711	SI306	SI201	SI210	SI381
				H <sub>E</sub> <sup>x</sup>	0.40	0.49	0.49	0.47	0.49	0.49	0.48	0.40	0.49	0.41
				H <sub>O</sub> <sup>w</sup>	0.40	0.58	0.68	0.44	0.53	0.57	0.64	0.47	0.53	0.44
				PIC <sup>v</sup>	0.32	0.37	0.37	0.36	0.37	0.37	0.37	0.32	0.37	0.33
1	レモン <sup>y</sup>	117289			CG	CC	AA	TT	GG	AC	GG	TT	GG	CT
4	ユズ <sup>y</sup>	117380			GG	CC	TT	AT	AG	CC	AG	TT	GG	TT
11	スダチ <sup>y</sup>	117383			GG	AC	TT	AT	GG	AC	AG	TT	GG	TT
22	シィクワーサー <sup>y</sup>	117514			CG	CC	TT	AT	AG	AC	AA	TT	GG	CT
23	カボス <sup>y</sup>	117381			GG	AC	TT	TT	AG	AC	AG	TT	GG	TT
26	タヒチライム	117356			CG	AC	AA	TT	GG	AC	GG	TT	GG	CT
48	ダイダイ <sup>y</sup>	117365			CG	AC	AT	AT	GG	AC	AG	CT	AG	CC
30	ユコウ	203330			CG	AC	AT	TT	GG	CC	AA	CT	AG	CT
33	ジャバラ				CG	AC	AT	TT	GG	AC	AG	CT	AG	CT
37	辺塚だいたい				GG	AC	AT	AT	AG	AC	AG	CT	AG	TT
38	阿波すず香		11×4		GG	AC	TT	AT	AG	AC	AG	TT	GG	TT
39	璃の香 <sup>y</sup>		1×60		CG	CC	AT	AT	AG	AC	GG	CT	AG	TT
40	イヨ <sup>y</sup>	117373			CG	AC	AT	AT	AG	AC	AA	CT	AG	CT
41	ウンシュウミカン <sup>y</sup>	117351	44×48		GG	CC	AT	AA	AG	CC	AA	CT	AA	CC
42	黄金柑 <sup>y</sup>	172148			GG	AC	AT	TT	AG	CC	AA	CT	GG	TT
43	河内晩柑 <sup>y</sup>	117412			GG	AC	AT	TT	GG	CC	AG	CC	AG	TT
44	キシウミカン <sup>y</sup>	171490			CG	CC	TT	AT	AG	AC	AA	TT	AG	CC
47	キング				CC	AC	AT	AA	GG	AC	AG	CT	AG	TT
48	クネンボ				CG	AC	AT	AT	GG	AC	AA	CT	AG	CT
49	グレープフルーツ <sup>y</sup>	168864			GG	AA	AT	AT	GG	AC	AG	CT	AG	TT
50	クレメンティン		52×57		CG	AC	AT	AT	AG	AA	AG	TT	GG	TT
51	三宝柑 <sup>y</sup>				GG	AC	TT	TT	GG	AC	AG	CT	AG	CT
52	スイートオレンジ <sup>y</sup>	172154			GG	AA	AT	AT	AG	AC	AG	CT	AG	CT
53	スイートライム	113217			GG	CC	AA	AT	GG	AC	AG	TT	AG	TT
54	タチバナ				GG	CC	TT	AT	AG	AC	AA	TT	GG	TT
55	タンカン <sup>y</sup>				CG	AC	AT	AA	AA	AC	AG	TT	AG	TT
56	ダンシータンジェリン				CG	AC	AT	AA	AA	AA	AA	TT	GG	TT
57	地中海マンダリン				CC	CC	AT	AA	GG	AA	AG	TT	AG	TT
58	ナツダイダイ <sup>y</sup>	117297			GG	AC	AT	TT	AG	AC	AG	CT	AA	CT
59	ハッサク <sup>y</sup>	117286			GG	AA	AT	AT	GG	CC	AG	CT	AA	CT
60	ヒュウガナツ <sup>y</sup>				GG	AC	AT	AT	AG	CC	AG	CT	AG	TT
65	ブンタン (土佐ブンタン) <sup>y</sup>				GG	AA	AA	TT	GG	CC	GG	CC	AG	TT
66	ボンカン <sup>y</sup>	171505			CG	AC	AT	AA	AG	AA	AG	TT	GG	TT
67	マーコット <sup>y</sup>				CG	AA	AT	AA	AG	AC	AG	TT	AG	TT
68	安芸タンゴール		41×52		GG	AC	AT	AT	AG	AC	AG	CT	AG	CC
69	朱見		84×95		GG	AC	AT	AA	AG	AA	AG	CT	AG	CT
70	あすき <sup>y</sup>				GG	AA	TT	AA	AA	AC	AG	CT	GG	CT
71	あすみ <sup>y</sup>	245233			GG	AA	TT	AA	AG	AA	GG	CT	GG	CT
72	あまか <sup>y</sup>		84×75		CG	CC	AT	AA	AG	AA	AG	TT	AG	CT
73	天草 <sup>y</sup>				CG	AA	AT	AT	AA	AC	AG	CT	AG	CT
74	ありあけ		52×50		CG	AA	TT	TT	AA	AA	AA	CT	AG	CT
75	アンコール <sup>y</sup>		47×57		CC	AC	AT	AA	GG	AA	GG	TT	AG	TT
76	ウィルキング		47×57		CC	CC	AT	AA	GG	AC	AG	TT	GG	TT
77	愛媛果試第28号 [紅まどんな] <sup>y</sup>		100×73		GG	AA	TT	TT	AA	AC	AG	CT	AG	TT
78	オーランド		49×56		GG	AA	AT	AA	AG	AC	AA	CT	GG	TT
79	オセオラ		50×78		GG	AA	AT	AT	AA	AA	AA	TT	GG	TT
80	カラマンダリン <sup>y</sup>		41×47		CG	AC	AT	AA	GG	AC	AA	CT	AG	CT
81	かんきつ中間母本農5号		117×44		GG	AC	TT	AT	GG	AC	AG	TT	AG	CT
82	かんきつ中間母本農6号 <sup>y</sup>		47×44		CC	AC	AT	AT	AG	CC	AG	TT	AG	CT

第3表 (続き)

83	甘平 <sup>z</sup>		101×66	CG	AC	AT	AT	AG	AA	AG	TT	GG	CT
84	清見 <sup>y</sup>	115521	41×52	GG	AC	AT	AA	AG	AC	AG	TT	AA	CT
85	佐賀マンダリン <sup>y</sup>		41×108	GG	AC	AT	AT	AG	AC	AA	CT	AG	CT
86	サザンイエロー			GG	AC	TT	TT	AG	CC	AG	CT	AA	CT
87	サザンレッド		80×79	CG	AA	AT	AT	AG	AC	AA	TT	AG	CT
88	サマーフレッシュ		59×58	GG	AA	AT	AT	GG	AC	GG	CT	AA	TT
89	不知火 [デコボン] <sup>y</sup>	117159	84×66	CG	AA	TT	AA	AG	AC	AG	TT	AG	TT
90	スイートスプリング <sup>y</sup>		41×59	GG	AC	AT	AT	AG	CC	AG	CT	AA	CC
91	西南のひかり <sup>y</sup>			GG	AC	TT	AA	GG	AC	AA	CT	GG	CT
92	清峰		84×112	GG	AC	AT	AA	AG	AC	AG	CT	AA	TT
93	せとみ <sup>y</sup>	118842		GG	AA	TT	AA	AA	AC	AG	TT	AA	TT
94	せとみ		84×66	CG	AA	AT	AA	AG	AC	GG	TT	AG	CT
95	セミノール <sup>y</sup>		49×56	GG	AC	AT	AA	AG	AA	AG	CT	AG	TT
96	たまみ <sup>y</sup>		84×76	CG	CC	AT	AA	AG	AC	AG	TT	AG	CT
97	津之香		84×41	GG	AC	AT	AA	AG	CC	AG	TT	AA	CT
98	津之輝 <sup>y</sup>			CG	AC	TT	AA	GG	AA	AG	TT	AA	CT
99	津之望 <sup>y</sup>		84×75	CG	AA	AA	AA	AG	AC	AG	TT	AA	TT
100	南香 <sup>y</sup>		52×50	GG	AC	AT	AT	AG	AC	AG	CT	AG	CT
101	西之香 <sup>y</sup>		84×52	GG	AC	TT	AT	AA	AA	AA	TT	AG	CC
102	ノバ		50×78	GG	AC	AA	AT	AA	AA	AG	CT	GG	TT
103	はるひ <sup>y</sup>	237599		GG	AC	TT	AT	GG	AC	AA	CC	AG	CT
104	はるみ <sup>y</sup>	117468	84×66	GG	AC	AT	AA	AA	AA	AG	TT	AG	TT
105	早香		41×66	GG	AC	AT	AA	AG	AC	AA	CT	AG	CT
106	はれひめ <sup>y</sup>			GG	AC	AT	AT	AA	CC	AA	CT	AA	CT
107	はれやか		75×66	CG	AC	AA	AA	AG	AA	AG	TT	AG	TT
108	フェアチャイルド		50×78	GG	AC	AT	AT	GG	AA	AG	TT	GG	TT
109	フォーチェン		50×78	CG	AC	AT	AT	GG	AA	AG	TT	GG	TT
110	ページ		112×50	CG	AA	AT	AT	AA	AA	AG	TT	GG	TT
111	べにばえ			CG	AA	AT	AA	AG	AC	AG	CT	AG	TT
112	ミネオラ		49×56	CG	AC	AT	AA	AG	AA	AG	CT	AG	TT
113	みはや <sup>y</sup>	251815		GG	AA	AT	AT	AG	AC	AA	CT	AG	CT
114	ミホコール		41×75	CG	AC	AT	AA	GG	AC	AG	CT	AA	CT
115	陽香		84×66	CG	AA	AT	AA	AG	AA	AA	TT	AG	CT
116	麗紅 <sup>y</sup>			CC	AC	AT	AA	GG	AC	AG	TT	AA	TT
117	リー		50×78	GG	AA	AT	AA	AG	AA	AG	TT	GG	TT
118	ロビンソン		50×78	CG	AA	AT	AT	AG	AA	AA	TT	GG	TT

<sup>z</sup> 農研機構遺伝資源研究センター農業生物資源ジーンバンクの記述による (<[https://www.gene.affrc.go.jp/index\\_j.php](https://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php)>)

<sup>y</sup> SI312, SI322, SI306, SI201, SI210, SI381 の SNP 遺伝子型は Endo ら (2020a) からの引用

<sup>x</sup> ヘテロ接合度期待値

<sup>w</sup> ヘテロ接合度観察値

<sup>v</sup> 多型情報量

安定して SNP が検出できる。85 品種には、43 組合せの親子関係を持つ品種組合せが存在しており、MARCO (藤井ら, 2010) を用いたトリオ解析により、SNP 遺伝子型の遺伝がトリオ間で矛盾がないことを確認している。

カンキツでは、珠心胚や枝変わりなどの突然変異により生じた品種が多数存在している。これまでジェノタイプングしていなかったヒュウガナツの系統を含め、レモン、ユズ、スダチ、カボス、タヒチライム、ダイダイ、ユコウ、ジャバラ、キシユウミカンにおいて、10 種類の SNP マーカーの遺伝子型が同一であることを確認している。以上のことから、新たに選抜した 10 種類の SNP マーカーは、カンキツの品種識別で安定した多型検出が可能であり、トリオ

解析による妥当性が確認された 85 品種の SNP 遺伝子型は、輸入果実などのサンプルの SNP 遺伝子型の照合用データとして極めて重要である。

本研究では、生果の果皮、果汁、搾汁酢、凍結乾燥や糖置換法によるドライフルーツから抽出したゲノム DNA で SNP ジェノタイプングが安定して分析できることを確認している。一方、熱風乾燥したドライフルーツでは、ヘテロ型として検出される SNP マーカーにおいて片側のアレルが検出されない、アレルドロップがみられた。これらのサンプルでは、加工時に長時間熱に晒されたことでサンプルの DNA の分解が進み、PCR アンプリコンの増幅量が十分でなかったため、シグナルの検出ができなかったと考え

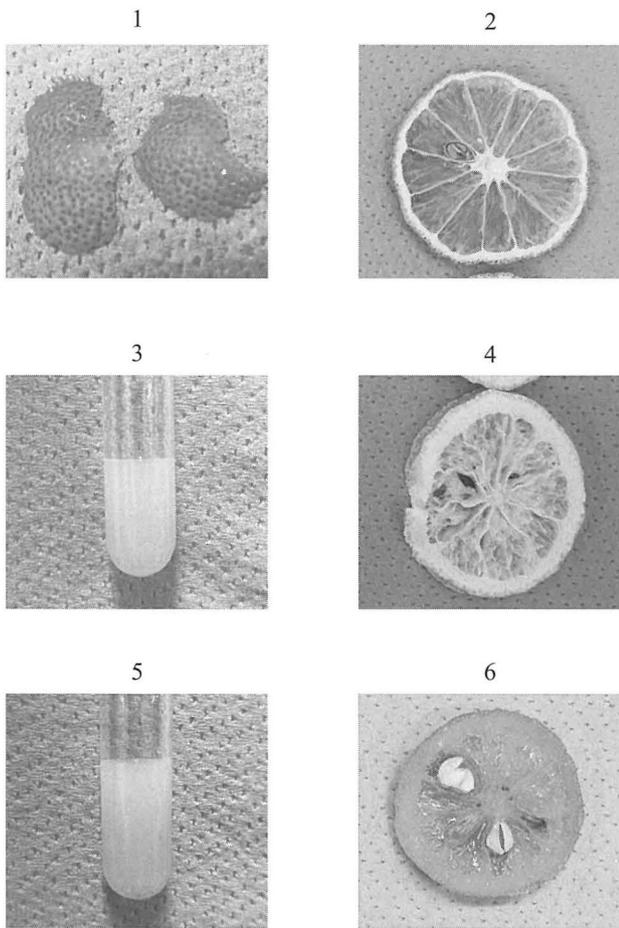
第4表 育成者権が存在する品種を特定するための最少マーカーセット

サンプル 番号	品種	品種登録年月日	育成者権の 存続期間 (年)	最少 マーカー セットを 構成する マーカー数	最少マーカーセットの例				最少 マーカー セットの数
					SI145	SI2042	SI281	SI322	
38	阿波すず香	2017年 9月 28日	30	4	SI145	SI2042	SI281	SI322	1
39	璃の香	2015年 3月 20日	30	3	SI201	SI2042	SI312		20
69	朱見	1999年 11月 25日	25	4	SI2042	SI2711	SI312	SI381	8
70	あすき	2017年 11月 16日 <sup>γ</sup>		3	SI145	SI210	SI281		5
71	あすみ	2014年 9月 30日	30	2	SI145	SI306			1
72	あまか	1999年 11月 25日	25	3	SI2042	SI2711	SI312		3
77	愛媛果試第28号〔紅まどんな〕 <sup>z</sup>	2005年 3月 23日	25	3	SI281	SI312	SI322		7
81	かんきつ中間母本農5号	1999年 11月 25日	25	4	SI145	SI201	SI312	SI381	10
82	かんきつ中間母本農6号	2004年 6月 4日	25	2	SI312	SI322			4
84	甘平	2007年 8月 7日	30	4	SI145	SI201	SI2711	SI312	2
91	西南のひかり	2009年 3月 19日	30	3	SI281	SI312	SI322		4
93	せとか	2001年 10月 18日	25	3	SI145	SI2042	SI210		10
94	せとみ	2004年 3月 3日	25	3	SI2042	SI306	SI312		7
96	たまみ	2006年 12月 14日	30	4	SI2042	SI2711	SI312	SI322	9
98	津之輝	2009年 3月 19日	30	2	SI210	SI2711			1
99	津之望	2011年 5月 24日	30	2	SI145	SI210			1
101	西之香	2000年 12月 22日	25	2	SI281	SI381			2
103	はるひ	2011年 3月 18日	30	2	SI145	SI201			5
104	はるみ	1999年 11月 25日	25	4	SI2042	SI281	SI312	SI322	13
106	はれひめ	2004年 6月 4日	25	2	SI2711	SI281			1
111	べにばえ	2008年 3月 18日	30	4	SI201	SI2042	SI312	SI322	4
113	みはや	2014年 9月 30日	30	4	SI2042	SI210	SI306	SI312	3
116	麗紅	2005年 12月 7日	30	2	SI210	SI312			1

<sup>z</sup>全農愛媛登録商標<sup>γ</sup>出願公表年月日

第5表 供試した香酸カンキツの果実・加工品における SNP マーカーの遺伝子型

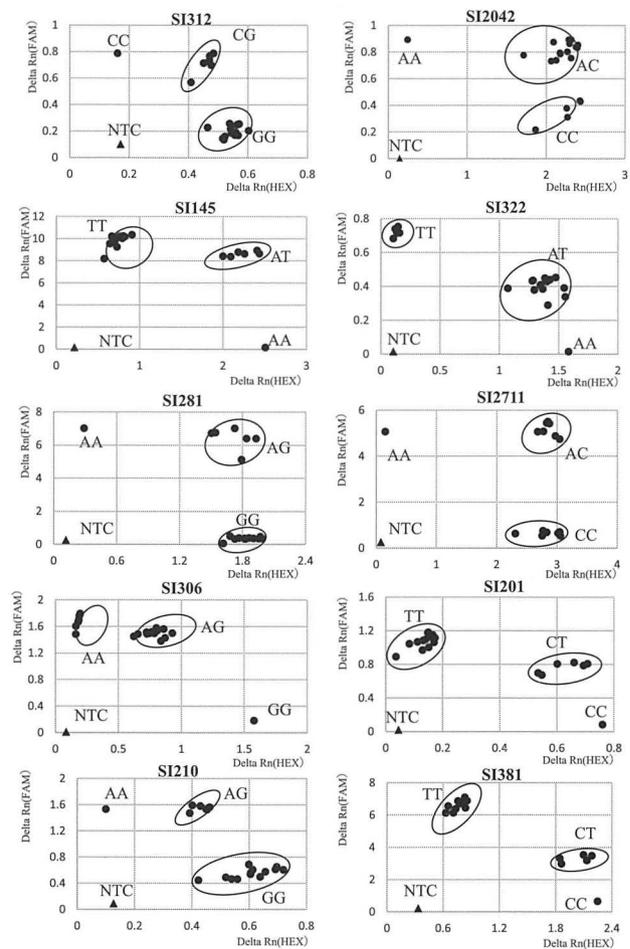
品種	加工品	SNP マーカー									
		SI312	SI2042	SI145	SI322	SI281	SI2711	SI306	SI201	SI210	SI381
ユズ	生果・果皮	CG	CC	TT	AT	AG	AC	AG	TT	GG	TT
	生果・果汁	CG	CC	TT	AT	AG	AC	AG	TT	GG	TT
	JA 搾汁酢	CG	CC	TT	AT	AG	AC	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (凍結乾燥)	CG	CC	TT	AT	AG	AC	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (糖置換法)	CG	CC	TT	AT	AG	AC	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (熱風乾燥)	CG	-	TT	AT	-	-	AG	TT	GG	-
スダチ	生果・果皮	CG	AC	TT	AT	GG	AA	AG	TT	GG	TT
	生果・果汁	CG	AC	TT	AT	GG	AA	AG	TT	GG	TT
	JA 搾汁酢	CG	AC	TT	AT	GG	AA	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (凍結乾燥)	CG	AC	TT	AT	GG	AA	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (糖置換法)	CG	AC	TT	AT	GG	AA	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (熱風乾燥)	CG	AC	TT	AT	GG	AA	AG	TT	GG	-
ユコウ	生果・果皮	CC	AC	AT	TT	GG	AC	AA	CT	AG	CT
	生果・果汁	CC	AC	AT	TT	GG	AC	AA	CT	AG	CT
	JA 搾汁酢	CC	AC	AT	TT	GG	AC	AA	CT	AG	CT
	ドライフルーツ (凍結乾燥)	CC	AC	AT	TT	GG	AC	AA	CT	AG	CT
	ドライフルーツ (糖置換法)	CC	AC	AT	TT	GG	AC	AA	CT	AG	CT
	ドライフルーツ (熱風乾燥)	CC	AC	AT	TT	GG	-	AA	CT	AG	-
阿波すず香	生果・果皮	CG	AC	TT	AT	AG	AA	AG	TT	GG	TT
	生果・果汁	CG	AC	TT	AT	AG	AA	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (凍結乾燥)	CG	AC	TT	AT	AG	AA	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (糖置換法)	CG	AC	TT	AT	AG	AA	AG	TT	GG	TT
	ドライフルーツ (熱風乾燥)	CG	AC	TT	AT	AG	AA	AG	TT	GG	-



第1図 供試した香酸カンキツの果皮, 果汁, 搾汁酢, ドライフルーツ

1: ユズの果皮, 2: ユコウのドライフルーツ (熱風乾燥), 3: スダチの果汁, 4: ユズのドライフルーツ (凍結乾燥), 5: スダチの搾汁酢, 6: ‘阿波すず香’のドライフルーツ (糖置換法)

られた. 本研究では, 上記の加工品以外にも, ジャム, ポン酢, 果汁調味料, 果皮焙煎茶などのサンプルからゲノムDNAを抽出し, SNPジェノタイピングを試みたが, これらの加工品では, SNP分析に適した品質のDNA抽出は一般に難しく, シグナルが検出できない, アレドロップが生じるなどの分析結果となった (データ未発表). 加工過程において, 原材料の熱処理や化学処理によりDNAが分解することは報告されており (Quirascoら, 2004; Vijayakumarら, 2009), カンキツでは, 熱処理時間の長いジャムなどでは, DNAの劣化が著しく進み, SNPジェノタイピングが困難であった (Endoら, 2020b). これらの加工品では, 分析に最適なゲノムDNAを抽出することが, 現段階では極めて困難であることから, 加工品の原材料が入手可能な国内で製造された加工品においては, 原材料からゲノムDNAを抽出し, SNP分析を行うことで権利侵害の立証が可能であると考えられる. 一方, 輸入加工品については, 原材料の入手が困難であることから, 本技術の適用範囲は加熱産品以外の加工品に限定される.



第2図 ユズ, スダチ, ユコウ, ‘阿波すず香’の果実や加工品から抽出したDNAサンプルのSNPジェノタイピング2種類の蛍光色素で標識したプローブにより検出されたシグナル値を2次元プロットし, プロットされた位置から各サンプルのSNP遺伝子型を決定している

X軸: 蛍光色素 HEX で標識したプローブで検出したシグナル値, Y軸: 蛍光色素 FAM で標識したプローブで検出したシグナル値, NTC: 鋳型DNAを加えていないサンプル, 2文字のアルファベット: SNP遺伝子型を示す

以上のように, 本報告で開発したSNP品種識別技術は, 生鮮果実などの輸入差止申立に必要な迅速な検査が求められる税関などの検査現場に利用できる実用技術であり, 我が国で育成した優良品種の知的財産の保護に結び付くことを期待している.

## 摘要

香酸カンキツの果実は調理や加工などへの利用が多く, 新品種の育成者権を保護するためには, 種苗の適正管理のための調査に加え, 加工品や原材料の果実についても育成者権の権利侵害に対する調査が必要であることから, 果実や加工品を対象とした品種識別技術の確立が求められている. これまでに開発した生食用カンキツを主な対象としたSNP品種識別技術を基に, 主要な香酸カンキツの品種識別に適用できるようにSNPマーカーを新たに設計し, カンキ

ツの9本の染色体の遺伝子型が評価できる10種類のSNPマーカーからなる品種識別用のマーカーセットを開発した。新たなマーカーセットの利用により、香酸カンキツの10品種と農研機構および徳島県で育成された香酸カンキツ2品種、生食用の73品種を相互に識別できる。分析した85品種には43組合せの親子関係がみられ、トリオ間でSNPの遺伝に矛盾はなかった。また、香酸カンキツの主要品種の果皮、果汁、搾汁酢およびドライフルーツにもこれらのSNPマーカーが適用可能である。本報告で開発したSNP品種識別技術は、生鮮果実などの輸入差止申立に必要な迅速な検査が求められる税関などの検査現場に利用できる実用技術であり、我が国で育成した優良品種の知的財産保護の強化が期待できる。

**謝辞** 本研究の実施に当たり、ドライフルーツの作成についてご指導くださった徳島県立農林水産総合技術支援センター高度技術支援課・宮崎佳子課長補佐、供試材料の採取に協力いただいた徳島県立農林水産総合技術支援センター農産園芸研究課・津村哲宏首席研究員に心より感謝申し上げます。

本研究は文部科学省科学技術人材育成費補助事業「ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ(牽引型)」に基づく研究助成金により実施したものである。

## 引用文献

- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1(4): 19–21.
- Distefano, G., S. la Malfa, A. Gentile and S. Wu. 2013. EST-SNP genotyping of citrus species using high-resolution melting curve analysis. *Tree Genet. Genomes.* 9: 1271–1281. DOI: 10.1007/s11295-013-0636-6.
- Endo, T., H. Fujii, T. Yoshioka, M. Omura and T. Shimada. 2020a. TaqMan-MGB SNP genotyping assay to identify 48 citrus cultivars distributed in the Japanese market. *Breed. Sci.* 70: 363–372.
- Endo, T., H. Fujii, T. Yoshioka, M. Omura and T. Shimada. 2020b. Citrus cultivar identification fresh and processed fruits by TaqMan-GB SNP genotyping assay. 2020b. *DNA Polymorphism* 28: 33–40.
- 藤井 浩・山下浩之・保坂ふみ子・寺上伸吾・山本俊哉. 2010. 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の開発. *園学研.* 9 (別1): 34.
- Fujii, H., T. Ogata, T. Shimada, T. Endo, H. Iketani, T. Shimizu, T. Yamamoto and M. Omura. 2013. MinimalMarker: an algorithm and computer program for the identification of minimal sets of discriminating DNA markers for efficient variety identification. *Journal of Bioinformatics and computational Biology* 11: 1250022.
- Fujii, H., T. Narita, H. Oshino, T. Endo, T. Kawakami, H. Goto, T. Yoshioka, M. Omura and T. Shimada. 2019. CAPS markers with stability and reproducibility for discriminating major citrus cultivars in Japan. *DNA polymorphism* 27: 71–79.
- Kawahara, Y., T. Endo, M. Omura, Y. Teramoto, T. Itoh, H. Fujii and T. Shimada. 2020. Mikan genome database (MiGD): integrated database of genome annotation, genomic diversity, and CAPS marker information for mandarin molecular breeding. *Breeding Science.* 70: 200–211.
- Kumagai, M., J. Kim, R. Itoh, and T. Itoh. 2013. TASUKE: a web-based visualization program for large-scale resequencing data. *Bioinformatics* 29: 1806–1808.
- 中島光廣・徳永忠士・新居美香・津村哲宏・山本浩史・阪口 優・山尾正実. 2015. 三倍体香酸カンキツ新品種‘阿波すず香’の育成. *徳島農林水産総合技術支援センター研報.* 2: 9–12.
- 新見恵理・藤井 浩・太田 智・岩倉拓哉・遠藤朋子・島田武彦. 2021. CAPSマーカーを用いた香酸カンキツの品種識別技術の確立. *園学研.* 20: 17–27.
- 農研機構. 2019. カンキツ22品種のDNA品種識別技術マニュアル—CAPSマーカーによるカンキツ22品種のDNA品種識別技術—. <[https://www.naro.go.jp/publicity\\_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130601.html](https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130601.html)>.
- 農林水産省. 2020a. 地理的表示(GI)保護制度. <[https://www.maff.go.jp/j/shokusan/gi\\_act/index.html](https://www.maff.go.jp/j/shokusan/gi_act/index.html)>.
- 農林水産省. 2020b. 特産果樹生産動態等調査 平成28年産. かんきつ類の果樹. <[https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan\\_kazyu/](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/)>.
- 農林水産省. 2021. 種苗法の改正について. <<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/syubyouhou/>>.
- 太田 智・吉岡照高・根角博久・喜多正幸・國賀 武・中嶋直子・濱田宏子・滝下文孝. 2014. レモン新品種‘璃の香’. *園学研.* 13 (別2): 316.
- Quirasco, M., B. Schoel, J. Plasencia, J. Fagan and A. Galvez. 2004. Suitability of realtime quantitative polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for cry9C detection in Mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. *J. AOAC Int.* 87: 639–646.
- 高品 善・遠藤玲子・藤井 浩・山本俊哉. 2008. オウトウ加工品へのSSRマーカーによる品種識別技術の適用. *DNA多型.* 16: 95–98.
- Tanaka, T. 1969. Misunderstanding with regards citrus classification and nomenclature. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B* 21: 139–145.
- Vijayakumar, K. R., A. Martin, L. R. Gowda and V. Prakash. 2009. Detection of genetically modified soya and maize: Impact of heat processing. *Food Chem.* 117: 514–521.
- Wu, G. A., S. Prochnik, J. Jenkins, J. Salse, U. Hellsten, F. Murat, X. Perrier, M. Ruiz, S. Scalabrin, J. Terol et al. 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnol.* 32: 656–662. DOI: 10.1038/nbt.2906.
- 山本俊哉・寺上伸吾・滋田徳美・西谷千佳子・西尾聡悟・齋藤寿広・藤井 浩. 2012. クリ果実および加工品のDNA分析. *DNA鑑定.* 4: 29–38.