

CAPS マーカーを用いた愛媛県育成イチゴ品種 ‘紅い雫’

‘あまおとめ’ の効率的な品種識別

三谷亜実 井門健太*

Efficient discrimination of strawberry cultivars ‘Akaishizuku’ ‘Amaotome’ bred in Ehime prefecture from other cultivars using CAPS markers

MITANI Ami and IMON Kenta

要 旨

愛媛県育成イチゴ品種 ‘紅い雫’ ‘あまおとめ’ を含む国内 25 品種・系統を供試して、農研機構野菜茶業研究所で開発された 25 個の CAPS マーカーを用いたイチゴの品種識別技術への適用性を検討した。その結果、‘紅い雫’ ‘あまおとめ’ および両品種と同じ交配組合せとなる 2 系統も含めた品種・系統識別が可能となった。

また、農研機構果樹研究所で開発された最小マーカーセット検出ソフトウェア MinimalMarker を用いて、25 個ある CAPS マーカーのうち、最小の組合せ 9 個を用いることで品種識別マニュアルに記載されている国内 125 品種と効率的に識別できることを確認した。

キーワード：DNA マーカー，MinimalMarker，育成者権の保護，妥当性試験

1. 緒言

イチゴの品種識別は、苗の大きさや生育ステージを揃えるなど、同一環境下で栽培し、開花日、果実の大きさ、着花・果実特性、草勢等を品種間差で比較することにより行われるが、品種の異同が判明するまでには多くの労力と時間を要する (Nielsen and Lovell, 2000)。そのため、育成者権の侵害事例に早急に対応するためには、より簡便で迅速な品種識別技術が必要となる。

イチゴにおける簡便で迅速な品種識別技術の一つとして、レトロトランスポゾン挿入多型に基づく DNA マーカー (Retrotransposon Based Insertion Polymorphism markers; 以下, RBIP マーカー) を活用した品種識別技術が確立されており (門田, 2018; 井門, 2020), 再現性も優れている。しかしながら, RBIP マーカーは, イチゴにおいては実際に品種識別等の様々な場面で適用可能か否かを判断するための基準となる再現性を証明する妥当性試験 (矢野, 2018) が実施されていない。

イチゴにおいて妥当性試験が実施されてい

る品種識別技術には、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 (現; 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 以下, 農研機構) 野菜茶業研究所 (現; 農研機構野菜花き研究部門) が開発した Cleaved Amplified Polymorphic Sequence markers (以下, CAPS マーカー) を活用した品種識別技術がある (國久, 2010)。同技術における妥当性試験は、公開されている「DNA マーカー (CAPS 法) によるイチゴ品種識別マニュアル (農研機構, 2007)」 (以下, 品種識別マニュアル) に従って、国内のイチゴ 125 品種を対象に複数の公的研究機関等で実施されている (國久, 2010)。

CAPS マーカーは、検出までの操作が簡単で、高度な技術や高額な機器を必要とせず汎用性が高いことに加え、再現性にも優れることから (國久, 2010), かんきつ (二宮ら, 2015; 岡本ら, 2018), サツマイモ (田中ら, 2005), 二条オオムギ (内村ら, 2004), テッポウユリ (竹之下ら, 2014) 等、様々な作物において CAPS マーカーを活用した品種識別が試みられている。

そこで、本試験では、愛媛県育成イチゴ品種 ‘紅い雫’ ‘あまおとめ’ における育成者権の保

*現 愛媛県農林水産部農政企画局農政課農地・担い手対策室

護を目的として、CAPS マーカーを活用した品種識別技術への適用性を検討した。また、農研機構果樹研究所（現；農研機構果樹茶業研究部門）で開発された最小マーカーセット検出ソフトウェア MinimalMarker (Fujii ら, 2013) を用いて、品種識別マニュアルに記載のある国内のイチゴ 125 品種との識別に必要な最小の CAPS マーカーの組合せについて明らかにした。

2. 材料および方法

2.1 供試材料

愛媛県育成イチゴ品種‘紅い雫’（あかいしず

く：2017年3月1日登録，第25595号），‘あまおとめ’（2009年2月24日登録，第17391号）ならびに両品種と両親が同一である兄弟系統との識別可否を確認するため，‘紅い雫’と同じ交配組合せ（‘あまおとめ’×‘紅ほっぺ’）および‘あまおとめ’と同じ交配組合せ（‘とちおとめ’×‘さがほのか’）となる愛媛県による育成系統の‘20-15-53’と‘愛媛12号’の2系統を用いた（表1）。また，愛媛県育成品種・系統以外は，品種識別マニュアルに記載されている国内のイチゴ125品種のうち，愛媛県農林水産研究所で保存されている21品種を用いた（表1）。

表1 供試した愛媛県育成品種を含むイチゴ23品種・2系統

品種・系統名	育成者名	品種・系統名	育成者名
20-15-53	愛媛県農林水産研究所	レッドパール	西田 朝美 氏（愛媛県）
紅い雫	〃	熊研い548	熊本県農業研究センター
愛媛12号	〃	ひみこ	農研機構九州沖縄農業研究センター
あまおとめ	〃	めぐみ	徳島県立農林水産総合技術支援センター
紅ほっぺ	静岡県農林技術研究所	ゆめのか	愛知県農業総合試験場
さがほのか	佐賀県農業試験研究センター	さつまおとめ	鹿児島県農業開発総合センター
とちおとめ	栃木県農業試験場	北の輝	農研機構東北農業研究センター
福岡S6号	福岡県農林業総合試験場	やよいひめ	群馬県農業技術センター
さちのか	農研機構九州沖縄農業研究センター	とちひとみ	栃木県農業試験場
章姫	萩原 章弘 氏（静岡県）	越後姫	新潟県農業総合研究所園芸研究センター
とよのか	農研機構九州沖縄農業研究センター	おとめ心	山形県庄内総合支庁産業経済部 農業技術普及課産地研究室
女峰	栃木県農業試験場	ペチカ	(株) ホーブ
アイベリー	愛三種苗(株)		

注) 公的機関の表記は現在の名称

2.2 DNA抽出

供試苗から採取した小葉70~80mgを、φ3.2mmステンレスビーズ(トミー精工)2個と一緒に2.0mL専用コニカルチューブ(トミー精工, TM-625)に入れ、細胞破碎装置(トミー精工, MS-100)を用いて室温・4,000rpm・120秒の条件で破碎した。破碎後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 付属のAPIバッファ500μL, ポリクラールVT(和光純薬)2~10mg, 同キット付属のRNase A 4μLを加え、60秒ボルテックスミキサーにかけ、サンプルを十分に混合した。その後、破碎液の入ったチューブは65°Cで20分間保温し、その間、チューブを2~3回転倒混和もしくは10秒ボルテックスミキサーにかけ混合した。以降、品種識別マニュアルに記載されてい

る手順に従い、同キットを用いてDNA抽出を行った。抽出したDNAは超純水で10倍に希釈し、PCR反応のテンプレートとして用いた。

2.3 CAPS マーカー

品種識別マニュアルに記載されている25個のCAPSマーカーを用いた(表2)。

2.4 PCR 反応

プライマーは、25個のCAPSマーカーのプライマーの塩基配列に基づく20組を用いた(表2)。PCR反応は、品種識別マニュアルを一部改変し、PCR反応試薬にはAmpliAq Gold® 360 Master Mix (ABI)を使用し、PCR反応系は10μLとした。1サンプル当たりのPCR反応液の組成

表2 CAPSマーカーのプライマーの塩基配列, 制限酵素, 多型バンドサイズ

No.	CAPSマーカー	プライマー	塩基配列	制限酵素	多型バンドサイズ (bp)
1	DFR-Hin6I(DFR-Hhal)	DFR-Fw DFR-Rv	GAGACCCTGGTCCGTCG CCTCCGAAGTGTCTTTGGTTGAG	Hin 6 I	A : 553+385+168, X : 553
2	APX-MluI	APX-Fw APX-Rv	GTGGTCACACCTTGGTGC AGTATAATATTTAAGCAGAATGCAGACTTC	Mlu I	ABC : 567+488+408, AB : 567+488, BC : 488+408, AA : 567, BB : 488, CC : 408
3	CHI-PvuII	CHI-Fw CHI-Rv	AGGAGTTGACAGAGTCGGTTG GACTTGTGAGTATGATAGTCTGCTG	Pvu II	A : 531, B : 418+113, H : A+B
4	F3H-NcoI(N)	F3H-Fw(N)	ACCATGGACATGTGAGTACTTFF	Nco I	A : 426, B : 314+112, H : A+B
5	F3H-Eam1104I(EarI)(N)	F3H-Rv(N)	ACTAAGGAAGTACTACTCAACCA	Eam 1104 I	A : 428, B : 357, H : A+B
6	F3H2-HpaII(N)	F3H-Fw(N)	ACCATGGACATGTGAGTACTTFF	Hpa II	A : 505+280+225, X : 280+225
7	F3H2-DdeI(N)	F3H2-Rv(N)	CCCAAATAATGTGTCAATACATATACGAT	Dde I	A : 505+411, X : 411
8	F3H3-AccI(N)	F3H3-Fw F3H3-Rv(N)	TAATAGGGTCTAGGTGCGTGG ACCCAAATAATGTGTCAATACATATAAGAC	Acc I	A : 327, B : 249, H : A+B
9	CTI1-HinfI	CTI1-Fw CTI1-Rv	TTCTAATGATCAACACCTACTTTCCC GTAGCCACCCGCTG	Hinf I	A : 515, B : 432, H : A+B
10	MSR-AluI	MSR-Fw MSR-Rv	AGCACTTTCACCATAGGCATAATC CCTTGAGCATAAATGAAGTGGCA	Alu I	A : 525, B : 276+249, H : A+B
11	PGPA-AccI(N)	PGP-FwA	CCTCACCTTCCTCGAGCTC	Acc I	A : 400, B : 288, H : A+B
12	PGPA-RsaI(N)	PGP-RvA(N)	AAGTCTATCCGATCAAAGTTCATG	Rsa I	A : 400+211+189, X : 400
13	PGPB-RsaI	PGP-FwB PGP-RvB	ACCTCACCTTCCTTGAGCTT GACAAGTCTATCCGATCAAAGTTCATA	Rsa I	A : 404+295+109, X : 404
14	APX2-DraI	APX2-FwA APX2-Rv	CAGAGGCCTCATCGCCG TCAGGTCCACCGGTGACC	Dra I	A : 508+375+123, X : 375+123
15	APX3-DraI(N)	APX3-Fw(N) APX2-Rv	GGCCTCATCGCCGAG TCAGGTCCACCGGTGACC	Dra I	A : 397, B:348, H : A+B
16	APX4-TaqI(N)	APX4-Fw(N) APX2-Rv	CTCCGATCCCTATCTTTTCTTT TCAGGTCCACCGGTGACC	Taq I	A : 441, B : 309+132, H : A+B
17	AUB-Hin6I(Hhal)(N)	AUB-Fw(N) AUB-Rv(N)	GGGTGTTTGTGAATTRGTTTGC TACATACTGCCCCCAAGA	Hin 6 I	A:445, B : 354, H : A+B
18	OLP-DdeI	OLP-Fw OLP-Rv	TGTGTCCAAAACCGATCAGTATTGC TCTTCAGAGTGGTACGTACCCC	Dde I	A : 520, B : 415, H : A+B
19	CTI2-MboI(N)	CTI2-Fw(N)	CAAAGCATGCATGATCGTAGTG	Mbo I	A : 364, B : 253+111, H : A+B
20	CTI2-Bsh1236I(N)	CTI2-Rv(N)	CTCCGATTGCCTTACCCGC	Bsh1236 I	A : 461, B : 281+180, H : A+B
21	CYT-BsaBI(N)	CYT-Fw(N) CYT-Rv	CCAGCCATAATGTCTTAC CCGTACTTGAGCCTATCTGACTGG	Bsa B I	A : 468, B : 294+174, H : A+B
22	tRNA-BseGI(FokI)	tRNA-Fw tRNA-Rv	CATTTACAAAACAGATCTGAGCGG TTATTTGAACTGGTGACACGAGGA	Bse G I	A : 304, X : 381
23	PYDA-HaeIII	PYD-FwA	CTTTCAGGTAAGGAACATGATCAAG	Hae III	A : 497+475, B : 261+236, H : A+B
24	PYDA-CfrI3 I	PYD-RvA	GTAAGAAGTAAACAAAACCATATCTCTCTA	Cfr13 I	A : 497+475, B : 373, H : A+B
25	PYDB-HaeIII(N)	PYD-FwB(N) PYD-RvB(N)	CAACTTTGAGTCTTTATGATGAATTGA ACCAAGTAGAACTTACGTTAAGTTA	Hae III	A : 476, B : 374, H : A+B

注1) 品種識別マニュアルより抜粋

注2) Fw : Forward, Rv : Reverse の各プライマー

注3) 多型バンドサイズにおけるアルファベットは品種識別マニュアル記載の各CAPSマーカーの多型タイプを示す

は、AmpliQ Gold[®] 360 Master Mix 5 μ L, 5 μ M プライマー各 1 μ L, 超純水 2 μ L, DNA テンプレート 1 μ L とした。サーマルサイクラーは、Takara PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (タカラバイオ) を用い、95 $^{\circ}$ C・10 分 \rightarrow (95 $^{\circ}$ C・30 秒 \rightarrow 55 $^{\circ}$ C・30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C・30 秒) \times 35 サイクル \rightarrow 72 $^{\circ}$ C・7 分で PCR 反応を行った。

2.5 制限酵素処理および CAPS マーカーの多型検出

制限酵素は、25 個の CAPS マーカーに対応したものをを用いた (表 2)。1 サンプル当たりの制限酵素処理溶液の組成は、10 \times 制限酵素用バッファー 1 μ L, 超純水 3.6 μ L, 制限酵素 (10U/ μ L) 0.4 μ L, PCR 反応後の DNA テンプレート 5 μ L としたが、制限酵素が *Nco* I, *Taq* I の場合は、10 \times 制限酵素用バッファー 1 μ L, 超純水 2.6 μ L, 0.1%BSA 1 μ L, 制限酵素 (10U/ μ L) 0.4 μ L, PCR 反応後の DNA テンプレート 5 μ L とした。サーマルサイクラーは Takara PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (タカラバイオ) を用い、制限酵素は基本的には 37 $^{\circ}$ C・2 時間で反応させたが、*Taq* I は 65 $^{\circ}$ C・2 時間、*Bsa*B I は 60 $^{\circ}$ C・2 時間、*Bse*G I は 55 $^{\circ}$ C・2 時間の処理条件とした。

制限酵素処理後、マーカーとなる特定の DNA 断片の有無を 2%アガロースゲル電気泳動 (100V, 25 分) (ゲル強度 \geq 1200g/cm² (1.5%)) により確認した。F3H2-Dde I (N) は、多型を明確に識別するため、泳動時間を 35~45 分とした。供試材料において各 CAPS マーカーで検出された多型は、品種識別マニュアルに記載されている多型タイプに基づきカタログ化した。

2.6 MinimalMarker による検定

農研機構果樹研究所 (現; 農研機構果樹茶業研究部門) で開発された最小マーカーセット検出ソフトウェア MinimalMarker (Fujii ら, 2013) を用いて、25 個の CAPS マーカーの中から、品種識別マニュアルに記載されている国内のイチゴ 125 品種と愛媛県育成品種・系統の識別に必要なマーカーの最小組合せを算出した。

なお、國久 (2010) の指摘に基づき、品種識別マニュアルに記載されている 125 品種のうち、特定の 4~5 品種で多型の増幅が見られない CAPS マーカーとされている F3H-Nco I (N),

F3H-Eam1104 I (N) および CTI2-Mbo I (N), CTI2-Bsh1236 I (N) は除外した。

3. 結果

供試材料について、品種識別マニュアルに記載されている 25 個の CAPS マーカーの多型を検出した。その検出例を図 1 に示したが、F3H-Eam1104 I (N) における多型バンドサイズは、‘紅い雫’が 428bp と 357bp, ‘あまおとめ’が 357bp のみとなり、表 2 より多型タイプはそれぞれ H, B と判定された。供試した 25 個の CAPS マーカーのうち、CTI1-Hinf I は非特異的増幅産物がみられた (データ省略) が、多型タイプの判定に影響はなかった。供試材料において各 CAPS マーカーにより検出した多型に基づき多型タイプを判定した結果、‘紅い雫’‘あまおとめ’‘20-15-53’‘愛媛 12 号’は、品種識別マニュアルに記載されている各 CAPS マーカーのいずれかの多型タイプに該当し、また、供試した 21 品種については、品種識別マニュアルに記載されている各品種の多型タイプと全て一致した (表 3)。効率的に愛媛県育成品種・系統および国内のイチゴ 125 品種を識別するために、MinimalMarker (Fujii ら, 2013) を用いて CAPS マーカーの最小組合せを算出した結果、25 個のマーカーのうち、9 個を 1 組とする組合せが 64 種類得られた (データ省略)。

4. 考察

公的研究機関や民間企業、団体・個人等が育成した新品種は、品種登録を行うことで種苗法に基づく育成者権が発生し (丸山, 2003), 果樹や林木、鑑賞樹等の木本性植物は 30 年, それ以外の植物は 25 年の間, 当該権利が継続的に保護される (農林水産省品種登録ホームページ)。しかし、登録品種であっても優良品種が育成者権者に無断で海外へ持ち出され、日本へ逆輸入される事例が複数報告されており (門田, 2017), 育成者権の侵害が大きな問題となっている。登録品種が国内外で育成者権者の許諾を受けずに不適切に栽培される事例が発生すると、育成者権者だけでなく登録品種を栽培する産地およびその生産者も不利益を被る。このため、種

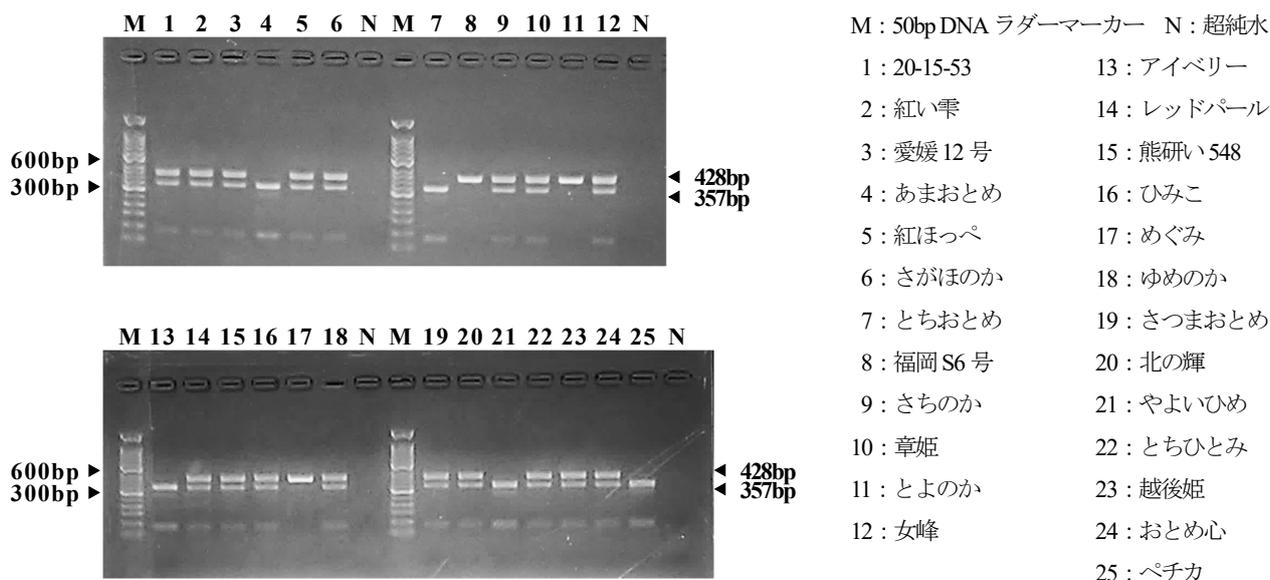


図 1 供試材料における CAPS マーカー (F3H-Eam1104 I (N)) による多型検出

表 3 各 CAPS マーカーの検出により判定した 23 品種・2 系統の多型タイプ

品種名 系統名	マーカーの 名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
		DFR-Hin6I	APX-MinI	CHI-PvuII	F3H-NcoI(N)	F3H-Eam1104(N)	F3H2-HpaII(N)	F3H2-DdeI(N)	F3H3-AccI(N)	CTII-HinI	MSR-AIuI	PGPA-AccI(N)	PGPA-RsaI(N)	PGPB-RsaI	APX2-DraI	APX3-DraI(N)	APX4-TaqI(N)	AUB-Hin6(N)	OLP-DdeI	CTE-MboI(N)	CTI2-Bsh1236(N)	CYT-BsaBI(N)	tRNA-BseGI	PYDA-HaeIII	PYDA-CfrI3I	PYDB-HaeIII(N)
1	20-15-53	X	BB	H	A	H	A	A	B	A	H	H	X	X	X	A	H	B	B	H	H	H	X	A	A	A
2	紅い雫	X	AB	H	A	H	X	A	B	A	A	B	X	X	X	A	H	B	H	H	H	H	X	A	H	A
3	愛媛12号	X	AB	A	A	H	X	A	H	A	H	H	A	A	X	H	B	B	H	H	H	H	X	A	A	H
4	あまおとめ	X	AB	A	A	B	X	X	H	H	H	H	X	A	X	A	B	B	H	A	B	H	X	A	H	A
5	紅ほっぺ	X	BB	B	A	H	A	A	B	A	A	B	X	X	X	A	H	B	H	H	H	B	A	A	A	A
6	さがほのか	X	BB	A	A	H	X	A	B	A	A	H	A	A	X	A	H	B	A	H	H	B	X	A	A	H
7	とちおとめ	X	AA	A	A	B	X	X	A	B	H	H	X	X	X	H	B	B	H	A	B	A	X	A	H	A
8	福岡S6号	X	AA	A	A	A	A	H	A	H	H	H	X	A	X	B	B	H	A	B	A	H	X	H	H	H
9	さちのか	X	BC	H	A	H	A	A	H	A	H	B	X	A	A	H	H	B	H	H	H	H	X	H	H	H
10	章姫	X	BB	H	H	H	X	X	H	B	A	B	X	X	X	A	A	B	B	A	H	H	A	H	H	A
11	とよのか	X	BC	A	H	A	A	A	H	A	H	H	A	X	X	H	H	H	A	H	A	H	X	A	A	H
12	女峰	X	AB	A	H	H	X	X	A	B	H	H	X	A	X	A	H	B	H	A	B	H	A	H	B	H
13	アイベリー	A	BC	H	A	B	X	X	H	A	H	B	X	A	A	A	H	H	A	H	A	H	A	B	B	H
14	レッドパール	X	BC	A	A	H	A	A	H	A	B	H	X	A	X	H	A	H	A	H	H	B	A	H	H	H
15	熊研い548	X	BB	A	A	H	A	A	H	A	B	A	X	X	A	A	H	B	B	H	H	H	X	A	A	H
16	ひみこ	A	BC	A	A	H	X	A	B	A	H	H	A	X	A	H	A	A	H	H	H	B	X	H	H	A
17	めぐみ	A	BC	H	A	A	A	A	B	A	B	H	A	X	X	A	H	B	A	H	H	H	X	A	A	B
18	ゆめのか	A	AB	A	A	H	X	A	H	A	H	H	X	X	A	A	H	B	A	H	H	B	X	H	B	B
19	さつまおとめ	X	BC	A	A	H	A	A	H	A	A	H	X	X	X	H	H	B	A	H	H	H	A	H	H	H
20	北の輝	A	AA	A	A	H	X	A	B	A	A	X	X	A	A	A	H	A	H	A	H	B	A	H	H	H
21	やよいひめ	X	AA	A	A	B	X	X	H	A	B	H	X	X	X	H	H	B	A	A	B	H	A	H	B	H
22	とちひとみ	A	AB	B	A	H	X	A	H	A	A	H	X	X	A	H	H	B	H	H	H	B	X	H	B	H
23	越後姫	X	BB	A	A	H	A	A	B	A	A	H	A	X	A	H	B	B	A	H	H	B	A	H	H	A
24	おとめ心	A	AB	A	A	H	X	A	B	A	A	H	X	A	A	H	A	H	A	H	B	B	X	H	H	A
25	ペチカ	A	AB	B	A	B	X	X	B	A	H	B	X	X	A	H	H	B	H	A	B	B	X	H	B	B

注 1) 表中の記号は、品種識別マニュアルに記載のある各 CAPS マーカーの多型タイプを示す (品種識別マニュアル記載品種は全て本試験結果と一致)

注 2) ‘20-15-53’ ‘紅い雫’ ‘愛媛 12 号’ ‘あまおとめ’ は品種識別マニュアル未記載品種・系統

苗や収穫物に育成者権の侵害が疑われる場合、それらと対照品種との間で、特性比較試験や比較栽培試験を行い、その類似性を判定すること

で侵害の有無を確認する必要がある (吉野ら, 2008)。

検定の再現性を担保する妥当性試験は、使用

する実験機器の種類や分析実施者が異なる複数の公的研究機関等第三者機関において、同一のマニュアルに基づき試験を実施し、技術の妥当性（再現性）を確認しなければならない（矢野，2018；國久，2010）。試験結果は100%の信頼性が要求されるものではないが、開発した品種識別技術を学術的な成果にとどめず社会実装するためには、妥当性試験を実施して高い再現性を客観的に証明する必要がある。CAPS マーカーを活用したイチゴの品種識別技術における妥当性試験の結果は、ほぼ全てのマーカーで、感度・特異性ととも一般に高精度とされる95%以上の再現性を保証できることが示されている（矢野，2018；國久，2010）。

供試材料において、25個のCAPS マーカーにおける多型タイプが互いに全て一致する品種・系統はなく、品種識別マニュアルに記載されていない‘紅い雫’と‘20-15-53’，‘あまおとめ’と‘愛媛12号’は同じ交配組合せであるが、多

型タイプは異なったことから、近縁な品種・系統についても識別可能であることが示された（表3）。以上の結果より、イチゴの苗（小葉）から抽出したDNAを用い、品種識別マニュアルに記載されている25個のCAPS マーカーを活用することで、愛媛県育成イチゴ品種‘紅い雫’‘あまおとめ’を含む23品種・2系統の品種識別が可能となった（表3）。

また、國久（2010）が示すように、突然変異等で育成された品種は、親品種とは同一の多型タイプを示すため識別不可能となる結果が得られているものの、本試験では愛媛県育成品種・系統の識別が目的であるため、MinimalMarkerにより算出された9個のマーカーを1組とする64種類の組合せの中から、操作性や識別性を考慮し、制限酵素処理の温度条件や電気泳動時間が共通しており、多型が安定して明瞭に検出可能な4種類の組合せを選抜できた（表4）。

表4 国内のイチゴ125品種と愛媛県育成品種・系統の識別に必要なCAPS マーカーの最小組合せ

組合せの種類	No.	CAPS マーカー	制限酵素	処理温度 (°C)	組合せの種類	No.	CAPS マーカー	制限酵素	処理温度 (°C)
組合せ 1	1	DFR-Hin6 I	<i>Hin6 I</i>	37	組合せ 3	1	DFR-Hin6 I	<i>Hin6 I</i>	37
	2	APX-Mlu I	<i>Mlu I</i>			2	APX-Mlu I	<i>Mlu I</i>	
	6	F3H2-Hpa II (N)	<i>Hpa II</i>			3	CHI-Pvu II	<i>Pvu II</i>	
	13	PGPB-Rsa I	<i>Rsa I</i>			6	F3H2-Hpa II (N)	<i>Hpa II</i>	
	14	APX2-Dra I	<i>Dra I</i>			8	F3H3-Acc I (N)	<i>Acc I</i>	
	17	AUB-Hin6 I (N)	<i>Hin6 I</i>			17	AUB-Hin6 I (N)	<i>Hin6 I</i>	
	18	OLP-Dde I	<i>Dde I</i>			18	OLP-Dde I	<i>Dde I</i>	
	24	PYDA-Cfr13 I	<i>Cfr13 I</i>			24	PYDA-Cfr13 I	<i>Cfr13 I</i>	
25	PYDB-HaeIII (N)	<i>HaeIII</i>	25	PYDB-HaeIII (N)	<i>HaeIII</i>				
組合せ 2	1	DFR-Hin6 I	<i>Hin6 I</i>	37	組合せ 4	1	DFR-Hin6 I	<i>Hin6 I</i>	37
	2	APX-Mlu I	<i>Mlu I</i>			2	APX-Mlu I	<i>Mlu I</i>	
	3	CHI-Pvu II	<i>Pvu II</i>			6	F3H2-Hpa II (N)	<i>Hpa II</i>	
	6	F3H2-Hpa II (N)	<i>Hpa II</i>			8	F3H3-Acc I (N)	<i>Acc I</i>	
	13	PGPB-Rsa I	<i>Rsa I</i>			13	PGPB-Rsa I	<i>Rsa I</i>	
	17	AUB-Hin6 I (N)	<i>Hin6 I</i>			17	AUB-Hin6 I (N)	<i>Hin6 I</i>	
	18	OLP-Dde I	<i>Dde I</i>			18	OLP-Dde I	<i>Dde I</i>	
	24	PYDA-Cfr13 I	<i>Cfr13 I</i>			24	PYDA-Cfr13 I	<i>Cfr13 I</i>	
25	PYDB-HaeIII (N)	<i>HaeIII</i>	25	PYDB-HaeIII (N)	<i>HaeIII</i>				

注1) 表中の組合せは、MinimalMarkerの検定により得られた64種類の組合せから選抜した4種類を示す

注2) No.は、品種識別マニュアル記載の25個のCAPS マーカーにおける番号を示す

本試験では、小葉を DNA の抽出材料として用いたが、イチゴの場合、育成者権の侵害が疑われる事例が発生した際には、苗だけでなく果実を入手して品種識別を実施することも想定される。‘紅い雫’‘あまおとめ’‘紅ほっぺ’‘さがほのか’の4品種については、当所において、小葉、ガク片、果肉由来の各 DNA から CAPS マーカーによる多型検出が可能であり、‘紅ほっぺ’‘さがほのか’については、供試した13個の CAPS マーカー全てにおいて検出した多型タイプが品種識別マニュアルに記載されている多型タイプと完全に一致した結果を得ている(データ省略)。さらに、長井ら(2004)は、鹿児島県育成イチゴ品種‘さつまおとめ’等の小葉、ガク片、果肉から DNA を抽出し、CAPS マーカーにより検出した多型を比較したが、各組織による多型の違いは見られなかったと報告しており、本試験で得られた‘紅い雫’‘あまおとめ’の小葉由来の DNA における CAPS マーカーの多型タイプは、ガク片、果肉由来の DNA でも一致するものと判断する。

本試験では、愛媛県育成イチゴ品種‘紅い雫’‘あまおとめ’に対する CAPS マーカーを用いた品種識別技術の適用性について明らかにしたが、これらの品種および兄弟系統における多型は当所において検出したのみである。しかしながら、2019-2020 年度に農研機構野菜花き研究部門および農研機構種苗管理センターに両品種の小葉サンプルを提供しており、今後、妥当性が確認されれば、農研機構の品種識別マニュアルへ追記される予定である。以上のことから、愛媛県育成イチゴ品種について、最小の CAPS マーカーセットとなる4種類の組合せのいずれかにより、効率的な品種識別を可能とすることができた。

引用文献

- 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, *J. Bioinform. Comput. Biol*, **11** (2), 1250022 (17 pages), DOI: 10.1142/S0219720012500229.
- 井門健太(2020): レトロトランスポゾン挿入多型を活用した DNA マーカーによる愛媛県育成イチゴ品種等の識別技術の確立, *愛媛農林水研報*, **12**, 1-8.
- 國久美由紀(2010): 栽培イチゴにおけるゲノム特異的 DNA マーカーの開発と品種識別技術への応用, *野菜茶研研報*, **9**, 7-56.
- 丸山恵史(2003): 植物新品種育成者の権利保護と DNA 品種識別技術, *育種学研究*, **5** (3), 127-135.
- 門田有希(2017): 農作物・食品の品種判別検査技術の開発 日本のお大切な品種を守るために, *化学と生物 Vol. 55*, **12**, 817-824.
- 門田有希(2018): 高速シーケンサーによるレトロトランスポゾン遺伝解析技術の開発とその活用, *育種学研究*, **20** (2), 185-191.
- 長井純一, 大江正和, 國久美由紀, 松元哲(2004): CAPS マーカーを用いたイチゴ‘さつまおとめ’の品種識別, *九農研*, **66**, 215-215.
- Nielsen, J.A. and P.H. Lovell (2000): Value of morphological characters for cultivar identification in strawberry (*Fragaria × ananassa*), *New Zeal. J. Crop Hort. Sci*, **28**, 89-96.
- 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** (2), 127-133.
- 農研機構(2007): DNA マーカー(CAPS法)によるイチゴ品種識別マニュアル, http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/004282.html
- 農林水産省品種登録ホームページ: <http://www.hinshu2.maff.go.jp/>
- 岡本充智, 奥貞丈博, 山本紗綺, 二宮泰造(2018): 愛媛県育成カンキツ品種識別法の妥当性検証に利用可能な CAPS マーカーの選抜, *愛媛果樹セ研報*, **6**, 1-9.
- 竹之下佳久, 長谷健, 永吉実孝(2014): DNA マーカーを用いた鹿児島県育成テッポウユリ品種の識別技術, *鹿児島農総セ研報*, **8**, 1-4.
- 田中勝, 中山博貴, 高畑康浩(2005): CAPS マーカーを用いたサツマイモ品種識別の試み, *九農研*, **67**, 28-28.

内村要介, 古庄雅彦, 吉田智彦 (2004) : 国内二条オオムギの DNA マーカーによる品種識別, 日作紀, **73** (1), 35-41.

矢野博 (2018) : DNA 品種識別技術の開発支援による育成者権侵害対策の強化－認定 NPO 法人 DNA 鑑定学会の取組－, DNA 鑑定, **10**, 1-18.

吉野稔, 江藤文香, 矢羽田二郎 (2008) : 福岡県における農産物の育成者権侵害事例と対応方策, 福岡農総試研報, **27**, 1-6.