

# CAPS マーカーを用いた和歌山県育成カンキツの品種識別技術

岩倉拓哉・田嶋 皓<sup>1</sup>

和歌山県果樹試験場

## Identification of Citrus Cultivars Bred in Wakayama Prefecture by CAPS Markers

Takuya Iwakura and Hikaru Tajima

*Wakayama Fruits Tree Experiment Station*

### 緒 言

和歌山県では、温暖な気候を生かしてウンシュウミカンを中心にカンキツ類の栽培が盛んであり、中晩生カンキツでは、‘ハッサク’で国内流通量の70.4% (28,175t)、『清見』で国内流通量の42.1% (14,729t) が生産されている（農林水産省，2021）。しかし、近年の異常気象による果皮障害の発生や産地間競争の激化などにより、生産者からは果実品質に優れ栽培しやすいカンキツ品種が求められている。そのため、和歌山県果樹試験場では交雑育種による新品種育成に取り組み、3月に出荷可能で食味が優れるカンキツ新品種‘はるき’（田嶋ら，2019）を育成した。現在、果樹試験場ではさらに‘はるき’の流通時期の前後を埋める優良品種の開発に取り組んでいるところである。

今後‘はるき’などの新品種が産地に普及し、生産者所得の向上につながっていくことが期待されるが、全国的に認知度が上がった品種において、不適切な持ち出しにより海外へ流出する事例が散見される（植物品種等海外流出防止対策コンソーシアム，2020）。品種育成には長い年月と多額の費用がかかることから、県育成品種については知的財産として適切に利用される必要がある。民間育成品種についても同様に育成者の意思に基づいた利用がなされる必要がある。また、愛媛県では有望系統の不適切な持ち出しに備えて、品種登録前の段階で遺伝子型による有望系統の識別を行っており（岡本，2018）、選抜段階から権利侵害への対策を行うことも重要である。

育成者権の侵害が疑われる場合、これまでは当該品種と類似品の樹体特性や果実特性などの比較により、侵害か否かが判定されてきた。近年ではより効率的で迅速に判定する技術としてDNAによる品種識別技術の開発が様々な果樹で進められている（谷口，2021）。カンキツでは、Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) マーカーを用いて愛媛県や農研機構果樹茶業研究部門で育成されたカンキツの品種識別が報告されている（二宮ら，2015；Nonaka et al., 2017）。また、ミカンゲノムデータベース (<https://mikan.dna.affrc.go.jp/>) で公開されている遺伝子のアノテーションやローカス情報を持つ2,696種類のCAPSマーカーの中から、カンキツの品種識別に適した26種類のCAPSマーカーを選定し、国内の流通量の94%を占める主要カンキツ24品種の遺伝子型が報告されている（Fujii et al., 2019）。これらの研究成果を基にISO（国際標準化機構）の基準に準拠してマーカーの妥当性が確認された「カンキツ22品種のDNA品種識別技術マニュアル」（農研機構，2019）が農研機構種苗管理センターのホームページで公開されている。加えて、香酸カンキツにおいても、Fujiiら（2019）が開発した生食用カンキツのDNA品種識別に適した26種類

<sup>1</sup>現在：和歌山県農林水産部農業生産局果樹園芸課

の CAPS マーカーを用いて、国内流通量の多い主要な香酸カンキツ品種・系統と近年、農研機構と徳島県で育成された香酸カンキツ品種の遺伝子型が報告されている（新見ら，2021）．これらにより、国内で流通する主要なカンキツの品種識別技術は概ね確立されたといえる．しかしながら、和歌山県育成の‘はるき’や現在選抜中の系統、また和歌山県内民間育成品種の‘早和の香’や‘春峰’といった現在の果実流通は無いまたは少ないものの、今後の産地化が期待される品種についてはこれまで検討されていない．

そこで本研究では、Fujii ら（2019）が開発した生食用カンキツの DNA 品種識別に適した CAPS マーカーのうち、「カンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル」（農研機構，2019）で利用されている 11 種類の CAPS マーカーと、新見ら（2021）によりプライマー配列を再設計された 4 種類の CAPS マーカーを用いて、和歌山県育成品種や育成中の有望系統、和歌山県内の民間育成品種の DNA 品種識別技術を確立した．併せて、‘はるき’については得られた遺伝子型データから親子鑑定を行っ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

供試材料として、和歌山県果樹試験場で栽培している和歌山県が育成した‘はるき’と育成中の 4 系統、および和歌山県内民間育成品種の‘早和の香’、‘春峰’に加え、対照品種としてウンシュウミカンから‘ゆら早生’、‘はるき’の親品種である‘清見’、‘中野 3 号ポンカン’、‘はるき’同様‘清見’とポンカンの交配で得られた既存品種から‘不知火’、‘はるみ’、‘せとみ’（山口県より供試）、和歌山県の育成系統の親品種から‘イエローポメロ’、‘あすみ’、‘みはや’を用いた（表 1）．ゲノム DNA は各品種・系統の 2019 年 8 月にサンプリングした葉から CTAB 抽出法（Dellaporta ら，1983）により抽出した．

表 1 CAPS 分析に供試した 16 品種・系統

調査番号	供試種・育成品種・育成系統	品種・系統・交配組み合わせ
1	はるき	清見×中野3号ポンカン
2	早和の香	水晶文旦×（水晶文旦×黄金柑）
3	春峰	清見×水晶文旦
4	KY1	清見×イエローポメロ
5	YB12	ゆら早生×はるみ
6	No. 1099	あすみ×春峰
7	No. 1184	みはや×春峰
8	ウンシュウミカン	ゆら早生
9	清見	宮川早生×トロビタオレンジ
10	ポンカン	中野3号ポンカン
11	不知火	清見×中野3号ポンカン
12	はるみ	清見×ポンカンF-2432
13	せとみ	清見×吉浦ポンカン
14	イエローポメロ	ハッサク×平戸ブント
15	あすみ	興津46号×はるみ
16	みはや	津之望×No. 1048

### 2. CAPS 分析

Fujii ら（2019）が開発した生食用カンキツの DNA 品種識別に適した CAPS マーカーのうち、「カンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル」（農研機構，2019）で利用されている 11 種類の CAPS マーカーと、新見ら（2021）によりプライマー配列を再設計された 4 種類の CAPS マーカーの計 15 種（表 2）を適用した．CAPS 分析方法は、すべての CAPS マーカーにおいて Fujii ら（2019）の手順に従って実施したが、PCR プログラムのみ、「カンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル」（農研機構，2019）に記載の条件で一律に行った．

表 2 品種識別に用いた CAPS マーカー

CAPS マーカー 番号	CAPS マーカー		増幅断片サイズ (bp) <sup>z</sup>				アレルの種類	増幅断片サイズ (bp) <sup>z</sup>				アレルの共通断片長	スクリーン ポスター ボード	遺伝子座	引用 <sup>x</sup>	
	STS名	制限酵素	Forward プライマー	Reverse プライマー	a アレル	b アレル		c アレル	d アレル							
1	Bf0036-2	<i>Msp</i> I	CAGGTTTCCTTTGTTAGCATATTGCC	CTGTGTGGATCAAAATGGTTCC	700	400	300	700	400	300	700	400	300	1	Ciclev10008751m.g	1
2	Tf0168-3	<i>Rsa</i> I	GCATACITTTTCAGGAAGCA	CCCTAGTTAAGCAAGGGNA	500	300	200	500	300	200	500	300	200	1	Ciclev10007563m.g	2
3	Bf0158-3	<i>Pvu</i> II	AAAGCATTACAGAGGAGTTGAC	GGAAATTCATTAAACCGTATCGGCA	350	200	150	350	200	150	350	200	150	3	Ciclev10021285m.g	1
4	Tf0420	<i>Hae</i> III	TGGAGGCATTTCTTATTAGA	CTCTGACCCAGGGATCA	450	225		450	225		450	225		3	Ciclev10022018m.g	1
5	Tf0001	<i>Msp</i> I	AAAGITTCACAAGTAGGAGGG	AGCAATCCTTTGAGAATACGCA	650/450*	325	325	650	325	325	650	325	325	3	Ciclev10020248m.g	1
6	Tf0300	<i>Dra</i> I	GCTGCGATTAGGGTTGC	TAAACATATCCCACCGAAGCAT	750	500	250	750	500	250	750	500	250	3	Ciclev10022370m.g	1
7	Tf0419	<i>Pvu</i> II	GGTATGAGAAGCCAACTTAT	ATCTTGATCATGGGAAAT	650	400	150	650	400	150	650	400	150	3	Ciclev10019228m.g	1
8	Tf0293-3	<i>Hind</i> III	TTCTGGAGTCAACGAATGCC	AAAGACTCGTAAAGCTCTCT	600	300	300	600	300	300	600	300	300	3	Ciclev10019219m.g	2
9	Tf0318	<i>Hinc</i> II	GACGACTACCGCTACTACTAC	ACAGCCAGGAACAAGCTTT	600	100		600	100		600	100		4	Ciclev10031873m.g	1
10	Tf0208	<i>Hinf</i> I	AATATTTCTGGCAATCACTGA	GCAACCCACACCAAGGA	550	300	250	550	300	250	550	300	250	5	Ciclev10001680m.g	1
11	Tf0271	<i>Rsa</i> I	AGTATCCAAAGGAACTCT	CATGGCAACTTTGTAGTTC	700	400	300	700	400	300	700	400	300	6	Ciclev10010976m.g	1
12	Tf0386	<i>Msp</i> I	GACAAGAAATTAATATACGG	GGAAATCAACCCATGAGTGACA	500	300	200	500	300	200	500	300	200	6	Ciclev10012022m.g	1
13	Tf0326-2	<i>Hha</i> I	TTAGCGGTGGATTAATGGAG	CTCCAGACAGAAGCTGATAG	700	450	250	700	450	250	700	450	250	7	Ciclev10024695m.g	2
14	Tf0013-3	<i>Rsa</i> I	TGAATTCCTGTCAAGTTGGT	TTGTGTAGAAGCAGGGATAG	800	300	300	800	300	300	800	300	300	8	Ciclev10027769m.g	2
15	Tf0150	<i>Hinf</i> I	ACAGAAGGCGCACAATCT	TTTCTTCAGCTAAGGCTCAC	500	350	150	500	350	150	500	350	150	8	Ciclev10028292m.g	1

<sup>z</sup> 100bp ラダマーカーから推定した増幅断片サイズ

<sup>y</sup> クレメンティンのゲノム情報はPhytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/bz/porta1.html>) を参照

<sup>x</sup> 1 は Fujii ら (2019) , 2 は 新見 ら (2021) に基づく

<sup>\*</sup> 本研究の供試材料では検出されないアレルの増幅断片サイズ

### 3. 遺伝子型データ分析法

遺伝型データの分析は Fujii ら (2019) および新見ら (2021) の方法に従って以下のように行った。得られた電気泳動図から各マーカーのアレルの増幅断片の構成を整理して、泳動距離の短いアレルバンド順、つまり増幅断片長が長い順にアルファベット「A」、「B」、「C」で記述し、各品種・系統の遺伝子型をその組み合わせで表記した。

得られた CAPS マーカーの遺伝子型データについて、すべての品種・系統を識別することができる最少の DNA マーカーセットを算出するため、最少マーカーセット検出ソフトウェア Minimal Marker (Fujii et al., 2013) を用いた。また、和歌山県育成品種・系統については、親子関係を推定するソフトウェア MARCO (藤井ら, 2010) を用いて、CAPS マーカーで明らかとなった遺伝子型が、交雑親と遺伝的に矛盾がないか解析を行った。さらに、育成者権の存続する‘はるき’および‘早和の香’を他の品種・系統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. CAPS 遺伝子型分析

表 1 に記載されているカンキツの 16 品種・系統について、15 種類の CAPS マーカー (表 2) を用いて分析した結果、全品種・系統で明瞭な電気泳動図が得られ、すべての CAPS マーカーにおいて遺伝子型の判定が可能であった (図 1)。供試したカンキツ 16 品種・系統と既報のカンキツ 27 品種・系統の遺伝子型 (Fujii et al., 2019; 新見ら, 2021) と合わせて表 3 に示した。

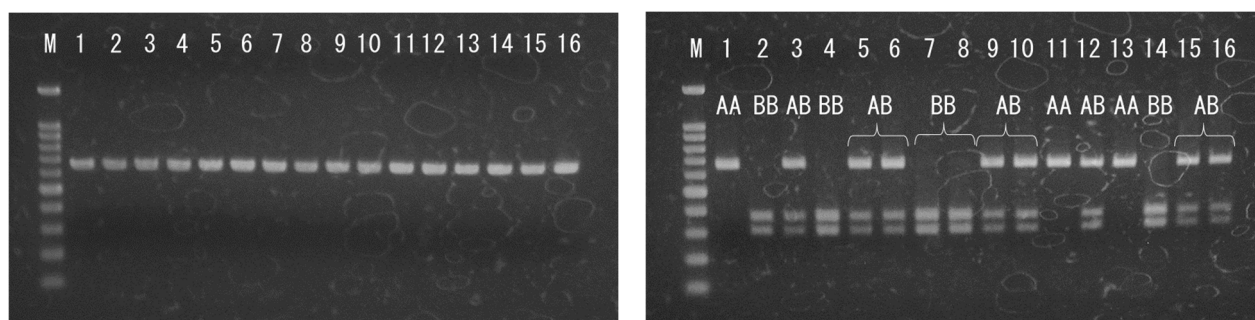


図 1 Bf0036-2 の PCR 増幅断片 (左) と制限酵素 *Msp I* 処理した増幅断片 (右) の電気泳動図  
注) M: 100bp ラダー, 1-16: 第 1 表の調査番号に準じる

各品種の遺伝子型は調査番号の下に記す

### 2. 和歌山県または和歌山県内民間の育成品種識別のための最少マーカーセット

Tf0001/*MSP I* は‘阿波すず香’において泳動パターンが不明瞭である (新見ら, 2021) ため、解析から除外し、明瞭な電気泳動パターンが得られている 14 種類の CAPS マーカーの遺伝子型データを解析した。供試した品種・系統に加え、生食用カンキツの遺伝子型データ (Fujii et al., 2019) および香酸カンキツの遺伝子型データ (新見ら, 2021) を加え、合計で 43 品種の遺伝子型データを解析に用いた。Minimal Marker を用いて、すべての品種を識別するために必要な最少マーカーセットを算出したところ、7 種類の CAPS マーカーから構成される 4 組み合わせの最少マーカーセットが存在した。そのうち、クレメンティン (*C. clementina hort. ex Tanaka*) の物理地図に CAPS マーカーをマップした場合に (表 2)、すべて異なるスキュフォールドにマップされる CAPS マーカーか

表3 供試したカンキツにおける15種類のCAPSマーカーの遺伝子型

調査番号	供試種・育成品種・育成系統	品種・系統・交配組み合わせ	CAPSマーカー														
			Bf0036-2	Tf0168-3	Bf0158-3	Tf0420	Tf0001	Tf0300	Tf0419	Tf0293-3	Tf0318	Tf0208	Tf0271	Tf0386	Tf0326-2	Tf0013-3	Tf0150
			Msp I	Rsa I	Pvu II	Hae III	Dra I	Pvu I	Hind III	Hinc II	Hinf I	Rsa I	Msp I	Hha I	Rsa I	Hinf I	
1	はるき	清見×中野3号ポンカン	AA	AA	AB	AA	AB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	BB	AB	BB	
2	早和の香	水島文目×(水島文目×黄金柑)	BB	AA	BB	AA	AA	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
3	義峰	清見×水島文目	AB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
4	KY1	清見×イエローホメロ	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
5	YB12	ゆら早生×はるみ	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
6	No. 1099	あすみ×義峰	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
7	No. 1184	みはや×義峰	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
8	ウシユウミカン	ゆら早生	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
9	清見	宮川早生×トロピオオレンジ	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
10	ポンカン	中野3号ポンカン	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
11	不知火	清見×中野3号ポンカン	AA	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
12	はるみ	清見×ポンカンF-2432	AB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
13	せとみ	清見×吉浦ポンカン	AA	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
14	イエローホメロ	清見×吉浦ポンカン	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
15	あすみ	ハツタケ×平戸フンダン	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
16	みはや	興津46号×はるみ	AB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
		津之置×No.1048	AB	AA	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z グレープフルーツ	ダンカン	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z スイートオレンジ	トロピオオレンジ	AB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z イヨ	カンキツ研究領域保存系統 y	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z ナツダイヤ	川野ナツダイヤ	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z ハツタケ	カンキツ研究領域保存系統 y	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 麗紅	不明×マーコット	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 津之置	Ky0w No. 14×アンコール	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 西南のひかり	En0w No. 21×陽香	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 津之置	清見×アンコール	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z はるひ	興津46号×阿波オレンジ	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z せとか	KyEn No. 4×マーコット	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z はれひめ	E-647×宮川早生	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z あすき	興津46号×はるみ	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 甘平	西之香×ポンカン	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 愛媛県試第28号(紅まどんな)	南香×天皇	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z レモン	リスポン	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	ABC	AB	AB	BB	
引用データ	z スダチ	カンキツ研究領域保存系統 y	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z シンクワサー	カンキツ研究領域保存系統 y	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z カボス	大直味クガニ	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z ライム	カンキツ研究領域保存系統 y	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z ダイダイ	タヒチライム	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z ユコウ	カブス	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	ABC	AB	AB	BB	
引用データ	z ジャバラ	無核柑	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 辺塚ダイダイ	和歌山県果樹試験場標準木	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 阿波すず香	カンキツ研究領域保存系統 y	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ	z 理の香	スダチ(速水本田4倍体)×ユズ(山相系)	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA	AB	AB	BB	
引用データ		リスポンレモン×ニューガナツ	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BC	AB	AB	BB	

z Fujiri (2019)で報告されているCAPSマーカーのうち15種類のCAPSマーカーの遺伝子型を参照データとして引用  
 y 農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究領域  
 \* 新見ら (2021)で報告されているCAPSマーカーのうち15種類のCAPSマーカーの遺伝子型を参照データとして引用  
 \*\* 泳動パターンが不明瞭であることを示記

ら構成される最少マーカーセットの組み合わせは 1 組み合わせであった (表 4)。

‘はるき’と‘早和の香’について、統合した 43 品種の遺伝子型データを用いて同様に最少マーカーセットを算出した。‘はるき’を識別する最少マーカーセットは、2 種類の CAPS マーカーから構成される 1 組み合わせであった (表 5)。<sup>2</sup> ‘早和の香’の最少マーカーセットは、2 種類の CAPS マーカーから構成される 10 組み合わせの最少マーカーセットが存在し、そのうちスキヤフォールドの位置が異なる構成のマーカーセットは 8 組み合わせであった (表 5)。

表 4 43 品種・系統の品種識別をするための最少マーカーセット

最少マーカーの サブセット番号	CAPSマーカー(スキヤフォールド <sup>2</sup> )						
サブセット 1	Bf0036-2/ <i>Msp</i> I (1)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Tf0318/ <i>Hinc</i> II (4)	If0208/ <i>Hinf</i> I (5)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	Tf0326-2/ <i>Hha</i> I (7)	Tf0013-3/ <i>Rsa</i> I (8)

<sup>2</sup>クレメンティンのゲノム情報はPhytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) を参照

表 5 ‘はるき’、‘早和の香’ と他の 42 品種を識別するための最少マーカーセット

最少マーカーの サブセット番号	‘はるき’の最少マーカーセット (クレメンティンのスキヤフォールド番号) <sup>2</sup>		‘早和の香’の最少マーカーセット (クレメンティンのスキヤフォールド番号) <sup>2</sup>	
サブセット 1	Bf0036-2/ <i>Msp</i> I (1)	Tf0326-2/ <i>Hha</i> I (7)	Bf0036-2/ <i>Msp</i> I (1)	Tf0300/ <i>Dra</i> I (3)
サブセット 2			Tf0168-3/ <i>Rsa</i> I (1)	Tf0300/ <i>Dra</i> I (3)
サブセット 3			Tf0300/ <i>Dra</i> I (3)	Tf0318/ <i>Hinc</i> II (4)
サブセット 4			Tf0300/ <i>Dra</i> I (3)	If0208/ <i>Hinf</i> I (5)
サブセット 5			Tf0300/ <i>Dra</i> I (3)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)
サブセット 6			Tf0300/ <i>Dra</i> I (3)	Tf0326-2/ <i>Hha</i> I (7)
サブセット 7			Tf0300/ <i>Dra</i> I (3)	Tf0150/ <i>Hinf</i> I (8)
サブセット 8			Tf0318/ <i>Hinc</i> II (4)	If0208/ <i>Hinf</i> I (5)

<sup>2</sup>クレメンティンのゲノム情報はPhytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) を参照

### 3. 和歌山県育成品種・系統の親子鑑定

‘はるき’は‘清見’と‘中野 3 号ポンカン’の組み合わせで得られた品種で、15 種類の CAPS マーカー遺伝子型について MARCO を用いて親子鑑定を行った。15 種類のマーカーのうち、両親で多型を示すマーカーは 9 種類あり、‘はるき’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。育成中の系統について、‘KY1’は‘清見’と‘イエローポメロ’の組み合わせで得られた系統で、両親で多型を示すマーカーは 9 種類あった。‘YB12’は‘ゆら早生’と‘はるみ’の組み合わせで得られた系統で、両親で多型を示すマーカーは 9 種類あった。‘No. 1099’は‘あすみ’と‘春峰’の組み合わせで得られた系統で、両親で多型を示すマーカーは 8 種類あった。‘No. 1184’は‘みはや’と‘春峰’の組み合わせで得られた系統で、両親で多型を示すマーカーは 6 種類あった。いずれの系統も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。

## 考 察

本研究では、Fujii ら (2019) が開発した生食用カンキツの DNA 品種識別に適した CAPS マーカーのうち、「カンキツ 22 品種の DNA 品種識別技術マニュアル」(農研機構, 2019) で利用されている 11 種類の CAPS マーカーと、新見ら (2021) によりプライマー配列を再設計された 4 種類の CAPS マーカーを用いた。Fujii ら (2019) と新見ら (2021) により、流通しているカンキツでは 34 種類のカンキツの識別が可能で遺伝子型データが得られているが、今回、既に品種として流通しているも

のでは‘はるき’、‘早和の香’、‘春峰’、‘せとみ’、‘イエローポメロ’の遺伝子型データが新たに得られた。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(二宮ら, 2015)。本研究によりCAPSマーカーを用いた品種識別の適用範囲が広がったため、これに寄与したといえる。

また、ウンシュウミカンについては、これまでにCAPSマーカーを用いて‘宮川早生’、‘池田温州’、‘山田温州’、‘青島温州’、ウンシュウミカンの原木複製樹において、同一の遺伝子型データが得られている(Fujii et al., 2019)。ウンシュウミカンの‘ゆら早生’についても適用したすべてのCAPSマーカーで既報のウンシュウミカンと同じ遺伝子型であることが明らかとなった。さらに、‘清見’、‘中野3号ポンカン’、‘不知火’、‘はるみ’、‘あすみ’、‘みはや’についてもFujiiら(2019)と同じ遺伝子型データが得られ、再現性が確認できた。

Tf0001/MSP1を除く14種類のCAPSマーカーの遺伝子型データを解析したところ、7種類のCAPSマーカーを用いることにより、43種類の品種・系統を識別することができた。現在和歌山県で育成中の4系統についても今後いずれかの系統が品種登録された場合には品種識別が可能となる。また、‘はるき’および‘早和の香’について、2種類のCAPSマーカーを用いることでそれぞれを他の品種・系統から識別することが可能であった。最少マーカーセットの情報を用いてCAPS分析を行い、供試サンプルの遺伝子型が‘はるき’あるいは‘早和の香’の遺伝子型と合致すれば、供試サンプルがいずれかの品種であることが簡易に判定できる。

品種のDNA鑑定において、親子関係にある3品種を用いたトリオ解析により、交雑親のいずれかのアレルが後代に遺伝することが確認されており、カンキツの育成品種の親子鑑定に利用できることが報告されている(二宮ら, 2015; Nonaka et al., 2017)。15種類のCAPSマーカーを用いて和歌山県育成品種‘はるき’の親子鑑定を行ったところ、‘はるき’は種子親である‘清見’と花粉親である‘中野3号ポンカン’のいずれかのアレルを受け継いだ遺伝子型を有しており、親子関係に矛盾がないことが示された。また、育成系統の‘KY1’、‘YB12’、‘No.1099’、‘No.1184’についても、それぞれの種子親と花粉親のいずれかのアレルを受け継いだ遺伝子型を有しており、親子関係に矛盾がないことが示された。

交配組み合わせが似た個体同士では、識別可能なマーカー数が少なくなる傾向がある(岡本, 2018)。「はるき」と同様に‘清見’とポンカンの交配により得られた品種は多く、供試品種の中では‘不知火’、‘はるみ’、‘せとみ’が該当する。ポンカンについてはこれまでに‘太田ポンカン’、‘吉田ポンカン’、‘中野3号ポンカン’、‘F-2432ポンカン’でCAPSマーカーが適用されているが、いずれも同じ遺伝子型が得られている(Fujii et al., 2019)。そのため、‘清見’とポンカンの交配組み合わせで得られた品種の遺伝子型は、花粉親のポンカンの系統が異なる場合でも識別性が低い可能性が考えられたものの、本研究で用いたCAPSマーカーにより、‘はるき’、‘不知火’、‘はるみ’、‘せとみ’のそれぞれを識別可能であった。

国内で交雑育種により育成された生食用カンキツでは、ウンシュウミカンと‘清見’などのウンシュウミカンの後代を繰り返し用いて得られた品種が多く、由来の似た品種を交配に使い続けることにより、アレルに偏りが生じる可能性がある。今後、今回用いた15種類のCAPSマーカーでは識別できなくなることも考えられるため、引き続き適用するCAPSマーカー数を増やしていくことが必要である。また、由来の似た品種を交配に使うことで、その後代が既存品種と差別化しにくくなることも懸念される。そのため、これまで交雑育種に用いられることが少なかった品種・系統の育種親としての利用も、既存品種の差別化を図るうえで重要であるとともに、育成された品種の識別性を高めるうえでも重要である。

以上のことから、本研究により和歌山県育成品種や育成中の有望系統、和歌山県内の民間育成品種においても品種識別が可能となった。今後‘はるき’など新品種の普及に伴い権利侵害の発生が懸念されるが、本研究で得られた知見をもとに権利侵害か否か迅速に対応できるようになるとともに、本技術が品種盗難の抑止力となることで、育成品種の権利保護が進むと思われる。

## 摘 要

‘はるき’などの和歌山県オリジナルの新品種が産地に普及するに伴い、今後不適切な持ち出しなどの権利侵害が発生する可能性が考えられるため、和歌山県育成品種・系統と和歌山県内の民間育成品種について品種識別技術の確立に取り組んだ。

1. 16 種類のカンキツの品種・系統について、これまでに国内で流通する主要なカンキツの品種識別に適用可能であった 15 種類の CAPS マーカーを用いて遺伝子型を調査した結果、供試した全ての品種・系統において利用可能であった。
2. Tf0001/*Msp* I を除く 14 種類の CAPS マーカーの遺伝子型データを用いて Minimal Marker プログラムで最少マーカーセットを算出したところ、和歌山県で育成した品種・系統と県内の民間育成品種の合わせて 7 品種・系統と国内で流通する 36 種類のカンキツを含むカンキツ 43 品種・系統は 7 種類の CAPS マーカーで相互に品種・系統を特定できることが明らかとなった。
3. MARCO プログラムを用いて和歌山県で育成された ‘はるき’ の親子関係を鑑定したところ、‘はるき’ が両親のいずれかから受け継いだアレルを有し、親子関係に矛盾がないことが示された。

本試験を実施するにあたり、技術指導していただくとともに研究機器を使用させていただきました農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究領域の島田武彦博士、藤井浩博士に厚くお礼を申し上げます。

## 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.
- 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, Tomoko, H. Iketani, T. Shimizu, T. Yamamoto and M. Omura. 2013. 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. 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.
- 田嶋皓・中地克之・宮井良介・岩倉拓哉. 2019. カンキツ新品種 ‘はるき’. *園学研*. 18 (別 2): 313.
- 谷口郁也. 2021. 果樹における品種識別技術の開発. *農村と都市をむすぶ*. 71(8): 41-45.
- 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.
- 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: 127-133.
- Nonaka, K., H. Fujii, M. Kita, T. Shimada, T. Endo, T. Yoshioka and M. Omura. 2017. Identification and parentage analysis of citrus cultivars developed in Japan by CAPS markers. Hort. J. 86: 208-221.
- 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)> (2021 年 12 月 24 日閲覧)
- 農林水産省. 2021. 平成 30 年産特産果樹生産動態等調査. <<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500503&tstat=000001020907&cycle=7&year=20180&month=0&tclass1=000001032892&tclass2=000001150626>>. (2021 年 12 月 24 日閲覧)
- 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: 1-10.
- 植物品種等海外流出防止対策コンソーシアム. 2020. 農業知的財産（育成者権，商標権等）の保護活用・侵害対策と事例. <[https://pvp-conso.org/page\\_12/](https://pvp-conso.org/page_12/)> (2021 年 12 月 24 日閲覧)

