

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

岡本充智・奥貞丈博・山本紗綺・二宮泰造*

Selection of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers to identify original citrus cultivars released in the breeding program in Ehime prefecture

Mitsutoshi Okamoto, Takehiro Okusada, Saki Yamamoto and Taizou Ninomiya.

Summary

Protection of breeder's rights in citrus cultivar development is very important. Cultivar identification based on cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) makers has been developed.

1. From 29 CAPS markers previously described, 22 CAPS markers were selected and the specific genotypes were obtained for three new citrus cultivars and eight breeding lines in the breeding program of Ehime prefecture.

2. Concerning the identification ability of these 22 markers, the maximum value of probability was $P1=0.000069967$, based on the variety identification theory by Ukai. For obtaining the specific electrophoresis pattern of each citrus, the maximum number of markers was 15, while the minimum was five. In hybrids crossed by using the same seed parent (Ehimekashi dai-28-gou), a small number of marker sets were necessary to identify. It seems that difficulty to identify depends on the degree of inbreeding.

3. For saving the detection time and cost, minimized CAPS marker sets were found to identify 11 varieties from the genotype data based on 22 markers. The marker sets were obtained in 36 combinations with six markers as one set.

Key Words: citrus, CAPS markers, smallest marker set, PCR

I 緒言

本県のカンキツ生産は、それぞれの地域の立地や気候条件を活かして各地で特徴ある産地を形成している。特に、'愛媛果試第28号'

(全農登録商標「紅まどんな」)や'甘平'など本県が独自に育成した品種(重松ら、2005、2008)は市場評価も高く、生産量は年々拡大しており、各産地においては、生産振興や流通・販売強化などに努めている。

*現在：南予地方局産業振興課

一方、これらの育成品種が全国的な注目を集めることで、品種の不適切な持ち出しなどの事例が発生する懸念が高まりつつある。長い年月をかけて開発した研究成果である新品種は、知的財産として適切に管理し本県カンキツ生産の発展に有効活用する必要がある。このため、権利の侵害と思われる事例が発生した場合、科学的な根拠に基づく調査・解析が必要となることから、果実の形状や重さその他の表現形質の比較法や、より効率的で精度の高いDNAによる品種識別技術の開発が急務となっている。カンキツにおける品種識別技術開発に関する報告は、Shimadaら(2014)が開発した708個のCAPSマーカーを基本に、これまで二宮ら(2015)や、Nonakaら(2017)による品種識別法の報告など複数存在し、国内流通するカンキツ品種の大半を識別することが可能である。ところが、平成27年6月24日の知的財産高等裁判所の判決で「DNA分析の手法は、全ゲノムを解析するのではなく、特定のプライマーを用いることにより、品種に特徴的であると考えられる一部のDN

A配列を分析するものであるから、品種識別に利用する際には、その正確性、信頼性を担保するためにも、妥当性が確認されたものとして確立された分析手法を採用することが必要である。」とされた事から、今後、これらの識別技術の妥当性を検証する事が必要となった。

妥当性検証を行うためには、品種により増幅が不安定なマーカーや、電気泳動後のバンド像が不明瞭なマーカーなどをあらかじめ除く必要がある。さらに、保護の対象とする品種については、登録品種はもちろんのこと、近年登録前の有望系統における不適切な持ち出しと考えられる事例も国内において散見される(吉岡、2017)ことから、育成中の有望系統も含めて検討する必要がある。

そこで、本稿では二宮ら(2015)およびNonakaら(2017)の論文掲載のマーカーの中から、妥当性検証が実施可能なマーカーを選抜するとともに、選抜したマーカーを用いた場合の愛媛県育成品種や有望な育成系統における遺伝子型データを取得した。

表1 供試材料の名称と交配組合せ

調査番号	供試品種 系統名称	交配組合せ	品種 系統 の別
1	愛媛果試第28号	南香×天草	品種
2	甘平	西之香×ボンカン	品種
3	媛小春	清見×黄金柑	品種
4	愛媛43号	愛媛27号(清見×ミネヲ)×中間母本(アソール×不知火)	系統
5	愛媛44号	日向夏×はるみ	系統
6	愛媛45号	愛媛27号(清見×ミネヲ)×中間母本(アソール×不知火)	系統
7	愛媛46号	愛媛果試第28号×はるみ	系統
8	愛媛47号	愛媛果試第28号×中間母本(アソール×興津早生)	系統
9	愛媛48号	愛媛果試第28号×甘平	系統
10	愛媛49号	愛媛果試第28号×中間母本(アソール×興津早生)	系統
11	愛媛50号	はれひめ×愛媛14号(アソール×大谷伊予柑)	系統

II 材料及び方法

1 供試材料とDNAの抽出

品種識別の供試材料は、みかん研究所で栽

培している愛媛県が独自に育成した3品種と育成中の8系統を用いた(表1)。ゲノムDNAは6月に採取した各品種・系統の当年葉80mg

岡本・奥貞・山本・二宮：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

から DNeasy®Plant Mini Kit ((株) キアゲ
ン) を用いて、キット添付のプロトコルによ
り抽出した。

2 CAPS マーカー

二宮ら (2015) および Nonaka ら (2017)
に記載されている品種識別に利用可能な
CAPS マーカーのうち 27 種 (表 2) を適用し
た。

表 2 供試した遺伝子マーカーの名称及びプライマー配列

マーカー名称	制限 酵素	Forward	mer	Reverse	mer	温度 ^z 条件	引用 ^y
AI0326/Nde II	Nde II	CAGAACAAAGCGATGGAACC	20	CCCAAGTCCTGACCAACTA	21	60	1
AI0413/ Msp I	Msp I	ATACCATTCCGGTCCTGAAAG	21	GCTCCACTTGCTCCAAACA	19	56	1
AI0636/EcoR I	EcoR I	AAAGATTGGCCACTATTTTGA	21	GGGCGATTGCTTATTTTGT	19	56	1
Bf0029/Sty I	Sty I	GAGCCTGAGATTCCGGAACATA	21	GGAGGCCAACATCAACTG	18	58	1
Bf0036/Msp I	Msp I	TCAAAACCCCAATCTACCGT	20	CTGCTTGAGTAACCCCAACTT	21	56	1
Bf0145/Msp I	Msp I	CATCTCCATCAGTCCCCACAG	21	CAACCATCAAGGCAAGAACCA	21	60	1
Bf0158/Pvu II	Pvu II	GGAATTCGAACCCAAGCCTAA	21	GCGATAACGGCGACAGTAGAG	21	60	1
CP1624/Msp I	Msp I	ACCTCTGTCTTGCAAGC	18	AGTTTGATCAAAGAGTGACCG	21	Td	1
Gn0043/Hinc II	Hinc II	TTTCCAGTTCCTTTTGAGAG	21	AGAGCTTTCATGCAACGGCTT	22	56	1
IF0208/Hinf I	Hinf I	AATATTTCTGCGAATCACTGA	22	GCAAACCACACCAAGGA	17	58	1
Mf0097/Dra I	Dra I	GCAACTCATTATTCATTTCTC	21	CTCCATTTTCTTGTTGGCACA	21	56	1
Tf0062/Rsa I	Rsa I	ACTTCATCAGTGCACAACCT	21	CGATTGCGTGAAGATTGGTAT	21	Td	1
Tf0150/HinfI	HinfI	ACAGAAGAGGCCACAATCT	19	TTTCTTCAGCTAAAGCGTCAC	21	Td	1
Tf0168/Rsa I	Rsa I	TTTGATCCTCCGTGGGCATAC	21	CGCCTATCACAGCCGAAATG	20	Td	1
Tf0235/HaeIII	HaeIII	ATTCTTGACGAAGGGCATATC	21	GAGCAGGAACGGCATGAC	18	Td	1
Tf0271/Rsa I	Rsa I	AGTTATCCAACGGAATCT	18	CATGGCAATACTTTGTAGTTC	21	Td	1
Tf0326/Hha I	Hha I	TTGACGCCACTAAGTA	16	AGCATTTGGGTATCATATCTA	21	62	1
Tf0300/BamH I	BamH I	GCTGCGATTAGGGTTGC	17	TAAACATATCCCACGGAACAT	21	Td	1
Cp0089/HindIII	HindIII	CGGGCACTTTCAATAATCGT	20	CAATTCAGGCCTCCGCTTTC	21	Td	2
Cp0635/Dra I	Dra I	GGCCTGGTGTCAATCAT	17	TGCAAGCTGCCATCTTACAAC	21	Td	2
Tf0001/Msp I	Msp I	AAAAGTTCACAAGTACGAGGG	21	AGCAATCCTTGAGAATACGCA	21	Td	2
Tf0013/Rsa I	Rsa I	GTTCTATGCGTTGTTAAGGTT	21	GCCCTGAAGTTGAACGAGAC	20	Td	2
Tf0293/HindIII	HindIII	CTTTCTTCCGGTTATCTAA	20	TGCAGCAGAAGGCCTCTTATA	21	Td	2
Tf0318/Hinc II	Hinc II	GACGACTACCGCTACTACTAC	21	ACAGCCAGGAACAAGCTTT	19	Td	2
Tf0386/Msp I	Msp I	GACAAGAAAATTACTATACGG	21	GGAATCAACCATGAGTGACA	20	Td	2
Tf0419/Pvu II	Pvu II	GGTGATGAGAAGCCAACCTAT	21	ATCTTGATCATGGCGAAAT	19	Td	2
Tf0420/HaeIII	HaeIII	TGGAGGCCATTTCTTATTAGA	21	CTCTGACCACGGGATCA	17	Td	2

注) z 温度条件の数字はアニーリング温度、Td は Touch down PCR である。

y 1 は Nonaka et. al. (2017)、2 は二宮ら (2015) に基づく。

3 PCR 条件

1) 反応液組成

PCR には、Ampli Taq Gold® DNA Polymerase (Roche, Branchburg, NJ, USA) を用い、各サンプルあたり表 3 に掲げた組成で実施した。

2) 反応条件

DNA の増幅は、表 2 に記載した各マーカーを用いて、コンベンショナル法またはタッチダウン法により実施した。コンベンショナル法は、94℃で 10 分間の変性反応を行った後、94℃で 40 秒間、表 2 に掲げた温度で 1 分間、72℃で 2 分間の反応ステップを 35 サイクル、さらに伸長反応を 72℃で 7 分間の条件で実施した。タッチダウン法は、94℃で 10 分間の変性反応後、94℃で 30 秒間、62℃で 30 秒間、72℃で 1 分間の反応ステップを 2 サイクル、その後アニーリング温度のみを 60℃、58℃に変更してそれぞれ 2 サイクル行い、続いてアニーリング温度を 56℃に変更して 30 サイクル実施した。さらに伸長反応を 72℃で 7 分間の条件で実施した。

表 3 PCR の反応液組成

reagent	volume
dH2O (滅菌水)	5.0 $\mu\ell$
10×buffer (AmpliTaq Gold 付属)	1.0 $\mu\ell$
MgCl ₂ (AmpliTaq Gold 付属)	1.0 $\mu\ell$
dNTP mix (AmpliTaq Gold 付属)	1.0 $\mu\ell$
Forward Primer (10 pmol)	0.5 $\mu\ell$
Reverse Primer (10 pmol)	0.5 $\mu\ell$
AmpliTaqGold(5 unit/ $\mu\ell$)	0.1 $\mu\ell$
DNA (10 ng/ $\mu\ell$)	1.0 $\mu\ell$
計	10.0 $\mu\ell$

4 制限酵素処理

PCR 産物は、表 2 に記載した、それぞれのマーカーに応じた制限酵素による処理を行っ

た。制限酵素反応液は表 4 に掲げたとおり調整し、調整後 37℃で 180 分保温し処理を行った。

5 電気泳動条件

表 4 制限酵素処理液の組成

reagent	volume
dH2O (滅菌水)	9.3 $\mu\ell$
10×Buffer (酵素添付)	1.5 $\mu\ell$
制限酵素	0.2 $\mu\ell$
PCR 増幅産物	4.0 $\mu\ell$
計	15.0 $\mu\ell$

制限酵素処理後、電気泳動処理により多型の確認を行った。電気泳動は、TAE 緩衝液 (40 mM Tris、40mM 氷酢酸、1mM EDTA、pH8.0) および 2%アガーロスゲルを用い 100V で 25 分を行った。その後、泳動後エチジウムブロマイドで染色してトランスイルミネーターで観察した。

6 マーカーの選抜と遺伝子型データの解析方法

CAPS における多型の解析は、二宮ら (2014) に準じて行った。すなわち、識別領域に制限酵素部位が存在しないアレルを a とし、存在するアレルを b とし、各品種・系統の遺伝子型をホモの aa、bb およびヘテロの ab を決定した。また、泳動像の特徴から妥当性検証に利用可能なマーカーを選抜した。さらに、選抜したマーカーについて Marker Tool Kit (Fujii ら、2008) により鵜飼の品種判別理論値 (鵜飼、2004) と各品種間を識別するマーカーセット数を求めるとともに、選抜した遺伝子型データにおいて、最小マーカーセット検出ソフトウェア Minimal Marker (Fujii ら、2013) によりすべての品種を識別することができるマーカーセットの算出を行った。

型の一覧は第 5 表のとおりである。各マーカーのうち、19 種類のマーカーでは識別に関与する多型のみ観察された (図 1)。Al0326/Nde II、Bf0029/Sty I、Bf0145/Msp I、Gn0043/Hinc II、Tf0062/Rsa I、Tf0013/Rsa I、Tf0293/Hind

III 結果

調査したマーカーと愛媛県育成品種・系統の組み合わせにおいて観察された PCR 増幅断片長、観察された多型の断片長および遺伝子

Ⅲ、Tf0419/PvuⅡの8マーカーでは、識別に
関与する多型を示すバンドと識別に関与しな
い多型が観察された(図2)。また、Bf0029/Sty

IとCp0089/HindⅢの2マーカーでは、調査
した品種・系統内で多型がみられなかった。

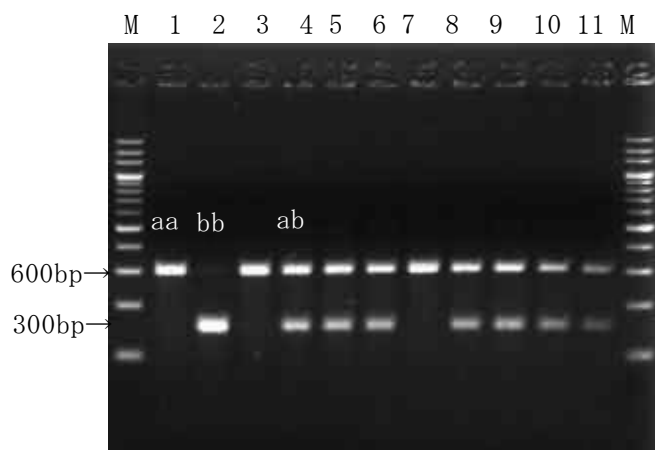


図1 識別に関与する多型のみ観察される例(Bf0158/PvuⅡ)

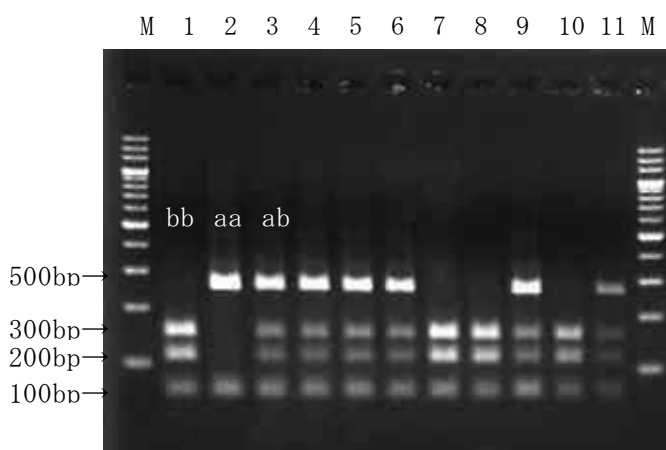


図2 識別に関与する多型としない多型が観察される例(A10326/NdeⅡ)

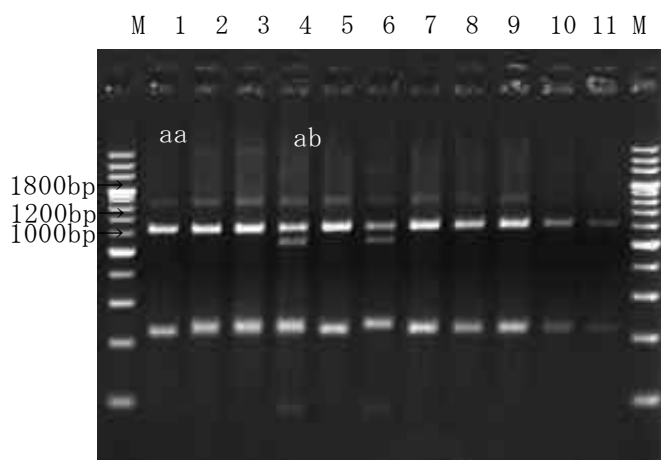


図3 不明瞭な多型(1800bp)が観察される例(Bf0145/MspⅠ)

レーン番号は
M 200bp ladder、
1 愛媛果試第28号
2 甘平
3 媛小春
4 愛媛43号
5 愛媛44号
6 愛媛45号
7 愛媛46号
8 愛媛47号
9 愛媛48号
10 愛媛49号
11 愛媛50号
を表す。

Bf0145/Msp I、Gn0043/Hinc II、Tf0062/Rsa Iの3マーカーには、制限酵素処理の未消化断片と考えられる不明瞭なバンド等が観察された(図3)。これらの結果から、調査品種・系統内で多型が見られなかった2マーカーと不明瞭なバンド等が観察された3マーカーを除いた22マーカーを選抜した。

表5 遺伝子マーカーにおける各品種・系統間の遺伝子型

マーカー名称	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	A10326/Nde II	A10413/Msp I	A10636/EcoR I	Bf0029/Sty I	Bf0036/Msp I	Bf0145/Msp I	Bf0158/Pvu II	Cp1624/Msp I	Gn0043/Hinc II	If0208/Hinf I	Mf0097/Dra I	Tf0062/Rsa I	Tf0150/Hinf I	Tf0168/Rsa I
品種・系統名														
紅まどんな	bb	ab	ab	ab	aa	aa	aa	ab	ab	ab	ab	ab	bb	aa
甘平	aa	aa	ab	ab	ab	aa	bb	ab	ab	bb	ab	aa	ab	aa
媛小春	ab	aa	ab	ab	ab	aa	aa	ab	ab	ab	aa	aa	ab	aa
愛媛43号	ab	aa	ab	ab	aa	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa	bb	ab
愛媛44号	ab	ab	ab	ab	bb	aa	ab	aa	aa	bb	ab	ab	bb	aa
愛媛45号	ab	ab	aa	ab	aa	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa
愛媛46号	bb	ab	aa	ab	aa	aa	aa	ab	ab	bb	ab	ab	bb	aa
愛媛47号	bb	aa	bb	ab	ab	aa	ab	bb	aa	bb	bb	ab	bb	ab
愛媛48号	ab	aa	bb	ab	ab	aa	ab	bb	ab	ab	aa	ab	bb	aa
愛媛49号	bb	aa	bb	ab	ab	aa	ab	ab	aa	ab	bb	ab	bb	aa
愛媛50号	ab	ab	ab	ab	bb	aa	ab	bb	aa	bb	ab	ab	bb	ab
PCR増幅断片長	600	1100	1200	2200	1400	1200	600	900	1100	550	400	900	500	1100
Aアレル断片長	500	1100	1200	1700	1400	1200	600	900	1100	550	400	900	500	1100
Bアレル断片長	300	900	950	1200	800	1000	300	800	900	300	300	600	350	600
	200	200	250		650					250	100		150	600
共通断片長	100			600		450			200			220		80
利用判定 ^z	○	○	○		○		○	○		○	○		○	○
最少マーカー ^y					◎			◎		◎				◎

マーカー名称	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
	Tf0235/Hae III	Tf0271/Rsa I	Tf0326/Hha I	Tf0300/BamH I	Cp0089/Hind III	Cp0635/Dra I	Tf0001/Msp I	Tf0013/Rsa I	Tf0293/Hind III	Tf0318/Hinc II	Tf0386/Msp I	Tf0419/Pvu II	Tf0420/Hae III
品種・系統名													
紅まどんな	aa	ab	ab	ab	ab	aa	ab	ab	aa	bb	ab	ab	aa
甘平	ab	aa	ab	ab	ab	ab	ab	aa	aa	ab	ab	aa	ab
媛小春	bb	aa	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa	aa	aa
愛媛43号	ab	aa	ab	ab	ab	ab	ab	ab	aa	bb	aa	aa	aa
愛媛44号	ab	ab	bb	ab	ab	ab	ab	aa	ab	ab	ab	aa	aa
愛媛45号	ab	ab	bb	ab	ab	ab	bb	bb	aa	bb	ab	aa	aa
愛媛46号	aa	ab	bb	ab	ab	aa	bb	ab	aa	bb	ab	aa	aa
愛媛47号	aa	ab	ab	ab	ab	aa	bb	ab	aa	bb	ab	aa	aa
愛媛48号	ab	ab	bb	ab	ab	aa	aa	ab	aa	bb	ab	aa	aa
愛媛49号	aa	ab	bb	ab	ab	aa	ab	ab	aa	bb	ab	aa	aa
愛媛50号	ab	ab	bb	aa	ab	aa	ab	ab	aa	bb	aa	ab	aa
PCR増幅断片長	650	700	1400	800	1000	1000	650	1100	900	600	550	650	400
Aアレル断片長	650	700	1400	800	400	1000	650	850	900	600	550	550	400
Bアレル断片長	450	400	800	600	300	550	350	600	600	500	300	400	200
	200	350	600			450		350			200		
共通断片長								250	300			100	50
利用判定 ^z	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○
最少マーカー ^y	◎		◎										

注) z○ 妥当性検証実施可能
y◎ スクリーニングに利用可能な最少マーカーセットの一例

選択した 22 マーカーにおける品種識別能力の判定のため、MarkerToolKit により鵜飼の品種判別理論値を求めた結果、22 マーカーすべてが一致した時に、一致した品種・系統が愛媛県育成品種・系統と偶然一致する確率は、最大でも愛媛 49 号の $P1=0.000069967$ であった（表 6）。また、それぞれの品種・系統間を識別するマーカー数を求めたところ、‘甘平’と愛媛 50 号、‘媛小春’と愛媛 50 号間を識別するマーカーが 16 マーカーと多く、‘愛媛果試第 28 号’と愛媛 46 号、愛媛 47 号と愛媛 49 号、愛媛 48 号と愛媛 49 号を識別できるマーカーはそれぞれ 5 マーカーと少なかった（表 7）。

表 6 供試した各品種・系統における鵜飼の品種判別理論値

品種・系統名	p1
愛媛果試第 28 号	0.0000259144
甘平	0.0000000200
媛小春	0.0000000686
愛媛 43 号	0.0000322854
愛媛 44 号	0.0000007592
愛媛 45 号	0.0000095661
愛媛 46 号	0.0000097180
愛媛 47 号	0.0000019523
愛媛 48 号	0.0000084338
愛媛 49 号	0.0000699676
愛媛 50 号	0.0000004100

$$P1=1-(1-f_0^k)^n$$

表 7 供試した各品種・系統間における識別可能なマーカー数

	愛媛果試 第 28 号	甘平	媛小春	愛媛 43 号	愛媛 44 号	愛媛 45 号	愛媛 46 号	愛媛 47 号	愛媛 48 号	愛媛 49 号	愛媛 50 号
愛媛果試 第 28 号		13	12	9	12	9	5	10	11	7	10
甘平			9	10	10	11	14	14	14	13	16
媛小春				8	12	12	15	15	12	12	16
愛媛 43 号					11	8	12	11	10	10	9
愛媛 44 号						8	11	14	11	12	9
愛媛 45 号							8	14	9	9	11
愛媛 46 号								8	10	7	11
愛媛 47 号									7	5	11
愛媛 48 号										5	10
愛媛 49 号											12
愛媛 50 号											

マーカー数が十分であることから、Minimal Marker を用いてすべての品種を 2 マーカー以上で識別することができるマーカーセット

を算出したところ、最低必要なマーカー数は 27 マーカー中 6 マーカーで、組合せ数は 36 種類であった。

IV 考 察

品種識別の妥当性を検討する際に必要なマ

ーカーの条件は、シンプルな多型を示すこと、PCR 反応が安定していること、不明瞭な多型が観察されないことなどが優先されると考え

られる。また、可能な限り制限酵素処理による未消化断片やプライマーダイマーの発生が起り難いことが望ましい。この観点から愛媛県育成品種や有望な育成系統を識別するために調査した 27 マーカーの中では、22 マーカーが該当すると考えられた。

次に、選択した 22 マーカーの識別能力について、鵜飼の品種判別理論値を求めると、最大でも愛媛 49 号の $P1=0.000069967$ と、十分な能力であることが明らかになった。ただし、今回調査した品種・系統間における 2 品種間を識別するマーカー数は、最大 15 マーカーから最小 5 マーカーであり、識別できるマーカーの少ない 2 品種間の共通点は、種子親に‘愛媛果試第 28 号’を用いた系統（表 1）である。このため今後類似した組み合わせの品種が増加すると今回選抜したマーカーのみでは識別できない可能性が予想される。

また、22 マーカーをすべて用いて識別を行うと時間とコストが掛かることから、スクリー

ニングに利用可能な最少のマーカーセットを、各品種・系統を 2 マーカー以上で識別することを条件に算出したところ、最少マーカーセットは 6 マーカーを 1 セットとして、組合せ数は 36 種類であった。このうち、PCR の温度条件や制限酵素の種類が共通な方が、処理に関する手間を省くことが可能でよりスクリーニングに適したマーカーセットとなる。

このようなマーカーセットの一例として、Bf0036/Msp I、Cp1624/Msp I、If0208/Hinf I、Tf0168/Rsa I、Tf0235/HaeIII、Tf0326/Hha I を選抜できる（表 5）。

また、対象品種数が多くなった場合にも、品種特性などにより今回選抜した 22 マーカーだけでは識別ができなくなる可能性もある。これらに対応するためにも、現在、国の研究機関等で実施されているマーカーの選抜プログラムと連携が重要であり、今後の研究の進展により、カンキツの品種識別が早期に完成されることが望まれる。

V 摘要

愛媛県育成カンキツ品種・系統における品種識別法の妥当性検証に利用可能な CAPS マーカーの選抜を行った。

1) 二宮ら (2015) と Nonaka ら (2017) の論文に掲載されている 29 マーカーのうち電気泳動後の泳動像と多型から 22 マーカーを選抜した。さらに、それらの 22 マーカーを愛媛県育成 3 品種と育成中の 8 系統に適用した場合の遺伝子型を明らかにした。

2) 今回選抜した 22 マーカーの識別能力について鵜飼 (2004) の品種判別理論値 (22 マーカーすべてが一致した時に、一致した品

種・系統が愛媛県育成品種・系統と偶然一致する確率) は、最大でも $P1=0.000069967$ であった。また、選択した 22 マーカーによる品種・系統間を識別するマーカー数について、最大は 15 マーカー、最小は 5 マーカーであった。識別するマーカー数の少ない品種は、それぞれ‘愛媛果試第 28 号’を種子親に使用した品種でありその原因は、類似した交配組み合わせにあることが推測された。

3) 識別の時間とコスト低減のため、22 マーカーの遺伝子型からさらにスクリーニング可能な最少のマーカーセットを算出したところ、6 マーカーを 1 セットとして 36 組合せが得られた。

VI 引用文献

- 藤井 浩・山下浩之・島田武彦・遠藤朋子・清水徳朗・山本俊哉. 2008. DNA マーカー型一覧表に関する各種計算を自動的に行うソフトウェア MarkerToolKit の開発、DNA 多型 Vol. 16: 103-107.
- Fujii, H., T. Ogata, T. Shimada, T. Endo, 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.
- 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. *The Hort. J.* 86: 208-221.
- 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. *愛媛果樹試研報.* 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 . 2008. カンキツ新品種 ‘甘平’ について. *愛媛果樹試研報.* 22: 1-4.
- Shimada, T., H. Fujii, T. Endo, T. Ueda, A. Sugiyama, M. Nakano, M. Kita, T. Yoshioka, T. Shimizu, H. Nesumi, Y. Ikoma, T. Moriguchi, M. Omura. 2014. Construction of a citrus framework genetic map anchored by 708 gene-based markers. *Tree Genetics & Genom.* 10: 1001-1013.
- 鵜飼保雄. 2004. 植物品種における品種同定理論. *農業および園芸.* 79: 194-198.
- 吉岡照高. 2017. カンキツ口之津 39 号. *農研機構報告. 果樹茶部門.* 1: 37-45.