

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

井門健太*

Discrimination of Japanese strawberry cultivars including those cultivated in Ehime prefecture
using retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) markers

IMON kenta

要 旨

登録品種における不適切な栽培等が疑われる事例に迅速に対応するためには、品種の特定が可能であるとともに、当該品種と他品種を明確に区別することが短期間で可能な科学的根拠に基づく品種識別技術が必要である。イチゴ果実の形、色、大きさ、葉の形や大きさ、草型等の形質の比較により行われている従来の品種識別では、大きさや生育ステージを揃えた苗を同一の環境下で栽培して同一品種や異なる品種間の形質を比較する必要がある、品種識別には多大な労力と長時間を要する。

そこで、イチゴにおいて開発されている品種識別を目的とした DNA マーカーのうち、迅速性、簡便性および再現性に優れる品種間のレトロトランスポゾン挿入位置の違いを多型として検出する DNA マーカー (retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) markers ; 以下 RBIP マーカー) を用いて、愛媛県育成イチゴ品種 ‘紅い雫’ ‘あまおとめ’ を含む日本で栽培されている主要なイチゴ品種の識別技術を検討した。

RBIP マーカーを 11 個使用することにより、‘紅い雫’ ‘あまおとめ’ を含む 32 品種および ‘紅い雫’ ‘あまおとめ’ と交配親が同一の 2 系統の識別が可能となった。また、種苗法における育成者権の保護対象が種苗だけでなく、その収穫物にも及ぶことから、流通段階でのパック詰めイチゴ果実からガク片や果肉を採取し、分析することを想定して、果実のガク片や果肉 (果皮を除く) から抽出した DNA を使用した結果、RBIP マーカーによる品種識別が可能であることが示された。

キーワード: イチゴ, レトロトランスポゾン, DNA マーカー, 品種識別

1. 緒言

公的研究機関、民間企業、団体・個人等が育成した新品種は、種苗法に基づき品種登録を行うことで知的財産として扱われ、育成者権が保護される。現在、愛媛県が育成したイチゴ品種は ‘あまおとめ’ (2009 年 2 月 24 日登録, 第 17391 号), ‘紅い雫’ (あかいしずく: 2017 年 3 月 1 日登録, 第 25595 号) が品種登録されている (農林水産省品種登録ホームページ)。

イチゴにおいては過去に ‘さちのか’ ‘とちおとめ’ が育成者に無断で海外へ持ち出された事例や、韓国から輸入されたイチゴ果実に ‘さちのか’ の果実が含まれていた事例が報告されている (松元, 2004 ; 國久ら, 2005)。また、‘福岡 S6 号’

(商標名: あまおう) が育成者に無断で福岡県外において栽培・販売された事例も報告されている (吉野ら, 2008)。このように登録品種について不適切な栽培等が疑われる事例が発生した場合、育成者は育成者権の保護を目的とした品種識別を行う必要がある。そのため、品種の特定が可能であるとともに、当該品種と他品種を明確に区別することが短期間で可能な科学的根拠に基づく品種識別技術が必要である。

従来からイチゴの品種識別は果実の形、色、大きさ、葉の形や大きさ、草型等の形質の比較により行われているが、これらの形質は栽培環境や生育ステージにより、同一品種でも個体間の差が大きい。そのため、大きさや生育ステージを揃えた苗を同一の環境下で栽培して同一品種や異なる

*現 愛媛県農林水産部農政課農地・担い手対策室

品種間の形質を比較する必要があり、品種識別には多大な労力と長時間を要する (Neilsen et al, 2000). また、流通果実は多数の生産者がそれぞれ異なる環境で栽培したものであり、これらの果実の形質から品種を正確に特定することは極めて困難である (國久・松元, 2004).

イチゴはランナーにより栄養繁殖を行う植物であるため、突然変異が起こらない限り、同一品種の個体はほぼ同一の DNA を保有していると考えられる (國久・松元, 2004). そのため、科学的根拠に基づく新しい品種識別技術として、品種間の DNA レベルでの変異を検出する DNA マーカーを用いた方法が開発されている. イチゴでは主に「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) が作成されている CAPS マーカー (Kunihisa et al, 2003 ; 2005 ; Kunihisa, 2011) や SSR マーカー (Shimomura and Hirashima, 2006 ; Honjo et al, 2011) を用いた手法がある. CAPS マーカーはシークエンサーが不要で再現性が高い一方、多数のマーカーや制限酵素処理が必要なため、多検体の解析には長時間を要する (Honjo et al, 2011). また、SSR マーカーは高い多型性があり、近縁な品種でも識別可能である一方、自動解析や正確なジェノタイピングにはシークエンサーが必要である (Weber and May, 1989). そこで、不適切に栽培された苗や果実の流通を迅速に差し止めるためには、再現性が高く、より迅速・簡便で高額な機器を使用しない品種識別技術が求められている.

レトロトランスポゾンは真核生物のゲノム内に存在する可動遺伝因子であり、コピーアンドペースト型の複製を行い、ゲノム内に挿入された後は安定的に遺伝する (Kumar and Bennetzen, 1999). また、レトロトランスポゾンの複製配列はゲノム上に多数存在しており、これらをターゲットにしたマーカーは、多型を検出するための有用な DNA マーカーとなる (Flavell et al, 1998). このようなマーカーのうち、レトロトランスポゾン挿入多型に基づく RBIP マーカーは、公開されているゲノム配列情報や、ランダムショットガンシークエンスにより得られたゲノム DNA の塩基配列情報から設計可能であることに加えて、マーカーとなる PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動で検出可能であり (藤井ら, 2016)、検出が迅速、簡便かつ再現性の高い優れた DNA マーカーであ

る. RBIP マーカーはニホンナシ (Kim et al, 2012), パインアップル (奈島ら, 2015), リンゴ (西谷ら, 2016), マンゴー (奈島ら, 2018) といった果樹に加え、イチゴ (秋竹ら, 2013 ; Monden et al, 2014) においても開発されている.

本研究では、イチゴにおける RBIP マーカーの開発や品種識別に関する研究を行った岡山大学他のグループによる「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 (実用技術開発ステージ) 現場での検査導入を実現する農作物品種 DNA 判定法の開発」(2012~2014 年度 : 課題番号 24003) の成果を活用して、RBIP マーカーを用いた愛媛県育成イチゴ品種等の識別技術について検討した. あわせて、種苗法における育成者権の保護対象が種苗だけでなく、その収穫物にも及ぶことから、流通段階でのパック詰めイチゴ果実からガク片や果肉を採取し、分析することを想定して、苗の小葉に加え果実のガク片および果肉から抽出した DNA を使用して、それぞれの RBIP マーカーの検出パターンを比較した.

2. 材料および方法

2.1 供試品種および系統

供試品種は愛媛県育成品種の「紅い雫」(「あまおとめ」×「紅ほっぺ」), 「あまおとめ」(「とちおとめ」×「さがほのか」) を含む 32 品種ならびに「紅い雫」と同じ交配親をもつ「20-15-53」および「あまおとめ」と同じ交配親をもつ「愛媛 12 号」の 2 系統を用いた (表 1).

2.2 DNA 抽出等

供試品種・系統の苗の小葉 50~100mg, ならびに「紅い雫」「あまおとめ」「紅ほっぺ」「さがほのか」のガク片 50~100mg および瘦果が混入しないように採取した果肉 (果皮を除く) 200~300mg を φ3.2mm ステンレスビーズ 2 個と一緒に 2.0mL 専用チューブ TM-625 コニカル型 (トミー精工) に入れ、細胞破碎装置 MicroSmash MS-100 (トミー精工) を用いて室温・4,000rpm・120 秒の条件でサンプルを破碎した. その後、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてキットに同封のマニュアルを一部改変した方法により DNA を抽出した. 抽出した DNA は分光光度計 (NanoPhotometer™ ; IMPLN) を用いて濃度と純度を確認した後、超純水で 10 倍に希釈して、

PCR1 反応あたり 5.0~20ng をテンプレートとして用いた。

2.3 PCR 反応

プライマーは前述の研究課題「現場での検査導入を実現する農作物品種 DNA 判定法の開発」の

表1 供試した32品種・2系統

品種・系統名	育成機関（育成者）	品種・系統名	育成機関（育成者）
紅い雫	愛媛県農林水産研究所	みやざきなつはるか	宮崎県総合農業試験場
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	静岡県農業技術研究所	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	まりひめ	和歌山県農業試験場
福岡 S6 号	福岡県農林業総合試験場	北の輝	農研機構東北農業研究センター
さちのか	農研機構九州沖縄農業研究センター	やよいひめ	群馬県農業技術センター
章姫	萩原 章弘 氏	とちひとみ	栃木県農業試験場
とよのか	農研機構九州沖縄農業研究センター	もういっこ	宮城県農業・園芸総合研究所
女峰	栃木県農業試験場	越後姫	新潟県農業総合研究所園芸研究センター
アイベリー	愛三種苗（株）	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
レッドパール	西田 朝美 氏	栃木 i27 号	栃木県農業試験場
熊研い 548	熊本県農業研究センター	ペチカ	（株）ホーブ
かおり野	三重県農業研究所	なつおとめ	栃木県農業試験場
古都華	奈良県農業研究開発センター	サマーティアラ	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
おおきみ	農研機構九州沖縄農業研究センター	20-15-53	愛媛県農林水産研究所
ひみこ	農研機構九州沖縄農業研究センター	愛媛 12 号	〃

注) 育成機関は現在の名称

参画機関である岡山大学, 福岡県農林業総合試験場, 栃木県農業試験場, および株式会社ファスマックから情報提供を受け, 11 組を作製した. また, 陽性コントロールプライマーとして, 葉緑体 DNA の *rbcL* 遺伝子の部分領域に由来する塩基配

列から作製したもの (日本バーコードオブライフ・イニシアチブホームページ) を用いた (表 2). PCR 反応は栃木県農業試験場より情報提供を受けた方法を一部改変し, マルチプレックス PCR 法により行った. 1 サンプル当たりの PCR 反応

表 2 RBIP マーカーおよびプライマーの名称, 増幅断片長, 塩基配列

No.	マーカー の名称	プライマーの 名称	増幅 断片長	塩基配列
1	Cl 161_1T	Cl 161_1T_Fw	79bp	5'-GGATCTCTCCTCTCCAACAGTCAG-3'
2		Cl 161_1T_Rv		5'-TTCCAGTAGTCATAAACCTCCGCTC-3'
3	Cl 76_2	Cl 76_2_Fw	94bp	5'-GGATCTCTCCTCTCCAACAAGAATAG-3'
4		Cl 76_2_Rv		5'-GCAGTGATGAGACATGAGTAGACACG-3'
5	Cl 19_5	Cl 19_5_Fw	99bp	5'-GGATCTCTCCTCTCCAACACATC-3'
6		Cl 19_5_Rv		5'-GGCTTTAGATCCGATCTACAATGAC-3'
7	Cl 242_2	Cl 242_2_Fw	108bp	5'-GGATCTCTCCTCTCCAACAAAATG-3'
8		Cl 242_2_Rv		5'-CAATCTATGCCCGGATATGAAGTTC-3'
9	pattern524_1	pattern524_1_Fw	114bp	5'-GGATCTCTCCTCTCCAACACCATATA-3'
10		pattern524_1_Rv		5'-CAATCCTCATTTTCATGTCTTCGAAG-3'
11	Cl 258_2	Cl 258_2_Fw	119bp	5'-GGATCTCTCCTCTCCAACATAACC-3'
12		Cl 258_2_Rv		5'-GAATTTGGTCGAGTTGGTCCAC-3'
13	Cl 261_1	Cl 261_1_Fw	143bp	5'-GGGATCTCTCCTCTCCAACAGTTAAG-3'
14		Cl 261_1_Rv		5'-CGAAGCACATTCTATGCTACTAATGAGG-3'
15	Cl 322	Cl 322_Fw	280bp	5'-CGTGGATCATCCTTGTACCGATATT-3'
16		Cl 322_Rv		5'-GCCAAGAGTGAAAGAGAGCAAATG-3'
17	Cl 124	Cl 124_Fw	281bp	5'-TGGATCATCCTTGTACCGATATTGT-3'
18		Cl 124_Rv		5'-CTCTTGCTGCAAATGAACCCAATTC-3'
19	Cl 115	Cl 115_Fw	283bp	5'-ATCATCCTTGTACCGATATTGTCC-3'
20		Cl 115_Rv		5'-GAAACTACAAGACCGGAATGATG-3'
21	pattern320	pattern320_Fw	300bp	5'-ATCATCCTTGTACCGATATTGTCC-3'
22		pattern320_Rv		5'-GTGAACCTCCTCAGATAAAGTCACA-3'
23	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i> _Fw	—	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'
24		<i>rbcL</i> _Rv		5'-GTAAAATCAAGTCCACCR*CG-3'

注) Fw : Forward 側, Rv : Reverse 側 *rbcL* の増幅断片長は約 600bp, *R は A+G の混合塩基

液の組成は、10×Ex Taq Buffer 2μL, 5U/μL TaKaRa Ex Taq HS 0.1μL, 2.5mM dNTPs Mixture 1.6μL, 5μM 陽性コントロールプライマー各 0.1μL, 5μM プライマー各 0.5μL, DNA テンプレート 5.0~20ng に超純水を加えて 20μL 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、

以下の条件により PCR 反応を行った。
94℃・3分→(94℃・30秒→63℃*・30秒→72℃・45秒)×5 サイクル

→(94℃・30秒→58℃・30秒→72℃・45秒)×30 サイクル

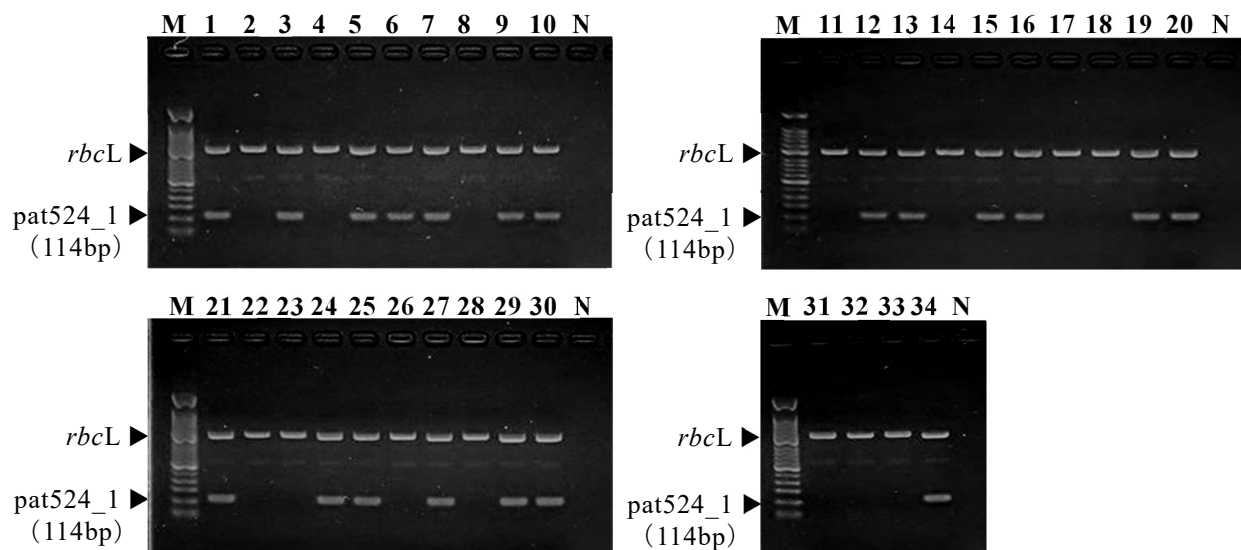
※1 サイクルにつき 1℃ずつ温度を下げた。

2.4 DNA マーカーの検出等

PCR 産物の有無は 2%アガロースゲル電気泳動により確認し、供試品種・系統における RBIP マーカーの検出パターンから作成した品種識別表と福岡県農林業総合試験場作成の組み合わせ識別表を照合して、32 品種および愛媛県育成 2 系統の識別表を作成した。

3. 結果および考察

供試品種・系統で品種識別用 RBIP マーカーと陽性コントロールマーカーを同時検出した。その検出例を図 1 に示す。RBIP マーカーは正常に検出され、その近傍に非特異的増幅産物はみられなかった(図 1)。また、供試した RBIP マーカーの検出パターンから品種識別表を作成した結果、表 2 で示した CI 76_2, CI 19_5, CI 242_2, pattern524_1, CI 258_2, CI 261_1, CI 322, CI 124, CI 115, pattern320 の 10 個の RBIP マーカーでは‘紅い雫’と‘とちおとめ’が同一の検出パターンとなり、識別が不可能であった。そこで、新たに 1 個の RBIP マーカー (CI 161_1T) を追加することにより、‘紅い雫’‘あまおとめ’を含む 32 品種および愛媛県育成 2 系統の識別が可能になった(表 3)。このことから、新たに育成された品種・系統を加えることにより、品種識別の対象となる品種・系統数が増加するに従って、品種識別を行うために必要な RBIP マーカー数が増加する可能性が示唆された。



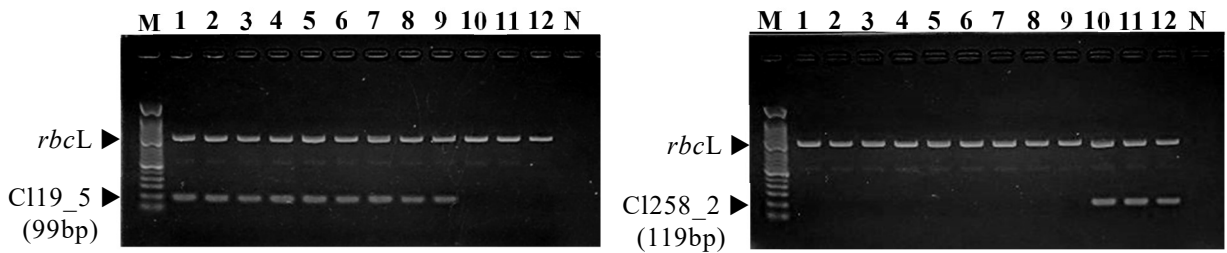
M: 50bp サイズマーカー N: 超純水 1: 紅い雫 2: あまおとめ 3: 紅ほっぺ 4: さがほのか 5: とちおとめ 6: 福岡S6号
7: さちのか 8: 章姫 9: とよのか 10: 女峰 11: アイベリー 12: レッドパール 13: 熊研い548 14: かおり野 15: 古都華
16: おおきみ 17: ひみこ 18: みやざきなつはるか 19: めぐみ 20: ゆめのか 21: さつまおとめ 22: まりひめ 23: 北の輝
24: やよいひめ 25: とちひとみ 26: もういっこ 27: 越後姫 28: おとめ心 29: 栃木i27号 30: ペチカ 31: なつおとめ
32: サマーティアラ 33: 20-15-53 34: 愛媛12号

図 1 供試品種における RBIP マーカー (pattern524_1 ; 114bp) の検出例

表 3 RBIP マーカーに基づく 32 品種および 2 系統における識別表

マーカーの名称	品種名 系統名	増幅 断片長	2015153	紅い雫	あまおとめ	紅ほっぺ	さがほのか	とちおとめ	福岡S6号	さちのか	章姫	とよのか	女峰	アイベリー	レッドパール	熊研い548	かおり野	古都華	おおきみ	ひみこ	みやぎきなつはるか	めぐみ	ゆめのか	さつまおとめ	まりひめ	北の輝	やよいひめ	とちひとみ	もういつこ	越後姫	おとめ心	栃木i27号	なつおとめ	ベチカ	サマーティアラ		
			<i>rbcL</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CI 161_1T	79bp	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
CI 76_2	94bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CI 19_5	99bp	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
CI 242_2	108bp	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
pattern524_1	114bp	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-
CI 258_2	119bp	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CI 261_1	143bp	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI 322	280bp	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CI 124	281bp	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CI 115	283bp	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
pattern320	300bp	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

注) 表中の記号は、当該マーカーによる増幅断片が - : ない, + : ある ことを示す



M : 50bp サイズマーカー N : 超純水 1: 紅い雫 (小葉) 2: 紅い雫 (ガク片) 3: 紅い雫 (果肉) 4: あまおとめ (小葉) 5: あまおとめ (ガク片) 6: あまおとめ (果肉) 7: 紅ほっぺ (小葉) 8: 紅ほっぺ (ガク片) 9: 紅ほっぺ (果肉) 10: さがほのか (小葉) 11: さがほのか (ガク片) 12: さがほのか (果肉)

図 2 供試品種における RBIP マーカー (CI19_5 ; 99bp (左) , CI258_2 ; 119bp (右)) の検出例

表 4 RBIP マーカーに基づく供試品種における 識別表

マーカーの名称	品種名	DNA抽出 サンプル	増幅 断片長	紅い雫		あまおとめ		紅ほっぺ		さがほのか			
				小葉	ガク片 果肉	小葉	ガク片 果肉	小葉	ガク片 果肉	小葉	ガク片 果肉		
<i>rbcL</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
CI 161_1T	79bp	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	
CI 76_2	94bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CI 19_5	99bp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
CI 242_2	108bp	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
pattern524_1	114bp	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	
CI 258_2	119bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CI 261_1	143bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CI 322	280bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CI 124	281bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
CI 115	283bp	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
pattern320	300bp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

注) 表中の記号は、当該マーカーによる増幅断片が - : ない, + : ある ことを示す

さらに、識別可能となった品種・系統のうち、‘紅ほっぺ’と‘まりひめ’、‘紅い雫’と‘20-15-53’、‘あまおとめ’と‘愛媛12号’は交配親の組み合わせが同一であり、‘さちのか’と‘レッドパール’は同一の交配親の正逆交配品種であることから、近縁な品種・系統についても RBIP マーカーにより識別可能であることが示された (表 3)。これは、供試した RBIP マーカーにおいて近縁な品種・系統間でも多型が検出され、11 個の RBIP マーカーの組み合わせにより供試品種・系統間で識別可能になったためであるが、‘紅い雫’と同一の交配親をもつ佐賀県育成の‘佐賀i5号’ (岡ら, 2017) など愛媛県育成品種に近縁な品種・系統を追加して供試した場合、これらの品種・系統と愛媛県育成品種の間でマーカーの多型が検出されず、識別ができない可能性がある。一方、‘紅い雫’‘あまおとめ’‘紅ほっぺ’‘さ

がほのか’の小葉, ガク片, 果肉(果皮を除く)から抽出したDNAを用いてRBIPマーカーを検出した。その検出例を図2に示す。小葉, ガク片, 果肉におけるRBIPマーカーの検出パターンは一致し, その近傍に非特異的増幅産物はみられなかった。また, 供試したRBIPマーカーの検出パターンから品種識別表を作成した結果, 供試した4品種について表3の結果と一致した(表4)。このことから, イチゴ苗の小葉, 果実のガク片および果肉から抽出したDNAを用いたRBIPマーカーによる品種識別が可能であり, 生産から流通段階における愛媛県育成イチゴ品種の不適切な栽培等が疑われる事例に対応可能な品種識別技術を確立することができた。

本研究では, 種苗法に基づく愛媛県育成イチゴ品種の育成者権の保護を目的として, イチゴ苗の小葉, 果実のガク片および果肉から抽出したDNAを用い, マルチプレックスPCR法とアガロースゲル電気泳動により1個のRBIPマーカーと陽性コントロールマーカーを同時検出した後, 11個のRBIPマーカーの検出パターンを組み合わせた識別表を作成することで, 愛媛県育成品種・系統を含む32品種・2系統における品種識別技術を確立した。一方で, RBIPマーカーを用いたイチゴの品種識別には課題もある。

RBIPマーカーを用いた品種識別では, パインアップルおよびリンゴ(成田ら, 2016)において妥当性試験が実施されているが, イチゴでは実施されていない。DNA鑑定学会が定めた「DNA鑑定提供までのジョブフローと規則」によれば, DNAマーカーを用いた品種識別技術を社会実装するためには, 技術マニュアルを作成のうえ, ISO17023等の資格を取得している第三者機関による流通品を対象とした妥当性検証試験が必要とされている(矢野, 2018)。本研究で行ったDNA抽出からアガロースゲル電気泳動でRBIPマーカーを検出する一連の手法について, イチゴ品種識別の標準的な技術として迅速に普及を図るために, 妥当性試験の実施が強く望まれる。

さらに, イチゴではRBIPマーカーとSTHクロマトPAS法を活用した品種識別キットが開発可能であり(Monden et al, 2014), ‘福岡S6号’の簡易識別キット(GeneCheck[®] あまおう; 株式会社ファスマック)がすでに市販されている。しかし, ‘福岡S6号’と他品種を識別するためのキ

ットであり, 日本の主要品種を個々に識別可能なキットは開発されていない。今後, ‘紅い雫’ ‘あまおとめ’を含む日本の主要品種を網羅した識別キットの開発が進めば, 税関や全国の公的研究機関, 都道府県の普及組織やJA等, 生産・流通現場に近い場所へ導入されることで, 登録品種の不適切な栽培等, 育成者権の侵害が疑われる事例における一層の迅速な対応が可能になると期待される。

謝辞

本研究を実施するにあたり, 岡山大学大学院環境生命科学研究科の田原誠教授(現 岡山理科大学附属中学校・高等学校長), 門田有希准教授には懇切な御指導と多大な御助言を賜りました。

また, 福岡県農林業総合試験場, 栃木県農業試験場, 株式会社ファスマックの関係者の皆様にはプライマー情報や実験手法等に関する詳細な情報を提供していただきました。

宮崎県総合農業試験場, 熊本県農業研究センター, 農研機構九州沖縄農業研究センター, 奈良県農業研究開発センター, 愛知県農業総合試験場, 新潟県農業総合研究所園芸研究センター, 栃木県農業試験場, 宮城県農業・園芸総合研究所, 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の関係者の皆様には苗を提供していただきました。ここに深く感謝の意を表します。

引用文献

- 秋竹広翔, 田原誠, 門田有希, 高崎一人, 布藤聡(2013): イチゴにおけるレトロトランスポゾン品種識別マーカーの開発. DNA多型, **21**, 64-72.
- Flavell, A.J., M. Knox, S.R. Pearce and T.H.N. Ellis (1998): Retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP) for high throughput marker analysis. Plant Journal, **16**, 643-650.
- H. Kim, S. Trakami, C. Nishitani, K. Kurira, H. Kanamori, Y. Katayose, Y. Sawamura, T. Saito and T. Yamamoto (2012): Development of cultivar-specific DNA markers based on retrotransposon-based insertional polymorphism in Japanese pear. Breeding science, **62**, 53-62.
- 藤井浩, 東暁史, 伊藤剛, 大村三男, 國久美由紀, 島田武彦, 立木美保, 奈島賢児, 西谷千佳子, 沼寿隆, 宮本真理(2016): 果樹研究のバイオ

インフォマティクス, 66-73.

- K. Shimomura and K. Hirashima (2006) : Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Frararia*×*ananassa* Duch.). J. Japan. Soc. Hort. Sci, **75**, 399-402.
- Kumar, A and H. Hirochika (2001) : Application of retrotransposons as genetic tools in plant biology. Trends Plant Sci, **6**, 127-134.
- 國久美由紀, 松元哲 (2004) : DNA 分析によるイチゴ品種の識別. 農業および園芸, **79**(1), 181.
- 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. 野菜茶業研究所研究報告第 4 号, 71-76.
- 松元哲 (2004) : 海外情報 韓国のイチゴ生産事業 - 2003 年論山イチゴ祭り, 論山イチゴ試験場を訪問して. 施設と園芸, **126**, 59-63.
- M. Kuniyama, N. Fukino and S. Matsumoto (2003) : Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. Eupytica, **134** (2), 209-215.
- M. Kuniyama, N. Fukino and S. Matsumoto (2005) : CAPS markers improved by cluster -specific amplification for octoploid strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). Theor. Appl. Genet, **110**, 1410-1418.
- M. Kuniyama (2011) : Studies DNA Markers in *Frararia*×*ananassa* : Genetic Analysis, Genome Structure, and Cultivar Identification. J. Japan. Soc. Hort. Sci, **80** (3), 231-243.
- M. Honjo, T. Nunome, S. Kataoka, T. Yano, H. Yamazaki, M. Hamano, S. Yui and M. Morishita (2011) : Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. Breeding Science, **61**, 420-425.
- 奈島賢児, 寺上伸吾, 國久美由紀, 西谷千佳子, 山本俊哉, 正田守幸, 竹内誠人, 浦崎直也, 太郎良和彦, 門田有希, 田原誠 (2015) : パインアップルにおけるレトロトランスポゾン挿入多型マーカー開発と品種識別への適用. DNA 多型, **23**, 29-33.
- 奈島賢児, 内田喬之, 國久美由紀, 西谷千佳子, 山本俊哉, 正田守幸, 松村まさと, 尾上(牧志)祐子, 浦崎直也, 太郎良和彦, 緒方達志 (2018) : マンゴーにおける共優性レトロトランスポゾン挿入多型マーカーの開発. DNA 多型, **26**, 69-73.
- 成田知聡, 後藤洋, 木村鉄也, 奈島賢児, 押野秀美, 國久美由紀, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 山本俊哉 (2016) : 品種識別技術のマニュアル化とその妥当性評価について. DNA 多型, **24**, 108-111.
- Nielsen, J. A. and P. H. Lovell (2000) : Value of morphological characters for cultivar identification in strawberry (*Frararia*×*ananassa*). NZJ Crop Hort Sci, **28**, 89-96.
- 日本バーコードオブライフ・イニシアチブホームページ : <http://www.jboli.org/>
- 西谷千佳子, 山本俊哉, 藤井浩, 岡田和馬, 門田有希, 田原誠 (2016) : レトロトランスポゾン挿入多型を利用したリンゴの品種識別マーカー開発. DNA 多型, **24**, 101-107.
- 農林水産省品種登録ホームページ : <http://www.hinshu2.maff.go.jp/>
- 岡和彦, 木下剛仁, 中島寿亀, 西美友紀, 伊東寛史, 大坪竜太, 溝口千佳, 中山裕介, 中尾雅明, 田川愛, 石橋泰之, 小川浩樹 (2017) : イチゴ新品種 '佐賀 i5 号' および '佐賀 i9 号' の育成. 佐賀県農業試験研究センター研究報告第 39 号, 1-15.
- Weber, J.L. and May, P.E (1989) : Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal of Human Genetics, **44**, 388-396.
- 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**, 1-17.
- 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. 福岡県農業総合試験場研究報告第 27 号, 1-6.
- Y. Monden, K. Takasaki, S. Futo, K. Niwa, M. Kawase, H. Akitake and M. Tahara (2014) : A rapid and enhanced DNA detection method for crop cultivar discrimination . Journal of Biotechnology, **185**, 57-62.