

(参考資料 9)

DNA 分析によるおうとう品種の識別

山形県農業総合研究センター 農業生産技術試験場

1. はじめに

日本国内におけるおうとう (*Pavium* L.) 生産量は約 2 万 t あり、このうちの約 7 割強が山形県 (14,000 t、72%、H15 年度) で生産されている。一方、おうとうの輸入は平成 15 年度 13,978 t あり、99%以上がアメリカ産で品種は「ビング」が大部分を占める。山形県で栽培されているおうとう品種の栽培面積を表 1 に示す。「佐藤錦」、「ナポレオン」で 80% 以上を占めるが、「佐藤錦」を補完する品種として近年、山形県育成の登録品種である、「紅秀峰」、「紅さやか」及び「紅てまり」などの新品种の作付けが増加している。近年問題となっている品種偽装表示や登録品種の海外流出は、おうとうの産地に大きな影響をおよぼす問題である。そこで、消費者に対する食の安全・安心と産地保護のために、DNA マーカーを利用し果実 1 粒からでも品種識別できる技術を開発した。本技術を用いることで、国内品種及び海外から輸入されるおうとうについても品種識別が可能である。

表1 H15年度おうとう品種別栽培面積

品種	栽培面積(ha)	比率(%)
佐藤錦	2050.0	74.0%
ナポレオン	350.0	12.6%
紅秀峰	167.0	6.0%
高砂	72.3	2.6%
紅さやか	40.3	1.5%
香夏錦	20.6	0.7%
南陽	20.0	0.7%
正光錦	14.4	0.5%
ジャボレー	12.4	0.4%
紅てまり	12.0	0.4%
その他	12.9	0.5%
合計	2771.9	100%

(平成 15 年度特産果樹生産動態等調査より)

2. おうとう品種識別の留意点

(1) 遺伝的背景

おうとうを含むばら科果樹は、品種の増殖を接ぎ木で行う栄養繁殖性作物である。よって種子繁殖性植物とは異なり、同一品種の異なる個体は全てクローンであるため、同一品種の個体・果実の遺伝的バックグラウンドは全てのサンプルで等しいと考えられる。

（２）標準試料

おうとうの品種識別を行うに当たっては、調査品種について信頼のおける個体をその品種の標準サンプルとし、標準サンプルと調査品種の遺伝子型を比較する必要がある。また、調査品種以外についても、可能な限り各品種がどのような遺伝子型を示すかデータを蓄積し、同一の遺伝子型を示す品種が存在しないことを提示することが望ましい。

当試験場では、本県育成品種である「紅さやか」、「紅秀峰」、「紅てまり」については、原木を標準試料とし、その他の品種については、場内で保存する遺伝資源を標準試料とし、各 DNA マーカーの遺伝子型データを収集した。

（３）サンプルの採取部位

おうとうは果実として流通しているため、おうとうの果肉部位もしくは軸より DNA を抽出し、DNA マーカーの遺伝子型を判定する必要がある。この場合、どの部位から抽出したサンプルでも同様の結果を出せること、標準試料のサンプル（葉）より抽出した DNA サンプルと同じ結果が得られることを確認する必要がある。

3. SSR (Simple Sequence Repeat) マーカーによるおうとうの品種識別

（１）はじめに

上記の留意点を踏まえ、当試験場では、SSR マーカーによるおうとうの品種識別法の開発を行った。SSR マーカーは、ももを中心とする核果類（もも、アーモンド、すもも等）において、既に多くマーカーが開発されている。これらのマーカーは、ばら科果樹の異なる樹種間においても相互に利用可能である。今回、当試験場において品種識別に利用した SSR マーカーは、(独) 農業・生物系特定産業技術研究機構果樹研究所より分譲頂いたもも及び酸果おうとう由来 SSR マーカーである。

（２）識別の原理

SSR マーカーでは、ゲノム DNA 上に存在する単純反復配列を含む領域を特異的に増幅するプライマーを用い、PCR 法で DNA 断片を増幅し、その長さの違いを利用して品種識別を行う。

- ① 品種間に違いのある SSR 領域について、蛍光プライマーを用いて特異的に増幅する。
- ② 増幅産物を DNA シーケンサーでジーンスキャンし、増幅された DNA 断片の長さを特定する。
- ③ あらかじめ、品種ごとに特定しているパターンと照合し、品種を特定する。

（３）おうとう品種識別用 SSR マーカーセットの特徴

これまでに約 150 種の SSR マーカーについて検討を行い、85 品種 49 マーカーについて

各遺伝子型のデータを蓄積した。品種識別には 49 マーカーのうち、比較的対立遺伝子数が多く、品種識別に適した 12 マーカーを利用する。表 2 に山形県の作付面積上位 10 品種並びに「天香錦」、「ピング」及び「レーニア」の遺伝子型を示した。表 2 では、「佐藤錦」と同じ遺伝子型を示すマーカーを黄色に網掛けした。またこれら 12 品種は、最小 3 マーカー（5, 6, 7）で品種識別可能である。

品種識別にあたっては、まず No. 5, 6, 7 の 3 マーカーについて判定を行い、表 2 の登録品種（「紅秀峰」、「紅さやか」、「紅てまり」等）に一致した場合、マーカー数を 12 種類に増やし、日本の品種と一致するかどうか判定することが望ましい。

表2 おうとう主要品種における12SSRマーカーの遺伝子型

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
品 種	MA007a	MA013a	MA020a	BPPCT0 02	BPPCT0 37	BPPCT0 39	PMS30	PMS3	PceGA25	PMS40	pchgms1	PS12A02
佐藤錦	115/139	220/228	157/161	181/183	142/146	134/134	142/172	189/189	161/194	95/97	137/183	162/162
ナポレオン	115/139	220/228	157/169	181/183	140/146	134/138	142/176	189/189	161/190	95/97	139/183	162/166
紅秀峰	115/115	220/228	157/161	181/183	142/142	134/134	142/142	189/189	194/194	95/97	137/137	162/162
高砂	103/109	219/219	165/169	179/183	142/146	134/150	155/176	189/201	161/194	95/99	137/137	162/166
紅さやか	109/115	220/228	161/169	181/181	142/146	134/134	160/172	189/201	161/194	97/97	137/137	162/162
南陽	103/115	220/220	161/161	181/185	142/146	134/138	142/176	189/191	161/194	97/97	137/139	166/166
香夏錦	109/115	219/228	165/169	179/181	142/146	134/150	142/155	189/201	161/194	97/99	137/183	162/162
紅てまり	103/139	219/220	157/159	183/185	136/142	134/134	142/176	189/189	161/194	95/107	137/183	162/166
正光錦	109/115	219/228	165/169	179/181	142/146	134/134	142/155	189/201	161/194	97/99	137/183	162/162
ジャボレー	109/109	220/220	157/157	181/185	140/140	134/134	153/162	189/204	190/198	95/97	137/141	162/162
天香錦	115/139	220/228	161/169	181/183	140/142	134/138	142/172	189/189	190/194	95/97	137/183	160/162
ピング	115/139	220/228	161/169	181/183	140/142	138/148	132/176	189/189	161/194	95/97	139/183	166/166
レーニア	115/139	220/228	161/165	181/183	140/142	146/148	132/176	189/189	161/194	95/95	139/183	166/178

（４）DNA 分析上の注意

① サンプルの採取

- ・ DNA 抽出には新鮮な果実を用いる。
- ・ 果実の果肉部分および軸のどちらからも抽出可能
- ・ 腐敗した組織、かびの生えた組織の使用は避ける。

② DNA の抽出

- ・ サンプル間の交互汚染に注意する。
- ・ サンプル DNA 中にタンパク質や多糖類が多量に含まれていると PCR 反応が阻害されるので、できるだけ夾雑物は除去する。
- ・ 抽出した DNA の濃度を定量し、一定量の DNA を PCR に供する。

③ 再現性の確認

- ・ 同じロットから数果実を独立に検証し、同じ遺伝子型が得られることを確認する。
- ・ 比較対照品種を設け、必ず DNA 抽出段階から同時に分析を行うことが望ましい。

(5) 識別フロー

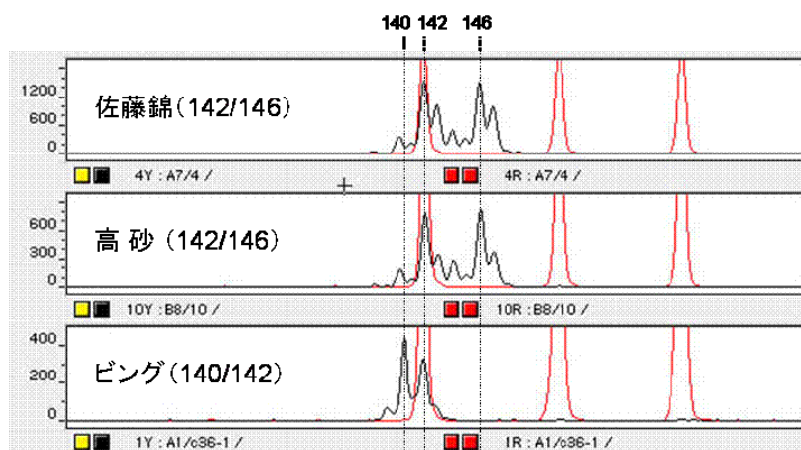
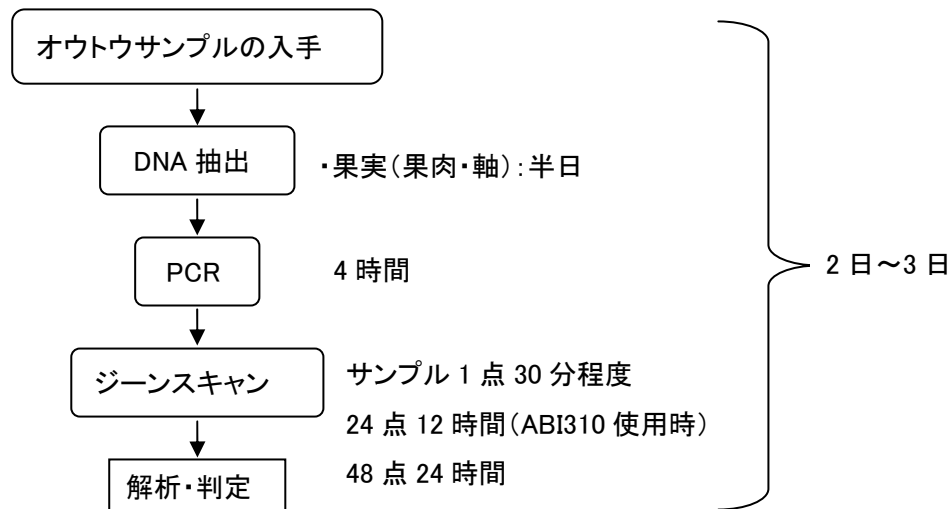


図 1 BPPCT037 における 3 品種の遺伝子型

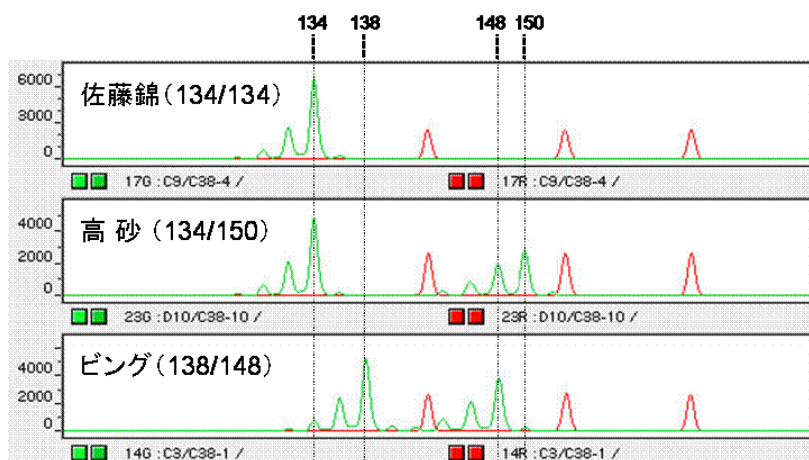


図 2 BPPCT039 における 3 品種の遺伝子型

(5) SSR マーカーによる品種識別の方法

① DNA の抽出その 1 (QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit を用いた果肉からの抽出)

準備するもの

- ・ QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit
- ・ 不溶性ポリビニルピロリドン
- ・ メルカプトエタノール
- ・ 液体窒素
- ・ 滅菌済乳鉢・乳棒

手 順

1. 2 ml マイクロチューブにキット付属の AP1 液 400 μ l、キット付属の RNaseA 4 μ l、メルカプトエタノール 8 μ l、不溶性ポリビニルピロリドン 4 mg を入れ、あらかじめ 65°C に温める。
2. 果肉 0.5g を小さな乳鉢に取り、液体窒素中で粉碎し、解凍する前に 1 のチューブに入れる。
3. 攪拌機 (Vortex) 等で混合し、65°C で 15 分保温。途中数回反転混和する。
4. キット付属の AP2 液 130 μ l を加え、軽く混ぜた後、氷上で 5 分冷却。
5. 室温で 14000rpm、5 分遠心。
6. 上澄み液をキット付属の QIAshredder spin column に加え、室温で 14000rpm、2 分遠心し、溶出液を 2 ml のマイクロチューブに移す。
7. 上澄み液の 1.5 倍量の AP3(キット付属) + エタノール混合液 (0.5vol AP3 + 1.0vol EtOH) を加え、10 秒間ボルテックスする。
8. 得られた混合液を 500 μ l ずつ、キット付属の Mini Spin column に通し、室温で 14000rpm、2 分遠心し、混合液がなくなるまでこれを繰り返す。
9. カラムにキット付属の AW 液 500 μ l を加え、室温で 14000rpm、5 分遠心しリンスする。さらにもう 1 回 500 μ l 加え、同じ条件で 15 分遠心しエタノールを完全に除く。
10. Mini Spin カラムを新しいチューブにセットし、温めておいた滅菌ミリ Q 水 50 μ l を加え、5 分放置し、14000rpm で 1 分遠心し、DNA を溶出する。これを 2 回繰り返し、得られた溶液を DNA 試料の原液とする。

② DNA 抽出その 2 (簡易 CTAB 法による軸からの抽出)

準備するもの

- ・ 2×CTAB Buffer (100ml)

2 %CTAB	2 g
---------	-----

0.1M Tris-HCl	10ml (1M Tris-HCl pH9.5)
---------------	--------------------------

20mM EDTA	4ml (0.5M EDTA pH8.0)
-----------	-----------------------

1.4M NaCl	8.16g
-----------	-------

- | | |
|--------------------|---------------------|
| ・ メルカプトエタノール | ・ 不溶性ポリビニルピロリドン |
| ・ クロロホルム | ・ イソプロパノール (−20℃保存) |
| ・ 70%エタノール | ・ 1/10 T E buffer |
| ・ 滅菌乳鉢、乳棒または滅菌ペッスル | ・ 液体窒素 |

手 順

1. 軸 1 本を剃刀でスライスし 2 ml のマイクロチューブに入れ、液体窒素で凍結し、−80℃で保存する。
2. 抽出液を作り (0.9ml CTAB Buffer+4.5 μ l メルカプトエタノール+30mg 不溶性ポリビニルピロリドン)、2 ml のチューブに入れておく。
3. 液体窒素で凍結した軸を、滅菌した乳鉢または滅菌済ペッスルを用いて、粉砕する。
4. 粉砕後、直ちに抽出液を入れたチューブに移し、よく攪拌する。
5. 65℃で 30 分インキュベートする (10 分でも可)。
6. 20 回程度、上下反転混和する。
7. 12000rpm、5 分遠心する (室温で可)。
8. 上澄み液を新しい 2 ml のチューブへ移す。
9. クロロホルム 0.8ml を加え、10 分振とうする。
10. 12000rpm、5 分遠心する (室温で可)。
11. 上澄み液を新しい 1.5ml のチューブへ移す。
12. −20℃の冷イソプロパノールを取った液体と等量加え、ゆっくり混ぜる。
13. 12000rpm、5 分、4℃で、遠心する。
14. 上澄みを捨てる。
15. 70%エタノールを 1ml 加え、沈殿をリンスする。
16. 12000rpm、5 分、4℃で、遠心する。上澄みを捨てる。
17. ペーパータオルを敷いた上に、逆さに立て、数分放置し乾かす。
18. チューブに 1/10TE を 100 μ l 加え、沈殿物を溶かす。
19. DNA 濃度を電気泳動で確認し、−20℃で保存。使用時には所定の濃度に希釈する。

② PCR

果実より抽出した DNA 試料は、原液を PCR 用の作業液として用いる。軸より抽出した DNA は、濃度を確認し濃いようならば滅菌ミリ Q 水で数倍に希釈し (10ng/ μ l 程度)、PCR 用作業液とする。

PCR 反応液および増幅プログラムは以下のとおりとする。

PCR 反応液		増幅プログラム	
滅菌ミリ Q 水	11.9 μ l	94℃	3 分
10X ExTaq buffer	2.0 μ l	94℃	1 分
dNTPs	2.0 μ l	55℃	1 分
SSR プライマー *	1.0 μ l	72℃	2 分
サンプル DNA	3.0 μ l	72℃	5 分
Ex Taq polymerase	0.1 μ l	4℃	∞
計		20.0 μ l	

35 回

* : 蛍光ラベルされたフォワード、リバースプライマーを各 10pmol/ μ l 含む

<プライマー情報>

No.	Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
1	MA007a	GTGCATCGTTAGGAAGTCC	GCCCTGAGATACAAGTCA
2	MA013a	CACACTCCAAAACTCCTAT	CACAAAGAGAGGTGAACAAC
3	MA020a	CTTGCCCATTTATGTACTGA	TATATCGCATAATCACGGTC
4	BPPCT002	TCGACAGCTTGATCTTGACC	CAATGCCTACGGAGATAAAGAC
5	BPPCT037	CATGGAAGAGGATCAAGTGC	CTTGAAGGTAGTGCCAAAGC
6	BPPCT039	ATTACGTACCCTAAAGCTTCTGC	GATGTCATGAAGATTGGAGAGG
7	PMS30	CTGTCGAAAGTTTGCCTATGC	ATGAATGCTGTGTACATGAGGC
8	PMS3	TGGACTTCACTATTTTCAGAGA	ACTGCAGAGAATTTACAAACCA
9	PceGA25	GCAATTCGAGCTGTATTTTCAGATG	CAGTTGGCGGCTATCATGTCTTAC
10	PMS40	TCACTTTTCGTCCATTTTCCC	TCATTTTGGTCTTTGAGCTCG
11	pchgms1	GGGTAAATATGCCATTGTGCAATC	GGATCATTGAACTACGTCAATCCTC
12	PS12A02	GCCACCAATGGTTCTTCC	AGCACCAGATGCACCTGA

③ ジーンスキャンによる DNA 多型の検出 (DNA Sequencer ABI310 使用の場合)

PCR 反応液 1 ~ 2 μ l を取り、滅菌水で 20 ~ 50 倍に希釈する。この希釈溶液 1 μ l とサイズマーカーを含む HiDi ホルムアミド 12.5 μ l を混和し、94℃ 5 分 - 4℃ 10 分の熱変性後、ジーンスキャンに供試する。各サンプルのマーカーごとの波形ピークを検出し、そのピークの示す長さを対立遺伝子型とした。例として「佐藤錦」、「高砂」、「ビング」の波形を図

1 及び図 2 に示す。

④ 品種の識別

3 マーカー (No. 5, 6, 7) について、比較対照品種 (「佐藤錦」、「紅秀峰」など) とサンプルのピークを比較し、各サンプルの遺伝子型を決定する。これを表 2 のようにタイピングし、3 つのマーカーの遺伝子型が一致する品種を探す。一致するものが無ければ、上記以外の品種と判断する。一致した場合、その品種である可能性と偶然一致する未知の品種である可能性が考えられるため、次に、表 2 の 12 マーカーについて検定を行う。12 マーカー全てにおいて遺伝子型が一致した場合、その品種であると同定する。

4. まとめ

ばら科果樹において SSR マーカーを用いた品種識別、系統樹作成、親子判定は、複数の報告が学会・論文等でなされており、既に信頼できる手法となっている。今回、オウトウ生産量の 9 割以上を占める上位 10 品種及び輸入おうとう 2 品種について、最少 3 マーカーを用いることで識別が可能となった。

DNA 品種識別技術の信頼性を確保するためには、流通する可能性のある全ての品種の遺伝子型をカタログ化する必要がある。また、未知の供試体の品種識別には、カタログ化された遺伝子型の比較と統計学的手法の併用が重要である。当試験場では、既に 85 品種・系統 (表 3) について 49 マーカーの遺伝子型データを得ており、このうちのほとんどの品種がこの 3 マーカーで識別できることを確認した。例えば、本試験場が育成した紅秀峰と同じパターンを示す品種はこの 85 品種・系統中にはなく、「紅秀峰」と未知の品種のパターンが偶然一致する確率は、この 85 品種・系統を母集団とし 3 マーカーを用いた場合は 6.43%、12 マーカーを用いた場合は 0.0000034% である。

今後は、入手可能な未検討品種を中心に解析を進め、より多くの品種について遺伝子型のデータを蓄積していく予定である。また、おうとう加工品 (缶詰など) からの DNA 抽出の検討を現在進めており、将来的には、加工品の品種識別も可能になる技術に発展させていく。

表3 85品種リスト

No.	品種・系統名	No.	品種・系統名	No.	品種・系統名	No.	品種・系統名
1	佐藤錦	26	八興錦	51	Giorgia	76	Velvet
2	ナポレオン	27	秀雅錦	52	Hedelfingen	77	Victor
3	紅秀峰	28	富士山	53	Hederfinger Riesen	78	Victoria
4	高砂	29	マドンナ	54	Inge	79	Vitoria
5	紅さやか	30	マドンナの瞳	55	Korkovanyi Csersznye	80	White Elton
6	南陽	31	芳玉	56	Late Amber	81	Yellow Spanish
7	香夏錦	32	佳紅	57	Merton Glory	82	11w-26-50
8	紅てまり	33	C3	58	Moreau	83	11w-26-58
9	正光錦	34	C3-5	59	Norwegian	84	13s-39-51
10	ジャボレー	35	C3-91	60	Peggy Rivers	85	13s-41-55
11	ピング	36	C6	61	Red Glory	86	
12	レーニア	37	C7	62	Rodmershaw Seedling	87	
13	大富一号	38	C8	63	Rustina	88	
14	月山錦	39	C9	64	Sapikisa	89	
15	北光	40	C10	65	Seneca	90	
16	黄玉	41	Adriana	66	Spaulding	91	
17	グロリアス・スターク・ゴールド	42	Alpha	67	Starking	92	
18	紅灯	43	Bada	68	Sue	93	
19	紅蜜	44	Bell Agatha	69	Sweet Heart	94	
20	寿錦	45	Burlat	70	Uta Gaiant	95	
21	蔵王錦	46	Compact Stella	71	V66161	96	
22	さおり	47	Celesta 1	72	V690620	97	
23	ジャンボ錦	48	Copas White	73	V69068	98	
24	大将錦	49	Du Righi	74	Van	99	
25	天香錦	50	Emperor Francis	75	Vega	100	