

DNA マーカーによるイチジク品種 「とよみつひめ」の識別技術

池上秀利*・野方 仁¹⁾・栗村光男²⁾・平島敬太

福岡県育成のイチジク品種「とよみつひめ」の知的財産権の保護を図るとともに、正しい表示に基づいた適正なイチジクの市場流通を確保するため、「とよみつひめ」を含む国内外イチジク15品種について、DNA マーカーによる識別技術の開発を行った。

SSR 法および STS 法により識別技術を確認し、前者では2種類のマーカー (LMFC20または LMFC30) により、「とよみつひめ」の識別が可能であり、4種類のマーカー (LMFC26, LMFC27, LMFC28, LMFC30) を併用することで、15品種の相互識別が可能であった。後者では2種類のマーカー (TOP5, TOP2) を併用したマルチプレックス PCR により、前者と比べて簡易・迅速・安価に最短8時間程度で「とよみつひめ」を識別することが可能であった。

[キーワード: イチジク, 品種識別, DNA マーカー, SSR, STS]

Discrimination Technology of Fig (*Ficus carica* L.) cultivar "Toyomitsuhime" using DNA markers. IKEGAMI Hidetoshi, Hitoshi NOGATA, Mitsuo AWAMURA and Keita HIRASHIMA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549 Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 29: 65-69 (2010)

We developed discrimination technology for 15 domestic and foreign fig (*Ficus carica* L.) cultivars including "Toyomitsuhime" using DNA markers to protect intellectual property rights and to ensure an adequate post-market based on appropriate labeling of figs.

We developed the SSR and STS methods. The former enables us to discriminate "Toyomitsuhime" using only one SSR marker (LMFC20 or LMFC30) and even to identify all 15 cultivars reciprocally using four SSR markers (LMFC26, LMFC27, LMFC28, and LMFC30). By contrast, the latter provides two markers (TOP5, TOP2) that are applicable for multiplex PCR, which enables us to undertake simpler, faster, and less expensive discrimination of "Toyomitsuhime" than the former in as little as 8 hours.

[Key words: *Ficus carica* L., variety identification, DNA markers, SSR, STS]

緒 言

福岡県は21世紀を勝ち抜く「攻めの果樹農業」を目指して、ミカン、カキ、ブドウ、ナシ、イチジクなどの主要品目の生産振興を進めている。特に、イチジクは栽培面積が愛知県に次ぐ第2位（農林水産省2004）であるものの、作付が伸び悩む中、平成16年に福岡県が育成したイチジク品種「とよみつひめ」（野方・栗村2005）は良食味で輸送性の高いブランド農産物として平成21年4月現在、約40haと栽培面積が増加中であり、今後海外を含めた市場拡大が期待されている。

他方、昨今の国内外における激しい産地間競争においては、「とよみつひめ」のような地域ブランド農産物の出所を正しく把握することは、これらの知的財産権（育成者権）を積極的に保護するとともに、市場流通の適正性・公正性を確保する意味において不可欠である。そのためには、正確かつ迅速に品種を識別することが必要である。

識別手段として以前は、圃場における種苗特性分類に基づいた識別法が採用されていたが、現在では、客観性、迅速性に優れた DNA 分析技術の利用が期待さ

れている（独立行政法人種苗管理センター2008）。そこで本研究では、福岡県育成の「とよみつひめ」を含むイチジク国内主要15品種について、DNA 分析による識別技術を確認することを目的とした。

DNA 分析の手法は多く存在するが、技術的利点からいくつかの手法が主に採用されており、例えば果樹分野においては、リンゴの RAPD 法（濱・小牧2008）、AFLP 法（福田ら1999）、オウトウの SSR 法（高品ら2004）等の報告がある。これらの中で特に SSR 法は、1) ゲノムの保存領域を利用しているため信頼性が高い、2) SSR 領域がゲノム中に多く存在し多型性が高い、3) ターゲット長が比較的短く PCR 増幅に適している等の点で優れており、多くの品目の DNA 品種識別において最も標準的な手法になりつつある（独立行政法人種苗管理センター2008）。また、イチジクにおいては Giraldo ら（2005）や Khadari ら（2001）により系統分類等を目的とした相当数の SSR マーカーが既に開発されており、これらを同時に利用することにより高い精度での識別が期待できる。そこで著者らは最初に SSR 法による識別を試みた。

他方で、SSR 法の実施にはフラグメント解析装置を用いることが多いが、当該装置での解析は当該装置を

*連絡責任者

(バイオテクノロジー部: ikegami@farc.pref.fukuoka.jp)

1) 豊前分場

2) 現 福岡県農林水産部経営技術支援課

受付2009年8月3日; 受理2009年11月26日

用いない他の識別手法と比較してコスト高となり、なおかつ装置特有の操作やメンテナンスが煩雑である等の問題を有している。そこで、より簡便・迅速・安価な識別手法を開発するため、アガロース電気泳動による検出を前提とした、ISSR-STs(Inter Simple Sequence Repeats - Sequence Tagged Sites)法(矢野・池田 2003)およびRAPD-STs(Random Amplified Polymorphic DNA-Sequence Tagged Sites)法(濱・小牧 2008)による識別法も併せて検討した。

最後に、開発したSSR法とSTS法の大きく2種類の識別手法について、それぞれの利点・欠点を整理するとともに、想定される活用場面について議論した。

試験方法

1 供試材料とDNA抽出

識別対象品種は、福岡県育成品種「とよみつひめ」に加え、国内で主に流通している「榊井ドーフィン」や「蓬萊柿」および海外品種を含む合計15品種とした(第1表)。イチジクの品種には、大きく分けて、カブリ系、スミルナ系、サンペドロ系、普通系の4つの生態型があり、国内で流通している生食用イチジクは、完全単為結果性を有する最も流通量の多い普通系と部分的単為結果性を有するサンペドロ系のみである。今回供試した15品種は、うち12品種が「榊井ドーフィン」と「蓬萊柿」を含む普通系、3品種が「キング」や「ピオレー・ドーフィン」等のサンペドロ系であり、主流品種および両生態型を包含していることから、品種識別技術確立の対象としては十分であると考えられる。解析材料は、旧農林水産省果樹試験場より育種材料として分譲され、現在、福岡県農業総合試験場豊前分場で維持・保存されているイチジク株の葉を用いた。各品種の葉組織50mgを採取し液体窒素で凍結した後、細胞自動破砕装置(MM400 Mixer Mill型; Retsch GmbH & Co. KG社製)により破砕し、DNeasy Plant Kit(Qiagen社製, Germany)によりゲノムDNAを抽出した。

2 SSR法による識別

SSRマーカーはGiraldoら(2005)が報告したものうち11種類; LMFC15, LMFC17, LMFC19, LMFC20, LMFC26, LMFC27, LMFC28, LMFC30, MFC3, MFC5, MFC7を用い、1で抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCR反応を行った。PCR装置はASTEC800型(ASTEC社製, Japan)を使用した。反応用混合液の組成は以下の通りである; PCR buffer (1x), 200 μ M dNTP, 0.5 μ Mプライマー, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems社製, USA) 0.2ユニット, ゲノムテンプレート30ngの総量10 μ L。反応プログラムは、1サイクル; 94 $^{\circ}$ C (1 min), 35サイクル; 94 $^{\circ}$ C (30s), 50 $^{\circ}$ C又は55 $^{\circ}$ C (30s), 72 $^{\circ}$ C (1 min), 1サイクル; 72 $^{\circ}$ C (5 min)とした(Giraldoら 2005)。PCR反応終了後、反応液の一部(0.5 μ L)をHi-Di Formamide 24 μ LおよびGeneScan 500 ROX Size Standard (Applied Biosystems社製, USA) 0.1 μ Lと混合し、94 $^{\circ}$ C, 2 minで熱処理した。熱処理後、

氷上で冷却したサンプルを、Genetic Analyzer 310型(Applied Biosystems社製, USA)のGeneScanソフトウェアで解析した。GeneScanによる解析は1品種につき2度行い、再現性が認められるシグナルを該当アリーのデータとして採用した。得られたデータについて、マーカーごとに検出されたアリーの数を算出した。

3 RAPDおよびISSR多型の検出とSTS化によるプライマーの開発

新たなイチジク品種間多型を獲得するため、1で供試するイチジク15品種におけるISSRマーカーおよびRAPDマーカーに基づいた多型検出を行った。ISSRマーカーは、13種のUBCプライマーセット(The University of British Columbia製, Canada)を、RAPDマーカーは、20種のプライマーセット(SetA)(Operon Biotechnologies社製, USA)を使用した。抽出したゲノムDNAを鋳型として、PCR buffer (1x), 200 μ M dNTP, 0.3 μ Mプライマー, AmpliTaq Gold (Applied Biosystems社製, USA) 0.25ユニット, ゲノムテンプレート30ngの総量12.5 μ Lの混合液を調製した後、2のSSR法と同じ装置を用いて、PCR反応を行った。反応プログラムはISSRマーカーでは、1サイクル; 94 $^{\circ}$ C (5 min), 35サイクル; 94 $^{\circ}$ C (30s), 50 $^{\circ}$ C (30s), 72 $^{\circ}$ C (2 min), 1サイクル; 72 $^{\circ}$ C (5 min), RAPDマーカーでは、1サイクル; 94 $^{\circ}$ C (5 min), 45サイクル; 94 $^{\circ}$ C (1 min), 35 $^{\circ}$ C (2 min), 72 $^{\circ}$ C (2 min), 1サイクル; 72 $^{\circ}$ C (5 min)とした。PCR産物は1.4%のSeaKem GTGアガロース(タカラバイオ株式会社, Japan)により100Vで電気泳動し、多型パターンを確認した。PCR反応から多型確認までの作業を2度行い、再現性のあるパターンのみを多型として判定した。

得られた多型マーカーをSTS(Sequence Tagged Site)化するために(Olsonら 1989), ISSRおよびRAPDのターゲットバンドをサブクローニングして塩基配列を特定しPCRプライマーをデザインした(DNA品種識別技術検討会 2003a)。具体的には、「とよみつひめ」と他品種との識別性に優れ、増幅効率の良い計2種類のPCR産物のクローニングおよび配列解読を行った。PCR産物はPCR Purification Kit(Qiagen社製, Germany)により精製し、pCR-script Amp Cloning Kit(Stratagene社製, USA)でpCR-script Amp SK+ベクターへ導入した。当該ベクターに特異的なシーケンシングプライマー(T3, T7)により、2種のPCR産物のシーケンスを決定した。得られた配列情報を元に、5'側又は3'側のISSRプライマーおよびRAPDプライマー配列について増幅領域内側(プライマー3'方向)に1~5 bp伸長してプライマーを再設計し、これと反対側領域の配列特異的プライマーを併せて再度のPCRを行い、同品種における多型保存性の確認を行った。

4 ISSR-STs, RAPD-STs マーカーによる識別

3で開発したプライマーを用いてイチジク15品種の

遺伝子型の決定を行った。PCR 装置、混合液の組成および反応プログラムは、3 と同様とした。PCR 反応のアニーリング温度は、開発したプライマー配列の GC 含量率の高低に応じて第 2 表のとおり変更した。

結果および考察

1 SSR マーカーによる識別

11種類の SSR マーカーセットにより、合計30のアリールを検出した（データ略）。Giraldo ら（2005）の報告と同程度のアリール数を検出できたことから、今回使用した SSR マーカー群は、海外品種だけでなく国内品種を含めた識別にも有効であると考えられた。明らかとなった全ての SSR 遺伝子型から判断して、福岡県育成品種「とよみつひめ」は LMFC20 または LMFC30 を用いることによって、他の14品種と識別することが可能であった（第 1 表）。また、今回供試した全15品種を相互に識別するには、識別力が高く各品種で同一の遺伝子型組合せを有しない 4 種類の SSR マーカーすなわち、LMFC26、LMFC27、LMFC28、LMFC30 の最少セットを用いれば可能であった（第 1 表）。識別に要する時間は、フラグメント解析装置の機種およびサンプル数により異なるが、10解析サンプルを本報告における条件で解析した場合、「とよみつひめ」であるかの可否のみを一つのマーカーを用いて判定するのに約12時間程度が、4 種類の SSR マーカーを使用した品種同定のための相互識別に 3～7 日程度が必要である。ちなみに、供試の全てのマーカーを用いた場合に、ある持ち込まれた品種 V に対し、比較 15 品種中に 1 品種以上の同一マーカー型が偶然存在する確率は、

$$P_1 = 1 - (1 - p_0^k)^n = 0.00051$$

（ただし、 p_0 = 同一アリールの頻度
 $= 0.067 \sim 0.667$
 n = 品種数 = 15
 k = ローカスの数 = 12）

であり（DNA 品種識別技術検討会 2003b）、これは極めて低い値であることから、判定結果の信頼性は高いと考えられる。

以上のことから、供試した11種類の SSR マーカーを用いることによって、高精度にイチジク品種を識別することが可能であると考えられた。

2 ISSR-STS, RAPD-STS 法による識別

ISSR マーカーおよび RAPD マーカー由来の増幅産物から、それぞれ 1 種類計 2 種類の STS マーカーを開発した（第 2 表）。増幅産物の STS 化により標的バンド以外のバンドが消失し、より明瞭で簡潔な識別が可能となった（第 1 図）。これら開発した STS マーカー TOP 5 と TOP 2 の 2 種類を併用すれば、「とよみつひめ」を他の14品種から識別することが可能であった。さらに、本マーカー利用における「とよみつひめ」の識別時間を短縮するため、TOP 5 と TOP 2 について同時検出系（マルチプレックス PCR）の確立を試みた。その結果、2 種類のプライマーセットを同時に用いても、単独のプライマーセットを用いた場合と同様に「とよみつひめ」識別性が保存されたパターンが得られることが明らかとなった（第 2 表、第 1 図）。「とよみつひめ」であるか否かをマルチプレックス PCR により判定するのに要する時間は、10 の解析サンプル数で、約 8 時間程度である。

以上の結果、STS 化を行うことにより、ISSR および RAPD の多型バンド出現の再現性と特異性を向上することができたと同時に、TOP 5 と TOP 2 のマルチプレックス PCR 反応による「とよみつひめ」の簡便・迅速・安価な識別手法を確立できた。

3 イチジク品種識別システムの確立とその利用性

本報告では、SSR 法と STS 法の 2 種類の手法を用いて、県育成イチジク品種「とよみつひめ」を他品種と識別する技術を確立した。

SSR 法による識別は、緒言でも述べたように多くの

第 1 表 SSR マーカーによるイチジク15品種の遺伝子型

品種名	SSR マーカー				
	LMFC20	LMFC26	LMFC27	LMFC28	LMFC30
とよみつひめ	140	222/232	194	197/200	251/255
蓬菜柿	134/140	222	194	194/197	- ¹⁾
姫蓬菜	134	222/232	194	194/197	229
榊井ドーフィン	134	232	184	-	-
バナーネ	134	222/232	184/194	194/197	239/259
ピオレー・ソリエス	134	232	184/194	194/197	239/259
キング	134	232	184	197	-
ブルシャソット・グリーン	134	232	184/194	190/194	239
谷川	134/140	222	181/184	194/197	237/255
ヌアール・ド・カロン	134	232	184/194	194	251
ブラウン・ターキー	134	232	184/194	197	239
ピオレー・ドーフィン	134/140	232	184/194	194/197	251
ゼノア・ホワイト	134	222/232	184	194	259
ニグロ・ラーゴ	134	232	184	-	251/259
セレスト	134	232	194	197/200	253
検出アリール数	2	2	3	4	7

1) アリールが検出されないことを示す。

第2表 開発した STS マーカーのプライマー配列と特性

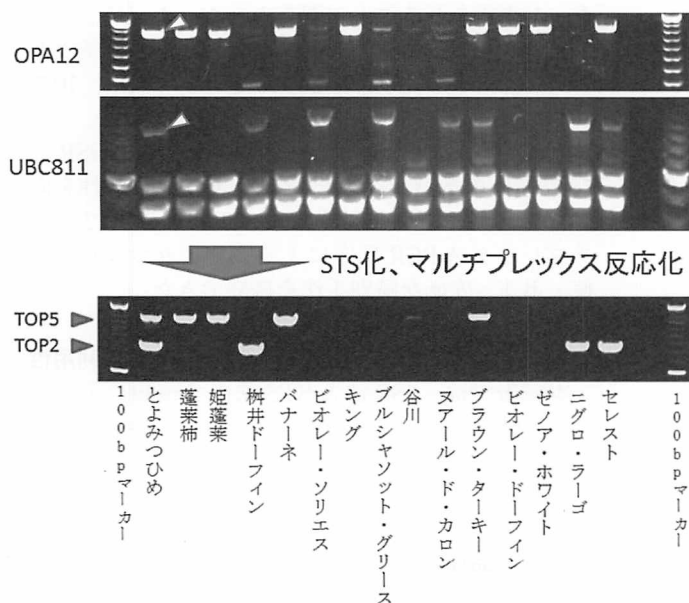
マーカー名	由来	増幅サイズ (bp)	アニーリング温度 ¹⁾ (°C)	配列 (5'-3')
TOP5	RAPD (OPA12) ²⁾	1300	65 (64)	F: TTCTCTTGCATGTTTGGCTTATCCG R: TCGGCGATAGGCTTG
TOP2	ISSR (UBC811) ³⁾	950	63 (64)	F: GAGAGAGAGAGAGACAG R: GTGCGTAAAACGGGACAAAAATCC

- 1) アニーリング温度()内数字はマルチプレックス反応時の温度を示す。
- 2) Operon Biotechnologies 社製 RAPD プライマー。
- 3) The University of British Columbia 製 ISSR プライマー。

第3表 STS マーカーによるイチジク15品種の遺伝子型

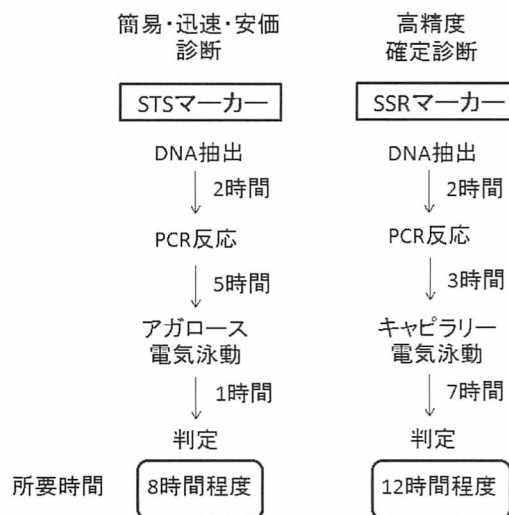
アッセイ	マーカー名	とよみつひめ	蓬莱柿	姫蓬莱	榊井ドーフィン	バナーネ	バイオレー・ソリエス	キング	ブルシャソット・グリース	谷川	スアール・ド・カロン	ブラウン・ターキー	バイオレー・ドーフィン	ゼノア・ホワイト	ニグロ・ラゴ	セレスト	
ユニプレックス	TOP5	+ ¹⁾	+	+	- ²⁾	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	TOP2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
マルチプレックス	TOP5	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	TOP2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

- 1) バンドが検出されたことを示す。
- 2) バンドが検出されなかったことを示す。



第1図 ISSR および RAPD 多型の STS 化と STS マーカーによるイチジク15品種の電気泳動パターン (マルチプレックス PCR)

1) 矢頭は目的のバンドを示す。



第2図 開発した DNA マーカーによるイチジク品種識別の流れ

利点を有しており、特に信頼性の高いデータを提供できることと、塩基レベルでの検出と複数のマーカー情報による識別精度の向上が可能である点で優れている。一方、STS法による識別では、保存領域以外のゲノム領域を利用しているため SSR法に匹敵するだけの信頼性はなく、また塩基単位での検出が不可能であり、今回のように供試するマーカー数が少ない場合には、高い識別精度は期待できない。しかしながら、SSR法に比べてより簡易・迅速・低コストに結果を出し、判定することができる。このように、2つの手法はそれぞれ特徴が異なっており、個別の状況に応じて両者を

使い分けることが望まれる (第2図)。

例えば、育成者権の侵害可能性が疑われるもののその真偽は不明であり、早期に一定の科学的判断材料を得たい初期段階では、迅速に結果を得られる STS法を用いることが好ましい。他方、侵害事実がほぼ確定し、実際に育成者権を相手方に主張するような段階においては、より高精度な識別データを提示することができる SSR マーカーを採用すると良い。以上のように、利用場面を想定した2種類の識別手法を確立したことにより、より利便性の高いイチジクの品種識別技術を確立できたと考えられる。

本報告は日本国内のイチジク品種を DNA 分析により識別した初めての事例である。したがって、本報告の結果は国内のイチジク品種の識別技術の基盤として有意義であるとともに、今後品種数やマーカー数を追加すること等により、識別精度や信頼性がさらに高まることが期待される。加えて、今回得られたデータは、遺伝子診断のような実用途だけでなく、国内のイチジク遺伝資源における育種プログラムの構築や遺伝学的考察を深める上でも有用であると思われる (Ikegami ら 2009)。

引用文献

- 独立行政法人種苗管理センター (2008) DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン—SSR について. p. 3–4.
- DNA 品種識別技術検討会 農林水産省生産局種苗課 (2003a) 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項—技術開発と利用のガイドライン—. p. 5.
- DNA 品種識別技術検討会 農林水産省生産局種苗課 (2003b) 植物品種識別における品種同定理論 p. 3.
- Giraldo E, Viruel MA, Lopez-Corrales M, Hormaza JI (2005) Characterisation and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 80 : 217–224.
- 濱 絵里子・小牧正子 (2008) RAPD-STS マーカーを用いたリンゴ品種識別. http://narc.naro.affrc.go.jp/chousei/shiryoku/kankou/seika/kanto19/04/19_04_21.html (2009年11月1日閲覧)
- 福田伸二・寺井理治・稗圃直史・山本俊哉・池谷祐幸・松田長生・林 建樹 (1999) AFLP 法によるビワ品種の識別. *園学誌*68 (別1) : 136.
- Ikegami H, Nogata H, Awamura M, Hirashima K, Nakahara T (2009) Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56 : 201–209.
- Khadari B, Hochu I, Satoni S, Kjellberg F (2001) Identification and characterization of microsatellite loci in the common fig (*Ficus carica* L.) and representative species of the genus *Ficus*. *Mol. Ecol. Notes* 1 : 191–193.
- 農林水産省農産園芸局果樹花き課 (2004) 特産果樹生産動態等調査 : 87.
- 野方 仁・粟村光男 (2005) イチジク新品種 ‘H156-70’ の育成. *福岡農総試研報*24 : 104–107.
- Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D (1989) A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245 : 1434–1435.
- 高品 善・松田成美・山本俊哉・林 建樹・木村鉄也・西村幸一 (2004) オウトウ品種識別における SSR マーカーの利用. *育種学研究* 6 (別1) : 181.
- 矢野 博・池田達哉 (2003) ISSR-PCR 法を用いたイグサ品種識別. *DNA 多型*11 : 57–60.