

DNA 品種識別技術を用いた韓国産イチゴ果実の分析

國久美由紀・松元 哲・吹野 伸子

(平成 16 年 12 月 8 日受理)

Cultivar Identification of Strawberry Fruits Imported from Korea by Use of DNA Markers

Miyuki KUNIHISA, Satoru MATSUMOTO and Nobuko FUKINO

Synopsis

Cultivar identification using DNA markers revealed that samples of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* DUCH.) fruits imported from Korea, including those displayed as 'Nyoho' on the Japanese domestic market, consisted of 38% 'Sachinoka' and 62% 'Redpearl'. This result strengthens the suspicion of the infringement of breeders' rights on 'Sachinoka' and the incorrect labeling of commodities.

Key Words: imported strawberry, cultivar identification, DNA marker, breeders' right, incorrect labeling

I 緒 言

栽培イチゴ (*Fragaria* × *ananassa* DUCH.) は収益性が高く、国内の野菜生産において重要な品目の一つとなっている。1990 年代中頃にはイチゴといえば、市場は 'とよのか' と '女峰' の 2 大品種で占められていた。しかし近年、消費者の嗜好が多様化するにしたがって新品種の開発が相次ぎ、普及が進んでいる。'さちのか'、'とちおとめ'、'章姫'、'さがほのか'、'福岡 S6 号 (あまおう)' 等は最近の人気品種であるが、これらはいずれも育成者の権利保護のために品種登録されている。登録品種は本来、許諾がなければ販売用に苗を増殖することはできず、従って許諾のない苗からの果実の栽培・出荷もできない。また、UPOV 条約 (植物の新品種の保護に関する国際条約) により品種保護ができない海外へ苗を出荷する際、およびその収穫物を日本に輸入する際には再許諾が必要となる。

ところが 2001 年、当研究所が育成した 'さちのか' の果実が韓国から日本国内に流入し、販売されていると

いう情報が寄せられた。当時韓国ではイチゴは品種保護対象とはなっておらず、かつ許諾契約もなかったため、この情報が事実とすれば、無断で 'さちのか' の苗が持ち出された上、その収穫物が日本に出荷されたものと考えられ、種苗法に違反する。同様の事例は、栃木県農業試験場が育成した 'とちおとめ' に関しても懸念されており、輸入イチゴの育成者権侵害対策が急務となっている。2003 年 4 月には関税定率法の改正で育成者権侵害農作物が輸入禁制品に追加された。しかし、韓国から輸入される生鮮イチゴの品種については明確なデータが無く、侵害事実は推測の域を出ることができなかった。

このことから、輸入果実が侵害品種であることを立証する検査技術の開発が求められ、我々は DNA 多型を用いたイチゴ品種識別技術の開発を行ってきた。DNA 多型による品種識別のメリットは、栽培試験により植物形質を比較する従来法と比較して迅速かつ正確で、短時間で結果が得られること、また店頭で流通している実やわずかな切片からでも識別が可能なことである。コメでは既に品種識別技術が確立され (OHTSUBORA, 2002)、検出に必要な試薬がキット化され販売されている。イチゴ

においても、イタリアでは random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法を用いた DNA 識別法が、イチゴ品種‘マルモラーダ’の育成者権侵害裁判において立証の一助として用いられた例がある (CONGIU ら, 2000). 我々は、cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーを用いて、より高い再現性で、主要な 14 品種を安定的に識別できるイチゴの DNA 品種間多型検出法を開発した (KUNIHISA ら, 2003). さらにマーカーの数を増やすことで、65 種の国内外の品種識別が可能になった (國久ら, 2003).

韓国におけるイチゴ生産の品種構成については、公的な統計を見出すことはできなかったが、中清南道農業振興院論山イチゴ試験場による 2003 年の推計によると、‘レッドパール’ 60%, ‘章姫’ 30%, その他 10% (‘とちおとめ’, ‘さちのか’, ‘苺香’ 等) となっており、韓国育成品種‘苺香’を除く大部分が日本品種と想定されている (小林, 2003). 國久ら (2003) が開発した品種識別法は、大部分の日本品種に加えて‘苺香’を識別することも可能であるため、韓国産イチゴの品種識別に十分に適用できると思われる。しかし本法は、研究施設内で栽培された鮮度の高いイチゴを用いて開発されたものであり、収穫後数日を経た流通品への応用性は確認できていなかった。

以上のことから本研究では、流通品における識別技術の有効性を確認し、かつ韓国産輸入イチゴ果実の品種の識別を行うことにより、育成者権侵害の有無について調査したので報告する。

表-1 分析に供試した韓国産イチゴパックの詳細

パック番号	果実数 (個)	購入日	店舗	品種表示
1	20	2003. 1. 18	a	なし
2	4	2003. 1. 18	a	女峰
3	15	2003. 1. 20	a	女峰
4	17	2003. 1. 20	a	女峰
5	15	2003. 1. 20	b	なし
合計	71			

a, b はパックを購入した店舗の仮称

II 材料および方法

1 市場から購入した試料

供試材料は、近畿地方県内のスーパー2店舗で販売されていた韓国産表記の5パック計71果実である(表-1)。2番パックは4個入りで、スーパーで小売り用に詰め直されたものと推定されるが、その他のパックはいずれも15個から20個入りであった。商品に貼付けられたバーコードの国番号は「880」であり、これは韓国の国番号と一致していた(図-1)。品種名についてはいずれもパック自体に記載はなかったが、3パックは売り場の表示で‘女峰’と記されていた。また本分析法を市販品へ適用し、正確な結果が得られるか確認するための比較対照として、表-2に示す‘とよのか’, ‘とちおとめ’ および‘さちのか’表示の国産品を三重県内のスーパーで1パックずつ購入し、それぞれから7果実をランダムに抽出した。これら計92個の果実を実験に供試した。

2 CAPS マーカーによる分析方法

DNA 抽出用試料として果実ごとに萼片約 50 mg を採取し、個々に分析を行った。苗を試料として用いる場合



図-1 識別対象としたパック詰め韓国産輸入イチゴの写真(例, 15果実入り/b店購入)

表-2 5 マーカーによる国産イチゴパックの分析結果

表示品種	分析果実数	購入日	店舗	検出された多型タイプ					多型タイプの一致する品種
				ア	イ	ウ	エ	オ	
とよのか	7	2003.12.15	c	B	X	A	A	C	とよのか, 明宝, はるのか
とちおとめ	7	2003.12.15	d	A	X	X	X	X	とちおとめ
さちのか	7	2003.12.15	d	B	A	X	A	C	さちのか, しゅうこう

ア~オの各マーカーにより得られた果実ごとの多型タイプ(A; B; C; X等) および一致する品種名。

ア, APX-MluI; イ, CHI-PvuII; ウ, F3H-NcoI; エ, F3H-HpaII; オ, F3H-AccI. マーカー名は遺伝子名と制限酵素名を示す構成とした。c, d はパックを購入した店舗の仮称。

には、幼葉約 50mg を採取した。DNA 抽出は QIAGEN 社の DNeasy Plant Mini kit により行い、得られた DNA 溶液を滅菌水で 10 倍に希釈して PCR 反応の鋳型として用いた。

開発された 26 の CAPS マーカーを用いると、国内に流通している可能性のある 65 品種の識別が可能であるが、輸入品の DNA 分析には‘さちのか’および‘とちおとめ’を他の 64 品種と識別するのに十分な 9 マーカーを使用した（使用したマーカー名は表-3 に記載）。APX（Ascorbate Peroxidase）遺伝子（DNA Data Bank of Japan, Accession 番号: AF158654）、CHI（Chalcone Isomerase）遺伝子（同: AY017478）、F3H（Flavanone 3-Hydroxylase）遺伝子（同: AY017479）、APX2 遺伝子（APX 遺伝子の下流部位）、OLP（Osmotin-like Protein）遺伝子（同: AF199508）または tRNA（tRNA-Leu and tRNA-Phe）遺伝子（同: AF163538）を対象として設計されたプライマーを用いて、抽出した DNA 溶液を鋳型に PCR 反応を行い、その増幅産物をマーカー指定の制限酵素で消化した。（PCR 反応条件や APX, CHI, F3H 増幅用プライマー配列等、詳細なマーカー分析方法については、KUNIHISA ら（2003）の報告を参照。）1.5% アガロースゲル電気泳動により多型を検出し、9 マーカーについて各サンプルの多型タイプを決定した上で、すでに確定している 65 品種の多型タイプと比較して一致する品種を検索した。また比較対照の国産品に関してはマーカー数を省略し、9 マーカーの中から、国内イチゴ生産量の 9 割以上を占める主要な品種が識別可能な 5 マーカー（表-2；ア～オ）を選択した。

III 結 果

1 5 マーカーによる市販国産果実の分析

5 マーカーを用いて市販されていた国産の‘とよのか’、‘とちおとめ’および‘さちのか’表示の果実を 7 個ずつ分析したところ、多型の検出は問題なく行えた。‘とよのか’表示の果実はいずれも、65 品種の中で‘とよのか’、‘明宝’または‘はるのか’と多型タイプが一致し、‘さちのか’表示の果実は‘さちのか’または‘しゅうこう’と一致した。‘とちおとめ’は‘とちおとめ’以外に一致するものは無かった（表-2）。

2 9 マーカーによる市販輸入果実の分析

市販輸入果実の萼片を用いて 9 マーカーで同様の

DNA 分析を行った。イチゴにおいては、特に DNA 抽出の対象部位である萼片に鮮度の影響が出やすく、サンプルの中には長期の輸送による傷みがひどく、高品質の DNA 抽出および正常な PCR 反応が阻害されることが懸念されたものもあった。しかし、萼片の褐変部分を避け、できるだけ緑色部分のみを使用することで、多型タイプの分析が可能な DNA 抽出量と PCR 増幅量を得ることができた。また、PCR 産物の制限酵素処理により検出された多型はいずれも、新鮮葉で得られる多型と変わらないものであった。表-3 に 5 番パックの分析結果を例として示す。これは 15 個の果実を、ア～ケで示す 9 種のマーカーで分析し、得られた多型タイプを表にしたものである。その結果、tRNA-FokI マーカー分析の泳動写真からも判断できるように、このパックには 2 タイプの多型パターンを示す個体が混在していた（図-2）。

表-3 9 マーカーによる輸入パック（No. 5）の分析結果

果実番号	分析マーカー									多型タイプの一致する品種
	ア	イ	ウ	エ	オ	カ	キ	ク	ケ	
1	B	X	X	A	C	X	X	A	A	レッドパール
2	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
3	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
4	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
5	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
6	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
7	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
8	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
9	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
10	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
11	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
12	B	X	X	A	C	X	X	A	A	レッドパール
13	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
14	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか
15	B	A	X	A	C	A	A	C	X	さちのか

各マーカーにより得られた果実ごとの多型タイプ（A；B；C；X等）および一致する品種名。

ア、APX-MluI；イ、CHI-PvuII；ウ、F3H-NcoI；エ、F3H-HpaII；オ、F3H-AccI；カ、APX2-TaqI；キ、APX2-DraI；ク、OLP-DdeI；ケ、tRNA-FokI。

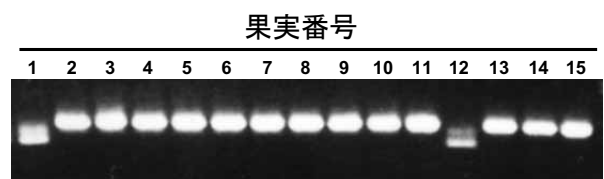


図-2 輸入イチゴパック内における多型タイプの混在
tRNA-FokI マーカーによる 5 番パック（15 果実入り、No. 1～15）の解析結果。

表-4 各パックの品種別果実数および‘さちのか’の混合比

パック番号	さちのか	レッドパール	合計	さちのか混入比
1	1	19	20	0.05
2	0	4	4	0.00
3	2	13	15	0.13
4	11	6	17	0.65
5	13	2	15	0.87
合計	27	44	71	0.38

9 マーカーにより検出された多型タイプについて、候補となる 65 品種の中からそれぞれに一致する品種を検索した結果、果実番号 1, 12 に該当する品種は‘レッドパール’以外に無く、残りの 13 果実が一致する品種は‘さちのか’以外になかった。このパックの分析結果を含めて、全体の結果を表-4 に示す。今回の調査では、全ての果実が‘さちのか’または‘レッドパール’のいずれかの多型タイプと一致した。また、2 番パック以外の全てのパックにおいて、これら 2 種の果実が混在していた。

IV 考 察

2003 年度の国内のイチゴ品種構成は、JA 全農の調査によると‘とちおとめ’33%、‘とよのか’24%、‘さちのか’11%、‘章姫’10%、‘さがほのか’7%、‘あまおう’7%、そして‘女峰’、‘濃姫’および‘アスカルビー’で5%を占め、その他3%となっている。本実験で供試した‘とよのか’表示の国内産イチゴは、現在日本に流通していると考えられる品種を含む65品種の中で、‘とよのか’、‘明宝’または‘はるのか’と多型が一致し、‘さちのか’表示の果実は‘さちのか’または‘しゅうこう’と一致していた。しかし国内の品種構成を考慮すると、これらは‘とよのか’、‘さちのか’である可能性が極めて高い。識別精度を向上させるためには分析に用いるマーカー数を増やせばよいが、市場に流通する生鮮イチゴの大部分は限られた数の主力品種であり、また商品の品種名も一般的には店頭で表示されていることから識別の際の品種候補の数は限定され、従ってマーカー数の省略が可能である。国内の流通イチゴに関しては、‘とちおとめ’表示の果実を含め、いずれも品種表示と矛盾のない分析結果が得られ、流通品における本法の有効性が確認された。

これを踏まえた輸入イチゴの分析では、供試した38%の果実が‘さちのか’、62%が‘レッドパール’の多

型タイプと一致した。韓国のイチゴ生産は大部分が日本品種に依存しており、特にレッドパールは6割を占める主要品種であること、また品種検索の際に対照とした65品種は主要な日本の流通品種だけでなく、最近韓国で育成された‘莓香’や‘早紅’も含んでいることを踏まえて、我々はこれらが‘さちのか’および‘レッドパール’であると判定した。

購入日(おそらく入荷日も)や購入店舗が異なっていたにもかかわらず、供試したイチゴは‘さちのか’と‘レッドパール’のみで構成されており、ほとんどのパックに2品種の混合が認められた。‘さちのか’の混合率は5%から87%と幅があるが、これは生産あるいはパック詰め作業の段階で混合されたものと考えられる。韓国産輸入イチゴから‘さちのか’が検出されたことから、育成者の許諾なく品種苗が国外へ持ち出された疑いが強まった。2003年当時、韓国では、イチゴは品種保護制度の対象となっていなかった。品種保護のできない国へ種苗を持ち出す際、あるいはその収穫物を国内へ輸入する際には、育成者の許諾を得ることが種苗法第21条において義務づけられているため、今回の事例は種苗法に違反する可能性が極めて高い。

本分析結果は輸入果実における種苗法違反の可能性を指摘しただけでなく、店頭における品種表示の不正も示唆した。2番、3番および4番パックは店頭で‘女峰’と表示され販売されていたが(表-1)、実際には‘女峰’は一果実も含まれていなかった。この品種表示が生産者、輸出入関係者、販売店のいずれでなされたのかは不明であるが、品種の情報も重要な品質構成要素であることを考えると、種苗法違反に劣らず大きな問題である。

V 摘 要

野菜茶業研究所で開発したイチゴ品種識別用CAPSマーカーのうち9マーカーを用いて、市場で流通していた韓国産輸入イチゴ5パックの品種識別を行った。本試験の目的は、開発した識別技術が長期の流通期間を経て鮮度の低下した果実サンプルに適用できるか確認すること、および韓国からの輸入イチゴ品種の実態を調査し、‘さちのか’に関する育成者権の侵害が起こっていないか確認することであった。分析の結果、著しく鮮度の低下したサンプルでも品種の特定は可能であった。また、分析した5パックのうち4パックは‘さちのか’と‘レッドパール’の混合であり、全71果実のうち27個が‘さちのか’で、種苗法に違反している疑いが極めて強かつ

た。また3パックは‘女峰’と表示され店頭で販売されていたことから、品種の不正表示も示唆された。

引用文献

- 1) CONGIU, L., M. CHICCA, R. CELLA, R. ROSSI and G. BERNACCHIA (2000): The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Mol Ecol.* 9: 229–232.
- 2) KUNIHISA, M., S. MATSUMOTO and N. FUKINO (2003): Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134(2), 209–215.
- 3) 國久美由紀・松元哲・吹野伸子 (2003)：イチゴ品種識別に有効な DNA マーカーの開発. 育種学研究 5 (別 2), 74.
- 4) 小林彰一 (2003)：韓国のイチゴ産業の現状と未来. 日本イチゴセミナー紀要 No. 11, 33.
- 5) OHTSUBO, K., S. NAKAMURA and T. IMAMURA (2002): Development of the primer sets for identification of a rice cultivar, Koshihikari, by PCR. 日本農芸化学会誌 76, 388–397.

Cultivar Identification of Strawberry Fruits Imported from Korea by Use of DNA Markers

Miyuki KUNIHISA, Satoru MATSUMOTO and Nobuko FUKINO

Summary

We identified the cultivars in 5 packages of fresh strawberry fruits imported from Korea and bought on the Japanese domestic market. For the identification we used 9 cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers we had developed for strawberry. Our objectives were: 1) to check the applicability of the markers we had developed to fruits that had lost their freshness after long-term transportation; and 2) through cultivar identification of the fruits in each package, to check whether infringement of breeders' rights on 'Sachinoka', bred at National Institute of Vegetable and Tea Science, was occurring. We successfully identified the cultivars of all fruits, even when they were severely damaged. Twenty-seven of 71 fruits were 'Sachinoka'; we therefore strongly suspected patent infringement. All the fruits analyzed were either 'Redparl' or 'Sachinoka', and these 2 cultivars were mixed in 4 of the packages. We also confirmed incorrect cultivar labeling of commodities, because 3 of the 5 packages were labeled 'Nyoho'.