

# DNAマーカーによる 果樹・果実の品種判別



豊水



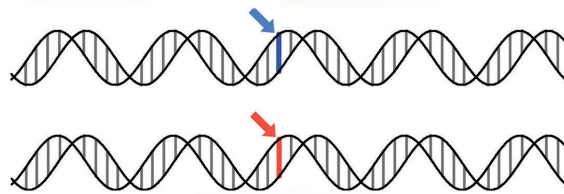
はるみ



幸水



筑波



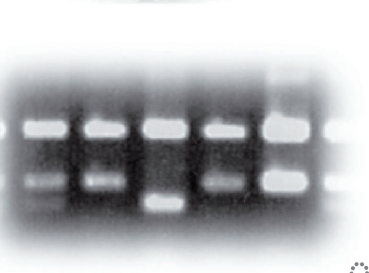
なつおとめ



なつしずく



あかつき



ちよひめ



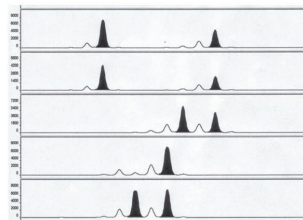
あきづき



秋峰



ちよひめ



ゆうぞら



独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

果樹研究所



## はじめに

果樹研究所は、明治35（1902）年に創設されてから100年余の間、我が国の果樹・果物の専門研究機関として、リンゴ「ふじ」、カンキツ「興津早生」、「清見」、ナシ「幸水」、「豊水」、モモ「あかつき」、クリ「筑波」、「丹沢」など多くの新品種を育成して我が国の果樹産業の発展を支えてきました。

くだもの品種名、原材料や原産地の表示など消費者サイドに立った食の安全・安心を確保する観点から、また、海外からの海賊版品種流入や産地詐称等の偽装表示の抑止など生産者や果樹産業を支えるために、育成品種や国内外の品種を科学的な手法により判別する技術の開発が必要とされてきました。しかし、果樹類の果実は、生食用のほか加工用果実として利用されるために果実形態での識別が困難な場合が多く、果樹生産や販売、研究に従事する専門職でも品種判別は困難です。さらに、乾燥果実（各種ドライフルーツ）や缶詰、シロップ漬け、甘露煮、ジュース、チップス（リンゴチップス、バナナチップス）、ジャム、塩漬け（梅干し）、果実酒（ワイン）など多種多様な加工品の場合、外観からの品種同定は不可能といえます。

果樹研究所ではこのような社会的要請を請け、各種DNAマーカーの開発、遺伝子地図の作成、データベースやコンピュータソフトウェアの開発などゲノム解析研究を進めてきました。これらの研究成果を利用して、大学や公立研究機関と協力してDNA品種判別の研究を進めてきました。現在までに、カンキツ類、ナシ、モモ、リンゴ、オウトウ、スモモ、ウメ、アンズ、ビワ、クリなど主要果樹でDNA品種判別技術を確立することができました。さらに、生果実に加えて果実加工品からのDNA抽出とDNA鑑定を進めてきた結果、生果実に加え一部の果実加工品のDNA鑑定にも成功しています。

本パンフレットでは、これらの成果をわかりやすくまとめました。今後加工原料品種の偽装表示や原産国の偽装の抑止とともに、くだもの消費拡大の一助になればと考えます。

### DNAマーカーとは？

品種間でのDNA塩基配列の違いを識別するための、ゲノム上の標識（目印）のことです。染色体上の遺伝子内あるいはその近傍の塩基配列の違いを識別して、DNAマーカーとして利用します。DNAマーカーによって、特定の遺伝子を含む染色体のある領域が親から子へ受け継がれたかどうか調べることができます。これらを用いて、品種・個人の識別や親子の判定を行うことをDNA鑑定といいます。ヒトでは、約10年ほど前から、DNA鑑定が裁判の証拠や犯罪捜査に広く使われています。植物分野でも、コメ、イグサ、イチゴ、インゲンマメなどでDNA鑑定が利用されています。

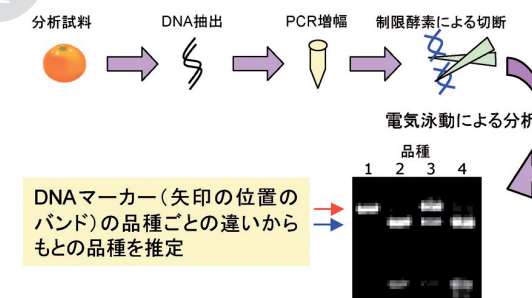
## 》》》 DNA分析のしくみ

DNA（デオキシリボ核酸）は、核の中の染色体と呼ばれる物質のことです。植物や動物では、A（アデニン）、G（グアニン）、T（チミン）、C（シトシン）の4種類の塩基の暗号によって、数万種類もの遺伝情報が書き込まれています。DNAは比較的安定な化学物質であり、生果実だけでなく、その加工品からもDNAを抽出することができます。品種が近縁であれば配列もよく似ており、逆に遠縁になるほど配列の違いが見つかる可能性も高くなります。

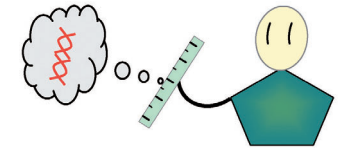
DNA分析では、遺伝子を増幅する方法（PCR法）を利用して数百から数千塩基の配列を数千～数万倍に増幅し、下記のようなさまざまな方法で分析することで、果実だけでなく、加工品についても品種や混合割合などを調べることができます。

## 下記に、代表的な3種類のDNA分析法を紹介します。

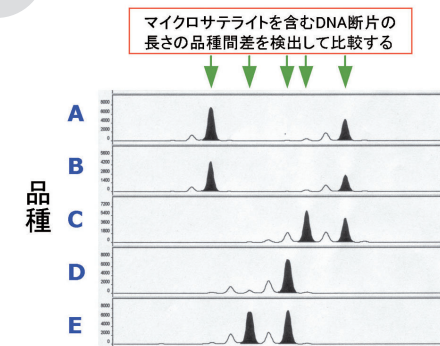
### 1 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 法



CAPS法は、対象とする遺伝子領域をPCR法で増幅した後、制限酵素で特定の塩基配列を切断して長さの違いを検出する方法です。PCR-RFLP法とも呼ばれます。塩基配列情報が必要ですが、比較的簡単な操作で正確な結果が得られます。



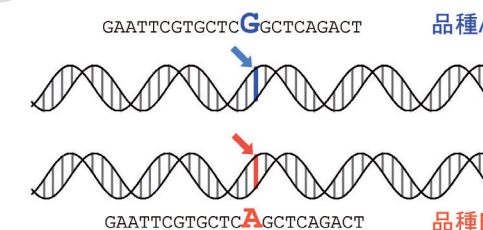
### 2 SSR (Simple Sequence Repeat) 法



マイクロサテライトと呼ばれる数塩基の繰り返し配列（SSR）を利用して、PCR法で増幅したDNA断片の長さの差異を検出します。繰り返し配列領域は、突然変異を起こしやすいことから、DNA断片の長さを高精度で分析することにより、近縁な品種同士でも判別が可能です。

品種A: GAGAGAGAGAGAGA  
 品種B: GAGAGAGAGA-----  
 品種C: GAGAGA-----  
 SSRによる判別の例  
 GAの繰り返し回数の差  
 =長さの違いを見わける

### 3 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 法



DNAの塩基配列を品種どうしでくらべると1塩基程度の違いがあちこちに見つかります。これらはSNPと呼ばれ、この違いを利用することで品種を識別する方法がSNP法です。現時点ではまだ高度な技術と分析コストが必要ですが、CAPS法やSSR法がDNAの長さを比較するのに比べ特定の塩基の違いを直接見分けるために信頼性の高い分析が可能で、今後分解の進んだ試料や近縁な品種の識別に最も期待される方法です。



現在、下記のような様々な樹種で、品種判別が可能となっています。

樹種名	マーカータイプ	判別可能な主要品種名
モモ	SSR	白鳳、あかつき、川中島白桃、日川白鳳、清水白桃など約 50 品種
ナシ	SSR	幸水、豊水、二十世紀、新高、長十郎、あきづきなど約 100 品種
リンゴ	SSR	ふじ、つがる、王林、ジョナゴールド、千秋、陸奥など約 80 品種
オウトウ	SSR	佐藤錦、ナポレオン、高砂、紅秀峰、紅さやかなど約 100 品種
スモモ	SSR	大石早生、ソルダム、太陽など約 120 品種
ウメ	SSR	南高、白加賀、豊後、小梅など約 40 品種
アンズ	SSR	信州大実、ハーコット、アーリーオレンジなど約 20 品種
ビワ	SSR	茂木、田中、長崎早生、楠、大房、房姫など約 30 品種
カンキツ	CAPS, SNP	ウンシュウミカン、スイートオレンジ、清見、はるみ、ポンカン、不知火など 40 品種以上

さまざまな樹種において科学的に品種を判別できるようになったことで、

- 果樹の品種名の確認や不当表示の抑制
- 外国からの果実の不法輸入の防止
- 品種登録や権利侵害でのトラブルの解決

が可能となっています。



### 品種判別技術が不正防止に役立った例

サクランボの紅秀峰、無断持ち出し一豪の生産者ら告訴へー

豪流出の山形高級サクランボ「紅秀峰」中国にも不正流出か？

～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でマニュアルを作成)

農林水産省品種登録ホームページで情報公開中  
<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>

果実加工品を対象とする場合、加工の過程でDNAが分解されてしまい、従来の方法では安定した分析結果を得ることは困難です。そこで、さまざまな加工品からのDNA抽出法と、分解の進んだDNAでも安定した品種判別が可能となる分析法を開発しました。

### 果実や加工品からのDNA抽出



#### ナシ果実を用いたDNA鑑定

ナシ果実からDNA鑑定に利用できるDNAの抽出方法を確立しました。DNAマーカーデータベースと組み合わせることにより、果実の品種同定が可能です。

#### ナシにおけるDNA鑑定結果

材 料	DNA 鑑定
無 果 実	◎
乾 燥 果 実	◎
缶 詰 果 実	△
ジ ュ ー ス	△

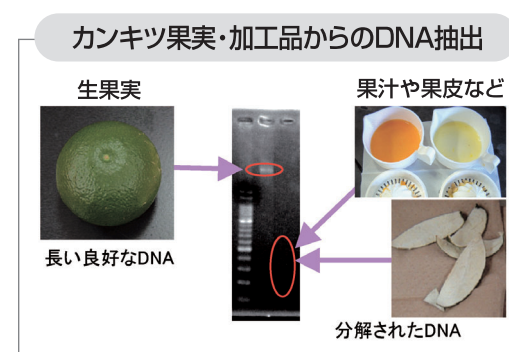
#### ナシ果実加工品のDNA鑑定

乾燥果実から得られたDNAは部分的に分解されていますが、DNA鑑定が可能です。缶詰果実やジュースからのDNAは低分子にまで分解されていますが、そのようなサンプルでも、それに合わせたSSRマーカーを設計することで、DNA鑑定が可能となりつつあります。

#### カンキツ果実・加工品のDNA鑑定

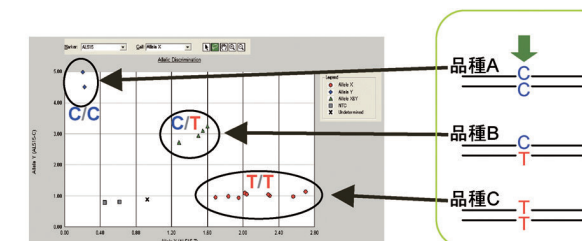
カンキツ果実から抽出したDNAを用いて分析を行い、DNAマーカーデータベースと組み合わせることにより果実の品種同定が可能です。

果汁や果皮などのカンキツ果実加工品から抽出されるDNAは分解が進んでいるため、長さを利用した分析方法で品種を識別することは困難です。そこで、1塩基の違いを見分けることのできるSNPマーカーを新たに開発しました。この方法を使うことで、品種判別の信頼性が飛躍的に向上しました。



#### 分解の進んだDNAでも分析可能な判定法を開発しました

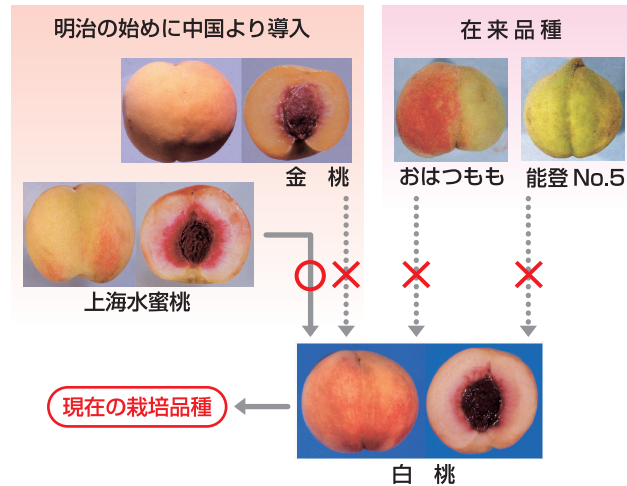
1塩基の違いを見分ける高感度な方法を使い、分析結果の座標位置（DNAマーカー）から遺伝子型を検出して品種を推定することができます。



### 日本の栽培モモの由来

現在の生食用モモ品種のほとんどは、「白桃」の子もしくは「白桃」の血を引いています。白桃自身の親は不明でした。SSR マーカーによる分析の結果、「上海水蜜桃」が現在の生食用モモの起源品種であることが分かりました。

品種名	交雑親あるいは原品種	分析結果
白鳳	白桃×橘早生	親子である
あかつき	白桃×白鳳	親子である
長沢白鳳	白鳳	枝変わりの可能性大
日川白鳳	白鳳	枝変わりでない

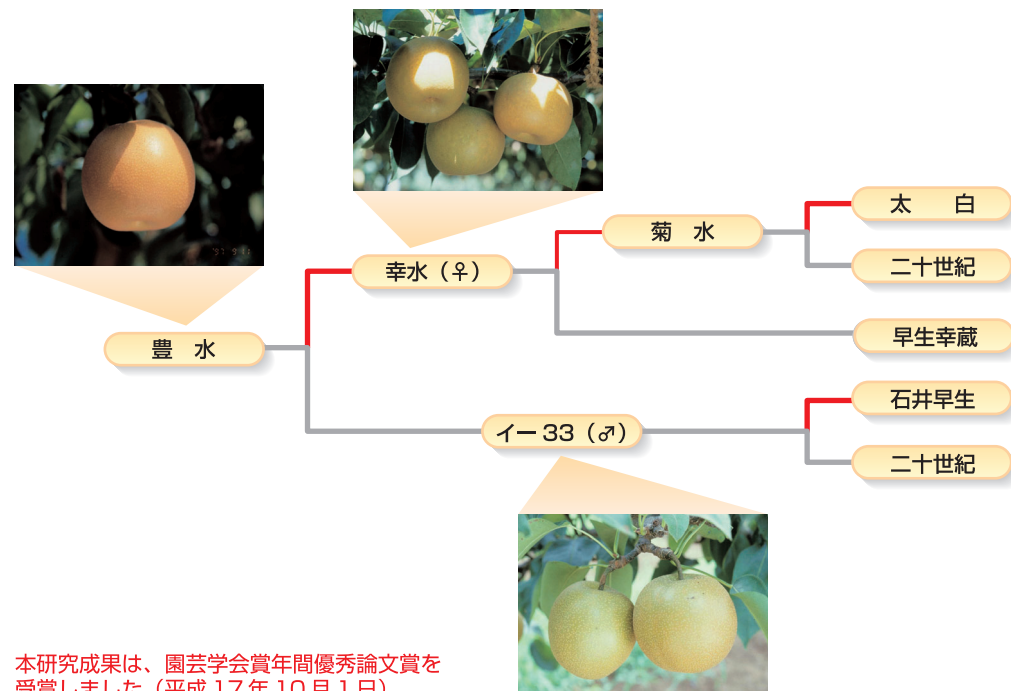


### ナシ育成品種の親子鑑定

品種名	交雑親あるいは原品種	分析結果
幸水	菊水×早生幸蔵	親子である
新世紀	二十世紀×長十郎	親子である
豊水	リー14×八雲	両方とも親でない
大原紅	晩三吉×マックスレッド・パートレット	晩三吉は親でない マックスレッド・パートレットは親である

鑑定した14の親子品種のうち、4品種は親子でないことが判明しました。

### DNA マーカーで明らかになった「豊水」の育成系譜



本研究結果は、園芸学会賞年間優秀論文賞を受賞しました（平成17年10月1日）。

DNA マーカーを用いて品種判別を行うには、既存の品種に関するデータの蓄積が不可欠です。これまでに、カンキツやナシなどのDNA マーカー型をデータベース化しています。

### カンキツ品種のDNA マーカーデータベース

DNA マーカー（矢印の1つのバンド）の品種ごとの違いから品種を推定

電気泳道による分析

育成18品種の81のマーカー型をデータベース化

品種/マーカー	Ai304	Ov118	Ov401	LP024	Mf033
不知火	bb	aa	aa	ab	bb
はるみ	bb	aa	bb	aa	bb
清見	ab	ab	ab	ab	ab
せとか	aa	bb	bb	aa	ab

### ナシ品種のDNA マーカーデータベース

ナシ品種同定の基盤となるDNA マーカーデータベースを作成中です。ナシで開発したSSR マーカーや遺伝子地図の情報、さらにニホンナシ等96品種のSSR 遺伝子型、自家不和合性遺伝子型、来歴、有用形質を網羅したデータベースで、完成後はナシの日本（世界）標準データベースとして公開していく予定です。

### 分析支援プログラムの開発

これまでに多数の品種について多くのDNA マーカー情報がデータベース化されています。しかし品種判別を行う場合、品種とDNA マーカーの組み合わせは莫大な数になります。そこで、特定の品種を判別するための最少限のマーカーセットを選ぶプログラム“MinimalMarker”を開発しました。これにより、分析精度を確保しつつ、時間とコストを抑えることが可能になります。

#### 8つのDNA マーカーを9品種に適用した例

マーカー	品 種								
	V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V08	V09
MO1	AA	AB	BB	AA	AB	AB	AA	AB	BB
MO2	AA	AA	AA	AA	BB	AA	AA	AA	AA
MO3	AB	AA	BC	AB	AC	AA	AB	BC	AA
MO4	AA	AB	BB	AA	AA	AC	BB	AA	BB
MO5	AA	BB	AA	AA	BB	AA	AA	BB	bb
MO6	AA	AA	AA	BB	BB	AA	BB	BB	AA
MO7	AC	AB	AD	AD	AC	AB	BC	AC	AD
MO8	AA	BB	BB	BB	AA	BB	AA	AA	BB

9品種を判定するのに、すべてのマーカーは必要か？  
最小限必要なマーカーの組み合わせはどれか？

マーカー数や品種数が増えると その組合せは莫大な量になる

#### MinimalMarker による計算

#### 計算結果

マーカー	品 種								
	V01	V02	V03	V04	V05	V06	V07	V08	V09
MO3	AC	AB	AD	AD	AC	AB	BC	AC	AD
MO4	AA	BB	AA	AA	BB	AA	AA	BB	BB
MO5	AB	AA	BC	AB	AC	AA	AB	BC	AA

最少マーカーセット選択のためのコンピュータプログラム MinimalMarker の利用

3つのマーカーですべての品種が判別可能なことがわかる

時間とコストを節約できる  
どのような作物にも使える



くだものは食生活に豊かさと広がりを与え、また時には季節の移ろいを感じさせてくれます。また近年はくだもの持つ健康機能性や癒し効果などにも注目が集まっています。果樹には特徴が大きく異なる多様な品種が存在し、その利用方法もさまざまです。

いろいろなくだものやその加工品を消費者の皆さんに安心して購入してもらうために、ここで紹介したさまざまな方法を駆使して表示されたものが適正に流通していることを科学的に証明することが必要です。また、これらの品種を長年にわたって研究し、開発してきた多くの人々の権利を守るためにも、今後さらに多くの品種を正しく識別できる技術の開発を進めていきます。



## 参 画 機 関

各樹種の品種識別は、農研機構果樹研究所と以下の研究機関との共同研究で得られた成果です。

福島県農業総合センター果樹研究所(モモ)	種苗管理センター調査研究課(ナシ)
岐阜大学教育学部生物学教室(リンゴ)	山形県立農業総合研究センター農業生産技術試験場(オウトウ)
山梨県果樹試験場(スモモ)	和歌山県農林水産総合技術センター果樹試験場うめ研究所(ウメ)
長崎県果樹試験場(ビワ)	千葉県農業総合研究センター(ビワ)
静岡大学農学部(カンキツ)	

果  
樹  
研  
究  
所

### 問い合わせ先

果樹ゲノム研究チーム

029-838-6474 (落葉果樹関係)・0543-69-7108 (カンキツ)

発行年月：2006年11月

発 行：独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所

住 所：〒305-8605 茨城県つくば市藤本2-1

U R L：<http://fruit.naro.affrc.go.jp/>