

## 試験研究成果普及情報

部門	果樹	対象	研究
課題名：DNA 鑑定によるビワ品種識別技術の開発			
〔要約〕千葉県育成の種子なし品種「希房」を含む登録品種等、計 35 品種・系統のビワについて、選定した 12 個の DNA マーカーで識別できる。			
フリーワード <sup>※</sup> ビワ、DNA マーカー、品種識別、オリジナル品種、品種育成者権			
実施機関名	主 査 農林総合研究センター 生物工学研究室 協力機関 農林総合研究センター 暖地園芸研究所 特産果樹研究室、 (公財)かずさ DNA 研究所、長崎県農林技術開発センター、 株式会社 LSI メディエンス		
実施期間	2015 年度		

### 〔目的及び背景〕

千葉県オリジナル品種に対する信頼性の確保と品種育成者権の保護のために、本県で育成した品種を正確に識別できる技術を開発することは極めて重要である。品種識別技術の確立が求められている。近年、国内でビワ品種が新たに開発され、品種数が増加しているため、それら新品種と従来の品種を識別できる技術を開発するとともに、識別精度の向上を図る必要がある。

### 〔成果内容〕

- 1 文献情報から DNA マーカーを収集し、35 個のマーカーから品種識別に安定して利用可能なマーカー 12 個を選定した（表 1）。
- 2 ビワ品種識別マニュアルにより（図 1）葉又は果実から抽出した DNA と 12 個の DNA マーカーで、「希房」を含むビワ 35 品種・系統を識別できる（図 2、表 1、表 2）。

### 〔留意事項〕

### 〔普及対象地域〕

ビワ生産地

### 〔行政上の措置〕

### 〔普及状況〕

[成果の概要]

表 1 ビワ品種識別遺伝子型データベース

品 種	マーカー											
	CH03a09	CH03d12	CH05g08	NH007b	NH033b	CH01e01	CH01h01	CH01h02	CH02b03b	CH02b10	CH02d12	NH039a
No.1	140/146	121/144	172/205	126/138	189/200	105/105	112/114	229/241	100/108	138/138	226/245	142/159
No.2	146/146	121/146	172/172	126/126	200/200	105/105	110/112	241/247	100/108	134/138	226/245	142/159
No.3	146/146	146/146	172/172	126/126	200/200	105/105	110/112	241/241	108/108	134/138	226/226	159/159
No.4	146/146	101/121	168/205	126/138	189/200	105/112	110/110	241/241	100/108	138/138	226/226	142/159
No.5	146/146	121/121	172/205	126/126	200/202	105/105	110/110	247/247	100/108	134/148	226/245	142/159
No.6	140/156	101/144	185/205	138/144	189/189	105/105	112/114	229/247	100/108	138/138	230/245	159/159
No.7	146/146	101/121	168/205	138/144	189/202	105/112	110/112	241/241	100/100	138/148	226/245	159/159
No.8	146/146	101/144	172/172	126/126	189/200	105/112	110/114	241/241	100/100	138/148	226/226	142/144
No.9	146/154	101/101	172/205	138/144	189/202	112/118	110/110	241/241	100/108	138/138	224/226	159/159
No.10	140/158	101/121	168/205	144/144	189/200	105/112	110/112	229/247	100/108	134/138	226/245	142/159
No.11	146/154	101/121	172/205	144/144	189/202	112/118	110/110	241/241	100/100	138/148	224/245	159/159
No.12	140/142	144/144	168/205	126/126	200/200	105/118	114/114	229/247	100/108	138/138	226/245	155/159
No.13	140/146	121/121	168/168	126/126	202/202	105/118	110/114	241/241	100/108	138/148	226/245	159/159
No.14	146/146	121/146	172/172	126/126	202/202	105/105	110/112	241/247	100/108	148/148	226/245	142/159
No.15	146/156	121/146	168/205	126/144	200/202	105/118	110/110	241/247	100/108	143/148	226/245	144/159
No.16	146/146	101/146	205/205	138/144	189/202	105/118	110/110	241/241	100/108	138/148	226/226	144/159
No.17	146/146	101/121	168/205	126/138	189/202	105/112	110/110	241/241	100/108	138/148	226/245	144/159
No.18	146/146	121/146	168/172	126/144	200/202	105/105	110/112	241/247	100/108	138/148	226/245	142/159
No.19	146/156	101/121	172/207	126/138	189/200	105/112	110/114	229/241	100/100	138/138	224/230	159/159
No.20	146/146	121/121	168/172	126/126	200/202	105/112	110/114	241/241	100/100	138/148	224/245	159/159
No.21	146/156	121/121	168/205	126/144	202/202	105/105	110/110	247/247	100/108	148/148	226/245	159/159
No.22	140/146	121/121	205/205	138/144	189/202	105/105	110/112	229/241	100/108	138/148	226/245	159/159
No.23	146/156	146/146	172/205	126/126	200/202	105/105	110/112	241/241	100/108	138/143	226/226	159/159
No.24	140/156	127/144	168/205	126/138	189/200	105/105	114/114	229/247	108/108	138/138	226/245	159/159
No.25	146/146	101/121	168/205	144/144	202/202	105/112	110/110	241/247	100/108	138/148	226/245	144/159
No.26	146/146	121/121	172/205	126/126	189/200	105/112	110/112	241/241	100/108	138/138	226/245	142/144
No.27	146/154	101/121	168/172	138/144	189/202	105/112	110/110	241/241	100/100	138/148	226/226	142/159
No.28	146/154	101/146	172/172	126/138	189/202	105/118	110/110	241/247	100/108	138/138	226/226	159/159
No.29	156/156	121/127	172/172	138/144	189/206	105/118	110/110	241/241	100/108	138/138	224/226	142/159
No.30	140/154	121/121	168/207	144/144	189/206	105/105	110/114	241/241	90/108	138/148	230/230	142/157
No.31	146/156	121/146	168/205	126/138/144	189/200	105/118	110/112	229/247	100/108	138/143	226/245	144/159
No.32	146/156	144/146	172/205	126/144	200/200	105/105	110/112	229/247	100/100	138/143	245/245	142/159
No.33	140/156	121/146	168/172/205	126/144	189/200	105/118	110/114	229/247	100/108	138/143	226/245	144/159
No.34	146/156	121/146	168/205	126/144	200/200	105/118	110/110	241/247	100/108	143/143	226/245	144/159
No.35	146/154	101/146	172/172	126/144	189/200	105/112	110/112	241/247	100/108	134/138	226/226	159/159

表中の数字は PCR 産物の断片長サイズ (bp)

サンプル提供元の意向により、品種名は非公開

### 1. ビワ植物体からの DNA 抽出

- 1) 蒸留水で洗浄した葉 (0.05g) または果皮 (0.1g) を切り取り、乳鉢で冷却しながら粉碎する
- 2) 乳鉢に温めた DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) の AP1 バッファーを加え、2ml のチューブに粉碎した植物体ごと回収する
- 3) チューブに RNase を 4 $\mu$ l と PVPP を 5mg 加える
- 4) 以下は Kit の手順に従い DNA を抽出する

### 2. PCR

1) 反応液組成	使用量	最終濃度
10 $\times$ PCR バッファー	1.5 $\mu$ l	1 $\times$
2 mM dNTPs	1.5 $\mu$ l	0.2 mM
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.8 $\mu$ l	3 mM
25 $\mu$ M each プライマー	0.24 $\mu$ l	0.4 $\mu$ M
Taq ポリメラーゼ	0.024 $\mu$ l	0.12 unit / well
DNA	3 $\mu$ l	0.2 ng / $\mu$ l
滅菌水	6.936 $\mu$ l	
全量	15 $\mu$ l	

プライマー配列は、ニホンナシ品種識別マニュアルやリンゴデータベースを参照

[http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna\\_manual/san10.pdf](http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna_manual/san10.pdf)

<http://www.hidras.unimi.it/>

### 2) PCR 反応

94 $^{\circ}$ C 3:00  $\rightarrow$  [94 $^{\circ}$ C 1:00  $\rightarrow$  52 $^{\circ}$ C 2:00  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 0:30] $\times$ 40  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 3:00  $\rightarrow$  4 $^{\circ}$ C  $\infty$

### 3. 電気泳動と判定

- 1) PCR 産物を 50 倍に希釈したものと、Hi-Di ホルムアミドに 1/200 量の 500 LIZ サイズマーカー (Thermo Fisher Scientific) を加えたものを、1:9 で混合する
- 2) 混和後、スピンドウンし、95 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性後素早く冷却する
- 3) ABI3730DNAAnalyzer (Thermo Fisher Scientific) で電気泳動を行い、付属のフラグメント解析ソフトを用いて、増幅産物のサイズを測定する

図 1 ビワ品種識別マニュアル

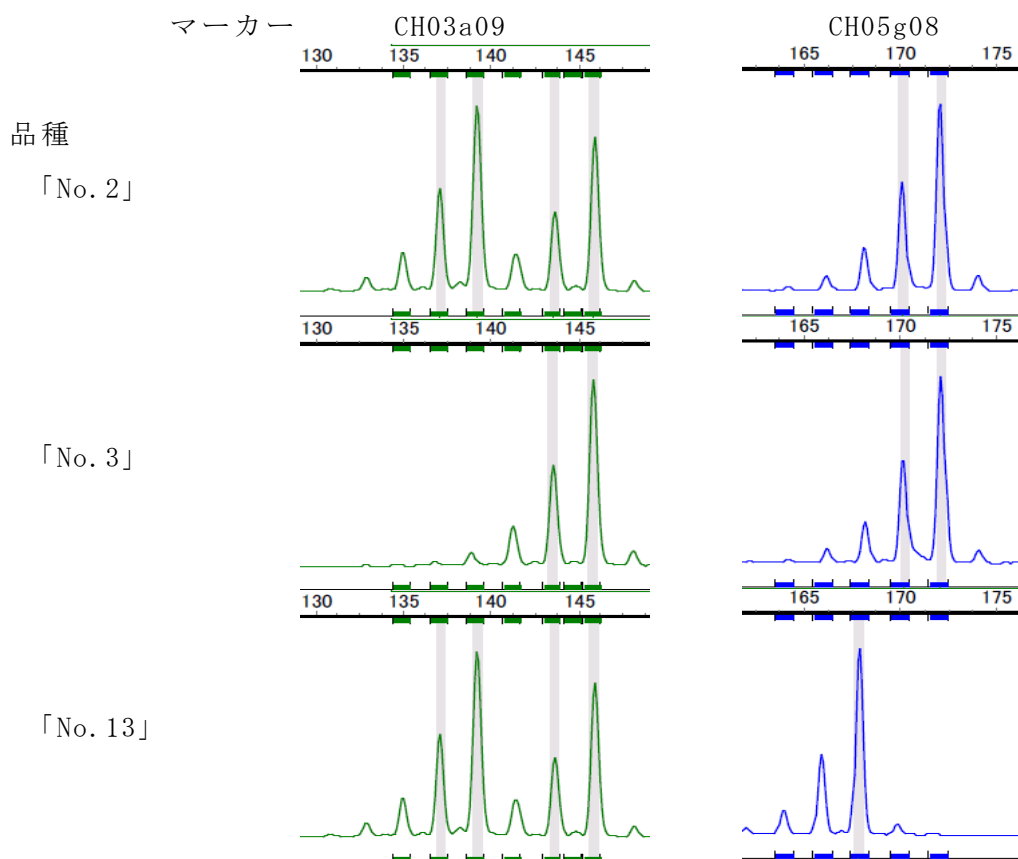


図2 蛍光フラグメントアナライザーAB3730による品種識別波形パターン（抜粋）

注）数字はPCR産物の断片長

マーカーCH03a09では「No.2」と「No.13」は140/146、「No.3」は146/146と言う判定になる。同様にマーカーCH05g08では「No.2」と「No.3」は172/172、「No.13」は168/168となり、これら遺伝子型の違いによってお互いに識別することができる。

表2 品種識別可能なピワ 35 品種・系統

長生早生	涼風	長崎早生	田中	Dahongpao
里見	陽玉	茂木	大房	Wanhong
房光	麗月	楠	瑞穂	Zaohuang
白茂木	希房	土肥	津雲	3N長崎17
富房	涼峰	奄美白	室戸早生	3N長崎30
田茂	なつたより	福聚院	大竜	4N田中-1
房姫	はるたより	戸越	天草極早生	4N楠2

[発表及び関連文献]

- 1 SSRマーカーによるピワ品種識別技術、平成27年度果樹バイオテク研究会抄録集
- 2 平成24年度試験研究成果普及情報「DNA塩基配列による種子なしピワ新品種『希房』の識別法」

[その他]

品種保護に向けたDNA品種識別技術確立事業（平成26年度）