

試験研究成果普及情報

部門	果樹	対象	研究
課題名：ニホンナシ育成系統を含む主要品種の品種識別技術			
<p>[要約] ナシの DNA 情報を利用して、千葉県育成中の品種を含む主要な計 61 品種・系統のナシを、葉または果皮から抽出した DNA によって識別できる。これにより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を保護することができる。</p>			
キーワード [※] ナシ、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	生物学研究室
	協力機関	農林総合研究センター	果樹研究室
実施期間	2012年度～2014年度		

[目的及び背景]

千葉県はナシの栽培面積・収穫量・産出額ともに全国順位では第1位で、優良な品種の育成も行われている。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を保護するために、本県で育成した品種を正確に識別できる技術の開発が必要であり、品種識別技術の確立が求められている。ナシは DNA マーカー情報が比較的そろっており、それらを活用して千葉県が保有する品種・系統をデータベースとする品種識別技術の開発を行う。

[成果内容]

- 1 農研機構が公開している「SSR マーカーによるニホンナシの DNA 品種識別技術」に記載されている情報から品種識別用 DNA マーカーを収集し、識別能力と安定性が高いマーカー 8 個を選抜した。
- 2 上記の公開情報の記載方法に準じて、葉または果皮から抽出した DNA と 8 個の DNA マーカーを用いることにより、計 61 品種・系統を枝変わりの 2 グループ以外をすべて識別できる（図 1、図 2、図 3、表 1）。

[留意事項]

データベースの品種を識別する技術であり、今後開発される新品種については新たに確認が必要である。

[普及対象地域]

ナシ育成者

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

1. ナシ植物体からの 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、冷却しながら乳鉢で粉砕する
- 2) 乳鉢に温めた DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) の AP1 バッファーを加え、2ml のチューブに粉砕した植物体ごと回収する
- 3) 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×PCR バッファー (EX 用)	1.5 μ l	1×
2.5 mM dNTPs	1.2 μ l	0.2 mM
10 μ M each プライマー	0.3 μ l	0.2 μ M
Ex Taq ポリメラーゼ	0.075 μ l	0.38 unit / well
DNA	2 μ l	1 ng / μ l
滅菌水	9.925 μ l	
全量	15 μ l	

使用プライマー : NH004a, NH005b, NH007b, NH025a, NH009b, NH204a, BGT23b, NH039a

プライマー配列及び PCR 反応プログラムは、農研機構公開資料参照

(http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna_manual/san10.pdf)

3. 電気泳動と判定

- 1) PCR 産物を 10 倍に希釈したものと、Loading dye 入り Hi-Di ホルムアミドに 1/8 量の GeneScan400 HD ROX サイズマーカー (Life Technologies) を加えたものを、1:3 で混合する
- 2) 混和後、スピンドウンし、95°C で 5 分間熱変性後素早く冷却する
- 3) ABI377DNA Analyzer (Life Technologies) 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、増幅産物を測定する

図 1 ナシ品種識別方法

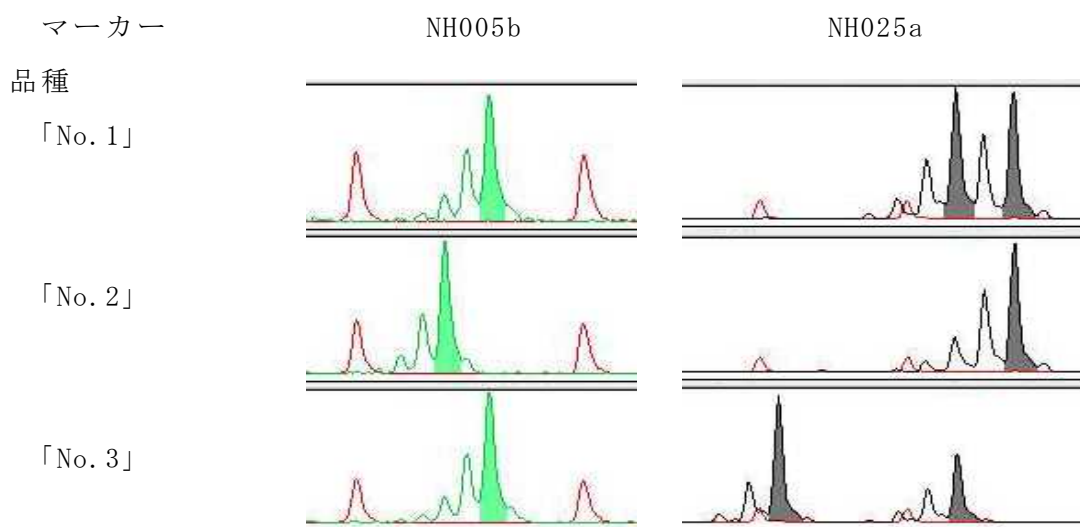


図 2 ABI377DNA Analyzer による品種識別波形パターン (抜粋)

マーカー NH005b では「No. 1」と「No. 3」は b/b、「No. 2」は a/a という判定になる。同様にマーカー NH025a では「No. 1」は b/c、「No. 2」は c/c、「No. 3」は a/b 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1 データベース作成に供試したナシ品種・系統

愛甘水	あきあかり	あきづき	あけみず	旭	愛宕	ゴールド二十世紀
石井早生	市原早生	王秋	晩三吉	なつしずく	祇園	育成系統1 [○]
菊水	君塚早生	清澄 [○]	雲井	光月	幸水	育成系統2 [○]
寿新水	秀玉	秋麗	新興	新水	新星	育成系統3 [○]
新雪	翠星	清玉	青竜	太白	多摩	育成系統4 [○]
筑水	長寿	長十郎	独逸	南水	早玉	育成系統5 [○]
新高	二十世紀	にっこり	八幸	八達	八雲	育成系統6 [○]
平塚16号	豊月	豊水	明月	鴨梨	八里	なつひかり [○]
若光 [○]	早生幸蔵	真鍮	26-21 [○]	7-7 [○]		

○印は千葉県で育成された品種・系統を示す

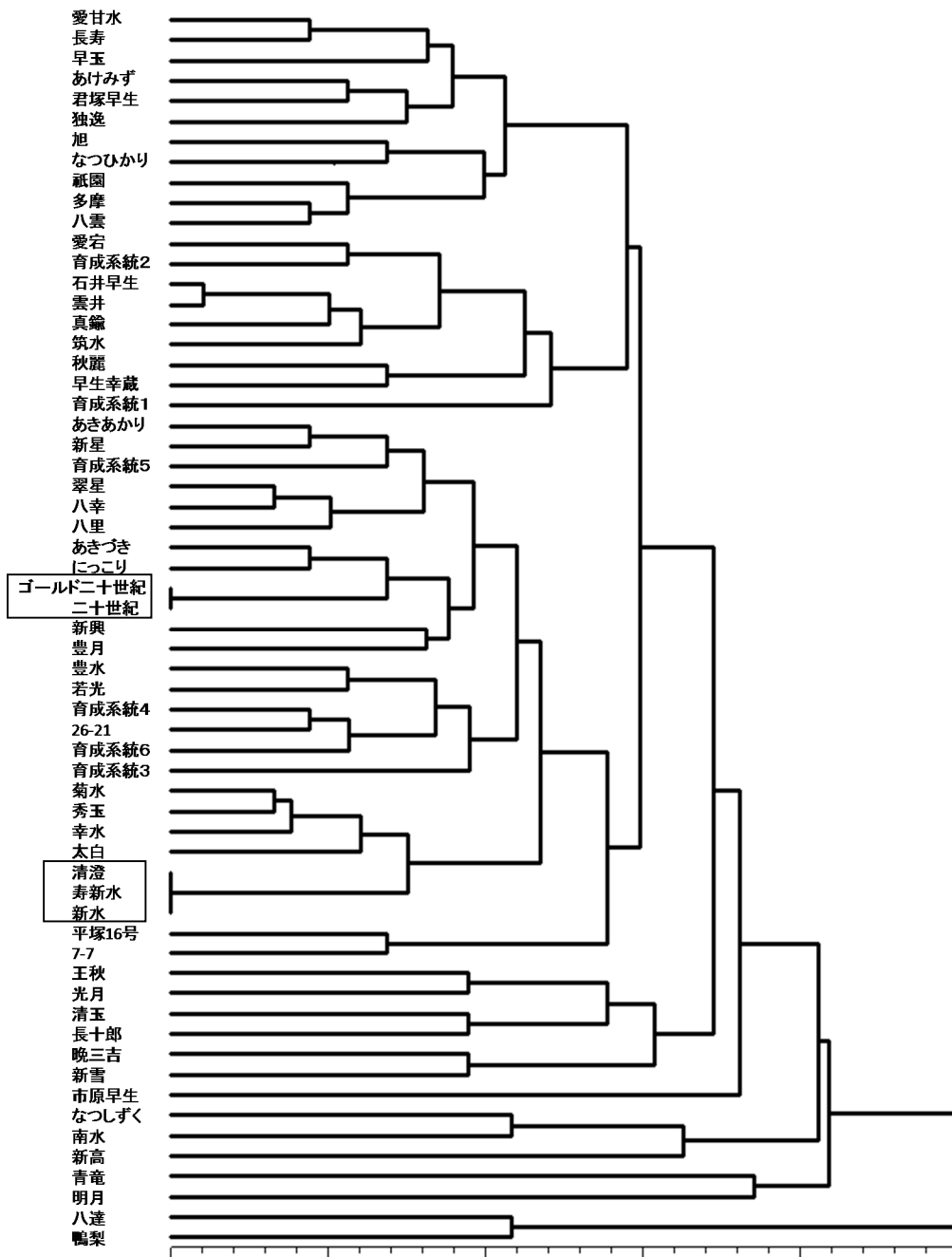


図3 遺伝子型情報から作成した樹状図

注) 四角で囲った2グループが識別できない枝変わり品種である

[発表及び関連文献]

[その他]

「千葉県を元気にするオリジナル品種の開発・定着促進」事業（平成 24 年度～26 年度）