

オリーブ新品種「香オリ3号」および「香オリ5号」の 品種判別法の確立

植田 早紀^{a)}・水谷 亮介^{b)}・多田寿和子^{c)}・久保 有司^{b)}・山下 泰生^{d)}・田中 利幸^{c)}・
窪田 健康^{c)}・森末 文徳^{d)}・村上 恭子^{a)}

キーワード：オリーブ，新品種，香オリ3号，香オリ5号，品種判別，SSRマーカー

Identification of new olive (*Olea europaea* L.) cultivars 'Kaori 3 go' and 'Kaori 5 go'

Saki UETA^{a)}, Ryosuke MIZUTANI^{b)}, Suwako TADA^{c)}, Yuji KUBO^{b)}, Taisei YAMASHITA^{d)},
Toshiyuki TANAKA^{c)}, Takeyasu KUBOTA^{c)}, Fuminori MORISUE^{d)}, Kyoko MURAKAMI^{a)}

Keywords: olive, new cultivars, 'Kaori 3 go', 'Kaori 5 go', cultivar discrimination, SSR markers

Abstract

1. We have devised a method for the stable extraction of high-purity DNA from a small sample of olive sprouts (apical buds, axillary buds) by adding a pretreatment step to the conventional DNA extraction method.
2. Using 6 types of simple sequence repeat (SSR) markers, we sorted 188 cultivars and lines (Kagawa Prefecture cultivars 'Kaori 3 go' and 'Kaori 5 go' in addition to 124 other Kagawa Prefecture lines and 62 other existing cultivars) into 124 polymorphisms.
3. We investigated methods for efficiently discriminating between 6 olive cultivars: Kagawa Prefecture cultivars 'Kaori 3 go' and 'Kaori 5 go', and the 4 cultivars most widely grown in Japan, namely 'Mission', 'Lucca', 'Manzanillo', and 'Nevadillo Blanco'. We found that the 6 cultivars could be identified either by using agarose gel electrophoresis with 2 of the 6 SSR markers mentioned in 2 above (GAPU071B and UDO99-024) or by using microchip electrophoresis with those 2 and 1 other SSR marker (UDO99-012).

摘 要

1. 従来のDNA抽出法に前処理工程を加えることで、少量のオリーブの新芽（頂芽，腋芽）から純度の高いDNAを安定して抽出する方法を確立した。
2. 香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」、既存62品種および香川県育成124系統の計188品種・系統は、6種類のSSR（単純反復配列：Simple Sequence

Repeat）マーカーにより124種類の多型に分類された。

3. 香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」および国内で栽培されている主要4品種「Mission」「Lucca」「Manzanillo」「Nevadillo Blanco」の計6品種について効率的に判別する方法を検討した。その結果、アガロースゲル電気泳動を用いた場合、2. の6種類のうち2種類のマーカーGAPU071BおよびUDO99-024を用いて判別が可能であった。マイクロチップ電気泳動を用いた場合には、3種類のマーカー

a) 生産環境部門 b) 農業生産流通課 c) 小豆オリーブ研究所 d) 府中果樹研究所

受理日：2021年12月28日

GAPU071B, UDO99-024およびUDO99-012を用いて判別が可能であった。

緒 言

香川県のオリーブ (*Olea europaea* L.) 栽培は明治41年から始まり、小豆島を中心に全国一の産地を形成してきた。本県では、現在「Mission」「Lucca」「Manzanillo」「Nevadillo Blanco」の4品種が主に栽培されており、この中でも「Mission」が一番多く栽培されている。さらに、他産地にはない優位性を維持し続けるため新品種の開発に取組み、「香オリ3号」および「香オリ5号」の2品種を育成し²⁶⁾、令和3年3月18日に、「香オリ3号」は第28382号、「香オリ5号」は第28383号としてそれぞれ品種登録された。これら新品種は「Mission」と比較して、「香オリ3号」は果実が大きく炭疽病に強く、「香オリ5号」はオイル中のポリフェノール含量が多くオイルの好ましい特性とされる辛味と苦味が際立ち官能評価が高い特徴を持つ。本県では、このように優れた特徴を持つ新品種の早期普及を目指して、平成30年度から苗木供給体制を整備し、苗木生産に取り組んできた。そして令和3年2月に、一定基準を満たした生産者に現地調査を実施したうえで苗木供給が行われた。現在、2品種の栽培面積は2.6ヘクタール程度と見込まれており、今後、香川県のオリジナル品種として県内全域への栽培の拡大が予定されている。

一方でオリーブは、苗段階の外観において品種間で明瞭な差異が少なく目視での品種判別が難しいため、栽培の拡大に伴う種苗生産、種苗流通の際に、苗の取り違い等の危険性がある。このことから香川県の知的財産である育成品種を保護するために品種判別法を開発し、競争力強化や苗段階での異品種混入と生産制限地域外への流出に対する抑止力として活用する必要がある。従来、果樹やイネなどの農作物の品種判別は、植物の形態的・外観的な特徴に基づいて行われてきた¹⁰⁾。しかしながら、そのような特徴は栽培環境（気象、土壌など）の影響を大きく受ける¹⁰⁾。また、果樹は果実をつけるまでに長い時間を要するため、形態的な特徴による品種判別が困難である。これと比較してDNAマーカーによる品種判別は、発育ステージに関係なく苗段階でも判別可能な優れた方法である。中でも、SSRマーカーは多型の検出頻度や再現性の高さなどの点から広く用いられており、コムギ¹⁶⁾、モモ¹⁷⁾ ¹⁸⁾、ナス²²⁾、カラー⁸⁾、イチジク⁹⁾等で品種判別技術が報告されている。これまでにオリーブでは、R.De La Rosa et al.²⁰⁾、F. Carriero et al.³⁾、G.Cipriani

et al.⁵⁾、K.M.Sefc et al.¹¹⁾ およびF.Sabino et al.⁴⁾により系統分類等を目的とした80種類のSSRマーカーが既に開発されており、これらを使用することで、高い精度での品種判別が期待される。

前述の通り、SSRマーカーは多型が得られやすく再現性が高いという長所を有する。一方、SSRマーカーを用いた多型の検出にはフラグメント解析を行うための装置（蛍光フラグメントアナライザ）を用いることが多く、当該装置を用いない他の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などの短所も有している。しかし、種苗生産、種苗流通現場でのDNAマーカーを用いた品種判別には、より簡易で安価な方法であることが求められる。

また、オリーブはポリフェノール類などのDNA抽出阻害物質を多く含むため少量サンプルからの抽出効率が悪く、品種判別に利用できる純度のDNAを少量抽出する際にも500mg程度の大量のサンプルを用意する必要がある。抽出には5月頃に採取できる新芽（頂芽、腋芽）が一般的に用いられるが、3～5mgの新芽を大量に用意し、抽出するには多くの労力と費用を要する。さらに苗段階では時期によって、大量のサンプルを用意できない場合も想定される。

そこで本報では、まず初めに、従来のDNA抽出法に前処理工程を加えることで50mg程度の少量サンプルから純度の高いDNAを安定して抽出する方法を検討した。次に、品種判別に使用可能なSSRマーカーの絞り込みを行った¹⁴⁾。具体的には、まず由来の異なる12品種のDNAを鋳型にして、80種類のSSRマーカーを用いて分析を行い、多型を検出できるSSRマーカーを選抜した。その後、香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」、既存62品種（表-1）および香川県育成124系統の計188品種・系統のDNAを鋳型にして、選抜したSSRマーカーを用いて分析を行い、多型の解析を行った。

さらに、蛍光フラグメントアナライザよりも低コストに多型を検出できるアガロースゲルまたはマイクロチップ電気泳動装置を用いて、香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」および国内で栽培されている主要4品種の計6品種（図-1）の品種判別に最適で最小限のDNAマーカーの組み合わせ（最少マーカーセット）を検討した²³⁾。

材料および方法

1. DNA抽出法の検討

1) 材料

香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」および国内で栽培されている主要4品種「Mission」「Lucca」「Manzanillo」「Nevadillo Blanco」の計6品種を供試した(図-1)。

2) 方法

DNA抽出は、改変CTAB法¹⁹⁾で行った。乳鉢・乳棒を液体窒素で冷却し、凍結した新芽50mgを入れて即座に摩砕した。ポリフェノール類を効率よく取り除くために、改変CTAB法(方法1)にサンプルを前処理する工程を加えた(図-2)。すなわち、2mLチューブに摩砕したサンプル、洗浄バッファー(100mM Tris-HCl (pH8.0), 0.35M ソルビトール, 10%ポリエチレングリコール, 2% 2-メルカプトエタノール) 1mLを加え転倒混和後、14,000rpm, 4℃で10分間遠心分離し、上清を除去する作業を2, 3回繰り返した。その後、沈殿に洗浄バッファーを加え、室温(方法2)またはヒートブロックで45℃(方法3)16時間以上加熱したのち、14,000rpm, 4℃で10分間遠心分離し、上清を除去した。

分光光度計NanoDrop (Thermo Fisher Scientific)を用いて230, 260, 280nmの値を測定した。各品種、3反復ずつDNA抽出と吸光度測定した。

2. 「香オリ3号」および「香オリ5号」を品種判別できるSSRマーカーの選定

1) 材料

香川県農業試験場小豆オリブ研究所に植栽されている、香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」、既存62品種(表-1)および香川県育成124系統の計188品種・系統(各1個体)を供試した。

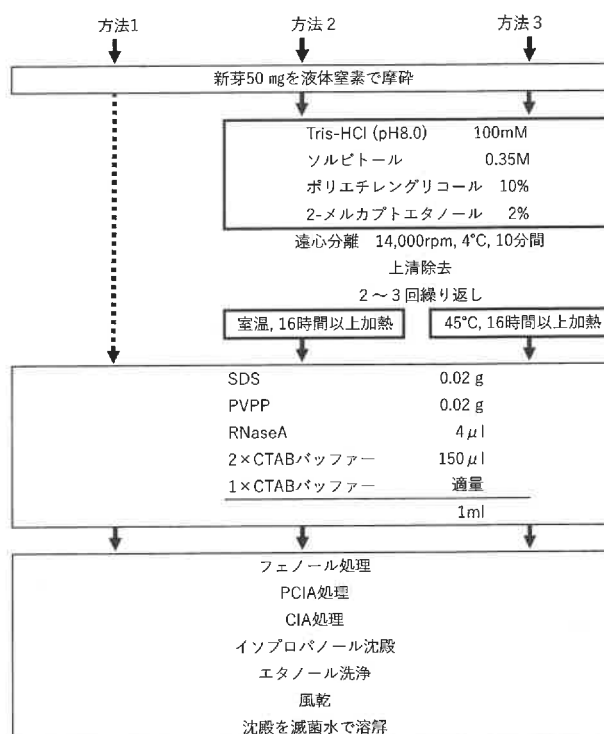


図-2 検討したDNA抽出方法のフロー図



図-1 「香オリ3号」「香オリ5号」および国内で栽培されている主要4品種

1 「香オリ3号」、2 「香オリ5号」、3 「Mission」、4 「Lucca」、5 「Manzanillo」、6 「Nevadillo Blanco」

既報の80種類のオリーブ由来SSRマーカー^{3)~5) 9) 11) 20)}を用いた。

2) PCR

反応液は、0.25 μ M フォワードプライマー、0.5 μ M リバースプライマー、0.025 unit BIOTAQ polymerase (Bioline社)、酵素添付の1 $\times$ NH₄ Buffer、200 μ M each dNTP、2 mM MgCl₂、50倍希釈したDNA 2 μ L、滅菌蒸留水を加えて総量を5 μ Lに調整した。既報の80種類のSSRマーカー^{3)~5) 9) 11) 20)}の絞り込みでは、188品種・系統のうち由来の異なる12品種のDNAを鋳型とした。フラグメント解析時のPCRでは、フォワードプライマーの5'末端を蛍光色素FAMでラベルした各SSRマーカーを用いた。反応条件は、初期活性化ステップを94 $^{\circ}$ C 2分、次に変性94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング57 $^{\circ}$ C (マーカーssrOeIGP15は55 $^{\circ}$ C) 30秒、伸長72 $^{\circ}$ C 45秒を1サイクルとし、これを40回繰り返したのち、最終伸長72 $^{\circ}$ C 10分とした。

3) PCR産物の検出

由来の異なる12品種を対象とした既報の80種類のSSRマーカー^{3)~5) 9) 11) 20)}の絞り込みでは、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて多型を検出した。

フラグメント解析では、ABI3730xl DNAアナライザ (Thermo Fisher Scientific) による電気泳動を実施し、GeneMarkerプログラム (SoftGenetics LLC.) で多型の決定、比較分析を行った。

なお、一部の解析は、公益財団法人かずさDNA研究所の技術サポートを受けて行った。

3. アガロースゲルまたはマイクロチップ電気泳動を用いた品種判別

1) 材料

香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」および国内で栽培されている主要4品種「Mission」「Lucca」

「Manzanillo」「Nevadillo Blanco」の計6品種 (図-1) を供試した。

表-2に示す6種類のSSRマーカーを用いた。

2) PCR

反応液は、鋳型DNA 10 ng、0.4 μ M各プライマー、1 $\times$ AmpliTaq Gold 360 (Thermo Fisher Scientific)、滅菌蒸留水を加えて反応液の総量を10 μ Lに調整した。PCRは、サーマルサイクラー (PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient TP600, TaKaRa) を用いて行った。反応条件は初期活性化ステップを95 $^{\circ}$ C 9分、次に変性94 $^{\circ}$ C 30秒、アニーリング56.8 $^{\circ}$ C 30秒、伸長72 $^{\circ}$ C 30秒を1サイクルとし、これを40回繰り返した。

3) PCR産物の検出

アガロースゲル電気泳動は、4%ゲル (2.0% TypeII Agarose (SIGMA) + 2.0% Metaphor Agarose (Lonza)) を使用し、PCR産物2 μ Lを0.5 $\times$ TBE緩衝液で100V約90分間泳動した。電気泳動後、GelRed (Biotium) を用いて染色し、UVトランスイルミネーターによる紫外線照射によって可視化した。

マイクロチップ電気泳動 (MultiNA: 島津製作所) は、DNA-500キット (島津製作所) を用いて行った。

結 果

1. DNA抽出法の検討

ポリフェノール類を効率よく取り除くために、改変CTAB法に2種類の前処理工程を加えて、DNA抽出を行い、その結果を表-3に示した。どの品種も方法ごとに同様な傾向が見られたため、全品種の抽出濃度、OD₂₆₀/OD₂₈₀値およびOD₂₆₀/OD₂₃₀値を平均し、Tukey法を用いて多重比較 (p<0.05) した。全品種の抽出濃度の平均は、方法1は44.23 μ g/ μ Lと少ないのに対し、方法2は239.97 μ g/ μ L、方法3は249.47 μ g/ μ Lと有意に多

表-2 品種判別マーカーとして選抜された6種類のSSRマーカー

マーカー名	モチーフ	プライマー配列 (5'-3')		参考文献*
		Forward	Reverse	
GAPU045	(AG) ⁷	ATCGGGAGGGATGTGATGTA	CATCGCATCGCCTGTAAATA	A
GAPU059	(CT) ⁹	CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA	CAAAGGTGCACTTTCTCTCG	A
GAPU071B	GA(AG) ⁶ (AAG) ⁸	GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA	ACAACAAATCCGTACGCTTG	A
UDO99-012	(GT) ¹⁰	TCACCATTTCTTAACCTTCACACCA	TCAAGCAATTCACGCTATG	B
UDO99-024	(CA) ¹¹ (TA) ² (CA) ⁴	GGATTTATTTAAAAGCAAAACATACAAA	CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA	B
ssrOeIGP15	(CA) ⁹ (GA) ²	AGAGGAAGAGTAATGATGAGATC	TATCGCACTCTGTGTGTCTTCC	C

*参考文献A (F. Carriero et al, 2002), B (G. Cipriani et al, 2002), C (F. Sabino et al, 2006)

表ー1 「香オリ3号」「香オリ5号」およびオリーブ188品種・系統のフラグメント解析の結果

品種・系統名	マーカー名						Type*
	GAPU045	GAPU059	GAPU071B	UDO99-012	UDO99-024	ssrOelGP15	
Amellenque	207/208	238/238	145/150	182/182	193/212	200/220	1
Arbequina*	208/210	248/248	148/168	184/192	228/228	220/225	2
Ascolano	207/208	238/238	148/168	182/182	198/212	218/225	3
Azapa	207/210	238/238	148/168	182/184	212/212	218/225	4
Barnea	207/208	238/238	168/171	182/182	214/220	220/220	5
Barnea	208/210	234/238	148/168	190/192	207/212	220/220	6
Barouni	207/208	238/238	150/168	182/190	212/212	220/220	7
Biancollilla	207/208	238/238	145/154	182/192	212/212	218/220	8
Bidh El Hamman	207/208	238/244	150/154	182/190	193/212	218/220	9
Blanqueta	210/221	238/244	148/151	192/192	210/212	220/225	10
Cailler Blanc	207/208	238/238	145/150	182/182	193/212	220/220	1
Cayonne	207/210	238/244	145/148	182/192	198/212	220/220	11
Chemilali	207/208	248/248	150/168	182/184	193/212	220/220	12
Chitoni	207/221	238/240	145/150	184/192	212/218	218/220	13
Cipressino	221/221	234/234	148/154	192/192	212/214	218/220	14
Coratina	207/210	238/238	148/168	182/192	192/212	220/222	15
Correggiola	208/210	234/238	148/168	190/192	207/212	220/220	6
Cucco	207/208	238/238	145/168	182/182	212/212	218/220	16
El Greco	210/210	238/238	148/151	184/192	205/205	220/220	17
Frantoio	208/210	234/238	148/168	190/192	207/212	220/220	6
Gigante di Cerignola	207/207	238/238	144/148	182/182	193/212	218/225	18
Glappolo	208/208	234/238	148/168	182/192	207/212	218/220	19
Hardy's Mammoth I-77	207/210	238/248	148/150	182/192	205/212	212/220	20
I-77	207/208	248/248	145/154	182/184	205/212	220/225	21
Itrana	207/210	238/248	150/168	182/184	212/212	220/220	22
Jumbo Kalamata	207/207	238/238	144/148	182/182	193/212	218/225	18
Kalamata	208/208	234/238	145/150	182/192	212/212	218/220	23
香オリ3号	207/208	234/238	148/168	182/192	212/212	218/220	19
香オリ5号	208/210	238/248	145/168	182/190	193/212	220/225	24
Koroneiki (A)	207/207	234/238	148/154	184/192	212/214	212/220	26
Koroneiki (G)	207/210	234/238	148/154	184/192	212/214	218/220	26
Leccino	208/210	234/238	148/168	182/192	212/212	218/220	27
Lectio del Corno	208/208	234/238	148/168	182/192	207/212	218/220	19
Lucca	208/210	234/238	148/168	190/192	207/212	220/220	6
Lueques	207/210	234/238	150/154	182/182	207/212	212/220	28
Manzanillo	207/210	238/238	148/168	182/182	193/212	220/225	29
Manzanillo (長粒系)	207/210	238/238	168/168	184/190	205/207	218/220	30
Maurino	208/208	234/238	145/150	182/182	193/212	220/220	1
Michellenque Mission	207/210	238/248	145/154	182/182	193/212	218/225	31
Mission USA	207/210	238/238	148/168	182/182	193/212	220/225	29
Nabati Mohassan	207/208	238/238	168/171	182/182	214/220	220/220	5
Negral	207/207	238/238	145/154	182/192	212/212	220/220	32
Nevadillo Blanco	208/210	238/238	148/168	182/184	212/212	220/220	33
Nocellara del Belice	208/208	238/238	168/168	182/192	212/212	218/220	34
Obliza	207/208	238/248	145/154	182/182	193/212	218/225	35

*1:124の多型グループを示す。

*2:アンダーライン：80種類のブライママーの絞り込みに用いた由来の異なる12品種

表-1 (つづぎ)「香オリ3号」「香オリ5号」およびオリープ188品種・系統のフラグメント解析の結果

品種・系統名	マーカー名					Type ^{*)}
	GAPU045	GAPU059	GAPU071B	UDO99-012	UDO99-024	ssrOeGPI15
KN5	208/208	234/238	168/171	182/182	205/205	220/225
KN6	207/210	238/248	148/154	182/190	207/212	220/225
KN7	210/210	238/238	168/168	182/192	212/212	220/220
KN8	208/210	238/238	168/168	182/184	212/214	218/220
KN9	208/208	234/238	145/168	182/184	205/212	220/220
KN10	207/208	234/238	150/171	182/192	205/212	212/225
KN11	207/210	234/238	168/168	182/190	193/207	220/225
KN12	207/208	234/238	145/168	182/190	207/212	218/220
KN13	207/210	238/238	168/168	182/192	212/212	220/220
KN14	207/210	234/248	154/168	182/190	212/212	218/220
KN15	207/208	234/238	148/168	182/192	207/212	220/225
KN16	210/210	238/248	145/148	182/190	207/212	220/225
KN17	210/210	238/248	145/148	182/190	207/212	220/225
KN18	207/208	238/240	145/148	182/192	193/212	220/220
KN19	208/210	234/238	168/171	182/182	220/220	220/220
KN20	210/210	238/248	145/168	182/192	212/212	220/225
KN21	207/210	234/248	154/168	182/190	212/212	218/220
KN22	208/210	238/238	148/168	182/190	193/207	220/225
KN23	207/208	238/248	145/148	182/190	207/212	218/220
KN24	207/210	238/238	168/168	182/192	193/212	218/225
KN25	208/210	234/234	168/168	182/190	212/212	220/225
KN26	207/210	234/238	148/148	182/190	207/212	220/220
KN27	208/210	234/238	145/168	182/190	212/212	218/220
KN28	208/210	238/238	148/168	182/190	193/207	220/225
KN29	208/210	238/238	148/168	182/190	193/207	220/225
KN30	207/210	234/248	145/148	182/190	193/212	212/225
KN31	210/210	238/238	148/168	182/192	207/212	220/225
KN32	207/207	238/238	145/150	182/192	212/212	212/218
KN33	207/207	238/240	148/168	182/190	193/205	220/225
KN34	210/210	234/238	148/168	182/190	193/212	220/220
KN35	210/210	238/238	168/168	182/192	207/212	220/220
KN36	208/210	234/238	154/168	182/190	207/212	220/225
KN37	207/208	238/238	148/148	182/192	198/207	218/220
KN38	207/208	238/238	148/168	182/192	207/212	220/225
KN39	208/210	234/238	148/148	182/190	193/207	220/220
KN40	210/221	238/238	150/154	182/192	212/218	220/225
KN41	207/210	238/238	168/168	182/192	198/207	220/225
KN42	208/210	248/248	148/168	184/192	228/228	220/220
KN43	207/210	238/244	145/148	182/192	198/212	220/220
KN44	208/210	234/238	145/148	182/184	205/205	220/220
KN45	210/221	238/240	150/154	182/184	212/212	212/225
KN46	208/210	248/248	148/168	184/192	228/228	220/220
KN47	207/210	234/238	168/168	182/190	207/212	220/220
KN48	207/210	234/238	148/168	182/190	212/212	220/220
KN49	210/210	234/238	148/148	182/190	207/212	220/220
KN50	208/210	234/238	168/171	182/184	205/212	220/225
KN51	207/208	238/248	145/148	182/190	193/207	220/225

・判別に用いたバンドの塩基数 (bp) を表記した。

・*)124の多型グループを示す。

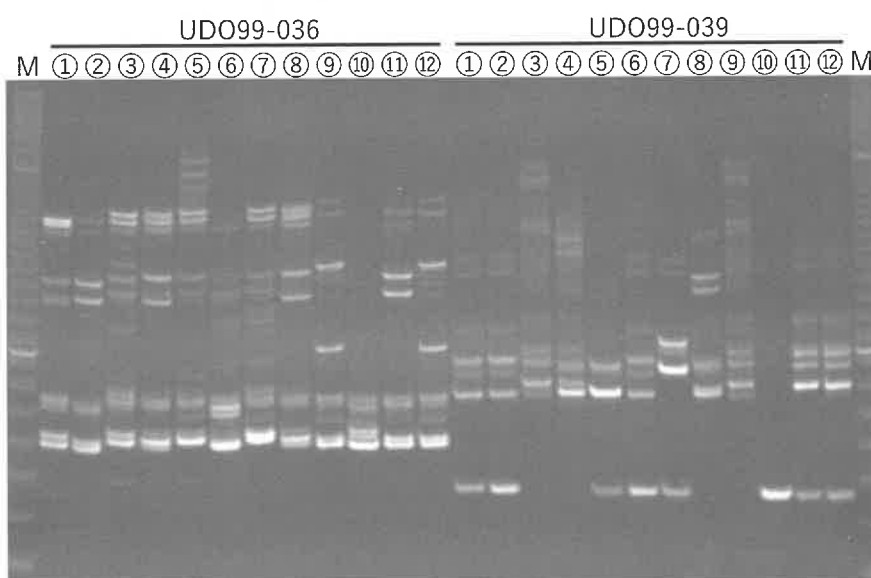
・**)アンダーライン：80種類のプライマーの絞り込みに用いた由来の異なる12品種

表－3 「香オリ3号」「香オリ5号」 および主要4品種のDNA抽出結果

品種名	($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)			$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$			$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$		
	方法1	方法2	方法3	方法1	方法2	方法3	方法1	方法2	方法3
香オリ3号	47.4	196.92	196.69	1.84	2.01	2.0	0.4	1.61	1.77
香オリ5号	35.3	232.76	215.62	2.23	2.00	2.0	0.4	1.93	2.13
Mission	35.2	383.10	399.95	2.27	2.01	2.0	0.4	2.12	2.20
Lucca	49.5	212.80	213.70	2.04	1.99	2.0	0.4	1.79	2.00
Manzanillo	42.1	269.84	277.00	2.15	1.94	1.9	0.5	1.98	2.10
Nevadillo Blanco	56.0	144.41	193.89	1.85	2.00	2.0	0.4	1.57	1.90
全品種の平均	44.23	a 239.97	b 249.47	b 2.06	a 1.99	ab 1.96	b 0.39	a 1.83	b 2.02

各品種のデータは3反復の平均値

異なる英文字間に5%水準で有意差あり (Tukey法 $n=18$)



図－3 マーカーUD099-036およびUD099-039を用いた場合のポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果

①「Arbequina」, ②「Ascolano」, ③「Cipressino」, ④「Coratina」, ⑤「Frantoio」, ⑥「Kalamata」, ⑦「Koroneiki (G)」, ⑧「Leccino」, ⑨「Manzanillo」, ⑩「Picual」, ⑪「Sevillano」, ⑫「Zarza」, Mマーカー

くなった。また、全品種の $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 値の平均は、方法1は0.39と低いのに対し、方法2では1.83と有意に高くなった。方法3では2.02と方法2よりもさらに高純度のDNAが抽出された。

2. 「香オリ3号」および「香オリ5号」を品種判別できるSSRマーカーの選定

まず、由来の異なる12品種を対象に、80種類のSSRマーカー^{3)～5) 9) 11) 20)}を用いてPCRを行い、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で多型を確認できるSSRマーカーを選抜した(図－3)。その結果、15種類のSSRマーカーで多型を確認できた(表－4)。

次に、由来の異なる12品種を対象に、多型を確認できた15種類のSSRマーカーを用いてPCRを行い、フラグメ

ント解析を実施した。そのうちマーカーGAPU071Bを用いた場合の結果を図－4に示す。その結果、6種類のSSRマーカーは波形が安定せず、判定が困難であった。

さらに、188品種・系統を対象に、選抜された9種類のSSRマーカーを用いてPCRを行い、フラグメント解析を実施した。その結果、3種類のマーカーは多型の判定が困難であると考えられ、最終的に6種類のSSRマーカーを品種判別マーカーとして選抜した(表－2)。

これら6種類のSSRマーカーを用いた解析結果より、供試した188品種・系統は、124種類の多型に分類できた(表－1)。一部の品種・系統間で判別できない事例が見られたものの、「香オリ3号」および「香オリ5号」については、他のすべての品種・系統とは異なる多型を示した。

表-4 多型が得られた15マーカーのポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果

マーカー名 \ 品種名	Arbequina	Ascolano	Cipressino	Coratina	Frantoio	Kalamata	Koroneiki (G)	Leccino	Manzanillo	Pical	Sevillano	Zarza
EMO88	B	AC	B	A	D	A	B	— *	B	B	A	A
EMO90	BC	B	C	BC	BC	BD	BC	BC	B	A	A	A
GAPU045	B	AB	C	AB	BC	BD	A	BC	AB	B	AB	B
GAPU059	D	C	A	C	BC	BC	BC	BC	C	CD	C	C
GAPU071B	BE	BE	BC	BE	BE	AC	BD	BE	BE	AD	AE	BE
GAPU090	A	B	A	A	B	AB	A	B	AB	B	B	B
UDO99-006	E	C	D	AC	AD	BC	AE	A	E	E	C	AC
UDO99-008	B	C	D	B	AB	BC	C	A	C	B	C	C
UDO99-012	BC	AB	C	AC	C	AC	BC	AC	AB	A	A	A
UDO99-015	B	D	C	AC	C	A	C	C	B	A	A	AB
UDO99-024	D	BC	C	AC	C	C	C	C	B	C	C	C
UDO99-042	B	A	BC	B	C	AC	B	B	A	B	AB	A
ssrOeUA-DCA13	C	A	C	B	B	B	C	B	C	B	C	C
ssrOeUA-DCA15	AC	AC	AC	A	AC	C	C	BC	BC	AB	AC	AB
ssrOeIGP15	B	BC	B	B	B	B	AB	B	BC	BC	B	B

判別に用いたバンドのうち塩基配列の短いものからABCDEと表記した。

*PCR増幅産物が得られなかった。

GAPU071B

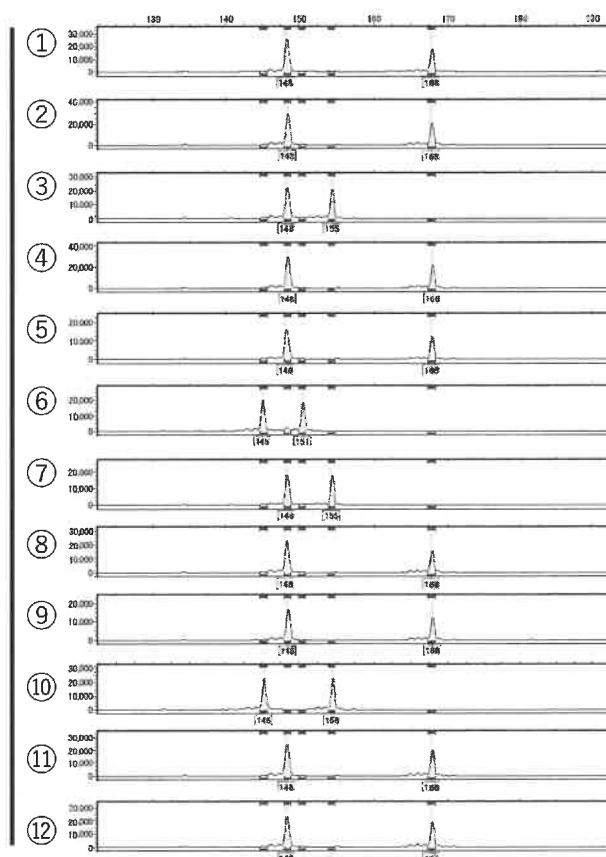


図-4 マーカーGAPU071Bを用いた場合のフラグメント解析の結果

- ①「Arbequina」, ②「Ascolano」, ③「Cipressino」, ④「Coratina」, ⑤「Frantoio」, ⑥「Kalamata」, ⑦「Koroneiki (G)」, ⑧「Leccino」, ⑨「Manzanillo」, ⑩「Pical」, ⑪「Sevillano」, ⑫「Zarza」

3. アガロースゲルまたはマイクロチップ電気泳動を用いた品種判別

アガロースゲル電気泳動を用いた場合、供試した6種類のマーカー（表-2）のうち4種類のマーカーで、多型が検出された（表-5、図-5）。GAPU045およびssrOelGP15の2種類のマーカーでは、いずれの品種も判別できなかった。多型が検出された4種類のマーカーのうちGAPU071Bでは、「香オリ3号」「香オリ5号」「Mission」が判別でき、残り3品種が1つの集団に分かれた。残り3品種についてUDO99-024を用いると、「Lucca」「Manzanillo」「Nevadillo Blanco」が判別できた。つまり本法では、2種類のマーカーGAPU071Bおよび

UDO99-024を用いることで、香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」および国内で栽培されている主要4品種「Mission」「Lucca」「Manzanillo」「Nevadillo Blanco」の計6品種が判別可能であった（図-6）。

マイクロチップ電気泳動を用いた場合、供試した6種類のマーカーすべてで多型が検出された（表-6、図-7）。そのうちGAPU071Bでは、アガロースゲル電気泳動による検定と同様に、「香オリ3号」「香オリ5号」「Mission」が判別でき、残り3品種が1つの集団に分かれた。残り3品種についてUDO99-024を用いると、「Manzanillo」が判別でき、残り2品種が1つの集団に分かれた。残り2品種についてUDO99-012を用いると、

表-5 「香オリ3号」「香オリ5号」および主要4品種のアガロースゲル電気泳動の結果

品種／マーカー名	GAPU045	GAPU059	GAPU071B	UDO99-012	UDO99-024	ssrOelGP15
香オリ3号	180	210	135/150	170/180	170/180	195
香オリ5号	180	215	125/150	170/180	170/185	195
Mission	180	215	125/135	170	170/185	195
Lucca	180	210	130/150	180	180/185	195
Manzanillo	180	215	130/150	170	170/185	195
Nevadillo Blanco	180	215	130/150	170	185	195

判別に用いたバンドの塩基数（bp）を表記した。

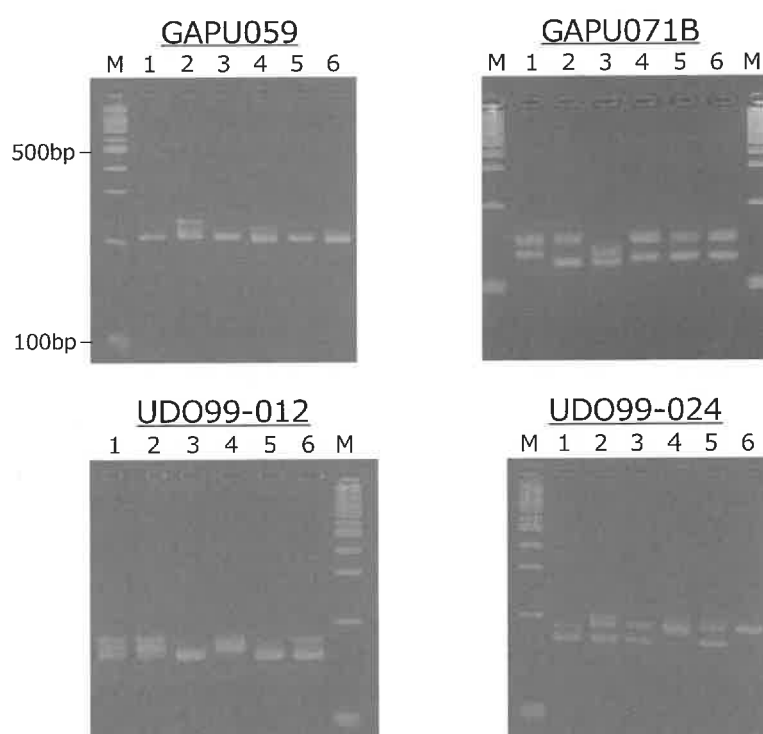


図-5 アガロースゲル電気泳動の結果

1「香オリ3号」、2「香オリ5号」、3「Mission」、4「Lucca」、5「Manzanillo」、6「Nevadillo Blanco」、Mマーカー

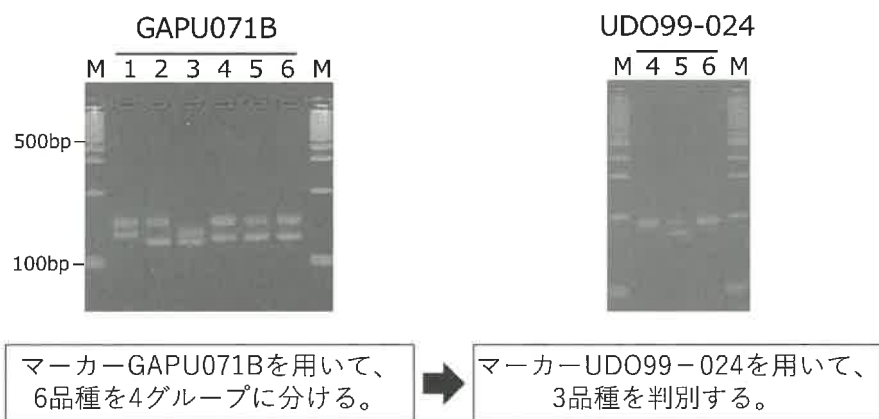


図-6 アガロースゲル電気泳動による品種判別のながれ

1「香オリ3号」、2「香オリ5号」、3「Mission」、4「Lucca」、5「Manzanillo」、6「Nevadillo Blanco」、Mマーカー

表-6 「香オリ3号」「香オリ5号」および主要4品種のマイクロチップ電気泳動の結果

品種／マーカー名	GAPU045	GAPU059	GAPU071B	UDO99-012	UDO99-024	ssrOelGP15
香オリ3号	184	212	128	156/163	168	193
香オリ5号	184/199	214	121/161	156/163	168/187	193/200
Mission	184	214	121/128	156	168/187	193
Lucca	184/199	212	124/161	163	187	193
Manzanillo	184	214	124/161	156	168/187	193
Nevadillo Blanco	184/199	214	124/161	156/ (163)	187	193

判別に用いたバンドの塩基数 (bp) を表記した。

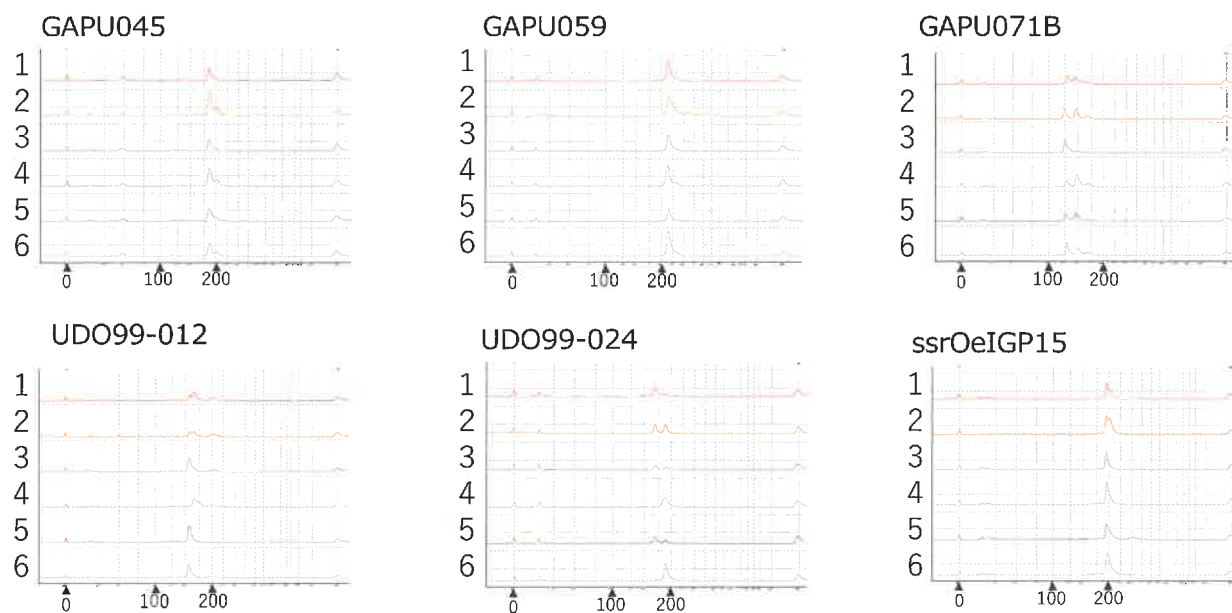


図-7 マイクロチップ電気泳動の結果

1「香オリ3号」、2「香オリ5号」、3「Mission」、4「Lucca」、5「Manzanillo」、6「Nevadillo Blanco」

「Lucca」「Nevadillo Blanco」が判別できた。つまり本
法では、3種類のマーカーGAPU071B、UDO99-024お
よびUDO99-012を用いることで、前述の6品種が判別

可能であった(図-8)。

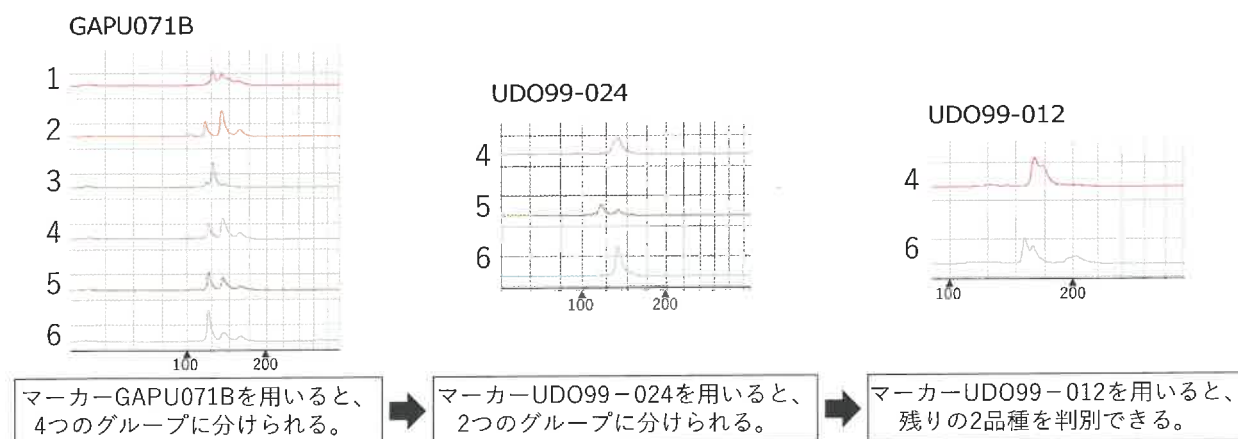


図-8 マイクロチップ電気泳動による品種判別のながれ

1 「香オリ3号」、2 「香オリ5号」、3 「Mission」、4 「Lucca」、5 「Manzanillo」、6 「Nevadillo Blanco」

考 察

改変CTAB法を利用した植物からのDNA抽出は、陽イオン性の界面活性剤CTABのもつ選択的な沈殿効果を利用したものである。CTABと核酸の複合体は、塩濃度が0.5Mより低くなった場合にのみ沈殿を生ずる。そこで、塩濃度を保持した状態で、CTABとタンパク質・多糖類の複合体を除去したのち、塩濃度を低下させCTABと核酸の複合体を析出させるとというのがこの手法の原理である^{1) 13)}。しかしオリーブは、ポリフェノール類などの抽出阻害物質を多く含むことから、他の植物と比較してDNAの抽出効率が悪く、大量のサンプルから少量のDNAしか抽出できない。一方、木本植物からのDNAの単離は、酸化防止剤とポリアミンを用いた別の方法が報告されており¹⁵⁾、水溶性ポリマであるポリエチレングリコール (PEG) で多糖類を除き、次に陰イオン性の界面活性剤SarcosineでDNAを抽出するというものである。そこで本研究ではDNAの抽出効率を上げるために、改変CTAB法にポリフェノール類を取り除くための前処理工程として、PEGで多糖類を除く原理を取り入れた。その結果、どの品種も同様にDNAの抽出効率が質・量ともに大幅に改善された (表-3)。

吸光度260nm (OD_{260}) は核酸、吸光度230nm (OD_{230}) はポリフェノール類や多糖類等の吸収極大であり、 OD_{260}/OD_{230} 値が1.8以上であれば高純度なDNAといえる^{6) 7) 12) 24)}。このことから、前処理工程によりこれらの抽出阻害物質が取り除かれた結果、抽出濃度も高くなったと考えられた。また、Tukeyの多重比較 ($p < 0.05$) で、方法2と方法3の間でDNAの抽出濃度に有意差はなかったが、 OD_{260}/OD_{230} 値では有意差があったことか

ら、洗浄処理を常温で行うよりも45℃で行うほうが、より純度の高いDNAが得られると考えられた。本抽出法を利用することで、従来の10分の1量のサンプルからでも高濃度・高純度のDNAを安定して抽出できるようになった。

SSR (単純反復配列: Simple Sequence Repeat) とは、1塩基から数塩基の長さのDNAが繰り返している領域のことである。SSRマーカーを用いた解析では、この領域を挟み込むように設計したプライマーを用いてPCRを行い、電気泳動によって、DNAの繰り返し数の違いを長さの差 (多型) として検出する。SSRマーカーの利点は、多型性が非常に高く遺伝的に近い個体間でも差異が得やすいこと、ゲノム中に豊富に存在すること、共優性であることなどが挙げられる^{2) 18) 25)}。欠点は、対象とする生物ごとにマーカーを開発する必要があること、マーカー開発に時間と労力がかかることなどが挙げられる^{2) 18) 25)}。これまでにオリーブでは、系統分類等を目的とした80種類のSSRマーカーが既に開発されている^{3) ~5) 9) 11) 20)}。本研究では、香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」の品種登録に伴い、既報の80種類のSSRマーカーの中から、これら新品種を他の品種・系統と判別可能なものを選抜した。それらのマーカーを用いたフラグメント解析では、一部の品種・系統間で判別できない事例が見られたものの、「香オリ3号」および「香オリ5号」は、他のすべての品種・系統とは異なる多型を示した (表-1)。このことから、国内で栽培される可能性のある苗木について、精度の高い品種判別が可能になった。今後、新たに品種が導入された場合は、その品種の多型を調査する必要があると考えられる。

SSRマーカーを用いた品種判別では、一般的に蛍光フラグメントアナライザを用いてフラグメント解析を行う

ことが多い。本装置は検出能力が高く1塩基長の違いまで確認できる一方、当該装置を用いない他の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などの難点も有している。そこで、現場レベルでの実施を想定し、より安価で効率的な品種判別法を検討した。選抜した6つのSSRマーカー（表-2）を用いて、香川県育成品種「香オリ3号」「香オリ5号」および国内で栽培されている主要4品種「Mission」「Lucca」「Manzanillo」「Nevadillo Blanco」の計6品種（図-1）を対象にPCRを行い、アガロースゲルまたはマイクロチップを用いた電気泳動で多型の検出を行った。その結果、アガロースゲル電気泳動では4マーカー、マイクロチップ電気泳動では6マーカーすべてで多型が検出された（表-5, 6, 図-5, 7）。さらにそれぞれの方法について、前述した6品種の品種判別に必要な最少マーカーセットを検討した結果、それぞれ2つまたは3つのSSRマーカーを組み合わせることで、アガロースゲルまたはマイクロチップを用いた電気泳動法でも品種判別が可能となった（図-6, 8）。アガロースゲル電気泳動は一般的に検出精度が低いとされているが、本研究では標準的なアガロースの2倍の分解能を発揮し20bp~800bpの断片の微細分離が可能なMetaphor Agarose（Lonza）を使用した4%ゲルで実施したことで、精度の高い分析が可能となった。一方でマイクロチップ電気泳動は、検出精度は高く6マーカーすべてで多型が検出されたものの、特定領域の微細分離能は今回使用したアガロースゲルのほうが高く、6品種の品種判別に必要な最少マーカーセット数がアガロースゲル電気泳動よりも多くなってしまったと考えられた。最少マーカーセット数の違いはあるものの、両方法とも前述した6品種の品種判別には問題なく導入できる方法だと考えられた。

本研究では、蛍光フラグメントアナライザ、アガロースゲルおよびマイクロチップ電気泳動の3つの手法を用いた品種判別法を確立した。それぞれの品種判別能力、費用等を考慮した結果、6品種以外を対象とする場合やコストが高くなったとしてもより確実に品種判別を実施する必要がある場合は蛍光フラグメントアナライザ、それ以外の場合ではアガロースゲルおよびマイクロチップ電気泳動が適していると考えられた。実際に品種判別を行う場合は、実施頻度や作業員の熟練度等、現場の状況に応じて手法を使い分けることが望まれる^{9) 21) 22)}。そして、本研究で開発された品種判別法が香川県の知的財産である育成品種の保護に活用されることで、競争力強化や苗段階での異品種混入に対する抑止力として有効な手

段になると考えられる。

引用文献

- 1) Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl (1987) : "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York.
- 2) DNA品種識別技術検討会 (2003) : 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—
- 3) F. Carriero, G. Fontanazza, F. Cellini, G. Giorio (2002) : Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). Theor Appl Genet 104 : 301-307.
- 4) F. Sabino Gil, M. Busconi, A. Da Camara Machado and C. Fogher (2006) : Development and characterization of microsatellite loci from *Olea europaea*. Molecular Ecology Notes 6, 1275-1277.
- 5) G. Cipriani, M. T. Marrazzo, R. Marconi, A. Cimato, R. Testolin (2002) : Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. Theor Appl Genet 104 : 223-228.
- 6) Glasel, J. A. (1995) : Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. Biotechniques 18 : 62-63.
- 7) Huberman, J. A. (1995) : Importance of measuring nucleic acid absorbance at 240 nm as well as at 260 nm and 280 nm. Biotechniques 18 : 636.
- 8) 飯牟禮和彦・齋藤彰 (2016) : 単純反復配列 (SSR) マーカーによる湿地性白色カラー新品種「熊本FC01」「熊本FC02」及び既存5品種間の識別, 熊本県農業研究センター研究報告第23号 : 17-24.
- 9) 池上英利・野方仁・栗村光男・平島敬太 (2010) : 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, 福岡県農業総合試験場研究報告第29号 : 65-69.
- 10) 門田有希 (2017) : 農作物・食品の品種判別検査技術の開発 日本大切な品種を守るために, 科化学と生物Vol.55, 12, 817-824.
- 11) K. M. Sefc, M. S. Lopes, D. Mendonca, M. Roderiges Dos Santos, M. Laime Da Camara Machado, and A. Da Camara Machado (2009) : Identification of

- microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology* 9, 1171-1193.
- 12) Manchester, K.L. (1995) : Value of A260/A280 Ratios for the Measurement of Purity of Nucleic Acids. *Biotechniques* 19 : 208-210.
- 13) 光永伸一郎・宮村祥代・下村正彦 (2004) : クリ緑葉からのゲノムDNAの単離, 上越教育大学研究紀要第23巻第2号 : 741-751.
- 14) 水谷亮介・久保有司・山下泰生・田中利幸・窪田健康・森末文徳 (2020) : オリーブ新品種 '香オリ3号' および '香オリ5号' のSSRマーカーを用いた品種識別技術の開発, 園学研19別1 : 276
- 15) 向井譲・山本直樹 (1995) : 木本植物のDNA・RNA単離法, "植物のPCR実験プロトコール", 秀潤社, 東京, 93-117
- 16) 村上恭子・河田和利・本田雄一 (2014) : コムギ使用加工食品からのDNA抽出法と「さぬきの夢2009」品種判別法の開発, 香川農試研報第64号 : 25-38.
- 17) 大橋義孝・小野勇治・木幡栄子・岡田初彦・佐藤守・木村鉄也・西谷千佳子・山本俊哉 (2012) : モモの品種識別技術の開発, 福島農総セ研報第4号 : 29-38.
- 18) 大橋義孝・小野勇治・木幡栄子・岡田初彦・佐藤守・山口正己・西谷千佳子・山本俊哉 (2012) : モモの品種識別技術の開発, 福島農総セ研報第4号 : 39-52.
- 19) Porebski S., Bailey L.G. and Baum B.R. (1997) : Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15 (1) : 8-15.
- 20) R. De La Rosa, C. M. James and K. R. Tobutt (2002) : Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology Notes*, doi : 10.1046.
- 21) 高嶋康晴 (2010) : 全自動電気泳動装置を用いたDNA分析の導入検討, 独立行政法人農林水産消費安全技術センター食品関係等調査研究報告, 34 : 7-14.
- 22) 谷本秀夫・古川真・布目司・福岡浩之 (2006) : SSRマーカーによるナス品種識別法の開発, 大阪食とみどり技セ研報第42号 : 5-10.
- 23) 植田早紀・多田寿和子・村上恭子 (2021) : オリーブ新品種 '香オリ3号' および '香オリ5号' のSSRマーカーを用いた効率的かつ安価な品種識別法の開発, 園学研20別1 : 203
- 24) Warburg, O. and W. Christian. (1942) : Isolation and crystallization of Enolase. *Z. Biochem.* 310 : 384-421.
- 25) 山本俊哉 (2004) : クリのSSRマーカー, 植生史研究第12巻第1号 : 47-52
- 26) 山下泰生・窪田健康・柴田英明・田中利幸・米澤晃子・柴崎博行 (2018) : オリーブ新品種 '香オリ3号', '香オリ5号' の特性, 園学研17別2 : 571