

オリーブ新品種「香オリ3号」と「香オリ5号」の DNAを使った品種判別

生産環境部門 植田早紀、村上恭子 小豆オリーブ研究所 多田寿和子
農林水産省 水谷亮介

オリーブ新品種「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な4品種（「ミッション」、「ルッカ」、「マンザニコ」、「ネバディロ・ブランコ」）の計6品種について、品種判別が可能になりました。判別には、DNAの少しの違いを検出できるSSRマーカーを使います。

1 はじめに

香川県のオリジナル品種「香オリ3号」（写真1）および「香オリ5号」（写真2）は、国内初のオリーブ新品種として令和3年3月に品種登録されました。県では産地化を目指し同年2月から苗木の配布を開始しました。

一方、オリーブは目視で正確に品種判別することが難しく、苗木の取り違え等による生産現場での混乱が想定されます。これに備えるためには、科学的な品種判別技術を用意しておく必要があります。そこで、6つのSSRマーカーを開発し、それらを用いて、低コストで効率的に品種を判別する方法を確立しました。



写真1 「香オリ3号」



写真2 「香オリ5号」

〈間違いこそが「かぎ」～みんなちがって、みんないい〜〉

DNAは遺伝情報の担い手で、A、T、G、Cのたった4種類の文字で書かれた暗号文のようなものです。この暗号文(DNA)をよく見ると、ところどころに「CACACACA・・・」のような、文字が繰り返されている部分があります。この繰り返しのことを「**単純反復配列(SSR: Simple Sequence Repeat)**」といいます。この単純反復配列(SSR)は、作物の品種や系統によって繰り返し数に違いがあります。例えば、A品種は「CACACA」と3回繰り返しがあるけれど、B品種は「CACA」と2回しか繰り返さないという具合です。これは、暗号文を写すときに時々起こる小さな読み間違いの結果で、遠い親戚ほど間違いの数が多くなります。

2 研究結果の概要

1) SSR マーカーの開発

【材料および方法】

- (1) 供試品種・系統：小豆オリーブ研究所に植栽されている既存 62 品種および本県が育成した 131 系統（新品種 2 品種を含む）の計 193 品種・系統
- (2) 供試マーカー：既報の 80 種類のオリーブ由来の SSR マーカー
- (3) マーカーの選抜：全供試品種・系統を対象に、蛍光フラグメントアナライザーによる分析を実施し、DNA 型の決定、比較分析を行いました。

【結果および考察】

供試した 80 種類のマーカーから、品種判別に利用可能な 6 種類の SSR マーカーを選抜しました(表 1)。

表1 選抜された6種類のSSRマーカー

マーカー名	識別できるモチーフ*
GAPU045	(AG) ₇
GAPU059	(CT) ₉
GAPU071B	GA(AG) ₆ (AAG) ₈
UDO99-012	(GT) ₁₀
UDO99-024	(CA) ₁₁ (TA) ₂ (CA) ₄
ssrOeIGP15	(CA) ₉ (GA) ₂

*例えば、モチーフ(AG)₇は、「AGAGAGAGAGAG」のように AG が 7 回繰り返されていることを表します。GAPU045 マーカーを使用することで、品種・系統間での AG の繰り返し数の違いを識別することができます。

選抜した 6 種類の SSR マーカーを用いた分析を行った結果、供試した 193 品種・系統は、124 種類の DNA 型に分類されました。一部の品種・系統では、識別ができないケースが見られたものの、「香オリ 3 号」および「香オリ 5 号」については、他の品種・系統と異なる DNA 型を示し、品種判別が可能になりました。

〈大切なのは「誰でもできる」を目指すこと！〉

SSR は、暗号文 (DNA) 中に数多く存在するため、とても有用です。しかし、「CACACA」と「CACA」の文字数の差が 2 文字しかないように、繰り返し数の違いから生じる文字数の差が小さいため、SSR マーカーを利用した解析には、通常**蛍光フラグメントアナライザー**という特別な機械を用いる必要があります。これが大きな欠点となっています。

そこで、比較的容易に利用できる、**アガロースゲル電気泳動**を用いた方法を確立しました。その結果、SSR マーカーを使用して、低コストで効率的にオリーブを品種判別することが可能になりました。

*専門的な用語では A、T、G、C の 4 種類の文字のことを塩基といい、文字数のことを塩基長 (bp) といいます。

2) アガロースゲル電気泳動を用いた品種判別法の開発

【材料および方法】

- (1) 供試品種：国内で栽培されている主要 4 品種（「ミッション」「ルッカ」「マンザニロ」「ネバディロ・ブランコ」）および本県が育成した 2 品種（「香オリ 3 号」「香オリ 5 号」）の計 6 品種
- (2) DNA 抽出：令和 2 年 4、5 月に展開した新芽 50 mg から改変 CTAB 法を用いてゲノム DNA を抽出し、PCR の鋳型としました。
- (3) PCR：開発した SSR マーカー（GAPU045, GAPU059, GAPU071B, UDO99-012, UDO99-024, *ssrOelGP15*）を用いて PCR を行いました。
- (4) 電気泳動：4%ゲルを使用して、0.5×TBE バッファーで 100V 約 90 分間泳動しました。バンドの検出は、ゲルレッド染色、トランスイルミネーターによる紫外線照射により行いました。

【結果および考察】

予想された位置にバンドが確認できました。目視により品種判別可能なマーカーを検討し（図 1）、すべてのマーカーについて結果をまとめました（表 2）。135/150 のような表記は、135bp と 150bp の 2 つの塩基長のバンドを品種判別のために使用することを表しています。

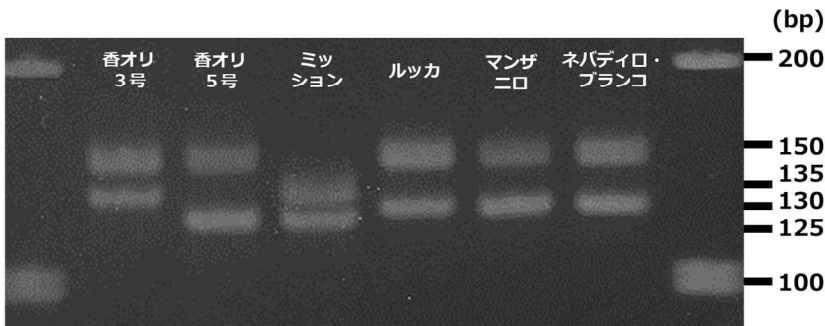


図 1 「GAPU071B」を用いた場合のアガロースゲル電気泳動の例
塩基長(bp)の短いものほど図の下側に位置します。

表2 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	<i>ssrOelGP15</i>
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
ミッション	180	215	125/135	170	170/185	195
ルッカ	180	210	130/150	180	180/185	195
マンザニロ	180	215	130/150	170	170/185	195
ネバディロ・ブランコ	180	215	130/150	170	185	195

*標記の数字は、品種判別に使用するバンドの塩基長（bp）を表しています。

GAPU071B では、「香オリ 3 号」、「香オリ 5 号」、「ミッション」が判別され、残り 3 品種が 1 つの集団に判別されました。GAPU045 および *ssrOelGP15* では、いずれの品種も判別できませんでした（表 2）。

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、県内で栽培されているオリーブ6品種を判別できることが確認されました（図2）。

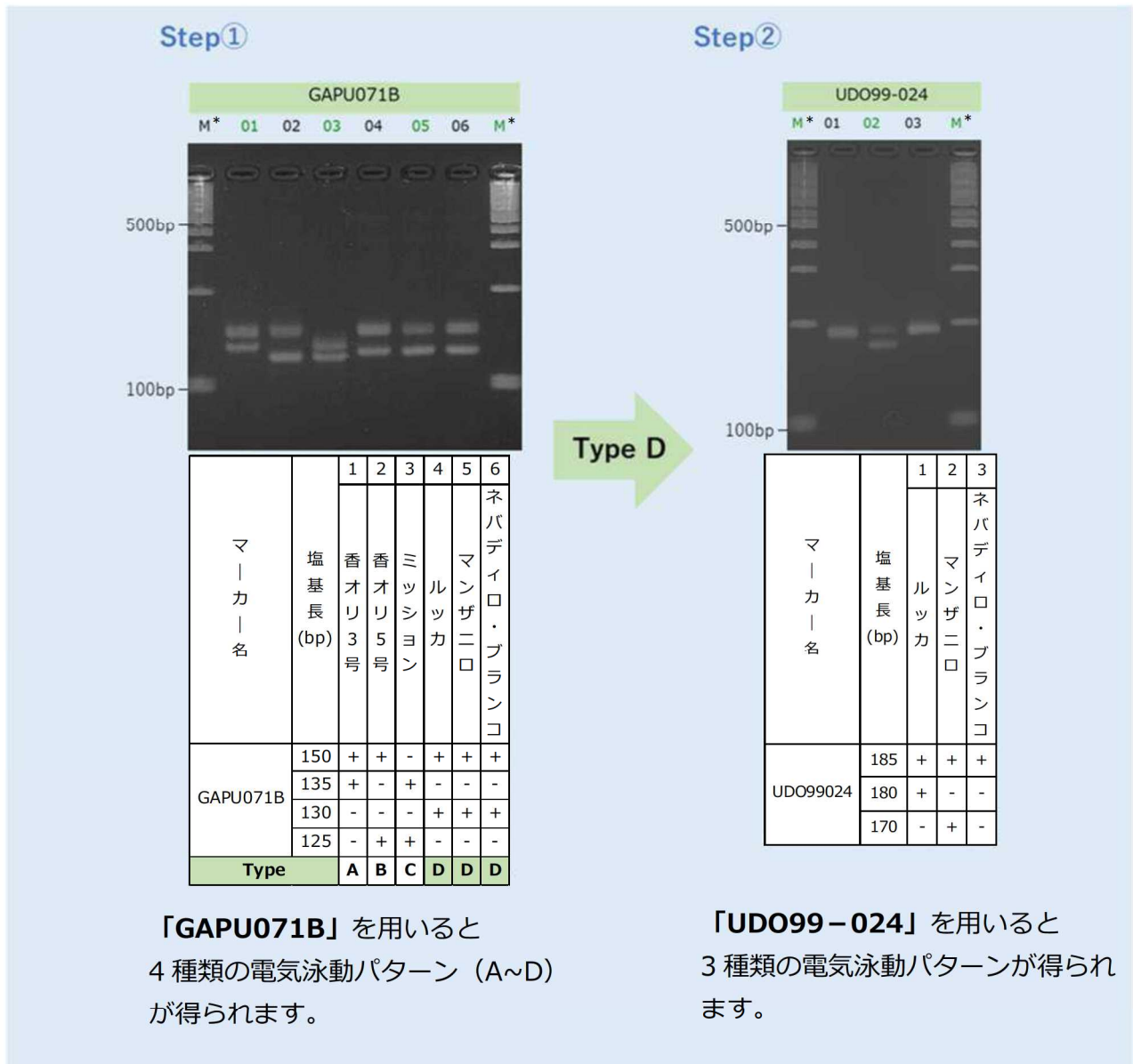


図2 アガロースゲル電気泳動を用いた品種判別の流れ

*図中のMは、塩基長（bp）を測る標準サンプルです。

3 成果の活用方法

今回開発した品種判別法は、苗木の取り違え等による生産現場での混乱防止ならびに流通現場での不正表示の抑止を目的とした科学的な品種判別技術として活用可能です。

4 成果の詳細について

この試験研究の詳細は、園芸学研究第20巻別冊1（令和3年発行）に掲載されています。