

ノート

近年沖縄県で育成されたパインアップル品種・系統の レトロトランスポゾン挿入多型 (RBIP) マーカーによる品種識別技術

伊礼 彩夏¹・小林 拓也²

¹沖縄県農業研究センター

²沖縄県農業研究センター名護支所

要 約

沖縄県で近年育成されたパインアップル品種「沖農 P17」(サンドルチェ[®]), 「沖農 P19」(ホワイトココ[®])を含む 17 品種・系統について, 34 種類のレトロトランスポゾン挿入多型 (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism, 以下, RBIP) マーカーを用いて, 遺伝子型を調査した. その結果, 各 RBIP マーカーは, 品種・系統間で PCR 増幅バンドの有無が異なり, その組み合わせにより 17 品種・系統が識別できた. また, 奈島ら (2015) により報告されている 24 品種を加えた合計 41 品種・系統でも識別可能であり, 識別に必要な最少マーカー数は, 8 種類であった. これらの情報は, 育成者の権利保護のための品種識別に活用できる.

キーワード: 登録品種, 権利保護, DNA マーカー, PCR, 最少マーカー数

緒 言

パインアップルのゲノム配列に基づいた品種識別は, 育成品種保護や研究現場における品種管理等で重要である. 改正種苗法 (2020 年 12 月 2 日成立, 農林水産省, 2020) に基づいて登録された品種は, 育成者権が保護されるとともに, 第三者による無許可での経済栽培や自家増殖, それに伴う種苗の販売は禁止されている. 2024 年 8 月時点で, 沖縄県が育成者権を持つ登録品種は, 「ゴールドバレル」, 「ジュリオスター」, 「沖農 P17」(サンドルチェ[®]), そして「沖農 P19」(ホワイトココ[®]) の 4 品種である (農林水産省品種登録ホームページ). 育成者権の権利侵害が疑われる際には, 形質の特性比較や比較栽培試験が行われるが, 環境要因に影響されない信頼性の高い方法として DNA マーカーによる品種識別がある.

パインアップルの品種識別に利用可能な DNA マーカーには, 高精度で判定できる共優性の Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーがある (Shoda *et al.*, 2012, Nashima *et al.*, 2020). SSR マーカーは, 識別に加えて交配親が推定できる利点があるが, その検出には, DNA シークエンサーなどの高額精密機器が必要であり, 設備の無い育種・研究現場や生産現場での利用は困難な場面が多い. そのため, 高額な分析機器を必要とせず, 迅速・簡便で再現性の高い品種識別技術が求められている.

迅速・簡便な品種識別法の一つにレトロトランスポゾン挿入多型に基づく DNA マーカー (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism markers, 以下 RBIP マーカー) がある. レトロトランスポゾンは真核生物のゲノム内に存在する可動遺伝因子であり, 自身をコピー後新たなゲノム配列に挿入されるコピーアンドペースト型の

複製を行う. 複製配列はゲノム上に多数存在しており, ゲノム内に挿入された後は安定的に遺伝する (Kumar and Hirochika, 2001). RBIP マーカーでは, 複製配列の有無が PCR 増幅産物の有無として検出可能であり (Flavell *et al.*, 1998), 迅速・簡便かつ再現性に優れた品種識別 DNA マーカーとして近年多くの作物で報告されている. 例として, ニホンナシ (Kim *et al.*, 2012), リンゴ (西谷ら, 2016), マンゴー (Nashima *et al.*, 2017, 奈島ら, 2018), イチゴ (Monden *et al.*, 2014), カンキツ (Okamoto *et al.*, 2023) などの品目がある.

パインアップルでは沖縄県育成品種「N67-10」のゲノム情報を基に, 34 種類の RBIP マーカーが開発され, そのうち 6 種類を用いることで, 沖縄県育成 7 品種, 導入品種 17 品種・系統, 計 24 品種の識別が可能であることが報告されている (奈島ら, 2015). しかし, 近年沖縄県で育成された登録品種である「沖農 P17」(サンドルチェ[®]), 「沖農 P19」(ホワイトココ[®]) や交配親として用いられている新たな育成系統は含まれていない. 登録品種の権利保護や品種管理のためには, これらの品種・系統の遺伝子型や識別可否を調査するとともに, 識別に必要な RBIP マーカー数や組合せを把握する必要がある.

本研究では, 沖縄県で近年育成された品種を含む 17 品種・系統の遺伝子型を新たに調査する. また, 既報の 24 品種を加えた計 41 品種・系統を識別可能な最少マーカー数および組合せを明らかにする.

材料および方法

供試材料および DNA 抽出

供試材料は沖縄県農業研究センター名護支所で育成さ

れた登録品種の「沖農 P17」(サンドルチェ®),「沖農 P19」(ホワイトココ®),そして、育成系統の沖縄 9 号, 沖縄 11 号, 沖縄 12 号, 沖縄 13 号, 沖縄 14 号, 沖縄 18 号, 沖縄 20 号, 沖縄 21 号, 沖農 P22, 沖縄 23 号, 沖縄 24 号, 沖縄 25 号, 沖縄 26 号, 沖縄 27 号, 沖縄 28 号の計 17 品種・系統を用いた。各品種・系統の若葉の基部組織から、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA は NanoDrop2000c (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度と純度を測定した。

PCR 条件および RBIP マーカーの検出

プライマーセットは奈島ら (2015) が開発した JPACRBIP0001 ~ JPACRBIP0034 の 34 種類を用いた。各 RBIP マーカーは、PCR 増幅産物が 209 ~ 335bp になるように設計されている。DNA ポリメラーゼは KOD FX (TOYOBO LIFE SCIENCE) を用いた。また、陽性コントロールとして、葉緑体ゲノムコード遺伝子 *rbcl* (Forward 5' -ATGTCACCACAAACAGAAAC-3', Reverse 5' -GTAAAATCAAGTCCACCRG-3') を用いた。PCR 反応液の組成は、12.5 μ L の 2 $\times$ PCR Buffer, 5 μ L の dNTPs (2mM each), RBIP マーカーのプライマー各 1 μ L (5 pmol), KOD 0.25 μ L, 陽性コントロールプライマー各 0.5 μ L (0.75 pmol) に 1 μ L の DNA 溶液を加え、超純水を用いて総量を 25 μ L とした。PCR 増幅条件は、94 $^{\circ}$ C で 2 分の熱変性後、94 $^{\circ}$ C, 1 分, アニーリング 55 $^{\circ}$ C, 1 分, 伸長反応 72 $^{\circ}$ C, 1 分間を 1 サイクルとして 40 サイクル、

最終伸長反応は 72 $^{\circ}$ C で 2 分行った。PCR 増幅産物は 1.5 %アガロースゲルを用いて、100 V, 30 分間の電気泳動 (0.5 $\times$ Tris-Borate-EDTA buffer) を行い、臭化エチジウムでゲル染色後、紫外線下 (354 nm) で増幅産物を検出した。

最少マーカー数の決定

本試験で供試した 17 品種・系統と、奈島ら (2015) により遺伝子型が明らかにされている 24 品種を加えた合計 41 品種・系統の遺伝子型データを用いた (表 1)。識別に必要な最少マーカー数は、最も少ないマーカー数で、すべての品種を判別するためのマーカーセットを検出するコンピュータプログラム MinimalMarker (Fujii *et al.*, 2013) を用いて決定した。

結果および考察

17 品種・系統を供試し陽性コントロールと RBIP マーカーを同時検出した。RBIP マーカー JPACRBIP0001 を用いた結果を図 1 に示す。陽性コントロールは全ての品種・系統で目的のサイズ (約 600 bp) 付近で検出された。34 種類の RBIP マーカーを用いて、17 品種・系統の遺伝子型を調査すると、各 RBIP マーカーの目的サイズのバンドの有無が品種・系統間で異なっており、識別可能であった (表 1)。RBIP マーカーは優性マーカーであるため、PCR 反応がうまくいかない場合、偽陰性と判定されるリスクがある。しかし、

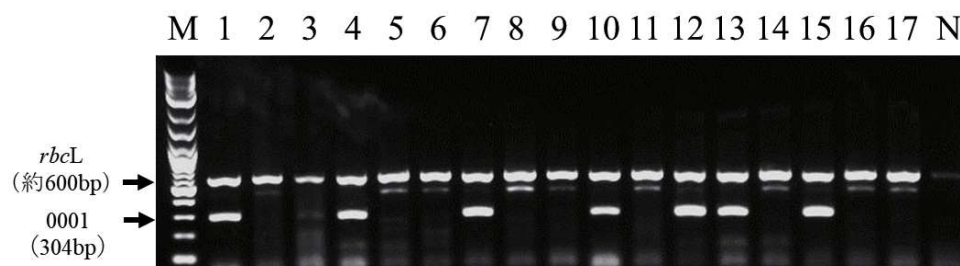


図1. 供試した17品種・系統におけるRBIPマーカーJPACRBIP0001 (304bp)と*rbcl* (約600bp)の同時検出

M: 1 kb Plus DNA Ladder (New England Biolabs), 1: 沖縄 9 号, 2: 沖縄 11 号, 3: 沖縄 12 号, 4: 沖縄 13 号, 5: 沖縄 14 号, 6: 「沖農 P17」(サンドルチェ®), 7: 沖縄 18 号, 8: 「沖農 P19」(ホワイトココ®), 9: 沖縄 20 号, 10: 沖縄 21 号, 11: 沖農 P22, 12: 沖縄 23 号, 13: 沖縄 24 号, 14: 沖縄 25 号, 15: 沖縄 26 号, 16: 沖縄 27 号, 17: 沖縄 28 号, N: ネガティブコントロール (H₂O).

表1. バインアップル41品種・系統における34種類のRBIPマーカーの遺伝子型判定

No. 品種・系統名	マーカー名	JPACRBIP0001	JPACRBIP0002	JPACRBIP0003	JPACRBIP0004	JPACRBIP0005	JPACRBIP0006	JPACRBIP0007	JPACRBIP0008	JPACRBIP0009	JPACRBIP0010	JPACRBIP0011	JPACRBIP0012	JPACRBIP0013	JPACRBIP0014	JPACRBIP0015	JPACRBIP0016	JPACRBIP0017	JPACRBIP0018	JPACRBIP0019	JPACRBIP0020	JPACRBIP0021	JPACRBIP0022	JPACRBIP0023	JPACRBIP0024	JPACRBIP0025	JPACRBIP0026	JPACRBIP0027	JPACRBIP0028	JPACRBIP0029	JPACRBIP0030	JPACRBIP0031	JPACRBIP0032	JPACRBIP0033	JPACRBIP0034	備考		
1 N67-10		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
2 ソフトタッチ		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+			
3 ハニーブライト		-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+		
4 サマーゴールド		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+		
5 ゆがふ		-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+		
6 ゴールドパレル(登録品種)		+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+		
7 ジュリオスター(登録品種)		+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
8 A882		-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+		
9 A. comosus var. ananasoides		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
10 A. comosus var. bracteatus		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
11 Bogor		-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
12 Cheese Pine		+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
13 Cream Pineapple		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
14 A. comosus var. ananasoides x Rondon		+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
15 HI101		+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
16 I-43-880		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
17 McGregor ST-1		-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
18 MD2		-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
19 Papuri Vaupes Colombia		+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
20 Red Spanish		+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
21 Santa Marta No. 1		+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
22 Seijo Cayenne		+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
23 Tainung No. 11		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
24 Tainung No. 17		+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
25 沖縄9号		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
26 沖縄11号		-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
27 沖縄12号		-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
28 沖縄13号		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
29 沖縄14号		-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30 沖縄P17(サンドルチェ®/登録品種)		-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
31 沖縄18号		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
32 沖縄P19(ホワイトココ®/登録品種)		-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
33 沖縄20号		-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
34 沖縄21号		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
35 沖縄P22		-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
36 沖縄23号		+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
37 沖縄24号		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
38 沖縄25号		-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
39 沖縄26号		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
40 沖縄27号		-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
41 沖縄28号		-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

+: PCRで増幅あり, -: PCRで増幅なし. 供試した41品種・系統の識別が可能な最少マーカーセットを灰色で示した.

No.1~7, 25~41の太字は沖縄県育成品種・系統を示す.

奈島ら, 2015
より引用

本研究で用
いた沖縄県
育成系統・品
種

陽性コントロールを同時検出することで、このリスクを避けることができた。本試験で供試した 17 品種・系統と、奈島ら(2015)の 24 品種を加えた計 41 品種・系統を識別するために必要な最少マーカー数を算出した結果、少なくとも 8 種類のマーカーセットが必要であり、その組み合わせは 15 通り検出された。一例として表1の灰色で示したRBIPマーカー、JPACRBIP0001, JPACRBIP0005, JPACRBIP0009, JPACRBIP0010, JPACRBIP0012, JPACRBIP0019, JPACRBIP0027, JPACRBIP0029 を用いることで識別可能であった。これらの RBIP マーカーは、栽培現場において、沖縄県で栽培される品種管理に活用できる。

奈島ら(2015)は24品種を識別するには6種類のRBIPマーカーが必要になることを報告している。本試験において、41品種・系統の識別には8種類のRBIPマーカーが必要であることが明らかとなった。今後、新たな品種・系統を加えて識別する場合は、RBIPマーカー全34種類を用いて、遺伝子型を調査し、識別の可否および識別に必要な最少マーカーセットを決定する必要がある。ただし、育種・研究現場

や生産現場において、識別する品種が限られる場合は、表1の遺伝子型を活用して数種類のRBIPマーカーで識別可能である。

なお、突然変異により生じた品種については、ゲノムの変異部位がプライマー配列部位やプライマー間に起きる確率は極めて低く、原品種と遺伝子型が同一となるため、RBIPマーカーによる識別は困難である。SSRマーカーによる品種識別においても「Hawaiian Smooth Cayenne」と「N67-10」は異なる名称であるが、遺伝子型は同一であり、ゲノム情報から突然変異によって生じた品種であることが示唆されている(Shoda *et al.*, 2012)。

これまでに、育成者権侵害対応の強化を目的として様々な植物等の品種を対象にDNA品種識別技術が開発されている。RBIPマーカーについても今後、新たに開発される品種をはじめとして、まだ対応していない種や品種への利用拡大が期待される。一方、DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン(農林水産省輸出・国際局知的財産課, 2023)によると、実際の品種判定に利用し、税関における輸

出入差止や育成者権侵害紛争等に利用する上では、技術の妥当性を確認することが重要とされている。パインアップルでは、奈島ら (2015) が報告した 24 品種について、この妥当性試験が実施されており (成田ら, 2016), 農研機構種苗管理センターにおいて「ゴールドバレル」および「ジュリオスター」の品種類似性識別 (DNA 分析) が可能となっている。本試験で、新たに供試した 17 品種・系統についても妥当性試験が実施され、社会実装されることが望まれる。

RBIP マーカーは PCR およびアガロースゲル電気泳動のみで品種識別が可能のため、他の識別マーカーと比較して安価に実施可能である。近年、さらに簡易で実用的な手法として、RBIP マーカーで増幅した PCR 産物を核酸クロマト PAS (C-Pas) 法で検出する技術がカンキツで開発されている (Okamoto *et al.*, 2023)。本手法は、マッチ棒サイズのメンブレンスティックを DNA 溶液に浸し、青い DNA シグナルの有無を検出することで遺伝子型を判定できることから、実験器具および設備が不要なため、実用性が極めて高いと考えられる。

近年では台湾産のパインアップル輸入量が 2021 年の約 0.2 万 t から 2022 年には約 1.76 万 t と 8.2 倍に急激に増えており (財務省貿易統計)、沖縄県内において台湾産パインアップルの流通や増殖も考えられ、沖縄県登録品種の権利保護のための品種識別技術はこれまで以上に重要になると推察される。パインアップルにおいても、C-Pas 法を活用した識別キットの開発が進むことで、生産・流通現場に近い場所において、登録品種の不適切な栽培といった育成者権の侵害が疑われる事例が生じた際に、迅速な対応が可能になることを期待したい。

謝 辞

本研究は、持続可能な沖縄型果樹生産技術開発事業 (2022 年～2026 年度、沖縄振興特別推進交付金) において実施しました。本研究を実施するにあたり、日本大学生物資源科学部の奈島賢児博士および沖縄県農業研究センター石垣支所の太郎良和彦研究主幹には実験手法に関して多くのご指導を頂きました。また、沖縄県農業研究センター研究企画班の皆様には分析や調査に多大なご協力を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

引用文献

Flavell AJ, Knox MR, Pearce SR and Ellis THN (1998) Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. *Plant J.*, 14: 643-650.
Fujii H, Ogata T, Shimada T, Endo T, Iketani H, Shimizu T, Yamamoto T and Omura M (2013) Minimal marker: an algorithm and computer program for the identification of minimal sets of discriminating DNA markers for efficient variety identification. *J. Bioinform. Comput.*

Biol., 11: 1250022.

Kim H, Terakami S, Nishitani C, Kurita K, Kanamori H, Katayose Y, Sawamura Y, Saito T and Yamamoto T (2012) Development of cultivar-specific DNA markers based on retrotransposon-based insertional polymorphism in Japanese pear. *Breed. Sci.*, 62: 53-62.

Kumar A and Hirochika H (2001) Application of retrotransposons as genetic tools in plant biology. *Trends Plant Sci.*, 6: 127-134.

Monden Y, Takasaki K, Futo S, Niwa K, Kawase M, Akitake H and Tahara M (2014) A rapid and enhanced DNA detection method for crop cultivar discrimination. *J. Biotechnol.*, 185: 57-62.

成田知聡, 後藤洋, 木村鉄也, 奈島賢児, 押野秀美, 國久美由紀, 寺上伸吾, 西谷千佳子, 山本俊哉 (2016) 品種識別技術のマニュアル化とその妥当性評価について, *DNA 多型*, 24: 108-111.

Nashima K, Hosaka F, Terakami S, Kunihisa M, Nishitani C, Moromizato C, Takeuchi Makoto, Shoda M, Tarora K, Urasaki N and Yamamoto T (2020) SSR markers developed using next-generation sequencing technology in pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. *Breed. Sci.*, 70: 415-421.

Nashima K, Terakami S, Kunihisa M, Nishitani C, Shoda M, Matsumura M, Onoue-Makishi Y, Urasaki N, Tarora K, Ogata T and Yamamoto T (2017) Retrotransposon-based insertion polymorphism markers in mango. *Tree Genet. Genomes*, 13: 110.

奈島賢児, 寺上伸吾, 國久美由紀, 西谷千佳子, 山本俊哉, 正田守幸, 竹内誠人, 浦崎直也, 太郎良和彦, 門田有希, 田原誠 (2015) パインアップルにおけるレトロトランスポゾン挿入多型マーカー開発と品種識別への適用, *DNA 多型*, 23: 29-33.

奈島賢児, 内田喬之, 國久美由紀, 西谷千佳子, 山本俊哉, 正田守幸, 松村まさと, 尾上 (牧志) 祐子, 浦崎直也, 太郎良和彦, 緒方達志 (2018) マンゴーにおける共優性レトロトランスポゾン挿入多型マーカーの開発, *DNA 多型*, 26: 69-73.

西谷千佳子, 山本俊哉, 藤井浩, 岡田和馬, 門田有希, 田原誠 (2016) レトロトランスポゾン挿入多型を利用したリンゴの品種識別マーカー開発, *DNA 多型*, 24: 101-107.

農林水産省 (2020) 種苗法の改正について,
<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/syubyuhou/>

農林水産省品種登録ホームページ

<https://www.maff.go.jp/j/shokusan/hinshu/>

農林水産省輸出・国際局知的財産課 (2023) DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン (令和 4 年度改訂版)。

Okamoto M, Monden Y, Shindo A, Takeuchi T, Endo T, Shigematsu Y, Takasaki K, Fujii H and Shimada T (2023)

A target cultivar-specific identification system based on the chromatographic printed array strip method for eight prominent Japanese citrus cultivars. *Breed. Sci.*, 73: 146-157.

Shoda M, Urasaki N, Sakiyama S, Terakami S, Hosaka F, Shigeta N, Nishitani C and Yamamoto T (2012) DNA profiling of pineapple cultivars in Japan discriminated by SSR markers. *Breed. Sci.*, 62: 352-359.

財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>

Identification of recently registered pineapple cultivars in Okinawa using retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP) markers.

Ayaka Irei¹ and Takuya Kobayashi²

¹ Okinawa Prefectural Agricultural Research Center

² Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Nago Branch

Abstract

We investigated the genotypes of 17 pineapple cultivars, including “Okinou P17” (Sun Dolce[®]) and “Okinou P19” (White Coco[®]), recently registered in Okinawa Prefecture, using retrotransposon-based insertion polymorphism (RBIP) markers. RBIP markers were detected at target sizes, with PCR amplification band patterns varying among cultivars. Additionally, at least 8 markers were required to identify all 41 cultivars, including the 24 previously reported by Nashima *et al.* (2015). These findings support cultivar identification for protecting breeders' rights.

Keywords: Registered cultivars, Protection of rights, DNA marker, PCR, Minimal marker sets

学位論文

小規模離島における野菜産地の形成と展開過程に関する研究

新崎 泰史

沖縄県農業研究センター名護支所

要 旨

離島は人口の減少と高齢化が著しく進展しているが、わが国の国土保全などに重要な役割を果たしている。そのため、離島住民の定住条件を維持していくことは社会的にも重要な課題であり、産業振興による所得確保が求められている。離島において農業は産業の中心的な役割を果たしているが、近年では安価な外国産農産物の輸入が拡大する一方で、価格・所得政策などによる国の支援が縮小しており、従来型の農業のみでは所得確保が困難となりつつある。とくに農業経営の規模拡大が困難な小規模離島ではそれがより顕著であり、野菜など高収益作物の産地化が期待されるが、産地形成の条件はもとより、産地維持の課題が明確にならなければ、根拠を持って離島振興施策を講ずることは困難である。

そこで、本論文では沖縄県内の小規模離島を対象として、野菜産地の形成および展開過程を分析し、小規模離島における野菜産地の形成条件と産地維持の課題を明らかにすることを目的とした。研究方法は統計資料の分析とあわせて、次の3つの産地を事例としてヒアリング調査等に基づく実証分析を行った。第1に、輸送条件がきわめて厳しい遠隔地にある北大東島のカボチャ産地の事例である。第2に、鮮度保持が商品化の重要な要件である生鮮野菜の産地化に成功した伊良部島のエダマメ産地の事例である。第3に、野菜の産地化に成功したものの、縮小・後退にある津堅島のニンジン産地の事例である。

本論文の具体的な研究成果は、概ね次のとおりである。

まず、統計分析より、わが国の離島農業は肉用牛と工芸作物の生産が中心となっているが、沖縄県内で長年にわたって耕種部門を支えてきたサトウキビの収益性が低下していることを明らかにし、規模拡大が困難な離島農業の維持・発展を図るためには高収益作物の導入が重要となっていることを指摘した。

また、沖縄県内の離島市町村における野菜生産の動向をみると、一部には産地形成に成功しているところがあるものの、未だ多くの離島市町村では産地形成には至らず、いったん形成された産地であっても維持・存続を図ることが困難であることを示した。

つぎに、北大東島のカボチャ産地と伊良部島のエダマメ産地の事例分析から、小規模離島における野菜産地の形成条件として、①生産量が少なくても安定供給を可能とする生産・出荷方法の確立と販路の選択、②集出荷過程を支える労働力と施設などの社会資本の不足への対応、③鮮度保持と輸送コストの低減に向けた取り組み、④生産から販売までを支援する組織の存在とそれによる産地システムの構築などが重要であることを明らかにした。

さらに、津堅島のニンジン産地の事例分析から、小規模離島において野菜産地の維持・存続を図るための課題として、①担い手の減少・高齢化に伴う農業労働力の弱体化への対応、②兼業する漁業や複合経営部門など、より有利な産業や品目が出現した場合の対応、③老朽化するかんがい施設などの生産基盤の維持・更新、④産地形成を牽引したリーダーの継承など、リーダー人材の育成・確保などがあることを明らかにした。

キーワード：小規模離島、野菜、産地形成条件、産地維持、北大東島、伊良部島、津堅島

学位授与大学名：鹿児島大学大学院連合農学研究科

Formation conditions and Problems of maintaining vegetable production areas in small-scale remote islands

Taishi Arasaki

Okinawa Prefectural Agricultural Research Center Nago Branch

Abstract

The purpose of this paper is to analyze the formation and development process of vegetable production areas on small scale remote islands in Okinawa Prefecture, and to clarify the conditions for the formation of vegetable production areas on small isolated islands and the problems of maintaining production areas. In addition to analyzing statistical data, an empirical analysis was carried out using interview surveys to study three production areas. The first is a pumpkin production area on the island of Kitadaito. It is located in a remote area with extremely difficult transportation conditions. The second is a fresh vegetable production area on Irabu Island. Freshness is an important requirement for marketing. The third is the case of the carrot production area on Tsuken Island. This area has succeeded in establishing a vegetable production area, but is in the process of downsizing and regression.

The specific research results of this paper are as follows.

First, statistical analysis shows that while Japan's remote island agriculture is centered on the production of beef cattle and industrial crops, the profitability of sugarcane, which has long supported the agricultural sector in Okinawa Prefecture, is declining, and the introduction of highly profitable crops is important for the maintenance and development of remote island agriculture, which is difficult to scale up.

Next, looking at the trend of vegetable production in remote island municipalities in Okinawa Prefecture, although some have succeeded in establishing production areas, many remote island municipalities have yet to establish production areas, and even once established, it is difficult to maintain and sustain these production areas.

Then, based on case analyses of a pumpkin production area on Kitadaito Island and an green soybean production area on Irabu Island, the following four conditions for the establishment of a vegetable production area on a small scale remote island were clarified. (1) the establishment of production and transportation methods and the selection of sales channels that enable a stable supply even when production volume is low, (2) the response to the lack of social capital such as labor and facilities to support the collection and transportation process, (3) efforts to maintain freshness and reduce transportation costs, and (4) the existence of organizations that support everything from production to sales and the establishment of a production area system through these organizations.

And finally, from a case study analysis of the carrot production area on Tsuken Island, the following four issues were identified as challenges to maintaining and sustaining vegetable production areas on small, remote islands. (1) coping with the weakening of the agricultural labor force due to the decline and aging of the bearers, (2) coping with the emergence of more lucrative industries and commodities, such as dual-use fisheries and combined business sectors, (3) maintaining and updating aging irrigation facilities and other production infrastructure, and (4) developing and maintaining leadership, including succession of leaders who have led the establishment of production areas.

Keywords: Small-scale remote islands, Vegetable, Conditions for forming vegetable production areas, Maintenance of vegetable production, Kitadaito island, Irabu Island, Tsuken Island

Name of doctoral degree granting university: The United Graduate School of Agricultural Sciences Kagoshima University

Genotyping of the Y_2 Locus in the Yellow-Root Carrot, *shima-ninjin* (*Daucus carota* subsp. *sativus*).

Ayaka IREI, Kazuhiko TARORA, Haruki SUNAGAWA, Daisaku YAMASHITA,
Tsubasa HESHIKI, and Naoya URASAKI

shima-ninjin is a carrot with a long yellow root. The spread of orange root contaminants is a serious issue for *shima-ninjin* cultivation. In carrots, root color is regulated by the Y , Y_2 and Or genes, and the genotypes of the yellow color have been reported to be yyY_2 or a homozygote of wild type Or allele with yyy_2y_2 . In other words, by identifying the genotype of the Y_2 locus, the genetic mechanism of the yellow color in *shima-ninjin* could be estimated. Therefore, as a first step to clarifying the genetic basis of the yellow color in *shima-ninjin*, genotyping of the Y_2 locus was carried out. An investigation for each four yellow *shima-ninjin* and orange contaminants using the 4144^{ApeKI} CAPS marker and genotyping of 186 germplasm, 166 *shima-ninjin* and 20 orange contaminants, with the newly developed 4144^{BssSI} CAPS marker showed that the recessive y_2 and SY_2 designated in this study were existed. Furthermore, the homozygotes of SY_2 showing orange root color suggested that SY_2 is also recessive allele and Or gene may be involved in yellow color. To confirm the involvement of the Or gene and produce seeds without contaminants, an association analysis was carried out in F1 progeny. All fifty F1 progeny, the homozygotes of the well-known recessive y_2 , had the yellow root. These results suggest that the yellow phenotype in *shima-ninjin* may be determined by the Or as well as the Y and Y_2 genes and traditional yellow *shima-ninjin* seeds without contaminants are producible.

出典：Tropical Agriculture and Development 68(3):49-54 (2024)

Vinegar extraction from the acerola fruit (*Malpighia emarginata*) cultivated in Okinawa, Japan

T. Hanagasaki

Introduction - Acerola (*Malpighia emarginata* Mocino et Seese ex DC.) is cultivated in Okinawa, Japan. This fruit is mainly used for processed food. When acerola puree is produced, residual substances are typically discarded. These residual substances mainly comprise fruit skin and are bright red. This waste product can instead be turned into an excellent product with value-added processing. Objective - To utilize the acerola puree waste, we developed a process for extracting vinegar from it. Materials and method - Acerola is cultivated in Motobu and Itoman in the Okinawa prefecture. The acerola puree was produced using Pulper Finisher in the factory of Acerola Fresh Co., Ltd. Pulverizing acerola puree waste and acerola puree in spirit vinegar, vinegar extracts were produced. Results and discussion - The vinegar extract obtained from the acerola puree waste is characterized by the anthocyanin content (126.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ascorbic acid content (122.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$), malic acid content (78.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), and its red color (a^* value of 16.77). The resulting color of vinegar fades at room temperature, and the anthocyanin content drastically decreases after two weeks. However, refrigerator storage (4.8 °C $\pm$ 0.5 °C) allows the vinegar extract to retain anthocyanin to some extent for approximately 10 weeks and to remain red for 16 weeks. Conclusion - Acerola vinegar extracts are a nutritional functional food and can be used in seasonings and food products such as salad dressings, fruit vinegar drinks, and alcoholic drinks.

出典：Fruits 77(2) (2022)

The Change of Nutrient Components Contained in the Acerola Fruit (*Malpighia emarginata*) Cultivated in Okinawa, Japan

Takashi Hanagasaki

Acerola (*Malpighia emarginata*) was brought from Hawaii to Okinawa, Japan, and has been cultivated for approximately 60 years. The variety of the fruit is mainly sweet species and is cultivated in Motobu and Itoman, the Okinawa Main Island. Acerola is mostly used in processed food and then, comprehending the change of nutrient components in acerola is really important. In the present study, ascorbic acid, anthocyanin, and others present in acerola fruits were investigated depending on the maturity level of acerola, harvest time, and cultivation place. From the result, anthocyanin contents in acerola fruit significantly increased as maturity level was higher and ascorbic acid content significantly decreased in several months as the maturity level of acerola was higher but it was kept to some extent over level 6 of maturity. And there was no clear tendency of polyphenol, brix, and acidity in acerola fruits depending on the maturity level of acerola. In addition, there was no clear tendency regarding those components depending on harvest time and cultivation place in Okinawa. Therefore, maturity level is considered to be rather important for the change of ascorbic acid and anthocyanin contents in acerola fruits, not harvest time and cultivation place. And acerola fruits have abundant ascorbic acid regardless of which the maturity level is in the Okinawa Main Island.

出典：Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science 60(2): 37-46 (2022)

***In vitro* antibiotic susceptibility of *Erwinia* sp. causing papaya (*Carica papaya*) black rot in Okinawa, Japan and several pesticides effectiveness on potted papaya plantlets before infection**

T. Hanagasaki, T. Takushi, A. Ajitomi, H. Yamagishi, S. Kawano

Introduction - Papaya bacterial disease has spread all over the world and papaya black rot has been an epidemic in Okinawa Prefecture, Japan. The pathogen is *Erwinia* sp. identified by phylogenetic trees of 16s rRNA gene and four housekeeping genes. There is only one pesticide, Orthocide, registered in Japan, but it is not enough to counter the disease spread. Objective and method - To hunt for other pesticide candidates, antibiotics were examined using minimum inhibitory concentration assay and resulted in oxytetracycline and streptomycin strongly inhibiting the papaya black rot pathogen. Besides, the test using potted papaya plantlets was performed in the condition the pesticides were applied before potted papaya plantlets were infected, using several pesticide candidates. Results and discussion - Captan (Orthocide), mancozeb, copper (II) hydroxide, and oxytetracycline exhibited a preventive effect on black rot on potted papaya plantlets. Especially, captan was found to be stronger when it was sprayed before the infection of potted papaya plantlets with black rot. However, streptomycin did not. Conclusion - mancozeb, copper (II) hydroxide, and oxytetracycline should also be approved to register as papaya black rot. Specifically, using the time of copper (II) hydroxide against papaya soft rot is unlimited, and it would be useful and effective for papaya black rot by being registered for legal expansion.

出典：Fruits 78(1) (2023)

沖縄県農業研究センター研究報告
第 18 号

編集・発行

沖縄県農業研究センター

〒901-0336 沖縄県糸満市真壁 820 番地

電話 098-840-8500 (代表) Fax098-840-8510

ホームページ : [https://www.pref.okinawa.lg.jp/shigoto/kenkyu/
1010703/1018784/1010711.html](https://www.pref.okinawa.lg.jp/shigoto/kenkyu/1010703/1018784/1010711.html)

代表 E-mail : xx049400@pref.okinawa.lg.jp

印刷

印刷センターテル

〒901-0211 沖縄県豊見城市字饒波 500-1

電話 098-856-5512 Fax098-856-4330

Number18 March, 2025

Original paper

Note

Thesis Paper

12-13 Taishi Arasaki: A study on the formation and development process of vegetable production areas in small-scale remote islands