

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、

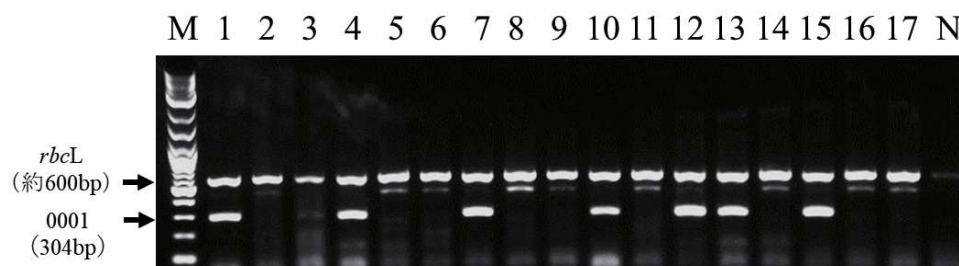


図1. 供試した17品種・系統におけるRBIPマーカーJPAcRBIP0001 (304bp)と*rbcl* (約600bp)の同時検出

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