

園学研. (Hort. Res. (Japan)) 20 (1) : 17-27. 2021.
doi: 10.2503/hrj.20.17

原 著

CAPS マーカーを用いた香酸カンキツの品種識別技術の確立

新見恵理¹・藤井 浩²・太田 智²・岩倉拓哉³・遠藤朋子²・島田武彦^{2*}

¹徳島県立農林水産総合技術支援センター 779-3233 徳島県名西郡石井町

²農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究領域 424-0292 静岡市清水区興津中町

³和歌山県果樹試験場 643-0022 和歌山県有田郡有田川町

Development of Acid Citrus Cultivar Identification by CAPS Markers

Eri Niimi¹, Hiroshi Fujii², Satoshi Ohta², Takuya Iwakura³,
Tomoko Endo² and Takehiko Shimada^{2*}

¹Tokushima Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Support Center, Ishii-cho, Myozai, Tokushima 779-3233

²Institute of Fruit Tree & Tea Science, NARO, Okitsu Naka-cho, Shimizu, Shizuoka 424-0292

³Wakayama Fruits Tree Experiment Station, Aridagawa-cho, Arida, Wakayama 643-0022

Abstract

The development of cultivar identification technology and the protection of breeder's rights are required for Japanese acid citrus cultivars in conjunction with the increasing domestic production and expanding overseas export of acid citrus fruits. Thirty-three acid citrus cultivars and lines were analyzed using 26 CAPS markers previously applied to the identification of table citrus cultivars. It revealed that all accessions of Yuzu (*Citrus junos* hort. ex Tanaka), Sudachi (*C. sudachi* hort. ex Shirai), Yuku (*C. yuku* hort. ex Tanaka), and Jabara (*C. jabara* hort. ex Tanaka), which had different phenotypes and local origins, had the same genotypes as their representative samples. In acid citrus cultivars, five CAPS markers detected novel alleles that were not found in table citrus cultivars. Based on the calculation of 25 CAPS markers genotypes except for Tf0001/Msp I by the MinimalMarker program, a minimal marker set comprising 6 CAPS markers can discriminate all 35 citrus cultivars. Parentage analysis of a new triploid cultivar of 'Awasuzuka' (*C. sudachi* (2n=4x) × *C. junos* (2n=2x)) bred in Tokushima Prefecture by the MARCO program indicated that 'Awasuzuka' was inherited from either of the parental alleles and showed no discrepancy in the parent-offspring relationship. The establishment of cultivar identification technology for major acid citrus cultivars in the Japanese market reinforces the protection of Japanese brands and breeding rights of superior citrus cultivars.

Key Words : Awasuzuka, DNA marker, parentage analysis, Sudachi, Yuzu

キーワード : 阿波すず香, DNA マーカー, 親子鑑定, スダチ, ユズ

緒 言

香酸カンキツの果実は、酸含有量が高く優れた香りを有する。この特性により、料理や食品への風味づけや酸味づけなど、調理・加工用に利用されており、生食用と並んでカンキツ利用の重要な用途の一つとなっている。たとえば、レモン (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) は国内で生産された果実の出荷量と輸入された果実の量を合わせると、生食用のカンキツを含めた国内流通量の約4.6% (55,627t) を占め、その順位は第4位となっている (農林水産省, 2019a, b)。また、ユズ (*C. junos* hort. ex Tanaka) の国内流通量は2.4% (24,292t) を占め、国内流通量は第9位となっている。香酸カンキツには、各地域で古くから栽培され、特徴的な形質をもつ品種がある。農林水産省が行っている地域産品の

名称を知的財産として登録する制度である。地理的表示 (GI) 保護制度においても、木頭ゆず (徳島県那賀郡那賀町) や大分かぼす (大分県)、辺塚だいたい (鹿児島県肝属郡肝付町) といった香酸カンキツが登録されるなど (農林水産省, 2020)、地域産品としての関心も高い。また、安全・安心を求める消費者のニーズや我が国の農林水産物や食品の輸出促成の推奨を受けて、国産レモンの生産量の拡大やユズ、スダチ (*C. sudachi* hort. ex Shirai) などの香酸カンキツの輸出量の拡大が進んでいる。

近年、交雑による香酸カンキツの新品種の育成も進められ、種子が少なく多汁の 'イエローベル' (金好ら, 2014)、かいよう病に強く豊産性の '璃の香' (太田ら, 2014)、ユズとスダチの交雑で得られた種子が少なく豊産性の '阿波すず香' (中島ら, 2015) が品種登録され、農業者所得の向上やジャパンブランドの確立に貢献している。こうしたことを背景に、香酸カンキツについても、消費者の食の安全や知的財産としての育成者権の保護に向けて、DNA 品種

2020年3月3日 受付. 2020年6月11日 受理.

* Corresponding author. E-mail: tshimada@affrc.go.jp

18

新見恵理・藤井 浩・太田 智・岩倉拓哉・遠藤朋子・島田武彦

識別技術の確立が必要と考える。

育成者権の侵害が疑われる種苗、収穫物、加工品などの類似度を判定する際には、特性比較、比較栽培、DNA分析などの品種類似性試験が行われるが、この中でDNA分析は迅速、簡便に判定できることから様々な作物種で技術開発が進められている。カンキツでは、Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) マーカーを用いて愛媛県や農研機構果樹茶業研究部門で育成されたカンキツの品種識別が報告されている(二宮ら, 2015; Nonakaら, 2017)。また、ミカンゲノムデータベース (<https://mikan.dna.affrc.go.jp/>) で公開されている遺伝子のアノテーションやローカス情報を持つ2,696種類のCAPSマーカーの中から、カンキツの品種識別に適した26種類のCAPSマーカーを選定し、国内の流通量の94%を占める主要カンキツ24品種の遺伝子型が報告されている(Fujiiら, 2019)。これらの研究成果を基にISO(国際標準化機構)の基準に準拠してマーカーの妥当性が確認された「カンキツ22品種のDNA品種識別技術マニュアル」(農研機構, 2019)が農研機構種苗管理センターのホームページで公開され、主要な生食用カンキツの品種識別技術は確立されている。

一方、DNAマーカーを用いた香酸カンキツの品種識別技術については、SSRマーカーを用いた‘イエローベル’の親子鑑定(Nakanoら, 2019)、酸果種ライム(*C. spp.*)の遺伝的多様性の評価(Sharafiら, 2016)など数例の報告に限られている。ユズやスダチについては我が国での栽培の歴史が古く、かつては実生によって増殖されており、偶発実生や枝変わりなども加わって様々な特性を備えた品種・系統が見られる(間苧谷ら, 2006)。このことから、ユズやスダチなどの香酸カンキツのDNA品種識別技術を確立するためには、国内で栽培される複数の品種・系統について遺伝的な多様性を評価し、DNAマーカーの遺伝子型に基づいて品種・系統を整理する必要がある。同時に、香酸カンキツとして包括されるカンキツには、レモン、ダイダイ(*C. aurantium* L.)、シクワサー(*C. depressa* Hayata)など、生食用カンキツとは遺伝的背景の異なるものが含まれ、DNAマーカーを用いた香酸カンキツの品種識別技術を確立するうえで、同一種内の遺伝的多様性の評価が課題となっている。

そこで本研究では、Fujiiら(2019)が開発した生食用カンキツのDNA品種識別に適した26種類のCAPSマーカーを用いて、国内流通量の多い主要な香酸カンキツ品種・系統と近年、農研機構と徳島県で育成された香酸カンキツの育成品種に適用して、香酸カンキツのDNA品種識別技術を確立し、複数の呼称で流通しているユズとスダチについて、その多様性を明らかにする。

材料および方法

1. 供試材料とDNAの抽出

品種識別の対象として、我が国での香酸カンキツの果実

の国内流通量(出荷量+輸入量)の99%を占める上位10品種(農林水産省, 2019a, b)、レモン、ユズ、スダチ、シクワサー、カボス(*C. sphaerocarpa hort. ex Tanaka*)、ライム(タヒチライム)、ダイダイ、ユコウ(*C. yuko hort. ex Tanaka*)、ジャバラ(*C. jabara hort. ex Tanaka*)、辺塚だいたいおよび、交雑育種によって得られた香酸カンキツとして農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究領域の育成品種‘璃の香’(リスボンレモン×ヒュウガナツ(*C. tamurana hort. ex Tanaka*))と徳島県育成品種の‘阿波すず香’(スダチ[速見本田四倍体]×ユズ[山根系])を選んだ。農研機構果樹茶業研究部門カンキツ研究領域(静岡県静岡市清水区)、徳島県立農林水産総合技術支援センター(徳島県石井町)、和歌山県果樹試験場(和歌山県有田川町)で保存している品種・系統と、徳島県神山町で採取したスダチ、和歌山県北山村で採取したジャバラ、および上記の交雑育種で得られた育成品種を加えた33品種・系統を供試した(第1表)。ゲノムDNAは各品種・系統の2019年10月にサンプリングした葉からCTAB抽出法(Dellaportら, 1983)により抽出した。

2. CAPS分析

国内で育成された生食用カンキツの品種識別を目的に開発された26種類のCAPSマーカー(Fujiiら, 2019)(第2表)を33品種・系統(第1表)のジェノタイプングに適用した。4種類のCAPSマーカー、Tf0168/Rsa I, Tf0293/Hind III, Tf0326/Hha I, Tf0013/Rsa Iについては、より安定した試験結果を得るため、PCRの増幅断片長が小さくなるようにプライマー配列を再設計した。このため、Fujiiら(2019)に記載されたマーカー名のサフィックスの数字を変更して、それぞれTf0168-3/Rsa I, Tf0293-3/Hind III, Tf0326-2/Hha I, Tf0013-3/Rsa Iと命名し、既報のマーカー名と区別した。CAPS分析の方法は、Fujiiら(2019)の手順に従って実施した。

3. 遺伝子型データ分析法

得られた電気泳動図から各マーカーのアレルの増幅断片の構成を整理して、泳動距離の短いアレルバンド順にアルファベット「A」、「B」、「C」で記述し、各品種・系統のCAPSマーカーの遺伝子型をその組み合わせで表記した。この表記により、増幅断片長が長い順にアルファベットが割り振られるので、制限酵素で消化されないアレルバンドが「A」となる。得られたCAPSマーカーの遺伝子型データについて、すべての品種を識別することができる最少のDNAマーカーセットを算出するため、最少マーカーセット検出ソフトウェアMinimalMarker(Fujiiら, 2013)を用いた。また、徳島県育成の‘阿波すず香’については、親子関係を推定するソフトウェアMARCO(藤井ら, 2010)を用いて、CAPSマーカーで明らかとなった遺伝子型が、交雑親と遺伝的に矛盾がないか解析を行った。さらに、‘璃の香’または‘阿波すず香’を他の品種・系統から識別するための最少マーカーセットを算出した。

第 1 表 CAPS 分析に供試した 33 品種・系統

調査番号	JP 番号 ^z	流通量による順位 ^y	分類名 ^y	品種・系統・個体	学名 ^x ・交配組合せ	保存場所・採取場所
1	117289	1 位	レモン	リスボン	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
2	117380	2 位	ユズ	カンキツ研究拠点保存系統 ^w	<i>C. junos</i> hort. ex Tanaka	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
3	113187			多田錦		農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
4				山梨系		徳島県農林水産総合技術支援センター
5				海野系		徳島県農林水産総合技術支援センター
6				栗系		徳島県農林水産総合技術支援センター
7				藤田木頭		徳島県農林水産総合技術支援センター
8				平の香		徳島県農林水産総合技術支援センター
9	117383	3 位	スダチ	カンキツ研究拠点保存系統 ^w	<i>C. sudachi</i> hort. ex Shirai	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
10	113189			本田系		農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
11	113191			新居系		農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
12	169659			大東スダチ (大スダチ)		農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
13				本田系		徳島県農林水産総合技術支援センター
14				速水本田四倍体		徳島県農林水産総合技術支援センター
15				新居系		徳島県農林水産総合技術支援センター
16				緑香系		徳島県農林水産総合技術支援センター
17				200 年生古木 (2 代目)		徳島県農林水産総合技術支援センター
18				神山 4 号		徳島県農林水産総合技術支援センター
19				勝浦 1 号		徳島県農林水産総合技術支援センター
20	117514	4 位	シクワワーサー	大宜味クガニー	<i>C. depressa</i> Hayata	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
21	117381	5 位	カボス	カンキツ研究拠点保存系統 ^w	<i>C. sphaerocarpa</i> hort. ex Tanaka	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
22	117356	6 位	ライム	タヒチライム	<i>C. latifolia</i> Tanaka	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
23	117365	7 位	ダイダイ	カブス	<i>C. aurantium</i> Linn.	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
24	203330	8 位	ユコウ	無核	<i>C. yuko</i> hort. ex Tanaka	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
25				有核		徳島県農林水産総合技術支援センター
26				無核		徳島県農林水産総合技術支援センター
27				原木複製樹 A (20 年生)	<i>C. jabara</i> hort. ex Tanaka	和歌山県果樹試験場
28				原木複製樹 B (40 年生)		和歌山県北山村相須七色
29				原木複製樹 C (40 年生)		和歌山県北山村相須パイロット
30				10 年生の流通苗木		和歌山県北山村
31	117475	10 位	辺塚だいだい	カンキツ研究拠点保存系統 ^w	<i>C. spp</i>	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域
32				阿波すず香	<i>C. sudachi</i> hort. ex Shirai × <i>C. junos</i> hort. ex Tanaka	徳島県農林水産総合技術支援センター
33				璃の香	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f. × <i>C. tamurana</i> hort. ex Tanaka	農研機構果樹茶研カンキツ研究領域

^z 農研機構遺伝資源センター農業生物資源ジーンバンクの記述による (https://www.gene.afrc.go.jp/index_j.php)

^y 農林水産省特産果樹生産動態等調査 (平成 28 年度産) (農林水産省, 2019a) および農林水産物輸出入概況 2016 年 (平成 28 年) (農林水産省, 2019b) を参照

^x Tanaka (1969) の分類による

^w 農研機構果樹茶研カンキツ研究領域

第2表 品種識別に用いたCAPSマーカー

CAPSマーカー番号	CAPSマーカー		Reverseプライマー	PCRプログラムの種類	増幅断片サイズ (bp) ^x	増幅断片サイズ (bp) ^x			clementine genome ver 1.0 ^w			
	制限酵素	STS名				Forwardプライマー	Aアレル	Bアレル		Cアレル	両アレルの共通断片長	
1	Cp1624	<i>Msp</i> I	ACCTCTGCTTGGCAAGC	AGTTTGATCAAAAGTGACCG	900	900	800	100	300	300	1	Cielev10008537m.g
2	Bf0036-2	<i>Msp</i> I	CAGGTTTCTTTGTTAGCAATTTGCC	CTGTGTGGATCAAAATGGTTTCG	700	700	400	300			1	Cielev10008751m.g
3	Tf0168-3 ^y	<i>Rsa</i> I	GCATACTTTTCAAGGAAGCA	CCCTAGTTAAGCAAAAGGGAA	500	500	300	200			1	Cielev10007563m.g
4	A10224	<i>Hind</i> III	GGCATGATAATCTTGTGTGT	TCAACCGAATCAATACATAAAA	2200	2200	1800	400	1900	300	2	Cielev10015872m.g
5	Gn0073	<i>Ssp</i> I	TGGCGTGTATATGTGTATGT	GCTTACGTCTCGGAATTAATG	1400	1400	800	600			2	Cielev10014770m.g
6	Bf0158-3	<i>Pvu</i> II	AAAAGCATACAGAGGATTCGAC	GGAAATTCATTAACCGTATCCGCA	350	200	150				3	Cielev10021285m.g
7	Tf0420	<i>Hae</i> III	TGGAGGCCATTTCTTATTAGA	CTCTGACCACGGGATCA	450	450	225				3	Cielev10022018m.g
8	Tf0001	<i>Msp</i> I	AAAAGTTTCAACAAGTACGAGGG	AGCAATCTTTAGAAATACGCA	650/450	650	325	325	125		3	Cielev10020248m.g
9	Tf0300-2 ^z	<i>Dra</i> I	GCTCGGATTAGGGTTGC	GAGAACACTTACCCACGGAAACAT	800	800	500	300			3	Cielev10022370m.g
10	Tf0419	<i>Pvu</i> II	GGTGAITGAGAAAGCAACTTAT	ATCTTGATCATGCGCAAT	650	550	400	150		100	3	Cielev10019228m.g
11	Tf0293-3 ^z	<i>Hind</i> III	TTCTGGAGTCAACGAATGCC	AAAGACTCGTAAAGCTCTCT	600	600	300	300			3	Cielev10019219m.g
12	A10524	<i>Hha</i> I	GAACTTCCGTCAGATAGTGT	CCTTGGCCATTTTCAATTG	1800	1800	1000	800	1050	750	4	Cielev10031723m.g
13	Tf0318	<i>Hinc</i> II	GACGACTACCGCTACTACTAC	ACAGCAGGAACAAGCTTT	600	600	500	100			4	Cielev10031873m.g
14	Mf0097	<i>Dra</i> I	GCAACTCAITATTCATTTCTC	CTCCATTTTCTTTGTTGGCACA	300	300	200	100			4	No hit to locus
15	Gn0048	<i>Pvu</i> II	ATGGAACAAGTGAAGACCTT	ACACTTACTTATTTGGAGTCCG	1100	1100	1000	100			4	Cielev10032275m.g
16	Cp0419	(No Cut)	GCAGCAATGGCAACAGCATGT	TACTTGGCCACTAGCTCC	800/600	800	600 ^v				5	Cielev100002215m.g
17	If0208	<i>Hinf</i> I	AATATTTCTGGCAATCACTGA	GGAAAACCAACCAAGGA	550	550	300	250			5	Cielev10001680m.g
18	Cp1308	<i>Hind</i> III	GCACCCGACAGTAGTCTC	CATACTTGGTGGCCGTFAGTTC	400	400	200	200			6	Cielev10011420m.g
19	Tf0271	<i>Rsa</i> I	AGTTATCCAAACGGAAATCT	CATGGCAATACTTTGTAGTTC	700	700	400	300			6	Cielev10010976m.g
20	Tf0386	<i>Msp</i> I	GACAAGAAAATTAATATACGG	GGAAATCAACATGAGTGACA	500	500	300	200			6	Cielev10012022m.g
21	Tf0326-2 ^z	<i>Hha</i> I	TTAGGGCGTGGATATAGGAG	CTCCAGACAGAAAGCTGTAG	700	700	450	250			7	Cielev10024695m.g
22	Mf0090	<i>Hind</i> III	CTCACTGATGCATTTGATGAAG	TTCCTTTTGAGAGGGGGAGAA	1100	1100	700 ^v	400 ^v			7	Cielev10025866m.g
23	Tf0013-3 ^y	<i>Rsa</i> I	TGAAATTTCTGTCAAGTTGGT	TTGTGTAAGACAGGGATAG	800	800	300	300		200	8	Cielev10027769m.g
24	Tf0150	<i>Hinf</i> I	ACAGAAGAGGCCAATCT	TTTTTTCAGTAAAGGCTCAC	500	500	350	150			8	Cielev10028292m.g
25	Cp1031	<i>Hha</i> I	GCCCAATCTTTCACGTCAA	TTCCACACACTTTCGCAATTT	1700	1700	1200	500	1300	400	9	Cielev10005224m.g
26	A10302	<i>Hind</i> III	TCGCTTACAACACTCTTTCC	CCCTGAACATGTTGACAAAT	1700	1700	1500	200			9	Cielev10004372m.g

^z プライマー配列を再設計したマーカー

^y 数値はアニーリングの温度 (°C) を示す

^x 100bp ラダーマーカーから推定した増幅断片サイズ

^w クレメンティンのゲノム情報はPhytozome <<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>>を参照

^v 本研究の供試材料では検出されないアレルの増幅断片サイズ

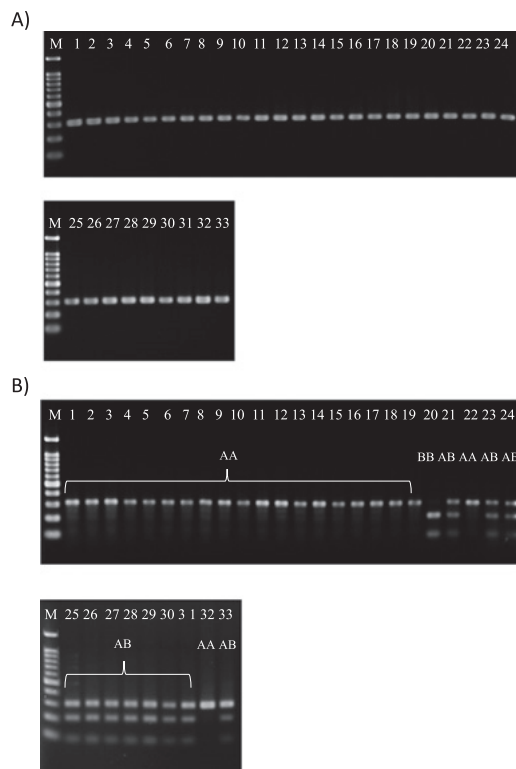
園学研. (Hort. Res. (Japan)) 20 (1) : 17-27. 2021.

21

結 果

1. CAPS 遺伝子型分析

第1表に記載されている香酸カンキツの33品種・系統について、26種類のCAPSマーカー(第2表)を用いて分析した結果、‘阿波すず香’を除いた全品種・系統で明瞭な電気泳動図が得られ、すべてのCAPSマーカーにおいて遺伝子型の判定が可能であった(第1図)．‘阿波すず香’については、Tf0001/*Msp* Iを適用した場合のみ、電気泳動バンドパターンのAアレルのバンドがBアレルのバンドに比べて薄く不明瞭であるため、このマーカーによる遺伝子型の決定を保留した．CAPSマーカーでは、‘阿波すず香’とタヒチライムに含まれるアレルの種類の判定はできるが、倍数化したアレルの特定はできない．具体的には、三倍体品種でヘテロの遺伝子型「AB」を示す場合、いずれのアレルが倍化しているか、すなわち「AAB」か「ABB」かを判定できない．ただし、両親の遺伝子型が得られていて、両親ともに「AB」でなければ、推定可能である(第3表)．26種類のCAPSマーカーの遺伝子型を整理した結果、農研機構果樹茶研カンキツ研究領域と徳島県農林水産総合技術支援センターで保存しているユズ、‘多田錦’、‘山根系’、‘海野系’、‘要系’、‘藤田木頭’、‘平の香’の計7品種・系統(第1表調査番号[2]～[8])、農研機構果樹茶研カンキツ研究領域と徳島県農林水産総合技術支援センターで保存しているスダチ、‘本田系’と‘新居系’の各2系統、‘大東スダチ’、‘速見本田四倍体’、‘緑香系’、‘神山4号’、‘勝浦1号’、および徳島県神山町で採取した200年生古木のスダチの計11品種・系統([9]～[19])、ユコウの無核および有核の計3品種・系統([24]～[26])、和歌山県果樹試験場で保存しているジャバラおよび和歌山県北山村で採取した採取地や樹齢の異なるジャバラの計4系統([27]～[30])における品種・系統間の遺伝子型がすべて同一であった．これらの品種・系統は、珠心胚由来の品種あるいは栄養繁殖体(クローン)である可能性が高く、以降の解析では代表する1品種・系統についてのみ遺伝子型を記載し、レモン、ユズ、スダチ、シクワサー、カボス、タヒチライム、ダイダイ、ユコウ、ジャバラ、辺塚だいだいの10種類の在来品種と、‘璃の香’および‘阿波すず香’の2種類の育成品種の遺伝子型を、既報の生食用カンキツ25品種・系統の遺伝子型(Fujiiら, 2019)と合わせて第3表に示した．また、香酸カンキツと既報の生食用カンキツについて、それぞれのCAPSマーカーと品種・系統のアレル頻度を第3表に示した．香酸カンキツでは、CAPSマーカーのアレル頻度の平均は、A, B, Cそれぞれのアレルが0.58, 0.40, 0.03であり、Tf0293-3/*Hind* IIIとCp0419, Mf0090/*Msp* Iの3つのCAPSマーカーですべての遺伝子型がAアレルのホモであった．既報の生食用カンキツでは、CAPSマーカーのアレル頻度の平均は、A, Bそれぞれ0.51, 0.49で、すべてホモとなるアレルはなかつ



第1図 Mf0097のPCR増幅断片(A)と制限酵素*Dra*I処理した増幅断片(B)の電気泳動図
M: 100 bp ラダー, 1-33: 第1表の調査番号に準じる各品種の遺伝子型は調査番号の下に記す

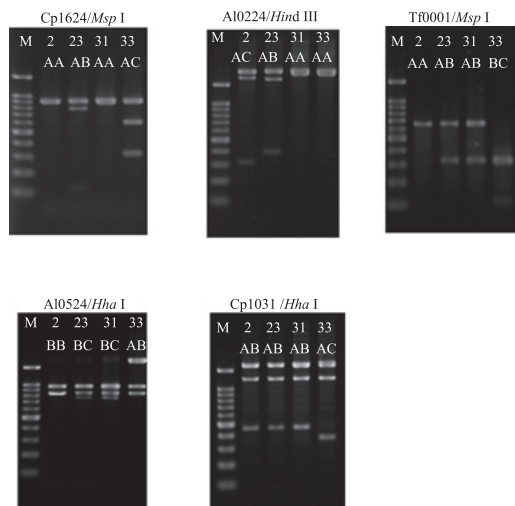
た(第3表)．以上のことから、生食用カンキツの品種識別に選抜されたCAPSマーカーが、香酸カンキツ品種においても有効に適用できることが確認された．

2. 香酸カンキツ特有なアレルの検出

26種類のCAPSマーカーを用いて本研究で供試した33品種・系統の香酸カンキツについて遺伝子型を調査した結果、Fujiiら(2019)で報告された生食用カンキツ25品種・系統にみられない新たなアレルが検出された．Al0224/*Hind* IIIでは、1,900 bpと300 bpで構成されるCアレルが検出され、ユズ、スダチ、ユコウ、‘阿波すず香’が特異的にCアレルを保持していることが明らかとなった(第2図)．また、Al0524/*Hha* Iでは、1,050 bpと750 bpで構成されるCアレルが検出され、タヒチライム、辺塚だいだい、ダイダイがCアレルを保持していることが明らかとなった．これらのマーカーのCアレルは、生食用カンキツでは見られなかったことから、香酸カンキツの識別に利用できる特有のアレルと考えられた．この他、Cp1624/*Msp* I, Tf0001/*Msp* I, Cp1031/*Hha* IにおいてもFujiiら(2019)の研究で報告されているレモンに特異的なCアレルが、本

園学研. (Hort. Res. (Japan)) 20 (1) : 17-27. 2021.

23



第2図 香酸カンキツにみられるCアレルを持つ5種類のCAPSマーカーの制限酵素処理した増幅断片の電気泳動図
M: 100 bp ラダー, 2, 23, 31, 33: 第1表の調査番号に準じる。各品種の遺伝子型は調査番号の下に記す

研究で供試した‘璃の香’とタヒチライムで検出された、A10224/*Hind* III, A10524/*Hha* I, Cp1624/*Msp* I, Tf0001/*Msp* I, Cp1031/*Hha* Iは、それぞれ Scaffold 2, 4, 1, 3, 9 にあり、Cアレルをもつマーカーが特定の染色体に偏っていることはなかった。

3. 香酸カンキツの在来品種識別のための最少マーカーセット

品種識別に利用するDNAマーカーは、明瞭で安定的な識別結果が求められていることから、Tf0001/*Msp* Iは香酸

カンキツを対象とするDNA品種識別には不適であると判定し、以降のすべての解析から除外し、明瞭な電気泳動パターンが得られた25種類のCAPSマーカーの遺伝子型データを解析した。国内流通量1位から10位までの香酸カンキツの在来品種と既報の生食用カンキツを加えた合計で35品種・系統の遺伝子型データ(第3表)を用いてMinimalMarkerにより、すべての品種を識別するために必要な最少マーカーセットを検出した。6種類のCAPSマーカーから構成される53組み合わせの最少マーカーセットが存在した。そのうち、クレメンティン(*C. clementina hort. ex Tanaka*)の物理地図にCAPSマーカーをマップした場合に(第2表)、異なるScaffoldにマップされるCAPSマーカーから構成される最少マーカーセットの組み合わせは16通りあった(第4表)。

育成者権を有する‘璃の香’と‘阿波すず香’について、統合した35品種・系統の遺伝子型データを用いて同様に最少マーカーセットを検出した。‘璃の香’を識別する最少マーカーセットは、2種類のCAPSマーカーから構成される66組み合わせの最少マーカーセットが存在し、そのうちScaffoldの位置が異なる構成のマーカーセットは60通りであった(第5表)。「阿波すず香」の最少マーカーセットは、2種類のCAPSマーカーから構成される1組み合わせであった(第5表)。最少マーカーセットの情報を用いてCAPS分析を行い、供試サンプルの遺伝子型が‘璃の香’あるいは‘阿波すず香’の遺伝子型と合致すれば、供試サンプルがいずれかの品種である可能性が高いことを簡易に判定できる。

4. 育成品種の親子鑑定

‘阿波すず香’はスタチ‘速見本田四倍体’とユズ‘山根系’の組み合わせで得られた三倍体品種で、Tf0001/*Msp* Iを除く電気泳動パターンが明瞭な25種類のCAPSマーカー

第4表 35品種・系統の品種識別をするための最少マーカーセット(6種類のマーカーの組み合わせで構成される)

最少マーカーのサブセット番号	CAPSマーカー(スキュフォールド)						
サブセット1	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	A10524/ <i>Hha</i> I (4)	Tf0326-2/ <i>Hha</i> I (7)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット2	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	A10524/ <i>Hha</i> I (4)	Mf0090/ <i>Msp</i> I (7)	Tf0013-3/ <i>Rsa</i> I (8)	
サブセット3	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	A10524/ <i>Hha</i> I (4)	Mf0090/ <i>Msp</i> I (7)	Tf0150/ <i>Hinf</i> I (8)	
サブセット4	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Tf0318/ <i>Hinc</i> II (4)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット5	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Mf0097/ <i>Dra</i> I (4)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット6	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Gn0048/ <i>Pvu</i> II (4)	Mf0090/ <i>Msp</i> I (7)	Tf0150/ <i>Hinf</i> I (8)	
サブセット7	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Gn0048/ <i>Pvu</i> II (4)	Tf0150/ <i>Hinf</i> I (8)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット8	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Tf0271/ <i>Rsa</i> I (6)	Mf0090/ <i>Msp</i> I (7)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット9	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	Gn0073/ <i>Sty</i> I (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Tf0318/ <i>Hinc</i> II (4)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット10	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	Gn0073/ <i>Sty</i> I (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Mf0097/ <i>Dra</i> I (4)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット11	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Tf0318/ <i>Hinc</i> II (4)	Tf0271/ <i>Rsa</i> I (6)	Tf0326-2/ <i>Hha</i> I (7)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット12	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Tf0318/ <i>Hinc</i> II (4)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	Tf0150/ <i>Hinf</i> I (8)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット13	Cp1624/ <i>Msp</i> I (1)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Mf0097/ <i>Dra</i> I (4)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	Tf0013-3/ <i>Rsa</i> I (8)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット14	Bf0036-2/ <i>Msp</i> I (1)	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Tf0318/ <i>Hinc</i> II (4)	Tf0208/ <i>Hinf</i> I (5)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	
サブセット15	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Gn0048/ <i>Pvu</i> II (4)	Mf0090/ <i>Msp</i> I (7)	Tf0013-3/ <i>Rsa</i> I (8)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	
サブセット16	A10224/ <i>Hind</i> III (2)	Bf0158-3/ <i>Pvu</i> II (3)	Tf0386/ <i>Msp</i> I (6)	Mf0090/ <i>Msp</i> I (7)	Tf0013-3/ <i>Rsa</i> I (8)	A10302/ <i>Hind</i> III (9)	

² クレメンティンのゲノム情報はPhytozome <<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>>を参照

第5表 ‘璃の香’ または ‘阿波すず香’ と第3表の他の品種を識別するための最少マーカーセット

最少マーカーの サブセット番号	‘璃の香’ の最少マーカーセット ² (クレメンティンのスキヤフォールド番号) ³		‘阿波すず香’ の最少マーカーセット (クレメンティンのスキヤフォールド番号) ³	
サブセット 1	Cp1624/Msp I (1)	Gn0073/Sty I (2)	Al0224/Hind III (2)	Bf0158-3/Pvu II (3)
サブセット 2	Gn0073/Sty I (2)	Tf0420/Hae III (3)		
サブセット 3	Tf0420/Hae III (3)	Tf0150/Hinf I (8)		
サブセット 4	Tf0318/Hinc II (4)	Tf0271/Rsa I (6)		
サブセット 5	If0208/Hinf I (5)	Tf0326-2/Hha I (7)		
サブセット 6	Tf0271/Rsa I (6)	Tf0326-2/Hha I (7)		
サブセット 7	Mf0090/Msp I (7)	Tf0150/Hinf I (8)		
サブセット 8	Tf0013-3/Rsa I (8)	Cp1031/Hha I (9)		
サブセット 9	Al0302/Hind III (9)	Tf0150/Hinf I (8)		

² 全 66 サブセットのうち 9 サブセットを表示

³ クレメンティンのゲノム情報は Phytozome <<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>> を参照

遺伝子型について MARCO を用いて親子鑑定を行った。25 種類のマーカーのうち、両親で多型を示すマーカーは 6 種類あり、‘阿波すず香’ は両親のいずれかのアレルを受け継いだ遺伝子型を有していた。Al0224/Hind III で検出された C アレルについては、両親のスタチ ‘速見本田四倍体’ とユズ ‘山根系’ でみられ、‘阿波すず香’ にも受け継がれていることが確認された。以上のことから、中島ら (2015) の記載どおり、‘阿波すず香’ はスタチ ‘速見本田四倍体’ とユズ ‘山根系’ の交配で得られたとして矛盾はなかった。

考 察

本研究では、Fujii ら (2019) がカンキツの品種識別のために開発した 26 種類の CAPS マーカーを用いて香酸カンキツの品種識別開発を試みた。26 種類の CAPS マーカーはクレメンティンやウンシュウミカンのゲノム配列情報と遺伝子 ID で紐づけられ、ゲノム中の位置情報や遺伝子のアノテーション情報が明らかとなっている。26 種類のマーカーは、カンキツの 9 本の各染色体に少なくとも 2 マーカーを含む構成となっており、ゲノムワイドな多型の検出が可能となっている。また、親子関係にある 3 品種を用いたトリオ解析により、交雑親のいずれかのアレルが後代に遺伝することも確認されており、カンキツの育成品種の親子鑑定に利用できることが報告されている。26 種類の CAPS マーカーのプライマーは、ウンシュウミカン (*C. unshiu* Marcow.) やボンカン (*C. reticulata* Blanco) などのマンダリン類、オレンジ (*C. sinensis* (L.) Osbeck)、ブタン (*C. grandis* Osbeck) など幅広いカンキツに適応することが確認されており、本研究において、香酸カンキツ類にも適用できることが確認された。しかしながら、CAPS マーカーでは、三倍体品種の分析でヘテロの遺伝子型が得られた場合、いずれのアレルが倍数化しているかを判定できないことが課題として明らかとなった。倍数化したアレルを判定する必要がある場合、リアルタイム PCR 機器を用いた SNP 分析法などによるジェノタイプングが有効で

あると考える。

26 種類の CAPS マーカーを国内で流通する主要な香酸カンキツに適用した結果、供試したユズの 7 品種・系統、スタチの 11 品種・系統、ユコウの 3 系統、ジャバラの 4 系統において遺伝子型がすべて同一であることが明らかとなった。従来、ユズやスタチは形質や産地により系統名がつけられ区別されてきた (音井, 1989; 佐金, 1999)。ユズでは ‘多田錦’ など種子のほとんど入らない無核種、‘山根系’ を含む有核の早期結実種、‘海野系’ を含む普通種といった系統分けがなされているほか、産地で選抜育成された ‘要系’ や ‘藤田木頭’、在来のユズに比べやや腰高で果頂部周辺の凹環が円盤状に突出するといった特徴を有するユズの偶発実生 ‘平の香’ などの品種が存在している (音井, 1989)。スタチでは、刺や種子の有無に基づいた区別がなされており、現在徳島県で最も盛んに生産されている ‘本田系’ を含む無刺有核種、一般に種なしスタチと呼ばれる ‘新居系’ を含む無刺無核種、‘大東系’ や在来の古木を多く含む有刺有核種といった系統が存在するほか、果皮がひととき濃緑色の晩生種である ‘緑香’ や ‘勝浦 1 号’、大玉系の ‘速見本田四倍体’、さらには ‘神山 4 号’ など産地で選抜育成された系統も多く存在している (安達, 1966)。ユズ、スタチは歴史が古く、かつては実生によって増殖されており、偶発実生や枝変わりなども加わって様々な形質に分化が見られる (間苧谷ら, 2006)。本研究の結果、供試したユズやスタチの遺伝子型がすべて同一であったことから、各系統でみられる形質の違いは、交雑ではなく、枝変わりや珠心胚実生による突然変異で生じたものであることが示唆された。ユズとスタチは多胚であるため、珠心胚実生による繁殖であれば、基本的に種子親と同じ遺伝子型が伝達され、ゲノムの同一性が保たれるので、実生繁殖が行われていたとしても各系統の遺伝子型が一致したことは合理的に説明できる。ユコウはユズとダイダイの自然交雑により生じた日本原産のユズの変種と推定されている。ユズやスタチと異なり、青果としての利用は少なく、果汁はカンキツ酢などの加工品に利用され、地域特産

品として徳島県や高知県で古くから栽培されている。ジャバラは和歌山県東牟婁郡北山村原産で、ユズ、クネンボ (*C. nobilis* Lour.), コミカンなどの自然交雑から生じたユズの変種と推定されている (Tanaka, 1969)。ジャバラの果実にはナリルチンなどのフラボノイドが含有されており、ジャバラには花粉症の症状改善効果があると報告され (湊口ら, 2008), 特産果樹として和歌山県, 三重県, 愛媛県などで栽培されている。ジャバラやユコウについても系統間の遺伝的な多様性はこれまで不明であったが、ユコウは多胚であることや供試した系統間で遺伝子型が一致したことから、ユズやスダチと同様に系統の形質の違いは自然交雑によって生じたものではなく、枝変わりや珠心胚実生による突然変異で生じたものであることが示唆された。一方、ジャバラは単胚であることや供試した系統間で遺伝子型が一致したことから、接ぎ木繁殖により普及したことが考えられる。

26種類のCAPSマーカーを用いて香酸カンキツの遺伝子型を調査した結果、Fujiiら(2019)が解析した生食用カンキツでは見られなかった新規のアレルを検出した。AI0224/*Hind* IIIでは、ユズ、スダチ、ユコウに特異的なCアレルが検出され、ユズとスダチの交配で得られた‘阿波すず香’においてもCアレルが検出された。AI0524/*Hha* Iでは、タヒチライム、ダイダイ、辺塚だいたいに特異的なCアレルが検出された。これらのCアレルは二倍体のユズやダイダイで検出されていることから、AアレルまたはBアレルの遺伝子座の近傍に重複進化により生じた可能性が高いと考えられるが、異なる遺伝子座に由来する可能性もあるため、交雑実生を用いてこれらのアレルの分離パターンを調査する必要がある。この他、Cp1624/*Msp* I, Tf0001/*Msp* I, Cp1031/*Hha* Iにおいて、Fujiiら(2019)の研究で報告されているレモンに特異的なCアレルがタヒチライムでも検出されている。これらの香酸カンキツ特異的なCアレルについては品種識別や香酸カンキツの派生を検討するうえで極めて有効である。次世代シーケンサーを用いたゲノム解析からカンキツ類は数種の古代種の繰り返しの自然交雑により様々な在来種が派生したと推察されている (Curkら, 2014)。本研究で新たに検出されたユズやスダチに特異的なCアレルについては、インド原産とされるレモンやタヒチライムと共有していないことから、ユズ、スダチ、ユコウ、ジャバラについては、レモンやタヒチライムなどの香酸カンキツ群とは異なる成立過程に由来することを支持する結果となった。香酸カンキツと既存生食用カンキツのアレル頻度の平均を比較すると、AアレルとBアレルのアレル頻度はそれぞれ0.58, 0.40と0.51, 0.49であり、香酸カンキツでは生食用カンキツよりもAアレルに偏っている。CAPSマーカーは制限酵素認識配列内の変異を利用したマーカーであり、アレル頻度が偏っていること、3種類のCAPSマーカーですべてホモであったことから、香酸カンキツは生食用カンキツよりもアレル間の変

異が少ないことを示している。これは、本研究で使用したCAPSマーカーが生食用カンキツを対象に開発されたために、生食用カンキツにおいて制限酵素認識配列に変異が生じやすい領域がマーカー化されたことに起因していると考えられる。また、スダチ、カボス、ユコウ、ジャバラなど我が国特有の香酸カンキツにおいて、これらのマーカーの制限酵素認識配列が保存されていることから、間苧谷ら(2006)が指摘しているように、これらがユズなどの比較的少数の祖先品種から派生したことを示唆していると考えられる。

品種のDNA鑑定では、明瞭で安定的な識別結果が求められている。このためTf0001/*Msp* Iを除く25種類のCAPSマーカーを用いて徳島県育成品種‘阿波すず香’の親子鑑定を行ったところ、‘阿波すず香’は種子親であるスダチの‘速見本田四倍体’と花粉親であるユズ‘山根系’のいずれかのアレルを受け継いだ遺伝子型を有しており、親子関係に矛盾がないことが示された。‘阿波すず香’のTf0001/*Msp* I泳動パターンから遺伝子型の判定が困難であったことについては、‘阿波すず香’が四倍体と二倍体の両親から得られた三倍体であることが原因の一つであると考えられた。他の25種類のCAPSマーカーについては‘阿波すず香’で明瞭な泳動パターンが得られていることから、倍数体では親の遺伝子型の組み合わせにより判定が困難になるマーカーが生じることが示唆された。品種のDNA鑑定では、明瞭で安定的な識別結果に加え、実験の再現性も求められる。栄養繁殖のカンキツでは接ぎ木など栄養繁殖で増殖した複製樹に加え、種子繁殖で増殖している多胚のカンキツもみられる。このため、カンキツのDNA品種識別では実験の再現性を担保するために、供試材料の遺伝子型情報を取得した個体を特定する必要がある。本研究で供試したジャバラを除くすべての個体は、いずれもカンキツ研究拠点で遺伝資源として保存され、ジーンバンクのJP番号が付与されているため、個体の特定が可能であり、再実験への供試が可能である。ジャバラについても、和歌山県果樹試験場で基準木(第1表, 調査番号27番)を設定しているため、同様である。シクワサー、カボス、タヒチライム、ダイダイについても苗木の増殖が栄養繁殖か種子繁殖か不明瞭であるものが流通している可能性があることから、ユズやスダチと同様に、採取場所の履歴情報を持つ複数系統を解析する必要がある。本研究では、これらのサンプルの入手が困難であることから遺伝子的多様性を明らかにできなかったが、JP番号を持つ代表的な系統の遺伝子型情報が今後の研究の足がかりとなることを期待している。

以上のことから、本研究により我が国の主要な香酸カンキツの科学的な品種識別のための基盤が確立された。これまでユズ、スダチ、ユコウ、ジャバラについては、それぞれのグループ内の品種・系統間の遺伝的な多様性が不明であったが、本研究では26種類のCAPSマーカーの遺伝子

型がすべて同一であることを明らかにした。同時に、このマーカーによる解析は、Fujiiら(2019)で報告した生食用カンキツのDNA品種識別を拡張し、我が国の主要なカンキツ35品種・系統の識別が可能となった。35品種・系統のCAPSマーカーの遺伝子型情報や品種識別に必要な最小マーカーセットの情報を新たに整理したことから、我が国で育成された優れたカンキツ品種の育成者権保護に必要な基盤情報が強化された。今後は、本研究で得られたCAPSマーカーの遺伝子型を参照することで、本研究で解析していない品種・系統や国内で自生する未知の系統、さらに新たに育成される交雑系統などの香酸カンキツを遺伝的に整理することが可能となる。

摘 要

香酸カンキツの国内生産量の増加や輸出量の拡大を受けて、香酸カンキツの品種識別技術の確立と新品種の育成者権の保護が求められている。33品種・系統の香酸カンキツについて、生食用カンキツの品種識別に適用した26種類のCAPSマーカーを用いて遺伝子型を調査した結果、形質や産地によって複数の系統に分類されていたユズ(*C. jumos hort. ex Tanaka*)、スダチ(*C. sudachi hort. ex Shirai*)、ユコウ(*C. yuko hort. ex Tanaka*)、ジャバラ(*C. jabara hort. ex Tanaka*)は系統間で遺伝子型がすべて同一であることが示された。また、5種類のCAPSマーカーで生食用カンキツにみられない新規のアレルが検出された。Tf0001/*Msp* Iを除く25種類のCAPSマーカーの遺伝子型データを用いてMinimalMarkerプログラムで最少マーカーセットを算出したところ、主要な10種類の香酸カンキツを含むカンキツ35品種・系統は6種類のCAPSマーカーで相互に品種・系統を特定できることが明らかとなった。MARCOプログラムを用いて徳島県で育成された三倍体の新品種‘阿波すず香’(*C. sudachi* (2n=4x) × *C. jumos* (2n=2x))の親子関係を鑑定したところ、‘阿波すず香’が両親のいずれかから受け継いだアレルを有し、親子関係に矛盾がないことが示された。国内で流通する主要な香酸カンキツのDNA品種識別技術の確立により、国産ブランドや育成者権の保護が強化された。

謝 辞 本研究の実施に当たり、供試材料の採取に協力いただいた徳島県立農林水産総合技術支援センター農産園芸研究課・津村哲宏専門研究員に心より感謝申し上げます。

本研究は文部科学省科学技術人材育成費補助事業「ダイバーシティ研究環境実現イニシアティブ(牽引型)」に基づく研究助成金により実施したものである。

引用文献

- 安達義正. 1966. 徳島の園芸. p. 19–20. 徳島県.
- Curk, F., G. Ancillo, A. Garcia-Lor, F. Luro, X. Perrier, J. P. Jacquemoud-Collet, L. Navarro and P. Ollitrault. 2014. Next generation haplotyping to decipher nuclear genomic interspecific admixture in *Citrus* species: analysis of chromosome 2. *BMC Genet.* 15: 152.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19–21.
- Fujii, H., T. Narita, H. Oshino, T. Endo, T. Kawakami, H. Goto, T. Yoshioka, M. Omura and T. Shimada. 2019. CAPS markers with stability and reproducibility for discriminating major citrus cultivars in Japan. *DNA polymorphism* 27: 71–79.
- Fujii, H., T. Ogata, T. Shimada, T. Endo, H. Iketani, T. Shimizu, T. Yamamoto and M. Omura. 2013. MinimalMarker: 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.
- 藤井 浩・山下浩之・保坂ふみ子・寺上伸吾・山本俊哉. 2010. DNAマーカー型データから親子関係を推定するソフトウェアの開発. *園学研.* 9 (別1): 34.
- 金好純子・古田貴音・塩田 俊・赤坂信二・柳本裕子・栗久宏昭. 2014. レモン自然交雑実生における三倍体の出現と新品種‘イエローベル’の育成. *園学研.* 13: 19–26.
- 間学谷 徹・小野祐幸・木原武士・仙台谷峰彦・宇田川美代子. 2006. 特産果樹. p. 399–400. 日本果樹種苗協会. 東京.
- 湊口信也・大野 康・舟口祝彦. 2008. スギ花粉症の症状とQOLに対する「じゃばら」果汁の効果. *臨床免疫・アレルギー科.* 50: 360–364.
- 中島光廣・徳永忠士・新居美香・津村哲宏・山本浩史・阪口 優・山尾正実. 2015. 三倍体香酸カンキツ新品種‘阿波すず香’の育成. *徳島農林水産技術支援セ研報.* 2: 9–12.
- Nakano, M., T. Shimizu, S. Sugawara, J. Kaneyoshi, H. Fujii, M. Kita, T. Yoshioka and A. Kitajima. 2019. Determining the parental combinations of the triploid acid citrus cultivars ‘Yellow Bell’ and ‘Tahiti lime’ using DNA marker analyses. *Sci. Hortic.* 246: 893–897.
- 二宮泰造・島田武彦・遠藤朋子・野中圭介・大村三男・藤井 浩. 2015. CAPSマーカーによるカンキツの品種識別法の開発と親子鑑定. *園学研.* 14: 127–133.
- Nonaka, K., H. Fujii, M. Kita, T. Shimada, T. Endo, T. Yoshioka and M. Omura. 2017. Identification and parentage analysis of citrus cultivars developed in Japan by CAPS markers. *Hort. J.* 86: 208–221.
- 農研機構. 2019. カンキツ22品種のDNA品種識別技術マニュアル—CAPSマーカーによるカンキツ22品種のDNA品種識別技術—. <https://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/130601.html>.

園学研. (Hort. Res. (Japan)) 20 (1) : 17-27. 2021.

27

- 農林水産省. 2019a. 特産果樹生産動態等調査 平成28年度産. <https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tokusan_kazyu/>.
- 農林水産省. 2019b. 農林水産物輸出入概況 平成28年度. <https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/houkoku_gaikyou.html>.
- 農林水産省. 2020. 地理的表示 (GI) 保護制度. <https://www.maff.go.jp/j/shokusan/gi_act/index.html>.
- 太田 智・吉岡照高・根角博久・喜多正幸・國賀 武・中嶋直子・濱田宏子・滝下文孝. 2014. レモン新品種 '璃の香'. 園学研. 13 (別2): 316.
- 音井 格. 1989. ユズー露地・ハウス栽培と貯蔵法一. p.29-33. 農文協. 東京.
- 佐金信治. 1999. スダチに関する研究—スダチ百科—. 徳島果試特報. 6: 39-45.
- Sharafi, A. A., A. A. Abkenar, A. Sharafi and M. Masaeli. 2016. Genetic variation assessment of acid lime accessions collected from south of Iran using SSR and ISSR molecular markers. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 22: 87-95.
- Tanaka, T. 1969. Misunderstanding with regards citrus classification and nomenclature. *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B* 21: 139-145.