

耐病性育種に向けたイチゴおよびニラ SSR マーカー等の 大量開発に関する研究

田崎 公久

目 次

総合序論	1
第 1 章 RAPD-STS マーカー, AFLP-STS マーカーおよびマルチプレックス PCR による イチゴ品種識別	3
第 1 節 ‘とちおとめ’および‘とちひめ’識別用プライマーセットの開発	3
第 2 節 国内主要イチゴ品種を識別するマルチプレックス PCR プライマーセットの開発	12
第 2 章 イチゴ SSR マーカーの大量開発	16
第 1 節 イチゴゲノムにおける SSR 濃縮ライブラリー法による SSR マーカー大量開発	16
第 2 節 イチゴ EST からの SSR マーカー大量開発	23
第 3 章 SSR マーカーによる‘とちおとめ’× イチゴ炭疽病抵抗性‘いちご中間母本農 2 号’F ₁ 集団の多型検索	27
第 4 章 ニラにおける RNA-seq による SSR マーカー大量開発	46
総合考察	53
要旨	56
謝辞	58
引用文献	59

総合序論

栽培イチゴ (*Fragaria*×*ananassa*) は、バラ科イチゴ属に分類される 8 倍体 ($2n=8x=56$) の多年生草本植物である。果実は、生食またはジャムや菓子等の加工品として食される。その起源は不明な点があるが、18 世紀半ばにヨーロッパ市場に現れており、Duchense は、8 倍体である北アメリカ原産の *F. virginiana* と南アメリカ原産の *F. chiloensis* の種間雑種と推定し、*F.*×*ananassa* と命名している (國久, 2008)。イチゴは、世界的に需要が増加しており、特に東アジアの中国や韓国において生産量および面積が増加している。2000 年における世界の生産量は 566 万 t、栽培面積は 38 万 ha であったが、2017 年においては生産量が 1,295 万 t、栽培面積が 53 万 ha と増加している (FAO STAT)。

日本における栽培イチゴは、江戸時代末期にオランダより渡来している。戦後、収益性が高いことや水田転換の園芸品目として作付され、食味や収量面での品種改良、露地およびトンネル栽培からビニールハウス栽培への転換、夜冷育苗、電照、炭酸ガス施用等の栽培技術の導入により安定的に市場に供給されるようになり、現在では初冬～春における一般的な果物として認知されている。2018 年産国内収穫量は 161,800t、作付面積は 5,200ha であり、栃木県、福岡県、熊本県、静岡県、長崎県、愛知県、茨城県、佐賀県、千葉県、宮城県が主要産地である (農林水産省平成 30 年産野菜生産出荷統計)。また、その国内産出額は 2017 年産で 1,752 億円に達し、園芸品目ではトマトの 2,422 億円に次ぐ品目となっている (農林水産統計平成 29 年生産農業所得統計)。

栃木県におけるイチゴの集団栽培は、1952 年に宇都宮市姿川地区および御厨町 (現足利市) で始まったとされる (川里, 2008, 大橋, 2019)。その後、首都圏に近い立地条件、冬期の日照時間が多いこと、比較的地下水が得られやすいこと、冬期の保温がウオーターカーテンで行えることから作付けが拡大した。収穫量は 2018 年産で 24,900t、作付面積が 545ha であり、全国における割合はそれぞれ 15.5%および 10.5%と全国一位である (農林水産省平成 30 年産野菜生産出荷統計)。また、産出額は 2017 年産で 271 億円である (農林水産統計平成 29 年生産農業所得統計)。栽培品種は、‘女峰’ (赤木ら, 1985) 以降、‘とちおとめ’ (石原ら, 1996)、極大果‘栃木 i27 号’ (商標登録名:スカイベリー, 重野ら, 2015)、観光摘み取り用‘とちひめ’ (栃木ら, 2001)、夏秋採り用四季成りイチゴ‘なつおとめ’ (小林ら, 2015) とほぼ本県育成品種で占められる。また、2018 年には、新たに白色果‘栃木 iW1 号’ (商標登録名:ミルキーベリー, 鶴見ら, 2020)、極早生およびイチゴ萎黄病耐病性である‘栃木 i37 号’ (商標登録名:とちあいか, 大橋ら, 2020) を育成している。このように

品種育成は、栽培技術の確立とともに本県のいちご生産振興に極めて重要な役割を果たしている。

国内における栽培イチゴの重要病害については、イチゴ炭疽病 (*Glomerella cingulate* = *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*)、イチゴ萎黄病 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)、イチゴうどんこ病 (*Sphaerotheca aphana* var. *aphana*) が挙げられる。特に *Glomerella cingulata* によるイチゴ炭疽病は、枯死に至ることから難防除病害である。本病は、夏期育苗中の高温多湿条件下により葉、葉柄およびランナーに病斑を形成し、頭上かん水または降雨により分生胞子が飛散し、感染が拡大する (石川, 2005)。一次感染源は潜在感染株および罹病残さである (石川ら, 1989a)。本県で育成した‘女峰’および‘とちおとめ’は、ともにイチゴ炭疽病罹病性であり、特に‘女峰’については 1987 年に本病により深刻な苗不足が発生した (橋田ら, 1988)。本病は、感染を予防することが重要であり、薬剤散布による化学的防除、雨除け育苗 (石川ら, 1989b; 手塚・牧野, 1989; Okayama, 1993)、底面給水 (石川ら, 1993; Okayama, 1993)、残さの不活化 (石川ら, 1990)、潜在感染株の検出 (岡山, 1993; Ishikawa, 2003; 岡山ら, 2007; 鈴木ら, 2008; 中田ら 2018) および除去等の耕種的防除法が確立されている。しかし、多回数の薬剤散布や潜在感染株の除去は、生産者の身体的、精神的負担が大きい。また、薬剤耐性菌に関しては、ペノミル (手塚・牧野, 1989)、ストロビルリン系 (稲田ら, 2008)、ベンズイミダゾール系 (稲田ら, 2009)、ジエトフェンカルブ (稲田ら, 2009) の薬剤で報告されている。そのため、抵抗性品種の育成は、生産者および関係団体から常に望まれている。イチゴ炭疽病抵抗性品種は、接種試験により‘宝交早生’、‘はつくに’、‘明宝’、‘Dover’が報告されている (岡山ら, 1989; 石川, 2005; Noguchi *et al.* 1994)。「宝交早生」および‘Dover’、またこれらの後代品種・系統は、イチゴ炭疽病抵抗性育種素材として利用され、近年では、抵抗性品種として農研機構の‘カレンベリー’ (沖村ら, 2010) および‘いちご中間母本農 2 号’ (沖村ら, 2004)、三重県の‘サンチーゴ’ (森ら, 2000) および‘かおり野’ (北村ら, 2015) が品種登録されている。しかし、本県育成品種については、いまだに罹病性であり、イチゴ炭疽病抵抗性付与は、本県のイチゴ育種の需要目標の一つである。また、近年の‘かおり野’の育成においては、交配親に‘女峰’、‘アイベリー’、‘とよのか’、‘宝交早生’を相互交配後、‘章姫’、‘あかしやみつこ’、‘とちおとめ’、‘サンチーゴ’を加えて、9 世代にわたり相互交配した抵抗性系統を交配親として育成されており (北村ら, 2015)、最初の交配から登録出願までに 18 年の年月が費やされている。炭疽病抵抗性は quantitative trait locus (QTL) であるため (森, 2001)、効率的に抵抗性遺伝子の集積を図るために

は、DNA マーカーの利用が必要不可欠である。

8 倍体である栽培イチゴの遺伝様式については、國久 (2008) のゲノム特異的な cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーの研究により、近年では、Bringham (1990) が提唱した AAA'A'BBB'B' 説が有力である。ゲノムサイズに関しては、Akiyama *et al.* (2001) がフローサイトメトリーにより‘宝交早生’が 578 Mb/C、‘とよのか’が 571 Mb/C、2 倍体である *Fragaria vesca* における‘UC5’が 164 Mb /C と推定し、ゲノムサイズは小さいことを報告している。

ニラ (*Allium ramosum*, syn. *A. tuberosum*) は、ヒガンバナ科ネギ属に分類される 4 倍体 ($2n=4x=32$) の多年生草本植物である。原産地は中国西部とされ、ネギ属特有の臭いであるアリシンを含む緑黄色野菜である。可食部は、葉および若い花茎・蕾であり、定植株養成後、地上部を複数回収穫し、市場出荷する。世界においては東アジアおよび東南アジアで栽培されている。

日本におけるニラは、古くは古事記に上美良 (かみら)、万葉集に久君美良 (くくみら) として記載されている。2018 年産国内収穫量は 58,500t、作付面積は 2,020ha である。主要産地は、高知県、栃木県、茨城県、宮城県、群馬県であり、収穫量の割合は、それぞれ 25.3%、18.1%、13.7%、5.7%、5.3%である (農林水産省平成 30 年産野菜生産出荷統計)。

栃木県におけるニラ栽培は、水田転換園芸品目として 1960 年代頃より導入されている。その後、イチゴやトマト等の園芸品目と比較して施設整備が低コストであること、イチゴほど栽培管理労力がかからないことから、県内各地で栽培されるようになった。本県におけるニラの作型は、2 年 1 作であり、一般的に 3 月播種・育苗、5～6 月に定植、その後 12 月まで株養成を行い、翌年 1 月より捨て狩り・保温後、収穫を開始する。収穫回数は 6～8 回程度あり、夏期に収穫する夏ニラを組み合わせることより、周年出荷を行うことができる。2018 年産収穫量は 10,600t で全国二位、作付面積は 360 ha であり (農林水産省平成 30 年産野菜生産出荷統計)、全国一位である。本県が育成したニラ品種は、‘きぬみどり’ (木村, 1995)、近年では‘ゆめみどり’ (大島ら, 2017) がある。特に‘ゆめみどり’は葉幅および葉厚があり、低温伸長性があることから、収量向上が見込め、2018 年産で 24ha と増えてきている。また、抽苔時期をずらす目的で、ネギとニラの種間雑種‘なかみどり’ (天谷ら, 1995) が育成されている。

ニラの代表的な生物学的特徴としては、①同質また部分的異質 4 倍体 ($2n=4x=32$)、②高温長日条件下で花芽分化する、③アポミキシス (apomixis) 性を有する、以上 3 点が挙げられる。特に、アポミキシス性は、育種年限の短縮とヘテロシスを固定できるというメリットがある。しかし、その前に通常

の交雑育種ができないという問題点がある。ニラのアポミキシスは、複相大孢子形成 (diplospory; Kojima・Nagato, 1992a) と単為発生 (parthenogenesis; Kojima・Nagato, 1992b) から成る。人工交配によって交雑率は 0～25.8%と推定されており (中澤, 2005)、条件的なアポミキシスであることが示されている。本県の育種では、当初エステラゼ・アインゾイム (天谷, 1996)、続いて花粉親特異的な random amplified polymorphic DNA (RAPD) マーカー (中澤ら, 2005) により交雑個体を確認していた。しかし、胚珠観察によってアポミキシス性を示さない個体を見出したこと (中澤ら, 2006) から、両性生殖個体を種子親、アポミキシス個体を花粉親とした F₁ 集団を作製し、RAPD マーカーによるスクリーニング後、sequence characterized amplified region (SCAR) 化した単為発生連鎖マーカー parthenogenesis linked marker (PLM) 1 と PLM3 を作出している (天谷ら, 2010)。両マーカーは単為生殖因子を挟んでいると推定され、現在、これらを用いて交雑個体の単為発生性を確認し、単為発生個体は新品種候補、非単為発生性個体は中間母本候補として選抜していく画期的な育種システムを確立し (齋藤ら 2012)、唯一ニラの効率的な交雑育種を行うことを可能にしている。

ニラにおける病害については、ニラ白斑葉枯病 (*Botrytis cinerea* Persoon, *B. byssoidea* Walker, *B. squamosa* Walker)、ニラえそ条斑病 (*Iris yellow spot virus*)、ニラ乾腐病 (*Fusarium oxysporum*, *F. proliferatum*)、ニラ白絹病 (*Sclerotium rolfsii* Saccardo)、ニラ紅色根腐 (*Pyrenochaeta terrestris*) 等がある。また、害虫では、ネダニ (*Rhizoglyphus robini*) による被害が著しい。これらの病害虫の防除は、イチゴと同様に薬剤散布による防除および耕種的防除が基本となるが、ニラは、準マイナー作物であるため登録農薬が少ない。そのため、耕種的防除技術の開発とともに抵抗性育種を進めていく必要がある。

育種を行う上で最大の問題点は、品種育成までに長い歳月を必要とすることである。本県のイチゴ育種の場合、‘女峰’から‘とちおとめ’出願までに 12 年、‘とちおとめ’から‘栃木 i27 号’出願までに 17 年を要している。また、本県のイチゴ交配実生は年間約 1 万系統に達しており、その形質調査に膨大な労力が費やされている。DNA マーカーを用いた育種は、幼苗の段階で選抜できることから、ほ場の有効活用および調査労力軽減等の育種の迅速化の手段として着目されている。また、DNA マーカーは、品種識別技術にも活用され、育成者権保護や混種防止にも利用することができる。

DNA マーカーの多型検出技術は、上述の CAPS および RAPD の他に amplified fragment length polymorphism (AFLP)、simple sequence repeat (SSR)、inter-simple sequence repeat (ISSR) 等がある。RAPD、AFLP、ISSR は優性マーカー

一であるが、CAPS および SSR は共優性マーカーとして利用できる。また、CAPS および AFLP は PCR の他に制限酵素処理を必要とするが、RAPD、SSR、ISSR は PCR 後の電気泳動により簡便にマーカーが検出できる。RAPD については、マーカーの再現性が不安定であるため、目的とするマーカーのみ増幅させる sequence tagged site (STS) 化を行う必要がある。このように、各マーカー検出法には一長一短があり、必要場面に応じたマーカーの選択が必要である。

本研究を開始した 2000 年代初頭、イネではゲノム解読が行われていたが、イチゴおよびニラについては、倍数体であることから分子生物学的手法による遺伝解析がほぼ行われていなかった。また、ニラについてはゲノムサイズが大きいことや、世界における生産地域が限定されていることからほぼ知見はなかった。しかし、同じく 2000 年代初頭、海外から使用許諾していないイチゴを含む農産物が輸入される事例が発生したことから (竹次, 2004), DNA マーカーによる品種技術の開発が急務となった。

そこで、本研究では、まず栃木県の主要園芸品目であり、優良品種を作出しているイチゴの RAPD-STs および AFLP-STs マーカーによる迅速な品種識別技術の確立を目的とした。また、難防除病害であるイチゴ炭疽病耐病性連鎖 DNA マーカーの開発に向けて、イチゴの SSR マーカーの大量開発を目的とした。さらに、同じく主要園芸品目であり、交雑育種が行えるニラにおいても遺伝解析を行うため、イチゴと同様に SSR マーカーの大量開発を目的とした。

第 1 章の RAPD-STs マーカー、AFLP-STs マーカーおよびマルチプレックス PCR によるイチゴ品種識別については、2002～2004 年度に実施し、本県育成品種である‘とちおとめ’および 2001 年に品種登録した‘とちひめ’の育成者権保護を目的に、RAPD-STs および AFLP-STs マーカーとマルチプレックス PCR 法により、国内主要 8 品種 (‘とちおとめ’、‘さちのか’ (森下ら, 1997), ‘さがほのか’ (田中ら, 2001), ‘とよのか’ (本多ら, 1985), ‘福岡 S6 号’ (商標登録名: あまおう; 三井ら, 2003), ‘章姫’ (萩原, 1992), ‘女峰’, ‘紅ほっぺ’ (竹内ら, 1999), 合計作付面積 92.8%, 2005 年 JA 全農) を含む 25 品種・系統内から 1 回の PCR で品種識別する技術を開発した。さらに、3 組のプライマーセットを設計し、25 品種・系統を品種識別する技術を開発した。

第 2 章のイチゴ SSR マーカーの大量開発については、2005～2007 年度に実施し、‘とちおとめ’由来ゲノム SSR 濃縮ライブラリーおよび本県が蓄積した‘とちおとめ’由来 expressed sequence tag (EST) から SSR マーカーの大量開発を行った。また、Genomic-SSR マーカーと EST-SSR マーカーの配列特徴とモチーフ分類を比較検討した。

第 3 章の SSR マーカーによる‘とちおとめ’×‘いちご中間母

本農 2 号’F₁ 集団の多型検索については、2006～2007 年度に実施し、イチゴ炭疽病耐病性連鎖マーカーの開発を目的に、‘とちおとめ’ (罹病性) × ‘いちご中間母本農 2 号’ (抵抗性) F₁ 集団を利用して SSR マーカーによる多型検索を行った。また、genomic-SSR マーカーと EST-SSR マーカーの多型比較および複 2 倍体的な共優性関係を示す SSR マーカー検索を行った。

第 4 章のニラにおける RNA-seq による SSR マーカーの大量開発については、2013～2014 年度に実施し、‘ゆめみどり’由来の cDNA ライブラリーを構築後、次世代シーケンスによる RNA-seq 解析を行い、SSR マーカーの大量開発を行った。また、‘ゆめみどり’由来ゲノム SSR 濃縮ライブラリーおよび‘きぬみどり’由来 EST から SSR マーカーについても開発し、RNA-seq 由来 SSR マーカーと配列特徴およびモチーフ分類を比較した。さらに、RNA-seq 由来 SSR マーカーについては SSR 配列が含む領域および反復回数の違いによる多型の有無について検討した。

以上のように、本論文では、栃木県において育種を実施しているイチゴの RAPD-STs および AFLP-STs マーカーによる品種識別技術、イチゴおよびニラの SSR マーカーの知見についてとりまとめた。

なお、第 1 章の RAPD-STs マーカー、AFLP-STs マーカーおよびマルチプレックス PCR によるイチゴ品種識別については、先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「野菜・茶およびウメの原産地表示判別技術の開発」(2002～2004) により実施した。

第 1 章 RAPD-STs マーカー、AFLP-STs マーカーおよびマルチプレックス PCR によるイチゴ品種識別

第 1 節 ‘とちおとめ’ および ‘とちひめ’ 識別用プライマーセットの開発

1. 序論

2000 年代初頭、日本国内で育成された品種の苗および種が違法に海外へ持ち出され、栽培後、その収穫物が輸入された事例がイグサ、インゲンマメ、イチゴで報告されている (竹次, 2004)。更に、コメにおいては、流通の段階で他品種の混入や偽装表示の問題も起きている。このような違法農産物の鑑定には、DNA マーカーを用いた品種識別技術が用いられ、イネ (大坪ら, 2002; 新村ら, 2005), イグサ (齋藤, 2004), インゲンマメ (紙谷ら, 2004), イチゴ (Kunihisa *et al.*, 2003・2005) で実用化されている。

DNA マーカーによるイチゴの品種識別としては, cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) 法 (Kunihisa *et al.*, 2003・2005), random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法 (Degani *et al.*, 1998), amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法 (Degani *et al.*, 2001; Tyrka *et al.*, 2002; 下村ら, 2005), simple sequence repeat (SSR) 法 (Shimomura・Hirashima, 2006) を用いた技術が報告されている。Kunihisa *et al.* (2005) は CAPS 法を用いた品種識別技術を開発し, 国内外 64 品種の識別が可能であると報告している。しかし, CAPS 法による品種識別は, 検出過程で制限酵素処理を行う必要があり, コストおよび検出時間がかかる。そのため, 多検体を効率的に処理するためには, 検出手順の簡略化および低コストな DNA マーカーの開発が必要である。

そこで, 本県育成品種である‘とちおとめ’ (石原ら, 1996) および‘とちひめ’ (栃木ら, 2001) を識別できる RAPD-sequence tagged site (STS) および AFLP-STs マーカーの開発を試みた。さらに, 主要イチゴ 25 品種・系統内で‘とちおとめ’および‘とちひめ’を 1 回の PCR で識別できるようマルチプレックス PCR 化を試みた。

2. 材料および方法

(1) 供試品種および DNA 抽出

供試したイチゴ品種・系統は, ‘とちおとめ’, ‘さちのか’ (森下ら, 1997), ‘さがほのか’ (田中ら, 2001), ‘とよのか’ (本多ら, 1985), ‘福岡 S6 号’ (三井ら, 2003), ‘章姫’ (萩原, 1992), ‘女峰’ (赤木ら, 1985), ‘紅ほっぺ’ (竹内ら, 1999), 以上主要 8 品種 (2005 年 JA 全農調べ), ‘とちひめ’, ‘栃の峰’ (植木ら, 1993), ‘久留米 49 号’, ‘麗紅’ (成川ら, 1981), ‘はるのか’ (本多ら, 1974), ‘レッドパール’ (西田, 1993), ‘濃姫’ (長谷部ら, 1997), ‘アスカルビー’ (泰松ら, 2000), ‘メイヒャン’ (韓国育成品種), ‘熊研い 548’ (商標登録名: ひのしずく; 田尻ら, 2007), ‘さつまおとめ’ (鮫島ら, 2002), ‘サンチーゴ’ (森ら, 2000), ‘とねほっぺ’ (武井・湯谷, 2001), ‘やよいひめ’ (武井ら, 2007), ‘宝交早生’, ‘アスカウェイブ’ (峯岸ら, 1994) および‘とちひとみ’ (植木ら, 2006), 計 25 品種・系統を使用した。なお, ‘福岡 S6 号’は福岡県農業総合試験場, ‘アスカルビー’は奈良県農業技術センターよりポット苗を分譲していただいた。‘メイヒャン’については, 忠南農村振興院論山イチゴ試験場から葉を提供していただいた。その他 22 品種・系統は, 栃木県農業試験場栃木分場の品種保存苗を供試した。

DNA 抽出は, 各品種の葉片 1.0g を液体窒素で凍結後, 乳鉢および乳棒により粉砕し, Yamamoto *et al.* (2001) の CTAB 法により行った。

(2) RAPD 分析

RAPD 分析は, ‘とちおとめ’, ‘とちひめ’, 両品種の親である‘栃の峰’および‘久留米 49 号’の 4 品種・系統間で行った。明瞭な多型が検出されたランダムプライマーについては, 上記 4 品種・系統に‘女峰’, ‘麗紅’, ‘さちのか’, ‘とよのか’, ‘はるのか’, ‘章姫’, ‘紅ほっぺ’, ‘レッドパール’, ‘濃姫’, ‘アスカルビー’, ‘福岡 S6 号’および‘さがほのか’を加えた計 16 品種・系統間で多型を検索した。PCR 組成は, 液量 25 μ L とし, 鋳型 DNA 5ng, *rTaq* 1U (TAKARA 社), 1 $\times$ PCR Buffer (TAKARA 社), 0.2mM dNTP Mixture (TAKARA 社), 0.5 μ M ランダムプライマーとした。増幅反応は, サーマルサイクラー (DNA Engine Tetrad PTC-225, MJ Research 社) を用いて行った。ランダムプライマーは, DNA オリゴマーセット (12) セット (和光純薬社) 300 種類 (A-E) および OPERON 10mer kit (オペロン社) 167 種類 (OPA-OPH, OPQ04, OPQ07, OPQ20, OPR01-01, OPT17), 計 467 種類を用いた。PCR 条件は, 94 $^{\circ}$ C で 1 分間熱変性後, 94 $^{\circ}$ C で 1 分間, 44 $^{\circ}$ C で 2 分間, 72 $^{\circ}$ C で 2 分間を 1 サイクルとして 45 回繰り返す, 最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分間伸長反応を行った。PCR 増幅産物は, 6 $\times$ ローディングバッファー 5 μ L を添加混合後, 10 μ L を 1.5% アガロース (AGAROSE HT, AMRESCO 社), 0.5 $\times$ TBE で 100V, 40 分間電気泳動した。泳動したアガロースゲルは, エチジウムブロマイド溶液 (0.5 μ g/ml) で 30 分間染色後, デンシトグラフ AE-6920-FX (ATTO 社) で多型を検出した。

(3) AFLP 分析

AFLP 分析は, RAPD 分析と同様に 16 品種・系統により行った。各品種・系統の DNA 150ng を Kawaguchi *et al.* (2001) の方法に従い, 制限酵素処理および *EcoRI* および *MseI* アダプターをライゲーションした。ライゲーション産物は 1/10 TE で 10 倍希釈後, Preselective PCR に用いた。Preselective PCR は, AFLP core mixture (Applied Biosystems 社) および *EcoRI*+A/*MseI*+C プライマーを用いた。反応液組成および条件については, AFLP plant Mapping protocol (Applied Biosystems 社) に従った。得られた Preselective PCR 産物は, 1/10 TE で 50 倍希釈し, Selective PCR に用いた。プライマーは, *EcoRI*+3 プライマーを 16 種類, *MseI*+3 プライマーを 16 種類用い, 計 256 通りのプライマーの組合せで行った。PCR 組成は, 液量 20 μ L とし, *rTaq* 1U (TAKARA 社), 1 $\times$ PCR Buffer (TAKARA 社), 0.2mM dNTP Mixture (TAKARA 社), 0.25 μ M *EcoRI*+3 プライマー, 0.05 μ M *MseI*+3 および Preselective PCR 産物 3 μ L の組成で混合後, Vos *et al.* (1995) の PCR 条件で増幅反応を行った。PCR 産物は, 6 $\times$ ローディングバッファー 4 μ L を添加混合後, 3.5%

アガロース (AGAROSE HT, AMRESCO 社) に 15 μ L 滴下し、電気泳動した。1 $\times$ TAE で 100V, 3 時間電気泳動後、SYBR Green I (20,000 倍希釈, TAKARA 社) で 30 分間染色し、蛍光イメージアナライザー-FLA-5000 (Fuji film 社) で多型を検出した。

(4) STS 化プライマーの作製

RAPD 分析により多型を示したバンドは、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) により DNA 断片の抽出・精製後、pGEM-T Easy Vector Systems (Promega 社) を用いて TA クローニングを行った。得られたクローンは、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega 社) によりプラスミド DNA を抽出後、プラスミド DNA 100-150ng を鋳型にして GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter 社) によりシーケンス反応を行い、シーケンサー (CEQ8000, Beckman Coulter 社) を用いて DNA 断片の塩基配列を解読した。解読した塩基配列は、DNAsis pro (Hitachi software engineering 社) を用いてプライマーを設計した。

AFLP 分析により多型を示したバンドは、RAPD 分析における STS 化と同様に目的とする DNA 断片の塩基配列を決定後、ゲノム上における DNA 断片部位の 5' 上流および 3' 下流領域の塩基配列を決定するため、thermal asymmetric interlanced (TAIL) -PCR を行った。TAIL-PCR は劉 (1997) の方法に従い、5' 上流および 3' 下流領域のバンドを検出後、TA クローニング (概出の方法) し、塩基配列を解読後、STS 化プライマーを設計した。設計した RAPD および AFLP-STs 化プライマーの塩基配列は第 1-1 表に示す。

STS 化したプライマーの再現性は、RAPD および AFLP 分析に用いた 16 品種・系統の DNA を鋳型にして PCR を行うことにより確認した。PCR 組成は、液量 20 μ L とし、鋳型 DNA 50ng, *rTaq* 1U (TAKARA 社), 1 $\times$ PCR Buffer (TAKARA 社),

0.2mM dNTP Mixture (TAKARA 社), 0.5 μ M フォワードプライマーおよび 0.5 μ M リバースプライマーの組成で混合した。ただし、C44-STs に関しては、フォワードおよびリバースプライマー 0.25 μ M で行った。反応条件は、95 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、任意のアニーリング温度 (第 1-1 表) 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1 分間を 1 サイクルとして 35 回繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 7 分間伸長反応を行った。多型の検出は、(2) RAPD 分析と同様に行った。

(5) マルチプレックス PCR による品種識別

マルチプレックス PCR 法により、一処理で「とちおとめ」および「とちひめ」の識別を可能にするため、3 組の STS 化プライマー (E24-STs, E89-STs および *Eco*RI-ACA/*Mse*I-CGG-STs) を選抜した (第 1-1 表の*印)。プライマー混合比率は、各プライマー等量の 0.5 μ M と、E24-STs および *Eco*RI-ACA/*Mse*I-CGG-STs のみ 0.25 μ M とした 2 通りの反応で行った。その他、PCR およびバンドの検出については、アニーリング温度を 59 $^{\circ}$ C とした以外、(4) STS 化マーカー検出の条件と同様に行った。

マルチプレックス PCR 条件を決定した後、「メイヒヤン」、「熊研い 548」、「さつまおとめ」、「サンチーゴ」、「とねほっぺ」、「やよいひめ」、「宝交早生」、「アスカウェイブ」、「とちひとみ」を新たに加えたイチゴ 25 品種・系統について「とちおとめ」および「とちひめ」識別マーカーの有効性を確認した。

(6) 果実部位から DNA マーカーの検出

市販の「とちおとめ」および「福岡 S6 号」のがく片 0.5g および果実 1.0g より DNA を抽出した。STS 化マーカーの検出は、がく片、果実および比較対照として葉から抽出した DNA を鋳型とし、マルチプレックス PCR 用プライマーセットを用いて行った。

第 1-1 表 イチゴ品種「とちおとめ」・「とちひめ」識別用 STS 化プライマーの塩基配列およびアニーリング温度

プライマー名	塩基配列	アニーリング 温度 ($^{\circ}$ C)	PCR産物 (bp)
E89-STs*	forward tagacaagaatgccgtttga	59	1550
	reverse ggcgacatagtatacataga		
C44-STs	forward cgcagccgagatggatct	64	818
	reverse cgcagccgagatcatctg		
A72-STs*	forward tacgattcgtgtatggttat	59	202
	reverse taccgaaattagaaggatt		
E24-STs	forward cttaacggagttagttagtt	59	402
	reverse aatgctgacataccatcatc		
<i>Eco</i> RI-ACA/ <i>Mse</i> I-CGG-STs*	forward ttttcattcttagctggaggt	61	310
	reverse ttaacggcgtgtatgaatag		

* : マルチプレックス PCR に用いた。

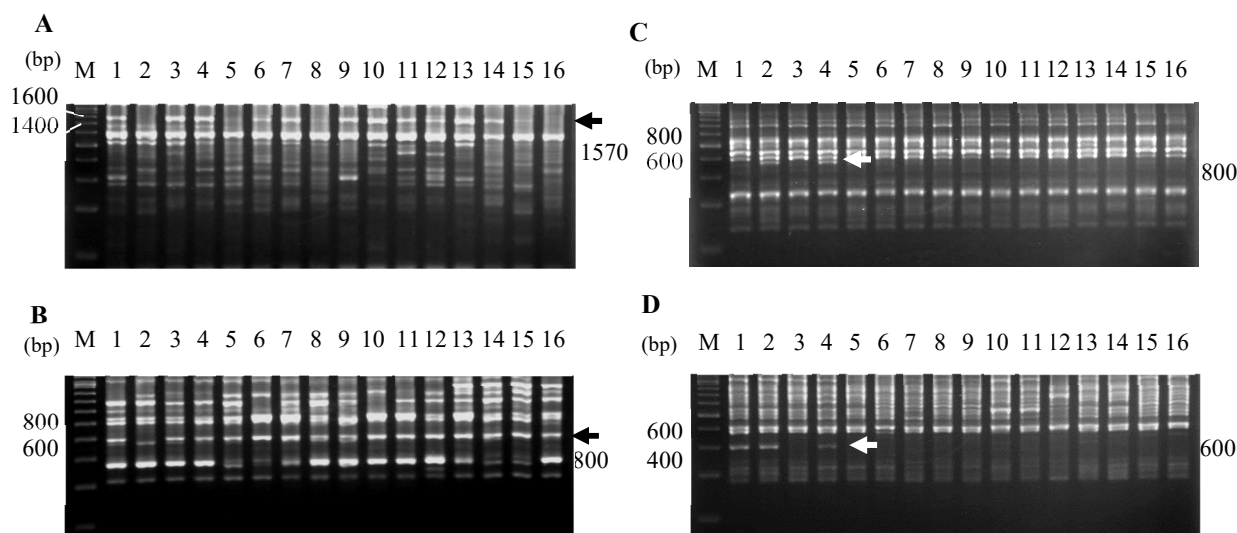
3. 結果

(1) ‘とちおとめ’・‘とちひめ’ 識別 RAPD マーカー

467 種類のランダムプライマーを用いて, ‘とちおとめ’, ‘とちひめ’, ‘栃の峰’および‘久留米 49 号’間で RAPD 分析を行った結果, 381 種類 (81.6%) のプライマーで増幅が認められ, 298 種類 (63.8%) のプライマーで多型が得られた. 多型が得られた 298 種類のプライマーを用い, 16 品種・系統間で‘とちおとめ’または‘とちひめ’を一回の PCR のみで識別できる RAPD マーカーを検索した結果, プライマー E89 における約 1570bp (以下 E89-1570) のバンドおよび C44 における約 800bp (以下 C44-800) のバンドが‘とちひめ’のみバンドが検出されないネガティブマーカーであった (第 1-1 図-A および B). ‘とちおとめ’については, 一回の PCR のみで識別できる RAPD マーカーが得られなかった. しかし, A72 における約 800bp のバンド (以下 A72-800) が‘とちひめ’および‘栃の峰’のみ, E24 における約 600bp (以下 E24-600) のバンドが‘とちおとめ’, ‘とちひめ’および‘栃の峰’のみ見出された (第 1-1 図-C および D). この結果, ‘とちおとめ’については, この‘栃の峰’由来のマーカーである A72-800 および E24-600 を組み合わせることで識別が可能となった. また, 同時に本マーカーの組み合わせにより‘とちひめ’についても識別が可能であった.

(2) ‘とちおとめ’・‘とちひめ’ 識別 AFLP マーカー

256 種類のプライマー組合せにより 16 品種・系統間の AFLP 分析を行った結果, すべてのプライマー組合せで増幅が認められ, 104 種類 (40.6%) のプライマー組み合わせで多型が得られた. この中から, ‘とちおとめ’または‘とちひめ’を一度で識別できる AFLP マーカーを検索した結果, ‘とちひめ’に関しては, プライマー組合せ *EcoRI*-ACT/*MseI*-CCC における約 350bp のバンド (以下 *EcoRI*-ACT/*MseI*-CCC-350), *EcoRI*-ACC/*MseI*-CGA における約 120bp のバンド (以下 *EcoRI*-ACC/*MseI*-CGA-120) および *EcoRI*-ACG/*MseI*-CTA における約 80bp のバンド (以下 *EcoRI*-ACG/*MseI*-CTA-80) が‘とちひめ’ネガティブマーカーとして検出されたが (第 1-2 図-A, B, C), ‘とちおとめ’については見出されなかった. しかし, ‘とちおとめ’および‘栃の峰’のみバンドを示すマーカーが, *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG における約 260bp (以下 *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-260), *EcoRI*-AGG/*MseI*-CGG における約 480bp (以下 *EcoRI*-AGG/*MseI*-CGG-480) に認められた (第 1-2 図-D および E). また, ‘とちひめ’および‘栃の峰’のみバンドを示すマーカーも *EcoRI*-ACC/*MseI*-CCG の約 110bp (以下 *EcoRI*-ACC/*MseI*-CCG-110) に認められた (第 1-2 図-F). RAPD マーカーと同様に, これら‘栃の峰’由来マーカーを組み合わせることにより, ‘とちおとめ’および‘とちひめ’の識別が可能となった.



第 1-1 図 イチゴ 16 品種・系統における ‘とちおとめ’・‘とちひめ’ 識別 RAPD マーカーの電気泳動結果

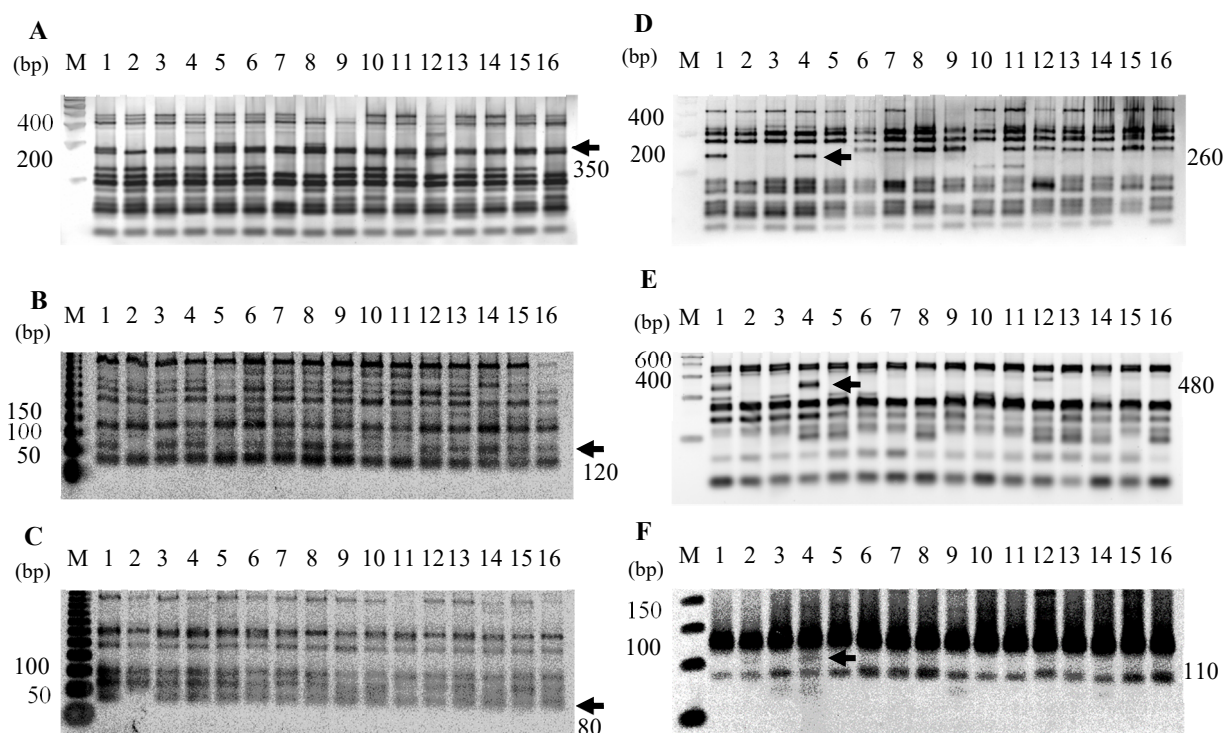
プライマー: A (E89), B (C44), C (A72), D (E24)

1: とちおとめ, 2: とちひめ, 3: 女峰, 4: 栃の峰, 5: 久留米 49 号, 6: 麗紅, 7: さちのか, 8: とよのか, 9: はるのか, 10: 章姫, 11: 紅ほっぺ, 12: レッドパール, 13: 濃姫, 14: アスカルビー, 15: 福岡 S6 号, 16: さがほのか

M: DNA 分子量マーカー (200bp ladder)

黒矢印: ‘とちひめ’ネガティブマーカー (A: E89-1570, B: C44-800)

白矢印: ‘栃の峰’由来マーカー (C: A72-800, D: E24-600)



第 1-2 図 イチゴ 16 品種・系統における‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別 AFLP マーカーの電気泳動結果

プライマー

A: *EcoRI*-ACT/*MseI*-CCC, B: *EcoRI*-ACC/*MseI*-CGA, C: *EcoRI*-ACG/*MseI*-CTA,

D: *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG, E: *EcoRI*-AGG/*MseI*-CGG, F: *EcoRI*-ACC/*MseI*-CCG

1: とちおとめ, 2: とちひめ, 3: 女峰, 4: 栃の峰, 5: 久留米 49 号, 6: 麗紅, 7: さちのか, 8: とよのか, 9: はるのか, 10: 章姫, 11: 紅ほっぺ, 12: レッドパール, 13: 濃姫, 14: アスカルビー, 15: 福岡 S6 号, 16: さがほのか

M: DNA 分子量マーカー (200bp ladder: A・D・E, 50bp ladder: B・C・F)

矢印

‘とちひめ’ネガティブマーカー

A: *EcoRI*-ACT/*MseI*-CCC-350, B: *EcoRI*-ACC/*MseI*-CGA-120, C: *EcoRI*-ACG/*MseI*-CTA-80

‘栃の峰’由来マーカー

D: *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-260, E: *EcoRI*-AGG/*MseI*-CGG-480, F: *EcoRI*-ACC/*MseI*-CCG-110

(3) ‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別 RAPD および AFLP マーカーの STS 化

‘とちおとめ’および‘とちひめ’識別のため選抜された 4 個の RAPD マーカー (E89-1570, C44-800, A72-750, E24-600) および 1 個の AFLP マーカー (*EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-280) について STS 化を行った。作製した‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別用プライマーの塩基配列および PCR のアニーリング温度については第 1-1 表に示す。‘とちひめ’ネガティブマーカーである E89-1570 および C44-800 について STS 化した結果, E89-1570 は約 1550bp, C44-800 は 818bp に‘とちひめ’のみネガティブなマーカーが検出された (第 1-3 図-A および B)。‘栃の峰’由来マーカーである A72-750 および E24-600 については, それぞれ 202bp に‘とちひめ’および‘栃

の峰’, 402bp に‘とちおとめ’, ‘とちひめ’および‘栃の峰’のみポジティブなマーカーが検出された (第 1-3 図-C および D)。AFLP マーカーについては, とちひめおよび栃の峰のみバンドが検出される *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-260 について STS 化した結果, 5’上流領域にプライマーを設計したため, 元の AFLP マーカーサイズより分子量が大きい 310bp に‘とちおとめ’および‘栃の峰’のみポジティブなマーカーが検出された (第 1-3 図-E)。

(4) マルチプレックス PCR による ‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別用プライマーセットの作製

‘とちおとめ’および‘とちひめ’を 1 回の PCR で識別できる STS 化マーカーの組合せとして, アニーリング温度を考慮し

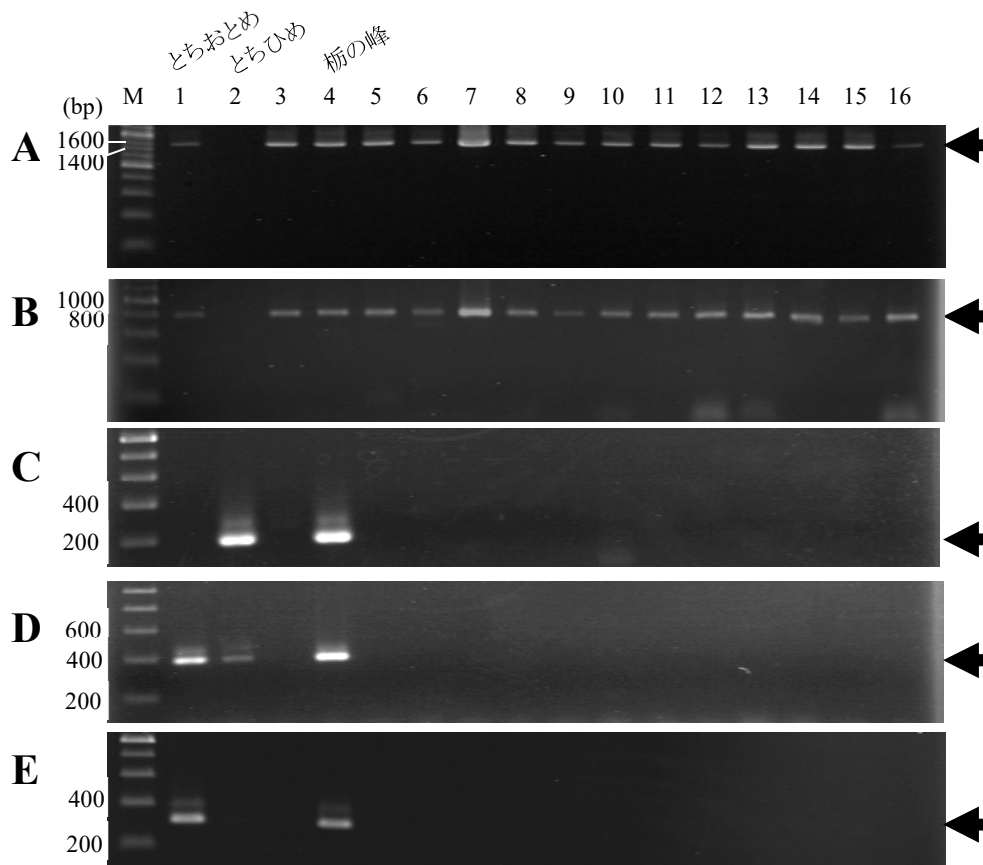
た結果 (第 1-1 表), ‘とちひめ’ネガティブマーカーである E89-STS, ‘とちおとめ’および‘栃の峰’ポジティブマーカーである *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS, ‘とちひめ’および‘とちおとめ’ポジティブマーカーである A72-STS を選抜した. プライマー混合比率を検討した結果, すべて等量 (0.5 μ M) で PCR を行った場合, ‘とちおとめ’および‘栃の峰’における E89-STS のバンドが確認できなかった (第 1-4 図). そこで, *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS および A72-STS のプライマー濃度を半量 (0.25 μ M)にした結果, ‘とちおとめ’および‘栃の峰’における E89-STS のバンドが検出され, 4 品種とも品種特有のバンドパターンを示した (‘とちおとめ’:E89-STS および *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS, ‘とちひめ’:A72-STS, ‘女峰’:E89-STS, ‘栃の峰’:E89-STS, *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS および A72-STS, 第 1-4 図).

‘メイヒャン’, ‘熊研い 548’, ‘さつまおとめ’, ‘サンチーゴ’, ‘とねほっぺ’, ‘やよいひめ’, ‘宝交早生’, ‘アスカウェイブ’および‘とちひとみ’を加えたイチゴ 25 品種・系統について‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別プライマーセットを用いマーカー検出

を行った結果, ‘とちおとめ’および‘とちひめ’と同様のバンドパターンを示す品種・系統が見出されず (第 1-5 図, 第 1-2 表), 25 品種・系統内でも‘とちおとめ’および‘とちひめ’の品種識別は可能であった. また, 本プライマーセットは, ‘とちおとめ’および‘とちひめ’以外にも‘栃の峰’および‘メイヒャン’ (検出バンド:E89-STS および A72-STS) についても 1 回の PCR で識別が可能であった. また, ‘やよいひめ’, ‘宝交早生’および‘アスカウェイブ’については, ‘とちひめ’ネガティブマーカーである A72-STS についても検出されず, 3 マーカーすべてが検出されなかった (第 1-5 図, 第 1-2 表).

(5) 果実由来 DNA における ‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別マーカーの検出

市販の‘とちおとめ’および‘福岡 S6 号’におけるがく片および果実から DNA を抽出し, ‘とちおとめ’および‘とちひめ’識別プライマーセットの有効性を検討した結果, 葉由来 DNA と同様のバンドパターンが検出できた (第 1-6 図).



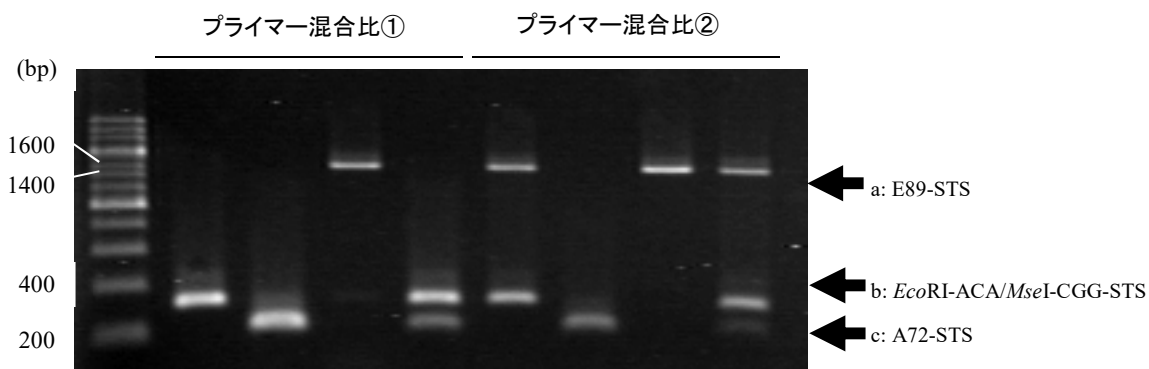
第 1-3 図 イチゴ 16 品種・系統間における ‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別用 RAPD-STS マーカーおよび AFLP-STS マーカーの電気泳動結果

プライマー: A E89-STS, B C44-STS, C A72-STS, D E24-STS, E *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS

1: とちおとめ, 2: とちひめ, 3: 女峰, 4: 栃の峰, 5: 久留米 49 号, 6: 麗紅, 7: さちのか, 8: とよのか, 9: はるのか, 10: 章姫, 11: 紅ほっぺ, 12: レッドパール, 13: 濃姫, 14: アスカビー, 15: 福岡 S6 号, 16: さがほのか

M: 分子量マーカー (200bp ladder)

矢印: STS 化したバンド



第 1-4 図 マルチプレックス PCR におけるプライマー混合比の検討

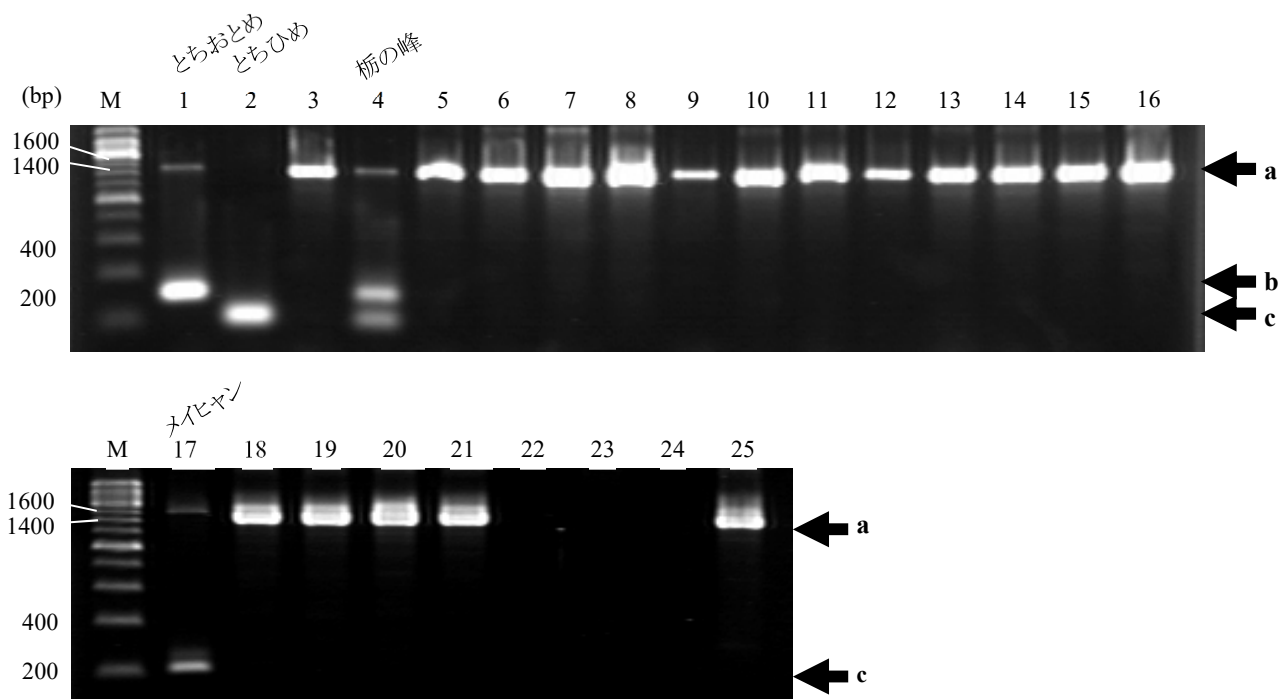
1: とちおとめ, 2: とちひめ, 3: 女峰, 4: 栃の峰

M: DNA 分子量マーカー (200bp ladder)

a: E89-STS, b: *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS, c: A72-STS

プライマー混合比① E89-STS : *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS : A72-STS = 1 : 1 : 1

プライマー混合比② E89-STS : *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS : A72-STS = 1 : 0.5 : 0.5



第 1-5 図 イチゴ 25 品種・系統間におけるマルチプレックス PCR を用いた‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別マーカーの電気泳動結果

1: とちおとめ, 2: とちひめ, 3: 女峰, 4: 栃の峰, 5: 久留米 49 号, 6: 麗紅, 7: さちのか, 8: とよのか, 9: はるのか, 10: 章姫, 11: 紅ほっぺ, 12: レッドパール, 13: 濃姫, 14: アスカルビー, 15: 福岡 S6 号, 16: さがほのか, 17: メイヒヤン, 18: 熊研い 598, 19: さつまおとめ, 20: サンチーゴ, 21: とねほっぺ, 22: やよいひめ, 23: アスカウェイブ, 24: 宝交早生, 25: とちひとみ

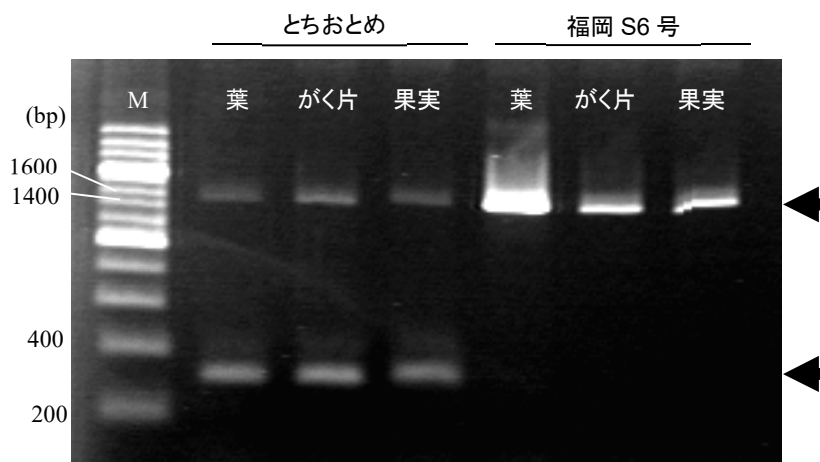
M: DNA 分子量マーカー (200bp ladder)

a: E89-STS, b: *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS, c: A72-STS

第 1-2 表 イチゴ品種 ‘とちおとめ’ ・ ‘とちひめ’ 識別用プライマーセットによる 25 品種
・系統間のバンド有無

品種・系統名	E89-STS	<i>Eco</i> RI-ACA/ <i>Mse</i> I-CGG-STS	A72-STS
	1550	310	202
1 とちおとめ	+	+	—
2 とちひめ	—	—	+
3 女峰	+	—	—
4 栃の峰	+	+	+
5 久留米49号	+	—	—
6 麗紅	+	—	—
7 さちのか	+	—	—
8 とよのか	+	—	—
9 はるのか	+	—	—
10 章姫	+	—	—
11 紅ほっぺ	+	—	—
12 レッドパール	+	—	—
13 濃姫	+	—	—
14 アスカルビー	+	—	—
15 あまおう	+	—	—
16 さがほのか	+	—	—
17 メイヒヤン	+	—	+
18 熊研い548	+	—	—
19 さつまおとめ	+	—	—
20 サンチーゴ	+	—	—
21 とねほっぺ	+	—	—
22 やよいひめ	—	—	—
23 宝交早生	—	—	—
24 アスカウェイブ	—	—	—
25 とちひとみ	+	—	—

注) +はバンド有, —はバンド無を示す.



第 1-6 図 イチゴ品種 ‘とちおとめ’ ・ ‘とちひめ’ 識別プライマーセットによるイチゴの葉, がく片および果実
由来 DNA 間のマーカー検出比較

M: DNA 分子量マーカー (200bp ladder), a: E89-STS, b: *Eco*RI-ACA/*Mse*I-CGG-STS

4. 考察

DNA マーカーによる品種識別は、果実外観による識別と比較し、客観的かつ簡易に品種を判別することが可能である。DNA マーカーによる国内イチゴの品種識別は、すでに Kunihiya *et al.* (2005) が国内外 64 品種を識別できる 23 個の CAPS マーカーを開発している。しかし、多サンプルを迅速かつ効率的に識別するためには、制限酵素を使用せず、PCR のみで検出できる DNA マーカーや、目的とする識別品種のみバンドが検出される DNA マーカーの開発が必須である。そこで、本県育成品種である‘とちおとめ’および‘とちひめ’に限定した識別技術の開発を試み、マルチプレックス PCR により 3 マーカーを同時に検出できるプライマーセットの開発に成功した。

‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別用プライマーセットは、PCR のみで制限酵素を必要としない RAPD-STS および AFLP-STS マーカーを用いている。さらに、マルチプレックス PCR により 1 回の PCR で 3 マーカーを同時に検出することができる。STS マーカーおよびマルチプレックス PCR による品種識別技術の実用性については、すでにコメの品種識別技術で実証されている。大坪ら (2002) は、4 個の RAPD-STS マーカーをマルチプレックス PCR することによりイネ 50 品種内からコシヒカリのみを識別することができる‘コシヒカリ’用判別プライマーセットを開発している。また、新村ら (2005) は、15 個の RAPD-STS マーカーを 4 組のマルチプレックス PCR 用プライマーセットに分け、イネ 130 品種を識別できることを報告している。

本プライマーセットは、1 回の PCR およびアガロース電気泳動によりマーカーが検出できることから、検出操作の容易性および低コスト等の利点がある。また、3 マーカーのパターンのみで識別することから、結果を見誤る可能性も低い。実際に、本プライマーセットによる品種識別に要する時間は、DNA 抽出を含めても数検体なら 1 日で可能であった。

本プライマーセットは、主要 8 品種 (‘とちおとめ’、‘さちのか’、‘さがほのか’、‘とよのか’、‘福岡 S6 号’、‘章姫’、‘女峰’、‘紅ほっぺ’) を含む 25 品種・系統内で識別することが可能である。しかし、国内主要 8 品種の作付面積は全体の 92.8% を占めること (2005 年 JA 全農調べ) や、‘栃の峰’由来の特異的マーカーを使用していることから、市場流通するイチゴ品種の中から‘とちおとめ’および‘とちひめ’を識別することが可能であると考えられる。

本識別法の対象は、主に市場に流通する果実である。イチゴ果実は、多糖類等の夾雑物が多いため、PCR に利用可能な DNA を抽出することが難しいことが知られている (Aljanabi *et al.*, 1999; 松元ら, 2003)。今回、Yamamoto *et al.*

(2001) のナシにおける DNA 抽出方法を用いた結果、がく片以外にも果実からも DNA が抽出でき、葉の DNA と同様に‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別用マーカーが検出できた。このことから、本 DNA 抽出を用いることにより、市場に流通する果実に十分適応できることが示された。

‘とちおとめ’および‘とちひめ’特異的なマーカーについて検索した結果、両品種の親である‘栃の峰’由来で‘とちおとめ’および‘とちひめ’のみバンドが検出されるマーカーが RAPD 法で 2 個、AFLP 法で 3 個得られた。しかし、同じく親である‘久留米 49 号’由来で‘とちおとめ’および‘とちひめ’のみバンドが検出されるマーカーは認められなかった。‘栃の峰’由来マーカーのみ検出される理由として、‘栃の峰’の交配親を辿ると海外品種である‘Florida 69-266’が用いられている (植木ら, 1993)。(‘Florida 69-266’は今回解析に用いた他の 13 品種・系統の交配親には用いられていない。そのため、‘Florida 69-266’由来マーカーが‘とちおとめ’および‘とちひめ’に遺伝したものと考えられる。(さちのか×‘栃の峰’) の選抜系統に (久留米 54 号×‘栃の峰’) の選抜系統を交配した‘熊研い 548’ (田尻ら, 2007) および (とねほっぺ×‘とちおとめ’) に ‘とねほっぺ’を交配した‘やよいひめ’ (武井ら, 2007) については、今回作成した‘栃の峰’由来マーカー (EcoRI-ACA / MseI-CGG-STS および A72-STS) は検出されなかった。一方で、韓国育成品種である‘メイヒャン’は、‘栃の峰’、‘とちおとめ’、‘とちひめ’以外で唯一‘栃の峰’由来マーカー (A72-STS) が検出された。‘メイヒャン’は‘栃の峰’×‘章姫’で育成されており (松元, 2004)、‘栃の峰’由来マーカー (A72-STS) が遺伝したものと考えられる。

国内のイチゴ品種を識別できる技術は、CAPS 法による識別および本プライマーセットによる識別以外にも開発されている。下村ら (2005) および Shimomura・Hirashima (2006) は、AFLP 法および SSR 法による‘福岡 S6 号’の識別を試みている。AFLP 法については、1 組のプライマーの組み合わせにより‘福岡 S6 号’を含む国内イチゴ 10 品種を識別できると報告している (下村ら, 2005)。一方、SSR マーカーについても国内イチゴ 10 品種を識別できるマーカーが 2 個開発されている (Shimomura・Hirashima, 2006)。野村ら (2005) は、‘アスカルビー’の品種識別技術を RAPD-STS マーカーおよびマルチプレックス PCR により開発している。‘福岡 S6 号’または‘アスカルビー’のみを識別する場合は、これらの手法により識別の効率化が図られると考えられる。

今後、本研究で開発した‘とちおとめ’・‘とちひめ’識別用プライマーセットの利用方法としては、1 回の PCR で識別できる簡易性から、育成者権保護以外にも、原苗生産、栽培圃場、流過程における他品種混入防止に使用されることが期待される。

第2節 国内主要イチゴ品種を識別するマルチプレックス PCR プライマーセットの開発

1. 序論

2007 年におけるイチゴの品種登録は 154 品種が登録され (品種登録ホームページ: <http://www.hinsyu.maff.go.jp/>). 作付されていた上位 8 品種は, ‘とちおとめ’(32.7%), ‘さがほのか’(16.7%), ‘福岡 S6 号’(商標登録:あまおう, 11.5%), ‘さちのか’(10.8%), ‘紅ほっぺ’(6.8%), ‘とよのか’(5.9%), ‘章姫’(5.1%), ‘女峰’(1.4%)であり, 全作付面積の 90.9%を占めていた (2007 年 JA 全農調べ). 前節では, 1 回の PCR でこれらの主要品種を含む 25 品種・系統内で‘とちおとめ’および‘とちひめ’識別するプライマーセットの開発を行っている. そこで, 本節では, イネ における品種識別 (大坪ら, 2002; 新村ら, 2005) と同様に主要イチゴ品種を識別する RAPD-STS マーカーによるマルチプレックス PCR プライマーセットの開発を試みた.

2. 材料および方法

(1) 供試材料

国内作付面積上位 8 イチゴ品種, ‘とちおとめ’, ‘さがほのか’, ‘福岡 S6 号’, ‘さちのか’, ‘紅ほっぺ’, ‘とよのか’, ‘章姫’, ‘女峰’に‘とちひめ’, ‘栃の峰’, ‘久留米 49 号’, ‘麗紅’, ‘はる

のか’, ‘レッドパール’, ‘濃姫’, ‘アスカルビー’, ‘メイヒャン (韓国育成品種)’, ‘熊研い 548’ (商標登録名:ひのしずく), ‘さつまおとめ’, ‘サンチーゴ’, ‘とねほっぺ’, ‘やよいひめ’, ‘宝交早生’, ‘アスカウェイブ’および‘とちひとみ’を加えた計 25 品種・系統を供試した. 供試品種のうち, 福岡県農業総合試験場から‘福岡 S6 号’, 奈良県農業技術センターから‘アスカルビー’をポット苗で分譲していただいた. ‘メイヒャン’については, 忠南農村振興院論山イチゴ試験場から葉を提供していただいた. その他 22 品種・系統は, 栃木県農業試験場栃木分場の品種保存苗を使用した.

(2) DNA 抽出および STS 化プライマーの設計

DNA 抽出は, 各品種の葉片 1.0g を液体窒素で凍結後, 乳鉢および乳棒により粉碎し, Yamamoto *et al.* (2001) の CTAB 法により行った. STS 化する RAPD マーカーは, 467 種類のランダムプライマーによる 16 品種・系統 (‘とちおとめ’, ‘とちひめ’, ‘女峰’, ‘久留米 49 号’, ‘栃の峰’, ‘麗紅’, ‘さちのか’, ‘とよのか’, ‘はるのか’, ‘章姫’, ‘紅ほっぺ’, ‘レッドパール’, ‘濃姫’, ‘アスカルビー’, ‘福岡 S6 号’, ‘さがほのか’) 間の多型データをもとに選抜した. STS プライマーの設計および作製した STS 化プライマーによるバンドの再現性については第 1 節 2- (4) と同様に行った. ただし, E28-STS プライマーについては, PCR の際, プライマー濃度を 0.33 μ M とした.

第 1-3 表 イチゴ 25 品種・系統識別用 STS 化プライマーの塩基配列およびアニーリング温度

マルチプレックス PCR プライマーセット名	プライマー名	塩基配列	アニーリング 温度 (°C)	PCR産物 (bp) ²⁾
プライマーセット1 ¹⁾ (とちおとめ・とちひめ識別用)	E89-STS	forward tagacaagaatgccgtttga	59	1550
		reverse ggcgacatagtatacataga		
	Eco RI-ACA/ Mse I-CGG-STS	forward ttttcatcttagctggagggt	61	310
		reverse ttaacggcgtgtatgaatag		
	A72-STS	forward tacgattcgtgtatggttat	59	202
		reverse tacccgaaattagaagatt		
プライマーセット2	OPC-12-STS	forward gccttcttctgtacgccatt	65	1150
		reverse cctcgatcgaaactcgtaaat		
	A31-STS	forward cgaccgtactcttccatcttt	65	921
		reverse tggatccgttgagagcgta		
	C29-STS	forward aagcgatcgagtagagttag	65	613
		reverse gccttaccaaaactaaaccag		
プライマーセット3	OPE3-STS	forward cgcaacagacccttcttta	65	285
		reverse gatgcacacaaacaccaacc		
	E28-STS	forward aggcgtgtgcagattaaag	66	457
		reverse cctcaagcattcaagccttc		
	OPD7-STS	forward tggcacgggctataagtttc	65	381
		reverse ggggtgcgtctatcatcttc		
	B22-STS	forward ggagttggctgtggaatgtt	66	312
		reverse tggacttccccttaacttgc		

¹⁾田崎ら (2008a) より引用

²⁾E89-STS および OPC12-STS は電気泳動より PCR 増幅産物を推定した. 他の PCR 産物は STS 化バンドの塩基配列より決定した.

³⁾第 1-3 表は田崎ら (2008b) より転載した.

(3) マルチプレックス PCR プライマーセットの作製

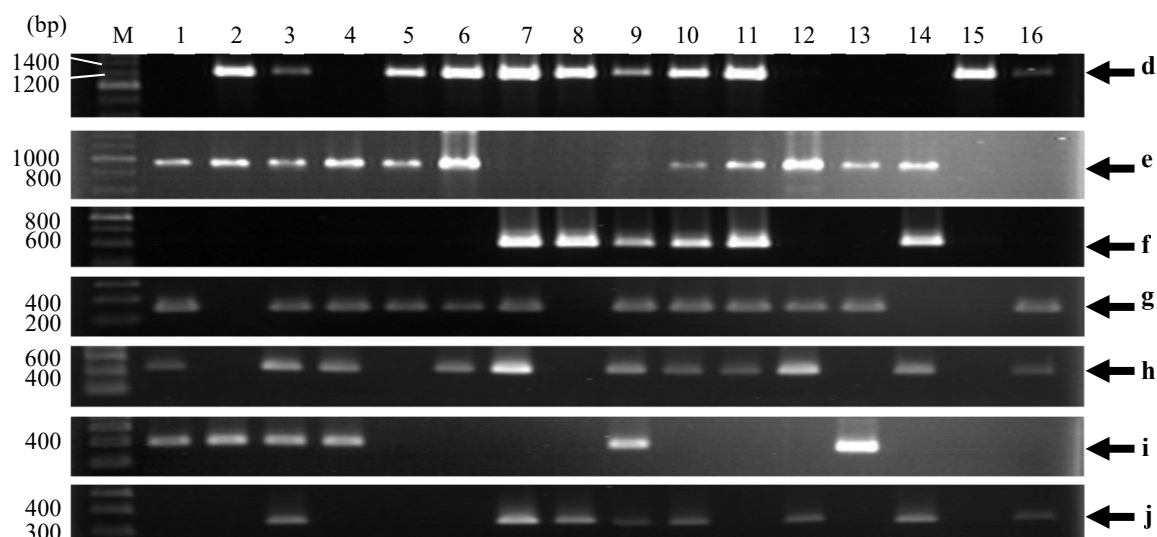
マルチプレックスPCRプライマーセットには、7組のSTS化プライマー (A31-STS, B22-STS, C29-STS, E28-STS, OPC12-STS, OPE3-STS, OPD7-STS) を用いた (第1-3表). プライマーセットは、‘とちおとめ’および‘とちひめ’識別用マルチプレックスPCRプライマーセット (第1節2- (5) 参照) をプライマーセット1とし、OPC12-STS, A31-STS, C29-STS, OPE3-STSの4組のプライマーをプライマーセット2, E28-STS, OPD7-STS, B22-STSの3組のプライマーをプライマーセット3とした (第1-3表). この3セットのプライマーセットを用い、RAPDマーカー選抜に使用した16品種・系統に9品種 (‘メイヒャン’, ‘熊研い548’, ‘さつまおとめ’, ‘サンチーゴ’, ‘とねほっぺ’, ‘やよいひめ’, ‘宝交早生’, ‘アスカウェイブ’, ‘とちひとみ’) を加えた25品種・系統のバンドパターンの検出を行った. PCR組成は、鋳型DNA 50ng, 1U *rTaq* (TAKARA社), 1×PCR Buffer (TAKARA社), 0.2 mM dNTP Mixture (TAKARA社), 各濃度のフォワードおよびリバープライマー (プライマーセット1: 0.50μM E89-STS, 0.25μM A72-STS, 0.25μM *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS, プライマーセット2: 0.25μM OPC12-STS, 0.50μM A31-STS, 0.50μM C29-STS, 0.50μM OPE3-STS, プライマーセット3: 0.15μM E28-STS, 0.25μM OPD7-STS, 0.25μM B22-STS) とし、液全量を20μLとした. 増幅反応は、サーマルサイクラー (DNA Engine Tetrad PTC-225, MJ Research社) を用いて行った. 反応条件は、95℃で5分間熱変性後、94℃で30秒間、59℃ (プライマーセット1) または64℃ (プライマーセット2および3)

で30秒間、72℃で1分間を1サイクルとして35回繰り返し、最後に72℃で7分間伸長反応を行った. 電気泳動およびバンドの検出は、第1節2- (2) と同様に行った. なお、識別に使用するバンドの上にダミーのバンドが出現した場合は、明瞭なバンドのみを識別に使用した.

3. 結果および考察

(1) イチゴ品種識別用 RAPD マーカーの選抜と STS 化

イチゴ 16 品種・系統間で明瞭な多型を示した RAPD マーカーについて STS 化を試みた結果、安定した品種間多型が得られる 7 組の STS 化プライマー (A31-STS, B22-STS, C29-STS, E28-STS, OPC12-STS, OPE3-STS, OPD7-STS) が作製でき、マルチプレックス PCR プライマーセット用に選定した (第 1-7 図). A31-STS プライマーについては、RAPD マーカーと異なるバンドパターンを示したが、増幅が安定しているため選定した. 7 組の STS 化プライマーによる 16 品種・系統間のバンドパターンを比較した結果、‘とちおとめ’および‘栃の峰’が同一であった (第 1-7 図). さらに、9 品種を加えた 25 品種・系統間についてバンドパターンを比較した結果、‘とねほっぺ’および‘やよいひめ’についても同一であった (第 1-8 図-B, C, 第 1-4 表). そのため、‘とちおとめ’と‘栃の峰’、‘とねほっぺ’と‘やよいひめ’を識別できる‘とちおとめ’および‘とちひめ’識別用マルチプレックス PCR プライマーセット (第 1 節2- (5) 参照) を合わせて用いることとした (第 1-3 表および第 1-4 表、以後プライマーセット 1 と記す).



第 1-7 図 イチゴ品種識別 STS 化プライマーによる電気泳動結果

1:とちおとめ, 2:とちひめ, 3:女峰, 4:栃の峰, 5:久留米 49 号, 6:麗紅, 7:さちのか, 8:とよのか, 9:はるのか, 10:章姫, 11:紅ほっぺ, 12:レッドパール, 13:濃姫, 14:アスカルビー, 15:福岡 S6 号, 16:さがほのか
M:分子量マーカー (200bp ladder)

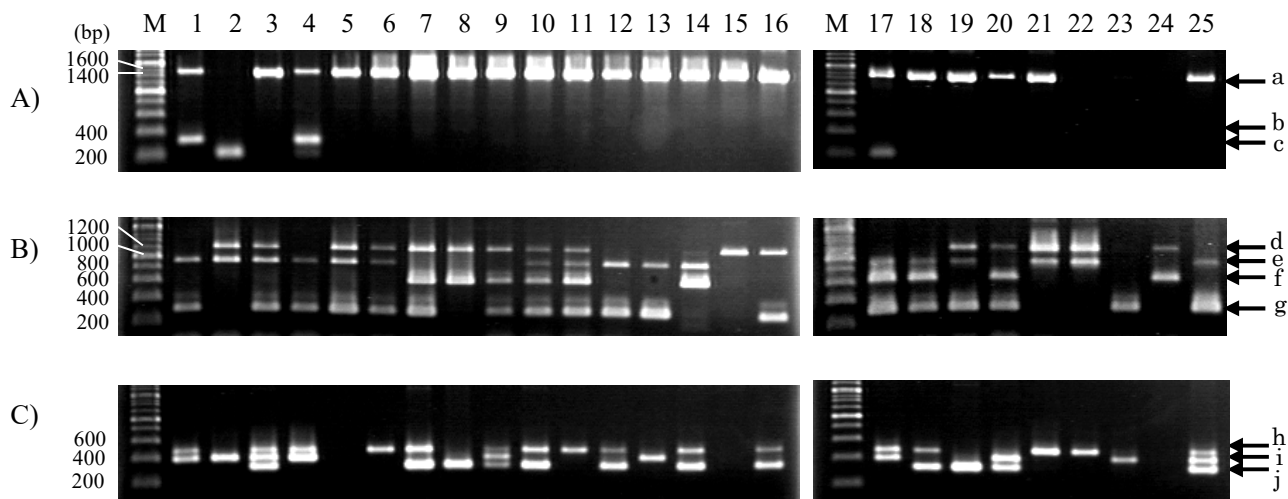
d:OPC12-STS, e:A31-STS, f:C29-STS, g:OPE3-STS, h:E28-STS, i:OPD7-STS, j:B22-STS

第 1-7 図は田崎ら (2008b) より転載した.

(2) イチゴ品種識別用マルチプレックス PCR プライマーセットの開発

7 組の STS 化プライマーは、増幅産物の視認性を考慮し、OPC12-STS (1150bp), A31-STS (921bp), C29-STS (613bp),

OPE3-STS (285bp) の 4 組の STS 化プライマーで構成されるプライマーセット 2 (第 1-3 表), E28-STS (457bp), OPD7-STS (381bp), B22-STS (312bp) の 3 組の STS 化プライマーで構成されるプライマーセット 3 (第 1-3 表) に 2 分割した。



第 1-8 図 イチゴ品種識別用マルチプレックス PCR プライマーセット 1~3 による電気泳動結果

A: プライマーセット 1, B: プライマーセット 2, C: プライマーセット 3

1: とちおとめ, 2: とちひめ, 3: 女峰, 4: 栃の峰, 5: 久留米 49 号, 6: 麗紅, 7: さちのか, 8: とよのか, 9: はるのか, 10: 章姫, 11: 紅ほっぺ, 12: レッドパール, 13: 濃姫, 14: アスカルビー, 15: 福岡 S6 号, 16: さがほのか, 17: メイヒヤン, 18: 熊研い 548, 19: さつまおとめ, 20: サンチーゴ, 21: とねほっぺ, 22: やよいひめ, 23: アスカウェイブ, 24: 宝交早生, 25: とちひとみ

M: DNA 分子量マーカー (200bp ladder)

a: E89-STS, b: *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS, c: A72-STS, d: OPC12-STS, e: A31-STS,

f: C29-STS, g: OPE3-STS, h: E28-STS, i: OPD7-STS, j: B22-STS

第 1-8 図は田崎ら (2008b) より転載した。

第 1-4 表 イチゴ 25 品種・系統間における各マルチプレックス PCR プライマーセットを用いたバンドの有無

品種・系統名	プライマーセット1 ¹⁾			プライマーセット2				プライマーセット3		
	E89-STS	<i>EcoRI</i> -ACA/ <i>MseI</i> -CGG-STS	A72-STS	OPC12-STS	A31-STS	C29-STS	OPE3-STS	E28-STS	OPD7-STS	B22-STS
	1550	310	202	1150	921	613	285	457	381	312
1 とちおとめ	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
2 とちひめ	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
3 女峰	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
4 栃の峰	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
5 久留米49号	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
6 麗紅	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
7 さちのか	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
8 とよのか	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+
9 はるのか	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+
10 章姫	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+
11 紅ほっぺ	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
12 レッドパール	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
13 濃姫	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
14 アスカルビー	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
15 あまおう	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
16 さがほのか	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
17 メイヒヤン	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
18 熊研い 548	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
19 さつまおとめ	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
20 サンチーゴ	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
21 とねほっぺ	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
22 やよいひめ	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
23 宝交早生	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
24 アスカウェイブ	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
25 とちひとみ	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+

¹⁾田崎ら(2008a)より引用。

²⁾＋はバンド有，－はバンド無を示す。

³⁾第 1-3 表は田崎ら (2008b) より転載した。

3 種類のプライマーセットを用いてマルチプレックス PCR による 25 品種・系統を識別した結果、すべての品種・系統が異なるバンドパターンを示し、識別することが可能となった(第 1-8 図, 第 1-4 表). 供試品種・系統のうち, ‘熊研い 548’, ‘やよいひめ’, ‘濃姫’, ‘アスカルビー’の国内全作付面積における割合は, 各 1.3%, 1.0%, 1.0%, 1.0%であり (2007 年 JA 全農調べ), 主要 8 品種およびこれら 4 品種を合わせた国内作付面積の割合は約 95%に達する. そのため, 本プライマーセットは, 育成者権の保護とともに国内市場に流通するイチゴの検査にも有用であると考えられる.

プライマーセットの組合せによる識別可能なイチゴ品種数は, プライマーセット 1:4 品種, プライマーセット 2:4 品種, プライマーセット 3:1 品種, プライマーセット 1 および 2:13 品種, プライマーセット 1 および 3:10 品種, プライマーセット 2 および 3:21 品種であった (第 1-5 表). 25 品種・系統内で特定の品種のみを識別したい場合は, 1~2 のプライマーセットを用いることで可能となった (第 1-5 表). 例えば, ‘福岡 S6 号’を識別する場合はプライマーセット 2 を, ‘さちのか’を識別する場合は, プライマー 2 および 3 を使用すれば識別できる

(第 1-5 表). これは, 育成者権の保護以外にも, 栽培品種が限られている原苗生産, 栽培圃場および流通加工段階における他品種混入防止, 偽装表示防止において効率的に品種識別ができるものと考えられる. 検査サンプルとしては, 主に市販成熟果実が想定されるが, 成熟果実には多糖類等の夾雑物が多く含まれるため, PCR に利用できる DNA の抽出が難しいことが知られている(Mercado *et al.*, 1999). しかし, すでに, Yamamoto *et al.* (2001)の方法によりイチゴの成熟果実 (がく片および花托) からの DNA 抽出を可能とし, 識別バンドの増幅も確認しているため (第 1 節-3- (5)参照), 成熟果実における品種識別についても本方法により問題なく対応できる.

開発した国内主要イチゴ品種識別用マルチプレックス PCR プライマーセットは, 3 セットの PCR およびアガロース電気泳動により国内主要イチゴ 25 品種・系統識別できることから, 目的である操作性の簡易化また低コスト化が図れた. また, コメの品種判別(大坪ら, 2002, 新村ら, 2005)には, RAPD-STs 法およびマルチプレックス PCR 法が広く普及しており, 本イチゴ品種識別方法は実用性が高いと考えられる.

第 1-5 表 マルチプレックス PCR プライマーセットの組み合わせによる識別可能なイチゴ品種・系統

マルチプレックスPCRプライマーセット の組み合わせ	識別可能品種数	品種名*
プライマーセット1	4	とちおとめ, とちひめ, 栃の峰, メイヒャン
プライマーセット2	4	さがほのか, 福岡S6号, アスカルビー, 宝交早生
プライマーセット3	1	サンチーゴ
プライマーセット1・2	13	とちおとめ, さがほのか, 福岡S6号, とよのか, 熊研い548, やよいひめ, アスカルビー, とちひめ, 栃の峰, メイヒャン, 宝交早生, とねほっぺ, アスカウェイブ
プライマーセット1・3	10	とちおとめ, やよいひめ, 濃姫, とちひめ, 栃の峰, メイヒャン, サンチーゴ, とねほっぺ, 宝交早生, アスカウェイブ
プライマーセット2・3	21	さがほのか, 福岡S6号, さちのか, 紅ほっぺ, とよのか, 章姫, 女峰, 熊研い548, 濃姫, アスカルビー, 宝交早生, サンチーゴ, とちひめ, 久留米49号, 麗紅, はるのか, レッドパール, メイヒャン, さつまおとめ, アスカウェイブ, とちひとみ
プライマーセット1・2・3	25	とちおとめ, さがほのか, 福岡S6号, さちのか, 紅ほっぺ, とよのか, 章姫, 女峰, 熊研い548, やよいひめ, 濃姫, アスカルビー, とちひめ, 栃の峰, メイヒャン, 宝交早生, サンチーゴ, 久留米49号, 麗紅, はるのか, レッドパール, さつまおとめ, とねほっぺ, アスカウェイブ, とちひとみ

*: 太文字は国内作付面積上位イチゴ 8 品種
第 1-5 表は田崎ら (2008b) より転載した.

第 2 章 イチゴ SSR マーカーの大量開発

緒言

DNA マーカーは、①育成者権保護や混種防止のため DNA 鑑定、②遺伝解析のための連鎖地図の作製、③有用形質と連鎖したマーカーによる幼苗選抜等に用いられる。使用されるマーカーには、random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS), simple sequence repeat (SSR) がある。RAPD マーカーは、PCR ベースでスクリーニングできるが、再現性で問題があり、幼苗選抜の際はマーカーの sequence tagged site (STS) 化が必要となる。AFLP マーカーは、連鎖地図作製の際、多型が得られやすい長所があるが、検出操作工程が煩雑であるため、幼苗選抜際は RAPD マーカーと同様に STS 化する必要がある。CAPS マーカーは、再現性が高く、多型も得られやすく、共優性マーカーであるためホモとヘテロを識別できる。しかし、PCR 後制限酵素処理を行うことやマーカー作製の際に塩基配列情報が必要となり、大量 DNA マーカー開発を行うことは難しい。

SSR マーカーは、PCR 後、電気泳動するのみであるため、操作工程は単純である。また、単純反復配列の長さを識別するマーカーであるが、多型は得られやすく、CAPS マーカーと同様に共優性マーカーとして用いることができる。電気泳動に関しては、変性ポリアクリルアミドゲルを用いるが、キャピラリーシーケンサーの使用により、簡易に検出することもできる。欠点としては、SSR マーカーを作製する際、塩基配列情報が必要であることやゲノムライブラリーの作製およびブラークスクリーニングに労力、費用および時間がかかることが挙げられる。その欠点を補うため、ゲノムにおける SSR 配列部分を濃縮してライブラリーを作製する手法 (Nunome *et al.*, 2006) および SSR マーカー開発支援ソフト (Fukuoka *et al.*, 2005) が開発されている。園芸品目では、ナス (*Solanum melongena* L.) で 1,054 SSR マーカー (Nunome *et al.*, 2009)、ネギ (*Allium fistulosum* L.) で 1,796 SSR マーカー (Tukazaki *et al.*, 2007) が作出されている。また、expressed sequence tag (EST) 配列情報からも SSR 配列を検索でき、既に公開されているデータベースを用いれば簡易に SSR マーカーが作製できる。

イチゴ炭疽病 (*Glomerella cingulata*) 抵抗性は、複数の遺伝子が関与する quantitative trait locus (QTL) のため (森, 2001)、解析を行うためにはまず連鎖地図の作製が必須となる。栽培イチゴの連鎖地図は、Lerceteau-Köhler *et al.* (2003) が報告しており、pseudo-testcross 法と AFLP マーカーにより、

種子親が 235 マーカー、花粉親が 280 マーカーからなる 43 連鎖群に収束した地図が作製されている。AFLP マーカーは上述の通り、制限酵素処理やアダプター付加が必要となるため、様々な集団を解析する際は、大変な労力が必要となる。一方、SSR マーカーは、PCR のみで検出可能であるため、1 度のプライマーの作製により、様々な形質集団の解析用いることが可能である。また、幼苗選抜の際のマーカーとしても、AFLP マーカーのように STS 化する必要はなく、そのまま選抜マーカーとして用いることができる。

そこで、イチゴ連鎖地図作製のため、イチゴ品種‘とちおとめ’ (石原ら, 1996) を材料として SSR 濃縮ライブラリーを作製し、Genomic-SSR マーカーの大量開発を行った。また、本県で集積している EST 配列 5,494 個の情報からも EST-SSR マーカーの開発を行った。また、作製できた Genomic-SSR および EST-SSR マーカーは配列特徴を調査し、比較検討を行った。

第 1 節 イチゴゲノムにおける SSR 濃縮ライブラリー法による SSR マーカー大量開発

1. 材料と方法

(1) 供試材料および DNA 抽出

供試材料は、‘とちおとめ’を用いた。DNA 抽出は、葉片 1.0g を液体窒素で凍結後、乳鉢および乳棒により粉碎し、Yamamoto *et al.* (2001) の CTAB 法により行った。

(2) イチゴゲノム SSR 濃縮ライブラリー作製条件の検討

SSR 濃縮ライブラリーの作製は、Nunime *et al.* (2006) の方法に従い作製した。条件検討時のライブラリーは、制限酵素 *AluI* (New England Lab. 社) のみ使用し、また、濃縮する SSR 配列は (CA)_n および (GA)_n とし、プローブとして (CA)₁₅ および (GA)₁₅ を使用した。制限酵素処理および PCR は、サーマルサイクラー (DNA Engine Tetrad PTC-225, MJ Research 社) を用いて行った。形質転換は、エレクトロポレーション (Easy ject plus, EquiBio 社) により行った。大腸菌は ElectroMAX DH10B (Invitrogen 社) を用いた。

クローンの塩基配列の決定は、コロニー PCR 産物を用いたダイレクト PCR により行った。PCR 産物 5μL は 1.5% アガロース (バッファー: 0.5×TBE) 電気泳動により増幅確認に用い、残り 5μL を用いて Exo/SAP 処理 (反応組成: PCR 産物 5μL, Exonuclease I (20U/μL, New England Lab. 社) 0.25μL, Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/μL, Thermo Fisher 社) 0.5μL, 滅菌水 0.75μL, 合計 6.5μL) を行った。反応条

件は、37℃30 分後、80℃15 分とした。

シーケンス反応は、GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter 社)を用い、Exo/SAP 反応液 1 μ L, 10 μ L で行った。サーマルサイクラー (DNA Engine Tetrad PTC-225, MJ Research 社) を用いた。シーケンス産物は、シーケンサー (CEQ8000, Beckman Coulter 社) を用いて DNA 断片の塩基配列を解読した。得られた各クローンにおける塩基配列は、SSR マーカー開発支援ソフト read2marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により、SSR 領域の検出 (SSR コア配列 12bp 以上で SSR 領域検出)、重複クローンの除去およびプライマー設計を行った。

SSR 濃縮ライブラリー作製の条件の検討は、ハイブリダイゼーション温度を 2 段階 (60℃および 75℃)、ビオチン標識部位の差異 (5'末端標識および 3'末端標識) とし、SSR クローンの含有率および重複率に及ぼす影響を検討した。また、SSR 配列含有クローンの検出の PCR 条件として、Bloor *et al.* (2001)の方法、Gardner *et al.* (1999) の方法、本研究室の条件の 3 条件で検討した。本研究室の PCR 組成は、液量 10 μ L とし、大腸菌培養液 1 μ L, *rTaq* 0.25U (TAKARA 社), 1 $\times$ PCR Buffer (TAKARA 社), 0.2mM dNTP Mixture (TAKARA 社), 1.0 μ M リンカープライマー, 0.5 μ M 反復配列プライマーとした。PCR 条件は、95℃で 4 分間熱変性後、94℃で 1 分間、60℃で 1 分間、72℃で 3 分間を 1 サイクルとして 30 回繰り返し、最後に 72℃で 7 分間伸長反応を行った。

(3) イチゴゲノム SSR 濃縮ライブラリー作製

SSR 濃縮ライブラリーの作製は、Nunome *et al.* (2006) の方法により作製した。‘とちおとめ’の DNA を制限酵素 *A*luI (New England Lab.社), *Hae*III (New England Lab.社) および *Rsa*I (New England Lab.社) で消化後、(CA)_nおよび(GA)_nの配列を含む SSR 濃縮を行った。ハイブリダイゼーション温度

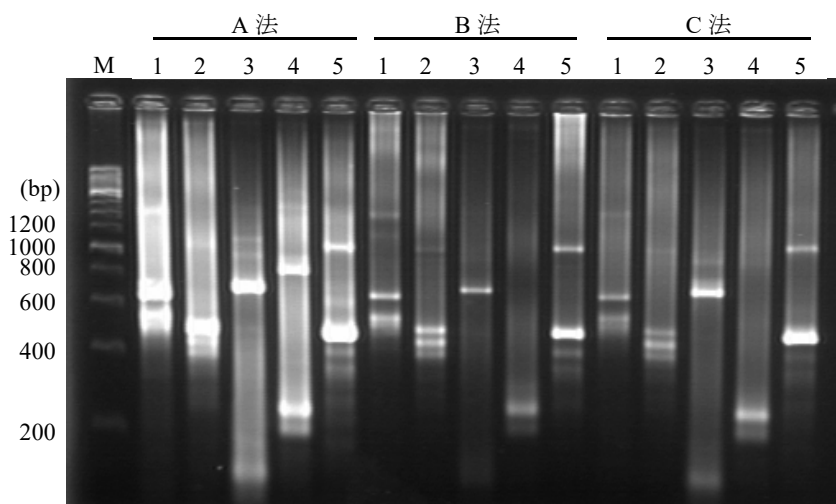
は 60℃、ビオチン標識は 3'末端で行った。作製した SSR 濃縮ライブラリーからの SSR 含有クローンの選抜は、1-(2)の本研究室の方法の条件によりコロニーPCR により行った。シーケンス、SSR 領域の検出、重複クローンの除去およびプライマー設計は 1-(2) と同様に行った。

2. 結果

(1) イチゴゲノム SSR 濃縮ライブラリー作製条件の検討

SSR 含有クローンを検出するために 3 種類の PCR 条件を比較したところ、どの方法においても SSR を含有すると推定されるクローンは、2 本以上のバンドまたはスメアーなバンドを示した (第 2-1 図)。コスト面を考慮した結果、Gardner *et al.*(1999) の方法または本研究室の方法が有効であった (第 2-1 図)。

濃縮条件を検討した結果、(GA)_nプローブを用いたライブラリーは、コロニーPCR によるスクリーニングの結果、各条件とも 60%以上のクローンが SSR を含んでいると推定された (第 2-1 表)。特に、3'末端標識とハイブリ温度 60℃の条件では 87.8%のクローンが SSR 配列を含有していると推定された (第 2-1 表)。(CA)_nプローブを用いたライブラリーにおいても、3'末端標識・ハイブリ温度 60℃の条件で 70.1%のクローンが SSR を含んでいると推定されたが、他の条件では約 30%と低かった (第 2-1 表)。本研究室の PCR 方法により選抜した推定 SSR 含有クローンの一部について塩基配列を決定した結果、独立クローンの含有率は、3'末端標識、ハイブリ温度 60℃の条件で(GA)_n が 93.4%、(CA)_n が 83.5%と高かった (第 2-2 表)。また、5'末端標識においては、断片の末端に SSR 配列が検出されるクローンが少数認められた (第 2-2 表)。推定 SSR 含有クローンの一部をシーケンスの結果、選



第 2-1 図 SSR 含有クローン検出のための PCR 条件の比較
供試クローン: (GA)_n ライブラリークローン 5 個, M: 200bp ladder
方法: A) Bloor の方法, B) Gardner の方法, C) 本研究室の方法

第 2-1 表 各ビオチン標識およびハイブリダイゼーション温度条件における SSR 含有率

SSR配列	プロンプ ビオチン 標識末端	ハイブリ 温度 (°C)	選抜 クローン数	推定SSR配列 含有クローン数 ¹⁾	SSR 含有率 (%)	平均インサートDNA 断片長 (bp)
(CA) _n	3'	60	432	303	70.1	567
		75	564	192	34.0	471
(CA) _n	5'	60	96	29	30.2	428
		75	192	34	17.7	571
(GA) _n	3'	60	180	158	87.8	523
		75	598	379	63.4	466
(GA) _n	5'	60	144	88	61.1	543
		75	168	129	76.8	520

¹⁾ PCR により SSR 配列含有クローンを決定した。

第 2-2 表 各濃縮条件における SSR クローンのシーケンス結果および重複率

SSR配列	ビオチン 標識末端	ハイブリ 温度 (°C)	供試 クローン数	シーケンスした クローン数 (A)	非SSR クローン数 (B)	B/A (%)	PCR 一致率 (%)	重複SSR クローン数 (C)	C/A (%)	末端SSR クローン数 (D)	D/A (%)	独立 クローン数 (E)	E/A (%)
(CA) _n	3'	60	96	91	4	4.4	95.6	11	12.1	0	0.0	76	83.5
		75	96	89	2	2.2	97.8	9	10.1	0	0.0	78	87.6
	5'	60	29	29	2	6.9	93.1	7	24.1	1	3.4	19	65.5
		75	34	26	7	26.9	73.1	2	7.7	4	15.4	13	50.0
(GA) _n	3'	60	96	91	0	0.0	100.0	5	5.5	1	1.1	85	93.4
		75	96	92	2	2.2	97.8	28	30.4	0	0.0	62	67.4
	5'	60	88	84	0	0.0	100.0	29	34.5	0	0.0	55	65.5
		75	96	85	1	1.2	98.8	3	3.5	2	2.4	79	92.9

抜いたほぼ 90%以上のクローンは、SSR 配列を含んでいた (第 2-2 表)。この結果から、*Hae*III および *Rsa* I 処理におけるイチゴゲノム SSR 濃縮ライブラリーは、ハイブリダイゼーション温度は 60°C、ビオチン標識は 3'末端で作製することとした。

(2) イチゴゲノム SSR 濃縮ライブラリー作製

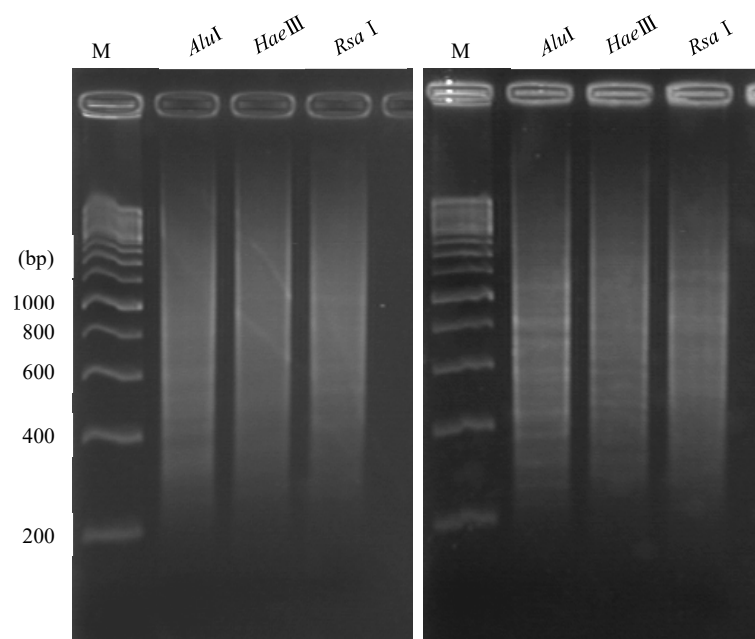
SSR の濃縮程度を電気泳動により確認した結果、GA および CA ライブラリーで低分子の DNA 断片 (200bp 以下) が除去された良好な DNA 断片が得られた (第 2-2 図)。

Alu I 消化による SSR 濃縮ライブラリーは、CA プロンプ (ハイブリ温度 60°C および 3'ビオチン) で 432 クローンのうち推定 SSR 含有クローンは 303 クローン (70.1%)、GA プロンプ (ハイブリ温度 60°C および 3'ビオチン) 180 クローンのうち推定 SSR 含有クローンは 158 クローン (87.8%) であった (第 2-3 表)。*Hae*III 消化による SSR 濃縮ライブラリーは、CA プロンプで 1,400 クローンのうち推定 SSR 含有クローンは 1,077 クローン (76.9%)、GA プロンプで 123 クローンのうち推定 SSR 含有クローンは 94 クローン (76.4%) であった (第 2-3 表)。*Rsa* I 消化による SSR 濃縮ライブラリーは、CA プロンプで 1,104 クローンのうち推定 SSR 含有クローンは 682 クローン (61.8%)、GA プロンプで 1,112 クローンのうち推定

SSR 含有クローンは 748 クローン (67.3%) であった (第 2-3 表)。6 SSR 濃縮ライブラリーにおける合計推定 SSR 含有クローンは、3,913 クローン (64.0%) であった (第 2-3 表)。

イチゴ SSR 濃縮ライブラリーにおける選抜した推定 SSR 含有クローンについてシーケンスした結果は、CA-*Alu* I で 172 クローンのうち 168 クローン (97.7%)、CA-*Hae*III で 169 クローンのうち 149 クローン (88.2%)、CA-*Rsa* I で 178 クローンのうち 173 クローン (97.2%)、GA-*Alu* I で 140 クローンのうち 140 クローン (100%)、GA-*Hae*III で 75 クローンのうち 73 クローン (97.3%)、GA-*Rsa* I で 173 クローンのうち 165 クローン (95.4%) で SSR 配列が検出された (第 2-4 表)。シーケンスした合計 907 クローンの結果は、868 クローン (95.7%) で SSR 配列が検出された (第 2-4 表)。

シーケンスしたイチゴ SSR 濃縮ライブラリーにおける独立クローン数およびプライマー設計可能クローン数は、CA-*Alu* I で独立クローン 134 個 (77.9%)、プライマー設計可能クローン 102 個 (59.3%)、CA-*Hae*III で独立クローン 110 個 (65.1%)、プライマー設計可能クローン 70 個 (41.4%)、CA-*Rsa* I で独立クローン 122 個 (68.5%)、プライマー設計可能クローン 77 個 (43.3%)、GA-*Alu* I で独立クローン 127 個 (90.7%)、プライマー設計可能クローン 99 個 (70.7%)、GA-*Hae*III で独立ク



第 2-2 図 SSR 濃縮後の PCR 増幅結果

A) (GA)₁₅ をプローブとした SSR 濃縮ライブラリー, B) (CA)₁₅ をプローブとした SSR 濃縮ライブラリー
M: 200bp ladder

第 2-3 表 各 SSR 濃縮ライブラリーにおける推定 SSR 含有率

プローブ	制限酵素	選抜 クローン数	推定SSR配列 含有クローン数 ³⁾	SSR 含有率 (%)
(CA) _n	<i>Alu</i> I ¹⁾	432	303	70.1
	<i>Alu</i> I ²⁾	852	255	29.9
	<i>Alu</i> I 合計	1,284	558	43.5
	<i>Hae</i> III	1,400	1,077	76.9
	<i>Rsa</i> I	1,104	682	61.8
(GA) _n	<i>Alu</i> I ¹⁾	180	158	87.8
	<i>Alu</i> I ²⁾	910	596	65.5
	<i>Alu</i> I 合計	1,090	754	69.2
	<i>Hae</i> III	123	94	76.4
	<i>Rsa</i> I	1,112	748	67.3
合計 (平均)		6,113	3,913	64.0

¹⁾条件検討時にハイブリ温度 60℃, 3'ビオチン標識で行った.

²⁾条件検討時にハイブリ温度 60℃, 3'ビオチン以外で標識を行った.

³⁾PCR により SSR 配列含有クローンを決定した.

ローン 62 個 (82.7%), プライマー設計可能クローン 40 個 (53.3%), GA-*Rsa* I で独立クローン 148 個 (85.5%), プライマー設計可能クローン 108 個 (62.4%)であった (第 2-5 表). シーケンスした合計 907 クローンの結果は, 独立クローン 655 個 (72.2%), プライマー設計可能クローン 456 個 (50.3%)であった (第 2-5 表).

(3) イチゴゲノム SSR 配列の特徴

イチゴ SSR 濃縮ライブラリーにおける単独 SSR 配列および

複数 SSR 配列で構成比は, CA-*Alu* I 134 クローンで単独 48 クローン (35.8%), 複数 86 クローン (64.2%), CA-*Hae* III 110 クローンで単独 53 クローン (48.2%), 複数 57 クローン (51.8%), CA-*Rsa* I で単独 54 クローン (44.3%), 複数 68 クローン (55.7%), GA-*Alu* I で単独 62 クローン (48.8%), 複数 65 クローン (51.2%), GA-*Hae* III で単独 30 クローン (48.4%), 複数 32 クローン (51.6%), GA-*Rsa* I で単独 72 クローン (48.6%), 複数 76 クローン (51.4%) であった (第 2-6 表). CA ライブラリー 339 クローンでは, 単独 142 クローン

第 2-4 表 イチゴゲノム SSR 濃縮ライブラリーにおける SSR 配列含有率

ライブラリー名 ¹⁾	シーケンス クローン数 ²⁾	SSR 含有 クローン数	SSR 含有クローン数/ シーケンスクローン数 (%)
CA- <i>Alu</i> I	172	168	97.7
CA- <i>Hae</i> III	169	149	88.2
CA- <i>Rsa</i> I	178	173	97.2
CAライブラリー合計(平均)	519	490	94.4
GA- <i>Alu</i> I	140	140	100.0
GA- <i>Hae</i> III	75	73	97.3
GA- <i>Rsa</i> I	173	165	95.4
GAライブラリー合計(平均)	388	378	97.4
全ライブラリー合計(平均)	907	868	95.7

¹⁾ CA: (CA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.

GA: (GA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.

Alu I・*Hae* III・*Rsa* I: イチゴゲノム DNA の消化に使用した制限酵素

²⁾ 挿入断片の両側から塩基配列を決定したクローン.

第 2-5 表 イチゴ濃縮ライブラリーにおける独立クローンとプライマー設計可能クローンの割合

ライブラリー名 ¹⁾	シーケンス クローン数 ²⁾ (A)	独立 クローン数 ³⁾ (B)	B/A (%)	プライマー設計 可能クローン数 (C)	C/A (%)
CA- <i>Alu</i> I	172	134	77.9	102	59.3
CA- <i>Hae</i> III	169	110	65.1	70	41.4
CA- <i>Rsa</i> I	178	122	68.5	77	43.3
全CAライブラリー ⁴⁾	519	339	65.3	229	44.1
GA- <i>Alu</i> I	140	127	90.7	99	70.7
GA- <i>Hae</i> III	75	62	82.7	40	53.3
GA- <i>Rsa</i> I	173	148	85.5	108	62.4
全GAライブラリー ⁴⁾	388	325	83.8	238	61.3
全ライブラリー ⁴⁾	907	655	72.2	456	50.3

¹⁾ CA: (CA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.

GA: (GA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.

Alu I・*Hae* III・*Rsa* I: イチゴゲノム DNA の消化に使用した制限酵素

²⁾ 挿入断片の両側から塩基配列を決定したクローン.

³⁾ 重複クローンを除去したクローン数.

⁴⁾ 全 CA ライブラリー: 各 CA ライブラリーのすべてのクローンをを用い, read2marker による解析した.

全 GA ライブラリー: 各 GA ライブラリーのすべてのクローンをを用い, read2marker による解析した.

全ライブラリー: 各ライブラリーのすべてのクローンをを用い, read2marker による解析した.

(41.9%), 複数 197 クローン (58.1%), GA ライブラリー 325 クローンでは, 単独 158 クローン (48.6%), 複数 167 クローン (51.4%) であった (第 2-6 表).

イチゴ SSR 濃縮ライブラリーにおける単独 SSR 配列の平均反復回数は, CA-*Alu* I で 11.9 回, CA-*Hae* III で 11.7 回, CA-*Rsa* I で 13.2 回, GA-*Alu* I で 19.4 回, GA-*Hae* III で 20.7 回, GA-*Rsa* I で 19.6 回であった (第 2-7 表). 全 CA ライブラリーでは 12.2 回, 全 GA ライブラリーでは, 19.8 回であった (第 2-7 表). 最大反復回数は, CA ライブラリーで 31 回, GA ライブラリーで 38 回であった (第 2-7 表). 複数 SSR 配列における平均反復回数については, CA-*Alu* I で 20.1 回, CA-*Hae* III で 17.9 回, CA-*Rsa* I で 18.9 回, GA-*Alu* I で 24.3 回,

GA-*Hae* III で 23.1 回, GA-*Rsa* I で 24.2 回であった (第 2-8 表). 全 CA ライブラリーでは 19.1 回, 全 GA ライブラリーでは, 23.7 回であった (第 2-8 表). 最大反復回数は, CA ライブラリーで 46 回, GA ライブラリーで 52 回であった (第 2-8 表). モチーフの種類については, CA 濃縮ライブラリー由来 339 クローンで CA/AC/GT/TG 配列のみ構成されるクローンが, CA-*Alu* I 64 クローン (47.8%), CA-*Hae* III で 62 クローン (56.4%), CA-*Rsa* I で 68 クローン (55.7%) であった (第 2-3 図). 全 CA ライブラリーでは 175 クローン (51.6%) であった (第 2-3 図). また, AT/TA+CA/AC/GT/TG 配列で構成されるクローンが, CA-*Alu* I 34 クローン (25.4%), CA-*Hae* III で 26 クローン (23.6%), CA-*Rsa* I で 23 クローン (18.9%)

第 2-6 表 イチゴ SSR 濃縮ライブラリーにおける単独 SSR 配列および複数 SSR 配列の構成比

ライブラリー名 ¹⁾	クローン数 ²⁾ (A)	単独SSR配列 クローン数 ³⁾ (B)	B/A (%)	複数SSR配列 クローン数 ⁴⁾ (C)	C/A (%)	複数SSR配列 平均構成モチーフ数
CA- <i>Alu</i> I	134	48	35.8	86	64.2	2.6
CA- <i>Hae</i> III	110	53	48.2	57	51.8	2.6
CA- <i>Rsa</i> I	122	54	44.3	68	55.7	2.5
全CAライブラリー ⁵⁾	339	142	41.9	197	58.1	2.6
GA- <i>Alu</i> I	127	62	48.8	65	51.2	2.6
GA- <i>Hae</i> III	62	30	48.4	32	51.6	3.0
GA- <i>Rsa</i> I	148	72	48.6	76	51.4	2.7
全GAライブラリー ⁵⁾	325	158	48.6	167	51.4	2.7

¹⁾ CA: (CA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.GA: (GA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.*Alu* I・*Hae* III・*Rsa* I: イチゴゲノム DNA の消化に使用した制限酵素²⁾ SSR 配列が検出され独立クローン.³⁾ 1 つの SSR 配列モチーフで構成. 例:CACACACACA.....⁴⁾ 複数の SSR 配列モチーフで構成. 例:CACACACACA.....CACACACA.....⁵⁾ CA および GA ライブラリーにおける重複クローンを除いた全クローン.

第 2-7 表 イチゴ SSR 濃縮ライブラリーにおける SSR 配列反復回数 (単独 SSR 配列モチーフ)

ライブラリー名 ¹⁾	クローン数 ²⁾	平均反復回数	最大反復回数
CA- <i>Alu</i> I	45	11.9	23
CA- <i>Hae</i> III	48	11.7	29
CA- <i>Rsa</i> I	48	13.2	31
全CAライブラリー ³⁾	129	12.2	31
GA- <i>Alu</i> I	57	19.4	37
GA- <i>Hae</i> III	26	20.7	38
GA- <i>Rsa</i> I	61	19.6	31
全GAライブラリー ³⁾	139	19.8	38

¹⁾ CA: (CA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.GA: (GA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.*Alu* I・*Hae* III・*Rsa* I: イチゴゲノム DNA の消化に使用した制限酵素²⁾ SSR 配列が検出され、挿入断片が完全に塩基配列を解読したクローン.³⁾ CA および GA ライブラリーにおける重複クローンを除いた全クローン.

第 2-8 表 イチゴ SSR 濃縮ライブラリーにおける SSR 配列反復回数 (複数 SSR 配列モチーフ)

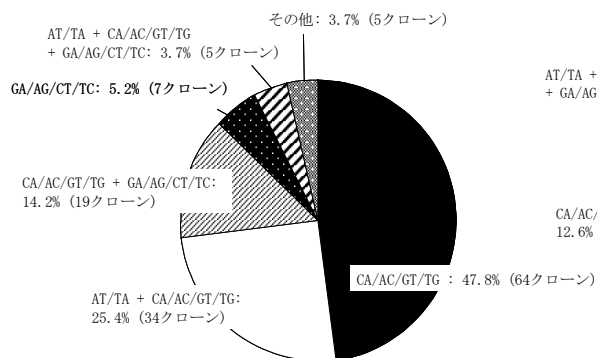
ライブラリー名 ¹⁾	クローン数 ²⁾	平均反復回数 (複数SSR配列合計)	平均反復回数 (1SSR配列当たり)	最大反復回数 (複数SSR配列合計)
CA- <i>Alu</i> I	82	20.1	7.6	36
CA- <i>Hae</i> III	53	17.9	6.9	46
CA- <i>Rsa</i> I	64	18.9	7.5	38
全CAライブラリー ³⁾	186	19.1	7.3	46
GA- <i>Alu</i> I	58	24.3	9.4	52
GA- <i>Hae</i> III	31	23.1	7.7	37
GA- <i>Rsa</i> I	67	24.2	9.1	37
全GAライブラリー ³⁾	151	23.7	9.0	52

¹⁾ CA: (CA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.GA: (GA)₁₅ をプローブにして作製したライブラリー.*Alu* I・*Hae* III・*Rsa* I: イチゴゲノム DNA の消化に使用した制限酵素²⁾ SSR 配列が検出され、挿入断片が完全に塩基配列を解読したクローン.³⁾ CA および GA ライブラリーにおける重複クローンを除いた全クローン.

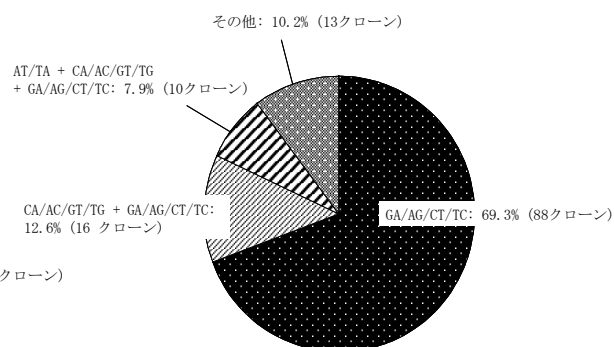
であり (第 2-3 図), 全 CA 濃縮ライブラリーでは 78 クローン (23.0%) であった (第 2-3 図). GA ライブラリーについては GA/AG/CT/TC 配列のみ構成されるクローンが, GA-*Alu* I 88 クローン (69.3%), GA-*Hae*III で 47 クローン (75.8%),

GA-*Rsa* I で 97 クローン (65.5%) であった (第 2-3 図). 全 GA ライブラリーでは 221 クローン (68.0%) であった (第 2-3 図).

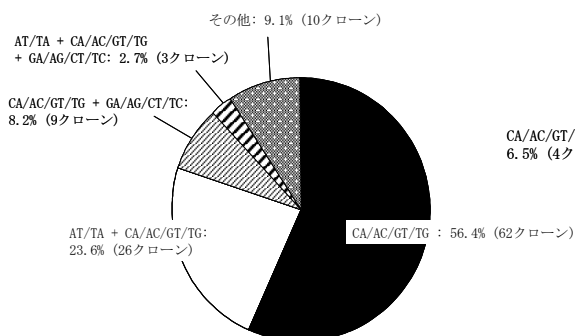
A) CA-*Alu* I (134 クローン)



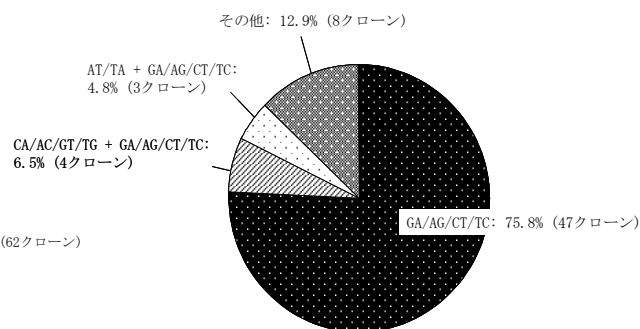
E) GA-*Alu* I (127 クローン)



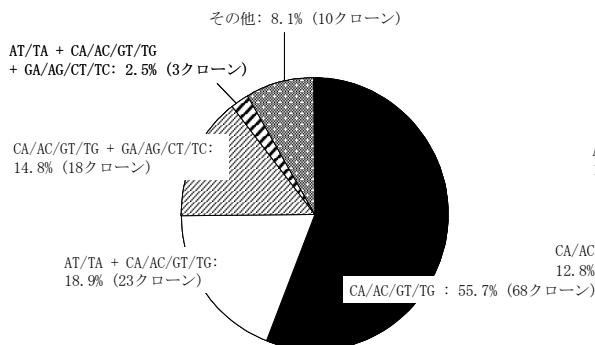
B) CA-*Hae*III (110 クローン)



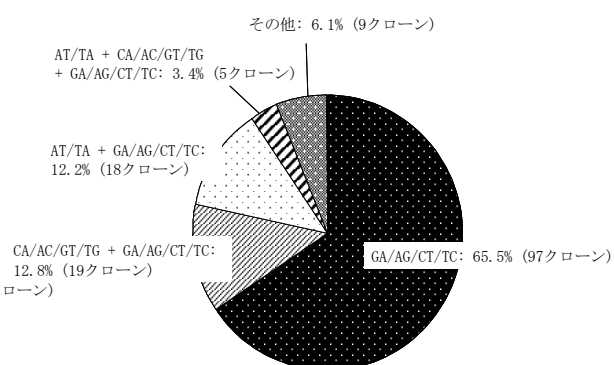
F) GA-*Hae*III (62 クローン)



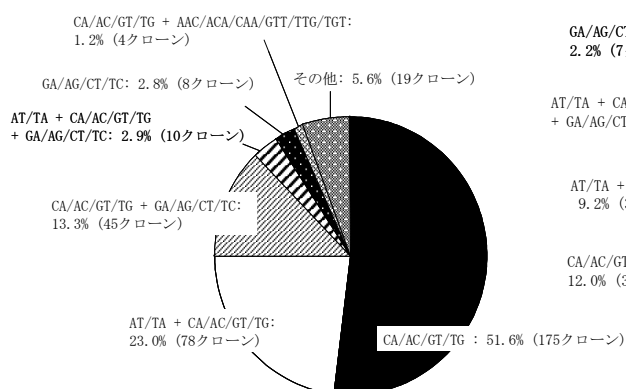
C) CA-*Rsa* I (122 クローン)



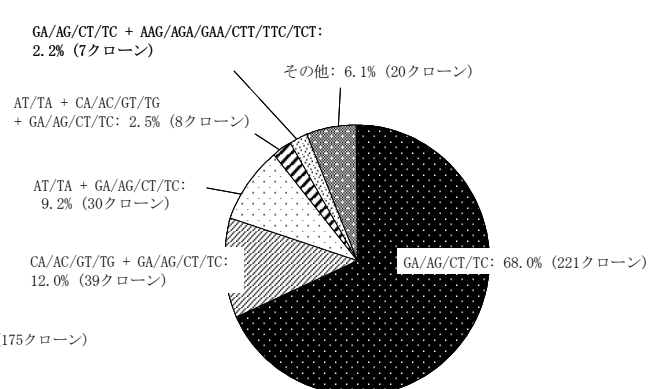
G) GA-*Rsa* I (148 クローン)



D) 全 CA ライブラリー (339 クローン)



H) 全 GA ライブラリー (325 クローン)



第 2-3 図 CA および GA ライブラリーにおいて検出された SSR 配列のモチーフ分類

モチーフ分類は read2Marker (Fukuoka *et al*, 2005)により行った.
解析は重複配列を除いた独立クローンにより行った.

第2節 イチゴ EST からの SSR マーカー大量開発

1. 材料と方法

(1) 供試材料

イチゴ EST は, Namai *et al.* (2013) が集積した 8,056 非重複 EST のうち, イチゴ品種‘とちおとめ’由来の 5,494 EST を使用した。

(2) SSR 配列の検索および ORF および 3' UTR 領域検索

SSR 領域の検出, 重複クローンの除去およびプライマー設計は, 本章 2-(2) と同様に行った。ORF 領域の検索は, SSR 配列を含むイチゴ EST 723 個から, 3'末端側から確実に塩基配列が解読された EST (poly-T または poly-A が末端に存在する EST および dT18 プライマーにより塩基配列を解読した EST) を選抜した。選抜した EST における翻訳領域 (open reading frame: ORF) および 3' 非翻訳領域 (3'untranslated region: 3'UTR) の推定は, EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite ,

<http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/getorf>) における ORF 検索プログラム getorf により行い (ORF: >100bp 以上), 最も大きい値を ORF 配列とした, ORF および 3'UTR を推定した EST は, SSR 配列がどちらの領域に位置しているか調査した。

2. 結果

(1) イチゴ EST における SSR 配列検索

イチゴ EST 5, 494 個 において SSR 配列を検索した結果, SSR 配列が検出された EST は 723 個 (13.2%) であった (第 2-9 表)。このうち, プライマー設計可能な EST は 544 個 (9.9%) であった (第 2-9 表)。

(2) EST-SSR の配列特徴

イチゴ EST-SSR 配列における 2 塩基および 3 塩基反復モチーフの EST 数は, 2 塩基反復が 369 個 (51.0%), 3 塩基反復が 201 個 (27.8%), 2 塩基反復+3 塩基反復が 153 個 (21.2%) であった (第 2-10 表)。単独 EST-SSR 配列 188 個における平均反復回数は, 2 塩基反復で 8.7 回, 3 塩基反復で 4.8 回であった (第 2-11 表)。最大反復回数については 2

第 2-9 表 イチゴ EST における SSR 配列の含有率

SSR配列含有の有無	EST数	全ESTに対する割合 (%)
SSR配列含有EST (プライマー設計可能EST)	723 (544)	13.2 (9.9)
SSR配列無EST	4,771	86.8
合計	5,494	100.0

第 2-10 表 イチゴ EST 由来 SSR 配列の 2 塩基および 3 塩基反復モチーフの割合

反復モチーフ	SSR配列含有EST	全SSR配列含有ESTに対する割合 (%)
2塩基反復	369	51.0
3塩基反復	201	27.8
2塩基反復+3塩基反復	153	21.2
合計	723	100.0

第 2-11 表 イチゴ EST 由来 SSR 配列の反復回数 (単独 SSR 配列モチーフ¹⁾)

反復の種類	クローン数	平均反復回数	最大反復回数
2塩基反復	45	8.7	24
3塩基反復	143	4.8	14

¹⁾1 つの SSR 配列モチーフで構成。例:CACACACACACA.....

第 2-12 表 イチゴ EST 由来 SSR 配列の反復回数（複数 SSR 配列モチーフ¹⁾）

反復の種類	クローン数	平均反復回数 (複数SSR配列合計)	平均反復回数 (1SSR配列当たり)	最大反復回数 (複数SSR配列合計)	複数SSR配列 平均構成モチーフ数
2塩基反復	324	7.2	3.4	23	2.1
3塩基反復	61	7.3	3.5	17	2.1
2塩基反復+3塩基反復	150	8.1	3.4	22	2.4

¹⁾ 複数の SSR 配列モチーフで構成. 例: ...CACACACACACA.....CACACACA.....

第 2-13 表 イチゴ EST 由来 SSR 配列のモチーフ分類

SSRモチーフの種類	EST数	モチーフの種類 割合 (%)
GA/AG/CT/TC	99	13.7
AT/TA	82	11.3
CA/AC/GT/TG+GA/AG/CT/TC	55	7.6
AT/TA+CA/AC/GT/TG	51	7.1
AT/TA+GA/AG/CT/TC	47	6.5
AAG/AGA/GAA/CTT/TTC/TCT	43	5.9
ATG/TGA/GAT/CAT/ATC/TCA	31	4.3
CA/AC/GT/TG	26	3.6
AGC/GCA/CAG/GCT/CTG/TGC	18	2.5
AAG/AGA/GAA/CTT/TTC/TCT+GA/AG/CT/TC	15	2.1
AGG/GGA/GAG/CCT/CTC/TCC	13	1.8
ACC/CCA/CAC/GGT/GTG/TGG	12	1.7
AAC/ACA/CAA/GTT/TTG/TGT	11	1.5
AAT/ATA/TAA/ATT/TTA/TAT	10	1.4
AAT/ATA/TAA/ATT/TTA/TAT+AT/TA	10	1.4
AAC/ACA/CAA/GTT/TTG/TGT+AT/TA	10	1.4
ATG/TGA/GAT/CAT/ATC/TCA+GA/AG/CT/TC	10	1.4
AGC/GCA/CAG/GCT/CTG/TGC+GA/AG/CT/TC	10	1.4
GGC/GCG/CGG/GCC/CCG/CGC	8	1.1
AAC/ACA/CAA/GTT/TTG/TGT+CA/AC/GT/TG	7	1.0
ATG/TGA/GAT/CAT/ATC/TCA+AT/TA	7	1.0
AGG/GGA/GAG/CCT/CTC/TCC+GA/AG/CT/TC	6	0.8
ACC/CCA/CAC/GGT/GTG/TGG+GA/AG/CT/TC	6	0.8
ACG/CGA/GAC/CGT/GTC/TCG	5	0.7
AGT/GTA/TAG/ACT/CTA/TAC	4	0.6
ACC/CCA/CAC/GGT/GTG/TGG+GGC/GCG/CGG/GCC/CCG/CGC	4	0.6
AAC/ACA/CAA/GTT/TTG/TGT+GA/AG/CT/TC	4	0.6
AGT/GTA/TAG/ACT/CTA/TAC+AT/TA	4	0.6
AGC/GCA/CAG/GCT/CTG/TGC+CA/AC/GT/TG	4	0.6
その他	111	15.4
合計	723	100.0

*モチーフ分類は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005)により行った.

塩基反復で 24 回, 3 塩基反復で 14 回であった (第 2-11 表). 複数で構成される EST-SSR 配列 535 個における平均反復回数については, 2 塩基反復で 7.2 回, 3 塩基反復で 7.3 回, 2 塩基反復+3 塩基反復で 8.1 回であった (第 2-12 表). 最大反復回数については 2 塩基反復で 23 回, 3 塩基反復で 17 回, 2 塩基反復+3 塩基反復で 22 回であった (第 2-12 表).

EST-SSR 配列のモチーフの構成比は, 2 塩基反復で GA/AG/CT/TC が最も多く 99 個(13.7%), 次に AT/TA 反復 82 個 (11.3%) であった (第 2-13 表). 3 塩基反復については, AAG/AGA/GAA/CTT/TTC/TCT 反復が最も多く, 43 個 (5.9%), 次に ATG/TGA/GAT/CAT/ATC/TCA 反復が 31 個 (4.3%) であった (第 2-13 表). 複数で構成される SSR 配列については, CA/AC/GT/TG+GA/AG/CT/TC が最も多く 55 個 (7.6%), AT/TA+CA/AC/GT/TG が 51 個 (7.1%)であった

(第 2-13 表).

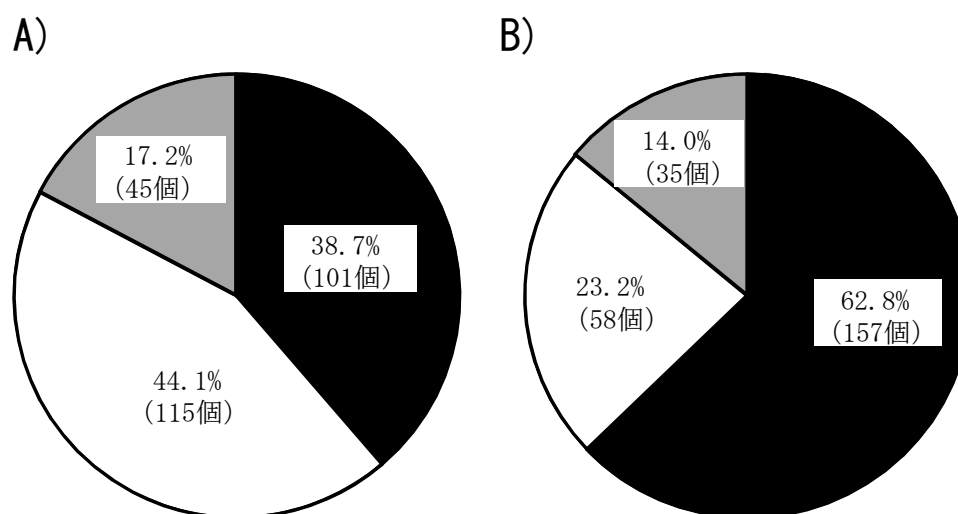
(3) EST-SSR における ORF および 3' UTR 領域区分

EST-SSR 723 個のうち, 3'末端より塩基配列が解読された EST は 511 個 (70.7%) であった. 511 個の EST について ORF を検索した結果, すべての EST において ORF が推定できた. SSR 配列が ORF および 3'UTR のどちらの領域に含まれているか調べた結果は, ORF 領域で検出された EST-SSR が 261 個 (51.1%), 3'UTR 領域で検出された EST-SSR が 250 個 (48.9%) であった (第 2-14 表). 各領域に含まれる EST-SSR 配列のモチーフについて解析した結果, ORF では 3 塩基反復モチーフの SSR 配列を含む EST が 115 個 (44.1%) と最も多かった (第 2-4 図). 一方, 3'UTR では 2 塩基反復モチーフの SSR 配列を含む EST が 157 個 (62.8%) と最も多かった (第 2-4 図). プライマーが設計可能

第 2-14 表 イチゴ EST-SSR 配列が検出された領域における EST 数

cDNA領域 ¹⁾	EST(個数)	各領域の EST数 /総EST数 (%)
ORF	261	51.1
3'UTR	250	48.9
合計	511	100.0

¹⁾ 3'末端側から確実に塩基配列が解読された EST (poly-T または poly-A が末端に存在する EST および dT18 プライマーにより塩基配列を解読した EST) を選抜した. ORF および 3'UTR 領域の決定は getorf (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/getorf>) により行った.



第 2-4 図 ORF および 3' UTR 領域におけるイチゴ EST-SSR 反復モチーフの割合

A) ORF (EST: 261 個) B) 3' UTR (EST: 250 個)

■ : 2 塩基反復モチーフ □ : 3 塩基反復モチーフ
 ■ : 2 塩基反復+3 塩基反復モチーフ

第 2-15 表 各領域および反復モチーフにおける EST-SSR プライマーが作製可能な EST 数

反復モチーフ	ORF		3'UTR	
	EST数	各反復モチーフのEST数 /総EST数(%)	EST数	各反復モチーフのEST数 /総EST数(%)
2塩基反復	77	36.2	109	63.7
3塩基反復	100	46.9	23	13.5
2塩基反復+3塩基反復	36	16.9	39	22.8
合計	213	100.0	171	100.0

¹⁾ 3'末端側から確実に塩基配列が解読された EST (poly-T または poly-A が末端に存在する EST および dT18 プライマーにより塩基配列を解読した EST) を用いた。

な EST-SSR 数は、ORF 領域で 213 個、3'UTR 領域で 171 個であり、合計 384 個であった (第 2-15 表)。

考察

SSR マーカーの開発は、これまでゲノムライブラリー作製後、ブランクスクリーニングを行うことが主流であり、クローンの選抜からマーカー開発に至るまでに多大な労力を必要としていた。Suwabe *et al.* (2004) は、*Brassica rapa* の SSR マーカー開発において約 45,000 クローンから 8 種類の 3 塩基反復プローブと 2 種類の 2 塩基反復プローブを用いて、210 個の SSR 配列を含むクローンを得ている。また、Song *et al.* (2004) は、ネギの SSR マーカー開発において約 180,000 クローンから GA および GT 反復のポジティブクローンを 94 個選抜し、シーケンスした結果、52 個の SSR 配列を得ている。そのうち、9 品種間で多型得られたマーカーは 33 個と報告している。*F. × ananassa* においては、Shimomura・Hirashima (2006) が約 1,000 クローンから 4 個の SSR マーカーを開発したと報告している。このように SSR マーカーの開発効率は低い現状があった。

今回本県で行った SSR 濃縮ライブラリーによる SSR マーカーの開発は、6,113 クローン中、3,913 クローンがポジティブクローンであり、大幅に効率が上昇した。また、その際、ハイブリダイゼーションではなく、PCR による選抜を実施したため、迅速にクローン選抜することが可能となった。シーケンスした結果は、907 クローン中、50.3%に当たる 456 個でプライマーが設計可能であった。Nunome *et al.* (2009) は、ナスにおいて GA および CA 反復配列を濃縮後、14,071 クローンをシーケンスした結果、16.1%に当たる 2,265 クローンにおいてプライマー設計可能であったと報告している。本県ではシーケンス規模が少ないがほぼ同等の SSR 濃縮が行われたと考えられる。

本県が集積した 5,494 EST において SSR 配列を検索した結果は、9.9%に当たる 544 EST においてプライマーの設計が可能であった。この結果は、Folta *et al.* (2005) におけるイチゴ 1,304 EST における SSR 検索の結果である 14 % (190 EST) とほぼ同等であった。他の植物における EST-SSR 報告では、イネ (*Oriza sativa*) およびシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) がそれぞれ 3.5%、0.84% (Victoria *et al.*, 2011)、ナスが 3.9% (Nunome *et al.*, 2009)、ブドウが 2.5% (Scott *et al.*, 2000) であることから、イチゴ EST に含まれる SSR は若干多いかもしれないと考えられる。EST-SSR は、Genomic-SSR と比較すると SSR 配列が含む割合は少ない。しかし、すでに集積していたデータを用いたため、マーカー作製におけるコストおよび労力については、大幅に軽減することができた。また、EST-SSR において多型が得られた場合、遺伝子が連鎖地図上に座乗できるため、そのメリットは極めて大きいと考えられる。

Genomic-SSR におけるモチーフ特徴を調べた結果は、CA モチーフにおいては近傍に AT モチーフにある配列が全体の 23.0%と多く、Nunome *et al.* (2009) のナスにおける報告 19.0%と同様な結果であった。また、CA モチーフおよび GA モチーフにおける SSR マーカーの集積差は認められなかった。Tukazaki *et al.* (2007) はネギにおいて GT モチーフが 74%占めることを報告しているが、イチゴではその傾向はなかった。EST-SSR のモチーフについては GA モチーフ 13.7%、AT モチーフ 11.3%と多かった。Folta *et al.* (2005) は、*F. × ananassa* の EST-SSR の上位モチーフとして GA 24.2%、AAG 13.0%、AGG 7.8%、AT 5.6%と報告していることから、イチゴ EST-SSR モチーフの特徴であると考えられる。

今回、プライマー設計可能な SSR マーカーが Genomic-SSR で 456 個、EST-SSR で 544 個、併せて 1,000 SSR マーカーが使用できる環境となった。今後、多型の有無を調査する必要があるが、これらを使用することにより、イチゴの耐病

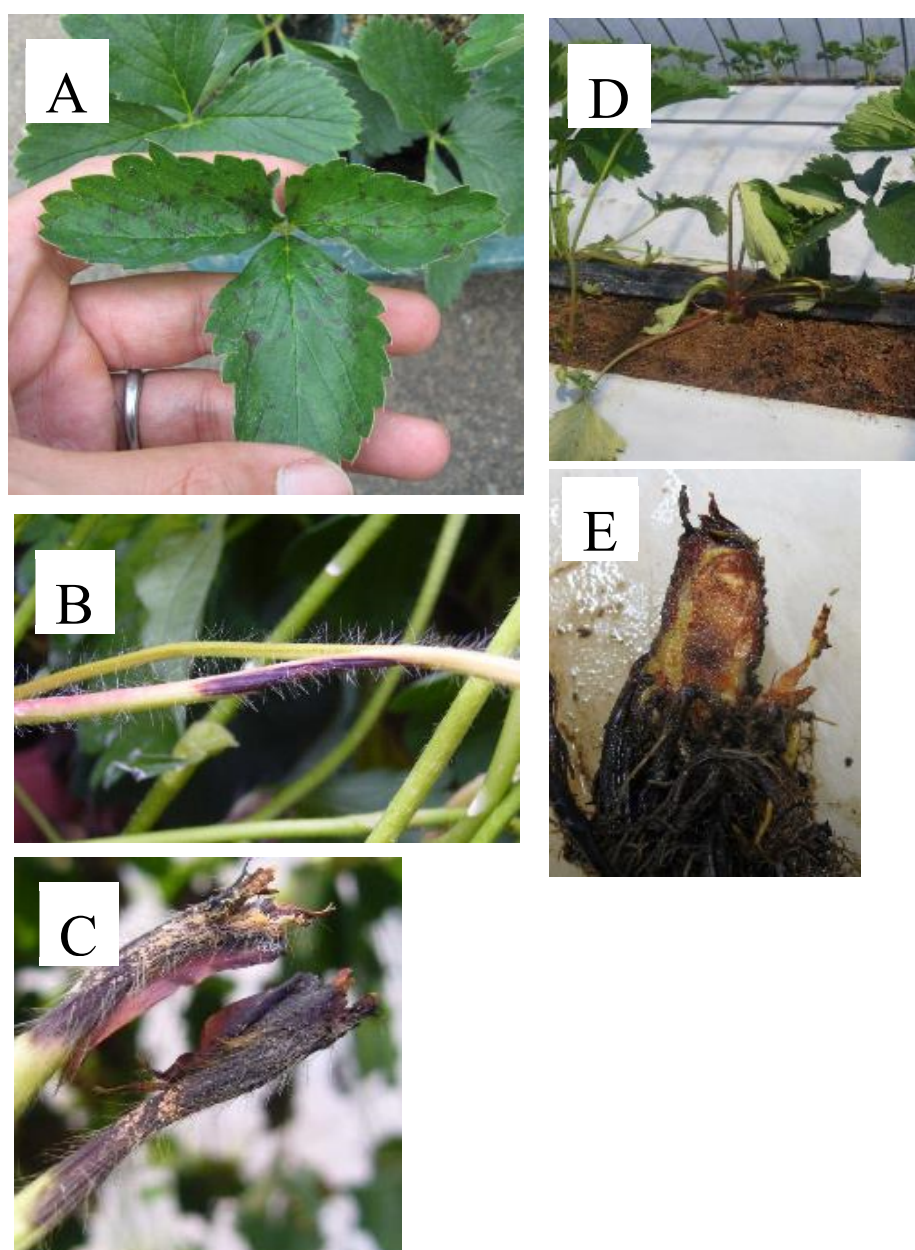
性連鎖マーカーや有用形質マーカーの開発が加速化すると考えられる。

第3章 SSR マーカーによる‘とちおとめ’ × イチゴ炭疽病抵抗性‘いちご中間母本 農2号’F₁集団の多型検索

1. 緒言

イチゴ炭疽病は、イチゴにおける難防除病害であり、国内においては、2種類の病原菌 (*Glomerella cingulata*=*Colletotrichum gloeosporioides* および *Colletotrichum acutatum*) のうち *G. cingulata* による被害が

大きい。育苗期間 (6~9 月) に発生しやすく、基本枯死に至る (病徴: 第 3-1 図)。発生後の治療は、極めて困難であり、発病株からの分生胞子の水はねにより、感染が広がるため、定植苗不足に陥る生産者もいる。また、発生した育苗ハウスにおける苗は、潜在感染している可能性が高く、定植や親株に使用后、萎凋枯死にいたる株も発生し、収量減につながる。イチゴ炭疽病の防除は、薬剤の予防散布およびハウス育苗、育苗棚の設置、早朝灌水また底面給水等の耕種的防除が基本となる。育苗期間は夏期高温期となるため、生産者の身体的精神的な負担も大きく、耐病性品種の育成が強く望まれている。また、消費者の嗜好からも減農薬化できるメリットは極めて大きい。



第 3-1 図 イチゴ炭疽病病徴

写真は、本県生産者ほ場にて撮影した (2008~2010 年)。

A: 斑点型病斑, B および C: 陥没型病斑, D: 株萎凋症状, E: クラウン部病徴。

国内の主要品種は、イチゴ炭疽病罹病性であり、イチゴ品種育成研究機関は、イチゴ炭疽病抵抗性品種の育成を一つの目標としている。農研機構においては、‘カレンベリー’ (沖村ら, 2010) および ‘いちご中間母本農 2 号’ (沖村ら, 2004) を育成している。また、三重県においても、多数の交配親を用いて抵抗性因子の集積を図り、炭疽病抵抗性品種として‘サンチーゴ’ (森ら, 2000) を育成している。

炭疽病抵抗性の遺伝は、相加的な効果を持つ複数の遺伝子に支配されているとされ (森, 2001), DNA マーカー開発には、連鎖地図の作製と quantitative trait locus (QTL) 解析が必要となる。

そこで、炭疽病罹病性品種‘とちおとめ’ (石原ら, 1996) と炭疽病抵抗性中間母本‘いちご中間母本農 2 号’を交配し、F₁ 集団を作出後、本県で開発した simple sequence repeat (SSR) マーカーによるスクリーニングを行い、連鎖地図に座乗する DNA マーカーの選定を行った。また、國久 (2008) は、ゲノム特異的な cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーを作製している。本 SSR マーカーにおいても複 2 倍体の挙動を示すマーカーの検索し、ゲノム特異的なマーカー候補を選定した。

2. 材料と方法

(1) 供試材料および DNA 抽出

供試材料は、炭疽病罹病性品種‘とちおとめ’および炭疽病抵抗性母本‘いちご中間母本農 2 号’、‘とちおとめ’×‘いちご中間母本農 2 号’F₁ 94 個体を用いた。DNA 抽出は、葉片 1.0g を液体窒素で凍結後、乳鉢および乳棒により粉碎し、Yamamoto *et al.* (2001) の CTAB 法により行った。

(2) SSR マーカー検出条件の検討

DNA サンプルは、‘とちおとめ’、‘いちご中間母本農 2 号’、‘とちおとめ’×‘いちご中間母本農 2 号’F₁ 94 個体を使用した。PCR 組成は、DNA 10ng, 0.25U *rTaq* (TAKARA 社), 1×PCR buffer (TAKARA 社), 0.2mM dNTP mixture (TAKARA 社), 0.2μM フォワードプライマー, 0.2μM リバースプライマー, 1% ホルムアミド (SLS, Beckman coulter 社) とし、液量は 10 μL とした。フォワードおよびリバースプライマーは、Genomic-SSR プライマー *AluICA030103* (第 3-1-1 表) を用いた。PCR 条件は、タッチダウン PCR とし、94℃で 3 分間熱変性後、94℃で 30 秒間, 65℃ (-1℃/サイクル) で 1 分間, 72℃で 1 分間を 1 サイクルとして 10 回繰り返す、さらに 94℃で 30 秒間, 55℃で 1 分間, 72℃で 1 分間を 30 回繰り返した後、最後に 72℃で 5 分間伸長反応を行った。

電気泳動については high efficiency genome scanning

(HEGS) 電気泳動装置 (NS-1216K, 日本エイドー社) を使用した。泳動方法については、HEGS 法 (Kawasaki・Murakami, 2000; Kawaguchi *et al.*, 2001) の濃縮・分離ポリアクリルアミドゲルおよび変性ポリアクリルアミドゲルを比較した。濃縮・分離ポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるゲル組成は、分離ゲル が 12% アクリルアミド (19:1), 0.375M Tris-HCl (pH8.8), 0.042% 過硫酸アンモニウム, 0.1% TEMED とし、濃縮ゲル が 5.7% アクリルアミド (19:1), 0.125M Tris-HCl (pH6.8), 0.1% 過硫酸アンモニウム, 0.1% TEMED とした。サンプルコウムは 100 検体用を使用し、PCR 産物 4μL をアプライ後、1×Tris-Glycine バッファーを用い 250V で電気泳動した。マーカーの検出は、SYBR GREEN I (20,000 倍希釈, TAKARA 社) により 30 分間染色後、フルオロ・イメージアナライザー (FLA-5000, Fuji firm 社) により行った。

変性ポリアクリルアミドゲル電気については、Nunome *et al.* (2003) より行った。ゲル組成は、6%アクリルアミド (19:1), 1×TBE, 7M 尿素, 30% ホルムアミド, 0.1% 過硫酸アンモニウム, 0.1% TEMED とした。PCR 産物は、泳動直前に 2.5 倍量のローディングバッファー (98%ホルムアミド, 0.1%キシレンシアノール, 0.1%ブロモフェノールブルー, 10mM EDTA (pH8.0))を加えた後、94℃で 3 分間熱変性し、氷上で急冷した。サンプルコウムは 50 検体用を使用し、PCR 産物 4μL をアプライ後、1×TBE を用い 500V で電気泳動した。マーカーの検出は、SYBR Gold (20,000 倍希釈, Invitrogen 社) により 30 分間染色後、フルオロ・イメージアナライザー (FLA-5000, Fugii firm 社) により行った。

上記 2 種類のゲルを比較するため、シーケンサーによるマーカー検出を行った。蛍光色素付加は、ポストラベル法 (福岡ら, 2003) により行った。

(3) ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁ 集団の SSR 多型検索

多型検索に使用したプライマーは、濃縮ライブラリー由来プライマーが 165 種類 (第 3-1-1 表～第 3-1-6 表), EST-SSR 由来プライマーが 60 種類 (ORF 由来 30 種類, 3'UTR 由来 30 種類) を用いた (第 3-2-1 表および第 3-2-2 表)。一次スクリーニングとして、交配親である‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農 2 号’の DNA を用いて多型アレルの有無を調査した。多型が検出されたプライマーについては 2 次スクリーニングとして、‘とちおとめ’×‘いちご中間母本農 2 号’F₁ 94 個体の DNA を用いて多型アレルの分離比を調査した。また、F₁ 94 個体の多型を調査した際は、複 2 倍体的な挙動を示すマーカーについても調査した。PCR 組成および条件は、上記 2- (2) の条件で行った。電気泳動については 2- (2) の変性ゲルを用いて行った。

第 3-1-1 表 イチゴ Genomic-SSR マーカーのプライマー配列 (CA-A/u I)¹⁾

SSRマーカー名	反復配列 ²⁾	フォワードプライマー配列 ²⁾	リバースプライマー配列 ²⁾
<i>Alu</i> ICA030103	(tg)3tt(tg)18tttgccgc(gt)3	gtttgtgtttccaatcaggcttcct	gtttctacatgcagttcaaggttccca
<i>Alu</i> ICA030136	(tc)7(ac)9	gtttccaaccagagacataaacgaccct	gtttacagcatgcagagttcaactgga
<i>Alu</i> ICA030139	(tg)10(ag)7	gtttgcaagagttgtggagattagtga	gtttcggcaagaattgactaacatgg
<i>Alu</i> ICA030147	(ac)10	gtttacgacctcatcatgattgctcttc	gtttcctgctccctcttactggttc
<i>Alu</i> ICA030154	(gt)3t(tg)8	gtttgttttagtgaagaaagcgagca	gtttgacagcaaaaattgacagccat
<i>Alu</i> ICA030163	(tc)19	gtttctcgtgtgtgtgtcaattgtgtt	gtttcactattgtgccacctggaatgaa
<i>Alu</i> ICA030165	(ac)10	gtttgcaaacctgaaaggtacgtcgat	gtttatagtttatgagggccgggtgaa
<i>Alu</i> ICA030170	(tg)13	gtttactgtgtgcaatggataatgggg	gtttgggatgtttgtctgtagactgtacg
<i>Alu</i> ICA030210	(gt)3ac(tc)5tg(tc)9(ac)9	gtttgttgacattgtctgctcattttg	gtttccatagttttgggtgaatttggga
<i>Alu</i> ICA030211	(ac)16	gtttccctgatgccaaaagagaat	gtttaacaggttgctatgcatcggtt
<i>Alu</i> ICA030212	(ac)11	gtttgatcgcatgttaattgtgtcact	gtttgcattaggatgctcaaacctcaa
<i>Alu</i> ICA030213	(tg)11	gtttgatcactgtctccctgttagtg	gtttccctgagcagttgacctgactttt
<i>Alu</i> ICA030225	(ac)12	gtttgacatccaacccaaatcttgacc	gtttccgaaagaaccttcaaatcatgc
<i>Alu</i> ICA030248	(tg)10	gtttccctcgtgtgttagataggga	gtttccagctgtgttgacagggcatta
<i>Alu</i> ICA030249	(ac)10	gtttcagttattgacagttattgcagac	gtttgaaacctggccagaagagcaagta
<i>Alu</i> ICA030253	(ta)6(tg)22	gtttaaaccacatcctatgctctcctcg	gtttcagtggtgtgagattgtatgttcg
<i>Alu</i> ICA030259	(tg)18	gtttgggtgatcacattatgtcccgat	gtttgcaaatgatatactcccacctc
<i>Alu</i> ICA030261	(tc)13	gtttgttgagcctgattgggaactga	gtttccactacaaagatgaggtttccg
<i>Alu</i> ICA030273	(tc)3(tg)8	gtttgacatgacgactgacatggaaat	gtttcttacaagcctaagtggcga
<i>Alu</i> ICA030101	(tg)10	gtttgcaacatcttctcgaggcctaag	gtttccatttgaagatggtcgagttcc
<i>Alu</i> ICA030133	(ac)12	gtttcatcggttaagtgtgtaacttca	gtttcaagcattagatgtggaagcaaca
<i>Alu</i> ICA030153	(tg)6	gtttgcgaaaatgtgaggagattgtgt	gtttcgatgaggtacattgtcatacca
<i>Alu</i> ICA030158	(ac)12	gtttgcatttagtcaaacatcaaatgtg	gtttgtcaaatgtgtgtcccttgg
<i>Alu</i> ICA030172	(tg)9	gtttgaatggcatttgagaaatgagagca	gtttcactccctcattctaagtgttc
<i>Alu</i> ICA030206	(tg)3cg(tg)8tagtctgttaa(ta)3(ac)3	gtttgaattgaagcaagcccatagt	gtttccaatcatcaggttgataggctt
<i>Alu</i> ICA030229	(tg)8	gtttagaattgtttgtttgggaagct	gtttgcaattgacaatcttcttccctt
<i>Alu</i> ICA030250	(tg)7	gtttccattgcaggttaattgttctgttt	gtttacacaagggaacaaatgtagcc
<i>Alu</i> ICA030268	(at)3gtatgtaaacatca(ta)11	gtttgaaatttcctacacaaagttagca	gtttggccaccacataatgtgtatct
<i>Alu</i> ICA030118	(tg)10	gtttatgatagccgggtcataacattgc	gtttccctggcgaagatgaacaataaac

¹⁾ プライマー数は 29 プライマー. Genomic-SSR は Nunome *et al.* (2006) の方法により作製した.

²⁾ 反復配列の検出およびプライマーの設計は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により行った. また, フォワードプライマーにも pig-tail (GTTT または GTTTC) を付加した.

第 3-1-2 表 イチゴ Genomic-SSR マーカーのプライマー配列 (CA-HaeIII)¹⁾

SSRマーカー名	反復配列 ²⁾	フォワードプライマー配列 ²⁾	リバースプライマー配列 ²⁾
<i>Hae</i> IIIA030210	(ac)10c(ac)6	gtttgtactgtccgatgctttgtctt	gtttgttggggcagcctgtatatt
<i>Hae</i> IIIA030213	(cg)3cacg(tg)14	gtttgtgtcttatacaaacccccagtc	gtttacactgtctgtacttggcaaatg
<i>Hae</i> IIIA030234	(tg)11(ag)9	gtttcaaaatttccaagggtgcaagtcc	gtttgtgtgcttttggctctaat
<i>Hae</i> IIIA030242	(ac)10	gtttgtccctcagacacaaaacaaagg	gtttcaaaagggaagcttctccagcata
<i>Hae</i> IIIA030260	(ta)3(tg)12	gtttgctagatactactatgcaaggaa	gtttggagccacaatttcttctcc
<i>Hae</i> IIIA030261	(ac)10	gtttgaccaacaaactgaacgatggaga	gtttcaggatgtttatagctgtgtga
<i>Hae</i> IIIA030278	(at)3gtt(tg)12	gtttcctgacgataacgtacaacaaaa	gtttcaatgccgacagcactattt
<i>Hae</i> IIIA030301	(ac)12(ta)3	gtttgggtgtttgatttgggttctaa	gtttgaaaaccgattatgcatgacc
<i>Hae</i> IIIA030302	(ta)7(tg)19	gtttaaaattccgcacaaaaccattg	gtttgcaactccacttctctgttttc
<i>Hae</i> IIIA030320	(tg)10	gtttgcatgggtttaaagcattgtcatt	gtttgcttccagcaacatgtattt
<i>Hae</i> IIIA030336	(ac)18	gttttctgttgggatgctttgattttc	gttttagaatccctcatttgaacgg
<i>Hae</i> IIIA030338	(ac)11	gtttgggattcagacagataaaacacagg	gtttccaaggatcatggaatctttca
<i>Hae</i> IIIA030344	(ta)4(ta)12tagcgagatggg(ta)3	gtttcgcaacatccattttagaaccttc	gttttagccaagatggctagggttgag
<i>Hae</i> IIIA030362	(ac)21	gtttcaaaagtgaagaaattaccaccgc	gtttgctgcaaaaagcttggaggt
<i>Hae</i> IIIA030378	(ac)8ttaaa(ta)3	gtttcttccataccagcctgaatcaca	gttttagctttgtcgcaccttgatg
<i>Hae</i> IIIA030380	(tg)7(ta)5tgtatgta(tg)9	gtttcactcctatacagcttctgtctgg	gtttactgctcaatccaacatcaa
<i>Hae</i> IIIA030381	(ac)9tcaaacac(at)3	gtttgcacgcatctgaccaactctta	gtttccatatttcaattgtgggattc
<i>Hae</i> IIIA030388	(ac)20	gtttggcattctgtgtgcaaaccttctc	gtttgtcagggttacaaccttactcg
<i>Hae</i> IIIA031215	(ac)10	gtttggggagaaagctttgtgagagt	gtttgaggaaatggctatcccaagag
<i>Hae</i> IIIA031220	(ac)11	gtttgaaatgctgtatctctgatgcct	gtttcgtcgaatttcaagtctctt
<i>Hae</i> IIIA030216	(ac)7	gttttctcgatccaattcaagaggaa	gtttgcgtacggcatttctcatctcat
<i>Hae</i> IIIA030219	(tg)9	gttttagcattgcatcatgtgtcatt	gtttcagaagcatgttctcggttcttta
<i>Hae</i> IIIA030244	(at)3tttgcaggcagctgttctta(tg)6	gtttgtctacatacatgtgcatggaagtct	gtttaaattcgatgataagtcagccca
<i>Hae</i> IIIA030333	(tg)6ag(tg)7ctgtttctgtgtctt(tg)7	gtttgtgtggaagcaactaaacctgtg	gtttatggggatggaatcctgttg
<i>Hae</i> IIIA030363	(tg)6ttctct(ta)3tcgtagc(tc)3	gtttcacaaaaccatcgtgatacatgc	gtttgcaaatcagctaacagagggaaga
<i>Hae</i> IIIA030395	(ac)10	gtttcaaaaggtttcattccgaaacct	gtttgcagcaagggaagcaattttac
<i>Hae</i> IIIA031202	(tg)7	gtttacattacaaggcaatgtcccgc	gtttgtgaaatttgcgtgaactctga

¹⁾ プライマー数は 27 プライマー. Genomic-SSR は Nunome *et al.* (2006) の方法により作製した.

²⁾ 反復配列の検出およびプライマーの設計は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により行った. また, フォワードプライマーにも pig-tail (GTTT または GTTTC) を付加した.

第 3-1-3 表 イチゴ Genomic-SSR マーカーのプライマー配列 (CA-Rsa I)¹⁾

SSRマーカー名	反復配列 ²⁾	フォワードプライマー配列 ²⁾	リバースプライマー配列 ²⁾
RsaICA030104	(ac)12a(ta)4	gtttacgaactggtgtctagcctcgct	gtttcgtacaagagatagtcgagtgga
RsaICA030105	(ac)6atactctcaactct(tc)4tagtctactg-tagatgttttaaaac(ag)25	gtttcccccttttcccccaagtgttt	gtttaagcacatcacagaaaactcccA
RsaICA030115	(ac)4attggtttcagtcctttgtt(ac)9	gtttaccagggaagcattgataggat	gtttcagaaattcatgaggcgacttcta
RsaICA030118	(ac)7	gtttgatctagctagccagcctgtcag	gtttgcagaaaacatggcacaagaagaa
RsaICA030119	(ac)5attc(ac)5aacaagaggattatattg-atc(ac)10	gtttggctgttccagtttgagaaaaa	gtttccaaaggagctgtgttaaatgag
RsaICA030120	(tg)11	gtttaacaaaacaacagtgaggcagtc	gtttgcattagatggggcacaagg
RsaICA030133	(tg)10	gtttaaaaatccccccacccataaaa	gtttccaaactcaggaacgggtttgtc
RsaICA030137	(ac)3tgaattc(ac)10aa(caa)6	gtttaggcatcttcgcataattcaggtg	gtttgcatagagtggtgcattgaaaacc
RsaICA030150	(ac)8atgaga(ag)3	gtttgaatatcagttgctctgtccca	gtttccagatgaaggatctgaacagcaa
RsaICA030154	(tg)14	gtttcaagtggtgttgacctgaaa	gtttatgcaacgcccttaggattaagcaa
RsaICA030162	(tg)14	gtttaaacattccatgtgtgtgcc	gtttgtgaatgcaaggagctggag
RsaICA030164	(tg)14(aat)3	gtttaaagaccatagctgggagccaaat	gtttaaagtagtcgtctcagagcggtg
RsaICA030169	(ac)10	gtttgaaacacaaagtcatttggctacct	gtttatacaaaagtcaggacgatccgtc
RsaICA030175	(ac)6	gtttattagttgggattcgtcccc	gtttgttcattagtcctgtgccaaagc
RsaICA030176	(tg)11	gtttccaaatccaaataccagcttcaa	gtttggcctgccacataataggctaga
RsaICA030186	(ac)10	gtttcaggtttgtggaacgtaaaagg	gtttggccttaggtcagtcctttgtga
RsaICA030188	(tg)13	gtttggacaacagcagatcaaaagtga	gtttagctaatgcatgagtggtggaa
RsaICA030301	(tc)3atatgctcttcgca(ta)7(tg)13	gtttacctggaacaacctcaagaata	gtttggaaaggcagaataacctattaggc
RsaICA030303	(ac)11	gtttcaattttgacatcttggaaggctt	gtttgacatgctttgaattggaaggct
RsaICA030313	(tg)6cg(tg)8(ag)8	gtttgagcagcatgaattctgcctcca	gtttcaatatccaaatcagatgttgccg
RsaICA030335	(gt)3agaagtgctgtctatag(tg)12(ag)13	gtttgcatacagtcctctattgcattctc	gtttaaccttgccagctaaccaaggatcg
RsaICA030336	(ac)16	gtttcacacaaaggccataaaaaccccc	gtttgcaatgtcaacggagctcaggag
RsaICA030359	(tg)12	gtttccgcgtgtgttttaaacatttg	gtttgggttgacagtgctccagt
RsaICA030373	(ac)12	gtttatcacgccctacccgtattcaa	gtttcatcaagccatcatccaactcaac
RsaICA030392	(ac)15	gtttcagtggttaattgacactggctcg	gtttcagagggcagacttagtttggc
RsaICA030722	(tg)12tc(ta)3	gtttcacagtttgaaacagaacaagcg	gtttattgagcaccatccattagcacct

¹⁾ プライマー数は 26 プライマー。Genomic-SSR は Nunome *et al.* (2006) の方法により作製した。

²⁾ 反復配列の検出およびプライマーの設計は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により行った。また、フォワードプライマーにも pig-tail (GTTT または GTTTC) を付加した。

第 3-1-4 表 イチゴ Genomic-SSR マーカーのプライマー配列 (GA-A/Iu I)¹⁾

SSRマーカー名	反復配列 ²⁾	フォワードプライマー配列 ²⁾	リバースプライマー配列 ²⁾
Alu IGA030107	(ag)12	gtttgggttaaggagacaaaagagca	gtttccggtttatgaccgatattccca
Alu IGA030110	(tc)26	gtttcttttccccctctcatgtattccc	gtttcggaaagagcttgggagcttaga
Alu IGA030116	(ag)14	gtttacactgagatggacagaggatgg	gtttctctgttgaagcgtagaatagg
Alu IGA030118	(ag)22	gtttagggtgtgacatttggaggaaagg	gtttcgaataaagccagttatcacgcc
Alu IGA030126	(tc)25	gtttccggtttttgatcgagatttcagt	gtttccgatggagtgatgatgagca
Alu IGA030127	(ag)18	gtttcatcagtaggtcccaagggttttg	gtttgatcccttgctgctctatc
Alu IGA030134	(tc)31	gtttctcagtttctgctgctcctcgt	gtttctatgtcgtatgctgctgtg
Alu IGA030135	(ag)31aaactgagattgactgactt(gt)3	gtttactaaactgccaacacacagcgag	gtttcaaatgttccctgaaaatcgaa
Alu IGA030149	(ag)20tcagtga(ggt)3g(gt)3	gtttggccaccctaagaaaggaaat	gtttgtcttgggctctgctgtat
Alu IGA030167	(ag)19gg(ag)4	gtttgtagcaactgatgctccacaag	gtttacgccataaacaatgtaccgtga
Alu IGA030169	(tc)6cc(tc)8	gtttactacagcgcagcagaaagtaac	gtttctgctcatgtgtaattcccaa
Alu IGA030173	(tc)13tatc(ac)7	gtttccgggatttctgtctcattta	gtttgaaacccatatttgtctccca
Alu IGA030177	(ag)13	gtttatgtgcccagcacttaattggt	gtttaaagtgaattccgggatgaatga
Alu IGA030203	(ag)13	gtttctctgtgaggtgtgttaagcgag	gtttctctacacacacttctctgatt
Alu IGA030216	(ag)16	gtttgtacaaaattatcgtcggggta	gtttataattgcgttctctgcttctc
Alu IGA030217	(ag)24	gtttcttcaaaccttcttcagctc	gtttacggaggtggtggggaatct
Alu IGA030231	(ag)19	gtttaaaaccacttacacggaggagg	gtttgcaatttatccgtcgtctgtt
Alu IGA030240	(ag)18	gtttatccaaatgagcactattccacc	gtttagaaggtgctcttgcctatcact
Alu IGA030247	(ag)13	gtttcggcttagaaggagcatgttta	gtttaggccagaacaagcacaactagc
Alu IGA030266	(gga)5gg(ag)15	gtttccaccacaaaattcagaacttg	gtttctgctgttagtcccaacccaac
Alu IGA030109	(ag)22	gtttgcaacagtttctcatgaagccat	gtttccagccttcttctctctttttt
Alu IGA030113	(ag)17attaaagggtacgcgga(gt)3	gttttcttggcgaaaccctaagat	gtttgaaaaaccagccagtcggttc
Alu IGA030115	(ag)20tg(ag)4	gtttgaggactgaaaaaggcctgagat	gtttaacaattcggaaaccgtcagagc
Alu IGA030125	(tc)3gc(tc)13acaccttttctgcaacta-taac(ta)3	gtttcgaataatgtcccaaacactcctt	gtttagggggtacaaaataagccaagcat
Alu IGA030156	(tc)3actaacagggttttagt(tc)10	gtttccacatggttcttatgttggtc	gtttcgacgagacaaacgtgttcaaat
Alu IGA030244	(ag)23attagaagcagtagatgga(ta)3	gtttgagcaaatcataaccacgcatc	gtttcaagcctacctgtcagcaactgaa
Alu IGA030265	(tc)18	gtttggtatgtgactgtttgtgtgt	gtttcaccataaccaggaataactagggtg
Alu IGA030104	(ag)13	gtttacagcatgtggaatccctctac	gtttatttctggcctgtgtctggg
Alu IGA030143	(tc)31	gtttctaacgcggcaactgaagaatctc	gtttgtgttagaacggtctcaaatgat
Alu IGA030252	(tc)15(ta)6	gtttctatcattgactctcgtggtc	gtttaaaacgcaggcatttgagaagg

¹⁾ プライマー数は 30 プライマー。Genomic-SSR は Nunome *et al.* (2006) の方法により作製した。

²⁾ 反復配列の検出およびプライマーの設計は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により行った。また、フォワードプライマーにも pig-tail (GTTT または GTTTC) を付加した。

第 3-1-5 表 イチゴ Genomic-SSR マーカーのプライマー配列 (GA-HaeIII)¹⁾

SSRマーカー名	反復配列 ²⁾	フォワードプライマー配列 ²⁾	リバースプライマー配列 ²⁾
Hae IIIGA030107	(ag)3aatcgggaggaggagacaga-(ag)17	gtttgacggaggcagagaaatccagtag	gtttaggagtggactggtttgaaaaa
Hae IIIGA030110	(ag)36	gtttcgatgattaggcttgggtgagt	gtttcttttttcgaacacgcaaac
Hae IIIGA030114	(tc)15	gtttaaacttggtttctcggtatccct	gtttccatgcaactcctcatctca
Hae IIIGA030124	(ag)17gcagagaaattttgtca(ta)3	gtttcacaaacaggaaatcaatggtgagc	gtttcgataaggacgtctgtctggtt
Hae IIIGA030125	(ag)25	gtttctcctgaacacatggctattcaca	gtttcctaagtgtttctcatgtgtcgg
Hae IIIGA030126	(ag)18	gtttcgaatgcctgaaagttaagggtc	gtttaaaaactcaagtgtgactgag
Hae IIIGA030127	(tc)4tt(tc)16cc(tc)3	gtttaatttcttcttggagaccttggg	gtttgaaaaactgcaaaatcaggagtca
Hae IIIGA030135	(ag)19	gtttgatcgaagaacccattaggttgg	gtttcccaaaactcaacaagaacc
Hae IIIGA030142	(ag)16	gtttaaggaaccacataggatgccacat	gtttagctgctcttttccccctctaa
Hae IIIGA030145	(ag)3aa(ag)10	gtttgtgcttctcgtatttggctat	gtttctgtctcactcaccacctcac
Hae IIIGA030151	(ag)27	gtttcagaatctgcataaagagatgtacgtg	gtttacagcctttatcacaccccaaaag
Hae IIIGA030152	(tc)4tt(tc)11	gtttggacatgaagtcacgtccacaatg	gtttgaatacacagactgtcataggagcac
Hae IIIGA030154	(ag)19	gtttattggaatatgttgaccgtctcgg	gtttgatcatctctccgaaaccaa
Hae IIIGA030155	(ag)18	gtttgatcgaagacccattaggttgg	gtttcccaaaactcaacagaac
Hae IIIGA030163	(ag)19gcagagaaatttggct(ta)3	gtttcacaaacaggaaatcaatggtgagc	gtttccacgataaggacctactgtctg
Hae IIIGA030179	(tc)7taaaac(tc)5taaaac(tc)6taaa-ac(tc)5	gtttcctgtgggtactcctcgaat	gtttgctgggaatgaaaagattaccagt
Hae IIIGA030181	(ag)23	gtttcaatgcacccataaacctgactc	gtttcgttgggtggagaccatctaata
Hae IIIGA030184	(ag)13	gtttgctcattcttccgcatattcacc	gttttaaccagaagccaaggtaatcaacg
Hae IIIGA030192	(tc)12	gtttctgacactgcatacaaaaacgtg	gttttaaccttaacctgtccatgctcg
Hae IIIGA030195	(ag)3aaaga(ag)22	gtttcacattgatccgtcgcattatac	gttttaaccttaggggttcttcccctct
Hae IIIGA030177	(ag)3at(ag)15	gtttcaaaatgatagacaagaccaca	gtttccaaagccgataagcctgtca
Hae IIIGA030178	(tc)8	gtttcagtttaccacccctgaacttt	gttttccctgagactcatcaatgt
Hae IIIGA030180	(ta)4caaaacaaagacac(ag)3aaagtg-(ag)4at(ag)5cgcagaaggaaagca-agcttgggagt(ta)4gggcatagctaag-tgaga(ag)4	gttttaaccaagggtctctggagggtatc	gttttaactccaagctcttcttacttc

¹⁾ プライマー数は 23 プライマー。Genomic-SSR は Nunome *et al.* (2006) の方法により作製した。

²⁾ 反復配列の検出およびプライマーの設計は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により行った。また、フォワードプライマーにも pig-tail (GTTT または GTTTC) を付加した。

第 3-1-6 表 イチゴ Genomic-SSR マーカーのプライマー配列 (GA-Rsa I)¹⁾

SSRマーカー名	反復配列 ²⁾	フォワードプライマー配列 ²⁾	リバースプライマー配列 ²⁾
Rsa IGA030102	(ag)21	gtttccatgtccacatcatccaatgaa	gtttaaaatagaagccactgcccactc
Rsa IGA030110	(tc)29	gtttggcctaatttcttaactcaagaacc	gtttcttttggttcaataagggaagggg
Rsa IGA030125	(ag)30	gtttgcaaaagcaaccagcacatacaag	gttttagttcgatgttctggtccat
Rsa IGA030137	(ag)25	gtttgtcttcttgagtgcaatccaccttt	gtttgtcatattcccgctcatgttca
Rsa IGA030140	(ag)11	gtttcaacagagcagttggcaagaaga	gtttcctgagcaagaacggtttga
Rsa IGA030142	(ag)25	gtttcgaagcagaagcaagctgtaatg	gtttaccgttctgattcccaagtaa
Rsa IGA030153	(ag)24	gtttattcggacagtaagagaggagcaa	gtttggactgtttatttcttggtagcg
Rsa IGA030158	(ag)20	gtttgcaaacctatcatgcagaaac	gtttggaccaaaatccccctttaaag
Rsa IGA030168	(ag)26	gttttaacctatctgttgcgaacgaa	gtttctgcgactcatctcaagttctcaa
Rsa IGA030173	(ag)29	gtttatagatagaaggtggagggcccg	gtttgtgtgtcacaacacctca
Rsa IGA030175	(tc)11t(tc)16	gtttcgagtttctcttcttctgcccct	gtttgcagattcttgtaagcctat
Rsa IGA030205	(ta)3ct(ac)4gg(ag)23	gtttcaatgaaccaaccaactcgtt	gtttgcagaaatccctgttaattctgt
Rsa IGA030211	(tc)3gac(tc)17	gtttcaatgtctctgtaacaaagaagca	gtttgtgcgcatgaaaatattg
Rsa IGA030213	(ag)19	gtttgcggttagttcattggagattga	gtttctcatcttccctctcaccgatt
Rsa IGA030214	(ag)23	gtttcatctacggcaacataacgcttca	gtttcttttgccttctgtctctca
Rsa IGA030253	(ag)22	gtttgtcattatcatctgcataaccctcg	gtttcccaatctgtgcaaaactagc
Rsa IGA030266	(ag)21ttacttgatacccatcact(ta)3	gtttcgatcaattaccacattagtagagc	gtttaccaaccattagcgtcatctctt
Rsa IGA030271	(tc)14	gtttgcaggtatgaatgtgactacagc	gtttctcttgggtgggtatctgcat
Rsa IGA030274	(tc)24	gtttgcacacgggtaaatgtgtaac	gtttggaggttctttaggaacagtagtga
Rsa IGA030293	(tg)6(ag)20	gtttgatgtgtgagaaaagatgcattgg	gtttcgaccaccaaaaacgaagaagat
Rsa IGA030136	(ag)25	gtttgctcggagaagtagctgtgtga	gtttctgtgtgaggcaaaactcag
Rsa IGA030139	(ag)17cgaagctacagtatat(ta)3tc-ttctagacaaaagcttgatacac(at)3	gtttgaaaggatgaggagggaacagat	gtttctgcatcactgcatgtctacaa
Rsa IGA030150	(tc)15	gtttatgcatgttccccagctgttagt	gtttccaaagggaacttctcagtcacc
Rsa IGA030170	(tg)9(ag)8attg(ag)10	gtttacctcaggccacatgataaaaga	gtttctgtgactaagatgtctggg
Rsa IGA030215	(ag)3gacggctattggaatatagcgg(ag)14	gtttgaattctggacgactggatctgt	gtttctttcagggttactcactcgt
Rsa IGA030258	(tc)12	gtttgttttctgggtgcttctctgt	gtttacattgttcattgcaaaacc
Rsa IGA030269	(ag)15	gtttgtctaacaagggaagggaattgggg	gtttaaagcttactgcccgaattgcac
Rsa IGA030284	(tc)5tt(tc)8tt(tc)9(ta)6t(ac)4	gtttgtctcatgcaggcttattcttgg	gtttgaactttgagttgctccata
Rsa IGA030813	(ag)28	gttttaattgtcagggtgaacatggaat	gtttcgagcattgtgctatgatttag
Rsa IGA030155	(ag)18	gtttccaggataacgaacaaaatgg	gtttcacatcaatgaagcgacactt

¹⁾ プライマー数は 30 プライマー。Genomic-SSR は Nunome *et al.* (2006) の方法により作製した。

²⁾ 反復配列の検出およびプライマーの設計は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により行った。また、フォワードプライマーにも pig-tail (GTTT または GTTTC) を付加した。

第 3-2-1 表 イチゴ EST-SSR マーカーのプライマー配列 (ORF 領域)¹⁾

SSRマーカー名	反復配列 ²⁾	フォワードプライマー配列 ²⁾	リバースプライマー配列 ²⁾
2bp repeat			
Contig150S_ORF	(ac)3a(ac)3	gtttcagccaaagacaaaacagacga	gtttcaggattgatccaaaggttttg
Contig272S_ORF	(ct)3tg(ta)3	gtttgactactaaataaaccacagacg	gtttgaaggaaagccaaagctactgga
Contig602S_ORF	(ta)4agaacagagcg(ag)4	gtttactcggagatgcaactaaggatg	gtttgctagaattgggtcagctgagtg
Stg001G08S_ORF	(ca)3tatagcaga(at)3	gtttgactcggcagcatttaacccat	gtttgatccagttgctctactgtgc
Stg002C02S_ORF	(ca)3tgggga(ag)3	gtttaaagtacatagcaggccgatcaa	gtttgagaaggacacaaaggtttgtgga
Stg014A07S_ORF	(tc)4ttcc(tc)3	gtttaatgggacagctgattttgagagc	gtttggattgggtcctatcagccattt
Stg021C04S_ORF	(ct)3g(tg)4	gttttagtagtaccgctcgaatcgtggc	gtttccagcgcgtcctcctccaaa
Stg045A02S_ORF	(ta)3tgag(ga)3	gtttaaagtctgccgaatcaacaagagg	gtttgaggggtattgttgatgctgatg
Stl002E11S_ORF	(ag)6	gtttgtccaattgatggcaaatgtaga	gtttacgagggaaactctgtcctggat
Str045G04S_ORF	(tc)7	gtttccctcatctgactactcagcCTC	gtttgagttgggaccgaggtgaatc
3bp repeat			
Stf023E03S_ORF	(cgg)4	gtttagcaatctacacctaaccagcgc	gtttaaagctcaaggacctgttcgtgc
Stg006A04S_ORF	(cct)6	gtttggttactttaagtggtgggtacc	gtttccaaaggtagcagctttccaaaga
Stg008C06S_ORF	(gaa)5	gtttccaggcttggagtaaggatgaga	gtttcaacaacacacagggccaac
Stg011C03S_ORF	(tgt)4	gtttcatcgccactctcattgtttgt	gtttcacaaaaccagctatccatttc
Stg029A01S_ORF	(tgt)4	gtttacttctcaaggtgtcaagtgcgc	gtttgacttgacgggagcgaagttaaa
Stg036B12S_ORF	(agt)5	gtttggacactaacgcacataacaa	gtttaccgtcacattgctttcagttca
Stg041E06S_ORF	(gga)5	gtttaaagttatgcagcagttttggga	gtttgctcatcatcaacatcctggtc
Stg043H05S_ORF	(tca)4	gtttgatgtgcagccaggaagaataca	gtttaaactgtgtgcgtttgttggagt
Stl003A08S_ORF	(gct)6	gtttcaaatgtctctgtcctcgttca	gtttggcagttgttaggaacgatg
Stl015D10S_ORF	(tgt)5	gtttgttaacttcaataatggcgc	gtttaatgctttgagggcaccag
2&3bp repeat			
Contig408S_ORF	(cta)3tca(ta)3	gtttaaacaattacactcgtgtaccgcc	gtttgatgatgtgtgttcaatgtgcc
Contig56S_ORF	(ct)3agctctcatcatcg(tca)3	gttttagttgacaggtgaagcaaaagcc	gtttgggatatgattcgggtgaaggta
Contig814S_ORF	(cgg)3(ag)3	gtttgcaccttgaccttcacatcttct	gtttccctctcgtctcgaagtctcaa
Stf015B08S_ORF	(ct)3tgggtccaat(tgg)3	gtttgaaaccagtcacgactcct	gtttctatgccagaactagcagcgg
Stf021E08S_ORF	(tc)3tacacgatcatctata(gca)4- tgcgcaataacaacct(tc)3	gtttgaatcaaatccagcagcagaagca	gtttgagaattgattccccctgcaag
Stf023G06S_ORF	(tg)3gtaagaacataca(gag)3	gtttactcttgggtgttcttccaac	gtttcagtagctgcaggcaacaatgact
Stg019E07S_ORF	(gca)4acatcccgatgtgattccaggc(tc)4	gtttagcagggaattcttgagcagcag	gtttgcaagctcacaaagaaaggct
Stg025F02S_ORF	(ag)17at(gat)5	gtttcagcatatactgccggagaatgaa	gtttcaacctataatcatcagaacca
Stl006B07S_ORF	(ag)3ttctctttagcagcttcaagtc(cag)3	gtttctgcagcaatttcagcaaggtg	gtttcgaattgaagcagagggaagt
Stl012B06S_ORF	(ct)3ggggacaatatcaactagaaaatcaa- (at)3cagctcttgtaat(tgc)3	gtttggatcgatgcaagaacctcatctt	gtttggaggaactgcacaaagaatgaca

¹⁾ プライマー数は 30 プライマー。EST は Namai *et al.* (2013) を使用した。ORF 領域は getorf (<http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/getorf.html>)により検出した。

²⁾ 反復配列の検出およびプライマーの設計は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により行った。また、フォワードプライマーにも pig-tail (GTTT または GTTTC) を付加した。

第 3-2-2 表 イチゴ EST-SSR マーカーのプライマー配列 (3' UTR 領域)¹⁾

SSRマーカー名	反復配列 ²⁾	フォワードプライマー配列 ²⁾	リバースプライマー配列 ²⁾
2bp repeat			
Contig1020S_UTR	(at)3ga(ta)3	gtttctatgaattgggtccctgaca	gtttgtgggttaaaattgttgacg
Contig174S_UTR	(ta)3gattg(at)3	gtttcaatccaccaaaagtcgatg	gtttacctatgatgctggtgctgctga
Contig320S_UTR	(ta)3ctg(ta)3	gtttcgaactgttcatttcacgtttg	gtttctcaatagatgtggcagggaa
Stf014G03S_UTR	(ag)7	gtttctgagcagcctctaaactggctc	gtttaaactcattcgaatccaccaaa
Stg012D11S_UTR	(ac)5a(ta)3	gtttgcttgaccttaactaagcagca	gtttgggtgacctttcgaagcact
Stg020B05S_UTR	(ga)3a(ag)3	gtttctatcttttcccaaacctcgc	gtttgaggatttccaattgttcgagtc
Stg025A11S_UTR	(ta)5gtttac(at)3	gtttacatagcgcataaacatttca	gtttaccactgccaatcatcatgctc
Stg041B03S_UTR	(ag)7	gtttcatttccctgagaccacaattca	gtttaaacttgggtgctaacgagtgaa
Stl001E01S_UTR	(tc)3(ag)3	gtttagaagatcacccaaacctctgg	gtttgtgattttgtcctctctgt
Str038H08S_UTR	(ct)3(ag)3	gtttgaacagcctggatattgggatct	gtttcctgccaaagttgtgtgagaca
3bp repeat			
Contig308S_UTR	(caa)5	gtttcagaagaccaactcctgcttt	gtttgagcgaagggtgatgtaaatagg
Contig818S_UTR	(caa)5	gtttcgggttcaatttcacaccctaa	gtttggaagggaagaaagacaacggt
Contig955S_UTR	(caa)4	gtttgcaagcaaacccagatttgaacc	gtttactgtgggtgggtgagaagaat
Stf015H12S_UTR	(caa)4	gtttcatgaacggaaaccttaacc	gtttccgattgggtttcctcaattct
Stf025F01S_UTR	(tgt)6	gtttccgggtgaacactgcacataaact	gtttgagacgacccaagtgaagg
Stg017B02S_UTR	(taa)4	gttttactcggtaaccaggttccaat	gtttgggttaaagcaatctgcaacctttg
Stg034A03S_UTR	(taa)4	gtttcacgtcaagaacaggaaacaaagc	gtttggaagctcattcgggaaccaccag
Stg037A04S_UTR	(taa)4	gtttgcagggttcatcacgaacagta	gtttggaactgtctattgttcacgga
Stl014F12S_UTR	(ctc)4TCT	gtttaaaaccaaaaggctcatcatccc	gtttaggccagccaaaagaattaaagctc
Str016C08S_UTR	(cct)6	gtttccctgagctaatggcaaacagt	gtttatgccaaaacgaactggagctc
2&3bp repeat			
Contig271S_UTR	(gta)3t(ca)3	gtttgagctagtcttacagaccccaacc	gtttcaatgctggaattgtgtctgc
Stf016F06S_UTR	(gaa)3aaactatctagcactttcaactcaaat(tc)3	gtttcaccatctcagcagatacaagctg	gtttatgtgtcctcattgaccttga
Stg010B08S_UTR	(at)3ca(gca)3	gtttgcatgacaaatgcaaatggctc	gtttagcaaacctggctatcatgctcc
Stg022A12S_UTR	(gca)3tcttttc(at)3tacacacaaaaaaa- aaa(ag)4	gtttgaaagcattgggttgggttaaag	gtttaatgcaccactggggtcctgt
Stg027D02S_UTR	(caa)4agcgaagcgaac(ta)3	gtttcgaacactgattctctgtacat	gtttgactacggagccattgagaattg
Stg037E10S_UTR	(taa)14ta(at)3	gtttcgaacgacatttgcgtgtgat	gtttgatgcagtatggatatctgcgg
Stg046D09S_UTR	(caa)3a(tc)3	gtttgtacaagaaaataagggccaccc	gtttgctcagattgattttgtctcg
Stg047A11S_UTR	(tac)3aaatggcctacg(ta)3	gtttcgaatcaaacgcaaaccaagat	gtttggggaattacattaacgcccaaac
Stl018D11S_UTR	(agg)3gct(ac)3	gtttggggtaaaaagaaaacagctcaa	gtttggcactccactgtgtgtgatt
Str027C03S_UTR	(ta)3gtat(gca)3	gtttcagcagtagatcaagtacatggaa	gtttggtgccatgcttggattttt

¹⁾ プライマー数は 30 プライマー。EST は Namai *et al.* (2013) を使用した。3'UTR 領域は getorf (<http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/getorf.html>)により検出した。

²⁾ 反復配列の検出およびプライマーの設計は read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) により行った。また、

32 フォワードプライマーにも pig-tail (GTTT または GTTTC) を付加した。

3. 結果

(1) SSR マーカー検出条件の検討

AluICA030103 プライマーを用いて、シーケンサーにより SSR マーカー検出した結果、‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農 2 号’ともに 3 アリルが検出され、‘とちおとめ’では 229 nt, ‘いちご中間母本農 2 号’では 240 nt のアリルが多型を示した(第 3-2 図)。

HEGS 法における濃縮・分離アクリルアミドゲルにより同マーカーを検出した結果、シーケンサーと同じ大きさ付近に多型を検出した(第 3-3 図)。しかし、高次構造による影響のためか、高分子領域に偽バンドが多く検出され、マーカー精度の信頼性に問題があった(第 3-3 図)。一方、変性ゲルにより泳動した結果、シーケンサーより pig-tail 分の 2bp を付加した大きさが多型が検出された(‘とちおとめ’:231 nt, ‘いちご中間母本農 2 号’:242 nt, 第 3-3 図)。以降、‘とちおとめ’、‘いちご中間母本農 2 号’、‘とちおとめ’×‘いちご中間母本農 2 号’F₁ 集団は変性ポリアクリルアミドゲルによりスクリーニングを行うこととした。

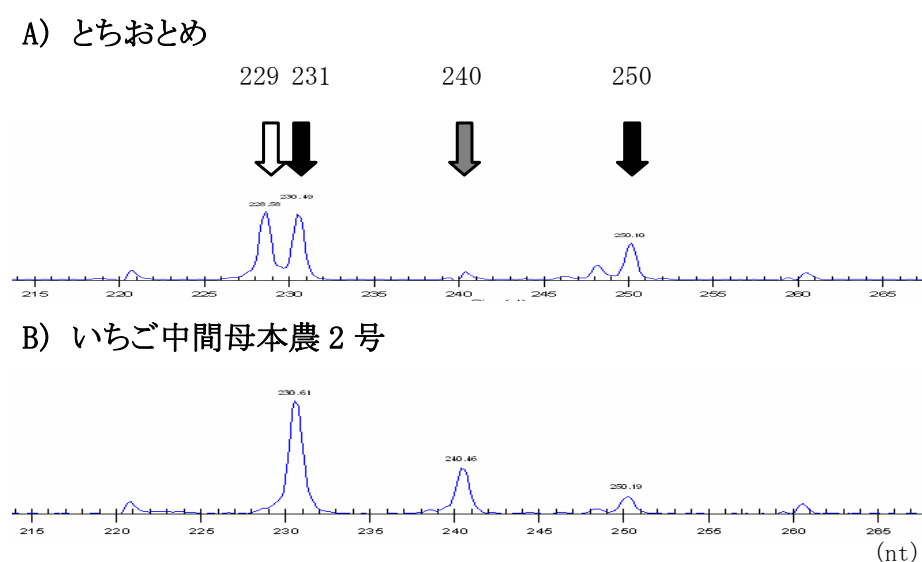
(2) ‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農 2 号’間における SSR 多型検索

‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農 2 号’間で多型が得

られたプライマー数は、CA モチーフにおける Genomic-SSR で 60 プライマー (72.3%), GA モチーフにおける Genomic-SSR で 66 プライマー(80.5%), 合計で 126 プライマー (76.4%) であった(第 3-3 表)。一方、EST-SSR では、ORF 領域で 6 プライマー (20.0%), 3'UTR 領域で 10 プライマー (33.3%), 合計 16 プライマー (26.7%) であった(第 3-3 表)。EST-SSR における 2 塩基反復と 3 塩基反復間の多型は、ORF 領域で 3 塩基反復が 5 プライマー (50.0%), 3'UTR 領域で 2 塩基反復が 5 プライマー (50.0%) と最も多かった(第 3-3 表)。

(3) ‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農 2 号’F₁ 94 個体における SSR 多型分離

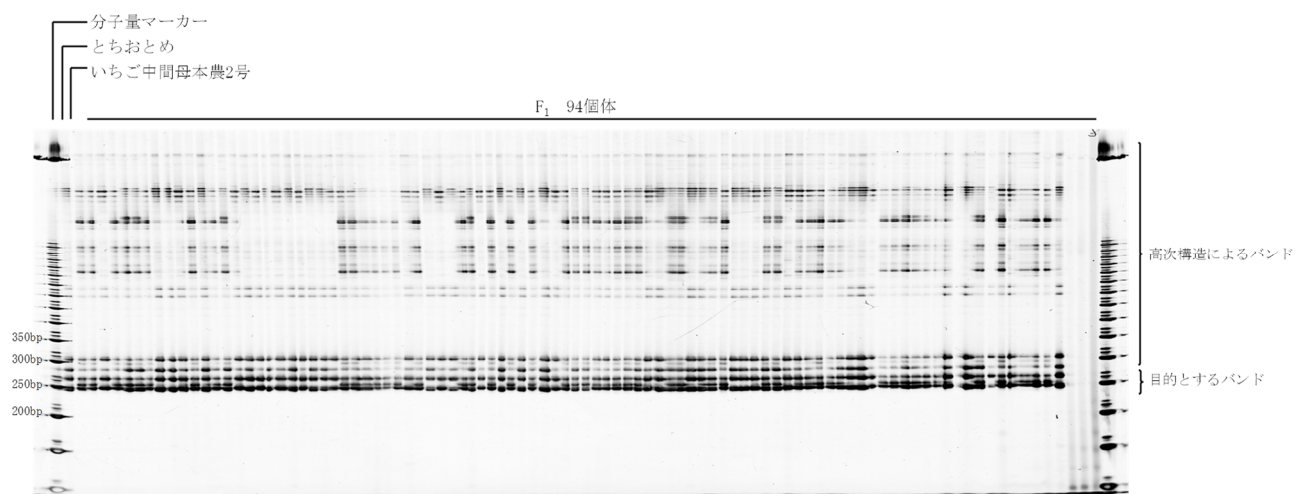
多型を示した 143 プライマーのうち、116 プライマー (285 アリル) を用いて(第 3-4-1 表～第 3-4-8 表および第 3-5 表), ‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農 2 号’F₁ 94 個体における分離比を調査した結果、‘とちおとめ’では 1:1 分離を示すアリルが 92 アリル(70.2%), 1:0 分離を示すアリルが 27 アリル (20.6%), 3:1 分離を示すアリルが 2 アリル (1.5%), その他が 10 アリル (7.6%) であった(第 3-4 図)。一方、‘いちご中間母本農 2 号’では 1:1 分離を示すアリルが 121 アリル (78.6%), 1:0 分離を示すアリルが 10 アリル (6.5%), 3:1 分離を示すアリルが 7 アリル (4.5%), その他が 16 アリル (10.4%) であった(第 3-4 図)。



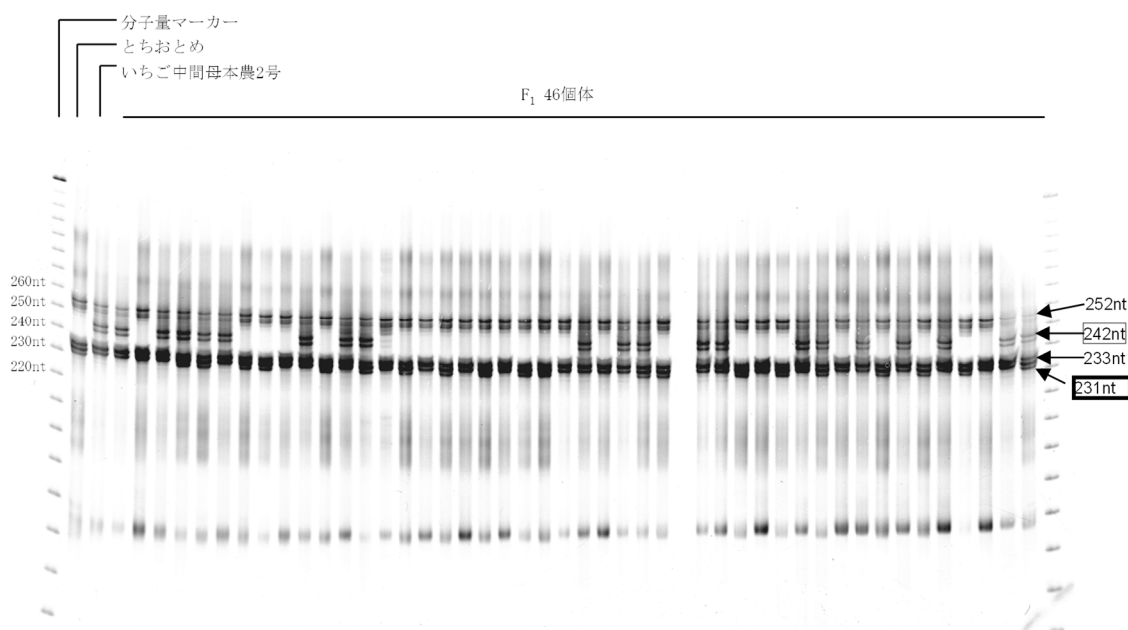
第 3-2 図 シーケンサーによるイチゴ SSR マーカーの検出

黒矢印は‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農 2 号’で共通なマーカー、
白矢印は‘とちおとめ’のみに検出されるマーカー。
灰色矢印は‘いちご中間母本農 2 号’のみ検出されるマーカー。
使用プライマー: *AluICA030103*

A) 濃縮分離ゲル (HEGS 法)



B) 変性ゲル



第 3-3 図 濃縮分離ゲルと変性ゲルによる SSR マーカーの電気泳動差異

ゲル組成は, A)が分離ゲル (12% アクリルアミド (19:1), 0.375M Tris-HCl (pH8.8)), 濃縮ゲル (5.7% アクリルアミド (19:1), 0.125M Tris-HCl (pH6.8))とし, 泳動バッファーは 1×Tris-Glycine を使用した. B)のゲル組成は,6%アクリルアミド (19:1), 7M 尿素, 30% ホルムアミドとし, 泳動バッファーは 1×TBE を使用した.

使用プライマーは *AluICA030103* を使用した, 分子量マーカーは濃縮分離ゲルが 50bp ladder, 変性ゲルが 10bp ladder を使用した.

変性ゲルで検出された 242nt は'とちおとめ'で検出される多型,231nt が'いちご中間母本農 2 号'で検出される多型を示す.

第 3-3 表 ‘とちおとめ’ および ‘いちご中間母本農 2 号’ 間における Genomic-SSR および EST-SSR マーカーの多型率

プライマー由来	供試 プライマー数	多型が検出された プライマー数	多型率 (%) ¹⁾
Genomic-SSR			
CAライブラリー由来	83	60	72.3
GAライブラリー由来	82	66	80.5
Genomic-SSR合計	165	126	76.4
EST-SSR			
ORF領域 ²⁾			
2bp repeat	10	1	10.0
3bp repeat	10	5	50.0
2bp +3bp repeat	10	0	0.0
ORF領域合計	30	6	20.0
3'UTR領域 ²⁾			
2bp repeat	10	5	50.0
3bp repeat	10	3	30.0
2bp +3bp repeat	10	2	20.0
3'UTR領域合計	30	10	33.3
EST-SSR合計	60	16	26.7

¹⁾ 多型が検出されたプライマー/供試プライマー×100

²⁾ getorf (<http://emboss.sourceforge.net/apps/cvs/emboss/apps/getorf.htm>) により領域を決定した.

第 3-4-1 表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果
(CA-AluI 由来 Genomic-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量(nt) ²⁾	F ₁ 94 個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
Alu ICA030103	いちご中間母本農2号	242	46	48	1:1	0.84	ns
	とちおとめ	230	44	50	1:1	0.54	ns
Alu ICA030113	いちご中間母本農2号	158	41	53	1:1	0.22	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	153	62	32	3:1	0.04	*
	いちご中間母本農2号	141	53	41	1:1	0.22	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	134	71	23	3:1	0.91	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	133	70	24	3:1	0.91	ns
	とちおとめ	125	46	48	1:1	0.84	ns
	とちおとめ	113	58	36	1:1	0.02	*
Alu ICA030118	いちご中間母本農2号	96	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	166	50	44	1:1	0.54	ns
	とちおとめ	164	49	45	1:1	0.68	ns
Alu ICA030136	とちおとめ/いちご中間母本農2号	160	65	29	3:1	0.19	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	113	73	21	3:1	0.55	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	109	77	17	3:1	0.12	ns
	いちご中間母本農2号	107	40	54	1:1	0.15	ns
	いちご中間母本農2号	105	94	0	分離なし	-	-
Alu ICA030139	とちおとめ	102	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	188	44	50	1:1	0.54	ns
Alu ICA030153	いちご中間母本農2号	116	21	73	1:1	0.00	**
	いちご中間母本農2号	114	60	34	1:1	0.01	**
Alu ICA030158	いちご中間母本農2号	168	38	56	1:1	0.06	ns
	いちご中間母本農2号	166	38	56	1:1	0.06	ns
	いちご中間母本農2号	142	42	52	1:1	0.30	ns
Alu ICA030165	とちおとめ	163	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	158	52	42	1:1	0.30	ns
	いちご中間母本農2号	155	42	52	1:1	0.30	ns
Alu ICA030170	とちおとめ/いちご中間母本農2号	176	68	26	3:1	0.55	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	172	68	26	3:1	0.55	ns
	いちご中間母本農2号	169	47	47	1:1	1.00	ns
Alu ICA030172	いちご中間母本農2号	150	94	0	分離なし	-	-
	とちおとめ	122	39	55	1:1	0.10	ns
Alu ICA030210	とちおとめ	208	51	43	1:1	0.41	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	204	75	19	3:1	0.28	ns
	いちご中間母本農2号	182	40	54	1:1	0.15	ns
Alu ICA030211	とちおとめ	186	52	42	1:1	0.30	ns
	いちご中間母本農2号	172	40	54	1:1	0.15	ns
	いちご中間母本農2号	151	53	41	1:1	0.22	ns
Alu ICA030213	とちおとめ	164	51	43	1:1	0.41	ns
	とちおとめ	160	67	27	11:3	0.08	ns
Alu ICA030225	とちおとめ	161	48	46	1:1	0.84	ns
Alu ICA030229	とちおとめ	164	54	40	1:1	0.15	ns
	いちご中間母本農2号	162	94	0	分離なし	-	-
Alu ICA030248	いちご中間母本農2号	220	50	44	1:1	0.54	ns
Alu ICA030249	とちおとめ	139	44	50	1:1	0.54	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	137	67	27	3:1	0.40	ns
	いちご中間母本農2号	127	48	46	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	126	44	50	1:1	0.54	ns
Alu ICA030250	いちご中間母本農2号	106	55	39	1:1	0.10	ns
	いちご中間母本農2号	104	55	39	1:1	0.10	ns
Alu ICA030259	とちおとめ	209	40	54	1:1	0.15	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	198	71	23	3:1	0.91	ns
	いちご中間母本農2号	187	49	45	1:1	0.68	ns
Alu ICA030273	いちご中間母本農2号	182	56	38	1:1	0.06	ns
	いちご中間母本農2号	180	38	56	1:1	0.06	ns

¹⁾ SSR プライマー:20 種類, 多型:55 アレル.

²⁾ 変性ポリアクリルアミド電気泳動により推定した.

³⁾ 有意差は, ns:有意差なし, *:p<0.05, **:p<0.01 を示す.

第 3-4-2 表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果 (CA-HaeIII 由来 Genomic-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量 (nt) ²⁾	F ₁ 94 個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
Hae III CA030210	とちおとめ	203	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	195	41	53	1:1	0.22	ns
	いちご中間母本農2号	191	57	37	1:1	0.04	*
Hae III CA030216	いちご中間母本農2号	170	55	39	1:1	0.10	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	164	59	35	3:1	0.01	**
	とちおとめ	160	54	40	1:1	0.15	ns
	いちご中間母本農2号	142	55	39	1:1	0.10	ns
Hae III CA030234	とちおとめ	306	94	0	分離なし	-	-
	とちおとめ	236	49	45	1:1	0.68	ns
	いちご中間母本農2号	226	54	40	1:1	0.15	ns
	いちご中間母本農2号	222	40	54	1:1	0.15	ns
	とちおとめ	216	45	49	1:1	0.68	ns
Hae III CA030242	とちおとめ	161	48	46	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	135	44	50	1:1	0.54	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	125	73	21	3:1	0.55	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	118	67	27	3:1	0.40	ns
Hae III CA030278	とちおとめ	218	48	46	1:1	0.84	ns
Hae III CA030320	とちおとめ	283	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	279	94	0	分離なし	-	-
Hae III CA030333	いちご中間母本農2号	170	53	41	1:1	0.22	ns
	いちご中間母本農2号	145	41	53	1:1	0.22	ns
Hae III CA030338	とちおとめ/いちご中間母本農2号	209	73	21	3:1	0.55	ns
	とちおとめ	206	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	202	50	44	1:1	0.54	ns
Hae III CA030344	とちおとめ	190	47	47	1:1	1.00	ns
	いちご中間母本農2号	182	47	47	1:1	1.00	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	172	69	25	3:1	0.72	ns
Hae III CA030362	とちおとめ/いちご中間母本農2号	188	68	26	3:1	0.55	ns
	とちおとめ	160	54	40	1:1	0.15	ns
Hae III CA030363	いちご中間母本農2号	139	36	58	1:1	0.02	*
	いちご中間母本農2号	135	52	41	1:1	0.25	ns
	いちご中間母本農2号	133	42	52	1:1	0.30	ns
	とちおとめ	130	94	0	分離なし	-	-
Hae III CA030380	いちご中間母本農2号	253	51	43	1:1	0.41	ns
	とちおとめ	138	94	0	分離なし	-	-
Hae III CA030388	とちおとめ	155	46	48	1:1	0.84	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	137	89	5	15:1	0.71	
	いちご中間母本農2号	134	75	19	3:1	0.28	ns
	とちおとめ	133	94	0	分離なし	-	-
Hae III CA030395	いちご中間母本農2号	147	45	49	1:1	0.68	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	145	59	35	3:1	0.01	**
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	141	67	27	3:1	0.40	ns
Hae III CA031202	とちおとめ	135	57	37	1:1	0.04	*

¹⁾ SSR プライマー:15 種類, 多型:43 アレル.

²⁾ 変性ポリアクリルアミド電気泳動により推定した.

³⁾ 有意差は, ns:有意差なし, *:p<0.05, **:p<0.01 を示す.

第 3-4-3 表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果 (CA-Rsa 由来 Genomic-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量 (nt) ²⁾	F ₁ 94 個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
Rsa ICA030105	とちおとめ	105	47	47	1:1	1.00	ns
	とちおとめ	147	46	48	1:1	0.84	ns
Rsa ICA030115	とちおとめ	220	39	55	1:1	0.10	ns
	いちご中間母本農 2 号	216	94	0	分離なし	-	-
	とちおとめ	212	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農 2 号	204	56	38	1:1	0.06	ns
Rsa ICA030118	いちご中間母本農 2 号	158	48	46	1:1	0.84	ns
	とちおとめ	156	46	48	1:1	0.84	ns
	とちおとめ	154	94	0	分離なし	-	-
	とちおとめ/いちご中間母本農 2 号	153	76	18	3:1	0.19	ns
	いちご中間母本農 2 号	142	45	49	1:1	0.68	ns
	いちご中間母本農 2 号	160	43	51	1:1	0.41	ns
Rsa ICA030133	いちご中間母本農 2 号	150	51	43	1:1	0.41	ns
	いちご中間母本農 2 号	162	51	43	1:1	0.41	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農 2 号	160	70	43	3:1	0.00	**
	とちおとめ/いちご中間母本農 2 号	156	70	43	3:1	0.00	**
	とちおとめ	152	52	42	1:1	0.30	ns
Rsa ICA030137	とちおとめ/いちご中間母本農 2 号	184	67	27	3:1	0.40	ns
	とちおとめ	178	57	37	1:1	0.04	*
	いちご中間母本農 2 号	176	50	44	1:1	0.54	ns
Rsa ICA030154	とちおとめ	134	89	5	15:1	0.71	ns
	とちおとめ	130	94	0	分離なし	-	-
Rsa ICA030169	とちおとめ	191	61	33	3:1	0.02	*
Rsa ICA030176	とちおとめ	202	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農 2 号	176	49	45	1:1	0.68	ns
Rsa ICA030188	とちおとめ/いちご中間母本農 2 号	161	66	28	3:1	0.28	ns
	とちおとめ	156	56	38	1:1	0.06	ns
	いちご中間母本農 2 号	152	47	47	1:1	1.00	ns
	とちおとめ	149	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農 2 号	144	45	49	1:1	0.68	ns
Rsa ICA030301	とちおとめ/いちご中間母本農 2 号	212	68	26	3:1	0.55	ns
	いちご中間母本農 2 号	202	45	49	1:1	0.68	ns
	とちおとめ	198	45	49	1:1	0.68	ns
Rsa ICA030303	とちおとめ/いちご中間母本農 2 号	210	77	17	3:1	0.12	ns
	いちご中間母本農 2 号	208	44	50	1:1	0.54	ns
	とちおとめ	195	41	53	1:1	0.22	ns
Rsa ICA030335	いちご中間母本農 2 号	164	55	39	1:1	0.10	ns
Rsa ICA030373	とちおとめ/いちご中間母本農 2 号	123	72	22	3:1	0.72	ns
	とちおとめ	119	45	49	1:1	0.68	ns
Rsa ICA030722	いちご中間母本農 2 号	211	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農 2 号	208	45	49	1:1	0.68	ns
	とちおとめ	202	42	52	1:1	0.30	ns

¹⁾ SSR プライマー: 15 種類, 多型: 42 アレル.²⁾ 変性ポリアクリルアミド電気泳動により推定した.³⁾ 有意差は, ns: 有意差なし, *: p<0.05, **: p<0.01 を示す.

第3-4-4表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農2号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果 (GA-*Alu* I 由来 Genomic-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量 (nt) ²⁾	F ₁ 94個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
<i>Alu</i> IGA030104	とちおとめ/いちご中間母本農2号	180	70	24	3:1	0.91	ns
	いちご中間母本農2号	170	28	66	1:1	0.00	**
<i>Alu</i> IGA030107	とちおとめ	160	48	46	1:1	0.84	ns
<i>Alu</i> IGA030110	とちおとめ	138	46	48	1:1	0.84	ns
<i>Alu</i> IGA030116	とちおとめ	200	49	45	1:1	0.68	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	132	64	30	3:1	0.12	ns
	とちおとめ	118	50	44	1:1	0.54	ns
<i>Alu</i> IGA030118	いちご中間母本農2号	178	56	38	1:1	0.06	ns
	とちおとめ	164	41	53	1:1	0.22	ns
	いちご中間母本農2号	134	40	54	1:1	0.15	ns
<i>Alu</i> IGA030125	いちご中間母本農2号	178	43	51	1:1	0.41	ns
	とちおとめ	170	45	49	1:1	0.68	ns
	とちおとめ	166	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	154	46	48	1:1	0.84	ns
<i>Alu</i> IGA030127	とちおとめ	131	46	48	1:1	0.84	ns
	とちおとめ	129	71	23	3:1	0.91	ns
	いちご中間母本農2号	124	41	53	1:1	0.22	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	121	36	58	3:1	0.00	**
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	117	70	24	3:1	0.91	ns
	いちご中間母本農2号	106	67	27	3:1	0.40	ns
	とちおとめ	103	50	44	1:1	0.54	ns
	いちご中間母本農2号	88	42	52	1:1	0.30	ns
<i>Alu</i> IGA030134	とちおとめ	126	49	45	1:1	0.68	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	95	72	22	3:1	0.72	ns
<i>Alu</i> IGA030149	とちおとめ	184	41	53	1:1	0.22	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	182	82	12	7:1	0.94	ns
	とちおとめ	176	47	47	1:1	1.00	ns
<i>Alu</i> IGA030167	とちおとめ	170	48	46	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	145	47	47	1:1	1.00	ns
<i>Alu</i> IGA030169	いちご中間母本農2号	128	42	52	1:1	0.30	ns
<i>Alu</i> IGA030177	とちおとめ	155	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	140	69	25	3:1	0.72	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	137	74	20	3:1	0.40	ns
<i>Alu</i> IGA030216	とちおとめ	122	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	101	45	49	1:1	0.68	ns
	いちご中間母本農2号	99	49	45	1:1	0.68	ns
<i>Alu</i> IGA030240	とちおとめ	148	37	57	1:1	0.04	*
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	135	72	22	3:1	0.72	ns
	いちご中間母本農2号	122	59	35	1:1	0.01	*
	とちおとめ	118	54	40	1:1	0.15	ns
<i>Alu</i> IGA030244	とちおとめ	176	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	172	57	37	1:1	0.04	ns
	とちおとめ	165	49	45	1:1	0.68	ns
	いちご中間母本農2号	164	64	30	3:1	0.12	ns
	とちおとめ	154	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	150	42	52	1:1	0.30	ns
<i>Alu</i> IGA030252	とちおとめ	230	46	48	1:1	0.84	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	206	75	19	3:1	0.28	ns
	とちおとめ	200	48	46	1:1	0.84	ns

¹⁾ SSR プライマー: 18 種類, 多型: 63 アレル.²⁾ 未変性ポリアクリルアミド電気泳動により推定した.³⁾ 有意差は, ns: 有意差なし, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ を示す.

第 3-4-5 表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果
(GA-*Alu*I 由来 Genomic-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量 (nt) ²⁾	F ₁ 94 個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
	いちご中間母本農2号	182	53	41	1:1	0.22	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	176	74	20	3:1	0.40	ns
	いちご中間母本農2号	162	43	51	1:1	0.41	ns
			86	8	7:1	0.24	ns
<i>Alu</i> IGA030265	とちおとめ/いちご中間母本農2号	158	86	8	15:1	0.37	ns
			86	8	25:3	0.49	ns
	とちおとめ	145	47	47	1:1	1.00	ns
	いちご中間母本農2号	140	49	45	1:1	0.68	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	138	69	25	3:1	0.72	ns
	いちご中間母本農2号	137	43	51	1:1	0.41	ns
	とちおとめ	121	94	0	分離なし	-	-
<i>Alu</i> IGA030266	とちおとめ/いちご中間母本農2号	114	80	14	3:1	0.02	*
	いちご中間母本農2号	104	41	53	1:1	0.22	ns
	とちおとめ	99	53	41	1:1	0.22	ns

¹⁾ 注釈は第 3-4-4 表と同じ。第 3-4-6 表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果
(GA-*Hae*III 由来 Genomic-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量 (nt) ²⁾	F ₁ 94 個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
	いちご中間母本農2号	141	55	39	1:1	0.10	ns
<i>Hae</i> III GA030107	とちおとめ	138	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	131	39	55	1:1	0.10	ns
	とちおとめ	198	43	51	1:1	0.41	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	196	81	13	7:1	0.70	ns
<i>Hae</i> III GA030110	いちご中間母本農2号	170	52	42	1:1	0.30	ns
	とちおとめ	166	50	44	1:1	0.54	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	164	67	27	3:1	0.40	ns
	いちご中間母本農2号	148	48	46	1:1	0.84	ns
	とちおとめ	136	44	50	1:1	0.54	ns
<i>Hae</i> III GA030114	いちご中間母本農2号	170	56	38	1:1	0.06	ns
	いちご中間母本農2号	262	50	44	1:1	0.54	ns
	とちおとめ	250	49	45	1:1	0.68	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	246	71	23	3:1	0.91	ns
<i>Hae</i> III GA030127	とちおとめ	242	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	235	53	41	1:1	0.22	ns
	とちおとめ	232	48	46	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	221	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	211	43	51	1:1	0.41	ns
<i>Hae</i> III GA030139	いちご中間母本農2号	215	47	47	1:1	1.00	ns
	とちおとめ	170	45	49	1:1	0.68	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	141	40	54	1:1	0.15	ns
<i>Hae</i> III GA030142	いちご中間母本農2号	140	54	40	1:1	0.15	ns
	とちおとめ	130	49	45	1:1	0.68	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	255	68	26	3:1	0.55	ns
<i>Hae</i> III GA030145	とちおとめ	226	43	51	1:1	0.41	ns
	とちおとめ	205	57	37	1:1	0.04	*
	とちおとめ	215	50	44	1:1	0.54	ns
<i>Hae</i> III GA030179	いちご中間母本農2号	202	53	41	1:1	0.22	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	201	73	21	3:1	0.55	ns
	とちおとめ	194	40	54	1:1	0.15	ns
	とちおとめ	134	52	42	1:1	0.30	ns
<i>Hae</i> III GA030181	いちご中間母本農2号	114	94	0	分離なし	-	-
	とちおとめ	108	43	51	1:1	0.41	ns
	とちおとめ	266	49	45	1:1	0.68	ns
	いちご中間母本農2号	258	43	51	1:1	0.41	ns
<i>Hae</i> III GA030184	いちご中間母本農2号	247	51	43	1:1	0.41	ns
	とちおとめ	236	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	229	72	22			
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	227	70	24	3:1	0.91	ns
	とちおとめ	215	39	55	1:1	0.10	ns
	とちおとめ	211	48	46	1:1	0.84	ns
<i>Hae</i> III GA030195	いちご中間母本農2号	201	39	55	1:1	0.10	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	197	76	18	3:1	0.19	ns
	いちご中間母本農2号	187	43	51	1:1	0.41	ns

¹⁾ SSR プライマー: 11 種類, 多型: 45 アレル.²⁾ 未変性ポリアクリルアミド電気泳動により推定した.³⁾ 有意差は, ns: 有意差なし, *: p<0.05, **: p<0.01 を示す.

第 3-4-7 表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果 (GA-Rsa I 由来 Genomic-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量 (nt) ²⁾	F ₁ 94 個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
Rsa IGA030125	とちおとめ	172	52	42	1:1	0.30	ns
	いちご中間母本農2号	153	38	56	1:1	0.06	ns
	いちご中間母本農2号	130	37	57	1:1	0.04	*
	とちおとめ	128	94	0	分離なし	-	-
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	125	70	24	3:1	0.91	ns
Rsa IGA030137	いちご中間母本農2号	182	53	41	1:1	0.22	ns
	いちご中間母本農2号	160	62	32	1:1	0.00	**
Rsa IGA030139	いちご中間母本農2号	146	39	55	1:1	0.10	ns
Rsa IGA030140	とちおとめ/いちご中間母本農2号	302	79	15	7:1	0.31	ns
	いちご中間母本農2号	298	40	54	1:1	0.15	ns
	とちおとめ	294	43	51	1:1	0.41	ns
	いちご中間母本農2号	280	55	39	1:1	0.10	ns
	とちおとめ	279	58	36	1:1	0.02	*
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	277	61	33	3:1	0.02	*
	とちおとめ	170	47	47	1:1	1.00	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	168	72	22	3:1	0.72	ns
	いちご中間母本農2号	163	47	47	1:1	1.00	ns
	いちご中間母本農2号	143	51	43	1:1	0.41	ns
Rsa IGA030142	いちご中間母本農2号	139	49	45	1:1	0.68	ns
	とちおとめ	128	45	49	1:1	0.68	ns
	いちご中間母本農2号	196	72	22	3:1	0.72	ns
Rsa IGA030150	いちご中間母本農2号	196	72	22	11:3	0.64	ns
	とちおとめ	186	47	47	1:1	1.00	ns
	とちおとめ	180	47	47	1:1	1.00	ns
	いちご中間母本農2号	175	52	42	1:1	0.30	ns
Rsa IGA030155	とちおとめ/いちご中間母本農2号	194	65	29	3:1	0.19	ns
	とちおとめ	182	46	48	1:1	0.84	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	162	65	29	3:1	0.19	ns
	いちご中間母本農2号	158	48	46	1:1	0.84	ns
Rsa IGA030158	とちおとめ	170	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	146	50	44	1:1	0.54	ns
	いちご中間母本農2号	140	48	44	1:1	0.64	ns
	とちおとめ	137	76	18	3:1	0.19	ns
	とちおとめ	137	76	18	11:3	0.59	ns
Rsa IGA030168	とちおとめ	193	40	54	1:1	0.15	ns
	とちおとめ	191	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	156	39	55	1:1	0.10	ns
Rsa IGA030170	とちおとめ/いちご中間母本農2号	170	80	14	7:1	0.48	ns
			80	14	25:3	0.19	ns
			86	8	7:1	0.24	ns
	いちご中間母本農2号	158	86	8	15:1	0.37	ns
			86	8	13:1	0.61	ns
Rsa IGA030175	いちご中間母本農2号	140	94	0	分離なし	-	-
	とちおとめ	133	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	117	40	54	1:1	0.15	ns
	いちご中間母本農2号	115	54	40	1:1	0.15	ns
	とちおとめ	110	47	47	1:1	1.00	ns

¹⁾ SSR プライマー: 23 種類, 多型: 82 アレル.²⁾ 未変性ポリアクリルアミド電気泳動により推定した.³⁾ 有意差は, ns: 有意差なし, *: p<0.05, **: p<0.01 を示す.

第 3-4-8 表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果
(GA-Rsa I 由来 Genomic-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量 (nt) ²⁾	F ₁ 94 個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
Rsa IGA030211	とちおとめ	160	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	145	56	38	1:1	0.06	ns
	いちご中間母本農2号	144	51	43	1:1	0.41	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	140	80	14	7:1	0.48	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	136	64	30	3:1	0.12	ns
Rsa IGA030213	とちおとめ	115	41	53	1:1	0.22	ns
	とちおとめ	99	54	40	1:1	0.15	ns
	いちご中間母本農2号	93	70	24	3:1	0.91	ns
Rsa IGA030214	とちおとめ	150	39	55	1:1	0.10	ns
Rsa IGA030215	いちご中間母本農2号	186	45	49	1:1	0.68	ns
	いちご中間母本農2号	170	45	49	1:1	0.68	ns
Rsa IGA030253	とちおとめ	168	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	158	35	59	1:1	0.01	*
	とちおとめ	148	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	147	35	59	1:1	0.01	*
	とちおとめ	146	44	50	1:1	0.54	ns
	いちご中間母本農2号	145	46	48	1:1	0.84	ns
	いちご中間母本農2号	144	42	52	1:1	0.30	ns
	いちご中間母本農2号	141	52	42	1:1	0.30	ns
Rsa IGA030258	とちおとめ	208	43	51	1:1	0.41	ns
	いちご中間母本農2号	194	33	61	1:1	0.00	**
Rsa IGA030269	とちおとめ	152	45	49	1:1	0.68	ns
Rsa IGA030266	いちご中間母本農2号	268	40	54	1:1	0.15	ns
Rsa IGA030271	とちおとめ/いちご中間母本農2号	157	73	21	3:1	0.55	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	140	65	29	3:1	0.19	ns
	とちおとめ	138	43	51	1:1	0.41	ns
	いちご中間母本農2号	136	51	43	1:1	0.41	ns
Rsa IGA030284	とちおとめ/いちご中間母本農2号	176	73	21	3:1	0.55	ns
	いちご中間母本農2号	168	41	53	1:1	0.22	ns
	いちご中間母本農2号	156	45	49	1:1	0.68	ns
	とちおとめ	150	41	53	1:1	0.22	ns
	いちご中間母本農2号	146	54	40	1:1	0.15	ns
Rsa IGA030813	いちご中間母本農2号	130	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	125	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	118	49	45	1:1	0.68	ns

¹⁾ 注釈は第 3-4-7 表と同じ。

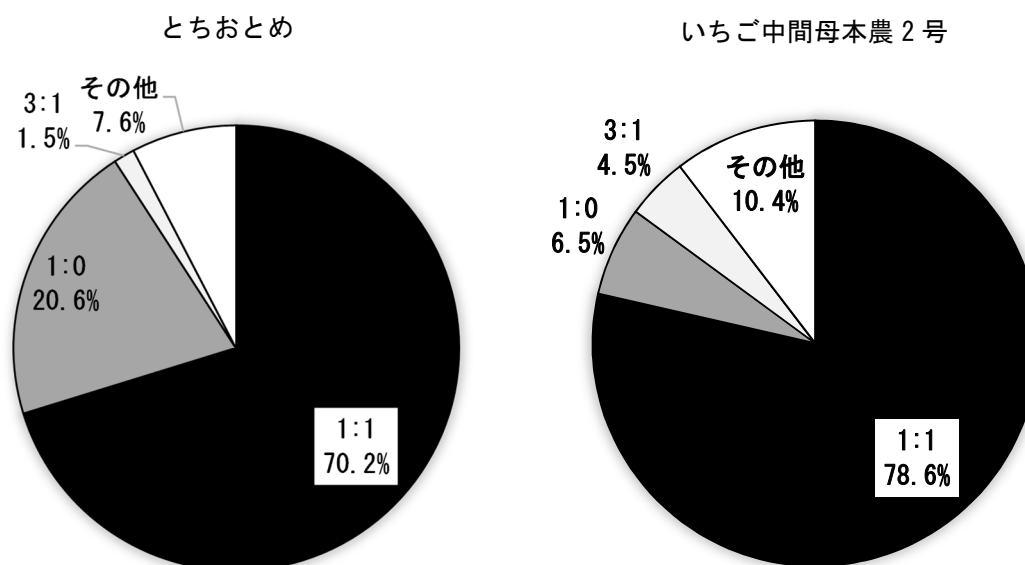
第 3-5 表 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁94 個体にアレル分離比 χ^2 検定結果 (EST-SSR)¹⁾

プライマー名	マーカーを有する品種・系統	推定 分子量 (nt) ²⁾	F ₁ 94個体のマーカーの分離		期待される 分離比	χ^2 検定 (P 値)	有意差 ³⁾
			マーカー有	マーカー無			
Contig308S_UTR	いちご中間母本農2号	276	51	43	1:1	0.41	ns
Contig320S_UTR	とちおとめ	208	47	47	1:1	1.00	ns
Contig818S_UTR	いちご中間母本農2号	202	94	0	分離なし	-	-
stf014G03S_UTR	とちおとめ	120	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	118	52	42	1:1	0.30	ns
	とちおとめ	206	37	57	1:1	0.04	*
Stg017B02S_UTR	いちご中間母本農2号	202	47	47	1:1	1.00	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	200	65	29	3:1	0.19	ns
	とちおとめ	176	52	42	1:1	0.30	ns
Stg022A12S_UTR	とちおとめ	210	43	51	1:1	0.41	ns
stg025A11S_UTR	とちおとめ	216	94	0	分離なし	-	-
	いちご中間母本農2号	214	44	50	1:1	0.54	ns
	いちご中間母本農2号	210	50	44	1:1	0.54	ns
Stg037E10S_UTR	とちおとめ	187	56	38	1:1	0.06	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	163	61	33	3:1	0.02	*
	いちご中間母本農2号	158	64	30	3:1	0.12	ns
	いちご中間母本農2号	154	38	56	1:1	0.06	ns
stg041B03S_UTR	いちご中間母本農2号	240	47	47	1:1	1.00	ns
	とちおとめ	238	44	50	1:1	0.54	ns
Contig150S_ORF	いちご中間母本農2号	130	40	54	1:1	0.15	ns
	とちおとめ/いちご中間母本農2号	118	80	14	7:1	0.48	ns
stg006A04S_ORF	とちおとめ	206	38	56	1:1	0.06	ns
	いちご中間母本農2号	192	56	38	1:1	0.06	ns
stg041E06S_ORF	いちご中間母本農2号	162	36	58	1:1	0.02	ns
stg036B12S_ORF	とちおとめ	126	94	0	分離なし	-	-
stg043H05S_ORF	とちおとめ	125	45	49	1:1	0.68	ns

¹⁾ SSR プライマー: 14 種類, 多型: 26 アレル.

²⁾ 未変性ポリアクリルアミド電気泳動により推定した.

³⁾ 有意差は, ns: 有意差なし, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ を示す.



第 3-4 図 ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁ 集団における SSR マーカーの分離比の割合

‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F₁ 集団: 94 個体.

SSR は 116 プライマーを用い, ‘とちおとめ’において多型示すアレル 131 個,

‘いちご中間母本農 2 号’において多型示すアレル 154 個の分離比を調査した.

‘とちおとめ’は 1:1 分離 92 アレル, 1:0 27 アレル, 3:1 2 アレル, その他 10 アレルであった.

‘いちご中間母本農 2 号’は 1:1 分離 121 アレル, 1:0 10 アレル, 3:1 7 アレル, その他 16 アレルであった.

(4) 複 2 倍体的な分離比を示す SSR マーカー

複 2 倍体的な分離比を示す SSR マーカーについては、15 プライマーで 16 ローカス見出された (第 3-6 表)。 χ^2 検定の結果、14 プライマーで 15 ローカスが適合した (第 3-6 表および第 3-5 図)。また、シングルおよびマルチローカスについては、ともに 7 プライマーであった (第 3-6 表および第 3-5 図)

4. 考察

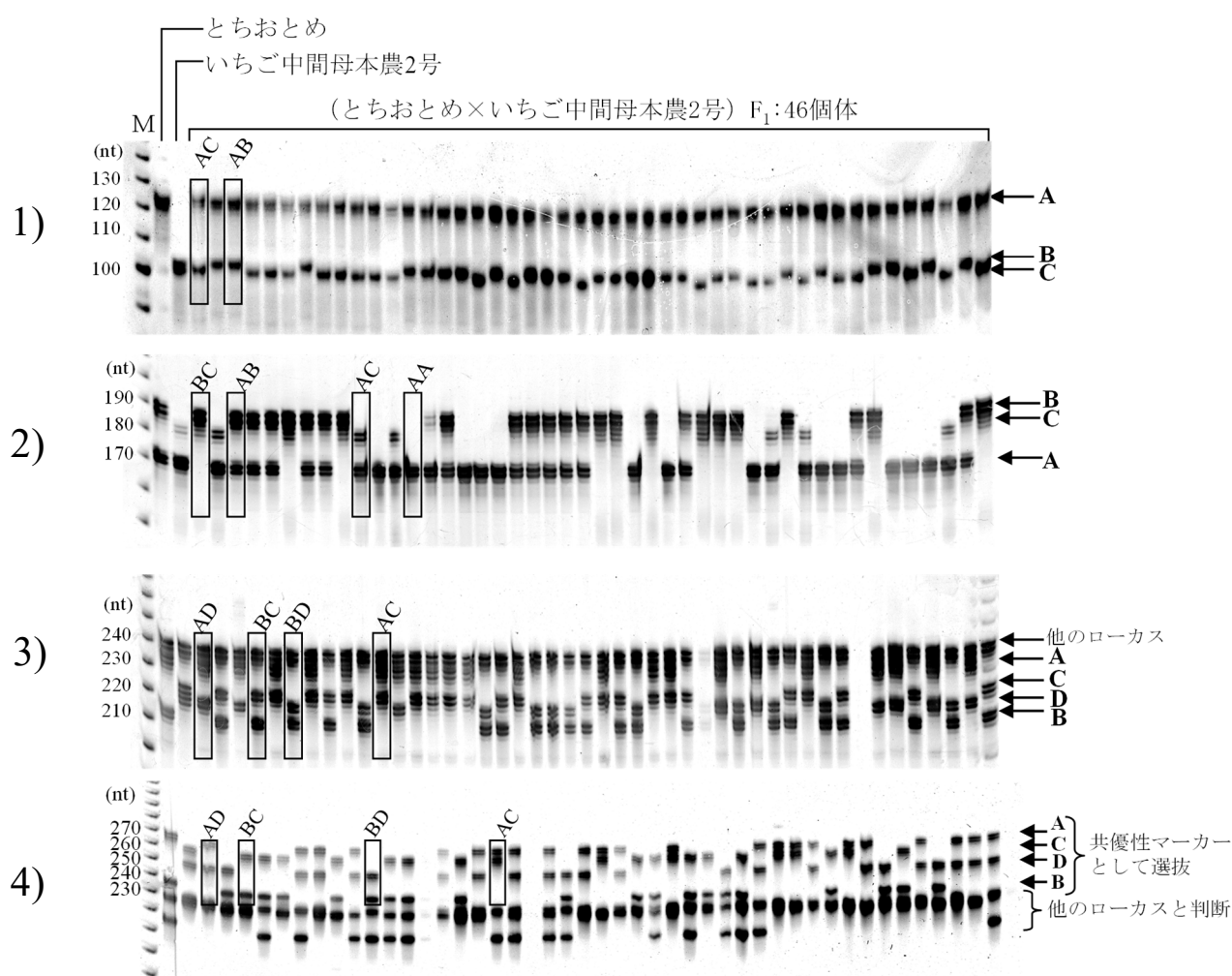
今回、解析材料として、イチゴ炭疽病罹病性品種である‘とちおとめ’に抵抗性育種素材である‘いちご中間母本農 2 号’を交配し F₁ 集団を作出した。イチゴ炭疽病耐病性連鎖マーカー開発のため、まず、両親間での Genomic-SSR と EST-SSR の多型率を比較した結果は、Genomic-SSR が 76.4%、EST-SSR が 26.7% と Genomic-SSR において高い多型率を示した。Nunome *et al.* (2009) は、ナスにおける Genomic-SSR および EST-SSR の多型率が、Genomic-SSR で 56.7%、EST-SSR で 30.3% であること示し、Genomic-SSR の方が品種や系統における遺伝解析に適するとしている。イチゴにおいても本結果から Genomic-SSR の方が連鎖解析に適すると考えられる。EST-SSR については、26.7%と低い結果であったが、遺伝子そのものが連鎖地図に座乗できるメリットがある。また、Ohya *et al.* (2009) は、トマトにおける Genomic-SSR

解析でその多くが centromeric heterochromatin 領域に座乗することを報告していることから、ゲノムを網羅するためには、EST-SSR についても活用していく必要があると考えられる。ORF および 3'UTR 領域に位置する EST-SSR の多型率は、3'UTR 領域で 33.3%であり、ORF 領域の 20.0%より高かった。Scott *et al.* (2000) は、ブドウにおける EST-SSR の多型検出において、3'UTR 領域の SSR で多型率が高いことを報告している。そのため、設計した EST-SSR については、3'UTR 領域の SSR による連鎖地図の作製が効率的であると考えられる。

両親間で多型が得られた 116 プライマーを用いて、F₁ 集団の解析を行った結果は、‘とちおとめ’由来で 1:1 および 1:0 分離したアリル合計が 90.8%、‘いちご中間母本農 2 号’由来で 84.1%と大多数を占め、そのうち、16 プライマーについては、複 2 倍体的な共優性マーカー関係を示す分離比を示した。2 倍体的挙動の分離比は AB×BB=1:1、AA×BB=1:0 となる。共優性関係のマーカーについては、AA×BC の場合が AB:AC=1:1、AB×AC の場合が AA:AB:AC:BC=1:1:1:1、AB×CD= AC:AD:BC:BD=1:1:1:1 となり、16 プライマーについてはこれらの分離と一致した。共優性マーカーは連鎖地図の統合に用いることができるため、今後、さらに検索していく必要があると考えられる。一方、2 倍体の分離比からと一致しないマーカーについても見出された。木庭ら (2007) は、花粉母細胞の減数分裂時の対合観察で 71.6%の細胞は 2

第 3-6 表 共優性マーカー的挙動を示すイチゴ SSR マーカー

ローカス (SSR-マーカー名)	総アリル数	シングルローカス・ マルチローカス	共優性関係と 推定されるアリル数	遺伝子型およびバンドの大きさ (nt) ¹⁾	期待される分離比	観察された分離比	χ^2 検定 (p 値)	有意差 ²⁾
AA×BC								
<i>Alu</i> ICA030165	5	マルチ	3	とちおとめ: 164/164 (A/A) いちご中間母本農2号: 160/158 (B/C)	AB:AC=1:1	AB:AC=52:42	0.30	NS
<i>Alu</i> IGA030216	3	シングル	3	とちおとめ: 125/125 (A/A) いちご中間母本農2号: 102/100 (B/C)	AB:AC=1:1	AB:AC=45:49	0.68	NS
<i>Hae</i> III GA030107	3	シングル	3	とちおとめ: 140/140 (A/A) いちご中間母本農2号: 142/132 (B/C)	AB:AC=1:1	AB:AC=55:39	0.10	NS
stg025A11S-UTR	4	マルチ	3	とちおとめ: 216/216 (A/A) いちご中間母本農2号: 214/210 (B/C)	AB:AC=1:1	AB:AC=44:50	0.54	NS
AB×AC								
<i>Alu</i> ICA030210	3	シングル	3	とちおとめ: 208/204 (B/A) いちご中間母本農2号: 204/182 (A/C)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=24:30:19:19	0.32	NS
<i>Alu</i> ICA030259	4	マルチ	3	とちおとめ: 215/205 (B/A) いちご中間母本農2号: 205/195 (A/C)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=28:17:26:23	0.40	NS
<i>Alu</i> IGA030240	5	マルチ	3	とちおとめ: 150/136 (B/A) いちご中間母本農2号: 136/125 (A/C)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=20:15:37:22	0.01	**
<i>Hae</i> III CA030338	3	シングル	3	とちおとめ: 212/208 (A/B) いちご中間母本農2号: 212/202 (A/C)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=26:19:29:20	0.40	NS
<i>Hae</i> III CA030344	3	シングル	3	とちおとめ: 190/172 (B/A) いちご中間母本農2号: 182/172 (C/A)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=28:21:20:25	0.63	NS
<i>Rsa</i> ICA030137	7	マルチ	3	とちおとめ: 184/178 (A/B) いちご中間母本農2号: 184/176 (A/C)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=14:30:23:27	0.10	NS
<i>Rsa</i> ICA030188	7	マルチ	3	とちおとめ: 164/156 (A/B) いちご中間母本農2号: 164/154 (A/C)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=19:28:19:28	0.33	NS
<i>Rsa</i> ICA030303	3	シングル	3	とちおとめ: 210/208 (A/B) いちご中間母本農2号: 210/195 (A/C)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=26:24:27:17	0.46	NS
<i>Rsa</i> IGA030140	9	マルチ	6	とちおとめ: 300/292 (A/B) いちご中間母本農2号: 300/295 (A/C) とちおとめ: 170/168 (A/B) いちご中間母本農2号: 168/160 (B/C)	AA:AB:AC:BC=1:1:1:1	AA:AB:AC:BC=22:25:25:22	0.94	NS
AB×CD								
<i>Hae</i> III CA030234	6	マルチ	4	とちおとめ: 230/215 (A/B) いちご中間母本農2号: 222/218 (C/D)	AC:AD:BC:BD=1:1:1:1	AC:AD:BC:BD=34:16:20:24	0.05	NS
<i>Hae</i> III GA030184	7	マルチ	4	とちおとめ: 270/238 (A/B) いちご中間母本農2号: 260/250 (C/D)	AC:AD:BC:BD=1:1:1:1	AC:AD:BC:BD=17:31:26:20	0.17	NS



第 3-5 図 イチゴ SSR マーカーにおいて共優性マーカーと推定される ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F_1 集団のバンド分離パターン

親における SSR マーカーの遺伝子型

1) ‘とちおとめ’ (AA) × ‘いちご中間母本農 2 号’ (BC), 2) ‘とちおとめ’ (AB) × ‘いちご中間母本農 2 号’ (AC), 3) ‘とちおとめ’ (AB) × ‘いちご中間母本農 2 号’ (CD), 4) ‘とちおとめ’ (AB) × ‘いちご中間母本農 2 号’ (CD).

使用 SSR マーカー: 1) *Alu I* GA030216, 2) *Hae III* CA030344, 3) *Hae III* CA030234, 4) *Hae III* GA030184

分子量マーカー (M): 10bp ladder.

A-D は共優性関係にある SSR マーカーのアリルを示す.

四角枠は ‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F_1 集団における SSR マーカーの遺伝子型分離パターンの例を示す.

4) については遺伝子型の分離比から隣接する A-D のアリルを共優性関係にある SSR マーカーとし, その他をアリルは別のローカスであると判断した.

飯村ら (2013) より一部転載.

倍体的対合を示し, 残りは多価染色体の対合を示したという報告している. このことから, これらのマーカーは, 4~8 倍体的な対合している可能性が考えられる.

その後, 飯村ら (2013) は, 本 SSR マーカー多型データおよび RAPD および AFLP マーカーを用いて, ‘とちおとめ’ が座乗マーカー数 376 個, 全長 1005.4cM, 30 連鎖群, ‘いちご中間母本農 2 号’ が座乗マーカー数 506 個, 全長 1448.1cM, 29 連鎖群に収束した連鎖地図を完成させている.

また, QTL 解析により ‘いちご中間母本農 2 号’ で 5 か所, ‘とちおとめ’ で 4 か所の炭疽病関連領域を検出している (飯村ら, 2013). しかし, 検出された QTL は, LOD 値が 2.0~3.5, 寄与率が 7.7%~14.4%と低かったため, 飯村ら (2013) は, ‘いちご中間母本農 2 号’ の耐病性には効果の弱い複数の QTL が関与していると考察している. このことから, 今後, 他の炭疽病抵抗性遺伝資源から集団を作製し, QTL を比較する必要があると考えられる.

第 4 章 ニラにおける RNA-seq による SSR マーカー大量開発

1. 序論

ニラ (*Allium ramosum*, syn. *A. tuberosum*) は、条件的なアポミクシス性を有していることから数パーセントしか交雑しない (中澤, 2005). そのため、交雑育種による品種育成は極めて困難な作物である。しかし、栃木県では、両性生殖性ニラを中間母本として保有していること、単為発生性連鎖 DNA マーカーである parthenogenesis linked marker (PLM) 1 および PLM3 を開発していること (天谷ら, 2010) から、両性生殖性ニラに単為生殖性ニラを交配し、交雑個体を PLM1 および PLM3 により単為発生性 (品種候補) と非単為発生性 (中間母本) に判別する育種システムを確立している (齋藤ら, 2012).

今後、効率的なニラ育種が可能な本県において、さらに育種を加速化していくためには、優良形質 (アポミクシスのもう一方の因子である複相大孢子形成性、耐病性や抽苔性の早晩等) に連鎖した DNA マーカーの開発が必要である。simple sequence repeat (SSR) マーカーは、single nucleotide polymorphism (SNP) とともにゲノム研究に用いられる主流な DNA マーカーである。第 2 章におけるイチゴの SSR マーカー開発においては、SSR 濃縮ライブラリー作製による大量開発を行ったが、近年では次世代シーケンサー (Next-Generation Sequencing: NGS) による SSR マーカーの大量開発が可能となっている (Zalapa *et al.* 2012). ニラにおける SSR マーカーの開発は、最近まで我々が集積した 5,080 EST から検出した 25 マーカーだけであった (生井ら, 2013) が、近年、Zhou *et al.* (2015) が 2,125 SSR マーカーを報告している。しかし、ニラのゲノムサイズは、2C 当たり 64.18pg (1C=約 31G bp, Baranyi・Greilhuber, 1999) と他の植物と比較して非常に大きいこと、また、4 倍体であることから、連鎖地図の作成の際に pseudo-testcross 法を用いることが考えられ、更に SSR マーカーを開発していく必要がある。

そこで、ニラにおける DNA マーカー解析のための基盤整備として、NGS による RNA-seq および SSR 濃縮ライブラリー解読を行い、SSR マーカーの大量開発を試みた。また、検出された SSR 配列、さらにこれまでに蓄積した EST 由来の SSR 配列についてモチーフ配列の比較を行った。そして、RNA-seq 由来 SSR マーカーについては、より効率的に多型を検出することを目的に、SSR 配列が位置する領域 (5'および 3' untranslated region: UTR, coding sequence: CDS) 別に多型の有無を調査した。

2. 材料と方法

(1) RNA-seq 解析

供試材料は、本県育成ニラ品種‘ゆめみどり’のセル苗の葉を用いた。サンプリングは、2 日間セルトレイごと 24 時間室温暗黒条件下で生育後、葉部を採取し、液体窒素で凍結粉砕した。total RNA 抽出は、RNeasy plant mini kit (Qiagen 社) により行い、Ribo-Zero Magnetic kit (plant leaf) (Epicentre 社) により rRNA-depleted RNA に精製した。cDNA ライブラリーの作製は、NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs 社) により行った。Tru seq DNA sample Preparation kit (Illumina) によりライゲーションサンプルを増幅後、2.0%アガロースゲルにより 300~500bp を切り出し、サイズ分画を行った。MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen 社) によりゲル精製後、Qubit (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Invitrogen 社) および 2100 bioanalyzer (HS DNA kit, Agilent 社) により濃度、品質、サイズを確認し、MiSeq (MiSeq Reagent Kits v3, Illumina 社) によりシーケンスを行った。

(2) SSR 濃縮ライブラリー

材料は、本県育成ニラ品種‘ゆめみどり’の成葉を用いた。DNA 抽出は、葉を液体窒素により凍結粉砕後、Yamamoto *et al.* (2001) の CTAB 法により行った。SSR 濃縮ライブラリーの作製は、Nunome *et al.* (2006) の方法に従った。ただし、ビオチン標識した反復配列プローブは 3'末端に付加したものを使用した。濃縮する SSR 配列は、(CA)_n および (GA)_n とし、制限酵素は *Alu* I, *Hind*III, *Rsa* I を用いた。濃縮処理後に PCR した 6 サンプル (2 種類反復配列×3 制限酵素) は等量混合し、GS Junior (Roche 社) によりシーケンスを行った。

(3) データ解析

RNA-seq は、SOAPdenovo 1.05, Gapcloser1.10 (<http://saop.genomics.org.cn/soapdenovo.html>), Trinity (<http://trinityrnaseq.github.io/>) を用いてアセンブルを行った。SSR 濃縮ライブラリーは、Newbler2.7 (Roche 社) および CAP3 (Huang・Madan, 1999) でアセンブルを行った。

SSR 配列の検索は、SciRoKo (www.kolfer.or.at/Bioinformatics; Kofler *et al.*, 2007) を用いた。search mode は、mmvp (mismatched variable penalty) および misa (microsatellite searching tool) の 2 種類で行った。また、5,080 EST 配列についても再度検索を行った。プライマー検索は、Primer3 (Rozen・Skaletsky, 2000) により行い、検索条件は PRIMER_OPT_SIZE=20 および PRIMER_PRODUCT_SIZE_RANGE=100-300 とした。

(4) CDS および UTR 領域の推定

SSR 配列が検出された RNA-seq および EST は, FrameDP (<http://iant.toulouse.inra.fr/FrameDP>, Gouzy *et al.*, 2009) により, SSR 配列が含まれる mRNA 上の領域 (CDS および UTR) を推定した. データベースは TAIR8_pep を使用した. 5'UTR および 3'UTR 領域の推定は, SSR 配列が start codon より上流に位置する場合を 5'UTR, stop codon より下流に位置する場合を 3'UTR とした. また, SSR 配列が CDS と UTR 領域にまたがる場合には境界領域とした.

(5) 多型検出

供試材料は, 本果が育成したニラ系統'H12C2' (非単為発生・非複相大孢子形成) および'97-11-7' (非単為発生・複相大孢子形成) を用いた. DNA 抽出は, 葉身を液体窒素により凍結粉砕後, DNeasy plant mini kit (Qiagen 社) により行った. SSR マーカーの検出はポストラベル法 (Schuelke, 2000)

とし, 使用プライマーは, RNA-seq 由来の 112 プライマー (CDS:46 プライマー, 3'UTR:31 プライマー, 5'UTR:30 プライマー, 境界領域:5 プライマー, 第 4-1-1 表~第 4-1-3 表) した. PCR 組成は, DNA 10ng, 0.25 U My Taq DNA polymerase (Bioline 社), 1×My Taq Reaction Buffer, 0.04 μM フォワードプライマー, 0.16 μM リバースプライマー, 0.08 μM ユニバーサル蛍光標識プライマー (M13Rv 配列に Beckman Dye D4 で蛍光標識) とし, 液量は 10 μL とした. 反応条件は 94°C で 5 分間熱変性後, 94°C で 30 秒間, 56°C で 45 秒間, 72°C で 45 秒間を 1 サイクルとして 30 回繰り返し, さらに 94°C で 30 秒間, 53°C で 45 秒間, 72°C で 45 秒間 を 8 回繰り返しした後, 72°C で 10 分間伸長反応を行った. PCR 産物は 1/10 TE で 20 倍希釈し, 希釈液 1 μL に 25 μL のホルムアミド, 0.08 μL の CEQ size standard-400 (Beckman Coulter 社) を加えた後, DNA シーケンサー GenomeLab-GeXP (Beckman Coulter 社) で検出した.

第 4-1-1 表 ニラ RNA-seq 由来 SSR マーカーにおけるプライマー配列 (2 塩基モチーフ¹⁾)

SSR マーカー名	反復 モチーフ ²⁾	SSR 配列長 ²⁾	領域 ³⁾	フォワードプライマー	リバースプライマー
nr0199	AT	19	5'UTR	caggaaacagctatgacccatcccttgatcttctcc	gtttggtgcataagagggga
nr4144	CT	15	5'UTR	caggaaacagctatgacccaatctccctgttgga	gtttccacaacaacattctgtg
nr4183	AC	15	5'UTR	caggaaacagctatgaccttctactacacgctcgtt	gtttgggagcaaaaacatga
nr4202	TC	15	5'UTR	caggaaacagctatgacccgccatggtgtgtgaaaa	gtttcagatgtaagcccaggtctg
nr4212	AG	15	5'UTR	caggaaacagctatgaccgtccctgcagttacactcac	gtttgcacctgaaagagatgcct
nr4236	AT	18	5'UTR	caggaaacagctatgacctcatcacttctcgaaagacca	gtttcgggaatagtgaggagcattca
nr4267	CT	20	5'UTR	caggaaacagctatgacccctctaaatggcctacctt	gtttctcgagccttcttcca
nr4365	AG	17	5'UTR	caggaaacagctatgaccccttttggacgttttctga	gtttccacgtatttccccattgt
nr4694	TC	19	5'UTR	caggaaacagctatgacccgagagtgtgtgtgtcgt	gtttcttttcatgacttgagggc
nr4790	AG	15	5'UTR	caggaaacagctatgacctgtgtttatgggttttgc	gtttccagggtcaggacttgatggt
nr4097	AC	18	3'UTR	caggaaacagctatgacctcaaatgaccttccaatttt	gtttacatggtgcacacaacag
nr4199	TG	17	3'UTR	caggaaacagctatgaccaacttcttctggttctga	gtttggtgtagtaattccaagcat
nr4211	GA	19	3'UTR	caggaaacagctatgacctgttacctatgcacagctc	gtttcggagctaaactgaagggtct
nr4224	TC	15	3'UTR	caggaaacagctatgaccgaactctccaagctcacgc	gtttgctcgtatcattcccagc
nr4226	GT	15	3'UTR	caggaaacagctatgaccgtgtgtgaagccatggaagt	gtttcccaacttctaccagatagcca
nr4229	AG	16	3'UTR	caggaaacagctatgaccggctgagctcgtcttctatg	gtttgggatatttcttccga
nr4402	TA	16	3'UTR	caggaaacagctatgaccagaaaatgaaggaggagc	gtttcaggcatcaccaacatt
nr4628	TG	16	3'UTR	caggaaacagctatgaccttctgaatcgatcaggacttg	gtttccacatacaatgcacgcac
nr4881	AC	17	3'UTR	caggaaacagctatgaccgacaaggcaggcatcattaaa	gtttgaatcagctgggaggac
nr4887	GA	16	3'UTR	caggaaacagctatgaccatcaatgattggagaagccg	gtttgaagggaacaagtgtgaacg
nr4390	TC	15	境界 (3'側)	caggaaacagctatgacccgcctattgagttctccatc	gtttcaaaaagtgtgcgacggaaag
nr0889	AG	19	ORF	caggaaacagctatgacctgtgcctctatttctccg	gtttcacggtattgccagtagcatc
nr3495	AC	19	ORF	caggaaacagctatgacctgtggtggaaaagagtgg	gtttcccaagtagcatctcca
nr3678	TG	16	ORF	caggaaacagctatgacctgtgtgtgtgtgtgtcg	gtttcttgcatgtgtgtgtg
nr3929	GA	15	ORF	caggaaacagctatgacctttaggggtgtggaggtgtg	gtttccctctctcttaggcat
nr4141	CA	16	ORF	caggaaacagctatgacctcagctccacagcagcaatc	gtttccacgtgactctctcgatca
nr4253	TC	19	ORF	caggaaacagctatgaccggcaggactgattttcaaca	gtttcaaatcgattggccaagaaaa
nr4428	AG	16	ORF	caggaaacagctatgaccggcaggaggagattgaaaga	gtttgacttgagactgtgc
nr4451	AG	16	ORF	caggaaacagctatgacctgcaccaaagaaaacaatcg	gtttgtgttccatctcattcg
nr4557	TA	17	ORF	caggaaacagctatgacctcttccacttccctttcc	gtttatgctagtggccagaa
nr4601	GA	20	ORF	caggaaacagctatgaccttgtgataccctttaggaatg	gtttcaactgtcccttccaaa

¹⁾ 2 塩基モチーフは 31 プライマー.

²⁾ SSR モチーフおよび SSR 配列長は, SciRoKo (www.kolfer.or.at/Bioinformatics, Kofler *et al.*, 2007) による解析結果を用いた.

³⁾ SSR 配列を含む領域は, FrameDP (<http://iant.toulouse.inra.fr/FrameDP>, Gouzy *et al.*, 2009) による解析結果により判断した.

⁴⁾ プライマーの設計は, Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) で行った.

第 4-1-2 表 ニラ RNA-seq 由来 SSR マーカーにおけるプライマー配列 (3 塩基モチーフ¹⁾)

SSR マーカー名	反復 モチーフ ²⁾	SSR 配列長 ²⁾	領域 ³⁾	フォワードプライマー	リバースプライマー
nr2512	CAT	18	5'UTR	caggaaacagctatgacctcttcacagtaggaggaaaa	gtttccggataatggtctgatcgct
nr2549	TTA	22	5'UTR	caggaaacagctatgacctactgctcaacattttgt	gtttccaagacgctcctgtcaaat
nr2599	CAG	16	5'UTR	caggaaacagctatgacctcttctctcatcctctcc	gtttctttgtccagccttgaa
nr2738	GCC	16	5'UTR	caggaaacagctatgacctggcgcccttctagtctac	gtttcaactgcttttgcgtc
nr2795	TCA	17	5'UTR	caggaaacagctatgacctcaaatgaaaacgtaaggcaca	gtttcaggactaagcagattgcgga
nr2853	GAA	23	5'UTR	caggaaacagctatgacctgaggtttgttcatggagg	gtttcaagccctctccctcattct
nr2889	TGT	19	5'UTR	caggaaacagctatgacctccactgtcaactccact	gtttgattgagcaactgcaaagg
nr2909	AAG	17	5'UTR	caggaaacagctatgacctcagcttcaaccaagaagg	gtttgctccagaagatcctgc
nr3051	TAG	20	5'UTR	caggaaacagctatgacctcaaaagcttcttccacg	gtttgccaaagcaaacacaaaag
nr4244	GAG	24	5'UTR	caggaaacagctatgaccttggaccccatcttaagcaa	gtttcggtgcatcgatcccttatg
nr2092	TTG	20	3'UTR	caggaaacagctatgacctgcaacgttttggatcaga	gttttagcaacgatgataaggactgc
nr2105	TCT	24	3'UTR	caggaaacagctatgacctgaatttgcgccaagtgaatc	gttttaaggacataaagcttcccga
nr2144	CGC	20	3'UTR	caggaaacagctatgacctgagcaagagaagaagcagcg	gttttaagaaaaagcaccgc
nr2670	CAC	16	3'UTR	caggaaacagctatgacctgtcactctcttcttgggc	gtttgaagcgtgcaaacatcaag
nr2680	TTA	17	3'UTR	caggaaacagctatgacctgatatgaggagggaagaa	gtttgtgtgattgaaacatgttc
nr2747	GAC	16	3'UTR	caggaaacagctatgacctcttctctcttggctt	gtttccctgttccctaaaccctct
nr2806	TCC	18	3'UTR	caggaaacagctatgacctgttacctggacgcgaatgat	gtttctaaagcgttaacgggtgc
nr2816	TGA	22	3'UTR	caggaaacagctatgacctaacctgtctgatgctgtttg	gtttcaaatcagccagtgcacctct
nr2873	TGC	22	3'UTR	caggaaacagctatgacctgataaaccgactccaccgaa	gtttccagtagattccctcc
nr2936	TAC	20	3'UTR	caggaaacagctatgaccttggatctcctcgttgggtc	gtttcttttgcacaaggattcgct
nr2835	TCA	21	境界 (5'側)	caggaaacagctatgacctccatctcaaatgtcaccc	gtttccaggcgtggagagaataac
nr3229	TTC	15	境界 (5'側)	gcaggaaacagctatgaccttttctattctaatgcaaaacatct	gtttatcacatatctacaccagtgcat
nr3314	AAT	19	境界 (5'側)	caggaaacagctatgacctgggtcgtctctgtaactgga	gtttcaggaaattcatggggaggtt
nr3214	ATC	16	境界 (3'側)	caggaaacagctatgacctgctgacgtatgctgaaa	gtttgatacatccgacgtgaag
nr2526	CGA	21	ORF	caggaaacagctatgacctggaactcaagggggaaac	gtttcaagcagtgtcgaagacgat
nr2552	AAG	23	ORF	caggaaacagctatgacctgacccatagtgtgtgctttgg	gtttccaccacctcatcatc
nr2604	TCA	24	ORF	caggaaacagctatgacctggaacgtgtcataccctga	gtttggaggagaagatgaaaacga
nr2626	AGT	20	ORF	caggaaacagctatgacctgcttgggtgcaggagtatgt	gtttggtgctctcaactctcc
nr2663	AAT	23	ORF	caggaaacagctatgaccttgactcagcgggtgatgatt	gtttcaggcaagtgtgtgtgtt
nr2731	CAC	24	ORF	caggaaacagctatgacctaaatcagcaggcgtcaactt	gtttccactgcttgatccac
nr2841	TGC	24	ORF	caggaaacagctatgacctgcgagctggattcatattt	gtttccacaatcgtcgctaactct
nr2849	CAA	23	ORF	caggaaacagctatgacctgtacatactgcgaacccg	gtttctgtggaggaggagcagat
nr2911	GGC	20	ORF	caggaaacagctatgacctgtggaggaggatctgtgtg	gtttctgagcaagaaagcagca
nr2966	TCC	24	ORF	caggaaacagctatgacctcatatcatcgagatcaaagc	gtttgaagaggctgtatcgagg

¹⁾ 3 塩基モチーフは 34 プライマー。

²⁾ SSR モチーフおよび SSR 配列長は, SciRoKo (www.kolfer.or.at/Bioinformatics, Kofler *et al.*, 2007) による解析結果を用いた。

³⁾ SSR 配列を含む領域は, FrameDP (<http://iant.toulouse.inra.fr/FrameDP>, Gouzy *et al.*, 2009) による解析結果により判断した。

⁴⁾ プライマーの設計は, Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) で行った。

第 4-1-3 表 ニラ RNA-seq 由来 SSR マーカーにおけるプライマー配列 (4~6 塩基モチーフ)¹⁾

SSR マーカー名	反復 モチーフ ²⁾	SSR 配列長 ²⁾	領域 ³⁾	フォワードプライマー	リバースプライマー
nr1452	TATC	17	5'UTR	caggaacagctatgaccaactctcgggtgctcatttg	gtttcgctgacctgctgttaca
nr1659	TATT	16	5'UTR	caggaacagctatgacctacaatttgaccctgagca	gtttctctctgatgcgagctga
nr1663	TCAT	16	5'UTR	caggaacagctatgacctgacagtactgccttccc	gtttcaatgacccgcattaagaacg
nr1680	GCTC	16	5'UTR	caggaacagctatgaccggaaaatcctcttctaagctgc	gtttcacgggagcatctactcgttg
nr1751	GTAG	16	5'UTR	caggaacagctatgacctccattgccggtattttt	gtttacaacggtgaagatggca
nr1820	TTTA	19	5'UTR	caggaacagctatgaccggagggtttatggctttggt	gtttcacgggaataatccatgctg
nr1520	TGTT	20	3'UTR	caggaacagctatgaccggaaaatggggatcaaaat	gtttcggacatgctctaaaatgagtg
nr1596	TGTA	16	3'UTR	caggaacagctatgacctatcctccttgcgatgtt	gtttccatttcagcgaggcacta
nr1658	CATT	16	3'UTR	caggaacagctatgaccgcatgcatggctagtgatt	gtttcaagtctactcaattgtggcaa
nr1687	TTTA	17	3'UTR	caggaacagctatgacctggcatcacagacttcgta	gtttcaacaatgatcccatactgtg
nr1709	AATG	16	3'UTR	caggaacagctatgacctgcatgtcaagtggctcat	gtttcgtacaaaatagcaaatatccc
nr1734	GTAT	17	3'UTR	caggaacagctatgacctctcttgcctctgcttcag	gtttccaacgaagcatacagctct
nr1830	TTTA	19	3'UTR	caggaacagctatgaccctactaacacgttaaggccaa	gtttcatcattgtctataaacca
nr1846	TTGT	26	3'UTR	caggaacagctatgacctcccaatcacaaaatccat	gtttccaacatacacacaagccaaaa
nr1883	TGCT	17	3'UTR	caggaacagctatgaccgtgcatgtgttaattggag	gtttcaaataggaaacaccattttgc
nr4208	TTAA	16	3'UTR	caggaacagctatgacctgaacattactaaatgtcaccac	gtttactcgcctcgttttgggtg
nr1702	ATAC	21	ORF	caggaacagctatgacctctctgattgggtgctc	gtttcggaaacagaaccggaatttga
nr1718	TTTA	16	ORF	caggaacagctatgacctcaagtacgacttccagca	gtttgggtaccctaatttatgg
nr1735	AAGA	17	ORF	caggaacagctatgaccagagggaatggagctctta	gtttctctgctggccttgctc
nr1736	TTTC	23	ORF	caggaacagctatgacctgtccaacttcagcaccac	gtttgttaccacctccaatgctc
nr1737	AGTC	16	ORF	caggaacagctatgaccgctctggtttaaactttg	gtttaaacacgcagcaagcaaac
nr1738	CCAA	16	ORF	caggaacagctatgacctgtgctaagcacgacacgc	gtttgttagtttcttcggatggtga
nr1745	CGAC	17	ORF	caggaacagctatgaccacaagccatcgtcttgact	gtttgggctaggcttgacagta
nr1787	CTCA	21	ORF	caggaacagctatgaccaggaggtttgaacggat	gtttccacactccctttcca
nr1867	GAGG	17	ORF	caggaacagctatgaccggagagctgtgttttggga	gtttctataacgggagcgactg
nr3061	GGAA	16	ORF	caggaacagctatgaccggggggaggagagagaagag	gtttcctcctcttcttctctttt
nr0865	CATTC	21	5'UTR	caggaacagctatgaccgtatccaactgcccagcat	gtttgccatcacagtgttga
nr0870	TTTTA	20	5'UTR	caggaacagctatgaccgcggaattgtaaaacaatgc	gtttggtgcgaagagaattcgac
nr2321	TTATT	20	5'UTR	caggaacagctatgacctgtgtaataatgcctgagc	gtttgttgacctcctcttctc
nr0448	CCTTA	20	ORF	caggaacagctatgaccttgattgtgatggcttg	gtttcggcttcgacctcatagctg
nr0873	TTTCT	21	ORF	caggaacagctatgacctgatggcactgtaccagaa	gtttgctttcaagttggtcgaa
nr1124	AAGAA	21	ORF	caggaacagctatgaccgaacaaagttaacaacactcaca	gtttcaggctcctgttaaggactca
nr2491	GAAAA	20	ORF	caggaacagctatgaccgaagaagaaggaaaggggg	gtttcttttcttccctccctc
nr0040	GACAC	26	5'UTR	caggaacagctatgaccctccaaaagcaaccgtaaa	gtttcaatgggaaagggaat
nr0138	GCCCGA	24	3'UTR	caggaacagctatgaccagcctagccatcttagcgg	gtttcccgtttgggttgtaactgac
nr0010	CCCAA	27	ORF	caggaacagctatgacctatcctgccaatgcgtact	gtttacaaccaagcttcgctcc
nr0127	AGAGGC	26	ORF	caggaacagctatgacaaaatgcgaggtgtagatca	gtttcacccgtctgttaggaggac
nr0134	TTCTCC	24	ORF	caggaacagctatgaccggatcgatgctcgaataat	gtttacctctgcaagcggg
nr0187	TCTATC	24	ORF	caggaacagctatgaccggatccggtctctatcgta	gtttcttttagccgtggcagaga
nr0188	TATCTT	26	ORF	caggaacagctatgacctgtgcatgtctgaaagctcc	gttttagcgggaaccaaaaagt
nr0217	GAAGAC	29	ORF	caggaacagctatgaccggagggaaggagagaagg	gtttccaggtgaagagcagtcct
nr0235	CATTTG	24	ORF	caggaacagctatgacaaaactaaaaacgcccggact	gtttagctccaaaaggcaacc
nr0265	CATGGT	24	ORF	caggaacagctatgacctttgagttgcagctattgg	gtttctccccattgagcaaa
nr0333	ATACCC	29	ORF	caggaacagctatgaccctcccaatcccataccaat	gtttctctgaaatccccctccg
nr0400	ATCAGA	26	ORF	caggaacagctatgaccctctgtatagcagcggaac	gtttgccttgaagcacgaagaac
nr2709	AACCTT	26	ORF	caggaacagctatgaccttaaaagggaacgatgcagg	gtttcgaccagcaaaaggaccata
nr4188	TCTTCA	24	ORF	caggaacagctatgaccgccacaacgctctcttctt	gtttcaagctgctgaaggagacaa

¹⁾ 4 塩基モチーフは 26 プライマー, 5 塩基モチーフは 7 プライマー, 6 塩基モチーフは 14 プライマー。²⁾ SSR モチーフおよび SSR 配列長は, SciRoKo (www.kolfer.or.at/Bioinformatics, Kofler *et al.*, 2007) による解析結果を用いた。³⁾ SSR 配列を含む領域は, FrameDP (<http://iant.toulouse.inra.fr/FrameDP>, Gouzy *et al.*, 2009) による解析結果により判断した。⁴⁾ プライマーの設計は, Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) で行った。

3. 結果

(1) シーケンス結果

RNA-seq の結果は、トリム後で 18.1M リード、総塩基数 3.5G bp (平均配列長 198.5 bp) であった (第 4-2 表). アッセンブルした結果については、458,560 配列、総塩基数 102.6M bp であり、アッセンブル前の配列と比較して 2.9% となった (第 4-2 表). 一方、SSR 濃縮ライブラリーの結果は、11, 851 リード、総塩基数 4.2M bp (平均配列長 351.4bp) であった (第 4-2 表), アッセンブル後、2,246 配列、総塩基数 990,599 bp とアッセンブル前の 23.8% になった (第 4-2 表). なお、EST についても再解析した結果、アッセンブル後に 3,925 配列、総塩基数 1.9M bp となった. また、RNA-seq 458,560 配列をデータベースにし、EST 3,925 配列を blastn による解析を行った結果、EST 配列の 3,279 配列 (83.5%) が RNA-seq 2, 826 配列 (0.6%) とほぼ一致した.

(2) SSR 配列検索

アッセンブル後の RNA-seq 458,560 配列を用いて SSR を検索した結果、mmvp で 11,395 箇所 (2.5%), misa で 4, 992 箇所 (1.1%) において検出された (第 4-2 表). プライマー作製可能配列については、mmvp で 5,026 箇所 (1.1%), misa で 1, 769 箇所 (0.4%) であった (第 4-2 表). SSR 濃縮ライブラリーにおける SSR 配列を検索した結果は、mmvp および misa とともに同じであり、3,109 箇所 (138.4%) で検出された (第 4-2 表). また、プライマー作製可能配列については、1,228 箇所 (54.7%) となった (第 4-2 表). EST における SSR 配列の検索結果については、mmvp で 238 箇所 (9.3%), misa で 131 箇所 (3.5%), プライマー作製可能配列については、mmvp で 190 箇所 (4.8%), misa で 105 箇所 (2.7%) であった (第 4-2 表).

第 4-2 表 ニラ RNA-seq, SSR 濃縮ライブラリー, EST における SSR マーカー作製数

	RNA-seq		SSR濃縮ライブラリー		ニラ EST	
シーケンサー	MiSeq (illumina)		GS junior (Roche)		GenomeLab-GeXP (Beckman Coulter)	
read数	18,124,827		11,851		5,080	
解読塩基数 (bp)	3,597,643,598		4,164,687		2,430,950	
1 readあたりの塩基解読数 (bp)	198.5		351.4		479	
	(%) ^{*1)}		(%) ^{*1)}		(%) ^{*1)}	
アッセンブル後の配列数	458,560		2,246		3,925	
総塩基数 (bp)	102,559,371		990,599		1,943,525	
SSR配列検出数	(%) ^{*2)}		(%) ^{*2)}		(%) ^{*2)}	
mode=mmvp	11,395 2.5		3,109 138.4		238 9.3	
mode=misa	4,992 1.1		3,109 138.4		131 3.5	
プライマー作製可能数	(%) ^{*3)}		(%) ^{*3)}		(%) ^{*3)}	
mode=mmvp	5,026 1.1		1,228 54.7		190 4.8	
mode=misa	1,769 0.4		1,228 54.7		105 2.7	

*1): パーセントはアッセンブル後の配列数/read数×100および総塩基数/解読塩基数×100で表した.

*2): パーセントはSSR配列検出数/アッセンブル後の配列数×100で表した.

*3): パーセントはプライマー作製可能数/アッセンブル後の配列数×100で表した.

第 4-3 表 ニラ RNA-seq, SSR 濃縮ライブラリー, EST における反復モチーフ別分類

反復 モチーフ	search mode	RNA-seq				SSR濃縮ライブラリー				EST			
		配列数	(%) ^{*1)}	平均長(bp)	配列数/Mbp	配列数	(%) ^{*1)}	平均長(bp)	配列数/Mbp	配列数	(%) ^{*1)}	平均長(bp)	配列数/Mbp
2塩基	mmvp	5,118	44.9	27.7	49.9	2,484	79.9	32.6	2507.6	44	18.5	33.2	22.5
	misa	2,490	49.9	17.8	24.3	2,484	79.9	32.6	2507.6	32	24.4	25.8	16.4
3塩基	mmvp	2,597	22.8	23.1	25.3	159	5.1	26.7	160.5	122	51.3	23.8	62.5
	misa	1,604	32.1	17.4	15.6	159	5.1	26.7	160.5	77	58.8	18.9	39.4
4塩基	mmvp	1,507	13.2	19.1	14.7	326	10.5	27.8	329.1	29	12.2	19.7	14.9
	misa	745	14.9	17.9	7.3	326	10.5	27.8	329.1	20	15.3	19.2	10.2
5塩基	mmvp	1,508	13.2	16.8	14.7	96	3.1	25.6	96.9	27	11.3	16.2	13.8
	misa	91	1.8	21.2	0.9	96	3.1	25.6	96.9	1	0.8	21.0	0.5
6塩基	mmvp	665	5.8	20.4	6.5	44	1.4	32.3	44.4	16	6.7	22.1	8.2
	misa	62	1.2	24.7	0.6	44	1.4	32.3	44.4	1	0.8	41.0	0.5
合計	mmvp	11,395	100.0	21.4	111.1	3,109	100.0	29.0	3138.5	238	100.0	23.0	121.8
	misa	4,992	100.0	19.8	48.7	3,109	100.0	29.0	3138.5	131	100.0	25.2	67.1

*1): パーセントは配列数/各modeの合計配列数×100とした.

(3) SSR 配列の特徴

RNA-seq における反復モチーフを分類した結果、2 塩基モチーフがもっとも多く、約半分 (mmvp: 44.9%, misa: 49.9%) を占めた (第4-3表)。SSR 濃縮ライブラリーでは、プローブに (CA)_n および (GA)_n を用いているため、2 塩基モチーフが 79.9%と大部分を占めた (第4-3表)。一方、EST については RNA-seq と異なり、3 塩基モチーフが最も多く、約半分 (mmvp: 51.3%, misa: 58.8%) を占める結果となった (第4-3表)。RNA-seq におけるモチーフ分類についての結果は、2 塩基モチーフで AT が最も多く、次に AC, AG となった (第4-4表)。CG については極めて少なかった (第4-4表)。3 塩基モチーフについては AAT が最も多く、次に AAG,

ATC が多かった (第4-4表)。4 塩基モチーフでは AAAT が最も多く、ATAC, AATT と続いた (第4-4表)。SSR 濃縮ライブラリーについては、(CA)₁₅ および (GA)₁₅ プローブによる濃縮のため、AC および AG モチーフが大部分を占めた (第4-4表)。特に AC モチーフについては、AG モチーフの 2.4 倍であった。これは、RNA-seq および EST における AC/AG 比 (RNA-seq: misa AC/AG=2.9, EST: misa AC/AG=4.0) と同様の傾向にあった。3~6 塩基モチーフについてもプローブの影響により AC および AG モチーフを含むモチーフが多く検出された (第5-4表, 3 塩基: ACT および AAG, 4 塩基: ATAC および ACGT)。EST における配列特徴については、RNA-seq と同様の傾向を示した (第4-4表)。

第4-4表 ニラ RNA-seq, SSR 濃縮ライブラリー, EST における SSR (2~4 塩基) モチーフ比較^{*1)}

モチーフ	RNA-seq				SSR濃縮ライブラリー				EST			
	配列数	(%) ^{*2)}	平均長(bp)	配列数/Mbp	配列数	(%) ^{*2)}	平均長(bp)	配列数/Mbp	配列数	(%) ^{*2)}	平均長(bp)	配列数/Mbp
2塩基												
AT	1,182	23.68	18.0	11.53	271	8.72	24.9	273.6	22	16.8	28.6	11.3
AC	971	19.45	17.5	9.47	1,573	50.60	33.1	1,587.9	8	6.1	16.8	4.1
AG	331	6.63	17.4	3.23	639	20.55	34.5	645.1	2	1.5	31.0	1.0
CG	6	0.12	17.8	0.06	1	0.03	17.0	1.0				
3塩基												
AAT	539	10.80	17.7	5.26	16	0.51	28.0	16.2	17	13.0	18.8	8.7
AAG	326	6.53	17.1	3.18	54	1.74	23.0	54.5	13	9.9	17.0	6.7
ATC	226	4.53	17.3	2.20	2	0.06	20.0	2.0	17	13.0	22.8	8.7
AAC	135	2.70	17.5	1.32	4	0.13	19.3	4.0	2	1.5	18.0	1.0
AGG	100	2.00	17.1	0.98	3	0.10	29.7	3.0	3	2.3	19.3	1.5
AGC	110	2.20	17.5	1.07	1	0.03	17.0	1.0	12	9.2	18.0	6.1
ACC	68	1.36	16.8	0.66	1	0.03	20.0	1.0	6	4.6	16.2	3.1
ACT	32	0.64	17.0	0.31	71	2.28	30.1	71.7	1	0.8	17.0	0.5
ACG	37	0.74	17.1	0.36	6	0.19	25.2	6.1	3	2.3	17.7	1.5
CCG	31	0.62	17.0	0.30	1	0.03	16.0	1.0	3	2.3	17.7	1.5
4塩基^{*3)}												
AAAT	302	6.05	17.7	2.94	27	0.87	17.1	27.3	6	4.6	20.3	3.1
ATAC	170	3.41	18.4	1.66	134	4.31	28.5	135.3	1	0.8	17.0	0.5
AATT	66	1.32	17.7	0.64	6	0.19	17.3	6.1	3	2.3	21.3	1.5
ACGT	2	0.04	16.5	0.02	80	2.57	32.8	80.8				
AAAG	36	0.72	18.2	0.35	7	0.23	18.1	7.1	3	2.3	19.3	1.5
その他	169	3.39	17.3	1.67	72	2.32	24.5	72.7	11	4.6	19.2	5.6

*1): SciRoKoCo (mode=misa) のデータを用いた。

*2): パーセントは配列数/合計配列数×100とした。

*3): 4塩基反復モチーフは上位各3モチーフを示した。

第4-5表 ニラ RNA-seq 由来および EST-SSR が含まれる mRNA 上の領域^{*1)}

モチーフ	RNA-seq										EST									
	配列数	(%) ^(*)2)	CDS	(%) ^(*)3)	5'UTR	3'UTR	UTR 合計	(%) ^(*)3)	境界	(%) ^(*)3)	配列数	(%) ^(*)2)	CDS	(%) ^(*)3)	5'UTR	3'UTR	UTR 合計	(%) ^(*)3)	境界	(%) ^(*)3)
2塩基	126	16.9	44	34.9	42	37	79	62.7	3	2.4	17	17.5	11	64.7	3	2	5	29.4	1	5.9
AT	55	7.4	18	32.7	20	17	37	67.3			11	11.3	9	81.8	1	1	2	18.2		
AG	38	5.1	14	36.8	15	7	22	57.9	2	5.3	2	2.1			1		1	100.0	1	50.0
AC	33	4.4	12	36.4	7	13	20	60.6	1	3.0	4	4.1	2	50.0	1	1	2	50.0		
3塩基	532	71.4	396	74.4	47	84	131	24.6	5	0.9	67	69.1	42	62.7	2	20	22	32.8	3	4.5
AAG	157	21.1	116	73.9	12	28	40	25.5	1	0.6	11	11.3	8	72.7		3	3	27.3		
ATC	87	11.7	64	73.6	8	13	21	24.1	2	2.3	17	17.5	9	52.9		7	7	41.2	1	5.9
AGC	69	9.3	53	76.8	6	10	16	23.2			11	11.3	8	72.7		3	3	27.3		
AGG	69	9.3	55	79.7	6	8	14	20.3			11	11.3	8	72.7		3	3	27.3		
AAT	44	5.9	27	61.4	6	9	15	34.1	2	4.5	11	11.3	7	63.6		3	3	27.3	1	9.1
ACC	33	4.4	27	81.8	2	4	6	18.2			5	5.2	2	40.0		2	2	40.0	1	20.0
AAC	26	3.5	19	73.1	1	6	7	26.9			2	2.1	2	100.0						
CCG	21	2.8	17	81.0	2	2	4	19.0			3	3.1	1	33.3	2		2	66.7		
ACG	18	2.4	15	83.3	1	2	3	16.7			3	3.1	2	66.7		1	1	33.3		
ACT	8	1.1	3	37.5	3	2	5	62.5			1	1.0	1	100.0						
4塩基	55	7.4	21	38.2	11	23	34	61.8			12	12.4	6	50.0	4	2	6	50.0		
5塩基	8	1.1	5	62.5	3		3	37.5												
6塩基	24	3.2	18	75.0	3	3	6	25.0			1	1.0	1	100.0						
合計	745	100.0	484	65.0	106	147	253	34.0	8	1.1	97	100.0	60	61.9	9	24	33	34.0	4	4.1

*1): SciRoKoCo (mode=misa) のデータを用いた。

*2): パーセントは、配列数/全モチーフ合計(745配列)×100とした。

*3): パーセントは、各領域の配列数/各モチーフ合計×100とした。

(4) SSR 配列を含む RNA-seq および EST 配列における CDS 領域推定

RNA-seq 由来 SSR 4,992 配列および EST-SSR 131 配列を用いて FramePD による CDS 領域の推定を行った結果, RNA-seq 由来 SSR で 745 配列 (14.9%, 第 4-5 表), EST-SSR で 97 配列 (74.0%) に CDS 領域が検出された (第 4-5 表). RNA-seq では, CDS が 484 配列 (65.0%), UTR 領域が 253 配列 (34.0%), 境界領域が 8 配列 (1.1%) であった (第 4-5 表). EST-SSR についても同様の傾向であり, CDS が 60 配列 (61.9%), UTR 領域が 33 配列 (34.0%), 境界領域が 4 配列 (4.1%) であった (第 4-5 表). 5'UTR および 3'UTR の割合については, RNA-seq で 5'UTR が 106 配列 (41.9%), 3'UTR が 147 個 (58.1%) でありほぼ同等の傾向にあったが (第 4-5 表), EST においては 3'末端シーケンスを行っているクローンが多いため, 5'UTR が 9 配列 (27.3%) に対し, 3'UTR が 24 配列 (72.7%) となった (第 4-5 表).

反復モチーフ別に比較検討した結果は, RNA-seq では 2 塩基および 4 塩基モチーフが UTR 領域に位置する割合が高く, 3 塩基, 5 塩基, 6 塩基モチーフでは CDS 領域に含む

割合が高い傾向にあった (第 4-5 表). EST 配列においては, 2 塩基, 3 塩基, 4 塩基, 6 塩基モチーフが CDS 領域に含まれる割合が高く, 5 塩基モチーフではほぼ同じ割合であった (第 4-5 表).

モチーフ別の特徴としては, RNA-seq において AT モチーフが UTR 領域に多く含まれる傾向 (67.3%) にあった (第 4-5 表). 一方, EST における AT モチーフの割合は, CDS 領域に位置する割合が高かった (81.8%, 第 4-5 表).

(5) 多型検出

RNA-seq 由来 121 SSR マーカーについて多型の有無を調査した結果, 45 マーカー (40.2%) で多型が検出された (第 4-6 表). 領域別の多型検出率は, CDS 37.0%, 5'UTR 30.0%, 3'UTR 54.8%であり, 3'UTR でもっとも多く多型が検出された (第 4-6 表). 特に 3'UTR 領域における 2 塩基モチーフおよび 4 塩基モチーフの多型検出率が高かった (第 4-6 表, 70.0%, 60.0%). 6 塩基モチーフについては, 逆に CDS 領域に位置する SSR 配列で多型検出率が 58.3%であった (第 4-6 表).

第 4-6 表 ニラ RNA-seq 由来 SSR マーカーにおける領域 (UTR および CDS) 別多型の有無

	プライマー数	多型有	多型無	増幅無	増幅不良	多型率 (%)	平均アレル数
2塩基	31	14	7	5	5	45.2	4.5
CDS	10	3	3	2	2	30.0	5
5'UTR	10	3	3	1	3	30.0	4.7
3'UTR	10	7	7	2		70.0	4.3
境界 (3'側)	1	1	1			100.0	2
3塩基	34	11	9	8	6	32.4	2.5
CDS	10	3	1	3	3	30.0	2.3
5'UTR	10	3	3	3	1	30.0	1.6
3'UTR	10	4	3	2	1	40.0	3.4
境界 (5'側)	3	1	1		1	33.3	2
境界 (3'側)	1		1			0.0	1
4塩基	26	11	12	2	1	42.3	2.1
CDS	10	4	5	1		40.0	2.2
5'UTR	6	1	5			16.7	1.3
3'UTR	10	6	2	1	1	60.0	2
5塩基	7	1	3	1	2	14.3	2.5
CDS	4		2	1	1	0.0	1.5
3'UTR	3	1	1		1	33.3	3.5
6塩基	14	8	5	1		57.1	2.9
CDS	12	7	4	1		58.3	2.8
5'UTR	1	1				100.0	6
3'UTR	1		1			0.0	1
合計	112	45	36	17	14	40.2	2.9
CDS	46	17	15	8	6	37.0	2.8
5'UTR	30	9	12	4	5	30.0	3.4
3'UTR	31	17	7	5	2	54.8	2.1
境界 (5'側)	2	1	1			50.0	2
境界 (3'側)	3	1	1		1	33.3	1.5

4. 考察

今回、RNA-seq, SSR 濃縮ライブラリー, EST から検出された SSR 配列でプライマーが作製可能な SSR マーカー候補は、mmvp による検索で 6,444 マーカー、misa では 3,102 マーカーとなった。NGSを活用することにより、大量の SSR マーカーを開発することができたが、今後、いかに多型が得られるマーカーを選抜できるかが重要となる。一般的に EST-SSR と Genome-SSR では、Genome-SSR において多型が得られやすいことが知られており、Tukazaki *et al.* (2015) は、ネギ (*Allium fistulosum*) において Genomic-SSR > Transcriptome Shotgun Assembly (TSA)-SSR > EST-SSR で多型が得られやすいと考察している。我々は、RNA-seq 由来 SSR マーカーの多型を検討した結果、35.7%の SSR マーカーで多型が得られており、Tukazaki *et al.* (2015) の TSA-SSR マーカーの多型率 24.6~43.7%とほぼ同等の割合であった。今後、SSR 濃縮ライブラリーのマーカーについても検討していく予定である。

RNA-seq 由来 SSR マーカーにおけるモチーフについては、GC モチーフが少ないこと、AG より AC モチーフが多いことが示された。ネギにおいても同様の報告であり (Tukazaki *et al.*, 2007・2015)、ネギ属の特徴と考えられる。また、2 塩基モチーフについては AT および AC が同等の割合であり、3 塩基モチーフでは AAT が最も多く、AAG がその次に多かった。Zhou *et al.* (2015) におけるニラのトランスクリプトーム解析では、2 塩基モチーフで AC および AG がほぼ同等、3 塩基モチーフで AAG が多いと報告している。我々の結果では AT および AAT が多く異なる結果となったが、同じネギ属であるネギのトランスクリプトーム解析 (Tukazaki *et al.*, 2015) およびタマネギ (*Allium cepa*) の EST 解析 (Radhika *et al.*, 2013) においても、AT モチーフが最も多いと報告されている。また、我々の EST 配列の結果も AT モチーフが最も多かった。このことからネギ属においては、AT モチーフが多い可能性が示唆される。一方、ニンニク (*Allium sativum*) の EST 解析では AG モチーフが最も多いこと (Chand *et al.*, 2015)、3 塩基モチーフではネギ、タマネギ、ニンニクのいずれも AAG モチーフが多いことが報告されている (Tukazaki *et al.*, 2015; Radhika *et al.*, 2013; Chand *et al.*, 2015)。今回、我々は葉組織のみで RNA-seq 解析を行っていることから、このことを確認するために他の様々な組織 (根や花等) で RNA-seq 解析を進めていく必要があると考えられる。

mRNA 上の領域 (CDS および UTR) 別の多型については、3'UTR 領域において最も多型が得られた。Scott *et al.* (2000) は UTR 領域、Holland (2001) は 5'UTR より 3'UTR 領域において多型が得られやすいと同様の報告をしており、

本法で 3'UTR 領域を推測することによって、多型が得られるマーカーを効率的に選抜できると考えられる。一方、6 塩基モチーフの SSR については、CDS 領域でも 58.3%の確率で多型が検出された。今回、UTR 領域で作製できる 6 塩基モチーフマーカーが少なかったため、今後、6 塩基モチーフマーカーの更なる開発や FramePD 以外の CDS 領域検出プログラムを用いて再解析する必要があると思われる。また、高反復モチーフになるにつれて多型が得られにくいと考えられているが、今回、我々の結果では 6 塩基モチーフマーカーにおいて供試プライマーが少ないながらも多型が得られやすいことが示唆された。6 塩基モチーフは、2 塩基モチーフと比較してスタッターが出難いことから、多型判別が明瞭となり、アレルが多数検出されるニラのような高次倍数体の解析や信頼度が求められる品種識別において重要であると考えられる。今後、SSR 濃縮ライブラリーや EST 由来 6 塩基モチーフマーカーについても検討していく予定である。

今回、我々は NGS により SSR マーカーを開発したが、ネギ属のデータベースが構築されれば、より効率的な SSR マーカーの開発が行えると考えられる。他のネギ属の SSR マーカーの開発は、ネギ (Tukazaki *et al.*, 2007・2015)、タマネギ (Baldwin *et al.*, 2012; Radhika *et al.* 2013)、ニンニク (Cunha *et al.*, 2012; Chand *et al.*, 2015) で行われている。Lee *et al.* (2011) は、ニンニクの SSR マーカーを使用してネギ属の 4 種間における SSR マーカーの増幅を検討した結果、ネギでは 48.0%のマーカーが増幅したが、ニラにおいては 66.8%のマーカーが増幅したと報告している。我々のデータと他のネギ属のデータを比較検討することで、より安価に SSR マーカー開発が行えると考えられる。現在、ネギ属のトランスクリプトームデータベースの構築も進んでおり (執行ら, 2015)、今後、飛躍的に SSR マーカーの開発が進むものと考えられる。

総合考察

栃木県におけるイチゴは、作付面積が 545ha (2018 年)、収穫量が 24,900t (2018 年) とともに全国一位である。また、同じ園芸品目であるニラについては、作付面積が 360 ha (2018 年) と全国一位、収穫量が 10,600t (2018 年) と全国二位である。この産地形成は、首都圏に近いことや冬期の気候条件といった地理的要因もあるが、生産者の高い技術力や新たな栽培技術の導入、関係機関による新規栽培者や後継者の支援によるものが大きい。本県の品種育成は様々な品目で行われているが、特にイチゴにおいては、‘女峰’ (赤木ら, 1985) に始まり、‘とちおとめ’ (石原ら, 1996)、そして‘栃木 i27 号’ (重野ら, 2015) と収量性や商品価値のある品

種を育成している。また、ニラについても近年、‘ゆめみどり’ (大島ら, 2017) が育成され、その高い収量性から、年々作付する生産者が増えている状況となっている。

品種育成の際の欠点となるのは、育成までにとても長い年月を必要とすることである。その解決策の一つとして DNA マーカーの利用が挙げられる。DNA マーカーによる選抜は、幼苗時に選抜を実施することにより、ほ場展開規模が縮小でき、調査労力の大幅な低減が図ることができる。また、新品種育成の迅速化のため、空いたスペースにより多くの交配集団を展開することも可能である。また、病害抵抗性品種育成においては、接種試験を省略化することもでき、他の優良形質選抜に労力集中することもできる。一方、品種育成後については、育成者権の保護することも重要である。DNA マーカーによる鑑定は、外観形質から識別が困難であっても、判定を行うことができる。また、その技術の開発は、違法栽培の抑止力となる効果も大きい。

このように、DNA マーカーは、このように育種現場において重要なツールになっている。しかし、本県主要園芸品目であるイチゴ およびニラについては、それぞれ 8 倍体 ($2n=8x=56$) と 4 倍体 ($2n=4x=32$) であること、ゲノムサイズについてもイチゴは小さいもの、ネギ属であるニラはとても巨大であることから、2000 年代初頭においては遺伝解析が困難であると予想され、イネと比較してその開発が遅れていた。しかし、同じく 2000 年代初頭、海外から使用許諾していないイチゴを含む農産物が輸入される事例が発生したことから (竹次, 2004)、早急な DNA マーカーによる品種技術開発が求められた。

そこで、最初にイチゴにおける random amplified polymorphic DNA (RAPD)- sequence tagged site (STS) および amplified fragment length polymorphism (AFLP)- STS マーカーによる迅速な品種識別技術の開発、その後、イチゴおよびニラにおける simple sequence repeat (SSR) マーカーの大量開発を行った。また、イチゴについては、炭疽病 (*Glomerella cingulata*) 耐病性連鎖マーカーの検索に向けて、SSR マーカーによる‘とちおとめ’(罹病性)×‘いちご中間母本農 2 号’(抵抗性、沖村ら, 2004) F₁ 集団における分離比の調査を行った。

第 1 章では、育成者権保護のために RAPD-STS および AFLP-STS マーカーを開発し、マルチプレックス PCR により、本県育成品種である‘とちおとめ’および‘とちひめ’ (栃木ら, 2001) を識別するプライマーセットの開発を行った。また、当時の国内主要品種を識別するプライマーセットの開発も行った。イチゴの品種識別技術は、Kunihisa *et al.* (2005) による cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) マーカーによる方法がある。しかし、CAPS マーカーはマーカー検出の

際、制限酵素処理が必要となる。そこで、迅速に PCR のみで判定できる RAPD-STS および AFLP-STS マーカーの開発を行った結果、3 種類のプライマー (E89-STS, *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS, A72-STS) を開発した。また、本マーカーをマルチプレックス PCR することにより、1 回の PCR で‘とちおとめ’および‘とちひめ’の識別が可能となった。また、市販果実を想定し、ガク片および果実からもマーカーの検出を可能にした。さらに、主要イチゴ品種の識別を行うため、10 種類のプライマーのマルチプレックス PCR 化を試み、3 種類のプライマーセット (プライマーセット 1: E89-STS・*EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS・A72-STS, プライマーセット 2: OPC12-STS・A31-STS・C29-STS・OPE3-STS, プライマーセット 3: E28-STS・OPD7-STS・B22-STS) を開発した。本プライマーセットを用いることにより、主要品種 25 品種・系統の識別が可能となった。本プライマーセットを開発したことにより、本県育成品種の育成者権保護につながったと考えられる。

第 2 章では、イチゴ連鎖地図作製に向けて SSR マーカーの大量開発を試みた。第 1 章で用いた RAPD 法は再現性の問題で、STS 化すること必須となる。AFLP 法による多型検出は、多型再現性は高く、多型情報も多いが、検出方法が煩雑であり、労力がかかる。SSR マーカーは、PCR のみで多型検出が可能であり、多型も得られやすく、しかも共優性マーカーであることから開発のメリットが大きい。しかし、通常のゲノムライブラリーからの SSR マーカー開発は効率が非常に悪いという欠点がある。そこで、SSR マーカーが大量開発できる SSR 濃縮ライブラリー法 (Nunome *et al.*, 2006) と SSR マーカー開発支援ソフト read2Marker (Fukuoka *et al.*, 2005) を併用し、‘とちおとめ’由来 SSR マーカー (Genomic-SSR) の大量開発を行った。また、本県で集積していた 5,494 expressed sequence tag (EST) (Namai *et al.*, 2013) も併せて解析し EST-SSR の開発を行った。その結果、プライマー設計可能な SSR マーカーが Genomic-SSR で 456 個、EST-SSR で 544 個、併せて 1,000 SSR マーカーが開発できた。配列モチーフの特徴としては、CA モチーフでは、近傍に AT モチーフがある割合が全体の 23.0%と GA モチーフの 9.2%より多く、Nunome *et al.* (2009) のナスでの結果と一致していた。一方、EST からの SSR 検出割合は 9.9%であり、Folta *et al.* (2005) の 14% (190/1,304EST) と同等であった。また、ナスの 3.4% (Nunome *et al.*, 2009) やイネ (*Oriza sativa*) およびシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のそれぞれ 3.5%, 0.84% (Victoria *et al.*, 2011) より多く検出されたため、イチゴにおいては EST から効率的に SSR マーカーが作製できると考えられる。しかし、第 3 章の結果から多型率は 26.7%と低く、SSR 配列が位置する領域を検討後、プライマーを作製した方がよいと考えられる。

第3章では、イチゴ炭疽病耐病性連鎖マーカーの開発のため、‘とちおとめ’×‘いちご中間母本農2号’F₁集団を用いて SSR マーカーの多型および分離比の調査を行った。イチゴ炭疽病は、イチゴにおける難防除病害であり、国内では、2種類の病原菌 (*G. cingulate* = *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*) のうち *G. cingulata* による被害が大きい。国内の普及品種はほぼ罹病性であり、抵抗性品種の作出には、複数の抵抗性遺伝子を集積させる必要がある。炭疽病抵抗性品種の開発は強く望まれていたが、当時の開発状況は‘サンチーゴ’ (森ら, 2000) と育種母本としての‘いちご中間母本農2号’のみであった。そこで、イチゴ炭疽病耐病性連鎖マーカーの開発に向けて、‘とちおとめ’×‘いちご中間母本農2号’F₁集団を作出し、連鎖地図作製に向けて分離比の調査を実施した。

‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農2号’間における多型割合は、Genomic-SSR の割合が 76.4%, EST-SSR が 26.7%であった。EST-SSR における領域(open reading frame: ORF および 3'untranslated region: 3'UTR) 別の多型割合は、ORF で 20.0%, 3'UTR で 33.3%であった。本結果から、連鎖解析には、Genomic-SSR および 3'UTR に位置する EST-SSR を用いることが適すと考えられた。F₁ 集団における分離比は、1:1 および 1:0 の合計アリル割合は、‘とちおとめ’由来アリルで 90.8%, ‘いちご中間母本農2号’由来アリルで 84.1%と大部分を占めた。そのうち、16 プライマーについては、明確に複2倍体的な共優性マーカー関係を示す分離比を示した。このことは、栽培イチゴが2倍体のように連鎖解析が行えることを示す。一方、複2倍体の分離比を示さないアリルも存在しており、時折同質倍数体様に対合していると考えられた。

イチゴ炭疽病耐病性連鎖マーカーの開発は、その後、飯村ら (2013) により本 SSR マーカー多型データおよび RAPD および AFLP マーカーを用いて、‘とちおとめ’が座乗マーカー数 376 個、全長 1005.4cM、30 連鎖群、‘いちご中間母本農2号’が座乗マーカー数 506 個、全長 1448.1cM、29 連鎖群に収束した連鎖地図を完成させている。また、quantitative trait locus (QTL) 解析により‘いちご中間母本農2号’で5か所、‘とちおとめ’で4か所の炭疽病関連領域を検出している。

同じくイチゴ萎黄病抵抗性に関しても‘とちおとめ’(罹病性)×‘アスカウェイブ’(抵抗性)F₁集団を解析材料として SSR および AFLP マーカーを用いて連鎖地図が作製しており、イチゴ萎黄病耐病性領域を特定している (飯村ら, 2011)。萎黄病抵抗性はその分離比から主働遺伝子の関与が示唆されており (Mori *et al.*, 2005)、主働遺伝子と連鎖している DNA マーカーを用いて、交配実生より選抜を実施している。また、耐病性と異なるが、イチゴ四季成り性に関しても単因子優性遺伝子支配と考えられており (森下ら, 2012)、『なつおとめ’

(四季成り性)×‘やよいひめ’(一季成り性)F₁集団を材料に同じく SSR および AFLP マーカーにより、四季成り性因子近傍にあるマーカーを選定している (鈴木ら, 2015)。本マーカーについても育種交配実生より選抜を実施している。また、対立アリルが2倍体的挙動を示すローカスについては、その後、イチゴ品種識別技術に活用され、中澤ら (2012) により新たなイチゴ品種識別マーカーが開発されている。

このように、SSR マーカーを大量開発したことにより、連鎖解析や有用形質連鎖マーカー開発に貢献できたと考えている。

ニラにおける SSR マーカー開発は、SSR 濃縮ライブラリーとともにさらに短期間で大量に開発を行うため、次世代シーケンサー (next generation sequencing: NGS) を活用した。また、遺伝子そのものが座乗できるように RNA-seq による SSR マーカーの開発を行った。プライマー設計可能な配列は、RNA-seq で 5,026 個 (mode=mmvp) および 1,769 個 (mode=misa), 濃縮ライブラリーで両モードともに 1,228 個 (mode=mmv), EST で 190 個 (mode=mmvp) および 105 個 (mode=misa)であり、短期間で大量の SSR マーカーの開発が行えた。多型に関しては、112 プライマーを用いて、‘H12C2’ (非単為発生・非複相大孢子形成) および ‘97-11-7’ (非単為発生・複相大孢子形成) 間で調査し、3'UTR 領域で 54.8%, coding sequence (CDS) 領域で 37.0%, 5'UTR 領域で 30.0%のプライマーで多型が検出された。これは、Holland *et al.* (2001) と同様な結果であり、3'UTR 領域にある SSR マーカーを中心に解析を進めた方が効率的であると考えられる。また、6 塩基モチーフが 57.1%と最も多型検出割合が多かった。2 塩基モチーフの SSR マーカーは多型が得られやすい反面、スタッターピークが出やすく、アリルの判定が困難な場合が多い。一方、6 塩基モチーフはスタッターピークはほぼ出ない。今後更なる解析を進めて有効性を確認したいと考えている。また、SSR 配列の特徴としては、同じネギ属の解析と同様に AC モチーフの割合が多く、特に濃縮ライブラリーで顕著に AG が 20.6% に対し、AC は 50.6%に達した。これはネギ属の共通の特徴であると考えられた。

ニラの SSR マーカーの活用は、単為発生の前段階の複相大孢子形成性に連鎖マーカーの開発に用いられ (若舂ら, 2017)、現在、交配育種において両性生殖性と単為生殖性の判定のために実用化されている。また、‘ゆめみどり’の交雑率検定の際、花粉親特異的な SSR マーカーを用いて検定を行っている (大島ら, 2017)。

ゲノム解析は、近年、NGS の登場によりゲノムシーケンスが容易に実施できるようになり、目覚ましい進歩を遂げている。栽培イチゴにおいては、‘麗紅’ (成川ら, 1981) の 698.7 Mb のゲノムシーケンスデータが得られ (Hirakawa *et al.*,

要旨

2014), Web 上で公開されている (Strawberry GARDEN: <http://strawberry-garden.kazusa.or.jp/>). また, 2020 年には, アメリカの品種である‘Camarosa’から 805.5Mb のゲノムデータが得られ(Edger *et al.*, 2020), GDR (Genome database of rosaceae, <https://www.rosaceae.org/>) で公開されている. 連鎖地図においては, 高密度化が進み, Isobe *et al.* (2013) は, *F. vesca* および *F.×ananassa* の EST-SSR マーカー, *F.×ananassa* の transcriptome-SSR マーカーにより 1,856 ロークラス, 2,364.1cM の 28 連鎖群に収束した連鎖地図を報告している. さらに single nucleotide polymorphism (SNP) についても情報集積を進み, 現在, 95,062 SNP が解析できるアレイが市販されている (Axiom™ Strawberry Genotyping Array, Thermo Fisher Scientific 社). SNP アレイによる高密度連鎖地図は, Bassil *et al.* (2015) が 6,593 SNP, Nagano *et al.* (2017) が 11,002 SNP マーカーが座乗する連鎖地図を報告している. 今後, イチゴの優良形質連鎖 DNA マーカーの開発は, これらの情報を利用することにより, 飛躍的に進むと考えられる.

G. cingulata によるイチゴ炭疽病の抵抗性連鎖 DNA マーカーについては, 榎ら (2017) が‘さちのか’×‘いちご中間母本農 2 号’F₁ 集団を材料に第 23 連鎖群に寄与率 45% の領域を検出している. また, Anciro *et al.* (2018) は, 24 交配親から 62 組み合わせの集団で QTL 解析を行い, サブゲノム 6B 染色体に抵抗性領域 *Fragaria resistance to C. gloeosporioides locus/gene 1 (FaRCg1)* を検出している. これらの領域の DNA マーカーについては, 今後有効性を確認する必要がある. また, *G. cingulata* によるイチゴ炭疽病の抵抗性は QTL であるため, さらなる抵抗性領域の検索が必要であると考えられる.

一方, ニラについてゲノム解析は, Zhou *et al.* (2015) のグループによる RNA-seq の解析の報告以降進展はない. 他のネギ属において比較的遺伝解析が進んでいるタマネギ等の情報を活用することが必要であると考えられる. ニラにおける病害抵抗性品種・系統の報告はなく, 山崎 (2014) のニラ乾腐病における品種間比較の報告のみである. 今後, 本県で保有しているニラ遺伝資源の病害抵抗性評価を行うことが必要不可欠であると考えられる.

本研究は, 栃木県における主要園芸品目であり, 品種育成に取り組んでいるイチゴおよびニラにおける RAPD-STs マーカー, AFLP-ST マーカーおよび SSR マーカーの開発に取り組む, それらの成果をまとめたものである. 開発された DNA マーカーは, イチゴおよびニラの遺伝解析に活用され, 本県農業の発展および生産者が安心して栽培できる品種育成に貢献できれば幸いである.

世界における栽培イチゴ (*Fragaria×ananassa*) の作付面積および生産量は, それぞれ 53 万 ha (2017 年), 1,295 万 t (2017 年) であり, その需要の高まりから, 2000 年と比較すると作付面積で 1.4 倍, 生産量で 2.3 倍と増加している. 国内のイチゴの作付面積および収穫量は, それぞれ 5,200 ha (2018 年), 16.2 万 t (2018 年) である. そのうち, 栃木県のイチゴ生産は, 作付面積 545ha (2018 年), 収穫量 24,900t (2018 年) である. 作付面積は 18 年間, 収穫量は 51 年間連続日本一であり, 「イチゴ王国」と呼称されている.

ニラ (*Allium tuberosum*) は, 主にアジア地域にて栽培され, 国内の作付面積および生産量は, それぞれ 2,020 ha (2018 年), 5.6 万 t (2018 年) である. 栃木県のニラ生産は, 作付面積が 360 ha (2018 年) であり全国一位, 収穫量 10,600t (2018 年) であり全国二位であり, 「餃子の街宇都宮市」の周辺が主な産地となっている.

栃木県農業試験場におけるイチゴ, ニラの品種育成能力の評価は極めて高く, ‘女峰’ (1985 年品種登録), ‘とちおとめ’ (1996 年), ‘栃木 i27 号’ (商標登録名: スカイベリー, 2014 年) 等を育成し, 近年では ‘栃木 i37 号’ を登録出願 (2018 年) している.

ニラにおいては, ‘きぬみどり’ (1995 年), ‘ゆめみどり’ (2017 年) を育成している. また, ニラは, 一般的に数パーセントしか交雑しない条件的な単為生殖性である. しかし, 本県では両性生殖性のニラを見出したため, 両性生殖ニラは種子親, 単為生殖性ニラは花粉親とした交雑育種を可能としている. また, 現在では, 単為発生性連鎖 DNA マーカーを活用した本県独自の交雑育種システムを確立しており, 交雑後代を両性生殖性ニラ (中間母本) と単為生殖性ニラ (品種候補) に区分することが可能である.

一般的に品種育成には, 長い歳月を要し, イチゴでは 10 年に一品種と云われている. その解決策として, DNA マーカーを用いた品種育成方法が着目されている. 研究を開始した 2000 年代初頭においては, DNA マーカーによる育種選抜方法は, 品種育成に用いられていなかった. しかし, 本方法を用いれば, 交配, 選抜の労力削減やほ場のさらなる効率的な利用に繋がり, かつ多収・高品質, 耐病性などの形質を持つ, 優良品種育成の迅速化につながると期待されている.

本研究では, 2000 年代初頭, 他国より使用許諾なしに違法なイチゴ等の農産物が輸入される事例が発生したことから, 最初に本県育成イチゴにおける迅速な品種識別技術開発を目的とした. また, 品種育成の効率化を目指し, イチゴおよびニラを対象品目として遺伝解析用 DNA マーカーの大量

開発を目的とした。なお、開発に着手した際の知見は、栽培イチゴは八倍体 ($2n=8x=56$)、ニラは四倍体 ($2n=4x=32$) と倍数体であるため、DNA による遺伝解析はほぼ行われていない未知の分野であった。

イチゴにおいては、まず本県育成イチゴ品種の育成者権保護を目的に、DNA 多型検出法の一つである random amplified polymorphic DNA (RAPD) 法と amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法による sequence tagged site (STS) 化マーカーを作製し、品種識別技術の開発を行った。その後、より汎用性および多型率が高い simple sequence repeat (SSR) マーカーの大量開発を行った。開発した SSR マーカーは、難防除病害であるイチゴ炭疽病 (*Glomerella cingulata*) に対する耐病性連鎖マーカーの検索を行った。検索方法は、‘とちおとめ’ (罹病性) × ‘いちご中間母本農 2 号’ (抵抗性) F1 集団のマーカー分離比に本 SSR マーカーを用いて取り組んだ。

一方、ニラについては、検出技術の進歩により、大量の塩基配列情報が得られる次世代シーケンサー (next generation sequencing: NGS) を用いて、イチゴと同様に SSR マーカーの大量開発に取り組んだ。

第1章では本県育成イチゴ品種の育成者権保護を目的とした品種識別技術の開発についてまとめた。イチゴにおける RAPD-STs マーカーおよびマルチプレックス PCR による品種識別技術は、‘とちおとめ’および‘とちひめ’を対象として、特異的品種識別マーカーの開発を行った。まず、RAPD および AFLP マーカーによるスクリーニング後、再現性を高めるため STS 化を行った。その後、複数マーカーを同時に検出できるようマルチプレックス PCR 化を行った。

RAPD 法により 467 種類のランダムプライマー、AFLP 法により 256 種類のプライマーの組合せによりスクリーニングした結果、RAPD 法で 4 マーカー、AFLP 法で 6 マーカーを選抜した。RAPD 4 マーカーおよび AFLP 1 マーカーについては STS 化を行い、3 種類の STS 化プライマーをセット化した (プライマーセット 1: E89-STs, *Eco*RI-ACA/*Mse*I-CGG-STs および A72-STs)。

日本初の本プライマーセット開発により、イチゴ 25 品種・系統間で両品種との差異を 1 回の PCR により識別可能とした。この 3 種類プライマーについては、マルチプレックス PCR により、さらに、国内主要品種 (‘とちおとめ’ (32.7%)、‘さがほのか’ (16.7%)、‘福岡 S6 号’ (商標登録: あまおう, 11.5%)、‘さちのか’ (10.8%)、‘紅ほっぺ’ (6.8%)、‘とよのか’ (5.9%)、‘章姫’ (5.1%)、‘女峰’ (1.4%)、上位 8 品種 (90.9%)、2007 年) を識別できるよう上記のスクリーニングから、7 種類の RAPD-STs 化プライマー (A31-STs, B22-STs, C29-STs, E28-STs, OPC12-STs, OPE3-STs および OPD7-STs) を作製した。7 種

類のプライマーは、マルチプレックス PCR により、2 種類 (プライマーセット 2: OPC12-STs, A31-STs, C29-STs および OPE3-STs, プライマーセット 3: E28-STs, OPD7-STs および B22-STs) にプライマーセット化し、上記のプライマーセット 1 と合わせて 3 組で構成されるプライマーセットの開発に日本で初めて成功した。

第2章ではイチゴにおける SSR マーカーの大量開発についてまとめた。イチゴの SSR マーカーについては、DNA の反復配列部分を濃縮し、SSR マーカーを効率的に作製できる濃縮ライブラリー法を用いた Genomic-SSR マーカーと本県で蓄積した 5,494 Expressed sequence tag (EST) 由来の EST-SSR マーカーを大量開発した。SSR 濃縮ライブラリーは、CA 反復配列と GA 反復配列を濃縮し、PCR によりスクリーニングした結果、3,913 クローンにおいて SSR 配列が含まれていると推定された。シーケンスした 907 クローンの結果は、868 クローン (95.7%) で SSR 配列が検出され、プライマー設計可能な配列が 456 クローン (50.3%) であった。

イチゴ EST-SSR マーカーについては、723 EST (13.2%) から SSR 配列が検出された。そのうち、プライマー設計可能な EST は 544 EST (9.9%) であった。それらの結果、Genomic-SSR マーカーおよび EST-SSR マーカーの合計で 1,000 マーカーを作製できた。

第3章ではイチゴ炭疽病に対する耐病性連鎖マーカーの検索のため、‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F1 集団のマーカー分離比の検討についてまとめた。SSR マーカーによる‘とちおとめ’および‘いちご中間母本農 2 号’間の多型検索は、Genomic -SSR で 126 プライマー (76.4%)、EST-SSR マーカーで 16 プライマー (26.7%) で多型が得られた。‘とちおとめ’ × ‘いちご中間母本農 2 号’ F1 94 個体における SSR 多型分離比は、‘とちおとめ’では 1:1 および 1:0 の分離比を示すアリルが 119 アリル (90.8%) ‘いちご中間母本農 2 号’では 131 アリル (84.1%) と大多数を占めた。また、14 プライマーが複 2 倍体的な共優性的な関係を示すアリル分離であった。この結果は、栽培イチゴ (8 倍体) の複二倍体的挙動を示していると考えられる。

第4章ではニラにおける NGS を活用した SSR マーカーの大量開発の検討についてまとめた。ニラにおける SSR マーカー開発は、SSR 濃縮ライブラリーとともに NGS を活用し、遺伝子そのものが座乗できるように RNA-seq による SSR マーカー開発を行った。プライマー設計可能な配列は、RNA-seq で 5,026 個 (mode=mmvp) および 1,769 個 (mode=misa)、濃縮ライブラリーで両モードともに 1,228 個 (mode=mmv)、EST で 190 個 (mode=mmvp) および 105 個 (mode=misa) であり、短期間で大量の SSR マーカーを開発できた。多型に関しては、112 プライマーを用いて、H12C2 (非単為発生・

非複相大孢子形成) および 97-11-7 (非単為発生・複相大孢子形成) 間で調査した結果, 3'UTR 領域で 54.8%, CDS 領域で 37.0%, 5'UTR 領域で 30.0%のプライマーで多型が検出された。

マーカー検索の際は, 3'UTR 領域の設計プライマーを用いることにより, 効率的に多型が検出できると考えられる。また, 6 塩基モチーフが 57.1%と最も多型検出割合が多かった。一般的に 6 塩基モチーフは多型が少ないと考えられており, このことはニラにおける特徴と考えられる。配列特徴としては, 同じネギ属の解析と同様に AC モチーフの割合が多く, 特に濃縮ライブラリーでは顕著で AG が 20.6% に対し, AC は 50.6%に達した。これは他の報告同様にネギ属の共通の特徴であると考えられる。

本論文では, 主要な園芸作物のイチゴに関しては, 本県育成品種の育成者権保護を目的に, DNA 多型検出法の一つである RAPD 法および AFLP 法による STS 化マーカーを作製し, 品種識別技術の開発をとりまとめた。イチゴおよびニラにおいては, SSR マーカーの大量開発に取り組み, イチゴ炭疽病耐病性集団やニラ複相大孢子形成性集団を用いて多型検索を行い, Genomic-SSR, EST-SSR, RNA-seq-SSR における特徴についてとりまとめた。

本イチゴ品種識別技術が開発されて以降, 違法な輸入農産物の流通がなくなり, 抑止力として大きな効果があった。また, 新たな本県育成品種については, 開発した SSR マーカーを用いた品種識別技術が開発され, 現在, 育成者権保護に活用されている。さらに, イチゴ育種においては, SSR マーカーおよび AFLP マーカーを活用して, イチゴ萎黄病耐病性や四季成り性の遺伝解析が進められ, イチゴ萎黄病耐病性や四季成り性連鎖マーカーが開発されている。現在, 萎黄病耐病性や四季成り性に関しては, 約 5,000 実生から 1/2 の 2,500 実生に減らすことに成功し, 育種の効率化につながっている。一方, ニラにおける SSR マーカーにおいては, 複相大孢子形成連鎖マーカーの開発や品種登録前の交雑率検定マーカーの開発に用いられ, ニラ育種に活用されている。今後, さらに耐病性連鎖マーカーの開発に本 SSR マーカーが活用されることが期待される。

ここで得られた知見が, イチゴおよびニラの育種現場などで効果的に活用され, 我が国の園芸作物の生産安定に繋がり, 農業者の経営安定に貢献できれば幸いである。

謝 辞

本論文を執筆するに当たり, 法政大学生命科学部 石川成寿教授には, ご多忙の中, 終始ご懇切な研究指導とご校閲を賜った。また, 常に研究に対し叱咤激励を賜った。ここに衷心より感謝の意を表する。

法政大学生命科学部 大島研郎教授, 佐野俊夫教授にはご多忙の中, 本論文のご校閲賜った。ここ深甚なる感謝の意を表する。

第 1 章の研究では, 野菜茶業研究所 松元哲博士 (現農研機構 野菜花き研究部門 研究推進部長), 國久美由紀博士 (現農研機構 果樹茶業研究部門) には, イチゴの品種識別技術の開発において快く研修を受け入れていただいた。また, その後のイチゴの DNA マーカー開発においても多大なるご助言を賜った。第 2 章および第 3 章の研究では, 同じく野菜茶業研究所 福岡浩之博士 (現タキイ種苗株式会社 研究農場 副農場長), 布目司博士 (現農研機構 野菜花き研究部門 ゲノム解析ユニット長) には, SSR 濃縮ライブラリー作製や SSR 検出方法について快くご教授を賜った。第 4 章の研究では, かずさ DNA 研究所 磯部祥子博士 (現植物ゲノム・遺伝学研究室長), 平川英樹博士 (現情報解析施設 施設長) には, ニラ SSR マーカーの開発において快く研修を受け入れていただき, ご助言やご協力を賜った。同じくかずさ DNA 研究所 笹本茂美氏, 窪岡久乃氏, 南千春氏にはニラ SSR マーカー作製においてご協力いただいた。ここに深く感謝の意を表する。

栃木県農業試験場 遺伝子工学研究室 天谷正行博士 (現経営技術課長) には, イチゴ品種識別技術の開発およびイチゴ SSR マーカーの開発にご助言, ご協力をいただいた。生井潔博士 (現上都賀農業振興事務所) には, イチゴ EST-SSR およびニラ SSR マーカー開発においてご助言, ご協力をいただいた。小林俊一博士 (現生物工学研究室) にはイチゴの品種識別技術の開発にご助言, ご協力いただいた。中澤佳子氏 (現生物工学研究室長) には, イチゴ炭疽病耐病性連鎖マーカー解析にご協力いただいた。また, 現室長として本論文の執筆環境を整えていただいた。ここに心より感謝申し上げる。

栃木県農業試験場 生物工学研究室 若樹睦子氏 (現病理昆虫研究室) にはニラ SSR マーカーの開発, 遺伝子工学研究室 柏谷祐樹氏 (現生物工学研究室) にはイチゴ品種識別マーカーの開発, 飯村一成氏 (現いちご研究所) にはイチゴ炭疽病耐病性連鎖マーカー解析に共同研究者として多大なるご協力いただいた。また, 遺伝子工学研究室 阿久津操氏 (現分析チーム), 分析チーム 田村茂子氏には実験補助やサンプリング, 栽培管理をしていただいた。ここに厚く感謝申し上げる。

生物工学研究室在籍された皆様にはサンプリングおよび実験補助をしていただいた。また, いちご研究所および野菜研究室に在籍された皆様には試験材料の提供およびサンプリングにご協力していただいた。ここに謹んで感謝申し上げます。

最後に、芳賀農業振興事務所経営普及部いちご園芸課 (2008~2010 年) および上都賀農業振興事務所経営普及部野菜課 (2011~2012 年) の在籍期間に懇切丁寧にイチゴおよびニラの栽培技術、現地での問題点を教えていただいた生産者や関係機関の皆様、諸先輩の皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 赤木博・大和田常晴・川里宏・野尻光一・安川俊彦・長修・加藤昭 (1985) イチゴ新品種「女峰」について. 栃木農試研報 31: 29-41.
- Akiyama Y., Yamamoto Y., Ohmido N., Ohshima M. and Fukui K. (2001) Estimation of the nuclear DNA content of strawberries (*Fragaria* spp.) compared with *Arabidopsis thaliana* by using dual-step flow cytometry. Cytologia 66: 431-436.
- Aljanabi S.M., Forgetand L. and Dookun A. (1999) An improved and rapid protocol for isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. Plant Mol. Biol. Repr. 17: 1-8.
- 天谷正行・大橋一夫・木村栄・小栗尚子・小島昭夫 (1995) ネギとニラの種間雑種植物の育成. 栃木農試研報 43: 87-94.
- 天谷正行 (1996) エステラーゼ酵素多型を利用したニラ交雑個体の選抜. 栃木農試研報 44: 49-54.
- 天谷正行・中澤佳子・松本紀子・飯村一成 (2010) パルクセグレガント法によるニラ四倍体 (*Allium ramosum*, *syn. A. tuberosum* $2n=4x=32$) の単為発生性連鎖マーカーの開発. 育学研 12: 73-80.
- Anciro A., Mangandi J., Verma S., Peres N., Whitaker V.M. and Lee S. (2018) *FaRCg1*: a quantitative trait locus conferring resistance to *Colletotrichum* crown rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in octoploid strawberry. Theor. Appl. Genet. 131: 2167-2177.
- Baldwin S., Pither-Joyce M., Wrigth K., Chen L. and McCallum J. (2012) Development of robust genomic simple sequence repeat markers for estimation of genetic diversity within and among bulb onion (*Allium cepa* L.) populations. Mol. Breeding 30: 1401-1411.
- Baranyi M. and Greilhuber J. (1999) Genome size in *Allium*: in quest of reproducible data. Ann. Bot. 83: 687-695.
- Bassil N.V., Davis T.M., Zhang H., Ficklin S., Mittmann M., Webster T., Mahoney L., Wood D., Alperin E.S., Rosyara U.R., Koehorst-Vanc Putten H., Monfort A., Sargent D.J., Amaya I., Denoyes B., Bianco L., van Dijk T., Pirani A., Iezzoni A., Main D., Peace C., Yang Y., Whitaker V., Verma S., Bellon L., Brew F., Herrera R. and van de Weg E. (2015) Development and preliminary evaluation of a 90 K Axiom® SNP array for the allo-octoploid cultivated strawberry *Fragaria* × *ananassa*. BMC Genomics 16: 155.
- Bloor P.A., Barker F.S., Watts P.C., Noyes H.A. and Kemp S.J. (2001) Microsatellite libraries by enrichment. <http://www.genomics.liv.ac.uk/animal/research/microsatellite.pdf>.
- Bringham R.S. (1990) Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. HortScience 25: 879-881.
- Chand S.K., Nanda S., Rout E. and Joshi R.K. (2015) Mining, characterization and validation of EST derived microsatellites from the transcriptome database of *Allium sativum* L. Bioinformation 11: 145-150.
- Cunha C.P., Hoogerheide E.S.S., Zucchi M.I., Monteiro M. and Pinheiro J.B. (2012) New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* (Alliaceae). Am. J. Bot. 99: e17-e19.
- Degani C., Rowland L.J., Levi A., Hortynski J.A. and Galletta G.J. (1998) DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 102: 247-253.
- Degani C., Rowland L.J., Saunders J.A., Hokanson S.C., Ogden E.L., Golan-Goldhirsh A. and Galletta G.J. (2001) A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. Euphytica 117: 1-12.
- Edger P.P., Poorten T.J., VanBuren R., Hardigan M.A., Colle M., McKain M.R., Smith R.D., Teresi S.J., Nelson A.D.L., Wai C.M., Alger E.I., Bird K.A., Yocca A.E., Pumpin N., Ou S., Ben-Zvi G., Brodt A., Baruch K., Swale T., Shiue L., Acharya C.B., Cole G.S., Mower J.P., Childs K.L., Jiang N., Lyons E., Freeling M., Puzey J.R. and Knapp S.J. (2020) Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. Nat. Genet. 51: 541-547.
- 榎宏征・西村哲・水藤百江・布目司・野口裕司 (2017) イチゴ属植物の炭疽病抵抗性関連マーカーとその利用. 特許登録 6253132.
- Folta K.M., Staton M., Stewart P.J., Jung S., Bies D.H.,

- Jesdurai C. and Main D. (2005) Expressed sequence tags (ESTs) and simple sequence repeat (SSR) markers from octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). *BMC Plant Biol.* 5: 12.
- 福岡浩之・布目司・大山暁男 (2003) ナス品種識別のためのSSRマーカーによる省力的DNA多型検出法の検討. *育学究* 5(2):258.
- Fukuoka H., Nunome T., Minamiyama Y., Kono I., Namiki N. and Kojima A. (2005) read2Marker: a data processing tool for microsatellite marker development from a large data set. *BioTechniques* 39: 472-476.
- Gardner M.G., Cooper S.J.B., Bull C.M. and Grant W.N. (1999) Isolation of microsatellite loci from a social lizard, *Egernia stokesii*, using a modified enrichment procedure. *J. Hered.* 90: 301-304.
- Gouzy, J., S. Carrere and T. Schiex (2009) FrameDP: sensitive peptide detection on noisy matured sequences. *Bioinformatics* 25: 670-671.
- 萩原章弘 (1992) 章姫. 品種登録 2991
- 長谷部健一・羽賀豊・鈴木滋雄・越川兼行・加藤弘文・桑原輝夫 (1997) イチゴ新品種「濃姫 (品種登録申請中)」について. *岐阜農総研研報* 10:1-5.
- 橋田弘一・石川成寿・手塚紳浩 (1988) 栃木県におけるイチゴ炭そ病の発生実態. *関東病虫研報* 35: 83-84.
- Hirakawa H., Shirasawa K., Kosugi S., Tashiro K., Nakayama S., Yamada M., Kohara M., Watanabe A., Kishida Y., Fujishiro T., Tsuruoka H., Minami C., Sasamoto S., Kato M., Nanri K., Komaki A., Yanagi T., Guoxin Q., Maeda F., Ishikawa M., Kuhara S., Sato S., Tabata S. and Isobe S.N. (2014) Dissection of the octoploid strawberry genome by deep sequencing of the genomes of *Fragaria* species. *DNA Res.* 21: 169-181.
- Holland J.B., Helland S.J., Sharopova N. and Rhyne D.C. (2001) Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat. *Genome* 44: 1065-1076.
- 本多藤雄・大和茂八・二井内清之・天野智文 (1974) イチゴ新品種「はるのか」の育種に関する研究. *野菜試報* C1:1-14.
- 本多藤雄・岩永喜裕・松田照男・森下昌三・伏原肇 (1985) イチゴ新品種「とよのか」の育種に関する研究. *野菜試報* C8:39-57.
- Huang X. and Madan A. (1999) CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-877.
- 飯村一成・中澤佳子・天谷正行 (2011) イチゴ「アスカウェイブ」における萎黄病耐病性に関する連鎖解析. *育学研* 13(1): 295.
- 飯村一成・田崎公久・中澤佳子・天谷正行 (2013) QTL解析によるイチゴ炭疽病耐病性遺伝子領域の検索. *育学研* 15:90-97.
- 稲田稔・石井英夫・Chung Wen-Hsin・山田智子・山口純一郎・古田明子 (2008) ストロビルリン系薬剤耐性イチゴ炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*)] の発生. *日植病報* 74:114-117.
- 稲田稔・山口純一郎・古田明子 (2009) 佐賀県におけるベンズイミダゾール系薬剤およびジエトフェンカルブ剤耐性イチゴ炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*) の発生と各種薬剤の防除効果. *九病虫研会報* 55:31-36.
- 石原良行・高野邦治・植木正明・栃木博美 (1996) イチゴ新品種「とちおとめ」の育成. *栃木農試研報* 44:109-123.
- 石川成寿・中山喜一・大兼善三郎 (1989a) イチゴ炭そ病に関する研究 第2報 本病菌の越冬形態について. *栃木農試研報* 36:37-42.
- 石川成寿・田村恭志・中山喜一・大兼善三郎 (1989b) イチゴ炭そ病に関する研究 第4報 イチゴ炭そ病の防除法. *栃木農試研報* 36:49-58.
- 石川成寿・萩原廣・中山喜一・国安克人 (1990) 罹病残渣の嫌氣的発酵によるイチゴ炭そ病菌の不活性化. *関東病虫研報* 37:111-112.
- 石川成寿・中山喜一・常見謙史 (1993) ポット育苗時の底面給水法によるイチゴ炭そ病の蔓延抑制効果及び本病菌分生胞子の飛散に及ぼす風と水の影響. *関東病虫研報* 40:63-68.
- Ishikawa S. (2003) Method to diagnose latent infection by *Glomerella cingulata* in strawberry plants using ethanol. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 372-377.
- 石川成寿 (2005) イチゴ炭疽病の病原菌, 生態ならびに環境に配慮した防除技術開発. *栃木農試研報* 54: 1-187.
- Isobe S.N., Hirakawa H., Sato S., Maeda F., Ishikawa M., Mori T., Yamamoto Y., Shirasawa K., Kimura M., Fukami M., Hashizume F., Tsuji T., Sasamoto S., Kato M., Nanri K., Tsuruoka H., Minami C., Takahashi C., Wada T., Ono A., Kawashima K., Nakazaki N., Kishida Y., Kohara M., Nakayama S., Yamada M., Fujishiro T.,

- Watanabe A. and Tabata S. (2013) Construction of an integrated high density simple sequence repeat linkage map in cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) and its applicability. DNA Res. 20: 79-92.
- 紙谷元一・竹内徹・楠目俊三 (2004) DNA 多型による白インゲンマメ品種「雪手亡」の識別. 育学研 6: 29-32.
- Kawaguchi M., Motomura T., Imaizumi-Anraku H., Akao S. and Kawasaki S. (2001) Providing the basis for genomics in *Lotus japonicus*: the accessions Miyakojima and Gifu are appropriate crossing partners for genetic analyses. Mol. Gen. Genomics. 266: 157-166.
- Kawasaki S. and Murakami Y. (2000) Genome analysis of *Lotus japonicas*. J. Plant Res. 113: 497-506.
- 川里宏 (2008) 栃木のいちご半世紀. 自費出版
- 北村八祥・森利樹・小堀純奈・山田信二・清水秀巳 (2015) 極早生性を有するイチゴ炭疽病抵抗性品種「かおり野」の育成と普及. 園学研 14: 89-95.
- 木村栄 (1995) きぬみどり. 品種登録 4363.
- 木庭卓人・狩野友香・石川正美 (2007) イチゴの減数分裂 種子繁殖性イチゴ品種の育成に向けて. 食と緑の科学 61: 61-65.
- 小林泰弘・植木正明・須永哲央・直井昌彦・癸生川真也・稲葉幸雄・家中達広・岡村昭子・重野貴・畠山昭嗣・永嶋麻美・豊田明奈 (2015) 四季成り性イチゴ新品種「なつおとめ」の育成. 栃木農試研報 73: 77-84.
- Kofler R., Schlötterer C. and Lelley T. (2007) SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation. Bioinformatics, 23: 1683-1685.
- Kojima A. and Nagato Y. (1992a) Diplosporous embryo-sac formation and the degree of diplospory in *Allium tuberosum*. Sex. Plant Reprod. 5: 72-78.
- Kojima A. and Nagato Y. (1992b) Pseudogamous embryogenesis and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum*. Sex. Plant Reprod. 5: 79-85.
- Kunihisa M., Fukino N. and Matsumoto S. (2003) Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. Euphytica 134: 209-215.
- Kunihisa M., Fukino N. and Matsumoto S. (2005) CAPS markers improved by cluster-specific amplification for identification of octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars, and their disomic inheritance. Theor. Appl. Genet. 110: 1410-1418.
- 國久美由紀 (2008) 栽培イチゴにおけるゲノム特異的 DNA マーカーの開発と品種識別技術への応用. 筑波大学大学院生命環境科学研究科博士 (農学) 学位論文.
- Lee G., Kwon S., Park Y., Lee M., Kim H., Lee J., Lee S., Gwag J., Kim C. and Ma K. (2011) Cross-amplification of SSR markers developed from *Allium sativum* to other *Allium* species. Scientia Horticulturae 128: 401-407.
- Lerceteanu-Köhler E., Guerin G. Laigret F. and Denoyes-Rothan B. (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) using AFLP mapping. Theor. Appl. Genet. 107: 619-628.
- 松元哲・國久美由紀・吹野伸子 (2003) 品種識別のためのイチゴの多検体 DNA 抽出法. 園学雑 72 (別 2): 251.
- 松元哲 (2004) 韓国のイチゴ生産事情. 施設および園芸 126: 59-63.
- Mercado J.A., Mansouri I.E., Jiménez-Bermúdez S., Pliego-Alfaro F. and Quesada M.A. (1999) A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35: 152-153.
- 峯岸正好・内藤潔・前川寛之 (1994) イチゴ新品種「アスカウェイブ」の育成ならびに栽培特性. 奈良農試研報 25: 9-19.
- 三井寿一・藤田幸一・末吉孝行・伏原肇 (2003) イチゴ新品種「福岡S6号」, 「福岡S7号」の育成. 福岡農総試研報 22: 61-68.
- 森利樹・戸谷孝・藤原孝之 (2000) 炭そ病抵抗性イチゴ新品種「サンチーゴ」の育成. 三重農技研報 27: 27-36.
- 森利樹 (2001) イチゴにおける炭そ病抵抗性の遺伝と選抜反応. 三重農技研報 28: 15-21.
- Mori T., Kitamura H. and Kuroda K. (2005) Varietal differences in *Fusarium* wilt-resistance in strawberry cultivars and the segregation of this trait in F1 hybrids. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 74: 57-59.
- 森下昌三・望月龍也・野口祐司・曾根一純・山川理 (1997) 促成栽培用イチゴ新品種「さちのか」の育成経過とその特性. 野菜茶試研報 12: 91-115.
- 森下昌三・本城正憲・濱野恵・山崎浩道・矢野孝喜 (2012) 24 時間日長下における栽培イチゴの四季成り性の遺伝解析. 園学研 11: 301-307.
- Nagano S., Shirasawa K., Hirakawa H., Maeda F., Ishikawa M. and Isobe S.N. (2017) Discrimination of candidate

- subgenome-specific loci by linkage map construction with an S₁ population of octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*). BMC Genomics 18: 374.
- 中澤佳子・生井 潔・酒井美幸・田崎公久・小林俊一・小玉弘恵・土屋久子・木村栄・室井栄一・石原良行・大島一則・天谷正行 (2005) RAPDマーカーを用いたニラ交雑個体の選抜技術の確立. 栃木農試研報 55:27-32.
- 中澤佳子・生井潔・小島昭夫・小林俊一・田崎公久・天谷正行 (2006) 四倍体ニラにおける単為発生性の遺伝様式. 育学研 8:89-98.
- 中澤佳子・若槻睦子・飯村一成・天谷正行 (2012) SSRマーカーによる8倍体イチゴ品種・系統の識別と親子鑑定への利用の可能性. 育学研 14(1):277.
- 中田奈々子・鈴木健・深見正信 (2018) PCRを用いたイチゴ苗の炭疽病検査技術の効率化. 千葉農林総研研報 10:55-62.
- 生井潔・田崎公久・柏谷祐樹・中澤佳子 (2013) ニラ遺伝子の類縁関係解析に用いるEST-SSRマーカーの作出. 育学研 15 (別1):32.
- Namai K., Matsushima Y., Morishima M., Amagai A. and Natsuaki T. (2013) Resistance to anthracnose is decreased by tissue culture but increased with longer acclimation in the resistant strawberry cultivar. J. Gen. Plant Pathol. 79: 402-411.
- 成川昇・石橋光治・荻原佐太郎・土岐和久 (1981) イチゴ新品種「麗紅」の育成経過と特性. 千葉農試研報 22:45-55.
- 西田朝美 (1993) レッドパール. 品種登録 3755.
- Noguchi Y., Mochizuki T. and Yamakawa O. (1994) Petiole dip inoculation is a convenient method for screening strawberry for resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae*. Bull. Natl. Res. Inst. Veg. Ornam. Plants and Tea Japan A9: 13-26.
- 野村貴浩・天谷正行・田崎公久・楠本憲一・浅尾浩史 (2005) マルチプレックス PCR によるイチゴ品種「アスカルビー」の識別. 近中四農研 7:37-40.
- 農林水産省 (2018) 平成 29 年生産農業所得統計
- 農林水産省 (2019) 平成 30 年産野菜生産出荷統計.
- Nunome T., Suwabe K., Ohyama A. and Fukuoka H. (2003) Characterization of trinucleotide microsatellites in eggplant. Breed. Sci. 53: 77-83.
- Nunome T., Negoro S., Miyatake K., Yamaguchi H. and Fukuoka H. (2006) A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. Plant Mol. Biol. Report. 24: 305-312.
- Nunome T., Negoro S., Kono I., Kanamori H., Miyatake K., Yamaguchi H., Ohyama A. and Fukuoka H. (2009) Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.). Theor. Appl. Genet. 119: 1143-1153.
- Ohyama A., Asamizu E., Negoro S., Miyatake K., Yamaguchi H., Tabata S. and Fukuoka H. (2009) Characterization of tomato SSR markers developed using BAC-end and cDNA sequence from genome databases. Mol. Breed. 23: 685-691.
- 岡山健夫 (1989) 奈良県におけるイチゴ炭そ病の発生実態と薬剤防除について. 奈良農試研報 20:79-85.
- 岡山健夫 (1993) 加温によるイチゴ炭そ病潜在感染株の検定. 奈良農試研報 24:41-46.
- Okayama K. (1993) Effects of rain shelter and capillary watering on disease development of symptomless strawberry plants infected with *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*). Ann. Phytopath. Soc. Japan 59: 514-519.
- 岡山健夫・平山喜彦・西崎仁博 (2007) 選択培地によるベノミル剤耐性イチゴ炭疽病菌 *Glomerella cingulata* の潜在感染株及び育苗培養土からの検出. 日植病報 73:155-161.
- 沖村誠・野口裕司・望月龍也・曾根一純・北村恵美 (2004) 炭そ病抵抗性の「いちご中間母本農 2 号」の育成とその特性. 園学研 3:257-260.
- 沖村誠・曾根純一・野口裕司・望月龍也・北谷恵美 (2010) カレンベリー. 品種登録 19474.
- 大橋隆 (2019) 「いちご王国とちぎ」を支える新品種・新技術の開発. 表面と真空 62:161-163.
- 大橋隆・小林泰弘・重野貴・畠山昭嗣・中西達郎・飯村一成・植木正明・豊田明奈・鶴見理沙・永嶋麻美・齋藤容徳・小島夏実・大橋幸雄 (2020) イチゴ新品種「栃木 i37 号」の育成. 栃木農試研報 81:83-103.
- 大島一則・青木雅子・佐藤隆二・齋藤容徳・仁平祐子・稲葉幸雄・天谷正行・松本紀子・中澤佳子・若槻睦子・生井 潔 (2017) 花粉親特異的DNA マーカーによる選抜を介したニラ新品種「ゆめみどり」の育成. 園学研 16:401-408.
- 大坪研一・中村澄子・今村太郎 (2002) 米の PCR 品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発. 日農化会誌 76:388-397.
- Radhika V., Reddy D.C.L., Veeregowda R. and Aswath C.

- (2013) *In silico* identification and validation of microsatellite markers from onion EST sequences. J. Hort. Sci. Biotech. 88: 664-670.
- Rozen S. and Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol. Biol. 132: 365-86.
- 劉耀光 (1997) TAIL-PCR による未知 DNA 配列の増幅とシーケンシング. '新版植物の PCR 実験プロトコール'. p. 83-89. 島本功・佐々木卓治編著, 秀潤社. 東京.
- 齋藤彰 (2004) DNA マーカーによるイグサ品種の識別. 農及園 79:168-174.
- 齋藤容徳・大島一則・松本紀子・癸生川真也・中澤佳子・天谷正行 (2012) 両性生殖性系統と単為発生性連鎖マーカーを利用したニラ四倍体F₁ 集団における休眠性および抽だい期の変動. 栃木農試研報 68: 15-22.
- 鮫島國親・小山田耕作・中庸一・江口洋・加藤善啓 (2002) 促成栽培用イチゴ新品種「さつまおとめ」の育成経過とその特性. 鹿児島農試研報 30:27-35.
- Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nat. Biotechnol. 18: 233-234.
- Scott K.D., Egger P., Seaton G., Rossetto M., Ablett E.M., Lee L.S. and Henry R.J. (2000) Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor. Appl. Genet. 100: 723-726.
- 重野貴・直井昌彦・植木正明・家中達広・岡村昭子・須永哲央・小林泰弘・永嶋麻美・稲葉幸雄・畠山昭嗣・癸生川真也・豊田明奈・中西達郎 (2015) 極大果イチゴ品種「栃木i27号」の育成. 栃木農試研報 73:85-100.
- 下村克己・三井寿一・藤田幸一・佐藤公洋 (2005) Amplified Fragment Length polymorphism 法によるイチゴ・福岡 S6 号の品種識別. 福岡農総試研報 24: 43-47.
- Shimomura K. and Hirashima K. (2006) Development and characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75: 399-402.
- 新村和則・金川寛・三上隆司・福森武 (2005) イネ品種判別用マルチプレックス PCR プライマーセットの開発. 育学研 7:87-94.
- 執行正義・佐藤修正・Abdelrahman, Mostafa・平田翔・平川英樹・田中啓介・峯洋子・杉山信男・山内直樹 (2015) ネギ属パイオリソースを用いたトランスクリプトーム解析データの活用. 園学研 14 (別2):154.
- Song Y.S., Suwabe K., Wako T., Ohara T., Nunome T. and Kojima A. (2004) Development of microsatellite markers in bunching onion (*Allium fistulosum* L.). Breed. Sci. 54: 361-365.
- Suwabe K., Iketani H., Nunome T., Ohyama A., Hirai M. and Fukuoka H. (2004) Characteristics of microsatellites in *Brassica rapa* genome and their potential utilization for comparative genomics in Cruciferae. Breed. Sci. 54: 85-90.
- 鈴木恵美子・藤本里美・植木正明・重野貴・若槻睦子・田崎公久・中澤佳子・生井潔 (2015) イチゴ品種「なつおとめ」の四季成り性に連鎖するDNAマーカーの作出. 園学研 14(1):148.
- 鈴木健・田中千華・伊藤靖之・植松清次・平山善彦・岡山健夫 (2008) イチゴ炭疽病に対する特異的プライマーの作成. 日植病報 74:198.
- 泰松恒夫・信岡尚・西本登志・安川人央 (2000) アスカルビー. 品種登録7651.
- 武井幸雄・湯谷譲 (2001) イチゴの新品種「とねほっぺ」. 群馬園試研報 6:47-57.
- 武井幸雄・多々木英男・清水正興・湯谷譲 (2007) イチゴ新品種「やよいひめ」の育成. 群馬農技セ研報 4: 28-32.
- 竹次稔 (2004) 育成者権の侵害を巡る動き. 農及園 79: 199-204.
- 竹内隆・藤浪裕幸・川田智明・松村雅彦 (1999) イチゴ新品種「紅ほっぺ (仮称)」の育成経過と主特性. 静岡農試研報 44:13-24.
- 田中政信・森欣也・中島寿亀・松尾孝則・田中龍臣・中村典義 (2001) さがほのか. 品種登録8839.
- 田尻一裕, 三原順一, 石田豊明, 西本太 (2007) 促成栽培用イチゴの新品種“熊研い548”の育成. 熊本農研セ研報 14:42-48.
- 田崎公久・柏谷祐樹・小林俊一・天谷正行 (2008a) 「とちおとめ」および「とちひめ」識別用プライマーセットの開発. DNA多型 16:118-129.
- 田崎公久・柏谷祐樹・小林俊一・天谷正行 (2008b) 日本の主要イチゴ品種を識別するマルチプレックスPCRプライマーセットの開発. 育学研 10:111-115.
- 手塚信夫・牧野孝宏 (1989) イチゴ炭そ病の発生様相と防除. 関東病虫研報 36:92-94.
- 栃木博美・石原良行・高野邦治・植木正明・高際英明 (2001) イチゴ新品種「とちひめ」の育成. 栃木農試研

- 報 50:27-37.
- Tsukazaki H., Nunome T., Fukuoka H., Kanamori H., Kono I., Yamashita K., Wako T. and Kojima A. (2007) Isolation of 1, 796 SSR clones from SSR-enriched DNA libraries of bunching onion (*Allium fistulosum*). *Euphytica* 157: 83-94.
- Tsukazaki H., Yaguch S., Sato S., Hirakawa H., Katayose Y., Kanamori H., Kurita K., Itoh T., Kumagai M., Mizuno S., Hamada M., Fukuoka H., Yamashita K., McCallum J.A., Shigyo M. and Wako T. (2015) Development of transcriptome shotgun assembly-derived markers in bunching onion (*Allium fistulosum*). *Mol. Breeding* 35: 55.
- Tyrka M., Dziadczyk P. and Hortynski J.A. (2002) Simplified AFLP procedure as a tool for identification of strawberry cultivars and advanced breeding lines. *Euphytica* 125: 273-280.
- 鶴見理沙・中西達郎・石原良行・大橋 隆・小島夏実・齋藤容徳・小林泰弘・畠山昭嗣・飯村一成・半田有宏 (2020) 白イチゴ新品種「栃木iW1号」の育成. 栃木農試研報 81:67-82.
- 植木正明・長修・川里宏・赤木博・高野邦治 (1993) イチゴ新品種「栃の峰」について. 栃木農試研報 40:99-108.
- 植木正明・大橋幸雄・重野貴・出口美里・高際英明・栃木博美・深沢郁男・癸生川真也・稲葉幸雄 (2006) 四季成り性イチゴ新品種「とちひとみ」の育成. 栃木農試研報 58:47-57.
- Victoria F.C., Maia L.C. and Oliveira A.C. (2011) *In silico* comparative analysis of SSR markers in plants. *BMC Plant Biology* 11: 15.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. and Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- 若槻睦子・田口久美子・中澤佳子・田崎公久・平川英樹・磯部祥子・飯村一成・天谷正行・松本紀子・大島一則・生井潔 (2017) 四倍体ニラにおける複相大孢子形成性連鎖マーカーの作出. 育学研 19(2): 35.
- Yamamoto T., Kimura T., Sawamura Y., Kotobuki K., Ban Y., Hayashi T. and Matsuta M. (2001) SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor. Appl. Genet.* 102: 865-870.
- 山崎睦子 (2014) 高知県におけるニラとショウガの土壌伝染性病害の発生生態と防除に関する研究. 東京農工大大学院連合農学研究科博士 (農学) 学位論文.
- Zalapa J.E., Cuevas H., Zhu H., Steffan S., Senalik D., Zeldin E., McCown B., Harbut R. and Simon P. (2012) Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. *Am. J. Bot.* 99: 193-208.
- Zhou S.M., Chen L., Liu S., Wang X. and Sun X. (2015) *De Novo* assembly and annotation of the Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler ex Spr.) transcriptome using the Illumina platform. *PLOS ONE* 10: e133312.