

8 倍体イチゴ品種・系統を識別する SSR マーカーの開発と利用

中澤佳子・田崎公久¹⁾・飯村一成²⁾・田村有紀子・若槻睦子・天谷正行³⁾

摘要：イチゴは栃木県の園芸を代表する作物であり、栽培品種は本県育成品種が中心である。本研究では、なつおとめや栃木 i27 号の育成者権保護を目的として、2010~2011 年に、とちおとめ由来の genomic-SSR マーカー及び EST-SSR マーカーの中から、品種識別に適した SSR マーカーを 7 種類選定した。それらのマーカーは、それぞれ異なる相同染色体上に位置し、2 倍体的な挙動を示す共優性マーカーであることから、育成品種の親子鑑定にも利用可能であった。また、国内外の 137 品種・系統すべてで増幅し、女峰と新女峰(女峰の培養変異株)以外の品種・系統については、7 種類のうち 4 種類の組合せで識別が可能であった。マーカー検出は、ポストラベル法による PCR を行い、DNA シーケンサーを用いた。2018 年に新品種栃木 iW1 号、栃木 i37 号が育成され、新品種を含む 24 品種・系統を追加したところ、5 種類のマーカー組合せで識別が可能で、新品種にすぐに利用できる汎用性の高いマーカーであることが実証された。さらに、迅速な DNA 鑑定に対応するため、簡易な DNA 抽出法を用いた検定法を確立した。

キーワード：SSR マーカー、親子鑑定、イチゴ、品種識別、ポストラベル法

Development and utilization of SSR markers identifying octoploid strawberry cultivars and breeding lines

Yoshiko NAKAZAWA, Kimihisa TASAKI, Kazunari IIMURA, Yukiko TAMURA, Mutsuko WAKAMASU,
Masayuki AMAGAI

Summary: Strawberry is a representative crop of horticulture in Tochigi Prefecture, and the cultivars bred by the prefecture have exclusively been cultivated in the prefecture. The present study was carried out to protect the breeder's rights of 'Natsuotome' and 'Tochigi i27' in 2010 – 2011. Seven SSR markers suitable for cultivar identification were selected from 'Tochiotome'-derived genomic-SSR markers and EST-SSR markers. These markers were located on different homologous chromosomes, and co-dominant showing diploid behavior, which indicated additional use as parentage analysis of breeding cultivars. The markers enabled amplification of all of the 137 domestic and foreign cultivars and strains tested. The combinations of 4 out of the 7 markers additionally allowed the distinction of the cultivars and strains except for 'Nyoho', and 'Shinnyoho', which was culture mutant of the former. These markers were detected with a DNA sequencer following PCR using post-labeling method. In 2018 the combinations of the 5 markers provided the distinction of additional 24 cultivars and strains containing new cultivars 'Tochigi iW1' and 'Tochigi i37', which confirmed the extreme versatility of the markers. In addition, we established the analysis method using a simple DNA extraction technique for rapid identification.

Key words: SSR marker, parentage analysis, strawberry, cultivar identification, post-labeling method

I 緒言

イチゴは栃木県を代表する作物であり、作付面積 518ha、収穫量 22,700t(農林水産統計データ「野菜生産出荷統計(令和 2 年産)」)、産出額 238 億円(農林水産統計データ「生産農業所得統計(令和 2 年)」)で、特に収穫量については 1968 年産から 2020 年産の 53 年間連続で全国一位である。栽培品種は本県育成品種が中心となっており、これまでに、女峰(赤木ら, 1985)、新女峰(高野ら, 1989)、栃の峰(植木ら, 1993)、栃木県内はもとより国内で最も多く生産されているとちおとめ(石原ら 1996)、観光栽培用品種とちひめ(植木ら, 2001)、夏秋採り用品種とちひとみ(植木ら, 2006)、なつおとめ(小林ら, 2015)、贈答用品種として極めて大果で、収量性や外観品質に優れた栃木 i27 号(スカイベリー, 重野ら, 2015)を育成してきた。これらの品種は、種苗登録することで育成者権が与えられ、知的財産として保護されるが、ブランド農産物は高値で取引されるため、品種名の偽装や無断栽培など育成者権の侵害が問題となっている。

イチゴの品種識別法に関する研究は、2000 年代初頭、日本国内で育成された品種の苗が違法に海外に持ち出され、栽培後、その収穫物が輸入された事例が報告されたことから始まった。DNA マーカーによるイチゴの品種識別法としては、cleaved amplified polymorphic sequences(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 and Hirashima, 2006, Honjo *et al.*, 2011)を用いた技術が報告されている。栃木県でも、田崎ら(2008a)が、とちおとめ、とちひめの育成者権保護を目的に、RAPD-STS(sequence tagged site)及び 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、田崎ら(2008b)は、違法輸入農産物に対する抑止力とするため、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。

その後、イチゴの品種開発は全国で盛んに行われ、各地で新品種が誕生し、輸出もされるようになった。本県では、2009 年になつおとめ、2011 年に栃木 i27 号が品種登録出願されたことを契機に、より広範囲の品種に対応でき、新品種にもすぐに利用できる DNA マーカーの開発の必要性が高まった。

イチゴ栽培種(*Fragaria* × *ananassa*)は 8 倍体($2n=8x=56$)と非常に高い倍数性を持ち、そのゲノム構造は、國久(2008)のゲノム特異的な CAPS マーカーの研究により、

Bringhurst(1990)が提唱した AAA'A'BBB'B'説が有力である。さらに、SSR マーカーを用いたイチゴの染色体数($n=28$)と同数に収束した連鎖地図が作成され、異質 8 倍体であることが示唆されている(Sargent *et al.*, 2012, Isobe *et al.*, 2013)。

イチゴのゲノム解析では、栽培種に先立ち、2 倍体野生種である *F. vesca* の全ゲノム解読が発表された(Shuaev, *et al.*, 2011)。その後、かずさ DNA 研究所を中心とした日中の研究グループによって、*F. vesca* のゲノムを参考にして 8 倍体イチゴの全ゲノムが解読されている(Hirakawa *et al.*, 2014)。

2005~2007 年に、イチゴ連鎖地図作成のため、とちおとめ由来の Genomic-SSR マーカー及び EST(expressed sequence tag)-SSR マーカーの大量開発を行った(田崎, 2020)。さらに、それらのマーカーは、イチゴ炭疽病耐病性遺伝子領域の QTL 解析及びイチゴ萎黄病抵抗性遺伝子領域の QTL 解析に利用された(飯村ら, 2012, 2021, 田崎, 2020)。本研究では、2010~2011 年に、それらの SSR マーカー情報を利用して、本県育成品種のブランド価値を守るために、新品種や海外品種も識別可能な 7 種類の品種識別用マーカーを開発した。それらのマーカーは品種間多型性が高く、2 倍体的な挙動を示す共優性マーカーであった。

2018 年には、白色果栃木 iW1 号(ミルキーベリー, 鶴見ら, 2020)、極早生でイチゴ萎黄病耐病性の栃木 i37 号(とちあいか, 大橋ら, 2020)が品種登録出願されたため、7 種類の品種識別用マーカーによって、新品種や近縁種を識別できることを明らかとした。また、迅速に鑑定が行えるように、簡易な DNA 抽出法による検定法も確立したので報告する。

II 試験方法

1. 供試品種・系統及び DNA 抽出

イチゴ品種・系統は、栃木県農業試験場で保有していた 161 品種・系統を供試した(第 1 表)。DNA 抽出は、新葉約 1g を液体窒素で凍結粉碎し、Yamamoto *et al.* (2001)の Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide(CTAB)法または、新葉約 0.1g から DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)で抽出した(ただし、buffer AP1 添加時に、約 40mg の polyclarVT を加えた)。とちおとめ及び栃木 i27 号については、果実のがく片及び果肉から上記抽出法または、Noh *et al.* (2017)を一部改変したアルカリボイル法を用いて行った。

2. 供試 SSR プライマー

とちおとめ由来の Genomic-SSR 及び EST-SSR プライマー(飯村ら, 2012, 田崎, 2020)の中から、144 種類(Genomic:130, EST:14)を供試した。144 種類のうち 94 種類は、炭疽病耐病性マーカー開発のための連鎖地図作成に使用したプライマーであり、50 種類は新しく合成した Genomic-

SSR プライマーである。本研究では、シーケンサーによって多型検出を行うため、Schuelke (2000)の方法(以下、ポストラベル法)に準じて、ユニバーサル蛍光標識プライマーがアニーリングするように、フォワードプライマーの 5' 側に付加した pig-tail 配列を、M13Rv 配列(5'-caggaacagctatgacc)または M13(-21)配列(5'-tgtaaacgacggccagt)に変更した。ユニバーサル蛍光標識プライマーは M13Rv 配列に Beckman

Dye4 を標識したものまたは M13(-21)配列に Beckman Dye3 を標識したものを使用した。

3. SSR マーカーの検出

マーカーの検出は、Schuelke (2000)の方法を参考に行った。2018 年以前は、DNA 増幅酵素に Hybriplol DNA Polymerase(BIOLINE)を用いていたが、以降は、My Taq DNA

第 1 表 供試品種・系統一覧 (161品種・系統)

栃木県育成品種 (10) 栃木県育成系統 (38)				国内育成品種・系統 (103)				外国品種 (10)			
品種・系統名	品種・系統名	導入先(育成者)	導入年度	品種・系統名	導入先(育成者)	導入年度	品種・系統名	導入先	導入年度		
女峰*	アイストロ	愛知県	2004	しゅうこう	静岡県		Aptos	野菜・茶業試験場(注2000)			
新女峰	アイベリー	(愛三種苗)		春訪	千葉県	2000	Bolero	北海道立道南農試(注2000)			
栃の峰	あかしゃのみつこ	木下清和	1995	するがエース	静岡県		Chandler	キューピー	1998		
とちおとめ*	あかねつ娘	愛知県		スルガレッド	静岡県		Dauglus				
とちひめ	章姫	萩原章弘		セリーヌ	ホープ	1995	Dover*				
とちひとみ	アスカウェイブ	奈良県	1995	促成3号	野菜試(注4)		Florida69-26(野菜試(注5)	1975			
なつおとめ	アスカルビー	奈良県	1998	ダナー*			Florida693	キューピー	1989		
栃木i27号(スカイベリー)	あまおとめ	愛媛県	2006	千葉S4号(チーパベリー)	千葉県	2018	Hecker	野菜・茶業試験場(注2000)			
栃木i37号(とちあい)	あわなつか	徳島県	2008	筑紫	野菜試(注4)	1967	Selva	ベルギー	1998		
栃木iW1号(ミルキーベリー)	いちご中間母本農1号	野菜試(注4)	1995	デコルージュ	野菜試(注5)		Sweet Charlie	フランス	1999		
栃木1号	いちご中間母本農2号	野菜試(注4)	1998	てるのか	野菜試(注4)	1989					
栃木4号	いばらキッス	茨城県	2017	とねほっぺ	群馬県	1999					
栃木9号	越後姫	新潟県	1995	とよのか*	野菜試(注4)	1989					
栃木12号	エバーベリー	野菜試(注5)		なつあかり	野菜試(注5)						
栃木14号	愛媛農試V1号	愛媛県		ニューダナー	野菜試(注4)	1971					
栃木16号	王香	(山口照男)		濃姫	岐阜県	2000					
栃木17号	大石四季成り	富山県	1970	はつくに	奈良県	1983					
栃木19号	大鈴	千葉県		華かがり	岐阜県	2017					
栃木20号	大錦	みかど		はるのか	野菜試(注4)	1967					
栃木21号	大村朱	(松田昇)	1968	はるよい	野菜試(注4)						
栃木22号	尾瀬はるか	群馬県	2003	ビーストロ	愛知県	2004					
栃木23号	おとめ心	山形県	2008	東12-16	東北種苗	1995					
栃木24号	かおり野	三重県	2010	ひたち姫	茨城県	2006					
栃木26号	夏芳	キューピー	1998	ひのみね	野菜試(注4)	1989					
栃木28号	北の輝	野菜試(注5)		ひむか	宮崎県	1989					
栃木29号	熊研い548(ひのしずく)	熊本県	2004	媛育	愛媛県						
栃木30号	熊本VS03(ゆうべに)	熊本県	2017	ファーストベリー	太田宣明	1995					
栃木31号	久留米49号	野菜試(注4)		福岡S6号(あまおう)	福岡県	2005					
栃木32号	久留米63号	九州沖縄農業研究センター	2011	福羽*							
栃木33号	けいきわせ	静岡県	2000	ふさの香	千葉県	2006					
栃木34号	けんたろう	北海道立道南農試(注6)	2006	ベチカ	ホープ	2003					
栃木35号	こいのか	九州沖縄農業研究センター	2008	紅孔雀	富山県	1969					
栃木36号	紅寿	(神奈川県)		紅滝							
栃木38号	紅姫	富山県	1969	紅光	野菜試(注4)	1967					
栃木W2号	紅宝満	(福岡県)		紅富士	野菜試(注4)	1967					
系210	紅露	富山県	1970	紅ほっぺ	静岡県	2000					
系511	古都果	奈良県	2011	ベリースター	埼玉県	1975					
栃木素材2号	彩のかおり	埼玉県	1996	ベルマーレ	東北種苗	1995					
00-24-1	さがほのか	佐賀県	2000	ベルルージュ	野菜試(注5)						
00-25-1	さちのか	野菜試(注4)	1993	芳玉	徳島県						
05-108-88	さつまおとめ	鹿児島県	2004	宝交早生	埼玉県	1968					
09-48-5	さぬき姫	香川県	2005	美濃娘	岐阜県	2006					
09-52-1	サマーアミーゴ	徳島県	2017	宮崎*	野菜試(注4)	1967					
12-8-4	サマーエンジェル	長野県	2017	みよし	徳島県	1989					
14-w1-1	サマーキャンディ	宮城県	2005	もういっこ	宮城県	2005					
15-15-3	サマーティアラ	山形県	2008	八雲(幸玉と同一)*		1983					
15-15-8	サマーフェアリー	徳島県	2008	やよいひめ	群馬県	2003					
S4-1	サマープリンセス	長野県	2004	夢甘香	兵庫県	2000					
	サマーベリー	奈良県		ゆめのか	愛知県	2006					
	サンチーゴ	三重県	2000	リンダモール	(愛知県)						
	しずたから	静岡県		麗紅*	千葉県						
	しずちから	静岡県									

注1. *は、品種識別用SSRマーカーの選定において、多型検索を行った8品種
 注2. 緑色セルは、品種識別用SSRマーカーの選定に用いた48品種・系統
 注3. 橙色セルは、2019年度に品種識別用SSRマーカーのアレル型を調査した24品種・系統
 注4. 現：農研機構 九州沖縄農業研究センター
 注5. 現：農研機構 東北農業研究センター
 注6. 現：地方独立行政法人北海道立総合研究機構道南農業試験場
 注7. 空欄は、詳細が不明

Polymerase (BIOLINE)を用いた。PCR 反応組成は、0.25U My Taq DNA Polymerase, 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, 10ng 鋳型 DNA とし, 反応液量は 10μL とした。反応条件は 94℃・5 分の後, (94℃・30 秒, 56℃・45 秒, 72℃・45 秒)を 30 回繰り返す, さらに(94℃・30 秒, 53℃・45 秒, 72℃・45 秒)を 8 回繰り返した後, 72℃・7 分とした。サーマルサイクラーは, GeneAmp PCR System 9700 または Veriti (Applied Biosystems)を用いた。Dye4 標識の PCR 産物は 1/10TE で 20 倍希釈し, Dye3 標識の PCR 産物は 10 倍希釈し, 1μL の希釈液に 25μL のホルムアミド, 0.08μL の DNA SizeStandard Kit-400 (Beckman Coulter)を加えた後, シーケンサー GenomeLab GeXP (Beckman Coulter)で検出した。

4. Blast 検索

品種識別用 SSR マーカーについて, プライマー設計時に用いた濃縮ライブラリーのクローン配列及びプライマー配列をデータベースサイト Strawberry Garden (<https://strawberry-garden.kazusa.or.jp/>)の FAN_r2.3 で Blast 検索を行った。

Ⅲ 結果

1. 品種識別用 SSR マーカーの選定

144 種類の SSR プライマーを用いて, 多くの国内育成品種の祖先となっているとちおとめ, 女峰, ダナー, とよのか, 福羽, 宮崎, 八雲, 麗紅の 8 品種間で多型検索を行った。品種識別用マーカーの選定基準は, ①8 品種すべてで増幅が良く, スタッターピークが少ないこと, ②各品種で検出されるアレル数が 4 以下であること, ③8 品種のうち同じアレル型が 3 品種以下であることとした。その結果, 12 種類の SSR プライマーを一次選定した(第2表)。AluICA030253 は, 5'側に M13Rv 配列を付加したフォワードプライマーと M13Rv 配列に Beckman

Dye4 を標識した蛍光標識プライマーを用いた場合には, 増幅が悪かったが, M13(-21)配列を付加したフォワードプライマーと M13(-21)配列に Beckman Dye3 を標識した蛍光標識プライマーを用いたところ, 改善を図ることができた。同じく, RsaIGA030115 も M13Rv 配列を付加した場合は, 非特異的なピークが検出されていたが, M13(-21)配列を付加した場合には, 非特異的なピークが検出されなくなった。さらに, 8 品種のアレル型より, AluICA030103, AluICA030259 及び HaeIII CA030216 は, 複数のローカスを増幅するマーカーであると推定した。また, 一次選定した 12 種類の SSR マーカーはすべてゲノム由来で, EST 由来の SSR マーカーは, 全体的に多型性が低い傾向にあった(田崎, 2020)。

次に, 栃木県育成品種・系統及び国内主要品種を含む 48 品種・系統(第1表 緑色セル)のマーカー検出を行い, 48 品種・系統すべて安定して増幅した 7 種類の SSR プライマーを品種識別用 SSR マーカーとして選定した(第3表)。48 品種・系統のアレル型からも, AluICA030103 及び AluICA030259 は, 2つのローカスを増幅するマーカーであると推定できた(第4表)。

DNA 鑑定を行う場合, 葉だけではなく, がく片や果実(種子を含まない)から抽出した DNA を用いて分析をすることが想定されるため, とちおとめ及び栃木 i27 号について, 葉, 果実のがく片及び果肉から抽出した DNA でマーカー検出結果が異なるかどうかを確認したところ, 7 種類すべての品種識別用 SSR マーカーで組織による検出結果に違いはなかった(データ省略)。

2. 国内外の品種・系統における SSR マーカー検出

2011 年に栃木 i27 号が品種登録出願されたことから, 前述の 48 品種・系統に栃木 i27 号の近縁系統及び国内外育成 89 品種・系統(第1表 白色セル)を加えた 137 品種・系統について, 7 種類の SSR マーカーのアレル型を調査し, それら

第2表 一次選定されたSSRプライマーによる8品種の検出アレル

プライマー名	付加配列	各品種における検出アレル ^(注1) (nt)							
		とちおとめ	女峰	ダナー	とよのか	福羽	宮崎	八雲	麗紅
AluICA030103	M13Rv	250 252 272	250 252 272 299	250 252 272 299	252 272 299	252 293 299	250 252 272 299	252 272 299	252 293 299
AluICA030109	M13Rv	249	249 253	239 249	239 249	237 241	249	237 249	253 280
AluICA030253	M13(-21)	203	187 203	187 192	192 203	180 203	203	192	187 203
AluICA030259 ^(注2)	M13Rv	220 232	220	220 232	220 232	209 228	209 217	209 220	220
Hae III CA030216 ^(注3)	M13Rv	175 177	157 175	175 177	175	157 175 194	157 177	175	157 177
RsaICA030303	M13Rv	211 225	213 223	213 223	211 215	215	211 223	211	215 223
AluIGA030216	M13Rv	135	123 135	113 123	113 135	113	113 151	135 151	113 135
Hae III GA030107	M13Rv	151	151 153	153	153 165	139 153	143 165	153 165	151 153
RsaIGA030115	M13(-21)	194	182 194	178 182	180 194	182 194	180	178 180	182 194
RsaIGA030150	M13Rv	196 202	202	202 212	196	194	212 218	212	202 212
RsaIGA030153	M13Rv	171	171	171 179	171 181	179	185 189	179 183	171 179
RsaIGA030221	M13Rv	256	256	238 256	247 267	228 247	230 267	267	247

注1. シーケンサーによる検出サイズを示す

注2. 全品種に検出された190アレルを除く

注3. 全品種に検出された190及び196アレルを除く

がすべて識別可能かを検討した。

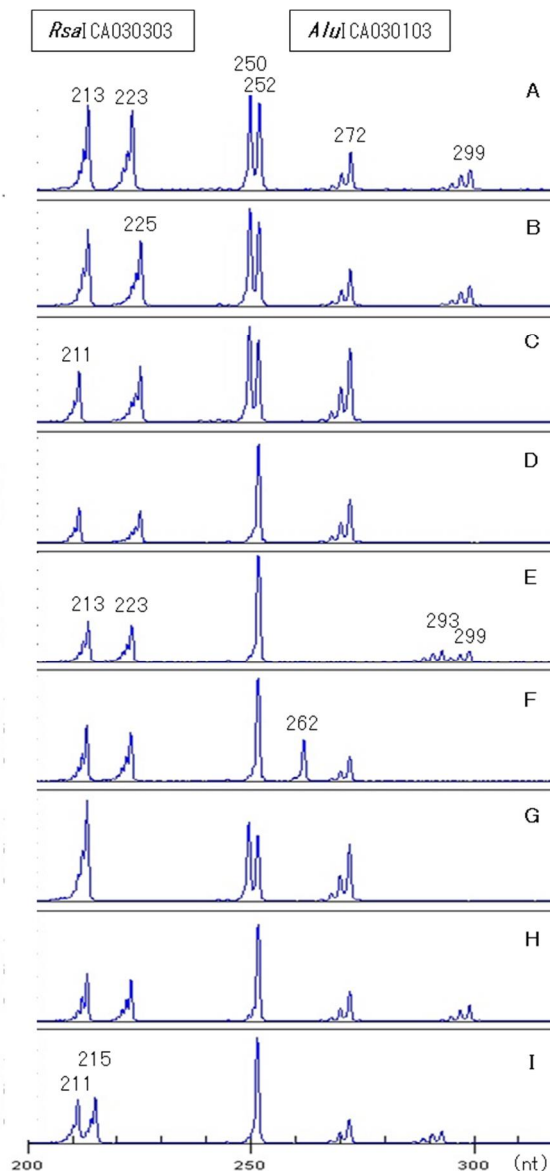
女峰と新女峰(女峰の培養変異株)はすべてのマーカーで同じアレル型を示した。また、しずちからとその父親である宝交早生は、*AluICA030259* のみで異なるアレル型を示した。新女峰を除く 136 品種・系統は、7 種類のうち 4 種類の組合せ (*AluICA030109*, *AluICA030259*, *RsaICA030303* に加えて *HaeIII GA030107* または *RsaIGA030115*) で識別が可能であった。

2018 年に栃木 iW1 号及び栃木 i37 号が相次いで品種登録出願されたことから、両品種の他に近縁系統及び国内育成の 24 品種・系統(第 1 表 橙色セル)を追加して 7 種類の SSR マーカーで識別したところ、栃木 31 号とその父親である 05-108-88 は、*RsaIGA030115* のみで異なるアレル型を示した。新女峰を除く 160 品種・系統は、7 種類のうち 5 種類の組合せ (*AluICA030109*, *AluICA030259*, *RsaICA030303*, *RsaIGA030115* に加えて *AluICA030103* または *AluIGA030216*) で識別が可能であった。

また、新女峰を除く栃木県育成 9 品種については、7 種類のうち 2 種類の組合せ (*AluICA030103* に加えて *AluIGA030216* または *RsaICA030303*) で識別することができた(第1図)。

3. 品種識別用 SSR マーカーの特徴

田崎 (2020) により、*AluIGA030216*, *HaeIII GA030107*, *AluICA030259*, *RsaICA030303* は、とちおとめといちご中間母本農 2 号の F₁ 94 個体の SSR 多型分離比より、2 倍体的な挙動を示す共優性マーカー関係を示すことが明らかとなっていたが、残り3種類の SSR マーカーについては不明であった。



第 1 図 SSRマーカーによる栃木県育成品種の識別結果

RsaICA030303 で検出されるアレル：211～225nt, *AluICA030103* で検出されるアレル：250～229nt

A. 女峰, B. 栃の峰, C. とちおとめ, D. とちひめ, E. とちひとみ, F. なつおとめ,

G. 栃木i27号(スカイベリー), H. 栃木i37号(とちあいか), I. 栃木iW1号(ミルクベリー)

第3表 品種識別用SSRマーカーのプライマー配列及び48品種におけるアレル多型数

SSRマーカー名	プライマー配列(5'-3') 上段: フォワード, 下段: リバース	反復配列	ローカス数	アレル数	アレル多型数
<i>AluICA030103</i>	caggaaacagctatgacctgtgtttcccaatcaggcttcct gtttctacatgcagttcaaggttccca	(tg)3tt(tg)18tttgtgcgc(gt)3	2	7	11
<i>AluICA030109</i>	caggaaacagctatgacctaaagggagggaaggttgacta gtttgtggaggtgatgaatttgaa	(ta)7ggttcactgagttcacttt(ac)13(tc)8	1	6	11
<i>AluICA030259</i>	caggaaacagctatgaccgggtgatcacacttatgtcccgat gtttgcaacaatgatatcctcccacctc	(tg)18	2	6	8
<i>RsaICA030303</i>	caggaaacagctatgacctgacatgctttgaattggaaggtc gtttcaattttgacatcttgagggtt	(ac)11	1	5	13
<i>AluIGA030216</i>	caggaaacagctatgaccgtacaaaatattcgtcggggta gtttataattgcgctttcctgctttc	(ag)16	1	5	10
<i>Hae III GA030107</i>	caggaaacagctatgaccgacggaggcagagaaatccagtag gtttaggagttgactggtttgaaaaa	(ag)3aatcgggaggaggagacaga(ag)17	1	6	10
<i>RsaIGA030115</i>	tgtaaacgacggccagtgggatggctgaccattattttga gtttgaccaggttagcttctacccaa	(ag)14ggagg(ga)3	1	4	9

そこで、品種識別用 SSR マーカーのプライマー設計に用いた濃縮ライブラリーのクローン配列及び SSR プライマー配列を Strawberry Garden の FAN_r2.3 で Blast 検索を行った結果、相同性の高い配列が検出され、座乗染色体が推定された。選定した品種識別用 SSR マーカーは、相同染色体上に位置することから、2 倍体的な挙動を示す共優性マーカーであることが示唆された。また、第1染色体上に位置するマーカーが

多く、第6, 7染色体上に位置するマーカーはなかった。そして、第1染色体上に位置する3マーカー (*AluICA030103*, *RsaICA030303*, *HaeIII GA030107*) は、異なる相同染色体上に位置しており、各マーカーの独立性が示唆された。さらに、*AluICA030103*, *AluICA030259* は、結果1で推定したとおり、2つのローカスを増幅していることも確認できた(第5表)。

第5表 SSRマーカーの座乗染色体の推定結果

SSRマーカー名	座乗染色体		
<i>AluICA030103</i>	ch1Ava	ch1Avb	ch0
<i>AluICA030109</i>	ch3Ava	ch3Avb	
<i>AluICA030259</i>	ch4X1a	ch4X1b	ch0
<i>RsaICA030303</i>	ch1X1a	ch1X1b	
<i>AluIGA030216</i>	ch5X1a	ch5X1b	
<i>Hae III GA030107</i>	ch1Bia	ch1Bib	
<i>RsaIGA030115</i>	ch2Ava	ch2Avb	

注1. ch1Avaとch1Avbは相同染色体(他も同様)

注2. ch0は染色体が未特定のDNA領域を示す

4. 栃木県育成品種の親子鑑定への利用

品種識別用 SSR マーカーは、2 倍体的な挙動を示す共優性マーカーであることから、8 倍体のイチゴでも親子鑑定に利用可能であると推察された。本県育成品種を用いて、親子鑑定が可能かを検討したところ、両親の DNA がある7品種(女峰, 栃の峰, とちおとめ, とちひめ, なつおとめ, 栃木 i27 号, 栃木 i37 号)及び、父親のみの DNA がある2品種(とちひとみ, 栃木 iW1 号)の親子関係に矛盾はなかった(第6表)。以上より、品種識別用 SSR マーカーはイチゴの親子鑑定にも利用できることが示唆された。

第6表 品種識別用SSRマーカーによる栃木県育成品種の親子鑑定結果

続柄	品種・系統名	各SSRマーカー ^(注1) による対立アレル型(bp)							
		AC103	AC109	AC259 ^(注2)	RC303	AG216	HG107	RG115	
母親	麗紅	252/252	293/299	253/280	220/220	215/223	113/135	151/153	182/194
父親	系210	250/252	272/299	249/249	220/220	213/213	113/123	153/153	182/194
子	女峰	250/252	272/299	249/253	220/220	213/223	123/135	151/153	182/194
母親	系511	252/252	293/299	239/253	220/228	223/225	135/135	153/153	178/182
父親	女峰	250/252	272/299	249/253	220/220	213/223	123/135	151/153	182/194
子	栃の峰	250/252	272/299	249/253	220/220	213/225	135/135	151/153	182/194
母親	久留米49号	252/252	272/272	239/249	220/232	211/213	113/135	151/153	180/194
父親	栃の峰	250/252	272/299	249/253	220/220	213/225	135/135	151/153	182/194
子	とちおとめ	250/252	272/272	249/249	220/232	211/225	135/135	151/151	194/194
母親	栃の峰	250/252	272/299	249/253	220/220	213/225	135/135	151/153	182/194
父親	久留米49号	252/252	272/272	239/249	220/232	211/213	113/135	151/153	180/194
子	とちひめ	252/252	272/272	239/249	220/232	211/225	113/135	151/151	194/194
父親	さちのか	252/252	272/299	239/249	220/232	215/223	113/135	151/153	182/194
子	とちひとみ	252/252	293/299	239/239	220/232	213/223	113/135	153/153	180/182
母親	00-25-1	250/252	262/272	239/249	220/232	213/223	113/135	151/153	182/182
父親	栃木24号	252/252	272/272	249/249	217/220	223/225	113/115	151/153	194/194
子	なつおとめ	252/252	262/272	239/249	217/220	213/223	115/135	151/153	182/194
母親	00-24-1	250/252	272/272	239/249	220/220	213/223	115/135	151/153	182/194
父親	栃木20号	250/252	272/272	249/249	220/232	213/223	113/135	151/165	182/194
子	栃木i27号	250/252	272/272	239/249	220/232	213/213	113/135	153/165	182/194
母親	栃木32号	252/252	272/272	249/253	220/220	213/223	135/135	151/151	194/194
父親	09-48-5	252/252	272/299	249/253	228/232	223/223	113/135	151/153	182/194
子	栃木i37号	252/252	272/299	249/253	220/232	213/223	113/135	151/151	182/194
父親	09-52-1	250/252	272/272	249/253	220/232	215/225	113/135	153/153	194/194
子	栃木iW1号	252/252	272/293	249/280	220/220	211/215	135/135	153/153	194/194

注1. AC103 : *AluICA030103*, AC109 : *AluICA030109*, AC259 : *AluICA030259*, RC303 : *RsaICA030303*, AG216 : *AluIGA030216*, HG107 : *Hae III GA030107*, RG115 : *RsaIGA030115*

注2. すべての品種・系統に共通に検出される190ntのアレルは除く。

注3. 母親由来のアレルは赤字. 父親由来のアレルは青字. どちらの両親由来か判断できないアレルは緑色セル.

第4表 48品種におけるSSRマーカーのアレル多型一覧

品種・系統名	AC103	AC109	AC259 ^(注2)	RC303	AG216	HG107	RG115
女峰	250/252 272/299	249/253	220/220	213/223	123/135	151/153	182/194
栞の峰	250/252 272/299	249/253	220/220	213/225	135/135	151/153	182/194
とちおとめ	250/252 272/272	249/249	220/232	211/225	135/135	151/151	194/194
とちひめ	252/252 272/272	239/249	220/232	211/225	113/135	151/151	194/194
とちひとみ	252/252 293/299	239/239	220/232	213/223	113/135	153/153	180/182
なつおとめ	252/252 262/272	239/249	217/220	213/223	115/135	151/153	182/194
栞木i27号(スカイベリー)	250/252 272/272	239/249	220/232	213/213	113/135	153/165	182/194
栞木24号	252/252 272/272	249/249	217/220	223/225	113/115	151/153	194/194
栞木26号	252/252 272/272	249/253	232/232	223/225	113/135	151/151	182/194
栞木28号	250/252 262/272	239/249	220/232	213/225	113/135	151/165	182/194
栞木29号	252/252 272/272	249/249	232/232	223/223	113/135	151/165	194/194
栞木30号	252/252 272/299	249/253	220/220	213/223	113/151	151/151	194/194
00-25-1	250/252 262/272	239/249	220/232	213/223	113/135	151/153	182/182
章姫	250/252 299/299	241/253	209/220	211/213	113/135	151/165	194/194
アスカルビー	250/252 272/299	249/253	220/232	211/213	113/123	151/153	178/182
あまおとめ	252/252 272/272	249/253	220/220	211/223	113/135	151/151	194/194
あわなつか	252/252 282/293	237/253	220/220	213/223	113/135	137/165	180/182
いちご中間母本農2号	252/252 262/272	249/249	209/220	223/225	113/115	143/153	182/194
おとめ心	252/252 272/272	239/239	209/220	213/213	113/123	153/153	178/194
熊研い548(ひのしずく)	252/252 272/272	249/253	220/232	215/215	135/135	151/151	194/194
さがほのか	252/252 272/272	249/253	220/220	215/223	113/113	151/165	180/194
さちのか	252/252 272/299	239/249	220/232	215/223	113/135	151/153	182/194
さつまおとめ	252/252 272/272	239/249	220/220	223/223	113/135	151/165	182/194
さぬき姫	252/252 272/272	239/253	220/232	215/223	113/135	151/165	194/194
サマーキャンディ	252/252 262/272	249/253	220/220	211/213	113/135	151/153	194/194
サマーフェアリー	252/252 272/282	253/280	220/220	213/223	113/135	151/165	178/182
サマープリンセス	250/252 272/299	253/280	209/220	213/223	113/123	151/165	182/182
サンチーゴ	252/252 272/299	249/249	220/232	211/213	113/135	137/165	182/194
春訪	252/252 272/272	239/253	220/232	211/223	123/135	153/165	182/194
セリーヌ	252/252 293/299	239/253	220/232	211/213	113/135	137/153	180/194
ダナー	250/252 272/299	239/249	220/232	213/223	113/123	153/153	178/182
とねほっぺ	252/252 272/272	239/249	209/220	213/223	115/123	153/165	182/194
とよのか	252/252 272/299	239/249	220/232	211/215	113/135	153/165	180/194
はるのか	252/252 272/299	249/249	209/220	213/215	113/123	153/153	182/194
ひたち姫	252/252 272/299	249/253	220/232	211/225	135/135	151/165	194/194
福岡S6号(あまおう)	252/252 299/299	239/239	209/232	215/223	113/135	151/153	180/194
福羽	252/252 293/299	237/241	209/228	215/215	113/113	139/153	182/194
ふさの香	252/252 272/272	249/253	220/232	211/223	113/135	151/153	182/194
紅ほっぺ	250/252 272/299	241/249	220/220	213/215	113/135	151/165	194/194
宝交早生	252/252 299/299	237/253	209/232	211/211	115/135	137/165	180/182
美濃娘	252/252 299/299	249/253	220/232	223/223	113/123	151/165	182/194
宮崎	250/252 272/299	249/249	209/217	211/223	113/151	143/165	180/180
もういっこ	252/252 272/272	239/253	220/232	213/223	113/135	151/151	182/194
八雲	252/252 272/299	237/249	209/220	211/211	135/151	153/165	178/180
やよいひめ	252/252 272/272	249/249	220/220	213/225	123/135	151/151	182/194
ゆめのか	252/252 272/299	239/253	220/220	215/223	135/135	153/165	194/194
麗紅	252/252 293/299	253/280	220/220	215/223	113/135	151/153	182/194
Dover	252/252 262/272	239/249	209/228	223/225	113/113	143/153	180/194

注1. AC103 : *Alu*ICA030103, AC109 : *Alu*ICA030109, AC259 : *Alu*ICA030259, RC303 : *Rsa*ICA030303, AG216 : *Alu*IGA030216, HG107 : *Hae* III GA030107, RG115 : *Rsa*IGA030115

注2. すべての品種・系統に共通に検出される190ntのアレルは除く。

5. 簡易検定法の検討

迅速に DNA 鑑定を行うために、簡易な DNA 抽出法によるマーカー検出について検討した。Noh *et al.* (2017) を一部改変したアルカリボイル法について、葉、果実のがく片及び果肉の各組織ごとに、DNA 抽出条件を検討した。組織のサンプリングは、生検トレビン(φ2mm, kai medical)を用いて行い、葉、がく片は直径 2 mm のディスク葉を 1 枚、果肉は直径 2 mm・厚さ 7 mm 程度のサンプル量とした。0.2mL PCR チューブにバッファー A (0.1M NaOH, 2% Tween20) 70μL とサンプルを入れ、サーマルサイクラーで 95°C・10 分間加熱した後、バッファー B (0.1M Tris-HCl (pH8.0), 2mM EDTA (pH8.0)) 70μL を加えて抽出液とした。抽出液 10μL に超純水を 40μL を加えて希釈し、鋳型 DNA とした。従来の PCR 反応組成に、終濃度が 1mg/mL BSA, 1% PVP になるように加えて、PCR 増幅を実施した場合に、安定した結果を得ることができた。

IV 考察

栃木県では、2008 年に栃木県育成 5 品種と国内主要 8 品種を含む国内外 25 品種・系統について、RAPD-STs 及び AFLP-STs マーカーを用いて識別する技術を開発している(田崎ら, 2008a,b)。しかし、2009 年になつおとめ、2011 年に栃木 i27 号が相次いで品種登録出願されたことや、国内各地で新品種育成が盛んに行われるようになったことから、新品種を含む、より広範囲な品種に迅速に対応できる新たな DNA マーカーを開発する必要性が高まった。

SSR マーカーは信頼度が高く、一般に共優性でアレル数が多いことから品種識別能力も高いため、様々な動植物において、品種識別や親子鑑定の手法として利用されている。

2005~2007 年に、イチゴ連鎖地図作成のため、とちおとめ由来の Genomic-SSR マーカー及び EST-SSR マーカーの大量開発を行い(田崎, 2020)、それらのマーカーを、イチゴ炭疽病耐病性遺伝子領域の QTL 解析に利用した研究実績があったことから(飯村ら, 2012, 田崎, 2020)、本研究では、新たなイチゴの品種識別マーカーとして、SSR マーカーを用いることにした。コムギやアズキのように品種識別に EST-SSR マーカーが利用されている農作物もあるが、田崎(2020)が開発したイチゴの SSR マーカーでは、プライマー作成可能な SSR 配列は、Genomic-SSR で 456 個、EST-SSR で 544 個であったが、とちおとめ及びいちご中間母本農 2 号における多型割合は、Genomic-SSR の割合が 76.4% に対して、EST-SSR は 26.7% と低かった。このことは、本研究で選定した品種識別用 SSR マーカーがすべてゲノム由来であったことと矛盾しない。

SSR マーカーによるイチゴの品種識別法は、Shimomura and Hirashima (2006), Honjo *et al.* (2011) で報告されている。これらの SSR マーカーは、少なくとも 3~4 以上の複数の

ローカスを増幅するマーカーであり、多型性は高いものの、検出アレルの識別が難しく、アレル間の共優性関係も不明であった。

本研究では、開発にあたって、検出アレルの識別がしやすいように、各品種において検出アレル数が 4 以下となる条件でマーカー選抜を行った。また、品種識別だけではなく、8 倍体のイチゴでも親子鑑定や現在取り組んでいる種子繁殖育種における F₁ 純度検定にも応用できるよう、2 倍体的な挙動を示す共優性マーカーを選定した。マーカーの独立性については、開発当初は確認することができなかった。その後、かずさ DNA 研究所が中心となり、イチゴ品種麗紅の全ゲノムシーケンスが解読され、データベースサイト Strawberry Garden が開設されたことにより、イチゴゲノム情報が誰でも使えるようになり、マーカーの座乗位置についても確認することができた(第 5 表)。さらに、今回供試した 161 品種・系統ではすべて増幅し、Null 対立遺伝子は確認されなかった。

開発した品種識別技術では、女峰と女峰の培養変異株である新女峰はすべてのマーカーで同じアレル型を示し、区別することはできなかった。また、しずちからとその父親である宝交早生、栃木 31 号とその父親である 05-108-88 は 7 種類中 6 種類のマーカーのアレル型が一致していた。本研究で開発した SSR マーカーは保存性が高い DNA 配列上で作成したため、突然変異を識別することはできないマーカーであると考えられる。また、しずちからの母親であるしずたからは、宝交早生の戻し交配品種であることから、しずちからの DNA の 8 分の 7 は宝交早生由来であると推定できる。同様に、栃木 31 号の母親である栃木 23 号と父親である 05-108-88 は、どちらも片親がとちおとめであり、近親交配を繰り返している。以上のことから、上記の品種間では 6 種類のマーカーのアレル型が一致していたと推測された。

種苗法に基づく栃木県育成いちご品種の育成者権の保護を目的として、品種識別を行う場合は、正確性と緊急性が求められるため、DNA 抽出法の簡便化は重要である。対象となる部位は、イチゴ苗の葉、果実のがく片及び果肉で、それらの組織から短時間で簡易に抽出でき、安定的に PCR 増幅が可能で検出条件が必要とされる。本研究では、アルカリボイル法を用いることで、15 分程度で DNA 抽出が可能となり、安定した PCR 増幅結果が得られる PCR 条件を設定することができた。

イチゴにおいて妥当性試験が実施されている品種識別技術には、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構(現; 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、以下、農研機構)野菜茶業研究所(現; 農研機構野菜花き研究部門)が開発した CAPS マーカーを活用した品種識別技術がある(國久, 2010)。シーケンサーのような高額な機器を

必要としないが、多数の制限酵素を準備する必要があり、また、純度の低い DNA では、結果が安定しないことが知られている。本研究で開発した SSR マーカーを活用した品種識別技術は、妥当性試験を実施していないため、税関や裁判の証拠等へ利用はできないが、育成者権の侵害が疑われる事例における迅速な対応は可能である。また、新品種にもすぐに適用可能であるだけでなく、育種現場での遺伝資源の管理や、種子繁殖育種における F₁ 純度検定への利用も期待できる技術であると言える。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、供試材料を提供していただいた導入先の皆様及び栃木県農業試験場いちご研究所(旧栃木分場いちご研究室)の皆様には厚くお礼申し上げます。

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

Bringham, R. S. (1990) Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. HortScience 25: 879-881.

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.

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, Isobe SN. (2014) Dissection of the Octoploid Strawberry Genome by Deep Sequencing of the Genomes of *Fragaria* Species. DNA Research 21: 169-181.

Honjo M., Nunome T., Kataoka S., Yano T., Yamazaki H., Hamano M., Yui S. and Morishita M.(2011) Strawberry cultivar identification based on hypervariable SSR markers. Breeding Science 61:420-425.

飯村一成・田崎公久・中澤佳子・天谷正行(2012) QTL 解

析によるイチゴ炭疽病耐病性遺伝子領域の検索. 育種学研究 15: 90-97.

飯村一成・田崎公久・中澤佳子・森島正二・生井 潔・天谷正行(2021) イチゴ栽培種における萎黄病抵抗性 QTL の検索. 育種学研究 23: 101-108.

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.

Isobe, S., H. Hirakawa, S. Sato, F. Maeda, M. Ishikawa, T. Mori, Y. Yamamoto, K. Shirasawa, M. Kimura, M. Fukami et al. (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.

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・畠山昭嗣ら (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.

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.

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.

Noh Y.-H, Lee S, Whitaker V. M, Cearley K. R. and Chae J-S. (2017) A high-throughput marker-assisted selection system combining rapid DNA extraction high-resolution melting and simple sequence repeat analysis: Strawberry as a model for fruit crops. Journal of Berry Research 7:23-31.

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・永嶋麻美ら(2020) イチゴ新品種「栃木 i37 号」の育成. 栃木農試研報 81:83-103.

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 No73: 85-100.

- Sargent, D.J., T. Passey, N. Surbanovski, E. Lopez, P. Kuchta, J. Davik, R. Harrison, A. Passey, A.B. Whitehouse and D.W. Simpson (2012) A microsatellite linkage map for the cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) suggests extensive regions of homozygosity in the genome that may have resulted from breeding and selection. *Theor. Appl. Genet.* 124: 1229–1240.
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.
- 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.
- Shuaev V. *et al.* (2011) The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat. Genet.* 43:109-116.
- 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.
- 田崎公久(2020) 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. 法政大学博士(生命科学)
- 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, *育種学研究* 10:111-115.
- 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 No50:27-37.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi, N. Matsuta (2001) SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor. Appl. Genet.* 102: 865-870.

