ノ ー ト

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

田崎公久^{1,2)}・柏谷祐樹^{1,2)}・小林俊一¹⁾・天谷正行¹⁾¹⁾栃木県農業試験場, 宇都宮市, 〒 320-0002²⁾現: 芳賀農業振興事務所, 真岡市, 〒 321-4305Development of multiplex PCR primer sets for identification of major strawberry (*Fragaria × ananassa* Duchesne) cultivars in JapanKimihiisa Tasaki^{1,2)}, Yuuki Kashiwaya^{1,2)}, Shun-ichi Kobayashi¹⁾ and Masayuki Amagai¹⁾¹⁾Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station, Utsunomiya 320-0002, Japan²⁾Present address: Haga Agricultural Promotion Office, Moka 321-4305, Japan

キーワード

イチゴ, 品種識別, RAPD, STS 化, マルチプレックス PCR

1. 緒 言

日本国内におけるイチゴ生産量は, 190,600 t と世界第 8 位であり (2006 年度 FAO 調べ), 最重要な園芸品目である. 品種育成は, 主に国公立研究機関および種苗会社によって行われており, 1981–2007 年までに 154 品種が登録されている (農林水産省品種登録ホームページ). 現在, 作付されている上位 8 品種は, ‘とちおとめ’ (32.7%), ‘さがほのか’ (16.7%), ‘福岡 S6 号 (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% を占めている (2007 年度 JA 全農調べ).

近年, 国内育成品種が無許可で国外へ流出し, 栽培されて収穫物が輸入される育成者権侵害の事例がイグサ, インゲンマメ, イチゴ等で報告されている (竹次 2004). このような違法農産物を検査する際, DNA マーカーによる品種識別は, 客観的かつ簡易に判定することができることから有効な方法であり, イグサ (齋藤 2004), インゲンマメ (紙谷ら 2004) で開発されている. また, イネでは改正 JAS 法の品種名等の表示義務化により, 他品種混入および不正表示防止のために DNA マーカーによる品種識別技術が開発されている (大坪ら 2002, 新村ら 2005). イチゴの品種識別技術については, CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 法による国内外 64 品種の識別技術が開発され (Kunihisa *et al.* 2003, 2005), 検査機関ですでに利用されている. さらに, SSR (Simple Sequence Repeat) 法や AFLP (Amplified Fragment Length

Polymorphism) 法による国内 10 品種の識別技術も報告されている (Shimomura *et al.* 2006, 下村ら 2005). しかし, CAPS 法や AFLP 法では制限酵素処理を必要とするためにコストおよび時間という問題が残る. そこで, より簡便な方法により特定のイチゴ品種のみを識別する技術が開発されている. 野村ら (2005) は, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-STS (Sequence Tagged Site) 法および β-ガラクターゼ遺伝子より設計したプライマーにより, ‘アスカルビー’ のみを 25 品種・系統の中から識別できるマルチプレックス PCR プライマーセットを開発している. 筆者らも RAPD-STS 法および AFLP-STS 法により, 栃木県育成品種 ‘とちおとめ’ および ‘とちひめ’ のみを 25 品種・系統の中から識別できるマルチプレックス PCR プライマーセットを開発している (田崎ら 2008).

今回, 日本国内に流通する主要イチゴ品種を簡易かつ効率的に識別するために, 制限酵素処理を必要としない 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. その結果, ‘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 (田崎ら 2008) を加えた 3 セットからなるマルチプレックス PCR プライマーセットを開発し, 国内主要 8 品種を含む 25 品種・系統の識別が可能となったので報告する.

2. 材料および方法

1) 供試材料

国内作付面積上位 8 位までのイチゴ品種, ‘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 (ひのしづく)', '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 を粉砕後, Yamamoto *et al.* (2001) の改変 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 (田崎ら 2008). 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も既報 (田崎ら 2008) の方法に従った. 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 0.38 μM とした.

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 (表 1). '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 (田崎ら 2008) 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 (表 1). 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を検出を行った. PCR 組成は, 鋳型 DNA 50 ng, rTaq 1U (タカラバイオ社), 1×PCR Buffer (タカラバイオ社), 0.2 mM dNTP Mixture (タカラバイオ社), 各濃度のフォワードおよびリバースプライマー (プライマーセット 1 : 0.50 μM E89-STS, 0.25 μM A72-STS, 0.25 μM *EcoRI*-ACA/*MseI*-CGG-STS, プライマーセット 2 : 0.25 μM OPC12-STS, 0.50 μM A31-STS, 0.50 μM C29-STS, 0.50 μM OPE3-STS, プライマーセット 3 : 0.15 μM E28-STS, 0.25 μM OPD7-STS, 0.25 μM B22-STS) とし, 液全量を 20 μL とした. 増幅反応は, サーマルサイクラー (DNA Engine Tetrad PTC-225, MJ Japan 社) を用いて行った. 反応条件は, 95°C で 5 分間熱変性後, 94°C で 30 秒間, 59°C (プライマーセット 1) または 64°C (プライマーセット 2 および 3) で 30 秒間, 72°C で

表 1. 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	TAgACAAGAAATgCCgTTTgA	59	a (1550)
	reverse	ggCgACATAgTATACATAgA		
	<i>EcoRI</i> -ACA/ <i>MseI</i> -CGG-STS forward	TTTTTCATCTTAgCTggAggT	61	b (310)
	reverse	TTAACgCgTgTATgAATAg		
プライマーセット 2	A72-STS forward	TACgATTCTgTATggTTAT	59	c (202)
	reverse	TACCCgAAATTAAGaggATT		
	OPC-12-STS forward	gCCTTCTTCTgTACgCCATT	65	d (1150)
	reverse	CCTCgATCgAACTCgTCAAT		
プライマーセット 2	A31-STS forward	CgACCgTACTCTTCCATCTTT	65	e (921)
	reverse	TggTATCCgTTgAgAgCgTA		
	C29-STS forward	AAgCgATCgAgTAgAgTgAg	65	f (613)
	reverse	gCCTTACCAAACTAAACCAg		
プライマーセット 2	OPE3-STS forward	CgCAACAgACCCCTTCTTTA	65	g (285)
	reverse	gATgCACACAAACACCAACC		
プライマーセット 3	E28-STS forward	AggCgTgCTgCAgATTAAAg	66	h (457)
	reverse	CCTCAAgCATTCAAgCCTTC		
	OPD7-STS forward	TggCACgggCTATAAgTTTC	65	i (381)
	reverse	gggTgCgCTCTATCATTTTC		
プライマーセット 3	B22-STS forward	ggAgTTggCTgTggAATgTT	66	j (312)
	reverse	TggACTTCCCCTTAACCTgC		

*1) : 田崎ら (2008) 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.

1 分間を 1 サイクルとして 35 回繰り返し、最後に 72°C 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、田崎ら (2008) に従った。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. 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 (図 1)。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 (図 1)。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 (図 2-B, C, 表 2)。そのため、‘とちおとめ’ と ‘栃の峰’、‘とねほっぺ’ と

図 1. 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 (200 bp ladder)

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

図 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 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: メイヒャン, 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

M: DNA 分子量マーカー (200 bp 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

‘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(田崎ら 2008)を合わせて用いることとした(表1, 2, 以後プライマーセット1と記す)。

4. 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 (1150 bp), A31-STS (921 bp), C29-STS (613 bp), OPE3-STS (285 bp) 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(表1), E28-STS (457 bp), OPD7-STS (381 bp), B22-STS (312 bp) 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(表1)に2分割した。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によるイチゴ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(図2, 表2)。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年度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(表3)。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。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。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、主に市販成熟果実を想定されるが、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、筆者らは、すでに、Yamamoto *et al.* (2001)の方法によりイチゴ成熟果実(萼片および花托)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(田崎ら 2008)、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

表2. 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/ プライマー名および 分子量 (bp)	プライマーセット 1 ^{*)}			プライマーセット 2				プライマーセット 3		
	E89-STS	<i>Eco</i> RI-ACA/ <i>Mse</i> I-CGG-STS	A72-STS	OPC-12-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 メイヒャン	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
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 (2008) より引用。

*²⁾: + はバンド有, - はバンド無を示す。

表 3. 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

*: 太文字は国内作付け面積上位イチゴ 8 品種

が図れた。また、イネの品種判別（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。

謝 辞

本研究の一部は、農林水産省の先端技術を活用した農林水産研究高度化事業における「野菜・茶・ウメの原産地表示判別技術の開発プロジェクト」（2001–2004）の中で実施された。本研究を遂行するにあたり、サンプルの提供および貴重な御助言をいただいた（独）農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 松元哲博士ならびに國久美由紀氏、奈良県農業技術センター 浅尾浩史博士ならびに野村貴浩氏、福岡県農業総合試験場 下村克己氏に厚く感謝申し上げます。また快くサンプルを提供していただいた忠南農村振興院論山イチゴ試験場 金泰日博士ならびに栃木県農業試験場栃木分場に感謝申し上げます。また、実験で多大なるご協力をいただいた栃木県農業試験場生物工学部 阿久津操氏に感謝致します。

引用文献

FAO (2007) FAOSTAT <http://faostat.fao.org/>

- JA 全農 (2007) H20 年産いちご主産県協議会資料
紙谷元一・竹内 徹・楠目俊三 (2004) 育種学研究 6: 29–32.
Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto (2003) Euphytica 134: 209–215.
Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto (2005) Theor. Appl. Genet. 110: 1410–1418.
Mercado, J.A., I. El Mansouri, S. Jiménez-Bermúdez, F. Pliego-Alfaro and M.A. Quesada (1999) In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35: 152–153.
野村貴浩・天谷正行・田崎公久・楠本憲一・浅尾浩史 (2005) 近畿中国四国農研究 7: 37–40.
農林水産省 (2007) 品種登録ホームページ <http://www.hinsyu.maff.go.jp/>
大坪研一・中村澄子・今村太郎 (2002) 日本農芸化学会誌 76: 388–397.
齋藤 彰 (2004) 農業および園芸 79: 168–174.
下村克己・三井寿一・藤田幸一・佐藤公洋 (2005) 福岡県農業総合試験場研究報告 24: 43–47.
Shimomura, K. and K. Hirashima (2006) J. Japan Soc. Hort. Sci. 75: 399–402.
新村和則・金川 寛・三上隆司・福森 武 (2005) 育種学研究 7: 87–94.
竹次 稔 (2004) 農業および園芸 79: 199–204.
田崎公久・柏谷祐樹・小林俊一・天谷正行 (2008) DNA 多型 16: 119–128.
Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta (2001) Theor. Appl. Genet. 102: 865–870.