

SSR マーカーによるバレイシヨ 4 5 品種 の DNA 品種識別技術

国立研究開発法人

農業・食品産業技術総合研究機構

2023 年 3 月 16 日 初版

SSR マーカーによるバレイショ 45 品種の DNA 品種識別技術

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門、種苗管理センター

1. はじめに

バレイショは、ナス科ナス属に属する作物で、米・小麦・とうもろこしに続く世界の4大作物の一つであり、世界100カ国以上の国において、4500種類以上の品種が栽培されている重要な基幹作物である。一方で、栄養繁殖性植物であり種いもによる栽培が行われるため、種苗の増殖率が低く、ウイルス病や細菌病等の病害虫に極めて弱い。そのため、我が国では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」という。）種苗管理センターにより種苗増殖の起点となる健全無病な原原種を安定的に生産・供給している。

は使用用途によって様々な品種が開発されており、通常のスーパー等で販売される生食用、チップやフライ、サラダ等の特定用途向けの加工用、片栗粉以外にも様々な食品、工業用途で使用されるでん粉用がある。

日本における令和元年産の総作付面積は74,403haであり、そのうち「男爵薯」（生食・加工用）が15.4%、「コナフブキ」（でん粉用）が13.0%、「トヨシロ」（加工用）が12.0%、「メークイン」（生食・加工用）が8.5%、「ニシユタカ」（生食用）が7.8%と続いており、近年ではシストセンチュウ類やウイルス病への抵抗性を有した多様な優良品種が開発されている（図1、農林水産省農産局地域作物課「令和2年度いも・でん粉に関する資料」から作成）。

これら優良品種の偽装表示や登録品種の海外流出は、知的財産権（育成者権）の侵害につながる可能性があるだけでなく、公正に品種を扱っているバレイショ生産者、流通関係者にとっても大きな影響を及ぼすとともに、消費者に対する食の安全・安心の確保の観点からも大きな問題である。そこで、DNA分析による品種識別技術は、農産物の育成者権の保護や種苗管理の適正化のためにも非常に有効な技術である。

一般的なバレイショは、同じ種類の染色体を4本ずつ持つ同質四倍体として知られており、1箇所のSSRマーカーの分析によって、最大4本の増幅産物が生じる。これまでに開発された2塩基反復単位のSSRマーカーでは、本来の増幅産物の前後にスタッターピーク（DNA増幅の際に生じる反復数がずれた産物）が生じやすく、その結果、数多くのピークが重なり合い正確な判定が困難とな

る場合があった。そこで、農研機構食品研究部門はヤマザキビスケット(株)と共同で、スタッターピークが少ない4塩基の反復単位を持つSSRマーカーを利用し、高精度にバレイショ品種を識別できる手法を開発した。

(Kishine M. et al. (2017) Breed. Sci. 67(5):544-547)

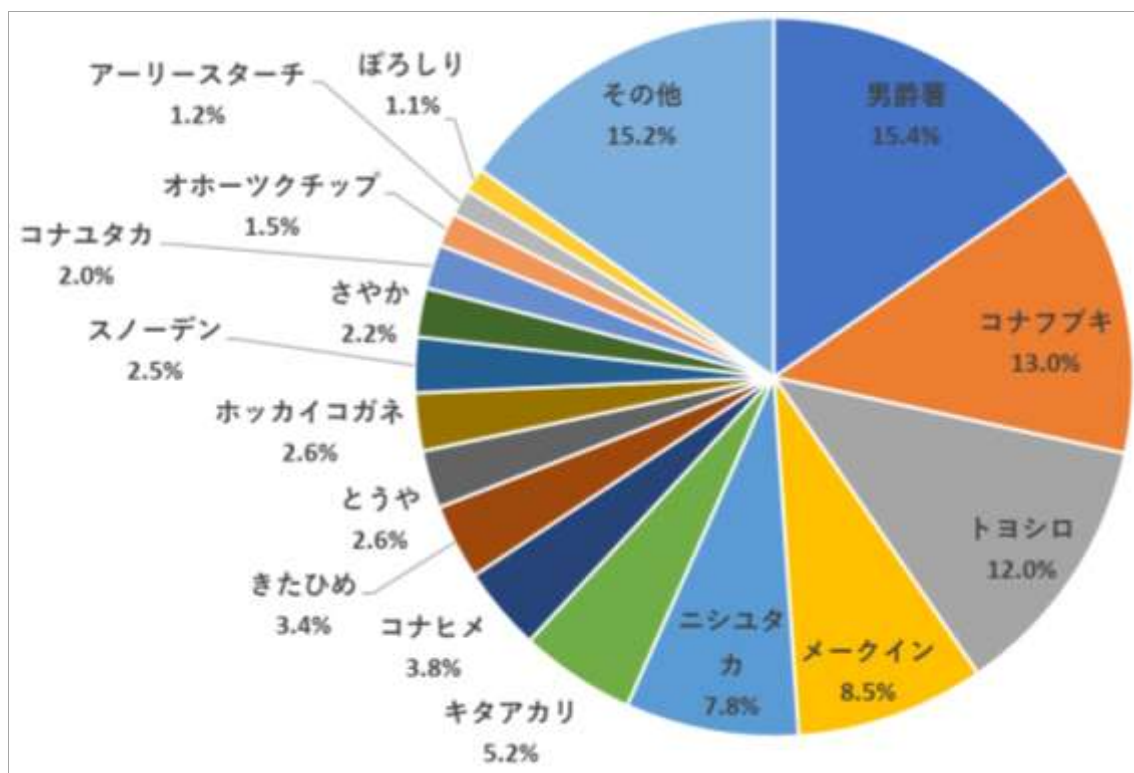


図1 バレイショの品種別作付面積(令和元年産)

2. 一般的注意事項及び DNA 抽出法について

SSR マーカーによる DNA 品種識別分析での実験、試薬調製の一般的注意事項については、農林水産省ホームページに掲載の〈SSR マーカーによるニホンナシの DNA 品種識別技術 (http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/san10.pdf)〉に記載されている「2. SSR マーカーによる DNA 品種識別分析での実験、試薬調製の一般的注意事項」を参照のこと。

植物の DNA 品種識別技術についての基本的留意事項については〈植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項— 技術開発と利用のガイドライン—〉 (http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf)〉、妥当性確認の方法等については〈DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン (http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_meeting/H20_2nd/guideline.pdf)〉を参照のこと。

2.1 葉及び塊茎からの DNA 抽出

- (1) 葉は生葉 100 mg または凍結乾燥葉 10 mg、塊茎は内部の肉部分 300 mg を約 3 mm 角のサイコロ状にナイフで細かく切断して用いる。
- (2) DNA は DNeasey Plant MiniKit (QIAGEN 社) を用いて、キットプロトコールに従って抽出する。塊茎を使用する場合、試料と DNA 抽出液の混合はボルテックスミキサー等を使用して十分に行う (混合が不十分であると DNA 収量が減少する)。
- (3) 抽出した DNA 原液は濃度測定した後、原液の一部を滅菌水または 1/10TE バッファーで 5.0 ng/μL の濃度となるよう希釈する。希釈した DNA 及び原液は超低温フリーザー等 (-20°C 以下) で保管する。

3. SSR マーカー検出のための PCR 反応

波形のチェックや遺伝子型の判定が容易なことを条件として絞り込んだ 6 種類の SSR マーカーを用いて、2. で希釈調整した DNA に対して PCR 反応を行う。

<準備するもの>

1.5 mL 又は 2.0 mL チューブ（滅菌済み）、8 連チューブ又は 96 穴 PCR プレート（Thermo Fisher Scientific/ Applied Biosystems 社、以下 ABI 社と記載）、8 連チューブキャップ又はフルプレートカバー（ABI 社）、サンプル DNA 溶液（5.0 ng/μL に調製したもの）、KOD-Multi & Epi-（東洋紡社）、滅菌超純水、SSR プライマー混合溶液（蛍光ラベルされたフォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 μmol/L とした溶液）、サーマルサイクラー（PCR システム ProFlex™ PCR System（ABI 社）など）

<用いた SSR マーカー>

それぞれの SSR マーカーについて、マーカー名、フォワードプライマーとリバースプライマーの塩基配列、増幅範囲などを、表 1 に掲載した。

<本マニュアルで遺伝子型を確認済みのバレイショ 45 品種>

「アーリースターチ」「アイユタカ」「アスタルテ」「アトランチック」「アンデス赤」「インカのひとみ」「インカのめざめ」「オホーツクチップ」「キタアカリ」「きたひめ」「キタムラサキ」「グラウンドペチカ（デストロイヤー）」「こがね丸」「コナフブキ」「コナユタカ」「西海 31 号（ドラゴンレッド）」「サクラフブキ」「さやあかね」「さやか」「さんじゅう丸」「シェリー」「シャドークイーン」「シンシア」「スノーデン」「スノーマーチ」「男爵薯」「チェルシー」「デジマ」「とうや」「十勝こがね」「トヨシロ」「ニシュタカ」「農林 1 号」「ノーザンルビー」「花標津」「はるか」「ひかる」「ピルカ」「北海 98 号（インカルージュ）」「ホッカイコガネ」「マチルダ」「メイクイン」「リラチップ」「レッドムーン」「ワセシロ」

表1 SSRマーカー情報

| マーカー名 | 蛍光色素 | モチーフ | 染色体 | フォワードプライマー(5'-3') リバースプライマー (5'-3') | 増幅範囲 (bp) |
|-------|------|------|-----|---|--------------|
| 8242 | FAM | CTTT | 2 | CGTCTTGGATGTCTTAGTTGTGG GCAAAACCAGAAAGGCTAACAAAC | 192-220 |
| 12002 | NED | ACAT | 3 | CCATGAACCTGAAGTTTTTCTGC TGGATATCTTGTGCCTACAAGCTAG | 211-237 |
| 31924 | VIC | ATAC | 8 | CGAAGACACCAAATCGCTCAG GAAACGCCATTAACATTTTACATCG | 138-251 |
| 35584 | VIC | GAAA | 9 | AGTAAGTCAAACCTCAAACCTCCAAGGTG GTTCTAGATTATCTCACTCATGCCTTTC | 86-113 |
| 43016 | PET | ATCC | 11 | CAAGCTGCATGAAAGCCATC TTTGCCTAAAAGTTTGTAGTGTGAGG | 173-228 |
| 46514 | PET | TATC | 12 | TGCTTTTTGTTTCCTTTTGTGTG GGAATGAAACTAAGCCTTGCTCTG | 132-166 |

<基本操作>

(1) PCR 反応液の調整

品種の判定にはサンプル抽出 DNA1 本に対して、6 プライマーの反応液を調製する必要がある。各プライマーの反応液を調製する場合は液量誤差を少なくするため数サンプル分の反応液をまとめて調製する。

| | |
|--|--------------------|
| 滅菌水 | 2.8 μL |
| 2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- | 5.0 μL |
| SSR プライマー溶液(10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) | 1.0 μL |
| KOD -Multi & Epi-® (1 U/ μL) | 0.2 μL |
| サンプル DNA 溶液 (5.0 ng/ μL) | 1.0 μL |
| <hr/> | |
| 合計 | 10.0 μL |

<10 サンプル分の PCR 反応液を調整する場合の例>

必要サンプル数プラス 2 サンプル分の反応液をまとめて調製する。

- ① 1 本の 1.5 mL 又は 2.0 mL チューブ (滅菌済み) に以下の試薬・溶液を混合する。

| | |
|--|--|
| 滅菌水 | 33.6 μL (2.8 μL × 12) |
| 2×PCR Buffer for KOD -Multi & Epi- | 60.0 μL (5.0 μL × 12) |
| SSR プライマー溶液(10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) | 12.0 μL (1.0 μL × 12) |
| KOD -Multi & Epi-® (1 U/ μL) | 2.4 μL (0.2 μL × 12) |

- ② 8 連チューブ又は 96 穴 PCR プレートに 9.0 μL ずつ分注した後、サンプル DNA 溶液 (5.0 ng/ μL) を各 1.0 μL 加える。

(2) サーマルサイクラー (PCR システム ProFlex™ PCR System など) を用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。

- ・ 94°C 2 分間熱変性。
- ・ 98°C 10 秒間、63°C 30 秒間、68°C 30 秒間の反応を 30 サイクル。
- ・ 68°C 2 分間の反応後、10°C で ∞ 。

4. スタンダードセットの作製

それぞれのマーカーで検出される増幅ピークをすべて網羅するように 3-4 品種の PCR 産物を混合したスタンダードセットを作製し、これと分析サンプルとを比較することで遺伝子型を判定する。スタンダードセット用の基準品種は表 2 に、それぞれの波形データは図 2 に示した。

<準備するもの>

1.5 mL チューブ (滅菌済み)、1/10TE バッファー、PCR フラグメント精製キット (MiniElute Reaction Cleanup Kit(QIAGEN 社))

<基本操作>

- (1) 3. の条件で基準品種を増幅する。
- (2) PCR フラグメント精製キットを用いて、キットプロトコールに従って増幅産物を精製する。
- (3) マーカーごとに精製産物を混合し、1/10TE バッファーで 20~100 倍の解析に適した倍率に希釈したものを 10 μ L 程度ずつ分注する。分注したチューブには、調製日を記入し超低温フリーザー等 (-20°C以下) に遮光して保存し、概ね 2 年以内を目処に使用する。

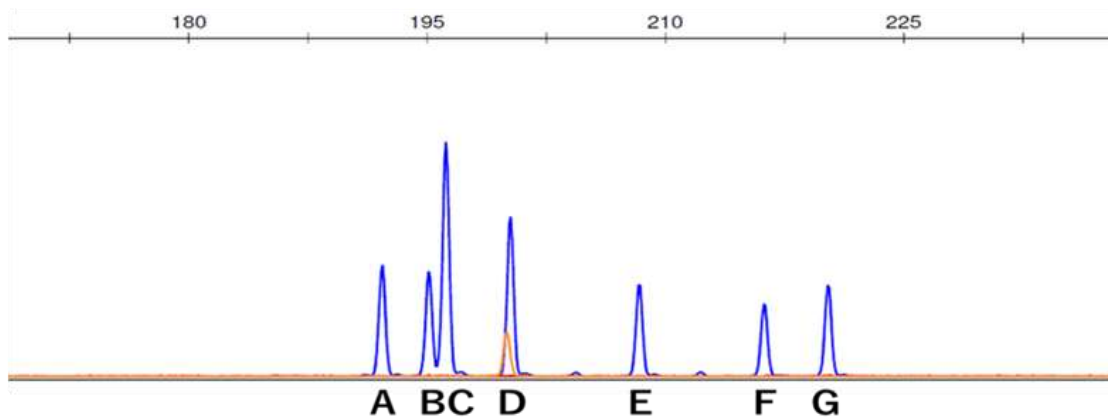
表2 スタンダードセット用基準品種

| メーカー名 | 蛍光色素 | 基準品種 | フラグメントパターン |
|-------|------|---------------------|-----------------|
| 8242 | FAM | きたひめ・コナユタカ・マチルダ | A/B/C/D/E/F/G |
| 12002 | NED | チェルシー・アトランチック・はるか | A/B/C/D/E/F/G |
| 31924 | VIC | ワセシロ・レッドムーン・十勝こがね | A/B/C/D/E/F |
| 35584 | VIC | はるか・さんじゅう丸・こがね丸 | A/B/C/D/E/F |
| 43016 | PET | マチルダ・はるか・レッドムーン・花標津 | A/B/C/D/E/F/G/H |
| 46514 | PET | メークイン・アンデス赤・ひかる | A/B/C/D/E/F |

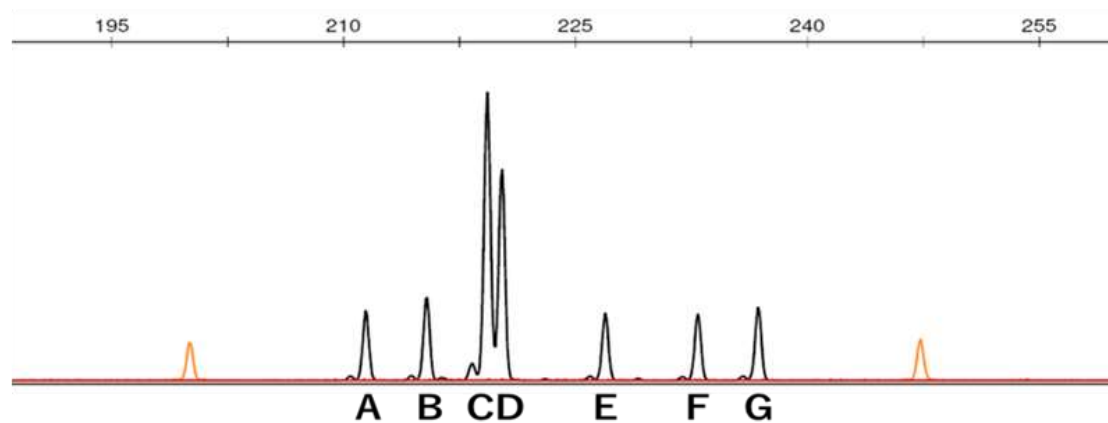
注)フラグメントパターン:各メーカーでの各遺伝子型におけるフラグメントサイズの小さい順にアルファベットを付与した。

図2 スタンドセット波形図

8242



12002



31924

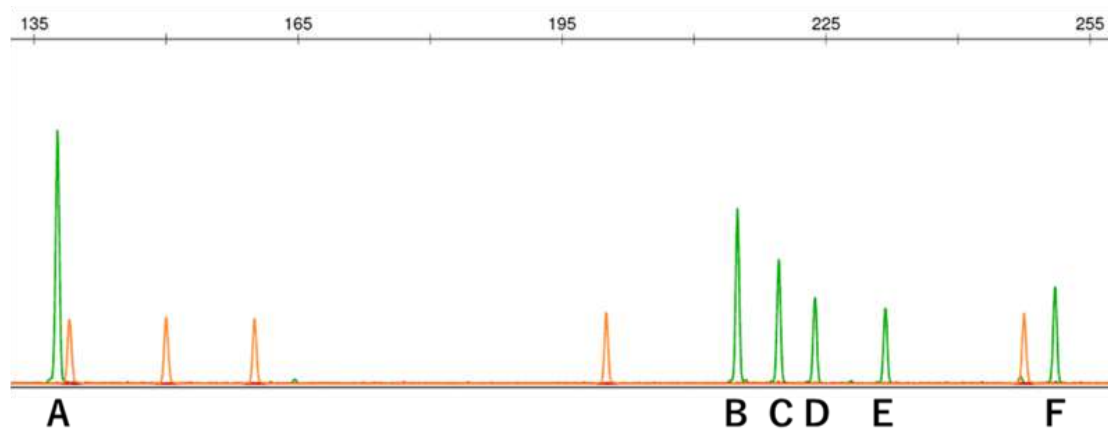
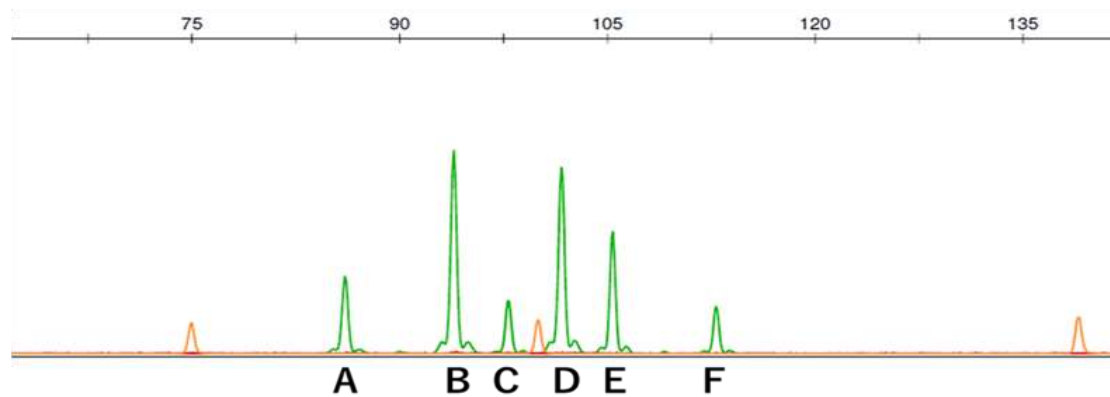
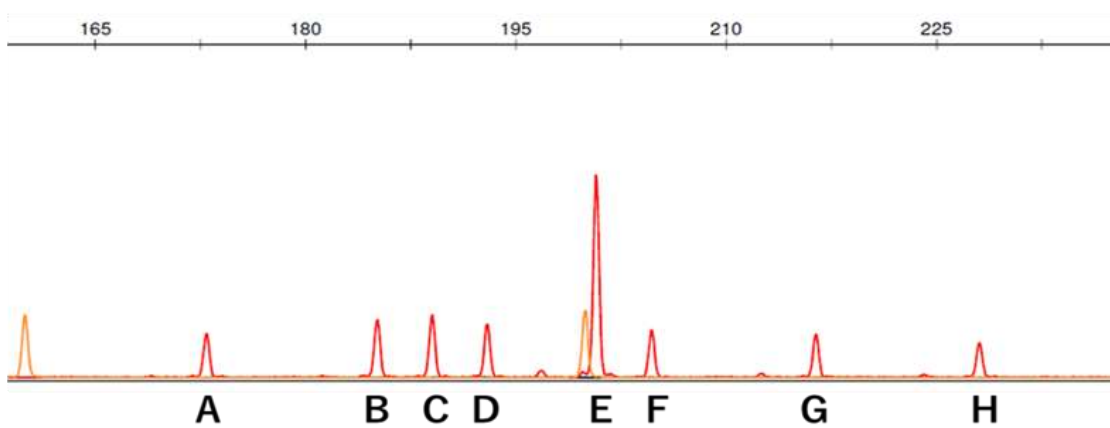


図2 スタンダードセット波形図 (続き)

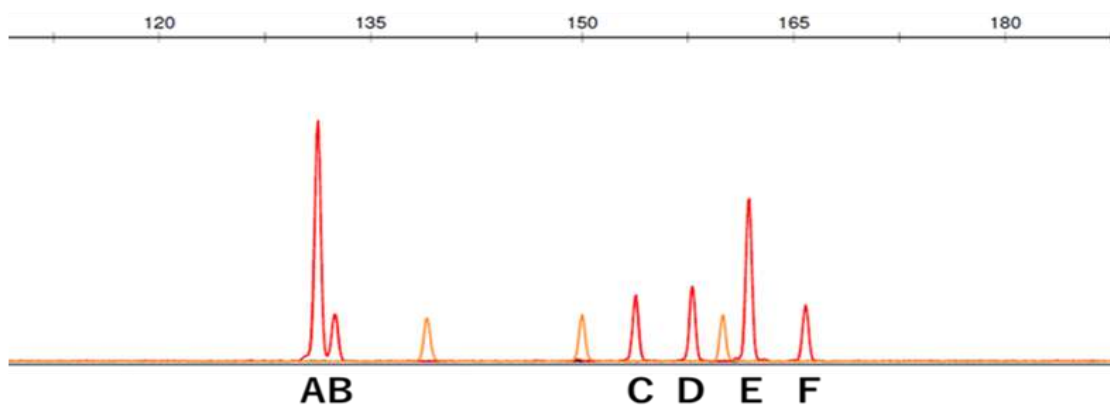
35584



43016



46514



5. ジェネティックアナライザーを用いたフラグメント解析

3. および 4. で得た SSR-PCR 産物をジェネティックアナライザーで分析し、フラグメント解析を行う。基本的分析操作は、ABI 社のフラグメント解析のプロトコルに従って行う。

<準備するもの>

本マニュアルは、以下に列挙した機器で最適化してある。他の機器を用いる場合は、同等の結果が得られることを確認した上での利用が望ましい。

96 穴 PCR プレート (ABI 社)、1/10TE バッファー、Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (ABI 社)、SeqStudio Cartridge (ABI 社)、SeqStudio Cathode Buffer Container (ABI 社)、Hi-Di Formamide (ABI 社)、GeneScan™ 500LIZ™ サイズスタンダード (ABI 社)、GeneMapper ソフトウェア (ABI 社)、PCR システム ProFlex™ PCR System (ABI 社) など。

<基本操作>

- (1) 3. で得た PCR 産物の一部を使用し、1/10TE バッファーで PCR 増幅を考慮し、フラグメント解析に適した倍率で希釈する。
- (2) (1) の希釈 PCR 産物または 4. で作製したスタンダードセット 1 本に対して、下記の溶液を混合して 96 穴 PCR プレートに分注する。なお、3. (1) と同様に、液量誤差を少なくするため数本分の反応液をまとめて調製しプレートに分注した後、希釈 PCR 産物又は 4. で作製したスタンダードセットを加える。

| | |
|-------------------------------|---------|
| Hi-Di Formamide | 14.9 µL |
| GeneScan™ 500LIZ™ サイズスタンダード | 0.1 µL |
| 希釈 PCR 産物又は 4. で作製したスタンダードセット | 1.0 µL |
| <hr/> | |
| 合計 | 16.0 µL |

- (3) PCR システム ProFlex™ PCR System などを用いて、95°C 5 分間の熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。

- (4) Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer のプロトコルに従い、SeqStudio Cartridge、SeqStudio Cathode Buffer Container を用いて、PCR 産物及びスタンダードセットを同時に分析する。

- (5) GeneMapper[®] ソフトウェアを用いて、結果の解析を行う。

6. フラグメント解析による遺伝子型判定

(1) フラグメント解析時の注意点

以下に、フラグメント解析を行う際の基本的な留意点について記した。

- ① 全ての蛍光色素を表示して解析すること。これにより、PCR 増幅産物の希釈濃度が濃すぎることによって生じるフラグメントの乱れをチェックすることが可能である。サンプル濃度が濃いと、本来フラグメントとして検出されるはずのない色でも検出されることがある。このような状態では、ターゲットのフラグメントも正しい結果を表していない場合があるため、PCR 産物の希釈をやり直して、再度分析を行う。
- ② サイズスタンダードのフラグメントと比較して適正な希釈濃度とすること。PCR 増幅産物の希釈濃度が薄い場合、サイズスタンダードのフラグメントと比較して、サンプルのフラグメントが低くなる。最も高いフラグメントがサイズスタンダードの 1/3 以下の場合には別の低いフラグメントを見落とす危険性があるため、注意が必要である。明確に判断できない場合は、希釈をやり直して、再度分析を行う。また、希釈濃度が濃すぎるとフラグメントの大きさが検出限界を超えてしまい、フラグメントの先端が表示されない。この場合、サイズスタンダードセットとの比較ができないことがあるため、PCR 産物の希釈をやり直して再度分析を行う。
- ③ サイズスタンダードの波形を確認すること。フラグメント解析におけるフラグメントの数値は、サイズスタンダードのフラグメントサイズをもとに作成した検量線によって計算されるため、サイズスタンダードの波形が乱れていると、正しいデータが計算できない。よってサイズスタンダードの波形が乱れていた場合は分析をやり直す。
- ④ 遺伝子型判定のためのスタンダードセットを必ず供試すること。フラグメント解析では、ジェネティックアナライザーの機種、ポリマー、キャピラリー、サイズスタンダードなどの違いにより、計算上の対立遺伝子のサイズ（フラグメントのピークサイズのこと）がずれる場合がある。このため、4. のスタンダードセットを供試しこれらのフラグメントとの比較で遺伝子型を判

定する必要がある。

(2) バレイショ品種の遺伝子型判定

- ① SSR 遺伝子型の判定は、スタンダードセットとの比較により決定する。判定に当たっては、キャピラリー間の泳動のずれ等を考慮し、スタンダードセットの数値±0.5 bp 未満のずれに収まるようであれば該当の遺伝子型と判定する。また、品種の判定に当たっては、マニュアル掲載時において確認済みの6 マーカーで明らかにされた45 品種の遺伝子型（表3）と比較し、全ての遺伝子型が一致すれば当該品種と判定する。なお、6 マーカーで明らかにされた45 品種の遺伝子型に一致する品種がない場合、判定不能とする。

- ② また、本マニュアルを用いて表3に記載の45 品種の遺伝子型は確認済みであるが45 品種以外の品種を分析する場合には、来歴が明確な品種の試料と来歴が不明の同一と思われる品種の試料を比較することで遺伝子型の検証は可能である。また、45 品種以外の品種の遺伝子型を確認する場合、スタンダードセットと明らかに異なるピークが検出される可能性があり、ピークの実測値 (bp) を記録し X (xxx bp)、Y (yyy bp) として区別する。なお、45 品種以外の品種の分析に際してピークの判定が困難な場合は、スタンダードセットと PCR 産物の希釈溶液を混合して解析を行うことによって、フラグメントサイズの判定を確実にすることが可能である。

- ③ 本識別技術では、塊茎の皮色に変化した突然変異系統である「レッドムーン」と「グラウンドペチカ」、「インカのめざめ」と「北海 98 号」の2組の組み合わせは相互に識別できない。

表3 ばれいしょ45品種の6マーカーにおける遺伝子型

| 品種名 | マーカー名 | 8242 | 12002 | 31924 | 35584 | 43016 | 46514 |
|-----|-------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | アーリースターチ | CF | CD | ABD | BE | AE | AC |
| 2 | アイユタカ | ABF | BD | BD | CD | GH | AF |
| 3 | アスタルテ | BCF | D | ABD | BE | E | AE |
| 4 | アトランチック | ACD | CDEF | BD | BCE | EGH | AB |
| 5 | アンデス赤 | ABG | F | BDF | BE | E | ADE |
| 6 | インカのひとみ | FG | FG | F | B | E | E |
| 7 | インカのめざめ | CG | F | F | BD | E | E |
| 8 | オホーツクチップ | CDF | BCF | BE | BEF | EG | AF |
| 9 | キタアカリ | ABF | CDF | BE | BC | AE | AE |
| 10 | きたひめ | CF | CG | BCE | BEF | EF | E |
| 11 | キタムラサキ | B | CD | ADE | DEF | E | ACE |
| 12 | グラウンドペチカ(デストロイヤー) | BDF | CD | CF | AB | CDEG | ACE |
| 13 | こがね丸 | ABD | CD | BDE | ABE | EGH | ACE |
| 14 | コナフブキ | ABD | CD | BD | B | AE | A |
| 15 | コナユタカ | ABDE | DFG | BE | BC | E | AE |
| 16 | 西海31号(ドラゴンレッド) | ADF | BCD | BD | BCF | EG | ABE |
| 17 | サクラフブキ | ABD | CD | BD | BC | AE | AE |
| 18 | さやあかね | CDF | CDF | BCD | BCDE | E | AE |
| 19 | さやか | BCDF | CG | BD | BEF | EF | AE |
| 20 | さんじゅう丸 | BDF | BC | B | D | EH | AEF |
| 21 | シェリー | ABCD | CD | AD | B | EG | E |
| 22 | シャドークイーン | BCF | CD | ABCD | BEF | EFG | AC |
| 23 | シンシア | BF | CD | BD | B | DEG | ABE |
| 24 | スノーデン | BCF | CDF | B | BC | AE | ABE |
| 25 | スノーマーチ | ABCF | CDE | B | BCE | EH | AE |
| 26 | 男爵薯 | ABD | CF | AB | BC | E | E |
| 27 | チェルシー | BCG | ACD | BCD | ABE | E | AE |
| 28 | デジマ | ABF | BCD | B | BCD | A | AF |
| 29 | とうや | ACD | BDF | BDE | BCDE | H | A |
| 30 | 十勝こがね | BDF | BCD | ABD | BCDE | EH | ACE |
| 31 | トヨシロ | ABD | CDF | BDE | BC | E | AE |
| 32 | ニシユタカ | BCF | CD | B | BDE | A | AE |
| 33 | 農林1号 | ABD | CDF | AB | BCE | E | AE |
| 34 | ノーザンルビー | BCF | CD | ABD | BDF | EF | AE |
| 35 | 花標津 | ADF | DFG | BCD | BDE | BE | AE |
| 36 | はるか | BCDF | BCDG | BD | BCEF | EFH | AEF |
| 37 | ひかる | BDEF | DE | ABCE | BCF | E | ACEF |
| 38 | ピルカ | ABCD | BCD | BD | CDE | DEH | ACE |
| 39 | 北海98号(インカルージュ) | CG | F | F | BD | E | E |
| 40 | ホッカイコガネ | ABD | CDF | ABE | BC | E | AC |
| 41 | マチルダ | CDG | DG | CD | ABE | AE | E |
| 42 | メークイン | CDF | CFG | BE | BE | FG | ABE |
| 43 | リラチップ | ACF | BCD | BE | BC | EH | AE |
| 44 | レッドムーン | BDF | CD | CF | AB | CDEG | ACE |
| 45 | ワセシロ | CDF | CDG | ABE | BE | D | AE |

著作権に関する事項：

本技術に掲載された内容は、「私的使用」または「引用」など著作権法上認められた場合を除き、無断で転載、複製、販売などの利用はできません。

免責事項：

利用者が記載された技術を利用したこと、あるいは技術を利用できないことによる結果について、農研機構は一切責任を負いません。

特許権等：

本技術については、特許権を取得しています。

<特許第 6934647 号（農研機構、ヤマザキビスケット）>

本マニュアルを業として利用する場合には、特許許諾について農研機構までご相談下さい。

<<https://prd.form.naro.go.jp/form/pub/naro01/patent>>

更新履歴：

初版 2023 年 3 月 16 日 発行