

ネギ (*Allium fistulosum*) の育種における SSR マーカーの応用[†]

塚崎 光

(平成 21 年 10 月 5 日受理)

Application of SSR Markers for the Breeding of Bunching Onion (*Allium fistulosum*)

Hikaru Tsukazaki

目 次

I 緒 言	138	e 分離 (観察) スコアおよび連鎖解析	149
II ネギ濃縮 DNA ライブラリーからの SSR クロー ンの大量単離	140	f 連鎖群の染色体への対応付け	149
1 目的	140	3 結果	150
2 材料および方法	141	a SSR マーカー	150
a 植物材料および DNA 抽出	141	b InDel および SNP マーカー	150
b SSR 濃縮 DNA ライブラリーの作成	141	c ネギ連鎖地図	150
c 塩基配列データのアセンブルとプライマー 設計	141	d ネギ連鎖群のタマネギ染色体への対応付け	150
d ネギ自殖系統による DNA 多型性の評価	141	e 連鎖群のネギ染色体への対応付け	155
3 結果	142	4 考察	156
a SSR 濃縮 DNA ライブラリー	142	IV ネギ市販 F ₁ 品種における高い異質性と SSR マー カーを利用した遺伝的トレーサビリティを付与す るための育種法の提案	158
b コア配列	143	1 目的	158
c ネギ自殖 5 系統における DNA 多型	144	2 材料および方法	158
4 考察	146	a 植物材料	158
III ネギにおける SSR を基本とした連鎖地図構築	147	b DNA 抽出および PCR	159
1 目的	147	c 遺伝的均一性の評価	159
2 材料および方法	148	3 結果	159
a 連鎖解析のための植物材料	148	4 考察	161
b SSR マーカー	148	V 他殖性作物における品種標識法のネギへの適用	162
c InDel および SNP マーカー	148	1 目的	162
d イネゲノム配列を利用したネギ用 EST マー カー開発	149	2 材料および方法	162
		a 原集団における SSR マーカーの多型性に 関する予備調査	162
		b 原集団での選抜	163

〒514-2392 三重県津市安濃町草生 360

野菜育種研究チーム

[†] 本論文は千葉大学学位審査論文 (平成 21 年 7 月) を基に編集・加筆したものである。本報告の一部は、*Breed. Sci.* 56, 321-326 (2006); *Euphytica* 157, 83-94 (2007); *Theor. Appl. Genet.* 117, 1213-1223 (2008); *Euphytica* 169, 327-334 (2009) において発表した。

c 原種圃での選抜	163
d 農業形質の評価	165
3 結果	165
a ‘下仁田’における遺伝的異質性	165
b 品種標識法	167
c 品種標識法の有効性	168
4 考察	168
VI 総合考察	168
1 ネギにおける汎用マーカーの開発	169
2 ネギにおける汎用連鎖地図	169
3 他殖性作物における品種標識法	170
VII 摘要	171
Supplemental Tables	172
引用文献	185
Summary	188

I 緒 言

ネギ属 (*Allium*) には約 750 種が含まれ (Stearn 1992), そのうち, ネギ (*A. fistulosum* L.), タマネギ (*A. cepa* L. Common onion group), ニンニク (*A. sativum* L.), リーキ (*A. ampeloprasum* L. Leek group), ニラ (*A. ramosum* L.) 等 20 種以上が食用に利用されている (van der Meer, 1997).

ネギは, 中国北西部に起源すると考えられ, 現在では主に東アジア, 特に日本, 中国および韓国で広く栽培されている (熊沢ら, 1965; Ford-Lloyd ら, 1993). 日本では, 西暦 918 年に書かれた「本草和名」にも記載されていることから, すでに, 古墳時代頃には栽培されていたと考えられる. このため様々な気候に適応した多くの在来品種が国内に存在している. ネギの品種は, 生育特性と用途により加賀群, 千住群, 九条群および櫛ネギの 4 つに分類されている (熊沢ら, 1965; Inden ら, 1990). このうち櫛ネギは, 通常不稔で花茎に珠芽を形成し栄養繁殖によって増殖する. また各品種群は, 用途により根深ネギ (長ネギ) 用品種と葉ネギ用品種に分類されるが, 近年では根深ネギはほとんどが千住群の品種であり, その多くが F₁ 品種となっている.

ネギの作付面積および生産量は, ここ 10 年ではわずかに減少しており, 2006 年度の作付面積は 2.27 万 ha, 収穫量は 49.1 万 t である (農林水産省統計部, 2008). その一方で, ネギの輸入量はここ 10 年で急増し, その

ほとんどは中国からの輸入であり (農林水産省統計部, 2008), 国内の産地を圧迫している. このため, 2001 年にセーフガード暫定措置が発動され, 一時輸入量が減少したものの, その後急増し, 2006 年度には約 8 万 t のネギが輸入されており, 国内消費量の約 2 割が輸入品と推定される.

わが国では, ネギは野菜の中でトマト, イチゴ, キュウリに次ぐ第 4 位の生産額 (1,202 億円, 2006 年) を占める (農林水産省, 2008). しかし, その経済的な重要性にも関わらず, 分子生物学的手法に基づく遺伝研究は, 十分に進んではいない. その理由として, 他殖性であり自殖弱勢が著しく, 世代を進めるのに時間がかかり (1~2 年/世代), 遺伝解析を行うための系統ならびに分離集団を育成することが容易でないことが考えられる. また, ネギのゲノムサイズは非常に大きく (1.2×10^4 Mbp, Ricroth ら, 2005), ゲノム全塩基配列が解読されたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) やイネ (*Oryza sativa* L.) の 88.5 倍および 30.8 倍のゲノムサイズを有することも, これまで研究が十分に進んでいない理由の一つと考えられる. このため, DNA マーカー開発をはじめとする遺伝研究基盤の整備が, ネギの分子育種を促進する上で必要不可欠と考えられる.

一方, 野菜品種の多くは F₁ 品種であるが, 種苗会社は, F₁ 種子の品質を決めるため収穫から販売までの種子をモニターするため, 遺伝的純度, 種子の活力および健全性等に関する一連の品質管理プログラムを整備している (McDonald, 1998). F₁ 種子の遺伝的純度をチェックするため, 多くの場合には実際栽培による形態比較が行われている. しかしながら, これらは時間がかかり試験規模が圃場面積に依存するという問題がある. そこで, 実際栽培による形態比較に代わる方法として, 生化学的調査, アイソザイム, 制限酵素断片長多型 (restriction fragments length polymorphisms, 以下 RFLP) やランダム増幅多型 DNA (random amplified polymorphism DNA, 以下 RAPD), または sequence-tagged site (STS) マーカーによる PCR などの方法が用いられてきた (Tanksley ら, 1981; Livneh ら, 1990; Hashizume ら, 1993; Ballester ら, 1998; Crockett ら, 2000; Crockett ら, 2002).

多くの野菜 (品種) がそうであるように, ネギにおいても, 農業形質についてより高い均一性を示す F₁ 品種が現在主流となっている. 1977 年 (昭和 52 年) に最初の F₁ 品種‘氷川’が育成され, 現在では, 国内産の大部分は F₁ 品種が占めている. このため, 固定品種が主流

であった頃より種子の遺伝的純度の管理が重要となっている。一般にネギの F_1 採種は細胞質雄性不稔 (CMS) を利用しているため、原種が適正に管理されていれば、 F_1 採種した種子の中に自殖あるいはきょうだい交配した種子が混在する可能性は低い。しかし、維持系統中に稔性回復遺伝子が混入する等の理由により、CMS 系統の中で稔性回復してしまう株が出現することがあり、 F_1 採種において自殖またはきょうだい交配した種子が混入する可能性がある。また、 F_1 親系統が十分に揃っていない場合や、 F_1 採種時に他の花粉が流入した場合にも品種の揃いが悪くなる。その結果、育成者 (種苗会社等) の信用問題に進展する可能性がある。

合わせて、近年のネギ輸入量の増大ならびに、輸入ネギおよびその加工品における残留農薬や産地偽装問題の発覚により、消費者の食の安全・安心に対する関心が高まり、国産ネギの輸入ネギとの差別化が望まれてきた。そこで、DNA マーカーにより国内外の品種を識別する技術の開発も必要になりつつある。

しかし、ネギは雌雄異熟性 (protandry) による典型的な他殖性作物の一つであり、これにより高頻度で交雑する (Ford-Lloyd ら, 1993)。ネギは自家和合性植物であるが、自殖することで著しい自殖弱勢が生じる。このため、ネギの放任受粉 (open-pollinated, 以下 OP) 品種は、ある程度の異型接合性 (heterozygosity) と異質性 (heterogeneity) を保持している。したがって、 F_1 品種の両親系統もまた、ある程度の遺伝的異質性を保持しながら育成されていると考えられる。

DNA 多型を検出するための簡便かつ迅速な手法である RAPD および増幅断片長多型 (amplified fragment length polymorphism, 以下 AFLP) 分析は、ネギ属の遺伝研究に用いられてきた (Wilkie ら, 1993; Bradeen ら, 1995; van Heusden ら, 2000; Ohara ら, 2005; Ipek ら, 2005)。これらの手法に用いられる DNA マーカーは通常優性の特性を示す。これに対して、King ら (1998) は、共優性の特性を示し、RAPD や AFLP よりも高い特異性をもつ RFLP を利用して、タマネギ (*A. cepa* L.) 連鎖地図を構築した。このような利点にもかかわらず、RFLP 分析は時間および労力がかかるのが問題点である (Crockett ら, 2000)。その一方で、単純反復配列 (simple sequence repeat, 以下 SSR, マイクロサテライトや simple tandem repeat (STR) と呼ばれる) は、簡便性および再現性に優れ、かつ共優性の遺伝を示すことから理想的な DNA マーカーといえる。このため SSR マーカーは、多くの作物において、

品種・系統分類や連鎖地図構築に用いられている (Jones ら, 1997)。さらに、SSR マーカーは、種子の F_1 純度を検定するための分子マーカーとしても、その共優性の遺伝性、RAPD よりも高い再現性、ゲノム中における豊富な分布といった点から非常に有用であり (Jones ら, 1997)、多くの作物において利用されている (Bredemeijer ら, 1998; Meesang ら, 2001; Rajora ら, 2003)。

以上の観点から、遺伝研究基盤の整備や F_1 純度検定ならびに品種同定を行うための DNA マーカーとして、本研究では SSR を選択した。

ネギ属における SSR マーカーに関する報告は、Fischer ら (2000) によって、タマネギから 30 の SSR マーカーを開発したのが最初である。若生ら (2002 a) および Song ら (2004) もネギのゲノムライブラリーから 118 の SSR を単離した。また、タマネギでは、発現遺伝子タグ (expressed sequence tag, 以下 EST) の大規模シーケンスから、313 の EST から 336 の SSR を含む配列が Kuhl ら (2004) によって見出され、その一部は Martin ら (2005) によってタマネギ連鎖地図の構築に用いられた。

しかしながら、これらの SSR は、ネギにおける遺伝研究基盤を整備するための DNA マーカーとしては十分な数ではない。そこで本研究では、ネギから大量の SSR マーカーを開発することを目的として、まず、SSR 濃縮 DNA ライブラリーを作成し、1,000 以上の SSR クローンを単離し、その特性を明らかにした (第 II 章)。そして、共優性マーカーである SSR を主としたネギ連鎖地図を構築するとともに、ネギ属異種染色体添加系統を用いて、連鎖群上のマーカーが座乗する染色体を直接明らかにすることにより、連鎖群を 8 本のタマネギ基本染色体に対応付けた (第 III 章)。

その一方で、SSR マーカーを用いて、ネギの F_1 純度検定ならびに品種同定が可能かどうかを検討した。しかしネギは、農業形質についてより高い均一性を示す F_1 品種においても、ある程度の異型接合性と異質性を保持している可能性がある。そこで、まずネギ市販 F_1 品種における遺伝的均一性を評価し、その上で、SSR マーカーを用いて F_1 品種の品種同定や F_1 純度検定を可能にするためのトレーサビリティを付与できる育種法 (品種標識法) を提案した (第 IV 章)。そして、ネギ在来品種を他殖性作物集団のモデルとし、異なる選抜基準に基づいて 2 種類の品種標識集団を育成し、対照集団との比較栽培を行って、本法の有効性を示した (第 V 章)。

なお、本研究の計画から実施、取りまとめにあたり、千葉大学園芸学部三位正洋教授および木庭卓人教授、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所小島昭夫企画管理部長には、終始ご助言ならびにご指導頂き、格段の感謝の意を表します。旧葉根菜研究部ユリ科育種研究室のメンバーである野菜茶業研究所の若生忠幸上席研究員、山下謙一郎主任研究員には、植物材料の栽培や調査から、研究結果のとりまとめや解釈に至るあらゆる場面で日頃からお世話になりました。ここに感謝の意を表します。また、小原隆由主任研究員および Song Yeon-Sang JSPS 特別研究員（現在 韓国農村振興庁作物科学院木浦試験場）には、ネギ自殖系統および F₂ 分離集団の育成ならびにネギにおける分子生物学実験についてご指導頂きました。ここに感謝の意を表します。布目司主任研究員には、SSR 濃縮 DNA ライブラリー作成に関してご指導ご助言いただきました。福岡浩之上席研究員には、「read 2 Marker」によるネギおよびタマネギ塩基配列データからの SSR マーカー開発ならびに「品種標識法」に関する手法構築について、ご指導ご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

農林水産先端技術研究所研究第1部の金森裕之主任研究員ならびに河野いづみ研究員には、ネギ SSR クローンのシーケンスならびに特異的プライマーによる多型解析をしていただきました。東北農業研究センター（現在独立行政法人農業生物資源研究所 QTL ゲノム育種研究センター）の米丸淳一主任研究員には、イネゲノム情報を利用したタマネギ EST 配列情報からのマーカー開発に関してご協力いただきました。ここに感謝の意を表します。山口大学農学部執行正義准教授、増崎真一博士、谷口成紀博士には、シャロット単一染色体添加系統、ネギ単一染色体欠失系統の分離ならびにマーカー座の座乗染色体特定についてご協力いただきました。ここに感謝の意を表します。

さらに、一連の分子生物学的研究に関して、最も多くのデータを出していただいた田中記三子女史を始め、根来里美女史、脇田恵子女史、池山真由美女史、紀平照子女史、田野田博子女史、三上尚子女史、庄村和彦氏、佐々木健依頼研究員（青森県グリーンバイオセンター）、高橋正典技術講習生（株武蔵野種苗園）には、圃場試験や種子の管理、実験補助等にご協力いただきました。また、堀文明氏、丸山寿美氏、増地智氏には、圃場管理全般に関してご協力いただきました。深く感謝の意を表します。

最後に、本研究を通して野菜茶業研究所内外の皆様に

は、多大なご協力やご助言を賜りました。ここに記して感謝いたします。

II ネギ濃縮 DNA ライブラリーからの SSR クローンの大量単離

1 目的

ゲノムや遺伝子の配列情報が少ない植物における遺伝研究において、比較的簡便に開発可能な RAPD や AFLP は有効な DNA マーカーであり、ネギ属においても、これまでこれらのマーカーを利用した遺伝研究が行われている（Wilkie ら, 1993; Bradeen ら, 1995; van Heusden ら, 2000; Ipek ら, 2005; Ohara ら, 2005）。しかし、これらは優性マーカーであり、再現性や他集団への適応性が乏しい等の問題がある。また RFLP は、共優性マーカーとして利用できるものの、大量の DNA が必要であり操作が煩雑、またゲノムサイズが大きなネギ類においてはバックグラウンドが影響して特異的バンドを検出しにくい等の問題がある。このため、簡便な手法で解析が可能な共優性マーカーの開発が望まれていた。

これに対して、SSR マーカーは、数塩基の単純反復配列である SSR に隣接するユニークな配列をプライマーとするために、特異性が高く PCR により簡便に解析することができる。また、ゲノム中に多数存在し、反復数の違いにより多型を検出することから、他の DNA マーカーと比べて多型性が高く、かつ1つの SSR 座で多数の対立遺伝子を検出することが可能となり、多くは共優性のパターンを示す。このため DNA マーカーとして優れている。

タマネギでは、Fischer ら（2000）がゲノム DNA から 30 の SSR 様配列を単離したのが最初である。しかしこれらは、SSR モチーフが不十分なものも含まれている、PCR 条件が煩雑、また複数座を増幅していると考えられるマーカーが多いこと等から、汎用マーカーとは言にくい。また、ネギにおいては、フェージスクリーニング法によりゲノム DNA から 118 の SSR が単離されている（若生ら, 2002 a; Song ら, 2004）。さらに、約 1.1 万のタマネギ EST の大規模シーケンスから、数百個の EST 由来 SSR マーカーが開発されている（Kuhl ら, 2004; Martin ら, 2005）。しかし、ネギにおける連鎖地図の構築等、遺伝研究基盤を整備するための DNA マーカーとしては十分な数ではない。

そこで、ネギから大量の SSR マーカーを開発することを目的とした。大量の SSR マーカーを単離するには、

ベクターへクローニングする前に SSR を含む DNA 断片を濃縮させることが効果的であり、いろいろな手法が考案されている (Kijas ら, 1994; Edwards ら, 1996; Hamilton ら, 1999; Zane ら, 2002). しかしながら、これらの多くは、SSR 濃縮がうまくいかず SSR を含むクローンの頻度が低い場合や、逆に特定の配列のみが優先的に増幅され、同じ配列のクローンばかり得られるなど、必ずしも効率的な手法とはいえなかった。このため、SSR 濃縮ライブラリーの作成を受託で行う業者もある。また、Nunome ら (2006) は、Hamilton ら (1999) の手法を改良して、効率的な SSR 濃縮ライブラリーを作成することに成功している。

本章では、SSR 濃縮 DNA ライブラリーを作成し、1,000 以上の SSR クローンを新たに単離して、その特性を明らかにした。

2 材料および方法

a 植物材料および DNA 抽出

九条群の品種‘九条太’に由来するネギ自殖系統 (J1s-14s-23s-9s-2) を SSR 濃縮 DNA ライブラリー作成のための材料とした。0.1 g の新鮮葉サンプルより DNA 抽出キット Nucleon PhytoPure (GE ヘルスケア バイオサイエンス, CA, USA) を用いて、ゲノム DNA を抽出した。ネギ属植物の葉は多糖類が多く、Nucleon PhytoPure により抽出した DNA 溶液は粘性が高いことから、さらにもう一度 DNA 抽出キットに含まれる PhytoPure レジンによる精製を行った。

b SSR 濃縮 DNA ライブラリーの作成

4 種類の SSR 濃縮ライブラリー (AFA, AFB, AFC および AFD, AF は *Allium fistulosum* を示す) は、GIS 社 (Genetic Identification Services, CA, USA) に依頼して作成した。3塩基のモチーフには、予備試験で最も多いと推察された GAA と AGC を選択した (Song, 未発表)。制限酵素処理した DNA 断片は、(GT)_n、(GA)_n、(GAA)_n および (AGC)_n プローブとハイブリダイズさせ、それぞれ AFA, AFB, AFC, AFD ライブラリーとした。ライブラリー作成において、ゲノム DNA を切断する制限酵素の種類やプローブとして用いたモチーフの反復数等の詳細については非公開のため不明であるが、SSR 濃縮 DNA 断片は、プラスミドベクター pUC 19 の *Hind*III サイトにライゲーションされている。

その他の 6 種類のライブラリーは、Nunome ら (2006) に従い作成した。ゲノム DNA は 3 種類の制限

酵素 (*Alu*I, *Hae*III, *Rsa*I) のいずれかを用いて完全消化し、PCR アダプターを連結した。DNA 断片は、ジゴキシゲニン (DIG) で標識した (GA)₁₅ または (GT)₁₅ プローブを 60°C で 16 時間ハイブリダイズさせ、60°C の 1×SSC 溶液 (0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) で洗浄後回収した。こうして得られた SSR 濃縮 DNA 断片は、DNA ポリメラーゼ KOD Plus (東洋紡, 大阪) を用いて増幅後、Klenow fragment (東洋紡) を用いて 3'末端に dATP を付加した。dATP を付加した PCR 増幅産物は、精製後 pGEM-T-easy ベクター (プロメガ, WI, USA) にライゲーションし、その後大腸菌 (*Escherichia coli*) の形質転換受容性細胞 (JM 109; プロメガ) に形質転換した。こうして作成した SSR 濃縮ライブラリーは、AFAA, AFAT, AFHA, AFHT, AFRA および AFRT とした。なお、3 番目の文字 (A, H, R) は、それぞれゲノム DNA を切断した制限酵素名 (*Alu*I, *Hae*III, *Rsa*I) を、4 番目の文字 (A, T) はプローブとして用いた配列の (GA)₁₅ および (GT)₁₅ を示す。

c 塩基配列データのアセンブルとプライマー設計

塩基配列データのアセンブル、SSR 検出およびプライマー設計は、Fukuoka ら (2005) により開発された自動 SSR 検出システム「read 2 Marker」を用いて行った。

各ライブラリーについて、①SSR 濃縮の指標として、塩基配列を決定した全クローンにおける SSR クローンの割合 (SSR 濃縮率) を算出した。また、②最終的なマーカー開発効率の指標として、全クローンにおける独立 SSR クローンの割合 (SSR ライブラリー効率) を、③クローンの重複性の指標として、SSR クローンにおける独立 SSR クローンの割合 (非冗長性) を、それぞれ算出した。なお、本研究では、単一の反復配列における最大の繰り返し回数が 6 回以上のクローンを SSR クローンと定義した。

d ネギ自殖系統による DNA 多型性の評価

由来の異なる 5 種類のネギ自殖系統、‘東京冬黒一本太’ (千住群) 由来 C1s-11s-25s-7 (C), ‘西光’ (千住群) 由来 D1s-15s-10s-8 (D), ‘下仁田’ (加賀群) 由来 F1s-7s-17s-3s-1 (F), ‘九条太’ (九条群) 由来 J1s-14s-23s-9 (J) および ‘北葱’ (台湾から導入した遺伝資源) K1s-5s-2s-2s-4s-5 (K) を用いて (各系統 S₃ から S₅ 世代)、無作為に選択した 100 の SSR 座 (Suppl. Table 1) に

における DNA 多型程度を評価した。

PCR 増幅は以下の条件で行った：94℃ で 2 分間（熱変性）処理した後，94℃ 30 秒，65℃ 30 秒（アニーリング），72℃ 30 秒（伸長）の反応を 10 サイクル（ただしアニーリング温度はサイクルごとに 1℃ ずつ下げた），94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 30 秒の反応を 35 サイクル行い，最後に 72℃ で 4 分間伸長反応を行った。Forward 側プライマーは，あらかじめ蛍光色素（6-FAM, NED, PET または VIC (Applied Biosystems, CA, USA)) で標識した。PCR 産物はキャピラリー DNA シーケンサー（ABI 3730；Applied Biosystems）を用いて電気泳動し，各遺伝子型についてソフトウェア Gene Mapper ver. 3.0 (Applied Biosystems) を用いて解析した。

各 SSR 座における DNA 多型性の程度を評価するため，ネギ自殖 5 系統における対立遺伝子数および多型情報含有値（polymorphism information content, 以下 PIC）を調査した。PIC 値は，以下の式（Anderson ら，1993）に従い各 SSR 座について算出した；

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2,$$

ここで， k は各座で検出された対立遺伝子数を， P_i は調査した 5 系統における i 番目の対立遺伝子頻度を示す。

3 結果

a SSR 濃縮 DNA ライブラリー

全 10 種類の SSR 濃縮 DNA ライブラリーから，それぞれ 69 から 2,426 クローンの塩基配列を決定した。塩基配列を決定した 10,922 クローンのうち，3,752 (34.4%) クローンが 6 回以上の繰り返しの SSR モチーフを含んでいた (Table 1)。

ライブラリー AFA, AFAA および AFAT は，高い SSR 濃縮率と SSR ライブラリー効率を示した。このうち，AFAT は最も高いライブラリー効率 (37.6%) を示し，AFAA がそれに次いだ (37.1%)。その理由としては，これらのライブラリーが，AFA と比べてクローンの重複が少なかったためである。すなわち，ライブラリー AFA T, AFAA, AFA における SSR クローンのうち独立クローンの割合を示す指標が，それぞれ 84.7%，85.0%，53.8% であり，AFAT と AFAA が本研究で用いたライブラリーのうち SSR マーカー開発に最も有用であると考えられた。しかしながら，これらの 2 つのライブラリー，特に AFAA において塩基配列を決定したクローン数が相対的に少ないことは留意すべきである。

ライブラリー AFB は，2,000 以上のクローンの塩基配列を決定した結果，中程度のライブラリー効率 (21.1%，平均より高い) となった。さらに AFB は，大部分の SSR クローンが GA の繰り返しを含む唯一のライブラリーであった。

これに対して，ライブラリー AFHA や AFHT は，非常に低い SSR 濃縮率（それぞれ 14.5%，17.6%）と

Table 1 Characteristics of SSR-enriched DNA libraries

Library	Restriction enzyme	Probe	No. of clones sequenced		SSR-containing clones		SSR-containing uniclones		Core motif									
			No.	%	No.	%	No.	%	GT	GA	AT	GAA	AGC	CCT	GGT	Total		
AFA	- ^{a)}	GT	1,725	1,009	58.5	576	33.4	57.1	569	1	6	0	0	0	0	0	0	576
AFB	-	GA	2,426	858	35.4	511	21.1	59.6	8	259	3	1	1	0	0	0	0	272
AFC	-	GAA	1,347	237	17.6	203	15.1	85.7	1	4	0	49	0	0	0	0	0	54
AFD	-	AGC	589	200	34.0	77	13.1	38.5	0	2	1	0	18	1	0	0	0	22
AFAA	<i>Afa</i> I	GA	534	233	43.6	198	37.1	85.0	144	11	8	0	1	0	0	0	0	164
AFAT	<i>Afu</i> I	GT	1,062	471	44.4	399	37.6	84.7	269	14	28	0	0	0	0	0	0	311
AFHA	<i>Hae</i> III	GA	69	10	14.5	6	8.7	60.0	4	1	1	0	0	0	0	0	0	6
AFHT	<i>Hae</i> III	GT	1,067	188	17.6	139	13.0	73.9	58	2	7	1	1	1	0	0	0	70
AFRA	<i>Rsa</i> I	GA	1,372	391	28.5	326	23.8	83.4	196	18	12	0	1	0	1	0	1	228
AFRT	<i>Rse</i> I	GT	731	155	21.2	126	17.2	81.3	82	2	7	0	2	0	0	0	0	93
Total			10,922	3,752	34.4	1,796 ^{b)}	16.4	47.9	1,331	314	73	51	24	2	1	1	1	1,796

a): Not disclosed by the supplier.
b): Duplicated clones among libraries were excluded.

なり、それゆえ非常に低いライブラリー効率（それぞれ 8.7%, 13.0%）となった。ライブラリー AFD における SSR 濃縮は中程度（34.0%）であったが、最も高いクローンの冗長性（38.5%；SSR クローンにおける独立クローンの割合が最も低い）により、ライブラリー効率は 3 番目に低かった（13.1%）。

最終的に、10 種類の SSR 濃縮 DNA ライブラリーより、合計で 1,796 個の SSR を含む独立クローンが得られた。

b コア配列

独立 SSR クローンの長さは 86 から 1,320 bp, 平均で 505 bp であり、これらのうち 1,331 クローン（74.1%）において GT 反復が含まれていた（Table 2）。(GT)_n

を含むクローンは、(GT)_n プローブで濃縮した AFA, AFAT, AFHT, AFRT ライブラリーのみならず、(GA)_n プローブで濃縮した AFB, AFAA, AFHA, AFRA ライブラリーからも多数単離された（Table 1）。AFB ライブラリーから得られたものを除いて、(GA)_n をプローブとしたライブラリーから単離されたクローンの多くは、GT 反復数の方が GA 反復数より多く、そのようなクローンは、Table 2 では、コアモチーフを「GT + others (GA 反復数が 6 以上)」または「GT (GA 反復数が 5 以下)」に分類した。

コアモチーフの平均反復数は、(GT)_n および (GA)_n クローンはそれぞれ 10.5, 10.4 であり、(AT)_n および 3 塩基反復は 7.9, 7.3 であった（Table 2）。

Table 2 Core motif and number of repeats in 1,796 SSR clones of bunching onion

Motif	Clones	Frequency (%)	Repeats (max) ^{a)}
GT	856		10.1
GT + others	475		11.2
GT (total)	1,331	74.1	10.5
GA	277		9.8
GA + others	37		14.2
GA (total)	314	17.5	10.4
AT	52		7.5
AT + others	21		9.0
AT (total)	73	4.1	7.9
Trinucleotides	78	4.3	7.3
total	1,796	100.0	10.2

a): Mean number of repeats in the longest continuous repeat sequence in each clone.



Fig. 1 DNA polymorphisms among inbred lines of bunching onion.

PCR fragments were separated by 3% agarose gel electrophoresis (left) or DNA sequencer (right).

(AT)_n プローブは用いていないが、多数 (73 クローン) の (AT)_n を含むクローンが単離され、これらのうち 21 個が、(AT)_n+(GT)_n をコアとしていた。他方、GC 反復を含むクローンは 6 つしか得られず、このうち 5 つが (GT)_n+(GC)_n コア、残りの 1 つが (GA)_n+(GC)_n コア

であった。また、ネギ SSR クローンの全配列から、ネギゲノムにおける平均 GC 含量は 37.7% と推定された。

c ネギ自殖 5 系統における DNA 多型

ネギ自殖 5 系統において、100 の SSR 座について多

Table 3 DNA polymorphisms at 100 SSR loci among 5 inbred lines of bunching onion (*Allium fistulosum*)

SSR locus	Product size (bp) in inbred line					No. of alleles	PIC
	C1s-11s-25s-7	D1s-15s-10s-8	F1s-7s-17s-3s-1	J1s-14s-23s-9	K1s-5s-2s-2s-4s-5		
AFA01A08	300	306	304	302	314	4	0.72
AFA01C06	- ^{b)}	244	242	242	-	2	0.44
AFA01C07	280	280	288	288	284	3	0.56
AFA01C09	225	225+227	223	227	225	3	0.62
AFA01F03	219	229	223	221+223	223	4	0.66
AFA02	176+184	182	180	178	190	6	0.83
AFA02F09	292	267	294	290	296	5	0.80
AFA02H08	-	190	186	186	-	2	0.44
AFA03B07	328	328	328	336+350	334	4	0.58
AFA03C06	223+243	-	-	241	219+225	5	0.78
AFA06A08	178	184	176	176+190	188	5	0.78
AFA06A10	278	278	276	284	290	4	0.72
AFA06H12	274	264+266	268	268	264	4	0.70
AFA07A08	223	225+253	223+249	223	251	5	0.68
AFA07A10	-	-	230+236	238	240	4	0.72
AFA07G10 ^{a)}	192, 206	192, -	192, 200	192, 204	192, 202	4	0.75
AFA09C01	-	201	199	203	-	3	0.67
AFA09C08	-	206	182	182	-	2	0.44
AFA10B06	302	294	294	296+302	-	3	0.74
AFA10C07	237+247	247+261	253	249	253	5	0.74
AFA11D02	-	161	165	161	-	2	0.44
AFA13H07	-	211	211	211	-	1	0.00
AFA14C03	-	200	190	192	-	3	0.67
AFA14E06	209	209	209	217	209	2	0.32
AFA14G03	216	216	214+216	216	216	2	0.18
AFA16E11	-	186	186	186	-	1	0.00
AFA17A05 ^{a)}	151, 183	151, 161	151, 161	151, 183	151, 181	2	0.64
AFA23A09	198	196+198	-	198	198	2	0.22
AFA23D07	206	204	202	204	204	3	0.56
AFA23H11	-	227	222	222	-	2	0.44
AFAA01D09	120	120	120+130	128	120+130	3	0.56
AFAA02A06	294+298	294	296	296	292+296	4	0.69
AFAA02D08	170	168	176	168	184	4	0.72
AFAA03F01	233	231	231	235	233	3	0.64

型性を調査した。その結果、検出された対立遺伝子数は、1 から 6 (平均 3.2), PIC 値は、0.00 から 0.83 (平均 0.55) であった (Fig.1, Table 3)。AFA 13 H 07, AFA 16 E 11, AFAT 02 D 10, AFAT 05 A 12, AFAT 06 B 02, AFB 17 C 10 および AFRA 13 H 07 の 7 座では、

調査した 5 系統間で多型が認められなかった。PIC とモチーフの最大反復数との間に低い正の相関 ($r = 0.36$) が認められたが、PIC とモチーフの合計反復数との間には相関 ($r = 0.05$) が認められなかった。

Table 3 (Continued)

SSR locus	Product size (bp) in inbred line					No. of alleles	PIC
	C1s-11s-25s-7	D1s-15s-10s-8	F1s-7s-17s-3s-1	J1s-14s-23s-9	K1s-5s-2s-2s-4s-5		
AFAA05F12	-	245	241	241	-	2	0.44
AFAA07E07	-	173	171+173	173	-	2	0.50
AFAT00B05	202	202+204	204	202	202	2	0.42
AFAT00C07	105+129	105	-	129	-	2	0.50
AFAT02A03	-	239	237	239	-	2	0.44
AFAT02B11	220	220	214+222	220	214+222	3	0.56
AFAT02D10	303	303	303	303	303	1	0.00
AFAT02H05	300+302	296	302	290+302	282	5	0.74
AFAT03D12	222+224	224	224	224	224	2	0.10
AFAT03H10	-	210	210	208	198	3	0.63
AFAT04E02	241	229	239	235	231	5	0.80
AFAT04E10	273	275	275	275	279	3	0.56
AFAT04F03	168	168	170	168	164	3	0.56
AFAT04H07	207+219	221	207+217	221	203+205	6	0.76
AFAT05A12	180	180	180	180	180	1	0.00
AFAT05B07	198	198	198+200	196	202	4	0.66
AFAT05D02	302	304	302	302	296	3	0.56
AFAT05D09	300	308	300	298	302	4	0.72
AFAT05F03	229	225	223	217	217	4	0.72
AFAT05G01	308	294	308	308	308	2	0.32
AFAT06B02	-	207	207	207	207	1	0.00
AFAT06B10	259	275	277	275	275	3	0.56
AFAT06C02	205	207	205	215	203	4	0.68
AFAT06H08	168	172	172	168	148+150	4	0.66
AFAT13H10	257	259	257	251	259	4	0.68
AFB01B03	204	200	206+220	204+220	206+220	4	0.74
AFB02E10	236+246	236	236	236	234+236	3	0.34
AFB03G07	192	202	192	204	202	3	0.64
AFB04A09	250+252	272	250+252	260	250+252	4	0.74
AFB04B12	243	235	231+239	233+243	233	5	0.76
AFB04F07	156	156	154+158	158	154	3	0.66
AFB05H09	268	268	270	272	270	3	0.64
AFB06C08	144	164	170	146	180	5	0.80
AFB06E05	144+149	142	-	151	-	4	0.72
AFB09D04	171	169	167	171	169	3	0.64

Table 3 (Continued)

SSR locus	Product size (bp) in inbred line					No. of alleles	PIC
	C1s-11s-25s-7	D1s-15s-10s-8	F1s-7s-17s-3s-1	J1s-14s-23s-9	K1s-5s-2s-2s-4s-5		
AFB09E05	145+147	147	145	145	143+145	3	0.54
AFB09G09	206	206	204	208+210	206	4	0.58
AFB10D09	298+302	298	298	298	290+296	4	0.48
AFB10F03	181+187	181	-	181	181+189	3	0.41
AFB10G06	279+291	279	279	279	279+289	3	0.34
AFB15A03	149+153	149	153	153	155	3	0.65
AFB16A11	152+154	168	162	162	162	4	0.58
AFB16C05	283	283	285	283+285	285	2	0.50
AFB17B09	131+133	133	129	125+129	129+131	4	0.70
AFB17C10	300	300	300	300	300	1	0.00
AFB17G01	255	251	251	251	255	2	0.48
AFB17G02	146	158	150	150	146	3	0.64
AFB20F12	228	230	228	230	226	3	0.64
AFB21A08	257	253	257	253+257	255	3	0.62
AFB23B03	133+145	133	131	133	131+143	4	0.64
AFB24E07	204	206	200	200+206	204	3	0.66
AFB25G01	218	222	210	212	220	5	0.80
AFB25H01	218+228	208	220	208	218+222	5	0.72
AFC01E09	140	140	144	146	140	3	0.56
AFC03G02	164	164	166	168	164	3	0.56
AFC08G05	293	290	290	293	293	2	0.48
AFC12	236	233	233	236	236	2	0.48
AFC12A06	208	214	206	208	198+208	4	0.66
AFRA01B05	212	212	210	210	212	2	0.48
AFRA04B10	298	284	298	296	284	3	0.64
AFRA04D09	147	147	151	151	149	3	0.64
AFRA04F12	300	300	300	306	300	2	0.32
AFRA07E10	172	172	170	178	170	3	0.64
AFRA13H07	185	185	-	185	185	1	0.00
AFRT01F02	222	222	222	220	222	2	0.32
AFRT01F06	164+172	194	194	214	172	3	0.70
Average						3.2	0.55

a): Amplified at 2 loci.

b): Did not investigated.

4 考 察

ネギのゲノム DNA から SSR を含むクロンの単離効率を上昇させるため、SSR 濃縮法を利用した。さらに、新たなマーカーを開発する上で SSR クロンの重複をできるだけ避けるために、10 種類の異なる SSR 濃縮ライブラリーを作成して、その特性を比較した。濃縮ライブラリーより得られた 3,752 の SSR を含むクロンにおける

独立クロンの頻度（非冗長性）は 47.9% (Table 1) であり、より多くのクロンについて塩基配列を決定すると、クロンの冗長性が増加する傾向にあった（データ省略）。しかしながら、ライブラリー AFA, AFB, AFAT, AFRA において、各ライブラリーとも 1,000 クロン以上の塩基配列を決定していながら、全シーケンスクロンにおける SSR を含む独立クロンの頻度

(SSR ライブラリー効率) はそれぞれ 20%以上であった (Table 1)。したがって、これらのライブラリーから、さらにクローンの塩基配列を決定することで、新たな SSR を含む独立クローンを有効に単離できると考えられる。その中でも、塩基配列を決定したクローン数は相対的に小さいものの、ライブラリー効率が 2 番目に高く、冗長性が 2 番目に低いことから、ライブラリー AFAA は、新たな SSR を含む独立クローンを数多く単離できる可能性が大きく、非常に有効だと考えられる。また、新規な (GT)_n を含む独立クローンのソースとしては、AFA、AFAA、AFAT および AFRA が、(GA)_n を含むソースとしては、AFB が有望であると考えられる。

予期せぬことに、(GA)₁₅ プローブで SSR 濃縮したライブラリー AFAA および AFHA から単離された SSR 独立クローンの大部分が、(GA)_n の代わりに (GT)_n をコアとしていた (Table 1)。AFAA では、GT コアを含むクローンに分類された 144 クローンのうち 4 つのみが、AFRA では 196 個のうち 1 つのみが 6 回以上の繰り返し GA モチーフを含んでいた (データ省略)。

GA 反復は、大部分の植物種では GT より高頻度に存在することが知られている (Lagercrantz ら, 1993)。ネギゲノムにおいて、Song ら (2004) は GT 反復が GA 反復よりも驚くほど多いことを明らかにした。また本研究では、ネギゲノム SSR の 74.1% が GT コアで、GA をコアとする SSR は 17.5% のみであった (Table 2)。つまりこれらの結果は、ネギゲノムにおいて GA 反復よりも GT 反復ははるかに多いことを示している。さらに Fischer ら (2000) は、SSR 濃縮ライブラリーから開発した 30 個のマーカーのうち 21 個が、GT 反復を含み、(GA)_n を含むクローンが 3 つしかなかったことから、タマネギゲノムにおいても、GT 反復が豊富であることを示唆した。しかしながら、Kuhl ら (2004) は、タマネギ EST データセットから GT 反復 (31 座) と同程度の GA 反復 (34 座) を見出していることに注目すべきである。この理由の一つとして、遺伝子コード領域における (GT)_n : (GA)_n 比が、ゲノム SSR の大部分を占める非コード領域における比と異なるからかもしれない。

本研究では、GC 反復の頻度が AT 反復と比べてかなり低かった。Kuhl ら (2004) は、タマネギ EST 配列のデータセットから見出した SSR のうち、(AT)_n コアが 54 個に対して (GC)_n コアは 1 個のみであったことを報告している。これまで、ネギの核 DNA における GC 含量は、37.9% (Kirk ら, 1970) 39.8% (Ricroch ら, 2005) と推定されており、この数字は、被子植物で知られている

中では最も低いものの 1 つである (Kirk ら, 1970 ; Stack ら, 1979)。EST データからは、タマネギの GC 含量は、全体では 41.9%、イントロン領域では 30.4% と推定されている (Kuhl ら, 2004)。ネギ SSR クローンの平均 GC 含量は 37.7% と推定されたことから、本研究の結果もまた、ネギ属ゲノムは GC 含量が低いことを示した。

開発した SSR マーカーは、ネギ自殖 5 系統において高い多型性を示した (Table 3)。Song ら (2004) は、ネギ 9 品種による 33 個の SSR マーカー座における平均対立遺伝子数および PIC がそれぞれ 3.3 と 0.59 と報告している。その一方で、タマネギ EST 由来 SSR マーカーは、より多型性が低く、ネギ自殖 5 系統を用いた結果では、平均対立遺伝子数および PIC はそれぞれ 2.0 および 0.34 であった (データ省略)。したがって、ネギ SSR は系統間多型検出用 DNA マーカーとして強力であると考えられる。

結論として、ネギの SSR 濃縮 DNA ライブラリーから 1,796 の SSR を単離し、一部は多型マーカーとして利用可能であることを示した。これらの SSR は、ネギ類の系統分類、連鎖地図構築および育種に利用できると考えられる。

III ネギにおける SSR を基本とした連鎖地図構築

1 目的

ネギの主な育種目標は、病害抵抗性、高収量、晩抽性、高品質 (低辛味、高糖度等) および機械栽培適性 (旺盛な初期生育) 等である。これらの形質はタマネギ育種においても重要である。連鎖地図に基づく QTL 解析は、これらの形質の遺伝様式を明らかにするのに有用である。しかしながら、ネギにおける農業形質の QTL 解析はほとんどなされていない。この理由としては、他殖性であり自殖弱勢が著しく、世代を進めるのに時間がかかるために、遺伝解析を行うための材料育成が容易でないこと、また、SSR に代表される、簡便かつ汎用性の高い DNA マーカーの数が限定的であること、さらにこれらのマーカーが多数座乗した連鎖地図が構築されていないことが挙げられる。そこで、これらのマーカーを主とした連鎖地図を構築することにより、ネギの遺伝ならびに QTL 解析、さらには分子育種が促進されるものと考えられる。

SSR マーカーはその簡便性、再現性および共優性の遺伝を示すことから望ましい DNA マーカーである (Jones ら, 1997)。ネギ属では、Fischer ら (2000) が

タマネギゲノムライブラリーより SSR マーカーを開発したのが最初である。Kuhl ら (2004) は、タマネギ EST の大規模シーケンスを行い、313 の EST 配列から 336 の SSR を見出し、88 個の EST 由来 SSR を開発した。その後 Martin ら (2005) は、King ら (1998) のタマネギ連鎖地図に、35 個の EST 由来 SSR、43 個の SNP、および 4 個の InDel (挿入・欠失) マーカーを追加した連鎖地図を構築した。この地図上の連鎖群は、同時に Shigyo ら (1996) により育成されたネギシャロット単一染色体添加系統を用いて、シャロット染色体へ対応付けた (Martin ら, 2005)。さらに、ネギゲノムライブラリーおよび 10 種類の SSR 濃縮 DNA ライブラリーより 1,940 の SSR クローンが単離されている (若生ら, 2002 a; Song ら, 2004; 第 II 章)。

そこで本章では、上述したマーカーを用いてネギ F_2 集団における多型をスクリーニングするとともに、新たに有望なマーカーを開発し、ネギおよびタマネギ由来の共優性 SSR マーカーを基本としたネギ連鎖地図を構築した。さらに、ネギ属異種染色体添加系統を用いて、いくつかのアンカーマーカーが座乗する染色体を直接解明することにより、連鎖群を 8 本のタマネギ基本染色体に対応付けた。

2 材料および方法

a 連鎖解析のための植物材料

2 つのネギ自殖系統、D1s-15s-10s と J1s-14s-23s との間の単交配に由来する F_2 集団 225 個体をマッピング集団として用いた。D1s-15s-10s は、千住群品種 '西光' から育成した S_3 系統、J1s-14s-23s は、九条群品種 '九条太' から育成した S_3 系統である。 F_2 マッピング集団は、これらの S_3 系統間 F_1 個体の自殖後代である。全 DNA は、第 II 章で述べた通りに各個体から抽出した。

b SSR マーカー

これまでネギゲノム SSR クローンから開発された 266 のプライマーセット (若生ら, 2002 a; Song ら, 2004; Ohara ら, 2005; 第 II 章)、新たに開発した 1,456 のセット、およびタマネギゲノム SSR マーカー 30 (Fischer ら, 2000) を供試して、両親系統間で多型を示すマーカーをスクリーニングした。

タマネギ EST 由来 SSR マーカーとして、Dana-Farber Cancer Institute (DFCI) *A. cepa* Gene Index v.1.0 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=onion>) から得た 11,008 のタマネ

ギ EST 配列について、read 2 Marker (Fukuoka ら, 2005) による SSR コアの検出および PCR 用プライマーセットの設計を行い、99 の有望なプライマーセットを新たに開発した。これらのプライマーセットは *Allium cepa* EST (ACE) と名付け、両親系統間で多型を示すマーカーをスクリーニングした。この他に、Kuhl ら (2004) および Martin ら (2005) により報告された 118 のタマネギ EST 由来 SSR マーカー (ACM) も同様にスクリーニングした。

PCR 条件は第 II 章で述べた通りであるが、マーカーによってはアニーリング温度を変更した (Suppl. Tables 2~4 を参照)。PCR 産物は、3% (w/v) アガロースゲルまたは 5% (w/v) 変性アクリルアミドゲル電気泳動 (Song ら, 2004) により分離し、マーカー遺伝子型を解析した。さらに、いくつかの forward 側プライマーについては、あらかじめ蛍光標識して PCR を行い、キャピラリー DNA シーケンサー (ABI 3730) を用いて泳動し、GeneMapper ver. 3.0 ソフトウェアを用いて遺伝子型を解析した。なお、STS マーカーのうち両親系統間で多型を示した割合を多型マーカー率とした。

c InDel および SNP マーカー

これまでに、若生ら (2002 b) は、*Allium cepa* CAPS (ACC) と名付けた 39 のタマネギ EST 由来 STS プライマーセットを開発している。また McCallum ら (2001)、Gökçe ら (2002)、Kuhl ら (2004) および Martin ら (2005) により報告されている合計 209 個のタマネギ EST 由来 STS マーカーについても、プライマーセットを設計した。この中には、タマネギ雄性不稔回復遺伝子座 (M_s) に連鎖する STS マーカー AOB 272 (Gökçe ら, 2002) も含まれている。さらに、93 のイントロンを挟み込むネギ用 EST マーカーをイネゲノム配列から新たに開発した (2-d 参照)。

以上、合計 341 個のタマネギ EST 由来マーカーについて、ネギ両親系統間で多型をスクリーニングした。

2% (w/v) アガロースゲル電気泳動により、両親系統間における PCR 産物のサイズを比較するとともに、単一増幅産物を得たプライマーセットを選抜した。明確な対立遺伝子の違い (約 0.1kbp 以上の PCR 産物のサイズの違い) が見出された場合は、直ちに F_2 集団に適用した。また、SNP や小さな InDel を検出するために、各 PCR 産物は、Wizard CV Gel and PCR clean-up system (プロメガ, WI, USA) を用いて精製し、DNA

シーケンサー ABI 3730 を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の整列化および SNP または InDel の検出は、ATGC ver.3 (Genetyx, 東京) を用いて行った。制限酵素認識部位で検出された SNP は、GENETYX-WIN ver.5.1 ソフトウェア (Genetyx) を用いて、増幅切断多型配列 (cleaved amplified polymorphic sequence, 以下 CAPS) マーカーに変換した。また、いくつかの SNP については、dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>, Neff ら, 2002) および Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, Rozen ら, 2000) を用いて、derived CAPS (以下 dCAPS) マーカーに変換した。7bp 以上の InDel が検出された場合は、より小さな PCR 産物を増幅してバンドの差異を明確にするために、Primer 3 を用いて再度プライマーを設計した。

d イネゲノム配列を利用したネギ用 EST マーカー開発

公開タマネギ EST 情報とイネゲノム配列を利用して、イントロンを挟み込むネギ用 EST マーカーを新たに開発した。その手法は以下の通りである。イネ cDNA 配列およびそれらのアノテーションデータは、The Institute for Genomic Research Rice Genome Pseudomolecules ver. 4.0 (ftp://ftp.tigr.org/pub/data/Eukaryotic_Projects/o_sativa/annotation_dbs/pseudomolecules/version_4.0/) から得た。BLASTN 検索により、イネ cDNA 配列と同祖 (1^{st} hit score > 80) かつイネゲノム中でユニークなタマネギ EST 配列をスクリーニングした。なお本研究では、最も相関性が高かった配列と 2 番目に相関性が高かった配列における E-value の比が 1×10^{10} 以上となる配列をユニークであると判断した。11,008 のタマネギ EST 配列からスクリーニングされた 1,090 クローンについて、イネ cDNA およびイネゲノム配列と整列化し、相同領域にイントロンを含むかどうか確認した。その後、タマネギやネギの DNA を鋳型として PCR するために、推定イントロン領域を増幅するプライマーペアを、タマネギとイネの両種で高く保存された配列から設計した。なお、その後の多型解析を行うにあたり PCR 産物のダイレクトシーケンスを可能とするために、イネゲノム DNA を鋳型とした PCR 産物における予測増幅サイズが 1kb 以下となるようにプライマーセットを設計した。このようにして、93 のイントロンを挟み込むネギ用 EST マーカーをイネゲノム配列から新たに開発した。

e 分離 (観察) スコアおよび連鎖解析

両親系統間で多型を示したマーカーについて F_2 集団を用いて多型解析を行った。いくつかのマーカーについては、プライマーの選択的アニーリングもしくは制限酵素処理した PCR 断片の小さなサイズの差異と考えられる原因により、共優性の分離を示さなかったため、これらは優性マーカーとして扱った。コンピュータプログラム MAPMAKER/EXP 3.0 b (Lander ら, 1987) を用いて連鎖解析を行い、Kosambi 係数を用いて遺伝距離として cM 値を得た (Kosambi, 1944)。また、マーカーのグループ分けの閾値を 6.0 とし、マーカー座の順番を決定した。

f 連鎖群の染色体への対応付け

ネギ連鎖群を染色体に対応付けるために、Shigyo ら (1996) により開発された、ネギにシャロット染色体を 1 本添加したネギーシャロット単一染色体添加系統 (以下添加系統, $2n = 17; FF + 1C \sim + 8C$, ここで F はネギの基本染色体セットを示し, 1C から 8C まではそれぞれタマネギにおける 1 番染色体から 8 番染色体までを示す) を供試した [Shigyo ら (1996) では、シャロット染色体を示すアルファベットとして、C の代わりに A を用いている]。これらの添加系統を用いて、任意に選んだ 30 個のネギ SSR について直接座乗染色体の特定を試みた。

また、Martin ら (2005) により構築されたタマネギ連鎖地図をレファレンスとした。この地図は、222 個のタマネギマーカー (RFLP, SSR, SNP および InDel) からなり、上述したシャロット添加系統 (Shigyo ら, 1996) を用いて、8 本の基本染色体へ対応付けられている。両連鎖地図に位置付けられている 13 個のタマネギ由来マーカーを利用して、ネギ連鎖地図とタマネギ連鎖地図とを比較した。その他のタマネギ由来マーカーのいくつかについては、シャロット添加系統を用いて、マーカー座の座乗染色体特定を試みた。

一方、Hang ら (2004) および Yaguchi ら (2009) により育成された、シャロットとネギの二基三倍体からネギ染色体を 1 本欠失した低異質三倍体 (hypo-allotriploids) ($2n = 23; CCF-1F, CCF-4F, CCF-6F, CCF-7F$ および $CCF-8F$; ここで C と F は、それぞれ *A. cepa* および *A. fistulosum* の基本的な染色体セットを表し、例えば 1F はネギの 1 番染色体を表す) を用いて、各連鎖群から任意に選んだ 141 マーカー (ネギ SSR 139 個, タマネギ SSR 2 個) の座乗染色体特定を試みた。

この低異質三倍体は、以下欠失系統と表記する。

3 結 果

a SSR マーカー

1,722 のネギゲノム SSR プライマーセットのうち、単一増幅産物を得たのが 1,406 (81.6%) であり、このうち 398 組において両親系統間で多型が検出された (Table 4)。多型検出の頻度は、設計したプライマーセットあたり 23.1%、STS マーカーあたりで 28.3% (多型マーカー率) となった。一方、30 のタマネギゲノム SSR のうち、13 (43.3%) のみがネギにおいて安定して増幅した (Table 4)。つまりタマネギゲノム SSR マーカーの 50%以上が、ネギ DNA では増幅できないか、または非特異的な多数の DNA 断片を産生した。これに対して、217 のタマネギ EST 由来 SSR マーカーのうち 163 (75.1%) がネギで増幅可能であった。タマネギ EST 由来 SSR における多型マーカー率 (11.0%) は、タマネギゲノム SSR (15.4%) と同等であった。

このようにして、ネギ SSR マーカー 398 個、タマネギ SSR マーカー 20 個 (ゲノム由来 2 個、EST 由来 18 個) が、両親系統間で多型を示したマーカーとして得られた。このうちネギ SSR については明瞭な多型を示す 259 個を、タマネギ SSR は全マーカーを F_2 集団に適用した (Table 4)。

b InDel および SNP マーカー

イネユニゾン cDNA 配列と高い相同性を示すクローンとして選抜された 1,090 クローンのうち、19 個は既に Kuhl ら (2004) および Martin ら (2005) によって、EST マーカーを開発するために用いられている。残る 1,071 の塩基配列から、イントロンを挟み込むネギ用 EST マーカーとして 93 のプライマーセットを新たに設計し、既報の 248 個のマーカーと同様にネギにおける増幅を評価した。

341 のプライマーセットのうち、253 個 (74.2%) がネギにおいて単一増幅産物を得た (Table 5)。このうち、3 マーカー (ACAAJ 79, ACAAX 07, TC 1952) については、両親系統間で 0.1 kb 以上の InDel を示し、アガロースゲルで多型を識別できた (Fig. 2 a)。また、両親系統における増幅産物の塩基配列を決定した結果、これらの InDel がイントロン領域で生じていることが推定された (Fig. 2 b)。

この他の 192 マーカーについて、両親系統における増幅産物の塩基配列を決定した結果、55 マーカー座にお

いて両親系統間で多型が検出された。すなわち、10 座の計 13 ヶ所で 1~11 bp の InDel、54 座で 134 ヶ所の SNPs が検出され、うち 9 座は InDel と SNP の両方を含んでいた。上述した 0.1 kb 以上の大きな InDel を含めて、多型マーカーの頻度は 29.7% ($[3+55] / 195$ 座) であった。検出された SNP に関して、大部分 (95 ヶ所、70.9%) の SNP が、塩基転移 (transition; A/G, C/T) によるものであった。SNP の検出頻度は、1 kbp の塩基配列あたり 1.5 個と推定された。

PCR 産物の塩基配列決定により、8bp の InDel が検出された TC 0678 について、両親系統の対立遺伝子をはっきりと識別するために、プライマーセットを再設計した (Fig. 2 c)。54 座に含まれる SNP のうち、17 座については直接 CAPS マーカーに変換できた (Fig. 2 d)。また、その他の 4 座 (ACAER 46, ACAER 72, CF 439394, TC 2026) については、dCAPS マーカーに変換できたが、残りは適当なマーカーに変換できなかった (Fig. 2 e)。

このようにして、25 個の多型マーカー (InDel 4 個、CAPS 17 個、dCAPS 4 個) が得られた (Table 5)。これらは、ACAAX 07, AOB 272, TC 1891 を除いて、 F_2 集団で共優性の分離を示した。

c ネギ連鎖地図

F_2 集団における連鎖地図は、230 個の SSR (ネギ SSR 213 個およびタマネギ SSR 17 個) ならびに 25 個のタマネギ由来非 SSR (InDel 4 個、CAPS 17 個および dCAPS 4 個) マーカーが、17 連鎖群に座乗しており全長が 2,069 cM である (Fig. 3)。この地図に位置付けられているマーカーのうち、ネギ SSR 151 個、タマネギ SSR 11 個およびタマネギ非 SSR 5 個は、本研究において新たにマップされた (Suppl. Tables 2~4)。 F_2 集団に適用した残りの 52 個のマーカーは、 F_2 集団における分離の歪みもしくは他のマーカーとの有意な連鎖が認められなかったことによりマップされなかった。平均マーカー間距離は 8.1 cM であった。本連鎖地図に座乗する 11 個の SSR と 2 個の CAPS マーカーが、既報 (Ohara ら, 2005) のネギ連鎖地図にも座乗していることから、本連鎖地図の 10 連鎖群が、既報 (Ohara ら, 2005) の連鎖地図の 9 連鎖群と対応付けられた (Fig. 3)。

d ネギ連鎖群のタマネギ染色体への対応付け

連鎖地図に位置付けられた 213 のネギ SSR マーカーのうち、30 マーカーについて、シャロット添加系統を

Table 4 Number of bunching onion- and bulb onion-derived SSR markers used for our bunching onion map

	No. of primer sets designed		STS markers		Polymorphic markers		No. of markers applied to F ₂	Marker name	No. of SSR markers mapped
	No.	%	No.	% ^{b)}	No. ^{a)}	% ^{b)}			
Bunching onion									
Genomic SSR	1,722	1,406	81.6	398	28.3	259	AFA, AFAA, AFAT, AFB, AFC, AFD, AFHT, AFRA, AFRT, AFS	213	
Bulb onion									
Genomic SSR ^{c)}	30	13	43.3	2	15.4	2	AMS	1	
EST-derived SSR (original)	99	78	78.8	12	15.4	12	ACE	11	
EST-derived SSR (reported ^{d)})	118	85	72.0	6	7.1	6	ACM	5	
EST-derived SSR (total)			75.1		11.0				
Total	1,969	1,582	80.3	418	26.4	279		230	

a) Markers showing polymorphisms between the parental lines, D1s-15s-10s and J1s-14s-23s.

b) No. of polymorphic markers / No. of STS markers obtained (%).

c) Fischer and Bachmann (2000).

d) Kuhl *et al.* (2004) and Martin *et al.* (2005).

Table 5 Numbers of bulb onion EST-derived InDel, CAPS and dCAPS markers used for our bunching onion map

Primer sequence source	No. of STS markers		InDel/SNP markers ^{a)}		No. of InDels detected	No. of SNPs detected	No. of markers applied to F ₂	Marker name	No. of non-SSR markers mapped			
	No.	%	No.	%					InDel	CAPS	dCAPS	Total
Original	93	71	76.3	52	13	25.0	4	misc. ^{b)}	2	2	1	5
Reported ^{c)}	39	27	69.2	20	8	40.0	1	ACC	7	7		7
Reported ^{d)}	209	155	74.2	123	37	30.1	11	misc. ^{b)}	2	8	3	13
Total	341	253	74.2	195	58	29.7	16		4	17	4	25

a) Markers showing polymorphisms between the parental lines, D1s-15s-10s and J1s-14s-23s, including three large (>0.1kbp) InDel markers, ACAAJ79, ACAAX07 and TC1952.

b) Marker names are headed with "TC" or EST clone names such as ACA and CF.

c) Waiko *et al.* (2002b).

d) McCallum *et al.* (2001), Gökçe *et al.* (2002), Kuhl *et al.* (2004) and Martin *et al.* (2005).

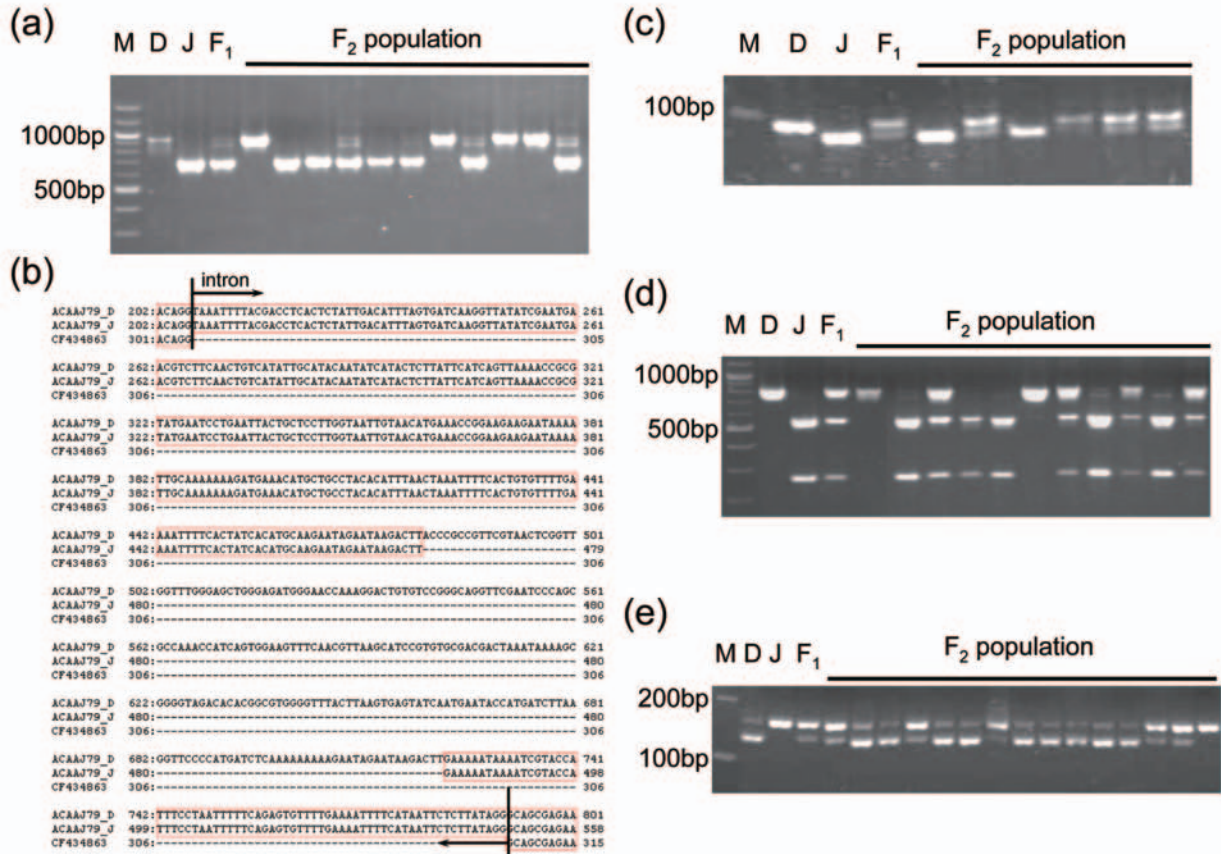


Fig. 2 DNA polymorphisms of bulb onion EST-derived markers within F₂ individuals of bunching onion.

M, 100 bp ladder; D, D1s-15s-10s; J, J1s-14s-23s.

(a): A large InDel marker ACAAJ 79.

(b): DNA sequence alignment of a part of the ACAAJ 79 locus; PCR products from the bunching onion parental lines, D1s-15s-10s (ACAAJ 79_D) and J1s-14s-23s (ACAAJ-79_J), and the bulb onion EST sequence (CF 434863) which was submitted to GenBank for bulb onion cDNA clone of ACAAJ 79. A large deletion (243 bp) was detected in a putative intron region in the parental line 'J'.

(c): InDel (8 bp) marker TC 0678.

(d): CAPS marker ACACU 34. PCR products were digested by *Ssp* I.

(e): dCAPS marker CF 439394. PCR products were digested by *Taq* I.

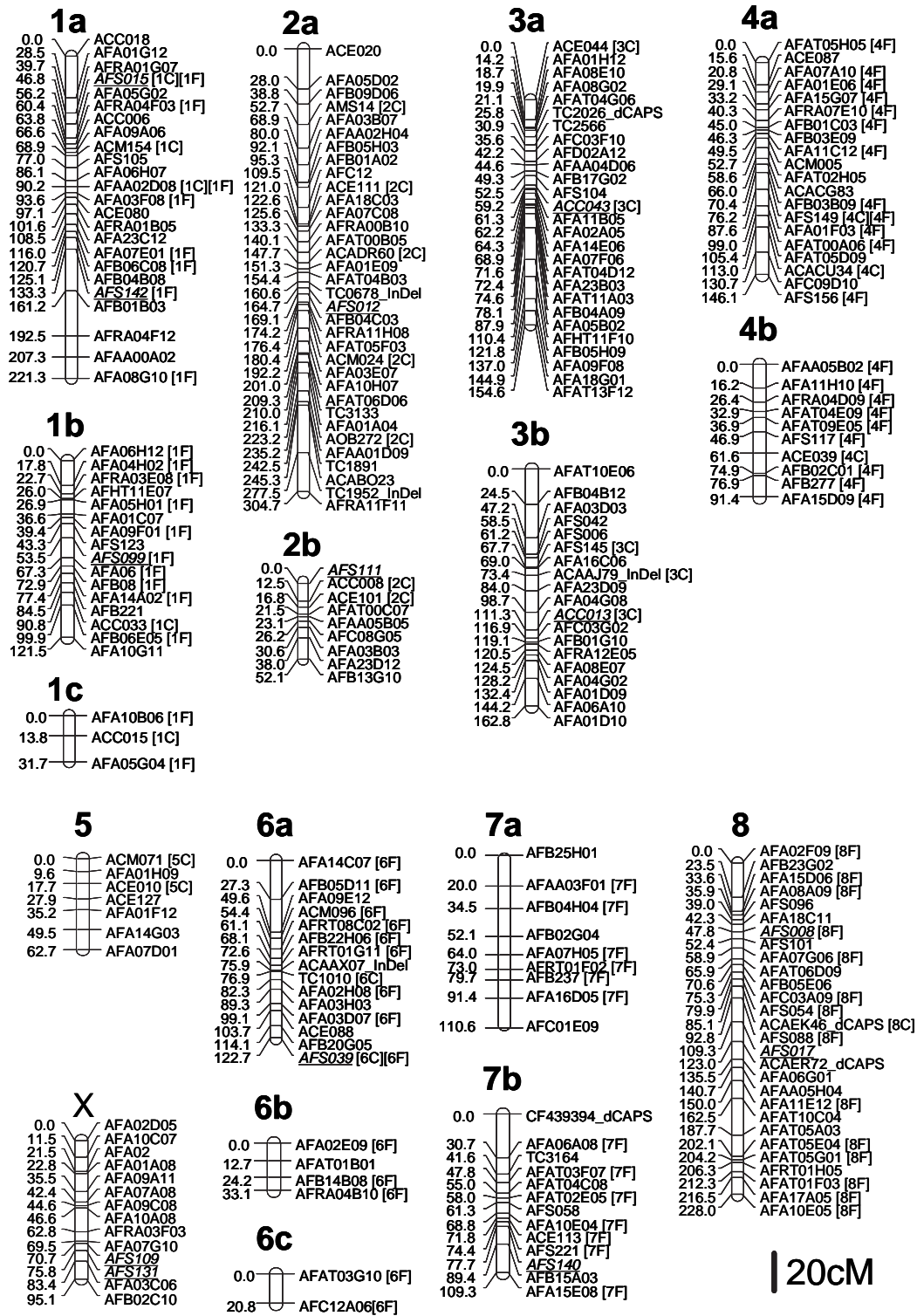


Fig. 3 Bunching onion linkage map consisting of 17 groups with 230 SSRs (213 bunching onion SSRs and 17 bulb onion SSRs) and 25 bulb onion-derived non-SSR markers (4 InDels, 17 CAPSs and 4 dCAPSs) covering 2,069 cM.

The genetic markers used to assign linkage groups to their relevant chromosomes are marked with [1 C] to [8 C] (assigned to *A. cepa* chromosomes) and [1 F] to [8 F] (to *A. fistulosum* chromosomes). Markers located on a previously reported bunching onion linkage map (Ohara *et al.* 2005) are indicated in *italic* with underlines.

用いて座乗染色体特定を試みた。その結果、8 マーカー (AFAA 02 D 08, AFB 20 G 05, AFS 015, AFS 039, AFS 104, AFS 145, AFS 149, AFRA 11 F 11) について座乗染色体を特定できた (Fig. 4 a, Table 6)。しかし残りのマーカーについては、シャロットにおける増幅の不安定性、もしくは添加系統内における多型の不一致 (おそらく、添加系統を育成するために用いたシャロットおよび/もしくはネギに残っていたヘテロ接合性が原因と考えられる) により、座乗染色体を特定できなかった。

一方、合計 42 のタマネギ由来マーカー (SSR 17 個, InDel 4 個, CAPS 17 個, dCAPS 4 個) が、ネギ連鎖地図における 17 連鎖群のうち 13 連鎖群にマップされており (Fig. 3)、うち 13 個については、Martin ら

(2005) により、既にタマネギ染色体地図上にマップされている。また、これらのうち、ACC 013 および ACC 033 (Martin ら (2005) のタマネギ連鎖地図では、それぞれ API 40, AJB 64 と呼ばれている (若生ら, 2002 b)) の 2 マーカーについては、シャロット添加系統により座乗染色体が明らかとなっている。

この他の 29 個のタマネギマーカーのうち、4 マーカー (ACC 008, ACC 015, ACC 043, AMS 14) については、座乗するシャロット染色体が既に明らかとなっている (若生ら, 2002 b; Masuzaki ら, 2006; Fig. 4 b)。本研究では、新たに 3 マーカー (ACE 039, ACE 044, TC 1010) の座乗染色体を明らかにした (Table 6)。これらの新たに対応付けたマーカーに加えて、Martin ら

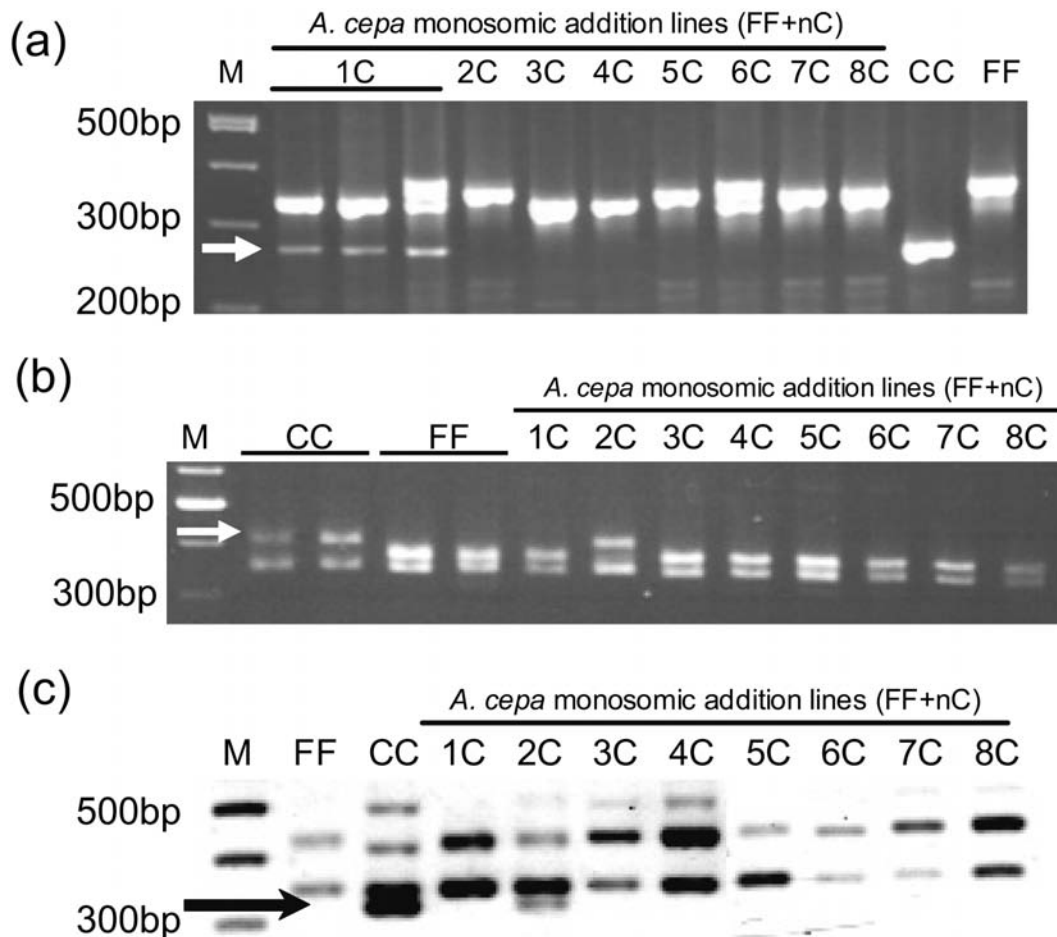


Fig. 4 Direct identification of relevant *A. cepa* chromosomes for the bunching onion-derived SSR marker AFS 015 (a), the bulb onion EST-derived CAPS marker ACC 008 digested by *Hae* III (b), and the bulb onion EST-derived CAPS marker ACADR 60 digested by *Taq* I (c) by using a complete set of bunching onion-shallot monosomic addition lines (Shigyo *et al.* 1996).

M: 100 bp DNA ladder, CC: *A. cepa*, FF: *A. fistulosum*.

Arrows show shallot-specific DNA fragments. These markers are located on 1 C (AFS 015) and 2 C (ACC 008, ACADR 60) chromosome, respectively.

(2005) が 6 C 染色体に対応付けた ACADR 60 が、本研究では 2 C に対応付けられた (Fig. 4 c). 他の 5 マーカーについては、ネギとシャロットの間で多型が認められなかった。また、残りの 17 マーカーについては調査していない。

結果として、8 個のネギ SSR および 20 個のタマネギマーカー (ゲノム SSR 1, EST 由来 SSR 8, InDel 1, CAPS 9, dCAPS 1) により、ネギ連鎖地図における 12 連鎖群が、7 本のタマネギ染色体 (染色体番号 1 C から 6 C, 8 C) と対応付けられた (Table 6).

e 連鎖群のネギ染色体への対応付け

ネギ連鎖地図上の 213 個のネギ SSR のうち、139 マーカーについてネギ欠失系統を用いて座乗染色体の特定を

試みた。70 マーカーについてはシャロットでは増幅せず、このうち 39 個については、特定の染色体欠失系統においてネギ特異的バンドが欠失することから、座乗染色体を特定できた。残りの 69 マーカーについてはシャロットでも増幅し、このうち 55 マーカーでネギとシャロット間で多型が認められ、38 マーカーの座乗染色体が特定された (Fig. 5 a, 5 b). さらに、ネギ欠失系統を用いて、タマネギ EST 由来 SSR マーカー 2 個 (ACM 096, ACE 113) が座乗する染色体も決定された。

結果として、77 個のネギ SSR および 2 個のタマネギ EST 由来 SSR により 11 連鎖群が 5 本の染色体 (染色体番号 1 F, 4 F, 6 F, 7 F, 8 F) と対応付けられた (Table 7).

Table 6 List of markers with the chromosome identity determined in *A. cepa*

Marker	Origin	Marker type	Linkage group in <i>A. fistulosum</i>	Chromosome number in <i>A. cepa</i>		Corresponding marker in <i>A. cepa</i> map	Accession No.
				Addition lines ^{a)}	<i>A. cepa</i> map ^{b)}		
ACM154	bulb onion EST	SSR	1a		1	ACM154	CF451414
AFAA02D08	bunching onion genomic	SSR	1a	1 ^{e)}		-	-
AFS015	bunching onion genomic	SSR	1a	1 ^{e)}		-	-
ACC033	bulb onion EST	CAPS	1b	1 ^{d)}	1	AJB64	AA451549
ACC015	bulb onion EST	CAPS	1c	1 ^{d)}		-	ALCLECTINA
ACADR60	bulb onion EST	CAPS	2a	2 ^{e)}	6	ACADR60	CF437227
ACE111	bulb onion EST	SSR	2a		6	ACM177	CF445960
ACM024	bulb onion EST	SSR	2a		6	ACM024	CF446873
AFRA11F11	bunching onion genomic	SSR	2a	2 ^{e)}		-	-
AMS14	bulb onion genomic	SSR	2a	2 ^{e)}		-	-
AOB272	bulb onion EST	CAPS	2a		2	AOB272-E1-	AA451592
ACC008	bulb onion EST	CAPS	2b	2 ^{d)}		-	AF218356
ACE101	bulb onion EST	SSR	2b		6	ACM066	CF437209
ACC043	bulb onion EST	CAPS	3a	3 ^{d)}		-	AJ006067
ACE044	bulb onion EST	SSR	3a	3 ^{e)}		ACM078	CF436576
AFS104	bunching onion genomic	SSR	3a	3 ^{e)}		-	-
ACAAJ79_InDel	bulb onion EST	InDel	3b		3	ACAAJ79	CF434863
ACC013	bulb onion EST	CAPS	3b	3 ^{d)}	3	API40	AA451549
AFS145	bunching onion genomic	SSR	3b	3 ^{e)}		-	-
ACACU34	bulb onion EST	CAPS	4a		4	ACACU34	CF449808
AFS149	bunching onion genomic	SSR	4a	4 ^{e)}		-	-
ACE039	bulb onion EST	SSR	4b	4 ^{e)}		-	CF442638
ACE010	bulb onion EST	SSR	5		5	ACM133	CF436768
ACM071	bulb onion EST	SSR	5		5	ACM071	CF449595
TC1010	bulb onion EST	CAPS	6a	6 ^{e)}		-	CF440857/CF449499
AFB20G05	bunching onion genomic	SSR	6a	6 ^{e)}		-	-
AFS039	bunching onion genomic	SSR	6a	6 ^{e)}		-	-
ACA EK46_dCAPS	bulb onion EST	dCAPS	8		8	ACA EK46	CF451695

a) Complete set of alien addition lines of *A. fistulosum* carrying single chromosomes of shallot (*A. cepa*) (Shigyo *et al.* 1996).

b) Reported by Martin *et al.* (2005).

c) Reported by Masuzaki *et al.* (2006).

d) Reported by Wako *et al.* (2002b).

e) Identified in the present study.

4 考 察

これまでの研究において, Ohara ら (2005) は AFLP マーカーを基本とした全長 947 cM のネギ連鎖地図を構築している. 本研究では, 2,069 cM をカバーする新たな連鎖地図を構築した (Fig. 3). 既報のタマネギ連鎖地図 (694 cM, van Heusden ら, 2000 ; 1,907 cM, Martin ら, 2005) と比較すると, 本連鎖地図は座乗するマーカーの種類および数から, ネギの基準地図となりうると考える. また, 本連鎖地図はネギにおける有用形質に関する QTL 解析のような遺伝研究にも有用であると考えられる.

ネギにおける DNA マーカーとして, タマネギ由来マーカーもまた有用であることが示された (Tables 4, 5). ネギの両親系統間で多型が認められたマーカーの頻度は, タマネギ EST 由来マーカーの中では, 非 SSR (InDel および SNP, 29.7%) マーカーの方が SSR (11.0%) より高かった (Tables 4, 5). 本研究において, 558 組

のタマネギ EST 由来プライマーセットから, 76 個の多型マーカー (SSR 18 個, InDel または SNP 58 個) を見出し, うち 41 マーカーをネギ連鎖地図に位置付けた (Fig. 3). なお, 本研究では 558 個のタマネギ EST について調査したが, Kuhl ら (2004) が報告したユニークなタマネギ EST 配列の数は 11,008 である. したがって, ネギ連鎖地図に新たにタマネギ EST 由来マーカーを多数追加することも可能だと考えられる.

ゲノム SSR 1 個を含む 42 個のタマネギ由来マーカーは, ネギ連鎖地図の 17 連鎖群中の 13 連鎖群に位置付けられた (Fig. 3). 本連鎖地図の連鎖群 2a および 2b に座乗したタマネギ由来マーカーについて, Martin ら (2005) により報告されたタマネギ連鎖地図では, AOB 272 は 2C 染色体に, その他の 4 マーカー (ACADR 60, ACM 024, ACM 066, ACM 177) は 6C 染色体に位置付けられている. Masuzaki ら (2006) は, タマネギ

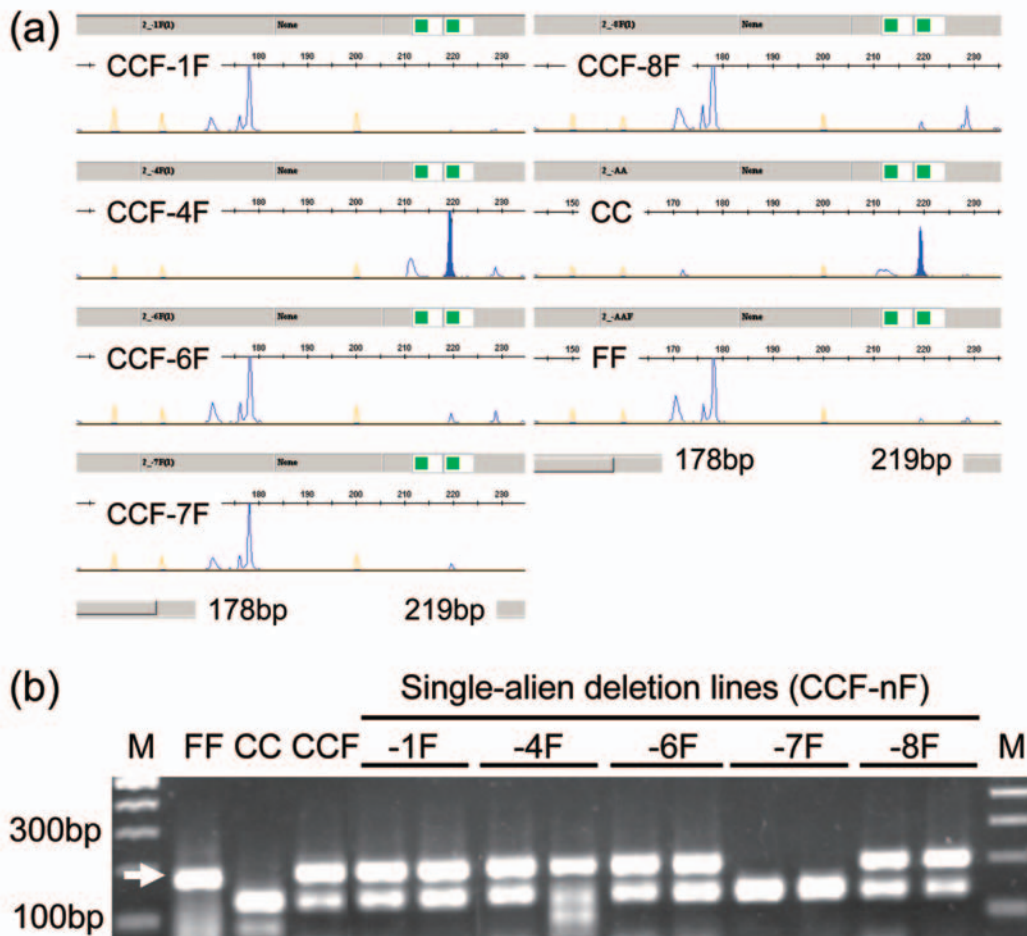


Fig. 5 Direct identification of relevant *A. fistulosum* chromosomes for bunching onion SSR markers AFRA 07 E 10 (a) and AFA 06 A 08 (b) by using allotriploid-bunching onion single-alien deletion lines.

These markers are located on 4 F (AFRA 07 E 10) and 7 F (AFA 06 A 08) chromosomes, respectively.

Table 7 List of SSR markers with the chromosome identity determined in *A. fistulosum*

Chromosome No. ^{a)}	Linkage group	SSR markers				
1F	1a	AFA03F08	AFA07E01	AFA08G10	AFAA02D08	AFB06C08
		AFS015	AFS142	AFRA04F03		
		AFA04H02	AFA05H01	AFA06	AFA06H12	AFA09F01
	1b	AFA14A02	AFB06E05	AFB08	AFRA03E08	AFS099
		AFA10B06	AFA05G04			
	4F	4a	AFA01E06	AFA01F03	AFA11C12	AFA15G07
AFAT05H05			AFB01C03	AFB03B09	AFB03E09	AFRA07E10
AFS149			AFS156			
4b		AFA11H10	AFA15D09	AFAA05B02	AFAT04E09	AFAT09E05
		AFB02C01	AFB277	AFRA04D09	AFS117	
6F	6a	ACM096 ^{b)}	AFA02H08	AFA14C07	AFB05D11	AFB22H06
		AFRT01G11	AFRT08C02	AFS039		
		AFA02E09	AFB14B08	AFRA04B10		
	6b	AFA02E09	AFB14B08	AFRA04B10		
		AFA02E09	AFB14B08	AFRA04B10		
	6c	AFAT03G10	AFC12A06			
7F	7a	AFA07H05	AFA16D05	AFAA03F01	AFB04H04	AFB237
		ACE113 ^{b)}	AFA06A08	AFA10E04	AFA15E08	AFAT02E05
	7b	AFAT03F07	AFS221			
8F	8	AFA07G06	AFA08A09	AFA10E05	AFA11E12	AFA15D06
		AFA17A05	AFAT01F03	AFAT05E04	AFAT05G01	AFC03A09
		AFS008	AFS054	AFS088		

a) Determined by using allotriploid-bunching onion single-alien deletion lines (Hang *et al.* 2004, Yaguchi *et al.* 2009).

b) Bulb onion EST-derived SSR marker.

ゲノム SSR マーカー AMS 14 が 2 C 染色体に座乗することを明らかにしている。今回構築したネギ連鎖地図において、これらのマーカーは、連鎖群 2 a (ACADR 60, ACM 024, ACM 177 [本連鎖地図では ACE 111], AMS 14) もしくは 2 b (ACM 066 [本連鎖地図では ACE 101]) に座乗している。これらのうち、ACE 101, ACE 111, ACM 024 の 3 マーカーは、ネギとシャロットの間で多型が認められなかった (データ省略)。本研究では、ACADR 60 および ACE 101 と強く連鎖する ACC 008 の座乗染色体を、添加系統を用いて明らかにした (Fig. 4 b, 4 c)。さらに、ネギ連鎖地図において連鎖群 2 a に位置する ACM 024 および 2 b に位置する ACE 101 は、別のタマネギ分離集団において AOB 272 に連鎖している (J. McCallum, 未発表データ)。したがって、ネギ連鎖群 2 a および 2 b は、タマネギ 2 番染色体に対応すると結論付けた (Table 6)。

ネギおよびタマネギは、異なる群 (alliance), つまりそれぞれ *Altaicum* 群および *Cepa* 群に分類されるが、ともにネギ属 *Cepa* 節に属し、同じ染色体数 ($2n = 16$) である (Fritsch *ら*, 2002)。本研究において、添加系統および欠失系統を用いることにより 103 マーカーについて座乗染色体が明らかとなり、ネギ連鎖地図を構成する

17 連鎖群のうち 16 連鎖群がタマネギの 8 本の基本染色体と対応付けられた。すなわち、28 マーカーがタマネギ、79 マーカーがネギにおける座乗染色体が明らかとなり、うち AFAA 02 D 08, AFS 015, AFS 039, AFS 149 の 4 個のネギ SSR マーカーが、タマネギとネギの両種の染色体に対応付けられた (Fig. 3, Tables 6, 7)。この新たなアンカーマーカーのセットは、81 個のネギ SSR, 11 個のタマネギ SSR および 11 個の非 SSR マーカー (InDel 1 個, CAPS 9 個および dCAPS 1 個) からなる。これらの結果から、ネギとタマネギの間では、高いレベルでのマクロシンテニーが存在すると結論付けられる。

X と名付けた残りの連鎖群は、どの染色体とも対応付けられなかった。新たなタマネギ由来マーカーを位置付ける、または共通マーカーにより別のネギ連鎖地図と連鎖群を統合することによって、連鎖群 X の対応する染色体が明らかになると考えられる。

ネギは、タマネギと比較して、一年生植物であることおよびゲノムサイズが約 28% 小さい (Ricroth *ら*, 2005) ことから、遺伝研究により適していると考えられる。上述したように、ゲノムシンテニーはネギとタマネギの間で高く保存されていると考えられる。しかしながら、ネギとタマネギの種間雑種における減数分裂におい

て、最低2ヶ所で異型の二価染色体 (heteromorphic bivalents) が観察されている (Peffley, 1986). このことは、転座や挿入のような染色体突然変異が、ネギとタマネギの種分化に関係している可能性を示唆している。そのような染色体突然変異についての詳細な研究のためには、両種の連鎖地図上により多くの共通マーカーをプロットし、ゲノムワイドなレベルでシンテニーを評価する必要があると考える。

IV ネギ市販 F₁ 品種における高い異質性と SSR マーカーを利用した遺伝的トレーサビリティを付与するための育種法の提案

1 目的

植物の主な繁殖様式は、自殖性、他殖性、栄養繁殖性に大別できる。自殖性作物は遺伝的には同型接合で固定しており、栄養繁殖性作物は遺伝的には異型接合性が高いがクローンにより増殖されるために、これらの作物では品種内の遺伝子型は均質である。このため、理論上は品種の遺伝子型を推定することが1個体で可能であり、実際に、イネ、インゲンマメ、イチゴなどでは品種識別技術が開発、実用化されている (DNA 品種識別技術検討会, 2003)。

一方、他殖性作物では異なる個体間の交雑を基本として系統が維持されるので、一般に異型接合性が高い。人為的に自殖することも可能であるが、自殖を繰り返すことによって自殖弱勢が生じやすく、収量や採種量が著しく減少して、系統が途絶えることもある。このため、品種・系統の遺伝子型を完全に固定することは困難であり、F₁ 品種の両親系統には、通常数回の自殖により、農業形質 (外観、品質、耐病性、交雑親和性等) については固定させながらも、その他の部分についてはかなりの雑駁性を保持した系統が用いられている。したがって他殖性作物に

おける DNA 品種識別法を確立するためには、品種間の DNA 多型を調査するとともに、品種内個体間における DNA パターンを調査し、総合的に評価する必要がある。

種子の純度検定は、これまで実際栽培による形態比較やアイソザイム分析が主流であった。しかし、形態比較では時間がかかり、試験規模がスペースに依存する。またアイソザイム分析は、簡便で容易であるが、遺伝子型が近い間での多型を検出するのは困難である (Crockett ら, 2000)。これに対して、PCR ベースの技術は、簡便、迅速、かつ自動化しやすいという利点がある。その優れた簡便性および迅速性から、RAPD 技術は DNA 多型を検出するのに広く利用されているものの、優性マーカーであること、再現性や汎用性といった問題点がある (Klaas ら, 2002)。

これまで、ネギにおける遺伝研究基盤を整備するために SSR マーカーを開発してきた (第II章, 第III章)。ネギは、雌雄異熟性による典型的な他殖性作物の一つであり、これにより高頻度で交雑する (Ford-Lloyd ら, 1993)。このため、現在ネギにおいても主流となっている F₁ 品種の両親系統もまた、ある程度の遺伝的異質性を保持していると考えられる。

そこで、本章では、市販 F₁ 品種の遺伝的均一性のレベルを調査することにより、SSR マーカーがネギ F₁ 純度検定に利用できるかどうか評価した。さらに、SSR マーカーを用いて品種同定や種子純度決定を容易にすることを可能にするためのトレーサビリティを付与できる育種法を提案した。

2 材料および方法

a 植物材料

ネギ 8 品種 (F₁ 品種 6 品種, OP 品種 ‘吉蔵’, 在来品種 ‘尾島’) および *A. altaicum* Pall. 系統 JP 138870

Table 8 Plant materials used for DNA fingerprinting.

Species	Cultivars	Type	Seed company (Genebank)	Accession No.	Seed production year
<i>A. fistulosum</i>	Fuyuougi 2	F ₁	Sakata Seed		1997
	Natsubasyo	F ₁	Kaneko Seed		1999
	Natsuougi 2	F ₁	Sakata Seed		1998
	Shuitsu	F ₁	Musashino Seed		2001
	White Tower	F ₁	Takii Seed		1998
	Yuzan	F ₁	Tokita Seed		1998
	Yoshikura	OP	Musashino Seed		2000
	Ojima	landrace	MAFF	JP25445	1998
<i>A. altaicum</i>	JP138870		MAFF	JP138870	

を用いた (Table 8). *A. altaicum* は、ネギに最も近い祖先種と考えられている (Friesen ら, 1999). 200 穴セルトレイに播種し、播種 7 週後に圃場へ苗を定植した。なお、全てのネギ品種は、日本で最も広く栽培されている千住群に属する。また、*A. altaicum* 系統は、1997 年にカザフスタン共和国アルタミー植物園 (Almaty Botanical Garden) から導入し、野菜茶業研究所で放任受粉による集団採種を行い、増殖した種子を用いた。

b DNA 抽出および PCR

播種後約 3 ヶ月の植物体 (各品種・系統とも無作為に選んだ 33 個体) の葉 0.1g から、第 II 章で述べた通りに全 DNA を抽出した。

14 個の SSR マーカーを用いて各個体の遺伝子型を調査した (Suppl. Table 5)。これらの SSR 座の多くは、ネギ 9 品種を用いた既報の研究 (Song ら, 2004) において高い多型性を示している。PCR 条件は第 II 章で述べた通り (ただしプライマーのアニーリング温度は 50°C) に行い、PCR 産物は、Song ら (2004) に従って 5% (w/v) 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。

c 遺伝的均一性の評価

ネギ種内における各 SSR 座の DNA 多型程度は PIC により評価し、以下の式 (Anderson ら, 1993) に従って各 SSR 座について算出した；

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2,$$

ここで、 k は SSR 座で検出された全対立遺伝子数、 P_i は調査したネギ全個体 (8 品種, 各 33 個体) における i 番目の対立遺伝子頻度を示す。

遺伝的同一性を評価するために、対立遺伝子数、遺伝子型数および優占的な遺伝子型を示す個体の割合 (Pr%) を各品種・系統について算出した。ある品種・系統において、5%以上の個体が優占的な遺伝子型と異なる遺伝子型のパターンを示した場合、この座は品種・系統内で多型であると定義した。また各品種・系統について、品種・系統内で多型を示す SSR 座の割合は、調査した 14 座における多型遺伝子座の割合 (PI%) として表記した。

3 結 果

全ての SSR プライマーセットにおいて、各植物で 1 ないし 2 本のバンドが増幅され、各品種における多型および遺伝的異質性が明らかとなった (Fig. 6)。SSR マーカーの PIC 値は、ネギ 8 品種の中では 0.41 から 0.76 となり、14 座の平均は 0.59 であった (Table 9)。

品種内の各座で検出された対立遺伝子数は、ネギ 8 品種では 3 から 7 で、平均は 4.3 であった (Table 9)。*A. altaicum* 特異的対立遺伝子は、AFS 096, AFS 146, AFS 149 の 3 座で検出された (データ省略)。

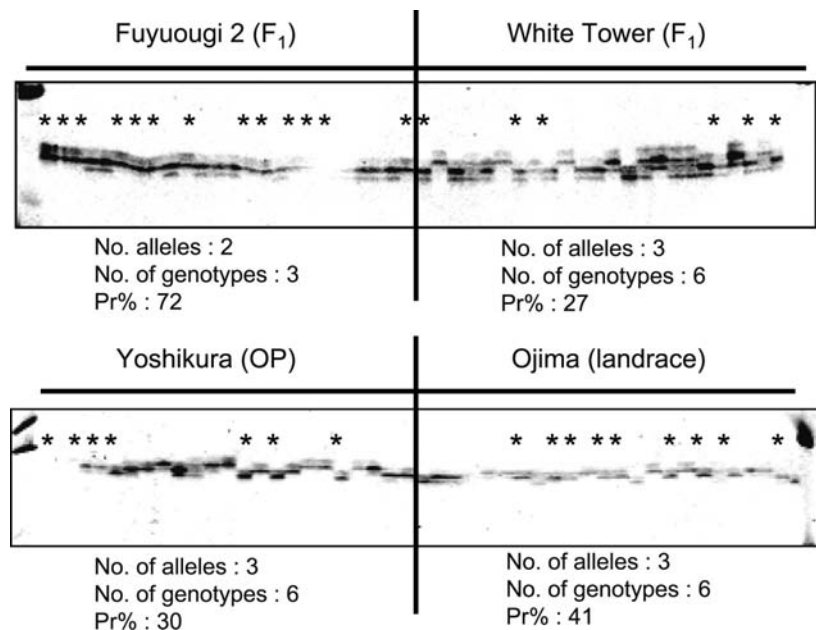


Fig. 6 Example of polymorphism among 24 plants, each from four cultivars of bunching onion. Detected at a SSR locus AFS 131. PCR products were separated on 5% denatured polyacrylamide gels. Asterisks indicate the prevailing genotype in each cultivar.

Table 9 Polymorphisms of 14 SSR loci among eight bunching onion cultivars

Locus	No. of alleles	PIC	Locus	No. of alleles	PIC
AFS039	5	0.57	AFS123	7	0.62
AFS096	5	0.66	AFS131	3	0.60
AFS099	5	0.57	AFS142	5	0.76
AFS104	3	0.64	AFS145	3	0.41
AFS105	5	0.66	AFS146	4	0.54
AFS110	3	0.54	AFS149	5	0.68
AFS111	4	0.47	AFS152	3	0.54
	Mean		Mean	4.3	0.59

Table 10 No. of alleles, genotypes, proportion of plants exhibiting the prevailing genotype (Pr%) and proportion of polymorphic loci (Pl) using 14 SSR markers in bunching onion

Species	Cultivars	No. of alleles			No. of genotypes			Pr%		Pl %	
		Max.	Min.	Avg.	Max.	Min.	Avg.	Min.	Avg.		
<i>A. fistulosum</i>	Fuyouugi 2 (F ₁)	4	2	2.7	6	2	3.4	97	23	63	100.0
	Natsubasyo (F ₁)	5	2	3.1	7	2	4.5	84	39	56	100.0
	Natsuougi 2 (F ₁)	4	2	2.9	5	1	3.4	100	45	70	85.7
	Shuitsu (F ₁)	4	2	2.9	5	1	3.2	100	31	73	85.7
	White Tower (F ₁)	6	2	3.3	7	2	3.4	88	27	56	100.0
	Yuzan (F ₁)	4	2	3.1	5	2	4.1	70	30	49	100.0
	(mean of 6 F ₁ cultivars)	4.5	2	3.0	5.8	1.7	3.7	90	32	61	95.2
	Yoshikura (OP)	5	2	3.2	9	2	5.1	88	28	50	100.0
	Ojima (landrace)	7	2	3.6	15	2	5.6	80	18	45	100.0
	(mean of 8 cultivars)	4.9	2	3.1	7.4	1.8	4.1	88	30	58	96.4
<i>A. altaicum</i>	JP138870	6	2	3.4	7	2	4.6	82	27	49	100.0
	mean	5.0	2	3.1	7.3	1.8	4.1	88	30	57	96.8

各座における各品種内の対立遺伝子数は、2 から 7 となり、平均は 3.1 であった (Table 10). 各品種における遺伝子型数は、1 から 15 で、平均は 4.1 であった. 在来品種 ‘尾島’ では、AFS 123 座において 7 種類の対立遺伝子が検出され、それゆえ 15 の遺伝子型が見出された. 各品種における 14 座での Pr% 値の平均は 45 から 73 で、その 8 品種平均が 58 であった. F₁ 品種は高い異質性を示したが、OP 品種 ‘吉蔵’ および在来品種 ‘尾島’ はさらに高い異質性を示した. F₁ 2 品種 ‘夏場所’ および ‘ホワイトタワー’ における平均 Pr% は、OP 品種と同程度であり、‘雄山’ および在来品種における平均 Pr% は、調査した *A. altaicum* 系統と同程度であった (Table 10).

調査した 112 座 (8 品種 × 14 SSR 座) のうち、‘夏扇 2 号’ の 2 座 (AFS 104, AFS 145) および ‘秀逸’ の 2 座 (AFS 105, AFS 110) の合計 4 座のみが、品種内で高い同質性を示した. しかしながら、その他の大部分の座については、上記 2 品種を含めて品種内多型を示した. 結果として、調査した品種における *PI* 値は非常に高かった (86 もしくは 100%) (Table 10).

4 考 察

ネギは、自家和合性植物であるが、通常雌雄異熟性で虫媒受粉によるため高頻度で交雑する (熊沢ら, 1965; Ford-Lloyd ら, 1993). したがって、ネギ在来品種および OP 品種は高レベルでの異型接合性と異質性を維持していると考えられる. これまで、アイソザイム分析に基づいて、在来品種において高レベルの遺伝的異質性が存在することが、ネギ (Haishima ら, 1993) およびタマネギ (Rouamba ら, 2001) で報告されている. 本研究では、遺伝的異質性を評価するために SSR マーカーを利用した. 各 SSR 座における対立遺伝子数および PIC 値は、用いた SSR が多型性の高いマーカーであることを示している (Table 9). これら SSR 座の解析の結果、市販 F₁ 品種においても高い異型接合性程度が見出された (Fig. 6, Table 10). 本研究では、異質性の程度を評価するために、異型接合性程度 (He; Nei, 1973) の代わりに Pr% 値を用いた. その理由として、F₁ 品種は完全に異型接合性であっても高い同質性となる場合があるためである. もし F₁ 品種が 2 つの純系の交雑により作出されるのなら、同型接合性または異型接合性に関わらず、全ての遺伝子座は遺伝的に同質である. しかしながら、本研究では、各品種においてかなりの頻度で 2 以上の遺伝子型が見出され、OP 品種や在来品種のみならず F₁ 品種におい

ても非常に高い *PI* 値を示した (Table 15). それゆえ、全てではないにしろ、既存 F₁ 品種の両親系統のほとんど全ては遺伝的に均一ではないと考えられる. したがって、既存の F₁ 品種では、品種内における遺伝的均一性は高いことから、現状では SSR マーカーは F₁ 純度検定には利用できないと考えられる.

タマネギの F₁ 種子生産において、両親系統は、自殖弱勢を避けるために通常 2-3 回のみ自殖し、その後系統内で放任受粉することにより維持している (Jakše ら, 2005). 同様な手法がネギ育種においても用いられていると考えられる. さらに、ある F₁ 雑種種子は、種子生産コストを減らすために三元交雑や複交雑 (四元交雑) により生産しているかもしれない. 今回の結果は、いかにネギ育種家が自殖弱勢を避けるために注意しているかが明らかとなるとともに、既存のネギ品種についても適切な遺伝子型を同定することができないことを示している.

一般的に、F₁ 品種における農業形質は、OP 品種や在来品種よりも高く揃っている. ネギ F₁ 品種においても、OP 品種や在来品種よりも遺伝的に揃っている傾向にあった (Table 10). しかしながら、ネギの育種は多くの年月がかかり (通常世代あたり 1~2 年)、またネギは著しい自殖弱勢を示すため、ネギにおいて純系を育成することは非常に難しい. さらに、実際栽培による形態比較に基づく F₁ 純度検定は、植物体の生長が極端に遅いために、時間がかかり大面積を必要とする.

そこで、ネギ F₁ 品種において品種同定や F₁ 純度検定における迅速性、簡便性および正確性を高めるための手法として「品種標識法」を提案する (Fig. 7). この手法は、以下の 4 つのステップからなる;

1. 互いに強く連鎖していない少数の高い多型性を示す SSR 座を選定し、F₁ 雑種の両親系統について、選定した各 SSR 座に目印とする (標識する) 対立遺伝子を決める. その際、両親系統で異なる対立遺伝子となるようにする.
2. 選定した全ての SSR 座について、目印とした対立遺伝子の同型接合型を示す個体を原種圃から選抜し、これを標識両親系統とする.
3. 標識両親系統は、それぞれの集団内において放任受粉により増殖する. このことにより、選定した SSR 座の標識は維持 (同型接合) されつつ、他の大部分が異型接合となることから、自殖弱勢は生じていないことになる.
4. 標識両親系統間で F₁ 採種する. そして選定した SSR 座の遺伝子型を調査することで、品種同定や F₁

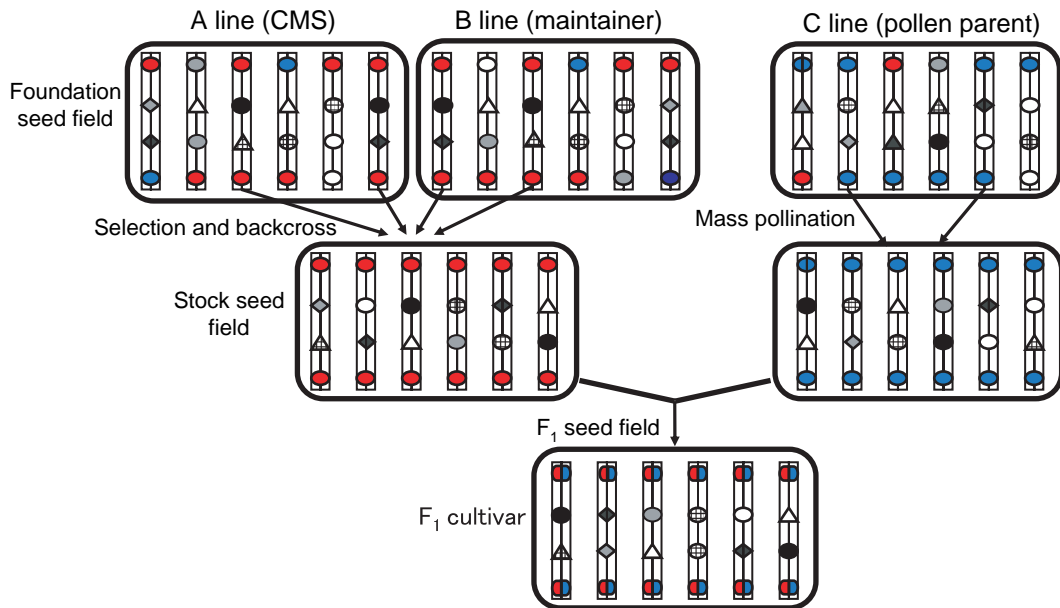


Fig. 7 The “SSR-tagged breeding” scheme to achieve cultivar identification and F_1 purity test in bunching onion. In bunching onion breeding, most of the F_1 seeds are produced by using the cytoplasmic male sterility (CMS) system as in bulb onion. In this case, the top and the bottom loci are selected and genetically fixed into a genotype denoted by a red circle for the seed parent and blue circle for the pollen parent. These two parental lines are crossed to produce F_1 hybrid seeds, which are heterozygous and homogeneous at the selected loci but heterogeneous at many others. For F_1 purity test or cultivar identification, these selected loci can be used.

純度検定を行うことが可能となる。

本手法により育成された品種は、個体が少数の SSR 座について望ましい遺伝子型かどうかを検定することにより効率的に同定できる。さらに、選定した SSR 座における均一性の程度に基づいて、 F_1 種子純度も迅速かつ正確に評価できる。

「品種標識法」は、ネギのように自殖弱勢が著しいあらゆる他殖性作物においても適用できると考えられる。そのような作物において、育成者権を保護し、品種のトレーサビリティを付与するのにも、本手法は有用であると考えられる。

V 他殖性作物における品種標識法のネギへの適用

1 目的

DNA マーカーによる品種同定は、新しい品種における育成者権を保護するために有効な手段の一つである。既に、RAPD, STS, CAPS および SSR は、自殖性ならびに栄養繁殖性作物における品種同定に利用されている (Bellamy ら, 1996; Meesang ら, 2001; Kunihisa ら, 2003; 大

坪ら, 2005) が、これらの作物は通常品種内の各個体が非常に高程度もしくは完全に同型接合性を示す。これに対して、他殖性作物では、自殖弱勢が遺伝的固定を妨げ、その結果として集団内の異型接合性を引き起こすと考えられるため、既存品種の正確な同定はしばしば非常に難しい。実際に、近年育成された F_1 品種でさえも市販種子集団において高い異型接合性が存在していた (第IV章)。したがって、他殖性作物であるネギにおいては、DNA マーカーによる既存品種の正確な同定は極めて困難である。

第IV章では、他殖性作物において品種同定や F_1 品種種子の純度チェックを簡便で正確に行うための「品種標識法」を提案した。これは原種圃で少数の SSR 座が同型接合性の個体を選抜する手法である。本章では、他殖性作物集団の例としてネギ在来品種を用いて、品種標識法の有効性を示した。

2 材料および方法

a 原集団における SSR マーカーの多型性に関する予備調査

在来品種 ‘下仁田’ 37 個体を原集団 (starting population) として予備調査に供試した。ネギ連鎖地図に位

置付けられている 17 個の SSR マーカーを DNA フィンガープリントに用いた (Suppl. Table 6). これらのマーカーは、163 マーカー (AFLP 111 個, SSR 48 個, CAPS 4 個) が座乗する 17 連鎖群, 1,098 cM からなる AFLP を基本としたネギ連鎖地図上に位置付けられている (Fig. 8). また AFS 103 を除いて, これらの SSR マーカーは SSR を基本とした連鎖地図にも位置付けられている (Fig. 3).

PCR およびアクリルアミドゲル電気泳動は, Song ら (2004) の方法に従った. 各個体について 17 座の遺伝子型を解析して, 第 IV 章で述べた通りに, 原集団における対立遺伝子数, 遺伝子型数, PIC を算出した. また Pr% 値については, 最頻対立遺伝子の割合 (PrA%) および優占的な遺伝子型を示す個体の割合 (PrG%) をそれぞれ算出した.

b 原集団での選抜

「品種標識法」においてマーカー情報は有効である. マーカー情報を利用した品種標識法の利点について, Table 11 に示す. 予備試験の結果から, 2 つのマーカーセットを選択した, すなわち, Set A (AFS 039, AFS

088) と Set B (AFS 099, AFS 131, AFS 140, AFS 142) である (Table 12). これらのマーカー座は以下の理由により選定した; (1) 安定した PCR 増幅, (2) Set A については, PIC 値が高い (結果として PrA% (Prevailing allele %) や PrG% (Prevailing genotype %) は低くなる) マーカー, (3) Set B については, PIC が中程度もしくは低い (結果として PrA% や PrG% は高くなる) マーカー, そして (4) 標的とする対立遺伝子とそれ以外の対立遺伝子との間で PCR 産物の差が大きい (選択した遺伝子型を容易に識別できる).

2002 年秋に, 選択した全マーカー座について, 最頻対立遺伝子が同型または異型接合性の遺伝子型で検出された個体を, Set A および Set B についてそれぞれ 12 および 20 個体選抜し, このうち無作為に 7 および 12 個体を鉢上げして, 2003 年春に自殖した (Fig. 9). 残りの 18 個体も鉢上げ後自殖したが, 1 個体については採種量が少なく廃棄した.

c 原種圃での選抜

圃場で劣悪個体を除去することにより予備選抜した各 S_1 植物体の葉から全 DNA を抽出し, Set A または Set

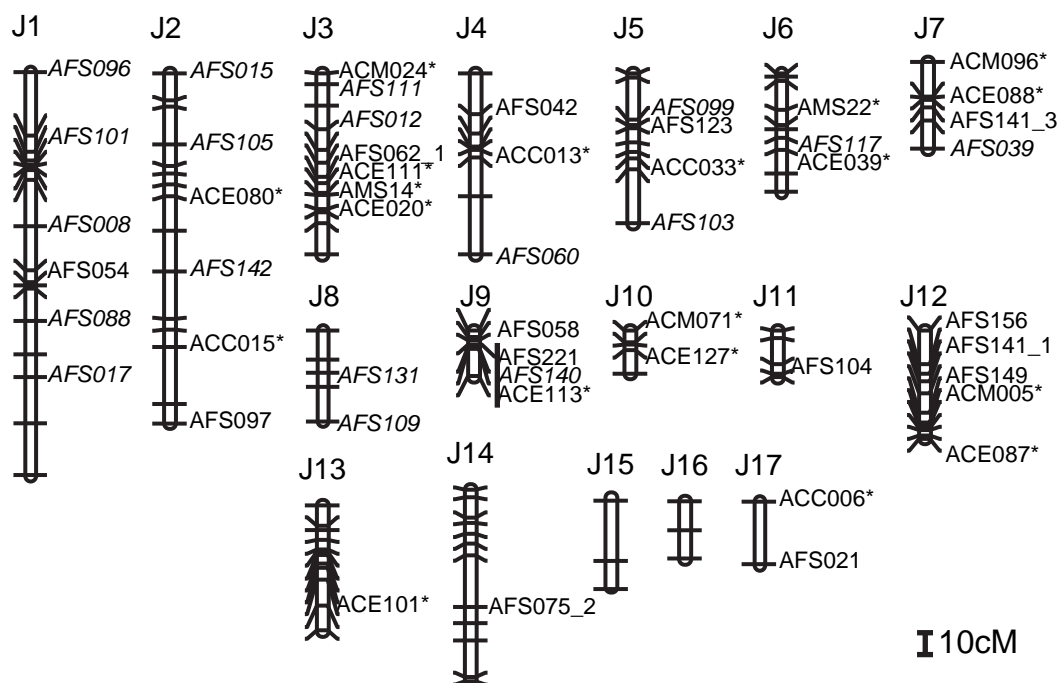


Fig. 8 SSR markers on the linkage map of the backcross population of bunching onion.

The map consists of 17 linkage groups (1,098 cM) with 163 markers (111 AFLPs, 48 SSRs and 4 CAPS).

SSR and CAPS marker names are included. Asterisks show bulb onion EST-derived markers.

SSR markers used in the preliminary examination were shown as *italic*.

Table 11 Selection criteria of marker loci for SSR-tagged breeding

Selection criterion	Advantage	Disadvantage
Located on different linkage groups from each other	Unexpected selection of large linkage blocks can be avoided.	Linkage map information is needed.
High PIC	The identification power of marker is high.	There is a trade-off between PIC and Pr%. Too high PIC results in rather low Pr%, and thereby homozygous individuals for multiple selected loci can hardly be obtained from original population.
High Pr% (PrA% and PrG%)	The probability of close linkage to undesirable agronomical traits is low.	Too high Pr% results in rather low PIC, and thereby many homozygous individuals for the selected loci might appear in non-selected populations by chance.
Large differences in molecular size of PCR product between the prevailing allele and the other alleles	The prevailing allele (the allele targeted) can easily be distinguished.	

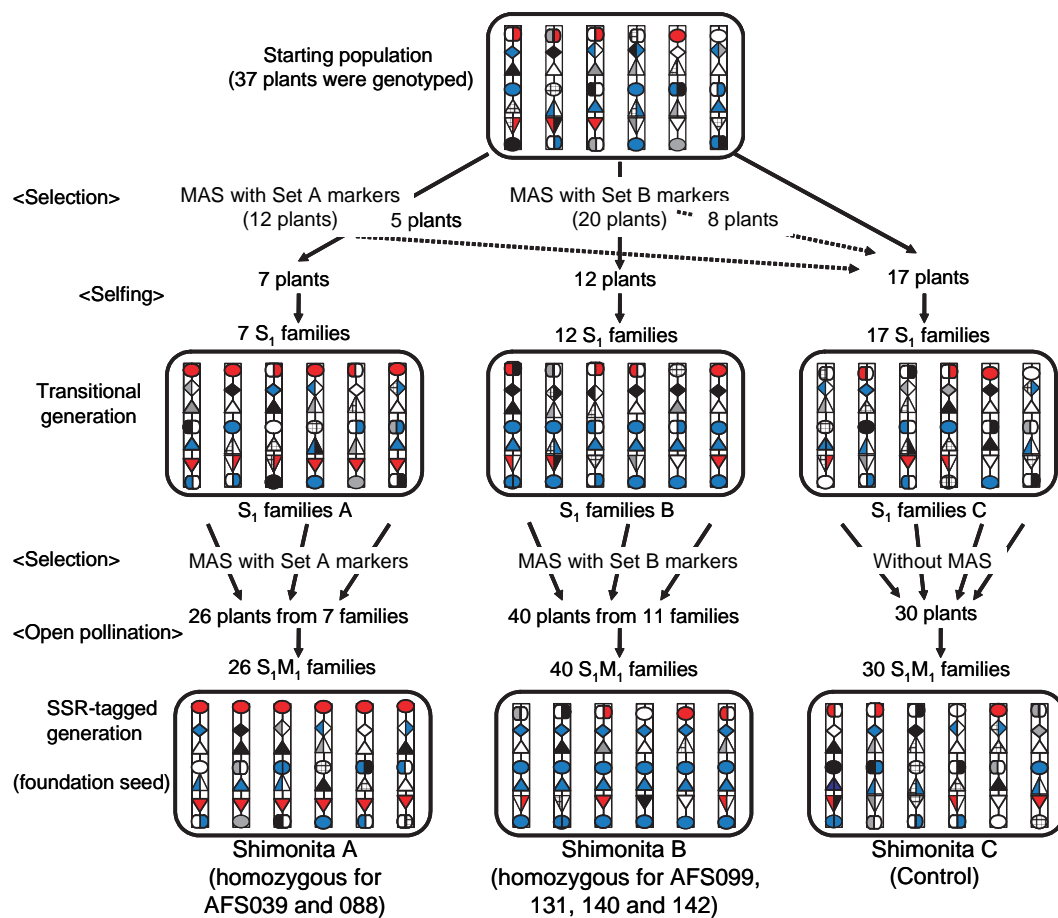


Fig. 9 The SSR-tagged breeding trial in this study.

B のマーカーセットを用いて PCR を行った。ここでは、予備調査と比べて非常に多くの個体の遺伝子型を正確に調査する必要があるため、アクリルアミドゲル電気泳動の代わりにキャピラリー DNA シーケンサー (ABI 3730) による泳動を行い、GeneMapper ver.3.0 を用いて遺伝子型を解析した。Set A および Set B マーカーで選抜した S_1 植物は、鉢上げし、各集団内で放任受粉した。そして得られた後代集団を Shimonita A および Shimonita B と名付けた。

Shimonita A の育成では、2003 年 6 月に原種団の 7 個体から採種した合計 2,037 粒 (植物あたり 120 から 450 粒) の S_1 を播種した。播種 7 週後に合計 680 個体 (家系あたり 30 から 120 個体) を圃場に定植した。10 月に立毛により形質を評価後、108 個体 (家系あたり 12 から 16 個体) をマーカー利用選抜のために前選抜した。これらの 108 個体から、AFS 039 が 298 bp, AFS 088 が 168 bp の同型接合体を示す 26 個体を選抜した。

Shimonita B の育成では、原種団の 12 個体から採種した合計 2,138 粒 (植物あたり 53 から 364 粒) の S_1 を播種し、合計 820 個体 (家系あたり 30 から 180 個体) を圃場に定植し、立毛により 147 個体 (家系あたり 5 から 16 個体) をマーカー利用選抜のために前選抜した。これらの 147 個体から、AFS 099, AFS 131, AFS 140 および AFS 142 が、それぞれ 234 bp, 159 bp, 208 bp および 248 bp の同型接合体を示す 40 個体を選抜した。

こうして、移行世代 (transitional generation) において、Set A については 7 の S_1 家系に由来する 26 個体が、Set B については 11 の S_1 家系に由来する 40 個体を選抜された (Fig. 9)。これらの植物は鉢上げて各集団内で放任受粉した。得られた集団、すなわち Shimonita A と Shimonita B は、結果として SSR 標識された。さらに、立毛により選抜はしたが遺伝子型については調査していない、つまり、どの SSR 座についてもスクリーニングしていない 17 の S_1 家系に由来する 30 個体もまた放任受粉し、対照 (Shimonita C) とした。

d 農業形質の評価

2 つの品種標識集団、Shimonita A と Snimonita B、および対照集団の Shimonita C の各個体から、母系系統として採種し、採種量の多い母系系統を用いて品種標識法の有効性を評価した；すなわち、Shimonita A, B および C についてそれぞれ 13, 21 および 10 の母系系統を用いた。2004 年 4 月 26 日に各母系系統 60 粒を温室に播種し、6 月 24 日に各母系系統あたり無作為に選

抜した 22 から 48 個体を圃場に定植した。11 月 9 日に収穫し、一般形質およびピルビン酸生成量を測定した。一般形質として、各集団の母系あたり 10 個体について、6 形質 (葉鞘数、生重、葉身長、葉身折径、葉鞘長、葉鞘径) を調査し、各母系を反復とみなしてデータとした。また、辛味の指標として、葉組織から抽出した汁液におけるピルビン酸生成量を測定した。なおピルビン酸は、ネギ属特有の辛味および香り成分の前駆体 (システインスルフォキシド) が、酵素アリイナーゼにより分解される際に生成される安定した副産物であり、定量分析することが比較的容易である。その定量法は以下の通りである。各植物の葉身および葉鞘約 0.1 g を TissueLyser (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて破碎処理し、室温で 30 分間放置してピルビン酸を生成させた。10,000 ×g で 10 分間遠心分離後、上清を回収した。ピルビン酸濃度は、各系統 3 個体について Yoo ら (1995) の方法に従い、分光光度計を用いて 420 nm の吸光度を測定することによって算出した。

収穫し形質を評価した植物体は、その後無加温のパイプハウスに移植し、抽苔するまで栽培を継続した。抽苔日は、各母系系統 (8 個体) における平均抽苔日として評価した。また、形質評価した個体から、Shimonita A, Snimonita B, および対照集団の Shimonita C について、それぞれ 92, 117, 40 個体を任意に選び DNA を抽出して、Set A, Set B に用いた 6 マーカーおよびそれらとは異なる 2 マーカー (AFS 017, AFS 015) 座の異型接合性の程度を調査した。

各形質および異型接合性の程度についての集団間の統計解析は、JMP ver. 4.0 (SAS Institute Inc., NC, USA) による Tukey-Kramer HSD 検定 ($P = 0.05$) および Wilcoxon の順位和検定 ($P = 0.05$) により行った。

3 結 果

a ‘下仁田’における遺伝的異質性

原集団では、全 SSR プライマーセットで品種内多型および遺伝的異質性が明らかとなった (Fig. 10)。調査した 17 の SSR 座について、原集団で検出された対立遺伝子数は 2 から 10 で、PIC 値は 0.31 から 0.82 であった (Table 12)。平均対立遺伝子数および遺伝子型数は、それぞれ 4.4 および 7.3、平均 PrG% は 46 であった。これらのデータは、他のネギ在来品種 (Haishima ら, 1993) および OP 品種 (第 IV 章) の結果と同等であり、‘下仁田’には高い遺伝的異質性が含まれていることを示唆している。

Table 12 Polymorphisms at 17 SSR loci in the starting population (37 plants) of the bunching onion landrace 'Shimonita' and two sets of markers selected for SSR-tagged breeding

Linkage group ^{a)}	Locus	No. of individuals	No. of alleles	No. of genotypes	PIC	Prevailing allele % ^{b)}	Pr% ^{c)}	Marker set
J1	AFS008	33	3	5	0.43	72.7	55	
J1	AFS017	36	10	21	0.82	29.2	17	
J1	AFS088	36	3	6	0.57	61.1	39	A
J1	AFS096	32	4	8	0.64	48.4	41	
J1	AFS101	37	4	4	0.31	82.4	76	
J2	AFS015	37	2	3	0.50	54.1	70	
J2	AFS105	33	3	5	0.49	66.7	58	
J2	AFS142	35	3	5	0.45	61.4	54	B
J3	AFS012	35	5	9	0.72	42.9	29	
J3	AFS111	34	3	2	0.60	50.0	74	
J4	AFS060	18	6	8	0.71	44.4	39	
J5	AFS099	35	5	6	0.47	63.5	54	B
J5	AFS103	35	6	13	0.73	38.7	34	
J7	AFS039	34	6	13	0.76	36.8	21	A
J8	AFS109	35	3	4	0.66	40.0	40	
J8	AFS131	37	3	5	0.48	59.5	46	B
J9	AFS140	36	6	7	0.57	62.5	41	B
Average			4.4	7.3	0.58	53.8	46	

a) According to Fig. 8.

b) The frequency exhibiting prevailing allele.

c) The frequency of plants exhibiting prevailing genotype.

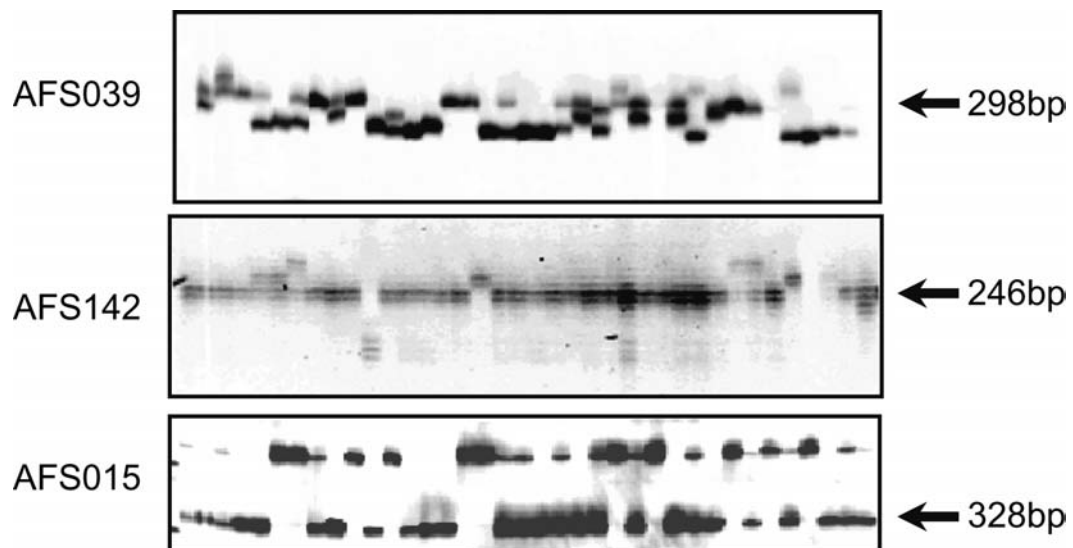


Fig. 10 Polymorphic patterns detected at AFS 039, 142 and 015 among 37 individuals of starting population 'Shimonita'.

Fragments were separated on a 4% denatured polyacrylamide gel.

Arrows show the prevailing allele among the starting population. These DNA fragment size (length) were determined 298 bp (AFS 039), 246 bp (AFS 142) and 328 bp (AFS 015), respectively, by using a DNA sequencer.

b 品種標識法 選抜強度 (Set A) = $[1-(1-a_1/100)^2] \times [1-(1-a_2/100)^2]$
 原集団での予備試験より選抜した 2 種類のマーカーセッ
 選抜強度 (Set B) = $[1-(1-b_1/100)^2] \times [1-(1-b_2/100)^2]$
 ト (Set A および Set B) における選抜強度は以下の式
 $\times [1-(1-b_3/100)^2] \times [1-(1-b_4/100)^2]$
 により算出される； ここで、 a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , b_3 および b_4 は、それぞれ

Table 13 Agronomic traits in SSR-tagged populations of bunching onion 'Shimonita' ^{a)}

Traits	Shimonita (control)	Shimonita A	Shimonita B	P value (Prob > F)	Tukey-Kramer HSD test (P=0.05)
No. of maternal lines	10	13	21		
No. of pseudostems	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.88	NS ^{b)}
Fresh weight (g)	290 ± 8.9	281 ± 8.3	278 ± 8.1	0.64	NS
Leaf blade length (mm)	473 ± 8.0	481 ± 7.6	481 ± 6.2	0.26	NS
Leaf blade width (mm)	55 ± 0.7	55 ± 1.0	54 ± 1.0	0.75	NS
Pseudostem length (mm)	190 ± 3.1	195 ± 3.7	192 ± 3.3	0.69	NS
Pseudostem width (mm)	28 ± 0.4	26 ± 0.4	26 ± 0.5	0.20	NS
Pyruvic acid (leaf blade) (μg/ml)	16.8 ± 1.2	19.0 ± 0.9	19.1 ± 0.8	0.21	NS
Pyruvic acid (pseudostem) (μg/ml)	18.5 ± 0.7	17.7 ± 0.6	17.7 ± 0.5	0.62	NS
Bolting time difference (2005) (day) ^{c)}	0.0 ± 1.6	0.2 ± 1.6	-3.1 ± 1.6	0.14	NS

a) Sown on April 26, 2004, transplanted on June 24, and harvested on Nov 9.

Each data was shown as average ± SE.

b) Not significant.

c) Difference between the bolting time in the control (February 25, 2005) and that in the SSR-tagged populations.

Table 14 Degree of heterogeneity at targeted and untargeted loci in SSR-tagged bunching onion populations derived from a landrace 'Shimonita'

		Starting population ^{a)}	Shimonita C (control)	Shimonita A	Shimonita B
No. of plants genotyped		34-37	40	92	117
Locus	Linkage group ^{b)}				
Set A					
AFS088	J1	0.57	0.78	0.00	0.66
AFS039	J7	0.76	0.66	0.00	0.53
Set B					
AFS142	J2	0.45	0.65	0.32	0.00
AFS099	J5	0.47	0.32	0.48	0.00
AFS131	J8	0.48	0.53	0.55	0.00
AFS140	J9	0.57	0.61	0.56	0.00
Others					
AFS017	J1	0.82	0.48	0.38	0.37
AFS015	J2	0.50	0.80	0.78	0.76
Wilcoxon rank-sum scores (P=0.05)		-	NS ^{c)}	NS	NS

a) See Table 12.

b) According to Fig. 8.

c) Not significant.

AFS 039, 088, 099, 131, 140 および 142 における PrA %を示す。Table 18 に示すように、 a_1 , a_2 , b_1 , b_2 , b_3 および b_4 は、それぞれ 36.8, 61.1, 63.5, 59.5, 62.5 および 61.4 であり、したがって、選抜強度は Set A では 0.51, Set B では 0.53 と期待された。原集団における実際の選抜強度は、Set A が 0.32 (12/37 個体), Set B が 0.54 (20/37 個体) であった。

c 品種標識法の有効性

2004 年 4 月から 2005 年 4 月までの圃場試験を通して、品種標識集団と対照集団との間で、調査した形質について有意差は認められなかった (Table 13)。Shimonita A, B および C の各集団について、各標識座における異質性の程度を評価した。SSR マーカーで標識した集団は標識座では遺伝的に均一であったのに対して、非標識座ではなお高い異質性を保持していた (Table 14)。各品種標識集団における非標識座の遺伝的異質性の程度は、対照集団のそれと同程度であった。なお、原集団における高い異質性は、Shimonita C においても維持されていた。

4 考 察

品種標識法の有効性を評価するために、異なる選抜基準 (Table 11) に従い 2 種類のマーカーセットを選んだ。まず、標識マーカー数を、Set A では 2 座、Set B では 4 座とし、Set A と Set B における選抜強度の期待値が同程度となるようにマーカー座を選定した。Set A については、より高い多型検出力によって少ないマーカー数で解析可能なマーカーとして、PIC 値が高く、また PCR の結果が安定している AFS 039 を選定した。調査したマーカーの中では AFS 017 が最も高い PIC 値を示したが、解析した原集団における遺伝子型数が極端に多く (21 種類/36 個体)、SSR の slippage が多発する可能性があるため除外した。Set A のもう一つのマーカーとして、非常に高い PIC 値を示してはいなかったが、以下の 2 つの理由により AFS 088 を選定した：(1) 当時のネギ連鎖地図 (Fig. 8) において最も長い連鎖群 (J 1) の中央部に位置し、それゆえ J 7 連鎖群の端に位置する AFS 039 と連鎖する危険性が非常に低いと考えられた；(2) AFS 039 と AFS 088 の組合せによる選抜強度が下記に示す Set B マーカーと同程度であった。Set B については、中間的な値の PrA% (すなわち 60~64) を示す 4 マーカーを選定した (Table 12)。Set A および Set B における選抜強度の期待値は、それぞ

れ 0.51 および 0.53 となった。今回の結果では、品種標識のためにはどちらのマーカーセットでも有効であることが示された。このように、SSR マーカーを用いた品種標識には、高 PIC と、それほど高くはない PIC の連鎖していない 2 マーカーの組合せで十分可能であることが示された。

圃場試験において、品種標識集団と対照集団との間で調査した形質について有意差は認められなかった (Table 13)。これは、品種標識法が原集団の農業形質を実際に維持できることを示している。その一方で、品種標識集団はなお高いレベルの異質性を維持していた (Table 14)。これは、原集団における高いレベルの異質性が、品種標識法を通して維持できることを示唆している。こうして、ネギ在来品種を用いて品種標識法の有効性を示した。本手法は、ネギだけではなくネギと同じくらい自殖弱勢が著しい他の他殖性作物においても適用可能と考えられる。さらに、 F_1 品種の親系統が本手法を用いて育成される場合、 F_1 種子ロットの純度を少数の選定した SSR 座における均質性の程度により迅速かつ正確に評価できる。したがって、品種標識法は、他殖性作物において育成者権の保護やトレーサビリティの付与に有効であると考えられる。

本研究では、品種標識法に用いた DNA マーカーとしてゲノム SSR を用いた。近年、タマネギ cDNA ライブラリーによる大量の EST 解析から、数百の EST 由来 SSR マーカーが開発されている (Kuhl ら, 2004; Martin ら, 2005)。EST 由来 SSR は、遺伝子に強く連鎖あるいは遺伝子そのものであるために、農業形質に連鎖した DNA マーカーを開発するためには非常に優れている。しかしながら、EST 由来 SSR が直接的に農業形質に影響し、それゆえ原品種の中で元々異質性が低い可能性があるため、SSR マーカーを利用した品種標識法においては、ゲノム SSR の方がより適していると考えられる。

VI 総合考察

ネギは、わが国では野菜の中で第 4 位の生産額 (農林水産省, 2008) を占める重要な野菜の一つであり、古くから栽培されてきた経緯から、多様な在来品種が国内に存在している。しかし近年では、根深ネギはほとんどが千住群の品種であり、その多くが F_1 品種となっている。現在のネギにおける主な育種目標は、病害抵抗性、高収量、晩抽性、高品質 (低辛味、高糖度等) および機械裁

培適性(旺盛な初期生育)等である。連鎖地図に基づく QTL 解析は、これらの形質の遺伝様式を明らかにするのに有用であり、さらに分子育種への発展が大いに期待される。しかしながら、ネギにおける農業形質の QTL 解析はほとんどなされてはいない。この理由としては、他殖性であり、世代を進めるのに時間がかかるために、遺伝解析を行うための材料育成が容易でないこと、また、簡便かつ汎用性の高い DNA マーカーの数が限定的であること、さらにはこれらのマーカーが多数座乗した連鎖地図が構築されていないことが挙げられる。

そこで、本研究では、まず DNA マーカーとして、汎用性が高く共優性を示す SSR マーカーに着目し、第 II 章ではネギから SSR 濃縮 DNA ライブラリーを作成して、1,000 以上の SSR クローンを単離し、その特性を明らかにした。また第 III 章では、SSR マーカーを主としたネギ連鎖地図を構築するとともに、連鎖群と染色体との対応関係を明らかにした。

一方、農業形質についてより高い均一性を示す F_1 品種が現在主流となっているネギにおいては、種子純度検定も重要な問題である。さらには、消費者の食の安全・安心に対する要望に合わせて、DNA マーカーによる品種識別技術の開発も必要となった。しかし、ネギは自家和合性植物であるが、雌雄異熟性および通常虫媒受粉であることから、高頻度の交雑性を示す (Ford-Lloyd ら, 1993)。したがって、ネギ在来品種や OP 品種には高いレベルの異型接合性および異質性を含んでいると考えられる。

そこで、第 IV 章では、SSR マーカーによる市販 F_1 品種における遺伝的均一性を評価し、品種同定や F_1 純度検定を可能にする品種標識法を提案した。そして、第 V 章では、他殖性作物集団のモデルとして、ネギ在来品種を原集団とし、2 種類の品種標識集団を育成して、品種標識法の有効性を評価した。

1 ネギにおける汎用マーカーの開発

本研究によって、ネギから 1,796 個の SSR クローンを新たに単離されるとともに、開発した SSR マーカーは、自殖 5 系統による解析において高い多型性を示した (Table 3)。また、1,722 のネギゲノム SSR マーカーのうち、398 個において、連鎖地図構築のための両親系統間で多型が認められた (Table 4)。さらに、開発したネギ SSR マーカー 380 組における他のネギ属野菜での増幅の可否を調査した結果、タマネギおよびニンニクでは約 50%、ニラでは約 16%の SSR マーカーで安定して増

幅した (塚崎ら, 2007 a)。また、ネギ SSR マーカーを用いて、ニンニクやノビルの子種・系統分類に関する研究も行われている (佐々木ら, 2007; 郭ら, 2008)。このように、本研究で開発されたネギ SSR マーカーが、ネギのみならず他のネギ属植物にも利用されることを期待する。

その一方で、タマネギ由来のマーカーもまた、ネギにおけるマッピングに有用であった (Tables 4, 5)。タマネギ EST 由来マーカーの中では、ネギの両親系統間で多型があるマーカーの頻度は、InDel および SNP (29.7%) マーカーの方が SSR (11.0%) より高かった (Tables 4, 5)。本研究において、11,008 のタマネギ EST 配列 (Kuhl ら, 2004) から、イネのユニジーン cDNA 配列と相同な配列が 1,090 見出され、イントロンを挟みこみ、増幅するタイプのネギ用 EST マーカーを 93 組設計できた。しかしその他の配列については、イネユニジーンとの相同性が認められたもののプライマーを設計していない。その理由は、対応するイネゲノム配列においてイントロン長が長い (> 1 kb)、もしくはイントロン近接領域においてイネとタマネギでかなりの塩基配列の違いが認められたためである。Kuhl ら (2004) は、タマネギとイネの間におけるイントロン領域の相同性 (39%) が、コード領域 (78%) より低いことを報告している。本研究において、イントロンを挟み込んだマーカーのネギにおける PCR 増幅産物のサイズと、対応するイネゲノム領域における予測増幅サイズとの間に相関がない ($r = 0.07$) ことが明らかとなった (データ省略)。さらに Kuhl ら (2004) は、第 3 のコドンにおける平均 GC 含量が、タマネギ (40.9%) とイネ (61.8%) とで大きく異なることを報告している。この点について、タマネギとイネの間での同義の第 3 のコドンの違いを無視することにより、ネギ用 EST マーカーの追加プライマーセットを多数設計できると考えられる。したがって、結果としてもっと多くのタマネギ EST 由来マーカーをネギの連鎖地図に追加マッピングすることが可能だと考えられる。

2 ネギにおける汎用連鎖地図

これまでに報告されたタマネギ連鎖地図 (694 cM, van Heusden ら, 2000; 1,907 cM, Martin ら, 2005) およびネギ連鎖地図 (947 cM, Ohara ら, 2005) と比べて、本研究で構築した連鎖地図は、操作の容易な PCR ベースマーカーのみで構成され、そのほとんどが共優性マーカーであることから、汎用性が高く、他の集

団へ適用することができる。その上、カバーする遺伝距離 (2,069 cM) もこれまでの連鎖地図と比べて大きいことから、ネギの基準連鎖地図になりうると考えられる。

また、添加系統および欠失系統を用いることにより、17連鎖群のうち16連鎖群について、対応する染色体が明らかとなった (Fig. 3)。さらに、タマネギ連鎖地図 (Martin ら, 2005) における連鎖群 Chr. 6 C の少なくともある領域が、添加系統を用いることで2番染色体に対応することが明らかとなった (Fig. 4 a, 4 b)。このように、汎用性の高い DNA マーカーによる連鎖地図がネギでも構築されたことにより、地図の比較による正確で詳細な連鎖地図の再構築や、ネギとタマネギのゲノム比較が可能になると考えられる。

しかしながら、X と名付けた残りの連鎖群は、どの染色体とも対応付けられなかった。今回、連鎖群 X の対応する染色体が明らかとならなかった原因として、以下の2つの理由が考えられる：(1) ネギ欠失系統セットが不完全であり、連鎖群 X が2 F, 3 F もしくは5 F 染色体のいずれかに対応することを示唆している；(2) 連鎖群 X に座乗するマーカーの全てがネギ由来 SSR マーカーであり、ネギゲノムを優先的に増幅するために、シャロットゲノムにおける増幅が不安定だった可能性が考えられる。別のネギ F₂ 集団においては、連鎖群 X に座乗するいくつかのマーカーが、ACE 010 (Martin ら (2005) の連鎖地図では ACM 133 であり、タマネギ5番染色体に対応付けられている) に弱く連鎖していた (未発表データ)。さらにその後、添加系統を用いて5C染色体に振り分けられた AFAT 06 C 11 が、新たに連鎖群 X 上に位置付けられたことから、この連鎖群が5番染色体に対応することが明らかとなった (Tsukazaki ら, 2009)。

それでもなお、連鎖群8を除いて、1つの染色体に対応する連鎖群が複数存在することから、本研究により構築された連鎖地図は、ネギゲノム全体をカバーしているとは言えず、まだ大きなギャップ領域が複数存在している可能性が高いと考えられる。

このようなギャップ領域が存在する原因として、(1) 用いた解析集団の中で多型検出が困難な領域が存在することが考えられる。今後、ネギにおいてゲノム育種を進めるためには、染色体 (連鎖群) のギャップ領域を解消した連鎖地図を構築する必要である。

そのためには、複数の解析集団を用いて連鎖地図を構築し、共通マーカーにより連鎖地図を統合させるのが有効である。ダイズでは、3集団からそれぞれ構築した連

鎖地図を統合することで、非常に高密度な連鎖地図を構築している (Hwang ら, 2009)。

その一方で、(2)用いた DNA マーカーの多くがゲノム SSR であったことも、連鎖群が染色体数に収束しなかった原因の一つかもしれない。ゲノム SSR は染色体のヘテロクロマチン領域に多く存在する (Frary ら, 2005) ことから、この領域に多くの SSR マーカーがマッピングされる一方、遺伝子が多く存在するユークロマチン領域には、あまりマッピングされない可能性がある。実際にトマト (Ohyama ら, 2009) やナス (Nunome ら, 2009) で構築された連鎖地図には、連鎖群 (染色体) の特定の領域にゲノム SSR が集中する箇所が複数存在した。ネギにおいては、ゲノム SSR が連鎖群の特定の領域に集中する傾向は認められなかったものの、今後より多くの EST 由来マーカーを位置付けることが必要である。

このようにして、より詳細な連鎖地図を構築することにより、ネギ育種に重要な諸形質の遺伝様式が明らかになると考えられる。これまで両側戻し交雑集団を用いて、ネギのセル苗育苗に適する初期生育量の旺盛さに関する QTL を複数見出している (Ohara ら, 2009)。また、本研究において連鎖地図を構築した F₂ 集団においても初期生育量に関する QTL 解析を行い、主要な QTL を見出している (塚崎ら, 2006; 塚崎ら b, 2007)。

加えて、今後はタマネギ等他のネギ属野菜との詳細なゲノム比較が可能となり、ネギ属野菜で共通の形質に関する遺伝様式も明らかになるのではないかと考える。

3 他殖性作物における品種標識法

ネギは、自家和合性植物であるが、通常雌雄異性で虫媒受粉によるため高頻度で交雑する (Ford-Lloyd ら, 1993)。したがって、ネギ品種は高いレベルの異型接合性と異質性を維持していると考えられる。本研究では、高いレベルの異型接合性が市販 F₁ 品種においても見出された (Fig. 6, Table 10)。したがって、既存のネギ F₁ 品種における大部分の両親系統は、遺伝的に均一ではないと考えられる。一般に、F₁ 品種の両親系統は、自殖弱勢を避けるために通常2, 3回のみ自殖し、その後系統内で放任受粉することにより維持されていると考えられる上、さらに、種子生産コストを減らすために三元交雑や複交雑 (四元交雑) により生産している可能性も考えられる。

今回の結果は、いかにネギ育種家が自殖弱勢を避けるために注意しているかが明らかになるとともに、既存の

ネギ品種についても適切な遺伝子型を同定することができないことを示している。

そこで、ネギにおいて品種同定や F₁ 純度検定における迅速性、簡便性および正確性を高めるための手法として、SSR マーカーを利用した「品種標識法」を提案し (Fig. 7)、ネギ在来品種を用いて、SSR マーカーを利用した品種標識法の有効性を示した (第 V 章)。合わせて、品種標識法による F₁ 系統の育成 (鈴木ら, 2006) や神奈川県育成品種「湘南一本」における実用化試験が行われた (北浦ら, 2005; 北浦ら, 2007)。

SSR 座はゲノム中に多数存在しているために、無数の組合せによる品種標識が可能となる。また、連鎖地図を利用することにより、品種標識用マーカー座を効果的に選定できる。さらに、標識マーカー座および遺伝子型の組合せにより、産地や年次の識別も技術的には可能である。しかし、同一系統について異なる標識マーカー座および遺伝子型を多数準備することは、それだけ多くの標識系統が必要になり、採種および管理のコストを考慮すると容易ではない。とはいえ、他殖性植物における品種識別については、これまで集団遺伝学的手法によらざるを得なかったこともあり、対象となる複数の品種について、品種内多型度をあらかじめ把握する必要があったのに対して、品種標識法により育成した品種では、標識マーカー座の遺伝子型の相違により判別するため、異品種の混入がない限り個体レベルでの識別も可能となりうる。今後は、ネギと同様な手法で品種育成されている他の他殖性野菜においても、品種標識法を利用した識別技術が開発されることを期待する。

その一方で、DNA マーカーによる品種識別の重要性から、タマネギでは、RAPD および STS マーカーを用いた品種識別に関する研究も報告されている (足立 1999, 足立・杉村 2002)。近年、白井ら (2006 a, 2006 b) は、RAPD, STS, 既報のタマネギ遺伝子およびオルガネラ DNA 由来マーカーを用いて、各品種の対立遺伝子頻度を算出した上で、2 品種間で対立遺伝子頻度について有意差検定することにより、国内外の主要タマネギ 45 品種・系統のほとんどの組合せにおいて、品種識別が可能であることを示した。

また、他殖性作物において、マーカー遺伝子座の対立遺伝子頻度が品種間で異なっている場合には、アサインメントテストにより品種を判別できる可能性がある。アサインメントテストは、ある個体における複数の遺伝子座における遺伝子型の組合せ (マルチローカス遺伝子型) が、由来する可能性のある候補集団であるリファレンス集団の

どの集団で生じる可能性が最も高いのかを各集団の遺伝子頻度に基づいて算出する手法であり (Paetkau ら, 1995; Manel ら, 2005)、ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) やセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) では、20 前後の SSR マーカー座を利用することで正答率が得られている (Kubik ら, 2001; Tommasini ら, 2003)。

このように、他殖性作物における品種識別について、集団遺伝学的手法を用いることで、一部の作物では技術的に実現可能なレベルとなっている。しかし、対象となる複数の品種について、品種内多型度をあらかじめ把握する必要がある上、ネギに代表される多くの他殖性野菜のように、主要品種が民間種苗会社から育成され、かつ品種の変遷が早い作物においては、DNA マーカーにより育成者権の保護やトレーサビリティ付与のためには品種標識法の方がより適しているのではないかと考える。

Ⅶ 摘 要

ネギはわが国では重要な野菜の一つであるものの、DNA マーカーを用いた遺伝学的研究は近縁種を含めてネギ属ではあまり進んでいない。そこで、ネギにおける分子遺伝学的基盤を確立するため、汎用性が高く他のネギ属植物でも利用可能な SSR マーカーの開発に着手した。

まず、SSR 濃縮ライブラリーより 1,796 個の SSR クロームを単離してその特性を明らかにするとともに、ネギ自殖系統を用いた SSR の多型性を評価した。次に、F₂ 分離集団を用いて SSR マーカーを主とする 17 連鎖群、255 マーカーからなる全長 2,069 cM の連鎖地図を構築した。シャロット単一染色体添加系統ならびにネギ単一染色体欠失系統を用いることで、16 連鎖群が 8 本のネギ属基本染色体に対応することを明らかにした。

一方、DNA マーカーは品種判別や F₁ 純度検定において有効な手段の一つである。しかしネギは一般に他殖性であるため、形質の揃った F₁ 品種であっても品種内には遺伝的異質性が存在すると考えられる。そこで、F₁ 品種を含む市販 8 品種について SSR マーカー 14 個を用いて品種内における異質性を明らかにするとともに、他殖性作物において遺伝形質に関与しない SSR マーカーを利用することにより他品種との DNA 識別を可能にする育種法 (品種標識法) を考案した。また、在来品種「下仁田」を用いて本法の実証試験を行い、その有効性を示した。

Suppl. Table 1 Primer sequences of 100 SSR markers of bunching onion (*Allium fistulosum*)

Marker name	Core repeats	Repeat (total) ^{a)}	Repeat (max) ^{b)}	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
AFA01A08	(TA) ₇ (TG) ₁₄	24	14	agataagtgtcatggagcaaggg	acatccacagcaaacatagcaagc
AFA01C06	(TG) ₇ tata(TG) ₆	13	7	tatgtataaagaaattgtacgggttgg	aacattaaggaggaggtcaatagatttt
AFA01C07	(TG) ₁₄	18	14	cattccagacgtttgtgtgacag	tggctccaatacagagcatcaaaa
AFA01C09	(TG) ₉ tt(GAT) ₅	17	9	tgggactctgtgtctagcgtacaa	cagcacgtagctttgcccataa
AFA01F03	(TG) ₁₉	19	19	aaaccttgacaaaagaattcagg	atcgtgcttggctccatctatgt
AFA02	(TA) ₇ (TG) ₁₂	19	12	ccttggtaatggcaagact	catagcctcacatctctcactc
AFA02F09	(AC) ₁₄	23	14	ctaggttcattaggggactatagga	ccaagcaccagtatctgctttct
AFA02H08	(AC) ₁₂	22	12	agacttggatagttataaagtagttccagtaga	gggctgaaatattatgtgggtttg
AFA03B07	(AC) ₁₄ ag(AT) ₅	19	14	tttactaatacaataacaactataatgctcataca	agtagttagtcagagcacagtagaagacct
AFA03C06	(AC) ₁₁ aacacgc(AC) ₅	16	11	ggctgcctatcaacacaaatgaga	ggctacgtgccgcatattattgta
AFA06A08	(AC) ₆ atatacatat(AC) ₁₀	20	10	cctcaggagaggggtatgttgggt	cttgggaaagcttctcttgagggt
AFA06A10	(CAA) ₃ (TA) ₈ (TG) ₁₄	25	14	gttgccaggtttctttggcttaaa	tgtcagcaccaccatttttcatgt
AFA06H12	(TG) ₁₄	18	14	tggacattgactttggatgtttagc	gaacacatagaacagaacatagcgaaga
AFA07A08	(TG) ₈ tt(TG) ₅	13	8	tctggaagggcgtttaaggtctatt	gcactcatatccatctcccagct
AFA07A10	(AC) ₁₁ (AT) ₄ gtatg(TA) ₇	22	11	actactgggatgaatgccaaaga	atccagttgcacatgacttttg
AFA07G10	(AC) ₁₄	20	14	ttcgtgtgtgtctgattctgtg	tcaaatggttaggagcaacatcc
AFA09C01	(AC) ₁₁	11	11	ggatctcatctctcactctacca	cacgaacatgctcaatagattcaaaa
AFA09C08	(TG) ₁₀ ta(TG) ₄ cg(TG) ₅ tata(TG) ₉	35	10	gaaaccgataatgacttaattgcttgaaaa	ccttatcttaatctgctccagctctctcaa
AFA10B06	(AC) ₁₅ (TC) ₆	21	15	ccgcaaacggactaacgtacaaa	ggcagaatagccaaggttttca
AFA10C07	(AC) ₂₂ (AT) ₇	29	22	caacattgcaaacatgtcacaca	gcactgagttgctgtgagta
AFA11D02	(TA) ₆ cacatattc(TG) ₉ tt(TG) ₄	26	9	cggcaaacctgttaaatcc	tttatacataaacacacacacacag
AFA13H07	(TA) ₆ tc(TG) ₆ ag(TG) ₈	20	8	ctaccatcatgacggcctacg	acgattacgaattctcaataatgtgtcct
AFA14E06	(AC) ₁₀	10	10	cacaacatgctgctccagattact	tgaagatagcaccgtttgagagagtg
AFA14C03	(TG) ₁₁	11	11	gtaggcgtggataaagaatattgacaagaat	tgaatcaaacacagtagtaacatcaaaat
AFA14G03	(TG) ₁₂	12	12	ctccatgaatgggaggtctctgt	gttttccaaaaggattccacgc
AFA16E11	(TG) ₆ tatgtatgtata(TG) ₅	25	6	tatgctgacatgagggcacaat	cacaacatgagaataactgtggca
AFA17A05	(TG) ₂₂	22	22	ttccatcaattacactgccagc	tgctgaaactggatgttgatactcca
AFA23A09	(TG) ₉	9	9	gtgtttccagctttacaggtgagtttt	taacacaaaagaagattctcctcaggtctaa
AFA23D07	(TG) ₅ (TA) ₄ tgtatgtatg(TA) ₆ (TG) ₉	24	9	ttagctactagcatgtgcgaagga	gttgtaccagctgctccattgat
AFA23H11	(TA) ₆ (TG) ₁₇	29	17	catgaccacactttgtcgatttt	tctcgttctgaattcaacccaat
AFAA01D09	(TC) ₆ (AC) ₆	12	6	gccataatggagatccaaaaact	aaagcaacttgcactgtagctcat
AFAA02A06	(TG) ₉	12	9	ccttggttcattggcctaaggtat	ggcaccctcactagctccatct
AFAA02D08	(TG) ₁₀ (TA) ₆ tgtatgtatgcatgta(TG) ₇	23	10	ctatggccaagttccattttgagc	tatttttacagcaacggagcagca
AFAA03F01	(AC) ₈	8	8	cagcttggttctcgtctgtgggt	aaattgcaaaaggctctgcgagat
AFAA05F12	(TG) ₈	8	8	ttcattattgctttagtctgttagtgt	ttcaagctcactatcgaggttcc
AFAA07E07	(AC) ₆	12	6	ggaagcaggtttggcatt	ctattggacagacctggaataactt
AFAT00B05	(TA) ₆ ttcgtgtatc(TG) ₁₂	21	12	tgtccactattcacggcttactca	gatgggtctgctcctccttattt
AFAT00C07	(TG) ₅ ctgagtgctg(TG) ₃ tt(TA) ₄	12	5	aagcacatcgctagaatagacc	attctcaacattggagtcagccc
AFAT02A03	(AC) ₄ aa(AC) ₇	14	7	tagcagaagcctttagcagagatag	gaatgcaataaaatgacacatcaagca
AFAT02B11	(AC) ₈ atctacacgtgtatgtatg(AC) ₇	21	8	ctcctgggtcagacgttagtattt	caagaagaacaaaaggatgactgaag
AFAT02D10	(AC) ₉	27	9	acgcacttgggttctctcttttg	gtgggtaattttgtgtaggcgtt
AFAT02H05	(AC) ₁₂	16	12	tctcgtaccagtttctccttttcc	gattcggatcaatacaggggaatgc
AFAT03D12	(AC) ₇ agag(AC) ₃	25	7	atacacggcaatgggtcaagtacc	gtctgggttgtgtttatgtgggt
AFAT03H10	(AC) ₁₁ (AT) ₆	36	11	gcacttctacttgattcacacaagc	ttgatttcatggtgataaaactggttaactt
AFAT04E02	(TG) ₇	13	7	tccattgggttaaaagttatctaaaatgtca	ttcacgctatgctcaatgtcc
AFAT04E10	(TG) ₈ tatt(TA) ₅ tgcaact(TG) ₇	26	8	actaatctcgcgtccatcattgggt	tgcgtaaatgagagtgagatagc
AFAT04F03	(AC) ₈ atattat(AC) ₅ gc(AC) ₃ t(CA) ₃	29	8	caaaaagtgagaagggtcatatga	gagagagaaattgttagtctggcaaca
AFAT04H07	(AC) ₆ at(AC) ₉	15	9	ttggaaccaacttgcacatca	ggccttatttatgaaacgatgataaga
AFAT05A12	(AC) ₃ aa(AC) ₇	10	7	gctggttattctctgattttgttt	tgcacgggtacagttctatttacag
AFAT05B07	(TG) ₇ ta(TG) ₃ tctgta(TG) ₁₁	27	11	gaaatataccgaatcagctaccgtga	tgcagttcaaatagttgaaaccttttcc
AFAT05D02	(AC) ₁₁	11	11	ggcatttaggcttccacttagtgt	cccaaaatgcatacaactcct
AFAT05D09	(AC) ₁₂	12	12	cggataaaattacctgcaaatcc	cagcctaaagaacctgatgtaag
AFAT05F03	(TA) ₉	13	9	ggctcagtggtttatctacgaaaagg	tcaactaacctcccctaatcca
AFAT05G01	(TG) ₈	56	8	cgtgtgttgagctgtttgtgtatg	ccactacaccgcacatccctatct
AFAT06B02	(TG) ₈ cgca(TG) ₄	12	8	tgagcacatgctgattgtgta	ttaatatataatggcactggacaactt
AFAT06B10	(AC) ₁₀ (AT) ₄	17	10	acgaaagtctgcaaatcaatgc	tccacatgttactaccctccat
AFAT06C02	(AC) ₉	9	9	tctcgataagaactcaggtgaaa	acgttattccgattccctcctcat
AFAT06H08	(TA) ₇ (TG) ₁₀ ttatgta(AT) ₇ (AC) ₄	34	10	attttattattcacaacgtctcatcattt	tgtcgaaaacattgtaaacctagtaaaa
AFAT13H10	(TA) ₈ (TG) ₆	14	8	cggattgtgtcttctgattctgtg	ggctgatcaaccagaaggttaag
AFB01B03	(AG) ₁₁	11	11	gattgcaactgattctggtgagtg	cagcacactctggtggattcag

Suppl. Table 1 (Continued)

Marker name	Core repeats	Repeat (total) ^{a)}	Repeat (max) ^{b)}	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
AFB02E10	(AG) ₆ gg(AG) ₅	11	6	cgtagggtgtgattggaaaggagg	acgaccacacatggcatatacag
AFB03G07	(TC) ₉ c(TC) ₉ gctc(AC) ₆	38	9	ggctgttggaaagcccttctt	atgcgtgtatgtgtgcgtgtg
AFB04A09	(AG) ₁₃	16	13	actagagtcattgcgagacggagg	tatttggtagcggaaagtcagca
AFB04B12	(AC) ₆ (TC) ₁₅	24	15	ctagacttgagggaggatgggtt	ggagagggcaacatgatttttag
AFB04F07	(TC) ₁₀	10	10	agcaatatgaaggagacacatgg	cccaaactaatttagggtttacaattc
AFB05H09	(AG) ₁₇ (CG) ₅	22	17	gcgagcgtatcccctaagaagaat	ttggccctagatttcaactgcaca
AFB06C08	(AG) ₃ gg(AG) ₁₈	21	18	cgcaaaaacatataggagagggg	tctccgtaagaagacctgcaactca
AFB06E05	(TC) ₁₃	13	13	ttgaaatggcagagacaatgggtg	tgtatggggaagggctgaaagag
AFB09D04	(AG) ₈	8	8	tgagatgggtgtggttggtaggaa	aatcctgattgccaacgctgatct
AFB09E05	(AG) ₁₀	10	10	ctaagaaactacatcggtaacctga	gtggtcctgatgtatgcatgttc
AFB09G09	(TC) ₁₃	16	13	ccaagcaaaaagattcctatacacc	aatcagacatcgaggatgcaaaaa
AFB10D09	(TC) ₉	9	9	ggttcctttgggtctgtgtttgc	ccatacagatttcccttaagagacga
AFB10F03	(TC) ₆	6	6	taccgtaaccaatagtcgctgct	gccaagcaaaaagaagtgga
AFB10G06	(AG) ₈	8	8	tgatgagtcataaaatgcaagtcc	ccttgatgttcgacgatgcaatta
AFB15A03	(TC) ₅ ttt(TC) ₃ tgc(TC) ₈	16	8	tctttacggctcgggtcagtggtt	agaagatagggcagcaactctccg
AFB16A11	(TC) ₇	7	7	ctactcccttgcctcgtacgctc	gacagggaaagctctatcacgggta
AFB16C05	(AG) ₆	6	6	acgggtcagatatttagtgaacga	tcgggtccaatattcacctacaca
AFB17B09	(AG) ₈	8	8	ctagtggaagaagtcgacggcac	caagtaagcctctgcatctcctc
AFB17C10	(TC) ₇	7	7	ccgtgtattaaccaacagccatt	gagtgtagcggcctgaaaaatag
AFB17G01	(TC) ₇	7	7	gattcaagtgcccacttttcaaca	gcagaagaagaatgaatgtgagcc
AFB17G02	(AG) ₇ aa(AG) ₃	13	7	tgtcaaggagaggtgaggaggaa	atggattcccttgggcaattg
AFB20F12	(AG) ₁₁	14	11	agtatccaccatttgggtgttgg	atgttcaatacatccactccggc
AFB21A08	(AG) ₃ tg(AG) ₇ (TG) ₅	18	7	tacaggtatattggggtcgggtgg	gcctcagtgccgacttatatacagcta
AFB23B03	(TC) ₈	8	8	cctattcgtctccaccatgatagc	aaaggtgacgtgaaaggctacttcg
AFB24E07	(TCA) ₆	6	6	agagacgactctccacagactca	atagagcagcagaagtgcatgggtg
AFB25G01	(TC) ₂₀	20	20	tgagatgttgagtgagagtcgct	tgcaatgtcaagtcgatgttcaact
AFB25H01	(AG) ₇	7	7	aaaggtagttggtggcagtggt	tgtcactcctctcctccatttcc
AFC01E09	(TCT) ₇	7	7	ccctttgttcgacaagatttcca	caagacagcagatgacaaggaagaa
AFC03G02	(TCT) ₉	9	9	tcactcctcttctctgatgtcg	tccgatgaagttcagtagaagg
AFC08G05	(GAA) ₁₁	17	11	gttaaaggccattgggtatgaca	gaagttcgatgcttcatgtctca
AFC12	(TTC) ₈	8	8	tgcgattgtgagatttgt	ccagcgttggatagttg
AFC12A06	(TCT) ₇	7	7	acgacatatttgatacggttttgagc	gaataacttagcataactcagcgcatt
AFRA01B05	(TG) ₅ tt(TG) ₆	11	6	caaaagcccaaaaggaagacc	ttgaagtggttgaatgtaggac
AFRA04B10	(TG) ₅ cagttgta(TG) ₈ , (TG) ₅ catagttgta(TG) ₇	35	8	gtgagtgtagcagtttggagggt	gtgagcaggtccatctgtaaaaa
AFRA04D09	(TG) ₃ ca(TG) ₇	16	7	ctagcgggaatttactcgtgttc	cgatacggcaacttactcagactt
AFRA04F12	(TG) ₃ cga(TG) ₄ a(TG) ₃	14	4	tgaggtcaggtgtagactcgggt	ctgctcacaatcacactcaaca
AFRA07E10	(TC) ₉	9	9	cagaactagacgggttggaggaa	agctcatatttgaagctcgcagg
AFRA13H07	(TG) ₈	15	8	gcgtatgttagttgggattcatgt	accagtcacacaagagcagtagatg
AFRT01F02	(GC) ₃ (AC) ₆	9	6	acgagcagataggtggatgaggtta	cagccaactgcataggaacgata
AFRT01F06	(TG) ₅ tc(TA) ₆ tgt(TG) ₈	22	8	cctttgtccctctcatcata	acatgcaaatgcacatacaca

a): Total number of repeats.

b): Number of repeats in the longest continuous repeat sequence.

Suppl. Table 2 Primer sequences of 213 bunching onion SSR markers located on bunching onion (*Allium fistulosum*) map

Marker name ^{a)}	Core repeats	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amelting temperature (°C)	Segregation in F ₂ ^{b)}	Linkage group	Map position in D1s-15s- in J1s-14s- 10s (cM)	Product size (bp)
AFA01A04	+ (TA) ₅ (TG) ₁₄ cgcc(GT) ₂ atgt	cctatattgtagcattcttgaag	cgaccacatacaatattgtccac	55	codominant	2a	216.1	266
AFA01A08	+ (TA) ₇ (TG) ₁₄ tatciaaggcactc gagt(GA) ₃	agataagtgctcatgagcgaagg	acatccacagcaacatagcaagc	55	codominant	X	22.8	306
AFA01C07	+ (TG) ₁₄ (TA) ₄	cattccacagctttgttgacag	tgtctccaatcagagcacaaca	55	codominant	1b	36.6	288
AFA01D09	(TA) ₃ (GT) ₁₇ (TG) ₃	ttcttcgattctggttgagc	tacttgattcaacatgcaagcca	55	codominant	3b	132.4	300
AFA01D10	(CA) ₃ (AC) ₉	tcgcttcaacagtttccacaca	taggctgtgttggtgagttta	55	codominant	3b	162.8	250
AFA01E06	+ (AT) ₂ ggagcctgagattccata	caatctgtcaaccgagactca	tcgttccatctattcattctccc	55	codominant	4a	29.1	258
AFA01E09	aca(AC) ₁₄ (AT) ₅	cccaactacttgaggattgcta	gtctgtgtatgcagccaattgg	55	codominant	2a	151.3	160
AFA01F03	+ (TG) ₁₉	aaacccatgacaagaattcaagg	atctgtgctggttccatctatgt	55	codominant	4a	87.6	229
AFA01F12	(ac) ₁₁	ggtgacatagacacgccataaca	ccctatgttgcctgtgagttt	55	codominant	5	35.2	160
AFA01G12	(TA) ₄ (TG) ₁₉	gccatgctaaagtttttaagctc	ggatggatggaaattgaggagga	55	codominant	1a	28.5	180, 240 ^{c)}
AFA01H09	+ (TA) ₃ (TG) ₁₆ tt(CA) ₂ tg(TA) ₃	cactgttgccttggatgaagtgc	gtccaaggtgacagcagcagc	55	codominant	5	9.6	100, 150 ^{c)}
AFA01H12	+ (TA) ₆ (TG) ₁₈	cagacaatcaatgaccacagacca	tcaggagaccgctaccttttfta	55	codominant	3a	14.2	180
AFA02	* (TA) ₇ (TG) ₁₂	ccttggatggcgaagact	catagcctcaatctctcac	55	codominant	X	21.5	182
AFA02A05	(AC) ₁₁	ttatcagccagccctctaaa	agactggaaaatgaggagttcgcg	55	codominant	3a	62.2	260
AFA02D05	+ (TA) ₃ cta(AT) ₃ (AC) ₁₁	ttagcgfcaacataccaangctaca	tggatfttcaaaagaccagcagtaa	55	codominant	X	0.0	220
AFA02E09	+ (AC) ₄ at(AC) ₁₁ (AT) ₆	tgcatacacacacagcagacata	ttccccctttctagctcatgga	55	codominant	6b	0.0	230
AFA02F09	+ (AT) ₃ (AC) ₁₄ (AT) ₄ g(TA) ₃	cctaggcttattagggactatagga	ccaagcaccagatctgcctttct	55	codominant	8	0.0	267
AFA02H08	+ (TA) ₃ cat(AC) ₈ aa(AC) ₁₂	agatctggatgatttaaagtagttccagtaga	ggcctgaatattatgtgggtttg	55	codominant	6a	82.3	190
AFA03A05	(TA) ₁₀ (TG) ₁₂	aaaaacatttgattacagcgttactt	tcactcctccccctcgc	55	J_ dominant	5	96.5	190
AFA03B03	+ (AT) ₂ gaa(TA) ₆ (TG) ₁₆ ta(TG) ₆	gftggaagttgagctgttggcag	ggcattaccagtagtctgttgg	55	codominant	2b	30.6	230
AFA03B07	+ (AC) ₁₄ aga(TA) ₅	tttactacataaacaactataatgctcaca	agtagtagttagtcagcagcagtagagacact	55	codominant	2a	68.9	328
AFA03C06	+ (AC) ₁₁ aacacc(AC) ₅	ggctgcctatcaacacaatgaga	ggcaagcgcctatattgta	55	codominant	X	83.4	230
AFA03D03	(TA) ₂ catgta(TG) ₆ ca(TG) ₇ ta(TG) ₃	tgcccaagcagigttagctggaa	ccaagcacaatgaaagtgcaacaag	55	codominant	3b	47.2	183
AFA03D07	(TG) ₃ (CA) ₁₈	tgtcctcgaataggatgcttca	tgaatgtaaccaccagctgcca	55	codominant	6a	99.1	290
AFA03E07	(TG) ₁₂	agggaagatttcaaaaggtttgac	cctcggagctattcttgcata	55	codominant	2a	192.2	275
AFA03F08	+ (TA) ₄ (TG) ₇ ta(TG) ₇	ttaggtaaaggagcaaacagacca	tgcctcagagctgaacataca	55	codominant	1a	93.6	301
AFA03H03	(TA) ₂ cagccagcagtagtagagaa	gatcattcaaacagctttccctc	cagttgaagtagagccttggtag	55	codominant	6a	89.3	205
AFA04G02	aaga(AT) ₆ (GT) ₁₇ (TCT) ₃	ggaaacaatgaagtttggaggg	gagtgaattcaaaaacaactgac	55	codominant	3b	128.2	170
AFA04G08	(TG) ₁₀ (AC) ₁₃ (AT) ₆	aagtggctgctatcaagttggcat	tcatacactacaatacagcagac	55	codominant	3b	98.7	200
AFA04H02	+ (AA) ₂ attttatttctgtgaa(AC) ₅ at (AC) ₁₂ (AT) ₄	tgtgatgctcaagagtgagttg	tgcgacaagtagcaagactatg	55	codominant	1b	17.8	270+290
AFA05B02	+ (AC) ₃ ctc(AT) ₄ (AC) ₁₂	cgcactgactagaattcttaagccac	agcgaacactagccttggggtat	55	codominant	3a	87.9	150, 210 ^{c)}
AFA05D02	+ (AC) ₁₀ (AT) ₅	caactggaacatactgggac	gaaactgttggcacttttgg	55	codominant	2a	28.0	280
AFA05G02	(TG) ₄ (TA) ₇ (TG) ₁₅	atccagcatgaagcacttaaca	tgcacaactggttatacaacaagg	55	codominant	1a	56.2	150
AFA05G04	+ (TG) ₁₁ (TA) ₅ (TG) ₃	agtttgaatttgcctatttgcatt	agtatgcttggtaggagcaagg	55	codominant	1c	31.7	180

Suppl. Table 2 (continued)

Marker name ^{a)}	Core repeats	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amelting temperature (°C)	Segregation in F ₂ ^{b)}	Linkage group	Map position (cM)	Product size (bp) in D1s-15s- in J1s-14s- 23s
AFA05H01	+ (TG) ₉ t(TG) ₇ t(TG) ₁₂ tttccgtgt	acacctctgacattgctta	tctcagaagaatatacagaaggaga	55	codominant	1b	26.9	230
AFA06	gcggt(TG) ₅	cgaatcacaagttgaggaac	ccactgaacagatgactc	55	codominant	1b	67.3	170+180
AFA06A08	+ (CA) ₈ gata(CA) ₁₁	cctcagagaggggatttgggt	ctgggaaggctctcttgaggt	55	codominant	7b	30.7	184
AFA06A10	taca(TA) ₄	gtgcccaggttttggctaaa	tgctagcaccattttctatgt	55	codominant	3b	144.2	278
AFA06G01	+ (CAA) ₇ (TA) ₈ (TG) ₁₄	tacatttgggctcactcgtgg	ttaatgagcacaacctaccctca	55	codominant	8	135.5	110, 190 ^{c)}
AFA06H07	(AC) ₁₅ (AT) ₇	catgtaaatgtcatccgctaca	tgaatcactgcatatgttcagc	55	codominant	1a	86.1	180
AFA06H12	(TG) ₁₄ ttttaigtctccatgatg(TA) ₄	tggaacttgacttttggatgtaagc	gaaacatagaacaagaacatagcgaaga	55	codominant	1b	0.0	264+266
AFA07A08	(TG) ₈ t(TG) ₅	tctggaagcgggtttaaaggctatt	gcatccatccatataccacagat	55	J_dominant	X	42.4	225+253
AFA07A10	+ (AC) ₁₁ (AT) ₄ tgtatg(TA) ₇	actactggatgtaagtcacaaga	atccagttgacatgacttttg	55	J_dominant	4a	20.8	228
AFA07C08	(TG) ₄ (TA) ₈ ctc(TG) ₉	tgctcaaaagcaggatcatggag	tgcttcaaaagtaaaagggaaca	55	codominant	2a	125.6	230
AFA07D01	+ (TA) ₇ (TG) ₁₆ tctcttggc(AT) ₂	ttaatttgatttgggtcgttaacaa	tcatttggggtgactgtaattgtcca	55	codominant	5	62.7	280
AFA07E01	+ (TA) ₅ (TG) ₁₈	tcgatcttaactctgatttttfga	cgatagggcacaacatga	55	codominant	1a	116.0	189+222
AFA07F06	+ (TA) ₇ (TG) ₁₄	aaagcgaagaaagaaggggg	fggtttgctcaacgaattggct	55	codominant	3a	68.9	280
AFA07G06	+ (TG) ₅ tc(TA) ₅ (TG) ₁₄	tgaaccgtcccatcactctctg	atgagatcgtgatacaacagcgcg	55	codominant	8	58.9	160, 200 ^{c)}
AFA07G10	+ (TA) ₃ tactttgtcgagactgttc	ttegtgtgtgtctgattctgtg	tcaaatgtaggagcaaccatcc	55	J_dominant	X	69.5	192
AFA07H05	(AC) ₁₄ (AT) ₃	gfgsttatttctgagfsgagggg	cccgatcgatgagaataggcctac	55	codominant	7a	64.0	310
AFA08A09	+ (TA) ₈ (TG) ₁₁ tatgctgga(TA) ₃	ttcggtaataaccaccctacc	tccaacatgccccctacatcata	55	codominant	8	35.9	230
AFA08E07	(TG) ₁₃	ataccatgcttccattgaaacct	cccctatccacttcaagatgacg	55	codominant	3b	124.5	220
AFA08E10	(TA) ₂ atagc(TA) ₂ cg(TG) ₁₁	gfacgatgcgcccaacctactcta	aggagcaagcctaataaccat	55	codominant	3a	18.7	288
AFA08G02	+ (TA) ₄ (TG) ₁₁	ggftgaacacgtttttgtaattg	ccagttctaggggtctcaaccg	55	codominant	3a	19.9	298
AFA08G10	+ (TG) ₁₈	tgagcatgcccagaanaaccactaa	cgagaatgagggatagattcgagtg	55	codominant	1a	205.6	235
AFA09A06	(TA) ₂ gta(AT) ₂ gctaat(AC) ₁₁	cacataigtgtctatcgtccatgt	agttattggcagatgcatacct	55	codominant	1a	66.6	280
AFA09A11	(AC) ₃ (AT) ₂ acat(AC) ₁₇ at	agaactctgttgcctacc	ggagactatatacctcctgcta	55	codominant	X	35.5	206
AFA09C08	* + (AC) ₂ g(TACA) ₂ (TA) ₃	gaaaccgataatgacttaattgctgaaaa	ccctatctaatcgtctccagttctca	55	codominant	X	44.6	206
AFA09E12	* + (AC) ₁₁	tggaccctaatgagggttaagcaa	tttgaatgagagggggrcagaa	55	codominant	6a	49.6	262
AFA09F01	+ (AC) ₁₁ (AT) ₃	tfgcaatgaaagaacagaggtta	ccctctttgtttctgtctgct	55	codominant	1b	39.4	170
AFA09F08	(AC) ₃ gc(AC) ₁ at(AC) ₃ aa(AC) ₈	gggaactgctcacaataagacttg	aaataatgccaacaaaataaaggatta	55	codominant	3a	137.0	280
AFA10A08	(TG) ₁₁	gfttagggcgtaaaatacctaacgct	fgtctttgactaacctcgtacc	55	codominant	X	46.6	294
AFA10B06	+ (AC) ₁₅ (TC) ₆	ccgcaacggactcaactgtaacaaa	ggcagaatagcccgaaggtttcca	55	codominant	1c	0.0	294
AFA10C07	+ (AC) ₂₂ a(TA) ₇	caacatgcaaacatgtaacaca	gactgagtttggcttgagcta	55	codominant	X	11.5	247+261
AFA10E04	+ (AC) ₃ aa(AC) ₂ agaga(CA) ₃ caa	gaaaggaacttattgctgtgcgca	ggctctctactcctctgagc	55	codominant	7b	68.8	216
AFA10E05	+ (TG) ₁₀ t(TG) ₂	gcttggatgctctgctttatggag	catatgataaacaacagcagc	55	codominant	8	228.0	284
AFA10G11	* + (TG) ₉ (TA) ₂ tgtttactactcatg(TA) ₂	ttggttgatggtctatctcatttg	agtgacgatacaacaattgtcca	55	codominant	1b	121.5	150

Suppl. Table 2 (continued)

Marker name ^{a)}	Core repeats	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amelting temperature (°C)	Segregation in F ₂ ^{b)}	Linkage group	Product size (bp)	
							in D1s-15s-	in J1s-14s-23s
AFA10H07	(TG) ₁₂	tacgatacgcgaacctactcaag	gaatgctctgtgctcaatgagg	55	codominant	2a	201.0	120
AFA11B05	(TA) ₆ (TG) ₁₀ ttgtgattgcs(AT) ₃	ctcggctcaactttgaggtatcg	tatgataaacgggactgctg	55	codominant	3a	61.3	250
AFA11C12	+ (AC) ₄ tga(TA) ₃ (TG) ₇ tt(TG) ₃ ta (TG) ₃ ta(TG) ₃ tata(TG) ₈ tatc (TAG) ₂ tattat(AC) ₄ atc atacgtatgtatg(TA) ₃ a(TA) ₃	gggtcagctgagctccaagatca	caagggaactgattgcccctat	55	codominant	4a	49.5	296
AFA11E12	+ (AC) ₃ tctc(AC) ₁₂	gctgagcagactctgtatgcttt	cgaccttaagtataaacggtgtaa	55	codominant	8	150.0	158
AFA11H10	+ (TG) ₁₁ tctcgcag(TA) ₃	atcttttggfgrtgcaccat	gcaagfcaagcaactcaacat	55	codominant	4b	16.2	230
AFA14A02	+ (TG) ₁₂ (TA) ₃	aaagtggcctagtagcactctgg	tagecgtgggttgaagaaaaa	55	codominant	1b	77.4	250+260
AFA14C07	+ (AT) ₃ (AC) ₁₁ a(CT) ₃	atgctgcaacctataaccgctct	acttcaatagattcgaagggg	55	codominant	6a	0.0	182
AFA14E06	+ (AC) ₃ attcatcc(AC) ₁₀	caacaatgctctcctcagatctact	tgaagtagcaaccgcttggagagfg	55	codominant	3a	61.3	209
AFA14G03	(TG) ₁₂	ctccatgaatggaggtctctgt	gtttccaaaaggattcaccgc	55	codominant	5	49.5	216
AFA15D06	+ (TA) ₃ ca(TG) ₃ tatgg(TG) ₃	tcaatgcccagggcttttct	tttctagtggttgcatatgic	55	codominant	8	33.6	236
AFA15D09	+ (AC) ₁₁	cgtagaacaacgactgactaga	caccggtgggtaaacatcattaga	55	codominant	4b	91.4	161
AFA15E08	+ (TG) ₈ tattg(TA) ₃	tgagaagfgrtgaagcgaagc	gccccaaagtactactgctgtag	55	codominant	7b	109.3	240
AFA15G07	+ (AC) ₇ aaaa(AC) ₈	agagcagaacaatgfggaggsa	aacgaatacctaagaaaggsaag	55	codominant	4a	33.2	214
AFA16C06	+ (TG) ₁₈	ggagcttggaaacttgaactaa	attgcaaaactcaagcagaag	55	codominant	3b	69.0	220
AFA16D05	+ (AC) ₁₂ (AT) ₅	aattcaccataactcgcctacg	fgcaacactgaactcgcatt	55	codominant	7a	91.4	200
AFA17A05	+ (TG) ₂₂	ttcacaattacacigccagcac	tgctgaacttgatggtgatactca	55	codominant	8	216.5	151, 161 ^{c)}
AFA18C03	(AC) ₅ (TC) ₅ (AC) ₃ tatacatataaa r(AC) ₆ agag(AC) ₃ (AT) ₄ (AG) ₅ (AC) ₁₃ (AT) ₈	aattggtccaaatggtcatccc	cacctgctggcactttaattt	55	codominant	2a	122.6	270
AFA18C11	(AC) ₆ agag(AC) ₃ (AT) ₄ (AG) ₅	aacgcagaatttcggcgagtha	taggctcagcactatfatg-cggg	55	J-dominant	8	42.3	220
AFA18G01	(TG) ₇ tatg(TC) ₃ (TG) ₁₃	aaaatttcccattaacctgcaac	tgagttcattggttataaacttccctacc	55	codominant	3a	144.9	152
AFA23B03	+ (TG) ₁₃	attgaaactgcttaggatgaaatcg	tgctatgattatagcactcccaa	55	J_dominant	3a	72.4	240
AFA23C12	(AC) ₂₀	aaactgatcaaatgfgcccaact	ggaaatccgattaaaacagcagaag	55	codominant	1a	108.5	146
AFA23D09	(AC) ₄ aagc(AC) ₈ (AT) ₇	ttgcatgtgcttggataacac	ggatcagatgctacgagacagcg	55	codominant	3b	84.0	164
AFA23D12	(AC) ₄ gc(AC) ₁₃ (AT) ₈	cggfgcagagttacgtatgagcg	gggatgggttagaacaattttgg	55	codominant	2b	38.0	310
AFAA00A02	(CA) ₃ tatac(AC) ₄ atacatgc(AT) ₃ gt(AC) ₆ (TC) ₆ (AC) ₆	acagagtttctactaaaggattttgg	gtttcagataaaaaatgcatgattggaatg	55	codominant	1a	207.3	220
AFAA01D09	(TC) ₆ (AC) ₆	gccataatgagcatccaanaact	aaagcaactgcatcagctcat	55	codominant	2a	235.2	120
AFAA02D08	* + (TG) ₁₀ (TA) ₆ (TGT) ₂ tgcattga (TC) ₇	ctatggccaagtccattttgagc	tattttacagaacaggagcagca	55	codominant	1a	90.2	179
AFAA02H04	+ (TC) ₂₄	tgataggfsggaagtgtctgga	tgacagcgrtattttaaaggagat	55	codominant	2a	80.0	130
AFAA03F01	+ (AC) ₈	cgacttggctctcctctgtgt	aaattgcacaagctcgcgagat	55	codominant	7a	20.0	231
AFAA04D06	(AC) ₄ aaaaattatatacaaac (AC) ₄ agat(AC) ₄ gcctgc (AC) ₄ tcat(AC) ₄ (AT) ₁₁	ttattagccatgatacaacatacaaaa	agattcaagcagatcaggtattcaatg	55	codominant	3a	44.6	260

Suppl. Table 2 (continued)

Marker name ^{a)}	Core repeats	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amelting temperature (°C)	Segregation in F ₂ ^{b)}	Linkage Map position (cM)	Product size (bp)	
							in D1s-15s-10s	in J1s-14s-23s
AFAT10C04	(TA) ₆ (TG) ₁₅ a(TA) ₄ (TG) ₅	ctgagatggtgacacatggttgg	togatagatgctgggtgtttacat	55	J_dominant	74.6	230	230+280
AFAT10E06	(TG) ₉	tggcctaataagaagaagggtt	tgttctactaaaactcgttggc	55	J_dominant	0.0	170	180
AFAT11A03	(TA) ₄ (TG) ₉	ctgtctataatgaaatggttccaaa	cggaaatatttgggtcgtatggt	55	codominant	74.6	210	190
AFAT13F12	(AC) ₁₅ (AT) ₇ c(TG) ₅	aaaattcttggtagatcttattgttt	tgtttgtatcatcaaatagagagattgt	55	codominant	154.6	220	240
AFB01A02	(TG) ₂ aaac(TA) ₉ (TG) ₁₇ (AG) ₇	aacagcaatgcaacagtggtt	caattcaactgcaacttggctg	55	codominant	95.3	200	250
AFB01B03	+ (AG) ₁₁	gattcattcgtattcgttgag	cagcaactcgtttggatttcag	55	codominant	161.2	200	204+220
AFB01C03	+ (TC) ₁₄ ttaagattttaggagta ggc(AT) ₂	gfttagcgataacctcaccctct	gctcgtatgacctattagcattg	55	codominant	45.0	115	130
AFB01G10	+ (TC) ₂₉	tccgaatccttggnaactggttta	aagfagactattatcgtccgtaic	55	codominant	119.1	95	120
AFB02C01	+ (AG) ₁₇ ggaagtagagtggaactcc (GA) ₃	tccataggtggatgggttatgtcc	aacaaatcccgctggagaataat	55	codominant	74.9	160	180
AFB02C10	(AG) ₃₀ ggagg(AG) ₃	gataatgcatgaagggttagcg	atcccggatacaatccaatcct	55	codominant	95.1	310	300
AFB02G04	+ (TC) ₁₈	acacgtacagfaggcgagaacaa	gcagagggfaggattagctattgg	55	codominant	52.1	170	175
AFB03B09	+ (AG) ₇ gg(AG) ₂ aa(AG) ₂₀	atcacatcacatcatctctgcaa	agattcattcccggtgtttt	55	codominant	70.4	220	270
AFB03E09	+ (TC) ₂₇	tgactgcaacttagactctctgcc	tgtgctaggaagaatgicactca	55	codominant	46.3	170	144
AFB04A09	+ (AG) ₃ aaagaaa(AG) ₁₃	actagatcattgcgagacggagg	tattttgtagcggaaagcagca	55	codominant	78.1	272	260
AFB04B08	(AG) ₁₃	agaattcggagatggaatggtt	atfctcttcaactgctggcactc	55	codominant	125.1	170+175	165
AFB04B12	+ (AC) ₈ (TC) ₁₅	ctgacttggaggagattgggtt	ggagagcacaactcatttttag	55	codominant	24.5	235	233+243
AFB04C03	(CAA) ₄ aacaaaataaccaaaaa c(AG) ₂₁ (TG) ₈	ctaaaacctctcatcgtatgcca	gagfctcctctggtgaatctctc	55	codominant	169.1	230	260
AFB04H04	+ (TC) ₃ ctcc(CT) ₃ t(CT) ₇	cgcacaacaaaagataaactctcg	agactcgaagtagctccgtagg	55	codominant	34.5	300	290
AFB05D11	+ (TC) ₂ ctatcccttcaacgctctt(TC) ₃ cttctacatgactgcc(TC) ₁₃	actttgataaacccccagctca	ggttccagcgaigaccaatttt	55	codominant	27.3	290	295
AFB05E06	tctcacatgactgctt(CT) ₂ (AG) ₄ aaag(AG) ₃ gggagaa gatcgggaaatgatga(CGA) ₂	aagcgaagagagatgaaggaagagg	acatccaatggcggtaaactt	55	codominant	70.6	301	299
AFB05H03	(AG) ₈	catgccaatcttattaccctcat	ccctatcgatgaattcttttagctc	55	codominant	92.1	290	260
AFB05H09	+ (AG) ₁₇ (CG) ₅	gcgagcgtatccccaaagaagaat	ttgctccttagatttctactgcaca	55	codominant	121.8	268	272
AFB06C08	+ (AG) ₃ gg(AG) ₁₈	cgcacaacataatagagagaggg	tctc-gtaagaagac-tgcaactca	55	codominant	120.7	164	146
AFB06E05	+ (TC) ₁₃	tttgattggcagagacaatgggtg	tgtatggagagaggtcgaagagag	55	codominant	99.9	142	151
AFB08	+ (GA) ₁₃ (GT) ₇	ttactggagacaaaatgaaag	cagggaacaatgactatttgg	55	codominant	72.9	135	131
AFB09D06	+ (TC) ₂₀	caggcaactctatgctcttctt	tcgagagaatttgrtggagagatt	55	codominant	38.8	270	310
AFB13G10	+ (AG) ₁₇	aaaagtaagagagc-gttaggc	atctgcgggattgatttctact	55	codominant	51.1	220	240
AFB14B08	+ (TA) ₈ cat(AC) ₄	gcgagcagrttgaigtgigtgta	agaatgctgagcggaggaatgag	55	codominant	24.2	290	316
AFB15A03	(TC) ₂ ttr(TC) ₃ tg(CT) ₈	tctttacggctggfctcagtggtt	agaagalagcagcaactctctccg	55	codominant	89.4	149	153
AFB17G02	(AG) ₂ aa(AG) ₂ aaaga(AG) ₃	tgttaagagaggtgagagagagga	atggattccctggcatttgg	55	codominant	49.3	158	150
AFB20G05	* + (TC) ₁₀ at(CT) ₃	ttccaccggaatccaactctt	attaaatgagcgttggcttggc	55	codominant	114.1	105	107
AFB22I	(CT) ₂ at(CT) ₈	gacaggttggattgtgtg	gaccgatgagatgatgtt	55	J_dominant	84.5	140	160
AFB22H06	+ (AG) ₁₅	gatgctcgatattacttggggc	aaaacctctgcaaccacaactt	55	J_dominant	68.1	150	170

Suppl. Table 2 (continued)

Marker name ^{a)}	Core repeats	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amelting temperature (°C)	Segregation in F ₂ ^{b)}	Linkage group	Product size (bp)		
							in D1s-15s-10s	in J1s-14s-23s	
AFB237	+(CA) ₃ tgt(GA) ₁₆	aggcgtagcctaaggctg	gtgtcgtgagtgacigtg	55	codominant	7a	79.7	120	135
AFB23G02	(AG) ₁₅ aa(AC) ₃	aagcaagatcatagcccgatg	gttcaaaagtaatgaacaag	55	codominant	8	23.5	210	230
AFB25H01	(AG) ₇	aaaggfagttgtgtggcaggtg	tgtcactctctctccatttc	55	codominant	7a	0.0	220	200
AFB277	+(CT) ₁₅	aggtgaggggtatgtcc	tcctttcacactcttctcc	55	codominant	4b	76.9	98	114
AFC01E09	+(TCT) ₇	ccctttgtcgaagattcca	caagacagcagatgaagaagaa	55	codominant	7a	110.6	140	146
AFC03A09	+(GAA) ₇	gtgttagagaagagagatgga	tcaggagatgttcccgtatgat	55	codominant	8	75.3	175	170
AFC03F10	+(TCT) ₃ tgg(TCT) ₆ (CT) ₃	agttctgatcgtctagaggctg	gaaagcaaatgatgtctccta	55	codominant	3a	35.6	190	180
AFC03G02	+(TCT) ₉	tcactcccttctctgatctcg	tcctgatgagttcagtagaagg	55	codominant	3b	116.9	164	168
AFC08G05	+(GA) ₃ a(GAA) ₁ aa(AGA) ₃	gttaaagcccaatggatgaca	gaagttcagctccctctctca	55	codominant	2b	26.2	290	293
AFC09D10	(GAA) ₈	gatgggtcagcgttftaagtg	tcattccccagcttctcttg	55	codominant	4a	130.7	200	200+220
AFC12	+(TTC) ₈	tgc-gatgtagatattgt	ccagc-gttggatattg	50	codominant	2a	109.5	233	236
AFC12A06	+(TCT) ₇	acgacatattgatccgtttgagc	gaaatactttagataactcagcatt	55	codominant	6c	20.8	214	208
AFD02A12	(GCT) ₈	gatcagggttaccgtgaagagc	tcaataactcaatgctggagag	55	codominant	3a	42.2	100	100+115
AFHT11E07	(AG) ₈ (TG) ₁₀ (AG) ₈ ctacttgt (TA) ₃ tttcatttcaaac(TA) ₃	aggtgagctaggttgc-gttgtt	caagtagtaccogtggctgagtg	55	J_dominant	1b	26.0	200	200+220
AFHT11F10	ttattatt(TA) ₄ (TG) ₆ catgcaigtttcaaa(TA) ₇ (TG) ₉	gcaaaagaaagaagttttgtgctg	gctcttctctcttcagsgtcc	55	codominant	3a	110.4	310	300
AFRA00B10	* +(TA) ₈ (TG) ₉ tctcatg(TA) ₃	tfgaatcatgctgctgctacata	tagaacacaccgaatgacacact	55	codominant	2a	133.3	205+213	201
AFRA01B05	+(TG) ₃ tt(TG) ₆	caaaagccaaaggaagaaagacc	ttagatggttgaatgtagggac	55	codominant	1a	101.6	212	210
AFRA01G07	+(AC) ₁₃ (AT) ₄ aaactctatac ac(AT) ₃ t(TA) ₃ atgataa(AT) ₃	ggtttgtgtagatcatctcggt	catgacatgagcaggttagtga	55	codominant	1a	39.7	240	230
AFRA03E08	+(CG) ₃ agcgtg(CA) ₁₁ (TA) ₅	caaccactactcatgaaatagca	ggggatctaaagtggttagcgg	55	codominant	1b	22.7	200	190
AFRA03F03	(AC) ₁₀ (AT) ₄	gacgagggcaagaagtatggttg	tgaagacaaagtgctcagtgctc	55	codominant	X	62.8	220	220+230
AFRA04B10	+(TG) ₃ agttgta(TG) ₈ cgcggtcat (GCGT) ₂ gtgcatgc(GT) ₃ atgct ac(TG) ₃ ca(TG) ₄ cagttgta	gtgagtgcaagttttgagsggt	gtgacaggtccatctgtaaaaa	55	codominant	6b	33.1	284	296
AFRA04D09	(TG) ₃ catagttgta(TG) ₇ (TG) ₃ tatattatgtagt(TA) ₃	ctagcggsgaattatcttggttc	cgataegcccaactactcagatt	55	codominant	4b	26.4	147	151
AFRA04F03	+(AC) ₄ (gc) ₃ (AC) ₃ atacat(AC) ₇ (AT) ₅	accgactttcactttgctccat	ccattatggaggaacaataagaacc	55	codominant	1a	60.4	250	220
AFRA04F12	+(TG) ₄ atcgtcgg(TG) ₃ oga (TG) ₄ a(TG) ₃	tgaggtcagggtgtagctcggtt	ctgctccacaatcaactcaaca	55	codominant	1a	192.5	300	306
AFRA07E10	+(TC) ₉	catgactagacggttsgaggaa	agctcattattttgaagctgcaggg	55	codominant	4a	40.3	172	178
AFRA11F11	* (CT) ₃ atggttttaagcataataca t(AC) ₅ (AT) ₄ (AC) ₄ ata(TACA) ₂ (TA) ₃ t(AC) ₃	ccgccattagtagactaagc	gggcaaaagttatcatatagccaa	55	codominant	2a	304.7	220	200
AFRA11H08	(TC) ₁₆	gatggsgggtttgttctgtttct	atgcatgacacacacttccattt	55	codominant	2a	174.2	101	115
AFRA12E05	(TA) ₆ (TG) ₁₅	aaaagtcattgccagcccatcta	gatttcttggatctgagcgg	55	codominant	3b	120.5	280	285

Suppl. Table 2 (continued)

Marker name ^{a)}	Core repeats	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Amelting temperature (°C)	Segregation in F ₂ ^{b)}	Linkage group	Map position (cM)		Product size (bp)
							in D1s-15s-	in J1s-14s-23s	
AFRT01F02	+ (CG) ₆ (CA) ₆	acgagcctagctggatgagatta	cagccaactgctataggaacgata	55	codominant	7a	73.0	222	220
AFRT01G11	+ (AGA) ₄ (GA) ₁₅	agfgatgattctagggtggg	ctgacaccaccatacaaaaa	55	codominant	6a	72.6	254	260
AFRT01H05	+ (TC) ₁₀ agtgta(TATG) ₂ ca(TG) ₄ acagtgatgcaag(TG) ₁₀ atg tgcattgagtgta(TG) ₂ taigtaat tactatccccctctcg(CT) ₂	taatggatggcattagatgaacg	ctctccaccatccatgaatgagt	55	codominant	8	206.3	420	270
AFRT08C02	+ (AC) ₈ (AT) ₇	catccttaactcaattctatggg	ttatccaattaagccttgggc	55	codominant	6a	61.1	200	204
AFS006	* + (AC) ₁₃ (AT) ₆	gfgaccctatgaggggtaggatt	tgcctcattccaatnaaaa	55	codominant	3b	61.2	296	300
AFS008	* + (AC) ₈ at(AC) ₆	ggftatgatactagcgggtag	atcagacaacattctgctgacta	50	codominant	8	47.8	254	256
AFS012	* + (AC) ₁₃	attgagaattggaaatagaccgtt	gggttcatttttgggttctaagt	50	codominant	2a	164.7	200	190
AFS015	* + (TA) ₄ tgtatg(TA) ₆ tg(TA) ₅ tgtg (TA) ₈ tg(TA) ₂	atctcaactgctctgtaaccgaaag	catctgactttgtgatattgtgc	50	codominant	1a	32.7	358	328
AFS017	+ (TC) ₃ caatctttac(TC) ₁₅	tgaacttttattgctctctc	atggagacgaagtggtt	50	codominant	8	109.3	233	261
AFS039	* + (AT) ₈	cggstaataacggatatacaaca	cagtttcatatggtatcagagc	50	codominant	6a	122.7	292	288
AFS042	(AC) ₉ (AT) ₇	atgcttaaatcaatacaacacac	accatttttaatcaagsgagat	50	codominant	3b	58.5	253	251
AFS054	* + (AT) ₁₂ (AC) ₈	ttttgctagaacaagacaga	ggatagaggtgggctca	50	J_dominant	8	79.9	238	232
AFS058	* + (AC) ₈ (AT) ₆	tggactgagtgaaagatgg	accttttcattgctgttg	55	codominant	7b	61.3	193	193+197
AFS088	* + (TG) ₁₀	tatcttgagacagcttcttctgt	atggcttcgatgtagatgtgta	50	codominant	8	92.8	157	167
AFS096	(CA) ₁₂ (CT) ₃	ccaagattgggtgctcaagatca	tcacaagagtggtggtgtg	50	codominant	8	39.0	161	165
AFS099	* + (AC) ₁₃ (AT) ₈ caactatata(AT) ₂	tggcccttaataaacaatgac	ttaatcgatgacaagaattttt	50	codominant	1b	53.5	243	229
AFS101	* (AC) ₃ atat(AC) ₆ atatacag(AT) ₃	atacaacaacataatacaacac	agcgaccatataagccttgccta	50	codominant	8	52.4	124	128
AFS104	* + (AT) ₃ (AC) ₇	tcaagaaacagatgccaact	tgccttttagattcttcc	50	codominant	3a	52.5	210	216
AFS105	* (AC) ₂ aa(AC) ₁₀	ttcgttgcaacatttacacac	gfggagttactccccaaatgaag	50	codominant	1a	77.0	289	273
AFS109	* (TG) ₃ tt(TG) ₇	cctatgctttactctcaaccaaca	cggaaattcaagtggtcaagttt	50	codominant	X	70.7	197	195
AFS111	* + (AT) ₃ gtgtctata(TC) ₈	tgtttaatggactttcaatcctgt	gcataaaatgagaatcccgaag	50	codominant	2b	0.0	228	230
AFS117	* + (AC) ₄ gc(AC) ₄	attccaaatgagattctctctctg	ttgactgaccataggttccatcg	50	codominant	4b	46.9	290	270
AFS123	* + (AT) ₂ (TA) ₄ (AT) ₇ ttatacata (TG) ₃ tc(TA) ₉ tgtaca(TA) ₃	tctccagattttcttaagctct	tgggatttaacatgcaacat	50	codominant	1b	43.3	387	397
AFS131	* + (AC) ₈	caacaatcagagagaacagatga	actgtatattatgatacctctataa	50	codominant	X	75.8	161	163
AFS140	* + (TA) ₂ ca(AC) ₁₂ (AT) ₆ g(CA) ₃	cgtagcggatggtcaaca	tggaccggagcctagact	50	codominant	7b	77.7	219	199
AFS142	* + (AC) ₂ aa(AC) ₁₁ (AT) ₂ gt(TA) ₈	tggagataatataattggagcctat	ataaaatgacaaccaacctgtta	50	codominant	1a	133.3	246	244
AFS145	* + (AC) ₉	accttgggataaggtgttttga	ggctaggaattcaaccgaactt	55	J_dominant	3b	67.7	210	216
AFS149	* + (AC) ₁₁ (AT) ₇ ttcaactgtaca(TA) ₃	aaccaattgattacctctcatcgc	tgcggaccttccatagctgtataa	50	codominant	4a	76.2	202	204
AFS156	* + (AG) ₁₃	tcatatgctgctcaatctcgata	ttataatagaccccggagcaaa	55	codominant	4a	146.1	214	216
AFS221	* + (TC) ₉	tggcttaataagctcgaatg	gactgcttctgactacaata	50	codominant	7b	74.4	246	242

a) Used for assignment of chromosomal location in *A. cepa* (*) and *A. fistulosum* (+).

b) D_dominant shows dominant pattern for D1s-15s-10s allele and J_dominant shows dominant for J1s-14s-23s allele.

c) Amplified at two loci.

Suppl. Table 3 Primer sequences of 17 bulb onion SSR markers located on bunching onion (*Allium fistulosum*) map

Marker name ^{a)}	Accession No.	Core repeats	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Segregation in F ₂ ^{b)}	Linkage group	Map position (cM)	Product size (bp) in		Reported in
									D1s-15s-10s	J1s-14s-23s	
ACE010*	CF436768	(AC) ₈ (CC) ₆ gc(GT) ₄	atgtaccacatgatgaataaacaca	ggtagctgaagcaaatcaagcaa	55	codominant	5	17.7	167	169	this study
ACE020	CF439232	(AT) ₈ (AC) ₇ at(AC) ₄	agtggtcatggtgcttctgt	tgcacagatcacagcgaacaac	55	codominant	2a	0.0	200	210	this study
ACE039*	CF442638	(GC) ₄ (AC) ₁ (TC) ₃ t	atggctgccttctctatgaagt	ttagatgatggcagcattctactg	55	codominant	4b	61.6	273	275	this study
ACE044*	CF436576	(CGT) ₇	atgtaccagaaatctgctctttt	tccaatttttctgctgatggcttc	55	codominant	3a	0.0	186	187	this study
ACE080	TC1121	(TA) ₂₂	aggattaaaatgggagaagaagat	ttagaataaagaagccgcttga	45	codominant	1a	97.1	300	250	this study
ACE087	CF449129	(TA) ₃₁	aggeccacatctgattatgctttcc	tcceggaaacttgaatagaagaca	50	codominant	4a	15.6	250	258	this study
ACE088	TC2278	(TA) ₃₃	attatagccatcattctttt	gggatctatctgattgctcagctcgc	55	J_dominant	6a	103.7	220	250	this study
ACE101*	CF437209	(TAA) ₃ c(TA) ₅ (TC) ₆	ttaacaggctccctctctctccc	aggggacttctctcactcctggt	55	codominant	2b	16.8	190	182	this study
ACE111*	CF440609	(TCA) ₁₄	acttggatgtagaaactcacaacatt	ttagcctaacaataatagctcccaaaa	50	codominant	2a	121.0	270	260	this study
ACE113 ⁺	TC839	(TCA) ₆	atcagacctggagacatcaaaccttc	ttagaacaagcatccaacaattcca	55	codominant	7b	71.8	200	196	this study
ACE127	TC1106	(TG) ₄ taig(TA) ₈ gtg	ttagagcagcagcagcagcaaaa	agctccatgtccgcttccatt	55	codominant	5	27.9	292	296	this study
ACM005	BI095610	(ACA) ₅	cgtctcagcagtgagttggt	tgtgtccgatacagagttgct	55	codominant	4a	52.7	205	201	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
ACM024*	CF446873	(GCA) ₁₀	ccccatttctctatttctca	tgtgtgtcctgtgtgtgtgt	50	codominant	2a	180.4	95	105	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
ACM071*	CF449595	(AG) ₁₀	tctcattcaacttctactctacc	ctgactttgtctgactctgga	55	codominant	5	0.0	170	160	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
ACM096+	CF446191	(CTA) ₅	gtggcaattcagttatgtgtgt	agttccaagcaccacaagaagcagc	55	codominant	6a	54.4	275	271	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
ACM154*	TC387	(GAA) ₈	cttgttttgcaattgggat	cgaataacaccagtagcag	55	codominant	1a	68.9	210	220	Martin <i>et al.</i> , 2005
AMS14*	genomic	(CA) ₂₆ (TA) ₄	ccccggagtaaatcaaatccc	tcttagtaataattcggggtaaac	50	codominant	2a	52.7	150	154	Fischer and Backmann 2000

a) Used for assignment of chromosomal location in *A. cepa* (*) and *A. fistulosum* (+).

b) J dominant shows dominant pattern for J1s-14s-23s allele.

Suppl. Table 4 Primer sequences of 4 InDel, 17 CAPS and 4 dCAPS markers located on bunching onion (*Allium fistulosum*) map

Marker name ^{a)}	Marker type	Accession No.	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Segregation in F ₂ ^{b)}	Linkage group	Map position (cM)	Restriction enzyme	Reported in
ACAAJ79_InDel*	InDel	CF434863	tgaccactttctctgttg	cttaagctcttctctgtgg	55	codominant	3b	73.4	-	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
ACAAAX07_InDel	InDel	CF447127	tgatgttgatttcagccagcagaga	gcatgtgcccctgctatattgttg	50	D_dominant	6a	75.9	-	Martin <i>et al.</i> , 2005
TC0678_InDel	InDel	ACAD041/CF447640	tgcaatgccacaattctcca	aaatggagagcacaactgc	50	codominant	2a	160.6	-	this study
TC1952_InDel	InDel	CF450835/CF447545	aatgcacaactgaigtigt	cccttggagaatattgctt	55	codominant	2a	277.5	-	this study
ACAB023	CAPS	CF448968	ccgagatcacccgctcactctccg	tgacatattctcctagtctccaaa	55	codominant	2a	245.3	<i>Hae</i> III	Martin <i>et al.</i> , 2005
ACACG83	CAPS	CF436477	tacatcacgacaagcsggaagg	gaccacaagttatctcgaagctg	55	codominant	4a	66.0	<i>Alu</i> I	Martin <i>et al.</i> , 2005
ACACU34*	CAPS	CF449808	gtcagacttggtgigtgatactgtcc	ccacttcaccaaccttctcacc	55	codominant	4a	113.0	<i>Ssp</i> I	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
ACADR60*	CAPS	CF437227	gtacaagggtgtagagccctcc	gcatctctctatctcgcact	55	codominant	2a	147.7	<i>Taq</i> I	Martin <i>et al.</i> , 2005
ACC006*	CAPS	AF255795	acagtaagggaacggcgctt	tgccacagttccaattaagaca	55	codominant	1a	63.8	<i>Mbo</i> I	Wako <i>et al.</i> , 2002b
ACC008*	CAPS	AF218356	agfacacagacattccggc	aaaagcacaccactttggc	50	codominant	2b	12.5	<i>Hsp</i> 92II	Wako <i>et al.</i> , 2002b
ACC013*	CAPS	AA451549	cgfgaacaccacattatcgc	ctcagtggtatcccgctat	55	codominant	3b	111.3	<i>Acc</i> II	Ohara <i>et al.</i> , 2005
ACC015*	CAPS	ALCLECTINA	caggccaatccctagctgta	gocettaaggeccacatacat	50	codominant	1c	13.8	<i>Mse</i> I	Wako <i>et al.</i> , 2002b
ACC018*	CAPS	ACY13373	ttctcgtatctctgtgt	gacaaaagatcccctcgc	50	codominant	1a	0.0	<i>Hsp</i> 92II	Wako <i>et al.</i> , 2002b
ACC033*	CAPS	AA451560	gactgaecgagccaatc	acggcagtgacattctgattc	55	codominant	1b	90.8	<i>Fok</i> I	Wako <i>et al.</i> , 2002b
ACC043*	CAPS	AJ06067	atgcagggtttctgataagactc	ataaaacttcccagctabacc	55	codominant	3a	59.2	<i>Ban</i> I	Wako <i>et al.</i> , 2002b
AOB272*	CAPS	AA451592	gcatgtgatggctttgtgt	gcaacagagagcagacaact	55	D_dominant	2a	223.2	<i>Sac</i> I	Gökçe <i>et al.</i> , 2002
TC1010*	CAPS	CF440857/CF449499	attggagaatgagctgcaga	agaccatcgactttgttga	55	codominant	6a	76.9	<i>Tsp</i> 509I	this study
TC1891	CAPS	CF447415/CF434904	ccgagatcacccgctcaactccgc	tgacatattcccagttctccaaa	55	J_dominant	2a	242.5	<i>Hae</i> III	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
TC2566	CAPS	CF447326	ccgttccaatttaccag	atcatccaactcctata	55	codominant	3a	30.9	<i>Hpy</i> CH4IV	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
TC3133	CAPS	CF441621/BQ579911	gcatctcaatctcgactcca	acacgaacagacaacagctc	58	codominant	2a	210.0	<i>Msp</i> I	this study
TC3164*	CAPS	CF449495	tagaggtggaactgttgg	ttggtagaataagttgat	55	codominant	7b	41.6	<i>Hsp</i> 92II	Kuhl <i>et al.</i> , 2004
ACAERK46_dCAPS*	dCAPS	CF451695	atgccaagtttgaagatgacaatgatt	gcatgtcttttggatctcagg	55	codominant	8	85.1	<i>Hin</i> fl	this study
ACAER72_dCAPS	dCAPS	CF452432	ctccagctatccattcaagctct	gtttgaagaatttaggtcgaatbaagc	55	codominant	8	123.0	<i>Alu</i> I	this study
CF439394_dCAPS*	dCAPS	CF439394	tggattttatccatttctcc	tgaactatataatgctcattttatttttg	50	codominant	7b	0.0	<i>Taq</i> I	this study
TC2026_dCAPS	dCAPS	CF445209	ttttaattgattccaatttcccg	atgattgccaagagggcttt	55	codominant	3a	25.8	<i>Msp</i> I	this study

a) Used for assignment of chromosomal location in *A. cepa* (*).

b) D dominant shows dominant pattern for D1s-15s-10s allele and J dominant shows dominant for J1s-14s-23s allele.

Suppl. Table 5 Primer sequences of 14 SSR markers used

Markers	Forward and reverse primer sequences (5'-3')	Core repeats
AFS039	cgggtaataacggatatacaaca cagttgtacatgtggtacagagc	(AT) ₈
AFS096	ccaagtattgggtgtcaaagtaca tcacaagagagtggtgtgtgtg	(CA) ₁₂ (CT) ₃
AFS099	atgccctcattaataacaacatgac ttaatcgattgacaaagttattt	(AC) ₁₃ (AT) ₈
AFS104	actcaaggaacacgtatgccact tcgcccttttagattcattcc	(AC) ₇
AFS105	acttcgttgcaaacatttacacacac gtggagtttactccccaaatgaag	(AC) ₃ aa(AC) ₁₀
AFS110	tttgaagtttgccttttatcc tcatgacaccatgtgtctctatgtct	(GT) ₃ ata(TG) ₉
AFS111	tgtttaatggactttcaatgcctgt gcattaaaatgaagaaatcccgaag	(TG) ₈
AFS123	tctccagattttctaagctct tgggatttacatcgcaacat	(TG) ₉ tc(TA) ₉
AFS131	caacaatcagagagaaacagatga actgtatattatgtatcactccatgtaaa	(AC) ₈
AFS142	tgagagaattaatattattggaggcctat ataaaatgacaaccaacctatgta	(AC) ₁₁ (AT) ₅ gt(TA) ₈
AFS145	acccttgggataagtggtttattga ggtcatgagtaattcaccgaacatt	(AC) ₉
AFS146	attcagatgactcacaggaatgacc ggagaaggcctggtcctatgtaag	(AC) ₁₀ aa(TAA) ₄
AFS149	aaccaattgattacctctcatctgc tgccggaccttccatagctgtataa	(AC) ₁₁ (AT) ₇
AFS152	tttcgaactttgactttcatcgtc acaaggatgagttgcatgttgtga	(AC) ₈

Suppl. Table 6 Primer sequences of SSR markers used in the preliminary examination

Markers	Forward and reverse primer sequences (5'-3')	Core repeats
AFS008	ggttatgaatactagcgggatag atcagaacaacattctgctgacta	(AC) ₆ at(AC) ₆
AFS012	attgagaattggaatatgaccgtt ggtgttcattttgggtttctaagt	(AC) ₁₃
AFS015	atctcactgtccttgatcctgaaag catcttgactttgatattgtgc	(TGTA) ₅ , (TA) ₆ tg(TA) ₅ tg(TA) ₆ (TA) ₄ , (TA) ₄ , (TATG) ₄
AFS017	tgaactttatttatgcttctctc atggaggacgaagtggtt	(TC) ₅ , (TC) ₁₅
AFS039	cgggtaataacggatatcataaaca cagttgttacatgtggtatcagagc	(AT) ₈
AFS060	cctatccccatgcatcacacttat attccttcaccaccgttgatttatt	(GC) ₅ t(AC) ₈ t(TA) ₈ c(TG) ₁₃
AFS088	tatcttcgagcacggttcttctgt atggcttcgatgatggatagttgta	(TG) ₁₀
AFS096	ccaagtattgggtggtcaaagtaca tcacaagagagtgtgtgtgtgtg	(AC) ₁₂
AFS099	atgcccctcattaataacaacatgac ttaatgcattgacaagtttattt	(AC) ₁₃ (AT) ₈
AFS101	atcacacacacatatacacacac agcgaccatatatagccttgctta	(AC) ₅ atat(AC) ₉
AFS103	ttttacctagatattttcgaattca catctttcttttctactagcttctg	(TA) ₉ (TG) ₉
AFS105	actttcgttgcaaacatttacacacac gtggagtttactccccaaatgaag	(AC) ₁₀
AFS109	cctatgtctttacctatccaaccaaca ccgaatttcaagtgtgtcaagttt	(TG) ₇
AFS111	tgtttaatggactttcaatgcctgt gcattaaatgaagaaatcccgaag	(TG) ₈
AFS131	caacaatcagagagaaacagatga actgtatatttatgtatcactccatgtaaa	(AC) ₈
AFS140	cgtagcggatggtcacaaga tggacctggaggcctagact	(AC) ₁₂
AFS142	tgagagaattaatattattggaggcctat ataaaatgacaaccaacctgta	(AC) ₁₁ (AT) ₅ gt(TA) ₈

引用文献

- 1) 足立静香 (1999): RAPD 法によるタマネギの品種識別及び RAPD マーカーの STS 化. 農林水産消費技術センター「研究調査報告」**23**, 17-31.
- 2) 足立静香・杉村豊裕 (2000): タマネギの RAPD 法による品種識別及び原産地推定. 農林水産消費技術センター「研究調査報告」**24**, 29-39.
- 3) Anderson, J. A., G. A. Churchill, J. E. Autrique, S. D. Tanksley and M. E. Sorrells (1993): Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **36**, 181-186.
- 4) Ballester, J. and M. C. de Vicente (1998): Determination of F₁ hybrid seed purity in pepper using PCR-based markers. *Euphytica* **103**, 223-226.
- 5) Bellamy, A., F. Vedel and H. Bannerot (1996): Varietal identification in *Cichorium intybus* L. and determination of genetic purity of F₁ hybrid seed samples, based on RAPD markers. *Plant Breed.* **115**, 128-132.
- 6) Bradeen, J. M and M. J. Havey (1995): Randomly amplified polymorphic DNA in bulb onion and its use to assess inbred integrity. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **120**, 752-758.
- 7) Bredemeijer, G. M. M., P. Arens, D. Wouters, D. Visser, B. Vosman (1998): The use of semi-automated fluorescent microsatellite analysis for tomato cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* **97**, 584-590.
- 8) Crockett, P. A., P. L. Bhalla, C. K. Lee and M. B. Singh (2000): RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar. *Genome* **43**, 317-321.
- 9) Crockett, P. A., M. B. Singh, C. K. Lee and P. L. Bhalla (2002): Genetic purity analysis of hybrid broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) seeds using RAPD PCR. *Aust. J. Agric. Res.* **53**, 51-54.
- 10) DNA 品種識別技術検討会 (2003): 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—.
- 11) Edwards, K. J., J. H. A. Barker, A. Daly, C. Jones and A. Karp (1996): Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques* **20**, 758-760.
- 12) Fischer, D. and K. Bachmann (2000): Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus *Rhizirideum*. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 153-164.
- 13) Ford-Lloyd, B. V. and S. J. Armstrong (1993) Welsh onion *Allium fistulosum* L. In Genetic Improvement of Vegetable Crops. (Kalloo, G. and B. O. Bergh, Eds), Pergamon Press, 51-58.
- 14) Frary, A., Y. M. Xu, J. P. Liu, S. Mitchell, E. Tedeschi and S. Tanksley (2005) Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments. *Theor. Appl. Genet.* **111**, 291-312.
- 15) Friesen, N., S. Pollner, K. Bachmann and F. R. Blattner (1999): RAPDs and non-coding chloroplast DNA reveal a single origin of the cultivated *Allium fistulosum* from *A. altaicum* (*Alliaceae*). *Am. J. of Bot.* **86**, 554-562.
- 16) Fritsch, R. M. and N. Friesen (2002): Evolution, domestication and taxonomy. In *Allium crop science: Recent advances*. (Rabinowitch, H. D. and L. Currah, Eds), CABI Publishing, 5-30.
- 17) Fukuoka, H, T. Nunome, Y. Minamiyama, I. Kono, N. Namiki and A. Kojima (2005): Read 2 Marker: a data processing tool for microsatellite marker development from a large data set. *BioTechniques* **39**, 472-476.
- 18) Gökçe, A. F., J. McCallum, Y. Sato and M. J. Havey, (2002): Molecular tagging of the *Ms* locus in onion. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **127**, 576-582.
- 19) Haishima, M., J. Kato and H. Ikehashi (1993): Isozyme polymorphism in native cultivars of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). *Japan J. Breed.* **43**, 537-547.
- 20) Hamilton, M. B., E. L. Pincus, A. Di Fiore and R. C. Fleischer (1999): Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques* **27**, 500-507.
- 21) Hang, T. T. M., M. Shigyo, N. Yamauchi and Y. Tashiro (2004): Production and characterization of alien chromosome additions in shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) carrying extra chromosome(s) of Japanese bunching onion (*A. fistulosum* L.). *Genes Genet. Syst.* **79**, 263-269.
- 22) Hashizume, T., T. Sato and M. Hirai (1993): Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Japan J. Breed.* **43**, 367-375.
- 23) Hwang, T. Y., T. Sayama, M. Takahashi, Y. Takada, Y. Nakamoto, H. Funatsuki, H. Hisano, S. Sasamoto, S. Sato, S. Tabata, I. Kono, M. Hoshi, M. Hanawa, C. Yano, Z. Xia, K. Harada, K. Kitamura and M. Ishimoto (2009): High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean. *DNA Research* **16**, 213-225.
- 24) Inden, H. and T. Asahira (1990): Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). In "Onions and Allied Crops. Volume III. Biochemistry, Food Science, and Minor Crops", Brewster, J. L. and H. D. Rabinowitch (eds.), CRC press, Florida. p. 159-178.
- 25) Ipek, M., A. Ipek, S. G. Almquist and P. W. Simon (2005): Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic, based on AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **110**, 228-236.
- 26) Jakše, J., W. Martin, J. McCallum and M. Havey (2005): Single nucleotide polymorphisms, indels, and simple sequence repeats for onion cultivar identification. *J. Am. Hort. Sci.* **130**, 912-917.
- 27) Jones, C. J., K. J. Edwards, S. Castaglione, M. O. Winfield, F. Sala, C. van de Wiel, G. Bredemeijer, B. Vosman, M. Matthes, A. Daly, R. Brettschneider, P. Bettini, M. Buiatti, E. Maestri, A. Malcevski, N. Marmiroli, R. Aert, G. Volckaert, J. Rueda, R. Linacero, A. Vazquez and A. Karp (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.* **3**, 381-390.
- 28) 郭始光・若生忠幸・塚崎光・加藤鎌司・小倉久和 (2008) 単純反復配列 (SSR) マーカーによるユリ科植物ノビル自然集団の多型解析. 日本植物学会中国四国支部 第 65 回大会講演要旨, 15
- 29) Kijas, J. M. H., J. C. S. Fowler, C. A. Garbett and M. R.

- Thomas (1994): Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *BioTechniques* **16**, 656-662.
- 30) King, J. J., J. M. Bradeen, O. Bark, J. A. McCallum and M. J. Havey (1998): A low-density map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. *Theor. Appl. Genet.* **96**, 52-62.
- 31) Kirk, J. T. O., H. Rees and G. Evans (1970): Base composition of nuclear DNA within the genus *Allium*. *Heredity* **25**, 507-512.
- 32) 北浦健生・河田隆弘・塚崎光・福岡浩之・山下謙一郎・若生忠幸・北宜裕 (2005): ネギにおけるトレーサビリティ付与のための SSR マーカーによる品種標識法. (2) 育成品種「湘南一本」における品種内 DNA 多型と標識マーカーの選択. 育学研 **7** (別 1・2), 220.
- 33) 北浦健生・河田隆弘・久保深雪・塚崎光・山下謙一郎・若生忠幸・北宜裕 (2007): ネギ育成品種「湘南一本」における品種標識による形質への影響. 育学研 **9** (別 2), 109.
- 34) Klaas, M. and N. Friesen (2002): VIII. Molecular markers in *Allium*. In *Allium crop science: Recent advances*. (Rabinowitch, H. D. and L. Currah, Eds), CABI international, Wallingford, Oxon, 159-185.
- 35) Kosambi, D. (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* **12**, 172-175.
- 36) Kubik, C., M. Sawkins, W.A. Meyer and B.S. Gaut (2001): Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. *Crop Sci.* **41**, 1565-1572.
- 37) Kuhl, J. C., F. Cheung, Q. Yuan, W. Martin, Y. Zewdie, J. McCallum, A. Catanach, P. Rutherford, K. C. Sink, M. Jenderk, J. P. Prince, C. D. Town and M. J. Havey (2004): A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders *Asparagales* and *Poales*. *Plant Cell* **16**, 114-125.
- 38) 熊沢三郎・勝又広太郎 (1965): 葱. 「蔬菜園芸学論」, 熊沢三郎編, 養賢堂, 東京, 280-289.
- 39) Kuniyoshi, M., N. Fukino and S. Matsumoto (2003): Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* **134**, 209-215.
- 40) Lagercrantz, U., H. Ellegren and L. Andersson (1993): The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acid Res.* **21**, 1111-1115.
- 41) Lander, E., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M. Daly, S. Lincoln and L. Newburg (1987): MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**, 174-181.
- 42) Livneh, O., Y. Nagler, Y. Tal, S. B. Harush, Y. Gafni, J. S. Beckmann and I. Sela (1990): RFLP analysis of a hybrid cultivar of pepper (*Capsicum annuum*) and its use in distinguishing between parental lines and in hybrid identification. *Seed Sci. and Tech.* **18**, 209-214.
- 43) Manel, S., O.E. Gaggiotti and R.S. Waples (2005): Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecol. Evol.* **20**, 136-142.
- 44) Martin, W. J., J. McCallum, M. Shigyo, J. Jakše, J. C. Kuhl, N. Yamane, M. Pither-Joyce, A. F. Gokce, K. C. Sink, C. D. Town and M. J. Havey (2005): Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity. *Mol. Gen. Genomics* **274**, 197-204.
- 45) Masuzaki, S., N. Araki, N. Yamane, N. Yamauchi, T. Wako, A. Kojima and M. Shigyo (2006): Chromosomal locations of microsatellites in onion. *Hort Sci.* **41**, 315-318.
- 46) McCallum, J., D. Leite, M. Pither-Joyce and M. J. Havey (2001) Expressed sequence markers for genetic analysis of bulb onion (*Allium cepa* L.). *Theor. Appl. Genet.* **103**, 979-991.
- 47) McDonald, M. B. (1998): Seed quality assessment. *Seed Sci. Res.* **8**, 265-275.
- 48) Meesang, N., S. L. Ranamukhaarachchi, M. J. Petersen and S. B. Andersen (2001): Soybean cultivar identification and genetic purity analysis using microsatellite DNA markers. *Seed Sci. and Tech.* **29**, 637-645.
- 49) Neff, M. M., E. Turk and M. Kalishman (2002): Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends in Genetics* **18**, 613-615.
- 50) Nei, M. (1973): Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 3321-3323.
- 51) Nunome, T., S. Negoro, K. Miyatake, H. Yamaguchi and H. Fukuoka (2006): A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. *Plant Mol. Biol. Rep.* **24**, 305-312.
- 52) Nunome, T., S. Negoro, I. Kono, H. Kanamori, K. Miyatake, H. Yamaguchi, A. Ohyama and H. Fukuoka (2009): Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Theor. Appl. Genet.* **119**, 1143-1153.
- 53) Ohara, T., Y. S. Song, H. Tsukazaki, T. Wako, T. Nunome and A. Kojima (2005): Genetic mapping of AFLP markers in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum*). *Euphytica* **144**, 255-263.
- 54) Ohara, T., H. Tsukazaki, Y. S. Song, T. Wako, K. Yamashita and A. Kojima (2009): Mapping of quantitative trait loci controlling seedling growth in bunching onion (*Allium fistulosum* L.). *J. Japan Soc. Hort. Sci.* **78**, 436-442.
- 55) 大坪研一・中村澄子・雲聡・川上宏智・宮村毅 (2005): PCR 法による米の DNA 品種判別のためのプライマーセットの開発. 食科工 **52**, 102-106.
- 56) Ohyama, A., E. Asamizu, S. Negoro, K. Miyatake, H. Yamaguchi, S. Tabata and H. Fukuoka (2009): Characterization of tomato SSR markers developed using BAC-end and cDNA sequences from genome databases. *Mol. Breed.* **23**, 685-691.
- 57) Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling and C. Strobeck (1995): Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* **4**, 347-354.
- 58) Peffley, E. B. (1986): Evidence for chromosomal differentiation of *Allium fistulosum* and *A. cepa*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **111**, 126-129.
- 59) Rajora, O. P. and M. H. Rahman (2003): Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus* × *canadensis*) cultivars. *Theor. Appl. Genet.* **106**, 470-477.

- 60) Ricroch, A., R. Yockteng, S. C. Brown and S. Nadot (2005) Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome* **48**, 511-520.
- 61) Rouamba, A., M. Sandmeier, A. Sarr and A. Ricroch A (2001): Allozyme variation within and among populations of onion (*Allium cepa* L.) from West Africa. *Theor. Appl. Genet.* **103**, 855-861.
- 62) Rozen, S. and H. J. Skaletsky (2000): Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*. (Krawetz, S. and S. Misener, Eds), Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.
- 63) 佐々木健・塚崎光・山下謙一郎・若生忠幸・鈴木正彦 (2007): ネギ SSR 及びタマネギ EST マーカーを利用したニンニクの品種識別. *園学研* **6** (別 1), 391.
- 64) Shigyo, M., Y. Tashiro, S. Issiki and S. Miyazaki (1996): Establishments of a series of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) with extra chromosomes from shallot (*A. cepa* L. Aggregatum group). *Genes Genet. Syst.* **71**, 363-371.
- 65) Song, Y. S., K. Suwabe, T. Wako, T. Ohara, T. Nunome and A. Kojima (2004): Development of microsatellite markers in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.). *Breed. Sci.* **54**, 361-365.
- 66) Stack, S. M. and D. E. Coming (1979) The chromosomes and DNA of *Allium cepa*. *Chromosoma* **70**, 161-181
- 67) Stearn, W. T. (1992): How many species of *Allium* are known? *Kew Magazine* **9**: 180-182.
- 68) 鈴木隆夫・泉田敦・塚崎光・小野寺忠宣・富田健一・山下謙一郎・若生忠幸・小島昭夫 (2006): DNA マーカーで標識したネギ F₁ 品種の開発. *育学研* **8** (別 2), 110.
- 69) Tanksley, S. D. and R. A. Jones (1981): Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F₁ hybrids of tomato. *Hort Sci.* **16**, 179-181.
- 70) Tommasini, L., J. Batley, G. Arnold, R. Cooke, P. Donini, D. Lee, J. Law, C. Lowe, C. Moule, M. Trick and K. Edwards (2003): The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* **106**, 1091-1101.
- 71) 塚崎光・山下謙一郎・宮武宏治・若生忠幸・小島昭夫 (2006): ネギの初期生育に関する QTL 解析. *育学研* **8** (別 1), 144.
- 72) 塚崎光・佐々木健・米丸淳一・金森裕之・河野いつみ・山下謙一郎・若生忠幸・小島昭夫 (2007 a): PLUG システムを利用したネギにおけるマーカー開発. *園学研* **6** (別 1), 128.
- 73) 塚崎光・山下謙一郎・小島昭夫・若生忠幸 (2007 b): ネギの初期生育に関する QTL の遺伝効果. *育学研* **9** (別 2), 268.
- 74) Tsukazaki, H., K. Yamashita, S. Yaguchi, S. Masuzaki, M. Shigyo, A. Kojima and T. Wako (2009): Determination of the chromosomal location of bunching onion SSRs and bulb onion EST markers using a complete set of bunching onion-shallot monosomic addition lines and allotriploid-bunching onion single-alien deletion lines. *Plant and Animal Genome XVII Conference*, P 207.
- 75) 臼井裕一・足立静香・紙谷元一・中島寿亀・山元義久・鈴木忠直・安井明美 (2006 a): タマネギの品種識別用 DNA マーカーの開発. *食科工* **53**, 498-504.
- 76) 臼井裕一・足立静香・紙谷元一・中島寿亀・山元義久・鈴木忠直・安井明美 (2006 b): 統計的手法を用いた DNA マーカーによるタマネギの品種識別. *食科工* **53**, 505-513.
- 77) van der Meer (1997): Old and new crops within edible *Allium*. *Acta Hort.* **433**, 17-31.
- 78) van Heusden, A. W., J. W. van Ooijen, R. Vrielink-van Ginkel, W. H. K. Verbeek, W. A. Wietsma and C. Kik (2000): A genetic map of an interspecific cross *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.* **100**, 118-126.
- 79) 若生忠幸・小原隆由・Song Yeon-Sang・小島昭夫 (2002 a): ネギにおける SSR マーカーの開発. *育学研* **4** (別 1), 83.
- 80) 若生忠幸・執行正義・田代洋丞・片岡園・小原隆由・小島昭夫 (2002 b): シャロットにおける染色体特異的 CAPS マーカーの開発. *園学雑*, **71** (別 1), 348.
- 81) Wilkie, S. E., P. G. Isaac and R. J. Slater (1993): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* **86**, 497-504.
- 82) Yaguchi, S., T. T. M. Hang, H. Tsukazaki, V. Q. Hoa, S. Masuzaki, T. Wako, N. Masamura, N. Shiomi, S. Onodera, N. Yamauchi and M. Shigyo (2009): Molecular and biochemical identification of alien chromosome additions in shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) carrying extra chromosome(s) of bunching onion (*A. fistulosum* L.). *Genes Genet. Syst.* **84**, 43-55.
- 83) Yoo, K. S., L. M. Pike and B. K. Hamilton (1995): A simplified pyruvic acid analysis suitable for onion breeding programs. *Hort Sci.* **30**, 1306.
- 84) Zane, I., L. Bergelloni and T. Patarnello (2002): Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* **11**, 1-16.
- 85) 農林水産省 (2008): 主要農作物の産出額の構成比 — 全国 — 「生産農業所得統計. 2006 年. 市町村別推計統計表. 8. 分析指標」. <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001031687B2004-002-004-002>.
- 86) 農林水産省統計部 (2008): グラフと絵で見る食料・農業 — 統計ダイジェスト — 「やさい 5 ねぎ」. <http://www.toukei.maff.go.jp/digest/yasai/negi/negi.html>.

Application of SSR Markers for the Breeding of Bunching Onion (*Allium fistulosum*)

Hikaru Tsukazaki

Summary

Bunching onion (*Allium fistulosum* L.) is one of the most important vegetables in Japan. However, despite its economic importance, its genetic characteristics are poorly studied. To establish a genetic basis for molecular breeding of bunching onion, I isolated 1796 simple sequence repeat (SSR) clones by large-scale sequencing of SSR-enriched genomic DNA libraries. Of these, 1331 (74.1%) contained (GT)_n repeats ($n > 5$) and 314 (17.5%) contained (GA)_n repeats. The average numbers of SSRs among the respective clones were 10.5 and 10.4. Five inbred lines contained an average of 3.2 alleles at 100 SSR loci, with a mean polymorphism information content (PIC) of 0.55. These results indicate that bunching onion SSRs are very rich sources of highly informative genetic markers.

I constructed a linkage map of bunching onion ($2n = 16$) using an F₂ population of 225 plants. The map, covering 2069 cM, consists of 17 linkage groups with 213 bunching onion SSR markers and 42 bulb onion (*A. cepa* L.) SSR, insertion-deletion (InDel), cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) or derived CAPS (dCAPS) markers. This is the first linkage map based mainly on SSR markers in *Allium*. Using 103 anchor markers (81 bunching onion SSRs, 11 bulb onion SSRs, and 11 bulb onion non-SSR markers: 1 InDel, 9 CAPSs, 1 dCAPS), I assigned markers to *A. cepa* or *A. fistulosum* chromosomes via the use of several kinds of *Allium* alien addition lines, and connected 16 of the 17 linkage groups to the 8 basic chromosomes of *A. cepa*.

DNA markers can be powerful tools for verifying cultivar identity and genetic homogeneity of F₁ hybrid seed. F₁ cultivars of bunching onion are becoming prevalent in Japan owing to their high uniformity in agronomic traits. However, bunching onion is an allogamous crop and suffers from severe inbreeding depression when selfed. It is thought that not only open-pollinated cultivars but also parental lines of F₁ hybrids may be bred to hold a degree of genetic heterogeneity. Thus, I evaluated the genetic homogeneity of 8 bunching onion cultivars, including 6 F₁ hybrids, by using 14 SSR markers. The number of alleles detected in the 8 cultivars varied from 3 to 7 among the 14 SSR loci, with PIC values ranging from 0.41 to 0.76. All 8 cultivars showed a low degrees of uniformity at all of these polymorphic loci. Hence, it would seem impossible to determine an appropriate genotypic identity for any existing cultivar of bunching onion. Thus, to improve cultivar identification, I propose an "SSR-tagged breeding" scheme, in which individuals that are homozygous at a few SSR loci are selected out of a foundation seed field.

To demonstrate the feasibility of this procedure, I used a bunching onion landrace as starting material for a trial in an allogamous population. Two SSR-tagged populations were produced by selecting double homozygous individuals (population A) and quadruple homozygous individuals (population B) at selected loci. The selected individuals were then open-pollinated within each population. Field growth tests detected no significant differences in any traits tested among the SSR-tagged populations and the control (untagged) populations. In addition, the SSR-tagged populations were genetically uniform at the selected loci, whereas the other loci still contained high degrees of heterogeneity, suggesting that the SSR-tagged populations can be distinguished from other cultivars by using the selected SSR markers. Therefore, we suggest the "SSR-tagged breeding scheme" as a tool for cultivar identification and for conferring traceability, not only in bunching onion, but also in other allogamous crops that experience severe inbreeding depression.

Accepted; October 5, 2009

Vegetable Breeding Research Team

360 Kusawa, Ano, Tsu, Mie, 514-2392 Japan