

SSRマーカーによるリンゴ47品種・系統の
DNA品種識別技術

国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構

2021年3月25日 第2版

SSRマーカーによるリンゴ47品種・系統のDNA品種識別技術

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
果樹茶業研究部門

1. はじめに

リンゴ (*Malus Mill.*) は、バラ科ナシ亜科に属する果樹であり、日本なし、ビワなどが、同じナシ亜科に属している。

日本におけるリンゴの栽培総面積は、35,896ha である (図1、特産果樹生産動態等調査 (農林水産省生産局農産部園芸作物課 平成30年産) から作成)。平成30年産の品種別栽培面積では、「ふじ」が50.8%、「つがる」が11.7%、「王林」が7.4%、「ジョナゴールド」が6.7%を占めている。また、リンゴは世界の各地で栽培されており、2019年の総生産量は8723.6万tである (FAOSTAT 公表)。

日本の種苗法における品種登録状況は、出願公表を含めて296品種あり、最近では、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所 (以下、農研機構・果樹研究所) などから、「紅みのり」、「錦秋」、「ローズパール」、「ルビースイート」などの食用の優良品種や台木用品種の「JM系統」など多数の品種が育成され、出願登録されている。これら優良品種における品種名の偽装表示や登録品種の海外流出は、リンゴ生産に大きな影響をおよぼすだけでなく、消費者に対する食の安全・安心の確保の観点からも大きな問題である。

これまで、なしを初めとする主要果樹では、SSR (Simple Sequence Repeat の略、別名マイクロサテライト) マーカーによる品種識別技術が報告されている。リンゴでは、15種類のSSRマーカーを用いた栽培リンゴ120品種・系統、台木及びリンゴ属近縁種17品種の識別が報告されている (Moriya et al, 2011, *Euphytica* 177:135-150)。一方で、SSRマーカーの多くは、スタッターバンドが生じやすく遺伝子型決定が困難な場合があること、対立遺伝子間の増幅に差が見られること、1-2bpのフラグメントサイズ間の識別が煩雑であることから、正確な遺伝子型判定には熟練を要することが知られており、判定し易く信頼性が高いDNAマーカーの開発が期待されていた。このことから、農研機構・果樹研究所では、開発したリンゴ由来のSSRマーカーのうち、より判定し易いSSRマーカーを選定し、新しいSSRマーカーセットによるリンゴ品種識別技術を開発した。(押野秀美ら,2014.園芸学研究13(別2):335)

そこで、上記報告から得られた情報を基に、国内の主要な品種を含むリンゴ47品種・系統を識別できる最小SSRプライマーセット等を確認し、リンゴ品種のDNA品種識別技術に関する分析マニュアルを作成した。

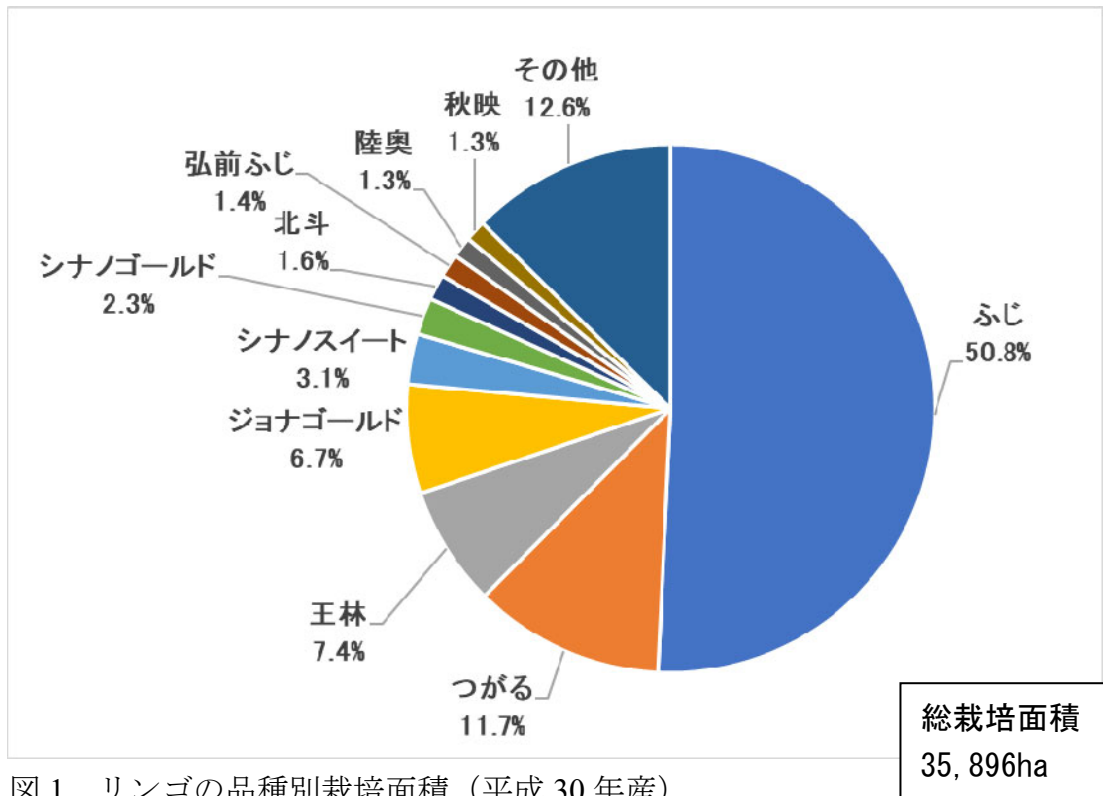


図1 リンゴの品種別栽培面積（平成30年産）

2. 一般的注意事項及びDNA抽出法について

DNA品種識別分析における一般的注意事項及び実験、サンプルからのDNA抽出方法については、＜植物のDNA品種識別についての基本的留意事項－技術開発と利用のガイドライン－＞及び＜DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン＞を参照のこと。

3. SSRマーカーを用いたPCR反応

波形のチェックや遺伝子型の判定が容易なことを条件として絞り込んだ、9種類のSSRマーカーを用い47品種・系統についてPCR反応を行う。PCR反応条件は、通常のPCRと基本的に同じプロトコールである。

＜準備するもの＞

1.5 ml 又は 2.0 ml チューブ（滅菌済み）、96 穴 PCR プレート又は 8 連チューブ（Thermo Fisher Scientific/ Applied Biosystems 社、以下 ABI 社と記載）、キャップまたはフルプレートカバー（ABI 社）、サンプル DNA 溶液（5 ng/μl に調製したもの）、Go Taq® Green Mastar Mix（Promega 社）、1/10TE バッファー、滅菌超純水、SSR プライマー溶液（蛍光ラベルされたフォワードプライマーとリバース

プライマーを各 10 pmol/μl 含む溶液、1/10 TE バッファーで希釈)、Veriti サーマルサイクラー (ABI 社) もしくは GeneAmp PCR System 9700 (ABI 社) 等のサーマルサイクラー

<用いた SSR マーカー>

それぞれの SSR マーカーについて、マーカー名、フォワードプライマーとリバースプライマーのシーケンス、各マーカーにおける増幅範囲 (Size range)などを、表 1 に掲載した。

<本マニュアルで識別可能なリンゴ 47 品種・系統>

「あかね」、「秋映」、「旭」、「いわかみ」、「印度」、「王林」、「おぜの紅」、「ガラ」、「きおう」、「きざし」、「きたかみ」、「きたろう」、「錦秋」、「金星」、「紅玉」、「こうたろう」、「ゴールデンデリシャス」、「さんさ」、「さんたろう」、「シナノゴールド」、「シナノスイート」、「ジョナゴールド」、「世界一」、「千秋」、「ちなつ」、「つがる」、「デリシャス」、「はつあき」、「ひめかみ」、「ふじ」、「紅みのり」、「北斗」、「陸奥」、「メイポール」、「もりのかがやき」、「陽光」、「ルビースイート」、「ローズパール」、「JM1」、「JM2」、「JM5」、「JM7」、「JM8」、盛岡 66 号、盛岡 68 号、盛岡 69 号、盛岡 71 号。

表1 リンゴにおける9種類のSSRマーカー

SSR name	Primer sequence (5'-3')		Label	Motif	Size range (bp)
	Forward	Reverse			
CH01b09b	TTATAGCAGCAACAGGAGCG	gtttcttTATTCGGGAGGCATGGTATG	Fam	GA	177-187
Hi22d06	CCCCGAGCTCTACCTCAAA	CATTATGTTTCCGGTTTTTGG	Fam	AAC	123-132
Hi15h12	GAACAAGAAGGACGCGAATC	GTTTGGGCCTCGTTATCACTACCA	Ned	ATC	221-230
Hi08h08	TGAACAAATTCCACCACGAA	GTTTGCCAAGGCTACAATTTTCA	Fam	AAC	236-242
Hi09f01	CACCACCAAATTCTCCATCTTC	GTTTACCGCCAAATGCTTTGTTAC	Ned	AAG	257-266
NZmsEB119405	GCATGTCAAACCACTTGTC	gtttcttATTCTCTCGCGGCAGTT	Ned	CGT	180-190
NZmsEB116209	AAAATCCCAATTCCAAAACC	gtttcttTTGGAGCAGTGAAAGATTGG	Ned	AGA	122-139
NZmsEB146613	AGAGTTCCGTTCCCTCTCT	gtttcttGTGGATTCGAAATGCACTC	Fam	TTCC	162-183
SAMsEB132187	TCTCCCTCACTCGACGTTG	gtttcttGTTGCAGGAAGGAGTGTCG	Fam	GGA	249-258

*マーカーセットには安定を図るためにテイル (gtttctt) を付加しているものがある。

<基本操作>

(1)以下のように PCR 反応液を調製する。

Go Taq® Colorless Master Mix	
もしくは Go Taq® Green Master Mix	5.0µl
SSR プライマー溶液	0.5µl
滅菌超純水	3.5µl
サンプル DNA 溶液	1.0µl
合計	10.0µl

(2)サーマルサイクラーを用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。

- ・ 94°C5 分間熱変性。
- ・ 94°C1 分間、55°C1 分間、72°C1 分間の反応を、35 サイクル。
- ・ 72°C7 分間の反応後、10°C で保持。

4. スタンダードセットの作製

本マニュアルでは、それぞれのマーカーに固有のスタンダードセット（1 品種又は 2 品種の PCR 産物の混合物）を作製し、これを基準として各サンプル品種の遺伝型を比較することで判定する。スタンダードセット用の基準品種は表 2 に、それぞれの波形データは図 2 に示した。

<準備するもの>

1.5 ml チューブ（滅菌済み）、1/10 TE バッファー等、PCR フラグメント精製キット（MiniElute Reaction Cleanup Kit (Qiagen 社) 又は同等品）

<基本操作>

- (1)3.の(1)の条件で基準品種を増幅する。
- (2)PCR フラグメント精製キットを用いて増幅産物を精製する。
- (3)精製産物を等量混合し、1/10 TE バッファー等で 20~100 倍に希釈したものを 10 µl 程度ずつ分注する。分注したチューブには、調製日を記入し超低温フリーザー等に遮光して保存し、概ね 2 年以内を目処に使用する。

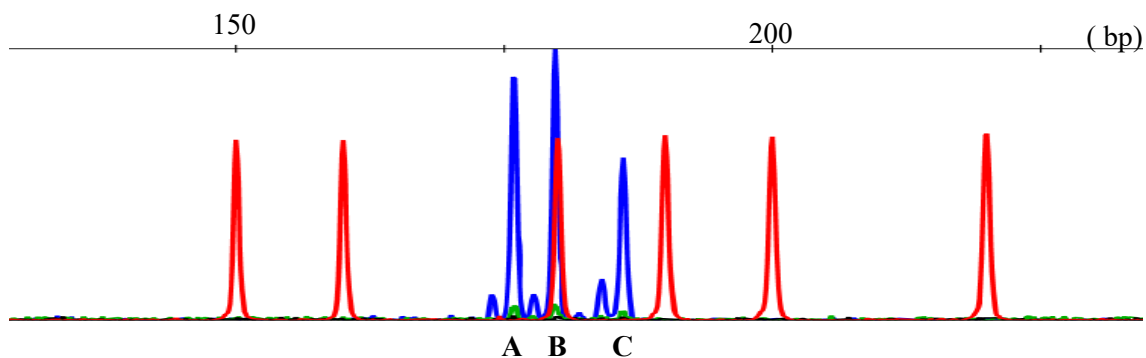
表 2 スタンダードセット用基準品種とそのフラグメントパターン

SSR name	蛍光色素	基準品種	遺伝子型判定のためのフラグメントパターン
CH01b09b	Fam	ジョナゴールド	A/B/C
Hi22d06	Fam	ふじ、ジョナゴールド	A/B/C/D
Hi15h12	Ned	ちなつ、メイポール	A/B/C/D
Hi08h08	Fam	さんたろう	A/B/C
Hi09f01	Ned	JM7、ジョナゴールド	A/B/C/D
NZmsEB119405	Ned	JM8、いわかみ	A/B/C/D
NZmsEB116209	Ned	ちなつ、ふじ	A/B/C
NZmsEB146613	Fam	ジョナゴールド	A/B/C
SAmEB132187	Fam	北斗	A/B/C

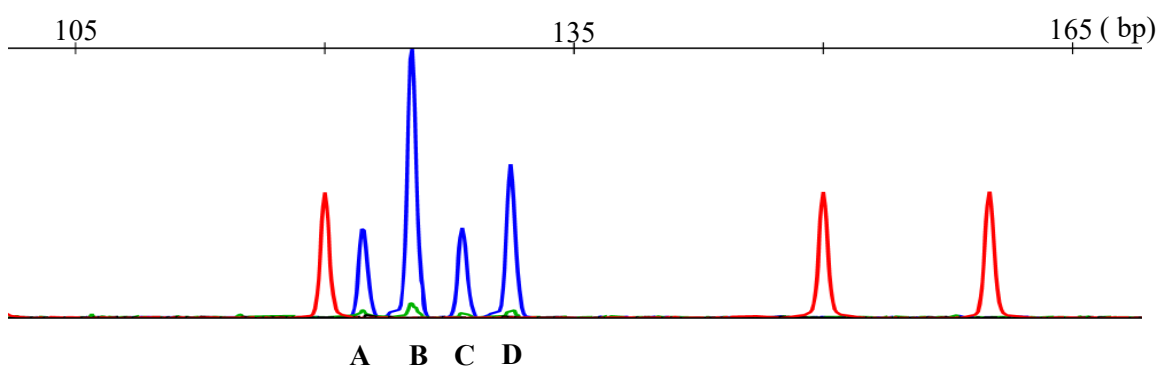
図 2 スタンダードセット波形図

- ・ Alphabet (A、B、C 等) は、基準品種のフラグメントパターンを示す。
- ・ 赤色の波形図はサイズスタンダード GeneScan™ 400HD ROX™ を示す。

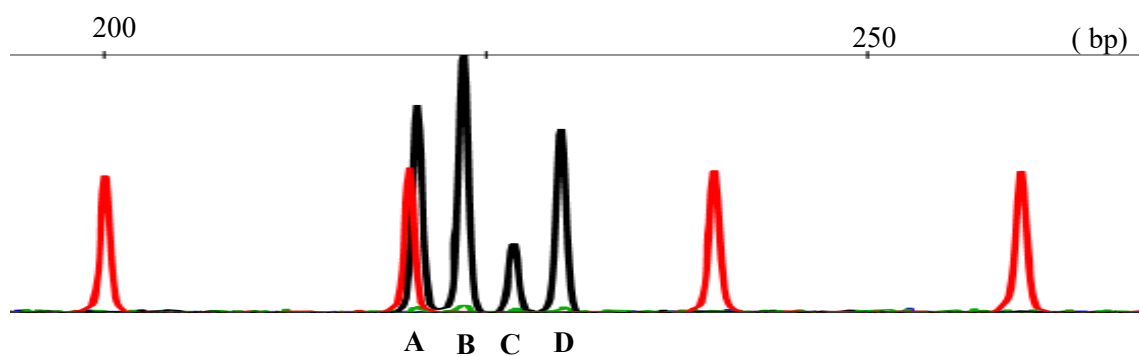
SSR locus:CH01b09b (ジョナゴールド)



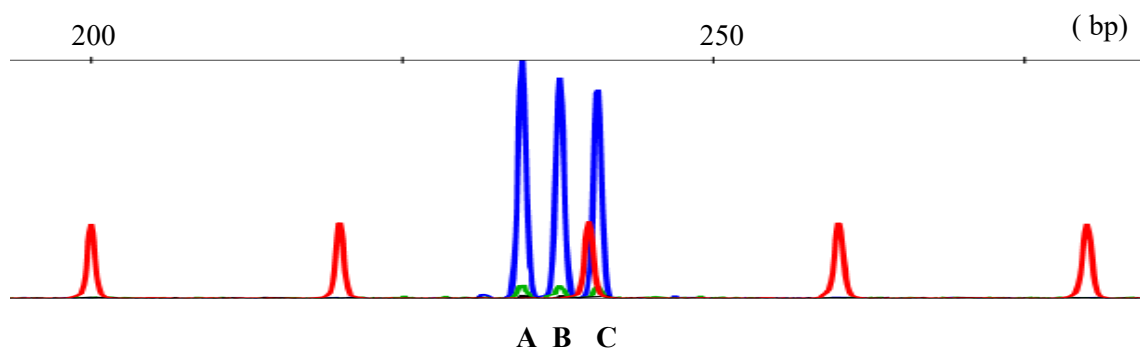
SSR locus:Hi22d06 (ふじ、ジョナゴールド)



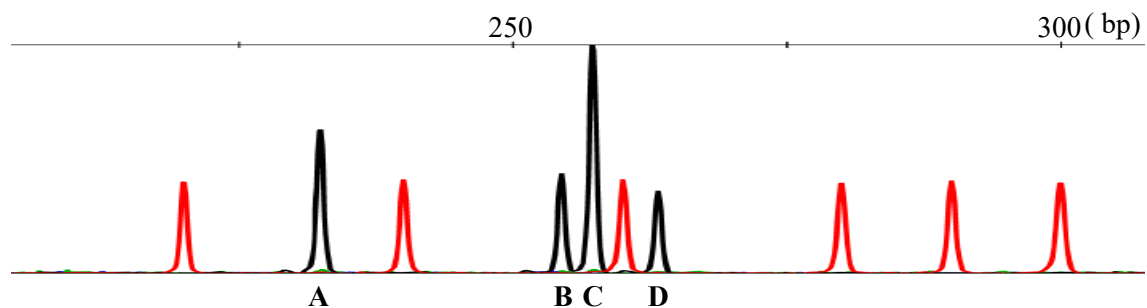
SSR locus:Hi15h12 (ちなつ、メイポール)



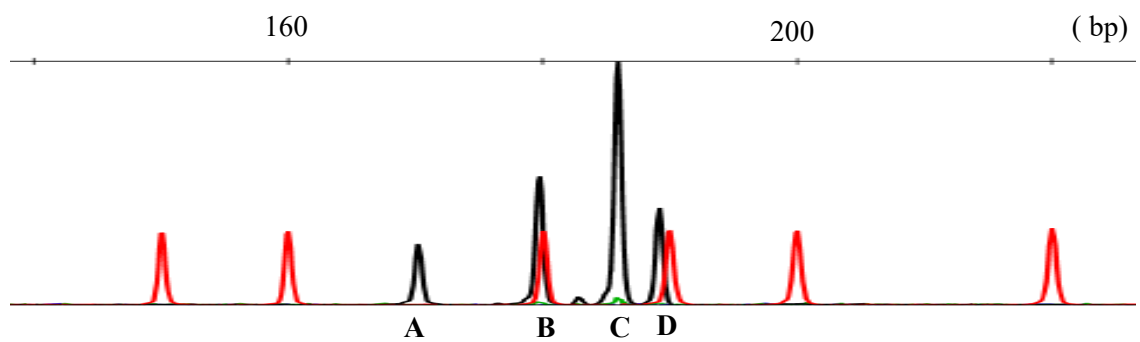
SSR locus:Hi08h08 (さんたろう)



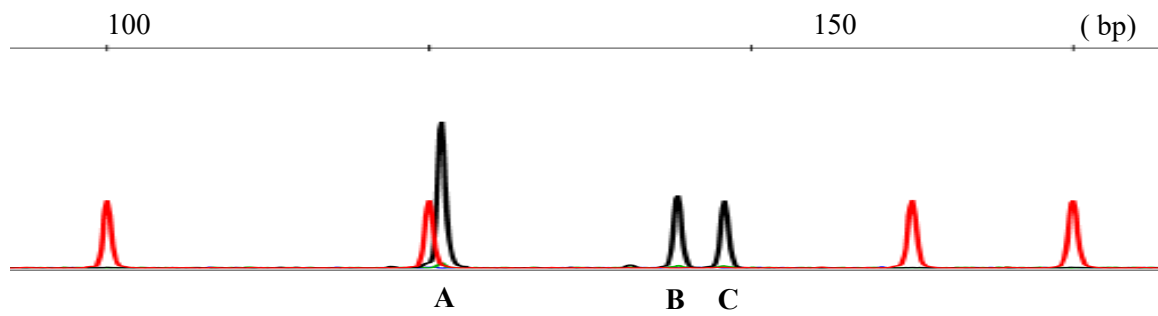
SSR locus:Hi09f01 (JM7、ジョナゴールド)



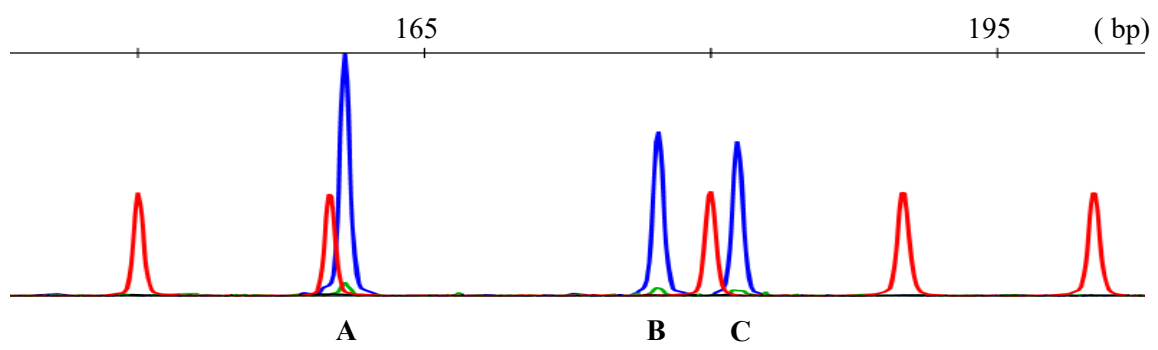
SSR locus:NZmsEB119405 (JM8、いわかみ)



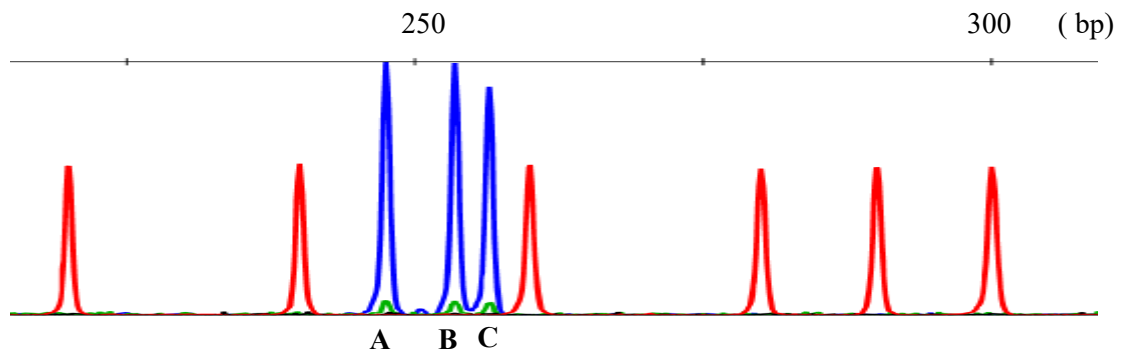
SSR locus: NZmsEB116209 (ちなつ、ふじ)



SSR locus: NZmsEB146613 (ジョナゴールド)



SSR locus: SAmS EB132187 (北斗)



5. DNAシーケンサを用いたフラグメント解析

上記4項で得た SSR-PCR 産物を DNA シーケンサで分析し、フラグメント解析を行う。基本的分析操作は、ABI 社のフラグメント解析のプロトコールに従って行う。

<準備するもの>

(1) Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (ABI 社) を使用する場合

96 穴 PCR プレート (ABI 社)、1/10TE バッファー、Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer (ABI 社)、SeqStudio Cartridge (ABI 社)、SeqStudio Cathode Buffer Container (ABI 社)、Hi-Di Formamide (ABI 社)、GeneScan™ 400HD ROX™ サイズスタンダード (ABI 社)、GeneMapper ソフトウェア (ABI 社)、Veriti サーマルサイクラー (ABI 社) もしくは GeneAmp PCR System 9700 (ABI 社) 等のサーマルサイクラーなど。

(2) ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (ABI 社) を使用する場合

96 穴 PCR プレート、384 穴プレート又は 8 連チューブ (ABI 社)、1/10 TE バッファー、ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer (ABI 社)、Genetic Analyzer Buffer with EDTA (ABI 社)、Hi-Di Formamide (ABI 社)、3130 POP-7 ポリマー (ABI 社)、3100/3130xl 36 cm Capillary Array (47 cmx50 µm、ABI 社)、GeneScan™ 400HD ROX™ サイズスタンダード (ABI 社)、GeneMapper ソフトウェア (ABI 社)、Veriti サーマルサイクラー (ABI 社) もしくは GeneAmp PCR System 9700 (ABI 社) 等のサーマルサイクラーなど。

<基本操作>

(1) 3. で得た PCR 産物を、1/10 TE バッファーで PCR 増幅を考慮し、フラグメント解析に適した倍率で希釈する。

(2) 1.5 µl の希釈 PCR 産物、0.08 µl の GeneScan™ 400HD ROX™ サイズスタンダード、8.42 µl の Hi-Di ホルムアミドを、96 穴 PCR プレート、384 穴プレート又は 8 連チューブに入れ、混合する。

(3) サーマルサイクラーなどを用いて、95°C 5 分間の熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。

(4) Applied Biosystems SeqStudio Genetic Analyzer のプロトコールに従い、SeqStudio Cartridge、SeqStudio Cathode Buffer Container を用いて分析を行う。もしくは ABI PRISM 3130 xl Genetic Analyzer のプロトコールに従い、36 cm キャピラリー、POP-7 ポリマー、専用のバッファー (Genetic Analyzer Buffer with

EDTA) を用いて、分析を行う。

(5)GeneMapper ソフトウェアを用いて、結果の解析を行う。

6. フラグメント解析による遺伝子型判定と結果

(1)フラグメント解析時の注意点

以下に、フラグメント解析を行う際の基本的な留意点について記した。

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

(2)リンゴ品種の遺伝子型判定

SSR 遺伝子型の判定は、スタンダードセットとの比較により決定する。判定に当たっては、キャピラリー間の泳動のずれ等を考慮し概ね 1 bp 未満のずれに

収まるようであれば該当の遺伝子型と判定する。なお、本 9 マーカーを全て使用することで、47 品種・系統を少なくとも 1 つのマーカーが異なることで識別することが可能である。

また、本マニュアルは、リンゴ 47 品種・系統で最適化されたものであり、これを用いて 47 品種・系統以外の品種を識別する場合には、スタンダードセットと明らかに異なるピークが検出される可能性がある。その場合は、ピークの実測値 (bp) を記録し X (xxx bp)、Y (yyy bp) として区別する。なお、未知の品種の識別に際してピークの判定が困難な場合は、スタンダードセットと PCR 産物の希釈溶液を混合して解析を行うことによって、フラグメントサイズの判定を確実にすることが可能である。

本マニュアルで用いるマーカーセットのプライマーには波形を安定させるためのテイル (gtttctt) をリバースプライマーに付加しているものもある。しかしながら、供試品種数が多くなると、対立遺伝子間の〈競合〉でピークの高さがかなり違っている場合、ピークがやや判別しにくい場合が出てくる。このような時には、親子関係が正しい両親と子供で、対立遺伝子が遺伝しているか否かを確認することで、対立遺伝子の正確な同定が可能となる。

表 3 SSR マーカーにおけるリンゴ品種・系統の遺伝子型

品種名	SSR name (SSR locus)								
	CH01b09b	Hi22d06	Hi15h12	Hi08h08	Hi09f01	NZms EB119405	NZms EB116209	NZms EB146613	Sams EB132187
あかね	BB	AA	AB	BC	BD	CC	AB	AB	BB
秋映	AC	AB	AA	AC	CD	CD	AB	AB	BC
旭	AB	BC	AB	AB	BC	BC	BC	AA	CC
いわかみ	AA	CD	AA	AA	CD	BD	BC	AB	BC
印度	AA	AD	AA	AA	CC	CC	BC	BB	AB
王林	AC	AB	AA	AA	CD	CC	AB	AB	BC
おぜの紅	AA	DD	AB	BB	BD	BC	AB	AB	BB
ガラ	AC	BD	AA	AB	BD	BC	BC	AB	BC
きおう	AA	AB	AA	AA	CD	CC	AB	AC	AC
きざし	AC	AD	AB	AA	CD	BC	AC	AB	AC
きたかみ	BC	CC	AA	AB	BC	BC	BC	AC	BB
きたろう	AA	BD	AA	AB	BC	BC	BC	AB	BC
錦秋	AA	CD	AA	AC	CC	CD	CC	BC	AB
金星	CC	AC	AA	AB	CD	BC	AC	BC	AC
紅玉	AB	AC	AA	AC	CD	CD	BB	BB	BB
こうたろう	AC	BC	AA	AB	BC	CC	BB	BB	BC
ゴールデン デリシャス	AC	AB	AA	AB	BD	CC	AB	AC	CC
さんさ	AB	AB	AA	AB	BD	CC	AC	AB	BB
さんたろう	AC	BC	AA	ABC	BCD	BC	BC	AB	ABC
シナノゴールド	AC	AD	AA	AA	CD	CC	AB	CC	AC
シナノスイート	AC	CD	AB	AA	CC	CD	AB	AA	CC
ジョナゴールド	ABC	ABC	AA	AB	BCD	CD	AB	ABC	BC
世界一	CC	AC	AA	AB	BC	BC	AC	BC	AC
千秋	AC	AD	AA	AA	CC	CC	AC	AC	AC
ちなつ	AB	AB	AD	BB	CD	CC	AA	BB	BC
つがる	AC	BC	AA	AC	CD	CD	AB	AB	BC
デリシャス	AC	CD	AA	AA	CC	BB	CC	BB	AB
はつあき	AC	BC	AA	BC	BD	CC	BB	AB	BC
ひめかみ	AB	AB	AA	AC	CD	CC	BB	BB	BC
ふじ	AA	BD	AB	AA	CC	BC	BC	AB	AC
紅みのり	AA	BC	AA	AB	CD	CD	BC	AB	BB
北斗	AA	BD	AB	AA	CC	BC	BC	AB	ABC
陸奥	AC	ABD	AA	AB	BCD	CC	AB	ABC	BC
メイポール	AB	BB	BC	AB	CC	CC	CC	AB	CC
もりのかがやき	AA	CD	AA	AB	BD	BC	BC	AB	BC
陽光	BC	AB	AA	BC	BC	CC	AB	BC	BC
ルビースイート	AA	BD	BB	AA	CC	BC	BC	AB	CC
ローズパール	AB	AB	AB	AC	BC	BC	BB	AB	BC
JM1	AC	BB	AB	AA	AC	AC	AA	AC	BB
JM2	AA	BB	AA	AA	BC	AC	BB	AC	BC
JM5	AC	BB	AB	AA	AC	AC	AB	AC	BC
JM7	AC	BB	AB	AA	AC	CC	BB	AB	BB
JM8	AC	AB	AA	AA	BC	AC	AB	AC	BB
盛岡 66 号	BC	AC	AA	AB	BC	CD	AC	AA	BC
盛岡 68 号	BC	AA	AA	AB	CD	CC	AA	AC	BC
盛岡 69 号	AC	AC	AA	BB	BC	BC	AC	AC	AB
盛岡 71 号	AC	CD	AA	AC	CC	BD	AC	BB	CC

* 「あかね」から「ローズパール」までの品種の並びは五十音順にした。

著作権に関する事項：

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

免責事項：

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

初 版 2015年11月10日

第2版 2021年3月25日

マーカーを妥当性が確認された9マーカーに修正するとともに、
使用する機器・試薬類を最新情報に更新