

栽培イチゴにおけるゲノム特異的 DNA マーカーの開発と  
品種識別技術への応用

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
博士（農学）学位論文

國久 美由紀

## 略語

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism  
AOAC: Association of Official Agricultural Chemists  
APX: ascorbate peroxidase またはその遺伝子増幅産物  
AUB: auxin-binding protein またはその遺伝子増幅産物  
CAPS: Cleavage Amplified Polymorphic Sequence  
CHI: chalcone isomerase またはその遺伝子増幅産物  
CTI1: chitinase 2-1 またはその遺伝子増幅産物  
CTI2: chitinase 2-2 またはその遺伝子増幅産物  
CYT: cystathionine gamma synthase またはその遺伝子増幅産物  
DFR: dihydroflavonol 4-reductase またはその遺伝子増幅産物  
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid  
F3H: flavanone 3-hydroxylase またはその遺伝子増幅産物  
HW 平衡: ハーディ・ワインバーグ平衡  
ISSR: Inter Simple Sequence Repeat  
IUPAC: 国際純正・応用化学連合  
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism  
MSR: methionine sulfoxide reductase またはその遺伝子増幅産物  
OLP: osmotin-like protein またはその遺伝子増幅産物  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PGP: polygalacturonase inhibitor protein またはその遺伝子増幅産物  
QTL: Quantitative Trait Locus  
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA  
PYD: pyruvate decarboxylase またはその遺伝子増幅産物  
SNP: Single Nucleotide Polymorphism  
SSR: Simple Sequence Repeat  
STS: Sequence Tagged Site  
TE: Tris-EDTA  
tRNA: tRNA-Leu (trnL) and tRNA-Phe (trnF) またはその遺伝子増幅産物  
UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean  
UPOV 条約: 植物の新品種の保護に関する国際条約

## 目次

第 1 章	序論	1
第 1 節	栽培イチゴの起源	2
第 2 節	栽培イチゴの遺伝学	4
第 3 節	栽培イチゴと育成者権	9
第 2 章	栽培イチゴにおけるゲノム特異的 DNA マーカーの開発	10
第 1 節	ゲノム非特異的 DNA マーカーの開発	15
第 2 節	ゲノム特異的 DNA マーカーへの改良	27
第 3 節	ゲノム特異的 DNA マーカーの遺伝様式	39
第 4 節	ゲノム特異的 DNA マーカーを利用した <i>Fragaria</i> 属 野生種の分析	55
第 3 章	DNA マーカーを利用したイチゴの品種識別技術の開発	67
第 1 節	DNA マーカーによるイチゴの品種識別	70
第 2 節	品種識別技術の妥当性確認	79
第 3 節	多型頻度に基づく品種同定精度の算出	94
第 4 節	(事例) 韓国産イチゴの品種識別	103
第 4 章	総合考察	111
摘要		118
Summary		121
謝辞		124
引用文献		126
研究業績		134

## 第 1 章 序論

## 第 1 章 第 1 節 栽培イチゴの起源

栽培イチゴ (*Fragaria × ananassa* Duch.) は収益性の高い農作物であり、その独特の香気と栄養価から、世界的な需要は年々高まっている。Fruit and Tree Nuts Outlook (USDA, July, 2005)によると、最大生産量を誇るアメリカの人口一人当たりの年間消費量は、1970 年には 2 ポンド以下であったのが 2004 年には 6.8 ポンドを超えている。2006 年の世界のイチゴ総生産量は 408 万 t で、リンゴの約 15 分の 1 にあたる (FAO STAT, 2008)。

一方、国内の年間生産量は約 20 万 t であり、主に 11 月から 6 月にかけて流通し、夏季の需要は約 4000 t の輸入イチゴによって賄われている。2004 年にはイネ、トマトに次いで 3 番目に産出額の多かった重要農作物でもある (農林水産統計情報総合データベース)。

栽培イチゴは、バラ目 (Rosales) バラ科 (Rosaceae) オランダイチゴ属 (*Fragaria*) の多年生草本植物で、その起源はわずか 250 年前という比較的新しい雑種起源の作物である。現在の栽培地はヨーロッパ、北アメリカ、東アジアを中心に、亜寒帯から一部亜熱帯にまで拡大している。

*Fragaria* 属には野生種と栽培種を含めて約 40 の種が報告記載されているが、これらのうち種として確実に同定されているのは約 20 程度である。この属の基本染色体数は 7 ( $n=7$ ) で、二倍体 ( $2n=2x=14$ ) から八倍体 ( $2n=8x=56$ ) までの多様な倍数性の種が存在する。

二倍体種で最も知られているのは *F. vesca* である。*Fragaria* 属野生種の中で最も広い地理的分布を示し、北アメリカ、ヨーロッパ、北アジアで生息する。また、ヨーロッパでは古来より品種育成や栽培も行われている。他には、主にアジア大陸に分布する *F. viridis*、*F. nilgerrensis*、*F. daltoniana*、*F. nubicola* や、日本に生息する *F. iinumae*、*F. nipponica* などが代表的な二倍体種である。

四倍体種は現在、*F. orientalis*、*F. corymbosa*、*F. moupinensis* の 3 種が同定されており、中国やチベット、シベリアに分布し、低温耐性があるとされている。その起源はアジア原産の二倍体種の染色体倍加によるものと考えられている。

六倍体種はヨーロッパ北部やロシアに分布する *F. moschata* のみが知られており、ヨーロッパ原産の二倍体種の交雑から生じた三倍体の自然倍加が起源と考えられている。

八倍体種では、*F. virginiana* と *F. chiloensis* の 2 種が主なものである。*F. virginiana* は北アメリカ大陸の草地に自生し、鮮紅色の果実を多く実らせる。この種は 16 世紀頃にアメリカ東部からヨーロッパに導入され、植物園や育種家に渡って行った。一方、*F. chiloensis* は北および南アメリカ大陸の海岸の砂地に自生し、大果性を特徴とし、ヨーロッパへの導入は、18 世紀になってチリやカリフォルニアから行われた。18 世紀後半には、大果で独特の香りを持ち、*F. virginiana* と *F. chiloensis* の種間雑種であると推定される現在の栽培イチゴがヨーロッパ市場に出現し、Duchense によって *F. × ananassa* と命名された（織田、2004）。*F. × ananassa* も、*F. virginiana*、*F. chiloensis* と同様に八倍体である。

八倍体の由来については、複数の二倍体野生種が種間交雑と染色体倍加を重ねることにより生じたと推測されているが（Senanayake et al., 1967）、いくつかの野生種から派生したのか、またどの野生種に由来しているのかは不明である。

本研究では、第 2 章において、*F. × ananassa* におけるゲノム特異的 DNA マーカーの作出法を考案し、作出したマーカーを利用して各ゲノムの由来する祖先種の探索を試みた。

## 第 1 章 第 2 節 栽培イチゴの遺伝学

1990 年代頃までは、イチゴといえば「女峰」と「とよのか」の 2 大品種で市場が独占されていたが、近年、その市場価値の高さから育種研究が過熱し、消費者の好みに応じた多様な品種が流通するようになった。「さちのか」や「章姫」をはじめ、各県独自の品種開発も進み、栃木県の「とちおとめ」、福岡県の「あまおう」、佐賀県の「さがほのか」、熊本県の「ひのしずく」、静岡県「紅ほっぺ」等、多くの品種がブランド化し、一部価格にも反映されている。

しかし近年、消費者と生産者のニーズは多様化し、迅速な品種開発が望まれている。これに対応するため、多くの作物で遺伝子組換え技術や形質連鎖 DNA マーカーの開発が進んでいる。栽培イチゴにおいても、伝統的育種法のみには頼らない分子生物学的手法による育種研究が取り組まれてきた。Asao ら（1997）はイネのキチナーゼ遺伝子を導入することにより、栽培イチゴのうどん粉病抵抗性を向上させ、Vellicce ら（2006）はインゲンマメのキチナーゼ遺伝子を強発現させることにより灰色カビ病の発症を軽減したと報告している。ペクチン酸リアーゼのアンチセンス鎖の導入により、果実を軟化させた報告もある（Jimenez-Bermudez et al., 2002）。栽培イチゴで最初の形質連鎖マーカーは、Haymes ら（1997）によって報告された根腐病菌抵抗性遺伝子に連鎖した RAPD マーカーである。その後、Sugimoto ら（2005）によって 11.8 cM と 15.8 cM で四季成性遺伝子に連鎖した 2 つの RAPD マーカーが見つかった。また、二倍体野生種である *F. vesca* では、1.7 cM という隣接した領域に四季成性遺伝子連鎖マーカーが見つかった（Albani et al., 2004）。

これだけの研究にも関わらず、*F. × ananassa* には解明されていない根本的な問題がある。*F. × ananassa* は八倍体であり（ $2n=8x=56$ ）、そのゲノム構成がいまだ未解明であり、したがって遺伝様式が決定できていない。このため、バルク法等による連鎖マーカーの開発は可能だが、連鎖地図の作成は困難を極め、これまでに発表されている地図は、根腐病菌抵抗性遺伝子座に連鎖する 7 つの RAPD マーカーによる 1 連鎖群（Haymes et al., 1997）と、Lerceteau-Köhler ら（2003）

が作成した AFLP マーカーによる 43 連鎖群の 2 つのみである。研究はむしろモデル植物である二倍体野生種で発展しており、*F. vesca* と *F. nubicola* の種間交雑集団を用いた SSR 主体の 182 マーカーによる連鎖地図が公開されている (Sargent et al., 2004a, 2006)。

*F. × ananassa* は、八倍体野生種である *F. virginiana* と *F. chiloensis* の種間交雑により生じたと考えられおり、八倍体のゲノム構成については、古くから議論が成されてきた。最初に Fedorova (1946) によって AABBBBCC (部分四倍体) という構成が提唱されたが、Senanayake ら (1967) は、八倍体野生種と二倍体野生種 (ゲノム構成 AA) の種間交雑から得られた五倍体 (AABBC) および六倍体 (AAABBC) の減数分裂時における染色体対合を観察し、A ゲノムと C ゲノムが稀に対合を起こすことから、AAA'A'BBBB であると修正した。これを裏付けるように、Mok ら (1971) は、*F. × ananassa* の大部分の品種において四価染色体が認められたと報告している。しかし、その他の多くの研究では、八倍体において二価染色体の形成しか報告されておらず (Ichijima, 1926; Longley, 1926; Powers, 1944; Byrne et al., 1976; Ibrahim, 1981)、また、アイソザイム研究において、その遺伝様式が disomic な遺伝様式に従うとの報告があったことから (Arulsekara et al., 1981)、八倍体は高度に複二倍体化しているとして AAA'A'BBB'B' に修正された (Bringhurst, 1990)。その後、Lerceteau-Köhler ら (2003) は、AFLP マーカーを主体として *F. × ananassa* の連鎖地図を作成し、相引マーカーに対して相反マーカーの割合が小さかったことを根拠に AAA'A'BBBB 説を支持しており、この議論は決着しないまま現在に至っている。

倍数体の遺伝学は、二倍体に比べて遺伝様式が非常に複雑であるために研究が遅れている。倍数体は、哺乳類、昆虫、両生類、爬虫類、魚類などの動物にはほとんど見られないが、植物においては一般的な形態であり、顕花植物の 3~4 割が倍数体であるとされている (Stebbins, 1950)。このため、イチゴの他にもコムギ、サツマイモ、ジャガイモ、サトウキビ、キク、バラ等、経済的に重要な倍数体作物も多く、倍数体研究の必要性は高い。

倍数体は理論上、同質倍数体 (autopolyploid) と異質倍数体



(allopolyploid) に大別できる。しかしこれらの定義は曖昧で、明確な境界は示されていない。一般的には、同質倍数体は一種類の染色体の倍加により生じ、異質倍数体は異種・異属間交雑と染色体倍加を経て生じるとされている。例えばコムギは、3種の異なる祖先を持つ異質倍数体であることが明らかになっている。しかし、祖先となる二倍体種が不明な場合や、既に絶滅している場合は、由来から同質・異質性を判断することは困難となる。別の判断基準として、同質染色体は減数分裂期に対合を起こすが、異質染色体は対合しないことが挙げられる。MacKey (1970) は、同質倍数体を polysomic polyploid、異質倍数体を disomic polyploid として、遺伝様式からこれらを区別し、それぞれの交配様式について考察している。

polysomic polyploid の生物学的意義は、ヘテロシスの維持にあると考えられている。このような倍数体は主に他殖性であり、ヘテロ接合体の形成を助けている。それに加えて、polysomic な遺伝様式は集団の大部分をヘテロ接合体として維持できる。例えば polysomic tetraploid における 2 対立遺伝子 (A,a) から想定される遺伝子型は、(AAAA) (AAAa) (AAaa) (Aaaa) (aaaa) の 5 種類あり、A と a 頻度が同等であれば、quadruplex あるいは nullplex は確率的にほとんど出現しない。これに対して disomic polyploid は、突然変異遺伝子のホモ接合がより頻繁に起こるため、自然淘汰圧に晒されやすく、環境に適応した迅速な進化が可能である。このため、倍数体は、進化の過程で変異や組換えによる染色体の分化を経て複二倍体化することも多く、現在、二倍体とされている多くの種も、系統学的には高度に複二倍体化した倍数体であると考えられている (MacKey, 1987; Da Silva, 1996)

polysomic polyploid では、相同染色体が 3 つ以上あるため、減数分裂期には二価染色体のみならず多価染色体が観察されることも多い。単純に倍加した倍数体では特に、多価染色体形成がよく観察できる。しかし、自然に生じた倍数体では、二価染色体しか観察されないこともある。馬鈴薯の倍数性野生種では、染色体対合観察において、ほぼ全ての染色体が二価対合をおこし、多価染色体はほとんど観察されなかったとの報告がある (Swaminathan et al., 1954; Watanabe et

al., 1994)。また、同質倍数体と言われるキク属野生種でも二価染色体の形成が一般的であり、多価染色体の形成は非常に少なかったことから、染色体の同質性は高いものの、複二倍体化に向けて分化しつつあるのではないかと考えられている (Watanabe, 1977)。Hattori (1991) は、キク属の花色を支配するカロチノイドの遺伝について、倍数体にも関わらず比較的シンプルな様式に支配されていることを明らかにし、その原因として、キク属が *disomic* な遺伝様式に従う可能性を示唆している。

二価染色体形成は、少なくとも二つの要因によって促進されている。ひとつは、二価の対合を制御する遺伝子の存在である。このような遺伝子として最も有名なのは、コムギの 5B 染色体に座上する *Ph* 遺伝子である (Wall et al., 1971)。この遺伝子は同祖染色体の対合を抑制することにより、相同染色体の二価対合を促進する働きを持つ。もうひとつの要因として、染色体のサイズや構造の類似性に基づいた選択的対合が考えられる。同質染色体であっても、元々多少の相違があったり、変異や組換え等により分化した等の原因で、完全に同質ではなくなり、特に類似性の高い染色体同士が優先的に二価対合を起こすことが知られている。選択性の強度は種によって様々であるが、強度が非常に強い場合は、*disomic* に近い遺伝様式を示すことも予想される。自然環境下で *polysomic polyploid* が複二倍体化する過程では、遺伝子機構の発達、または、染色体分化に伴う選択的対合の促進が起こっていると考えられる。したがって自然に生じた倍数体では、複二倍体化の兆候として、二価の対合が優勢となる場合も多いと思われる。

しかし、二価染色体対合は *disomic* 遺伝の必要条件ではあるが、必ずしも *disomic* 遺伝を裏付ける根拠とはならない。サトウキビでは、主に二価対合しか観察されないにも関わらず、*polysomic* な遺伝が示唆されている (Da Silva et al., 1993, 1995)。遺伝子による二価対合の制御システムは、2 つの相同染色体が対合を起こした時点で、他の相同染色体の対合を抑制すると考えられ、この制御のために、*polysomic polyploid* であっても二価対合が優勢となっている。したがって、多価対合が観察されないことを根拠に、倍数体が *disomic polyploid* であ

ると結論するのは尚早であり、実際に形質マーカーや分子マーカーの遺伝様式を確認することが不可欠である。

*F. × ananassa* のゲノム構成は AAA'A'BBBB (Senanayake et al., 1967; Lerceteau-Köhler et al., 2003)、または AAA'A'BBB'B' (Bringhurst, 1990) とされており、B ゲノムが polysomic な遺伝を示すのか、概ね、または完全に disomic な遺伝を示すのかが遺伝解析の焦点となる。

栽培イチゴはその農業上の重要性にも関わらず、ゲノム研究分野において他作物に大きく遅れを取っている。このことは、データベースで検索可能な *F. × ananassa* の遺伝子配列情報が 2004 年時点でわずか 58 であったことから示唆される。その原因は、倍数性に起因する複雑で未解明なゲノム構成にある。

本研究では、第 2 章において、*F. × ananassa* におけるゲノム特異的 DNA マーカーの作出法を考案し、作出したマーカーの遺伝様式に基づき、八倍体のゲノム構成に言及した。

### 第 1 章 第 3 節 栽培イチゴと育成者権

品種が多様化するイチゴ市場では、人気品種のブランドを維持するため、品種育成者権の保護、および品種の適正表示が求められるようになった。同時に、1999 年度には年間 200 t あまりであった韓国からの輸入量が 2001 年度には 1500 t にまで激増し、国産イチゴと競合する冬季の輸入であるだけに国内の生産者にとって脅威となった。しかも、輸入イチゴの一部が、海外への持ち出しが許可されていない「とちおとめ」や「さちのか」等日本品種である疑いが強く、育成者権保護のための体制整備が強く望まれた。イチゴのみならず、白餡の原料となる白インゲンや、高級畳表のイグサでも、許諾していないはずの国産品種が輸入されるという事態が発覚していたため、2003 年 4 月には関税定率法の改正により育成者権侵害農作物が輸入禁制品目に追加され、種苗法の罰則も強化された。これらの法整備と併行して、確実に権利侵害品を判定できる農作物の DNA 品種識別技術の開発が推進された。野菜茶業研究所は輸入の疑いのある「さちのか」の育成者権者であったため、2001 年度からいちはやく識別技術の開発に取り組んだ。

本研究では、第 3 章において、開発したゲノム特異的マーカーを品種識別に応用し、マニュアルに基づいた分析を行うことにより、技術の再現性を保証した。さらに品種同定精度の算出を行い、信頼性と汎用性あるイチゴの品種識別技術を確立した。

## 第 2 章 栽培イチゴにおけるゲノム特異的 DNA マーカーの開発

## 緒言

栽培イチゴ (*Fragaria* × *ananassa*) はその産業上の重要性から、多くの研究者やブリーダーが積極的に育種に取り組んでいる。新品種の育成には多大な時間と労力を要する。しかし近年、新品種に対する消費者ニーズは多様化し、かつ変動し、研究者やブリーダーは臨機応変で効率的な育種を求められている。このため、有用形質連鎖地図や連鎖マーカー等の分子生物学的手法による育種法の開発が期待されているが、高次倍数体の *F.* × *ananassa* では複雑かつ未解明のゲノム構成が原因となって、当該分野の研究が他作物に比べて著しく遅れている。

*F.* × *ananassa* のゲノム構成については、古くから議論が成されてきた。Fedorova (1946) によって AABBBBCC (部分四倍体) 説が提唱されて以来、減数分裂期における染色体対合観察、アイソザイムを用いた遺伝解析 (Arulsekhar et al., 1981)、AFLP マーカーによるマッピング (Lerceteau-Köhler et al., 2003) を根拠として AAA'A'BBBB (部分四倍体) 説と AAA'A'BBB'B' (完全複二倍体) 説が提唱され、現在も決着が着いていない。

上記いずれの説が正しいとしても、*F.* × *ananassa* は少なくとも 2 組の独立した二倍体ゲノムを含有している。AFLP マーカーによる連鎖地図作成において相反マーカーが得られたことから、確かに二倍体ゲノムの存在は示唆されている。ところが、育種や DNA マーカー等、多々の遺伝に関する研究報告があるにも関わらず、実際にメンデルの法則に従った disomic 遺伝を後代で観察できたのは、わずか 1 例にすぎない。Arulsekhar ら (1981) は、ホスホグルコイソメラーゼの 4 つのアイソザイムのうち 1 つが後代で 3 : 1 に分離しており、更にバンドの濃淡まで考慮すれば、これが 1 : 2 : 1 に分離しているように解釈できることを報告している。しかし、完全複二倍体とも想定される作物で disomic 遺伝がほとんど観察できないという状況は、遺伝学者にとって、最重要ポイントを回避して進まねばならない「もどかしさ」を残している。

*F.* × *ananassa* のゲノム構成と並んで議論の対象となっているのが、倍数性のルーツである。*F.* × *ananassa* は八倍体野生種である *F.*

*virginiana* と *F. chiloensis* の交雑により生じたというのが定説であるが、八倍体がどのように形成されたのかについては分かっていない。二倍体野生種が倍加と種間交雑を重ねることにより生じたと考えられており、Senanayake ら（1967）は A ゲノムと A' ゲノムが同一の野生種から分化したものであり、基本的に八倍体は A ゲノムと B ゲノムの 2 つの祖先種に由来していると推測している。分子的手法による祖先種探索の試みも報告されており、Potter（2000）は、葉緑体ゲノムの *trnL-trnF* 領域および rDNA のスペーサー領域の塩基配列に基づく分類から、*F. vesca* および *F. nubicola* が八倍体を含む倍数性 *Fragaria* 種と近縁であること、また *F. iinumae* も八倍体形成に関与している可能性があることを示した。しかし、どの種がどのゲノムの祖先種であるのか等、詳細については未解明のままである。

本研究では、*F. × ananassa* のゲノム構成、および各ゲノムの祖先種の 2 つの謎を解決するツールとして、構成ゲノムを特異的に検出できるゲノム特異的 DNA マーカーの開発を試みた。ゲノム特異的マーカーの概念図を Figure 1 に示す。*F. × ananassa* で従来開発されてきた DNA マーカーは、AFLP、RAPD、ISSR、SSR 等、基本的に全ゲノムを対象とした非特異的な PCR 増幅によるものであったため、各ゲノムの遺伝様式を個別に観察することは困難であった。一方、ゲノム特異的マーカーは、Figure 1 で示すように特定のゲノムのみを PCR 増幅の対象とするため、後代への遺伝様式を詳細に解析することで、各ゲノムの遺伝様式が判定可能と考えられた。多くの倍数性植物では、アイソザイムの後代でのヘテロ接合体の出現比から遺伝様式が特定されているが（Soltis et al., 1993）、ゲノム特異的マーカーは、アイソザイムと同様に共優性的性質を持つ上に、より簡易・大量の検定が期待できる。また、ゲノム特異的マーカーのゲノム選択性を利用すれば、多くの *Fragaria* 属野生種の同祖ゲノムの中から *F. × ananassa* 構成ゲノムと共通するゲノムだけを個別に検出することができ、どの構成ゲノムがどの祖先種由来であるのか、詳細な解析も可能と思われる。

倍数性作物で最も研究の進んでいるコムギではゲノム特異的マーカーの報告も多いが、栄養繁殖性で遺伝的に固定していない倍数性

作物では、計画的にゲノム特異的マーカーを作出する方法は開発されていない。本章ではその方法を試案し、ゲノム特異的マーカーの開発を通して、ゲノム構成および各ゲノムの祖先種を解明する一助とすることを目的とした。第 1 節では、本研究の多型検出に CAPS (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence) 法を採用するに当たり、従来法にしたがって *F. × ananassa* で CAPS マーカーを開発し、その特徴を確認した。また、従来法 (ゲノム非特異的マーカー) で倍数性作物を解析することの弱点を確認した。第 2 節では、第 1 節で得た知見を基に、同祖遺伝子群の塩基配列をクラスター分析にかけることによりゲノム構成を再現し、第 1 節で作成した CAPS マーカーをゲノム特異的マーカーと推定されるマーカーに改良した。第 3 節では、第 2 節で改良したマーカーの後代への遺伝様式を調査し、これらが真にゲノム特異的マーカーであるか否かを検討した。また、その結果を踏まえて、*F. × ananassa* のゲノム構成について考察した。第 4 節では、開発したゲノム特異的マーカーを用いて、*F. × ananassa* を構成するゲノム祖先種の推定を試みた。



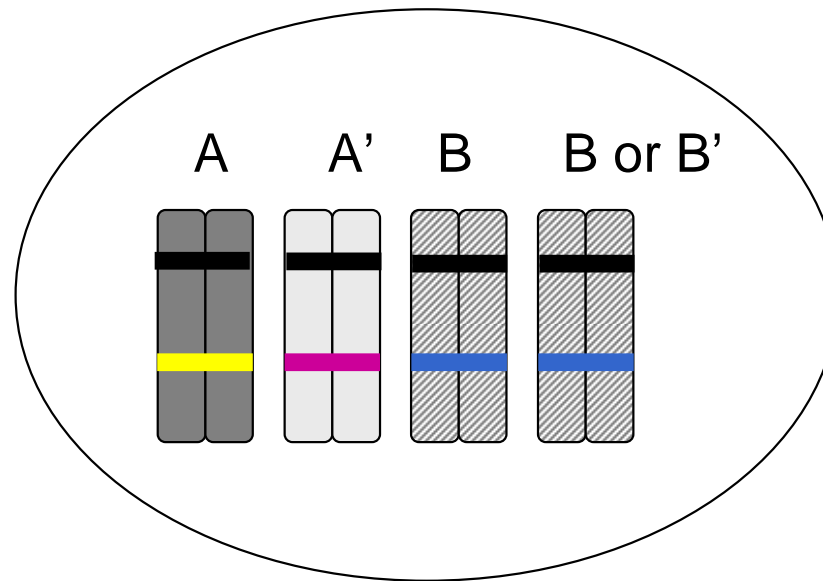


Figure 1. Concept of genome-specific markers for genomic study on *Fragaria* × *ananassa* Duch.

Black: Loci amplified with single conventional DNA marker.

Yellow, Pink, Blue: Locus separately amplified with different genome-specific markers.

## 第 2 章 第 1 節 ゲノム非特異的 DNA マーカーの開発

遺伝解析に用いられる分子マーカーには様々な種類がある。最も歴史が深いのはアイソザイムであり、発現した酵素タンパク質によって間接的に遺伝子解析を行う方法である。しかし、大量開発が困難なこともあり、最近では、より直接的な DNA マーカーに取って代わられつつある。

DNA マーカーにも様々な手法があり、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法は、特定の制限酵素で切断した DNA 断片を電気泳動で分離した後、プローブをハイブリダイズさせることにより、DNA 多型を検出する方法である。この方法は、大量かつ純度の高い DNA を必要とし、かつハイブリダイゼーション等の手順も煩雑であるため、最近では PCR をベースとした DNA マーカーの使用が一般的となった。DNA を増幅し、その反応生成物を制限酵素で切断する手法である CAPS (Cleavage Amplified Polymorphic Sequence、PCR-RFLP ともいう) 法は、PCR に用いるプライマー設計のためにゲノム情報が必要であるという点、また、適した制限酵素の探索が必要であるという点からマーカー開発効率はやや劣るが、一度開発してしまえば、検出操作は単純であり、簡易な機器で可能であるため汎用性は高く、かつ再現性も高い。生物の単純反復配列における多様性を利用した SSR (Simple Sequence Repeat) 法は、操作がより簡易で再現性も高い方法である。しかし、開発にはゲノムライブラリの作成等、相当の労力を要し、また検出には高価な機器が必要で汎用性はやや劣る。SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を利用する方法は、開発も比較的容易で、再現性も高いが、やはり検出に高額機器を要する。これらの方法で開発されるのは、一般に共優性マーカーである。

これらに比してマーカー開発効率が格段に優れているのが、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法、ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) 法である。RAPD 法は、ランダムプライマーを用いて、ゲノム上の不特定の領域から多様な DNA 断片を一度に検出する方法であり、最も簡易

で効率の良い方法とされている。しかし再現性は低く、使用機器など、少しの条件変化で結果が左右されるという欠点がある。AFLP 法は、制限酵素処理により断片化した DNA にアダプターを付加し、PCR でこれらの断片長を検出する方法である。本法はマーカー開発効率が高く、RAPD 法より再現性も優れているが、CAPS 法や SSR 法に比べるとまだ再現性は低く、検出操作が煩雑で相当の技術力を要する。ISSR 法は、個体の保有する不特定の SSR 配列を利用して、SSR 間の領域を一度に増幅する方法であるが、SSR 法ほど再現性が高くなく、検出にアクリルアミドゲルを要することもあり、あまり用いられていない。これらの方法で開発されるマーカーは、一般に優性マーカーである。

研究に着手した 2001 年時点、*Fragaria* 属では既に様々なマーカーが開発、利用されていた。アイソザイムを用いた遺伝解析(Arulsekhar et al., 1981)、RFLP を用いた種分類(Harrison et al., 1997)、RAPD や AFLP、ISSR を用いた品種識別や系統樹作成、連鎖マーカー開発が主なものである (Degani et al., 1998, 2001; Tyrka et al., 2002; Arnau et al., 2003)。主流となったのは RAPD や AFLP マーカーであるが、これらに共通して言えることは、PCR 増幅のターゲットを特定の座に絞っていないため、一度に多くの多型を得られること、その結果としてやや再現性が劣ること、一般に優性マーカーであることが挙げられる。

本研究では、開発したマーカーを品種識別に利用することが想定されたため、操作が簡易で汎用性が高く、かつ比較的再現性が高いとされる CAPS 法 (Kaundun et al., 2003) を用いるのが適当と判断した。

栽培イチゴでは、CAPS マーカーを含め、PCR を基盤とする共優性 DNA マーカーの報告がなかった。このため、我々はゲノム特異的マーカーの開発に先立って、既報に準じた方法で CAPS マーカーを開発し、八倍体である栽培イチゴにおいて共優性マーカーがどのような形態を示すのか、また共優性マーカーの PCR 産物にはどのような特徴があるのかについて解明を試みた。

## 材料及び方法

### 1. 植物材料

Table 1 に示す 16 品種の栽培イチゴ株（野菜茶業研究所維持）を DNA 抽出および CAPS 分析に使用した。また、「女峰」、「とちおとめ」、「さちのか」、「章姫」の株（栃木県農業試験場維持）、および店舗で購入した「女峰」、「とちおとめ」、「さちのか」、「レッドパール」の果実を再現性確認試験に供試した。

### 2. 植物体からの DNA 抽出

マーカ開発には DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を推奨プロトコルに従って使用した。再現性確認試験では、DNeasy による方法とともに、以下に述べる方法も検討した。

約 100mg の葉、萼片または果肉に 400  $\mu$ L の抽出バッファー (0.1 M NaOAc, 50 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 0.5% polyvinylpyrrolidone [PVP; mol. wt. 40 000], 1.4% sodium dodecyl sulfate [SDS], pH 5.5) を加え、破碎した。破碎後、抽出バッファーで 750  $\mu$ L に調整し、65°C で 10 分間インキュベートした後、15,000 rpm、室温で 10 分間遠心分離した。上清に 1/3 vol. の 5M KOAc を加え、15 分間氷上に放置し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した。得られた上清から、通常のイソプロパノール沈殿法により DNA を得た。この DNA 沈殿を TE バッファーに溶解し、5  $\mu$ g の RNase を加えて 65°C で 10 分間インキュベートした。次に DEAE-Sephadex (Pharmacia A-25) 樹脂により DNA 溶液中の多糖類を除去した。具体的には、洗浄バッファー (10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, 0.4 M NaCl) で平衡化した樹脂 200  $\mu$ L をカラムに詰め、DNA 溶液を通過させた。その後洗浄バッファー 200  $\mu$ L でカラムを 2 回洗浄後、55°C に温めた溶出バッファー (10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl) 200  $\mu$ L で DNA を溶出した。溶出バッファーを TE バッファーで置換したものを DNA 溶液として PCR 増幅に使用した。

### 3. CAPS マーカーの開発

DNA Data Bank of Japan (<http://srs.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>)に登録されている *Fragaria* 属のゲノム塩基配列情報から、ランダムに 34 の遺伝子をマーカーのターゲットとして選択した。次に、イントロン領域を含んだ 350-650 bp の PCR 産物が増幅されるように、遺伝子ごとにプライマーペアを設計した。以下の解析は各遺伝子について行った。「女峰」、「とちおとめ」、「さちのか」、「レッドパール」および「Cesena」において得られた PCR 増幅産物を用いて、品種あたり 5 クローンの塩基配列を決定した。合計 25 の配列を比較することにより品種間多型を予測し、117 の制限酵素からこれらを検出できるものを全て選出した。次に、実際に PCR 産物を各制限酵素で処理し、多型が検出できたものをマーカーとした。PCR 増幅量が少ない場合や多型検出が安定しない場合は、プライマー配列を再設計した。

### 4. 塩基配列の決定

PCR 増幅産物を pGEM-T Easy Vector (Promega) にサブクローニングし、ヒートショック法により大腸菌株 DH5 $\alpha$  に導入した。各遺伝子増幅産物について品種あたり 5 個のコロニーをブルーホワイトセレクションでランダムに選抜して培養し、抽出した DNA を鋳型に、DNA シーケンサー (ABI373) で塩基配列の決定を行った。

### 5. CAPS 分析法

抽出 DNA 10 倍希釈液 2  $\mu$ L (DNA 量 1-5 ng)、rTaq ポリメラーゼ (Takara) 1U、添付 dNTPs 1.6  $\mu$ L、添付バッファー 2  $\mu$ L、プライマー各 20 pmol を滅菌水で 20  $\mu$ L に調整したものを PCR 溶液として用いた。増幅反応は Gene Amp 9700 (Applied Biosystems) にて行った。PCR プログラムは次の通り、94 $^{\circ}$ C 5 分、(94 $^{\circ}$ C 30 秒・55 $^{\circ}$ C 30 秒・72 $^{\circ}$ C 30 秒)  $\times$  35 サイクル、72 $^{\circ}$ C 5 分とした。PCR 増幅後の反応溶液 5  $\mu$ L に対し、適切な制限酵素 4U およびバッファーを加え、10  $\mu$ L に調整して 2 時間インキュベートした。制限酵素反応後、溶液全量を 2% アガロースゲル電気泳動にて分離し、多型の検出を行った。

## 結果

### 1. 栽培イチゴにおける多型の特徴およびマーカー開発効率

5 品種に由来する 25 クローンの塩基配列を比較した結果、解析した 34 座全てについて、点変異、挿入配列、欠失等の多型が多く見つかった。クローンは比較的多様性に富み、保存領域は 80～95% 程度であった。一例として cystathione gamma synthase (CYT) の解析では 20 種類のクローンが検出され、同一品種に由来する 5 クローンは全て異なるものであった（以上、データ省略）。

検出された多くの多型の中から、品種間で異なる可能性があり、かつ制限酵素処理により検出可能と思われるものを、アラインメントデータを基に選抜した。34 遺伝子について、117 種の制限酵素処理を想定した結果、344 の遺伝子と制限酵素の組み合わせ（以下 CAPS と呼ぶ）が選抜された。しかし実際に処理を行ってみると、わずか 21 の CAPS で多型が検出されたのみであった（Table 2）。これら 21 の CAPS は 14 遺伝子に由来し、検討した残りの 20 遺伝子では全く多型が得られなかった。この予想と結果の相違は、比較に用いた塩基配列情報が不十分であったために起こったと考えられる。八倍体である栽培イチゴからの PCR 産物には、一品種につき最大 8 種類のクローンが含まれている。それにも関わらず、本試験では最大 5 クローンの情報しか得ていないため正しい品種間比較ができず、実際よりも過剰な CAPS を予測したのであろう。

### 2. 栽培イチゴでの CAPS マーカーの特徴

開発した 21 の CAPS を Table 2 に示す。CAPS 名は、増幅した遺伝子の略称と処理する制限酵素名の組み合わせとした。21 の CAPS は性質上、1) 1 つの多型のみを検出するもの（16CAPS、例：CHI-*Pvu* II, Figure 2-II）、2) 2 つの独立した多型を同時に検出するもの（4CAPS、例：APX-*Mlu* I, Figure 2-I）、3) 葉緑体 DNA 由来の配列を用いたため、明瞭な単一バンドが検出されるもの（1CAPS：tRNA-*Bse*G I、データ省略）の 3 種に分類できた。

栽培イチゴでの CAPS マーカーの最大の特徴は、二倍体植物の場合

と異なり、電気泳動で検出される多型バンドが比較的不明瞭なことである。CAPS マーカーのプライマーはターゲット遺伝子の保存領域に設計されており、八倍体イチゴの持つターゲット遺伝子の全ての座を増幅することになる。しかし、最大 8 種の増幅産物中で多型バンドを生ずるのはわずか 1~2 種であるため、このような現象が起こると考えられる。もうひとつの特徴は、二倍体植物の場合とは異なり、ヘテロ接合体とホモ接合体の区別ができないことである。このため、原理的には共優性マーカーでありながら、遺伝解析においては優性マーカーとして扱わねばならない。

### 3. 再現性の確認

以下の 4 つの実験条件を変動させ、それぞれの結果を比較して、開発した CAPS マーカーの再現性を検証した。変動させた条件は、1) DNA 抽出法－DNeasy Plant Mini kit 法と DEAE 樹脂精製法、2) DNA 抽出組織－葉、萼片および果肉、3) 分析者－4 名、4) 品種株－野菜茶業研究所維持の 14 品種、栃木県農業試験場維持の 4 品種および市販の 4 品種、の 4 条件である。その結果、全ての試験において検出された多型が一致し、本技術の再現性が確認された (Figure 3)

Table 1. Strawberry cultivars used in this study, their parents and origin.

Cultivar	Parents	Origin
Toyonoka (とよのか)	Himiko × Harunoka	Japan
Nyoho (女峰)	[Donner × (Harunoka × Donner)] × Reiko	Japan
Tochiotome (とちおとめ)	Kurume 49 × Tochinomine	Japan
Akihime (章姫)	Kunowase × Nyoho	Japan
Sachinoka (さちのか)	Toyonoka × Aiberry	Japan
Aiberry (アイベリー)	unpublished	Japan
Redpearl (レッドパール)	Aiberry × Toyonoka	Japan
Nou-Hime (濃姫)	Aiberry × Nyoho	Japan
Sanchiigo (サンチーゴ)	(Aiberry×Hokowase)-s × Toyonoka-s	Japan
Pistro (ピーストロ)	(Akanekko × Aiberry) × (Rindamore × Toyonoka)	Japan
Aistro (アイストロ)	[(Rindamore × Cruz) × Nyoho] × Reiko	Japan
Beni hoppe (紅ほっぺ)	Akihime × Sachinoka	Japan
Keiki wase (けいきわせ)	Asuka Wave × Akihime	Japan
Kurume IH-1 (久留米IH1号)	Toyonoka × <i>F. nilgerrensis</i> (var. Yunnan), followed by diploidization	Japan
Cesena	Tago × MDUS 3816	Italy

-s: The progeny of self-crossed population.



Table 2. Primer sequences and endonucleases for developed CAPS markers. DFR, dihydroflavonol 4-reductase; APX, ascorbate peroxidase; CHI, chalcone isomerase; F3H, flavanone 3-hydroxylase; CTI1, chitinase 2-1; MSR, methionine sulfoxide reductase; PGP, polygalacturonase inhibitor protein; AUB, auxin-binding protein; OLP, osmotin-like protein; CTI2, chitinase 2-2; CYT, cystathionine gamma synthase; tRNA, tRNA-Leu (trnL) and tRNA-Phe (trnF) genes; PYD, pyruvate decarboxylase

CAPS	Primer	Sequence	Endonuclease	Number of polymorphic fragment
DFR- <i>Hin</i> 6 I	DFR-Fw DFR-Rv	5'-GTTTCGTCGGTTGATGGCTCGTC-3' 5'-CCTCCGAAGTGTCTTTGCTTTGAG-3'	<i>Hin</i> 6 I	one
APX- <i>Mlu</i> I	APX-Fw APX-Rv	5'-ATTGTTGCTCTCTCTGGTGGTC-3' 5'-AGAGGGCGGAAGACAGGG -3'	<i>Mlu</i> I	two
APX2- <i>Dra</i> I	APX2-Fw	5'-CAGAGGCCTCATCGCCG-3'	<i>Dra</i> I	two
APX2- <i>Taq</i> I	APX2-Rv	5'-TCAGGTCCACCGGTGACC-3'	<i>Taq</i> I	one
CHI- <i>Pvu</i> II	CHI- Fw CHI-Rv	5'-AGGAGTTGACAGAGTCGGTTG-3' 5'-GGACCTGCAAAATGATAGCCAAG-3'	<i>Pvu</i> II	one
F3H- <i>Nco</i> I			<i>Nco</i> I	one
F3H- <i>Eam</i> 1104 I			<i>Eam</i> 1104 I	one
F3H- <i>Hpa</i> II	F3H-Fw F3H-Rv	5'-AMCCTGTGGAAGGACCTTTCG-3' 5'-GAGTTCACTACKGCCTGGTGATC-3'	<i>Hpa</i> II	one
F3H- <i>Dde</i> I			<i>Dde</i> I	one
F3H- <i>Acc</i> I			<i>Acc</i> I	two
CTI1- <i>Hinf</i> I	CTI1-Fw CTI1-Rv	5'-CTGCAGCCTTCTAATGATCAACACC-3' 5'-GTAGCCCACCCGCCTG-3'	<i>Hinf</i> I	one
MSR- <i>Alu</i> I	MSR-Fw MSR-Rv	5'-CTTTTKGTTTTGCATATTTGTGGGC-3' 5'-CAAGTAAACATATTGGTGCCTTGAGC-3'	<i>Alu</i> I	one
PGP- <i>Acc</i> I	PGP-Fw	5'-CAAATCCCCGCCCAAGTCG-3'	<i>Acc</i> I	one
PGP- <i>Rsa</i> I	PGP-Rv	5'-CGAATATCATTGACGCGTCTCCTTC-3'	<i>Rsa</i> I	two
AUB- <i>Hin</i> 6 I	AUB-Fw AUB-Rv	5'-GTTGTGCTTGCTTTTCTTCTCTGC -3' 5'-GCCTGTGTATCGGTGTGCC -3'	<i>Hin</i> 6 I	one
OLP- <i>Dde</i> I	OLP-Fw OLP-Rv	5'-TGTGTCCAAAACCGATCAGTATTGC-3' 5'-TCTTTCAGAGTGGTACGTACCCC-3'	<i>Dde</i> I	one
CTI2- <i>Mbo</i> I	CTI2-Fw CTI2-Rv	5'-GTCAAACCTCTCACGAAACCACT-3' 5'-CTCCGATTGCCTTACCCGC-3'	<i>Mbo</i> I	one
CYT- <i>Bsa</i> B I	CYT-Fw CYT-Rv	5'-CTTTGGTGGTTGTGAGAGCATCG-3' 5'-CCGTACTTGAGCCTATCTGACTGG-3'	<i>Bsa</i> B I	one
tRNA- <i>Bse</i> G I	tRNA-Fw tRNA-Rv	5'-CATTTACAAACAGATCTGAGCGG-3' 5'-TTATTTGAACTGGTGACACGAGGA-3'	<i>Bse</i> G I	one
PYD- <i>Cfr</i> 13 I	PYD-Fw	5'-TGCTTTTCAGACCGTGACTTGC-3'	<i>Cfr</i> 13 I	one
PYD- <i>Hae</i> III	PYD-Rv	5'-TGCAGCCTCTAGTCCCCAC-3'	<i>Hae</i> III	two

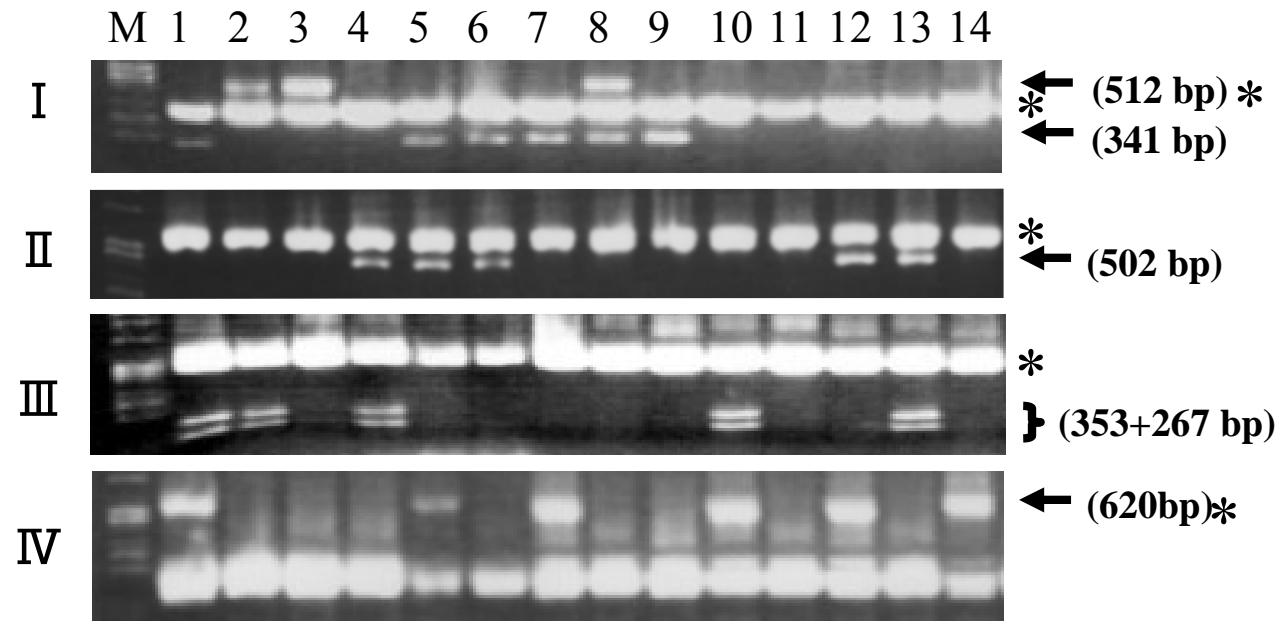


Figure 2. Electrophoretic patterns of commercial strawberry cultivars amplified by CAPS method. Arrows or angle brackets indicate the polymorphic bands, and asterisks show original position of amplified products before treatment with restriction enzymes. Fragment sizes were calculated based on sequence data. I : APX-*Mlu* I, II : CHI-*Pvu* II, III : F3H-*Nco* I, IV : F3H-*Hpa* II

1: 'Toyonoka', 2: 'Nyoho', 3: 'Tochiotome', 4: 'Akihime', 5: 'Sachinoka', 6: 'Aiberry', 7: 'Redpearl', 8: 'Nou-Hime', 9: 'Sanchiigo', 10: 'Pistro', 11: 'Aistro', 12: 'Beni hoppe', 13: 'Keiki wase', 14: 'Kurume IH-I', and M: size marker

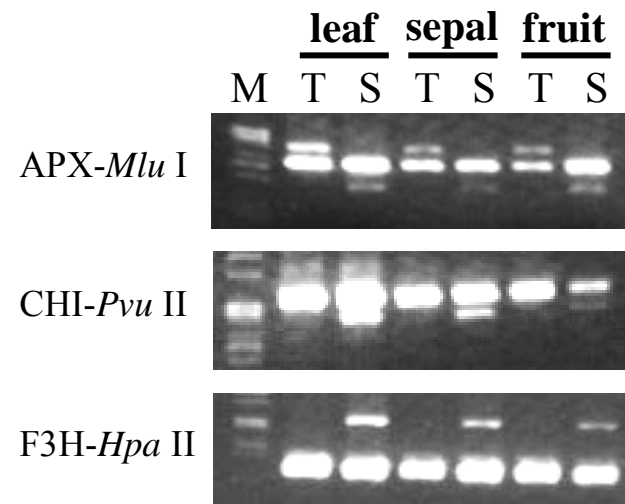


Figure 3. Comparison of polymorphic patterns among different organs (leaf, sepal, and fruit) of strawberry plant. M: size marker T: Tochiotome S: Sachinoka

## 考察

CAPS マーカーは、RAPD や ISSR のように PCR 増幅反応のみで解析できるマーカーとは異なり、制限酵素処理が必要である。また、AFLP や ISSR のように一度に検出できる多型も多くない。しかし操作は単純で、高度な技術や高価な機器が必要ないため、汎用性が高い。何よりも、他のマーカーに比して再現性が高い。安定なマーカーの条件は、PCR 増幅のターゲットが絞られており類似配列を持つ座との競合が起こらないことであり (Halldén et al., 1996)、一般に CAPS (および SSR) はこの条件を満たしている。

しかし栽培イチゴでは、八倍体という高次倍数性に起因して、検出される多型バンドが相対的に薄く不明瞭な傾向にある。八倍体イチゴは複数のゲノムの複合体と推定されており、1つの遺伝子について複数の同祖遺伝子座を有していると考えられる。このため PCR 増幅を行うと、多型バンドを生ずる遺伝子座の他に、多くの同祖遺伝子座が同時に増幅されてしまうため、このような問題が起こるのであろう。Figure 3 の果肉の分析結果からも推定できるように、多型バンドが相対的に薄いと、PCR 増幅量が不十分な場合に判断ミスにつながる可能性が高い。さらに、開発した CAPS マーカーは、分析を繰り返すと、時々、増幅量が十分であっても多型バンドが極端に薄くなるケースが見られた(データ省略)。これは、同祖遺伝子座間で PCR 増幅の競合が起こるため、結果が不安定になったものと考えられる。理論的に最も競合の起こりにくい CAPS 法であっても、倍数体植物においては同祖遺伝子間の競合が起こり、再現性が低下した。おそらく SSR でも、CAPS 同様に再現性が不安定となることが予想される。こうした CAPS や SSR マーカーは、単一ゲノムのみを増幅するゲノム特異的マーカーに改良することにより、前述の「不明瞭バンド」と「競合による再現性低下」の問題を解決することができるであろう。

一方で、PCR 増幅産物の塩基配列情報からは、単一品種由来の遺伝子増幅産物が非常に雑多であり (おそらく最大 8 種)、多型も豊富であることが分かった。これらの多型は、構成ゲノムごとに特有の

配列を持つ「ゲノム間多型」と、「対立遺伝子間多型」（品種間多型に相当する）に区別できると思われたが、一見したところでは判別がつかなかった。次節では、統計的手法を用いてこれらの多型を判別し、「ゲノム間多型」と想定される配列を利用してゲノム特異的マーカーの開発を試みた。

## 第 2 章 第 2 節 ゲノム特異的 DNA マーカーへの改良

高次倍数性植物として最も研究が進んでいるのはコムギであろう。パンコムギは AABBDD のゲノム構成を持つ異質六倍体であり、ゲノム特異的マーカーの作成は比較的容易である (Bryan et al., 1999)。品種は概ね固定されたホモ接合体であるため、PCR 増幅産物は 3 種類しかなく、これらの塩基配列からゲノム間多型が容易に特定できる。また、A、B および D の各ゲノムの祖先種が既に解明されており、ある祖先種で開発した SSR マーカーは約半数がゲノム特異的となったとの報告もある (Guyomarc'h et al., 2002)。これに対して栽培イチゴは、栄養繁殖性のため固定化されることはほとんどなく、ゲノム間多型と対立遺伝子間多型を区別することが容易ではない (第 1 節参照)。またゲノム構造、祖先種ともに解明されていないため、祖先種由来のマーカーからゲノム特異的なものを選抜することもできない。

一方で、栽培イチゴの cDNA ライブラリから単離された APX (アスコルビン酸ペルオキシダーゼ) 遺伝子について興味深い報告があった。Kim ら (2001) によると、品種「Yoho」のライブラリから単離された APX 配列は全部で 9 種類あり、これらをアミノ酸配列に翻訳すると 4 種類にまとめられた。基本的に 2~3 種類の DNA 配列が 1 種類のアミノ酸配列に対応していた。彼らは高次倍数体における遺伝子の共発現に言及をとどめているが、筆者らは、この結果からひとつの仮説を立てた。9 種類の配列のうち 1 種はわずか 1 塩基の違いで区別されていたことから、これが単純なシーケンスミスか増幅時のミスと仮定すれば、1 品種中に含まれる 8 種の APX 配列が、2 種ずつ 4 つのグループに分類できると解釈できる。このグループが、栽培イチゴのゲノム構成を反映している可能性は十分にある。そこで、第 1 節で得た遺伝子増幅クローンの塩基配列情報についても、遺伝子ごとに統計的分類 (クラスター分析) を行えば、ゲノム構成を反映した配列の群分けが可能であり、特定の群に特異的な「ゲノム間多型」を選択的 PCR に利用することで、CAPS マーカーをゲノム特異的マーカーに改良できるのではないかと考えた。

## 材料及び方法

### 1. クラスター特異的プライマーの設計

第1節で、遺伝子あたり5品種25クローンの塩基配列を決定した。これらを分類するために、UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic mean) 法によるクラスター分析を行った。分析ソフトはGENETYX (Genetyx) を利用した。分析によって、クローンは数個のクラスターに分類されるが、この中から選択的 PCR 増幅のターゲットとするクラスターを選び、このクラスターに特異的な配列を利用してプライマーを設計した。プライマーは Forward、Reverse 共に数種設計し、最も明瞭な多型バンドが得られた組み合わせを改良型 CAPS マーカー用のプライマーペアとした。

### 2. クラスター特異的プライマーによる分析

本章第1節の「材料及び方法－5. CAPS 分析法」に従った。

## 結果

### 1. クラスター分析による遺伝子増幅産物の分類

ゲノム特異的マーカー用のプライマーを設計するためには、ターゲットゲノムに特異的な配列を特定する必要がある。そこで各遺伝子から増幅された25クローンを塩基配列に基づいてクラスター分析し、分類した。分析対象は、第1節で多型が得られた20個のCAPS（葉緑体DNA由来のtRNAは除外）が由来する13遺伝子から増幅したクローン群である。

その結果、どの遺伝子においても、クローン群は大きく3～4のクラスターに分類された (Figure 4)。またこれらの分類は、クローンの由来する品種とは無関係であり、同一品種由来のクローンが複数のクラスターに散在していた。次に、得られた樹形図がゲノム構成を反映していると仮定し、選択的 PCR のターゲットとすべきクラスターを検索した。第1節でのCAPSマーカーの開発により、制限酵素で認識される品種間多型を保有するクローンは明らかになっていた

め、これが属しているクラスターをターゲットとした。例えば MSR-*Alu* I の場合 (Figure 4)、星印で示した 3 クローン (S1、N2、N3) が制限酵素 *Alu* I 認識配列を保有して多型バンドを生ずるが、これらは全て第 3 クラスターに属していた。そこで、第 3 クラスターに特異的な配列を探索し、ここに属するクローンのみを増幅するようにプライマーを設計した (Figure 5)。分析した大部分の遺伝子において、同一の多型バンドを生ずるクローンは全てひとつのクラスターに集中しており、ターゲットクラスターの決定は容易であった。複数の独立した多型バンドを生ずる遺伝子の場合にも、同一の多型を生ずるクローンは特定のクラスターに集中していた。しかし、異なる多型を生ずるクローンが同一クラスターに属するか、別のクラスターに属するかは様々であった。APX-*Mlu* I (Figure 6, B-a) の場合、512 bp の多型バンドを生ずるクローンと、341 bp の多型バンドを生ずるクローンは同一のクラスターに属していた。一方、PYD-*Hae* III (Figure 6, C-a) の場合、412 bp を生ずるクローンと、302/281 bp を生ずるクローンは別のクラスターに属していた。別のクラスターに属する複数の多型がある場合には、各クラスターについて特異的プライマーを設計し、多型を個別に検出した。

## 2. 改良型 CAPS マーカーの特徴

改良型 CAPS マーカーに関する情報を Table 3 に示す。葉緑体 DNA 由来のマーカーは改良を行っていないが、開発マーカー一覧表として併記した。改良型 CAPS 名に(N)がついているものは、原著論文 (Kunihisa et al., 2005) 報告後、更にプライマー配列に改良を加えたものであるが、基本的に同一の多型を検出対象とした等価なものである。前述したように、改良前はひとつの CAPS で検出できた 2 種類の多型が、改良によって別々の特異的プライマーで検出されるようになったケースもあることから、改良後の CAPS 数は 21 から 25 に増加している。

APX、APX3、APX4 の 3 つは、それぞれ APX 遺伝子の異なるクラスターに特異的な PCR 増幅産物である。F3H/ F3H3、PGPA/PGPB、PYDA/PYDB も同様に、単一遺伝子 (それぞれ F3H、PGP、PYD 遺伝



子) の別クラスターに特異的な増幅産物である。各クラスターが各構成ゲノムに対応すると仮定すれば、これらは同祖遺伝子を検出するマーカーとも言える。他にはこのような同祖遺伝子由来と考えられるマーカーは得られなかった。

CAPS マーカーの改良の一例として、MSR-*Alu* I を Figure 6-A に示した。改良によって余剰の PCR 増幅がなくなり、多型が明瞭になっている。更に、二倍体植物での CAPS マーカーと酷似した多型パターンが得られ、改良前には区別できなかったヘテロ接合体 (レーン 6) とホモ接合体 (レーン 7) が区別できるようになった。レーン 7 がホモ接合体であることは、改良前の多型バンドがヘテロ接合体と比較して濃いことから裏付けられる。APX-*Mlu* I (Figure 6-B) は、2 種の多型が同一のクラスターに属していたために、改良後も同時に検出可能であった CAPS マーカーである。この CPAS で検出される 3 種のバンドは、決して 3 本同時に検出されることはなく、複対立遺伝子の関係にあると推察された。PYD-*Hae* III (Figure 6, C-a) は、検出される 2 種の多型が別々のクラスターに属していたために、各クラスターについて別々にプライマーを設計し、PYDA-*Hae* III (Figure 6, C-b) と PYDB-*Hae* III (Figure 6, C-b') の二つの CAPS に分離した例である。PYDA-*Hae* III も、497 bp、475 bp および 261/236 bp の 3 複対立遺伝子を検出していると推察できた。PYD 遺伝子に含まれる 2 つの多型が完全に分離できたことから、PYD 遺伝子は少なくとも独立した 2 つの座を持ち、クラスター特異的に設計したプライマーは、これら 2 座を個別に検出できたと考えられる。

### 3. 改良の効率

クラスター特異的増幅による改良の効果を、マーカー別に Table 4 に示した。葉緑体 DNA 由来の 1 マーカー (*tRNA-BseB* I) を除く 24 マーカーのうち、22 マーカーで余剰な増幅産物が減少して多型バンドが明瞭になった。この 22 マーカーのうち、18 マーカーは *disomic* 遺伝する座を特異的に検出しているような多型パターンを示したが、4 マーカーは 3 種以上の PCR 産物を増幅しているように見えた。改良によって全く明瞭にならなかった 2 マーカー (DFR-*Hin6* I,

APX2-*Dra* I)は、ターゲット遺伝子のクラスター間での配列差異が小さく、特定のクラスターを特異的に増幅するプライマー設計が困難であったことが原因と思われる。

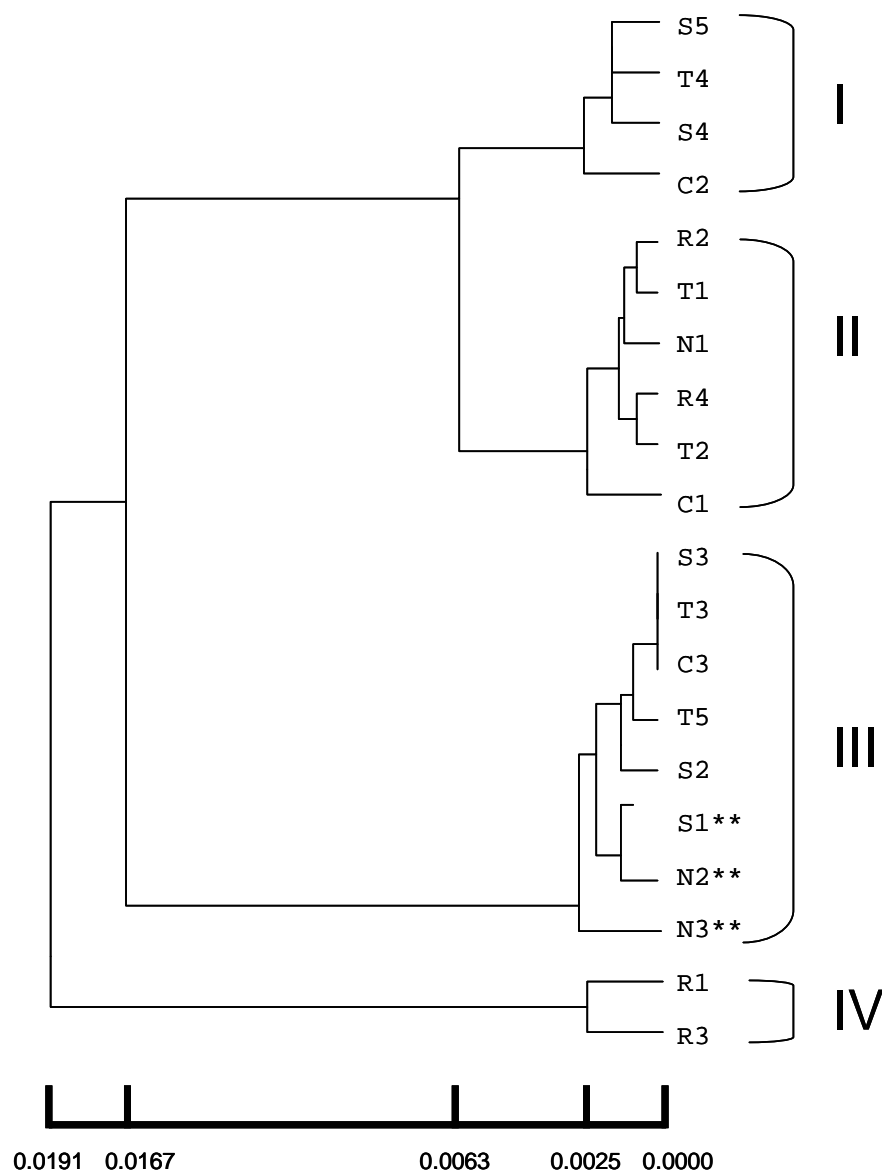


Figure 4. Classification of clones amplified from the methionine sulfoxide reductase (*MSR*) gene of five strawberry cultivars by their sequences (604 to 618 bp). S1–S5, clones from ‘Sachinoka’; T1–T5, clones from ‘Tochiotome’; N1–N3, clones from ‘Nyoho’; R1–R4, clones from ‘Redpearl’; C1–C3, clones from ‘Cesena’. We used the UPGMA method to perform this classification, dividing the clones among cluster I through IV. Double asterisks indicate the clones assumed to produce polymorphic bands after *Alu* I digestion.

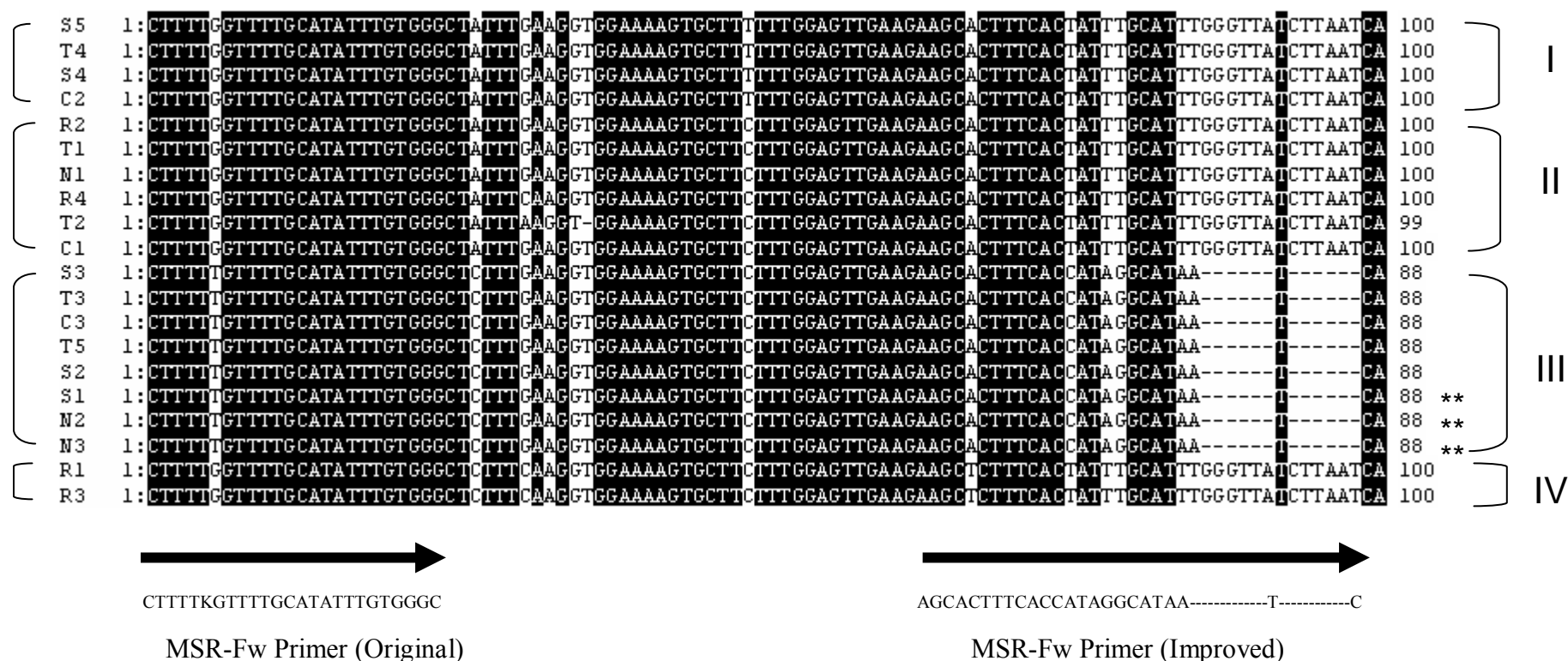


Figure 5. Design of forward primer for cluster III-specific amplification for the MSR-*Alu* I marker. S1–S5, clones from ‘Sachinoka’; T1–T5, clones from ‘Tochiotome’; N1–N3, clones from ‘Nyoho’; R1–R4, clones from ‘Redpearl’; C1–C3, clones from ‘Cesena’. Double asterisks indicate the clones assumed to produce polymorphic bands after *Alu* I digestion. Arrows parallel to the sequences show the positions of primers. The original primer was designed to amplify all clones (regardless of cluster). The improved primer was designed to amplify only cluster III clones.

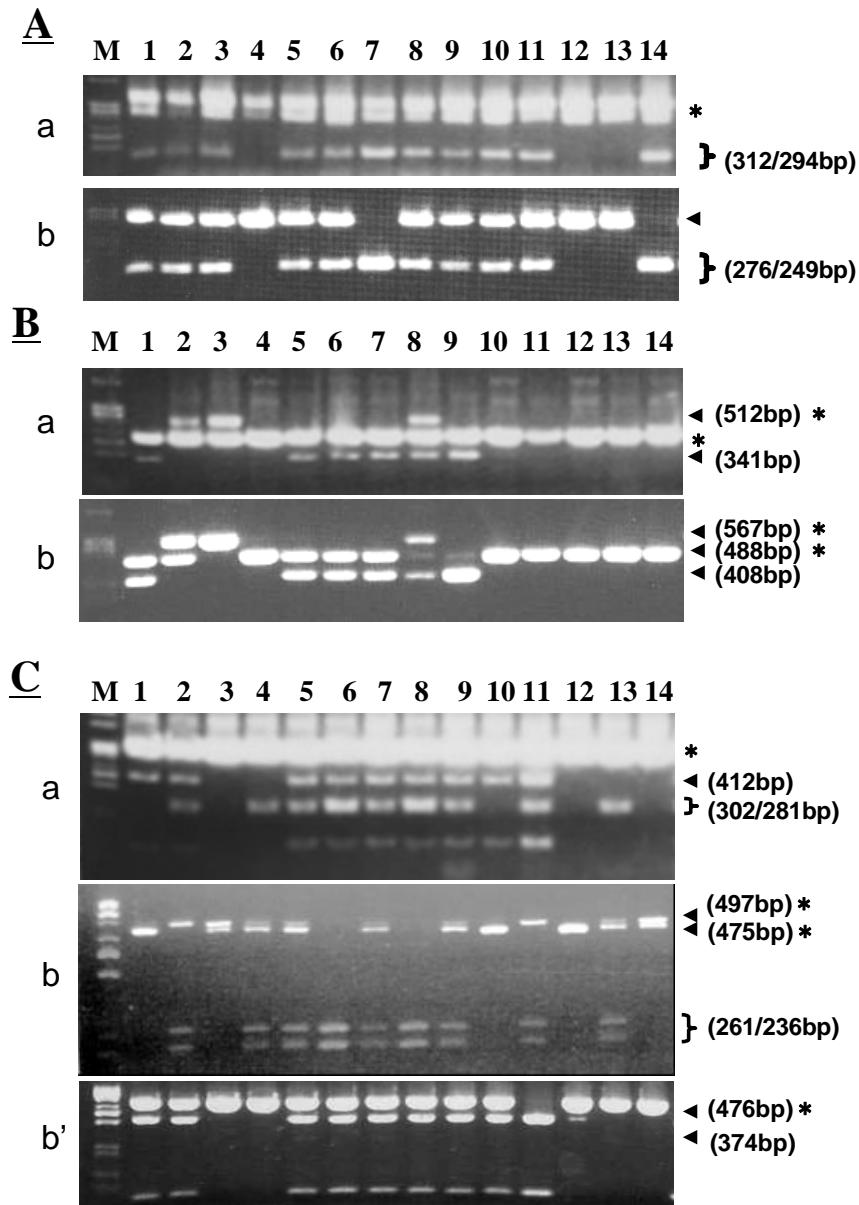


Figure 6. Examples of CAPS marker improvement by cluster-specific amplification in 14 strawberry cultivars. (a) Original marker. (b) Improved marker. Arrows and brackets indicate the polymorphic bands, and asterisks show the positions of amplified products before restriction enzyme digestion. Polymorphic band sizes indicated by arrows and brackets were calculated based on sequence data. 1, 'Toyonoka'; 2, 'Nyoho'; 3, 'Tochiotome'; 4, 'Akihime'; 5, 'Sachinoka'; 6, 'Aiberry'; 7, 'Redpearl'; 8, 'Nou-Hime'; 9, 'Sanchiigo'; 10, 'Pistro'; 11, 'Aistro'; 12, 'Beni hoppe'; 13, 'Keiki wase'; 14, 'Kurume IH-1'; M, size markers

**A.** MSR-*Alu* I markers. (a) Original. (b) Improved.

**B.** APX-*Mlu* I markers. (a) Original. (b) Improved. The original version detected two independent polymorphisms, which belonged to the same cluster.

**C.** PYD-*Hae* III markers. (a) Original. (b) Improved, PYDA-*Hae* III. (b') Improved, PYDB-*Hae* III. The original version detected two polymorphisms, which derived from different clusters. Cluster-specific amplification was carried out by cluster.

Table 3. Primer sequences, endonucleases and revealed polymorphisms for improved CAPS markers.

Original CAPS	Improved CAPS	Primer	Sequence	Endonuclease	Revealed genotypes and standard length of polymorphic bands (bp)
DFR- <i>Hin</i> 6 I	DFR- <i>Hin</i> 6 I	DFR-Fw DFR-Rv	5'-GAGACCCTGGTCCGTCG-3' 5'-CCTCCGAACGTCTTTGCTTTGAG-3'	<i>Hin</i> 6 I	A: 553+385+168 X: 553
APX- <i>Mlu</i> I	APX- <i>Mlu</i> I	APX-Fw APX-Rv	5'-GTGGTCACACCTTGGTGC-3' 5'-AGTATAATATTTAAGCAGAATGCAGACTTC-3'	<i>Mlu</i> I	AA: 567 BB: 488 CC: 408 AB: 567+488 BC: 488+408 AC: 567+408
APX2- <i>Dra</i> I	APX2- <i>Dra</i> I	APX2-Fw APX2-Rv	5'-CAGAGGCCTCATCGCCG-3' 5'-TCAGGTCCACCGGTGACC-3'	<i>Dra</i> I	A: 508+375+123 X: 375+123
	APX3- <i>Dra</i> I(N)	APX3-Fw APX2-Rv	5'-GGCCTCATCGCCGAG-3' 5'-TCAGGTCCACCGGTGACC-3'	<i>Dra</i> I	A: 397 B: 348 H: A+B
APX2- <i>Taq</i> I	APX4- <i>Taq</i> I(N)	APX4-Fw APX2-Rv	5'-CTCCGATCCCTATCTTTTCTTT-3' 5'-TCAGGTCCACCGGTGACC-3'	<i>Taq</i> I	A: 441 B: 309+132 H: A+B
CHI- <i>Pvu</i> II	CHI- <i>Pvu</i> II	CHI-Fw CHI-Rv	5'-AGGAGTTGACAGAGTCGGTTG-3' 5'-GACTTGTGAGTATGATAGTCTGCTG-3'	<i>Pvu</i> II	A: 531 B: 418 H: A+B
F3H- <i>Nco</i> I	F3H- <i>Nco</i> I(N)	F3H-Fw	5'-ACCATGGACATGTGAGTATACTTT-3'	<i>Nco</i> I	A: 426 B: 314 H: A+B
F3H- <i>Eam</i> 1104 I	F3H- <i>Eam</i> 1104 I(N)	F3H-Rv	5'-ACTAAGGAACCTACTCAACCA-3'	<i>Eam</i> 1104 I	A: 428 B: 357 H: A+B
F3H- <i>Hpa</i> II	F3H2- <i>Hpa</i> II(N)	F3H-Fw	5'-ACCATGGACATGTGAGTATACTTT-3'	<i>Hpa</i> II	A: 505+280+225 X: 280+225
F3H- <i>Dde</i> I	F3H2- <i>Dde</i> I(N)	F3H2-Rv	5'-CCCAAATAATGTGTCAATACATATACGAT-3'	<i>Dde</i> I	A: 505+411 X: 411
F3H- <i>Acc</i> I	F3H3- <i>Acc</i> I(N)	F3H3-Fw F3H3-Rv	5'-TAATAGGGTCTAGGTGCGTGG-3' 5'-ACCCAAATAATGTGTCAATACATATAAGAC-3'	<i>Acc</i> I	A: 327 B: 249 H: A+B
CTI1- <i>Hinf</i> I	CTI1- <i>Hinf</i> I	CTI1-Fw CTI1-Rv	5'-TTCTAATGATCAACCTACTTTCCC-3' 5'-GTAGCCCACCCGCTG-3'	<i>Hinf</i> I	A: 515 B: 432 H: A+B
MSR- <i>Alu</i> I	MSR- <i>Alu</i> I	MSR-Fw MSR-Rv	5'-AGCACTTTCACCATAGGCATAATC-3' 5'-CCTTGAGCATAAATGAACTGGCA-3'	<i>Alu</i> I	A: 525 B: 276+249 H: A+B
PGP- <i>Acc</i> I	PGPA- <i>Acc</i> I(N)	PGP-FwA	5'-CCTCACCTTCCTCGAGTC-3'	<i>Acc</i> I	A: 400 B: 288 and/or 288-α H: A+B
PGP- <i>Rsa</i> I	PGPA- <i>Rsa</i> I(N)	PGP-RvA	5'-AAGTCTATCCGATCAAAGTTCATG-3'	<i>Rsa</i> I	A: 400+211+189 X: 400
	PGPB- <i>Rsa</i> I	PGP-FwB PGP-RvB	5'-ACCTCACCTTCCTTGAGCTT-3' 5'-GACAAGTCTATCCGATCAAAGTTCATA-3'	<i>Rsa</i> I	A: 404 B: 295+109 H: A+B
AUB- <i>Hin</i> 6 I	AUB- <i>Hin</i> 6 I(N)	AUB-Fw AUB-Rv	5'-GGGTGTTTGTGAATTRGTTTGC-3' 5'-TACATACTGCCCCCAAGA-3'	<i>Hin</i> 6 I	A: 445 B: 354 H: A+B
OLP- <i>Dde</i> I	OLP- <i>Dde</i> I	OLP-Fw OLP-Rv	5'-TGTGTCCAAAACCGATCAGTATTGC-3' 5'-TCTTTCAGAGTGGTACGTACCCC-3'	<i>Dde</i> I	A: 520 B: 415 H: A+B
CTI2- <i>Mbo</i> I	CTI2- <i>Mbo</i> I(N)	CTI2-Fw	5'-CAAAGCATGCATGATCGTAGTG-3'	<i>Mbo</i> I	A: 364 B: 253+111 H: A+B
	CTI2- <i>Bsh</i> 1236 I(N)	CTI2-Rv	5'-CTCCGATTGCCTTACCCGC-3'	<i>Bsh</i> 1236 I	A: 461 B: 281+180 H: A+B
CYT- <i>Bsa</i> B I	CYT- <i>Bsa</i> B I(N)	CYT-Fw CYT-Rv	5'-CCAGCCATAATGTCTTAC-3' 5'-CCGTACTTGAGCCTATCTGACTGG-3'	<i>Bsa</i> B I	A: 468 B: 294+174 H: A+B
tRNA- <i>Bse</i> G I	tRNA- <i>Bse</i> G I	tRNA-Fw tRNA-Rv	5'-CATTTCACAAACAGATCTGAGCGG-3' 5'-TTATTGAACTGGTGACACGAGGA-3'	<i>Bse</i> G I	A: 304 X: 381
PYD- <i>Cfr</i> 13 I	PYDA- <i>Cfr</i> 13 I	PYD-FwA	5'-CTTTCAGGTAAGGAACATGATCAAG-3'	<i>Cfr</i> 13 I	AA: 497 BB: 475 CC: 373 AB: 497+475 BC: 475+373 AC: 497+373
PYD- <i>Hae</i> III	PYDA- <i>Hae</i> III	PYD-RvA	5'-GTAAGAACTTAACAAAACCATATCTCTCTA-3'	<i>Hae</i> III	AA: 497 BB: 475 CC: 261+236 AB: 497+475 BC: 475+261+236 AC: 497+261+236
	PYDB- <i>Hae</i> III(N)	PYD-FwB PYD-RvB	5'-CAACTTTGAGTCTTTATGATGAATTGA-3' 5'-ACCAAGTAGAACTTACGTTAAGTTA-3'	<i>Hae</i> III	A: 476 B: 374 H: A+B

Markers with genotype 'A', 'B' and 'H': 'A' shows higher molecular DNA fragment, and 'B' was lower one. 'H' was heterozygous genotype of 'A' and 'B'.

Markers with genotype 'AA', 'BB', 'CC', 'AB', 'BC' and 'AC': 'A' means the highest molecular DNA fragment, 'B' was medium one, and 'C' was the lowest one. The genotypes are presented by their combination.

Markers with genotype 'A' and 'X': 'A' shows genotypes with polymorphic DNA fragment, and 'X' was without one.

Table 4. Effect of improvement on CAPS markers for strawberry, and markers used for investigation of inheritance.

Marker	Effect of improvement	Investigation of inheritance.
APX- <i>Mlu</i> I		
APX3- <i>Dra</i> I(N)		
APX4- <i>Taq</i> I(N)		
CHI- <i>Pvu</i> II		
F3H3- <i>Acc</i> I(N)		
CTI1- <i>Hinf</i> I		
MSR- <i>Alu</i> I		Done in next section.
AUB- <i>Hin</i> 6 I(N)		
PGPB- <i>Rsa</i> I	Clarified.	
OLP- <i>Dde</i> I	Appear to be specific to single disomic locus.	
PYDA- <i>Cfr</i> 13 I		
PYDA- <i>Hae</i> III		
PYDB- <i>Hae</i> III(N)		
F3H- <i>Nco</i> I(N)		
F3H- <i>Eam</i> 1104 I(N)		
CTI2- <i>Mbo</i> I(N)		
CTI2- <i>Bsh</i> 1236 I(N)		
CYT- <i>Bsa</i> B I(N)		
PGPA- <i>Acc</i> I(N)		
PGPA- <i>Rsa</i> I(N)	Clarified.	
F3H2- <i>Hpa</i> II(N)	Appear to amplify more than two alleles	
F3H2- <i>Dde</i> I(N)		Done in next section.
DFR- <i>Hin</i> 6 I		
APX2- <i>Dra</i> I	Failed to be clarified.	
tRNA- <i>Bse</i> G I	No effect. ( Because it was derived from Chloroplast DNA)	

## 考察

本節では、遺伝子の PCR 増幅産物を塩基配列に基づいて分類し、特定のクラスターに特有の配列を選択的 PCR に利用することにより、既存のマーカーをクラスター特異的マーカーへ改良した。

クラスター分析による増幅産物の分類では、対象とした 13 の遺伝子座全てにおいて、クローンが 3~4 のクラスターに分類できた。同一品種から生じたクローンは複数のクラスターに散在しており、由来する品種とクラスターの間には明確な関連が見出せなかった。そこで我々は、各クラスターが八倍体イチゴを構成するゲノムに対応していると考えた。言い換えれば八倍体は、3~4 種類の異なるゲノムで構成されていると仮説を立てた。

一方で、PYD-*Hae* III をはじめとするいくつかの CAPS で一度に検出されていた 2 種の多型は、改良によって完全に別のクラスター特異的マーカーに分離された。このことは、PYD 等の遺伝子が少なくとも独立した 2 つの座を保有していることを意味しており、クラスター特異的マーカーはこれらの座を個別に検出していると言える。これらの座は独立したゲノムに座乗した同祖遺伝子である可能性が高いと考えられる。

更に、クラスター特異的マーカーでは、大部分において余剰増幅産物の消失が起こり、多型が明瞭に検出できるようになった。改良前の CAPS で問題になっていたマーカーの再現性も大幅に向上し、たとえ PCR 増幅量が十分でなくとも正確な多型が検出できるようになった。特筆すべきは、多くのマーカーが、disomic 遺伝をする座を特異的に検出していると推定できる電気泳動像を示したことである。

以上の状況を勘案すると、開発した「クラスター特異的マーカー」は計画通り「ゲノム特異的マーカー」である可能性が強く示唆されたが、結論を出すには至らなかった。そこで次節では、改良型マーカーの後代への遺伝様式を観察することで、開発した「クラスター特異的マーカー」が単一ゲノムに特異的な「ゲノム特異的マーカー」であるか否か、検証を試みた。

技術上の補足になるが、多くのクラスター特異的プライマーは 3'



末端に鍵となる特異的配列を有している。したがって 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のあるポリメラーゼ（ExTaq、LATaq 等）を PCR 増幅に用いると、特異的配列の選択性が低下し、非特異的な増幅を起こすことが予備試験から分かっている。また、 $T_m$  値が 55℃より低くなっても同様に選択性が低下し、非特異的増幅をもたらす。

## 第 2 章 第 3 節 ゲノム特異的 DNA マーカーの遺伝様式

栽培イチゴ (*F. × ananassa*) は世界的に重要な農産物であるにも関わらず、八倍体のゲノム構成および遺伝様式が未解明であり、研究上大きな課題となっている。ゲノム構成には 2 つの仮説があり、DNA マーカーのマッピングの際に出現する相反マーカー頻度に基づいた AAA'A'BBBB (部分四倍体) という説 (Lerceteau-Köhler et al., 2003) と、染色体対合観察や、一部のアイソザイムの遺伝様式に基づいた AAA'A'BBB'B' (完全複二倍体) という説 (Bringhurst, 1990) が目下有力である。しかし、いずれの仮説も決定打となる論拠に乏しく、議論の対象となっている。どちらの仮説が正しくとも、少なくとも 2 組の二倍体ゲノムが存在することが予想されるが、*F. × ananassa* の遺伝解析で明確な disomic 遺伝が観察されたという報告はほとんどない。

後代への遺伝観察で、分離比が 3 : 1 や 1 : 1 に最も適合したという報告は頻繁にされている。門馬ら (1990) は四季成形質の分離比が 3 : 1 に適合することから、四季成性遺伝子が単一で、メンデル遺伝に従うことを提唱した。Lerceteau-Köhler ら (2003) はマッピングにあたって、1 : 1 に分離する DNA マーカーのみを選抜している。しかしこれらの分離比は、単一の座がメンデル遺伝に従って遺伝することを示唆してはいるが、disomic 遺伝の根拠とはならない。同質四倍体または同質八倍体性遺伝であっても、単一の座であればこの分離比に適合するからである。遺伝様式の決定に必要なのは、disomic または polysomic 遺伝にそれぞれ特有の分離比を示すことである。また、disomic 遺伝の立証法としては、3 つ以上の複対立遺伝子が決して同時に検出されないことを示す方法もある (Ashley et al., 2003)。しかし現実には、ホスホグルコイソメラーゼのアイソザイムのひとつで、バンドの濃淡によるやや困難な判定の元で 1 : 2 : 1 の分離比が観察されたのが唯一の報告である (Arulsekhar et al., 1981)。ゲノム特異的マーカーは理論上、栽培イチゴで初めての実質的な共優性マーカーであり、従来の優性マーカーとは異なる分離特性を示すことが予想される。これまで困難であった遺伝様式観察にとって本マー

カーは、新しい解析ツールとなることが期待される。

本節では、開発した「クラスター特異的マーカー」の遺伝様式を調査し、これらが「ゲノム特異的マーカー」であるか否かを検証した。更に得られた結果を総合して、最終的に *F. × ananassa* のゲノム構成について言及した。

ただし、本研究では便宜上、マーカーの遺伝様式を検討するに当たり、**polysomic** であるか、**disomic** であるかの両極端なケースに限定して検証した。しかし倍数体の中には、これらの中間に位置する種もある。これらの種は、選択的対合により特定の相同染色体と二価対合を起こし、概ね **disomic** な遺伝を示す傾向にあるが、選択性の度合いによっては他の相同染色体と対合する場合もある。本研究では、このような中間的な遺伝様式は考慮していないことを留意しなければならない。

## 材料及び方法

### 1. 植物材料

後代へのマーカーの遺伝様式の検定には 5 つの交配集団を用いた。各 96 個体から成る「さちのか」および「とちひめ」の自殖集団、各 48 個体から成る「女峰」および「Cesena」の自殖集団、そして 96 個体から成る「さちのか」×「とちおとめ」の交配集団である。「さちのか」×「とちおとめ」の交配集団は、**APX-Mlu I**、**PYDA-Hae III** の複対立遺伝子の遺伝様式、および「ヘテロ接合型×ホモ接合型」となるマーカーの遺伝様式の検定にのみ用いた。

分離比から **disomic** と **octosomic** な遺伝様式を区別するには、優性マーカーの場合、**duplex** マーカー（それぞれ **Aa/Aa/aa/aa**、**AAaaaaaa**）を用いて 3:1 と 11:3 の分離比を区別する必要がある。これらを 80% の正確性で区別するには、およそ 1000 個体を分析しなければならない。本研究においてもこれに相当する規模の解析が望まれるが、実験規模の制約上実施できなかった。したがって、分離比からの遺伝様式の推定は、正確性が劣ることを踏まえた上で行った。

## 2. 使用した CAPS マーカー

開発したマーカーのうち、分離比観察に供試したマーカーを Table 4（および Table 8）に示した。第 2 節において、電気泳動像から二倍体の座に特異的と推察された 18 マーカーのうち、ランダムに選んだ 13 マーカーを試験に用いた。また、3 つ以上の産物を増幅すると推察される 4 マーカー、および非特異的な 2 マーカーは全て分離比を観察した。マーカー名に (N) が付随しているものは原著論文 (Kunihisa et al., 2005) 発表後にプライマー配列に再改良を加えたものであるが、本分析には原著論文で報告したマーカーを用いた。分析に供試したマーカーについては、この改良の前後で検出する多型に差がないことを確認しているため、特に問題はない。

## 3. CAPS マーカーによる分析

本章第 1 節の「材料及び方法－5. CAPS 分析法」に従った。

## 4. 遺伝様式の推定

disomic、tetrasomic、octosomic の各遺伝様式において、考え得る全てのヘテロ接合型について、自殖後代での期待分離比を算出した (Table 5)。これらの期待値と実際の観測値について  $\chi^2$  検定を行い、適合する遺伝様式を抽出した。複数の遺伝様式が適合した場合、後代において、分離比以外に現れると思われる、各遺伝様式の特徴 (Table 7) について検証し、総合的に判断した。

## 5. 対立遺伝子の比率がマーカー検出に及ぼす影響の検定

disomic polyploid で検出されるヘテロ接合体の遺伝子型はシンプルで、対立遺伝子型が 2 種 (A,B) であれば (AB) のみである。これに対し polysomic polyploid では、例えば四倍体の場合は少なくとも (AAAB) (AABB) (ABBB) の 3 タイプがあり、それぞれ対立遺伝子数が異なる。アイソザイムや RFLP マーカーでは、これらの対立遺伝子数がバンド強度に反映されることが分かっており (Martines-Zapater et al., 1984; Da Sivla, 1996)、Truong ら (2005) は SSR マーカーのピーク強度を比較することにより、四倍体であるシラ

カバの遺伝子型を決定している。こうした対立遺伝子数の違いが CAPS マーカーにより検出可能であることを検定するため、擬似的に各対立遺伝子の含有比率が異なる鋳型 DNA を作成した。OLP-*Dde* I マーカーで対立遺伝子 A のみが検出される「とよのか」の DNA と、B のみが検出される「章姫」の DNA を混合し、2 種のバンド強度が等しく検出されるよう DNA 濃度を調整した。これを基準に、混合比率を変化させ、これらを鋳型にマーカー解析を行った。OLP-*Dde* I マーカー以外に 3 マーカーで同様の試験を行った。

## 結果

### 1. disomic 遺伝する座に特異的と推察されるマーカーの遺伝様式

本節では、クラスター特異的プライマーによって増幅されたゲノム領域を「増幅座」と称する。第 2 節では、15 の増幅座から生じる 18 マーカーが、二倍体の座に特異的と推察された (Table 4)。そこで、これらが本当に二倍体的に後代に遺伝するかを検証するため、13 マーカーをランダムに選んで交配集団での分離比を観察した。基本的に 4 つの自殖系統で分析を行った。APX-*Mlu* I と PYDA-*Hae* III の 2 マーカーについては、3 複対立遺伝子の関係を検証するため、「さちのか」×「とちおとめ」の交配系統での分析を付加した。この交配系統で「ヘテロ接合体×ホモ接合体」となる CHI-*Pvu* II、F3H3-*Acc* I(N)、PGPA-*Acc* I(N)、APX4-*Taq* I(N)、PYDB-*Hae* III(N)の 5 マーカーについても分析を付加した。

MSR-*Alu* I の分析結果を Table 5 に示す。縦軸に、八倍体において考え得るヘテロ接合体の遺伝子型を列挙し、それぞれを自殖した場合の期待分離比を示した。これに対し、4 つの自殖集団で実際に観察された分離比を横軸に示し、 $\chi^2$  検定の結果を *P* 値で示した。*P*>0.05 で適合した検定を太字で表している。その結果、例として「さちのか」自殖集団では、(AB,nn,nn,nn) が *P*=0.24 で最も高い適合度を示し、増幅座が単一の disomic 遺伝子座を増幅している可能性を示唆した。しかし、tetrasomic または octosomic 遺伝子座の 2 つの染色体のみを増幅している可能性 (ABnn,nn<sub>(,)</sub>nn/ *P*=0.13、) (ABnnnnnnn/

$P=0.04$ ) も、少なからずあった。「とちひめ」および「女峰」の自殖集団でも「さちのか」と同様、(AB,nn,nn,nn) が最も適合したが、Cesena の自殖集団では (ABnn,nn<sub>(,)</sub>nn) が最も適合度が高くなっており、tetrasomic および octosomic 遺伝の可能性を却下することはできなかった。これら 3 つ以外の仮説は全く適合せず却下できた。他の 12 マーカーも同様の傾向を示し (Table 6 に 8 マーカーの分析結果を例として示した)、大多数の集団で disomic 遺伝に最も適合していたが、他の 2 つの可能性も十分に考えられる  $P$  値を示した。

分離比の  $\chi^2$  検定からは、disomic、tetrasomic、octosomic の 3 つの遺伝様式の可能性が示されたが、いずれの場合であっても、検定した全てのマーカーが、ヘテロ接合を示す全ての自殖系統親において、8 本の染色体のうち 2 本のみを増幅対象としていることが明らかとなった。これらのマーカーが、polysomic 遺伝子座の一部のみを増幅対象としているならば、3 ないし 4 本の染色体を増幅するケースがあってもいいものだが、そのような増幅を示唆する分離は見られなかった。

候補となる 3 つの遺伝様式について、後代でのマーカー遺伝子型の特徴を Table 7 にまとめた。第一に自殖後代での分離比であるが、これは先述したとおり、 $\chi^2$  検定で disomic 遺伝が比較的高い適合性を示したが、他の 2 つの遺伝様式も十分に適合する  $P$  値を示した。

第二に、Null となる個体、つまり増幅対象となる染色体が存在しないためにマーカーが増幅しない個体 (遺伝子型 nnnn<sub>(,)</sub>nnnn) であるが、理論上自殖後代では、disomic 遺伝では全く出現せず、polysomic 遺伝では一定の確率で出現する。今回検定した 13 マーカーは、いずれの自殖集団でも Null となる個体を検出することはなかった。tetrasomic 遺伝の場合、Null の出現確率は 1/36 であり、48 個体中に Null 個体が全く含まれない確率は 25.8%、96 個体中に含まれない確率はわずか 6.7% である。このことから、これらのマーカーは disomic 遺伝をする可能性が高いと言える。しかし、Null の遺伝子型を持つ個体が、特異的 PCR により正確に Null として検出できるか否かは議論の余地がある。プライマーの特異性が不十分であった場合には、増幅対象となる遺伝子座が存在しなければ、配列が多少異なる同祖

遺伝子座であっても誤って増幅してしまう可能性がある。本研究では、特異的 PCR 用プライマーの設計にあたり、単一の SNP（一塩基多型）のみに頼ることを可能な限り回避し、2～4 塩基多型や Indel を利用したり、Forward・Reverse プライマー共に特異的配列を利用しているため、特異性は高いと思われる。しかし Null は仮想の遺伝子型であり、適切な *F. × ananassa* のサンプルを入手することは困難であるため、この特異性を検証することはできない。

第三に、ヘテロ接合体の多様性の差異が挙げられる。自殖後代で出現するヘテロ接合体の遺伝子型は、disomic 遺伝の場合は (AB) のみであるが、例えば tetrasomic 遺伝の場合は (AABB) (AABn) (ABn) (ABnn) の 4 通りが考えられる。対立遺伝子の比率は、disomic 遺伝では  $A : B = 1 : 1$  のみであるが、tetrasomic 遺伝の場合では、11/19 は  $A : B = 1 : 1$ 、4/19 は  $A : B = 2 : 1$ 、4/19 は  $A : B = 1 : 2$  となる。つまり、ヘテロ接合体の約 2/5 が、非対称的な遺伝子型を持つ。そこで、CAPS マーカーにより、対称的遺伝子型と非対称的遺伝子型を区別できるか否か、擬似的に検証を行った (Figure 7-A)。その結果、鋳型の対立遺伝子比率がバンド強度に反映されることは明らかとなったが、バンド強度の比較により、各個体を正確に  $A : B = 2 : 1$ 、 $A : B = 1 : 1$ 、 $A : B = 1 : 2$  に識別するのは困難であると思われた。しかし、 $A : B = 2 : 1$  の場合と  $A : B = 1 : 2$  の場合には明らかにバンド強度比に差があり、このような個体が各 1/5 もの高頻度で出現すれば、全体の傾向として判断は可能と考えられた。実際の自殖後代の分析例を Figure 7-B に示すが、いずれのマーカー分析においてもバンド強度比は概ね一定で、非対称的遺伝子型を示唆するような個体が高頻度で観察されることはなかった。ただし、非常に稀にはあるが、低分子側のバンド強度が低くなる個体も出現することもあった。おそらく制限酵素処理が不十分であったためと思われる。以上のことは、マーカーの disomic 遺伝を示唆しているが、本法は目視と主観に頼っているため、客観的データとするためには定量のための技術改善が必要である。

第四に、複対立遺伝子を同時に保有する個体の出現である。disomic 遺伝ではそのような個体は生じないが、polysomic 遺伝ではかなりの高頻度で出現する。例えば PYDA-Hae III は、「さちのか」×「とちお

とめ」交配集団で BC×AB となり、tetrasomic 遺伝に従う場合は、後代で「ABC」となる個体が 5/36 の割合で出現する。しかし実際はそのような個体は全く観察されず、disomic 遺伝に適合した (Table 6)。APX-Mlu I でも同様に、3 複対立遺伝子を同時に保有する個体は見られなかった。以上より、この 2 マーカーは、disomic 遺伝に従うことが明らかとなった。

第五に、「ホモ接合体 (A)」×「ヘテロ接合体 (H)」の交配集団の遺伝子型であるが、disomic 遺伝では「B」と検出される個体は全く出現しないのに対し、polysomic 遺伝では出現する可能性が高い。tetrasomic 遺伝の場合、ホモ接合体の遺伝子型が simplex (A<sub>nnn</sub>)、または duplex (AA<sub>nn</sub>) であった場合、それなりの確率で「B」となる個体が出現する。ただし、triplex (AA<sub>A</sub>n) か quadruplex (AAAA) であった場合は、disomic と同様、1 : 1 の分離比を示す。検定した 5 つのマーカーは、すべて 1 : 1 に分離し、「B」となる個体は見られなかった (Table 6)。5 マーカー全てについて、ホモ接合体が triplex または quadruplex であるとは確率的に考えにくく、少なくとも一部のマーカーは真に disomic 遺伝に従っているものと思われた。

## 2. 3 種以上の産物を増幅すると推察されるマーカーの遺伝様式

第 2 節では、2 つの増幅座から生じる 4 マーカーが、改良によって多型は明瞭化した。disomic な遺伝子座に特異的とは考えにくい電気泳動像を示した (Table 4)。これらは、2 つ以上の座を同時に増幅しているか、もしくは tetrasomic 遺伝子座を増幅していると予想された。

分析の結果、調査したほぼ全ての集団において、PGPA-Rsa I(N)、F3H2-Hpa II(N)、F3H2-Dde I(N)の 3 マーカーは 3 : 1 に分離した。PGPA-Acc I(N)は、検出される 400 bp、288 bp、288-α bp の 3 種のバンドのうち、288-α bp のバンドを無視してタイピングを行えば、前項の 13 マーカーと同様に 1 : 2 : 1 の分離比に最も適合し、Null もなく、「ホモ接合体」×「ヘテロ接合体」の交配集団では polysomic 遺伝を示唆する遺伝子型も見られなかった。288-α bp のバンドは 3 : 1 の分離比で遺伝していた (データ省略)。以上から、PGPA-Acc I(N)は単一



の disomic 遺伝子座に加えて、異なる座の対立遺伝子のひとつを増幅している可能性が高いと考えられた。残りの 3 マーカーは、3 : 1 の分離を示したため、遺伝様式は特定できなかった。

### **3. ほぼ全ての同祖遺伝子を増幅すると推察されるマーカーの遺伝様式**

第 2 節では、2 つの増幅座から生じる 2 マーカーが、非特異的にほぼ全ての同祖遺伝子座を増幅していると推察された (Table 4)。分析の結果、これらのマーカーは調査した全ての集団において 3 : 1 の分離を示し、遺伝様式は特定できなかった (Table 8)。

Table 5. Expected segregation ratios of disomic and polysomic inheritance of heterozygotic marker in the self-crossed strawberry population, and goodness-of-fit test for them of MSR-*Alu* I marker using the chi-square test. The result of test is presented by *P*-value. n= Undetected chromosome. A and B are exchangeable. H=Heterozygous genotype of A and B. N=Null, which detects no polymorphism.

Inheritance	Parental configuration of heterozygote	Expected segregation ratio (A:H:B:N)	Observed segregation in each population, and <i>P</i> -values calculated by the test			
			MSR- <i>Alu</i> I			
			Sachinoka-self <sup>b</sup> 28:51:17(:0)	Tochihome-self <sup>b</sup> 19:52:25(:0)	Nyoho-self <sup>b</sup> 13:25:10(:0)	Cesena-self <sup>b</sup> 10:30:8(:0)
Disomic <sup>a</sup>	AB, nn, nn, nn	1:2:1(:0)	<b>0.24</b>	<b>0.49</b>	<b>0.80</b>	<b>0.21</b>
	An, Bn, nn, nn	3:9:3:1	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>	<b>0.17</b>	<b>0.31</b>
	AB, An, nn, nn	4:11:1(:0)	5.4E-06	1.2E-14	1.0E-04	1.1E-02
	An, Bn, An, nn	15:45:3:1	4.9E-09	2.6E-21	1.4E-06	1.1E-03
	An, Bn, An, Bn	15:225:15:1	4.8E-27	5.7E-24	1.8E-13	6.2E-07
	AB, An, Bn, nn	1:14:1(:0)	1.9E-25	1.5E-22	5.3E-13	7.9E-07
	AB, AB, nn, nn	1:14:1(:0)	1.9E-25	1.5E-22	5.3E-13	7.9E-07
Tetrasomic <sup>a</sup>	ABnn, nn <sub>(,)</sub> nn	8:19:8:1	<b>0.13</b>	<b>0.31</b>	<b>0.60</b>	<b>0.41</b>
	ABnn, An <sub>(,)</sub> nn	35:100:8:1	9.4E-07	1.2E-16	4.6E-05	0.01
	ABnn, ABnn	80:1135:80:1	5.6E-25	4.4E-22	1.9E-12	2.5E-06
	ABnn, AB, nn	1:14:1(:0)	1.9E-25	1.5E-22	5.3E-13	7.9E-07
Octosomic <sup>a</sup>	ABnnnnnn	40:107:40:9	0.04	<b>0.12</b>	<b>0.35</b>	<b>0.38</b>
	AABnnnnn	48:139:8:1	1.1E-10	1.6E-25	8.3E-08	2.0E-04
	AABBnnnn	224:4451:224:1	2.0E-38	2.1E-34	3.7E-19	2.9E-10

<sup>a</sup> Segregation ratios of H:B higher than 20:1 are not considered.

<sup>b</sup>-self means the progeny of self-crossed population.

*P*-values above 0.05 are showed by bold.

Table 6. Segregation ratio of heterozygotic CAPS markers in the strawberry progeny, and goodness-of-fit test to expected one in 3 probable configurations. The result of test is presented by *P*-value.

Marker	Popuraltion <sup>a</sup>	Genotype of parents used for cross	Segregation ratio of progeny's genotypes and <i>P</i> -values calculated by the test				
			Observed	Expected (self-crossed population)			Expected (Sachinoka × Tochiotome)
				Disomic AB, nn, nn, nn 1:2:1(:0)	Tetrasomic ABnn, nn <sub>(c)</sub> nn 8:19:8:1	Octosomic ABnnnnnn 40:107:40:9	Disomic AB, nn, nn, nn 1:1 or 1:1:1:1
MSR- <i>Alu</i> I	Sachinoka-self	H	28:51:17	0.24	0.13	0.04	-
	Tochihome-self	H	19:52:25	0.49	0.31	0.12	-
	Nyoho-self	H	13:25:10	0.8	0.6	0.35	-
	Cesena-self	H	10:30:8	0.21	0.41	0.38	-
APX- <i>Mlu</i> I	Sachinoka-self	BC	31:38:27	0.11	0.01	5.0E-04	-
	Tochihome-self	AA	96	-	-	-	-
	Nyoho-self	AB	11:24:13	0.92	0.59	0.31	-
	Cesena-self	AC	4:33:11	0.01	0.05	0.06	-
	Sachinoka×Tochiotome	BC×AA	50:46	-	-	-	0.68
APX3- <i>Dra</i> I(N)	Sachinoka-self	H	28:44:24	0.61	0.11	0.02	-
	Tochihome-self	H	18:59:19	0.08	0.19	0.15	-
	Nyoho-self	A	48	-	-	-	-
	Cesena-self	A	48	-	-	-	-
APX4- <i>Taq</i> I(N)	Sachinoka-self	H	16:47:33	0.05	0.01	2.0E-03	-
	Tochihome-self	B	96	-	-	-	-
	Nyoho-self	H	16:22:10	0.4	0.21	0.08	-
	Cesena-self	H	11:20:17	0.24	0.1	0.03	-
	Sachinoka×Tochiotome	H×B	51:45	-	-	-	0.54
CHI- <i>Pvu</i> II	Sachinoka-self	H	22:46:28	0.63	0.16	0.03	-
	Tochihome-self	A	96	-	-	-	-
	Nyoho-self	A	48	-	-	-	-
	Cesena-self	A	48	-	-	-	-
	Sachinoka×Tochiotome	H×A	42:54	-	-	-	0.22
F3H3- <i>Acc</i> I(N)	Sachinoka-self	H	28:50:18	0.33	0.15	0.04	-
	Tochihome-self	H	17:51:28	0.24	0.13	0.04	-
	Nyoho-self	A	48	-	-	-	-
	Cesena-self	H	18:19:11	0.13	0.05	0.01	-
	Sachinoka×Tochiotome	H×A	57:39	-	-	-	0.07
OLP- <i>Dde</i> I	Sachinoka-self	H	23:55:18	0.28	0.3	0.15	-
	Tochihome-self	H	24:47:25	0.97	0.27	0.06	-
	Nyoho-self	H	9:27:12	0.57	0.6	0.43	-
	Cesena-self	H	16:26:6	0.11	0.11	0.06	-
PYDA- <i>Hae</i> III	Sachinoka-self	BC	17:51:28	0.24	0.13	0.04	-
	Tochihome-self	AB	28:46:22	0.63	0.16	0.03	-
	Nyoho-self	AC	10:29:9	0.35	0.54	0.46	-
	Cesena-self	BC	9:22:17	0.22	0.12	0.04	-
	Sachinoka×Tochiotome	BC×AB	25:22:24:25	-	-	-	0.97

<sup>a</sup>-self means the progeny of self-crossed population.

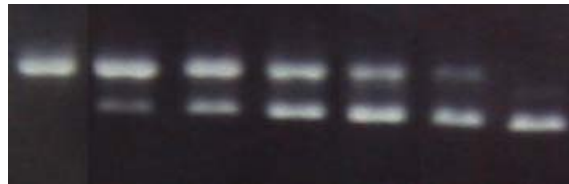
As to each genotype, refer to Table 3.

Table 7. The differences observed in the crossed population between disomic and polysomic inheritance in octoploid strawberry.

	Disomic AB, nn, nn, nn	Tetrasomic ABnn, nn <sub>(s)</sub> nn	Octosomic ABnnnnnnn
1 The segregation of heterozygote marker (self-crossed population)	A:H:B=1:2:1	A:H:B:N=8:19:8:1	A:H:B:N=40:107:40:9
2 The offspring genotyped as "Null" (self-crossed population)	None	Generated with probability 1/36	Generated with probability 9/196
3 The variation of heterozygote (self-crossed population)	only AB	AABB: AABn: ABBn: ABnn=1:4:4:10	AABBnnnn:AABnnnnn :ABBnnnnn:ABnnnnnn=9:24:24:50
4 The offspring with 3 multiple alleles ('Sachinoka'×'Tochiotome' population)	None	Generated with probability 5/36 (e.g in BC×AB cross)	Generated with probability 33/196 (e.g in BC×AB cross)
5 The offspring genotyped as "B" in A×H cross ('Sachinoka'×'Tochiotome' population)	None	Generated with probability 1/6 (when A is simplex), 1/18 (Duplex), None (Others)	Generated with probability 1/7 (when A is simplex), 3/49 (Duplex), 1/49 (Triplex), 1/245 (Quadruplex), None (Others)

**A**

Toyonoka (A)	1	4	2	1	1	1	0
Akihime (B)	0	1	1	1	2	3.5	1



**B**



Figure 7. The various band intensity, reflecting the dosage of template for PCR in strawberry.

**A.** OLP-*Dde* I markers. The template for PCR was prepared by mixing DNA extracted from 'Toyonoka (genotype=A)' and 'Akihime (genotype=B)' in various ratio.

**B.** The progenies of self-crossed population of 'Tochihiime' analyzed by OLP-*Dde* I markers.

Table 8. The character of locus amplified from strawberry by improved CAPS method.

Marker	Amplified locus	Appearance	Target of amplification, considered from the inheritance
APX- <i>Mlu</i> I	APX		
APX3- <i>Dra</i> I(N)	APX3		
APX4- <i>Taq</i> I(N)	APX4		
CHI- <i>Pvu</i> II	CHI		
F3H3- <i>Acc</i> I(N)	F3H3		
CTI1- <i>Hinf</i> I	CTI1		
MSR- <i>Alu</i> I	MSR		single disomic locus
AUB- <i>Hin</i> 6 I(N)	AUB		
PGPB- <i>Rsa</i> I	PGPB		
OLP- <i>Dde</i> I	OLP	specific to single disomic locus	
PYDA- <i>Cfr</i> 13 I	PYDA		
PYDA- <i>Hae</i> III	PYDA		
PYDB- <i>Hae</i> III(N)	PYDB		
F3H- <i>Nco</i> I(N)	F3H		
F3H- <i>Eam</i> 1104 I(N)	F3H		
CTI2- <i>Mbo</i> I(N)	CTI2		
CTI2- <i>Bsh</i> 1236 I(N)	CTI2		
CYT- <i>Bsa</i> B I(N)	CYT		
PGPA- <i>Acc</i> I(N)	PGPA		single disomic locus
PGPA- <i>Rsa</i> I(N)	PGPA		+ allele independent from it
F3H2- <i>Hpa</i> II(N)	F3H2	amplify more than two alleles	
F3H2- <i>Dde</i> I(N)	F3H2		
DFR- <i>Hin</i> 6 I	DFR		almost all homoeologous loci
APX2- <i>Dra</i> I	APX2	amplify almost all homoeologous loci	
tRNA- <i>Bse</i> G I	tRNA	Chloroplast DNA	Chloroplast DNA

## 考察

開発した 24 の染色体 DNA 由来 CAPS マーカーのうち、13 マーカーが、後代の分離比から、disomic 遺伝子座に特異的である (AB,nn,nn,nn) か、tetrasomic 遺伝子座のうちの二つを増幅している (ABnn,nn<sub>(,)</sub>nn) か、octosomic 遺伝子座のうちの二つを増幅している (ABnnnnnnn) ことが明らかとなった。分離比に基づいてこれらの可能性を正確に識別するためには、最低でも 1000 個体の自殖集団が必要である。

しかし、APX-Mlu I と PYDA-Hae III の 2 マーカーについては、後代で 3 複対立遺伝子を同時に検出する個体が全く見られなかったことから、disomic 遺伝子座特異的、つまり二倍体ゲノム特異的マーカーであることが明らかとなった。これまでに *F. × ananassa* の遺伝解析で disomic 遺伝を観察できたのは 1:2:1 に分離したホスホグルコイソメラーゼアイソザイムの一例だけであったが、本研究により、更に二つの遺伝子座で disomic 遺伝を観察することができた。これにより、*F. × ananassa* を構成するゲノムのうち少なくとも 1 つは二倍体であり、したがって *F. × ananassa* が同質八倍体ではないことが確実となった。また、「クラスター特異的 PCR」が「ゲノム特異的マーカー」の作成に有効であり、クラスター分析により分類された各クラスターが、ゲノム構成を反映する傾向にあるという仮説が正しいことが証明された。ただし厳密には、クラスターは、特に相同性の高い染色体群を反映しているに過ぎず、これらの染色体群が必ずしも独立ゲノムとは限らないことを留意せねばならない。

八倍体野生種である *F. virginiana* では、開発された SSR の一部が disomic 遺伝を示したという報告が既にある (Ashley et al., 2003)。しかし *F. × ananassa* で disomic 遺伝する DNA マーカーの報告は初めてであり、しかも計画的方法に基づいて開発されたものは、*Fragaria* 属全体でも例がない。*F. × ananassa* で SSR マーカーを開発すると、通常、非特異的増幅により 3 つ以上のピークが検出されることが知られている (Nourse et al., 2002; Shimomura et al., 2006)。偶然にゲノム特異的な SSR が得られる確率は非常に低く、94 個の SSR マーカー

を開発して、二倍体的なものはゼロであったとの報告もある（田崎ら、口頭発表、2007）。このことから、計画的なゲノム特異的マーカー作出の意義は大きい。

残りの 11 マーカーについては、1) 検定した全自殖系統親で、2 本の対立遺伝子のみを増幅していたこと、2)  $\chi^2$  検定で disomic な遺伝様式に最も適合する傾向にあったこと、3) polysomic 遺伝を示唆する Null の個体が全く見られなかったこと、4) 自殖後代のヘテロ接合体に多様性が見られなかったこと、5) A×H（ホモ接合体×ヘテロ接合体）の後代で B タイプを示す個体が全くなかったこと（5 マーカー）などの事実から総合的に判断すると、これらが disomic 遺伝子座に特異的である可能性が最も高いと考えられた。ただし、3) および 4) は手法の確実性が証明できておらず、1)、2)、5) は polysomic 遺伝の可能性を否定しきれないため、断定することはできない。しかし少なくとも、検定した全マーカー／全集団において、上記の 5 つの観点から polysomic 遺伝を示唆するものは全く見られなかった。

Table 8 で各 CAPS マーカーが増幅対象とする座について、整理した。各増幅座について遺伝特性をまとめると、APX、APX3、APX4、CHI、F3H3、CTI1、MSR、AUB、PGPB、OLP、PYDA、PYDB の 12 増幅座は、後代への遺伝様式から二倍体ゲノムに特異的に座乗している可能性が最も高いと考えられた。また PGPA 増幅座は、PGPA-Acc I(N)の分離比から、余分な対立遺伝子を増幅しているため「特異的」ではないが、基本的には二倍体ゲノムに座乗していると思われた。F3H2、DFR、APX2 の 3 増幅座は、マーカーが 3 : 1 に分離したことから、座乗するゲノムの遺伝様式は分からなかった。

総合すると、染色体 DNA に由来する 19 の増幅座のうち 16 増幅座の遺伝様式を観察し、13 が disomic 遺伝に最も適合していると思われた。これらの増幅座が polysomic 遺伝をする可能性を完全に否定できたわけではないが、少なくとも 50 近くの全検定において、polysomic 遺伝を示唆する現象は全く見られなかったことから、*F. × ananassa* は高度に複二倍体化していると考えられる。ゲノム構成が AAA'A'BBBB（部分四倍体）か AAA'A'BBB'B'（完全複二倍体）のいずれかであると仮定するならば、本研究は AAA'A'BBB'B'説を支持す



る。

しかし、倍数体は、両者の中間的性質を取ることもある。倍数体は進化の過程で複二倍体化すると言われており、その途上にある植物種では、染色体の選択的対合や遺伝子制御により特定の相同染色体との二価対合が促進される (Sybenga, 1973; Avraham et al., 2002)。そのため、主に *disomic* な遺伝様式に従うが、低い確率で他の相同染色体とも対合すると考えられる。複二倍体化の途上にあるのか、完全に複二倍体化しているのかの判断は非常に難しい。したがって、*F. × ananassa* が高度に複二倍体化しているとは言っても、完全複二倍体であるのか、それとも進化の途上にあり、ごく稀に *polysomic* な対合を起こすのかは不明である。

*F. × ananassa* が完全複二倍体であれば、イチゴのゲノム研究者にとって大きな励みとなる。完全複二倍体であれば基本的に従来法で連鎖地図が描けることを意味し、また様々な遺伝様式を考慮して幾通りもの解釈をする必要がなくなる。ゲノム研究者のみならず育種研究者にとっても、*F. × ananassa* の遺伝様式が未知であることは大きな障害であり、単純な遺伝モデルに従った育種計画を躊躇せざるを得ない現状がある (Folta et al., 2006)。しかし、確固とした論拠に基づいてゲノム構成が明らかにされるのは、もう少し先のことになるであろう。

本研究で開発したゲノム特異的マーカーは、その共優性的な性質から、従来の優性 DNA マーカーにはなかった観点からの解析が可能であった。今後一層の技術改善が必要ではあるが、ヘテロ接合体の出現頻度、ヘテロ接合体の多様性、および複対立遺伝子の関係を検証する上で、本マーカーは有用なツールとなり得るであろう。

## 第2章 第4節 ゲノム特異的 DNA マーカーを利用した *Fragaria* 属野生種の分析

*F. × ananassa* は八倍体であるため、連鎖地図で作成される連鎖群の数が多く、また遺伝様式も確定していないため、解析に大きな困難を伴う。このため *Fragaria* 属のゲノム研究では、モデルとして二倍体野生種を用いることが主流となっており、Sargent ら (2006) によって、*F. vesca* × *F. nubicola* 種間交雑を用いた SSR マーカーによる完成度の高い連鎖地図が発表されている。モデルの決定で重要なのは、*F. × ananassa* の構成ゲノムにより近い種を選択することであり、祖先となる二倍体種の特特定が強く望まれている。

*F. × ananassa* は、2 種の八倍体野生種の種間交雑 (*F. virginiana* × *F. chiloensis*) から生じた種であり、八倍体野生種は二倍体野生種が種間交雑や染色体倍加を重ねて生じたとされている (Senanayake et al., 1967)。昨今、分子的手法により多様な *Fragaria* 属野生種の分類が行われており、*F. × ananassa* の祖先種についてもいくつかの知見が得られている。Harrison ら (1997) は葉緑体 DNA の RFLP 解析により、*F. virginiana* と *F. chiloensis* が共通の八倍体野生種から派生したと推測した。また Potter (2000) は、葉緑体ゲノムの *trnL-trnF* 領域および rDNA のスペーサー領域の塩基配列に基づくクラスター分析から、*F. vesca* (2×)、*F. nubicola* (2×)、*F. orientalis* (4×)、*F. moschata* (6×)、*F. virginiana* (8×)、*F. chiloensis* (8×) が近縁であり、*F. nipponica* (2×)、*F. gracilis* (2×)、*F. pentaphylla* (2×)、*F. daltoniana* (2×)、*F. nilgerrensis* (2×) が別の群を形成し、*F. iinumae* (2×) は全野生種と共通性を持つと報告した。これにより、*F. vesca* および *F. nubicola* (2×) が倍数体の有力な祖先種候補であり、*F. iinumae* (2×) も祖先である可能性が示された。一方、*F. × ananassa* 由来の SSR マーカーの互換性は *F. vesca* が 98.4% と最も高いことが報告され (次いで *F. nubicola*、*F. iinumae* が 93.8%、*F. vilidis* の 73.4% が最低) (Davis et al., 2006)、やはり *F. vesca* が祖先種であることを示唆した。

しかし、*F. vesca* が第一の祖先種候補であることは疑いないが、第二候補である *F. nubicola* や *F. iinumae* の位置づけは難しい。*F. ×*

*ananassa* のゲノム構造が AAA'A'BBB'B'であり、A ゲノムが *F. vesca* と共通と仮定すると、*F. nubicola* や *F. iinumae* のゲノムは A ゲノムの第 2 候補であるのか、それとも A' (または B、B') ゲノムと近縁であるのか判断できない。また、A'ゲノムは A ゲノムと類似性が高いとされているが、やはり *F. vesca* が祖先種であるのか、それとも別の種とより近縁であるのかも判断が難しい。これは、種の近縁度を、構成ゲノムを区別することなく総合的に算出せざるを得ないためである。しかし、より詳細に構成ゲノムの祖先種・近縁種を特定するためには、ゲノムごとに野生種との近縁度を算出するのが最良であり、ゲノム特異的マーカーはこの重要なツールとなることが期待できる。第 3 節で開発した大部分のマーカーは二倍体ゲノム特異的マーカーであると考えられたが、四倍体ゲノムの一部を増幅している可能性も完全には否定できなかった。しかしいずれの場合でも、単一ゲノムに特異的な配列を検出している点では共通しており、ゲノムごとの近縁種探索にはある程度有効であると考えられた。本節では、開発したゲノム特異的プライマーペアによる野生種での PCR 増幅の有無により、*F. × ananassa* の各構成ゲノムと共通性の高い野生種ゲノムの探索を試みた (Figure 8)。

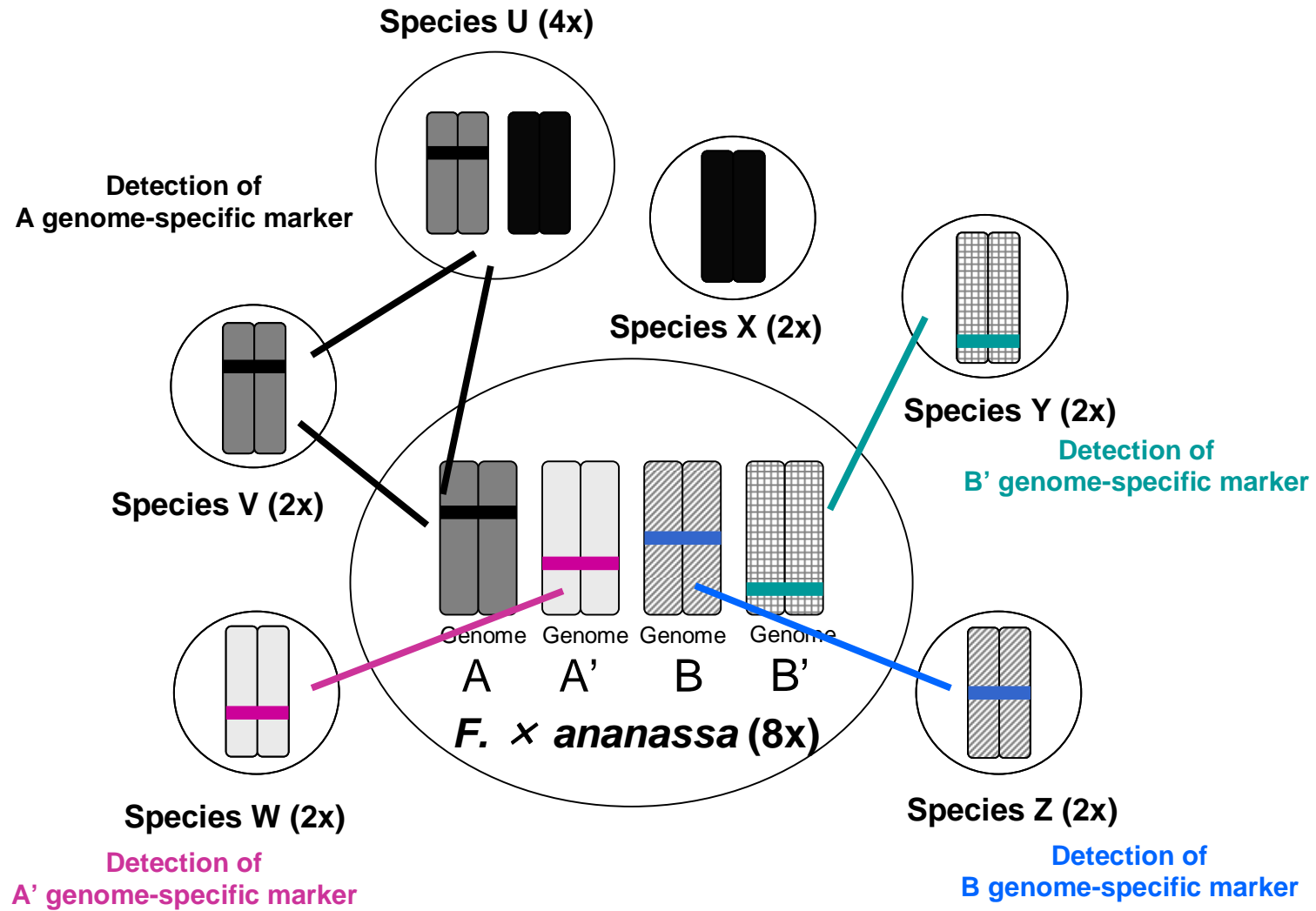


Figure 8. Search for ancestral species of *F. × ananassa* with genome-specific markers.

## 材料及び方法

### 1. 植物材料および使用したプライマー

解析に使用した *Fragaria* 種は、*F. × ananassa* を含めて 13 種である (Table 9)。可能な限り、同一種について複数の系統を供試した。抽出した DNA を鋳型として、染色体 DNA 由来のゲノム特異的プライマーペア 15 組（うち 3 組は後代で分離比検定を行っていないが、電気泳動像からゲノム特異的であると判断した）、およびゲノム非特異的プライマーペア 4 組を用い、計 19 の増幅座 (Table 10) について、野生種で増幅の有無を観察した。ただし、各ゲノム特異的プライマーが、AA'BB'ゲノムのいずれに特異的であるかは不明である。

### 2. DNA 抽出および PCR 増幅

本章第 1 節の「材料及び方法－5. CAPS 分析法」に従った。

## 結果

*F. × ananassa* ゲノム特異的および非特異的プライマーペアによる、*Fragaria* 種での増幅の例を Figure 9 に示した。*F. × ananassa* をはじめ、*F. virginiana* と *F. chiloensis* の八倍体種では全てのプライマーペアが目的サイズのバンドを明瞭に増幅した。しかし、六倍体、四倍体および二倍体ではプライマーペアによって増幅の様子が異なり、特異性に違いが見られた。そこでこれらを、特異性の高さに基づいて 1) 高特異性－CHI、F3H3、MSR のように *F. × ananassa* および一部の野生種でのみ明瞭な増幅を示すもの、2) 低特異性－DFR のように大部分の野生種で増幅を示すもの、3) 非特異性－APX2 のように全ての *Fragaria* 種で増幅を示すものの 3 つに分類した。

全てのプライマーペアの分析結果を Table 10 にまとめた。15 のゲノム特異的プライマーのうち、12 は高特異性を示した。このうち、F3H3、MSR の 2 つは、八倍体種以外に *F. moschata*(6×)、*F. vesca*(2×)、*F. nubicola*(2×) で明瞭な増幅を示した。残る 3 つの特異的プライマーは、2 つが低特異性、1 つが非特異性を示した。*F. × ananassa* におい

てゲノムを特異的に増幅していたプライマーが、野生種で特異性を低下させた原因は、次の 2 つが考えられる。ひとつは、プライマーの選択性の低さである。*F. × ananassa* では複数の同祖遺伝子が増幅の競合を起こした結果、プライマー配列が一致する同祖遺伝子だけが選択的に増幅された。しかし野生種では、プライマー配列に一致する同祖遺伝子が存在しない場合、プライマーの選択性が弱ければ、多少配列が異なるものでも増幅してしまうのであろう。もうひとつ考えられるのは、特異性が低下したのではなく、供試した野生種が真にプライマーと同じ特異的配列を保有している場合である。八倍体の祖先種の大部分が既に絶滅しており、供試した野生種は全て単一ゲノムの近縁種であった場合、こういったことも起こり得るだろう。4 つのゲノム非特異的プライマーは全て低特異性、または非特異性を示した。DFR および PGPA プライマーからは、予想と異なるサイズのバンドが多く種の増幅された。そこで、各プライマーによる増幅の有無を基本データとして、増幅バンドのサイズも考慮して *Fragaria* 種の近縁関係の考察を行った。

Table 9. Materials used for genome analyses using genome-specific primers developed in *F. ×ananassa*.

Species	Ploidy level	Origin	Source	Accession No.
<i>F. × ananassa</i>	8	Japan	AFFRC	Toyonoka
<i>F. × ananassa</i>	8	Japan	AFFRC	Tochiotome
<i>F. × ananassa</i>	8	Japan	AFFRC	Benihoppe
<i>F. × ananassa</i>	8	Italy	AFFRC	Cesena
<i>F. virginiana</i> subsp. <i>patypetala</i>	8	U.S.	NCGR	CFRA 176
<i>F. virginiana</i> subsp. <i>glauca</i>	8	U.S.	NCGR	CFRA 436
<i>F. chiloensis</i>	8	-	Shizuoka, Japan	-
<i>F. chiloensis</i>	8	-	Tochigi, Japan	-
<i>F. chiloensis</i> subsp. <i>c. forma. c.</i>	8	Chile	NCGR	CFRA 1484
<i>F. moschata</i>	6	Russia	NCGR	CFRA 541
<i>F. moschata</i>	6	-	EMR	-
<i>F. olientalis</i>	4	China	NCGR	CFRA 1612
<i>F. nipponica</i>	2	-	Tochigi, Japan	-
<i>F. nipponica</i>	2	Japan	IPK	98134-09.K
<i>F. nipponica</i>	2	Japan	AFFRC	-
<i>F. pentaphylla</i>	2	China	NCGR	CFRA 1198
<i>F. pentaphylla</i>	2	China	IPK	94059-01.P
<i>F. pentaphylla</i>	2	China	IPK	99116-02.K
<i>F. vilidis</i>	2	Germany	IPK	92046-01.P
<i>F. vilidis</i>	2	China	IPK	96148-01.P
<i>F. nubicola</i>	2	Pakistan	IPK	94056-33.K
<i>F. vesca</i>	2	-	Shizuoka, Japan	-
<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	2	Japan	AFFRC	-
<i>F. vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	2	Probably U.K.	EMR	FDP805
<i>F. vesca</i>	2	-	EMR	FDP815
<i>F. daltoniana</i>	2	-	EMR	FDP001
<i>F. iinumae</i>	2	Japan	NCGR	CFRA1008
<i>F. iinumae</i>	2	Japan	AFFRC	-
<i>F. nilgerensis</i>	2	Yunnan, China	IPK	94056-12.K
<i>F. nilgerensis</i>	2	Hubei, China	NCGR	CFRA1610

EMR: East Malling Research, UK

AFFRC: National Institute for Vegetable Research, Japan

IPK: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Fruit Gene-Bank, Dresden-Pillnita, Germany

NCGR: National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, USA

-: unknown

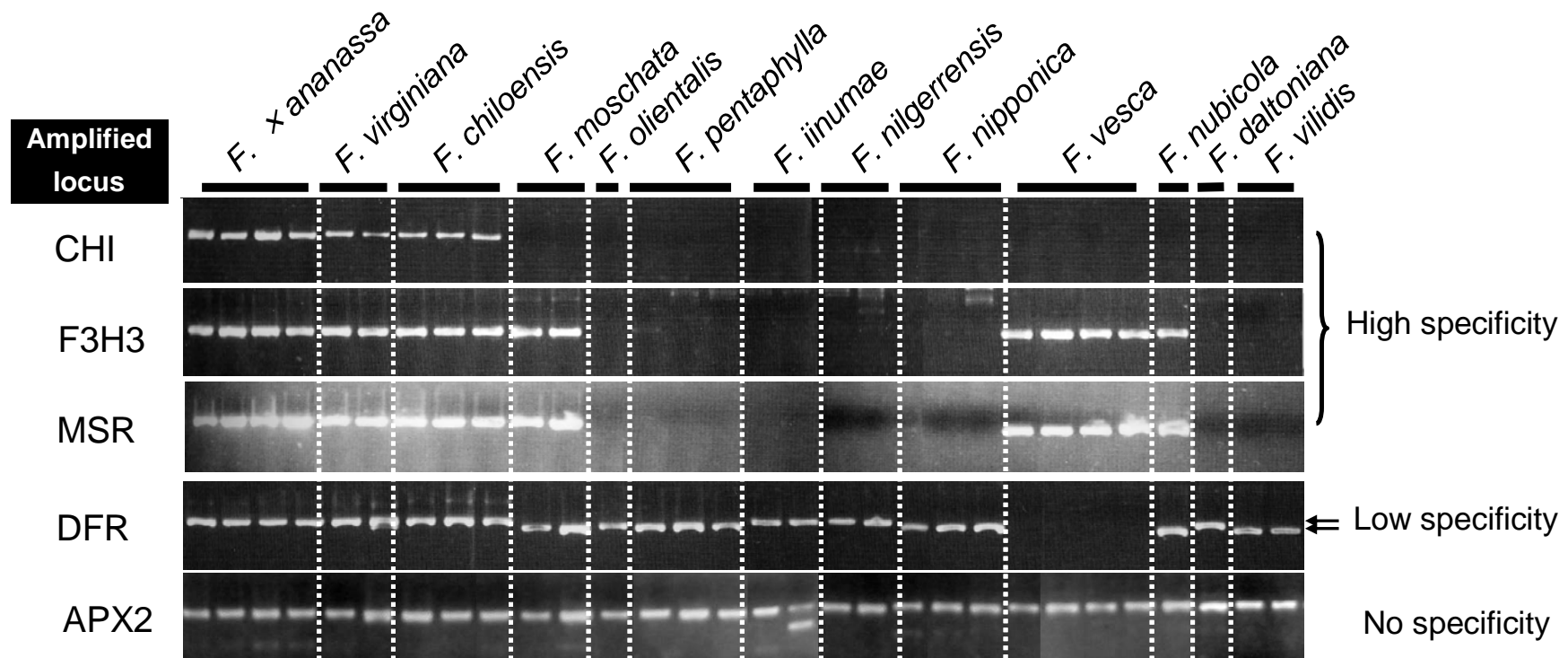


Figure 9. Amplification of locus with genome-specific primers in *Fragaria* species. Arrows show the fragments of two size amplified from DFR locus.



Table 10. Result of genome-specific amplification in *Fragaria* species. ○ shows the amplification of intense band of expected size, △ shows the amplification of weak band of expected size, ● shows the amplification of intense band of unexpected size.

Species ( ): number of tested sample	Ploidy level	Amplified locus																		
		High specificity											Low specificity				No specificity			
		F3H3	MSR	APX	APX4	F3H	PYDB	PGPB	CHI	OLP	CTH1	CTH2	CYT	DFR	F3H2	APX3	AUB	PGPA	APX2	PYDA
		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	M	M	S	S	M	M	S
<i>F. × ananassa</i> (4)	8×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>F. virginiana</i> (2)	8×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>F. chiloensis</i> (3)	8×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
<i>F. moschata</i> (2)	6×	○	○											●	△	○	△	○	○	○
<i>F. orientalis</i> (1)	4×													●		○	△	●	○	○
<i>F. nipponica</i> (3)	2×													●		○	△	●	○	○
<i>F. pentaphylla</i> (3)	2×													●		○	△	●	○	○
<i>F. vilidis</i> (2)	2×													●	△	△	△	○	○	○
<i>F. nubicola</i> (1)	2×	○	○											●	△	△	△	○	○	○
<i>F. vesca</i> (4)	2×	○	○													△		○	○	○
<i>F. daltoniana</i> (1)	2×													○			△	○	○	○
<i>F. iinumae</i> (2)	2×													○	△		△	○	○	○
<i>F. nilgerensis</i> (2)	2×													○	△			●	○	○

S: Single locus in *F. × ananassa*. M: Multilocus in *F. × ananassa*.

## 考察

*Fragaria* 種の DNA マーカー開発はここ 2,3 年で大きく進歩している。公開 Database で検索可能な *Fragaria* 種の遺伝子配列は、2004 年時点でわずか 58 であったが、2007 年現在では、2 万近くの EST 情報が公開されている。このうち SSR を含むものは約 4 千あり、*Fragaria* 種間や Rosaceae 属間での互換性検定も多く行われている (Sargent et al., 2004b; Davis et al., 2006; Lewers et al., 2005; Gil-Ariza et al., 2006; Hadonou et al., 2004; Gil-Ariza et al., 2006)。しかし、*F. × ananassa* に由来する SSR の種間での互換率は 73.4(*F. vilidis*)-98.5(*F. vesca*)% と比較的高く、直接的な祖先種探索には適していなかった。一方、本研究で開発した改良型 CAPS マーカーの互換性は予想通り低く、26.3(*F. daltoniana*)-47.4(*F. moschata*/ *F. nubicola*)% であった。

*F. virginiana* および *F. chiloensis* では、供試した全プライマーペアで *F. × ananassa* と同サイズの増幅産物が得られたことから、*F. × ananassa* と等しいゲノム構成を持っていると考えられた。この結果は、これら 2 つの八倍体野生種の交雑が *F. × ananassa* の起源であるという定説を裏付けている (Figure 10)。

八倍体ゲノムの祖先種 (ゲノムドナー) の推定には、基本的に高特異性の 12 プライマーペアでの分析結果を用いた。このうち F3H3 と MSR の 2 つが *F. vesca*、*F. nubicola* および *F. moschata* で特異的増幅を示したため、これらの種が *F. × ananassa* と等価のゲノムを持つことが示唆された。過去の知見を踏まえると、*F. vesca* が *F. × ananassa* のゲノムドナーであると推定できた (Figure 10)。Senanayake ら (1967) は、AA'BB'ゲノムのうち、A ゲノムを *F. vesca* のものと仮定している。本分析で新たに得た知見は、1) Potter (2000) のデータと反して *F. orientalis* は A ゲノムを保有していないであろうこと、2) *F. nubicola* は A ゲノム特異的プライマーペアでのみ検出されることから、*F. vesca* の次に A ゲノムに近縁なのであって、A'BB'ゲノムのドナーである可能性は低いこと、の 2 点である。残り 10 プライマーペアでは、供試したいずれの野生種でも増幅は見られなかったことから、ターゲットゲノムを共有する野生種は供試した以外にあるか、

既に絶滅したか、またはターゲットゲノム自体が八倍体中で進化（分化）したものであるため、そもそも直接的な二倍体ドナーが存在し得ないと考えられた。

高特異性のマーカーはゲノムドナーの推定には有用であるが、特異性が高すぎるため、等価ゲノムのみを検出し、近縁関係にあるゲノムは全く検出できない。このため、A ゲノム以外のゲノムについては、ゲノムドナーとなる種が供試材料中にないことは明らかになったが、近縁ゲノムの推定も不可能であった。そこで、近縁ゲノムの推定には低特異性のプライマーペアのデータを用いた。非特異的プライマーによる DFR は、*F. vesca* でのみ増幅が見られなかった。*F. vesca* ゲノムは A ゲノムと等価であると考えられるため、DFR は A ゲノム以外の 3 ゲノムを特異的に増幅しており、A'、B または B' ゲノムの近縁種の推定に使用できると考えられた。*F. daltoniana*、*F. iinumae*、*F. nilgerrensis* の DFR 増幅産物のサイズが *F. × ananassa* のものと等しかったことから、これらが第 2 のゲノムの近縁種である可能性が示唆された。

A ゲノム以外のゲノム近縁種の推定は、今後の大きな課題である。A'ゲノムは *F. vesca* と近縁であるとする説が有力であるが、これを立証するためにも、ゲノム別の近縁解析を更に進める必要がある。しかしゲノム特異的マーカーを用いる本法は、数塩基の特異的配列を有するか否かで結果が大きく変動し、多様に分化していると考えられる近縁種の推定には限界がある。今後はマーカー増幅の有無によるのではなく、特定の遺伝子について、八倍体に含まれる 3～4 種の同祖遺伝子配列を決定し、それぞれについて野生種の配列と直接比較することで、各ゲノムに最も近縁な種を決定するのが効果的と思われる。

最近では、新しいイチゴ育種法として、野生種からの有用形質導入を目的とした種間雑種の作成が報告されている。Mochizuki ら（2002）は、栽培イチゴ（8×）と野生種（2×）を交雑し、倍加することにより十倍体イチゴを作出している。しかし作成した十倍体の稔性は交配に用いた野生種によって左右され、例えば *F. vesca* との種間雑種では花粉稔性が非常に低いことが知られている（森下ら、

1996)。これは、交配した野生種ゲノムと *F. × ananassa* ゲノムとの相同性によって染色体対合に攪乱が生じているためと思われる。構成ゲノムの由来する祖先種の特定は、今後の種間交雑育種を理論的にサポートする上でも重要な知見となることが予想される。

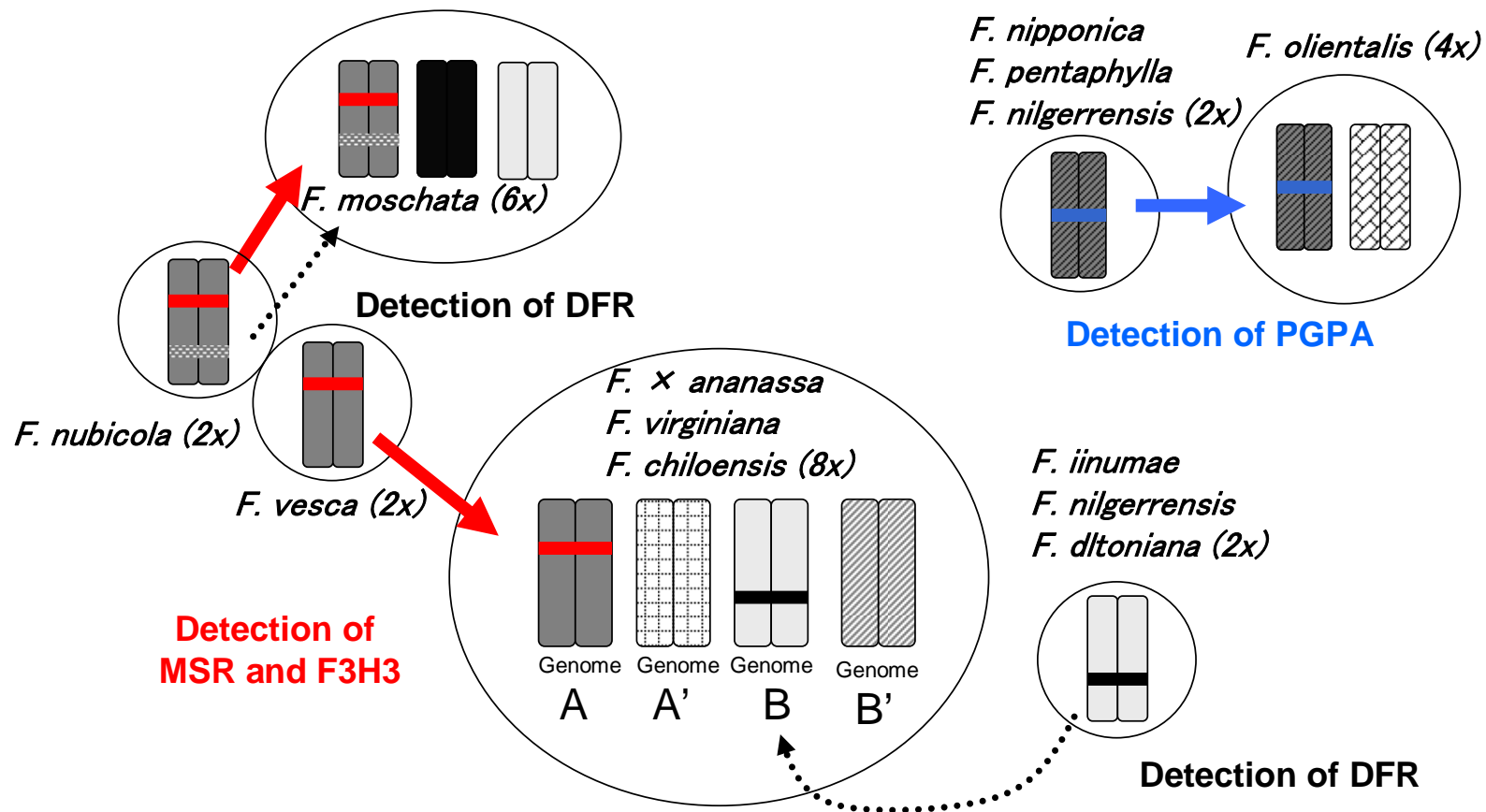


Figure 10. Assumption of genome flow among *Fragaria* species. Arrows with full line present the flow of common genome, and ones with dotted line do of related genome.

### 第 3 章      DNA マーカーを利用したイチゴの品種識別技術の開発

## 緒言

栽培イチゴ(*Fragaria* × *ananassa*)は収益性が高く、国内でも重要作目のひとつである。1990 年代中頃にはイチゴといえば、市場は「とよのか」と「女峰」の 2 大品種で占められていた。しかし近年、消費者の嗜好が多様化するにしたがって新品種の育成が相次ぎ、普及も進んでいる。「さちのか」、「とちおとめ」、「章姫」、「さがほのか」、「あまおう」が最近の人気品種であるが、これらはいずれも育成者の権利保護のために品種登録されている。登録品種は種苗法上、育成者の許諾がなければ販売用に苗を増殖することはできず、許諾のない苗から果実を栽培・出荷することもできない。また、UPOV 条約（植物の新品種の保護に関する国際条約）により品種保護が成されていない海外へ苗を出荷する際、およびその収穫物を日本に輸入する際には再度許諾が必要である。

ところが 2001 年、野菜茶業研究所で育成された「さちのか」の果実が韓国から日本国内に流入し、販売されているという情報が寄せられた。当時韓国ではイチゴは品種保護の対象ではなく、かつ許諾契約もなかったため、この情報が事実とすれば、無断で「さちのか」の苗が持ち出された上、その収穫物が日本に出荷されたものと考えられ、種苗法に違反する。しかし当時は、侵害事実を立証する検査技術がなく、侵害は「推測」の域を出ることはなかった。同様の事例は栃木県農業試験場が育成した「とちおとめ」に関しても懸念されており、輸入イチゴの育成者権侵害対策が急務となった。そこで、育成者権侵害農産物の輸入に対処するため、法律の整備と併せて、侵害事実を立証する検査技術の開発が求められた。

こういった背景から、我々は DNA 多型を用いたイチゴ品種識別技術の開発に着手した。DNA 多型による品種識別のメリットは、栽培試験により植物形質を比較する従来法と比較して迅速かつ正確で、短時間で結果が得られること、また市場に流通している果実やわずかな切片からでも識別が可能なことである。イネでは既に品種識別技術が確立されている（Ohtsubo et al., 2002）。

第 3 章では、国内育成のイチゴ品種を簡易かつ安定に識別できる信頼性の高い普及技術の開発についてまとめた。第 1 節では、前章

で開発した CAPS マーカーを用いて、可能な限りの国内流通品種の多型タイピングおよび識別を試みた。第 2 節では、品種検出技術の再現性を保証するため、AOAC(Association of Official Agricultural Chemists) International の指定する定性分析法の妥当性確認試験基準を参考に、研究室間共同試験を設計・実施し、本技術の感度・特異性を明示した。第 3 節では、科学的に信頼性ある品種識別技術とするために、品種同定理論に基づいて、偶然に全ての DNA 多型が一致する品種が別に存在する可能性、つまり誤判定の危険性を算出した。第 4 節では、韓国からの輸入イチゴの分析実例を記した。



### 第 3 章 第 1 節 DNA マーカーによるイチゴの品種識別

研究に着手した時点で、DNA マーカーを利用したイチゴの品種識別に関してはいくつかの報告があった。Degani ら（1998）は 10 の RAPD マーカーを用いて 41 品種を識別し、イタリアでは RAPD 法を用いた DNA 品種識別法が、品種「マルモラーダ」の育成者権侵害裁判において侵害事実立証の一助として用いられた（Congiu et al., 2000）。その後、AFLP マーカーや ISSR マーカーによる品種識別法も報告されたが（Tyrka et al., 2002; Arnau et al., 2003）、日本国内で育成された品種の識別に関する研究は成されていなかった。また RAPD、AFLP、ISSR のいずれの手法も、多型検出力は格段に優れ、開発も容易であるが、再現性がやや劣る・操作が煩雑である・高度な分析技術を要するなどの欠点もあり、各地に散在する税関検査所や育種現場での普及を目的とした簡易・簡便な技術開発には適さないと考えられた。そこで我々は、多型検出効率・開発労力面からはやや劣るが、簡易な分析機器と分析手順で、安定した結果が得られる CAPS 法を利用してイチゴの DNA 品種識別を試みた。

## 材料及び方法

### 1. 植物材料

品種登録されているものを主体として、公立農業研究機関や品種育成者から可能な限りのイチゴ品種の葉を収集した。このうち、複数機関から入手できて多型の整合性が確認できる品種、または育成者本人から入手した品種（Table 11 に示した 125 品種）のみを分析に用いた。

### 2. CAPS 分析法

各品種から抽出した DNA をもとに、Table 2 の改良前の 21 マーカーおよび Table 3 の改良型 25 マーカーで多型タイピングを行った。

本章では、PCR に使用するポリメラーゼの種類および添付バッファーのみ、第 2 章と変更した。PCR 溶液組成は、抽出 DNA10 倍希釈

液 2  $\mu$ L、AmpliTaQ Gold (Applied Biosystems) 1U、添付 dNTPs 2  $\mu$ L、添付バッファー 2  $\mu$ L、プライマー各 20 pmol を蒸留水で 20  $\mu$ L に調整したものとした。PCR プログラムは、94°C 10 分、(94°C 30 秒・55°C 30 秒・72°C 30 秒)  $\times$  35 サイクル、72°C 7 分とした。制限酵素処理方法は第 2 章第 1 節の方法に従った。

## 結果

改良前の 21 マーカーで品種の多型タイピングを行ったところ、Figure 2 で観察されたように、検出される多型バンドが不明瞭で判定に躊躇する品種が多々見られた。特に PCR 産物の増幅量が十分でない場合には、検出するべき多型バンドが視覚的にほとんど見えないことから誤判定を招く傾向にあり、再試が必須であった。そこで改良型の 25 マーカーを用いてタイピングを行ったところ、Figure 6 で観察されたように明瞭な多型が検出でき、さらに改良前のマーカーでは識別不可能であったホモ接合体とヘテロ接合体が識別可能となったことで、マーカーあたりの識別の効率が大きく向上した。例を挙げると、APX-*Mlu* I (Figure 6-B) では、改良前には 4 つのタイプしか検出できなかったが、改良によって 6 つのタイプが検出可能となった。

改良型マーカーにより決定した 125 品種の多型タイプを Table 12 に示した。突然変異や蒔培養により育成された「アンテール」「新女峰」「ぴいひゃらどんどん」は親である「女峰」と全く同一の多型タイプを示したため互いに識別できず、同様に「ひまつり」は「とよのか」と、「アキタベリー」は「盛岡 16 号」と識別不可能であった。これら 8 品種を除く 117 品種については、多型タイプが完全に一致するものではなく、最低 11 マーカーを用いることにより識別可能であった。F3H および CTI2 の 2 増幅座は、特定の 4~5 品種で増幅が見られなかったため、「N(null)」とタイピングした。これらの品種を識別する場合には、F3H と CTI2 由来の 4 マーカーは有効ではない。

本研究で決定した品種の多型タイプは、今後技術が普及した場合に、分析結果を照会するプロトタイプとなることが予想された。そ

ここで確実を期すため、育成者本人から入手した品種を除いては、同一品種を複数機関から入手して分析結果が一致するか検証した。その結果、多くの機関で品種維持株の他品種との混入が検出された。

Table 11. The strawberry cultivars used in this study, their parents and origins.

Cultivar name	Parents	Origin
Aiberry (アイベリー)	—	Japan
Aiko	CAL 46.5-1 × CAL 59.51-11	USA
Aistro (アイストロ)	[(Rindamore × Cruz) × Nyoho] × Reiko	Japan
Akanekko (あかねっ娘)	[(Aiberry × Hokowase) × Toyonoka] × (Aiberry × Hokowase)	Japan
Akashanomitsuko (あかしやのみつこ)	Aiberry × Nyoho	Japan
Akihime (章姫)	Kunowase × Nyoho	Japan
Akita Berry (アキタベリー)	MS of Morioka 16	Japan
Amaterasu (アマテラス)	Kinuama × Toyonoka	Japan
Anther (アンテール)	MS of Nyoho	Japan
Aroma (アロマ)	—	Japan
Asuka Ruby (アスカルビー)	Asuka Wave × Nyoho	Japan
Asuka Wave (アスカウェイブ)	[Uzushio × {(Kurume Sokusei-3 × Hokowase) × (Donner × Hokowase)}] × [(Kurume Sokusei-3 × Hokowase) × {Donner × (Kobe-1 × Hokowase)}]	Japan
Awanatsuka (あわなつか)	Tokukei 5 × (Sweet Charmy × Ikeko)	Japan
Belle Rouge (ベルルージュ)	(Huxley × Albriton) × Morioka 19	Japan
Beniatago (べにあたご)	Toyonoka × (Nyoho × Shuko)	Japan
Beni hoppe (紅ほっぺ)	Akihime × Sachinoka	Japan
Beniyutaka (べにゆたか)	Toyonoka × Haruyoi	Japan
Berry Star (ベリースター)	Harunoka × Shikinari	Japan
Chizuru (千鶴)	[(Donner-s)-s × (Harunoka-s)-s]-s × Harunoka-s	Japan
Coinche (クワンシエ)	Progeny of Akanekko (Female parent is unpublished)	Japan
Deco Rouge (デコルージュ)	Pajaro × Morioka 26	Japan
Diamond Berry (ダイヤモンドベリー)	Sagahonoka × Kurume 54	Japan
Donner	CAL 145.52 × CAL 222	USA
Echigohime (越後姫)	(Belle Rouge × Nyoho) × Toyonoka	Japan
Elsanta	Gorella × Holiday	Netherlands
Enrai (円雷)	Donner × CN-18	Japan
Ever Berry (エバーベリー)	Oishishikinari 2 × Haruyoi	Japan
Fukuayaka (ふくあや香)	[(Osuzu × Aiberry) × Chandler] × (Akihime × Sachinoka)	Japan
Fukuba (福羽)	Progeny of General Chanzy	Japan
Fukuharuka (ふくはる香)	Akihime × Sachinoka	Japan
Fukuoka S 6 (福岡S 6号)	Kurume 53 × (Kurume 49 × Sachinoka)	Japan
Fukuoka S 7 (福岡S 7号)	Kurume 53 × (Kurume 49 × Sachinoka)	Japan
Fusanoka (ふさの香)	Kiharu × Tochiotome	Japan
Hanagasaotome (花笠おとめ)	Serenata × Aiberry	Japan
Harunoka (はるのか)	Kurume 103 × Donner	Japan
Haruyoi (はるよい)	Hokowase × Harunoka	Japan
Hatsukuni (はつくに)	Uzushio × 47-1-12 (※)	Japan
Himatsuri (ひまつり)	MS of Toyonoka	Japan
Himesodachi (媛育)	—	Japan
Himiko (ひみこ)	Kurume 34 × Hokowase	Japan
Hinomine (ひのみね)	Terunoka × Harunoka	Japan
Hitachi-hime (ひたち姫)	Tochiotome × Akihime	Japan
Hogyoku (芳玉)	Progeny of Fukuba	Japan
Hokowase (宝交早生)	Kogyoku × Tahoe (※)	Japan
Hotta Wonder (堀田ワンダー)	Fukuba × Shikinari	Japan
HS138 (エッチェス138)	(Tribute × Ever Berry) × Morioka 16	Japan

-s: The progeny of self-crossed population.

—: We couldn't investigate.

MS: Mutator strain

※: Not clear which is female or male parent.

(continued)

Cultivar name	Parents	Origin
Iwao 1 (いわお1号)	MS of Aiberry, probably	Japan
Johong (早紅)	—	Korea
Junberry 2 (純ベリー2)	Junberry × Nyoho	Japan
Kanamihime (かなみひめ)	Tochiotome × (Akihime or Tochiotome)	Japan
Keiki wase (けいきわせ)	Asuka Wave × Akihime	Japan
Kentaro (けんたろう)	Kita-ekubo × Toyonoka	Japan
Kita-ekubo (きたえくぼ)	(Aiko × Morioka 19) × Reiko	Japan
Kitanokagayaki (北の輝)	Belle Rouge × Pajaro	Japan
Kiyoka (清香)	(Progeny of Akashanomi haru) × (MS of Akashanomitsuko)	Japan
Kofuku (紅福)	—	Japan
Kogyoku (幸玉)	Progeny of Fairfax	Japan
Koju (紅寿)	Shuka × Reiko	Japan
Kumaken-I-548' (熊研い548)	(Sachinoka × Tochinomine) × (Kurume 54 × Tochinomine)	Japan
Kunowase (久能早生)	(Hokowase × Kurume 103) × Reiko (※)	Japan
Kurume IH-1 (久留米IH1号)	Toyonoka × <i>F. nilgerrensis</i> (var. Yunnan), followed by diploidization	Japan
Kurume IH-4 (久留米IH4号)	Strawberry parental Line Nou - 1 × Red Ruby	Japan
Kurume 49 (久留米49号)	Toyonoka × Nyoho	Japan
Kurume 56 (久留米56号)	Sachinoka × (Hokowase × Meiho)	Japan
Kurume 57 (久留米57号)	Sachinoka × (Douglas × Toyonoka)	Japan
Kurume 103 (久留米103号)	(Miyazaki × The Sun) × Fukuba	Japan
Kyoko (京虹)	Tochiotome × (Shizutakara × Nyoho)	Japan
Maehyang (莓香)	Tochinomine × Akihime	Korea
Malach	Dorit × Chandler	Israel
Megumi (めぐみ)	(Toyonoka × Aiberry) × Toyonoka	Japan
Meiho (明宝)	Harunoka × Hokowase (※)	Japan
Minomusume (美濃娘)	(Nyoho × Hokowase) × (Toyonoka × Nou-Hime)	Japan
Miranche (ミランシェ)	Progeny of Akanekko (Female parent is unpublished)	Japan
Miyoshi (みよし)	Himesodachi × Oishishikinari 2	Japan
Morioka 16 (盛岡16号)	(Fairfax × Etters burg) × Chiyoda	Japan
Nou-Hime (濃姫)	Aiberry × Nyoho	Japan
Nyoho (女峰)	[Donner × (Harunoka × Donner)] × Reiko	Japan
Oishishikinari 2 (大石四季成2号)	InstituteX2 × Oishishikinari 1	Japan
Osuzu (大鈴)	[(Donner-s)-s × (Harunoka-s)-s]-s × Harunoka-s	Japan
Otomegokoro (おとめ心)	Sakuyu S 2 × Kitanokagayaki	Japan
Ouko (王香)	—	Japan
Ozcharuka (尾瀬はるか)	Tonehoppe × Kitanokagayaki	Japan
Pajaro	Sequoia × CAL 63.7-101	USA
Pechika (ペチカ)	Oishishikinari 2 × Summer Berry	Japan
Pihyaradondon (びいひやらどんどん)	MS of Nyoho	Japan
Pistro (ピーストロ)	(Akanekko × Aiberry) × (Rindamore × Toyonoka)	Japan
Redpearl (レッドパール)	Aiberry × Toyonoka	Japan
Reiko (麗紅)	Harunoka-s × Fukuba-s	Japan
Rindamore (リンダモール)	Aiberry × Hokowase	Japan
Rouge TM (ルージュターエム)	(Progeny of Pajaro) × Shizuoka 4	Japan
Sachinoka (さちのか)	Toyonoka × Aiberry	Japan
Sagahonoka (さがほのか)	Osuzu × Toyonoka	Japan

-s: The progeny of self-crossed population.

—: We couldn't investigate.

MS: Mutator strain

※: Not clear which is female or male parent.

(continued)

Cultivar name	Parents	Origin
Sanchiigo (サンチーゴ)	(Aiberry × Hokowase)-s × Toyonoka-s	Japan
Sanrei (讃麗)	—	Japan
Sanukihime (さぬき姫)	(Sachinoka × Tochiotome) × Sagahonoka	Japan
Satohoro (サトホロ)	Tioga × Fairfax	Japan
Satsumaotome (さつまおとめ)	8821-11 × Sachinoka	Japan
Sawaberry (サワベリー)	Himiko × Nyoho	Japan
Sequoia	CAL 52.16-15 × CAL 51.51-1	USA
Serenata	No. 82/12-10 × Pink Panda ( <i>Fragaria</i> × <i>Potentilla</i> )	UK
Shinnyoho (新女峰)	MS of Nyoho	Japan
Shizuchikara (しずちから)	Shizutakara × Hokowase	Japan
Shizunoka (しずのか)	(Kurume 103 × Hokowase) × Hokowase	Japan
Shizutakara (しずたから)	(Kurume 103 × Hokowase) × Hokowase	Japan
Strawberry Parental Line Nou - 1 (いちご中間母本農1号)	[(Aiberry-s)-s]-s × [(Toyonoka-s)-s]-s	Japan
Strawberry Parental Line Nou - 2 (いちご中間母本農2号)	(Florida693 × Hinomine) × Dover	Japan
Summer Berry (サマーベリー)	Kaho × Reiko	Japan
Summer Princess (サマープリンセス)	(Reiko × Kaho) × Nyoho	Japan
Suruga ace (するがエース)	—	Japan
Suruga red (スルガレッド)	Nyoho × Aiberry	Japan
Shuko (しゅうこう)	Shizutakara × Haruyoi	Japan
Shunho (春訪)	Toyonoka × Chizuru	Japan
Tioga	Lassen × CAL 42.8-16	USA
Tochihime (とちひめ)	Tochinomine × Kurume 49	Japan
Tochihitomi (とちひとみ)	(Progeny of Celine) × Sachinoka	Japan
Tochinomine (栃の峰)	(Florida69-266 × Reiko) × Nyoho	Japan
Tochiotome (とちおとめ)	Kurume-49 × Tochinomine	Japan
Tonehoppe (とねほっぺ)	Kei 56 × Nyoho	Japan
Toshihime (としひめ)	Hokowase × Akihime	Japan
Toyonoka (とよのか)	Himiko × Harunoka	Japan
Tsuburoman (つぶろまん)	Donner × Chiyoda	Japan
Vivarosa	Progeny of Frel ( <i>Fragaria</i> × <i>Potentilla</i> ) (Male parent is unpublished)	France
Yayoihime (やよいひめ)	(Tonehoppe × Tochiotome) × Tonehoppe	Japan
Yumeamaka (夢甘香)	[(Hokowase × Reiko) × Meiho] × Aiberry	Japan
Yumenoka (ゆめのか)	Kurume 55 × [(Nyoho × Pistro) × Aistro]	Japan

-s: The progeny of self-crossed population.

—: We couldn't investigate.

MS: Mutator strain

Table 12. Genotype of 125 strawberry cultivars detected by 25 markers. As to each genotype, basically refer to Table 3.

Serial number for markers	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Cultivar	DFR-Hin 6 I	APX-Mlu I	APX2-Dra I	APX3-Dra I(N)	APX4-Taq I(N)	CHI-Pvu II	F3H-Nco I(N)	F3H-Eam 1104 I(N)	F3H2-Hpa II(N)	F3H2-Dde I(N)	F3H3-Acc I(N)	CTT1-Hinf I	MSR-Alu I	PGPA-Acc I(N)	PGPA-Rsa I(N)	PGPB-Rsa I	AUB-Hin 6 I(N)	OLP-Dde I	CTT2-Mbo I(N)	CTT2-Bsh 1236 I(N)	CYT-Bsa B I(N)	rRNA-Bse G I	PYDA-Cfr 13 I	PYDA-Hae III	PYDB-Hae III(N)
Aiberry(アイベリー)	A	BC	A	A	A	H	A	B	X	X	H	A	H	B	X	A	H	H	A	B	H	A	B	B	H
Aiko	A	BB	A	H	A	H	A	B	X	X	B	A	H	B	A	X	H	H	A	B	B	A	B	B	H
Aistro(アイストロ)	X	BB	X	A	H	A	A	B	X	X	H	A	H	B	X	X	H	B	A	B	A	A	B	H	B
Akanekko(あかねっ娘)	A	BC	A	A	A	A	B	A	X	H	A	H	B	X	X	X	H	H	A	B	B	A	H	H	B
Akashanomitsuko(あかしやのみつこ)	A	AB	A	A	H	H	A	B	X	X	H	A	A	B	X	A	B	H	A	B	A	A	B	H	H
Akihime(章姫)	X	BB	X	A	A	H	H	X	X	H	B	A	B	X	X	B	B	A	H	H	A	H	H	A	A
Akita Berry(アキタベリー)	A	AB	A	A	A	H	B	A	X	X	B	A	A	A	X	X	B	H	A	A	B	A	A	A	A
Amaterasu(アマテラス)	X	BC	X	H	A	H	A	H	X	A	B	A	H	B	A	X	H	H	H	H	A	H	A	B	
Anther(アンテール)	X	AB	X	A	H	A	H	H	X	X	A	B	H	H	X	A	B	H	A	H	H	A	B	H	H
Aroma(アロマ)	A	BC	A	B	H	A	H	H	X	X	H	A	A	H	X	X	H	H	A	H	B	A	H	A	H
Asuka Ruby(アスカルビー)	X	AB	X	H	B	A	H	H	X	X	A	A	H	B	X	X	H	H	A	H	H	A	B	H	A
Asuka Wave(アスカウェイブ)	X	AB	X	H	H	A	A	B	A	X	H	A	A	B	A	X	A	A	B	B	X	B	B	H	B
Awanatsuka(あわなつか)	X	AB	A	H	A	B	N	N	X	X	B	A	H	H	X	A	B	H	N	N	B	A	B	B	H
Belle Rouge(ベルルージュ)	A	AB	A	A	A	H	A	B	A	X	B	A	A	A	X	X	B	H	A	B	B	A	A	A	A
Beniatago(べにあたご)	X	BB	X	A	H	A	A	B	A	A	H	A	B	H	A	X	B	H	A	B	B	X	B	B	H
Beni hoppe(紅ほっぺ)	X	BB	X	A	H	B	A	H	A	A	B	A	A	B	X	X	B	H	H	H	B	A	A	A	A
Benivutaka(べにゆたか)	X	AC	A	A	H	A	H	A	A	A	H	A	H	A	A	X	H	H	H	A	H	X	H	H	A
Berry Star(ベリースター)	A	BB	X	A	H	A	A	A	X	A	H	A	A	B	X	X	B	H	B	A	H	X	H	A	B
Chizuru(千鶴)	X	BC	X	A	H	A	H	A	X	B	A	H	H	X	A	B	A	A	A	H	A	H	A	H	H
Coinche(クワンシエ)	A	BC	A	A	A	A	A	H	X	A	B	A	H	A	X	X	H	H	B	A	B	X	A	A	H
Deco Rouge(デコルージュ)	A	AA	X	A	A	H	A	B	X	X	B	A	A	B	X	X	A	H	A	B	B	A	B	B	H
Diamond Berry(ダイヤモンドベリー)	X	BB	X	H	B	A	H	A	X	A	H	A	A	H	A	X	B	H	H	A	H	X	H	A	H
Donner	A	AC	A	A	A	A	H	A	X	A	H	B	H	A	X	X	H	A	H	A	B	A	H	H	H
Echigohime(越後姫)	X	BB	A	H	B	A	A	H	A	A	B	A	A	H	A	X	B	A	H	H	B	A	H	H	A
Elsanta	X	AB	A	A	A	H	A	B	X	X	B	A	A	A	X	A	B	H	H	H	B	X	A	A	A
Enrai(円雷)	A	AC	X	H	A	A	H	H	X	X	H	B	H	H	X	X	A	H	H	A	B	A	B	B	B
Ever Berry(エバーベリー)	X	BC	A	A	H	H	A	A	X	A	H	A	H	H	X	A	B	H	B	A	H	A	H	H	B
Fukuavaka(ふくあや香)	X	CC	X	A	H	A	H	H	X	X	H	A	A	B	X	A	B	H	A	H	B	A	B	B	A
Fukuba(福羽)	A	BB	X	H	H	A	A	A	A	A	H	A	B	B	A	A	B	B	B	A	H	X	H	A	B
Fukuharuka(ふくはる香)	X	BC	A	H	A	A	H	A	X	A	H	H	A	B	X	A	B	H	H	A	B	A	H	H	A
Fukuoka S 6 (福岡S 6号)	X	AA	X	B	B	A	A	A	A	A	H	A	H	H	X	A	H	A	B	A	H	X	H	H	H
Fukuoka S 7 (福岡S 7号)	X	AA	A	H	B	A	A	B	A	X	H	A	H	H	X	A	H	H	A	B	B	X	A	A	B
Fusanoka(ふさの香)	X	AB	X	H	B	A	A	H	A	X	A	H	A	A	X	X	B	H	A	H	H	A	B	A	A
Hanagasaotome(花笠おとめ)	A	AC	X	A	A	B	A	X	X	A	B	A	B	X	X	H	H	A	A	B	A	H	A	B	B
Harunoka(はるのか)	A	BC	X	H	H	A	H	A	A	A	H	A	H	H	X	A	B	H	H	A	H	A	A	A	B
Haruyoi(はるよい)	A	BC	A	A	H	A	A	H	A	A	B	A	H	H	X	A	H	H	H	H	A	H	H	H	H
Hatsukuni(はつくに)	X	AB	X	A	B	A	A	H	X	A	B	A	A	H	A	X	H	A	H	H	B	X	H	H	H
Himatsuri(ひまつり)	X	BC	X	H	H	A	H	A	A	A	H	A	H	H	A	X	H	A	H	A	H	X	A	A	H
Himesodachi(媛育)	X	BB	A	A	B	B	A	A	X	A	H	A	A	H	A	A	B	B	B	A	H	X	A	A	H
Himiko(ひみこ)	A	BC	A	H	A	A	A	H	X	A	B	A	H	H	A	X	A	A	H	H	B	X	H	H	A
Hinomine(ひのみね)	A	AC	X	A	H	A	H	H	A	X	H	A	H	A	X	A	B	H	A	H	A	H	A	H	H
Hitachi-hime(ひたち姫)	X	AB	X	A	H	H	A	B	X	X	A	B	H	H	X	X	B	B	A	B	H	X	A	A	A
Hogyoku(芳玉)	A	BB	A	A	H	A	A	A	A	A	B	A	B	H	A	A	H	B	B	A	H	X	H	A	H
Hokowase(宝交早生)	X	AB	A	A	H	H	A	B	X	X	B	A	A	H	A	X	A	H	A	B	B	A	H	H	A
Hotta Wonder(堀田ワンダー)	X	BB	X	H	H	H	H	A	A	A	H	A	B	B	A	A	B	H	H	A	H	A	H	A	B
HS138(エッチェス138)	A	BB	A	A	A	A	B	A	X	X	H	A	A	A	X	A	B	A	A	B	A	A	A	A	H
Iwao 1(いわお1号)	X	CC	A	A	H	H	A	A	X	A	B	A	B	A	X	X	A	H	B	A	H	A	A	A	H
Johong(早紅)	X	BB	X	A	A	A	H	H	X	X	H	A	H	H	X	A	B	B	A	H	B	A	B	B	A
Junberry 2(純ベリー2)	X	AB	X	A	H	A	H	H	X	X	H	A	H	H	X	A	B	B	H	A	H	H	A	B	H
Kanamihime(かなみひめ)	X	AB	X	H	H	A	A	B	X	X	A	B	A	H	X	X	B	B	A	B	H	X	H	H	A
Keiki wase(けいきわせ)	X	BB	X	A	A	H	H	X	X	X	H	A	A	B	A	X	H	H	A	H	H	X	H	H	A
Kentaro(けんたろう)	X	AB	A	A	A	H	H	A	X	A	H	A	H	H	X	A	H	A	B	A	B	A	A	A	H
Kita-ekubo(きたえくぼ)	A	AB	A	A	A	H	A	A	A	A	B	B	A	H	X	A	H	H	H	A	B	A	A	A	A
Kitanokagayaki(北の輝)	A	AA	A	A	A	A	A	H	X	A	B	A	A	A	X	X	H	A	H	H	B	A	H	H	H
Kiyoka(清香)	A	BB	X	A	A	H	A	B	X	X	A	A	A	B	X	A	B	H	A	B	A	A	B	B	H
Kofuku(紅福)	X	AB	A	A	H	H	A	B	X	X	B	A	H	A	X	A	H	H	A	B	H	X	A	A	A
Kogyoku(幸玉)	X	BB	A	A	A	A	N	N	X	X	B	A	H	H	X	X	H	N	N	B	A	H	H	A	H
Koiu(紅寿)	X	BB	X	A	B	H	H	A	X	X	H	A	B	B	X	A	B	B	A	H	B	X	B	H	H
Kumaken-I-548(熊研い548)	X	BB	A	A	H	A	A	H	A	A	H	A	B	A	X	X	B	B	H	H	H	X	A	A	H
Kunowase(久能早生)	X	BC	A	B	H	H	H	H	X	X	B	A	H	B	X	A	H	B	A	H	H	X	H	A	H
Kurume IH-1(久留米IH1号)	X	BB	X	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	X	B	A	B	A	A	X	A	A	A
Kurume IH-4(久留米IH4号)	X	BC	A	A	A	H	A	A	X	A	B	A	H	H	X	X	H	H	B	A	B	A	A	A	H
Kurume 49(久留米49号)	X	AC	X	H	B	A	A	H	X	A	H	H	H	H	A	X	B	A	H	H	H	X	H	A	H

(continued)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Cultivar	DFR-Hin 6 I	APX-Mlu I	APX2-Dra I	APX3-Dra I(N)	APX4-Taq I(N)	CHI-Pvu II	F3H-Aco I(N)	F3H-Eam 1104 I(N)	F3H2-Hpa I(N)	F3H2-Dde I(N)	F3H3-Acc I(N)	CT11-Hinf I	MSR-Alu I	PGPA-Acc I(N)	PGPA-Rsa I(N)	PGPB-Rsa I	AUB-Hin 6 I(N)	OLP-Dde I	CT12-Mbo I(N)	CT12-Bsa 1236 I(N)	CYT-Bsa B I(N)	tRNA-Bse G I	PYDA-Cfr 13 I	PYDA-Hae III	PYDB-Hae III(N)
Kurume 56(久留米56号)	X	BB	X	H	A	H	A	B	A	X	B	A	A	B	X	A	H	B	A	B	B	X	H	H	A
Kurume 57(久留米57号)	A	AB	A	B	H	B	H	H	X	X	B	A	A	H	X	A	H	B	A	H	B	X	B	B	H
Kurume 103(久留米103号)	A	BB	X	H	B	H	H	A	A	A	H	A	B	B	X	A	B	H	H	A	H	A	H	A	B
Kvoko(京虹)	A	AB	X	A	H	A	A	B	X	X	H	B	H	H	X	X	H	H	A	B	A	A	H	H	H
Maehyang(莓香)	X	BB	X	A	H	A	H	H	X	X	B	B	A	H	X	X	B	B	A	H	B	A	B	B	A
Malach	X	AC	A	A	H	A	B	X	X	B	H	B	H	X	X	B	H	H	H	B	A	B	B	H	
Megumi(めぐみ)	A	BC	X	A	H	H	A	A	A	B	A	B	H	A	X	X	B	A	H	H	H	X	A	A	B
Meiho(明宝)	A	BC	A	A	H	A	B	A	A	X	B	A	A	B	X	A	H	B	A	A	H	A	A	A	H
Minomusume(美濃娘)	X	AB	X	A	H	A	A	H	X	A	H	A	A	B	A	X	B	A	A	H	H	A	B	B	H
Miranche(ミランシェ)	X	BB	A	A	A	H	N	N	X	X	B	A	H	B	X	A	B	H	B	A	A	X	A	A	A
Mivoshi(みよし)	X	AB	A	A	H	H	N	N	X	X	B	A	A	H	X	A	B	H	N	N	B	X	H	A	B
Morioka 16(盛岡16号)	A	AB	A	A	A	H	B	A	X	X	B	A	A	A	X	X	B	H	A	A	B	A	A	A	A
Nou-Hime(濃姫)	X	AC	X	A	H	A	A	B	X	X	H	B	H	H	X	A	B	H	A	B	A	A	B	B	H
Nyoho(女峰)	X	AB	X	A	H	A	H	H	X	X	A	B	H	H	X	A	B	H	A	H	H	A	B	H	H
Oishishikinari 2(大石四季成2号)	X	AB	A	A	A	H	A	A	X	A	H	A	A	H	X	A	B	H	B	A	B	A	B	H	B
Osuzu(大鈴)	X	BC	X	A	H	A	H	H	X	X	B	A	H	H	X	A	H	H	A	H	B	A	H	A	B
Otomegokoro(おとめ心)	A	AB	A	H	A	A	A	H	X	A	B	A	A	H	X	A	H	A	H	H	B	X	H	H	A
Ouko(王香)	X	AB	A	A	A	A	B	A	X	X	H	H	H	H	X	X	H	H	A	A	B	A	H	H	A
Ozoharuka(尾瀬はるか)	A	AA	X	A	A	H	A	H	X	A	H	A	A	A	X	X	A	A	A	B	B	A	H	H	H
Pajaro	A	AA	X	H	A	H	A	H	X	A	B	A	A	H	X	X	A	A	H	H	B	A	B	B	H
Pechika(ベチカ)	A	AB	A	H	H	B	A	B	X	X	B	A	H	B	X	X	B	H	A	B	B	X	B	H	B
Pihvaradondon(ひいひやらどんどん)	X	AB	X	A	H	A	H	H	X	X	A	B	H	H	X	A	B	H	A	H	H	A	B	H	H
Pistro(ピーストロ)	A	BB	A	A	A	H	A	H	A	X	B	A	H	H	A	X	H	H	A	H	B	A	A	A	H
Redpearl(レッドパール)	X	BC	X	H	A	A	A	H	A	A	H	A	B	H	X	A	H	A	H	H	B	A	H	H	H
Reiko(麗紅)	X	BC	X	H	H	A	A	H	A	X	H	A	H	B	X	A	B	B	A	H	H	A	B	H	H
Rindamore(リンダモール)	A	BC	A	A	A	H	A	B	X	X	B	A	H	B	A	X	H	H	A	B	H	A	B	B	H
Rouge TM(ルーージュターエム)	A	CC	X	A	A	A	A	A	X	A	B	A	A	H	A	X	A	A	H	H	B	A	H	H	H
Sachinoka(さちのか)	X	BC	A	H	H	H	A	H	A	A	H	A	H	B	X	A	B	H	H	H	H	X	H	H	H
Sagahonoka(さがほのか)	X	BB	X	A	H	A	A	H	X	A	B	A	A	H	A	A	B	A	H	H	B	X	A	A	H
Sanchiigo(サンチーゴ)	X	CC	A	H	A	A	A	H	X	A	H	A	H	H	A	A	H	A	H	H	B	A	H	H	H
Sanrei(讃麗)	X	AB	A	A	H	A	A	B	X	X	H	A	H	H	A	X	H	B	A	B	B	X	H	H	H
Sanukihime(さぬき姫)	X	AB	X	A	A	A	A	B	X	X	H	A	H	A	X	A	B	A	A	B	H	X	A	A	H
Satohoro(サトホロ)	A	AB	A	A	H	B	A	B	X	X	B	A	A	A	A	X	A	B	A	B	B	A	H	H	A
Satsumaotome(さつまおとめ)	X	BC	X	H	H	A	A	H	A	A	H	A	A	H	X	X	B	A	H	H	H	A	H	H	H
Sawaberry(サワベリー)	A	AC	A	A	H	H	A	B	X	X	A	B	B	H	X	A	H	B	A	B	A	A	B	B	A
Sequoia	A	AA	A	H	H	A	H	X	A	B	A	A	H	X	X	X	H	H	H	H	B	A	H	H	H
Serenata	A	BB	A	A	A	A	H	A	X	A	B	A	A	H	X	X	B	H	B	A	X	A	X	A	A
Shinnvoho(新女峰)	X	AB	X	A	H	A	H	H	X	X	A	B	H	H	X	A	B	H	A	H	H	A	B	H	H
Shizuchikara(しずちから)	X	BB	A	A	H	B	A	B	X	X	B	A	H	A	X	X	A	B	A	B	B	A	H	H	A
Shizunoka(しずのか)	A	BB	A	A	H	H	H	H	X	X	B	A	H	B	A	X	A	B	A	H	B	A	H	H	H
Shizutakara(しずたから)	A	BB	A	A	H	B	N	N	X	X	B	A	H	H	X	X	A	B	N	N	B	A	H	A	A
Strawberry Parental Line Nou - 1 (いちご中間母本農1号)	X	BC	X	A	H	H	A	H	X	A	H	A	H	H	X	X	H	B	H	H	H	A	H	H	H
Strawberry Parental Line Nou - 2 (いちご中間母本農2号)	X	AB	A	A	A	A	A	B	X	X	B	A	H	A	X	A	B	B	A	B	H	A	H	H	A
Summer Berry(サマーベリー)	A	BB	A	H	H	H	A	B	X	X	B	A	A	H	B	X	X	H	H	A	B	B	A	B	B
Summer Princess(サマープリンセス)	A	BC	A	A	A	H	H	H	X	X	H	A	A	H	X	A	B	B	A	H	H	A	B	H	B
Suruga ace(ずるがエース)	X	BB	A	A	H	H	H	A	X	A	B	A	B	H	X	A	H	H	H	A	A	X	A	A	A
Suruga red(スルガレッド)	X	AC	A	A	A	A	H	H	X	X	H	A	B	H	X	A	B	H	A	H	B	A	B	B	B
Shuko(しゅうこう)	X	BC	A	A	B	H	A	B	A	X	B	A	H	B	X	A	H	H	A	B	H	A	B	B	A
Shunho(春訪)	X	BC	X	H	H	A	H	A	X	A	H	A	H	H	X	A	H	A	H	A	H	X	A	A	H
Tioga	X	BB	A	H	A	B	A	H	X	A	B	A	B	H	A	X	B	B	H	H	B	A	H	H	A
Tochihime(とちひめ)	A	AA	X	H	B	A	A	H	X	A	H	H	H	A	X	B	H	H	H	H	A	H	A	A	H
Tochihitomi(とちひとみ)	A	AB	A	H	H	B	A	H	X	A	H	A	A	H	X	X	B	H	H	H	B	X	B	H	H
Tochinomine(栃の峰)	A	AB	A	A	B	A	A	B	X	X	H	B	A	A	X	A	B	B	A	B	H	A	H	H	A
Tochiotome(とちおとめ)	X	AA	X	H	B	A	A	B	X	X	A	B	H	H	X	X	B	H	A	B	A	X	H	A	A
Tonehoppe(とねほっぺ)	X	AB	X	A	H	A	A	H	X	A	H	B	H	H	X	A	B	A	A	B	B	A	B	H	B
Toshihime(としひめ)	X	BB	X	A	H	A	A	B	X	X	B	B	A	H	X	X	H	B	A	B	H	A	H	H	A
Tovonoka(とよのか)	X	BC	X	H	H	A	H	A	A	A	H	A	H	H	A	X	H	A	H	A	H	X	A	A	H
Tsuburoman(つぶろまん)	A	AB	A	A	A	A	A	A	X	A	B	H	H	A	X	X	H	H	A	A	B	A	A	A	A
Vivarosa	X	BB	A	A	H	A	H	A	X	A	B	H	H	B	A	A	B	A	H	A	H	X	H	A	A
Yavoihime(やよいひめ)	X	AA	X	H	H	A	A	B	X	X	H	A	B	H	X	X	B	A	A	B	H	A	B	H	H
Yumeamaka(夢甘香)	X	CC	A	A	A	A	A	B	A	X	B	A	A	B	X	A	B	H	A	B	H	A	H	H	A
Yumenoka(ゆめのか)	A	AB	A	A	H	A	A	H	X	A	H	A	H	H	X	X	B	A	H	H	B	X	B	H	B



## 考察

改良した 25 の CAPS マーカーを利用することにより、突然変異体を除く全ての供試品種を識別することができた。改良前の 21 マーカーでも同様に識別は可能であったが、検出される多型の明瞭性およびマーカーの識別能力という点で、明らかに改良したマーカーが優れていた。高次倍数体における DNA 品種識別法としては、ゲノム特異的マーカーは、アレル特異的マーカー（例：STS マーカー）と同様に安定で明瞭であるが、ポジコンを入れる必要がないという点でより便利であり、制限酵素処理を要するという点でより煩雑である。2008 年現在では、CAPS マーカーの他にも、SSR マーカーや RAPD-STS マーカーによる国産品種の識別法が開発されている（Shimomura et al., 2006; 田崎ら、2006）。特に田崎らの RAPD-STS マーカーは、1 マーカーで「とちおとめ」、「とちひめ」、「栃の峰」の栃木系品種を他の 23 品種から識別することができ、目的によっては非常に有効である。ただし、従来の CAPS 法、RAPD 法、SSR 法のように全ての同祖遺伝子（または SSR）が PCR 増幅の対象となる手法を用いる場合には、同祖性の座が競合を起こすため、目的の多型バンドの増幅が不安定となる危険性を踏まえておく必要がある。

一方で、disomic 遺伝が想定されるゲノム特異的マーカーは、イチゴの親子関係の検証にも利用できる（森ら、2007）。ただし、F3H、CTI2 の 2 増幅座が「みよし」、「ミランシェ」、「八雲」、「しずたから」および「あわなつか」の 5 品種で増幅しなかったことから、これら 2 増幅座には、厳密には増幅できない対立遺伝子が存在することが分かった。したがって、これらから生じる 4 マーカーは、後代で disomic 遺伝に従った分離をするとは限らないため、親子鑑定には不適である。

また本節の分析から、長年ランナーによる栄養増殖で維持されているイチゴ品種は、特に遺伝資源の管理圃場において他品種と入れ替わる危険性が高いことが示された。開発した DNA 品種識別法はこれら遺伝資源の正確な管理にも貢献が期待される。

### 第 3 章 第 2 節 品種識別技術の妥当性確認

開発した品種識別技術は、育成者権の保護や偽装表示防止だけでなく、遺伝資源の管理や品種登録制度への利用が期待されており、税関検査所、イチゴ生産県、民間分析センター、種苗管理センター等へ広く技術移転することが望まれていた。そのため、本識別技術をマニュアル化し、分析技術の再現性（妥当性）を証明する必要が生じた。本技術は、野菜茶業研究所の設備においては十分に高い再現性が実証されている。しかしながら DNA 分析技術は、分析設備や分析者が異なれば、大なり小なり結果が変動することが知られている（This et al., 2004）。技術を一般化するためには、分析マニュアルの作成、および研究設備や実験担当者の技術的な差異に結果が左右されない高い再現性の確保が求められる。再現性を確認するために必須であるのが研究室間妥当性試験である。

EU（欧州連合）の「Food Control Lab の要求事項（EU Additional Measures Directive 93/99 EEC）」と Codex（FAO/WHO 合同食品規格）の「国際的に通用する分析試験所のガイドライン（CAC/GL27-1999）」では、国際的に信頼される食品分析データを得るためには、「妥当性が確認された方法」を用いなければならないとしている。つまり、国際的に通用する分析法となるには妥当性試験が必要不可欠である。また、この妥当性試験の実施方法についても、国際的なガイドラインに準拠しなければならない。国際的な妥当性試験のガイドラインとしては、IUPAC（国際純正・応用化学連合）の Harmonized protocol（Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies： pure & appl.Chem., Vol.60, No.6, pp.855-864）、ISO（国際標準規格）、AOAC（Association of Official Agricultural Chemists）International の Official Methods of Analysis－ Appendix D（2002）& R が存在する。しかしいずれも、主に定量分析法を対象としたガイドラインであり、定性分析法の試験要件について触れているのは AOAC の Appendix D のみである。そこでイチゴの品種識別の研究室間共同試験に関しては、AOAC が定める要件（Table 13）に従うこととした。

これまでに AOAC で発表された定性分析法の妥当性試験は、主に食

品中の毒素や菌の検出に関するものである（Feldsine et al., 1997, 2003）。陽性、陰性を判定するこれらの試験とは根本的に性質の異なった DNA 品種識別法については、要件を満たした妥当性試験の報告はない。本節では、国際基準に準じた食品品種識別法の妥当性試験の初めての試みについてまとめた。

## 材料及び方法

### 1. AOAC-Appendix D の解釈

妥当性試験は、基本的に共同研究ラボに複数の試料を配布して分析・判定してもらうブラインド試験に基づき、対象技術の感度（A の試料を A と判定できる確率）および特異性（A でない試料を A でないと判定できる確率）を算出することが目的である。AOAC-Appendix D に記された定性分析法の妥当性試験の必要条件は 4 つあり、1) 共同試験に必要なラボ数は最低 10、2) 分析レベル数はマトリックスごとに最低 2、3) 分析試料数はレベルごとに最低 6、4) ネガティブコントロールはマトリックスごとに最低 6 を満たすことである（Table 13）。

必要ラボ数の解釈はどのような分析法であっても共通である。ただし、大きく逸脱した結果を出したラボは統計上棄却するため、有効ラボ数を 10 確保するためには 12 以上のラボで試験を実施するのが望ましいと言われている。これらの必要ラボ数と分析試料数は、算出された感度・特異性の信頼区間が 10% 以下になるように設定されており（McClure, 1990）、ラボ数を増やせば分析試料数を減らすことも可能であるが、本試験では 12～13 のラボを設定した。

マトリックスは、「一つの分析結果を導くための一連の技術」と解釈でき、品種識別技術においては 25 マーカーでの一連の分析に当てはまる。

分析レベルは「検出対象となるものの存在形態」と解釈でき、サルモネラ菌検出技術（Feldsine et al., 2003）では、分析レベルは「菌濃度の高いもの」と「菌濃度の低いもの」が設定されている。これにネガティブコントロールとして「菌が存在しないもの」を加え、

各 6 サンプル、合計 18 サンプルをブラインド試験の分析試料としている。しかし、菌等の陰陽判定技術の解釈が品種識別技術には適用できない。品種識別においては、検出対象の存在形態は、濃度ではなく品種である。したがって分析レベルは、品種の数だけ（本研究では 125）存在し、各 6 サンプル、合計 750 サンプルも分析しなければならない。分析では必ず異なる多型が検出されるため、ネガティブコントロールは必要ない。しかし、共同研究室に対して、750 サンプルから DNA を抽出し、25 マーカーについて分析を行い、品種の特定を依頼するのは現実的に不可能である。そこで、検出対象を「品種」ではなく「DNA 多型」に設定した。マトリックスを各マーカー分析と解釈することで、分析レベルを多型の数（CHI-*Pvu* II ならば A、H、B の 3 レベル）に減らし、分析サンプル数は各多型について 6 サンプル、合計 12~36 サンプル（CHI-*Pvu* II ならば 18 サンプル）とした。回答は「品種名」ではなく「検出された DNA 多型」を求めた。したがって本試験で妥当性確認の対象となるのは、厳密には「品種識別技術」ではなく、「イチゴの DNA タイピング技術」と言える。

## 2. 妥当性試験設計

本試験は 25 マトリックス（マーカー）の分析であり、多大な労力を要する。このため、試験を 2 年に分割した。共同研究ラボには基本的に 2 年間参画していただいたが、一部単年のところもあった。同一ラボ内でも、2 年目に分析者が変更になったところが半数以上あった（Table 14）。初年度では 15 マーカー（Figure 11）、2 年目に 10 マーカーの妥当性確認試験を行った（Figure 12）。

Figure 11-12 に、2 年間の試験設計および参画ラボへ配布した回答表を示した。上図が回答表、下図が試験設計およびブラインド試験の正答である。全マーカーで、各多型が最低 6 反復とれるように分析マスを決定した。初年度は各多型 6 反復、2 年目は反復数から分析結果に先入観が入るのを防ぐため、6-8 反復と幅を持たせた。供試サンプルの品種名は完全に伏せ、ナンバリングしたイチゴ葉を計 40-41 枚送付した。初年度は回答表の白マス部分のみ分析を行って多型を検出するよう依頼し、2 年目は分析すべきサンプル番号を抽出して回

答表を整理した。回答はあくまでも「検出多型」であり「推定品種」ではないことを強く確認した。

回答期限は分析用の葉サンプルを送付してから 1 ヶ月とし、分析の再試験は、PCR 増幅に失敗して全くタイピングが行えない場合を除いては、行わないよう指示した。タイピングミスの原因究明のため回答提出後に再試験を依頼した場合もあるが、その結果は妥当性試験の成績に反映させていない。

### 3. マニュアルの作成および試験の実施

参画ラボに配布したマニュアル(一部抜粋)を Figure 13 に示した。マニュアルでは、妥当性試験に入る前に、予備試験の実施を指示した。予備試験では、送付した葉サンプル 4-6 品種について 4-6 マーカーで分析を行い、技術的な問題が生じていないか確認した。問題点が判明したラボには、解決するまで技術的改善を行い、その後妥当性試験を実施した。

マニュアルには、使用するマーカーで検出される多型の典型的な電気泳動写真、プライマー配列、試験に用いる PCR や制限酵素反応溶液の組成を計算して記載した。操作上の主な注意点として、氷上操作および試薬類の冷凍保存の徹底を明示した。試験期間中、参画ラボからの問い合わせや技術指導に対しては、回答に影響しない範囲で個別に対応した。

イチゴ葉の分析サンプル以外に、主要な試薬類も送付し、指定以外の試薬の使用を禁止した。送付したのは、DNA 抽出キット (DNeasy Plant Mini kit, Qiagen)、ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems)、制限酵素 (NEB または Fermentas 製)、バッファー溶解みのプライマー (理科研) である。アガロースやエチジウムブロマイド、チップ、サンプルチューブ、サーマルサイクラーやインキュベーターは、各参画ラボで常用しているものを利用した。

試験終了時には、回答表の提出とともに、1) 使用したサーマルサイクラーの機種、2) 制限酵素反応のインキュベート法、3) マニュアルに従うとうまくいかなかった点、4) マニュアルを逸脱した点についても報告を依頼した。

#### 4. 感度・特異性の算出

参画ラボから得た全回答から、マーカーごとに無効回答の選抜を行った。マニュアルを著しく逸脱した手順で行われた分析のみ、無効とした。McClure (1990) によると Cochran の Q 検定を用いて外れ値検定を行い、極端に成績の悪いラボは棄却することが推奨されているが、本試験では、予備試験により各ラボの技術力は確認していたため、外れ値検定による棄却は行わなかった。残った有効回答から各ラボについて感度および特異性を算出した。たとえば、「多型 A」の感度は「A と正しく判定されたサンプル数 $\times$ 100/A であることが既知のサンプル数」、特異性は「A ではないと正しく判定されたサンプル数 $\times$ 100/A ではないことが既知のサンプル数」の定義式より算出した。全データを総合して感度・特異性の平均値、最小値、25 パーセンタイル値（75%のラボがこれより高値となる値）を算出した。

Table 13. The criteria for validation of method of qualitative analysis showed in AOAC OMA Appendix D, and the translation of it into three kinds of analysis.

Criteria	Appendix D		Detection of <i>Salmonella</i>	Cultivar identification	Detection of DNA polymorphism
Minimum number of laboratories	10	→	10	10	10
Analyte levels	2 analyte levels per matrix	→	High and low inoculation level per material	125 cultivars per analysis	2 to 6 genotypes per marker
Minimum number of test samples	6 samples per level	→	6 samples per level	6 samples per cultivar	6 samples per genotype
	6 negative controls per matrix	→	6 negative controls	needless	needless

Table 14. The collaborators for validation of DNA genotyping of strawberry in 2005 and 2006. 'A' or 'B' present the partners, that is, the change from A in 2005 to B in 2006 means the partner change in same laboratory. '-' presents the non-attendance in the year.

Laboratories	2005	2006
Aichi Agricultural Research Center	A	B
Central Customs Laboratory	A	B
Chiba Prefectural Agriculture Research Center	A	A
Fukuoka Agricultural Research Center	A	B
Fukushima Agricultural Technology Centre	-	A
Gifu Agricultural Experiment and Research Facilities	A	B
Japan Food Research laboratories	A	B
Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center	A	-
Mie Prefectural Science and Technology Promotion Center Agricultural Research Division	A	A
Miyagi Prefectural Agriculture and Horticulture Research Center	A	A
Nara Agricultural Experiment Station	A	-
National Center for Seeds and Seedlings	A	A
Tochigi Prefectural Agricultural Experiment Station	A	A
Visionbio Corporation	A	B
Total number	13	12



マーカー	サンプル番号																																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
DFR- <i>Hin</i> 6 I																																										
APX- <i>Mlu</i> I																																										
CHI- <i>Pvu</i> II																																										
F3H- <i>Eam</i> 1104 I(N)																																										
F3H2- <i>Hpa</i> II(N)																																										
MSR- <i>Alu</i> I																																										
PGPA- <i>Rsa</i> I(N)																																										
PGPB- <i>Rsa</i> I																																										
APX2- <i>Dra</i> I																																										
APX3- <i>Dra</i> I(N)																																										
APX4- <i>Taq</i> I(N)																																										
CYT- <i>Bsa</i> B I(N)																																										
tRNA- <i>Bse</i> G I																																										
PYDA- <i>Hae</i> III																																										
PYDB- <i>Hae</i> III(N)																																										

マーカー	サンプル番号																																									多型ごとのサンプル数 (全解析数)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
	サンチャーゴ とちひめ	紅ほっぺ	純ペリー	濃姫	アイペリー	アイストロ	濃姫	純ペリー	サンチャーゴ	レッドパール	紅ほっぺ	とちひめ	純ペリー	濃姫	リンダモール	紅ほっぺ	サンチャーゴ	福岡S6	濃姫	純ペリー	とちひめ	紅ほっぺ	アイペリー	ひのみね	サンチャーゴ	とちひめ	レッドパール	純ペリー	濃姫	とちひめ	サンチャーゴ	紅ほっぺ	宝交早生	レッドパール	濃姫	とちひめ	純ペリー	サンチャーゴ	アイペリー	紅ほっぺ		
DFR- <i>Hin</i> 6 I						A	X		X		X	X	A			A			X		A			A									X							A		6 (12)
APX- <i>Mlu</i> I	CC	AA	BB		AC		BB	AC	AB	CC	BC		AA	AB		BC	BB	CC	AA	AC	AB	AA	BB	BC	AC	CC	AA	BC	AB	AC		CC	BB	AB	BC	AC	AA	AB	CC	BC	BB	6 (36)
CHI- <i>Pvu</i> II	A		B	H		H	A	A				B		H		H	B		A			B					A	A				B	H					H		B	6 (18)	
F3H- <i>Eam</i> 1104 (N)				A		B	B		A		H			A	B				A	B	A			B	H	H			A		H		B					H		H	6 (18)	
F3H2- <i>Hpa</i> II(N)		X					X			X		A						A				A		A					X				X	A				A		X	6 (12)	
MSR- <i>Alu</i> I			A	B	H						B	A	H	B		H	A	H					H	H			B	B				A	A	B					A		6 (18)	
PGPA- <i>Rsa</i> I(N)	A					X				X					A			X		X	X									A	A		A		X	A					6 (12)	
PGPB- <i>Rsa</i> I							X		X						A				A		X				A	A	X	A				X	X						A		6 (12)	
APX2- <i>Dra</i> I		X	X	A				X							A			X						A	X								A	X				A	A		6 (12)	
APX3- <i>Dra</i> I(N)			B			A	A		B	H	H				A	A	A	H	B		B	H						B	A	H	H						B			6 (18)		
APX4- <i>Taq</i> I(N)		B				A	H					B			A			H	B		H			A	H		B	A		B		H	H	A	H	B		A		6 (18)		
CYT- <i>Bsa</i> B I(N)	B			B	A	H	A				B				A	H			A		H		H	H					A			B		A	H	B		B		6 (18)		
tRNA- <i>Bse</i> G I			A	X				A	X	A			A	X				X											X					A			X		A		6 (12)	
PYDA- <i>Hae</i> III		A			B	B	H	B				A		A	B	B	A		H				B	H	H			H			A			H				A		6 (18)		
PYDB- <i>Hae</i> III(N)			A	B			B		B		H		A					H		B	A	A						B	H	A	H		A			B		H		6 (18)		

Figure 11. Response sheet used for blind tests in 2005 (above chart), and correct answer with strawberry cultivar name (ground chart).

マーカー	サンプルNo.																				
F3H- <i>Nco</i> I(N)	3	4	5	6	8	10	15	16	17	20	21	22	23	26	28	32	34	36	38	39	計20
F3H2- <i>Dde</i> I(N)	1	2	7	13	14	16	17	23	24	27	29	31	32	35	計14						
F3H3- <i>Acc</i> I(N)	2	4	5	9	10	11	13	14	18	20	25	26	27	29	30	31	34	38	39	40	計20
CTI1- <i>Hinf</i> I	1	2	3	8	9	11	12	15	18	21	22	25	26	28	33	35	36	37	39	40	計20
PGPA- <i>Acc</i> I(N)	3	4	5	8	11	13	18	19	20	21	23	25	26	28	30	32	33	34	35	36	計20
AUB- <i>Hin6</i> I(N)	3	5	6	8	12	14	17	18	19	20	21	22	24	27	29	31	33	34	37	40	計20
OLP- <i>Dde</i> I	2	4	5	6	7	13	14	15	17	19	22	24	27	29	31	33	36	38	39	40	計20
CTI2- <i>Mbo</i> I(N)	1	3	4	7	9	10	11	17	19	20	22	24	25	26	28	31	32	34	37	39	計20
CTI2- <i>Bsh</i> 1236 I(N)	1	2	3	5	6	7	8	11	12	13	14	19	21	25	27	31	33	36	37	38	計20
PYDA- <i>Cfr</i> 13 I	2	6	8	9	10	12	13	16	18	19	22	24	25	26	28	29	30	35	36	38	計20

マーカー	サンプル番号																																								多型ごとのサンプル数 (全解析数)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
	とちひめ	女峰	盛岡16号	福岡S6	ひのみね	明宝	福岡	アスカウェイブ	とちひめ	女峰	福岡	宝交早生	とよのか	とちおとめ	とちひめ	明宝	とよのか	とちおとめ	アイストロ	宝交早生	とちひめ	福岡	盛岡16号	福岡S6	紅ほっぺ	栃の峰	宝交早生	とよのか	アスカウェイブ	女峰	ひみこ	ひのみね	栃の峰	明宝	とちひめ	章姫	福岡S6	盛岡16号	とちおとめ	とちひめ		
F3H- <i>Nco</i> I(N)			B	A	H	B		A		H						A	B	H			A	A	A	B			A		H			H		B		H		B	A		6-8 (20)	
F3H2- <i>Dde</i> I(N)	A	X					A							A	X		X	A					X	A			X		X		A	X			A						7 (14)	
F3H3- <i>Acc</i> I(N)		A		H	H				H	A	H		H	A				A		B					B	H	B		H	A	B			B			B	A	H		6-8 (20)	
CTI1- <i>Hinf</i> I	H	B	A					A	H			A	A			H		B			H	A				A	B		A			B		H	B	A		B	H		6-8 (20)	
PGPA- <i>Acc</i> I(N)			A	H	A			B				B		H				H	B	H	H		A			B	A		H		H		A	A	B	H	B				6-8 (20)	
AUB- <i>Hin6</i> I(N)			B		B	H		A					A		B			H	B	H	A	B	B		H		A		A		A		B	H			H			B		6-8 (20)
OLP- <i>Dde</i> I		H		A	H	B	B						A	H	H			A		B		B		A			H		A		A		B			B		H	H	H		6-8 (20)
CTI2- <i>Mbo</i> I(N)	H		A	B			B		H	A	B						H		A	A		B		B	H	A		H		H		A		A			B	B	A		6-8 (20)	
CTI2- <i>Bsh</i> 1236 I(N)	H	H	A		H	A	A	B			A	B	A	B				B			H				H	A		B		H		B			H	A	A				6-8 (20)	
PYDA- <i>Cfr</i> 13 I		B				A		B	H	B		H	A			A		H	B			H		H	A	H		A	B	B				H	H		A				6-8 (20)	

Figure 12. Response sheet used for blind tests in 2006 (above chart), and correct answer with strawberry cultivar name (ground chart).

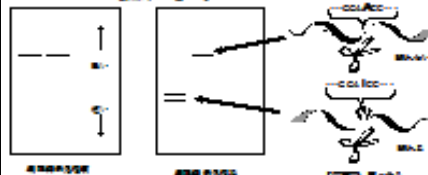
## 目次

1. DNA マーカーと CAPS について
2. 妥当性試験について
3. 妥当性試験の進め方
4. イチゴ葉からの DNA 抽出
5. PCR 法による目的 DNA 断片の増幅
6. 制限酵素処理による増幅断片の消化
7. アガロースゲル電気泳動による多型の検出
8. トラブルシューティング
9. 使用マーカー一覧表
10. 本試験回答用紙(例)
11. 問合せ先

### 1. DNA マーカーと CAPS について

ヒトがひとり一人違う DNA 配列をもっているように、イチゴの品種もそれぞれ異なる DNA 配列をもっている。このような配列の違いを単純に検出する手段が DNA マーカーである。DNA マーカーには、ハイブリダイゼーションを行う RFLP、マーカーを用いる AFLP や RAPD、また生物に内蔵する酵素活性の検出(ライト)の異なる遺伝子を検出する SSR 等様々な手法のものがあるが、酵素処理により配列差を検出する Cleavage Amplified Polymorphism (CAPS) 法が最も簡単で、CAPS マーカーの利点は、安く、検査をする人やサンプルの状態、DNA 抽出方法などによって検出される多型も比較的にシンプルで、高価な設備設置や高度な技術から、様々な検査機関で容易に実行されることにも挙げられる。

CAPS 法では、あらかじめ品種間で塩基配列に差があると分かっている遺伝子座を、イチゴが保有する膨大なゲノムの中から、該当遺伝子座を特定する。



実際の分析例

1. DNA 抽出 (イチゴ葉から抽出)

2. DNA の増幅 (PCR 法)

3. 増幅断片の消化 (制限酵素処理)

4. 消化断片の電気泳動 (アガロースゲル)

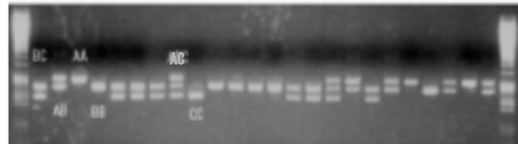
**CAPS マーカーの仕組み**

ある品種)を遺伝子座に処理を行う。その結果、制限酵素で切断される DNA を保有する品種と、切断されない DNA を持つ品種とでは、処理後に残る DNA 断片の長さが異なる(図参照)。この長さの違いはアガロースゲル電気泳動法により容易に検出できる。

実際に分析に必要な手順についても図に示した。手順1は、ある品種に適用した分析費が 10 サンプルについて 3 つのマーカーで分析する場合の概算である。

**CAPS 検査の例**

電気泳動後のゲル (左は分子重量マーカー 1 kb、右は任意の品種)



多型タイプ: AA, BB, CC, AB, BG, AC

補足: PCR 増幅の際で 2 通りのバンドが増幅される。制限酵素処理後さらにもう一通りのバンドが検出できる。

プライマー	Sequence	Base	制限酵素	処理温度
APK-Fw	GTGCTGAGGCTTCTG	18	MspI	37℃
APK-Rv	AGTATGATTTAGGAGATGAGGCTG	30		

多型バンドサイズ (下線の有無で判別)	制限酵素反応液分量 (予備試験用プレミックス)	制限酵素反応液分量 (本試験用プレミックス)
PCR 増幅産物:		
多型 ABG: 661 bp, 488 bp, 488 bp	6+1 サンプル分	36+6 サンプル分
多型 AB: 661 bp, 488 bp	Exonuclease III (10U/μL)	Exonuclease III (10U/μL)
多型 BG: 488 bp, 488 bp	MspI 2.8 μL	MspI 16.8 μL
多型 AA: 661 bp	Buffer 1.0 μL	Buffer 48.0 μL
多型 BB: 488 bp	H2O 26.2 μL	H2O 161.2 μL
多型 GG: 488 bp		

Figure 13. Manual for collaborative study (Excerpt) : “Detection of DNA polymorphisms of strawberry cultivars”.

## 結果

初年度、2年目ともに、全参画ラボから期限内に回答を得た。結果に関わらず再試験は原則的に行わなかったが、以下の2点に関してのみ、再試験を行った。1) 1つのラボで、CYT-*Bsa*B Iの20の分析試料のうち1-8の試料と9-16の試料を完全に入れ替えていた。8連チューブの取り違いによることが明らかで、ケアレスミス範囲と解釈できたこと、およびこの取り違いはマーカの再現性に甚大な影響を与えると判断したため、再試験を行って回答を修正した。2) 2つのラボに対して送付した6つの「とちひめ」サンプルが、一部「とちおとめ」であったことが判明した。これは、送付した葉の葉柄を手元に保管していたため、それを分析したことによって判明した。この原因は明らかな当方の手違いにあり、マーカの再現性を正しく評価するため、2つのラボには「とちひめ」を用いて再試験を依頼し、回答を修正した。

次に、参画ラボの自己申告にしたがって、マニュアルを大きく逸脱した以下3点の分析を無効回答とした。すなわち、1) PCR増幅量の少なかったマーカに関して、PCR産物を鋳型に再度同じプライマーでPCRを行った分析、2) 指定サンプルだけでなく、全サンプルの多型を決定した分析、3) 送付したAmpliTaq Gold以外のポリメラーゼを用いてPCRを行った分析の3点である。抽出DNAの希釈率を10倍から20倍へ変更してPCRの鋳型とした分析は許容範囲とした。その結果、全てのマーカについて、最低10の有効ラボ数を確保できた (Table 15)。

有効回答をもとに、マーカの多型タイプごとに (マトリックスのレベルごとに) 感度・特異性を計算し、全ラボの結果を総合して平均値を算出した (Table 15)。感度・特異性ともに大部分のラボが100%を示したため、データが正規分布に従わず、標準誤差や信頼区間が算出できなかった。そこで、25パーセンタイル値および最小値を示した。その結果、25マーカのうち、12が感度・特異性100%、12が95%以上、1つが90%以上となった。25パーセンタイル値は、APX-*Mlu* Iを除く全マーカが100%となった。最小値はMSR-*Alu* I、

tRNA-*Bse*G I の 2 つ以外は 80% 以上であった。

本試験ではマニュアルに記載されている事項以外は、参画ラボの常法に一任した。したがって、サンプル破碎方法は、液体窒素と乳鉢を用いる方法、海砂とペッスルを用いる方法、ビーズクラッシャー使用法など様々であった。サーマルサイ클ラーの機種も、Biorad、ABI、TAKARA、ASTEC、MJ Research、Eppendorf と多様であった。

以上から本分析法は、マニュアルに従って遂行することにより、使用機器の機種や分析者の違いに関わらず、全マーカーで 90% 以上の感度・特異性が確保されることが確認できた。

Table 15. Result of validation for strawberry genotyping by collaborative study. The twenty-five percentile or minimum value were adopted as index for distribution, because data was not obviously consistent with normal distribution.

Marker	Genotype	Result (%)						Available response / All response	Year to validate
		Sensitivity rate			Specificity rate				
		Mean	25 percentile	Minimum	Mean	25 percentile	Minimum		
1 DFR- <i>Hin</i> 6 I	A	98.6	100.0	83.3	100.0	100.0	100.0	12/13	2005
	X	100.0	100.0	100.0	98.6	100.0	83.3		
2 APX- <i>Mlu</i> I	CC	97.0	96.3	83.3	100.0	100.0	96.7	11/13	
	BC	98.5	100.0	83.3	99.7	99.3	96.7		
	AC	100.0	-	-	100.0	-	-		
	BB	100.0	-	-	100.0	-	-		
	AB	100.0	-	-	100.0	-	-		
	AA	100.0	-	-	100.0	-	-		
3 APX2- <i>Dra</i> I	A, X	100.0	-	-	100.0	-	-	12/13	
4 APX3- <i>Dra</i> I(N)	A, B, H	100.0	-	-	100.0	-	-	10/13	
5 APX4- <i>Taq</i> I(N)	A	98.5	100.0	83.3	100.0	-	-	11/13	
	B	100.0	-	-	100.0	-	-		
	H	100.0	-	-	99.2	100.0	91.7		
6 CHI- <i>Pvu</i> II	A, B, H	100.0	-	-	100.0	-	-	12/13	
7 F3H- <i>Nco</i> I(N)	A	97.9	100.0	87.5	100.0	-	-	12/12	2006
	B	100.0	-	-	99.4	100.0	92.9		
	H	100.0	-	-	99.4	100.0	92.9		
8 F3H- <i>Eam</i> 1104 I(N)	A	100.0	-	100.0	100.0	-	100.0	12/13	2005
	B	98.6	100.0	83.3	99.3	100.0	91.7		
	H	98.6	100.0	83.3	99.3	100.0	91.7		
9 F3H2- <i>Hpa</i> II(N)	A, X	100.0	-	-	100.0	-	-	12/13	
10 F3H2- <i>Dde</i> I(N)	A, X	100.0	-	-	100.0	-	-	12/12	
11 F3H3- <i>Acc</i> I(N)	A, B, H	100.0	-	-	100.0	-	-	12/12	2006
12 CTI1- <i>Hinf</i> I	A	99.0	100.0	87.5	100.0	-	-	12/12	
	B	100.0	-	-	100.0	-	-		
	H	100.0	-	-	99.4	100.0	92.9		
13 MSR- <i>Alu</i> I	A	100.0	-	-	100.0	-	-	11/13	2005
	B	90.9	100.0	0.0	100.0	-	-		
	H	100.0	-	-	95.5	100.0	50.0		
14 PGPA- <i>Acc</i> I(N)	A	100.0	-	-	98.8	100.0	92.9	12/12	2006
	B	100.0	-	-	100.0	-	-		
	H	97.9	100.0	87.5	100.0	-	-		
15 PGPA- <i>Rsa</i> I(N)	A	95.8	100.0	50.0	98.6	100.0	83.3	12/13	2005
	X	98.6	100.0	83.3	95.8	100.0	50.0		
16 PGPB- <i>Rsa</i> I	A, X	100.0	-	-	100.0	-	-	12/13	
17 AUB- <i>Hin</i> 6 I(N)	A, B, H	100.0	-	-	100.0	-	-	12/12	
18 OLP- <i>Dde</i> I	A	100.0	-	-	100.0	-	-	12/12	2006
	B	98.6	100.0	83.3	100.0	-	-		
	H	100.0	-	-	99.3	100.0	91.7		
19 CTI2- <i>Mbo</i> I(N)	A, B, H	100.0	-	-	100.0	-	-	12/12	
20 CTI2- <i>Bsh</i> 1236 I(N)	A	98.8	100.0	85.7	99.4	100.0	92.3	12/12	2005
	B	100.0	-	-	99.4	100.0	92.9		
	H	98.8	100.0	85.7	100.0	-	-		
21 CYT- <i>Bsa</i> B I(N)	A, B, H	100.0	-	-	100.0	-	-	12/13	
22 tRNA- <i>Bse</i> G I	A	97.2	100.0	66.7	98.6	100.0	83.3	12/13	2005
	X	98.6	100.0	83.3	97.2	100.0	66.7		
23 PYDA- <i>Cfr</i> 13 I	A	98.6	100.0	83.3	100.0	-	-	12/12	2006
	B	100.0	-	-	100.0	-	-		
	H	100.0	-	-	99.3	100.0	91.7		
24 PYDA- <i>Hae</i> III	A, B, H	100.0	-	-	100.0	-	-	12/13	2005
25 PYDB- <i>Hae</i> III(N)	A, B, H	100.0	-	-	100.0	-	-	11/13	

As to each genotype, refer to Table 3.

'-': Not calculated, because all laboratories correctly genotyped all tested samples.

## 考察

本試験設計は、厳密に言う「品種識別法」ではなく「DNA 多型検出技術」の妥当性確認を目的として立てられた。したがって、「イチゴの DNA 多型を正確に検出できること」は検証されたが、「検出した多型から分析サンプルの品種を正確に特定できること」は未検証である。

本試験では各 DNA 多型について 6-8 反復ずつ検出されるように設計しているが、これらは必ず複数の品種から検出されるように留意した。単一の品種から反復をとると、一般性が欠け、品種が異なったときの多型検出技術に疑問が残るためである。また、一部のマーカーで検出された多型から品種が推定でき、他のマーカーのタイピングに先入観が入る恐れもある。多様な品種を組み合わせで反復をとることで、技術が様々な品種に対応していることを一般化でき、タイピングの先入観も防止でき、更には限られた DNA サンプル数から効率よく全マーカーの反復をとることが可能となった。

妥当性試験の結果から、MSR-*Alu* I を除く 24 マーカーの感度・特異性が 95%以上であることが確認された。一般に定性分析法は、感度・特異性が 95%であれば十分に高精度であるとされており、McClure(1990)は 80%が許容できる最低ラインであると述べている。本技術は、マニュアルに従うことにより、DNA 抽出法や使用機器、分析者の違いに左右されず、十分に高い再現性が得られると結論した。

回答で誤答があったマーカー分析については、試験終了後、参考データとして該当ラボに再試験を依頼した。その結果、DFR-*Hin*6 I、APX-*Mlu* I、APX4-*Taq* I、PGPA-*Rsa* I、CTI2-*Bsh*1236 I、tRNA-*Bse*G I、PYDA-*Cfr*13 I の 7 マーカーでは 100%の正答率が得られた。本試験での誤答、再試験での正答、ともに電気泳動像が明瞭であったため、誤答の原因は単純なサンプル取り違いと推察された。分析サンプル数が多く、また初年度は虫食い式の回答表であったため、サンプルの取り違いが多発したものと思われる。F3H-*Nco* I、F3H-*Eam*1104 I、CTI1-*Hinf* I、PGPA-*Acc* I、OLP-*Dde* I の 5 マーカーでは、再試験を行

っても完全正答は得られず、誤答の原因は真にマーカー設計にあると思われる。

注意を要するのが、MSR-*Alu* I の「多型 B」の検出である。平均すると 90%の感度を確保しているが、ひとつのラボにおいて 6 反復の「多型 B」が全て「多型 H」として検出された。本来なら Q 検定で外れ値として棄却されるべきデータであるが、このラボの他のマーカー分析は順調に行われていたため、原因はラボではなくマーカーにある可能性が高いと考え、有効データとした。再試験では完全正答が得られたが、注意すべきマーカーとして特筆する。

農産物の品種育成者権侵害や偽装表示問題は、もはや国内に留まらず、国際的な問題に発展しかねない。このことから、今後の農産物品種識別技術は、国際的に信頼されるものでなければならない。既に、SSR マーカーを用いたブドウ品種の多型検出技術について 10 ラボで再現性の検証を試みた例があるが、これはブラインド試験の形式をとらずに、配布した 46 品種の多型を各々で決定するものであったため、統計的な感度・特異性の算出は行えなかった (This et al., 2004)。国際的なガイドラインに準じて妥当性が確認された食品の DNA 品種識別技術は前例がなく、AOAC の定める基準の解釈も含めて、本試験が初めてひとつのプロトタイプを示した。今後、本試験設計を叩き台に、様々な食品 DNA 鑑定法の妥当性が検証されることを期待する。



### 第 3 章 第 3 節 多型頻度に基づく品種同定精度の算出

本研究で開発した品種識別法は、厳密にはあくまで「識別」「区別」であって「同定」ではない。未知のサンプル（品種「X」とする）が、リストアップされた 117 品種の中のいずれかであると分かっている場合に限り、100% 品種を特定できる。しかし、117 品種以外にも「X」の品種として考えられる候補が存在する場合には、仮に 117 品種の中に「X」と多型が一致する品種「Y」が存在しても、「X の品種は Y である」とは 100% 言い切れなくなる。「X」が 117 品種以外の品種である危険性を常に念頭に置かねばならないためである。言い換えれば、「X」と DNA 多型が完全に一致する別の品種が偶然に存在する確率を、危険率として明示することによってのみ、品種を「同定」できる。

ヒトの DNA 鑑定では、集団の無作為なサンプリングに基づいて算出した各 DNA 多型の頻度から、誤判定の危険率を算出し、法廷でも採用されている。植物の DNA 鑑定でも、今後はヒトと同様、数値で鑑定結果の精度を示すことが要求されると考えられる。しかし現時点では、多くの植物で品種識別用 DNA マーカーが開発されているにも関わらず、鑑定の精度を算出した例がない。そこで鵜飼（2004）は、誤判定の危険率を算出した上で植物品種を「同定」する「品種同定理論」を提案した。本節ではこの理論に則って、開発した CAPS マーカーによる品種同定精度の数値化を試みた。「品種同定理論」は、互いに独立したマーカーを使用することが大前提である。そこで最初に、全ての CAPS マーカーについて遺伝的な独立性検定を行った。次に国内イチゴ品種における各マーカーの多型頻度を算出し、117 品種を同定する上での誤判定の危険率を算出した。

## 材料及び方法

### 1. 利用データ

多型頻度の算出には、第 3 章第 1 節で分析した 125 品種の多型データを用いた。マーカーの独立性検定は基本的に、第 2 章第 3 節で

分析した「さちのか」と「とちひめ」の自殖集団各 96 個体、「女峰」と「Cesena」の自殖集団各 48 個体、および「さちのか」×「とちおとめ」の交配集団 96 個体の計 5 集団の多型データを用いて行った。これら 5 集団で検定不可能であった場合のみ、125 品種を 1 つの集団とみなし、これらの多型データから検定を行った。

## 2. マーカーの独立性検定

「遺伝的に独立なマーカー」とは、「異なる染色体に座乗し、互いに影響を与えることなく後代に遺伝するマーカー」と同義であると定義できる。したがって、葉緑体 DNA に由来する tRNA-*Bse*G I を除いた 24 マーカーについて、独立性検定を行った。想定される全てのマーカー組み合わせについて、5 つの各交配集団の多型データに基づいて 2 元分割表を用いた  $\chi^2$  検定を行った。ただし  $\chi^2$  検定では、期待値が 5 以下となる遺伝子型が分割表の 20% を超えた場合、または期待値 1 以下となる遺伝子型が存在した場合には、検定の信頼性が劣ると言われている (Cochran, 1954; 青木, 2002)。そこで、この条件に合致した場合には、 $\chi^2$  検定ではなく Fisher の exact test を採用した。多型が分離しなかったため、5 つの交配集団のいずれにおいても検定が不可能であったマーカー組み合わせについては、Table 11 の 125 品種をひとつの集団と捉え、この多型データを用いて独立性検定を行った。マーカー名に (N) が付随しているものは原著論文 (Kunihisa et al., 2005) 報告後にプライマー配列に再改良を加えたものであるが、本分析には原著論文で報告したマーカーを用いた。改良によってマーカーの増幅効率、または特異性が向上しているが、検出する多型の座上位置は変わらないことを確認しているため、独立性の検定には影響はない。

## 3. 同定精度の算出

同一多型の偶然の出現確率を算出するに際して、各マーカーで検出された DNA 多型の出現頻度を乗ずるためには、各マーカーが独立であることが前提条件である。「品種同定理論」はこの前提に基づいて打ち立てられている。そこで互いに独立性の証明されたマーカー

についてのみ、各多型頻度を 125 品種の多型データから算出した。

分析対象のサンプルを「X」と仮定し、「X」の候補として想定する比較品種数を  $n$ 、分析に用いるマーカー数を  $k$ 、マーカー  $i$  で検出された「X」の多型の頻度を  $f_i$  とする。任意の品種が、偶然に「X」と完全一致する DNA 多型を示す確率を  $P_1$  とすると、

$$P_1 = f_1 \cdot f_2 \cdot f_3 \cdots f_k$$

$n$  個の比較品種中に「X」と一致する品種が最低 1 つ出現する確率（誤判定の確率）を  $P_n$  とすると、

$$P_n = 1 - (1 - P_1)^n$$

比較品種数  $n$  が大きくなるほど  $P_n$  は 1 に近づき、誤判定の危険率は高くなる。現時点で品種登録または出願公表されているイチゴ品種は 180 であるため、本研究では  $n=200$  とした。

## 結果

### 1. マーカーの独立性検定

本研究では、異なる染色体に座するマーカーは遺伝的に独立であると定義した。したがって、葉緑体 DNA に由来する tRNA-*BseG* I は、問題なく他のマーカーと独立である。そこで他の 24 マーカーについて、全組み合わせで独立性検定を行った（Table 16）。ひとつのマーカー組み合わせについて、平均 2 個の交配集団で検定が可能であった。交配集団で検定不可能な組み合わせについては、125 品種を集団として検定を行った。その結果、No.14 と No.23 の組み合わせでは、検定した 3 集団全てで  $P < 0.001$  となり、明らかに連鎖していた。一方、No.2 と No.5 の組み合わせでは、4 集団全てで  $P > 0.05$  であり、独立と判断できた。No.2 と No.3、No.2 と No.16 のように、 $P < 0.05$  の集団が存在する一方で、他の集団では独立と判断できる  $P$  値が得られている組み合わせも多かった。統計的には、たとえ独立であっても 5% の確率で  $P < 0.05$  となるため、検定数が増加すると、このような歪みが生ずるのは妥当である。そこで、検定集団の全てで  $P < 0.05$  である組み合わせ、またはひとつ以上の検定集団で  $P < 0.001$  である組み合わせを、「独立でない可能性が高い」と判定した。その結果、

No.7、No.8、No.10、No.19、No.20 は同一染色体上にあると推定でき、No.14、No.23、No.24 も同様に連鎖していると推定できた ( $P < 0.001$ )。No.14 と No.15 も連鎖を示したが、No.15 は No.23、No.24 とは完全に独立であった。No.15 と No.16、No.16 と No.17 はひとつの集団で  $P < 0.001$  を示していたが、No.15 と No.17 は独立であった。これらの矛盾したマーカー組み合わせは、「独立でない可能性がある」と判定した。最終的に「独立でない可能性が高い」および「独立でない可能性がある」としたマーカー組み合わせを除き、16 の CAPS マーカーを選抜した (Table 17)。

## 2. 品種同定精度

独立な 16 マーカーにより検出される各多型の頻度を、125 品種の DNA 多型データ (Table 12) をもとに算出した (Table 17)。これら 125 品種は、我々が入手でき、かつ異株混入の恐れのない最大限の数である。現在登録または出願されているイチゴ品種は 180 程度であるため、125 品種で国内のイチゴ品種を概ね反映していると仮定した。決定した多型頻度に基づき、比較品種中に偶然、主要な 5 品種と 16 マーカーの多型が一致する品種が出現する確率を計算し、Table 18 に示した。その結果、「さちのか」と同一の多型が不特定の 200 品種中に偶然現れる確率は 0.017%であった ( $P_{200}=0.00017$ )。言い換えると、未知のサンプル「X」の多型が「さちのか」と一致し、「X」として想定できる候補品種数が 200 であった場合、「X」は 99.983%の精度で「さちのか」であると言える。調査した全 125 品種のうち、107 品種は 99.9%以上、8 品種は 99.8%以上、1 品種は 99.7%以上、1 品種は 99.2%の精度でそれぞれ同定可能であった。8 品種は突然変異・薬培養品種もしくはその親品種であったため、同定不可能であった。ただし、F3H-*Eam1104* I(N) (No. 8) は「あわなつか」、「しずたから」、「ミランシェ」、「みよし」、「八雲」の 5 品種で Null であることが分かっている。No. 8 のマーカーを利用する際は Null の可能性もあることを念頭に置き、該当する場合には  $f_8$  を確率計算から除外する必要がある。

Table 16. *P*-value from goodness-of-fit test for independence between two markers for strawberry genotyping. SS: the progeny of 'Sachinoka' self-crossed population, TT, NN and CC: the progeny of 'Tochihime', 'Nyoho' and 'Cesena' self-crossed population, ST: the progeny of 'Sachinoka' × 'Tochiotome' population, 125: the population showed in Table 11. The deviating results at *P* < 0.05 level were marked by gray background, and ones at *P* < 0.001 level were done by black background. '-' mean the impossibility of test in self-crossed population, and the inexecution of test in the population of 125 cultivars.

		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25
Marker		APX-Mlu I	APX2-Dra I	APX3-Dra I(N)	APX4-Taq I(N)	CHI-Pvu II	F3H-Nco I(N)	F3H-Eam 1104 I(N)	F3H2-Hpa I(N)	F3H2-Dde I(N)	F3H3-Acc I(N)	CTT1-Hinf I	MSR-Alu I	PGPA-Acc I(N)	PGPA-Rsa I(N)	PGPB-Rsa I	AUB-Hin6 I(N)	OLP-Dde I	CTT2-Mbo I(N)	CTT2-Bsh 1236 I(N)	CYT-Bsa B I(N)	PYDA-Cfr-13 I	PYDA-Hae III	PYDB-Hae III(N)
1	TT	-	-	0.36	-	-	-	1.00	-	0.39	0.42	0.39	0.89	0.78	0.45	-	-	0.36	-	-	0.01	0.72	0.72	-
	125	0.64	0.00	-	0.02	0.46	0.05	-	0.59	-	-	-	-	-	-	0.05	0.02	-	0.95	0.56	-	-	-	-
2	SS	0.00	0.27	0.52	0.08	-	0.16	0.66	0.54	0.06	-	0.19	-	0.44	-	0.91	-	0.47	-	0.11	0.19	0.19	0.78	-
	NN	-	-	0.20	-	0.83	0.76	-	-	-	0.75	0.95	0.65	-	0.91	-	0.35	-	-	-	0.76	-	0.04	0.80
	CC	0.41	-	0.05	-	0.52	-	0.17	0.48	0.29	-	0.32	0.36	0.25	-	0.41	0.22	-	-	0.03	1.00	1.00	-	-
	ST	0.02	0.61	0.82	0.01	-	0.24	0.22	0.24	0.17	0.59	0.05	0.11	-	0.04	-	0.65	0.37	0.37	0.77	0.67	0.30	0.68	-
3	SS	0.91	0.81	0.32	-	0.24	0.75	0.30	0.02	-	0.36	-	0.90	1.00	0.24	-	0.38	-	0.47	-	0.08	0.03	0.03	0.55
	CC	-	0.21	-	0.73	-	0.29	0.75	0.27	-	0.90	1.00	0.24	-	0.38	-	0.27	0.29	-	-	0.47	0.46	0.46	-
	ST	0.99	0.23	0.05	-	0.47	0.54	0.47	0.03	0.56	0.75	0.47	-	0.03	-	0.03	-	0.09	0.23	0.23	0.75	0.95	0.69	0.15
4	SS	0.17	0.09	-	0.40	0.39	0.35	0.96	-	0.44	-	-	-	0.04	-	0.04	-	0.58	-	-	0.97	0.87	0.87	0.20
	TT	-	-	-	0.94	-	0.94	-	0.75	0.52	0.37	0.27	0.92	0.49	-	-	0.84	-	-	-	0.39	0.87	0.87	-
	ST	0.81	0.34	-	0.54	0.00	0.54	0.79	0.99	0.55	0.03	-	0.35	-	0.35	-	0.21	0.66	0.66	0.26	0.02	0.01	0.44	-
	125	-	-	-	0.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.20	-	-	-	-	-	-	-
5	SS	0.85	-	0.55	0.01	0.21	0.39	-	0.31	-	-	0.08	-	0.08	-	0.08	-	0.06	-	-	0.29	0.23	0.23	0.57
	NN	-	0.84	0.84	-	-	-	-	0.13	0.30	0.23	-	0.05	-	0.05	-	0.61	-	-	-	0.31	-	0.04	0.54
	CC	-	0.30	-	0.50	0.71	0.62	-	0.84	0.81	0.06	-	0.84	0.81	0.06	-	0.62	0.87	-	-	0.76	0.20	0.20	-
	ST	0.34	-	0.08	0.31	0.08	0.05	0.30	0.95	0.76	-	0.28	-	0.28	-	0.20	0.13	0.13	0.75	0.19	0.41	0.31	-	-
6	SS	-	0.40	0.94	0.62	0.90	-	0.53	-	0.22	-	0.27	-	0.22	-	0.27	-	0.27	-	-	0.01	0.12	0.12	0.61
	TT	-	0.53	1.00	0.53	0.10	0.32	0.71	0.06	-	0.35	-	0.35	-	0.35	-	0.09	0.68	0.68	0.78	0.03	0.02	0.10	-
	125	0.54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.60	-	-	-	0.07	-	-	-	-	-	-	-
7	NN	0.02	-	-	-	-	0.74	0.56	0.38	-	0.91	-	0.26	-	0.91	-	0.26	-	-	-	1.00	-	0.72	0.09
	CC	-	0.08	0.00	0.18	-	0.80	0.56	0.11	-	0.05	0.82	-	0.05	0.82	-	0.82	-	-	-	1.00	0.27	0.27	-
	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16	0.00	-	-	-	-
8	SS	1.00	0.02	0.42	-	0.48	-	-	0.66	-	0.74	-	0.74	-	0.74	-	0.74	-	-	-	0.92	0.66	0.66	0.62
	TT	-	0.00	0.20	0.52	0.64	0.92	0.09	-	0.15	-	-	0.15	-	0.15	-	0.15	-	-	-	0.04	0.95	0.95	-
	NN	-	-	1.00	0.20	0.54	-	0.11	-	0.73	-	0.22	-	0.73	-	0.22	-	-	-	-	0.73	-	0.05	0.90
	ST	0.41	0.00	0.92	0.97	0.36	0.58	-	0.49	-	0.19	0.00	0.00	0.79	0.62	0.29	0.41	-	-	-	0.79	0.62	0.29	0.41
9	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SS	0.77	0.72	-	0.28	-	1.00	-	0.16	-	0.16	-	0.16	-	0.16	-	0.16	-	-	-	0.70	0.21	0.21	0.70
	CC	0.09	0.10	-	0.04	0.07	0.43	-	0.70	0.65	-	0.70	0.65	-	0.70	0.65	-	0.70	0.65	-	1.00	0.33	0.33	-
	ST	0.41	0.30	0.48	0.03	0.10	-	0.68	-	0.39	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.92	0.04	0.84	0.10	-
10	SS	0.37	-	0.75	-	0.88	-	0.88	-	0.17	-	0.17	-	0.17	-	0.17	-	0.17	-	-	0.84	0.25	0.25	0.46
	TT	0.72	0.60	0.94	0.93	0.55	-	0.51	-	0.51	-	0.51	-	0.51	-	0.51	-	0.51	-	-	0.36	0.26	0.26	-
	CC	0.80	-	0.62	0.73	0.71	-	0.29	0.91	-	0.29	0.52	0.52	-	0.29	0.52	0.52	-	-	-	0.36	0.26	0.26	-
	ST	0.92	0.97	0.36	0.58	-	0.49	-	0.19	0.00	0.00	0.79	0.62	0.29	0.41	-	0.19	0.00	0.00	0.79	0.62	0.29	0.41	-
11	SS	-	0.81	-	-	0.85	-	0.85	-	0.36	0.99	0.99	0.81	-	0.36	0.99	0.99	0.81	-	-	0.36	0.99	0.99	0.81
	TT	0.05	0.67	0.83	0.85	-	0.56	-	0.56	-	0.56	-	0.56	-	0.56	-	0.56	-	-	-	0.24	0.52	0.52	-
	CC	-	0.36	0.52	0.60	-	0.83	0.98	-	0.83	0.98	-	0.83	0.98	-	0.83	0.98	-	-	-	0.05	0.91	0.91	-
	ST	0.04	0.67	0.25	-	0.23	-	0.37	0.88	0.88	0.32	0.81	0.65	0.84	-	0.37	0.88	0.88	0.32	0.81	0.65	0.84	-	-
12	TT	0.77	0.12	0.13	-	-	0.01	-	0.89	0.88	0.88	-	0.89	0.88	0.88	-	0.89	0.88	0.88	-	0.89	0.88	0.88	-
	NN	0.35	0.24	-	0.82	-	0.68	-	0.28	-	0.68	-	0.28	-	0.68	-	0.28	-	-	-	0.28	0.28	0.28	-
	CC	0.87	0.95	-	0.44	-	0.07	0.98	0.98	0.17	0.12	0.27	0.80	-	0.07	0.98	0.98	0.17	0.12	0.27	0.80	-	-	-
	ST	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	SS	-	-	0.85	-	0.06	-	0.21	0.92	0.92	0.97	-	0.21	0.92	0.92	-	0.21	0.92	0.92	-	0.21	0.92	0.92	-
	TT	0.86	0.92	-	0.33	-	0.93	0.56	0.56	-	0.93	0.56	0.56	-	0.93	0.56	0.56	-	-	-	0.93	0.56	0.56	-
	NN	0.96	-	0.40	-	0.70	-	0.29	-	0.99	0.42	-	0.29	-	0.99	0.42	-	0.29	-	-	0.99	0.42	-	-
	CC	0.08	1.00	-	0.51	0.31	-	0.64	0.44	0.44	-	0.64	0.44	0.44	-	0.64	0.44	0.44	-	0.64	0.44	0.44	-	-
14	ST	0.12	-	0.50	-	0.52	0.37	0.37	0.33	0.17	0.40	0.11	-	0.52	0.37	0.37	0.33	0.17	0.40	0.11	-	-	-	-
	TT	0.00	-	-	0.11	-	0.28	0.00	0.00	-	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	-	0.00	0.00	0.00	-
	NN	-	0.29	-	0.65	-	0.04	-	0.00	0.97	-	-	-	0.04	-	-	-	-	-	-	0.04	-	0.00	0.97
	CC	0.04	-	0.08	0.73	-	0.34	0.00	0.00	-	-	-	-	0.04	-	-	-	-	-	-	0.34	0.00	0.00	-
15	ST	-	0.58	-	0.25	0.33	0.33	0.96	0.00	0.51	0.21	-	-	0.58	-	0.25	0.33	0.33	0.96	0.00	0.51	0.21	-	-
	TT	-	-	0.02	-	0.04	0.32	0.32	-	-	-	-	-	0.02	-	0.04	0.32	0.32	-	-	0.04	0.32	0.32	-
	CC	-	0.12	0.49	-	0.41	0.47	0.47	-	-	-	-	-	0.12	0.49	-	0.41	0.47	0.47	-	0.41	0.47	0.47	-
	125	0.00	-	-	0.01	0.52	-	-	0.28	-	-	-	-	0.00	-	-	0.01	0.52	-	-	-	-	-	0.28
16	SS	-	0.92	-	-	0.88	0.13	0.13	0.32	-	-	-	-	0.92	-	-	0.88	0.13	0.13	0.32	-	-	-	-
	NN	-	0.16	-	-	0.47	-	0.34	0.89	-	-	-	-	0.16	-	-	0.47	-	-	-	0.34	0.89	-	-
	ST	-	0.68	0.65	0.65	0.25	0.62	0.15	0.41	-	-	-	-	0.68	0.65	0.65	0.25	0.62	0.15	0.41	-	-	-	
	125	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	CC	0.24	-	-	0.83	0.77	0.77	-	0.47	-	-	-	-	0.24	-	-	0.83	0.77	0.77					

Table 17. Independent 16 markers and frequency of detectable genotypes. The frequency is calculated based on genotypes of 125 strawberry cultivars in Table 11.

Marker		Frequency of each genotype					
2	<i>APX-Mlu</i> I	AA	0.08	BB	0.28	CC	0.04
		AB	0.30	AC	0.08	BC	0.22
3	<i>APX2-Dra</i> I	A	0.53	X	0.47		
4	<i>APX3-Dra</i> I(N)	A	0.67	H	0.30	B	0.03
5	<i>APX4-Taq</i> I(N)	A	0.37	H	0.51	B	0.12
6	<i>CHI-Pvu</i> II	A	0.58	H	0.34	B	0.08
8	<i>F3H-Eam</i> 1104 I(N)	A	0.29	H	0.42	B	0.29
9	<i>F3H2-Hpa</i> II(N)	A	0.27	X	0.73		
11	<i>F3H3-Acc</i> I(N)	A	0.10	H	0.46	B	0.45
12	<i>CTI1-Hinf</i> I	A	0.78	H	0.06	B	0.15
13	<i>MSR-Alu</i> I	A	0.38	H	0.49	B	0.14
16	<i>PGPB-Rsa</i> I	A	0.46	X	0.54		
18	<i>OLP-Dde</i> I	A	0.24	H	0.54	B	0.22
21	<i>CYT-Bsa</i> B I(N)	A	0.09	H	0.42	B	0.49
22	<i>tRNA-Bse</i> G I	A	0.67	X	0.33		
24	<i>PYDA-Hae</i> III	A	0.39	H	0.45	B	0.16
25	<i>PYDB-Hae</i> III(N)	A	0.34	H	0.49	B	0.18

As to each genotype, refer to Table 3.

Table 18. Probability of accidental matching of strawberry genotypes. Genotype detected by each marker is shown in upper stand, and frequency of the genotype (abbr.  $f_2, f_3, f_4, \dots, f_{25}$ ) showed at Table 17 is in lower stand.  $P_1 = f_2 \cdot f_3 \cdot f_5 \cdot \dots \cdot f_{25}$ ,  $P_{200} = 1 - (1 - P_1)^{200}$

Cultivar	Marker																$P_1$	$P_{200}$
	2	3	4	5	6	8	9	11	12	13	16	18	21	22	24	25		
Akihime	BB	X	A	A	H	H	X	H	B	A	X	B	H	A	H	A	4.6E-07	9.3E-05
	0.28	0.47	0.67	0.37	0.34	0.42	0.73	0.46	0.15	0.38	0.54	0.22	0.42	0.67	0.45	0.34		
Sagahonoka	BB	X	A	H	A	H	X	B	A	A	A	A	B	X	A	H	3.5E-06	0.0007
	0.28	0.47	0.67	0.51	0.58	0.42	0.73	0.45	0.78	0.38	0.46	0.24	0.49	0.33	0.39	0.49		
Sachinoka	BC	A	H	H	H	H	A	H	A	H	A	H	H	X	H	H	8.7E-07	0.00017
	0.22	0.53	0.3	0.51	0.34	0.42	0.27	0.46	0.78	0.49	0.46	0.54	0.42	0.33	0.45	0.49		
Tochiotome	AA	X	H	B	A	B	X	A	B	H	X	H	A	X	A	A	1.3E-09	2.6E-07
	0.08	0.47	0.3	0.12	0.58	0.29	0.73	0.1	0.15	0.49	0.54	0.54	0.09	0.33	0.39	0.34		
Fukuoka S6	AA	X	B	B	A	A	A	H	A	H	A	A	H	X	H	H	3.8E-09	7.7E-07
	0.08	0.47	0.03	0.12	0.58	0.29	0.27	0.46	0.78	0.49	0.46	0.24	0.42	0.33	0.45	0.49		

As to each genotype, refer to Table 3.

## 考察

ヒトにおける DNA 鑑定では、鑑定に利用する DNA マーカーについて、以下に述べる 2 つの「独立性」が統計的に証明されていなければならない。ひとつは、対立遺伝子座がハーディ・ワインバーグ (HW) 平衡にあること、もうひとつは、利用するマーカー座が連鎖関係にないことである。集団が十分に大きく、任意交配が成立している場合には HW 平衡が成立するはずである。ところが実際は、集団内にいくつかの下位集団が存在し、互いの交流が少ない場合は全体として任意交配が成立せず、結果としてホモ接合頻度が上昇することが知られている。欧米では下位集団の問題は重要視されており、現在も議論となっている (青木、2002)。厳密な遺伝学的条件を適用すれば「独立」とは言えないマーカーが多すぎるため、集団遺伝学者は計算の便宜上、異なる染色体上にある座は「独立」と仮定する場合もある (Risch et al., 1992)。

一方、イチゴ品種集団は選抜育種で成り立っており、任意交配が前提の HW 平衡はまず成立しないと言ってよい。そこでヒトの例にならって、マーカーが統計的に異なる染色体上にあれば、「独立」とみなすことにした。異染色体に座上するか否かを検定するには、後代検定による連鎖解析を行うのが最適であると考え、主に 5 つの自殖・交配集団を利用して検定を行った。

本節では、独立な 16 マーカーを利用すれば、約 99.9% の精度で国内の 117 品種を同定することが可能であると見積もられた。今後さらに新品种が育成され、比較品種数の増加が想定されるが、本技術は当分適用可能である。例えば比較品種数が 1000 まで増加しても、「さちのか」の同定精度は単純計算で 99.91% を維持できる。ただし、多型頻度は新品种が育成される度に変化するため、より正確な同定精度を算出するためには、頻繁にマーカーの多型頻度を更新する必要がある。本技術を海外で利用する際には、言うまでもなく、多型頻度の算出母体品種を見直す必要がある。

DNA 品種識別技術は、育成者権侵害や偽装表示の摘発が主な利用目的であり、係争の資料となることが予想される。その際に品種同



定の「確かさ」を数値で提示することが求められることも十分に考えられる。本節で明らかにした各マーカの独立性と多型頻度は、本識別技術の有用な付帯情報となるであろう。

### 第 3 章 第 4 節 （事例）韓国産イチゴの品種識別

国内ではイチゴは、11 月から 6 月にかけて市場に流通する。年間流通量は約 20 万 t であり、端境期に当たる夏季には約 4000 t の輸入イチゴが製菓用に流通する。従来、冬季の需要は国産のイチゴでほぼ賄われていたが、1999 年度を境に、年間 200 t あまりであった韓国からの輸入量が激増し、2001 年度には 1500 t にまで達した。これらの輸入イチゴは量販店でも頻繁に目にできるようになったため、品種育成関係者らの目にも触れ、果実の形態等から「さちのか」や「とちおとめ」ではないかとの疑惑が生じた。

韓国における栽培イチゴの品種構成については、公的統計資料を見出すことはできなかったが、中清南道農業振興院論山イチゴ試験場による 2003 年の推計によると、「レッドパール」60%、「章姫」30%、その他 10%（「とちおとめ」、「さちのか」、「苺香」等）となっており、韓国育成品種「苺香」を除く大部分が日本品種であると想定されている（小林、2003）。本研究で識別可能となった 117 品種はこれらの品種を全てカバーしている。

そこで 2001 年度、2002 年度の二年間にわたり、全国に分布する旧農業技術研究機構拠点の協力を得て、店頭で販売されている輸入イチゴをサンプリングし、開発途上であった DNA 品種識別技術を用いて分析を行った。本節では 2002 年度（2003 年初春）の分析についてまとめた。

## 材料及び方法

### 1. 分析材料

供試材料は、近畿地方県内のスーパー 2 店舗で販売されていた韓国産表記の 5 パック計 71 果実である（Table 19）。2 番パックは 4 個入りで、スーパーで小売り用に詰め直されたものと推定されるが、その他のパックはいずれも 15 個から 20 個入りであった。商品に貼付けられたバーコードの国番号は「880」であり、これは韓国の国番号と一致していた（Figure 14）。品種名についてはいずれもパック自体

に記載はなかったが、3 パックは売り場の表示で「女峰」と記されていた。これらの果実のがく片を DNA 抽出材料とし、第 2 章第 1 節と同様の方法で抽出を行った。

## 2. CAPS マーカーによる品種分析

分析には Table 2 で挙げた改変前の CAPS マーカーのうち、9 つを用いた（用いた 9 マーカーは Table 20 に記載）。第 2 章第 1 節と同様の方法により、全サンプルについて多型タイプを決定し、すでに確定している 125 品種の多型タイプと比較して一致する品種を検索した。

### 結果

Table 20 に 5 番パックの分析結果を例として示した。これは 15 個の果実を 9 マーカーで分析し、得られた多型タイプを表にしたものである。その結果、tRNA-*Bse*G I マーカー分析の泳動写真 (Figure 15) から判断できるように、このパックには 2 タイプの多型パターンを示す個体が混在していた。検出された多型タイプについて、候補となる 125 品種の中からそれぞれに一致する品種を検索した結果、果実番号 1、12 に該当する品種は「レッドパール」、残りの 13 果実が一致する品種は「さちのか」であった。このパックの分析結果を含めて、全体の結果を Table 19 に示す。本調査では解析した全ての果実が「さちのか」または「レッドパール」のいずれかの多型タイプと一致していた。また、2 番パック以外の全てのパックにおいて、これら 2 種の果実が混在していた。

Table 19. Information of strawberry samples transported from Korea and result of DNA analyses.

Package	Number of fruits	Buy date	Store	Labelled cultivar	Result of analyses	
					Sachinoka	Redpearl
1	20	2003. 1. 18	a	-	1	19
2	4	2003. 1. 18	a	Nyoho	0	4
3	15	2003. 1. 20	a	Nyoho	2	13
4	17	2003. 1. 20	a	Nyoho	11	6
5	15	2003. 1. 20	b	-	13	2
Total	71				27	44

a, b: Different two stores.



Figure 14. Investigated packed strawberry (No. 5) transported from Korea.

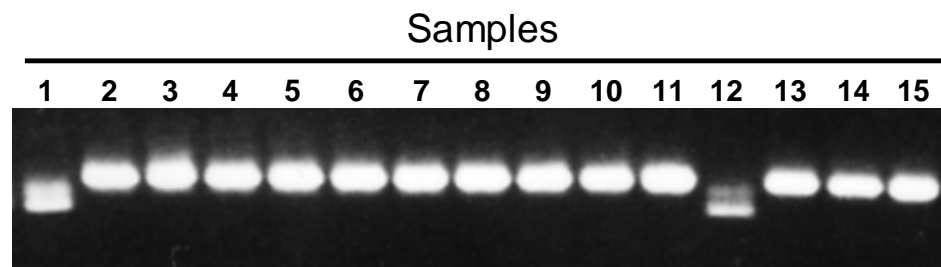


Figure 15. The mixed genotypes detected by tRNA-*Bse*G I marker from strawberries in same package (No. 5).

Table 20. Result of DNA analyses of strawberry pack No.5 by 9 markers.

Sample No.	Markers									Cultivar having identical genotype to detected one
	APX- <i>Mlu</i> I	CHI- <i>Pvu</i> II	F3H- <i>Nco</i> I	F3H- <i>Hpa</i> II	F3H- <i>Acc</i> I	APX2- <i>Dra</i> I	APX2- <i>Taq</i> I	OLP- <i>Dde</i> I	tRNA- <i>Bse</i> G I	
1	B	X	X	A	C	X	X	A	A	Redpearl
2	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
3	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
4	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
5	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
6	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
7	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
8	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
9	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
10	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
11	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
12	B	X	X	A	C	X	X	A	A	Redpearl
13	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
14	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka
15	B	A	X	A	C	A	A	H	X	Sachinoka

As to genotype of APX2-*Dra* I, OLP-*Dde* I and tRNA-*Bse* G I, refer to Table 3.

As to APX-*Mlu* I, CHI-*Pvu* II, F3H-*Nco* I and F3H-*Hpa* II, refer to lane 5 and 7 in Figure 2.

F3H-*Acc* I: Genotype 'C' is heterozygous of 620, 455, 320 and 300 bp bands.

APX2-*Taq* I: Genotype 'A' is heterozygous of 505 bp and 391 bp bands, and 'X' is homozygous of 505 bp band.

## 考察

本分析では、供試した 38% の果実が「さちのか」、62% が「レッドパール」の多型タイプと一致した。韓国のイチゴ生産は大部分が日本品種に依存しており、特にレッドパールは 6 割を占める主要品種であること、また品種検索の際に対照とした 125 品種は主要な日本の流通品種だけでなく、最近韓国で育成された「莓香」や「早紅」も含んでいることを踏まえて、我々はこれらが「さちのか」および「レッドパール」であると判定した。本試験を実施した時点で品種同定理論に基づく同定精度算出は行っていない。

購入日（おそらく入荷日も）や購入店舗が異なっていたにもかかわらず、供試したイチゴは「さちのか」と「レッドパール」のみで構成されており、ほとんどのパックに 2 品種の混合が認められた。「さちのか」の混合比率は 5-87% と幅があるが、これは生産あるいはパック詰め作業の段階で混合されたものと考えられる。韓国産輸入イチゴから「さちのか」が検出されたことから、育成者の許諾なく品種苗が国外へ持ち出された疑いが強まった。2003 年当時、韓国では、イチゴは品種保護制度の対象となっていなかった。品種保護のできない国へ種苗を持ち出す際、あるいはその収穫物を国内へ輸入する際には、育成者の許諾を得ることが種苗法第 21 条において義務づけられているため、今回の事例は種苗法に違反する可能性が極めて高い。

本分析結果は輸入果実における種苗法違反の可能性を指摘しただけでなく、店頭における品種表示の不正も示唆した。2 番、3 番および 4 番パックは店頭で「女峰」と表示され販売されていたが、実際には「女峰」は一果実も含まれていなかった。この品種表示が生産者、輸出入関係者、販売店のいずれでなされたのかは不明であるが、品種の情報も重要な品質構成要素であることを考えると、種苗法違反に劣らず大きな問題である。

本分析は 2002 年度に行ったものであるが、2001 年度にも同様の分析を行っており、輸入イチゴから「とちおとめ」と「さちのか」を検出している。韓国での栽培面積の広さにも関わらず「章姫」が全



く検出されなかったのは、果実硬度が低いため、おそらく栽培時点から輸出向け品種として意図的に除外されていたためと考えられる。2001 年度に開始した本分析の結果に基づいて、「さちのか」育成者権者である野菜茶業研究所は違法果実を販売していた量販店に逐次警告を行い、再犯防止の念書を受領した。これらの対処が、種苗法や関税定率法の法律面の整備、「レッドパール」育成者である西田朝美氏の提訴と連動した結果、2001 年度に 1500 t のピークに達した韓国産イチゴの輸入量は、2002 年度には半減し、2003 年度以降は 200 t 前後で安定して現在に至っている。

## 第 4 章 総合考察

栽培イチゴ (*Fragaria* × *ananassa*) は収益性が高く、イネ、トマトに次いで高い産出額を誇る重要農産物である。このため多くの研究者が変動する消費者ニーズに応じて味、硬さ、色、病害抵抗性、四季成性等の重要形質を臨機応変に操作しようと、育種、栽培、遺伝子等あらゆる面から取り組んでいる。しかし八倍体である栽培イチゴのゲノム構成は未解明で、遺伝様式も特定できておらず、育種研究およびゲノム研究分野にとって重大な懸案となっている。特にゲノム研究分野にとっては致命的であり、他作物での著しいゲノム育種の発展とは対照的に、未だ連鎖地図に基づく QTL 解析も行えない。

高次倍数体のゲノム構成を明らかにするツールのひとつとして、従来は優性 DNA マーカーのみが利用されてきたが、本研究では、共優性マーカーである「ゲノム特異的マーカー」の作出を試み、その性質と利用例を示した。また、ゲノム特異的マーカーが明瞭かつ安定である性質を利用して DNA 品種識別技術に応用し、2001 年度から表面化したイチゴの育成者権侵害問題の解決の一助とした。

### 栽培イチゴにおけるゲノム特異的 DNA マーカーの開発

倍数性植物は自然界では決して珍しくない。栽培植物においても、人為的操作や選抜により多くの倍数体が存在している。種間交雑や染色体倍加により生じた倍数体植物は、しばしば非常に複雑なゲノム構成を取り、遺伝学者を悩ませている。しかし、近年急速に発展している DNA マーカー技術は、この入り組んだゲノム構成を分解し、遺伝様式解明に道筋をつける一助となることが期待されている。「ゲノム特異的マーカー」は理論上、雑多なゲノムの中から特定のゲノムだけを検出し、ゲノム別にさまざまな遺伝解析が可能となるため、従来の優性マーカー分析では得られなかった情報が得られる可能性が高い。

ゲノム構成および各ゲノムの祖先種が解明されており、遺伝的にも固定されているコムギでは、ゲノム特異的マーカーの作出はさほど難しいことではない。しかし、コムギよりさらに高次の倍数体であり、ゲノム構成も祖先種も解明されていない *F.* × *ananassa* では、栄養繁殖性のため遺伝的に固定されていないこともあり、コムギと

同様の手法でマーカーを作出することは不可能である。そこでクラスター分析を用いて、擬似的に PCR で増幅された同祖遺伝子群をゲノム別に分類することにより、ゲノム特異的マーカーの作出を試みた。

*F. × ananassa* で開発されていた従来のマーカーはいずれも、同祖遺伝子群を非特異的に増幅 (RAPD、AFLP、SSR、CAPS)、もしくは特定のアレルを特異的に増幅 (STS) するもので、自殖後代での分離比は 1:1 や 3:1 を示し、具体的なゲノム構成を反映した報告はなかった。本研究で開発した 25 マーカーのうち 2 つは二倍体ゲノム特異的であることが明らかとなり、*F. × ananassa* における二倍体ゲノムの存在を裏付けた。その他の大部分のマーカーも、自殖後代で 1:2:1 の分離比に最も適合し、また polysomic 遺伝であれば観察される可能性の高い遺伝子型が全く観察されなかったことから、二倍体ゲノム特異的ではないかと推測された。disomic 遺伝する DNA マーカーの意図的な作出は *Fragaria* 属で初めてであり、Folta ら (2006) は総説で、将来のイチゴゲノム研究に有用なマーカーとして、SSR と並んでこのゲノム特異的マーカーを紹介している。

本研究では、マーカー作出のターゲットとしてランダムに選出した 19 座のうち 16 座の遺伝様式を観察したが、13 座が disomic 遺伝に最も適合しており、polysomic 遺伝を示唆する現象は全く見られなかった。このことから、*F. × ananassa* は高度に複二倍体化していると考えられ、そのゲノム構成は、AAA'A'BBBB (部分四倍体説) よりも、AAA'A'BBB'B' (完全複二倍体説) が適していると結論した。しかし、複二倍体化が完全であるか否かは未検証で、稀に同祖染色体と対合する可能性は否定できない。一方、マーカーのゲノム選択性を利用して *F. × ananassa* の祖先種の推定も試み、*F. vesca* が A ゲノムドナーであり、八倍体 *Fragaria* 種の祖先である可能性が高いこと、また他のゲノムドナーは供試した 10 種 21 系統の二～六倍体野生種には存在しないことを確認した。

今後、ゲノム構成の完全解明や祖先種の探索を行う上で、更に多くの座におけるゲノム特異的配列の特定、およびマーカー化は有用であろう。その際、同一の同祖遺伝子群から各構成ゲノムに特異的

な同祖性マーカー（それぞれ A、A'、B、B' ゲノムに特異的）を作出すること、および開発マーカーの遺伝特性が明確になるよう、複対立遺伝子を検出できるような設計にすることが望ましい。*F. × ananassa* の遺伝様式や祖先種の決定は、ゲノム研究分野と育種研究分野にとって悲願ともいえ、今後の展開が期待される。

また、ゲノム特異的マーカーは現時点で唯一、ホモ接合体とヘテロ接合体を区別できるマーカーであり、既に育種研究者らによって、種苗の親子鑑定、種子繁殖性イチゴ育種を視野に入れた自殖率の推定、自殖による遺伝的固定度の確認等に利用されている。

*F. × ananassa* は  $2n=8x=56$  の染色体構造を持ち、ヘテロ接合体であるため、今後作成される連鎖地図は理論上 56 に収束し、完全複二倍体と仮定すると 28 組のペアを形成すると予想される。これら 28 組は、1～7 の同祖染色体別に分類でき、かつ A、A'、B、B' の 4 種の由来ゲノム別にも分類できるはずである。コムギの例に倣えば、1A 染色体から 7B' 染色体までに整理できることになる（Figure 16）。本研究が提示した手法により、同一の同祖遺伝子群に由来する複数のゲノム特異的マーカーを開発して利用すれば連鎖群を 1～7 の同祖群に分類することが可能となり、かつ各マーカーが検出するゲノムの祖先種（近縁種）を特定できれば、ゲノム由来別に整理することも可能となろう。コムギのように全染色体が特定された連鎖地図が完成すれば、遺伝解析を行う上でも、異数体育種を行う上でも、大きなメリットとなる。

ゲノム特異的マーカーは作出に労力を要するため、通常の連鎖地図作成や連鎖マーカー開発には適していない。しかし、共優性という性質から、要所で利用するキーマーカーとしての価値は高い。今後一層のゲノム特異的マーカーの開発が望まれるが、CAPS 法に基づくマーカー開発は手間がかかり現実的ではない。CAPS は品種識別のように、汎用性、経済性、簡易性を目的とした技術開発には最適であるが、今後のゲノム研究には SSR を利用したほうが得策であろう。本研究を開始した 2001 年にはイチゴで SSR の報告はなく、2004 年時点でも 58 個の遺伝子配列情報が公開されているのみであったため、他に選択の余地はなかったが、2007 年現在、EST 情報を利用した SSR

マーカーの開発が進み (Bassil et al., 2006)、*Fragaria* 属で 4000 弱、*F. × ananassa* でも約 700 の SSR 情報が公開され、利用可能となっている。従来法 (CAPS) では、開発ターゲットとした同祖遺伝子群に品種間多型があるとは限らず、多型があったとしても制限酵素認識部位でなければならないという厳しい条件があった。したがってマーカーの開発効率は非常に低く、34 の同祖遺伝子群を解析して 25 のマーカーしか作出できなかった。当然ながら、ひとつの同祖遺伝子群から複数のマーカーが作れることは稀であった。しかし SSR では高確率で品種間多型が存在し、かつその多型はほぼ確実に検出できるため、マーカー作出効率は格段に上昇することが期待できる。1 種の同祖 SSR 群から、A、A'、B (B') ゲノムのそれぞれに対応するマーカーを作出できれば、単純にマーカー数を倍増できるだけでなく、前述したようにゲノム構成の解明、ゲノム祖先種の推定、連鎖地図の整理を行っていく上で非常に有用なツールとなる。

コムギでは染色体が全て同定されており、異数体の解析、種間交雑、その他多くの研究が確固たる理論に基づいて計画されており、研究勢力、研究材料、研究資金も充実している。その反面、他の倍数性植物研究は恵まれているとは言いがたく、二倍体作物と比較しても、特にゲノム研究面で遅れを取っていると言わざるを得ない。本研究で提示したゲノム特異的マーカー開発法の利用により、倍数性植物研究で新たな展開・知見が得られることを期待する。

## **DNA マーカーを利用したイチゴの品種識別技術の開発**

本研究で開発したイチゴの品種識別技術は、再現性が高く（感度・特異性 95%以上）操作も簡易であるため、既に種苗管理センター、関税中央分析所、地方税関、民間の食品分析センターに特許許諾や講習による技術移転をおこなっている。また 10 以上の県の農業試験場に技術移転を行っており、熊本県の「ひのしずく」、鹿児島県の「さつまおとめ」、茨城県の「ひたち姫」等、各県で育成した品種の権利保護に利用されている（長井ら、2004；野田ら、2005；氏家ら、2007）。

農林水産省種苗課では、将来、品種登録の際に DNA データを同時に登録するシステムを検討しているが、種苗管理センターでは既に、

このシステムの導入に向けて、本識別技術を用いたイチゴ遺伝資源の DNA タイピングを開始している。一方、イチゴのみならず、他作物の DNA 品種識別法についても再現性確認を行う必要性が提起されており、現在種苗管理センターを中心に SSR マーカーの妥当性試験が進められ、試験設計に関して、本研究が唯一の前例として参考にされている。

本研究を開始し、流通果実の分析と量販店への警告を行った 2001 年度を境に、韓国からの生鮮イチゴ輸入量は急激に減少した。現在では、冬季に青果売場で輸入イチゴを目にできることはほとんどない。法整備とともに、抑止効果が十分に働いた結果であろう。これまで韓国は、UPOV 条約による育成者権保護対象作物に、イチゴを含めていなかった。したがって、韓国における日本品種の収穫物には権利は及ばず、輸入される果実についてのみ関税定率法で取り締まっていた。しかし 2009 年以降は、韓国もイチゴを育成者権保護対象とし、海外品種の栽培に許諾料を支払うこととなった。今後は国内だけでなく海外でも、品種の DNA 分析が求められると予想される。再現性が保証され、同定精度の算出が可能な本法の活用面はさらに広がる可能性がある。

関税定率法は、輸入される農産物加工品の原材料にまで、育成者権の及ぶ範囲を広げている。しかし本研究で開発した技術は、PCR 増幅のターゲットとなる DNA 領域のサイズが大きく、加熱・加工により DNA が断片化したイチゴには適用できない。現在、加工品へ適用可能な短鎖長のゲノム特異的マーカーの開発が進められている。

**2n=8x=56、56 linkage groups (28 pairs?)**

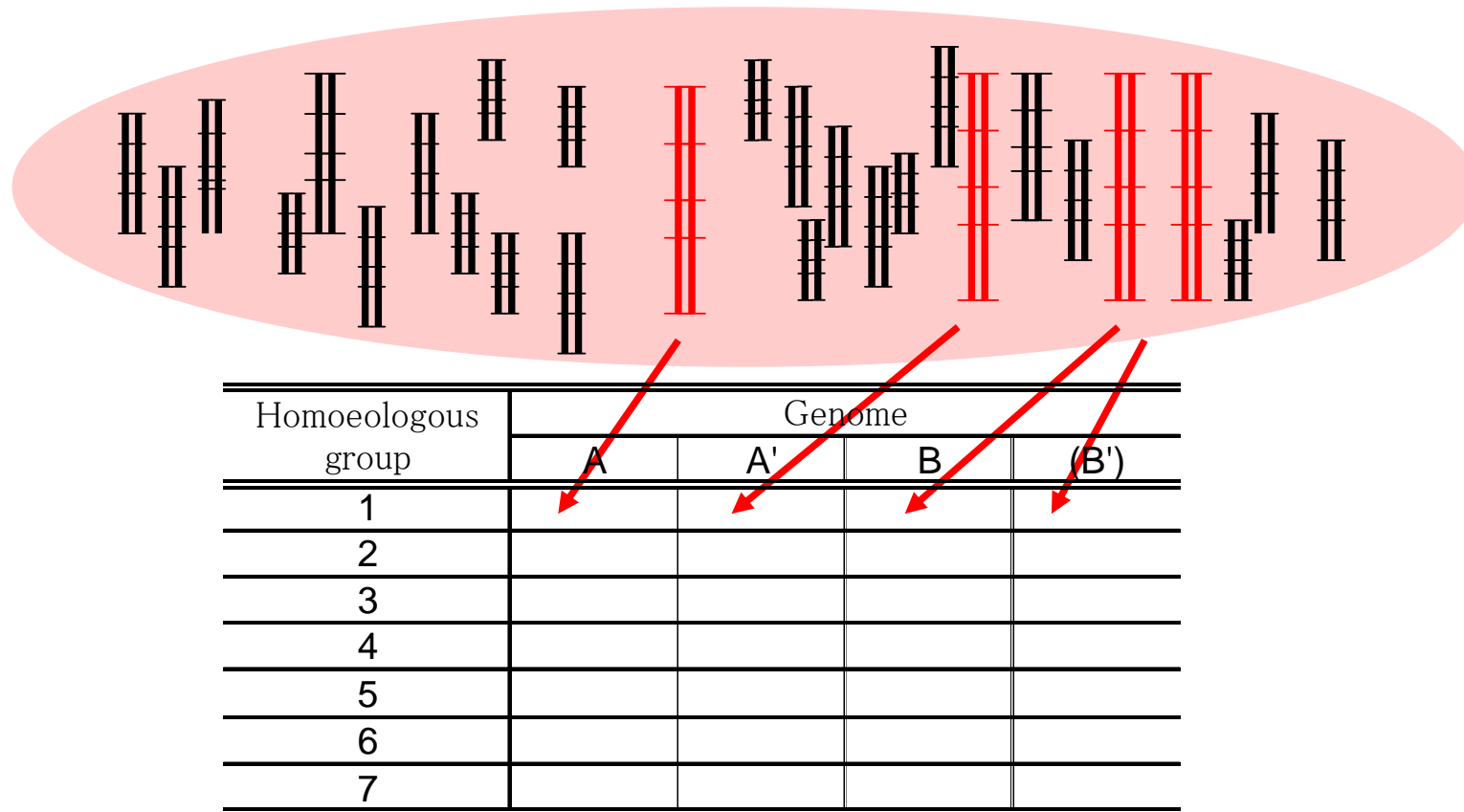


Figure 16 Concept of identification of linkage groups in the polyploid strawberry.



## 摘要

### 栽培イチゴにおけるゲノム特異的 DNA マーカーの開発

栽培イチゴ (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) は産業上重要な作目のひとつであり、活発な育種事業により、次々と新品種が育成されている。しかし栽培イチゴは高次倍数体（八倍体）で、ゲノム構成も未だ解明されておらず、マーカー解析や遺伝解析、またこれに基づく効率的育種の実施が困難である。そのため、栽培イチゴでは他作物に比べこれらの研究が大きく遅れを取っている。

そこで著者は、複数ゲノムの複合体であるとされる八倍体イチゴゲノムのうち、単一ゲノムのみを特異的に検出するゲノム特異的（DNA）マーカーの作出を試み、ゲノム構成解明の一助となることを目的に本研究を実施した。はじめに、PCR で増幅された同祖遺伝子群を塩基配列に基づいてクラスター分析すると 3～4 群に分類できた。この分類が八倍体イチゴのゲノム構成を反映していると仮定し、特定の遺伝子群に特異的な配列を利用してプライマーの設計を行った。多型検出は CAPS 法で行った。その結果、非特異的に遺伝子群を増幅した場合に比べ、得られる多型の明瞭性は大幅に向上し、二倍体植物の場合と酷似したマーカーが得られた。続いて、自殖・交配システムを用いて、これらのマーカーの遺伝様式を解析したところ、大部分のマーカーが disomic 遺伝する可能性が最も高いことを確認した。栽培イチゴで disomic 遺伝する DNA マーカーの報告は例がない。また、polysomic 遺伝を示唆する遺伝様式が全く見られなかったことから、八倍体イチゴゲノムが AAA'A'BBB'B'（完全複二倍体）に近い構成をとっていると推測された。

更に、*Fragaria* 属野生種におけるゲノム特異的マーカーの増幅の有無を調査することにより、栽培イチゴを構成する個々のゲノムが由来する祖先種の探索を試みた。その結果、*F. vesca*（二倍体）が最低一組のゲノム祖先種であるという従来知見と一致したが、その他の祖先種は供試種には見られなかった。今後、ゲノムごとに近縁種を探索する必要がある。

研究最先端のコムギにおいてはゲノム特異的マーカーは難なく得られるが、研究の進んでいない多くの倍数性作物では馴染みがない。研究材料・勢力共にコムギには到底及ばない多くの倍数性作物研究に対して、本研究はひとつの手法を提案する。

## **DNA マーカーを利用したイチゴの品種識別技術の開発**

平成 13 年頃、栄養繁殖性であるイチゴが無断増殖され、品種育成者の許可を得ずに栽培、流通されているという事態が懸念され始めた。特に海外から輸入されたイチゴの中に、公的機関育成の「さちのか」や「とちおとめ」が混入している疑いが強く、事実であれば国内のイチゴ生産者にとって著しい不利益となる。このため、「育成者権侵害」を立証できる DNA 品種識別法の開発が強く望まれていた。

そこで著者らは、栽培イチゴで開発した 25 の DNA マーカーを利用して品種識別技術の確立を試み、これらのマーカーを用いることで、突然変異系統を除く 117 品種が識別可能であることを明らかにした。

品種検出技術の再現性を保証するには、適正な試験に基づいて、感度・特異性を明示する必要がある。著者らは、AOAC(Association of Official Agricultural Chemists) International の指定する定性分析法の妥当性確認試験基準を参考に、研究室間共同試験を設計・実施した。その結果、10 以上の独立した分析機関において、ほぼ全てのマーカーで感度・特異性共に 95% 以上という良好な再現性が確認できた。再現性の保証された品種識別技術は農作物では初めてであり、現在は信頼度の高い技術として各県、分析センターや税関に技術移転されている。

また DNA 品種識別には、常に、偶然に、全ての DNA 多型が一致する他品種が存在する可能性、つまり誤判定の危険性を考慮しなければならない。そこで品種同定理論（鵜飼・2004）に基づき、相互独立なマーカーを選出した上で、解析した全品種（125 品種）の多型データから各マーカーの多型頻度を算出し、危険率を明示した。この結果、16 マーカーを用いることで 99.9% の確率で品種判定が可能であることを示した。

最後に、平成 15 年春に量販店より購入された韓国産「女峰」イチゴを本識別技術により分析したところ、「さちのか」と「レッドパール」の混合であることが立証された。

## Summary

### Development of genome-specific DNA markers in *F. × ananassa*

*Fragaria × ananassa* (strawberry) is a highly-valued fruit crop species. Traditional breeding has brought many improved cultivars to the marketplace. However, analyses with DNA markers and Mendelian predictions in octoploid *F. × ananassa* are confounded by its complex and incompletely understood genetic constitution. Therefore, the breeding with genome analysis of *F. × ananassa* lags far behind other major crops.

In this study we tried to develop genome-specific DNA markers which can detect a single genomic locus among multiple homoeologous genomes in *F. × ananassa*, in order to clarify the genetic constitution of *F. × ananassa*. Homoeologous genes amplified by PCR from the octoploid genome could be divided into 3-4 major clusters based on their sequences, and it was assumed that each cluster represents each genome composing octoploid. Primers with genome-specific sequences were designed, and polymorphisms were detected by the CAPS method. As a result, the clarity of polymorphic bands detected by these specific markers was dramatically improved compared with one by non-specific markers. We then investigated the inheritance of developed markers, and demonstrated that the manner of heredity of them were most suitable to disomic, Mendelian inheritance. This is the first report of DNA markers segregating under normal disomic inheritance in *F. × ananassa*. Moreover, no detection of polysomic inheritance in any developed markers implied that *F. × ananassa* is highly diploidized octoploid (AAA'A'BBB'B').

A search for ancestral species that could have donated a genome to *F. × ananassa* was carried out by detecting the genome-specific markers in *Fragaria* species. At least one genome was thought to be derived from *F. vesca* (2×). However, no other ancestral genomes were found in the 10 species tested. Further research is necessary to identify closely related species as potential genome donors.

Genome-specific markers have proven to be valuable tools for the

study of wheat genetics. However, there has been no established method to obtain such markers in other polyploids. This study provides one method to accelerate the genetic analysis of understudied polyploids, whose materials, funding and manpower is far smaller than what is available for the study of wheat.

### **Identification of strawberry cultivars using DNA markers**

The unregulated propagation and distribution of patented domestic strawberry cultivars was first suspected as a serious problem in 2001. Fresh strawberries had been imported from other Asian countries. However, there were strong suspicions that cvs. ‘Sachinoka’ and ‘Tochiotome’ might have been mixed with imported strawberries. If these cultivars were imported, the rights of breeders have been infringed, thus inflicting economic damage on domestic producers. In light of these concerns, the development of a practical technique for identifying strawberry cultivars is required.

We tested the utility of 25 markers we developed for cultivar identification and confirmed their ability to distinguish among 117 cultivars, except for mutator strains.

Validation of the genome-specific markers as a regulatory tool rests on the reproducibility of the technique as measured by sensitivity and specificity. We carried out a collaborative study according to the criteria which the AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) International has established for qualitative analyses, and confirmed the high sensitivity and specificity of over 95% for most markers. This is the first report of a technique for cultivar identification with a reproducibility assured through collaborative study. This method was disseminated to several prefectural agricultural research centers, private food research laboratories and the customs service.

A false positive could possibly result from the accidental generation of a cultivar which has a completely identical genotype as one of the patented cultivars. We calculated the probability of such an event

based on the frequency of each genotype detected by independent markers (Ukai, 2004. *Theory of cultivar identification*). The theoretical accuracy of identification is about 99.9% with 16 independent markers.

As a practical test of the methodology, imported strawberries from Korea which were labeled ‘Nyoho’, were found to be a mixture of cvs. ‘Sachinoka’ and ‘Redpearl’.

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始適切なご指導、ご鞭撻を賜り、また多大なる御校閲の労をとっていただいた筑波大学大学院生命環境科学研究科 江面浩教授に心から感謝申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、深遠なるご助言と温かい激励を賜り、また御校閲の労をとっていただいた筑波大学大学院生命環境科学研究科 西村繁夫教授、渡邊和男教授、半田高准教授に深謝の意を表する。

農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所 松元哲上席研究員には、本研究の遂行にあたり、終始適切なご助言と叱咤激励を賜った。素晴らしい研究環境と惜しみないご協力に対して、ここに深く感謝する。

野菜茶業研究所 吹野伸子主任研究員には、研究者の先輩として、研究面および精神面から終始ご厚情を賜った。また本研究をまとめるにあたり、適切なご助言と激励を賜り、心から感謝申し上げます。

野菜茶業研究所 上田浩史非常勤研究員には、研究室間妥当性試験の実施において甚大なるご協力を賜った。ここに感謝の意を表する。

野菜茶業研究所 東尾久雄研究チーム長には、本研究をまとめるにあたり、甚大な激励と執筆環境を賜った。ここに深く感謝申し上げます。

ゲノム特異的マーカーの応用研究を行うにあたり、私的な時間を割いてサンプルを作成、供与いただき、また終始にわたり、温かいご助言と激励、ご高察を賜った三重県科学技術振興センター農業研究部 森利樹主幹研究員、山本有子研究員に深謝の意を表する。

輸入イチゴの分析、DNA マーカーの開発等、本研究開始当初から甚大なるご協力と温かい激励を賜った栃木県農業試験場 小林俊一分場長、天谷正行室長、田崎公久研究員に感謝の意を表する。

最後に、本研究の遂行に当たり、公私にわたって温かくサポートいただいた野菜茶業研究所 山川利美非常勤職員、竹内絹江非常勤職員に深く感謝するとともに、イチゴ品種のサンプル収集に快くご

協力くださった育成者の方々、ご多忙中、多大なお時間を割いて研究室間妥当性試験にご協力くださった研究者の方々に、心から感謝申し上げます。



## 引用文献

- Albani MC, Battey NH and Wilkinson MJ (2004) The development of ISSR-derived SCAR markers around the seasonal flowering locus (SFL) in *Fragaria vesca*. Theor Appl Genet 109: 571-579
- AOAC International (2002) Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analyses. AOAC Official Method of Analysis. pp12.
- 青木康博 (2002) DNA 鑑定による法医学的個人識別の確率・統計学的背景. 岩手医学雑誌 54 : 81-94
- Arnau G, Lallemand J and Bourgoïn M (2003) Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. Euphytica 129: 69-79
- Arulsekhar S, Bringham RS and Voth V (1981) Inheritance of PGI and LAP isozymes in octoploid cultivated strawberries. J Amr Soc Hort Sci 106: 679-683
- Asao H, Nishizawa Y, Arai S, Sato T, Hirai M, Yoshida K, Shinmyo A and Hibi T (1997) Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca fumuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. Plant Biotechnol 14: 145-149
- Ashley MV, Wilk JA, Styan SMN, Craft KJ, Jones KL, Feldheim KA, Lewers KS and Ashman TL (2003) High variability and disomic segregation of microsatellites in the octoploid *Fragaria virginiana* Mill. (Rosaceae). Theor Appl Genet 107: 1201-1207
- Avraham AL and Moshe F (2002) The impact of polyploidy on grass genome evolution. Amer Soci Plant Biol 130: 1587-1593
- Bassil NV, Gunn M, Folta K and Lewers K (2006) Microsatellite markers for *Fragaria* from 'Strawberry Festival' expressed sequence tags. Mol Ecol Notes 6: 473-476
- Bringham RS (1990) Cytogenetics and evolution in American *Fragaria*. Hort Sci 25: 879-881
- Bryan GJ, Stephenson P, Collins A, Kirby J, Smith JB and Gale MD

- (1999) Low levels of DNA sequence variation among adopted genotypes of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet* 99: 192-198
- Byrne D and Jelenkovic G (1976) Cytological diploidization in cultivated octoploid strawberry *Fragaria × ananassa*. *Can J Genet Cytol* 18: 653-659
- Cochran WG (1954) Some methods for strengthening the common  $\chi^2$  test. *Biometrics* 110: 417-451
- Congiu L, Chicca M, Cella R, Rossi R and Bernacchia G (2000) The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Mol Ecol* 9: 229-232
- Da Silva JAG, Sorrells ME, Burnquist WL and Tanksley SD (1993) RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum*. *Genome* 36: 782-791
- Da Silva JAG and Sobral BWS (1996) Genetics of polyploids. The Impact of Plant Molecular Genetics. 3-38. Birkhäuser Boston. pp348.
- Davis TM, DiMeglio LM, Yang R, Styan SMN and Lewers KS (2006) Assessment of SSR marker transfer from the cultivated strawberry to diploid strawberry species: functionality, linkage group assignment and use in diversity analysis. *J Amer Soc Hort Sci* 131: 506-512
- Degani C, Rowland LJ, Levi A, Hortynski JA and Galletta GJ (1998) DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica* 102: 247-253
- Degani C, Rowland LJ, Saunders JA, Hokanson SC, Ogden EL, Golan-Goldhirsh A and Galletta GJ (2001) A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. *Euphytica* 117: 1-12
- Fedorova N (1946) Crossability and phylogenetic relations in the main European species of *Fragaria*. *Comp Rend Acad Sci USSR* 53: 545-547

- Feldsine PT, Lienau AH, Forgey RL and Calhoon RD (1997) Visual immunoprecipitate assay (VIP) for *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* species detection in selected foods: collaborative study. J AOAC Int 80: 791-805
- Feldsine PT, Lienau AH, Leung SC, Mui LA, Humbert F, Bohnert M, Mooijman K, Schulten S, Veld PI, Rollier P, Leuschner R and Capps K (2003) Detection of *Salmonella* in fresh cheese, poultry products, and dried egg products by the ISO 6579 *Salmonella* culture procedure and the AOAC official method: collaborative study. J AOAC Int 86: 275-295
- Folta KM and Davis TM (2006) Strawberry genes and genomics. Crit Rev Plant Sci 25: 399-415
- Gil-Ariza DJ, Amaya I, Botella MA, Blanco JM, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V and Sánchez-Sevilla JF (2006) EST-derived polymorphic microsatellites from cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa*) are useful for diversity studies and varietal identification among *Fragaria* species. Mol Ecol Notes 6: 1195-1197
- Guyomarc'h H, Sourdille P, Edwards KJ and Bernard M (2002) Studies of the transferability of microsatellites derived from *Triticum tauschii* to hexaploid wheat and to diploid related species using amplification, hybridization and sequence comparisons. Theor Appl Genet 105: 736-744
- Hadnou AM, Sargent DJ, Wilson F, James CM and Simpson DW (2004) Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping. Genome 47: 429-438
- Halldén C, Hansen M, Nilsson NO, Hjerdin A and Säll T (1996) Competition as a source of errors in RAPD analysis. Theor Appl Genet 93: 1185-1192
- Harrison RE, Luby JJ and Furnier GR (1997) Chloroplast DNA restriction fragment variation among strawberry (*Fragaria spp.*)

- taxa. J Amer Soc Hort Sci 122: 63-68
- Hattori K (1991) Inheritance of carotinoid pigmentation in flower color of *Chrysanthemum*. Jpn J Breed 41: 1-9
- Haymes KM, Henken B, Davis TM and Weg WE (1997) Identification of RAPD markers linked to a *Phytophthora fragariae* resistance gene (*Rpf1*) in the cultivated strawberry. Theor Appl Genet 94: 1097-1101
- Ibrahim AMF, Sadanaga K and Denisen EL (1981) Chromosomal behavior in octoploid strawberry progenies and their parental clones during meiosis. J Amer Soc Hort Sci 106: 522-526
- Ichijima K (1926) Cytological and genetic studies on *Fragaria*. Genetics 11: 590-604
- Jimenez-Bermudez S, Redondo-Nevado J, Munoz-Blanco J, Caballero JL, Lopez-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA and Mercado JA (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiol 128: 751-759
- Kaundun SS and Matsumoto S (2003) Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between assamica and sinensis varieties. Theor Appl Genet 106:375-83
- Kim IJ, Lee BH, Jo J and Chung WI (2001) Sequence variability of nine cytosolic ascorbate peroxidases in polyploid strawberry. DNA Sequence 11: 475-484
- 小林 彰一 (2003) 韓国のイチゴ産業の現状と未来. 日本イチゴセミナー紀要 No.11 : 33
- Kunihisa M, Fukino N and Matsumoto S (2005) CAPS markers improved by cluster-specific amplification for identification of octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars, and their disomic inheritance. Theor Appl Genet 110: 1410-1418
- Lerceteau-Köhler E, Guérin G, Laigret F and Denoyes-Rothan B (2003) Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in

- the octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) using AFLP mapping. Theor Appl Genet 107: 619-628
- Lewers KS, Styan SMN and Hokanson SC (2005) Strawberry GenBank-derived and genomic simple sequence repeat (SSR) markers and their utility with strawberry, blackberry, and red and black raspberry. J Amer Soc Hort Sci 130: 102-115
- Longley AE (1926) Chromosomes and their significance in strawberry classification. J Agr Res 15: 559-568
- MacKey J (1970) Significance of mating systems for chromosomes and gametes in polyploids. Hereditas 66: 165-176
- MacKey J (1987) Implication of polyploidy breeding. Biol Zent bl 106: 257-266
- Martinez-Zapater JM and Oliver JL (1984) Genetic analysis of isozyme loci in tetraploid potatoes (*Solanum Tuberosum* L.). Genetics 108: 669-679
- McClure FD (1990) Design and analysis of qualitative collaborative studies: minimum collaborative program. J AOAC 73: 953-960
- Mochizuki T, Sone K and Noguchi Y (2002) Proceeding quality of decaploid strawberry lines derived from *Fragaria* × *ananassa* and diploid wild species. Acta Hort 567: 239-242
- Mok DWS and Evans WD (1971) Chromosome associations at diakinesis in the cultivated strawberry. Can J Genet Cytol 13: 231-236
- 門馬信二、興津伸二、高田勝也（1990）イチゴの四季成り性の遺伝．野菜茶研報 C1：21-29
- 森下昌三、山川理、望月龍也（1996）イチゴの種間雑種に関する研究．野菜茶研報 A（野菜・花き）11：69-95
- 森利樹、國久美由紀、山本有子、松元哲（2007）イチゴの品種識別用 DNA マーカーを活用した品種検索と親子関係判定プログラム．園学雑 6（別 1）：126
- 長井純一、大江正和、國久美由紀、松元哲（2004）CAPS マーカーを用いたイチゴ‘さつまおとめ’の品種識別．九州農業研究 66：215

- 野田孝博、飯牟礼和彦、國久美由紀、松元哲（2005）CAPS マーカ  
ーを用いたイチゴ‘熊研い 548’の品種識別． 九州農業研究 6  
7 : 156
- Nourse SM, Fickus EW, Cregan PB and Hokanson SC (2002)  
Development of simple sequence repeat (SSR) molecular markers  
in strawberry. Strawberry research to 2001. 48-53. ASHS Press,  
Alexandria, USA. pp174.
- 織田弥三郎（2004）栽培イチゴの起源と来歴． 農業技術大系野菜編  
3－イチゴ－基礎編：3-10 東京社団法人 農山漁村文化協会．  
pp452.
- Ohtsubo K, Nakamura S and Imamura T (2002) Development of the  
primer sets for identification of a rice cultivar, Koshihikari, by  
PCR. [Japanese] Nippon Nogeikagaku Kaishi 76: 388–397.
- Potter D (2000) Phylogenetic relationships among species of *Fragaria*  
(Rosaceae) inferred from non-coding nuclear and chloroplast DNA  
sequences. Syst Bot 25: 337-348
- Powers L (1944) Meiotic studies of crosses between *Fragaria ovalis* and  
*F. × ananassa*. J Agr Res 69: 435-448
- Risch NJ and Devlin B (1992) On the probability of matching DNA  
fingerprints. Science 255: 717-720
- Sargent DJ, Davis TM, Tobutt KR, Wilkinson MJ, Battey NH and  
Simpson DW (2004a) A genetic linkage map of microsatellite,  
gene-specific and morphological markers in diploid *Fragaria*.  
Theor Appl Genet 109: 1385-1391
- Sargent DJ, Hadnou AM, Wilkinson MJ, Battey NH and Hawkins JA  
(2004b) Cross-species amplification and phylogenetic  
reconstruction using *Fragaria* microsatellite primers. Acta Hort  
649: 87-92
- Sargent DJ, Clarke J, Simpson DW, Tobutt KR, Arus P, Monfort A,  
Vilanova S, Denoyes-Rothan B, Rousseau M, Folta KM, Bassil NV  
and Battey NH (2006) An enhanced microsatellite map of diploid  
*Fragaria*. Theor Appl Genet 112: 1349-1359

- Senanayake YDA and Bringhurst RS (1967) Origin of *Fragaria* polyploids. I. Cytological analysis. Amer J Bot 54: 221-228
- Shimomura K and Hirashima K (2006) Development and Characterization of simple sequence repeats (SSR) as markers to identify strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.). J Jpn Soc Hort Sci 75: 399-402
- Soltis DE and Soltis PS (1993) Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. Crit Rev Plant Sci 12: 243-273
- Stebbins GL (1950) Variation and evolution in plants. Columbia Univ Press. NY. pp643.
- Sugimoto T, Tamaki K, Matsumoto J, Yamamoto Y, Shiwaku K and Watanabe K (2005) Detection of RAPD markers linked to the everbearing gene in Japanese cultivated strawberry. Plant Breed 124: 498-501
- Swaminathan MS (1954) Cytogenetic studies in *Solanum verrucosum* variety spectabilis. Amer J Botany 41: 645-651
- Sybenga J (1973) Allopolyploidization of autopolyploids. 2. Manipulation of the chromosome pairing system. Euphytica 22: 433-444
- 田崎公久、柏谷祐樹、天谷正行 (2006) マルチプレックス PCR 法による国内主要イチゴ品種識別法. 平成 18 年度関東東海北陸農業研究成果情報
- 田崎公久、飯村一成、家中達広、稲葉幸雄、天谷正行 (2007) イチゴ SSR 配列の特徴. 育種学研究 9 (別 1) : 103
- This P, Jung A, Boccacci P, Borrego J, Botta R, Costantini L, Crespan M, Dangl GS, Eisenheld C, Ferreira-Monteiro F, Grando S, Ibàñez J, Lacombe T, Laucou V, Magalhães R, Meredith CP, Milani N, Peterlunger E, Regner F, Zulini L and Maul E (2004) Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. Theor Appl Genet 109: 1448-1458
- Truong C, Palme AE, Felber F and Naciri-Graven Y (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch,

- Betula pubescens* ssp. *tortuosa*. Mol Ecol Notes 5: 96-98
- Tyrka M, Dziadczyk P and Horthyński JA (2002) Simplified AFLP procedure as a tool for identification of strawberry cultivars and advanced breeding lines. Euphytica 125: 273-280
- 氏家有美、宮城慎、高津康正、國久美由紀、松元哲 (2007) CAPS (cleavage amplified polymorphic sequence) マーカーを利用したイチゴ系統「ひたち姫」「ひたち 3 号」「ひたち 4 号」の品種識別. 園学雑 6(別 1): 387
- 鵜飼保雄 (2004) 植物品種における品種同定理論. 農業および園芸 79: 194-198
- Vellicce GR, Ricci JCD, Hernandez L and Castagnaro AP (2006) Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene *ch5B* in strawberry. Transgenic Res 15: 57-68
- Wall AM, Riley R and Gale MD (1971) Position of a locus on chromosome 5B of *Triticum-Aestivum* affecting homoeologous meiotic pairing. Genet Res 18: 329-339
- Watanabe K and Orrillo M (1994) Disomic behavior of polyploid tuber-bearing *Solanum* species. Jpn J Genet 69: 637-643
- Watanabe K (1977) The control of diploid-like meiosis in polyploid taxa of Chrysanthemum (compositae). Jpn J Genet 52: 125-131



## 研究業績

### 原著論文

- Kunihisa M, Matsumoto S, and Fukino N (2003) Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for identification of strawberry cultivars. *Euphytica* 134: 209-215
- Kunihisa M, Fukino N, and Matsumoto S (2005) CAPS markers improved by cluster-specific amplification for identification of octoploid strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivars, and their disomic inheritance. *Theor Appl Genet* 110: 1410-1418
- Kunihisa M, Matsumoto S, and Fukino N (2006) Development of PCR-RFLP markers for strawberry and the identification of cultivars and their progeny. *Acta Hort* 708: 517-521
- Fukino N, Kunihisa M, and Matsumoto S (2004) Characterization of recombinant inbred lines derived from crosses in melon (*Cucumis melo* L.), 'PMAR No.5' × 'Harukei No.3'. *Breed Sci* 54: 141-145
- Fukino N, Sakata Y, Kunihisa M, and Matsumoto S (2007) Characterization of novel simple sequence repeat (SSR) markers for melon (*Cucumis melo* L.) and their use for genotype identification. *J Hort Sci & Biothch* 82: 330-334
- Yazaki K, Kunihisa M, Fujisaki T, and Sato F (2002) Geranyl diphosphate: 4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*- Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *J Biol Chem* 277: 6240-6246

### 報文

- 國久美由紀、松元哲、吹野伸子（2003）DNA 鑑定を用いたイチゴ品種識別技術．平成 14 年度野菜茶業研究所成果情報
- 松元哲・國久美由紀（2003）DNA 多型を用いたイチゴ品種識別技術の開発．日本イチゴセミナー紀要 2003：56
- 國久美由紀・松元哲・吹野伸子（2005）DNA 品種識別技術を用いた韓国産イチゴ果実の分析．野菜茶業研究所研究報告 第 4

号：71-76

國久美由紀、松元哲、上田浩史、吹野伸子(2007) 高精度で再現性の高いイチゴの品種同定技術．平成 18 年度野菜茶業研究成果情報

## 総説

國久美由紀（2003）DNA マーカーによるイチゴの品種識別技術の開発．野菜園芸技術 30：38

國久美由紀、松元哲（2004）DNA 分析によるイチゴ品種の識別．農業および園芸 79：180-184

國久美由紀（2007）高精度で再現性の高いイチゴの品種同定技術．農業技術 62：506-511

## 著書

國久美由紀(2005) 4-5 生鮮果実の品種判別 II.イチゴ．食品鑑定技術ハンドブック．サイエンスフォーラム．pp405.

國久美由紀（2006）2-2-8 野菜類の品種識別－イチゴ．新・食品分析法 2－食品機能と安全保証のための分析技術－．日本食品科学工学会・食品分析研究会 共同編纂、光琳．pp700.

## 出願特許

松元哲、國久美由紀、吹野伸子（2002）イチゴ品種識別方法．特願 2002-155547

## 登録特許

國久美由紀、松元哲、吹野伸子（2008）イチゴの品種識別方法．特許第 4065951 号