

# Amplified Fragment Length Polymorphism法による イチゴ‘福岡S6号’の品種識別

下村克己\*・三井寿一・藤田幸一・佐藤公洋<sup>1)</sup>

近年、国内育成品種の海外での違法使用や違法生産が重大な問題となっている。福岡県では、園芸農業振興のためにイチゴ新品種‘福岡S6号’（商標名：‘あまおう’）を育成した。こういった問題はこの品種についても起きる可能性が考えられることから、その違法使用や生産を抑止することを目的にDNAによる‘福岡S6号’の識別技術の開発に取り組んだ。

DNAによる品種識別技術の一つであるAFLPは、遺伝情報がない、あるいは少ない作物の品種識別に有効な手法とされている。イチゴは、米や大豆に比べ遺伝解析が十分に行われていない作物である。そこで、AFLPがイチゴの品種識別に適用可能かどうかについて検討した。

その結果、AFLPに用いるセレクトティブプライマー組合せの内、[MseI-CAA, EcoRI-AGC]は、供試した10品種の識別が可能であり、イチゴの品種識別に最も有効であると考えられた。識別精度を向上させるため、最終的に7つのプライマー組合せを用いたAFLPによって得られる20個のマーカーを選抜した。これらのマーカーにより、本県で育成した‘福岡S6号’を含む主要なイチゴ10品種の識別が可能であった。

[キーワード：イチゴ、品種識別、DNA、AFLP]

Identification of Strawberry Cultivar ‘Fukuoka S6’ (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) by Amplified Fragment Length Polymorphism. SHIMOMURA Katsumi, Hisakazu MITSUI, Kouichi FUJITA and Kimihiro SATOH (Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 24:43-47(2005)

Of recent concern is the problem of cultivars being developed in Japan and used in other countries and even exported to Japan without permission. A new strawberry cultivar ‘Fukuoka S6’ (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) was bred at our research center for the promotion of horticulture in Fukuoka Prefecture. It is possible that the same situation could regrettably happen to our own strawberry cultivar. So we studied an identification method for ‘Fukuoka S6’ using DNA fragments to prevent the lawless use and production of our strawberry cultivar.

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) is known to be one of the available DNA fingerprinting techniques for identification of cultivars with little or no genetic information. We examined whether AFLP was suitable for the identification of strawberry cultivars, because the genetic analysis of strawberries has not been carried out to an extent comparable with that of rice and soybeans.

For this study, one selective primer pair for AFLP, [MseI-CAA, EcoRI-AGC], was found to be the most useful for identifying strawberry cultivars. Using the AFLP technique on this primer pair enabled the identification of 10 strawberry cultivars tested. Twenty markers produced by AFLP using 7 selective primer pairs were selected for certain identification in the end. These markers enabled us to identify 10 major commercial Japanese strawberry cultivars including our ‘Fukuoka S6’.

[Key words : strawberry, identification, DNA, AFLP]

## 緒 言

我国の園芸作物の主要品目であるイチゴにおいては、産地間競争の激化に伴い、競争力強化が重要な課題となり、新品種の育成が各県で進められている。そうした中、本県でも、新たなイチゴ品種‘福岡S6号’（商標名：‘あまおう’）を育成した。

一方、近年、国内で育成されたイチゴや大豆等の栽培用品種が育成者の許諾を受けることなく、生産、逆輸入される事例が増加傾向にある。これらは、明らかに違法な行為であり、この抑止は、育成者権益の保護とともに、

国内農業の振興を図る上で、重要な課題となっている。

育成者権益を確保するためには、当該品種の生産についての違法性を証明する必要がある。米を始めいくつかの作物については、DNAによる品種識別が行われている。その手法については、PCR (Polymerase Chain Reaction) を基本としたRAPD<sup>5, 8, 12, 15)</sup> (Random Amplified Polymorphic DNA) 法が広く利用されてきたが、再現性の低さから、RFLP<sup>5, 6, 10)</sup> (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法やAFLP<sup>9, 13)</sup>

(Amplified Fragment Length Polymorphism) 法等の利用が進められてきた。イチゴは、米や大豆などの主要穀類と比較して遺伝解析が不十分であるため<sup>3)</sup> 遺伝情報に基づいた手法の利用が困難であること、識別については再現性の確保が不可欠であることなどから、遺伝情

\* 連絡責任者 (野菜育種部)

1) 現野菜栽培部

報が必要なく、かつ再現性もRAPD法より高い<sup>9, 10, 14)</sup>とされるAFLP法による品種識別技術の開発が最適と考えられた。

そこで、本県で育成したイチゴ品種‘福岡S6号’の識別を主な目的として、AFLP法によるイチゴの品種識別技術の開発に取り組み、一定の成果が得られたので報告する。

## 材料および方法

### 供試品種

2002年に野菜茶業試験場久留米支場（現独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構九州沖縄農業研究センター 野菜花き研究部）から株の分譲または葉の提供を受けた‘とよのか’、‘さちのか’、‘さがほのか’、‘章姫’、‘レッドパール’、栃木県農業試験場から分譲された‘とちおとめ’、‘女峰’、奈良県農業技術センターから分譲された‘アスカルビー’、株式会社ミヨシから分譲された‘アイベリー’および当场で育成した‘福岡S6号’の計10品種を供試した。

### DNAの抽出

上記品種の未展開葉またはガク片0.05gをジルコニアボールを入れた2.0mLのエッペンチューブにそれぞれ分取し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。これらのチューブを液体窒素中に沈めた後、ワーリングブレンダー300MM (Retch社製) にセットし、30秒間破碎した。破碎後、0.1%チオグリコール酸を添加した50mMTris-HCl緩衝液（5mMEDTA, 350mMSorbitol, 10%PEG含む）を各1mL分注し、攪拌した。その後、 $4^{\circ}\text{C}$ 下、6,000rpm、5分間遠心し、上清をできるだけ除いた後、DNA抽出キットNucleon PHYTO Pure (Amersham Pharmacia Biotech社製) を用いて、全DNAを抽出した。

抽出したDNAは、100 $\mu\text{L}$ のTE緩衝液（10mMTris-HCl, 1mMEDTA, pH7.5）に溶解し、紫外吸光測定器DU640 (BECKMAN社製) で定量し、その値を基に濃度を調整して供試した。

### 抽出したDNAの制限酵素処理

制限酵素処理は、各イチゴ品種の葉またはガク片から抽出したDNAと、制限酵素EcoRI（15u/ $\mu\text{L}$ , Takara社製）、MseI（10u/ $\mu\text{L}$ , BioLabs社製）を用いてそれぞれ以下のように実施した。DNA0.5 $\mu\text{g}$ 、酵素10uおよび10倍濃度緩衝液を用い、滅菌蒸留水で20 $\mu\text{L}$ に調製して、 $37^{\circ}\text{C}$ 、2時間処理した後、1.5%アガロースゲル電気泳動を実施した。

### AFLP法

AFLP法は、Vos, P. ら<sup>13)</sup>に準じて実施し、実施に当たっては、PE Applied Biosystems社製AFLPスタートアップモジュール（レギュラー用）およびPRISM 310ジェネティックアナライザーを使用し、解析用ソフトGene Scanを用いて解析した。

なお、セレクトティブプライマー組合せの選定については、まず、‘とよのか’、‘さちのか’および‘福岡S6号’の3品種で検討し、次に、その結果を踏まえて、他

の7品種を加えて実施した。

## 結果および考察

### 抽出したDNAの純度

2種類の制限酵素EcoRI, MseIによる処理は、AFLP法を実施する上で、必須かつ前提となる操作である<sup>13)</sup>。そこで、抽出したDNAがAFLP法に供試可能な程度の純度を有していることを確認するために、制限酵素処理を実施した。また、本識別技術を実用化するに当たっては、イチゴ果実での識別も必要となることが予想されることから、葉とともにガク片から抽出したDNAについても処理した。

その結果、葉、ガク片いずれの部位から抽出したDNAも、本処理によって十分消化されたことから（Fig. 1）、今回用いた抽出法によって得られるDNAは、AFLP法に供試するに十分な純度を有していると考えられた。

### セレクトティブプライマーの選定

当场で育成した‘福岡S6号’の識別を目的に、この品種と交配親株の育成に利用した‘とよのか’、‘さちのか’を加えた3品種間のAFLP法による識別を試みた。

その結果、64通りのセレクトティブプライマー組合せ中53組合せで多型が検出された（Table 1）。この内、MseI側プライマーにMseI-CAAまたはMseI-CTAを用いた組合せで、供試した3品種に単独の多型が多く認められた（Table 1）。

このことから、供試した全品種の多型検出には、MseI側プライマーにMseI-CAA, MseI-CTAを用いた組合せを用いると良いと考えられた。

M 1 2 3 4 5 6

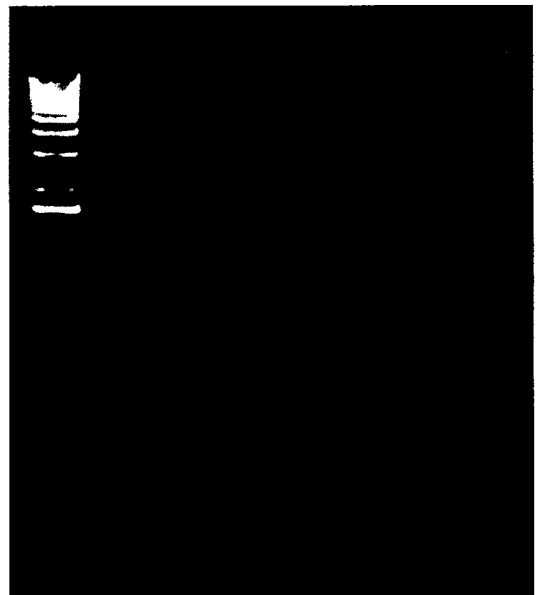


Fig.1 Agarose gel electrophoresis of Toyonoka's DNAs cut with restriction enzymes.

Lane M, 1kb DNA ladder, lanes 1 to 3, 4 to 6, DNAs extracted from leaves and calyxes, respectively. Lanes 1 and 4, 2 and 5, DNAs cut with EcoRI, MseI, respectively.

**AFLP法によるイチゴの品種識別**

供試したイチゴ10品種に対して、*MseI*側プライマー *MseI*-CAAおよび*MseI*-CTAに、8種類の*EcoRI*側プライマーを組み合わせた16プライマー組合せによるAFLPを実施した。

その結果、すべての組合せで多型が検出された(データ略)。中でも [*MseI*-CAA, *EcoRI*-AGC] の組合せでは、8個の多型が認められ (Fig. 2 に一部を示す)、これらにより10品種すべての識別が可能であった (Table 2)。

また、識別精度を向上させるためには、さらなる多型が必要と考えられたが、 [*MseI*-CAA, *EcoRI*-AAC] の組合せでは、'とちおとめ'と'章姫'に、 [*MseI*-CTA, *EcoRI*-ACT] では、'とよのか'、'さがほのか'、'レッドパール'と'章姫'に、さらに、 [*MseI*-CAA, *EcoRI*-ACG] および [*MseI*-CTA, *EcoRI*-ACC] では、'福岡S6号'に特異的な多型が認められ、品種識別に有効と考えられた (Table 2)。

一方, Soller. M. and J. S. Beckmann<sup>11)</sup>によると、品種同定の目的において、比較品種nが互いに異なるマーカー型を持つ品種の割合Rは、

$$R = \frac{a^k C_n \cdot n!}{a^{nk}} = \frac{n! a^k!}{a^{nk} \cdot n! (a^k - n)!} = \frac{a^k!}{a^{nk} \cdot (a^k - n)!}$$

(ただし、a:アリス数, k:ローカス数)

で表される。

したがって、与えられた比較品種が互いに異なるマーカー型を示すためには、Rが限りなく1に近いkの値を求めると良い。

よって、供試したイチゴ10品種の場合、a=2であるので、R=0.999以上とすると、k≥16となる。

以上のことと識別精度の確保を考慮した上で、最終的に7つのプライマー組合せを用いたAFLPによって得られる20個のマーカーを選抜した (Table 2)。

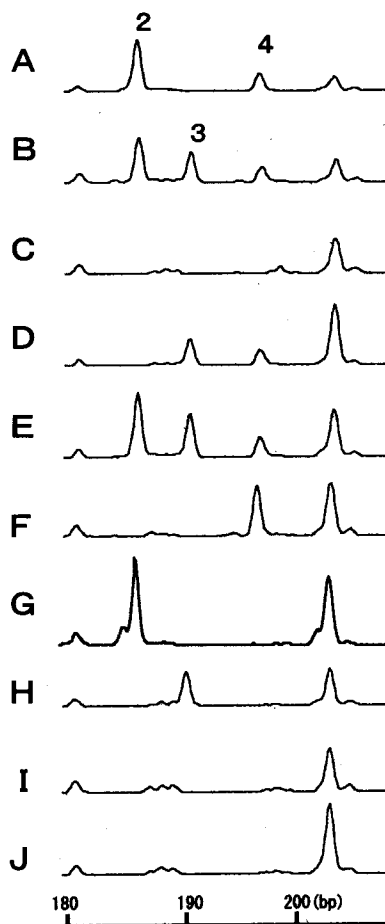


Fig.2. Amplified fragment patterns by AFLP using primer pair [*MseI*-CAA, *EcoRI*-AGC] from 10 strawberry cultivars.

Numbers above peaks indicate marker's numbers on Table2. Lane A:Fukuoka S6; B:Toyonoka; C:Sachinoka; D:Nyoho; E:Tochiotome; F:Asuka Ruby; G:Red Pearl; H:Sagahonoka; I:Akihime; J:Ai Berry.

Table 1. Comparison of primer combinations for detection of three strawberry cultivars

<i>EcoRI</i> primers	<i>MseI</i> primers							
	CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
ACT	●	○	●	●○	◎●○	●○	●	○
ACA	●○	●○	○	●	◎●○	●○	●	●○
AAC	-	●	-	○	◎●○	●	-	-
ACC	◎●○	●○	●	●	◎○	●○	●○	●○
AGC	◎●○	-	○	●	○	●○	●○	●○
AAG	●○	-	●○	●	-	○	●○	-
AGG	●○	●○	●○	●	●	●○	●○	●○
ACG	-	●○	●○	○	-	●○	-	●

◎ indicates an available primer combination for the identification of 'Fukuoka S6'.

● indicates an available primer combination for the identification of 'Toyonoka'.

○ indicates an available primer combination for the identification of 'Sachinoka'.

- indicates we could recognize no polymorphism for the identification of three strawberry cultivars.

Table 2. Polymorphism detected by AFLP in 10 strawberry cultivars

cultivars	No. of markers, DNA product size(bp) and selective primer pairs																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	96	186	190	195	265	283	289	306	165	127	167	249	97	187	293	119	127	137	209	317
					CAA				CAA		CAA		CTA		CTA				CTA	
					AGC				AAC		ACC		ACG		ACT		ACA		ACC	
	MseI EcoRI																			
Fukuoka S6	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Toyonoka	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Sachinoka	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Nyoho	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Tochiotome	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Asuka Ruby	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Red Pearl	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Sagahonoka	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
Akihime	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
Ai Berry	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+

'+', '-', the fragment was detected and not, respectively.

### 選抜したマーカーによる識別精度

ある持ち込まれた品種に対し、比較品種中に1品種以上の同一マーカー型が、偶然存在する確率 $P_1$ は、

$$P_1 = 1 - (1 - P_0^k)^n$$

ただし、 $P_0 = \exp [1/k \sum \log (p_i)]$ ,  $k$ : マーカー数  
 $p_i$ :  $i$  番目ローカスのアリル頻度とする。

で表される<sup>2)</sup>。

したがって、ある品種が今回行った10種の比較品種中の'福岡S6号'のマーカー型と偶然一致する確率 $P_1$ は、 $n=10$ ,  $k=20$ であるから、 $P_1=0.0000006$ となる。よって、もしマーカー型が一致するものが見られた場合は、'福岡S6号'である可能性が非常に高いと判断できる。

今回の結果から、本県で育成した'福岡S6号'を含むイチゴ10品種の識別は、AFLP法により可能と考えられた。しかし、新たに育成あるいは流通する品種の識別については、今後検討する必要がある。

また、AFLP法は、RAPD法に比較して再現性は高いとされるが、操作が煩雑であることや識別に要する時間が抽出操作を含めて4日程度かかる点が問題である。したがって、今後は、今回得られた結果を基に品種識別に有効であったマーカーをSTS化<sup>7)</sup>し、簡便かつ迅速な識別技術を確立する必要がある。一方、イチゴの品種識別についてはPCR-RFLP法の利用が最近報告された<sup>6)</sup>。今後、イネなどで報告<sup>5, 9, 10)</sup>があるように、イチゴの品種識別についても、識別能力が特に高いとされるSSR<sup>1, 4, 10, 16, 17)</sup>(Simple Sequence Repeat)法を含めた手法の比較等を行い、識別精度の向上や簡易化のための研究を進める必要がある。

### 引用文献

- 1) Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. and Cregan, P.B. (1992) Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* **32**:1131-1139.
- 2) DNA品種識別検討委員会編(2003) 植物のDNA品種識別についての基本的留意事項-技術開発と利用のガイドライン-。
- 3) 福岡浩之(2002) 野菜におけるDNAマーカー育種の現状と展望。「研究開発ターゲットシンポジウム」-DNAマーカー育種の推進-、独)農業技術研究機構:5-8.
- 4) Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc and C. Gessler (1998) Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* **96**:1069-1076.
- 5) 河野いずみ, 竹内善信, 島野公利, 佐々木卓治, 矢野昌裕(2000) DNAマーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. *育種学研究* **2**:197-203.
- 6) 國久美由紀(2002) イチゴ品種識別に有効なDNAマーカーの開発. *育種学研究* **4**(別2):259.
- 7) Monna, L., Miyao, A., Inoue, T. et al. (1994) Detection of RAPD markers in rice and their conversion into sequence tagged sites (STSs) and STS-specific primers. *DNA Res.* **1**:139-148.
- 8) 大坪研一, 藤井剛, 橋野陽一ら(1997) RAPD法を用いた国内産精米の品種判別技術. *日本食品工業学会誌* **44**(5):386-390.
- 9) Sharma, S.K., Knox, M.R. and Ellis, T. H. N. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis.(1996) *Theor. Appl. Genet.* **93**:751-758.
- 10) Powell, W., Morgante, M., Andre, C. et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* **2**:225-238.
- 11) Soller, M. and J.S.Beckmann (1983) *Theor. Appl. Genet.* **67**:25-23.
- 12) Welsh, J. and McClelland, M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **24**:7213-7219.
- 13) Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, Theo van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, **23**(21):4407-4414.
- 14) Waugh, R., N. Bonar, E. Bair, B. Thomas, A. Granar (1997) Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Mol. Gen. Genet.* **255**:311-321.

- 15) Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J. et al. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6535.
- 16) Yamamoto, T., T. Kimura, M. Shouda, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta (2002) Development of microsatellite markers in the Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) *Molecular Ecology Notes* **2**:14-16.
- 17) Yamamoto, T, T. Kimura, Y. Sawamura, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta (2001) SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor. Appl. Genet.* **102**:865-870.