

# 単純反復配列 (SSR) マーカーによる湿地性白色カラー新品種 「熊本 FC01」「熊本 FC02」及び既存 5 品種間の識別 Identification with SSR Markers for Arum Lily Cultivars, Newly Registered ‘Kumamoto FC01’, ‘Kumamoto FC02’ and Commercial Five Cultivars

飯牟禮和彦・齋藤彰

Kazuhiko IIMURE, Akira SAITO

## 要 約

種苗法による育成者権保護を図る目的で、熊本県育成湿地性白色品種「熊本 FC01」「熊本 FC02」両品種及び他の白色 5 品種間で各品種の識別可能性を SSR マーカーを使って検討した。

既報の EST-SSR マーカー (ZW) と本研究で開発した Genomic SSR マーカー (AC,GA) の合計 11 種類でアガロース電気泳動により供試品種間で多型が得られた。すなわち、「熊本 FC01」は AC-11A・AC2-03A および AC-11A・GA-06A の 2 種類のマーカーにより、「熊本 FC02」は GA-06A の 1 種類のマーカーにより他の 6 品種と識別することができた。供試した他の品種についてみると、「チルドシアナ」は AC2-03B の 1 種類のマーカーにより、「ウェディングマーチ」は ZW045 の 1 種類のマーカーにより、「ホワイトゴッテス」は ZW025,ZW123,ZW158,AC-03G,AC-11C,AC2-03A,AC2-03B のそれぞれ 1 種類のマーカーで、「アクアホワイト」は AC-03G の 1 種類のマーカーで、「白雪式部」は ZW025・GA-06A,ZW025・AC2-03A および AC-03G・GA-06A の 2 種類のマーカーで他の 6 品種と識別できた。

キーワード：湿地性カラー (*Zantedeschia aethiopica*) ,熊本 FC01,熊本 FC02,品種識別,SSR(Simple Sequence Repeat)

## I 緒言

カラー (*Zantedeschia*) はサトイモ目 (Arcales) サトイモ科 (Araceae) に属し湿地性と畑地性がある。このうち湿地性 (*Z. aethiopica*, 英名: arum lily) は、熊本県の出荷量が都道府県中第 2 位 (平成 25 年産愛知県農林水産部農産課調べ) で重点振興品目に指定されている。主な品種としては、白色の「ウェディングマーチ」「チルドシアナ」が国内で流通している<sup>2)</sup>。熊本県は「ウェディングマーチ」×「チルドシアナ」の交配から疫病 (*Phytophthora ricardiae*)<sup>9)</sup> に強い白色品種「熊本 FC01」「熊本 FC02」を 2012 年に品種登録<sup>7)8)</sup> し、2014 年度から県内栽培希望農家へそれぞれ「ホワイトトーチ」「ホワイトスワン」のブランド名で苗配布を開始している。

近年、小豆、いぐさ、いちご、稲、いんげん豆、おうとう、カーネーション、輪菊等多くの作物で育成者権侵害事例が発生している<sup>3)</sup>。カラーは栄養性繁殖で 1 株から無限大に増殖することができる。特に湿地性白色品種間においては切り花の状態での形態による識別が困難であるため (第 1 図)、新品種の普及に伴い DNA マーカーによる品種識別技術が強く求められている。品種間の DNA 多型を識別する DNA マーカーによる品種識別は、環境変異に影響されやすい形態特性による識別と比較して優れた識別方法である。これまでカラーに関しては RAPD (Random

Amplified Polymorphic DNA) マーカーによる畑地性品種間の識別<sup>1)</sup> や EST-SSR (Simple Sequence Repeats in Expressed Sequence Tags) マーカーによる湿地性品種間の識別に関する報告<sup>10)</sup> がある。そこで、本報では、まずすでに開発されている EST-SSR マーカー<sup>10)</sup> により「熊本 FC01」「熊本 FC02」を含む湿地性白色カラー 7 品種間でそれぞれ識別が可能かどうか検討した。また SSR マーカー開発がこれまでの方法と比較して容易かつ効率的である Dual-suppression-PCR 法<sup>4)</sup> により新たに Genomic SSR マーカーを開発し同様の識別が可能かどうかを検討した。

## II 材料および方法

### 【供試品種】

識別する品種として「熊本 FC01」「熊本 FC02」、対照として県内で主に栽培されている「チルドシアナ」「ウェディングマーチ」「ホワイトゴッテス」、それに千葉県育成品種「アクアホワイト」<sup>5)</sup> と京都府育成品種「白雪式部」<sup>6)</sup> の計 7 品種を、Dual-suppression-PCR 法<sup>4)</sup> による新たな Genomic SSR マーカー開発には「熊本 FC02」を供試した。いずれの品種も熊本県農業研究センター農産園芸研究所花き研究室が栽培している品種を供試した。

### 【DNA 抽出】

イグサ品種識別で用いられた山形ら<sup>11)</sup>の方法を以下

のようにカラーDNA用に改変した。

カラーの比較的若い葉をエッペンチューブの本体とふたで挟むことによって得られる直径 8mm の葉片 3 枚(約 60mg)に抽出バッファー(100mM Tris-HCL(pH8.0),50 mM EDTA(pH8.0), 1%(w/v) Cetyl trimethyl ammonium bromide(CTAB),1.4M NaCL,10 μg/mL RNaseA) 150 μL を加えホモジナイゼーション用ペッスルで摩砕後,抽出バッファー550 μL を追加し直ちに 65℃・15 分間保温した。保温の途中約 5 分おきにチューブを振って抽出バッファーと摩砕した葉を混ぜ合わせた。その後スピンドウンし CIAA (クロロホルム:イソアミルアルコール=24:1) 700 μL を加え乳状になる程度に激しく混ぜ合わせ 4℃・10,000rpm・10 分間遠心後 400 μL の上澄みを新しいチューブに移し上澄み液の等量(400 μL)のイソプロパノールを加えた。よく混合後 4℃・15000 rpm・30 分間遠心し上清を除去,滅菌水 100 μL を加え沈殿物を溶解した。次に滅菌水の 1/2 量(50 μL)の低分子 DNA 除去用 PEG 沈殿溶液(30mM MgCL<sub>2</sub>,30%(w/v) Polyethyleneglycol(PEG)8000) を加え完全に混和し,直ちに 4℃・15000rpm・30 分間遠心し上清を除去した。これに 70%エタノール 1mL を加え沈殿物を洗浄後 TE バッファー(10mM Tris-HCL(pH8.0),1mM EDTA(pH8.0)) 40 μL を加えタッピングにて溶解した。得られた DNA は翌日に Qubit® (2.0) Fluorometer と Qubit® dsDNA HS Assay Kit(いずれもライフテクノロジーズ社製)により濃度を測定し,アガロース電気泳動により DNA サイズの分布を調査した。



第1図 供試した湿地性白色カラー品種(白雪式部を除く)  
 注1) 1:「熊本 FC01」,2:「熊本 FC02」,3:「チルドシアナ」,4:「ウエディングマーチ」,5:「ホワイトゴッテス」,6:「アクアホワイト」  
 注2) 5以外 <http://www.otakaki.co.jp/showroom/2015/20150302T>  
 5 <http://www.otakaki.co.jp/showroom/2014/20140225> から引用

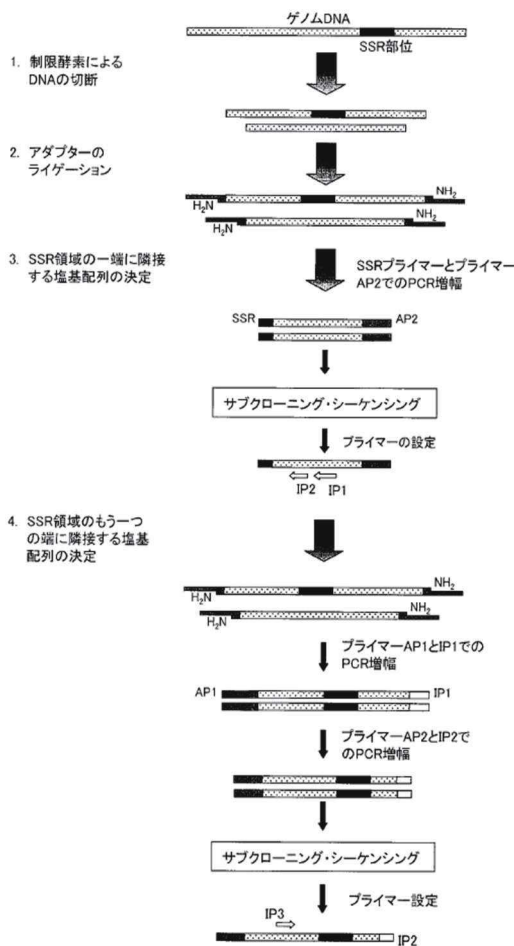
【EST-SSR マーカーによる解析】

基本的に Wei ら<sup>10)</sup>の方法に準じた。

EST-SSR マーカーは 43 種類あり,PCR 反応液は 10 μL で TaKaRa EX Taq® (タカラバイオ社製) 0.25U,各カラー品種の DNA 30ng,1×PCR バッファー,0.2mM dNTP,0.5 μM 各マーカーのプライマーとし,96℃・2 分の後【96℃・30 秒→[各マーカーのアニーリング温度(論文記載)]・45 秒→72℃・1 分】を 25 サイクル,最後に 72℃・30 秒の条件で反応させた。その後,反応液を高精度解析ができるマイクロチップ型電気泳動装置(MultiNA)と DNA-500 キット(いずれも島津製作所製)で DNA 多型を調査し,多型が認められたマーカーについてさらに精度は低いがいり簡便に解析できるアガロース電気泳動により DNA 多型を調査した。

【新たな Genomic SSR マーカーの開発】

練ら<sup>4)</sup>の方法に準じた。方法の概略を第2図に示す。



第2図 Suppression-PCR を用いたマイクロサテライトマーカー作製法

引用文献 4) から引用

1) 制限酵素による DNA の切断

平滑末端を生じる 6 種類の制限酵素 (*Alu I*, *Afa I*, *EcoRV*, *HaeIII*, *Hinc II*, *Ssp I*: タカラバイオ社製) を用

いて「熊本 FC02」の DNA 各 2  $\mu$ g を各制限酵素のマニユアルに準じて消化した。アガロースゲル電気泳動により DNA が完全消化されたかのチェックの後、酵素等を除くため MinElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN 社製) により消化 DNA を精製し Kit 付属の BE バッファー (10mM Tris-HCL (pH8.5)) 10  $\mu$ L に溶解した。その後 Qubit® (2.0) Fluorometer と Qubit® dsDNA HS Assay Kit により濃度を測定した。

#### 2) 不等長アダプター付き制限断片の作成

アダプターに使用する 2 本の合成 1 本鎖オリゴ DNA, 48mer の長鎖 5' -GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACG GCCCGGGCTGGT-3' 2  $\mu$ g と 3' 末端をアミノ化した 8mer の短鎖 5' -ACCAGCCC-NH<sub>2</sub>-3' 12  $\mu$ g を混合し 70°C・10 分→37°C・10 分の条件で両鎖をアニールさせ、不等長のアダプターを作製した。

次にこのアダプターと前述した平滑末端 DNA フラグメントとのライゲーションを行った。ライゲーションには DNA Ligation Kit Ver.1 (タカラバイオ社製) を用いた。反応液は 60  $\mu$ L で制限酵素により消化・精製された DNA 0.5  $\mu$ g, 不等長アダプター 1.4  $\mu$ g, それにキットの Solution A と Solution B をそれぞれ 40  $\mu$ L, 10  $\mu$ L 加え 16°C・1 時間でライゲーションを行った。反応液は MinElute Reaction Cleanup Kit により精製し BE バッファー 20  $\mu$ L に溶解し Qubit® (2.0) Fluorometer と Qubit® dsDNA HS Assay Kit により濃度を測定した。

さらに 3' 末端からの PCR 反応における DNA 伸長を完全にブロックするために、不等長アダプター付き制限酵素断片の短鎖 3' 末端にデオキシグアニジンを付加した。すなわち、反応液は 80  $\mu$ L で AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, LD (Thermo Fisher Scientific 社製) 2U, 不等長アダプター付き制限断片 400ng, 1×PCR バッファー, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02mM ddGTP (2',3'-Dideoxyguanosine 5' -Triphosphate, Amersham Biosciences 社製) とし, 94°C・9 分→50°C・10 分の条件で反応させた。反応液は MinElute Reaction Cleanup Kit により精製し BE バッファー 22  $\mu$ L に溶解し Qubit® (2.0) Fluorometer と Qubit® dsDNA HS Assay Kit により濃度を測定した。

#### 4) SSR 領域の一端に隣接する塩基配列の決定

制限酵素消化ゲノム断片内に存在する SSR 領域を仮定し, 6 種類の不等長アダプター付き制限酵素断片の中から制限酵素が *EcoRV* の断片を鋳型にして SSR プライマー ((AC)<sub>10</sub> あるいは (GA)<sub>10</sub>) と AP2 アダプター (5' -CTATAGGGCACGCGTGGT-3') を用いて PCR 増幅した。反応液は 50  $\mu$ L で AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, LD 1.25U, 不等長アダプター付き制限断片 5ng, 1×PCR バッ

ファー, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, SSR プライマーと AP2 は 0.4  $\mu$ M とし, タッチダウン法すなわち 94°C・9 分の後【94°C・30 秒→62°C・30 秒→72°C・1 分】を 5 サイクル, 【94°C・30 秒→60°C・30 秒→72°C・1 分】を 38 サイクル, 最後に 72°C・10 分の条件で反応させた。反応液の一部をアガロース電気泳動により増幅確認し, 残りを MinElute Reaction Cleanup Kit により精製, BE バッファー 10  $\mu$ L に溶解し Qubit® (2.0) Fluorometer と Qubit® dsDNA HS Assay Kit により濃度を測定した。

得られた PCR 産物を pT7 Blue Perfectly Blunt Cloning Kit (Novagen 社製) でクローニングした。まず, PCR 産物の平滑末端化を行った。反応液は 10  $\mu$ L で PCR 産物 0.05pmol, End Conversion Mix 2  $\mu$ L とし, 22°C・15min → 75°C・5min → on ice・2min の条件で反応させ, スピンドウンの後に反応液とカルベニシリン抵抗性遺伝子及びテトラサイクリン抵抗性遺伝子をもつ Blunt Vector (50ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L と T4 DNA ligase (4 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L を加え, 22°C・15 分の条件でベクターとのライゲーションを実施した。次にコンピテントセルが入ったチューブをフリーザーから取出し 3 分程度氷上に置いて溶かし 2 回程度タッピング, このチューブにライゲーション反応液 1  $\mu$ L を加え軽く混合し氷上・5 分程度→42°C・30 秒→氷上・2 分の条件で処理し SOC 培地 250  $\mu$ L 加えた。この液 25  $\mu$ L を LB 固形培地 (10g/L Tryptone (Bacto 社製), 5g/L Extract Yeast Dried (ナカライテスク社製), 10g/L NaCl<sub>2</sub>, 0.2g/L NaOH, 50mg/L Carbenicillin (和光純薬社製), 12.5mg/L Tetracycline (和光純薬社製), 15g/L Agar, 9cm シャーレに入れ固化後 2% X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) (和光純薬社製) 50  $\mu$ L, 100mM IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) (和光純薬社製) 25  $\mu$ L を培地表面に塗布する。) に入れ直径 3mm のジルコニアビーズ 3 個を転がすことにより培地表面に広げ, 37°C・16 時間の条件で培養した。得られた白色のコロニーを滅菌爪楊枝先端に接触させ, マスタープレート (LB 固形培地, 但し X-gal と IPTG は除く), 次に反応液が入った PCR チューブに菌を植えた。マスタープレートは 37°C・16 時間の条件で培養後に冷蔵庫に保存した。PCR 反応液は 25  $\mu$ L で AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, LD 0.625U, 1×PCR バッファー, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, T7 promotor primer と U-19mer primer は 0.4  $\mu$ M とし, 94°C・9 分の後【94°C・30 秒→55°C・30 秒→72°C・1 分】を 30 サイクル, 最後に 72°C・5 分の条件で反応させた。反応液の一部をアガロース電気泳動しインサートサイズが 150bp 以上のコロニーを選び, その PCR 産物について MinElute Reaction Cleanup Kit により精製し BE バッファー 10  $\mu$ L に溶解し Qubit® (2.0) Fluorometer と Qubit®

dsDNA HS Assay Kit により濃度を測定した。さらに BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit および AB3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社製) により塩基配列を決定した。得られた配列情報から IP1 プライマー (長さ 24~27bp, GC 含量 35~60%) を AP2 と SSR 間の塩基配列から, IP2 プライマー (長さ 19~24bp, GC 含量 35~60%) を IP1 と SSR 間の塩基配列から, それぞれの 3' 側に SSR 配列がくるように, しかもできれば互いに重ならないように設計した。プライマー設計にはソフトウェア FastPCR Professional Evaluation version:5.4.56 (PrimerDigital 社製) を用いた。

5) SSR 領域のもう一つの端に隣接する未知塩基配列の決定

Nested PCR により, SSR のもう一つの端に隣接する未知塩基配列を決定した。1 回目の PCR は, 6 種類の不等長アダプター付き制限酵素断片をそれぞれ鋳型として AP1 と IP1 のプライマーペアを用いて実施した。反応液は 10  $\mu$ L で AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA Polymerase, LD 0.25U, 不等長アダプター付き制限断片 (各 1.25ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 1 $\times$ PCR バッファー, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, AP1 プライマーと IP1 プライマーは 0.5  $\mu$ M とし, 94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 9 分の後 [94 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒 $\rightarrow$ [IP1 の Tm 値 - 5 $^{\circ}$ C] $\cdot$ 30 秒 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分] を 35 サイクル, 最後に 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5 分の条件で反応させた。Tm 値は, Melting Temperature(Tm) Calculation

([http://www.biophp.org/minitools/melting\\_temperature/demo.php?formula=Base-Stacking](http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php?formula=Base-Stacking)) により計算した。2 回目の PCR は, 1 回目の PCR 反応液を 100 倍に希釈したものを鋳型として AP2 と IP2 プライマーペアを用いて実施した。反応液は 20 $\mu$ L で鋳型とプライマー, PCR 反応の第 2 ステップのサイクル数を 40 にする以外は 1 回目 PCR と同じとした。反応液の一部についてアガロース電気泳動を行

い増幅確認し, 6 種類の制限断片中にバンドが 1 本あればダイレクトシーケンスし, 非特異的なバンドが少量でも混在する場合は, いったん 4) と同様の方法でクローニングしてシーケンスした。得られた塩基配列情報を基に SSR と AP2 の間に IP3 プライマーを, その 3' 側に SSR が位置するように設計した。プライマー作製にはソフトウェア FastPCR Professional Evaluation version:5.4.56 を用いた。次に IP2/IP3 プライマーペアを用いて実際にゲノム DNA から断片を PCR 増幅できるかチェックした。反応液は 10  $\mu$ L で TaKaRa EX Taq<sup>®</sup> 0.25U, 各カラー品種の DNA 30ng, 1 $\times$ PCR バッファー, 0.2mM dNTP, IP2 プライマーと IP3 プライマーは 0.5  $\mu$ M とし, 96 $^{\circ}$ C $\cdot$ 2 分の後 [96 $^{\circ}$ C $\cdot$ 5 秒 $\rightarrow$ [プライマーペアで低い Tm 値 - 5 $^{\circ}$ C] $\cdot$ 15 秒 $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 30 秒] を 30 サイクル, 最後に 72 $^{\circ}$ C $\cdot$ 2 分の条件で反応させた。Tm 値は Melting Temperature(Tm) Calculation により計算した。反応液をマイクロチップ型電気泳動装置 (MultiNA) と DNA-500 キットで増幅が確認できれば Genomic SSR マーカーとし, さらにアガロース電気泳動により DNA 多型を調査した。

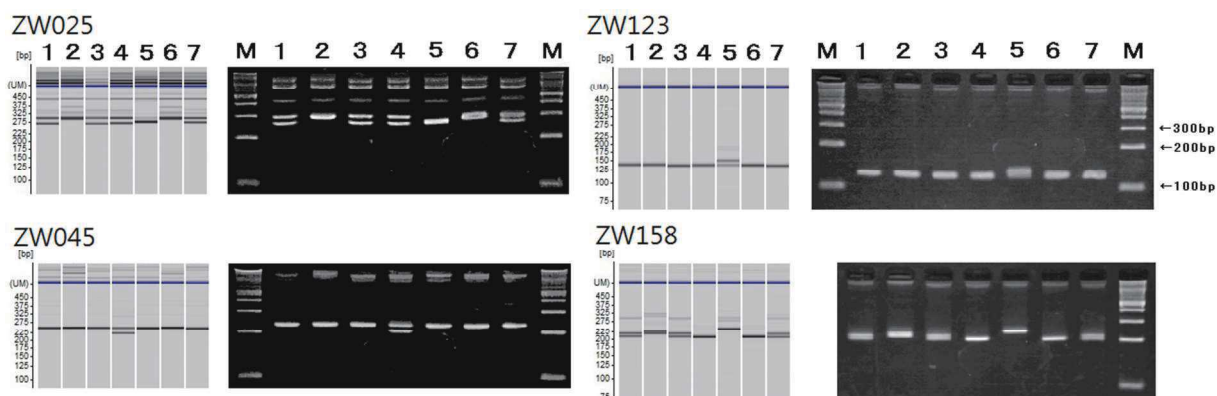
### III 結果

#### 【DNA 抽出】

エッペンチューブの本体とふたで葉を挟むことによって, 直径 8mm の葉片 3 枚 (約 60mg) を触れることなく得た。DNA 収量は葉 1g 当り 38 から 103  $\mu$ g 程度得られ, アガロース電気泳動により観察した結果,  $\lambda$  DNA サイズ (45kb) より高分子で損傷の少ない DNA を得ることができた (データ省略)。

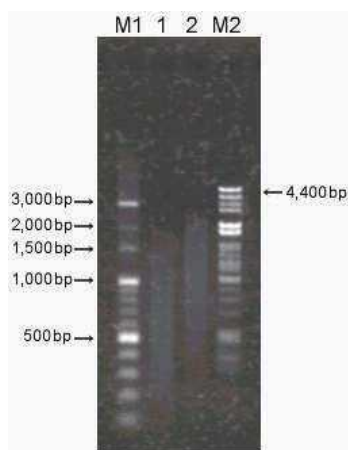
#### 【EST-SSR マーカーによる解析】

供試した 43 種類のマーカーのうち 7 品種間で多型が認



第 3 図 アガロースゲル電気泳動で多型が認められた EST-SSR マーカーにおけるバンドパターン

注 1) 1:「熊本 FC01」, 2:「熊本 FC02」, 3:「チルドシアナ」, 4:「ウェディングマーチ」, 5:「ホワイトゴッテス」, 6:「アクアホワイト」, 7:「白雪式部」, M: 100bp ラダー  
 注 2) 左: マイクロチップ電気泳動装置によるゲルイメージ, 右: アガロース電気泳動像  
 注 3) アガロースゲル: 4% Agarose SFR (Amresco 社製), 0.5 $\times$ TBE



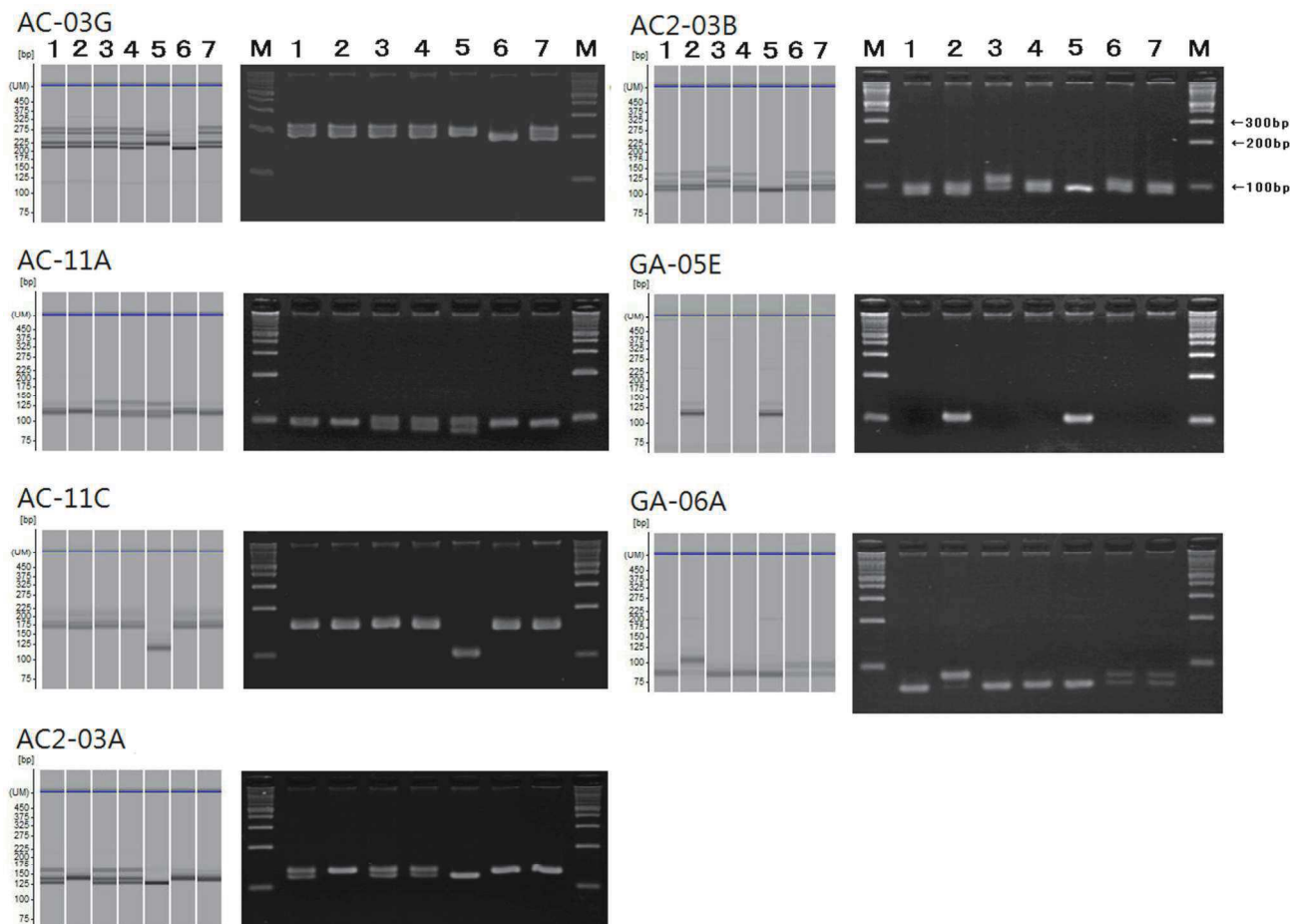
第4図 SSRプライマーとAP2プライマーによるPCR増幅産物

1: (AC)<sub>10</sub>プライマー, 2: (GA)<sub>10</sub>プライマー, M1: 100bpラダー, M2:  $\lambda$ -Hind II/III  
1.5% Agarose Gel, 1×TAE

められたのは、マイクロチップ型電気泳動装置で33種類、このうちアガロース電気泳動でも多型が明確に認められたのは4種類のみであった(第3図)。4種類のマーカーのアガロース電気泳動によるバンドパターンから「熊本FC01」「熊本FC02」をそれぞれ他6品種と識別することは困難であったので Dual-suppression-PCR 法による新たな SSR マーカー開発を試みた。

【新たな Genomic SSR マーカーの開発】

SSR 領域の一端に隣接する塩基配列の決定において、不等長アダプター付き制限酵素断片 (*EcoRV*) を鋳型にして SSR プライマーと AP2 プライマーを用いて PCR を実施し、その反応液をアガロース電気泳動を行った。AC, GA プライマーいずれを用いた場合でもスメアーなパターンを示し、AC と比較して GA が全体として増幅産物の分子量が大きかった(第4図)。そこで、その後のクローニングにおいては AC, GA それぞれスメアーなパターンの増幅量が多いほぼ中央部の分子量を基準とし



第5図 アガロースゲル電気泳動で多型が認められた新たな SSR マーカーにおけるバンドパターン

注1) 1:「熊本 FC01」, 2:「熊本 FC02」, 3:「チルドシアナ」, 4:「ウェディングマーチ」, 5:「ホワイトゴッテス」, 6:「アクアホワイト」, 7:「白雪式部」, M: 100bp ラダー  
注2) 左: マイクロチップ電気泳動装置によるゲルイメージ, 右: アガロース電気泳動像  
注3) アガロースゲル: 4% Agarose SFR (Amresco 社製), 0.5×TBE

て,PCR 産物 0.05pmol を決定し PCR 産物の平滑末端化を行った。

その後,クローニング後の Colony PCR とアガロース電気泳動によりインサートが 150bp 以上だった白色のコロニーは,SSR プライマーとして(AC)<sub>10</sub>を用いた場合,144コロニー中 56,(GA)<sub>10</sub>を用いた場合,48 コロニー中 33 であった。このうちシーケンスができたクローンはそれぞれ 51,29 であり,更に 2 塩基の反復数が 6 以上でかつ,SSR 部分が大きすぎたり SSR 以外の部分が小さすぎたりしたものを除くとそれぞれ 23,7 の合計 30 クローンであった。さらにそれらは IP1,IP2 両プライマーの設計が可能であった。次に IP1 と AP1 プライマーおよび IP2 と AP2 プライマーにより SSR 領域のもう一つの端に隣接する部分を増幅し未知塩基配列を決定した。その配列に基づき IP3 プライマーが設定できたのは, (AC)<sub>10</sub> で 10,(GA)<sub>10</sub> で 5 クローンであった。この IP3 と IP2 プライマーを使用し「熊本 FC02」のゲノム DNA を鋳型として PCR をおこなったところ,(AC)<sub>10</sub> で 6,(GA)<sub>10</sub> で 3 の合計 9 クローンにおいて想定される分子量のバンドが増幅された。そこでこれら IP2 と IP3 各プライマーペアを湿地性白色カラーの品種識別用 Genomic SSR マーカーとした。第 1 表に

9 種類のマーカーのプライマー情報とアニーリング温度を示した。

今回得られた 9 種類のマーカーのうち 7 品種間で多型が認められたのは,マイクロチップ型電気泳動装置で 8 種類,このうちアガロース電気泳動でも多型が明確に認められたのは 7 種類であった (第 5 図)。

【供試 7 品種の SSR マーカー解析】

EST-SSR マーカーと今回開発した Genomic SSR マーカーの合計 11 種類のバンドパターンを記号化したものを第 2 表に示す。これにより「熊本 FC01」は AC-11A・AC2-03A および AC-11A・GA-06A の 2 種類のマーカーにより,「熊本 FC02」は GA-06A の 1 種類のマーカーにより他の 6 品種と識別することができた。他の品種についてみると,「チルドシアナ」は AC2-03B の 1 種類のマーカーにより,「ウェディングマーチ」は ZW045 の 1 種類のマーカーにより,「ホワイトゴッテス」は ZW025,ZW123,ZW158, AC-03G,AC-11C,AC2-03A,AC2-03B のそれぞれ 1 種類のマーカーで,「アクアホワイト」は AC-03G の 1 種類のマーカーで,「白雪式部」は ZW025・GA-06A,ZW025・AC2-03A および AC-03G・GA-06A の 2 種類のマーカーで他の 6 品種と識別できた (第 3 表)。

第 1 表 今回得られたマーカーのプライマー情報およびアニーリング温度(Ta)

マーカー名	Forward Primer Sequence(5'-3')	Reverse Primer Sequence(5'-3')	Ta(°C)
AC-03G	gatttgatgatggaggagaga	catgcatcagcagccacaga	60
AC-09C	cctcatgtgtattaccgtggcaca	agtgtaggagggttagagggt	62
AC-11A	gcagcaacatggctcctca	tctcagtcgcggtccaggctct	61
AC-11C	agcaccttacattgagccttc	aggcatgtgatcttccccctc	64
AC2-03A	gagtgatttcttgtgtgtgc	acagttattcccaggactca	61
AC2-03B	gcctcctagtcacattgt	ccctcctctagtagtgcagcct	63
GA-01B	gttctgatgtgtcactgggga	agtggaaccaagaggaccttc	61
GA-05E	gccataggtagctaaagtgcgcga	atgcattgggtgtggagag	63
GA-06A	gctagcccactgccgtgtctc	cggggtgaaagacccttct	66

注) Ta : 各マーカーのアニーリング温度

第 2 表 記号化した各マーカーにおけるバンドパターン

品種No.	1	2	3	4	5	6	7	識別バンド範囲
品種名	FC01	FC02	チルドシアナ	ウェディングマーチ	ホワイトゴッテス	アクアホワイト	白雪式部	
ZW025	B	A	B	B	a	A	B	290bp前後
ZW045	A	A	A	B	A	A	A	220bp前後
ZW123	A	A	A	A	B	A	A	120bp前後
ZW158	a	a	a	a	A	a	a	220bp前後
AC-03G	C	C	C	C	B	A	C	250bp前後
AC-11A	A	A	B	B	B	A	A	100bp前後
AC-11C	A	A	A	A	a	A	A	150bp前後
AC2-03A	B	A	B	B	a	A	A	130bp前後
AC2-03B	B	B	b	B	A	B	B	100bp前後
GA-05E	X	A	X	X	A	X	X	100bp前後
GA-06A	a	A	a	a	a	B	B	90bp前後

注) バンド数が少ない品種からアルファベット順

バンド数が同じ場合は,分子量が小さいほうが小文字,大きいほうが大文字

X : バンドが無いことを示す。

IV 考察

【DNA抽出】

エッペンチューブの本体とふたで葉を挟んで直径8mmの葉片をDNA抽出サンプルとして採取する方法は、葉に触れることなく簡便な方法として利用できることがわかった。サンプル重量は予備的に1枚の葉片を計測しておけば概数値を求めることができる。しかし、葉が汚れている場合は、軽く洗ったうえで葉片を採取する必要がある。得られたDNA量は10μLの反応系で最低でも70回分は得ることができ、かつDNAの損傷も大きくないことから今回の抽出法は葉からのDNA抽出において妥当であると考えられた。実際の識別においては切り花が対象となる場合が多いと考えられることから、仏炎苞でも同様の抽出法を行った結果、葉からの抽出とほぼ同等の量のDNAを抽出することができた。

【SSRマーカーによる解析】

EST-SSRマーカーを開発したWeiら<sup>10)</sup>は、増幅産物が得られたプライマーペアは68種類であり、このうち「ウェディングマーチ」「チルドシアナ」を含む供試湿地性カラー24品種間で多型が得られたのが43種類であるとし、これらをEST-SSRマーカーとしている。この43種類のうち今回、7品種間で多型が認められたのは、マイクロチップ型電気泳動装置で33種類、アガロース電気泳動でも多型が明確に認められたのは4種類のみであった

(ZW025,045,123,158)。一方、今回得られた9種類のGenomic SSRマーカーのうち7品種間で多型が認められたのは、マイクロチップ型電気泳動装置で8種類、このうちアガロース電気泳動でも多型が明確に認められたのは7種類であった(AC-03G,-11A,-11C,AC2-03A,-03B,GA-05E,-06A)。

以上の結果から増幅産物が得られたものうち、マイクロチップ型電気泳動装置で多型が認められたものはEST-SSRマーカーで76.8%、今回得られたSSRマーカーで88.9%、アガロース電気泳動においてはEST-SSRマーカーで9.3%、今回得られたSSRマーカーで77.8%となり増幅産物の分離能が低い方法ほどEST-SSRマーカーでは数値が低下した。増幅産物の分子量がEST-SSRが全体的に大きいことも原因であると考えられるが、それ以外の何らかの要因があるものと考えられる。

練ら<sup>4)</sup>はSuppression-PCRを用いたSSRマーカー作製法の成功率について、不等長アダプター付き制限酵素断片を鋳型として、SSRプライマーとAP2プライマーによるPCR産物をクローニングした際、インサートを含むコロニーの平均40%が150bp以上のインサートを含んでいると述べている。今回の結果では、SSRプライマーのうちACでは38.9%、GAでは68.8%となった。

第3表 各品種識別に必要なマーカー

品種No.	1	2	3	4	5	6	7
品種名	FC01	FC02	チルドシアナ	ウェディングマーチ	ホワイトゴッテス	アクアホワイト	白雪式部
ZW025					○		①②
ZW045				○			
ZW123					○		
ZW158					○		
AC-03G					○	○	③
AC-11A	①②						
AC-11C					○		
AC2-03A	②				○		②
AC2-03B			○		○		
GA-05E							
GA-06A	①	○					①③

注1) ○ : 1種類のマーカーで識別可能

注2) 番号付きの○ : 2種類のマーカーで識別可能、同じ番号が識別マーカーとなる。

第4表 本報におけるSuppression-PCRによるSSRマーカー作製法の各段階での成功率

段階	段 階	AC	GA	合計	直前段階に対する成功率(%)			練らの報告
					AC	GA	合計	
1段階目	白色コロニー(インサート有)	144	48	192				
	インサート≥150bp	56	33	89	38.9	68.8	46.4	
	シークエンスできたクローン	51	29	80	91.1	87.9	89.9	
	IP1とIP2が設定できたクローン	23	7	30	45.1	24.1	37.5	100
2段階目	IP3が設定できたマイクロサテライト座	10	5	15	43.5	71.4	50.0	80≥
	PCRで増幅されるマイクロサテライト座	6	3	9	60.0	60.0	60.0	100
	多型性があるマイクロサテライト座	5	3	8	83.3	100.0	88.9	70

このうち練らは、ほとんどがシーケンスできたと述べているが、今回も AC,GA 合計で 89.9%となった。しかし、以降の過程では「PCR で増幅されるマイクロサテライト座」から「多型性があるマイクロサテライト座」間の成功率を除けば今回は練らの報告と比較して低い成功率であった(第4表)。原因としては、プライマー設計ソフトの条件設定等に問題があった可能性がある。また、練らは Suppression-PCR が様々な生物種に適用されていることを報告しているが、花き類では報告がなくカラーの DNA 自体の特性である可能性もある。

今後は、43 種類の EST-SSR マーカーと今回得られた 9 種類の Genomic SSR マーカーにより、今回供試した 7 品種以外に流通している湿地性カラー品種があれば逐次解析していく予定である。

## VI 引用文献

- 1) Hamada K. and M.Hagimori 1996. RAPD-based method for cultivar-identification of calla lily (*Zantedeschia* spp.). *Scientia horticulturae* 65:215-218
- 2) 市村一雄 (2013): 花き流通最新の動向. 花き研報,13,1-15
- 3) 国内外における品種保護をめぐる現状. 農林水産省・食料産業局,東京,[http://www.maff.go.jp/j/study/shokbutu\\_hogo/01/pdf/data2.pdf](http://www.maff.go.jp/j/study/shokbutu_hogo/01/pdf/data2.pdf) (平成 27 年 8 月 21 日閲覧)
- 4) 練春蘭・宝月岱造 (2004): 効率的マイクロサテライト (SSR) マーカー作製のためのプロトコル. 日本林學會誌,86(2),191-198
- 5) 登録品種データベース. 農林水産省・食料産業局・新事業創出課,東京,[http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM112.aspx?TOUROKU\\_NO=10578&LANGUAGE=Japanese](http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM112.aspx?TOUROKU_NO=10578&LANGUAGE=Japanese) (平成 27 年 6 月 24 日閲覧)
- 6) 登録品種データベース. 農林水産省・食料産業局・新事業創出課,東京,[http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM112.aspx?TOUROKU\\_NO=21892&LANGUAGE=Japanese](http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM112.aspx?TOUROKU_NO=21892&LANGUAGE=Japanese) (平成 27 年 6 月 24 日閲覧)
- 7) 登録品種データベース. 農林水産省・食料産業局・新事業創出課,東京,[http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM112.aspx?TOUROKU\\_NO=21893&LANGUAGE=Japanese](http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM112.aspx?TOUROKU_NO=21893&LANGUAGE=Japanese) (平成 27 年 6 月 24 日閲覧)
- 8) 登録品種データベース. 農林水産省・食料産業局・新事業創出課,東京,[http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM112.aspx?TOUROKU\\_NO=21894&LANGUAGE=Japanese](http://www.hinsyu.maff.go.jp/vips/CMM/apCMM112.aspx?TOUROKU_NO=21894&LANGUAGE=Japanese) (平成 27 年 6 月 24 日閲覧)
- 9) 植松清次・堀川照男・鈴木孝仁・本間宏基・荒井仁・赤山喜一郎 (1990): カラーに発生した疫病(新病害). *Annals of the Phytopathological Society of Japan*,56(3),385-386
- 10) Wei ZZ., LB.Luo, HL.Zhang, M Xiong and D.Zhou 2013. Identification and characterization of 43 novel polymorphic EST-SSR markers for arum lily, *Zantedeschia aethiopica* (Araceae). *American Journal of Botany*: e1-e5.
- 11) 山形悦透・牧内貴子・吉村淳 (2012): イグサ優良品種「ひのみどり」を識別する多型の探索およびマーカー開発. DNA 鑑定,4,39-47

## Summary

### Identification with SSR Markers for Arum Lily Cultivars, Newly Registered 'Kumamoto FC01', 'Kumamoto FC02' and Commercial 5 Cultivars

Kazuhiko IMURE and Akira SAITO

Arum lily(Calla lily) is a special product in Kumamoto prefecture and two white color cultivars 'Kumamoto FC01' and 'Kumamoto FC02' were bred in 2012. So to protect plant breeder's right of these cultivars, We performed to identify them from other 5 cultivars with white color lowers by former reported four EST-SSR makers and newly developed 7 Genomic SSR-makers in agarose gel electrophoresis analyses.

'Kumamoto FC01', 'Kumamoto FC02' and other 5 cultivars:'Childsiana', 'Wedding March', 'White Goddess', 'Aqua White' and 'Shirayukisikibu' could be identified by one or two makers respectively from other six cultivars.