

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) **公開特許公報** ( A )

(11)特許出願公開番号

**特開2003 - 339399**

( P 2 0 0 3 - 3 3 9 3 9 9 A )

(43)公開日 平成15年12月2日(2003.12.2)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup>	(参考)
C12Q 1/68	ZNA	C12Q 1/68	A	2B030
A01H 5/00		A01H 5/00	Z	4B024
C12N 15/09		C12N 15/00	A	4B063

審査請求 有 請求項の数 3 O L (全14頁)

(21)出願番号 特願2002 - 155547( P 2002 - 155547)

(22)出願日 平成14年 5月29日(2002.5.29)

(71)出願人 501203344

独立行政法人農業技術研究機構

茨城県つくば市観音台3 - 1 - 1

(72)発明者 松元 哲

三重県津市小舟904 - 75

(72)発明者 國久 美由紀

三重県津市中河原364 - 1 レジデンス

イコー301号

(72)発明者 吹野 伸子

三重県安芸郡安濃町大字太田1664番地49

(74)代理人 100074077

弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】イチゴの品種識別方法

(57)【要約】

【課題】 イチゴの種苗、果実等を試料として、栽培条件や保存条件などに左右されずに、イチゴ品種を正確に識別することが可能な方法を提供すること。

【解決手段】 イチゴのガクを含む果実及び/又は葉より抽出したDNAを鋳型として、イチゴ品種間で異なる塩基配列を標的としたPCR法によってDNAを増幅し、増幅したDNAの多型及び増幅したDNAの制限酵素による消化で生じる多型を識別することを特徴とするイチゴの品種識別方法

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 イチゴのガクを含む果実及び/又は葉より抽出した DNA を鋳型として、イチゴ品種間で異なる塩基配列を標的とした PCR 法によって DNA を増幅し、増幅した DNA の多型及び増幅した DNA の制限酵素による消化で生じる多型を識別することを特徴とするイチゴの品種識別方法。

【請求項 2】 PCR 法におけるプライマー対として、APXFP (配列表の配列番号 1) と APXRV (配列表の配列番号 2)、CHIFP (配列表の配列番号 3) と CHIRV (配列表の配列番号 4)、又は F3HFP (配列表の配列番号 5) もしくは F3HFP2 (配列表の配列番号 6) と F3HRV (配列表の配列番号 7) のいずれかを用いることを特徴とする請求項 1 記載のイチゴの品種識別方法。

【請求項 3】 イチゴ品種間で異なる塩基配列として、APX 挿入配列 (配列表の配列番号 16)、APX-Mlu I (配列表の配列番号 17)、CHI-Pvu II (配列表の配列番号 18)、F3H-Nco I (配列表の配列番号 19)、F3H-Hpa II (配列表の配列番号 20)、F3H-Acc I (配列表の配列番号 21)、F3H-Dde I (配列表の配列番号 22) 及び F3H-Rsa I (配列表の配列番号 23) の中から選ばれた少なくとも 1 種を識別用 DNA マーカーとして用いる請求項 1 記載のイチゴ品種識別方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、イチゴの品種識別方法に関し、詳しくはイチゴのガク(へた)を含む果実及び/又は葉より抽出した DNA を鋳型として、イチゴ各品種間で識別性のある塩基配列を標的にした PCR 法によって DNA を増幅し、得られた DNA の多型及び該増幅産物を制限酵素処理して得られる DNA の多型を検出し、これを識別することによって、イチゴの品種を識別する技術に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来、イチゴの品種識別は、果実の形や大きさ、葉の形や大きさ、草型等の比較により行われてきた。しかし、これらは連続的な形質による違いに依存しているため、正確に判断するのが極めて困難であった。さらに、上記の方法は、苗の大きさや生育状態等を揃えて同一の条件下で栽培した場合には有効であるが、果実のない苗では品種を識別することは事実上できない。また、市場に流通している果実は、多様な条件下で栽培されているため、上記の従来方法では品種を識別することは困難である。

【0003】種苗法では、登録されているイチゴ品種の育成者権を認めている。しかし、育成者権を有する者、団体等が苗の増殖、販売に関する承諾を与えていない者、団体等によって、当該品種を違法に増殖、販売していることを見つけても、従来のイチゴの品種判別方法では、登録されたイチゴ品種との同一性を特定することが

難しいため、育成者権の保護が有効になされていないという一面があった。また、JAS 法による農産物の表示義務が強化されると共に、消費者がイチゴの購入時に品種を基準にして選択している等の状況からしても、イチゴの品種を正確に識別することは重要なことであるにもかかわらず、外見では一部の品種を除いて殆ど識別することができず、表示の上で大きな問題である。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、イチゴの種苗、果実等を試料として、栽培条件や保存条件などに左右されずに、イチゴ品種を正確に識別することが可能な方法を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、イチゴ品種の識別を DNA 解析によって行うべく検討し、PCR 法により増幅した特定の DNA を特定の制限酵素で切断して多型を生じさせ、その多型のパターンによって品種を効果的に識別できることを見出し、本発明に到達したのである。

【0006】すなわち、イチゴのアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(以下、APX と略記することもある。)をコードする遺伝子、カルコンイソメラーゼ(以下、CHI と略記することもある。)をコードする遺伝子及びフラバノン 3 ヒドロキシラーゼ(以下、F3H と略記することもある。)をコードする遺伝子のイントロンを含む塩基配列が、イチゴの品種によって特異的に変異していること並びにその差を制限酵素 Mlu I、Pvu II、Hpa II、Nco I、Acc I、Dde I、Rsa I 等で処理することによって検出できることを見出し、本発明に到達した。

【0007】請求項 1 記載の本発明は、イチゴのガクを含む果実及び/又は葉より抽出した DNA を鋳型として、イチゴ品種間で異なる塩基配列を標的とした PCR 法によって DNA を増幅し、増幅した DNA の多型及び増幅した DNA の制限酵素による消化で生じる多型を識別することを特徴とするイチゴの品種識別方法である。請求項 2 記載の本発明は、PCR 法におけるプライマー対として、APXFP (配列表の配列番号 1) と APXRV (配列表の配列番号 2)、CHIFP (配列表の配列番号 3) と CHIRV (配列表の配列番号 4)、又は F3HFP (配列表の配列番号 5) もしくは F3HFP2 (配列表の配列番号 6) と F3HRV (配列表の配列番号 7) のいずれかを用いることを特徴とする請求項 1 記載のイチゴの品種識別方法である。請求項 3 記載の本発明は、イチゴ品種間で異なる塩基配列として、APX 挿入配列 (配列表の配列番号 16)、APX-Mlu I (配列表の配列番号 17)、CHI-Pvu I (配列表の配列番号 18)、F3H-Nco I (配列表の配列番号 19)、F3H-Hpa II (配列表の配列番号 20)、F3H-Acc I (配列表の配列番号 21)、F3H-Dde I (配列表の配列番号 22) 及び F3H-Rsa I (配列表の配列番号 23) の中から選ばれた少なくとも 1 種を識別用 DNA マ

ーカーとして用いる請求項 1 記載のイチゴ品種識別方法である。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】イチゴの品種を DNA 解析によって分類する方法では、特定のマーカーが用いられるが、本発明では新たに開発したマーカーを使用し、PCR法によって増幅した特定の DNA を特定の制限酵素で切断して多型を生じさせ、その多型のパターンによって品種を分類する方法を確立した。すなわち、PCR法により増幅した部分にイチゴ品種間で異なる塩基配列が存在し、かつその配列を認識できる制限酵素があることから、これらの組み合わせによってイチゴの品種識別を行う方法である。

【 0 0 0 9 】本発明では、イチゴの品種間で特異的に塩基配列が異なる酵素遺伝子として、APX、CHI 及び F3H の遺伝子を選択した。APX は、植物の葉に含まれる代表的な活性酸素消去能を有する酵素の一つで、葉緑体に局在している。CHI は、カルコンシンターゼによって合成されたカルコンを異性化させる酵素であり、F3Hは、さらに 3 位を水酸化するなど、植物に含まれる天然色素であるアントシアニンの生合成経路を触媒するものである。

【 0 0 1 0 】PCR法では、イチゴ試料から抽出した DNA を鋳型とし、上記の APX、CHI 又は F3H 遺伝子とイントロン部分を含む領域を標的にして行う。DNA の増幅に必要なプライマーについて、本発明では、既知のイチゴのイントロンを含む DNA 配列を利用して PCR 増幅に必要な配列を設計した後、識別が求められるイチゴ品種の DNA を鋳型として、その部分をクローニングして塩基配列を決定し、多型が生じるような DNA 配列を確認すると共に、その部分が確実に増幅するようにプライマーの設計を修正し、最終的なものとした。これらのプライマーが、APXFP ( 配列表の配列番号 1 ) と APXRV ( 配列表の配列番号 2 )、CHIFP ( 配列表の配列番号 3 ) と CHIRV ( 配列表の配列番号 4 )、又は F3HFP ( 配列表の配列番号 5 ) もしくは F3HFP2 ( 配列表の配列番号 6 ) と F3HRV ( 配列表の配列番号 7 ) である。すなわち、DNA データベースから APX の DNA 配列 ( AF158652 ) を選択し、この DNA 配列情報を参考にして APXFP と APXRV を設計した。また、DNA データベースから CHI の DNA 配列 ( AY017486 及び AY017478 ) を選択し、この DNA 配列情報から CHIFP と CHIRV を設計し、同様に DNA データベースから F3H の DNA 配列 ( A0Y17482 及び A0Y17479 ) を選択し、この DNA 配列情報から F3HFP、F3HFP2 と F3HRV を設計した。

【 0 0 1 1 】試料のイチゴからの DNA の抽出は、ガクを含む果実及びノ又は葉から、Laurence Marechal-Drouard et.al. ( Plant Molecular Biology Reporter, 1995, vol. 13(1), p. 26-30 ) の方法を改変し行った。この方法では、すりつぶした試料に DNA 抽出溶液を加え、保

温・冷却処理したのち、遠心して得た上清にイソプロパノールなどの溶媒を加えて DNA を沈殿させ、必要に応じて遠心して DNA を分離する。次いで、TE と リボヌクレアーゼ溶液を加えて RNA を分解する。この RNAase 処理後の溶液に DEAE セファデックス混液を添加し、再度遠心して得た固形物に溶出バッファーを加えて DNA を溶出させ、これを常法により精製する。

【 0 0 1 2 】上記により抽出した DNA を鋳型とし、APX 遺伝子、CHI 遺伝子又は F3H 遺伝子とイントロン部分を含む領域を標的として PCR 法を行う。PCR 反応液として、Taq ポリメラーゼ等の耐熱性 DNA ポリメラーゼ、反作用緩衝液、鋳型 DNA、dNTPs にプライマー対を加えたものを用いる。反応工程は、常法に従い約 90 ~ 96 の高温処理過程 ( 変性 )、約 30 ~ 75 のプライマー・DNA 結合過程 ( アニールリング )、約 70 ~ 75 の DNA 複製過程 ( 伸長 ) の 3 過程を 1 サイクルとする反応を 30 ~ 40 サイクル行って DNA を増幅する。

【 0 0 1 3 】次に、増幅 DNA の電気泳動を行う。これにより、増幅産物のうち品種間の識別性が現れる塩基配列であることを示すバンドを検出する。すなわち、PCR法により増幅された産物を特定の制限酵素で処理した後、アガロースゲル等で分離すると、DNA がアガロース等のゲル中を直流電荷に引かれて移動する際に、DNA の分子量の差により分離され、臭化エチジウムブロマイド等により染色されてバンドとして増幅 DNA の相違が検出されるのである。イチゴ各品種から得られた DNA 断片をアガロースゲルごと切り出して DNA を回収し、これを Easy T Vector システム ( プロメガ社 ) 等を用いてクローニングを行う。まず、DNA をプラスミドに組み込み、大腸菌に導入する。次いで、大腸菌を増殖させた後、プラスミドを取り出して精製し、DNA シーケンサーを用いてクローンの塩基配列を決定する。イチゴ各品種からのプラスミドの解析結果や公開されている配列情報を比較することによって、標的とした塩基配列中に品種間で特異的に変異しており、かつその差を制限酵素処理と電気泳動により検出できる部位が存在するかを調べ、品種識別用マーカーとする。

【 0 0 1 4 】イチゴ APX のクローンとして APX6ny1 ( 配列表の配列番号 8 )、APX6ih2 ( 配列表の配列番号 9 )、APX6ih3 ( 配列表の配列番号 10 )、イチゴ CHI のクローンとして CHIPvu11 ( 配列表の配列番号 11 )、CHImain ( 配列表の配列番号 12 )、イチゴ F3H のクローンとして F3HCesena1 ( 配列表の配列番号 13 )、F3HCesena2 ( 配列表の配列番号 14 )、F3HCesena3 ( 配列表の配列番号 15 ) がある。これらは、挿入配列の有無、特定の制限酵素認識部位の有無により特徴付けられる。

【 0 0 1 5 】イチゴ品種は、これらの対立遺伝子の組み合わせが異なることから、識別が可能である。イチゴ AP

X のクローンは、挿入配列の有無の他に、制限酵素 Mlu I の認識部位の有無により識別され、イチゴ CHI のクローンは、制限酵素 Pvu II の認識部位の有無により識別される。また、イチゴ F3H のクローンの対立遺伝子間で配列の異なる部分を認識する制限酵素としては、Nco I、Acc I、Hpa II、Dde I、Rsa I などがある。

【0016】したがって、APX 挿入配列（配列表の配列番号 16）、APX-Mlu I（配列表の配列番号 17）、CHI-Pvu II（配列表の配列番号 18）、F3H-Nco I（配列表の配列番号 19）、F3H-Hpa II（配列表の配列番号 20）、F3H-Acc I（配列表の配列番号 21）、F3H-Dde I（配列表の配列番号 22）及び F3H-Rsa I（配列表の配列番号 23）の中から選ばれた少なくとも 1 種を識別用 DNA マーカーとして用いることによって、イチゴ品種の識別をすることができる。

【0017】本発明では、イチゴ品種として「とよのか」、「女峰」、「とちおとめ」、「章姫」、「さちのか」、「アイベリー」、「レッドパール」、「濃姫」、「サンチーゴ」、「ピーストロ」、「アイストロ」、「べにほっぺ」、「けいきわせ」、「セセナ」の 14 種類を供試したが、これらに限定されず、その他の品種であっても、本発明の方法により識別することが可能である。

#### 【0018】

【実施例】以下に、本発明を実施例などにより詳しく説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

試験例 1（イチゴ品種識別用（PCR 制限酵素断片長多型）マーカーの開発）

DNA データベースからイチゴ APX の DNA 配列（AF158652）を選択し、この DNA 配列情報を参考にして、フォワードプライマー（APXFP）（配列表の配列番号 1）とリバースプライマー（APXRV）（配列表の配列番号 2）を設計した。イチゴ「セセナ」、「女峰」、「久留米 IH3 号」の 2 品種、1 系統の新葉から DNA を抽出した。すなわち、イチゴ新葉約 100 mg を乳鉢ですりつぶし、DNA 抽出溶液（100 mM 酢酸ナトリウム、50 mM エチレンジアミン二ナトリウム二水和物、0.5 M 塩化ナトリウム、0.5% ポリビニルピロリドン（MW 40000）、1.4% ドデシル硫酸ナトリウム、pH 5.5）1 ml を加え、65 で 10 分間保温した後、遠心（15000 rpm、10 分間）して固形物を分離した。上清 750 μl を新しい遠心管に移し、5 M 酢酸カリウム 250 μl を加えて氷中で 10 ~ 30 分間保冷後、遠心（15000 rpm、10 分間）した。

【0019】次に、この上清約 700 μl を新しい遠心管に移し、同量のイソプロパノールを添加し、DNA を沈殿させた。遠心（15000 rpm、10 分間）後、上清を捨て、DNA を含む沈殿物を TE（10 mM トリス塩酸、5 mM EDTA、pH 8.0）+ リボヌク

レアーゼ（RNase、終濃度 0.1 mg/ml）溶液 200 μl を添加し、55 で 30 分間保温して RNA を分解した。洗浄バッファー（10 mM トリス塩酸、pH 7.5、1 mM EDTA、塩化ナトリウム 0.4 M）で平衡化した DEAE セファデックス混液 200 μl を上記 RNase 処理後の溶液に添加し、10 分程度ゆっくり混ぜた。この溶液を遠心した後、上清を捨て、洗浄バッファー 500 μl を添加してセファデックスを洗浄した。この洗浄操作を 2 回繰り返した。沈降後、上清を取り除き、60 に保温した溶出バッファー（10 mM トリス塩酸、pH 7.5、1 mM EDTA、塩化ナトリウム 2.0 M）を加え、DNA を DEAE セファデックスから溶出バッファー中に溶出させた。DNA を含む溶出バッファーを新しい遠心管に移し、イソプロパノールを添加した。10 分間保冷（-80）後、遠心して DNA を集め、70% エタノールで洗浄した。得られた DNA を乾燥して 1/10 に希釈した TE バッファーに溶解した。

【0020】このようにして抽出した DNA 10 ~ 100 ng を鋳型に、APX 遺伝子及びイントロン部分を含む領域を標的にした PCR 反応を行った。PCR 反応液の組成は、Taq ポリメラーゼ（5 ユニット/μl、宝酒造）1 μl、反応用緩衝液（12 mM トリス塩酸、60 mM KCl、pH 8.3）5 μl、25 mM MgCl<sub>2</sub> 2 μl、鋳型 DNA 100 ng、dNTPs（100 μM）5 μl を混合し、上記の APXFP と APXRV をそれぞれ 50 pmol を加え、滅菌水を加えて合計の反応量を 50 μl とした。反応装置は、ABI（Applied Biosystems Instrument）社製、Gene Amp PCR System 9700 を使用し、94 5 分後、94 30 秒、55 60 秒、72 60 秒の反応を 35 サイクル行い、72 5 分間の伸長反応を補足した。

【0021】増幅 DNA の電気泳動は、コスモバイオ（株）製、ミュービッド II を使用し、1.5% アガロースゲルで 30 分間泳動し、臭化エチジウムブロマイド染色後の紫外線照射によりバンドを検出した。各品種から得た DNA 断片（約 0.75 kb）をアガロースゲルごと切り出して QIAEX（キアゲン社）を用いて DNA を回収した。次に、回収した DNA 断片を Easy T vector システム（プロメガ社）を用いてプラスミドに組み込み、大腸菌に導入した。この大腸菌を増殖させた後、プラスミドを取り出して精製し、ABI 社製、DNA シーケンサー PRISM377 を用いて塩基配列を決定した。各品種から数個のプラスミドを解析した結果、特徴的な配列を有するクローン APX6nyl（配列表の配列番号 8）、APX6ih2（配列表の配列番号 9）、APX6ih3（配列表の配列番号 10）等の複対立遺伝子を見出した。公開されているクローン AF158652 と塩基配列を比較したところ、高い相同性があったものの、一部に異なる配列を有していた。

APX6nyl は 76 bp の挿入があり（216 番目から 29

1 番目)、また APX6ih2 は 9 4、9 5 番目の位置に C G の挿入があるため、前後の配列 ( 9 1 ~ 9 6 番目) が a cgcgt となり、制限酵素 Mlu I の認識部位であった。AP X6ih3 とクローン AF158652 は、挿入配列もなく、Mlu I の認識部位も存在しなかった。これらのことから、イチ

ゴ品種は、これらの複対立遺伝子を組み合わせて持っていることが明らかとなった ( 表 1 )。

【 0 0 2 2 】

【表 1】表 1 イチゴ APX の P C R クローンの挿入配列及び Mlu I の認識部位の有無

DNA クローン	挿入配列の有無	Mlu I の認識部位の有無
APX6ny1	有	無
APX6ih2	無	有
APX6ih3	無	無
AF158652	無	無

【 0 0 2 3 】試験例 2 (イチゴ品種識別用 ( P C R 制限酵素断片長多型) マーカーの開発)

DNA データベースからイチゴのカルコンイソメラーゼ ( CHI) の DNA 配列 ( AY017486、AY017478) を選択し、この DNA 配列情報を参考にしてフォワードプライマー ( CHIFP、配列表の配列番号 3 ) とリバースプライマー ( CHIRV、配列表の配列番号 4 ) を設計した。設計したプライマーと、各品種から試験例 1 と同様にして抽出した DNA を鋳型に用いた P C R 反応により、CHI 遺伝子及びイントロン部分を含む領域を増幅させた。得られた DNA 断片を Easy T vector を用いてクローニングし、2 個のクローン ( CHIPvu II、CHImain1) の塩基配列 ( 前者が配列表の配列番号 1 1、後者が配列番号 1 2 ) を決定した。この配列は、公開されている AY017486、AY 017478 と高い相同性を有していた。しかし、複数の部位で DNA 配列の異なる断片があった。CHIPvu II は、1 1 1 b p 付近に制限酵素 Pvu II 認識部位を有していたが、CHImain1 は、この付近に Pvu II 認識部位を有していなかった。このことから、イチゴ品種の CHI 遺伝子については、Pvu II 認識部位の有無が異なる対立遺伝子が存在することが明らかとなった。

【 0 0 2 4 】試験例 3 (イチゴ品種識別用 ( P C R 制限酵素断片長多型) マーカーの開発)

DNA データベースからイチゴのフラバノン 3 ヒドロキシラーゼ ( F3H) の DNA 配列 ( AOY17482、AOY17479) を選択し、この DNA 配列情報を参考にしてフォワードプライマー ( F3HFP、配列表の配列番号 5、F3HFP2、配列表の配列番号 6 ) とリバースプライマー ( F3HRV、配列表の配列番号 7 ) を設計した。設計したプライマーと、各品種から試験例 1 と同様にして抽出した DNA を鋳型に用いた P C R 反応により、F3H 遺伝子及びイントロン部分を含む領域を増幅させた。得られた DNA 断片を Easy T vector を用いてクローニングし、複数のクローンについて塩基配列を決定した。得られたクローン F3HCesena1、F3HCesena2、F3HCesena3 は、公開されている AOY1

7482、AOY17479 と高い相同性を有していたが、複数の部位で DNA 配列が異なっていた。

【 0 0 2 5 】

AOY17482、AOY17479、F3HCesena1、F3HCesena2 及び F3HCesena3 の 5 個の F3H の対立遺伝子間で配列の異なる部分を認識する制限酵素として、Nco I、Acc I、Hpa II、Dde I、Rsa I などがあった。Cesena1 は、1 個の Acc I、Hpa II、Rsa I、2 個の Nco I、3 個の Dde I の認識部位があり、Cesena2 では、Hpa II の認識部位はなく、1 個の Acc I、Dde I、Nco I、Rsa I の認識部位があった。また、F3HCesena3 は、1 個の Hpa II、Nco I、Rsa I、2 個の Acc I、3 個の Dde I の認識部位が確認された。AOY17482 では、Acc I、Rsa I の認識部位はなく、4 個の Dde I、1 個の Hpa II、Nco I の認識部位があった。AOY17479 では、Rsa I の認識部位はなく、1 個の Acc I、Hpa II、Nco I、3 個の Dde I の認識部位があった ( 表 2 )。イチゴ品種の F3H 遺伝子については、複数の制限酵素認識部位の有無が異なる対立遺伝子が存在することが明らかとなった ( 表 2 )。

【 0 0 2 6 】

【表 2】表 2 F3H 遺伝子の複対立遺伝子間の制限酵素認識部位数の違い

DNA クローン	NcoI	AccI	HpaII	DdeI	RsaI
Cesena1	2	1	1	3	1
Cesena2	1	1	0	1	1
Cesena3	1	2	1	3	1
AOY17482	1	0	1	4	0
AOY17479	1	1	1	3	0

20

30

40

50

【0027】実施例1 (APX のPCR増幅DNA断片の制限酵素多型を用いたイチゴ品種の識別)

イチゴ14品種のガク又は葉より試験例1と同様の方法でDNAを抽出した。すなわち、乳鉢にイチゴのガク片約半分、DNA抽出溶液(100mM 酢酸ナトリウム、50mM エチレンジアミンニナトリウム二水和物(EDTA)、0.5M 塩化ナトリウム、0.5%ポリビニルピロリドン(分子量40000)、1.4%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、pH5.5)200μL、消泡剤1滴を加えてすりつぶし、さらにDNA抽出溶液400μlを添加し、遠心管に移した。65で10分間保温した後、遠心分離(10000rpm、10分間)を行って固形物を分離した。

【0028】この上清600μlを新しい遠心管に移し、氷冷した5M 酢酸カリウム200μl(終濃度1.25M)を加え、氷中で10分間保冷する。遠心分離(15000rpm、4、10分間)後、上清750μlをとり、新しい遠心管に移し、同量のイソプロパノールを添加した。-85で10分間保冷後、遠心分離(15000rpm、4、10分間)した。上清を捨て、DNAを含む沈殿物にTE(10mM トリス塩酸、5mM EDTA、pH8.0)+リボヌクレアーゼ(RNase、終濃度0.1mg/ml)溶液150μlを添加し、55で10分間保温しRNAを分解した。

【0029】洗浄バッファー(10mM トリス塩酸pH7.5、1mM EDTA、塩化ナトリウム0.4M)で平衡化したDEAEセファデックス混液200μlをRNase処理後の溶液に添加し、10分程度、ゆっくり混ぜた。ガラスウールを詰めたピペットチップをカラムにして混液をアプライし、排出した。(このとき排出が悪ければ、圧をかけて押し出す。)

次いで、200μlの洗浄バッファーを添加し、圧をかけ排出するという操作を2回繰り返す。カラムから完全にバッファーを排出し、カラムを新しい1.5ml遠心管に入れ、60に保温した溶出バッファー200μlを添加し、1分程度待ち、圧をかけて排出した。200μlのイソプロパノールを添加し、-85で10分間保冷後、遠心分離(15000rpm、4、10分

間)した。上清を捨て、70%エタノール100μlを添加し、洗浄した。遠心分離(15000rpm、4、10分間)後、上清を捨て、遠心管の蓋を開けて20分ほど乾燥させた。滅菌水40μlを添加し、軽くボルテックスした。55で10分間ほど保温し、スピンドウンして蓋についた液を集めた。得られた液10μlを泳動してDNAの有無を確かめた。

【0030】APX マーカーを用いたイチゴ品種識別のため、以下の操作を行った。抽出したDNA(10~100ng)5.0μl、APX 増幅用プライマー対(配列番号1及び2)それぞれ(50pmol)0.5μl、dNTPミックス4.0μl、PCR用10xバッファー5.0μl、Taq ポリメラーゼ5.0ユニット/μl(宝酒造)0.5μl、滅菌水34.5μlの合計50.0μlをPCRチューブに入れ、PCR機械(ABI社製、Gene Amp PCR System 9700)にセットして反応を開始した。

【0031】PCR条件は次の通りである。94で5分間反応後、94 30秒、55 60秒、72 60秒の反応を35回繰り返し、72 5分で伸長反応を補足した。PCR反応液50μlから10μlをとり、制限酵素10x反応バッファー2μl、制限酵素MluI約10ユニット/分の合計20μlとなるように滅菌水で調整し、37で2~3時間反応させてDNAを消化した。制限酵素処理後の反応液10μlに6xローディングバッファー2μlを添加し、エチジウムブロマイド入りの1.5%アガロースゲルのウェルに入れて、電気泳動を行った。電気泳動は、コスモバイオ(株)製、ムービッドIIを使用して紫外線照射によりバンドを検出した。電気泳動後のアガロースゲルを紫外線下に移し、写真をとって品種間で多型を比較した(図1)。また、検出結果を表3にまとめた。図中の試料番号は、1:とよのか、2:女峰、3:とちおとめ、4:章姫、5:さちのか、6:アイベリー、7:レッドパール、8:濃姫、9:サンチーゴ、10:ピーストロ、11:アイストロ、12:べにほっぺ、13:けいきわせ、14:セセナを表す。

【0032】

【表3】表3 APX マーカーによる品種の識別

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
APX 挿入	×	○	○	×	×	×	×	○	×	×	×	×	×	○
APX- MluI	○	×	×	×	○	○	○	○	○	×	×	×	×	○

はDNA断片(マーカー)を有する、×は有しないことを示す。

【0033】実施例2 (CHI-Pvu IIのPCR増幅DNA

断片の制限酵素多型を用いたイチゴ品種の識別) CHI-Pvu II マーカーを用いたこと以外は実施例1と同様にしてイチゴ品種の識別を行った。結果を図2と表4

10

20

30

50

に示す。なお、表中の数字や記号は表 3 と同じである。

【表 4】表 4 CHI-Pvu II マーカーによる品種の識別

【 0 0 3 4 】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CHI-Pvu II	×	×	×	○	○	○	×	×	×	×	×	○	○	×

【 0 0 3 5 】 図 2 及び表 4 から明らかなように、供試した 14 品種をマーカーの有無により 2 群に分けることができる。

【 0 0 3 6 】 実施例 3 ( F3H マーカーによるイチゴ品種の識別 )

F3H の各 マーカーを用いたこと以外は実施例 1 と同様にしてイチゴ品種の識別を行った。すなわち、PCR 用

プライマーと PCR 反応後に使用する制限酵素の種類の違いを除くと PCR 反応液の組成、PCR 条件及び検出操作は実施例 1 の場合と同様に実施した。その結果を図 3 ( 1 )、( 2 )、( 3 )、( 4 )、( 5 ) 及び表 5 に示す。なお、表中の数字や記号は表 3 と同じである。

【 0 0 3 7 】

【表 5】表 5 F3H マーカーによるイチゴ品種の識別

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
F3H-NcoI	○	○	×	○	×	×	×	×	×	○	×	×	○	○
F3H-HpaII	○	×	×	×	○	×	○	×	×	○	×	○	×	○
F3H-AccI	○	×	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F3H-DdeI	○	×	×	×	○	×	○	×	○	×	×	○	×	○
F3H-RsaI	○	×	×	×	×	○	○	×	○	○	×	×	○	○

【 0 0 3 8 】 表及び図から明らかなように、F3H マーカーの有無により、供試した 14 種の品種は分類される。すなわち、「とよのか」、「セセナ」の 2 品種が 5 種のマーカーを有し、「レッドパール」は F3H-NcoI 以外の 4 種、「ピーストロ」は F3H-DdeI 以外の 4 種のマーカーを有していた。また、「さちのか」、「べにほっぺ」は F3H-HpaII、F3H-AccI 及び F3H-DdeI の 3 種、「サンチーゴ」は F3H-AccI、F3H-DdeI 及び F3H-RsaI の 3 種、「けいきわせ」は F3H-NcoI、F3H-AccI 及び F3H-RsaI の 3 種のマーカーを有していた。「アイベリー」は F3H-AccI 及び F3H-RsaI の 2 種、「章姫」は F3H-NcoI 及び F3H-AccI の 2 種、「濃姫」、「アイトロ」は F3H-AccI の 1 種、「女峰」は F3H-NcoI の 1 種を有しており、「とちおと

め」はどのマーカーも有していなかった。【 0 0 3 9 】 以上の結果より、実施例 1 ~ 3 において各マーカーを組み合わせることによって、供試した 14 品種のイチゴはすべて識別することができる。

【 0 0 4 0 】

【発明の効果】本発明により、イチゴの種苗、果実等を試料として、栽培条件や保存条件などに左右されずに、イチゴ品種を正確に識別することができる方法が提供される。そのため、本発明によれば、多様な条件の下で栽培され、市場に流通しているイチゴ果実についても、その品種を正確に識別することが可能である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING  
<110>独立行政法人 農業技術研究機構  
<120>イチゴの品種識別方法  
<130>P141259K  
<160>23  
<210>1  
<211>22  
<212>DNA  
<213>Strawberry (Fragaria ananassa)  
<400>1

40

13

14

attgttgctc tctctggtg tc 22

&lt;210&gt;2

&lt;211&gt;18

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;2

agagggcggg agacaggg 18

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;21

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;3

aggagttgac agagtcggtt g 21

&lt;210&gt;4

&lt;211&gt;23

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;4

ggacctgcaa aatgatagcc aag 23

&lt;210&gt;5

&lt;211&gt;21

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;5

amcctgtgga aggaccttc g 21

&lt;210&gt;6

&lt;211&gt;18

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;6

tggattaccg ttcamcctgt gg 22

&lt;210&gt;7

&lt;211&gt;18

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;7

gagttcacta ckgcctggtg atc 23

&lt;210&gt;8

&lt;211&gt;831

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;8

attgttgctc tctctggtg tcacacctg gtgcattaat agtcttttta tcttcggaat 60

taatttgcta ttctgcattt aggtcaagaa atacgtgttt tttttttatt ccaatgaatg 120

gtgctgttct ctctttgatt aatggatggt gtctggattc aggaagggc acacaaggaa 180

cggctctggat tgcagggacc ctggactccc aaccctctta tctttgacaa ctcatatttc 240

acgtgagttt tgtttctctg ttcattgtat tagcaatata tgttcttggg atcttatctt 300

tgacaactca tatttcacgt gagttttggt tctctgttca tgttattagc aatacatggt 360

cttgggatat gcctactggt atgtaatttg ttttgcaaac cagcttataa cgttcttgggt 420



15

atgtcagtg tgtgttgag tggagagaag gaaggccttc tacagcttcc aactgacaag 480  
 gctcttctgt cagaccctgt cttccgccct cttgttgaga aatacgctgc ggtatgtatt 540  
 ttatttggg tgtgaagtct gcattctgct taaatattat actgatttat aaacctcttc 600  
 tcaggatgaa gatgctttct ttgctgatta tgctctagct catcagaggc tctctgagct 660  
 tgggtatggt ttcatttttag catactgtgt tgtattttgc tctgtatgtg ttgaacaat 720  
 gggctaaat gatcactgtt atattatgca gttttgctga agcttaagca gtggaactct 780  
 attaaggata aaggatgatg ccaatgcctg cgtgccttgc ttctgtattt t 831

&lt;210&gt;9

&lt;211&gt;745

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;9

atgtttgctc tctctggtag tcacaccttg gtgcgttaat agtcttttta tcttcggaat 60  
 taatttgcta ttctgcattt aggtcaagaa atacgcgtct tttttattc caatgaatgg 120  
 tgctgttctc tctttgatta atggtgatgg tctggattca gggaaggcca cacaaggac 180  
 ggtctggatt cgagggacc tggactccta accctcttat ctttgacaac tcatatttca 240  
 cgtgagtttt gtttctctgt tcatgttatt agcaatacat gttcttggga tatgcctact 300  
 ggtatgtaat ttgttttgta aaccagctta taacgttctt ggtatgtca gtgtgctgtt 360  
 gagtggagag aaggaaggcc ttctacagct tccaactgac aaggctcttc tgcagaccc 420  
 tgtctccgc cctctgttg agaaatagc tgcggtatgt attttattg tgggtggaag 480  
 tctgcattct gcttaaatat tatactgatt tataaacctc ttctcaggat gaagatgctt 540  
 tctttgctga ttatgctcta gctcatcaga ggctctctga gcttgggtat gttttcattt 600  
 tagcactact cgttgtattt tgcttttgaa caatgggtct aatgatcac tattatatta 660  
 tgcagttttg ctgaagctta agcagtggaa ctctattaag gataaaggat gatgccaatg 720  
 cctgcgtgcc ttgcttctgt atttt 745

&lt;210&gt;10

&lt;211&gt;765

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;10

atgtttgctc tctctggtag tcacaccttg gtgtgtaat aatcttttta tcttgggaat 60  
 taatttgcta ttctgcattt aggtcaagaa atacgtgttt ttttattcca atgaatgggtg 120  
 ctgttcgctc tttgattaat ggtgatggtc tggattcagg gaagggcaca caaggaacgg 180  
 tctggatttg agggaccatg gactccaac cctcttatct ttgacaactc atatttcacg 240  
 tgtgttctgt ttctctgttc aagttattag caatacatgt tcttgggata tgcctactgg 300  
 tatgtaattt gttttgtaac ccagcttata atgttcttgg tattgtcagt gtgctgttga 360  
 gtggagagaa ggaaggcctt ctacagcttc caactgacaa ggctcttctg tcagaccctg 420  
 tcctccgccc tcttgttgag aaatacgctg cgttatatat tttatttttg gtgtaaagtc 480  
 tgcatatctg gtctgcattc tgcgtaata ttatactgat ttataaacct cttctcagga 540  
 tgaagatgct ttctttgctg attatgctct agctcatcag aggcctctctg agcttgggta 600  
 tgttttcatt ttagcactact gtgttattt ttgctctgta tgcgtttgaa caatgggtct 660  
 aatgatcac tgttatatta tgcagttttg ctgaggctta agcagtggaa ctctattaag 720  
 gataaaggat gatgccaatg cctgcgtgcc ttgcttctgt atttt 765

&lt;210&gt;11

&lt;211&gt;636

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;11

aggagttagc agagtgggtt gagttcttca gggagatcgt tacaggtaaa atgagttttt 60  
 tattttaatt ttttttgac gaacagctaa aatgagtgg ttttgataaa cagctgaact 120

17

agaaatagtt ggactttgag attccgagtg caatgtagat gcttatgatt gtcagattgt 180  
 gtaatgtagt tccaatcatt ggaattttag gcttgaactc ttcctagtct atttgcttgt 240  
 gttcgttttt ttttttttaa caaggcttgt gttcggttta agaactctgtt tttagtctta 300  
 gcaatggaca atgggaatga tcttcatttt agtagagtta aggtattgaa tcttatgaaa 360  
 gtttgaacc tttggcctat cataaaccag acgcttaacc tccatcccca attggtctaat 420  
 tcgatatttc gatgtgctta ctaaaattgg ttcacttggg tagctgatag agattaatta 480  
 gtgtggtaga ttccatccag ttgtgacagc agactatcat actcacaagt cacaacagaa 540  
 caaataatat agacattcaa atggatgctg cattttgtaa ttgctgtaaa tatgttagta 600  
 caatggatat aaacttggct atcattttgc aggtcc 636

&lt;210&gt;12

&lt;211&gt;611

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;12

aggagttgac agagtcggtt gagttcttca gggagatcgt tacaggtaaa atgagtttgt 60  
 tttttttttt ggacgaacag ctaaaatgag ttggttttga taaacggctg aactaaaaat 120  
 agttggactt tgagattcct tgtgcaattt agatgcttat gattgtcaga ttgtgtaatg 180  
 tagttccaat cattggaatt ttaggcttga actcttccta gtctatttgc ttgtgttcgg 240  
 tgttcggttt aagaatctgt ttttagtctt agcaatggag aatgggaatg agcttcattt 300  
 tagtaaaggt attgaatcct atgaaagttt ggaacctttg gcctatcaca aactagacac 360  
 ttaacctcca tcaccaatg gctaattcga tatttcgatg tgcttactaa aattggttgg 420  
 cttggttagc tgatagagat taattagtgt ggtagattcc atccagttgt gagatcagac 480  
 tatcatactc acaagtcaca agactcaca gtcacaacag aacaataca ttcaaatgga 540  
 tgctgcattt gtttattgct gtaaatatgt tagtacaatg gatataaact tggctatcat 600  
 tttgcaggtc c 611

&lt;210&gt;13

&lt;211&gt;606

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;13

aacctgtgga aggaccttcc gtggtgaatc ttggagacca tggacatgtg agtatacttt 60  
 gcgacaattt caattaatcc gattcattat tcttgattga tacttttact attttagtgt 120  
 cactatctta atgtgattgt gaaataagca agataaggac acattaatg ttatttatac 180  
 caaactcggt atggtcaaga ttttttga aagaaatcgt gaataatagg gtgcaggtgg 240  
 atgttgaagt catgggttca atttgattta attggttaat taatttttat gtcacatata 300  
 atcaattata tttaccgggt tagtacgacc caaaaattca tactcaatca tccatggatg 360  
 taattcaatg gaaatgaaga attatgttta agtgaagttt ttttattttc aacatttaga 420  
 tgtaaatata taataatggt tgagtatgag ttccttagtg actgagcaaa cattaacata 480  
 cgtataatat ataccaatc gaacgtataa tcgtatatgt attgacacat taattatttg 540  
 ggtgatggaa cagtttctga gcaatgggag gttcaagaat gctgatcaca aggcagtagt 600  
 gaactc 606

&lt;210&gt;14

&lt;211&gt;606

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;14

aacctgtgga aggaccttcc gtggtgaatc ttggagacca tggacatgtg agtatacttg 60  
 cgacaatttc aattaatctg attcattatt cttgattgat aattttacta ttttagtgtc 120  
 acgtactatc ttaatgtgat tgtgaaataa gcaagatgag gacacattaa ttgttattta 180  
 taccaaacct gttatgggtc agatattttt gtaaagaaat cgtgaataat aggggtgcagg 240

18

19

tggatgttgg agtcatgggt ttaatttgat ttaattgggt aattaatfff tatgtcacgt 300  
 ataatacaatt atatttaccg ggftaatatcg acccagaaat tcatacttaa tcatctatgg 360  
 taattcaata gaaggaaga attatgttta agtgaagtta tcttattttc aacaatgtaa 420  
 atatataata gtggttgaac atgagttttt taatgagtta gtgactgaat gaacattaac 480  
 atatgtataa tatatactaa tatcaacgta tagtctgata tgtgttgaca cattatttgg 540  
 gtgatggaac agtttctgag caatgggagg ttcaagaatg ctgatcacia aggcagtagt 600  
 gaactc 606

&lt;210&gt;15

&lt;211&gt;612

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;15

aacctgtgga aggacctttc gtgggaatc ttggagacca tggacatgtg agtatacttg 60  
 cgacaatttc aattaatctg attcattatt ctgtattgat aattttacta ttttagtgc 120  
 actatcttaa tgtgattgtg aaataagcaa gataaggaca cattaattgt tatttatacc 180  
 aaactcatta tggcaagat atttttgtaa agaaatcgtg aataataggg tctagggtgc 240  
 tggatgttga agtcatgggt ttaatttgat ttaattgggt aattaatfff tatgttacgt 300  
 atactcaatt atatttaccg ggftagtacg accaagaaac tcatactcaa tcatttatgg 360  
 atgtaattca atgaaaaagg agaattatgt ttaagtgaag ttatfffatt ttcaacattt 420  
 atatgtaaat atacaaaatt gttgagtatg agtttcttag tgagttatgt actgagtgac 480  
 cattaacata cgtataatat ataccaatac gaacgtatag tcttatatgt attgacacat 540  
 tatttgggtg atggaacagt ttctgagcaa tgggaggttc aagaatgctg atcacaaggc 600  
 agtagtgaac tc 612

&lt;210&gt;16

&lt;211&gt;76

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;16

tcttatcttt gacaactcat atttcacgtg agttttgttt ctctgttcat gttattagca 60  
 atacatgttc ttggga 76

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt;6

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;17

acgcgt 6

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt;6

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;18

cagctg 6

&lt;210&gt;19

&lt;211&gt;6

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Strawberry (Fragaria ananassa)

&lt;400&gt;19

ccatgg 6

&lt;210&gt;20

&lt;211&gt;4

21  
 <212>DNA  
 <213>Strawberry (Fragaria ananassa)  
 <400>20  
 ccgg 4  
 <210>21  
 <211>6  
 <212>DNA  
 <213>Strawberry (Fragaria ananassa)  
 <400>21  
 gtmkac 6  
 <210>22  
 <211>5  
 <212>DNA  
 <213>Strawberry (Fragaria ananassa)  
 <400>22  
 ctnag 5  
 <210>23  
 <211>4  
 <212>DNA  
 <213>Strawberry (Fragaria ananassa)  
 <400>23  
 gtac 4

【図面の簡単な説明】

【図1】 イチゴ品種間で検出されたAPX-Mlu I マーカー多型の泳動写真である。

【符号の説明】

1は「とよのか」、2は「女峰」、3は「とちおとめ」、4は「章姫」、5は「さちのか」、6は「アイベリー」、7は「レッドパール」、8は「濃姫」、9は「サンチーゴ」、10は「ピーストロ」、11は「アイストロ」、12は「べにほっぺ」、13は「けいきわせ」、14は「セセナ」をそれぞれ示す。

【図2】 イチゴ品種間で検出されたCHI-Pvu II マー

カー多型の泳動写真である。

【符号の説明】

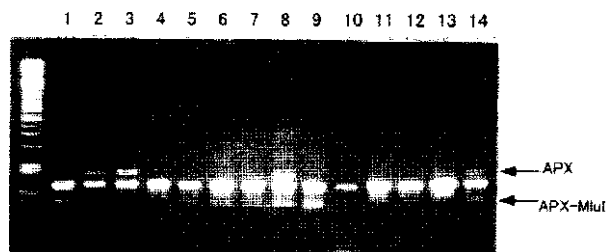
図1と同じである。

【図3】 (1)はイチゴ品種間で検出されたF3H-Nco I マーカー多型、(2)はF3H-Hpa II マーカー多型、(3)はF3H-Acc I マーカー多型、(4)はF3H-Dde I マーカー多型、(5)はF3H-Rsa I マーカー多型のそれぞれの泳動写真である。

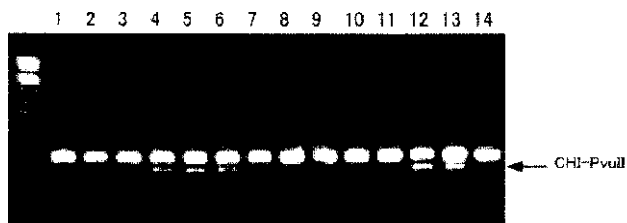
【符号の説明】

図1と同じである。

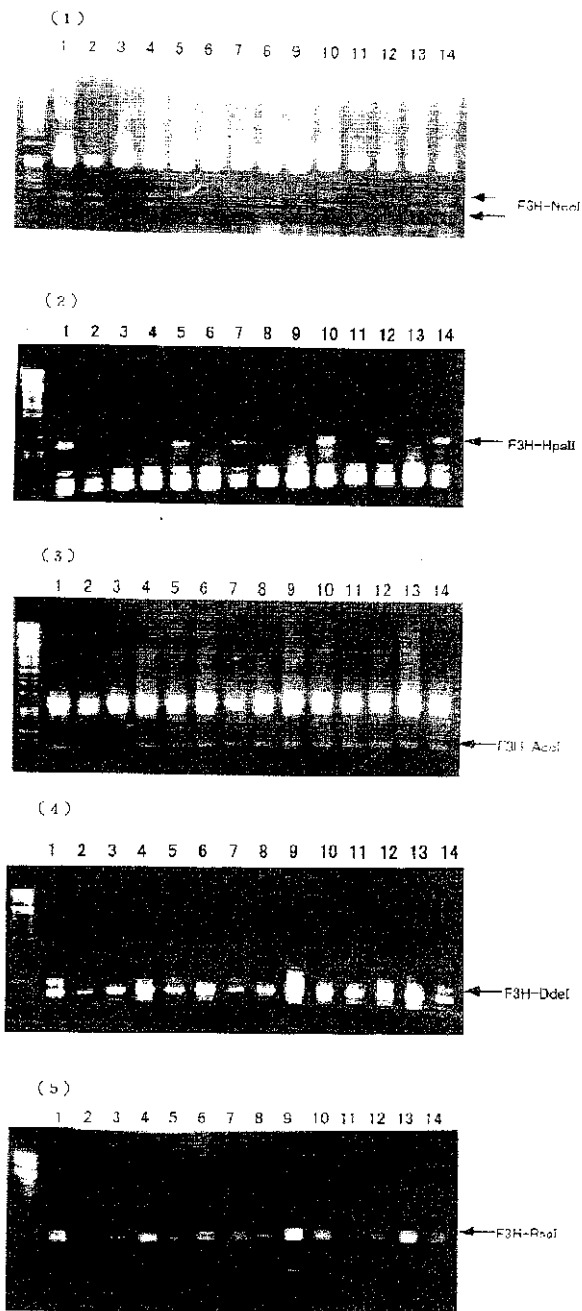
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2B030 AA02 AD20 CA24  
4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09  
GA17 HA14  
4B063 QA01 QA12 QA18 QQ04 QQ42  
QR08 QR14 QR32 QR38 QR42  
QR55 QR62 QR63 QR73 QR82  
QS16 QS25 QS34 QS39 QX02