

SSRマーカーによる日本なし 29 品種 のDNA品種識別技術

国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
2022年12月12日 初版

SSR マーカーによる日本なし 29 品種の DNA 品種識別技術

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
果樹茶業研究部門、種苗管理センター

1. はじめに

日本なし (*Pyrus pyrifolia* Nakai) は、バラ科サクラ亜科のナシ連に属する果樹であり、リンゴ、ビワなどが、同じナシ連に属している。セイヨウナシ (*Pyrus communis* L.)、チュウゴクナシ (*Pyrus bretschneideri* Rehd., *Pyrus ussuriensis* Maxim.) が、日本なしと同じ *Pyrus* 属に分類されている。

日本での日本なしの栽培は、総栽培面積 7,953 ha である (図 1、特産果樹生産動態等調査 (農林水産省農産局果樹・茶グループ果樹振興班 2022 年 3 月 2 日公表) から作成)。令和元年産の品種別栽培面積では、「幸水」が 40%、「豊水」が 27%、「新高」が 8%、「あきづき」及び「二十世紀」がそれぞれ 5%を占めている。「あきづき」は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門 (以下、農研機構・果樹茶部門) によって育成された品種であり、2001 年の品種登録以降、栽培面積が拡大している。また、農研機構からは、極早生の良食味品種である「はつまる」や、黒星病抵抗性を有する「ほしあかり」、自家和合性を有する「なるみ」など、近年も多くの新品種が育成され、今後の普及が期待されている。これらの優良品種の品種名の偽装表示や登録品種の海外流出は、日本なし生産に大きな影響をおよぼすだけでなく、消費者に対する食の安全・安心の確保の観点からも大きな問題である。

これまでに、農研機構・果樹茶部門と種苗管理センターは共同して、<SSR (Simple Sequence Repeat の略、別名マイクロサテライト) マーカーによるニホンナシの DNA 品種識別技術>を開発し育成者権者の保護に有用な DNA 品種識別技術を確立した。しかしながら、2 塩基モチーフの SSR マーカーでは、スタッターバンドが生じやすく正確な遺伝子型決定が困難な場合があること、従来の濃縮ゲノムライブラリー法では 2 塩基より長いモチーフをもつ SSR マーカーの開発が困難であること等の問題があった。このため、次世代シーケンサ 454 GS-FLX Titanium (Roche Diagnostics 社) で得た日本なし品種「豊水」のゲノム情報から、4 塩基及び 5 塩基モチーフの SSR マーカーを開発し、4 塩基モチーフで 34 種類、5 塩基モチーフで 38 種類を選択して遺伝子型決定を行い、79 品種を識別可能であることを報告している (山本俊哉ら, 2012. DNA 多型. 20: 58–61)。

そこで、上記報告で用いた SSR マーカーから正確な遺伝子型の判定が可能等の条件でマーカーを絞り込み、SSR マーカーによる日本なし 29 品種の DNA 品

種識別技術を作成した。

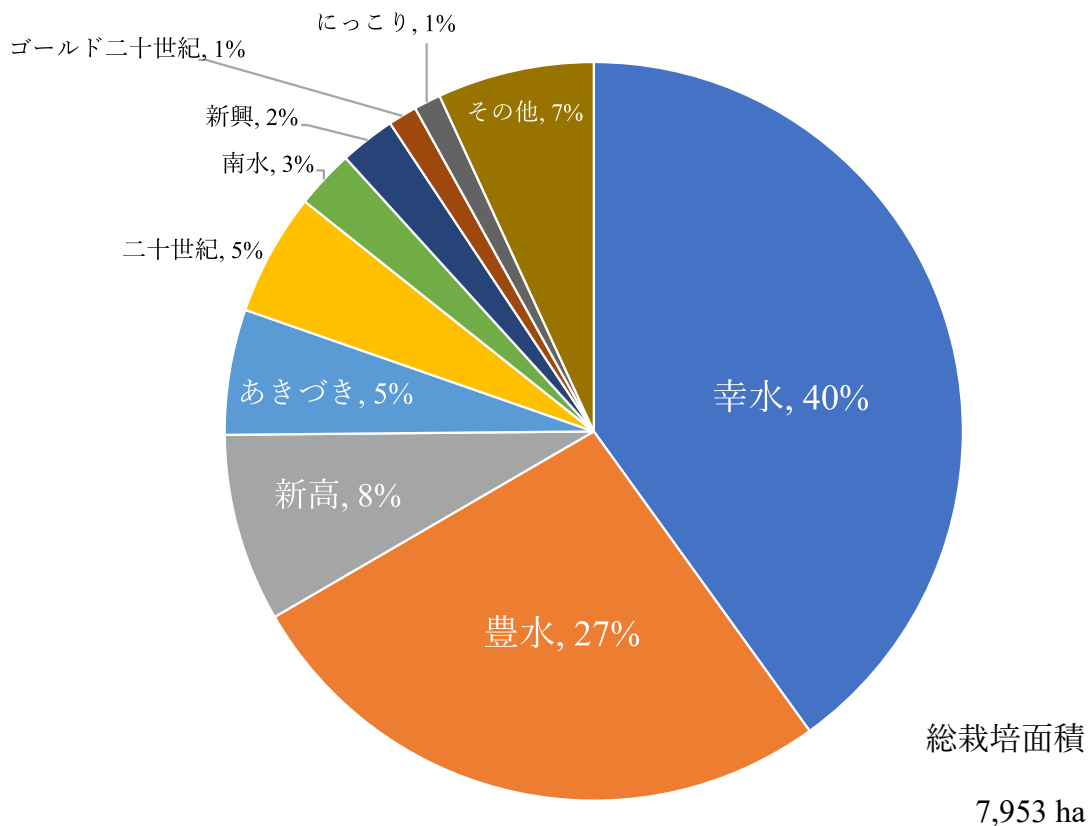


図1 日本なしの品種別栽培面積（令和元年産）

2. 一般的注意事項及びDNA抽出法について

SSR マーカーによる DNA 品種識別分析での実験、試薬調製の一般的注意事項及びサンプルからの DNA 抽出方法については、農林水産省 HP に掲載の＜SSR マーカーによるニホンナシの DNA 品種識別技術 (http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/san10.pdf)＞を参照のこと。

DNA 品種識別分析における一般的注意事項及び実験、サンプルからの DNA 抽出方法については、＜植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項 — 技術開発と利用のガイドライン— (http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf)＞及び＜DNA 品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン (http://www.hinshu2.maff.go.jp/pvr/dna_meeting/H20_2nd/guideline.pdf)＞を参照のこと。

3. SSR マーカーを用いた PCR 反応

波形のチェックや遺伝子型の判定が容易なことを条件として絞り込んだ、10種類の SSR マーカーを用い 29 品種について PCR 反応を行う。PCR 反応条件は、通常の PCR と基本的に同じプロトコールである。

<準備するもの>

1.5 mL 又は 2.0 mL チューブ (滅菌済み)、96 穴 PCR プレート又は 8 連チューブ (Thermo Fisher Scientific/Applied Biosystems 社、以下 ABI 社と記載)、キャップまたはフルプレートカバー (ABI 社)、サンプル DNA 溶液 (5 ng/μL に調製したもの)、Go Taq (Promega 社)、1/10TE バッファー (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA)、滅菌超純水、SSR プライマー溶液 (蛍光ラベルされたフォワードプライマーとリバースプライマーを各 10 pmol/μL 含む溶液、1/10TE バッファーで希釈)、PCR システム GeneAmp PCR System 9700 (ABI 社) など。

<用いた SSR マーカー>

それぞれの SSR マーカーについて、マーカー名、フォワードプライマーとリバースプライマーの塩基配列、ターゲットサイズ、連鎖地図上の座乗連鎖群番号を、表 1 に掲載した。

<本マニュアルで識別可能な日本なし 29 品種>

「あきあかり」、「あきづき」、「愛宕 (あたご)」、「天の川 (あまのがわ)」、「王秋 (おうしゅう)」、「晩三吉 (おくさんきち)」、「甘太 (かんだ)」、「雲井 (くもい)」、「幸水 (こうすい)」、「秀玉 (しゅうぎよく)」、「秋麗 (しゅうれい)」、「新興 (しんこう)」、「新水 (しんすい)」、「新星 (しんせい)」、「翠星 (すいせい)」、「筑水 (ちくすい)」、「長十郎 (ちょうじゅうろう)」、「なつしづく」、「なるみ」、「新高 (にいたか)」、「二十世紀 (にじっせい)」、「八幸 (はっこう)」、「はつまる」、「早玉 (はやたま)」、「豊月 (ほうげつ)」、「豊水 (ほうすい)」、「ほしあかり」、「八里 (やさと)」、「凜夏 (りんか)」。

表1 SSRマーカー

SSRマーカー名 (登録番号)	蛍光色素	作成に用いた 材料品種	フォワードプライマー配列 (上部: 5' to 3')	反復モチーフ	ターゲット サイズ (bp)	連鎖地図上の座乗連鎖群番号		
			リバースプライマー配列 (下部: 5' to 3')			バートレット	豊水	ラ・フランス
TsuGNH124 (AB733237)	Ned	豊水	GATGGGAGAAGGTGGAAAAG gtttcttGTGTCGGTGATGAATCTTCC	(AGGG)5	188+7		Ho15	La15
TsuGNH161 (AB733249)	Vic	豊水	CTTCCCGTTTGACCAGTGT gtttcttCGGCAAAGAACTTTGGAGAG	(CCAAC)5	111+7			La2
TsuGNH164 (AB733250)	Vic	豊水	ACTCGGACAGAGCGGTGTAA gtttcttAGATGGTTGGTCATCTGCGT	(TTTTG)5	230+7	Ba11	Ho11	La11
TsuGNH179 (AB733260)	Vic	豊水	CGATCCATTCGGTTCAGTTG gtttcttGAGCTCAGACGCCAAAAAGA	(TGGAG)5	290+7		Ho17	
TsuGNH184 (AB733264)	Fam	豊水	GAAGTTGATTGGGGGAGACA gtttcttCCTTTTGTATCCCAGGACGA	(CAGTG)4	269+7			La3
TsuGNH194 (AB733272)	Vic	豊水	GCGTCATCATTATGCCACG gtttcttCGGGGAGCTTACCTCTCTGT	(CTCCT)4	146+7	Ba1		La1
TsuGNH204 (AB733274)	Ned	豊水	TAAAGGTTGGACGGTGAAGG gtttcttGTGATGGTGCATTTGCCA	(GATGG)4	237+7			La15
TsuGNH207 (AB733276)	Ned	豊水	AGCGTATCAAGGGAAAGGGT gtttcttCATCCATTCCTCGCTCTGTT	(CAACT)4	159+7			La2
TsuGNH208 (AB733277)	Fam	豊水	AGGGATATGAGCGAAACAGG gtttcttGTTGTGAGAGTGAAGCCACAAG	(TTTCT)4	302+7	Ba10		
TsuGNH250 (AB733298)	Fam	豊水	TGTTGGGTATGCCAGTTGGT gtttcttGCCGTCAGTGCAGACTAGGT	(AGAGT)4	337+7		Ho1	

※波形を安定させるため、テイル配列 (gtttctt) をリバースプライマー配列に付加している。

<基本操作>

(1) 以下のように PCR 反応液を調製する。

Go Taq	5.0 μ L
SSR プライマー溶液	1.0 μ L
滅菌超純水	3.0 μ L
サンプル DNA 溶液	1.0 μ L
合計	10.0 μ L

(2) PCR システム GeneAmp PCR System 9700 を用いて、以下のプログラムで、PCR 反応を行う。

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

4. スタンダードセットの作製

本マニュアルでは、従来の「豊水」の小さい方の対立遺伝子を“A”として、その実測値と対立遺伝子の実測値の差を用いて遺伝子型を判定する手法ではなく、それぞれのマーカーに固有のスタンダードセット（1 品種又は 2 品種の PCR 産物の混合物）を作製し、これと比較することで遺伝子型を判定する。スタンダードセット用の基準品種は表 2 に、それぞれの波形データは図 2 に示した。

<準備するもの>

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

<基本操作>

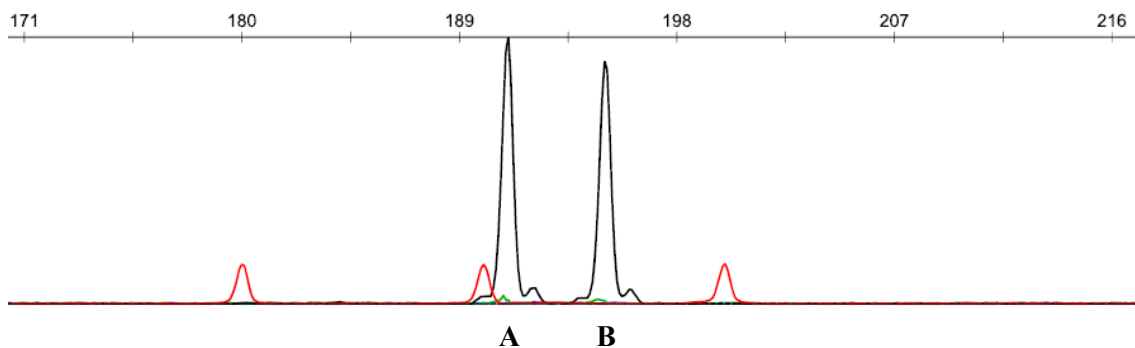
- (1). 3.の(1)の条件で基準品種を増幅する。
- (2). PCR フラグメント精製キットを用いて増幅産物を精製する。
- (3). 精製産物を等量混合し、1/10TE バッファー等で 50-200 倍に希釈したものを 10 μ L 程度ずつ分注する。分注したチューブには、調製日を記入し超低温フリーザー等に遮光して保存し、概ね 2 年以内を目処に使用する。

表2 スタンダードセット用基準品種

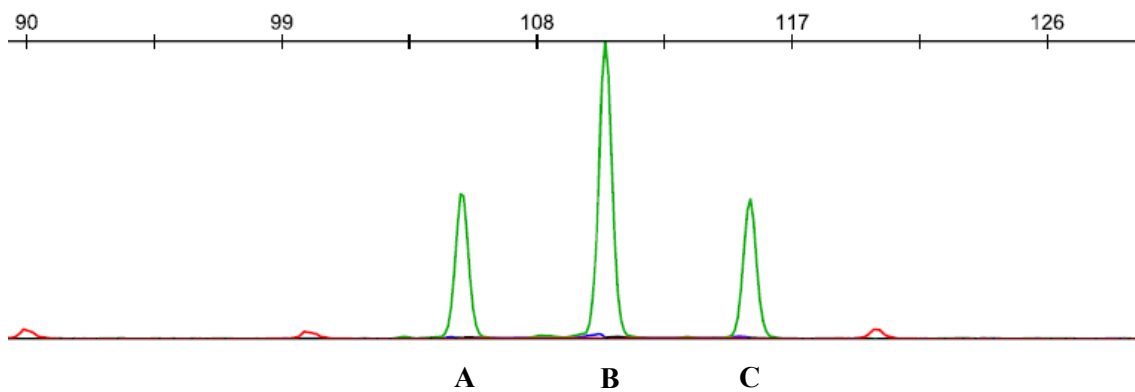
SSRマーカー名	蛍光色素	基準品種	フラグメントパターン
TsuGNH124	Ned	豊水	A/B
TsuGNH161	Vic	あきづき、王秋	A/B/C
TsuGNH164	Vic	王秋、豊水	A/B/C
TsuGNH179	Vic	王秋、豊水	A/B/C
TsuGNH184	Fam	王秋、豊水	A/B
TsuGNH194	Vic	王秋、豊水	A/B
TsuGNH204	Ned	二十世紀	A/B
TsuGNH207	Ned	豊水	A/B
TsuGNH208	Fam	新水、新星	A/B/C
TsuGNH250	Fam	豊水	A/B

図2 スタンダードセット波形図

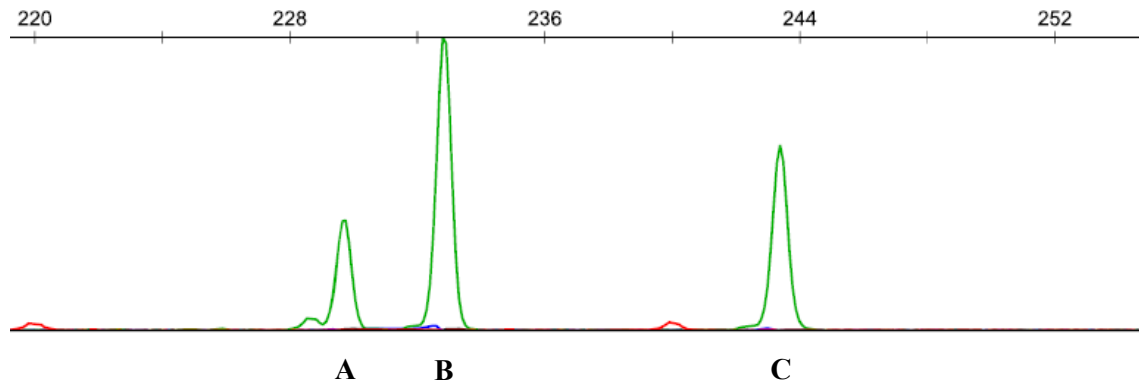
SSR マーカー名: TsuGNH124



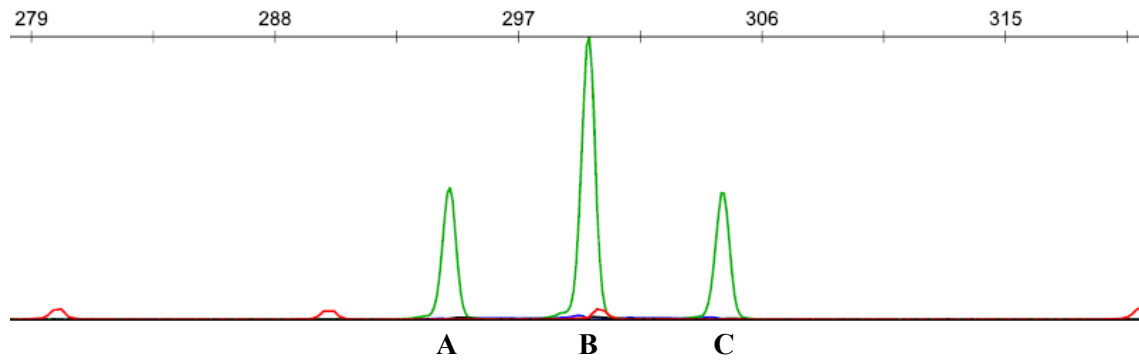
SSR マーカー名: TsuGNH161



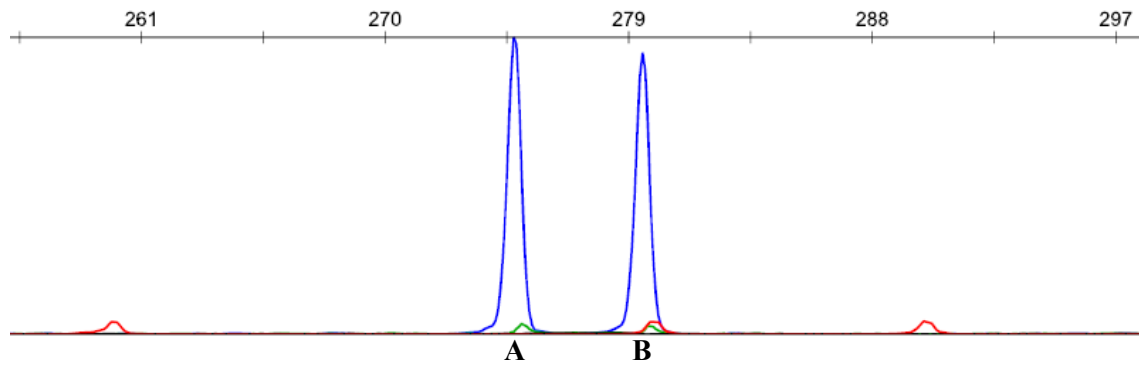
SSR マーカー名: TsuGNH164



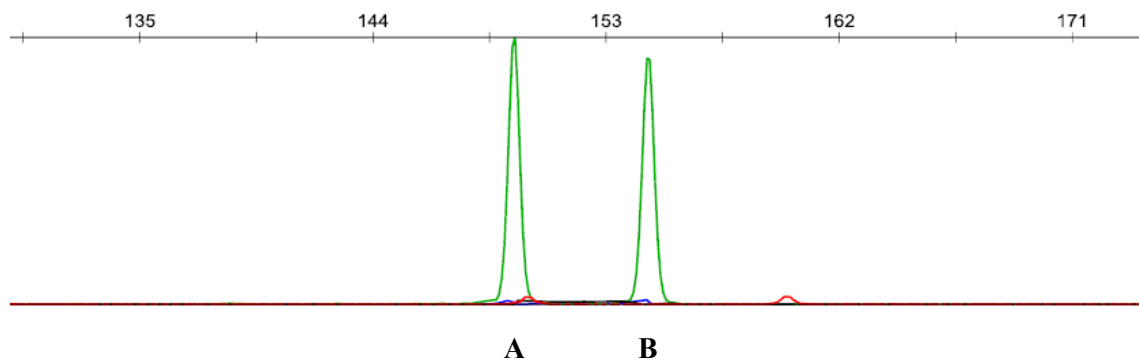
SSR マーカー名: TsuGNH179



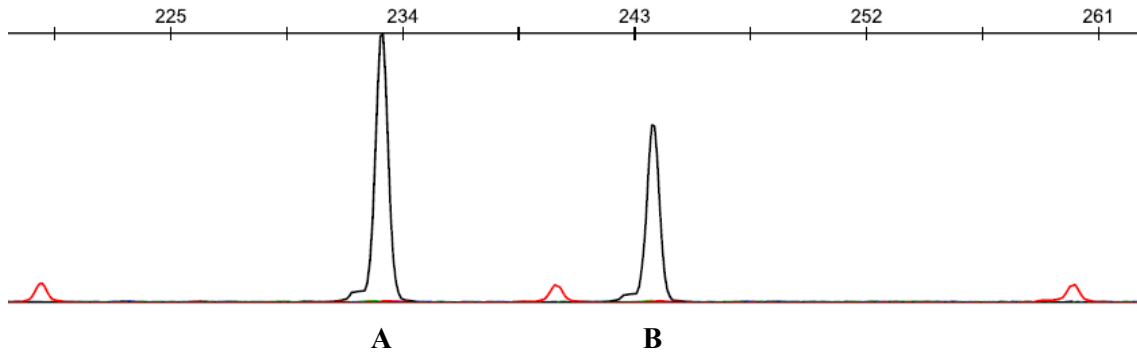
SSR マーカー名: TsuGNH184



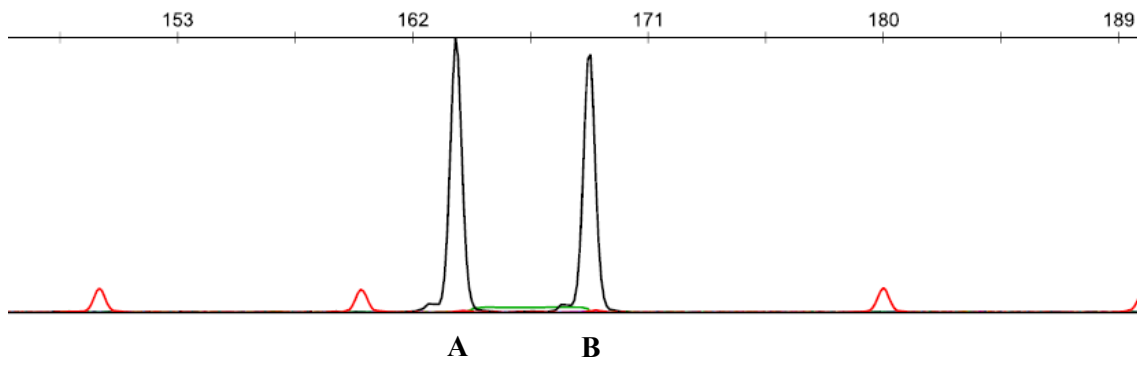
SSR マーカー名: TsuGNH194



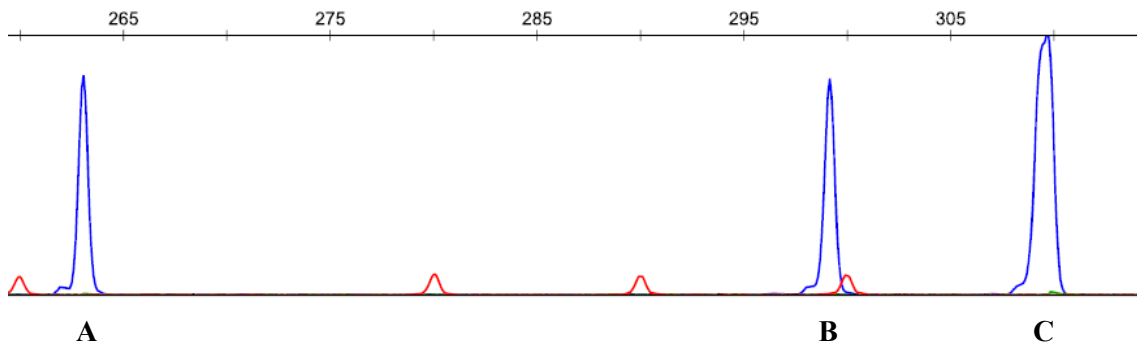
SSR マーカー名: TsuGNH204



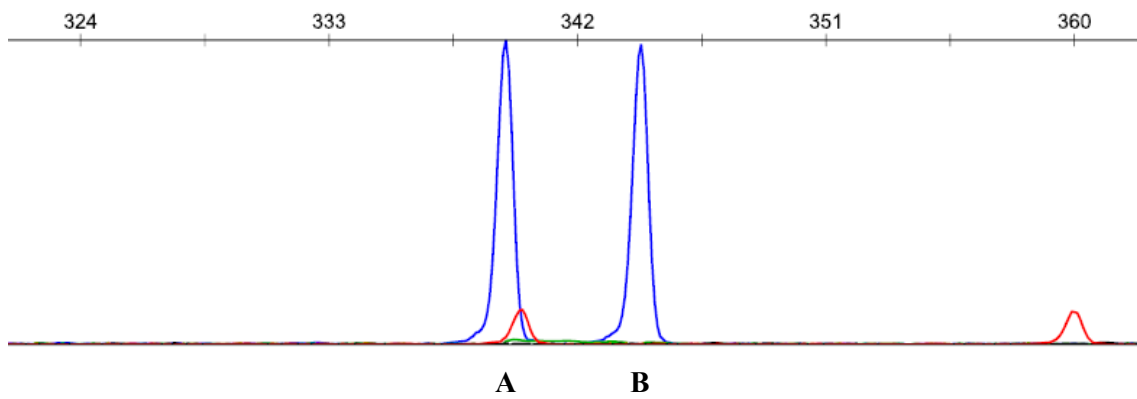
SSR マーカー名: TsuGNH207



SSR マーカー名: TsuGNH208



SSR マーカー名: TsuGNH250



5. DNAシーケンサを用いたフラグメント解析

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

<準備するもの>

96 穴 PCR プレート、384 穴プレート又は 8 連チューブ (ABI 社)、1/10TE バッファー、Genetic Analyzer Buffer with EDTA (ABI 社)、Hi-Di Formamide (ABI 社)、3130 POP-7 ポリマー (ABI 社)、3100/3130x/ 36cm Capillary Array(47cm × 50 μm、ABI 社)、GeneScan 400HD ROX サイズスタンダード (ABI 社)、Applied Biosystems 3130x/ DNA Genetic Analyzer (ABI 社)、GeneMapper ソフトウェア (ABI 社)、PCR システム GeneAmp PCR System 9700 (ABI 社) など。

※フラグメント解析に使用する機種は、SeqStudio Genetic Analyzer (ABI 社) 等の同等品でも可能である。

<基本操作>

- (1). 3.で得た PCR 産物を、1/10TE バッファーで PCR 増幅を考慮し、フラグメント解析に適した倍率で希釈する。
- (2). 1.5 μL の希釈 PCR 産物、0.02 μL の 400HD ROX サイズスタンダード、8.48 μL の Hi-Di ホルムアミドを、96 穴 PCR プレート、384 穴プレート又は 8 連チューブに入れ、混合する。
- (3). PCR システム GeneAmp PCR System 9700 などを用いて、95°C5 分間の熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。
- (4). Applied Biosystems 3130x/ DNA Genetic Analyzer のプロトコールに従い、36cm キャピラリー、POP-7 ポリマー、専用のバッファー (Genetic Analyzer Buffer with EDTA) を用いて、分析を行う。
- (5). GeneMapper ソフトウェアを用いて、結果の解析を行う。

6. フラグメント解析による遺伝子型判定と結果

(1) フラグメント解析時の注意点

以下に、フラグメント解析を行う際の基本的な留意点について記した。

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

(2)日本なし品種の遺伝子型判定

SSR 遺伝子型の判定は、スタンダードセットとの比較により決定する。判定に当たっては、キャピラリー間の泳動のずれ等を考慮し概ね 1 bp 未満のずれに収まるようであれば該当の遺伝子型と判定する。なお、本 10 マーカーを全て使用することで、29 品種を少なくとも 1 つのマーカーが異なることで識別することが可能である。

また、本マニュアルは、日本なし 29 品種で最適化されたものであり、これを用いて 29 品種以外の品種を識別する場合には、スタンダードセットと明らかに異なるピークが検出される可能性がある。その場合は、ピークの実測値 (bp) を記録し X (xxx bp)、Y (yyy bp) として区別する。なお、未知の品種の識別に際してピークの判定が困難な場合は、スタンダードセットと PCR 産物の希釈溶液を混合して解析を行うことによって、フラグメントサイズの判定を確実にすることが可能である。

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

(3)日本なし品種識別における 10 種類の SSR マーカーの特徴

本マニュアルで用いた 10 種類の SSR マーカーは、いずれも単一座由来のマーカーであり、連鎖地図上の座乗位置が明らかになっている (表 1)。すなわち、日本なし品種「豊水」、セイヨウナシ品種「バートレット」、「ラ・フランス」の 3 つの連鎖地図の一つ以上の地図にマッピングされている。このように、単一座由来で、連鎖地図上の位置が同定されているマーカーを用いることにより、より正確な遺伝子型の同定や品種識別が可能となる。

TsuGNH124 は、「豊水」の第 15 連鎖群 (Ho15)、「ラ・フランス」の第 15 連鎖群 (La15) に位置付けられている。TsuGNH161 は La2 に、TsuGNH164 は「バートレット」の第 11 連鎖群 (Ba11)、Ho11 及び La11 に、TsuGNH179 は Ho17 に、TsuGNH184 は La3 に、TsuGNH194 は Ba1 と Ho1 に、TsuGNH204 は La15 に、TsuGNH207 は La2 に、TsuGNH208 は Ba10 に、TsuGNH250 は Ho1 にそれぞれマッピングされている。

表3 各マーカーの遺伝子型

品種名	Cultivar name	SSRマーカー名									
		TsuGNH124	TsuGNH161	TsuGNH164	TsuGNH179	TsuGNH184	TsuGNH194	TsuGNH204	TsuGNH207	TsuGNH208	TsuGNH250
あきあかり	Akiakari	BB	BB	AC	AB	BB	AB	BB	AA	BC	AB
あきづき	Akizuki	AB	BC	AA	AC	BB	AA	BB	AB	CC	AB
愛宕	Ataga	BB	BC	BC	AB	BB	AB	BB	AA	AB	AA
天の川	Amanogawa	BB	BB	BB	AB	BB	BB	BB	AA	AA	AA
王秋	Oushuu	AB	AB	BB	AB	AA	BB	BB	AA	CC	AA
晩三吉	Okusankichi	AB	BB	BC	AB	BB	AB	BB	AA	AC	AA
甘太	Kanta	BB	BC	AA	AC	AB	AB	BB	AA	CC	AA
雲井	Kumoi	AB	BC	CC	AC	AB	AA	BB	AB	BC	AA
幸水	Kosui	AB	AC	AC	AB	AB	AA	BB	AA	BC	AA
秀玉	Shuugyoku	AA	BC	AC	AB	AA	AA	BB	AA	CC	AA
秋麗	Shuurei	BB	BC	CC	AC	AB	AA	BB	AA	BC	AB
新興	Shinkou	AB	BB	AA	AB	AB	AB	BB	AA	AC	AB
新水	Shinsui	AB	AA	AC	AB	AB	AA	BB	AA	BC	AB
新星	Shinsei	BB	BC	AA	AB	AB	AA	BB	AA	AC	AB
翠星	Suisei	AB	BC	AC	AA	AA	AA	BB	AA	CC	AA
筑水	Chikusui	AB	BC	AC	AC	AB	AA	BB	AA	CC	AB
長十郎	Chojuro	AB	CC	CC	AC	AB	AB	BB	AB	BB	AA
なつしずく	Natsushizuku	AB	AB	CC	AC	AB	AA	BB	AA	BC	AA
なるみ	Narumi	AB	BB	CC	AB	AB	AB	BB	AB	CC	AA
新高	Niitaka	BB	BC	CC	BC	AB	AB	BB	AA	AB	AA
二十世紀	Nijisseiki	AB	AB	AC	AA	AA	AA	AB	AA	CC	AB
八幸	Hakkou	AB	BC	CC	AB	AA	AA	BB	AA	CC	AA
はつまる	Hatsumaru	AA	CC	CC	AA	BB	AA	BB	AA	BC	AB
早玉	Hayatama	BB	AC	CC	AA	AB	AA	BB	AB	BB	AA
豊月	Hougetsu	AA	BB	AB	AA	AB	AB	BB	AA	CC	AA
豊水	Hosui	AB	CC	AC	BC	BB	AA	BB	AB	CC	AB
ほしあかり	Hoshiakari	BB	BC	CC	AB	BB	AA	BB	AB	BC	AB
八里	Yasato	AA	AB	AC	AB	AA	AA	BB	AA	CC	AA
凜夏	Rinka	AB	BB	CC	AC	BB	AB	BB	AB	CC	AB

資料1 用いた SSR マーカーの特徴

SSR マーカー名：TsuGNH124

登録番号：AB733237

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：GATGGGAGAAGGTGGAAAAG

プライマー2*：gtttcttGTGTCGGTGATGAATCTTCC

ターゲットサイズ (bp)：188+7*

反復モチーフ：(AGGG)5

塩基配列**：

```
gctgatggga gaaggtggaa aagggcgagg gttgggagtt tatttatagg
gcgaatgcaa atatagggag ggagggaggg agggagatga tgatggtttt
tatctttcta gatgtttctt gtgttttggtg gaaaaatata gaacaatcta
gcaaagtaat gagattggga tggaagattc atcaccgaca ccaaaaaaag
acgaggttta tcgaatgttc cagatagtaa aagaaacaac tcaaggtaga
gttgcttaag ttaaaacacc aagtattctt gtgctagggc ttaactacga
atgagatgag atttactcaa aacaatcgtg tgataatddd atgcatcttg
tttcatgt
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH161

登録番号：AB733249

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：CTTTCCCGTTTGACCAGTGT

プライマー2*：gtttcttCGGCAAAGAACTTTGGAGAG

ターゲットサイズ (bp)：111+7*

反復モチーフ：(CCAAC)5

塩基配列**：

```
cgteccaatt ttggggctct ttctcgctgt gtgtgttttt gtaaccataa
actccttgag gcaaaaaaag caccatggct ttcccgtttg accagtgttt
ggcatgttcc ccctctctc tctggcacta ctccaacca accaacca
accaaccca tatgagttgc tctccaaagt tctttgccgc caaaatggaa
cggtttagatt caaaggccct tggtttagca gcctcgtatg cgtcatcact
tgcgaccgtc gtaacttgga gtcccttctc aagaccaagt tctccaatth
tctcaaagg cccttatttc caagacaccg ttcggatctt ctcggttgat
ggcatattca tgc
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH164

登録番号：AB733250

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：ACTCGGACAGAGCGGTGTAA

プライマー2*：gtttcttAGATGGTTGGTCATCTGCGT

ターゲットサイズ (bp)：230+7*

反復モチーフ：(TTTTG)₅

塩基配列**：

```
ttggttttaa  cgctggttggg  aagggactcg gacagagcgg tgtaaggat  
tcaaaattgt  cgaacgttgc  atttgccact  ggtgtcttat  ttaaattttt  
cttcaacggc  tagttatttg  gttttcctaa  aatggccgag  ccaccatttt  
act ttttgtt  ttgttttgtt  ttgttttgtt  tgtgaattga  gaatatgtat  
tcagtgaata  taagaagtaa  taagacacaa  tttttacgca gatgaccaac  
catcttttct  tcatttaact  taat
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH179

登録番号：AB733260

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：CGATCCATTCGGTTCAGTTG

プライマー2*：gtttcttGAGCTCAGACGCCAAAAGA

ターゲットサイズ (bp)：290+7*

反復モチーフ：(TGGAG)5

塩基配列**：

```
atgcaagtgg ttaaattact cacagaaatt cgatccattc ggttcagttg
acattgacac aacctgatca tgatctctat gtctatgatg atgaagatga
taatacatcg taaatggttt attttcaatg atgagtgga gtgagtgga
gtggagaact atagctccct tggccttttc ttatacatca tgtggtgcat
attcatttgc ctctgcctct ctatctatta tgaagacgca aaccagaatg
aatcaagaat cgatggaacg cggaagacaa aaggatgcaa tgggagtttg
tcttttggc gtctgagctc tggctcatga tacttttttcg gaaaaaaaaatg
atgccatgag acaaactcac gactttgtca tgatatacaa tagatttcgg
ccattcgggg tcgtttcaac cttcaaatg cagttttaag ttgtaataaa
aattttgact tttcatttgt catccgaatt tattttatta gtcttttgag
ttgt
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH184

登録番号：AB733264

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：GAAGTTGATTGGGGGAGACA

プライマー2*：gtttcttCCTTTTGTATCCCAGGACGA

ターゲットサイズ (bp)：269+7*

反復モチーフ：(CAGTG)4

塩基配列**：

```
gccatgagga aaatgggcat tcggaaaggt ttaagaacga tttatgaaga
attagtcggt gactgtgatg ccaaaaattg acaaaaagttg agtagtgaaa
ccgagcatta tacgggttga atgatctcct aatctggttg gccaaagtta
gagtttaact ttaatcccca attatctggt tatgtgactt attttggtga
ggtaacatat gaaagcagga tccaggacac gcactactga agaagttgat
tgggggagac acaagctaag gtattattag atatgaatga gtttgatttt
cttacat cag tgcagtgcag tgcagtgcag tttcttacgt aaaatctaat
ccgtaggact tgctggtgaa cttcctcttt aatggaattg atgagctagg
aagcaaactt tcctcgatta ctttccagag tacggctgtg aggatgggac
tgtaaaccag agtcgcagta tgataggaaa tctttgaaag tcgtcctggg
atacaaaagg agaatttatt agtaacagag a
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH194

登録番号：AB733272

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：GCGTCATCATTATGCCACG

プライマー2*：gtttcttCGGGGAGCTTACCTCTCTGT

ターゲットサイズ (bp)：146+7*

反復モチーフ：(CTCCT)4

塩基配列**：

caacatgtcg cgtcatt atgccacgta tacaaaataa aataattgcg
gttgccctc tctc**ctctc** **tcctctctc** **tcct**ctctcc tgtctttctt
tctttccccg tacgtccaga cgaggccaca cagacacaga gaggtaagct
ccccgccgat ccagaattgg ga

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH204

登録番号：AB733274

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：TAAAGGTTGGACGGTGAAGG

プライマー2*：gtttcttGTGATGGTGCATTTGCCA

ターゲットサイズ (bp)：237+7*

反復モチーフ：(GATGG)4

塩基配列**：

```
ctccctcaaa ttctccaagt gtggctgccg tgccgcacac gacagcacac  
tcaacgaggg gtgaatgcat cccgtagtct gagtgtgtag ttgtacgcga  
cagagccgca ccctattgga tgttcaaata aatgtgtaa atggtgggct  
ttgttgttgt taggca taaa ggttggacgg tgaaggtgac ggcacgcaa  
aactaagaaa aaagtggggg acgcatggca aactccaaga ggtgtttggc  
tccaccaaac tcaatcactc aacttgggtg ttggatttta tattattgat  
acatgtaata tgataggtta tacaattgta cacaccaacg atgggatggg  
atgggatggg atccgctgct aggtgggtgc actggtgcca aatgcaccat  
caccatggtt caat
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH207

登録番号：AB733276

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：AGCGTATCAAGGGAAAGGGT

プライマー2：gtttcttCATCCATTCCTCGCTCTGTT

ターゲットサイズ (bp)：159+7*

反復モチーフ：(CAACT)₄

塩基配列**：

```
tgatgcatca ggatatgttc aaggaaatgt aaatattctc ccaagaaagc
gtatcaaggg aaagggtaac agaaaatgta aaaatatatc cgtgaagcct
gctaccaaag agaactggca ccttaaacca cagactaaag aactcggatt
tctggagtaa caactcaact caactcaact caatcaaaca gagcgaggaa
tgatgaggc aagcaaatat tactatattc caacacaaga aacgtctgaa
atataaatca cagttcacia tgtaatattg actgcaagtc gagaatacaa
agtaaaccgc caactactac gagcatactc gtagacaact cacaggttcg
ctattatatg aaaaatgcta aaaacatttg aaatggtgag tcataccaac
ttgcaatgcc aaaaatggc aaacaagcaa gcaaaccaac aaccacaatt
gcatgactct atatatgtag caatctagac tcattgactc aactagtt
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH208

登録番号：AB733277

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：AGGGATATGAGCGAAACAGG

プライマー2：gtttcttGTTGTGAGAGTGAAGCCACAAG

ターゲットサイズ (bp)：302+7*

反復モチーフ：(TTTCT)4

塩基配列**：

```
agttagagag gtaacatttg ctagggatat gagcgaaaca ggtataatgt
atcacactgt ttagttttgt aactctaaca taaaatgatt gctggtaaag
agaggaagat aggaatatta atattattgc tttcttttct tttcttttct
tttgctatgt gttatgatca cacatataat actctttaa tagagtcaca
tccgtgaaaa cttacaaaag tgaaatgaat gctttttgaa agaccttata
caacaacaac ataatcacta ttctaaaagt cttcctcatc tttgtctaaa
aacttgtggc ttcactctca caacttttac aacaaaaata taaataaaac
ccaggggatc gaaatgggtt cgtcttctaa gacctggtct catttcccct
aacgagtatc caaacgcca attcttttct cctgccatca cagctcccaa
ctgagcaagc acccatggac gttctctcaa tcgcatcccc ctatattcca
ccccaccca acctccaagc tctctcactc ttcccgcgcc
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

SSR マーカー名：TsuGNH250

登録番号：AB733298

作成に用いた材料品種：日本なし品種「豊水」

至適アニーリング温度：55°C

プライマー1：TGTTGGGTATGCCAGTTGGT

プライマー2：gtttcttGCCGTCCTGCAGACTAGGT

ターゲットサイズ (bp)：337+7*

反復モチーフ：(AGAGT)4

塩基配列**：

```
tgtttggtat ttataatat t gttgggtatg ccagttggta tgtaagttga
tcggtgagat gaatTTTTga ctttgatata tgtggttgac aattcagaat
agtgaaca aagtcgttgt tccttgttgg aaaagaaatc ttctaaaac
aaagagtaga gtagagtaga gtaatggggg aattgaggaa ataaaaatat
tgggtttaaa agtttcgtga ttggttaatt agtggtttg tgtgaaaagg
agatagctag caggatatgg attatataca gaacgacgta actgacatg
gaagcatgac tacatatagc aagaagtact gcagagacct agtctgcagt
gacggctata catacgtgtc tttcctagaa cttcaactt ctagaagatt
```

*gtttctt は、波形を安定させるためのテイル配列

**赤太字は反復のモチーフ、太字下線はプライマーを示す。

著作権に関する事項：

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

免責事項：

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

更新履歴：

初 版 2022 年 12 月 12 日 発行