

添付資料 2
SSR マーカーによるブナシメジの
DNA 品種識別マニュアル

SSR マーカーによるブナシメジの DNA 品種識別マニュアル

ホクト株式会社きのこ総合研究所

Ver2.0
2014/10/20

ブナシメジの DNA 品種識別マニュアルの目次

目次

1. 適用範囲
2. 一般事項
3. 測定の方法
4. 識別方法
 4. 1 方法の要旨
 4. 2 検査試料
 4. 3 購入試薬
 4. 4 調製試薬
 4. 5 機器・プログラム
 4. 6 実験操作
 4. 6. 1 操作準備作業
 4. 6. 2 操作場所
 4. 6. 3 試薬および器具
 4. 6. 4 試験材料の取り出し
 4. 6. 5 DNA 抽出操作
 4. 6. 6 DNA の定量
 4. 6. 7 PCR 増幅操作
 4. 6. 8 PCR 産物の増幅確認試験
 4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法
 4. 6. 10 データ解析、判定
 4. 6. 11 実験操作フロー図
5. トラブルシューティング
6. 是正処理

付属文書：

1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細
2. 8 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長
3. 参考文献

別添資料：

農林水産省品種登録ホームページより「植物品種識別における品種同定理論」

この目次リストはDNA鑑定学会の様式に準拠したものです。

1. 適用範囲

ブナシメジ (*Hypsizygus marmoreus*) は、今日ではシイタケ、エノキタケに次ぐ第 3 位の消費量を誇る食用きのこで、きのこの需要が増大した結果、日本などで広く栽培され、流通している。国内生産量が増加し、現在では多くの品種が農林水産省に登録されるに至った。

品種登録では、ブナシメジの重要な形質に基づいて品種が判断されるため、栽培試験による特性調査を行う必要がある。そのため品種を識別するためには数ヶ月の期間を要する。品種識別の簡易的な方法として、審査基準 (<http://www.hinsyu.maff.go.jp/>) にあるように、対峙培養試験が有効とされているが、対峙培養試験であっても品種を識別するには 1.5 ヶ月程度要する。税関で育成者権侵害物品を取り締まるためには、短期間で侵害嫌疑貨物を疎明することが必要となる。

そこで、ブナシメジの品種識別法を確立することを目的に、ブナシメジにおいて多数の SSR (Simple Sequence Repeat の略、別名マイクロサテライト) 領域を同定し、そのうちの 6 種類の品種識別に有用な SSR マーカーを開発した。このマーカーにより当社保有の登録品種「ホクト白 1 号菌(品種登録番号:第 13294 号)」と、持ち込まれたサンプル品種との異同の鑑定が可能である。

基準品種：ホクト白 1 号菌 (品種登録番号：第 13294 号)

被検査物：子実体 菌糸体 (ブナシメジ加工品は対象外)



図 1 子実体 (左図) と菌糸体 (右図)

2. 一般事項

本 DNA 品種識別マニュアルは、ホクト株式会社きのこ総合研究所 (長野県長野市下駒沢 800-8) で維持・栽培されている既存栽培品種の 10 品種 (ホクト白 1 号菌、MH025014、MH025016、MH025019、MH025022、MH025066、MH025091、MH025146、MH025217、MH025374)、野生品種である 10 品種 (MH025038、MH025045、MH025046、MH025054、MH025070、MH025092、MH025097、MH025121、MH025160、MH025339)、そして市販されている 10 品種 (MH025012、MH025064、MH025286、MH025288、MH025362、MH025369、MH025397、MH025462、MH025463、MH025528) の計 30 品種を用いて、解析・作成されたものである。

本 DNA 品種識別マニュアルは、子実体または菌糸体から抽出した DNA を用

いて、SSR マーカーによる分析法を確立し、マニュアルとして作成したものである。

3. 測定の原理

SSR とは、Simple Sequence Repeat の略称であり、法医学では、Short Tandem Repeat と呼ばれ、STR と略称されている。SSR 分析は、2～数塩基の反復配列からなる SSR 領域を特異的に増幅するプライマーを用い、PCR 法で増幅した DNA 断片の長さの差異（遺伝子型）を検出する方法である。反復配列領域は、その反復回数に突然変異を起こしやすいとされており、DNA 断片の長さを高精度で分析することにより、近縁な品種間でも判別が可能である。その測定手順は、

- 1) ブナシメジのサンプルから、ゲノム DNA を抽出する。
- 2) SSR 領域を特異的に増幅するプライマーを用いて、ブナシメジのサンプルから抽出したゲノム DNA とホクト白 1 号菌のゲノム DNA を鋳型にして PCR 増幅を行う。PCR の際に、一方のプライマーの 5' 端に蛍光標識したものをを用いる。
- 3) 蛍光 DNA シーケンサーを用いて、PCR 増幅産物を電気泳動で分離し、検出する。
- 4) 内部標準のサイズスタンダードを基に、フラグメント解析用ソフトウェアを用いて、PCR 増幅産物の長さとして遺伝子型を決定する。
- 5) 2)～4)を 3 回、反復実験を行い試験結果に矛盾がないか検討する。
(トラブルシューティング参照)
- 6) サンプルのブナシメジがホクト白 1 号菌と同一品種であるかを照合して判定する。

4. 識別方法

DNA マーカーの一種である SSR マーカーを 8 種類用いた識別方法である。

4. 1 方法の要旨

ゲノム中に豊富に散在している 4 塩基以上の反復配列を挟み込むように設計したプライマーを用いて、PCR 増幅断片長の差異を蛍光 DNA シーケンサーで分析する。SSR 領域はその反復回数に突然変異を起こしやすく、塩基置換と比較して変異頻度が 1～2 ケタ大きいとされている。

本マニュアルで利用する 8 種類の SSR マーカーは、ホクト株式会社のこの総合研究所保有菌株「ホクト白 1 号菌」のゲノム DNA 配列を次世代シーケンサーによって決定し、得られた配列を基に 4 塩基以上の反復配列を探索し、開発したものである。「表 1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの特徴」と「付属文書 1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細」に詳細なデータを記している。

表1. ブナシメジ品種識別に用いる8種類のSSRマーカーの特徴				
SSR マーカー	アニー リング 温度(℃)	プライマー配列 (5'-3')		ターゲッ トサイズ (bp)
		Forward	Reverse	
msHm-1	59	CGAGTGTTCATCGCTGT	GCTGATGATGCTCGTTGATG + Tailed option	132
msHm-2	59	AAGCTGCGAGAATCCACTC	ACCGTCCGTGAGAATACGAG + Tailed option	77
msHm-3	59	GAGGTGTGCGTTCTCGTTCT	GCACCAGTACCTACGCCAAC + Tailed option	139
msHm-4	59	ACCCGGAAATAGAACGAGAG	CAACCTCTGTTCAACCACCTC + Tailed option	150
msHm-5	59	CAGAAGGCTGTCCTCACACA	GAGCCGATCAAGAACCGATA + Tailed option	256
msHm-6	59	CCGTTGTGGGTTAGGTCAA	TAGTATGTGTAGGCGACAAAGG + Tailed option	126
msHm-7	59	GGAAGAGAGGGAGGCAAAAA	GTCGACGGTTATTTTCAACG + Tailed option	131
msHm-8	59	ATCACGCATATACGCACCC	CACCTCTCGCAGGTATGGAC + Tailed option	242

4. 2 検査試料

ブナシメジの子実体、菌糸体を検査試料対象とし、病害、虫害、その他の被害を受けていない健全な組織を用いる。1 サンプル 1 子実体、または 1 菌糸体とする。

基準とするホクト白 1 号菌の DNA、もしくは子実体、菌糸体は、ホクト株式会社きのか総合研究所より入手する。入手した検査試料は、4℃で保存する。

4. 3 購入試薬

<一般試薬>

- ・ フォルテクターⅡ(消毒用エタノール)(日本化薬フードテクノ株式会社)

<DNA抽出関係>

- ・ Plant Geno-DNA-Template™ (Geno Technology社, code: 786-135)

Template Extraction Buffer

pink RESIN

Wash- I

Wash- II (要調製)

スピンカラム

TE Buffer

RNase

- ・ クロロホルム(Wako, code:038-02606)
- ・ エタノール(99.5) (Wako, code:057-00456)

<PCR 関係>

- ・ SSR プライマーセット (ABI Prism 社)

表 1 に記した msHm-1~8 の 8 種類のマーカーを増幅するプライマーセットを使用する。蛍光プライマーの合成には、必ず ABI Prism 社受託合成サービスの DNA フラグメント解析用カスタム蛍光プライマーを利用する。フォワードプライマーの 5'端に VIC で蛍光ラベルしたものをを用いる。リバープライマーは、ノンラベルとし、オプションでテイル配列を付ける。

※ABI Prism 社のテイル配列は非公開となっているため、本マニュアル通り

の結果を出すために、蛍光プライマーの合成は ABI Prism 社で行うこととする。

- AmpliTaq Gold 360 Master Mix (アプライドバイオシステムズ社)
 <電気泳動関係>
- ゲルローディング溶液 (シグマアルドリッチジャパン社)
- DNA マーカー 100bp DNA Ladder One (ナカライテスク社)
- TBE バッファー (10x) (Tris-Borate-EDTA buffer 10x) (シグマアルドリッチジャパン社)
- Agarose 900 (株式会社 同仁化学研究所)
- エチジウムブロマイド溶液 (滅菌超純水に 0.5-1.0 μ g/ml の濃度でエチジウムブロマイドを加えた溶液)
 <フラグメント解析関係>
- Genetic Analyzer Buffer with EDTA (アプライドバイオシステムズ社)
- Hi-Di Formamide (アプライドバイオシステムズ社)
- 3130 POP-7 ポリマー (アプライドバイオシステムズ社)
- 3100/3130xl 50cm Capillary Array (61cm $\times$ 50 μ m、アプライドバイオシステムズ社)
- GeneScan 600LIZ サイズスタンダード (アプライドバイオシステムズ社)

4. 4 調製試薬

- SSR プライマー溶液
 8 組の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のペアを、それぞれ 10pmol/ μ L の濃度になるように滅菌超純水に溶解した溶液を、8 マーカーそれぞれに対応して用意する。
- Wash- II
 使用前に 99.5%エタノールを 80ml 加え、ストック溶液として保存する。
- TBE バッファー (10x)
 使用時に、超純水で 10 倍希釈したものを以後使用する TBE バッファーとして用いる。
- 70%エタノール (DNA 抽出用)
 99.5%エタノールを滅菌超純水希釈して 70%エタノールを調製する。

4. 5 機器・プログラム

- フリーザー (−20℃以下)
- 凍結乾燥機 (EYELA FDU-1100)
- ボルテックスミキサー
- 高速冷却遠心機 (1.5-2 ml チューブが利用可能なもの)
- 分光光度計 (Thermo Scientific 社 Multiskan GO)
- PCR Thermal cycler (BIO-RAD 社 C1000 Thermal Cycler)
- 電気泳動装置 (アドバンス社、Mupid など)
- 紫外線照射装置
- 振盪装置

- ・ 電子天秤
- ・ オートクレーブ
- ・ 超純水製造装置
- ・ 恒温機（ヤマト科学株式会社 DG400）
- ・ Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社）
もしくはこれに準じる蛍光 DNA シーケンサー
- ・ Gene Mapper ソフトウェア（アプライドバイオシステムズ社）
※フリーソフトである Peak Scanner software でもサイジングが可能

4. 6 実験操作

4. 6. 1 操作準備作業

DNA 実験操作は、実験開始前に実験台上を 70%エタノールで消毒する。また、無菌作業が必要なときはクリーンベンチを使用する。実験操作時は、白衣、上履きを着用し、各操作に応じてゴム手袋、眼鏡、マスクを着用する。

4. 6. 2 操作場所

DNA 抽出から PCR 増幅、DNA シーケンサー分析まで、供試サンプル以外の DNA が混入しないクリーンな環境で操作する。

4. 6. 3 試薬および器具

- ・ 上記の購入試薬、調製試薬
- ・ 滅菌超純水
- ・ ポテトブドウ糖寒天培地（分包：造粒タイプ）（関東化学株式会社）
- ・ ラップ
- ・ アルミホイル
- ・ 輪ゴム
- ・ 新聞紙
- ・ 9cm 滅菌シャーレ
- ・ スパーテル
- ・ 白金耳
- ・ メス
- ・ ピンセット
- ・ ステンビーカー(容量 1000ml)
- ・ ソレックス SH 容量 5ml(連続式自動分注器)（アズワン株式会社）
- ・ 1.5 ml チューブ
- ・ 2 ml チューブ
- ・ パラフィンフィルム
- ・ ホモジナイゼーション用ペッスル（フナコシ社）
- ・ マイクロピペット各種容量
- ・ マイクロピペット用チップ
- ・ 96 穴 PCR プレートまたは 8 連 PCR チューブ（アプライドバイオシステムズ社）

ズ社)

- ・ PCR 用 96 穴シーリングマット
- ・ 96 穴プレートセプター

純水は電気伝導率 0.0056 mS/m (25 °C) 以下になるように脱イオン化されたものをさらに精製した超純水を用いる。滅菌水は超純水を 120°C、20 分間オートクレーブで処理したものを用いる。

特別の指定がある試薬はそれに従い、その他については JIS 特級試薬（あるいは同等のグレード）を用いること。

チップやチューブ類は、滅菌済みのものを用い、必ず使い捨てとする。マイクロピペットのチップ類、その他ピペット類及び 1.5 ml と 2.0 ml 等のチューブは、オートクレーブ滅菌(120°C、20 分)し、その後、60°Cに設定した恒温器に入れ、完全に乾燥してから用いる。

4. 6. 4 試験材料の取り出し

サンプルの取り出し・取り扱い時には、サンプル間で相互に混入しないように、サンプル毎に作業台や電子天秤等の清掃を十分に行うとともに、マスクを着用し唾液などの飛散を防ぎながら操作に細心の注意をはらう。

子実体を検査試料対象とする場合（図 2 参照）、汚れていない子実体の内側を使用するため、傘部分と柄の部分を切り分け、柄の部分の外皮を削ぐように切り落とし内側を露出させる。それをメスとピンセットを用いて 5mm 角程度の大きさに切り分けて 2ml のチューブに 8 粒程度入れ、-20°C以下のフリーザーで凍結させ、DNA 抽出直前に凍結乾燥し、4. 6. 5 の DNA 抽出操作に用いる。

図 2 および後述の図 3 では手袋を未着用であるが、サンプルに素手で触れてしまう危険のある場合は手袋を着用することでコンタミのリスクを軽減させることができる。

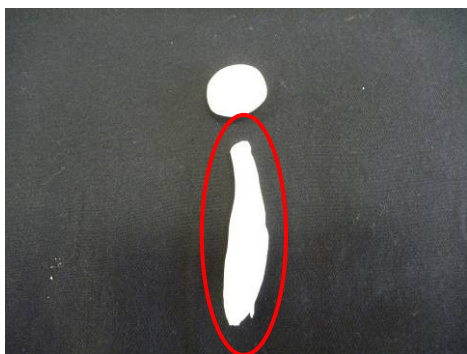


図 2-1 子実体ブナシメジ
赤丸の部分を使用する



図 2-2 子実体の外側部分を削ぐ



図 2-3 5mm 角に試料を裁断する



図 2-4 2ml チューブに試料を入れ完成

菌糸体を検査試料対象とする場合、まず、ポテトデキストロース（PDA）平板培地を 9cm シャーレに作製する。ポテトブドウ糖寒天培地分包 1 袋をステンレスビーカーに開け、超純水 400ml 加えてよく混和する。ラップをし、アルミホイルで蓋をして輪ゴムでとめる。ソコレックス SH をアルミホイルで包み、さらに新聞紙で全体を包み輪ゴムでとめる。ポテトブドウ糖寒天培地とソコレックス SH をオートクレーブで 121℃、15 分間高圧蒸気滅菌をする。培地が 60℃まで冷めたらクリーンベンチ内で、ソコレックス SH を用いて、ポテトブドウ糖寒天培地を 9cm 滅菌シャーレに 16ml ずつ分注する。25 枚ほど作製できる。培地が固まるまで 1 時間ほどクリーンベンチ内で静置する。作製した PDA 平板培地 4 枚(予備 1 枚含む)の中央部付近に、クリーンベンチ内で菌糸体または子実体の小片を接種し、25℃、2 週間培養後、気中菌糸を集菌する（0.1g-0.5g で可、0.3g が適量）。集菌方法は図 3 参照。まず、スパーテルを用いて菌糸を集める。このとき、寒天培地を削り取らないように注意する。次に、集めた菌糸を 2ml チューブに入れる。2ml チューブ 1 本に PDA 平板培地 3 枚分の気中菌糸を集菌し、-20℃以下のフリーザーで凍結させ、DNA 抽出直前に凍結乾燥し、4. 6. 5 の DNA 抽出操作に用いる。



図 3-1 スパーテルを用いて菌糸を集める



図 3-2 全体から集菌しまとめる



図 3-3 集めた菌糸を 2ml チューブに入れる



図 3-4 1 本につき 3 片ほど入れて完成

いずれの場合も、DNA 抽出の際には、凍結乾燥機からサンプルを出して、できる限り短時間(15 分以内)に扱うことが重要である。室温で長時間放置すると吸湿し、糖質がでてくるため、粉碎が困難になる。なお、凍結サンプルを保存したい場合は-20℃以上のフリーザーで、2ml チューブにパラフィンフィルムをまいて保存するようにする。

4. 6. 5 DNA 抽出操作

基本操作は、Geno Technology 社の Plant Geno-DNA-Template™ のプロトコルに従っている。なお、抽出工程が多く 2 時間程度要するため、マスクおよびゴム手袋を着用し、クロロホルム使用時には眼鏡を使用することで安全を確保するとともにコンタミのリスクを軽減できる。

1. 4.6.4 で 2ml チューブに作製した凍結サンプルを凍結乾燥し、ホモジナイゼーション用ペッスルを用いてそのサンプルを粉状になるまで丁寧に粉碎する。
2. 300μl の Template Extraction Buffer を添加し、ホモジナイゼーションペッスルでさらにサンプルをすりつぶした後 300μl の Template Extraction Buffer を加えて合計 600 μl とし、室温で 20 分間放置する。
3. 200μl のクロロホルムを添加し、数回反転させて混合する。

4. 冷却遠心機で、15,000 x g、15 分間、室温で遠心する。(この遠心中に、恒温機を 60℃に設定し、その中に TE buffer を入れて温めておく)
5. 4 の遠心分離で得られた上清 (クロロホルムの下層、菌糸体の凝集物である中間層、Buffer に DNA が溶出している液の上層のうちの上層のこと) を、新しい 1.5ml チューブに回収し、等量(約 600μl)の 70%エタノールを添加する。

上清を回収する際、上清と沈殿したクロロホルムを混合しないために、中間層にある粉碎した子実体または菌糸体の凝集物に触れないよう静かに上清を吸い取るようにする。また、70%エタノールを添加する際、上清との境界を乱さないよう、チューブ壁を伝わらせて静かに重層する。ここで 70%エタノールを上清と混合してしまうと DNA の収率が著しく低下してしまうため、細心の注意を払う。
6. 40μl の *pink* RESIN を添加後、数回反転させて混合し、室温で 5 分間放置(ときどき混合して懸濁状態を保つ)。なお、*pink* RESIN は使用前にボルテックスまたはピペッティングを激しく行い、溶液を均一な状態にすること。また、*pink* RESIN は顆粒状の物質を多く含んでいるため、ピペットチップの先端をはさみで斜めに切り、孔を大きくすることで先端での顆粒の詰りを防ぐことができる。
7. 12,000xg、5 分間、室温で遠心し、デカンテーションして上清を除去する。
8. チューブをタッピングして沈殿をほぐし(ボルテックスミキサーを用いてはならない)沈殿がほぐれたことを確認してから、500μl の Wash- I を添加して *pink* RESIN をタッピングでさらに懸濁する。
9. 12,000xg、5 分間、室温で遠心し、上清を除去する。
10. 新しい 1.5ml チューブにスピнкаラムをセットし、そこに 500μl の調製済みの Wash- II に再懸濁 (※8 と同様の操作を行い、沈殿がしっかりほぐれるまで懸濁すること) した *pink* RESIN を添加する。
11. 10,000xg、2 分間室温で遠心し、溶出された洗液を除去し、調製済みの Wash- II で同様に、さらに 2 回遠心洗浄する。この洗浄の際にスピнкаラム内でメンブレンにピペットの先が触れないようにピペッティング操作を行い、しっかりとペレットを洗うことにより抽出される DNA の品質が向上する。また、2 回目の遠心はカラムから洗液を完全に除去するよう、10 分間行う。
12. スピнкаラムを新しい 1.5ml チューブに移し、1μl の RNase と 50μl の TE Buffer (50~60℃)を添加して、ピペットチップを用いて RESIN を懸濁し、室温で 10 分間静置する。
13. 3,600xg、10 分間、室温で遠心し、DNA 溶出液を得る。DNA 溶液は 4℃保存する。長期保存の場合は -20℃保存し、凍結融解を繰り返さないように注意する。

4. 6. 6 DNA の定量

抽出したDNAの定量方法には、アガロースなどの電気泳動による分析や分光光度計による分析がある。本マニュアルでは、分光光度計による定量を行う。本分析については通常の分子生物実験でのDNA濃度測定法に準じたものであればよい。なお、石英セルを使用する場合、セルを直接素手で触れて光路面を汚さないためにゴム手袋を着用する。

1. 5 μ l のサンプル DNA に 995 μ l の滅菌超純水を添加し、DNA 溶液を 1/200 に希釈する。
2. 260nm と 280nm の吸光度を測定する(図 4 参照)。
260nm/280nm の値の比が 1.8-2.0 になることを確認する(トラブルシューティング参照)。
DNA濃度計算は吸光度 1 の時の濃度が50 μ g/ml であるので、
DNA 濃度 (μ g/ml) =260nmの吸光度 $\times$ 50 $\times$ 200で計算できる。
3. SSR分析用に、100ng/ μ l (50-100ng/ μ l) の調製DNA溶液を、滅菌超純水を溶媒として作成する。
4. 元の DNA 溶液は-20 $^{\circ}$ C以下で凍結保存し、調製 DNA 溶液がなくなるまたは調製DNA 溶液を作成してから1ヶ月程度経過した際に再度融解し、調製 DNA 溶液を作成するようにする。なお、凍結・融解を繰り返して使用するのはこの調製 DNA 溶液とする。

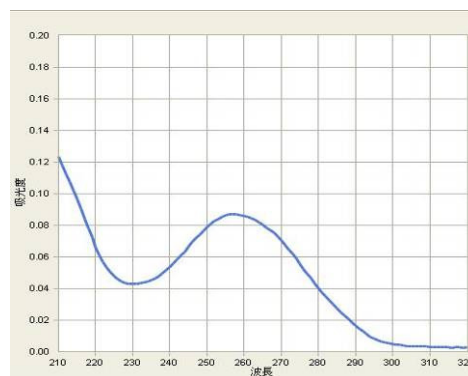


図 4 分光光度計を用いた DNA の波長

このような山成の形状になり、260nm付近に
ピークがくる形が望ましい

なお、NanoDrop などの微量サンプル測定機器による DNA 吸光度の測定でも同様の結果が得られればサンプルを使用してよい。

4. 6. 7 PCR 増幅操作

PCR 増幅操作は以下の通りである。なお、PCR 実験では、微量の鋳型 DNA であっても増幅されるので、目的以外の DNA の混入を防ぐとともに、試料の酵素的分解を防ぐため、人間の皮膚表面から分泌されている DNase の混

入を防止しなければならない。コンタミネーション防止のため、実験の際はマスクと手袋を必ず着用する。また、PCR 反応液の調製はすべて氷上で行う。

1. PCR反応液の調製（1 サンプル分）

サンプル DNA 溶液（20 ng/μl）	1.0 μl
調整済み SSR プライマー溶液	1.0 μl
AmpliTaq Gold 360 Master Mix	10.0 μl
滅菌超純水	8.0 μl
合計	20.0 μl

なお、SSR マーカー毎の組成の誤差を防ぐために、例えば 30 品種測定する場合、30 サンプル分+ロス分を見込んだ量(31 サンプル分)の、サンプル DNA 溶液を除く試薬の混合液を予め作成し、チューブに 1 反応分ずつの液量を分注してから、各々のチューブにサンプル DNA 溶液を加えるようにする。

2. PCR システムを用いて、以下のプログラムで PCR 反応を行う。

※不必要な PCR 産物の増幅を最小限に抑えるため、ステップダウン PCR 法を用いて行う。これによりフラグメント解析が容易になる。

- 95℃10 分間熱変性。
- 95℃30 秒間、62℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、5 サイクル。
- 95℃30 秒間、60℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、5 サイクル。
- 95℃30 秒間、58℃30 秒間、72℃15 秒間の反応を、35 サイクル。
- 72℃7 分間の反応後、4℃で∞。

3. 反応終了後にサンプルを保存する場合は、プライマーの蛍光標識を失活させないようにするためアルミホイルで遮光し、-20℃で保存する。

4. 6. 8 PCR 産物の増幅確認試験

4. 6. 7 で作成した PCR 産物の増幅を確認するため、アガロースゲル電気泳動を行う。増幅が確認された場合は 4. 6. 9 へ、増幅がみられなかった場合にはトラブルシューティングを参照し、再度 4. 6. 7 の PCR 増幅操作を行い、産物を得るようにする。

なお、得られた産物は今後の試験に使用する可能性が高いため、コンタミを防ぐためにマスクとゴム手袋を必ず着用する。

1. 泳動用アガロースゲルと泳動用バッファの作成

TBE バッファを、電気泳動装置に入れ、また 200ml 程度の三角フラスコに TBE バッファ 70ml と Agarose 900 を 1.05g 加えて濃度が 1.5% のゲルを作成する。フラスコにラップをかけて電子レンジで溶解させる。このとき、突沸が起きないように 500W を数十秒単位でかけながら内部を確認する。一度

かけたら、アガロースを融解させるようにゆっくりとフラスコを回すように混ぜる。内部にアガロースの粒が見えなくなったら、ゲル板に溶液を流し込んで固まるまで静置する。

2. サンプルの泳動

ゲルが作成できたら、電気泳動装置に入れてゲルが浸ることを確認してからアプライを行う。サンプルの一部 (5 μ l) を未使用の PCR チューブまたは 8 連チューブに移し、そこにゲルローディング溶液を 1 μ l 加えて計 6 μ l とする。一番左に 100bp のラダーマーカを 5 μ l アプライし、その他のサンプルも順次アプライする。アプライが完了したら、100V25 分または 125V20 分で泳動を行う。この条件に関してだが、バンドがしっかり分離でき、産物の有無が確認できればよいので電圧と時間は適宜変更してもかまわない。

3. ゲルの染色

泳動が完了したら、300ml の純水にエチジウムブロマイド溶液を 3~5 μ l 混合したゲル染色液を作成し、その中に泳動したゲルを浸して 20~30 分ほど浸透し、染色する。染色後、手袋をした手でゲルを紫外線照射装置にのせ、254nm や 366nm などの紫外線を照射する。図 5-1 のようにバンドが確認されたらそのサンプルを 4. 6. 9 のフラグメント解析に用いる。

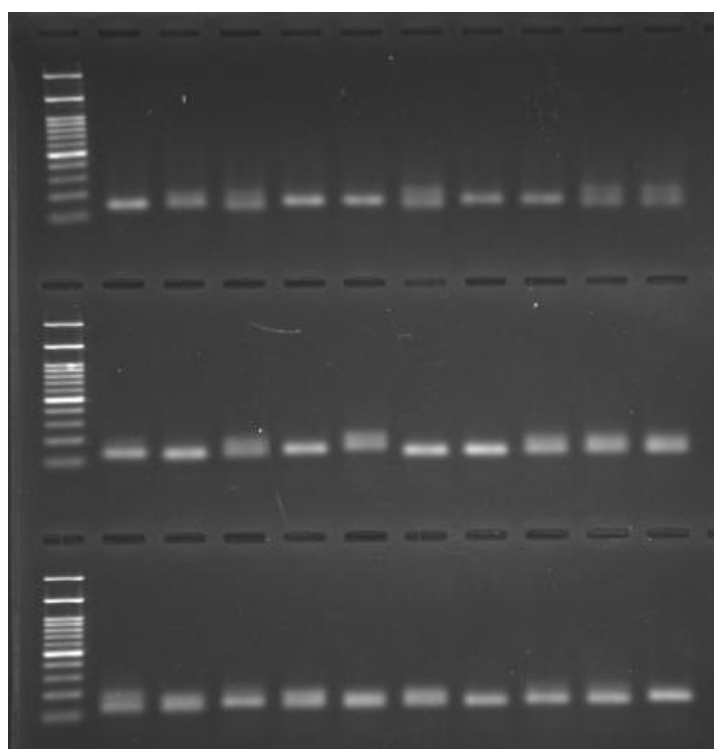


図5-1 msHm-1 の電気泳動図 30 菌株すべてで増幅がみられる
このようにマニュアル記載のバンドを確認することで次のフラグ
メント解析をスムーズに行うことができる

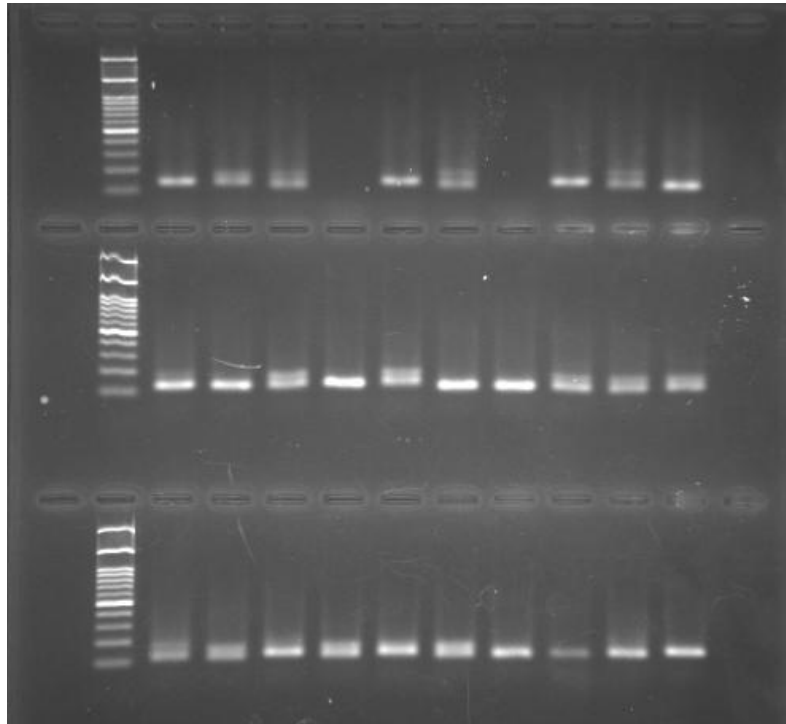


図 5－2 msHm-1 の電気泳動図 2 か所で増幅がみられない
この場合トラブルシューティングを参照し、すべての菌株でバンドが
見える様に再度 PCR を行う。

4. 6. 9 SSR マーカーの検出方法

前項で得た SSR マーカーによる PCR 産物を DNA シーケンサーで分析し、フラグメント解析を行う。基本的分析操作は、アプライドバイオシステムズ社のフラグメント解析のプロトコルに従って行う。

1. 前項で得た PCR 産物を、滅菌超純水で 100 倍から 500 倍に希釈する。希釈倍率は、PCR 増幅を考慮し、フラグメント解析に適した倍率で行う。(トラブルシューティング参照)
2. 1.0 μ l の希釈 PCR 産物、0.2 μ l の 600LIZ サイズスタンダード、10 μ l の Hi-Di ホルムアミドを、96 穴 PCR プレートに入れ混合し、シーリングマットで蓋をする。
3. PCR システムなどを用いて、95℃3 分間熱変性を行った後、直ちに氷上で 5 分間以上静置する。※サーマルサイクラーのプログラムを使用し、95 度 3 分間の反応後、4℃で ∞ とすることで同様の反応として扱うことができる。
4. Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer のプロトコルに従い、50cm 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. Gene Mapper ソフトウェアを用いて、結果の解析を行う。

4. 6. 10 データ解析、判定

表 2 にホクト白 1 号菌の 8 SSR マーカーの遺伝子型(フラグメント長)を示した。フラグメント長は 600LIZ サイズスタンダードに対しての相対値を表している。また、スラッシュ区切りで 2 つの数字が並んでいるものは、同一プライマーセットで 2 本の鎖長の異なるフラグメントが増幅することをあらわしている。付属文書 2 に、全 8 種類の SSR マーカーでの既存栽培品種の 10 品種 (ホクト白 1 号菌、MH025014、MH025016、MH025019、MH025022、MH025066、MH025091、MH025146、MH025217、MH025374)、野生品種である 10 品種 (MH025038、MH025045、MH025046、MH025054、MH025070、MH025092、MH025097、MH025121、MH025160、MH025339)、そして市販されている 10 品種 (MH025012、MH025064、MH025286、MH025288、MH025362、MH025369、MH025397、MH025462、MH025463、MH025528) の計 30 品種の 8 SSR マーカーの遺伝子型を示した。この計 30 品種を 8SSR マーカーで識別を行ったところ、すべての品種を区別することが可能であった。

表 2.ホクト白 1 号菌の 8SSR マーカーの遺伝子型 (フラグメント長)

	SSRマーカー							
	msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8
ホクト白1号菌	133	67/79	145	155	269	130	132	243

SSR マーカーの開発時に、プライマー対の Tm 値、プライマーダイマーやヘアピン構造を考慮して、プライマーを作成している。50℃～63℃までアニー

リング温度を検討して、至適アニーリング温度の決定を行い、波形を安定させるためのテイル配列をプライマーに付加している。

以下、データ解析、判定に際しての注意点を記す。

1. まず、全ての蛍光色素を表示して波形を確認する。次に VIC の蛍光色素である緑色のピークのみを表示して解析を行う。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、本来フラグメントのピークとして検出されるはずのない色が検出されることがあり、ターゲットのフラグメントの正しい値を表していないことがある。その場合は、原則として高い値を示している上位二本のピークを選びこれを遺伝子型とする。
2. PCR 増幅産物はサイズスタンダードのピークと比較して適正な希釈濃度にする。PCR 増幅産物の希釈濃度が低い場合、サイズスタンダードのピークと比較して、サンプルのピークが低くなる。最も高いフラグメントのピークがサイズスタンダードの 1/3 以下の場合は別の低いフラグメントのピーク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、希釈倍率を 2 倍～4 倍程度低くして、濃度のより高い希釈液を作製し直し、再度分析を行う。また、希釈濃度が濃すぎるとピークの大きさが検出限界を超えてしまい、ピークの先端が表示されない（波形の相対値が 10000 を超えている）。この場合、フラグメントのサイズデータが正しく表示されないため、PCR 産物の希釈倍率をさらに 5～20 倍希釈してピークが上限を超えないように調製する。（図 6-1）
3. サイズスタンダードの波形を確認する。フラグメント解析におけるピークの数値は、サイズスタンダードのピーク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ず、結果が表示されない。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 4. 6. 9 の 2 からやり直す。

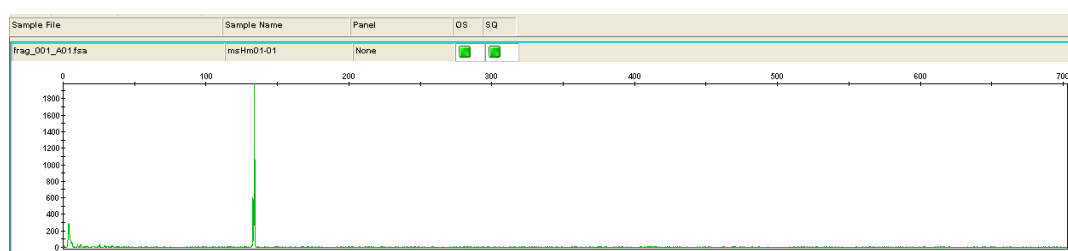


図 6-1 フラグメント解析結果の例①

ピークが 2 箇所のみに表示されており、そのピークの値も上限を超えていない。OS, SQ という表示が緑印になっている。サイズスタンダードの波形、サンプルの波形がともに安定しているということであるため、信頼性の高いデータといえる。



図 6-2 フラグメント解析結果の例②

ピークが 2 箇所のみに表示されているが、ピークの値が 10000 程度の高い値になってしまっており、ピークが高すぎるためにサンプルの波形に信頼性がないということで黄色い三角印 (OS) が表示されてしまう。図のように単一のバンドしか検出されない場合はアリルを決定することが可能であるが、複数 (2 本) のバンドが出現してしまった際に、それが非特異的なものか判断するのが非常に難しくなるため、そのような波形は望ましくない。複数のピークが出てしまって判断できないときは希釈倍率を変更して再度フラグメント解析を行う。

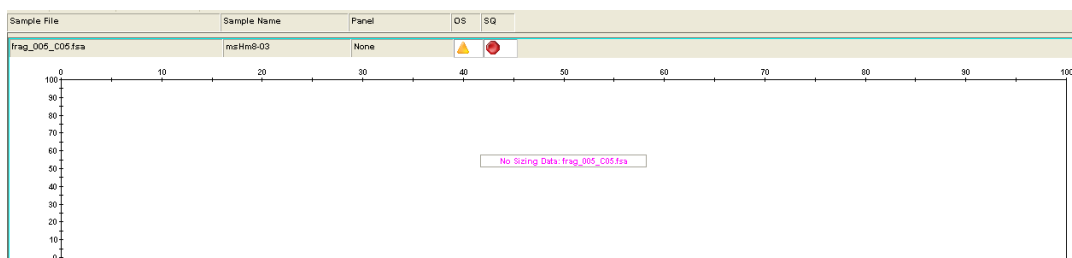


図 6-3 フラグメント解析結果の例③

解析を行ったが波形がみられない状態。この場合 SQ に赤い丸が表示され、上図のような画面が表示される。要因の一つとしては、サイズスタンダードとサンプルの濃度が濃すぎたために泳動がうまくいかなかったことが考えられる。サイズスタンダード、サンプルともにピーク値が 100 程度あれば検出可能であるため、なるべく低濃度に調製して再度泳動を試みることによって改善される可能性が高い。

4. 6. 1 1 実験操作フロー図

サンプル採取	ブナシメジ子実体もしくは菌糸体 ↓
DNA抽出	Plant Geno-DNA-Template™キットを用いる方法または、同等の濃度及び純度のDNA が抽出できる方法 ↓
DNA 濃度測定 (分光光度計)	DNA量の確認、DNAの質の確認(吸光度260nm/280nm比)、DNA溶液 (20ng/μl) の調製 ↓
PCR増幅	PCR反応液 ↓ ※ 4. 6. 7 参照 PCR 産物の増幅を電気泳動で確認 ↓ 産物ありの場合は次のステップへ ↓ 産物がない場合は再度 PCR 反応を行う
フラグメント解析	希釈PCR産物+サイズスタンダード+Hi-Di Formamide ↓ DNAシーケンサー分析 ↓ GeneMapperソフトウェアによる解析、遺伝子型決定 ↓ 同じパターン ↓ ホクト白1号菌と同一品種の可能性あり 栽培試験等のさらなる詳細な解析が必要 ↓ 違うパターン ↓ ホクト白1号菌と同一品種ではない (解析終了)

5. トラブルシューティング

問題点	対応
1. 反復実験で同じ結果が得られない	鋳型とする DNA (テンプレート DNA) とプライマーがすべての試験で同一の場合、PCR で増幅される産物は原則として同一のものが得られるはずである。従って、反復実験で同じ結果が得られない原因としては①テンプレート DNA が純粋なものではない②フラグメント解析での希釈率が適正でないため波形が安定しない、の2つがあげられる (②に関しては後述のトラブルシューティングを参照)。 よって、同一の結果が得られなかった場合は 1) の DNA 抽出までさかのぼり、実験を再度行う必要がある。
2. 抽出 DNA の 260nm と 280nm の吸光度の 260nm/280nm 比が 1.8-2.0 にならない	分光光度計を用いて抽出した DNA の純度を測定した際、図 4 のような波形にならなかった場合、まず 260nm の部分にピークがあるかどうかを確認する。ピークがあった場合、そのまま次の行程に進み、PCR 産物が増幅されたらそのままテンプレート DNA として用いてよい。増えなかった場合はトラブルシューティング「SSR-PCR 反応で増幅がうまくいかない」を参照。ピークがなかった場合は、再度 DNA 抽出を行う。その際、試料をより細かくホモジナイズすること、上清を取るときに下層と混じり合わないことなどを注意すると改善される可能性がある。

3. PCR 反応で増幅がうまくいかない (産物が得られない、非特異的なバンドが多数出現する等)	抽出 DNA の質や夾雑物の混在に問題がある場合(抽出 DNA の 260nm と 280nm の吸光度の 260nm/280nm 比が 1.8-2.0 にならない場合)、テンプレート DNA を滅菌超純水で 5-10 倍希釈することで、増幅が向上する場合がある。希釈しても増幅が見られないときは、再度 DNA 抽出を行う。 PCR 機の温度制御は、メーカー／機種によって異なるため、PCR Thermal cycler は BIO-RAD 社 C1000 Thermal cycler を推奨機器としている。異なるメーカー／機種を用いて、SSR-PCR 反応の増幅が悪い場合、アニーリング温度を 2-5℃下げる。一方、非特異的なバンドが多数出る場合(図 5-2)には、アニーリング温度を 2-5℃上げる。
4. フラグメント解析の際に波形がみられない	蛍光標識をつけた PCR 産物は光に弱く、遮光保存を行わないと失活してしまう。PCR 産物を作成し、それらを保存しておいてから後日フラグメント解析を行った際に波形がみられなかった場合、PCR 産物が失活している可能性が高いため、再度 PCR からやり直す。 図 6 より、SQ が赤丸で表示されて波形がみられない場合は、全体の濃度を 1/5 ～1/10 程度に希釈して再度泳動を試みる。

6. 是正処置

本マニュアルの使用者からの情報収集として、改善依頼票を設けて情報交換を行い、必要に応じてマニュアル等の是正措置を行う。

付属文書：

1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細
2. 8 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長
3. 参考文献

別添資料：

農林水産省品種登録ホームページより「植物品種識別における品種同定理論」

付属文書 1. ブナシメジ品種識別に用いる 8 種類の SSR マーカーの詳細

※注 付属文書 1 は、Roche GS-FLX の結果を基に作成した参考データである。実際は、配列をアセンブルする際に Variant が複数箇所存在するので本来の配列とは数塩基程度異なる場合がある。そのため、プライマー 1 とプライマー 2 で挟み込まれている塩基数と本文中で表記されているフラグメント鎖長には差が生じているが、本文のフラグメント鎖長を基準とする。

SSR マーカー名：msHm-1

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：CGAGTGTTTCTCATCGCTGT<青字>

プライマー 2**：GCTGATGATGCTCGTTGATG<青字>

反復モチーフ：(ACCAGC)6<赤字>

塩基配列**：

```
AATTGTCCAA CTGTCTCTAT AAACAATTGT CCAACTGTCT CTATAAACTC
GTGCGTAAGG ATCGTGCTTA TAATTGAACG TTTATCCTGA CATCTAGCCA
GCTTCCCGCA ACCGATCCCT CAAAAACAT TTGTACCAGG ATGGGCCTTT
CTGGATGTGA AGGTAGCGTA TGCTTCGCTC CCACTGCGAC AAGTCTCATG
ACTTTGTCCA GGC GAATGAC ATGTTTGAGC AGGCGAATGC TAAACAGAAC
GCAAGTAAGT ATTGACATCT GTACATTTCG AGTGTTTCTC ATCGCTGTAT
CTGAAGATAT AACCGAGTCG ACGGCTGCCC CTTCCCCCAG CAAGACCGAC
ACCAGCACCA GCACCAGCAC CAGCACCAGC ACCAGCATCA CATCAACGAG
CATCATCAGC GCCACCACAT CCACGACGTT TCTTGCGAGC AGTCCATCAT
CACCTGTTAC TACAGCCGAT TCCGCCTCCA CTAGCGAGAC AGCGGCGGGCG
TCTCTGGAGT CACATGCGAA CGCGGTTGTC GGGGGGATTG TTGGTGGTGC
AATGGGCCTC ACTCTTATCC TGGGCTTTGC ATACTGGTAC ATCAGTCGAC
```

*プライマー 1 はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2 には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-2

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：AAGCTGCGAGAATTCCACTC<青字>

プライマー 2**：ACCGTCCGTGAGAATACGAG<青字>

反復モチーフ：(ACCT)8<赤字>

塩基配列**：

**AAGAAGGCGC GCAACCCTCA CAGTCAGAAC AAGCATCCAT GTTTCCTTCG
TCCAGCAAGA AGGCGCGCAA CCCTCACAGT CAGAACAAGC ATCCATGTTT
CCTTCGTCCA TATTGTTCAA GTATATGAAT CTGTCGTGCA TAGGCCTCGC
TACAGCTAAG CTGCGAGAAT TCCACTTAC CTACCTACCT ACCTACCTAC
CTACCTACCT ACCACTCGTA TTCTCACGGA CGGTGACTTC CACCATGGTC
ATTGCAACTA ATGGGGGCCT GAAATAAAGT GTTCAAGTTA AAAGAGGCGG
TCAACGAACT GATCCGATCA CTGATCGTGA CGTCGACGCC TTAAATCTAA
ATCACGTGCT CTCCAAAATT TCGATCGACA GTCCACAGCA GTCCACCCTT**

*プライマー 1 はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー 2 には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-3

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：GAGGTGTGCGTTCTCGTTCT<青字>

プライマー2**：GCACCAGTACCTACGCCAAC<青字>

反復モチーフ：(GCTGGT)6<赤字>

塩基配列**：

TTGCAGTGA TCAACGGGTT CATCTTTCAC GATAGTAACG GGAGGTGGAG
GTGTAGGTGC AGAGGGAGGC ACGGGTTTCG TTTGTCGAGC TTGAGGTGTG
CGTTCTCGTT CTGGTTCTTG TCGTTCCGCC TCGGCGGGTT GGGGAGGAGC
AGCCCTCTTA GGGCCACTGG GTGGTGCTGG TGCTGGTGCT GGTGCTGGTG
CTGGTGCTGG TGTGGCGTA GGTACTGGTG CTGGTGTGGG TGTGGGTGCG
GATATTCAA GACCGCGACT TTCACGGAAT GCCTGCACCA GACCAATCAA
CGTCGGTTCA CTGAAGGCCT CGAGATTCGC GACGATGAGT TCCGTAATGA

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-4

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：ACCCGGAAATAGAACGAGAG<青字>

プライマー2**：CAACCTCTGTTCAACCACCTC<青字>

反復モチーフ：(GACTCG)5<赤字>

塩基配列**：

GACTTGTTC AGACGTTGAC CCAGCTGTGA TTTGGGTAAC TGTTTCAACG
ATCACGTTGG TGTTTGACCC GGAAATAGAA CGAGAGGGAG AGGGTGATGG
TGATGGTGAT GGAGTAGGAG AATTGATACT GGGCGGGGCC GCTGGTCGCG
TCGTCTCCGG ACTCAGACTC GGA CTGACTCGG TCGGACTCGG ACTCGGAGGT
GGTTGAACAG AGGTTGAGGA CTGTGATGTT TGAGGATCTA TGAGGCAATA
GCCACAGCCG AAAAAAAAAA AAAAAAAGGG GAAACGAAAA GAAAATACAG
AAGGTGCGTT AGAATGAGCG GGGAGACACT GAAGTACCTA AAGCGACCTC
GAAATAGTCC CGAATTCTTG GCGAGAACCA GAAATTGTTG CCGTC

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-5

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー 1*：CAGAAGGCTGTCCTCACACA<青字>

プライマー 2**：GAGCCGATCAAGAACCGATA<青字>

反復モチーフ：(GATA)5<赤字>

塩基配列**：

```
AGACTGCGGT CACATTTCAG AAGGCTGTCC TCACACAACC CCTTTAAATT
CTGCGTGGGA TTGAAAAATT TCGACATTAC TGTATTATTC TTCCTTTGCT
ACCAATTGTG TTGCTTGCTT TGATATGCAT CTTACGAGTG ATTTAGCTAT
CCGCATTTTT AGTGTTCGAA ATAAACAGCC TGAGCAAATA TGAATCGTGT
GATAGATAGA TAGATAGATA TTTTTTTGTG AAGTGCAATA TCATGTTTTC
CGTAAGTACA TATCGGTTCT TGATCGGCTC CAGACTAGTA TCCGAAGCCT
GCGTAGGTTT AAGCAGAGTA AGTATCTACC GCATCACATC AATCCAATCA
CATTCTCCT GCGGGCTCGT CCTGCGTGTC CTTCGCAAAA CTTGACCTTT
```

*プライマー 1 はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー 2 には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-6

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：CCGTTGTGGGTTAGGTCAAA<青字>

プライマー2**：TAGTATGTGTAGGCGACAAAGG<青字>

反復モチーフ：(TGGA)5<赤字>

塩基配列**：

CTGATATCGT TGTTCGTAT ATACCACGTC CTGACCTCCT GATTCTGATT
GTAGTCAAAG TTGCACCAAG TATAGCGACT TCTTTTTTCA CGTATGAGCT
TGTGAGTTTG TTCATCCTTT TTGCTTCCTT ATGTGGTGAT TGATGTGCCG
TTGTGGGTTA GGTCAAAGAC TTCCTTGTCC CGACATGATA CACAGACAAT
TGGATGGATG GATGGATGGA TGTAGAACAG GATTCTTCTT TCTCTCTTGC
CCCTTTGTCT CCTACACATA CTATTATTAC AACTAAGGC CGAGCCCTCT
GCGCAGGGAT AACATATACT ATAGAACAGA TGAATGCCAA TGGACAGGTG
ACTGAATCGA TATCCGTATA GCATCAGGAA CGTTTGAGGC CATGTGCGTG

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名：msHm-7

作成に用いた材料品種：ホクト白1号菌

至適アニーリング温度：59℃

プライマー1*：GGAAGAGAGGGAGGCCAAAAA<青字>

プライマー2**：GTCGACGGTTATTTTCGAACG<青字>

反復モチーフ：(AAGG)13<赤字>

塩基配列**：

```
GAGAATTGGA ATGGGAAAGG GAGGGGGAAG TGAGGCAGAA AAGAGGCGGA
CGGAGAATTG GAATGGGAAA GGGAGGGGGA AGTGAGGCAG AAAAGAGGCG
GACGTGTGTT TCTGGTGAAC GGAGGCACGG GGAAGAGAG GGAGGCCAAA
AAGAGAGAGG GGAGGGAGGG AGGGAGGAA GGAAGGAAGG AAGGAAGGAA
GGAAGGAAGG AAGGAAGGAA GGAAGGAAGA AGGGACTACG TACGTTTCGAA
ATAACCGTCG ACGGTGCGAT ACGCTGCACG TTCGCTTTCA CGTTTTCTTC
GACGAGGGCG CGGAACGCCG CTACATCATG CAGATAGTGA GGATGTGGTA
TATGTCGGGG AAAAAAAGA AGAGAGGTAT ACGGACGATC ATGCAAATCC
GGCAATTGCT CGCCCGCTTC CTTCGTGCCT GTCTCCCTTG TCCTCGTGTT
GAGCGTAGCC CTCTCCC
```

*プライマー1はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー2には tail 配列を付加した。

SSR マーカー名 : msHm-8

作成に用いた材料品種 : ホクト白1号菌

至適アニーリング温度 : 59℃

プライマー 1* : ATCACGCATATACGCACCC<青字>

プライマー 2** : CACCTCTCGCAGGTATGGAC<青字>

反復モチーフ : (AAAGA)₈<赤字>

塩基配列** :

```
GGTTGAGTGA TGCAGAGGAA GACGAAGAGG CAGAAGTGGG TGTAAGAAGAA
GCAGAAGCCG AAAACGAACG AAGAGAAAAC CCCGCATCAC GCATATACGC
ACCCCGCAAC TTCTTCGGGT CCGTAGCGAG CGTATGCATA TATCTTCACG
TGCATAAAGT TACATTCAGT AAGGAAACCG CAGATTTAAT ATTACGCAGG
AAGTAAAGAA AAGAAAAGAA AAGAAAAGAA AAGAAAAGAA AAGAGAGAAA
ACGCACCGTT GCAGAAAAGC CACAGCCGTG GGCTCGACGT CCGCCATCTC
ATCCGCGGTC CATACCTGCG AGAGGTGCGG TTCCGTTTCC ACTGGATTCC
AGGGATCTAC CTCCACCTCC ACGTCCACTG GTGGGACTTT AGGGACGGGG
AGCTTTTCGCC GGGGTAAGGA
```

*プライマー 1 はVICの蛍光修飾を行った。

**プライマー 2 には tail 配列を付加した。

付属文書 2. 8 種類の SSR マーカーによる 30 品種のフラグメント長

	SSRマーカー							
	msHm-1	msHm-2	msHm-3	msHm-4	msHm-5	msHm-6	msHm-7	msHm-8
ホクト白1号菌	A	B-12/B	C	D	E	F	G	H
MH025014	A	B-12/B+8	C-6/C	D+6	E+21	F+4	G-40	H-23
MH025016	A-18/A	B-12	C-18/C-6	D-6	E+12	F	G	H-23
MH025019	A	B-12/B	C-18/C	D-6	E+15	F+8	G-40/G	H-23
MH025022	A	B-12	C-18/C-6	D+6	E+15	F/F+8	G-40/G	H-23
MH025066	A-18/A	B-12/B	C-6	D	E/E+15	F/F+4	G-40	H
MH025091	A	B-12/B	C-18	D-6	E+15	F	G-40/G	H-23
MH025146	A	B-12	C	D-6	E/E+15	F+4	G	H-36
MH025217	A-18/A	B-12/B	C	D	E/E+15	F	G	H
MH025374	A-18/A	B-12/B	C	D	E	F	G-60	H
MH025038	A-12	B-12	C-26/C-8	D+6	E+9/E+24	F+4	G-45	H-23
MH025045	A-18	B-12/B-8	C-12/C	D/D+6	E+24	F	G-35	H-28
MH025046	A-18/A-6	B-20/B-8	C-6	D-6	E+12	F+4	G-40	H-23/H
MH025054	A-6	B-8	C-18	D	E+9	F-4	G-40	H-23
MH025070	A-6/A+12	B-8	C-6	D-12	E+9	F	G-40	H-36
MH025092	A-18	B-12/B-4	C	D-6/D+6	E+15	F+4/F+8	G-45	H-23
MH025097	A-18	B-12	C-18/C-6	D+6	E-4/E	F+4/F+18	G-55	H-34
MH025121	A-18/A-6	B-16	C-18	D+12	E-4/E+15	F	G-60	H-20
MH025160	A-18/A-6	B-16/B-4	C-18	D+12	E+12	F-8	G-48	H+48
MH025339	A-18/A-12	B-12/B-8	C-12	D+18	E+15	F-4/F+4	G-40	H-23
MH025012	A-18/A	B-12/B	C-6	D	E/E+15	F/F+4	G-40	H
MH025064	A-18/A-12	B-12	C-18/C-6	D	E-4/E	F+4	G-60	H-36
MH025286	A	B-12/B	C-18/C-6	D	E/E+24	F/F+4	G-60	H
MH025288	A-12/A	B-12	C-18	D-6	E-4/E+15	F+12	G-40	H-23
MH025362	A-18/A-12	B-12/B	C-6	D+6	E	F+4	G-60	H+4
MH025369	A-18/A-12	B-12/B-8	C-6	D+6	E/E+12	F+4	G-60	H-26/H+4
MH025397	A-18	B-16/B	C	D-6	E/E+15	F	G-60/G	H
MH025462	A-12	B-12/B-8	C-18/C-6	D+6	E	F/F+4	G-60	H-26
MH025463	A-12	B-8/B	C-6	D	E/E+24	F+4	G-60	H+4
MH025528	A	B-12/B	C-6	D	E/E+15	F/F+4	G-40	H

フラグメント長は 600LIZ サイズスタンダードに対しての相対値を表している。また、スラッシュ区切りで2つの数字が並んでいるものは、同一プライマーセットで2本の鎖長の異なるフラグメントが増幅することをあらわしている。

付属文書 3. 参考文献

- 1) Bell, C J And Ecker, J R: *Genomics*, **19**, 137-144 (1994)
- 2) Davis, T M, DiMeglio, L M, Yang, R, Stanton, M N S And Lewers, K S: *J Amer Soc Hort Sci*, **131**, 506-512 (2006)
- 3) Dirlewanger, E, Cosson, P, Tavaud, M, Aranzana, M J, Poizat, C, Zantto, A, Arús, P And Lagre, F: *Theor Appl Genet*, **105**, 127-138 (2002)
- 4) Foulon-Gne-Oriol M, Spataro C And Savoie, J M: *Appl Microbiol Bio Technol*, **84**, 1125-1135 (2009)
- 5) Hossain, K G, Kawai, H, Hayashi, M, Hoshi, M, Yamanaoka, N And Harada, K: *DNA Res*, **7**, 103-110 (2000)
- 6) Ito Y, Fushimi, T And Yanagi, S O: *MycoScience*, **39**, 361-365 (1998)
- 7) Kimura, T, Shi, Y Z, Shoda, M, Kobuchi, K, Matsuta, N, Hayashi, T, Ban, Y And Yamamoto, T: *Breed Sci*, **52**, 115-121 (2002)
- 8) Kresovich, S, Szewczyk-MCFadden, A K, Bliks, S M And McFerson, J R: *Theor Appl Genet*, **91**, 206-211 (1995)
- 9) 北村眞希・石井 真・星 雅子・稲富 聡・原田久也：日本きのこ学会誌, **18**, 7-12 (2010)
- 10) Parnaud, O, Chen, X And McCouch, S R: *Genome*, **38**, 1170- 1176 (1995)
- 11) RosA, V D, Cappuccino, I, Fanelli, C And Urbanielli, S: *Mol Ecol Notes*, **4**, 271-273 (2004)
- 12) Röder, M S, Plaschke, J, König, S U, Börner, A, Sorrells, M E, Tanksley, S D And Ganal, M W: *Mol Gen Genet*, **246**, 327-333 (1995)
- 13) Röder, M S, Wendehake, K, Korzun, V, Bredemeijer, G, Lohorie, D, Bertrand, L, Isaac, P, Rendell, S, Jackson, J, Cooke, R J, Vosman, B, And Ganal, M W: *Theor Appl Genet*, **106**, 67-73(2002)
- 14) Rozen, S And Skaltsky, H: *Methods Mol Biol*, **132**, 365-386 (2000)
- 15) Song, Q J, QuiGley, C V, Nelson, R L, Carter, T E, Boerma, H R, Strachan, J L And Cregan, P B: *Plant Var Seeds*, **12**, 207-220 (1999)
- 16) Song, S, Su, W, Zeng, W And Wang, Z: *Science And Cultivation of Edible Fungi*, Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp 191-199 (2000)
- 17) 砂川政英・根田 仁・宮崎和弘：木材学会誌, **41**, 949-951 (1995)
- 18) Turuspekova, Y, Nakamura, K, Yoshikawa, R And Tuberosa, R: *Breed Sci*, **51**, 215-218 (2001)

