

皮性二条オオムギの多型判別用 Temperature-switch PCR マーカーの作製事例と最適プライマー濃度比およびプライマー設計基準の検討

原口雄飛*・轟 貴智・甲斐浩臣

Temperature-switch PCR (TSP) マーカーは、標的の一塩基多型 (SNP) を含む領域を増幅する locus-specific (ls) プライマーセットと標的 SNP に対応する 3' 末端配列を有する allele-specific (as) プライマーにより、1 回の PCR で迅速かつ簡便に SNP を判別できる共優性マーカーである。しかし、TSP 用プライマーを作製した際に多型マーカーが得られる効率や、その効率向上に寄与するプライマー設計条件および反応液組成についての報告例は限られている。そこで、二条オオムギを供試材料とし、77 箇所の SNP を標的とした 77 式のプライマーセットを作製して TSP に供した。その結果、既報の反応液組成、反応温度で共優性マーカー化できたのは 32.5% (25/77) の SNP であった。さらに、反応液中の as プライマーの終濃度を調整することで、共優性マーカー成功率は 41.6% (32/77) まで向上した。また、プライマーの T_m 値や塩基数などの特性値と SNP 判別効率との関係について検討し、ls プライマーの T_m 値と as プライマーの T_m 値との差は 6~8°C が適正であると推察された。以上の知見は、新規に TSP マーカーを作製する際、共優性マーカー開発効率の向上に活用できる。

[キーワード: DNA マーカー, SNP, Temperature-switch PCR]

Cases for Co-dominant DNA Marker Development Between Two Japanese Two-rowed Hulled Barleys Using Newly Designed Temperature-switch PCR Primers, and Consideration of Optimized Primer Concentration for Improvement of Success Rate. HARAGUCHI Yuhi, Takatomo TODOROKI and Hiroomi KAI (Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. For. Res. Cent.* 6 :21-28 (2020)

Temperature-switch PCR (TSP) marker is an efficient codominant DNA marker to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a single PCR experiment. SNPs can be detected using two locus-specific primers, which requires amplification of a fragment from template DNA containing the SNP, and one allele-specific (as) primer which has a nucleotide that corresponds to a specific SNP site at the 3' terminal. Although TSP marker is an easy method for SNP genotyping, there are few reports about TSP marker development. To accumulate cases of TSP marker development, we designed 77 TSP primer sets for genotyping of 77 SNPs in two-rowed barley. As a result, success rate of codominant markers was 32.5% (25/77) under standard conditions of reaction solution composition, and reaction temperature as previously reported. The success rate increased to 41.6% (32/77) when the as primer concentration was adjusted appropriately. As another element to obtain higher detection efficiency of SNPs it was considered that the difference in values of melting temperatures between the locus-specific primer and the as primer should be 6–8°C. This information can be used for improvement of success rate for TSP marker development.

[Key words: DNA markers, SNP, Temperature-switch PCR]

緒 言

DNA マーカーを利用した優良系統の選抜は作物や家畜育種における重要な品種改良技術であり、単純反復配列 (SSR)、制限酵素断片長多型 (RFLP)、無作為増幅多型 (RAPD)、切断増幅多型配列 (CAPS)、増幅断片長多型 (AFLP)、一塩基多型 (SNP) を検出できる DNA マーカーが育種や遺伝解析に幅広く活用されている (Collard・Mackill 2008, 農林水産省 2007)。その中でも SNP についてはゲノム全体にわたる数万箇所について多型が収集できる大規模解析手法の開発が進んでいる (Bayer *et al.* 2017)。このような大規模解析手法により、特定の品種・系統について大量の SNP 情報が取得され、蓄積した SNP 情報は、多型解析に供した品種・系統から派生する解析集団で利用する DNA マーカーの開発時に、有効な情報資源となっている (Ishikawa *et al.* 2018)。その一方で、

ゲノム全体にわたる SNP の大規模解析手法は、過剰な解析力や高価な解析費用から、大規模な集団など膨大なサンプルを材料として少数の SNP 判別を行うには理想的ではないとの指摘もある (Yamagata *et al.* 2018)。

育種の過程では多数の有望系統について少数の SNP を迅速、簡便で安価に判別できる方法も依然として求められている (Yamagata *et al.* 2018)。このような状況から、サーマルサイクラーなど多くの研究機関で標準的に導入されている機器を用いた SNP 解析手法についても、判別精度の向上に寄与する研究が継続されている。サーマルサイクラーを用いた簡便な SNP 判別方法の 1 つである allele-specific PCR (AS-PCR; Okayama *et al.* 1989) は、SNP のうち片方のアリルに一致する 3' 末端配列を有する allele-specific (as) プライマーを使用して SNP を検出する方法で、判別感度を高める as プライマーの設計基準も提案されている (Liu *et al.* 2012)。また、こ

*連絡責任者 (農産部: haraguchi-y6079@pref.fukuoka.lg.jp)

受付 2019 年 7 月 4 日; 受理 2019 年 11 月 8 日

の AS-PCR の原理に基づき, mismatch amplification mutation assay (Cha *et al.* 1992), amplification-refractory mutation system-PCR (Ye *et al.* 2001), kompetitive allele specific PCR (Semagn *et al.* 2014) など, いくつかの SNP 判別方法が開発されている。

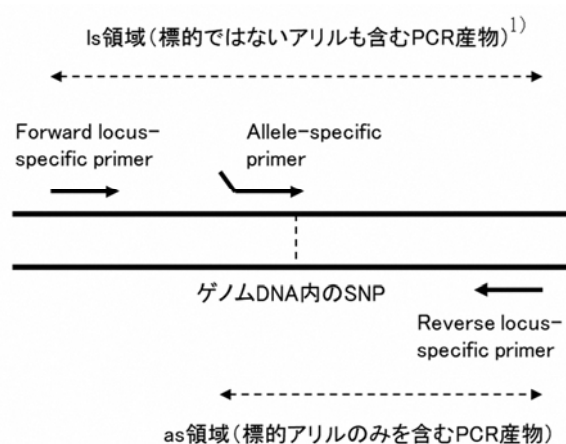
Temperature-switch PCR (TSP) も AS-PCR を改良した SNP 判別方法であり, ヘテロ性を区別することで, より多くの遺伝子型情報を獲得できる共優性 DNA マーカーである (Hayden *et al.* 2009)。具体的には, T_m 値の異なる 2 つの locus specific (ls) プライマーセット (forward, reverse) と 1 つの as プライマー (forward) を混合し, 1 回の PCR 反応で 2 つの領域を競合させながら増幅する二相性の PCR である (第 1 図)。つまり, 第一段階で SNP 位置を含む 400bp 以上の ls 領域を検出限界以下のレベルで少量増幅する。これを鋳型として, 続く第二段階でアニーリング温度を下げ, SNP のうちの片方のアリルを標的として設計した as プライマーを ls 領域内の SNP 位置にアニーリングさせる。第三段階でアニーリング温度を上げ, as プライマーと ls プライマー (reverse) により, 標的のアリルを含む as 領域と ls 領域を競合させながら増幅する。ls 領域と as 領域との塩基数の差が 100bp 以上となるようにプライマーを設計することで, アガロース電気泳動等で標的 SNP を迅速かつ簡便に検出できる (Hayden *et al.* 2009)。

このように, TSP は一般的なサーマルサイクラーを用いて, 標準化された条件下での 1 回の PCR で実施できる。そのため, 96 穴または 384 穴のサンプルプレートで実施すれば, 多数の系統について少数の SNP を判別することも, もしくは少数の系統について多数の SNP を判別することも可能である。また, PCR 産物を制限酵素で処理し, 切断の有無により生じる DNA 断片長の違いから多型を検出する CAPS マーカー (Konieczny and Ausubel 1993) と比較しても, TSP は制限酵素処理反応が不要なため短時間で安価に SNP を判別できる。TSP に使用するプライマーは既存の SNP 情報を基に設計するが, 次世代シーケンサーや参照ゲノム配列も併用した大規模解析手法によって SNP 情報の蓄積量は日々増加している (Tanaka *et al.* 2019)。そのため, TSP は新たに SNP 判別マーカーを作製する際に導入しやすい方法であり, 数箇所~数十箇所の SNP を標的とした TSP マーカーセットの開発例も複数報告されている (Hayden *et al.* 2009, Huang and Brûlé-Babel 2011, Röltgen *et al.* 2012)。

TSP マーカーの発明 (Tabone *et al.* 2009) や TSP マーカーセット開発の報告 (Hayden *et al.* 2009, Huang and Brûlé-Babel 2011, Röltgen *et al.* 2012) の中で, TSP に必要なプライマーの設計基準や PCR の反応液組成, 反応温度条件については一定の基準が示されている。しかしながら, これらの基準に従って新たにプライマーセットを設計し, 標準とされる反応液組成および反応温度条件で TSP を実施した際に共優性マーカーが得られる割合は, Hayden *et al.* (2009) と Tabone *et al.* (2009) による報告しか見当たらない。また, その割合を向上させる方法については as プライマーへのミスマッチ配列の

追加 (Tabone *et al.* 2009), 標的のアリルの変更 (Hayden *et al.* 2009, Tabone *et al.* 2009), as プライマー濃度の変更 (Röltgen *et al.* 2012) が言及されているが, それらの情報は限られているため, 共優性マーカーの開発効率や開発費用を見積もることは難しい。

本報告では, 日本国内の皮性二条オオムギ 2 品種・系統間の 77 箇所の SNP に対して 1 式ずつ, 合計 77 式のプライマーセットを設計し, 既報の反応液組成, 反応温度 (Hayden *et al.* 2009) を参考に TSP を実施した。本報告の目的は, 新たに TSP マーカーを設計した際の共優性マーカー作製効率の検証と, 効率向上に資する条件検討である。各プライマーセットについて標的 SNP 判別の可否と共優性マーカーとしての利用の可否を調査し, 共優性マーカー開発効率およびその効率向上に寄与する as プライマー濃度について明らかにしたので報告する。



第 1 図 TSP 用プライマーと PCR 産物の模式図 (Hayden *et al.* 2009 より転載)

1) 反応の第一段階で少量増幅され, 第二段階以降の主要な鋳型となる

材料および方法

1 TSP 用プライマーセットの作製

対象作物は皮性二条オオムギとし, 標的の SNP は「きぬゆたか」と「吉系 15」の間で多型が得られた 77 箇所とした (第 1 表)。「きぬゆたか」と「吉系 15」はビール用オオムギの被害粒である側面裂皮粒発生率の遺伝解析に用いられた倍加半数体系系統群の両親である。RFLP, SSR, RAPD, STS の合計 998 の DNA マーカーから両親間で多型を示した 61 マーカーにより連鎖地図が構築されたが, ギャップ領域が多く残されている (Kai *et al.* 2003)。本報告では開発した TSP マーカーを将来的に側面裂皮粒発生率の遺伝解析に応用する目的で, 「きぬゆたか」と「吉系 15」を供試品種・系統とした。

両品種・系統の間の SNP を調査するため, ゲノム DNA を 3 葉期の植物体の完全展開葉から GENE PREP STAR PI-480 (倉敷紡績株式会社) により抽出した。遺伝子型

第 1 表 作製した TSP 用プライマーセット

マーカー No.	判別 ¹⁾ 結果	SNP検出プローブ ²⁾	SNP		locus-specific (ls) primer		allele-specific (as) primer
			Y	K ³⁾	forward ⁴⁾	reverse	
1	A	JHI-Hv50k-2016-88372	G	A	GTGGAATGCGCCAAAGAGAAT	TGCTGATGGCTTCACCAAAG	CC CCTTAAAAATGTGGAACCTTCT ⁵⁾
2	G	JHI-Hv50k-2016-88660	A	G	GGTGCCAAAGGAACACGATT	CTGCACCATCGGGGTATATG	CC CCCTCAAGTTACCCCAAG
3	G	JHI-Hv50k-2016-88730	A	G	CAAAAACCGATGTCCGCTCCT	GATGGGCATCAGTGACGACT	GG GGCCCATCCAGCAACAG
4	C	JHI-Hv50k-2016-90803	G	C	CCATAAAGGCATCGGTTTCC	GCAACCATCGATGACGTTTC	CC CCGGAACACGAGAAAG
5	H	JHI-Hv50k-2016-93770	A	G	GATGCAAGGCTTCCGATGAT	TGTGAATCCAAACCAACGAG	CC CCGCGGGGCGCG
6	A	JHI-Hv50k-2016-98638	A	G	TGGTGCCATAGTAATGCCAAA	TTTAGGAACACCTGGGATGGA	GG GGATGATAATAGCCAGAGG
7	A	JHI-Hv50k-2016-99984	C	A	TGTCATGGGCGAGAACAAC	GGCATGCAACACTTGACACA	GG GGATTTGGCAGAGGATCG
8	G	JHI-Hv50k-2016-99992	T	A	TCTTGCGTGTCTTCTCCTGA	AGAGCAAGCAACGCTCACAGG	GG GGGGCCAAGGGCC
9	B	JHI-Hv50k-2016-100142	A	G	GATCATCGTTGATGCTGCAAA	AAAGGTTGACCATGTATTCAACAGA	GG GGCTCTACTTATAAATGATGTATG
10	G	JHI-Hv50k-2016-100171	G	A	AGGTTTCAGTTGGCCAGGAG	TTCCGGCTCAACCAGACAGATA	GG GGTGCAACTGCAGGTTG
11	D	JHI-Hv50k-2016-100264	A	T	GCATCCGACGAGAAGAACCT	GGGCAGAGAAAATGCAGAGC	CC GGCTTGGCTTAGAATCAAC
12	G	JHI-Hv50k-2016-101315	G	A	TCTGGTGGAGCACACACCTC	GCACCTGGCAACAAGAACACC	CC CCATATGTTGGGTACCA
13	G	JHI-Hv50k-2016-102115	A	C	CGCAGCTTTGGAAGATAGCA	CTTCCTCTTAGTCCAGGGGTTT	CC CCACTATTGCAAGAGTCCCG
14	A	JHI-Hv50k-2016-103074	C	G	CTGGCATCGCGCCTATTTAT	ACTGCACAGCCCTCCAGATT	CC CCATTGTGGTGTTCCTTATG
15	G	JHI-Hv50k-2016-103364	G	A	ACGGTTTCCAGCAACAGCTT	CTCAGCCATGTGACGAGGTC	GG GGCTCTTTGCTAAGATGTATAAG
16	A	JHI-Hv50k-2016-111554	A	G	CATGGCAGCAAATTCATCAAA	CCAAATTACGTGCACATGGCTGT	CC CGACTTGTTTGGTCTGTCTG
17	G	JHI-Hv50k-2016-231258	A	C	TAAGCCAACTTTGCCAGGT	GGATTGCCCAAGCTATGGAAC	GG GGACTTCGTTCCAGCAG
18	A	JHI-Hv50k-2016-231536	G	C	CGCTTTTCTCGTGTGTTGCTG	AGCAGCCACTCGTACCTTCC	GG GGTCACTTCGTTTTTGTG
19	G	JHI-Hv50k-2016-231681	A	G	CGCGCATCTCCTGAAACATA	GCCATCCCCTCCCTCATC	CC CCACACATGGCAGAGATG
20	E	JHI-Hv50k-2016-262937	C	A	GCTCATGTGCGCAATGTTTT	TTGAAGCTTTGCGTTGCAGT	CC CCATCGTTCTGGGTTACAG
21	A	JHI-Hv50k-2016-263046	G	A	CCCAAATTTGCATGCGGAGTA	ACGAGCCTTCACAGGGTGCCCT	CC CCTTTGATGGCAAGAAGAG
22	D	JHI-Hv50k-2016-263895	A	C	ACACGGAGAAAGGTGGAGCTG	GCATGGGTAGGCTGGGTAAA	GG GGTTAATTTGTTACCGCCG
23	A	JHI-Hv50k-2016-265457	C	G	AACAAGGAGAGCTGCGTGAGC	GCTTCCAACTTTCCGCTGGAT	CC CCCTAGATAAAAGTAGGTGTTG
24	A	JHI-Hv50k-2016-273727	A	C	CCGGCACCAGGATAATAAC	GGCGGTGCTAATCTGGAAGTG	CC CTGACAGTTGAATATGCC
25	G	JHI-Hv50k-2016-273925	G	A	CTACTGGCCCGGAAATGAA	TGACGGTGATAGGGAAGACA	CC CCACCTTTGAGTCATGTGTG
26	H	JHI-Hv50k-2016-280010	G	A	AGCGGTGCGGTGGACCTAATA	ACGAAGCATTTGCGGCTGAT	CC GCGCTTTTATACACACTTACTG
27	G	JHI-Hv50k-2016-286527	A	G	GAGCTGTTGGGCGAGTCATT	AGTCTCGGGTTCGCTTTCAG	CC CCGTGTGGCTGTTCCG
28	G	JHI-Hv50k-2016-290458	A	G	GGAAGCTGGGTAAAGCGGTTT	CCCTTTTCTAATGAAGCACCA	GG GGAGCTTCTCAACTGGAGG
29	G	JHI-Hv50k-2016-292116	C	A	GGGTCAATTCGGAAGAAACCA	CCTGCTCCTCCTCCTCTGAC	CC CCGCGTGTGCTTTGAGC
30	A	JHI-Hv50k-2016-292856	A	G	GCTTCCCAGGCGGAAAGAGT	GGGAGCACCTTTTGCATTC	CC CGAATGCGAGTAGCTACCTTG
31	A	JHI-Hv50k-2016-293775	A	T	CTAGCACCAACCCAGCAAC	GGAAAGAGTCTGAGGCCATC	GG GGATAGAGAAAAATATCAACATCT
32	G	JHI-Hv50k-2016-294528	A	C	TGGCTTCGACTTTGAGAATCG	ACAGCCCTCGAGCAAGTTTC	CC CCGCGGTGCAAAAGG
33	A	JHI-Hv50k-2016-295227	A	G	GTTTGGCTCCCATTTCTCCA	TCAATGCCGGTCTTCATGTC	GG GGCTTTGATGTAAAATGAAAGG
34	A	JHI-Hv50k-2016-296636	A	G	GCATGTGGATACCTGGTGGA	TGAGAAACGCGGCGATCTATG	CC CCGACGCCCCCG
35	G	JHI-Hv50k-2016-297256	A	G	GCCTGTCTCTTTGCGCTCCTT	TGGACCTCCTCCGGGTATAA	GG GGGTCCGAAAATAGTCTG
36	G	JHI-Hv50k-2016-297727	A	G	CCAAACATCAGCCTCACTGG	CCTGCAGGCAAGCAATCAC	CC CGGTTGATATTTATAGGTAGTTG
37	A	JHI-Hv50k-2016-297922	G	C	CACCTGGTATCGTCCACCA	GCACGGATACATGAGGTCCA	GG GGCAACATCTACAGCCG
38	D	JHI-Hv50k-2016-298746	C	A	AGATCGCTTGTGAGGCTCCTT	AGTGCAAGGATTTCCACAGG	GG GGAATCTCATAGAAGGTTTTG
39	A	JHI-Hv50k-2016-299910	G	A	TCTGCACCTGGGTTATGAA	TTGGAACATGAGGTGGCAAG	GG GGAGCTTTGGAGAAGAGG
40	G	JHI-Hv50k-2016-301520	G	A	TGCTTCATTCGGAATTTTG	CAGAAGTGCCATGAGCGAGT	CC CCCACAGGCATATGGTTG
41	G	JHI-Hv50k-2016-302708	A	G	CAGGCTGTTTGGTCACTGT	TCATGTTTTTTCGCGGTTGTG	CC GGCTAATGTTTCATCGCATG
42	G	JHI-Hv50k-2016-304090	A	G	GCAAAGGCTGTGAGCTGAAC	TACCGTCTTCTCCCTCTGCG	GG GGCGATCAGCTCAAGGG
43	D	JHI-Hv50k-2016-304202	A	G	GTGTGTGTAGGCTTGTGTTG	ATAGAACGATGCGGGGTTTG	GG GGCGATCATCTCCTCCG
44	G	JHI-Hv50k-2016-304304	A	G	ATCATCCATGGGTTCTGCT	CATTGAAGAACACGCGGCAAA	GG GGCCAGTCAAGTGAAACG
45	G	JHI-Hv50k-2016-304643	A	G	GTCTTGAACACCGCCTCCTT	GCCACTGCCATCGATATTTCA	GG GGTGTATACCTCTTGCAAG
46	H	JHI-Hv50k-2016-305138	A	G	AACACCTTGTCTCAACCCCTA	ACTATGCCCAAGGCAAGGA	GG GGCGAGAGGCGGAGAG
47	A	JHI-Hv50k-2016-305567	A	G	CCTGGCTGTTGCAAAATCAT	TGCTTGCACCGCTAGAGGTA	CC CCGGCCAATCTCAGCG
48	G	JHI-Hv50k-2016-306334	G	A	TTTTTTGTACGCGTGAAGTTTG	CATAATGTCGGGCTCACCAA	GG GAGAATAAAGTCAACCGG
49	G	JHI-Hv50k-2016-308611	G	A	TGAAGCATGTTGCAAGGTTT	CCTGGGAGCTCCAATTCATT	GG GGAATTTGCTTGGTAACG
50	G	JHI-Hv50k-2016-310164	G	A	GCCATGAAATATGAGGCGAAA	GTTGGTTCTCGGACCATGT	GG GGAAGAAATCGTACCCTG
51	G	JHI-Hv50k-2016-310437	A	G	TTTGGAGTCTCAAACCTCGATCA	TGAAGCAGCAGCAGAAAGGA	GG GGTTTTCTCACAAAAGACAG
52	D	JHI-Hv50k-2016-460479	G	C	TGCCCATCTGGAATAACCC	TCGTTGAGCATGTTTGGACA	GG GGGACTTTTAAAGCCATTTAG
53	A	JHI-Hv50k-2016-465187	C	G	CCTGTTTGTCTGGACAAAACG	AAGCGGCGCTACAGGATGTC	CC CGTGTCTATAAGAAGTACTGTAG
54	A	JHI-Hv50k-2016-469406	A	G	CATGGGCACACAGTTTCTCC	TGGAATCGAAACCAACATGA	CC CCGCGATGATCTTGTTCG
55	A	JHI-Hv50k-2016-473439	A	G	TTTGACAAATGGCCACGAAG	CCTCTGCAACCAACACAG	CC CGTAGTCAGCCGCGC
56	G	JHI-Hv50k-2016-474813	G	A	CCTGCACAAAACAGCTGTGAA	AACCCAAAGGCCACCAACAC	CC CGAGACGCCCTGAAGG
57	G	JHI-Hv50k-2016-475592	G	A	GAGCGCATGGTTTCTATTCA	CGTGTGGGCTACCTTCTGTG	CC CCGGCGCTGCTTGTG
58	D	JHI-Hv50k-2016-475633	A	G	GATGATCCGAGCCCTGCTAC	TGACCCACATGAGCTTGAAGT	GG GGTTTGGGAAATAATGTATG
59	D	JHI-Hv50k-2016-475677	G	C	AATGGCAGGTGGAACACACA	GCCTGCTGACCCTGTTTAGG	GG GGCCACGCAACAGCA
60	D	JHI-Hv50k-2016-475711	C	A	AGAGGGGATAGCGGGATGAT	CACGCCAATGAGACGGACATT	GG GGTCCCAACCGACACG
61	G	JHI-Hv50k-2016-476567	C	A	TGGTGGACCATCTCCAAGTG	TTGGTTGAGACCCATGCAA	GG GGGCTCCCTCCTGCAAG
62	G	JHI-Hv50k-2016-481098	A	G	GCACGCATGCTGCAGATTAT	AGATAGCTGACAGCCTGGAA	CC CGGCTCTTGTCAAATGTGG
63	A	JHI-Hv50k-2016-483333	G	A	GGGCCAAAGACTCCACATTC	GCTCTTCTCAGAGGGCATC	GG GGTAGAAAATATGTGCAAAAG
64	G	JHI-Hv50k-2016-483699	G	A	AATGCACCTGTGCAGATTTCG	TTGCCTTTTGTGGAAGTGACG	CC CGCTTAAAGGCCACTG
65	F	JHI-Hv50k-2016-484144	A	G	CAGTAATGAGCGCATCAGC	TGTTGTCTCCCAACAAGATG	GG GGCAAGTACCGAAGGTACTAG
66	A	JHI-Hv50k-2016-486919	G	A	TGGCGCTCTTTGATTCTCCA	GGCATTTGCTCGACCATAGA	GG GGCCCTCAATAAGTCTCGGTG
67	A	JHI-Hv50k-2016-487444	A	G	ACGAGTACAGGGAGCCATGC	CGTATTCTCACCCTGTCGT	CC CGGTTTAAAGACACTTATTTTGG
68	H	JHI-Hv50k-2016-488664	G	A	CTCGTTGCCGACATTTGGAT	TGACAATTGACACACGCATCA	GG GGATGGGACAGGGCG
69	A	JHI-Hv50k-2016-489384	G	A	CCAGGCCGATTATTGCTTGAA	TGACCACAAGTCCACAACCA	GG GGACTGGTCTGTGGTTCG
70	G	JHI-Hv50k-2016-491428	G	A	CCTGCTGGACATGCAACATT	GCTTCAATTGGTAGGCTGTGG	CC CCGTGGTCCACTCCTCG
71	A	JHI-Hv50k-2016-491720	A	G	CCACATCAGGGTTCATCATGC	AAGCTTGGGCTGAGTTCAC	CC CCGTTGGAGACAGATCG
72	G	JHI-Hv50k-2016-492998	G	A	GCGGTGTGCAACATATTGGT	GAGCAGCGATCTCATCATCG	CC CCGATTATACAAGTGAAGAAG
73	A	JHI-Hv50k-2016-499282	A	G	GGCAAGGAACTGGGTATGGA	CTCGAGATCCAAGGTTGCAC	GG GGGGCTTAGTAGTTGTGTG
74	G	JHI-Hv50k-2016-503694	A	G	ATTGCCTCACTGCAGGAACTT	ATGGTTGTGGTTGCTTGC	GG GGTTGCTGCAGATGCG
75	D	JHI-Hv50k-2016-516439	A	G	CTGGATGTGAGGCTGCAAG	TCAGGCATCTGCCTATGTGG	GG GGATCAATTAGTATTAGTATTAGGTG
76	C	JHI-Hv50k-2016-518900	A	G	ACACTCAACCTACGGAGGAAATG	GTGGCATCTGTGGGCATA	CC CCGGGTCCGCTCTGGG
77	G	JHI-Hv50k-2016-519729	C	A	CGATGCGATGGAGAAACAA	CAGATTTTGACGCGAGATG	CC CCGGACGATGCCAGGAG

1) 判別結果は第 2 図に対応

2) SNP 位置情報を含む検出プローブの名称は Bayer *et al.* (2017) による

3) Y は「吉系 15」, K は「きぬゆたか」

4) プライマーの塩基配列はいずれも左から右に向かって 5' から 3' 方向

5) as プライマーの一重下線部分は 5' 尾部に付与した GC 配列, 二重下線部分は標的 SNP

の決定はbarley 50K iSelectアレイ (Bayer *et al.* 2017) プローブ情報に従い, Illumina HTS Genotyping Custom BeadChips と HiScan chip imaging platform (イルミナ株式会社) を使用して行った。遺伝子型データは GenomeStudio ソフトウェア (イルミナ株式会社) により解析し, SNP 情報を取得した。

Bayer *et al.* (2017) が報告した SNP プローブ情報を基に, Ensembl Plants (Bolser *et al.* 2016) での BLAST 検索により SNP の前後 300bp の塩基配列情報を取得した。取得した塩基配列を基に, BatchPrimer3 ソフトウェア (You *et al.* 2008) で forward および reverse の 1s プライマー (Hayden *et al.* 2009) を設計した。その際, T_m 値は Hayden *et al.* (2009) に従い 60~65°C (最適値 63°C) に設定し, product size は最適値を 500bp に設定し, その他の変数は規定値のままとした。as プライマーも Hayden *et al.* (2009) に従って設計した。すなわち, SNP を 3' 末端としてその 5' 側の塩基配列に遡りながら, T_m 値が 43~48°C となる一定塩基数の配列を決定し, さらにその 5' 側にゲノム DNA とは相補的でないグアニン (G) もしくはシトシン (C) のアンカー配列を 2 塩基加えて再度 T_m 値を確認し, 最終的な T_m 値が 53°C 前後の配列とした。このように, as プライマーは T_m 値の調整と as 産物の増幅を至適化するため, 5' 尾部領域にゲノム DNA とは相補的でない G, または C を 2~3 塩基程度加える必要がある (Hayden *et al.* 2009)。また, as プライマーと SNP との結合を強化する目的で, SNP アリルの片方もしくは両方に G または C が含まれる場合は, それらを優先して標的アリルとした。SNP アリルの両方がチミン, アデニンであった場合はいずれかを無作為に標的アリルとした。その結果, 設計した 77 式の as プライマーのうち, 73 式の標的アリルが G または C となった (第 1 表)。第 2 図では標的アリルを持つ親を a, 標的アリルを持たない親を b とした。なお, BatchPrimer3 は任意の塩基配列について T_m 値を計算できないため, as プライマー作成時の T_m 値の確認には任意の塩基配列について T_m 値が計算可能な NetPrimer ソフトウェア (Premier Biosoft International) を使用した。プライマーの合成は北海道システム・サイエンス株式会社に, OLIGO KIDS (15nmol スケール), ゲル濾過精製グレードで依頼した。

2 TSP の基本反応条件

TSP の反応は Go Taq®Green Master Mix (プロメガ株式会社) を 5 μ L 使用し, 2 種類の 1s プライマーと 1 種類の as プライマー, DNA 溶液を添加した後に滅菌蒸留水で全量 10 μ L に調整した系で行った。プライマー量は 1s プライマーを終濃度 0.1 μ M ずつ, as プライマーを終濃度 0.5 μ M とした。DNA は 3 葉期のオオムギの展開葉を材料とし, DNeasy Plant Mini Kit (株式会社キアゲン) により抽出し, 10 μ L の TSP 反応に 10ng を用いた。ヘテロ試料は濃度が同一な標的アリル親 a と標的アリルを持たない親 b の DNA 溶液を, 等量ずつ混合して調整した。TSP の温度条件は 95°C 10 分の後, 第一段階として 94°C 30 秒, 58°C 30 秒, 72°C 60 秒を 15 サイクル, 第二段階として 94°C

10 秒, 45°C 30 秒を 5 サイクル, 第三段階として 94°C 30 秒, 53°C 30 秒, 72°C 5 秒を 15 サイクルとした。電気泳動には 2% アガロースゲルを用い, 反応後の溶液 9 μ L を泳動に供した。

3 as プライマー量の検討

反応液中の as プライマーの終濃度を 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 μ M の範囲で調整し, その他の反応液組成, 温度条件は基本反応条件と同一とした。

4 共優性マーカー化に寄与するプライマー設計条件の検討

基本反応条件で共優性マーカーとならなかった場合の要因として, プライマー設計変数に着目した。Hayden *et al.* (2009) は TSP の二相性を確保するための重要なプライマー設計変数として, 1s プライマーと as プライマーの T_m 値を挙げている。また, as プライマーについては 5' 尾部領域にアンカー配列を付与する前の T_m 値の基準も示している。これらの基準値には 5°C 程度の増減が許容されているが, そのわずかな差異が SNP 判定結果に及ぼす影響について示されていないため, 本報告ではそれらの T_m 値と SNP 判定結果との関連を検討した。また, as プライマーの設計変数として, 標的 SNP の 5' 側配列によりある程度決定される as プライマーの塩基数と SNP 判定結果との関連も検討した。1s プライマーの T_m 値については, 設計時に BatchPrimer3 から自動出力された値と, 設計後の塩基配列を再度 NetPrimer に入力して算出した値を用いた。as プライマーの T_m 値はプライマー設計時に NetPrimer で算出した値を用いた。また, 比較対象とした Hayden *et al.* (2009) が報告した TSP 用プライマーセットの T_m 値については, 当該塩基配列を NetPrimer に入力して算出した。

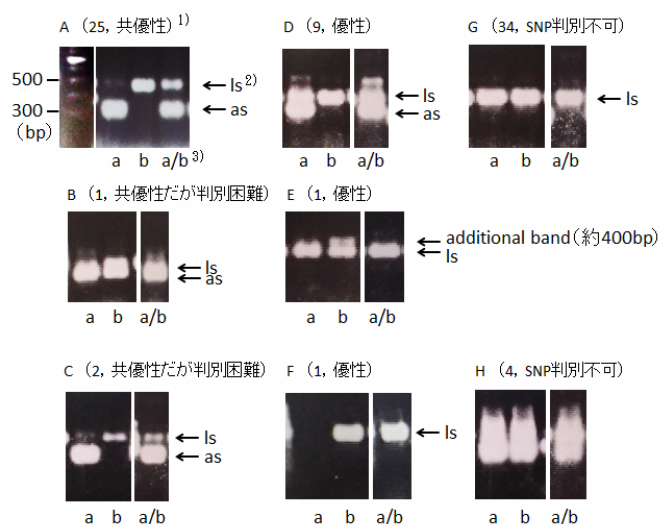
結 果

1 基本反応条件での SNP 判別結果

77 箇所の SNP 情報を基に作製した 77 式の TSP プライマーセット (第 1 表) について, Hayden *et al.* (2009) に従った基本反応条件により標的 SNP の判別の可否を検討したところ, 共優性のバンドパターンを示したプライマーセットは 28 式あった (第 2 図 A, B, C)。その中でも 2% アガロースゲルで 1s バンドと as バンドが明確に分離され, 双方のバンドが鮮明に検出されたものは 25 式であった (第 2 図 A)。また, 優性のバンドパターンを示したプライマーセットは 11 式 (第 2 図 D, E, F), SNP の判別ができなかったプライマーセットは 38 式であった (第 2 図 G, H)。

2 as プライマー量の増減による効果

as プライマー量の増減により優性マーカーを共優性マーカー化できるか検討した (第 2 表)。まず, as プライマーの終濃度が 0.5 μ M の反応液組成において, 標的アリル親 a で as バンドは鮮明に検出されたものの, 標的ア



第2図 電気泳動後のバンドパターンによる分類

- 1) () 内にマーカー数, SNP 判別の結果を示す
- 2) 「ls」は locus specific バンドを, 「as」は allele specific バンドを示す
- 3) 図下部の a, b, a/b はそれぞれ標的としたアリルを持つ親, 標的アリルを持たない親, ヘテロ試料を示す

第2表 反応液中の as プライマー濃度と SNP 判別結果

マーカーNo. ¹⁾	asプライマー濃度 (μM)				
	0.1	0.3	0.5	0.7	1.0
4	A(共優性) ²⁾	A(共優性)	C(判別困難)		
76	優性 ³⁾	F(優性)	C(判別困難)		
11			D(優性)	A(共優性)	A(共優性)
22			D(優性)	A(共優性)	A(共優性)
43			D(優性)	A(共優性)	D(優性)
52			D(優性)	A(共優性)	D(優性)
58			D(優性)	D(優性)	D(優性)
59			D(優性)	H(×)	H(×)
60			D(優性)	F(優性)	F(優性)
75			D(優性)	A(共優性)	D(優性)
2			G(×)	G(×)	G(×)
3			G(×)	G(×)	G(×)
8			G(×)	A(共優性)	D(優性)
10			G(×)	G(×)	G(×)
12			G(×)	G(×)	G(×)
13			G(×)	G(×)	G(×)
15			G(×)	G(×)	G(×)
17			G(×)	G(×)	G(×)
19			G(×)	G(×)	G(×)
25			G(×)	G(×)	G(×)
27			G(×)	G(×)	G(×)
28			G(×)	G(×)	G(×)

- 1) マーカーNo. は第 1 表に対応
- 2) アルファベットは第 2 図に示したバンドパターンに対応, ×は SNP 判別不可を示す
- 3) 第 2 図では示していない新たなバンドパターン

リルを持たない親bではlsバンドが不鮮明であり共優性での判別が困難であった 2 式のプライマーセット (第 2 図 C) を供試対象とした。これらのプライマーセットでは, 親 b およびヘテロ試料で ls バンドが薄かったことから, ls 産物の増幅に対し as 産物の増幅の競合度合が強

すぎると予想された。したがって, as 産物の競合度合を弱める目的で as プライマーの終濃度を 0.1μM および 0.3μM とした。その結果, 1 式は 0.3μM で共優性マーカーとなった (第 2 表)。続いて, 標的アリル親 a で ls バンドが鮮明に検出されたため共優性とならなかった 9 式のプライマーセット (第 2 図 D) のうち, 8 式を供試対象とした。これらのプライマーセットでは親 a においても ls 産物が増幅されたことから, ls 産物の増幅に対し as 産物の競合度合が弱すぎると予想された。したがって, as プライマーの終濃度を 0.7μM および 1.0μM とした。その結果, 5 式が 0.7μM で共優性マーカーとなった (第 2 表)。

さらに, 両親ともに ls バンドが検出され, 標的アリルを持つ親で as バンドが検出されず SNP 判別が不可能であった 34 式のプライマーセット (第 2 図 G) のうち, 12 式を無作為に選んで供試対象とした。これらのプライマーセットについても ls 産物に対して as 産物の競合度合が弱すぎると予想されたため, as プライマー濃度を 0.7μM および 1.0μM とした。その結果, 1 式は 0.7μM 共優性マーカーとなったが, 残り 11 式のバンドパターンは変化しなかった (第 2 表)。

3 共優性マーカー化に寄与するプライマー設計条件の検討

共優性パターン (第 2 図 A) を示した 25 式のプライマーセット (第 3 表 A 群) と優性パターン (第 2 図 D, E, F) を示した 11 式のプライマーセット (第 3 表 D-F 群), および SNP 判別ができなかった (第 2 図 G) 34 式のプライマーセット (第 3 表 G 群) について, プライマーの設計に関与する変数を比較検討した (第 3 表, 第 3 図)。また, 比較対象として Hayden *et al.* (2009) がプライマー塩基配列情報と共に報告したオオムギの共優性 TSP マーカー 87 式の変数 (第 3 表 Ha 群, 第 3 図 Ha) も算出した。なお, Hayden *et al.* (2009) を含め, 既報の TSP マーカー開発事例では共優性マーカーのみが報告されており, 優性マーカーや SNP 判別が不可能なプライマーセットについては塩基配列情報が無いため, 今回は先述の共優性マーカー 87 式のみを比較対象に加えた。

まず, ls プライマーの作成時に BatchPrimer3 により自動出力された Tm 値 (第 3 表変数①) について検討したところ, 共優性マーカーの A 群と比較して優性マーカーの D-F 群, SNP 判別ができなかった G 群の間に有意差は無く, いずれの群の平均値も 62℃程度であった。続いて, BatchPrimer3 とはアルゴリズムの異なる NetPrimer により, 個別の ls プライマーについて改めて Tm 値を算出し, 群毎の平均値を整理した (第 3 表変数②)。その結果, 共優性マーカーの A 群と比較して優性マーカーの D-F 群, SNP 判別ができなかった G 群の間に有意差はなかったものの, 各群の平均値は BatchPrimer3 による算出値より 2.5℃程度低くなった。既報の共優性マーカーである Ha 群については, その平均値は 62.3℃となり A 群の平均値より有意に高かった。

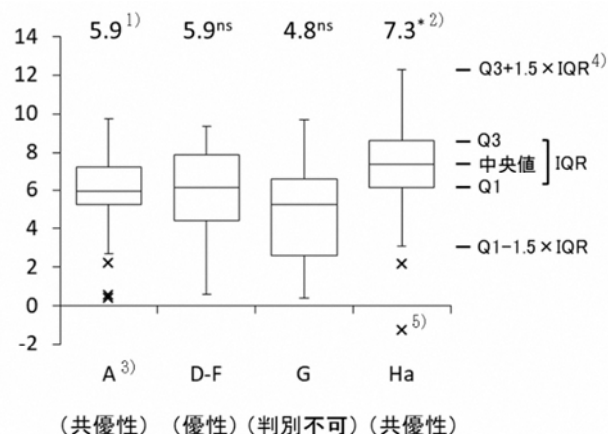
また, NetPrimer により as プライマーの Tm 値を算出

したところ (第 3 表変数③), 共優性マーカーの A 群と優性マーカーの D-F 群との間に平均値の有意差は無かった。一方, SNP 判別ができなかった G 群の平均値は, 有意差は無かったものの A 群の平均値と比べて 1.1℃高かった。また, 既報の共優性マーカーである Ha 群の平均値も, A 群の平均値より 1.6℃有意に高かった。続いて as プライ

第 3 表 SNP 判別結果ごとに分類したプライマーセットの設計変数

変数 ¹⁾	A群 (n=25, 共優性)		D-F群 (n=11, 優性)			G群 (n=34, 判別不可)			Ha群 ²⁾ (n=87, 共優性)	
	標準 平均値	標準 偏差	標準 平均値	標準 偏差		標準 平均値	標準 偏差		標準 平均値	標準 偏差
①	62.0	0.5	62.0	0.3	ns	61.9	0.4	ns	n.d. ³⁾	n.d.
②	59.3	0.7	59.4	0.6	ns	59.3	0.7	ns	62.3	0.7
③	53.4	2.4	53.5	2.6	ns	54.5	2.4	ns	55.0	2.0
④	44.4	2.1	44.7	1.2	ns	44.2	1.7	ns	44.7	2.5
⑤	19.4	2.5	19.5	2.7	ns	18.0	2.2	†	19.6	2.1

- 1) 変数は①: BatchPrimer3 で算出した 1s プライマーの Tm, ②: NetPrimer で算出した 1s プライマーの Tm, ③: NetPrimer で算出した as プライマーの Tm, ④: GC 配列を除いた as プライマー配列について NetPrimer で算出した Tm, ⑤: as プライマーの塩基数
- 2) Ha 群の数値は Hayden *et al.* (2009) のプライマー配列情報より算出
- 3) BatchPrimer3 では任意の配列について Tm 値を計算できないため, Ha 群の変数①は無し
- 4) **, † は A 群に対する dunnett の多重比較検定によりそれぞれ 1%, 10% 水準で有意, ns は有意差無し



第 3 図 変数⑥: 1s プライマーの Tm 値と as プライマーの Tm 値の差

- 1) 図上部の数値は各群の平均値を示す
- 2) * は A 群に対する dunnett の多重比較検定により 5% 水準で有意, ns は有意差無し
- 3) 図下部に電気泳動パターンによる分類と SNP 判別結果 (第 2 図) を示す
- 4) Q1 は第一四分位数, Q3 は第三四分位数, IQR は四分位範囲を示す
- 5) × は外れ値を示す

マーの 5' 尾部領域に GC 配列を付与する前の塩基配列について NetPrimer により Tm 値を算出し (第 3 表変数④), 各群間で比較した。その結果, 共優性マーカーである A 群の平均値と他の 3 群の平均値の間に有意差は無かった。

as プライマーの塩基数 (第 3 表変数⑤) についても各群について平均値を比較した結果, 共優性マーカーの A 群に対して優性マーカーの D-F 群, 既報の共優性マーカーの Ha 群は有意差が無かった一方, SNP 判別ができなかった G 群は A 群に対して有意に 1.4 塩基少なかった。

さらに, NetPrimer で算出した Tm 値を用い, 1s プライマーの Tm 値と as プライマーの Tm 値の差について検討した (第 3 図, 変数⑥)。各群の平均値を比較した結果, 共優性マーカーの A 群に対して優性マーカーの D-F 群と SNP 判別ができなかった G 群は有意差が無かった。しかしながら G 群の平均値は A 群の平均値より 1.1℃低く, 分布を比較すると全体的に数値が低い傾向が認められた。また, 既報の共優性マーカーである Ha 群の平均値は A 群よりも 1.4℃有意に高かった。

考 察

本報告では, 共優性マーカー作製効率は 32.5% (25/77) であった (第 2 図 A)。TSP マーカーを発明したグループによると, オオムギの SNP を対象に TSP マーカーを作製した際は, 最初に設計したプライマーセットの 93% が共優性マーカーとなり, 残りの 7% も as プライマーの標的アリルをもう一方のアリルに変更すると全て共優性マーカーになったと報告されている (Hayden *et al.* 2009)。本報告で共優性マーカーの取得率が低かった要因の 1 つとして, SNP の前後 300bp ずつ, 合計 600bp の塩基配列を基に 500bp 程度を増幅する 1s プライマーセットを設計した点が考えられる。1s プライマーの設計に用いる基の塩基配列の長さについては, TSP マーカーを発明したグループの報告 (Hayden *et al.* 2009, Tabone *et al.* 2009) で具体的な基準は示されていない。しかし, 本報告では基の塩基配列を極端に短くした結果, Tm 値の条件に合致しないために設計可能な 1s プライマーセットが制限され, そのため共優性マーカーの作製効率が低くなったと推察される。この点については, 基の塩基配列を 700bp 以上に長くしてプライマーセットを設計した場合, 共優性マーカーの取得率がどのように変動するか検討する必要がある。

as プライマー終濃度の調整により, 当該濃度が 0.5μM の反応液組成において C, D (第 2 図) のバンドパターンを示したプライマーセットは 60% (6/10) が共優性となった (第 2 表)。従って, このようなプライマーセットについては, 1s バンドと as バンドの強弱を見て as プライマー量を調整することで, 約半数が共優性となると推察される。一方, as プライマーの終濃度 0.5μM で G (第 2 図) のバンドパターンを示したプライマーセットについては, as プライマー量を調整した場合も共優性とならないものが多かった (第 2 表)。従って, このようなプ

ライマーセットに関しては、as プライマーの量ではなく、配列や Tm 値など as プライマーの設計段階の不具合により as 産物の増幅に支障が生じたと推察される。as プライマー量の調整により、最終的には 41.6% (32/77) の効率で共優性の TSP マーカーが作製できた。なお、今回は as プライマーの終濃度が 0.3 μ M または 0.7 μ M で共優性パターンが多く得られたため、as プライマーの終濃度 0.5 μ M で共優性とならなかった場合、まずは当該濃度を 0.3 μ M または 0.7 μ M の条件で再度検討するのが効率的であると思われる。

as プライマー量の調整効果については、Röltgen *et al.* (2012) が *Mycobacterium ulcerans* を対象に 1 箇所の SNP に関する 10 種類のハプロタイプ試料を用いて検討している。Röltgen *et al.* (2012) は、本報告の第 2 図 D に相当するバンドパターンを示したプライマーセットについて、as プライマーを 0.25～1.0 μ M の範囲で調整した結果、最適な as プライマー終濃度は 1.0 μ M であると報告しており、as プライマー量を増加させることで共優性パターンとなった点は本報告で見出した傾向も同じである。

共優性マーカーの作製効率をさらに高めるため、as プライマー量を終濃度 0.5 μ M とした際の電気泳動パターンにより 77 式のプライマーセットを分類し、プライマーの設計に関する変数について検討した。NetPrimer で算出した ls プライマーの Tm 値と as プライマーの Tm 値の差 (変数⑥、第 3 図) については、SNP 判別ができなかった G 群の平均値が他の 3 群に比べて低い傾向であったことから、この変数⑥を一定値以上に保つことで共優性マーカー作製効率を向上できると考えられた。TSP は、ls プライマーと as プライマーの Tm 値の差を利用して、ls 領域の鋳型増幅と、増幅した ls 領域への as プライマーの結合を別々に行うことから始まる (Hayden *et al.* 2009, Tabone *et al.* 2009)。そのため、変数⑥が小さい場合は、アニーリング温度を下げて as プライマーを ls 領域に結合する段階に支障をきたすものと考えられる。第 3 図によると、共優性の TSP マーカーを作製するうえで変数⑥の数値は 6～8 が適正であると考えられる。

プライマー設計の他の変数のうち、変数③ (第 3 表) の NetPrimer で算出した as プライマーの Tm 値の平均値については、A 群と比較して G 群は高い傾向が認められた (第 3 表)。ls プライマーの Tm 値については、NetPrimer による算出値 (第 3 表変数②) で A 群と G 群の間に有意差は無かったため、変数③が高くなることで、先述した変数⑥の ls プライマーの Tm 値と as プライマーの Tm 値の差 (第 3 図) が小さくなる。そのため、as プライマーの Tm 値も基準である 53°C (Hayden *et al.* 2009) を大きく上回らないように留意する必要がある。しかしながら、実際の設計場面では as プライマーの Tm 値は標的 SNP の 5' 側の塩基配列によりある程度決定してしまうため、その領域が GC リッチであれば基準値より高くなりやすく、厳密な調整が不可能である。また、as プライマーの 5' 側に付与する GC アンカー配列も、鋳型とは相補しない配列とするため配列パターンが限定され、この GC アン

カー配列の内容によっても Tm 値が多少高くなる場合がある。このように標的 SNP によっては as プライマーの Tm 値の調整が難しいため、SNP 情報が豊富にありマーカー間の連鎖距離に支障が生じない場合は、as プライマーの Tm 値が基準値近くとなるように、近傍にある別の SNP を標的とすることが望ましい。標的 SNP を変更できない場合の対応として、as プライマーを設計時に 5' 側にアンカー配列を付与する前の Tm 値を 48～54°C とやや高めにし、アンカー配列を G、C ではなくアデニン、チミンで設計して Tm 値の上昇程度を抑え、最終的に as プライマーの Tm 値を 53～56°C として SNP 判定に成功した事例もある (Huang *et al.* 2011)。標的 SNP を変更できず、かつ as プライマーの Tm 値が基準値を上回る場合は、ls プライマーの Tm 値をやや高めに設計し、相対的に変数⑥ (ls プライマーの Tm 値と as プライマーの Tm 値の差) の数値を大きくする方法もある。実際、本報告で解析対象に加えた Ha 群は、変数③の as プライマーの Tm 値が基準値である 53°C より高く (Hayden *et al.* 2009) G 群とほぼ同じ値であったが (第 3 表)、ls プライマーの Tm 値 (変数②) は A 群、D-F 群、G 群と比較して 3°C 程度高く (第 3 表)、結果として変数⑥の NetPrimer による ls プライマーの Tm 値と as プライマーの Tm 値の差が高い水準となっていた (第 3 図)。

なお、今回 BatchPrimer3 と NetPrimer で ls プライマーの Tm 値を算出したが、その数値には 2.5°C 程度の差異があった (第 3 表変数①、変数②) ため、ls プライマーの設計時には as プライマーの設計に用いる支援ソフトウェアで Tm 値を再度確認することが必要である。

別のプライマー設計基準として、変数⑤の as プライマーの塩基数も A 群と比較して G 群で有意に少なかった (第 3 表)。本報告では as プライマーの塩基数と共優性マーカー化との関係を実証していないが、当該塩基数については Huang *et al.* (2011) が指摘しており、その必要数は 5' 側のアンカー配列を除いて最低 15 塩基、アンカー配列を含めて最低 17 塩基としている。as プライマーを設計する際、標的 SNP によってはその近傍の配列が GC リッチなために Tm 値が高くなりやすく、Tm 値の基準を優先すると as プライマーの塩基数が短くなる。標的 SNP が変更できない場合は、Tm 値が基準より高くとも塩基数が 17 を下回らないよう設計し、かつ ls プライマーの Tm 値をやや高く設計し、ls プライマーの Tm 値と as プライマーの Tm 値との差を 6～8°C になるよう設計した場合について、共優性マーカー取得効率を検討する余地がある。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、TSP マーカーの作製をご指導頂きました次世代作物開発研究センター 基盤研究領域 育種法開発ユニット 上席研究員の石川吾郎博士、ならびに SNP 情報を提供頂きました岡山大学 資源植物科学研究所 教授の佐藤和広博士に深謝いたします。

引用文献

- Bayer MM, Rapazote-Flores P, Ganai M, Hedley PE, Macaulay M, Plieske J, Ramsay L, Russell J, Shaw PD, Thomas W, Waugh R (2017) Development and evaluation of a barley 50k iSelect SNP array. *Front Plant Sci.* 8:1792.
- Bolser D, Staines DM, Pritchard E, Kersey P (2016) Ensembl Plants: integrating tools for visualizing, mining, and analyzing plant genomics data. *Methods Mol Biol.* 1374:115-140.
- Cha RS, Zarbl H, Keohavong P, Thilly WG (1992) Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl.* 2:14-20.
- Collard BC, Mackill DJ (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363(1491):557-572.
- Hayden MJ, Tabone T, Mather DE (2009) Development and assessment of simple PCR markers for SNP genotyping in barley. *Theor Appl Genet.* 119(5):939-951.
- Huang XQ, Brûlé-Babel A (2011) Development of simple and co-dominant PCR markers to genotype puroindoline a and b alleles for grain hardness in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Cereal Sci.* 53(3):277-284.
- Ishikawa G, Saito M, Tanaka T, Katayose Y, Kanamori H, Kurita K, Nakamura T (2018) An efficient approach for the development of genome-specific markers in allohexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) and its application in the construction of high-density linkage maps of the D genome. *DNA Res.* 25(3):317-326.
- Kai H, Baba T, Tsukazaki M, Uchimura Y, Furusho M (2003) The QTL analysis of hull-cracked grain in Japanese malting barley. *Breed Sci.* 53(3):225-230.
- Konieczny A, Ausubel FM (1993) A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4(2):403-410.
- Liu J, Huang S, Sun M, Liu S, Liu Y, Wang W, Zhang X, Wang H, Hua W (2012) An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods.* 8(1):34.
- 農林水産省農林水産技術会議 (2007) 農林水産研究開発レポート 21.
- Okayama H, Curiel DT, Brantly ML, Holmes MD, Crystal RG (1989) Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *J Lab Clin Med.* 114(2):105-113.
- Röltgen K, Assan-Ampah K, Danso E, Yeboah-Manu D, Pluschke G (2012) Development of a temperature-switch PCR-based SNP typing method for *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(11):e1904.
- Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M (2014) Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol. Breed.* 33:1-14.
- Tabone T, Mather DE, Hayden MJ (2009) Temperature Switch PCR (TSP): Robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs. *BMC Genomics.* 10:580.
- Tanaka T, Ishikawa G, Ogiso-Tanaka E, Yanagisawa T, Sato K (2019) Development of genome-wide SNP markers for barley via reference-based RNA-Seq analysis. *Front Plant Sci.* 10:577.
- Yamagata Y, Yoshimura A, Anai T, Watanabe S (2018) Selection criteria for SNP loci to maximize robustness of high-resolution melting analysis for plant breeding. *Breed Sci.* 68(4):488-498.
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN (2001) An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29:e88.
- You FM, Huo N, Gu YQ, Luo MC, Ma Y, Hane D, Lazo GR, Dvorak J, Anderson OD (2008) BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics.* 9:253.