

アールスメロンの日持ち性形質(非黄化形質)と連鎖するPCRマーカーの開発

誌名	愛知県農業総合試験場研究報告 = Research bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center
ISSN	03887995
著者名	遠山, 孝通 浅見, 逸夫 大藪, 哲也 矢部, 和則 菅原, 眞治 神戸, 三智雄
発行元	愛知県農業総合試験場
巻/号	32号
掲載ページ	p. 47-52
発行年月	2000年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



アールス系温室メロンの日持ち性形質(非黄化形質)と連鎖する PCRマーカーの開発

遠山孝通*・浅見逸夫**・大藪哲也***・矢部和則***・
菅原眞治***・神戸三智雄*

摘要 : 近年育成されるアールス系温室メロンF₁品種は、収穫期を過ぎても果皮が黄化しにくい形質(非黄化形質)を持つ。育苗時にこの形質を共優性のDNAマーカーを用いて検定できれば、育種の効率化に役立つ。非黄化形質と連鎖するRAPDマーカーC1とCAPSマーカーC2を開発した。C1マーカーは、PCR反応によって非黄化系統「O-3」のDNAから、約700bpのDNA断片を増幅する。C2マーカーは、非黄化系統「O-3」と黄化系統「NAT-2」のDNAから、約838bpのDNA断片を増幅する。「O-3」のDNAからC2マーカーによって増幅されたDNA断片は制限酵素 *A_{lu} I* により454bp、255bp、129bpのDNA断片に切断される。「NAT-2」のDNAから増幅されたDNA断片は、同酵素により454bp、255bp、85bp、44bpに切断される。C2マーカーは、C1マーカーの改良によって得られたものである。C2マーカーと非黄化形質の地図距離は2.9cMであった。

キーワード : 温室メロン、黄化、日持ち性形質、RAPD マーカー、CAPS マーカー

Development of PCR-based Markers Linked to a Long-Shelf-Life-Character 'Non-yellowing' in Muskmelon

Takamichi TOUYAMA, Itsuo ASAMI, Tetsuya OYABU,
Kazunori YABE, Shinji SUGAHARA and Michio KANBE

Abstract : An F₁ cultivar of muskmelon "Aisophy" recently developed has a characteristic of which skin does not easily turn to yellow (non-yellowing) even after passing its proper harvest time. If this characteristic can be detected at the time of seedling raising using a codominant DNA marker, efficiency in the breeding would come to be much higher. Therefore, the authors attempted to develop RAPD marker C1 and CAPS marker C2 that are linked to the non-yellowing characteristic. The C1 marker amplifies the DNA fragment of about 700bp from DNA of the non-yellowing line "O-3" by the PCR response. The C2 marker amplifies the DNA fragment of about 838bp from DNA of the non-yellowing "O-3" and yellowing line "NAT-2". The DNA fragment amplified from DNA of "O-3" by the C2 marker is cut by restriction enzyme *A_{lu} I* to DNA fragments of 454bp, 255bp, and 129bp. The DNA fragment amplified from the DNA of "NAT-2" is cut by the same enzyme to 454bp, 255bp, 85bp and 44bp. The C2 marker was obtained through the improvement of the C1 marker. The map distance between the C2 marker and non-yellowing character was 2.9cM.

Key Words : Muskmelon, Yellowing, Long shelf life character, RAPD marker, CAPS marker

緒言

近年育成されるアールス系温室メロンF₁品種の多くは、収穫期になっても果皮が黄化しにくく（非黄化形質）日持ち性の高い性質を備えているものが多い。非黄化形質を備えた果実は、色玉の発生による流通過程でのロスが削減されることから栽培シェアが急激に増加してきた。果皮の黄化はクロロフィル色素の分解及び黄色色素の合成促進により発生すると考えられており、温室メロンの色玉は、ハンター表色系の黄色度を示す値であるb*値を用いて黄色色素の合成量を測定することで判定される³⁾。メロンは自殖性の作物であり、初期世代において、対象遺伝子が固定した材料を選抜しておけば以後の世代で対象とする形質が分離しないため、限られた育種面積を他の形質の選抜に利用できる。非黄化形質を持つ個体は発芽時にエチレン発生剤であるエセフォンを処理しても根の伸長抑制や根毛の発達が抑制されず、これを利用する選抜技術が開発されている⁴⁾。定植前に非黄化形質を検定できる有用な方法であるが、非黄化形質は完全優性主働遺伝子に支配されている⁷⁾ので、非黄化ホモ型とヘテロ型とを表現型で見分けることは不可能である。また、種子の充実度など形質発現の条件に係わる誤差が生じる場合もある。

DNAマーカーによる育種選抜は、遺伝子型の解析であるため、表現型による解析よりも多くのメリットがあり、有用な農業形質を選抜するためのマーカーが数多く開発されている。一例として、イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子 *Sv-b-1* を検出するSCAR (Sequence Characterized Amplified Region) マーカーが育種選抜に利用されている⁵⁾。

DNAマーカーのメリットの一つとして共優性性があげられる。共優性のDNAマーカーを使用すれば、検定当代で検定個体の遺伝子の接合型が、ホモ接合かヘテロ接合か判別できる。CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)¹⁾ マーカーは、PCRと制限酵素処理を基礎技術としたマーカーで、サザンハイブリダイゼーションによるRFLP解析よりも実験操作が容易である点で、育種選抜に有用な共優性のDNAマーカーとして注目されている。

DNAマーカーでの選抜に使用するDNAのサンプリングはどの生育ステージでも可能なため、DNAマーカーによる選抜でも非黄化形質を育苗時に検定できる。

非黄化形質の育苗段階でのより正確な検定、遺伝子の接合型の検定技術の開発を目的として、非黄化形質と連鎖するRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)¹¹⁾用のC1マーカーを探索し、C1マーカーを用いたPCRによって非黄化形質を持つ個体に特異的に増幅されるDNA断片とそのゲノム周辺領域の塩基配列を解析し、共優性のCAPSマーカー、C2マーカーを開発したので以下に報告する。

材料及び方法

1 供試材料と非黄化形質の評価

アールス系温室メロンF₁品種「アイソフィ」と、その母親系統の「0-3」（非黄化形質導入親）、父親系統の「NAT-2」及び「アイソフィ」を自殖して得られたF₂世代の69個体を用いた。各個体は、1997年2月20日には種し、3月13日に100m²の温室に、うね幅150cm、株間40cm、2条植で定植した。栽培管理、施肥、温室管理は当場の慣行によった。各株は自家受精により収穫時期を揃えるために着果節位を揃えて着果させ、5日以内に交配を終えた。交配後60日が中心日になる6月19日に全果実を一斉に収穫して調査に用いた。収穫後の果実を25℃の恒温室で4日間追熟した後、果実全体を代表する平均的な色合いの部分を選り、直径5mmの側色窓を用いネット間の果皮の黄色度をハンター表色系のb*値で測定した。測定には測色色差計TC-1500MC (東京電色株式会社)を用いた。

2 DNAの抽出と調整

DNAの抽出サンプルには定植後の腋芽の葉身を用い、CTAB法⁹⁾でDNAを抽出した。抽出したDNAを0.8%のアガロースゲルで電気泳動して定量し、10ng/μlの濃度に希釈して調整した。非黄化形質の評価結果をもとに、共試した69個体のうち、果皮の黄化が最も著しかった個体から順に5個体、果皮が最も黄化しにくかった個体から順に5個体を選定し、それぞれ各個体のDNAを等量混合してバルクDNAを作成した (表1)。

3 RAPDプライマーの選抜

テンプレートDNAには、黄化と非黄化のバルクDNAを用い、PCR反応液は、テンプレートDNA10ng、Ampli Taq Gold Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer) 2Unitを含む合計25μlとした。プライマーには、651種類のオペロン社及びブリティッシュコロロンビア大学製の10塩基のプライマーと、オペロン社のOPA1~20とOPB1~20の組み合わせによる400種のプライマーを用いた。PCRにはサーマルサイクラーTP2,000 (Takara)を用い、95℃で10分間処理した後、熱変性94℃30秒、アニーリング35℃2分、伸長反応72℃3分を1サイクルとして45サイクル行い、72℃10分の処理を行った。反応終了後、5μlのPCR増幅産物を、2%のアガロースゲルで電気泳動して分離し、エチジウムブロミドで10分間染色した。

黄化と非黄化のバルク間で多型を示した137種類のプライマーを用いて、再度バルク間でPCR解析を行った。このうちで再現性の高かった1組のプライマーOPA8-OPB16 (以下C1マーカー) について、「アイソフィ」を自殖して得られたF₂世代の69個体のDNAをテンプレートに用いてPCR解析を行い、非黄化形質との連鎖関係を調査した。

4 CAPSマーカーの開発

C1マーカーを用い、「0-3」のDNAをテンプレートにしたPCR反応で増幅される約700bpのDNA断片をpGEM-TEasyベクターシステム (Promega) を用いてTAクローニング¹²⁾し、GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia) を用いてプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドを使用して、クローニングしたDNA断片の塩

表1 「アイソフィ」を自殖して得られたF₂個体の、果皮色とPCRマーカーによる解析結果

F ₂ 個体番号 及 品 種 名	果 皮 色		PCRマーカー		F ₂ 個体番号 及 品 種 名	果 皮 色		PCRマーカー	
	b*値	判定	C1	C2		b*値	判定	C1	C2
48 *	14.7	非黄化	D	H	6	19.3	非黄化	D	H
18 *	15.2	#	D	A	36	19.3	#	D	H
19 *	15.5	#	D	H	67	19.3	#	D	A
34 *	15.6	#	D	H	59	19.6	#	D	H
23 *	16.1	#	D	A	7	19.7	#	D	H
26	16.2	#	D	H	50	20.0	#	D	H
64	16.2	#	D	H	2	20.1	#	D	H
57	16.4	#	D	A	53	20.2	#	D	A
9	16.6	#	D	H	63	20.4	#	D	H
51	16.7	#	D	A	52	20.5	#	D	A
24	16.8	#	D	H	13	20.7	#	D	H
58	16.8	#	D	H	61	20.7	#	D	H
60	17.0	#	D	H	39	21.0	#	D	H
17	17.1	#	D	H	73	21.2	#	D	H
49	17.1	#	D	H	47	21.9	#	D	A
35	17.2	#	D	A	62	21.9	#	D	H
31	17.3	#	D	H	37	24.2	黄化	B	B
72	17.3	#	D	H	14	24.3	#	D	H
33	17.5	#	D	H	74	24.5	#	B	B
40	17.5	#	D	A	3	24.6	#	D	H
56	17.5	#	D	H	32	25.6	#	B	B
38	17.6	#	D	H	16	26.1	#	B	B
20	17.8	#	D	H	30	26.1	#	B	B
22	17.8	#	D	A	29	27.3	#	B	B
27	17.8	#	D	A	12	27.5	#	B	B
68	17.8	#	D	H	76	27.5	#	B	B
45	17.9	#	D	H	21	27.6	#	B	B
66	17.9	#	D	H	28	28.6	#	B	B
54	18.0	#	D	H	69 *	29.1	#	B	B
43	18.3	#	D	H	42 *	30.4	#	B	B
77	18.3	#	D	H	80 *	33.1	#	B	B
71	18.5	#	D	H	75 *	33.2	#	B	B
78	18.6	#	D	H	70 *	36.3	#	B	B
79	18.9	#	D	H	0-3	15.6	非黄化	D	A
25	19.0	#	D	A	NAT-2	27.4	黄化	B	B
41	19.1	#	D	H	アイソフィ	17.6	非黄化	D	H

注 A：「0-3」由来のホモ型、B：「NAT-2」由来のホモ型、H：ヘテロ型、D：「0-3」由来のホモ型又はヘテロ型、C1マーカーで約700bpのDNA断片が増幅されたもの。*：バルクDNAの作成に用いた個体。

基配列を、シーケンサーに (Perkin-Elmer Japan Applied Biosystems373A) を用い、DNAダイターミネーターレディリアクションキット (同前) を使用して、ターミナルシーケンシング反応により決定した。

得られた配列を基にC1マーカーによって「0-3」に特異的に生ずる約700bpのDNA断片の内側を増幅するように設計したプライマー4種、この断片の両外側をTAIL (thermal asymmetric interlaced) PCR法¹³⁾により増幅するためのプライマー17種を作成した (表2)。「0-3」及び「NAT-2」のDNAをテンプレートに用いてPCRを行い増幅されたDNA断片をTAクローニングし、各クローンの塩基配列を解析した。

以上の解析で得られた、塩基配列をもとに、「0-3」と「NAT-2」のDNAをテンプレートに用いてPCR反応を行うと、両種ともに838bpの1つのサイズのDNA断片が増幅され、制限酵素 *Alu*I によって「0-3」に由来するDNA断片が454bp、255bp、129bpの3つの断片に、「NAT-2」に由来するDNA断片が454bp、255bp、85bp、44bpの4つの断片に切断される位置にプライマーME16 (5'-GAAAGCTACGAGTTGTGC-3')、ME18 (5'-TTCGCCTGTTTCTTGCC-3') を設定し、C2マーカー用のプライマー (C2プライマ

ー) とした (図1)。

C2マーカーを用いて、「0-3」、「NAT-2」、「アイソフィ」及び、「アイソフィ」を自殖して得られたF₂世代の69個体のDNAをテンプレートに用いて解析を行った。PCR反応液は、テンプレートDNA10ng、Ampli Taq Gold Taqポリメラーゼ (Perkin Elmer) 2Unitを含む合計25μlとした。PCRは95°Cで10分間加熱したのち、熱変性94°C1分、アニーリング50°C2分、伸長反応72°C3分を1サイクルとして、35サイクル行い、72°C10分の処理を行った。反応終了後、PCR増幅産物15μlを制限酵素 *Alu*I (Roche Molecular Biochemicals) 2Unitを用い37°Cで2時間処理し、反応液の全量にあたる30μlを5%のアガロースゲルで電気泳動して分離し、エチジウムブロミドで10分間染色した。

試験結果

1 非黄化形質の評価

「アイソフィ」と、その両親系統「0-3」及び「NAT-2」の果実を、収穫後25°Cの恒温室で4日間追熟させたの
表2 C1で増幅した約700bpのDNA断片の周辺の

ゲノム塩基配列解析用プライマー

番号	塩基配列
C1マーカー	
OPA08	GTGACGTAGG
OPB16	TTTGCCCGGA
C1 700bp断片の内部増幅用	
ME1	GTAGGCATCAAAGACCGTT
ME2	CTTCGTGTATGGGTAAGAGG
同上NEST用	
ME3	AAACATCATCCGAGG
ME4	ATGTGATGGGTGCTT
TAIL-PCR用	
5' 方向	
ME5	ATGCGAGAGACATCAGAAAGCA
ME6	GAAGTTACCAAGCACCCATCACAT
ME7	GATACTAGGCAACGGTCTTT
3' 方向	
ME8	CTTTTGGTTGTAGATCACTCCTCG
ME9	TCGGATGATGTTTACCTCTTACCC
ME10	GGTTGGATGATGCAGAGATTAAGC
TAIL-PCR外側用	
N1	NGTCGA (G/C) (A/T) GANA (A/T) GAA
N2	GTNCGA (G/C) (A/T) CANA (A/T) GTT
N3	(A/T) GTNAG (A/T) ANCANAGA
TAIL-PCR産物NEST用	
5' 側	
ME14	ATGTTGGCTACTTCGGGT
ME15	GGAGAGAGGAATGGAAGAGC
ME19	CCAAGTTAAGAGTCGA
3' 側	
ME16	GAAAGCTACGAGTTGTGC *
ME17	TTGTCACCTCTCGCTTTG
ME18	TTCGCCTGTTCTTGCCCT *
ME20	ACACACACGAACCGA
ME21	TTCACACACAGACCGA

注 NEST: 解析した塩基配列を基にさらに内側を解析するためのプライマー。

*: C2マーカーのプライマー。

ち測定した果皮色のb*値は、「アイソフィ」が17.6、「0-3」が15.6、「NAT-2」が27.4であった。

「アイソフィ」を自殖して得られたF₂世代の69個体のb*値は、階級値幅2の頻度分布をとると、14.7~22の範囲にあるグループと24~36.3の範囲にある2つに分かれ、それぞれのグループの中で正規分布を示した。黄化バルクにはb*値が29.1~36.3、非黄化バルクには14.7~16.2のF₂個体を用いた(表1)。黄化現象の中身として、緑色の退化(a*値)や、明るさの増加(L*値)も考えられたため、参考にL*値、a*値も測定したが、肉眼観察の結果とはあまり一致しなかった(データ省略)。

2 RAPDプライマーの選抜

黄化、非黄化バルクDNAをテンプレートに、合計1,051種類のプライマーの1次スクリーニングを行った結果、137種類のプライマーにおいて、バルクDNA間で多型が認められた。この内の一つC1マーカーを用いて「0-3」と

「NAT-2」のDNAをテンプレートにして、PCRを行うと「0-3」では、約700bpの1種類のDNA断片が、「NAT-2」では約850bpと約2,500bpの2本のDNA断片が増幅された(図2)。C1マーカーを用いて、「アイソフィ」を自殖して、得られたF₂世代の69個体から抽出したDNAをテンプレートにした解析では、b*値が21.9以下の52個体では、すべての個体に、「0-3」に認められたものとゲル上の同じ位置に約700bpのバンドが認められた。b*値が24.2以上の17個体のうち、15個体で「NAT-2」に認められたものと同じ位置に2本のバンドが認められ、「0-3」と同じ位置の約700bpのバンドが認められた個体は2個体であった(表1)。

3 CAPSマーカーの開発

C1プライマーによって「0-3」に特異的に増幅される約700bpのDNA断片の周辺に相当する染色体領域について、「0-3」では2,580bp、「NAT-2」では2,569bpの塩基配列を解析した(図1)。得られた塩基配列を基にC2プライマーを設定した。「0-3」、「NAT-2」、「アイソフィ」及び「アイソフィ」を自殖して得られたF₂世代の69個体から抽出したDNAをテンプレートに、C2プライマーを用いてPCRを行い反応産物を電気泳動した結果、C2プライマーを設定したときに予測した838bpのバンドが検出された。「0-3」のDNAをテンプレートにC2プライマーを用いたPCR反応で得られた838bpのPCR産物を制限酵素*Alu*Iで切断して電気泳動で分離した結果検出されたバンドは、マーカーを設定した時に予測された255bp、129bp、454bpの3本であった。同様にして「NAT-2」のDNAをテンプレートにしたPCR産物を制限酵素処理した場合には、255bp、44bp、85bp、454bpの4本のバンドが認められた(図2)。

4 C2マーカーによる解析結果

「アイソフィ」を自殖して得られたF₂世代の69個体のDNAをテンプレートにしてC2マーカーによる解析を行った結果、各F₂個体は、「0-3」型に特異的な129bpのバンドを持つ13個体と、「NAT-2」型に特異的な85bpと44bpの2本のバンドを持つ15個体と、「0-3」型、「NAT-2」型の両方のバンドを併せ持つヘテロ型に相当する41個体に分類された。「0-3」型とヘテロ型を示した54個体は、C1マーカーによる解析によって「0-3」に特異的な約700bpのバンドが認められた個体と一致した。また、「NAT-2」型を示した15個体についても、C1マーカーによる解析で約700bpのバンドが認められず「NAT-2」型と判定された個体と一致した(表1)。

考 察

浅見らは、「アイソフィ」を自殖して得られたF₂集団を用いて、観察による黄化とb*値の関係を解析した結果、b*値が25程度以上になると肉眼観察によってもはっきりと黄化が認められたことを報告している²⁾。本試験においても、浅見らによる25に値が近く、該当する個体の無い頻度分布の階級値22~24を、黄化と非黄化を分ける境

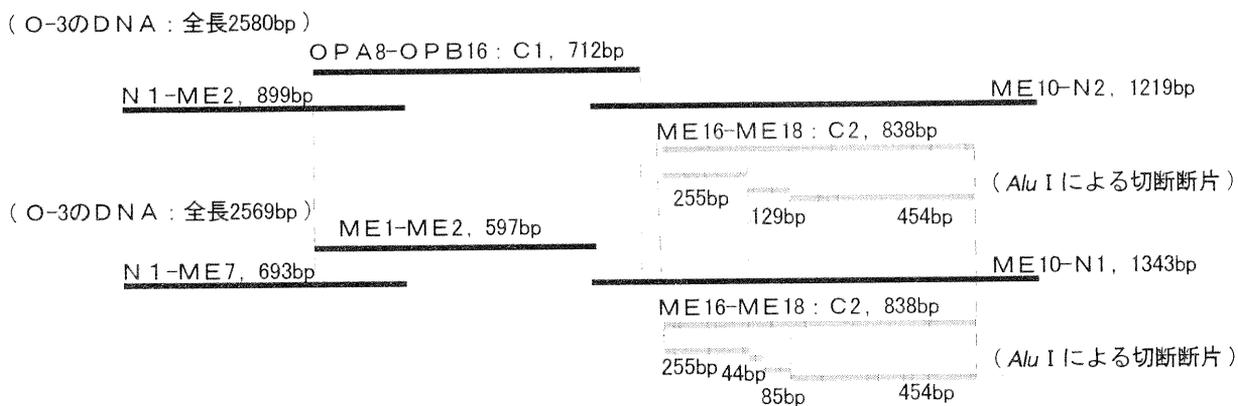


図1 C1マーカーによるPCR産物周辺の塩基配列を解析したクローン及びC2マーカーによるPCR産物と制限酵素処理によって生ずるDNA断片の位置関係

注 図中の記号はプライマーとDNA断片のサイズを示す

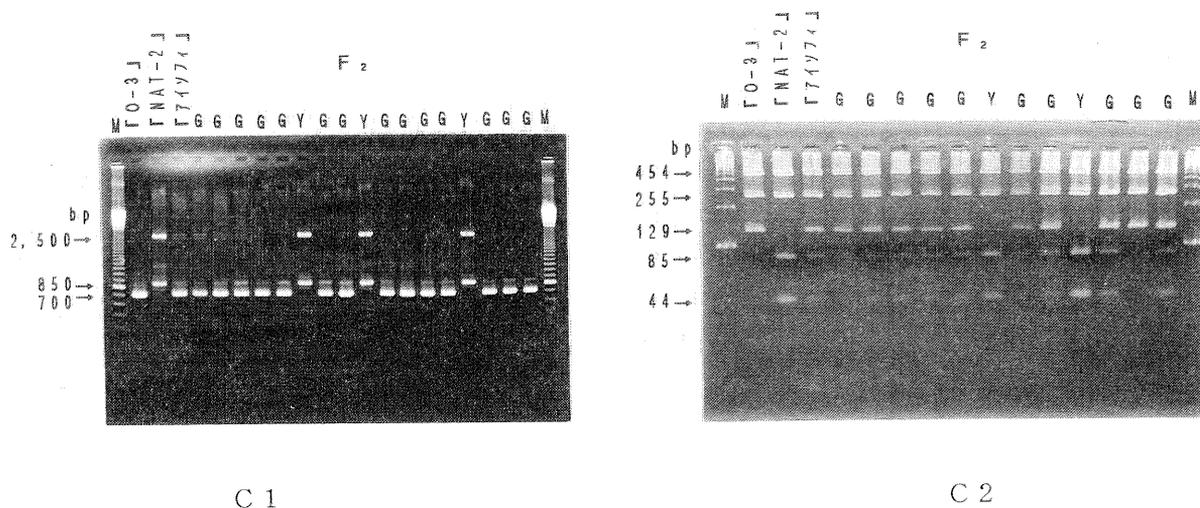


図2 「アイソフィ」を自殖して得られたF₂個体をテンプレートにしたC1、C2マーカーによる多型

注 「O-3」:「アイソフィ」の母親系統で非黄化形質を持つ。

「NAT-2」:「アイソフィ」の父親系統で黄化する。

Y:黄化型 G:非黄化型 M:サイズマーカー(100Base-Pair-Ladder)

表3 非黄化形質、C1、C2マーカーの分離と地図距離
(「アイソフィ」を自殖して得られたF₂集団)

形質 及び マーカー	個体数			χ^2 検定		地図 距離
	P1	H	P2	χ^2	P	
非黄化	52	—	17	0.01	0.95~0.90	—
C1	54	—	15	0.39	0.75~0.50	3.1
C2	13	41	15	2.66	0.50~0.25	2.9

注 地図距離はMapmaker/EXP3.0による。

P1: 非黄化型または遺伝子型が「O-3」の個体。

P2: 黄化または遺伝子型が「NAT-2」の個体。

H: ヘテロ型の個体。

界値とした。この基準によって各F₂個体は、52個の非黄化型と17個の非黄化型に分類された。この場合C1、C2マーカーと非黄化形質の間で組換えが認められた個体は69個体中2個体であった。この2個体はb*値が境界値の24.3と24.6に属するもので、果実の黄化部位にむらがあり肉眼観察からも黄化、非黄化の判定が難しい個体であった。

非黄化形質は優性の主動遺伝子によって支配される形質である^{7,9)}。本試験のF₂集団の分離比は χ^2 検定の結果3:1に適合した(表3)。境界値に近い数個体の判定には不確かさが残るものの、集団全体としては、ほぼ妥当な分類ができていたものと判断した。なお、Mapmaker/EXP3.0(Whitehead Institute for Biomedical Research)で計算したC2マーカーと非黄化形質の地図距離は、2.9cMであった(表3)。

非黄化形質導入親の母親系統の「0-3」は豊橋農業技術センターが、農家の所有していた品種から系統選抜によって育成したもので、由来及び、他の温室メロンとの血縁関係は不明である⁷⁾。一方、「アールスナイト夏系1号」(サカタのタネ育成)と、「夏系15号」(トヨハシ種苗育成)の自殖F₂についてエセフォン処理発芽試験を行うとエチレンの非感受性:感受性が3:1に分離することが知られており⁹⁾、これらの品種の持つ非黄化形質も「アイソフィ」と同種の遺伝子によるものであることが推察される。また、「クレスト春秋系」(横浜植木育成)の自殖によって得られたF₂集団では、C2マーカーによって非黄化固定型またはヘテロ型と判定された個体の果皮色のb*値の平均値は、黄化固定型と判定された個体の同値と明らかに差があり、C2マーカーは「クレスト春秋系」にも適用できるものと考えられた¹⁰⁾。

DNAマーカーを利用する場合、1つの形質を解析するために抽出したDNAを他の形質の検定にも利用できれば、DNAの抽出の手間が省略できるだけでなく生物検定では全く別々の操作の必要な試験が、PCRや電気泳動といった共通の操作で行うことができ実験操作の統一が可能となる。筆者らは、温室メロンにおいて非黄化形質以外の形質のDNAマーカーを開発する試みとして、現在、つる割病抵抗性遺伝子(*Fom-1*)を検出するマーカーの開発を行っている。「アイソフィ」の、父親系統の「NAT-2」はつる割病に抵抗性であるため、今回の試験で用いたF₂集団を材料に利用している。また、つる割病抵抗性と共に近年育成されるF₁品種に必須の形質である、うどんこ病の抵抗性のマーカーの開発も試みられており⁸⁾、このような育種上重要な形質のDNAマーカーが開発が進んだ場合には、C1、C2マーカーの育種利用上の有用性もより一層増すものと考えられる。

謝辞:本研究は、農林水産省技術会議事務局地域研究振興課が主催する、地域先端技術共同研究開発促進事業試験研究により行った。本試験に供試したメロンは、当場の園芸研究所で栽培し、黄化の評価は生物工学部細胞工学研究室で行った。また、メロンのDNAの抽出に際しては愛三種苗株式会社の岩山一敏氏に協力していただいた。ここに記して謝意を表する。

引用文献

1. Andrzej Konieczny, Frederic M. Ausubel. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*. 4(2), 403-410(1993)
2. 浅見逸夫, 朱宮昭男. 日持ち性保有アールス系温室メロンのDNAマーカーによる育種の効率化技術の開発2. アイソフィF₂の成熟特性の解明. 地域先端技術共同研究開発促進事業試験研究成績概要集. 農林水産省農業生物資源研究所. 36-2(1998)
3. 石上清, 高橋和彦, 尾沢義昭, 金田雄二. 温室メ

- ロン果皮の黄化に関する研究. 静岡農試研報. 34, 23-32(1989)
4. 古川一, 塩見桂, 菅原眞治. エセフォン処理によるネットメロンのエチレン感受性の差異の検出. 園芸学雑誌. 66別(1), 360-361(1997)
5. 早野由里子, 斉藤浩二, 藤井潔, 遠山孝通, 辻孝子, 杉浦直樹, 井澤敏彦, 岩崎真人. イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子*Stvb-i*を検出するSCARマーカー. 育種学研究. 2, 67-72(2000)
6. Murray, M. G., Thompson, W. F.. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8, 4321-4325(1980)
7. 小川理恵, 菅原眞治, 伊藤裕朗, 河合仁, 坂森正博, 青柳光昭, 櫻井擁三. 温室メロン新品種「アイソフィ」の育成. 愛知農総試研報. 27, 175-180(1995)
8. 斉藤猛雄, 森下昌三, 平井正志. メロンのうどんこ病抵抗性の遺伝様式とそれに関連したRAPDマーカー. 育種学研究. 48別(1), 111(1998)
9. 菅原眞治, 浅見逸夫, 古川一, 大藪哲也, 朱宮昭男, 落合秀彦. 日持ち性の高いアールス系温室メロンのエチレン感受性による選抜. 農業及び園芸. 73(10), 1098-1105(1998)
10. 遠山孝通. 日持ち性保有アールス系温室メロンのDNAマーカーによる育種の効率化技術の開発. 地域先端技術共同研究開発促進事業試験研究成績概要集. 農林水産省農業生物資源研究所. 31-1(1999)
11. Williams, J. G. et al.. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18, 6531-6535(1990)
12. 安田純. PCR産物の解析 TAクローニング. 蛋白質核酸酵素. 542, 518-521(1996)
13. 吉田薫. 植物のPCR実験プロトコール. 秀潤社. 73-79. (1995)