

研究・技術ノート

## RAPD 分析による栃木県水稻優良品種の品種識別

小林俊一<sup>1,2)</sup>・吉田智彦<sup>3)</sup>

(<sup>1)</sup> 栃木県農業試験場生物工学部, (<sup>2)</sup> 東京農工大学大学院連合農学研究科, (<sup>3)</sup> 宇都宮大学農学部)

**要旨:** 栃木県産米の品質向上及び原種, 及び原々種の混種防止を目的として, 栃木県奨励品種を中心に, 品種登録申請中の栃木 7 号, 及び栃木酒 14 号 (酒造好適米) 等, 合計 20 品種についての RAPD 法による品種識別技術を確立した. これらの品種識別は 7 種類のランダムプライマーを用いて DNA を増幅した後, 1.5% アガロースゲルで電気泳動を行い, エチジウムブロマイド溶液で染色後に現れた 9 種類の DNA マーカーの多型を比較することで可能であった.  
**キーワード:** 水稻, DNA マーカー, 栃木県, 品種識別, RAPD 分析.

栃木県における水稻の生産は, 2003 年度で作付面積が約 65300 ha, 収穫量は作況指数が 92 であったが 316700 t であり本県農業産出額の 1/3 を占める基幹作物となっている (栃木県農務部 2004). 品種の構成は良食味であるコシヒカリが約 8 割, 次いで県南を中心に縞葉枯病抵抗性の月の光が 7%, ひとめぼれ・あさひの夢がそれぞれ約 4% となっている. 栃木県農業試験場では 1987 年から水稻品種の育種を開始し, 1995 年には県南地域向きの縞葉枯病抵抗性で良食味の品種, 晴れすがたを育成した (大谷ら 1996). また, 2004 年 2 月に早生で良食味の栃木 7 号を, 10 月には酒造好適米の栃木酒 14 号を品種登録出願した.

一方で, 近年消費者の安全性に対する関心や健康志向の高まりにより農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律が改正される (改正 JAS 法) とともに, 農林水産大臣が制定した品質表示基準に従った表示を義務付ける品質表示基準制度が充実・強化された. このことにより, 米の流通業者から米品種の DNA 鑑定が強く要望されている. さらに, 栃木県の種子更新率は 2002 年産では 63% と米の主産県としては低く, この向上も流通業者から求められており, 県としては種子更新率 100% を目標に掲げている (栃木県農務部 2004). しかし, これら品種数の増加や種子更新率の向上は原々種や原種生産において作業の煩雑さの増加を伴い混種・取り違えの危険性が高まる. 従来, 識別は品種の形態や生理特性等で行ってきたが, この方法では気象条件や栽培方法等が結果を大きく左右し, 識別が困難となる場合がある. これらの影響を受けない DNA マーカーの利用は品種識別にとって極めて有効である.

イネの品種識別のための DNA マーカーの開発は大坪ら (1997) が Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 分析を用いて国内作付け上位 10 品種を識別した. その後, 赤木 (2000) は Simple Sequence Repeats (SSR) 分析が近縁品種の識別に有効であるとしている. 河野ら (2000) は Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 分析, RAPD 分析, SSR 分析, Amplified Fragment Length

Polymorphism (AFLP) 分析について日本型品種の多型検出頻度を比較している. 多型検出頻度は SSR 分析, RFLP 分析で高く, これらの組み合わせが連鎖解析手法には有効で, 日本型品種識別には検出操作の容易な SSR 分析や RAPD 分析が有用で特に AFLP 分析が適しているとしている. 大坪ら (2002) は RAPD 分析によって得られた品種識別に好適なバンドを Sequence Tagged-Site (STS) 化し, それらのランダムプライマーをマルチプレックス化して使用することにより, 日本の代表的な 50 品種を識別できるプライマーセットを開発した. 同様な STS プライマーを利用して秋田県においても秋田県の奨励品種を識別している (小笠原・高橋 2000). これらのプライマーセットは極めて有用であるが, 栃木県で開発した品種への適用性については検討されていない.

以上の事を踏まえ, DNA マーカーの中で最も検出操作が簡便な RAPD 分析を用い, 栃木県周辺地域の奨励品種である優良粳品種, 及び奨励品種ではないが県の事業等で栽培されていた酒造好適米品種, 並びに栃木県農業試験場育成中の有望な系統の識別を試みた.

### 材料と方法

#### 1. 供試品種

供試品種は粳品種では品種登録申請中の栃木 7 号 (育種家種子 5 系統), 栃木県奨励品種のひとめぼれ, 晴れすがた, コシヒカリ, アキニシキ, 月の光, 及びあさひの夢, 育成中の有望品種である栃木 13 号・15 号, 茨城県の奨励品種であるキヌヒカリ, ゆめひたち, 及び日本晴, さらに群馬県の奨励品種であるゴロピカリ, 及び朝の光を供試した. 酒造好適米では品種登録申請中の栃木酒 14 号, 及び産地品種銘柄の五百万石, ひとごち, 美山錦, 及び若水と参考として山田錦を供試した. 合計 20 品種であった (農業技術協会 2003). ゴロピカリは群馬県産原種を, その他の品種は奨励品種決定調査に供試した種子かあるいは, 栃木県農業試験場で維持保存していた種子を用いた.

第1表 RAPD分析による品種識別.

識別セット	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
プライマー名	OPB1	OPB18		OPC9		OPD2		OPD3	OPG5		OPG6		OPG13	OPM2	OPS13	A03	A09
マーカ長 (bp)	500	1100	2200	1200	430	980	800	1200	1000	800	2200	980	650	1000	1800	810	1600
栃木7号	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
ひとめぼれ	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
晴れすがた	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
コシヒカリ	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
アキニシキ	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
月の光	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
あさひの夢	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
栃木13号	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
栃木15号	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
キヌヒカリ	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
ゆめひたち	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
日本晴	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
ゴロピカリ	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
朝の光	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
栃木酒14号	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
五百万石	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
ひとごこち	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
美山錦	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
山田錦	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
若水	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1

DNA多型の現れたマーカの品種毎の有無を0 (バンド無し), 1 (バンド有り)で示した。  
○印は20品種の識別に必要なマーカを示している。

DNA は葉身から MagExtractor -Plant Genome- DNA 抽出キット (東洋紡績株式会社), 及び同社製自動核酸抽出装置 (MFX-2000) を用いて抽出を行った。

## 2. RAPD 分析による品種識別

鋳型 DNA 濃度は  $5 \text{ ng} / \mu\text{L}$  とした。PCR 反応液はランダムプライマー  $7.8 \mu\text{M}$  を  $0.8 \mu\text{L}$ , dNTP 混合液  $2.5 \text{ mM}$  (タカラバイオ社) を  $1 \mu\text{L}$ , 反応バッファ (タカラバイオ社) を  $1.25 \mu\text{L}$  および rTaq (タカラバイオ社)  $0.5 \text{ unit}$  に滅菌蒸留水を加え  $12 \mu\text{L}$  とした。PCR は, サーマルサイクラー DNA Engine Tetrad PTC-225 (MJ Japan 社) を用い, 熱変性を  $94^\circ\text{C}$  で 3 分後,  $94^\circ\text{C}$  で 1 分間, アニーリングを  $44^\circ\text{C}$  で 1 分間,  $72^\circ\text{C}$  で 2 分間を 1 サイクルとして 40 サイクル行い, 伸長反応を  $72^\circ\text{C}$  で 2 分間行った。増幅した DNA は 1.5% アガロースゲルを用い  $100 \text{ V}$  の電圧で約 90 分間の電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液で 30 分間染色後, デンシトグラフ (アトー社) を用い DNA 増幅産物を確認し, PCR 増幅バンドの有無による DNA 多型を検出して品種識別を行った。

品種識別のためのプライマーは, 大坪ら (1997), 吉橋ら (1999) 及び森ら (2001) 等を参考に多型の見られた 23 プライマーを選定した。20 プライマーは 10 量体 (オペロン社), 3 プライマーは 12 量体 (和光純薬社) である。

## 結 果

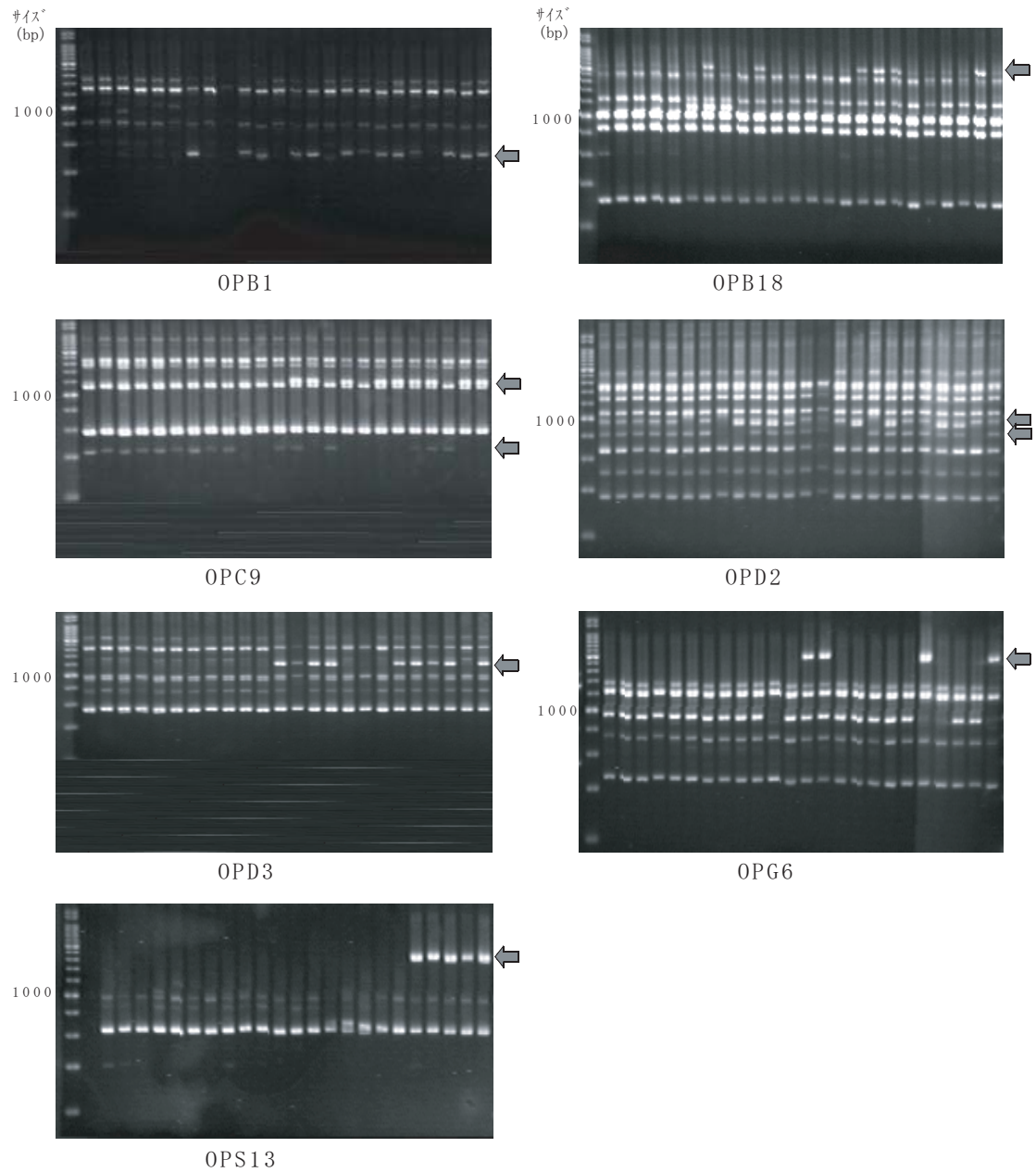
供試した 23 プライマーの内, 22 プライマーで増幅がみられ, 合計 178 バンドが検出された。これらのバンドの内, DNA 多型が認められたのは 13 プライマーで 25 バンドあ

た。DNA 多型が認められたランダムプライマーについては, 最低 2 回 DNA 多型を再確認した。その結果, 明瞭かつ再現性の高い多型を DNA マーカーとした。得られた DNA マーカーは 12 プライマーにおいて 17 種類に絞られた (第 1 表)。これらの DNA マーカーにおいて栃木 7 号の系統間ではすべて多型は見られなかった。178 マーカーで多型が見られなかったことから, かなりの確率で固定していると推察された。そこで, 栃木 7 号に関しては系統毎ではなく, 栃木 7 号として表した。

これらの 17 種類の DNA マーカーの内, プライマー OPD2 を用いて増幅した  $800 \text{ bp}$  の DNA マーカーと A09 で増幅した  $1600 \text{ bp}$  の DNA マーカーで得られた多型は同じであった。プライマー A03 の  $810 \text{ bp}$  で得られた多型は美山錦にのみ出るポジティブな品種特異的のマーカーであった。また, OPM2 の  $1000 \text{ bp}$  で得られた多型は栃木 15 号のみに DNA マーカーが現れないネガティブな特異的のマーカーであった。さらに, OPB1, OPB18, OPC9, OPD2, OPD3, OPG6, OPS13 の 7 種類のランダムプライマーで増幅された 9 マーカーを用いることによって, 供試した 20 品種すべてを識別することができた (第 1 図)。第 1 表に ○印を付けて示したのがこれらのプライマー及び DNA マーカーの長さである。また, 7 プライマーの塩基配列を第 2 表に示した。

## 考 察

本実験ではアニーリングの温度を  $44^\circ\text{C}$  で行った。従来, アニーリングは  $36\sim 40^\circ\text{C}$  で行われている例が多いが, 予備的に  $35^\circ\text{C}$  から  $46^\circ\text{C}$  までの温度で検討した。その結果,



第 1 図 供試した20品種を識別できる7種類のランダムプライマーで検出されるDNA.

図の下にランダムプライマー名を示す. 図はいずれも左のレーン1番目から, 1. サイズマーカー (200bp DNA ladder), 2. 栃木7号-1, 3. 栃木7号-2, 4. 栃木7号-3, 5. 栃木7号-4, 6. 栃木7号-5, 7. ひとめぼれ, 8. 晴れすがた, 9. コシヒカリ, 10. アキニシキ, 11. 月の光, 12. あさひの夢, 13. 栃木13号, 14. 栃木15号, 15. キヌヒカリ, 16. ゆめひたち, 17. 日本晴, 18. ゴロピカリ, 19. 朝の光, 20. 栃木酒14号, 21. 五百万石, 22. ひとごころ, 23. 美山錦, 24. 山田錦, 25. 若水. 矢印が識別マーカー.

第 2 表 ランダムプライマーの塩基配列.

プライマー名	塩基配列(5'→3')
OPB 1	GTTTCGCTCC
OPB18	CCACAGCAGT
OPC 9	CTCACCGTCC
OPD 2	GGACCCAACC
OPD 3	GTCGCCGTCA
OPG 6	GTGCCTAACC
OPS13	GTCGTTCTCG

35.0°Cでは1000 bp以上にミスマッチと思われる薄いバンドが幾つか見られた. これらのバンドは温度が高くなるに連れて薄くなり, 39.7°Cでほとんど見えなくなった. 逆に41.6°Cから900 bp付近と1200 bp付近に明瞭なバンドが現れ, 温度が高くなるに連れ濃くなり, 44.3°Cから安定した(データ略). また, 鋳型DNAの濃度を50~5 ng/μLに変えた場合, 濃度が薄くなるにつれてバンド数は増加し, パターンは明瞭となった(データ略). 以上のことから, 鋳

型 DNA 濃度は 5 ng/μL とし、PCR は熱変性を 94°C で 3 分後、94°C で 1 分間、アニーリングを 44°C で 1 分間、72°C を 2 分間で 1 サイクルとして 40 サイクル行い、伸長反応を 72°C で 2 分間行う条件で実施した。

本研究では、RAPD 分析のみを用いて栃木県水稻優良品種を識別できるマーカーの組み合わせを見出した。イネ品種の識別法としては、RAPD 分析の他に RFLP 分析、SSR 分析及び AFLP 分析等が実施されている。将来的に採種担当者および農業協同組合関係者等の現場での利用を前提として考えた場合、操作方法の簡易性及び安全性を考慮する必要がある。RFLP 分析は操作が煩雑であり、この目的にそぐわない。一方、SSR 分析や AFLP 分析は DNA マーカーの長さが短い場合が多く、電気泳動の際、アガロースゲルよりもポリアクリルアミドゲルが適している。しかし、ポリアクリルアミドゲルの材料となるアクリルアミドは毒性が強く、使用する際には熟練を要する。また、アガロースゲルを使用する場合には、アガロース濃度を高める必要がある。1.5% 程度のアガロースゲルは作製も容易で染色する際のハンドリングも良く安全である。この濃度で検出しやすい DNA マーカーの長さは 400 bp から 2400 bp までである。そこで、本研究ではこれらの長さの DNA マーカーを検出するのに最も適していると考えられる RAPD 分析を採用した。

RAPD 分析を用いたイネの品種識別法は、大坪ら (1997) や小笠原・高橋 (2000) によって確立されている。しかし、栃木県育成品種については知見が無い。そこで、筆者らは栃木県内で生産されている、または生産される可能性の高い品種について RAPD 分析を適用した。大坪ら (1997) は当初、10 品種を識別するために 600 プライマーを検討した。それに対し筆者らはわずか 23 プライマーで 19 品種を識別できるランダムプライマーを選定できた。これは、これまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用したためである。今後も新しい品種が出てくる毎にこれまでの情報を有効に利用することが必要である。本報告では再現性が高く、かつ、明瞭なバンドを DNA マーカーとして選抜した。しかし、RAPD マーカーは一般的に他の DNA マーカーに比較して再現性が低いと言われている。また、不要なバンドが出て視認性が劣る。今後は大坪ら (2002) や小笠原・高橋 (2000) のように STS 化し、さらに、マルチプレックス化することによって操作回数を減らし簡便化すること、また、視認性を高める必要がある。

本報告では前述のような理由で RAPD 分析のみで識別を行った。しかし、今後はより近縁度の高い品種が多数開発される可能性が高く、さらに効率的に多型を検出することが必要である。そのためには、RAPD 分析だけではなく、AFLP 分析、SSR 分析等も実施する必要性が考えられる。また、イネで使用している例は少ないが、イチゴ (Kunihisa ら 2003) や大麦 (内村ら 2004) の品種識別に利用されて

いる Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) 分析や品種識別を目的とはしていないが大麦 (Fernández ら 2002) やイチゴ (Cekic ら 2001) で用いられている Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) 分析も有効な手法と思われる。

本研究では DNA を MagExtractor -Plant Genome- DNA 抽出キットを用いて葉身から抽出した。実際には、種子生産や米の流通関係者が識別業務を行うことが予想され、穀粒から抽出した DNA を使用することになると考えられる。吉田ら (注:平成 10 年度兵庫県成果情報) は酒米 5 品種で、RAPD 分析による品種識別法を開発した。その中で生葉、及び米粒から抽出した DNA において検出された多型バンドは同一であることを確認しており、本研究で得られた品種識別法についても、穀粒から抽出した DNA を用いることは可能と考えられる。

今後、実用性を高めるには穀粒から抽出する簡便な方法が必要とされよう。一般には CTAB 法 (Murray ら 1980)、及びその改変法や市販されている DNA 抽出キットが使用されているが、CTAB 法は操作手順が多く時間がかかる。また、DNA 抽出キットは高額である。葉身については非常に簡便な DNA 抽出法 (池田ら 2000) が確立されている。本研究で確立した品種識別法を現場に適用するまでにはさらに簡易で安価な穀粒からの DNA 抽出方法を確立する必要があると考えられた。染色についても、エチジウムブロマイドよりも安全性の高い蛍光色素が市販されていることから、それらの利用についても組み合わせて検討していく必要があると考えられた。

謝辞: 本研究の遂行に当たり、材料の提供を頂いた群馬県農業技術センター生産技術部、ご助言を頂いた (独) 食品総合研究所大坪研一博士に感謝します。

## 引用文献

- 赤木守弘 2000. DNA 多型によるイネの品種識別. 育種学研究 2 : 89-96.
- Cekic, C., N.H. Batty and M.J. Wilkinson 2001. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor. Appl. Genet.* 103 : 540-546.
- Fernández, M.E., A.M. Figueiras and C. Benito 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.* 104 : 845-851.
- 池田延行・山田哲也・上島脩志・石井尊生 2000. イネにおけるマイクロサテライトマーカーを利用した効率的な marker-assisted selection のための超簡単 DNA 抽出法. 育種学研究 2 (別 2) : 134.
- 河野いずみ・竹内善信・島野公利・佐々木卓治・矢野昌裕 2000. DNA マーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. 育種学研究 2 : 197-203.
- Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto 2003. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) marker for identification of

- strawberry cultivars. *Euphytica* 134 : 209–215.
- 森真理・宮村弘明・渡辺健三 2001. 滋賀県における水稻主要栽培品種の RAPD 法による品種の判別. 近畿中国農研 101 : 16–19.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8 : 4321–4325.
- 農業技術協会 2003. 水陸稲・麦類・大豆奨励品種特性表. 農林水産省生産局編. 5–306
- 小笠原博信・高橋砂織 2000. STS-PCR 法によるあきたこまち等の 1 粒品種判別. 食科工 47 : 632–637.
- 大坪研一・藤井剛・橋野陽一・豊島英親・岡留博司・中村澄子・川崎信二 1997. RAPD 法を用いた国内産精米の品種判別技術. 食科工 44 : 386–390.
- 大坪研一・中村澄子・今村太郎 2002. 米の PCR 品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発. 農化 76 : 388–397.
- 大谷和彦・小島隆・佐藤恭子・大久保堯司・伊藤浩・五月女敏範・古田土通・藤井敏男・栃木喜八郎・小林俊一 1996. 水稻品種「晴れすがた」の育成. 栃木農試研報 44 : 1–14.
- 栃木県農務部 2004. 平成 16 年度稲作推進資料. 1–69.
- 内村要介・古庄雅彦・吉田智彦 2004. 国内二条オオムギの DNA マーカーによる品種識別. 日作紀 73 : 35–41.
- 吉橋忠・中村澄子・藤井剛・川崎信二・大坪研一 1999. RAPD 法による精米 1 粒からの品種判別技術. 食科工 46 : 250–254.

**Identification of Main Paddy Rice Cultivars in Tochigi Prefecture by RAPD Analysis** : Shun-ichi KOBAYASHI<sup>\*,1,2)</sup> and Tomohiko YOSHIDA<sup>3)</sup> (<sup>1)</sup>Tochigi Agr. Exp. Stn.,; <sup>2)</sup>Tokyo Univ. of Agr. and Tech.,; <sup>3)</sup>Utsunomiya Univ.)

**Abstract** : The objective of this study was to establish the technology to identify paddy rice cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis to raise the quality of rice in Tochigi prefecture and to prevent seed contamination in the foundation seed and the stock seed. A total of 20 paddy rice cultivars including 9 recommended and promising cultivars in Tochigi prefecture, were studied. They could be identified individually by the electrophoresis of the DNA fragments amplified by PCR using 7 random primers, on 1.5% agarose gels and by staining with ethidium bromide.

**Key words** : DNA marker, Identification of cultivars, Paddy rice, RAPD analysis, Tochigi pref..