

香川県水稲奨励品種等の品種判別法の開発

村上 恭子^{a)}, 河原 望遥^{b)}, 田淵 宏朗^{c)}

キーワード：イネ, 品種判別, マルチプレックスPCR

Development of a Method for Discriminating Recommended Rice Cultivars in Kagawa Prefecture

Kyoko MURAKAMI ^{a)}, Miharu KAWAHARA ^{b)}, Hiroaki TABUCHI ^{c)}

Key words: rice, cultivar identification, multiplex PCR

Abstract

We devised a 2-stage multiplex PCR protocol for the simple identification of 12 rice cultivars, 8 of which are designated by Kagawa Prefecture as recommended cultivars, and 4 others that are commonly cultivated in the Prefecture. In the first stage, we performed multiplex PCR using 2 SNP markers and a PCR control marker simultaneously to divide the 12 cultivars into 4 groups. In the second stage, we selected combinations of primers that would enable discrimination of the cultivars in each group with a single multiplex PCR. The cultivar identification protocol enables DNA extracted by a simple method to be used as a template, and cultivars to be identified within about half a day after sample collection.

摘 要

香川県水稲奨励品種8品種および県内で作付実績のある4品種, 計12品種の判別をPCR法により試み, 2段階のマルチプレックスPCRですべての品種を簡易に判別できる方法を確認した。

第一段階として, 2つのSNPマーカーとPCRコントロールマーカーを同時に反応させるマルチプレックスPCRを行うことで, 対象とする12品種を4グループに分けることができる。さらに第二段階として, 各グループ内の品種が1回のマルチプレックスPCRで判別可能となるようにプライマーの組み合わせを選択した。

確立した品種判別法は, 簡易法で抽出したDNAを鋳

型に用いることができ, サンプル採取から判別までを半日程度で行うことが可能である。

緒 言

2002年に施行された改正JAS法のもとで米の品種表示が義務化され, 違反者に対する罰則が強化された。これに伴い水稲の生産流通現場では, 種子生産から栽培, 出荷にわたって品種の厳密な管理が強く求められるようになった。一方, 激化する産地間競争のなかで, いわゆるブランド米や県独自の品種開発が盛んに行われており, 本県においても2009年に好適酒造品種「さぬきよいまい」(香川大学と共同育成), 2014年に「おいでまい」(村上⁴⁾) が品種登録されている。これらの県独自品種を

a) 生産環境部門 b) 作物・特作部門 c) 農研機構九州研

受理日: 2021年12月23日

含む水稻奨励品種の原種生産はその大半を県が担っており、異種混入のない種子を提供することが求められている。

従来、イネの品種判定には草型、粒形などが用いられてきたが、近年では気象などの外的要因に影響を受けることのない方法として、DNAの塩基配列情報をもとに作成したDNAマーカーによる品種判別技術の利用が主流となってきた。これまでに、多くの種類のDNAマーカーが検討され、random amplified polymorphic DNA (RAPD) マーカー (黒柳ら³⁾、松古ら⁵⁾、大坪ら⁹⁾、吉田ら¹⁶⁾、sequence tagged site (STS) マーカー (新村ら⁷⁾、大坪ら¹⁰⁾、simple sequence repeat (SSR) マーカー (江嶋ら¹⁾、両角ら⁶⁾) およびsingle nucleotide polymorphism (SNP) マーカー (Nasu et al.⁸⁾、Sato et al.¹³⁾) などが開発・報告されている。また、原種生産を担う各県では、独自に開発した品種を含む県奨励品種等についての品種判別法が研究されている (江嶋ら¹⁾、橋本ら²⁾、黒柳ら³⁾、松古ら⁵⁾、両角ら⁶⁾、小原ら¹¹⁾、吉田ら¹⁶⁾)。

開発が進むにつれてイネの品種判別用マーカーは、数、種類ともに豊富になり、判別できる品種数も増加している。新村ら⁷⁾は、15のSTSマーカーを作成し、130の水稻うるち品種が判別可能であることを報告している。一方Tabuchi et al.¹⁴⁾は、15のSNPマーカー、6つのSTSマーカーおよび1つのSSRマーカーを用いることにより、国内のイネ114品種の判別が可能であることを報告している。いずれもPCRとアガロースゲル電気泳動という必要最低限の装置を用いて分析することが可能である。また、複数のプライマーを1つの反応液に加えるPCRのマルチプレックス化を検討し、コスト削減および作業時間の短縮を図っている。

香川県内では、県の奨励品種を中心とする限られた品種が作付けされている。このため栽培段階で異品種の混入が疑われる場合には、限られた品種間での判別が十分であるが、一方で確実かつ迅速に分析を行うことが求められる。

そこで本研究では、Tabuchi et al.¹⁴⁾により報告されている計22マーカーから、香川県水稻奨励品種および県内作付け実績のある品種の計12品種を判別できるマーカーを選抜し、あらためて組み合わせを検討してマルチプレックス化し、2回のPCRですべての品種が判別できる方法を確立した。さらに、作業時間の短縮と技術の標準化を図るため、開発した品種判別法で利用可能な簡易的DNA抽出法の検討を行った。

材料および方法

試験1：品種判別のためのマーカーのマルチプレックス化の検討

1) 供試品種

「コシヒカリ**」「はえぬき**」「オオセト**」「ヒノヒカリ**」「あきげしき*」「クレナイモチ**」「モチミノリ*」「おいでまい**」「にこまる*」「さぬきよいまい**」「あきたこまち*」「あきさかり**」の12品種を判別の対象として用いた。

(**：香川県水稻奨励品種、*：作付実績のある品種)

2) DNA抽出

止葉40～50mgを液体窒素で凍結して乳鉢・乳棒で摩砕し、改変CTAB法 (Porebski et al.¹²⁾) を用いてDNAを抽出した。得られたDNA溶液は、分光光度計NanoDrop-1000 (LMS) でDNA量を測定し、10ng/μLに調整した。

3) PCRおよび増幅産物の検出

各ステップの使用マーカーおよび反応液への添加濃度を、表-1および表-2に示した。R1933以外のDNAマーカーは、Tabuchi et al.¹⁴⁾が報告したものを使用した。DNAマーカーR1933はイネで塩基配列の保存性が高い部分に作成し、12品種の同じ位置に1本のバンドが得られるPCRコントロールとして使用した。なお、26P1-K-5、26P1-31、17P1-K-51、17P1-K-32、6P1-N-522、6P1-N-322、34P1-A-3、18P1-51、18P1-31および34P3-51の10プライマーは、農研機構が特許権 (特許第4344818号) を保有しており、農研機構からの許可を得て使用している。

PCRは、反応酵素としてAmpliTaQ Gold 360 (ThermoScientific) を使用し、鋳型として改変CTAB法で抽出したDNA10ngを加え、超純水で反応液量を10μLに合わせた。PCR反応は、TaKaRa PCR Thermal Cycler DiceTM (タカラバイオ) を用いて、95℃ 9分を1サイクル、94℃ 10秒-58℃ 10秒-72℃ 30秒を35サイクルで行った。反応終了後、3%アガロースゲル (2% Agarose TypeII (SIGMA) + 1% MetaphorTM Agarose (Lonza))、泳動バッファー0.5×TBEで100V25分間電気泳動し、GelRed (Biotium) で染色し、UV照射下でバンドを確認した。

表-1 使用プライマーの種類と塩基配列

マーカー名	マーカー種類	プライマー名	プライマー塩基配列 (5'-3')
R1933	STS	R1933-F	CCACGGTTAATTTGCTCATCC
		R1933-R	GAGAAACACAAGTGTGCAGTCG
27P2	SNP	27P2-K-5	GGTAATCTTTCTTCTACATCGGAGC
		27P2-K-3	CTTTGATTTCATCCACTGGACATAAT
26P1	SNP	26P1-K-5	TTGTTTAGACAAAGTAAAGGAGCAATGCT
		26P1-31	GATATCTTAGGGCCCGTTTGG
17P1	SNP	17P1-K-51	TGACAACGTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAC
		17P1-K-32	ACAATCCTGTTTGTGCGCAGG
6P1	SNP	6P1-N-522	CCAACTGCTGCAATAATGCC
		6P1-N-322	CGTAGCAACTCAATATAACATCAGCTAA
34P1	SNP	34P1-512	CGAGCAGATCCTCCTCGTC
		34P1-A-3	CGGCAAGCACAGCGTTC
18P1	STS	18P1-51	GGCTGCTAGCGTCATCAGG
		18P1-31	TTCTCATCATAACATATTGATCCTTGC
34P3	STS	34P3-51	TCCCTCCTTCTCACGACTCC
		34P3-31-I	GACACCAGCTTCCCTTGCC

表-2 PCR反応液へのプライマー添加濃度

判別段階	マーカー名	プライマー添加濃度 (μM) ^z
Step I	R1933	1
	27P2	1
	26P1	1
Step II ①, ②	17P1	1
	6P1	1
Step II ③	34P1	1
	17P1	2
	6P1	1
Step II ④	18P1	1
	34P3	1
	6P1	0.8

Z: フォワード, リバースプライマーともに同じ濃度で添加する。

行った。ただし抽出液は5倍希釈し、このうち1 μL をPCR反応液(計10 μL)に加えた。Single-Step法は、2 mLネジロチューブに試料を入れ、100 μL の抽出緩衝液(1 M KClおよび10mM EDTAを含む100mM Tris-HCl緩衝液(pH8.5))および直径3 mmのステンレスビーズ2個を加え、ShakeMaster® AUTO(バイオメディカルサイエンス)で1,100rpm 3分間破碎した。さらに10分間煮沸したのち15,000rpm, 10min.室温で遠心分離し、得られた上清を20倍希釈し、このうち1 μL をPCR反応液(計10 μL)に加えた。

3) PCRおよび増幅産物の検出

試験1と同様に行った。

結 果

試験2: 簡易DNA抽出法の検討

1) 供試材料

試験1と同様に、12品種の止葉(採取後-30℃で凍結保存)を用い、5 mm角4枚を供試した。

2) DNA抽出

市販のDNA抽出試薬GenCheck® DNA Extraction Reagent(以下GenCheck, ファスマック)を使用した方法およびThomson and Henry¹⁵⁾の報告に一部改変を加えたSingle-Step法の2つの簡易法でDNA抽出を行った。GenCheckは、試薬のマニュアルに従って抽出を

試験1 品種判別のためのマーカーのマルチプレックス化の検討

Tabuchi et al.¹⁴⁾で報告されている計22マーカーから、香川県水稲奨励品種等12品種を判別することができるマーカーを選択し、2または3マーカーを組み合わせるマルチプレックスPCRを行った。そのうち、組み合わせたすべてのマーカーで安定して増幅産物が得られ、アガロースゲルでのバンドの目視確認が容易なマーカーの組み合わせを選抜した。最終的に図-1に示すように、いずれの品種も2回のマルチプレックスPCRを行うことで品種判別が可能であった。具体的にはまず、3マーカー

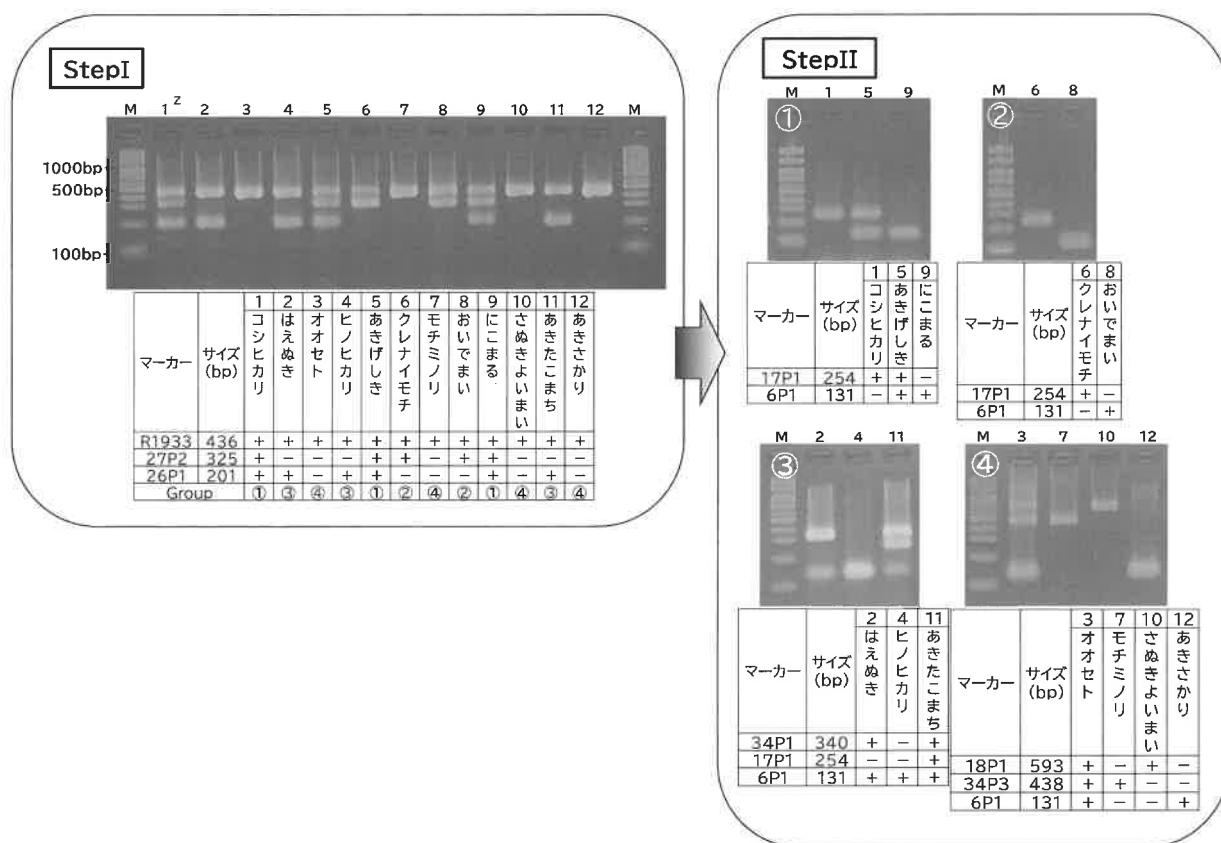


図-1 香川県水稻奨励品種等の品種判別における電気泳動結果
M: 100bp ラダーマーカー 0.1 μ g
Z: 各レーンのNo.は写真下表中の品種番号を示す

を組み合わせたマルチプレックスPCRにより12品種を4つのグループに分けたのち (Step I), 各グループに合わせたマルチプレックスPCRを行えばよい (Step II①, ②, ③, ④)。

試験2: 簡易DNA抽出法の検討

いずれの抽出法を用いた場合にも, CTAB法で得られたDNAを鋳型に用いた場合 (図-1) と同様のパターンが得られ, 品種判別が可能であった (図-2)。GenCheckを用いた場合に一部のバンドが薄くなる傾向が見られたが, PCRのサイクル数を38に増やすことでバンドを濃くすることが可能であった (データ省略)。

考 察

DNAマーカーを用いた品種判別法の重要なポイントとして, 安定してPCR増幅産物を得られること, 作業が複雑で無いこと等があげられる。本研究で開発したイネの品種判別法は, PCR産物をアガロースゲル電気泳動で安定して検出できるため, ジェネティックアナライザー

など高価な機器を持たない試験研究施設や分析室においても, ある程度のトレーニングを行えば実施可能である。また, 簡易的に抽出したDNAを鋳型として使用可能であり, 2回のマルチプレックスPCRで香川県奨励品種等12品種を判別することができるため, サンプル採取から判別までの作業がシンプルである。

また, イネは現在も各地で品種開発が進められており, 県の奨励品種も時代とともに変遷する。その度に品種判別法も見直しが必要となるが, これに対し, Tabuchi et al.¹⁴⁾ の報告ではマーカーが豊富に準備されており, マーカー間のアニーリング温度に大きな差が無いためマルチプレックス化が比較的容易であり, 品種判別法の見直しにもスムーズに対応できると期待される。

さらに, 2つの簡易DNA抽出法について検討した。いずれの方法でも, 得られたDNAを鋳型に用いたPCRの結果は, 改変CTAB法で抽出した高純度のDNAを鋳型に用いた場合と同様であった。また, サンプル後1サンプル当たり約30分でDNA抽出が可能であり, 改変CTAB法の約180分と比較して短時間での抽出が可能

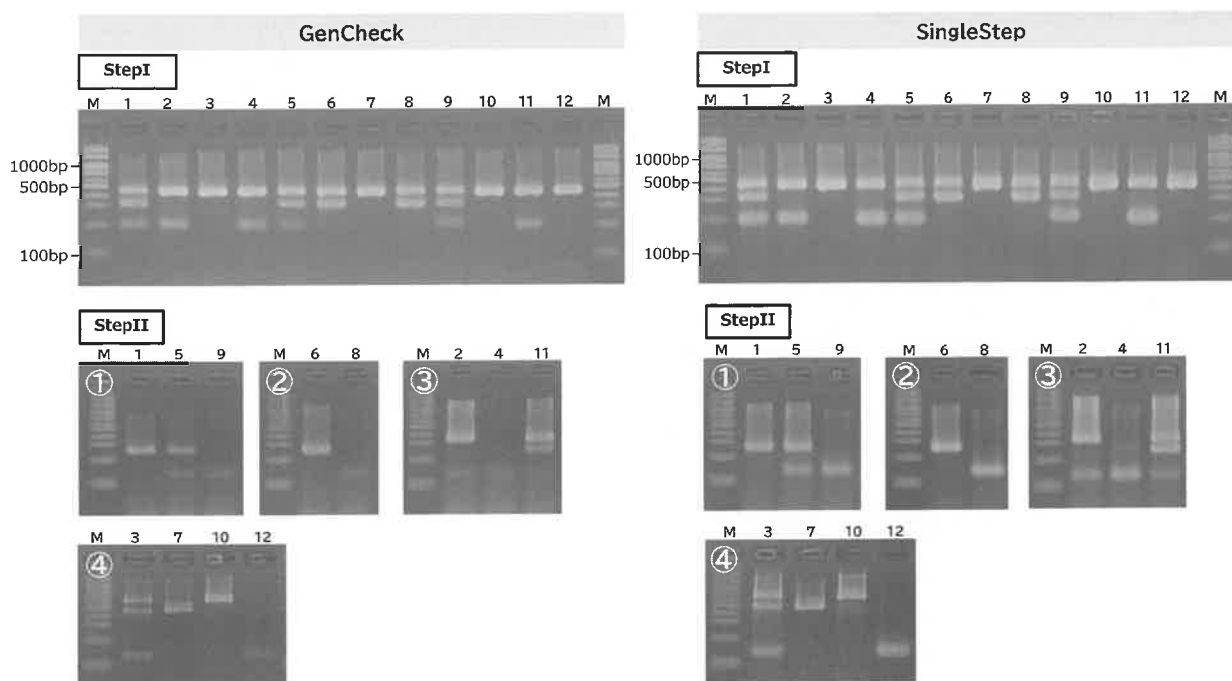


図-2 簡易抽出DNAを鋳型に用いた場合の品種判別における電気泳動結果
 M : 100bpラダーマーカー0.1 μ g
 *各レーンのNo.は、図-1写真下表中の品種番号を示す

であった。GenCheckは市販のDNA抽出試薬であり、自作の試薬と比較してコストは高くなるが、試薬調製の手間が無く、サンプルの磨砕も不要なため特別な機械や作業が不要である。一方のSingle-Step法(Thomson and Henry¹⁵⁾)は、試薬を自作するためコストを抑えられるが、磨砕を行うために高額の破碎装置または1点ずつ乳棒乳鉢やベッスルで磨砕する手間が必要となる。このような特徴を踏まえ、分析時の状況に応じた方法を選択することができる。

本研究で開発した品種判別法は、サンプル数にも左右されるが、株の持ち込みから半日程度で分析結果を得ることができ、実用性の高い方法であると考えられる。今後、栽培中に発生する異形株が意図せぬ他品種の混入によるものか否かの迅速な確認など、原種生産における品種の管理面での活用が期待される。

謝 辞

本研究の実施にあたり、材料の採取および的確な助言をいただきました歴代原種担当の皆様には大変お世話になりました。深くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 江嶋亜祐子, 和田卓也, 坪根正雄, 尾形武文 (2007): 米の品種判別のためのSSRマーカーの選抜と効率的な品種識別システムの構築, 福岡県農業総合試験場研究報告, 26: 19~23.
- 2) 橋本憲明, 大源正明, 石村尚子, 高原美規, 山元皓二 (2004): PCR法を利用した新潟県内で栽培・流通する水稻品種の判別, 北陸作物学会報, 39: 15~17.
- 3) 黒柳悟, 水上裕子, 大矢俊夫 (2006): DNAマーカーによるイネの品種識別, 愛知県農業総合試験場研究報告, 38: 19~26.
- 4) 村上てるみ, 藤田究, 河田和利, 多田伸司, 三木哲弘, 本田雄一 (2014): 水稻新品種「おいでまい」の育成, 香川県農業試験場研究報告, 64: 9~15.
- 5) 松古浩樹, 中村澄子, 大坪研一 (2006): DNAマーカーによる岐阜平坦地向け水稻奨励品種の品種判別, 岐阜県農業技術研究所研究報告, 6: 7~11.
- 6) 両角悠作, 小林麻子, 富田桂 (2018): 福井県の水稲奨励品種を判別するSSRマーカーセットの改良, 北陸作物学会報, 53: 50~52.
- 7) 新村和則, 金川寛, 三上隆司, 福森武 (2005): イネ品種判別用マルチプレックスPCRプライマーセット

- の開発, 育種学研究, 7 : 87~94.
- 8) Shinobu Nasu, Junko Suzuki, Rieko Ohta, Kana Hasegawa, Rika Yui, Noriyuki Kitazawa, Lisa Monnna and Yuza Minobe (2002) : Search for and Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and Establishment of SNP Markers, DBA Research, 9 : 163~171.
- 9) 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, 日本食品科学工学会誌, 44 : 386~390.
- 10) 大坪研一, 中村澄子, 今村太郎 (2002) : コメの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, 日本農芸化学会誌, 76 : 388~397.
- 11) 小原麻里, 鎌形民子, 大越一雄 (2007) : 千葉県水稻奨励品種のDNAによる識別方法, 千葉農総研研報, 6 : 117~124.
- 12) Porebski S., Bailey L.G. and Baum B.R. (1997) : Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide Components., Plant Molecular Biology Reporter, 15 : 8~15.
- 13) Hideki Sato, Takashi Endo, Sachiko Shiokai, Takeshi Nishio and Masayuki Yamaguchi (2010) : Identification of 205 current rice cultivars in Japan by dot-blot-SNP analysis, Breeding Science, 60 : 447~453.
- 14) Hiroaki Tabuchi, Keko Hayashi, Ikuo Ashikawa, Hitosi Yoshida (2016) : Multiplex PCR with SNP, STS and SSR Markers for Discriminating 114 Japanese Rice Cultivars, 中央農業総合研究センター研究報告, 26 : 23~37.
- 15) Darelle Thomson and Robertt Henry (1995) : Single-Step Protocol for Preparation of Plant Tissue for Analysis by PCR, BioTechniques, 19 : 394~400.
- 16) 吉田晋弥, 李余良, 玉木克知, 塩飽邦子 (2000) : 米粒からの簡易なDNA抽出とRAPD法による兵庫県奨励品種の識別, 兵庫農技研報 (農業), 48 : 1~6.