

RAPD 法を利用した滋賀県内水稲栽培品種の品種判別法

森真理, 北村治滋, 渡辺健三

DNA Fingerprinting of Japonica Rice Varieties Cultivated in Shiga Prefecture Using RAPD Markers.

Mari MORI, Harushige KITAMURA and Kenzo WATANABE

キーワード：水稲, DNA, RAPD, 品種判別

本県水稲の主要栽培品種を含む8品種および4系統についてRAPD法による品種判別を試みた。DNAはCTAB法で抽出した。100種類の10塩基からなる任意配列のプライマーを用いてPCR反応を行いDNAを増幅した。その結果、7種のプライマーで再現性があり識別性の良い9個のDNAマーカーを得た。この9個のDNAマーカーによって、供試した8品種および4系統の水稲は11のパターンに分類され、RAPD法によって品種の判別が可能であった。

1. 緒 言

近年、農家や農協等で扱う水稲の品種数が増え、育苗等の段階で品種がわからなくなるといった事故がしばしば起きている。これまで、水稲品種の判別は、交配稔実性や草型による方法⁵⁾、酵素多型による方法⁶⁾、画像解析を利用した粒型判別による方法⁶⁾等が報告されている。しかしながら、これらの方法は、判別に熟練を要すること、気候や栽培条件に影響されること、分析時間が長いこと、高価な機器や試薬を必要とすること等の問題があり、簡易で正確な判別は難しいのが実態であった。このため、近年、正確な判別が可能な方法としてDNAを利用した制限酵素多型(RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism)を利用した品種判別法^{3, 9)}が報告されている。しかし、本方法は正確な判別が可能であるという利点はあるが、試料を大量に必要とすること、分析方法が複雑で時間と熟練を要すること等の問題がある。一方、Williamsら¹⁰⁾は、任意配列のプライマーを用いたPCR

(Polymerase Chain Reaction) 反応で増幅されたDNAの違いを利用した品種判別法(RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)法)を報告している。RAPD法はRFLPを利用した方法に比べ実験操作が簡単で、かつ短時間で行え、試料も少量で良いという利点がある。これまでに水稲においてもRAPD法の有用性が示唆されている^{1, 2, 4, 11, 12, 14)}。そこで、本県水稲の主要栽培品種を含む8品種および4系統を用いて、RAPD法による品種判別法を検討した。

2. 材料および方法

2. 1 DNAの精製

材料は、「コシヒカリ」、「キヌヒカリ」、「日本晴」、「滋賀羽二重糯」、「吟おうみ」、「ハナエチゼン」、「ひとめぼれ」、「あきたこまち」、「滋系酒56号」、「滋系58号」、「滋系60号」、「滋系62号」の計8品種および4系統の幼苗または出穂期前の葉を用いた。DNAは、Murray and Thompson¹¹⁾らの方法を改変して精製

した。まず、水稻の葉約1gを液体窒素中でパウダー状になるまですりつぶし、ファルコンチューブ(50ml容)に採取した。約70°Cのヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)2%溶液(2%CTAB, 0.1Mトリス塩酸 pH8.0, 20mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA2Na), 1.4M塩化ナトリウム, 1%ポリビニルピロリドン)10mlを加えて攪拌した後、55°Cの恒温槽に10分間静置した。その後、クロロホルム・イソアミルアルコール液(クロロホルムとイソアミルアルコールが24:1(v/v))10mlを添加し、30分間ゆっくり振とうした後、2,800rpmで15分間遠心分離を行い、上層を採取した。この液に再度クロロホルム・イソアミルアルコール液10mlを加え、30分間ゆっくり振とうし、同様に遠心分離を行い、上層を採取した。このようにして採取した液に1/10倍量(v/v)のCTAB10%溶液(10%CTAB, 0.7M塩化ナトリウム)および1.5倍量(v/v)の沈澱用緩衝液(1%CTAB, 5mMトリス塩酸 pH8.0, 10mM EDTA)を加えよく混和し30分間室温で静置した。静置後、室温で15分間遠心分離(2,800rpm)を行い、得られた沈澱に5mlの1M塩化ナトリウム溶液(1M塩化ナトリウム, 10mMトリス塩酸 pH8.0, 1mM EDTA)を加え55°Cで静置した。沈澱が完全に溶解した後、5mlのイソプロピルアルコールを加え混和し、室温で、10分間遠心分離(2,800rpm)を行い沈澱を得た。得られた沈澱は70%エタノールで洗浄し、真空乾燥した後、500 μ lのTE-RNase溶液(100 μ g/ml RNaseA, 10mMトリス塩酸 pH8.0, 1mM EDTA)を加え、55°Cで溶解した後、供試するまで冷蔵保存した。

2. 2 DNAの増幅

前述の方法で精製したDNAを鋳型とし、PCR反応を行った。DNAポリメラーゼはrTaq polymerase(TOYOBO社製)を使用した。プライマーはオペロン社製の任意配列からなる10塩基合成プライマー100種類(OPERON 10mer kit A,B,C,D,M)を使用した。PCR反応液の組成は、鋳型DNA1 μ l(約30ng)、プライマー(10 μ M)1.25 μ l、ポリメラーゼ0.25 μ l、デオキシリボヌクレオチド3リン酸混合液(dNTP, 各2mM)2.5 μ l、塩化マグネシウム溶液(25mM)2.5 μ l、10倍希釈緩衝液(500mM塩化カリウム, 100mMトリス塩酸 pH8.3, 1%TritonX-100:rTaq polymerase 添付緩衝液)2.5 μ l、滅菌

水15 μ lの全量25 μ lとした。パラフィンオイルを重層した後、遺伝子増幅装置(アステック社製, PC-700, 0.5 μ l用ブロック)にセットした。DNAの増幅は、94°Cで4分間保持した後、94°C, 1分, 36°C, 1分, 72°C, 2分の条件で40サイクル行った。

2. 3 DNAの電気泳動

増幅後のDNA溶液にグリセロール色素液(50%(v/v)グリセロール, 0.1%(g/v)プロモフェノールブルー, 0.1%(g/v)キシレンシアノール, 0.2%(g/v)オレンジG, 0.4Mトリス塩酸 pH8.0, 10mM EDTA)2.5 μ lを加えた後に、10 μ lをアガロースゲル電気泳動分析に供した。ゲルは、1.5%アガロースゲル、泳動バッファーはTAE緩衝液(40mMトリス酢酸 pH8.0, 1mM EDTA)を用いた。電気泳動装置は、ミニ電気泳動装置Mupid II(アドバンス社製)を使用し、100Vで50分間泳動した。泳動後のゲルは、0.25 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含むTAE緩衝液で染色した後、紫外線照射下でポラロイドカメラにより写真撮影した。分子量マーカーは、 ϕ X174/Hinc II digest(TOYOBO社製)を用いた。

3. 結 果

100種類のプライマーを供試しPCR反応を行い品種間差の認められるDNAのバンドを調査した。供試した水稻8品種および4系統におけるRAPD法による電気泳動分析の結果を図1に示した。品種間差の認められたDNAのバンドのうち、再現性があり、識別性の良いバンドを選択しDNAマーカーとした。その結果、B1, B18, C4, C9, D3, M2, M11の7種のプライマー(表1)で9個のDNAマーカー(A, B, C, D, E, F, G, H, I)が得ら

表1 選抜したプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
B1	GTTTCGCTCC
B18	CCACAGCAGT
C4	CCGCATCTAC
C9	CTCACCGTCC
D3	GTCGCCGTCA
M2	ACAACGCCTC
M11	GTCCACTGTG

プライマーはオペロン社製のOPERON 10mer kitを用いた。

RAPD 法を利用した滋賀県内水稲栽培品種の品種判別法

表2 RAPD 分析による滋賀県内水稲栽培 8 品種および 4 系統の判別結果

品 種	プライマー (DNA マーカー ¹⁾)									判別タイプ
	B 1 (A)	B 18 (B)	C 4 (C)	C 9 (D)	D 3 (E)	M 2 (F)	M 2 (G)	M 11 (H)	M 11 (I)	
コシヒカリ	-	+	+	-	+	-	+	-	+	I
キヌヒカリ	+	-	+	+	-	-	+	-	+	II
日 本 晴	+	-	-	+	+	+	-	-	-	III
滋賀羽二重糯	+	-	+	+	+	-	-	-	+	IV
吟 お う み	+	-	-	+	+	-	+	+	-	V
ハナエチゼン	-	-	-	+	-	+	-	-	+	VI
ひとめぼれ	-	+	+	-	-	-	+	-	+	VII
あきたこまち	-	+	-	-	-	-	+	-	+	VIII
滋系酒56号	+	-	-	+	+	-	+	-	-	IX
滋系58号	-	-	-	+	-	-	+	-	+	X
滋系60号	+	-	-	+	+	+	-	-	-	III
滋系62号	+	+	+	+	-	-	+	+	+	XI

+ ; DNA マーカーが有 - ; DNA マーカーが無

1) アルファベットは, 図1のDNA マーカー名と共通している。

れた, これら 9 個の DNA マーカーの有無により供 (表2).
試した 8 品種および 4 系統は 11 パターンに分類された

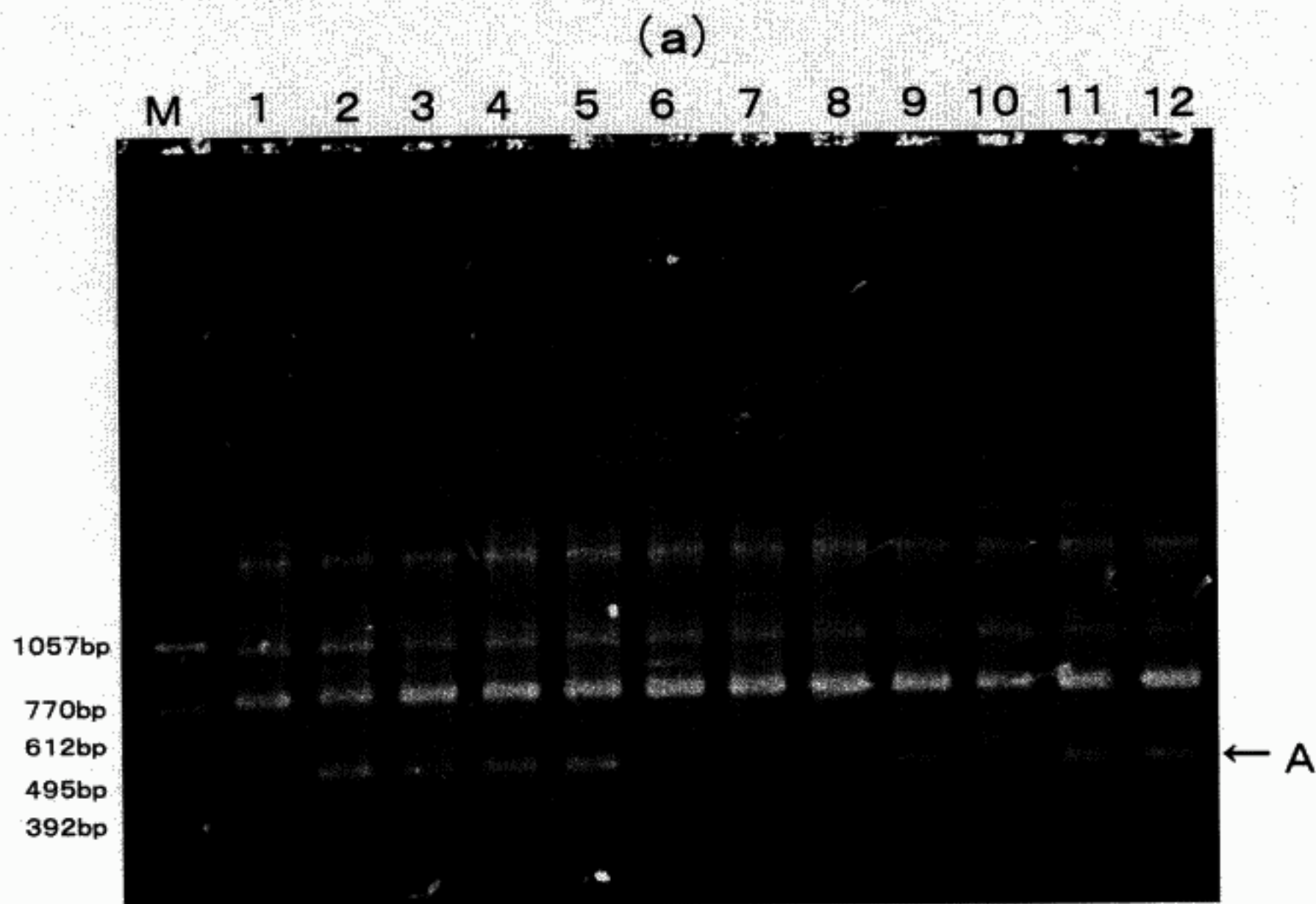


図1. 各種のプライマーで増幅したイネ DNA の電気泳動分析結果

プライマー ; (a) B 1

レーン M ; 分子量マーカー (ϕ X174/Hinc II digest), 1 ; コシヒカリ, 2 ; キヌヒカリ,
3 ; 日本晴, 4 ; 滋賀羽二重糯, 5 ; 吟おうみ, 6 ; ハナエチゼン, 7 ; ひとめぼれ,
8 ; あきたこまち, 9 ; 滋系酒56号, 10 ; 滋系58号, 11 ; 滋系60号, 12 ; 滋系62号

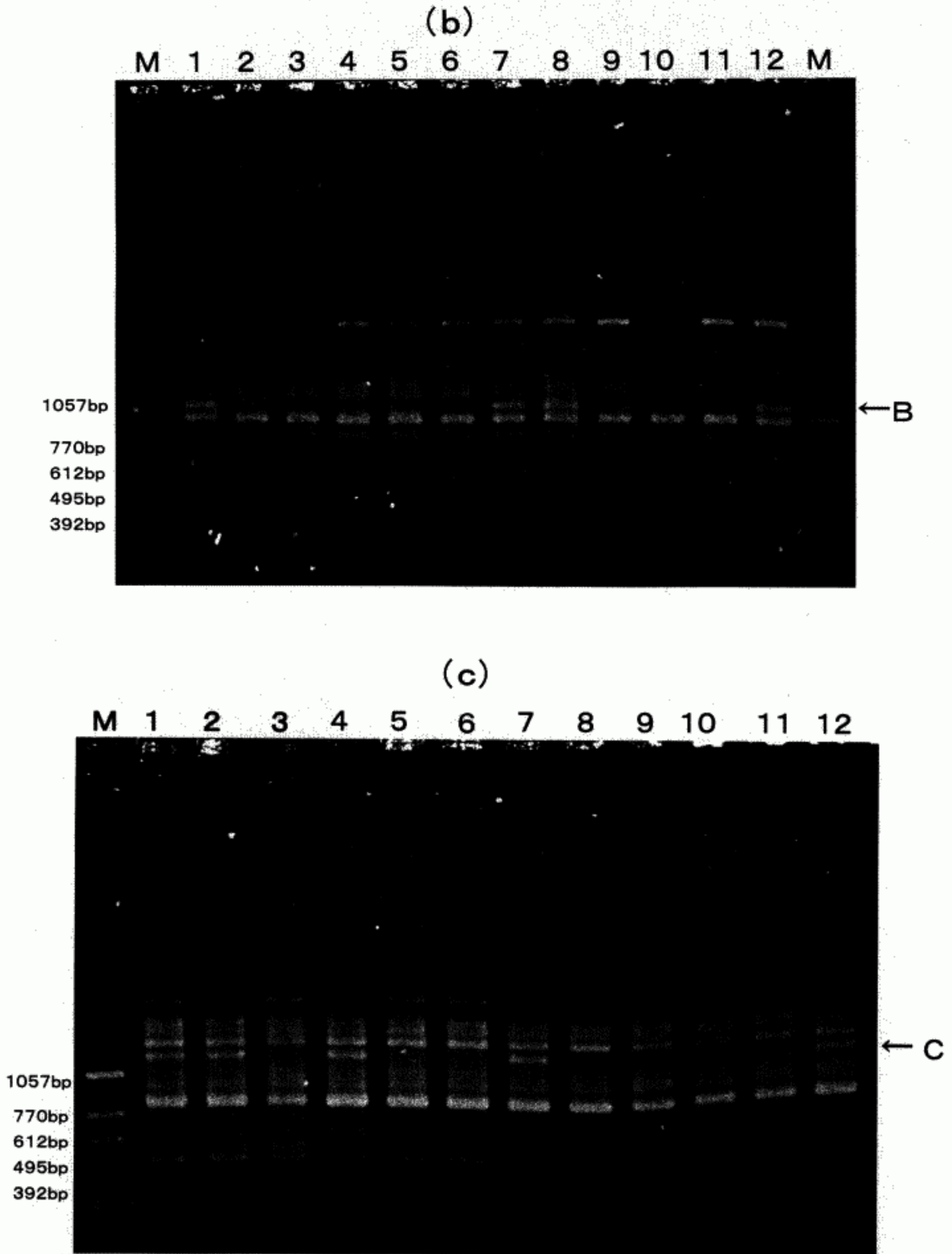


図1. 各種のプライマーで増幅したイネ DNA の電気泳動分析結果
 プライマー ; (b)B18, (c)C4
 レーン M ; 分子量マーカー (ϕ x174/Hinc II digest), 1 ; コシヒカリ, 2 ; キヌヒカリ,
 3 ; 日本晴, 4 ; 滋賀羽二重糯, 5 ; 吟おうみ, 6 ; ハナエチゼン, 7 ; ひとめぼれ,
 8 ; あきたこまち, 9 ; 滋系酒56号, 10 ; 滋系58号, 11 ; 滋系60号, 12 ; 滋系62号

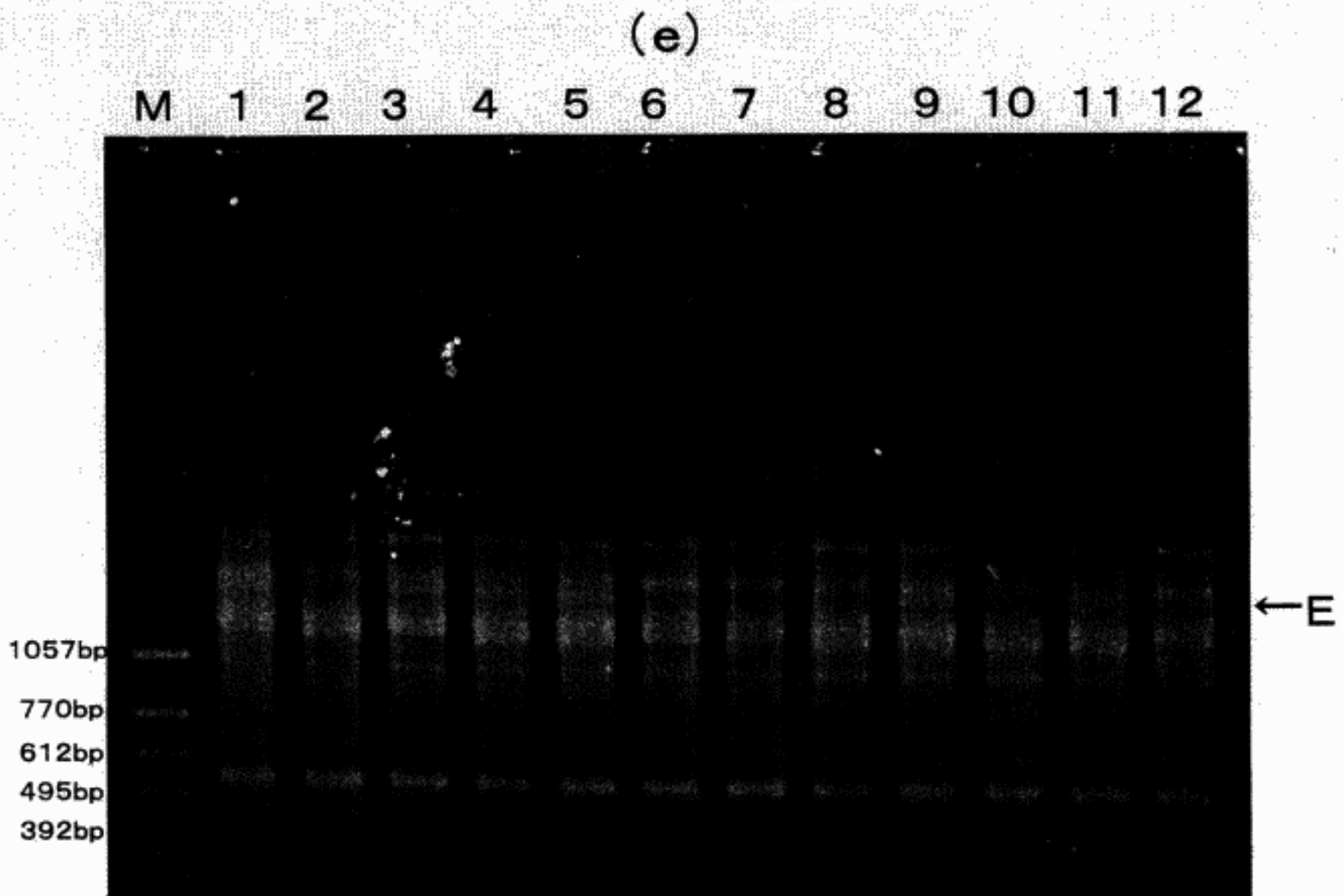
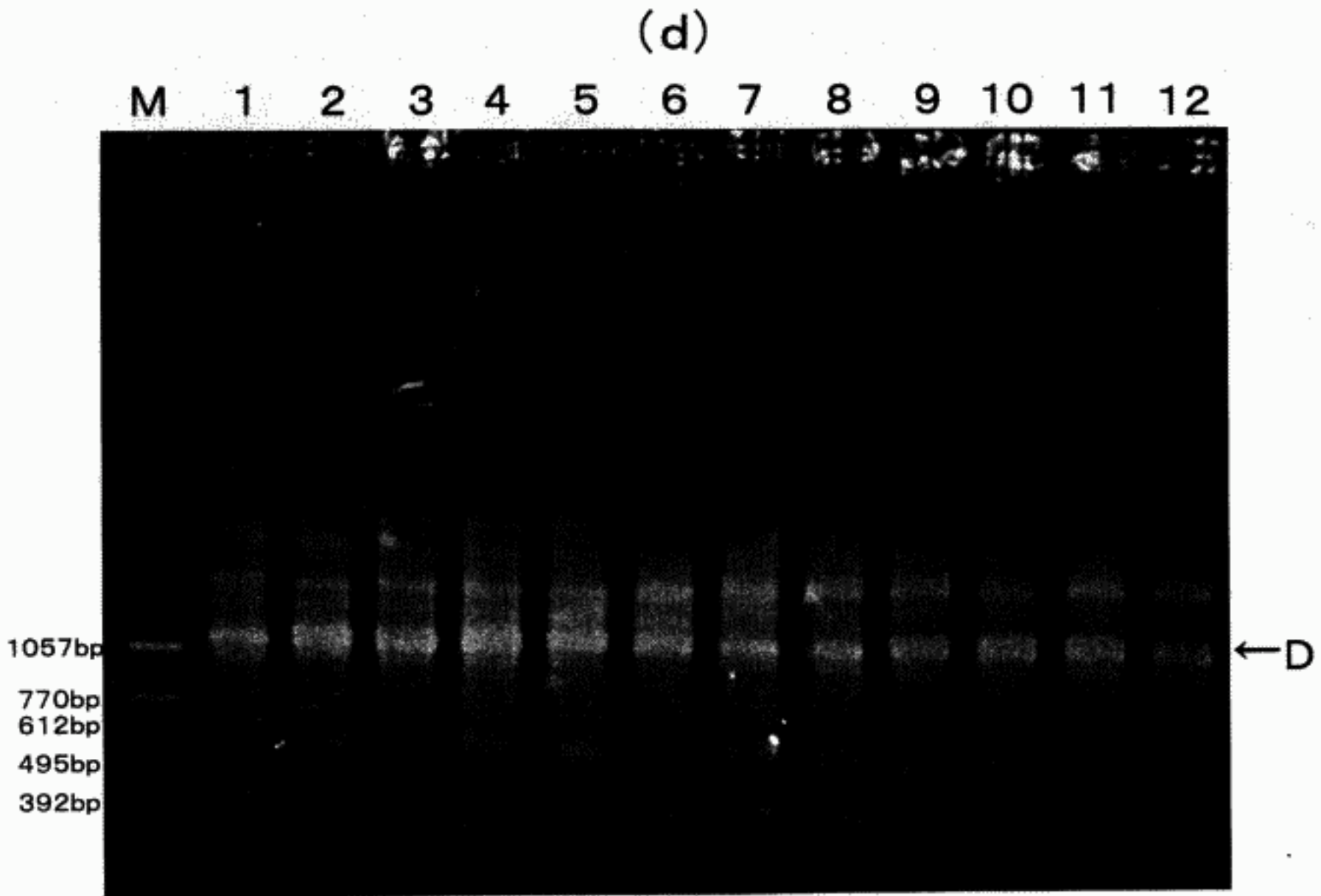


図1. 各種のプライマーで増幅したイネ DNA の電気泳動分析結果
 プライマー ; (d)C 9, (e)D 3
 レーン M ; 分子量マーカー (ϕ x174/Hinc II digest), 1 ; コシヒカリ, 2 ; キヌヒカリ,
 3 ; 日本晴, 4 ; 滋賀羽二重糯, 5 ; 吟おうみ, 6 ; ハナエチゼン, 7 ; ひとめぼれ,
 8 ; あきたこまち, 9 ; 滋系酒56号, 10 ; 滋系58号, 11 ; 滋系60号, 12 ; 滋系62号

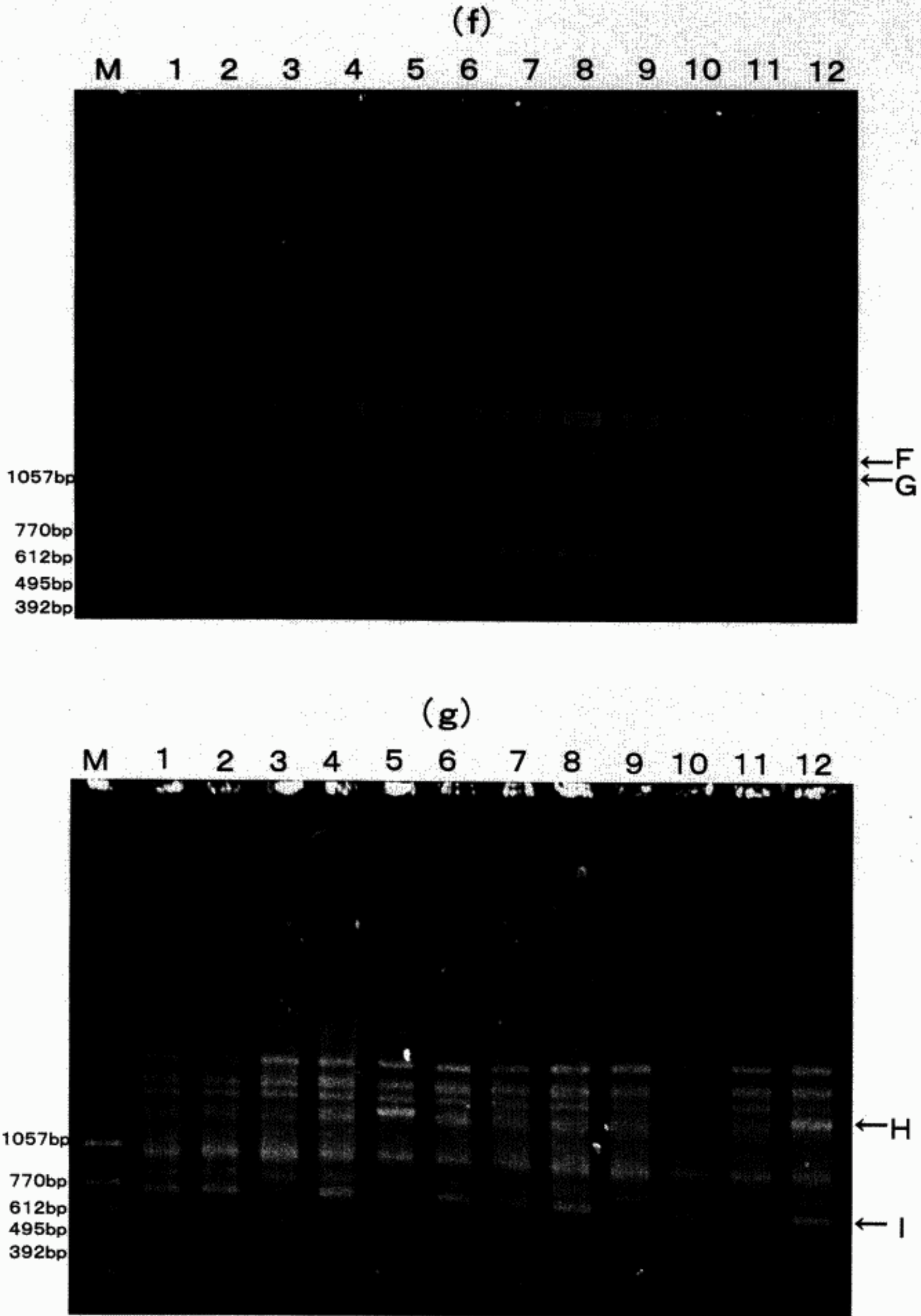


図1. 各種のプライマーで増幅したイネ DNA の電気泳動分析結果
 プライマー; (f)M2, (g)M11
 レーン M; 分子量マーカー (ϕ x174/Hinc II digest), 1; コシヒカリ, 2; キヌヒカリ,
 3; 日本晴, 4; 滋賀羽二重糯, 5; 吟おうみ, 6; ハナエチゼン, 7; ひとめぼれ,
 8; あきたこまち, 9; 滋系酒56号, 10; 滋系58号, 11; 滋系60号, 12; 滋系62号

4. 考 察

DNAは、栽培条件や組織等の違いによって変化することはなく、品種に固有であるという特徴がある。そのため、DNAを利用する品種判別法は信頼度が高いといえる。日本の水稻栽培品種について、大坪ら¹⁾は「コシヒカリ」や「あきたこまち」をはじめとする国内作付上位10品種について、また、小笠原ら²⁾は秋田県奨励品種6品種について、RAPD法による品種判別法を報告している。今回、著者らは滋賀県で栽培されている主要8品種および4系統についてRAPD法による品種判別の可能性を検討した。その結果、7プライマーで再現性があり識別性の良い9個のDNAマーカーを得た。これらのプライマーを用いた反応結果である9個のDNAマーカーの有無で12種的水稻を11種類のパターンに分類することが可能となり、ほとんどの品種の判別が可能であった(表2)。しかしながら、本実験の9個のDNAマーカーでは「日本晴」と「滋系60号」は判別することが出来なかった。今後、さらに他のプライマーを検討することによって、判別が可能になると考えられる。なお、今回得られたDNAマーカーのうち、4個のDNAマーカーは大坪ら¹⁾が指標としたものと同一の分子量であった。

RAPD法の欠点として、一般的にその不安定さが指摘される。この点は特に品種判別において重要な問題となる。本実験ではその観点から、再現性の高いDNAバンドのみを選定した。しかしながら、DNAの精製程度が悪い場合、PCR反応によるDNAの増幅が不安定になることがある。生産現場で利用する場合、判別ミスを防ぐため品種に応じていくつかのプライマーを選び、再度確認することが望ましい。

本方法は、所要時間が約2日と短く、手法自体も簡便なことから、今後生産現場に近いところで応用可能な方法である。今回は、葉を材料に用いた結果であるが、最近、米1粒からのDNA単離法も報告されており¹⁰⁾、今後、葉以外からの判別にも本方法は応用可能であると考えられる。

謝 辞

本実験を行うにあたり、久保貴彦氏(九州大学農学部)には貴重な助言および御協力を頂いた。また、宮村弘明氏(湖東地域農業改良普及センター)には多大な御協力を頂いた。ここに記して感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 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: 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(5), 386-390, 1997.
- 2) 小笠原博信・柏木豊・椎木敏・小林昭一: PCR法による秋田県産米奨励品種の判別, 日本食品科学工学会第44回大会講演集, 54, 1997.
- 3) FUKUCHI, A., F. KIKUCHI and H. HIROCHIKA: DNA fingerprinting of cultivated rice retrotransposon probes. *Jpn. J. of Genet.* 68(3), 195-204, 1993.
- 4) FUKUOKA, S., K. HOSAKA and O. KAMIJIMA: Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* 67, 243-252, 1992.
- 5) 松尾孝嶺: 栽培稲に関する種生態学的研究 農業技術研究所研究報告D3, 1-112, 1952.
- 6) 松永隆司, 田村真八郎: コメの産地品種銘柄の判別-米粒二次元形態(輪郭)の数量化表現-. 食の科学, No131, 60-71, 1989.
- 7) MURRAY M. G. and W. F. THOMPSON: Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8, 4321-4325, 1980.
- 8) NAKAGAWARA, M.: The differentiation, classification and center of genetic diversity of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) by isozyme analysis. *Trop. Agr. Res. Ser.*, 11, 77, 1978.
- 9) 竹内睦・齊藤彰・岸本直巳: DNAマーカーによる新潟県水稻品種判別の可能性, 北陸作物学会報, 29, 22-25, 1994.
- 10) WILLIAMS, J. E. K., A. R. KUBELIK, K. J. LIVAK, J. A. RAFALSKI and S. V. TINGEY.: DNA polymorphism amplified by arbitrary primers

- are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535, 1990.
- 11) YAMAMOTO, T., A. NISHIKAWA and K. OEDA : DNA polymorphism in *Oryza sativa* L. and *Lactuca sativa* L. amplified by arbitrary primed PCR. *Euphytica* 78, 143-148, 1994.
- 12) YI, Q - M. and J. LU : Polymerase chain reaction identifies genomic DNA polymorphism in rice. *Rice Genetics Newsletter* 8 , 139-141, 1991.
- 13) 吉橋忠・大坪研一 : 米1粒からの DNA 抽出法, 新版植物の PCR 実験プロトコール, 秀潤社, 63-66, 1997.
- 14) ZHENG, K - L., B. SCHEN and H - R. QIAN : DNA polymorphisms generated by arbitrary primed PCR in rice. *Rice Genetics Newsletter* 8, 134-136, 1991.

Summary

DNA fingerprinting using RAPD markers was used to analyze 12 rice (*Oryza sativa* L.) varieties cultivated in Shiga Prefecture, Japan. Each DNA was extracted by the CTAB method and amplified by PCR, using 10 mer primers. When 100 primers were tested, 9 DNA markers were detected by 7 primers. It became possible to classify 12 varieties into 11 groups.