九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

RAPD分析による日本型水稲品種の品種識別

久保，貴彦
九州大学大学院農学研究院生物資源開発管理学部門遺伝育種学講座植物育種学研究室

尾形，武文
福岡県農業総合試験場 | 九州大学大学院農学研究院生物資源開発管理学部門遺伝育種学講座植物育種学研究室

吉村，淳
九州大学大学院農学研究院生物資源開発管理学部門遺伝育種学講座植物育種学研究室

松江，勇次
福岡県農業総合試験場 | 九州大学大学院農学研究院生物資源開発管理学部門遺伝育種学講座植物育種学研究室

他

https://doi.org/10.15017/21063

出版情報：九州大学大学院農学研究院学芸雑誌. 55 (1), pp.5-11, 2000-11. 九州大学大学院農学研究院
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

九大農学芸誌（Sci. Bull. Fac. Agr., Kyushu Univ.）
第55巻　第1号　5-11　(2000)

RAPD分析による日本型水稲品種の品種識別

久保貴彦・尾形武文*・吉村　淳
松江勇次*・岩田伸夫
九州大学大学院農学研究院生物資源開発管理学部門遺伝育種学講座植物育種学研究室

(2000年7月31日受付，2000年8月18日受理)

DNA Fingerprinting of Japonica Rice Varieties Using RAPD Analysis

Takahiko KUBO, Takefumi OGATA, Atsushi YOSHIMURA,
Yuji MATSUE and Nobuo IWATA
Plant Breeding Laboratory, Division of Genetics and Plant Breeding,
Department of Applied Genetics and Pest Management, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

緒　言

1996年度の福岡県における水稲奨励品種および準奨励品種は，主食用粳種8，かけ米としての酒造用粳種3，酒造好適米1，糯種4の計16種類ある．これらの品種の種子供給にあたっては，主要農作物種子法（昭和27年法律第131号）にもとづき，県下で指定された種子生産地において品種の純度維持を行いながら優良な種子の生産を行っている．優良な種子とは，遺伝的純度が高いこと，発芽性や発芽率が高く健全であること，さらには粒の充実がよく斉一であり良質であることがあげられる．これらの優良種子の条件の中で，純度が高いことは特に重要であるにもかかわらず，異品種の混入（機械的混入）や自然交雑，遺伝的な分離，突然変異等の要因のために，純度維持には大きな困難が伴っている．現在，これらの異品種混入等の事故に当たっては，混入したと思われる個体や次世代の草姿や形態的特性から品種識別を行っている．しかし，この識別法は，時間を要し，多大なる労力がかかるにもかかわらず決定的な識別根拠とはなっていない．

PCR法発見以後，10年以上が経過した現在では，PCR法を用いた簡便なDNA多型検出技術が普及しており，代表的なものとしてRandom Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) がよく知られている．イネにおいては種間および亜種間などの遺伝的に遠縁な組合せで，PCRマーカーならびにRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) が充実しており，DNA連鎖地図の作成 (Harushima *et al.*, 1998) や系統・品種分類 (Fukuoka *et al.*, 1992) などに幅広く利用されている．その一方で，限られた遺伝的背景をもつ日本型品種内においては，種間や亜種間で得られたDNA多型のほとんどは多型性を示さないためDNAマーカーの利用が遅れているのが現状である．

これらの事実をふまえ，著者らは，日本型品種内で利用できるDNA多型の集積とDNA連鎖地図の作成を行い (Kubo *et al.*, 1998)，その成果として，RAPDを主とする70個以上のDNAマーカーを同定した．本研究では，これらの多型（RAPD）を利用し，水稲品種の純度検査，種子生産段階での変異個体チェック，さらには水稲の育成段階での純度維持と品種管理に応用できるRAPDの検索と簡易な品種識別法について検討し，DNAマーカーによる品種識別法の確立を試みた．

材料および方法

供試イネ

実験材料として，福岡県農業総合試験場で維持管理しているキヌヒカリ，黄金晴，コシヒカリ，ちくし15号，ちくし23号，ツクシホマレ，ニシホマレ，日本晴，

* 福岡県農業総合試験場

ハヤユタカ，ヒノヒカリ，ほほえみ，ミネアサヒ，山田錦，夢つくし，ユメヒカリ，レイホウの粳16品種とサイワイモチ，ハクトモチ，ひみこもち，ヒヨクモチの糯4品種を品種識別に供試した．

DNA 抽出および RAPD 分析

供試イネ20品種を，1996年に福岡県農業総合試験場で播種したのち，幼苗から各品種ごとにひとまとめにして採葉し，液体窒素中で粉砕した後に，CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) 法 (Rogers and Bendich, 1988) に準じて DNA を抽出した．

また，DNA 抽出法に関しては，一連の実験操作の簡易化を図るために，次の2種類の簡易法の適用を試みた．1つは，Edwards *et al.* (1991) の簡易抽出法（液体窒素で粉末化した葉組織に抽出緩衝液を加えて DNA を溶出し，エタノール抽出する方法）であり，1つは，Yoshimura *et al.* (1992) の粗抽出法（葉片を TE 緩衝液中で磨砕して得られた DNA 溶出液を鋳型 DNA として用いる方法）である．

PCR 反応は，1.0 unit の*Taq* DNA polymerase (Promega)，*Taq* DNA polymerase 付属の10× buffer 2.5 μl，$MgCl_2$ 1.5mM，dNTP（dATP，dTTP，dGTP，dCTP をそれぞれ100mM），鋳型 DNA 20ng，プライマー0.4mM を含む総量25 μl の反応液で行った．

Yoshimura *et al.* (1992) の粗抽出法においては，PCR の増幅具合が好ましくなかったので，通常の0.1% TritonX-100を含む PCR 反応緩衝液ではなく，Liu *et al.* (1995) による0.4%の高濃度緩衝液を用いた．

PCR プライマーには，OPERON 社の10塩基合成プライマー15種類（A07，B08，E04，L12，P01，T03，U10，X02，AA07，AD19，AE01，AE14，AI11，AM13，AN07）を用いた．ただし，これら15種類のプライマーでは識別できない2品種（「コシヒカリ」と「ちくし23号」）がみられたので，この2品種間で多型を示すプライマーAC17を加えて供試した．

PCR 反応は，反応液をミネラルオイルでカバーし，IWAKI 社の Thermal sequencer (TSR-300) により94℃で1分間（熱変性），36℃で1分間（アニーリング反応），72℃で2分間（伸長反応）を1サイクルとするサイクルを40回行い，最後に伸長反応を完全に終わらせるために72℃で7分間保温した．

PCR 増幅産物は，0.5×TAE buffer 中にて1.5%のアガロースゲルで，大型サブマリンゲル電気泳動装置を用いて100V の電圧で3.5時間電気泳動を行った．さらに簡略化の試みの一つとして，電気泳動時間の削減のためにミニゲル電気泳動装置（Mupid2）を用いた．ミニゲル電気泳動においては，高濃度にした2.0%アガロースゲルで，100V の電圧により増幅産物の分離を試みた．

結果および考察

著者らは，任意配列からなる RAPD プライマー800種類を用いて，2種類の日本型品種「台中65号」と「日本晴」との間で多型を検出するプライマー59種類を同定している（Kubo *et al.*, 1998）．この59種類のプライマーから比較的明確な多型バンド（RAPD）が得られる15種類のプライマーを選び，日本型20品種の DNA フィンガープリンティングを行った．その結果を，増幅バンドが有る方を "1"，無い方を "0" として Table 1 にまとめた．15種類のプライマーから得られた RAPD の有無は，個々の品種特有であり，「コシヒカリ」と「ちくし23号」を除いて，供試した品種を識別しうるものであった．「コシヒカリ」と「ちくし23号」では15種類のプライマーによるバンドパターンが全て相同であり，これらのプライマーでは両品種を識別することができなかった．

そこで，供試した20品種についての完全な識別を行うために，相同な DNA フィンガープリントを示した2品種「コシヒカリ」と「ちくし23号」の間で多型を示すプライマーの検索を進めた．ここでも既報の多型情報に基づきプライマー検索を進め，2品種で多型を示すプライマーAC17を新たに選び出した．プライマーAC17における20品種の増幅パターンを Fig. 1 に示した．プライマーAC17から得られる3個の RAPD のうち，$AC17_{460}$ と $AC17_{430}$ は対立遺伝子様のバンドパターンを示したので，ここでは分子サイズの小さい430bp のバンドの有無を識別マーカーとして用いた．AC17を合わせた合計16種類のプライマーから，20品種を識別するための最少数のプライマー組合せを選んだところ，A07，P01，AC17，AI11，AN07 の5種類で識別が可能であることが明らかになった．選抜した RAPD マーカーによる20品種の DNA フィンガープリンティングを図式化したものを Fig. 2 に示した．濃い網掛け部分は RAPD バンドの増幅がみられることを，白い部分は増幅がみられないことを表し，6種類の RAPD により各品種特異的な DNA フィンガープリントを得ることができた．

以上のように5種類のプライマーから得られた6種類の RAPD を用いることにより，日本型水稲20品種

Table 1. DNA fingerprinting of 20 Japonica varieties using 15 RAPD primers.

	Kinuhikari	Koshihikari	Nipponbare	Koganebare	Hinohikari	Yumehikari	Yumetsukushi	Chikushi 15	Chikushi 23	Tsukushihomare	Mineasahi	Hohoemi	Reiho	Hayayutaka	Nishihomare	Yamadanishiki	Saiwaimochi	Hakutomochi	Himikomochi	Hiyokumochi
$A07_{1260}$	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
$A07_{640}$	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
$B08_{360}$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0
$E04_{490}$	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
$L12_{1310}$	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1
$P01_{730}$	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
$T03_{2150}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0
$U10_{1790}$	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
$U10_{1400}$	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
$X02_{1650}$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
$AA07_{1340}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
$AD19_{1440}$	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1
$AE01_{1390}$	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
$AE14_{1090}$	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0
$AI11_{380}$	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
$AM13_{1880}$	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1
$AM13_{340}$	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
$AN07_{1010}$	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$AN07_{720}$	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
$AN07_{350}$	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1

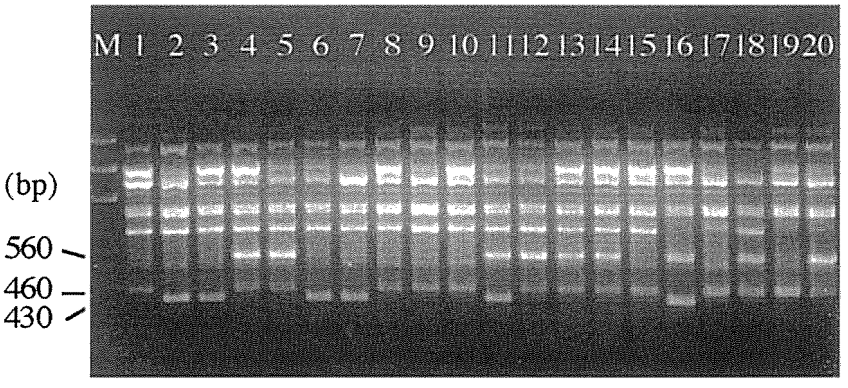

Fig. 1. Amplification products from 20 different Japonica varieties using primer AC17. M: Size marker, ϕX174 DNA digested with *Hae* Ⅲ. 1: Kinuhikari, 2: Koshihikari, 3: Nipponbare, 4: Koganebare, 5: Hinohikari, 6: Yumehikari, 7: Yumetsukushi, 8: Chikushi 15, 9: Chikushi 23, 10: Tsukushihomare, 11: Mineasahi, 12: Hohoemi, 13: Reiho, 14: Hayayutaka, 15: Nishihomare, 16: Yamadanishiki, 17: Saiwaimochi, 18: Hakutomochi, 19: Himikomochi, 20: Hiyokumochi.

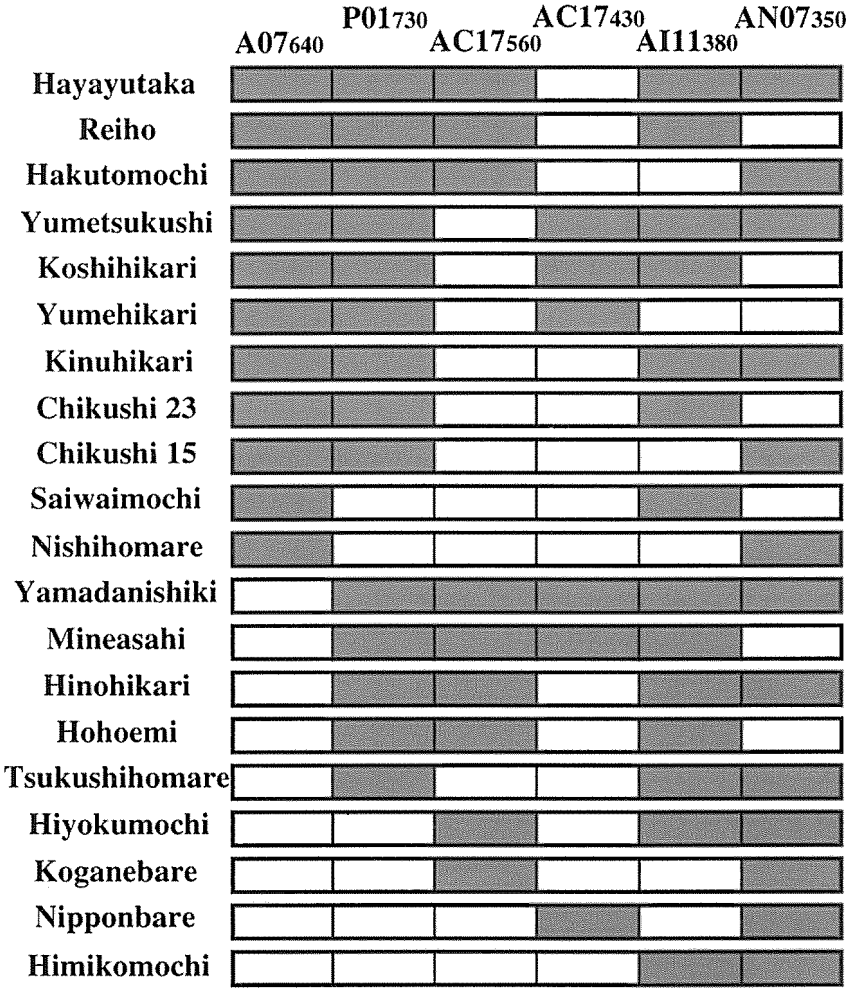

Fig. 2. DNA fingerprinting of 20 Japonica varieties using RAPD analysis. Variety name is shown in the left of each column and 6 RAPDs are shown at the top of columns. ■: Presence of an amplification product, □: Absence of an amplification product.

の識別が可能となった．しかしながら，本識別法の今後の利用と普及を考慮したとき，実験操作の簡略化が必須となる．本識別法では，CTAB 法により抽出・精製した DNA を使用しているため，DNA 抽出の過程において煩雑な実験操作と時間が必要となる．そこで DNA 抽出における操作手順および時間の削減を図り，簡易抽出した DNA を用いた品種識別法の検討を行った．また，同時に電気泳動の過程においては，ミニゲル電気泳動装置を併用することにより，一層の時間削減を試みた．

CTAB 法で抽出した DNA と Edwards *et al.* (1991) の簡易抽出 DNA を用いた PCR 増幅産物の電気泳動図を Fig. 3 に示した．ここで，CTAB 法 (Fig. 3A) では，大型サブマリンゲル電気泳動装置を，簡易抽出法 (Fig. 3B) ではミニゲル電気泳動装置を用いた結果を示した．プライマーAC17による 2 つの増幅産物を比較したところ，着目する 2 本の RAPD バンド (560bp と430bp) が，簡略化した方法 (Fig. 3B) においても明瞭に増幅した．また，他の 4 種類のプライマーを用いた場合においても簡易抽出 DNA が増幅パターンに及ぼす影響は認められず，供試した 5 種類のプライマーに関して簡易法の適用が

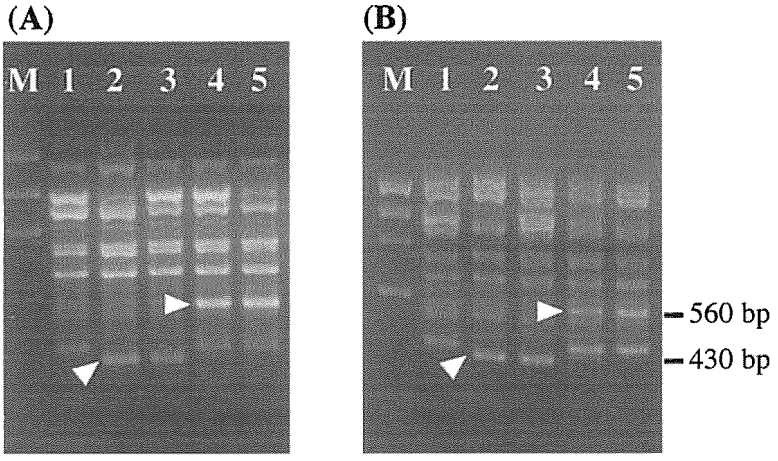

Fig. 3. Amplification products with the primer AC17 using template DNA extracted by CTAB method (Fig. 3A) and simple method (Fig. 3B). Arrow heads indicate 560 and 430bp bands. M: Size marker, ϕX174 DNA digested with *Hae* Ⅲ. 1: Kinuhikari, 2: Koshihikari, 3: Nipponbare, 4: Koganebare, 5: Hinohikari.

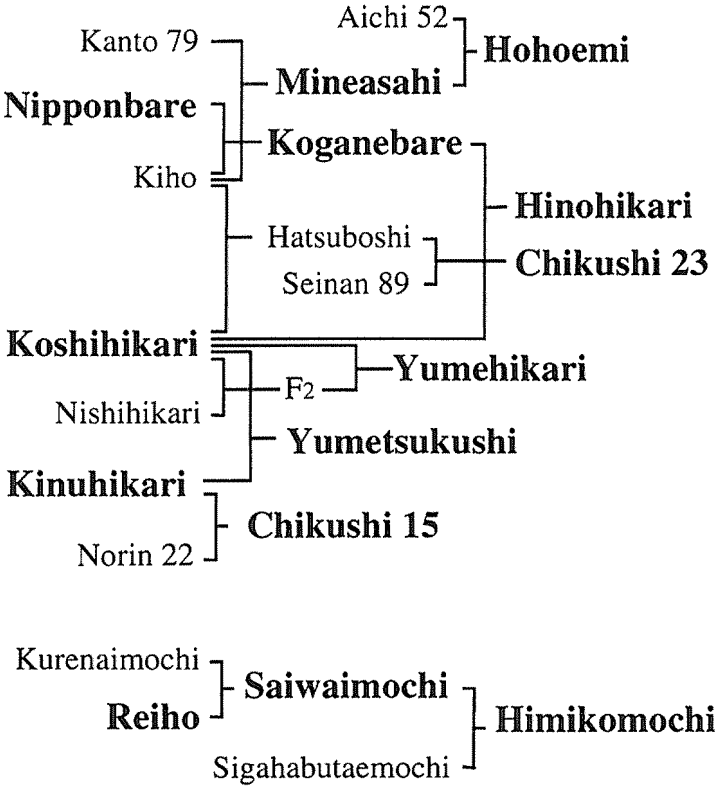

Fig. 4. The derivation of Japanese paddy rice varieties. The varieties shown in large bold letters were used in this study.

可能であることが確認された．

また，Yoshimura *et al.*（1992）の粗抽出によるDNAを用いた場合には，通常のPCR反応条件ではほとんどのプライマーによるRAPDバンドのシグナル量は低かった．しかしながら，通常の使用濃度よりも高濃度の0.4% TritonX-100を含むPCR反応バッファーを用いたときには，$A07_{640}$，$AC17_{430}$，$AI11_{380}$，$AN07_{350}$の4つのRAPDマーカーが検出できた．これらの4つのRAPDはいずれもその断片サイズが小さいことから，増幅バンドが低分子なものほど，鋳型となるDNAが損傷を受けず，正常に増幅するものと推測した．したがって，分子サイズの小さいRAPDに限定すれば，Yoshimura *et al.*（1992）の粗抽出法も利用可能であるが，増幅の安定性に関しては今後の検討が必要である．

RAPD分析の欠点として，増幅の不安定さが示唆されるが，特に品種分類や識別においては重要な問題となる．識別に供試するプライマー数を最小限に減らすことは，時間的・労力的に有意義となるが，識別の信頼性を高めるためには，より多くのマーカーを供試することが望ましい．この度得られた結果（Table 1）から必要状況に応じてプライマーを選択し，再度確認することにより，信頼性のある識別が可能となると考えられる．

DNAマーカーは多型が得られやすいと考えられるが，日本で栽培される日本型水稲品種間においては多型頻度は著しく低く（Kubo *et al.*，1998；河野ら，1998），多型選抜に多大なる時間と労力が必要とされる．本研究では既報の多型情報を活用したことから，マーカー設定が容易に行われた．さらに，「台中65号」と「日本晴」の間で得られた多型が，種々の日本型品種を識別するマーカーとしても利用できることが証明された．日本の栽培水稲品種間では多型が得られにくいという特徴は，これらが限られた在来品種間の交雑により成立したことに起因しており，その傾向は供試品種の系譜（Fig. 4）からも伺える．本実験に供試した品種には，日本において安定的に作付け面積の上位を占める「コシヒカリ」や「日本晴」を含み，これらを交配親として派生した品種が多くを占めた．

本研究におけるDNAフィンガープリンティングの簡略化により，従来ならば2日以上を必要としたDNA抽出から電気泳動までの全ての行程を，5時間程度（対照サンプル数20個体とする）で遂行することが可能になった．DNAフィンガープリンティングに必要な実験設備はPCR機器とミニゲル電気泳動装置の2点のみであり，実験操作も簡便であることから，今後，本法の農業試験場における実用・普及が期待される．

要　　約

イネの種苗管理において，品種の純度を維持することは極めて重要であるが，種子を増殖する過程では，異品種の混入や自然交雑，突然変異等，品種の純度を損なう問題が伴ってくる．現時点では，形態的特性から，混入した個体等の識別を行っているが，このような方法による識別は，多大なる時間と労力を要する上に，決定的な根拠とはならない．この問題の解決にあたって，著者らはDNAマーカーの利用が有効であると考え，Kubo *et al.*（1998）に記載された多型情報をもとに種苗管理に応用できる品種識別法としてRAPDマーカーによる日本型水稲品種のDNAフィンガープリンティングを行った．

材料には，福岡県農業総合試験場で維持管理されている日本型水稲の粳16品種と糯4品種を用いた．Kubo *et al.*（1998）の多型情報から，識別に有効であると考えたRAPDプライマー16種類を用いてDNAフィンガープリンティングを行い，20品種を識別できる最少のプライマーのセットを選んだ．その結果，5種類のプライマーから得られた6種類のRAPDマーカー，$A07_{640}$，$P01_{730}$，$AC17_{560}$，$AC17_{430}$，$AI11_{380}$，$AN07_{350}$を用いて20品種の識別が可能となった．次に，農業試験場等の現場における実用化を考え，DNA簡易抽出法，およびミニゲル電気泳動装置の導入による実験操作の簡略化・迅速化を図った．その結果，簡略化した方法においても通常の方法と相違ない泳動パターンが得られ，簡略化したDNAフィンガープリンティングの実用性が証明された．

文　　献

Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson 1991 A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19**: 1349.

Fukuoka, S., K. Hosaka and O. Kamijima 1992 Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.*, **67**: 243-252.

Harushima, Y., M. Yano, A. Shomura, M. Sato, T. Shimano, Y. Kuboki, T. Yamamoto, S. Y. Lin, B. A. Antonio, A. Parco, H. Kajiya, N. Huang, K.

Yamamoto, Y. Nagamura, N. Kurata, G. S. Khush and T. Sasaki 1998 A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F_2 population. *Genetics*, 148 : 479-494.

河野いづみ・竹内善信・佐々木卓治・矢野昌裕 1998 マイクロサテライトマーカーを利用したイネ日本型品種間の多型検出. 育雑, 48(別2) : 114.

Kubo, T., A. Yoshimura and N. Iwata 1998 Trial construction of molecular linkage map of Japonica rice. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 43 : 95-101.

Liu, Y. S., R. J. S. Thomas and W. A. Phillips 1995 Single-step direct PCR amplification from solid tissues. *Nucleic Acids Research*, 23 : 1640.

Rogers, S. O. and A. J. Bendich 1988 Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual.*, A6 : 1-10.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 : 6531-6535.

Yoshimura, S., A. Yoshimura and N. Iwata 1992 Simple and rapid PCR method by using crude extracts from rice seedlings. *Japan. J. Breed.*, 42 : 669-674.

Summary

Maintaining the purity of rice varieties is the primary concern in seed and seedling production since the occurrence of mixture with other lines, outcrossing and mutation is frequently encountered in the field. Until now, pure lines are being maintained using the observed morphological characteristics that requires a lot of time and effort and in turn do not give conclusive evidence. To solve this problem, we propose the utilization of DNA fingerprinting in maintaining rice varieties.

In our previous study (Kubo *et al.* 1998) on the construction of Japonica rice linkage map, 64 RAPDs were identified from the screened 800 primers between Taichung 65 and Nipponbare. DNA fingerprinting based on the identified RAPDs was applied in maintaining these varieties.

Twenty Japanese varieties consisting of 16 non-glutinous and four glutinous Japanese varieties planted in Fukuoka Agricultural Research Center were used as planting materials in the succeeding experiment. Sixteen primers from the previous RAPD data were selected for DNA fingerprinting. Of 16 primers, a set of five primers yielding six reproducible markers were identified. These primers differentiated all the 20 varieties with less number of primer set.

We tried to simplify and expedite the experiment by using simple method of DNA extraction and mini-gel electrophoresis system in DNA fingerprinting and we obtained scorable RAPD bands using this method. This result demonstrated that the closely related Japanese paddy rice varieties could be easily identified by utilizing the simplified RAPD technique.