

RAPD分析による日本型水稻品種の品種識別

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：

RAPD 分析による日本型水稻品種の品種識別

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稻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、水稻品種の純度検査、種子生産段階での変異個体チェック、さらには水稻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、液体窒素中で粉碎した後に、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 μ l, MgCl₂ 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 μ l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ため、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°Cで1分間 (熱変性)、36°Cで1分間 (アニーリング反応)、72°Cで2分間 (伸長反応) を1サイクルとするサイクルを40回繰り返し、最後に伸長反応を完全に終わらせるために72°C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、AC17₄₆₀とAC17₄₃₀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、日本型水稻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	0	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	0
B08 ₃₆₀	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0
E04 ₄₈₀	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
L12 ₁₃₁₀	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	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	0
T03 ₂₁₅₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	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	0
U10 ₁₄₀₀	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
X02 ₁₆₅₀	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	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	1
AD19 ₁₄₄₀	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	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	1
AE14 ₁₀₉₀	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
AI11 ₁₃₈₀	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
AM13 ₁₈₈₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
AM13 ₃₄₀	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
AN07 ₁₀₁₀	0	0	1	1	1	0	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	1
AN07 ₃₅₀	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1

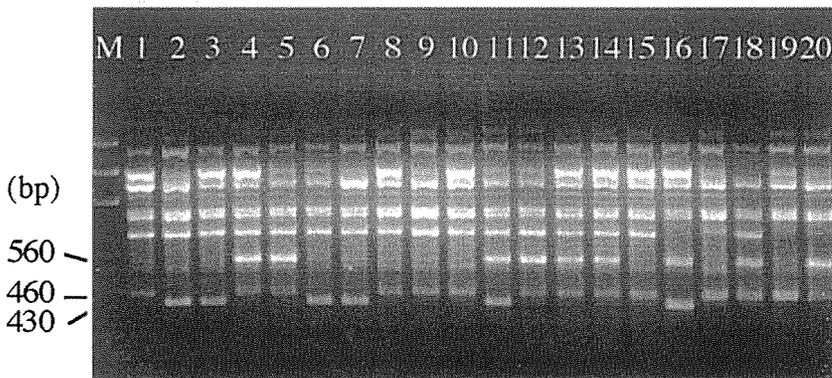


Fig. 1. Amplification products from 20 different Japonica varieties using primer AC17. M: Size marker, ϕ X174 DNA digested with *Hae* III. 1: Kinuhikari, 2: Koshihikari, 3: Nipponbare, 4: Koganebare, 5: Hinohikari, 6: Yumehikari, 7: Yumetsukushi, 8: Chikushi 15, 9: Chikushi 23, 10: Tsukushihomare, 11: Mineasahi, 12: Hohoemi, 13: Reiho, 14: Hayayutaka, 15: Nishihomare, 16: Yamadanishiki, 17: Saiwaimochi, 18: Hakutomochi, 19: Himikomochi, 20: Hiyokumochi.

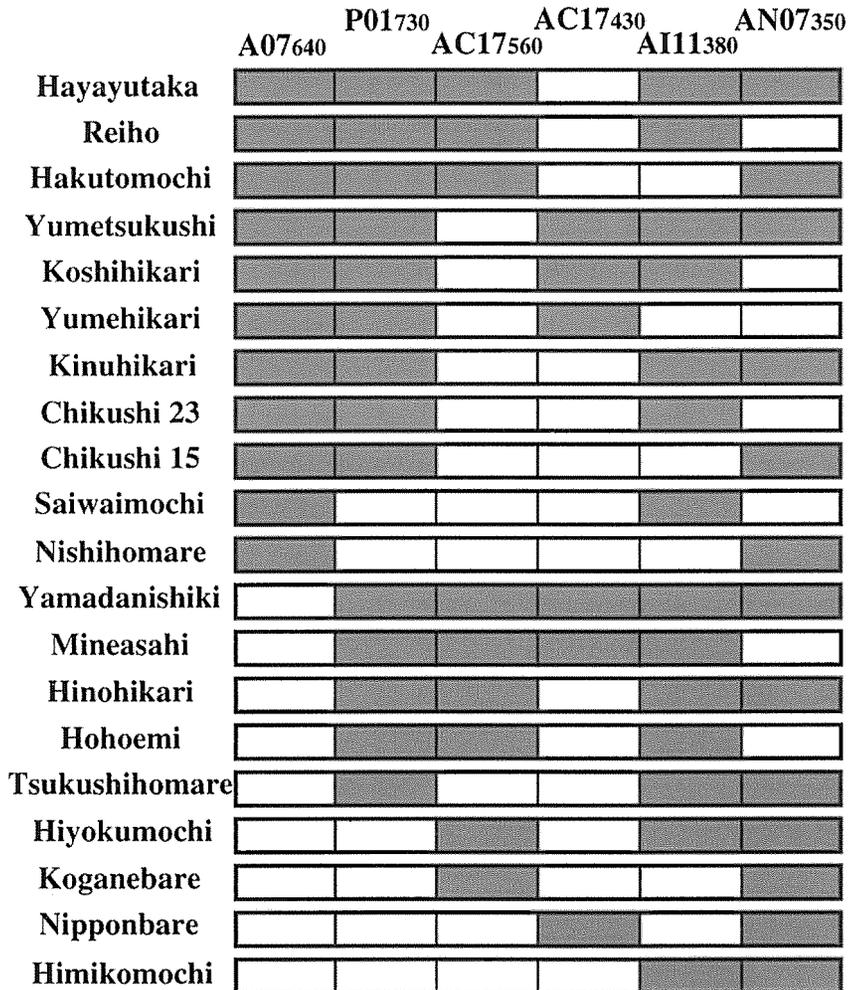


Fig. 2. DNA fingerprinting of 20 Japonica varieties using RAPD analysis. Variety name is shown in the left of each column and 6 RAPDs are shown at the top of columns. ■: Presence of an amplification product, □: Absence of an amplification product.

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

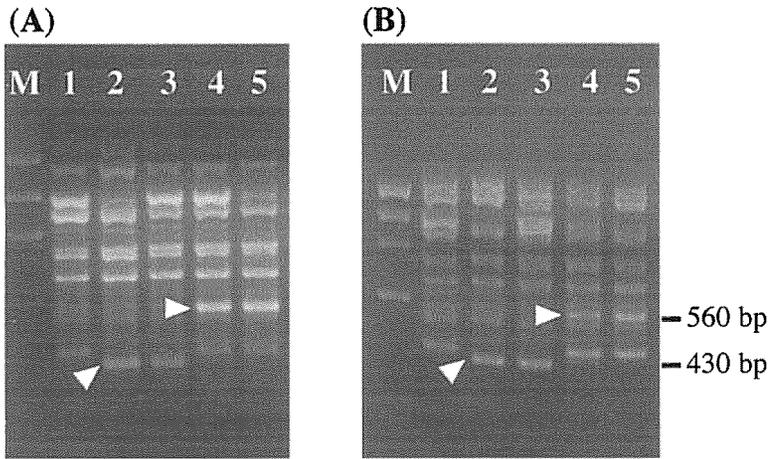


Fig. 3. Amplification products with the primer AC17 using template DNA extracted by CTAB method (Fig. 3A) and simple method (Fig. 3B). Arrow heads indicate 560 and 430bp bands. M: Size marker, ϕ X174 DNA digested with *Hae* III. 1: Kinuhikari, 2: Koshihikari, 3: Nipponbare, 4: Koganebare, 5: Hinohikari.

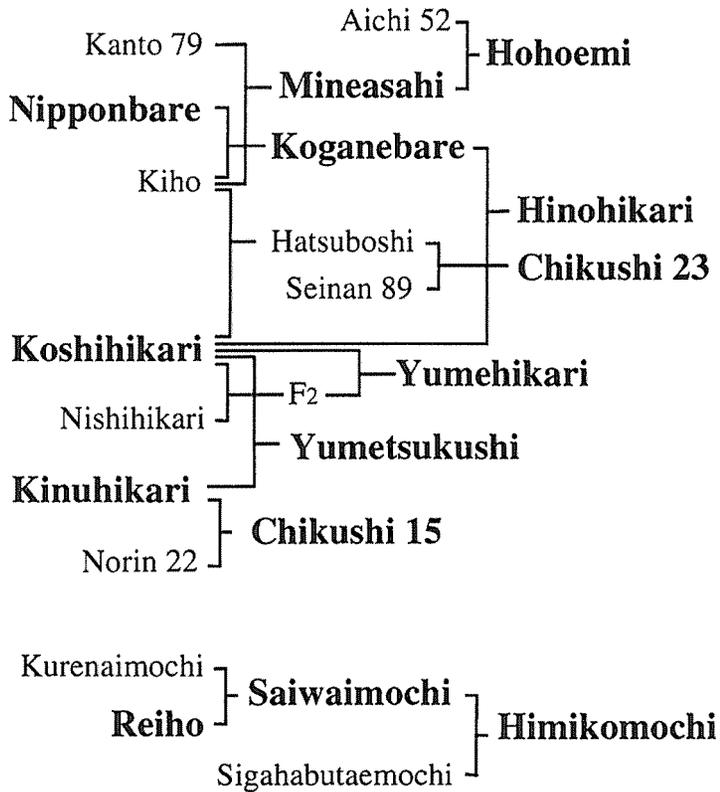


Fig. 4. The derivation of Japanese paddy rice varieties. The varieties shown in large bold letters were used in this study.

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, A07₆₄₀, AC17₄₃₀, AI11₃₈₀, AN07₃₅₀ 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, これらを実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梗 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, A07₆₄₀, P01₇₃₀, AC17₅₆₀, AC17₄₃₀, AI11₃₈₀, AN07₃₅₀ 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 F₂ 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. 育種, 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.