

## DNA マーカーによる愛知県水稻奨励品種等の相互識別

水上優子<sup>1)</sup>・森 賢一郎<sup>2)</sup>・都築雅美<sup>2)</sup>

**摘要:**愛知県主要農作物奨励品種(2023年9月22現在)と愛知県育成で個別許諾を行っている水稻品種について、DNAマーカーによる相互識別を可能とした。市販のマルチプレックスPCR試薬により、うるち品種・系統は8プライマー、酒用うるち品種は2プライマー、糯品種は5プライマーを用い、反応液中のプライマー濃度の最適化を図ることで、1回の反応で識別できる。本技術は、他の流通品種との比較で品種を特定する技術ではないが、種子生産場面での混種の有無や品種確認、県内産地での自主検査の簡易な識別法として利用できる。

**キーワード:**水稻、品種識別、DNAマーカー

### 緒言

愛知県は主要農作物の品種の開発並びに種子の生産及び供給に関する条例(2020年4月1日施行)に基づき、稲・麦・大豆の品種開発とともに優良な品種を奨励品種として決定し、その種子の生産・供給について県が一体的に取り組んでいる<sup>1)</sup>。また、消費者の米品種への関心も年々高まり、水稻育成機関や生産者も産地ブランドとして品種を保護する動きも活発である。このため、種子生産段階や生産・流通時の品種識別は重要となっている。

近年の品種識別ではDNAマーカーの利用が主流となっている。稲の品種識別における利用は1990年代後半から始まり<sup>2)</sup>、現在までに多くの県でDNAマーカーによる識別法が報告されている<sup>3-8)</sup>。愛知県でも黒柳ら<sup>9)</sup>が愛知県育成品種・系統及び主要流通品種のDNAマーカーによる識別法を報告している。現在では企業による米品種識別検査も充実し<sup>10)</sup>、検査用の試薬キットも販売されている<sup>11)</sup>。これらの検査サービスや試薬は多数の流通品種識別に対応しているものの、新たに開発された品種や流通量の少ない品種への適用には時間がかかる。本県奨励品種(2023年9月22日現在)のうち、現在民間サービスの識別対象と表示されているのは流通の多い「あいちのかおり」等の6品種のみである。また、入手しやすい市販試薬でも検定費用は1回あたり550~836円と、比較的高価である。このため、奨励品種の県内栽培面積が7割以上を占める愛知県では、実需現場において実施可能でより安価かつ簡易なDNAマーカーによる識別法が求められている。

本研究では、2006年以後の愛知県育成品種を中心に、農業総合試験場での原種生産と県内生産が行われている奨励品種と個別許諾品種について、黒柳ら<sup>9)</sup>の報告を元にしたDNAマーカーによる相互識別法を報告する。

### 材料及び方法

#### 1 供試品種・系統

材料として農業総合試験場で保管する原種種子を用い、水稻うるち品種として奨励品種「あいちのかおり SBL」、「あさひの夢」、「ゆめまつり」、「大地の風」、「愛知135号」、「みねはるか」、「チヨニシキ」、「ミネアサヒ SBL」、「もみゆたか」、「あきたこまち」、「コシヒカリ」、個別許諾品種「コシヒカリ愛知 SBL」、「なつきらり」、参考品種として「ミネアサヒ」、「あいちのかおり」の計 15 品種・系統を供試した。酒用うるち品種として奨励品種「若水」、「夢山水」、「夢吟香」の計3品種、糯品種として奨励品種「恵糯」、「ココノエモチ」、「十五夜糯」、「こはるもち」に個別許諾品種「きぬはなもち」、「やわ恋もち」、「峰のむらさき」の計 7 品種を供試した。

#### 2 DNA抽出

DNA はイネの成葉または玄米から、簡易 DNA 抽出試薬(DNA すいすい-S、(株)リーズ、つくば)を用い製品の標準プロトコルによって抽出した。抽出後の DNA は TE バッファー(10 mM Tris-HCl、1 mM 2Na-EDTA)に溶解し、10 ng/μl 濃度になるように調整して PCR 反応に用いた。

#### 3 単独PCRとマルチプレックスPCR

供試品種・系統の DNA を鋳型とし、黒柳ら<sup>9)</sup>が報告したプライマーによる PCR で増幅 DNA 断片の有無を確認し、その後プライマーを組み合わせたマルチプレックス PCR を行った。プライマー塩基配列は WKA9、F6、E30、B43、G22、P5、B1 及び G28 は大坪ら<sup>12,13)</sup>、M2CGV2、M11V1、及び TM2 は黒柳ら<sup>9)</sup>、N4-1 は林ら<sup>14)</sup>の報告によった。また、「なつきらり」と「コシヒカリ」を識別する DNA マーカーと

<sup>1)</sup>環境基盤研究部(現研究戦略部) <sup>2)</sup>環境基盤研究部



図1 うるち品種・系統、糯品種の電気泳動像例

(1)プライマーB1、(2)プライマーG28、(3)プライマーP5。

M:100bp DNALadder(\*は500bpを示す)、B: 蒸留水、1:あきたこまち、2:コシヒカリ、3:コシヒカリ愛知 SBL、4:なつきらり、5:みねはるか、6:ミネアサヒ SBL、7:ミネアサヒ、8:あさひの夢、9:ゆめまつり、10:大地の風、11:愛知 135 号、12:あいちのかおり SBL、13:あいちのかおり、14:チヨニキ、15:もみゆたか、16:恵糯、17:ココノエモチ、18:十五夜糯、19:こはるもち、20: 峰のむらさき、21:きぬはなもち、22:やわ恋もち

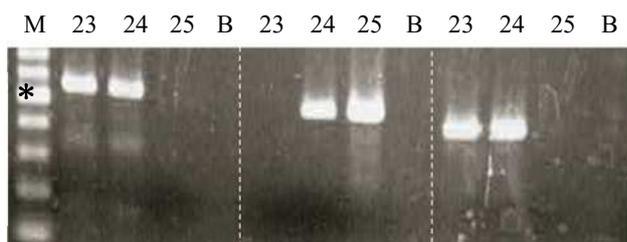


図2 酒用うるち品種の電気泳動像例

左:プライマーP5、中:プライマーB1、右:プライマー G28。

M:100bp ladder (\*は500bpを示す)、B: 蒸留水 23:若水、24:夢山水、25:夢吟香

して、NGS 解析(GRAS-Di®解析、(株)生物技研、相模原)で得られた両品種の部分塩基配列を比較し、塩基欠失部分を利用して「なつきらり」のみで増幅可能なプライマー N302(N302F: 5'-GGCAGCTTCTGCATGCACAT-3'、N302R:5'-ATCAGGCGCTTTGTTTCAGCA-3')を設計した。

単独 PCR は DNA ポリメラーゼ(AmpliTaq Gold® 360 Master Mix、サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)、東京)を用い、試薬組成は試薬の標準プロトコルで示された終濃度に合わせ、反応液量 10  $\mu$ l になるよう調整した。PCR 反応はサーマルサイクラー(T-100、バイオ・ラッドラボラトリーズジャパン(株)、東京)を用い、酵素活性化 95  $^{\circ}$ C 9 分、次に変性 95 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 60 $^{\circ}$ C 15 秒、伸長 72 $^{\circ}$ C 1 分を 1 サイクルとして 35 反復し、最終伸長を 72 $^{\circ}$ C 5 分として行った。

単独 PCR の結果からプライマーの組み合わせを検討し、マルチプレックス PCR キット(Multiplex PCR Assay Kit Ver.2、タカラバイオ(株)、草津)を用いてマルチプレックス PCR を行った。試薬組成は試薬の標準プロトコルで示された終濃度に合わせ、反応液量 10  $\mu$ l または 20  $\mu$ l になるよう調整した。なお、プライマーの最終濃度は標準プロトコル

の 0.2  $\mu$ M が基本であるが、反応結果によって一部のプライマーを 0.4~0.8 $\mu$ M の範囲で変更した。PCR 反応は単独 PCR と同じサーマルサイクラーを用い、酵素活性化 94 $^{\circ}$ C 1 分、次に変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 60 $^{\circ}$ C 30 秒、伸長 72 $^{\circ}$ C 1 分を 1 サイクルとして 35 反復し、最終伸長を 72 $^{\circ}$ C 10 分として行った。

PCR反応後、1 $\times$ TAE緩衝液(0.04 M Tris-HCl、1 mM 2Na-EDTA、pH 8.0)に2%濃度でアガロース(Agarose、A9539、シグマアルドリッチジャパン(株)、東京)を溶かした2%ゲルに、泳動指標用の染色液(グリセリン25%、ブロムフェノールブルー0.25%、キンシアノール0.25%、滅菌蒸留水74.5%)1  $\mu$ lを加えた反応液5  $\mu$ lを滴下し、電気泳動装置(Mupid2、(株)アドバンス、東京)を用い100 Vで25~35分で電気泳動を行った。泳動後にゲルをエチジウムブロマイド染色液に数分浸して染色し、ゲル撮影装置(E-BOX-CX5、VILBER、フランス)で紫外線照射によってバンドを検出し、泳動像を撮影した。

## 結果及び考察

単独PCRの電気泳動像の一部を図1、図2に示した。品種ごとに、単独PCRとマルチプレックスPCRでの増幅断片の有無を+/-で表1にまとめた。「若水」は黒柳<sup>9)</sup>の報告と異なり単独PCRでも増幅したが、使用した酵素の増幅能の向上によるものと考えられた。また、今回用いたマルチプレックスPCR試薬もDNA断片の増幅能が高く、一部のプライマーでは単独PCRで増えなかった断片がマルチプレックスPCRで増える場合が複数品種で認められた。うるち品種・系統はWKA9、M2CGV2、M11V1、B1、G28、TM2、N302にE30またはP5のいずれかを加えた8プライマー、酒用うるち品種はWKA9、F6、B1のうちから、N4-1、P5、G28のうちからそれぞれ1プライマーを組み合わせた2プライマー、糯品種はWKA9、M2CGV2、E30、B1、G28の5プライ

表1 遺伝子多型

| マーカー名(bp)   |   | WKA9  | F6    | M2CGV2 | N4-   | E30 | B43 | M11V1 | G22   | P5  | B1  | G28 | TM2 | N302 |
|-------------|---|-------|-------|--------|-------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|-----|-----|------|
| 品種・系統名      |   | 1,600 | 1,200 | 1,200  | 800   | 800 | 800 | 700   | 600   | 550 | 500 | 450 | 350 | 300  |
| あきたこまち      | 粳 | 奨     | +     | -      | -     | +   | -   | -     | +     | -   | +   | -   | +   | +    |
| コシヒカリ       |   | 奨     | -     | -      | -     | +   | -   | +     | +     | +   | -   | +   | +   | -    |
| コシヒカリ愛知 SBL |   | 個     | -     | -      | -     | -   | +   | +     | +     | -   | +   | +   | +   | -    |
| なつきらり       |   | 個     | -     | -      | -     | +   | -   | +     | +     | +   | -   | +   | +   | +    |
| みねはるか       |   | 奨     | +     | -      | +     | +   | -   | -     | +     | -   | +   | +   | +   | -    |
| ミネアサヒ SBL   |   | 奨     | +     | -      | +     | -   | -   | -     | +     | -   | +   | +   | +   | -    |
| ミネアサヒ       |   | 参     | +     | -      | +     | +   | +   | -     | +     | -   | -   | +   | +   | -    |
| あさひの夢       |   | 奨     | +     | -      | -     | -   | -   | -     | -     | -   | +   | -   | +   | -    |
| ゆめまつり       |   | 奨     | +     | +      | -     | -   | -   | -     | -     | -   | +   | -   | -   | -    |
| 大地の風        |   | 奨     | +     | +      | -     | -   | -   | +     | -     | -   | +   | -   | -   | -    |
| 愛知 135 号    |   | 奨     | +     | -      | +     | -   | +   | -     | -     | -   | +   | -   | -   | -    |
| あいちのかおり SBL |   | 奨     | +     | -      | +     | -   | +   | +     | -     | -   | +   | -   | +   | -    |
| あいちのかおり     |   | 参     | +     | -      | +     | +   | +   | -     | -     | -   | -   | -   | +   | -    |
| チヨニシキ       |   | 奨     | -     | -      | +     | +   | -   | -     | +     | +   | -   | +   | +   | -    |
| もみゆたか       |   | 奨     | -     | -      | - (+) | -   | -   | +     | -     | -   | -   | +   | +   | +    |
| 恵籾          | 糯 | 奨     | +     | -      | +     | +   | +   | -     | +     | -   | -   | -   | +   | +    |
| ココノエモチ      |   | 奨     | -     | +      | +     | +   | +   | +     | -     | -   | -   | -   | +   | +    |
| 十五夜籾        |   | 奨     | -     | -      | +     | +   | +   | +     | -     | -   | -   | -   | +   | +    |
| こはるもち       |   | 奨     | +     | +      | +     | -   | -   | -     | - (+) | -   | -   | +   | -   | +    |
| 峰のむらさき      |   | 個     | -     | +      | - (+) | +   | -   | +     | -     | -   | -   | +   | +   | +    |
| きぬはなもち      |   | 個     | +     | +      | -     | -   | -   | -     | -     | -   | +   | -   | +   | +    |
| やわ恋もち       |   | 個     | +     | +      | - (+) | -   | +   | -     | - (+) | -   | -   | +   | +   | +    |
| 若水          | 酒 | 奨     | -     | -      | +     | +   | -   | -     | -     | +   | -   | +   | +   | +    |
| 夢山水         |   | 奨     | - (+) | +      | - (+) | +   | -   | -     | -     | +   | +   | +   | +   | +    |
| 夢吟香         |   | 奨     | +     | +      | - (+) | -   | -   | -     | +     | -   | +   | -   | +   | +    |

注)+:増幅あり。 -:増幅なし。 ()内はマルチプレックスPCRにおいて単独PCRと異なる増幅が認められた場合を示す。 n.d.は未実施。  
奨:奨励品種、個:個別許諾品種、参:参考。

マールまたはWKA9、F6、E30、M11V1の4プライマーを用いると、増幅断片のバンドが重ならず相互識別が可能と考えられた。これらのプライマーを混合したマルチプレックスPCRを行った結果、増幅が安定し品種間のバンドパターンの差がより見やすかったプライマー組み合わせを識別用のセットとし、その電気泳動像を図3に示した。なお、TPS Buffer(100 mM Tris-HCl, 10m 2Na-MEDTA, 1M KCl)を用いた簡易抽出法<sup>8)</sup>によるDNAを鋳型とした場合でも、増幅は可能であった(データ未掲載)。

マルチプレックス化したことで各プライマーによる増幅量に差が生じ、電気泳動後のバンドの検出に影響がみられた。このようなマルチプレックスPCRと単独PCRでの増幅差は、黒柳ら<sup>9)</sup>も述べているように、複数のプライマー同士の干渉の影響と考えられた。特にM11V1は増幅が弱くなる傾向が強かったため、反応液のプライマー最終濃度の増加を検討し、標準の4倍(0.8 μM)に増加することでバンドの検出を安定させた。図3(1)はM11V1の濃度を4倍にした時のうるち品種・系統の識別電気泳動像である。糯品種の識別でもM11V1を用いる4プライマーの場合はプライマー量の調整が必要であったため、等量のプライマーで反応が可能5プライマーが識別に適すると判断し、図3(2)に示した。酒用うるち品種については、前述のプライマー組み合わせのいずれでも識別可能であったが、増幅バンド長の差が大きいF6とP5の組み合わせを識別用として図3(3)に示した。本報告で選んだプライマー組み合わせを用いれば、うるち品種・系統、酒用うるち品種、糯品種のいずれも、1回のマ

ルチプレックスPCR反応で相互識別が可能であった。黒柳ら<sup>9)</sup>の選定したプライマーは主に大坪ら<sup>12,13)</sup>により米品種判別用に作成されたものであり、ここで供試した愛知県育成品種・系統の相互識別に利用できた。これ以外にもDNAマーカーとして使えるイネの公開プライマー情報は非常に多く、もっと多くの品種識別を可能とする組み合わせも選定可能である。しかし、「なつきらり」と「コシヒカリ」のような準同質遺伝子系統に近い育成品種の場合、品種間の塩基配列差が小さく、既報のプライマーが使えず探索に時間がかかる。その場合、両品種の詳細塩基配列を解読し、差のある部分から新たなプライマーを設計する方が有利と考えられる。近年は次世代シーケンサーを用いた様々な塩基配列解読法が比較的安価に利用できる。本報告のN302も「なつきらり」と「コシヒカリ」のNGS解析データの一部を利用し設計することができた。

本報告で述べたマルチプレックスPCRにより、現行の愛知県水稲奨励品種、個別許諾品種についての相互識別が可能で、これらの品種間の混入の有無は確認できる。しかし、他の流通品種との比較は行っておらず、品種を特定する技術ではない。また、農林水産省が「DNAマーカー品種判別技術の妥当性確認のためのガイドライン」を示しているが<sup>15)</sup>、本報告の相互識別法は妥当性確認を行っていない。このため、種子生産上の混種の有無や、県内産地での自主検査用の簡易な確認法としての活用にとどめ、他の流通品種との識別は民間の検査委託の利用が勧められる。

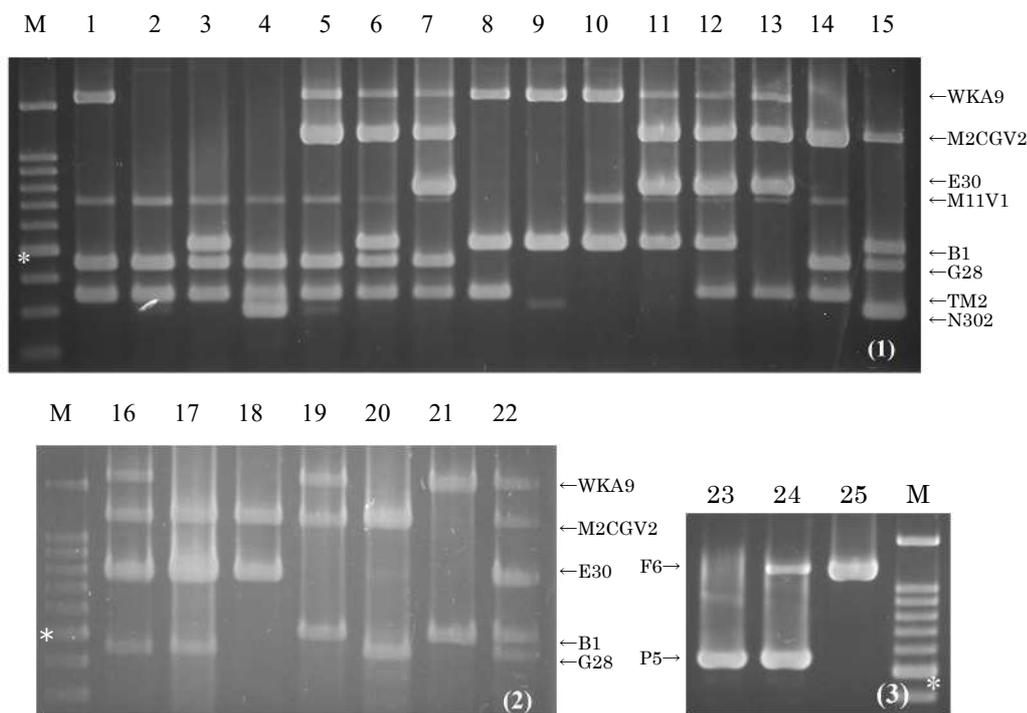


図3 マルチプレックスPCRの電気泳動像  
(1)-うるち品種、(2)-糯品種、(3)-酒用うるち品種、M、1~25:図1、2と同様。

## 引用文献

1. 愛知県園芸農産課. 主要農作物種子対策 (2024.3.28更新).  
<https://www.pref.aichi.jp/soshiki/engei/shushi.html>
2. 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法を用いた国内産製麻の品種判別技術. 日本食品科学工学会誌. 44, 386-390(1997)
3. 松古浩樹, 中村澄子, 大坪研一. 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. 岐阜農技研報. 6, 7-11(2006)
4. 小原麻里, 鎌形民子, 大越一雄. 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(2007)
5. 江嶋亜祐子, 和田卓也, 坪根正雄, 緒方武文. 米品種識別のための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(2007)
6. 林猛, 小林麻子, 鮑根良, 富田桂. 福井県的水稻奨励品種を識別するSSRマーカーセット開発. 北陸作物学会報. 44, 11-14(2010)
7. 癸生川真也, 中澤佳子, 天谷正行, 生井潔. ポストラベル法を用いた栃木県水稻奨励品種を品種識別するSSRマーカーセットの開発. 栃木農試研報. 71, 55-61(2013)
8. 橋口太亮, 藤川和博. DNAマーカーによる鹿児島県水稻奨励品種・適品種の識別技術. 日作九支報. 87, 1-5(2021)
9. 黒柳悟, 水上優子, 大矢俊夫. DNAマーカーによるイネの品種識別. 愛知農総試研報. 38, 19-26(2006)土壤環境分析法編集委員会. 土壤環境分析法. (1997)
10. <https://www.naro.go.jp/laboratory/ncss/hogotaisaku/DNAinfo/kit.html>
11. <https://www.naro.go.jp/laboratory/ncss/hogotaisaku/DNAinfo/organization.html>
12. 大坪研一, 中村澄子, 今村太郎. 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. 日本農芸化学会誌. 76, 388-397(2002)
13. 大坪研一, 中村澄子, 宮村毅, 雲聡, 加藤郁之進. 米粒中の混合品種の有無および混合された品種の判別方法. 特許第4189873号(2008)
14. 林長生, 加藤恭宏, 船生岳人, 早野由里子. Pb1遺伝子と連鎖する分子マーカーを指標にイネの穂もち抵抗性を識別する方法. 特許第4775945号(2007)
15. 農林水産省輸出・国際局知的財産課. DNA品種識別技術の妥当性確認のためのガイドライン(令和4年度改訂版). 令和5年3月.