

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

Development of Multiplex PCR Primer Sets for the Identification of Rice Varieties Recommended in Southern of Gifu Prefecture

松古浩樹・中村澄子*・大坪研一*

Hiroki MATSUFURU, Sumiko NAKAMURA*, Ken'ichi OHTSUBO*

要 約:本研究では、8品種の岐阜県平坦地奨励品種を判別できる2セットのマルチプレックス PCR プライマーセットを開発した。PCR の鋳型 DNA は、葉片から DNA 抽出キット (ISOPLANT II) を用いて抽出精製したゲノム DNA を用いた。15種類の "sequence-tagged site"(STS) プライマーを PCR で増幅し、その中から、岐阜県平坦地奨励品種 (あきたこまち、ひとめぼれ、コシヒカリ、白雪姫、あさひの夢、みのにしき、ハツシモ、モチミノリ) を判別するマルチプレックス PCR プライマーセットと8種類の岐阜県平坦地奨励品種の内、ハツシモだけ検出しないマルチプレックス PCR プライマーセットを開発した。本研究に用いたマルチプレックス PCR プライマーセットは、岐阜県平坦地奨励品種の品種判別に有効であると考えられる。

キーワード: 品種判別、岐阜県平坦地奨励品種、マルチプレックス PCR、STS プライマー

結 言

農家が受取る作物の種子は良いものであることが常識の世界である。そのため、種子を扱う者は、安心して種子を使って頂ける様、日々事故のないよう細心の注意を払って生産・管理に努めている。当研究所もそれら種子の元となる原原種及び原種を扱っており、食の安心を確保するための品質管理の観点から、種子への異品種混入検査に活用できる品種判別法の開発は重要である。コメの品種判別技術は、すでに「コシヒカリ」、「あきたこまち」等のブランド米については確立されているが、それぞれの県独自に育成した品種については研究対象とされずに残されているものも少なくない。そこで、本県平坦地向け水稻奨励品種について、DNA による品種判別法の確立を試みた。

材料及び方法

1. 供試品種

岐阜県平坦地向け水稻奨励品種

早生 (あきたこまち、ひとめぼれ、コシヒカリ)

中生 (白雪姫、あさひの夢、モチミノリ)

晩生 (みのにしき、ハツシモ)

を供試した。

2. 各供試品種の葉片からの鋳型 DNA の調整

奨励品種決定調査ほ場で栽培されている各供試品種の葉片を採取し、葉片0.1gを1.5ml エッペンチューブにカットしながら入れ、液体窒素で凍結させてホモジナイザーを用いて粉碎した。トータル DNA の抽出及び精製は、DNA 抽出キット (ISOPLANT II) に改良を加えた方法で行った。粉碎したサンプルに 1ml WashBuffer+2-ME (2-Mercaptoethanol) を加え攪拌し冷却遠心機 (日立 Himac CF15D) によって遠心分離 (15,000rpm、10min) を行い、上清を除去した。沈殿物を 300 μ l Solution I +2-ME を加え攪拌し、150 μ l Solution II を加え混合後、インキュベーター (TAITEC DTU-N) を用いて 50°C で 20 分間加熱処理を行った。処理後、100 μ l Solution III-A と 120 μ l Solution III B を加え攪拌後、氷上で 10 分間処理し、遠心分離 (15,000rpm、10min) を行った。上清を新しい 1.5ml エッペンチューブに移し、40 μ l クロロホルムを加え攪拌し、遠心分離 (15,000rpm、5min) を行い、有機層を含まないように上清を新しい 1.5ml エッペンチューブに移した。これに 2 倍容のエタノールを加え、室温で 10 分間静置し遠心分離 (15,000rpm、10min) を行い上清を除去し、70%エタノール 350 μ l で洗浄した後、遠心分離 (15,000rpm、5min) を行い上清を除去した。これを減圧乾燥機 (MILLIPORE Milli-Dry) を用い乾燥 (2min) させ、50 μ l TE で溶解し、鋳型 DNA とした。

*独立行政法人 食品総合研究所

*National Food Research Institute

3. PCRに用いる STS 化対合プライマー

15種類の STS 化対合プライマー (大坪ら, 2003年) について検討した。各種の STS 化プライマーの塩基配列を表1に示す。

表1 STS 化プライマーの塩基配列

プライマーの名称	塩基配列
A6 フォワード	CCAGCTGTACGCCTGTA CTAC
リバース	CCAGCTGTACGTCTTCCCAGC
A7 フォワード	TGCCTCGCACCAGAAATAG
リバース	TGCCTCGCACCATGAG
B1 フォワード	GTTTCGCTCCTACAGTAATTAAGG
リバース	GTTTCGCTCCCATGCAATCT
B43 フォワード	GGCCGGCATGACTCAC
リバース	ACTGGCCGGCATCAAGAC
F6 フォワード	ACCACTCCATATATATCATCCAAAG
リバース	ACCACTCCATATCACCACAAGG
G4 フォワード	GAGACCGATATGCGATTC
リバース	GTGGTGTTTAGATCCAGAGACTTA
G22 フォワード	CTCACTCAAATTTACAGTGCATTTTCTTG
リバース	AGGGCCATGATACAAGACTCTGT
G28 フォワード	GGCGGTCGTTCTGCGAT
リバース	GGAGAATCCACAGTAAGTTTTTCTTTG
J6 フォワード	GTCGGAGTGGTCAGACCG
リバース	GTCGGAGTGGATGGAGTAGC
M2CG フォワード	ACAACGCCTCCGATGA
リバース	ACAACGCCTCCGACAACAAGAT
M11 フォワード	GTCCACTGTGACCACAACAT
リバース	GTCCACTGTGGGGATTGTTC
P5 フォワード	ACAACGGTCCGTCCTTGCTT
リバース	ACAACGGTCCAACAGATACTTTTGA
S13 フォワード	GTCGTTCCCTGTGGTTAGGACAGGGT
リバース	GTCGTTCCCTGCTGGTGTCTCAGAT
T16 フォワード	GGTGAACGCTGTAGTTGGAATATA
リバース	GGTGAACGCTCAGATTTAAATATAAT
WK9 フォワード	CCCGCAGTTAGATGCACCATT
リバース	CCGCAGTTAGATCAAGTGCC

4. 各種 STS 化対合プライマーの PCR による DNA の増幅

8種類の奨励品種の葉片から調整した DNA を鋳型 DNA とし、PCR (図1) を行った。PCR におけるアニーリング温度は、各種の STS 化対合プライマーの融解温度をもとに、より高い温度 (62°C) を採用した。鋳型

DNA 約50ng、10pmol/ μ l の STS 化対合プライマー各 0.4 μ l、2.5mM dNTPs Mixture 2 μ l、Ex Taq ポリメラーゼ (TaKaRa) 0.2 μ l、Ex Taq 10 \times Buffer 2 μ l とし、反応液量は20 μ lとした。PCR 反応は、Thermal Cycler Dice (TaKaRa, TP600) を用いて、96°C 1分、62°C 1分、72°C 2分、35サイクル行った。反応産物は、TAE Buffer にアガロース (SIGMA, Type I-A) を加えて作成した1%(w/v)アガロースゲルで電気泳動した後、エチジウムブロマイドを1 μ g/ml に調整した TAE Buffer で染色しトランスイルミネーターで DNA バンドの有無を確認した。

5. マルチプレックス PCR プライマーセットの PCR による DNA の増幅

各種 STS 化対合プライマーの PCR の結果から、マルチプレックス PCR を行った。方法は各種 STS 化対合プライマーの PCR による DNA の増幅と同じ条件で行った。

結果及び考察

1. 各種 STS 化対合プライマーによる識別バンドの検討

各種の STS 化対合プライマーと各品種の反応結果を表2及び図2に示した。15種類の STS 化対合プライマーの内、7種類が品種判別に有効であった。

- ①B1 STS 化対合プライマーは、中晩生品種全てに増幅バンドが確認されたが、早生品種「あきたこまち」「ひとめぼれ」「コシヒカリ」では認められず、熟期別の識別に有効であった (図3-C)。
- ②A6 STS 化対合プライマーは、「みのにしき」と「ハツシモ」を識別した。
- ③F6 STS 化対合プライマーは、「白雪姫」と「みのにしき」を識別した (図3-B)。
- ④S13 STS 化対合プライマーは、「モチミノリ」のみバンドを増幅し、識別した (図3-A)。
- ⑤P5 STS 化対合プライマーは、早生品種「あきたこまち」「ひとめぼれ」「コシヒカリ」を認識し、熟期別の識別に有効であった。
- ⑥B43 STS 化対合プライマーは、「ひとめぼれ」「コシヒカリ」「白雪姫」「みのにしき」「ハツシモ」「モチミノリ」に増幅バンドを確認した。
- ⑦WK9 STS 化対合プライマーは、「あきたこまち」「ひとめぼれ」「あさひの夢」を識別した。

A7 (図3-D)、J6、T16 の STS 化対合プライマーは、岐阜県平坦地向け奨励品種の全ての品種で増幅したことから、鋳型 DNA の PCR 反応阻害による判定ミスの防止に利用できる可能性を確認した。

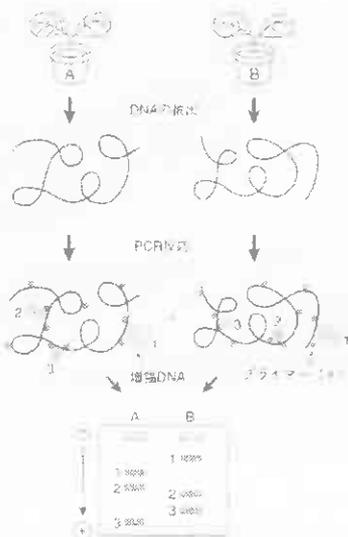


図1 品種判別の原理



図2 品種と STS 化対合プライマーの関係

表2 PCRにおける品種と STS 化対合プライマーの関係

STS Primer	A6	A7	B1	B43	F6	G4	G22	G28	J6	M2CG	M11	P5	S13	T16	WK9
	730	300	530	870	1180	830	650	460	1070	1240	770	580	1680	1600	1600
あきたこまち	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
ひとめぼれ	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
コシヒカリ	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
白雪姫	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
あさひの夢	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
みのにしき	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
ハツシモ	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
もちみのり	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-

注) + : 認識バンドが出現、- : 認識バンドが出現せず
各プライマーの下の数値は増幅バンドの分子量(bps)を示す

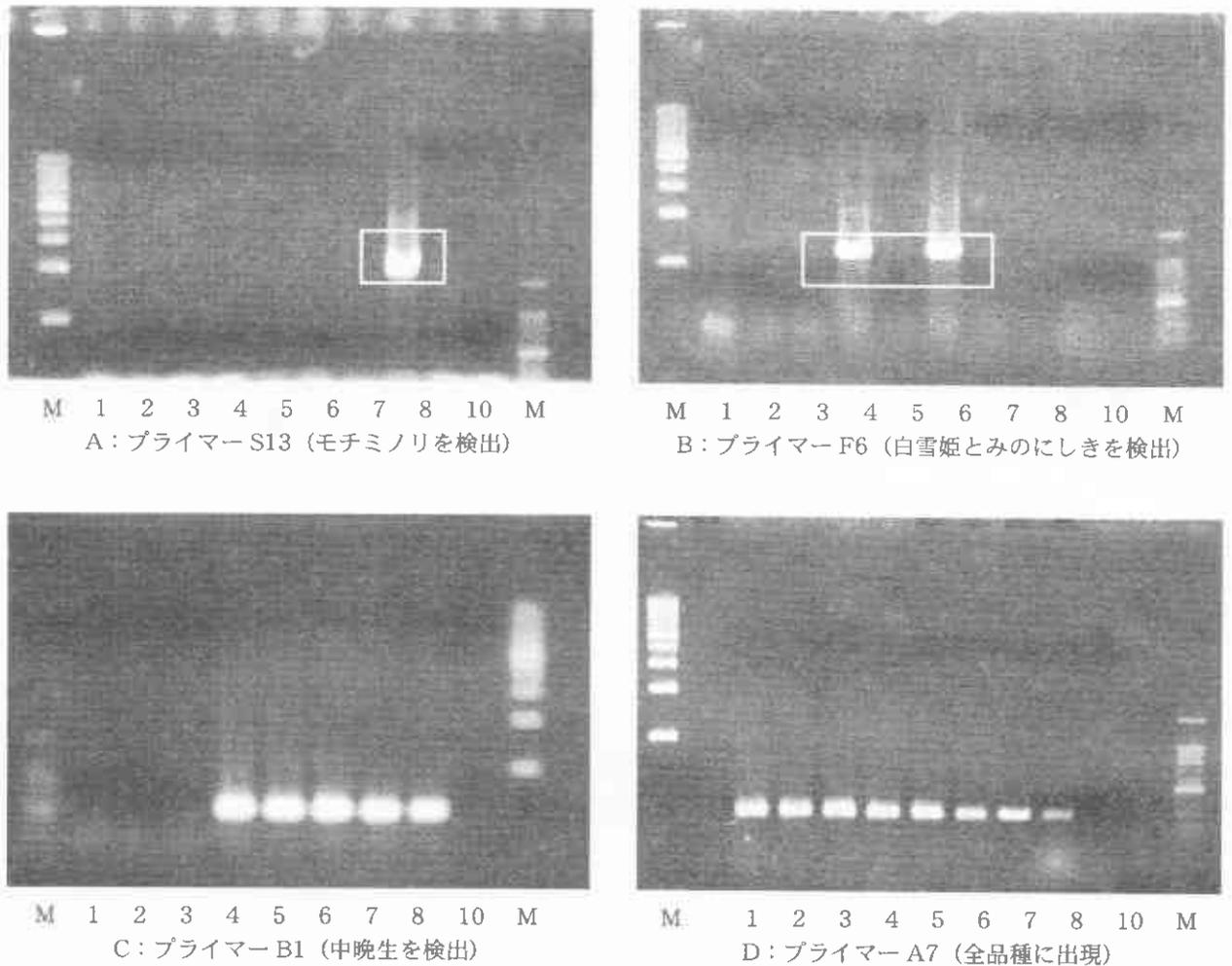


図3 各種のSTS化対合プライマーを用いたPCRの結果

1:あきたこまち、2:ひとめぼれ、3:コシヒカリ、4:白雪姫、5:あさひの夢、6:みのにしき、
7:ハツシモ、8:モチミノリ 10:H₂O M:DNA分子量マーカー(TaKaRa, 1kb DNA Ladder 及び100bp DNA Ladder)

2. 本県平坦地向け水稲奨励品種判別のマルチプレックスPCR法

①早生品種の判別:早生品種である「あきたこまち」「ひとめぼれ」「コシヒカリ」の品種判別については、B1、B43、WK9 STS化対合プライマーを用いることにより可能となった(図4-A)。

②中晩生品種の判別:中晩生品種である「白雪姫」「あさひの夢」「みのにしき」「ハツシモ」「モチミノリ」の品種判別についてはA6、F6、S13 STS化対合プライマーと(増幅バンドが鋳型DNA不良によるのか確認するため)全ての中晩生品種で増幅するB1 STS化対合プライマーの4種STS化対合プライマーを用いることで各品種の判別が可能となった(図4-A)。

3. ハツシモネガティブ判別のマルチプレックスPCR

岐阜県で最も多く作付けされている「ハツシモ」について、他品種の混入を防ぐ目的として、「ハツシモ」のみ増幅バンドが確認されない(他品種だけが発現する)ハツシモネガティブ判別プライマーセットの開発を検討した。その結果、P5、F6、WK9、S13を用いた場合、図4-Bのように「ハツシモ」のみ増幅バンドがない結果が得られ、ハツシモネガティブ判別プライマーセットとしての利用が可能と考えられた。

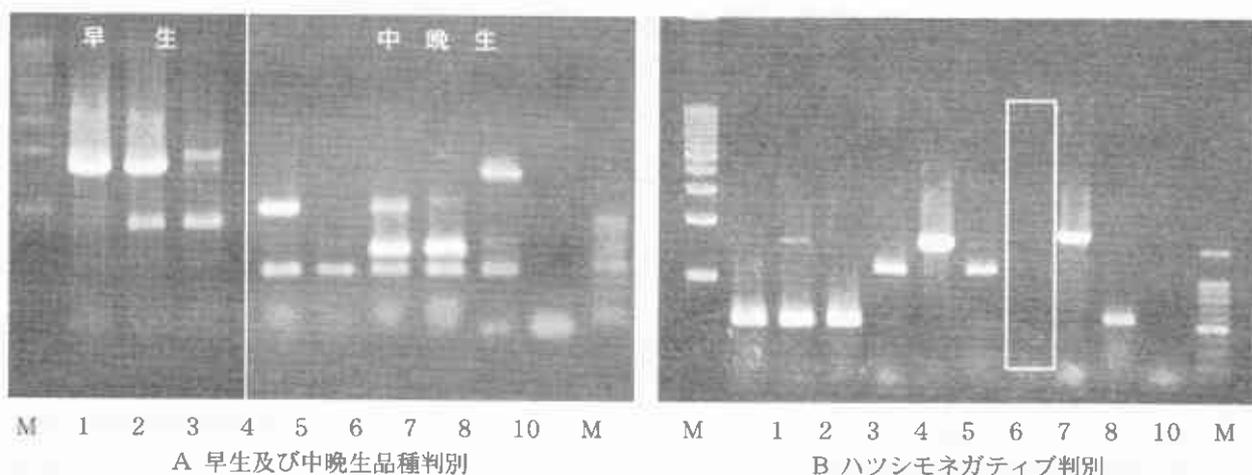


図4 マルチプレックスPCR法による平坦地向け奨励品種の判別

1 : あきたこまち, 2 : ひとめぼれ, 3 : コシヒカリ, 4 : 白雪姫, 5 : あさひの夢, 6 : みのにしき, 7 : ハツシモ, 8 : モチミノリ 10 : H₂O M : DNA 分子量マーカー (TaKaRa, 1kb DNA Ladder 及び100bp DNA Ladder)

おわりに

この技術は、本県平坦地向け水稻奨励品種の種子圃の異品種混入検査に活用できる。長所として現地圃場から新鮮な葉を直接持ち込み、検定を行うと、約6時間で品種判別が可能である。

普及・利用上の留意点としては、本県平坦地向け8水稻奨励品種の原原種及び原種の品種判別に利用することが目的であり、一般圃場での全国の品種に対する品種判別は対応していない。

謝 辞

研究の実施にあたり、独立行政法人 食品総合研究所には、助言・指導等、多大なご協力を頂きました。ここに記して心から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・豊島英規・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. 日本食品化学工学会誌 44 : 386-390.
- 2) 大坪研一・藤井 剛・橋野陽一(1999) RAPD 法による国内産精米の品種判別. 日本食品化学工学会誌 46 : 117-122.
- 3) 大坪研一・中村澄子・今村太郎(2002) 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. 日本食品化学工学会誌 76 : 388-397.
- 4) 小笠原博信(1998) ジャパンフードサイエンス 8 月号27
- 5) 中村澄子・岡留博司・大坪研一ら(2004) PCR による世界の広範な特性の米の識別および食味要因の探

索. 日本農芸化学会誌 78 : 764-779

ABSTRACT

In the present study, 2 sets of multiplex PCR primers were developed to identify 8 rice varieties recommended in southern of Gifu prefecture. As template DNAs for PCR, genomic DNAs of sample milled leaf were extracted and purified by ISOPLANT KIT2. Rice genomic DNAs were proliferated by PCR with the use of fifteen kinds of "sequence-tagged site" (STS) primers. In result, It became possible to identify of the rice varieties recommended in southern of Gifu prefecture (*Akitakomachi*, *Hitomebore*, *Koshihikari*, *Shirayuki hime*, *Asahinoyume*, *Minonishiki*, *Hatsushimo*, *Motiminori*) by multiplex PCR. In addition, It became possible to detect of the rice varieties recommended in southern of Gifu prefecture *except* Hatsushimo by multiplex PCR using 4 primer (P5, F6, WK9, S13). The present study suggest that the multiplex PCR primer sets developed were effective in distinguishing the rice varieties recommended in southern of Gifu prefecture.

KEYWORDS

Identification of Rice Varieties
Recommended in Gifu Prefecture of Southern
Multiplex PCR
STS Primer