

高知県の水稻奨励品種を判別する DNA マーカーの選定

武田俊也

Selection of DNA Markers to Identify the Recommended Rice Cultivars in Kochi Prefecture

Shunya TAKEDA

要 約

高知県の水稻奨励品種 13 品種を対象に、外観品質に依存せず遺伝子型によって品種を判別することが可能となる DNA マーカー 5 種 (RM9, RM8208, RM1320, いもち病真性抵抗性遺伝子 *Pia* または同 *Pii* の保有の有無を推定する DNA マーカー) を選定した。
キーワード : 品種判別, 奨励品種, 高知県, DNA マーカー, 水稻

はじめに

高知県では、高知県主要農作物種子生産要綱²⁾に基づいて、水稻奨励品種 13 品種の原原種、原種および一般種子が生産され、これらは県内水稻生産の基盤となっている。そのため、これらの種子生産には細心の注意が払われており、生産過程で異品種等の混入を避けるため、外観形質による品種判別が行われている。しかし、この判別方法では、外観形質が気象条件や栽培条件に大きく影響された場合や、育苗時等の外観形質情報が少ないステージの場合では、その判別が難しい。一方で、外観形質に依存せず、遺伝子型によって水稻品種を判別することが可能である DNA マーカーを用いた手法が広く用いられており、福井県⁸⁾や鹿児島県¹⁾、富山県⁷⁾では自県的水稻奨励品種を判別することができる DNA マーカーが選定されている。さらに、DNA マーカーを利用した品種判別については、ビジョンバイオ株式会社、日本穀物検定協会、株式会社サタケ等への委託分析も可能である。ただし、高知県の水稻奨励品種 13 品種の中には、高知県が独自に育成した品種も含まれており、他研究機関で選定されている DNA マーカーや委託分析が高知県の水稻奨励品種 13 品種に対応しているわけではない。また、新たに奨励品種が追加された場合は、委託分析が対応可能となるまで一定の期間を要する。

そこで本研究では、本県的水稻奨励品種の判別が可能となる DNA マーカーを選定した。

材料および方法

DNA マーカーの選定対象品種は高知県の水稻奨励品種 13 品種 (コシヒカリ, 南国そだち, よさ恋美人, にこまる, ヒノヒカリ, 黄金錦, アキツホ, 吟の夢, 土佐麗, さわかおり, ヒデコモチ, サイワイモチ, たまひめもち) とし、試料にはそれぞれの原原種を用いた。供試した DNA マーカーは McCouch ら³⁾により公開されているものの中で、福井県⁸⁾や鹿児島県¹⁾、富山県⁷⁾の報告を参考にし、選択した 12 種と Okuyama ら⁴⁾、Takagi ら⁶⁾、太田、野々上⁵⁾が公開しているいもち病真性抵抗性遺伝子 *Pia*, 同 *Pii* の保有の有無を推定できる DNA マーカー 2 種とした。選定基準は同一の PCR 条件で増幅産物が得られ、4.0%アガロースゲルで 2 種類以上の多型が確認でき、その判別が容易であることとした。各供試品種の DNA の抽出は葉身約 5cm をはさみで細断後、TE 溶液 (0.01 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.001 M EDTA (pH 8.0)) を 500 μ L 加え、95°C で 20 分湯煎し、行った。PCR 反応液の組成は鋳型 DNA 2 μ L, プライマー各 0.05 μ L, Go taq Green Master Mix (Promega 製) 5 μ L, ヌクレアーゼフリー水 4.9 μ L とした。PCR 反応には、サーマルサイクラー [TP600 (TaKaRa 製)] を用い、初期変性 95°C 5 分保持後、熱変性 95°C 30 秒, アニール 59°C 30 秒, 伸長反応 72°C 1 分を 1 サイクルとして 35 反復し、最終伸長 72°C 5 分保持の条件で行った。得られた PCR 増幅産物を核酸染色試薬 [ミドリグリーンアドバンス (日本ジェネティクス製)] により染色した 4.0%アガロース

[NusieveTMGTGTMAgarose（ロンザ製）]/0.5%TBE ゲルで電気泳動後、トランスイルミネーター [FTI-20M（フナコシ製）] で観察し、多型を調査した。

結果および考察

供試した計 14 種の DNA マーカー全てから増幅産物が確認できたが、2 種類以上の多型が認められ、その判別が容易であった RM9, RM8208, RM1320, いもち病真性抵抗性遺伝子 *Pia* または同 *Pii* の保有の有無を推定する DNA マーカーの計 5 種を品種判別用 DNA マーカー候補として選定した（表 1, 図）。

これらのうち、DNA 増副産物のバンドがコシヒカリと同じ位置に見られたものを A, 異なるものを B としたところ、DNA マーカーの組み合わせによって高知県の水稲奨励品種である 13 品種を判別することができた（表 2）。

McCouch[®]らによって公開されている 2,240 種類の DNA マーカーは、共優性であり、ホモ接合体とヘテロ接合体を区別できるため、交雑個体の判別が可能である。また、塩基配列情報が公開されているため、特許等の制限を受けずに使用できる利点がある。そのため、多くの県でこれらの情報を基に自県の水稲奨励品種を判別できる DNA マーカーセットを開発し

表1 選定したDNAマーカーとプライマー配列

DNAマーカー No.	DNAマーカー名	遺伝子名	染色体	プライマー名	配列(5'→3')	塩基対(bp)
1	RM9 ^{a)}	—	1	RM9-F RM9-R	GGTGCCATTGTCGTCCTC ACGGCCCTCATCACCTTC	18 18
2	RM8208 ^{a)}	—	3	RM8208-F RM8208-R	GCCCAAACACTACTCTCTTG GTAAATGCCTGAGTGCCTAC	20 20
3	RM1320 ^{a)}	—	1	RM1320-F RM1320-R	GTTAGTAGGGGCTGCACTG CTCTGCAGCAAACCAAAACC	20 20
4	—	<i>Pia</i> ^{b)}	11	Pia-F Pia-R	GCGACTGACACTTTCAATAGC CGGTAGAGCAATTTAGAAGCAG	21 22
5	—	<i>Pii</i> ^{c)}	9	Pii-2_SNP02 Pii-2_SNP03 Pii-IBRC-F Pii-IBRC-R	GATCATCTCATGGATCTTTTAATGC AGCTCTTCAGCGCTGTTTTC TCCAATGCTTCTGAAAGGTAGC TGGAACATGAACCCATATCC	25 20 22 21

a)McCouch *et al.*, 2002.

b)Okuyama *et al.*, 2011.

c)Takagi *et al.*, 2013., 太田・野々上, 2015.

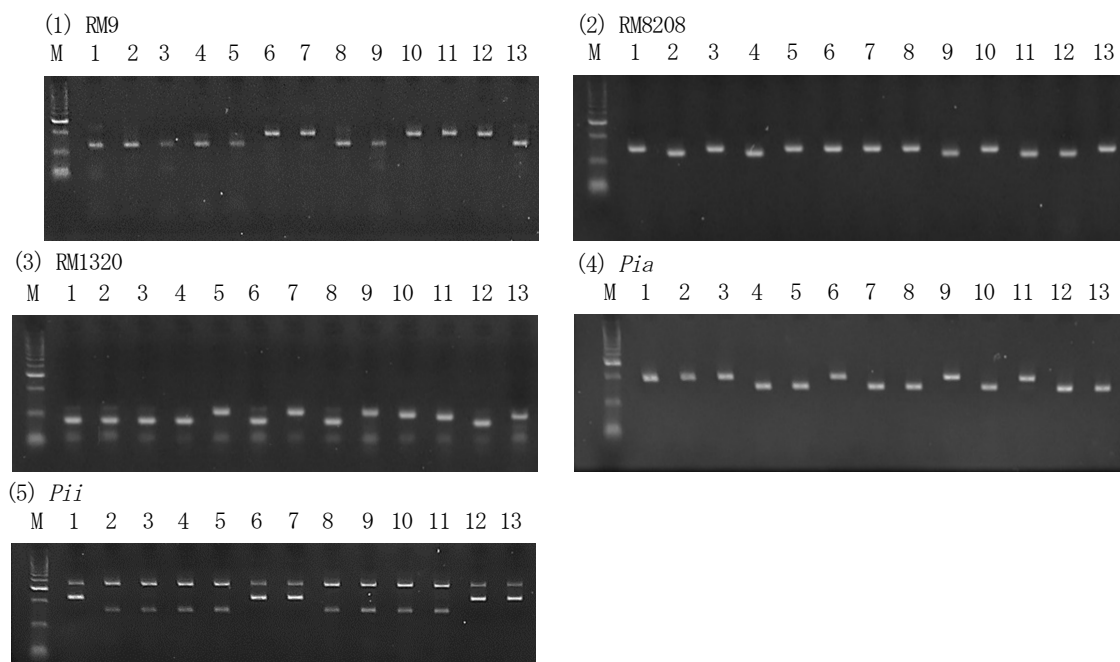


図 選定した DNA マーカーにおける増副産物の電気泳動結果

注) (1) ~ (5) は使用した DNA マーカー No. を示す。1: コシヒカリ, 2: 南国そだち, 3: よさ恋美人, 4: にこまる, 5: ヒノヒカリ, 6: 黄金錦, 7: アキツホ, 8: 吟の夢, 9: 土佐麗, 10: さわかおり, 11: ヒデコモチ, 12: サイワイモチ, 13: たまひめもち, M: サイゾマーカーを示す。

表2 選定したDNAマーカーにおける各品種の判別結果

品種名	DNAマーカーNo.				
	1 (RM9)	2 (RM8208)	3 (RM1320)	4 (<i>Pia</i>)	5 (<i>Pii</i>)
コシヒカリ	A	A	A	A	A
南国そだち	A	B	A	A	B
よさ恋美人	A	A	A	A	B
にこまる	A	B	A	B	B
ヒノヒカリ	A	A	B	B	B
黄金錦	B	A	A	A	A
アキツホ	B	A	B	B	A
吟の夢	A	A	A	B	B
土佐麗	A	B	B	A	B
さわかおり	B	A	B	B	B
ヒデコモチ	B	B	B	A	B
サイワイモチ	B	B	A	B	A
たまひめもち	A	A	B	B	A

注) 各DNAマーカーの多型はコシヒカリ型をA, コシヒカリ型と異なるものをBとした。

ている。本研究では、福井県⁸⁾、鹿児島県¹⁾、富山県⁷⁾の報告で使用されているマーカーのうち、12種類を供試したが、県育成品種「よさ恋美人」とその親品種「コシヒカリ」の判別ができなかった。そこで、これら12種類のマーカーに加え、いもち病真性抵抗性遺伝子を推定するDNAマーカー2種類を組み合わせた結果、本県の水稲奨励品種である13品種の判別が可能となった。McCouch³⁾らによって公開されているDNAマーカーでは、高知県独自の水稲奨励品種においてどのような多型を示すのかが不明であったため、判別可能なDNAマーカーを選定することが難しいと考えられた。一方で、いもち病真性抵抗性遺伝子を推定するDNAマーカーについては、品種登録時や系譜の情報、いもち病検定試験の結果から多型を予測できるため、選定が容易であった。このことから、品種判別時に後者のDNAマーカーを利用することは有効であると考えられた。今後、水稲奨励品種の改廃に応じて、DNAマーカーを再検討、更新していくことが必要となるが、本研究成果は原原種、原種および一般種子の安定生産に寄与することが期待される。

利益相反の有無

著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) 橋口太亮・藤川和博 (2021) . DNA マーカーによる鹿児島県水稲奨励品種・適品種の識別技術. 日本作物学会九州支部会報 87 : 1-5.
- 2) 高知県 (2021) . 高知県主要農作物種子生産要綱. <https://www.pref.kochi.lg.jp/doc/2021081000282/>

(2024. 10. 31. 閲覧) .

- 3) McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Fjellstrom, G. Declerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein (2002) . Development and mapping of 2240 new SSR Markers for rice (*Oryza sativa* L.) . DNA Research 9:199-207.
- 4) Okuyama, Y. H. Kanzaki, A. Abe, K. Yoshida, M. Tamiru, H. Saitoh, T. Fujibe, H. Matsumura, M. Shenton, D. C. Galam, J. Undan, A. Ito, T. Sone, and R. Terauchi (2011) . A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. The Plant Journal 66:467-479.
- 5) 太田裕貴・野々上慈徳 (2015) . DNA マーカーを利用した いもち病真性抵抗性遺伝子型推定. 東北農業研究 68:53-54.
- 6) Takagi, H. A. Umemura, H. Yaegashi, M. Tamiru, A. Abe, C. Mitsuoka, H. Utsushi, S. Natsume, H. Kanzaki, H. Matsumura, H. Saitoh, K. Yoshida, L. M. Cano, S. Kamoun, and R. Terauchi (2013) . MutMapGap: whole-genome resequencing of mutant F₂ progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii* . New Phytologist 200:276-283.
- 7) 富山県農林水産総合技術センター (2006) . 共優性型 DNA マーカーを利用した水稲および大豆品種の判別技術. 平成 18 年度研究成果
<https://taffrc.pref.toyama.jp/nsgc/nougyou/blog/kankoubutu/%e5%b9%b3%e6%88%9018%e5%b9%b4%e5%ba%a6%e7%a0%94%e7%a9%b6%e6%88%90%e6%9e%9c/> (2025. 9. 29. 閲覧)

8) 渡辺脩斗, 小林麻子, 中岡史裕, 茶谷弦輝 (2024). 福井
研の水稻奨励品種を判別する SSR マーカーセットの再改良
北陸作物学会報 59 : 20~23.

Summary

We selected five DNA markers (RM9, RM8208, RM1320, and markers estimating the presence or absence of the blast resistance gene *Pia* or *Pii*) that enable the identification of 13 recommended rice cultivars in Kochi Prefecture based on genotype rather than external quality.

Key words: cultivar identification, recommended cultivars, kochi prefecture, DNA markers, rice