

〔短報〕

DNAマーカーによる 小豆および菜豆の北海道優良品種判別技術

梶田路津子*¹ 木内 均*² 玉掛 秀人*¹

小豆および菜豆について、DNAマーカーの一つであるSSRマーカーを利用して、現在の北海道優良品種および地方番号系統を迅速かつ客観的に判別できる品種判別マーカーセットを選定した。小豆では6個のマーカーから成る品種判別マーカーセットを選定し、優良品種11点、旧優良品種6点、他県優良品種2点、地方番号系統4点の判別を可能とした。菜豆では7個のマーカーから成る品種判別マーカーセットを選定し、北海道優良品種9点、旧優良品種3点、地方番号系統3点の判別を可能とした。「福勝」にインゲンマメ黄化病抵抗性をDNAマーカー選抜と戻し交配により導入した「福寿金時」と親品種の「福勝」、同様の「十勝B80号」と親品種の「大正金時」は、本マーカーセットでは判別不能であった。

緒 言

DNAマーカーによる品種判別技術は、農産物の流通における適正表示推進とともに不正輸入の抑制に寄与する技術として育成者権の保護や生産農家の利益保護に役立っている。不正輸入に対する国際的な対応では信頼性の高い公定法が定められているが、DNAシーケンサーなどの高度な分析機器が必要で、分析費用も高価であることからその利用は限定的である。一方で、ポリアクリルアミドゲル電気泳動やアガロース電気泳動を用いた目視による品種判別技術は、簡便で安価な手法として多くの機関で広く用いられており、農産物の国内流通における適正表示の推進に寄与するとともに、道総研農試はもとより、秋田県や新潟県など複数の県において、種子生産現場における異型の確認、解析等にも利用されている。

北海道立総合研究機構農業試験場（以下「道総研農試」という。）における豆類のDNAマーカー品種判別技術に関しては、大豆では既に新品種を含めた現在の北海道優良品種全てを判別可能な品種判別マーカーセットを選定している⁶⁾。一方、北海道の主要畑作物である小豆および菜豆については、主要品種に係る判別DNAマーカーが開発されており^{5), 8)}、当該成績の一部はマニュアル化されて公定法として農林水産省品種登録ホームページ内

に公開されている³⁾。しかしながら、これらの判別DNAマーカーは開発後すでに数年が経過しており、その後の新品種や現在の有望育成系統への適用は未確認であることから、新品種に対応したDNAマーカーによる品種判別技術の開発が早急に必要とされていた。

そこで本研究では、小豆および菜豆について、既存の判別DNAマーカーおよび公開されているSSRマーカー情報を利用して、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により多型マーカーの探索を行い、新品種を含む北海道優良品種および地方番号系統を判別可能な品種判別マーカーセットを選定することを目的とした。

試験方法

1. 小豆

(1) 供試材料

北海道優良品種11点（「エリモシヨウズ」、「きたのおとめ」、「きたろまん」、「しゅまり」、「サホロシヨウズ」、「きたあすか」、「とよみ大納言」、「アカネダイナゴン」、「ほまれ大納言」、「ほくと大納言」、「きたほたる」）、旧優良品種6点（「宝小豆」、「ハヤテシヨウズ」、「寿小豆」、「アケノワセ」、「カムイダイナゴン」、「ホッカイシロシヨウズ」）、他県の優良品種2点（「ときあかり」、「ベニダイナゴン」）、2012年時点の地方番号系統4点（「十育160号」、「十育161号」、「十育162号」、「十育163号」）、計23点。

(2) 供試マーカー

道総研農試および独立行政法人農業生物資源研究所が開発した品種判別DNAマーカー9個⁸⁾、および独立行政法人農業生物資源研究所が公開しているSSRマーカー情

2013年12月4日受理

*¹ (地独) 北海道立総合研究機構中央農業試験場遺伝資源部, 073-0013 滝川市

E-mail: kazita-rutuko@hro.or.jp

*² 同上(現: 同上川農業試験場, 078-0397 上川郡比布町)

報⁷⁾からPCR増幅断片が250bp以下のマーカー56個、計65個について、供試材料において多型を示すマーカーを探索した。

(3) DNA抽出方法

種子1粒から1/8切片を切り出して粉碎し、単粒DNA抽出法を改変した方法⁶⁾で行った。2mlマイクロ遠心チューブに1個のステンレスビーズ(5mm)とともに使用直前にプロテナーゼK(20mg/ml)を2~4 μ l/ml添加した抽出バッファー(Tris:200mM, EDTA:25mM, NaCl:200mM, SDS:0.5%, pH8.0)600 μ lと種子切片を入れ、室温で約30分間浸漬した後、シェイクマスターオートVer.2((株)バイオメディカルサイエンス)を用いて1,100rpmで3分間粉碎した。試料が十分粉碎されていることを確認して、65°Cで約1時間インキュベートし、5%フェノール含有クロロホルム/イソアミルアルコール(24/1)を等量加えて1分間攪拌した後、14,000rpmで30分間遠心した。上清400 μ lにクロロホルム/イソアミルアルコール(24/1)を等量加えて1分間攪拌した後、14,000rpmで15分間遠心した。上清300 μ lに210 μ lの2-プロパノールを加えて転倒混和した後、12,000rpmで5分間遠心した。上清を廃棄し、沈殿したDNAにTE(Tris-HCl:10mM, EDTA:1.0mM, pH8.0)を500 μ l加えて溶解した。

(4) PCR反応条件など

サーマルサイクラーはGeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystems社)およびMyCyclerサーマルサイクラー(BioRad社)を使用した。反応液量は15 μ lとし、鋳型DNA5~30ng, KAPA Taq Extra DNA Polymerase(KAPA社)0.35units, 添付のバッファー2.8 μ l, MgCl₂1.63mM, dNTP0.28mM, プライマー各0.07~0.17 μ Mを加えた。反応条件は94°C2分の後、94°C15秒, 50°C15秒, 68°C1分を29回繰り返す、最後に72°C1分を付加した。PCR増幅断片の検出は7.5%非変性ポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド/Bis比19:1)を用いて、スラブゲル電気泳動装置により泳動を行い、ゲルをGelRed(Biotium社)で染色の後、紫外線照射下(312nm)で写真撮影を行った。

2. 菜豆

(1) 供試材料

北海道優良品種12点(「大正金時」,「福勝」,「福良金時」,「福寿金時」,「北海金時」,「福白金時」,「雪手亡」,「絹てぼう」,「姫手亡」,「福虎豆」,「福うずら」,「福粒中長」), 旧優良品種3点(「丹頂金時」,「改良虎豆」,「改良中長」), 2011年時点の地方番号系統1点(「十育B80号」), 2012年時点の地方番号系統3点(「十育A57号」,「十育A59号」,「十育A60号」), 計19点。

(2) 供試マーカー

道総研農試が開発したRAPD-STSMマーカー3個³⁾, 同じく品種判別技術に利用したSSRマーカー5個⁵⁾, サンパウロ大学が開発したSSRマーカーから44個⁴⁾, および国際熱帯農業センター(以下「CIAT」と記す。)が開発したSSRマーカーから16個^{1), 2)}, 計68個。

(3) DNA抽出方法

種子1粒から1/16切片を切り出し、その後の工程は小豆と同様に行った。

(4) PCR反応条件など

使用したサーマルサイクラーおよび反応液組成は、小豆と同様である。PCR反応条件は、94°C2分の後、94°C15秒, 47°C15秒, 68°C1分を30回繰り返す、最後に72°C1分を付加した。PCR増幅断片の検出は、小豆と同様に行ったが、RAPD-STSMマーカーのPCR増幅断片の検出のみ1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。

試験結果

1. 小豆

供試した65個のSSRマーカーのうち、27個のマーカーで多型が得られた。これらの中から表1に示した道総研農試他が開発した品種判別DNAマーカー⁸⁾CEDG008, CEDG029およびCEDG021の3個と、新たに多型が確認できたマーカーCEDG025, CEDG036およびCEDG081の3個、計6個のマーカーにより供試した23品種・系統全ての判別が可能であった。この6個のマーカーについて、道内で栽培されている主要4品種のそれぞれ96粒の遺伝子型を調査した結果、全て品種内で同一のPCR増幅断片サイズが得られた。いずれのマーカーも十分な品種内遺伝子型の均一性を有していると判断し、この6個のマーカーを小豆品種判別マーカーセットとして選定した。また、電気泳動におけるPCR増幅断片の位置は、その増幅量や泳動条件により僅かに変化し、断片サイズの判定に影響することがある。そのため、標準品種として8品種を定め、分析対象の試料とともに供試してPCR増幅断片サイズを相対比較し、判定の精度を確保することとした(表2)。

表1 選定した小豆品種・系統判別マーカー

マーカー名	座乗連鎖群	フォワードプライマー(5'-3')	リバースプライマー(5'-3')
CEDG008	5	AGGCGAGGTTTCGTTTCAAG	GCCCATATTTTTACGCCAC
CEDG021	10	GCAGAATTTTAGCCACCCGAG	AAAGGATGCGAGAGTGATGC
CEDG025	1	TAGTCAACCGTTACTATGCC	CGAGAAAAATGAATCTCCCC
CEDG029	2	GATTGCTTTTAGCAGAGGGC	GAAGAAACCCATCTCGATCC
CEDG036	4	CAGGTATTGTGCAGAGAGAC	TGCACCCAAAAGCTGTAAGC
CEDG081	10	TGTGGGTGTTTTATGCTTTGTG	GTATTCCGGTCATTCGATCTAC

表2 小豆品種判別マーカーとPCR増幅断片サイズ

品種・系統名	PCR増幅断片サイズ (bp)					
	CEDG 025	CEDG 036	CEDG 008	CEDG 029	CEDG 021	CEDG 081
ベニダイナゴン	92	209	103	191	163	205
ほくと大納言	92	209	109	181	163	205
きたあすか	96	193	119	177	153	193
十育162号	96	193	119	177	161	193
ときあかり	96	193	119	181	161	219
きたのおとめ*	96	199	117	181	143	193
宝小豆	96	199	117	181	143	205
しゅまり	96	199	119	177	153	193
寿小豆	96	199	119	181	143	193
エリモショウズ*	96	199	119	181	161	193
サホロショウズ	96	209	113	153	163	205
ハヤテショウズ	96	209	117	153	143	205
カムイダイナゴン	102	193	103	181	161	219
アカネダイナゴン	102	193	109	181	161	219
アケノワセ	102	193	117	185	143	205
きたろまん*	102	193	119	153	161	193
十育163号	102	193	119	181	161	221
とよみ大納言*	102	193	119	191	161	219
ほまれ大納言	102	199	103	153	159	185
ホッカイシロショウズ	102	199	109	181	161	219
十育161号	102	199	119	181	153	193
きたほたる	102	199	119	185	157	205
十育160号	102	199	125	177	161	221

注1) PCR増幅断片サイズはサイズマーカー (10bpラダー) と比較して目視で判定した。
 注2) 判別はPCR増幅断片サイズが同一のものを右隣のマーカーで分けて行う。
 注3) 網掛けはPCR増幅断片サイズの標準品種。
 注4) *印は判別マーカーの品種内遺伝子型均一性を確認した品種。

2. 菜豆

供試した3個のRAPD-STSマーカーおよび65個のSSRマーカーのうち、2個のRAPD-STSマーカーおよび21個のSSRマーカーで多型が得られた。これらの中から表3に示した道総研農試が品種判別技術に利用したSSRマーカー⁵⁾ PVSSR01およびPVSSR09の2個と、新たに多型が確認できたマーカーPvM126, BMc229, BMc238, BMc367およびBMc294の5個、計7個のマーカーにより、供試した19品種・系統のうち、DNAマーカー選抜と戻し交配を利用してインゲンマメ黄化病抵抗性を「福勝」に導入した「福寿金時」、同様に「大正金時」に導入した「十育B80号」を除く、優良品種9点、旧優良品種3点、地方番号系統3点の判別が可能であった。この7個のマーカーについて道内で栽培されている主要な4品種のそれぞれ96粒の遺伝子を調査した結果、全て品種内で同一のPCR増幅断片サイズが得られた。いずれのマーカーも十分な品種内遺伝子型の均一性を有していると判断し、この7個のマーカーを菜豆品種判別マーカーセットとして選定した。なお、「福寿金時」は「福勝」の、同様に「十育B80号」は「大正金時」のそれぞれインゲンマメ

黄化病抵抗性に係る特定のDNA領域を置換した品種であるため、その判別には置換に用いたDNAマーカー⁹⁾を利用することとした。また、小豆と同様に標準品種として8品種を定め、分析対象の試料とともに供試してPCR増幅断片サイズを相対比較し、判定の精度を確保することとした(表4)。

表3 選定した菜豆品種・系統判別マーカー

マーカー名 ¹⁾	座標 ²⁾ 連鎖群	フォワードプライマー (5'-3')	リバースプライマー (5'-3')
PVSSR01	4	GAGGGTGTTCACCTATTGTCA CTGC	TTCATGGATGGTGGAGGAAC AG
PVSSR09	9	AGTTAAATTATACGAGGTTA GCCTAATC	CATTCCCTTCACACATTACCCG
PvM126	3	AAATCCTCTCCACCTTTG	AACACGCACACACAGACA
BMc229	-	TTCTCTCTCACTCTCATCAACA	CCAAAACAAAACAAAAGC
BMc238	-	CCAAACCTCTCTCTCTCTCTC	CGAACTCTCTGCTCTCTGA
BMc294	-	GGTCGTGATGTCTCCATT	TACCTCCCATCATGCATTAC
BMc367	-	GCTGGTGTGTTCACCAAACT	CCTGTGAGCTATATCTCGAAA

注1) “PvM”は、サンパウ大学が開発したマーカー⁴⁾。
 “BMc”はCIATが開発したマーカー^{1), 2)}。
 “PVSSR”は道総研農試の品種判別技術⁵⁾のマーカーの記号で、引用元の文献¹⁰⁾でのマーカー名は、“PVSSR01”が“PV-ctt001”、“PVSSR09”が“PV-at007”。
 注2) “-”は、不明。

表4 菜豆品種判別マーカーとPCR増幅断片サイズ

品種・系統名	PCR増幅断片サイズ (bp)						
	PvM 126	PVSSR 01	BMc 229	BMc 238	PVSSR 09	BMc 367	BMc 294
姫手亡	128	168	101	136	198	160	93
雪手亡*	128	168	101	136	198	162	93
絹てぼう*	128	168	101	136	208	160	93
十育A60号	128	168	101	136	208	166	93
十育A57号	128	168	113	136	198	160	93
十育A59号	128	168	113	136	198	162	101
福うずら	132	153	101	142	190	156	125
福良金時	132	168	101	134	192	150	125
福虎豆	132	168	101	134	196	154	125
福勝*	132	168	101	142	190	150	125
福寿金時	132	168	101	142	190	150	125
福白金時	132	168	101	142	190	150	127
改良虎豆	132	168	101	142	190	156	125
丹頂金時	138	153	101	134	192	150	127
大正金時*	138	168	101	134	192	150	125
十育B80号	138	168	101	134	192	150	125
北海金時	138	168	101	134	192	150	129
福粒中長	138	168	101	134	196	150	129
改良中長	138	168	101	134	196	154	131

注1) PCR増幅断片サイズはサイズマーカー (10bpラダー) と比較して目視で判定した。
 注2) 判別はPCR増幅断片サイズが同一のものを右隣のマーカーで分けて行う。
 注3) 網掛けはPCR増幅断片サイズの標準品種である。
 注4) 「福勝」と「福寿金時」、「大正金時」と「十育B80号」の判別にはインゲンマメ黄化病抵抗性マーカーを用いる。
 注5) *印は判別マーカーの品種内遺伝子型均一性を確認した品種。

考 察

小豆および菜豆について新品種を含む北海道優良品種および地方番号系統を判別可能な品種判別マーカーセットの選定を目的として、既存の判別DNAマーカーおよび公開されているSSRマーカー情報を利用して多型マーカーを探索し、小豆では6個、菜豆では7個のSSRマーカーから成る品種判別マーカーセットを選定した。これにより、小豆23品種・系統、菜豆15品種・系統の判別が可能である。

菜豆では、「福勝」と「福勝」にDNAマーカー選抜と戻し交配によりインゲンマメ黄化病抵抗性を導入した「福寿金時」および「大正金時」と「大正金時」に同じく導入した「十育B80号」を区別できるDNAマーカーは見出されず、その判別は不可能であった。しかし、これらの判別は、選抜に用いたインゲンマメ黄化病抵抗性に関与する遺伝子座のマーカーを利用することで可能である。このようなDNAマーカー選抜により特定のDNA領域のみを置換した品種の育成は今後も想定されるが、選抜に用いたマーカーを利用することで同様に対応が可能と考えられる。

今後育成される新品種への対応は、本研究で供試した地方番号系統が品種化された場合には、本研究結果が直接適用可能である。さらにその後の育成品種については、本研究において選定したマーカーセットのほか、多型が確認できた他のマーカーの活用も可能である。

本研究の分析手法は、さき開発された水稻、小麦および大豆の品種判別技術⁶⁾の手順を基本としており、ピーズ破砕機およびPCRサーマルサイクラーなどの機器、並びに一般的な実験で使用するマイクロピペットなどの道具を具備することにより分析が可能で、DNAシーケンサーなどの高額な機器類や施設が不要であることから、導入・運用が比較的容易である。なお、前述の技術⁷⁾では、1サンプルにつき種子1粒とする単粒分析のほか、複数粒を1サンプルとして同時に分析できる最大の粒数を4粒と定めたが、本研究の成果を活用する際には、1サンプルにつき種子1粒を由来とする単粒分析で行うものとする。

本研究の成果は、既に新品種に対応したDNA品種判別マーカーが開発済みである水稻、小麦および大豆⁶⁾と並んで、小豆および菜豆における農試の種子生産での品質管理への活用、および農試以外の種子生産現場における異型分析や品種の確認などの依頼分析への対応も可能である。

引用文献

- 1) Blair, M.W., Munoz-Torres, M., Giraldo, M.C., Pedraza, F. Development and diversity assessment of Andean-derived, gene-based microsatellites for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Bio.* 9, 100 (2009) doi:10.1186/1471-2229-9-100.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/9/100>
- 2) Blair, M.W., Hurtado, N., Chavarro, C.M., Munoz-Torres, M.C., Giraldo, M.C., Pedraza, F., Tomkins, J., Wing, R. Gene-based SSR markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) derived from root and leaf tissue ESTs: An integration of the BMC series. *BMC Plant Bio.* 11, 50 (2011) doi:10.1186/1471-2229-11-50.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/11/50>
- 3) DNA品種識別技術検討会. 植物のDNA品種識別についての基本的留意事項—技術開発と利用のガイドライン—(平成15年1月), 参考資料2 DNA分析による白いんげんまめ(手亡)品種の識別, 参考資料5 DNA分析による小豆品種の識別.
<http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/hogo.html>
- 4) Hanai, L.R., Santini, L., Aranha, L.E.C., Pelegrinelli, M.H.F., Gepts, P., Tsai, S.M., Carneiro, M.L., Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers. *Mol Breeding.* 25, 25-45 (2010)
- 5) 北海道農政部. SSRマーカーを利用した小豆・菜豆の品種判別(普及推進事項). 平成19年普及奨励ならびに指導参考事項. 2007. p.123-125.
- 6) 木内均, 玉掛秀人, 山下陽子. DNAマーカーを利用した水稻, 小麦, 大豆の北海道優良品種判別技術. 道総研農試集報. 97, 58-62 (2013)
- 7) 独立行政法人農業生物資源研究所. “マーカー情報 1. アズキ(*Vigna angularis*)のSSRマーカー情報”. 農業生物資源研究所データベース.
http://www.gene.affrc.go.jp/databases-marker_information.php
- 8) 鈴木 孝子. SSRマーカーを利用した小豆, インゲンマメ種子および加工製品の品種判別. 豆類時報. 63, 14-17. (2011)
- 9) 竹内 徹, 佐々木 純, 江部 成彦. インゲンマメ黄化病抵抗性遺伝子Sdvy-1を検出する分子マーカー(平成20年度日本植物病理学会大会講演要旨). 日本植物病理学会報. 74(3). 248 (2008)
- 10) Yu K, Park SJ, Poysa V, Gepts P. Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Heredity.* 91. 429-434. (2000)

Identification of recommended varieties for Hokkaido of Azuki Bean and Common Bean using DNA markers

Rutsuko KAJITA^{*1}, Hitoshi KIUCHI^{*2},
Hideto TAMAGAKE^{*1}

^{*1} Hokkaido Research Organization Central Agricultural Experiment Station, Plant Genetic Resources Division, Takikawa, Hokkaido, 073-0013, Japan
E-mail: kazita-rutuko@hro.or.jp

^{*2} ditto. (Present; Hokkaido Research Organization Kamikawa Agricultural Experiment Station, Pippu, Hokkaido, 078-0397 Japan)