９）あんでもわかるＤＮＡ品種判別

（豆類のＤＮＡ品種判別技術の開発）

北海道立中央農業試験場　農産工学部　遺伝子工学科

１．試験のねらい

近年、野菜をはじめとした農産物の輸入増加で多くの道産品との間に競合が生じており、豆類も例外ではない。道産豆類の権威と特性を守るには、これまで以上の良質安定生産に努めるとともに、DNA 多型を利用した迅速・正確な品種判別法を開発する必要がある。

現在、種々の分野で利用されているポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は画期的な遺伝子増幅法で、DNA の目的とする領域を短時間で増幅できる。作物は非常に多くの細胞からできているが、同じ品種の細胞には全て同じ遺伝子（DNA）のセットが存在する。品種について特徴的な遺伝子をいくつか特定しておくと、それらの組み合わせで品種判別が可能である。この技術を利用して水稲では市販の精白米 1 粒から品種を特定できるようになった。豆類でも同様な手法を開発することで、品種判別の効率化を図り、道産豆類の生産拡大に寄与する。

２．試験の方法

白いんげんまめ（手亡類）、小豆、大豆を対象とした。DNA は植物体の葉（1 個体単位）または種子（1 粒）から抽出した。いんげんまめ、小豆では RAPD プライマー、大豆では SSR プライマーにより PCR で増幅される DNA 断片の有無や長さの違いで品種判別を試みた。

３．試験の結果

１）白いんげんまめ（手亡類）

品種判別用として 8 種の RAPD マーカーを選抜・利用することによって、「雪手亡」と「姫手亡」、「銀手亡」および海外産の白いんげんまめとの判別が可能であった（表 1）。次に、RAPD 断片の塩基配列を決定し、新たにプライマーを設計した（STS 化）。STS 化することで、白餡製品からの品種判別も可能となった。さらに、STS 化プライマーによって 2 種類のプライマー組み合わせを混合して同時に PCR を行うマルチプレックス PCR が可能となった（図 1）。

２）小　豆

10 種の RAPD マーカーを選抜・利用することによって、「エリモショウズ」、「きたのおとめ」、「しゅまり」と中国小豆との判別が可能であった（表 2）。また、近縁種を含む内外の小豆 34 品種、系統を検定したところ、大部分の品種が判別可能であった。いんげんまめと同様に RAPD 断片の塩基配列を決定し、新たにプライマーを設計した。STS 化により、餡製品からの品種判別も可能となり、マルチプレックス PCR も可能となった（図 2）。

３）大　豆

品種判別用に 10 種の SSR マーカーを選抜した。16 品種、系統を供試したところ、その内 4 種のマーカーで供試品種、系統の識別が可能であった（表 3）。

以上により、豆類種子 1 粒および餡からの品種判別が可能である。この手法は種子生産での品種の確認、流通段階での品種鑑定、加工段階での原料品種の確認等に幅広く活用できる。

【用語解説】

PCR(polymerase chain reaction)：目的の DNA 配列を挟むように設計した 1 対のプライマーと合成酵素で DNA を特異的に増幅する方法。

RAPD(random amplified polymorphic DNA)：10 塩基程度のランダムな配列をプライマーとして PCR を行い、増幅される DNA 断片のパターンの違いで元の配列の差違を検出する。

SSR(simple sequence repeat)：DNA に存在する単純繰り返し配列の差を検出する方法。

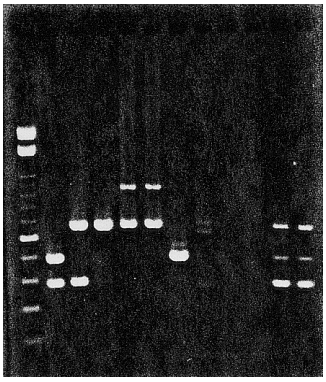
STS(sequence tagged site)化：RAPD プライマーによる DNA 増幅断片の塩基配列を調べ、新たに 1 対のプライマーを設計することで特異性を高め、検出効率を上げることが可能になる。

表 1. RAPD マーカーによる白いんげんまめの品種間多型

	品種または銘柄名	ubc105 1000bp	ubc157 500bp	ubc218 1500bp	ubc245 500bp	ubc276 1300bp	ubc289 1900bp	ubc355 1200bp	ubc375 1200bp
いんげんまめ	雪手亡	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋
	姫手亡	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	－
	銀手亡	－	－	－	－	－	－	－	－
	ｸﾞﾚｰﾄﾉｰｻﾞﾝ	＋	＋	－	－	－	－	－	－
	ﾋﾟｰﾋﾞｰﾝ	＋	＋	－	＋	－	＋	＋	－
	小白芸豆	－	－	－	－	－	－	－	＋
花豆	大白芸豆	－	－	－	－	＋	－	－	－
らい豆	ﾍﾞﾋﾞｰﾗｲﾏ	－	－	－	－	＋	－	－	－
	ﾊﾞﾀｰﾋﾞｰﾝ	－	－	－	－	＋	－	－	－

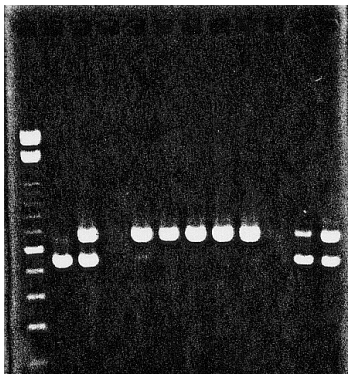
表 2. RAPD マーカによる道産小豆と中国産小豆の比較

	品種名または整理番号	ubc33 700bp	ubc72 1000bp	ubc327 2000bp	ubc468 950bp	ubc468 500bp	ubc516 700bp	ubc569 700bp	ubc777 1600bp	ubc777 1400bp	ubc791 600bp
北海道	ｴﾘﾓｼｮｳｽﾞ	＋	－	＋	＋	－	－	－	－	＋	－
	きたのおとめ	＋	－	－	－	－	＋	＋	－	＋	＋
	しゅまり	－	＋	－	－	－	－	＋	－	－	－
	光小豆	＋	－	＋	－	－	＋	－	－	＋	＋
中　国	宝清小豆	＋	＋	＋	＋	－	＋	＋	－	－	＋
	Acc 2565	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋
	Acc 2550	＋	＋	＋	＋	－	＋	－	－	－	＋



左より
雪手亡、
姫手亡、
銀手亡、
グレートノーザン、
ピービーン、
小白芸豆、
ベビーライマ、
バタービーン、
ネガティブコントロール、
白餡 A、
白餡 B

図 1. マルチプレックス PCR によるいんげんの品種判別（SP01+SP02）



左より
エリモショウズ、
きたのおとめ、
しゅまり、
Acc2565（中国）、
宝清小豆、
Acc2550（中国）、
天津小豆 A、
天津小豆 B、
ネガティブコントロール、
小豆餡 D、
小豆餡 E

図 2. マルチプレックス PCR による小豆の品種判別（SV01+SV02）

表 3. SSR マーカーによる大豆の遺伝子型

	品種系統名	SATT1	Satt357	Satt055	Satt157
中粒褐目	ハヤヒカリ	C	C	D	B
	キタムスメ	C	C	A	B
	十勝長葉	C	A	A	B
小粒白目	スズマル	B	B	B	B
	スズヒメ	B	A	E	B
	十育 234 号	B	A	B	B
中粒白目	ユキホマレ	A	B	C	D
	トヨコマチ	C	C	D	C
	カリユタカ	C	C	C	B
	トヨホマレ	C	C	D	D
大粒白目	トヨムスメ	A	C	C	D
	トヨスズ	A	C	D	D
	十育 236 号	C	C	A	A
	中育 47 号	A	A	E	A
	中育 48 号	A	A	E	D
極大粒白目	ツルムスメ	C	A	E	A