

(参考資料3)

DNA分析による稲品種の識別

独立行政法人 食品総合研究所

1 稲のDNA品種識別技術の開発

食糧庁公表の平成14年産水稻うるち米の作付け状況(速報値)の上位10品種の作付面積は、全作付面積の80.3%を占めており、上位20品種の作付面積は、87.4%を占めており、上位品種の割合の多いことがわかる。その第一位は、「コシヒカリ」であり、全作付面積に占める割合は36.6%に達している。また、上位品種の「コシヒカリ」に対する近縁度は、「ひとめぼれ」で78%、「ヒノヒカリ」で57%、「あきたこまち」で50%、「きらら397」で13%、「キヌヒカリ」で50%、「ササニシキ」で25%など、全国のうるち米栽培面積の約73%をコシヒカリと近縁の品種が占める状況となっている。

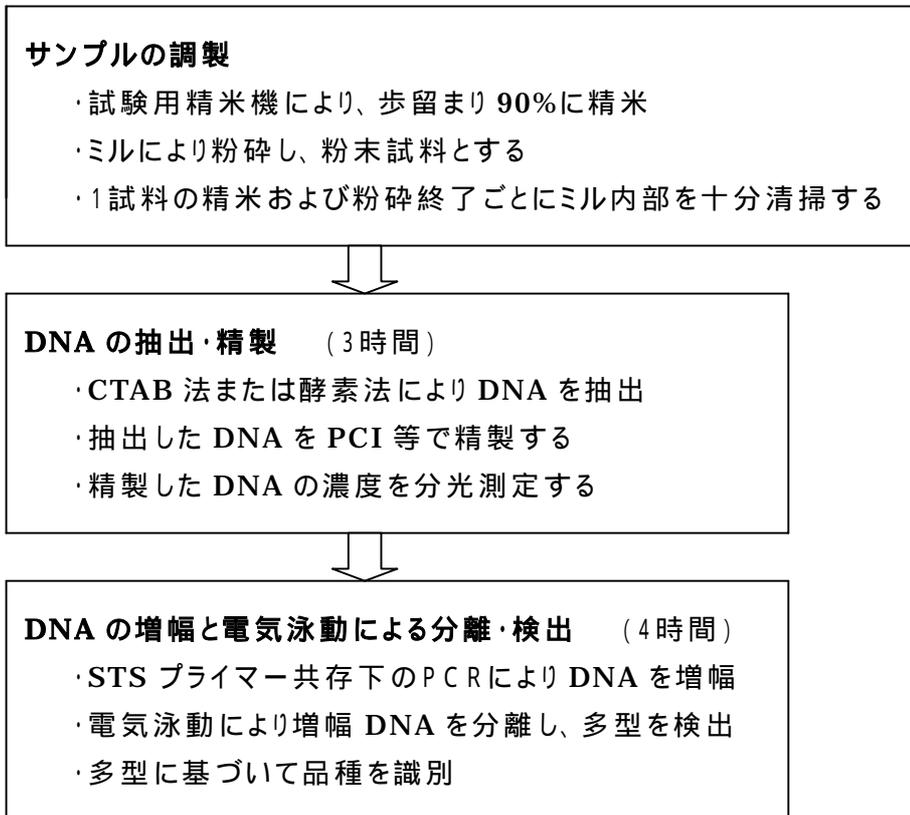
平成14年産米の作付面積(食糧庁・速報値)

順位	品種名	栽培面積 (ha)	作付け率 (%)
1	コシヒカリ	540,897	36.6
2	ひとめぼれ	146,397	9.9
3	ヒノヒカリ	144,161	9.8
4	あきたこまち	121,609	8.2
5	きらら 397	71,651	4.9
6	キヌヒカリ	54,728	3.7
7	はえぬき	43,008	2.9
8	ほしのゆめ	27,440	1.9
9	つがるロマン	18,047	1.2
10	ササニシキ	17,843	1.2
11	むつほまれ	13,876	0.9
12	日本晴	12,865	0.9
13	ハナエチゼン	12,564	0.9
14	ゆめあかり	11,799	0.8
15	夢つくし	11,610	0.8
16	ハツシモ	9,903	0.7
17	あさひの夢	8,398	0.6
18	祭り晴	7,818	0.5
19	ふさおとめ	7,808	0.5
20	あいちのかおり	7,782	0.5

このように、全国でコシヒカリと近縁の品種が多く栽培されている状況にあることから、DNAの持つ豊富な情報量に基づいた品種識別方法の開発が必要とされた。

2 RAPD・STS 法による品種識別

(1) 分析のフロー



(2) 品種識別のプロトコール

DNA の抽出

CTAB 法による精米粉からの DNA 抽出 (0.4g)

〔注意：精製スタートから手袋を着用し、検体のクロスコンタミネーションを起こさないようにする。また、すべての操作において、ボルテックスミキサーでの攪拌はしない。〕

1. コメ 20 粒をコーヒーマルで粉碎する。(数秒ずつ様子を見ながら数回行う)
2. ロックつき 2.0ml チューブ(エッペンドルフ社)に精米粉 0.4g をとり、あらかじめ混合し 65 に保温した 2×CTAB*10.6ml・滅菌水 0.2ml の混合液を加え混和する。
3. 65 の湯浴中で 30 分間振とうする。(10 分おきに転倒混和)
4. CIA*2 を 0.8ml 加え転倒混和する。
5. ローテーター(15 回転/分)で 15 分間混和する。

6. 遠心分離を行う(1,500rpm、4、15分間)。
7. 液が3層に分離後、最上層を新しいロックつき2.0mlチューブに速やかに移す。
8. 65 の10%CTAB^{*3}を上清に対し1/10量加える。
9. 等量のCIAを加え、転倒混和を行う。
10. ローテーター(15回転/分)で15分間混和する。
11. 遠心分離を行う(15,000rpm、4、15分間)。
12. 上層を新しいロックつき2.0mlチューブに速やかに移す。
13. 65 に加温した沈殿 buffer^{*4}をチューブ目盛り2mlまで加え(前操作で得られた上層の3~4倍量)、ゆっくり転倒混和する。
14. 4 で30~60分間(-20 の場合5分、あるいは氷上で10分間程度)放置する。
15. 遠心分離を行う(15,000rpm、4、20分間)
16. 上清を除去し、1M NaCl/TE^{*5}を200μl加え、沈殿物を溶解する。
17. 等量のイソプロピルアルコール200μlを重層し、ゆっくり転倒混和する。
18. ローテーター(15回転/分)で15分間混和する。
19. 遠心分離を行う(15,000rpm、4、15分間)。
20. 上清を除去し、冷却70%エタノール^{*6}を50μl加え、洗浄する。
21. 遠心分離を行う(15,000rpm、4、5分間)。
22. 上清を除去し、エタノール臭が無くなるまで沈殿物を自然乾燥する。
23. TE^{*7}を200μl加え、沈殿物を溶解する。(手で軽く叩く程度)
24. RNaseA(10mg/ml)を1μl加え、55 で30~60分間放置する。
25. 中性フェノール^{*8}を200μl加え、転倒混和を行う。
26. ローテーター(15回転/分)で15分間混和する。
27. 遠心分離を行う(15,000rpm、4、15分間)。
28. 上層を新しいロックつき2.0mlチューブに移す。
29. 等量のPCI^{*9}を加え、転倒混和を行う。
30. ローテーター(15回転/分)で15分間混和する。
31. 遠心分離を行う(15,000rpm、4、15分間)。
32. 上層を新しいロックつき2.0mlチューブに移し、氷中に入れる。
33. 液量を測り、上清の1/25倍量の5M NaCl^{*10}を加え2~2.5倍量冷却エタノール^{*11}を静かに重層し、ゆっくり転倒混和後、氷上に30分間静置する。
34. 遠心分離を行う(15,000rpm、4、15分間)。
35. 上清を除去し、冷却70%エタノールを50μl加え、洗浄する。
36. 遠心分離を行う(15,000rpm、4、5分間)。
37. 上清を除去し、エタノール臭がしなくなるまで30分間、蓋を開けた状態で沈殿物を自然乾燥する。

38. 沈殿に 1/10TE*¹²30 μlを加え、静置にて over night で溶解後、静かにピペティングを行い、均質化する。
39. 吸光度計にて260nm、および280nmにおける吸光度を測定する。
40. 4 で保存する。
41. OD = 1 の場合を50 μg/mlとして、操作39で得られた測定値からDNA濃度を計算する。なおOD₂₆₀/OD₂₈₀の値が1.8~2.0の範囲であれば、タンパクはほぼ除かれていると考えられる。

【試薬調製】

- * 1 2 × CTAB : CTAB 4gを蒸留水100mlで加温しながら溶解し、0.1M Tris-HCl(pH8.0)を20mlと0.5M EDTA(pH8.0)を8mlと5M NaCl を56ml添加し、蒸留水で200mlに fill up、オートクレーブ後室温保存
- * 2 CIA : クロロホルム/イソアミルアルコール/(24/1、v/v) クロロホルム288mlにイソアミルアルコール12mlをよく混合し、遮光し4 保存
- * 3 10%CTAB : CTAB 2gを蒸留水15mlで加温しながら溶解し、5M NaCl 2.8mlを添加し蒸留水で20mlに fill up、オートクレーブ後室温保存
- * 4 沈殿 buffer : CTAB 1gを蒸留水70mlで加温しながら溶解し、1M Tris-HCl(pH8.0)と0.5M EDTA(pH8.0)を2ml添加し蒸留水で100mlに fill up、オートクレーブ後室温保存
- * 5 1M NaCl/TE : 1M Tris-HCl(pH8.0)1mlと0.5M EDTA(pH8.0)0.2mlと5M NaCl 20mlを加え蒸留水で100mlに fill up、オートクレーブ後室温保存
- * 6 冷却70%エタノール : エタノール(99.5V%、特級)70mlを滅菌蒸留水100mlに fill up 後、-20 フリーザー保存
- * 7 TE : 1M Tris-HCl(pH8.0)10mlと0.5M EDTA(pH8.0)2mlを添加し蒸留水で1,000mlに fill up、オートクレーブ後室温
- * 8 中性フェノール : 市販フェノール(特級)を 65 で融解し、8-ヒドロキシキノリンを0.05~0.1%(w/w)程度の濃度になるよう添加し、等量の1M Tris-HCl(pH8.0)を加え激しく混合する。水層(上層)を除去し水層のpHが7.5以上になるまでこの操作を繰り返す。等量の0.1M Tris-HCl(pH8.0)を加え混合し、2,000rpm、5分間遠心後冷暗所に保存し、酸化して赤みの帯びたものは使用しない。
- * 9 PCI : フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25/24/1、v/v/v)遮光、4 保存する(水層が分離するまで静置)
- * 10 5M NaCl : NaCl 29.22gを蒸留水にて溶解後、100mlに fill upし、オートクレーブ後、室温保存
- * 11 冷却エタノール : エタノール(99.5V%、特級)を-20 フリーザーにて保存

- * 12 1/10 TE : TE を 10 倍希釈する。
- * 13 1M Tris-HCl(pH8.0) : Tris 121.14gを500mlの蒸留水にて溶解し、25
において pH8.0 になるまで HCl を添加し、蒸留水で 1,000ml fill up し、オート
クレーブ後室温保存
- * 14 0.5M EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, Disodium salt, Dihydrate、3
72.2g を蒸留水 700mlにて懸濁し、25 において pH8.0 になるまで NaOH を
添加し 1,000ml に fill up し、オートクレーブ後室温保存

コメ1粒から DNA を抽出する場合(酵素法)

1. 精米試料1粒を1.5ml容量のプラスチックチューブに採り、滅菌蒸留水50 μ lを加え、スタンドに立てて、室温で1時間浸漬する。
2. チューブの蓋に注射針23G \times 1にて中心に一点穴を開ける。
3. 適当なラックにチューブを立て、電子レンジのあたためモードにて6~12分間加熱する。(まず2分 \times 2回加熱し、その後軽く遠心して蓋に付着した水滴を一旦落とし更に2分加熱する。米粒に芯が残っていれば、さらに2分ずつ加熱を続ける。)
4. 抽出 Buffer^{*1}300 μ lを加え、米飯をチップの先で細かく潰す。
5. 15mg/mlとなるよう滅菌蒸留水で溶解した α -アミラーゼ(*Bacillus licheniformis* 由来、Sigma 社製)10 μ lを加え、80 $^{\circ}$ Cで1時間放置する。
6. 33 μ lの2%SDS^{*2}、および、20 μ lの ProteinaseK(20mg/ml)を加え55 $^{\circ}$ Cで1時間放置する。
7. 遠心分離(15,000rpm、1分間)を行う。
8. 沈殿物を吸い上げないように上清を新しいロック付き 2mlチューブ(エッペンドルフ社製)に移し、2~2.5倍量の冷却エタノール^{*3}を加え、手でゆっくり転倒混和し、氷上に15分間静置する。
9. 遠心分離(15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、15分間)し、沈殿をTE^{*4}300 μ lで溶解する。
10. 1 μ lの RNaseA(10mg/ml)を加え、55 $^{\circ}$ Cで1時間放置する。
11. PCI^{*5}300 μ lを加え、ローテーター(15分間/分)で15分間攪拌する。
12. 遠心分離(15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、15分間)し、上清を新しいロック付き 2mlチューブに移す。
13. 等量の PCI^{*5}を加え、ローテーター(15分間/分)で15分間攪拌する。
14. 遠心分離(15,000rpm、4 $^{\circ}$ C、15分間)し、上層を新しいロック付き 2mlチューブに移しすぐに氷に漬ける。
15. その後、上清に 2~2.5 倍の冷却エタノール^{*3}を加え、手でゆっくりと転倒混和し、

その後氷上に 10 分間静置する。

16. 遠心分離(15,000rpm、4、15 分間)し、沈殿を冷却 70%エタノール*650 μ l で洗淨する。
17. 遠心分離(15,000rpm、4、15 分間)を行う。
18. 上清を除去しエタノール臭がなくなるまで自然乾燥する。このとき、沈殿を失わないように注意する。
19. 沈殿に 1/10TE*730 μ l を加え、静置にて overnight で溶解後、静かにピペティングを行い、均質化する。
20. 操作 19 で得られた溶液を 50 ~ 100 倍に希釈後、吸光度計にて 260nm、および 280nm における吸光度を測定する。
21. 4 で保存する。
22. OD₂₆₀=1 の場合、50 μ g/mlとして、工程 20 で得られた測定値から DNA 濃度を計算する。なお、OD₂₆₀/OD₂₈₀ の値が 1.8 ~ 2.0 であれば、タンパク質はほぼ除かれていると考えられる。

本方法は、炊飯米からでも DNA 抽出が可能である。炊飯米の場合は、試料検体 1 粒を 1.5 ml 容量のプラスチックチューブに採り、操作 4 から始める。

【試薬調製】

- * 1 抽出 Buffer: 1M Tris-HCl(pH8.0) 10mlと5M NaCl 2mlを混合し、蒸留水で100mlに fill up しオートクレーブ後室温保存
- * 2 2% SDS: Dodecyl Sulfate sodium salt 2g を蒸留水にて溶解し、100mlに fill up し、0.22 μ m フィルターにて濾過滅菌、室温保存
- * 4 0.2M NaCl/TE: 1M Tris-HCl(pH8.0) *13 1mlと0.5M EDTA (pH8.0) *14 0.2mlと5M NaCl *10 4mlを混合し、蒸留水で100mlに fill up しオートクレーブ後室温保存
- * 3、* 5、* 6、* 7はCTAB法の項を参照

PCRによる品種特異DNA断片の増幅

RAPD法

PCR装置はアステック社のもの(PC-700、0.5ml用ブロック)を用いた。鋳型DNAは400ng/ μ lを1 μ l、滅菌水10.8 μ l、DNAポリメラーゼ(宝酒造(株)製、Taq polymerase、5U/ μ l)0.2 μ l、反応用緩衝液(12mM Tris塩酸、60mM KCl、pH

8.3) 2.0 μ l、25mMのMgCl₂ 2.0 μ l、dNTPs(デオキシリボヌクレオチド3リン酸混合液、100 μ M) 2 μ lを混合して調整し、PCRに用いる対合プライマーとして、オペロン社(10量体)および和光純薬工業(株)(12量体)の市販ランダムプライマー2 μ lを加えて液量の合計を20.0 μ lとし、ミネラルオイルを重合した。PCR条件は、変性を94 $^{\circ}$ Cで1分間、アニーリングを36 $^{\circ}$ Cで1分間、伸長を72 $^{\circ}$ Cで2分間を1セットとし、これを40回反復した。

1) 反応液組成

DNA 溶液(400ng/ μ l)	1.0 μ l
10 \times PCR Buffer	2.0 μ l
25mM MgCl ₂	2.0 μ l
2.5mM dNTPs	2.0 μ l
Taq(5U/ μ l)	0.2 μ l
Primer(5pmol/ μ l)	2.0 μ l
滅菌水	10.8 μ l
Total	20.0 μ l

2) PCR の温度条件

94	1分間	} 40回反復
36	1分間	
72	2分間	

3) STS 化プライマーを用いる PCR

RAPD 法と同様の方法で PCR を行う。ただし、アニーリング温度は62 $^{\circ}$ Cとする。また反復回数を35回とする。プライマーの濃度と量は種類によって異なる。

4) マルチプレックスPCRによる品種の識別

STS 化PCRの結果に基づいて、「コシヒカリ」と他の品種との識別に有用なSTS化プライマーを各種組み合わせせてPCRを行い、品種間の差異を生じ、かつ、産地および年産の差異を生じない組み合わせを選定した。すなわち、複数年次の全国33産地における「コシヒカリ」の原種あるいは原々種のサンプルに対して同じ識別パターンを示し、他の主力品種とは異なる識別パターンを示すSTS化対合プライマーの組み合わせによって「コシヒカリポジキット」を開発し、全国の複数年次の「コシヒカリ」では識別バンドが全く現れず、他の品種の場合には識別バンドが出現するようなSTS化対合プライマーを組み合わせさせた「コシヒカリネガキット」についても開発した。

さらに、国内外で流通している120品種を識別できるSTS化プライマーについても開発済みであり、これらプライマーを使った反応条件などは、「コシヒカリポジキット」の

場合と同様である。

コシヒカリポジキットPCR反応液組成

DNA溶液(400ng/μl)	1.0 μl
10×PCR Buffer	2.0 μl
25mM MgCl ₂	2.0 μl
2.5mM dNTPs	2.0 μl
Taq(5U/μl)	0.2 μl
Primer Mixture	1.3 μl
滅菌水	11.5 μl
<hr/>	
Total	20 μl

コシヒカリネガキットPCR反応液組成

DNA溶液(400ng/μl)	1.0 μl
25mM MgCl ₂	2.0 μl
2.5mM dNTPs	2.0 μl
Taq(5U/μl)	0.2 μl
Primer Mixture	2.38 μl
滅菌水	9.58 μl
<hr/>	
Total	20.0 μl

PCRの温度条件(ポジキット、ネガキット同様)

96	2分間	} 35回反復
94	1分間	
62	1分間	
72	2分間	

(参考)

幼苗または葉からの鋳型DNAの抽出 (市販キット「ISOPLANT」の方法)

- 1) 約0.2g(なければ0.1gでも良い)の試料を乳鉢に入れ、約30mlの液体窒素を入れ凍結・粉砕する。
- 2) 予め用意してあるWash Buffer 1mlに混合し、遠心分離(15,000rpm、10分間、4℃)する。
- 3) 上清をできるだけいねいに捨て、Solution 300 μlを加えボルテックスを1～

- 2秒かけ、Solution 150 µlを加えボルテックスを10秒間かける。
- 4) 予め50 に温めておいたヒートブロックに10分間入れる。
 - 5) Solution -A100 µlと Solution -B120 µlを加えボルテックスを1~2秒かけ氷上に10分間置く
 - 6) 遠心分離 (15,000rpm、10分間、4)する。 *1
 - 7) 上清の2倍量の室温保存の100%エタノールを混合する。
 - 8) 遠心分離 (6,000rpm、5分間、室温)する。
 - 9) 沈殿を室温保存の70%エタノール300 µlで洗浄する。
 - 10) 遠心分離 (6,000rpm、1分間、室温)する。
 - 11) 沈殿を風乾し、1/10 TE 30 µlで溶解する。
- *1. 上清が濁っている場合は、上清に Solution -A、Bを再度加え、混合した後、遠心し、その上清を使用する。
-

電気泳動によるDNA多型の検出

PCR終了後の反応液にローディングバッファー(1mM EDTA、グリセリン 30%、プロモフェノールブルー0.25%、滅菌水 69.5%)を3 µl加え、2%濃度のアガロースゲル(サワデーテクノロジー(株)製 Ultra-pureAgarose)電気泳動によって各DNAを分離し、エチジウムブロミド染色(500 ng/ml、1時間)を行い、紫外線照射によりDNAバンドを確認する。電気泳動装置はコスモバイオ(株)製ムーピッドを使用し、100Vで30分間泳動した。DNA分子量マーカーは和光純薬工業(株)Marker4(X174ファージ、Hae)を使用した。

品種の識別

コシヒカリポジキット、コシヒカリネガキットを使った場合の主要品種バンドパターンを表1、表2、図1、図2で示した。

(該当するバンドを有するものを「+」、有しないものを「-」で表示)

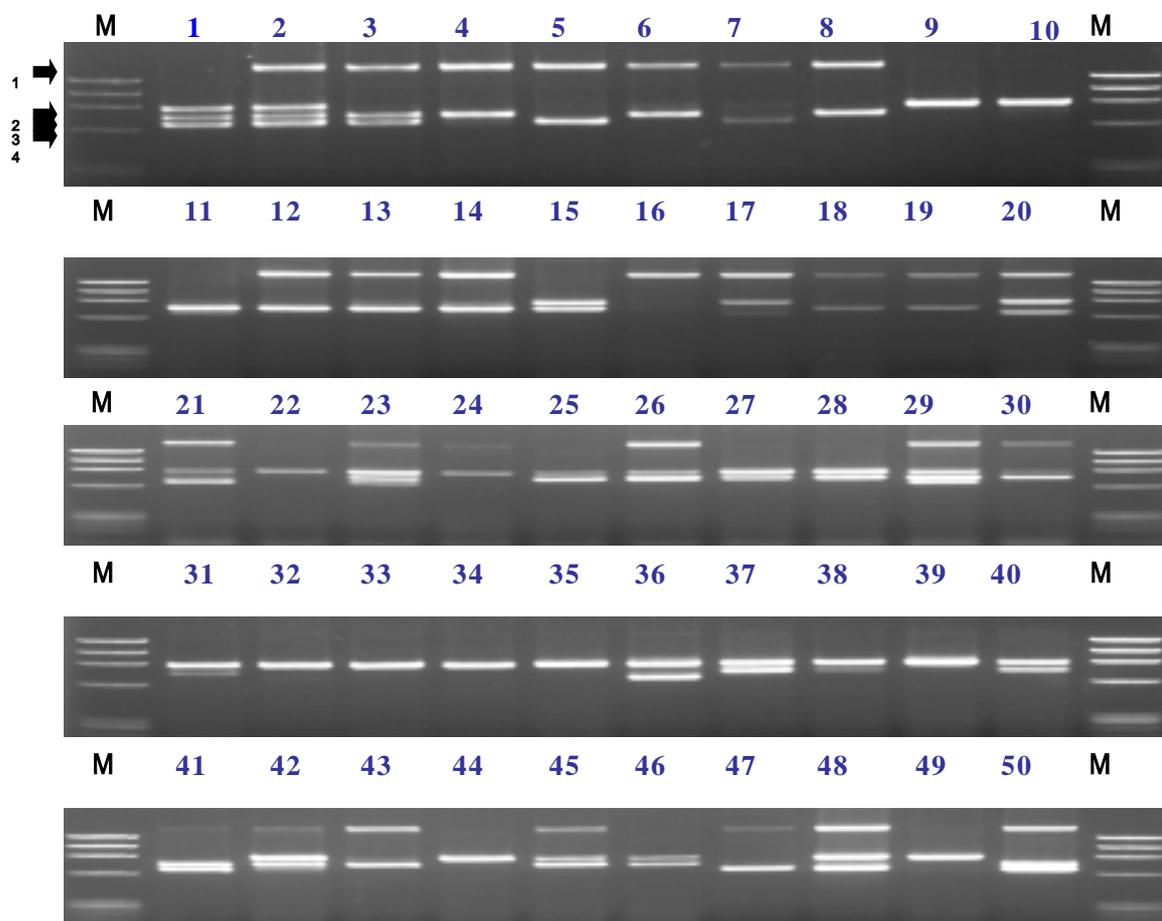
コシヒカリポジキット、コシヒカリネガキットで識別できない品種がある場合は、新たなプライマーとしてB1、P3、G28、B7、T16、A6、M2CGを使用することにより、現在120品種が識別可能である。ここでは主要60品種について表3に例示した。

なお、各品種のプライマー毎のバンドの有無を有=1、無=0として数値化することによって、多くの品種の比較が効率的に行える。

表1. コシヒカリポジキットによる識別結果

	品種/プライマ-	WKA9	B43	M11	G22
1	コシヒカリ	-	+	+	+
2	ひとめぼれ	+	+	+	+
3	ヒノヒカリ	+	-	+	+
4	あきたこまち	+	-	+	-
5	きらら397	+	-	-	+
6	キヌヒカリ	+	-	+	-
7	ほしのゆめ	+	-	-	+
8	はえぬき	+	-	+	-
9	むつほまれ	-	+	-	-
10	日本晴	-	+	-	-
11	ササニシキ	-	-	+	-
12	つがるロマン	+	-	+	-
13	ハナエチゼン	+	+	+	-
14	夢つくし	+	+	+	-
15	ハツシモ	-	+	+	-
16	朝の光	+	-	-	-
17	月の光	+	+	-	-
18	あいちのかおり	+	-	+	-
19	祭り晴	+	-	+	-
20	あきほ	+	+	-	+
21	ゆきまる	+	+	-	+
22	むつかおり	-	+	-	-
23	まなむすめ	+	+	+	+
24	かけはし	+	+	-	-
25	キヨニシキ	-	+	+	-
26	どまんなか	+	+	+	-
27	越路早生	-	+	+	-
28	ゆきの精	-	+	+	-
29	ほほほの穂	+	+	+	+
30	ゆめあかり	+	+	+	-
31	能登ひかり	-	+	+	-
32	アキツホ	-	+	-	-
33	アケボノ	-	+	-	-
34	朝日	-	+	-	-
35	ヤマホウシ	-	+	-	-
36	ヤマヒカリ	-	+	-	+
37	黄金錦	-	+	+	-
38	コガネマサリ	-	+	+	-
39	レイホウ	-	+	-	-
40	ミネアサヒ	-	+	+	-
41	ふさおとめ	+	-	+	+
42	かりの舞	+	+	+	+
43	どんとこい	+	-	+	-
44	アキニシキ	-	+	-	-
45	ながのほまれ	+	+	+	-
46	フクヒカリ	-	+	+	-
47	ゴロヒカリ	+	-	-	+
48	初星	+	+	-	+
49	中生新千本	-	+	-	-
50	森のくまさん	+	-	+	+

図1. コシカリポジキットによる増幅 DNA の電気泳動結果



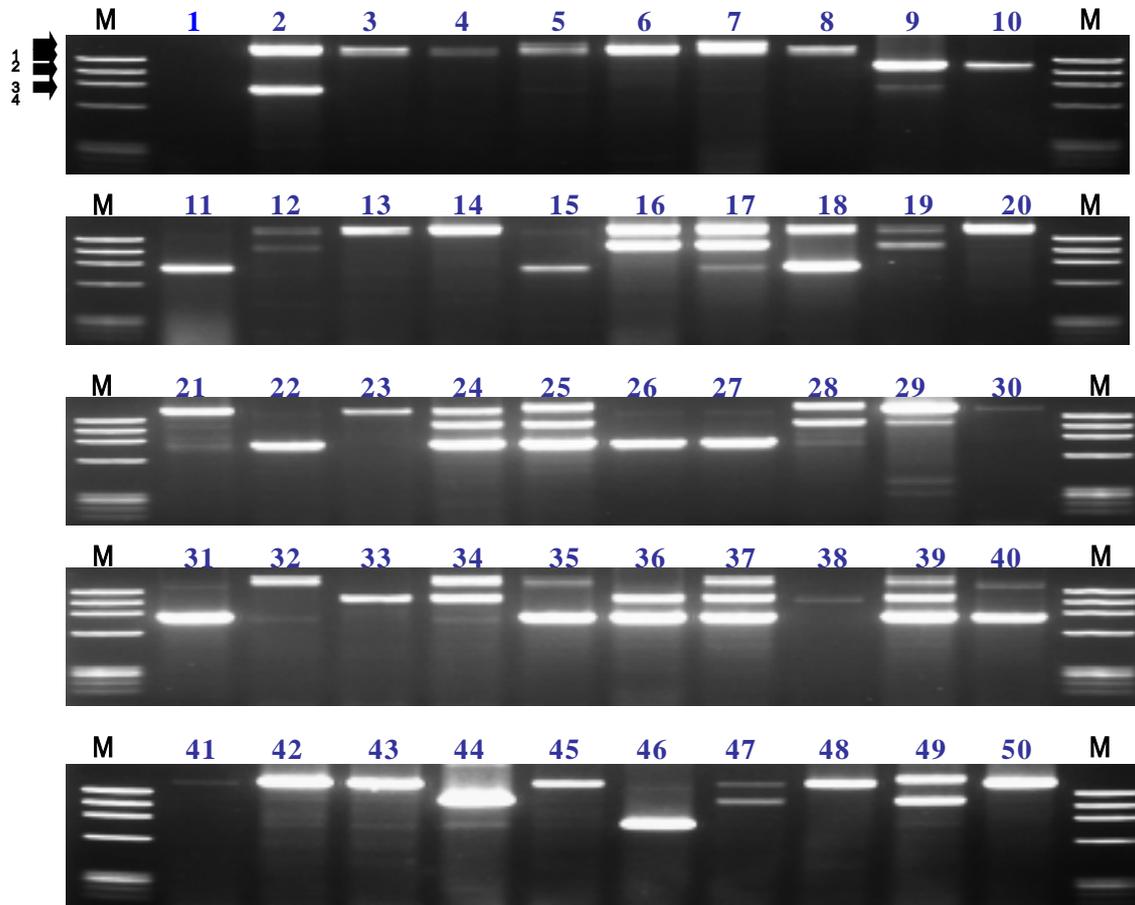
1:コシヒカリ 2:ひとめぼれ 3:ヒノヒカリ 4:あきたこまち 5:きらら 397 6:キヌヒカリ
 7:ほしのゆめ 8:はえぬき 9:むつほまれ 10:日本晴 11:ササニシキ 12:つがる
 ロマン 13:ハナエチゼン 14:夢つくし 15:ハツシモ 16:朝の光 17:月の光 18
 :あいちのかおり 19:祭り晴 20:あきほ 21:ゆきまる 22:むつかおり 23:まなむす
 め 24:かけはし 25:キヨニシキ 26:どまんなか 27:越路早生 28:ゆきの精 29
 :ほほほの穂 30:ゆめあかり 31:能登ひかり 32:アキツホ 33:アケボノ 34:朝日
 35:ヤマハウシ 36:ヤマヒカリ 37:黄金錦 38:コガネマサリ 39:レイハウ 40:ミネ
 アサヒ 41:ふさおとめ 42:かりの舞 43:どんとこい 44:アキニシキ 45:ながのほ
 まれ 46:フクヒカリ 47:ゴロピカリ 48:初星 49:中生新千本 50:森のくまさん

識別バンドの DNA 分子量は、上から順に、WKA9:1600bps、B43:870bps、
 M11:770bps、G22:650bps である。

表2. コシヒカリネガキットによる識別結果

	品種/プライマ-	WKA9	F6	S13	E30
1	コシヒカリ	-	-	-	-
2	ひとめぼれ	+	-	-	+
3	ヒノヒカリ	+	-	-	-
4	あきたこまち	+	-	-	-
5	きらら397	+	-	+	-
6	キヌヒカリ	+	-	-	+
7	ほしのゆめ	+	-	+	-
8	はえぬき	+	-	-	-
9	むつほまれ	-	+	-	-
10	日本晴	-	+	-	-
11	ササニシキ	-	-	-	+
12	つがるロマン	+	+	-	-
13	ハナエチゼン	+	-	-	-
14	夢つくし	+	-	-	-
15	ハツシモ	-	-	-	+
16	朝の光	+	+	-	-
17	月の光	+	+	-	-
18	あいちのかおり	+	-	-	+
19	祭り晴	+	+	-	-
20	あきほ	+	-	-	-
21	ゆきまる	+	-	-	-
22	むつかおり	-	-	-	+
23	まなむすめ	+	-	-	-
24	かけはし	+	-	-	+
25	キヨニシキ	-	+	+	+
26	どまんなか	+	-	-	-
27	越路早生	-	-	-	+
28	ゆきの精	-	+	+	-
29	ほほほの穂	+	-	-	-
30	ゆめあかり	+	-	-	-
31	能登ひかり	-	-	-	+
32	アキツホ	-	-	+	-
33	アケボノ	-	+	-	-
34	朝日	-	+	+	-
35	ヤマハウシ	-	-	+	+
36	ヤマヒカリ	-	+	-	+
37	黄金錦	-	+	+	+
38	コガネマサリ	-	+	-	-
39	レイホウ	-	+	+	+
40	ミネアサヒ	+	-	-	+
41	ふさおとめ	+	-	-	-
42	かりの舞	+	+	-	-
43	どんとこい	+	-	-	-
44	アキニシキ	-	+	-	+
45	ながのほまれ	+	-	-	-
46	フクヒカリ	-	-	-	+
47	ゴロビカリ	+	-	-	-
48	初星	+	-	-	-
49	中生新千本	-	+	+	+
50	森のくまさん	+	-	-	-

図2. コシヒカリネガキットによる増幅 DNA の電気泳動結果



1:コシヒカリ 2:ひとめぼれ 3:ヒノヒカリ 4:あきたこまち 5:きらら 397 6:キヌヒカリ
 7:ほしのゆめ 8:はえぬき 9:むつほまれ 10:日本晴 11:ササニシキ 12:つがる
 ロマン 13:ハナエチゼン 14:夢つくし 15:ハツシモ 16:朝の光 17:月の光 18
 :あいちのかおり 19:祭り晴 20:あきほ 21:ゆきまる 22:むつかおり 23:まなむす
 め 24:かけはし 25:キヨニシキ 26:どまんなか 27:越路早生 28:ゆきの精 29
 :ほほほの穂 30:ゆめあかり 31:能登ひかり 32:アキツホ 33:アケボノ 34:朝日
 35:ヤマハウシ 36:ヤマヒカリ 37:黄金錦 38:コガネマサリ 39:レイホウ 40:ミネ
 アサヒ 41:ふさおとめ 42:かりの舞 43:どんとこい 44:アキニシキ 45:ながのほ
 まれ 46:フクヒカリ 47:ゴロピカリ 48:初星 49:中生新千本 50:森のくまさん

識別バンドの DNA 分子量は、上から順に、S13:1680bps、WKA9:1600bps
 F6:1180bps、E30:800bps である。

表3. 各種のプライマー共存下のPCRによる主要60品種の識別結果

品種/プライマー-	数値化	WKA9	B43	M11	G22	M2CG	F6	S13	E30	B1	P3	G28	B7	T16	A6
ひとめぼれ	11,111,001,001,010	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
まなむすめ	11,111,000,001,000	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
かりの舞	11,110,000,011,000	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
ほほほの穂	11,110,000,010,000	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
どまんなか	11,101,000,101,011	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+
ながのほまれ	11,101,000,101,010	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
ハナエチゼン	11,101,000,001,010	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
ゆめあかり	11,101,000,001,000	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
夢つくし	11,100,000,111,010	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
アキホ	11,011,000,010,010	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
ゆきまる	11,011,000,001,010	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
初星	11,011,000,001,000	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
月の光	11,001,100,110,010	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
かけはし	11,001,001,011,010	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-
ゆめひかり	10,111,000,111,011	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
森のくまさん	10,111,000,110,100	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
ヒノヒカリ	10,111,000,110,000	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
ふさおとめ	10,111,000,001,000	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
あいちのかおり	10,101,001,010,011	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+
どんとこい	10,101,000,111,011	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
はえぬき	10,101,000,001,001	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+

加賀ひかり	10,100,100,101,010	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
キヌヒカリ	10,100,000,111,111	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
祭り晴	10,100,000,110,010	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
つがるロマン	10,100,000,001,110	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
あきたこまち	10,100,000,001,000	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
きらら 397	10,011,010,011,010	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
ほしのゆめ	10,011,010,011,000	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
ゴロピカリ	10,011,000,110,000	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
きらり宮崎	10,010,000,011,010	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
ナツヒカリ	10,010,000,000,010	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
たかねみのり	10,001,100,001,000	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ゆめさんさ	10,001,000,001,010	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
朝の光	10,000,100,110,010	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
あさひの夢	10,000,000,110,010	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
あかねぞら	1,110,000,110,110	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
コシヒカリ	1,110,000,011,000	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
黄金錦	1,101,111,101,011	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
キヨニシキ	1,101,111,001,110	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
コガネマサリ	1,101,100,110,011	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
ゆきの精	1,101,100,101,011	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
ミネアサヒ	1,101,001,101,010	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
ゆめみのり	1,101,000,111,110	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
ハツシモ	1,101,000,110,011	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+

能登ひかり	1,100,001,110,001	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
越路早生	1,100,001,101,001	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
フクヒカリ	1,100,001,100,011	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
ヤマヒカリ	1,010,101,010,011	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
レイホウ	1,001,111,001,011	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
朝日	1,001,110,110,010	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
中生新千本	1,001,110,100,010	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
日本晴	1,001,100,110,011	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
むつほまれ	1,001,100,101,110	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
アケボノ	1,001,100,100,010	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
ニシホマレ	1,001,001,101,111	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
むつかおり	1,001,001,001,111	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
アキツホ	1,001,000,100,010	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
アキニシキ	1,000,100,011,010	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
ヤマハウシ	1,000,001,111,001	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
チヨニシキ	101,001,101,011	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
ササニシキ	100,001,000,100	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-