

(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

- 登録品種「雪手亡」の識別を中心として -

北海道立中央農業試験場

1 子実の外観等からの識別

いんげんまめは世界各地で栽培されており、我が国では大部分が子実用として栽培されている。子実用いんげんまめの消費量は年間約 9 万 t で餡原料（66.1%）が最も多く、煮豆（15.6%）や甘納豆等（10.2%）に利用されている。本稿で品種識別の対象とする小粒の白いんげんまめ（手亡）は主に白餡の原料として用いられている。

いんげんまめの子実、種皮の地色、斑紋の種類、斑紋の色、環色、子実の形や大きさなど品種により多様な特性を示すため、これらの特性により品種の大まかな区分が可能である。また、実際の流通もこれらの区分に基づき流通している場合が多い。

平成 13 年度における子実用いんげんまめの国内生産量は 23,800t、輸入量は 61,700t である。国内生産のうち 93.7%、22,300t は北海道で生産されている。北海道産および輸入いんげんまめを子実の特性（粒色、粒形、粒大）で識別すると表 1 及び表 2 のように大別される。

北海道産の白いんげんまめのうち、手亡類は子実の特性や大きさから他の白いんげんまめである大福、大青花豆、白金時との識別は明確で容易である。（表 1 参照）

輸入豆類では NAVY BEAN 等が手亡の区分に分類されることが考えられる。これらのいんげんまめのうち白餡原料として輸入されるものは GREAT NORTHERN、PEA BEAN (NAVY BEAN)、小白芸豆等である。（表 2 参照）また、これらの名称は手亡と同様に流通上の名前であり、複数の品種が含まれている可能性がある。

子実の外観等の特性による絞り込みの後、手亡類の内での品種の識別には DNA 多型による品種識別法が必要となる。

(表1) 子実特性による北海道産いんげんまめの特性例

地色	斑紋の種類	斑紋の色	環色	子実の形	粒の大小	種 類	品種名	作付面積(ha)
白	無	無	無	楕円体	小	手 亡	姫手亡	745
白	無	無	無	楕円体			雪手亡	1,826
白	無	無	無	楕円体			その他手亡	29
白	無	無	無	じん臓形	中～大	大 福	大 福	75
白	無	無	無	じん臓形			改良早生大福	5
白	無	無	無	じん臓形			洞爺大福	269
白	無	無	無	じん臓形	(極大)	大白花豆	大白花	355
白	無	無	黄	楕円体	やや大	白金時	福白金時	99
白	偏斑紋・小	多色	黄褐	短楕円体	やや大	虎 豆	福虎豆	155
淡褐	普通斑・うずら斑	赤紫	黄褐	楕円体	中～やや大	うずら	改良中長	2
淡褐	普通斑・うずら斑	赤紫	黄褐	楕円体			福粒中長	207
淡褐	普通斑・うずら斑	赤紫	黄褐	楕円体			福うずら	255
淡褐	普通斑・うずら斑	赤紫	黄褐	楕円体			その他うずら	3
赤紫	無	無	無	楕円体	やや大～大	金 時	大正金時	3,852
赤紫	無	無	無	楕円体			北海金時	247
赤紫	無	無	無	長楕円体			丹頂金時	6
赤紫	無	無	無	楕円体			福 勝	3,163
赤紫	無	無	無	.			その他金時	193
紫	偏斑紋・小	黒	赤紫	じん臓形	(極大)	紫花豆	紫花豆	123
						合 計		11,800

特性の分類は「平成 10 年度種苗特性分類調査報告書(種類名 いんげんまめ)」(北海道、平成 11 年 3 月)によった。「大白花」、「紫花豆」はべにばないんげんのため粒大の基準が異なる。作付面積は北海道農政部調べ、合計は一致しない。

(表2) 子実特性による輸入豆類の特性例

粒 色	粒 形	粒 大	銘 柄 名	生産国	用途
【いんげんまめ】					
白	楕円	小	NAVY BEAN	カナダ	白餡
白	楕円		HARICOT BEAN	北朝鮮	
白	楕円	小	小白芸豆	中国	白餡
白	楕円		HARICOT BEAN	ブラジル	
白	楕円	中	GREAT NORTHERN BEAN	米国	白餡
白	楕円	小	PEA BEAN 又は NAVY BEAN	米国	白餡
白	長楕円		POROTO ALUBIA	アルゼンチン	白餡
白	長楕円		長型白芸豆	中国	白餡
白	長楕円		WHITE GARDEN BEAN	米国	白餡増量材
白	扁平		扁型白芸豆	中国	白餡
(白)			WHITE BEAN	南アフリカ	煮豆
茶	長楕円		LIGHT RED KIDNEY BEAN	カナダ	赤餡
茶	楕円		FEIJAO	ブラジル	煮豆、スープ
茶	楕円		PINK BEAN	米国	赤餡増量材
茶 / 赤斑	楕円	中	CRANBERRY BEAN	米国	煮豆、甘納豆
茶 / 赤斑	楕円	中	PINT BEAN	米国	赤餡増量材
赤	長楕円		RED KIDNEY	アルゼンチン	赤餡
赤	長楕円		DARK RED KIDNEY BEAN	カナダ	赤餡
赤	長楕円	中	紅花芸豆	中国	煮豆、菓子、餡
赤	長楕円	中	DARK RED KIDNEY BEAN	米国	赤餡増量材、煮豆
赤	楕円	小	SMALL RED BEAN	米国	赤餡
濃赤	長楕円		紫花芸豆	中国	赤餡、煮豆
赤黒	楕円		BLACK TURTLE BEAN	米国	赤餡増量材
赤黒混色	楕円		雑芸豆	中国	赤餡
黒	楕円		POROTO NEGRO	アルゼンチン	赤餡
(黒)	不明		BLACK BEAN	ブラジル	
(黒)	不明		BOLIVIAN BLACK BEAN	ボリビア	スープ
不明	不明		BICO DE OURO	ブラジル	煮豆、スープ
不明	不明		ROSINHA	ブラジル	煮豆、スープ
不明	不明		CARIO QUINHA	ブラジル	煮豆、スープ
不明	不明		CARIO QUINHA	ボリビア	煮豆、スープ
【べにばないんげん】					
白	腎臓型	大	大白芸豆	中国	煮豆、甘納豆
赤 / 黒斑	腎臓型	大	大黒花芸豆	中国	甘納豆、煮豆
(斑)	不明	(大)	SPECKLED BEAN	中国	
【らいまめ】					
白	扁平		LARGE LIMA BEAN	米国	白餡増量材
白	扁平		BABY LIMA BEAN	米国	白餡
白	扁平		BUTTER BEAN	ミャンマー	白餡
赤	扁平		SULTANIPYA BEAN	ミャンマー	赤餡増量材
赤 / 褐斑	扁平		RED FLAT BEAN	ミャンマー	赤餡増量材

「雑豆に関する資料」(財団法人 日本豆類基金協会、平成 14 年 9 月)

粒色等は「輸入豆類図鑑」(財団法人 雑豆輸入基金協会、昭和 60 年 3 月)によった。

2 DNA 多型による白いんげんまめ（手亡）の品種識別

（RAPD・STS マーカーによるいんげんまめの品種識別技術）

（１） 識別の原理

植物や動物は多くの細胞からできているが、いんげんまめのように自殖性の植物では同じ品種、個体の細胞には全て同じ DNA のセットが含まれている。酵素反応を利用したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、DNA の目的とする領域を短時間に数十万倍に増幅できる。PCR 法は、もとなる DNA に既知の塩基配列が存在するかどうかを高感度で検定できるので、ウイルスや病原菌の検出、遺伝病の診断、親子鑑定等に利用されている。作物で、品種に特徴的な DNA の配列をあらかじめ特定しておく、その配列の有無で品種の判定が可能となる。

北海道立中央農業試験場では白いんげんまめの手亡類について、10 塩基のランダムプライマーを用いて PCR を行う RAPD（random amplified polymorphic DNA）法により、増幅される品種間の多型断片を選抜した。さらに選抜した DNA 断片の塩基配列を解読し、新たに 3 組の特異プライマーセットを設計した。特異プライマーを用いた PCR では品種に特徴的な DNA 配列のみを増幅できるため品種識別の信頼性が向上する。また、複数のプライマーセットを混合して PCR を行うマルチプレックス PCR も可能で品種識別の効率化が図られる。品種識別では、豆類の葉、子実などから DNA を抽出し、抽出した DNA を鋳型に特異プライマーを用いて PCR を行い、増幅された DNA 断片のサイズや有無を電気泳動で確認する。得られた DNA 情報を既存の品種データと照合することにより品種の識別が可能である。なおこの場合、品種の子実特性等の情報も併せて検討することにより、より確実な判定ができる。

（２） 品種識別に利用可能な RAPD、STS マーカー

北海道の手亡 3 品種を対象に多数の RAPD プライマーを供試して品種間多型を探索した結果、8 種の RAPD 断片を品種識別用マーカーとして選抜した。

手亡品種識別用 RAPD マーカー

プライマー	塩基配列	多型断片 (bp)	雪手亡	姫手亡	銀手亡
ubc105	CTC GGG TGG G	1000	+	+	-
ubc157	CGT GGG CAG G	500	+	+	-
ubc218	CTC AGC CCA G	1500	+	+	-
ubc245	CGC GTG CCA G	500	+	+	-
ubc276	AGG ATC AAG C	1300	+	+	-
ubc289	ATC AAG CTG C	1900	+	+	-
ubc355	GTA TGG GGC T	1200	+	-	-
ubc375	CCG GAC ACG A	1200	+	-	-

(注) 各品種でのプライマーの多型断片の有無は、有 = 「+」、無 = 「-」で表示した。

選抜したマーカーのうち、ubc375-1200 は、塩基配列の挿入により「姫手亡」及び「銀手亡」では約 1400bp の DNA 断片が増幅される共優性型のマーカーである。

得られた多型断片の塩基配列を解読し、新たにプライマーを設計することで 3 種の STS マーカーを開発した。

品種識別用 STS プライマー

判別マーカー	RAPD 断片	上流プライマー	下流プライマー
SP01	ubc218-1500	CTCAACGGATGCAAACACTTG	CTCCATTTGGAAGACTAGAC
SP02	ubc375-1200	ACGAGGCACCACATTTAATG	ATGTAGTGGTAAAAGACATAC
SP03	ubc289-1900	TGAGTGTCTACGCTCGATG	ACCAAAGTGCAGCTAGCTG

プライマーの塩基配列は特許出願中 (特願 2002-171417)

(3) DNA 分析の留意点

サンプルの採取

いんげんまめは流通上、同一のロットに複数の品種が混入している可能性があるため、試料の採取は粒単位で行い、複数の子実から独立に試料を調製する。

試料を調製する子実は全体を代表する特性のものを選び、未熟、罹病、虫食い等の子実を避け、健全な子実を使用する。

DNA の抽出

サンプル間の交互汚染に注意する。

抽出した DNA 中にタンパク質や多糖類が含まれていると PCR が阻害されるので、できるだけ夾雑物は除去する。

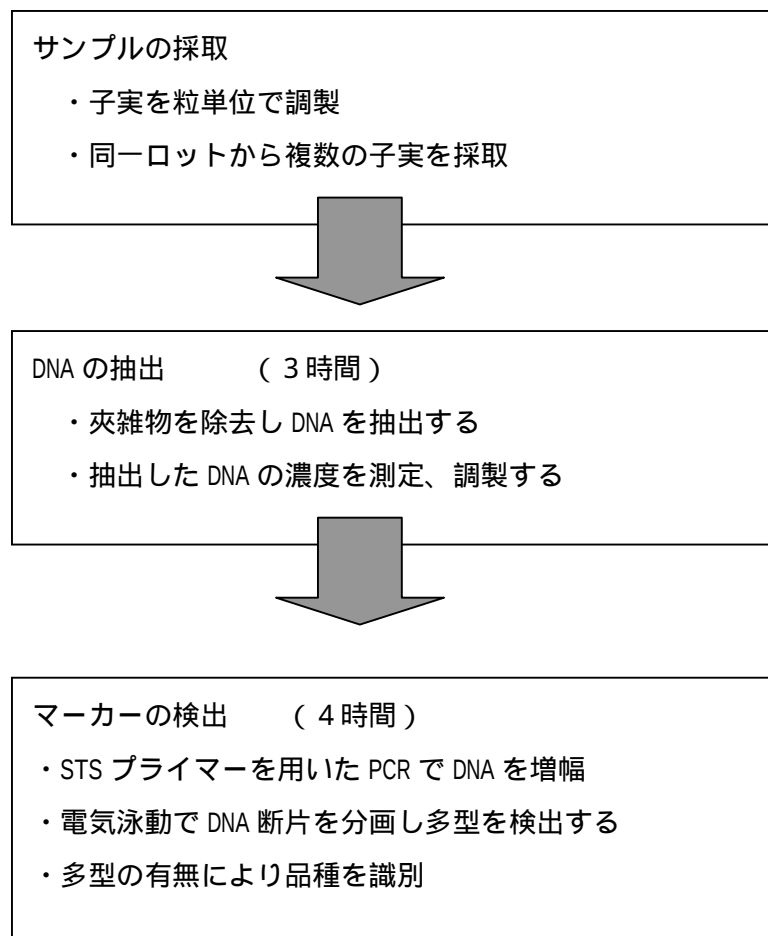
抽出した DNA は濃度を測定し、一定量の DNA を PCR に供する。

再現性の確認

同じサンプルから、同じ DNA パターンが得られることを確認するために、

- ・ DNA 抽出から多型確認までを複数回行う。
- ・ 比較対照品種を設け、必ず DNA 抽出段階から分析を行う。

(4) 識別フロー



(5) RAPD・STS マーカーによるいんげんまめの品種識別プロトコール

試料の採取

- ・ 試料は 1 粒単位で調製する。乾燥子実を粉碎する際は子実間の相互汚染に注意する。
- ・ 2.5mm 程度のドリルで子実に穴をあけると、容易に試料が調製できる。この場合、ドリルの切り屑を試料として利用する。ドリルは子実ごとに洗浄、滅菌することが望ましいが、70%エタノールで湿らせたキムワイプで丁寧に拭き取ることで、DNA の相互汚染は回避できる。
- ・ 粉碎した子実（切り屑）約 20mg を 1.5ml のマイクロテストチューブに入れ、DNA 抽出に用いる。



DNA の抽出

・試料からの DNA 抽出は CTAB 法、SDS・フェノール法や市販の DNA 抽出キットで可能であるが、SDS・フェノール法について記述する。

子実からの DNA 抽出 (SDS-フェノール法): 約 3 時間

- 1) 1.5ml のマイクロテストチューブに試料 20mg を入れ、抽出液 0.2ml を加え攪拌、55 で 20 分間加温。
- 2) テストチューブに 0.2ml の Phenol/Chloroform を加え振とうする。
- 3) テストチューブを 14000rpm で 5 分間遠心する。
- 4) 上清を新しいテストチューブに移す。
- 5) 上清に 0.2ml の 2-propanol を加え、攪拌する。
- 6) テストチューブを 14000rpm で 5 分間遠心する。
- 7) 上清を捨て、沈殿物を風乾する。
- 8) テストチューブに蒸留水 0.1ml を加え、沈殿物を溶解し分光光度計で濃度を測定する。
- 9) DNA 溶液を 30ng / μ l に希釈し、1 μ l を PCR に使用する。

使用する試薬

抽出液 (10mM Tris-HCl pH7.8, 5mM EDTA, 0.5% SDS, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20, 80 μ g/ml proteinase-K)

Phenol/Chloroform (TE-saturated phenol/Chloroform/Isoamylalcohol) 25:24:1(v/v/v)
2-propanol

PCR による品種特異 DNA 断片の増幅

STS プライマーを用いた PCR : 約 3 時間

サーマルサイクラーはアプライドバイオシステム社の Gene Amp PCR System 9700、合成酵素は同社の AmpliTaq Gold を使用した。反応液量は 15 μ l とし、鋳型 DNA は 30ng を添加、プライマー濃度は上流、下流各 0.15 μ M とした。合成酵素は 0.5units を使用、その他の反応液組成は酵素添付のバッファーで最終濃度が 10mM Tris-HCl(pH9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5mM $MgCl_2$, 0.2mM each of dNTPs となるよう調製した。

PCR の温度サイクルは 94 ; 7 分の後、94 ; 30 秒、55 ; 30 秒、72 ; 1 分を 35 回繰り返す、最後に 72 ; 7 分を付加した。STS プライマーによる PCR ではホットスタート用の Taq polymerase の使用を推奨する。

1) 反応液組成

DNA 溶液 (30ng/ μ l)	1.0 μ l
10 $\times$ PCR Buffer	1.5 μ l
25mM $MgCl_2$	0.9 μ l
2mM each of dNTPs	1.5 μ l
F-primer(2pmol/ μ l)	1.1 μ l
R-primer(2pmol/ μ l)	1.1 μ l
Taq polymerase(5u/ μ l)	0.1 μ l

滅菌水を加えて 15 μ l とする。

2) PCR の温度条件

94	7 分	
94	30 秒	} 35 回繰り返し
55	30 秒	
72	1 分	
72	7 分	
4		∞

RAPD プライマーを用いた PCR : 約 5 時間 (参考)

RAPD プライマーによる PCR ではプライマー濃度を 0.2 μ M、 $MgCl_2$ 濃度を 2mM とし、サーマルサイクルは 45 とした。

1) 反応液組成

DNA 溶液 (30ng/ μ l)	1.0 μ l
10 $\times$ PCR Buffer	1.5 μ l
25mM $MgCl_2$	1.2 μ l
2mM each of dNTPs	1.5 μ l
RAPD-primer(5pmol/ μ l)	0.6 μ l
Taq polymerase(5u/ μ l)	0.1 μ l
滅菌水を加えて 15 μ l とする。	

3) PCR の温度条件

94	7 分	
94	30 秒	} 45 回繰り返し
55	30 秒	
72	1 分	
72	7 分	
4		∞

PCR 産物の電気泳動：約 1 時間

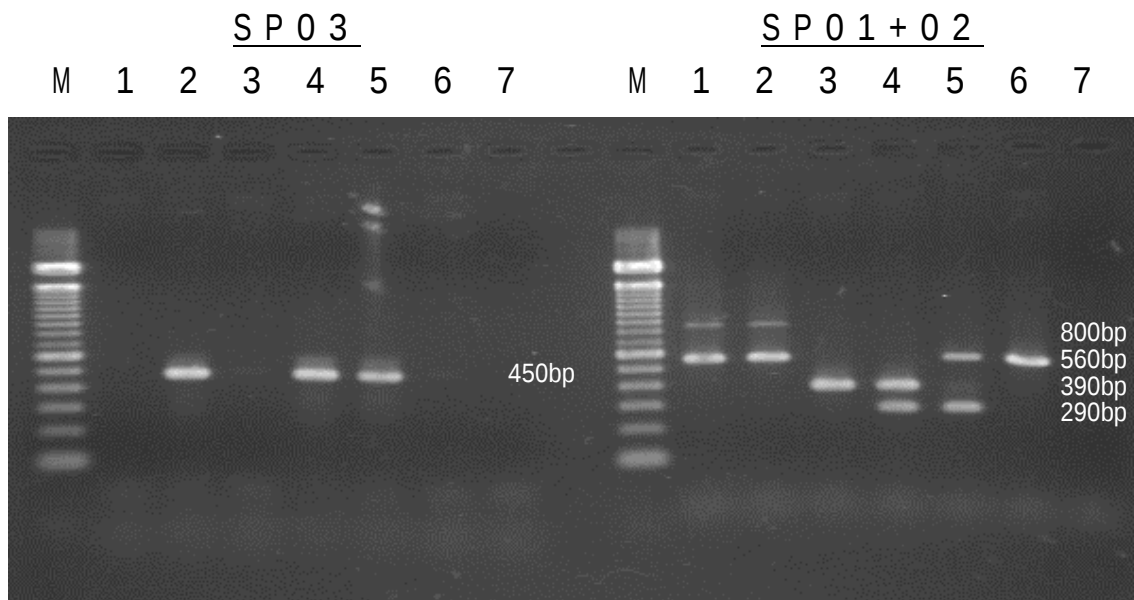
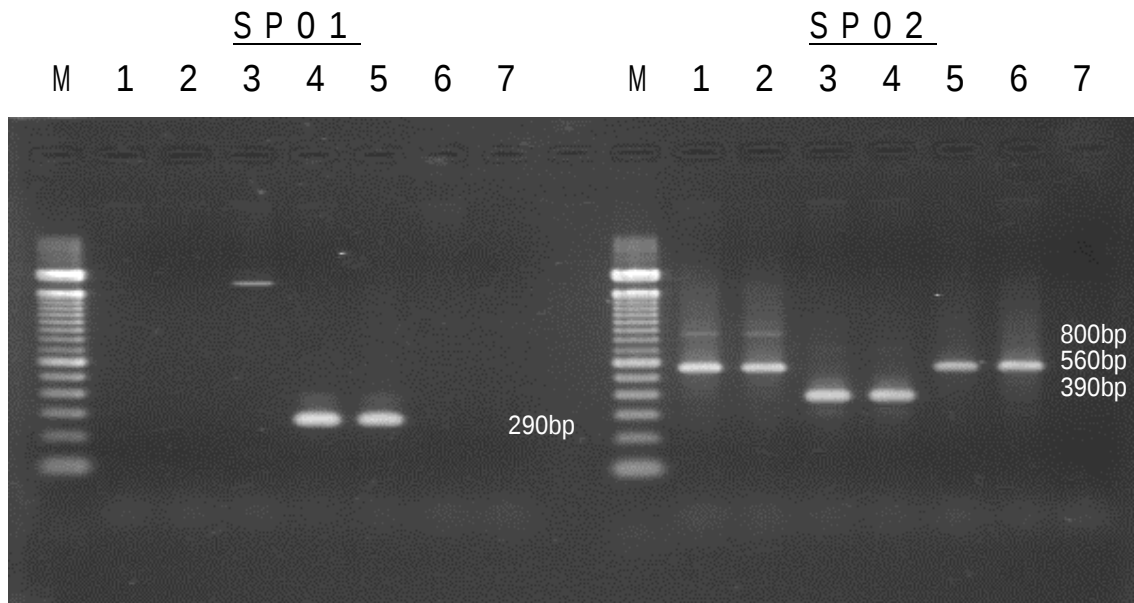
反応液 4 μ l にローディングバッファー 2 μ l を加えてよく混ぜ、1.5% アガロースゲルにアプライし、1 $\times$ TAE バッファーで電気泳動する。ミュールピッド型の電気泳動槽では 100 ボルトで約 20 分間泳動する。泳動後のゲルは SYBR Green I またはエチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下で写真撮影し増幅断片の有無や大きさを確認する。

品種の識別

STS マーカーにより白いんげんまめの登録品種「雪手亡」と既存品種「姫手亡」、「銀手亡」との識別が可能である。また、グレートノーザン、ピーブーン、小白芸豆等海外から輸入される主要な白いんげんまめと「雪手亡」の識別も可能である。

(6) DNA 分析による品種識別

北海道立中央農業試験場で開発した 3 組の STS プライマーを用いた PCR により、白いんげんまめ（手亡）の登録品種「雪手亡」と他の手亡類及び海外から白飴原料として輸入される小粒の白いんげんまめとの識別が可能である。



1：グレートノーザン、2：ピービーン、3：小白芸豆、4：雪手亡、5：姫手亡、6：銀手亡、7：ネガティブコントロール

SP01 と SP02 はプライマーを混合して同時に PCR を行うマルチプレックス PCR が可能である。グレートノーザン、ピービーン、小白芸豆は現在流通しているもの 1 点を供試した。白飴原料として輸入されるべにばないんげん（大白芸豆）やらいまめ（ベビーライマ、バタービーン）は、植物種が異なるため DNA 断片の増幅は認められなかった。SP02-390 と SP02-560 は塩基配列の挿入による共優性マーカーである。SP02 により、グレートノーザン、ピービーンでは約 800bp の断片が増幅される。

STS マーカーによる品種識別

品種・銘柄名	SP01 290bp	SP02 390bp	SP02 560bp	SP02 800bp	SP03 450bp
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	-	+	-	-	-
大白芸豆	-	-	-	-	-
ベビーライマ	-	-	-	-	-
バタービーン	-	-	-	-	-

（注）各プライマーの多型断片の有無は、有 = 「 + 」、無 = 「 - 」で表示した。

また、北海道立植物遺伝資源センターが保管する北海道の手亡、白金時の遺伝資源 25 品種を供試した結果、「雪手亡」と同じ遺伝子型を示す遺伝資源は存在しなかった。

北海道産手亡、白金時の DNA 識別

保存番号	品 種 名	SP01	SP02	SP02	SP02	SP03
		290bp	390bp	560bp	800bp	450bp
	雪手亡（参考）	+	+	-	-	+
3412	大手亡（芽室）	-	-	+	-	-
3437	十育 A-23 号	-	+	-	-	-
3447	十育 A-27 号	-	-	+	-	-
3448	姫手亡	+	-	+	-	+
3646	大手亡	-	-	+	-	-
3647	改良大手亡	-	-	+	-	-
3648	大手亡（網走）	-	-	+	-	-
3649	大手亡（訓子府）	-	-	+	-	-
3651	大手亡	-	-	+	-	-
3652	大手亡 20Kr-107	-	-	+	-	-
3653	大手亡（幕別）	-	-	+	-	-
3672	大正大手亡（白莢）	-	-	+	-	-
3676	銀手亡	-	-	+	-	-
7019	大手亡	-	-	+	-	-
7020	姫手亡	+	-	+	-	+
7021	銀手亡	-	-	+	-	-
7031	大正大手亡	-	-	+	-	-
7032	改良大手亡	-	-	+	-	-
3416	白金時	-	-	-	-	+
6297	白金時（半蔓性）	-	-	-	-	+
6301	白金時（矮性、軟莢）	-	-	-	-	+
7006	福白金時	-	-	-	-	+
7008	大正白金時	-	-	-	-	+
7994	白金時（北見）	-	-	-	-	+

（注）保存番号は北海道立植物遺伝資源センターにおける番号。

各プライマーの多型断片の有無は、有 = 「 + 」、無 = 「 - 」で表示した。

さらに、北海道立十勝農試が所有する海外産の小粒白いんげんまめ 98 品種を供試した結果、「雪手亡」と同じ遺伝子型を示す遺伝資源が 3 品種検出された。しかし、これらの品種はいずれも粒大が「雪手亡」に比べ小さく、子実の外観形質で「雪手亡」との識別が可能であった。RAPD マーカーを用いることでも、「雪手亡」との識別は可能であった。

海外産白いんげんの DNA 識別

保存 番号	品種名	百粒重 (g)	SP01 290bp	SP02 390bp	SP02 560bp	SP02 800bp	SP03 450bp	ubc105 1000bp	ubc355 1200bp
	雪手亡	32.7	+	+	-	-	+	+	+
	姫手亡	32.7	+	-	+	-	+	+	-
	銀手亡	38.7	-	-	+	-	-	-	-
21007	Pearl Bean	17.2	+	+	-	-	+	-	-
21015	Michigan Pea Bean	20.2	+	+	-	-	+	-	-
61028	Merton	18.7	+	+	-	-	+	-	-
98 品種中の増幅数			15	38	55	7	63	34	11

(注) 保存番号は北海道立十勝農業試験場における番号。

各プライマーの多型断片の有無は、有 = 「+」、無 = 「-」で表示した。

(7) まとめ

手亡の登録品種「雪手亡」と他の白いんげんまめとの識別マーカーを開発した。DNA 識別技術の信頼性を確保するためには、輸入豆類を含め国内に流通する品種の遺伝子型をカタログ化し、未知の供試試料を既存品種のマーカー型に可能な限り類別できる条件を確立する必要がある。さらに、今後新たな品種が育成、普及された場合にはこれに対応したマーカーの開発を継続的に行っていく必要がある。