

## LAMP法による愛知県産レンコンの品種識別技術の開発

大橋博子<sup>1)</sup>・市川あゆみ<sup>1)</sup>・鈴木良地<sup>2)</sup>・水上優子<sup>2)</sup>

**摘要**:LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)法を用いて、愛知県の主要なレンコン栽培品種「備中」及び「ロータスホワイト」を相互に識別できる技術を開発した。本技術はDNA抽出試薬やDNA増幅のための高価な機器が不要なため、実験施設だけでなく生産現場での利用も可能である。

**キーワード**:レンコン、品種識別、LAMP法

### 緒言

国内の各産地で栽培されている主なレンコン品種は十数種類にのぼり<sup>1)</sup>、その多くが明治以降に導入された中国種を起源としている<sup>2)</sup>。愛知県は2020年の出荷量が全国4位の産地であり<sup>3)</sup>、県内主産地の海部地域では、「備中」及び「ロータスホワイト」が主力品種である<sup>4)</sup>。

近年、レンコンの各産地で地域独自のブランド化によって販路拡大と産地の持続的成長を目指す取り組みが行われている<sup>5)</sup>。産地ブランドとして定着させるためには、各品種の特性を活かし、安定した品質の生産物を供給できる栽培技術の確立が重要である。しかし、レンコンでは根茎の伸長によりほ場をまたいだ混入や自然交配実生株がしばしば発生することから、品種特性である食感を損なう場合がある。その一方で、植え付け時や収穫時に根茎の外観による品種・系統の判別が困難で、品種・系統の維持管理が難しい。このため、DNA情報を活用した遺伝子診断技術による品種識別への期待が高く、国立大学法人茨城大学を代表とした「国産レンコンのブランド力強化コンソーシアム」が「品種識別マニュアル レンコン編」を発行した<sup>6)</sup>。

本研究では、愛知県の主要栽培品種である「備中」及び「ロータスホワイト」について、前述の品種識別マニュアルに記載されたDNAマーカーを利用し、PCR法よりも簡易な設備で実施でき、生産現場での利用も可能なLAMP法による両品種の識別技術を開発したので報告する。

### 材料及び方法

#### 1 供試材料

本研究には愛知県愛西市の栽培ほ場で2019年6月に採取した「ロータスホワイト」36点と「備中」1点の葉、同年11月に集荷された「備中」18点及び「ロータスホワイト」22点の根茎を用いた。標準検体として「備中」及び「ロータスホワイト」の根茎(海部農林水産事務所農業改良普及課から提供)を用い

た。また、開発したLAMPマーカーの検証材料として、2021年11月に「ロータスホワイト」10点、2022年1月に「備中」10点の側芽がついた根茎を同農業改良普及課から提供を受けた。

#### 2 既報DNAマーカーを用いた品種識別

レンコン葉または根茎からISOPLANT(株式会社ニッポンジーン、東京)またはISOPLANTII(株式会社ニッポンジーン、東京)を用いて抽出したDNAを鋳型とし、表1に示した既報のレンコン品種識別マーカー9種類を用いてDNAポリメラーゼKOD-FX(東洋紡株式会社、大阪)によりPCR反応を行った。PCR反応液の調整はKOD-FXの標準プロトコールに準じ、反応条件は初期変性94°C2分、変性98°C10秒ーアニーリング62°C30秒ー伸長68°C30秒を1サイクルとして40反復し、最終伸長を62°C5分とした。PCR増幅産物は3%アガロースで電気泳動した。

#### 3 LAMPマーカーの開発

「備中」、「ロータスホワイト」で遺伝子多型が確認されたPCRマーカーのうちIndel04、Indel13、Indel15及びIndel26の増幅産物について、DNAシーケンサー(Seq Studio Genetic Analyzer、サーモフィッシュャーサイエンティフィック株式会社、東京)で塩基配列解読を行った。このうち両品種の違いが大きかったIndel04、Indel26の増幅産物の塩基配列を元に、Primer Explorer V5(<http://PrimerExplorer.jp>、栄研化学株式

表1 レンコン品種識別 PCR(Indel)マーカー

| Indel | フォワード(fwd)プライマー         | リバース(rev)プライマー          |
|-------|-------------------------|-------------------------|
| 01    | CCACCTAGTTGACAATCTTACG  | TCACTTGAGTCGTCTTCCTCTTC |
| 04    | GGCTATTCGTCTTCTTCTGAT   | TGGTCTTGGTCTTGGACTACCTA |
| 13    | CATGTCACCTGTCTTCCCTTTC  | GGAAACTATCACTGTTGGTCTGG |
| 15    | GTTTCTAATTGGGTCGTCAACTG | CATGAACCAACAACAAGACAAA  |
| 16    | CAGTGCTTAGAAAGCTCGAGAAC | AACCTTGATCCCGTCTTCTGAAT |
| 18    | GTTGCTTCAGGGTAAAGAAAGT  | AGTATTATGCAGGGGGAGATGTT |
| 20    | GATAAAACCTTATTTCCGGCATC | TAGGCTGTGTTGGTGTATTGAA  |
| 24    | GCACAATAATGAATGAACAAAGT | CCACACAGCATGTAACACACAGT |
| 26    | ACTCTACAAGTGGGGTCAACAAA | TCTTCCAGGAAAAGTACGGATA  |

注) 品種識別マニュアル レンコン編<sup>6)</sup>より引用

会社、東京)を用いて「備中」、「ロータスホワイト」それぞれに特異的に反応するLAMPプライマーを設計した(図1、2)。

設計したLAMPプライマーの特異性、反応温度の検討は、DNeasy Plant Mini Kit(株式会社キアゲン、東京)を用いて根茎から抽出したDNAを鋳型とし、福田ら<sup>7)</sup>のLAMP反応液組成でリアルタイム濁度測定装置(LA-200またはLoopAmpExia、いずれも栄研化学株式会社、東京)を用い、60°C、63°C、65°C、68°Cの一定温度で60分間反応して行った。

#### 4 LAMPマーカによる簡易識別法

生産現場での実施を想定して、DNA抽出試薬の利用や抽出作業・時間の削減を図るため、爪楊枝懸濁法<sup>7)</sup>の応用を検討した。「備中」及び「ロータスホワイト」の肥大前の根茎、肥大後の収穫根茎、側芽(図3)を爪楊枝で10回刺した先端を0.1 mM Tris-HCl 100 µLに浸け、10分間煮沸した後に卓上遠心機で1分間遠心した上清1 µLをDNAサンプルとし、DNeasy Plant Mini Kitで標準根茎から抽出したDNAを比較対照としてLAMPマーカ-B03、LW09で識別を行った。LAMP反応は、LAMP MASTER for Turbidity(株式会社ニッポンジーン、東京)を用い、LAMP反応液組成は製品マニュアルのプロトコールに準じて行った。加温は卓上恒温器(MyBL-10、アズワン株式会社、大阪)を用い、B03については68°C、LW09については65°Cで60分間反応して行った。

また、目視判別をより簡便にするため、上述のLAMP反応液に比色試薬マラカイトグリーンシュウ酸塩(終濃度80 µM)、ヒドロキシナフトールブルー(HNB)(終濃度15 µM)、LAMP MASTER for Turbidity(Visible Dye)に付属する目視試薬

Visible Dye(株式会社ニッポンジーン、東京)を加え、標準根茎のDNAを鋳型として反応後の呈色を比較した。

## 結果及び考察

### 1 既報DNAマーカを用いた品種識別

表2に既報のレンコン品種識別PCRマーカ9種類のうち「備中」及び「ロータスホワイト」の増幅産物に差が認められた5種類(Indel04、Indel13、Indel15、Indel16、Indel26)の遺伝子型を表2にまとめ、その電気泳動像を図4に示した。

これら5マーカを用いて、ほ場から採取した葉又は集荷根茎サンプルの遺伝子型を判定した結果を図5に示した。葉サンプルの遺伝子型調査では、「ロータスホワイト」ほ場で採取された36点中3点は5マーカ全てが「備中」と同じ遺伝子型を示し、4点は「ロータスホワイト」と「備中」の両品種の遺伝

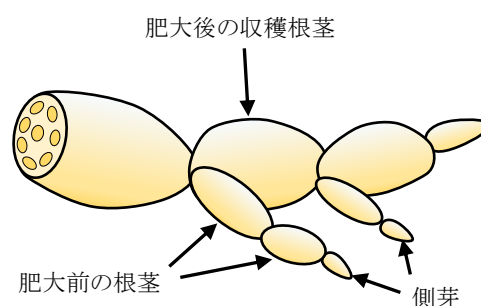


図3 爪楊枝懸濁法の抽出部位



図1 Indel04 の塩基配列及び備中識別用 LAMP プライマー(B03)の設計  
注)網掛け部分は Indel プライマーの配列及び挿入・欠損部分

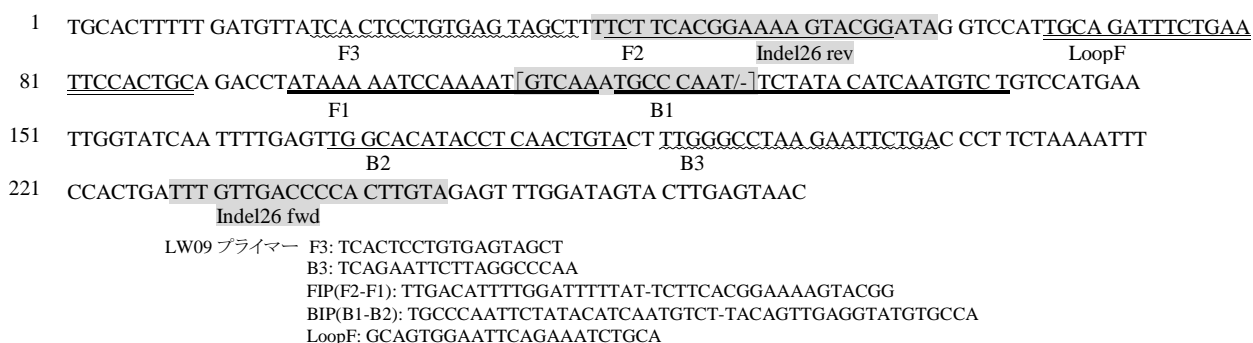


図2 Indel26 の塩基配列及びロータスホワイト識別用 LAMP プライマー(LW09)の設計  
注)網掛け部分は Indel プライマーの配列及び挿入・欠損部分

子型が認められた。前者はほ場内における「備中」の掘り残しや近接ほ場からの伸長、後者は自然交配による混種と考えられた。集荷根茎サンプルでは、40点中、品種名とその遺伝子型が一致しなかったものは「備中」で7点、「ロータスホワイト」で4点あった。レンコンはその栽培特性上、品種転換時の前作の掘り残しや隣接ほ場からの侵入をなくすることが困難である。ほ場内の品種の斉一度を調査する等の目的でDNAマーカーを用いた品種識別を行う際は、同一ほ場から複数個体のサンプルを採取し行うことが望ましいと考えられた。

2 LAMPマーカーの開発

「備中」を検出するB03は68°C、「ロータスホワイト」を検出するLW09は65°CでLAMP反応を行った場合、反応速度が速く、品種特異性も安定していた(表3)。

表2 「備中」及び「ロータスホワイト」間の品種識別 PCR マーカーにおける遺伝子型多型

| PCR マーカー(bp)* | 品種  |          |
|---------------|-----|----------|
|               | 備中  | ロータスホワイト |
| Indel04       | 271 | -        |
|               | 262 | +        |
| Indel13       | 276 | -        |
|               | 270 | +        |
| Indel15       | 265 | +        |
|               | 231 | -        |
| Indel16       | 225 | +        |
|               | 292 | +        |
| Indel26       | 286 | -        |
|               | 243 | +        |
|               | 229 | +        |

\*bp は塩基配列データから計数した塩基数

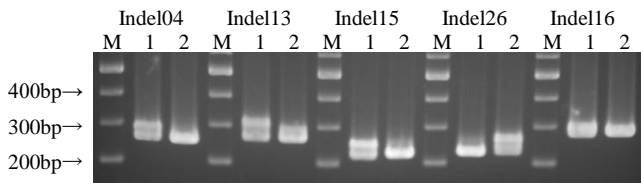


図4 品種識別 PCR マーカーの電気泳動像

1:備中、2:ロータスホワイト、M:100bp ラダーマーカー

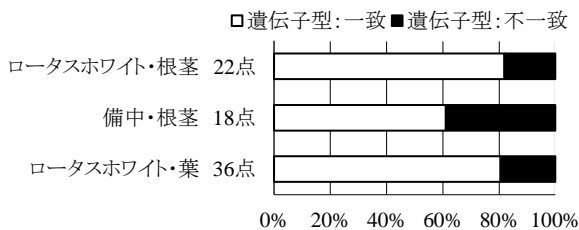


図5 サンプルの品種と PCR マーカー 遺伝子型の一一致率

表3 B03、LW09の LAMP 反応温度による濁度閾値到達時間<sup>1)</sup>の比較

| LAMP 反応温度 | B03    |          | LW09 |          |
|-----------|--------|----------|------|----------|
|           | 備中     | ロータスホワイト | 備中   | ロータスホワイト |
| 60°C      | 49'24" | 反応せず     | 反応せず | 34'54"   |
| 63°C      | 39'36" | 反応せず     | 反応せず | 27'30"   |
| 65°C      | 34'42" | 反応せず     | 反応せず | 25'30"   |
| 68°C      | 28'06" | 反応せず     | 反応せず | 25'00"   |

1) LAMP 反応液の濁度が0.1を超えるまでにかかる時間

3 LAMPマーカーによる簡易品種識別法

(1) LAMPマーカー検定に適した部位

部位ごとに爪楊枝懸濁法(Tris-HCl/煮沸)で抽出したDNAサンプルでLAMP反応を行った結果、B03については「備中」の側芽サンプルは30分以内に反応したが、根茎サンプルの反応は著しく遅く「ロータスホワイト」との識別が困難であった(図6)。一方、LW09については「ロータスホワイト」のサンプル部位に関わらず30分以内に反応した(図7)。根茎にはDNA増幅を阻害する多糖類やポリフェノールが含まれるため、LAMPマーカーの種類に関わらず増幅反応を安定させるには、阻害物質の少ない側芽をサンプルとして用いることが望ましい。また、B03については、50分程度で「ロータスホワイト」に非特異的反応が起きる場合があり、反応時間は40分程度が適すと考えられた。

(2) 目視判別法

LAMP Master for Turbidityに3種の比色試薬を加えて60分の保温後に呈色を比較した。マラカイトグリーンを加えた場合は陽性で「水色」、陰性は「透明」を示したが、B03では「ロータスホワイト」も薄い陽性の呈色があった。HNBを加え

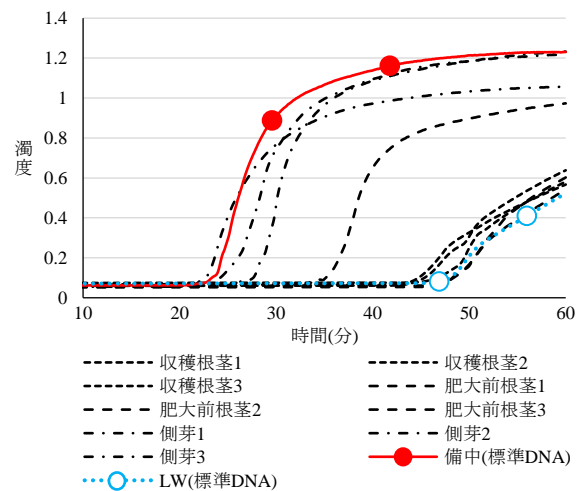


図6 「備中」部位別サンプルの B03の LAMP 反応

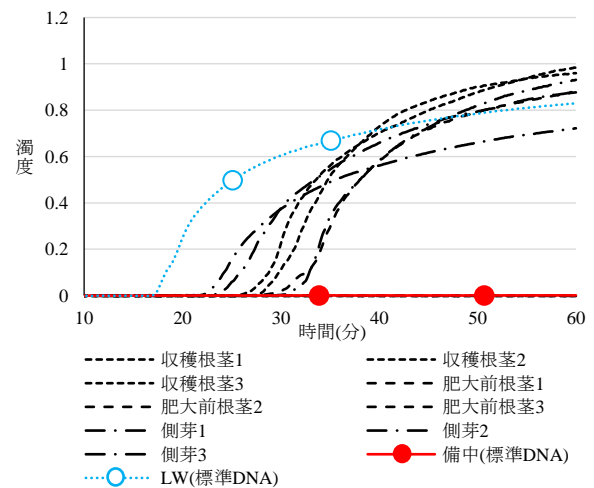


図7 「ロータスホワイト」部位別サンプルの LW09の LAMP 反応

た場合、LAMP反応前後で呈色に変化がなく陽性・陰性判定ができず、LAMP Master for Turbidityを用いた識別には不適であった。Visible Dyeを加えた場合は陽性で「蛍光黄緑」、陰性で「淡赤色」であり、最も反応が安定し判別も容易なため、現場での使用に適すと考えられた(表4)。3(1)で述べたように、サンプルによっては60分まで反応させた場合、非特異的反応による呈色反応が生じる場合があるため、陽性、陰性の呈色差が安定している加温開始後40分までに判定を行う必要がある。

LAMP MASTER for Turbidity(Visible Dye)の生産現場での識別適性を検証するため、爪楊枝懸濁法(Tris-HCl/煮沸)で調整した「備中」及び「ロータスホワイト」の側芽各10サンプルについて、B03及びLW09を用いて40分間のLAMP反応を行った。B03では全ての「備中」サンプルで陽性反応である蛍光黄緑、「ロータスホワイト」は陰性反応である淡赤色を示した。同様にLW09については、全ての「ロータスホワイト」サンプルが陽性であり、「備中」サンプルは陰性だった。反応後の呈色状態を図8に示した(各品種10サンプル中3サンプルを抜粋)。













本研究では、LAMP法での「備中」、「ロータスホワイト」の2種類のレンコン品種を相互に識別する方法を開発し、あわせてDNA抽出試薬を用いず抽出する爪楊枝懸濁法に供試できる部位を明らかにした。サンプル採取の簡便さと精密な温度制御を必要とする専用機器類が不要であることは、両品種の種ハスの確認やほ場内の混種状況の把握などにおいて、生産現場でのLAMP法による簡易識別の利用が期待できる。今後は、これらのマーカー技術を活用して識別できる品種・系統を拡充する必要がある。

**謝辞:** 本研究を行うに当たりあいち海部農業協同組合の大橋誠氏始め皆様、海部農林水産事務所農業改良普及課野菜経営指導グループ、茨城県農業総合センターの堀井学氏、茨城大学農学部久保山勉教授、公益財団法人かずさDNA研究所の白澤健太氏にご協力頂いたので、ここに感謝の意を表す。

## 引用文献

1. 沢田英司. レンコン基礎編品種生態と作型適応性. 農業技術体系野菜編第10巻. 一般社団法人農山漁村文化協会. 東京. p.基27(2013)
2. 尾崎行生. レンコン基礎編ハスの原産と来歴. 農業技術体系野菜編第10巻. 一般社団法人農山漁村文化協会. 東京. p.基3(2013)
3. 農林水産省. 令和2年産野菜生産出荷統計. [https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou\\_yasai/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/index.html) (2022.7.4参照)
4. 愛知県農業水産局農政部農業経営課. 特産品紹介レンコン. ネット農業あいち.(2019.12.13) <https://www.pref.aichi.jp/nogyo-keiei/nogyo-aichi/tokusanhin/renkon/index.html>. (2022.7.4参照)

表4 LAMP 反応と比色試薬の発色(反応時間 60 分)

| 比色試薬                 | 品種       | B03 |  | LW09 |  |
|----------------------|----------|-----|--|------|--|
|                      |          | 濁度  | 呈色   | 濁度   | 呈色   |
| マラカイトグリーン            | 備中       | +   |  水色   | -    |  透明   |
| シュウ酸塩                | ロータスホワイト | ±   |  淡い水色 | +    |  水色   |
| ヒドロキシナフトールブルー        | 備中       | +   |  青色   | -    |  青色   |
|                      | ロータスホワイト | -   |  青色   | +    |  青色   |
| Visible Dye (蛍光目視試薬) | 備中       | +   |  蛍光黄緑 | -    |  淡赤色  |
|                      | ロータスホワイト | -   |  淡赤色  | +    |  蛍光黄緑 |

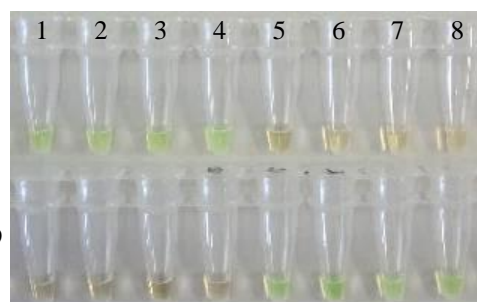


図8 LAMP Master for Turbidity(Visible Dye)によるLAMP 反応(反応時間40分)

- 1-3: 備中爪楊枝懸濁法、4: 備中(標準検体)、  
5: ロータスホワイト(標準検体)、6-8: ロータスホワイト(爪楊枝懸濁法)

5. 生物系特定産業技術研究支援センター. 革新的技術開発・緊急展開事業「収穫後品質の向上と機能性を活かした加工品の展開による国産レンコンのブランド力強化プロジェクト」.(2017.9.1) [https://www.naro.go.jp/laboratory/brain/h27kakushin/files/subject3\\_2nd\\_06.pdf](https://www.naro.go.jp/laboratory/brain/h27kakushin/files/subject3_2nd_06.pdf) (2022.7.4参照)
6. 国産レンコンのブランド力強化コンソーシアム. 品種識別マニュアル レンコン編 2019.茨城大学農学部(連絡先:久保山勉).p.1-32(2019)
7. 福田至朗, 穴井尚子, 加藤政司, 吉村幸江, 深谷雅博, 矢部和則, 大矢俊夫, 神戸美三雄. 簡易な鋳型調製によるloop-mediated isothermal amplification(LAMP)法を用いたトマト黄化葉巻ウイルスの検出. 関西病虫研報. 47,37-41(2005)