

アミロース迅速定量法とイネのモチ性突然変異体の遺伝分析への応用

A Quick Measuring Method of Amylose Content and Application to Analysis of Low Amylose Mutants in Rice.

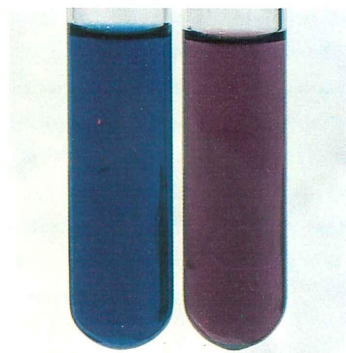
澱粉は直鎖状分子のアミロースと分岐の多いアミロペクチンから構成されている。ウルチ澱粉ではヨードで青色に染まるアミロースが一般に20～25%程度含まれるのに対し、モチ澱粉ではアミロースが減少して殆ど100%アミロペクチンとなり、ヨードで紅紫色に染まる(第1図)。アミロース含有量の定量によく用いられる青価法では、澱粉試料の精製、秤量の後、その水溶液をヨード染色し、赤色光で測定する。この方法のうち、秤量作業をアミロペクチンに対応する青色光で測定することで簡易化をはかり、第2図のようなモチ性突然変異体の遺伝分析に応用している。

測定試料としては、イネでは穀粒を1粒ずつペンチで碎き、小型試験管にいれ、水3mlを加えて、オートクレーブで15分間加熱し、攪拌、静置後、上清を用いる。この溶液1mlに、 I_2 -KI溶液(ヨード0.09%)0.1mlを加えて、直ちに測定する。測定装置の概要を第3図に示す。安定化された白色光をヨード染色した試料溶液に通した後、表面鏡で振分け、干渉フィルターを用いて430nmと660nmの2波長で同時に測定できるようになっている。試料セ

ルには連続希釈装置がつけてあり、430nmでモニターして、透過率50%の濃度になったときに、660nmの赤色光の透過率を、アミロース含有量を示す指数として読み取る。測定値をプリンターで打ち出すなどの自動化によって、1試料の測定は50秒程度で終る。試料の調製等を含めても、一人で連日300試料の測定が容易である。

測定した660nm赤色光の透過率から、アミロース含有量への換算は、標準試料による検量線によって行なった。この方法は1粒毎の測定が可能であり、 F_2 集団の分離の検定に適している。第4図に示すように、ウルチ域の個体の分離の有無で遺伝子座の異同を判定し、第5図の結果を得た。これによればモチ遺伝子座内にも塩基対置換型と見られる中間型突然変異体が確認できた。本法は簡易且つ迅速な方法で、一粒毎の測定に適しており、またアミロース含有量10%以下では分解能、測定再現性ともによい方法である。

(天野悦夫)



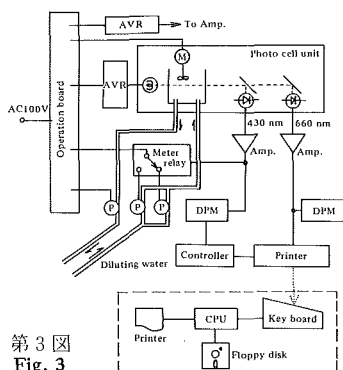
第1図
ヨード染色したウルチ澱粉(左)とモチ澱粉(右)の水溶液。

Fig. 1 Non-waxy (left) and waxy (right) starch solutions stained by iodine.



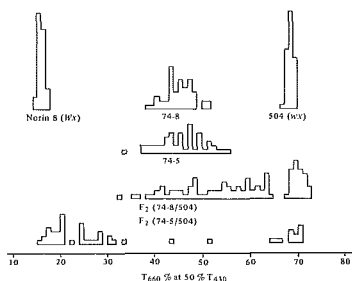
第2図
水稻農林8号に誘発されたモチ性突然変異体。ほぼ連続した分布を示す。4粒あるものは左から台中65号、農林8号および標準モチ504wx(台中65号系)。

Fig. 2 Low amylose mutant grains induced in Norin 8. They distributed continuously from Wx to wx. Four grains lines are (from left) Taichung 65, Norin 8 and standard wx (Taichung 65 background).



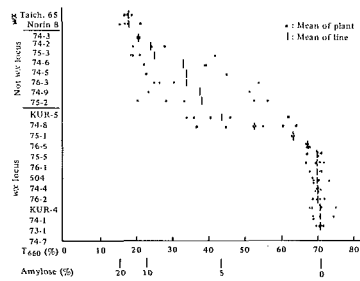
第3図
Fig. 3

第3図 希釈装置付き2波長光電比色計の構成。
Fig. 3 Scheme of double wave lengths photometer with dilution system.



第4図
Fig. 4

第4図 1粒毎に測定したモチ性指数の分布。ウルチ性原系統、中間型モチ性突然変異体およびF₂集団。
Fig. 4 Distributions of waxiness indices of grains of Wx, wx, intermediate wx and F₂ populations.



第5図
Fig. 5

第5図 水稻に誘発された低アミロース突然変異系統の表現形と遺伝子座。
Fig. 5 Results of genetic analyses of low amylose mutants in rice.

Normal starch is composed of straight chain molecules, amylose, and branched molecules, amylopectin. The former stains dark blue and the latter redish purple by iodine (Fig.1). Amylose is much reduced or deleted in waxy starch mutants in cereals. To measure amylose content, Blue Value Method, which utilizes absorption of red light of starch solution stained by iodine, has been used. To simplify the method and to shorten the time for measurement, weighing procedure for each starch sample to prepare solution of known concentration, was replaced by optical measurement of the major and common component of starch, amylopectin, using 430 nm blue light. By this method, sensitivity was much improved and each single grain could be measured.

This method was used to analyze waxy starch mutants in rice, which distributed continuously from normal non-waxy to fully waxy phenotype (Fig. 2). Each grain was crushed by pliers and autoclaved in a small test tube with 3 ml of water for 15 min. Tube was stirred while warm, then cooled to room temperature. 1 ml of supernatant was taken into glass cell. 0.1 ml of I₂-KI solution (Iodine 0.09%) was added, and measured immediately, by two-wave-lengths photometric apparatus shown in Fig. 3.

White light was used as light source. The light beam from sample cell was splitted and guided to two photocells each equipped with 430 nm or 660 nm interference filter. A diluting system was set to the sample cell. Thus sample solution was diluted continuously within the cell. When its concentration reached to 50% transmission for 430 nm blue light, an electric signal was generated to print out transmission value of 660 nm red light as waxiness index. Automatized system required only 50 sec or less for a sample, enabling to measure more than 300 samples daily. For conversion of the index to percent amylose content, standard starch specimens were used.

Results of genetic analyses of various waxy starch mutants in rice are shown in Figs. 4 and 5. If two mutants were in the same locus (cistron), no non-waxy segregants would be expected like the case of 74-8/504(wx). 74-5 was a case of non-“wx-locus” mutant. Fig. 5 shows that most of the wx-locus mutants were fully waxy, however, still a few intermediate waxy mutants were confirmed. Such mutants are very likely to be mis-sense mutants, or base pair exchange type mutants. Further investigations of these mutants are in progress.

(E. Amano)