

SSR マーカーを用いた水稻の品種識別と DNA 簡易抽出法の検討

○和田卓也・江嶋亜祐子・坪根正雄・尾形武文
(福岡県農業総合試験場)

【目的】

福岡県が育成した「夢つくし」などの水稻品種の知的財産保護のため、SSR マーカーを用いた品種識別法を確立するとともに、識別作業を効率化するための DNA 簡易抽出法について検討を行ったので結果を報告する。

【材料および方法】

試験Ⅰ 品種識別のためのSSRマーカーの選定と作業フローの作成

識別対象品種は、福岡県の奨励品種を中心とした12品種(第1表)とし、McCouch *et al.* (2002)によって公開されているSSR マーカー約40種類を供試して、12品種を相互に識別可能なマーカーセットについて検討を行うと同時に、作業フローの作成を行った。

試験Ⅱ DNA簡易抽出法の検討

粒別分析法におけるDNA 簡易抽出法の確立を目的に、以下の4種類の手法を検討した。① MagAttract 96 DNA Plant Core Kit(磁性ビーズによるQIAGEN社製抽出キット) ② Potassium Acetate法(Dellaporta *et al.* 1983) ③ TPS法(Thomson and Henry 1995) ④ TPS+PCI法(TPS法の途中でPCIによる除タンパク処理を行う方法) 「夢つくし」の白米を用いて、それぞれの抽出法で96穴ディー

プウェルプレートで1粒ごとのDNA抽出を行い、回収したDNA量の調査を分光光度計(Beckman DU640)を用いて行った。

【結果および考察】

供試した12品種は第1表の8種類のSSR マーカーで相互に識別可能であった。識別作業フローは、一次判定としてのバルク分析と二次分析の粒別分析を組み合わせる方法が効率的である。(第1図)。

第2表にDNA抽出法の比較結果を示した。DNA濃度をみると、いずれの抽出法も30~50ng/ulのDNAが回収でき、品種識別を行うための鋳型DNA量としては十分な量が得られた。また、DNA濃度のバラツキを標準偏差でみると、Potassium Acetate法が最も大きく、TPS+PCI法が最も小さかった。DNA溶液の純度を示す260nm/280nmの吸光度比をみると、どの処理区も1.8程度あるいはそれ以上あることからPCR分析を行うには問題ない純度と考えられた。

DNA分析におけるコスト、時間および抽出安定性を総合的にみると、DNA濃度の純度はやや低いが、分析コストと時間に優れ、有機溶媒の廃液がでないTPS法が比較的優れていると判断される。

第1表 12品種識別のためのSSRマーカーと遺伝子型。

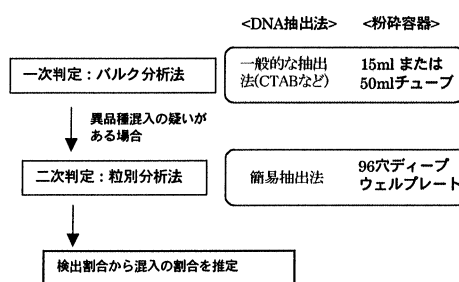
品種名	SSRマーカー名							
	RM5470	RM3529	RM1338	RM4595	RM8030	RM0336	RM3019	RM1896
コシヒカリ	2	1	2	1	1	2	2	1
つくしろまん	2	1	2	1	1	2	1	1
つやおとめ	2	1	2	1	3	1	2	1
ヒノヒカリ	2	1	2	1	3	2	2	1
夢つくし	2	1	2	2	1	2	2	1
つくし早生	2	1	2	2	2	2	2	1
あきさやか	2	1	1	1	3	1	2	1
ニシホマレ	1	2	1	1	3	1	2	2
ほほえみ	1	2	2	2	3	2	1	1
ひとめぼれ	1	2	2	1	1	2	2	2
レイホウ	2	2	1	1	3	1	2	1
ツクシホマレ	2	2	1	1	3	1	2	2

注)数字はアガロースゲルで区別できる遺伝子型の違いを示す。

第2表 粒別分析におけるDNA抽出法の比較結果。

抽出法	分析コスト	分析時間	有機溶媒 廃液の有無	DNA (ng/ul)	260nm/280nm 吸光度比
Mag Attract法	高	短	無	37.1±12.1	2.02±0.10
Potassium Acetate法	安	中	無	50.9±22.5	1.90±0.10
TPS法	安	や短	無	37.7±19.8	1.77±0.08
TPS+PCI法	安	や短	有	46.7±7.1	1.86±0.02

数字は平均値±標準偏差 吸光度比は、DNA純度を表し、1.8程度以上が望ましい。



第1図 DNA品種判定作業フロー図

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, pH7.9