

高知県の水稲奨励品種を判別するDNAマーカーの選定 (情報)

農業技術センター

[背景・ねらい]

高知県では、高知県主要農作物種子生産要綱に基づいて、水稲奨励品種13品種の原原種、原種および一般種子が生産され、これらは県内水稲生産の基盤となっている。そのため、これらの種子生産には細心の注意が払われており、生産過程で異品種等の混入を避けるため、外観形質による品種判別が行われている。しかし、この判別方法では、外観形質が気象条件や栽培条件に大きく影響された場合や、育苗時等の外観形質情報が少ないステージの場合では、その判別が難しい。一方で、外観形質に依存せず、遺伝子型によって水稲品種を判別することが可能であるDNAマーカーを用いた手法が全国的に用いられている。

そこで、外観形質に依存せず、遺伝子型によって、本県の水稲奨励品種の判別が可能となるDNAマーカーを選定する。

[技術の内容・特徴]

DNAマーカー5種を選定した(表1)。これらのDNAマーカーにおける多型の組合せから、高知県水稲奨励品種13品種の判別が可能である(表2、図1)。

[留意点]

1. DNAの抽出に用いた試料は高知県水稲奨励品種13品種の原原種である。
2. DNAは葉身約5cmをはさみで細断後、TE500 μ Lを加え、95 $^{\circ}$ Cで20分湯煎し、抽出し、これを鋳型DNAとした(濃度調整無し)。
3. PCR反応液の組成およびPCR反応条件は下表のとおり。PCR反応には、サーマルサイクラー〔TP600 (TaKaRa製)〕を用いた。

表 PCR反応液組成およびPCR反応条件

反応液組成			PCR反応条件			
組成液	容量	最終濃度	step No.	サイクル数	温度	時間
鋳型DNA	2 μ L	不明	step1	1	95 $^{\circ}$ C	5分
各プライマー(100 μ M)	0.05 μ L	0.4 μ M			95 $^{\circ}$ C	30秒
Go taq [®] Green Master Mix, 2X	5 μ L	0.8X	step2	35	59 $^{\circ}$ C	30秒
ヌクレアーゼフリー水	4.9 μ L	—			72 $^{\circ}$ C	1分
合計	12~12.1 μ L	—	step3	1	72 $^{\circ}$ C	5分

4. 増幅産物はミドリグリーンアドバンス(日本ジェネティクス製)により染色した4.0%アガロース(Nusieve[™]GTG[™]Agarose(ロンザ製))/0.5%TBEゲルで電気泳動し、トランスイルミネーター(FTI-20M(フナコシ製))で観察し、多型を調査した。
5. 一連の分析手順のイメージは図2のとおりである。
6. 本技術は高知県の水稲奨励品種のみ判別が可能であり、異品種等の混入率や品種の特定は不可能である。

[評 価]

選定したDNAマーカーを用いることで、外観形質に依存せず、本県の水稲奨励品種13品種の判別が可能となり、原原種、原種および一般種子の安定生産に寄与することが期待される。

[具体的データ]

表1 選定したDNAマーカーとプライマー配列

DNAマーカーNo.	DNAマーカー名	遺伝子	染色体	プライマー名	配列 (5' → 3')	塩基対 (bp)
a	RM9 ¹⁾	—	1	RM9-F	GGTGCCATTGTCGTCCTC	18
				RM9-R	ACGGCCCTCATCACCTTC	18
b	RM8208 ¹⁾	—	3	RM8208-F	GCCCAAACCTACACTCTCTTG	20
				RM8208-R	GTAATGCCTGAGTGCCTAC	20
c	RM1320 ¹⁾	—	1	RM1320-F	GTTAGTAGGGCCTGCACTG	20
				RM1320-R	CTCTGCAGCAAACCAAACC	20
d	—	<i>Pia</i> ²⁾	11	Pia-F	GCGACTGACACTTTCATAGC	21
				Pia-R	CGGTAGAGCAATTTAGAAGCAG	22
e	—	<i>Pii</i> ^{3), 4)}	9	Pii-2_SNP02	GATCATCTCATGGATCTTTAATGC	25
				Pii-2_SNP03	AGCTCTCAGCGCTGTTTTTC	20
				Pii-IBRC-F	TCCAATGCTTCTGAAAGGTAGC	22
				Pii-IBRC-R	TGGAAACATGAACCCATATCC	21

注) 引用文献

- 1) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) (McCouch *et al.* (2002))
- 2) A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes (Okuyama *et al.* (2011))
- 3) MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F₂ progeny bulk combined with *de novo* assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii* (Takagi *et al.* (2013))
- 4) DNAマーカーを利用したもち病真性抵抗性遺伝子型推定 (太田・野々上 (2015))

表2 選定したDNAマーカーにおける各品種の判別結果

品種名	DNAマーカーNo.				
	a (RM9)	b (RM8208)	c (RM1320)	d (<i>Pia</i>)	e (<i>Pii</i>)
コシヒカリ	A	A	A	A	A
南国そだち	A	B	A	A	B
よさ恋美人	A	A	A	A	B
にこまる	A	B	A	B	B
ヒノヒカリ	A	A	B	B	B
黄金錦	B	A	A	A	A
アキツホ	B	A	B	B	A
吟の夢	A	A	A	B	B
土佐麗	A	B	B	A	B
さわかおり	B	A	B	B	B
ヒデコモチ	B	B	B	A	B
サイワイモチ	B	B	A	B	A
たまひめもち	A	A	B	B	A

注) 各DNAマーカーの多型はコシヒカリ型をA, コシヒカリ型と異なるものをBとした

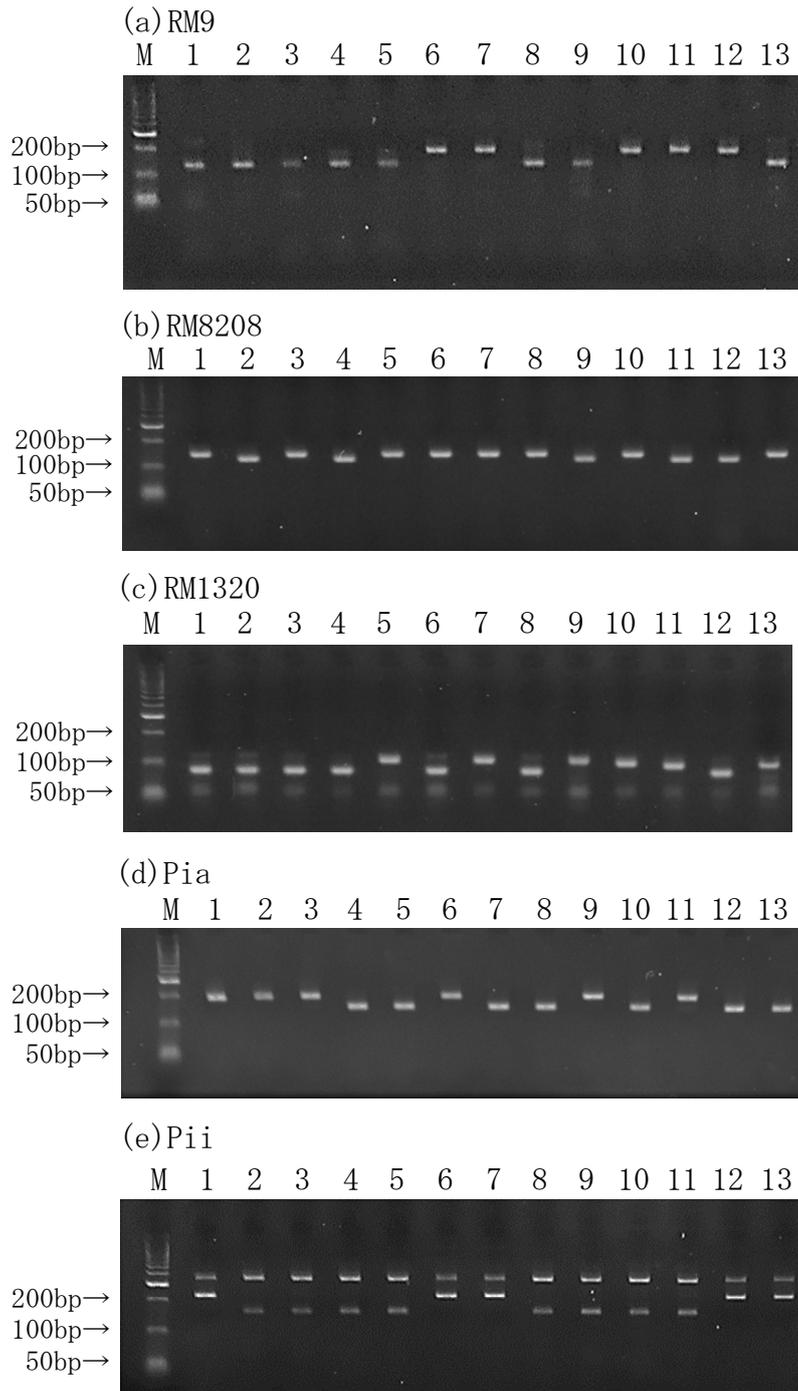


図1 選定したDNAマーカーにおける増副産物の電気泳動結果
 注) (a)～(e)は使用したDNAマーカーNo.を示す。1:コシヒカリ、2:南国そだち、
 3:よさ恋美人、4:にこまる、5:ヒノヒカリ、6:黄金錦、7:アキツホ、8:吟の
 夢、9:土佐麗、10:さわかおり、11:ヒデコモチ、12:サイワイモチ、13:たま
 ひめもち、M:サイズマーカーを示す。

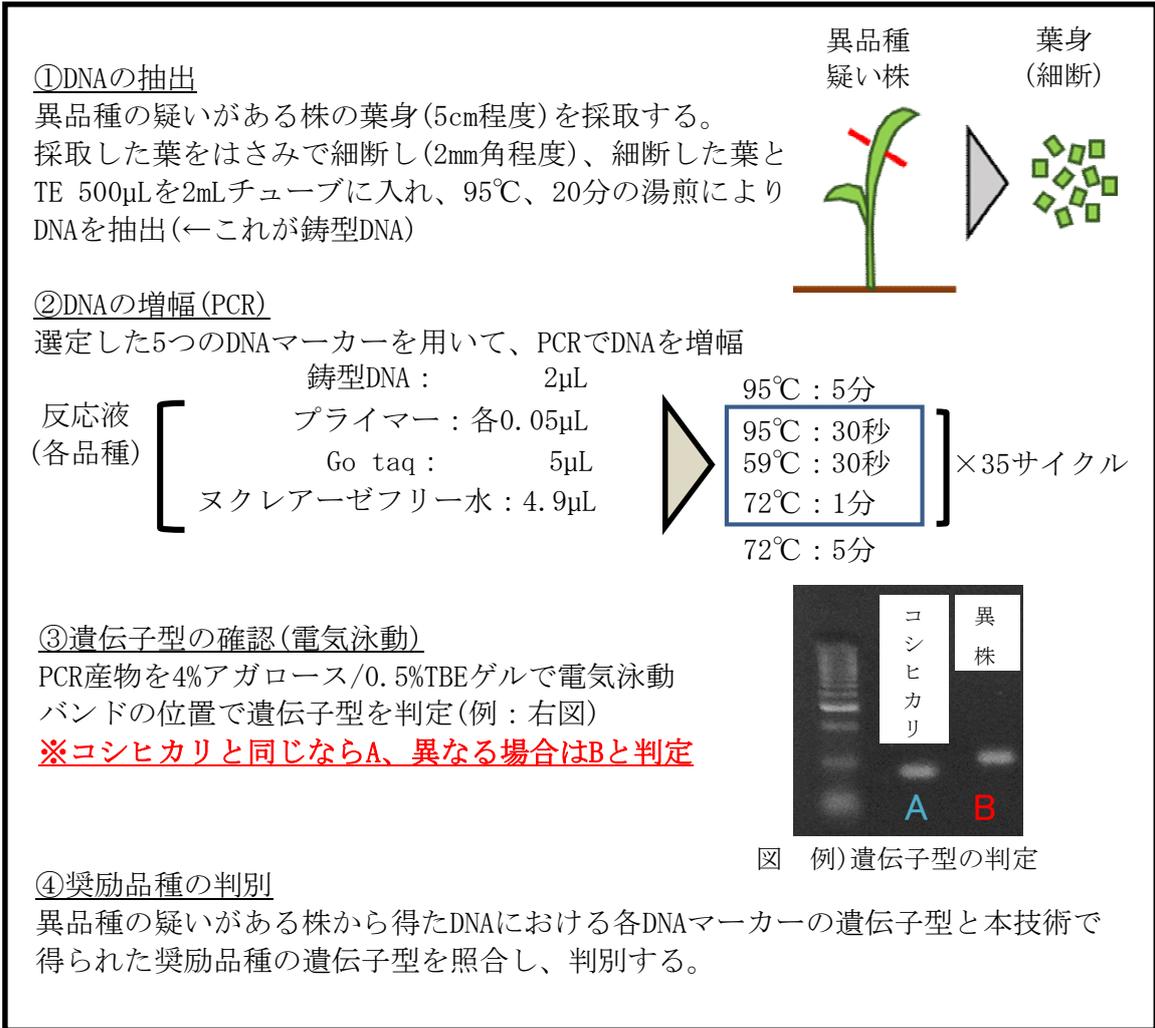


図2 分析手順のイメージ

[その他]

事業・課題名：県産米高品質生産推進事業・社会ニーズに対応した水稻系統の育成

研究期間：令和6年度(研究課題期間：平成27年度～継続)、予算区分：県単

研究担当：水田作物担当

分類：情報