

Molecular Identification of Recommended Rice Cultivars in Chiba Prefecture

Mari OHARA, Tamiko KAMAGATA and Kazuo OHKOSHI

Key words : rice, identification of cultivars, DNA, PCR

Summary

In this report, we established a molecular method of distinguishing each of 12 rice cultivars, that is, 10 recommended cultivars of Chiba prefecture, a new cultivar, "Yumekanae," and an excellent line, "ChibaMochi no. 23".

To prepare DNA from the brown or pearled rice, a convenient method which is suitable for PCR amplification using the DNA isolation kit, "Phytopure" was established.

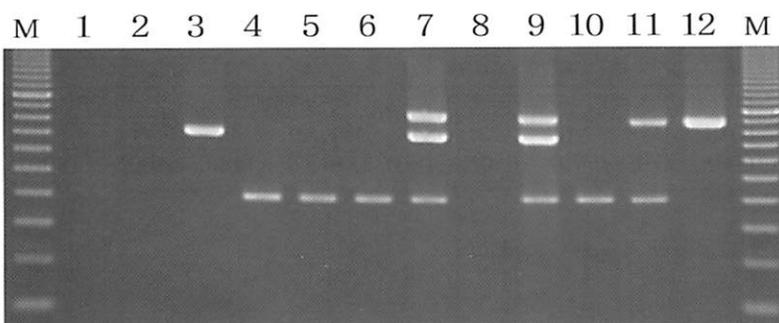
Ten cultivars, not including "Fusaotome" and "Chiba no. 28," can be identified individually by the "Koshihikari distinction kit," while "Fusaotome" and "Chiba no. 28" can be distinguished by the "Hokkaido 61 distinction kit".

In this method, the limit ratio of detection of the different cultivar mixed with "Koshihikari" is 0.2%.

3. 玄米及び精米からDNAを抽出する方法として、「Phytopure」を選定し、抽出手順が簡便かつ良好なPCR結果が得られる改良法を確立した。
4. 「コシヒカリ」に混入した異品種の検出限界は0.2%であった。

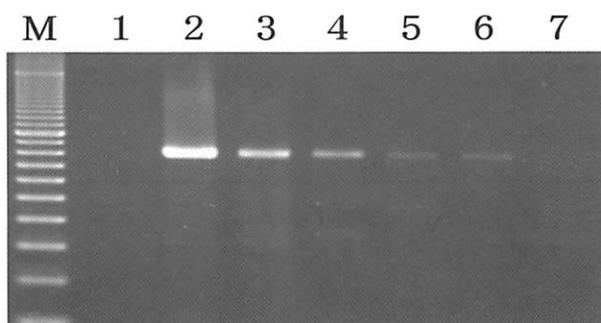
VI 引用文献

- (独)食品総合研究所(2005). DNA分析による稲品種の識別. 植物のDNA品種識別についての基本的留意事項—技術開発と利用のガイドライン—: 参3-1-16
- 中村澄子・岡留博司・與座宏一・原口和朋・奥西智哉・鈴木啓太郎・佐藤光・大坪研一(2004). PCR法による世界の広範な特性の米の識別および食味要因の探索. 日本農芸化学会誌78: 764-779
- 大坪研一・中村澄子・與座宏一・宍戸功一(2001). 餅を試料とする原料米のDNA品種判別. 日本食品科学工学会誌48: 306-310.
- 大坪研一・中村澄子・今村太郎(2002). 米のPCR品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発. 日本農芸化学会誌76: 388-397
- 大坪研一・中村澄子・岡留博司(2003). DNA判別による米の食味推定. 日本食品科学工学会誌50: 122-132.
- 新村和則・金川寛・三上隆司・福森武(2005). イネ品種判別用マルチプレックスPCRプライマーセットの開発. 育種学研究7: 87-94.
- Rice Genome Reserch Program (2000). 公開データ実験プロトコル. 分子マーカーを利用した有用形質の遺伝解析方法. <http://rgp.dna.affrc.go.jp/rgp/protocols/QTL.pdf>



第6図 「北海道61」による2005年度奨励品種及び新品種・系統のDNA識別パターン

M: サイズマーカー (200bpラダー)、1: 「はなの舞い」、2: 「ふさおとめ」、3: 「ちば28号」、4: 「初星」、5: 「ひとめぼれ」、6: 「コシヒカリ」、7: 「ゆめかなえ」、8: 「ヒメノモチ」、9: 「ツキモチ」、10: 「千葉糯23号」、11: 「トヨハタモチ」、12: 「総の舞」



第7図 「コシヒカリ判別キットII」による「コシヒカリ」に混合した「ふさおとめ」の検出

M: サイズマーカー (200bpラダー)、1: 「コシヒカリ」100%、2: 「ふさおとめ」100%、3: 「コシヒカリ」に「ふさおとめ」を5%混合*、4: 同2%混合、5: 同0.5%混合、6: 同0.2%混合、7: 同0.1%混合、* 玄米粉末を重量割合で混合した

3. 混入異品種の検出限界

供試した「コシヒカリ」以外の粳品種のすべてに共通して検出されるWKA9 (1600bp) による識別バンドに着目し、「ふさおとめ」を用いて混入品種の検出限界を調査した。改良した方法でDNAを抽出し、「コシヒカリ判別キットII」でPCRを行うことにより、0.2%以上の異品種混入については検出できることを明らかにした (第7図)。

4. 残された課題

本報で明らかにした改良法は、PCRと小規模なアガロースゲル電気泳動で品種の判定ができることから、生産現場等での利用が可能である。また、上記11品種1系統に加えて、県内の一部で生産されている「あきたこまち」についても「コシヒカリ判別キットI」で相互に識別が可能である (大坪ら、2002)。しかし、「コシヒカリ」と「ミルキーQueen」では、同一パターンを示すために識別できない (データ未掲載)。

従って、イネの品種識別法については、一塩基多型 (SNPs) を利用したマーカーの組み合わせにより、「コ

シヒカリ」と国内85品種の識別が可能な判別キット (植物ゲノムセンター製) や、新村ら (2005) の報告する国内130品種を識別するSTS化マーカー等を並行して利用することで、本県産米の識別に充分対応できるものと考えられる。

本試験で明らかにした「コシヒカリ」に混入した異品種の検出限界の数値0.2%は、コメの流通段階では充分利用できる値と考えられるが、種子生産現場ではさらに高い精度が望まれており、精度の向上が必要と考える。

V 摘 要

1. 千葉県の2005年度水稲奨励10品種に新品種「ゆめかなえ」及び有望系統「千葉糯23号」を加えた11品種1系統を識別するための方法を確立した。
2. 「ふさおとめ」及び「ちば28号」以外の品種は「コシヒカリ判別キットI、II」で識別が可能であり、「ふさおとめ」と「ちば28号」は「北海道61」で識別が可能であった。

第2表 STS化プライマーセットによる千葉県奨励品種及び新品種・系統の識別パターン

品種・系統	プライマーセット										
	コシヒカリ判別キット1				コシヒカリ判別キット2				北海道61		
	WKA9 (1600)	B43 (870)	M11 (770)	G22 (650)	S13 (1800)	WKA9 (1600)	F6 (1180)	E30 (800)	(1800)	(1500)	(800)
はなの舞い	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
ふさおとめ	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
ちば28号	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
初星	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
ひとめぼれ	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
コシヒカリ	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
ゆめかなえ	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
ヒメノモチ	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
ツキモチ	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
千葉糯23号	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
トヨハタモチ	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+
総の舞	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-

注1) ()内の数字は増幅領域の大きさ (bp) を示す

2) + : バンド有り, - : なし

1. 1サンプルにつき「Phytopure」試薬1を600 μ lと α -アミラーゼ溶液 (40mg/ml) 8 μ lを混合する。
- ↓
2. 粉状のサンプル (0.1g又は1粒)をチューブに入れ、上記の試薬1を608 μ l及び試薬2を200 μ lを加えて均一に混ぜ、65 $^{\circ}$ Cで10分間振とうし、氷上に20分間置く。
- ↓
3. クロロホルム (-20 $^{\circ}$ C) 600 μ l及び試薬3を100 μ l加え、10分間振とうする。
- ↓
4. 5,000回転/分で12分間遠心分離し、上層を新しいチューブにとる。
- ↓
5. クロロホルム (-20 $^{\circ}$ C)を600 μ l加え、10分間振とうする。
- ↓
6. 15,000回転/分で15分間遠心分離し、上層を新しいチューブにとる。
- ↓
7. 同容量のイソプロパノールを加えてゆるやかに混ぜ、7,000回転/分で3分間遠心分離する。
- ↓
8. 上清を捨て、70%エタノールを1000 μ l加えて沈澱と管壁を洗い、7,000回転/分で3分間遠心分離する。
- ↓
9. 上清を捨て、99%エタノールを1000 μ l加えて沈澱と管壁を洗い、7,000回転/分で5分間遠心分離する。
- ↓
10. 上清を捨てて沈澱を乾燥し、RNA分解酵素 (10 μ g/ml) 入り1/10TE1 5~20 μ lに溶解し、37 $^{\circ}$ Cで30分間の温度処理を行う (4 $^{\circ}$ Cで保存する)。

第5図 コメの品種識別用DNAの改良抽出法