

試験研究成果普及情報

部門	麦及び雑穀	対象	研究
課題名：落花生品種識別技術の開発			
<p>〔要約〕落花生の葉または種子から抽出した DNA と 6 個の DNA マーカーを用いて、千葉県育成品種「おおまさり」を含む登録品種及び一般に販売されている品種の計 11 品種の落花生を識別することができる。</p>			
キーワード [※] 落花生、DNA マーカー、品種識別、新品種、品種育成者権			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター・生産環境部・生物工学研究室	
	協力機関	農林総合研究センター・育種研究所・畑作物育種研究室落花生試験地、(公財) かずさ DNA 研究所、(株) 三菱化学メディアエンス	
実施期間	2013 年度		

〔目的及び背景〕

千葉県育成品種に対する信頼性の確保と品種育成者権の保護のために、本県で育成した落花生品種を正確に識別できる技術を開発することは極めて重要であることから、新品種「おおまさり」を含む登録品種について、DNA 情報を利用した品種識別技術を確立する。

〔成果内容〕

- 1 DNA 塩基配列情報等を活用して、ゲノム全体にわたり作製した 3,000 個以上の DNA マーカーから品種識別に利用可能な DNA マーカー 6 個を選抜した。
- 2 落花生品種識別マニュアルにより (図 1)、葉または種子から抽出した DNA と 6 個の DNA マーカーを用いて、それぞれの遺伝子型の違いを比較することで、新品種「おおまさり」を含む落花生 11 品種を識別できる (図 2、表 1)。

〔留意事項〕

加工品等での、識別可否の確認は行っていない。

〔普及対象地域〕

県内全域

〔行政上の措置〕

[普及状況]

(公財) かずさ DNA 研究所と LSI メディエンス株式会社 (旧 (株) 三菱化学メディエンス) において、落花生品種識別を実施している。

[成果の概要]

1. 落花生植物体からの DNA 抽出

- 1) 蒸留水で洗浄した葉または種子 (0.05g) を切り取り、乳鉢で冷却しながら粉碎する
- 2) 乳鉢に温めた DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) の AP1 バッファーを加え、2ml のチューブに粉碎した植物体ごと回収する
- 3) 以下は Kit の手順に従い DNA を抽出する

2. PCR

1) 反応液組成	使用量	最終濃度
10×PCR バッファー	1.5 μ l	1×
2 mM dNTPs	1.5 μ l	0.2 mM
25 mM MgCl ₂	1.8 μ l	3 mM
25 \cdot M each プライマー	0.24 μ l	0.4 μ M
Taq ポリメラーゼ	0.024 μ l	0.12 unit / well
DNA	3 μ l	0.2 ng / μ l
滅菌水	6.936 μ l	
全量	1.5 μ l	

プライマー配列は、かずさ DNA 研究所のデータベース参照
(<http://marker.kazusa.or.jp/Peanut/>)

2) PCR 反応

95°C 2:00 \rightarrow [95°C 0:30 \rightarrow 55°C 0:30 \rightarrow 72°C 1:00] \times 40 \rightarrow 72°C 3:00 \rightarrow 4°C ∞

3. 電気泳動と判定

- 1) PCR 産物を 50 倍に希釈したものと、Hi-Di ホルムアミドに 1/200 量の 500 LIZ サイズマーカー (Life Technologies) を加えたものを、1:9 で混合する
- 2) 混和後、スピンドウンし、95°C で 5 分間熱変性後素早く冷却する
- 3) ABI3730DNAAnalyzer (Life Technologies) で電気泳動を行い、付属のフラグメント解析ソフトを用いて、増幅産物のサイズを測定する

図 1 落花生品種識別マニュアル

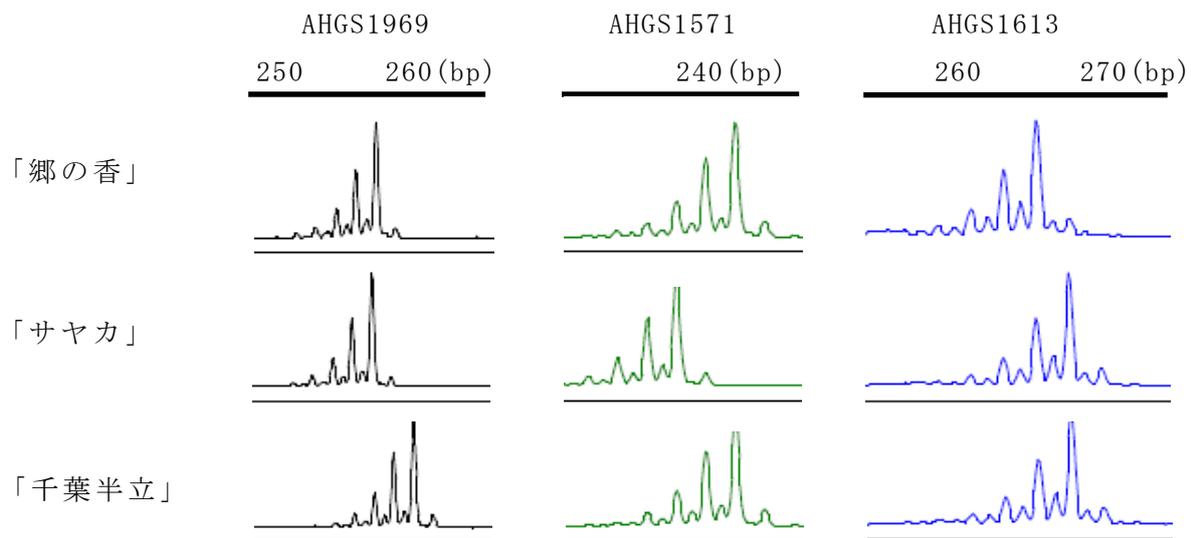


図2 蛍光フラグメントアナライザーAB3730による品種識別波形パターン（抜粋）

注) bpで示されている数字はPCR産物の断片長

AHGS1969では「郷の香」、「サヤカ」は254bpのC型、「千葉半立」は258bpのA型という判定になる。同様にAHGS1571では「郷の香」、「千葉半立」は241bpのA型、「サヤカ」は237bpのB型、AHGS1613では「郷の香」は266bpのC型、「サヤカ」、「千葉半立」は268bpのB型となり、これら遺伝子型の違いによって互いに識別することができる。

表1 識別可能な11品種の遺伝子型（品種識別用データベース）

	AHS1250	AHGS1969	AHGS1571	AHGS1613	AHGS2299	AHGS1126
品種\マーカー	A:290bp	A:258bp	A:241bp	A:270bp	A:225bp	A:236bp
	B:267bp	B:256bp	B:237bp	B:268bp	B:223bp	B:232bp
		C:254bp	C:229bp	C:266bp	C:217bp	C:226bp
		D:238bp	D:227bp		D:211bp	D:222bp
			E:225bp			E:220bp
						F:218bp
千葉半立	A	A	A	B	D	E
おおまさり	A	B	A	B	D	F
JenkinsJumbo	A	B	A	A	D	C
郷の香	A	C	A	C	D	F
セトノシホウ	A	D	E	B	A	B
ダイチ	AB	A	A	B	D	D
ユデラッカ	AB	B	C	B	B	A
ナカテユタカ	AB	C	A	B	D	F
ふくまさり	AB	C	A	C	D	A
サヤカ	AB	C	B	B	C	F
土の香	AB	C	D	B	A	F

注) 表中のアルファベットは遺伝子型を示し、bpで示されている数字はPCR産物の断片長を示す

[発表及び関連文献]

内藤ら、Genetic diversity and relationship analysis of peanut germplasm using SSR markers、Breeding Science、Vol.58、2008年

[その他]

品種保護に向けたDNA品種識別技術実用化事業（平成25年度）