

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拡充			
<p>[要約] 落花生の葉または種子から抽出した DNA と 13 個の DNA マーカーを用いて、千葉県育成品種「おおまさり」を含む登録品種等計 17 品種の落花生を識別することができる。最少識別マーカーセットとマルチプレックス PCR を併用し効率的に品種識別ができる。</p>			
キーワード [※] 落花生、DNA マーカー、品種識別、品種育成者権、マルチプレックス PCR			
実施機関名	主 査	農林総合研究センター	生物工学研究室
	協力機関	農林総合研究センター	落花生研究室、(公財)かずさ DNA 研究所、(株) LSI メディエンス
実施期間	2014 年度～2015 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。そこで「おおまさり」のような登録品種と登録品種ではないが一般に生産・販売されている品種について、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、遺伝子型解析の結果が安定し、かつ多型性に優れた 13 個の DNA マーカーを選抜した (表 1)。
- 2 図 1 に示した方法により、葉または種子から抽出した DNA と 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、「おおまさり」を含む落花生 17 品種を識別できる (表 2)。
- 3 最少識別マーカーセットとして、8 個のマーカーを使用するセットが得られ、マーカーを 2 つずつ混合するマルチプレックス PCR 反応を確立し (表 3)、効率的な品種識別技術を構築した。

[留意事項]

[普及対象地域]

落花生育成者

[行政上の措置]

[普及状況]

[成果の概要]

表 1 本技術に用いた DNA マーカーの配列

マーカー名	プライマー配列 (5' → 3')	
	Forward	Reverse
AHS0021	GGATCGCCGTAACACAATCT	TGAAGATAACAAGCCCAGCC
AHS0039	AACACATCACTTTCCTTTTCCA	GGAATGAAGGTGTGTGAGCA
AHS0116	ACAAGACCACCACCATAGCC	CGGTTATGAGGGGGAAGATT
AHS0740	TCACAACAAACCACGACCAT	CCCGTAATGAGCATTACCT
AHS1250	CACACCCACTCACCTCTTT	ATGGACTCCTCCTCCTCCAT
AHGS0153	CTCCATCGTGTGTTTGCTCCT	GCACTTGCAACGCTGTTCTA
AHGS0235	GTGTGTGCAGGTATGGTTGG	GGGAATGGAATCTCTGTTGG
AHGS1429	CGCGACATAAGTGGACAGAG	ATGGTGATCTCTTTGGTGGG
AHGS1613	GCTCTTGGTATTTATTGCTCGC	GCAGCATATTGCCCTATTCC
AHGS1638	GAAGACTTCAACGAAGGCAG	ACAAAAATTCAGCGACCCAG
AHGS1772	CTTTATTGGCGCCATCATCT	GGTGGCACAGCTACAACAGA
AHGS1851	AACCTCCTTTCCCGTAGTGC	TGAGTTGCTAATGAAGATAGAGTGA
AHGS2299	GTCCAAAGCCCAATGTCTTG	GCTGTCAAACGGTCAAACCT

注) Forward プライマーの 5' 末端には、蛍光色素を付加
Reverse プライマーの 5' 末端には、Tail 配列 (GTTTCTT) を付加した

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 µl	1×
2 mM dNTPs	1.5 µl	0.2 mM
25 mM MgCl ₂	1.8 µl	3 mM
25 µM each プライマー	0.24 µl	0.4 µM
Taq ポリメラーゼ	0.024 µl	0.12 unit / well
DNA	3 µl	0.2 ng / µl
滅菌水	6.936 µl	
全量	15 µl	

なおマルチプレックス PCR 反応は 2 つのプライマーペアを単独の時と同じ濃度で入れる

2) PCR 反応

95°C 2:00 → [95°C 0:30 → 55°C 0:30 → 72°C 1:00] × 40 → 72°C 3:00 → 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) ABI3730DNA Analyzer (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 品種識別方法

表2 識別可能な17品種の遺伝子型（品種識別用データベース）

品種名	マーカー名												
	AHS	AHS	AHS	AHS	AHS	AHGS							
	0021	0039	0116	0740	1250	0153	0235	1429	1613	1638	1772	1851	2299
千葉半立	A	AC	AB	C	A	B	BC	B	B	C	C	C	E
テコナ	A	AC	AB	BC	A	C	BC	B	B	C	C	C	E
ワセダイリュウ	B	AC	B	AC	A	E	BC	E	C	A	C	B	E
ベニハンダチ	A	AC	AB	BC	A	A	BC	B	B	C	C	C	E
サチホマレ	A	AC	AB	BC	A	B	BC	B	B	C	B	C	A
タチマサリ	B	AB	B	AC	A	E	AC	E	C	A	C	B	B
アズマユタカ	A	AC	AB	BC	AB	B	AC	A	C	A	B	D	D
ナカテユタカ	A	AC	AB	BC	AB	D	AC	B	B	A	B	D	E
ダイチ	A	AC	AB	C	AB	B	BC	B	B	C	B	D	E
サヤカ	A	AC	AB	BC	AB	B	AC	A	B	A	B	D	D
ユデラッカ	B	AB	B	AC	AB	D	AC	D	B	A	B	B	C
土の香	A	AC	AB	BC	AB	B	AC	B	B	A	B	D	A
郷の香	A	AB	B	BC	A	D	BC	B	C	A	B	D	E
ふくまさり	A	AB	AB	C	AB	D	BC	B	C	A	C	D	E
おおまさり	A	AC	AB	BC	A	D	AC	C	B	C	B	C	E
セトノシホウ	B	AD	AB	BC	A	D	BC	A	B	B	A	A	A
JenkinsJumbo	A	AC	B	BC	A	A	BC	C	A	C	C	C	E

表3 最少識別マーカーセットのマルチプレックスPCR反応での組み合わせ

反応	混合するプライマー	
1	AHS0039	と AHGS1429
2	AHS0740	と AHGS2299
3	AHS1250	と AHGS1851
4	AHGS0153	と AHGS1613

注) PCR 反応系は図1参照

[発表及び関連文献]

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

[その他]

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業「先端ゲノム解析技術を利用した高度品種識別システムの開発」（平成22年度～24年度）