農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

# Development of Negative Marker Sets to Detect Contamination among 16 Rice Cultivars in Niigata Prefecture and Its Application with Bulk DNA Preparation Method.



| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2019-03-22<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 田淵, 宏朗, 橋本, 憲明, 林, 敬子, 芦川, 育夫, 吉田, 均<br>メールアドレス:<br>所属: |
|---|---|
| URL | https://doi.org/10.24514/00001610 |

〔中央農研研究報告　26：39-55（2016）
Bull. NARO. Agric. Res. Cent.〕



# 新潟県水稲16品種の混入・交雑検定用DNAネガマーカーセットによるバルク検定

田淵宏朗*1†・橋本憲明*2†・林敬子*3・芦川育夫*4・吉田均*5

## 目　次

Ⅰ．緒言……39
Ⅱ．材料と方法……42
　1．供試品種……42
　2．DNA調製方法……42
　3．DNAマーカー設計方法……43
　4．PCR条件……43
Ⅲ．結果……43
　1．「コシヒカリ新潟BL1，2，3，4，10，11号」識別用DNAマーカーの作成……43
　2．ネガマーカーセットの開発……45
　3．花粉交雑および異品種混入検定……47
　4．バルク検定法の適用……47
Ⅳ．考察……50
Ⅴ．摘要……52
謝辞……52
引用文献……53
Summary……55

## Ⅰ．緒　言

新潟県では，2005年から「コシヒカリ」のほぼ全てをいもち病真性抵抗性遺伝子が異なるマルチライン品種「コシヒカリ新潟BL1号」（いもち病真性抵抗性遺伝子は*Pia*．また，以下「BL1号」等と略記．他のBL品種についても同様），「コシヒカリ新潟BL2号」（*Pii*），「コシヒカリ新潟BL3号」（*Pita-2*），「コシヒカリ新潟BL4号」（*Piz*），「コシヒカリ新潟BL10号」（*Pii*と*Pib*）（2008年より追加），「コシヒカリ新潟BL11号」（*Pii*と*Piz-t*）（2011年より追加）のうち4品種の混合栽培へと転換し，約25％の防除農薬の削減が可能となった[6, 9, 14]．

マルチラインが最大の効果を発揮するには複数のBL品種を適切な割合で混合することが必要だが[8, 11]，原原種や原種等の維持・管理時に異品種の混入や交雑がおきると品種の純度が保てなくなり，農薬の削減効果が弱まる恐れがある．特に，交雑株の後代からはいもち病真性抵抗性遺伝子を保持しない株が出現する可能性があるので注意が必要である．そのため，混入株および交雑株の発見と排除は重要な作業であり，通常の原原種や原種の維持・管理の際には，草姿・葉の状態・出穂時期・稈長などの目視形質の差異によって選抜と抜き取りを行っている．ところがBL品種群はいもち病真性抵抗性以外の形質は同じであるため[6, 7, 9]，混入株および交雑株の目視形質の差異による識別が困難である．一方で，改正JAS法により米の品種の表示が義務づけられたこと，品種育成者の権利保護やプレミア品種の価格の維持などの観点からも[12, 20, 21]，「コシヒカリ」およびBL品種群だけでなく，主要品種間の簡易・迅速な識別および混入・交雑検定方法の開発が望まれる．

イネの混入異品種検出方法としては，STS

平成27年10月23日受付　平成28年3月15日受理
*1　現　農研機構九州沖縄農業研究センター
*2　新潟県農業総合研究所作物研究センター
*3　農研機構中央農業総合研究センター
*4　元　農研機構作物研究所
*5　現　農研機構作物研究所
†　本研究に対し同等の貢献を行った．

（sequence tag site）型のDNAマーカーとPCRの利用によるネガマーカーキット（本稿では以降ネガマーカーセットと表記）が大坪ら[18]によって開発されている（図1）．ネガマーカーセットは単一または複数のDNAマーカーから構成され，純度検定の対象品種から調製したDNAを用いてPCRを行っても増幅断片は全く検出されないが，混入の可能性がある異品種のDNAの存在下ではいずれかのDNAマーカーの増幅断片が検出される（図１）．異品種のDNAの存在下でのみPCR増幅断片が検出されることから，単純な実験で明瞭に異品種の混入を判断できる優れたシステムである．しかし，ネガマーカーセットの構築にかかる労力はDNAマーカーの種類により異なる．SNP（single nucleotide polymorphisms）型のマーカーはどの品種でPCR増幅が起きるかをプライマーの3’末端の塩基の変更で任意に選ぶことができるが（図２），STS型のDNAマーカーは品種ごとの増幅の有無を変更することはできない．そのため，STSマーカーのみでネガマーカーセットを構築するには，まず多数のマーカーを作成し，その中から上記の条件を満たすものを選抜するため開発効率が悪いという欠点がある．そのため，大坪ら[19]と中村ら[13]による「BL1 号」～「BL8 号」と「コシヒカリ」の識別用STSマーカー

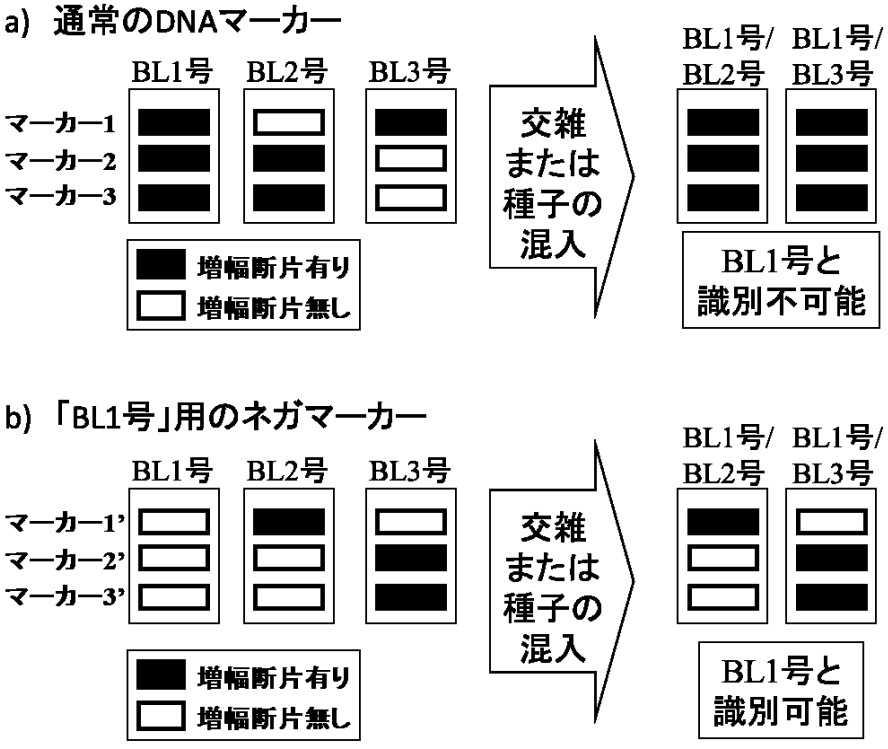



**図１「BL1 号」を例としたネガマーカーのしくみ．**

a）：STS型やSNP型の優性のDNAマーカー1，2，3 によるPCR増幅パターンが上図のようである場合，「BL1 号」と「BL2 号」や「BL3 号」の交雑，または，種子が混入したサンプルを「BL1 号」と区別することはできない．

b）：対象品種（純度検定の対象となる品種）である「BL1 号」用のネガマーカー1’，2’，3’ を使用した場合，「BL1 号」のDNAではPCR増幅は起きない．一方，異品種（混入の可能性があるその他の品種）である「BL2 号」や「BL3 号」のDNAでは１つ以上のマーカーでPCR増幅が起きる．また，交雑や混入があるサンプルの検出も可能である．

STSマーカーでネガマーカーを構築するには，あらかじめ作成した多数のマーカーの中から条件を満たすものを選抜しなければならないため開発効率が悪い．一方SNPマーカーでは，どの品種でPCR増幅が起きるかをプライマーの3’末端の塩基の置換で任意に設定することができるため（図２），マーカー1，2，3 の増幅の有無を逆転させてマーカー1’，2’，3’ として利用することが可能であり，効率的にネガマーカーを構築することができる．

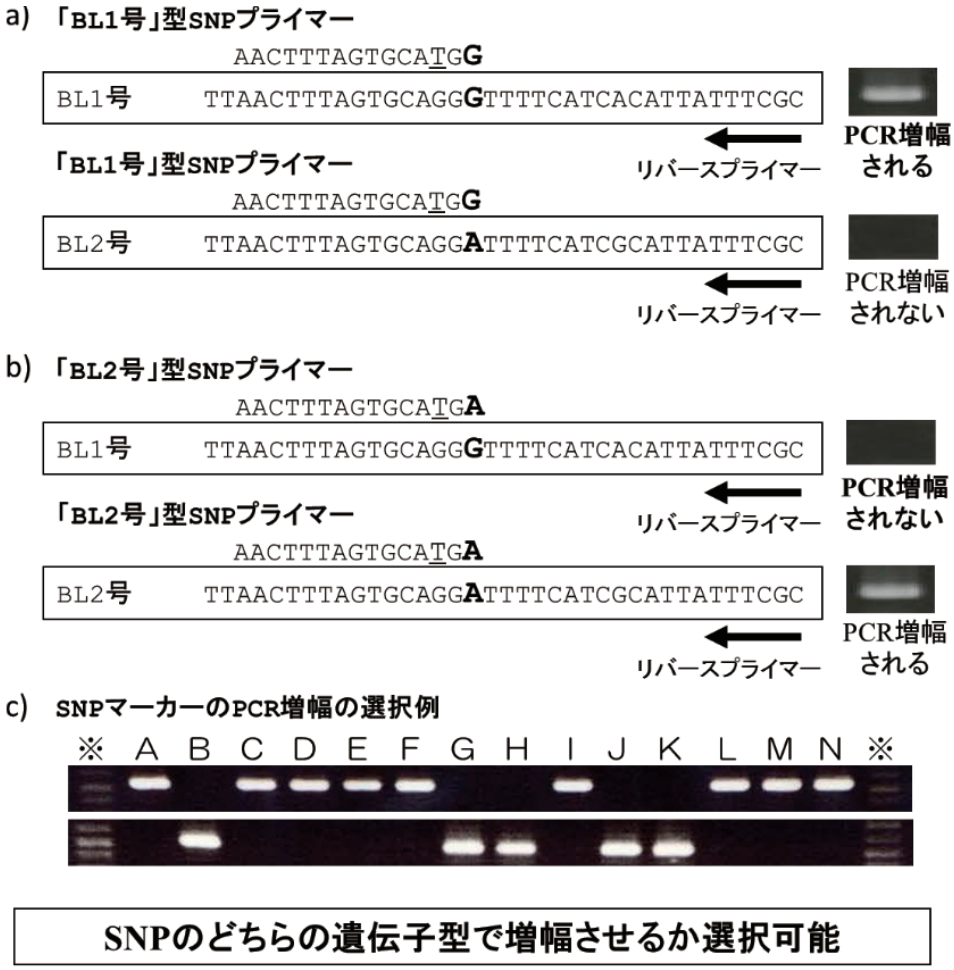



**図2　プライマー設計によるSNPマーカーの増幅の有無の選択例.**

塩基配列の太字；SNP部位．塩基配列の下線；人為的に置換した非対合塩基.

a)；「BL1号」と「BL2号」にSNPがある場合，SNPマーカーを用いて「BL1号」のDNAでPCR増幅させるには，プライマーの3'末端を「BL1号」の遺伝子型に対応させる．なお，SNP部位で異なる遺伝子型を示す「BL2号」での非特異的なPCR増幅を抑制するために，プライマーの3'末端から3塩基目を非対合塩基に置換する[3].

b)；PCR増幅の有無を逆転させて「BL2号」で増幅させる場合には，「BL1号」用のプライマーの3'末端を「BL2号」の遺伝子型に変更するだけでよい.

c)；上記の方法に従い，SNPマーカーのプライマーの3'末端を上段と下段で変更して，PCR増幅の有無を逆転させた実施例．横軸；A～Nは異なる品種．※はサイズマーカー．下から400 bp，500 bp，650 bp.

の報告はあるものの，新潟県で栽培されている上記6種類のBL品種群についてのネガマーカーセットの報告はない.

一方，母集団からのサンプル抽出による異品種混入検定について，流通米に関しては「異品種混入限度水準としては，4～5％程度が妥当である」（米の農産物検査等検討会，2006）との目安が示されている[17]．しかし，20個体調べて混入個体が検出されない場合，母集団の異品種混入率は5％未満ではなく，二項分布の確率計算をすると14％未満と算出される（信頼度95％．以下同じ）（表1）．PCRとDNAマーカーで1個体ずつ検定する場合，5％の水準を満たすためには59回の反応が必要となる（表1）．だが，原原種等の維持・管理時にはさらに高い水準が必要とされる．例えば，米の農産物検査等検討会[17]では，混入の検出を目的とした定性

検査として 2500 個体を調査する方法が紹介されており，0.12％の混入の調査が可能である．我々の算出した結果においても 0.1％の混入を調べるには約 3000 個体が必要である（表 1 ）．従って，1 個体ずつの検定は費用および労力の点からも現実的ではない．そこで，複数の個体からまとめてバルク調製した DNA を用いて少ない反応数で検定を行うバルク法が検討・開発されている[1, 10, 18, 24, 26]．

このような背景から，BL 品種群のネガマーカーセットを構築しバルク検定法を適用することにより，原原種等の維持・管理時にこれまで目視では困難であった検定を高い精度で行えることが期待される．我々は既にイネ品種群識別用 DNA マーカー[25]および 8 種類のいもち病真性抵抗性遺伝子判別用 DNA マーカー[3, 4]を開発している．そこで，これらを組み合わせて使用・改変することで，新潟県の作付面積の 95％以上[15]を占める品種群を含む主要 16 品種について，SNP および STS マーカーを用いたネガマーカーセットの開発を目指した．更に，バルク法による異品種混入率の検出限度の検証も行ったので報告する．

**表 1　混入異品種検出確率と検定個体数**

| 異品種混入割合 1)（％） | 検定個体数 2)（粒） | 信頼度 3)（％） |
|---|---|---|
| 50.0 | 5 | 96.8750 |
| 50.0 | 7 | 99.2188 |
| 14.0 | 20 | 95.1026 |
| 10.0 | 29 | 95.2899 |
| 10.0 | 44 | 99.0302 |
| 5.0 | 59 | 95.1505 |
| 5.0 | 90 | 99.0112 |
| 1.0 | 299 | 95.0464 |
| 1.0 | 459 | 99.0079 |
| 0.50 | 598 | 95.0088 |
| 0.50 | 919 | 99.0014 |
| 0.10 | 2995 | 95.0038 |
| 0.10 | 4603 | 99.0001 |
| 0.05 | 5990 | 95.0001 |
| 0.05 | 9209 | 99.0005 |
| 0.01 | 29956 | 95.0001 |
| 0.01 | 46050 | 99.0001 |

1）；母集団の異品種混入割合.
2）；母集団からサンプル抽出して検定する個体数.
3）；1 個体以上異品種が検出される確率.

# Ⅱ．材料と方法

## 1．供試品種

「コシヒカリ」,「コシヒカリ新潟 BL1 号」,「コシヒカリ新潟 BL2 号」,「コシヒカリ新潟 BL3 号」,「コシヒカリ新潟 BL4 号」,「コシヒカリ新潟 BL10 号」,「コシヒカリ新潟 BL11 号」,「こしいぶき」,「ゆきの精」,「わせじまん」,「ひとめぼれ」,「こがねもち」,「わたぼうし」,「五百万石」,「越淡麗」,および「あきたこまち」の 16 品種を供試した．「あきたこまち」以外の全ての種子は新潟県農業総合研究所で維持・管理している原原種または原種を用いた．「あきたこまち」は秋田県農業試験場から分譲された原原種を用いた．また，品種間の交配は新潟県農業総合研究所で行った．

## 2．DNA 調製方法

米粉サンプルは，玄米のみまたは玄米と米粉をミルサー IFM-150（イワタニ）に入れ，10 秒通電，小休止，10 秒通電，小休止，10 秒通電のサイクルで粉砕して作成した．

DNA 調製は以下の方法で行った．具体的な条件は実験ごとに異なるため，表 2 にそれぞれの詳細を示す．直径 7 mm ジルコニアボールと玄米または米粉を入れた 2 ml プラスチック試験管に DNA 抽出バッファー（100 mM Tris，10 mM EDTA，1 M KCl，2％ CTAB，pH=8.0）を加え，玄米のバルク検定を行う場合には 2 時間以上抽出バッファーに浸漬した．ミキサーミル MM300（キアゲン）を用い毎分 30 回転で振盪破砕し，遠心後上澄みの一部を取り出し DNA 抽出バッファーを加えて 400 µl とした．その後，同量のクロロホルム / イソアミルアルコール（24:1（vol.:vol.））で 1 回精製し，上澄みに同量のイソプロパノールを加え撹拌し，遠心後の沈殿を 70％エタノールでリンスして真空乾燥させ，100 µl の 1/10TE（pH=8.0）を加えピペッティングと撹拌で沈殿を十分に溶かした．なお，玄米千粒重を約 20 g と想定した．

表2　玄米および米粉からのDNAバルク調製方法

| 検定方法 | 1粒検定 | バルク検定 | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 異品種混入率 | 100％ | 20％ | 10％ | 5％ | 約2％[1)] | 約1％[1)] | 約0.4％[1)] |
| 異品種粒数<br>＋対象品種粒数または重量 | 1粒<br>+0粒 | 1粒<br>+4粒 | 1粒<br>+9粒 | 1粒<br>+19粒 | 1粒<br>+1g | 1粒<br>+2g | 1粒<br>+5g |
| ミルサーによる粉砕（秒） | - | - | - | - | 30 | 30 | 30 |
| 玄米粒数または米粉重量 | 1粒 | 5粒 | 10粒 | 20粒 | 0.5g | 0.5g | 0.5g |
| ＋DNA抽出バッファー（μl） | 400 | 500 | 500 | 500 | 750 | 750 | 750 |
| バッファー浸水時間（時間） | 0～18 | 2～18 | 2～18 | 2～18 | 0 | 0 | 0 |
| 振盪機による破砕（分） | 2 | 2～4 | 2～4 | 2～4 | 2 | 2 | 2 |
| 遠心後使用する上澄み（μl） | 400 | 50 | 100 | 100 | 40 | 40 | 40 |
| ＋希釈用バッファー（μl） | 0 | 350 | 300 | 300 | 360 | 360 | 360 |
| クロロホルム/イソアミルアルコール（μl） | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 |
| イソプロパノール（μl） | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 | 400 |
| 1/10TE（μl） | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

1)；玄米千粒重を約20gと想定.

## 3．DNAマーカー設計方法

本研究で用いたDNAマーカーを表3に示す．DNAマーカーPc1454とPg320は，品種間のSNP情報をもとにHayashiら[3]の方法に従って作成した．SNP部位をプライマーの3’末端に位置させ，3’末端を1塩基目とした場合の3塩基目を相補鎖と対合しない塩基に置き換えた（図2）．Pc1454とPg320以外のDNAマーカーは，Hayashiら[3,4]とTabuchiら[25]に報告されたものを使用した．それらのうち一部のマーカーについては，PCR増幅する遺伝子型を変更するためにプライマーを改変する，または，プライマーの長さを変更して利用した．なお，4P1-K-52，4P1-N-52，17P1-N-51，17P1-N-51L，17P1-N-32，17P1-N-32L，26P1-K-5，26P1-N-5，26P1-31，26P1-31L，6P1-N-522，6P1-N-322，33P1-5，34P1-A-3，34P2-5L，および，34P2-3Lの16プライマーは農研機構が特許権を保有しているため（特許第4344818号），研究以外の目的で使用する場合には農研機構本部に問い合わせいただきたい．

DNAマーカー6P1，34P1，Pg320，z56592はプライマーの配列情報を元にOryzabase（http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/）で染色体上の位置関係を調べた．また，塩基配列の決定にはCEQ8000とCEQ DTCS-QUICK Start Kit（ベックマン・コールター）を用いた．

## 4．PCR条件

PCRは，1/10容量のDNA溶液と1/200容量のTakara Taq Hot Start Version（5ユニット/μl，タカラバイオ）を含む反応液を調製し，Takara Thermal Cycler Dice（タカラバイオ）を用いて，基本的に94℃2分を1サイクル，94℃10秒－60℃10秒－72℃30秒を32サイクル，4℃を1サイクルで行った．各マーカーのプライマーの終濃度および各ネガマーカーセットのアニーリング温度，サイクル数を表3に示した．反応終了後10μlを2％アガロースゲル（Agarose TypeⅡ，Medium EEO，Sigma，Tokyo）とミニゲル電気泳動装置で泳動し，エチジウムブロミド染色後にPCR増幅断片の有無を確認した．

# Ⅲ．結　果

## 1．「コシヒカリ新潟BL1，2，3，4，10，11号」識別用DNAマーカーの作成

「BL1号」と「BL2号」が保持するいもち病真性抵抗性遺伝子*Pia*と*Pii*は[6]，それぞれ第11染色体の0～36cMと第9染色体の26.7～34.4cM付近に座乗すると推定される[2,23]．そこで，座乗位置付近で多型を示すRFLPマーカーを公開データベース[22]

**表 3-1　DNA マーカー塩基配列・PCR 条件・バルク法検出限度**

| 対象品種<br>バルク法限度 | マーカー名 | マーカー種類 | プライマー名 | プライマー塩基配列 [1] | 長さ（bp） | 濃度（μM） | サイクル数 | アニーリング（℃） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| コシヒカリ | Pc1454 | SNP | Pc1454 BL2-531 | TCAGTTCTGGGGTTTGATTTAATTGCG | 590 | 0.2 | 32 | 56 |
| 20％ | | | Pc1454 BL2-311 | TGTATTTGTTTTATATTCACCGGTTACAAAGT | | | | |
| | Pg320 | SNP | Pg320-521 | TGTTCCAAGCCTCACGTACC | 554 | 0.2 | | |
| | | | Pg320-BL1-32 | AATATCTGAAACAGCCAAACAACCGA | | | | |
| | ta5 | SNP | Pita5e | CGAAAGGTGTATGCACTATAGTATCC | 516 [2] | 0.2 | | |
| | | | Pita5sta5 | CAGCGAACTCCTTCGCATACGCA | [2] | | | |
| | z56592 | SNP | P5659e21L | GCATAGGAATCTATTGCTAAGCATGAC | 299 [2] | 0.4 | | |
| | | | P5659sZ95LL | GAGGACCCGCGTTTTCCACGTGTAA | [2] | | | |
| BL1 号 | Pc1454 | SNP | Pc1454-BL2-531 | TCAGTTCTGGGGTTTGATTTAATTGCG | 590 | 0.2 | 32 | 60 |
| 10％ | | | Pc1454-BL2-311 | TGTATTTGTTTTATATTCACCGGTTACAAAGT | | | | |
| | Pg320 | SNP | Pg320-521 | TGTTCCAAGCCTCACGTACC | 555 | 0.2 | | |
| | | | Pg320-K-32 | CAATATCTGAAACAACCAAACAACCGT | | | | |
| | 17P1 | SNP | 17P1-N51L | GCTGACAACGTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAA | 265 [3] | 0.2 | | |
| | | | 17P1-N32L | CTTGACAATCCTGTTTGTCGCAGA | [3] | | | |
| BL2 号 | Pc1454 | SNP | Pc1454-K-53 | CAGTTCTGGGGTTTGATTTAATTGCT | 583 | 0.2 | 34 | 56 |
| 5％ | | | Pc1454-K-31 | TGTTTTATATTCACCGGTTACAAAGC | | | | |
| | b28 | SNP | b28s1 | ATCAGGCCAGGCCAGATTTG | 389 [2] | 0.08 | | |
| | | | b28eb15 | GACTCGGTCGACCAATTCGCC | [2] | | | |
| | 34P1 | SNP | 34P1-512 | CGAGCAGATCCTCCTCGTC | 340 [3] | 0.4 | | |
| | | | 34P1-A-3 | CGGCAAGCACAGCGTTC | [3],[4] | | | |
| | zt56591 | SNP | P5659s91L | TCTAAAACATCTCTTCATATATATGAAGGCCAC | 271 [2] | 0.2 | | |
| | | | P5659eZ95L | AGTAGTTGCTGAGCCATTGTTAAACA | [2] | | | |
| BL3 号 | ta5 | SNP | Pita5e | CGAAAGGTGTATGCACTATAGTATCC | 516 [2] | 0.2 | 32 | 60 |
| 0.4％ | | | Pita5sN5 | CAGCGAACTCCTTCGCATACGCG | [2] | | | |
| BL4 号 | z56592 | SNP | P5659e21L | GCATAGGAATCTATTGCTAAGCATGAC | 293 [2] | 0.1 | 32 | 60 |
| 10％ | | | P5659sN95S | CCGCGTTTTCCACGTGTAC | [2] | | | |
| | 26P1 | SNP | 26P1-N-5 | TTGTTTAGACAAAGTAAAGGAGGAATGCC | 201 [3] | 0.2 | | |
| | | | 26P1-31 | GATATCTTAGGGCCCGTTTGG | [3] | | | |
| BL10 号 | b28 | SNP | b28s1 | ATCAGGCCAGGCCAGATTTG | 389 [2] | 0.2 | 32 | 60 |
| 2％ | | | b28eN15 | GACTCGGTCGACCAATTCGCA | [2] | | | |
| BL11 号 | zt56591 | SNP | P5659s91L | TCTAAAACATCTCTTCATATATATGAAGGCCAC | 271 [2] | 0.2 | 32 | 60 |
| 2％ | | | P5659eN95L | AGTAGTTGCTGAGCCATTGTTAAACG | [2] | | | |
| こしいぶき | 4P1 | SNP | 4P1-N-52 | TTGTACCAAATAAATCAGGACCACTCTT | 381 [3] | 0.4 | 32 | 60 |
| 5％ | | | 4P1-314 | TGAAAGCAACTTAGACGAATAATAAACC | [3] | | | |
| | 26P1 | SNP | 26P1-K-5 | TTGTTTAGACAAAGTAAAGGAGCAATGCT | 201 [3] | 0.2 | | |
| | | | 26P1-31 | GATATCTTAGGGCCCGTTTGG | [3] | | | |
| | 6P1 | SNP | 6P1-N-522 | CCAACTGCTGCAATAATGCC | 131 [3] | 0.2 | | |
| | | | 6P1-N-322 | CGTAGCAACTCAATATAACATCAGCTAA | [3] | | | |
| ゆきの精 | 19P1 | SNP | 19P1-N-5 | GAGAGAGATTTTGTATCAGATTGCTGTCAG | 230 [3] | 0.2 | 32 | 60 |
| 1％ | | | 19P1-3H1 | ACAAACAGCAGTTAGCTTGTGACC | [3] | | | |
| わせじまん | 33P1 | STS | 33P1-5 | AGTGCTCAAGAAATCATAGCTGA | 260 [3] | 0.04 | 32 | 60 |
| 10％ | | | 33P1-D3 | AGTTTCCAGCACCTAGCC | [3] | | | |
| | 17P1 | SNP | 17P1-N-51 | TGACAACGTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAA | 259 [3] | 0.2 | | |
| | | | 17P1-N-32 | ACAATCCTGTTTGTCGCAGA | [3] | | | |

表3-2　DNAマーカー塩基配列・PCR条件・バルク法検出限度

| 対象品種<br>バルク法限度 | マーカー名 | マーカー種類 | プライマー名 | プライマー塩基配列[1] | 長さ（bp） | 濃度（μM） | サイクル数 | アニーリング（℃） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ひとめぼれ | 17P1 | SNP | 17P1-N51L | GCTGACAACGTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAA | 265[3] | 0.2 | 32 | 60 |
| 5％ | | | 17P1-N32L | CTTGACAATCCTGTTTGTCGCAGA | [3] | | | |
| | 26P1 | SNP | 26P1-N-5 | TTGTTTAGACAAAGTAAAGGAGGAATGCC | 203[3] | 0.2 | | |
| | | | 26P1-31L | TCGATATCTTAGGGCCCGTTTGG | [3] | | | |
| こがねもち | 35P1 | STS | 35NP1-52 | ATATGTCCCGTGCTTTGTGC | 208[3] | 0.2 | 38 | 60 |
| 1％ | | | 35P1-5 | TCTGACACTCTTATCAACAATTACATGAC | [3] | | | |
| わたぼうし | 4P1 | SNP | 4P1-K-52 | TTGTATCCAAATAAATCAGGACCACTCTG | 382[3] | 0.4 | 32 | 56 |
| 5％ | | | 4P1-314L | TGAAAGCAACTTAGACGAATAATAAACCTAGTATC | [3] | | | |
| | 17P1 | SNP | 17P1-N51L | GCTGACAACGTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAA | 265[3] | 0.1 | | |
| | | | 17P1-N32L | CTTGACAATCCTGTTTGTCGCAGA | [3] | | | |
| 五百万石 | 33P1 | STS | 33P1-5 | AGTGCTCAAGAAATCATAGCTGA | 260[3] | 0.08 | 32 | 60 |
| 10％ | | | 33P1-D3 | AGTTTCCAGCACCTAGCC | [3] | | | |
| | 6P1 | SNP | 6P1-N-522 | CCAACTGCTGCAATAATGCC | 131[3] | 0.2 | | |
| | | | 6P1-N-322 | CGTAGCAACTCAATATAACATCAGCTAA | [3] | | | |
| 越淡麗 | 27P2 | SNP | 27P2-K5L | GTGGTAATCTTTCTTCTACATCGGAGC | 330[3] | 0.3 | 32 | 60 |
| 5％ | | | 27P2-K3L | CCACTTTGATTCATCCACTGGACATAAT | [3],[5] | | | |
| | 34P2 | STS | 34P2-5L | TCATTACTGCCAAACCGCTTGC | 98[3] | 0.2 | | |
| | | | 34P2-3L | AATTCTGTGATCCATTATTGTCCGTAACC | [3] | | | |
| あきたこまち | 27P2 | SNP | 27P2-K-5 | GGTAATCTTTCTTCTACATCGGAGC | 325[3] | 0.3 | 32 | 60 |
| 5％ | | | 27P2-K-3 | CTTTGATTCATCCACTGGACATAAT | [3],[5] | | | |
| | 26P1 | SNP | 26P1-N-5 | TTGTTTAGACAAAGTAAAGGAGGAATGCC | 201[3] | 0.2 | | |
| | | | 26P1-31 | GATATCTTAGGGCCCGTTTGG | [3] | | | |

1）；人為的に置換した非対合塩基は下線で示す.
2）；Hayashiら[3,4]で報告されたプライマーおよびそれらを改変したプライマー.
3）；Tabuchiら[25]で報告されたプライマーおよびそれらを改変したプライマー.
4）；3’末端と2塩基目にSNPがあるため，3塩基目の人為的な非対合塩基への置換無し.
5）；3’末端と3塩基目にSNPがあるため，3塩基目の人為的な非対合塩基への置換無し.

から選抜し，使用された制限酵素の認識部位近傍にDNA多型があると予想し，「コシヒカリ」，「BL1号」，「BL2号」の該当領域の塩基配列を決定後比較した.「コシヒカリ」と「BL1号」，「コシヒカリ」と「BL2号」間で，それぞれRFLPマーカーG320（第11染色体，34.8cM）とC1454（第9染色体，30.6cM）の近傍のDNA多型を利用し，SNPマーカーPg320とPc1454を作成した（図3a）.

「BL3号」，「BL4号」，「BL10号」および「BL11号」の真性抵抗性遺伝子はそれぞれ*Pita-2*，*Piz*，*Pii*と*Pib*，*Pii*と*Piz-t*と推定される[6,9]．*Pii*以外の真性抵抗性遺伝子については，近傍ほぼ0 cMの位置にHayashiら[3,4]が作成したマーカーを使用した（図3a）.

## 2．ネガマーカーセットの開発

新潟県の主要16品種用のネガマーカーを構築するため，上記のBL品種群識別マーカーと共に，イネ品種識別用のDNAマーカーセットであるMix1～Mix5[25]の遺伝子型を調べた（図3a）．全22マーカーの中から，純度検定の対象品種ではPCR増幅が起こらずその他の品種では増幅断片が検出され，かつ，可能な限り少ないマーカー数で検出できるネガマーカーセットの組み合わせを見つけ出し，最終

a)

| マーカーMix名と種類 | マーカー名 | サイズ(bp) | 1 コシヒカリ | 2 BL1号 | 3 BL2号 | 4 BL3号 | 5 BL4号 | 6 BL10号 | 7 BL11号 | 8 こしいぶき | 9 ゆきの精 | 10 わせじまん | 11 ひとめぼれ | 12 こがねもち | 13 わたぼうし | 14 五百万石 | 15 越淡麗 | 16 あきたこまち |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Mix.1 | 4P1 | 382 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0* | 0 | 0 | 1 |
| | 17P1 | 254 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0* | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| SNP | 26P1 | 201 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 6P1 | 131 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Mix.2 | 34P3 | 438 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | 33P1 | 260 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| STS | 29P1 | 148 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| Mix.3 | 31P1 | 410 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 27P2 | 325 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0* | 0 |
| SNP | 19P1 | 230 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mix.4 | 31P2 | 505 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | 34P1 | 340 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| SNP | 38P1 | 193 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mix.5 | 18P1 | 593 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 35P1 | 208 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| STS | 34P2 | 91 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0* | 1 |
| SNP | Pg320 | 554 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | Pc1454 | 583 | 0* | 0* | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| | ta5 | 516 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | z56592 | 293 | 0* | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | b28 | 389 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | zt56591 | 258 | 0 | 0 | 0* | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

b)

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 改変 SNP | 4P1** | 381 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | 17P1** | 259 | 0 | 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0* | 1 | 1 | 0 |
| | 26P1 | 201 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0* | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | 19P1 | 230 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | Pg320 | 554 | 1 | 0* | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | Pc1454 | 583 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | ta5 | 516 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | z56592 | 293 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0* | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| | b28 | 389 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | zt56591 | 258 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0* | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ネガマーカー数合計 | | | 4 | 3 | 4 | 1 | 2 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |

**図 3　DNA マーカーの遺伝子型とネガマーカーセットに使用したマーカー.**

a）；イネ品種群識別用 DNA マーカー[25]，いもち病真性抵抗性遺伝子判別用 DNA マーカー[3,4]，および Pg320 と Pc1454 の遺伝子型．緑のセルはネガマーカーに使用したマーカー.

b）；プライマーを改変し PCR 増幅の有無を a）と逆転させたネガマーカーの遺伝子型．赤のセルはネガマーカーに使用したマーカー．1（黒のセル）；PCR 増幅断片有り．0（白、緑、赤のセル）；PCR 増幅断片無し.

*；プライマー長を変更して PCR 増幅程度を調整したネガマーカー（PCR 増幅断片長の変更については表 3 に示す）.

**；改変 SNP マーカーでは 4P1 はプライマー内に 1bp の欠損が，17P1 は増幅断片内に 5bp の挿入があるため，a）と断片長が異なる.

的にSNP型の14マーカー，STS型の2マーカーを選択した（図3）．

こちらのうちSNP型の10マーカー（「わたぼうし」と「こしいぶき」の4P1，「ひとめぼれ」と「BL1号」・「わせじまん」・「わたぼうし」の17P1，「こしいぶき」と「BL4号」・「ひとめぼれ」・「あきたこまち」の26P1，「ゆきの精」の19P1，「コシヒカリ」と「BL1号」のPg320，「コシヒカリ」・「BL1号」と「BL2号」のPc1454，「コシヒカリ」と「BL3号」のta5，「コシヒカリ」と「BL4号」のz56592，「BL2号」と「BL10号」のb28，「BL2号」と「BL11号」のzt56591）については，図3aに示した改変前のマーカーに増幅がある場合には，プライマーの3’末端の塩基の置換によりPCR増幅が起きないように改変してネガマーカーとして用いた（図3b）．

「BL3号」，「BL10号」，「BL11号」，「ゆきの精」，「こがねもち」についてはそれぞれ1マーカーのみでネガマーカーセットを構築できたが，それ以外の品種については2～4マーカーを組み合わせなければネガマーカーセットの構築ができなかった（図3）．そこで，これらのマーカーに関しては，プライマー濃度等の反応条件を調整し1反応で結果が分かるようにマルチプレックス化した．また，「コシヒカリ」のPc1454とz56592，「BL1号」のPc1454と17P1とPg320，「BL2号」のzt56591，「BL4号」のz56592，「BL11号」のzt56591，「ひとめぼれ」の17P1と26P1，「わたぼうし」の4P1と17P1，「越淡麗」の27P2と34P2については，プライマーの長さを変更してPCR増幅程度を調整し，より明確にDNA増幅断片が検出できるようにした（図3，表3）．最終的に16品種用のネガマーカーセットに使用したマーカーは，延べ数では33マーカーで，SNP型は30マーカー，STS型は3マーカーであった．

玄米1粒から調製したDNAと「コシヒカリ」ネガマーカーセットでPCRを行うと，純度検定の対象品種である「コシヒカリ」では増幅断片は検出されないが，「コシヒカリ」以外の異品種では1つ以上の増幅断片が検出された．また，他の15品種用のネガマーカーセットについても同様に，対象品種ではPCR増幅がないが異品種では増幅断片が検出されることを確認した（ネガマーカーセット毎，品種毎の増幅断片の有無はバルク検定法確認時の図5と同じであるためここではデータを示さない）．

## 3．花粉交雑および異品種混入検定

「BL1，2，3，4，10号」，「こしいぶき」，「ゆきの精」，「こがねもち」，「五百万石」については品種間の交配を相互に行い交雑種子を作成した．なお，「BL3号」を母本とし，「こしいぶき」と「ゆきの精」を父本として用いた場合には，交雑種子が得られず以下の実験は行っていない．

各々玄米1粒からDNAを調製しネガマーカーセットで交雑種子検定を行ったところ，自殖種子以外では増幅断片が検出され，異品種との花粉交雑を検出できることが確認された（図4）．また，「こしいぶき」，「ゆきの精」，「こがねもち」，「五百万石」の原種各192粒について玄米1粒毎にネガマーカーセットによる検定を行い，混入や交雑がないことを確認した（データは示さない）．

## 4．バルク検定法の適用

玄米1粒を用いた検定は有効であることが明らかとなったため，より効率の高い方法の確立を目指してバルクDNA調製法を検証した．異品種を混入させた複数の玄米または米粉からバルク調製したDNAを用い，16セットのネガマーカーの異品種検出限度を調べたところ，いずれも異品種を20％混入したサンプルでは1つ以上の増幅断片が検出され，検出限度は20％以下であることが確認された．さらに，異品種混入率10％，5％，約2％，約1％，約0.4％について検証した結果，「コシヒカリ」ネガマーカーセットでは異品種を10％で混入したサンプルでは増幅断片が検出されない場合があったため，検出限度を20％とした．同様に，検出限度が10％のネガマーカーセットは4品種（「BL1号」，「BL4号」，「わせじまん」，「五百万石」），5％は6品種（「BL2号」，「こしいぶき」，「ひとめぼれ」，「わたぼうし」，「越淡麗」，「あきたこまち」），約2％は2品種（「BL10号」，「BL11号」），約1％は2品種（「ゆきの精」，「こがねもち」），約0.4％は1品種（「BL3号」）であった（表3，図5）．

なお，ネガマーカーのDNA増幅断片長が98 bp～590 bpであることから，電気泳動には2％程度のアガロースゲルを用いるのが適当だと思われる．この条件では「コシヒカリ」ネガマーカーセットの

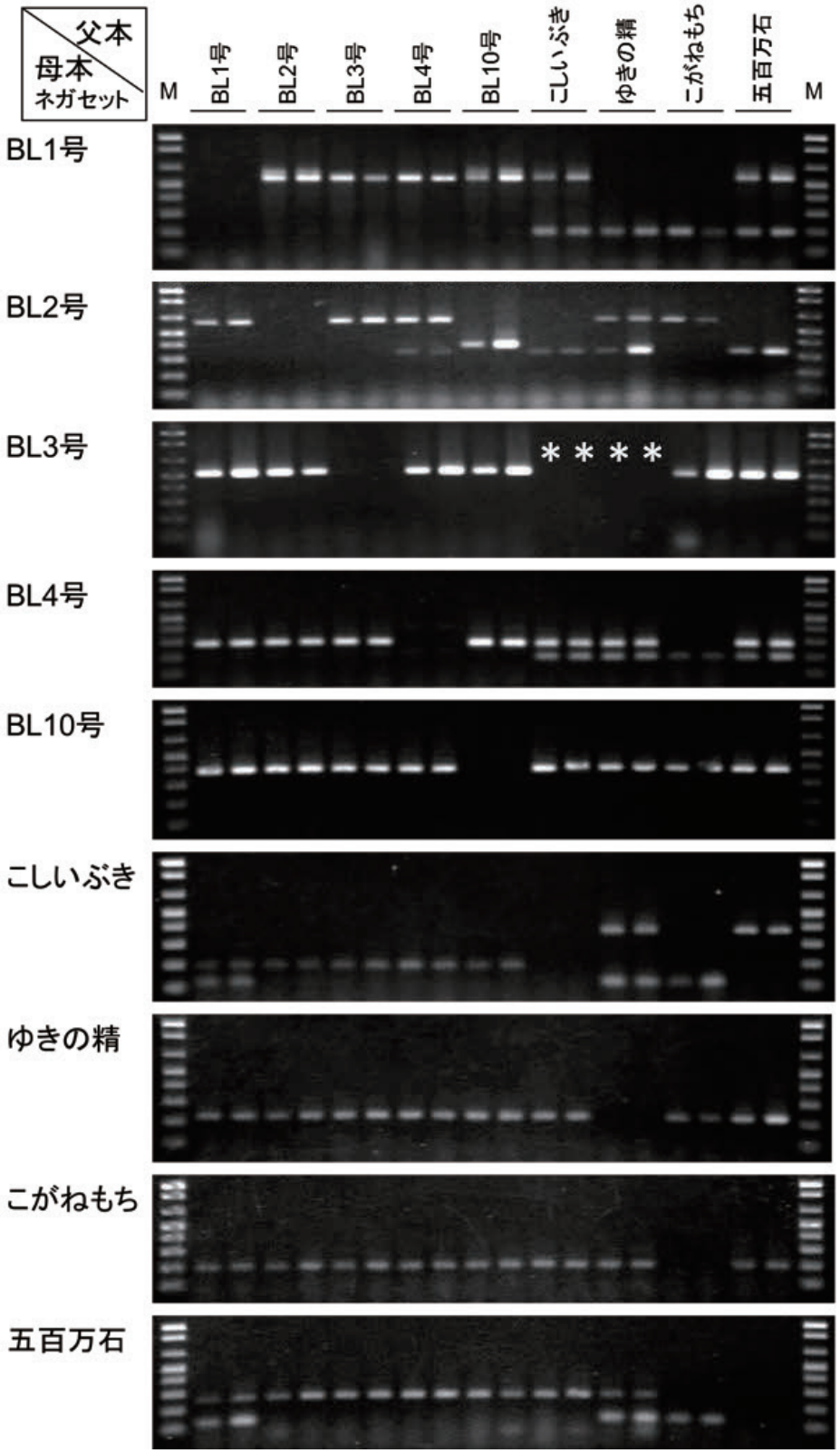



**図 4　ネガマーカーセットによる交雑種子の検定.**

横軸；父本．縦軸；母本品種および用いたネガマーカーセットの対象品種．*；母本の「BL3 号」に対して，「こしいぶき」と「ゆきの精」を父本とした交雑種子は得られなかったためデータは無し．M；サイズマーカー．下から上に 100bp，200bp，300bp，400bp，500bp，650bp，850bp，1kbp.

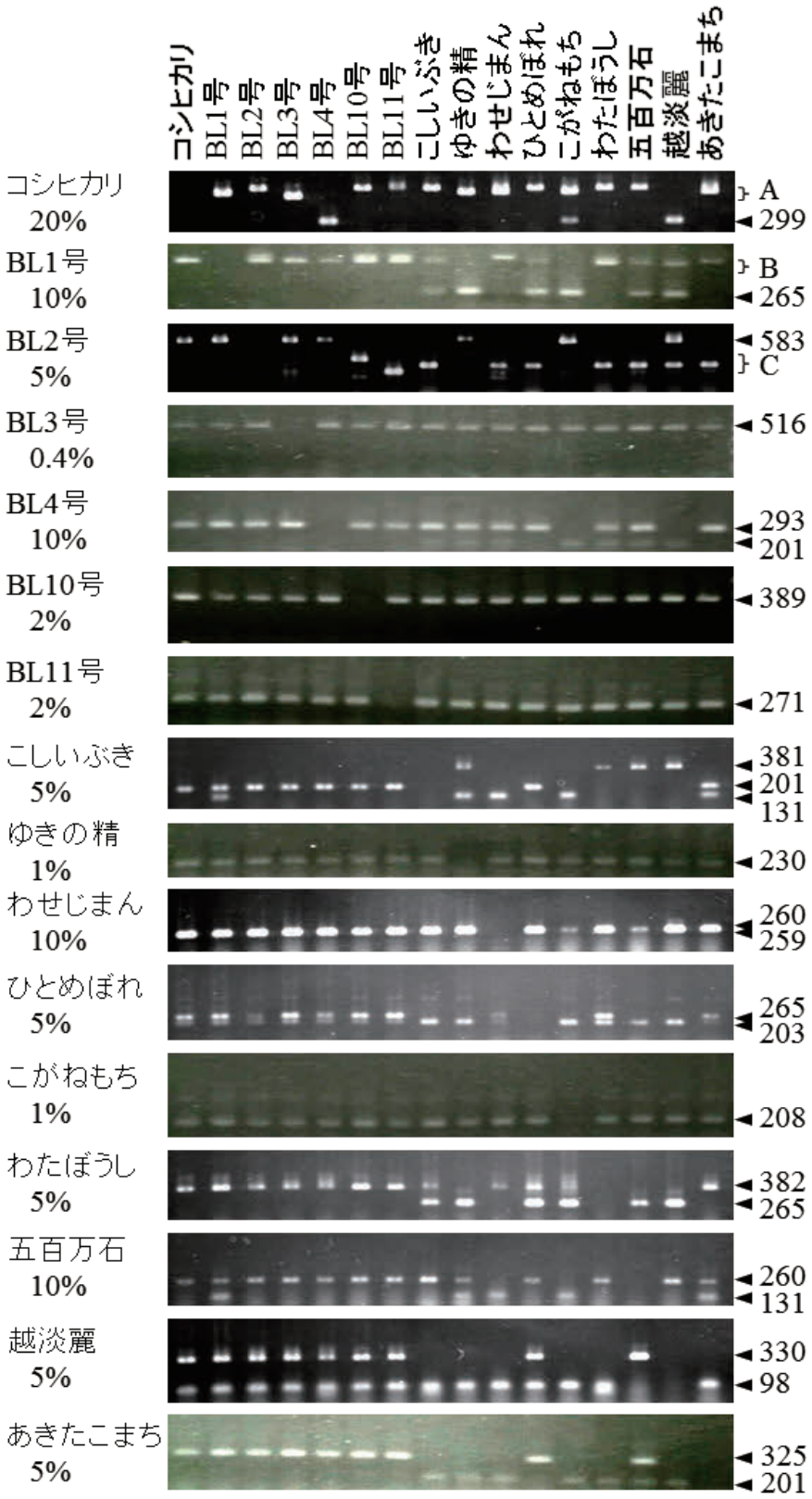



**図5　ネガマーカーセットによる混入異品種の検定.**

横軸；混入した異品種名．左側；対象品種と異品種混入率．右側；増幅断片長（bp）．A；590，554，516bp．B；590，555bp．C；389，340，271bp．対象品種用のネガマーカーセットを用いた.

Pg320・Pc1454・ta5,「BL1 号」の Pg320・Pc1454,「わせじまん」の 17P1・33P1 は，DNA 増幅断片長の差が小さいためミニゲル電気泳動装置では分離が不十分である．この点に関しては，ネガマーカーでは増幅断片の有無が重要であるため特段の問題とはならないと思われる．「BL2 号」ネガマーカーセットでの 220 bp や 300 bp,「ひとめぼれ」ネガマーカーセットでの 320 bp,「こがねもち」ネガマーカーセットでの 300 bp,「わたぼうし」ネガマーカーセットでの 320 bp 付近には，いずれの使用マーカーとも異なる非特異的な増幅断片が検出される場合があるものの，長さが異なることから容易に識別可能であった．また,「BL2 号」ネガマーカーにおいて 34P1 の 340 bp の増幅断片が検出されにくいが，いずれも検定結果には影響を与えなかった．今回の結果から，本ネガマーカーセットにバルク法を適応することで，多検体の異品種混入検定を効率的に行えることが示された．

## Ⅳ．考　察

本研究で開発した新潟県のイネ主要 16 品種のネガマーカーセットを構成する延べ 33 マーカーのうち，30 マーカーが SNP 型であり，STS 型は 3 マーカーのみであった（図 3 ）．STS マーカーはネガマーカーの開発効率が悪いのに対し，SNP マーカーでは一対のプライマーのうち片方，もしくは両方の SNP 部位に相当する 3’ 末端の塩基を替えて PCR による増幅の有無を任意に変更することができることから，1 つのマーカーを改変して複数の品種に対応するネガマーカーとして利用することが可能である．品種間のゲノムを比較した場合に最も頻繁に検出される多型は SNP であること[5]，PCR とミニゲル電気泳動という単純な装置で検定できることも併せると，SNP 型の PCR マーカーは柔軟性と利便性が高い多型解析システムである．

BL 品種群と「コシヒカリ」はいもち病真性抵抗性以外の形質の識別が困難な同質遺伝子系統であることから[6, 9]，品種間の DNA 多型も少ないと予想される．ところが図 3a で示した 16 品種の遺伝子型の検定結果において，*Pia* を持つ「BL1 号」の 6P1 と，*Piz* を持つ「BL4 号」の 34P1 は「コシヒカリ」および他の BL 品種群と PCR 増幅の有無が異なった．その原因として，染色体上で 6P1 は *Pia* 近傍の Pg320 と約 13kbp，34P1 は *Piz* 近傍の z56592 と約 61kbp の位置に座乗するため，交配親の *Pia* と 6P1，*Piz* と 34P1 が連鎖して「BL1 号」と「BL4 号」にそれぞれ導入されたためではないかと考えられる．一方，Pg320 は *Pia* を持たない「コシヒカリ」と *Pia* を持つ「BL1 号」を識別するために開発したマーカーであるが，*Pia* を持たない「わせじまん」でも「BL1 号」と同様の PCR 増幅が起きた（図 3a ）．*Piz* の保持の有無を判別するマーカーとして開発された z56592 においても，*Piz* を持つ「BL4 号」と，*Piz* を持たない「こがねもち」と「越淡麗」で同じ遺伝子型を示した（図 3a ）．Pg320 は「コシヒカリ」と「BL1 号」間の，z56592 は *Piz* を持つ「Zenith」と持たない「日本晴」間の DNA 多型に基づいて作成したマーカーであることから[3]，マーカー開発時と遺伝背景が異なる品種では真性抵抗性遺伝子の保持の判別ができない場合があることを示している．特に，Pg320 は連鎖解析を行って作成したマーカーではないため，抵抗性遺伝子との連鎖が完全でない可能性も考えられる．同様に *Pii* を持つ「BL2 号」と持たない「コシヒカリ」を識別するために開発した Pc1454 についても，本研究で対象とした以外の品種での *Pii* 遺伝子の保有の判別に利用できるかは不明である．

バルク法による異品種混入率の検出限度の検証では，マルチプレックスマーカーよりシングルマーカーで構成されるネガマーカーセットの方がより低い混入率の異品種を検出できる傾向を示したため（図 5 ），マルチプレックス PCR の代わりに個々のマーカーによるシングル PCR を複数回行えば，より効率の良い検定を行える可能性がある．例えば「BL4 号」用ネガマーカーセットは z56592 と 26P1 で構成されており，検出限度が 10 % であるため，50 個体の検定には 10 個体ずつ DNA をバルク調製して 5 回の PCR が必要である．ここで z56592 と 26P1 のシングルマーカーの検出限度が，シングルマーカーで最も検出限度が高い b28 や zt56591 と同等の 2 % と仮定すれば，50 個体から DNA をバルク調製してそれぞれのマーカーで 1 回，合計でも 2 回の PCR で検定を行うことができるため，結果的

に検定作業の効率化につながる．もしくはマーカー検定はz56592のみで行い，z56592では判別できない「こがねもち」と「越淡麗」については目視検査を行うことでも混入リスクは低減できる．これらの可能性については今後の検討課題である．また，ネガマーカーの異品種検出限度は，作成したネガマーカーの配列，および，同一のネガマーカーを用いた場合でも混入する異品種のDNAの違いにより異なる場合があった．これは，2種類の遺伝子型が異なる濃度で混在するヘテロ状態において一方の遺伝子型を検出できる能力がマーカーによって異なることを示しているが，その原因として，全てのプライマーのTm値をほぼそろえて設計しているものの，近傍のゲノムを含め遺伝子型間や遺伝子座間での塩基配列の差異によってPCR増幅程度に差が生じたと考えられる．

DNAのバルク調製を行う際の留意点として，玄米は2時間以上抽出バッファーに浸漬することが望ましい．その理由は十分に溶液を含ませ全ての玄米をほぼ完全に破砕するためであり，浸水時間が短いと均一に壊れず混入異品種のDNAが十分に抽出されない可能性がある．また，ミルサーでの米粉作成時にはコンタミネーションに十分に注意すること，および，のり状になることを避けるため抽出バッファーに米試料が含まれる工程では加熱は行わないことも留意点としてあげられる．また，サンプル数にも依存するが，米の粉砕から結果を得るまでに5～8時間以上かかった．そのため，DNA調製とPCRを異なる日に行う，または，玄米のバルク検定の場合には一晩抽出バッファーに浸漬し翌朝から以後の工程を行う等の工夫が必要である．

今回開発したネガマーカーセットは異品種の混入がなければPCR増幅が起きないため，DNA増幅断片が検出されない場合，異品種の混入が無いのか，何らかの原因によりPCR反応が失敗したのかの区別ができない．そのため，検定時にはどのサンプルでもPCR増幅が起きるマーカーを用いた対照実験を同時に行うことが望ましい．混入・交雑検定用マーカーとPCR反応確認マーカーを含めてマルチプレックス化したネガマーカーセットがあればより効率的な検定が可能となるが，その開発については今後の課題である．

原原種等の維持・管理時におけるDNA検定について，新潟県農業総合研究所では目視調査で異品種または交雑を疑われる株を対象に個体毎にネガマーカーによる調査を行っている．以下，本研究で検証した玄米からのDNAバルク調製法と同等の結果が葉身等からのDNAバルク調製法でも得られると仮定して，バルク検定法の可能性について考察する．新潟県の2013年度の「BL11号」の原原種圃場は9.6 aで[16]，1株1個体植えで約17500個体栽培されたと推定される．「BL11号」ネガマーカーのバルク法での検出限度は2％であるが，交雑株の葉身（核相が2nの細胞）では1/2，胚乳（核相が3nの細胞）であれば1/3しか異品種のゲノムが含まれていないため，個体数で考えた場合の検出限度はそれぞれ4％と6％と計算される．そのため，栽培中のイネ全17500個体について葉身を用いたバルク検定を行う場合，検出限度が4％であることから，25個体の葉身からバルク調製したDNAを1サンプルとして，700回のPCR反応が必要となる．また，収穫した原原種の種子について3000粒を用いて0.1％の混入異品種の抽出検定を行う場合，16粒毎のバルク検定（検出限度6％）で188回の反応が必要である（表1）．検出限度が0.4％の「BL3号」ネガマーカーで同等の個体数を検定する場合，それぞれ140回，37回のPCR回数で十分である．原原種の更新は3～6年毎に行われるため毎年検定を行う必要はない．この現状から考えても，検出限度が低いネガマーカーセットの実用性は高いと思われる．一方，「BL11号」よりも検出限度が高い「BL4号」（10％）の場合では，原原種圃場7.2 aの[16]約13000個体の全株検定を行うには5個体毎のバルク検定（検出限度20％）で2600回のPCR反応が，種子で0.1％の混入異品種の検定を行うには3個体毎のバルク検定（検出限度30％）で1000回の反応が必要である．原種や種場圃場ではさらに個体数が増加し更新も頻繁になるため，少なくとも「BL4号」での全株検査は現実的ではない．どのレベルまでの異品種の混入を認めるか判断することは難しいが，現状では慣行の目視調査による抜き取りとネガマーカーセットによる検定を併用することで，双方の欠点を補完する運用が適切であると考える．なお，本研究で開発したネガマーカーセットを用いた混入異品種・交雑個体検定方法について図6にまとめた．

**ネガマーカーセットを用いた混入異品種・交雑個体検定方法**

①玄米または葉身のサンプリング.
全個体の検定を行わない場合，検定個体数は表 1 を参考に決定する.
*検定個体数が増加すれば検出精度も上昇する. なお葉身でのバルク検定法は本研究では未確認である.

②DNA のバルク調製.
同時に DNA をバルク調製する 1 サンプルあたりの個体数は，対象品種用のネガマーカーセットの検出限界を示した表 3 を参考に決定する.
＊交雑個体の混入 DNA 割合は，玄米が 1/3，葉身が 1/2 と異なることから，1 サンプルあたりの個体数もそれぞれ 1/3，1/2 となる点に注意する. 玄米からの DNA バルク調製法は表 2 を参照する.

③ネガマーカーセットによる PCR.
表 3 の対象品種用のネガマーカーセットで PCR を行い，ミニゲル電気泳動装置等で DNA 増幅断片の有無を検出する.
＊本ネガマーカーセットは異品種の混入がなければ増幅断片は検出されない. 従って， 全ての品種で PCR 増幅が起きるマーカーを用いた対照実験を行うことが望ましい.

④判定.
得られた結果から表 1 など併用して混入率を算出する.
＊全個体検定の場合には，異品種混入や交雑が確認されたバルクサンプルについて個体毎に DNA の再調製を行い，図 3a のマーカー群 [3,4,25] を用いて検定を行えば，混入・交雑個体の特定と品種の判別が可能である.
＊サンプル数にも依存するが，米の粉砕から結果を得るまでに 5〜8 時間以上必要である.

**図 6　ネガマーカーセットを用いた混入異品種・交雑個体検定方法.**

## V. 摘　要

いもち病真性抵抗性遺伝子のマルチライン品種「コシヒカリ新潟 BL1，2，3，4，10，11 号」を含む新潟県の主要 16 品種について，マルチプレックス PCR用ネガマーカーセットを開発した．ネガマーカーセットを用いると，検定対象となる 1 品種の DNAのみを鋳型として PCRを行った場合には増幅断片は検出されないが，その他の品種の DNAではいずれかの DNAマーカーの増幅断片が検出される．各品種用ネガマーカーセットは 1 〜4 マーカーを含んでおり，全体では延べ数で SNP 型 30 マーカーおよびSTS 型 3 マーカーから構成されている．そのうち 9 品種用のネガマーカーセットは交雑種子を検出できることを確認した．また，玄米や米粉を用いた DNAバルク調製法による検出可能な異品種混入率の検証を行ったところ，16 品種用のネガマーカーセットの検出限度は 20 %〜0.4 %であった．本ネガマーカーセットを利用することで，品種間の簡易・迅速な異品種混入・交雑株の検定が可能である.

## 謝　辞

農研機構中央農業総合研究センターの以下の諸氏に多大なるご支援・ご助力を頂いた．大森伸之介氏

には丁寧な討論と貴重な助言をいただいた．検定材料の維持保存には業務第4科の小竹剛志氏，玄蕃徳也氏，矢﨑孝司氏，齋藤進氏，市橋正則氏，小出賢一氏，弓納持忍氏のご協力を，渡辺梅子氏，湯川京子氏，市村徳子氏，上坂直美氏には技術的な支援をいただいた．本研究の一部は独立行政法人科学技術振興機構平成19，20，21年度シーズ発掘試験研究「コシヒカリ新潟BL1～4号用異品種混入・花粉交雑検定DNAネガマーカーセットの開発」，「米品種純度検定用DNAマーカーの開発」，「DNAマーカーを用いたイネ純度検定におけるバルク法の開発」により行った．ここに記し厚く御礼を申し上げる．

## 引用文献

1. 江嶋亜祐子・和田卓也・坪根正雄（2007）米の品種識別のためのSSRマーカーの選抜と効率的な品種識別システムの構築．福岡県農業総合試験場研究報告，**26**，19-23
2. 後藤岩三郎・趙永良・バルチアフメッドアリ（1981）いもち病抵抗性の遺伝Ⅳ．日本植物病理学会報，**47**，252-254
3. Hayashi, K., N. Hashimoto, M. Daimon and I. Ashikawa (2004) Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus. Theor. Appl. Genet. **108**, 1212 - 1220.
4. Hayashi, K., H. Yoshida and I. Ashikawa (2006) Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. Theor. Appl. Genet. **113**, 251-260
5. International Rice Genome Sequencing Project (2004) The map-based sequence of the rice genome. Nature **436**, 793-800
6. Ishizaki, K., T. Hoshi, S. Abe, Y. Sasaki, K. Kobayashi, H. Kasaneyama, T. Matsui and S. Azuma (2005) Breeding of blast resistant isogenic lines in rice variety "Koshihikari" and evaluation of their characters. Breed. Sci. **55**, 371-377
7. 石崎和彦・佐藤徹・浅井善広・長澤裕滋（2005）コシヒカリのいもち病真性抵抗性同質遺伝子系統の特性評価．日本作物学会紀事，**74**(**3**)，304-309
8. 石崎和彦・松井崇晃・原澤良栄（2005）新潟県におけるコシヒカリのいもち病真性抵抗性マルチラインの実用化．日本作物学会紀事，**74**(**4**)，438-443
9. 石崎和彦・松井崇晃・小林和幸・重山博信・金田智・加藤武司（2011）いもち病真性抵抗性同質遺伝子系統「コシヒカリ新潟BL9，10，11，12号」．新潟県農業総合研究所研究報告，**11**，1-17
10. 癸生川真也・中澤佳子・天谷正行・生井潔（2013）ポストラベル法を用いた栃木県水稲奨励品種を識別するSSRマーカーセットの開発．栃木県農業試験場研究報告，**71**，55-61
11. 小泉信三・谷俊男（1996）イネいもち病の発病抑制効果におけるササニシキ多系品種とほ場抵抗性強品種及び薬剤散布の比較．愛知県農業総合試験場研究報告，**28**，53-68
12. 丸山恵史（2003）植物新品種育成者の権利保護とDNA品種識別技術．育種学研究，**5**(**3**)，127-135
13. 中村澄子・鈴木啓太郎・伴義之・西川恒夫・徳永國男・大坪研一（2006）いもち病抵抗性に関する同質遺伝子系統「コシヒカリ新潟BL」のDNAマーカーによる品種判別．育種学研究**8**(**3**)，79-87
14. 新潟県．"2コシヒカリＢＬの開発状況と特性"．（オンライン），入手先〈http://www.pref.niigata.lg.jp/nosanengei/ 1215712857692.html〉，（参照2015-09-24）
15. 新潟県．第125回新潟県統計年鑑2014（第6章農林水産業），P130.（オンライン），入手先〈http://www.pref.niigata.lg.jp/tokei/1356806697874.html〉，（参照2015-09-24）
16. 新潟県．平成25年度農業総合研究所年報．作物研究センター，P75.（オンライン），入手先〈http://www.ari.pref.niigata.jp/nouken/nenpou/14/133saku.pdf〉，（参照2015-09-24）
17. 米の農産物検査等検討会（2006）米の農産物検査等に関する意見，P2およびP10.

（オンライン），入手先〈http://www.maff.go.jp/j/study/other/kome_kensa/pdf/comment.pdf〉，（参照 2015-09-24）

18. 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**(**4**)，388-397
19. 大坪研一・中村澄子・星豊一・松井崇晃・石崎和彦（2002）稲の同質遺伝子系統識別方法及び当該識別技術を利用した米の産地識別方法．特開 2004-141079
20. Ohtsubo, K. and S. Nakamura (2007) Cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) by PCR method and its application to processed rice products. J. Appl. Glycosci. **54**, 235-243
21. 大坪研一・中村澄子（2008）DNAによる品種判別．食品・食品添加物研究誌，**213**(**9**)，791-799
22. Rice Genome Research Project (2000) The Latest High-Density Rice Genetic Map, Including 3267 Markers. (online), available from〈http://rgp.dna.affrc.go.jp/E/publicdata/geneticmap 2000 / index.html〉，(accessed 2015-09-24)
23. 佐藤毅・竹内徹（2003）イネゲノム塩基配列データを利用したイネいもち病抵抗性遺伝子*Pii*の座乗染色体の決定．育学研究，**5**（**別 1**），108
24. 須藤政彦．イタリアンライグラスの品種識別に有用なSSRプライマー対及びその利用．特開 2008-237180
25. Tabuchi, H., K. Hayashi, I. Ashikawa and H. Yoshida (2016) Multiplex PCR with SNP, STS and SSR markers for discriminating 114 Japanese rice cultivars. Bull. NARO. Agric. Res. Cent. 26, 23-37
26. 湯山奈々・才宏偉・平田球子．オーチャードグラスの品種識別に有用なSSRプライマー対及びその利用の製造方法．特開 2011-211948

〔中央農研研究報告　26：39-55（2016）
Bull. NARO. Agric. Res. Cent.〕


# Development of Negative Marker Sets to Detect Contamination among 16 Rice Cultivars in Niigata Prefecture and Its Application with Bulk DNA Preparation Method.

Hiroaki Tabuchi[*1†], Noriaki Hashimoto[*2†], Keiko Hayashi[*3],
Ikuo Ashikawa[*4] and Hitoshi Yoshida[*5]

## Summary

In Niigata Prefecture, almost all of the rice cultivar 'Koshihikari', a good eating-quality cultivar, was replaced in 2005 by the cultivars 'Koshihikari Niigata BL No.1', 'Koshihikari Niigata BL No.2', 'Koshihikari Niigata BL No.3', 'Koshihikari Niigata BL No.4', 'Koshihikari Niigata BL No.10'（after 2008）and 'Koshihikari Niigata BL No.11'（after 2011）, which are multiline cultivars composed of blast-resistant isogenic lines, so that farmers could decrease using agricultural chemicals needed to control rice blast. Because unexpected contamination from other cultivars and outcrosses out of a certain cultivar may counteract the desired reduction of agricultural chemical use, it is necessary to maintain 'pure' seed strains（uncontaminated）of 'Koshihikari BLs'.

To detect such contaminations, a 'negative' DNA marker set composed of single or multiple DNA markers is very useful. We observed that with this negative marker set, no DNA fragments were amplified by PCR when template DNA from a certain target cultivar was used, but one or more DNA fragments were detected when DNA from any other contaminant cultivar was used. To develop markers for a negative marker set from STS markers, many markers must be assessed so that proper markers can be found. In contrast, developing negative sets from SNP markers is easier because by changing the 3'-end of a primer, it is possible to select the specific genotype for which the DNA fragment will be amplified.

In this study, we developed negative marker sets for multiplex PCR for 16 major Niigata rice cultivars including 'Koshihikari BLs' using 14 SNP markers and two STS markers. Of these 14 SNP markers, 10 markers of which the 3'-end of primers were changed properly were used for one or more of negative marker sets, resulting in the effective construction of these marker sets. Each negative marker set was composed of one to four markers, and the 16 negative marker sets were composed of a total of 33 SNP markers and three STS markers. By using nine negative marker sets to discriminate hybrid seeds crossing between a target and contaminant cultivars, we found that these nine negative marker sets could detect outcrosses. Using a bulk DNA preparation method for seeds or rice powder including target and contaminant cultivars, these 16 negative marker sets could discriminate contaminated samples of which the contaminant cultivars were included in at the rate of 0.4 % – 20 %. These results confirmed that these negative marker sets will be a useful tool to certify 'pure' seed strains by effectively detecting unexpected contamination and outcrosses.

＊1 Present address: NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, 6651-2 Yokoichicho, Miyakonojo, Miyazaki 885-0091, Japan
＊2 Crop Research Center, Niigata Agricultural Research Institute, 857 Nagakuracho, Nagaoka, Niigata, 940-0826, Japan
＊3 NARO Agricultural Research Center, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan
＊4 Previous address: NARO Institute of Crop Science, 2-1-18 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan
＊5 Present address: NARO Institute of Crop Science, 2-1-18 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan
† These authors contributed equally to this work.