

# 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<sup>\*1†</sup>, Noriaki Hashimoto<sup>\*2†</sup>, Keiko Hayashi<sup>\*3</sup>,  
Ikuo Ashikawa<sup>\*4</sup> and Hitoshi Yoshida<sup>\*5</sup>

## 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.

### ネガマーカース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ス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ネガマーカースセットによるPCR.

表3の対象品種用のネガマーカースセットで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。

\*本ネガマーカース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スセット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のマーカースセット<sup>(3,4,25)</sup>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、米の粉碎から結果を得るまでに5~8時間以上必要である。

図6 ネガマーカース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用ネガマーカースセットを開発した。ネガマーカースセットを用いると、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マーカースセットの増幅断片が検出される。各品種用ネガマーカースセットは1~4マーカースセット

を含んでおり、全体では延べ数でSNP型30マーカースセットおよびSTS型3マーカースセットから構成されている。そのうち9品種用のネガマーカース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スセットの検出限度は20%~0.4%であった。本ネガマーカース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