

新潟県水稻 16 品種の混入・交雑検定用 DNA ネガマーカ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	2. ネガマーカセットの開発	45
II. 材料と方法	42	3. 花粉交雑および異品種混入検定	47
1. 供試品種	42	4. バルク検定法の適用	47
2. DNA調製方法	42	IV. 考察	50
3. DNAマーカー設計方法	43	V. 摘要	52
4. PCR条件	43	謝辞	52
III. 結果	43	引用文献	53
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	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、通常の前原種や原種の維持・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ム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

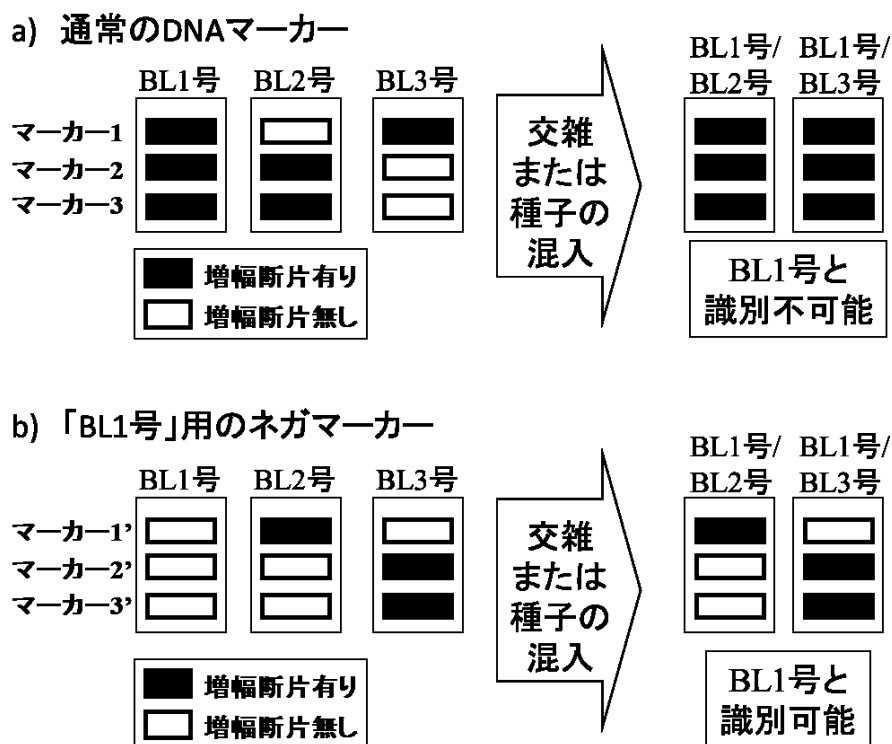


図1 「BL1号」を例としたネガマーカーのしくみ。

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な場合、「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。

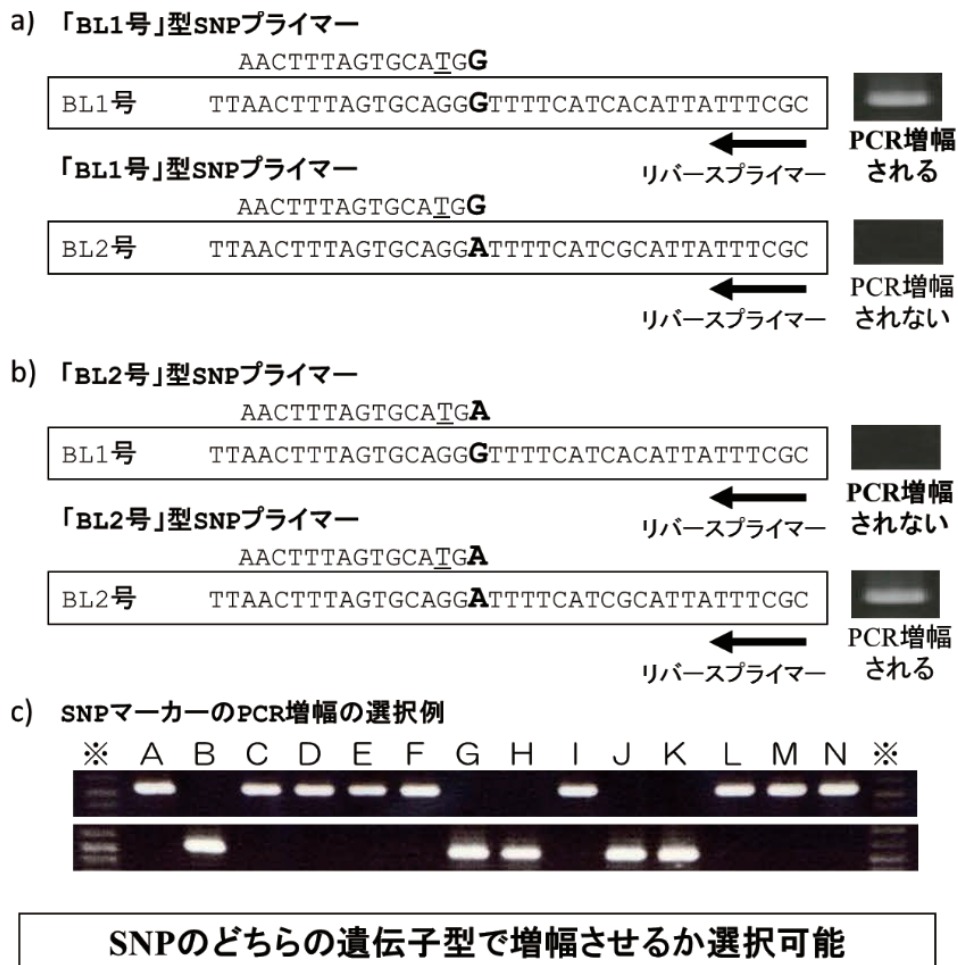


図2 プライマー設計によるSNPマーカーの増幅の有無の選択例。

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

粉碎して作成した。

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7mmジルコニアボールと玄米または米粉を入れた2mlプラスチック試験管にDNA抽出バッファー(100mM Tris, 10mM EDTA, 1M 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回転で振盪破碎し、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400μl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攪拌し、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、100μlの1/10TE(pH=8.0)を加えピペティングと攪拌で沈殿を十分に溶かした。なお、玄米千粒重を約20g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					
		20 %	10 %	5 %	約 2 % ¹⁾	約 1 % ¹⁾	約 0.4 % ¹⁾
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	1 粒	1 粒	1 粒	1 粒	1 粒	1 粒	1 粒
+対象品種粒数または重量	+0 粒	+4 粒	+9 粒	+19 粒	+1g	+2g	+5g
ミルサーによる粉碎 (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
振盪機による破碎 (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 Type II, 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 BL 1, 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 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 (μ M)	サイクル 数	アニーリン グ(°C)	
コシヒカリ 20%	Pc1454	SNP	Pc1454 BL2-531	TCAGTTCTGGGGTTTGATTTAATTGCG	590	0.2	32	56	
			Pc1454 BL2-311	TGTATTTGTTTTATATTCACCGGTTACAAAGT					
	Pg320	SNP	Pg320-521	TGTTCCAAGCCTCACGTACC	554	0.2			
			Pg320-BL1-32	AATATCTGAAACAGCCAAACAACCGA					
ta5	SNP	Pita5e	Pita5sta5	CGAAAGGTGTATGCACTATAGTATCC	516 ²⁾	0.2			
			Pita5sta5	CAGCGAACTCCTTCGCATACGCA					
z56592	SNP	P5659e21L	P5659sZ95LL	GCATAGGAATCTATTGCTAAGCATGAC	299 ²⁾	0.4			
			P5659sZ95LL	GAGGACCCGCGTTTTCCACGTGTAA					
BL1 号 10%	Pc1454	SNP	Pc1454-BL2-531	TCAGTTCTGGGGTTTGATTTAATTGCG	590	0.2	32	60	
			Pc1454-BL2-311	TGTATTTGTTTTATATTCACCGGTTACAAAGT					
	Pg320	SNP	Pg320-521	TGTTCCAAGCCTCACGTACC	555	0.2			
			Pg320-K-32	CAATATCTGAAACAACCAACAACCGT					
17P1	SNP	17P1-N51L	17P1-N32L	GCTGACAACGTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAA	265 ³⁾	0.2			
			17P1-N32L	CTTGACAATCCTGTTTGTGCGAGA					
BL2 号 5%	Pc1454	SNP	Pc1454-K-53	CAGTTCTGGGGTTTGATTTAATTGCT	583	0.2	34	56	
			Pc1454-K-31	TGTTTTATATTCACCGGTTACAAAGC					
	b28	SNP	b28s1	b28eb15	ATCAGGCCAGGCCAGATTTG	389 ²⁾	0.08		
				b28eb15	GACTCGGTCGACCAATTCGCC				
	34P1	SNP	34P1-512	34P1-A-3	CGAGCAGATCCTCCTCGTC	340 ³⁾	0.4		
34P1-A-3				CGGCAAGCACAGCGTTC					
zt56591	SNP	P5659s91L	P5659eZ95L	TCTAAAACATCTTTCATATATATGAAGGCCAC	271 ²⁾	0.2			
zt56591	SNP	P5659eZ95L	P5659eZ95L	AGTAGTTGCTGAGCCATTGTTAAACA					
BL3 号 0.4%	ta5	SNP	Pita5e	Pita5sN5	CGAAAGGTGTATGCACTATAGTATCC	516 ²⁾	0.2	32	60
				Pita5sN5	CAGCGAACTCCTTCGCATACGCG				
BL4 号 10%	z56592	SNP	P5659e21L	GCATAGGAATCTATTGCTAAGCATGAC	293 ²⁾	0.1	32	60	
			P5659sN95S	CCGCGTTTTCCACGTGTAC					
	26P1	SNP	26P1-N-5	26P1-31	TTGTTTAGACAAAGTAAAGGAGGAATGCC	201 ³⁾	0.2		
26P1	SNP	26P1-N-5	26P1-31	GATATCTTAGGGCCCGTTTGG					
BL10 号 2%	b28	SNP	b28s1	b28eN15	ATCAGGCCAGGCCAGATTTG	389 ²⁾	0.2	32	60
				b28eN15	GACTCGGTCGACCAATTCGCA				
BL11 号 2%	zt56591	SNP	P5659s91L	TCTAAAACATCTTTCATATATATGAAGGCCAC	271 ²⁾	0.2	32	60	
			P5659eN95L	AGTAGTTGCTGAGCCATTGTTAAACG					
こしいぶき 5%	4P1	SNP	4P1-N-52	4P1-314	TTGTACCAAATAAATCAGGACCACTCTT	381 ³⁾	0.4	32	60
				4P1-314	TGAAAGCAACTTAGACGAATAATAAAC				
	26P1	SNP	26P1-K-5	26P1-31	TTGTTTAGACAAAGTAAAGGAGCAATGCT	201 ³⁾	0.2		
				26P1-31	GATATCTTAGGGCCCGTTTGG				
6P1	SNP	6P1-N-522	6P1-N-322	CCAACTGCTGCAATAATGCC	131 ³⁾	0.2			
6P1	SNP	6P1-N-522	6P1-N-322	CGTAGCAACTCAATATAACATCAGCTAA					
ゆきの精 1%	19P1	SNP	19P1-N-5	19P1-3H1	GAGAGAGATTTTGTATCAGATTGCTGTGAG	230 ³⁾	0.2	32	60
				19P1-3H1	ACAAACAGCAGTTAGCTTGTGACC				
わせじまん 10%	33P1	STS	33P1-5	AGTGCTCAAGAAATCATAGCTGA	260 ³⁾	0.04	32	60	
			33P1-D3	AGTTTCCAGCACCTAGCC					
	17P1	SNP	17P1-N-51	17P1-N-32	TGACAACGTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAA	259 ³⁾	0.2		
17P1	SNP	17P1-N-51	17P1-N-32	ACAATCCTGTTTGTGCGAGA					

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 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 (μ M)	サイクル 数	アニーリン グ(°C)
ひとめぼれ 5%	17P1	SNP	17P1-N51L	GCTGACAACGTTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAA	265 ³⁾	0.2	32	60
			17P1-N32L	CTTGACAATCCTGTTTGTTCGCAGA	3)			
	26P1	SNP	26P1-N-5	TTGTTTAGACAAAGTAAAGGAGGAATGCC	203 ³⁾	0.2		
			26P1-31L	TCGATATCTTAGGGCCCGTTTGG	3)			
こがねもち 1%	35P1	STS	35NP1-52	ATATGTCCCGTGCTTTGTGC	208 ³⁾	0.2	38	60
			35P1-5	TCTGACACTCTTATCAACAATTACATGAC	3)			
わたぼうし 5%	4P1	SNP	4P1-K-52	TTGTATCCAAATAAATCAGGACCACTCTG	382 ³⁾	0.4	32	56
			4P1-314L	TGAAAGCAACTTAGACGAATAATAAACCTAGTATC	3)			
	17P1	SNP	17P1-N51L	GCTGACAACGTTAGATTAGGTTTCTATCAATAATAA	265 ³⁾	0.1		
			17P1-N32L	CTTGACAATCCTGTTTGTTCGCAGA	3)			
五百万石 10%	33P1	STS	33P1-5	AGTGCTCAAGAAATCATAGCTGA	260 ³⁾	0.08	32	60
			33P1-D3	AGTTTCCAGCACCTAGCC	3)			
	6P1	SNP	6P1-N-522	CCAAGTCTGCAATAATGCC	131 ³⁾	0.2		
6P1-N-322	CGTAGCAACTCAATATAACATCAGCTAA	3)						
越淡麗 5%	27P2	SNP	27P2-K5L	GTGGTAATCTTCTTCTACATCGGAGC	330 ³⁾	0.3	32	60
			27P2-K3L	CCACTTTGATTTCATCCACTGGACATAAT	3),5)			
	34P2	STS	34P2-5L	TCATTACTGCCAAACCGCTTGC	98 ³⁾	0.2		
34P2-3L	AATTCTGTGATCCATTATTGTCCGTAACC	3)						
あきたこまち 5%	27P2	SNP	27P2-K-5	GGTAATCTTCTTCTACATCGGAGC	325 ³⁾	0.3	32	60
			27P2-K-3	CTTTGATTTCATCCACTGGACATAAT	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	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
	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	0	1	0	1	0	1	1	1
	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	0	1	1	0	0	0	0	0	1
	27P2	325	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0*	0
	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
	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	0	1	1	1	1	1
	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	1	1	1	0*	1	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	0	0	1	0	1	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 に示した変更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変更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

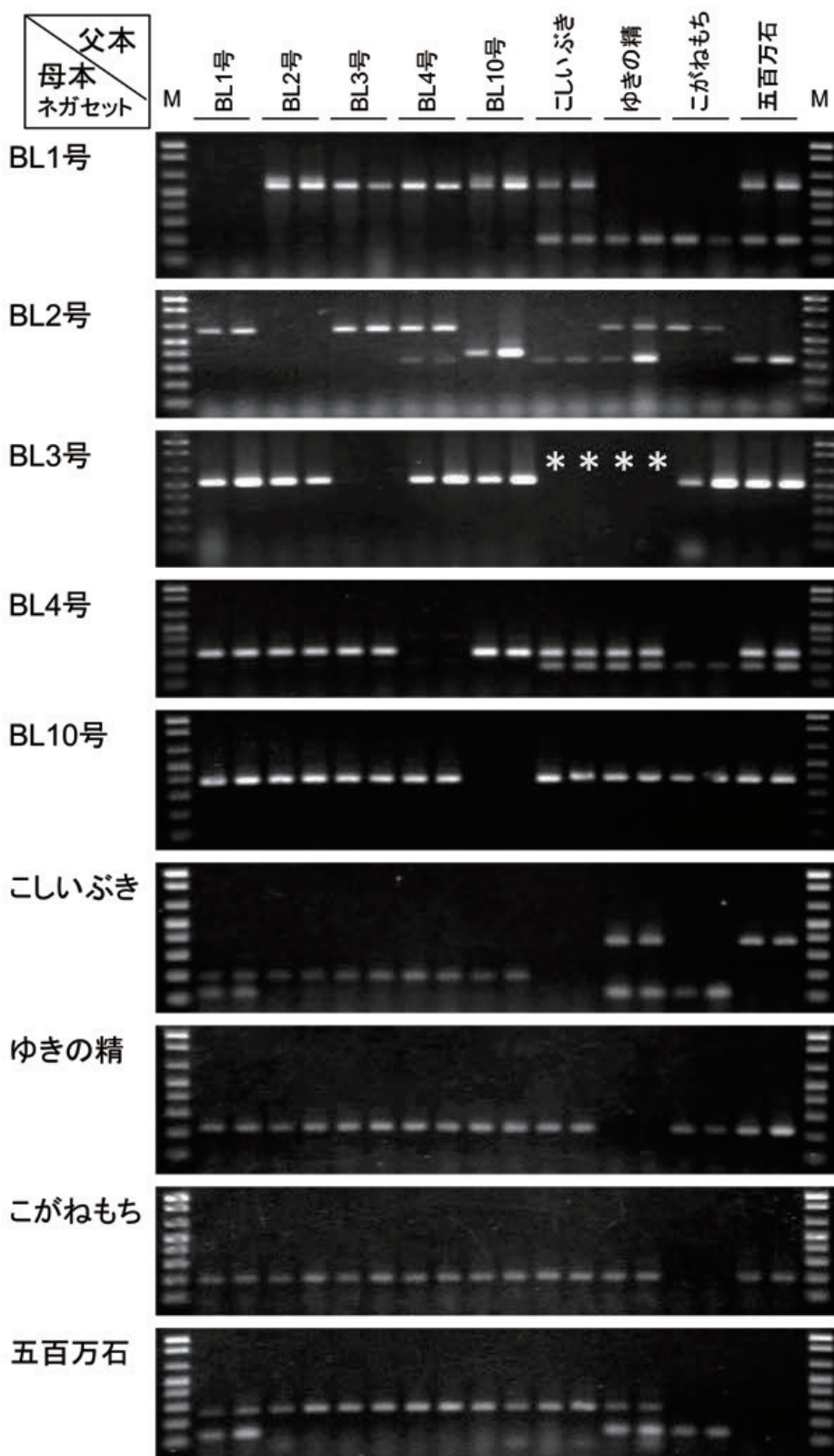


図4 ネガマーカセットによる交雑種子の検定.

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.

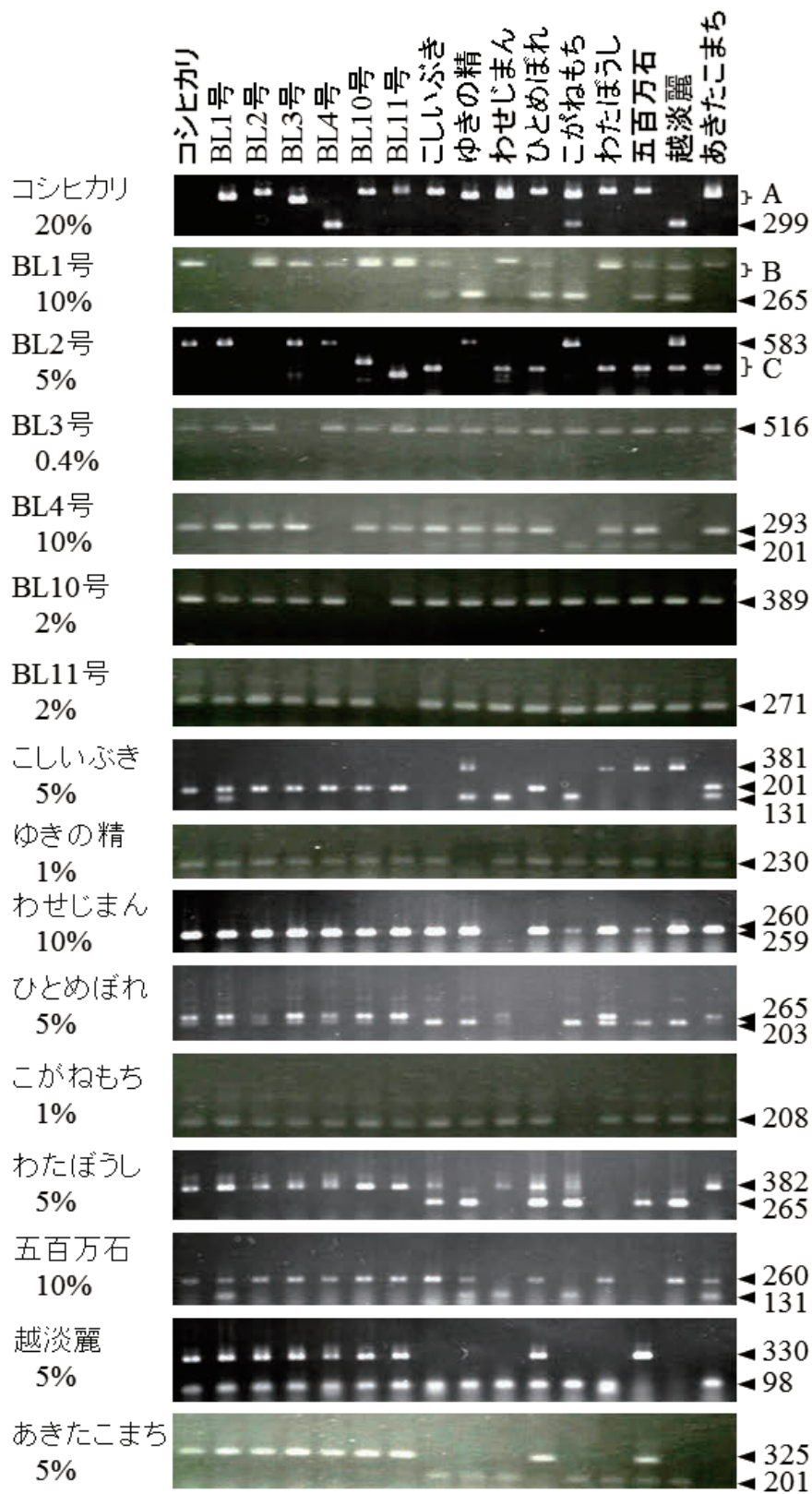


図5 ネガマーカーセットによる混入異品種の検定.

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, 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用することで, 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碎するためであり、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、米の粉碎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⁽¹⁶⁾、1 株 1 個体植えて約 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⁽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られる。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^(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

を含み、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

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、矢崎孝司氏、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は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

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.

