

ポストラベル法を用いた栃木県水稻奨励品種を識別する SSR マーカーセットの開発

癸生川真也・中澤佳子・天谷正行¹⁾・生井 潔

摘要：栃木県が育成した水稻品種なすひかり，とちぎの星等の知的財産の保護および原種の安定生産を目的とし，DNA マーカーを用いた品種識別技術を開発した。栃木県および近隣各県の奨励品種 15 品種は，5 種類の Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーを用いて識別可能であった。これらのマーカー検出は，1 段階のポストラベル法による Polymerase Chain Reaction (PCR) を行い，DNA シーケンサーを用いることを基本とする。さらに，これらのマーカーをマルチプレックス化することで，3 回の PCR で 15 品種の識別を可能とした。また，葉身および玄米から抽出可能な簡易 DNA 抽出法として，Template preparation solution (TPS) 法を選んだ。重量比 1 % の異品種を混入した米粉を用い，DNA 抽出および PCR を行ったところ，安定して異品種が検出可能であった。

キーワード：水稻，品種識別，SSR マーカー，ポストラベル法

Development of SSR markers set for identification of rice cultivars in Tochigi prefecture using post-labeling method

Shinya KEBUKAWA, Yoshiko NAKAZAWA, Masayuki AMAGAI and Kiyoshi NAMAI

Summary: In order to protect intellectual property rights regarding rice cultivars, such as “Nasuhikari” and “Tochigi-no-hoshi”, which were bred at the Tochigi prefecture, and to supply foundation seeds stably, we developed a cultivar discrimination system using DNA markers. Fifteen hortative cultivars in Tochigi prefecture and its neighbors were distinguished from each other by using five Simple Sequence Repeat (SSR) markers. These markers were basically detected by a DNA sequencer after Polymerase Chain Reaction (PCR) using a one-step post-labeling method. And, it is necessary to perform three times multiplex PCR to identify the 15 cultivars. A template preparation solution (TPS) method was adopted to extract DNA from a leaf blade and a grain. Our system could detect 1 percent of different cultivar (w/w) with rice flour.

Key words: rice, cultivar discrimination, SSR marker, post-labeling method

I 緒言

栃木県における米は、産出額 643 億円で県内の農業産出額の 25.2% を占め、品目別で 1 位を誇る重要な農産物となっている（平成 24 年度版栃木県農業白書）。栃木県では米の競争力を強化するため、これまでになすひかり（伊澤ら、2005）等のオリジナル品種を育成してきた。これらの品種は、種苗登録することで育成者権が与えられ、知的財産として保護されるが、ブランド農産物は高値で取引されるため、品種名の偽装や無断栽培など育成者権の侵害が問題となっている。

2001 年、栃木県で育成したイチゴ品種とちおとめが、許諾していない韓国から輸入される事件が発生し、DNA マーカーによる品種識別法開発の契機となった（田崎ら、2008a；2008b）。同様の事件が多発する中、JAS 法の改正により産地や品種名の表示が義務化され、偽装防止のための罰則規定が設けられるに至っている。

一方で、ゲノム解析の進んだ水稻では、複数の民間企業による識別サービスが早くから行われ（<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAkikaninfo.html>）、分析キットも販売されている（<http://www.ncss.go.jp/main/DNA/DNAkitinfo.html>）。しかし多くの自治体では、新品种への対応や原種生産現場での種子純度の管理などで、識別サービスやキットだけでは対応しきれないため、独自に DNA マーカーによる品種識別技術を開発している（森ら、1998；小笠原・高橋、2000；吉田ら、2000；黒柳ら、2006；松古ら、2006；江嶋ら、2007；林ら、2010）。栃木県においても、これまでに Random Amplified Polymorphic DNA（RAPD）マーカーを用いた水稻や大麦等の品種識別法を開発している（小林・吉田、2005；2006）。

しかし、2011 年に水稻新品种とちぎの星が育成された（山崎ら、2012）ことから新たな識別マーカー開発の必要性が生じたため、より簡便で再現性に優れ、かつ汎用性の高い品種識別技術の開発に着手した。

Simple Sequence Repeat（SSR）マーカーは一般に共優性マーカーであり、複数のアレルの識別や種子増殖過程でのアウトクロスを検出できること、PCR で容易に解析できることから、品種識別や種子純度の管理に有効と考えられている（赤木、2000）。また、水稻はゲノム全体に作成された SSR マーカーが公開されていることから（McCouch ら、2002）、比較的容易に SSR マーカーを用いた品種識別技術が開発できると考えられる。

そこで、知的財産の保護と原種生産の安定化を目的とし、公開されている SSR マーカーから栃木県的水稻奨励品種を中心とした 15 品種を識別できる SSR マーカーセ

ットを選抜した。さらに、汎用的で経済性に優れるポストラベル法（Schuelke、2000）を用いることと、簡易な DNA 抽出法についても検討を加え、迅速で高精度に品種識別を行う技術を開発したので報告する。

II 材料および試験方法

1. 供試材料

供試品種は、なすひかり、とちぎの星、コシヒカリ、あさひの夢、あきたこまち、キヌヒカリ、ゴロピカリ、彩のかがやき、ひとめぼれ、ゆめひたち、ゆめまつり、とちぎ酒 14、五百万石、モチミノりおよびヒメノモチの計 15 品種とした。また、供試組織として、葉身と玄米を用いた。

2. DNA 抽出

DNA抽出は、Cetyl trimethyl ammonium bromide（CTAB）法（Murray and Thompson, 1980；島本・佐々木、1997）または Template preparation solution（TPS）法（Thomson and Henry, 1995, 江嶋ら、2007）を用いた。CTAB法の供試材料は、葉身 1 g を乳鉢および乳棒を用いて液体窒素中で摩砕した。TPS法では、葉身 100 mg または玄米 1 粒を 1.5 ml マイクロチューブに入れ、TPSバッファー（100 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA, 1 M KCl）50 μ l と直径 2 mm のタングステンビーズ 1 個を加えた。破砕機 MM300（Retsch 社）を用いて 25 回転/秒で 90 秒間破砕した後、350 μ l の TPS バッファーを加えて抽出を行った。CTAB法で抽出した DNA は、TE（10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0）に溶解して分光光度計（e-spect, malcom 社）により濃度測定し、10 ng を PCR 反応に供試した。TPS法により抽出した DNA は 500 μ l の TE に溶解し、1 μ l を PCR 反応に供試した。

また TPS 法は、なすひかりおよびとちぎの星を供試して CTAB 法と抽出工程を比較した。さらに抽出した DNA を用いて Polymerase Chain Reaction（PCR）を行い、CTAB 法により抽出した DNA の増幅パターンと比較した。

3. 供試プライマー

プライマーは、イネ科植物の比較ゲノムデータベース Gramene で公開されている Panel of 50 standard SSR markers（http://www.gramene.org/markers/microsat/50_ssr.html）のうち RM19 と RM277 を除いた 48 組および McCouch *et al.*（2002）が公開しているプライマーのうちゲノム全体を網羅する 49 組（第 1 表）の計 97 組を供試した。ただし、シーケンサーによって多型検出を行うため、プライマーは Schuelke（2000）の方法（以下、ポス

トラベル法) に準じて作製し, ユニバーサル蛍光標識プライマーは M13Rv に変更して, 5'末端に Beckman Dye4 を標識した.

第1表 供試プライマー(McCouch *et al.*, 2002)

水稻の座乗 染色体番号	プライマー名 (Locus名)			
1	RM6120	RM8051	RM6405	RM8088
2	RM5984	RM2483	RM5470	RM8030
3	RM5628	RM1338	RM4796	RM6970
4	RM5412	RM8213	RM6130	RM8218
5	RM3529	RM5286	RM3790	RM6360
	RM2676			
6	RM8102	RM5963	RM1340	RM5509
7	RM5711	RM8262	RM2752	RM8249
8	RM3819	RM7080	RM4595	RM3496
9	RM1328	RM1896	RM3823	RM2255
10	RM5095	RM2125	RM6704	RM2371
11	RM3625	RM7391	RM2191	RM6688
12	RM8215	RM5939	RM5700	RM4888

4. PCR 方法および増幅産物の検出

PCR は, Schuelke (2000) の方法によるポストラベル法に従い, ユニバーサル蛍光標識プライマーの濃度を 1/2 に, 反応液量を 10 μ l に変更した. すなわち PCR 反応液組成は, 1 X Reaction Buffer, 0.25 mM dNTP mix, 1.5 mM MgCl₂, 0.04 μ M フォワードプライマー, 0.16 μ M リバースプライマー, ユニバーサル蛍光標識プライマーのユニバーサル配列を M13(-21)から M13Rv に変更したプライマーを 0.08 μ M とし, 10 μ l の液量で 0.25 U の HybriPol DNA Polymerase (BIOLINE 社) と CTAB 法で抽出した 10 ng の鋳型 DNA または, TPS 法で抽出した 1 μ l の DNA を加えた. 反応条件は 94°C・5 分の後, (94°C・30 秒, 56°C・45 秒, 72°C・45 秒) を 30 回繰り返す, さらに (94°C・30 秒, 53°C・45 秒, 72°C・45 秒) を 8 回繰り返した後, 72°C・10 分とした. PCR 産物は 1/10 TE で 10 倍希釈し, 1 μ l の希釈液に 20 μ l のホルムアミド, 0.05 μ l の DNA Size Standard Kit-400 (Beckman Coulter 社) を加えた後, シーケンサー GenomeLab GeXP (Beckman Coulter 社) で検出した. 検出されたマーカーのサイズは, なすひかりの塩基数を基本サイズ (a) とし, 増減をプラスマイナスで表示した (第 2 表).

5. PCR のマルチプレックス化

PCR のマルチプレックス化の検討は, プライマー RM1, RM5470, RM1328, RM3625 および RM2676 を用いて PCR を行い, 増幅産物を DNA シーケンサーで検出して行っ

た. PCR 反応液は前項に従い, プライマーは 2 種類ずつ混合した. プライマーの濃度は, フォワードプライマーが 0.02 μ M ずつ計 0.04 μ M, リバースプライマーは 0.08 μ M ずつ計 0.16 μ M とした. その後, 適切なマルチプレックスの組合せを決定し, その組合せでプライマー濃度を調整した.

6. 混入した異品種の検出

収穫期が近く, 混入するリスクの高い品種の組合せとして, なすひかりとコシヒカリ, とちぎの星とあさひの夢の DNA を混合した試料を調整し, マーカーの検出を行った. 試料は玄米を粉碎し, 各組合せの品種を重量比で 1%または 0.1%の割合で混合した米粉から, TPS 法を用いて DNA 抽出して調整した. プライマーは, なすひかりとコシヒカリの混合米粉では RM1328 と RM3625, とちぎの星とあさひの夢の混合米粉では RM283, RM3496 および RM1328 を用い, ポストラベル法で PCR を行いシーケンサーにより検出した. ただしシーケンサーでの検出は, 10 μ l の PCR 反応液原液に 20 μ l のホルムアミド, 0.1 μ l の DNA Size Standard Kit-400 (Beckman Coulter 社) をサンプルとした.

III 結果

1. 簡易 DNA 抽出法の検討

TPS 法を用いて葉身および玄米 1 粒から DNA を抽出し, 工程や要した時間を CTAB 法と比較した. TPS 法はクロロホルムを使用する必要が無く, DNA 抽出に要する時間は約 1 時間であった. これに対し, CTAB 法はクロロホルムを用い, 抽出に約 6 時間かかった. 得られた DNA をプライマー RM5711 で PCR を行ったところ, CTAB 法で葉身から抽出した DNA の増幅パターンと TPS 法で葉身および玄米から抽出した DNA の増幅パターン

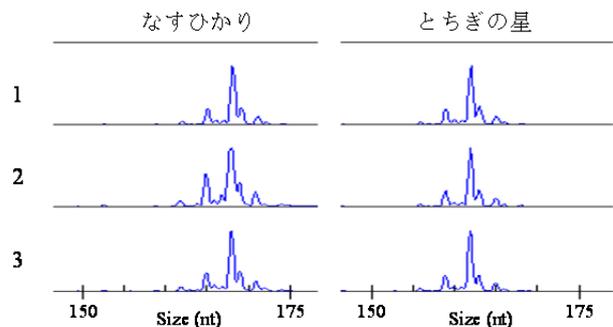


図1 DNA 抽出法および供試組織の違いによる PCR 増幅パターンの比較

- 1: CTAB法で葉身から抽出したDNAを供試
- 2: TPS法で葉身から抽出したDNAを供試
- 3: TPS法で玄米から抽出したDNAを供試

は同じであった(第1図)。以上のことから、TPS法は効率的で安全なDNA抽出法であることが分かった。

2. 品種識別用SSRマーカーの選抜

供試した97組のプライマーのうちRM2676を除いた96組について、モチミノおよびヒメノモチを除いた13品種を用いてPCRを行い、増幅産物を検出した。その結果、供試した96組のうち10組のプライマーで多型が検出された。しかし、多型が認められた10組のプライマーでは、彩のかがやきとゆめまつりの2品種を識別できなかった。そこで、彩のかがやきがツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子*Grh1*を保有し(平江, 2010)、ゆめまつりは別の抵抗性遺伝子*Grh3*を保有している(加藤ら, 2008)ことに着目し、*Grh1*近辺のマーカーRM2676を増幅するプライマーを追加した。

多型が認められた10プライマーペアにRM2676を加えた計11組のプライマーを用い、全15品種を供試して再びPCRを行った。その結果、各プライマーで検出されたアレル数は、2アレルが4組、3アレルが3組、4アレルが3組、6アレルが1組であった。また、彩のかがやきとゆめまつりはプライマーRM2676のマーカーサイズが異なり、供試した全15品種の識別が可能となった。また、11組のプライマーのうちRM1, RM5470, RM1328, RM3625およびRM2676の5組のプライマーを用いると、供試全15品種が識別できた(第2表)。

3. PCRのマルチプレックス化

供試全15品種を識別できる5組のプライマーセットを

用いて、PCRのマルチプレックス化について検討した。RM2676とRM5470またはRM1328を加えた2プライマーペアによるマルチプレックスPCRは、もう一方のプライマーの増幅産物は検出されるものの、RM2676の増幅産物が検出できなかったため、マルチプレックス化から除外した。残りの4プライマーペアについては、RM1とRM5470の組合せによる増幅が不安定であった。一方で、RM1とRM1328, RM3625とRM5470の組合せの場合、検出されるピークが分散しており、両プライマーペアの増幅産物を安定的に検出できた(第2図)。しかし、両方のピークの高さに差が認められたため、第3表のとおりプライマーの濃度を変更したところ、ピークがほぼ同じ高さに改善された(第2図)。

4. 混入した異品種の検出

収穫期の近いなすひかりとコシヒカリおよび、とちぎの星とあさひの夢の米粉を混合して抽出したDNAを用い、SSRマーカーの検出を行った。その結果、なすひかりにコシヒカリ、またはコシヒカリになすひかりを1%混入した場合は、プライマーRM1328(第3図)およびRM3625ともに混入が検出可能であったが、0.1%混入した場合は検出が不安定であった。また同様に、とちぎの星とあさひの夢の組合せでも、プライマーRM1328を用いたPCRでは、1%の混入は安定的に検出できたが、0.1%の混入は検出が不安定であった。この結果から、1%以上の混入であれば安定して識別できると考えられた。一方、プライマーRM283およびRM3496では、1%の混入条件でも再現性が劣り、検出が不安定であった。

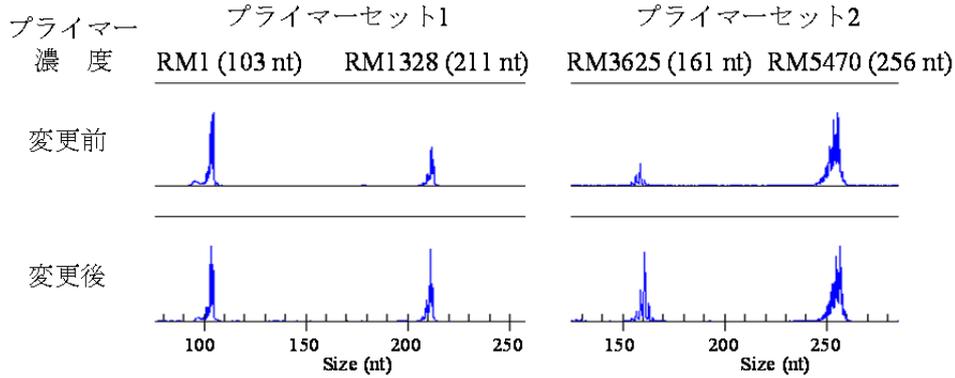
第2表 選抜したSSRプライマーによる水稻15品種の多型検出結果

プライマー名	RM1	RM283	RM5	RM5470	RM8213	RM5711	RM8249	RM3496	RM1328	RM3625	RM2676
座乗染色体	1	1	1	2	4	7	7	8	9	11	5
染色体上の位置(cM)	29.7	31.4	94.9	111.2	10.7	24.2	96.1	119.6	0.0	34.8	54.6
SSRモチーフ	GA	GA	GA	TC	TC	AAT	GA	CT	AG	GA	AT
検出アレル数	3	2	2	4	4	3	2	3	2	6	4
基本サイズ(nt)	103	167	125	256	230	168	190	148	211	161	167
供試品種	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
なすひかり(栃木,2007)	a	a	a	a	a	a-6	a	a+8	a+10	a	a
とちぎの星(栃木,出願中)	a	a	a	a+4	a	a	a	a	a+10	a+20	a
コシヒカリ(福井,未登録)	a-2	a+8	a	a-24	a	a-6	a-16	a	a	a	a
あさひの夢(愛知,2000)	a	a	a	a-24	a	a	a	a	a	a+20	a
ひとめぼれ(宮城,1992)	a	a	a	a-24	a-3	a	a	a	a	a	a
あきたこまち(秋田,未登録)	a	a	a	a-24	a	a	a	a+6	a+10	a+20	a
ゆめひたち(茨城,2000)	a	a	a+6	a	a	a-6	a	a	a	a+20	a
キヌヒカリ(北陸,1989)	a-12	a+8	a	a-24	a-3	a	a	a+6	a	a+20	a
ゴロピカリ(群馬,1995)	a-12	a+8	a	a-24	a-3	a-6	a-16	a	a	a	a-14
彩のかがやき(埼玉,2005)	a-12	a+8	a	a-24	a-3	a-6	a-16	a	a	a	a
ゆめまつり(愛知,2010)	a	a+8	a+6	a+4	a+4	a-6	a	a	a	a-2	a
とちぎ酒14(栃木,2007)	a-2	a+8	a+6	a-24	a-15	a-12	a	a+8	a	a+14	a-2
五百万石(新潟,未登録)	a-12	a+8	a+6	a-34	a+4	a-6	a-16	a	a+10	a+8	a-12
モチミノリ(農研,1991)	a	a	a+6	a-24	a+4	a-12	a	a+6	a+10	a+18	a-12
ヒメノモチ(東北,未登録)											

注1. 供試品種名横の()内は、育成県名と種苗法登録年を示す。ただし、北陸は北陸農業試験場、農研は農研センター、東北は東北農業試験場を示す。

2. 供試品種のマーカーサイズは、なすひかりの塩基数を基本(a)としプラスマイナスで表示した。

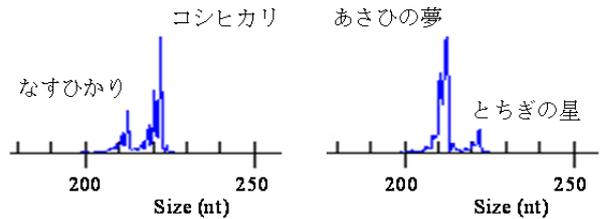
3. 灰色に網掛けしたプライマーは、15品種を識別する最少プライマーセットを示す。



第2図 マルチプレックスPCRにおけるプライマー濃度が増幅結果に与える影響

第3表 マルチプレックスPCRのプライマー濃度

プライマー種類	プライマー濃度 (μM)			
	プライマーセット1		プライマーセット2	
	RM1	RM1328	RM3625	RM5470
フォワードプライマー	0.016	0.020	0.024	0.012
リバースプライマー	0.064	0.080	0.096	0.048



第3図 異品種1%混入時のプライマーRM1328を用いたPCR増幅結果
左：コシヒカリに1%のなすひかりを混入
右：あさひの夢に1%のとちぎの星を混入

IV 考察

栃木県では、2005年に栃木県と近隣各県の奨励品種を中心とした20品種について、RAPDマーカーを用いて識別する技術を開発している(小林・吉田, 2005)。しかし、2011年に新品種とちぎの星を登録出願したことや、近県でも彩のかがやき(荒川ら, 2003)、ゆめまつり(加藤ら, 2008)等の新品種の導入を進めていることから、新たな識別マーカーを開発する必要性が高まってきた。

SSRマーカーは再現性が高く、一般に共優性でアレル数が多いことから品種識別能力も高いが、作出には塩基配列情報が必要であるため、開発費用や労力がかかるという特徴がある(DNA品種識別技術検討会, 2003)。しかし、水稻はゲノム全体に設定されたSSRマーカーが公開されている(McCouchら, 2002)ため、それらの情報を用いることで、簡易で安価に開発できると考えられた。そこで、新たな水稻の品種識別マーカーはSSRマーカーを用いることとした。

本研究では、供試した水稻15品種が5組のプライマーで識別が可能となった(第2表)。また、最も多型が認められたプライマーは6アレルが検出され(第2表)、SSRマーカーのアレル数の多さを反映した結果となり、SSRマーカーの有用性が示された。

品種偽装の判定を目的として品種識別を行う場合は、正確性と緊急性が求められるため、DNA抽出法の簡便化は重要である。対象となる試料は玄米や白米で、それらの組織から短時間で簡易に抽出でき、安定的にPCR増幅が可能なDNA品質を必要とされる。米1粒からのDNA

抽出は、CTAB法(大坪ら, 1997)やSDS法(吉田ら, 2000)、酵素法(大坪ら, 1999)、TPS法(江嶋ら, 2007)、キットを用いる方法(大坪ら, 1999; 小笠原・高橋, 2000)等が報告されている。本研究の結果では、TPS法によって玄米と葉身から約1時間で抽出が可能で、得られたDNAはPCRに利用可能であったことから、品種識別のための標準的なDNA抽出法とした。

PCRにおける正確性を確保するために、SSRマーカーが高い再現性を有するという利点があるものの、マーカーの性質上、最小で2塩基の違いを検出する高い解像度が必要となる。この点、シーケンサーによる検出では、1レーンごとに分子量マーカーを混合して泳動するため、検出の正確性と再現性は極めて高い。コストは高くなるものの、誰でも簡易で正確に品種識別ができるということを重視すると、シーケンサーでの検出が望ましい。そこで、シーケンサーで検出するためのPCR反応系のコスト削減を図った。

シーケンサーによる検出では、蛍光標識プライマーが必要となり、PCRのコストを押し上げる。そこで、本研究では水稻以外の品種識別でも蛍光標識プライマーを共用できるよう、ポストラベル法を採用した。実際に、イチゴの品種識別で使用される蛍光標識プライマーと共用しており汎用性が高い。さらに、PCRをマルチプレックス化することで、15品種が3回のPCRで識別可能となり、識別にかかるコストは単純に3/5に削減できるとともに、迅速化にも貢献できた。ここまでの技術を組み合わせる

と、SSR マーカーを用いた簡易で正確性が高く、比較的安価な識別技術が開発できたと言える。

次に、原種生産現場における少量の異品種混入に対応可能かどうか確認するため、異品種が混入した場合の検出感度について検討した。

栃木県の原種生産で異品種の混入が想定されるのは、収穫期の近いなすひかりとコシヒカリ、とちぎの星とあさひの夢の組合せである。プライマーRM1328とRM3625は1%の混入が安定して検出でき、想定した異品種の混入は識別可能であった。江嶋ら(2007)は、SSR マーカーをアガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイドによる染色で検出し、10%の米粒の混入と5%のDNAの混合の検出に成功している。これに対し、今回用いた蛍光ラベルとシーケンサーによる検出では1%の混合品種の検出に成功した。しかし、1%混入の検出が不安定なプライマーも認められたため、さらに詳細な条件検討が必要である。また、原種生産における異品種の混入は、少量でも極めて重要な問題となるため、今後は50粒程度のバルクで数回の検査を繰り返す等、現場で要求されるレベルで検出感度を向上させる手法について検討する必要がある。

現在、米は外食産業や中食産業での消費が大きなウェイトを占めることから、炊飯米の品種識別も想定される。また、煎餅は無論のことパンや菓子等の加工品における米粉の需要も高まっている。炊飯米や加工品は、製造工程の加熱によりDNAの断片化が懸念される。しかし、SSR マーカーは比較的小さい分子量の断片を増幅するため、断片化されたDNAにも比較的強いと考えられる。本研究で開発した技術が、炊飯米や加工品にも適応できるかどうか、今後の検討課題である。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、供試材料を提供していただいた栃木県農業試験場研究開発部水稲研究室山崎周一郎氏に厚くお礼申しあげる。また、栃木県農業試験場研究開発部生物工学研究室の皆様には、貴重なご助言、ご協力をいただいた。ここに記して心から感謝の意を表する。

引用文献

赤木宏守 (2000) DNA 多型によるイネの品種識別. 育種学研究 2:89-96.
 荒川誠・武井由美子・戸倉一泰・矢ヶ崎健治・小指美奈子・岡田雄二・渡辺耕造・大塚一雄・新井登

(2003) 病害虫複合抵抗性水稲新品種「彩のかがやき」, 「彩のきらびやか」の育成. 埼玉農総研研報 3:23-41.

DNA 品種識別技術検討会委員 (2003) 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項 —技術開発と利用のガイドライン—. .:

江嶋亜祐子・和田卓也・坪根正雄・尾形武文 (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. 福岡農総研報 26:19-23.

林猛・小林麻子・鮑根良・富田桂 (2010) 福井県の水稲奨励品種を識別する SSR マーカーセット開発. 北陸作物学会報 44:11-14.

平江雅宏 (2010) 抵抗性イネ品種を加害するツマグロヨコバイのバイオタイプ. 植物防疫 64:530-535.

伊澤由行・湯澤正明・藤井真弓・五月女恭子・大谷和彦・小林俊一・大久保堯司・小島隆・山口正篤・伊藤浩・倉井耕一・出口美里・栃木喜八郎・五月女敏範・池田二郎 (2005) 水稲新品種「なすひかり」の育成. 栃木農試研報 55:1-14.

加藤満・城田雅毅・中村充・工藤悟・藤井潔・辻孝子・濱田千裕・杉浦直樹・坂紀邦・中嶋泰則・加藤恭宏・遠山孝通・船生岳人・澤田恭彦・井澤敏彦・鈴木敏夫・釋一郎・井上正勝・朱宮昭男・小島元 (2008) 高品質、良食味な病害虫複合抵抗性水稲新品種「愛知 108 号」の育成. 愛知農総試研報 40:83-91.

小林俊一・吉田智彦 (2005) RAPD 分析による栃木県水稲優良品種の品種識別. 日作紀 74:207-211.

小林俊一・吉田智彦 (2006) RAPD 分析による栃木県を中心とした関東周辺地域のムギ類優良品種識別. 日作紀 75:165-174.

黒柳悟・水上優子・大矢俊夫 (2006) DNA マーカーによるイネの品種識別. 愛知農総試研報 38:19-26.

松古浩樹・中村澄子・大坪研一 (2006) DNA マーカーによる岐阜平坦地向け水稲奨励品種の品種判別. 岐阜農技研報 6:7-11.

McCouch, S.R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K.B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z., Xing, Y., Zhang, Q., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D. and Stein, L. (2002) Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res 9:199-207.

森真理・北村治滋・渡辺健三 (1998) RAPD 法を利用し

- た滋賀県内水稻栽培品種の品種識別法. 滋賀農試研報 39:35-42.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325.
- 小笠原博信・高橋砂織 (2000) STS-PCR 法によるあきたこまち等の 1 粒品種判別. 日食科工会誌 47:632-637.
- 大坪研一・藤井剛・橋野陽一・豊島英親・岡留博司・中村澄子・川崎信二 (1997) RAPD 法を用いた国内産精米の品種判別技術. 日食科工会誌 44:386-390.
- 大坪研一・中村澄子・諸岡宏・藤井剛・布施隆・川崎信二 (1999) RAPD 法による米飯一粒の品種判別. 日食科工会誌 46:262-267.
- Schuelke, M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.
- 島本功・佐々木卓治 (1997) 新版植物の PCR 実験プロトコール. 秀潤社 .pp. 34-37.
- 田崎公久・柏谷祐樹・小林俊一・天谷正行 (2008) イチゴ品種「とちおとめ」および「とちひめ」識別用プライマーセットの開発. *DNA 多型* 16:119-128.
- 田崎公久・柏谷祐樹・小林俊一・天谷正行 (2008) 日本の主要イチゴ品種を識別するマルチプレックス PCR プライマーセットの開発. *育種学研究* 10:111-115.
- Thomson, D. and Henry, R. (1995) Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques* 19:394-400.
- 山崎周一郎・湯澤正明・永島宏慧・青沼伸一・三好真弓・篠崎敦・伊澤由行・山口正篤 (2012) 水稻新品种「とちぎの星」の育成. 栃木農試研報 68:1-13.
- 吉田晋弥・李余良・玉木克知・塩飽邦子 (2000) 米粒からの簡易な DNA 抽出と RAPD 法による兵庫県奨励品種の識別. 兵庫農技研報(農業) 48:1-6.

