

栃木県奨励水稻品種を品種識別する新規 SSR マーカー データベースの構築

福田理沙・田崎公久¹⁾・癸生川真也²⁾・若槻睦子・生井潔³⁾・中澤佳子

摘要: 栃木県では、本県が育成した水稻品種の知的財産の保護および原種の安定生産を目的として、DNA マーカーを用いた品種識別を行っている。これまでの DNA マーカーを用いた品種識別法を見直し、用いる DNA マーカーを更新した。平成 30 年に品種登録出願された夢ささらについても同様に品種識別を行うため、夢ささらを識別可能な Simple Sequence Repeat (SSR) マーカーを選定した。マーカー検出は、ポストラベル法による PCR を行い、DNA シーケンサーを用いた。栃木県における奨励 7 品種を含む 13 品種は、5 種類の SSR マーカーで相互に識別可能であった。また、3 種類の SSR マーカーを追加することで、原種生産における 13 品種内での異品種混入判定が可能となった。さらに、異品種混入検査の検出感度を高めるため、検査方法を変更した。

キーワード: SSR マーカー, 水稻, 品種識別, ポストラベル法, 夢ささら

Construction of new SSR marker database for recommended rice cultivars identification in Tochigi prefecture

Risa FUKUDA, Kimihisa TASAKI, Shinya KEBUKAWA, Mutsuko WAKAMASU, Kiyoshi NAMAI,
Yoshiko NAKAZAWA

Summary: We use DNA markers to identify varieties for the purpose of protecting the intellectual property of rice cultivars developed by Tochigi prefecture and ensuring stable production of the original species. The cultivar identification method using DNA markers has been reviewed and updated the DNA markers used. We also selected the Simple Sequence Repeat (SSR) marker which can identify Yume-Sasara, the variety registered in 2018. These markers were detected with a DNA sequencer following PCR using post-labeling method. Thirteen varieties, including 7 varieties recommended in Tochigi prefecture were mutually distinguishable by using 5 types of SSR markers. Additional 3 types of SSR markers enabled the determination of the mixture of different varieties within the 13 varieties in the original production. In addition, the inspection method was changed in order to increase the detection sensitivity of the mixture of different varieties.

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

1)現栃木県農政部経営技術課, 2)元栃木県職員, 3)現栃木県上都賀農業振興事務所

I 緒言

栃木県における水稲は、産出額 714 億円で県内の農業産出額の 24.9%を占め、品目別で 1 位を誇る重要な農産物となっている。本県が育成した水稲品種は、晴れすがた(大谷ら, 1996), なすひかり(伊澤ら, 2005), とちぎの星(山崎ら, 2012), 酒造好適米では、とちぎ酒 14(伊澤ら, 2007), 2018 年に品種登録出願した新品種夢ささら(山崎ら, 2020)がある。本県で作付されている水稲の品種構成割合は、コシヒカリが 61.5%と半分以上を占め、次にあさひの夢(井澤ら, 2001)が 21.8%, 本県育成品種であるとちぎの星が 10.3%, 同じくなすひかりが 4.2%を占めている(令和 2 年度版栃木県農業白書)。また、本県の水稲奨励品種は、コシヒカリ, なすひかり, とちぎの星, あさひの夢, きぬはなもち, トヨハタモチ, そして新品種である夢ささらの 7 品種が選定され、原種生産されている。水稲の原種生産は、優良な種子の安定供給のために行われ、他の品種が混ざらないよう厳格な栽培・調整管理が実施され、本県においては、原種出荷の際、DNA 検査を実施し混種の危険性を排除している。

水稲の DNA マーカーによる品種識別技術は、他の農産物と比較してゲノム解析が進んでいたことにより、早い段階から複数の民間企業による品種識別サービスが行われ、識別キットも販売されている。これらは、偽装表示抑止や混種防止に活用されているが、多くの自治体では、新品種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 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) および Simple Sequence Repeat (SSR) マーカー等による新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)。本県においても、本県と近隣各県の奨励品種を中心とした 20 品種を識別できる RAPD マーカーを開発している(小林・吉田, 2005)。また、とちぎの星育成の際には、新たにポストラベル法(Schuelke, 2000)による 15 品種を識別する SSR マーカーセットを開発し(癸生川ら, 2013), 原種生産における検査に活用している。

SSR マーカーは、共優性マーカーであることから、アレル(対立遺伝子)型により識別でき、PCR および電気泳動のみにより容易に解析ができる(赤木, 2000)。また、新規 SSR マーカーの開発についても、現在では公開されているゲノムシーケンスデータから容易に設計でき、水稲では、McCouch *et al.* (2002)によりゲノム全体に作成された SSR マーカーが公開されている。

一方、SSR マーカーによる品種識別の欠点としては、2 塩基反復モチーフの SSR マーカーを使用した場合、その多くが識別に使用するアレルピーク以外に複数のスタッターピー

ク(本来の検出ピークの前後に生じる副産物)が検出され、識別の際に誤認する恐れがあることである。本県で使用されている癸生川ら(2013)の水稲品種識別用 SSR マーカーセットは、主に 2 塩基反復モチーフで構成されていたため、改良が望まれていた。スタッターピークの低減は、一般的に 4~6 塩基反復モチーフからなる SSR マーカーの開発が有効であることが知られており、水稲においては、識別用にスタッターが少ない 4 塩基反復モチーフからなる SSR マーカーが開発されている(岸根, 2015)。

そこで、新品種夢ささらを含む本県奨励品種の品種識別および原種生産における DNA 検査に用いることを目的に、4 塩基反復モチーフの SSR マーカーを含む識別マーカーを新たに選定し、新規に品種識別用データベースを構築した。また、異品種混入検査についても検出感度向上のためプロトコルを変更したので併せて報告する。

II 試験方法

1. 供試材料

供試品種は、本県奨励 7 品種を含む 13 品種を用いた。奨励品種では、粳品種であるコシヒカリ, なすひかり, とちぎの星, あさひの夢, 糯品種であるきぬはなもち(坂ら, 2009), トヨハタモチ(金ら, 1986), 品種登録申請中の酒造好適米である夢ささらを供試した。それ以外では、粳品種である月の光(香村ら, 1985), 糯品種では、モチミノリ(井辺ら, 2004), ヒメノモチ(平野ら, 1973), ゆめのはたち(根本ら, 1999), 酒造好適米であるとちぎ酒 14, 五百万石(杉谷ら, 1957)を供試した。いずれも五百万石を除く 12 品種は、本県で過去 10 年間に奨励品種として原種生産(月の光は原種見合)されていることから選定した。

供試組織としては、葉身を用いた。夢ささらを除く 12 品種は、本場および原種農場(高根沢本場および栃木分場)の保存種子(原種および原々種)をガラスシャーレーに播種・発芽後、128 セルトレー(培土: ニッピ育苗培土 SP200)に植え替えハイポネックスを適宜施肥しながら第 2 から 3 葉期の葉をサンプリングした。個体数は、各品種 3 個体とした。夢ささらについては、原種ほ場から 2 系統(各系統 10 個体)の葉をサンプリングした。

2. DNA 抽出

DNA 抽出は、DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いた。葉身 100 mg と直径 3 mm のステンレスビーズ 2 粒を 2.0 mL チューブに入れ、液体窒素で冷却したのち破砕機 MM300 (Retsch)を用いて 30 回転/秒で 30 秒間振とうした。液体窒素

による冷却と粉砕を 5 回繰り返し、葉身を粉末状にした。その後、抽出キットに添付のプロトコール通りに DNA 抽出を行った。抽出した DNA は、分光光度計(e-spect, malcom)により濃度測定し、10 ng/μL に調製し PCR に供試した。

3. 供試プライマー

21 組(RM5, RM5711, RM8249, RM10000, RM11499, RM12927, RM15043, RM16604, RM17039, RM18204, RM18950, RM19232, RM21367, RM21859, RM22194, RM24481, RM25036, RM25416, RM26245, RM27695, RM28174) のプライマーを供試した。RM5, RM5711, RM8249 は癸生川ら(2013)が供試したプライマー, RM10000 以降は岸根(2015)が開発し、農研機構により特許出願されたプライマーである(特許 第 5749466 号)。ただし、シーケンサーによって多型検出を行うため、フォワードプライマーは 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がアニーリングされるよう M13Rv 配列(5'- CAGGAAACAGCTATGACC)を 5' 側に付加した。さらに、癸生川ら(2013)が供試したプライマーのリバースプライマーには岸根(2015)のプライマーと同様に pig-tail 配列(5'- GTTCTT)を 5'側に付加した。

4. PCR 方法および増幅産物の検出

PCR 方法および増幅産物の検出は、癸生川ら(2013)の方法に準じて行った。ポリメラーゼは、MyTaq DNA Polymerase (Bioline)に変更した。反応液組成は、1×MyTaq Reaction Buffer, 0.25 U MyTaq DNA Polymerase (Bioline), 0.04 μM フォワードプライマー, 0.16 μM リバースプライマー, 0.08 μM ユニバーサル蛍光標識プライマー(Dye4_M13Rv)とし、10 μL の液量で 10 ng/μL に調製した鋳型 DNA 1 μL を加えた。サーマルサイクラーは、Veriti (Applied Biosystems)を用いた。PCR 産物は 1/10TE で 10 倍希釈し、1 μL の希釈液に 25 μL のホルムアミド, 0.05 μL の DNA Size Standard Kit-400 (Beckman Coulter)を加えた後、DNA シーケンサー GenomeLab GeXP (Beckman Coulter)を用いてキャピラリー電気泳動を行った。電気泳動により検出されたアレルサイズは、コシヒカリを基本サイズ(a)とし、他の供試品種の検出アレルをコシヒカリのアレルサイズと比較してプラスマイナスで表示した。

5. 品種識別および異品種混入判定用 SSR マーカーの選定

13 品種の品種識別用プライマーは、4 塩基反復モチーフの 18 組のプライマーから選定した(RM10000~RM28174)。

異品種混入判定用プライマーは、スタッターピークを考慮し、検査品種に比べて混入品種のアレルサイズが大きいことを条件として選定した。ただし、検査品種よりも混入品種のアレルサイズが小さい場合でも、検査品種と混入品種とのアレルサイズが大きく離れている場合は、スタッターピークの影響を受けにくいため異品種混入判定用マーカーとして用いることとした。

6. 異品種混入の検出と検査方法

ポストラベル法による PCR 増幅と解析機器における混入異品種の検出限界を調査した。供試品種は夢ささらおよび五百万石を用いた。混合割合は、夢ささらに対して五百万石を 1%相当(夢ささら 95 粒:五百万石 1 粒)および 4%相当(夢ささら 23 粒:五百万石 1 粒)とした。DNA 抽出は、癸生川ら(2013)の TPS 法で行った。使用プライマーは RM8249 とし、PCR およびマーカーの検出は II-4 と同様に行った。

III 結果

1. 4 塩基モチーフ SSR マーカーによる栃木県奨励水稲品種の識別プライマーセットの選定

本県奨励品種 7 品種を含む 13 品種を供試し、岸根(2015)が開発した 18 組の SSR プライマーを用いて PCR を行い増幅産物の検出をした結果、RM17039 および RM25416 ではすべての品種で同じアレルを検出し、RM25036 および RM28174 では一部 PCR 増幅が見られない品種があった。供試した 18 組のうち、14 組のプライマーで明瞭な多型が得られた(第 1 表)。13 品種の識別に用いる最小プライマーセットは、RM12927, RM21367, RM21859, RM24481, RM27695 であった(第 1 表)。新品种夢ささらについては、RM12927 (a+4, 295bp) および RM21859 (a-16, 213bp) のプライマーを用いることで、供試した 13 品種間での品種識別が可能であった(第 1 表)。なお、最も多型が認められたプライマーは RM12927 で 263 bp, 283 bp, 287 bp, 291 bp, 295 bp, および 299 bp の 6 アレルが検出された(第 1 表)。

2. 原種生産における異品種混入判定用プライマーセットの選定

原種の異品種混入判定用プライマーの選定においては、検査品種と混入品種間でアレルサイズが大きく離れている必要がある。上記の 5 組の品種識別用プライマー(RM12927, RM21367, RM21859, RM24481, RM27695)における検査品種と混入品種のアレルサイズを比較した結果、なすひかり

第1表 4塩基モチーフ SSR マーカーによる栃木県奨励品種等の検出アレル

マーカー名	RM10000	RM11499	RM12927	RM15043	RM16604	RM17039	RM18204	RM18950	RM19232	RM21367	RM21859	RM22194	RM24481	RM25036	RM25416	RM26245	RM27695	RM28174
SSRモチーフ	TATC	ATAG	ATAC	TCTA	ATAG	ATAC	ATAC	TTAT	ATAC	ATGT	TATC	CATA	ATCT	TATG	ATCT	ATCT	TGTA	TATG
検出アレル数	2	4	6	5	5	1	3	2	2	2	5	2	3	3	2	2	3	2
基本サイズ (bp)	254	350	291	242	265	225	272	232	258	306	229	285	273	235	266	269	245	227
栃木コンヒカリ (福井, 未登録)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a
木なすひかり (栃木, 2007)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a+8	a	a	a-24	a	a	a+4	a	a
県とちぎの星 (栃木, 2015)	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a+8	a	a	a-24	a	a	a+4	a+12	a
奨励あさひの夢 (愛知, 2000)	a	a	a+4	a	a	a	a	a	a	a	a+40	a	a	a-4	a	a+4	a	a+2
励きぬはなもち (愛知, 2011)	a+4	a	a+8	a-4	a	a	a	a	a	a+8	a+40	a	a	-	a	a	a	-
品トヨハタモチ (茨城, 1986)	a+4	a+16	a-4	a-12	a+4	a	a+4	a-4	a	a	a+16	a+16	a	-	a	a+4	a+8	-
種夢ささら (栃木, 出願公表)	a	a	a+4	a	a	a	a	a	a	a+8	a	a	a	a	a	a+4	a	a+2
月の光 (愛知, 1986)	a+4	a	a-8	a	a	a	a	a	a	a+8	a+40	a	a	a	a	a	a	a+2
モチミノリ (農研, 1991)	a+4	a+4	a-8	a-4	a	a	a-4	a	a	a+8	a+40	a	a-24	a	a	a+4	a	a
ヒメノモチ (東北, 未登録)	a+4	a	a-8	a-4	a-8	a	a-4	a	a-4	a	a	a	a-24	a+4	a	a	a+12	a
ゆめのはなもち (茨城, 2000)	a+4	a+20	a-28	a-22	a+8	a	a+4	a-4	a	a	a+22	a+16	a-4	-	a	a+4	a+12	-
とちぎ酒14 (栃木, 2007)	a+4	a+4	a	a-4	a-8	a	a	a	a	a	a+40	a	a	a	a	a+4	a+12	a
五百万石 (新潟, 未登録)	a	a+4	a-8	a+4	a-4	a	a-4	a	a-4	a+8	a+12	a	a-24	a	a	a+4	a	a
備考			◎			X				◎			◎	X	X		◎	X

注1. 供試品種名横の括弧内は、育成者と種苗法登録年を示す。ただし、東北は東北農業試験場 (現 農研機構東北農業研究センター) , 農研は農業研究センター (現 農研機構)を示す。

注2. 一はPCR増幅しなかったものを示す。

注3. 備考欄の◎は13品種の識別に用いる最小プライマーセットを示す。×は多型が得られないまたはPCR増幅しない品種があるため、品種識別に用いることはできないものを示す。

における五百万石, とちぎの星におけるヒメノモチ, きぬはなもちにおけるあさひの夢が混入検査不可 (-8bp 以内) であった(第 1 表). 多型が認められた 14 組から上記の 5 組を除いたプライマーセットおよび癸生川ら(2013)のプライマーセットの中から, 効率的に異品種混入判定に用いることができるものを検討した. その結果, 癸生川ら(2013)が設計し, 増幅が安定していた RM5, RM5711, RM8249 を異品種混入判定用プライマーとして選定した. 合計 8 組のプライマーを用いることにより, 供試した 13 品種内での異品種混入判定が可能となった(第 1 表および第 2 表).

新品種である夢ささらについては, 原種生産における異品種混入判定のための最小プライマーセットは, RM8249, RM21859, RM27695 であった(第 2 表). RM8249 では夢ささらは 181 bp(a-16)を示し, 197 bp(a)を示すコシヒカリ, なすひかり, とちぎの星, きぬはなもち, ヒメノモチ, とちぎ酒 14, 五百万石との混入判定が可能であった(第 2 表). RM21859 では夢ささらは 229 bp(a)を示し, 269 bp(a+40)を示すあさひの夢, きぬはなもち, 月の光, モチミノリ, とちぎ酒 14, 245 bp(a+16)を示すトヨハタモチとの識別が可能であった(第 2 表). RM27695 では夢ささらは 245 bp(a)を示し, 257 bp(a+12)を示すとちぎの星, ヒメノモチ, ゆめのはたもち, とちぎ酒 14, 253 bp(a+8)を示すトヨハタモチとの識別が可能であった(第 2 表).

第 3 表に各検査品種における異品種混入判定用プライマー組合せを示した. 異品種混入検査に必要なプライマー組合せは, 各検査品種によって異なっており, トヨハタモチ

(RM21859)は 1 組, モチミノリ(RM21859, RM24481), ゆめのはたもち(RM5711, RM8249)および五百万石(RM5711, RM27695)は 2 組, なすひかり(RM5, RM24481, RM27695), とちぎの星(RM5, RM24481, RM27695), きぬはなもち(RM8249, RM21859, RM27695), 夢ささら(RM8249, RM21859, RM27695), ヒメノモチ(RM5711, RM8249, RM27695) およびとちぎ酒 14(RM21859, RM24481, RM27695) は 3 組, コシヒカリ(RM8249, RM21859, RM24481, RM27695), あさひの夢(RM8249, RM21367, RM21859, RM24481), 月の光(RM8249, RM12927, RM21859, RM24481)は 4 組必要であった.

3. 異品種混入の検出と検査方法

本供試プライマーおよび解析機器における異品種混入検出限界を調査した. 夢ささらの DNA に, 同じく酒造好適米である五百万石を 1%と 4%の割合で混入させたところ, 混入の割合が 1%よりも 4%の方が五百万石を示すアレルを明確に確認できた(第 1 図).

本結果をもとに新たに原種における異品種混入検査方法を変更した(第 2 図). 最初に, 定性検査は, 水稻研究室において目視で確認された各サンプルから 96 粒を無作為に選抜き, 2 mL96 ディープウェルプレート(AXYGEN)(1 ウェルに 3 mm ステンレスビーズ 1 個)に 1 ウェルに 1 粒ずつ加えた. TPS buffer(1M KCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0)50 μ L を添加後, 96 ディープウェルプレート用マツ

第 2 表 SSR マーカーによる水稲 13 品種の多型検出結果

マーカー名	RM5	RM5711	RM8249	RM12927	RM21367	RM21859	RM24481	RM27695
SSRモチーフ	GA	AAT	GA	ATAC	ATGT	TATC	ATCT	TGTA
検出アレル数	3	5	2	6	2	4	3	3
基本サイズ (bp)	133	176	197	291	306	229	273	245
供試品種のアレルサイズ								
コシヒカリ	a	a	a	a	a	a	a	a
なすひかり	a	a	a	a	a+8	a	a-24	a
とちぎの星	a	a-6	a	a	a+8	a	a-24	a+12
あさひの夢	a	a-6	a-16	a+4	a	a+40	a	a
きぬはなもち	a	a-6	a	a+8	a+8	a+40	a	a
トヨハタモチ	a+11	a-9	a-16	a-4	a	a+16	a	a+8
夢ささら	a+6	a-6	a-16	a+4	a+8	a	a	a
月の光	a	a-6	a-16	a-8	a+8	a+40	a	a
モチミノリ	a+6	a-6	a-16	a-8	a+8	a+40	a-24	a
ヒメノモチ	a+6	a-12	a	a-8	a	a	a-24	a+12
ゆめのはたもち	a+6	a-15	a-16	a-28	a	a+4	a-4	a+12
とちぎ酒14	a+6	a-6	a	a	a	a+40	a	a+12
五百万石	a+6	a-12	a	a-8	a+8	a+4	a-24	a

注 1. RM12927, RM21367, RM21859, RM24481, RM27695 は岸根 (2015) が開発したマーカー.

注 2. 供試品種のアレルサイズは, コシヒカリのアレルサイズを基本 (a) としプラスマイナスで示した.

第 3 表 栃木県水稻原種品種識別用プライマー組合せ

	他 12 品種との混種識別に用いるプライマー
コシヒカリ	RM8249 ・ RM21859 ・ RM24481 ・ RM27695
なすひかり	RM5 ・ RM24481 ・ RM27695
とちぎの星	RM5 ・ RM24481 ・ RM27695
あさひの夢	RM8249 ・ RM21367 ・ RM21859 ・ RM24481
きぬはなもち	RM8249 ・ RM21859 ・ RM27695
トヨハタモチ	RM21859
夢ささら	RM8249 ・ RM21859 ・ RM27695
月の光	RM8249 ・ RM12927 ・ RM21859 ・ RM24481
モチミノリ	RM21859 ・ RM24481
ヒメノモチ	RM5711 ・ RM8249 ・ RM27695
ゆめのはなもち	RM5711 ・ RM8249
とちぎ酒 1 4	RM21859 ・ RM24481 ・ RM27695
五百万石	RM5711 ・ RM27695

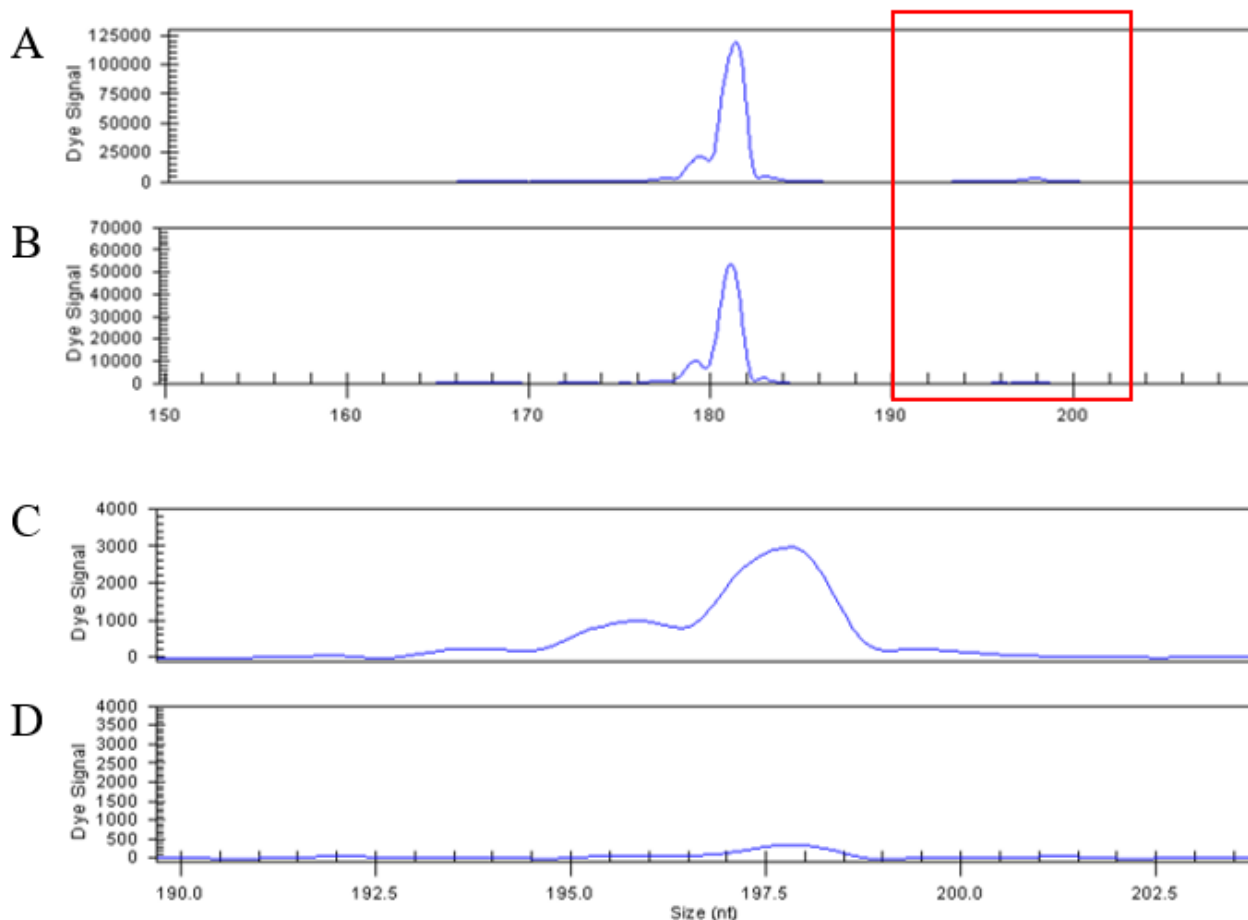
注. RM12927, RM21367, RM21859, RM24481, RM27695 は岸根 (2015) が開発したマーカー。

(BM6018D)で蓋をし, MM300(Retsch)により粉碎した(25S・90 秒×2 回). TPS buffer 450 μL を添加後, ボルテックスにより混合し, 4800 rpm で 15 分間遠心分離した. 1 粒あたり上清 40 μL をリザーバーに移し, 24 粒分 合計 960 μL をピペッタ

ーで混合後, 2 mL チューブに移し, 等量のイソプロパノールで転倒混和した(96 粒:24 粒×4 本). 15000 rpm で 10 分間遠心分離後, 上清を除去し, エバポレーターで 15 分間乾燥させ, TE-RNase(20 μg/mL)500 μL 加え, 37°C で 30 分間インキュベートした. 以降の PCR および増幅産物の検出は II-4, 供試プライマーは第 3 表に示した.

24 バルク法で混入品種アレル検出の疑いがあった場合, 1 粒ごとのマーカー検出を行うこととする. 混入品種アレル検出の疑いがあった 24 粒の抽出液を 1 ウェルあたり 50 μL ずつ PCR プレートにそれぞれ移し, 等量のイソプロパノールを加えボルテックスにより混和する. 4800 rpm で 15 分遠心分離し, エバポレーターで 15 分乾燥させ, TE-RNase(20 μg/mL)20 μL 加え, DNA を溶解後, 再検定を行う.

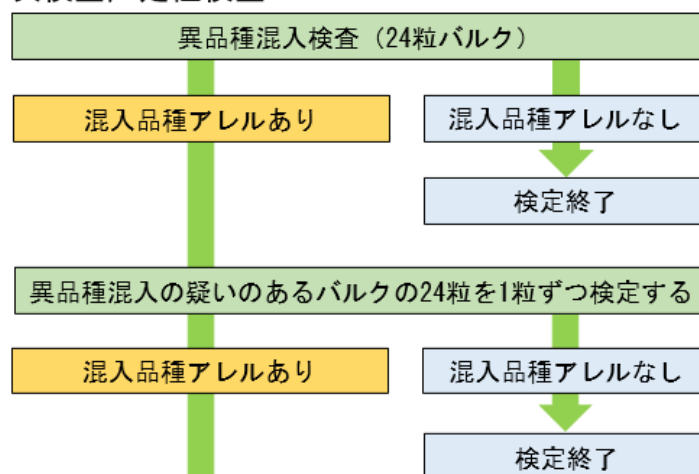
混入品種アレルが確認された場合は, さらに定量検査に移行し, 無作為に新たに 192 粒を抽出し, 1 粒ごとにアレル型確認を行い, 混入割合を算出することとした.



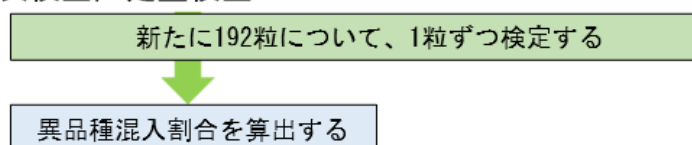
第 1 図 「夢ささら」に「五百万石」を混入させたときの検出例

A; 4%混入の図, B; 1%混入の図, C; 4%混入時の五百万石を示すアレルピークの拡大図, D; 1%混入時の五百万石を示すアレルピークの拡大図. C, DはA, Bの 197 bp 付近を拡大した図である. 4%混入の図(A, C)では, 五百万石を示す 197 bp 付近のアレルピークが 3000 程度であるのに対し, 1%混入の図(B, D)では, 500 以下となっている.

〈1次検査〉 定性検査



〈2次検査〉 定量検査



第2図 改良した24バルク法による異品種混入検査の流れ

V 考察

栃木県では、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(小林・吉田, 2005)や、SSR マーカーを用いて識別する技術(癸生川ら, 2013)を開発している。しかし、2018年に新品種である夢ささら(山崎ら, 2020)が出願公表されたことから、再度品種識別マーカーを選定する必要性が高まってきた。また、癸生川ら(2013)が開発したSSR マーカーは、2~3塩基反復モチーフであり、スタッターピークが発生することがあるため、混入判定の観点から、岸根(2015)の4塩基反復モチーフのSSR マーカーの有効性を確認した。

本県奨励水稲7品種を含む供試13品種は、岸根(2015)の4塩基反復モチーフのSSR マーカーのうち5マーカー(RM12927, RM21367, RM21859, RM24481, RM27695)で品種識別が可能であった。岸根(2015)は、水稲主要48品種のアレル型を決定しており、本試験のコシヒカリ、あさひの夢、なすひかり、ヒメノモチ、五百万石の5品種についてはすでにアレル型が決定していたが、新たにその他8品種(とちぎの星、きぬはなもち、トヨハタモチ、月の光、モチミノリ、ゆめのはたもち、とちぎ酒14、夢ささら)についてアレル型を決定することができた。このことから、今回供試した4塩基反復モチーフSSR マーカーの汎用性は高いと考えられる。

一方、異品種混入判定用マーカーについては、供試した18組の4塩基反復モチーフのSSRプライマーだけでは選定

できなかった。一般的に反復モチーフ数が大きくなると多型が得られにくいことが知られていることから、大きなアレルサイズの差が得られなかったと考えられる。今後、水稲においては、ゲノム全体に設定されたSSR マーカーが公開されていることから(McCouch *et al.*, 2002)、それらの情報を用いてさらに4塩基反復モチーフのSSRプライマーを選定し、スクリーニングすることにより解消できると考えられる。

本県の酒造用玄米の生産量は1315トンであり、品種別生産量および構成割合は、山田錦(池上ら, 2005):770トン(58.5%)、五百万石:320トン(24.3%)、夢ささら:107トン(8.2%)、ひとごころ(近藤ら, 1999):72トン(5.5%)、とちぎ酒14:27トン(2.1%)、美山錦:19トン(1.4%)である(平成30年度米の農産物検査, 農林水産省)。

今回、栃木県における奨励品種の品種識別および原種生産における異品種混入判定マーカーの開発を目的としたため、本県で生産されている酒造好適米の品種識別についてはとちぎ酒14、五百万石および新品種である夢ささらのみ調査した。

生産量の上位を占める山田錦および美山錦のアレル型については、岸根(2015)の水稲主要48品種のアレル型データで既に報告されている。そのため、岸根(2015)の山田錦および美山錦のアレル型と本試験における夢ささらのアレル型を比較した結果、山田錦に関しては3マーカー(RM12927, RM21367, RM27695)、美山錦に関しては4マーカー(RM12927, RM21367, RM24481, RM27695)で識別が可能

であり、特に RM12927 については他の 12 品種に関してもアレル型が異なっていた。今後、本県の検出手法により山田錦および美山錦のアレル型を決定し、品種識別データベースに加える必要があると考えられる。一方、ひとつごちに関しては、4 塩基反復 SSR マーカーのアレル型の報告はない。また、夢さらの交配親は、山田錦×T 酒 25(愛知 93 号(あさひの夢×山田錦)×山田錦)F5×ひとつごち)であることから、品種識別においてひとつごちのアレル型を決定することは重要であると考えられる。なお、RM21859 における夢さらのアレル型(a-16, 213bp)は、あさひの夢のアレル型(a+40, 269bp)および岸根(2015)の山田錦のアレル型(a+4, 233bp)と異なることから、ひとつごち由来と推定される。

品種の偽装や異品種混入を判定する目的で DNA 鑑定を行う場合、正確性と緊急性が求められる。簡便な DNA 抽出の方法として、玄米と葉身から TPS 法によって約 1 時間で抽出でき、抽出した DNA は PCR に利用可能な品質であったことから、識別のための標準的な DNA 抽出法とされている(江嶋ら, 2007; 癸生川ら, 2013)。そのため、今回の原種検査方法においても採用している。また、異品種の検査を行う際は、混入品種の割合が 4%相当となる 24 バルク法を採用することにより混入品種のピーク判断が容易となった。今後、原種生産における DNA 検査においては、今回使用した 4 塩基反復モチーフ SSR マーカーと本検出方法により、効率的に検査が行えると考えられる。

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長木村守氏、栃木県農業試験場原種農場長(現那須農業振興事務所経営普及部長)福島敏和氏に厚くお礼申し上げます。4 塩基反復モチーフの SSR マーカーについて御教授していただいた国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 食品分析研究領域 信頼性評価ユニット 岸根雅宏博士に深く感謝申し上げます。原種農場高根沢農場および栃木農場の職員の皆様には、快くサンプリングにご協力していただいた。また、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。

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.
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.
平野哲也・進藤幸悦・赤間芳洋・内山田博士・松本顕 (1973) 水稲新品種「ヒメノモチ」の育成について. 東北農試研報 45:17-31.
井辺時雄・赤間芳洋・中根晃・羽田丈夫・伊勢一男・安東郁男・内山田博士・中川宣興・古舘宏・堀末登・能登正司 (2004) 水稲糯品種「モチミノリ」. 作物研報 5:19-33.
池上勝・三好昭宏・世古晴美・渋谷幾夫・西田清数 (2005) 酒米品種「山田錦」の育成経過と母本品種「山田穂」, 「短稈渡船」の来歴. 兵庫農技総研報(農業) 53:37-50.
井澤敏彦・朱宮昭男・工藤悟・加藤恭宏・藤井潔・坂紀邦・遠山孝通・伊藤俊雄・杉浦直樹・小島元・中嶋泰則 (2001) 水稲新品種「あさひの夢」の育成. 愛知農総試研報 33:1-10.
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.
伊澤由行・山口正篤・小林俊一・倉井耕一・五月女恭子・出口美里・藤井真弓・大谷和彦・大久保堯司・池田二郎 (2007) とちぎ酒 14 品種登録番号 15391.
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. 栃木農試研報 71:55-61.
岸根雅宏 (2015) イネまたはそれに由来する組織,あるいはそれらの加工品の品種鑑定法. 特許第 5749466 号.
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.
近藤武晴・久保田基成・手塚光明・新井利直・前島秀和 (1999) 水稲新品種「ひとつごち」の育成. 北陸作報 34:10-11.
金忠男・奥津喜章・須賀立夫・平沢秀雄・根本博雄 (1986) 陸稲新品種「トヨハタモチ」の育成について. 茨城農試研報 26:1-16.
香村敏郎・朱宮昭男・釈一郎・高松美智則・伊藤俊雄・工藤悟・加藤恭宏・坂紀邦 (1985) イネ縞葉枯病抵抗性の新品種「月の光」の育成. 愛知農総試研報 17:1-16.
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稻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.
- 根本博・平山正賢・岡本和之・宮本勝・須賀立夫 (1999) 陸稲新品種「ゆめのはたもち」の育成. 茨城農総生工研報 2:57-74.
- 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.
- 大谷和彦・小島隆・佐藤恭子・大久保堯司・伊藤浩・五月女敏範・古田土通・藤井敏男・栃木喜八郎・小林俊一 (1996) 水稻新品種「晴れすがた」の育成. 栃木農試研報 44:1-14.
- 坂紀邦・寺島竹彦・工藤悟・加藤恭宏・大竹敏也・杉浦和彦・遠藤征馬・城田雅毅・林 元樹・中嶋泰則・伊藤幸司・井上正勝・加藤博美 (2009) 白度が高く粘りの強い餅ができる水稻糯新品種「中部糯 110 号」. 愛知農総試研報 41:165-175.
- Schuelke, M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18:233-234.
- 杉谷文之・国武正彦・白倉治一・山口政栄・樽林良衛 (1957) 酒米新品種「五百万石」. 新潟農試研報 8:9-14.
- 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) 水稻新品種「とちぎの星」の育成. 栃木農試研報 68:1-13.
- 山崎周一郎・糸川晃伸・伊澤由行・家中容子・永島宏慧・湯澤正明・若林(星)一好・青沼伸一・菅谷和音・篠崎敦・木村守・白間香里・三好真弓・竹内菜央子・秋山俊明・寺村好司・吉田彩花 (2020) 水稻新品種「夢ささら」の育成. 栃木農試研報 81:1-22.
- 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.

