

<<短 報>>

*mPing*挿入多型を利用した「むさしの27号」の判別と

異品種混入検出手法の開発

小山浩由*・宗方 淳**

Identification of rice cultivar ‘Musashino 27’ using *mPing* insertion polymorphisms and Development of methods to detect contamination of different cultivars.

Hiroyoshi KOYAMA, Jun MUNAKATA

埼玉県では高温耐性水稻新品種として「むさしの27号」を育成しており（大岡ら，2020），本品種は2022年に品種登録されている．登録品種の利用には育成者権者の許諾が必要であるが，これを守らず無断で栽培されていた例が報告されている（吉野ら，2008）．そのため，品種育成に併せて育成者の権利を保護する必要性も高まっている．育成者権を主張するためには，新品種と既存の品種を科学的根拠に基づいて正確に区別する技術が求められる．品種判別技術の存在は，権利の主張のみならず，不正利用を未然に防ぐ抑止力としても機能する．

埼玉県では主要農作物種子法の廃止に伴い「埼玉県主要農作物種子条例」を2018年に制定しており，継続して奨励品種の優良種子を生産，供給している．種子生産では一般的に原品種と形態的，生態的差異のある株を除去するなど圃場管理によって種子の純度を高く維持している．一方で，混入した異品種や交雑種子の形態的差異が小さい場合などは判断が非常に困難であり，形態的要素以外を指標とした確認のための技術開発が重要となる．また，種子中における異品種の混入程度を明らかにできれば，問題となった時期や原因の絞り込みが可能となる．

育成品種の判別および純度を確認する技術とし

て，DNA マーカーを利用した手法がある．民間企業による委託分析や市販のキットだけでは対応できていない新品種等の判別について，各自治体では独自にDNA マーカーセットを開発，選定しており，一部では混入試料中の異品種検出についても検討している（橋本ら，2004，江嶋ら，2007，小原ら，2007，癸生川ら，2013，渡邊ら，2015，両角ら，2018，橋口・藤川，2021）．同様に新品種である「むさしの27号」についても対応した手法がないことから，品種を判別するDNA マーカーセットおよび純度の確認手法を開発する必要がある．

前述の報告を含め単純反復配列（SSR）や一塩基多型（SNP），挿入欠失（InDel）など様々な遺伝的多型が水稻のDNA マーカーとして利用されている．非自立性トランスポゾンである *mPing* は全長430bpと比較的短く，その挿入の有無をPCRとアガロースゲル電気泳動だけで容易に判定できるといった利点がある．また，岸根・奥西（2014）は *mPing* の挿入多型について，日本の主要品種の近交係数の高い品種間でも多型が得られることから，有用なDNA マーカーとして利用可能であることを示唆している．

そこで本試験では，本県育成品種である「むさしの27号」と近県の主要品種を判別可能な

* 遺伝子情報活用担当 ** 遺伝子情報活用担当（現加須農林振興センター）

mPing 挿入多型判別マーカーセットの選定および異品種の混入検出手法の開発を行った。

本試験の実施にあたり、プライマーおよび参照配列の情報提供を頂いた農研機構の岸根雅宏氏、試験で使用した試料を分譲いただいた愛知県農業総合試験場、国立大学法人宇都宮大学、群馬県農業技術センター、有限会社但木米店、千葉県農林総合研究センター、栃木県農業試験場、農研機構旧次世代作物開発研究センター、西日本農業研究センター、三井化学アグロ株式会社、宮城県古川試験場に深謝の意を表す。

材料および方法

1 「むさしの 27 号」品種判別マーカーの選定

(1) 供試材料

試験には埼玉県育成品種である「むさしの 27 号」, 「彩のきずな」, 「彩のかがやき」, 「彩のみどり」, 「彩のほほえみ」, 「さけ武蔵」, 「へいせいもち」, 「むさしの 26 号」, 「むさしの 29 号」, 「むさしの 30 号」を、他県や民間育成品種である「あかね空」, 「あさひの夢」, 「日本晴」, 「朝の光」, 「ゆめまつり」, 「あきたこまち」, 「ゆうだい 21」, 「ゴロピカリ」, 「新生夢ごこち」, 「ふさおとめ」, 「ちば 28 号」, 「なすのひかり」, 「とちぎの星」, 「ミルキークイーン」, 「キヌヒカリ」, 「峰の雪もち」, 「あきだわら」, 「いなほっこり」, 「さとじまん」, 「コシヒカリ」, 「みつひかり 2003」, 「みつひかり 2005」, 「ひとめぼれ」の合計 33 種類の種子を供試した。

(2) *mPing* 挿入多型の判別

玄米に調整した種子をミルサー (IFM-800 : 岩谷産業) で粉砕し、各品種の玄米粉体から GM Quiker2 (ニッポンジーン) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は 10ng/μL に調整し、PCR に用いた。

mPing 挿入多型の判別マーカーとして岸根・奥西 (2014) のプライマーセットを供試した。反応液組成は、10ng/μL DNA 溶液 2.0μL, Nuclease Free Water 2.8μL, 10μM フォワードプライマー 0.1μL, 10μM リバースプライマー 0.1μL, GoTaq Green Master Mix (プロメガ) 5.0μL の計 10μL とした。反応は 95°C 2 分の後、

95°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分を 40 サイクル繰り返し、72°C 5 分の最終伸長の条件で実施した。各マーカーにおける遺伝子型は、Atlas ClearSight DNA Stain (Bio Atlas) を含む 2% アガロースゲル電気泳動による PCR 産物のバンドパターンから判定した。判定は岸根・奥西 (2014) に従い、100-500bp の増幅産物が得られた場合を「挿入なし」、500-900bp の増幅産物が得られた場合を「挿入あり」とした。

2 異品種混入の検出技術の開発

(1) 供試材料

試験には 1 で「むさしの 27 号」の判別マーカーとして選抜した No.101 と No.157 において *mPing* 挿入がある「むさしの 27 号」と、*mPing* 挿入がない「彩のほほえみ」を供試した。

(2) 玄米粉体混合試料を用いた検出条件の比較

「むさしの 27 号」に対し「彩のほほえみ」の玄米粉体を重量比 1-20% の割合で混合し、混合粉体から GM Quiker2 を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は 10ng/μL に調整したものを PCR に供試した。プライマーセットは品種判別マーカーとして選定した *mPing* 挿入多型判別マーカーの No.101 と No.157 を供試した。前述と同じ PCR 条件で実施した検出を「条件変更前」とした。また、検出感度の向上のため No.157 のフォワードプライマーを従来配列より 205bp 上流に再設計した (5'-ACATGGGTCTA-GTGACAAATCCT-3')。PCR 条件について、No.101 の反応は 95°C 2 分の後、95°C 30 秒, 55°C 30 秒, 72°C 20 秒を 40 サイクル繰り返し、72°C 5 分の最終伸長の条件に変更した。No.157 は 95°C 2 分の後、95°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 20 秒を 40 サイクル繰り返し、72°C 5 分の最終伸長の条件に変更した。上記の条件で実施した検出を「条件変更後」とした。PCR 産物の検出はアガロースゲル電気泳動により実施した。

(3) 玄米粒および DNA 混合試料を用いた検出限界の検討

「条件変更後」の検出限界を検証するため、玄米粒および抽出 DNA の混合試料を用いた検出を実施した。

「むさしの 27 号」玄米に「彩のほほえみ」玄

米を加え、20-400 粒中に 1 粒異品種が混合した試料を作製した。混合試料を粉碎し、玄米粉体から GM Quiker2 を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA は 10ng/μL に調整したものを PCR に供試した。また、10ng/μL に調製した「むさしの 27 号」と「彩のほほえみ」の DNA を 0.0625-2.0% の割合で混合した試料を作製し、同様に PCR に供試した。

供試プライマーセット、PCR 条件および PCR 産物の検出は、前述の変更した方法で実施した。3 回の反復すべてにおいて「彩のほほえみ」型の PCR 産物が検出される最低濃度を検出限界濃度とした。

3 異品種混入の定量的検出技術の開発

(1) 供試材料

試験には「むさしの 27 号」と「彩のほほえみ」を供試した。

(2) 定量 PCR による検出手法の比較

試験ではインターカレーション方式と蛍光プローブ方式の 2 手法を検討した。

10ng/μL に調製した「むさしの 27 号」と「彩のほほえみ」の DNA を 0.0625-10% の割合で混合した試料を作製し、定量 PCR に供試した。供試プライマーセットは No.101 および 2-(2) で変更した No.157 を供試した。

インターカレーション方式の反応液組成は、10ng/μL DNA 溶液 2.0μL, Nuclease Free Water 2.78μL, 10μM フォワードプライマー 0.1μL, 10μM リバースプライマー 0.1μL, 50× ROX reference dye 0.02μL, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 5.0μL の計 10μL とした。反応は 95°C 2 分の後、95°C 2 分、55°C 30 秒、72°C 1 分を 40 サイクル繰返す条件で実施した。反応後に融解曲線解析を行い、解析により得られる融解曲線のグラフから「彩のほほえみ」PCR 産物ピークに近いピークの面積を求め、供試 DNA 濃度との比較を行った。

蛍光プローブ方式の反応液組成は、10ng/μL DNA 溶液 2.0μL, Nuclease Free Water 2.28μL, 10μM フォワードプライマー 0.1μL, 10μM リバースプライマー 0.1μL, 3μM 蛍光プローブ 0.5 μL, 50× ROX reference dye 0.02μL, THUN-

DERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO) 5.0μL の計 10μL とした。蛍光プローブは *mPing* 挿入のない配列を対象に *mPing* の認識配列を挟む位置に設計した (図 1 ; No.101: 5'-FAM-CAGCGATTAGTTGCTTCTTAGTTAGTACTT-BHQ1-3', No.157: 5'-FAM-TGTGATTCATAC-ATTGTGATTAGACTAAG-BHQ1-3')。No.101 の反応は 95°C 2 分の後、95°C 30 秒、60°C 1 分を 40 サイクル繰返す条件で実施した。No.157 では 95°C 2 分の後、95°C 30 秒、55°C 1 分を 40 サイクル繰返す条件で実施した。増幅曲線解析により得られた Ct 値と供試 DNA 濃度との比較を行った。インターカレーション方式、蛍光プローブ方式ともに検出および解析には Stratagene Mx3000P (Agilent Tech.) を用いた。

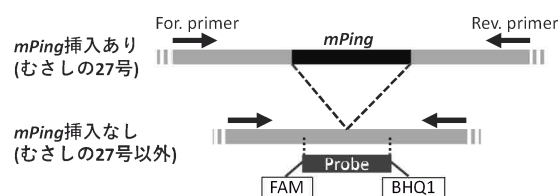


図 1 蛍光プローブ設計の概略図

mPing 挿入のある配列 (本試験では「むさしの 27 号」) の増幅を検出しないよう、*mPing* の認識配列を挟む位置にプローブを設計した。

結果

1 「むさしの 27 号」品種判別マーカーの選定

各マーカーにおける *mPing* 挿入多型を判定した結果、供試した品種や系統 33 品種中、「むさしの 27 号」のみで「挿入あり」または「挿入なし」の多型を示すマーカーは確認されなかった (データ省略)。判定したマーカーのうち No.101 と No.157 が「むさしの 27 号」とその他の供試品種や系統で異なる多型パターンを示す最小の組み合わせであった。なお、両マーカーとも「挿入あり」を示したのは「むさしの 27 号」のみであり、それ以外の品種や系統では両方またはいずれかのマーカーで「挿入なし」であった (表 1, 図 2)。

2 異品種混入検出手法の検討

玄米粉体混合試料を用いた検出の結果、「条件

表1 供試品種における No.101 および No.157 の *mPing* 挿入多型

No.	品種	No.101	No.157
1	むさしの 27 号	L	L
2	彩のきずな	L	S
3	コシヒカリ	L	S
4	ミルククイーン	L	S
5	あかね空	L	S
6	あさひの夢	L	S
7	ゆうだい 21	L	S
8	ふさおとめ	L	S
9	ちば 28 号	L	S
10	むさしの 29 号	S	L
11	むさしの 30 号	S	L
12	彩のかがやき	S	L
13	彩のみのり	S	L
14	むさしの 26 号	S	S
15	キヌヒカリ	S	S
16	峰の雪もち	S	S
17	彩のほほえみ	S	S
18	日本晴	S	S
19	さけ武蔵	S	S
20	へいせいもち	S	S
21	あきたこまち	S	S
22	朝の光	S	S
23	新生夢ごち	S	S
24	あきだわら	S	S
25	みつひかり 2003	S	S
26	みつひかり 2005	S	S
27	いなほっこり	S	S
28	ゆめまつり	S	S
29	ゴロビカリ	S	S
30	なすひかり	S	S
31	とちぎの星	S	S
32	ひとめぼれ	S	S
33	さとじまん	S	S

表中のアルファベットは *mPing* 挿入の有無を表す。
(L: 挿入あり, S: 挿入なし)

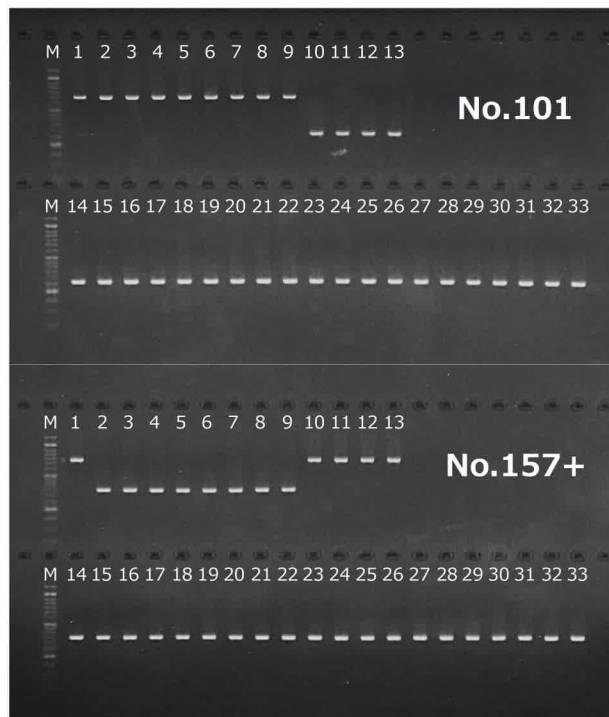


図2 *mPing* 挿入多型判別マーカー No.101 および No.157 における 33 品種・系統の多型

1-33: 水稲品種・系統試料 (図中の数字と品種・系統は表1に対応), M: DNA ラダーマーカー
No.157+は再設計した No.157 フォワードプライマーを用いた結果を表す。

変更前」の No.101 では 1%以上の混合試料において「彩のほほえみ」由来の PCR 産物が検出された。No.157 では 3%以上の混合試料において検出されたが、1%の混合試料では検出されなかった (図3)。

No.157 のプライマー再設計は増幅産物長の増加に伴い 1 分子当たりに入り込む蛍光物質の量を増やし、蛍光強度を増加させることを目的として行った。また PCR 反応における伸長反応時間の短縮は、増幅産物長の長い「むさしの 27 号」由来の PCR 産物の増幅を抑制し、「彩のほほえみ」由来の PCR 産物の増幅を相対的に促進する

ことを目的として行った。新規プライマーセットおよび反応条件による「条件変更後」の No.101 では変更前と同様に 1%以上の混合試料において「彩のほほえみ」由来の PCR 産物が検出された (図3)。特に 1-3%の混合試料においては変更前より混入された「彩のほほえみ」由来のシグナルが強く検出された。また、再設計した No.157 のフォワードプライマーを使用した結果、「むさしの 27 号」、「彩のほほえみ」とともに約 200bp の PCR 増幅産物長の増加が確認された。「条件変更後」の No.157 では 1%以上の混合試料から「彩のほほえみ」由来の PCR 産物が検出された。

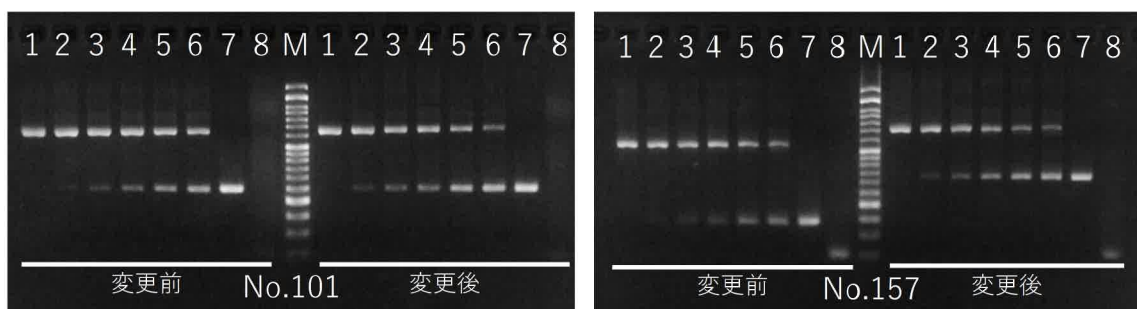


図3 玄米粉体混合試料における PCR 条件の変更による検出感度の比較

1:「むさしの 27号」, 2-6:混合試料* (2:1%, 3:3%, 4:5%, 5:10%, 6:20%),
7:「彩のほほえみ」, 8:ブランク, M:DNA ラダーマーカー
*:百分率は「むさしの 27号」中の「彩のほほえみ」の混入割合を示す.

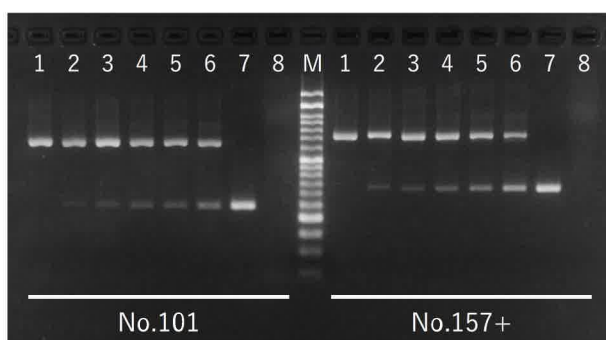


図4 玄米粒混合試料における No.101 および No.157+の電気泳動像

1:「むさしの 27号」, 2-6:混合試料* (2:1/400粒, 3:1/200粒, 4:1/100粒, 5:1/50粒, 6:1/20粒), 7:「彩のほほえみ」, 8:ブランク, M:DNA ラダーマーカー
*:1/n粒はn粒中に1粒「彩のほほえみ」が含まれることを示す.

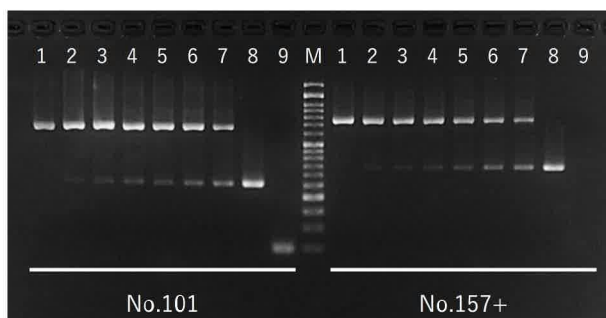


図5 DNA 混合試料における No.101 および No.157+の電気泳動像

1:「むさしの 27号」, 2-7:混合試料* (2:0.00625%, 3:0.125%, 4:0.25%, 5:0.5%, 6:1%, 7:2%), 8:「彩のほほえみ」, 9:ブランク, M:DNA ラダーマーカー
*:百分率は「むさしの 27号」中の「彩のほほえみ」の混入割合を示す.

変更した条件で玄米粒混合試料を用いた結果, No.101, No.157 とともにすべての混合試料において「彩のほほえみ」由来の PCR 産物が 3 反復中全てで検出された (図 4).

また, DNA 混合試料を用いた結果, No.101, No.157 とともに 0.125%以上の混合試料において「彩のほほえみ」由来の PCR 産物が 3 反復中全てで検出された (図 5). 一方, 0.0625%の混合試料では, No.101 が 3 反復中 2 回, No.157 が 3 反復中全てで検出された. よって, 本検出方法における No.101 の検出限界は 0.125%, No.157 の検出限界は 0.0625%以下であった.

3 定量 PCR による検出手法の比較

インターカレーション方式の融解曲線解析により, No.101, No.157 とともに「彩のほほえみ」で単一のピークが, 「むさしの 27号」と DNA 混合試料で 2 つのピークが確認された (図 6). No.101 のピークにおける融解温度は「彩のほほえみ」で 80.6°C, 「むさしの 27号」と DNA 混合試料で 82.4°Cと 87.8°Cであった. No.157 のピークにおける融解温度は「彩のほほえみ」で 83.7°C, 「むさしの 27号」と DNA 混合試料で 84.4°Cと 88.0°Cであった. DNA 混合試料の「彩のほほえみ」に近いピーク面積と混合 DNA 濃度を比較した結果, 回帰式の R_2 値は No.101 が 0.054, No.157 が 0.778 であった (図 7). 一方, 蛍光プローブ方式の増幅曲線解析で得られた Ct

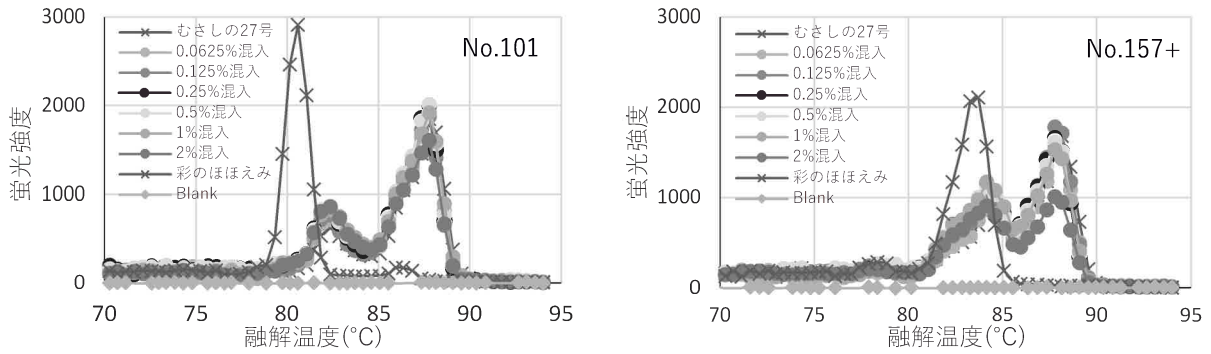


図 6 インターカレーション方式における融解曲線解析

図中の百分率は「むさしの 27 号」中の「彩のほほえみ」の混入割合を示す。

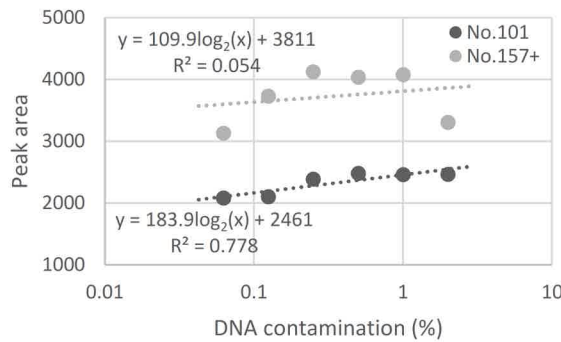


図 7 DNA 濃度と融解曲線ピーク面積の比較

横軸は対数軸で示す。

横軸の百分率は「むさしの 27 号」中の「彩のほほえみ」の混入割合を示す。

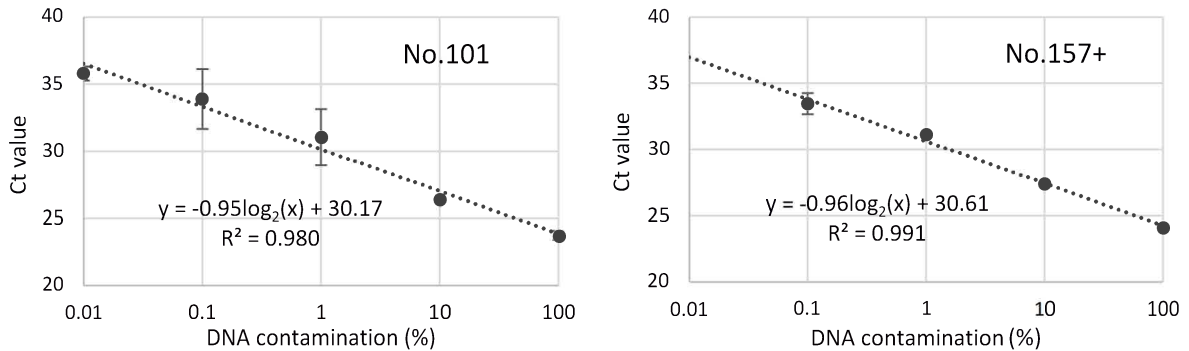


図 8 蛍光プローブ方式における供試 DNA 濃度と Ct 値の比較

横軸は対数軸で示す。エラーバーは標準誤差を表す。

横軸の百分率は「むさしの 27 号」中の「彩のほほえみ」の混入割合を示す。

値と混合 DNA 濃度を比較した結果、回帰式の R^2 値は No.101 が 0.980, No.157 が 0.991 であった (図 8)。

考察

「むさしの 27 号」とその他の供試品種や系統で異なる多型パターンを示す最小の組み合わせである No.101 と No.157 を (表 1, 図 2), 「むさしの 27 号」判別マーカーとして選定した。また, 両マーカーは岸根・奥西 (2014) が報告している 2012 年における農産物検査数量が概ね 2 万ト

ン以上である品種のうち「挿入あり」の品種が存在しないため、これらの品種とも判別可能なマーカーであると考えられる。

江嶋ら (2007) や田淵ら (2016) は、5%の混入割合から危険率 (見逃し率) 5%で異品種を検出するために必要な検査粒数は 59 粒、0.1%の混入割合で危険率 1%の場合は約 3000 粒であると試算している。異品種の混入割合について、米の農産物検査等検討会 (2006) では、稲作生産における不可避的な異品種混入を 4%程度としている。一方で、原原種等の種子ではより高い水準の純度維持が求められ、水準が高くなるとさらに多数の粒数を検査する必要がある。多数の粒数を費用面や労力面で効率よく検査するためには、複数の粒数をまとめてバルク調整した検体から高い検出感度で検査することが重要となる。本試験では検出感度の向上を目的として、プライマーの再設計および検出条件の変更を行った。変更の結果、No.101 では 1-3%の混合試料において変更前より「彩のほほえみ」由来のシグナルが強く検出された (図 3)。また、No.157 では変更前に検出されなかった 1%混合試料において PCR 産物が検出された。これらのことから、変更した条件では検出感度が向上しており、より低濃度の異品種混入の検出に有効であると推察される。

変更した条件による玄米粒混合試料を用いた試験の結果、すべての混合試料において「彩のほほえみ」由来の PCR 産物が 3 反復中全てで検出された (図 4)。また、DNA 混合試料を用いた試験において、本マーカーを用いたゲル電気泳動における「彩のほほえみ」由来の PCR 産物の検出限界は No.101 で 0.125%、No.157 で 0.0625%以下であることが確認された (図 5)。「むさしの 27 号」種子中に混入した異品種の検出では両マーカーを使用する必要があるため、本手法による検出限界は 0.125%となる。品種判別マーカーを用いた異品種混入の検出については様々なマーカー (SSR, STS, SNP) や手法 (ゲル電気泳動, ポストラベル法) で検討されており、それらの検出限界濃度は 0.1-20%程度である (橋本ら, 2004, 江嶋ら, 2007, 小原ら, 2007, 癸生川ら, 2013, 田淵ら, 2016, 橋口・藤川, 2021)。これらと比較すると本試験における検出限界濃度は

比較的低く、本手法は高い水準の異品種混入の検査において有用であると推察される。

種子中の異品種検出においては、突然変異等による遺伝子の変容による誤判定が問題となりえる。*mPing* 挿入多型判別マーカーにおいては、*mPing* の転移における切り出しで「むさしの 27 号」を異品種と判定してしまう「偽陽性」や、挿入で異品種を「むさしの 27 号」と判定してしまう「偽陰性」のリスクが想定される。

まず、「偽陽性」のリスクについて、*mPing* の転移は細胞培養や約培養などの条件で起こることが報告されている (Jiang *et al.*, 2003, Kikuchi *et al.*, 2003)。また、Teramoto *et al.* (2014) の試験において「日本晴」自殖後代では新たに発生した *mPing* の転移は検出されておらず、Naito *et al.* (2006) は 10-50 程度の *mPing* のコピー数である多くの品種において転移機能が通常、抑制されていることを示唆している。自然条件下における転移頻度についての報告はないが、「むさしの 27 号」においても転移による偽陽性のリスクは低いと推察される。次に「偽陰性」のリスクについて、*mPing* 挿入は TAA の 3 塩基を標的配列とすることや遺伝子がコードされる領域の周辺に多いことが報告されている (Naito *et al.*, 2006)。しかし、水稻のタンパク質がコードされている遺伝子は 30,000 程度あること、「挿入なし」の PCR 産物の塩基長は 500bp 以下であることから、増幅配列内にピンポイントで挿入が起こり偽陰性となるリスクは極めて低いと考えられる。

一方で、交配から 60 年以上経過し、日本各地で系統が維持されている「コシヒカリ」の *mPing* 挿入について解析した例では、集団全体で 38 の多型が出現しているとの報告がある (貴島ら, 2010)。これらのことから、本判別技術における誤判定のリスクについては十分に低いものと推察されるが、「コシヒカリ」の例を踏まえて自然条件下における転移頻度を調査し、評価する必要がある。

定量 PCR による解析の結果、インターカレーション方式よりも蛍光プローブ方式の方が高い決定係数を示し、当てはまりの良い回帰式が得られた (図 7, 8)。「むさしの 27 号」の融解曲線解析

において、No.101 と No.157 とともに 2 つのピークが確認されており、ピークにおける融解温度は混合試料と同様であった (図 6)。ピークが 2 つ現れる要因は不明であるが、比較に用いたピークの面積は「むさしの 27 号」由来の PCR 産物の影響を受け、「彩のほほえみ」由来のピーク面積が正確に反映されず、相関性が低下したと推察される。これらのことから、インターカレーション方式より蛍光プローブ方式のほうが混入率をより正確に定量できると考えられる。Okunishi *et al.* (2005) は、STS マーカーを用いた定量 PCR による異品種混入量の推定について、混合量と推定値の誤差が 30%以下であることを報告している。本試験で開発した手法においても混合量と推定値に誤差が生じると推察されるため、玄米粒混合試料を含む人為混入試料を用いた解析や他機関によるブラインドテストなどによって正確性を検証する必要がある。

引用文献

- 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.
- 橋口太亮・藤川和博 (2021) : DNA マーカーによる鹿児島県水稲奨励品種・適品種の識別技術. 日本作物学会九州支部会報 87, 1-5.
- 橋本憲明・大源正明・石村尚子・高原美規・山元皓二 (2004) : PCR 法を利用した新潟県内で栽培・流通する水稲品種の判別. 北陸作物学会報 39, 15-17.
- Jiang, N., Bao, Z., Zhang, X., Hirochika, H., Eddy, S. R., McCouch, S. R., and Wessler, S. R. (2003) : An active DNA transposon family in rice. *Nature* 421(6919), 163-167.
- 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.
- Kikuchi, K., Terauchi, K., Wada, M., and Hirano, H. Y. (2003) : The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture. *Nature* 421(6919), 167-170.
- 貴島祐治・堀田夕夏・石黒聖也・山村和照・埜章・内藤聡・佐野芳雄 (2010) : トランスポゾンを指標にしたコシヒカリ品種内の遺伝的差異. 育種学研究 12(3), 81-86.
- 岸根雅宏・奥西智哉 (2014) : 日本のイネ主要品種における *mPing* 挿入多型. 育種学研究 16(4), 139-146.
- 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
https://www.maff.go.jp/j/study/other/kome_kensa/pdf/comment.pdf
- 両角悠作・小林麻子・富田桂 (2018) : 福井県の水稲奨励品種を判別する SSR マーカーセットの改良. 北陸作物学会報 53, 50-52.
- Naito, K., Cho, E., Yang, G., Campbell, M. A., Yano, K., Okumoto, Y., Tanisaka, T., and Wessler, S. R. (2006) : Dramatic amplification of a rice transposable element during recent domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(47), 17620-17625.
- 小原麻里・鎌形民子・大越一雄 (2007) : 千葉県水稲奨励品種の DNA による識別方法. 千葉県農業総合研究センター研究報告 6, 117-124.
- Okunishi, T., Nakamura, S., and Ohtsubo, K. I. (2005) : Quantitative identification of rice cultivars by Real-Time PCR. *Food science and technology research* 11(3), 344-348.
- 大岡直人・大戸敦也・荒川誠・矢ヶ崎健治・齋藤孝一郎・加藤徹 (2020) : 水稲新品種「むさしの 27 号」の育成. 埼玉県農業技術研究センター研究報告 19, 1-10.
- 田淵宏朗・橋本憲明・林敬子・芦川育夫・吉田均 (2016) : 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. 中央農業総合研究センター研究報告 26, 39-55.
- Teramoto, S., Tsukiyama, T., Okumoto, Y., and Tanisaka, T. (2014) : Early embryogenesis-specific expression of the rice transposon *Ping* enhances amplification of the MITE *mPing*. *PLoS genetics* 10(6), e1004396.
- 渡邊洋一・佐々木園子・佐藤弘一・佐藤誠 (2015) : 福島県の水稲育成品種および奨励品種を識別する SSR マーカーセットの開発. 日本作物

小山ら： *mPing*挿入多型を利用した「むさしの 27 号」の判別と異品種混入検出手法の開発

学会東北支部会報 58, 21-22.

吉野稔・江藤文香・矢羽田二郎 (2008) : 福岡県

における農産物の育成者権侵害事例と対応方策.

福岡県農業総合試験場研究報告 27, 1-6