

## 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

江嶋亜祐子<sup>1)</sup>・和田卓也\*・坪根正雄・尾形武文

福岡県が独自に育成した水稻品種‘夢つくし’、‘つくしろまん’等の知的財産保護のため、DNA マーカーを用いた効率的な米の品種識別システムについて検討した。福岡県の奨励品種を中心とした 12 品種は 8 種類の SSR マーカーで相互に識別が可能であった。この SSR マーカーを用いた効率的な品種識別システムは、一次判定としては異品種の混入を検出する定性分析としてのバルク分析を、二次判定としては混入割合が推定できる粒別分析を組み合わせる手法である。白米および DNA を用いたバルク分析において、‘夢つくし’に‘ヒノヒカリ’を異なる割合で混入した場合の PCR 産物のアガロースゲル電気泳動におけるバンドの検出限界は、ヒノヒカリ混入率が 5~10%の範囲であった。分析粒数を異品種混入割合別に統計学的に検討したところ、誤判定の危険率が 5%以下になる分析必要粒数は、10%混入の場合のバルク分析で 29 粒、粒別分析で 80 粒であった。また 20%混入の場合はバルク分析で 14 粒、粒別分析で 20 粒であった。

[キーワード：米、品種識別、DNA、SSR]

An Efficient Rice Variety Discrimination System Using Simple Sequence Repeat Markers. ESHIMA Ayuko, Takuya WADA, Masao TSUBONE and Takefumi OGATA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 815-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Res. Cent.* 26: 19-23(2007)

In order to protect the intellectual property rights of rice varieties, such as the ‘Yumetsukushi’ and ‘Tsukushiroman’ varieties that were bred at the Fukuoka Agricultural Research Center, we developed a variety discrimination system using DNA markers. Twelve varieties, which were cultured or distributed in Fukuoka Prefecture, were distinguished from each other using eight SSR markers. The efficient variety discrimination system using SSR markers is composed of two steps. The first step is a bulk analysis, which is carried out as a qualitative analysis, and the second step is a separate analysis that supports the qualitative analysis and gives an estimation of the mixing ratio. In the bulk analysis, the detection limit of Hinohikari's DNA derivative PCR products band on the agarose gel electrophoresis ranged from 5% to 10% when the polished rice and DNA solution of the ‘Hinohikari’ was mixed with those of the ‘Yumetsukushi’ at different ratios. We performed a statistical analysis to reveal the essential number of grains at a significance level of 5%. Then, in order to find 10% mixed samples, 29 grains were needed for the bulk analysis, and 80 grains were needed for the separate analysis. Further, to find 20% mixed samples, 14 grains were needed for the bulk analysis, and 20 grains were needed for the separate analysis.

[Key word: rice, identification, DNA, SSR]

### 緒 言

福岡県では、県産米の競争力を強化するため、これまでに水稻‘夢つくし’、‘つくしろまん’などの独自品種を育成してきた。また、1998年の種苗法改正により、他の知的財産権と同様に規定が整備され、植物品種の育成者の権利保護が強化された<sup>10)</sup>。福岡県産米の販売に際しての異品種混入は、消費者のブランド米に対する信頼を低下させる大きな要因であることから、異品種を識別する技術を確立して植物品種の知的財産を保護することは、県産米の競争力を強化する有力な手段となる。

米を含む農産物の品種識別については、PCR (Polymerase Chain Reaction) を基本とした手法が広く用いられており、代表的なものとして RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法<sup>15)</sup>がある。久保らは‘夢つくし’を含む福岡県の育成品種等の識別について RAPD マーカーセットを報告している<sup>6)</sup>が、RAPD法の欠点である増幅

の不安定さを補う必要性についても併せて指摘している。DNA 品種識別検討委員会<sup>3)</sup>では、再現性の高い手法として CAPS (Cleaved Amplified Polymorphism Sequence) や SSR (Simple Sequence Repeats), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 法を挙げている。その中で、SSR マーカーは共優性であり、かつイネにおいては塩基配列情報を基に作成されたマーカーが公開されていることから<sup>8)</sup>、特許等の制限を受けずに使用できる利点がある。

一方、品種識別作業を効率的に行うには、作業内容をマニュアル化することが必要である。この点に関し、現行の JAS 法においては、米の品種判別に活用されている DNA 識別技術についての公定法等が定められていない。旧食糧庁の定めた品種識別マニュアル<sup>4)</sup>においては、第一段階で一括粉碎した米粉で DNA 分析し、第二段階として混入の疑いがあった試料の 20 粒を粒別分析する手法が提示されていたが、これらの分析粒数に関する統計学的な裏付けは示されていない。現在は、農林水産省が DNA による品種識別における基本的留意事項をまとめたガイドライン<sup>3)</sup>を提示しているが、分析粒数については特段の指標を設けていない。識別結果の信頼性を確保する上

\* 連絡責任者 (農産部)

1) 現食品流通部

では、DNA の識別手法とともに、分析粒数等の作業条件を検討する必要がある。

そこで本研究では、県産米の競争力強化と県育成品種の保護を目的として、‘夢つくし’等の水稻品種を識別する SSR マーカーセットを選定し、併せて分析粒数を統計学的に検討して品種識別作業フローを作成したので報告する。

## 材料および方法

### 試験 I 品種識別のためのマーカーセットの選定

試験は、第 1 表に示す福岡県的水稻奨励品種を中心とした 12 品種を用いて行った。白米をマルチビーズショッカー(安井器械社製 MB501)で 2200rpm, 15 秒間を 2 回繰り返して破碎処理後、Potassium Acetate 法<sup>2)</sup>により、DNA を抽出した。抽出した DNA は 1/10 TE 溶液 (0.1mM EDTA を含む 1mM Tris-HCl, pH8.0) に溶解し、紫外吸光測定器で定量し、必要に応じて濃度を調整して PCR 反応に使用した。

PCR のプライマーは、McCouch らにより公開されている SSR マーカー<sup>8)</sup> から 12 種類の染色体に分布する 45 種類を選定して用いた。反応液の組成は、鋳型としてのゲノム DNA 40ng, Forward 側プライマーと Reverse 側プライマーを各 0.4 $\mu$ M, Taq ポリメラーゼ (TaKaRa 社製) 0.5 unit, Taq ポリメラーゼと同梱の dNTP 混合液 100 $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 1.5 Mm, 反応バッファーを各濃度調整して合計 20 $\mu$ l とした。PCR は 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 50 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒間を 1 サイクルとして 35 サイクル行った (アステック社製 PC-808)。PCR 後の DNA 増幅断片は、3%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液に浸した後に紫外線照射装置 (ATTO 社製 densitometer) で検出した。

### 試験 II 品種識別作業システムの構築

品種識別作業システムは、一次判定としてバルク分析、二次判定として粒別分析を行う二段階で構成することとした。すなわち、一次判定のバルク分析は複数粒を同時に DNA 抽出して PCR 分析する方法とし、二次判定の粒別分析は一粒ずつを独立して DNA 抽出して分析する方法とした。

#### II-1 バルク分析における識別可能な異品種割合の検討

バルク分析では、複数粒をまとめて DNA 抽出を行うため、混入している異品種の検出限界を調査しておく必要がある。‘夢つくし’と‘ヒノヒカリ’の白米および DNA を用いて試験を行った。米粒を混合して識別可能粒数を調査する場合には、‘夢つくし’に‘ヒノヒカリ’の白米を混合してヒノヒカリの割合が 50%, 33%, 20%, 10%と段階的に混合して試験 I の手法で DNA を抽出した。次に、DNA を混合する場合は、既に抽出しておいた両品種の DNA 溶液を濃度調整し、ヒノヒカリの DNA 濃度が 50%, 33%, 20%, 10%, 5%となるように PCR 反応の直前に混合した。PCR 反応および DNA 増幅断片の確認は試験 I に述べた手法により実施した。

#### II-2 粒別分析における DNA 抽出法の検討

粒別分析作業の効率化には、米一粒という少量のサン

プルで構成される多検体から同時に安定して DNA 抽出できる抽出法が不可欠である。多検体の取り扱いに適した 96 穴ディープウェルプレートを使用する場合に適用可能な DNA 抽出法を検討した。試験 I と同様に破碎処理を行った後、TPS バッファー (10 mM EDTA と 1 M KCl を含む 100 mM Tris-Cl buffer) で DNA 抽出する手法 (以下、TPS 法) および Mag Attract 96 DNA Plant Core Kit (QIAGEN 社製) を用いて DNA 抽出を行った。DNA 抽出の成功の是非は、各法で抽出した DNA を用いて PCR 反応を行い、PCR 産物を視認することで判定した。

### II-3 分析粒数の統計学的な検討

品種識別では、分析粒数を増やすほど結果の正確性は高まるが、分析機器やランニングコスト等の制約により分析粒数は制限される。このため、一定の危険率を設定し、異品種が混入している場合に検出できない確率を当該危険率未満にするための分析粒数を求める必要がある。

異品種が混入している試料から分析サンプル中に異品種粒を選び出す確率は、二項分布の確率関数で表すことができる。

混入割合  $p$  の米粒集団から  $n$  粒をサンプルとして採取する場合、 $r$  個の異品種粒を選び出す確率  $Pr$  は、

$$Pr = \frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot p^r(1-p)^{n-r} \quad (式 1)$$

で表される<sup>13)</sup>。

ただし、試料は均一に混合された状態であり、 $n$  粒のサンプル採取を通して  $p$  が一定と仮定する。

上記の式は試料の混入割合  $p$  と分析粒数  $n$  に応じて、異品種粒を  $r$  粒選び出す確率が変動することを示している。

一方、混入割合が低い場合には、異品種粒を検出できる確率が低下するため、確実に検出するには混入割合が高い場合よりも分析粒数を増やす必要がある。しかし、農林水産省では遺伝子組み換え作物において、適正な分別生産流通管理が行われた場合であれば混入割合 5%以下を「意図せざる混入」として定めており<sup>9)</sup>、分析結果の再現性の観点からも混入割合がごく低い試料については一定以上が混入した試料と区別する必要がある。そこで、混入割合 5%, 10%, および 20%を検出する場合に必要な分析粒数について検討した。

## 結 果

### 試験 I 品種識別のためのマーカーセットの選定

McCouch らにより公開されている SSR マーカー 45 種を供試し、PCR 産物の電気泳動後の分離パターンを比較した。PCR 産物の分離パターンをアガロースゲル上で視認できるマーカーを選抜し、その中で 12 品種を識別するマーカー数が最少となるように組合せを検討した結果、12 品種は 8 種類のマーカーにより相互に識別可能であった (第 1 表)。SSR マーカー 45 種類 (‘ひとめぼれ’においては 25 種類) における 12 品種の多型検出頻度を比較したところ、多型検出率は 10.9~68.0%であった (第 2 表)。本県育成の‘夢つくし’、‘つくしろまん’、‘つや

おとめ’は、‘コシヒカリ’との多型検出頻度が 15.2~23.9% と低かった。上記 3 品種で多型検出頻度が最も低い組合せは、‘夢つくし’は‘コシヒカリ’ と (15.2%)，‘つくしろまん’は‘夢つくし’と (17.4%)，‘つやおとめ’は‘ヒノヒカリ’ と (15.2%) であった。また、70~80 年代に九州地域

の主要な水稻品種であった‘ニシホマレ’，‘レイホウ’，‘ツクシホマレ’間の多型検出頻度は、10.9~19.6%と低かったが、これらと‘コシヒカリ’との多型検出率は 54.3~56.5%と高かった。

第1表 福岡県で栽培される水稻12品種識別のためのSSRマーカーと遺伝子型

品種名	SSRマーカー名							
	RM5470	RM3529	RM1338	RM4595	RM8030	RM336	RM3019	RM1896
コシヒカリ	2	1	2	1	1	2	2	1
つくしろまん	2	1	2	1	1	2	1	1
つやおとめ	2	1	2	1	3	1	2	1
ヒノヒカリ	2	1	2	1	3	2	2	1
夢つくし	2	1	2	2	1	2	2	1
つくし早生	2	1	2	2	2	2	2	1
あきさやか	2	1	1	1	3	1	2	1
ニシホマレ	1	2	1	1	3	1	2	2
ほほえみ	1	2	2	2	3	2	1	1
ひとめぼれ	1	2	2	1	1	2	2	2
レイホウ	2	2	1	1	3	1	2	1
ツクシホマレ	2	2	1	1	3	1	2	2

1) 1, 2, 3はバンドパターンを示す。

第2表 福岡県で栽培される水稻12品種におけるSSR多型検出頻度

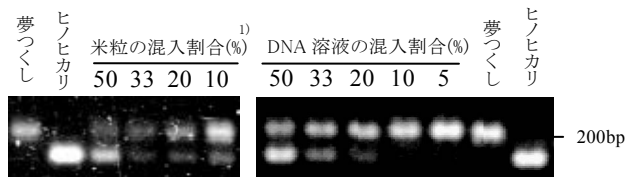
	多型検出率 (%) <sup>1)</sup>											
	コシヒカリ	つくしろまん	つやおとめ	ヒノヒカリ	夢つくし	つくし早生	あきさやか	ニシホマレ	ほほえみ	ひとめぼれ	レイホウ	ツクシホマレ
コシヒカリ	-	23.9	21.7	28.3	15.2	34.8	32.6	54.3	30.4	32.0	54.3	56.5
つくしろまん		-	28.3	34.8	17.4	32.6	39.1	63.0	30.4	40.0	54.3	56.5
つやおとめ			-	15.2	34.8	32.6	39.1	45.7	30.4	40.0	43.5	50.0
ヒノヒカリ				-	34.8	39.1	41.3	56.5	28.3	44.0	50.0	52.2
夢つくし					-	30.4	34.8	60.9	34.8	40.0	56.5	58.7
つくし早生						-	41.3	52.2	39.1	32.0	47.8	54.3
あきさやか							-	47.8	47.8	44.0	45.7	52.2
ニシホマレ								-	54.3	52.0	17.4	19.6
ほほえみ									-	32.0	54.3	52.2
ひとめぼれ										-	68.0	68.0
レイホウ											-	10.9
ツクシホマレ												-

1) ‘ひとめぼれ’を除く11品種では45種類のプライマー、‘ひとめぼれ’においては25種類のプライマーを用いた時に、各品種間で多型が検出されたSSRプライマーの比率を示す。

試験 II

II-1 バルク分析における識別可能な異品種割合の検討

夢つくしに対してヒノヒカリを様々な割合で混合し、粒および DNA で試験をした結果、各々10%、5%の割合の混入を検出することが可能であった (第1図)。また、米粒と DNA の混入割合は検出されるバンドの濃さの比に反映された。しかし、DNA の混入割合 5%と 10%を区別することはできなかった。

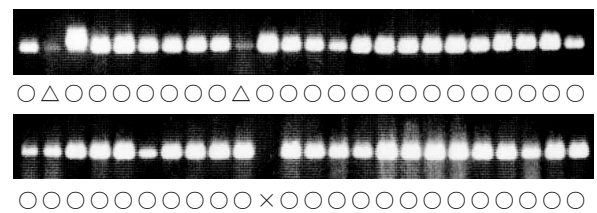


第1図 バルク分析における電気泳動による識別

1) ‘ヒノヒカリ’の混入割合を示す。  
2) SSR マーカーは RM4595 を使用した。

II-2 粒別分析における DNA 抽出法の検討

TPS 法で抽出した DNA を用いて PCR 反応を行った (第2図) とし、約 98% の確率で PCR 産物が確認され、PCR 反応に十分な量の DNA が抽出できることがわかった。Mag Attract 96 DNA Plant Core Kit においても、TPS 法と同様に安定して DNA 抽出が可能であった。しかし抽出過程にアルカリ性溶液を使用するため、抽出途中で粗抽出液が粘性をもち、ピペッティング等の吸い込み作業に支障が生じた。そのため、作業を正確に行うための労力的な負担が大きかった。

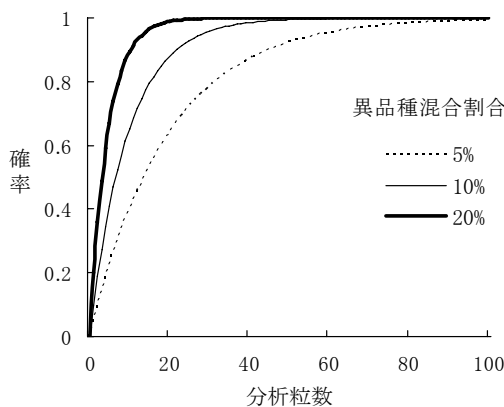


第2図 TPS 法で抽出した DNA の PCR 分析

1) 試料は全て夢つくし。  
2) ○と△は抽出成功、×は失敗。

II-3 分析粒数の統計学的な検討

『材料・方法』で述べた式1において、異品種の混入割合  $p$  を 5%, 10%, 20% と設定し、分析粒数  $n$  を変動させた時に、検出される異品種粒数  $r$  を 1 以上とした場合の検出確率、すなわち一粒以上の異品種を検出できる確率を第3図に示した。混入割合 5%, 10%, 20% のそれぞれの場合において、分析粒数の増加に伴って異品種粒の検出に成功する確率は上昇し、混入割合の最も低い 5% でも 100 粒程度を分析することでほぼ確実に異品種が検出されることが示された。混入を検出できない危険率を 5% 未満に設定したとき、各混入割合ごとの分析必要粒数は 20% の場合に 14 粒、10% では 29 粒、5% では 59 粒以上であった (第3表)。



第3図 異品種の混入割合別の検出率

第3表 異品種を検出しない確率と検出するための分析必要粒数

分析粒数	確率 (%) <sup>1)</sup>		
	混入割合5%	10%	20%
5	77.4	59	32.8
10	59.9	34.9	10.7
20	35.8	12.2	1.2
30	21.5	4.2	0.1
40	12.9	1.5	$1 \times 10^{-2}$
50	7.7	0.5	$1 \times 10^{-5}$
80	1.7	$2 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^{-8}$
100	0.6	$2 \times 11^{-5}$	$2 \times 10^{-10}$

1) 分析粒数中に異品種が含まれない確率。  
2) 各ブロック矢印は、危険率5%以下で混入を確認するための必要粒数を示す。

第4表 白米を用いた品種識別作業における 5% 混入を 10%、20% 以上と誤判定する確率

分析粒数	確率 (%) <sup>1)</sup>	
	混入割合10%	20%
5	22.6	22.6
10	40.1	8.6
20	26.4	1.6
30	18.8	0.3
40	13.8	0.1
50	10.4	$2 \times 10^{-2}$
80	4.7	$2 \times 10^{-4}$
100	2.8	$1 \times 10^{-5}$

1) 5% 混入の試料を 10% または 20% 以上と誤判定する確率。  
この確率を 5% 以下にするためには、枠囲いの左端に相当する分析粒数が必要。

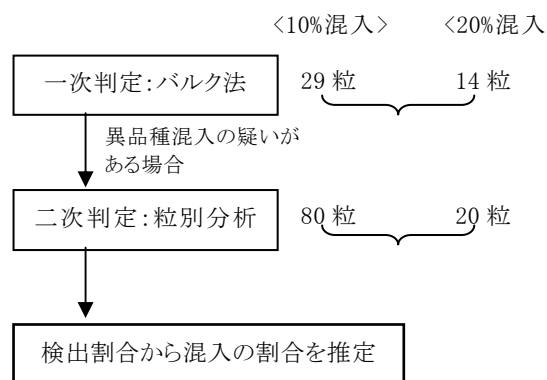
次に混入割合 5% をそれ以上の混入割合と誤判定する危険率について検討した (第4表)。先に述べた各混入割合ごとの異品種検出率と同様に、分析粒数を増加させると誤判定を行う危険率が低下した。10 粒を分析する場合、5% を 10% 以上、20% 以上の混入と誤判定する確率はそれぞれ 40.1%, 8.6% であった。この誤判定危険率は、分析粒数がそれぞれ 80 粒以上、20 粒以上で 5% 未満となった。

考 察

SSR マーカーは、他の DNA マーカーと比較して、多型検出頻度および検出できる対立遺伝子数が多いことが報告されており<sup>7) 16)</sup>、近縁品種間の多型検出に有効であることが指摘されている<sup>7) 11)</sup>。本研究においても、12 品種の識別が 8 種類の SSR マーカーセットで可能となり、近縁品種間の識別に SSR マーカーが有効であることが示された。McCouch らの SSR マーカーを用いた手法では、宮崎県の主要な水稻品種を識別するマーカーセットが開発されている<sup>12)</sup>。また、イネ日本型品種間の多型検出頻度については、Chen ら<sup>1)</sup> の SSR マーカー 70 種類において、日本型品種間の多型検出頻度が 11.4~34.3% であったことが報告されている<sup>5)</sup>。今回供試した 45 種類のマーカーでは、多型検出頻度は 10.9~68.0% と幅があり、平均して 41% と比較的高い検出頻度である。さらにコシヒカリの近縁品種においても多型検出率は 15% 以上であることから、他の日本型品種の識別にも有効であることが示唆される。

粒別分析作業の効率化のため、多検体を取り扱う DNA 抽出法を比較したところ、TPS 法が適していた。Mag Attract 96 DNA Plant Core Kit は、磁性ビーズに DNA を吸着させて回収する手法であり、工程に遠心機を必要としないので DNA 抽出の全行程を機械化できるメリットがある。しかし抽出溶媒にアルカリ性溶液を用いるため、デンプンを多量に含む米の DNA 抽出では糊化が起こり、人が抽出作業を行う場合には作業上の負担が大きい。TPS 法については、イネの葉から DNA 抽出するのに用いられている手法であり、特別な試薬・器具を使用しない<sup>14)</sup> ので、一般的な DNA 実験施設であれば適用できる。多検体の取り扱いに適した 96 ディープウェルプレートにおいても米の DNA 抽出が安定して行えたことから、TPS 法により粒別分析作業の効率化が可能となる。

検出する混入割合の基準と分析必要粒数の結果から、第4図に示す判定フローを構築した。一次判定では一定割合以上に混入している可能性がある試料をバルク分析で判別し、混入が認められた試料を二次判定で一定割合以上の混入か否かを判断する。検出基準を混入割合 10%、20% に設定する場合に必要な分析必要粒数は、5% に設定する場合のそれぞれ約 1/2、約 1/4 であり、分析規模は大幅に縮小される。検出基準を調節して分析規模を縮小することで、実験室の設備等に制限がある場合においても品種判別業務を効率的に行うことが可能となる。検出基準を 10% に設定する場合には、一次判定として 29 粒以上をバルク分析し、混入が認められた試料を二次判定として 80 粒以上を粒別分析することにより 95% の信頼度で「10% 以上の混入」と判定することができる。また、基準 20% の設定では一次判定で 14 粒、二次粒別判定で



第4図 DNA 品種判定作業フロー図

20粒を分析する。

旧食糧庁が示した分析マニュアル<sup>4)</sup>においては、第一段階で白米 25g (約 1200 粒) を一括粉砕した米粉で定性分析を行い、定量分析として 20 粒を粒別分析する手法が提示されていた。一次判定に用いる白米量は、本フローと比較すると規模が大きく、ほぼ確実に異品種混入の有無を確認できる粒数である。また、粒別分析は 20 粒であるが、一次判定で多量の米粉を分析に用いているので、一定割合以上の混入か否かを判断するためではなく、混入割合を推定するために行われる分析である。旧食糧庁のマニュアルは定性分析として統計学的に信頼できるものであるが、多量の試料を多数粉砕するための設備が整わない場合や、試料の絶対量が不足する場合等、分析規模が制限される状況では、必ずしも利用可能な手法ではない。本フローでは分析規模が小さいため、設備状況の制限を受けにくく、多数の試料を短時間で分析することができる。また、一次判定と二次判定を組み合わせることで、定性分析の正確性が高められ、定量分析の観点からもおおよその混入割合を推定することができる。

このように、本試験で開発された迅速かつ正確な品種識別システムが福岡県の知的財産である育成品種の保護に活用されることで、競争力強化や異品種混入に対する抑止力として有効な手段になると考えられる。今後は、バルク分析が可能である SSR マーカーの特性を活かしたマルチプレックス PCR などにより、本県育成品種を一度の分析で識別できる DNA 品種識別キットの開発が望まれる。

## 引用文献

- 1) Chen, X., S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho and S. R. McCouch (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 95: 553-567.
- 2) Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol.*

Rep. 1: 19-21.

- 3) DNA 品種識別検討委員会編 (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—.
- 4) 藤井剛(2002) DNA による米穀の品種判別に係る分析マニュアルについて. *農産物検査とくほん*144号: 71-82.
- 5) 河野いづみ・竹内善信・島野公利・佐々木卓治・矢野昌弘 (2000) DNA マーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. *育種学研究* 2: 197-203.
- 6) 久保貴彦・尾形武文・吉村淳・松江勇次・岩田伸夫 (2000) RAPD 分析による日本型水稻品種の品種識別. *九大農学芸誌* 55 (1): 5-11.
- 7) Mackill, D. J., Z. Zhang, E. D. Redona and P. M. Colowit (1996) Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977.
- 8) McCouch, S. R., L. Teytelman, Y. Xu, K. B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, Q. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. Declerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware, and L. Stein (2002) Development and mapping of 2240 new SSR Markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Research* 9: 199-207.
- 9) 農林水産省 (2001) 遺伝子組換えに関する品質表示基準の施行について. 12 食流第 1775 号, 一部改正 12 総合第 1115 号.
- 10) 農林水産省生産局種苗課 (2003) 逐条解説種苗法. 25-28.
- 11) Olufowote, J. O., Y. Xu, X. Chen, W. D. Park, H. M. Beachell, R. H. Dilday, M. Goto, and S. R. McCouch (1997) Comparative evaluation of within-cultivar variation of Rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome* 40: 370-378.
- 12) 杉田亘・河野朋恵・河野いづみ・竹内善信・矢野昌裕・堤省一郎・岩下喜朗・長田龍太郎・加藤浩・轟篤 (2003) イネ品種識別における SSR マーカーの利用. *育種学研究* 5 (別 2): 251.
- 13) 田中豊・垂水共之 (1997) Windows 版統計解析ハンドブック基礎統計. 131.
- 14) Thomson, D., and R. Henry (1995) Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19 (3): 394-400.
- 15) Williams J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S.V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18, 6531-6535.
- 16) Yang, G. P., M. A. Maroof, C. G. Xu, Q. Zhang and R. M. Biyashev (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol. Gen. Genet.* 245: 187-194.

