

レンコン栽培圃場における混種の実態解明

柏木 優・葛谷真輝¹⁾

(茨城県農業総合センター生物工学研究所)

要約

レンコンの DNA マーカーを用いた品種識別技術により、現地圃場における異品種混入（混種）の実態を調査した。定植前に無作為選抜した個体の肥大茎および圃場内の全個体の葉から DNA を抽出し、DNA マーカーによる品種識別を行った結果、調査した 9 圃場中 4 圃場から各 1~2 個体の異品種を検出し、その混種率は 0.4~1.5%であった。混種の主な要因は、圃場内の品種転換時の前作栽培品種の掘り残しおよび畦畔からの漏生個体であった。また、1 圃場においては、不良形状であるとして達観により選別された肥大茎の検定を行ったところ、全て異品種であった。本研究により、レンコン産地の混種の実態が明らかになるとともに、産地で実施されている混種対策のうち、種レンコンの達観選別の有効性が確認された。

キーワード：レンコン、混種、品種識別、DNA マーカー

1. はじめに

茨城県はハス (*Nelumbo nucifera*) の肥大茎であるレンコンの生産量が日本一であり、霞ヶ浦の周囲に広範囲に広がる大産地を有している。県内の産地では、‘金澄 36 号’、‘ひたちたから’、‘パワー’ など、民間の育種家や生産者が育成した、各産地に適した複数の品種が栽培されている。栄養繁殖性作物のレンコンは、作土中に形成された肥大茎を食用の生産物だけでなく、次作用の種レンコンとしても利用しており、各産地における種レンコンの維持・増殖は、各生産者もしくは産地が設置した種レンコン増殖用圃場（以下、種レンコン圃場）にて行われている。種レンコン圃場は、通常、出荷用の栽培圃場と隣接しているため、品種としての品質維持の観点から、特に異品種混入（以下、混種）を原因とした品質劣化が、常に懸念される状況にある。

採種圃場の混種の現状については、水稻の原原種圃場における報告が多く、自殖性作物である水稻の場合、混種の原因は、自然交雑（鎌形ら、1988；山内・服部、1994）、漏生株（伊藤、1984）等が報告されている。

一方、栄養繁殖性作物のレンコンにおいて混種が発生する要因は、地下茎の伸長による隣接圃場からの侵入や実生（自然交雑もしくは自殖による種子が生長した個体）（以下、実生）とともに、収穫時の圃場内もしくは収穫されにくい畦畔内での掘り残しの発生であると言われている（霞ら、2000；大橋ら、2022）。

レンコン圃場における混種の実態は、栽培品種同士の混種と実生由来の混種の 2 つが混在していると推定されているが、圃場内における詳細な実態は報告されていない。実態が不明である原因として、レンコンの品種もしくは実生が、同一もしくは異品種であることを、水田圃場における生育段階で識別することが一般に困難であることが挙げられる。現段階において、レンコンの品種の同定は、主に肥大茎の形状の達観評価により行っているため、収穫段階までは品種の識別が困難である。

一方で、形質評価による品種識別の困難な作物について、DNA マーカーによる識別技術の活用が試みられている（後藤ら、1997；臼井ら、2006）。レンコンにおいても、DNA を用いた品種識別技術が開発され、より効率的な検査手法としてダイレクト PCR 手法や DNA のバルクサンプリング法が併せて確立されている（国産レンコンのブランド力強化コンソーシアム、2019）。そこで、今後の種レンコン圃場における混種対策に資することを目的に、本研究では DNA マーカーによる品種識別技術を用いて現地の種レンコン増殖圃場（以下、圃場）における混種の実態を解明し、今後の混種対策について考察した。

1) 現 公益社団法人茨城県農林振興公社

2. 材料および方法

2020～2023年の4年間に、9圃場において品種識別技術による混種検定（以下、混種検定）を行った。各圃場の栽培品種は、茨城県の優良選抜系統‘みらい選抜’、‘ひたちたから’、‘パワー’（堀井ら、2016）であり、このうち2圃場（No.1、6）ではこの期間中に同一圃場内における栽培品種の切り替えが行われた（表1）。

表1 調査圃場の栽培歴

圃場 No.	所在地	栽培品種						
		2017年	2018年	2019年	2020年	2021年	2022年	2023年
1	土浦市	金澄20号	みらい選抜	みらい選抜	みらい選抜 ^{a)}	ひたちたから ^{b)}	ひたちたから ^{b)}	ひたちたから ^{b)}
2	土浦市	— ^{c)}	パワー	パワー	パワー ^{a)}	—	—	—
3	小美玉市	—	—	パワー	パワー	パワー ^{a)}	—	—
4	小美玉市	—	—	ひたちたから	ひたちたから	ひたちたから ^{a)}	—	—
5	かすみがうら市	—	ひたちたから	ひたちたから	ひたちたから ^{b)}	ひたちたから ^{b)}	ひたちたから ^{b)}	—
6	かすみがうら市	—	—	—	—	—	金澄44号	ひたちたから ^{b)}
7	河内町	—	—	—	(休作)	パワー ^{b)}	—	—
8	河内町	—	—	—	(休作)	ひたちたから ^{b)}	—	—
9	行方市	—	金澄36号	ひたちたから	ひたちたから ^{d)}	—	—	—

- a) 定植前選抜法を実施した圃場を示す。
 b) 定植後全個体法を実施した圃場を示す。
 c) —：栽培品種が不明なことを示す。
 d) 達観選抜された不良形状個体の混種検定を実施した圃場を示す。

2. 1 混種検定用試料の調製

混種検定に供試するレンコンは、現地の状況に応じ、以下の定植前選抜法もしくは定植後全個体法によりサンプリングした。なお、定植前選抜法において混種が確認された圃場 No.1（2020年）は、定植後全個体法も実施した。

2. 1. 1 定植前選抜法

各圃場で収穫された種レンコン中の混種の有無を調査した。各圃場において収穫され、種レンコン用に生産者が選抜した肥大茎を、個体数が概ね同一となるように5～7集団に分け、各集団から無作為に選抜した8～10個体からDNAを採取し、混種検定に供試した。

DNAの抽出は、国産レンコンのブランド力強化コンソーシアム（2019）の方法に準じて行った。圃場 No.1 および2では10本、圃場 No.3 および4では8本の肥大茎をつまようじで3回ずつ突き、1本のチューブに入れたDNA溶解液（TE 900 μ L、1.0%PVP 100 μ Lを混合した）内で10回攪拌し、DNAのバルクサンプルとした。

この方法は2020年および2021年の2か年において、4圃場で行った（表1）。

2. 1. 2 定植後全個体法

定植された圃場内の生育途中の個体について、混種の有無を調査した。定植から約2か月後に圃場内の全ての定植個体の葉からDNAを抽出し、混種検定に供試した。

DNAの抽出は、国産レンコンのブランド力強化コンソーシアム（2019）の方法に準じて行った。個体毎に葉をつまようじで3回突き、サンプル当り30 μ LのDNA溶解液（TE 27 μ L、1.0%PVP 3 μ Lを混合した）内で10回攪拌し、DNAを抽出した。

この方法は2020～2023年の3か年において、延べ10圃場で行った（表1）。

2. 2 DNA マーカーによる品種識別

品種識別には33品種群を9種のマーカーで識別可能なマーカーセット（国産レンコンのブランド力強化コンソーシアム、2019）を用いた（表2）。定植前選抜法および定植後全個体法による調査では、‘パワー’および‘ひ

たちたから’を異品種と識別可能なマーカー01、‘みらい選抜’を異品種と識別可能な04および20、不良形状個体の混種検定では全9種を用いた。

PCRは、2×Ampdirect[®]Plus ((株)島津製作所) 5μL、BIOTAQ[™]HS DNA Polymerase ((株)島津製作所) (5U/μL) 0.05μL、DNA マーカー0.5μL、1.0%PVP 1μL、0.1%牛血清アルブミン (BSA) 1μL、DNA サンプル 2μLを混合し、全量を10μLとした反応液を用いて行った。

PCRの反応条件は、95.0°C10分ののち、94.0°C45秒、54.0°C60秒、72.0°C45秒を10サイクル、94.0°C45秒、45.0°C60秒、72.0°C45秒を35サイクルにより増幅させ、最後に72.0°C7分を行った。その増幅産物を3500xL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Life-technologies)を用いて検出し、Gene Mapper[®]Software ver5 (Thermo Fisher Life-technologies)により解析を行った。

表2 レンコンの品種識別に用いたDNAマーカーセット(抜粋)

品種	DNAマーカー																	
	01		04		13		15		16		18		20		24		26	
	294 ^{a)}	305	287	296	295	301	250	256	311	317	305	311	235	239	266	270	254	268
みらい選抜	+ ^{b)}	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
パワー	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
ひたちたから	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
金澄20号	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
金澄34号	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
金澄36号	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-

a) 増幅断片長 (bp) を示す。

b) +/-: 解析によるピーク検出の有無を示す。

2. 3 混種率の算出

定植後全個体法による品種識別の結果から、圃場毎の混種率 (%) = (検出した混種個体数 / 圃場内の全個体数) × 100 として算出した。

2. 4 品種識別技術による漏生個体の確認

定植後全個体法により調査した延べ10圃場において、定植から約2か月後に圃場内のレンコンの発生位置を調査した。定植列から外れて発生した株を、前作の収穫時に掘り残された肥大茎由来の漏生個体(以下、漏生個体)として、個体数を確認するとともに、定植後全個体法による調査区と同様に葉からDNAを抽出し、混種検定に供試した。調査が終了した漏生個体は、生産者が圃場より除去した。なお、2021年の圃場No.5では、調査前に畦畔からの漏生個体を生産者が除去したため、調査できなかった。

2. 5 達観選抜された不良形状個体の混種検定

2020年に圃場No.9において生産者が達観により分類した定植前の全ての不良形状の個体(節間長が長い)(図1)の肥大茎から、定植後全個体法による調査区と同様にDNAを抽出し、混種検定に供試した。

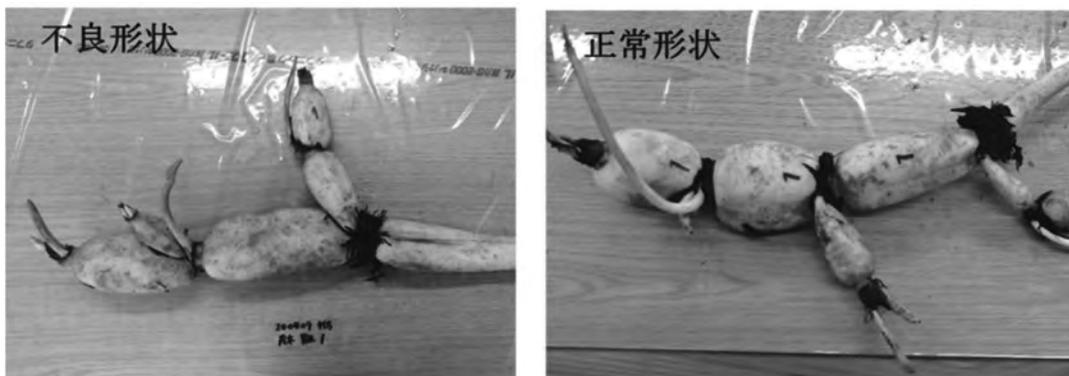


図1 達観評価における形状評価基準

3. 結果および考察

3. 1 定植個体の混種検定

調査した9圃場の中で、調査期間内において1作期以上で混種を検出した圃場は、4圃場（No.1、5、6、9）あった（表3）。

定植前選抜法で混種検定を行った4圃場のうち、3圃場においては本法による混種は検出されなかったが、圃場No.1の5バルク中1バルクについては、異品種の混入が明らかとなった。

定植後全個体法による調査の結果、定植前選抜法で2020年に‘みらい選抜’圃場において混種が確認された圃場No.1においては、同じく2020年に、生育途中の個体でも2個体の異品種を確認した。この異品種2個体は、圃場No.1で2018年以前に栽培されていた‘金澄20号’と品種識別マーカー型が一致しなかったことから、それ以前からの掘り残しもしくは実生由来であることが推定された（表2、4）。さらに、圃場No.1では、栽培品種を‘みらい選抜’から‘ひたちたから’に転換した初年目（2021年）および2年目（2022年）には、それぞれ異品種2個体および1個体の異品種を検出した。同様に、栽培品種が転換された圃場No.6では、2023年に異品種2個体を検出した。

一方、2023年に調査した圃場No.1の‘ひたちたから’190個体、2021年に調査した圃場No.7の‘パワー’48個体、圃場No.8の‘ひたちたから’22個体から混種は確認されなかった。

以上の事から、圃場内での混種の発生は、定植前の種レンコンへの異品種の混入、圃場内における掘り残しもしくは実生由来と推定される個体によって生じることが、DNAマーカーを用いた品種識別技術により明確に示された。

表3 試験期間中に1回以上混種を検出した圃場の全検定結果

圃場No.	2020年	2021年	2022年	2023年
1	◎ ^{a)}	○	○	×
5	○	×	○	
6				○
9	●			

a) ◎：定植前選抜法および定植後全個体法で混種を検出、

●：定植前選抜法で混種を検出、○：定植後全個体法で混種を検出、

×：混種を検出しなかったことを示す。

表4 定植後全個体法により検出した混種

圃場 No.	検定年	栽培品種	供試数 (個体)	混種 (個体)	マーカー-01		マーカー-04		マーカー-20	
					294 ^{a)}	305	287	296	235	239
1	2020年	みらい選抜 ^{b)}	195	2			+ ^{c)}	+	+	-
	2021年	ひたちたから	145	2	+	+				
	2022年	ひたちたから	140	1	+	+				
5	2020年	ひたちたから	267	1	+	+				
	2022年	ひたちたから	121	1	+	+				
6	2023年	ひたちたから	135	2	+	+				

a) 増幅断片長 (bp) を示す。

b) ‘みらい選抜’ の遺伝子型はマーカー-04 の 287bp が-、‘ひたちたから’ は 01 の 294bp が-である。

c) +/-: 解析によるピーク検出の有無を示す。

d) 表中の空欄は、当該マーカーを供試していないことを示す。

3. 2 品種識別技術による漏生個体の確認

定植後全個体法による調査を行った圃場 No.5 では、調査を行った 3 か年 (2020~2022 年) のいずれにおいても、畦畔に漏生個体を確認し、そのうち 2020 年、2022 年の各 1 個体は異品種であることが DNA マーカー検定によって明らかとなった。これらが確認された畦畔は隣接圃場がないことから、‘ひたちたから’ の栽培を始めた 2018 年以前に栽培されていた異品種もしくは実生由来の畦畔内の掘り残し (自然交雑もしくは自殖による種子由来の実生が生長し、形成された肥大茎が畦畔内に残存した個体) によるものと考えられた。

畦畔からの漏生個体を継続的に除去しているにもかかわらず、圃場 No.5 では、異品種が残存し続けていることが確認された。畦畔からの漏生個体が混種の主要な要因の一つであることが明らかになるとともに、産地で実施されている手作業による抜き取り等の手法では、完全な除去が困難であることが示唆された。

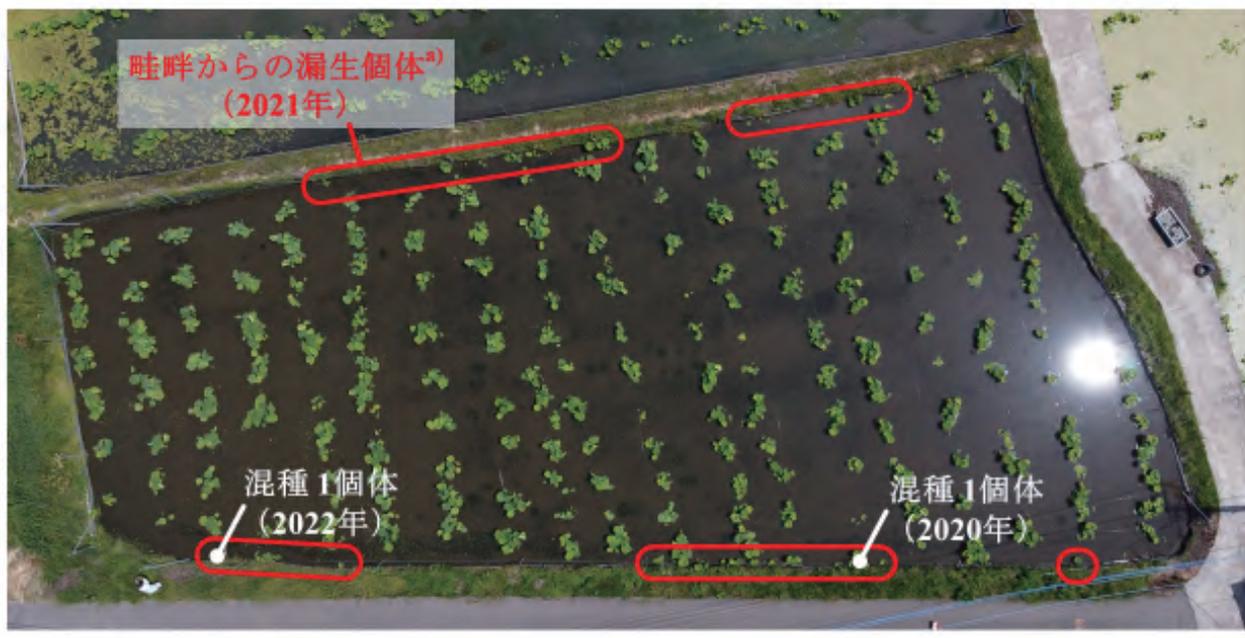


図2 圃場5の畦畔からの漏生する個体 (赤い楕円) および混種検定により検出した混種

a) 写真は茨城県農業総合センター園芸研究所野菜研究室が 2021 年に撮影したものの提供を受けた。

3. 3 達観選抜された不良形状個体の混種検定

達観選抜による不良形状 4 個体は、品種識別により全て異品種個体であることが明らかとなった (表 5)。これら 4 個体の遺伝子型は既知のいずれの品種の遺伝子型とも一致しなかったことから、実生由来であると考え

られた。一方、この検定において対照として供試した同一圃場から採取した‘ひたちたから’の正常形状 10 個体のうち、1 個体は前作に栽培されていた‘金澄 36 号’であった。

肥大茎の形状による達観選別は、生産者が栽培品種の均一性を維持するために行っている混種対策の一つであるが、その効果については未検証であった。本研究では、供試個体数は少ないものの不良形状として達観選抜した個体はすべて実生由来と考えられる異品種であった。産地では、肥大茎の節間長が長い、作土中で肥大茎が形成される位置が深いといった著しい不良形質を持つレンコン（産地により「ヤナギ」、「ヤリ」等、呼称は異なる）がしばしば発生し、栽培圃場では、出荷規格外となる、収穫作業の効率を著しく低下させる等、経営上の問題となる。達観選抜による形状評価は、実生由来の異品種を除去する手法として有効であると考えられた。一方で、達観で正常個体と評価された個体の中にも異品種が含まれていたことから、栽培品種間の識別には適さないことも併せて示唆された。

表 5 ‘ひたちたから’種レンコン増殖圃場 No.9 における不良形状個体の品種識別結果

形状	個体 No.	DNAマーカー																品種識別結果		
		01		04		13		15		16		18		20		24			26	
		294 ^{a)}	305	287	296	295	301	250	256	311	317	305	311	235	239	266	270		254	268
不良	1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	該当なし
	2	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	該当なし
	3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	該当なし
	4	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	該当なし
正常	1~9	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	ひたちたから
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	金澄36号

a) 増幅断片長 (bp) を示す。

b) +/- : 解析によるピーク検出の有無を示す。

3. 4 混種率

混種が確認された 3 圃場 (No.1、5、6) における混種率は 0.4~1.5% であり、そのうち品種転換初年目の圃場はいずれも 1% 以上の混種率であった (表 6)。

表 6 レンコンの現地圃場における混種率

圃場 No.	検定年	栽培品種	供試数 (個体)	異品種 (個体)	混種率 ^{a)} (%)	備考
1	2020年	みらい選抜	195	2	1.0	
	2021年	ひたちたから	145	2	1.4	品種転換初年目
	2022年	ひたちたから	140	1	0.7	" 2年目
5	2020年	ひたちたから	267	1	0.4	異品種は畦畔からの漏生個体
	2022年	ひたちたから	121	1	0.8	異品種は畦畔からの漏生個体
6	2023年	ひたちたから	135	2	1.5	品種転換初年目

a) 混種率 (%) = (検出した混種個体数 / 圃場内の全個体数) × 100

3. 5 総合考察

本研究における DNA マーカーを用いた品種識別技術により、これまで達観評価により行われていた産地における混種の実態がより明らかになった。圃場内での混種の発生は、定植前の種レンコンへの異品種の混入、圃場内における掘り残しもしくは実生由来と推定される個体によって生じること、品種転換時には混種が発生しやすいことが改めて確認された。従来から産地では、混種対策として、達観評価による不良形状個体の除去および圃場内における漏出個体の除去が実施されてきた。達観評価による不良形状個体の除去は、実生由来の異品種を除去する手法として有効であると考えられた一方、特に形状の類似した栽培品種間の識別には適さないことが

示唆されたことから、品種転換時には、ある程度の混種が生じる危険性は否めない。一方で、圃場 No.1 においては、品種転換後 3 年目の圃場からは混種が検出されなかったことから、種レンコンの時点で混種を除去することで圃場内の混種を回避できる可能性が示された。畦畔からの漏生個体の除去については、圃場 No.5 において、異なる年度で異なる場所に異品種の混入が確認されたことから、混種を防ぐためには、漏出個体を発見したら都度すべての漏出個体を除去する必要があると推定された。

また、DNA マーカーを用いた品種識別技術は高価な試薬や解析機器を要することから、コスト削減・簡易化が課題となっている。大橋ら (2022) は、LAMP 法を用いて愛知県の主要品種の識別技術を開発し、より簡易な爪楊枝懸濁法に供試する部位として、DNA 増幅の阻害物質の少ない側芽が適すると明らかにした。同様の技術を混種検定の全個体調査に適用するためには、阻害物質の多い葉を供試することから、DNA 増幅反応の安定化が課題となる。

4 さいごに

本研究に供試した圃場は、いずれも生産部会や研究組織が共同で管理する種レンコン増殖圃場であり、掘り残しなく収穫し、定植個体の選別や畦畔の補修を行うといった混種対策に多くの労力が割かれている。一方、生産者が個人で管理する一般的な種レンコン増殖圃場では、十分な混種対策が行われず、より多くの異品種が混入している危険性がある。そのため、レンコン生産の品質安定にむけては、既存の混種対策の励行が重要である。さらに、今後は本県の主要品種に適用可能で、安価かつ簡易に混種を検定できる手法を開発していく必要がある。

付記

本研究の一部は、「本県産レンコンブランド力向上のための優良選抜系統の安定生産技術開発試験」により実施した。

引用文献

- 後藤 晋・渡辺敦史・池田浩一 (1997) RAPD マーカーによるハゼノキの品種識別. 日本林学会誌 79 (4) : 229-233.
- 堀井 学・八城和敏・島本桂介・貝塚隆史・金子賢一・石井亮二 (2016) 茨城県における年内掘りに適したレンコン優良系統の選抜. 茨城農総セ生工研研究報告 15 : 41-51.
- 伊藤順之輔 (1984) イネ種子生産圃場における Contamination について. 日本作物学会中国支部研究集録 26 : 25-26.
- 鎌形民子・長谷川理成・畠山富治・藤代 淳 (1988) 水稻採種栽培におけるもち品種のうるち化現象. 千葉県原種農場研究報告 10 : 13-25.
- 霞 正一・八城和敏・佐久間文雄・林 幹夫 (2000) 繊維強化プラスチック製大型容器を用いた食用ハス遺伝資源の簡易保存と交配育種への利用. 茨城農総セ生工研研究報告 3 : 59-65.
- 国産レンコンのブランド力強化コンソーシアム (2019) 品種識別マニュアル レンコン編 2019. 茨城大学農学部 (連絡先: 久保山 勉).
- 大橋博子・市川あゆみ・鈴木良地・水上優子 (2022) LAMP 法による愛知県産レンコンの品種識別技術の開発. 愛知県農業総合試験場研究報告 54 : 103-106.
- 臼井裕一・足立静香・紙谷元一・中島寿亀・山本義久・鈴木忠直・安井明美 (2006) タマネギの品種識別用 DNA マーカーの開発. 日本食品科学工学会誌 53 (9) : 498-504.
- 山内敏美・服部 勲 (1994) 採種圃場におけるこぼれ籾発芽の品種間差異とこぼれ籾発生苗の防除法. 東北農業研究 47 : 11-12.

The Actual Situation of Variety Contamination in Lotus Root Cultivation

Yuu KASHIWAGI¹ and Maki KUZUYA

Summary

We investigated the actual situation of variety contamination in 9 local fields of lotus root (*Nelumbo nucifera*) with DNA marker fingerprinting. DNA was extracted from seed rhizomes and leaves. Variety contamination was confirmed in 4 fields, with incidence rates of 0.4-1.5%. The main causes of variety contamination were unharvested seed rhizomes from fields and ridges during variety conversion. In one field, all poorly-shaped seed rhizomes removed by observation were from different varieties. This study shows the effectiveness of local countermeasures against variety contamination, such as selection by observation of seed rhizomes.

Keywords: lotus root, variety contamination, variety identification, DNA marker

¹ Address: Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center, 3165-1 Ago, Kasama, Ibaraki 319-0292, Japan