

IV 考 察

今回、筆者は開発にコストがかからず、また将来的に採種担当者および農業協同組合関係者等現場で識別できる方法を前提としてRAPD分析を選択した。これら現場で分析される場面は、圃場で異株が現れた場合の確認や生産物を出荷する時に限られ、季節的な分析に限られる。また、従事者は数年おきに異動があり煩雑また危険を伴う操作に習熟するのは困難な場合が多い。つまり、操作が簡易で安全かつ低コストである方法を前提とした。前章で述べたように、CAPS分析は手順が煩雑になるとともに時間およびコストが増加する。SSR分析は電気泳動の際、アガロースゲルよりもポリアクリルアミドゲルが適しているが、アクリルアミドは神経毒が強く危険を伴い、使用する際には熟練を要する。アガロースゲルを使用する場合には、アガロース濃度を高くする必要があり電子レンジを用いて作製する時は濃度を高くすると突沸し易く作製が難しい。1.5%程度のアガロースゲルが作製も容易で染色する際の操作性も良く安全である。以上のことからRAPD分析を採用した。

大坪ら（1997）はイネの品種識別マーカーを開発する際、当初、10品種を識別するために600プライマーを検討した。筆者はこれまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用した。その結果、28プライマーでコムギ17品種を識別できるランダムプライマーセットを選定できた。さらに、小麦農林61号は県間で多型が見られた。これは、供試した各県の実生種や原種の維持は長期間に渡り各県独自に行われており、異なる地域と方法で選抜・淘汰されてきたためと考えられる。

今後出てくる新しい品種についても、いままでの情報を有効に利用することが必要と思われる。また、前章でイネの品種識別マーカーを開発する時に多型の現れた12種類の内、7種類がコムギでも使用できたことはイネとコムギの場合、共通のランダムプライマーが使用できる可能性を示唆していると思われる。

本論文では再現性が高く、かつ、明瞭なバンドをDNAマーカーとして選抜した。しかし、一般的にRAPD分析は他のDNAマーカーに比較して再現性が低いと言われている。水稻では大坪ら（2002）や小笠原ら（2000）が、STS化することにより視認性を高め、さらに、マルチプレックス化することによって操作回数を減らし簡便化することにより、実用化を図っている。また、イチゴにおいても田崎ら（2004）がSTS化し、国内主要品種を含む16品種の中で栃木県育成のとちおとめおよび

とちひめを識別できるプライマーを開発し、今後マルチプレックス化を行う予定であると述べている。コムギにおいても、同様にこれらの手法を用いて、実用化を図る必要がある。

また、DNAマーカーを研究者以外が使用する場合に残された課題がある。今回の実験ではDNA抽出は、生葉身から市販のDNA抽出キットを用いて行った。実際には、種子生産やムギ類の流通関係者がこの識別業務を行うことが予想され、より簡便で安価な方法でDNAを抽出する必要がある。イネの葉からの抽出では超簡単DNA抽出法（池田ら 2000）が開発されている。バレイショでも葉から簡易にDNAを抽出する方法が開発されている（森ら 2003）。現場で適用するには葉と同様に穀粒から簡易で安価なDNA抽出方法を開発する必要があると考えられた。染色についても、より安全性の高い蛍光色素の利用について検討していく必要があると考えられた。

第2節 オオムギの優良品種識別

I 緒 言

栃木県におけるオオムギの生産は、六条オオムギでは1995年には作付面積がわずかに61ha、収穫量が261tであったが、2003年には作付面積が2370ha、収穫量が10100tまで増加した。二条オオムギは主にビール醸造用であり、1999年に作付面積が9320ha、収穫量が33400tまで落ち込んだが、2003年には10900ha、42000tまで回復した。このように、減少傾向であったオオムギの生産は、コムギと同様に、順調に生産振興が図られているように見える。しかし、2000年から進められてきた民間流通の影響から、産地間の品質評価に格差が広がっている。また、全国的な生産増加の反面、品種や品質は必ずしも実需者側からの要望に答えられていない。

そのため、オオムギ品種の簡便で正確な品種識別技術に対する要望は高いが、国内オオムギ品種のDNAマーカーを利用した品種識別については、Turuspekovaら（2001）が主要精麦用オオムギをSSR分析で、内村ら（2004a）が二条オオムギでCAPS分析を行っているに過ぎない。

以上の事から、本節ではコムギと同様にDNAマーカーの中でも開発が低コストで済み、また、最も検出操作が簡便であるRAPD分析を用い、栃木県の奨励品種を中心として関東周辺地域の奨励品種を識別できるRAPDマーカーの組合せを明らかにしようとした。

第6表 供試品種の交配組合せ及び育成地。

麦種	品種名	交配組合せ	育成地
二条 オオムギ	関東二条35号	大系R4224/関東二条29号	栃木県農業試験場栃木分場
	ミカモゴールドン	南系B4718/新田二条1号(はるな二条)	栃木県農業試験場栃木分場
	スカイゴールドン	関東二条25号/栃系216	栃木県農業試験場栃木分場
	あまぎ二条	ふじ二条/成城17号	キリンビール(株)
	なす二条	成系5/5-3//成系5	キリンビール(株)
	みょうぎ二条	栃系144(ミサゴールデン)/やす系50(さつきばれ)	サッポロビール(株)
	タカホゴールドン	大系R2068/栃系144(ミサゴールデン)	栃木県農業試験場栃木分場
	きぬか二条	83SBC27/吉系8(ニシゴールト)	キリンビール(株)
六条 オオムギ	はるな二条	G65/K-3//さつき二条	サッポロビール(株)
	シュンライ	ミノリムギ/東山皮68号	長野県農事試験場
	東山皮101号	東山皮73号/東山皮86号	長野県農事試験場
	ミノリムギ	東山皮1号/コウゲンムギ	長野県農事試験場
	カシマムギ	北関東皮3号/ムサシノムギ	農事試験場
	マサカドムギ	Ea52/関東皮53号	農業研究センター
	さやかぜ	関東皮70号/関東皮68号(すずかぜ)	農業技術研究機構作物研究所
	すずかぜ	鴻系RB3017-5/関系b316	農業研究センター
裸ムギ	ファイバースノウ	東山皮85号/東山皮86号	長野県農事試験場
	セツゲンモチ	弥富モチ/東山皮83号//東山皮82号	長野県農事試験場
	イチバンボシ	四国裸58号/四R系697	四国農業試験場

交配組合せの()内は後に付された品種名。

II 材料と方法

1. 供試品種

供試品種は二条オオムギのミカモゴールドン、スカイゴールドン、あまぎ二条、なす二条、みょうぎ二条、タカホゴールドン、きぬか二条、はるな二条、および栃木県農業試験場で有望視している関東二条35号、六条オオムギのシュンライ、東山皮101号、ミノリムギ、カシマムギ、マサカドムギ、さやかぜ、すずかぜ、ファイバースノウ、セツゲンモチ、および参考として埼玉県で奨励品種に採用している裸ムギのイチバンボシの合計19品種である。各都県産原々種または原種を供試した。各品種の交配組合せおよび育成地を第6表に示した(農業技術協会 2003)。

関東二条35号は雑種第13代であり、品種に向けて検討しているもののDNAマーカー開発のために供試できる程度まで遺伝的に固定が完全であるか検討していないことから、系統育種法で維持してきた雑種第11世代での1個体由来の5系統を供試した。

2. DNAの抽出

コムギと同じ方法で抽出を行った。

3. RAPD分析による品種識別

抽出したDNAは、1/10TEバッファーを用いて5ng/μLに調製し、鋳型DNA量として1μL使用した。プライマー、PCR反応液、PCR増幅、電気泳動、およびアガロースゲルの染色はコムギと同じ方法を用いた。染色後、デンスシトグラフAE-6920-FX(アトー社)を用いPCR増

幅産物を確認し、バンドの有無によるDNA多型を検出して品種識別を行った。

III 結果

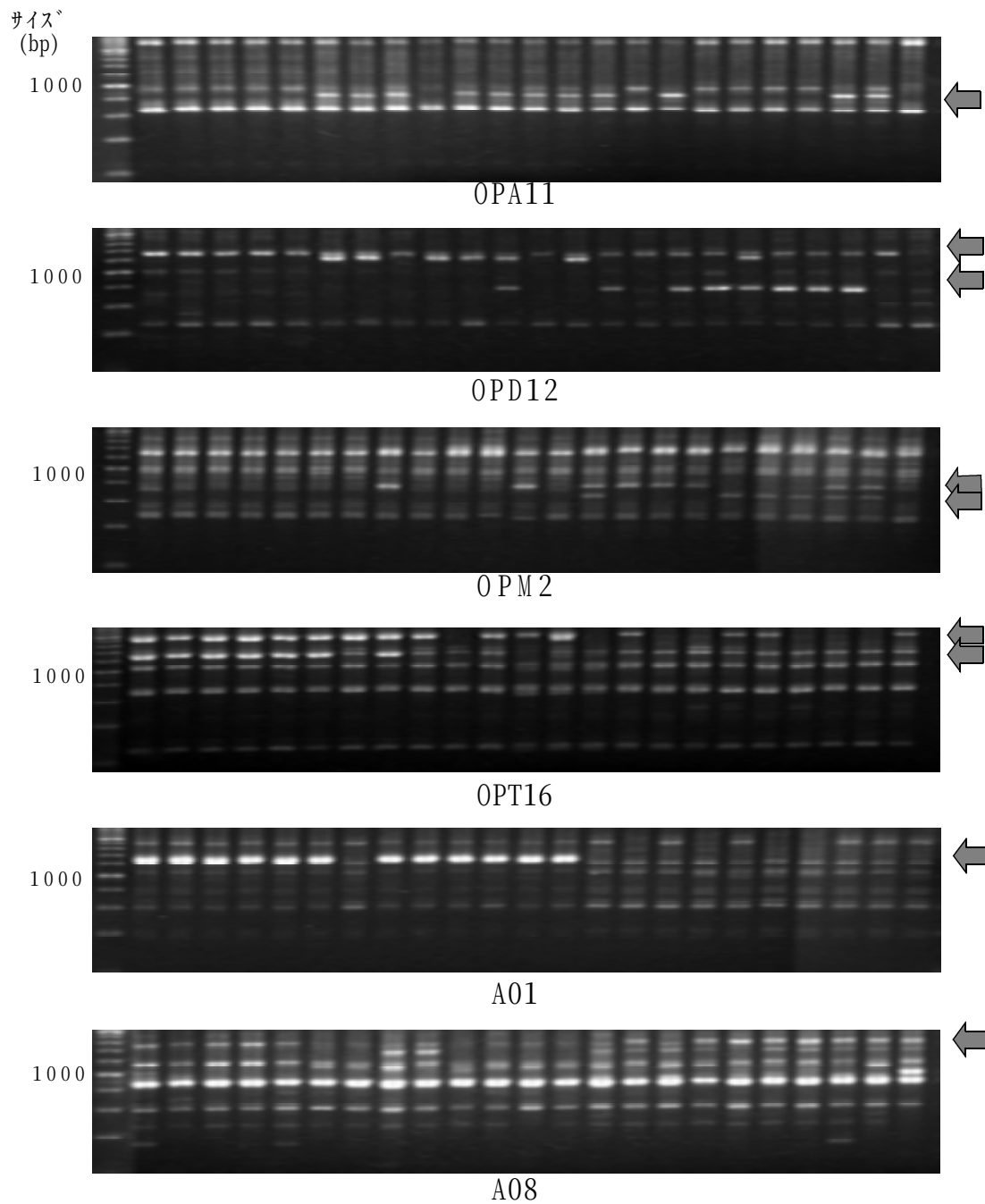
供試した28プライマーの内、コムギと同じ2プライマーで増幅が見られなかった。残り26プライマーの中で増幅の劣るものも含め、合計246バンドが検出できた。これらのバンドの内、再現性があったのは156バンドであった。品種間のDNA多型が認められたのは16プライマーで64バンドであった。DNA多型が認められたランダムプライマーについては、最低2回DNA多型を確認した。その結果、明瞭かつ再現性の高い多型をDNAマーカーとした。得られたDNAマーカーは16プライマーにおいて33種類に絞られた(第7表)。関東二条35号の供試した系統間で多型は認められなかった。雑種第13代であるが、156バンドで多型が見られなかったことから、今回の結果からでは、関東二条35号はほぼ固定していると推察された。以下、関東二条35号については1品種として記述する。これらのDNAマーカーの内、OPD2を用いて増幅した2100bpで得られたDNAマーカーは関東二条35号にのみ、A08の1000bpはイチバンボシのみにバンドが現れるポジティブマーカーであった。ネガティブなDNAマーカーでは、OPG5の350bpがシュンライにのみ、OPG6の1500bpがあまぎ二条にのみ現れなかった。OPB1の1900bp、およびOPG16の850bpで得られたDNAマーカーは二条オオムギ品種にのみバンドが現れた。逆にOPG16の750bpは二条オオムギ以外にバンドが現れるDNAマーカー

第7表 RAPD分析によるオムギの品種識別

プライマー名	OPH110P61	OPC4	OP02	OP05	OP012	OP018	OP65	OP66	OP611	OP616	OP42	OP18	OPT16	OP16	OP01	OP08	OP08															
マーカー長 (bp)	800	1900	1200	2100	900	500	560	350	1250	600	930	350	1530	950	550	450	1200	1100	850	750	780	680	1230	1600	1900	1300	1200	1650	1800	1350	1050	1000
識別セット	O																	O									O					
関根二条35号	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
ミカモゴルデン	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
スカイゴルデン	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0
あまぎ二条	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
なす二条	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
みょうぎ二条	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
タカホゴルデン	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
きぬが二条	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
はるな二条	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
シュンライ	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
東山渡田場	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
ミノリムギ	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1
カシムギ	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
マサカドムギ	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
さやかせ	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
すずかせ	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
ファイバースノウ	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
セツゲンモチ	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0
イチバンボン	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1

DNA多型の現れたマーカーの品種毎の有無を0（バンド無し）、1（バンド有り）で示した。

○印は19品種の識別に必要なマーカーを示している。



第7図 供試したオオムギ19品種を識別できる6種類のランダムプライマーで検出されるDNA.

図の下にランダムプライマー名を示す. 図はいずれも左のレーン1番目から, 1. サイズマーカー (200bp DNA ladder), 2. 関東二条35号-1, 3. 関東二条35号-2, 4. 関東二条35号-3, 5. 関東二条35号-4, 6. 関東二条35号-5, 7. ミカモゴールドン, 8. スカイゴールドン, 9. あまぎ二条, 10. なす二条, 11. みょうぎ二条, 12. タカホゴールドン, 13. きぬか二条, 14. はるな二条, 15. シュンライ, 16. 東山皮101号, 17. ミノリムギ, 18. カシマムギ, 19. マサカドムギ, 20. さやかぜ, 21. すずかぜ, 22. ファイバースノウ, 23. セツゲンモチ, 24. イチバンボシ.

矢印が識別マーカー.

第8表 オオムギ品種識別のためのランダムプライマーの塩基配列.

プライマー名	塩基配列(5'→3')
OPA11	CAATCGCCGT
OPD12	CACCGTATCC
OPM2	ACAACGCCTC
OPT16	GGTGAACGCT
A01	TGCACTACAACA
A08	GCCCGTTAGCA

であった。A01の1200bpおよび1050bpで得られた多型は二条オオムギのスカイゴールドのみと二条オオムギ以外の品種にバンドが現れた。

さらに、OPA11, OPD12, OPM2, OPT16, A01, A08の6種類のランダムプライマーで増幅された9マーカーを用いることによって、供試した19品種すべてを識別することができた(第7図)。第7表に○印を付けて示したのがこれらのプライマーおよびDNAマーカーの長さである。これらの識別マーカーについては、コムギと同様の方法で再現性について確認した。また、6プライマーの塩基配列を第8表に示した。

IV 考 察

コムギと同様の理由から、RAPD分析のみを用いてオオムギ品種を識別できるマーカーを開発した。

先に述べたように、大坪ら(1997)はイネの品種識別マーカーを開発する際、当初、10品種を識別するために600プライマーを検討した。筆者はこれまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用した。その結果、28プライマーでオオムギ19品種を識別できるランダムプライマーセットを選定できた。また、二条オオムギの関東二条35号は、雑種第13代であるが系統間で多型はみられなかった。これは既に固定がなされており、かつ雑種第11代では、1個体から採種したことによると考えられる。現在、品種の世代交代の期間が短縮してきており、固定が不完全なまま品種になっている例が見受けられる。こうした材料では、栽培環境が大きく変わることによって形質に分離がみられる場合がある。また、前年の気象条件によって不稔が多く周辺の異品種との自然交雑により混種となる(注：福岡県平成9年度秋冬作および平成10年度早期水稻試験成績概要書)場合もある。これらの種子を配布された原々種や原種担当者の心労は計りきれない。今後、固定度調査の中に今回のようなDNAマーカーによるチェック

体制を導入することも有効と考えられる。今後出てくる新しい品種についても、いままでの情報を有効に利用することが必要と思われる。

本論文の成果を実用化するには、コムギと同様に、簡易なDNAの抽出法を開発するとともに、プライマーをSTS化することにより視認性を高め、さらに、マルチプレックス化することによって操作回数を減らし簡便化する必要がある。また、さらに効率的に多型を検出するため、RAPD分析だけではなく、AFLP分析、SSR分析等も実施する必要性が考えられる。

第3節 コムギ優良品種のクラスター分析による分類

I 緒 言

近年の育成品種は加工適性の向上を最も重要な育種目標としていることから交配母本の系譜が似通ってきており、近縁度の高まっていることが懸念される。内村ら(2004b)は、育種計画策定のために、地域に普及している品種間、交配親となる品種間の遺伝的背景を把握しておくことは地域戦略として安定多収を維持するために重要な情報になるとしている。また、新品種育成のための交配親では、育種目標となる有用遺伝子の由来を知る手がかりとなり、効率的にそれらに関する遺伝子の集積を行い、新品種育成を図る情報となると述べている。そこで、その第1段階として、品種間の遺伝的関係を調査するため、DNA多型データによるユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。

II 材料と方法

1. 供試品種

供試品種は前節のコムギの優良品種識別で供試した、小麦農林61号、イワイノダイチ、タマイズミ、春のかがやき、きぬの波、つるぴかり、ダブル8号、シラネコ

ムギ、あやひかり、小麦農林26号、キヌヒメ、ユメセイキ、フウセツ、しゅんよう、ユメアサヒ、バンドウワセ、およびニシノカオリの合計17品種である。交配に用いた両親名、育成地などは第3表に示した。

2. クラスター分析

全品種についてDNA多型のデータ（第4表）を用いてクラスター分析を行い、品種間の距離をデンドログラムにより視覚化した。RAPDマーカーにより検出したDNA多型のデータは、PCR増幅産物が現れた場合を‘1’、無い場合を‘0’とした。数値化したDNA多型の全データを、そのまま青木によるプログラム（注：<http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/Mokuji/index2.html>）に入力し、正規化せずユークリッド距離を求め、群平均法（UPGMA）によるクラスター分析（奥野ら 1971, 1976）を行った。

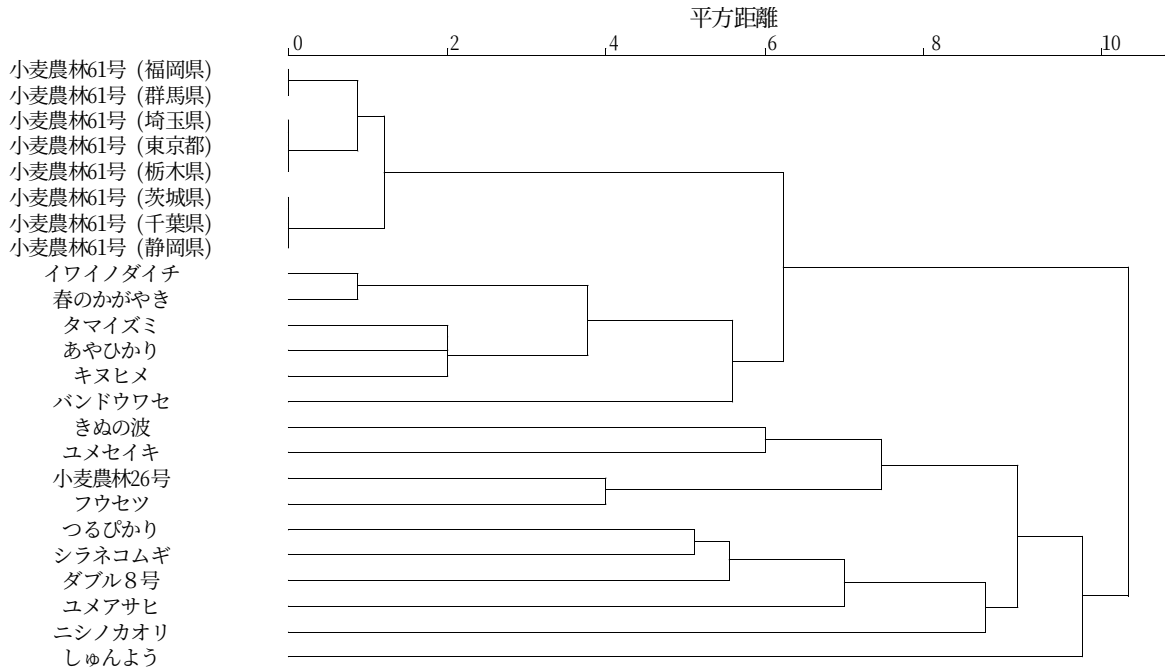
III 結 果

23種類のマーカー（第4表）より計算したコムギのクラスター分析の結果として得られたデンドログラムを第8図に示した。その結果、大きく2つのクラスターに分類された。小麦農林61号を含むクラスター（A）とそれ以外のクラスター（B）である。農業研究センターおよびその後独立行政法人化した農業技術研究機構作物研究所は同一場所で継続的に育種を実施していることから、同一育成地とした。この機関で育成された品種は、硬質粒で醤油醸造用のタマイズミも含めてAクラスターに分類された。九州農業試験場、長野県農事試験場および群馬県農業試験場育成の品種は一方のクラスターに偏らなかった。しかし、Aクラスターに含まれる品種の祖先系統には西海168号、ニシカゼコムギ、およびヒヨクコムギの九州農業試験場育成品種が多く使われている傾向があった。Bクラスターは大きく3つに分類された。低アミロース品種であるイワイノダイチ、春のかがやき、あやひかり、きぬの波、ユメセイキ、およびつるぴかりは1つのクラスターに含まれなかったが、硬質粒品種のダブル8号、ユメアサヒ、およびニシノカオリは1か所に集中した。Bクラスターの中で最も遠い位置にあるしゅんようは東北農業試験場の系統が母本として使用されていた。小麦農林61号は県間の多型バンドが2種類あり、3つのクラスターに分類された。福岡県と群馬県、埼玉県と東京都および栃木県、茨城県と千葉県および静岡県である。茨城県を含むグループが最も離れて位置していた（第8図）。

IV 考 察

本論文ではRAPD分析のみで識別を行った。しかし、近縁度が高まってくると品種識別は困難になってくる可能性が高まる。そこで、現在採用されている品種の遺伝的関係を確認するため、クラスター分析を行った。コムギでは硬質粒品種は醸造用のタマイズミを除き平方距離はやや大きい1か所に集中し、また、作物研究所育成品種が平方距離6を基準とすると1クラスターに含まれるなど用途や育成地の違いによってクラスターが分けられる傾向が一部みられた。系譜で見ると、低アミロース系統の中でも、西海168号由来のイワイノダイチと春のかがやきが1つのクラスターに含まれ、関東107号由来の品種はBクラスターに分類された。関東107号と西海168号の組合せであるあやひかりはイワイノダイチ、春のかがやきとやや離れたAクラスターに分類された。硬質粒品種についても、タマイズミを除く3品種の親には北海道育成系統が用いられていた。Bクラスターで最も遠くに位置したしゅんようは東北農業試験場育成系統を用いていた。水田・吉田（1996b）は、西海系統16品種相互間の近縁係数に基づいてクラスター分析を行い、3つの群に分類でき、それぞれの群で特徴的な系譜的關係がみられたと述べている。また、それらの群は品質や耐病性などの特徴を持っているとしている。今回の結果から、DNAマーカーからでも近縁係数と同様に用途や育成地がある程度分類できる傾向があり、系譜を考慮するとよりの確かな分類ができることが示唆された。

小麦農林61号は収集した県の間で多型がみられ、3つのクラスターに分けられた。水稻では、川島・勝股（1961）がホウネンワセ、コシヒカリおよびたかね錦を用いた純系維持のための研究を実施し、その中でこれらの普及に移されている品種でも遺伝的に完全に固定はしておらず、そのため、二次選抜も必要であることを明らかにしている。また、畠山ら（注：昭和60年度千葉県原種農場試験成績書）は22県からコシヒカリを収集し特性を調査し、穂長、着粒数、出穂期等で地域的に異なる傾向がみられたとしている。コムギでは西尾ら（1973）が奨励品種としている各県から小麦農林61号の種子を取り寄せ、採種地の相違と形質変異との関係を検討している。その結果、主成分分析による系統分類に関与した形質に出穂期、千粒重および1株穂数があり、1～2の形質について表現型および遺伝子型に差異を認めたが、その変異は微働遺伝子による範囲内であるとしている。小麦農林61号の育成地である佐賀県では1995年に奨励品種から廃



第8図 RAPDマーカーによる多型情報を基にしたコムギ品種間のクラスター分析結果。

止した。そこで、供試した各県の原々種や原種の維持は長期間に渡り各県独自に行われており、異なる地域と方法で選抜・淘汰されてきたと考えられる。西尾ら（1973）によると、各県の原々種導入経路は千葉県が1953年に九州農業試験場から、東京都が1954年に埼玉県から入手した以外は、年度は異なるものの佐賀県から直接入手している。埼玉県が1947年、福岡県が1948年、静岡県と栃木県が1952年、群馬県が1953年、茨城県が1956年であり、DNAマーカーを用いて分類した3つのクラスターの分類との関係はみられない。西尾ら（1973）が述べているように、単に導入先の違いだけではなく、採種地の自然的条件や原種の取扱い方法などの違いも含めて関連性を考える必要がある。RAPD分析は遺伝子レベルではなく塩基レベルの変異を利用しているので、この多型が直ちに表現型に反映するとは限らない。しかし、県間でDNAマーカーに多型が現れたことは西尾ら（1973）の結果をDNAレベルでも裏付けていると考えられる。厳密に品種の定義を考えた場合に特性が均一であることが条件の一つであることから、原々種や原種生産の際にDNAマーカーを用いた変異のチェックも必要になってくる。また、イネのゲノムが解読され他のイネ科作物等へのマーカー開発のための利用が試みられている。CAPSマーカーはこれらの遺伝子情報に基づいて作製されたものが多い（内村ら 2004a）。これらを利用することにより表現型に関連したDNA領域の識別が可能になってくれば、単に変異を識別するだけではなくどのような変

異が起きているか解明されると考えられる。

以上の様に、クラスター分析の結果からでは、用途や育成地毎に特徴があり、まだ遺伝的多様性が残されていると推定される。

第4節 オオムギ優良品種のクラスター分析による分類

Ⅰ 緒 言

栃木県におけるオオムギの作付けはビール醸造用の二条オオムギと主に食用となる六条オオムギがある。近年の育成品種はコムギと同様、加工適性の向上を最も重要な育種目標としていることから交配母本の系譜が似通ってきており、麦種ごとに近縁度の高まっていることが懸念される。一方、スカイゴールドのように、二条オオムギにも遺伝子を六条オオムギから導入している品種もある（谷口ら 2001）。今後、オオムギの育種を実施していくに当たり、二条オオムギや六条オオムギの品種間での、また、二条オオムギと六条オオムギの遺伝的関係を把握しておくことは、育種目標となる有用遺伝子の由来を知る手がかりとなり、効率的にそれらに関する遺伝子の集積を行い、新品種育成を図る情報となる。そこで、二・六条オオムギ品種間の遺伝的関係を調査するため、ユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。

II 材料と方法

1. 供試品種

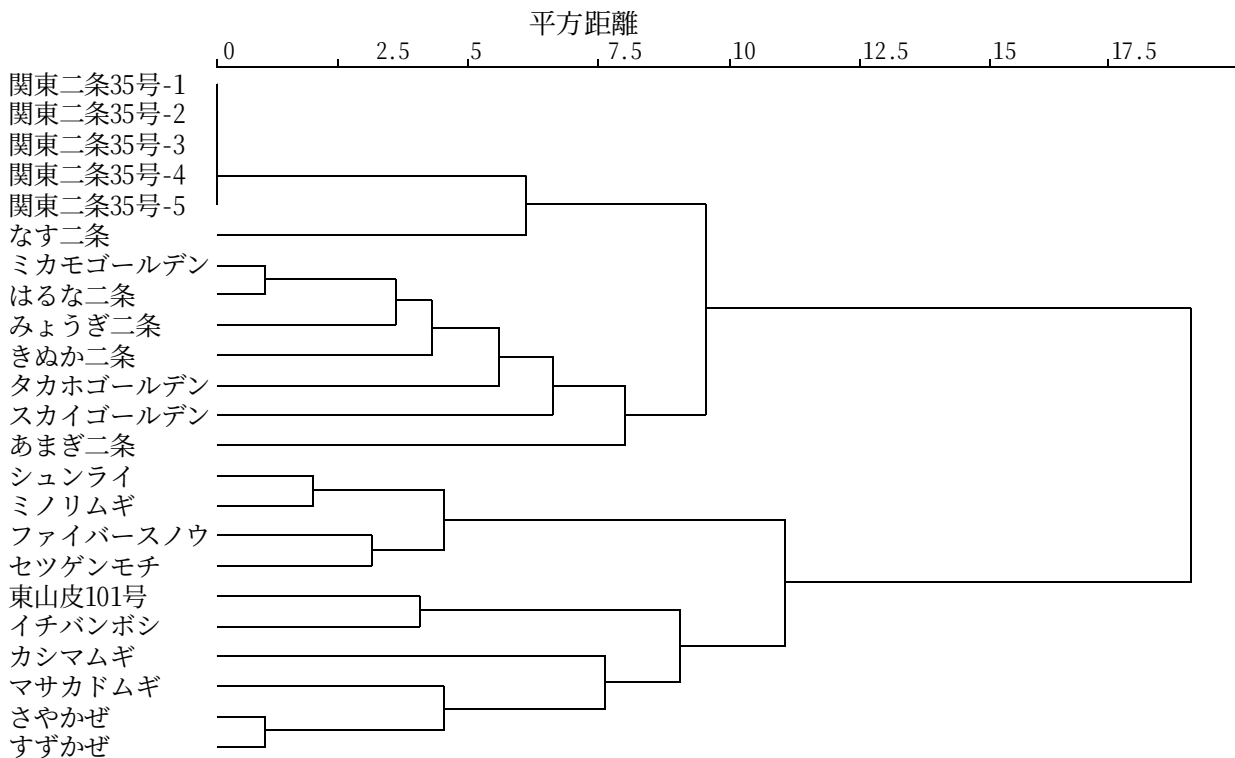
供試品種は前節のオオムギの優良品種識別で供試した、二条オオムギのミカモゴールドン、スカイゴールドン、あまぎ二条、なす二条、みょうぎ二条、タカホゴールドン、きぬか二条、はるな二条、関東二条35号、六条オオムギのシュンライ、東山皮101号、ミノリムギ、カシマムギ、マサカドムギ、さやかぜ、すずかぜ、ファイバースノウ、セツゲンモチ、および参考として裸ムギのイチバンボシの合計19品種である。交配に用いた両親名、育成地などは第4表に示した。

2. クラスタ分析

コムギと同様な方法で、全品種についてDNA多型のデータ（第7表）を用いてクラスタ分析を行った。

III 結 果

33種類のマーカー（第7表）より計算したオオムギのクラスタ分析の結果として得られたデンドログラムを第9図に示した。オオムギの品種は大きく2つのクラスターに分類された。二条オオムギと裸ムギを含む六条オオムギのクラスターである。二条オオムギのクラスターは関東二条35号およびなす二条とそれ以外の品種の2つのクラスターに分類された。関東二条35号は、系統間で多型がみられなかった。はるな二条を含むクラスターははるな二条と近縁度の高いクラスターで、最も遠くに由来の異なるあまぎ二条が位置した。六条オオムギのクラスターは大きく3つのクラスターに分類された。長野県農事試験場育成の品種のみからなるクラスター、東山101号とイチバンボシからなるクラスター、農業研究センター育成の品種からなるクラスターである。



第9図 RAPDマーカーによる多型情報を基にしたオオムギ品種間のクラスタ分析結果。

IV 考 察

オオムギのクラスタ分析の結果では、二条オオムギと六条オオムギとに明確に分かれた。これは、二条オオムギは醸造用として、六条オオムギは精麦用として育成されていることから、遺伝的背景が異なるためと考えられる。六条オオムギの中でも長野県農事試験場と農業研究センターでクラスタが分かれているが、これは、長

野県農事試験場は並性品種を、農業研究センターは渦性品種の育成を主に行っており、やはり遺伝的背景が異なっていることに起因すると思われる。この結果は裸ムギであるイチバンボシを除くとSSR分析で解析したTuruspekovら（2001）の結果と類似している。二条オオムギの関東二条35号は、雑種第13代であるが系統間で多型はみられなかった。

今後、固定度調査の中に今回のようなDNAマーカーによるチェック体制を導入することの有効なことが判明したと考えられる。

第5節 まとめ

栃木県産ムギ類の品質向上および原種、原々種の混種防止を目的に栃木県の奨励品種および有望視している品種を中心に関東周辺地域に作付けされているコムギ17品種、二条・六条・裸オオムギを含むオオムギ19品種についてRAPD分析による品種識別技術を開発した。これらの品種識別はコムギでは5種類のランダムプライマーを用いてDNAを増幅した後、1.5%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で染色し、現れた6種類のDNAマーカーの多型を確認することで可能であった。オオムギでは6種類のランダムプライマーで現れた9種類のDNAマーカーの多型を確認することで可能であった。1945年育成の古い品種である小麦農林61号は原種の採種地により多型が認められた。雑種第13世代の二条オオムギ関東二条35号の系統間に多型は認められず、固定しているものと考えられた。クラスター分析の結果からでは、コムギでは小麦農林61号を含むクラスターとそれ以外のクラスターの2つに、オオムギでは二条オオムギと六条オオムギとの2つのクラスターに明確に分類できた。用途や育成地毎に特徴があり、まだ遺伝的多様性が残されていると推定される。

第4章 コムギおよびオオムギにおける 近縁係数と遺伝的距離との関係

遺伝的背景を把握する方法としては、交配親となる品種間の近縁係数や遺伝的距離の解析が挙げられる。近縁係数は、品種の系譜図を基にして共通な祖先品種から統計的に算出する手法である。近縁係数の算出はコムギ（水田・吉田 1996b）およびビールオオムギ品種（水田ら 1996a）では系譜図のデータベースが入力されている推論型コンピュータ言語のPrologを用いることにより、迅速かつ簡単にできるようになっている。さらに、このプログラムおよびこれを利用したデータベースは従来MS-DOS上での処理系で実施していたが、現在では吉田（2004）によりWindows上で作動させられるようになった。このプログラムによる近縁係数の算出方法は、両親の遺伝物質を雑種が半分ずつ受け継ぐとの仮定をして計算を行うものである。

遺伝的距離は、分子マーカーなどを指標とした集団間の差から多次元空間における距離を求め、遺伝的相似度を算出する方法である。Smileら（2002）はコムギを用いて遺伝的距離と品種の系譜図からみた祖先の共通な割合とを比較し、良く一致したと報告している。また、内村ら（2004b）は国内の二条オオムギ22品種を用い、近縁係数と分子マーカーにより算出した遺伝的距離との関係を解析し、現在、これらの関係には有意な相関を認めている。

そこで、本章ではコムギおよびオオムギについて、育種の効率化のために遺伝的背景を把握する方法について検討した。前章で用いた栃木県を中心とした関東周辺地域におけるムギ類優良品種について、交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出した。次に簡単に品種間での違いを把握するため、RAPD分析のデータから品種間で同一のバンドを示したDNAマーカー数（以下、同一マーカー数と記す）を計算した。さらに品種間のマーカーの多型から根井の遺伝的距離D（根井 2002）（以下、遺伝的距離Dと記す）を算出した。これら、同一マーカー数と遺伝的距離Dで近縁係数がどの程度説明できるかも検討した。

第1節 コムギの近縁係数と 遺伝的距離との関係

I 緒 言

本節では、コムギについて遺伝的背景を把握するため、

交配記録の系譜から統計的に近縁係数、次に簡単に品種間での違いを把握するため、RAPD分析で得られた品種間で同一のバンドを示したDNAマーカー数、さらに品種間の距離の尺度を比較可能にして、より普遍化するためにマーカーの多型から根井の遺伝的距離Dを算出した。これら、相互間の関係も検討した。

II 材料と方法

1. 供試品種

品種は前章のコムギの優良品種識別で供試した、小麦農林61号、イワイノダイチ、タマイズミ、春のかがやき、きぬの波、つるびかり、ダブル8号、シラネコムギ、あやひかり、小麦農林26号、キヌヒメ、ユメセイキ、フウセツ、しゅんよう、ユメアサヒ、バンドウワセ、およびニシノカオリの合計17品種である。交配の両親名、育成地などは第3表に示した。

2. 同一マーカー数

DNA多型のデータは供試したコムギ17品種間について、RAPDマーカーにより検出した23種類のDNA多型で、PCR増幅産物がある、つまり、品種にそのDNAマーカーが現れた場合を“1”、現れない場合を“0”とした（第4表）。ある1品種と他の1品種で同じく現れたDNAマーカーの数を同一マーカーとしてすべての品種相互間で計算した。17品種相互間なので合計136組合せについての計算を行った。品種間の同一マーカー数はVisual Basicでプログラムを作成して算出した。

3. 遺伝的距離

品種間の遺伝的距離Dを以下の式で算出した。なお、算出に用いた品種の遺伝子頻度の値は同一マーカー数に用いたデータと同一である。

$$D = -\ln \left[\sum p_{1i} \times p_{2i} \right] / \sqrt{\left[\left(\sum p_{1i}^2 \right) \times \left(\sum p_{2i}^2 \right) \right]}$$

ここで、 p_{1i} ； 集団1（品種1）のi遺伝子座の遺伝子型の頻度、 p_{2i} ； 集団2（品種2）のi遺伝子座の遺伝子型の頻度である。計算には、Felsensteinによるプログラム（注：PHYMLIP <http://evolution.gs.washington.edu/phymlip.html>）を用いて行った。

4. 近縁係数

自殖作物の2個体X、Y間の近縁係数、 r_{xy} 、は2個体間の共通祖先をZとし、 n_1 、 n_2 をX、YからそれぞれZへさかのぼる世代数とすると、

$$r_{xy} = \sum (1/2)^{n_1+n_2}$$

で求められる（酒井 1957）。ここで $\sum$ は共通祖先へさかのぼる全経路の和を示す。

近縁係数の算出は、水田ら（1996a）が作成した推論型コンピュータ言語のPrologを用いたコムギのデータベースに近年のデータを付け加えて、Windows版のプログラムによって行った。突然変異系統、純系淘汰品種、変種は原品種と同一として計算した。古い品種の記録の若干の相違は計算結果に大差をもたらさないことが確認されている（吉田 1999）。近縁係数と、同一マーカー数や遺伝的距離Dとの相関係数を計算した。

III 結 果

同一マーカーの算出結果を第9表に示した。同一マーカー数が全マーカー数23の内、20を上回っている組合せは、イワイノダイチと春のかがやきおよびあやひかり、タマイズミとあやひかりおよびキヌヒメ、春のかがやきとあやひかり、あやひかりとキヌヒメであり、品質特性が類似している品種は同一マーカー数が多い傾向であった。また、これらの5品種は前章のコムギ優良品種のクラスター分析による分類でも、デンドログラムにおいて1つのクラスターを形成しており、同一マーカー数とクラスターの結果は同様の傾向を示した。イワイノダイチ、春のかがやき、およびあやひかりは共通の親として西海168号（後のきぬいろは）が使われていた。硬質粒品種であるタマイズミとそうでないあやひかりおよびキヌヒ

メ間で同一マーカーが多い原因は明らかではなかったが、系譜図を遡ると各育成地の品種が交配に使用されているためと考えられる。そこで、同一マーカー数と近縁係数との関係について第10図に示した。全品種相互間での相関係数は $r=0.518$ と1%水準で有意であった。秋播性程度の高い系統“秋9”を交配親に用いたイワイノダイチと他品種の組合せに限った場合の相関係数は、 $r=0.904$ と高くなった。

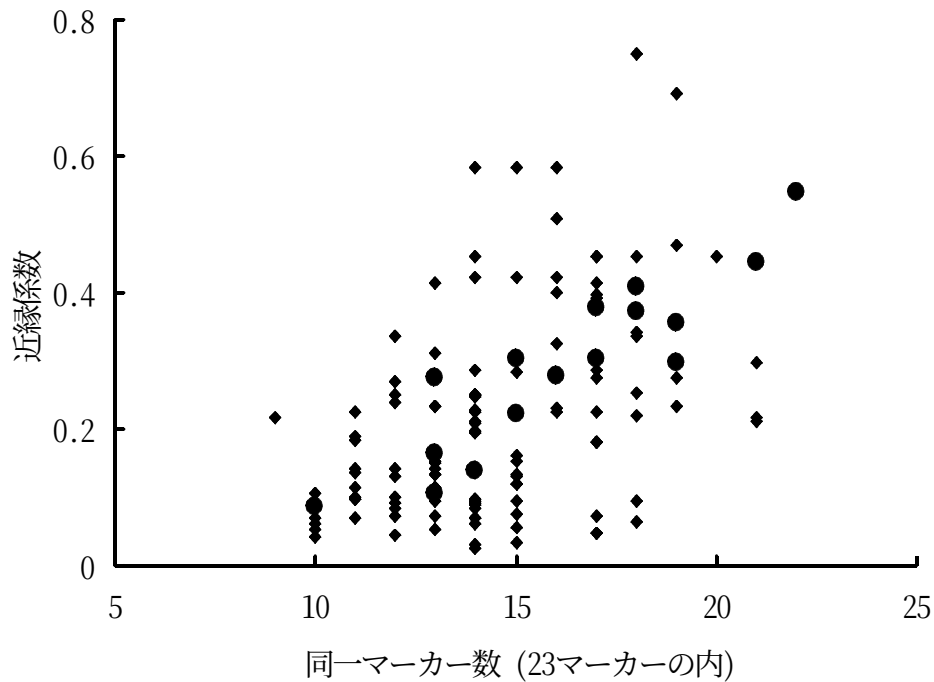
遺伝的距離Dの計算結果を第10表に示した。遺伝的距離Dの結果では、計算結果が0.1以下と遺伝的距離Dが近いと示されたのはイワイノダイチと春のかがやきおよびあやひかり、タマイズミとあやひかりおよびキヌヒメであった。また、次いで0.14と近かったのは春のかがやきとあやひかりであった。これらは同一マーカー数から得た結果とほぼ同様の傾向であった。品種間の近縁係数は0.02から0.75に分布していたが、ダブル8号とシラネコムギ間で0.75、春のかがやきとバンドウワセ間で0.69と高かった以外は0.6以下であった（第10表）。

近縁係数と遺伝的距離Dとの相関係数を求めた（第10表、第11図）。全品種相互間の組合せによる場合では、 $r=-0.511$ で1%水準の有意な相関が認められた。イワイノダイチと他品種間の組合せに限った場合の相関係数は、 $r=-0.892$ で1%水準で有意であり、相関係数の値が高くなった。

第9表 コムギ品種間における同一マーカー数。

No.	品種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	小麦農林61号																	
2	イワイノダイチ	17																
3	タマイズミ	17	19															
4	春のかがやき	16	22	18														
5	きぬの波	13	15	17	14													
6	つるぴかり	13	17	19	18	15												
7	ダブル8号	9	13	13	14	13	17											
8	シラネコムギ	14	14	14	15	14	18	18										
9	あやひかり	17	21	21	20	17	17	11	12									
10	小麦農林26号	12	18	14	17	16	14	14	15	16								
11	キヌヒメ	19	19	21	18	17	17	11	14	21	14							
12	ユメセイキ	11	15	15	14	17	13	13	14	15	18	13						
13	フウセツ	12	16	14	17	14	16	14	15	16	19	14	14					
14	しゅんよう	10	10	12	11	12	14	14	15	10	13	10	12	15				
15	ユメアサヒ	13	13	11	12	15	13	17	18	11	14	13	13	12	10			
16	バンドウワセ	18	18	16	19	14	16	12	15	16	13	18	12	15	11	14		
17	ニシノカオリ	13	13	13	12	11	11	17	14	13	14	11	15	14	14	15	10	
同一マーカー数平均		14.0	16.3	15.9	16.1	14.6	15.5	13.8	14.9	15.9	15.1	15.6	14.0	14.8	12.1	13.4	14.8	13.1

マーカー数は全部で 23個。

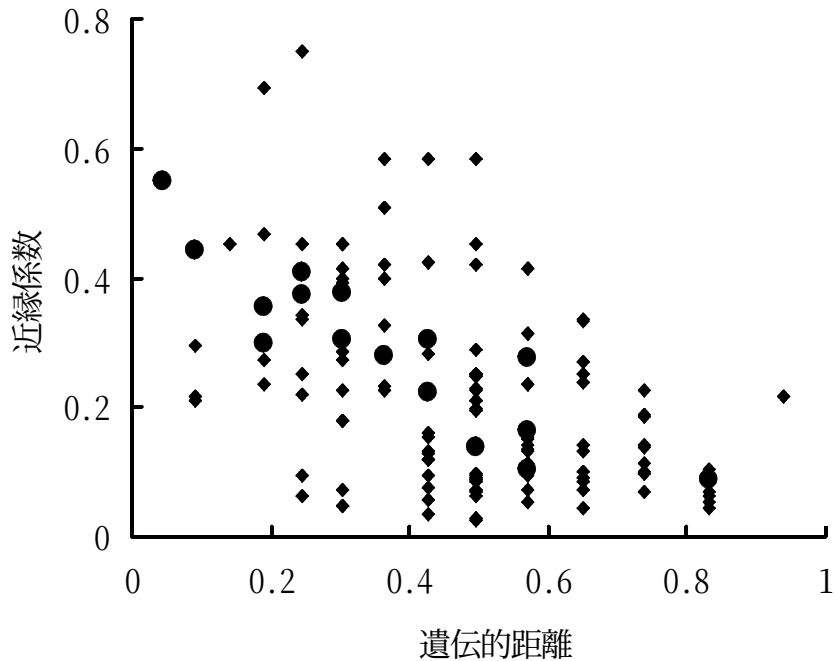


第10図 コムギ品種間の同一マーカー数と近縁係数の関係。

全品種間での相関は $r=0.518$ 。●印のイワイノダイチとの間の相関は $r=0.904$ 。

第10表 コムギ品種における遺伝的距離D (右上) と近縁係数 (左下) の値

品種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 小麦農林61号		0.30	0.30	0.36	0.57	0.57	0.94	0.50	0.30	0.65	0.19	0.74	0.65	0.83	0.57	0.25	0.57
2 イワイノダイチ	0.38		0.19	0.04	0.43	0.30	0.57	0.50	0.09	0.25	0.19	0.43	0.36	0.83	0.57	0.25	0.57
3 タマイズミ	0.39	0.30		0.25	0.30	0.19	0.57	0.50	0.09	0.50	0.09	0.43	0.50	0.65	0.74	0.36	0.57
4 春のかがやき	0.33	0.55	0.34		0.50	0.25	0.50	0.43	0.14	0.30	0.25	0.50	0.30	0.74	0.65	0.19	0.65
5 きぬの波	0.23	0.30	0.27	0.45		0.43	0.57	0.50	0.30	0.36	0.30	0.30	0.50	0.65	0.43	0.50	0.74
6 つるぴかり	0.23	0.30	0.27	0.45	0.58		0.30	0.25	0.30	0.50	0.30	0.57	0.36	0.50	0.57	0.36	0.74
7 ダブル8号	0.22	0.10	0.11	0.10	0.07	0.07		0.25	0.74	0.50	0.74	0.57	0.50	0.50	0.30	0.65	0.30
8 シラネコムギ	0.29	0.14	0.14	0.13	0.09	0.09	0.75		0.65	0.43	0.50	0.50	0.43	0.43	0.25	0.43	0.50
9 あやひかり	0.22	0.44	0.22	0.45	0.45	0.45	0.07	0.09		0.36	0.09	0.43	0.36	0.83	0.74	0.36	0.57
10 小麦農林26号	0.25	0.37	0.25	0.40	0.42	0.42	0.07	0.09	0.51		0.50	0.25	0.19	0.57	0.50	0.57	0.50
11 キヌヒメ	0.47	0.35	0.30	0.25	0.18	0.18	0.19	0.25	0.21	0.23		0.57	0.50	0.83	0.57	0.25	0.74
12 ユメセイキ	0.18	0.22	0.16	0.25	0.41	0.41	0.05	0.07	0.42	0.38	0.14		0.50	0.65	0.57	0.65	0.43
13 フウセツ	0.34	0.28	0.21	0.29	0.23	0.23	0.09	0.12	0.23	0.23	0.21	0.25		0.43	0.65	0.43	0.50
14 しゅんよう	0.06	0.09	0.07	0.10	0.08	0.08	0.02	0.03	0.07	0.09	0.05	0.05	0.06		0.83	0.74	0.50
15 東山38号	0.15	0.28	0.14	0.27	0.15	0.15	0.05	0.06	0.22	0.19	0.13	0.11	0.13	0.04		0.50	0.43
16 バンドウワセ	0.34	0.41	0.40	0.69	0.58	0.58	0.10	0.13	0.28	0.31	0.22	0.24	0.28	0.11	0.20		0.83
17 ニシノカオリ	0.11	0.16	0.11	0.14	0.10	0.10	0.05	0.06	0.13	0.14	0.14	0.07	0.09	0.03	0.12	0.10	
遺伝的距離平均	0.52	0.37	0.39	0.38	0.46	0.41	0.53	0.44	0.40	0.43	0.41	0.50	0.45	0.66	0.55	0.46	0.57
近縁係数平均	0.26	0.29	0.23	0.32	0.29	0.29	0.13	0.16	0.28	0.27	0.22	0.21	0.20	0.07	0.15	0.31	0.10
両者間の相関係数	0.71	0.89	0.68	0.72	0.46	0.15	0.20	0.35	0.60	0.43	0.68	0.47	0.15	0.34	0.27	0.60	0.41



第 11 図 コムギ品種間の遺伝的距離 D と近縁係数との関係。

全品種間での相関は $r=-0.511$ ，●印のイワイノダイチとの間の相関は $r=-0.892$ 。

IV 考 察

品種間多型の現れたコムギ品種について，同一マーカー数，遺伝的距離 D および近縁係数を計算した。どの値も系譜，育成地，交配親などを良く反映し，品種間の類似性も同様の傾向を示し，前章のコムギ優良品種のクラスター分析による分類の結果と概ね一致した。

全品種相互間での同一マーカー数と近縁係数との間には有意な相関関係がみられた。さらに，イワイノダイチと他品種間の組合せに限った場合の相関係数はさらに高くなった。次に，近縁係数と遺伝的距離との関係も同一マーカーの場合と同様で，全品種間で， $r=-0.511$ の有意な相関が認められた。イワイノダイチの他品種との相関係数は最も高く， $r=-0.892$ であった（第11図）。図中で，DNA多型の検出率からみて遺伝的相似度が高く遺伝的距離に近いにもかかわらず交配記録による系譜上では類縁関係があまり無い場合は，全体の傾向の左下に位置するはずである。逆に，DNA多型の検出率からみ

て遺伝的相似度が低く遺伝的距離が遠いにもかかわらず系譜上では互いに共通な交配親が多く使われていたり，なんらかの誤りで系譜内に共通親が記載されてしまった場合には，図の右上に位置する。図では全体的に左下に分布する傾向が認められた。この原因としては，低アミロースや製パン用の硬質粒品種が交配親として入っており，これらが交配記録上では類縁関係がないが，遺伝的背景からみると前述の形質以外は従来の育種目標であるため，共通している遺伝子領域が多いため，あるいは硬質粒品種の祖先は系譜上不明となったが実際は他の品種と同様な祖先を持っているためと考えられる。

このように一部の不整合性はあるにせよ，系譜上の類縁関係から計算した近縁係数は同一のDNAマーカー数や，遺伝的距離と有意な相関関係が認められた。

なお，遺伝的距離 D と同一マーカー数との関係をみるため，両者の相関を第11表に示した。コムギでの相関係数は $r=-0.993$ から -0.999 に分布し，全体でも $r=$

第11表 コムギ品種における遺伝的距離Dと同一マーカーの関係。

品種名	遺伝的距離平均	同一マーカー平均	相関係数
小麦農林61号	0.518	14.0	-0.994
イワイノダイチ	0.367	16.3	-0.993
タマイズミ	0.389	15.9	-0.996
春のかがやき	0.377	16.1	-0.995
きぬの波	0.461	14.6	-0.998
つるぴかり	0.405	15.5	-0.997
ダブル8号	0.530	13.8	-0.994
シラネコムギ	0.437	14.9	-0.998
あやひかり	0.398	15.9	-0.994
小麦農林26号	0.432	15.1	-0.998
キヌヒメ	0.412	15.6	-0.995
ユメセイキ	0.504	14.0	-0.997
フウセツ	0.446	14.8	-0.997
しゅんよう	0.657	12.1	-0.999
ユメアサヒ	0.554	13.4	-0.995
バンドウワセ	0.457	14.8	-0.996
ニシノカオリ	0.570	13.1	-0.997
全体			-0.993

遺伝的距離平均はある品種と他の16品種の遺伝的距離の平均値。

同一マーカー平均はある品種と他の16品種の同一マーカー数の平均値、マーカー数は全部で23個。

相関係数は遺伝的距離平均と同一マーカー平均との相関係数。

−0.993と極めて高かった。根井による遺伝的距離Dは品種相互間の距離の尺度として単なる同一マーカー数より普遍的ではあるが、ここでの結果は、単にマーカーが同一であるかどうかを数えるのみでも、品種相互間の遺伝的な違いを推定するのに有効であることを示している。

本論文の結果は近縁係数が同一マーカー数やDNAマーカーから算出した遺伝的距離Dからある程度の裏付けがなされ、今回DNAマーカーで検出した多型が存在する染色体領域は、品種育成の過程の選抜や淘汰により大きく偏ることなく、後代にほぼ均等に分離していったことを示している。

クラスター分析の結果からでは、用途や育成地毎に特徴があり、まだ遺伝的多様性が残されている。また、大里・吉田（1996）によれば、水稻で福岡県農業総合試験場育成系統を供試し、コシヒカリを祖先に持つ系統とコシヒカリとの近縁係数を算出し、0.404から0.783に分布したとしている。今回最も高い近縁係数を示したのは、コムギでは春のかがやきで0.10から0.69であった。その値は水稻と比較するとまだ低い値であり、まだ遺伝的多様性が残されていると思われる。現状では品種間の遺伝的背景の違いは近縁係数の計算で比較的簡単に推定可能

であるとともに、一方では近縁係数が高まってくることが予想され、分子マーカーによる同一マーカー数や遺伝的距離Dの推定も重要になってくるとされる。今後、分子育種の発展にとともに、RAPD分析だけではなく、遺伝情報が明らかになっている制限酵素サイトを利用するAFLP分析やCAPS分析、および有用遺伝子に連鎖したSSR分析等も考えられる。

以上のことから、近縁程度を求めるにはDNAマーカー利用も重要であるが、近縁係数による簡易な血縁関係の推定も有効であることを示している。さらに、同一マーカー数の利用も簡単な血縁関係の推定方法として利用できると考えられる。気象変動、栽培法の改良等に対応するためにリスク分散を図るうえで、遺伝的な多様性の維持を意識しながら品種育成を実施するためにも、近縁係数のみならず、分子マーカーから算出した遺伝的距離Dおよび同一マーカー数の有効な利用が必要と考えられた。

現在、すべての育種機関で分子マーカーを利用できる体制ではないが、育種者の利便性を考慮し、上記いずれかの方法を交配計画に取り入れることにより育種の効率化が図れると思われる。

第2節 オオムギの近縁係数と遺伝的距離との関係

I 緒 言

本節では、コムギと同様の方法を用いてオオムギについて、交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出し、次に、簡単に品種間での違いを把握するため、品種間で同一のバンドを示した同一マーカー数を計算した。さらに、品種間の距離の尺度を比較可能にして、より普遍化するためにマーカーの多型から遺伝的距離Dを算出した。これら、同一マーカー数と遺伝的距離Dで近縁係数がどの程度説明できるかも検討した。

II 材料と方法

1. 供試品種

品種は前章のオオムギの優良品種識別で供試した、二条オオムギのミカモゴールドデン、スカイゴールドデン、あまぎ二条、なす二条、みょうぎ二条、タカホゴールドデン、きぬか二条、はるな二条、および関東二条35号、六条オ

オムギのシュンライ、東山皮101号、ミノリムギ、カシマムギ、マサカドムギ、さやかぜ、すずかぜ、ファイバースノウ、セツゲンモチ、および裸ムギのイチバンボシの合計19品種である。交配に用いた両親名、育成地等は第6表に示した。

2 同一マーカー数

DNA多型のデータは供試した19品種間について、RAPDマーカーにより検出した33種類のDNA多型で、PCR増幅産物がある、つまり、品種にそのDNAマーカーが現れた場合を“1”、現れない場合を“0”とした(第7表)。ある1品種と他の1品種で同じく現れたDNAマーカーの数を同一マーカーとしてすべての品種相互間で計算した171組合せである。

3 遺伝的距離および近縁係数

コムギと同じ方法を用いた。

III 結 果

同一マーカーの算出結果を第12表に示した。品質や形態的特性が類似している品種では同一マーカー数が多か

第12表 オオムギ品種間における同一マーカー数。

No.	品種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	関東二条35号																			
2	ミカモゴールドデン	25																		
3	スカイゴールドデン	23	27																	
4	あまぎ二条	23	27	23																
5	なす二条	27	27	23	23															
6	みょうぎ二条	23	29	27	23	25														
7	タカホゴールドデン	21	27	25	23	23	29													
8	きぬか二条	23	29	25	27	25	27	25												
9	はるな二条	24	32	28	26	28	30	28	30											
10	シュンライ	1	13	17	13	13	15	15	17	14										
11	東山皮101号	18	14	18	14	20	16	16	16	15	22									
12	ミノリムギ	13	15	19	15	15	17	17	19	16	31	24								
13	カシマムギ	10	10	14	12	12	14	16	12	11	22	25	24							
14	マサカドムギ	12	10	14	6	14	12	16	8	11	18	23	18	25						
15	さやかぜ	14	10	14	8	16	12	14	10	11	20	25	20	25	29					
16	すずかぜ	13	9	13	7	15	13	13	9	10	21	24	21	26	28	32				
17	ファイバースノウ	14	12	16	12	16	14	14	16	13	28	27	28	23	21	23	24			
18	セツゲンモチ	13	15	19	15	15	17	15	19	16	29	26	29	24	18	20	21	30		
19	イチバンボシ	18	14	18	14	20	16	18	14	15	18	29	20	23	23	25	24	23	22	
	同一マーカー数平均	18.1	18.1	20.2	17.3	19.8	19.9	19.7	19.5	19.9	18.7	20.7	20.1	18.2	17.0	18.2	17.9	19.7	20.2	19.7

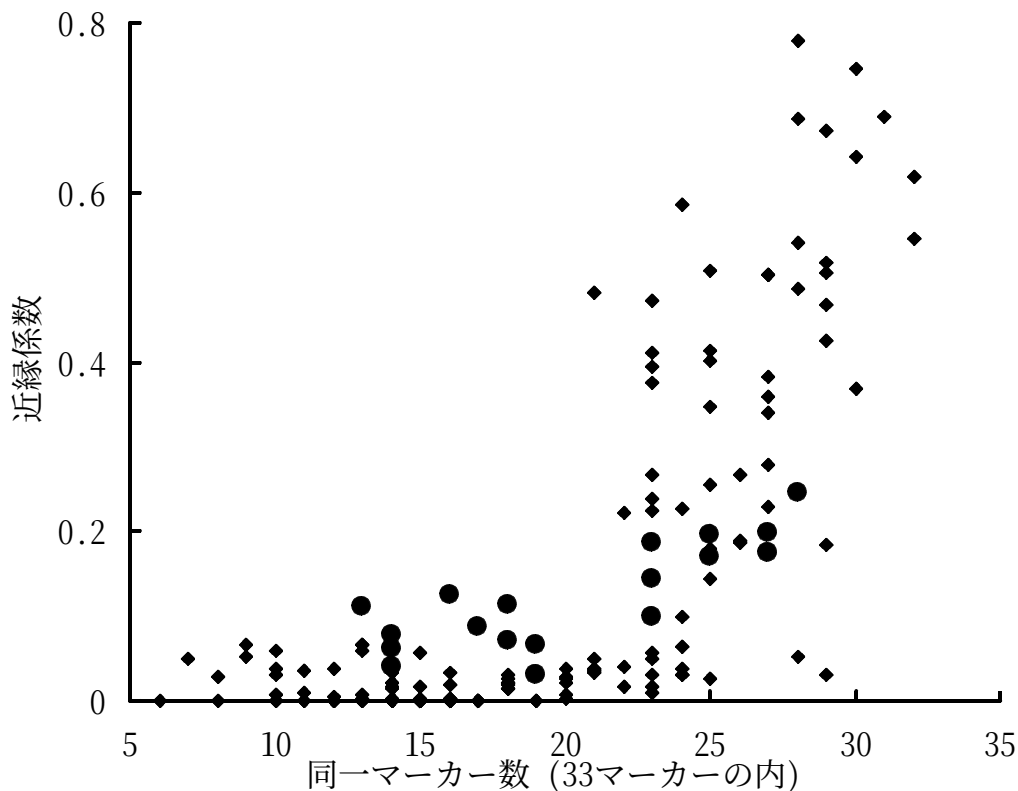
マーカー数は全部で33個。

った。特に、二条オオムギと六条オオムギでは明らかに差異がみられた。二条オオムギ間では同一マーカー数は33の内の23から30であり、六条オオムギ間でも18から30であった。それに対し、二条オオムギと六条オオムギ間では6から20であり10以下の組合せも多くみられた。裸ムギであるイチバンボシは六条であり、六条オオムギとの同一マーカー数が多かった。クラスター分析の結果でも、デンドログラムにおいて二条オオムギと六条オオムギは大きな2つのクラスターに分かれており、今回の結

果と一致していた。

同一マーカー数と近縁係数との関係について第12図に示した。オオムギ全品種相互間での相関係数は $r=0.731$ と1%水準で有意であった。六条オオムギを祖先に持つスカイゴールデンと他品種間の組合せでの相関係数は、 $r=0.805$ と高くなった。

遺伝的距離Dの計算結果を第13表に示した。二条オオムギ品種間では0.03～0.45、六条オオムギ品種間では0.03～0.61であるのに対し、二条オオムギ品種と六条オ



第12図 オオムギ品種間の同一マーカー数と近縁係数の関係。

全品種での相関は $r = 0.731$ 。●印のスカイゴールデンとの間の相関は $r = 0.805$ 。

第13表 オオムギ品種における遺伝的距離D（右上）と近縁係数（左下）の値。

品種名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 関東二条35号		0.28	0.36	0.36	0.20	0.36	0.45	0.36	0.32	1.10	0.61	0.93	1.19	1.01	0.86	0.93	0.86	0.93	0.61
2 ミカモゴールデン	0.40		0.20	0.20	0.20	0.13	0.20	0.13	0.03	0.93	0.86	0.79	1.19	1.19	1.19	1.30	1.01	0.79	0.86
3 スカイゴールデン	0.19	0.17		0.36	0.36	0.20	0.28	0.28	0.16	0.66	0.61	0.55	0.86	0.86	0.86	0.93	0.72	0.55	0.61
4 あまぎ二条	0.38	0.23	0.10		0.36	0.36	0.36	0.20	0.24	0.93	0.86	0.79	1.01	1.70	1.42	1.55	1.01	0.79	0.86
5 なす二条	0.34	0.36	0.14	0.24		0.28	0.36	0.28	0.16	0.93	0.50	0.79	1.01	0.86	0.72	0.79	0.72	0.79	0.50
6 みょうぎ二条	0.47	0.50	0.20	0.27	0.41		0.13	0.20	0.10	0.79	0.72	0.66	0.86	1.01	1.01	0.93	0.86	0.66	0.72
7 夕カホゴールデン	0.48	0.50	0.20	0.22	0.39	0.67		0.28	0.16	0.79	0.72	0.66	0.72	0.72	0.86	0.93	0.86	0.79	0.61
8 きぬか二条	0.41	0.47	0.17	0.28	0.35	0.50	0.51		0.10	0.66	0.72	0.55	1.01	1.42	1.19	1.30	0.72	0.55	0.86
9 はるな二条	0.59	0.62	0.24	0.27	0.49	0.75	0.78	0.64		0.86	0.79	0.72	1.10	1.10	1.10	1.19	0.93	0.72	0.79
10 シュンライ	0.01	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		0.41	0.06	0.41	0.61	0.50	0.45	0.16	0.13	0.61
11 東山101号	0.01	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22		0.32	0.28	0.36	0.28	0.32	0.20	0.24	0.13
12 ミノリムギ	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.23		0.32	0.61	0.50	0.45	0.16	0.13	0.50
13 カシマムギ	0.01	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.26	0.03		0.28	0.28	0.24	0.36	0.32	0.36
14 マサカドムギ	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.15	0.02	0.18		0.13	0.16	0.45	0.61	0.36
15 さやかぜ	0.04	0.04	0.08	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.14	0.03	0.20	0.18		0.03	0.36	0.50	0.28
16 すずかぜ	0.07	0.07	0.11	0.05	0.06	0.07	0.06	0.05	0.06	0.05	0.10	0.03	0.19	0.05	0.54		0.32	0.45	0.32
17 ファイバースノウ	0.01	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.38	0.54	0.06	0.04	0.05	0.06		0.10	0.36
18 セツゲンモチ	0.01	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.19	0.52	0.03	0.02	0.03	0.04	0.37		0.41
19 イチバンボシ	0.03	0.02	0.07	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.01	0.02	0.01	0.03	0.04	0.03	0.02	
遺伝的距離平均	0.62	0.60	0.50	0.70	0.52	0.53	0.52	0.57	0.56	0.58	0.47	0.50	0.62	0.71	0.64	0.66	0.54	0.50	0.51
近縁係数平均	0.19	0.19	0.12	0.12	0.16	0.22	0.21	0.19	0.25	0.13	0.10	0.12	0.06	0.04	0.09	0.09	0.13	0.09	0.02
両者の間の相関係数	0.83	0.87	0.77	0.76	0.87	0.88	0.88	0.76	0.86	0.81	0.71	0.83	0.67	0.66	0.58	0.41	0.72	0.81	0.12

オムギ品種間では0.50～1.19と遺伝距離Dは遠くなった。これらは同一マーカー数から得た結果とほぼ同様の傾向であった。

二条オオムギの近縁係数は、全品種間で0.10から0.78とコムギや六条オオムギよりも高い傾向がみられた（第13表）。特に、はるな二条ではミカモゴールドデンとの間で0.62、みょうぎ二条との間では0.75、きぬか二条とでは0.78と高い近縁係数がみられた。六条オオムギの品種間での近縁係数は0.02から0.69であった。シュンライとミノリムギおよびファイバースノウでいずれも0.69と高かったが、他はほとんどが0.50以下であった。二条オオムギ品種と六条オオムギ品種間の近縁係数は0.00から0.13と低かった。

近縁係数と遺伝的距離Dとの相関係数を求めた。計算結果を第13表および第13図に示した。全品種相互間の組合せでの場合は、 $r = -0.659$ で1%水準の有意な相関が認められた。スカイゴールドデンと他品種間の組合せでの相関係数は、 $r = -0.770$ であった。図ではコムギの傾向と異なり、X軸に沿って分布したものが多く傾向であった。

IV 考 察

品種間多型の現れたオオムギにおいて、同一マーカー数、遺伝的距離Dおよび近縁係数を計算した。どの値も系譜、育成地、交配親などを良く反映し、品種間の類似性も同様の傾向を示し、前章のオオムギ優良品種のクラスター分析による分類の結果と概ね一致した。

全品種相互間での同一マーカー数と近縁係数との間には、有意な相関関係がみられた。さらに、スカイゴールドデンと他品種間の組合せに限った場合の相関係数はさらに高くなった。オオムギではコムギに比較してX軸に偏る傾向があった。また近縁係数が0でもあるにもかかわらず同一マーカー数が6から20に並んでいる場合があったが、これは二条オオムギと六条オオムギで系譜図上では同じ祖先品種が無いが、共通の祖先が実際には存在していたことを示している。

次に、近縁係数と遺伝的距離Dとの関係をみると、全品種相互間での値の場合、 $r = -0.659$ の有意な相関が認められた（第13図）。スカイゴールドデンは六条オオムギの耐病性を導入した二条オオムギ品種で、他品種と遺伝的背景が似通った部分があると考えられる。スカイゴールドデンと他品種との組合せでの相関係数をみると、 $r = -0.770$ と高い値であった。前述したとおり、オオムギの場合はコムギと異なり、X軸に沿って分布している傾向がみられた。これは、DNAマーカーで推定した遺伝

的距離が近いにもかかわらず、系譜上の類縁関係は近いものから遠いものまで分布していることを示している。系譜上では共通祖先のない二条オオムギと六条オオムギを一緒に比較しているためと考えられる。特に、ただ1つ供試した裸ムギであるイチバンボシの他品種との相関係数は $r = -0.120$ と最も低くなっている。

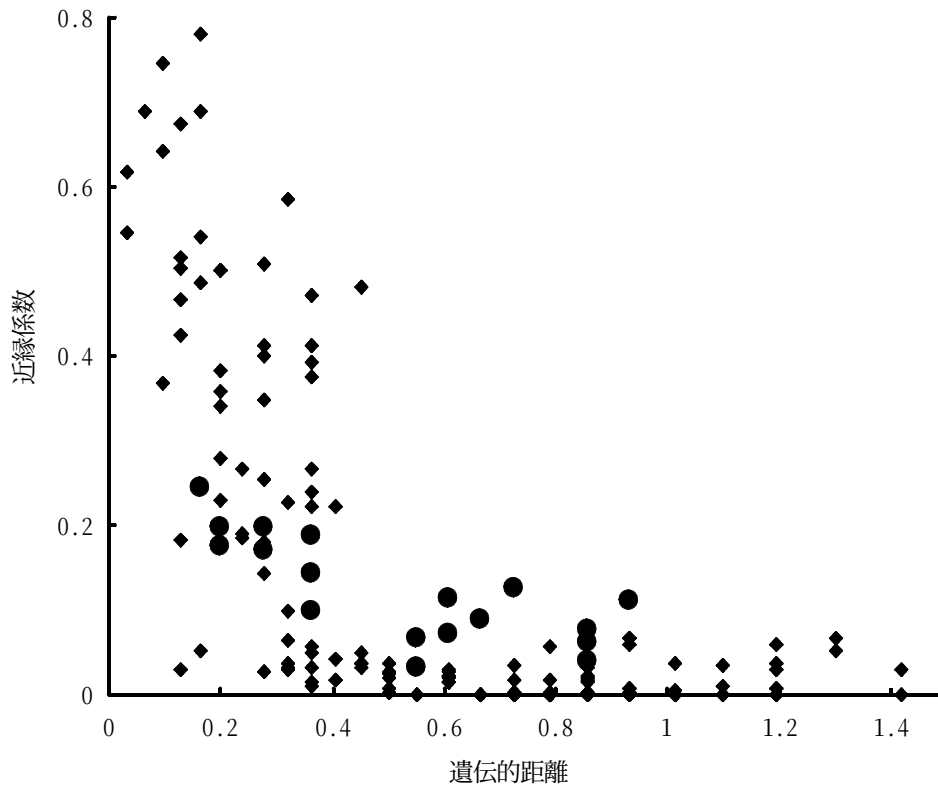
このように一部の不整合性はあるにせよ、系譜上の類縁関係から計算した近縁係数は同一のDNAマーカー数や、遺伝的距離と有意な相関関係が認められた。

なお、遺伝的距離Dと同一マーカー数との関係をみるため、両者の相関を第14表に示した。オオムギでの相関係数はコムギよりやや低いが、 $r = -0.975$ から -0.996 に分布し、全体でも $r = -0.983$ と極めて高かった。根井による遺伝的距離Dは品種相互間の距離の尺度として単なる同一マーカー数より普遍的ではあるが、ここでの結果は、コムギと同様に単にマーカーが同一であるかどうかを数えるのみでも、品種相互間の遺伝的な違いを推定するのに有効であることを示している。

本試験の結果はコムギと同じ様に、近縁係数が同一マーカー数やDNAマーカーから算出した遺伝的距離Dからある程度の裏付けがなされ、今回DNAマーカーで検出した多型が存在する染色体領域は、品種育成の過程の選抜や淘汰により大きく偏ることなく、後代にほぼ均等に分離していったことを示している。内村ら（2004b）が国内の二条オオムギ22品種で調査した結果でも近縁係数と遺伝的距離Dの相関係数は $r = -0.526$ であり、今回の結果はコムギや二条オオムギおよび六条オオムギを含めたオオムギ品種間でも同様な結果であることを示した。

前節のクラスター分析の結果からでは、用途や育成地毎に特徴があり、まだ遺伝的多様性が残されていると述べた。また、現状では品種間の遺伝的背景の違いは近縁係数の計算で比較的簡単に推定可能であるとともに、一方では近縁係数が高まってくることが予想され、また、二・六条オオムギ間の交配では近縁係数が0でも分子マーカーで関連性が認められることがある等から分子マーカーによる同一マーカー数や遺伝的距離Dの推定も重要になってくると思われる。

内村ら（2004b）は二条オオムギ品種を材料とし、系譜図から計算した近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝的距離の間に高い相関を認めている。また、片親を1品種に決定した場合にはさらに高い相関を認めた。本論文の結果から、コムギおよびオオムギでも同様に高い相関があることを明らかにした。これは、本研究に供試した品種の系譜図が極めて正確であることも示している。



第13図 オオムギ品種間の根井による遺伝的距離Dと近縁係数との関係。

全品種間での相関は $r=-0.659$ ，●印のスカイゴールデンとの間の相関は $r=-0.770$ 。

第14表 オオムギ品種における遺伝的距離Dと同一マーカーの関係。

品種名	遺伝的距離平均	同一マーカー平均	相関係数
関東二条35号	0.617	18.1	-0.994
ミカモゴールデン	0.605	18.1	-0.992
スカイゴールデン	0.495	20.2	-0.995
あまぎ二条	0.703	17.3	-0.979
なす二条	0.517	19.8	-0.995
みょうぎ二条	0.526	19.9	-0.995
タカホゴールデン	0.520	19.7	-0.996
きぬか二条	0.569	19.5	-0.985
はるな二条	0.557	19.9	-0.993
シュンライ	0.578	18.7	-0.989
東山皮101号	0.469	20.7	-0.996
ミノリムギ	0.500	20.1	-0.993
カシマムギ	0.621	18.2	-0.996
マサカドムギ	0.707	17.0	-0.975
さやかぜ	0.635	18.2	-0.984
すずかぜ	0.663	17.9	-0.983
ファイバースノウ	0.536	19.7	-0.994
セツゲンモチ	0.497	20.2	-0.994
イチバンボシ	0.512	19.7	-0.994
全体			-0.983

遺伝的距離平均はある品種と他の16品種の遺伝的距離の平均値。

同一マーカー平均はある品種と他の16品種の同一マーカー数の平均値，マーカー数は全部で23個。

相関係数は遺伝的距離平均と同一マーカー平均との相関係数。

以上のことから、近縁度を求めるにはDNAマーカー利用も重要であるが、近縁係数による簡易な血縁関係の推定もコムギ、オオムギともに有効であることを示している。さらに、同一マーカー数の利用も簡単な血縁関係の推定方法として利用できると考えられる。

第3節 まとめ

品種育成において、交配親を選定する際に遺伝的背景を把握しておくことは、育種の効率化のために有効である。そこで、関東周辺地域のムギ類品種を用い、交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出した。次にこれらの品種間でRAPD分析による同一のバンドを示すDNAマーカー数と根井の遺伝的距離Dを算出した。同一のマーカー数と近縁係数の間の相関係数はコムギで0.581～0.904、オオムギでは0.731～0.805であった。遺伝的距離と近縁係数の間の相関係数はコムギで-0.511～-0.892、オオムギでは-0.659～-0.770であった。このことは、コムギ、オオムギにおいて今回の分子マーカーから得た遺伝情報は、育成の過程で後代にほぼ均等に分離していったことを示すと考えられた。遺伝情報を利用したDNAマーカーおよび近縁係数による簡易な血縁関係の推定は利用価値が高いと考えられる。なお、同一マーカー数と遺伝的距離の相関係数は極めて高かった。遺伝的な多様性の維持を意識しながら品種育成するためにもこれらの情報の有効利用が必要と考えられた。

第5章 RAPD分析によるユウガオ (*Lagenaria siceraria*) の品種分類

かんぴょうの原料となるユウガオは栃木県の特産作物の一つである。その歴史は古く諸説があるが、1712年に江州（滋賀県）水口の城主であった鳥居伊賀守忠英が、下野国の壬生城に封ぜられてから栽培されるようになったというのが通説である（農山漁村文化協会 1989）。当時、特産が無かったため、ユウガオの種子を江州木津村から取り寄せて試作させたところ、結果が良好であったことから作付けが拡大したと記述されている。次いで、栃木県のユウガオを広く周知させたのは壬生町安塚の島田武七郎が1877年に第一回国内勧業博覧会に出品したことによる。このことが栃木県のかんぴょうの評価を高め、需要も増加し、ユウガオの作付けが県内各地に拡大した。

江戸時代から明治時代の生産状況は明らかでないが、1907年には作付面積が989ha、1041tの生産量であった。昭和10年代には3000ha以上の作付けが続いた（農山漁村文化協会 1989）。近年では、1978年の3040haをピークとして、生産者の高齢化、輸入量の増大、食生活の変化による消費の減少等により減少し1999年には作付面積は349haとなった（栃木県 2001）。

ユウガオは3月下旬から4月上旬に育苗ポット等に播種する。発芽適温は25～28℃であるので、ビニル被覆したトンネル内で電熱線等を用いて温度を確保する。定植地は肥沃で排水性の良い圃場を選定し、地温が15℃以上になる5月上旬以降に定植する。栽植距離は畦幅6m、株間2～2.5mとし、10a当たりの施肥量は、堆肥2t、苦土炭カル100kg、窒素20～25kg、リン酸25～30kg、カリ20～25kgが標準である。生育中、親づるを5～6枚で摘心し、子づるを2～3本伸ばして誘引する。生育初期に敷きわらを行い、さらに、6月中旬に追肥・耕起した後、直ちに全面に再度敷きわらを行う。ユウガオの開花は日没後で、通常、ヤガ、スズメガ等により交配が行われるが、7月上旬まではこれらの訪花昆虫が少ないので、初期の着花時には必ず人工交配（花合わせ）を行う。収穫適期は開花後15～20日で果実が5～7kgになった頃である。

栃木県ではかんぴょうは重要な特産品であることから、1928年頃からユウガオの品種育成が開始された。その途中、第2次世界大戦により一時中止となり、さらに、1945年の戦災により保存された品種や改良された系統が消滅し、それまでの業績は不明である。育種方法は在来優良品種を県内から収集し、これらからの純系分離が主であった。戦後もこの方法により育種を継続し、1956年に品種しもつけしろ、しもつけあおを育成した。1958年

頃からは一代雑種利用による品種育成を試みたが成果は得られなかった（中山 1962）。1959年以降は耐病性品種育成を目的に東南アジアを中心に広くユウガオ属を収集し、遠縁交雑を行った。その後は交雑育種が中心となり、しもつけ晩生（小熊・藤平 1979）、ゆう太（高野ら 1992）を育成した。しかし、生産の急激な減少によりユウガオの品種育成は縮小の方向にある。現在、育成を担当している栃木分場では、育成品種、在来種の他、日本国内を始め海外から収集した150を超える品種等を維持・保存している。しかし、労力や予算の縮小にともない大きな負担となってきた。

ウリ科のユウガオ属に属しているユウガオを、牧野（1989）はユウガオ（*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley var. *hispida* (Thunb. ex Murray) Hara)、その変種であるヒョウタン（*L. siceraria* (Molina) Standley var. *gourda* (Ser.) Hara)、フクベ（*L. siceraria* (Molina) Standley var. *depressa* (Ser.) Hara）に分類している。さらに、フクベは栃木県で栽培されており、かんぴょうと呼ばれていると記載している。しかし現在では、ユウガオの果皮の部分乾燥させたものを材料として作られた工芸品をフクベ細工と呼び、それ以外ではフクベと表現する例はほとんど無く、我が国で唯一品種育成を実施している栃木県農業試験場栃木分場においてもユウガオ（第14図）とヒョウタン（第15図）の2つに分類している。これらの品種分類についての研究はほとんど無く、中山（1962）が国内外から収集したフクベ類については果形と用途等で、栃木県内のかんぴょう品種については果型、果色、蔓の太さ等により数種類に分類しているのみである。ユウガオは他殖性植物であるが、同分場においては品種育成の母本として自殖により維持している。遺伝的に完全には固定しておらず、まれに表現型に年次間で変異のみられる品種もある。また、保存品種にはヒョウタンも多く含まれている。これらのことから、外観のみによる品種の特定、分類、純度維持が非常に困難であり、より正確で合理的な手法が必要である。

分子生物学の急激な進歩にともない、DNAマーカーを利用した品種識別が他作物では今まで述べてきたように盛んに行われている。水稻では大坪ら（1999, 2002）や小笠原・高橋（2000）が、ムギ類では内村ら（2004a）が品種識別のためのDNAマーカーを開発している。RAPD分析を用いた分類については、ペレニアルライグラスについて山下ら（1996）が、ヤムイモについて林ら（2001）が行っているが、ユウガオについて分類した例はまだ無く、Decker-Waltersら（2001）が世界各国のヒョウタン（*L. siceraria*; Cucurbitaceae）についてRAPDマ



第14図 代表的なユウガオの果実



第15図 代表的なヒョウタンの果実

ーカーを用いて多様性の評価をしているのみである。

本章では、栃木分場のユウガオおよびヒョウタン品種を維持保存する際の参考とするため、RAPDマーカーを用いて多型を検出した。また、そのデータをもとに品種を分類するため、ユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。

第1節 RAPD分析による品種分類

I 緒 言

本節では、栃木分場のユウガオおよびヒョウタン品種を維持保存する際の参考とするため、その一部についてRAPDマーカーを用いて多型を検出した。

II 材料と方法

1. 供試品種

栃木県農業試験場栃木分場で保存しているユウガオ14品種とヒョウタン10品種、計24品種を供試した。これらの由来、茎の太さ、果実の形・色、ユウガオとヒョウタンの分類について第15表に示した。これらのデータは、同分場の保存台帳と1989～1999年の野菜試験成績書から抜粋し取りまとめた。分類は同栃木分場が独自に行ったものである。

各品種は自殖またはきょうだい交配で維持してはいるが、他殖性であることから、各品種8個体を用い品種内

の変異も見ようとした。

2. DNAの抽出

ポットに栽培した株の第4～5葉の生葉身0.1gからMagExtractor -Plant Genome- DNA抽出キット（東洋紡績株式会社）、および同社製自動核酸抽出装置（MFX-2000）を用いて抽出を行った。

3 RAPD分析による多型検出

抽出したDNAは1/10TEバッファーを用いて5ng/μLに調製し、鋳型DNA量として1μL使用した。PCR反応液はランダムプライマー6pmol, dNTP混合液2.5mM（タカラバイオ社）、反応バッファー（タカラバイオ社）を1.25μLおよびrTaq（タカラバイオ社）0.5 unitに滅菌蒸留水を加え12μLとした。PCR増幅は、サーマルサイクラーDNA Engine Tetrad PTC-225（MJ Japan社）を用い、同じウリ科のメロンでFukinoら（2002）が用いたNunomeら（2001）の方法を改変し、熱変性を94℃で1分間行った後、94℃で30秒、アニーリングを45℃で1分30秒間、72℃で2分間を1サイクルとして45サイクル行い、伸長反応を72℃で5分間行った。増幅したDNAは1.5%アガロースゲルを用い100Vの電圧で約100分間の電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマ이드溶液で20分間染色後、デンストグラフAE-6920-FX（アトー社）を用いPCR増幅産物を確認し、バンドの有無によりDNA多型を検出した

プライマーは、Decker-Waltersら（2001）を参考に44種類を供試した。

第15表 ユウガオ供試材料の来歴と特性。

品 種 名	来歴（または両親）	形態的特性			分類
		茎の太さ	果実の形	果実の色	
しもつけ晩生	しもつけあお//しもつけしろ/T.143	中	洋梨	白	ユウガオ
しもつけしろ	在来種から純系分離	中	短洋梨～洋梨	白	ユウガオ
しもつけあお	在来種から純系分離	中	短洋梨～洋梨	緑	ユウガオ
ゆう太	しもつけあお/小山在来	太～中	長洋梨～洋梨	白	ユウガオ
野州7号	ゆう太/スイス（センター）	太	長洋梨	白	ユウガオ
小金井在来	県内から収集	中～やや細	洋梨～短洋梨	白	ユウガオ
小山在来	県内から収集	中～やや細	短洋梨～洋梨	白	ユウガオ
二宮在来	県内から収集	やや細	洋梨	緑→白	ユウガオ
上三川在来青	県内から収集	中～やや細	短洋梨～洋梨	緑	ユウガオ
かわちしろ	県内種苗会社から購入	やや細	洋梨	白	ユウガオ
岡山在来	岡山県和郡佐伯町(1966)	やや細～中	洋梨～長洋梨	白	ユウガオ
印度かんぴょう（広島）	不明	やや細	短洋梨～洋梨	白	ユウガオ
スイス(センター)	不明	中～やや細	洋梨～球	白	ユウガオ
マニラ野生種	不明	やや細～中	丸→瓶→円筒	白	ユウガオ
ヒョウタン18	青瓢箪/白長(ヒョウタン、苦み無)	やや細～中	丸→長洋梨～瓶	緑→白縦かすり	ヒョウタン
大長ひょうたん岐阜3	岐阜県から導入	中	長瓢箪～鶴首	白	ヒョウタン
極小千成	不明	細	瓢箪	白	ヒョウタン
中ひょうたんA	県内から収集収集したと推測	やや細	瓢箪	白	ヒョウタン
大ひょうたんA	県内から収集収集したと推測	やや細	瓢箪	白	ヒョウタン
特大ひょうたん	不明	やや細	瓢箪	白	ヒョウタン
長杓ひょうたん	不明	やや細	鶴首	中	ヒョウタン
イボ瓢箪	不明	やや細	扁珠	緑	ヒョウタン
マダガスカル	不明	やや細	円筒	緑	ヒョウタン
URUGUAI産	不明	中	瓢箪	緑	ヒョウタン

主に栃木分場所有のユウガオ保存台帳と1989～1999年野菜試験成績書を参考にし取りまとめた。

特性中の矢印は保存台帳と成績書で異なることを示す。

特性中の波線は成績書の年次間差を示す。

III 結 果

供試した44プライマーの内、OPO19, OPAQ3, OPAT2, OPAU16の4プライマーで増幅が見られなかった。残り40プライマーで合計309バンドが検出できたが、バンドが薄くかつ個体間で不規則に現れた134バンドは解析不能と判断しデータから除外し(第16図)、144バンドでは多型が得られなかった。DNA多型が認められたのは21プライマーで31バンドあり、これらを分類のためのDNAマーカーとした(第17図、第16表)。

特大ひょうたん、長杓ひょうたん、イボ瓢箪、URUGUAI産では同一品種内の8個体間で変異が検出され、これら品種でヘテロ接合性が残っていると推定された。それら以外は品種個体間の変異はなかった。DNAマーカーはOPF4, OPW7, OPAQ13, OPAS14, OPAV11, およびOPAX16で分離した(第17図)。品種別に見ると、特大ひょうたんで1マーカー、長杓ひょうたん、イボ瓢箪で2マーカー、URUGUAI産で5マーカーであった。DNAマーカー別にみるとOPF4の500bp, 同550bp, OPW7の650bp, OPAQ13の2400bp, OPAV11の1700bpおよびOPAX16の1000bpで1品種に、OPAS14の1000bpで4品種に見られた。

栃木県内のユウガオ10品種間に多型の現れたマーカーは4種類、OPL3, OPL18, OPU15, OPY3であった。国内産と推測されるユウガオ12品種間では8マーカーで多型が現れた。ユウガオ14品種間のみに多型の現れたDNAマーカーは11種類であった。

マダガスカルに特異的なDNAマーカーとして、プライマーOPK7で800bp, OPL18で2200bp, OPN8で1250bp, OPU15で2800bp, OPAF7で2000bp, OPAH1で1500bpにポジティブに現れる6種類と、OPAQ13で2400bpに現れないネガティブな1種類が得られた。また、イボ瓢箪では、OPU15で2400bpにポジティブな、OPC7で2000bpにネガティブな特異的なDNAマーカーが得られた(第16表)。

以上の結果、特に、県内由来の品種間での多型は少なかった。一方、イボ瓢箪、URUGUAI産およびマダガスカルでは多型が多くみられた。

IV 考 察

ユウガオは栃木県の特産作物であり全国の90%以上のシェアを占める。現在、栃木県農業試験場栃木分場で育種を行っているが、近年の急激な作付けの減少から収束の方向に向かうことが検討されている。このことは、現在保有している有用な遺伝資源としての保存品種の維持も難しいことを意味している。しかし、これらの遺伝資

源は極めて貴重であることから特性等を評価し、必要最小限の品種は保存していく必要がある。その一手法としてDNAマーカーを用いた分類とカタログ化が有効な手段と考えられる。そこで、開発にコストがかからず簡易にDNAマーカー検索が可能なRAPD分析を用いて同栃木分場で育種母本として有望としている中から24品種を供試し分類を試みた。

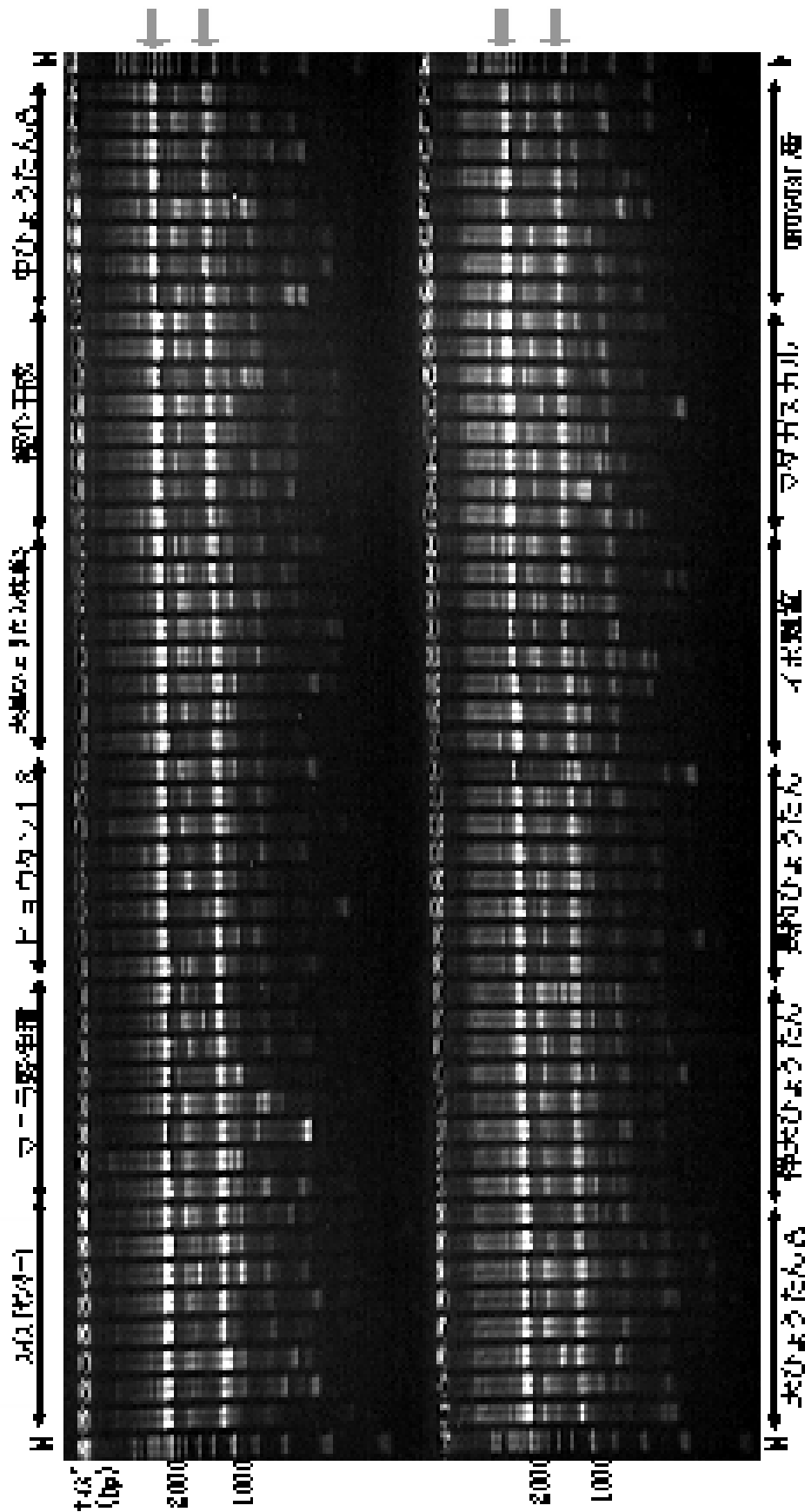
Decker-Waltersら(2001)は、45プライマーを用いて64種類のDNAマーカーを得ている。それらのマーカーを利用して世界各国から収集したヒョウタンの75品種が識別できている。今回の結果では、31マーカーが得られたが、多くは導入品種由来特異的なDNAマーカーであり、栃木県由来の10品種間で得られたのは4マーカーのみであった。国内産と推測されるユウガオ12品種間でも8マーカーのみであり、ユウガオに関しては、近縁関係が極めて近いと考えられた。

系譜が明らかとなっている栃木県育成品種では、しもつけしろを母に、タイから導入したT.143を父に交配を行い、その雑種第1代を父としてしもつけあおを母とするしもつけ晩生(小熊・藤平 1979)は小金井在来と同じ多型を示した。しもつけあおを母に、小山在来を父に用いたゆう太(高野ら 1992)は両親および二宮在来、ヒョウタン18と同じ多型を示した。以上のように、県育成の品種は、一部で系譜とDNAマーカーに関係が示唆されたが、最大で4種類のDNAマーカーで多型がみられたのみであることから、このデータにより分類することは危険であると判断した。

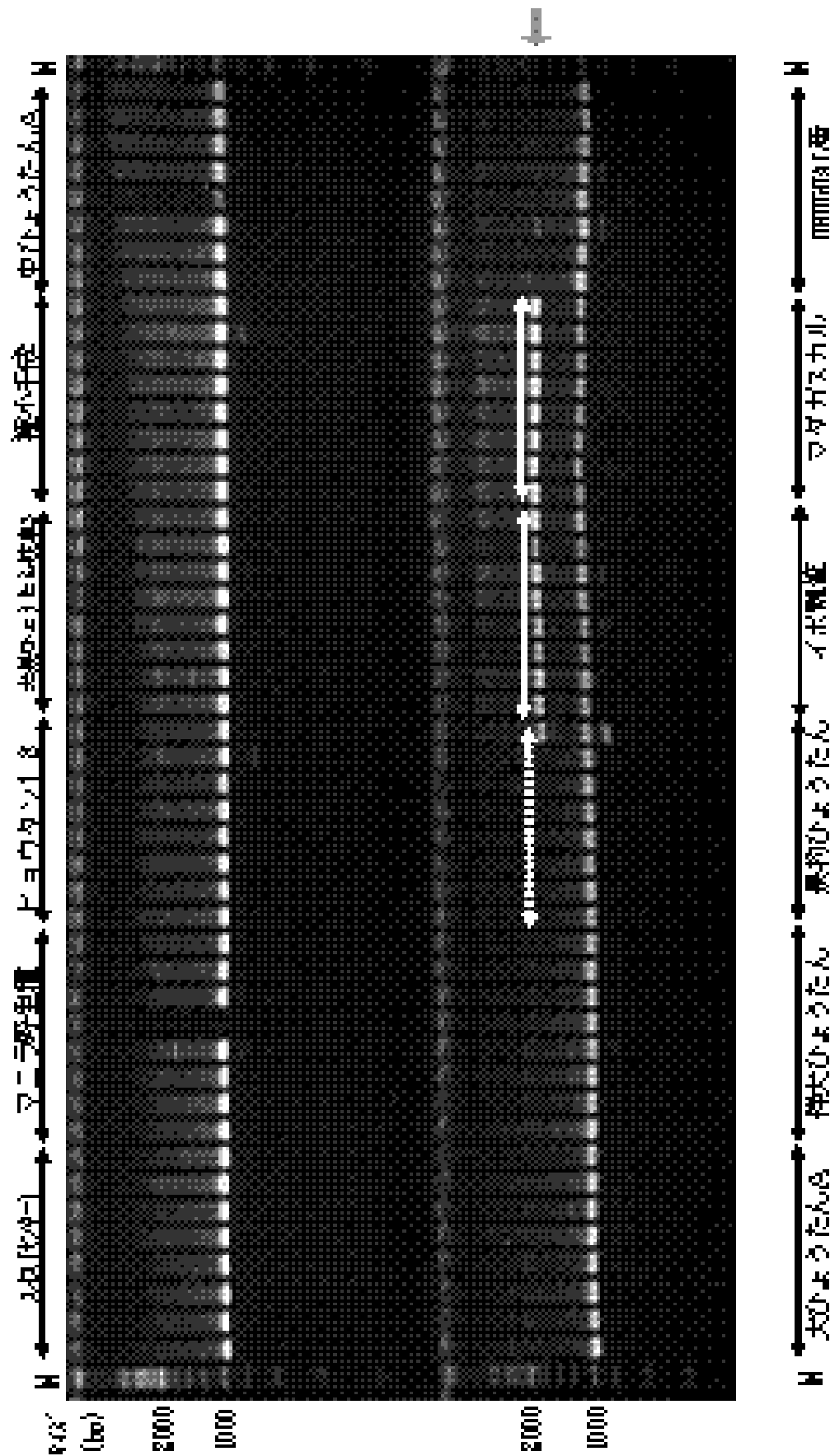
ヒョウタン18が栃木県由来品種と同じ多型を示したが、保存台帳と最近の試験成績での特性調査での果形が異なることから、混種または、自然交雑等、なんらかの原因により従来の品種とは異なる可能性が高いと推定され、材料として不適切であった可能性が高い。

以上の結果から、栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近く、DNAマーカーによる分類は困難であると推定された。これは、栃木県のユウガオは主に滋賀県から取り寄せたものに由来し、栃木県の気象条件等に適した品種が選抜されてきたことと一致する(農山漁村文化協会 1989)。

今後も同分場が現在の規模で品種を維持していくのは非常に困難な状況にある。また、今回供試した品種の中には導入当時と特性が異なっているものがある。中山(1962)がしもつけしろを育成する際、自殖弱勢を回避するため、約7年間の自家交配の後、系統群間の交配を行ったとあり、自殖による弱勢の影響も推察される。また、混種または、自然交雑等が原因とも推察される。



第16図 プライマーを用いて得られたユウカオのDNA多型。
矢印のバンドは多型帯と判定。
その他のバンドは判定不能とした。
Mは200bp DNA ladder.



第17図 プライマーNVIを用いて得られたユウガオのPCR産物。
 図中の連続的な帯は品管内で分離無し、点線の帯は分離している品種。
 N1はZooke DNA ladder.

[illegible]

多量の現れたDNAマーカーの何れを0（品種別個体全てにバンド無し）、1（品種別個体全てにバンド有り）、2（品種別個体間で分離）で示す。ブライママー各の遺伝表現は共通なので、省略して記載した。

図中央部、系縁より上をエウガオ、下をヒョウタンと分類した。

このように、数年に1回とはいえども、植物体が大きくなるユウガオをきょうだい交配することは多くの労力が必要となる。

そこで、今までの調査成績を基に表現型の特性、耐病性等で分類し、代表的な品種を残すことにより必要最少限の遺伝資源が維持・保存できると思われる。また、RAPDマーカーについてはより多くのDNAマーカーの探索と、それらを用いた効率的な分類を可能にするため、水稻で大坪ら（2002）、イチゴで田崎ら（2004）が行っているようにSTS化を図る必要がある。

第2節 ユウガオのクラスター分析による分類

I 緒 言

前節のRAPD分析によるユウガオの品種分類の結果、栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近く、DNAマーカーによる分類は困難であると推定された。しかし、それ以外の品種について判然としていない。一方、Decker-Waltersら（2001）は、アジア産とアフリカ産ヒョウタンが遠くに位置し、新大陸の品種は両方のクラスターに位置しているとしている。そこで、本節では類縁関係が視覚的に捉えられるクラスター分析を行った。

II 材料と方法

1. 供試品種

前節のRAPD分析によるユウガオの品種分類で得られたDNAマーカーを用いた（第15表、第16表）。

2. クラスター分析

品種の個体別にDNA多型のデータを用いてクラスター分析を行い、個体間の距離をデンドログラムにより視覚化した。RAPDマーカーにより検出したDNA多型のデータは、PCR増幅産物が現れた場合を‘1’、無い場合を‘0’とした。数値化したDNA多型の全データを、そのまま青木によるプログラム（注：http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/Mokuji/index2.html）に入力し、正規化せずユークリッド距離を求め、群平均法（UPGMA）によるクラスター分析を行った。

III 結 果

31種類のマーカー（第16表）より計算したクラスター分析の結果として得られたデンドログラムを第18図に示した。その結果、大きく4つのクラスターに分類された。

ほとんどの品種が含まれるクラスター、URUGUAI産、イボ瓢箪、マダガスカルのみで形成されるクラスターとなった。1品種8個体を供試したが、ほとんどの品種は個体間に多型がみられず同一のクラスターに分類された。同一クラスターにならなかった品種も隣接したクラスターとなったことから、遺伝的な固定は不完全ではあるものの、品種内変異が品種間変異を超えることは極めて少なく、本研究での供試品種が分類できることが示された。

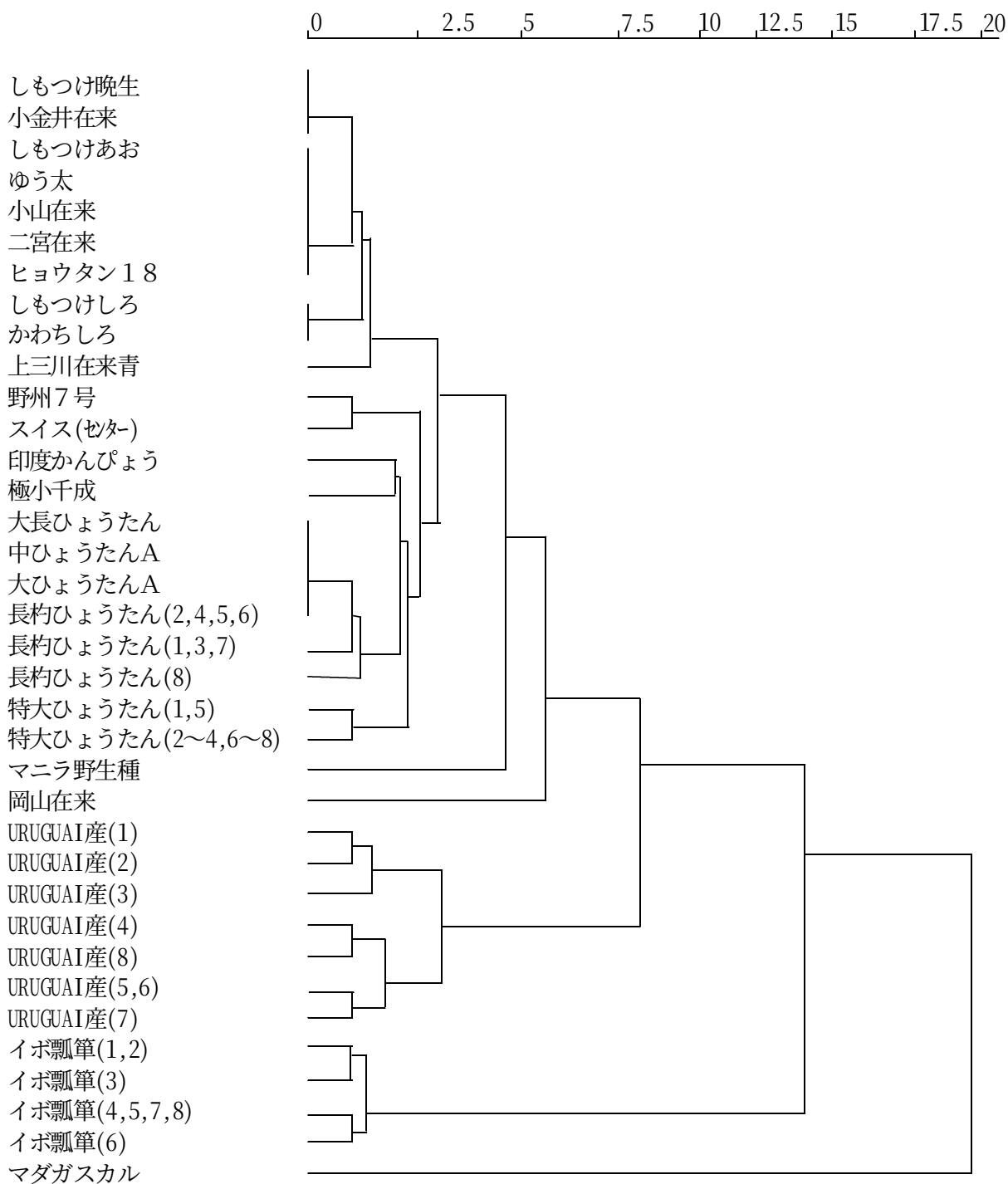
ユウガオは12品種が近くに位置したが、マニラ野生種と岡山在来は異なるクラスターを形成した。国内のヒョウタンはほとんどが隣接した。しかし、ヒョウタン18は栃木県由来のユウガオのクラスターに含まれた。栃木県由来ユウガオと国内から導入したヒョウタンは異なるクラスターを形成したが、大きな差ではなかった。栃木県由来のユウガオ品種から最も遠くに位置したのは、マダガスカル、次いで、イボ瓢箪、URUGUAI産となった。

栃木県内の在来種から純系分離で育成されたしもつけあおは、ゆう太、小山在来、二宮在来、ヒョウタン18と同じクラスターに位置した。同様に育成されたしもつけしろは、かわちしろとおなじクラスターに位置した。しもつけ晩生は、しもつけあおとしもつけしろに由来しているがそれぞれ隣接したクラスターに位置した。ゆう太は両親であるしもつけあお、小山在来と同じクラスターに位置し、野州7号は父親であるスイス（センター）に隣接した。

IV 考 察

ユウガオは栃木県の特産作物であり、現在、栃木県農業試験場栃木分場で育種を行っているが、作付けの減少から収束の方向に向かうことが検討されており、現在保有している有用な遺伝資源としての保存品種の維持も難しい。しかし、これらの遺伝資源は極めて貴重であることから特性等を評価し、必要最小限の品種は保存していく必要がある。その一手法としてDNAマーカーを用いた分類とカタログ化が有効な手段と考えられる。そこで、RAPD分析で得られたデータを用いてクラスター分析を試みた。

系譜が明らかとなっている栃木県育成品種では、しもつけしろを母に、タイから導入したT.143を父に交配を行い、その雑種第1代を父としてしもつけあおを母とするしもつけ晩生（小熊・藤平 1979）は小金井在来と同じクラスターに含まれた。しもつけあおを母に、小山在来を父に用いたゆう太（高野ら 1992）は両親および二宮在来、ヒョウタン18と同じクラスターに含まれた。ゆ



第18図 RAPDマーカーによる多型情報を基にしたユウガオ品種間のクラスター分析結果.
 品種内に分離のみられた品種は個体別に分析した.
 括弧内の数字は品種内の個体番号.

う太を母とし、スイス（センター）を父とした野州7号はスイス（センター）と隣接したクラスターに位置した。導入した品種を交配母本として用いているしもつけ晩生と野州7号が栃木県由来品種の中では、最も遠くに位置したことは興味深い。

ヒョウタン18が栃木県由来品種の中に位置しているが、前節で述べたように保存台帳と最近の試験成績での特性調査での果形が異なることから、なんらかの原因により従来の品種とは異なる可能性が高いと推定され、材料として不適切であった可能性が高い。海外からのヒョウタンの導入種は栃木県由来ユウガオから最も遠く位置した。アフリカ原産のマダガスカルが最も遠く、次いでイボ瓢箪、URUGUAI産が続く。

クラスター分析の結果からも、栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近いことが示唆された。一方、国内の他の地方産は岡山在来のみであるが、栃木県で栽培されているユウガオと由来が異なると推察された。また、海外からの導入種については、供試品種数が少ないこともあるが、栃木県由来品種とは遠縁であることが明らかとなった。

栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近いことが示唆されたことから、今までの調査成績を基に表現型の特性、耐病性等で分類し、代表的な品種を残すことにより必要最小限の遺伝資源を維持・保存できると思われる。また、海外からの導入種については、アフリカ産、アジア産、および新大陸産は多様性が広いことから、現在保有している品種を数多く維持・保存することが必要であると示唆された。

いずれにしても、同栃木分場保有のユウガオ属品種は遺伝資源として極めて貴重な財産である。できるだけ多くの品種を保存する努力をする一方で、新たな保存機関を早急に探していく必要がある。

第3節 まとめ

ユウガオを育種している栃木県農業試験場栃木分場の保存品種について、維持保存の参考とするため、栃木県育成品種5品種を含むユウガオ14品種とヒョウタン10品種、合計24品種についてRAPD分析とクラスター分析を用いて分類を試みた。44種類のランダムプライマーを用いて31種類のDNAマーカーが得られた。その内、栃木県由来の品種間では4種類の多型がみられたのみであり、近縁関係が極めて近いと示唆された。県外や海外からの導入品種は近縁関係が遠いことが示唆された。これらのことから、今後も保存品種を維持するにあたり、県内品

種については表現型で分類し代表的な品種を、導入品種については広い地域からの品種を数多く保存することが望ましい、との提言ができた。

第6章 総合考察

栃木県における水稲およびムギ類は本県農業の基幹作物となっている。そこで、栃木県では需要動向に応じた作付誘導、品質向上対策および優良品種の導入を図っている。これら水稲やムギ類の品種数の増加は原々種や原種生産において作業の煩雑さの増加を伴い混種・取り違えの危険性が高まる。一方で、近年消費者の安全性に対する関心や健康志向の高まりにより農林物資の規格化および品質表示の適正化に関する法律が改正され、品質表示基準制度が充実・強化された。これらの情勢から今後、水稲やムギ類の簡便で正確な品種識別技術に対する要望は高まってくると考えられる。従来、品種の識別は形態や生理特性等で行ってきたが、この方法では気象条件や栽培方法等が結果を大きく左右し、識別が困難となる場合がある。これらの影響を受けないDNAマーカーの利用は品種識別にとって極めて有効である。以上の事を踏まえ、本論文ではDNAマーカーの中で最も検出操作が簡便なRAPD分析を用い、まず、栃木県の奨励品種を中心に水稲とムギ類の品種を識別できるRAPDマーカーの組合せを明らかにしようとした。

また、近年の育成品種は、高品質の品種や系統が組み合わせられ、交配母本の系譜が似通ってきており、近縁度が高まっていると推定され、今後、品種識別マーカーを開発していくうえでの支障となることが考えられる。育種においても、交配親の遺伝的背景を解析し把握しておくことは効率的な品種育成や遺伝的多様性の維持のために重要となってくる。そこで、ムギ類品種間の遺伝的関係を調査するため、ユークリッド距離を用いたクラスター分析を試みた。また、遺伝的背景を把握するため、交配親となる品種間の近縁係数やDNAマーカーを用いた遺伝的距離などの解析を試みた。

最初に、栃木県水稲優良品種を識別できるRAPD分析によるマーカーの組合せを見出した。20品種について、7種類のランダムプライマーを用いて得られた9種類のDNAマーカーの多型を比較することで可能であった。イネ品種の識別法としては、RAPD分析の他にRFLP分析、SSR分析およびAFLP分析等が実施されている。将来的に採種担当者および農業協同組合関係者等の現場での利用を考えた場合、操作方法の簡易性および安全性を考慮する必要がある。これら現場で分析される場面は、圃場で異株が現れた場合の確認や生産物を出荷する時に限られ、季節的な分析に限られる。また、従事者は数年前に異動があり煩雑また危険を伴う操作に習熟するの

は困難な場合が多い。そこで、本論文では低コストで開発が可能で、操作が簡易で安価なRAPD分析を採用した。

大坪ら（1997）は当初、10品種を識別するために600プライマーを検討した。それに対し、本論文ではわずか23プライマーで19品種を識別できるランダムプライマーを選定できた。これは、これまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用したためである。今後も新しい品種が出てくる毎にこれまでの情報を有効に利用することが必要である。本論文では再現性が高く、かつ、明瞭なバンドをDNAマーカーとして選抜した。しかし、RAPDマーカーは一般的に他のDNAマーカーに比較して再現性が低いと言われている。また、不要なバンドが出て視認性が劣る。今後は大坪ら（2002）や小笠原・高橋（2000）のようにSTS化し、さらに、マルチプレックス化することによって操作回数を減らし簡便化すること、また、視認性を高める必要がある。

本論文ではRAPD分析のみで識別を行ったが、今後はより近縁度の高い品種が多数開発される可能性が高く、さらに効率的に多型を検出することが必要である。そのためには、RAPD分析だけではなく、AFLP分析、SSR分析等も実施する必要性が考えられる。また、イネで使用している例は少ないが、イチゴ（Kunihisaら 2003）やオオムギ（内村ら 2004a）の品種識別に利用されているCAPS分析や品種識別を目的とはしていないがオオムギ（Fernándezら 2002）やイチゴ（Cekicら 2001）で用いられているISSR分析も有効な手法と思われる。

ムギ類品種を識別できるマーカーもRAPD分析のみを用いて開発した。水稲と同様に開発にコストがかからず、操作が簡易で安全かつ低コストである方法を前提とした。

プライマーについても、水稲と同様に、これまでの品種識別に関する文献を参考に多型の出る可能性が高いランダムプライマーを使用した。その結果、28プライマーでコムギ17品種、オオムギ19品種を識別できるランダムプライマーセットを選定できた。今後出てくる新しい品種についても、ここでの情報が有効に利用できると思われる。また、大坪ら（1997）が国内主要10品種を識別した時に多型の現れた8種類のランダムプライマーの内5種類、本論文でイネの品種識別マーカーを開発する時に多型の現れた12種類の内、8種類がムギ類でも使用できたことはイネとムギ類の場合、共通のランダムプライマーが使用できる可能性を示唆していると思われた。

本論文ではRAPD分析のみで識別を行ったが、近縁度が高まってくると品種識別は困難になると推察さ

れる。そこで、現在採用されているムギ類品種の遺伝的背景を確認した。クラスター分析を行ったところ、コムギでは用途の違いによって、また、育成地でクラスターが分けられる傾向が一部みられた。小麦農林61号は収集した県の間で多型がみられた。厳密に品種の定義を考えた場合に特性が均一であることが条件の一つであることから、原々種や原種生産の際にDNAマーカーを用いた変異のチェックも必要になってくるであろう。イネでは、コシヒカリで同様な解析が必要と考えられる。

オオムギのクラスター分析の結果では、二条オオムギと六条オオムギとに明確に分かれた。これは、二条オオムギは醸造用として、六条オオムギは精麦用として育成されていることから、遺伝的背景が異なるためと考えられる。六条オオムギの中では育成地にクラスターが分かれ、これは、やはり遺伝的背景が異なっていることに起因すると思われた。一方、二条オオムギの関東二条35号は、雑種第13代であるが系統間で多型はみられなかった。今後、固定度調査の中に今回のようなDNAマーカーによるチェック体制を導入することも有効と考えられる。

品種間多型の現れたコムギおよびオオムギにおいて、同一マーカー数、遺伝的距離Dおよび近縁係数を計算した。どの値も系譜、育成地、交配親などを良く反映し、品種間の類似性も同様の傾向を示し、クラスター分析の結果と概ね一致した。

全品種相互間での同一マーカー数と近縁係数との間には、有意な相関関係がみられた。1品種の組合せに限った場合の相関係数はさらに高くなった。オオムギではX軸に偏る傾向があり、また近縁係数が0でもあるにもかかわらず同一マーカー数が6から20に並んでいる場合があったが、これは二条オオムギと六条オオムギで系譜図上では同じ祖先品種が無いが、共通の祖先が実際には存在していたことを示している。

次に、近縁係数と遺伝的距離との関係も同一マーカーの場合と同様で、コムギでは全品種間で有意な相関が認められ、イワイノダイチの他品種との相関係数は最も高くなった。DNA多型の検出率からみて遺伝的相似度が高く遺伝的距離が近いにもかかわらず交配記録による系譜上では類縁関係があまり無い傾向が認められた。これらが交配記録上では類縁関係がないが、遺伝的背景からみると共通している遺伝子領域が多いためと考えられる。オオムギの近縁係数と遺伝的距離Dとの関係をみると、全品種相互間で有意な相関が認められた。スカイゴールデンと他品種との組合せでの相関係数をみると、より高い値であった。オオムギの場合はコムギと異なり、DNAマーカーで推定した遺伝的距離が近いにもかかわらず

らず、系譜上の類縁関係は近いものから遠いものまで分布していることを示した。これは、系譜上では共通祖先のない二条オオムギと六条オオムギを一緒に比較しているためと考えられる。特に、ただ1つ供試した裸ムギであるイチバンボシの他品種との相関係数は最も低くなっていた。このように一部の不整合性はあるにせよ、系譜上の類縁関係から計算した近縁係数は同一のDNAマーカー数や、遺伝的距離Dとコムギ、オオムギ共に有意な相関関係が認められた。これらの結果は、近縁係数が同一マーカー数やDNAマーカーから算出した遺伝的距離Dからある程度の裏付けがなされ、今回DNAマーカーで検出した多型が存在する染色体領域は、品種育成の過程の選抜や淘汰により大きく偏ることなく、後代にほぼ均等に分離していったことを示している。さらに、不整合性のみられた品種では、その系譜の不完全性を示唆することができた。

現状では品種間の遺伝的背景の違いは近縁係数の計算で比較的簡単に推定可能であるが、今後、近縁係数が高まってくることが予想され、また、二・六条オオムギ間の交配では近縁係数が0でも分子マーカーで関連性が認められることがある等から分子マーカーによる同一マーカー数や遺伝的距離Dの推定も重要になってくると思われる。遺伝的距離Dと同一マーカー数の相関を求めた結果、コムギ、オオムギともに極めて高かった。これは、単にマーカーが同一であるかどうかを数えるのみでも、品種相互間の遺伝的な違いを推定するのに有効であることを示している。

内村ら(2004b)は二条オオムギ品種を材料とし、系譜図から計算した近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝的距離の間に高い相関を認めている。本論文の結果も、コムギおよびオオムギでも同様に高い相関があることを明らかにした。これは、品種の系譜図が極めて正確であることも示している。以上のことから、近縁程度を求めるにはDNAマーカー利用も重要であるが、近縁係数による簡易な血縁関係の推定もコムギ、オオムギともに有効であることを示している。気象変動、栽培法の改良等に対応するためにリスク分散を図るうえで、遺伝的な多様性の維持を意識しながら品種育成を実施するためにも、近縁係数のみならず、分子マーカーから算出した遺伝的距離Dおよび同一マーカー数の有効な利用が必要と考えられた。現在、すべての育種機関で分子マーカーを利用できる体制ではないが、育種者の利便性を考慮し、上記いずれかの方法を交配計画に取り入れることにより育種の効率化が図られると思われる。

他殖性のユウガオは栃木県の特産作物であり、栃木県

農業試験場栃木分場で育種を行っているが、近年の急激な作付けの減少から収束の方向に向かうことが検討されている。このことは、現在保有している保存品種の維持も難しいことを意味している。しかし、これらは遺伝資源として極めて貴重であることから早急に特性等を評価し、必要最小限の品種は保存していく必要がある。そのため、本論文ではDNAマーカーを用いた分類とカタログ化を試みた。

Decker-Waltersら（2001）は、45プライマーを用いて64種類のDNAマーカーを得て、世界各国から収集したヒョウタン75品種が識別できるとしている。今回の結果では、31マーカーが得られたが、多くは導入品種由来特異的なDNAマーカーであり、栃木県由来の10品種間で得られたのは4マーカーのみであった。国内産と推測されるユウガオ12品種間でも8マーカーのみであり、ユウガオに関しては、近縁関係が極めて近いと考えられた。

この結果から、栃木県内由来の品種については近縁関係が極めて近く、DNAマーカーによる分類は困難であると推定された。そこで、今までの調査成績を基に表現型の特性、耐病性等で分類し、代表的な品種を残すことにより必要最小限の遺伝資源を維持・保存できると思われる。国内の他の地方産は岡山在来のみであるが、栃木県で栽培されているユウガオと由来が異なると推察された。また、海外からの導入種については、供試品種数が少ないこともあり明らかにできなかったが、アフリカ産、アジア産、および新大陸産は多様性が広いことから、現在保有している品種を数多く維持・保存することが必要であると示唆された。このように、従来、品種改良もあまり進んでおらず、遺伝的情報も不明であった作物について、DNAマーカーを利用することでより合理的な遺伝資源保存方法を明らかにすることができた。

以上のように、本研究の結果、RAPD分析による自殖性作物である水稲、ムギ類の品種識別方法と他殖性である栃木県の地域特産作物であるユウガオとヒョウタンの品種分類方法を開発した。また、コムギ、オオムギでは品種間の近縁係数が遺伝的距離と有意な相関があることを明らかにし、より簡易な近縁関係を推定する方法としてDNA多型から算出した同一マーカー数が有効であることを明らかにした。ユウガオではRAPD分析により栃木県由来の品種間では近縁関係が極めて近いことを明らかにした。これらの成果は本県育成品種の権利保護と品質向上並びに原種、および原々種の混種防止、さらには二条オオムギの新品種育成技術とユウガオの品種保存に大きく寄与するものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、水稲の品種識別に関して多大なる助言を頂きました独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所大坪研一博士、ムギ類の品種識別に関して助言を頂きました福岡県農業総合試験場内村要介博士に感謝の意を表します。また、材料の提供を頂いた茨城県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都、山梨県、長野県、静岡県、および福岡県の農業研究機関関係者に謝意を表します。

本研究の遂行に関して、終始、ご親切なる御指導御鞭撻を賜りました宇都宮大学農学部吉田智彦教授に深甚なる感謝の意と心からの敬意を表します。

なお、東京農工大学農学部平沢正教授、茨城大学農学部松田智明教授、宇都宮大学農学部本條均教授、同和田義春助教授には本論文の校閲を賜りました。記して心より厚く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究の遂行に当たり、終始暖かい励ましを頂き、様々な形でご支援、ご協力を頂きました栃木県農業試験場生物工学部、栃木分場の皆様をはじめ、ご理解を頂きお世話になりました栃木県庁職員の皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 赤木守弘 2000. DNA多型によるイネの品種識別. 育種学研究 2:89—96.
- Cekic, C., N.H.Batty and M.J. Wilkinson 2001. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. Theor. Appl. Genet. 103:540—546.
- Decker-Walters, D., J. Staub, A. Lopez-Sese and E. Nakata 2001. Diversity in landrace and cultivars of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*; Cucurbitaceae) as assessed by random amplified polymorphic DNA. Genetic Resources and Crop Evolution 48:369—380.
- Fernández, M.E., A.M. Figueiras and C. Benito 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theor. Appl. Genet. 104:845—851.
- Fukino, N., M. Taneishi, T. Saito, T. Nishijima and M. Hirai 2002. Construction of a linkage map and genetic analysis for resistance to cottony mealybug and powdery mildew in melon. Acta Hort. 588:283—286.
- 林満・志和地弘信・遠城道雄 2001. ヤムイモ (*Dioscorea* spp.) における形態的およびRAPD法による系統の分類. Kagoshima Univ. Res. Center S. Pac. Occasional Papers 34:145—157.
- 池田延行・山田哲也・上島脩志・石井尊生 2000. イネにおけるマイクロサテライトマーカーを利用した効率的なmarker-assisted selectionのための超簡単DNA抽出法. 育種学研究 2 (別2):134.
- 河野いずみ・竹内善信・島野公利・佐々木卓治・矢野昌裕 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.
- 川島清・勝股昭一 1961. 水稻品種の純度維持に関する研究 (第1報) 育成種の量的形質の分離と二次選抜. 千葉県原種農場業報 2:1—16.
- 小林俊一・吉田智彦 2005 RAPD分析による栃木県水稻優良品種の品種識別. 日作紀 74:207—211.
- 小林俊一・吉田智彦 2006a 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.
- 小林俊一・吉田智彦 2006b 関東周辺地域のムギ類優良品種における近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝的距離との関係. 日作紀 75:175—181.
- 小林俊一・吉田智彦 2007 RAPD分析によるユウガオ (*Lagenaria siceraria*) の品種分類. 日作紀 76:93—99.
- Kuczyńska, A., P. Milczarski, M. Surma, P. Masojc and T. Adamski 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). J. Appl. Genet. 42:43—48.
- Kunihisa, M., N. Fukino and S. Matsumoto 2003. Development of cleavage amplified polymorphic sequence (CAPS) marker for identification of strawberry cultivars. Euphytica 134:209—215.
- 牧野富太郎 1989. 改訂増補牧野新日本植物圖鑑. 北隆館, 東京. 470.
- 水田一枝・佐々木昭博・吉田智彦 1996a. 近縁係数のためのPrologによるコンピュータプログラムとそのビール大麦品種の近縁関係の解析への応用. 農業情報研究 5:19—28.
- 水田一枝・吉田智彦 1996b. 小麦品種の近縁係数およびその品質との関係. 農業情報研究 5:57—67.
- 森一幸・小村国則・保坂和良 2003. 1分間DNA抽出法を用いたパレイショ育種におけるDNAマーカー選抜. 育種学研究 5 (別2):191.

- 森真理・宮村弘明・渡辺健三 2001. 滋賀県における水稲主要栽培品種のRAPD法による品種の判別. 近畿中国農研 101:16-19.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
- 中山保 1962. かんぴょうについての研究. 栃木農試南河内分場特別研報 2:1-34.
- 根井正利 2002. 分子進化遺伝学. 五條堀高・斉藤成也訳. 培風館, 東京. 1-433.
- 西尾小作・中川元興・牛腸英夫・渡辺進二 1973. 採種地を異にする小麦農林61号の主要形質の差異について. 東海近畿農試研報 25:98-126.
- 農業技術協会 2003. 水陸稲・麦類・大豆奨励品種特性表. 農林水産省生産局編. 5-306.
- 農山漁村文化協会編 1989. 全国の伝承江戸時代 人づくり風土記9. 農山漁村文化協会, 東京. 121-123.
- Nunome, T., K. Ishiguro, T. Yoshida and M. Hirai 2001. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers. Breed. Sci. 51:19-26.
- 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. 食科工 47:632-637.
- 小熊純一・藤平利夫 1979. ユウガオの炭そ病耐病性品種「しもつけ晩生」について. 栃木農試研報 25:27-32.
- 奥野忠一・久米均・芳賀敏郎・吉澤正 1971. 多変量解析法. 日科技連. 東京. 391-411.
- 奥野忠一・芳賀敏郎・矢島敬二・奥野智恵子・梨本茂司・古河陽子 1976. 続多変量解析法. 日科技連. 東京. 207-237.
- 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. 食科工 44:386-390.
- 大坪研一・中村澄子・今村太郎 2002. 米のPCR品種判別におけるコシヒカリ用判別プライマーセットの開発. 農化 76:388-397.
- 大里久美・吉田智彦 1996. イネ育成系統の近縁係数およびその食味との関係. 育雑 46:295-301.
- 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. 水稻品種「晴れすがた」の育成. 栃木農試研報 44:1-14.
- 酒井寛一 1957. 植物育種法に関する理論的研究 V. 自殖性作物の育種における近縁係数の応用. 育雑 7:87-92.
- Smile, M., M.P. Reynolds, M. Warburton, B. Skovmand, R. Trethowan, R.P. Singh, I. Ortiz-Monasterio and J. Crossa 2002. Dimensions of diversity in modern spring bread wheat in developing countries from 1965. Crop Sci. 42:1766-1779.
- 高野邦治・長修・川里宏・赤木博・田村恭志・田口章一 1992. ユウガオ新品種「ゆう太」について. 栃木農試研報 39:95-102.
- 谷口義則・小田俊介・常見譲史・大塚勝・関和孝博・糸川晃伸・山口昌宏・五月女敏範・福田暎・早乙女和彦・河田尚之・石川直幸・加藤常夫・加島典子・宮川三郎・神永明・小玉雅晴・佐々木昭博・仲田聡・徳江紀子・桐生光弘・野沢清一・佐藤圭一・伊藤浩 2001. 二条大麦品種「スカイゴールド」の育成 (二条大麦農林20号). 栃木農試研報 50:1-18.
- 田崎公久・柏谷祐樹・小林俊一・生井潔・酒井美幸・天谷正行 2004. RAPDおよびAFLPによるイチゴ品種「とちおとめ」および「とちひめ」識別マーカーの選抜. 育種学研究 6 (別2):357.
- 栃木県 2001. とちぎの地域特産物取組事例集. 24-26.
- 栃木県農務部 2003. 平成16年産麦作推進資料. 1-39.

栃木県農務部 2004a. 平成16年度稲作推進資料. 1－69.

栃木県農務部 2004b. 平成17年産麦作推進資料. 1－18.

栃木県 2006. 平成17年度首都圏農業推進計画21. 42－43.

Turuspekov, Y., K. Nakamura, R. Yoshikawa and R. Tuberosa 2001. Genetic diversity of Japanese barley cultivars based on SSR analysis. *Breed.Sci.* 51:211－213.

内村要介・古庄雅彦・吉田智彦 2004a. 国内二条オオムギのDNAマーカーによる品種識別. *日作紀* 73:35－41.

内村要介・古庄雅彦・吉田智彦 2004b. 二条オオムギ品種における近縁係数と分子マーカーから推定した遺伝距離との関係. *日作紀* 73:410－415.

山下雅幸・佐藤英樹・澤田均・山田敏彦 1996. RAPD分析によるペレニアルライグラスエコタイプ集団の多型解析. *日草誌* 42 (別):72－73.

吉田智彦 1999. 最終祖先間に類縁関係がある場合の近縁係数の変化－現行作物品種を例にして－. *農業情報研究* 7:97－104.

吉田智彦 2004. Windowsによる作物品種の家系分析用 Prologプログラムの作成. *日作関東支報* 19:54－55.

吉橋忠・中村澄子・藤井剛・川崎信二・大坪研一 1999. RAPD法による精米1粒からの品種判別技術. *食科工* 46:250－254.