

栃木県の主要作物および地域特産作物のDNAマーカーを利用した品種識別と遺伝資源の保存・利用に関する研究

小林 俊一

目次

総合要旨	1
要旨	1
Summary	3
第1章 序論	4
第2章 RAPD分析による栃木県水稻優良品種の品種識別	7
緒言	7
材料と方法	7
結果	8
考察	10
まとめ	12
第3章 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	13
第1節 コムギの優良品種識別	13
緒言	13
材料と方法	13
結果	14
考察	18
第2節 オオムギの優良品種識別	18
緒言	18
材料と方法	19
結果	19
考察	22
第3節 コムギ優良品種のクラスター分析による分類	22
緒言	22
材料と方法	22
結果	23
考察	23
第4節 オオムギ優良品種のクラスター分析による分類	24
緒言	24

材料と方法	25
結 果	25
考 察	25
第 5 節 まとめ	26
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	27
第 1 節 コムギの近縁係数と遺伝的距離との関係	27
緒 言	27
材料と方法	27
結 果	28
考 察	30
第 2 節 オオムギの近縁係数と遺伝的距離との関係	32
材料と方法	32
結 果	32
考 察	35
第 3 節 まとめ	37
第 5 章 RAPD分析によるユウガオ (<i>Lagenaria siceraria</i>) の品種分類	38
第 1 節 RAPD分析による品種分類	40
緒 言	40
材料と方法	40
結 果	41
考 察	41
第 2 節 ユウガオのクラスター分析による分類	45
緒 言	45
材料と方法	45
結 果	45
考 察	45
第 3 節 まとめ	47
第 6 章 総合考察	48
謝 辞	50
引用文献	51

総 合 要 旨

栃木県産米の品質向上と原種，および原々種の混種防止を目的として，栃木県奨励品種を中心に酒米品種を含む合計20品種について，RAPD分析により9種類のDNAマーカーを用いた品種識別技術を確立した。

同様に，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品種をRAPD分析による6種類のDNAマーカーで，二条・六条・裸オオムギを含むオオムギ19品種については9種類のDNAマーカーで，識別する技術を開発した。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。近年育成の水稻や二条オオムギ品種では，同一品種内に多型は検出されなかった。これらのデータを用いクラスター分析を行った結果，コムギ，オオムギともに大きく2つのクラスターに明確に分類できた。

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。コムギ，オオムギともにこれらの間の相関は高く，いずれも血縁関係の推定や遺伝的な多様性を維持しつつ品種育成をするための情報として有効と考えられた。

他殖性であるユウガオの保存品種について維持保存のため，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分析を行ったところ，同一品種内での変異もみられたが，品種間の分類が可能であった。クラスター分析によると，栃木県由来の品種間では近縁関係が極めて近く，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。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提言できた。

要 旨

1. 栃木県産米の品質向上と原種，および原々種の混種防止を目的として，栃木県奨励品種を中心に，栃木県育成の有望品種栃木7号，および栃木酒14号等，合計20品種について，安価で簡易なRAPD分析のみによる品種識別技術を確立した。これらの品種識別は7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を行い，エチジウムブロマイド溶液で染色後に現れた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。
2. 関東周辺地域に作付けされているコムギ主要17品種についてRAPD分析による品種識別技術を開発した。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識別が可能であった。
3. 栃木県の奨励品種を中心に二条・六条・裸オオムギを含むオオムギ主要19品種についてRAPD分析による品種識別技術を開発した。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識別が可能であった。
4. 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わずかにDNA多型が認められた。近年育成の水稻栃木7号や二条オオムギ関東二条35号の系統間にDNA多型は認められず，固定しているものと考えられた。

5. DNAマーカーの多型を用いたクラスター分析の結果、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た。
6. 品種間の遺伝的背景を把握する目的で、関東周辺地域のコムギ品種を用い、交配記録の系譜から統計的に近縁係数を算出した。また、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0.581～0.904、遺伝的距離と近縁係数の間の相関係数は-0.511～-0.892であった。
7. 同様にオオムギ品種では、同一のマーカー数と近縁係数の間の相関係数は0.731～0.805、遺伝的距離と近縁係数の間の相関係数は-0.659～-0.770であった。
8. 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。また、このことは、これら品種の系譜の記録は極めて正確であることを示す一方、系譜に不整合の可能性のある品種を示唆することができた。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。
9. 他殖性であるユウガオの保存品種について、維持保存のため、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。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。同一品種内の個体間で多型がみられた場合もあるが、品種間の分類が可能であった。
10. ユウガオのクラスター分析の結果から、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可能であった。
11. このようにして、本研究では他のDNAマーカーより安価で簡易なRAPD分析による自殖、他殖性作物の品種識別方法を開発した。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た。さらに、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。

Studies on the Identification of Main and Special Product Crops Cultivars in Tochigi Prefecture by DNA Markers and the Conservation and the Use of Genetic Resources

Shun-ichi KOBAYASHI

Summary :The objective of this study was to establish the technology to identify paddy rice, wheat, barley and bottle gourd cultivars by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis to raise the quality of seed, to prevent seed contamination in the foundation seed and the stock seed and to preserve the genetic resources in Tochigi prefecture.

A total of 20 paddy rice cultivars, including 9 recommended and promising cultivars in Tochigi prefecture, were studied. They could be identified individually by the electrophoresis of the DNA fragments amplified by PCR using 7 random primers, on 1.5% agarose gels and by staining with ethidium bromide.

A total of 17 wheat and 19 barley cultivars in the Kanto region were examined. Wheat cultivars could be identified individually by RAPD analysis using 5 random primers, followed by the electrophoresis of the DNA fragments on 1.5% agarose gels and staining with ethidium bromide. Barley cultivars could be identified individually by RAPD analysis using 6 random primers. A polymorphism was observed among stock seeds collected from various areas in the old wheat cultivar, Norin 61, that was bred in 1945. No polymorphism was observed among F_{13} pedigrees of two-rowed barley, Kanto Nijo 35, showing that it was fixed.

In breeding, understanding of the genetic background is effective for efficient improvement. The coefficients of parentage between the main cultivars of wheat and between those of barley were calculated based on their pedigree record. The number of same DNA markers in RAPD analysis and Nei's genetic distance between these cultivars were also calculated. The correlation between the coefficient of parentage and the number of the same DNA markers was 0.581 ~ 0.904 in wheat and 0.731 ~ 0.805 in barley. The correlation between the coefficient parentage and Nei's genetic distance was - 0.511 ~ - 0.892 in wheat and - 0.659 ~ - 0.770 in barley. These results show that the genetic codes detected by the molecular markers were nearly equally distributed to the offspring in the breeding process in wheat and barley. The results also show that although the DNA markers in RAPD analysis are useful, the rapid estimate of kinship by the coefficient of parentage is still effective. The number of the same DNA markers in RAPD analysis was highly correlated with Nei's genetic distance.

Bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) varieties were classified by RAPD analysis and cluster analysis to preserve them effectively. A total 24 bottle gourd varieties including 5 varieties bred by Tochigi prefecture were analyzed. Forty-four primers produced 31 scoreble, variable RAPD markers within bottle gourd varieties. Only 4 polymorphic markers were produced in 10 varieties derived from Tochigi prefecture. It suggests that the relationship between these 10 varieties is close. The relationship between these and introduced varieties was far. For preservation, the varieties derived from Tochigi prefecture should be selected by the phenotype. Introduced varieties has to be preserved for those from wide origin.

第1章 序 論

栃木県における水稻の生産は、2003年度で作付面積が約65300ha、作況指数は92であったものの収穫量は316700tあり、本県農業産出額の1/3を占める基幹作物となっている（栃木県農務部 2004a）。品種の構成は良食味であるコシヒカリが約8割、次いで県南を中心に縞葉枯病抵抗性の月の光が7%、ひとめぼれ・あさひの夢がそれぞれ約4%となっている。栃木県農業試験場では、1987年から水稻品種の育種を開始し、1995年には県南地域向きの縞葉枯病抵抗性で良食味の品種、晴れすがたを育成した（大谷ら 1996）。また、2004年2月に早生で良食味の栃木7号（後のなすひかり）を、10月には酒造好適米の栃木酒14号（後のとちぎ酒14）を品種登録出願した。

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る（改正JAS法）とともに、農林水産大臣が制定した品質表示基準に従った表示を義務付ける品質表示基準制度が充実・強化された。さらに、栃木県の種子更新率は2002年産では63%と米の主産県としては低く、この向上が流通業者から求められており、県としては種子更新率100%を目標に掲げている（栃木県農務部 2004a）。しかし、これら品種数の増加や種子更新率の向上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。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。

イネの品種識別のためのDNAマーカーの開発は大坪ら（1997）がRandom Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 分析を用いて国内作付け上位10品種を識別した。その後、赤木（2000）はSimple Sequence Repeats (SSR) 分析が近縁品種の識別に有効であるとしている。大坪ら（2002）はRAPD分析によって得られた品種識別に好適なバンドをSequence Tagged-Site (STS) 化し、それらのプライマーをマルチプレックス化して使用することにより、日本の代表的な50品種を識別できるプライマーセットを開発した。これらのプライマーセットは極めて有用であるが、栃木県で開発した品種への適用性については検討されていない。

栃木県のムギ類生産は、2000年産から増加しており、2003年産の作付面積は作付けの無い裸ムギを除いた3麦

計で15800ha、収穫量は62000tであり、ムギ類は本県農業の重要な土地利用型作物となっている。麦種別に見ると、コムギでは1997年には作付面積が2130ha、収穫量が8690tであったが、2003年には作付面積が2540ha、収穫量が9860tに増加した。六条オオムギは主に主食や麦茶用であり、1995年には作付面積がわずか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、減少傾向であったムギ類の生産は、生産者と実需者が共存共栄し、国民の理解が得られるような麦作振興方策と麦関連産業の発展の方向を見出し、消費者ニーズに適切に対応していくことが必要であるとして、「新たな麦政策大綱」（1998年5月省議決定）が策定されたことにより、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応えられていないことから、その解消が大きな課題となっており、現在、大綱に掲げられている民間流通の仕組み、銘柄やランク区分等の見直しが検討されている（栃木県農務部 2003, 2004b）。

以上の情勢に対応するため、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。コムギでは、イワイノダイチを2000年に、タマイズミを2002年に奨励品種として採用した。さらに、地産地消の推進の影響を受け、製パン用のニシノカオリの導入を検討中である。六条オオムギでは1995年にシュンライを奨励品種に採用し、大幅に作付けが拡大した。しかし、近年、硬質粒等の問題や、より加工適性の優れるファイバースノウが他県で採用されていることから、2005年産から東山皮101号（後のシルキースノウ）を新たに奨励品種に採用した。醸造用二条オオムギについては、2000年にスカイゴールデンを奨励品種に採用した（谷口ら 2001）。さらに醸造適性の高い関東二条35号（後のサチホゴールデン）を検討中である。このような品種のめまぐるしい変化および用途の多様化は栃木県のみならず、他県でも同様である。

これらの状況は、水稻と同様に原々種や原種生産において作業の煩雑さの増加を伴い、混種および取り違えの危険性を高めている。また、用途の多様化により、品種の加工適性が大きく異なることから流通過程での取り違えも今まで以上に大きな問題となる。特に、コムギにおいてはいままではオーストラリア産スタンダードホワイ

ト (ASW) に近い製麺適性を持つ品種を中心に選定してきたが、麵の食感の優れる低アミロース品種や、また硬質である醤油醸造用および製パン用コムギ品種が採用されてきている。これらの情勢から、今後、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。国においても、2005年度の「農林水産研究基本計画」では、農林水産物・食品の信頼確保に資する技術の開発の一つに生産地・品種・生産方法等を含む表示事項の真偽判別技術の開発を掲げ、2010年度の期別達成目標としてDNAマーカーによる品種または種子の簡易迅速判別技術を確立するとしている。

しかし、国内ムギ類品種のDNAマーカーを利用した品種識別については、Turuspekovら (2001) が主要精麦用オオムギでSSR分析を、内村ら (2004a) が二条オオムギでCleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) 分析を行っているに過ぎない。コムギでは内村ら (注：平成12年度福岡県農業総合試験場成果情報) が福岡県内の主要4品種についてRAPD分析で実施しているのみである。

以上の事を踏まえ、DNAマーカーの中で最も検出操作が簡便なRAPD分析を用い、水稻では栃木県周辺地域の奨励品種である優良粳品種、および奨励品種ではないが県の事業等で栽培されていた酒造好適米品種、並びに栃木県農業試験場育成中の有望な系統の識別を試みた。

ムギ類では、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並びに栃木県農業試験場で有望視している系統を識別できるRAPDマーカーの組合せを明らかにしようとした。また、近年の育成品種は民間流通の仕組みや銘柄、ランク区分等により、実需者の要望に応えられるよう高品質が求められ、育種目標は一定の収量や栽培特性を保持しつつも加工適性等、品質の向上が中心となっている。そのため、母本として自ずと高品質の品種や系統が組み合わされ、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る。この近縁度の高まりは、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。奨励品種の選定でも近縁の品種が増加し特性が似通ってくると、新たな品種の採用が難しくなる。育種においても、交配計画を策定する際に交配親となる品種や系統間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、品種間の遺伝的関係を探るため、交配親となる品種間の近縁係数や遺伝的距離の解析を試みた。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。遺伝的距離は、分子マーカ

一等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、これらの関係に有意な相関を認めている。

そこで、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として次に述べる手法の有用性について検討した。

栃木県を中心とした関東周辺地域におけるムギ類の品種について、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。

栃木県の特用作物には、かんぴょう、こんにやく、たばこ、あさなどが挙げられる。これらの作物は作付面積、収穫量ともに減少の一途にあるが、こんにやくとかんぴょうは比較的、栽培面積が維持されている。かんぴょうはユウガオの果肉を細長くむき、干して鮎や煮物の具にする栃木県特産品の一つであり、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)。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349haとなったものの (栃木県 2001)、全国生産のほとんどを占めている (栃木県 2006)。

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。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。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，ユウガオは他殖性でもあり遺伝的に雑駁であること，研究者の不足，労力や予算の縮小などにもない，その品種維持は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，かんばん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を乾燥させたものを材料とし，彩色して作る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 (*L. siceraria* var. *hispida*) とヒョウタン (*L. siceraria* var. *gourda*) の2つに分類している．

一方，分子生物学の急激な進歩にもない，DNAマーカーを利用した品種識別が盛んに行われているが，ユウガオについてDNAマーカーにより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) の在来種と品種についてRAPDマーカーを用いて多様性の評価をしているのみである．

本論文では，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ようとした．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．

以上のように，本研究では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ようとした．また，コムギ，オオムギでは品種間の近縁係数と遺伝的距離との関係を明らかにしようとした．さらに，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の有効性を明らかにしようとした．ユウガオではRAPD分析により栃木県由来の品種間の関係を明らかにしようとした．これらの知見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であろう．

第2章 RAPD分析による栃木県水稻 優良品種の品種識別

緒言

栃木県における水稻の品種構成は良食味であるコシヒカリが約8割、次いで月の光が7%、ひとめぼれ・あさひの夢がそれぞれ約4%となっている。

近年、適切な表示を義務付ける品質表示基準制度の充実・強化により、これら米品種のDNA鑑定が強く要望されている。

イネの品種識別のためのDNAマーカーの開発は大坪ら(1997)がRAPD分析を、赤木(2000)はSSR分析を行っている。河野ら(2000)は Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)分析, RAPD分析, SSR分析, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)分析について日本型品種の多型検出頻度を比較している。多型検出頻度はSSR分析, RFLP分析で高く、これらの組合せが連鎖解析手法には有効で、日本型品種識別には検出操作の容易なSSR分析やRAPD分析が有用で特にAFLP分析が適しているとしている。さらに、大坪ら(2002)はRAPD分析によって得られた品種識別に好適なバンドをSTS化し、それらのプライマーをマルチプレックス化した。同様なSTSプライマーを利用して秋田県においても秋田県の奨励品種を識別している(小笠原・高橋 2000)。これらのプライマーセットは極めて有用であるが、本県で開発した品種への適用性については検討されていない。

以上の事を踏まえ、本章ではDNAマーカーの中で最も検出操作の簡便であるRAPD分析を用い、栃木県の奨励品種を含め隣県の奨励品種であり県内で栽培されていると思われる優良品種、奨励品種にはなっていないが県の事業等で栽培されていた酒造好適米品種並びに栃木県農業試験場育成で有望である品種を識別できるDNAマーカーの組合せを明らかにしようとした。

材料と方法

1. 供試品種

供試品種は粳品種では品種登録申請中の雑種第15代である栃木7号の5系統、栃木県奨励品種のひとめぼれ、晴れすがた、コシヒカリ、アキニシキ、月の光、あさひの夢、有望系統である栃木13号・15号、茨城県の奨励品種であるキヌヒカリ、ゆめひたち、日本晴、群馬県のゴロピカリ、朝の光、酒造好適米では品種登録に向けて検討している栃木酒14号、産地品種銘柄となっており実際に

作付されている五百万石、試作されていたひとごち、美山錦、若水と参考として山田錦の合計20品種である。ゴロピカリは群馬県産原種を、その他の品種は栃木県農業試験場の奨励品種決定調査に供試した種子、または、栃木県農業試験場で維持保存していたものを用いた。

2. DNAの抽出

DNAの抽出はポットに栽培したイネの生葉身から PhytoPure DNA抽出キット (Amersham社)、MagExtractor -Plant Genome- DNA抽出キット (東洋紡績株式会社) およびスモールスケールCTAB法 (Murray and Thompson 1980) の3種類の方法を用いて試みた。

3. PCR条件の検討

最初に適正なアニーリング温度の検討を行った。コシヒカリのDNA10ng/μLを鋳型とし、PCR反応液はランダムプライマー-OPB18 (オベロン社) 7.8μMを0.8μL、dNTP混合液2.5mM (タカラバイオ社) を1μL、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条件は、サーマルサイクラーDNA Engine Tetrad PTC-225 (MJ Japan社) を用い、熱変性を94で3分後、94で1分間、アニーリングを1分間、72で2分間を1サイクルとして40サイクル行い、伸長反応を72で2分間行った。アニーリングは35から46間で温度勾配を付けて検討した。増幅したDNAは1.5%アガロースゲルを用い100Vの電圧で約90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イド溶液で30分間染色後、デンスシトグラフ AE-6920-FX (アトー社) によりDNA増幅産物の確認を行った。

次に、鋳型DNAの適正な濃度を検討した。栃木7号1系統のDNAを鋳型とし、濃度を50, 25, 20, 10, 5 ng/μLとした。ランダムプライマーはOPB18, OPM2, OPM11 (オベロン社) を使用した。PCR反応液および条件は前述と同様とし、アニーリング温度は44とした。その後の処理も同様に行い、PCR増幅産物の確認を行った。

4. RAPD法による品種識別

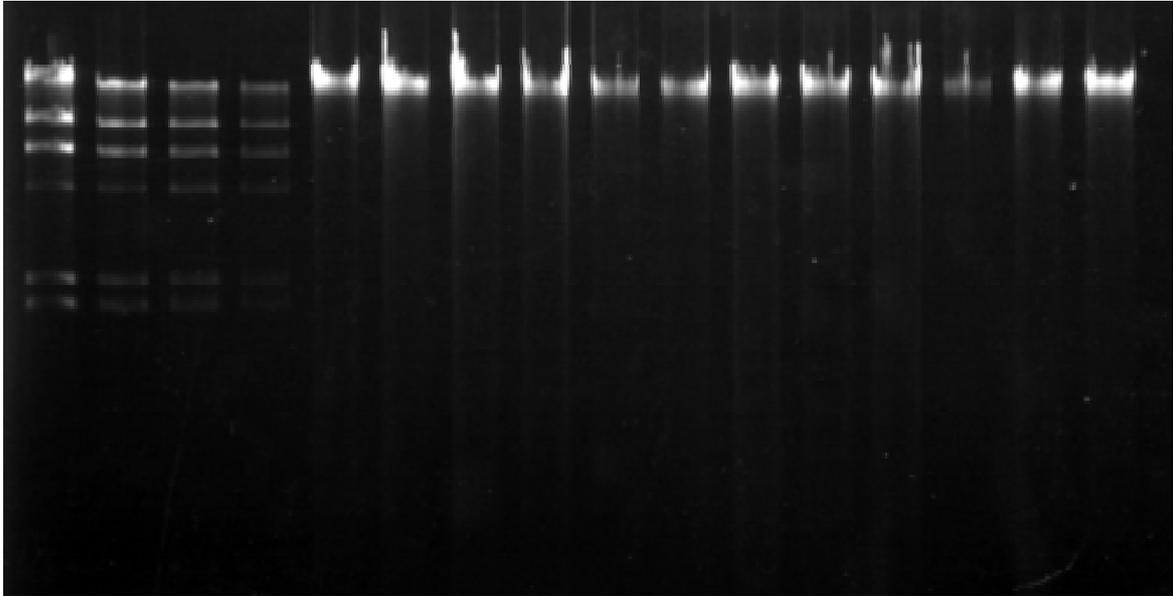
プライマーは大坪ら(1997)、吉橋ら(1999)および滋賀県の成績等(森ら 2001)を参考に多型の見られた23プライマーを選定した。20プライマーは10量体(オベロン社)、3プライマーは12量体(日本ジーン社)である。PCR条件は前述の結果から得られた最も有効な条件で行った。その後の処理は前述と同様に電気泳動後、エチジウムブロマイド溶液で染色し、デンスシトグラフ AE-6920-FX (アトー社) によりPCR増幅産物の確認を行

った。PCR増幅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。

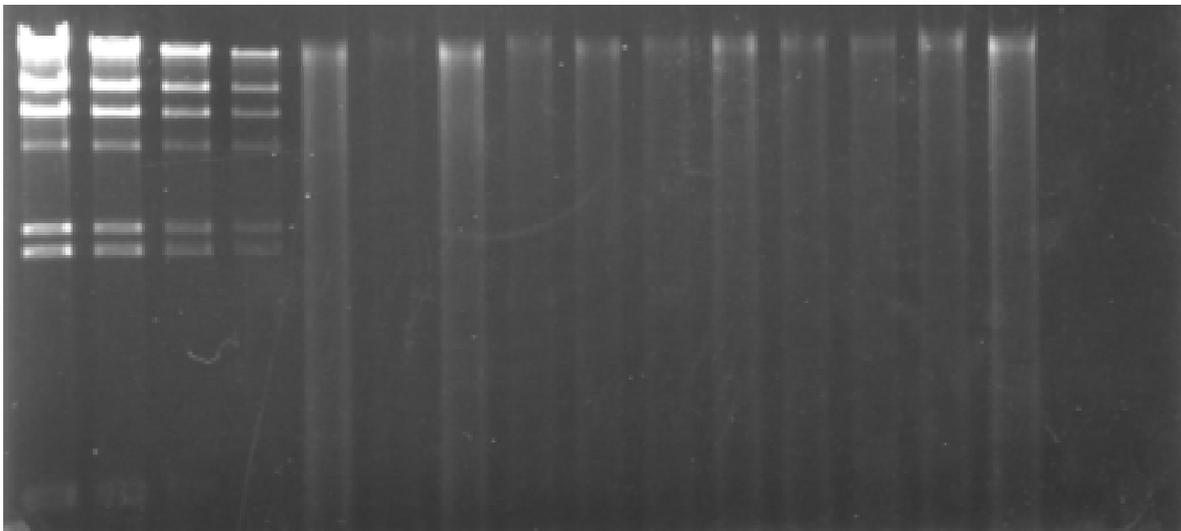
結果

3種類のDNA抽出法を比較すると、電気泳動の結果が

らMagExtractor -Plant Genome- DNA抽出キットを用いて抽出したDNAが収量が多く純度も高かった（第1図、PhytoPure DNA抽出キットのデータ略）。そこで、Extractor -Plant Genome- DNA抽出キットの説明書にそって前処理を行い、同社製自動核酸抽出装置（MFX-2000）を用いて抽出を行った。



MagExtractor -Plant Genome- DNA抽出キットを用いて抽出したDNA。



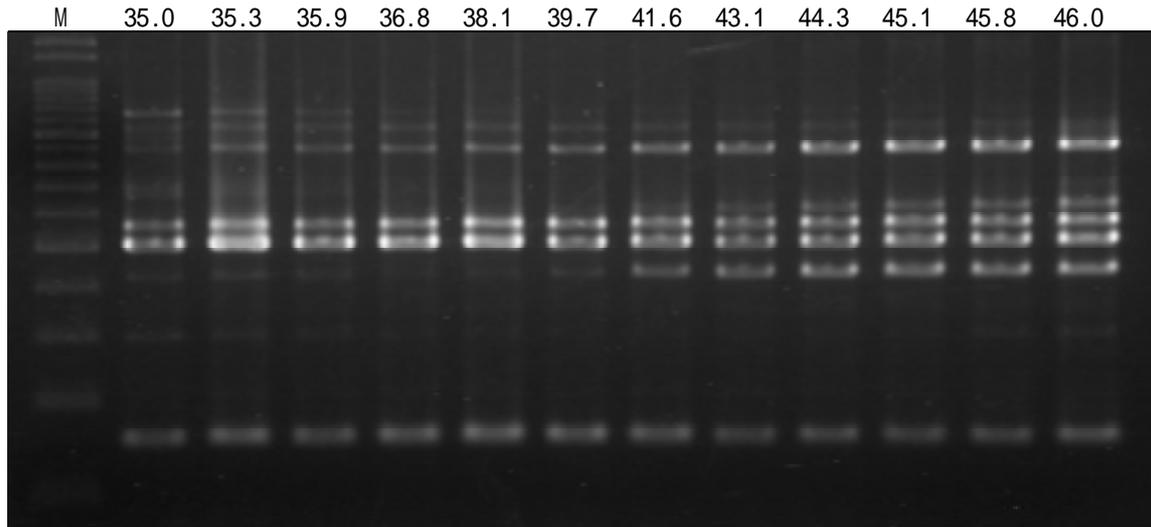
スモールスケールCTAB法（Murray and Thompson 1980）を用いて抽出したDNA。

第1図 水稻の生葉身から異なる方法で抽出したDNA。

レーンは左から1. Him : 200ng/ μ L, 2. Him : 100ng/ μ L, 3. Him : 40ng/ μ L, 4. Him : 20ng/ μ L, 5. 栃木7号 - 1, 6. 栃木7号 - 2, 7. 栃木7号 - 3, 8. 栃木7号 - 4, 9. 栃木7号 - 5, 10. ひとめぼれ, 11. 晴れすがた, 12. コシヒカリ, 13. アキニシキ, 14. 月の光, 15. あさひの夢。
泳動した各品種のDNA量は1 μ L。

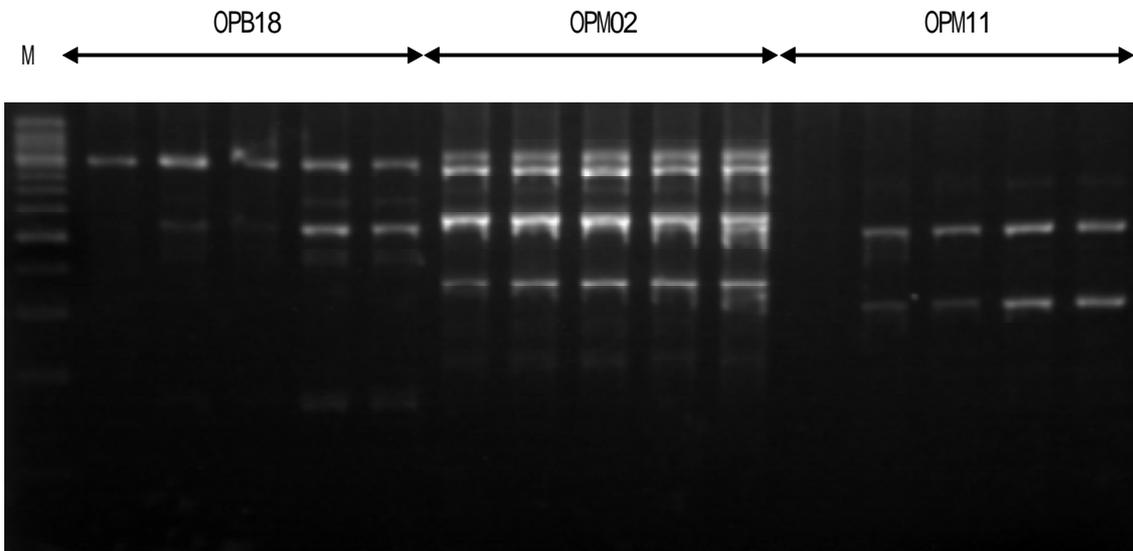
次いで、適正なPCR条件を検討した。サーマルサイクラーのグラジエント機能を使用し、アニーリング温度を35 から46 まで温度勾配をつけた。温度は35.0, 35.3, 35.9, 36.8, 38.1, 39.7, 41.6, 43.1, 44.3, 45.1, 45.8, 46.0 となった。その温度条件で増幅したDNA増幅産物を電気泳動した結果を第2図に示した。35.0 では1000bp以上にミスマッチと思われる薄いバンドが幾

つが見られる。これらのバンドは温度が高くなるにつれて薄くなり、39.7 でほとんど見えなくなった。逆に41.6 から900bp付近と1200bp付近に明瞭なバンドが現れ、温度が高くなるにつれ濃くなり、44.3 から安定した。鋳型DNAの濃度では用いた3プライマーとも同様の傾向を示し50, 25, 20, 10, 5ng/μLと濃度が薄くなるにつれて増幅したバンド数は増加し明瞭となった(第3図)。



第2図 水稲から抽出したDNAのアニーリング温度の変化による増幅の違い。

Mは200bp DNA ladder .
プライマーはOPB18 .



第3図 水稲から抽出した鋳型DNA量によるDNA増幅の違い。

Mは200bp DNA ladder .
上記はプライマー名 .
各プライマー毎に、左から50, 25, 20, 10, 5ng/μL .

品種識別マーカー開発のために供試した23プライマーの内、22プライマーで増幅がみられ、合計178バンドが検出できた。これらのバンドの内、DNA多型が認められたのは13プライマーで25バンドあった。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多型を再確認した。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12プライマーにおいて17種類に絞られた(第1表)。得られたすべての178バンドにおいて栃木7号の系統間で多型は見られなかった。178バンドで多型が見られなかったことから、ほぼ固定していると推察された。そこで、栃木7号に関しては系統毎ではなく、栃木7号として表示した。

これらの17種類のDNAマーカーの内、プライマーOPD2を用いて増幅した800bpのDNAマーカーとA09で増幅した1600bpのDNAマーカーで得られた多型は同じで

あった。プライマーA03の810bpで得られた多型は美山錦にのみ出るポジティブな品種特異的マーカーであった。また、OPM2の1000bpで得られた多型は栃木15号のみにDNAマーカーが現れないネガティブな特異的マーカーであった。さらに、OPB1, OPB18, OPC9, OPD2, OPD3, OPG6, OPS13の7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20品種すべてを識別することができた(第4図)。第1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。また、7プライマーの塩基配列を第2表に示した。

考 察

従来、アニーリングは36~40で行われている例が多いが、35から46までの温度で検討した。その結果、アニーリング温度は従来実施されている例より高い

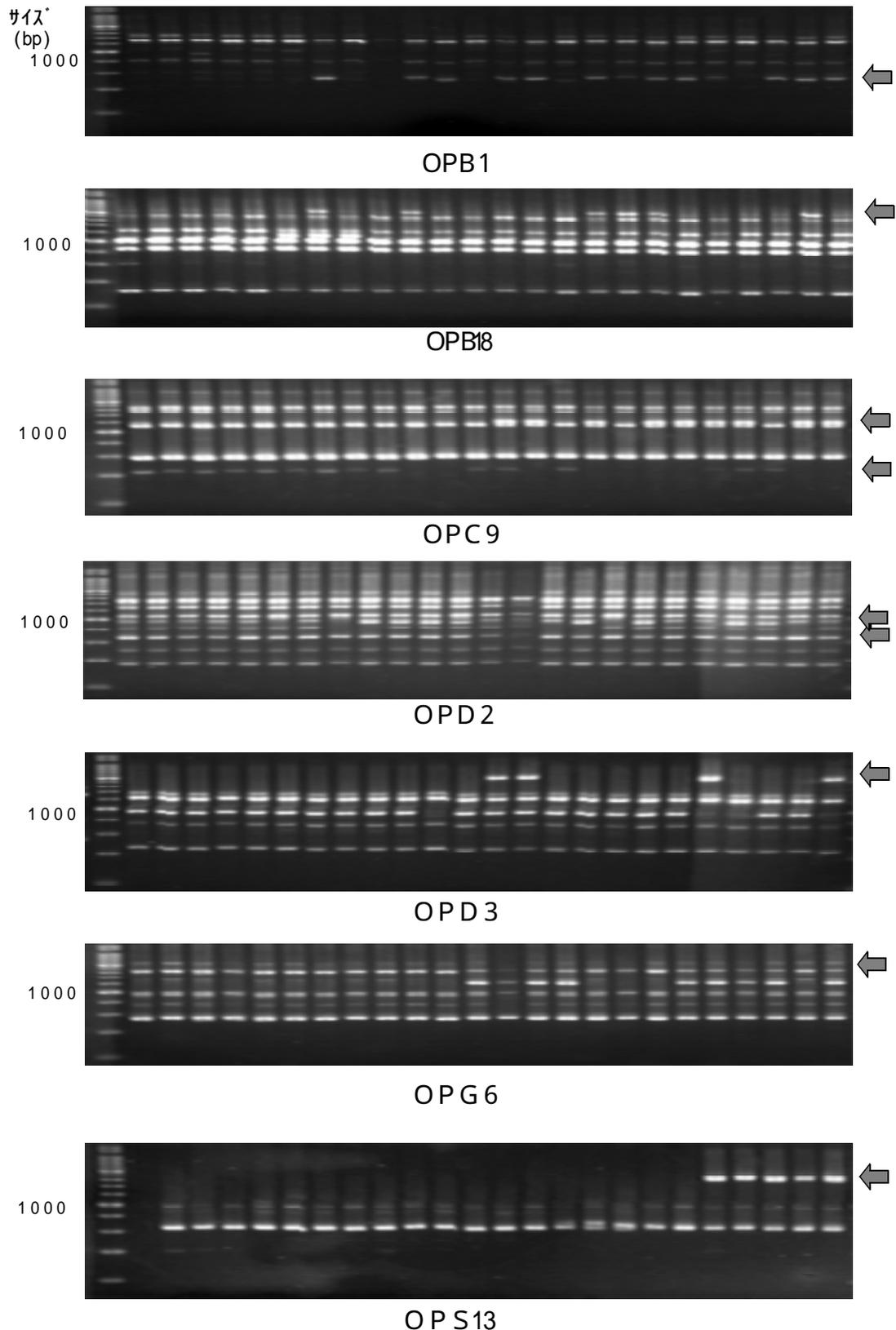
第1表 RAPD分析による水稻の品種識別。

識別セット																	
プライマー名	OPB1	OPB18		OPC9		OPD2		OPD3	OPG5		OPG6		OPG13	OPM2	OPS13	A03	A09
マーカー長(bp)	500	1100	2200	1200	430	980	800	1200	1000	800	2200	980	650	1000	1800	810	1600
栃木7号	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1
ひとめぼれ	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
晴れすがた	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
コシヒカリ	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
アキニシキ	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
月の光	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
あさひの夢	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
栃木13号	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
栃木15号	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1
キヌヒカリ	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1
ゆめひたち	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
日本晴	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
ゴロピカリ	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
朝の光	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1
栃木酒14号	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1
五百万石	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1
ひとごち	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1
美山錦	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
山田錦	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
若水	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	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20品種の識別に必要なマーカーを示している。

第2表 水稻品種を識別する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')
OPB 1	GTTTCGCTCC
OPB 18	CCACAGCAGT
OPC 9	CTCACCGTCC
OPD 2	GGACCCAACC
OPD 3	GTCGCCGTCA
OPG 6	GTGCCTAACC
OPS 13	GTCGTTCTTG



第4図 供試した水稻20品種を識別できる7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. 栃木7号-1, 3. 栃木7号-2, 4. 栃木7号-3, 5. 栃木7号-4, 6. 栃木7号-5, 7. ひとめぼれ, 8. 晴れすがた, 9. コシヒカリ, 10. アキニシキ, 11. 月の光, 12. あさひの夢, 13. 栃木13号, 14. 栃木15号, 15. キヌヒカリ, 16. ゆめひたち, 17. 日本晴, 18. ゴロピカリ, 19. 朝の光, 20. 栃木酒14号, 21. 五百万石, 22. ひとごち, 23. 美山錦, 24. 山田錦, 25. 若水。矢印が識別マーカー。

44 が適していた。また、鋳型DNAの濃度は薄くなるにつれてバンド数が増加し、パターンは明瞭となった。以上の結果から、鋳型DNAは5ng/μLとし、PCR条件は熱変性を94℃で3分後、94℃で1分間、アニーリングを44℃で1分間、72℃を2分間で1サイクルとして40サイクル行い、伸長反応を72℃で2分間行うのが最も好適な条件であると考えられた。以後、すべてのPCRはこの条件で実施した。

本論文では、RAPD分析のみを用いて栃木県水稲優良品種を識別できるマーカーの組合せを見出した。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前提として考えた場合、操作方法の簡易性および安全性を考慮する必要がある。RFLP分析は操作が煩雑であり、この目的にそぐわない。一方、SSR分析やAFLP分析はDNAマーカーの長さが短い場合が多く、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。しかし、ポリアクリルアミドゲルの材料となるアクリルアミドは毒性が強く、使用する際には熟練を要する。また、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める必要がある。1.5%程度のアガロースゲルは作製も容易で染色の際のハンドリングも良く安全である。この濃度で検出しやすいDNAマーカーの長さは400bpから2400bpまでである。そこで、本研究ではこれらの長さのDNAマーカーを検出するのに最も適していると考えられるRAPD分析を採用した。

RAPD分析を用いたイネの品種識別法は、大坪ら(1997)や小笠原・高橋(2000)によって確立されている。しかし、栃木県育成品種については知見が無い。そこで、筆者は栃木県内で生産されている、または生産される可能性の高い品種についてRAPD分析を適用した。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。それに対し筆者はわずか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。本論文では前述のような理由でRAPD分析のみで識別を行った。しかし、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(Kunihisara

2003)やオオムギ(内村ら2004)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Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)分析も有効な手法と思われる。

本論文ではDNAをMagExtractor-Plant Genome-DNA抽出キットを用いて生葉身から抽出した。実際には、種子生産や米の流通関係者が識別業務を行うことが予想され、穀粒から抽出したDNAを使用することになると考えられる。吉田ら(注:平成10年度兵庫県成果情報)は酒米5品種で、RAPD分析による品種識別法を開発した。その中で生葉、および米粒から抽出したDNAにおいて検出された多型バンドは同一であることを確認しており、本論文で得られた品種識別法についても、穀粒から抽出したDNAを用いることは可能と考えられる。

今後、実用性を高めるには穀粒からDNAを抽出する簡便な方法が必要とされよう。一般にはCTAB法(Murray and Thompson 1980)、およびその改変法や市販されているDNA抽出キットが使用されているが、CTAB法は操作手順が多く時間がかかる。また、DNA抽出キットは高額である。生葉身については非常に簡便なDNA抽出法(池田ら2000)が確立されている。本研究で確立した品種識別法を現場に適用するまでにはさらに簡易で安価な穀粒からのDNA抽出方法を確立する必要があると考えられた。染色についても、エチジウムブロマイドよりも安全性の高い蛍光色素が市販されていることから、それらの利用についても組み合わせて検討していく必要があると考えられた。

まとめ

栃木県産米の品質向上並びに原種、および原々種の混種防止を目的として、栃木県奨励品種を中心に、品種登録申請中の栃木7号、および栃木酒14号(酒造好適米)等、合計20品種についてのRAPD分析による品種識別技術を確立した。PCR条件は、鋳型DNAを5ng/μLとし、熱変性を94℃で3分後、94℃で1分間、アニーリングを44℃で1分間、72℃を2分間で1サイクルとして40サイクル行い、伸長反応を72℃で2分間行うのが最も好適な条件であった。これらの品種識別は7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を行い、エチジウムブロマイド溶液で染色後に現れた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。

栃木7号の系統間に多型は検出されなかった。

第3章 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

栃木県のムギ類生産は水田農業経営確立対策の推進等により2000年産から増加しており、2003年産の作付面積は作付けの無い裸ムギを除いた3麦計で15800ha、収穫量は62000tであり、ムギ類は本県農業の重要な土地利用型作物となっている。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応えられていないことから、その解消が大きな課題となっており、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。コムギでは実需者から品質面で評価の低かったバンドウワセを廃止し、やや低アミロースであるイワイノダイチを2000年に、醤油醸造用のタマイズミを2002年に奨励品種として採用した。さらに、地産地消の推進の影響を受け、製パン用のニシノカオリの導入を検討中である。六条オオムギでは1995年にシュンライを奨励品種に採用し、2005年産からシュンライより加工適性の優れる東山皮101号を、醸造用二条オオムギについては2000年にスカイゴールデンを奨励品種に採用し、さらに醸造適性の高い関東二条35号を検討中である。

このような品種のめまぐるしい変化の状況は、水稲と同様に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および品種の取り違えの危険性を高めており、ムギ類でも簡便で正確な品種識別技術に対する要望は高まっている。

そこで本章では、DNAマーカーの中で最も検出操作が簡便なRAPD分析を用い、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並びに栃木県農業試験場で有望視している系統を識別できるRAPDマーカーの組合せを明らかにしようとした。

第1節 コムギの優良品種識別

緒言

栃木県のコムギ生産は、1997年には作付面積が2130ha、収穫量が8690tであったが、2003年には作付面積が2540ha、収穫量が9860tに増加した。このように、減少傾向であったコムギの生産は、順調に生産振興が図られてきた。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、

従来は、オーストラリア産スタンダードホワイト (ASW) に近い製麺適性を持つ品種を中心に選定してきたが、麺の食感の優れる低アミロース品種や、硬質である醤油醸造用および製パン用コムギ品種が採用されてきている。このような用途の多様化に合わせた品種の採用は加工適性が大きく異なり、生産や流通過程での取り違えもいままでも以上に大きな問題となる。これらの情勢から今後、コ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まってくると考えられる。

しかし、国内コムギ品種のDNAマーカーを利用した品種識別については、内村ら（注：平成12年度福岡県農業総合試験場成果情報）が福岡県内の主要4品種についてRAPD分析で実施しているのみである。

そこで本節では、DNAマーカーの中で最も検出操作が簡便なRAPD分析を用い、栃木県のコムギ奨励品種を中心とし、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。さらに、古い品種である小麦農林61号の変異についても検討した。

材料と方法

1. 供試品種

供試品種は、関東主要各都県の奨励品種である小麦農林61号（茨城県産、群馬県産、埼玉県産、千葉県産、東京都産、静岡県産、栃木県産および福岡県産）、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、および栃木県農業試験場で製パン用として有望視しているニシノカオリの合計17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3表に示した（農業技術協会 2003）。

小麦農林61号は1945年に佐賀県農業試験場において育成された古い品種であるが、育成した佐賀県では1995年に奨励品種から廃止した。よって、原々種、原種の提供を受けられないことから、現在も奨励品種として採用している県は独自に原々種、原種を長期間に渡り維持している。そのため、採種条件の違いにより変異が生じると考えられることから、現在も奨励品種として採用しており、佐賀県が奨励品種から廃止した時に原々種の譲渡を受け最も近い福岡県を始め、関東地域の採用県から種子を収集し供試した。

2. DNAの抽出

ポットに栽培したムギの第3~4葉の生葉身0.1gから、

第3表 コムギ供試品種の交配組合せ及び育成地。

品種名	交配組合せ	育成地
小麦農林61号	福岡小麦18号/新中長	佐賀県農業試験場
イワイノダイチ	秋9/西海168号(きぬいろは)	九州農業試験場
タマイズミ	関係w364/関係w361	農業技術研究機構作物研究所
春のかがやき	西海168号(きぬいろは)/関東100号(パ`ンド`ウセ)	群馬県農業技術センター
きぬの波	関東107号/関東100号(パ`ンド`ウセ)	群馬県農業試験場
つるぴかり	関東100号(パ`ンド`ウセ)/関東107号	群馬県農業総合試験場
ダブル8号	シネコムギ`/ハルヒカ`//シネコムギ`	群馬県農業技術センター
シラネコムギ	北陸49号/東海80号	長野県農事試験場
あやひかり	関東107号/西海168号(きぬいろは)	農業研究センター
小麦農林26号	新中長/埼玉小麦29号	奈良県農業試験場
キヌヒメ	関東95号/東山18号//ニシカゼコムギ	長野県農事試験場
ユメセイキ	関東107号/東山24号	長野県農事試験場
フウセツ	東山23号/東山22号	長野県農事試験場
しゅんよう	東北148号/東山10号	長野県農事試験場
ユメアサヒ	西海179号/KS831957	長野県農事試験場
バンドウワセ	関東66号/ヒヨクコムギ	農業研究センター
ニシノカオリ	北見春42号/西海157号(アブクマワセ)	九州農業試験場

交配組合せの()内は後に付された品種名。

水稲と同様に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分析による品種識別

抽出したDNAは, 1/10TEバッファーを用いて, 10ng/ μ Lに調製し, 鋳型DNA量として1 μ L使用した。PCR反応液はランダムプライマー7.8 μ Mを0.8 μ L, dNTP混合液2.5mM(タカラバイオ社)を1 μ L, 反応バッファー(タカラバイオ社)を1.25 μ LおよびrTaq(タカラバイオ社)0.5unitに滅菌蒸留水を加え12 μ L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, 熱変性を95 $^{\circ}$ Cで3分後, 95 $^{\circ}$ Cで1分間, アニールを44 $^{\circ}$ Cで1分間, 72 $^{\circ}$ Cで2分間を1サイクルとして40サイクル行い, 伸長反応を72 $^{\circ}$ Cで2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90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イド溶液で30分間染色後, デンシトグラフ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。

品種識別のためのプライマーは, 大坪ら(1997), 吉橋ら(1999), 森ら(2001), Kuczyńskaら(2001)および内村ら(2004a)等を参考に, 水稲, オオムギで多型を示すと報告されている28プライマーを選定した。そのうち, 24プライマーは10量体(オペロン社), 4プライマーは12量体(日本ジーン社)である。

結 果

供試した28プライマーの内, OPB2およびOPD10の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バンドも含め, 合計207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153バンドであった。品種間のDNA多型が認められたのは14プライマーで37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, 再現性の確認のため, 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14プライマーにおいて23種類に絞られた(第4表)。これらのDNAマーカーの内, プライマーOPG6を用いて増幅した1500bpのDNAマーカーは小麦農林61号のみにバンドが出るポジティブな品種特異的マーカーであった。また, ネガティブなDNAマーカーではA08の300bpがしゅんよう, A09の1400bpがユメセイキのみに特異的に現れなかった。

さらに, OPA11, OPD18, OPG16, A01, A09の5種類のランダムプライマーで増幅された6マーカーを用いることによって, 供試した17品種すべてを識別することができた(第5図)。第4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, 同一品種の異なる植物体からDNAを抽出し, 同一条件でRAPD分析を行い再現性について確認を行った。また, 5プライマーの塩基配列を第5表に示した。

小麦農林61号については, 県の系統間で2種類のDNAマーカーにより多型が認められた(第6図)。これらのマーカーについては, 第4表に印を付けて示した。

第4表 B+PD分析によるコムギの品種識別.

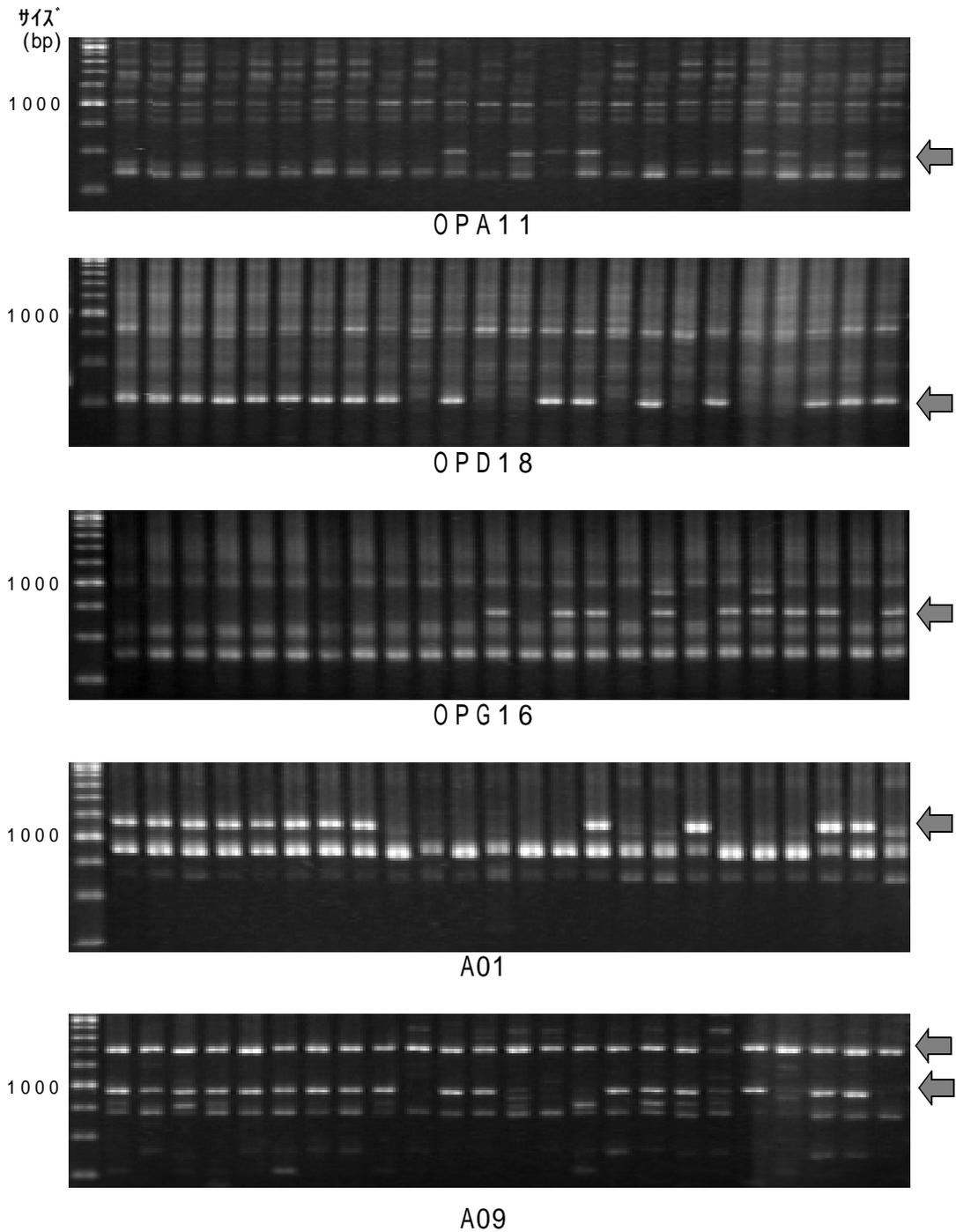
ブライマー名 マーカー長(bp)	OPB11		OPB11/OPC4		OPD2		OPD1/OP56/OPG1		OPG16		OPT16		A01		A08		A09				
	1600	600	1250	480	1200	2200	750	1300	420	1500	1000	800	700	750	1050	1000	1100	1400	880	680	
識別セット	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	
小麦農林61号 (福岡県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
小麦農林61号 (茨城県)	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (群馬県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
小麦農林61号 (埼玉県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (千葉県)	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (東京都)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (静岡県)	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
小麦農林61号 (栃木県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0
イワイノダイザ	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
タマイズミ	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
春のかがやき	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0
きぬの波	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
つるびかり	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
ダブル8号	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
シラネコムギ	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0
あやひかり	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0
農林28号	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
キヌヒメ	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0
エメセイキ	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
フウセツ	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
しゆんよう	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0
エメアサヒ	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
バンドウワセ	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
ニシノカオリ	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0

0/1は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17品種の識別に必要なマーカーを示している.

△印は農林61号に多型バンドが出ているマーカーを示している.

栃木県の主要作物および地域特産作物のDNAマーカを利用した
品種識別と遺伝資源の保存・利用に関する研究



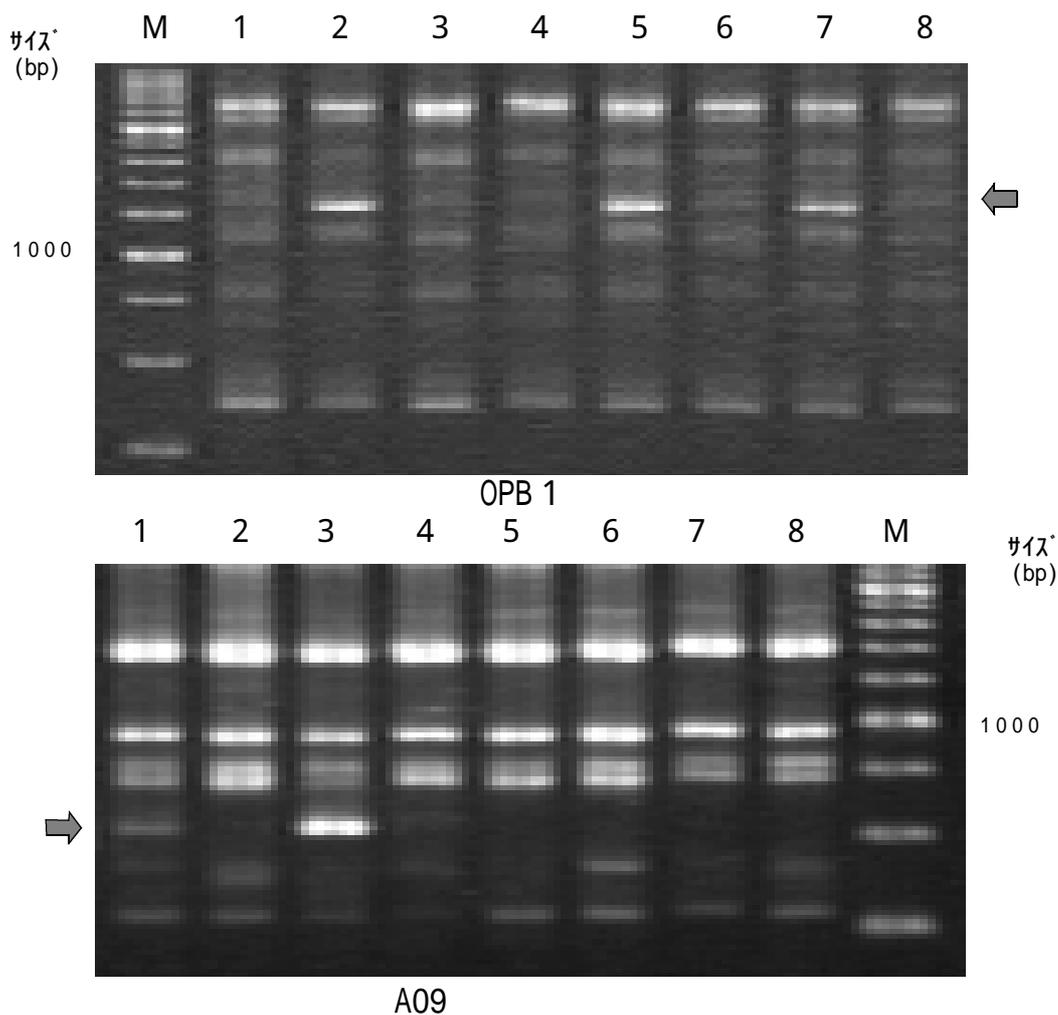
第5図 供試したコムギ17品種を識別できる6種類のランダムプライマーで検出されるDNA.

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 (200 bp DNA ladder) , 2.小麦農林61号(福岡県), 3.同(茨城県), 4.同(群馬県), 5.同(埼玉県), 6.同(千葉県), 7.同(東京都), 8.同(静岡県), 9.同(栃木県), 10.イワイノダイチ, 11.タマイズミ, 12.春のかがやき, 13.きぬの波, 14.つるぴかり, 15.ダブル8号, 16.シラネコムギ, 17.あやひかり, 18.小麦農林26号, 19.キヌヒメ, 20.ユメセイキ, 21.フウセツ, 22.しゅんよう, 23.ユメアサヒ, 24.バンドウウセ, 25.ニシノカオリ。

矢印が識別マーカー。

第5表 コ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
OPD18	GAGAGCCAAC
OPG16	AGCGTCCTCC
A01	TGCACTACAACA
A09	CCGCAGTTAGAT



第6図 小麦農林61号に見られた多型.

図の下にランダムプライマー名を示す.

M. サイズマーカー (200bp DNA ladder) , 1. 福岡県産, 2. 茨城県産, 3. 群馬県産, 4. 埼玉県産, 5. 千葉県産, 6. 東京都産, 7. 静岡県産, 8. 栃木県産.

矢印が多型.