

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

小林俊一^{1,2)}・吉田智彦³⁾

(¹⁾ 栃木県農業試験場生物工学部, ²⁾ 東京農工大学大学院連合農学研究科, ³⁾ 宇都宮大学農学部)

要旨：栃木県産麦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及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。

キーワード：オオムギ、関東地域、コムギ、DNA マーカー、栃木県、品種識別、RAPD 分析。

栃木県におけるムギ類の生産は、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 年産の作付面積が作付けの無い裸ムギを除いた 3 麦計で 15800 ha、収穫量は 62000 t 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 2130 ha、収穫量が 8690 t であったが、2003 年には作付面積が 2540 ha、収穫量が 9860 t に増加した。六条オオムギでは 1995 年には作付面積がわずかに 61 ha、収穫量が 261 t であったが、2003 年には作付面積が 2370 ha、収穫量が 10100 t 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 9320 ha、収穫量が 33400 t まで落ち込んだが、2003 年には 10900 ha、42000 t 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答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, 2004)。

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、

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 年産より東山皮 101 号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、1994 年に採用した大麦縞萎縮病およびうどんこ病に抵抗性のタカホゴールデンの醸造品質に問題があること、および大麦縞萎縮病レース III 型が増加していることから、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 号を検討中である。このような品種のめまぐるしい変化及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、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いままでは大きな問題となる。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、麺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において、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。

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に影響され識別が困難となる場合がある。DNA マーカーを利用した品種識別技術は、これらの影響を受けず極めて有効である。

イネの品種識別のための DNA マーカーの開発は最初は大坪ら(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。さらに、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 (大坪ら 2002), 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。秋田県においても同様な STS プライマーを開発して県内の奨励品種を識別している (小笠原・高橋 2000)。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を Simple Sequence Repeats (SSR) 分析で, 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。

本研究では, 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た。また, 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。そこで, 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。

材料と方法

1. 供試品種

供試品種はコムギで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, 栃木県産及び福岡県産), 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。オオムギでは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, および栃木県農業試験場で有望視している関東二条 35 号を, 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, センゲツモチ, 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 1 表に示した (農業技術協会 2003)。

第 1 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
コムギ	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	関系 w364/関系 w361	(独) 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 (バンドウワセ)	群馬県農業技術センター
	きぬの波	関東 107 号/関東 100 号 (バンドウワセ)	群馬県農業試験場
	つるぴかり	関東 100 号 (バンドウワセ)/関東 107 号	群馬県農業総合試験場
	ダブル 8 号	シラネコムギ/あやひかり/シラネコムギ	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
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
	ミカモゴールドデン	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
	スカイゴールドデン	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 (サトゴールド)/やす系 50 (さつきばれ)	サッポロビール (株)
	タカホゴールドデン	大系 R2068/栃系 144 (サトゴールド)	栃木県農業試験場栃木分場
	きぬか二条	83SBC27/吉系 8 (ニシゴールド)	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)	(独) 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
	センゲツモチ	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。

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てい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。一方、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 世代では 1 個体由来の 5 系統を供試した。

2. DNA の抽出

ポットに栽培したムギの 3~4 葉の葉身 0.1 g から MagExtractor -Plant Genome- DNA 抽出キット（東洋紡績株式会社）、及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、1/10 TE バッファーを用いて、コムギでは 10 ng/μL、オオムギでは 5 ng/μL に調製し、鋳型 DNA 量として 1 μL 使用した。PCR 反応液はランダムプライマー 7.8 μM を 0.8 μL、dNTP 混合液 2.5 mM（タカラバイオ社）を 1 μL、反応バッファー（タカラバイオ社）を 1.25 μL および rTaq（タカラバイオ社）0.5 unit に滅菌蒸留水を加え 12 μL 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℃ で 3 分後、95℃ で 1 分間、アニーリングを 44℃ で 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。増幅した DNA は 1.5% アガロースゲルを用い 100 V 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、水稻、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。

4. クラスター分析

全品種について DNA 多型のデータ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を行った。

結 果

1. RAPD 分析による品種識別

コムギでは供試した 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

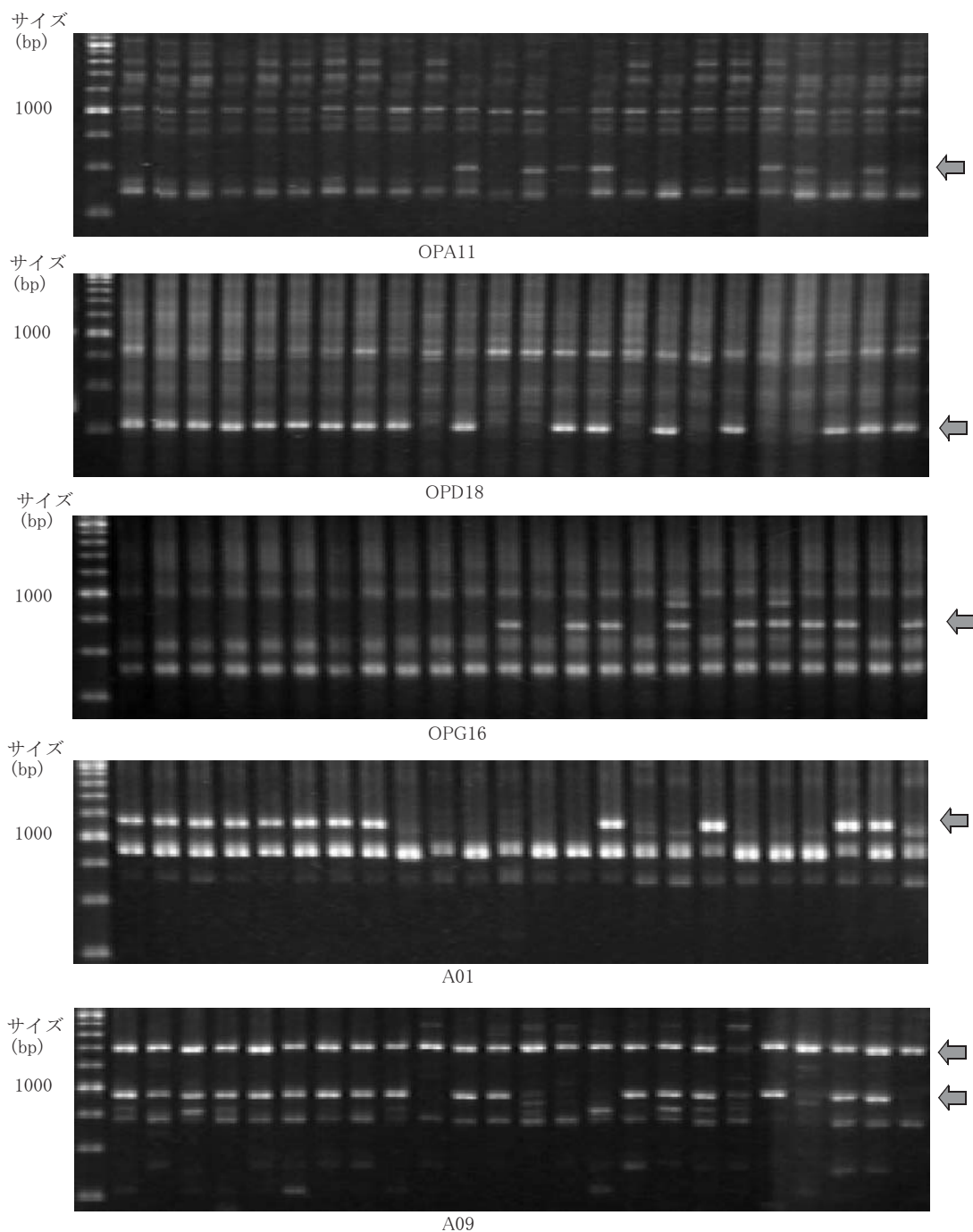
第 2 表 RAPD 分析によるコムギの品種識別。

プライマー名 マーカー長(bp)	OPA11 1600	600	OPB1 1250	480	OPB18 1200	OPC4 2200	OPD2 750	1200	OPD18 420	OPG6 1500	OPG13 1000	OPG16 900	OPS13 700	OPT16 750	1050	1000	A01 1100	A08 1400	500	300	A09 1400	980	630
識別セット	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○	△	○
小麦農林61号 (福岡県)	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	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	1	0	0	1	0	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	1	0	0	1	0	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	1	0	0	1	0	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	1	0	0	1	0	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	1	0	0	1	0	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	1	0	0	1	0	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	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
イワイノダイチ	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0
タマイズミ	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
春のかがやき	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	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	0	1	0	0	0	1	1	1	0
つるびかり	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
ダブル 8 号	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
シラネコムギ	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0
あやひかり	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0
小麦農林26号	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
キヌヒメ	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0
ユメセイキ	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
フウセツ	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
しゅんよう	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
ユメアサヒ	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0
バンドウワセ	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	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	0	0	1	0	1	1	0	0	0

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 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。



第1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 (200bp DNA ladder), 2. 小麦農林61号 (福岡県), 3. 小麦農林61号 (茨城県), 4. 小麦農林61号 (群馬県), 5. 小麦農林61号 (埼玉県), 6. 小麦農林61号 (千葉県), 7. 小麦農林61号 (東京都), 8. 小麦農林61号 (静岡県), 9. 小麦農林61号 (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. つるびかり, 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. バンドウワセ, 25. ニシノカオリ. 矢印が識別マーカー.

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2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 1500 bp 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のマーカーであった。また、ネガティブな DNA マーカーでは A08 の 300 bp がしゅんように、A09 の 1400 bp 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 1 図）。第 2 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

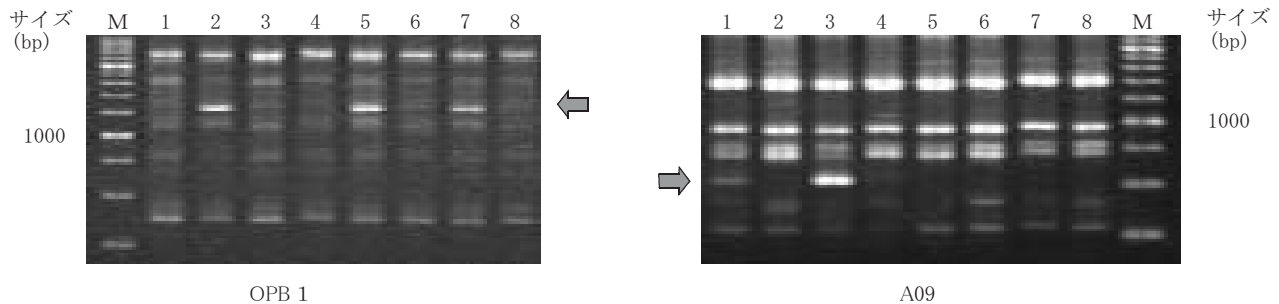
いて確認を行った。また、5 プライマーの塩基配列を第 3 表に示した。

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 2 図）。これらのマーカーについては、第 2 表に△印を付けて示した。

オオムギでは供試した 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、再現性があつたのは 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 4 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 世代であるが、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

第 3 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



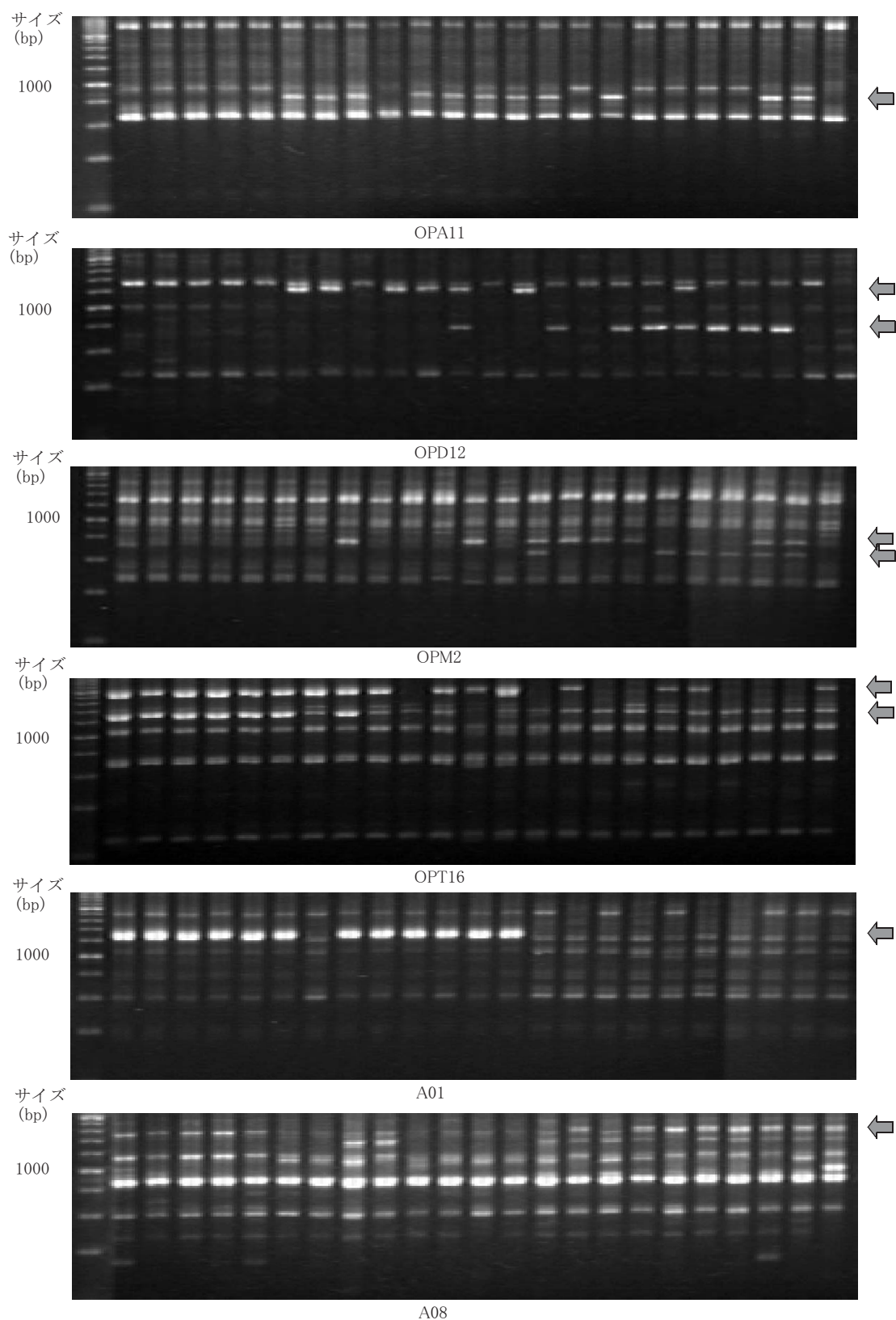
第 2 図 農林 61 号に見られた多型。

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. 小麦農林 61 号 (福岡県), 2. 小麦農林 61 号 (茨城県), 3. 小麦農林 61 号 (群馬県), 4. 小麦農林 61 号 (埼玉県), 5. 小麦農林 61 号 (千葉県), 6. 小麦農林 61 号 (東京都), 7. 小麦農林 61 号 (静岡県), 8. 小麦農林 61 号 (栃木県)。矢印が多型。

第 4 表 RAPD 分析によるオオムギの品種識別。

プライマー名	OPA11	OPB1	OPC4	OPD2			OPD5			OPD12	OPD18				OPG5				OPG6				OPG13		OPG16		OPM2	OPT8	OPT16		A01			A08				
マーカー長 (bp)	800	1900	1000	2100	900	580	980	350	1250	800	930	350	1500	950	550	450	1200	1100	850	750	780	680	1200	1900	1300	1300	1200	1050	1600	1300	1100	1050	1000					
識別セット	○								○	○												○	○		○	○	○			○								
関東二条 35 号	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0				
ミカモゴールドン	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0			
スカイゴールドン	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0			
あまぎ二条	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0			
なす二条	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	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	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0			
タカホゴールドン	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0			
きぬか二条	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0			
はるな二条	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0			
シュンライ	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0				
東山皮101号	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0			
ミノリムギ	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0			
カシマムギ	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	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	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0			
さやかぜ	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0			
すずかぜ	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0			
ファイバースノウ	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0			
センゲツモチ	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0			
イチバンボン	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	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3図 供試したオオギ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. センゲツモチ, 24. イチバンボシ. 矢印が識別マーカー.

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 2100 bp で得られた DNA マーカーは関東二条 35 号にのみ、A08 の 1000 bp 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 350 bp がシュンライにのみ、OPG6 の 1500 bp があまぎ二条にのみ現れなかった。OPB1 の 1900 bp、および OPG16 の 850 bp 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 750 bp は二条オオムギ以外にバンドが現れる DNA マーカーであった。A01 の 1200 bp および 1050 bp で得られた多型は二条オオムギのスカイゴールデン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 3 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、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 5 表に示した。

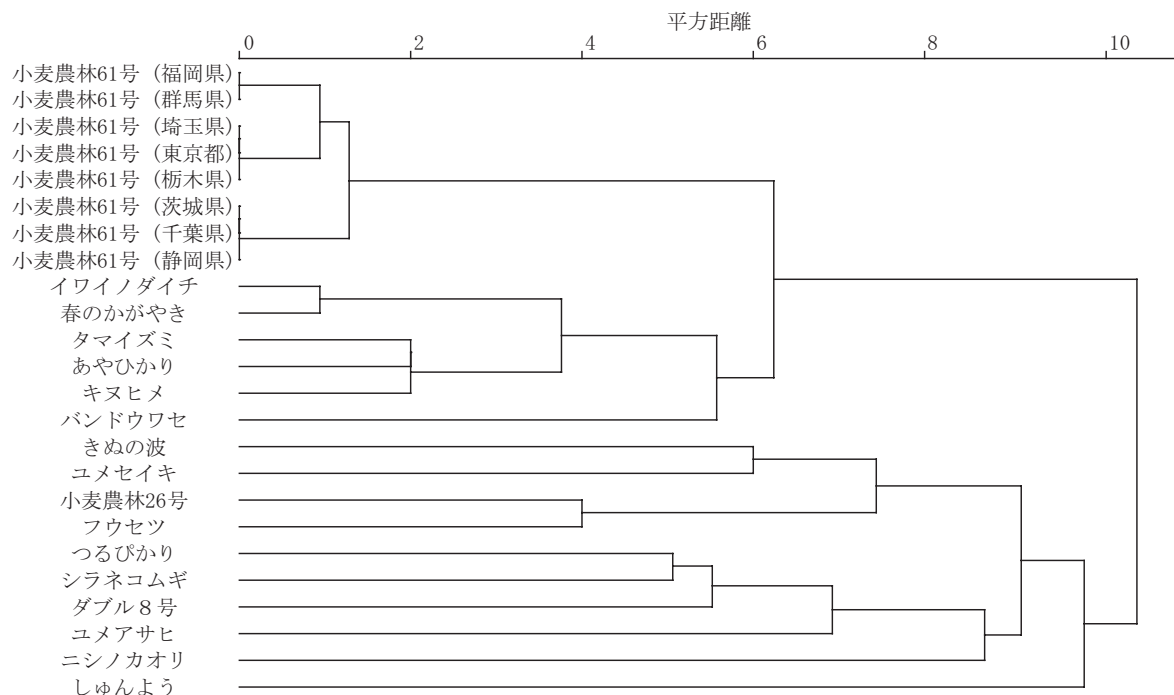
第 5 表 オオムギ品種識別のためのランダムプライマーの塩基配列。

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

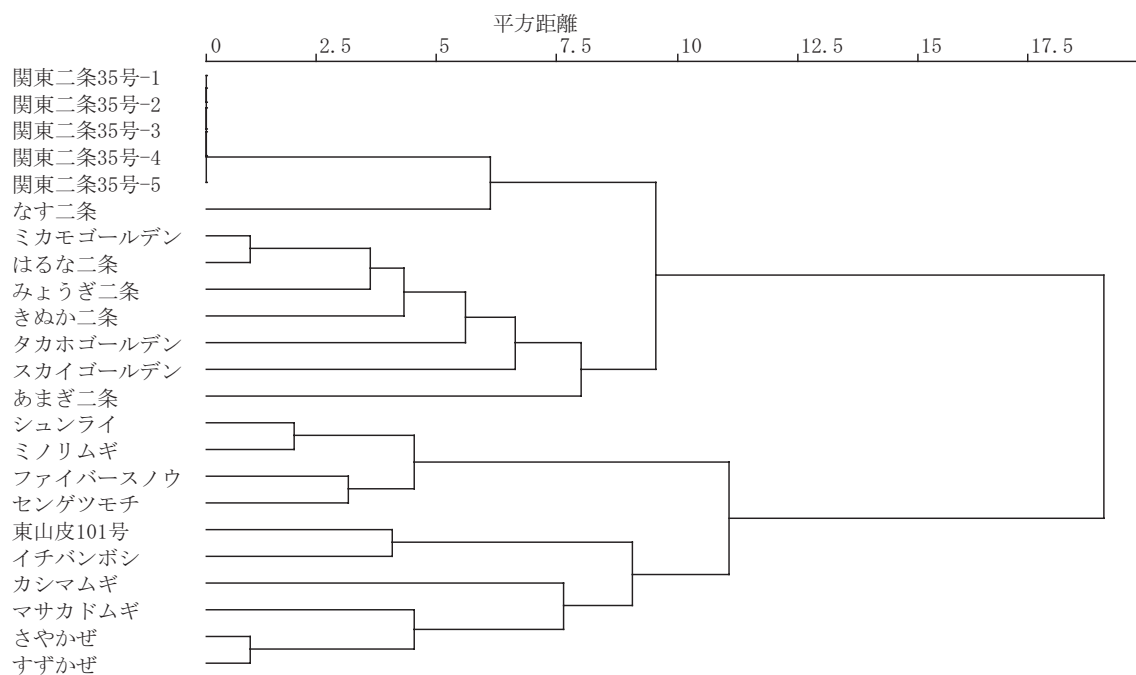
2. クラスター分析

23 種類のマーカー（第 2 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 4 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法人化した（独）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。低アミロース系統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、およびつるびかりは 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 4 図）。

33 種類のマーカー（第 4 表）より計算したオオ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



第 4 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。



第5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ー分析結果。

5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。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、最も遠くにあまぎ二条が位置した。六条オオムギのクラスターは農業研究センター育成の4品種が集中した。

考 察

本研究では、RAPD分析のみを用いてムギ類品種を識別できるマーカーを開発した。

今回、筆者ら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分析方法を選択した。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。小林・吉田 (2005) が述べているように、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成が難しい。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。筆者ら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、大麦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、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、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、小林・吉田 (2005) が栃木県の優良な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る。

本報告では再現性が高く、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。ムギ類においても、同様にこれらの手法を用いて、実用化を図る必要がある。

本報告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、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背景を確認するため、クラスター分析を行った。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、3つのクラスターに分けられた。水稻では、川島・勝股(1961)がハウネンワセ、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。小麦では西尾ら(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、その変異は微細遺伝子による範囲内であるとしている。小麦農林 61 号は育成した佐賀県では 1995 年に奨励品種から廃止した。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。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ことが考えられる。

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も長野県農事試験場と農業研究センターでクラスターが分かれているが、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。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 年度秋冬作及び平成 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。

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。内村ら(2004b)は今後、品種間の遺伝的多様性を把握するための有効な手段として、有用遺伝子に連鎖する DNA マーカーで検出する遺伝子型の情報を挙げている。品種識別においても、さらに効率的に多型を検出する技術を使用する必要があることから、RAPD 分析だけではなく、Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 分析、SSR 分析等も実施する必要性が考えられる。

また、DNA マーカーを研究者以外が使用する場合には残された課題がある。今回の実験では DNA 抽出は、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単に 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。染色についてもエチジウムブロマイドよりも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。

謝辞：本研究の遂行に当たり、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感謝します。

引用文献

- 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.
- 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.
- 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.

- 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. 滋賀県における水稻主要栽培品種の RAPD 法による品種の判別. 近畿中国農研 101 : 16-19.
- 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 栃木県農務部 2003. 平成 16 年産麦作推進資料. 1-39.
- 栃木県農務部 2004. 平成 17 年産麦作推進資料. 1-18.
- Turuspekoy, 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.
- 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.

Identification of Main Wheat and Barley Cultivars in the Kanto Region by RAPD Analysis : Shun-ichi KOBAYASHI^{1, 2)} and Tomohiko YOSHIDA³⁾ (¹⁾Tochigi Agr. Exp. Stn., Utsunomiya 320-0002, Japan; ²⁾Tokyo Univ. of Agr. and Tech.; ³⁾Utsunomiya Univ.)

Abstract : The objective of this study was to establish the technology to identify wheat and barley cultivars by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis to improve the quality of wheat and barley in Tochigi prefecture and to prevent seed contamination in the foundation seed and the stock seed. 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 F₁₃ pedigrees of two-rowed barley, Kanto Nijo 35, showing that they were fixed.

Key words : Barley, DNA marker, Identification of cultivars, Kanto region, RAPD analysis, Tochigi pref., Wheat.