The Crop Science Society of Japan

12
日作九支報
66：12－14，2000

Rep. Kyushu Br. Crop Sci. Soc.
Japan 66：12－14，2000

RAPD法によるイグサ在来種の類縁関係の検討

飯牟禮 和彦・中澤 芳則・斉藤 彰[1]・宮崎 力[2]
（熊本県農業研究センターい業研究所・[1] 九州農業試験場・[2] 科学技術振興事業団）

An analysis of the genetic relationship in local varieties of mat rush by the use of RAPD method

Kazuhiko IIMURE, Yoshinori NAKAZAWA, Akira SAITO[1] and Chikara MIYAZAKI[2]
(Kumamoto Pref.Agric.Res.Cent.,[1] Kyushu Natl.Agric.Exp.Stn.,[2] Japan Science and Technology Corporation)

熊本県農業研究センターい業研究所では国内外の近縁種を含め約600品種・系統のイグサ遺伝資源を保存しているが，イグサは形態的特徴が少なく，外観形質によって品種識別を行うことは非常に困難であるため，遺伝資源の類縁関係は必ずしも明確とはなっていない．

近年，バイオテクノロジー技術の発達によりDNAレベルでの品種識別が可能になりつつある．Williamら（1990）は，短鎖の任意配列プライマーによるポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction，PCR）から得られた増幅DNA産物の電気泳動パターンを比較し，その多型からDNA変異を検出する方法を開発した．この多型を示すDNA産物はRandom amplified polymorphic DNA（RAPD）と呼ばれる．この方法は同様にDNAレベルでの変異を検出できる制限酵素断片長多型（RFLP）に比べて簡単かつ迅速であることから植物の系統分類や品種識別に広く用いられつつある．

本研究では，RAPD法をイグサに適用して品種識別や遺伝資源の類縁関係解明についての可能性を検討し報告する．

材料および方法

1．DNAの抽出

供試材料は在来種20品種（第1表）である．1940年代から1980年代にかけて収集したものの中から，収集場所が偏らないよう全国的な視点で選び供試した．若い健全な茎約5gを対象にCTAB法によりDNAを抽出した．抽出後のDNA濃度測定には，試料に夾雑物（RNA）が存在するため分光光度計は用いず，エチジウムブロマイドを含むアガロースゲル上で既知量のλDNAと抽出したDNAに紫外線を照射し，発光強度によって測定値を求めた．茎約5gから約300ngのDNAを抽出し，これを20ng/μlに調整し合成酵素連鎖反応（PCR）に供試した．

第1表 供試在来種

No.	在来品種	生資研番号	収集年	収集場所	備考
1	生駒在来		1988	奈良県生駒郡安堵町	灯芯用
2	伊奈在来		1988	茨城県筑波郡伊奈町	灯芯用
3	勝山在来		1987	福山県勝山市鹿谷町	
4	具志川在来A		1979	沖縄県具志川市照間	
5	原町在来A	95000232	1970	福島県原町市小沢	
6	福井在来	95000206	1955	福井県三方郡三方町	
7	静岡在来	95000196	1951	静岡県引佐郡三ヶ日町	
8	三養基在来	95003415	1951	佐賀県三養基郡南茂安村	
9	碧海在来	95000193	1951	愛知県碧海郡富士松村	
10	常盤在来A	95000120	1951	長野県下水内郡常盤村	
11	小林在来A	95000113	1951	宮崎県小林市	
12	周桑在来	95000111	1951	愛媛県周桑郡壬生川町	
13	加西在来	95000110	1951	兵庫県加西郡西在田村	
14	加茂在来	95000091	1947	岡山県都窪郡加茂村	
15	高須在来A	95000076	1947	広島県沼隈郡高須村	
16	小松在来A	95000191	1951	石川県小松市	
17	下増田在来A	95000086	1947	宮城県名取郡下増田村	
18	文政在来		1959	熊本県八代郡鏡町	
19	氷見在来A	95000106	1950	富山県氷見郡速川村	
20	八幡在来	95000104	1950	山梨県東山梨郡八幡村	

2．PCR反応

PCR反応液は25μlでその組成は，DNA20ng，プライマー5pmole，基質であるdATP，dCTP，dGTP，dTTP各0.2mMおよびTaq DNAポリメラーゼ0.625unit，10mM Tris－HCl（pH8.3）緩衝液，50mM KCl，1.5mM $MgCl_2$とした．基質とTaq DNAポリメラーゼ，それにTris－HCl緩衝液，KCl，$MgCl_2$から成る10×PCRバッファーは宝酒造製（TaKaRa Ex Taq™）を，プライマーは60種類の10塩基任意配列のオペロン社製を用いた．PCRの1サイクルは熱変成（94℃，30秒），アニーリング（40℃，2分）及び伸長反応（72℃，3

キーワード：イグサ，品種分類，RAPD法

NII-Electronic Library Service

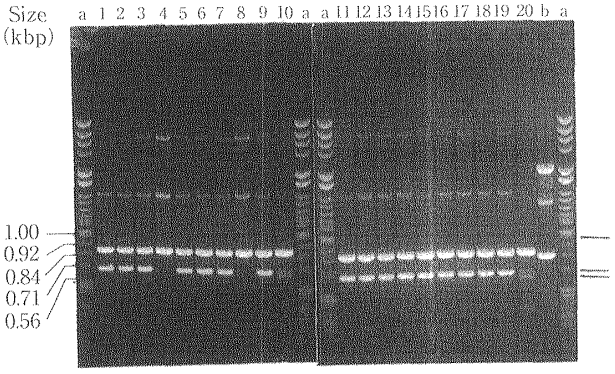
The Crop Science Society of Japan

分）からなり，これをサーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 9600，Perkin Elmer 社製）で45サイクル行った．

PCRによるDNA増幅後，反応液10μlをTAE溶液（0.04M Tris－acetate，1mM EDTA）中で，エチジウムブロマイドを含む1.2%アガロースゲル（Seakem Type－A：Low EEO）による電気泳動を行った．分離されたDNA断片の電気泳動パターンは，紫外線照射下でポラロイドカメラを用いて撮影した．

3．統計分析

少なくとも2回のPCR反応で品種間に多型が認められる明瞭なDNAバンドをRAPDマーカーとして選び，品種毎にRAPDマーカーの有(1) 無(0) に基づいてDNAタイピングを行った．得られたDNAタイピングを，統計ソフト（STATISTICA™，StadSoft JAPAN製）を用いてクラスター分析し，群平均法（UPGMA）により系統樹を作成した．



第1図　プラマーAB－09による
RAPDマーカー
a：Marker（λ/HindⅢ・Hinc），
b：*Juncus setchuensis*（イグサ近縁種）

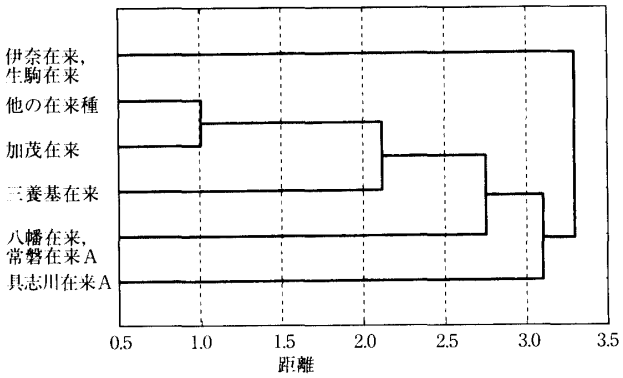
第2表　各品種間の互いに異なるバンド数

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		0	9	16	9	9	9	11	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9	9	9
2			9	16	9	9	9	11	9	9	9	9	9	10	9	9	9	9	9	9
3				9	0	0	0	4	0	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
4					9	9	9	7	9	13	9	9	9	10	9	9	9	9	9	7
5						0	0	4	0	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
6							0	4	0	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
7								4	0	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
8									4	10	4	4	4	5	4	4	4	4	4	10
9										6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
10											6	6	6	7	6	6	6	6	6	0
11												0	0	1	0	0	0	0	0	6
12													0	1	0	0	0	0	0	6
13														1	0	0	0	0	0	6
14															1	1	1	1	1	7
15																0	0	0	0	6
16																	0	0	0	6
17																		0	0	6
18																			0	6
19																				6
20																				

結果および考察

供試した60種類のプライマーのうち，14種類のプライマーで21本の増幅されたDNA断片が多型を示した．第1図にプライマーAB－09（5'－GGGCGACTAC－3'）で増幅されたDNAバンドパターン，第2表に2品種間の互いに異なるバンド数を示した．これによると最大16本の品種間差が認められたが，差が認められない組み合わせも多く存在した．また，2品種間の多型を示すバンド数の平均値は4.0本で1プライマー当たり0.07本となった．これは，アズキの0.1本（加賀秋人ら 1993），ダイズの0.5本（William et al. 1990），イネにおける*Japonica*間の0.3本（Fukuoka et al. 1992）に比べ低い値であり遺伝的多様性に欠けることを表す．

DNAタイピングをもとにクラスター分析を行い，群平均法（UPGMA）による系統樹を第2図に示した．まず「伊奈在来」と「生駒在来」がそれ以外の18品種と大きく分けられた．これら2品種は，いずれも茎内部の髄（星状細胞）が灯心として利用されてきた品種で，残りの18品種は畳表として利用されてきた品種である．灯心用イグサの産地は，江戸時代には常陸，武蔵，近江が有名であったが，これらの在来種を収集した当時は茨城県と奈良県の両県で灯心用品種が栽培されていた（定平 1988）．灯心は蝋燭業者によって取り引きされており，業者を介した両産地間のイグサ苗の移動が行われた可能性が十分に考えられる．



第2図　各在来種のバンドの有無に基づくクラスター分析
注）群平均法（UPGMA），ユークリッド距離

後者の18品種は「具志川在来A」とそれ以外の17品種に分けられた．「具志川在来A」は沖縄の在来種である

NII-Electronic Library Service

The Crop Science Society of Japan

のに対し，他の17品種は本土の在来種である.17世紀には沖縄でのイグサ栽培の記録がある（池田　1987）．現在栽培されている品種は，1965年に栽培が容易で品質良好な福岡県糟屋郡古賀町で収集導入した品種であるが（定平　1980),「具志川在来A」は，この導入された品種ではなく古くからの在来種である．残りの17品種は「常磐在来」と「八幡在来」のグループとそれ以外の15品種に分けられた.「常磐在来」の収集場所である長野県下水内郡常盤村では18世紀初めから野生のイグサを導入し畳表が作られてきた（弓削　1976).「常磐在来」と「八幡在来」は地理的に近い場所で栽培されてきたことから，遺伝的にも近い品種ではないかと考えられる.更に15品種は「三養基在来」とそれ以外の14品種に分けられ，14種は「加茂在来」とその他の13品種のグループに分けられた.

以上のように，遺伝的多様性が他の作物と比較して小さく，供試したすべての在来種を識別することはできなかったが，形態的特徴が少なく外観形質による品種識別が非常に困難なこれら在来種について，RAPD法を用いることによって，より明確な識別が可能であることが明らかになった．また，クラスター分析で最後まで分類できなかった13品種以外の在来種は，基本的には地理的あるいは用途的な理由から苗の移動の可能性が小さく古くから限定的に栽培されてきたものであることがわかった.

今後，品種識別や遺伝資源の類縁関係をより詳しく推測するためには，プライマー数を増やしたり，あるいは塩基数の少ないプライマーを用いてDNA断片数を増やして多型検出の頻度を高める必要があるものと考えられる.

摘　要

イグサ在来種20品種について,RAPD法を用いてこれらの類縁関係の解明を試みた.

1．2品種間で多型を示すバンド数の平均値は1プライマー当たり0.07本となった.この結果は，他の作物にRAPD法を適用した報告と比較して低い値であり，イグサの遺伝的多様性が小さいことが伺われた.

2．供試したすべての在来種を識別することはできなかったが，形態的特徴が少なく外観形質による品種識別が非常に困難なこれら在来種について，RAPD法を用いることによって，より明確な識別が可能であると考えられた.

3.クラスター分析で最後まで分類できなかった13品種以外の在来種は，地理的あるいは用途的な理由から苗の移動範囲が小さく古くから限定的に栽培されてきたものであることがわかった.

謝　辞

なお，本研究は熊本県農業研究センターい業研究所育種部（農林水産省いぐさ指定試験地）と農林水産省九州農業試験場作物開発部育種工学研究室の共同研究により実施された．また，供試した在来種の由来については，い業技術協会専務理事の定平正吉氏のご協力を頂いた．ここに厚く謝意を表する.

引用文献

池田正人　1987．い業に関する試験研究集録　17：36－61.

William, J. G. K. et al. 1990. Nucleic Acids Reseach 18, 6531－6535.

加賀秋人ら　1993．神大農研報20：171－176.

定平正吉　1980．農業技術　35，395－398.

定平正吉　1988．い業に関する試験研究集録　18：46－53.

Fukuoka, S. et al. 1992. Jpn. J. Genet. 67：243－252.

弓削春穂　1976．奥信濃飯山ものがたり，KK信濃路，東京，63－66.

NII-Electronic Library Service