

特集 地域特産作物

II い【品種】

DNA によるイグサ品種の識別技術

熊本県農業研究センター農産園芸研究所 飯牟禮和彦

1. はじめに

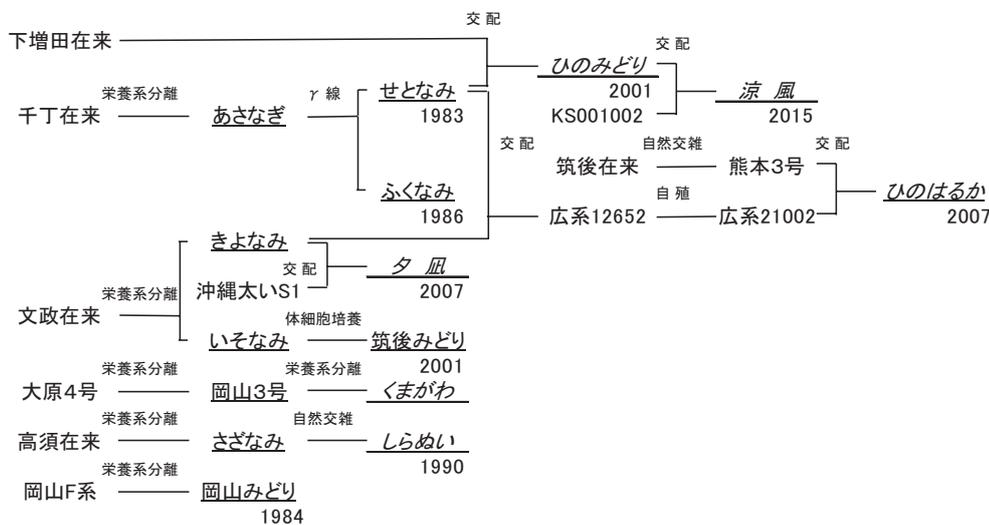
イグサ (*Juncus effusus* L.) の大部分は畳表や花ごぞ等の敷物として利用されている。当初は各地の在来種から栄養系分離（芽条変異）によって、続いて γ 線照射や体細胞培養により積極的に突然変異を起こすことによって品種が育成されてきた。その後は現在に至るまで交配による品種育成が主流となっている（第1図）。

イグサの栽培品種は植物体の形態的差異が比較的小さい。すなわち、肉眼観察による品種識別は非常に困難であり、原草（畳表の原料である泥染め後乾燥した茎）や畳表や花ごぞの状態では更に識別が困難となる。品種間のDNAの塩基配列の違いを基にした品種識別は、環境変異やDNAが抽出できる限りにおいて加工度合に影響されず、イグサにおいては極めて有効な識別方法である。

2. 識別技術開発の経緯

DNA によるイグサ品種識別に関連した研究としては、1997年に初めてその試みがなされ¹⁾、

2000年に在来種の類縁関係を検討した報告がある²⁾。その後、2001年の畳表等を対象とした一般セーフガードが暫定発動される状況の中で、一部原産国の不正表示問題及び国産品種の不正利用の疑義から、表示に対する消費者の信頼を損ないかねない事態が生じ、更に、2003年に関税定率法と種苗法が改定され、不正に輸入される国産品種の水際阻止が可能となった。以上から原産地や品種の識別技術開発が要望されるようになった³⁾ことが契機となり本格的な研究が始まった。具体的には、2001年から2003年までの農林水産省農林水産技術会議の行政対応特別研究であるネギ等の原産地判別技術とイグサの品種判別技術の開発である。後者のテーマでは当時の(独)農研機構・九州沖縄農業研究センター・作物機能開発部・育種工学研究室の齋藤彰氏をチームリーダーとして、(独)農業生物資源研究所、(独)近畿中国四国農業研究センター、それに熊本県農業研究センターの計4場所がそれぞれ異なる手法で研究開発を実施した。対象品種としては、安価な中国産畳表に対抗するために熊本県が開発した「ひのみどり」（2001年品種登録）であり、国内の主要品種からこの品種を識別するための技術がそれぞれの場所で開発された。熊本県では「ひのみどり」以後、「夕風」（2007年品種登録）、「ひのはるか」（2007年品種登録）の品種を育成し、その都度、そ



第1図 主要イグサ品種の系譜

注) アンダーラインは栽培品種、イタリックは熊本県育成、その右下の数字は品種登録年
KS001002：沖縄太いの自殖種子由来系統

それぞれの品種識別技術を開発してきた。

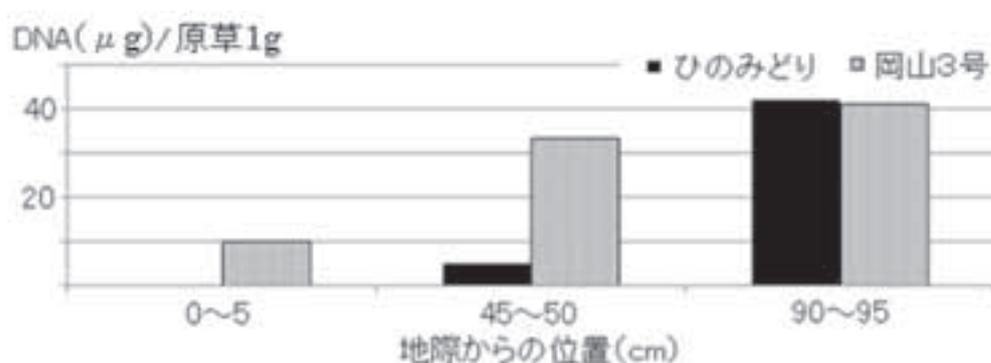
ここでは、DNA抽出を含めた識別技術について熊本県で実施した内容を中心に概要を説明する。

3. 識別技術の概要

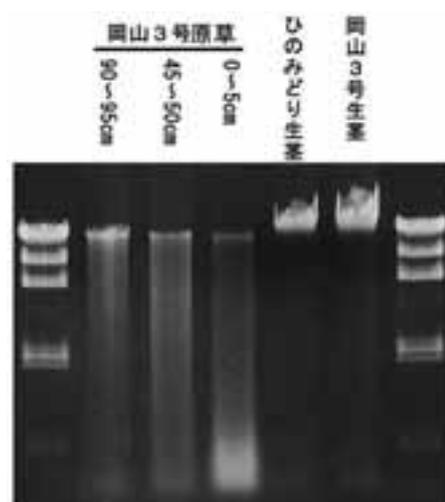
3-1. DNA抽出

イグサの品種識別では、生茎はもとより畳表等の製品からのDNA抽出が可能でなければならない。そこで、DNA抽出サンプルとして、生茎および原草を用いた。抽出部として生茎は約30cm程度伸長した比較的若い茎のほぼ中央部を、原草は1m以上伸長した茎の地際から0~5cm、45~50cm、90~95cmの3か所とした。生茎からは1gあたり100 μ g程度のDNAを安定的に得ることができた。原草からは抽出部で収量が大きく異なり地際部に近いほど抽出量が少なくなり、地際部ではほとんど抽出できなかった(第2図)。地際から90cm以上の部位で原草1gあたり40 μ g程度のDNAを得ることができた。生茎と原草からそれぞれ抽出したDNAの状態は、生茎では泳動結果がバンド状になり一定の大きさの高分子のDNAが得られたことが確認された。しかし、原草では帯状になり高分子のDNAと低分子化したその分解産物が混在していた。また、地際部に近いほど高分子のDNAが少なく、低分子のDNAが多かった(第3図)。

これらの原因として、①地際部がそれ以外の部分と比較して硬く、粉碎及びその後の抽出がうまくいかなかったこと。②イグサは収穫後、その日の内に泥染めをおこないイグサの束を縦詰めにして60℃から70℃の温度で十数時間機械乾燥する。その際地際部は熱風の風上にあたり、温度がより高く風量も多い状態で推移するためDNAの損傷が激しいのではないかとということが考えられた。したがって、原草や畳表等の製品からDNAを抽出する場合、損傷が少ないDNAを効率的に得る必要から、地際部から離れた部位から抽出することが望ましい。海外から輸入されるイグサ製品は



第2図 原草からの部位別 DNA 抽出量
注) CTAB 法⁴⁾により抽出



第3図 生茎および原草から抽出した DNA の状態
注) 各 DNA を400ng 流した。両端はλ Hind III

ほとんど畳表であるが、サンプリング部位としては、畳表の両端にある原草の先端近くに相当する部分である‘うら毛’(第4図)から抽出することで、量的にも質的にも比較的良好なDNAを抽出できる。なお、畳表を畳床に貼る際には、この‘うら毛’部分は切り落としてしまうのでサンプル採取が商品価値に与える影響はほとんど無い。花えん等他の製品についても染色されていない茎を取り出し、先端部分に近い部分をサンプリングすれば良い。

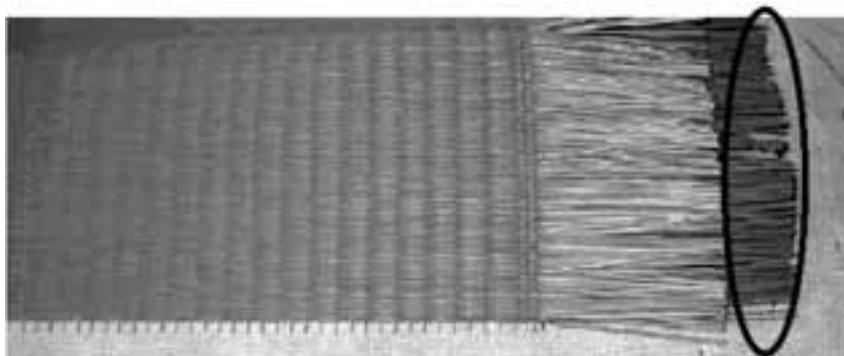
3-2. 各品種の DNA による識別技術について

DNAによる識別技術の手法については第1表⁵⁾のように様々な方法があり、それぞれ長所・短所がある。今回は各方法の詳細な説明は省略し、品種毎の識別技術について説明する。

3-2-1. 「ひのみどり」

「ひのみどり」については、前述の通り4場所が

SSR、SNP（（独）生研機構・九州沖縄農業研究センター）、RLGS（（独）農業生物資源研究所）、ISSR（（独）近畿中国四国農業研究センター）、AFLP、RAPD（熊本県農業研究センター）の各手法で多くの識別マーカーを開発した³⁾。現在、税関も含め一般的に用いられているのはSSRによる5種類のマーカーである（第5図）。これらの識別技術は



第4図 量表のうら毛（円内の部分）

すべて「ひのみどり」において目印が無いことで識別できる「ネガティブマーカー」であり、複数のサンプル（量表の茎）を混合して抽出したDNAから識別する場合、1サンプルでも別の品種が混在していれば他のサンプルが「ひのみどり」だったとしても「ひのみどり」があることを識別することができない。したがって、実際の識別では、茎1本1本から別々にDNAを抽出・識別する必要があり効率的・コスト的に課題がある。その後、「ひのみどり」において、目印があることで識別できる「ポジティブマーカー」を開発するために九州大学⁶⁾や熊本県（未発表）で研究が行われたが、残念ながら現在でも開発されていない。

3-2-2. 「夕風」「ひのはるか」

前述した（独）生研機構・九州沖縄農業研究センターが開発した「ひのみどり」の5種類のSSRマーカーを「夕風」「ひのはるか」に使用したところ、「夕風」で3種類（Primer 29、F、G）、「ひのはるか」で1種類（Primer F）のマーカーが見つ

かった（第5図）。「夕風」の3種類のマーカーの中でPrimer Fについては、「夕風」にだけ120bp付近のバンドがあることから「ポジティブマーカー」である。

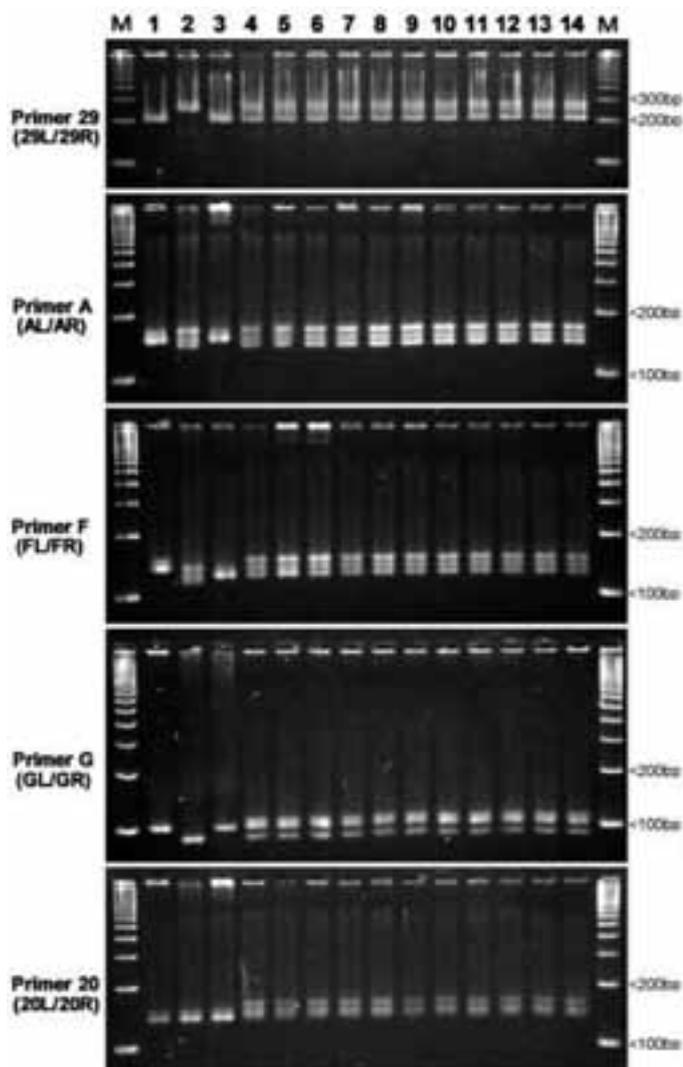
3-2-3. 「涼風」

九州大学が「ひのみどり」のポジティブマーカー化する研究の際に得られたSSR部分を増幅するプライマーペアの中から「涼風」の識別マーカーが得られた。このマーカーは「涼風」が2本のバンドであるのに対し、他の品種はバンドが1本であることから、「涼風」を容易に識別することができる。しかし、アガロースゲル電気泳動では「涼風」の2本のバンドが識別しにくいいため、現在はより分離能が高いマイクロチップ電気泳動装置（MultiNA：島津製作所）での識別を実施している。今後は、アガロースゲル電気泳動でも識別できるようにこのマーカーの改良を図っていく予定である。

第1表 DNAによる鑑定技術に使われる手法⁴⁾

手法	識別方法の特徴	利点	留意点
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	制限酵素で切断サブプロット	・共優性マーカーであり識別能が高い。	・操作が繁雑 ・多量のDNAが必要。
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	ランダムプライマーによるPCR	・簡便・安価。	・再現性を高めるためSTS化が推奨される。
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	制限酵素切断+PCR	・1回の操作で多数の多型マーカーを検出可能。	・再現性を高めるためSTS化が推奨される。
CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)	特定領域のPCR+制限酵素切断	・共優性マーカーであり識別能が高い。	・予め塩基配列情報が必要。
SSR (Simple Sequence Repeats)	縦列反復配列領域のPCR	・マーカー当たりの多型数が多く識別能が高い。 ・開発されたマーカーは非常に使い易い。	・開発費用と労力が大きい。
ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats)	縦列反復配列領域間のPCR	・簡便・安価。	・再現性を高めるためSTS化が推奨される。
RLGS (Restriction Landmark Genome Scanning)	2種類の制限酵素切断+2次元電気泳動	ゲノム全域を高い解像度で解析できる。	放射性同位元素ラベルによるスポット解析。
SNP (Single Nucleotide Polymorphism)	1塩基レベルの多型	・複数用いると識別能及び効率が極めて高い。	・開発費用と労力が大きい。

一部追加改変



第5図 「ひのみどり」「夕風」「ひのはるか」の SSR マーカー

注1) 1: ひのはるか、2: 夕風、3: ひのみどり、4: 岡山3号、5: いそなみ、6: 岡山みどり、7: せとなみ、8: 筑後みどり、9: ふくなみ、10: あさなぎ、11: きよなみ、12: しらぬい、13: くまがわ、14: さざなみ、M: 100bp ラダー

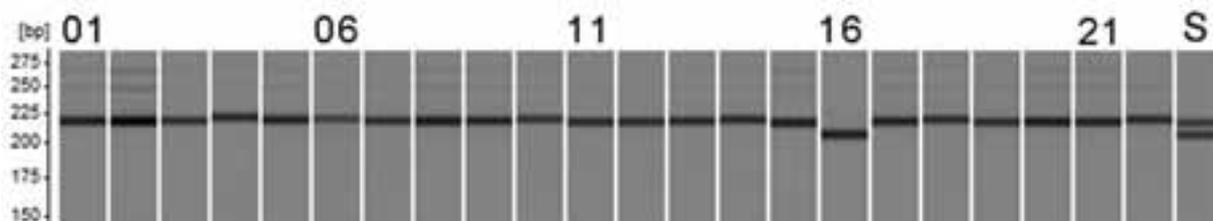
4. おわりに

現在、識別に要する時間は DNA 抽出→PCR→電気泳動→判定という一連の作業に最低6時間

程度を必要とし、これら作業の中で DNA 抽出は約3時間を要する。そこで、より簡易で短時間に DNA 抽出できる技術開発を行い、15分程度で DNA 粗抽出液を得ることができた(未発表)。この DNA 粗抽出液から識別できる品種は限られているが、今後は識別可能となるようにマーカーを改良し識別効率の向上を図っていきたいと考えている。

5. 引用文献

- 1) 飯牟禮和彦・中澤芳則・宮崎力・齋藤彰 (1997): RAPD 法によるイグサの品種識別. 九農研, 59, 16
- 2) 飯牟禮和彦・中澤芳則・齋藤彰・宮崎力 (2000): RAPD 法によるイグサ在来種の類縁関係の検討. 日作九支報, 66, 12-14
- 3) 農林水産省農林水産技術会議事務局 (2005): 微量元素分析及び分子マーカーの利用による農産物の品種・原産地判別手法の開発. 研究成果431
- 4) Murray, M. G. and W. F. Thompson. (1980). Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA/ *Nucleic Acids Research*/8 (19) : 4321-4326
- 5) DNA 品種識別技術検討会 (2003): 植物の DNA 品種識別についての基本的留意事項—技術開発と利用のガイドライン—. http://www.hinsyu.maff.go.jp/pvr/dna_manual/guideline.pdf (平成27年7月26日閲覧)
- 6) 山形悦透・牧内貴子・吉村淳 (2012): イグサ優良品種「ひのみどり」を識別する多型の探索およびマーカー開発. DNA 鑑定, 4, 39-47



第6図 「涼風」の SSR マーカー

注1): ひのみどり、2: 夕風、3: 岡山3号、4: ひのはるか、5: くまがわ、6: しらぬい、7: きよなみ、8: あさなぎ、9: いそなみ、10: ふくなみ、11: せとなみ、12: さざなみ、13: 岡山みどり、14: 千丁在来、15: 下増田在来A、16: 沖繩太いS1、17: 文政在来、18: 大原4号、19: 高須在来A、20: 岡山F系、21: 熊本3号、22: 広系21002、S: 涼風
注2) マイクロチップ電気泳動でのゲルイメージ