

分子マーカーによるイグサ品種“ひのみどり”の識別 Discrimination Between Mat Rush Cultivar "HINOMIDORI" and Other Cultivars by Molecular Marker

飯牟禮和彦・田中正美・上野育夫・深浦壯一

Kazuhiko IIMURE, Masami TANAKA, Ikuo UENO and Souichi FUKAURA

要 約

本研究は、イグサの泥染め乾燥茎（原草）から DNA を抽出することと、高級畳表原料であり違法輸入が懸念されている本県育成品種“ひのみどり”を対象とし、RAPD 分析と AFLP 分析による品種識別用分子マーカーを開発することを目的とした。

生茎からは、1g あたり 100 μ g 程度、原草からは、部位により異なったが最大で乾燥茎 1g あたり 40 μ g 程度の DNA を得ることができた。

RAPD 分析では、1 種類のプライマーで他の 11 品種と識別できる 1 個の多型バンドが、AFLP 分析では、EcoR I 側と Mse I 側の各 8 個から得られる 64 通りのプライマー組合わせから 16 組合わせで 28 個の多型バンドが認められた。これらはすべて、“ひのみどり”には無く、他の品種には有るネガティブマーカーであった。

キーワード：イグサ、ひのみどり、品種識別、RAPD、AFLP

I 緒 言

1990 年代以降、中国を中心とする外国からの安価な畳表の輸入が急増し国内のイグサ農家経営を圧迫したことから、2001 年 4 月にセーフガードが暫定発動された。

外国産畳表は、一般的に安価であるが品質はあまり良くないため、高級畳表市場においては国産が中心であり外国産との競合は少ない。国産が外国産と価格で競争することは、労働単価の違いから困難であるため、品質による格差をつけることが外国産に対抗する有効な対策となる。2001 年に種苗登録された“ひのみどり”は、茎が細く、着花及び変色茎の発生がほとんど認められず、元白や先枯れの発生も少ないため高品質の畳表を製織することができる¹⁾。そのため、外国産畳表に対抗できる品種として 1999 年から普及に移された。

一方、2003 年の改正関税定率法により税関が育成者権を侵害している輸入品を取り締まれるようになり、加えて種苗法においても、収穫物の侵害や法人による権利侵害に対する罰則強化がなされた²⁾。

そこで、“ひのみどり”を初めとする国内の優良品種が不正に持ち出されたり、海外で生産された畳表が逆輸入される権利侵害を防止するために、イグサ栽培品種の識別技術が必要である。畳表は、収穫したイグサ茎を泥染めし 60℃から 70℃の熱風で十数時間かけて乾燥した茎（原草）を製織したものなので、形態的特性による識別は非常に困難であることから、DNA による識別技術

の開発を実施した。

II 材料及び方法

イグサ品種を DNA により識別する場合、生茎とともに畳表や花ごぎ等の製品からも DNA が抽出できなければならない。そこで、DNA を抽出するサンプルとして、生茎および製品の原料である原草を用いた。また、多型の検出法としては分析操作が簡単な RAPD³⁾ (Random Amplified Polymorphic DNA) 法と 1 回の操作で多数の多型マーカーが検出可能な AFLP⁴⁾ (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法を用いた。

1 DNA の抽出

供試した品種は、い業研究所で維持・保存している遺伝資源の中の“ひのみどり”と主要栽培 11 品種（岡山 3 号、いそなみ、岡山みどり、せとなみ、筑後みどり、ふくなみ、あさなぎ、きよなみ、しらぬい、くまがわ、さざなみ）である（第 1 図）。

DNA を抽出するサンプルは、生茎では約 30cm 程度伸長した比較的若いものを用いた。各品種約 5g を液体窒素下でハサミで 10mm 以下に切断し、粉碎器（イワタニ）で粉碎した。原草では“ひのみどり”および“岡山 3 号”の 120cm 以上の茎で地際から 0～5cm、45～50cm、90～95cm の部位を用いた。付着した染土については、除去するための処理は行わなかった。それぞれの部位約 2g（水分約 10%、生茎の約 5g に相当する。）

をハサミで 1mm から 2mm 程度に細かく切断し、液体窒素素下で生茎の場合と同様に粉砕した。その後、生茎、原草とも CTAB 法により全 DNA を抽出した。

DNA の状態を調べるために、TAE 溶液中でエチジウムブロマイドを含む 1.0%アガロースゲルによる電気泳動を行い、その後、ゲルを紫外線照射下でポラロイドカメラを用いて撮影した。

2 RAPD 分析

PCR 反応に用いた Taq DNA ポリメラーゼは、タカラバイオ社製 TaKaRa Ex Taq™ を、プライマーは 10 塩基任意配列のオペロン社製 60 種類 (OPAA, AB, AC 各 20 種類) を供試した。PCR 反応液は 25ul で、鋳型 DNA20ng、プライマー 5pmol、Taq DNA ポリメラーゼ 0.025U、dNTP 混液 0.2mM、バッファー 2.5ul とした。dNTP 混液とバッファーはポリメラーゼに添付されているものを使用した。PCR は 94 °C 30 秒→ 40 °C 2 分→ 72 °C 3 分 ×35 サイクルの条件で、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystems 社製) を用いた。PCR 反応後、DNA の状態を調べるときと同様の方法で電気泳動・撮影を行い、増幅 DNA 断片の電気泳動パターンを調査した。多型の検出は、4 回の反復で明確なバンドのみを多型とした。

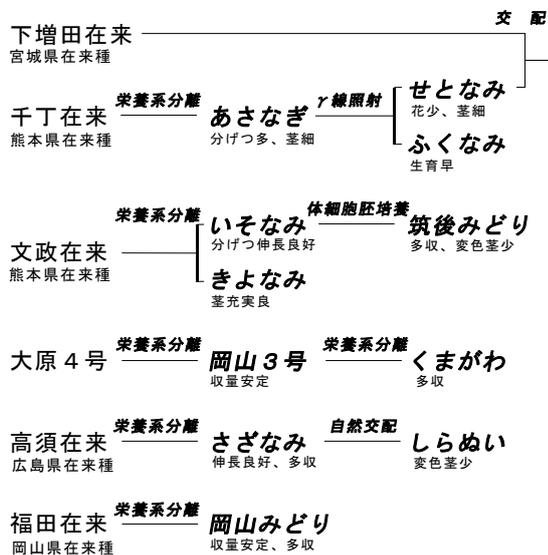
3 AFLP 分析

Invitrogen 社の AFLP Analysis System 1 を用い、プロトコールはこのキットに準じた。EcoR I 側プライマー 8 種類と Mse I 側プライマー 8 種類の計 64 通りのプライマー組合せで実施した。PCR 反応は、サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystems 社製) を用いた。DNA 断片の分画は、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行った。多型の検出は、ゲルを銀染色 (和光純薬キット) して撮影後、2 回の反復で明確なバンドのみを多型とした。

III 結果

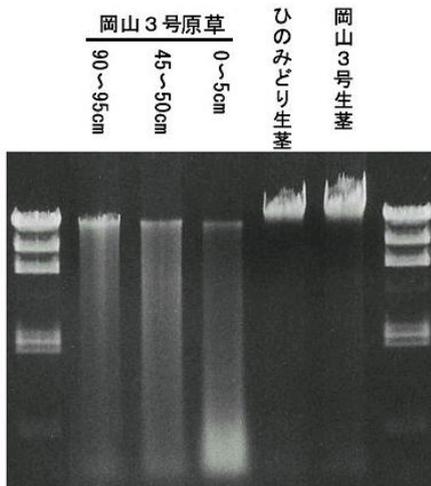
1 DNA の抽出

生茎からは、生茎 1g あたり 100 μg 程度の DNA を安定的に得ることができた。原草からは、茎の部位で抽出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 1 表)。最大で乾燥茎 1g あたり 40 μg 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が、原草では泳動結果が帯状になり低分子から高分子の DNA 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 2 図)。



第 1 図 主要イグサ品種の系譜
注) 斜体・太字が供試した 12 品種

ひのみどり
花極少、茎極細、
変色茎少



第 2 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/HindIII

第 1 表 原草 1g からの部位別 DNA 抽出量 (μg)

地際からの位置	岡山 3 号	ひのみどり
0 ~ 5cm	10.0	—
45 ~ 50cm	33.2	4.8
90 ~ 95cm	41.1	42.0

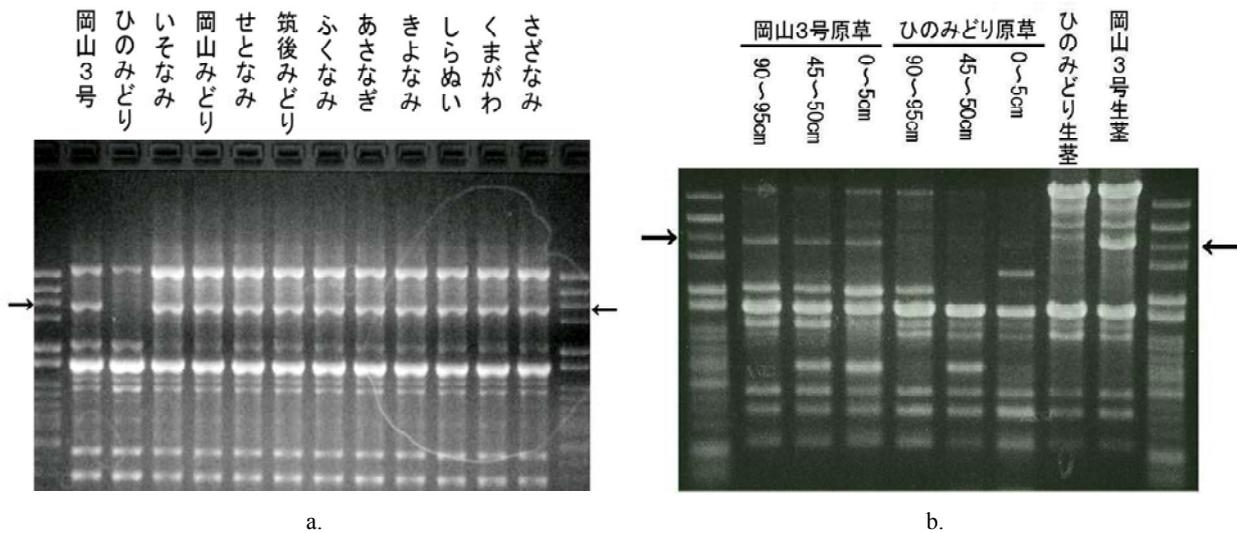
2 RAPD 分析

生茎から抽出した DNA を用いて RAPD 分析を実施したところ、供試した 60 種類のプライマーの中、1 種類 (OPAB-05: 5'-AGGGGTCTTG-3') で“ひのみどり”と他の 11 品種とが識別できるバンドが得られた。識別できたバンドは分子量で 3kb 程度で“ひのみどり”には存在せず、他の 11 品種にはすべて存在するものであった。また、原草でも、生茎の場合と比較して、多型バンドがやや不鮮明ではあったが確認することができた。

(第3図)。

3 AFLP 分析

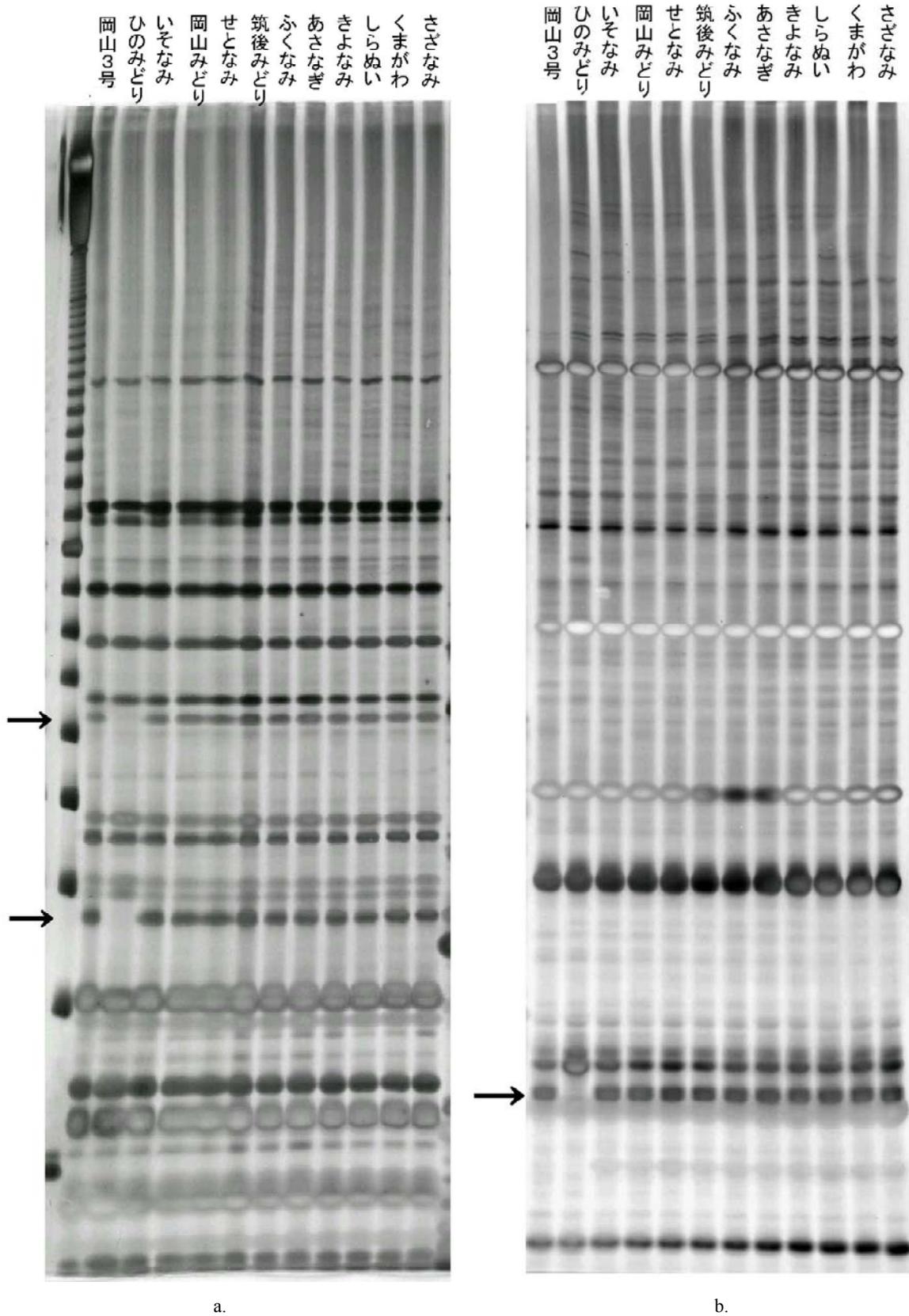
生茎から抽出した DNA を用いて AFLP 分析を実施したところ、EcoR I 側と Mse I 側各 8 個の組合せ 64 通りのプライマー組合せから 16 組合せで 28 個の多型バンドが認められた (第2表)。どの多型バンドも“ひのみどり”には存在せず、他の 11 品種にはすべて存在するものであった (第4図)。また、原草では、生茎の場合と同じ明瞭なバンドパターンが得られた。



第3図 「ひのみどり」のRAPDマーカー
 注) a.: 生茎から抽出したDNAを鋳型とした。b.: 原草から抽出したDNAを鋳型とした。
 両端はマーカー(λ Hind II/III)

第2表 「ひのみどり」のAFLPマーカー数

Mse I EcoR I	CAA	CAC	CAT	CAG	CTA	CTC	CTT	CTG	計
ACA			3	2		1		3	9
ACG			1			1			2
ACT	2			2					4
ACG	1	1							2
AGC	1								1
AGG	2						3		5
AAC						1			1
AAG		1	3						4
計	4	2	7	4	3	3	3		28



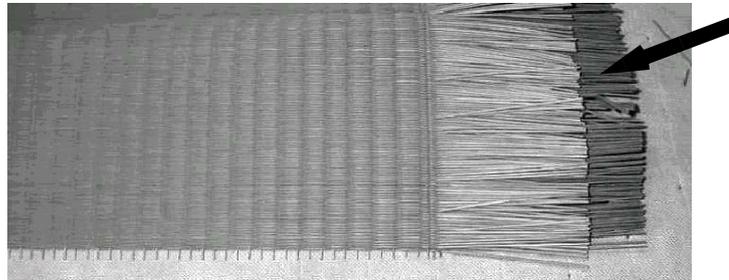
第4図 「ひのみどり」のAFLPマーカー
 注)プライマー組合せ a.:E-ACT,M-CAA、b.:E-AAG,M-CAC
 いずれも生茎から抽出したDNAを鋳型とした。
 a.の左端のレーンは100bラダー

IV 考察

1 DNAの抽出

生茎、原草のいずれからも DNA は抽出できたが、原草では位置によって抽出量に大きな差がみられた。特に地際部分ではほとんど抽出できなかつた。また、抽出できても低分子の DNA が多かった。この原因として、①地際部がそれ以外の部分と比較して硬く、抽出前の粉碎がうまくいかないこと。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、破壊が進んでいない DNA を効率的に得る必要から、地際部からはなるべく離れた部位から抽出することが望ましいと考えられた。海外から輸入されるイグサ製品は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’から抽出することで、量的にも質的にも比較的良好な DNA を抽出できると考えられた。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す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。他の上敷や花えん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と考えられた。



第5図 畳表のうら毛

2 品種識別マーカーの開発

イグサ (*J. effusus*) の栽培化の歴史は比較的新しく、16世紀初頭に水田で栽培されるようになったと考えられている⁵⁾。品種開発は、大正時代から昭和 20 年代前半までは、栄養系分離 (自然突然変異) や自然交配による実生選抜がおこなわれ、昭和 26 年から人工交配による育種が開始された。昭和 38 年からはガンマ線照射による突然変異育種が始まった⁶⁾。このように栽培の歴史の浅いこと、栄養系分離や突然変異育種等の育種方法、あるいは人工交配において遺伝的に比較的近い親同士を交配したこと等の理由からイグサ栽培品種の遺伝的変異は非常に小さいと考えられ、これまで RAPD 分析では栽培品種を識別できるマーカーは得られておらず、在来種間で若干の多型が得られた程度であった^{7) 8)}。今回の試験でも、“ひのみどり” 以外の供試品種の識別は AFLP 分析でもできなかった。

しかし、目的とする“ひのみどり”の識別マーカーが RAPD 分析で 1 種類、AFLP 分析で 28 種類得られた。ただし、RAPD 分析では、原草から抽出した場合、分子量が 3kbp と比較的大きかったため、マーカーとなるバンドが不鮮明になったことから、マーカーとしては不適であると考えられた。

“ひのみどり”で多くの識別マーカーが得られたのは、“ひのみどり”が唯一、人工交配によって育成されたことが一つの原因ではないかと考えられた。なお、これらすべてのマーカー (バンド) が“ひのみどり”には無く、他の品種には有るというネガティブマーカーであったことで、原草や畳表等の製品に“ひのみどり”が混じっているかどうかを調べる際には、茎を一本毎にサンプリングして品種識別する必要がある。このため今後は、検査の効率を上げるため、ポジティブマーカーの開発が望まれる。

V 謝辞

本研究は、行政対応特別研究「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：2001年～2003年度」で実施したものである。

本研究を遂行するにあたり、独立行政法人九州沖縄農業研究センターの斎藤彰育種工学研究室長と土門英司研究員 (現農林水産省農林水産技術会議事務局研究調査官) から適切なアドバイスを受け、機器類を使用させていただいた。また、い業研究所からは、イグサのサンプルを提供していただいた。ここに記して感謝の意を表す。

VI 引用文献

- 1) 中澤芳則・手塚隆久・飯牟禮和彦・定平正吉・赤木豊樹・濱田四郎・大川浩史：日作九支報 65, 44-45, 1999.
- 2) 丸山恵史：育種学研究 5, 127-135, 2003.
- 3) WILLIAM, J.G.K., A.R. KUBELIK, K.J. LIVAK, J.A. RAFALSKI, S.V. TINGEY, *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535,1990.
- 4) VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJNS, T. Van de LEE, M. HORNES, A. FRUITERS, J. POT, J. PELMAN, M. KUIPER and M. ZABEAU, *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414,1995.
- 5) 秋の企画展 備後表一壘の歴史を探る一, pp.32. 広島県立歴史博物館友の会, 1990.
- 6) 指定試験(育種)第15号 いぐさに関する研究, pp.4-51. 農林水産技術会議事務局・広島県立農業試験場, 1991
- 7) 飯牟禮和彦・中澤芳則・宮崎力・斎藤彰：九農研 59, 16, 1997.
- 8) 飯牟禮和彦・中澤芳則・斎藤彰・宮崎力：日作九支報 66, 12-14, 2000.
- 9) 島本功・佐々木卓治：細胞工学別冊 植物細胞工学シリーズ 新版植物のPCR 実験プロトコール, 164-170, 秀潤社, 東京, 1997.

Discrimination Between Mat Rush Cultivar "HINOMIDORI" and Other Cultivars by Molecular Marker

Kazuhiko IIMURE, Masami TANAKA, Ikuo UENO and Souichi FUKAURA

Summary

The purpose of this study was DNA extraction from mud dyed dry stems (Gensou) and discrimination of high-quality mat rush cultivar "Hinomidori" which was concerned about illegal import and other cultivars by RAPD analysis and AFLP analysis.

The results obtained are follows;

From raw stems, about 100 μ g DNA per 1 gram, and from dry stems, about 40 μ g per 1 gram at the maximum was able to be extracted.

By RAPD analysis, one polymorphic band was discovered with one kind of primer. And by AFLP analysis, 28 polymorphic bands were discovered in 16 combinations by 64 ways of primer combinations of EcoR I side and Mse I side respectively. They were all negative markers in "Hinomidori" but weren't in other cultivars.