

短報

ISSR多型による大豆在来系統「小糸在来」の同質性確認

前田 ふみ・津金 胤昭・鈴木 茂・青木 孝一

キーワード：大豆、在来系統、小糸在来、ISSR

I 緒 言

千葉県の大豆栽培は、転換畑を中心に1,000ha余りで作付けされており、栽培品種とともにいわゆる在来系統も栽培されてきた。在来系統は1994年には千葉県内の大豆作付面積の21%で作付けされていたが、2004年は12% (129ha) に留まった (千葉県、2006)。しかし、県内各地で栽培されてきた在来系統は遺伝資源として極めて重要であり、千葉県農業総合研究センターではこれらの特性評価と保存を行ってきた (鈴木、2006)。また、生産現場においても、「小糸在来」のように地域の特産品として見直され、栽培が増えている在来系統もある。

君津市小糸川流域を中心に伝統的に栽培されてきた在来系統のなかで、枝豆として味がよく、また乾豆としても品質の高い大豆として一部のの人に知られていた1系統が1974年に千葉県農業試験場 (現千葉県農業総合研究センター) に導入され、「小糸在来」という呼称で品種比較試験や栽培試験に供試された。現地の在来系統も「小糸在来」と呼称されていたが、農業試験場に導入された系統との関係は不明である。農業試験場に導入された「小糸在来」系統は、その後原種農場 (現千葉県農業総合研究センター育種研究所) で維持、保存される事となったが、1996年に君津市の農家から要望を受けてあらためて提供され、これが「小糸在来」商品化のきっかけとなった。2004年には「小糸在来」を地域の特産品として振興するため、生産者団体「小糸在来愛好クラブ」が発足し、育種研究所畑作物育種研究室 (旧原種農場) から再度種子の提供を受けて生産・販売の努力が積み重ねられた。2005年10月には、ブランド力強化と品質の保証を目的に、「小糸在来」の商標が登録された。今後も「小糸在来」を安定した品質で供給するために、系統を明確にして維持、管理する手法の確立が求められている。

Inter-simple sequence repeat (以下ISSRとする) 法は反復配列に挟まれた領域をPCRによって増幅し、電気泳動法により増幅したDNAの長さを比較する方法である (Zietkiewicz et al.,1994)。反復配列はゲノム中に広く

散在するためDNA多型を獲得できる頻度が高く、品種識別にも利用されている (黄ら、2003)。

そこで、君津地域と農業総合研究センターで維持している「小糸在来」についてISSR法による多型解析を行い、同質性の確認と系統維持管理のための技術開発を行った。

本研究を遂行するに当たり、小糸在来愛好クラブの各位及び君津農林振興センター熊谷一秀上席普及指導員には供試材料の提供に協力いただいた。ここに記して深く感謝の意を表する。

II 材料及び方法

1. 供試材料

千葉県農業総合研究センター育種研究所畑作物育種研究室が2006年に比較栽培を行った大豆在来系統及び品種のなかから、君津地域において「小糸在来」として2004年に栽培されていた3系統 (「小糸在来」A、B、C)、千葉県農業総合研究センター生産技術部生産工学研究室及び育種研究所畑作物育種研究室が、旧農業試験場畑作研究室から分譲を受け「小糸在来」として維持管理してきた2系統 (前者「小糸在来」D、後者「小糸在来」E)、県内各地で栽培されている在来系統4系統及び大豆品種3品種の計12品種・系統を供試した (第1表)。「小糸在来」とされる5系統及び県内の在来系統4系統は5個体から、3品種は1個体からDNA抽出用の葉をサンプリングした。

第1表 ISSR多型検出に用いた「小糸在来」及び大豆在来系統、品種

サンプル番号	品種名または系統番号	収集年度	収集地
1~5	「小糸在来」A	2004年	君津市
6~10	「小糸在来」B	2004年	君津市
11~15	「小糸在来」C	2004年	君津市
16~20	「小糸在来」D	1974年	君津市 ¹⁾
21~25	「小糸在来」E	1974年	君津市 ²⁾
26~30	在来F	1979年	鋸南町
31~35	在来G	1979年	市原市
36~40	在来H	1983年	八日市場市
41~45	在来I	2005年	君津市
46	「タマホマレ」		
47	「丹波黒」		
48	「フクユタカ」		

注1) 千葉県農業総合研究センター生産技術部生産工学研究室 (現流通経営研究室) 保存
 2) 千葉県農業総合研究センター育種研究所畑作物育種研究室 (旧千葉県原種農場) 保存

受理日2007年9月25日

2. ISSR法による多型解析

サンプリングした葉を個体ごとに凍結粉碎し、DNA抽出試薬 DNAzol (Molecular Rsearch Center社) を用いてDNAを抽出した。

PCRに使用したプライマーは、第2表に示した20種類のISSRプライマーとした。PCRの反応条件は1サイクル

につき変性を95℃で30秒間、アニーリングを50℃で30秒間、伸長を72℃で2分間とし、反応サイクルは40サイクルとした。ポリメラーゼには *TaKaRaTaq* Hot Start Version (タカラバイオ社) を使用した。装置はApplied Biosystems社製Model19700サーマルサイクラーを使用した。PCR産物を4%アガロースゲルで電気泳動し、バンドの有無を解析した。

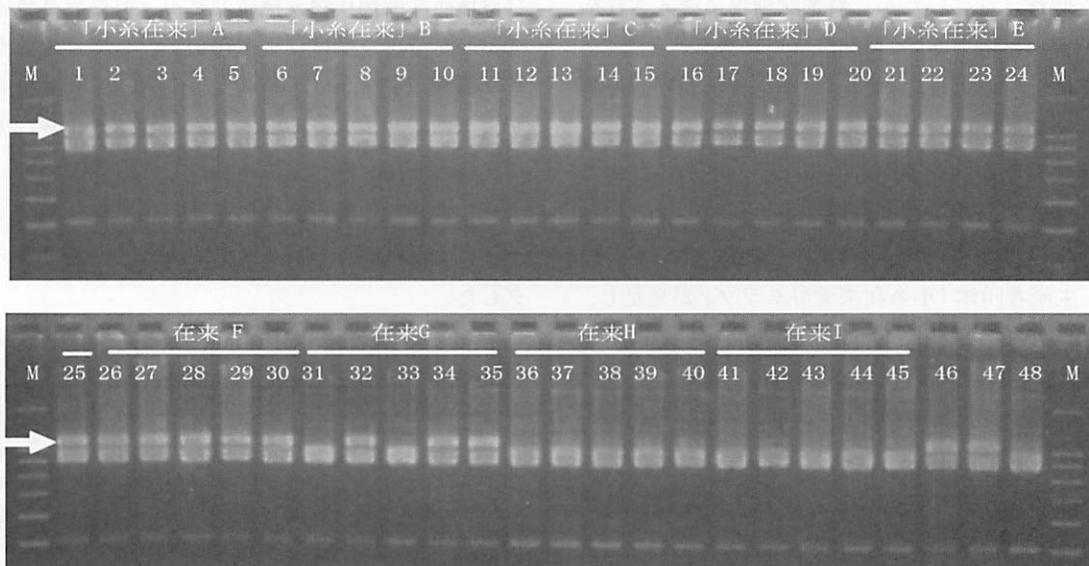
ISSR多型プロファイルのデータをクラスター分析(ウオード法または最近隣法)にかけ、系統間の類似度を示す樹状図を作成した。クラスター分析は、統計情報サイト <http://aoki2.si.gunma-u.ac.jp/BlackBox/> の分析ソフトを使用した。

III 結果及び考察

20種類のISSRプライマーを用いた多型解析の結果、延べ56本のバンドが検出された。そのうち14本で多型が認められた。多型検出の一例を第1図に示した。プライマーNo.12では2本のバンドを検出し、1本のバンドで多型が認められた。多型が認められた1108bpのバンドは、「小糸在来」A、「小糸在来」B、「小糸在来」C、「小糸在来」D、「小糸在来」E、在来F、「タマホマレ」「丹波黒」ではバンドが検出され、在来H、在来I、「フクユタカ」ではバンドが検出されなかった。

第2表 ISSRプライマー配列

No.	ISSR プライマー	配列
1	(AC) 8 G	ACACACACACACACG
2	(CA) 8 G	CACACACACACACAG
3	(AG) 8 G	AGAGAGAGAGAGAGG
4	(AG) 8 T	AGAGAGAGAGAGAGT
5	(GA) 8 A	GAGAGAGAGAGAGAA
6	(GA) 8 C	GAGAGAGAGAGAGAC
7	(TC) 8 A	TCTCTCTCTCTCTCA
8	(CA) 8 T	CACACACACACACAT
9	(TG) 8 A	TGTGTGTGTGTGTGA
10	(TG) 8 G	TGTGTGTGTGTGTGG
11	(TG) 8 C	TGTGTGTGTGTGTGC
12	(GT) 8 A	GTGTGTGTGTGTGTA
13	(GT) 8 T	GTGTGTGTGTGTGTT
14	(GT) 8 C	GTGTGTGTGTGTGTC
15	(AAG) 6	AAGAAGAAGAAGAAG
16	(AGA) 6	AGAAGAAGAAGAAGA
17	(GAA) 6	GAAGAAGAAGAAGAA
18	(CTT) 6	CTTCTTCTTCTTCTT
19	(TTC) 6	TTCTTCTTCTTCTTTC
20	(TCT) 6	TCTTCTTCTTCTTCT



第1図 ISSRプライマー No.12を用いた「小糸在来」及び大豆在来系統、品種の多型検出

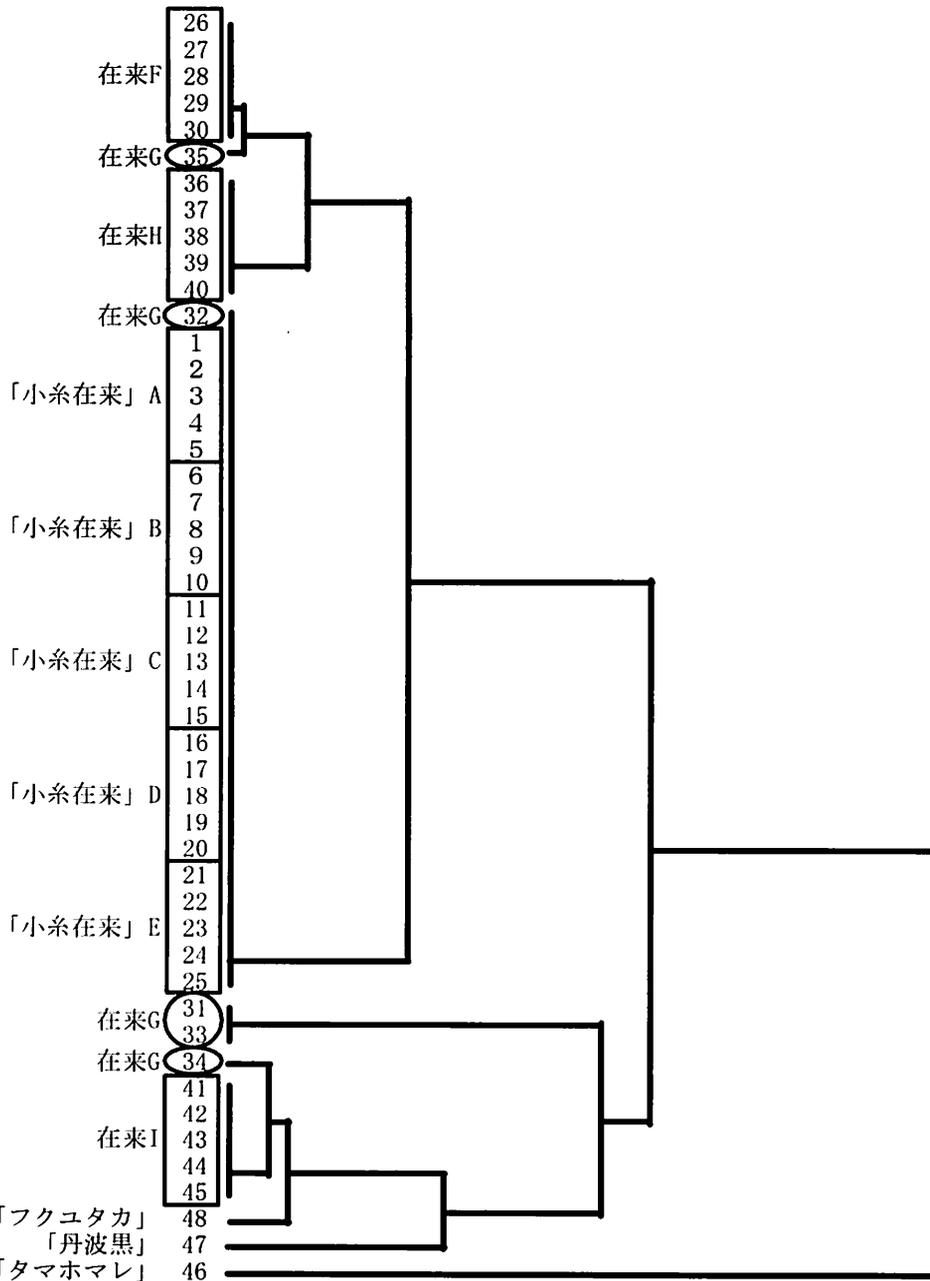
注1) M: 100bpマーカー 1~5:「小糸在来」A 6~10:「小糸在来」B 11~15:「小糸在来」C
16~20:「小糸在来」D 21~25:「小糸在来」E 26~30:在来F 31~35:在来G 36~40:在来H
41~45:在来I 46:「タマホマレ」 47:「丹波黒」 48:「フクユタカ」

2) →: 多型バンド

第3表 ISSR多型検出による「小糸在来」及び大豆在来系統、品種のバンドパターン

品種名・系統番号	プライマーNo./bp													
	2		4		6		8		10	11	12	15	17	
	1322	241	294	714	351	364	731	895	1253	1764	965	1108	242	930
「小糸在来」A	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
「小糸在来」B	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
「小糸在来」C	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
「小糸在来」D	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
「小糸在来」E	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-
在来F	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
在来G	+-	+	+-	+	+-	-	+	+-	-	-	+-	+-	+-	-
在来H	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
在来I	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
「タマホマレ」	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
「丹波黒」	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
「フクユタカ」	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+

注1) +: 増幅バンド有り -: 増幅バンド無し +-: 個体ごとに増幅バンドの有無が異なる



第2図 「小糸在来」及び大豆在来系統、品種のISSR多型を比較したクラスター解析（ウォード法）

今回得られた14個のISSR多型について各品種、系統のパターンを第3表に示した。君津地域で収集された「小糸在来」3系統と千葉県農業総合研究センターで保有する「小糸在来」2系統は、本研究で検出した14個の多型について同じパターンを示した。このことから、第3表に示した「小糸在来」のパターンは、「小糸在来」に特徴的なパターンであると考えられた。また、君津地域で収集された「小糸在来」と千葉県農業総合研究センターで保存されていた2系統は同一の系統である可能性が高いと判断された。

供試した全個体のISSR多型パターンについて、ウォード法によるクラスター分析を行った(第2図)。君津地域で収集された「小糸在来」3系統、15個体の多型パターンはすべて同じであり、これらは同質の集団であると判断された。最近隣法によるクラスター分析の結果では、ウォード法によるクラスター分析と比較してクラスター間の遺伝的距離に違いがあるものの、同様のクラスターを形成した(データ略)。

本研究で得られた「小糸在来」に特徴的な14個の多型パターンは他の多くの大豆品種、系統と確実に識別するには不十分と思われるが、「小糸在来」の系統維持、管理には活用できると判断した。また、大豆においてはISSR法により豊富な多型が得られることが判明したため、更にプライマー数を増やして解析することで、特異性を高めることができると考えられた。

IV 摘 要

千葉県君津地域を中心にこれまで伝統的に栽培されてきた「小糸在来」についてISSR法による多型解析を行い、同質性を確認した。

1. 2004年君津地域で収集された「小糸在来」3系統は同質の系統であると判断された。
2. 君津地域で2004年に収集された「小糸在来」と千葉県農業総合研究センターで1974年以降維持管理してきた「小糸在来」は同一の系統であると判断された。
3. 14個のISSR多型による「小糸在来」に特徴的な多型パターンを決定した。この情報は今後の系統維持管理の一助とできる。

V 引用文献

- 千葉県(2006). 千葉の園芸と農産. 48-56
- 黄建成・田辺賢二・板井章浩(2003).
ISSR分析によるハナハスの品種識別. 園学研. 2(4)
259-264
- 鈴木一男(2006). 千葉県内における大豆在来の特性評価. 千葉農総研セ研報. 5:55-63
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda(1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.

Genetic Homogeneity of 'Koitozairai', a Local Variety of Soybean, by ISSR Analysis

Fumi MAEDA, Taneaki TSUGANE, Shigeru SUZUKI and Koichi AOKI

Key words : soybean, local variety, Koitozairai, ISSR

Summary

We identified a genetic homogeneity of 'Koitozairai', a local variety of soybean was cultivated in Kimistu region, Chiba Prefecture by ISSR analysis.

1. Three 'Koitozairai' lines were collected in Kimistu region in 2004 were homogenous.
2. 'Koitozairai' lines which were collected in Kimistu region in 2004 and breeding material lines maintained by at Chiba prefectural agriculture research center since 1974 were homogenous.
3. The 14 ISSR analysis polymorphic bands established the characteristic polymorphism pattern of 'Koitozairai'. This report can be useful to keep uniform quality.