

2018年3月  
TG/120/4 2012-03-28 に準拠

# マカロニコムギ亜種

Durum Wheat

(*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.)

## マカロニコムギ亜種審査基準

### I. 審査基準の対象(Subject of these Guidelines)

この審査基準は、イネ科 (Poaceae) コムギ属 (*Triticum* L.) のマカロニコムギ亜種 (デュラム小麦) (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.) の全ての品種に適用する。

### II. 提出種苗(Material Required)

- i) 種苗の形態 種子
- ii) 提出時期 審査当局が指定する時期
- iii) 数量 300g

さらに、当局の要請があった場合は、穂を 100 本以上提出する。提出する種子は、発芽率、純度、含水量等保存に適したものであること。

- iv) 提出する種苗は、重要な病害虫に汚染されていない十分に健全なものであること。
- v) 提出種苗は審査当局が指示した場合を除き薬剤、その他の処理をしていないものであること。もし、処理が行われている場合はその処理の詳細について記載すること。

### III. 試験の実施(Conduct of Tests)

- i) 栽培条件 特性の確認が十分にできる正常な生育が可能な条件下で実施する。
- ii) 最低供試個体数 2,000 個体 (2 反復以上)
  - 穂列試験の場合 100 穂
  - まき性試験の場合 300 個体
- iii) 栽培期間 2 生育周期
- iv) 調査方法
  - 調査個体数 特に指示がない限り、植物体 20 個体又は各個体から採取した部分 20 個とする。  
なお、交雑品種については、植物体 200 個体以上を調査する。
  - 調査時期 特に指示がない限り、特性表の調査方法欄に記載した十進コードの時期に行う。
- v) 特別な試験 特別な条件下でのみ発現する特性があり、出願者が試験方法を添えて申告し、審査当局がそれに同意した場合は実施することがある。

### IV. 判定基準(Standards for decisions)

判定は、登録出願品種審査要領の区別性、均一性及び安定性 (DUS) 審査のための一般基準に基づくものとするが均一性の判定については以下のとおりとする。

「B」が付されている形質については、2000 個体で均一性を判定する。供試個体数が 2000 の場合、許容される異型個体数は 5 である (0.1%の母集団標準 (population standard) において 95%の受容確率 (acceptance probability) を適用する)。

「A」が付されている形質については、100 個体で均一性を判定する。供試個体、部分又は穂列数が 100 の場合、許容される異型個体又は穂列数は 3 である (1%の母集団標準 (population standard) において 95%の受容確率 (acceptance probability) を適用する)。

「A」が付されている形質については形質番号 1 を除いて、均一性の評価は 2 段階で

行うことができる。第1段階では、植物体20個体又は各個体から採取した部分20個を観察し異型個体が、観察されない場合は、均一性があると判断する。

3以上の異型個体が認められた場合は、均一性がないと判断する。1～3の異型個体が認められた場合は、植物体80個体又は各個体から採取した部分80個を追加して調査する。

#### V. グループ分けに使用する形質(Grouping of Varieties)

- i) 出穂期 (形質 4)
- ii) 草丈 (形質 11)
- iii) 護穎の外側表面の毛の有無 (形質 21)
- iv) 穂首直下の節間の髓の厚さ (形質 22)
- v) 芒の色 (形質 23)
- vi) 穂の着色 (形質 25)
- vii) 原麦粒のフェノール反応による着色 (形質 32)
- viii) まき性 (形質 34)

#### VI. 特性表で使用する記号の説明(Legend)

G : グループ分けに使用する形質

(\*) : 品種記載の国際調和のための必須調査形質

QL : 質的形質

QN : 量的形質

PQ : 擬似の質的形質

(+) : VIII. に特性表の説明図等を示す

MG : 区別性判定のため、植物体又は植物体の部分をグループで計測

MS : 区別性判定のため、個々の植物体又は植物体の部分を計測

VG : 区別性判定のため、植物体又は植物体の部分をグループで観察

VS : 区別性判定のため、個々の植物体又は植物体の部分を観察

A : 植物体 100 個体を調査

B : 植物体 2,000 個体を調査

C : 関連性を調べるための追加的な調査

網掛け (特性表のピンク色の部分) : 願書に添付する説明書 (種苗法施行規則第7条、別記様式第2号) に出願者が記載する特性及び階級値

#### 状態区分

質的形質及び擬似の質的形質の場合、全ての状態が特性表に記載してある。しかし、5階級以上の状態がある量的形質の場合、省略した状態が用いられることがある。例えば、9階級の状態による量的形質の場合、審査基準の状態は、以下のとおり略されることがある。

状態 (State)		階級 (Note)
(日本語)	(English)	
小	small	3
中	medium	5
大	large	7

しかし、以下の9階級の状態を品種の記述として使用できるが、その場合には適切に使用するよう留意する。

状態 (State)		階級 (Note)
(日本語)	(English)	
極小	very small	1
かなり小	very small to small	2
小	small	3
やや小	small to medium	4
中	medium	5
やや大	medium to large	6
大	large	7
かなり大	large to very large	8
極大	very large	9

VII. 特性表(Table of Characteristics)

形質番号	UPOV No.	記号	形質 (Characteristics)		定義	調査方法	階級	状態 (State)		標準品種 (Ex.Var.)	備考
			(日本語)	(English)				(日本語)	(English)		
1	1	QN (+)	子葉しょうのアントシアニンの着色	Coleoptile: anthocyanin coloration	本葉が出始めた時の子葉しょうのアントシアニン着色の強弱	観察 VG 09-11 C A	1 3 5 7	無又は極弱 弱 中 強	absent or very weak weak medium strong	Mv-Makaroni  Produra	
2	2	QN (* (+)	草姿	Plant: growth habit	第5～7分げつ期の株の姿	観察 VG 25-29 B	1 3 5 7 9	直立 半直立 開張 半ほふく ほふく	erect semi-erect intermediate semi-prostrate prostrate		
3	3	QN	反曲した止め葉を持つ個体の出現頻度	Plant: frequency of plants with recurved flag leaves	反曲した止め葉を持つ個体の出現頻度	観察 VG 50-51 B	1 3 5 7	無又は極低 低 中 高	absent or very low low medium high		
4	4	QN (* G	出穂期	Time of ear emergence	有効茎数の50%の穂の第1小穂が見えた期日	測定 月日 MG 50-51 B	1 2 3 4 5 6 7 8 9	極早 かなり早 早 やや早 中 やや晩 晩 かなり晩 極晩	very early very early to early early early to medium medium medium to late late late to very late very late	Produra Latino	

形質番号	UPOV No.	記号	形質 (Characteristics)		定義	調査方法	階級	状態 (State)		標準品種 (Ex.Var.)	備考
			(日本語)	(English)				(日本語)	(English)		
5	5	QN	止め葉の葉耳のアントシアニンの着色	Flag leaf: anthocyanin coloration of auricles	止め葉の葉耳のアントシアニン着色の強弱	観察 VG 55-59 A	1 3 5 7	無又は極弱 弱 中 強	absent or very weak weak medium strong		
6	6	QN (*)	止め葉の葉しよの白粉	Flag leaf: glaucosity of sheath	止め葉の葉鞘の白粉の強弱	観察 VG 55-65 B	1 3 5 7	無又は極弱 弱 中 強	absent or very weak weak medium strong		
7	7	QN (*)	止め葉の白粉	Flag leaf: glaucosity of lower side of leafblade	止め葉の葉身裏面の白粉の強弱	観察 VG 55-65 B	1 3 5 7	無又は極弱 弱 中 強	absent or very weak weak medium strong		
8	8	QN (+)	稈の最上部の節に着生する毛	Culm: density of hairiness of uppermost node	稈の最上部の節に着生する毛の粗密	観察 VG 55-69 B	1 3 5 7	無又は極粗 粗 中 密	absent or very weak weak medium strong		
9	9	QN (*)	穂首の白粉	Culm: glaucosity of neck	穂首の白粉の強弱	観察 VG 60-69 B	1 3 5 7	無又は極弱 弱 中 強	absent or very weak weak medium strong		
10	10	QN (*)	穂の白粉	Ear: glaucosity	穂の白粉の強弱	観察 VG 60-69 B	1 3 5 7	無又は極弱 弱 中 強	absent or very weak weak medium strong		

形質番号	UPOV No.	記号	形質 (Characteristics)		定義	調査方法	階級	状態 (State)		標準品種 (Ex.Var.)	備考
			(日本語)	(English)				(日本語)	(English)		
11	11	QN (* (+ G	草丈	Plant: length	植物体の先端までの高さ	測定 cm MG 75-92 B	3 5 7	低 中 高	short medium long		
12		QN	稈の長さ	Stem: length	地際部から穂の最下部までの長さ	測定 cm MG 75-92 B	3 5 7	短 中 長	short medium long		
13	12	PQ (+)	穂の芒の着生状態	Ear: distribution of awns	穂の芒の着生状態	観察 VG 75-92 B	1 2 3 4	芒なし 穂の先に着生 穂の半分に着生 全体に着生	awnless tip awned half awned fully awned		
14		QN	穂の先端の芒の長さ	Ear: length of awns or scurs at tip of ear	穂の先端の長芒又は短芒の長さ	測定 mm MS 75-92	3 5 7	短 中 長	short medium long		
15	13	QN (* (+)	芒の長さ	Ear: length of awns at tip relative to length of ear	穂と比較した芒の長さ	観察 VG 75-92 B	1 2 3	穂より短い 同等 穂より長い	shorter equal longer		

形質番号	UPOV No.	記号	形質 (Characteristics)		定義	調査方法	階級	状態 (State)		標準品種 (Ex.Var.)	備考
			(日本語)	(English)				(日本語)	(English)		
16	14	PQ (+)	護穎の形	Lower glume: shape	護穎の形	観察 VG 80-92 A	1 2 3	卵形 楕円形 狭楕円形	ovoid medium oblong narrow oblong		
17	15	PQ (+)	護穎の肩部の形	Lower glume: shape of shoulder	穂の中央部の小穂の護穎の肩部の形	観察 VG 80-92 A	1 2 3 4 5	下降 やや下降 水平 上昇 第2のくちばしあり	sloping rounded straight elevated elevated with a 2 <sup>nd</sup> beak		
18	16	QN (+)	護穎の肩部の幅	Lower glume: width of shoulder	穂の中央部の小穂の護穎の肩部の幅	観察 VG 80-92 A	3 5 7	狭 中 広	narrow medium broad		
19	17	QN	護穎のくちばしの長さ	Lower glume: length of beak	穂の中央部の小穂の護穎の先端くちばしの長さ	観察 VG 80-92 A	3 5 7	短 中 長	short medium long		
20	18	QN (+) G	護穎のくちばしの曲がり方	Lower glume: curvature of beak	穂の中央部の小穂の護穎のくちばしの曲がり方	観察 VG 80-92 A	1 3 5 7	無 弱 中 強	absent weak moderate strong		



形質番号	UPOV No.	記号	形質 (Characteristics)		定義	調査方法	階級	状態 (State)		標準品種 (Ex.Var.)	備考
			(日本語)	(English)				(日本語)	(English)		
21	19	QL (*)	護穎の外側表面の毛の有無	Lower glume: hairiness of external surface	穂の中央部の小穂の護穎の外側表面の毛(10倍程度のルーペを使用して観察)	観察 VG 80-92 A	1 9	無 有	absent present		
22	20	QN (*) (+) G	穂首直下の節間の髓の厚さ	Straw: pith in cross section	穂首節直下の節間の中央部の横断面の髓の厚さ	観察 VG 90-92 A	1 3 5	薄 中 厚	thin medium thick		
23	21	PQ (*) G	芒の色	Awn: color	芒の色	観察 VG 90-92 B	1 2 3 4	白 淡褐 紫 濃紫	white light brown medium purple dark purple		
24	22	QN (*)	穂の長さ	Ear: length (excluding awns)	芒を含まない穂の長さ	測定 cm MS 90-92 A	3 5 7	短 中 長	short medium long		
25	23	PQ (*) G	穂の着色	Ear: coloration	穂の着色	観察 VG 90-92 B	1 2 3	白 淡い 濃い	white slightly colored strongly colored		

形質番号	UPOV No.	記号	形質 (Characteristics)		定義	調査方法	階級	状態 (State)		標準品種 (Ex.Var.)	備考
			(日本語)	(English)				(日本語)	(English)		
26		QN	成熟期	Time of maturity	全穂数の80%の穂首部が黄化し、粒の硬さがろう程度になった日	観察 MG 91-92 B	3 5 7	早 中 晩	early medium late		
27		PQ	稈の色	Glume: color	完熟期の稈の色	観察 VG 91-92 A	1 2 3 4 5 6 7 8 9	淡黄 黄 黄褐 褐 赤褐 赤 赤紫 紫 濃紫	light yellow yellow yellowish brown brown reddish brown red reddish purple purple deep purple		
28	24	QN (* (+)	穂の粒着の粗密	Ear: density	穂の粒着の粗密	観察/ 測定 VG/ MS 92 A	3 5 7	粗 中 密	lax medium dense		
29	25	QN (* (+)	原麦粒の刷毛の長さ	Grain: length of brush hair	原麦粒の刷毛の長さ	観察 VG 92 A	1 3 5	短 中 長	short medium long		

形質番号	UPOV No.	記号	形質 (Characteristics)		定義	調査方法	階級	状態 (State)		標準品種 (Ex.Var.)	備考
			(日本語)	(English)				(日本語)	(English)		
30	26	QN (+)	原麦粒の形	Grain: shape	原麦粒の形	観察/ 測定 VG/ MS 92 A	1 2 3	やや細長い 細長い かなり細長い	slightly elongated moderately elongated strongly elongated		
31		PQ	原麦粒の色	Grain: color	原麦粒の色	観察 VG 92 A	1 2	白 赤	white red		
32	27	QN (* (+) G	原麦粒のフェノール反応による着色	Grain: coloration with phenol	原麦粒のフェノール反応による着色	観察 VG 92 C	1 3 5 7	無又は極淡 淡 中 濃	absent or very light light medium dark	Produra	
33		QN	千粒重	1000 grain weight	原麦粒の千粒の重さ	測定 g MG 92	3 5 7	小 中 大	low medium high		
34	28	PQ (* (+) G	まき性	Plant: seasonal type	まき性	観察 VG C	1 2 3	秋まき型 中間型 春まき型	winter type alternative type spring type		

形質番号	UPOV No.	記号	形質 (Characteristics)		定義	調査方法	階級	状態 (State)		標準品種 (Ex.Var.)	備考
			(日本語)	(English)				(日本語)	(English)		
電気泳動法を用いる形質 (35-36) Characteristics derived by using Electrophoresis (グルテニン組成 Glutenin composition)						検定					
35		QL (+)	Glu-A1 遺伝子座にある対立遺伝子の発現	Allele expression at locus Glu-A1	Glu-A1 遺伝子座にある対立遺伝子の発現		1 2 3	バンド 1 バンド 2 バンド無し	band 1 band 2 no band		
36		QL (+)	Glu-B1 遺伝子座にある対立遺伝子の発現	Allele expression at locus Glu-B1	Glu-B1 遺伝子座にある対立遺伝子の発現		1 2 3 4 5 6 7 8 9	バンド 6+8 バンド 7+8 バンド 7+9 バンド 7 バンド 13+16 バンド 14+15 バンド 17+18 バンド 20 バンド 6.1+22	bands 6+8 bands 7+8 bands 7+9 bands 7 bands 13+16 bands 14+15 bands 17+18 bands 20 bands 6.1+22		

## VIII. 特性表の説明(Explanations on the Table of Characteristics)

形質1 子葉しょうのアントシアニンの着色

Char.1 Coleoptile: anthocyanin coloration

アントシアニン着色程度の調査方法

供試粒数 100粒

粒の準備 休眠していない粒をシャーレ内の湿潤ろ紙上に置床し発芽させる。

試験場所 実験室又は温室内

光条件 子葉しょうが約1cmになるまでは暗黒条件下で、その後、3～4日15,000Luxの連続光条件下。

温度 15～20℃

調査時期 子葉しょうが十分に生育した時期(約1週間)生育コード表の09-11

階級値調査 特性表の形質1参照。

注 区別性の試験には、判定の指標として少なくとも2以上の標準品種を含めること。

### Method for the Determination of Anthocyanin Coloration

Number of grains per test: 100 grains

Preparation of grains: Set up non-dormant grains on moistened filter paper covered with a Petri dish lid during germination

Place: Laboratory or greenhouse

Light: After the coleoptiles have reached a length of about 1 cm in darkness, they are placed in artificial light (daylight equivalent), at 15,000 lux continuously for 3 - 4 days

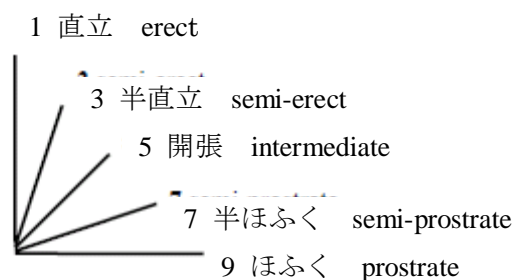
Temperature: 15 to 20℃

Time of recording: Coleoptiles fully developed (about 1 week) at stage 09-11

Scale of recording: See characteristic 1 in the Table of Characteristics

Note: At least two of the example varieties should be included as a control when testing for distinctness.

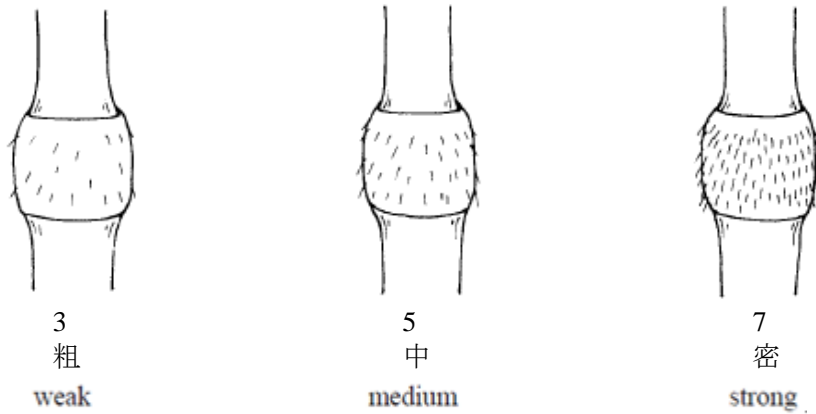
形質2 草姿 Char.2 Plant: growth habit



草姿は葉と分けつの状態の観察による。外側の葉と分けつが仮想の垂直軸と作る角度を用いる。

The growth habit should be assessed visually from the attitude of the leaves and tillers. The angle formed by the outer leaves and the tillers with an imaginary vertical axis should be used.

形質 8 稈の最上部の節に着生する毛  
 Char.8 Culm:density of hairiness of uppermost node



形質 11 草丈

Char.11 Plant: length

草丈は、植物体の地際から最も高い芒の先端までを測定する。  
 Plant length should be measured including stem, ear and awn. The length is taken from the base of the plant to the tip of the highest awn.

形質 13 穂の芒の着生状態

Char.13 Ear: distribution of awns



1  
芒なし  
awnless

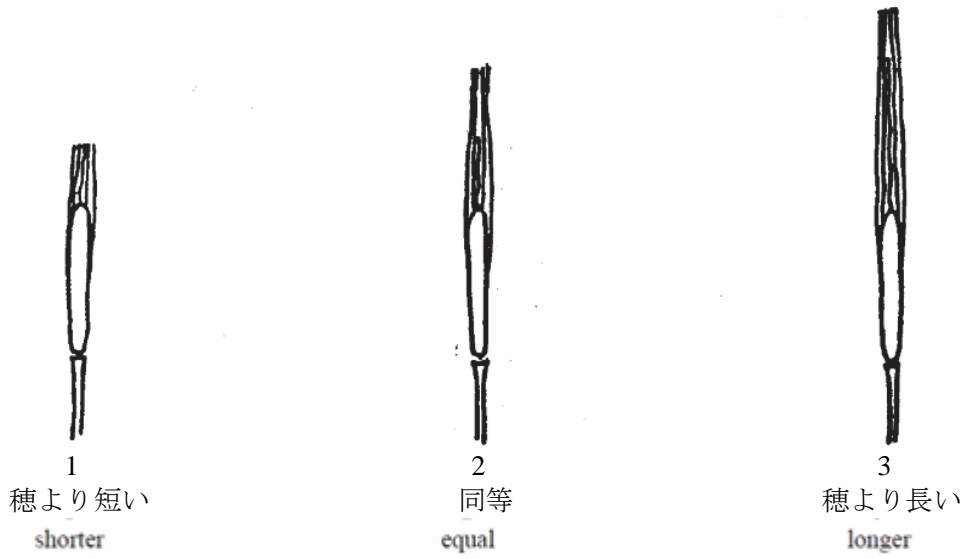
2  
穂の先に着生  
tip awned

3  
穂の半分に着生  
half awned

4  
全体に着生  
fully awned

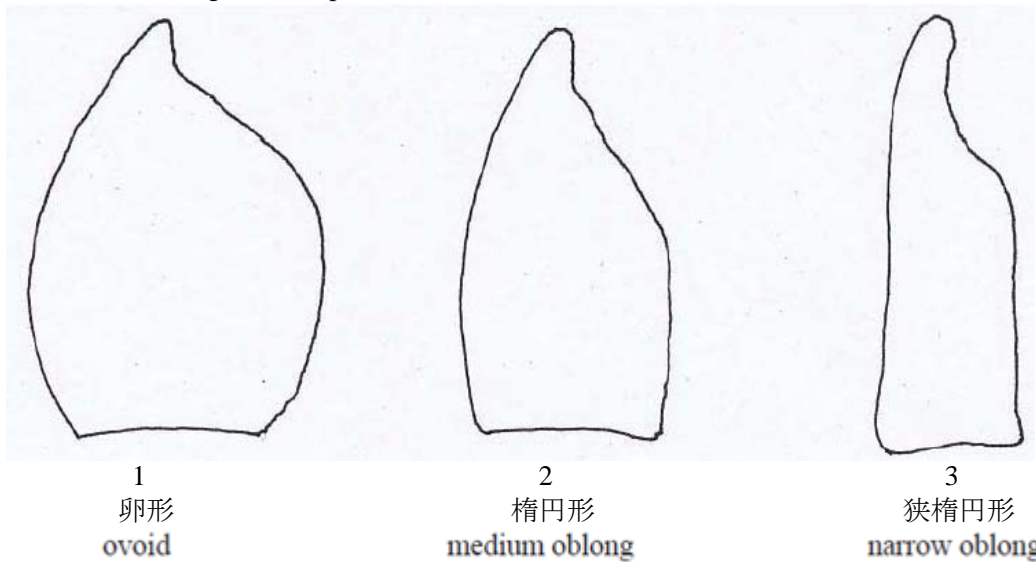
形質 15 芒の長さ

Char.15 Ear: length of awns at tip relative to length of ear



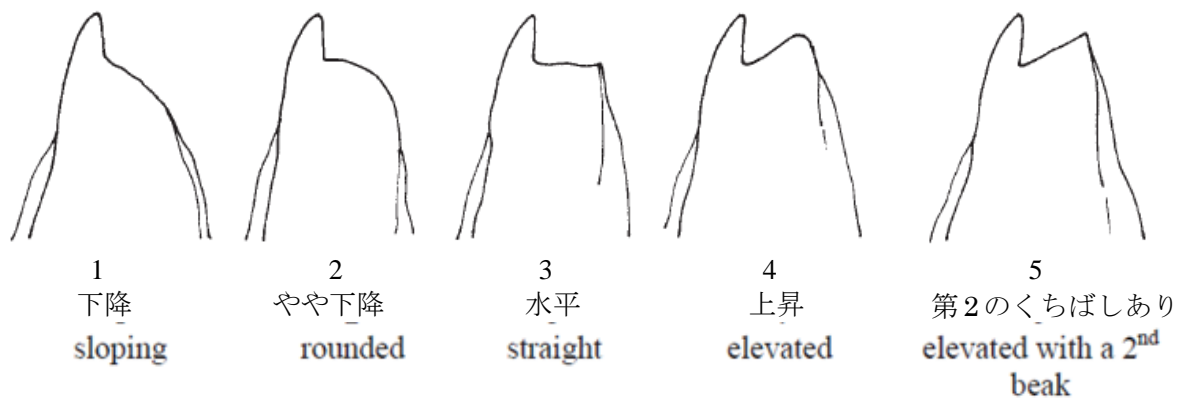
形質 16 護穎の形

Char.16 Lower glume: shape

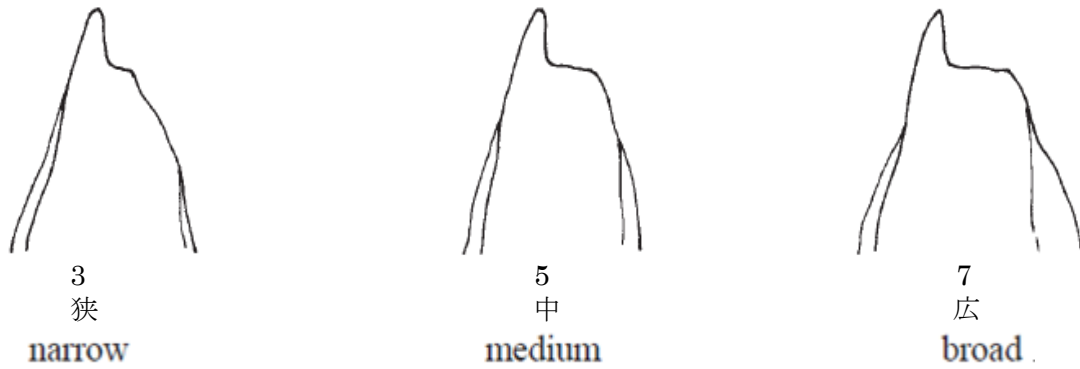


形質 17 護穎の肩部の形

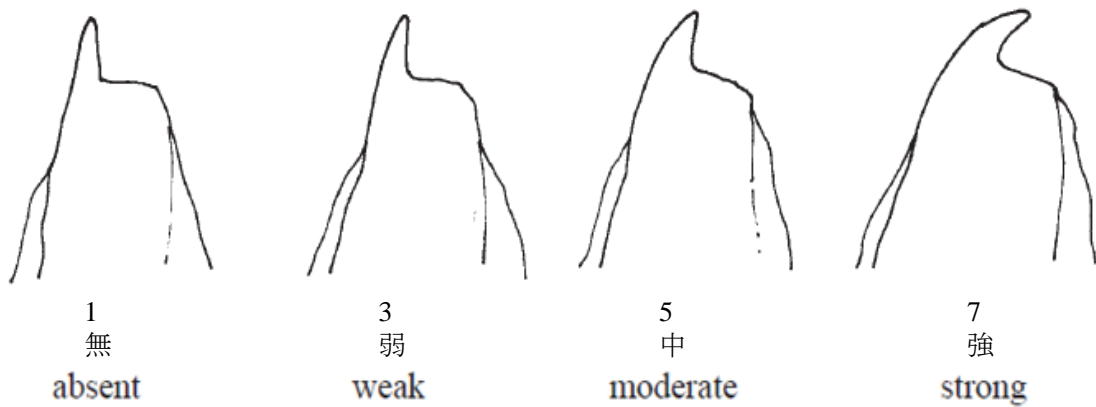
Char.17 Lower glume: shape of shoulder



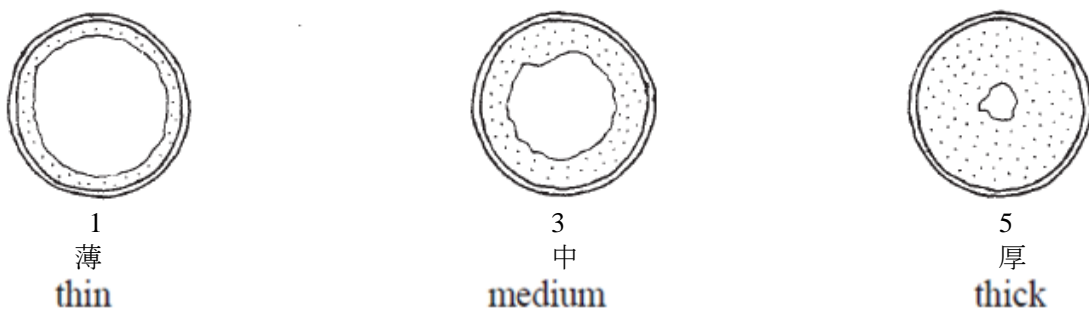
形質 18 護穎の肩部の幅  
Char.18 Lower glume: shoulder width



形質 20 護穎のくちばしの曲がり方  
Char.20 Lower glume: curvature of beak



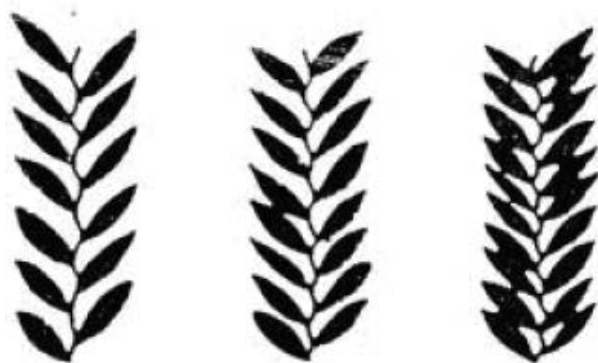
形質 22 穂首直下の節間の髓の厚さ  
Char.22 Straw: pith in cross section



穂首直下の節間の髓の厚さを観察  
The pith in cross section should be observed half way between base of ear and stem node below.



形質 28 穂の粒着の粗密  
Char.28 Ear: density



3  
粗

**lax**

5  
中

**medium**

7  
密

**dense**

粒着粗密は、小穂の数／穂の長さの割合で決定する。高い割合は高い密度を示す。  
Ear density can be determined by counting the number of spikelets and then dividing the number by the ear length. The higher ratio will indicate a higher density.

形質 29 原麦粒の刷毛の長さ  
Char.29 Grain: length of brush hair



1  
短

**short**

3  
中

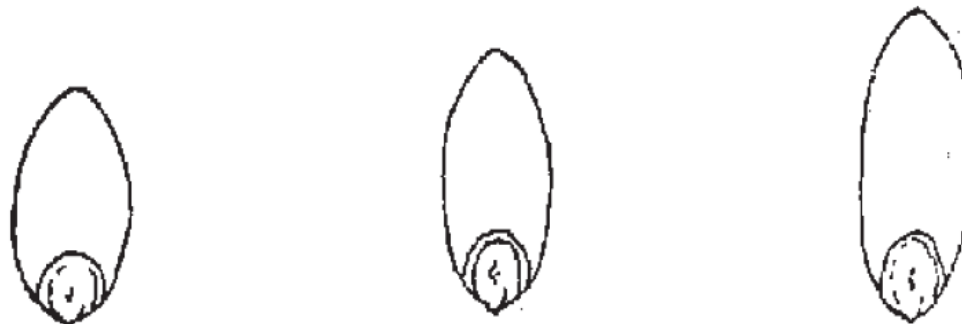
**medium**

5  
長

**long**

10倍程度のルーペを使用し、原麦粒の背側から先端を観察  
Observations should be made with a hand lens (x10 magnification). Brush hair length is viewed from the top of the grain on the dorsal side and can be described in the following ways:

形質 30 原麦粒の形  
Char.30 Grain: shape



1

やや細長い  
**slightly elongated**

2

細長い  
**moderately elongated**

3

かなり細長い  
**strongly elongated**

形質 32 原麦粒のフェノール反応による着色

Char.32 Grain: coloration with phenol

フェノール反応の方法

供試粒数	100 粒 (無処理の粒を使用すること)
調整	16-20 時間流水に浸した後、表面の水を除去し、縦溝を下にして蓋付きシャーレ (直径 9cm 程度) に置床
試薬の作成	1 %フェノール溶液(試験ごとに作成)
試薬の量	粒のおおむね 3/4 を浸す
試験場所	実験室
光条件	直射の当たらない自然光下
温度	18-20°C
調査時期	浸漬後 4 時間
階級値調査	特性表の形質 32 を参照
注	着色ありの判定の指標として普通小麦の農林 61 号を「5 中」として比較することができる。

#### Method for Determination of Phenol Reaction

Number of grains per test	100 grains for distinctness and uniformity. The grains should not have been treated chemically.
Equipment	Petri dishes (approx. 9 cm diameter).
Preparation of grains	Soak in tap water for 16 to 20 hours, drain and remove surface water, place the grains with crease downwards, cover dish with lid.
Concentration of solution	1 per cent Phenol-solution (freshly made up).
Amount of solution	The grains should be about 3/4 covered.
Place	Laboratory
Light	Daylight - out of direct sunshine.
Temperature	18 to 20°C.
Time of recording	4 hours (after adding solution).
Scale of recording	See characteristic 27 in the Table of Characteristics.

形質 34 まき性

Char.34 Plant: seasonal type

調査のため、標準品種を加えて全ての品種を春まきする。  
最も遅い春まき品種が完全に成熟した時期 (十進コード表のステージ 91/92 に達したとき) に、供試した各品種の状態を調査する。各タイプの状態は以下に示す。

秋まき型	最大で十進コード表のステージ 45 (穂ばらみ期) に達していない。
中間型	十進コード表のステージ 45 を超えて、原則としてステージ 75 以上になり、ステージ 90 を超えない。
春まき型	十進コード表のステージ 90 を超える。

The seasonal type should be assessed on one or several plots sown in springtime. At the time when the latest spring type variety is fully mature (growth stage 91/92 of the

Zadoks decimal code), the growth stage reached by the respective variety should be assessed. The states of expression are defined as follows:

Winter type: The plants have not exceeded stage 45 of the Zadoks decimal code (boots swollen).

Alternative type: The plants have exceeded stage 45 of the Zadoks decimal code --- as a rule they have exceeded stage 75 --- and have not exceeded stage 90.

Spring type: The plants have exceeded stage 90 of the Zadoks decimal code.

形質 35-36 電気泳動法の説明 Char.35-36 Description of the method to be used

#### 1. 器具と設備

(略)

#### 2. 試薬

アクリルアミド (電気泳動用に特別に精製したもの)

ビスアクリルアミド (同上)

TRIS (トリスヒドロキシメチルアミノメタン)

SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)

APS (過硫酸アンモニウム)

メルカプトエタノール

TEMED (テトラメチルサイレンジアミン)

TCA (クエン酸)

塩酸

氷酢酸

グリシン

ブタノール

ピロニンY (またはG)

グリセリン

メタノールまたはエタノール

クマシーブリリアントブルーR-250

クマシーブリリアントブルーG-250

#### 3.2 電気泳動 (通電) 用緩衝液

##### 保存液

グリシン 141.1g と TRIS 30.0g、SDS 10.0g に蒸留水を加えて 1 l とする。

使用直前に、保存液を蒸留水で 1 : 10 に希釈する。

保存緩衝液は室温で 2 か月保存が可能である。希釈緩衝液は 1 週間以上おかないこと。

緩衝液の pH は 8.3 近くとする。

#### 3.3 ゲル調製液

##### 3.3.1 分解用ゲルの保存緩衝液 (1 M TRIS 塩酸、pH 8.8)

TRIS 121.14 g と塩酸 (d=1.19) 20ml に蒸留水を加えて 1 l とする。この緩衝液は 4 °C で 2 か月保存が可能である。

##### 3.3.2 スタッキングゲル保存緩衝液 (1 M TRIS 塩酸、pH 6.8)

TRIS 121.14 g と塩酸 78ml に蒸留水を加えて 1 l とする。この緩衝液は 4 °C で 2 か月保存が可能である。

##### 3.3.3 10% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム液

SDS 10g を蒸留水に溶かして 100ml とする。この保存液は 4 °C で 2 か月保存が可能である。使用に先立って、SDS が結晶化していたら、攪拌してゆるやかに温めて SDS を溶解させる。

### 3.3.4 1%(w/v)過硫酸アンモニウム液

APS 1g を蒸留水に溶かして 100ml とする。この溶液は使用直前に作る。

### 3.3.5 アクリルアミド保存液

アクリルアミド 40.02g に蒸留水を加えて 100ml とする。

### 3.3.6 ビスアクリルアミド保存液

ビスアクリルアミド 0.5198g に蒸留水を加えて 130ml とする。

## 3.4 染色液

3.4.1 クマシーブリリアントブルーG-250 0.25g とクマシーブルリリアントブルーR-250 0.75g に蒸留水を加えて 100ml とする。

3.4.2 TCA 55g と氷酢酸 65ml、メタノールまたはエタノール 180ml、3.4.1 液 25ml に蒸留水を加えて 1 l とする。

## 4. 方法

### 4.1 蛋白質の抽出

#### 4.1.1 グルテニンのみの抽出

種子をハンマー（他の道具でも可）で粉砕する。粉と、希釈した試料抽出緩衝液(3.1.1)を、ねじ蓋か密閉蓋のついた 3ml 容量のポリエチレン製血液遠心分離用チューブの中に入れて混ぜる。粉と抽出緩衝液の割合は、59mg/0.75ml とする。試料抽出は室温で 2 時間かかる。その間に数回、ボルテックスミキサーにかけて攪拌し、そののち、沸騰させた湯煎器で 10 分間温存させて冷却する。チューブを 18000 g で 5 分間遠心分離する。

#### 4.1.2 グリアジンに引き続くグルテニンの抽出

グルテニンとグリアジンを同じ麦粒から分析できる。グリアジン抽出のため、はじめに粉砕粉（1 粒または半粒）と A 液(3.1.2) 0.25ml をマイクロ滴定板かマイクロ遠沈管に入れて、室温で一晩培養する。次にグルテニン抽出のために、粉砕粉に B 液(3.1.2) 0.5ml を加えて、室温で一晩培養する。

泳動しようとする抽出物の量はゲルの厚さや泳動槽の大きさによって異なる。一般には、10 $\mu$ l ないし 25 $\mu$ l あれば十分である。

### 4.2 ゲルの準備

用いる装置のデザインに従って、清潔で十分に乾燥したゲルカセットを組み立てる。カセットのシールにテープを用いるときは、テープがなれてよく着くよう、少なくとも使用する 1 日前に装置を組み立てるとよい。

#### 4.2.1 分解用ゲル（10%アクリルアミド、pH 8.8）

二枚垂直型ゲル（180mm $\times$ 160mm $\times$ 1.5mm）を作成するため、アクリルアミド保存液(3.3.5) 20ml とビスアクリルアミド保存液(3.3.6) 26ml、ゲル保存液(3.3.1) 30ml を室温で混合する。混合液は 100ml のブフナーフラスコ内で 2 分ないし 3 分かけて空気抜きする。これに、APS(3.3.4) 2ml と SDS(3.3.3.) 0.8ml、TEMED 40 $\mu$ l（瓶から直接用いる）を加える。次に、空気泡を立てないようにゲルを注意深く注入して、室温に置いて重合させる。

ゲルカセットは満杯にせず、3cm ないし 4cm のスタッキングゲルのために空気を残しておく。ゲルの表面にはピペットを用いてブタノール（または蒸留水）で注意深く覆う。30 分ほどで重合が終わるので、ゲル表面を蒸留水で注意深くすすぎ、ろ紙で乾かす。

#### 4.2.2 分解用ゲル (7%アクリルアミド、pH 8.8)

サブユニット 2 および 2\* を調製するため、7%濃度のアクリルアミドが必要である。

二枚垂直型ゲル (180mm×160mm×1.5mm) を作製するため、アクリルアミド保存液(3.3.5) 14ml と蒸留水 6ml、ビスアクリルアミド保存液(3.3.6) 26ml、ゲル保存液(3.3.1) 30ml を室温で混合する。混合液は 100ml のブフナーフラスコ内で 2 分ないし 3 分かけてガス抜きする。これに、A P S (3.3.4) 2ml と S D S (3.3.3.) 0.8ml、T E M E D 40 $\mu$ l (瓶から直接用いる) を加える。次に、空気泡を立てないようにゲルを注意深く注入して、室温に置いて重合させる。

ゲルカセットは満杯にせず、スタッキングゲルのために 3cm ないし 4cm の空気を残しておく。ゲルの表面にはピペットを用いてブタノール (または蒸留水) で注意深く覆う。30 分ほどで重合が終わるので、ゲル表面を蒸留水で注意深くすすぎ、ろ紙で乾かす。

#### 4.2.3 スタッキングゲル (3%のアクリルアミド、pH 6.8)

50ml のブフナーフラスコにアクリルアミド保存液(3.3.5) 1.50ml とビスアクリルアミド保存液(3.3.6) 2.15ml、ゲル緩衝保存液(3.3.2) 2.50ml、の蒸留水 13.15ml を入れて混合する。空気抜きののち、これに A P S (3.3.4) 0.75ml との S D S (3.3.3) 0.2ml、T E M E D 15 $\mu$ l (瓶から直接入れる) を加える。

これを注意深く混合したら直ちに、スタッキングゲルをゲルカセットの上端まで注ぎ入れる。空気泡を立てないようにサンプルコウムを挿入して、室温で 2 時間重合させる。そののちコウムをゲルカセットから静かに抜いて、希釈泳動緩衝液(3.2)で泳動槽をすすぐ。

### 4.3 電気泳動

タンクに適量の通電用緩衝液(3.2)を満たし、15°Cに冷却する。試料投入ののち、ピロニン Y/G がスタッキングゲルを動き出すまで 8mA/cm<sup>2</sup> (差し渡し部分) の定常電流で電気泳動を行い、さらにマーカーがゲルの下端に達するまで 16mA/cm<sup>2</sup> (最大電圧 300V) で泳動を続ける。温度は常に 15°Cを維持する。

### 4.4 固定および染色

ゲルカセットをタンクから取り出して開き、ゲルを 15%(w/v) T C A 250ml の液内で少なくとも 30 分間固定させる。ゲルを蒸留水ですすぎ、染色液(3.4.2) 250ml を用いて室温で一晩染色する。脱色は必ずしも必要ないが、ゲルはポリエチレン袋に密閉保存する前に蒸留水で洗う。

他の染色法も利用できる (たとえば、コマシーブリリアントブルー G や同濃度の T C A のみで)。ゲルの調製・染色のための最終的な品質調節条件は、ゲルに現れた標準品種を解析して決めるとよい。標準バンドの分離と電気泳動の相対移動度 (分子量) が十分満足できるほどに明瞭でなければならない。

#### グルテニン対立遺伝子の識別

この表は、上記の対立遺伝子を説明できるように、また、異なるバンドを識別する際に手助けとなるように構成してある。ここには、品種 Courtot に見られる対立遺伝子と比較して、各遺伝子座にあるすべてのグルテニンバンドの位置と分子量が描かれている。また、Payne の命名によるバンド数とともに、Payne・Lawrence (1983) に基づく各対立遺伝子に与えられる文字もつけられている。

形質 35 Glu-A1 遺伝子座にある対立遺伝子の発現  
 Char.35 Allele expression at locus Glu-A1

**Glu-A1 locus**

		Example Variety (Courtot)		Note		
				1 (a)	2 (b)	3 (c)
1	(113)---			1---		
2/2*	(108)---	2/2*---		2*---	n (no band)	
3	(107)---					
4	(106)---					
5	(105)---					
6	(100)---					
6.1	(99)---					
7	(98)---	7---				
13/14/ 20	(94)---					
15	(91)---					
16/	(90)---					
17/18	89.5)					
22	(87)---					
8	(86)---	8---				
9/10	(83)---					
12	(80)---	12---				

形質 36 Glu-B1 遺伝子座にある対立遺伝子の発現  
 Char.36 Allele expression at locus Glu-B1

Glu-B1 locus

	Example variety (Courtot)	Note								
		1 (d)	2 (b)	3 (c)	4 (a)	5 (f)	6 (h)	7 (i)	8 (e)	9
1	(113)---									
2/2*	(108)---	2/2*---								
3	(107)---									
4	(106)---									
5	(105)---									
6	(100)---		6---							
6.1	(99)---									6.1---
7	(98)---	7---	7---	7---	7---					
13/14/ 20	(94)---					13---	14---		20---	
15	(91)---						15---			
16/ 17/18	(90)--- (89.5)---					16---		17/18---		
22	(87)---									22---
8	(86)---	8---	8---	8---						
9/10	(83)---				9---					
12	(80)---	12---								

穀物の生育ステージに関する十進コード表

*The descriptions of the growth stages of the Zadoks decimal code for cereals (Zadoks et al., 1974)*

Zadoks	説明
Decimal code	
00	乾燥種子 Dry seed
01	吸水開始 Start of imbibition
03	吸水完了 Imbibition complete
05	種子から幼根の出現 Radicle emerged from seed
07	種子から鞘葉の出現 Coleoptile emerged from seed
09	鞘葉先端に葉がのぞく Leaf just at coleoptile tip
10	鞘葉から第1葉が出現 First leaf through coleoptile
11	第1葉の展開 First leaf unfolded
12	第2葉の展開 2 leaves unfolded
13	第3葉の展開 3 leaves unfolded
14	第4葉の展開 4 leaves unfolded
15	第5葉の展開 5 leaves unfolded
16	第6葉の展開 6 leaves unfolded
17	第7葉の展開 7 leaves unfolded
18	第8葉の展開 8 leaves unfolded
19	第9葉の展開 9 or more leaves unfolded
20	主茎のみ Main shoot only
21	主茎及び第1分げつ Main shoot and 1 tiller
22	主茎及び第2分げつ Main shoot and 2 tillers
23	主茎及び第3分げつ Main shoot and 3 tillers
24	主茎及び第4分げつ Main shoot and 4 tillers
25	主茎及び第5分げつ Main shoot and 5 tillers

26	主茎及び第6分げつ Main shoot and 6 tillers
27	主茎及び第7分げつ Main shoot and 7 tillers
28	主茎及び第8分げつ Main shoot and 8 tillers
29	主茎及び第9又はそれ以上の分げつ Main shoot and 9 or more tillers
30	偽茎の立ち上がり Pseudo stem erection
31	第1節が認められる 1st node detectable
32	第2節が認められる 2nd node detectable
33	第3節が認められる 3rd node detectable
34	第4節が認められる 4th node detectable
35	第5節が認められる 5th node detectable
36	第6節が認められる 6th node detectable
37	止め葉が認められる Flag leaf just visible
39	Flag leaf ligule/collar just visible
40	-
41	止め葉の鞘葉の伸展 Flag leaf sheath extending
45	穂ばらみ Boots just swollen
47	止め葉の鞘葉の開裂 Flag leaf sheath opening
49	最初の芒が認められる First awns visible
50	第1小穂が認められる First spikelet of inflorescence visible
53	穂の1/4出穂 1/4 of inflorescence emerged
55	穂の1/2出穂 1/2 of inflorescence emerged
57	穂の3/4出穂 3/4 of inflorescence emerged



59	出穂完了期 Emergence of inflorescence completed
60	開花始め Beginning on anthesis
65	半分開花 Anthesis half-way
69	開花完了 Anthesis completed
70	-
71	穎果に水分が満ちる Kernel watery ripe
73	乳熟初期 Early milk
75	乳熟中期 Medium milk
77	乳熟後期 Late milk
80	-
83	糊熟前期 Early dough
85	糊熟中期 Soft dough
87	糊熟後期 Hard dough
90	-
91	穎果が硬化（親指の爪で割るこ とが困難） Kernel hard (difficult to divide with thumbnail)
92	穎果が硬化（親指の爪で窪みが つかない） Kernel hard (no longer dented with thumbnail)
93	穎が日中緩む Kernel loosening in daytime
94	過熟、茎の枯れ上がり及び倒伏 Overripe, straw dead and collapsing
95	種子の休眠 Seed dormant
96	完熟種子の発芽力が 50% Viable seed giving 50% germination
97	種子休眠がとける Seed not dormant
98	2次休眠の誘発 Secondary dormancy induced
99	2次休眠の消失 Secondary dormancy lost

