

2023 年 04 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.) 及びその交雑種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
ただし、区別性、均一性の結果が明確な場合には、2 生育周期目を省略することができる。
- 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、審査当局がこ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、品種登録出願審査等要領の区別性、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。

なお、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。母集団標準 0.1%、受容確率 95%を適用し、UPOV の TGP 8 文書の 8.1.10 節の図表 7 により判定する。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。

「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。母集団標準 1 %、受容確率 95%を適用し、UPOV の TGP 8 文書の 8.1.10 節の図表 5 により判定する。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。

「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) : 区別性審査の計画において特に有用な形質

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、以下のとおりに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 中間 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 セトデュール 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	セトデ [®] ユール	
6	6	QN (*)	止め葉の葉しょうの白粉	Flag leaf: glaucosity of sheath	止め葉の葉鞘の白粉の強弱	観察 VG 55-65 B	1 2 3 4 5 6 7 8 9	無又は極弱 かなり弱 弱 やや弱 中 やや強 強 かなり強 極強	absent or very weak very weak to weak weak weak to medium medium medium to strong strong strong to very strong very strong	セトデ [®] ユール	
7	7	QN (*)	止め葉の白粉	Flag leaf: glaucosity of lower side of leaf blade	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		

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)		
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	セトデ [®] ユール	
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	1 2 3 4 5 6 7 8 9	極低 かなり低 低 やや低 中 やや高 高 かなり高 極高	very short very short to short short short to medium medium medium to long long long to very long very long	セトデ [®] ユール	
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	1 2 3 4 5 6 7 8 9	極短 かなり短 短 やや短 中 やや長 長 かなり長 極長	very short very short to short short short to medium medium medium to long long long to very long very long	セトデ [®] ユール	

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)		
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	セトデュール	
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	1 2 3 4 5 6 7 8 9	極短 かなり短 短 やや短 中 やや長 長 かなり長 極長	very short very short to short short short to medium medium medium to long long long to very long very long	セトデュール	
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		
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		

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)		
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 nd 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	セトデ ^{登録} ユール	
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		
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	セトデ ^{登録} ユール	

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)		
22	20	QN (*) (+) G	穂首直下の節間の髄の厚さ	Straw: pith in cross section	穂首節直下の節間の中央部の横断面の髄の厚さ	観察 VG 90-92 A	1 2 3 4 5	薄 やや薄 中 やや厚 厚	thin thin to medium medium medium to thick thick	セトデ ^{登録} ユール	
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	セトデ ^{登録} ユール	
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	セトデ ^{登録} ユール	
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	セトデ ^{登録} ユール	
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	セトデ ^{登録} ユール	

形質 番号	U P O V 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)		
27		PQ	稃の色	Glume: color	完熟期の稃の色	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	セトデ [®] ユール	
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	セトデ [®] ユール	
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	セトデ [®] ユール	
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	セトデ [®] ユール	

形質 番号	U P O V 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)		
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	セトデ [®] ユール	
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 セトデ [®] ユール 農林 61 号	
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	セトデ [®] ユール	
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	セトデ [®] ユール	

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		選択 形質
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		選択 形質

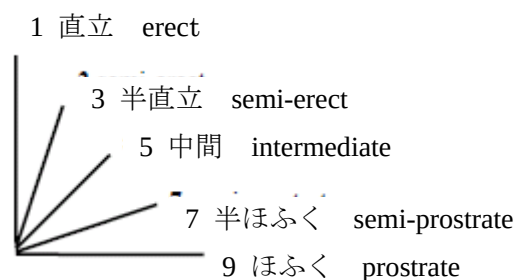
Ⅷ. 特性表の説明(Explanations on the Table of Characteristics)

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 1 cm 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。

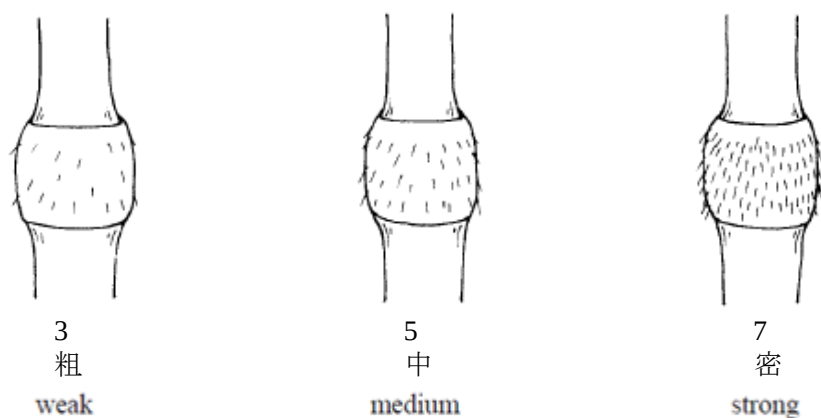
形質2 草姿 Char.2 Plant: growth habit



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

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。

形質 13 穂の芒の着生状態 Char.13 Ear: distribution of awns



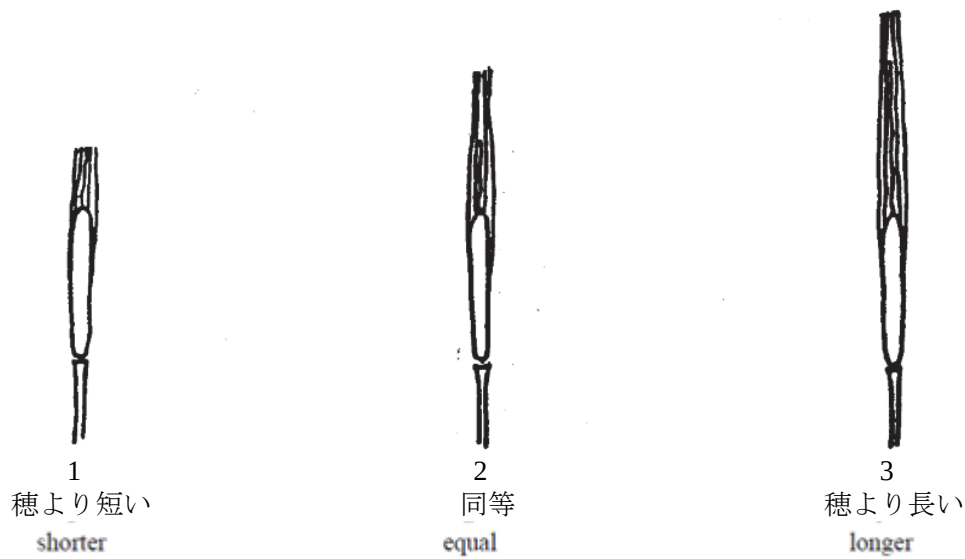
1
芒なし
awnless

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

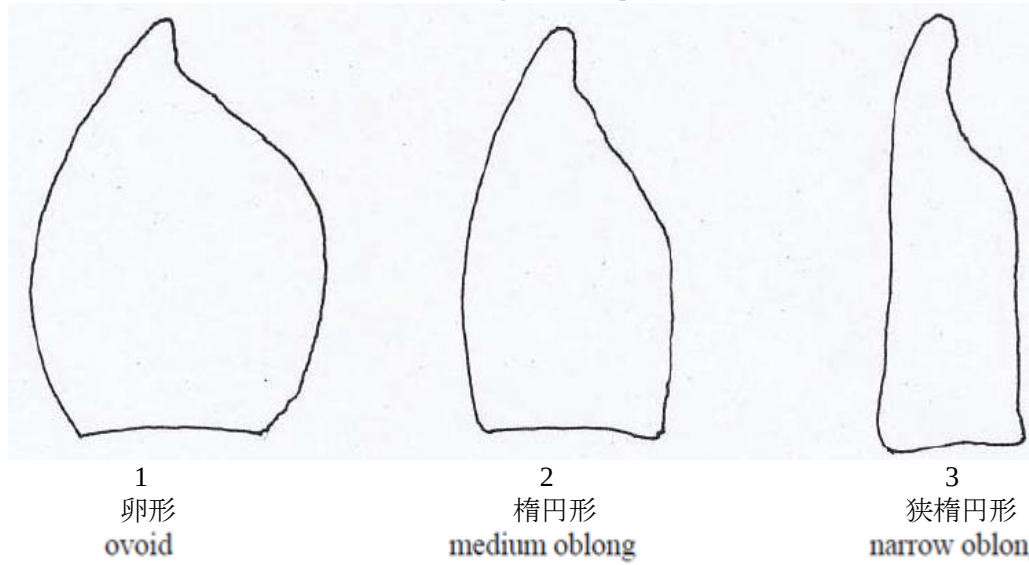


1
穂より短い
shorter

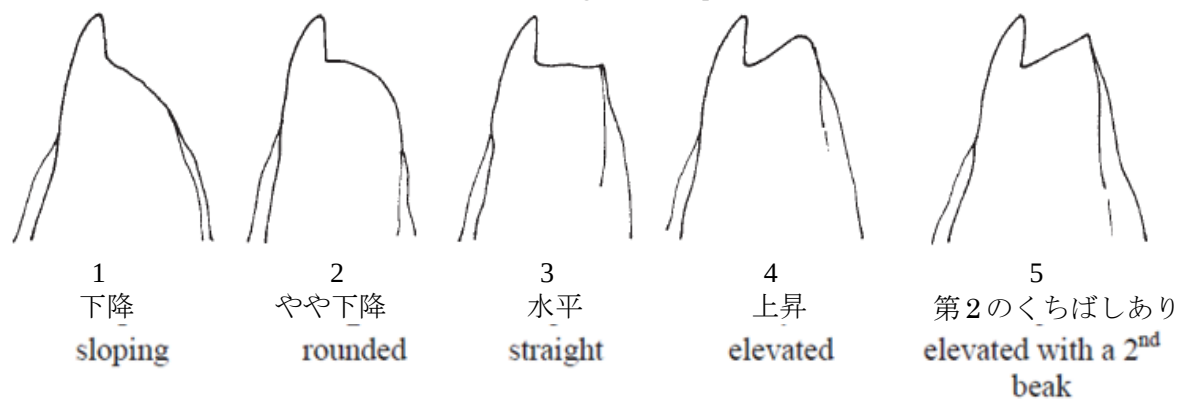
2
同等
equal

3
穂より長い
longer

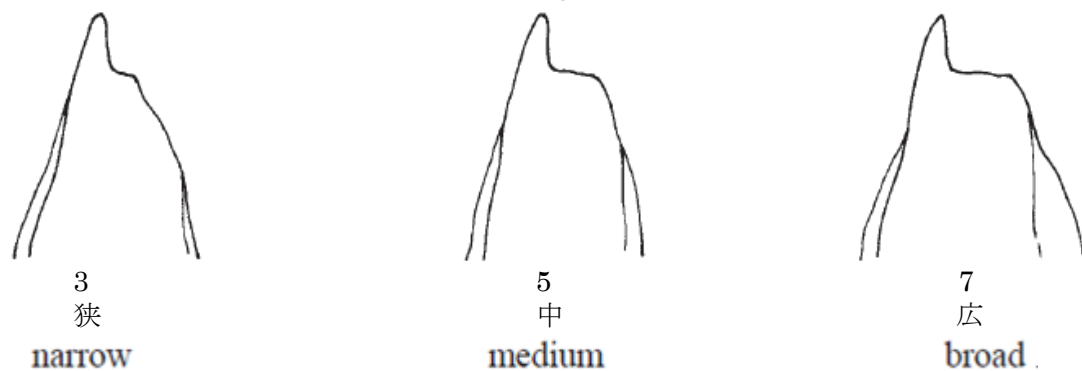
形質 16 護穎の形 Char.16 Lower glume: shape



形質 17 護穎の肩部の形 Char.17 Lower glume: shape of shoulder

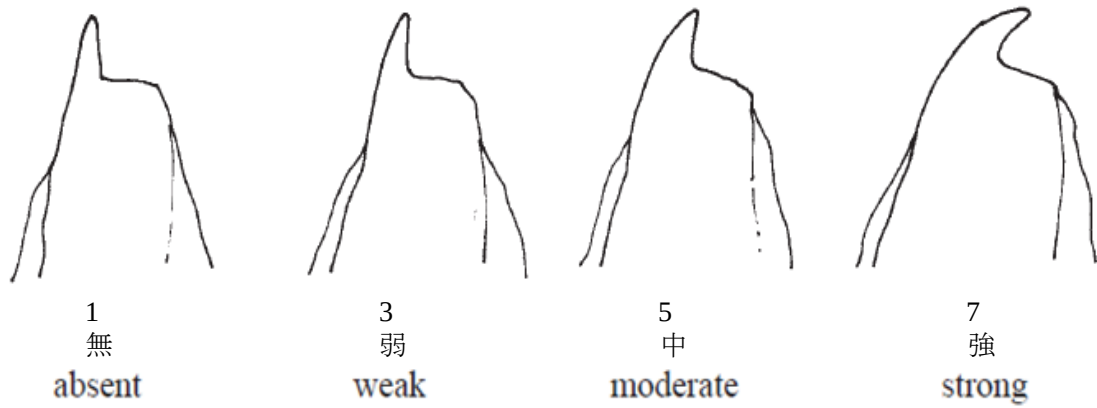


形質 18 護穎の肩部の幅 Char.18 Lower glume: shoulder width



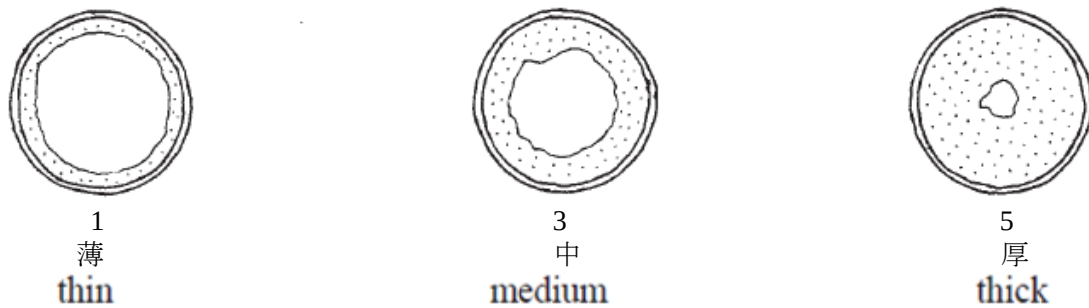
形質 20 護穎のくちばしの曲がり方

Char.20 Lower glume: curvature of beak



形質 22 穂首直下の節間の髓の厚さ

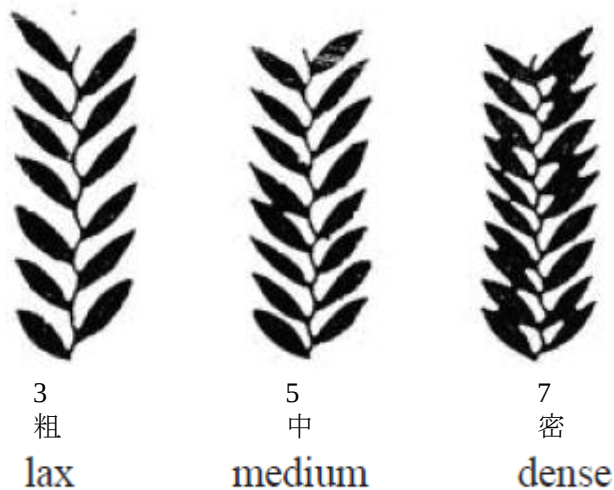
Char.22 Straw: pith in cross section



穂首直下の節間の髓の厚さを観察

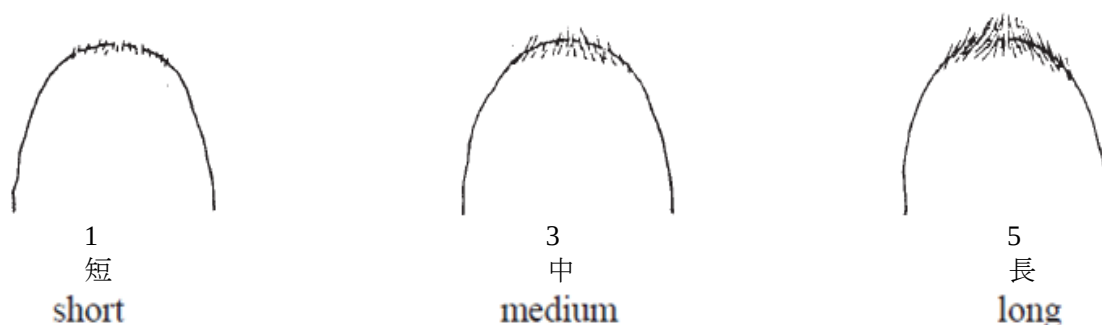
形質 28 穂の粒着の粗密

Char.28 Ear: density



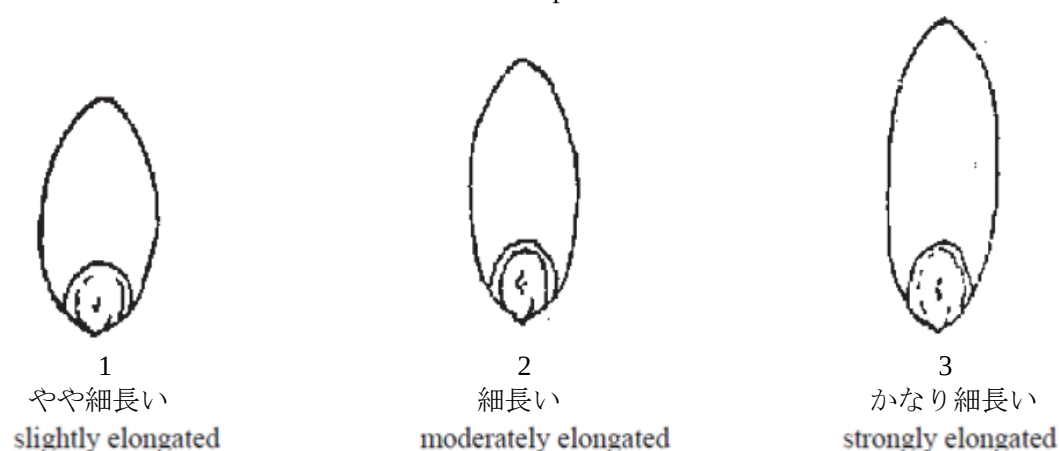
粒着粗密は、小穂の数／穂の長さの割合で決定する。割合が高いほど高い密度を示す。

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



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

形質 30 原麦粒の形 Char.30 Grain: shape



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℃
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。

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。

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

ゲルを一定の温度で保つことができる適切な垂直電気泳動システムを使用する。ゲルの厚さは 1.5 mm 以下を推奨する。使用する電源は、定電流、定電圧出力の両方ともできるべきである。

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）

2-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. 溶液

3.1 抽出液

3.1.1 グルテニンの抽出のみ

貯蔵液：

6.25 ml 1M TRIS HCl 緩衝液, PH 6.8（3.3.2 参照）

12.05 ml 蒸留水

2g SDS

10 mg ピロニン Y（又は G）

10 ml グリセリン

この溶液は 4℃で 2 ヶ月保存できる。

使用直前に抽出液を以下のように調整する。

4.25ml 貯蔵液（上記）に 0.75ml の 2-メルカプトエタノールに蒸留水を加えて 10ml にする。この溶液は使用直前に準備する必要がある、保存することはできない。

3.1.2 グリアジンの後のグルテニンの抽出

A 液—25ml 2-メルカプトエタノール+50mg ピロニン Y/G に蒸留水を加えて 100ml にする。

B 液—27.0g 尿素、3.0ml 2-メルカプトエタノール+10.0g SDS に蒸留水を加えて 100ml にする。

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 10.0 g に蒸留水を加えて 1ℓ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℃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℃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℃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、はじめに粉碎粉（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、粉碎粉に 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 μ l ないし 25 μ 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×160mm×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、TENED 40 μ 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、3 cm ないし 4 cm のスタッキングゲルのために空を残しておく。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 と 2*を分解するため、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、APS(3.3.4) 2ml と SDS(3.3.3.) 0.8ml、TEMED 40 μ 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 3 cm ないし 4 cm の空を残しておく。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 APS(3.3.4) 0.75ml との SDS(3.3.3) 0.2ml、TEMED 15 μ 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ームを挿入して、室温で 2 時間重合させる。そののちコー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

泳動槽に適量の通電用緩衝液(3.2)を満たし、15℃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 8 mA/cm² (断面積) の定常電流で電気泳動を行い、さらにマーカがゲルの下端に達するまで 16mA/cm² (最大電圧 300V) で泳動を続ける。温度は常に 15℃を維持する。

4.4 固定および染色

ゲルカセットを泳動槽から取り出して開き、ゲルを 15%(w/v) TCA 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 TCA のみで)。ゲルの調製・染色のための最終的な品質調節基準は、ゲルに現れた標準品種を解析して決める。標準バンドの分離と電気泳動の相対移動度 (分子量) は明確な判断のため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

この表は各遺伝子座からの全てのグルテニンバンドの分子量を説明するために設計されている。

HMW グルテニンのサブユニット：個々のバンドの命名

Band number	Molecular weight (kDa)
1	113
2	108
2*	108
3	107
4	106
5	105
6	100
6.1	99
7	98
8	86
9	83
10	83
12	80
13	94
14	94
15	91
16	90
17	89.5
18	89.5
20	94
22	87

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			Note								
Example variety (Courtot)			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)---						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	一般記述
Decimal code	
00	乾燥種子
01	吸水開始
03	吸水完了
05	種子から幼根の出現
07	種子からしょう 葉の出現
09	しょう 葉先端に葉がのぞく
10	しょう 葉から第1葉が出現
11	第1葉の展開
12	第2葉の展開
13	第3葉の展開
14	第4葉の展開
15	第5葉の展開
16	第6葉の展開
17	第7葉の展開
18	第8葉の展開
19	第9葉の展開
20	主茎のみ
21	主茎及び第1分げつ
22	主茎及び第2分げつ
23	主茎及び第3分げつ
24	主茎及び第4分げつ
25	主茎及び第5分げつ
26	主茎及び第6分げつ
27	主茎及び第7分げつ
28	主茎及び第8分げつ
29	主茎及び第9又はそれ以上の分げつ
30	偽茎の立ち上がり
31	第1節が認められる
32	第2節が認められる
33	第3節が認められる
34	第4節が認められる
35	第5節が認められる
36	第6節が認められる
37	止め葉が認められる

39	止め葉の葉舌/襟の視認期
40	-
41	止め葉の葉舌の伸長
45	穂ばらみ期
47	止め葉の葉舌の開裂
49	最初の芒が認められる
50	第1小穂が認められる
53	穂の 1/4 出穂
55	穂の 1/2 出穂
57	穂の 3/4 出穂
59	出穂完了期
60	開花始め
65	半分開花
69	開花完了
70	-
71	穎果に水分が満ちる
73	乳熟初期
75	乳熟中期
77	乳熟後期
80	-
83	糊熟前期
85	糊熟中期
87	糊熟後期
90	-
91	穎果が硬化（親指の爪で割ることが困難）
92	穎果が硬化（親指の爪で窪みがつかない）
93	穎が日中緩む
94	過熟、茎の枯れ上がり及び倒伏
95	種子の休眠
96	完熟種子の発芽力が 50%
97	種子休眠がとける
98	2次休眠の誘発
99	2次休眠の消失