

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580007

研究課題名（和文） 未利用遺伝資源を利用した耐塩性日本シバの作出

研究課題名（英文） Production of salt tolerant line of Japanese lawn grass using unused germplasm

研究代表者

村田 達郎（MURATA TATSURO）

東海大学・農学部・教授

研究者番号：80140953

研究成果の概要（和文）：

日本シバ(*Zoysia* 属)の未利用遺伝資源，特に *Z. sinica* を利用した高耐塩性系統作出を試みた結果，耐塩性と塩類腺との関連性が明らかになり，7%塩水灌水後も生存する系統を作出した。また，分子マーカーにより遺伝的多様性を評価したところ，対馬採集系統は特異的な集団であった。さらに，種子繁殖を検討した結果，自殖による種子生産が可能であり，分離および近交弱勢程度が少ない系統を選抜することができた。

研究成果の概要（英文）：

A high salt tolerant line was produced using *Zoysia sinica*, unused germplasm of the Japanese lawn grass (*Zoysia* genus). Relative salinity tolerance was found to positively correlate with the distribution pattern of salt glands on leaf surfaces, and some lines that survived after the 7% saline-treatment were produced. Using molecular markers (RAPD, SSR) to perform genetic diversity evaluation, the lines collected from Tsushima were found to form clusters that were independent of other regions. As a result of identifying an efficient propagating method by seedling, several elite lines were selected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：育種学・日本シバ・*Zoysia*属・耐塩性・種間雑種

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本シバ(*Zoysia*属)は、スポーツ施設や公共施設等での利用が増加しているが、本属の育種は歴史が浅く、様々な用途に利用できる新品種の育成が望まれている。

(2)多くの植物で、塩ストレス適応性機構の解明や耐塩性品種の育成が行われているが、*Zoysia*属では、耐塩性育種に関する報告例は極めて少ない。

(3)申請者らは、国内外から約 1000 系統の *Zoysia* 属の遺伝資源を収集・保存している。その中で *Z.sinica* (コオニシバ) が耐塩性に特に優れており、耐塩性日本シバの育種のための貴重な遺伝資源であることを確信し、耐塩性日本シバ品種獲得を目指すに至った。

2. 研究の目的

(1)*Z.sinica* は、他の *Zoysia* 属植物と形態が異なるために、外部形態を比較する。また、耐塩性に関与するといわれている「塩類腺」の分布や大きさと耐塩性程度との関連性を明らかにする。

(2)PCR および SSR マーカーを用いて、*Z.sinica* と他の *Zoysia* 属種との遺伝的類似関係を明らかにする。

(3) *Z.sinica* と日本に自生する *Zoysia* 属種との種間雑種を作出し、耐塩性系統の選抜を行う。

(4)日本シバの増殖は、一般的に張りシバによって行われるが、作出した耐塩性系統を効率よく増殖するために、播種造成用品種の育種方法について試みる。

3. 研究の方法

(1) *Z.sinica* と他の *Zoysia* 属植物の外部形態を比較するために、草丈・葉長・葉幅・葉表面の綿毛・葉耳周辺の綿毛・葉の展開角度等を測定する。

(2)葉の表裏面に分布する塩類腺を瞬間接着剤法(広瀬ら 日作紀1992)を用いて型取りし、1mm²あたりの塩類腺数を算出する。また塩類腺の大きさを走査型電子顕微鏡で観察し、最終的に塩類腺の分布状況および塩類腺の大きさと耐塩性程度との関連性について分析を行う。

(3)韓国・九州(対馬(長崎)・天草・水俣(熊本))から採集した20系統の *Z.sinica* を供試材料に、改変したCTAB法によってDNAを単離し、分析に用いる。採集系統に存在する

DNAレベルでの多型をRAPDおよび18種類のSSRマーカーを用いて分析し、遺伝的類似関係を評価する。

(4) *Z.sinica* と、*Z.matrella*, *Z.japonica* との組合せで交配を行い、柱頭上の花粉発芽および花柱内の花粉管の伸長状況を観察する。得られた稔性種子から実生個体を作成する。

(5) 得られた雑種を育成した後、0.3.5および7%の塩水で1ヶ月間灌水し、処理後の状態により高耐塩性系統を選抜する。また、原子吸光度計を用いて、処理後の植物体の各部位（葉、茎および根）におけるNaおよびK含有量を求める。

(6) 選抜した雑種個体と、母本とした日本シバ系統との戻し交雑を試み、雑種系統の形態的改良を図る。

(7) 熊本県内の6箇所に栽培および自生している日本シバの採種量および稔実率などの採種関連形質を調査した。本調査結果によって選抜した、種子生産性の高い50系統を用いて、1~2穂に袋掛けを行い自殖させ、採種後、軟X線照射装置を用いて稔性を判別し、稔実種子数および稔実率を求めた。その後、形質と変異の程度により、播種造成系統作出の可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 各外部形態を比較したところ、*Z.sinica* は、葉面の綿毛、および棍棒状毛の有無で*Z.jaoponica* と異なることが明らかとなった(図1)。また、葉の角度では*Z.jaoponica* がほぼ60°であったのに対し、*Z.sinica* では40°程度と有意に異なっていた。

(2) 6種の*Zoysia* 属種を対象とし、葉の表裏面に存在する塩類腺を観察し、各種の塩類腺のサイズを比較した。その結果、それぞれの種による大きさの違いは認められたが、耐

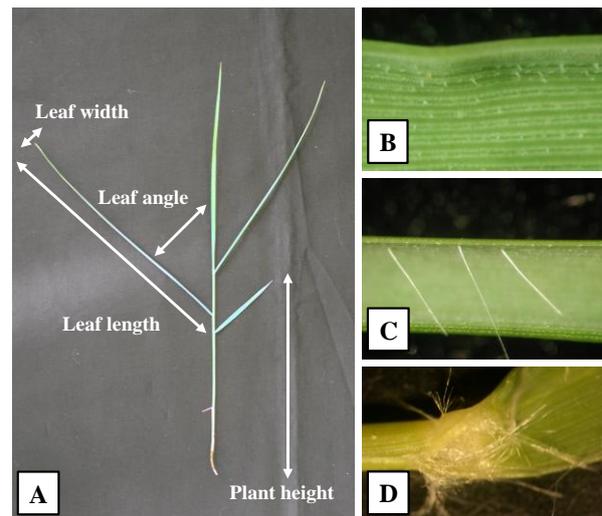


図1 *Z.sinica* の形態的形質。A:直立茎からの葉の角度, B:棍棒状毛, C:綿毛, D:葉耳

塩性程度との関係性を見出すことはできなかった。

さらに瞬間接着剤法により葉の表裏面における1mm²あたりの塩類腺を比較した。

日本シバと総称される3種(*Z.japonica*, *Z.matrella*, *Z. tenuifolia*)では耐塩性の程度と塩類腺数の増加に正の相関が認められると報告されている。本実験でもこの報告を支持する結果が得られ、3種の中で最も耐塩性の高い*Z.matrella*では170以上の値が得られた。しかし、これら3種より耐塩性の高い*Z.sinica*の塩類腺数は*Z.matrella*の約1/2となる89.5となり、塩類腺数と耐塩性との関係性は見出せなかった。そこで葉の表裏面における塩類腺の分布パターンを比較したところ、耐塩性程度の高い*Z.matrella*, *Z.sinica*では塩類腺の多くが葉の表面に認められ、合計塩類腺数の60%以上が表面に存在した。特に*Z.sinica*では98%が葉の表面に存在し、今回供試した6種の中で特異的なパターンを示した(図2)。本結果から、塩類腺数ではなく、分布パターンによる耐塩性評価の可能性が示唆された。

塩類腺数

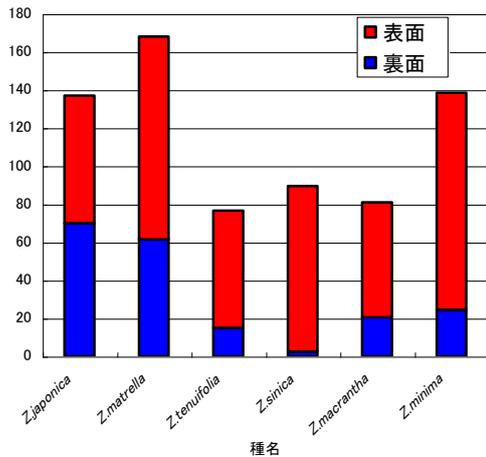


図2 葉の表裏面における塩類腺の分布

(3) 韓国および九州地域で採集した 20 系統の *Z.sinica* を対象とし, RAPD 法および SSR 法によって検出された DNA 断片の結果からクラスター分析を行い, 地理的分布と遺伝的類似関係を評価した. その結果, RAPD 法, SSR 法ともに類似した結果が得られ, 供試した 20 系統は 4 つのクラスターに分類された. このうちクラスター II~IV はそれぞれの採集地 (韓国, 対馬, 熊本) に由来する系統で構成されたが, クラスター I では韓国と熊本で

採集した系統が混在し, 地理的分布との関係性は見出せなかった(図 3). また, これらのクラスターのうち, クラスター III を構成する対馬採集系統内の遺伝的類似度が高く, これらが非常に近縁な集団であることが明らかとなった. このように対馬採集系統は, 採集地で特異的な遺伝集団を形成していることが明らかとなり, このような遺伝資源を育種母本として使用することで効率的な遺伝的変異拡大が可能であることが示唆された.

(4) *Z.sinica* と *Z.japonica*, *Z.matrella* との組み合わせで種間交雑を行い, 柱頭上の花粉発芽, および花柱内の花粉管伸張を観察したところ, 各組み合わせの正逆交雑において正常な花粉発芽, およびその後の花粉管伸張が認められた.

さらに得られた種子の稔性を X 線照射装置によって確認したところ, 稔性が認められた種子が得られた. この種子から実生個体を作成し, 個体の育成を図った.

(5) 得られた雑種個体を対象として 0, 3, 5, 7% の塩水で処理したところ, 育種母本とした *Z.matrella* では 5% 処理区から枯死

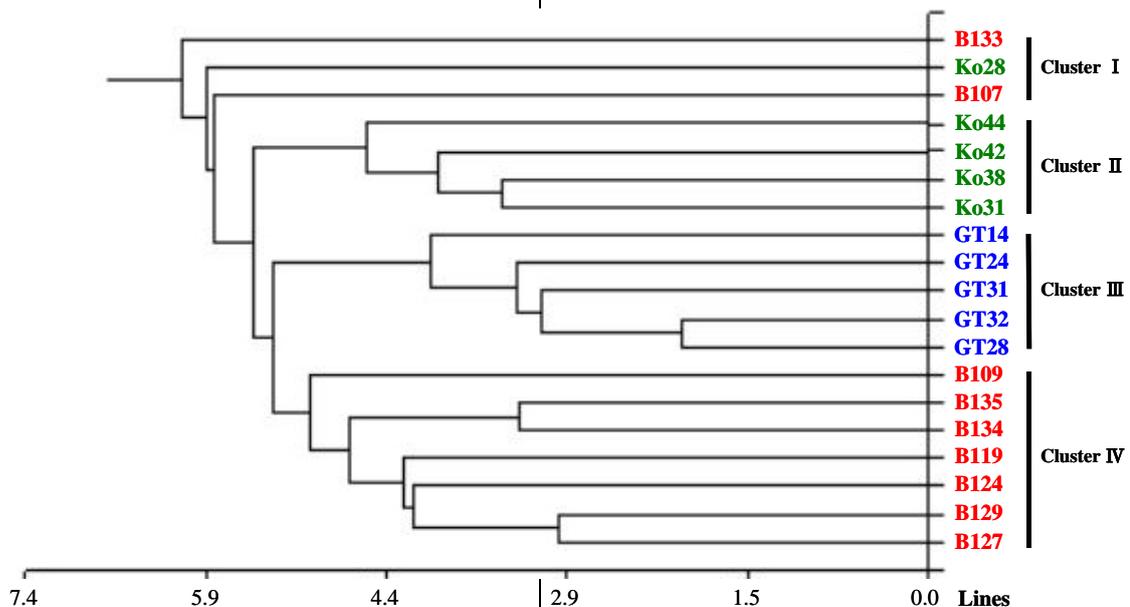


図3 韓国および九州地域で採集した *Z.sinica* の RAPD 分析および SSR 分析によるクラスター

する個体が認められたのに対し、雑種個体は7%処理区でも生存個体が得られ、交配による耐塩性向上が認められた。

さらに塩処理を行った育種母本および雑種個体におけるNaおよびK含有量を求めた。その結果、各処理濃度における雑種系統の葉と茎のNa含有量は、母本である*Z.sinica*と類似していたが、7%処理区では他の種に比べ低い値となった(図4)。また根における含有量では顕著な差異が認められないことから、雑種の耐塩性の向上は、葉からの塩排出能の向上によると推測された。

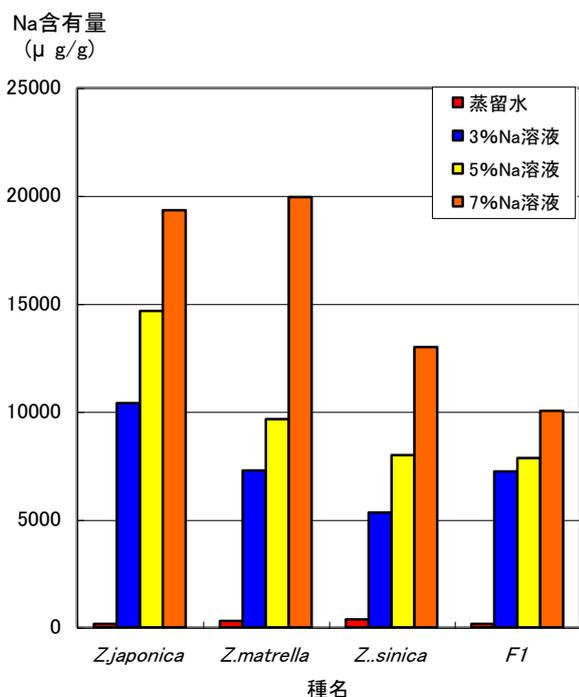


図4 異なる塩濃度で灌水した個体の葉におけるNa含有量

(6) 7%塩処理後に生存した雑種個体を選抜したが、その多くの形態は*Z.sinica*に類似していたため、芝草として利用することは困難であった。そこで*Z.matrella*との戻し交配を行うことで形態的な改良を図った。

得られた雑種個体は戻し交配が可能であり、本法による高耐塩性を有する芝草作出の可能性が示唆された。

(7)日本シバの播種造成用芝草品種の育種方法について試験を行った。日本シバは他殖と栄養繁殖を主体とするが、自殖も可能な特殊な繁殖様式を示すため、この特性を利用した新しい育種方法について検討した。

まずシバの種子生産特性、繁殖様式について調査した結果、自殖によっても種子生産が可能であり、1m²当り5万粒、150g以上の発芽可能種子を採種できると判断された。また異型接合体である生態型について、自殖後代の分離の程度と近交弱勢を既存品種と比較調査した結果、分離が小さく近交弱勢の程度の少ない系統を選抜することが可能であると推察された。

育種方法としては先ず多くの生態型や保存系統を調査し、穂数と着粒数から種子生産量が多いと推定される個体を数十個体選抜する。これらの個体に袋かけを行って、各個体50~100粒程度の自殖種子を採種する。自殖後代を個体植えて、特性と分離の程度を調査し、分離が少なく、近交弱勢の小さい有望な系統を数系統選抜する。選抜された系統の親を隔離栽培して自殖種子を採種する。比較品種とともに、反復区を設けた散播による生産力検定と、個体植えによる分離程度の検定を行い、最も目標にあった系統を選抜する。最終的に選抜された系統の親個体を栄養繁殖によって増殖し、隔離採種圃場を設けて自殖種子を生産し、播種造成用種子として用いる。本試験の結果、本方法は日本シバにおける播種造成用芝草品種の育種に有効に利用できることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①福岡壽夫・村田達郎・柴田耕平・篠田佳世子・高橋祐希, 日本シバ (*Zoysia* 属) の育種に関する研究 II 播種造成用品種の育成方法, 芝草研究, 査読有, 37(2), 2009, pp91-97.

[学会発表] (計 4 件)

①松田靖・古富史朗・満井人知・芦矢尚之・村田達郎, 高耐塩性 *Zoysia* 属系統における塩類腺の塩排出能 日本育種学会 2007 年 9 月 23 日 山形大学農学部

②松田靖・古富史朗・市場彩子・金子博・村田達郎, *Zoysia* 属植物の種間交雑種における塩水灌水後の Na および K 含有量の変化 日本育種学会九州支部会 2008 年 12 月 九州大学

③松田靖・古富史朗・市場彩子・金子博・村田達郎, 高耐塩性 *Zoysia* 属系統における形態的特徴と塩処理後の Na, K 含有量の変化 日本育種学会 2009 年 3 月 28 日 つくば国際会議場

④松田靖・金子博・村田達郎, *Zoysia sinica* との交配によるシバ属植物の耐塩性向上 日本育種学会 2009 年 9 月 25 日 北海道大学農学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 達郎 (MURATA TATSURO)

東海大学・農学部・教授

研究者番号: 80140953

(2) 研究分担者

なし

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし

研究者番号: