

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780202
 研究課題名 (和文) シバ属遺伝資源の種分化に関する分子生態学的研究
 研究課題名 (英文) Study on molecular phylogenetics and ecological analysis of *Zoysia* spp. in Japan.
 研究代表者
 霍田 真一 (Tsuruta Shin-ichi)
 宮崎大学・農学部・助教
 研究者番号：40381090

研究成果の概要：

本研究は、南西諸島を中心に収集した *Zoysia* (シバ) 属主要3種 (*Z. japonica*, *Z. matrella* および *Z. tenuifolia*) を用いて、葉の形態的特性および遺伝的多様性を評価した。葉の形態は概ね種によって異なっており、特に、*Z. japonica* および *Z. matrella* と *Z. tenuifolia* との間には葉芽構造に明確な違いが認められた。20種類の核由来マイクロサテライトマーカーによる解析では346本の明瞭な増幅産物が得られ、これらの増幅産物に基づく遺伝的多様性の評価から、*Z. matrella* 系統は他の2種よりも任意交配が進んでいることが示唆された。また、15種類の葉緑体ゲノム由来マイクロサテライトマーカーによる解析では、9マーカーで多型が得られ、これらの増幅パターンを基に、供試3種はそれぞれ22 (*Z. japonica*)、6 (*Z. matrella*) および17 (*Z. tenuifolia*) のハプロタイプに分類された。さらに、これらの結果をもとに、母集団が持つ全てのマイクロサテライトマーカー変異を含有する89系統を選抜した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	300,000	2,700,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・畜産学草地学

キーワード：シバ、*Zoysia*、マイクロサテライトマーカー、遺伝資源、遺伝的多様性

1. 研究開始当初の背景

シバ草地の造成・利用は、近年の輸入飼料依存型の畜産が抱える社会的問題の顕在化を背景に、自給飼料基盤の拡充のみならず、景観や土地の保全機能を有する低コストで持続性の高い草地畜産を可能にする一方策として注目されつつある。しかし、これまで

のシバの品種育成は主として庭園や校庭などでの、いわゆる芝生としての利用を目的としたものが多く、牧草としての利用を目的した品種育成はほとんど行われていない。その背景の一つとして、収集された遺伝資源の分類体系には不十分な点が多く、シバ草地として重要な環境ストレス耐性や被覆性などの

形質に関する情報が体系的に整備されていないことが挙げられる。シバの原産地であるわが国は世界的に見ても多様なシバ遺伝資源を保有するだけに、遺伝資源に蓄積された優秀な自然変異を効率良く検出し、その畜産分野における有効利用を図る上で、分類体系の確立とそれに基づく情報整備を推進する必要性は極めて高い。

2. 研究の目的

世界で芝草として利用されている40種以上のイネ科植物の中で、日本芝は分類学上 *Zoysia* (シバ) 属に位置づけられる。*Zoysia* 属には *Z. japonica* (シバ) や *Z. matrella* (コウシュンシバ)、*Z. tenuifolia* (コウライシバ) などがあり、これらの野生種はわが国における今後の新たな飼料資源として重要性の高い有用遺伝資源である。本研究は、(1) シバ属における種の分化過程とその多様性に及ぼす影響を分子生態学的観点から明らかにし、(2) これをもとに系統進化に即した類縁関係についての情報を備えたコアコレクションを作成することで、今後のシバ育種研究における知的基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) *Zoysia* 属遺伝資源の遺伝的多様性評価

供試系統は、これまでに収集した *Zoysia* 属 202 系統である。これらの系統は、葉幅を指標に種の分類を行った。また、出穂が認められた系統については、穂の形質も分類の参考とした。また、葉および葉芽の構造的な特性を明らかにするため、葉の形状、断面構造および葉芽構造を調査した。調査は止め葉から第3展開葉の最大葉幅部および葉鞘断面中の幼葉(葉芽)を用いて顕微鏡(100-250倍)により行った。

Z. japonica 系統について、*Z. japonica* 品種「朝駆」から開発した核ゲノム由来マイクロサテライトマーカー (ZjSSR) により多型解析を行い、マーカーのスクリーニングおよび重複系統の選抜を行った。残りの2種については、*Z. japonica* 系統で増幅が確認されたマーカーのみで多型解析を行った。さらに、上記で選抜した系統については同品種「朝駆」の葉緑体 DNA から開発したマイクロサテライトマーカー (ZjcpSSR) を用いて多型解析を行い、両ゲノムの多様性を比較調査した。また、葉緑体ゲノムの遺伝性を確認するため、ZjcpSSR マーカーを用いて *Z. japonica* および *Z. matrella* の正逆交雑によって得られた F1 集団 (計 70 個体) のバンドパターンを調査した。

(2) *Zoysia* 属遺伝資源の類縁関係の評価

(1) で得られたデータは多変量解析に用いた。多変量解析は解析ソフト PowerMarker お

よび JMP8 を用いて行った。これらの結果を基に母集団の多様性を網羅する系統群の選抜を行った。

4. 研究成果

(1) *Zoysia* 属遺伝資源の分類および系統識別

(1) -1 *Zoysia* 属遺伝資源の分類

南西諸島を中心に収集した *Zoysia* 属 3 種 202 系統について、葉幅を指標に種の分類を行った。また、出穂が認められた系統については、穂の形質も分類の参考とした。その結果、収集系統は *Z. japonica* 104 系統、*Z. matrella* 30 系統、*Z. tenuifolia* 68 系統、に分類された。

葉の形態は概ね種によって異なっており、各種における葉幅の平均値はそれぞれ 4.38、1.61 および 0.89mm であった (表 1)。特に、*Z. japonica* および *Z. matrella* と *Z. tenuifolia* との間には葉芽構造に大きな違いが認められた (図 1)。

表 1 シバ属3種における葉の形態的特性

種名	葉幅 (mm)	維管束数		葉身構造	葉型	葉芽構造	巻数 (回)
		大維管束数	小維管束数				
<i>Z. japonica</i>	4.38±1.11	8.07±1.59	35.10±9.11	中広・三角	扁平	内巻	2.0-3.0
<i>Z. matrella</i>	1.61±0.42	4.55±0.91	15.90±4.51	中広	湾曲-扁平	内巻	1.5-2.0
<i>Z. tenuifolia</i>	0.89±0.18	3.00±0.00	7.35±1.92	直線	内折	内折	—



図 1 シバ属3種における葉芽および葉断面の構造

(1) -2 *Zoysia* 属主要3種の予備的スクリーニング

供試 3 種 202 系統について、*Z. japonica* の核ゲノム由来マイクロサテライトマーカーによる予備的スクリーニングを行った。その結果、収集系統の中には遺伝子型が同じ系統も含まれており、それぞれ 85 系統 (*Z. japonica*)、25 系統 (*Z. matrella*) および 63 系統 (*Z. tenuifolia*) の計 173 系統が異なる遺伝子型であることが判明した。

(2) *Zoysia* 属遺伝資源の遺伝的多様性の評価

(2) -1 核 DNA 由来マイクロサテライトマーカーによる多型解析

選抜した *Zoysia* 属 3 種 173 系統について、24 種類の核ゲノム由来マイクロサテライトマーカーを用いて多型解析を行った。その結果、20 種類のマーカーにおいて 346 本の明瞭な増幅産物が得られ、*Z. japonica* および *Z.*

matrella 系統では全 20 マーカーで多型が認められた。一方、*Z. tenuifolia* では 19 マーカーで多型が認められた。対立遺伝子数は 3 (ZjAG129) -32 (M4H04) であり、ヘテロ接合度 (期待値) および PIC の平均値はそれぞれ 0.79 および 0.77 であった (表 2)。種別に

表 2 シバ属 3 種 173 系統における遺伝的多様性

Marker	対立遺伝子数	Ho	He	PIC
ZjAG116	20	0.43	0.70	0.68
ZjAG125	13	0.63	0.88	0.87
ZjAG130	21	0.74	0.93	0.93
ZjAG133	24	0.54	0.92	0.91
ZjAG136	19	0.63	0.86	0.85
M3A04	17	0.62	0.83	0.81
M4A01	23	0.65	0.92	0.91
M4E11	16	0.51	0.88	0.87
Zj132	15	0.41	0.87	0.85
Zj109	19	0.40	0.69	0.67
ZjAG129	3	0.00	0.11	0.10
ZjAG128	22	0.55	0.89	0.88
ZjAG108	11	0.41	0.75	0.72
ZjAG113	5	0.34	0.42	0.39
M3A12	7	0.26	0.77	0.74
M3C02	12	0.53	0.84	0.82
M3F02	23	0.66	0.93	0.92
M3H12	13	0.32	0.72	0.69
M4H03	28	0.68	0.92	0.92
M4H04	32	0.59	0.93	0.93
平均	17	0.49	0.79	0.77

Ho: ヘテロ接合度 (観察値), He: ヘテロ接合度 (期待値), PIC: 多型情報含有量

見ると、ヘテロ接合度 (期待値) および PIC 値はともに *Z. japonica* 系統が他の 2 種に比べて高い値を示した。また、近郊係数 (Fis) はいずれの種も正の値を示したが、*Z. japonica* および *Z. tenuifolia* ではそれぞれ 0.30 および 0.35 であるのに対し、*Z. matrella* は 0.05 と低く、本種は他の 2 種に比べ任意交配が進んでいるものと示唆された (表 3)。

表 3 シバ属 3 種における遺伝的多様性

種名	個体数	対立遺伝子数	Ho	He	PIC	Fis
<i>Z. japonica</i>	83	13.50±6.3	0.51±0.20	0.73±0.21	0.71±0.21	0.30±0.19
<i>Z. matrella</i>	25	7.04±2.72	0.63±0.30	0.66±0.17	0.62±0.17	0.05±0.40
<i>Z. tenuifolia</i>	63	9.67±5.84	0.43±0.18	0.65±0.24	0.62±0.24	0.35±0.19

(2) -2 葉緑体ゲノム由来マイクロサテライトマーカーによる多型解析

Zoysia 属 3 種 173 系統を用いて、15 種類の葉緑体ゲノム由来マイクロサテライトマーカーによる多型解析を行った。用いた 15 マーカーのうち、9 マーカーは多型を示し、残りの 6 マーカーでは多型が得られなかった。多型を示した 9 マーカーには種内変異が認められた。これらの増幅パターンを基に、供試 3 種はそれぞれ 22 (*Z. japonica*)、6 (*Z. matrella*) および 17 (*Z. tenuifolia*) のハプロタイプに分類された。

(2) -3 *Zoysia* 葉緑体ゲノムの遺伝性

一般に、葉緑体ゲノムは母性遺伝であるが、キウイやアルファルファなどいくつかの植物種において父性または両性遺伝することが認められていることから、その遺伝性の確認は系統進化に関する研究に葉緑体 DNA 多型を利用する上で重要である。本研究では正逆交雑集団計 70 個体を用いて、シバ属における葉緑体ゲノムの遺伝性を調査した。親系

統で多型を示した 6 プライマーを用いて各 F1 集団の多型解析を行ったところ、全てのプライマーで母親由来のバンドが認められた (表 4)。Milligan (1992) の方法により本研究で得られたデータを基に父親遺伝の可能性を評価したところ、その確立は約 3% 以下であったことから、*Zoysia* 属における葉緑体ゲノムは他の多くの被子植物と同様に母性遺伝であるものと推察された。

表 4 シバ属における葉緑体ゲノムの遺伝性

交配親 ¹⁾	F1 個体数	ZCP07		ZCP09		ZCP12		ZCP22		ZCP23			
		F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1	F1		
Zj x Zm	60	159/161 ²⁾	159	233/234	233	266/265	266	195/196	195	230/231	230	166/165	165
Zm x Zj	10	161/159	161	234/233	234	265/266	265	196/195	196	231/230	231	165/166	166

1) Zj: *Z. japonica*, Zm: *Z. matrella*

2) 数字は各マーカーにおける PCR 産物断片のサイズ (bp) を示す。

(3) *Zoysia* 属遺伝資源の類縁関係

(3) -1 供試系統における系統解析

Zoysia 属 3 種 173 系統について、核由来マイクロサテライトマーカーによる多型解析で得られた増幅断片を基に系統樹を作成した。その結果、供試系統は概ね種によって異なる分類群を形成した。特に、*Z. tenuifolia* 系統で構成される分類群は収集した地域ごとに細分化することができ、各地域における集団の遺伝的分化が大きいことが明らかとなった。また、*Z. matrella* および *Z. tenuifolia* はその地理的分布を反映して近い類縁関係を示した。

一部の *Z. matrella* 系統については同一グループに分類されなかった。これらの *Z. matrella* 系統は、15 種類の葉緑体ゲノム由来マイクロサテライトマーカーによる解析から、他の *Z. matrella* 系統とは異なるハプロタイプであることが判明し、分布域が近い *Z. japonica* または *Z. tenuifolia* 系統と同じ葉緑体ゲノム領域を持つことが認められた。また、これらの系統は形態的特性においても *Z. japonica* または *Z. tenuifolia* との中間的な特性を示すことから、*Z. matrella* 系統の中には自生地での自然交雑による種間雑種が含まれることが示唆された。

(3) -2 母集団の遺伝的多様性を網羅する系統群の選抜

系統解析の結果を基に、各分類群から希な対立遺伝子を持つ合計 89 系統を選抜した。この系統群は *Z. japonica* 40 系統、*Z. matrella* 16 系統および *Z. tenuifolia* 33 系統から構成され、調査したすべての対立遺伝子を網羅することが明らかとなった。すなわち、これらの選抜系統は、母集団 (202 系統) が持つ全てのマイクロサテライトマーカー変異を含有する系統群である。(図 2)。このことから、選抜した系統は母集団の多様性を広くカバーしているものと考えられ、今後のシバ属遺伝資源の効率的な収集・保存に大きく貢献するとともに、シバ属の種分化の解明および遺伝・育種学的研究に利用できるものと考えられる。

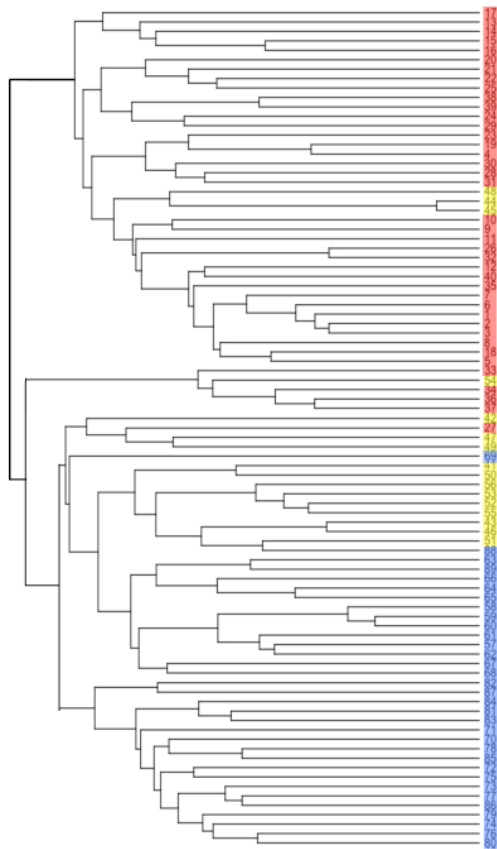


図2 シバ品種「朝暉」の核由来マイクロサテライトマーカーによる選抜系統の系統樹
赤: *Z. japonica*, 黄: *Z. matrella*, 青: *Z. tenuifolia*

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)

Tsuruta S, Hosaka F, Otabara T, Hashiguchi M, Yamamoto T, Akashi R., Genetic diversity of chloroplast DNA in Zoysia and other warm-season turfgrasses. *Grassland Science*, 54: 151-159, 2008, 査読有り

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

霍田 真一 (Tsuruta Shin-ichi)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号 : 40381090

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :