

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580012

研究課題名(和文) 国外採集遺伝資源利用による省力化および環境ストレス耐性日本シバの開発

研究課題名(英文) Production of labor saving and the environmental stress-resistant line of Japanese lawn grass using worldwide genetic resource collections

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ニュージーランド固有種である *Zoysia minima* の葉長、葉幅は、*Z. tenuifolia* よりもさらに小さい値を示した。*Z. minima* と日本に自生する *Zoysia* 属植物との間で交配を行い、雑種個体の作出に成功した。雑種個体は、葉幅が狭く、穂の形態も小さくなり、草姿が小型化する傾向が見られた。また *Z. sinica* と他の *Zoysia* 属植物との間で交配を行い、ターフを形成する耐塩性系統を作出することができた。これら F1 の雑種性は、RAPD 法で確認された。*Z. sinica* は交配親として利用することで耐塩性および被覆性に優れた個体を作成できる有効な遺伝資源であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The leaf length and width of *Zoysia minima*, indigenous plant to New Zealand, are smaller than *Z. tenuifolia*. Hybrid plants were obtained by crossing between *Z. minima* and other *Zoysia* species grown in Japan. In morphological characters of hybrids the widths of leaves were narrow, and the forms of the spikes became small, with a tendency towards a smaller size.

Some hybrid lines having high salt tolerant and fine turf were obtained by crossing between *Z. sinica* and other *Zoysia* species. The hybridities of F1 plants were confirmed by RAPD analysis. *Zoysia sinica* was an effective germplasm stock which advanced in the production of hybrid having salt tolerant and high quality turf by interspecific hybrid.

研究分野：農学

キーワード：育種 日本シバ *Zoysia* 属 遺伝資源 種間雑種 省力化 環境ストレス耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本にも自生種が認められる日本シバ (*Zoysia* 属種) は, 我が国の環境に適応し様々な環境ストレス耐性を有するため, 芝草・牧草・緑化素材等様々な目的で利用されている。このように様々な利用がなされているにもかかわらず, 本属の育種の歴史は浅いため品種数も少なく, 用途に応じた品種作出も望まれている。

(2) 申請者らは国内外から約 1000 系統の *Zoysia* 属種の遺伝資源を収集・保存している。その中で, ニュージーランドで収集した *Z.minima* は, 非常に微細で美しいターフを形成することから, 新たな芝草用品種作出に向けた育種素材として着目した。

(3) 近年, 作物種において環境ストレス耐性の機構解明, 耐性品種の作出が行われるようになり, 特に耐塩性に対して多くの研究がなされている。*Zoysia* 属種の中では, *Z.sinica* が河口や汽水域に自生し, 耐塩性を有するが, 本種を利用した育種例は報告されていない。そこで韓国および国内で収集した *Z.sinica* 系統を用いて, さらに耐塩性日本シバ品種作出を目指した。

2. 研究の目的

(1) *Z.minima* を材料とし, 葉幅, 葉長等の外部形態の比較および葉身における組織学的観察を行うことより, 本種の特性を評価する。

(2) *Z.minima* の種子および茎頂を外植体とし, カルス誘導から植物体再分化に至る一連の培養系を確立する。

(3) 培養系確立後, 誘導した *Z.minima* のカルスハイオンビームを照射することで突然変異誘発を行う。再分化個体誘導後は, 順化・育成の後, 形態学的な比較およびフローサイトメーターを利用した倍数性の評価を行い, 変異の検出を図る。

(4) *Z.minima* と日本に自生する *Zoysia* 属種の間で種間雑種を作出し, 小型の芝草として

利用可能な系統を作出する。

(5) RAPD 法により, 作出された個体群における雑種性を確認する。また, 作出された雑種の生育特性を評価する。

(6) 韓国および国内で採集した *Z.sinica* と他の *Zoysia* 属種との種間雑種を作出し, PCR 法によりこれらの雑種性を確認するとともに, 耐塩性系統を選抜する。

(7) 雑種性が確認された個体群を対象として塩水による灌水を行い, 耐塩程度を評価する。

(8) 瞬間接着剤法により, 葉の表裏面に分布する塩類腺を型取りし, 塩類泉の分布パターンと耐塩性程度の関連性について分析する。

3. 研究の方法

(1) *Z.minima* の草丈・葉長・葉幅等の外部形態はデジタルノギスを用いて測定した。さらに葉内部の組織学的観察については, FAA 固定液で固定後, 脱水し, 常法のパラフィン切片法によって横断切片を作製した後, サフランIN0 およびファストグリーンで二重染色することによって組織標本作製し, 葉内部の維管束配列を観察した。

(2) *Z.minima* の種子および茎頂を外植体とし, 異なる濃度の 2,4-D (0.5, 1, 3, 5mg/l), BA 0.1mg/l, チアミン塩酸塩 4mg/l, α -ケトグルタル酸 100mg/l を添加した LS 培地に置床することでカルスを誘導した。得られたカルスを増殖した後, BA 1mg/l を添加した培地に移植し, 植物体形成を促した。

(3) 再分化能を有することが確認できたカルスを選抜し, これらに炭素源の重イオンビーム (2.5, 5, 10, 25, 50Gy) を照射することで突然変異の誘導を行った。照射後のカルスは (2) で得た培養条件に従って植物体を誘導し, 順化の後温室内で栽培した。

(4) *Z.minima* と *Z.matrella* の組み合わせ, および *Z.sinica* と他の *Zoysia* 属種の組み合わせで交配を行い, 得られた稔性種子から実生個体を作出した。

(5) 雑種推定個体およびその両親系統の葉から改良 CTAB 法によって DNA を単離し，RAPD 法によってバンドを検出した．検出されたバンドのパターンから各個体の雑種性を確認した．

(6) *Z. sinica* との交配により得られた雑種個体を育成した後，0, 3, 5, 7% の塩水で 1 ヶ月間灌水し，処理後の状態により耐塩性評価を行った．

(7) 瞬間接着剤法（広瀬ら日作紀 1992）を用いて，葉の表裏面に分布する塩類腺を型取りし，単位面積 (1mm^2) あたりの塩類腺数を算出した．この塩類腺の分布状況と耐塩性程度との関連性について分析した．

4. 研究成果

(1) *Z. minima* の外部形態を測定したところ，葉幅の平均は 0.75mm ，葉長の平均 14.8mm と小さく，我が国で芝草として利用されている *Z. tenuifolia* よりもさらに小型であった．また，生育は遅いが非常に緻密なターフを形成することからも明らかとなった．また，葉の維管束配列を観察したところ，葉縁は C 型（左右対称）であり，*Z. tenuifolia* と同一であった（図 1, 2）．



図 1. *Z. tenuifolia* の葉の横断切片

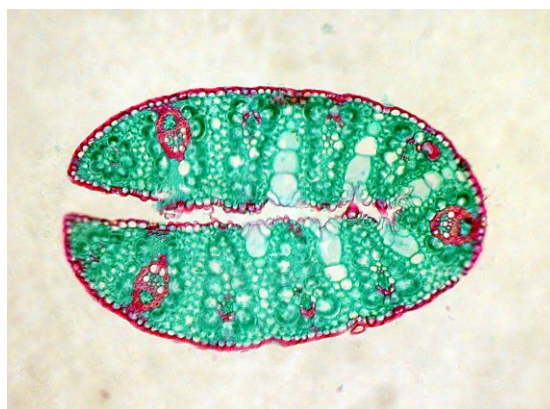


図 2. *Z. minima* の葉の横断切片

(2) *Z. minima* の種子を，異なる濃度の 2, 4-D を添加した LS 培地に置床し，カルス誘導およびカルスからの植物体再分化を試みた．その結果，比較的低濃度（0.5 および 1mg/l ）添加区で誘導したカルスで高い再分化率が示された．さらに茎頂組織を外植体として用いた場合， 1mg/l 2, 4-D を添加した培地で得たカルスを，比較的低濃度（0.5 ~ 2mg/l ）の BA を添加した再分化培地に移植することで植物体の再分化が観察された．このように，本種において，種子および茎頂組織を外植体とし，植物体形成に至る培養系を確立することができ，特に茎頂を外植体とした培養系で効率的なコンパクトカルスの誘導ならびに再分化が可能であることが明らかとなった（図 3）．



図 3 *Z. minima* の茎頂に由来するカルスからの植物体再分化

(3) *Z. minima* の茎頂に由来するカルスに炭素源の重イオンビームを異なる線量で照射し，

突然変異誘導を図った。全ての処理区で照射1ヶ月後から小植物体の形成が見られるようになり、2ヶ月後からカルスの枯死が観察された。カルスの枯死およびアルビノ形成に及ぼす照射線量の影響を比較したところ、照射量の上昇に従い両者とも上昇した。しかし、50Gy照射区においても枯死率は30%であり、このような高照射線量条件下でも半致死量には至らなかった(図4)。全ての処理区で再分化植物が形成されたが、形成された植物個体数は照射線量の影響を受け、5および10Gy照射区ではコントロールの2倍以上の個体が得られ、有意な個体数増加が認められたが、2.5、25および50Gy照射区の個体数は有意に低かった(表1)。

イオンビーム処理後に得られた323個体を対象にフローサイトメーターによる倍数性の確認および、葉幅、葉長等の外部形態の測定を行った。その結果、多くの個体形成が認められた2処理区を中心に68個体で倍加が確認でき倍加率は21.1%となった。また葉の形態を比較したところ、低線量照射区では小型化、高線量照射区では大型化する傾向が示された。

(4) *Z. minima* と日本に自生する *Zoysia* 属種間の種間交雑によって得られた系統を RAPD で分析したところ、その雑種性が確認された。そこでこれら雑種個体の分析を行ったところ、花粉稔性は80%以上であり、多くの花粉は正常であることが示された。また、これらの雑種個体を圃場で展開した結果、日本に自生する *Zoysia* 属種に比べ、葉幅が細く、穂の形態も小さくなるなど草姿が小型化する傾向がみられた。さらに葉の維管束配列を観察したところ、左右同型ではあるが、肥厚した機械組織が葉縁大維管束を包む流線型の C-B 型であることが明らかとなった。得られた系統は非常に緻密なターフを形成するが匍匐茎の伸長が遅く被覆性に劣るため、さらに栄養伸長が旺盛な系統との交雑による改

良を試みる必要がある。

(5) *Z. sinica* と他の *Zoysia* 属種の組み合わせで種間交雑を行い、稔性種子から個体を育成した。これらの個体の雑種性を RAPD 法で確認したところ、いずれの系統でも両親種の特異的なバンドを併せ持つことが示され、雑種性の確認ができた。このような雑種個体を対象に、0、3、5、7%の塩水で1ヶ月間灌水し、処理後の状況で耐塩性程度を評価した。その結果、7%塩処理後も生存する高耐塩性系統を選抜することができた。また、耐塩性を示す *Z. sinica* は直立型であるためターフを形成しないが、雑種個体ではターフを形成する系統も認められたため、耐塩性が高く、ターフを形成する優良系統として5系統を選抜した。さらにこれら選抜系統の被覆度を調査した結果、交配親である *Z. matrella* よりも高い被覆性を有することから、*Z. sinica* を交配親として利用することで耐塩性および被覆性に優れた個体を作出できることが明らかとなった。

(6) 瞬間接着剤法により *Zoysia* 属種および *Z. sinica* を交配親として得られた雑種群における塩類腺の分布パターンを調査した。*Zoysia* 属種7種の耐塩性と塩類腺の分布パターンの関係性を調査した結果、耐塩性を示した2種(*Z. sinica* および *Z. matrella*)では、総塩類腺数の80%以上が葉の表面に存在し、このような塩類腺の分布パターンが耐塩性の指標となることを明らかにした。しかし、これら2種の種間交配によって得られた雑種では、7%塩処理に対して生存した系統および枯死した系統ともに葉の表面に多くの塩類腺を有し、このような高濃度での耐塩性に関しては、耐塩性程度と塩類腺の分布パターンに関連性は認められなかった。

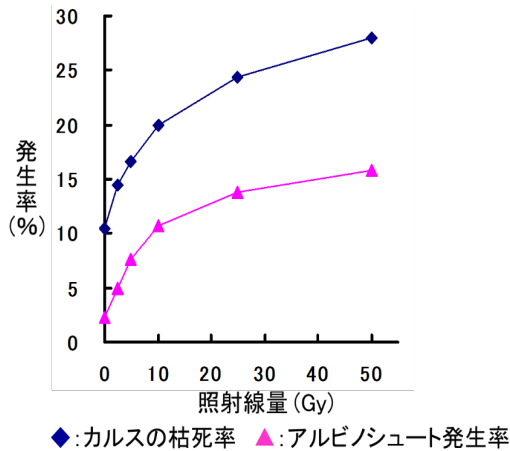


図4 カルスの枯死およびアルビノ形成に及ぼすイオンビーム照射線量の影響.

表1 染色体倍加に及ぼすイオンビーム照射線量の影響

照射線量 (Gy)	分析個体数	推定染色体倍加個体数	推定染色体倍加発生率(%)
0	17	0	0.0
2.5	9	0	0.0
5	67	6	8.8
10	197	59	30.0
25	10	0	0.0
50	23	3	13.0
合計	323	68	21.1

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)

Y. Matsuda, H. Kaneko, T. Murata and Y. Hoshi, RAPD analysis to assess genetic diversity in *Zoysia sinica* Hence (Poaceae) native to Japan and Korea, Chromosome Botany (査読有) 7, 2012, PP53-57.

〔学会発表〕(計 4 件)

松田靖・北島ゆう・岩堀英晶・村田達郎
*Zoysia*属7種におけるシバネコブセンチュウ抵抗性のスクリーニング 日本芝草学会 2015年6月21日 日本大学生物資源科学部 (神奈川県藤沢市)

松田靖・金子博・村田達郎 九州・沖縄地域における *Zoysia* 属種の分布と遺伝的多様

性 日本育種学会 2013年10月12~13日
鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

金子博・松田靖・村田達郎 シバネコブセンチュウの効率的な増殖と接種の試み

日本芝草学会 2012年6月24日 東京農業大学(東京都世田谷区)

金子博・松田靖・明石良・村田達郎 RAPDおよびSSRによる *Zoysia sinica* の遺伝的多様性評価 日本芝草学会 2012年6月24日 東京農業大学(東京都世田谷区)

〔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:
出願年月日:
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
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 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号: