

琉球在来豚（アグー）の効率的繁殖技術の確立

(5) 発情徴候不明瞭豚における性ホルモン動態と膣内粘液電気抵抗との関連

仲村敏 建本秀樹* 島袋宏俊 稲嶺修
山内昌吾* 屋嘉比達郎* 与古田稔

I 要 約

琉球在来豚(アグー)で多く認められる不明瞭な発情徴候を示す個体群(発情不明瞭群)の繁殖効率向上を目的に、発情不明瞭群における膣内粘液電気抵抗(VER)値と性ホルモン濃度の推移との関連性について検討した。

1. 発情徴候が不明瞭で、かつ VER 値が周期的な変動を示す個体群(発情不明瞭群 TypeA)の血漿中エストロゲン(Estradiol-17 β ; E₂)は、発情徴候が明瞭な個体群(正常発情群)と類似した動態を示した。しかし、発情不明瞭群 TypeA は、正常発情群より E₂の上昇開始時期が約 36 時間遅く、最高濃度に達するまでの時間も約 29 時間短かった。

2. 発情徴候が不明瞭で、かつ VER 値が周期的な変動を示さない個体群(発情不明瞭群 TypeB)は、個体ごとに異なる E₂動態を示し、規則性は認められなかった。

3. 発情不明瞭群 TypeA の血漿中プロゲステロン(Progesterone; P₄)は、正常発情群と類似した動態を示したが、P₄上昇は、正常発情群より約 44 時間早く開始された。いっぽう、発情不明瞭群 TypeB では、持続的な P₄の上昇は認められなかった。

3. 発情不明瞭群 TypeA の血漿中黄体形成ホルモン(Luteinizing Hormone; LH)は、正常発情群と類似した動態を示したが、LH サージは正常発情群より約 16 時間早く認められた。

4. 発情不明瞭群 TypeB の LH は、規則性が認められず、LH の増減を不規則に繰り返す個体と LH が低濃度で持続する個体が認められた。

5. VER 値と E₂濃度との間には負の相関性(P<0.01)、P₄濃度ならびに LH 濃度の間には正の相関性(P<0.01)が認められたことから、VER の測定は卵巢状態の推察に有効であることが示唆された。

以上のことから、発情不明瞭群 TypeA は、卵巢からの各ホルモンが不均衡な状態であることが示唆され、発情不明瞭群 TypeB はホルモンの分泌異常で多様な卵巢機能不全の状態であると推察される。そのため、発情不明瞭群でも VER を指標とした適切なホルモン処置により受胎率を改善できる可能性もあり、ホルモン療法による処置も今後、検討する必要があると思われる。

II 緒 言

繁殖豚は通常、外陰部の発赤・腫脹、膣粘液の漏出、乗駕許容や背圧反応などの発情徴候により交配適期を判断している。しかし、アグーは、発情徴候の発現に乏しく、その約半数が明瞭な発情徴候を示さない個体である¹⁾。また、体型が一般西洋豚に比べ小型なため、直腸検査による卵巢診断や治療も困難であり、繁殖供用ができていないのが現状である。このことが繁殖効率を低下させる要因の一つとなり種豚増殖を妨げる原因となっている。そのため、アグーを効率的に繁殖させ、生産性を高めるには、発情不明瞭豚に対しても応用可能な繁殖技術の確立が必要である。

近年、豚の発情期における VER 値と性ホルモン濃度には、高い相関があることが報告されている²⁾。伊東^{3~5)}や岩村ら⁶⁾も VER 値は性ホルモンと同様な周期的な変動パターンを呈し、それは、黄体期に高値を示し、発情開始の 1~2 日前に最低値となることから、VER の測定により発情開始日の推定が可能であると報告している。著者ら¹⁾もアグーの VER 測定において同様な変動パターンを確認し、VER を測定することで、発情および授精適期の推定が可能であることを報告した。さらに、正常発情群の VER 値と性ホルモン濃度の相関は高く、アグーは、一般西洋豚より排卵や授精適期が早期であることも明らかにした⁷⁾。また、VER 値を指標に適期で早期人工授精を実施すると、アグーの受胎率が飛躍的に向上することを示した⁸⁾。しかし、発情不明瞭群については、良好な受胎成績が得られず、繁殖に供用す

*琉球大学。

るには未だ不十分なのが実情である。

そこで本試験では、発情不明瞭群の繁殖効率向上を目的に、不明瞭な発情徴候を示すアグーの VER 値と性ホルモン濃度を測定し、その関連性や繁殖技術への応用について検討した。

Ⅲ 材料および方法

1. 期間および場所

試験は 2008 年 5 月から同年 9 月に沖縄県畜産研究センターで実施した。

2. 供試豚

当センターで飼養しているアグー種雌豚について事前に発情徴候と VER 動態を調べ、うち 11 頭を 1) 発情徴候が比較的明瞭で、かつ VER 値が周期的な変動を呈す個体群 (正常発情群) 5 頭, 2) 発情徴候が不明瞭で、かつ VER 値が周期的な変動を示す個体群 (発情不明瞭群 TypeA) 3 頭, 3) 発情徴候が不明瞭で、かつ VER 値が周期的な変動を示さない個体群 (発情不明瞭群 TypeB) 3 頭に群分けして供試した。

3. 採血手法およびサンプル処理

1) 頸静脈へのカテーテル装着手術および採血

前麻酔として鎮静剤 (ドミツール, 1ml/頭) および分泌抑制剤 (硫酸アトロピン, 0.05mg/kg) を耳根部に筋肉内投与, 続いて導入麻酔剤 (ドルミカム, 2ml/頭), 全身麻酔剤ペントバルビタール製剤 (ソムノペンチル 0.1ml/kg) の筋肉内投与により麻酔導入した。供試豚は手術台に固定し, ハロセン 2-3% と酸素の吸入により深麻酔状態を維持した。

頸静脈へのカテーテル装着手術は, 頸部腹側をメスで切開し, 外頸静脈を探り, そこへウロキナーゼ中心静脈用カテーテル (日本シャーウッド社, メディカット LCV-UK キット, 50cm, 18G) を挿入した。切開部は縫合し, カテーテルは体表に沿わせ背中に向け, 粘着性弾力包帯 (アルケア, エラテックス 5) を貼り付け, 固定し, 安静状態を保ったままでの採血を可能とした。術後は感染予防のため, アンピシリンを筋肉内投与した。

2) 採血およびサンプル処理

採血は, 安静状態を保ったまま外頸静脈に固定したカテーテルを通して, VER の最低値を基準に前後 7 日間, 8 時間間隔で行った。採取した血液は, 直ちに抗凝固剤 (EDTA-2Na) 加真空採血管に移し, 3000rpm 30 分間遠心分離後, 血漿サンプルとして, 各性ホルモンを測定するまで -80°C に保存した。なお, カテーテル内の血液凝固を防ぐため, 採血の前後にヘパリン生食を約 5ml カテーテル内へ注入し, フラッシュした。採血時には, カテーテル内のヘパリン生食を吸引除去し, 新しい注射筒で約 5-10ml の血液を採取した。

4. VER 値および性ホルモンの測定

VER 測定には, 市販の膈内電気抵抗測定器 (ポーランド国, DORAMINSKI 社製) を使用し, 測定は性周期に併せて継続的に 1 日 1 回行い, 測定期間中 VER が最も低値を示した日を 0 日目とした。また, -2 日目から +5 日目までの計 7 日間の VER 測定は, 採血と併せて 8 時間間隔で行った。

E_2 及び P_4 濃度の測定は, それぞれ市販の Estradiol EIA Kit, Progesterone EIA Kit (Cayman Chemical 社) を使用し, Protocol に従って Enzyme Immunoassay (EIA) 法により実施した。黄体形成ホルモン (Luteinizing Hormone; LH) 濃度は, 市販の LH ELISA Kit (Endocrine Technologies 社) を使用し, Protocol に従って Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法により定量した。

5. 統計処理

統計処理は統計解析ソフト R を用いて行った。Shapiro-Wilk normality test で正規性を確認し分散分析を行った後, 有意差の認められた試験区において Tukey-Kramer test で多重比較検定を行った。

IV 結 果

1. VER 値の動態

図1に各群(発情不明瞭群 TypeA, 発情不明瞭群 TypeB-1・TypeB-2・TypeB-3)の VER 最低値を基準とした VER の変動を示した。その結果, 正常発情群および発情不明瞭群 TypeA は, いずれも VER が最低値を示した後, 徐々に上昇するという類似した変動パターンを示した。また, VER の最低値は発情不明瞭群 TypeA が平均 273.3 ± 8.5 unit で正常発情群 (252.0 ± 8.6 unit) より若干高い値を示した。

いっぽう, 発情不明瞭群 TypeB は, 個体ごとに異なる VER 値の変動パターンを示し, 最低値を示した後の VER の持続的な上昇は, いずれの個体でも認められなかった。

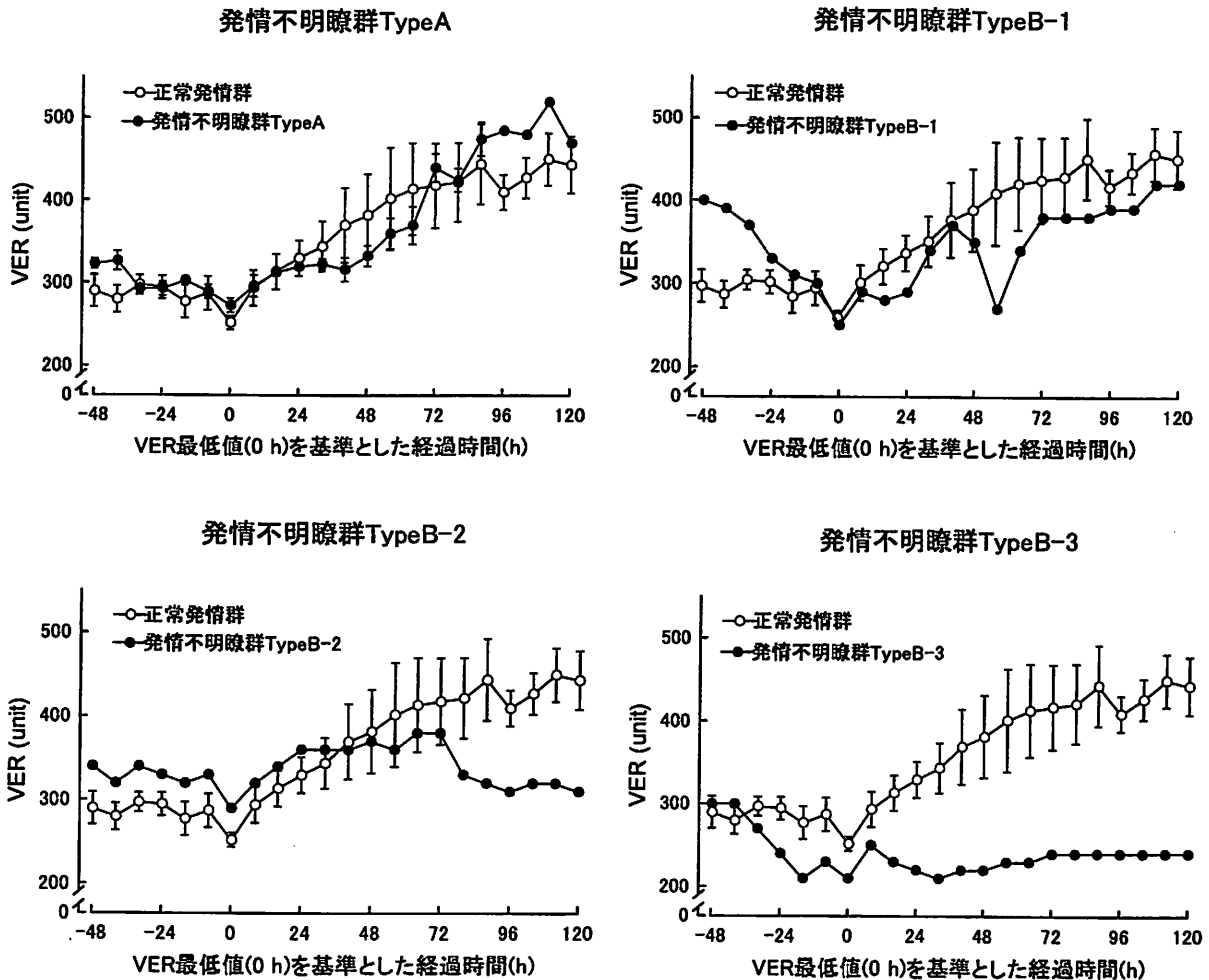


図1 VER 値の動態

注1) TypeB のグラフは個体 (n=1) を示す。

2) 平均±標準誤差。

2. 血漿中 E₂ 濃度の動態

図2に各群(発情不明瞭群 TypeA, 発情不明瞭群 TypeB-1・TypeB-2・TypeB-3)の VER 最低値を基準とした血漿中 E₂ 濃度の動態を示した。その結果, 正常発情群および発情不明瞭群 TypeA は, いずれも VER が最低値を示した前後に E₂ が上昇するという類似した動態を示した。しかし, E₂ が上昇し始めて (Mean + 2SD <) から最高濃度までの経過は, 正常発情群の場合, VER が最低値となる約 16 時間前に E₂ が上昇し始め, E₂ が最高濃度 (92.4 ± 8.1 pg/ml) に達したのは, それから約 56 時間後であった。それに対し, 発情不明瞭群 TypeA は, VER が最低値を示した約 16 時間後に E₂ が上昇し始め, E₂ が最高濃度 (150.8 ± 27.1 pg/ml) に達したのはそれから約 27 時間後であった。すなわち, 発情不明瞭群 TypeA は, 正常発情群より E₂ の

上昇が遅れて開始され、かつ持続時間も短かった。

いっぽう、発情不明瞭群 TypeB の E_2 は、個体ごとに異なる動態を示し、類似した規則性は認められなかった。

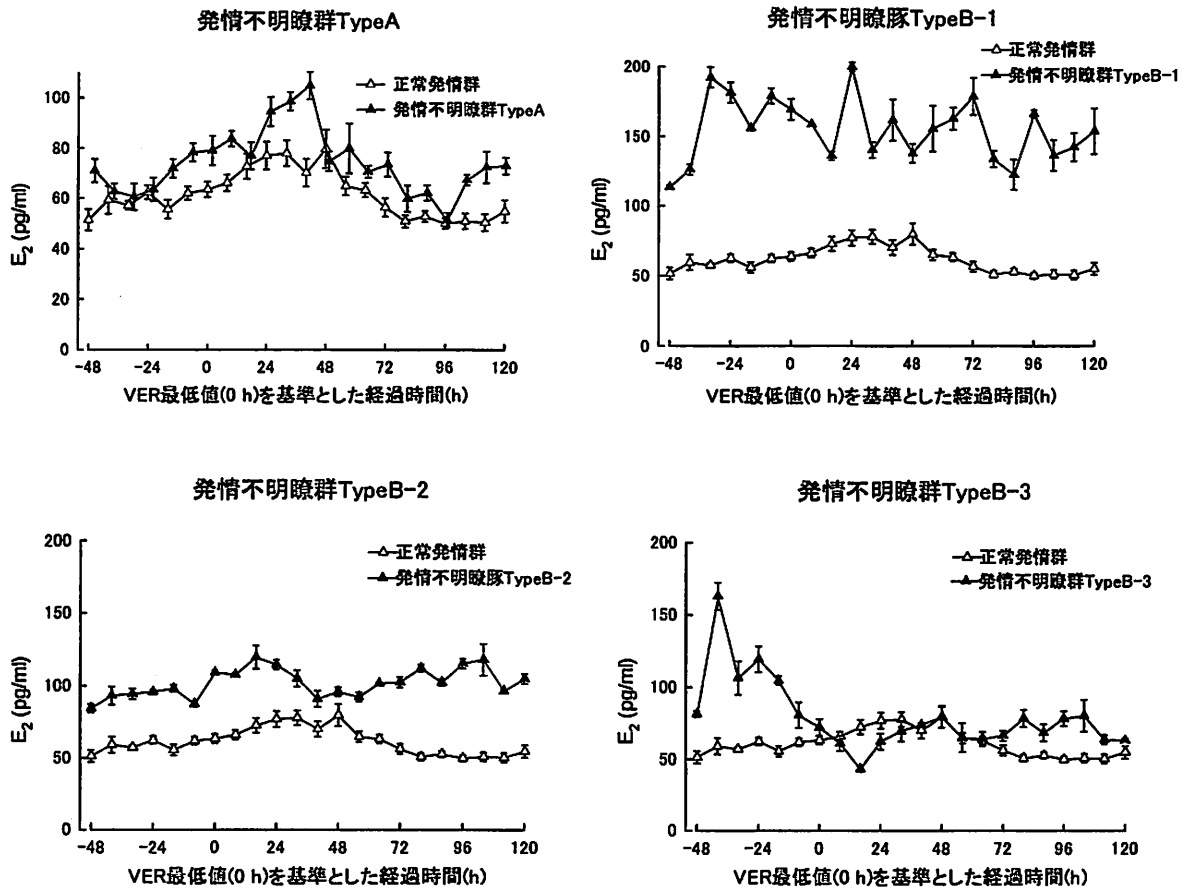


図2 血漿中 E_2 濃度の動態

注1) TypeB のグラフは個体 (n=1) を示す。

2) 平均±標準誤差。

3. 血漿中 P_4 濃度の動態

図3に各群(発情不明瞭群 TypeA, 発情不明瞭群 TypeB-1・TypeB-2・TypeB-3)の VER 最低値を基準とした血漿中 P_4 濃度の動態を示した。その結果、正常発情群および発情不明瞭群 TypeA は、いずれも VER が上昇し始めた後に P_4 も上昇 (Mean+2SD<) を開始するという類似した動態を示した。しかし、正常発情群の場合、VER が最低値を示してから約 88 時間後 P_4 が上昇し始めたのに対し、発情不明瞭群 TypeA は VER が最低値を示してから約 40 時間後に P_4 の上昇が開始された。すなわち、発情不明瞭群 TypeA は、正常発情群より P_4 の上昇が早く開始された。

いっぽう、発情不明瞭群 TypeB は、いずれの個体においても持続的な P_4 の上昇を示すことなく推移した。

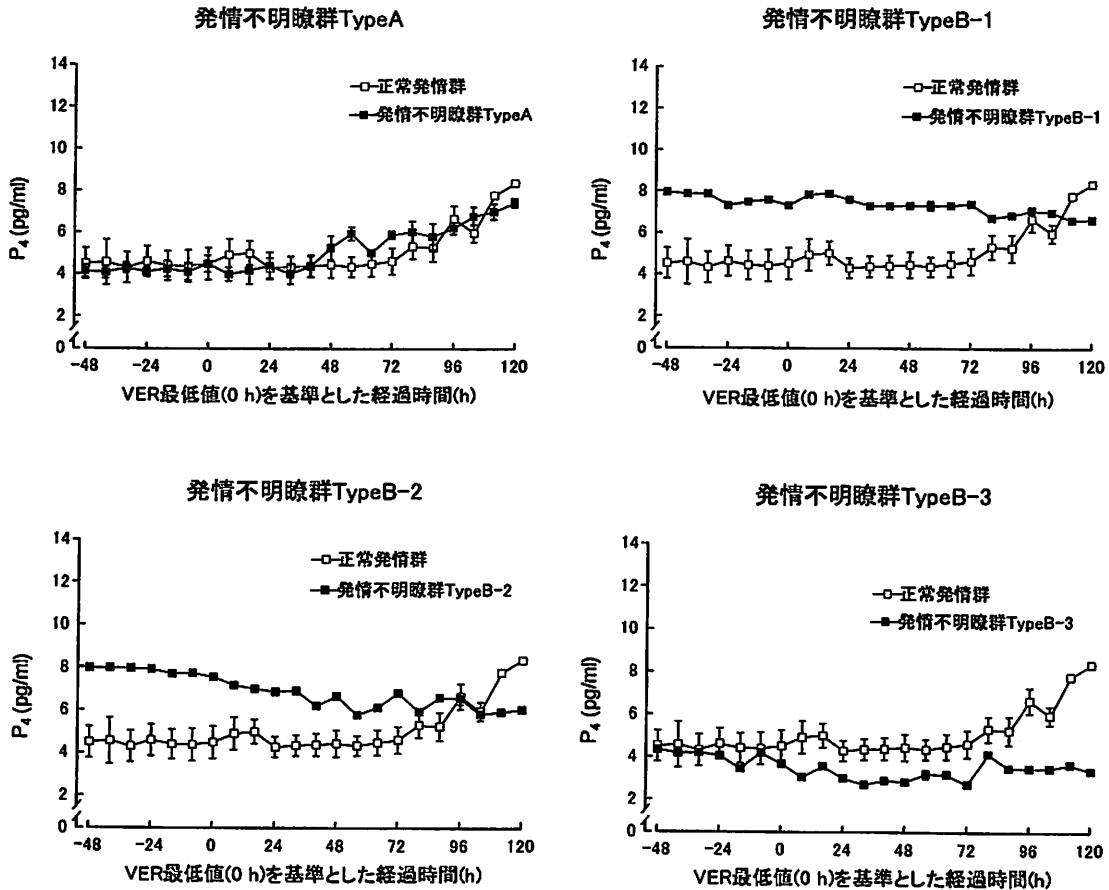


図3 血漿中 P₄ 濃度の動態

注 1) TypeB のグラフは個体 (n=1) を示す。
 2) 平均±標準誤差。

4. 血漿中 LH 濃度の動態

図 4 に各群(発情不明瞭群 TypeA, 発情不明瞭群 TypeB-1・TypeB-2・TypeB-3)の VER 最低値を基準とした血漿中 LH 濃度の動態を示した。その結果, 正常発情群および発情不明群 TypeA は, いずれも VER が上昇し始めた後に LH サージが認められるという類似した動態を示した。しかし, 正常発情群の場合, VER が最低値を示してから約 72 時間後に LH サージが認められたのに対し, 発情不明瞭群 TypeA は, VER が最低値を示してから約 56 時間後に LH サージが認められた。すなわち, 発情不明瞭群 TypeA は, 正常発情群より LH サージの発現が早期であった。また, 発情不明瞭群 TypeA の LH の最高濃度は $1.1 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$ で正常発情群 ($1.3 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$) より若干低い値であった。

いっぽう, 発情不明瞭群 TypeB のうち 2 頭(A-1, A-2)が無秩序に LH の増減を繰り返すパターン, 残り 1 頭は測定期間中 LH が低濃度で推移するパターンが認められた。しかし, いずれの個体も規則的な LH の動態は認められなかった。

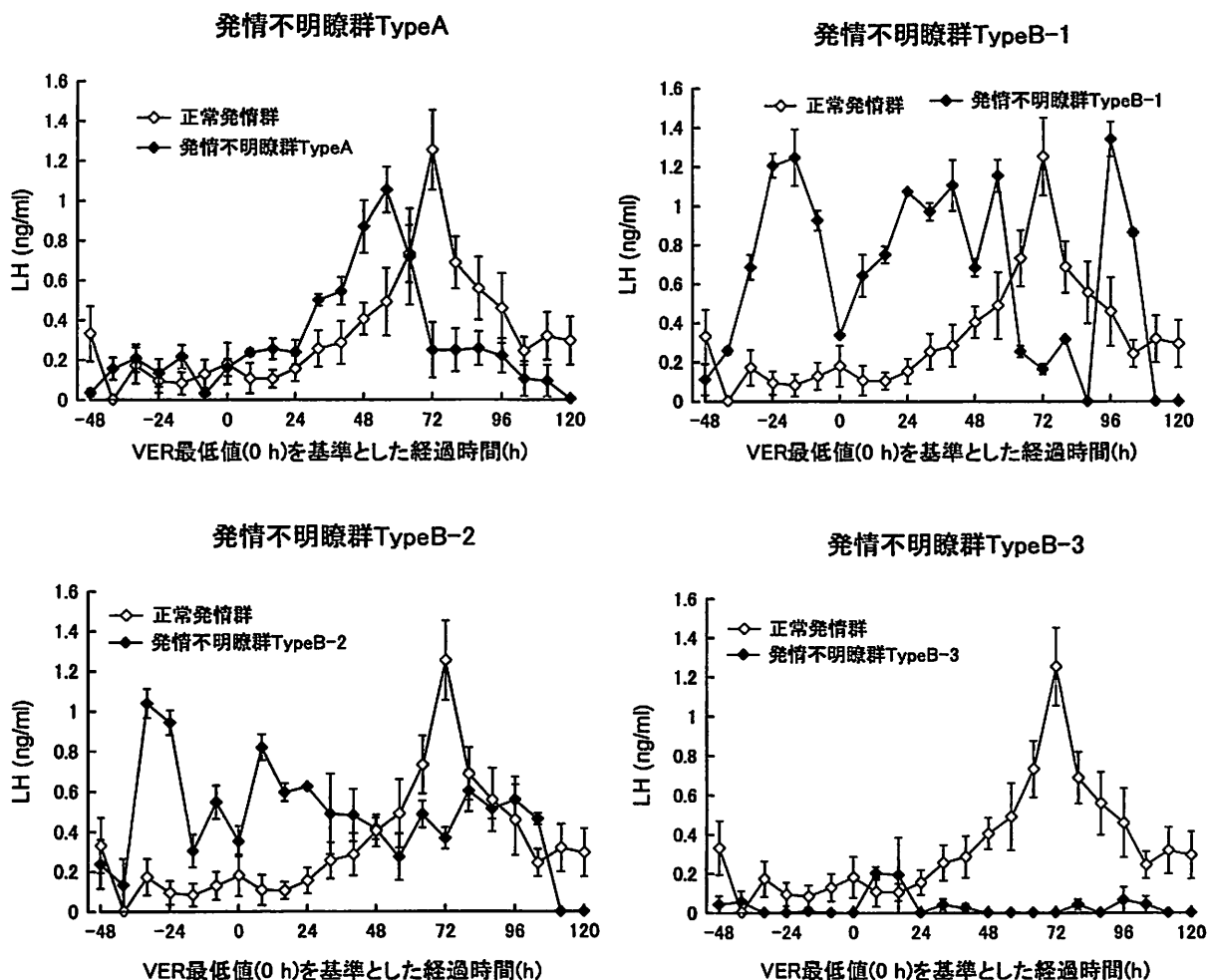


図4 血漿中 LH 濃度の動態

注1) TypeB のグラフは個体 (n=1) を示す。
 2) 平均±標準誤差。

5. VER 値と各性ホルモン濃度との相関関係

表1に VER 値と各性ホルモン濃度 (E_2 , P_4 および LH) の相関関係を示した。その結果, E_2 と VER 値の間には有意な負の相関が認められ ($P < 0.01$), P_4 ならびに LH と VER 値の間には有意な正の相関性が認められた ($P < 0.01$)。

表1 VER 値と各性ホルモン (E_2 , P_4 , LH) との相関関係

	E_2	P_4	LH
相関係数 (r)	-0.615 **	0.643 **	0.561 **

注1) NS; 有意差なし
 2) ** $p < 0.01$

V 考 察

今回、不明瞭な発情徴候を示すアグーの VER 値と性ホルモン濃度を測定し、その関連性や繁殖技術への応用について検討した。その結果、発情不明瞭群 TypeA の VER 値、 E_2 濃度、 P_4 濃度、LH 濃度は、正常発情群とほぼ類似した変動パターンや動態を示していた。いっぽう、発情不明瞭群 TypeB では、すべての検査項目において正常発情群との類似性は認められなかった。また、すべての群における VER 値と各性ホルモン濃度との間には相関性が認められ、VER は各性ホルモンの動態をよく反映しており、VER の測定は卵巣の状態を推察するのに非常に有効であることが示唆された。

発情徴候は主として E_2 の作用によって発現し、 P_4 がこれに協力的に働き、ホルモン濃度の上昇に伴って外陰部は腫脹・充血し、発情症状が現れてくる。家畜では E_2 が最高濃度に達して、 E_2 と P_4 との比率、すなわち E/P 比が最も高い数値を示した時点から発情行動が開始される⁹⁾。また、電気伝導度や抵抗値は、発情期における腔粘液中の塩化物を含む電解質イオン濃度の上昇を反映したものであり、その要因については E_2 や LH 等の性ホルモン作用と考えられている¹⁰⁾ また、排卵は、成熟卵胞の膨大、卵胞壁が拡張・充血することにより起こり、これらは LH サージにより誘起される¹¹⁾。いっぽう、ブタの排卵時期は、発情が始まってから 24~48 時間(平均 31 時間)の発情終了日頃とされ、ブタは排卵数が多いため最初の排卵から最後の排卵までに 1~7 時間(通常 2 時間程度)を要すると言われ⁹⁾、排卵時間は発情持続時間の短いものは早く、長いものは遅れる傾向にある¹¹⁾。著者ら¹⁾ は微弱発情を呈すアグーの発情持続時間は、1.7 日と短く、LH サージも早期に認められることから、一般西洋豚より排卵の時期が早く、持続時間が短いことを報告している。

今回の試験において、発情不明瞭群 TypeA は、VER や性ホルモンの動態は正常発情群とよく類似していた。しかし、 E_2 の上昇開始は正常発情群より約 36 時間遅かったにもかかわらず、最高濃度に達したのは正常発情群より約 29 時間早かった。また、正常発情群より約 16 時間早く LH サージが認められ、 P_4 が上昇を開始したのも正常発情群より約 44 時間早いことが確認された。このことから発情不明群 TypeA の場合、卵巣周期を営み、それに伴う腔粘液性状などの変化は認められるものの、正常発情群より E_2 の持続的な上昇に乏しく、 P_4 の上昇も LH サージも早期に発現することにより、卵巣における各ホルモンが不均衡な状態なため、明瞭な発情徴候が発現しないと考えられた。また、これらは成熟卵胞の発育や排卵にも影響を与えていると考えられ、著者ら⁷⁾ が報告した微弱発情豚より排卵の時期や時間がさらに早く、短いか無排卵と考えられた。すなわち、発情不明瞭群 TypeA の卵巣状態は、軽度な卵胞発育障害か未発達の機能性黄体が比較的長く遺残する黄体遺残型鈍性発情の状態ではないかと推察され、このことが VER を指標に早期人工授精を実施しても良好な受胎成績が得られない原因ではないかと考えられた。

したがって、発情不明瞭群 TypeA の受胎率を高め、繁殖に供用するには、VER を指標にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(PMSG) 投与により卵胞の成熟を促すとともにヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG) 投与により排卵を誘導した後、人工授精を実施することが有効な方法ではないかと思われた。

いっぽう、発情不明群 TypeB は、無秩序に LH の増減を繰り返す、あるいは、LH が低濃度で推移するという分泌異常が認められ、 E_2 および P_4 の動態においても正常発情群に見られる規則性が認められなかった。このことから、発情不明群 TypeB の卵巣は卵胞囊種や黄体囊種あるいは卵巣萎縮など個体により多様な状態があると思われた。

岩村ら¹²⁾ は、黄体遺残型鈍性発情の治療としてプロスタグランジン(PG) $F_2\alpha$ の反復投与による黄体退行作用と性腺刺激ホルモン放出ホルモン類縁物質(GnRH-A)による排卵誘起作用を併用し、人工授精による産子を得ることに成功している。このことから今後は、不明瞭な発情徴候を示すアグーの処置方法や臨床現場での治療技術の開発も検討する必要があると思われた。

VI 引用文献

- 1) 仲村敏・大城まどか・稲嶺修・山内昌吾, 吉元哲兵, 建本秀樹, 蝦名真澄(2006) 琉球在来豚(アグー)の効率的繁殖技術の確立(2) 腔内電気抵抗値を指標とした発情開始日および授精適期の推定, 沖縄畜研セ研報, 44,43-47
- 2) L. Dusza, M. Opałka, B. Kaminska, T. Kaminski, and R. E. Ciereszko(1996) The relationship between

electrical resistance of vaginal mucus and plasma hormonal parameters during periestrus in sows, *Theriogenology*, 45, 1491-1503

- 3) 伊東正吾・保科和夫・宮脇耕平(1999)周排卵期における豚の深部膈内電気抵抗性を指標とした授精成績, 豚の繁殖セミナー通信, 25, 26-30
- 4) 伊東正吾(1994)豚の周排卵期における膈深部電気抵抗性の変化と血中ホルモンの動態, 豚の繁殖セミナー通信, 21, 33-37
- 5) 伊東正吾(2005)種雌豚の深部膈内電気抵抗値を指標とした繁殖機能の判定技術, *Proc Jpn Pig Vet Soc*, 47, 18-22
- 6) 岩村祥吉・吉岡耕治・加茂前秀夫(1994)豚の周排卵期における膈深部の電気抵抗性の変化, 豚の繁殖セミナー通信, 21, 15-17
- 7) 仲村敏・島袋宏俊・稲嶺修・山内昌吾・吉元哲兵, 建本秀樹, 与古田稔(2007)琉球在来豚(アグー)の効率的繁殖技術の確立(3)膈内粘液電気抵抗値の変動と性ホルモン濃度の動態との関連, 沖縄畜研セ研報, 45, 25-30
- 8) 仲村敏(2008)琉球在来豚アグーを増殖させるための繁殖技術, 日豚会誌, 45(4), 2332-230
- 9) 日本家畜人工授精師協会(2003)家畜人工授精講習会テキスト(家畜人工授精編), 177-289
- 10) 星修三・山内亮(1982)新版家畜臨床繁殖学, 朝倉書店, 73-76
- 11) 上村謙一(1977)繁殖豚の種付適期とその簡易判定法, 畜産の研究, 6, 46-50
- 12) 岩村祥吉・吉岡耕治・鈴木千恵(2002)養豚場における離乳後無発情の卵巣診断, 豚の繁殖セミナー通信, 29, 57-59

研究補助：又吉博樹，赤嶺圭作

琉球在来豚（アグー）の効率的繁殖技術の確立

(6) 凍結精液希釈液への鶏卵黄由来低密度リポタンパク質 (LDL) の添加が融解後の精子性状に及ぼす影響

仲村敏 建本秀樹* 島袋宏俊 稲嶺修
山内昌吾* 与古田稔

I 要 約

琉球在来豚(アグー)精子に適した凍結保存技術の確立を目的に、鶏卵黄中に含まれる低密度タンパク質(LDL)を抽出し、凍結用希釈液へのLDL添加効果について検討した。凍結用希釈液へ添加したLDL濃度は、2%、4%、6%、8%、10%の5水準で区分し(LDL添加区)、20%の鶏卵黄添加を対照区(EY20%添加区)として凍結・融解後の精子性状を比較した。

1. LDL6%添加区は、EY20%添加区より融解 3 時間後の運動精子率(Motile)、前進運動精子率(Progressive)が高く($P<0.05$)、効果的に運動性を維持していた。
2. LDL4%および6%添加区は、EY20%添加区より、精子細胞膜を正常に維持した割合が高く($P<0.05$)、細胞膜障害を抑制する傾向が認められた。
3. LDL6%添加区は、EY20%添加区より精子先体タンパク質酵素活性が高く($P<0.05$)、精子先体の正常性が維持されていた。
4. LDL6%添加区は、EY20%添加区より細胞内ATP量およびミトコンドリアの正常性を維持した割合が高く($P<0.05$)、精子生存性が維持される傾向が認められた。
5. LDL添加区は、EY20%添加区より細胞内コレステロール量が増加する傾向が認められた。しかし、全ての試験区において体外受精(IVF)における精子受精能に有意差は認められず、コレステロール量増加による受精能抑制作用は認められなかった。

以上の結果、凍結用希釈液へのLDLの添加は、凍結・融解後の精子性状性を効果的に維持することが示唆され、至適濃度は6%であった。これは、LDLの添加により、細胞膜のコレステロールの授与作用などを介して精子の細胞膜流動性が向上し、精子の凍結障害を緩和した結果であると推察され、アグー凍結精子を作製する上で有効な方法であると思われた。

II 緒 言

アグーは、近交退化の影響と考えられる繁殖能力の低下が認められる¹⁾。雄では一般西洋品種と比較して精子性状が著しく劣っており、授精に適した液状または凍結精液が得られにくい。このことがアグーの増殖を妨げる一要因となっている²⁾。しかし、ブタ精子の凍結保存技術は、以前からその重要性を指摘されているものの生産現場においては未だ実用化の域に達していない。また、アグーの場合、一般的に利用されている豚凍結精液製造マニュアル³⁾に従って凍結処理を行っても、利用に耐えうる活力を有した精子は得られない。そのため、効率的にアグーの増殖を行うためには、アグー精子に適した凍結保存技術を確立し、年間通じて安定的かつ広域的に精子を利用することが重要である。

著者ら²⁾は、一般的に行われている精子の凍結処理工程や精子処理液を見直すことでアグーの精子性状が改善されたことを報告している。さらに凍結時の酸化ストレスを抑制するため、凍結希釈液へのアスコルビン酸(AA-2G)添加により、融解後の精子運動性や精子細胞膜正常性を効果的に維持できることも報告した⁴⁾。しかし、本方法においても凍結・融解時には約6割の精子に細胞膜障害が認められ、運動性やその他精子性状などもまだ授精に適した水準に達していない。

一般的に凍結用精子希釈液には、凍結障害を緩和するための鶏卵黄が添加されているが、その有効性に対する詳細な作用機序については判っていない。ブタの精子原形質膜は、他の家畜と比較してリン脂質

に対するコレステロール含量が低く、膜流動性が劣っている。そのため凍結時には細胞障害の影響を受けやすいことが報告されている⁵⁾。しかし近年、Huら⁶⁾により鶏卵黄中のLDLが精子凍結における有効な作用物質であるとする報告がなされた。LDLは、鶏の卵黄に多量に含まれており、その構造は85～90%の脂質と10～15%のタンパク質で構成され、トリグリセリドとコレステロールを核とし、周りをタンパク質とリン脂質で構成された膜によって覆われた構造を呈している。このLDLが、凍結・融解過程において精子細胞膜表面に付着し、細胞膜中のコレステロール比を上昇させ、細胞膜流動性を高めることにより、精子の細胞障害が軽減されると考えられている⁷⁾。

そこで、本試験ではアグー精子に適した凍結保存技術の更なる改良を行うため、凍結用希釈液へ添加する鶏卵黄をLDL単体に置換し、LDLの添加が凍結・融解後の精子性状に及ぼす影響について検討した。

Ⅲ 材料および方法

1. 試験設定

試験は、鶏卵黄から抽出したLDLを単体で精子凍結用希釈液(mBF5)に添加し、凍結・融解後の精子性状を評価した。希釈液に添加するLDL濃度は2%, 4%, 6%, 8%, 10%の5水準で区分し(LDL添加区)、20%の鶏卵黄添加を対照区(EY20%添加区)とした。

精子性状性は、運動性、細胞膜正常性、精子先体タンパク質分解酵素活性、精子生存性、DNA正常性、ミトコンドリア正常性、精子受精能を指標として評価した。また、コレステロール量が精子性状へ与える影響を検討するため、精子細胞内のコレステロール量を測定した。

2. 期間および場所

試験は2007年2月から2009年1月に沖縄県畜産研究センターで実施した。

3. 供試精液

精液は、当センターで飼養しているアグー種雄豚4頭(個体番号:A-1, A-2, A-3, A-4)から手圧法により全精液を採取し、試験に供した。

4. 凍結精液の作製

凍結精液の作製は著者ら²⁾の常法に準拠して行った。採取精液から精漿を遠心除去した後、Beltsville thawing solution(BTS)で遠心洗浄を行い、Beltsville F5(BF5)で精子濃度が 10×10^8 sperm/mlになるよう調製し、約1時間かけ5℃まで冷却した。5℃で約2.5時間静置後、同温の5%glycerol加BF5を等量加え、0.5mlストロー管に封入し、液体窒素の液面上約4cmの高さで約20分間静置した後、液体窒素に浸漬し、凍結保存した。

5. 鶏卵黄からのLDLの抽出

LDLの抽出は、Moussaら⁸⁾の方法に準じて行った。鶏卵黄を生理食塩液で希釈した後、10℃、10000×g、45分間遠心し、卵黄顆粒を除去した。鶏卵黄上清液に少量ずつ(NH₄)₂SO₄を添加し、4℃、10000×g、45分間の遠心によりタンパク質を除去した。上清液は、ヴィスキング透析チューブ(日本メディカルサイエンス社)内で2日間イオン水に浸漬し、脱塩透析を行った。脱塩後、チューブ内の溶液を4℃、10000×g、45分間遠心し、浮遊ペーストをLDLとして回収した。

6. 精子性状検査

1) 運動性・細胞膜正常性・先体タンパク質酵素活性・DNA正常性・精子受精能

各検査は著者ら²⁾の定法により行った。精子運動性は、精子運動性解析装置(Ceros Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne Research)を用いて融解後0, 1, 3時間後のMotileおよびProgressiveを指標として評価した。

精子細胞膜正常性は、CFDA/PI 蛍光染色により緑色蛍光を呈する精子を細胞膜が正常に保持されている精子、赤色蛍光を呈する精子を細胞膜に障害を受けている精子として評価した。なお、検査は各処理区当たり650個以上の精子を観察した。

精子先体タンパク質酵素活性は、固相化ゼラチンスライドに形成された光輪(halo)直径を測定し、精子アクロシン活性の指標として精子先体正常性を評価した。

精子のDNA正常性検査は、中性コメットアッセイ法⁹⁾によりSYBR Green Iで細胞染色し、蛍光顕微鏡下で各処理区当たり100個以上の精子を観察した。なお、評価は、精子が障害を受け、断片化されたDNA像(DNAテール像)が観察されたものをDNAに障害を受けている精子とし、DNAテール像が観察されない

ものを DNA が正常に保持されている精子とした。

精子受精能は、IVF による卵への精子侵入率を指標とし、培養後の卵子のホールマウント標本により、卵細胞質内に精子頭部または雄性前核および尾部の両方が確認された卵を精子侵入として評価した。

2) 精子生存性(細胞内 ATP 量)

細胞内 ATP 量はルミカウンター (PTL300SA; 東洋製作所) を用いて測定した。凍結精液ストロー 0.5ml (2.5×10^8 sperm) を 39°C の PBS 溶液中で融解し、4°C, 700×g, 4 分間の遠心洗浄を行った。遠心後、PBS 溶液により 0.5×10^8 sperm/ml に希釈し、100 μl の精子浮遊液と 300 μl 超純水を混合した後、4 分間の煮沸処理によりタンパク質を変性させた。その後、氷中で冷却し、ボルテックスにより攪拌後、4°C, 10000×g, 4 分間の遠心、得られた上清液を被検材料とした。測定は、サンプル溶液 100 μl に 400 μl のルシフェリン・ルシフェラーゼ溶液を添加、20 秒後に発光量を計測し、Blank 値を除いた値をルシフェリン発光量とし、検量線を基に ATP 量を算出して精子生存性とした。

3) ミトコンドリア正常性

凍結精液ストロー 0.5ml (2.5×10^8 sperm) を融解後、30ml の 1.0 μM MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen 社) 加 PBS 溶液に懸濁し、12 μl の SYBR Green I で染色し、39°C, 20 分間の培養後、700×g, 4 分間の遠心洗浄を行い、PBS 溶液で 0.1×10^8 sperm になるように希釈した。その後、350-460nm 励起波長、510nm 吸収波長の蛍光顕微鏡下で各処理区当たり 600 個以上の精子を観察し、中片部に強い赤色蛍光が認められた精子が正常にミトコンドリアを保持している精子として評価した。

4) 細胞内コレステロール量

細胞内コレステロールの測定は、cholesterol/cholesterol Ester Quantitation Kit (Bio Vision 社) を使用し、プロトコールに従い、マイクロプレートリーダー (Model 680, Bio-Rad 社) により吸光度 570nm で定量した。

6. 統計処理

すべての試験区で計 4 回の追試を行い、統計処理は統計解析ソフト R を用いて行った。Shapiro-Wilk normality test で正規性を確認し分散分析を行った後、有意差の認められた各処理区において Tukey-Kramer test で多重比較検定を行った。

IV 結 果

1. 精子運動性 (Motile, Progressive)

表 1 および表 2 に各 LDL 添加区における Motile と Progressive の成績を示した。その結果、融解直後 (0h) の Motile は、LDL4% 添加区と EY20% 添加区の全て個体で高い運動性を示す傾向にあった。しかし、融解後 1 時間 (1h) と 3 時間後 (3h) では、LDL4% および 6% 添加区が EY20% 添加区より有意に高い運動性を示した ($P < 0.05$)。

Progressive は、融解直後 (0h) では EY20% 添加区が LDL 添加区より有意に高い運動性 ($P < 0.05$) を示した。しかし、融解後 1 時間 (1h) では、LDL4% と 6% 添加区が EY20% 添加区より高い運動性を示し、3 時間後 (3h) においては LDL6% 添加区の全ての個体で EY20% 添加区より有意に高い運動性を示した ($P < 0.05$)。

表1 各LDL添加濃度における運動精子率 (Motile ; %)

個体番号	LDL (%)	融解後の経過時間 (h)		
		0	1	3
A-1	EY 20	71.9 ± 1.3 ^{ab}	42.4 ± 1.7 ^c	21.4 ± 1.4 ^c
	2	43.3 ± 1.6 ^c	27.6 ± 1.4 ^d	18.6 ± 1.3 ^c
	4	69.1 ± 1.4 ^{ab}	59.9 ± 1.1 ^a	39.4 ± 1.6 ^{ab}
	6	70.5 ± 1.4 ^{ab}	52.9 ± 1.6 ^b	42.7 ± 1.7 ^a
	8	73.7 ± 1.3 ^a	51.5 ± 1.6 ^b	33.9 ± 1.6 ^b
A-2	EY 20	64.7 ± 1.6 ^b	38.0 ± 1.7 ^b	20.4 ± 1.3 ^b
	2	47.5 ± 1.6 ^d	37.3 ± 1.6 ^b	15.5 ± 1.2 ^c
	4	67.7 ± 1.5 ^{ab}	52.4 ± 1.2 ^a	32.8 ± 1.5 ^a
	6	69.3 ± 1.4 ^{ab}	52.3 ± 1.7 ^a	31.3 ± 1.6 ^a
	8	72.8 ± 1.4 ^a	35.1 ± 1.6 ^{bc}	24.6 ± 1.4 ^b
A-3	EY 20	54.9 ± 1.7 ^b	33.4 ± 1.6 ^b	18.9 ± 1.3 ^c
	2	47.6 ± 1.7 ^{cd}	42.0 ± 1.7 ^a	25.9 ± 1.5 ^{ab}
	4	51.8 ± 1.7 ^{bc}	42.8 ± 1.1 ^a	29.5 ± 1.5 ^a
	6	61.6 ± 1.6 ^a	40.9 ± 1.7 ^a	23.5 ± 1.4 ^{bc}
	8	51.6 ± 1.7 ^{bc}	30.9 ± 1.6 ^b	20.2 ± 1.4 ^c
A-4	EY 20	71.4 ± 1.4 ^a	39.1 ± 1.6 ^c	12.8 ± 1.1 ^c
	2	38.0 ± 1.5 ^c	38.2 ± 1.4 ^c	8.3 ± 0.8 ^d
	4	69.0 ± 1.4 ^a	56.5 ± 1.2 ^a	32.7 ± 1.4 ^a
	6	63.4 ± 1.4 ^b	48.9 ± 1.5 ^b	22.6 ± 1.4 ^b
	8	68.4 ± 1.3 ^a	47.3 ± 1.5 ^b	22.7 ± 1.4 ^b
	10	69.6 ± 1.4 ^a	31.9 ± 1.5 ^d	21.1 ± 1.3 ^b

注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体の縦列内で異符号間に有意差有り (P<0.05)。

表2 各LDL添加濃度における前進運動精子率 (Progressive ; %)

個体番号	LDL (%)	融解後の経過時間 (h)		
		0	1	3
A-1	EY 20	9.9 ± 0.9 ^a	5.4 ± 0.8 ^b	3.2 ± 0.6 ^{cd}
	2	2.0 ± 0.5 ^c	2.3 ± 0.5 ^c	1.6 ± 0.4 ^d
	4	6.6 ± 0.8 ^b	12.8 ± 1.1 ^a	4.7 ± 0.7 ^{bc}
	6	6.5 ± 0.8 ^b	14.1 ± 1.1 ^a	8.5 ± 0.9 ^a
	8	6.1 ± 0.7 ^b	13.5 ± 1.1 ^a	6.6 ± 0.8 ^{ab}
A-2	EY 20	11.8 ± 1.1 ^a	8.7 ± 1.0 ^c	2.9 ± 0.6 ^b
	2	2.4 ± 0.5 ^d	5.5 ± 0.8 ^d	1.9 ± 0.5 ^b
	4	7.7 ± 0.9 ^{bc}	13.9 ± 1.2 ^a	7.4 ± 0.9 ^a
	6	8.9 ± 0.9 ^{ab}	13.2 ± 1.1 ^{ab}	6.1 ± 0.8 ^a
	8	5.6 ± 0.7 ^c	13.1 ± 1.2 ^{ab}	7.4 ± 0.9 ^a
A-3	EY 20	7.4 ± 0.9 ^a	7.9 ± 0.9 ^c	2.9 ± 0.6 ^b
	2	3.7 ± 0.6 ^b	5.3 ± 0.8 ^c	3.5 ± 0.6 ^b
	4	6.1 ± 0.8 ^{ab}	12.5 ± 1.1 ^a	4.2 ± 0.7 ^{ab}
	6	5.8 ± 0.8 ^{ab}	11.8 ± 1.1 ^{ab}	6.4 ± 0.8 ^a
	8	4.6 ± 0.7 ^{ab}	6.3 ± 0.8 ^c	4.2 ± 0.7 ^{ab}
A-4	EY 20	13.1 ± 1.1 ^a	9.0 ± 0.9 ^c	2.9 ± 0.6 ^{de}
	2	0.9 ± 0.3 ^c	5.6 ± 0.7 ^d	1.4 ± 0.4 ^c
	4	10.5 ± 0.9 ^a	21.4 ± 1.2 ^a	9.2 ± 0.9 ^a
	6	7.1 ± 0.8 ^b	14.0 ± 1.0 ^b	5.7 ± 0.8 ^{bc}
	8	6.8 ± 0.7 ^b	12.5 ± 1.0 ^{bc}	4.9 ± 0.7 ^{cd}
	10	5.9 ± 0.7 ^b	10.2 ± 0.9 ^c	8.4 ± 0.9 ^{ab}

注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体の縦列内で異符号間に有意差有り (P<0.05)。

2. 精子細胞膜正常性および精子先体タンパク質酵素活性

図 1 に各 LDL 添加区における精子細胞膜正常率(図 1-A)および精子先体タンパク質酵素活性(図 1-B)の成績を示した。その結果、精子細胞膜正常率では、LDL4%および 6%添加区が EY20%添加区より高い膜正常率を示す傾向にあった。いっぽう、LDL2%および 8%添加区は EY20%添加区より低い精子細胞膜正常率を示す傾向にあった。

精子先体タンパク質分解酵素活性では、LDL6%添加区の 1 頭(A-3)を除く全ての個体において EY20%添加区より有意に高い酵素活性を示したが(P<0.05)、その他の LDL 添加区では特に傾向は認められなかった。

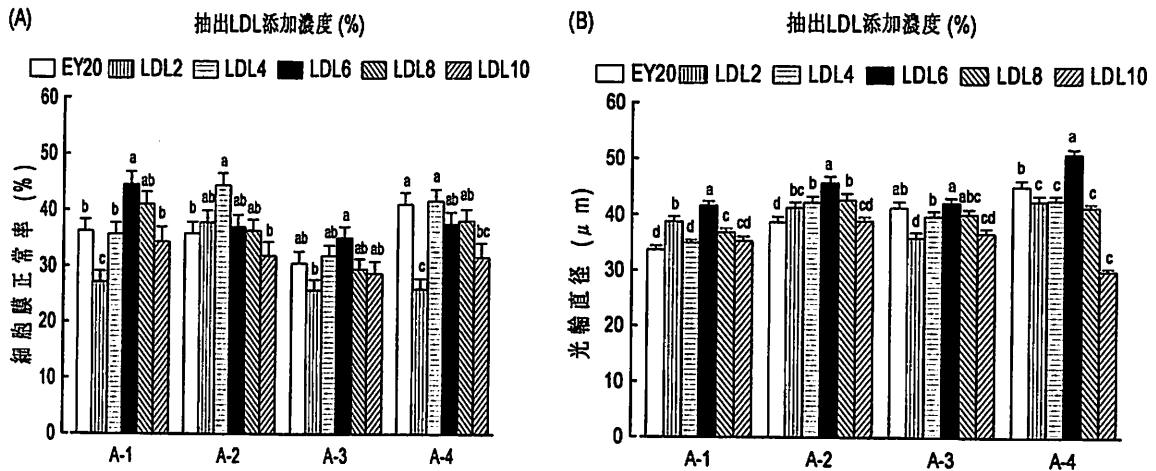


図 1 LDL 各添加区における精子細胞膜正常率 (A)・精子先体タンパク質分解酵素活性 (B)

注 1) 平均±標準誤差。

2) 同個体内の異符号間に有意差有り (P<0.05)。

3. DNA 正常性、細胞内 ATP 量およびミトコンドリア正常性

図 2 に DNA 正常率(図 2-A)、細胞内 ATP 量(図 2-B)およびミトコンドリア正常率(図 2-C)の成績を示した。その結果、DNA 正常性は、LDL6%添加区の 1 頭(A-3)の個体のみ EY20%添加区より有意に高い DNA 正常率を示し(P<0.05)、LDL2%および 10%添加区では、EY20%添加区より若干低い DNA 正常率を示す傾向にあった。

いっぽう、細胞内 ATP 量は、LDL6%添加区の 1 頭(A-3)を除く全ての個体において EY20%添加区より有意に高い精子生存性を示した(P<0.05)。しかし、LDL2%添加区の細胞内 ATP 量は、EY20%添加区より有意に低い値を示した(P<0.05)(図 2B)。

ミトコンドリア正常性では、LDL6%添加区全ての個体が EY20%添加区より有意にミトコンドリア正常率が高く(P<0.05)、LDL4%添加区においてもミトコンドリア正常率は、若干高くなる傾向にあった。

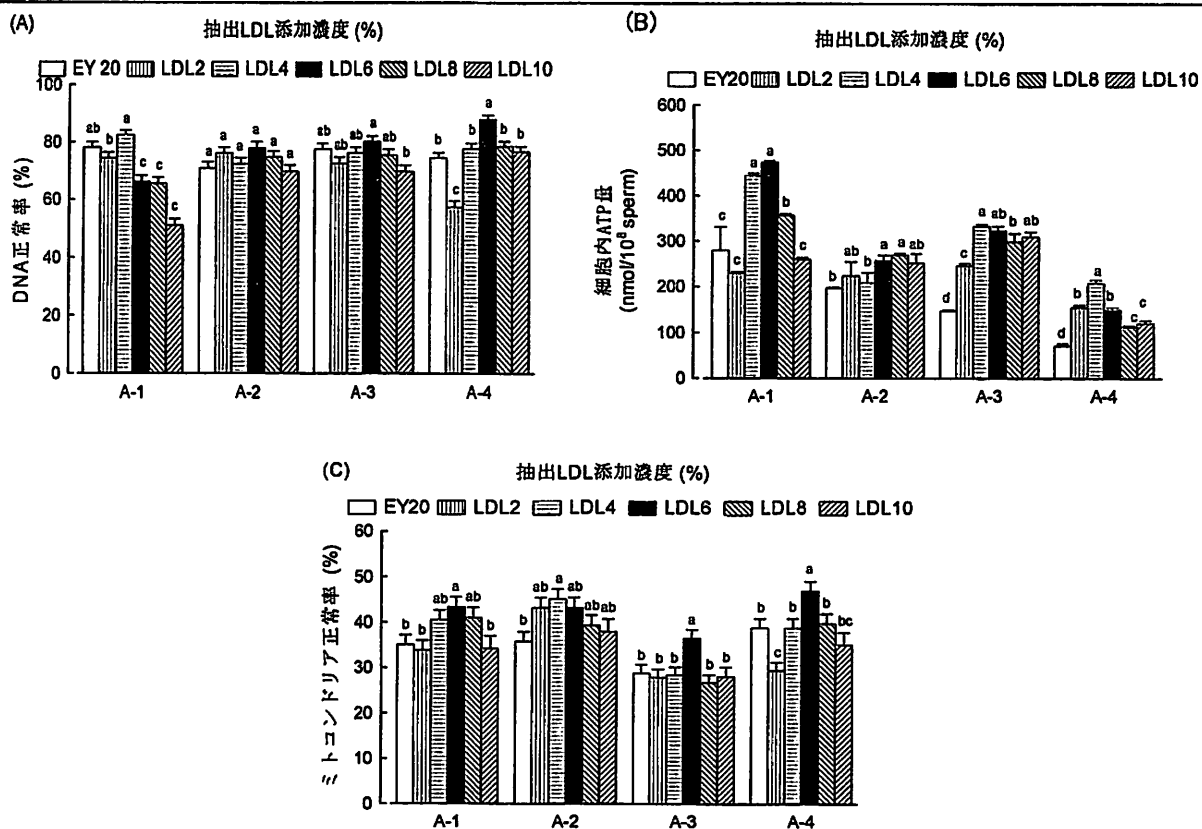


図2 各 LDL 添加区における DNA 正常率 (A)・細胞内 ATP 量 (B)・ミトコンドリア正常率 (C)

注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体内の異符号間に有意差有り (P<0.05)。

4. 細胞内コレステロール量および精子侵入率

図3に細胞内コレステロール量(図3-A)および精子侵入率(図3-B)の成績を示した。その結果,細胞内コレステロール量は, LDL 添加区のほぼ全ての個体が EY20%添加区より有意に高い値を示した (P<0.05)。しかし, LDL の添加量と細胞内コレステロール量との間には比例した傾向は認められなかった。

いっぽう, IVF における精子侵入率は, LDL 添加区と EY20%添加区の全ての個体間において有意な差は認められず, コレステロールによる精子受精能への影響は認められなかった。

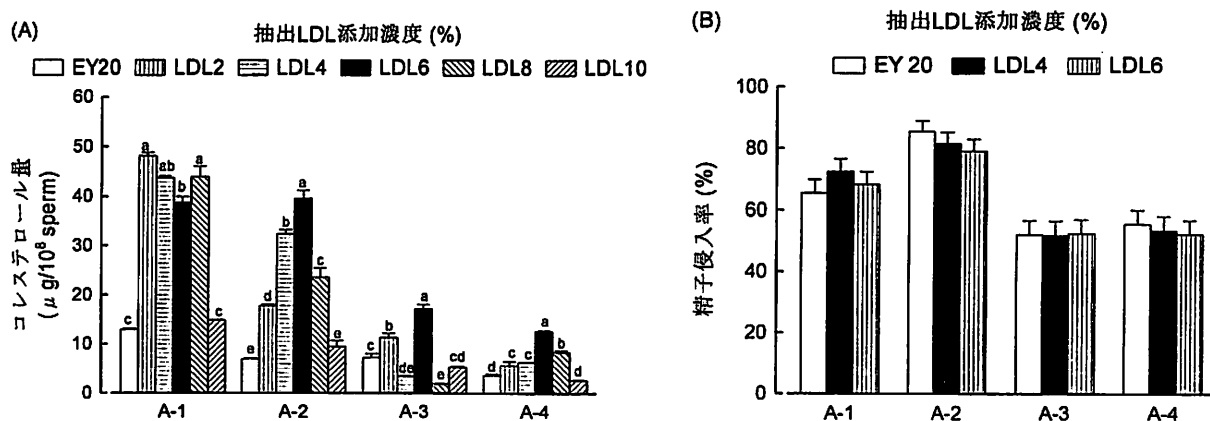


図3 各 LDL 添加区における細胞内コレステロール量 (A)・精子侵入率 (B)

注1) 平均±標準誤差。

2) 同個体内の異符号間に有意差有り (P<0.05)。

V 考 察

今回、鶏卵黄を LDL 単体に置換した精子凍結用希釈液を用いて、アグー精子の凍結処理を行い、LDL 添加が精子性状に及ぼす影響について検討した。

その結果、精子運動性は、LDL6%添加区で融解 3 時間後の Motile, Progressive が EY20%添加区より有意に高い運動性を維持していた ($P < 0.05$)。また、LDL4%および 6%添加区では、正常な細胞膜を維持した精子の割合が EY20%添加区より有意に高く ($P < 0.05$)、細胞膜の障害を抑制する傾向が認められた。LDL6%添加区は、精子先体の正常性についても有意に高く維持された ($P < 0.05$)。さらに、LDL6%添加区では、細胞内 ATP 量やミトコンドリアの正常性を維持した割合が EY20%添加区より有意に高く ($P < 0.05$)、精子生存性が高く維持される傾向が認められた。また、ほぼ全ての LDL 添加区で細胞内コレステロール量が EY20%添加区より有意に増加したにもかかわらず ($P < 0.05$)、IVF による精子受精能は全ての試験区において有意な差は認められず、コレステロールによる受精能抑制作用は認められなかった。

LDL は、精子の凍結・融解処理過程において、その構造が破砕され、トリグリセリドとリン脂質が溶液中に暴露される。それらが精子の細胞膜表面を覆うことにより、精子凍結時に発生する氷晶形成を伴う物理的細胞障害(凍結障害)が抑制されることが明らかになっている⁸⁾。さらに、Graham ら¹⁰⁾ は、LDL に由来するリン脂質が精子細胞膜上のリン脂質と置換することで、精子細胞膜の相転移温度を低下させると報告している。

今回の成績では、凍結希釈液へ LDL を 6%の割合で添加した場合に精子 DNA のダメージが軽減され、精子生存性などの精子性状性が効果的に維持された。これは、LDL のコレステロールにおける膜保護作用や授与作用などが複合して相乗的に働いたことで、精子細胞膜の流動性などが向上し、凍結障害に対して高い抵抗性を示したことが示唆された。

Hu らは⁹⁾、ブタ精子を凍結する際、凍結用希釈液へ 9%の割合で LDL を添加すると精子運動性が向上し、精子細胞膜や精子先体の正常性ならびにミトコンドリア活性が高く維持されたと報告している。しかし今回の研究結果においては、6%の割合で LDL を添加した場合に精子性状性が高く維持された。これは、ブタの個体間や品種間における精子性状性の違いによる影響、また、高濃度の場合、LDL の持つ膜保護作用より有害作用の影響の方が大きく作用したのではないかと思われた。実際に、Jiang ら¹¹⁾ は、LDL 加凍結用希釈液を用いてブタ精子を凍結した際、融解後の精子性状への効果は、ランドレースとデュロックで異なると報告している。また、著者ら²⁾ は凍結精子処理の工程や処理液について検討した際、アグーとランドレースの精子性状評価は異なることを報告している。

いっぽう、低濃度の LDL2%添加区は、凍結融解後の精子性状が EY20%添加区より著しく劣る結果であった。これは卵黄を 20%の割合で添加した場合、凍結用希釈液への LDL 含量は約 4~5%であることが著者らの予備試験により得られており、LDL2%の添加は卵黄 20%より LDL 含量が少ない。このことから、LDL2%添加区は EY20%添加区より LDL 含量が少ないために十分な効果が得られなかったと考えられた。

多様な物質を含む卵黄では、精子の凍結保存に有効な作用機序を解明する上で非常に複雑である。そのため、有効物質についての詳細は未だ明らかにされていない。また、凍結希釈液への卵黄添加は細菌やウイルス汚染の危険性も高くなる¹²⁾。さらに卵黄中には精子の凍結に際して負の作用を有する高密度リポタンパク質(HDL)や卵黄顆粒なども存在し、こうした物質が LDL の有効作用を妨げているとも考えられる。したがって、今回の研究で卵黄を LDL 単体に置換し、凍結用希釈液へ添加した手法は、精子凍結に有効な様々な物質を検証していく上で非常に有効な方法であると考えられる。また、卵黄中のホスファツジルコリンやホスファチジルセリンなども精子凍結に有効であると報告されている^{13, 14)} ことから、今後は、LDL 加凍結用希釈液へ卵黄中の有効単体物質を順次追添加し、凍結精液保存技術のさらなる向上をめざす必要がある。

VI 引 用 文 献

- 1) 大城まどか・仲村敏・鈴木直人・太田克之・渡久地政康(2003)琉球在来豚(アグー)を活用した銘柄豚の確立(2)アグーの繁殖性および哺育・育成成績への近親交配による影響、沖縄畜試研報, 41, 67-70
- 2) 仲村敏・大城まどか・稲嶺修・鈴木直人・吉元哲兵・建本秀樹・渡慶次功・玉代勢秀正(2005) 琉球

- 在来豚(アグー)の効率的繁殖技術の確立(1)ブタ凍結精液作製時の室温放置に用いる精子処理液と放置時間の検討, 沖縄畜研セ研報, 43, 12-20
- 3)丹羽太左右衛門監修(1989)豚凍結精液利用マニュアル, 日本家畜人工授精師協会
- 4) 仲村敏・島袋宏俊・稲嶺修・吉元哲平・山内昌吾・建本秀樹・与古田稔(2007) 琉球在来豚(アグー)の効率的繁殖技術の確立(4)凍結精液希釈液へのアスコルビン酸- α -グルコシドの添加が融解後の精子性状に及ぼす影響, 沖縄畜研セ研報, 45, 31-36
- 5)Watson, P.F(1981)The effects of cold shock on sperm cell membranes.In:Effects of low temperatures on biological membranes,London Academic Press,189-218
- 6)Hu JH, Li QW, Li G,Chen XY, Yang H, Zhang SS, Wang LQ(1996)The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins, *Asian-Aust. J. Anim*, 19, 486-490
- 7)Polge. C, Ashwood-Smith, MJ, Farrant. J(1980)Fertilizing of spermatozoa.In:Low temperature preservation in medicine and biologykonma, Tunbridge Wells,Kent:Pitman Medical 45-64
- 8)Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M(2002)Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method:cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen, *Theriogenology*, 57, 1695-1706
- 9)Frazer L, Strzeek J(2005) Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay, *Reprod Domest Anim*, 41, 530-536
- 10)Graham JK, Foot RH(1987)Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing, *Cryobiology*, 24, 42-52
- 11)Jiang ZL, Li QW, Hu JH, Li WY, Zhao HW, Zhang SS(2007)Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low density lipoprote in diluents, *Cryobiology*, 54, 301-304
- 12)Ahmad K, Foote RH(1986)Post thaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent, *J. Dairy Sci*, 69, 535-541
- 13)Foulkes JA(1997)Separation of lipoproteins from egg yolk and their effects on the motility and integrity of bovine spermatozoa, *J. Reprod. Fertil*, 49, 277-284
- 14)Quinn PJ, Chow PYW, White IG(1980)Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma site *J. Reprod. Fertil*, 60, 403-407

牧草および飼料作物の系統適応性検定試験

(28) 四倍体イタリアンライグラス「山系 33 号」の特性

幸喜香織 稲福政史 蝦名真澄* 与古田稔

I 要 約

山口県農林総合技術センターにて育成された早生四倍体イタリアンライグラス「山系 33 号」について、沖縄県畜産研究センター（今帰仁村）において、3 年間にわたり系統適応性検定試験を実施したところ、その結果は以下のとおりであった。

1. 山系 33 号は他品種よりも初期草勢が良好で、草丈も高い傾向が認められた。
2. 山系 33 号は試験期間中 3 月下旬以降に出穂し、安定した出穂始期を示した。
3. 1 年目に他品種では冠さび病に罹病したが、山系 33 号の冠さび病抵抗性は高く、標準播区および遅播区の合計生草収量が、それぞれワセユタカ比 141%および 131%と多収であった。
4. 2 年目に他品種ではいもち病が多発したが、山系 33 号の罹病程度は低く、標準播区および遅播区の合計生草収量が、それぞれワセユタカ比 172%および 235%と高く、著しく多収であった。
5. 山系 33 号の乾物率は低い傾向が認められた。しかし、標準播区の乾物収量は 1, 2 および 3 年目にワセユタカ比 114%, 141%および 130%, 遅播区ではワセユタカ比 129%, 156%および 142%と生草収量と同様に多収であった。

以上の結果から、山系 33 号はいもち病および冠さび病への複合抵抗性を持つため、病害が多発する年に著しく多収である。また、病害が少ない年でも多収性を示し、本県の冬期に安定した収量を確保する有望品種であることが示唆された。

II 緒 言

沖縄県では暖地型牧草が多年利用されているが、20℃以下の低温下では生産性が著しく低下することが報告されている^{1~3)}。沖縄本島では 12 月下旬から 3 月中旬がこの時期にあたり、その時期の粗飼料生産低下を補う草種・品種の普及が望まれている。イタリアンライグラスは沖縄の気象条件で冬期に生育し、品質が優れることから奨励草種とされている^{4~6)}。2005 年に山口県が品種登録した極短期利用型「さちあおば」は既存の同熟期の品種より高い収量性といもち病抵抗性を示したことから、本県に安定した収量を確保する有望品種であることが報告された^{6, 7)}。

山口県農林総合技術センターで育成されたイタリアンライグラス「山系 33 号」は市販品種として流通していない早生四倍体の新しいタイプの品種候補系統である。また、低温伸長性に優れることから遅播適性が高く、いもち病と冠さび病に対する複合抵抗性を備えている。

そこで、本県の環境条件に対する適応性を検討するため、沖縄県畜産研究センターにおいて、イタリアンライグラス「山系 33 号」の系統適応性検定試験を実施したので報告する。

III 材料および方法

牧草・飼料作物系統適応性検定試験実施要領⁸⁾に準拠し、以下のとおり実施した。

1. 試験地および試験圃場の土壌条件

試験地は沖縄県本島北部の沖縄県畜産研究センター内の圃場(N26° 40' 55.8" , E127° 56' 27.8")で、土壌は国頭マージの細粒赤色土で、礫が多い酸性土壌である。

2. 供試材料および試験方法

供試 4 品種・系統を 1 区 6 m² (2m×3m)で、4 反復の乱塊法で配置した。播種量は、四倍体品種・系統の種子が二倍体に比べて大きいいため、四倍体を 400g/a, 二倍体を 250g/a 散播した。

基準品種のワセユタカを標準品種、タチマサリを比較品種とし、四倍体中生品種ナガハヒカリ

*現 (独) 畜産草地研究所

を参考品種として供試した。試験は標準播区（10月中旬から11月中旬）と遅播区（12月上旬から12月中旬）の2区画とした。播種日を表1に示す。施肥は基肥として堆肥400kg/a, 炭酸カルシウム10kg/a, N, P₂O₅, K₂Oをそれぞれ1, 1, 0.6kg/a, 追肥として0.5, 0.2, 0.3kg/aを刈取り毎に施用した。収量調査は番外を除いて, 1区あたり3m²を手刈りで行った。

3. 調査項目および方法

1) 調査項目

(1) 生育特性調査

発芽良否および草勢, 出穂特性, 病害程度(いもち病, 冠さび病), 草丈および倒伏程度

(2) 収量特性調査

生草収量, 乾物率および乾物収量

2) 調査方法

調査は観察による評点および測定で行った。刈取りは供試品種・系統の草丈が概ね70cm程度になったときに一斉に行った。乾物収量は刈取った生草の一部を70℃, 48時間で乾燥させ, その乾物率から換算した。

表1 播種日および各利用年の刈取日

年	年次	播種区分	播種日 (月/日)	刈取日(月/日)	
				1番草	2番草
1年目	2005	標準播	11/17	4/ 3	5/15
		遅播	12/15	4/25	-
2年目	2006	標準播	10/17	3/29	5/18
		遅播	12/ 6	4/17	-
3年目	2007	標準播	10/30	4/ 4	5/ 8
		遅播	12/ 7	4/16	-

IV 結 果

1. 試験経過の概要

1年目(2005年度)の気象概況⁹⁾は11月中旬以降から平均気温が20℃以下となり, 再び平均気温が20℃を上回ったのは4月上旬以降であった。5月は平均気温が22℃以上となった。降水量は例年並みであった。いもち病および冠さび病は4月中旬以降から観察された。

1年目は10月の降雨が期待できなかったため, 11月中旬に播種した。

早生二倍体品種ワセユタカおよびタチマサリが2月下旬に出穂したが, 四倍体品種・系統である山系33号およびナガハヒカリは3月下旬の出穂となった。そのため, 刈取り調査時の出穂期に品種系統間にばらつきが認められた。その点を考慮して, 2年目以降では3月以内での収量確保するため, 10月中旬に播種した。

2年目(2006年度)の10月の平均気温は25℃で, 降水はほとんどみられなかったため, 播種後灌水した。平均気温が20℃以下になったのは12月上旬であった。例年より気温が高く, 寒暖差の著しい気象条件であった。1月頃からワセユタカおよびタチマサリでいもち病の被害が広がり, 収量に影響がみられた。3月から平均気温が20℃以上となる日がみられるようになった。降水は例年並であった。

3年目(2007年度)は10月の平均気温は26℃で, 12月下旬になっても平均気温が20℃を上回る日もみられ, 安定した暖かい気象条件であった。降水量は平年並みであった。いもち病の病徴が4月上旬から観察された。

2. 生育特性調査

1) 発芽および草勢

発芽および草勢を表2に示した。標準播区における供試品種系統の発芽日数は5日から7日で一斉に発芽した。山系33号の発芽良否は3年目に山系33号が8.8と有意に高くなった。1および2年目では他の品種と同等かやや高くなった。初期草勢では2年目にタチマサリが6.8と最も

高い評点であったが、山系 33 号は 5.8 と同等であった。1 および 3 年目では他の品種とやや同等か高くなった。

遅播区では供試品種系統間に有意差は認められなかった。供試品種系統の発芽日数は 10 日から 18 日と標準播区より遅くなった。山系 33 号の発芽良否は 5.5, 8.0, 8.5 となり、他の品種と同等かやや高くなった。初期草勢も同様に 6.5, 7.5, 8.5 と他の品種と同等かやや高くなった。

表 2 発芽および草勢

播種区分	年	品種系統名	発芽日数 ¹⁾	発芽良否 ²⁾	初期草勢 ²⁾
標準播	1年目	山系33号	5.0	7.0	6.3
		ワセユタカ	5.0	6.8	5.5
		タチマサリ	5.0	7.3	5.8
		ナガハヒカリ	5.0	7.0	6.0
	2年目	山系33号	7.0	7.3	5.8bc
		ワセユタカ	7.0	5.0	4.8b
		タチマサリ	7.0	5.5	6.8c
		ナガハヒカリ	7.0	6.0	6.0bc
	3年目	山系33号	7.0	8.8c	8.0
		ワセユタカ	7.0	6.5a	7.5
		タチマサリ	7.0	7.3ab	8.3
		ナガハヒカリ	7.0	8.0bc	7.5
遅播	1年目	山系33号	10.3	5.5	6.5
		ワセユタカ	10.0	5.8	7.0
		タチマサリ	10.0	5.8	7.0
		ナガハヒカリ	10.0	5.5	6.8
	2年目	山系33号	14.0	8.0	7.5
		ワセユタカ	14.0	6.0	6.5
		タチマサリ	14.0	6.3	7.0
		ナガハヒカリ	14.0	7.5	8.0
	3年目	山系33号	18.0	8.5	8.5
		ワセユタカ	18.0	7.0	7.5
		タチマサリ	18.0	7.3	8.0
		ナガハヒカリ	18.0	8.0	7.3

注1)発芽日数：播種日から発芽期に達するまでの日数。発芽期：約50%の個体が出穂した日。

2)発芽良否および初期草勢：1（極不良）～9（極良）とする9段階評点法。

2) 出穂特性，草丈および倒伏程度

出穂特性，草丈および倒伏程度を表 3 に示した。標準播区において，山系 33 号の出穂始期は 11 月中旬に播種した 1 年目にワセユタカおよびタチマサリより 26 日遅く，3 月下旬の出穂となった。10 月中旬から下旬に播種した 2 および 3 年目では，ワセユタカより 3 日遅く 3 月下旬に出穂した。どの年の 1 番草でも，ナガハヒカリの刈取り時出穂程度が低く，草丈が有意に低い値を示した。倒伏は 1 年目に 1.8 となったが，有意差は認められず，他の品種と同程度かやや高くなった。

遅播区では春一番の出穂始めは，1 年目にワセユタカより 13 日遅かった。しかし，2 年目に 4 日および 3 年目に 3 日とやや遅いか同程度であった。標準播区と同様に，ナガハヒカリの刈取り時出穂程度が低く，草丈が有意に低い値を示した。山系 33 号はワセユタカおよびタチマサリと同程度であった。倒伏は 2 年目に観察されたが，他の品種より 1.3 とやや低かった。

表3 出穂特性、草丈および倒伏程度

播種区分	年	品種系統名	出穂始期 ^{注1)}	刈取り時出穂程度 ²⁾		草丈(cm)		倒伏程度 ³⁾
				1番草	2番草	1番草	2番草	
標準播	1年目	山系33号	3/21	8.8	7.0	103b	116a	1.8
		ワセユタカ	2/23	8.0	9.0	113c	105b	3.5
		タチマサリ	2/23	7.5	9.0	116c	105b	1.0
		ナガハヒカリ	4/6	1.0	6.5	53a	106ab	1.0
	2年目	山系33号	3/31	2.3	9.0	99a	122b	1.0
		ワセユタカ	3/29	4.0	8.8	94a	106ab	2.0
		タチマサリ	3/27	6.3	9.0	106a	111a	1.5
		ナガハヒカリ	3/31	2.8	7.8	66b	105a	1.3
	3年目	山系33号	4/5	1.8	5.3	95b	109	1.0
		ワセユタカ	4/2	6.0	8.5	103bc	101	1.0
		タチマサリ	4/1	7.8	9.0	108c	103	1.0
		ナガハヒカリ	4/6	1.0	4.8	65a	120	2.0
遅播	1年目	山系33号	4/9	7.0	-	127b	-	1.0
		ワセユタカ	3/27	8.3	-	130b	-	1.0
		タチマサリ	3/24	7.8	-	130b	-	1.0
		ナガハヒカリ	4/25	1.5	-	79a	-	1.0
	2年目	山系33号	4/16	4.0	-	104b	-	1.3
		ワセユタカ	4/20	2.3	-	97b	-	1.3
		タチマサリ	4/15	5.0	-	107b	-	1.5
		ナガハヒカリ	4/18	3.5	-	63a	-	1.5
	3年目	山系33号	4/16	2.0	-	83b	-	1.0
		ワセユタカ	4/13	6.0	-	90b	-	1.0
		タチマサリ	4/13	6.3	-	96b	-	1.0
		ナガハヒカリ	4/19	1.0	-	51a	-	1.0

注1) 出穂始期：1㎡当り3本前後が出穂に達した月日。

2) 刈取り時出穂程度：1（無出穂または極少）～9（極多）とする9段階評点法。

3) 倒伏程度：1（無）～9（甚）とする9段階評点法。3年間の平均値を示す。

4) 同じ項目の異符号間に5%水準で有意差あり。

3) 病害程度

病害程度を表4に示した。標準播区では、1年目に2番草でいもち病および冠さび病が観察されたが、評点3.3および4.0と他品種より有意に低くなった。2および3年目ではいもち病が他品種では評点が5.0以上と多発したが、山系33号は2.3以下で高い抵抗性が認められた。冠さび病は発生しなかった。

遅播区では、1年目に他品種では冠さび病が発生したが、山系33号には病徴が観察されなかった。2年目に1番草でワセユタカは評点7.3、タチマサリで6.8と高く罹病し被害が広がったが、山系33号は2.0と低く、標準播区と同様に高い抵抗性が認められた。1および3年目に他品種ではいもち病が発生したが、山系33号には病徴が観察されなかった。2および3年目に供試品種系統で冠さび病は観察されなかった。

表4 病害の罹病程度

年	播種区分	品種系統名	1番草		2番草	
			いもち病	冠さび病	いもち病	冠さび病
1年目	標準播	山系33号	1.0	1.0	3.3a	4.0a
		ワセユタカ	1.0	1.0	5.5b	7.8b
		タチマサリ	1.5	1.5	4.8b	8.0b
		ナガハヒカリ	1.0	1.0	5.5b	8.5b
	遅播	山系33号	1.0	1.0a	-	-
		ワセユタカ	1.0	5.5b	-	-
		タチマサリ	1.0	4.5b	-	-
		ナガハヒカリ	1.0	2.8ab	-	-
2年目	標準播	山系33号	2.3a	1.0	2.3a	1.0
		ワセユタカ	6.5b	1.0	5.0b	1.0
		タチマサリ	6.5b	1.0	4.5b	1.0
		ナガハヒカリ	5.3b	1.0	3.8ab	1.0
	遅播	山系33号	2.0a	1.0	-	-
		ワセユタカ	7.3c	1.0	-	-
		タチマサリ	6.8c	1.0	-	-
		ナガハヒカリ	4.5b	1.0	-	-
3年目	標準播	山系33号	1.0a	1.0	1.8a	1.0
		ワセユタカ	1.5a	1.0	5.0c	1.0
		タチマサリ	1.5a	1.0	5.0c	1.0
		ナガハヒカリ	2.5a	1.0	3.3b	1.0
	遅播	山系33号	1.0a	1.0	-	-
		ワセユタカ	2.5b	1.0	-	-
		タチマサリ	2.5b	1.0	-	-
		ナガハヒカリ	2.0a	1.0	-	-

注1)罹病程度：1（無または極微）～9（甚）とする9段階評点法。

2)同じ項目の異符号間に5%水準で有意差あり。

3. 収量特性調査

1)生草収量

生草収量を表5に示した。山系33号の標準播区における合計生草収量は1および2では1番草，2番草で高くなり，合計収量が601kg/aおよび1080kg/aと有意に高くなった。次いでナガハヒカリ，タチマサリ，ワセユタカの順となった。山系33号のワセユタカ比はそれぞれ141%，172%および169%と供試品種の中で最も多収であった。

遅播区の合計生草収量は1，2および3年目に240kg/a，518kg/aおよび127kg/a，ワセユタカ比131%，235%および127%と最も高くなった。次いでナガハヒカリ，タチマサリ，ワセユタカの順となり，標準播区と同様の傾向が認められた。

2年目では1および3年目と比較してどの供試品種系統の収量が高く，山系33号と他品種の差が大きく認められた。また，どの利用年も1番草より2番草は低い収量であった。

表5 生草収量

播種区分	品種系統名	(kg/a)											
		1年目		ワセユタカ				2年目		ワセユタカ			
		1番草	2番草	合計	比(%)	1番草	2番草	合計	比(%)	1番草	2番草	合計	比(%)
標準播	山系33号	424	176b	601b	141	685c	395a	1080c	172	403	339b	741	169
	ワセユタカ	346	82a	427a	100	411a	216b	627a	100	309	128a	438	100
	タチマサリ	375	75a	450a	105	427ab	212b	638ab	135	359	168a	527	120
	ナガハヒカリ	415	178b	593b	139	506b	345a	851b	102	361	333b	694	158
遅播	山系33号	240	-	240	131	518b	-	518b	235	274	-	274	127
	ワセユタカ	183	-	183	100	220a	-	220a	100	215	-	215	100
	タチマサリ	200	-	200	109	248a	-	248a	113	217	-	217	101
	ナガハヒカリ	205	-	205	112	377ab	-	377ab	171	209	-	209	97

注)同じ項目の異符号間に5%水準で有意差あり。

2) 乾物率

乾物率を表6に示した。標準播区における乾物率の年平均値では、1、2および3年目でナガハヒカリが8.7、18.0および12.6と有意に低くなった。山系33号は10.6、19.0および13.0とナガハヒカリと同等であった。

遅播区では2年目に山系33号およびナガハヒカリがワセユタカおよびタチマサリより有意に低くなり、標準播区と同様の傾向が認められた。3年目では有意差は認められなかったが、山系33号が最も高い乾物率であった。

表6 乾物率

播種区分	品種系統名	1年目			2年目			3年目			(%)
		1番草	2番草	平均	1番草	2番草	平均	1番草	2番草	平均	
標準播	山系33号	12.2a	9.1a	10.6ab	19.7b	18.4a	19.0a	16.1a	9.9a	13.0ab	
	ワセユタカ	14.1a	12.9b	13.5b	21.1b	24.4b	22.7b	19.3b	13.5b	16.4ab	
	タチマサリ	14.4a	14.1b	14.3b	21.4b	23.4b	22.3ab	19.6b	14.8b	17.2b	
	ナガハヒカリ	11.3b	6.1a	8.7a	17.5a	18.6a	18.0a	15.4a	9.8a	12.6a	
遅播	山系33号	17.3b	-	17.3a	16.8b	-	16.8b	14.5	-	14.5	
	ワセユタカ	17.9b	-	17.9a	23.7a	-	23.7a	12.9	-	12.9	
	タチマサリ	18.7b	-	18.7a	23.9a	-	23.9a	13.7	-	13.7	
	ナガハヒカリ	14.3a	-	14.3b	18.0b	-	18.0b	12.7	-	12.7	

注) 同じ項目の異符号間に5%水準で有意差あり。

3) 乾物収量

乾物収量を表7に示した。標準播区では、2年目に山系33号が1番草で126.3kg/a、2番草で77.6kg/aと有意に高くなり、合計乾物収量が203.9kg/a、ワセユタカ比141%と最も多収であった。1および3年目では山系33号の合計乾物収量に有意差は認められなかったが、ワセユタカ比114%および130%と最も高い収量であった。

遅播区では、1年目に山系33号が41.4kg/a、ワセユタカ比129%と有意に高くなった。2および3年目では有意差は認められなかったが、ワセユタカ比156%および122%と最も多収であった。どの利用年の標準播区および遅播区でも山系33号は最も高い乾物収量であった。

表7 乾物収量

播種区分	品種系統名	1年目			ワセユタカ			2年目			ワセユタカ			3年目			(kg/a)
		1番草	2番草	合計	比(%)	1番草	2番草	合計	比(%)	1番草	2番草	合計	比(%)				
標準播	山系33号	51.7	15.9	67.6	114	126.3a	77.6c	203.9	141	64.8	33.7	98.5	130				
	ワセユタカ	48.3	10.8	59.1	100	99.6b	45.4a	145.0	100	59.0	17.1	76.0	100				
	タチマサリ	54.3	10.4	64.7	109	99.6b	45.3a	144.9	100	69.6	25.3	94.8	125				
	ナガハヒカリ	46.5	11.3	57.8	98	94.1b	60.4b	154.4	106	55.3	32.5	87.8	115				
遅播	山系33号	41.4b	-	41.4b	129	85.8	-	85.8	156	39.4	-	39.4	142				
	ワセユタカ	32.2a	-	32.2a	100	55.1	-	55.1	100	27.7	-	27.7	100				
	タチマサリ	37.3ab	-	37.3ab	116	59.7	-	59.7	108	29.5	-	29.5	106				
	ナガハヒカリ	29.4a	-	29.4a	91	67.2	-	67.2	122	25.6	-	25.6	92				

注) 同じ項目の異符号間に5%水準で有意差あり。

V 考 察

山口県農林総合技術センターが育成したイタリアンライグラス「山系33号」は、低温発芽性で選抜・育種されているため、低温伸長性が旺盛で遅播適性が高く、いもち病と冠さび病に対する複合抵抗性を備えている。

山系33号の発芽日数は他品種との品種間差が認められなかったが、標準播区の3年目の発芽良否および2年目の初期草勢で有意に高く、それ以外の年および各番草でも同様の傾向が認められた。山系33号は、生育温度が10℃と20℃の条件下でワセユタカより低温下での発芽が良く、草丈と葉面積の増加が著しく乾物増加率が高い系統である(小橋ら 未公表)。本試験では、遅播区の播種を日平均気温が20℃以下となる12月に実施した。山系33号の発芽日数、発芽良否および初期生育は、有意差が認められなかったが、やや高く、草丈も高い傾向が認められ、遅播き利用に適していることが示唆された。

山系 33 号は四倍体で早生に属する。11 月中旬に播種した 1 年目と 10 月中旬に播種した 2 および 3 年目では、ワセユタカやタチマサリは利用年の播種時期によって異なる出穂期を示した。しかし、山系 33 号は試験期間中において 3 月下旬以降に安定した出穂始期を示す傾向が認められた。

山系 33 号の合計生草収量は 3 年間の早播区および遅播区において供試材料の中で最も高い収量であった。特に、2 年目ではいもち病が多発しワセユタカおよびタチマサリではいもち病の罹病程度が高かったため、山系 33 号のワセユタカ比は標準播区 172%, 遅播区 235%と最も高くなった。いもち病が多発した年の山系 33 号の収量は他品種よりもいもち病抵抗性が高く、著しく収量が高くなることが示唆された。また、冠さび病が発生した 1 年目の標準播区 2 番草では罹病程度が低く、収量も有意に高くなった。遅播区 1 番草では病徴は確認されず、ワセユタカ比 131%と最も高く、冠さび抵抗性が高いことが認められた。また、山系 33 号は病害程度が低い 1 年目および 3 年目の 1 番草でも他品種より収量が高い傾向が認められた。

一般に四倍体品種は二倍体品種と比較して水分含量が高く乾物率が低くなる¹⁰⁾。本試験でも四倍体品種・系統の山系 33 号およびナガハヒカリの乾物率は二倍体品種のワセユタカおよびタチマサリと比較して乾物率が低い傾向が認められた。それにもかかわらず、山系 33 号の乾物収量は早播区および遅播区のいずれの年も、高い生草収量が低い乾物率を補って、高い乾物収量を示し、高いワセユタカ比を示した。

以上のことから、山系 33 号はいもち病および冠さび病への強い抵抗性、高い収量性を持ち、本県の冬期に安定した収量を確保する有望品種であることが示唆された。

VI 引用文献

- 1) 川鍋祐夫・Neal-Smith CA(1979)イネ科草類の温度反応に関する研究. II. 原産地の標高を異にするローズグラス五品種の比較, 日草誌, 25, 216-221
- 2) 川鍋祐夫・Neal-Smith CA(1980)イネ科草類の温度反応に関する研究. III. 暖地型・寒地型イネ科牧草類の乾物重および相対生長率の比較, 日草誌, 26, 137-144
- 3) Nada Y(1980)Effect of temperature on growth of main tropical pasture grasses, *J Japan Grassland Sci.*, 26, 165-173
- 4) 守川信夫・安谷屋兼二・庄子一成(1998)ギニアグラス草地におけるイタリアンライグラス直まき追播法の検討, 沖縄畜試研報, 36, 117-120
- 5) 奥村健治・稲福政史・幸喜香織・蝦名真澄(2006)冬期追播したイタリアンライグラスの品種および播種時期がギニアグラス永年草地の収量に及ぼす影響, 日草誌, 51(4), 348-353
- 6) 川本康博(2007)放牧における高牧養力草地管理放牧
- 7) 稲福政史・奥村健治・知念司・幸喜香織・奥村健治(2001)牧草および飼料作物の系統適応性検定試験(27)極短期利用型イタリアンライグラス「山系 31 号」のいもち病抵抗性と収量性, 沖縄畜試研報, 39, 95-104
- 8) 農林水産技術会議事務局(2001)飼料作物系統適応性検定試験実施要領(改訂 5 版), 6-7
- 9) 沖縄気象台, 2005-2008 気象月報
- 10) Nakagawa H(1998)Cytogenetical study and breeding and of some tropical grass, *bull Hiroshima Agri Res Cent*, 58, 55-98

ブラキアリアグラス遺伝資源の採種特性

幸喜香織 蝦名真澄* 末永一博** 中西雄二***
与古田稔 稲福政史 花ヶ崎敬資

I 要 約

CIAT(International Center for Tropical Agriculture:国際熱帯農業研究センター)から導入したブラキアリアグラス‘MG-5’, ‘Marandu’, ‘Basilisk’, ‘Tully’, ‘Kennedy’, ‘Mulato’, ‘Mulato II’の7品種を含む遺伝資源17系統の採種関連形質について調査したところ, その結果は以下のとおりであった。

1. 亜熱帯気候の沖縄(N26°, 標高90m:今帰仁村)でブラキアリアグラス品種の採種量は暖地型牧草の種子生産地であるタイと同等か, またはそれ以上であった。
2. ブラキアリアグラスの品種は採種性の良好な遺伝資源と比較すると, 稔実率が低く, 採種量は低い。
3. ブラキアリアグラス遺伝資源の中には, 稔実率が高く, 採種量が高い系統が認められる。

以上のことから, ブラキアリア遺伝資源の中から, 採種性の良好な育種素材が見いだされた。交配育種によって採種性の向上が期待できるとともに, 熱帯低緯度地域を原産とするブラキアリアグラスの沖縄での新品種育成の可能性が示唆された。

II 緒 言

ブラキアリアグラスは多年生で肥沃度の低い酸性土壌でも生育がよいため, 1970年代より熱帯の南米諸国の草地に広く導入されている暖地型牧草である¹⁾。南米では草地だけでなく緑地や道路や鉄道沿いなど土壌流出防止用として多目的利用されている。造成は栄養体もしくは種子の稔実率や発芽率が低いため, 薬剤処理により休眠打破した種子を用いて行われている²⁾。

近年, 沖縄本島および離島で草種選定試験が行われ, ブラキアリアグラスは新導入暖地型牧草として有望草種であると報告されている^{3~5)}。また, ブラジルで育成され農畜連携による輪作体系用に推奨され¹⁾ている *B. brizantha* ‘MG-5’は沖縄県の奨励品種であるローズグラスよりも耐干性, 栄養価および採食性に優れる多収品種である^{6, 7)}が, 踏圧耐性に劣る^{8, 9)}ことが報告されている。これまで南西諸島を含む日本の利用体系に適応した品種育成および栽培体系の構築はなされていない。

そこで, 沖縄での採種, 交配および育種の可能性を検討するため, CIATから導入したブラキアリアグラス7品種を含む遺伝資源17系統の亜熱帯気候条件での採種関連形質を検討したので報告する。

III 材料および方法

1. 試験地および試験圃場の土壌条件

沖縄県本島北部の沖縄県畜産研究センター内の圃場(N26° 41' 03.9", E127° 56' 19.6", 標高90m)で, 土壌は国頭マージの細粒赤色土で, 礫が多い酸性土壌である。

2. 供試材料および調査項目

材料は流通品種の *B. brizantha* ‘MG-5’, ‘Marandu’, *B. decumbens* ‘Basilisk’, *B. humidicola* ‘Tully’, *B. ruziziensis* ‘Kennedy’, *B. hybrid* ‘Mulato’, ‘Mulato II’の7品種, CIATから導入した *B. brizantha* の CIAT16467, CIAT16113, CIAT16316, CIAT16315, CIAT16306, CIAT26124, CIAT 26318, CIAT26990, CIAT16488 および *B. humidicola* の CIAT6369 の10系統を供試した。2006年5月29日播種し, 同年9月28日に10個体の個体植えにして試験区を設けた。2007年の出穂盛期に株ごとに全花穂を網袋で被った。登熟期に脱粒種子を含む種子全量を回収し, 室温, 湿度30%で保存した。回収した種子を用

*現(独)畜産草地研究所 **国際農林水産業研究センター*** (独)九州沖縄農業研究センター

いて採種関連形質を調査した。調査項目は夏期および秋期開花日、千粒重、1株あたりの種子数、稔実率(登熟種子/全種子)、稔実種子数および採種量とした。

IV 結果

1. 採種特性

ブラキアリアグラス *B. Brizantha* の採種関連形質の結果を表 1-1 に示した。ブラキアリアグラスの採種関連形質では夏期開花日が 5 月 14 日から 8 月 5 日および未出穂までのレンジ、千粒重は 3.0g から 9.1g までのレンジと品種・系統間差異が認められた。品種 Marandu は株あたり種子数が 1.9×10^4 粒、稔実率が 7.4% と低く、採種量が 0.1kg/a と低かった。品種 MG5 は 1.8×10^4 粒、稔実率が 21.7% と低く、採種量が 0.9kg/a であった。遺伝資源では CIAT16315 は株あたりの種子数が 11.8×10^4 粒と最も多く、稔実率 46.3% と高かったことから、採種量も 16.6kg/a と高くなった。

B. Brizantha を除く品種系統の採種関連形質の結果を表 1-2 に示した。*B. humidicola* の CIAT6369 が株あたりの種子数が 3.9×10^4 粒と少ない値となったが、稔実率が 56.9% と高く、採種量が 6.1kg/a と最も高くなった。しかし流通品種の 'Tully', 'Kennedy' および 'Mulato' は稔実率が 10.6%, 12.3% および 1.4%, 採種量が 0.03kg/a, 0.1kg/a および 0.1kg/a と低い値を示した。

表 1-1 *B. Brizantha* 品種系統の採種関連形質

形質/草種 品種系統名	<i>B. brizantha</i>										
	CIAT6294 'Marandu'	CIAT26110 'MG5'	CIAT16467	CIAT16113	CIAT16316	CIAT16315	CIAT16306	CIAT26124	CIAT26318	CIAT26990	CIAT16488
夏期開花日	7月2日	8月5日	5月14日	5月10日	5月14日	5月14日	未出穂	7月5日	5月14日	5月24日	6月8日
秋期開花日	-	-	9月12日	10月15日	10月21日	9月12日	-	10月31日	9月12日	10月1日	10月10日
千粒重(g)	3.0	5.2	6.1	8.9	8.7	9.1	-	5.2	8.9	6.4	4.7
種子数/株($\times 10^4$ 粒)	1.9	1.8	9.2	2.9	1.5	11.8	-	0.8	8.0	4.4	6.9
稔実率(%) ²⁾	7.4	21.7	32.6	52.1	30.6	46.3	-	23.4	62.3	40.6	37.4
稔実種子数($\times 10^3$ 粒)	1.4	4.3	29.9	15.4	5.1	54.4	-	1.8	50.1	17.8	25.0
採種量(kg/a) ³⁾	0.1	0.9	6.5	4.9	1.6	16.6	-	0.3	15.1	4.1	4.1

表 1-2 *B. Brizantha* を除く品種系統の採種関連形質

形質/草種 品種系統名	<i>B. decumbens</i>	<i>B. humidicola</i>		<i>B. ruziziensis</i>	<i>B. hybrid</i>		
	CIAT606 'Basilisk'	CIAT679 'Tully'	CIAT6369	CIAT605 'Kennedy'	CIAT36061 'Mulato'	CIAT36087 'Mulato II'	LSDO. 05
夏期開花日	6月8日	5月20日	7月5日	8月25日	7月16日	8月3日	-
秋期開花日	10月20日	10月10日	10月10日	-	-	-	-
千粒重(g)	5.2	3.6	7.7	3.2	5.2	4.2	2.81
種子数/株($\times 10^4$ 粒) ¹⁾	5.6	0.2	3.9	1.3	3.0	6.1	2.56
稔実率(%) ²⁾	35.7	10.6	56.9	12.3	1.4	4.2	15.5
稔実種子数($\times 10^3$ 粒)	20.2	0.2	21.9	2.3	0.4	3.1	5.03
採種量(kg/a) ³⁾	3.8	0.03	6.1	0.1	0.1	0.2	1.00

注1) 稔実種子および不稔種子を含む。

2) 稔実率=登熟種子/全種子。

3) $1.5 \times 1.5 \text{ m}^2$ の栽植密度をアールあたりに換算。

V 考察

Renvoize ら¹⁰⁾ は形態的特性からブラキアリアグラス 90 種あまりを形態特性で分類し、*B. humidicola* は *B. Brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* および *B. Brizantha* とは別のグループの属するとしている。これらは、草型や穂の形状等によって種の識別が可能で、*B. humidicola* はほふく茎を生じ、小穂が小さく、千粒重は 4g 以下とされている¹⁰⁾。ブラキアリアグラスの原産地はアフリカで、*B. decumbens* および *B. ruziziensis* で南緯 4° から北緯 2° の限られた低緯度地域分布するとされている。一方、*B. Brizantha* はアフリカ全域に広く分布しており、適応範囲も広く、形態変異も多様で *B. decumbens* と中間的形質をもつ系統が多く発見されている¹⁰⁾。*B. humidicola* は南緯 20° から北緯 11° の地域に分布されているが、特に 'Tully' は種子収量が少なく、標高の高い低緯度地域でのみ種子が採種可能とされている^{11, 12)}。

ブラキアリアグラスの種子稔実率および発芽率はともに低いとされ、硫酸処理によって休眠打破した種子が主に利用されている²⁾。沖縄県では、ブラキアリアグラスの草地造成法の検討を行い、刈り取った状態のまま最下部の節を埋め(刈取り状態法)、茎挿しする栄養系セル苗法の開発し、栄養系繁殖による草地造成が可能であることを示唆している¹³⁾。また、ブラキアリアグラスの採種量は比較的少ないものの、沖縄(北緯26°、標高90m:今帰仁村)でも採種および種子繁殖は可能であることを示唆している¹⁴⁾。

本試験では、ブラキアリアグラス品種の採種量は *B. Brizantha* 'MG5' で 0.9kg/a と最も高く、*B. humidicola* 'Tully' の採種は期待できなかった。*B. ruziziensis* 'Kennedy' は東南アジアで最も流通しているブラキアリアグラス品種である。開花が晩生であるため、タイでは乾期にあたる期間に結実し、稔実率の高い種子を生産することができる¹⁵⁾。沖縄県では、'Kennedy' は 0.1kg/a と *B. brizantha* 'Marandu' および *B. hybrid* 'Mulato' と同等に低い採種量、*B. decumbens* 'Basilisk' は 3.8kg/a と高い採種量を示した。タイ(北緯16°、標高180m)の試験によると、'Kennedy' の採種量は2001年に0.3kg/a、2002年に0.8kg/aと流通品種の中で最も高く、*B. decumbens* 'Basilisk' および *B. brizantha* 'Marandu' の採種量は0.053kg/a および 0.051kg/a、0.027kg/a および 0.029kg/a と低く¹⁵⁾、本結果と異なっている。栽培条件が異なり単純な比較はできないものの、このように環境の異なる地域によって採種量に変動が大きい原因は、ブラキアリアグラスの採種量は環境分散が大きく遺伝率の低い形質であることが示唆される。また、オーストラリアおよびブラジルでの'Basilisk' および'Marandu'の種子生産は低緯度(南緯17°~22°)で標高600~1000mの熱帯地域で良質な種子生産を行い流通品種となっており¹⁶⁾、生産現場の緯度と標高によって種子の成熟度が異なることが指摘されている¹⁵⁾。このことは、沖縄とタイでの採種量の変動で示唆されるのと同様に、採種量は環境分散が大きく遺伝率が低い形質であることを示唆している。このように採種量は環境分散の大きな形質であるが、ブラキアリアグラス品種の採種量は、沖縄(北緯26°、標高90m:今帰仁村)でも、ブラキアリアグラスなどの暖地型牧草の種子生産地であるタイと同等かそれ以上に採種量が確保される品種・系統が存在することが明らかとなった。

*B. humidicola*は分布域が比較的限られているため、採種の限界地域が示唆されている¹¹⁾が、遺伝資源の *B. humidicola* CIAT6369の採種量は6.1kg/aと高い値を示した。また *B. brizantha*にはCIAT16315のように、株あたりの種子数が多く、稔実率も高いため、採種量が16.6kg/aと高い系統が認められた。これらの遺伝資源はブラキアリアグラス採種性向上に向けた育種素材として有望であると考えられる。

VI 引用文献

- 1) 蝦名真澄(2008)日本における主な飼料作物(2)－暖地型牧草－, 畜産の研究, 62(2), 875-881
- 2) 国際農林業協会(1998)熱帯の飼料作物, 35-41
- 3) 望月智代・守川信夫・長利真幸・當眞嗣平(2005)導入暖地型牧草の適応品種選定試験(2001~2005年)
(1)成育特性および乾物収量の比較, 沖縄畜試研報, 43, 30-36
- 4) 花ヶ崎敬資・望月智代・守川信夫・長利真幸・當眞嗣平(2006)導入暖地型牧草の適応品種選定試験(2001~2005年)(2)可消化乾物収量および粗タンパク質収量の比較, 沖縄畜研セ研報, 44, 79-84
- 5) 水町進・新城健・川本康博(2007)西表島における新規導入草種の一次評価, 日草誌, 53(別), 252-253
- 6) 中西雄二・平野清・小路敦(2006)熱帯牧草ブリザンタ(MG5)の肉用繁殖牛における栄養価と採食性, 畜産草地研究・成果情報 No. 5
- 7) 中西雄二・花ヶ崎敬資・幸喜香織・与古田稔・平野清・小路敦(2008)熱帯牧草ブリザンタ(MG5)の乾物収量および栄養収量畜産草地研究, 成果情報 No. 7
- 8) Lascano C, Pérez R, Plazas C, Medrano J, Pérez O, Argel PJ (2002) Pasto Toledo (*Brachiaria Brizantha* CIAT26110), Villavicencio, Colombia Noviembre, 1-18
- 9) 花ヶ崎敬資・安里直和・守川信夫・長利真幸(2007)ブラキアリア属新導入品種の生産性の解明と干ばつ耐性の検討(1)ブリザンタ MG5 の踏圧耐性の検討, 沖縄畜研セ研報, 45, 53-56
- 10) Renvoize SA, Clayton WD, Kabuye CHS (1996) Morphology, taxonomy, and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb, Eds Miles JW, Maass BL, do Valle CB, CIAT, Cali, Colombia, and

-
- CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brazil, *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*, 1-15
- 11) Hopkinson JM, FHD de Souza, S Diulgheroff, A Ortiz, M Sanchez (1996) Reproductive physiology, seed production, and seed quality of *Brachiaria*, Eds Miles JW, Maass BL, do Valle CB, CIAT, Cali, Colombia, and CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brazil, *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*, 124-140
- 12) Keller-Grein G, BL Maass, J Hanson (1996) Natural variation in *Brachiaria* and existing germplasm collections, Eds Miles JW, Maass BL, do Valle CB, CIAT, Cali, Colombia, and CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brazil, *Brachiaria: Biology, agronomy, and improvement*, 16-42
- 13) 花ヶ崎敬資・与古田稔・望月智代・長利真幸・守川信夫・幸喜香織・宮城正男 (2007) ブラキアリアグラス属の草地造成法の確立(2)ブリザンタ MG5 のセルトレイ苗による繁殖の検討, 沖縄畜研セ研報, 45, 57-60
- 14) 幸喜香織・蝦名真澄・中西雄二・守川信夫・花ヶ崎敬資 (2006) ブラキアリア属の草地造成法の確立(1)種子繁殖の可能性の検討, 沖縄畜研セ研報, 44, 119-127
- 15) MD Hare, P Tatsapong A・Lunpha, K Wongpichet (2005) *Brachiaria* species in north-east Thailand: dry matter yields and seed production, *Tropical Grasslands*, 39, 99-106
- 16) Loch DS, Cook BG, Haevey GL (1999) Location of seed crops: Grass, Eds Loch DS, Ferguson LE, *Forage Seed Production Volume 2: Tropical and Subtropical species*, CAB International :Oxon, UK, 113-128
-

研究補助：宮城広明，伊藝博志

職員一覧表 (2009年3月31日現在)

所 長 : 庄子一成

企 画 管 理 班 班 長 : 新田宗博
主 査 : 宮城さとみ
主 任 : 古我知 健
主 任 : 長浜久美子
主 任 : 久保田 吏
主 任 : 竹内千夏

農業技術補佐員 : 伊藝博志・久田友美・宮里政人・宮城広明・照屋忠敏
又吉博樹・宮里政朗・小波津明彦・仲程正巳・赤嶺圭作
下地貴士・下里安志

研 究 主 幹 : 守川信夫

〃 特別研究グループ 主任 研究員 : 稲嶺 修
主任 研究員 : 知念 司

飼 養 ・ 環 境 班 班 長 : 宮城正男
主任 研究員 : 荷川取秀樹
研 究 員 : 棚原武毅・安里直和・花ヶ崎敬資

育 種 改 良 班 班 長 : 与古田 稔
主任 研究員 : 仲村 敏・山城 存・島袋宏俊・運天和彦・砂川隆治
稲福政史
研 究 員 : 幸喜香織・藤井 章
技 師 : 岸田和美

2008年度 編集委員会

編集委員長：新田宗博

事務局長：守川信夫

委員：与古田稔

委員：山城 存

委員：仲村 敏

委員：棚原武毅

委員：花ヶ崎敬資

委員：知念 司

事務局：稲嶺 修

沖縄県畜産研究センター試験研究報告（第46号）

平成21年7月1日 印刷

平成21年7月15日 発行

発行所 沖縄県畜産研究センター

〒905-0426

沖縄県国頭郡今帰仁村諸志2009-5

電話 0980(56)5142

FAX 0980(56)4803

印刷 沖縄高速印刷株式会社

〒901-1111

沖縄県南風原町字兼城577番地

電話 098(889)5513

FAX 098(889)5527
