

沖縄県内で収集したローズグラスの系統解析

幸喜香織、蝦名真澄*、稲福政史、秋山征夫*
与古田稔

I 要 約

ローズグラス (*Chloris gayana* Kunth.) について、沖縄県内で収集したローズグラス (沖縄収集系統)、鹿児島から移管された育種材料 (鹿児島移管系統) および供試 6 品種の AFLP 法による多型情報を得て、系統間の類似度にもとづく系統樹を作成した。

1. 沖縄収集系統、鹿児島移管系統および品種は系統樹によって明確に区分された。
2. 系統樹により 'Katambora (Kt)', 'Asatsuyu (As)', 'Hatsunatsu (Ht)', 'Top cut (Tc)', 'Fine cut (Fc)', および 'Callide (Cd)' は大きく 3 群に分類された。
3. 沖縄収集系統および鹿児島移管系統は大きく 2 群に分類された。
4. 四倍体の倍数性を示した国頭村安田、石垣市白保および石垣市川平は系統樹でも四倍体 Cd 選抜と同じ群に分類された。

以上の結果から、沖縄収集系統は供試品種とは異なる遺伝的特性をもち、沖縄の気候風土による自然選抜によって、永続性や耐干性など沖縄に適応するための遺伝的形質を獲得しており、有効な育種母材である可能性が示唆された。

II 緒 言

我が国のローズグラスは 1987 年、九州農業試験場で二倍体早生品種 Ht¹⁾、1995 年には鹿児島県農業試験場大隅支場 (現: 鹿児島県農業開発総合センター) で二倍体早生品種 As が育成された²⁾。しかし、これまで早生の限られた育種資源から選抜されてきた経緯がある。これに対して晩生系統は四倍体系統も含め形態的および遺伝的多様性が高いことが知られている^{3, 4)}。ローズグラスは二倍体と四倍体が存在し、いずれも他殖性の有性生殖である^{3, 4)}。一般に四倍体系統は二倍体系統に比べ大型になる傾向が認められるが、少数の系統を除いては倍数性による形態変異は形態的特徴だけからは、倍数性の識別は困難である。そのため、倍数性を識別するためには染色体調査が必要であるとされている^{3, 4)}。アポミクシスや栄養体繁殖種では系統内の分子マーカーのパターンの変異は全くないので遺伝子型の判別が容易であり、ギニアグラスでは RAPD⁵⁾ や SSR⁶⁾ を用いた品種識別が行われている。ローズグラスのように他殖性種では種内変異および品種内変異が大きいために分子マーカーを用いた品種系統間の判別は困難とされていたが、Ubi らは AFLP を用いた二倍体⁷⁾ および四倍体⁸⁾ のローズグラスの品種間多型を解析し、品種系統間の類縁関係の推定を行っている。

沖縄県では 1976 年以降、草地基盤整備に伴う草地造成が二倍体の Kt を中心に進められ、四倍体品種 Cd も一部導入されている。現在、県内には造成当時の導入品種が世代を重ね小規模な群落を形成し、自然交雑により沖縄の気候風土にあった有用な遺伝資源を集積している可能性が考えられる。そこで、県内の劣悪環境下に自生し、永続性や耐干性を遺伝的に獲得している可能性のあるローズグラスのエコタイプを収集し、それらの倍数性および品種との類縁関係を調査した。併せて、鹿児島移管系統との類縁関係も調査し、今後の育種母材としての有効性について検討した。

III 材料および方法

供試材料は Kt 18 個体、As 18 個体、Ht 20 個体、Tc 20 個体、Fc 13 個体、および Cd 19 個体の 6 品種、鹿児島移管系統の中から 101 系統 (表 1) および沖縄県内より収集した 24 個体 (表 2, 図 1) の合計

* 現: (独) 畜産草地研究所

233 個体である。ゲノム DNA の抽出は CTAB 法⁹⁾によって行い、ABI 社の AFLP (増幅 DNA 断片長多型 AFLP) plant mapping protocol に従って AFLP 反応を行った。Selective primer としては EcoR I 側と Mse I 側にそれぞれ 3 塩基付加の多型の認められた EcoR I -AAC/Mse I -CAG (プライマー組み合わせ略号: C1), EcoR I -AAG/Mse I -CAT (D2), EcoR I -ACC/Mse I -CAT (D4), EcoR I -ACT/Mse I -CTA (E6), EcoR I -AAG/Mse I -CTT (H2) および EcoR I -AGC/Mse I -CTT (H7) の計 6 通りのプライマー組み合わせを用いた。PCR による増幅産物は ABI3130 Genetic Analyzer を用いて検出し、GeneMapper v3.5 で解析した。統計解析は JMP6.0 を用いた。データセットは AFLP マーカーのバンドがある場合を 1, 無い場合を 0 で表記して作成した。主成分分析によりマーカーを選抜し、Word 法によって系統樹を作成した。

倍数性判定のため、DNA 量の推定を行った。Kt を二倍体品種、Cd を四倍体品種の対照区とし、As, 鹿兒島移管 9 系統および沖縄県内収集 18 系統の倍数性判定を行った。核の抽出には Cystain PI 植物 DNA 絶対量測定キット (Partec 社) を用い、フローサイトメーター (EPICS ALTRA BRCKEMAN COULTER 社) によって測定を行った。

表 1 供試材料 (鹿兒島移管系統)

系統名	来歴	備考	略記
大隅1号 構成親1, 2	オーストラリア系		大隅1号 構成親1, 2
大隅1号 構成親3	栃酪系		大隅1号 構成親3
大隅1号 構成親4	福岡系		大隅1号 構成親4
大隅1号 構成親5, 6	Gunsons		大隅1号 構成親5, 6
大隅1号 構成親1, 2	熊牧系		大隅1号 構成親1, 2
大隅1号 構成親3, 4	長牧系		大隅1号 構成親3, 4
Asatsuyu 構成親1, 2	熊牧系	Asatsuyu構成親, 大隅1, 2号構成親	As構成親1, 2
Asatsuyu 構成親3, 4	熊牧系	Asatsuyu構成親, 大隅2号構成親	As構成親3, 4
Asatsuyu 構成親5, 6	長牧系	Asatsuyu構成親, 大隅2号構成親	As構成親5, 6
Asatsuyu 構成親7, 8	長牧系	Asatsuyu構成親	As構成親7, 8
Asatsuyu 構成親9, 10	Gunsons	Asatsuyu構成親	As構成親9, 10
Asatsuyu 構成親11	長牧系	Asatsuyu構成親	As構成親11
Asatsuyu 構成親12, 13	800PC: Gunsons	Asatsuyu構成親	As構成親12, 13
低温伸長性 循環選抜3rd 1~6			低温選抜3rd 1~6
低温伸長性 循環選抜4th 1~13			低温選抜4th 1~13
Asatsuyu 展示圃1 1~5	大島郡天城町湾屋	3年目	As展示圃1 1~5
Asatsuyu 展示圃2 6~14	大島郡天城町岡前	1年目	As展示圃2 6~14
Asatsuyu 展示圃3 15~20	大島郡天城町松原西区	1年目	As展示圃3 15~20
Asatsuyu 展示圃4 21~26	大島郡天城町当部	1年目 Natsuyutakaとの混播	As展示圃4 21~26
Asatsuyu 展示圃5 27~35	大島郡徳之島町大原団	2年目 強酸性土壌	As展示圃5 27~35
踏圧耐性 循環選抜2nd 1~4	Asatsuyu		As踏圧2nd 1~4
Callide 選抜1~8			Cd選抜1~8
倍加Asatsuyu 1~8		人為四倍体選抜	倍加As1~8
Katambora 大隅1~4	Katambora		Kt(大)1~4

表2 供試材料（沖縄収集系統）

収集地点	系統名	市町村名	字名	具体的場所	北緯	東経
沖縄本島						
	国頭村辺戸	国頭村	辺戸	岬へ向かう道沿い	26° 51' 46"	128° 15' 34"
	国頭村宜名真	国頭村	宜名真	座津武トンネル前（海岸沿い）	26° 49' 33"	128° 14' 46"
	国頭村安田	国頭村	安田	県道70号線沿い山の斜面	26° 45' 00"	128° 19' 03"
	大宜味饒波	大宜味村	饒波	墓前旧道沿い	26° 41' 57"	128° 07' 44"
	名護市源河	名護市	源河	海の道路（R58）沿い	26° 37' 52"	128° 03' 20"
	与那城伊計島ホテル	うるま市	与那城伊計	道路沿い	26° 23' 38"	128° 00' 14"
	与那城伊計島	うるま市	与那城伊計	道路沿い	26° 23' 16"	127° 59' 54"
	与那城伊計島橋	うるま市	与那城伊計	道路沿い	26° 23' 09"	127° 59' 20"
	与那城宮城島橋	うるま市	与那城宮城	道路沿い	26° 21' 26"	127° 58' 19"
	与那城宮城島	うるま市	与那城宮城	道路沿い	26° 22' 11"	127° 59' 06"
	北中城村和仁屋	北中城村	和仁屋	国道329号線沿い空き地	26° 17' 39"	127° 48' 39"
	北中城村安谷屋1	北中城村	安谷屋	道路沿い	26° 17' 24"	127° 47' 18"
	北中城村安谷屋2	北中城村	安谷屋	高速道路	26° 17' 33"	127° 47' 23"
	豊見城市渡橋名	豊見城市	渡橋名	那覇看護専門学校前	26° 09' 34"	127° 40' 15"
	糸満市座波	糸満市	座波	県道7号線沿い、歩道わきの空き地	26° 08' 21"	127° 41' 44"
	南城市玉城奥武島	玉城村	奥武島	漁港内空き地	26° 07' 35"	127° 46' 42"
宮古島						
	宮古島市1	宮古島市		ローズ草地	24° 45' 54"	125° 23' 33"
	宮古島市2	宮古島市		ローズ草地	24° 43' 32"	125° 23' 41"
石垣島						
	石垣市宮良	石垣市	宮良	ジャーバル	24° 20' 42"	124° 14' 60"
	石垣市前勢岳	石垣市	前勢岳	道路沿い	24° 21' 47"	124° 08' 22"
	石垣市白保	石垣市	白保	道路沿い	24° 21' 56"	124° 14' 25"
	石垣市伊野田	石垣市	伊野田	道路沿い	24° 27' 33"	124° 14' 60"
	石垣市川平	石垣市	川平	道路法面	24° 26' 40"	124° 08' 01"
	石垣市玉取崎	石垣市	玉取崎	道路沿い	24° 29' 03"	124° 16' 33"

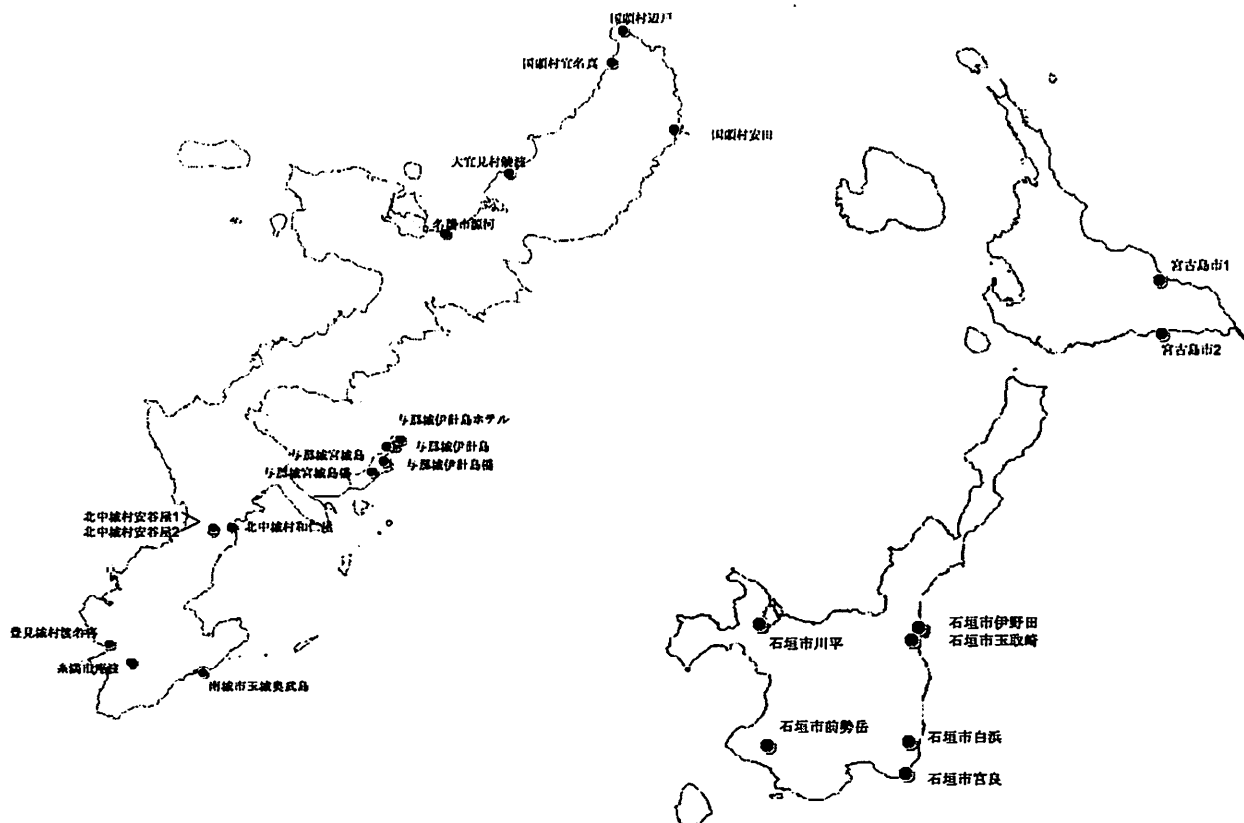


図1 ローズグラスの収集地点

IV 結果

品種と沖縄収集系統の倍数性を表3に示した。沖縄収集系統では国頭村安田が Kt 比 3.0, Cd 比 1.1

となり、Cdと類似していることから四倍体、石垣市白保はKt比2.1、Cd比0.9、石垣市川平はKt比1.9、Cd比0.8とKtの約2倍でCdとやや近い値を示すことから四倍体と判定された。低温選抜4th 1、倍加As9、Cd選抜1および2はKt比1.6、1.5、1.6および1.7、Cd比0.6、0.6、0.6および0.7を示し、Ktの約1.5倍、Cdの約0.5倍であることから三倍体と推定された。それ以外の系統は二倍体と判定された。

表3 品種、鹿児島移管系統および沖縄収集系統の倍数性

品種系統名	DNA相対量		倍数性
	Kt比	Cd比	
Kt (2n=20)	1.0	0.4	二倍体
Cd (2n=40)	2.8	1.0	四倍体
As	1.0	0.4	二倍体
低温選抜3rd 6	1.0	0.4	二倍体
低温選抜4th 1	1.6	0.6	三倍体
低温選抜4th 7	1.2	0.5	二倍体
低温選抜4th 8	1.4	0.5	二倍体
As展示圃1 3	1.0	0.4	二倍体
As展示圃2 7	1.2	0.5	二倍体
倍加As 9	1.5	0.6	三倍体
Cd選抜 1	1.6	0.6	三倍体
Cd選抜 2	1.7	0.7	三倍体
国頭村辺戸	1.1	0.4	二倍体
国頭村宜名真	1.4	0.5	二倍体
国頭村安田	3.0	1.1	四倍体
大宜味饒波	0.9	0.3	二倍体
名護市源河	1.1	0.4	二倍体
与那城伊計島ホテル	1.0	0.3	二倍体
与那城伊計島	1.0	0.4	二倍体
与那城伊計島橋	1.0	0.3	二倍体
与那城宮城島橋	1.1	0.4	二倍体
与那城宮城島	1.1	0.4	二倍体
北中城村安谷屋2	1.2	0.4	二倍体
南城市玉城奥武島	1.2	0.4	二倍体
石垣市宮良	1.1	0.5	二倍体
石垣市前勢岳	1.1	0.5	二倍体
石垣市白保	2.1	0.9	四倍体
石垣市伊野田	0.7	0.3	二倍体
石垣市川平	1.9	0.8	四倍体
石垣市玉取崎	0.9	0.4	二倍体

注) 倍数性判定はKt比=1を二倍体、Cd比=1を四倍体の基準とする。

得られた AFLP マーカーを利用して、沖縄収集系統および鹿児島移管系統の主成分分析を行った。第1, 2 および 3 主成分を軸に 3 次元回転プロットを作成し、図 2 に示した。鹿児島移管系統は各系統間で明確な差異が確認された。特に低温選抜 3rd と低温選抜 4th の識別性は明らかであった。表 3 によって沖縄収集系統のうち二倍体と判定された系統(沖縄二倍体)は低温選抜 3rd および 4th の集団に分布した。四倍体と判定された系統(沖縄四倍体)は Cd 選抜と同一の位置に分布した。

6 種類の AFLP プライマー組み合わせを使った多型解析から、合計 1225 の多型情報を含むマーカーが検出され、個体ごとにバンドの有無のスコアを用いて主成分分析を行い、表 4 に示した。第 1 主成分の寄与率は 18.5%、第 2 主成分は 11.1% となり、第 3 主成分までの累積寄与率は 30.0% となった。第 1 主成分ではプライマー組み合わせ C1 および H2 で固有ベクトルが大きなマーカーが高い頻度で検出された。第 1 主成分の固有ベクトルが大きく、選抜された 20 マーカーのうち C1 では 11 (55%)、H2 では 7 (35%) のマーカーが認められた。第 2 主成分ではプライマー組み合わせ C1 および D4 でそれぞれ 7 (35%)、および第 3 主成分ではプライマー組み合わせ D2 および E6 でそれぞれ 9 (45%) 認められた。第 1, 2 および 3 主成分の中から固有ベクトルの絶対値の大きさに従い、大きな値をもつ 60 マーカーを選抜した。

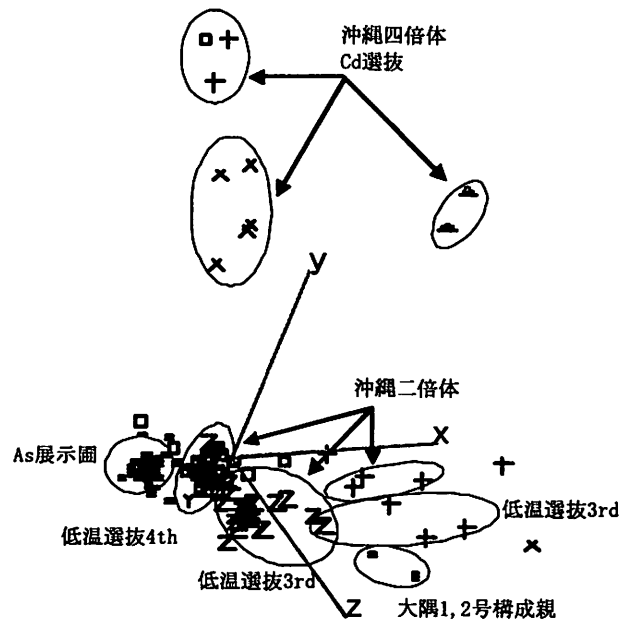


図2 AFLP法を利用した沖縄収集系統と鹿児島移管系統の主成分分析

注) x は第1主成分, y は2主成分, z は第3主成分

表4 多型情報の主成分分析から得た選抜マーカー

	第1主成分		第2主成分		第3主成分	
固有値	30.0835		11.1133		7.6225	
寄与率	18.4561		6.818		4.6764	
累積寄与率	18.4561		25.2741		29.9505	
マーカー名 ^{注)}	固有ベクトル	マーカー名 ^{注)}	固有ベクトル	マーカー名 ^{注)}	固有ベクトル	固有ベクトル
H2-136	-0.15679	H2-16	-0.17047	H7-2	-0.19191	
C1-88	-0.15123	C1-120	-0.16005	E6-77	-0.18504	
C1-82	-0.14202	D2-131	-0.12831	D2-57	-0.1345	
C1-80	-0.13475	D4-50	-0.1236	D2-131	-0.11371	
H2-94	-0.1338	D2-126	-0.11958	H2-118	-0.11354	
C1-10	-0.12762	D2-119	-0.11924	C1-35	-0.11122	
C1-152	-0.11996	C1-64	-0.11435	E6-107	-0.10987	
D4-50	-0.1131	C1-119	-0.11353	E6-137	-0.10644	
H2-207	-0.11123	C1-194	-0.10883	E6-76	-0.1061	
H2-19	-0.10626	D2-163	-0.10882	D2-19	-0.10497	
C1-158	0.14371	E6-74	0.12431	H7-20	0.1443	
C1-149	0.14478	C1-152	0.12478	D2-61	0.15505	
C1-20	0.1462	D4-142	0.12841	C1-66	0.16177	
H2-117	0.14688	D4-15	0.13328	D2-39	0.17712	
H2-10	0.14743	D4-185	0.13631	E6-69	0.17907	
H2-4	0.14813	D4-125	0.15394	E6-70	0.18019	
C1-73	0.14988	D4-10	0.1574	D2-104	0.19099	
D2-151	0.15278	C1-86	0.16815	D2-127	0.20518	
C1-196	0.15293	D4-49	0.18959	D2-67	0.20942	
C1-194	0.16001	C1-153	0.22784	D2-52	0.22728	

注) H2-136などはマーカー名で、H2はプライマー組み合わせ、-136はsize番号を示す。

表4に示した60マーカーの多型情報に基づいて、系統間の類似度から系統樹を作成し、図3に示した。系統樹は品種Iと鹿児島移管系統および沖縄収集系統IIの2群に分かれた。品種の中でCdのみがI-iii群を構成し、他の品種との類似度が低かった。品種内変異はCdが最も高かった。それ以外の品種はI-iおよびI-iiに分類され、品種間の類似度が高くなった。沖縄収集系統および鹿児島移管系統はAs展示圃II-iiとそれ以外の系統II-iの2群にわかれた。沖縄収集系統は主にII-i群に属し、鹿児島移管系統と類似した。石垣市白保、石垣市川平および国頭村安田はCd選抜と同一の群に属した。与那城伊計島橋、石垣市玉取崎、石垣市伊野田、南城市玉城奥武島および宮古島市はAs展示圃と同一のクラスタに分類された。

V 考 察

AFLPマーカーによる系統解析から、供試品種と沖縄収集系統が明確に区別された。このことから、沖縄収集系統は供試品種とは異なる遺伝的形質を獲得している可能性が示唆された。品種は二倍体5品種がI-iおよびI-ii群を構成し、四倍体のCdはI-iii群を構成した。Cdの形態的および遺伝的特性は他の品種との類似度が低く、品種内の個体ごとの特性に変異が大きいことが報告されており⁸⁾、AFLP法を用いた本実験の結果でも同様の傾向が認められた。沖縄収集系統の国頭村安田、石垣市白保および石垣市川平は系統樹で四倍体であると考えられるCd選抜系統と同一の群に分類され、倍数性判定と一致する結果であった。また、県内ではAsが一部普及し始めており、与那城伊計島橋、石垣市玉取崎、石垣市伊野田、南城市玉城奥武島および宮古島市はAs展示圃と同一の群に属していた。これらの系統はAs由来である可能性が示唆される。以上のことから、AFLPマーカーはローズグラスの類縁関係の把握や品種識別および育種目的のために有効であることが確認できた。

さらに、鹿児島移管系統を含めた主成分分析では、鹿児島県の低温選抜効果は3次選抜以降に顕著となっていることが確認された。このことは、集団の循環選抜効果が一般によく期待できる選抜世代であること、また、AFLPの多型マーカーが選抜による集団の遺伝的遷移を的確に表現しているためであると考えられる。また、沖縄収集系統は低温選抜3rd集団および4th集団の群を形成していた。それは亜熱帯地域の北方に位置する沖縄本島では、低温に対する順応性の獲得が永続性などの生育特性に影響して、エコタイプを成立させた可能性を示唆している。

以上の結果から、沖縄収集系統は供試品種とは異なる遺伝的特性をもち、沖縄の気候風土による自然選抜によって、永続性や耐干性など沖縄に適応するための遺伝的形質を獲得しており、有効な育種母材である可能性が示唆された。

VI 引用文献

- 1) 中川仁・清水矩宏・佐藤博保(1993)ローズグラス(*Chloris gayana* Kunth)新品種「ハツナツ」,九州農試報告, 27, 399-416
- 2) 沢井晃・白山竜次・南公宗・小松敏憲・鶴見義朗・山方誠・土井修・長谷健・上野敬一郎(1997)ローズグラスの新品種「アサツユ」の育成とその特性.鹿児島農試報告 25, 47-52
- 3) Nakagawa, H., N. Simizu and H. Sato(1987)Chromosome number reproductive method and morphological characteristics of *Chloris* species. *Grass. Sci*, 33, 191-205
- 4) Nakagawa H(1995)Cytogenetical study and breeding and of some tropical grass, *bull Hirosima Agri Res Cent*, 58, 99-124
- 5) Ebina, M. and H. nakagawa(2001)RAPD analysis on genes of apomictic and sexual lines in guineagrass, *Grassland Sci*, 47, 251-255
- 6) Ebina, M., K. Kouki, S. Thuruta, R. Akashi, T. Yamamot, M. Takahara, M. Inafuku(2007)Genetic Relationship estimation in Guineagrass(*Panicum maximum* Jacq) assessed on the basis of simple sequence repeat maker, *Grassland Sci*, 53, 155-164
- 7) Ubi, B. E, R. Kolliker, M. Fjimori and T. Komatu(2003)Genetic Diversity in Diploid Cultivars of Rhodesgrass Determined on the Basis of Amplified Fragment Length Polymorphism Markers, *Crop Sci*,

43, 1516-1522

8) Ubi, B. E., M. Fjimori, M. Ebina, Y. Mano and T. Komatu (2000) AFLP variation in tetraploid cultivars of rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth), *Grassland Sci*, 46, 242-248

9) Murray M. G. and Thompson W. F. (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA, *Nucl Acids Res*, 8, 4321-4325

研究補助：伊藤博志，宮城広明