

AFLP による島根県在来シバの系統解析

安部 亜津子・帯刀 一美・三島 好信

要 約 島根県内に自生するシバ 4 系統および高知県自生シバ 1 系統について Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) による系統識別の可能性を検討した。また、得られた結果を用いて分子系統樹を作成した。

ゲノム DNA は生葉から抽出し、64 とおりのプライマーセットについて反応をおこなった。反応産物の電気泳動パターンを比較し、系統間の多型を判定した。その結果、多型を示したバンドの総数は 307 であり、すべてのプライマーセットで多型を示すバンドが得られた。このうち、1 系統を識別できるバンドは 188 (バンドあり:122、バンドなし:66)であり、すべての系統について系統特異的なバンドが認められた。

分子系統樹は 2 つの解析方法により作成した。一方はバンドの有無を数値に変換し、フラグメント解析に対応した手法である、Jaccard coefficient および Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) により系統樹を作成した。他方はバンドの有無を DNA 塩基配列として変換して p-distance により遺伝的距離を算出し、UPGMA および近隣結合法により系統樹を作成した。その結果、地理的に隔離された隠岐島の 2 系統がクラスターを形成した。また、高知畜試系と吾妻山系もクラスターを形成したが、三瓶系は作成方法によって異なる結果であった。

以上の結果から、AFLP はシバの系統識別に適用可能な手法であることが明らかになった。

島根県立畜産試験場研究報告第 34 号 :15-18,2001

シバ(*Zoysia japonica*)は低投入 持続型の放牧用草種であり、近年、県内でも放牧場へのシバの導入が増加している。しかし、シバは一度芝生を形成すれば長年にわたって安定的に利用できるものの、造成に数年もの時間がかかり、また、放牧期間が春期から秋期に限られるなど、より効率的な利用のために解決すべき問題点がある。これらの問題点についてはポット苗移植法³⁾などの効率的造成方法の検討や、牧草のシバ草地へのオーバーシーディングによる放牧期間の延長¹⁾など、多くの取り組みがなされてきているが、初期生育や匍匐茎の伸長性に優れた品種・系統の作出が望まれている。

一方、シバには自生地ごとに多数の系統が存在し、生育特性⁵⁾や環境適応性⁷⁾について、それぞれ異なった特性を持つことが知られており、その中から有用な形質をもつ系統を選抜し、利用することで、より効率的な草地造成やシバ型草地の牧養力の向上が可能になると考えられる。当該においても本県の気象条件や地理的条件に適應する系統を選抜し、利用することを試みている。

ここで目的としている匍匐茎の伸長性や低温耐性とといった量的形質を比較する場合、圃場条件や気候といった環境要因による影響が問題となる。そのため、試験区における表現型データの比較と併せて DNA レベル

での系統比較をおこない、供試系統を識別することで、表現型の系統間差についてより正確なデータが得られると考えられる。さらに、目的とする形質と連鎖したマーカーを単離することで、DNA マーカーを利用した系統選抜も可能になると期待される。

そこで、今回は DNA マーカーを利用したシバの系統識別の可能性について検討した。DNA マーカーには、シバと同じくイネ科の植物であるコムギ²⁾やトウモロコシ¹⁾などでタイピングに利用されている AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism :増幅断片長多型)マーカーを用いた。また、得られたデータについてクラスター分析を行い、分子系統樹を作成した。クラスター分析はフラグメント解析に最適化された手法と併せて、塩基配列データのための解析方法についてもおこない、AFLP への適用の可能性を検討した。

材料および方法

材料には、当該に保存されている島根県在来シバ 4 系統 (吾妻山系、三瓶系、大峯山系、西ノ島系)および高知畜試系シバを供試した (図 1)。ゲノム DNA は生葉から CTAB 法⁶⁾により抽出し、RNase 処理後、フェノ

ール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製した。



- ① 吾妻山系
- ② 三瓶系
- ③ 大峯山系
- ④ 西ノ島系
- ⑤ 高知畜試系

図1 シバの採取地点

ゲノムDNAはAFLP Plant Mapping Kit™ Regular Plant Kit(Perkin Elmer)を使用して常法¹⁰⁾に準じて反応をおこなった。選択的プライマーはキット付属のEcoRIプライマー、MseIプライマー各8種類を使用し、64とおりすべての組み合わせについて反応をおこなった。

反応産物はABI PRISM™377 DNA sequencer(Perkin Elmer)により電気泳動し、GeneScan™672(Perkin Elmer)およびGenotyper™(Perkin Elmer)により解析をおこなった。得られたバンドパターンについて系統間比較をおこない、バンドの有無に系統間で差が認められるものを多型として判定した。

得られた結果は、多型の有無に関わらずすべてのバンドの有無を数値(バンドあり=1、バンドなし=0)に変換し、Diversity Database™(pdi Inc.)によりクラスター分析をおこない、分子系統樹を作成した。距離行列はJaccard coefficientにより算出し、系統樹作成法はUnweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean(UPGMA)⁹⁾を用いた。また、バンドの有無をDNA塩基配列(バンドあり=A、バンドなし=C,T,G)として変換し、Molecular Evolutionary Genetics Analysis(MEGA)プログラムによる分子系統樹も作成した。距離行列はp-distanceにより算出し、系統樹作成は

UPGMA および近隣結合法⁸⁾によりおこなった。

結 果

64 通りのプライマーセットについて分析をおこなったところ、系統間で多型が認められたバンドの総数は307であり(図2)、すべてのプライマーの組み合わせで

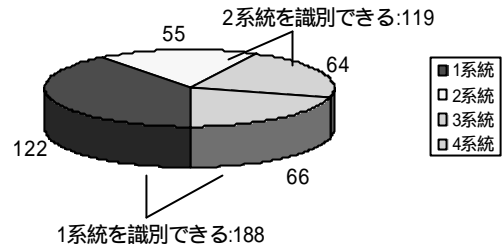


図2 AFLPにより得られた多型バンドの内訳

多型を示すバンドが得られた。このうち、1系統を識別できるバンドは188(バンドあり:122、バンドなし:66)であり、すべての系統について系統特異的なバンドが認められた(図3)。

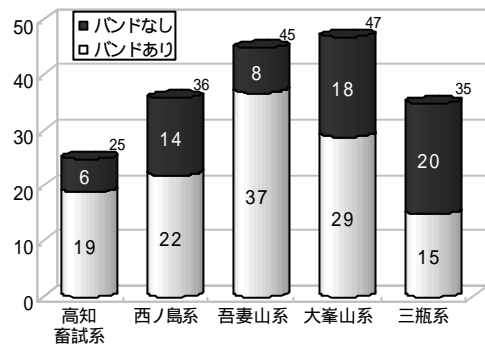


図3 各系統を識別できたバンド数

また、Diversity Database™により分子系統樹を作成したところ、供試した5系統のうち、隠岐島のシバ(大峯山系、西ノ島系)がクラスターを形成し、高知畜試系と吾妻山系がクラスターも形成した(図4)。また、バンドありをA、バンドなしをCとしたデータを用いて、MEGAにより分子系統樹を作成したところ、同様に隠岐島のシバがクラスターを形成し、高知畜試系もクラスターを形成した(図5)。しかし、三瓶系はいずれの手法でも他系統とクラスターを形成せず、位置もそれぞれ異なっていた(図4、5)。

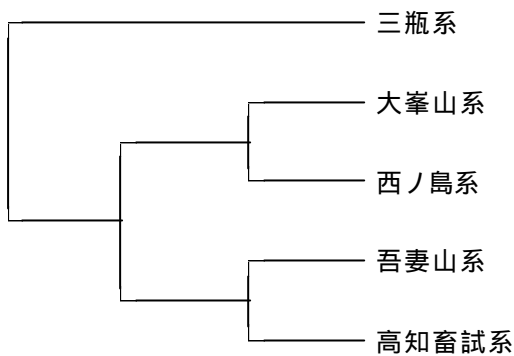
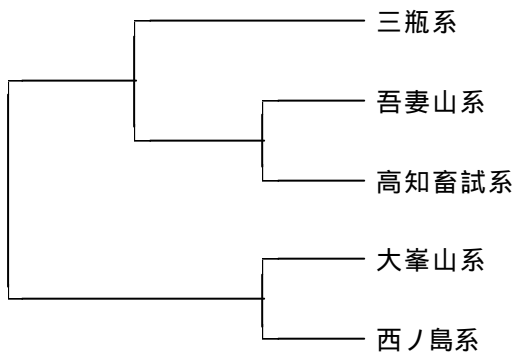


図4 Diversity Database™によるシバの分子系統樹

a) 近隣結合法



b) UPGMA法

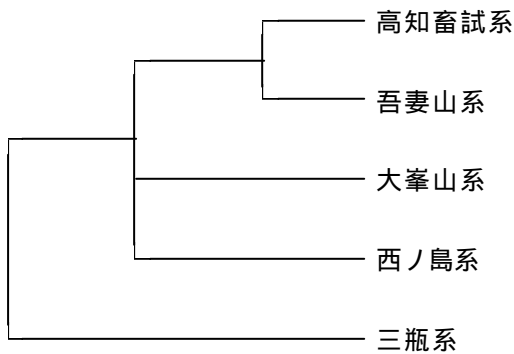


図5 MEGAによるシバの分子系統樹

考 察

以上の結果から、今回供試したシバの系統について AFLP による識別が可能であることが明らかになった。さらに、今回の供試系統に対して未知の系統を比較する

ことで、両者の類似性の評価が可能になるとともに、その結果、シバの系統識別が可能になると考えられる。このことから、圃場における系統間の表現型の比較と併せて DNA レベルでの系統識別をおこなうことで、系統の特性をより正確に評価することが可能になると期待される。

また、分子系統樹を作成した結果、隠岐島のシバである西ノ島系と大峯山系がクラスターを形成し、供試した5系統の中でこれらの2系統が遺伝的に近縁であることが示唆され、このことは隠岐島が他の自生地と地理的に隔離されていることと関連していると考えられる。

今回は複数の方法により距離行列の算出と系統樹の作成をおこなったが、Diversity Database™を用いた場合と MEGA を用いた場合では異なる結果となった。これは、Diversity Database™ で用いた Jaccard coefficient が RFLP や RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)、Differential Display などのフラグメント解析を用いた系統解析を対象として最適化された計算方法であるのに対し、MEGA で使用した距離行列算出法は DNA 塩基配列を用いた系統解析のための方法であることによると考えられる。また、バンドの有無を2つの塩基として置き換えたため、塩基配列が偏ったデータとなったためでもあると思われる。以上のことから、AFLP による系統解析をおこなう際には、塩基配列を利用したモデルでは信頼性が問題となり、フラグメント解析に適用可能な手法を用いることが必要であると考えられる。一方、MEGA による系統解析では、置換する塩基の種類を変えても、それぞれの手法で得られた系統樹は同じであったが、今回の解析では塩基置換がトランスポージョンであってもトランジションであっても影響を受けなかったといえる。

今回は64とおりすべてのプライマーセットについて解析をおこなったが、実際に多数の系統を用いてタイピングをおこなう場合にはプライマーの組み合わせを絞っておこなうことが必要であると考えられる。データは示していないが、プライマーの組み合わせによる多型の数の違いは EcoRI プライマーの種類に依存している傾向が認められた。また、既存の報告^{1,2,4)}では、6から8のプライマーセットで品種・系統比較をおこなって良好な結果を得ており、シバにおいても多型が多数検出できるプライマーセットを絞ってタイピングをおこなうことが可能であると考えられる。

今回は5系統について解析をおこなったが、今後は県内のみならず気象条件の異なる地域の自生系統を収集し、系統数を増やして解析をおこなうことにより、

現在、系統を収集中である。これらについて AFLP 解析をおこなうとともに、圃場においては表現型、特に匍匐茎の伸長性と緑度維持期間について系統間比較をおこない、それらに優れた系統を選抜することを考えている。

謝 辞

AFLP 解析および系統樹作成にあたり、ご指導ご協力をいただいた、農林水産省草地試験場育種部育種資源研究室蝦名真澄主任研究官ほか諸先生方に深謝いたします。

文 献

1) Ajmone, M. Pet al. (1998) Theor. Appl. Genet. 96 :219-227

- 2) Barrett, B. A. and Kidwell, K. K (1998) Crop Sci. 38:1261-1271
- 3) 高知県畜試 徳島県畜試 愛媛県畜試 (1996) シバ草地造成マニュアル. 1-71
- 4) Mahbubur Rahman, S. M et al. (1998) Breed. Sci. 48:5-10
- 5) Matsumura, M. et. al. (1990) Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. 55:259-265
- 6) Murray, M. G. and Thompson, W. F (1980) Nucleic Acids Res. 8:4321-4325
- 7) 長澤れんりら (1994) 芝草研究 23(1):79
- 8) Saitou, N. and Nei, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425
- 9) Sokal, R. R. and Michener, C. D (1958) Univ. Kans. Sci. Bull. 28:1409
- 10) Vos, P. et al (1995) Nucleic Acids Res. 23:4407-4414
- 11) 山本嘉人ら (1997) 日草誌 42:315-323