

RAPD 解析を利用したジャイアントスターグラス およびハイキビ(収集系統)の系統分類

稲福政史 幸喜香織 奥村健治

I 要 約

離島を含む沖縄県内各地、宮崎県およびタイより収集したジャイアントスターグラス 7 系統およびハイキビ 10 系統について、RAPD (Random amplified polymorphic DNAs) 解析を用いた系統分類の有効性を検討するために、従来の形態的特性による系統分類と比較した。その結果は、以下のとおりであった。

1. ジャイアントスターグラス収集系統を 10 項目の形態的特性および 14 種類の RAPD プライマーによる RAPD 解析法に基づきクラスター分析したところ、ともに大きく 2 つのグループに分けることができた。また、RAPD 解析では、同一グループ内の系統に変異はなく、それぞれ単一のクローンであることが示唆され、収集されたジャイアントスターグラスは 2 系統に由来すると考えられた。

2. ハイキビでは 4 種類の RAPD プライマーによる RAPD 解析においてクラスター分析の結果は 10 項目の形態的特性の分析結果と一致せず、また、収集地点の遠近との間に関連はみられなかった。

3. ハイキビでは 11 種類の RAPD プライマーのうち 7 種類で収集系統間に変異がみられず、また RAPD 解析により得られた総バンド数の 69% は収集系統間に変異がみられなかったことから、ハイキビ収集系統のもつ遺伝子群の大部分は共通し、遺伝的な変異の程度は小さいと考えられた。

以上のことから、RAPD 解析法は、環境要因に影響されず、また、系統間の遺伝的変異の程度の比較や、クラスター分析による系統分類には有効であると考えられた。

II 緒 言

近年、DNA マーカーを利用した試験研究はごく身近なものになってきた。RAPD 解析法¹⁾もそのひとつであり、PCR (Polymerase Chain Reaction) 技術の普及に伴い進展してきた簡易な DNA マーカー分析法である。これまでは、各地より収集されてきた遺伝資源は、形態的特性から得られるデータを基に、クラスター分析等により近縁関係を明らかにしてきた。本試験では従来行われてきた形態的特性と、DNA マーカーを利用した RAPD 解析法のクラスター分析を比較し、RAPD 解析法を利用した系統分類の有効性を検討した。

III 材料および方法

1. 供試材料

離島を含む沖縄県内各地、宮崎県およびタイより収集したジャイアントスターグラス 7 系統およびハイキビ 10 系統を用いた (表 1)。

2. 形態的特性評価

ジャイアントスターグラスおよびハイキビの形態的特性の評価項目について表 2 に示した。

ジャイアントスターグラスの形態的特性の評価は沖縄県畜産試験場試験圃場において出穂期となった 2001 年 12 月に行った。穂形質 4 項目、その他特性 6 項目の合計 10 項目について行った。ハイキビの形態的特性の評価は沖縄県畜産試験場試験圃場において出穂期となった 2002 年 10 月に、穂形質 3 項目、その他特性 7 項目の合計 10 項目について行った。

表 1 ジャイアントスターグラスおよびハイキビの収集地

草 種	収 集 地
ジャイアントスターグラス (計 7 地域)	1. 畜産試験場 (本島北部・今帰仁村), 2. 首里 (那覇市), 3. 名蔵 (石垣市), 4. 宮良 (石垣市), 5. 川良原 (石垣市), 6. 黒島 (竹富町), 7. タイ(コンケン)
ハイキビ (計 10 地域)	1. 儀間海岸 (本島中部・読谷村), 2. 奥武島 (本島南部・玉城村), 3. 名城ビーチ (本島南部・糸満市), 4. 伊江島東海岸 (伊江村), 5. 伊江島灯台 (伊江村), 6. 農業試験場宮古支場(平良市), 7. アガリタカーナ 1 (多良間村), 8. アガリタカーナ 2 (多良間村), 9. 黒島栈橋海岸(竹富町), 10. 白浜海岸 (宮崎県)

表 2 形態的特性評価項目

草 種	形態的特性	形 質
ジャイアントスターグラス (計 10 項目)	穂形質 (4) その他形質 (6)	第 2 ほう穎/第 1 ほう穎比, 外穎長/外穎幅比, 1 段型穂枝梗数および 1 段型穂枝梗長 稈長, 止葉長, 止葉幅, 第 1 葉長, 第 1 葉幅 および茎の太さ
ハイキビ (計 10 項目)	穂形質 (3) その他形質 (7)	穂長, 最下部枝梗長および穂数 稈長, 止葉長, 止葉幅, 第 1 葉長, 第 1 葉幅, 茎の太さおよび茎数

3. RAPD 法による解析

1) DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出は, 健全な成葉 2~3 枚 (約 5g) を液体窒素で粉碎し, CTAB (Cethyl trimethyl ammonium bromide) 法²⁾を用いて抽出した。抽出されたゲノム DNA は分光光度計を用いて DNA 濃度を測定し, ゲノム DNA 濃度が 20ng/ul になるように調整した。

2) PCR 条件

本実験では RAPD プライマーとして表 3 に示す OPERON 社製の 10 塩基からなる任意配列の RAPD プライマーを使用し, PCR 反応は, 1 テンプレートあたり 100mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP をそれぞれ等濃度含む), 0.1U TaKaRa Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造), 20pM RAPD プライマーおよび 20ng ゲノム DNA の 10ul 混合液で行った。PCR には GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer) を使用し, PCR 反応は, 最初に 94°C 2 分の熱変性後, 94°C 1 分, 36°C 1 分, 72°C 2 分を 1 サイクルとして 45 サイクル行い, 最後に 72°C の伸長反応を 15 分行った。

表 3 RAPD 解析に用いられた 10 塩基 RAPD プライマー (OPERON 社製)

草 種	OPC シリーズ	OPD シリーズ	OPE シリーズ	OPF シリーズ
ジャイアントスターグラス (計 14primer)	5, 7, 9, 11, 13, 20	6, 8, 9,	1, 6, 16, 20	2
ハイキビ (計 11primer)	18	1, 2, 9, 10, 18	10	1, 4, 5, 15

3) 電気泳動および解析

電気泳動は1.8%アガロースのミニゲルで、電圧100v、約45分で行った。泳動後エチジウムブロマイド溶液に1時間程度浸漬した後、UV(260nm)イルミネーター上でCCDカメラより画像保存後、画像解析ソフト BIO-1D++ (VILBER LOUMAT) を使いバンドパターンを解析した。バンド位置を決定するためのサイズマーカーには100bp molecular ruler(Bio-Rad Lab.)を使用した。

4. クラスター分析による系統分類

クラスター分析は統計ソフトウェア JMP(SASインターナショナル)を用いた。形態的特性の評価は、各々の形態特性ごとに Ward 法³⁾ により分析した。RAPD 法におけるクラスター分析は DNA マーカーバンドの有無により分類し、形態特性同様に Ward 法により分析した。その結果をもとに、形態特性および RAPD 解析のクラスターを比較した。

IV 結 果

ジャイアントスターグラスの形態的特性および RAPD 解析のクラスター分析の結果を図1および2に示した。

形態的特性では宮良、黒島および川良原と名蔵、首里、畜産試験場およびタイの大きく2つのクラスターに分けることができた。

RAPD 解析により14種類のプライマーで多型を示すバンドパターンが得られた。14種類のプライマーすべてにおいて写真1に示すように、プライマーの種類によって特異的に発現するバンドがみられ、畜産試験場、首里、黒島およびタイの収集4系統あるいは名蔵、宮良および川良原の収集3系統の間で遺伝的な変異はなく、図2のクラスター分析の結果に示されるように、2つのグループにはっきりと区別された。この結果より形態的特性と、RAPD 解析で黒島と名蔵を除くと、よく類似し、ジャイアントスターグラス収集7系統は2系統に由来すると考えられた。

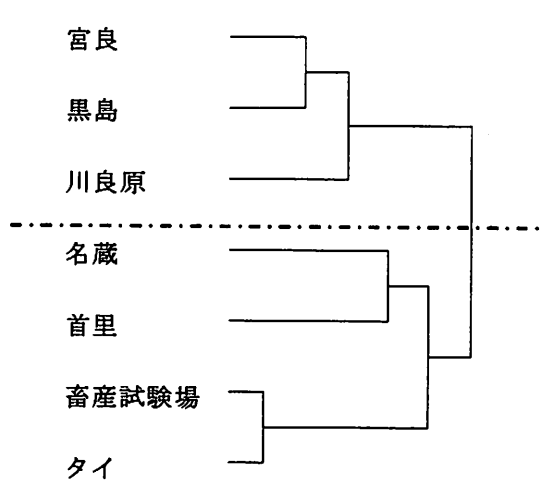


図1 ジャイアントスターグラスの形態的特性に基づくクラスター分析(特性10項目)

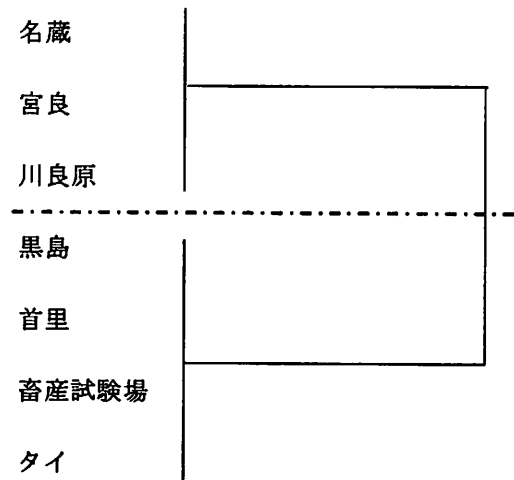


図2 ジャイアントスターグラスの RAPD 解析に基づくクラスター分析

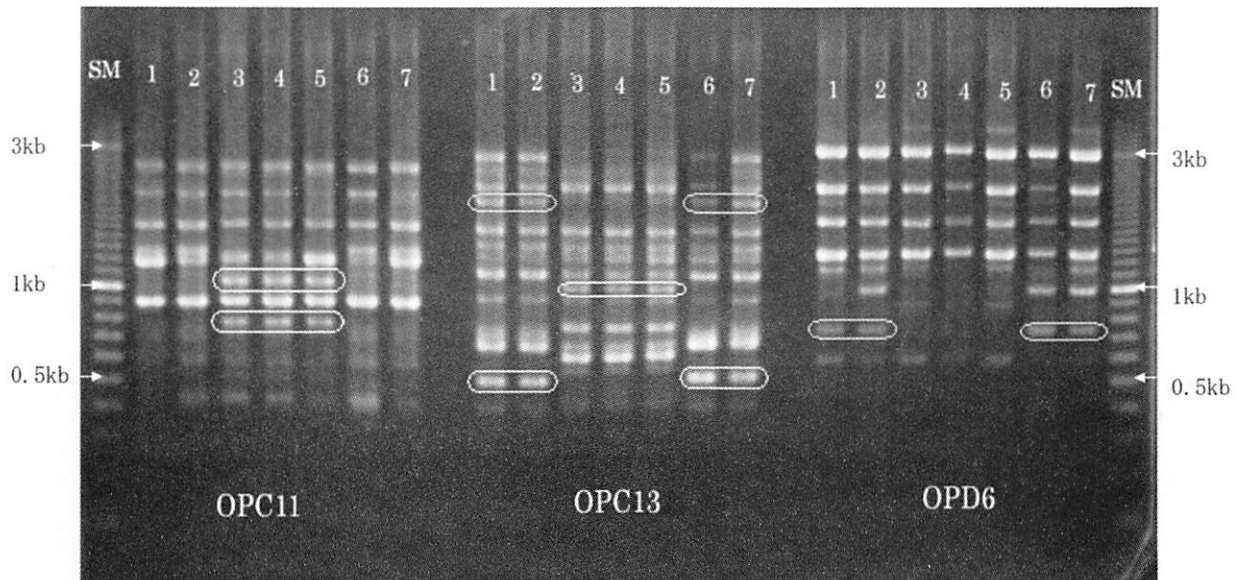


写真1 ジャイアントスターグラスの RAPD 分析法による DNA マーカー分離パターン

SM：サイズマーカー、

1：畜産試験場，2：首里，3：名蔵，4：宮良，5：川良原，6：黒島，7：タイ

注) 写真中の囲み線は収集系統で特異的に発現するバンド。9

ハイキビの形態的特性および RAPD 解析のクラスター分析の結果をそれぞれ図 3 および 4 に示した。

形態的特性では大きく 2 つのクラスターに分けることができたが、同一グループに属する収集系統に収集地点間の遠近関係はみられなかった。

RAPD 解析には 11 種類の RAPD プライマーが試され、7 種類のプライマーについては全系統において全く同じバンドパターンを示した (写真 2-1)。残り 4 種類のプライマーについてはバンドパターンに変異がみられた (写真 2-2)。11 種類のプライマーによる RAPD 解析で合計 151 本のバンドが得られたが、表 4 に示すように、変異のみられたバンドは 46 本で、バンド総数あたりの変異率は 31% であり、残りの 105 本 (69%) はすべての収集系統において共通したバンドであった。

RAPD 解析によるクラスター分析には変異のみられた 4 種類のプライマーを用いて行った。多良間島のアガリタカーナで収集された異なる 2 系統は同じグループに属したが、同一ではなく、変異がみられた。

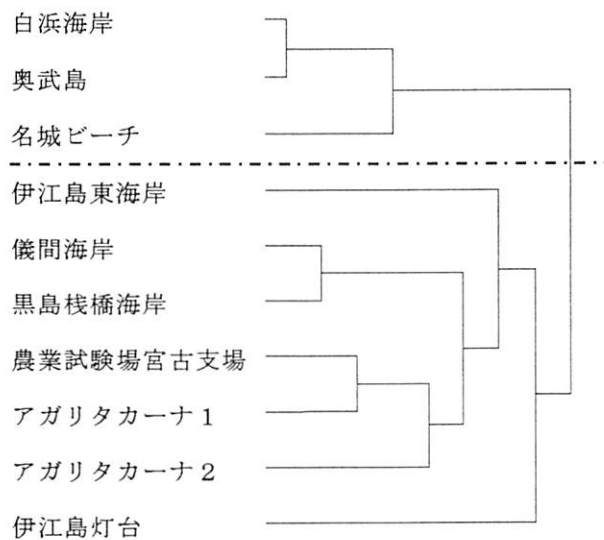


図3 ハイキビの形態的特性に基づく
クラスター分析(特性 10 項目)

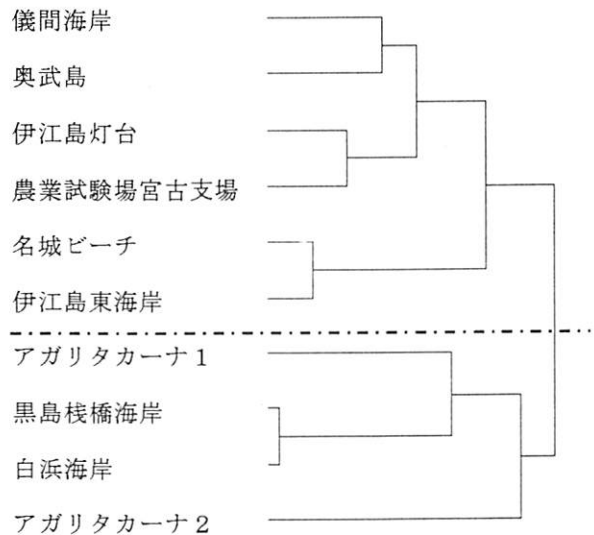


図4 ハイキビの RAPD 解析に基づく
クラスター分析

形態的特性の場合と同様に収集地の遠近間で共通性はみられなかった。また、形態的特性と RAPD 解析を比較しても、両クラスター分析の結果で共通する傾向はみられなかった。

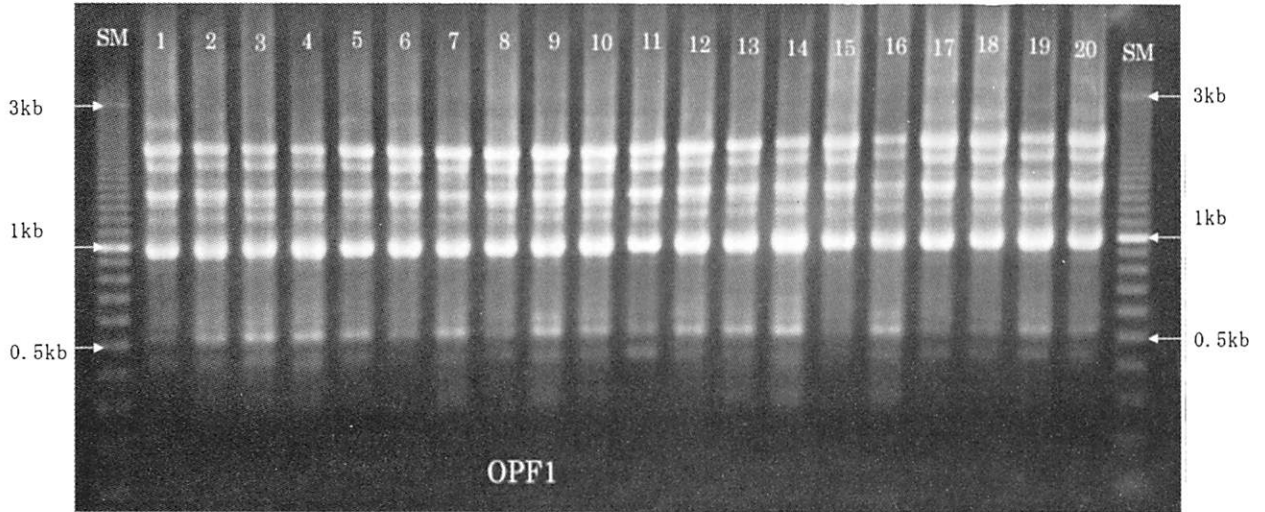


写真2-1 ハイキビの変異のみられなかった RAPD バンドパターン(プライマーは OPF1)

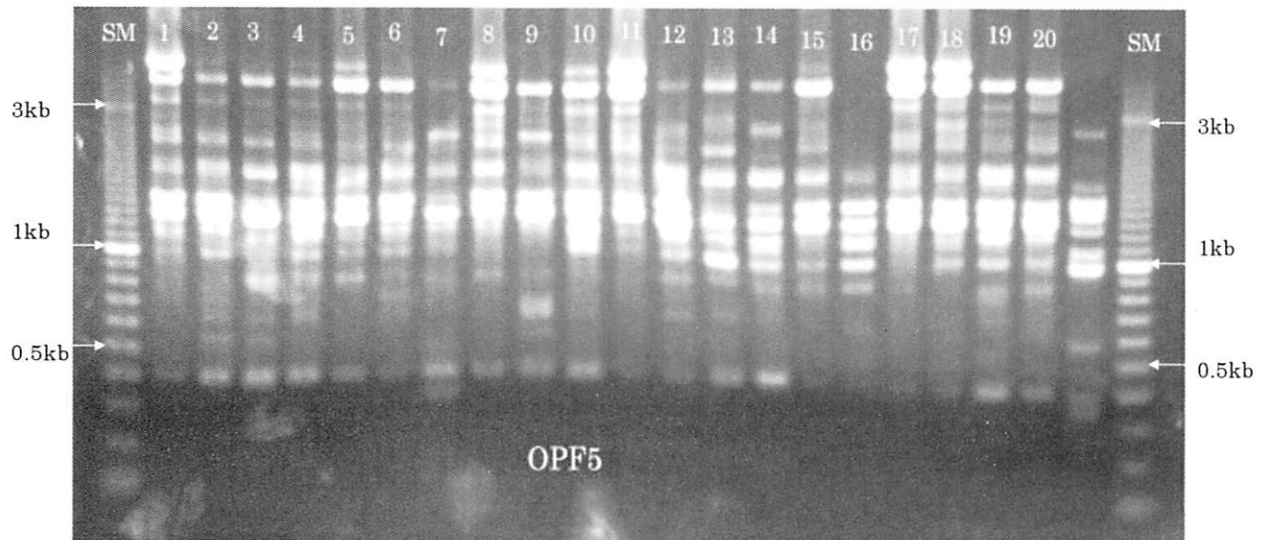


写真2-2 ハイキビの変異のみられた RAPD バンドパターン (プライマーは OPF5)

写真2 ハイキビの RAPD 法による DNA マーカー分離パターン

SM : サイズマーカー,

1 : 辺土岬 (国頭), 2 : 嘉陽海岸 (名護), 3 : 湧原 (宜野座), 4 : 勝連, 5 : 儀間海岸 (読谷),
6 : 新原ビーチ (玉城), 7 : 奥武島 (玉城), 8 : 名城ビーチ (糸満), 9 : 伊江東海岸 1 (伊江),
10 : 伊江灯台 1 (伊江), 11 : 農業試験場宮古支場 (平良), 12 : 来間島 (下地), 13 : アガリタ
カーナ 1 (多良間), 14 : アガリタカーナ 2 (多良間), 15 : 大里 (石垣), 16 : 謝花 (石垣),
17 : 黒島栈橋海岸 (竹富町), 18 : タイ (コンケン), 19 : 鶴戸郵便局 (宮崎), 20 : 白浜海岸 (宮崎)

注) 太字で表された収集系統をクラスター解析に用いた。

表 4 ハイキビ収集系統の RAPD 解析より得られたバンド数の比較

RAPD プライマー	変異のある バンド数	共通した バンド数	バンド数合計
OPC18	0	12	12
OPD 1	0	12	12
OPD 2	0	15	15
OPD 9	10	5	15
OPD10	0	7	7
OPD18	0	15	15
OPE10	7	8	15
OPF 1	0	11	11
OPF 4	0	14	14
OPF 5	17	3	20
OPF15	12	3	15
合 計 (変異率%)	46	105	151 (30.5)

V 考 察

ジャイアントスターグラスでは形態的特性および RAPD 解析との間でクラスター分析の結果がよく一致した。しかし、黒島と名蔵については形態的特性と RAPD 解析のクラスター分析で属するグループが異なっていた。黒島および名蔵の違いについては再度ゲノム DNA を抽出し、RAPD 解析法による DNA パターンを再確認することにより、環境要因による変異であるかどうかを検討する必要がある。

これまで、ジャイアントスターグラスは栄養繁殖で草地造成をおこなってきたこともあり、普及しているジャイアントスターグラスは単クローンである可能性が高いと考えられてきた。今回の RAPD 解析により少なくとも 2 系統のジャイアントスターグラスが存在することが明らかとなった。RAPD 解析のみならず形態的特性の中でも 2 系統のジャイアントスターグラスが存在する傾向がみられた。ジャイアントスターグラスとされている系統には *Cynodon plectostachyus* および *C. nlemfuensis* の 2 種あり、これらの 2 種が県内に導入されたかどうかは不明であり、分類学上の形態特性において今回の 2 系統がどちらの種によく類似しているかについてまだ同定はなされていない。ジャイアントスターグラスは、その近縁種であるバミューダグラス (*Cynodon dactylon* (L.) pers.) との相互交配により、実際に種間雑種後代が得られる。また、自然交配による変異体である可能性も示唆されるが、もし自然交配しているとすれば、さらに多くの変異体の存在が想定される。これらのことから自然交配による変異ではなく、異なる 2 種類の系統が栄養体 (クローン) として過去に本県へ導入されたという可能性が有力であると考えられた。

ハイキビ (*Panicum repens* L.) はギニアグラス (*Panicum maximum* Jacq.) と同属の自生種である。奥村ら⁴⁾ はハイキビの小花内にある子房や柱頭の 13% が正常であり、残りは褐変や萎縮あるいは退化し、また花粉稔性については不稔であるとしており、種子形成は非常に困難であると推察される。このことからハイキビは地下茎とほふく茎による栄養体繁殖が主体と考えられ、遺伝的な変異はないと考えられる。収集系統は形態的特性において収集系統間に明らかな変異がみられた。また、RAPD 解析において、11 種類の RAPD プライマーより得られたバンドパターンの 151 本のバンドのうち 31% を占めるバンドでは収集系統間に明らかな変異がみられた。多良間島より収集した 2 系統 (アガリタカーナ 1 および 2) は収集場所の実距離が近いため、非常に近いグループに属すると考えられたが、収集地点の遠近との間に関連はみられなかった。霍田ら⁵⁾ はネピアグラスの系統分類結果において、形態的特性で同一群に分類されている系統でも RAPD 解析による分類は必ずしも同群には含まれず、遺伝的類似性が低い場合が認

められるとし、それは今回の結果と一致している。しかし、残りの69%を占めるバンドでは系統間に変異はみられず、共通のDNAマーカーを有しているため、多くの遺伝子群は共通していると考えられ、収集系統間の遺伝的な変異は小さいと考えられた。

RAPD解析は、形態的特性と異なり、環境要因の影響を受けないため、ジャイアントスターグラスの結果に反映されているように、精密な系統分類が可能であり、また、系統間の遺伝的変異の程度の比較には、ハイキビの結果にみられるように、RAPD解析は有効であると考えられた。RAPD解析は、簡易におこなえるという利点があるが、その反面、再現性に若干劣る場合もあることから、再現性があり、より精密な解析法である AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) マーカーや SSR (Simple Sequence Repeats) マーカーを利用した系統分類についても、今後、検討する必要があると考えられた。

VI 引用文献

- 1) Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey, 1990, DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18, 6531-6535
- 2) Murray, M. G. and W. F. Thompson, 1980, Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.*, 8, 4321-4325
- 3) 宮本定明, 1999, クラスタ分析入門, 森北出版
- 4) 奥村健治・稲福政史・幸喜香織, 2002, ハイキビの種子繁殖性と形態特性の変異, 日草誌, 48(別), 324-325
- 5) 霍田真一・明石良・川村修・沼口寛次, 2002, RAPD(Random amplified polymorphic DNAs)分析法によるネピアグラス (*Pennisetum purpureum* Schumach) の系統分類, 日草誌, 48(1), 37-42

研究補助：比嘉正徳