

学 位 論 文 要 旨

氏 名

橋 口 正 嗣

題 目

我が国における *Zoysia* 属および *Lotus* 属の遺伝的多様性に関する研究
(Study of genetic diversity on indigenous *Zoysia* and *Lotus* species in Japan)

本研究は、日本に自生する 2, 3 の草種における遺伝資源の有効利用を目的としてそれらの基盤情報を整備するために、*Zoysia* 属および *Lotus* 属における形態的特性の評価を行い、それらの相互関係を調査するとともに、分子マーカーを用いた遺伝的類縁関係の調査を行ったものである。

南西諸島に自生するシバ属野生種 37 系統における形態的特性および被度増加率をもとにしたクラスター解析の結果、供試 41 野生・栽培種は大きく 3 群に分類でき、葉幅による種判別とほぼ一致した。このことは、葉幅とその他の形質との高い相関に関係するものと考えられた。さらに、被度増加率は、葉幅、草高および匍匐茎長に深く関係することが認められ、またフラクタル解析システムを用いることで、シバ系統間の被度増加能力を容易に評価でき、高被度増加率を示す系統を選抜することが可能であった。SSR マーカーによる多型解析の結果、*Z. matrella* は *Z. tenuifolia* よりもヘテロ接合度および多型情報含有値の値が有意 ($p < 0.001$, $p = 0.02$) に高く、遺伝的多様性に富んでいることが示唆された。さらに、クラスター解析を行った結果、その分類は葉幅および形態的特性による分類とは異なり、地理的分布を反映しさらに詳細に分類された。

南西諸島を除く日本全土から収集したミヤコグサ 57 野生種における形態的特性と採取地の緯度および気象条件の相互関係を調査した結果、葉長、茎色、種子重と年間平均気温、年間降水量との間で高い相関関係が認められ、高緯度・低降水量・低温地域の系統は葉長が長く、茎の紫色が濃く、種子重が重い傾向が認められた。新規なミヤコグサ遺伝資源であるシロバナミヤコグサ野生系統を南西諸島より収集し、その形態的特性を調査した結果、シロバナミヤコグサの初期生育は他種と比較して極めて遅いものであったが、開花期の植物体、莢果および種子形質は、葉幅と一莢種子数を除く全ての形質で最大値を示し、特に種子重は Gifu 系統の 3 倍以上の値を示した。SSR マーカーによる類縁関係の調査の結果、シロバナミヤコグサはミヤコグサ群とセイヨウミヤコグサ群の間に分類され、西洋ミヤコグサよりも遺伝的にミヤコグサに近縁であることが判明した。さらに、シロバナミヤコグサの DNA 含有量は、ミヤコグサの約 2.7 倍を示し、そのゲノムサイズは約 1,195.6 Mbp と考えられた。

以上のように、日本に自生する、*Zoysia* 属および *Lotus* 属遺伝資源を収集・保存し、形態的特性および遺伝的類縁関係を調査することで、それらの遺伝的多様性に関する基礎的知見を得ることができた。本研究で得られた情報は、今後、*Zoysia* 属および *Lotus* 属遺伝資源を利用した植物育種または環境保全を展開していく基盤となりうる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Masatsugu Hashiguchi
題 目	Study of genetic diversity on indigenous <i>Zoysia</i> and <i>Lotus</i> species in Japan (我が国における <i>Zoysia</i> 属および <i>Lotus</i> 属の遺伝的多様性に関する研究)

In this study we compiled basic information of genetic resource of *Zoysia* and *Lotus* species indigenous to Japan, with an aim towards their effective use.

Thirty-seven ecotypes and 4 cultivars of *Zoysia matrella* and *Z. tenuifolia* collected from Southwest Islands of Japan were investigated for 6 morphological characteristics and covering gain. Based on morphological characteristics and covering gain, cluster analysis showed that 37 ecotypes and 4 cultivars could be classified into 3 major groups. These groups are *Z. matrella* except Oujima 1 and Miyakojima (Cluster I group), *Z. tenuifolia* except Minatogawa 2 (Cluster II group) and Tanegashima 2 (Cluster III group). Due to high correlations between leaf width and other morphological characteristics, zoysiagrass ecotypes could be classified into two species. Moreover, covering gain showed high correlations with leaf width, plant height and runner length. We conducted a study of genetic diversity in 41 zoysiagrass. From 12 SSR markers used, a total of 155 SSR bands were scored. The number of putative alleles ranged from 6 to 22, with average value of 12.9. *Z. matrella* had significantly higher PIC than *Z. tenuifolia* ($p=0.02$). Cluster analysis based on the 155 SSR bands revealed that the 41 lines were classified into 7 groups.

Fifty-seven ecotypes of *Lotus japonicus* indigenous to Japan were investigated for 11 morphological characteristics. Average temperatures and precipitations of a year were negatively correlated with stem color and seed weight. On the other hand, latitude was positively correlated with stem color and seed weight. Consequently, the ecotypes from the sites of higher latitude, low temperatures and low precipitations tends to be of dark red color for the stem and heavy seeds. Cluster analysis based on 9 morphological characteristics showed that 46 lines could be classified into 6 major groups. We collected novel genetic resource of *Lotus* spp. '*Lotus australis*' from Southwest Islands of Japan and studied them for morphological characteristics and genetic relationship using SSR marker. Though the growth during early growing period of *L. australis* was poor, during flowering period, it showed biggest morphological characteristics except for leaflet width and number of seeds in pod. Particularly, seed weight of *L. australis* was 3.5-fold heavier than that of *L. japonicus* (Gifu B-129). Cluster analysis based on 13 SSR markers showed that 10 lines could be classified into 3 major groups. Cluster I, grouped 4 lines of *L. australis*. Cluster II, grouped 2 lines of *L. japonicus*, *L. burttii* and *L. filicaulis*. Cluster III, grouped 2 lines of *L. corniculatus*. *L. australis* could be classified between diploid *L. japonicus* and tetraploid *L. corniculatus*. Based on flow cytometric analysis, *L. australis* showed a fluorescence intensity 2.7-fold higher than that of *L. japonicus* (Gifu B-129). Genome size of *L. australis* could be calculated to be 1,195.6 M bp, from that of *L. japonicus* (Gifu B-129; 442.8 M bp).

These results could be of useful information for preservation of the environment as well as plant breeding by using *Zoysia* and *Lotus* species.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	橋 口 正 嗣
審査委員	主査 官 崎 大学 教 授 川 村 修
	副査 官 崎 大学 教 授 明 石 良
	副査 琉 球 大学 教 授 川 本 康 博
	副査 鹿 児 島 大学 教 授 中 西 良 孝
	副査 佐 賀 大学 助 教 授 鈴 木 章 弘
審査協力者	
題 目	我が国における <i>Zoysia</i> 属および <i>Lotus</i> 属の遺伝的多様性に関する研究 (Study of genetic diversity on indigenous <i>Zoysia</i> and <i>Lotus</i> species in Japan)
<p>生物遺伝資源は、産業の発展や地球環境の保全にとって不可欠であり、今後、いかにそれらを有効利用するかが求められている。しかしながら、近年の地球環境の悪化によりその枯渇化が危惧されていることから、種々の遺伝資源を収集・保存し、それらの特性を評価するとともに、得られた情報を整備することが喫緊の課題となっている。そこで、学位申請者は、日本に自生する重要な植物遺伝資源である <i>Zoysia</i> 属および <i>Lotus</i> 属を収集・保存し、それらの遺伝的多様性について評価した。</p> <p><i>Zoysia</i> 属は、古くから庭園における芝生や放牧用草種としても利用されてきた。南西諸島を中心に <i>Z. matrella</i> および <i>Z. tenuifolia</i> を含む約 200 系統を収集し、その 37 系統と栽培種である「朝駆 (<i>Z. japonica</i>)」、「鳥取コウライ (<i>Z. matrella</i>)」、「ピロードシバ (<i>Z. tenuifolia</i>)」および「Emerald」(<i>Z. japonica</i> と <i>Z. tenuifolia</i> の交雑品種) の合計 41 系統における形態的特性およびフラクタル解析システムによる被度増加率について調査した。また、SSR (simple sequence repeats) マーカーを用いて多型解析を行い、<i>Zoysia</i> 属における遺伝的多様性について評価し、考察した。その結果、形態的特性では、匍匐茎節間長が長い系統ほど葉身長も長くなる傾向が認められ、被度増加率は、葉幅、草高および匍匐茎長と深く関係すること</p>	

が判明した。さらに、これらの結果をもとにクラスター解析を行ったところ、供試 41 系統は大きく *Z. matrella*, *Z. tenuifolia* および *Z. japonica* の 3 群に分類することができた。また、フラクタル解析システムを用いることで、シバ系統間の被度増加能力を容易に評価でき、高被度増加率を示す系統を選抜することが可能であった。SSR マーカーによる遺伝的多様性評価では、*Z. matrella* は *Z. tenuifolia* よりもヘテロ接合度および多型情報含有値の値が有意 ($p < 0.001$, $p < 0.05$) に高く、遺伝的多様性に富んでいることが示唆された。さらに、その分類では、形態的特性による分類とは異なり、地理的分布が反映されていた。

Lotus 属は、150 種以上が認められており、食料、飼料、薬などに利用される種が存在しており、近年では *L. japonicus* がモデルマメ科植物として様々な研究分野で広く利用されている。本研究は、日本に自生する *L. japonicus* および *L. australis* を含む約 160 系統を収集し形態的特性調査を行った。*L. japonicus* 57 野生種における形態的特性とそれらの採取地の緯度および気象条件との関係について調査した結果、葉身長、茎色、種子重のそれぞれにおいて年間平均気温、年間降水量との間で高い相関関係が認められ、高緯度・低降水量・低温地域の系統は葉身長が長く、茎の紫色が濃く、種子が重い傾向が認められた。さらに、得られた結果をもとに、その一部をデータベース化することで情報の公開を行った。一方、*L. australis* における形態的特性および SSR マーカーによる *Lotus* 属 4 種 (*L. japonicus*, *L. burttii*, *L. filicaulis*, *L. corniculatus*) との類縁関係について調査した。その結果、*L. australis* の初期生育は他種よりも遅い傾向が認められたものの、開花期の植物体における各組織、豆果および種子の形態は他種よりも大きく、特に種子重は *L. japonicus* の約 3 倍であった。また、SSR マーカーを用いた類縁関係では、*L. australis* は *L. corniculatus* よりも *L. japonicus* に近縁であることが判明した。一方、フローサイトメトリーによる *L. australis* の DNA 含有量を測定したところ、*L. japonicus* の約 2.7 倍であり、ゲノムサイズが異なっていた。

以上のことから、本研究では我が国に自生する *Zoysia* 属および *Lotus* 属遺伝資源を収集して保存するとともに、形態的特性および遺伝的類縁関係を解明することで、それらの遺伝的多様性に関する貴重な基礎的知見を得ることができた。本研究で得られた情報は、今後、*Zoysia* 属および *Lotus* 属遺伝資源を利用した植物育種または環境保全を展開していくための基盤となるものと高く評価できる。したがって、審査委員一同は、本論文は博士（農学）の学位論文として十分価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏 名	橋口 正嗣
審査委員	主査 宮崎大学 教授 川村 修
	副査 宮崎大学 教授 明石 良
	副査 琉球大学 教授 川本 康博
	副査 鹿児島大学 教授 中西 良孝
	副査 佐賀大学 助教授 鈴木 章弘
審査協力者	
実施年月日	平成 19 年 1 月 29 日
試験方法（該当のものを○でかつ囲むこと。） <input checked="" type="radio"/> 答・筆答	
<p>主査および副査は、平成 19 年 1 月 29 日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は、申請者が連合農学研究科博士課程修了者としての学力および識見を有することを認め、博士（農学）の学位を与えるのに十分な資格を持つものと判定した。</p>	

学位申請者 氏 名	橋口 正嗣
<p>[質問] <i>Zoysia</i> 属の形態的特性調査について、植物体の本来の形質が反映されるという観点から、自生地の気象条件下で調査する必要があるのではないか。</p> <p>[回答] 植物の形態は環境によって大きく変動するため、詳細な形態的変異を調査するためには自生地での調査も必要である。しかしながら、遺伝資源の基礎情報整備の観点からは、同一条件で他系統との形態比較を行うことも重要であると考えた。</p> <p>[質問] <i>Zoysia</i> 属採集における自生種の定義（判定）について。</p> <p>[回答] 採集は、まず、文献、研究協力者の助言等から自生の情報収集を行い、未踏地においては現地での聞きこみ等により情報を収集し行った。いずれの場合も、その自生地における周辺環境の状態を考慮に入れながら野生種の判断を行い採取した。収集した系統については、本実験で用いた SSR マーカーにより栽培種との比較を行い、野生種であることの確認も可能である。</p> <p>[質問] ミヤコグサの形態的特性について、緯度などの違いで特性が違うのは生理学的観点からどのようなことが考えられるか。</p> <p>[回答] 例えば、本実験では高緯度・低温地域のミヤコグサ系統は茎の紫色が濃い傾向にあることが認められたが、茎の紫色はアントシアニンによるものであり、その合成は植物の環境に対する防御反応の一つとして知られている。このことから、地域による形態的相異の一つの理由として、植物の環境応答が関係していることが考えられる。</p> <p>[質問] シロバナミヤコグサのゲノムサイズについて、ミヤコグサとシロバナミヤコグサとの関係はあるのか。</p> <p>[回答] 本種のゲノムサイズにおいて他種と比べて大きかったことが、染色体数の相異あるいは単にゲノムサイズが異なるだけなのか、現在調査を進めている。</p> <p>[質問] マメ科の窒素固定に関する情報収集について、どのように考えているか。</p>	

[回答] マメ科植物においては、やはり窒素固定が最大の特性であり大変重要な情報でもあるため、今後は、各系統の窒素固定能や根粒菌との親和性など共生に関する情報も収集していきたい。

[質問] アソシエーション解析とは。

[回答] アソシエーション解析とは、自然集団を利用して、系統群における形質の変異を支配する候補遺伝子を探索する方法の一つである。交配集団 (F₂ や RIL) を用いる遺伝解析では両親の遺伝的相異しか解明できないのに対して、自然集団を用いる遺伝解析では、交配による集団の作成が不必要で、広範囲の遺伝変異を探索できる。

[質問] シロバナミヤコグサは種子が大きく、形態が大きい結果が得られているが、ミヤコグサとの結果と矛盾している。

[回答] ミヤコグサとシロバナミヤコグサは近縁種であるものの自生地が異なり、また、異種であるため、ミヤコグサの形態的特性とは一致しないことが考えられる。

[質問] *Zoysia* の分類について、SSR マーカーと形態的特性のどちらの指標で分類するのが良いのか。

[回答] 本研究で形態と SSR による分類が一致しなかった理由として、形態的特性は環境変異に左右されることと、用いた SSR マーカーは翻訳領域以外の部分から作成されたものであることがあげられる。このため、両方の結果を踏まえて総合的に判断することが重要である。

[質問] 土壌保全という観点から、被度増加率の高い品種を作ることについて、どのように考えているか。

[回答] 土壌保全には被覆能力や根の身長程度等が重要であるが、本研究では、*Zoysia* 属 2 種で高被度増加率を示す系統を選抜することができた。さらに、根の伸長程度などのデータも収集することで土壌保全に利用できる優れたシバ品種の開発に貢献できるものと考えられる。