

**森林農業班 B**

**ラオス・ルアンパバン近郊におけるモチイネ 2. 研究経過報告 (2004)**

**武藤千秋 (岐阜大学大学院連合農学研究所)**

**佐藤洋一郎 (総合地球環境学研究所)**

キーワード：モチイネ, ラオス少数民族, 遺伝的多様性

**A Preliminary Report of Glutinous rice at Luang Prabang, Lao PDR (2004)**

**Chiaki MUTO (United Graduate School of Agricultural Science, Gifu Univ.)**

**Yo-ichiro SATO (Research Institute for Humanity and Nature)**

Key words : Glutinous rice, Ethnic groups in Laos, Genetic diversity

**要旨**

東南アジアの内陸部に位置するラオスおよびその周縁地域には、「モチイネ栽培圏」(Watabe 1967) と呼ばれるように、モチイネを常食とする世界でも独特な習慣が残されている。本研究はラオス中部のモチイネの栽培様式や品種の多様性を評価し、モチイネの起源や伝播の過程を明らかにすることを目的とする。

**【研究経過報告】**

本年度は、昨年度にラオス中部、ルアンパバン県およびウドムサイ県の焼畑を中心に収集したイネ 159 系統の形質調査および DNA 分析をおこなった。調査項目はふ毛（籾の表面の毛）の有無、芒（籾先端の毛）の有無、ヨードヨードカリ反応（胚乳のモチ・ウルチ性）、フェノール反応などを調べた。DNA 分析では ORF100 領域における 69bp の欠失の有無、モチ遺伝子座内の多型、さらに 5 つの SSR 遺伝子座の遺伝的多様性を調べた。

供試した 159 系統中、ふ毛のないもの (gl 型) は約 127 系統、ふ毛のあるもの (+ 型) は約 31 系統であった。一般に gl 型は熱帯ジャポニカに特有の形質であると考えられている。gl 型はフェノール非反応型、ORF100 領域で非欠失型 (ND 型) にほぼ一致した。+ 型はフェノール反応型、ORF100 領域で欠失型 (D 型) にほぼ一致した。このことから、今回供試した材料は典型的なインディカ・ジャポニカ集団であることがわかった。

SSR 解析では 5 マーカーを用いて品種の遺伝的多様性を評価した。このことから、ラオスのモチイネは SSR 領域について高い遺伝的多様性を持つと考えられた。また SSR 遺伝子の対立遺伝子頻度は民族ごとに分布している傾向があることがわかった。今後は主にモチ遺伝子座内の多型を重点的に調査していく予定である。

**【サンプリング報告】**

2004 年 11 月 1 日～16 日にはラオスヴィエンチャン県サイタニー郡で農家をまわりインタビューおよびサンプリングを行った。この地域では主として水田稲作をおこなっており、焼畑陸稲中心のルアンパバン県周辺とは異なった特徴をもつ品種を収集できた。今後、これらも研究材料に加えていく予定である。

**【緒言】**

「モチイネ栽培圏」の中心部に位置するラオス人民共和国では、人々はモチ米を常食しており (図 1)1)、現在でも多くのモチ在来品種が栽培されている。そのためモチ米の起源や伝播を調べるには適した地域と考えられる。ラオス国内が政情不安定であったため 1960 年代の渡部による先駆的な研究以来、見るべき研究成果が得られていなかったが、1990 年代に入り佐藤らによって現地での調査が再開された 2)。現在では佐藤らを筆頭に、Lao Ministry of Agriculture and Forestry (MAF) や International Rice Research Institute (IRRI)3) など、ラオス内外の研究者によって遺伝資源としてのラオス国内の栽培品種および野生種の収集や保全活動が盛んに行われるように

なっている。しかしながら DNA レベルでの研究はまだあまりなされていない。

本研究はラオス中部のモチイネの栽培様式や品種の多様性を評価し、モチイネの起源や伝播の過程、民族や文化との関りを明らかにすることを目的とする。

## 1. 研究経過報告

### 1.1 材料および方法

本研究の対象とするラオス中部、ルアンパバン県およびウドムサイ県では焼畑を中心とした稲作をおこなっている。通常、一農家で数品種が栽培されており、多いときには 20 品種近くものイネがみられる。

昨年度はルアンパバン県のウー川沿い 17 村を訪問し、イネ栽培品種 96 系統を収集した。さらに鹿児島黎明館の川野和昭氏から、ルアンパバン県およびウドムサイ県で収集した 70 系統を分譲していただいた。本年度は、これら 166 系統のうち種籾が十分量ある 159 系統を京都大学農学部の水田で栽培し、形質調査および DNA 分析をおこなった。

#### 形質調査

ふ毛（籾の表面の毛）の有無、芒（籾先端の毛）の有無、および玄米色を観察した。

また玄米をヨードヨードカリ呈色反応により胚乳のモチ・ウルチ性を判定した。さらに籾のフェノール反応を調べた。籾を 1.5% フェノールに 2 日間浸漬し、無変化のものは一型、黒色または褐色に変化するものは+型と表記した。一型はジャポニカに多く、+型はインディカに多くみられる。

#### DNA 分析

各系統の生葉からフェノール法で DNA を抽出し、各種プライマーを用いて PCR 増幅した。増幅した DNA 断片は 1.5% アガロースゲルまたは 8% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色したのち紫外線を照射して観察した。分析は次の 3 項目についておこなった。

まず葉緑体の ORF100 領域における 69bp の欠失の有無を調べた。これまでの研究で、欠失のないものがジャポニカに、欠失のあるものがインディカに相当することがわかっている 4)。

モチ遺伝子はアミロース合成をつかさどる遺伝子である。ウルチ米の胚乳はアミロースとアミロペクチンからなるが、この遺伝子内に変異が起きてアミロース合成機能が損なわれるとモチ性胚乳になる。モチイネではモチ遺伝子座第 2 エクソンに 23bp の重複が起きており、これがモチ性の原因といわれている。これまでに、この 23bp の重複以外の変異に起因するモチ栽培品種は見つかっていないため、モチイネの起源は一元的であると考えられている。そこで本研究においてもモチ遺伝子座第 2 エクソンにおける、23bp の重複の有無を調べた。

さらに 5 つの SSR (Simple Sequence Repeat) 遺伝子座、RM 1, RM3, RM11, RM13, RM224 について遺伝的多様性を調べた。これら 5 つのマーカーはこれまでの研究からイネ栽培品種で多型を示すことがわかっている 5)。得られたバンドパターンをアレルの違いとして認識し、多様性を評価した。各アレルには bp の短いものから順に a', b', c'・・・と名付けた。なお前出の研究 (文献 5) と区別するため、本研究のアレル名ではアルファベットに「'」をつけて表示した。

### 1.2 結果および考察

供試した 159 系統中、ふ毛のないもの (gl 型) は約 127 系統、ふ毛のあるもの (+ 型) は約 31 系統であった。一般に gl 型は熱帯ジャポニカに特有の形質であると考えられている。

供試した系統の中では、芒のあるものはみられなかった。

ヨードヨードカリ溶液による胚乳のモチ・ウルチ性判別では、モチ 133 系統、ウルチ 21 系統であった。不稔のため 5 系統が判別できなかった。またヨードヨードカリ反応の結果とモチ遺伝子座内の 23bp の重複の有無は一致した。

籾のフェノール反応では、無反応型 (- 型) が 124 系統、反応型 (+ 型) が 27 系統であった。

ふ毛の有無、フェノール反応型、ORF100 領域の結果は 159 系統中 153 系統で一致し、6 系統で一致しなかった。

このことから、今回供試した材料にはインディカ、ジャポニカ間で組み替えが起きているものがあることがわかった。

サンプリング時のインタビューによると供試材料は陸稲 146 系統、水稲 13 系統であった。これをインディカ・ジャポニカ別にみても、陸稲ではジャポニカ 130 系統、インディカ 19 系統、水稲ではジャポニカ 3 系統、インディカ 10 系統であった。(表 1)

SSR 解析では RM1 では 7 アレル、RM3 では 10 アレル、RM11 では 7 アレル、RM13 では 6 アレル、RM224 では 4 アレルが検出された。(表 2)

どの SSR 領域においても、水稲と陸稲で異なるアレルを示す傾向がみられた。特に RM13 では a', b', c' アレルを示すものはすべて陸稲で、f' アレルを示すものはすべて水稲であった。d', e' アレルは水・陸稲両方でみられた。(表 3)

#### 民族ごとの比較

RM1 の f', g' アレルは 2 つの村のタイラー族の持つインディカ水稲品種 13 系統に特有であり、それら 13 系統はすべて、RM224 では d' アレルを示した(表 4)。平均遺伝子多様度はタイラー族の品種が 0.61 で最も高かった(表 5)。

このように SSR 遺伝子の頻度分布は民族で傾向があることがわかった。このことから、栽培植物の起源や伝播を考察するためには民族の情報も考慮することが必要であると考えられる。

#### 日本・中国品種との比較

平均遺伝子多様度をもとめ、遺伝的多様性の評価を試みた。平均遺伝子多様度とは遺伝的多様性の程度を具体的な数値で表すことができるパラメーターである。数値が高いほど、多様性が高いといえる。

ラオス中部の在来品種の平均遺伝子多様度 (H) は 0.57 であり、中国大陸の在来品種の集団 (H=0.61(n=90)) および朝鮮半島の在来品種 (H=0.58(n=55)) と同程度であった(表 2)。また、日本の在来品種の平均遺伝子多様度 (H=0.28(n=40)) を大幅に上回っていた。今回供試した系統はラオス・ルアンパバン県およびウドムサイ県という狭い地域から採集されたものである。これらのことから、ラオスのイネは高い遺伝的多様性を持つと考えられる。

供試した材料の中には RM224 においてヘテロが 2 系統みつかった。また、インディカ集団とジャポニカ集団はアレル頻度分布に違いがみられるものの共通のアレルを多く持っていた(表 6)。イネは通常自殖であるが他殖することもある。材料を採集した地域では一つの農地に複数品種が栽培されており、自然交雑しやすい環境である。今回研究対象となった地域ではインディカ・ジャポニカ間や品種間で自然交雑が起きていると考えられる。

Ishikawa et al. によると北部ラオスの在来品種では、アイソザイムの遺伝子型からインディカとジャポニカの自然交雑が示唆された。また Yamanaka et al. の研究ではふ毛と wx 遺伝子座多型の関係から、ラオスのモチイネ (モチ性突然変異) はジャポニカからインディカへの遺伝子移入によることがわかった。本研究はこれらの結果と一致する結果となった。

本研究の対象となったラオス・ルアンパバン県およびウドムサイ県の地域では、イネは品種間や亜種間で何度も交雑しながら伝播していったと考えられる。またこの地域のイネの遺伝的多様性は高く保持されているが、その遺伝的多様性は固定された品種として保持されているわけではなく、自然交雑によって流動的に保持されていると考えられる。

今後は主にモチ遺伝子座内の多型を重点的に調査していく予定である。

## 2. サンプリング報告

2004 年 11 月 1 日～ 16 日にはラオスヴィエンチャン県サイタニー郡で農家をまわりインタビューおよびサンプリングを行った。この地域では主として水田稲作をおこなっており、焼畑陸稲中心のルアンパバン県周辺とは異なった特徴をもつ品種を収集できた。今後、これらも研究材料に加えていく予定である。

引用文献

- 1) Watabe T. : Glutinous rice in northern Thailand. Reports on research in southeast Asia natural science series N-2, pp.160. CSEAS, Kyoto University, Kyoto. 1967.
- 2) Sato Y-I, Ando K, Chitrakon S, et al. : Ecological-Genetic Studies on Wild and Cultivated Rice in Tropical Asia (4th survey). Tropics 3:189-245, 1994.
- 3) Appa Rao S, Bounphanousay C, Schiller J.M. et al. : Collection, classification, and conservation of cultivated and wild rice of the Lao PDR. Genetic Resources and Crop Evolution 49:75-81, 2002.
- 4) Kannno A, Watanabe N, Nakamura I, et al. : Variations in chloroplast DNA from rice (*Oryza sativa*): differences between deletions mediated by short direct-repeat sequences within a single species. Theor. Appl. Genet. 86:579-584, 1993.
- 5) 佐藤洋一郎, 黒田洋輔, 平野智之ら : 日中の水稻品種のマイクロサテライト多型, DNA 多型 Vol.8 別刷, 2000.
- 6) Nei M.: Analysis of gene diversity in subdivided populations.Proc. Natl. Acad. USA. 70:3321-3323, 1973.
- 7) 平野智之 : マイクロサテライト多型からみた温帯 japonica の日本列島への伝播, 静岡大学大学院農学研究科, 修士論文 pp16, 2001.
- 8) Inukai T, Sako A, Hirano H-Y, et al. : Analysis of intragenic recombination at wx in rice: Correlation between the molecular and genetic maps within the locus. Genome 43:589-596, 2000.
- 9) Ishikawa R, Yamanaka S, Kanyavong K, et al. : Genetic resources of primitive upland rice in Laos. Econ. Bot. 56(2):192-197, 2001.
- 10) Yamanaka S, Fukuta Y, Ishikawa R, et al. : Phylogenetic Origin of Waxy Rice Cultivars in Laos Based on Recent Observations for “Glutinous Rice Zone” and dCAPS Marker of Waxy Gene. Tropics 11(2):109-120. 2002.

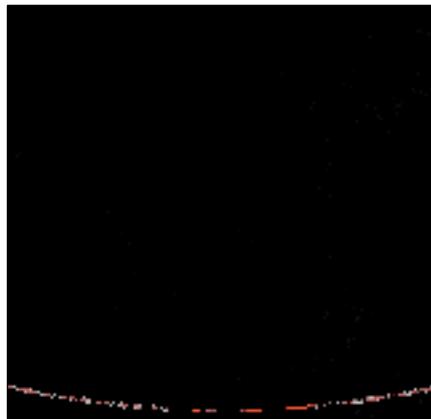


図1 モチイネ栽培圏 (Watabe 1967)

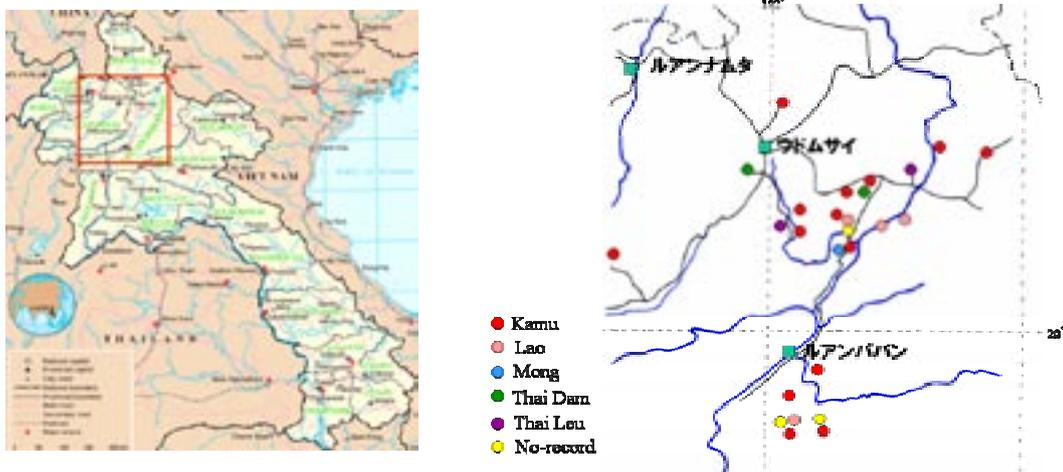


図2 供試材料の採集地 (囲み枠内)

表1 インディカ・ジャポニカ系統数

ジャポニカ		インディカ		計
陸稲	130	19		146
水稲	3	10		13
計				159
				(系統)

表2 ラオス中部および中国・朝鮮半島・日本の在来品種のアレル数と平均遺伝子多様度 (H)

遺伝子座	アレル数			
	ラオス	中国	朝鮮半島	日本
RM1	7	6	6	4
RM3	10	5		2
RM11	7	-	-	-
RM13	6	-	-	-
RM224	4	6	4	2
<i>H</i>	0.57	0.61	0.58	0.27

表3 RM3 における水稲・陸稲別アレル頻度

	a'	b'	c'	d'	e'	f'
陸稲	0.63	0.16	0.08	0.04	0.08	0
水稲	0	0	0	0.23	0.15	0.62

民族	n	RM1							RM224			
		a'	b'	c'	d'	e'	f'	g'	a'	b'	c'	d'
全体	158	0.15	0.38	0.14	0.27	0.04	0.02	0.01	0.78	0.02	0.09	0.11
カム	82	0.15	0.38	0.11	0.34	0.02	0	0	0.83	0	0.11	0.06
ラオ	25	0	0.48	0.24	0.28	0	0	0	0.88	0	0.12	0
タイルー	13	0.15	0	0.08	0.15	0.31	<b>0.23</b>	<b>0.08</b>	0.31	0	0	0.69
タイダム	10	0.30	0.40	0	0.30	0	0	0	0.80	0.20	0	0
モン	3	0	0.67	0	0.33	0	0	0	0.67	0	0.33	0
不明	24	0.25	0.46	0.25	0.04	0	0	0	0.79	0.04	0.04	0.13

表5 民族別平均遺伝子多様度

	n	<i>H</i>
全体	158	0.57
カム	82	0.50
ラオ	25	0.41
タイルー	13	0.68
タイダム	10	0.45
モン	3	0.36
不明	24	0.51

表6 RM11, RM13 のインディカ・ジャポニカ別アレル頻度

	RM11						
	a'	b'	c'	d'	e'	f'	g'
ジャポニカ	0.42	0.01	0.54	0.02	0.01	0.01	0
インディカ	0.11	0	0.07	0	0.36	0.25	0.21

	RM13					
	a'	b'	c'	d'	e'	f'
ジャポニカ	0.71	0.18	0.00	0.01	0.10	0.01
インディカ	0.00	0.00	0.43	0.29	0.04	0.25