

サトウキビとエリアンサスとの属間交雑における DNA マーカーを用いた雑種判定法の検証

著者	服部 太一郎, 寺島 義文, 福原 誠司, 木村 達郎, 西村 哲, 榎 宏征, 松岡 誠, 境垣内 岳雄, 石川 葉子, 寺内 方克
雑誌名	九州沖縄農業研究センター報告
巻	58
ページ	1-14
発行年	2012-09-28
URL	http://doi.org/10.24514/00002079

doi: 10.24514/00002079

サトウキビとエリアンサスとの属間交雑におけるDNAマーカーを用いた雑種判定法の検証

服部太一郎・寺島義文¹⁾・福原誠司²⁾・木村達郎³⁾・西村 哲³⁾
榎 宏征³⁾・松岡 誠⁴⁾・境垣内岳雄・石川葉子⁵⁾・寺内方克

(2010年11月8日 受理)

要 旨

服部太一郎・寺島義文・福原誠司・木村達郎・西村 哲・榎 宏征・松岡 誠・境垣内岳雄・石川葉子・寺内方克 (2012) サトウキビとエリアンサスとの属間交雑におけるDNAマーカーを用いた雑種判定法の検証。九州沖縄農研報告 58: 1-14.

九州沖縄農業研究センターさとうきび育種ユニットは、サトウキビとエリアンサスの属間雑種作出に取り組んできた。5SrDNAマーカーによる雑種判定法は既に確立しているが、本報では、属間交雑後代にエリアンサス染色体の一部のみが導入される場合も想定し、より広汎な染色体を検出可能なEaCIR1マーカーを併用して雑種判定を行った。その結果、両マーカーが検出される個体群とEaCIR1マーカーのみが検出される個体群が認められた。前者では肥厚帯消失や生育の弱勢化が認められ、DNA量も両親の中間値を示し、明らかに属間雑種であると考えられた。後者では肥厚帯消失は認められず、生育特性は母本のサトウキビに近い個体が多く、DNA量もサトウキビ経済品種と同程度であった。また、28種のエリアンサス由来プライマーを用いたマーカー解析でも、後者ではエリアンサスに特異的なバンドは検出されなかった。以上から、EaCIR1マーカーは必ずしもエリアンサス属だけに特異的ではないことが示唆された。また、マーカー解析には属間交雑を試みた多数の後代個体を供試したが、一部のプライマーのみでバンドが検出されるような、染色体の部分的導入を示す結果が得られた個体はなかった。このことから、染色体の部分的な導入が生じる可能性は低いか、少なくとも育種上問題となる頻度で生じる現象ではないと考えられた。

キーワード：サトウキビ、エリアンサス、属間交雑、属間雑種、DNAマーカー。

I. 緒 言

南西諸島において安定的にサトウキビを生産するためには、低肥沃度や干ばつといった不良環境に対する耐性の向上が不可欠である。サトウキビ属植物 (*Saccharum* spp.) の近縁遺伝資源であるエリアンサス属植物 (*Erianthus* spp.) は干ばつや低肥沃度等への適応性が高く、サトウキビ経済品種 (*Saccharum* spp. hybrid) の不良環境適応性を改善する育種素材として有望視されている (RAMDOYAL and BADALOO, 2002)。その育種利用は1927年にジャワ島で開始されたとされており (SREENIVASAN et al., 1987)、近年では、中国やオーストラリアなどいくつかのサトウキビ育種の盛んな国で、サトウキビ高貴種 (*S. officinarum*) や経済品種とエリアン

サスとの属間雑種作出の取り組みが行われている (AITKEN et al., 2007; CAI et al., 2005; PIPERIDIS et al., 2000)。

我が国では、遺伝資源の重要性を認識した永富らによって国内の遺伝資源探査が実施され、サトウキビ野生種 (*S. spontaneum*) とともにエリアンサスが収集された (永富ら, 1984)。また、1990年代には九州沖縄農業研究センターと国際農林水産業研究センター (JIRCAS) が共同で、インドネシアからエリアンサスを導入した。九州沖縄農業研究センターとJIRCASでは、これらのエリアンサスを用いてサトウキビ経済品種との属間交雑を試み、交雑の成否が未判定の後代集団 (以後、単に後代集団と呼ぶ) の養成に成功した。

サトウキビとエリアンサスとの属間交雑では、母

九州沖縄農業研究センター作物開発・利用研究領域 (種子島試験地) : 891-3102 鹿児島県西之表市安納1742-1

1) 現, 国際農林水産業研究センター熱帯・島嶼研究拠点

2) 現, アサヒビール株式会社豊かさ創造研究所

3) トヨタ自動車株式会社FP部バイオ・ラボ

4) 現, 九州沖縄農業研究センター広報普及室

5) 現, 中央農業総合研究センター

本とするサトウキビの自殖が生じやすいことが問題として挙げられている (NAIR et al., 2006)。そのため、後代集団の養成後は、真の属間雑種となっている系統を識別する必要がある。初期の属間雑種の開発では、主として形態的特徴に基づいて雑種となっている可能性がある系統を選抜し、詳細な雑種判定は、実際に染色体を観察することで実施していた (SREENIVASAN et al., 1987)。

近年では、遺伝解析技術の発展によりDNAマーカーに基づく雑種判定が可能となり、その利用が進んでいる。サトウキビとエリアンサスの属間雑種については、AFLPマーカー (AITKEN et al., 2007) やRAPDマーカー (NAIR et al., 2006)、SSRマーカー (CAI et al., 2005)、genomic slot blot hybridization (BESSE et al., 1997a) 等を利用した手法が報告されているが、現在では5S rDNAマーカー (D'HONT et al., 1995) を利用した手法が最も一般的に利用されている (CAI et al., 2005; HARVEY et al., 1998)。この5S rDNAマーカーは、5S rRNAの配列が種によって保存性が高く、PCRによってエリアンサス属とサトウキビ属とで異なる位置に特異的なバンドが検出されることを利用したものである。

我が国では、FUKUHARA et al. (2012) が5S rDNAマーカーを用いてサトウキビ経済品種とエリアンサスとの属間交雑後代集団を対象に雑種判定を実施し、5個体を属間雑種として同定している。

ところで、属間交雑では、その過程で片親の染色体の大部分が脱落する事例が報告されている。例えば、エンバク (*Avena sativa* L., $2n=42$) とトウモロコシ (*Zea mays* L., $2n=20$) の属間交雑では、エンバク由来染色体の半数を有するが、トウモロコシ由来染色体の大部分が脱落した属間雑種 ($2n=21+1\sim 4$) が作出されている (RIERA-LIZARAZU et al., 1996)。サトウキビとエリアンサスとの属間交雑においても、PIPERIDIS et al. (2000) やWANG et al. (2009) は、導入されたエリアンサス由来染色体が部分的に脱落する事を認めている。

これまで我が国で実施した属間交雑の取り組みの過程では、5S rDNAマーカーが検出されずに属間雑種ではないと判定された後代個体も多く得られてきた (FUKUHARA et al., 2012)。これらの個体の中には、母本のサトウキビ経済品種に比較して生育が

極めて旺盛な、エリアンサスに類似した特性を示すものも存在する。

属間交雑の過程において染色体の脱落が生じる可能性を考慮すると、これまで我々が行ってきた属間交雑の取り組みにおいて雑種ではないと判定された後代個体についても、エリアンサス由来染色体の脱落の程度が著しく、5S rDNAマーカーにより検出される領域を含む染色体が脱落し、一部の染色体のみが残存した個体が存在する可能性が考えられる。

一部の染色体のみが導入されている雑種個体を同定するには、多くの染色体に存在する分子マーカーを利用することが有効である (HARVEY et al., 1998)。5S rDNAは染色体の基本数あたり1箇所に縦列反復領域を形成しており、細胞内では複数の染色体上で確認可能な遺伝子であるが、特定の染色体に局在するために検出対象となる染色体は限定される。他方、植物のゲノム中には異なる種類の反復配列が多数散在しており、とくに染色体のセントロメア近傍や末端部分に存在する縦列反復配列はサテライトDNAとして知られている。ALIX et al. (1998) は、エリアンサス属のほぼ全ての染色体末端領域に共通して存在するサテライトDNA (EaCIR1) を単離するとともに、これを特異的に増幅するプライマーセットを報告した。従って、エリアンサス由来染色体の一部が導入されている属間雑種が存在する場合、その検出にEaCIR1をマーカーとして利用することが可能であると考えられる。

本研究では、染色体の部分的導入の可能性も想定して、より高い精度でサトウキビとエリアンサスとの属間雑種をスクリーニングする方法を確立することを目的とした。具体的には、サテライトDNA (EaCIR1) のマーカーとしての利用可能性を、マーカー検出個体の形態や生育特性、DNA量、および28種のエリアンサス特異的マーカーを用いた遺伝子型解析の結果に基づいて検証した。加えて、多数の属間交雑後代個体を対象とした遺伝子型解析により、エリアンサス染色体の部分的導入の可能性について検討した。また、これらの結果を踏まえて、サトウキビとエリアンサスとの属間雑種作出および雑種判定の効率化に向けた改善策について考察した。

本研究の実施にあたり、JIRCAS熱帯・島嶼研究

拠点の杉本明博士および沖縄県農業研究センター作物班の伊禮信氏には、属間交雑の遂行において多大な御協力と貴重な御助言を賜った。九州沖縄農業研究センター業務第3科の平原徳明氏、久保光正氏、追立祐治氏、羽生道明氏、松岡伸之氏、松崎直哉氏、杉松力氏、矢野節雄氏ならびに種子島試験地の非常勤職員の方々には多大な御協力を頂いた。また、JIRCAS熱帯・島嶼研究拠点技術支援室の大和浩二氏、識名安輝氏ならびに非常勤職員の方々にも大きな御支援を賜った。ここに記して関係諸氏への謝意を表す。

II. 材料と方法

1. サテライトDNAマーカーを用いた雑種判定

1) 供試する後代集団の養成

沖縄県石垣市のJIRCAS熱帯・島嶼研究拠点において、2001年から2004年にかけて、サトウキビ経済品種を母本、インドネシア由来エリアンサス (*E. arundinaceus*) を父本とする属間交雑を実施し、Ni9 (サトウキビ経済品種) × IJ76-349 (エリアンサス), NiF8 (サトウキビ経済品種) × IJ76-349, およびNiF8 × IK76-126 (エリアンサス) の各組み合わせから、計494個体の後代集団を養成した。なお、これらの後代集団には、前報 (FUKUHARA et al., 2012) においてエリアンサスに特異的な5S rDNAマーカーが検出された5個体が含まれている。

2) サテライトDNA (EaCIR1) マーカーの検出

各個体の新鮮葉からDNAを抽出し、エリアンサス属の染色体末端領域に存在する371bpのサテライトDNA (EaCIR 1; ALIX et al., 1998) を増幅するプライマー (AGRP 52 = 5'-AGG-AAG-TTA-TGG-TGG-AGT-AT-3', AGRP 53 = 5'-CGC-CAT-TCC-TAT-TGC-3') を用いてPCRを行った。本報では、以後、同プライマーを用いたPCR後に検出されるエリアンサス特異的なバンドをEaCIR1マーカーと呼ぶこととする。

PCR反応液 (25 μ l) は以下の通り調整した。すなわち、テンプレートDNA 30 ng, 各プライマー 0.4 μ M, Taq DNA polymerase (PROMEGA社) 0.025U, MgCl₂ 2.5mM, dNTPs 各0.2 mMおよび酵素に付属の1x PCRバッファーとした。PCR反応は

TC-312 Thermal cycler (TECHNE社) を用いて行い、94°C 4分間の初期反応の後、94°C 30秒, 55°C 30秒, 72°C 45秒を35サイクル、最後に72°Cで4分間反応させた。PCR産物は2%アガロースゲルで電気泳動を行い、EtBr染色後にEaCIR1マーカーの有無を確認した。

3) 圃場における形態・生育特性の調査

EaCIR1マーカーのみが検出された70個体のうち、NiF8 × IJ76-349後代から54個体を選定し、九州沖縄農業研究センター種子島試験地の試験圃場 (表層多腐植質黒色火山灰土) で栽培を行い、生育特性を評価した。栽培方法は種子島試験地のサトウキビ標準耕種法に準じ、地上部形質 (茎数, 茎径, 茎長) および品質 (蔗汁Brix, 繊維分等) を調査した。

4) フローサイトメーターによるDNA量測定

EaCIR1マーカーが検出された76個体 (5S rDNAマーカー検出個体を含む) のうち、NiF8 × IJ76-349後代3個体およびNiF8 × IK76-126後代19個体を選定し、フローサイトメーターによる2C DNA量の測定に供試した。まず、各個体から新鮮葉を採取して細断した。細断時には、DNA量が既知のイネ (日本晴, DNA量を2C = 0.9pgとした) の葉身を内部標準物質として一定量加えた。細断後は、Cystain PI植物DNA絶対量測定キット (PARTEC社) を用いて核抽出およびPI (Propidium Iodide) 染色を行い、フローサイトメーター (PA-II, PARTEC社) によりPI蛍光量のピークを測定した。2C DNA量の算出には以下の式を用いた; 2C DNA量 (pg cell⁻¹) = サンプル葉のピーク平均値 × 内部標準物質のDNA量 / 内部標準物質のピーク平均値。

2. エリアンサス属に特異的なその他のDNAマーカーによる検証

FUKUHARA et al. (2012) により5S rDNAマーカーが検出されるとともに、本研究でEaCIR1マーカーが検出された1個体 (Ni9 × IJ76-349後代) と、EaCIR1マーカーのみが検出された8個体 (NiF8 × IJ76-349後代), いずれのDNAマーカーも未検出だが生育が旺盛な3個体 (NiF8 × IJ76-349後代) を対象として、複数のプライマーセットを用いたマーカー解析を行い、EaCIR1マーカーによる雑種判定の結果を検証した。また、このマーカー解析では、

2005年に同様の属間交雑により養成した、雑種判定実供試のNiF8×IJ76-349後代268個体も解析対象に追加した。

検証に用いたプライマーセットは、エリアンサスゲノムDNA配列に由来するプライマー28点、サトウキビ属に特異的なサテライトDNA (SoCIR1) を検出可能なプライマー (ALIX et al., 1998) 1点の、合計29点とした。エリアンサスゲノムDNA配列に由来するプライマーは、本研究で父本としたインドネシア由来エリアンサスIJ76-349および国内 (静岡県) で収集されたエリアンサスJW630のゲノムDNA配列を解析し、その配列情報に基づいて我々が別途開発したものであり、NiF8, Ni9等のサトウキビ経済品種やサトウキビ野生種を用いた予備的なマーカー解析により、エリアンサスに特異的であることを確認している (特願2009-119142)。

PCR反応液 (20 μ l) は、いずれのプライマーを用いた場合にも以下通り調整した。すなわち、テンプレートDNA 25-40 ng, 各プライマー0.25 μ M, TaKaRa Taq DNA polymerase (TaKaRa社) 0.05 U, MgCl₂ 1.5mM, dNTPs 0.2mMおよび酵素に付属の10x PCRバッファーとした。PCR反応はTC-312 Thermal cycler (TECHNE社) を用いて、以下のサイクルで実施した。すなわち、95°C 2分間の初期反応の後、95°C 30秒, 56°C 30秒, 72°C 90秒を30サイクル行い、最後に72°Cで2分間反応させた。PCR産物については、それぞれ、電気泳動および

EtBr染色後にバンドの有無を確認した。

Ⅲ. 結果と考察

本研究では、サトウキビとエリアンサスとの属間雑種判定の精度向上に向けて、まず、雑種判定手法としてのEaCIR1マーカーに着目し、その利用可能性について検討した。

サトウキビ経済品種 (NiF8, Ni9) とエリアンサス (IJ76-349, IK76-126) におけるEaCIR1マーカーの検出状況を調査した。その結果、NiF8とNi9ではEaCIR1マーカーが検出されなかったのに対し、IJ76-349およびIK76-126では検出された (第1表)。この結果は、EaCIR1マーカーが、5S rDNAマーカーと同様に、エリアンサスに特異的な塩基配列を識別する手法として有効である可能性を示唆しており、既報 (ALIX et al., 1998; HARVEY et al., 1998) の結果とも一致した。

次に、上記のサトウキビ経済品種 (母本) とエリアンサス (父本) との組み合わせから作出した後代集団494個体について、EaCIR1マーカーを用いた雑種判定を実施した。その結果、NiF8×IJ76-349後代では56個体、NiF8×IK76-126後代では19個体、Ni9×IJ76-349後代では1個体において、EaCIR1マーカーが検出された (第1表)。このことから、これらの後代76個体では、エリアンサス由来塩基配列が導入されている可能性が考えられた。

第1表 サトウキビ, エリアンサスおよびその交雑後代集団におけるEaCIR1マーカーの検出状況

品種・系統名	グループ	DNAマーカー検出結果		系統数
		EaCIR1	5S rDNA ^{a)}	
NiF8	<i>Saccharum</i> spp. hybrid	- ^{b)}	-	
Ni9	<i>Saccharum</i> spp. hybrid	-	-	
IJ76-349	<i>E. arundinaceus</i>	+	+	
IK76-126	<i>E. arundinaceus</i>	+	+	
NiF8×IJ76-349	グループA	+	+	2
	グループB	+	-	54
	その他	-	-	264
NiF8×IK76-126	グループA	+	+	3
	グループB	+	-	16
	その他	-	-	154
Ni9×IJ76-349	グループA	+	+	1

a) 一部にFUKUHARA et al. (2012) の結果を引用。

b) +と-は、それぞれDNAマーカーが検出されたこと、検出されなかったことを示す。

EaCIR1マーカーによる判定結果を、5S rDNAマーカーを用いたFUKUHARA et al. (2012) の判定結果と比較すると、5S rDNAマーカーによりエリアンサス特異的バンドが検出された個体の全てにおいてEaCIR1マーカーが検出された一方で、5S rDNAマーカーでエリアンサス特異的なバンドが検出されなかった個体でもEaCIR1マーカーが検出されるという相違点も認められた(第1表)。このことから、両方のDNAマーカーが検出された個体とEaCIR1マーカーのみが検出された個体との間で、エリアンサス染色体の導入状況に何らかの差異が生じている可能性が考えられた。以降では便宜的に、両方のDNAマーカーが検出された後代個体をグループA、EaCIR1マーカーのみが検出された後代個体をグループBと区別して考察する(第1表)。

グループAとBとの相違点を明確にするため、形態的特徴を調査・比較した。まず、グループAにおいてNi9×IJ76-349後代から唯一供試した1個体では、肥厚帯(葉身と葉鞘との間にある帯状の結節部)が消失するというエリアンサスに特有の形質が認められ(第2表)、属間雑種であることが強く示唆された。これに対し、同じグループAではあるが、本研究で供試したNiF8×IJ76-349後代およびNiF8×IK76-126後代では、全ての個体において肥厚帯の消失は確認されなかった(第2表)。5S rDNAマーカーの検出により属間雑種と判定されたグループA内においても、このように肥厚帯消失の有無に差異が認められたことから、肥厚帯の消失は属間雑種に認められる特徴ではあるが、属間雑種であっても肥厚帯が消失しない場合があることが明ら

かとなった。

一方、グループBでは70個体を調査したが、肥厚帯が消失した個体は認められず(第2表)、属間雑種であることを明確に示す結果は得られなかった。ただし、グループA内でも肥厚帯消失の有無に差異が認められたことから、グループBが属間雑種である可能性は否定できなかった。

次に、圃場における生育の様相を観察した。まず、グループAのNi9×IJ76-349後代1個体については、前報(FUKUHARA et al., 2012)において、生育の弱勢化が認められたことを報告している。同じく、本研究において供試したグループAのNiF8×IJ76-349後代およびNiF8×IK76-126後代でも生育の弱勢化が観察されたが、Ni9×IJ76-349後代個体に比べて弱勢化の程度が著しく、供試した5個体全てが生育途中で枯死し、生育評価の実施および栄養体繁殖が困難であった。これに対して、グループBでは圃場条件下において著しい生育不良を示す個体は認められなかった。

遠縁の植物を用いた交雑では、交雑不和合が生じ、得られた雑種当代の生育が両親に比較して弱勢化する場合がある(BURKE and ARNOLD, 2001)。海外におけるサトウキビとエリアンサスとの属間交雑でも、得られた属間雑種が弱勢となり、生育途中で枯死する割合が多いことが報告されている(PIPERIDIS et al., 2000)。本研究でグループAにおいて認められた弱勢化は、これに該当すると考えられた。一方で、グループBはいずれの個体も通常の生育を示し、弱勢化という観点からは、グループAとグループBとの間で明確な差異があることが明ら

第2表 サトウキビ、エリアンサスおよびその交雑後代集団における肥厚帯の有無

品種・系統名	グループ	系統数	肥厚帯
NiF8	<i>Saccharum</i> spp. hybrid		有
Ni9	<i>Saccharum</i> spp. hybrid		有
IJ76-349	<i>E. arundinaceus</i>		無
IK76-126	<i>E. arundinaceus</i>		無
NiF8×IJ76-349	グループA	2	有
	グループB	54	有
	その他	264	有
NiF8×IK76-126	グループA	3	有
	グループB	16	有
	その他	154	有
Ni9×IJ76-349	グループA	1	無

かとなった。

次に、圃場での生育特性を調査した。グループAのうち、NiF8×IJ76-349後代およびNiF8×IK76-126後代については、前述した顕著な生育の弱勢化により、生育特性の評価自体が困難であった。Ni9×IJ76-349後代1個体については、前報 (FUKUHARA et al., 2012) において報告している。すなわち、同個体は生育が両親に比べて劣るが、品質的な特性である蔗汁Brixや繊維分は、両親の中間的な値を示した (FUKUHARA et al., 2012)。

グループBについては、本研究において、最も多くの後代個体が得られているNiF8×IJ76-349の組み合わせから54個体を選定して調査に供試した。その結果、茎数は母本のNiF8に近い値を示した個体が多かった一方で、一部にNiF8の茎数を大きく上回り、エリアンサスと同程度となる個体も認められた (第1図)。茎径も同様に、全体としてNiF8に近い頻度分布を示したが、茎径がエリアンサス以下となる個体も複数認められた (第1図)。茎長は、NiF8を中心とする頻度分布が認められた (第1図)。NiF8, IJ76-349の特性値およびグループBの集団平均は、それぞれ、茎数では14.0, 36.1および18.3本plot⁻¹、茎径では24.8, 19.8および22.1mm、および茎長では209, 223および205cmであった。

蔗汁Brixは、母本のNiF8に近い頻度分布を示し、エリアンサスと同程度の個体は無かった。NiF8, IJ76-349の特性値およびグループBの集団平均は、それぞれ、18.2, 8.2および17.1%であった。繊維分についても母本の値に近い頻度分布を示したが、母本に比較して2倍程度高い値を示す系統も一部に認められた (第1図)。NiF8, IJ76-349の特性値およびグループBの集団平均は、それぞれ、11.6, 24.2および13.2%であった。

前述のように、サトウキビとエリアンサスとの属間交雑では、母本のサトウキビの自殖が問題となる。雑駁な遺伝的背景を有するサトウキビ経済品種では、自殖により得られた後代集団においても各種形質の特性値に比較的大きな変異がみられる。例えば、過去に報告されている自殖後代集団におけるBrixの変異幅 (HEMAPRABHA et al., 2003) は、本研究のグループBにおける変異幅に比べて小さいとは言えない。同様に、茎数や茎径等においても、グループBにはエリアンサスに近い特性を有する個体

が含まれるが (第1図)、それらが母本の自殖による変異を超えて生じたものかについては判断が困難であった。

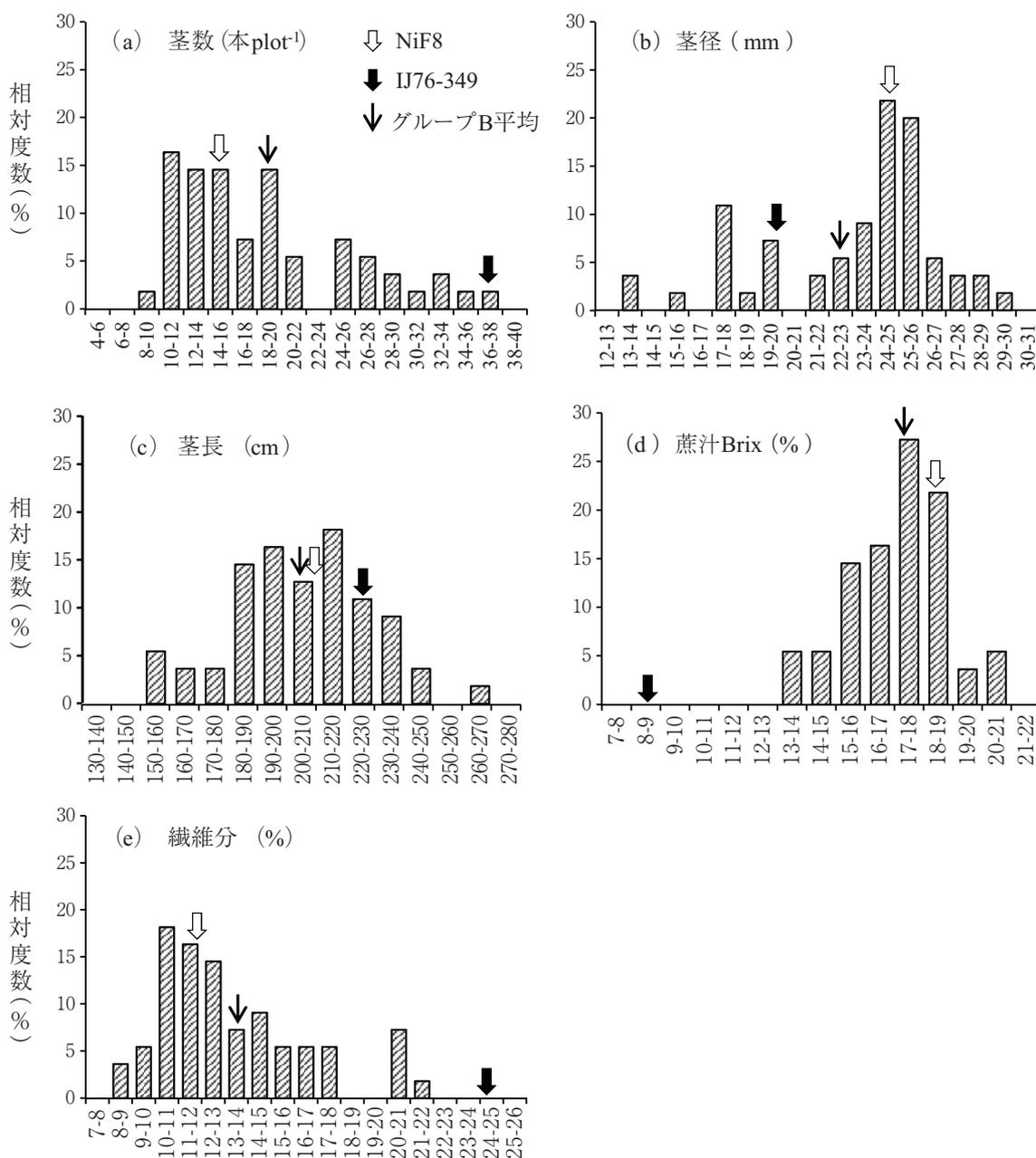
一方で、サトウキビ経済品種の自殖後代集団では、通常の交配あるいは多夫交配により得られる後代集団に比較して、一般に、茎数や茎長、茎径などの集団平均値が低下する傾向がある (e.g. FERREIRA et al., 2005; WU et al., 1980)。本研究では、グループBの茎径の集団平均値はNiF8に比べて低下したが、茎長の集団平均値はNiF8と同程度であり、茎数では集団平均値がNiF8の値を上回った (第1図)。こうした点において、グループBは、通常の自殖後代集団とは異なる特徴を有している可能性が示唆された。

以上の形態的特徴および圃場での生育状況、生育特性に基づく、5S rDNAマーカーが検出されたグループAでは、全体として弱勢化が認められ、肥厚帯の消失および両親の中間的な蔗汁Brixや繊維分を示す個体が確認されるなど、属間雑種であることを示唆する特徴が認められた。これに対して、グループBでは弱勢化は認められず、母本のNiF8に類似した特性を示す個体が多いなど、属間雑種であることを明確に示唆する結果は得られなかった一方で、各種形質の集団平均値の傾向から、グループBが自殖後代集団ではなく、何らかの父本との交雑により得られた集団であることが示唆された。

このことは、EaCIR1マーカーの検出により示唆された、グループBに母本以外の染色体が導入された可能性を改めて支持する結果であった。母本のNiF8に類似した特性を示す個体が多く認められたことを考慮すると、グループBでは、エリアンサスの一部の染色体が導入されているものの、表現型にエリアンサス由来の特性が現れる度合いは不均一であった可能性が考えられた。

この結果を受けて、グループBにおいて、エリアンサス由来染色体が部分的に挿入された場合を想定し、DNA量の観点から母本、父本およびグループAとの比較を行った。

フローサイトメーターを用いて測定した2C DNA量をみると、サトウキビ経済品種 (2n = 110 - 130, ALIX et al., 1998) は11.8および11.2pg、エリアンサス (*E. arundinaceus*, 2n = 30, 40, 60, BESSE and MCINTYRE, 1999) は7.9および7.7pgの



第1図 グループB (NiF8×IJ76-349後代) における茎数、茎径、茎長、蔗汁Brixおよび繊維分の変異 (n=54)

図中の白と黒の太矢印および黒の細矢印は、それぞれNiF8 (母本; サトウキビ経済品種), IJ76-349 (父本; エリアンサス) の特性値およびグループBの集団平均値を示す。

値を示した (第3表)。グループAでは、NiF8×IK76-126後代とNi9×IJ76-349後代が7.5~9.5pgとエリアンサスと同程度もしくは両親の中間的な値を示した。

サトウキビでは、種間雑種が形成される際に母本の染色体が半減しない、いわゆる非還元受精が生じる場合があることが知られている (BREMER,

1961; SREENIVASAN et al., 1987)。この場合は、母本の染色体数が倍加するため後代系統の染色体数は $2n+n$ (母本由来+父本由来) となり、結果として、母本と比較して父本の n 相当分のDNA量が増加することになる。本研究では、グループAのDNA量は母本と父本の中間的な値であったことから、上記のような母本の非還元受精は生じておら

ず、 $n+n$ 型の受精が起こっていたことが示唆された(第3表)。また、NiF8×IK76-126後代の1系統では、両親の中間値よりもDNA量が少なく(2C DNA量=7.5pg)、エリアンサスのDNA量に近かったことから、両親または片親に由来する染色体が部分的に脱落していることが示唆された(第3表)。なお、グループAのNiF8×IJ76-349後代から供試した1系統では、8.0pgと12.5pgの2つのDNA量のピークが検出されたことから、染色体数が異なる細胞を有するmixoploid(混数体)である可能性が考えられた。

一方、グループBにおいて、NiF8×IJ76-349後代では11.2~11.4pg、NiF8×IK76-126後代では10.7~12.0pgと、母本であるサトウキビ経済品種NiF8とほぼ同じかやや少ないDNA量を示した(第3表)。この結果から、まず、グループBでは、母本と父本から染色体を半数ずつ受け継ぐ $n+n$ 型の受精は起こっていないことが推察された。また、前述のように、非還元受精が生じている場合には後代系統の染色体数は $2n+n$ となるが、グループBのDNA量はこれにも該当しなかった。自殖により、母本とほぼ同じDNA量になった可能性は、EaCIR1マーカー検出結果および生育特性評価結果から低いと考えられる。すなわち、DNA量の調査結果に基づけば、グループBは、母本と同程度のDNA量を有する父本(他のサトウキビ品種・系統等)との交雑による集団である可能性が第一に考えられた。

一方で、最近、高貴種を母本、エリアンサスを父本とする属間雑種系統を経済品種に戻し交雑した場合に、非還元受精と染色体の脱落の両方が生じる事例が報告されている(PiPERIDIS et al., 2010)。エンバク($2n=42$)とトウモロコシ($2n=20$)の属間交雑において、後代へのトウモロコシ由来染色体の導入が極めて限定的(1~4本)であった事例も考慮すると(RIERA-LIZARAZU et al., 1996)、本研究で作出したグループBがエリアンサスとの属間雑種となっている場合、非還元受精とエリアンサス染色体の顕著な脱落との両方が生じ、結果的に、エリアンサス由来染色体の一部が残存した状態で母本に近いDNA量になった可能性も否定できない。

エリアンサス染色体の部分的な導入の有無を検証する方法の一つとして、エリアンサス染色体のそれぞれを検出できるような、より多数のDNAマーカーによる判定が有効であると考えられる。そこで、エリアンサスゲノムDNAの塩基配列に由来する28種のプライマーを用いたマーカー解析を実施した。解析には、NiF8, Ni9, J76-349, および、グループAの1個体とグループBの8個体を含む交雑後代集団(280個体)を用いた。

まず、両親について、エリアンサス由来プライマーを用いたマーカー解析を行った。その結果、母本のNiF8とNi9では、28種のプライマーのいずれにおいてもバンドは検出されなかった(第2図に解析結果の一例を示す。以降も同様)。これに対し、

第3表 サトウキビ, エリアンサスおよびその交雑後代集団におけるDNA量

品種・系統名	グループ	2C DNA量 (pg)
NiF8	<i>Saccharum</i> spp. hybrid	11.8
Ni9	<i>Saccharum</i> spp. hybrid	11.2
IJ76-349	<i>E. arundinaceus</i>	7.9
IK76-126	<i>E. arundinaceus</i>	7.7
NiF8×IJ76-349	グループA	8.0, 12.5 ^{a)}
	グループB	11.2
	グループB	11.4
NiF8×IK76-126	グループA	7.5
	グループA	9.4
	グループA	9.5
	グループB (16系統)	10.7~12.0
Ni9×IJ76-349	グループA	9.1

a) 2つのピークが検出されたことによる。

父本のIJ76-349では、28種全てのプライマーでバンドが検出された（第2図）。なお、1種のサトウキビ属特異的プライマーを用いた場合にはNiF8とNi9のいずれにおいてもバンドが検出されたのに対し、IJ76-349ではバンドは検出されなかった（データ省略）。

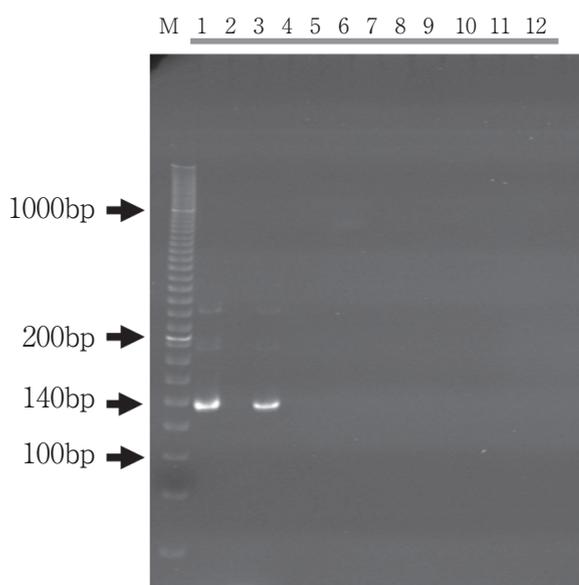
これらのことから、本検証に用いた28種のエリアンサス由来プライマーが、いずれもエリアンサス特異的な塩基配列を増幅していることが示唆された。

一方、属間交雑後代と判定されているグループAの1個体では、全てのエリアンサス由来プライマーにより特異的なバンドが検出され、エリアンサス由来ゲノムが導入されていることが明白であった（第2図）。これに対し、グループBの8個体では、いずれのエリアンサス由来プライマーを用いた場合にも特異的なバンドは検出されず、エリアンサスゲノムの存在を示す結果は得られなかった（第2図）。また、その他の271個体においても、エリアンサス由来プライマーにより特異的なバンドが検出された個体は存在しなかった（データ省略）。

エリアンサス属植物の染色体の基本数は $x=10$ である（BESSE and MCINTYRE, 1999; BESSE et al., 1997b）。エリアンサス (*E. arundinaceus*) は3-

6倍体であり、ゲノムDNA内に重複する部分が多く認められる点を考慮すると、エリアンサスに特異的な配列を検出可能なプライマーを28種用いた本解析においては、エリアンサス染色体の大半をカバーできていると考えられる。しかし、グループBから供試した8個体の全てにおいて、エリアンサス特異的なバンドは全く検出されなかった。このことは、プライマー数が不十分なために、導入された一部の染色体を検出できていないと考えるよりも、グループBにはエリアンサス由来染色体が導入されていない可能性があるとして解釈するのが妥当であると考えられた。

加えて、本研究では、グループA、Bを含む属間交雑後代280個体をマーカー解析に供試したが、一部のエリアンサス由来プライマーでのみバンドが検出されるような、エリアンサス染色体の部分的導入を示す結果が得られた個体はなかった。一方で、属間雑種（グループA）である場合には、全てのプライマーでバンドが検出された。このことから、当初、想定していたような、5S rDNAを含む染色体が脱落したことにより雑種が非雑種と誤判定される可能性は低いか、少なくとも、属間雑種作出の過程において問題になる頻度で生じる現象ではないこと



第2図 エリアンサスゲノムDNA由来プライマーを用いたマーカー解析の例

M：分子量マーカー，1：IJ76-349，2：NiF8，3：グループA（Ni9×IJ76-349後代），4～11：グループB（NiF8×IJ76-349後代），12：Ni9。

が示唆された。

以上のマーカー解析の結果、および、5S rDNAマーカーとEaCIR1マーカーによる雑種判定の結果を総合すると、グループBがエリアンサスとの属間雑種である可能性を示唆したのは、EaCIR1マーカーのみであった。形態や生育特性、DNA量から雑種性を多面的に検証した結果からも、グループBはNiF8の自殖後代集団ではないが、父本はエリアンサス以外である可能性が示唆されており、マーカー解析の結果に合致した。

このことは、EaCIR1マーカーが、両親以外に由来する、外来の不明花粉の塩基配列を検出した可能性を示唆している。DNA量の調査結果から、不明花粉をもたらした父本はNiF8やNi9と同程度のDNA量を有することが示唆された。このため、NiF8、Ni9以外のサトウキビ経済品種等がグループBの父本となっていた可能性が考えられる。

サトウキビ経済品種は、その育成過程においてソルガムやススキ類をはじめとする多様な育種素材が利用されており、極めて雑駁な遺伝的背景を有する (TEW, 1987)。国内におけるサトウキビの交配では、多様な系譜を持つ国内外の経済品種に加え、国内で育成した、サトウキビ野生種やススキ・ソルガム等との種属間交雑系統も多く利用している。これらのうち、EaCIR1マーカーに反応する塩基配列を有するいずれかの (エリアンサス以外の) 個体が父本となり、本研究の属間交雑の過程で偶発的に自然交雑を起こしていた可能性は否定できない。これまでの取り組みでは、NiF8×IJ76-349後代やNiF8×IK76-126後代からもグループAに分類される真の属間雑種が得られており、エリアンサスとの属間交雑自体に成功していることは明らかであるが、属間交雑の成功率を向上させるため、交雑時の環境整備を一層、厳格化する必要がある。

同時に、このことは、既往の報告 (PIPERIDIS et al., 2010; D'HONT, 2005) でエリアンサス由来塩基配列の検出に利用されているEaCIR1マーカーが、必ずしもエリアンサス属だけに特異的ではない可能性を示唆する結果であった。

雑種判定におけるDNAマーカーの精度は重要であり、その後の長期にわたる育種素材開発に重大な影響を及ぼす要因である。従来利用されている5S rDNAマーカーについては、本研究でも誤判定

と考えられる事例は認められなかった。一方で、EaCIR1マーカーについては、雑種である個体を非雑種と判定する事例は認められなかったが、グループBのような、エリアンサスゲノムを含まないと考えられる個体についても雑種と誤判定する結果となった。EaCIR1マーカーは、既往の報告では、5S rDNAマーカーによる雑種判定後の検証 (HARVEY et al., 1998) あるいは他のマーカーとの併用 (PIPERIDIS et al., 2010) で利用されている場合が多く、多個体を対象にEaCIR1マーカーを単独で使用した際の検出精度についてはほとんど検討されていない。本研究の結果からは、5S rDNAマーカーの高い信頼性が裏付けられたが、EaCIR1マーカーについては、単独でエリアンサス染色体の検出に利用することは適切ではないことが示唆された。

本研究を含め、これまでの国内における属間雑種作出の取り組みでは、NiF8×IJ76-349を重点組み合わせとして、2007年までに600以上の後代個体を養成してきた。しかし、本研究によりEaCIR1マーカーの不確実性が明らかになった結果、確実な属間雑種は、前報 (FUKUHARA et al., 2012) で5S rDNAマーカーを確認した数個体のみとなった。すなわち、NiF8×IJ76-349後代における雑種獲得確率は1%に満たないことが判明し、しかも、雑種個体はいずれも圃場での維持が困難であった。

これに対し、Ni9×IJ76-349の組み合わせでは、得られた後代が1個体のみであったにも関わらず5S rDNAマーカーが検出され、弱勢化は認められるものの圃場での維持が可能であった。

このことは、サトウキビとエリアンサスの属間交雑における交雑親系統の選択が重要であることを示唆している。我々はこれまで、高糖多収で耐病性にも優れるNiF8を母本として重点利用してきた。しかし、サトウキビとエリアンサスとの交雑では母本と父本の組み合わせによって雑種獲得の割合が変化する可能性も示されていることから (PIPERIDIS et al., 2000)、今後は由来の異なる多様なサトウキビ品種系統の母本適性を検証していく必要があると考えられる。同時に、エリアンサスについても、属間交雑後代に弱勢化が生じにくい父本を探索し、母本と父本の両方から、組み合わせの多様化を図ることが重要であると考えられる。

一方で、選抜に関しては、本研究の結果から、生

育初期に肥厚帯の有無を中心とした形態的特徴に基づく選抜を行い、肥厚帯消失が認められない系統については5S rDNAマーカーを軸とするDNAマーカー選抜を実施することが有効であると考えられた。本研究を通じて、エリアンサス染色体の部分的導入は、少なくとも事実上問題となる頻度では起こらないと判断されたことから、DNAマーカー選抜には、本研究で用いたエリアンサスゲノムDNA配列に基づくプライマー群も利用可能であると考えられる（第4表）。

以上、本研究では、サトウキビとエリアンサスとの雑種判定におけるEaCIR1マーカーの不確実性を示すとともに、多数の後代系統を対象としたマーカー解析の結果から、属間交雑においてエリアンサス染色体の部分的導入が生じる可能性が低いことを示唆した。今後の属間雑種作出の取り組みにおいては、交配組み合わせを多様にするとともに、形態的特徴に基づく初期選抜や、信頼性の高い5S rDNAマーカーあるいは本研究で提示したエリアンサス由来プライマー群を利用した雑種判定を早期に実施することで、雑種の獲得効率が改善されることが考えられる。

IV. 摘 要

1. サトウキビ経済品種とエリアンサスとの属間交雑において、属間交雑後代にエリアンサス染色体の一部のみが導入された個体が存在する可能性がある。そこで、既往の報告で、エリアンサス染色体に広汎に存在するサテライトDNAを検出可能とされているEaCIR1マーカーに着目し、雑種判定における利用可能性を、5S rDNAマーカーとの比較を通じて検証した。
2. 属間交雑後代には、5S rDNAマーカーとEaCIR1マーカーの両方が検出される個体（グ

ループA）とEaCIR1マーカーのみが検出される個体（グループB）が認められた。

3. グループAでは肥厚帯消失や生育の弱勢化、両親の中間的なDNA量など、属間雑種であることを示唆する特徴が認められた。グループBは、集団としては自殖後代とは異なる生育特性が認められたが、肥厚帯消失や生育の弱勢化は認められず、DNA量はサトウキビに近かった。
4. 28種のエリアンサス由来プライマーを用いたマーカー解析の結果、グループBではエリアンサス由来染色体の存在を示す結果は得られなかった。また、雑種判定未実施の多数の後代個体を対象とした解析結果から、エリアンサス染色体の部分的導入が生じる可能性は低いと考えられた。
5. 以上から、EaCIR1マーカーが必ずしもエリアンサス属だけに特異的でなく、雑種判定において不確実性を有することを示唆した。

引用文献

- 1) AITKEN, K., LI, J., WANG, L., QING, C., FAN, Y.H. and JACKSON, P. (2007) Characterization of intergeneric hybrids of *Erianthus rockii* and *Saccharum* using molecular markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.* **54** : 1395-1405.
- 2) ALIX, K., BAURENS, F.C., PAULET, F., GLASZMANN, J.C. and D'HONT, A. (1998) Isolation and characterization of a satellite DNA family in the *Saccharum* complex. *Genome* **41** : 854-864.
- 3) BESSE, P. and MCINTYRE C.L.(1999) Chromosome in situ hybridization of ribosomal DNA in *Erianthus* sect. *Ripidium* species with varying chromosome numbers confirms $x=10$ in *Erianthus* sect. *Ripidium*. *Genome* **42** : 270-273.
- 4) BESSE, P., MCINTYRE, C.L., BURNER, D.M. and de

第4表 サトウキビとエリアンサスとの属間雑種の検出に利用可能なプライマー配列の例

No.	F	R
P-1	GAGACTCCACGAGCGAAA	TATTATAACCAGCCACCGCC
P-2	CGTATTAATATATTTCCCTTCTTGCC	TCCATGGATCAGAAGTCTATTATTT
P-3	AAACCGAGGTCCGAGGTA	AATTAGACGCCTTGCTCGGA
P-4	GGATACAACAACAACAATAGCC	CTTGTGTGCTAATTTCTTTGCC
P-5	CTTGAGTTTTCGGCGAGTTTG	TTTCTAGCGGACTGATGA
P-6	CTAGCTTCACTAACTTCCAGTTCA	GACTTTAATGCACCCAGCA

- ALMEIDA, C.G. (1997a) Using genomic slot blot hybridization to assess intergeneric *Saccharum* x *Erianthus* hybrids (Andropogoneae – Saccharinae). *Genome* **40** : 428-432.
- 5) BESSE, P., MCINTYRE, C.L. and BERDING, N. (1997b) Characterisation of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (Andropogoneae-Saccharinae) using RFLP markers. *Euphytica* **93** : 283-292.
- 6) BREMER, G. (1961) Problems in breeding and cytology of sugar cane. *Euphytica* **10** : 59-78.
- 7) BURKE, J.M. and ARNOLD, M.L. (2001) Genetics and the fitness of hybrids. *Annu. Rev. Genet.* **35** : 31-52.
- 8) CAI, Q., AITKEN, K., DENG, H.H., CHEN, X.W., FU, C., JACKSON, P.A. and MCINTYRE, C.L. (2005) Verification of the introgression of *Erianthus arundinaceus* germplasm into sugarcane using molecular markers. *Plant Breed.* **124** : 322-328.
- 9) D'HONT, A., RAO, P.S., FELDMANN, P., GRIVET, L., ISLAM-FARIDI, N., TAYLOR, P. and GLASZMANN, J.C. (1995) Identification and characterization of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* **91** : 320-326.
- 10) D'HONT, A. (2005) Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenet. Genome Res.* **109** : 27-33.
- 11) FERREIRA, F.M., BARBOSA, M.H.P., de CASTRO, R.D., PETERNELLI, L.A. and CRUZ, C.D. (2005) Effects of inbreeding on the selection of sugar cane clones. *Crop Breed. Appl. Biotech.* **5** : 174-182.
- 12) FUKUHARA, S., TERAJIMA, Y., IREI, S., SAKAIGAICHI, T., UJIHARA, K., SUGIMOTO, A. and MATSUOKA, M.I. (2012) Identification and characterization of intergeneric hybrid of commercial sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) and *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jeswiet. *Euphytica* (DOI) 10.1007/s10681-012-0748-3.
- 13) HARVEY, M., D'HONT, A., ALIX, K. and HUCKETT, B.I. (1998) Use of PCR-based markers for identification of *Erianthus* Genetic material in putative intergeneric hybrids (*Saccharum* x *Erianthus*). *Proc. S. Afr. Sug. Technol. Ass.* **72** : 318-320.
- 14) HEMAPRABHA, G., NATARAJAN, U.S. and BALASUNDARAM, N. (2003) Breeding behavior for juice quality through selfing and progeny evaluation in hybrid clones and inbred derivatives of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Sugar Tech* **5** : 177-180.
- 15) 永富成紀・大城良計・仲宗根盛徳 (1984) 南西諸島におけるサトウキビ遺伝質の探索；第1・2次調査. *沖縄農試報告* **9** : 1-27.
- 16) NAIR, N.V., SELVI, A., SREENIVASAN, T.V., PUSHPALATHA, K.N. and MARY, S. (2006) Characterization of intergeneric hybrids of *Saccharum* using molecular markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* **53** : 163-169.
- 17) PIPERIDIS, N., CHEN, J.W., DENG, H.H., WANG, L.P., JACKSON, P. and PIPERIDIS, G. (2010) GISH characterization of *Erianthus arundinaceus* chromosomes in three generations of sugarcane intergeneric hybrids. *Genome* **53** : 331-336.
- 18) PIPERIDIS, G., CHRISTOPHER, M.J., CARROLL, B.J., BERDING, N. and D'HONT, A. (2000) Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. *Genome* **43** : 1033-1037.
- 19) RAMDOYAL, K. and BADALOO, G.H. (2002) Prebreeding in sugar cane with an emphasis on the programme of the Mauritius Sugar Industry Research Institute. In: *Managing Plant Genetic Diversity*. (ENGELS, J.M.M., RAMANATHA, R.V., BROWN, A.H.D. and JACKSON, M.T. eds.) p.307-321. CAB International Publisher, Oxon, UK.
- 20) RIERA-LIZARAZU, O., RINES, H.W. and PHILLIPS, R.L. (1996) Cytological and molecular characterization of oat x maize partial hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **93** : 123-135.

- 21) SREENIVASAN, T.V., AHLLOWALIA, B.S. and HEINZ, D.J. (1987) Cytogenetics. In: Developments in Crop Science 11: Sugarcane Improvement through Breeding. (HEINZ, D.J. eds.) p.211-253. Elsevier Science Publishers, Netherlands.
- 22) TEW, T.L. (1987) New varieties. In: Developments in Crop Science 11: Sugarcane Improvement through Breeding. (HEINZ, D.J. eds.) p.559-594. Elsevier Science Publishers, Netherlands.
- 23) WANG, X.H., YANG, Q.H., LI, F.S., HE, L.L. and HE, S.C. (2009) Molecular identification of *Saccharum* spp. x *Erianthus fulvus* hybrids using sequence-characterized amplified region markers. *Crop Sci.* **49** : 864-870.
- 24) WU, K.K., HEINZ, D.J., MEYER, H.K. and LADD, S.L. (1980) Combining ability and parental evaluation in five selected clones of sugarcane (*Saccharum* sp. Hybrids). *Theor. Appl. Genet.* **56** : 241-244.

Identification of Intergeneric Hybrids between *Saccharum* spp. Hybrid and *Erianthus Arundinaceus* Using DNA Markers

Taiichiro Hattori, Yoshifumi Terajima¹⁾, Seiji Fukuhara²⁾, Tatsuro Kimura³⁾
Satoru Nishimura³⁾, Hiroyuki Enoki³⁾, Makoto Matsuoka⁴⁾, Takeo Sakaigaiichi
Shoko Ishikawa⁵⁾ and Takayoshi Terauchi

Summary

The sugarcane Breeding Unit in the National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region has been working on intergeneric hybridization between sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) and *Erianthus* (*Erianthus arundinaceus*) to develop innovative breeding materials. In the present study, we applied *Erianthus*-specific EaCIR1 and 5S rDNA markers to identify hybrids. EaCIR1 is a tandemly-repeated DNA sequence in the subtelomeric regions of most *Erianthus* chromosomes. Progenies produced by intergeneric crossing (sugarcane x *Erianthus*) were divided into three groups: group A had both EaCIR1 and 5S rDNA markers, group B had only the EaCIR1 marker, and the other group did not have either marker. Seedlings of group A exhibited poor growth and had intermediate DNA amounts between their parents. One of them lost dewlaps (joint part of leaf blade and sheath) as morphologically similar to *Erianthus*. These results indicated that group A was composed of intergeneric hybrids. Group B had dewlaps and growth characteristics similar to sugarcane instead of *Erianthus*. The amount of DNA in seedlings of group B was almost the same as that of their maternal sugarcane. Marker analyses with 28 *Erianthus*-specific primers revealed no *Erianthus*-specific band pattern in group B. These results did not present any evidence that *Erianthus* chromosomes were introduced into individuals of group B. Consequently, the EaCIR1 marker should not be *Erianthus*-specific. Additionally, we used marker analyses to investigate a large number of progenies produced by intergeneric crossing, and did not find any individuals that contained *Erianthus* chromosomes. This suggested that partial introduction of *Erianthus* chromosomes into progeny by intergeneric crossing was less likely.

Key words: Sugarcane, *Erianthus*, intergeneric crossing, intergeneric hybrid, DNA marker.

Crop and Agribusiness Research Division, NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center (Tanegashima Branch), Anno 1742-1, Nishino-omote, Kagoshima 891-3102, Japan.

Present address:

- 1) Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tropical Agriculture Research Front, Okinawa
- 2) Research and Development Laboratories for Sustainable Value Creation, Asahi Breweries, Ltd., Ibaraki
- 3) Bio Research Laboratory, Future Project Division, Toyota Motor Corporation, Aichi
- 4) Public Relations and Expanding Section, NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, Kumamoto
- 5) NARO Agricultural Research Center