

ミャンマーイネ地方品種における エステラーゼアイソザイムの多型

入江憲治*・YE TINT TUN**・長峰 司***

(平成 24 年 2 月 23 日受付/平成 24 年 4 月 20 日受理)

要約: ミャンマーのイネ地方品種 491 点を用いて 3 つのエステラーゼアイソザイム (*Est1*, *Est2*, *Est3*) のザイモグラムを調査し, 地域間における遺伝子型頻度, 遺伝子座の平均遺伝子多様度および多様性指数を解析した。ミャンマーの地方品種には, *Est1*, *Est2*, *Est3* 座の対立遺伝子で決定される 12 種類の遺伝子型のうち, 10 型を除くすべての遺伝子型が存在した。とくに 1 型, 3 型および 5 型の 3 種類の遺伝子型の頻度が高かった。地域別でみると, どの地域でも多様な変異がみられたが, とくに北部の Sagaing 管区と西部丘陵地域の Chin 州と東部丘陵地域の Shan 州の品種には, ほとんどの遺伝子型が存在した。インドのアッサム州と隣接する西部丘陵地域の Chin 州では, 1 型の頻度が最も高く, 3 型および 5 型の遺伝子型も多い傾向が認められた。一方, イネの地方品種のエステラーゼアイソザイムの多様性に地域間差異があまり見られなかった。このことは, アイソザイムの酵素機能に差異がなく, 環境適応に伴う自然選択や栽培者による人為選抜の影響を受けにくいことによると考えられる。さらに, エステラーゼアイソザイムに限れば, ミャンマー全土が多様地域に包括され, 目立った地域的分化が生じていないとと考えられた。

キーワード: 遺伝子型, 遺伝的多様性, 対立遺伝子, 地域間変異

緒 言

ミャンマー連邦 (以下ミャンマー) は東南アジアの西端に位置し, 中国, ラオス, タイ, バングラデシュ, インドと国境を接する。地形的にはヒマラヤ山脈から続く西部丘陵地, 東部丘陵地そして中央平地からなり, 海拔 0 m から 5,881 m まで標高差が大きい。モンスーン熱帯, 暖温帯から高山性冷温帯などの気候を含み, 気温および降水量からデルタ地域 (Delta Region), 海岸地域 (Coastal Region), 中央乾燥地域 (Central Dry Zone Region), 山岳丘陵地域 (Mountainous Region) の 4 つに大きく分けられている。中央平地を流れる Ayeyarwady 河により作られた肥沃な土地は, この地域に稲作を中心とした水田農業を発達させ, とくに豊かな水量に恵まれた Ayeyarwady デルタは主要な水田稲作地帯である。一方, Chin 州, Kachin 州, Shan 州などの山岳丘陵地域では, 焼畑移動耕作による陸稲栽培が主に行われている。イネの総栽培面積は約 830 万 ha (2008 年統計) で, 全耕地面積の 69% を占める。ミャンマーで栽培されるイネ品種には, 浮稲, 深水稲, 灌漑稲, 天水田稲 (高地水稲, 低地水稲), 陸稲などさまざまな生態型がみられる。

ミャンマーのイネ地方品種は, 複雑な自然環境に対する適応, ならびに多くの少数民族による長年にわたる人為選抜の結果, 多様に分化してきたと考えられる^{1,2)}。近年,

同国では高収量の改良品種が急速に普及し, 地方品種の栽培は減少の一途を辿っている。しかし, 地方品種はさまざまな有用遺伝子を持ち, 稲作生産の向上と安定に資する品種改良に不可欠な遺伝資源となると考えられる³⁾。栽培稲の多様性中心の一部をなすミャンマーの地方品種は, 極めて多様な遺伝的変異をもつことが推測されてきたが, その実態についてはほとんど明らかにされていなかった。入江ら^{1,2)} は, ミャンマーの 14 の州・管区から収集し, 同国のシードバンクに保存中のイネ地方品種について地域適応性や品種分化に最も関わりの深い出穂特性, ならびに米の調理法や嗜好性に関連して直接的に人為選抜の対象となる穀粒形質などを調査した結果, 大きな品種間変異や地域間変異があることを明らかにした。

そこで, さらにミャンマー地方品種の遺伝的多様性を知るために, 本研究では, 人為選抜の影響を直接に受けにくいと考えられるアイソザイムを解析した。

アイソザイムは, 不可視形質であり, 特に人為的選抜の直接的影響は受けにくいと考えられている。このため, 植物種の多様性解析や系統分化の研究などに多く用いられてきた。イネについては, これまで NAKAGAHRA^{4,5)} や GLASZMANN^{6,7)} のほか, アイソザイムを用いた栽培稲や野生稲の多様性解析の多くの研究報告がある。

NAKAGAHRA^{4,5)} は, アジア各地のイネ地方品種について 3 つのエステラーゼアイソザイム遺伝子座の対立遺伝子の組

* 東京農業大学国際食料情報学部国際農業開発学科

** ミャンマー農業灌漑省農業公社

*** (独) 農業・食品産業技術総合研究機構近畿中国四国農業研究センター

合せにより生ずる 12 種 (2×3×2) の遺伝子型を調査し、12 種類のうち 11 の遺伝子型が存在することを明らかにした。また、ミャンマー・タイ・ラオス・中国の雲南省にまたがる地帯できわだって遺伝的多様性が大きいことを見出した。そして、ミャンマーには 11 種の遺伝子型が存在したことから、栽培イネの多様性中心の一部になっていると推定した。

GLASZMANN^{6,7)} はアジア栽培稲 1,688 品種を 8 酵素種 15 遺伝子座位の変異を澱粉ゲル電気泳動で解析し、供試品種を I 群～VI 群までの 6 群に分類した。その中の主要な 2 群である I 群と VI 群はそれぞれインド型と日本型に、II 群はインドの生態型の一つである Aus に対応することを明らかにした。

本研究ではミャンマー各地から収集した 490 地方品種について、NAKAGAHRA⁴⁾ と同様の方法で 3 つのエステラーゼアイソザイム遺伝子座 (*Est1*, *Est2*, *Est3*) の対立遺伝子を調べ、地域間差異を解析した。

材料および方法

ミャンマー・シードバンクに保存されていたイネ、491 地方品種を農業生物資源研究所の実験温室で栽培し、移植後 30 日の葉身を採取し、ガラスかん瓶に入れ -20℃ で冷凍保存した。冷凍試料をドリル式の摩砕装置で摩砕して粗酵素液を抽出し、脱脂した木綿糸に吸わせて、泳動前まで -20℃ の冷凍庫に保存した。寒天・ポリビニールピロリドン支持体とする平板薄層電気泳動法により酵素を分離した。エステラーゼアイソザイムは、1% *α*-Naphthyl acetate および 2% *β*-Naphthyl acetate を基質とし、2% Naphtanil diazo blue B で活性染色した。泳動ゲル上に現れるバンド像から、3 つの遺伝子座 (*Est 1*, *Est 2*, *Est 3*) の対立遺伝子の種類を同定した。

さらに、対立遺伝子の組み合わせからエステラーゼアイソザイム遺伝子型を下記のように決定し、遺伝子型頻度を

計算した。

Genotype				Genotype			
No	<i>Est1</i>	<i>Est2</i>	<i>Est3</i>	No	<i>Est1</i>	<i>Est2</i>	<i>Est3</i>
1	1	1	2	7	0	1	2
2	1	1	1	8	0	1	1
3	1	2	2	9	0	2	2
4	1	2	1	10	0	2	1
5	1	0	2	11	0	0	2
6	1	0	1	12	0	0	1

また、3 遺伝子座の平均遺伝子多様度 (H) は、

$$H = \frac{1}{n} \sum (1 - \sum p_{ij}^2)$$

p_{ij} は i 番目の遺伝子座の j 番目の遺伝子頻度、n は遺伝子座の数である。

遺伝子型の多様性指数 (H') は、

$H' = -\sum p_i \ln p_i$ により求め、 p_i は i 番目の遺伝子型頻度である。

エステラーゼアイソザイムの多型解析は、ミャンマーの自然環境をほぼ反映していると考えられる、現在の行政区にしながらって 14 の地域に分割して行った。

結 果

ミャンマーのイネ地方品種 491 点のエステラーゼアイソザイム遺伝子型の地域別の頻度ならびにそれらの平均遺伝子多様度 (Average gene diversity) を Table 1 に示した。ミャンマー 14 地域におけるエステラーゼアイソザイム 3 遺伝子座の平均遺伝子多様度は、最小が 0.305 で最大が 0.498 であり、ミャンマー全体では 0.426 であった。地域別にみると Chin 州が 0.498 で最も高く、次に Mandalay 管区が 0.457、Sagaing 管区が 0.444、Tanintharyi 管区が 0.446 で平均遺伝子多様度が高い値を示した。一方、平均遺伝子多様度が低い地域は、Kayah 州が 0.374、Kayin 州が 0.305、Yangon 管区が 0.377、Rakhine 州が 0.379 で、Kayin 州が最も平均遺伝子多様度が低い値を示した。ミャンマー全体を見たところ、ミャンマー北部地域は平均遺伝

Table 1 Allele frequencies at three esterase isozyme loci.

State or Division	<i>Est1</i>		<i>Est2</i>			<i>Est3</i>		H
	<i>Est1</i> ⁰	<i>Est1</i> ¹	<i>Est2</i> ⁰	<i>Est2</i> ¹	<i>Est2</i> ²	<i>Est3</i> ¹	<i>Est3</i> ²	
Ayeyarwady	0.105	0.895	0.211	0.289	0.500	0.211	0.789	0.381
Bago	0.096	0.904	0.365	0.250	0.385	0.212	0.788	0.388
Chin	0.310	0.690	0.214	0.500	0.286	0.333	0.667	0.498
Kachin	0.167	0.833	0.278	0.222	0.500	0.194	0.806	0.405
Kayah	0.000	1.000	0.208	0.458	0.333	0.417	0.583	0.374
Kayin	0.130	0.870	0.087	0.217	0.696	0.130	0.870	0.305
Magway	0.182	0.818	0.273	0.182	0.545	0.182	0.818	0.397
Mandalay	0.174	0.826	0.304	0.391	0.304	0.304	0.696	0.457
Mon	0.056	0.944	0.333	0.333	0.333	0.333	0.667	0.405
Rakhine	0.108	0.892	0.459	0.216	0.324	0.189	0.811	0.379
Sagaing	0.234	0.766	0.234	0.281	0.484	0.219	0.781	0.444
Shan	0.213	0.787	0.148	0.262	0.590	0.230	0.770	0.417
Tanintharyi	0.222	0.778	0.296	0.259	0.444	0.222	0.778	0.446
Yangon	0.114	0.886	0.257	0.286	0.457	0.171	0.829	0.377
Myanmar	0.163	0.837	0.259	0.295	0.446	0.234	0.766	0.426

H : Average gene diversity

子多様度が高い値を示し、南部地域は平均遺伝子多様度が低い値を示す傾向がみられた。

3つの遺伝子座 (*Est 1*, *Est 2*, *Est 3*) におけるそれぞれの対立遺伝子をみたところ、ミャンマー全体では、*Est 1* 遺伝子座では Est_1^1 遺伝子をもつ品種が多く、*Est 2* 遺伝子座では Est_2^2 遺伝子を持つ品種が多く、*Est 3* 遺伝子座では Est_3^2 遺伝子を持つ品種が多かった。地域別にみたところ、Chin 州、Kayah 州および Rakhine 州では、ミャンマー全体とは異なる対立遺伝子の遺伝子頻度を示した。すなわち、Chin 州では *Est 2* 遺伝子座の Est_2^1 遺伝子を持つ品種が多く、Kayah 州では *Est 3* 遺伝子座の Est_3^1 遺伝子を持つ品種が多く、Rakhine 州では *Est 2* 遺伝子座の Est_2^0 遺伝子を持つ品種が多かった。

次に、地域別に 12 種類のエステラーゼアイソザイム遺

伝子型頻度ならびに多様性指数を Fig. 1 に示した。ミャンマー全体では 12 種類のエステラーゼアイソザイム遺伝子型のうち、10 型を除くすべての遺伝子型がみられ、とくに、1 型 ($Est1^1 Est2^1 Est3^2$)、3 型 ($Est1^1 Est2^2 Est3^2$) および 5 型 ($Est1^1 Est2^0 Est3^2$) の 3 種類の遺伝子型の頻度が高い傾向がみられた。エステラーゼアイソザイム遺伝子型の多様性指数 (H') は、 $H' = 1.992$ であった。

地域別にみたところ、いずれの地域でも多様な変異がみられたが、北部の Sagaing 管区 ($H' = 2.064$) と西部丘陵地域の Chin 州 ($H' = 2.091$) と東部丘陵地帯の Shan 州 ($H' = 1.794$) では、ほとんどの遺伝子型がみられ、とくに多様性に富んでいた。これらの 3 地域はミャンマーの北部国境周辺であった。一方、遺伝子型の少ない地域は、ミャンマー西部の Kayah 州 ($H' = 1.643$)、Kayin 州 ($H' = 1.276$)

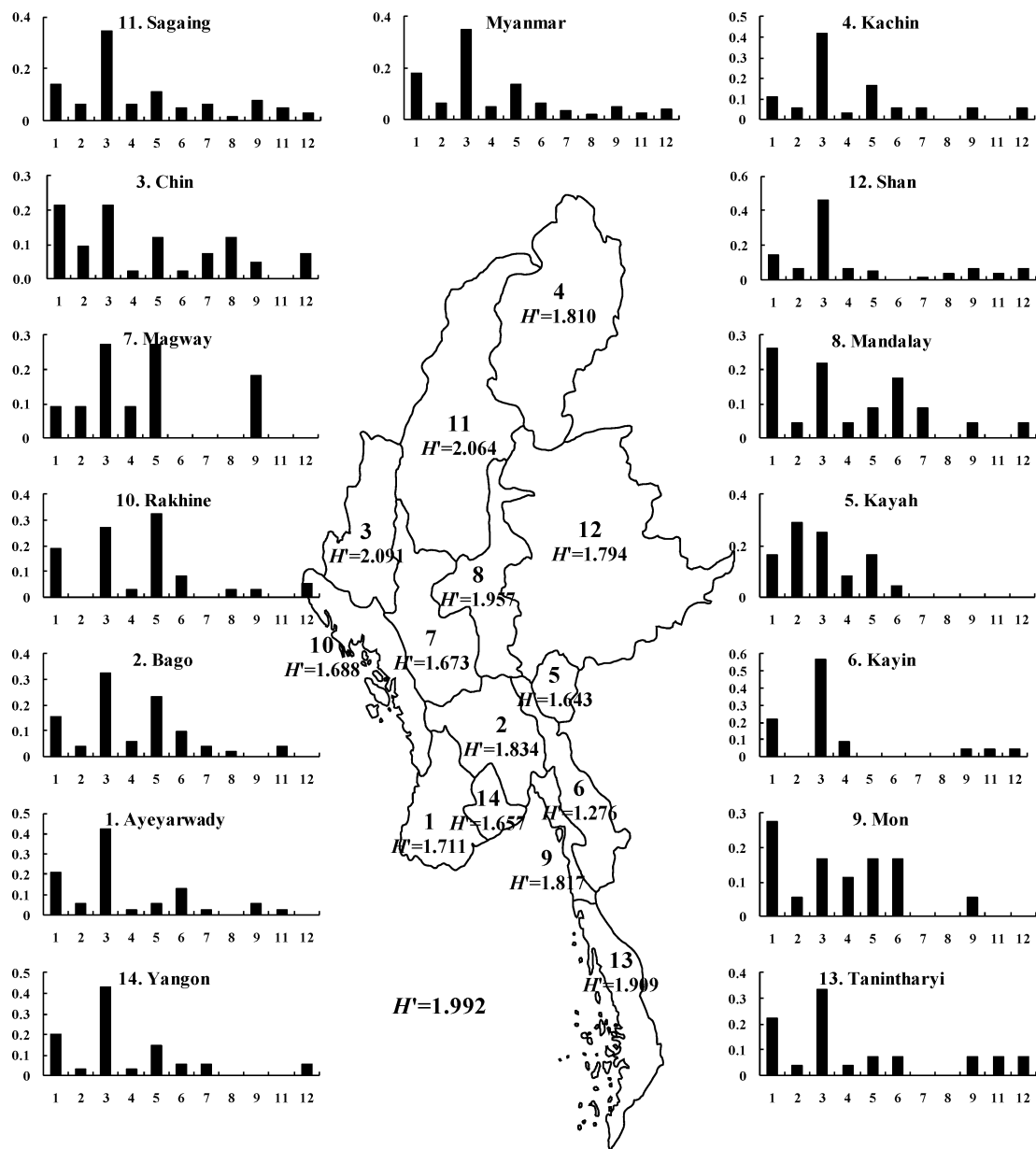


Fig. 1 Regional relative frequency distributions of genotype in esterase isozyme of rice landraces. H' : Shannon-Wiener index for diversity.

および Magway 管区 ($H' = 1.673$) で、6 種類の遺伝子型しかみられなかった。

考 察

アイソザイムは酵素としての機能は同一であるが、異なる電気泳動度を持つ酵素群である。アイソザイム分析は、農作物の進化、分類、分化などの研究の有効な手段となっており、アイソザイムを用いたイネ栽培品種の変異については、多くの研究が報告されている。

エステラーゼアイソザイムを用いた本研究では、ミャンマー地方品種には 1, 3, 5 型の遺伝子がとくに多いことがわかった。これは NAKAGAHRA⁵⁾ の結果とも一致した。

NAGAMINE⁹⁾ らは、イネの遺伝子中心地の一部と推定されている、ミャンマーの北東部の Shan 州と隣接する中国の雲南省の地方品種を用いて、アイソザイム 6 酵素種 7 遺伝子座について分析し、雲南省地方品種には大きな遺伝的変異が存在すること明らかにした。さらに、LU *et al.*¹⁰⁾ は、中国の雲南省のジーンバンクに保存されている地方品種を用いてエステラーゼアイソザイムの変異を詳細に解析し、雲南省の中では、ミャンマーに国境を接する南西部地域で多型程度が高いと報告した。

LU *et al.*¹⁰⁾ は、ミャンマーの東部丘陵地域の Shan 州と隣接する中国の雲南省のエステラーゼアイソザイムの 3 つの遺伝子座の変異を調べ、最も高い多様性がみられるのは Shan 州とラオス国境沿いの地域であることを報告した。本研究においても、Shan 州の平均遺伝子多様度は、ミャンマーの中では 0.417 と比較的高い値を示したが、ミャンマーで最も平均遺伝子多様度が高い地域は、Chin 州、Mandalay 管区、Sagaing 管区であり、中国の雲南省と隣接した地域ではなかった。NAKAGAHRA⁵⁾ は雲南省のエステラーゼアイソザイム遺伝子型は、日本のイネ品種に多く見られる 6 型を示す品種が多いことを明らかにしたが、本研究では雲南省と隣接する Shan 州で 6 型の品種はみられず、むしろ Mandalay 管区と Mon 州で多かった。

インドのアッサム地域と隣接する西部山岳丘陵地域の Chin 州では 1 型の頻度が最も高く、次に 3 型および 5 型の頻度が高かった。NAKAGAHRA⁵⁾ の報告によると、アッサム州の稲品種のエステラーゼアイソザイム遺伝子型も 1 型、3 型、5 型が多く、この結果から Chin 州の地方品種はアッサム地域の品種と遺伝的に類似していると推察される。

SHATTA *et al.*¹¹⁾ は、IRRI に保存されているミャンマーの 1,582 地方品種のアイソザイムを調べ、GLASZMAN⁶⁾ の分類法で解析したところ、地方品種のほとんどがインド型を示す I 群に属し、日本型を示す VI 群はわずか 1.6% に過ぎないことを報告している。本研究の結果でも、NAKAGAHRA⁵⁾ のエステラーゼアイソザイム遺伝子型で日本品種に多くみられる 6 型の地方品種はわずか 6% に過ぎなかった。また、Ohm MAR SAW *et al.*¹²⁾ は主としてミャンマーで収集された 110 地方品種について DNA マーカーを用いて解析して、おおまかに日本型とインド型の 2 グループがあることを明らかにし、また、日本型品種は 6 品種に過ぎないことを明

らかにした。

本研究の結果および SHATTA *et al.*¹¹⁾ のアイソザイム多型分析の結果、並びに Ohm MAR SAW *et al.*¹²⁾ による DNA 多型分析の結果をまとめると、ミャンマーのイネ地方品種には高い遺伝的多様性が存在し、インド型および日本型の両方が分布すると結論できた。しかし、本研究によるエステラーゼアイソザイムの分析では、インド型品種に多く分布する 1 型、3 型、5 型がとくに多いこと、GLASZMAN⁶⁾ の分析法でもインド型を示す I 群が多く、日本型を示す VI 群はわずか 1.6% に過ぎないこと、DNA マーカーによる解析でも日本型品種は 6 品種しかないことが明らかになった。これらのことを総合して考えると、ミャンマーの地方品種は品種群としてはインド型品種が卓越して分布していると判断できる。あるいはミャンマーのイネはインド型品種の多型程度が高い地域であるということが出来る。

岡¹³⁾ は、NAKAGAHRA⁵⁾ が調べたアジア各地域のエステラーゼアイソザイムの実験結果に基づいて多様性指数を計算し、ミャンマーの地方品種が最も高い値を示し、次いでミャンマー周辺の中国の雲南省やタイの品種が高いことを明らかにした。本研究ではミャンマー地方品種全体では多様性が大きいことが再確認できたが、エステラーゼアイソザイム遺伝子のミャンマー国内における地域間変異については、明瞭な差異は認められなかった。また、Ohm MAR SAW *et al.*¹²⁾ の DNA 多型解析の結果でも地域間差異はみられず、ミャンマーのいずれの地域にもアイソザイムの多様な遺伝子型が広く分布していることが確認された。

イネの地方品種のエステラーゼアイソザイムの多様性に地域間差異があまり見られないのは、アイソザイムの酵素機能に差異がなく、環境適応に伴う自然選択や栽培者による人為選抜の影響を受けにくいことによると考えられる。さらに、エステラーゼアイソザイムに限れば、ミャンマー全土が多様性地域に包括され、目立った地域的分化が生じていないとと考えられた。

参考文献

- 1) 入江憲治・KHIN AYE・長峰 司・藤巻 宏・菊池文雄, 2003. ミャンマーにおけるイネ地方品種の出穂期の品種間変異. 熱帯農業 47: 198-205.
- 2) 入江憲治・KHIN AYE・YI YI MYINT・L. NANG KHA・YE TINT TUN・長峰 司・藤巻 宏・菊池文雄, 2004. ミャンマーのイネ地方品種にみられる穀粒形質の地域変異. 熱帯農業 48 (2): 101-110.
- 3) Kenji IRIE, JOHN BA MAW, Tsukasa NAGAMINE, Mitsunori OKA and Makoto KAWASE, 2004. Management of plant genetic resources in the Myanmar Seed Bank. *J. ISSAAS* 10 (1): 91-100.
- 4) NAKAGAHRA, M. 1978. The differentiation classification and center of genetic diversity of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) by isozyme analysis. *Tropical Ag. Res.* 11: 77-82.
- 5) NAKAGAHRA, M. 1984. Geographical distribution of esterase genotypes of rice in Asia. *RGN* 1: 118-120.
- 6) GLASZMANN, J.C. 1986. A varietal classification of Asian rice (*Oryza sativa* L.) based on isozyme polymorphism —Rice Genetics—. *Int. Rice Res. Inst.* pp. 83-90.
- 7) GLASZMANN, J.C. 1987. Isozymes and classification of Asian

- rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* **74** : 21-30.
- 8) NAKAGAHRA, M. 1977. Genetic analysis for esterase isozymes in rice cultivars. *Japan J. Breed.* **27** : 141-148.
- 9) NAGAMINE, T., J.H. XIONG and Q. XIAO, 1992. Genetic variation in several isozyme of indigenous rice varieties in Yunnan Province of China. *Japan J. Breed.* **42** : 507-513.
- 10) LU Yuan Dai, JIAN Hua Xiong, GUO Song Wen, YONG Chen, CHANG Rong Ye, Tsukasa NAGAMINE, Yoshihiro SUNOHARA, and Katsura TOMITA, 1995. Further information on the genetic variation of indigenous rice varieties in Yunnan Province, China. *Breeding Science* **45** : 397-399.
- 11) SHATTA, A.M., B.G. delos REYES, D.S. BRAR and G.S. KHUSH, 1993. Classification of Myanmar rice germplasm based on isozyme polymorphism. *RGN* **10** : 73-74.
- 12) OHN MAR SAW, K. DOI, KHIN AYE, K. IRIE and A. YOSHIMURA, 2004. Genetic diversity of Myanmar rice cultivars detected by DNA markers. *RGN* **20** : 14-16.
- 13) OKA, H.I. 1988. Origin of cultivated rice. Elsevier, Tokyo.

Polymorphic Diversity of Esterase Isozyme of Myanmar Rice Landraces

By

Kenji IRIE*, YE TIN TUN** and Tsukasa NAGAMINE**

(Received February 23, 2012/Accepted April 20, 2012)

Summary : Esterase isozymes have often used for investigating phylogenetic differentiation of rice landraces. Three loci of *Est1*, *Est2* and *Est3* have been identified where 2, 3, and 2 alleles are respectively included. The combinations of those alleles in the three loci produce 12 genotypes. Myanmar landraces are found to have eleven genotypes among them. Such genotypes as 1, 3 and 5 are more frequent than any others and most genotypes of esterase isozyme showed similarly frequencies in every region. The result indicated that Myanmar landraces have a wide range of genetic variation. The variation of esterase isozyme was considered to be neutral to natural and artificial selection as well.

Genotypes of esterase isozyme were greatly diverse but no significant difference of genotypic frequency was observed among regions. The genotypes of esterase isozyme in Myanmar are as diverse as neighboring areas, as being reported earlier.

Key words : genetic diversity, genotype, allele, regional variations

* Department of International Agricultural Development, Tokyo University of Agriculture

** Myanma Agriculture Service, Ministry of Agriculture and Irrigation, Myanmar

*** National Agriculture Research Center for Western Region, Japan