



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ペレニアルライグラス (Lolium Perenne L. )における耐寒性とAco-1 (アイソザイム遺伝子座) の関係
Author(s)	山下, 雅幸; Yamashita, Masayuki; 阿部, 純 他
Citation	北海道大学農学部農場研究報告, 28, 25-30
Issue Date	1993-03-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/13416">https://hdl.handle.net/2115/13416</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	28_p25-30.pdf



# ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) における 耐寒性と *Aco-1* (アイソザイム遺伝子座) の関係

山下 雅幸・阿部 純・島本 義也

(北海道大学農学部植物遺伝資源学講座)

(1992年12月15日受理)

## 緒 言

ペレニアルライグラスは、家畜の嗜好性や栄養価に優れた寒地型イネ科牧草であるが、種々の環境ストレスに対する抵抗性が低く、北海道の草地では、耐寒性の低さにより不安定な牧草生産が強いられている。

ペレニアルライグラスの品種育成は、温暖なオーストラリアやイタリアから厳寒なフィンランド、スウェーデン、カナダ諸国まで広い地域で行われており、耐寒性の程度を異にする遺伝子型が多く存在する。しかし、耐寒性品種の育成に必要な耐寒性の遺伝機構の解明あるいは耐寒性の遺伝子源に関する研究は少ない。

近年、量的形質を解析する際の標識遺伝子として、アイソザイムや制限酵素断片長多型 (Restriction fragment length polymorphism) などの分子の標識が多数用いられている<sup>9)</sup>。ペレニアルライグラスにおけるアイソザイムの研究では、アコニターゼ (*Aco-1*, *Aco-2*)<sup>17)</sup>、酸性フォスファターゼ (*Aph-1*)<sup>5,6,7,13)</sup>、グルタミン酸オキサロ酢酸転移酵素 (*Got-1*, *Got-2*, *Got-3*)<sup>4,5,6,7,11,13)</sup>、フォスフォグルコースイソメラーゼ (*Pgi-1*, *Pgi-2*)<sup>1,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13)</sup>、フォスフォグルコムターゼ (*Pgm-1*)<sup>11,13)</sup>、パーオキシダーゼ (*Pox*)<sup>2,14)</sup> および6-フォスフォグルコン酸脱水素酵素 (*6 Pgd-1*, *6 Pgd-2*)<sup>11,13,17)</sup> の遺伝子座についての報告があり、*Pgi-2* と収量の間に関連性が見いだされている<sup>7)</sup>。

本研究では、世界各地で育成されたペレニアルライグラスの2倍体品種を供試し、耐寒性と詳細な調査がなされていない *Aco-1* 座との間の関係

について検討した。

## 材料および方法

### 1. 供試材料

供試品種は、世界各地から収集した2倍体ペレニアルライグラス117品種である (Table 1)。

### 2. 耐寒性の評価

各品種60粒の種子をペーパーポットに播種し、60日間屋外で生育させた後、4℃、8時間日長の条件で14日間ハードニングした。ハードニング終了後、嶋田(1982)<sup>16)</sup>の方法に従い、幼苗の根を冠部の下から0.5 cm、地上部を3~4 cm残して切除し、水洗後水で湿らせたガーゼ(10×10 cm)で包み、さらにアルミホイル(10×10 cm)に包んで密封した。この材料を毎時2℃ずつ加冷し、-6℃で16時間凍結処理した後、4℃で解凍した。解凍後、パーミキュライトを詰めたペーパーポットに移植し、温室で21日間生育させた後に、発根程度により個体の生死を判定し、個体生存率を調査し、耐寒性の指標とした。また、反復は2回行い、反復当たり20~30個体を調査した。

### 3. *Aco-1* の対立遺伝子の同定

温室内で育苗した播種後4週から8週令の幼苗の地上部を、各品種10個体より採集し、電気泳動に供試した。アコニターゼの粗抽出は、幼苗の地上部に1%メルカプトエタノールを含む0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 60 μl を加えて、乳鉢で粉碎して行った。電気泳動の担体には、0.003 M 水酸化リチウム、0.019 M ホウ酸、0.046 M トリスアミノメタンおよび0.007 M クエン酸緩衝液に3%

**Table 1.** Cultivar name, nation of origin, *a* allele frequency at *Aco-1* and cold hardiness of materials used.

Cultivar name	Nation of origin	<i>Aco-1</i> <sup>a</sup>	Cold hardiness	Cultivar name	Nation of origin	<i>Aco-1</i> <sup>a</sup>	Cold hardiness
Medea	Australia	0.90	0.0	Mondial	Netherlands	0.35	90.5
Tasdale	Australia	1.00	27.0	Moretti	Netherlands	0.95	44.4
Melino	Belgium	0.60	16.7	Ovation	Netherlands	0.30	69.4
Baca	Czechoslovakia	0.70	47.6	Pelleas	Netherlands	0.70	50.8
Sport	Czechoslovakia	0.30	59.5	Perma	Netherlands	0.90	78.6
Belida	Denmark	0.70	33.3	Player	Netherlands	0.35	50.0
Borvi	Denmark	0.60	50.0	Preference	Netherlands	0.75	57.1
Chantal	Denmark	0.90	45.8	Premo	Netherlands	0.30	88.9
Darbo	Denmark	0.90	61.1	Salem	Netherlands	0.80	29.8
Elrond	Denmark	0.70	33.3	Saver	Netherlands	1.00	57.0
Hella	Denmark	0.95	32.4	Score	Netherlands	0.40	63.0
Mirvan	Denmark	0.85	0.0	Semperweide	Netherlands	0.80	84.9
Pippin	Denmark	0.70	82.0	Sommora	Netherlands	1.00	73.1
Pleno	Denmark	1.00	0.0	Sprinter	Netherlands	0.40	100.0
Sisu	Denmark	0.55	76.4	Talbot	Netherlands	0.60	77.8
Trani	Denmark	0.65	65.6	Trimmer	Netherlands	0.55	100.0
Verna Pjabjerg	Denmark	0.70	94.4	Variant	Netherlands	0.80	46.7
Riikka	Finland	0.40	61.9	Grasslands Nui	New Zealand	0.50	45.2
Brenda	France	0.30	45.2	Gazon	Poland	0.50	95.2
Emir	France	0.60	46.8	Naki	Poland	0.60	63.5
Idole	France	0.40	52.5	Rapid	Romania	0.60	66.7
Baranna	Germany	1.00	39.3	Gunne	Sweden	0.39	90.5
Baranna (II)	Germany	0.50	89.6	Pavo	Sweden	0.20	84.9
Diana	Germany	0.80	80.6	Ronja	Sweden	0.45	66.9
Kerem	Germany	0.55	65.3	Servo	Sweden	0.60	52.6
Lidura	Germany	0.90	53.0	Svea	Sweden	0.50	0.0
Lilotta	Germany	0.50	54.0	Cockade	United Kingdom	0.50	94.4
Limage	Germany	0.35	67.4	Rathlin	United Kingdom	0.50	32.8
Limedia	Germany	0.90	76.8	All-Star	United States	0.60	59.6
Liperlo	Germany	0.90	66.7	Belle	United States	0.60	61.9
Liraylo	Germany	0.65	66.7	Blazer	United States	0.55	95.2
Loretta	Germany	0.80	0.0	Citation II	United States	0.30	75.0
Lorina	Germany	0.90	0.0	Commander	United States	0.40	90.0
Lucretia	Germany	0.65	38.9	Cowboy	United States	0.40	84.7
Maprima	Germany	0.70	81.0	Delray	United States	0.50	76.2
Marietta	Germany	0.50	28.3	Derby	United States	0.60	68.5
Parcour	Germany	0.30	33.3	Diplomat	United States	0.50	72.1
Printo	Germany	0.80	50.0	Gator	United States	0.30	40.7
Ranger	Germany	0.70	100.0	Lindsay	United States	0.70	85.7
Pamir	Italy	0.80	0.0	Manhattan II	United States	0.90	86.9
Vejo	Italy	0.50	44.8	NK200	United States	0.30	41.7
Barball	Netherlands	0.25	66.4	Omega II	United States	0.30	76.9
Barclay	Netherlands	1.00	40.0	Palmer	United States	0.70	85.6
Barrage	Netherlands	0.55	69.8	Pennfine	United States	1.00	79.1
Bellatrix	Netherlands	0.50	83.3	Prelude	United States	0.50	95.2
Bianca	Netherlands	0.60	49.4	Premier	United States	0.25	78.3
Caprice	Netherlands	0.60	0.0	Repel	United States	0.20	86.3
Compas	Netherlands	0.50	0.0	Yorktown II	United States	0.60	81.0
Elka	Netherlands	0.80	74.1	Barcredo	Unknown	0.85	35.7
Ensporta	Netherlands	0.40	0.0	Birdie II	Unknown	0.70	63.9
Falcon	Netherlands	0.60	7.4	CBS II	Unknown	0.40	69.9
Gremie	Netherlands	0.70	66.7	Coronet	Unknown	0.60	41.7
Hermes	Netherlands	0.80	81.5	Edoras	Unknown	0.10	52.4
Hubal	Netherlands	0.70	0.0	Jackpot	Unknown	0.20	35.1
Kosta	Netherlands	1.00	50.0	LBDK	Unknown	0.50	82.1
Lamora	Netherlands	0.20	60.6	Marathon	Unknown	0.60	42.3
Lennox	Netherlands	0.45	17.3	Pleasure	Unknown	0.10	95.2
Magella	Netherlands	0.90	52.8	Vintage	Unknown	0.90	95.2
Majestic	Netherlands	0.10	88.3				

のショ糖および13%のデンプンを溶かして作成したゲルを用いた。電極液には、0.029 M水酸化リチウム-0.19 Mホウ酸緩衝液を用いた。泳動は、5℃の恒温器内で、150 Vの定電圧下で1時間、その後250 Vの定電圧下で5時間行った。染色には、cis-アコニット酸20 mg、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸10 mg、テトラゾリウムチアゾールブルー10 mg、塩化マグネシウム50 mg、フェナジンメトスルフェート3 mgおよびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ40ユニットを0.1 Mトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)50 mlの中に加えた反応液を用いた。染色後、ザイモグラムを観察した。

### 結果および考察

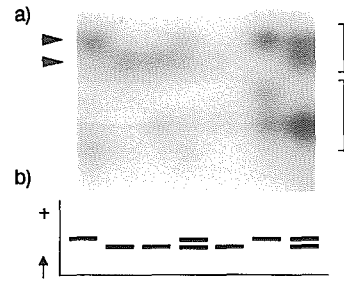
生存率で評価された耐寒性は、品種によって0~100%まで変異した(Table 1)。耐寒性の品種間差異を検定した分散分析の結果(Table 2)より、品種によって耐寒性に差異が認められ、算出した遺伝率は72%と高かった。また、育成国間にも差異が見られ、オーストラリアやイタリアで育成された品種の耐寒性は低く、アメリカで育成された品種には耐寒性の高い品種が多かった(Table 1)。アメリカの品種は、草丈が低く、茎数の多い芝生型の品種であることから、耐寒性と形態形質の関係について、さらに検討の余地がある。

ペレニアルライグラス117品種の1170個体におけるアコニターゼ・アイソザイムを分析した結果、陽極側に6本のバンドが観察された。移動距離の長い2本のバンドと移動距離の短い4本のバンドを示すザイモグラムの観察から、これらは2つの異なる遺伝子座に支配されていると推察さ

**Table 2.** Analysis of variance for cold hardiness in *Lolium perenne* L. (Arcsin transformed)

Source of variation	df	Mean square
Block	2	3456.8 **
Cultivars	116	1763.9 **
Error	232	417.1
Heritability		72.0 %

\*\* : Significant at 1% level.



**Fig. 1.** The aconitase (*Aco-1*, *Aco-2*) phenotypes(a) and schematic illustration and inferred genotypes for *Aco-1*(b).

れ、陽極側から *Aco-1* および *Aco-2* とし、*a*, *b* および *a*, *b*, *c*, *d* の2および4対立遺伝子を仮定した(Fig. 1)。本研究では、*Aco-1*に着目し、各品種の対立遺伝子頻度を求めた(Table 1)。対立遺伝子頻度には品種間に差異が観察され、*a* 遺伝子の頻度は0%~90%まで変異し、調査した全個体の平均は40%であった。

耐寒性と *Aco-1* の *a* 遺伝子の頻度との関係を知るために求めた両者間の品種相関係数は0.232(5%水準で有意)で、耐寒性と *Aco-1* の間に関係が認められた。供試した117品種を、耐寒性が80%以上の品種群(30品種)、耐寒性が40%以下の品種群(27品種)およびその中間の品種群(60品種)に分け、各品種群における *Aco-1* の対立遺伝子頻度を Fig. 2 に示した。調査した全個体の対立遺伝子頻度を期待頻度として、各品種群で観察された対立遺伝子頻度との適合性をカイ自乗検定した結果、耐寒性の高い品種群および耐寒性の低い品種群が期待頻度と異なった。各品種群における *a* 遺伝子の頻度は、耐寒性の高い品種群が47%、中間の品種群が41%、耐寒性の低い品種群は31%で、耐寒性が高いほど *a* 遺伝子の頻度が高く、*b* 遺伝子の頻度が低い傾向が認められた。

牧草類におけるアイソザイム遺伝子と量的形質の間関係についての報告は少ない。ペレニアルライグラスでは、*Pgi-2* と収量の間に<sup>7)</sup>、オーチャードグラスでは、*Got-1* と水分ストレスの間に関連性が認められている<sup>15)</sup>。本研究で調査した *Aco*

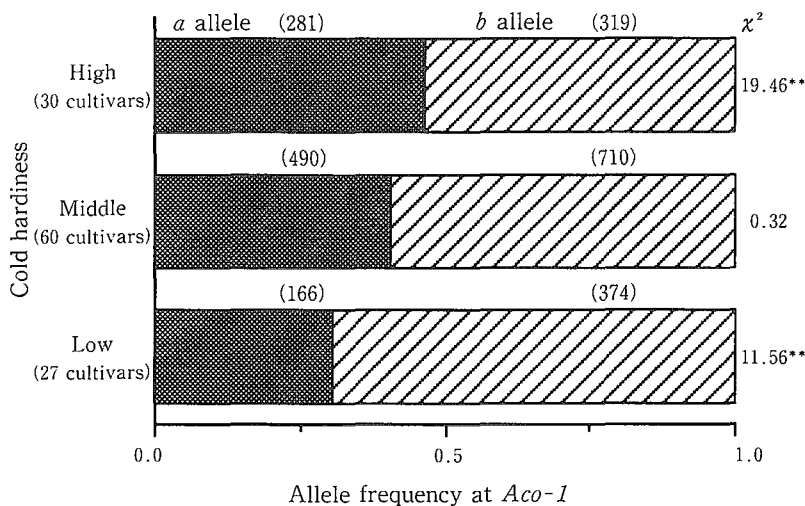


Fig. 2. Relation between cold hardness and allele frequency at *Aco-1* in *Lolium perenne* L. The number in parenthesis is the number of allele observed in each class. \*\*: Significant at 1% level by chi-square test.

-1は、ペレニアルライグラスにおける報告は少ないが、バンドの発現も比較的安定していることから、ペレニアルライグラスにおける新たな標識遺伝子として有望であろう。

#### 摘 要

世界各地で育成されたペレニアルライグラスの2倍体品種117品種を供試し、冠部凍結法により評価された耐寒性とでんぷんゲル電気泳動法によるアコニターゼ・アイソザイム遺伝子座との関係について検討した。耐寒性に関して、品種による差異が認められ、*Aco-1*には、品種内および品種間に変異が見られた。耐寒性と*Aco-1*の*a*遺伝子頻度との品種相関係数は0.232(5%水準で有意)で、耐寒性が高いほど*a*遺伝子の頻度が高かった。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、(株)北海道グリーンバイオ研究所のご援助を賜った。ここに記して謝意を表す。

#### 引用文献

1. 江本泰二：イタリアンライグラスのパーオキシダーゼ・アイソザイム・パターンとの品種内および品種間変異。日草誌 28：258-264. 1982
2. 江本泰二：*Lolium* 属のアイソザイム変異に関する研究。I. グルコース・リン酸イソメラーゼ・アイソザイ

ムからみた *Lolium* 属の系統類縁関係。日草誌 30：327-334. 1985

3. EMOTO, T: Isozyme variation in the genus *Lolium*. II. Intra- and interspecific relationships of tetraploid ryegrasses on the basis of phospho-glucose isomerase isozyme variation. *J. Japan. Grassl. Sci.* 32: 134-142. 1986
4. HAYWARD, M. D. and N. J. MCADAM: Isozyme polymorphism as a measure distinctiveness and stability in cultivars of *Lolium perenne*. *Z. Pflanzenzüchtg.* 79: 59-68. 1977
5. HAYWARD, M. D., L. D. GOTTLIEB and N. J. MCADAM: Survival of allozyme variants in swards of *Lolium perenne* L.. *Z. Pflanzenzüchtg.* 81: 228-234. 1978
6. HAYWARD, M. D. and M. T. M. ZARUK: Allozyme variation in the inbreeding species *Lolium temulentum* L.. *Heredity* 49: 255-257. 1982
7. HAYWARD, M. D. and N. J. MCADAM: The effect of isozyme selection on yield and flowering time in *Lolium perenne*. *Plant breeding* 101: 24-29. 1988
8. KENNEDY, S. J., S. J. GARDINER, T. J. GILLILAND and M. S. CAMLIN: The use of electrophoretic techniques to distinguish perennial ryegrass cultivars when sown in mixtures. *J. agric. Sci., Camb.* 104: 1-9. 1985
9. 森島啓子：稲の進化遺伝学的研究におけるアイソザイムの利用。育種学最近の進歩 29: 71-78. 1988
10. NIELSEN, G: Identification of all genotypes in tetraploid ryegrass (*Lolium* spp.) segregating for four alleles in a *Pgi*-enzyme locus. *Hereditas* 92: 49-52. 1980

11. NIELSEN, G., H. ØSTERGAARD and H. JOHANSEN : Cultivar identification by means of isoenzymes. II. Genetic variation at four enzyme loci in diploid ryegrass. *Z. Pflanzenzüchtg.* **94** : 74-86. 1985
12. ØSTERGAARD, H. and G. NIELSEN : Cultivar identification by means of isoenzymes. I. Genotypic survey of the *Pgi-2* locus in tetraploid ryegrass. *Z. Pflanzenzüchtg.* **87** : 121-132. 1981
13. ØSTERGAARD, H., G. NIELSEN and H. JOHANSEN : Genetic variation in cultivars of diploid ryegrass, *Lolium perenne* and *L. multiflorum*, at five enzyme systems. *Theor. Appl. Genet.* **69** : 409-421. 1985
14. POLANS, N. O. and R. W. ALLARD : Inheritance of electrophoretically detectable variants in ryegrass. *J. Heredity* **76** : 61-62. 1985
15. ROY, J. and R. LUMARET : Associated clinal variation in leaf tissue water relations and allozyme polymorphism in *Dactylis glomerata* L. populations. *Evolutionary trends in plants* **1** : 9-19. 1987
16. 鳴田 徹：オーチャードグラスの耐寒性検定法としての冠部凍結法の有効性. 日草誌 **28** : 247-252. 1982
17. 山下雅幸・阿部 純・島本義也：ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) におけるアイソザイム遺伝子頻度の変異と遺伝的分化 日草誌 **38** : 467-476. 1993

## Relation between Cold Hardiness and *Aco-1* in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.)

Masayuki YAMASHITA, Jun ABE and Yoshiya SHIMAMOTO

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan)

(Received December 15, 1992)

### Summary

In order to investigate the relation between cold hardiness and isoenzymic locus in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), 117 diploid cultivars released in various nations were assessed for viability by the technique of freezing plant crowns, and for isoenzymic locus, *Aco-1* by starch gel electrophoresis. Cold hardiness was greatly varied among cultivars used. Allele frequency at *Aco-1* was varied among and within cultivars. The correlation between cold hardiness and allele frequency at *Aco-1* was observed significantly at 5% level.