HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Implementation of GISH (genomic in situ hybridization) and DNA marker techniques for Festulolium breeding [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	久保田, 明人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	乙第7093号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78597
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Akito_KUBOTA_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏 名　久保田 明人

学 位 論 文 題 名

Implementation of GISH (genomic *in situ* hybridization) and DNA marker techniques for *Festulolium* breeding

（GISHおよびDNAマーカー技術のフェストロリウム育種への利用）

フェストロリウム (*Festulolium)*はフェスク(*Festuca*)属とロリウム(*Lolium*)属の属間雑種牧草種である．一般にフェスク属は乾燥耐性や越冬性，越夏性などの環境適応性が高く，ロリウム属は家畜の消化性や嗜好性が高く，初期生長がよい．フェストロリウムは両属の特性を併せ持つ人工牧草種として注目され，世界中で品種育成が行われている．近年，東北地域では余剰水田が問題となっており，その活用として，飼料作物の生産が推奨されている．しかしながら，現時点では水田作に適した牧草種が東北地域にはない．地域の基幹牧草のオーチャードグラス(*Dactylis glomerata* L.)は耐湿性が低く，水田での栽培には向かない．ロリウム属のイタリアンライグラス(*Lolium multiflorum* Lam.)は耐湿性が高いが，越冬性が低いために積雪の多い東北地域での栽培が限定されるとともに，単年利用である．これに対してフェスク属の代表的な牧草種であるトールフェスク（*Festuca arundinacea* Schreb.）やメドウフェスク（*Festuca pratensis* Huds.）は環境適応性が高く多年利用が可能である．そこで，両属の雑種であるフェストロリウムは東北地域での飼料生産に適していると考えられる．本研究では，東北地域におけるフェストロリウムの有用性を確認するとともにフェストロリム育種を効率的に展開するのに有用な育種技術を開発した．

フェストロリウム市販２品種とイタリアンライグラス，ペレニアルライグラス(*Lolium perenne* L.)およびハイブリッドライグラス(*Lolium* × *boucheanum* Kunth)を供試して東北地域における特性を調査した．一年目の越冬性はペレニアルライグラスが高く，イタリアンライグラスが低く，フェストロリウムとハイブリッドライグラスはその中間であった．多年利用することを考えると二年目の越冬性が重要である．二年目の越冬性も同じくペレニアルライグラスが高く，イタリアンライグラスが低かった．ハイブリッドライグラス品種の多くが二年目の越冬性はイタリアンライグラス程度まで下がったのに対し，フェストロリウムの中には二年目も高い越冬性を示した品種がみられた．なお，ペレニアルライグラスは放牧用の草種であるため草丈が低く，採草利用が主である日本での栽培には向かない．これらの結果から，フェストロリウムは東北地域での水田での栽培に適していると考えられた．

フェストロリウムを実際に栽培する上で，問題が二つある．一つは斑点米カメムシの問題でイネ科牧草種は斑点米カメムシの温床となる．先行研究でイタリアンライグラスにおいて，家畜に無害で昆虫には有害な物質を生産するエンドファイト(*Epichloë uncinate*）を人工接種することによ

り，斑点米被害の軽減効果が認められている．そこで，既存のエンドファイト感染イタリアンライグラスをフェストロリウムで戻し交雑する育種を検討した．効率的に戻し交雑を行うにはイタリアンライグラスの自殖個体を除く必要があり，フェスク属とロリウム属を識別できるDNAマーカーを利用した．自殖ではなくフェストロリウム花粉から受精していれば，フェスク属特異的なバンドが後代で出現する．DNAマーカー解析の結果，戻し交雑1回目のF_1世代では，21個体中20個体が自殖ではなくフェストロリウム花粉による受精でF_1個体が得られたと判断された．草勢に優れる6個体のF_1個体を選抜し，2回目の戻し交雑を行い，6母系各40個体，合計240個体のBC_1世代を得た．BC_1世代のDNAマーカー解析では，F_1世代（親世代）ではみられなかった新たなフェスク特異的なバンドを持つ個体を，フェストロリウム花粉による受精で得られたBC_1個体であると判断した．この結果，少なくとも146個体のエンドファイト感染BC_1個体を効率的に育成することができた．

もう一つの問題は，フェストロリウムにおけるゲノムの不安定性である．Genomic *in situ* hybridization (GISH) 法が確立されて以降，多くのフェストロリウム品種・系統のゲノム構成割合が調べられた．その結果，フェスク属側にメドウフェスクを用いた複二倍体型のフェストロリウムにおいては，世代を経る毎にフェスク属ゲノムが減少していく傾向がみられた．牧草の市販種子は少なくとも2回の種子増殖を経るため，増殖している間に育成したフェストロリウム品種から有用なフェスク属由来遺伝子が喪失することが懸念される．先行研究では，育種的な操作の加わった世代間でゲノム割合を比較しており，フェスクゲノムが減少していく現象が育種選抜によるものなのか，別の要因によるものなのかを判断することができなかった．そこで，本研究ではゲノム割合を正確に数値化できるGISH法と画像解析を組み合わせたf ratio（フェスクゲノム割合）法を用いて，育種選抜をしていない世代間でゲノム割合を比較した．最初に，品種間あるいは品種内におけるf ratio変動程度を調べたところ，一つの個体については，4～5枚の染色体画像があれば5ポイント程度の差を検出できること，品種間差については7個体を調べれば10ポイント程度の差を検出できることがわかった．次に育種選抜をしていない実験集団を用いて世代間比較を行った．一般にロリウム属はフェスク属よりも採種量が多いため，フェストロリウムにおいてはf ratioが低い個体ほど採種量が多いことが予想された．採種量の影響を回避するため，本試験では子世代の各母系について同数個体ずつ供試したところ，世代間でf ratioの変動はみられなかった．採種量の差異がフェストロリウムにおいてフェスク属のゲノムが減少していく現象に寄与していることが示唆されたため，先の実験集団を用いて採種量関連形質を調べた．f ratioの高い集団はf ratioの低い集団よりも採種量，登熟率，発芽率ともに低かった．また，これらの採種量関連形質を元に孫世代のf ratioを推定すると，f ratioの高い集団は1ポイント，f ratioの低い集団は0.2ポイント，両集団を合わせると2ポイント低下することがわかった．一方で，f ratioを40%程度まで下げれば，フェスク属ゲノムの減少が収まる傾向がみられた．

以上，フェストロリウムは飼料作物として東北地域の余剰水田での栽培が期待でき，斑点米カメムシ対策については，DNAマーカーを用いた効率的な選抜でエンドファイト感染品種を育成でき，ゲノムの不安定性については，GISH法と画像解析を組み合わせて算出するf ratioを40%程度まで下げることで抑えられることを示した．今後，本研究で開発されたGISH法やDNAマーカー技術を利用することにより，東北地域に適したフェストロリウム品種が育成されることが期待できる．