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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士（環境科学）　　氏 名 久保田 明人

審査委員　主査　准教授　星 野 洋一郎
副査　教 授　荒 木 肇
副査　教 授　露 崎 史 朗
副査　教 授　山 田 敏 彦（大学院国際資源科学）
副査　教 授　貴 島 祐 治（大学院農学研究科）
副査　講 師　小野寺 康 之（大学院農学研究科）

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，越夏性などの環境ストレス耐性が高いが，家畜の消化性や嗜好性に劣る，逆に，ロリウム属は，家畜の消化性や嗜好性が高く，初期生長はよいが，環境ストレス耐性に劣る．そのため，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．フェストロリウムは東北地域での水田での飼料生産に適していると考えられる．そこで，本研究では，フェストロリウムの東北地域で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．

フェストロリウムとイタリアンライグラス（*Lolium multiflorum*），ペレニアルライグラス（*Lolium perenne*）およびハイブリッドライグラス（*Lolium* × *boucheanum*）を供試して東北地域における特性を調査した．フェストロリウムは，重要な形質である越冬性に関して，ペレニアルライグラスよりやや劣るものの，水田でよく栽培されるイタリアンライグラスよりは，越冬性に優れた．ペレニアルライグラスは放牧用草種で草丈が低く，採草利用が主である日本での飼料作物栽培には向かないので，フェストロリウムは東北地域での水田での栽培に期待できると考えられた．

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マーカー利用を検討した．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ため，戻し交雑とマーカー解析を行い，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(*Festuca pratensis*)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．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，世代間でゲノム割合を比較した．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．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，その採取量の差異がフェストロリウムにおける種子増殖過程で，フェスク属のゲノムが減少していく要因であることを明らかにできた．また，採種量関連形質の調査から，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の高い集団はフェスク属ゲノムの減少が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，東北地域に適したレジリエントなフェストロリウム品種が育成されることが期待できる．よって，申請者は博士（環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した．