

略 号

畜草研研報

Bull NARO Inst Livest
Grassl Sci

ISSN:1347-0825
CODEN:CSKKCS



Bulletin of NARO Institute of Livestock and Grassland Science



第14号 (No.14) 平成26年3月 -March2014-

**NARO Institute
of Livestock and
Grassland Science
(NILGS)**

Ibaraki, Japan

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所

畜産草地研究所編集委員会
Editorial Board

所長
Director-General

土肥宏志
Hiroshi DOHI

草地研究監
Director, Grassland Research

大同久明
Hisaaki DAIDO

編集委員長
Editor-in-Chief

竹中昭雄
Akio TAKENAKA

副編集委員長
Deputy Editor

吉田信代
Nobuyo YOSHIDA

編集委員
Associate Editor

小迫孝実
Takami KOSAKO

間野吉郎
Yoshiro MANO

秋山典昭
Fumiaki AKIYAMA

手島茂樹
Shigeki TEJIMA

浦川修司
Shuji URAKAWA

平子誠
Makoto HIRAKO

森岡理紀
Riki MORIOKA

野村将
Masaru NOMURA

畜産草地研究所研究報告

第14号 (平成26年3月)

目次

原著論文

- 日本の公的機関におけるトウモロコシ (*Zea mays* L.) 育種のためのゲノムワイドセレクションに関する研究：親自殖系統群内に見られた一塩基多型 (英文)
..... 玉置宏之・松本敏美・三ツ橋昇平・
奥村直彦・黄川田智洋・佐藤 尚..... 1
- 「シバ中間母本農1号」の育成
..... 小林 真・蝦名真澄・高溝 正・霍田真一.....13
- 飼料タンパク質の給与水準と第一胃分解性の違いが泌乳牛の尿量に及ぼす効果
..... 大谷文博・樋口浩二・小林洋介・野中最子.....23

BULLETIN OF
NARO INSTITUTE OF
LIVESTOCK AND GRASSLAND SCIENCE

No.14 (March2014)

CONTENTS

Research Papers

- Hiroyuki TAMAKI, Toshimi MATSUMOTO, Shohei MITSUHASHI, Naohiko OKUMURA,
Tomohiro KIKAWADA and Hisashi SATO :
A Study on 'Genomewide Selection' for Maize (*Zea mays* L.) Breeding in Japanese Public
Sectors: Single Nucleotide Polymorphisms Observed among Parental Inbred Lines 1
- Makoto KOBAYASHI, Masumi EBINA, Tadashi TAKAMIZO and Shin-ichi TSURUTA :
Breeding of "Japanese Lawngrass Intermediate Parent Nou 1" 13
- Fumihiro OHTANI, Kouji HIGUCHI, Yousuke KOBAYASHI and Itoko NONAKA :
The Effects of Dietary Protein Level and Rumen Degradability on Urine Volume in Lactating
Dairy Cows 23

A Study on 'Genomewide Selection' for Maize (*Zea mays* L.) Breeding in Japanese Public Sectors: Single Nucleotide Polymorphisms Observed among Parental Inbred Lines

Hiroyuki TAMAKI, Toshimi MATSUMOTO¹, Shohei MITSUHASHI, Naohiko OKUMURA²,
Tomohiro KIKAWADA^a and Hisashi SATO

Forage Crop Research Division,
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Nasushiobara, 329-2793 Japan

¹ National Institute of Agrobiological Science, Tsukuba, 305-8602 Japan

² Japan Association for Techno-innovation in Agriculture, Forestry and Fisheries (JATAFF) Institute,
Tsukuba, 305-0854 Japan

Abstract

Recent rapid decrease of the cost for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs) has enabled maize (*Zea mays* L.) breeders in Japanese public sectors to introduce such molecular breeding techniques as 'genomewide selection (GwS)'. It has been found in the previous simulation study by the authors that GwS can be a powerful tool to accelerate yield improvement if molecular markers can be arranged over the whole genome at intervals of 20 cM or shorter. The purpose of this study was to discover SNPs of maize parental inbred lines developed in Japanese public sectors to conduct GwS in the future. Here 38 individuals from 32 inbred lines, all but one of which had been developed in Japanese public sectors, were genotyped on up to 56110 SNP loci over the whole genome. The results (1) are thought reliable on the whole because they mostly accord with those having been obtained in the past studies and with the breeding records, (2) have shown that sufficient SNP markers can be arranged to conduct GwS, and (3) that some inbred lines have many and/or large unfixed genome regions, suggesting the necessity to revise the assumption having been made in the previous simulation study by the authors that the intra-inbred-line polymorphisms can be negligible.

Key words: genomewide selection, maize breeding, molecular marker, single nucleotide polymorphism

Introduction

There are concerns in Japan on the difficulties in ensuring long-term food supply, which makes the Japanese government promote a policy to raise the food self-sufficiency. A primary measure for this goal is to raise the feed self-sufficiency rate from 26 (in 2008) to 38%¹¹⁾. Japanese public sectors are now

expected to support the policy through breeding high-yield maize (*Zea mays* L.) varieties for silage use that are highly adapted to the Japanese climates.

Molecular breeding techniques including quantitative trait locus (QTL) analysis²²⁾ and association mapping²⁵⁾ have widely been applied to maize because of its simple genome construction and economic importance⁶⁾. It has been, however,

substantially impossible for maize breeders in Japanese public sectors to introduce some of such techniques because they have not had so much information on molecular marker polymorphisms covering the whole genome of their materials as required in these techniques. But this situation has rapidly been changed in these few years; the cost for detecting single nucleotide polymorphisms (SNPs) has drastically been decreased²³⁾, which has enabled maize breeders in Japanese public sectors to explore SNPs over their materials and to introduce some molecular breeding techniques.

The purpose of this study was to discover SNPs over the whole genome of parental inbred lines (hereafter they are simply called inbred lines) developed in Japanese public sectors to conduct 'genomewide selection (GwS)' in the future. GwS is a molecular breeding technique whose details are explained with its concept in Bernardo *et al.*¹⁾ and Meuwissen *et al.*¹²⁾. GwS is thought advantageous for maize breeders in Japanese public sectors interested in accelerating yield improvement, because its focus is on accumulating favorable genes in many minor QTLs whereby yield is thought controlled²⁴⁾, and because it can be started from a biparental population, i.e. with molecular marker information on a small number of inbred lines. In the previous study by the authors²⁰⁾, computer simulations have been made on the assumption that a training population for GwS is developed from a three-way cross $(D_1 \times D_2) \times F_T$, where a new inbred line having high combining ability (i.e. yield) toward a specific flint tester inbred line F_T is developed from a biparental crossing between dent inbred lines D_1 and D_2 . The simulations have shown that GwS can be a powerful tool to accelerate yield improvement if the following two conditions are fulfilled; i.e. (1) if molecular markers can be arranged over the whole genome at intervals of 20 cM or shorter, and (2) if the heritability in the training population is 25% or more. In this study the authors have focused on the former condition; discussion will be made especially in terms of the feasibility to conduct GwS with sufficient SNP markers detected in this study.

Materials and Methods

Plant materials

Shown in Table 1 are the 38 individuals from 32 inbred lines whose SNPs were explored in this study. All inbred lines but 'B73', a public line of U.S. widely regarded as the standard¹⁷⁾, have been developed in Japanese public sectors; i.e. National Agriculture and Food Research Organization (NARO) Hokkaido Agricultural Research Center (NARO/HARC), Nagano Animal Industry Experiment Station (NAIES), NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center (NARO/KARC) or NARO Institute of Livestock and Grassland Science (NARO-ILGS). Their seeds were provided from the stocks in NARO-ILGS for breeding experiments. The 31 lines can be classified into three groups in terms of their genetic background (they are hereafter called genetic groups); dent mainly derived from U.S. corn-belt dent (MD, 12 lines), semi-dent mainly developed from hybrids for summer seeding (RD, 5 lines) and flint mainly derived from Japanese landraces (JF, 14 lines). The numbers from 33 to 38 in Table 1 are the second individuals of the six inbred lines, 'Mi29', 'Mi88' and 'Na71' in MD, 'Mi62' in RD and 'Na50' and 'Na101' in JF, to examine the extent of intra-inbred-line polymorphisms. Their seeds are provided from the same seed lots of the first individuals.

DNA preparation

A part of a fresh leaf (about 1g) of each individual (seedling) growing in a greenhouse of NARO-ILGS was cut by scissors, frozen with liquid nitrogen, and milled with 'Multi-beads shocker®', manufactured by Yasui Kikai Corporation (Osaka, Japan), for 6 times (each time consists of an operation for 5 seconds at 1000 rpm) in the frozen condition. After 300 μ l of 'PrepMan® Ultra Reagent', manufactured by Life Technologies Corporation (Carlsbad, CA, U.S.), was added to the milled leaf, the mixture was moved to a 1.5-mL Eppendorf® tube, and the tube was kept in boiling water for 10 minutes. After the stock was cooled down to room temperature, it was processed with protease (incubated in 37 degree centigrade for 60 minutes), and then the DNA was

purified with the procedures consisting of extraction with Tris-buffered 50% phenol, 48% chloroform, 2% isoamyl alcohol solution (in the second time and afterward, it was substituted with chloroform), ethanol precipitation, and dissolution in TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5 and 1 mM EDTA). The procedures repeated for up to four times until each DNA solution exceeded 1.75 in the ratio of absorbance at 260 to 280 nm. After the purification, the density of DNA was adjusted to 50 ng μl^{-1} with the TE buffer.

SNP analysis

The SNP analysis was made with the combination of products manufactured by Illumina Inc. (San Diego, CA, U.S.), ‘MaizeSNP50 BeadChip’ and an analyzing system including the software ‘GenomeStudio’, which genotypes up to 56110 SNP loci of maize over its whole genome at once. The datasheet and the manifest file (including the list of the SNP loci) of the BeadChip are in the website of Illumina, http://res.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_maize_snp50.pdf and http://supportres.illumina.com/documents/downloads/productfiles/maizesnp50/maizesnp50_a.csv, respectively (both sites were cited on January 24th, 2014). Although ‘GenomeStudio’ allows operators to adjust the setting for judging genotypes on each SNP locus manually, the authors fully followed the automatic judgment made by the software in this study.

Dendrogram drawing

A dendrogram was drawn based on the results to investigate in whether they would accord with the past similar studies and/or our breeding records, i.e. to evaluate their reliability, because the authors thought that it was necessary to verify them prior to the discussion on the primary purpose of this study, the SNPs obtained with the products. The methods adopted for the drawing were mostly equivalent to Enoki *et al.*⁸⁾ where the genetic similarity (GS) of maize inbred lines developed in Japanese public sectors had been investigated with simple sequence repeat (SSR) markers; i.e. adopted here were the unweighted pair group method with arithmetic mean

(UPGMA) and the computation presented by Dice⁵⁾ and Nei *et al.*¹⁵⁾. On the other hand, the following two slight modifications were made in this study; (1) that genetic distance (GD) was adopted instead of GS, both of which can be converted to each other with the equation that $\text{GD}=1-\text{GS}$, and (2) that a combination of a heterozygous genotype “AB” with homozygous “AA” or “BB” was counted as 0.5, which had not been considered in the past study with SSR markers.

Highly distinguishable SNP loci within a genetic group

SNP loci were examined on the ability to distinguish inbred lines within a genetic group i.e. on the potential usefulness in GwS. Let us assume here that N inbred lines ($N \geq 2$), all of which belong to a genetic group G , were genotyped, and that numbers of inbred lines genotyped as “AA” and “BB” are a and b ($0 < (a+b) \leq N$), respectively, in an SNP locus L . In this case, D is calculated from the following equation

$$D(L, G) = \frac{ab}{C_2^N} \dots (1)$$

where C_2^N is the number of all possible pairs made in G . If $D > 0.45$, L is judged as a ‘highly distinguishable locus’ in G . The threshold 0.45 has been set based on that D exceeds it if N is between 5 (in RD) and 14 (in JF), if all inbred lines are successfully genotyped as “AA” or “BB”, and if the ratio of a to b is between 1:2 and 2:1. In other words, D is lower than the threshold and then the SNP locus is not judged highly distinguishable if genotyping has been failed in one (in RD) or two (in MD and JF) inbred line(s) of the relevant group, or if the genotypes are extremely one-sided to “AA” or “BB”.

Intra-inbred-line polymorphic loci

In examining the intra-inbred-line polymorphisms, an SNP locus was regarded polymorphic in the relevant inbred line if at least one of the two individuals had been genotyped heterozygous or if they had been genotyped differently (i.e. combinations of “AA” and “BB”). Combinations of homozygous and unidentified genotypes were not regarded polymorphic.

After identification of intra-inbred-line

polymorphic loci, their ratio was computed in each genome region. A genome region was defined to consist of 500 (a somewhat different number in the end of each chromosome) ‘polymorphic and reliable loci’ that, according to the SNP list in the website of Illumina, could be regarded consecutive on a single chromosome. See Results and Discussion for the detailed definition of ‘polymorphic and reliable loci’.

Results and Discussion

The SNP information was thought reliable

Two indices are often used to evaluate the results of SNP genotyping with the products of Illumina; one is ‘Call Rate’, the ratio of SNP loci successfully genotyped for each sample, and the other is ‘GenTrain Score’ to evaluate the confidence of the genotyping for one SNP on all samples^{2,4)}. The Call Rates exceeded 0.9 in all samples (Table 1),

from which it was concluded that no materials need to be excluded, considering that many studies in the past have abandoned samples only if they are below 0.9^{10,18)}.

GenTrain Scores of the 56110 SNP loci ranged in this study from zero to 0.993. The scores of 12231 loci were below 0.7, which authors screened out, considering that studies in the past including Han *et al.*⁹⁾ and Namjou *et al.*¹⁴⁾ on human (*Homo sapiens* L.) as well as Pasam *et al.*¹⁶⁾ on barley (*Hordeum vulgare* L.) adopt this value as the threshold. In addition, another 4561 loci were excluded because the software judged that more than 10% of the materials successfully genotyped on the loci were heterozygous (such high frequency of heterozygosity was thought unrealistic because all of the materials were inbred lines and because almost all of their neighboring loci seemed fixed), or because no polymorphisms could be detected among the 32 inbred

Table 1. The parental inbred lines whose single nucleotide polymorphisms (SNPs) were examined in this study and their ‘Call Rate’

Developed in †	No.	Name	Group‡	CR§	Developed in †	No.	Name	Group‡	CR§
(U.S.)	1	B73	-	.986	NARO-ILGS	21	Na50	JF	.950
NARO/HARC	2	Ho95	JF	.954	22	Na65	MD	.961	
	3	Ho102	MD	.957	23	Na71	MD	.957	
	4	Ho104	MD	.959	24	Na91	MD	.934	
	5	Ho110	MD	.955	25	Na96	JF	.942	
	6	Ki66	MD	.962	26	Na99	MD	.942	
NAIES	7	Ki68	JF	.944	27	Na101	JF	.947	
	8	Ki70	MD	.962	28	Na102	MD	.963	
	9	Ki74	MD	.960	29	Na103	JF	.945	
	10	Ki75	JF	.948	30	Na104	JF	.948	
NARO/KARC	11	Mi29	MD	.956	31	N09-07	JF	.932	
	12	Mi47	JF	.949	32	N10-03	JF	.945	
	13	Mi62	RD	.952	NARO/KARC	33	Mi29¶	MD	.945
	14	Mi71	RD	.957	34	Mi62¶	RD	.940	
	15	Mi88	MD	.949	35	Mi88¶	MD	.956	
	16	Mi91	RD	.945	NARO-ILGS	36	Na50¶	JF	.931
	17	Mi93	RD	.947	37	Na71¶	MD	.949	
	18	Mi103	JF	.930	38	Na101¶	JF	.943	
	19	Mi106	RD	.960					
	20	Mi111	JF	.951					

† NARO/HARC, NAIES, NARO/KARC and NARO-ILGS are the abbreviations of NARO Hokkaido Agricultural Research Center, Nagano Animal Industry Experiment Station, NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center and NARO Institute of Livestock and Grassland Science, respectively.

‡ JF, MD and RD indicate flint mainly derived from Japanese landraces, dent mainly derived from U.S. corn-belt dent, and semi-dent mainly derived from hybrids for summer seeding, respectively.

§ Means ‘Call Rate’, the ratio of SNP loci successfully genotyped for each sample.

¶ The second individuals for examining intra-inbred-line polymorphisms.

lines. Therefore further analyses were made with the remaining 39318 loci that were judged polymorphic and reliable. On the SNP list of Illumina are the chromosomes of 35508 loci out of the 39318, and the coordinates of 35424 loci out of the 35508. Based on these 35424 loci will be discussed the intra-inbred-line polymorphisms in each genome region (Table 2).

The dendrogram based on the polymorphisms observed in the 39318 SNP loci (Fig. 1) mostly accords with the breeding records and/or the past studies, including that the genetic distances among the three genetic groups, MD, RD and JF, are roughly equivalent¹³⁾, that ‘Ho102’ has been developed from a crossing including ‘Mi29’, and that ‘N09-07’ and ‘Mi111’ have been developed from the same random-mating population. Therefore the authors concluded that the results were reliable on the whole (though it seems to have some errors), and that they would help the maize breeders in Japanese public sectors promote molecular breeding in the future.

The only discrepancy between the results in this study and those in the past is that the American public line ‘B73’ is very distantly located from MD group, to which it was assumed to belong. This seems to reflect the policy of the manufacturer in designing the BeadChip; the datasheet in the website of Illumina mentions that it has approximately 4000 SNPs that will less perform in other samples than in

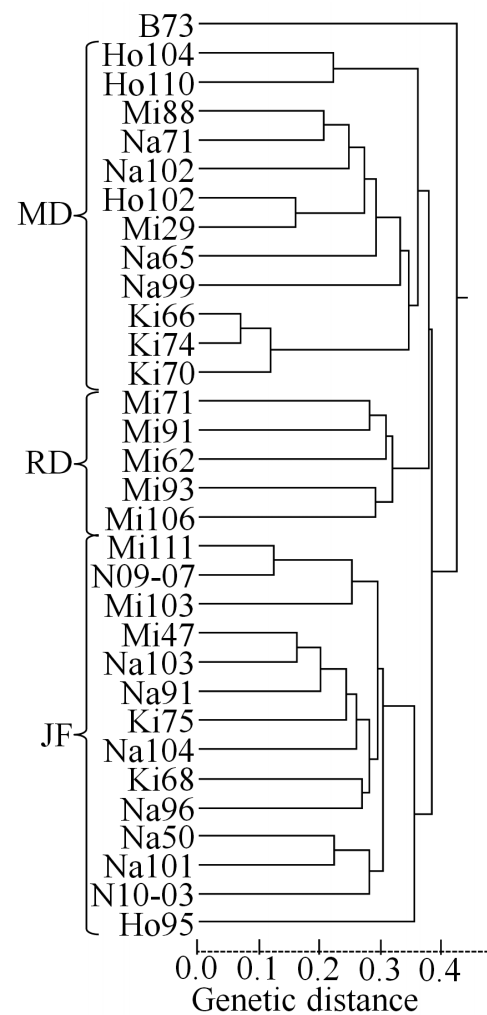


Fig. 1. The dendrogram of the 32 inbred lines drawn based on the genetic distance (GD) having been calculated from the single nucleotide polymorphisms (SNPs) detected in this study

Table 2. The SNP loci adopted for the analyses in this study

Description	Numbers
Total† (a)	56110
GenTrain Score‡ < 0.7 (b)	12231
GenTrain Score‡ ≥ 0.7 but frequency of heterozygosity§ > 0.1 (c)	457
GenTrain Score‡ ≥ 0.7 but no polymorphisms found among all inbred lines (d)	4104
SNP loci with which further analyses were made in this study (e)=(a)-(b)-(c)-(d)	39318
SNP loci in (e) whose chromosomes are identified on the SNP list of Illumina (f)	35508
SNP loci in (f) whose coordinates are identified on the SNP list of Illumina	35424

† Total SNPs that can be detected with a product of Illumina, ‘MaizeSNP50 BeadChip’.

‡ See the text for its definitions.

§ See the text for the detailed reason why these SNP loci were excluded.

this inbred line regarded as the most standard and having been used as the materials of various genetic analyses in the past^{3,7)}. In this study, the number of SNP loci unique to ‘B73’ was 481, three and 12 times as large as the second largest ‘Ho95’ (158) and the average of another 31 materials (39.4), respectively.

Sufficient SNPs over the whole genome

As mentioned above, the previous simulation study by the authors²⁰⁾ has shown that an important key to the success of GwS is to arrange molecular markers at intervals of 20 cM or shorter. Considering the whole genome size is about 1800 cM¹⁾, it means that more than 90 molecular markers should be arranged over the genome. Therefore the primary purpose of this study was to discover many “highly distinguishable SNP loci” i.e. SNPs which can efficiently distinguish inbred lines within a genetic group. It has been found that the numbers of such SNP loci are 7787 (in JF) or more, and that those per cM are 1.94 or more (Table 3. The information on the length of each chromosome in cM is based on the web page <http://www.maizegdb.org/cgi-bin/displaycompletemaprecord.cgi?id=1203637>, to which the previous simulation study by the authors has also referred). The authors have concluded from these results that sufficient SNP markers can be arranged over the whole genome for Japanese public sectors to conduct GwS.

The datasheet in the website of Illumina suggests that little attention has been paid to Japanese germplasms in choosing the 56110 SNP loci. But the products provided in this study not only more than 39000 polymorphic loci in total but also more than 7700 highly distinguishable loci within the genetic group mainly originated from Japanese landraces. These results suggest that the products have the potential to bring sufficient information on the polymorphisms within another genetic group of maize to which molecular approaches have never been made.

Many and/or large unfixed genome regions in some inbred lines

The averaged heterozygosity rates of the six inbred lines whose intra-inbred-line polymorphisms were examined in this study ranged from 0.05 (Na71) to 2.76% (Mi62) (Table 4), which seem similar to those of ‘B73’ and ‘Mol7’ (another standard inbred line in U.S.) indicated on the datasheet in the website of Illumina, 0.32 and 2.50%, respectively.

The ratio of polymorphic loci between two individuals belonging to the same inbred line ranged from 0.09 (Na71) to 4.28% (Mi62) (Table 4). The more important for the authors interested in introducing GwS is that the polymorphic loci seem to concentrate in some genome regions (Fig. 2). Inbred lines have been developed in Japanese public sectors

Table 3. Numbers of ‘highly distinguishable SNP loci’ within each genetic group and those per cM in each chromosome

Chromosome number (top) and length (bottom, in cM) ‡	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total†
MD§ Numbers¶	1584	494	1324	1137	1478	881	1023	1281	780	804	11804
Numbers¶ per cM	5.54	2.70	6.27	6.02	8.54	6.08	6.47	8.01	4.76	5.91	
RD§ Numbers¶	1227	449	1143	1177	1168	901	707	962	515	795	9859
Numbers¶ per cM	4.29	2.45	5.42	6.23	6.75	6.21	4.47	6.01	3.14	5.85	
JF§ Numbers¶	1080	355	1187	1081	693	557	459	654	542	452	7787
Numbers¶ per cM	3.78	1.94	5.63	5.72	4.01	3.84	2.91	4.09	3.30	3.32	

† The numbers of total SNP loci do not accord with those summed up on all 10 chromosomes because the carrying chromosomes have not been identified in some SNP loci.

‡ The length of each chromosome in cM has been quoted from the website <http://www.maizegdb.org/cgi-bin/displaycompletemaprecord.cgi?id=1203637>

§ JF, MD and RD indicate flint mainly derived from Japanese landraces, dent mainly derived from U.S. corn-belt dent, and semi-dent mainly derived from hybrids for summer seeding, respectively.

¶ Numbers of ‘highly distinguishable SNP loci’. See the text for their definition.

through repeated selfing for five or six times^{19,21)}. The results shown in this study suggest that some genome regions have remained unfixed during the procedures of repeated selfing. Some inbred lines have been found to have large and/or many unfixed genome regions, suggesting the necessity to revise the assumption having been made in the previous simulation study by the authors²⁰⁾ that the intra-inbred-line polymorphisms can be negligible. In addition, the supposition of unfixed genome regions in inbred lines will make the choice of molecular markers for GwS more complicated. In the case mentioned in Introduction where the training population has been developed from a three-way cross ($D_1 \times D_2$) $\times F_T$, heterozygous loci on F_T must be avoided to distinguish genotypes of individuals in the training

population accurately, i.e. careful consideration will be required in choosing marker loci in the genome regions that have remained unfixed in F_T . On the other hand, such unfixed genome regions may raise the efficiency of yield improvement. Again in the case mentioned in Introduction, let us assume a genome region where the inbred lines D_1 and D_2 have been unfixed and fixed, respectively. As shown in Fig. 3, two and one candidate genome regions from D_1 and D_2 , respectively, i.e. three candidates in total, can accurately be distinguished by two marker loci in a haplotype. It means that breeders can select the best candidate from the three, which may be better than the selection from two in the case both D_1 and D_2 have been fixed.

Table 4. Heterozygosity rate and ratio of intra-inbred-line polymorphic loci of the six inbred lines

Name (genetic group) †	Heterozygosity rate‡	Ratio of ‘intra-inbred-line polymorphic loci’§
Mi29(MD)	.0007	.0011
Mi62(RD)	.0276	.0428
Mi88(MD)	.0093	.0191
Na50(JF)	.0016	.0020
Na71(MD)	.0005	.0009
Na101(JF)	.0154	.0172

† JF, MD and RD indicate flint mainly derived from Japanese landraces, dent mainly derived from U.S. corn-belt dent, and semi-dent mainly derived from hybrids for summer seeding, respectively.

‡ The ratio of heterozygous loci to the ‘polymorphic and reliable loci (see the text for their definition)’ successfully genotyped in the relevant individual. Shown is the average of two individuals each.

§ See the text for their definition.

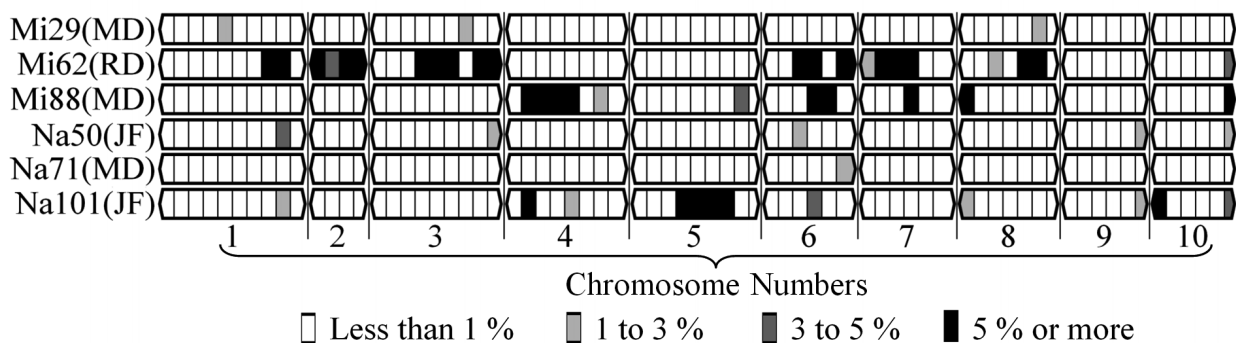
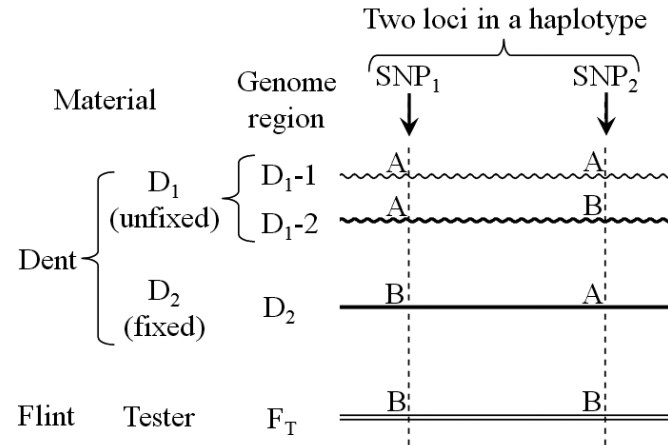


Fig. 2. The ratio of intra-inbred-line polymorphic loci in each genome region (see the text for the definitions) of the six inbred lines



SNP ₁	SNP ₂	Genotype*
AB	AB	D ₁ -1/F _T
AB	BB	D ₁ -2/F _T
BB	AB	D ₂ /F _T

*Genotype in the relevant genome region.

Fig. 3. A typical model to genotype individuals of a training population developed from a three-way cross (D₁ × D₂) × F_T in a certain genome region where D₁ and D₂ have been unfixed and fixed, respectively

References

- Bernardo, R. and Yu, J. (2007). Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize, *Crop Sci.*, 47, 1082-1090.
- Butler, H. and Ragoussis, J. (2008). BeadArray-based genotyping. In *Genomics Protocols* (Ed. Starkey, M. and Elasarapu, R.), 53-74, Humana Press, New York
- Cañas, R.A., Amiour, N., Quilleré, I. and Hirel, B. (2010). An integrated statistical analysis of the genetic variability of nitrogen metabolism in the ear of three maize inbred lines (*Zea mays* L.), *J. Exp. Bot.*, 62, 2309-2318.
- Deulvot, C., Charrel, H., Marty, A., Jacquin, F., Donnadiou, C., Lejeune-Hénaut, I., Burstin, J. and Aubert, G. (2010). Highly-multiplexed SNP genotyping for genetic mapping and germplasm diversity studies in pea, *BMC Genomics*, 11, 468.
- Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species, *Ecology*, 26, 297-302.
- Eathington, S.R., Crosbiea, T.M., Edwardsb, M.D., Reiterc, R.S. and Bull, J.K. (2007). Molecular markers in a commercial breeding program, *Crop Sci.*, 47 (Supplement 3), S154-S163.
- Eichten, S.R., Foerster, J.M., de Leon, N., Kai, Y., Yeh, C.T., Liu, S., Jeddelloh, J.A., Schnable, P.S., Kaeppeler, S.M. and Springer N.M. (2011). B73-Mol7 near-isogenic lines demonstrate dispersed structural variation in maize, *Plant Physiol.*, 156, 1679-1690.
- Enoki, H., Sato, H., and Koinuma, K. (2002). SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japan, *Theor. Appl. Genet.*, 104, 1270-1277.

- 9) Han, S., Kim-Howard, X., Deshmukh, H., Kamatani, Y., Viswanathan, P., Guthridge, J.M., Thomas, K., Kaufman, K.M., Ojwang, J., Rojas-Villarraga, A., Baca, V., Orozco, L., Rhodes, B., Choi, C.B., Gregersen, P.K., Merrill, J.T., James, J.A., Gaffney, P.M., Moser, K.L., Jacob, C.O., Kimberly, R.P., Harley, J.B., Bae, S.C., Anaya, J.M., Alarcón-Riquelme, M.E., Matsuda, K., Vyse, T.J. and Nath, S.K. (2009). Evaluation of imputation-based association in and around the integrin- α -M (ITGAM) gene and replication of robust association between a non-synonymous functional variant within ITGAM and systemic lupus erythematosus (SLE), *Hum. Mol. Genet.*, 18, 1171-1180.
- 10) Harlizius, B., Lopes, M.S., Duijvesteijn, N., van de Goor, L.H.P., van Haeringen, W.A., Panneman, H., Guimarães, S.E.F., Merks, J.W.M. and Knol, E.F. (2011). A single nucleotide polymorphism set for paternal identification to reduce the costs of trait recording in commercial pig breeding, *J. Anim. Sci.*, 89, 1661-1668.
- 11) MAFF (2011). Fiscal Year 2010 Annual Report on Food, Agriculture and Rural Areas in Japan -Summary, 1-56, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan
- 12) Meuwissen, T.H.E., Hayes, B.J. and Goddard, M.E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps, *Genetics*, 157, 1819-1829.
- 13) Muraki, M., Enoki, H., Cai, H.W., Yuyama, N. and Komatsu, T. (2010). Classification of maize (*Zea mays* L.) parental lines for the Japanese warm regions by profiling, *Grassl. Sci.*, 56(b), 91 (in Japanese).
- 14) Namjou, B., Sestak, A.L., Armstrong, D.L., Zidovetzki, R., Kelly, J.A., Jacob, N., Ciobanu, V., Kaufman, K.M., Ojwang, J.O., Ziegler, J., Quismorio, F. Jr., Reiff, A., Myones, B.L., Guthridge, J.M., Nath, S.K., Bruner, G.R., Mehrian-Shai, R., Silverman, E., Klein-Gitelman, M., McCurdy, D., Wagner-Weiner, L., Nocton, J.J., Putterman, C., Bae, S.C., Kim, Y.J., Petri, M., Reveille, J.D., Vyse, T.J., Gilkeson, G.S., Kamen, D.L., Alarcón-Riquelme, M.E., Gaffney, P.M., Moser, K.L., Merrill, J.T., Scofield, R.H., James, J.A., Langefeld, C.D., Harley, J.B. and Jacob, C.O. (2009). High-density genotyping of STAT4 reveals multiple haplotypic associations with systemic lupus erythematosus in different racial groups, *Arthritis and Rheum.*, 60(4), 1085-1095.
- 15) Nei, M. and Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273.
- 16) Pasam, R.K., Sharma, R., Malosetti, M., van Eeuwijk, M.F.A., Haseneyer, G., Kilian, B. and Graner, A. (2012). Genome-wide association studies for agronomical traits in a world-wide spring barley collection, *BMC Plant Biol.*, 12, 16.
- 17) Ramakrishna, W., Emberton, J., Ogden, M., SanMiguel, P. and Bennetzen, J.L. (2002). Structural analysis of the maize Rp1 complex reveals numerous sites and unexpected mechanisms of local rearrangement, *Plant Cell*, 14, 3213-3223.
- 18) Satake, W., Nakabayashi, Y., Mizuta, I., Hirota, Y., Ito, C., Kubo, M., Kawaguchi, T., Tsunoda, T., Watanabe, M., Takeda, A., Tomiyama, H., Nakashima, K., Hasegawa, K., Obata, F., Yoshikawa, T., Kawakami, H., Sakoda, S., Yamamoto, M., Hattori, N., Murata, M., Nakamura, Y. and Toda, T. (2009). Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease, *Nature Genet.*, 41, 1303-1307.
- 19) Sendo, S. (1998). Corn, In *Plant Breeding in Hokkaido* (Ed. Sanbuichi, T.), 219-244, Hokkaido Kyodo Kumiai Tsushin-sha, Sapporo, Japan (in Japanese)
- 20) Tamaki, H., Sato, H., Kikawada, T. and Mitsuhashi, S. (2012). Preliminary study on 'genomewide selection' for maize (*Zea mays* L.) breeding in Japanese public sectors: Estimated selection response in the first selfing cycle of single-cross progeny, *Grassl. Sci.*, 58, 20-27.
- 21) Tozawa, H. (2005). *Corn - History, Culture, Feature, Cultivation, Processing and Utilization*, Nosan Gyoson Bunka Kyokai, Tokyo, Japan (in Japanese)

- 22) Tuberosa, R. and Salvi, S. (2008). QTL for agronomic traits in maize production, In Handbook of Maize: Its Biology (Ed. Bennetzen, J. and Hake, S.), 501-541, Springer, New York.
- 23) Yan, J., Yang, X., Shah, T., Sánchez-Villeda, H., Li, J., Warburton, M., Zhou, Y., Crouch, J.H. and Xu, Y. (2010). High-throughput SNP genotyping with the GoldenGate assay in maize, Mol. Breed., 25, 445-451.
- 24) Yu, J. and Buckler, E.S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize, Curr. Opin. in Biotech., 17, 155-160.
- 25) Yu, J., Holland, J.B., McMullen, M.D. and Buckler, E.S. (2008). Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize, Genetics, 178, 539-551.

日本の公的機関におけるトウモロコシ (*Zea mays* L.) 育種のためのゲノムワイドセレクションに関する研究：親自殖系統群内に見られた一塩基多型

玉置宏之・松本敏美¹・三ツ橋昇平・奥村直彦²・黄川田智洋^a・佐藤尚

農研機構畜産草地研究所 飼料作物研究領域, 那須塩原市, 329-2793

¹ 農業生物資源研究所, つくば市, 305-8602

² 農林水産先端技術研究所, つくば市, 305-0854

摘 要

一塩基多型 (SNP) の検知に要する費用が近年大きく減少したことにより, 飼料用トウモロコシ (*Zea mays* L.) の育種を担当する日本の公的機関もゲノムワイドセレクション (GwS) の様な分子育種技術の導入が可能になりつつある。前報で著者らはコンピューター・シミュレーションを用い, 分子マーカーをゲノム全体に渡って 20 センチモルガン (cM) 以下の間隔で配置できれば, トウモロコシの収量性の改良を加速させる上で GwS が有効であることを示した。本研究の目的は, 将来における GwS の実施を視野に, 日本の公的機関で育成されたトウモロコシ自殖親系統群内における SNP の発見であった。この目的を達するため, 32 自殖親系統 (うち 31 が日本の公的育種機関の育成) 38 個体について, 最大 56110SNP 遺伝子座のジェノタイプピングを試みたところ, 以下の結果を得た。(1) 将来の GwS 実施に十分な数の SNP が発見された。(2) 得られた結果を基に描かれた系統樹が過去の育種記録や既往の知見とほぼ一致した。(3) その一方, 2 個体をジェノタイプピングした 6 自殖親系統の一部において多数または広大な未固定ゲノム領域が発見された。以上のことから, 本研究により得られた結果は高い信頼性を有する一方, 「自殖親系統内の多型は無視できるほど小さい」とした前報のシミュレーションにおける前提条件は, 実際の GwS においては見直す必要があると考えられた。

キーワード: ゲノムワイドセレクション, トウモロコシ育種, 分子マーカー, 一塩基多型

^a 現 農研機構北海道農業研究センター

「シバ中間母本農1号」の育成

小林真*・蝦名真澄*・高溝正・霍田真一^a

農研機構畜産草地研究所 飼料作物研究領域, 那須塩原市, 329-2793

要 約

遺伝的に不均一な市販シバ (*Zoysia japonica* Steud.) 種子約1万粒から組織培養適性に優れた系統を選抜し、栄養繁殖性品種「シバ中間母本農1号」として2009年に品種登録(第18204号)した。本品種には直立茎の生長点から誘導したカルの再分化能が高い特長があるため、種子由来カルスと異なって遺伝的背景が明瞭かつ均一なカルスおよび再分化植物体を得られ、再現性の高い遺伝子組換え実験が可能である。モデル実験では再分化植物における β -glucuronidase 遺伝子の形質転換がPCRによって、発現が染色によってそれぞれ確認された。形態的特性では葉長・葉幅・出穂茎の太さ・小穂数は大であるが、匍匐茎の密度・長さは小であり、生育特性では初期生育・春の草勢・秋の草勢・さび病抵抗性に劣るため、牧草・芝草としての実用栽培には適しない。2008年に登録された特許第4228044号「シバ属植物の再分化植物体及び形質転換植物体」による手法と本品種を組み合わせることにより、シバの遺伝子組換え研究が進むことが期待される。また、さび病罹病性の特徴を活かし、接種源やさび病罹病性の基準品種としての利用も期待される。

キーワード：シバ, 再分化能, 遺伝子組換え, さび病

緒 言

シバ (*Zoysia japonica* Steud.) は我が国を含む東アジアを原産地とし、古くから放牧地の飼料資源として低投入持続型畜産に利用されている。芝草としても重要な地位を占めており、実用栽培の統計はないが平成23年花木等生産状況調査によると、シバ・コウシュンシバ (*Z. matrella* (L.) Merr.)・コウライシバ (*Z. tenuifolia* Willd.) を合わせた日本芝は、種苗生産だけで作付面積4884 ha, 年間出荷数量3832 ha, 年間出荷額55億円に達している¹³⁾。産地の名称や茎葉の大きさによって区別される在来系統⁷⁾も流通しているが、今後は特性が一定かつ明確な種苗法に基づく登録品種が主体になると考えられる。シバ属として品種登録されているのは2013年8月現在で30品種あり¹²⁾、芝草分野では耐踏圧性、病害抵抗性、虫害抵抗性、葉色の濃さ、低草高に伴

う刈芝発生量の少なさ、冬季の緑度維持能などが求められている。農林水産省品種登録ホームページ¹²⁾で公開されている品種登録/出願公表データによると、現在の登録品種には生態型の特性を活かした栄養系選抜や生態型の交雑後代からの選抜によって育成されたものが多いが、今後、芝草用品種育成を加速するためには遺伝子組換え技術の利用も期待される。

シバにおける遺伝子組換えでは、均一な遺伝子型をもつ再分化個体の養成が困難であることが制約となっていた。すなわち、シバは他殖性で母材となる植物のヘテロ接合性が高いことから、それらに由来する個々の種子は異なる遺伝子型をもつと考えられるため、緑化向けの市販種子において遺伝的に均一な種子は入手不可能である。自殖を繰り返して純系(ホモ接合型)種子を得ようとしても自殖によるホモ化の過程で自殖劣性が生じる可能性が大きく、純系品種が存在しないため遺伝的に均一

2013年9月25日受付, 2013年11月18日受理

*共同第1著者

^a 現 国際農林水産業研究センター

な F₁ 種子を得ることもできない。既知の培養系ではシバ種子からカルス誘導・再分化する方法を採っているが^{2,16,17)}、これらの方法では上述の理由で遺伝的背景が不明なカルス・再分化個体しか得られないので、遺伝子組換え体作出に適用したとしても再現性の高い実験系構築は期待できない。一方、シバは匍匐茎によって容易に栄養繁殖が可能なので、多数の生長点を切り出して組織培養に供することで遺伝的に均一なカルス・再分化個体が得られ、再現性の高い遺伝子組換え実験系を構築できると考えられる。しかし、これまで生長点由来カルスの再分化を示した報告はない。

著者らはシバの生長点からカルスを誘導し植物体にまで再分化させる培養系およびアグロバクテリウム法によって形質転換¹⁴⁾を行った後に植物体を再分化させる方法を発明し、2002年に特許出願を行い、2008年に特許第4228044号として登録された⁹⁾。この過程で選抜・育成した再分化能の高いシバ系統を2007年に種苗法に基づく品種登録に出願し、2009年に「シバ中間母本農1号」として登録(第18204号)された。「シバ中間母本農1号」はシバ属の組換え体作出において基盤的育種材料として有用であり、本品種の匍匐茎から採取できる生長点を外植体として再現性の高いカルス誘導・遺伝子組換え・再分化が可能である。本報告では、「シバ中間母本農1号」の育成の経過、再分化に関する成績、本品種を用いた遺伝子組換え実験結果および形態的特性・生育特性について報告する。

材料および方法

1. 再分化系統の選抜と再分化能の評価

2000年に雪印種苗(株)販売のシバ市販種子(品種不確定の「普通種」)約1万粒を用いて再分化能の選抜を行った。培地組成はAsano *et al.*³⁾に準じて下記のように定めた。供試種子を定法(70%エタノール1分、1.0%次亜塩素酸ナトリウム溶液1分浸透後、滅菌水で3回すすぐ)により滅菌後、ガンボルグビタミンを添加したMurashige & Skoog(以下、MS)基本培地に2,4-dichlorophenoxyacetic acid(以下、2,4-D)を2 mg/l、6-Benzylaminopurine(以下、6-BAP)を0.5 mg/l、 α -ケトグルタル酸を100 mg/l、リボフラビンを1 mg/l、ゲルライトを2.5 g/l加えた培地上で培養した。種子を置床後、30日間、25℃・暗条件下で培養し、カルス誘導を行った。優良な生育を示したカルスは、カルス誘導培地と同じ組成でホルモンフリーの再分化培地に置床し、28日間、25℃、24時間の明条件下で培養して、数

多くのシュートを形成することから再分化能が高いと認められるカルスを選抜した。そのカルスから再分化したシュート1本に由来する個体「EM2」をポット栽培に移し、栄養繁殖で維持した。品種登録出願に当たり、この個体「EM2」の栄養系を「シバ中間母本農1号」と付名した。

生長点を外植体とするカルスの再分化能を確かめるため、「シバ中間母本農1号」および「朝駆」(品種登録第10487号、育成:農研機構畜産草地研究所)⁸⁾を供試して、3~4葉期の直立茎を70%エタノールで2分間浸透滅菌を行い、滅菌水で3回すすぎ、クリーンベンチ内で実体顕微鏡による観察を行いながら生長点を切り出した。上記と同じ培養条件で生長点からカルスを誘導し、カルス誘導率とそのカルスからの再分化率を求めた。直径1 cm以上のカルスについてはシュート数も求めた。

「シバ中間母本農1号」の再分化能が安定した特性であることを確認するため、生長点由来カルスから再分化した個体を用いて、さらに生長点からカルス誘導・再分化する処理を2サイクル繰り返した。

遺伝子組換えのモデル実験として、アグロバクテリウム法による β -glucuronidase(以下、GUS)遺伝子の形質転換を行った。「シバ中間母本農1号」の茎頂組織の生長点を外植体としてカルス誘導培地に置床し、25℃・暗条件下で培養してカルスを誘導した。1ヶ月後に誘導されたカルスを分割し、さらにカルス誘導培地で1ヶ月毎に3回以上継代培養した。遺伝子導入を可視化して確認することができる35S-Intron-GUS遺伝子(pIG121 Hm)を導入したアグロバクテリウムLBA4404株⁶⁾(名古屋大学から分譲)のコロニーを液体AB培地⁴⁾に植菌し、3日間・28℃で振盪培養した。この懸濁液20 mlに直径5 mm程度に分割したカルスを浸漬し、25℃・暗条件下で緩やかに振盪した。5日後、懸濁液からカルスを取り出して、アセトシリゴン50 mg/lを含む前述のカルス誘導培地に移し、25℃・暗条件下に7日間静置し共存培養した。カルベニシリン250 mg/lおよびセフトキシム200 mg/lを加えた滅菌水でカルスをすすいで付着しているアグロバクテリウムを除菌した後、ハイグロマイシン50 mg/l・カルベニシリン500 mg/l・セフトキシム100 mg/lをMS基本培地に加えたカルス誘導培地に置床し、25℃・暗条件下で約3ヶ月静置培養した。褐変せずに生き残ったカルスを、ハイグロマイシン50 mg/l・カルベニシリン500 mg/l・セフトキシム100 mg/lをMS基本培地に加えた再分化培地(選抜培地)に置床し、25℃・暗条件下で約1ヶ月間静置培養した。さらに生き残ったカルスを新しい選抜培地に置床し、25℃・34.2 μ mol/

m²/s・16時間日長条件で約2ヶ月培養し、再分化した植物体を鉢上げした。

再分化個体におけるGUS遺伝子の導入はPCRにより、発現は組織化学的染色法により確認した。PCRは100 µg/µlのCTAB法¹⁰⁾により抽出したゲノムDNA溶液0.5 µl, 10 × Ex Buffer 2.0 µl, dNTP (各2.5 mM) 1.8 µl, 5 U/µlの耐熱性DNAポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq, タカラバイオ株式会社, 大津市) 0.1 µl, 10 pmol/µlのプライマー各0.5 µl, 滅菌蒸留水14.6 µlの合計20.0 µlの反応液で行い, PCR反応の条件は, 95°Cで10分間, 続いて94°Cで30秒間, 55°Cで1分間, 72°Cで90秒間それぞれ保持するサイクルを30回, 最後に72°Cで10分間保持とした。PCRでは葉身0.1 gからゲノムDNAを抽出し, 35Sプロモーター遺伝子の内部配列5'-ATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC-3' およびGUS遺伝子の内部配列5'-CCCGGCTTTCTTGT AACGCGCT-3' のプライマーを用いて453 bpのPCR増幅バンドにより導入遺伝子の有無を確認した。PCR増幅バンドの確認は, 反応液10 µlをTAE (Tris-base 40 mM, Acetic acid 20 mM, EDTA-2Na 1 mM) バッファーを加えた1%のアガロースゲルにて100 V・30分の電気泳動で行い, 増幅バンドの染色はエチジウムブロマイドで行った。組織化学的染色法では葉身をGUS染色¹⁵⁾した後, 70%エタノールに3時間浸漬して葉緑素を脱色し, 染色の有無を観察した。

2. 形態的特性・生育特性の評価

品種登録の審査基準となっている「昭和57年度種苗特性分類調査報告書」¹¹⁾に基づき, 畜産草地研究所試験圃場(栃木県那須塩原市, 北緯36度55分・東経139度55分, 標高313 m)で特性評価を行った。同報告書で定める標準品種は「Emerald」・「Meyer」のみであるが, 両品種とも1950年代に米国農務省によって育成された匍匐茎の伸長性や葉長・葉幅が小さい品種であり¹⁾, 国内流通品種との比較対象として十分ではないため, 生育旺盛な国内育成品種を対照品種として加えた。対照品種には1995年以降育成された品種から, 緑度維持能の高い「みやこ」(品種登録第4300号, 育成:(株)ジェイツー), 匍匐茎の伸長性に最も優れる「朝駆」⁸⁾, 芝密度と匍匐茎の伸長性に優れる「朝萌」⁸⁾(品種登録第11724号, 育成:農研機構畜産草地研究所), 草高が低く葉色が濃い「つくばグリーン」(育成:茨城県)を選んだ。

各品種とも, 匍匐茎を採取して7.5 cm径ポリポット(個体植区)および5 cm角のピートモス製ポット(密植区)で育苗し, 2003年7月7日に個体植え・密植そ

れぞれ3反復で定植した。施肥はN:P₂O₅:K₂O各15 g/m²を年3回(4月下旬・梅雨明け後・9月上旬), 5 g/m²ずつ分施した。形態的特性・生育特性の評価は, 2003年から2006年にかけて「昭和57年度種苗特性分類調査報告書」¹¹⁾に基づいて行った。

データの有意差検定は, 統計処理ソフトウェア「JMP 7」(SAS Institute Japan 株式会社, 東京)を用いて行った。

結 果

1. 再分化系統の選抜と再分化能の評価

再分化系統の選抜において供試した市販種子約1万粒のうち, カルス誘導培地上で特に優良な生育を示したのは4粒由来のカルスのみであり, このうち, 再分化培地上で優れた再分化能を示したのは1粒由来のカルスのみであった。このカルスから再生した1本のシュートに由来する植物体を「シバ中間母本農1号」として栄養系で維持し, 以後の試験に使用した。

生長点由来カルスは, 「シバ中間母本農1号」が誘導率および再分化率ともに100%, 長径1 cm以上のカルス当たりの平均シュート数9.4であったのに対し, 「朝駆」はカルス誘導率は70%であったが, 再分化培地上ではカルスが褐変・枯死して全く再分化しなかった(図1, 表1)。

再分化個体の生長点からのカルス誘導・再分化を2サイクル繰り返した結果, 「シバ中間母本農1号」のカルス誘導率および再分化能は維持され, 安定した特性であることを確認した。

「シバ中間母本農1号」の生長点から誘導したカルスを用いてGUS遺伝子をアグロバクテリウム法で形質転換し, 得られた再分化植物体は13個体であった。これらの13個体すべてにおいて, PCRの結果ではゲノムDNAにGUS遺伝子が存在していることを示す453 bpのバンドが認められ(図2)⁹⁾, さらにGUS染色によって明らかな発色を示した(図3)。これらの結果は, 本品種のゲノムにGUS遺伝子が導入され, 発現したことを示している。

2. 形態的特性・生育特性の評価

特性評価の結果, 「シバ中間母本農1号」と標準品種「Emerald」・「Meyer」および対照品種「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」・「つくばグリーン」の特性評価値の間には有意差が認められた。以下の記述において単位を付さない数値は, 9段階評価値の3反復平均値を示す。

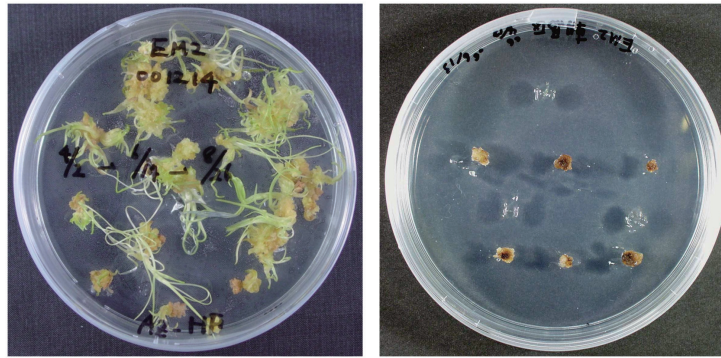


図1. 生長点から誘導したカルスの再分化培地上での再分化（左：シバ中間母本農1号）と褐変（右：朝駆）

表1. カルス誘導培地における誘導率および再分化培地における再分化能

		シバ中間母本農1号	朝駆
カルス誘導率		100% (100)	70% (30)
再分化率		100% (100)	0% (30)
シュート数	平均	9.4	0
	最大値	22	0
	最小値	4	0

注：カルス誘導率は生長点からの誘導率で示した。（ ）内の数字は置床数を示す。再分化率は再分化培地に置床したすべてのカルスについて、シュート数は長径1cm以上のカルスについて計測した。

1) 形態的特性等

草型（極直立：1～極匍匐：9）は5.8で標準品種・対照品種との間に有意差がなかった。匍匐茎の密度（極疎：1～極密：9）は2.4で「Emerald」・「朝駆」・「朝萌」より疎であり、「Meyer」・「みやこ」・「つくばグリーン」並みであった。匍匐茎の長さは定植3ヶ月後は14.0 cm、同11ヶ月後は18.3 cmで「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」・「つくばグリーン」より短く「Emerald」・「Meyer」並みであった。匍匐茎の太さは2.26 mmで「Emerald」・「Meyer」・「みやこ」・「朝萌」・「つくばグリーン」より太く「朝駆」より細かった。葉長は4.97 cm、葉幅は5.12 mmで「Emerald」・「Meyer」・「みやこ」・「つくばグリーン」より大で、「朝駆」・「朝萌」並みであった。葉色（極淡：1～極濃：9）は4.3で「Meyer」・「朝駆」・「つくばグリーン」より淡く、「Emerald」・「みやこ」・「朝萌」並みであった（表2）。

出穂茎の太さは1.33 mmで「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」より太く「朝萌」並み、出穂茎の長さは15.2 cm、穂長は46.8 mmで「Meyer」より長く「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」並みであった。穂色（極淡：1～極濃：9）は7.0で

「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」より濃く、小穂長は3.75 mmで「みやこ」・「朝萌」より長く「Meyer」・「朝駆」並み、小穂幅は1.41 mmで「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」より広く、小穂数（1穂当たりの計数値）は49.5で「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」より多く「朝萌」並みであった（表3）。出穂始め（極早：1～極晩：9）は7で有意差検定はできなかったが遅めであり、出穂は春のみであった。穂数は1484.5本/m²で「Meyer」より少なく「朝萌」並み、自然受粉による稔実率は1.2%で「Meyer」・「朝駆」・「朝萌」より低かった（表4）。

2) 生育特性

定植後の初期生育（極不良：1～極良：9）は3.1で「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」より不良で「Emerald」・「Meyer」・「つくばグリーン」並み、2004年春の草勢（極不良：1～極良：9）は2.0で「Emerald」・「Meyer」・「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」より不良で「つくばグリーン」並み、2004年秋の草勢（極不良：1～極良：9）は3.0で「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」・「つくばグリーン」より不良で「Emerald」・「Meyer」並み、再生の良否（極不良：1～極良：9）は5.3で「みやこ」・「朝駆」より良で

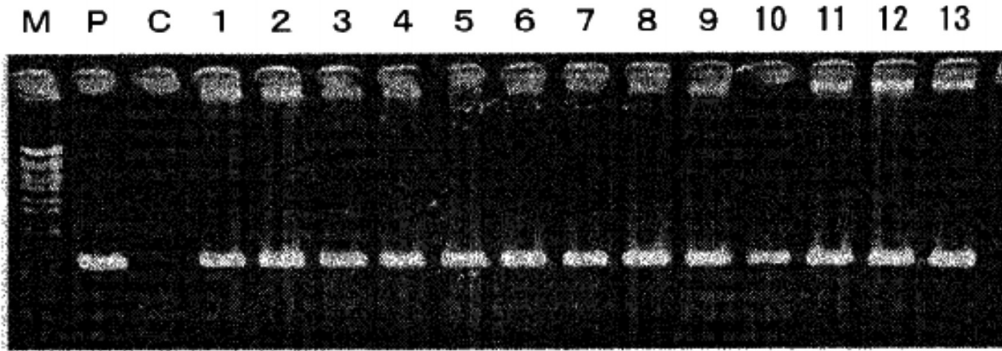


図2. PCRによるGUS遺伝子導入の確認

M:分子量マーカー (λ-EcoT14I), P:バイナリーベクター pIG121 Hm のPCR産物, C:非形質転換「シバ中間母本農1号」のPCR産物, 1~13:「シバ中間母本農1号」由来形質転換体 (全13個体) のPCR産物

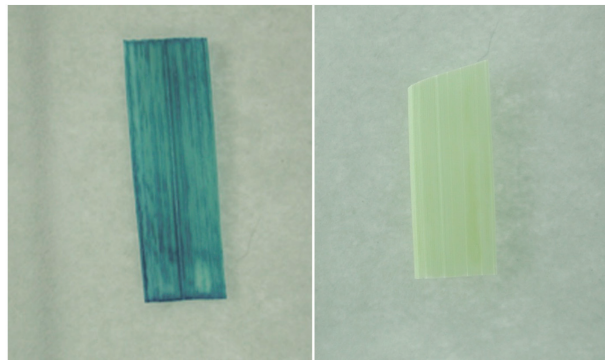


図3. 葉身の組織化学的染色によるGUS遺伝子発現の確認

左:GUS遺伝子が発現している「シバ中間母本農1号」カルス由来の再分化個体, 右:非形質転換「シバ中間母本農1号」

表2. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の形態的特性 (栄養体)

品種	草型	匍匐茎の密度		匍匐茎の長さ (cm)		匍匐茎の太さ (mm)		葉長 (cm)	葉幅 (mm)	葉色						
		極直立:1~ 極匍匐:9	極疎:1~ 極密:9	定植3ヶ月後	定植11ヶ月後	極淡:1~ 極濃:9										
シバ中間母本農1号	5.8	ab	2.4	c	14.0	d	18.3	c	2.26	b	4.97	ab	5.12	a	4.3	de
Emerald	7.0	a	5.2	ab	33.5	bed	39.1	bc	1.14	e	2.07	d	1.69	d	5.2	cd
Meyer	4.3	b	3.0	bc	24.0	cd	36.5	bc	1.65	d	2.20	d	3.13	c	6.4	b
みやこ	6.5	a	4.7	abc	50.0	b	55.4	b	1.89	cd	3.65	c	4.25	b	3.9	e
朝駆	6.4	a	4.7	ab	122.6	a	141.9	a	2.69	a	5.61	a	5.53	a	6.1	bc
朝萌	6.0	ab	5.4	a	115.6	a	118.8	a	1.83	cd	4.29	bc	4.78	ab	4.4	de
つくばグリーン	6.5	a	4.0	abc	43.9	bc	55.8	b	1.94	c	1.83	d	4.06	b	7.6	a

注: Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

「Emerald」・「Meyer」・「つくばグリーン」並みであった。緑化の早晚 (3月31日を0とした日数) は2005年は22.0で「Emerald」・「Meyer」・「朝駆」より早く「みやこ」・「朝萌」・「つくばグリーン」並みであったが, 2006年は

25.0で「Emerald」・「つくばグリーン」より早く「朝萌」より遅く「Meyer」・「朝駆」並みであった (表5)。

紅葉の早晚 (10月31日を0とした日数) は16.7で供試品種・系統の中で最も早かった。越冬の良否 (極不良:

1～極良：9) は4.0で有意差は検出できなかった。越夏の良否(極不良：1～極良：9) は5.3で最も不良であった。さび病 (*Puccinia zoysiae* Dietel) 抵抗性(審査基準における表記はシバさび病抵抗性, 極弱：1～極強：9) は4.3

で最も弱, 斑葉葉巻病抵抗性(極弱：1～極強：9) は9.0と罹病が認められず, 「Meyer」より強く「Emerald」・「みやこ」・「朝駆」・「朝萌」・「つくばグリーン」並みであった(表6)。

表3. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の形態的特性(穂・種子, その1)

品種	出穂茎の太さ (mm)	出穂茎の長さ (cm)	穂長 (mm)	穂色 極淡：1～ 極濃：9	小穂長 (mm)	小穂幅 (mm)	小穂数 小穂/穂
シバ中間母本農1号	1.33 a	15.2 a	46.8 a	7.0 a	3.75 ab	1.41 a	49.5 a
Emerald	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Meyer	0.73 c	7.8 b	25.8 b	2.6 c	3.37 bc	0.93 c	31.5 c
みやこ	0.73 c	15.4 a	43.7 a	4.4 b	3.08 c	0.90 c	39.5 b
朝駆	1.03 b	13.0 a	43.3 a	4.4 b	4.20 a	1.18 b	34.5 bc
朝萌	1.10 ab	12.2 a	47.6 a	4.8 b	3.06 c	1.15 b	50.7 a
つくばグリーン	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -

注1：Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

注2：「Emerald」, 「つくばグリーン」は試験期間中出穂しなかった。

表4. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の形態的特性(穂・種子, その2)

品種	出穂始め 極早：1～ 極晩：9	春秋の出穂の有無 1：不出穂, 2：春のみ, 3：秋のみ, 4：春も秋も	穂数 本/m ²	稔実率(自然受粉) (%)
シバ中間母本農1号	7 -	2 -	1484.5 b	1.2 d
Emerald	- -	1 -	- -	- -
Meyer	5 -	2 -	2714.2 a	76.4 a
みやこ	7 -	4 -	- -	- -
朝駆	6 -	2 -	- -	25.2 c
朝萌	6 -	2 -	635.1 b	49.1 b
つくばグリーン	- -	1 -	- -	- -

注1：Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。出穂始めには反復間差がないため, 春秋の出穂の有無は質的形質であって不連続値のため検定できなかった。

注2：「Emerald」, 「つくばグリーン」は試験期間中出穂しなかった。

注3：稔実率は試験圃場において放任受粉状態で結実した種子数を小花数で除して求めた。

表5. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の生育特性(その1)

品種	初期生育 極不良：1～ 極良：9	2004年春の草勢 極不良：1～ 極良：9	2004年秋の草勢 極不良：1～ 極良：9	再生の良否 極不良：1～ 極良：9	緑化の早晚 (2005年) 3月31日を0と した日数	緑化の早晚 (2006年) 3月31日を0と した日数
シバ中間母本農1号	3.1 b	2.0 c	3.0 b	5.3 ab	22.0 a	25.0 cd
Emerald	4.3 b	3.7 b	3.7 b	5.5 ab	16.0 c	37.0 a
Meyer	4.3 b	3.7 b	3.3 b	5.2 ab	18.3 bc	23.0 de
みやこ	6.2 a	6.0 a	5.7 a	3.0 c	20.0 ab	- -
朝駆	6.5 a	7.3 a	5.7 a	3.3 c	18.7 bc	27.0 c
朝萌	6.8 a	7.3 a	7.0 a	4.2 bc	20.0 ab	20.0 e
つくばグリーン	3.6 b	3.0 bc	5.7 a	6.3 a	21.0 ab	31.0 b

注：Tukeyの多重比較の結果, 異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

表 6. 「シバ中間母本農1号」および標準・対照品種の生育特性（その2）

品種	紅葉の早晚 (2003年)		越冬の良否		越夏の良否		さび病抵抗性		斑葉葉巻病抵抗性	
	10月31日を0と した日数		極不良：1～ 極良：9		極不良：1～ 極良：9		極弱：1～ 極強：9		極弱：1～ 極強：9	
シバ中間母本農1号	16.7	e	4.0	n.s.	5.3	e	4.3	c	9.0	a
Emerald	30.7	abc	6.0		6.9	c	9.0	a	9.0	a
Meyer	24.0	d	5.3		6.1	d	7.0	b	5.7	b
みやこ	35.0	a	4.0		8.9	b	9.0	a	9.0	a
朝駆	33.0	ab	4.3		8.9	b	9.0	a	7.3	ab
朝萌	30.0	bc	5.0		9.0	a	9.0	a	8.7	a
つくばグリーン	28.0	cd	6.0		8.9	b	9.0	a	8.7	a

注：Tukeyの多重比較の結果、異なる文字間には5%水準で有意差が認められる。

考 察

GUS 遺伝子を形質転換した「シバ中間母本農1号」の生長点由来カルスが再分化し、その再分化個体のゲノム DNA に GUS 遺伝子が導入されていることが PCR によって、GUS 遺伝子の発現が GUS 染色によって、それぞれ示された。サザン解析においても形質転換体のみから GUS 遺伝子配列のシグナルが検出され（データ省略）、これらの結果から遺伝子組換え植物が得られたことが示された。目的とする他の遺伝子を GUS 遺伝子に置き換えれば、同様に目的遺伝子を導入することが可能である。

アグロバクテリウム法によるシバの形質転換に関して、種子由来のカルスを用いた方法が2003年に報告された¹⁷⁾。さらに、形質転換系の効率化・単純化のためシバ品種「El Toro」の匍匐茎節を用いてカルスへの脱分化・再分化を経ずに直接遺伝子組換えする方法が報告された⁵⁾。これらの報告のうち、種子由来カルスでは遺伝的に均一な材料を使わず、匍匐茎節を用いた場合は形質転換効率が6.8%と低く、匍匐系節の発育程度の差が影響している可能性がある。本報告の再分化能が高い品種の生長点由来のカルスを経る方法では多数の均一な細胞レベルの材料を揃えることができ、また、遺伝的にも均一なため、再現性の高い実験材料を提供する意味で高い有用性を持つ。本報告で記述したように特許第4228044号「シバ属植物の再分化植物体及び形質転換植物体」で用いた方法⁹⁾と「シバ中間母本農1号」を組み合わせるにより、シバの遺伝子組換え研究が進むことが期待される。我が国では遺伝子組換えに対する社会的受容性が低く、遺伝子組換え農産物と混ざらないよ

うに（意図しない混入が5%以下に）管理されたことを示す「遺伝子組換えでない」表示がされている加工食品が多い。一方で、「青いバラ」に代表されるように花卉類では遺伝子組換えの成果が好意的に報道されることもあり、シバを含む非食用の緑化・観賞用植物では受容されやすいとも考えられる。病害虫抵抗性品種の育成を通じた芝生の減農薬管理の達成など、芝生管理者や芝生利用者の需要に沿った遺伝子組換えに本品種が利用されることが期待される。

「シバ中間母本農1号」の形態的特性は、葉長・葉幅・出穂茎の太さ・小穂数は大であるが、匍匐茎の密度・長さは小であるため、「朝駆」・「朝萌」のように疎植による草地・芝生造成には適していない。さらに生育特性では、初期生育・春の草勢・秋の草勢が供試品種中最低値を示したことから、さび病抵抗性が弱く顕著な発病を示した（図4）ことから、牧草・芝草としての実用栽培には適さないと判断する。2003年の紅葉の早晚は16.7と最も早かったが、2004年以降は夏から秋にかけて「シバ中間母本農1号」にさび病の発生が多く、観察不可能であった。越夏の良否は5.3と最も不良であったが、判断基準となる被覆率や葉の枯死程度がさび病の発生に影響され、必ずしも夏季の気象条件に依存しない可能性がある。さび病の発生程度は感染源の多寡によって影響を受けるので、発生が多い地域・圃場で栽培する場合は越夏性・越冬性に影響を及ぼす可能性に注意し、薬剤防除やポット栽培等でバックアップの栄養系を維持するなどの対策が必要である。一方で、さび病の感染源や罹病性の基準品種など、芝生病害の研究材料としての利用も考えられ、本品種が芝草の研究・技術開発に貢献することが期待される。

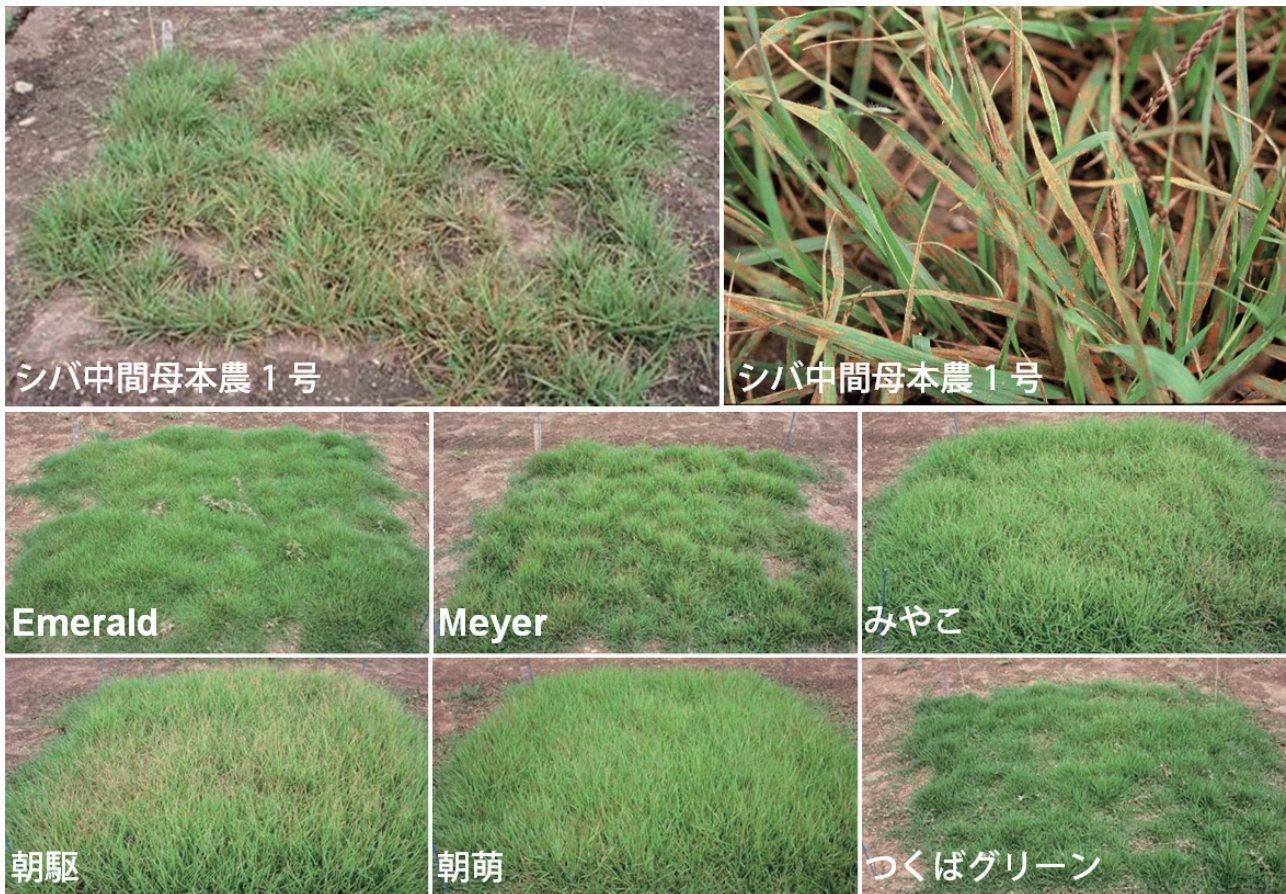


図4. 「シバ中間母本農1号」と標準・対照品種の草姿とさび病罹病程度
(2004年7月5日に畜産草地研究所試験圃場にて撮影)

引用文献

- 1) Agricultural Research Service, USDA (1972). *Zoysia japonica* Steud., Japanese lawngrass and *Zoysia japonica* × *Z. tenuifolia* Willd. ex Trin., In: Grass varieties in the United States, 115-116, U. S. Government Printing Office, Washington, D. C.
- 2) Al-Khayri, J. M., Huang, F. H., Thopmpson, L. F. and King J. W. (1989). Plant regeneration of Zoysiagrass from embryo-derived callus, *Crop Sci.*, 29, 1324-1325.
- 3) Asano, Y., Katsumoto H., Inokuma C., Kaneko S., Ito Y. and Fujie A. (1996). Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud., *J. of Plant Physiol.*, 149, 413-417.
- 4) Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1974). *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 3672-3676.
- 5) Ge, Y., Norton, T. and Wang, Z.-Y. (2006). Transgenic zoysiagrass (*Zoysia japonica*) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation, *Plant Cell Rep.*, 25, 792-798
- 6) Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. and Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation on rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA, *Plant J.*, 6, 271-282.
- 7) 北村文雄 (1970). 日本芝の園芸的分類および成立に関する研究, 東京大学農学部附属園芸研究所研究報告, 3, 1-60.
- 8) 小林真・蝦名真澄・春日重光・奥村健治・高井智之・荒谷博・鶴見義朗・中川仁 (2013). シバ品種「朝駆」

- および「朝萌」の育成, 畜産草地研究所報告, 13, 11-22.
- 9) 小林正樹・福澤洋光・蝦名真澄・高溝正・中川仁・小林真. シバ属植物の再分化植物体及び形質転換植物体, 特許第4228044号, 2008.
- 10) Murray, M.G. and Tompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucl. Acids Res.* 8, 4321-4325.
- 11) 日本飼料作物種子協会 (1983). 昭和57年度種苗特性分類調査報告書
- 12) 農林水産省食料産業局新事業創出課 (2013). 農林水産省品種登録ホームページ, <http://www.hinsyu.maff.go.jp/>
- 13) 農林水産省生産局 (2013). 平成23年花木等生産状況調査
- 14) Rahman, S.M.L., Mackay, A.W., Ebina, M., Nakagawa, H., Ahmed, A.S.M.M. and Quebedeaux, B. (2003). Transient gene expression in *Zoysia japonica* using *Agrobacterium tumefaciens*, *Subtrop. Plant Sci.*, 55, 11-17.
- 15) 高橋美佐・森川弘道 (1997). GUS 遺伝子のトランジェントアッセイ, 植物工学別冊 植物細胞工学シリーズ6 植物の細胞を観る実験プロトコール (福田裕穂・西村幹夫・中村研三監修), 秀潤社, 東京, 75-77.
- 16) 反保宏行・豊田秀吉・野々村照雄・大内成志 (1994). ノシバ (*Zoysia japonica* Steud.) におけるカルス誘導とその個体再生, *芝草研究*, 23, 27-30.
- 17) Toyama, K., Bae, C.H., Kang, J.G., Lim, Y.P., Adachi, T., Riu, K.Z., Song, P.S. and Lee, H.Y. (2003). Production of Herbicide-tolerant *Zoysiagrass* by *Agrobacterium*-mediated Transformation, *Molecules and Cells* 16, 19-27.

Breeding of “Japanese Lawngrass Intermediate Parent Nou 1”

Makoto KOBAYASHI*, Masumi EBINA*, Tadashi TAKAMIZO and Shin-ichi TSURUTA^a

Forage Crop Research Division,
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Nasushiobara, 329-2793 Japan

Summary

The vegetatively propagated cultivar of Japanese lawngrass (*Zoysia japonica* Steud.) “Japanese Lawngrass Intermediate Parent Nou 1” was selected for tissue culture adaptability from about 10,000 seeds which were genetically heterogenous and commercially sold as “common”. The cultivar shows superior redifferentiation ability of callus induced from shoot apical meristem. Because homogenous and/or homozygous seeds are not available in Japanese lawngrass, conventional method inducing callus from seed are poor in repeatability. The cultivar enables homogenous callus induction from meristem and promotes reliability of tissue culture and genetic transformation. As a model, genetic transformation of GUS (β -glucuronidase) gene was tested and successful. The cultivar was registered as number 18204 in 2009 by The Plant Variety Protection and Seed Act. Its leaf size, culm diameter and number of spikelet are significantly bigger than standard cultivars. Because density and length of stolon, vigor of early stage, spring vigor, fall vigor and resistance to rust disease are significantly inferior to standard cultivars, “Japanese Lawngrass Intermediate Parent Nou 1” will not be adaptable to actual use as forage grass and turf grass. It will be valued as experimental material and will contribute to studies for genetic transformation and rust disease.

Key words: Japanese lawngrass, redifferentiation ability, gene recombination, rust

* First coauthors

^a Present address: Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ishigaki, 907-0002 Japan

飼料タンパク質の給与水準と第一胃分解性の違いが泌乳牛の尿量に及ぼす効果

大谷文博・樋口浩二・小林洋介・野中最子^a

農研機構畜産草地研究所 家畜生理栄養研究領域, つくば市, 305-0901

要 約

窒素 (N) を制御して泌乳牛の尿量を低減化する栄養管理技術の開発を目的に, 飼料タンパク質の給与水準と第一胃分解性の違いが, 泌乳牛の尿量に及ぼす効果について調べた。泌乳後期のホルスタイン種泌乳牛 4 頭に, 粗タンパク質 (CP) 含量 2 水準 (概ね 16.5% および 13.5%) およびタンパク質第一胃分解性 2 水準 (大豆粕とバイパス大豆粕の比率を入れ替えて調製) を組み合わせた 4 飼料を給与して, 出納試験を実施した。飼料 CP 含量の減少によって, 乳量と乳脂肪率に有意な低下が観察されたが, その低下の程度はわずかであった。飼料 CP 含量の減少と飼料タンパク質の第一胃分解性の低下は, どちらも泌乳牛の尿量を有意に減少させる効果を示した。尿量の低減効果は, 飼料 CP 含量を減少させる処理の方が, 第一胃分解性の低下処理よりも大きく現れ, これは両処理の血中尿素濃度および第一胃液アンモニア濃度に及ぼす効果の違いが, 反映されたものと考えられた。低 CP 飼料区において糞中水分排せつ量の増加が観察されたが, この原因は低 CP 飼料区で用いた飼料の繊維消化率が低かったためと推察され, CP 含量を低減する飼料調製では, 飼料源の選択が重要であると考えられた。

キーワード: 泌乳牛, 栄養管理, タンパク質含量, タンパク質第一胃分解性, 尿量低減化

緒 言

家畜の中でも特に尿量の多い泌乳牛を飼養する酪農経営では, 大量に発生する糞尿の処理に要する労力の負担に加え, 堆肥化して利用する場合には, 水分調整のために固液分離システムの設置や多量の水分調整材が必要となるため²⁹⁾, 経済的な負担も強いられる。この状況を改善するために, 効率的な排せつ物処理技術を開発することも重要であるが, 泌乳牛が排せつする尿量自体を, 日常の栄養管理によって減少させることができれば, 排せつ物処理の負担は大いに軽減される。ただし, そのための栄養管理手法は, 泌乳牛の生産性に悪影響を与えないことが肝要であり, 飲水制限のような非生理的な栄養管理では, 尿量と同時に採食量や乳量も低下させてしまうので⁷⁾, 泌乳牛の尿量低減化手法としては不適切である。これに対して, ナトリウム (Na), カリウム (K) および窒素 (N) の 3 つの栄養素は, その摂取量が尿量

と高い正の相関を示し^{3,26)}, 泌乳牛の生理的な尿生成に関わる主要な栄養素要因と考えられることから, これらの栄養素を精密に制御する栄養管理を行えば, 泌乳牛の生理に矛盾することなく, 乳生産を維持させながら, 尿量を減少させることが可能と考えられる。

N を制御した栄養管理に関しては, 泌乳牛に粗タンパク質 (CP) 含量を低減した飼料を給与した試験が, 国内外問わず数多く実施されている。しかし, 最近も Hristov ら¹⁶⁾ が総説にまとめて紹介しているように, これまでの CP 低減飼料の給与試験の主たる目的が, 経済性の向上と N による環境負荷の低減にあったことから, 乳生産と N 排せつに対する飼料 CP 低減化の効果についての知見は, それらの報告から広範囲に得ることができるものの, 尿量に対する飼料 CP 低減化の効果に関する情報は, 比較的限られている。また, それらの情報についても, 泌乳牛へ給与する飼料の CP 含量を低下させることにより, 尿中への N 排せつ量の減少と同時

に、明確な尿量の減少が観察された試験結果が複数報告されている^{4,13,31,38)}。一方で、給与飼料のCP低減化が尿中N排せつ量には有意な減少を引き起こしても、尿量には有意な変化が観察されていない研究報告も見られる^{21,33,37,44)}。著者らの以前の研究²⁸⁾では、Kを低減した飼料の給与によって尿量が減少した泌乳牛に、CP含量も減らして飼料給与したところ、さらに尿量が減少する傾向($P = 0.07$)が観察されている。

飼料CP水準の低減処理以外に、Nを制御する栄養管理として、いわゆるバイパスタンパク質飼料を利用することにより、給与飼料タンパク質の第一胃分解性を低下させ、Nの利用効率の向上とN排せつ量の低減を図る手法についても、かなり多くの研究が行われている³⁹⁾。しかし、それらの研究報告から、尿量に対する効果についての情報が得られるものは、ほとんどないと言っても過言ではなく、尿量に対する飼料タンパク質の第一胃分解性の効果は定かではない。そこで本研究は、Nを制御して泌乳牛の尿量を低減化する栄養管理技術を開発するため、飼料タンパク質の給与水準と第一胃分解性の違いが、泌乳牛の尿量に及ぼす効果を明らかにすることを目的に実施した。

材料および方法

泌乳後期のホルスタイン種泌乳牛4頭(2産および4産各2頭、試験開始時点で平均分娩後日数 217 ± 15 日、平均体重 598 ± 62 kg)を、温度 20°C 、湿度60%に調節した代謝実験施設に収容して出納試験を実施した。試験は予備期9日間、出納試験5日間の連続した14日間を1期とし、飼料粗タンパク質(CP)含量2水準とタンパク質第一胃分解性2水準を 2×2 要因配置とした4飼料処理を、4期4頭に割り付ける 4×4 ラテン方格法によって実施した。なお、試験は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所動物実験指針に従って行った。

給与飼料の構成および成分組成を表1および2に示した。飼料処理は高CP高分解性飼料区(HPHD区)、高CP低分解性飼料区(HPLD区)、低CP高分解性飼料区(LPHD区)および低CP低分解性飼料区(LPLD区)の4区を設定した。いずれの区も粗濃比は45:55とし、粗飼料にはイタリアンライグラスサイレージ(2番草・出穂期)とアルファルファヘイキューブを用いた。2つの高CP飼料区のCP含量は、実際の酪農現場でも見られる程度の概ね16.5%の含量に調製し、2つの低CP飼料区はタンパク質飼料源を減らしてビートパルプとフス

マに代替することにより、日本飼養標準²⁶⁾の推奨値に近いCP含量である概ね13.5%に調製した。タンパク質飼料源には大豆粕および市販バイパス大豆粕(ソイパス、ウイルバー・エリス株式会社、東京)を使用し、2つの高分解性飼料区ではタンパク質の第一胃分解性の高い大豆粕を、2つの低分解性飼料区では第一胃分解性の低いバイパス大豆粕を主なタンパク質飼料源とした。なお、使用したバイパス大豆粕は、大豆粕を加糖加熱処理した製品である。

給与飼料はTMRとし、粗飼料と濃厚飼料の混合時に、水分含量が概ね45%となるように加水を行った。飼料給与量は試験開始に先だつ馴致期間中に、当所の慣行的な飼養条件下で観察された各試験牛の乳量と試験飼料の栄養価から、日本飼養標準²⁶⁾の要求量に基づいたTDN充足率が概ね100%となるように給与量を設定し、1日2回に分けて朝夕の搾乳(8:30および18:00)終了後に定量を給与した。なお、試験期間を通して、すべての牛で残飼は観察されなかった。また、ウォーターカップからの飲水は自由とした。

出納試験は全糞尿採取法により実施した。出納試験期間中は毎日、飲水量、乳量、糞量、尿量を個体毎に定時に測定し、糞および尿は5日分を日量に応じて按分混合して分析サンプルとした。牛乳も各搾乳時毎の乳量に応じて按分混合して分析サンプルとしたが、乳脂肪、乳蛋白質、乳糖および全固形分については各搾乳時毎のサンプルで分析し、乳量による加重平均を行って出納試験期間における成分値を算出した。出納試験最終日の朝の搾乳が終了して飼料を給与する直前に、真空採血管を用いて頸静脈血を採取し、さらに飼料給与の概ね4時間後に、第一胃液を経口的に採取した。採取した第一胃液は四重ガーゼでろ過した後、直ちにpHとアンモニア濃度を測定した。血液は3,000rpm、30分間の遠心分離により得られた血漿を、分析用サンプルとして -30°C で凍結保存した。

飼料および糞の一般成分と乳および尿中の水分とNは常法²⁾に従って分析し、飼料および糞のaNDFomおよびADFomはデタージェント法²⁾によって分析した。なお、飼料の有効第一胃分解性タンパク質(ECPd)含量は、日本飼養標準・乳牛2006年版²⁶⁾の値を引用した。飼料サンプルは硝酸-過塩素酸による湿式灰化後、原子吸光分光分析計(AA-6400F、島津製作所)によりKとNa濃度を測定した。乳脂肪、乳蛋白質、乳糖および全固形分の分析には赤外線自動分析計(ミルコスキャン133B、ホスエレクトリック社)を、血漿浸透圧の分析には浸透圧計(OSMOMAT 030、ゴノテック社)を用

いた。血漿、尿および乳中の尿素濃度と第一胃液アンモニア濃度は、市販の分析キット(尿素窒素Bテストワコーおよびアンモニアテストワコー、和光純薬)を用いて分析した。血漿 α アミノ窒素濃度はDNP法³⁵⁾、尿中アラントイン濃度はYoung-Conway法⁴⁷⁾による分析を行って測定した。また、血漿Na、K、塩素(Cl)、グルコース、遊離脂肪酸および乳酸濃度は、株式会社エスアールエル(東京)に分析を依頼し、Na、KおよびClは電極法により、グルコース、遊離脂肪酸および乳酸は酵素法によって測定した。

可消化養分総量(TDN)、CPおよびECPd充足率は、日本飼養標準・乳牛2006年版²⁶⁾の算出式から計算した各要求量で、それぞれの摂取量を除して求めた。見かけ

のN蓄積量は、N摂取量から総N排せつ量(糞中および尿中排せつ量と乳中移行量の合計)を差し引いて求め、見かけの水分保持量(蒸発量を含む)は、飼料水量、飲水量および代謝水量(可消化CP摂取量と可消化非タンパク質有機物摂取量から算出¹⁴⁾)を合計した総水分摂取量から、糞中および尿中水分排せつ量と乳中水分移行量(乳中全固形分から算出)を合計した総水分排せつ量を差し引いて求めた。

データは飼料処理を2×2要因配置とする4×4ラテン方格法に従って、SASのGLMプロシジャ⁴⁰⁾で分散分析を行い、飼料CP含量の効果、タンパク質第一胃分解性の効果およびCP含量と分解性の交互作用の有意性を検定した。また、交互作用が有意であった場合には、

Table 1. Ingredient composition of the experimental diets (% DM)

Ingredient	Diets ¹			
	HPHD	HPLD	LPHD	LPLD
Italian ryegrass silage	40.0	40.1	40.1	40.1
Alfalfa hay cube	5.0	5.1	5.0	5.0
Dehulled rice	29.9	30.0	29.8	29.9
Beet pulp	3.0	3.1	5.6	5.6
Wheat bran	2.0	2.0	8.0	8.0
Soybean meal	16.0	2.0	9.0	0.5
Heat-treated soybean meal ²	2.0	15.7	0.5	8.8
Vitamin-Mineral mixture	2.0	2.0	2.0	2.0

¹ HPHD = high CP high degradable protein diet, HPLD = high CP low degradable protein diet, LPHD = low CP high degradable protein diet, LPLD = low CP low degradable protein diet.

² Soy Pass (Wilbur-Ellis Co., (JAPAN) Ltd.).

DM : dry matter.

Table 2. Chemical composition of the experimental diets (% DM)

	Diets ¹			
	HPHD	HPLD	LPHD	LPLD
DM (% FM ²)	54.5	54.5	54.4	54.5
OM	90.7	90.7	90.8	90.8
CP	16.6	16.3	13.6	13.4
ECPd ³	11.4	9.7	10.2	8.6
EE	2.2	2.2	2.4	2.4
aNDFom	32.0	34.7	34.6	36.2
ADFom	18.6	18.9	19.3	19.4
K	1.60	1.60	1.48	1.48
Na	0.29	0.29	0.30	0.30

¹ HPHD = high CP high degradable protein diet, HPLD = high CP low degradable protein diet, LPHD = low CP high degradable protein diet, LPLD = low CP low degradable protein diet.

² FM (fresh matter) include added water.

³ Estimated using values from Japanese Feeding Standard for Dairy Cattle (2006)²⁶⁾.

DM : dry matter, OM : organic matter, CP : crude protein,

ECPd : effective degradable crude protein, EE : ether extracts,

aNDFom : ash-free neutral detergent fiber, ADFom : ash-free acid detergent fiber.

Tukey の多重検定を実施して、飼料処理区間の差を決定した。いずれの検定でも有意水準は危険率5%未満とした。

結 果

表3に摂取量、排せつ物量、乳量・乳成分率、消化率、TDN および充足率の測定結果を示した。乾物、CP、K および Na の摂取量に、CP 含量と分解性の有意な交互作用が検出され、飼料処理間に有意な差が観察された。

各飼料処理で等しくなるように設定していた乾物、K および Na 摂取量の違いは、定量給与の設定値と実給与量との若干の誤差が、飼料処理間で異なっていたことが影響したものであり、その差は有意ではあるもののわずかであった。また、CP 摂取量は低 CP 飼料区が高 CP 飼料区よりも平均して約 480g/日少なく、ECPd 摂取量は低分解性飼料区が高分解性飼料区よりも平均して約 375g/日少なかった。排せつ物量には有意な交互作用は検出されず、糞量、尿量および糞尿量のいずれにも、CP 含量の有意な効果が観察され、高 CP 飼料区に比べ

Table 3. Intake, excreta, milk performance, digestibility, TDN and nutrient sufficiency rate of cows fed the experimental diets

	Diets ¹				SE	Probability ²		
	HPHD	HPLD	LPHD	LPLD		CP	Deg	CP × Deg
Intake (g/day)								
DM	18010 ^c	17851 ^d	18358 ^a	18276 ^b	3	<0.01	<0.01	<0.01
CP	2994 ^a	2907 ^b	2492 ^c	2443 ^d	5	<0.01	<0.01	<0.01
ECPd	2058	1740	1872	1564	60	0.047	<0.01	0.74
K	288 ^a	286 ^b	271 ^c	270 ^d	1	<0.01	<0.01	0.02
Na	54.7 ^b	54.4 ^c	56.4 ^a	56.3 ^a	0.1	<0.01	<0.01	0.03
Excreta (kg/day)								
Feces	38.3	39.6	44.7	45.7	0.9	<0.01	0.22	0.84
Urine	19.7	16.7	15.1	13.7	0.8	<0.01	0.04	0.37
Feces + Urine	58.0	56.3	59.9	59.4	0.5	<0.01	0.06	0.22
Milk yield (kg/day)								
	20.9	21.4	20.5	20.7	0.2	0.04	0.12	0.41
Milk composition (%)								
Fat	4.75	4.63	4.58	4.50	0.06	0.04	0.15	0.73
Protein	3.85	3.83	3.83	3.80	0.02	0.35	0.31	0.85
Lactose	4.34	4.37	4.33	4.38	0.02	0.76	0.02	0.61
Digestibility (%)								
DM	71.8	70.2	67.5	66.6	0.6	<0.01	0.07	0.58
OM	75.8	74.3	71.5	70.7	0.6	<0.01	0.11	0.55
CP	63.5	60.9	56.3	55.5	0.8	<0.01	0.08	0.35
EE	71.9	69.5	71.1	70.1	1.6	0.95	0.32	0.67
aNDFom	68.2	69.2	62.7	63.0	0.9	<0.01	0.50	0.68
ADFom	66.3	64.0	61.3	59.5	0.7	<0.01	0.02	0.70
TDN (%DM)								
	70.7	69.2	67.1	66.3	0.6	<0.01	0.10	0.55
Sufficiency rate ³ (%)								
TDN	113	108	111	110	1	0.98	0.06	0.42
CP	136	131	116	114	1	<0.01	0.04	0.25
ECPd	116	101	109	92	4	0.17	<0.01	0.90

a,b,c,d Means in a row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

¹ HPHD = high CP high degradable protein diet, HPLD = high CP low degradable protein diet, LPHD = low CP high degradable protein diet, LPLD = low CP low degradable protein diet.

² CP = CP level, Deg = Degradability of protein source, CP × Deg = interaction of CP and Deg.

³ Sufficiency rate = intake / requirement × 100.

DM : dry matter, OM : organic matter, CP : crude protein, ECPd : effective degradable crude protein, EE : ether extracts, aNDFom : ash-free neutral detergent fiber, ADFom : ash-free acid detergent fiber, TDN : total digestible nutrients.

て低 CP 飼料区で尿量は減少したが、逆に糞量は増加し、合計の糞尿量もやや増加した。高 CP 飼料区から低 CP 飼料区への尿量の減少量は、平均して 3.8kg/日であった。また、尿量には分解性の有意な効果も認められ、低分解性飼料区では高分解性飼料区よりも、尿量が平均して 2.2kg/日減少した。

乳量・乳成分率にも有意な交互作用は検出されず、飼料 CP 含量の減少による乳量と乳脂肪率の有意な低下と、飼料タンパク質分解性の低下による乳糖率の有意な上昇が観察された。各栄養成分の消化率、TDN 含量および充足率のすべてで、有意な交互作用は認められなかった。粗脂肪以外の乾物、有機物、CP、aNDFom、ADFom の消化率および TDN 含量は、飼料 CP 含量の減少によって有意に低下し、加えて ADFom 消化率には分解性の低下による有意な低下も観察された。しかし、TDN 充足率の値には、飼料処理による有意な違いはなかった。CP 充足率には分解性の違いによる若干の有意

差も認められたが、飼料 CP 含量が減少することによって、CP 充足率はほぼ 20% 低下した。また、ECPd 充足率は HPHD 区が 116% と最も高く、次いで LPHD 区が 109% で、バイパス大豆粕によってタンパク質分解性を低下させた HPLD および LPLD 区は低値を示し、最も低い LPLD 区では 92% であった。

表 4 に N 出納および水分出納の結果を示した。CP 摂取量と同じく N 摂取量のみ飼料 CP 含量とタンパク質分解性の交互作用が検出されたが、飼料 CP 水準の低下による N 摂取量の減少が、平均して 77g/日と大きかったのに比べて、分解性の異なる飼料間の N 摂取量の違いは、いずれの CP 水準でもわずかであった。糞中への N 排せつ量に飼料処理による有意な効果は観察されなかったが、尿中への N 排せつ量は飼料 CP 含量の減少とタンパク質分解性の低下のいずれにも反応して有意に減少し、糞尿合計の N 排せつ量でも同様の有意な効果が認められた。また、乳中 N 移行量と見かけの N 蓄積

Table 4. Nitrogen and water balance of cows fed the experimental diets

	Diets ¹				SE	Probability ²		
	HPHD	HPLD	LPHD	LPLD		CP	Deg	CP × Deg
N intake (g/day)	479.1 ^a	465.1 ^b	398.8 ^c	391.0 ^d	0.8	<0.01	<0.01	<0.01
N excretion (g/day)								
Feces	175.0	181.6	174.1	174.2	4.5	0.40	0.48	0.50
Urine	116.6	94.2	63.5	54.4	5.4	<0.01	0.03	0.27
Milk	123.9	126.1	120.1	119.7	0.9	<0.01	0.37	0.21
Feces + urine	291.5	275.8	237.6	228.6	4.1	<0.01	0.02	0.44
Total excretion ³	415.4	401.9	357.7	348.3	4.4	<0.01	0.04	0.66
N balance ⁴ (g/day)	63.8	63.2	41.2	42.7	3.9	<0.01	0.91	0.80
Water intake (kg/day)								
Feed ⁵	15.0	14.9	15.4	15.3	0.1	<0.01	<0.01	0.42
Drinking	68.1	65.8	69.1	68.4	0.6	0.03	0.04	0.25
Metabolic ⁶	6.1	6.0	5.9	5.9	0.1	0.03	0.04	0.45
Total intake ⁷	89.3	86.7	90.4	89.5	0.6	0.02	0.03	0.22
Water excretion (kg/day)								
Feces	33.2	34.3	38.8	39.6	0.8	<0.01	0.27	0.87
Urine	18.9	15.9	14.4	13.1	0.8	<0.01	0.04	0.37
Milk	17.9	18.4	17.7	17.9	0.2	0.05	0.10	0.40
Feces + urine	52.1	50.2	53.2	52.7	0.4	<0.01	0.03	0.16
Total excretion	70.0	68.6	70.9	70.5	0.5	0.03	0.13	0.34
Water balance ⁸ (kg/day)	19.3	18.0	19.5	19.0	0.6	0.36	0.18	0.61

a,b,c,d Means in a row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

¹ HPHD = high CP high degradable protein diet, HPLD = high CP low degradable protein diet, LPHD = low CP high degradable protein diet, LPLD = low CP low degradable protein diet.

² CP = CP level, Deg = Degradability of protein source, CP × Deg = interaction of CP and Deg.

³ Sum of feces, urine and milk.

⁴ Subtracted total excretion from intake.

⁵ Feed water include added water.

⁶ Calculated from the intake of digestible crude protein and digestible non-protein organic matter¹⁴.

⁷ Sum of feed, drinking and metabolic.

⁸ Subtracted total excretion from total intake.

量には飼料 CP 含量の有意な効果が観察され、低 CP 飼料区は高 CP 飼料区と比べて、それぞれ平均して 5g/日および 22g/日少なかった。

飼料からの水分摂取量、飲水量、代謝水および総水分摂取量のいずれにも、飼料 CP 含量とタンパク質分解性の有意な影響が検出されたが、HPLD 区の飲水量と総水分摂取量が、他の処理区よりも 2kg/日以上少なかった以外、飼料処理間の違いはわずかであった。一方、糞中および尿中への水分排せつ量と乳中への水分移行量に対する飼料処理の効果は、上述の糞量、尿量および乳量で観察された結果と同様であり、すなわち、飼料 CP 含量が減少すると、尿中水分排せつ量と乳中水分移行量は有意に減少する一方で、糞中水分排せつ量は有意に増加した。また、タンパク質分解性の低下は、尿中水分排せつ量を有意に減少させた。糞尿合計の水分排せつ量では、タンパク質分解性の低下が、尿量減少を反映して、わずかではあるが有意な減少効果（平均して 1.2kg/日）を示したのに対し、飼料 CP 含量の減少は、糞中水分排せつ量の増加が影響して、やはりわずかではあるが、有意に糞尿中水分排せつ量を増加させた（平均して 1.8kg/日）。乳中水分移行量も含めた総水分排せつ量では、飼料 CP 含量減少による排せつ量の増加効果のみ、統計的

な有意性が検出された。見かけの水分保持量には飼料処理による影響は観察されなかった。

各飼料の給与による生体液成分の反応を表 5 にまとめた。生体液成分の測定値には、CP 含量と分解性の有意な交互作用は検出されなかった。第一胃液では pH に飼料処理による影響は観察されなかったが、アンモニア (NH₃) 濃度には飼料 CP 含量の有意な効果があり、平均すると高 CP 飼料区の 12.8mgN/dl が、低 CP 飼料区では 7.8mgN/dl へと大きく低下した。第一胃 NH₃ 濃度は、飼料のタンパク質分解性の低下によって低下する傾向にあったが、その効果は統計的に有意ではなかった。血漿では Na, K, Cl, 遊離脂肪酸, 乳酸および α アミノ N 濃度には飼料処理による有意な効果はなかったが、浸透圧, グルコースおよび尿素濃度には、飼料 CP 含量の有意な効果が観察され、いずれも高 CP 飼料区よりも低 CP 飼料区が低値を示し、特に血漿尿素濃度は低 CP 飼料区で大きく低下した。同様に、乳中尿素濃度も飼料 CP 含量の減少によって大きく低下した。血漿および乳中尿素濃度には、タンパク質分解性の低下によっても、数値的な低下が観察されたものの、統計的に有意な変化ではなかった。一方、尿中への尿素排せつ量には、飼料 CP 含量およびタンパク質分解性の両方に有意な効

Table 5. Ruminal fluid, plasma and milk constituent concentration and urinary constituent excretion of cows fed the experimental diets

	Diets ¹				SE	Probability ²		
	HPHD	HPLD	LPHD	LPLD		CP	Deg	CP × Deg
Ruminal fluid								
pH	6.85	7.00	6.78	6.83	0.10	0.30	0.36	0.63
Ammonia (mgN/dl)	14.1	11.5	8.8	6.8	1.1	<0.01	0.09	0.81
Plasma								
Osmolality (mOsm/kg)	285.0	287.0	282.0	283.0	0.8	<0.01	0.11	0.55
Na (mEq/L)	137.5	139.8	138.3	139.3	0.7	0.87	0.06	0.42
K (mEq/L)	4.1	4.0	4.0	3.9	0.1	0.23	0.34	0.48
Cl (mEq/L)	103.3	103.0	102.0	102.0	1.1	0.35	0.91	0.91
Glucose (mg/dl)	68.1	67.8	64.6	62.7	0.8	<0.01	0.22	0.37
Free fatty acid (μEq/L)	91.0	110.8	93.8	151.8	27.1	0.45	0.20	0.51
Lactic acid (mg/dl)	9.2	7.1	6.9	6.6	0.6	0.06	0.09	0.20
α amino acid (mgN/dl)	4.7	4.9	4.8	4.4	0.1	0.23	0.51	0.11
Urea (mgN/dl)	12.9	11.5	6.8	5.9	0.6	<0.01	0.12	0.66
Milk								
Urea (mgN/dl)	14.8	14.0	9.9	7.8	0.9	<0.01	0.16	0.51
Urine								
Urea (gN/day)	79.9	61.8	31.2	24.7	5.1	<0.01	0.05	0.30
Allantoin (g/day)	25.0	23.1	24.0	23.6	1.2	0.88	0.38	0.56

¹ HPHD = high CP high degradable protein diet, HPLD = high CP low degradable protein diet, LPHD = low CP high degradable protein diet, LPLD = low CP low degradable protein diet.

² CP = CP level, Deg = Degradability of protein source, CP × Deg = interaction of CP and Deg.

果が観察され、飼料 CP 含量の減少あるいは分解性の低下によって、尿中尿素排せつ量が減少した。また、尿中アラントイン排せつ量には、飼料処理による違いは認められなかった。

考 察

本研究は泌乳牛の摂取 N に対する生理的な反応を制御することで、乳生産に悪影響を与えずに尿量を低減化する栄養管理手法を検討したものであるが、CP 含量を約 13.5% とした低 CP 飼料区では、高 CP 飼料区と比べてわずかではあるが、乳量と乳脂肪率の低下が見られた。両低 CP 飼料区とも CP 充足率は 110% 以上と見積もられ、LPLD 区で ECPd 充足率が 92% と算出されているものの、これらの成分率の低下は ECPd 充足率 109% と算出された LPHD 区でも生じていることから、CP や ECPd 不足が直接の原因ではないと思われる。飼料 CP 水準の生産性への影響については、いろいろな乳量水準の泌乳牛で、種々の CP 水準を設定して研究が実施されており、設定した飼料 CP 含量の範囲で、乳量・乳成分に変化がなかったとする報告が多いが^{1,5,8,15,37,38)}、設定された飼料 CP 含量と乳量水準の条件によっては、本試験結果と同様に、飼料 CP 含量の低下で乳量の減少^{4,6,12,13)}あるいは乳脂肪含量の低下^{4,6,12,23)}が観察される場合も報告されている。それらの乳量減少を観察した試験では、その際に飼料乾物摂取量 (DMI) の減少が観察されており、それに起因する栄養素供給量の減少は、乳量を減少させた一因であったと考えられる。本試験は定量給与の試験条件で、DMI に各処理区間の実質的な違いはなかったが、低 CP 区の飼料は高 CP 区の飼料の大豆粕またはバイパス大豆粕を、全般的に成分消化率の低いビートパルプとフスマ²⁵⁾に代替して飼料の CP 低減化を図ったため、高 CP 区の飼料と比較して成分消化率と TDN 含量が低下していた。TDN 充足率には飼料 CP 含量の有意な効果は検出されなかったものの、低 CP 飼料区では血漿グルコース濃度が有意に低下しており、体内へのエネルギー供給量が高 CP 飼料区に比べて少なかった可能性が推測され、これらの栄養素供給量の減少は、低 CP 飼料区の乳量に一定の影響を及ぼした可能性が考えられる。また、乳脂肪率に関しては、飼料 CP 含量と乳脂肪率との正の直線的関係について報告した Olmos Colmenero と Broderick³¹⁾ が、タンパク質供給量の増加が引き起こす第一胃内のセルロース分解活性の上昇が、酢酸産生量を増加させることで、乳脂肪合成が亢進すると考察している。本試験でもタンパク質供給量の変

化で、そのようなセルロース分解活性の変化が生じた可能性がないとは言えないが、そもそも低 CP 飼料区で用いたビートパルプやフスマは繊維消化性が低く、セルロース分解の低下を招く飼料原料であったと考えられるので、低 CP 飼料区で観察された若干の乳脂肪率低下は、CP 含量低減化のために選択した飼料原料の繊維消化性に、原因があったのではないかとと思われる。

一方、飼料タンパク質の分解性低下によって、乳糖率にわずかな上昇が観察された。これまでに加熱大豆粕、魚粉あるいはコーングルテンミールなどのバイパスタンパク質飼料を用いた泌乳牛の給与試験^{6,9,19,46)}のいずれにおいても、乳糖率の変化は報告されていない。低分解性区の主たるタンパク質源として使用した加糖加熱処理されたバイパス大豆粕の糖成分が、何らかの影響を及ぼした可能性も考えられるが、乳糖の前駆物質であるグルコースの血漿中濃度には、タンパク質分解性による明確な効果は検出されていない。従って、この乳糖率の上昇に関しては、その理由は判然としない。ただし、いずれにしても、この乳糖率も含めて、今回の乳量および乳成分に観察された飼料処理間の差はわずかであり、本試験の飼料処理が乳生産へ及ぼした影響は、ごく限定的なものであったことは確かである。また、尿中アラントイン排せつ量には飼料処理による有意な変化が観察されなかったため、今回の CP 水準と第一胃分解性の低下が、第一胃微生物合成量に悪影響を与えるものではなかったことも推測される。しかし、飼料 CP 含量の低減化を図るための飼料設計に当たっては、可能な限り乳生産に影響が出ないように、タンパク質源を代替する飼料原料の選択について、さらに検討する必要があると思われる。

本試験結果は、飼料 CP 含量を減少させる処理と、飼料タンパク質の第一胃分解性を低下させる処理のどちらも、泌乳牛の尿量を有意に減少させることを示した。N と同様に尿量を規制する栄養要因と考えられる K と Na の摂取量には、統計的には有意な飼料処理間の違いがあったものの、どちらもその飼料間差は小さく、Na 摂取量の飼料間の違いは、CP とは逆の関係にあった。また、尿量と同様の反応が、尿中 N あるいは尿素排せつ量に観察されていることから、この両飼料処理による尿量反応の大部分が、尿中への N 排せつに関連して生じたことは間違いないと思われる。この結果は、飼料 CP 水準の低減はもとより、さらに N の利用効率を向上させる栄養管理も、泌乳牛の尿量を低減させる手法として利用できる可能性を示唆している。

これまでに統計的な研究では、泌乳牛の N 摂取量と尿量との正の相関が報告され^{3,22,24,32)}、実際に泌乳牛へ

CP 含量を低減した飼料を給与して、今回の我々の試験と同様に、尿中への N 排せつ量の減少と、それに付随した有意な尿量の減少を確認した試験結果が複数報告されている^{4,13,31,38}。しかし、一方で、明らかに CP 含量の異なる飼料を給与し、尿中への N 排せつ量には有意な影響があったにもかかわらず、尿量に有意な変化が観察されていない研究報告も散見される^{21,33,37,44}。これらの研究で尿量が有意に変化しなかった明確な理由は定かではないが、考えられる原因の一つとして、N 以外の尿量規制要因が飼料処理間で変動していた可能性が挙げられる。例えば、飼料の CP 含量を高めるために、粗飼料比率を低下させて濃厚飼料に置き換えたような試験条件では³⁷、一般的に濃厚飼料の K 含量は粗飼料よりも低い⁴⁵ため、そのような CP 含量を高めた飼料の給与は K 摂取量を減少させると推定され、尿量に対する N 摂取量増加の効果が、K 摂取量減少の効果によって相殺された可能性が考えられる。さらに、飼料 CP 水準の変化に対して、有意な尿量変化が検出されない一番大きな原因として、泌乳牛の腎の尿生成能力における個体差の存在が挙げられる。摂取されたタンパク質およびアミノ酸は、代謝の最終産物である尿素が尿中に排せつされる際に、腎尿細管で浸透圧効果を発揮して水分排せつ量に影響を与える⁴⁵が、腎は一定程度までは尿中に尿素を濃縮して排せつする能力を持ち、その能力の限界を超えると、尿量が増加することになる。しかし、この腎の能力は個体間で大きく異なるため、N 摂取に対する尿量反応には、大きな個体差が生じる³⁸。CP 低減飼料給与で試験群の平均尿量が数値的に減少していても、統計的な有意差が検出されていない報告例では³³、この反応の個体差がその効果を不明瞭にした一因であった可能性が考えられる。また、著者らの以前の K と CP の同時制御試験²⁸で観察された CP 低減飼料給与による尿量の減少効果が、統計的な傾向 ($P=0.07$) の確認に留まったのも、そのような反応の個体差が影響していたと思われる。

飼料タンパク質の第一胃分解性と尿量との関係が明示された報告は、非常に限られており、そこに示された尿量と分解性の関係についても、統一的な結果とはなっていない。Olibeira ら³⁰は、飼料の CP レベルは一定とし、飼料中の大豆粕を、第一胃で速やかに分解される尿素に段階的に代替した 4 種類の飼料を調製し、泌乳牛に給与したところ、尿量の代替量に比例して、尿量が増加することを観察したが、ほぼ同じ飼料条件で同様の試験を実施した Silva ら⁴³の研究では、有意な尿量の変化は観察されなかった。これらの報告において、前者の試験では尿量データの変動係数が 15.6% であったのに対

して、後者の試験では 50.9% と、データの変動が大きかったことが示されており、後者の試験結果は、上述した尿量反応における個体差に、少なからぬ影響を受けたものであったと推察される。さらに、飼料中のタンパク質源を大豆粕とした飼料と、その一部を低分解性のエクスペラー大豆粕に代替した飼料とを比較した Broderick ら⁶の試験では、エクスペラー大豆粕飼料を給与した泌乳牛の尿量が、大豆粕飼料を給与した牛よりも有意に増加するという結果が報告されている。その試験ではエクスペラー大豆粕飼料の給与で、乳中尿素濃度が有意に上昇し、尿中 N 排せつ量も有意ではないが数値的な増加が観察されていることから、それらに起因して尿量の増加反応が現れたものと思われる。しかしながら、低分解性タンパク質飼料を泌乳牛に給与した場合の反応としては、血漿あるいは乳中尿素濃度の低下^{11,41,42}と尿中 N 排せつ量の減少^{10,18,41,42}が報告されることが一般的であり、本試験でもバイパス大豆粕の給与は、尿中 N 排せつ量を有意に減少させている。従って、Broderick ら⁶の観察はどちらかと言えば特例的なものと考えべきであり、N 排せつ量や血漿ないし乳中尿素濃度の一般的な反応からすれば、低分解性タンパク質飼料を摂取した泌乳牛では、尿量減少が順当な反応と考えるのが妥当であろう。

今回の両飼料処理の尿量に対する効果を、尿中水分排せつ量の変化で比較すると、CP 含量の低下が平均して 3.7kg/日の減少を引き起こしたのに対して、分解性の低下による減少は平均して 2.2kg/日であり、この試験の範囲では、概ね 3% の CP 水準の低減処理の方が、飼料タンパク質の分解性の低減処理よりも、尿中水分排せつ量を大きく減少させた。また、この飼料処理による効果の違いは、尿中への N あるいは尿素排せつ量でも同様であった。この効果の違いの背景には、泌乳牛の N 排せつ量と尿量の決定に重要な役割を果たす血漿尿素濃度^{28,38}と、その血漿尿素濃度を左右する主たる要因の一つである第一胃液 NH₃ 濃度に見られた、両飼料処理に対する反応の違いが関与していたと推測される。すなわち、飼料 CP の低減処理が、血漿尿素濃度と第一胃液 NH₃ 濃度を、それぞれ平均して 5.9mg/dl および 5.0mg/dl と大きく低下させたのに対して、飼料タンパク質の分解性低減処理では、それぞれ平均して 1.2mg/dl および 2.3mg/dl の数値的な低下のみであり、これらの違いが尿中 N および水分排せつ量に対する効果の違いに反映されたことは、間違いのないと思われる。この違いは尿中水分排せつに直接関係する血漿浸透圧の変化にも反映されており、浸透圧構成成分である血漿尿素が大きく低下した低 CP 飼料区では、血漿浸透圧が有意な低

下を示しているのに対して、分解性低減処理では変化が観察されていない。さらに、第一胃 NH₃ 濃度を HPLD 区と LPHD 区で比較すると、ECPd 摂取量が多かった LPHD 区よりも、ECPd 摂取量が少なかった HPLD 区の方が、NH₃ 濃度が高いという結果であり、これは第一胃液 NH₃ 濃度の反応が、単純に ECPd 摂取量の比較だけでは判断できないことを示唆している。飼料 CP 水準の低下による第一胃液 NH₃ 濃度の低下は、多くの研究で報告されており^{5,20,31}、飼料タンパク質供給量の減少は、第一胃におけるタンパク質分解量の全般的な低下を引き起こし、アミノ酸の脱アミノからの NH₃ 生成量を減少させると考えられる¹。一方、第一胃 NH₃ 濃度に対するタンパク質分解性の効果に関しては、大豆粕のエクスペラー処理大豆粕への代替で、採食後の第一胃 NH₃ 濃度上昇に低下傾向は観察されたものの、統計的な有意差がなかった例⁹や、大豆粕と加熱大豆粕を比較した試験で、第一胃 NH₃ 濃度に違いが認められなかった例³⁶などが報告されており、今回の試験結果も含めて、タンパク質の分解性低減による第一胃 NH₃ 濃度への効果は、CP 水準低減の効果に比べると相対的に小さいと思われる、結果的に尿量低減効果も小さかったものと考えられる。

ただし、飼料タンパク質分解性低減処理の効果の程度は、CP 水準によって異なる可能性が考えられる。今回の結果では、尿中水分排せつ量に両飼料処理間の有意な交互作用は検出されなかったものの、高い CP 水準の HPHD 区と HPLD 区の間には、尿中水分排せつ量に 3.0kg/日の差が観察されたのに対して、低い CP 水準の LPHD 区と LPLD 区間の差は 1.3kg/日であり、バイパス大豆粕飼料を多用したことによる尿中水分排せつ量の減少量は、高 CP 条件の方が倍以上多かった。Castillo ら¹⁰は同様の結果を尿中 N 排せつ量で観察しており、飼料中の大豆粕をホルマリン処理大豆粕へ段階的に代替した際の尿中 N 排せつ量の減少率は、CP15.9% 飼料よりも CP19.0% 飼料の方が大きかったと報告している。飼料タンパク質分解性の効果の現れ方が、飼料 CP 水準あるいは尿量や尿中 N 排せつ量のレベルによって、どの程度異なってくるのかは今後の検討課題であるが、尿量あるいは尿中 N 排せつ量の低減を目的に、バイパスタンパク質飼料を有効に利用するためには、そのような条件による効果の違いも考慮した利用方法を検討する必要があるかもしれない。

本試験において飼料 CP 含量の低減処理は、尿量を有意に減少させたものの、糞中水分排せつ量を有意に増加させたために、糞尿合計の水分排せつ量を増加させると

いう結果であった。泌乳牛の水分代謝に関連する要因について、広範な統計解析を行った Paquay ら³⁴の研究や、泌乳牛の糞の堅さを左右する要因を調べるための給与試験を行った Ireland-Perry と Stalling¹⁷の研究では、糞中水分排せつ量あるいは糞乾物率に及ぼす飼料 CP 含量の効果は認められていない。しかし、どちらの報告においても、繊維摂取量にはこれらのパラメーターとの密接な関係が観察されており、繊維摂取量の増加は糞中水分排せつ量の増加あるいは糞乾物率の低下を引き起こす。Ireland-Perry と Stalling¹⁷は、高繊維含量の飼料を給与した泌乳牛の糞中には、未消化の NDF および ADF が多く含まれることから、これら繊維様物質の高い保水性が糞中に水分を保持することで、糞乾物率の低下が生じたと考察している。上述の通り、本試験の低 CP 飼料区は高 CP 飼料区よりも繊維の消化率が低く、低 CP 飼料区の牛の糞には繊維が多く残存しており、この性状が糞中への水分排せつを促した可能性が考えられる。ただし、本試験の場合、そのような繊維等の消化率の低下は、糞中の乾物量も増加させたため、糞乾物率は高 CP 飼料区も低 CP 飼料区も同じ 13.5% であった。以前に著者らが実施した今回と同水準の CP 低減飼料の給与試験²⁸では、タンパク質源を主に馬鈴薯デンプンに代替した CP 低減飼料を用いたが、その時は代替前の飼料と比べて繊維消化率に有意な低下は認められず、糞中水分排せつ量にも有意な変化は観察されなかったもので、その結果からも、糞中水分排せつにおける残存繊維の関与は支持されるだろう。

泌乳牛の尿量低減を目的に、著者らがこれまで検討した飼料中の K および N の低減処理では、尿量の減少に対応して、牛による自発的な飲水量の減少が誘起され、これらの栄養的な操作が、牛にとって生理的な尿量低減手法であることを示唆していた^{27,28}。おそらく、今回の CP 低減飼料給与による尿量の減少も、飲水量を減少させる作用を及ぼしたと推測されるが、それ以上に糞中に排せつされる水分量が増加したことにより、結果的に飲水量が増加し、CP 低減飼料給与時の水分総摂取量を増加させたと考えられる。糞中水分排せつ量は水分総摂取量と最も高い相関関係を示すことが報告されており³⁴、糞を経由した水分の排せつ量の変化も、乳牛の水分摂取行動に影響を与える大きな要因の一つである。従って、今回の低 CP 飼料区における尿量の減少と糞中水分排せつ量の増加は、別々の反応と考えるべきであり、尿中への排せつ量が減ったために、糞中への排せつ量が増加したのではないと推察される。今回の CP 低減飼料の場合でも、選択した飼料原料による繊維消化率低下の問題

を解決すれば、尿量低減効果を支障なく発揮させることができると考えられるので、そのためにはやはり、CP低減飼料の調製のために選択する飼料源についての検討が、今後の重要な課題と思われる。

謝 辞

本研究の動物試験の遂行にあたり多大なご協力をいただいた、畜産研究支援センター業務第一科C棟作業班の皆様、厚く御礼申し上げます。また、試料の分析にご協力いただいた葦沢恵美子氏と島田知子氏に、心より感謝申し上げます。なお、本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「自給飼料を基盤とした国産畜産物の高付加価値化技術の開発」の研究費により行われた。

引用文献

- 1) Agle, M., Hristov, A.N., Zaman, S., Schneider, C., Ndegwa, P.M. and Vaddella, V.K. (2010). The effects of ruminally degraded protein on rumen fermentation and ammonia losses from manure in dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 93, 1625-1637.
- 2) AOAC (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- 3) Bannink, A., Valk, H. and Van Vuuren, A.M. (1999). Intake and excretion of sodium, potassium, and nitrogen and the effects on urine production by lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 82, 1008-1018.
- 4) Broderick, G.A. (2003). Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 86, 1370-1381.
- 5) Broderick, G.A., Stevenson, M.J., Patton, R.A., Lobos, N.E. and Olmos Colmenero, J.J. (2008). Effects of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 91, 1092-1102.
- 6) Broderick, G.A., Stevenson, M.J. and Patton, R.A. (2009). Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 92, 2719-2728.
- 7) Burgos, M.S., Senn, M., Sutter, F., Kreuzer, M. and Langhans, W. (2001). Effect of water restriction on feeding and metabolism in dairy cows, *Am. J. Physiol.*, 280, R418-R427.
- 8) Burgos, S.A., Fadel, J.G. and DePeters, E.J. (2007). Prediction of ammonia emission from dairy cattle manure based on milk urea nitrogen: Relation of milk urea nitrogen to urine urea nitrogen excretion, *J. Dairy Sci.*, 90, 5499-5508.
- 9) Casper, D.P., Maiga, H.A., Brouk, M.J. and Schingoethe, D.J. (1999). Synchronization of carbohydrate and protein sources on fermentation and passage rates in dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 82, 1779-1790.
- 10) Castillo, A.R., Kebreab, E., Beever, D.E., Barbi, J.H., Sutton, J.D., Kirby, H.C. and France, J. (2001). The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets, *J. Anim. Sci.*, 79, 247-253.
- 11) Castro, S.I.B., Phillip, L.E., Lapierre, H., Jardon, P.W. and Berthiaume, R. (2008). The relative merit of ruminal undegradable protein from soybean meal or soluble fiber from beet pulp to improve nitrogen utilization in dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 91, 3947-3957.
- 12) Cyriac, J., Rius, A.G., McGilliard, M.L., Pearson, R.E., Bequette, B.J. and Hanigan, M.D. (2008). Lactation performance of mid-lactation dairy cows fed ruminally degradable protein at concentrations lower than National Research Council recommendations, *J. Dairy Sci.*, 91, 4704-4713.
- 13) Dinn, N.E., Shelford, J.A. and Fisher, L.J. (1998). Use of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 81, 229-237.
- 14) Faichney, G.J. and Boston, R.C. (1985). Movement of water within the body of sheep fed at maintenance under thermoneutral conditions, *Aust. J. Biol. Sci.*, 38, 85-94.
- 15) Frank, B., Persson, M. and Gustafsson, G. (2002). Feeding dairy cows for decreased ammonia emission, *Lives. Prod. Sci.*, 76, 171-179.
- 16) Hristov, A.N., Hanigan, M., Cole, A., Todd, R., McAllister, T.A., Ndegwa, P.M. and Rotz, A.

- (2011). Review: Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots, *Can. J. Anim. Sci.*, 91, 1-35.
- 17) Ireland-Perry, R.L. and Stallings, C.C. (1993). Fecal consistency as related to dietary composition in lactating Holstein cows, *J. Dairy Sci.*, 76, 1074-1082.
- 18) Kebreab, E., France, J., Mills, J.A.N., Allison, R. and Dijkstra, J. (2002). A dynamic model of N metabolism in the lactating dairy cow and an assessment of impact of N excretion on the environment, *J. Anim. Sci.*, 80, 248-259.
- 19) Keery, C.M. and Amos, H.E. (1993). Effects of source and level of undegraded intake protein on nutrient use and performance of early lactation cows, *J. Dairy Sci.*, 76, 499-513.
- 20) Kristensen, N.B., Storm, A.C. and Larsen, M. (2010). Effect of dietary nitrogen content and intravenous urea infusion on ruminal and portal-drained visceral extraction of arterial urea in lactating Holstein cows, *J. Dairy Sci.*, 93, 2670-2683.
- 21) Kröber, T.F., Külling, D.R., Menzi, H., Sutter, F. and Kreuzer, M. (2000). Quantitative effects of feed protein reduction and methionine on nitrogen use by cows and nitrogen emission from slurry, *J. Dairy Sci.*, 83, 2941-2951.
- 22) 久米新一・野中和久・大下友子 (2003). 乾乳牛のメタン発生量並びに窒素・ミネラル排泄量に及ぼす給与粗飼料の影響, 北海道農研研報, 178, 21-34.
- 23) Leonardi, C., Stevenson, M. and Armentano, L.E. (2003). Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 86, 4033-4042.
- 24) Nennich, T.D., Harrison, J.H., Van Wieringen, L.M., St-Pierre, N.R., Kincaid, R.L., Wattiaux, M.A., Davidson, D.L. and Block, E. (2006). Prediction and Evaluation of urine and urinary nitrogen and mineral excretion from dairy cattle, *J. Dairy Sci.*, 89, 353-364.
- 25) 農業・食品産業技術総合研究機構 (2009). 日本標準飼料成分表, 2009年版, 中央畜産会, 東京, 287p.
- 26) 農業・食品産業技術総合研究機構 (2006). 日本飼養標準 乳牛, 2006年版, 中央畜産会, 東京, 205p.
- 27) 大谷文博・田鎖直澄・甘利雅弘・小笠原俊介・森田 総一郎・松浦庄司・鈴木知之・栗原光規・樋口浩二・野中最子 (2010). 低カリウム飼料の給与が泌乳牛の尿量低減化に及ぼす影響, 畜草研研報, 10, 1-8.
- 28) 大谷文博・樋口浩二・小林洋介・野中最子・矢用健一・須藤まどか (2013). カリウムと窒素の同時制御による泌乳牛の尿量低減化, 畜草研研報, 13, 41-52.
- 29) 岡本英竜・原田靖生 (2006). 新編畜産ハンドブック (扇元敬司他編), 講談社, 東京, 471-484.
- 30) Olivira, A.S., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Renno, L.N., Queiroz, A.C. and Chizzotti, M.L. (2001). Microbial protein production, purine derivatives and urea excretion estimate in lactating dairy cows fed isoprotein diets with different non protein nitrogen compounds level, *Rev. Braz. Zootec.*, 30, 1621-1629.
- 31) Olmos Colmenero, J.J. and Broderick, G.A. (2006). Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 89, 1704-1712.
- 32) 扇勉・峰崎康裕・西村和行・糟谷広高・藤田眞美子・原悟志 (2003a). 牧草サイレージ主体飼養における泌乳牛の糞尿量および窒素排泄量, 日畜会報, 74, 525-530.
- 33) 扇勉・糟谷広高・藤田眞美子・斉藤繁・原悟志 (2003b). 魚粉利用による泌乳牛の窒素排泄量低減, 日畜会報, 74, 509-515.
- 34) Paquay, R., De Baere, R. and Lousse, A. (1970). Statistical research on the fate of water in the adult cow. II. The lactating cow, *J. Agric Sci.*, 75, 251-255.
- 35) Rapp, R.D. (1963). Determination of serum amino acids, *Clin. Chem.*, 9, 27-30.
- 36) Sahlu, T., Schingoethe, D.J. and Clark, A.K. (1984). Lactational and chemical evaluation of soybean meals heat-treated by two methods, *J. Dairy Sci.*, 67, 1725-1738.
- 37) 斉藤公一・川島知之・小松篤司・淵本大一郎・作本亮介・荻野暁史・黒田和孝・野中最子・永西 修・田鎖直澄・アグンブルノモアディ・樋口浩二・寺田文典 (2003). 泌乳牛における給与飼料中の粗蛋白質含量の違いが窒素排泄量および糞尿由来窒素揮散に及ぼす影響について, 畜草研研報, 3, 1-8.
- 38) Sannes, R.A., Messman, M.A. and Vagnoni, D.B. (2002). Form of rumen-degradable carbohydrate and nitrogen on microbial protein synthesis and

- protein efficiency of dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 85, 900-908.
- 39) Santos, F.A.P., Santos, J.E.P., Theurer, C.B. and Huber, J.T. (1998). Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: A 12-year literature review, *J. Dairy Sci.*, 81, 3182-3213.
- 40) SAS Institute (2008). *SAS/STAT 9.2 User's Guide: The GLM Procedure (Book Excerpt)*. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- 41) Shingfield, K.J., Jaakkola, S. and Huhtanen, P. (2001). Effects of level of nitrogen fertilizer application and various nitrogenous supplements on milk production and nitrogen utilization of dairy cows given grass silage-based diets, *Anim. Sci.*, 73, 541-554.
- 42) Shingfield, K.J., Vanhatalo, A. and Huhtanen, P. (2003). Comparison of heat-treated rapeseed expeller and solvent-extracted soya-bean meal as protein supplements for dairy cows given grass silage-based diets, *Anim. Sci.*, 77, 305-317.
- 43) Silva, R.M.N., Valadares, R.F.D., Filho, Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., Renno, L.N. and Silva, J.M. (2001). Urea for dairy cows. 2. Estimates of urinary volume, microbial production and urea excretion, *Rev. Braz. Zootec.*, 30, 1948-1957.
- 44) Tomlinson, A.P., Powers, W.J., Van Horn, H.H., Nordstedt, R.A. and Wilcox, C.J. (1996). Dietary protein effects on nitrogen excretion and manure characteristics of lactating cows, *Transactions of the ASAE*, 39, 1441-1448.
- 45) 津田恒之・小原嘉昭・加藤和雄 (2004). 第二次改訂増補 家畜生理学, 養賢堂, 東京, 200-203.
- 46) Wheeler, J.G., Amos, H.E., Froetschel, M.A., Coomer, J.C., Maddox, T. and Fernandez, J.M. (1995). Responses of early lactation cows fed winter and summer annual forages and undegradable intake protein, *J. Dairy Sci.*, 78, 2767-2781.
- 47) Young, E.G. and Conway, C.F. (1942). On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction, *J. Biol. Chem.*, 142, 839-853.

The Effects of Dietary Protein Level and Rumen Degradability on Urine Volume in Lactating Dairy Cows

Fumihiro OHTANI, Kouji HIGUCHI, Yousuke KOBAYASHI and Itoko NONAKA^a

Animal Physiology and Nutrition Research Division,
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, 305-0901 Japan

Summary

For the purpose of developing the nutritional management to decrease urine volume of lactating dairy cows by controlling nitrogen, the study set out to examine the effects of dietary protein level and rumen degradability on urine volume. Four Holstein cows in late lactation were offered four diets comprising two levels of crude protein (CP; almost 16.5% and 13.5%) and two levels of protein degradability (replacing the ratio of soybean meal to heat-treated soybean meal as a source of rumen protected protein), and balance trials were conducted. Milk yield and milk fat percentage decreased significantly with reducing CP content in diets, but the degree of decrease were small. Both reduction in dietary CP content and protein degradability showed the effect that significantly decreased urine volume in lactating dairy cows. The effect of dietary CP content on urine volume might be larger than the effect of protein degradability, reflecting a difference in the impact of two treatments on blood urea and ruminal ammonia concentration. Feeding low CP diets caused increase in fecal water excretion, and since this increment could be attributed to lower fiber digestibility in low CP diets, it was thought that the selection of feed source to prepare low CP diet was important.

Key words: lactating dairy cows, nutritional management, protein level, protein rumen degradability, urine volume reduction

^a Present address: NARO Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, Koshi, 861-1192 Japan

© 2014 NARO Institute of Livestock and Grassland Science

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced without the permission of the copyright holder.

Published by Institute of Livestock and Grassland Science,
National Agriculture and Food Research Organization (NARO)
Ikenodai 2, Tsukuba, Ibaraki 305-0901 Japan

編集委員会事務局

企画管理部情報広報課

新谷 成正

飛鳥井可奈子

那須企画管理室連絡調整チーム

大里 孝

本研究報告から転載、複製を行う場合は、農研機構畜産草地研究所の許可を得て下さい。

※農研機構は、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構のコミュニケーションネーム（略称）です。

平成 26 年 3 月 印刷

平成 26 年 3 月 発行

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所

〒305-0901 茨城県つくば市池の台2

TEL 029-838-8600(代)

FAX 029-838-8606

印刷所 朝日印刷株式会社つくば支社

(目的)

第1条 畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料への投稿については、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構刊行物著作権取扱規程（14規程56号）に定めるもののほかこの要領の定めるところによる。

(投稿者の資格)

第2条 投稿者は原則として、畜産草地研究所職員（以下「職員」という。）及び流動研究員、依頼研究員、日本学術振興会特別研究員、日本学術振興会外国人特別研究員等（以下「他の職員」という。）とする。

- 一 職員が投稿する内容は、主として畜産草地研究所（以下「研究所」という。）で行った研究とする。
- 二 他の職員が投稿する内容は、研究所で行った研究とする。

(投稿原稿の内容)

第3条 投稿原稿の内容は次のとおりとする。

- 1 畜産草地研究所研究報告（Bulletin of NARO Institute of Livestock and Grassland Science / 略誌名：Bull NARO Inst Livest Grassl Sci）
 - 一 原著論文：研究所において行った試験研究及び研究所以外の者に委託して行った試験研究の成果に関わる論文とする。
 - 二 短報：一以外の研究の予報、速報などの短報とする。
 - 三 技術論文：新しい技術や技術の組立、実証などを主体とする報告。
 - 四 総説：畜産草地研究に関わるものとする。総説は投稿のほか、編集委員会が依頼したものを含む。
 - 五 学位取得論文：研究所において主として行った試験研究による学位取得論文とする。
- 2 畜産草地研究所研究資料（Memoirs of NARO Institute of Livestock and Grassland Science / 略誌名：Mem NARO Inst Livest Grassl Sci）
調査資料・技術資料・研究資料：研究所において行った試験研究及び研究所が研究所以外のものに委託して行った試験研究のうち、学術的・産業的に有用な未発表の資料とする。

(原稿の執筆)

第4条 原稿の執筆にあたっては、別に定める畜産草地研究所研究報告及び畜産草地研究所研究資料執筆要領（13畜草B第44号）に基づくものとする。使用する言語は日本語又は英語とする。

(原稿の提出)

第5条 次の手続きにより原稿及び原稿提出票を事務局に提出する。

- 一 職員は原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究領域長等の校閲を受ける。
- 二 他の職員は原稿提出票に必要事項を記載し、所属研究領域長等の校閲を受ける。

(受付)

第6条 原稿及び原稿提出票を事務局が受け取った日を受付日とする。受理日は編集委員会の審査の結果、掲載が妥当と認められた日とする。

(審査)

第7条 編集委員会は次の手続きにより論文を審査する。ただし、学位取得論文については審査を省略することができる。

- 一 編集委員会は論文の内容により審査員正副をそれぞれ1名決定し、論文審査を依頼する。審査員は研究所内及び研究所外の研究者等とし、その氏名は公表しない。
- 二 審査員は論文審査票により審査を行う。また必要に応じて指摘事項を書き出し提出する。
- 三 事務局は審査員と著者の間のやり取りの対応にあたる。
- 四 編集委員会は審査員の審査結果を参考にして掲載の可否を判断する。
審査の内容によっては著者に原稿の訂正を求めることができる。
- 五 著者は審査結果を受領後、編集委員会が指定する期日までに修正原稿を事務局に提出する。

(校正)

第8条 著者による校正は原則として初校のみとする。校正は誤植の訂正程度にとどめる。やむを得ず大きな変更等を行う場合には編集委員会の承認を得なければならない。

(別刷り)

第9条 別刷りは次のとおりとする。

- 一 100部とし、筆頭著者が代表で受け取る。
- 二 別刷りの追加を希望する場合は研究費負担で印刷する。

附 則

この規定は、平成14年4月1日から施行する。

附 則

この規定は、平成15年10月1日から施行する。

附 則

この規定は、平成18年4月1日から施行する。

附 則

この要領は、平成20年4月1日から施行する。

附 則

この要領は、平成23年4月1日から施行する。

附 則

この要領は、平成23年8月8日から施行する。



農研機構