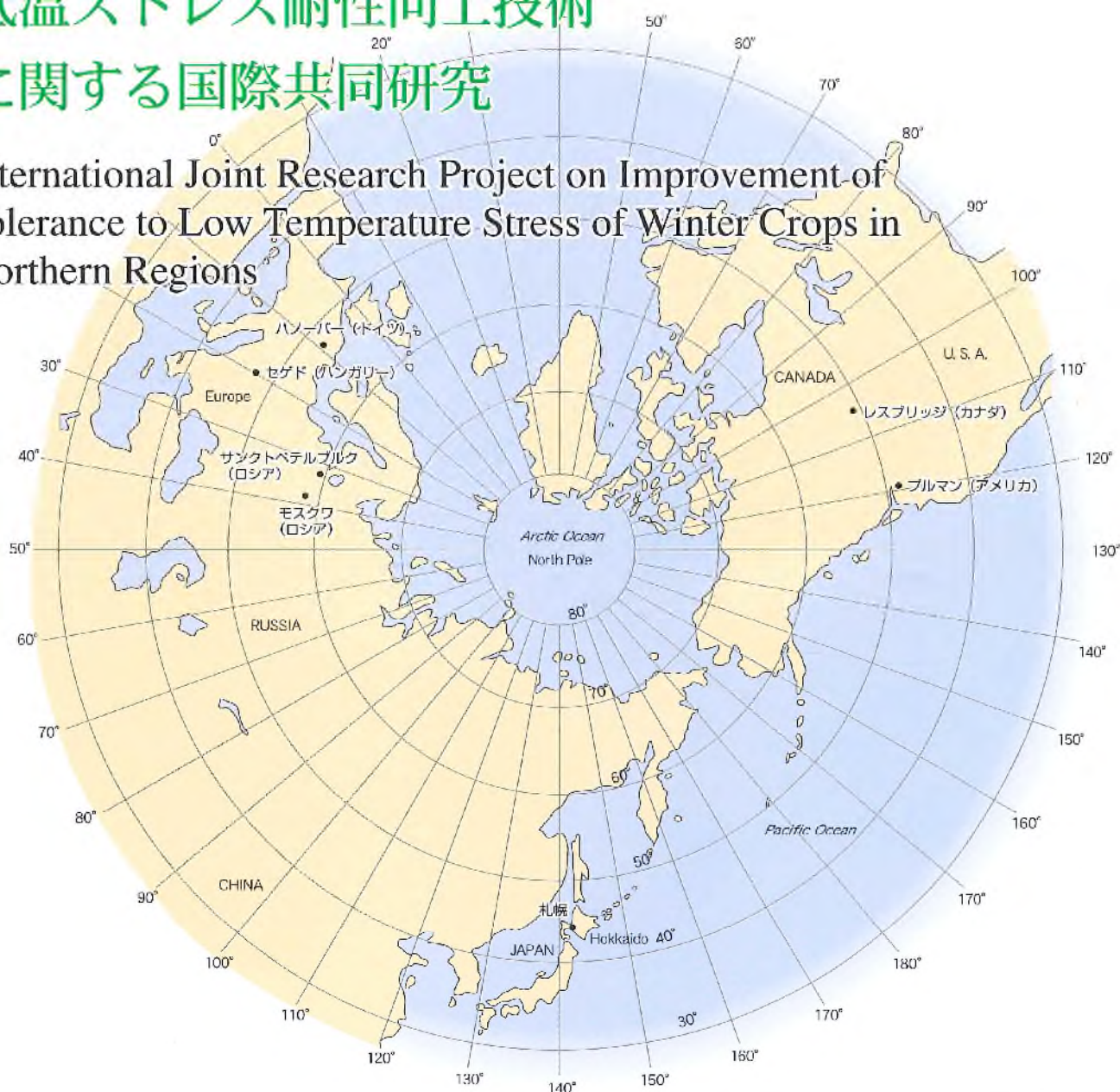


PROJECT NARCH

NATIONAL AGRICULTURAL RESEARCH CENTER FOR HOKKAIDO REGION (NARCH)

北方圏における作物の 低温ストレス耐性向上技術 に関する国際共同研究

International Joint Research Project on Improvement of Tolerance to Low Temperature Stress of Winter Crops in Northern Regions



北方圏における作物の低温ストレス 耐性向上技術に関する国際共同研究

International Joint Research Project on Improvement of
Tolerance to Low Temperature Stress of Winter Crops in
Northern Regions

2006年3月
March, 2006

序 文

北海道農業研究センタープロジェクト研究成果シリーズは、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構の運営費交付金によるプロジェクト研究や政府および外部機関委託で実施した研究について報告するとともに、併せて今後の研究あるいは行政の効率的推進等に資することを目的として刊行するものです。

この度発行する NO.3 は、北海道農業研究センターがロシア、アメリカ、ドイツ、カナダ、ハンガリーの5ヶ国6研究機関との共同で実施した「北方圏における作物の低温ストレス耐性向上技術に関する国際共同研究」の成果を取りまとめたものです。本プロジェクト研究は、農林水産省農林水産技術会議事務局の国際共同研究総合推進事業プロジェクトとして平成12年から平成16年度までの5年間計画で開始されましたが、研究機関の独立行政法人化に伴い、平成13年度以降は、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構の交付金プロジェクト研究として実施してきたものです。

21世紀の大幅な人口増加による地球規模の食料問題が懸念される中、開発途上地域の食料増産と並んで、地球上の耕地の46%を占める北方圏の食料生産の安定化と拡大を図っていくことが重要な課題となっています。北方圏の主要作物であるコムギは、一般的に収量性に優れた秋播きコムギを栽培することが望まれますが、これらの限界地帯では、冬の寒さによる枯死や雪腐れ病の被害により生産が安定していません。また、北方圏で重要な畜産を支える牧草についても、生産性の高い草種が冬期間の枯死により生産量が安定しないという問題を抱えています。

このように、北方圏では厳しい冬の低温条件が作物生産の最も大きな制限要因であり、バイオテクノロジー等の手法を用いて、耐凍性・耐雪性等の低温ストレス耐性を大幅に向上させるための技術を早期に開発することが求められています。

本プロジェクトは、北方圏諸国の複数の先進的研究機関との共同研究を通じて、各機関の有する優れたノウハウ等を集積することにより、作物の低温ストレス耐性の分子的制御機構の解明とその利用技術の早期開発を図ることを目標に実施されました。その結果、コムギ近縁種利用の可能性、コムギの耐凍性・耐雪性に関係するフルクタン合成酵素遺伝子の単離とその構造・機能の解明、フルクタン合成酵素遺伝子を導入したコムギ形質転換体の作出、DNAマーカーによるアカクローバの連鎖地図の作成、オーチャードグラスの耐凍性、耐雪性育種素材の開発などの成果が得られました。これらの知見や育種素材は、今後の低温ストレス耐性研究の推進に大いに役立つものと確信しております。また、本プロジェクトでは、海外の6研究機関とMOAを結び、研究推進とともに多くの研究者の交流を実現しました。このことは、今後の国際的な研究の推進にも役立つものと考えられます。

本研究の推進にあたって、多くの関係者のお世話になりました。研究の企画推進については農林水産省農林水産技術会議事務局国際研究課に、研究の推進にあたっては、海外の共同研究試験研究機関の皆様に、それぞれ大変お世話になりました。ここに記して深く感謝を申し上げます。

平成18年3月

独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
北海道農業研究センター所長
八戸 三千男

目 次

研究の要約	1
Outline of the project	11
第1章 コムギの低温ストレス耐性向上技術の開発	16
1. コムギ近縁野生種を利用した耐凍性、耐雪性素材の開発	16
(1) 自然環境及び人工環境下での耐凍性、耐雪性の評価	16
(2) コムギ近縁種との交雑による耐凍性、耐雪性素材の開発	19
2. フルクトタン合成酵素遺伝子群の機能解明と素材開発	27
(1) コムギのフルクトタン合成酵素遺伝子群の構造と機能	27
(2) フルクトタン合成酵素遺伝子導入による耐凍性、耐雪性形質転換コムギの作出	30
3. 低温応答性 ELIP 遺伝子群の機能解明と素材開発	34
(1) コムギの ELIP 遺伝子群の構造と機能	34
(2) ELIP 遺伝子導入による耐凍性、耐雪性形質転換コムギの作出	39
第2章 牧草類の低温ストレス耐性向上技術の開発	43
1. 分子マーカーを利用した牧草類の耐凍性、耐雪性関連形質の解析	43
(1) 分子マーカーを利用したアルファルファの耐凍性関連形質の解析	43
(2) 分子マーカーを利用したアカクローバの耐凍性、耐雪性関連形質の解析	46
2. エンドファイトと耐凍性、耐雪性との関係解明	51
(1) イネ科牧草遺伝資源の耐凍性、耐雪性の評価と利用	51
(2) エンドファイトの分離と耐凍性、耐雪性との関係解明	56
3. 分子マーカー、ロシア遺伝資源利用による耐凍性、耐雪性育種素材の開発	61
(1) 耐凍性、耐雪性マメ科牧草育種素材の開発	61
(2) 耐凍性、耐雪性イネ科牧草育種素材の開発	66

研究の要約

I 研究年次及び予算区分

研究年次：平成12年度～平成16年度
予算区分：農林水産省農林水産技術会議 国際共同
研究総合推進事業（平成12年度）
（独）農業・生物系特定産業技術研究機構
運営費交付金（平成13～16年度）

II 主任研究者

主査：北海道農業試験場長
稲葉忠興（平成12年4月～13年3月）
独立行政法人 農業技術研究機構北部地域研
究担当理事
滝本勇治（平成13年4月～15年9月）
独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研
究機構北海道農業研究センター所長
桑原真人（平成15年10月～16年3月）
丸山清明（平成16年4月～17年3月）

推進リーダー：

北海道農業試験場北方農業研究官
ハ戸三千男（平成12年4月～13年3月）
北海道農業研究センター北方農業研究官
國廣泰史（平成13年4月～17年3月）

チームリーダー：

北海道農業試験場地域基盤研究部長
奥野員敏（平成12年4月～13年3月）
北海道農業研究センター地域基盤研究部長
奥野員敏（平成13年4月～15年6月）
佐藤 裕（平成15年9月～17年3月）
北海道農業試験場草地部長
山口秀和（平成12年4月～13年3月）
北海道農業研究センター作物開発部長
山口秀和（平成13年4月～17年3月）

III 評価委員

島本義也 北海道大学教授（平成12～14年度）、北
海道大学名誉教授・東京農業大学教授（平
成15～16年度）
瀬古秀文 山口大学教授（平成12年度）
大杉 立 農林水産省農林水産技術会議事務局研究
開発官（平成12年度）
藤村達人 筑波大学教授（平成13～16年度）

IV 研究担当機関

北海道農業試験場（平成13年3月31日まで）
独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構
北海道農業研究センター（現在）
共同研究機関
バビロフ植物生産研究所（ロシア）
ウイリアムス飼料作研究所（ロシア）
ワシントン州立大学（アメリカ）
ハノーバー大学生物研究所（ドイツ）
レスブリッジ研究所（カナダ）
遺伝生物研究センター（ハンガリー）

V 研究目的

21世紀の大幅な人口増加による地球規模の食料
問題が懸念される中、開発途上地域の食料増産と並
んで、地球上の耕地の46%を占める北方圏の食料生
産の安定化と拡大を図っていくことが重要な課題と
なっている。

北方圏の主要作物であるコムギには秋播き性と春
播き性があるが、春播きコムギは生育期間が短いた
め、一般的に収量性に劣る。このため秋播き出来る
地域では秋播きコムギを栽培することが望ましいが、
限界地帯では、冬の寒さで枯死したり、雪腐病に侵
されたりするため生産が安定していない。また、北
方圏で重要な畜産を支える牧草についても、生産性
の高い草種が限界地帯では冬期間の枯死により生産
量が安定しないという問題を抱えている。

このように、北方圏では厳しい冬の低温条件が作
物生産の最も大きな制限要因であり、バイオテクノ
ロジー等の手法を用いて、耐凍性・耐雪性等の低温
ストレス耐性を大幅に向上させるための技術を早期
に開発することが求められている。

我が国は、これまでの北方圏諸国との共同研究を
通じ、耐凍性、耐雪性に関連した①コムギ遺伝資源
のグループ化、②コムギにおける一部耐凍性関与遺
伝子の単離、③牧草の分子マーカーの開発等の成果
を上げた。しかしながら、最終的な目標である耐凍
性、耐雪性品種の開発のためには、新たな耐凍性、
耐雪性関与遺伝子の探索と、それら関与遺伝子の単
離・機能解明・導入等の先端的な低温ストレス耐性
向上技術と低温ストレス耐性に優れた素材の開発が
必要である。このために、多数の有用な遺伝資源や

形質転換体作出技術等を有する北方圏諸国と共同研究を実施することは、研究推進上非常に有効な方法である。

本研究は、北方圏における作物生産の増大と安定化に資するために、主要作物であるコムギと牧草を対象に、北方圏諸国の複数の先進的研究機関との共同研究を通して、作物の低温ストレス耐性向上技術と有用素材の開発を目的に実施されたものである。

VI 研究方法

第1章 コムギの低温ストレス耐性向上技術の開発

1. コムギ近縁野生種を利用した耐凍性、耐雪性素材の開発

(1) 耐凍性、耐雪性に優れた系統を見いだすために、*Aegilops cylindrica*、*Ae. caudata*、*Ae. squarrosa*の各系統を供試し、札幌で雪腐病抵抗性を調査した。また、ロシアのバビロフ研究所（サンクトペテルブルク）で、*Ae. cylindrica*系統の越冬性を調査した。

(2) コムギ近縁種との交雑により耐凍性、耐雪性に優れた素材を開発するため、*Ae. cylindrica*の越冬時の糖代謝の調査、*Ae. cylindrica*からコムギ品種への雪腐病抵抗性の導入、*Agropyron elongatum* および *Agropyron spp.* とコムギとの属間雑種由来系統の越冬性の評価、植物体内の菌量による雪腐病抵抗性の評価などを行った。

2. フルクトン合成酵素遺伝子群の機能解明と素材開発

(1) コムギの耐凍性、雪腐病抵抗性と関連が深いフルクトンについて、フルクトン合成キナーゼ酵素遺伝子の単離と遺伝子の構造解析を行った。

(2) コムギの耐凍性、雪腐病抵抗性と関連が深いフルクトンの蓄積量を増加させることを目的に、フルクトン合成キナーゼ酵素遺伝子を導入したコムギ形質転換体の作出を試みた。

3. 低温応答性ELIP遺伝子群の機能解明と素材開発

(1) 低温下での光合成機能の維持に関与する遺伝子を利用してコムギの耐凍性の向上を図ることを目的として、光障害の防御とその修復機構に関与する葉緑体タンパク質ELIP (Early Light-inducible Protein) の発現とその機能解析を行った。

(2) ELIP遺伝子を導入したコムギ形質転換体を

作出するために、アグロバクテリウム法によるコムギの効率的・安定的な形質転換法について検討した。

第2章 牧草類の低温ストレス耐性向上技術の開発

1. 分子マーカーを利用した牧草類の耐凍性、耐雪性関連形質の解析

(1) DNAマーカーを利用した耐凍性アルファルファの効率的な育種を行うために、耐凍性のQTL解析、ハードニング課程で誘導される遺伝子の単離とその連鎖地図上の位置づけを行った。

(2) 越冬性に優れたアカクローバを育成するために、連鎖地図の作成、越冬性のQTL解析、越冬性と関連の深い菌核病の抵抗性選抜DNAマーカーの開発を行った。

2. エンドファイトと耐凍性、耐雪性との関係解明

(1) 耐凍性、耐雪性遺伝子の供給源としてのロシア遺伝資源の有効性を明らかにするために、オーチャードグラスで日ロ交雑系統の耐凍性、耐雪性を評価した。また、メドウフェスクでは、新規に導入した遺伝資源について、耐凍性、耐雪性を評価した。

(2) メドウフェスクについて、ロシア遺伝資源におけるエンドファイトの感染率と感染の地理的分布、エンドファイト感染と耐寒性、耐雪性の関係を調査した。

3. 分子マーカー、ロシア遺伝資源利用による耐凍性、耐雪性育種素材の開発

(1) チモシーとの混播適性に優れたアカクローバの耐寒、耐雪性育種素材を開発するために、2番草の開花が少ないロシア品種「Rannii 2」と北海道の優良品種「ホクセキ」との交配集団を作成し、耐雪性と開花特性について2世代の選抜・交配により系統を育成した。この育成系統において、生育特性・菌核病抵抗性を調査した。

(2) ロシア遺伝資源を利用して育成したオーチャードグラス「北海28号」について、北海道農業研究センターとバビロフ研究所パブロフスク試験地で収量性を調査した。また、オーチャードグラスのロシア現地選抜系統を北海道農業研究センターで生育特性を調査すると共に、耐凍性、耐雪性について選抜した。メドウフェスクの日ロ交雑系統について、バビロフ研究所で生育特性を調査した。さらに、オーチャード

グラスにおいて、耐凍性、耐雪性と可溶性糖類などの貯蔵養分および秋季休眠性との関係を調査した。

研究計画表

研究課題名	研究実施年度					担当研究機関 ()内の機関は共同研究機関
	12	13	14	15	16	
第1章 コムギの低温ストレス耐性向上技術の開発						
1. コムギ近縁野生種を利用した耐凍性、耐雪性素材の開発						
(1) 自然環境及び人工環境下での耐凍性、耐雪性の評価	○	○				地域基盤研究部 品質生理研究室 (ワシントン州立大、バビロフ研)
(2) コムギ近縁種との交雑による耐凍性、耐雪性素材の開発			○	○	○	地域基盤研究部 品質生理研究室 畑作研究部 麦育種研究室 (ワシントン州立大、バビロフ研)
2. フルクタン合成酵素遺伝子群の機能解明と素材開発						
(1) コムギのフルクタン合成酵素遺伝子群の構造と機能	○	○	○	○		地域基盤研究部 越冬ストレス研究室 (レスブリッジ研)
(2) フルクタン合成酵素遺伝子導入による耐凍性、耐雪性形質転換コムギの作出	○	○	○	○	○	地域基盤研究部 越冬ストレス研究室 (レスブリッジ研)
3. 低温応答性 ELIP 遺伝子群の機能解明と素材開発						
(1) コムギの ELIP 遺伝子群の構造と機能	○	○	○	○		地域基盤研究部 適応生態研究室 (ハノーバー大)
(2) ELIP 遺伝子導入による耐凍性、耐雪性形質転換コムギの作出			○	○	○	地域基盤研究部 適応生態研究室 (ハノーバー大)
第2章 牧草類の低温ストレス耐性向上技術の開発						
1. 分子マーカーを利用した牧草類の耐凍性、耐雪性関連形質の解析						
(1) 分子マーカーを利用したアルファルファの耐凍性関連形質の解析	○	○	○			草地部 マメ科牧草育種研究室(12年度) 作物開発部 マメ科牧草育種研究室 (遺伝生物研究センター)
(2) 分子マーカーを利用したアカクローバの耐凍性、耐雪性関連形質の解析	○	○	○			草地部 マメ科牧草育種研究室(12年度) 作物開発部 マメ科牧草育種研究室 (ウイリアムス研)
2. エンドファイトと耐凍性、耐雪性との関係解明						
(1) イネ科牧草遺伝資源の耐凍性、耐雪性の評価と利用	○	○	○			草地部 イネ科牧草育種研究室(12年度) 作物開発部 イネ科牧草育種研究室 (バビロフ研)
(2) エンドファイトの分離と耐凍性、耐雪性との関係解明	○	○	○			草地部 イネ科牧草育種研究室(12年度) 作物開発部 イネ科牧草育種研究室 (バビロフ研)
3. 分子マーカー、ロシア遺伝資源利用による耐凍性、耐雪性育種素材の開発						
(1) 耐凍性、耐雪性マメ科牧草育種素材の開発				○	○	作物開発部 マメ科牧草育種研究室 (ウイリアムス研)
(2) 耐凍性、耐雪性イネ科牧草育種素材の開発				○	○	作物開発部 イネ科牧草育種研究室 (バビロフ研)

VII 研究結果

第1章 コムギの低温ストレス耐性向上技術の開発

1. コムギ近縁野生種を利用した耐凍性、耐雪性素材の開発

- (1) 耐凍性、耐雪性に優れた系統を見いだすために、*Ae. caudata* の131系統、*Ae. squarrosa* の352系統を供試し、札幌で雪腐病抵抗性を調査したが、抵抗性の高い系統は見出せなかった。さらに、*Aegilops cylindrica* の137系統についても調査したが、コムギの最も抵抗性の高い品種を上回る系統を見いだせなかった。しかし、*Aegilops cylindrica* の雪腐病抵抗性極強系統の頻度は、コムギにおけるよりも高いと推定された。また、札幌で雪腐病抵抗性に関して選抜された *Ae. cylindrica* の12系統は、ロシアのバヒロフ研究所（サンクトペテルブルク）の圃場において高い越冬性を示した。しかし、試験年が比較的温暖であったため耐凍性についてはさらに検討が必要である。
- (2) *Ae. cylindrica* の雪腐病抵抗性系統の中に、従来知られていた糖代謝パターン（積雪前に多量のフルクタンを蓄積する）と異なるパターン（積雪時のフルクタンの消費が少ない）を示す系統が見出されたことから、雪腐病抵抗性に関する変異の拡大が期待できる。*Ae. cylindrica* の系統400452に北海道コムギ品種チホクコムギを戻し交雑し、*Ae. cylindrica* の染色体を1対添加した雪腐病抵抗性素材を作出した。この材料は、高い雪腐病抵抗性を示した。また、*Agropyron elongatum* とコムギの雑種由来系統である *Mnogoletnyaya 209* は、耐凍性遺伝資源として有用であることが明らかになった。さらに、過湿条件が雪腐病抵抗性を低下させること、雪腐病菌を接種後の植物体内の菌DNA量は、雪腐病抵抗性の指標となることを明らかにした。

2. フルクタン合成酵素遺伝子群の機能解明と素材開発

- (1) コムギの耐凍性、雪腐病抵抗性と関連が深いフルクタンの蓄積機構を明らかにするために、フルクタンの合成キー酵素（1-SST）遺伝子のゲノムDNAクローンを単離し、塩基配列を決定した。1-SSTのゲノム遺伝子は、3つのイントロンと4つのエクソンから構成され、このう

ち第2エクソンは9bpsのミニエクソンで、 β -フルクトシダーゼモチーフ内に存在していた。また、1-SSTの5'上流域から1342bpsのプロモーターを単離した。本プロモーターは、光、糖、ABA、エリシターに応答することが明らかになった。

- (2) コムギの耐凍性、雪腐病抵抗性と関連が深いフルクタンの蓄積量を増加させることを目的に、フルクタンの合成キー酵素（1-SSTと6-SFT）遺伝子の導入を試み、コムギ品種Bobwhiteと赤ダルマで1-SST遺伝子を導入した形質転換体 (T_0) を作出した。これの T_0 から採種した T_1 に導入遺伝子検出個体が得られ、さらに T_2 も正常に採種された。

3. 低温応答性ELIP遺伝子群の機能解明と素材開発

- (1) 低温環境下での光障害の防御とその修復機構に関与する葉緑体タンパク質ELIP (Early Light-inducible Protein) は、ハードニング環境下で持続的に蓄積し、耐凍性強品種 Valuevskaya では mature-ELIP が早期に蓄積した。また、このELIPの合成初期には、光が必須であることが明らかになった。ELIP cDNA のアンチセンス導入イネにおいて、光障害耐性の低下が認められたものがみられたことから、ELIPは低温下における光障害に対する防御機構に重要な役割を持つと考えられた。
- (2) コムギ未熟胚の効率的な培養法を検討した結果、高濃度ゲルライト (5g/1-7g/1) で誘導されたカルスは、再分化能が高く、再分化能も5週間維持された。また、選抜薬剤として除草剤ピアラホスが有効であった。アグロバクテリウムによるコムギの形質転換法に関して、高効率ベクターシステム (pGreen/pSoup dual plasmid system: pAL154, pAL156) がアグロバクテリウムの感染率および T_1 -DNA の挿入率の向上のために有効であることが明らかになった。

第2章 牧草類の低温ストレス耐性向上技術の開発

1. 分子マーカーを利用した牧草類の耐凍性、耐雪性関連形質の解析

- (1) 2倍体アルファルファの根の耐凍性に関して、連鎖群2 (LG2) にQTL (Lod値3.3、寄与率16.8%) が1個認められた。また、4倍体アル

ファルファから単離した60個の耐凍性関連候補遺伝子の内、3個(PhgKinase、FtsH、S1)が連鎖群上に位置づけられた。PhgKinaseはLG2上のマーカーU212Dから75cMのところに、FtsHはLG3上のマーカーU515Aから9cMのところにそれぞれ位置づけられた。また、S1はLG4上のマーカーN0D22Bから3cMのところに位置づけられた。

- (2) アカローバにおいて、RFLP連鎖地図を作成するとともに、菌核病抵抗性、越冬性に関する11個のQTLを見出した。また、耐雪性との関連が深い菌核病について、その抵抗性選抜マーカーの選定を行った結果、3個の有望なSSRマーカー(RCS0397、RCS03587およびRCS5826)が見出された。

2. エンドファイトと耐凍性、耐雪性との関係解明

- (1) ロシア遺伝資源を利用して育成された「北海28号」は、ロシア品種より優れた耐雪性を示し、耐凍性もロシア品種並みであった。また、他の育成系統についても耐凍性と耐雪性が北農研育成品種と同程度かやや優れていた。これらの結果から、ロシア遺伝資源の活用は、オーチャードグラスの耐凍性、耐雪性の向上のために有効であることが明らかとなった。また、メドウフェスクでも、ロシア遺伝資源の中に、北海道の標準品種「ハルサカエ」よりも耐凍性、耐雪性に優れた系統が見出された。

- (2) メドウフェスクのロシア遺伝資源210点の内、収集種子では75%の系統、増殖種子では2.5%の系統でエンドファイト菌糸が観察された。また、エンドファイトの感染は、極東の1系統を除いて全ての地域でみられ、コーカサス、ウラル、ノボシビルスクの系統の中には、ロリン(アルカロドの一種)の産生がみられない系統が多く認められた。エンドファイト感染と耐凍性、耐雪性の関係を調査したが、明らかな関係は認められなかった。

3. 分子マーカー、ロシア遺伝資源利用による耐凍性、耐雪性育種素材の開発

- (1) 2番草の開花が少なくチモシーとの混播適性のあるロシア品種「Rannii 2」と北海道の優良品種「ホクセキ」との交配集団を作出し、耐雪性との関連が深い菌核病と開花特性について選抜を行った。季節毎の草勢が優れ、開花率も中程

度なF2世代の6個体を選抜・交配して育成したF3集団は、菌核病抵抗性が「Rannii 2」より優れ、「ホクセキ」と同程度になった。

- (2) ロシア遺伝資源を利用して育成したオーチャードグラス「北海28号」の収量は、北海道農業研究センターでは「ワセミドリ」より低くかったが、バビロフ研究所パブロフスク試験地では「ワセミドリ」並みであった。耐凍性に優れるオーチャードグラス品種「Morshanskaya」と「北海28号」は、越冬後の糖の残存量が「ワセミドリ」より多く、越冬性も優れており、越冬後の糖の残存量と越冬性との関連が明らかになった。さらに、オーチャードグラスで、日ロ交雑系統から耐凍性に優れる素材を育成した。メドウフェスクにおいて、日ロ交雑系統は原品種より生育が良好であることが明らかになった。

VIII 研究発表

- 1) 入来紀雄・川上顕・高田兼則・桑原達雄(2000): トップクロスによる秋播コムギの雪腐黒色小粒菌核病抵抗性の遺伝分析. 日本作物学会紀事62(別2), 252-253.
- 2) Iriki, N., A. Kawakami, T. Takata, T. Kuwabara and T. Ban(2001): Screening relatives of wheat for snow mold resistance and freezing tolerance. *Euphytica* 122, 335-341.
- 3) 入来則雄・西尾善太・川上顕・斎藤浩二・黒木慎(2004): 近縁野生種を用いたコムギの越冬性の改良の可能性. 育種学研究6(別2), 293.
- 4) Iriki, N., Z. Nishio, A. Kawakami, M. Yoshida, M. Kuroki, K. Funtov and T. Kawahara(2005): Fructan content in *Aegilops cylindrica* and its relationship to snow mold resistance and freezing tolerance. *Plant Prod. Science*(in press).
- 5) Isobe, S., I. Klimenko, I. Sergey, M. Gau and N. Kozlov(2003): First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pratense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 108, 105-112.
- 6) Isobe, S., S. Sato, E. Asamizu, I. Klimenko, N. Kozlov, K. Okumura and S. Tabata(2005): A high-density SSR linkage map of red clover and its transferability to other legumes. The 4th international symposium on the molecular breeding of forage and

- turf p. 137.
- 7) Ivashuta S., R. Imai, K. Uchiyama, M. Gau and Y. Shimamoto (2002): Changes in chloroplast PtsH-like gene during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 159, 85-90.
- 8) Ivashuta S., M. Naumkina, M. Gau, K. Uchiyama, S. Isobe, Y. Mizukami and Y. Shimamoto (2002): Genotype-dependent transcriptional activation of novel repetitive elements in alfalfa (*Medicago sativa* L.) during cold acclimation. *Plant J.* 31 (5), 615-627.
- 9) Ivashuta S., K. Uchiyama, M. Gau and Y. Shimamoto (2002): Linear amplification coupled with controlled extension as a means of probe amplification in a cDNA array and gene expression analysis during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 53, 351-359.
- 10) Klimenko, I., S. Isobe, N. Kozlov, N. Razgulayeva and S. Ivashuta (2003): QTL-analysis of Sclerotinia tolerance in red clover mapping population. *Functional genomics and breeding strategies for cold tolerance in plants.* p. 69.
- 11) Nishio, N., K. Takata, T. Tabiki, N. Iriki and T. D. Murray (2003): Influence of cold hardening Temperature and soil matric potential on resistance to speckled snow mold of winter wheat. *Phytopathology* 93(6)Suppl. S65.
- 12) 奥村健治・我有満・磯部祥子・廣井清貞 (2003): アカクローバ「ホクセキ」とロシア導入品種「RANNY2」のF2集団における3年目の特性. *北草研* 38, 85.
- 13) Sanada, Y., T. Takai, R. A. B. M. Golam and T. Yamada (2003): Physiological characteristics of high freezing tolerant “Hokkai 28” during hardening and wintering in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *Functional Genomics and Breeding Strategies for Cold Tolerance in Plants.* Abstract p. 66.
- 14) Sanada, Y., T. Takai and T. Yamada (2004): Changes in freezing tolerance, enzyme activity and soluble carbohydrate content during cold acclimation in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *International Plant Cold Hardiness Seminar.* Abstract p. 61.
- 15) 眞田康治・Vladimir Chapulin・高井智之・山田敏彦 (2004): オーチャードグラスのロシア現地選抜系統の生育特性. *北草研報*, 39, 59.
- 16) 下坂悦生 (2002): アグロバクテリウムによるコムギ形質転換法の確立へ向けて 1) 未熟胚培養系の効率化とアグロバクテリウム感染. *育種・作物学会北海道談話会会報* 43, 61-62.
- 17) 下坂悦生・半田裕一 (2001): コムギ葉緑体タンパク質: ELIP (Early Light-Inducible Protein) の低温応答発現. *育種学研究* 3 (別2), 247.
- 18) Shimosaka, E. and H. Handa (2004): Expression of early light-inducible proteins during cold hardening in wheat. *7th International Plant Cold Hardiness.* p. 90.
- 19) 下坂悦生・半田裕一 (2004): ハードニング過程におけるコムギ ELIP の発現調節. *育種学研究* 6 (別2), 294.
- 20) 高井智之・T. Shelenga・眞田康治・山田敏彦 (2003): メドウフェスク遺伝資源におけるエンドファイト保有率. *北草研報*, 37, 95.
- 21) 内山和宏・S. Ivashuta, M. Naumkina・我有満・磯部祥子・P. Kalo and G. B. Kiss (2002): アルファルファの耐凍性関連形質の QTL 解析と低温誘導性遺伝子のマッピング. *日草誌* 48 (別) 344-345.
- 22) Yoshida, M., D. Lin and A. Kawakami (2004): A mini exon in the sucrose:sucrose 1-fructosyl-transferase gene of wheat. *J. Plant Physiol.* 161, 1277-1279.

IX 研究担当者

- 1 章 コムギの低温ストレス耐性向上技術の開発
1. コムギ近縁野生種を利用した耐凍性、耐雪性素材の開発
- (1) 自然環境及び人工環境下での耐凍性、耐雪性の評価
北海道農業試験場(平成13年3月31日まで)
地域基盤研究部 品質生理研究室
入来規雄
北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)
地域基盤研究部 品質生理研究室
入来規雄
- (2) コムギ近縁種との交雑による耐凍性、耐雪性素材の開発
北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)
地域基盤研究部 品質生理研究室
入来規雄

畑作研究部 麦育種研究室

西尾善太

2. フルクタン合成酵素遺伝子群の機能解明と素材開発

(1) コムギのフルクタン合成酵素遺伝子群の構造と機能

北海道農業試験場(平成13年3月31日まで)

地域基盤研究部 越冬ストレス研究室

吉田みどり

北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)

地域基盤研究部 越冬ストレス研究室

吉田みどり

(2) フルクタン合成酵素遺伝子導入による耐凍性、耐雪性形質転換コムギの作出

北海道農業試験場(平成13年3月31日まで)

地域基盤研究部 越冬ストレス研究室

吉田みどり

北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)

地域基盤研究部 越冬ストレス研究室

吉田みどり

3. 低温応答性 ELIP 遺伝子群の機能解明と素材開発

(1) コムギの ELIP 遺伝子群の構造と機能

北海道農業試験場(平成13年3月31日まで)

地域基盤研究部 適応生態研究室

下坂悦生

北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)

地域基盤研究部 適応生態研究室

下坂悦生

(2) ELIP 遺伝子導入による耐凍性、耐雪性形質転換コムギの作出

北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)

地域基盤研究部 適応生態研究室

下坂悦生

第2章 牧草類の低温ストレス耐性向上技術の開発

1. 分子マーカーを利用した牧草類の耐凍性、耐雪性関連形質の解析

(1) 分子マーカーを利用したアルファルファの耐凍性関連形質の解析

北海道農業試験場(平成13年3月31日まで)

草地部 マメ科牧草育種研究室

内山和宏(現 畜産草地研究所)

北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)

作物開発部 マメ科牧草育種研究室

廣井清貞・我有満(現 九州沖縄農業研究センター)・磯部祥子

(2) 分子マーカーを利用したアカクローバの耐凍性、耐雪性関連形質の解析

北海道農業試験場(平成13年3月31日まで)

草地部 マメ科牧草育種研究室

磯部祥子

北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)

作物開発部 マメ科牧草育種研究室

磯部祥子・我有満(現 九州沖縄農業研究センター)・廣井清貞

2. エンドファイトと耐凍性、耐雪性との関係解明

(1) イネ科牧草遺伝資源の耐凍性、耐雪性の評価と利用

北海道農業試験場(平成13年3月31日まで)

草地部 イネ科牧草育種研究室

眞田康治・高井智之(現 長野県畜産試験場)・山田敏彦(現 北海道大学)

北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)

作物開発部 イネ科牧草育種研究室

眞田康治・高井智之(現 長野県畜産試験場)・山田敏彦(現 北海道大学)

(2) エンドファイトの分離と耐凍性、耐雪性との関係解明

北海道農業試験場(平成13年3月31日まで)

草地部 イネ科牧草育種研究室

高井智之(現 長野県畜産試験場)・眞田康治・山田敏彦(現 北海道大学)

北海道農業研究センター(平成13年4月1日から)

作物開発部 イネ科牧草育種研究室

高井智之(現 長野県畜産試験場)・眞田康治・山田敏彦(現 北海道大学)

3. 分子マーカー、ロシア遺伝資源利用による耐凍性、耐雪性育種素材の開発

(1) 耐凍性、耐雪性マメ科牧草育種素材の開発

北海道農業研究センター（平成13年4月1日から）

作物開発部 マメ科牧草育種研究室

奥村健治・我有満（現 九州沖縄農業研究センター）・廣井清貞・磯部祥子

(2) 耐凍性、耐雪性イネ科牧草育種素材の開発

北海道農業研究センター（平成13年4月1日から）

作物開発部 イネ科牧草育種研究室

眞田康治・高井智之（現 長野県畜産試験場）・田村健一

X とりまとめ責任者のあとがき

本プロジェクト研究により、①コムギで積雪下におけるフルクタンの新しい代謝パターンを示す系統が見出されたこと、②コムギフルクタン合成酵素遺伝子の単離とコムギ形質転換体の作出、③アカクローバにおけるDNAマーカー連鎖地図の作成と越冬性に連鎖するDNAマーカーの開発、④オーチャードグラスとメドウフェスクにおける耐凍性遺伝資源の選抜、⑤越冬性に優れたオーチャードグラス系統「北海28号」の育成等新しい知見と有用な素材を得ることができた。今後、これらの成果を活用して、コムギ・牧草で越冬性に優れた新品種の育成が期待される。

（北方農業研究官 小松敏憲）

付録 研究者の招聘ならびに派遣

1. 研究者の招聘

年次	氏名	所属	課題名	期間
平成 12 年	Tatyana V. Shelenga	V I R	メドウフェスクのエンドファイトとアルカロイドに関する研究	12. 10. 11- 13. 3. 19
	Gyorgy B. Kiss	B R C	アルファルファ育種における分子マーカーの利用	12. 11. 12- 12. 11. 22
平成 13 年	Elena K. Kossio	WFRI	牧草類における適応性関連形質の分子遺伝学的解析と系統育成	13. 2. 23- 13. 3. 25
	Oleg B. Tkachenko	VIR	小麦-カモジグサ雑種への化学的突然変異源処理による小麦ゲノムの改変に関する研究	13. 3. 20- 13. 3. 28
	Klimenko I. Alexandrovana	WFRI	DNAマーカーによるアカクローバマッピング集団の多型解析とマーカー開発	13. 6. 20- 13. 8. 28
	Timothy D. Murray	WSU	コムギの耐凍性・耐雪性の評価法	13. 6. 22- 13. 6. 30
	Kirill Funtov	VIR	コムギ近縁種における越冬性の解析	13. 11. 24- 14. 3. 19
平成 14 年	Sergey Ivashuta	WFRI	分子マーカーを利用したアカクローバの耐凍性・耐雪性の遺伝解析と育種への利用	14. 5. 1- 14. 6. 19
平成 15 年	Klimenko I. Alexandrovana	WFRI	耐凍性・耐雪性マメ科牧草育種素材の開発	15. 8. 24- 15. 8. 30
平成 16 年	Andre Laroche	L R C	フルクタン合成遺伝子による耐凍性・耐雪性形質転換コムギの作出	16. 7. 9- 16. 7. 22

BRC: Institute of Genetic Biological Research Center

LRC: Lethbridge Research Center

VIR: N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry

WFRI: All-Russian Williams Fodder Research Institute

WSU: Washington State University

2.研究者の派遣

年次	氏名	所属	派遣先	課題名	期間
平成 12 年	川上 颯	地域基盤研究部	LRC WSU	北方圏における作物の低温ストレス耐性 向上技術に関する共同研究	12. 4. 5- 12. 4. 13
	八戸三千男	北方農業研究官	VIR WFRI	「北方圏における作物の低温ストレス耐性 向上技術に関する国際共同研究」の推進	12. 7. 18- 12. 7. 29
	磯部祥子	草地部	WFRI	アカクローバにおける耐凍性・耐雪性の評 価法	12. 10. 22- 12. 11. 11
平成 13 年	眞田康治	草地部	V I R	イネ科牧草遺伝資源の特性評価	13. 1. 13- 13. 1. 25
	下坂悦生	地域基盤研究部	HU	コムギの低温抵抗性関与蛋白質解析	13. 1. 24- 13. 1. 31
	磯部祥子	草地部	B R C	分子マーカーを利用した牧草類の耐寒性・ 耐雪性関連形質の解析	13. 3. 18- 13. 3. 29
	奥野員敏	地域基盤研究部	V I R	コムギ・牧草類の分子遺伝学的研究	13. 8. 25- 13. 9. 1
	吉田みどり	地域基盤研究部	L R C	コムギの耐凍性・耐雪性遺伝子の解析	13. 10. 14- 13. 10. 28
	西尾善太	畑作研究部	W S U	コムギの耐凍性・耐雪性の評価法	13. 12. 6- 13. 12. 16
平成 14 年	眞田康治	作物開発部	V I R	イネ科牧草の耐凍性・耐雪性の評価と耐凍 性・耐雪性育種素材の開発	14. 7. 8- 14. 7. 14
	西尾善太	畑作研究部	W S U	定量PCRによる雪腐病抵抗性の評価手法 の確立	14. 10. 1- 15. 3. 30
平成 15 年	磯部祥子	作物開発部	W F R I	分子マーカーを利用した牧草類の耐寒性・ 耐雪性マメ科牧草育種素材の開発	15. 3. 10- 15. 3. 15
	國廣泰史	北方農業研究官	V I R W F R I	「北方圏における作物の低温ストレス耐性 向上技術に関する国際共同研究」の推進	15. 8. 29- 15. 9. 7
平成 16 年	奥村健治	作物開発部	WFRI	アカクローバの特性評価法ならびに耐病 性検定法	16. 3. 14- 16. 3. 20
	磯部祥子	作物開発部	WFRI	アカクローバの耐凍性・耐雪性選抜マー カーの開発	16. 10. 10- 16. 10. 16

BRC: Institute of Genetic Biological Research Center

HU: Hanover University

LRC: Lethbridge Research Center

VIR: N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry

WFRI: All-Russian Williams Fodder Research Institute

WSU: Washington State University

Outline of the Project

Project Title: Improvement of Tolerance to Low Temperature Stress of Winter Crops in Northern Regions

Purpose:

There is growing concern that the food shortage caused by the expansion of human population would occur in the 21st century. It is important to increase and stabilize food production in northern regions which contain 46% of the arable land of the world, in addition to the increase of food production in developing countries.

Wheat is the most important food crop in northern regions and two types of wheat are cultivated in the regions: One is winter wheat and the other is spring wheat. Generally, the productivity of spring wheat is inferior to winter wheat because of the short growing period. For this reason, it is desirable to grow winter wheat in the regions if it is possible, but there is instability in productivity due to winter kill by low temperatures or snow mold. Forage crops which support livestock production in the northern regions have similar problems in that highly productive forage species are also unstable in their production due to winter kill.

Since low temperatures and snow mold during winter in the northern regions are the most serious limiting factors for crop production, it is very important to improve resistance to these stresses in winter wheat and forage crops in order to increase and stabilize food production in the regions.

This project was concerned with developing technologies for improvement of freezing tolerance and snow mold resistance and obtaining breeding materials with improved freezing tolerance and snow mold resistance in winter wheat and forage crops.

Work Areas:

- Development of freezing tolerant and snow mold resistant breeding materials in winter wheat using wild relatives of wheat
- Cloning and characterization of wheat fructan synthesis genes and production of winter wheat transgenic plants with introduced wheat fructan

synthesis genes

- Functional analysis of wheat early light-inducible protein(ELIP) genes and production of winter wheat transgenic plants with introduced wheat ELIP genes
- Analysis of characteristics relating to freezing tolerance and snow mold resistance in forage legumes using DNA markers
- Evaluation of freezing tolerance and snow mold resistance in grass germplasm and their utilization for breeding
- Development of freezing tolerant and snow mold resistant breeding materials in forage crops using DNA markers and Russian genetic resources

Research Organizations:

National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, National Agriculture and Bio-oriented organization, Japan

N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry, Russian Academy of Agricultural Sciences, Russian Federation

All-Russian Williams Fodder Research Institute, Russian Academy of Agricultural Sciences, Russian Federation

Lethbridge Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, Canada

Institute of Genetic Biological Research Center, Hungarian Academy of Agricultural Sciences, Republic Of Hungary

Institute of Genetic Biological Research Center, Republic of Germany

Washington State University, the United States of America

Research Period: 2000-2004

Expected Achievements:

- Cloning and characterization of freezing tolerant and

snow mold resistant genes in wheat.

- Developing freezing tolerant and snow mold resistant breeding materials in winter wheat.
- Identification of DNA markers linked to freezing tolerance and snow mold resistance in alfalfa and red clover.
- Developing freezing tolerant and snow mold resistant breeding materials in forage crops.

Results:

1. Development of freezing tolerant and snow mold resistant breeding materials in winter wheat using wild relatives of wheat

In order to find excellent materials with freezing tolerance and snow mold resistance, 131 accessions of *Ae. caudata*, and 352 accessions of *Ae. squarrosa* were evaluated for resistance to snow mold in artificially infested plots with *Typhula ishikariensis* at Sapporo. However, no accessions superior to wheat was found.

One-hundred and thirty-seven accessions of *Aegilops cylindrica* were evaluated for their resistance to snow mold in artificially infested plots with *Typhula ishikariensis* at Sapporo. No accessions had a higher level of resistance than PI 173438, a wheat cultivar with the highest resistance to snow mold. Twelve accessions of *Ae. Cylindrica*, which had high levels of winter hardiness at Sapporo, showed good winter survival in the field of N.I. Vavilov Institute for Plant Industry (St. Petersburg) in Russia.

Sugar metabolism in *Ae. cylindrica* under snow was different from that in wheat. The highly snow mold resistant wheat cultivar PI 173438 accumulated a high level of fructan before snow cover, resulting in a higher fructan content after snow cover compared to susceptible cultivars, whereas some *Ae. cylindrica* accessions reduced the fructan content slowly under snow, resulting in a higher fructan content after snow cover compared to susceptible ones.

Ae. Cylindrica 400452, a snow mold resistant accession, was backcrossed to "Chihokukomugi," a leading wheat cultivar in Hokkaido, and a breeding material possessing a pair of *Ae. Cylindrica* chromosomes was obtained. It showed high levels of

snow mold resistance.

"Mnogoletnyana 209," a line derived from a hybrid between *Agropyron elongatum* and wheat, was found superior to "Hokushin" in freezing tolerance and was crossed with "Hokushin." The F₃ population had a higher level of freezing tolerance than "Hokushin," indicating that "Mnogoletnyana 209" is useful as a genetic resource for improving freezing tolerance of wheat.

The amount of fungal DNA in wheat plants inoculated with the snow mold pathogen would be an indicator for snow mold resistance.

2. Cloning and characterization of wheat fructan synthesis genes and production of winter wheat transgenic plants with introduced wheat fructan synthesis genes

Using the nucleotide sequence of a cDNA coding for a key enzyme (1-SST) involved in fructan synthesis, the 1-SST genomic gene from the wheat genome library was isolated and its sequence was determined. The 1-SST genomic gene consisted of three introns and four exons. The second exon was a 9 bp mini-exon that had often been reported to exist in the invertase genomic gene and was present in the β -fructosidase motif. In addition, the 5' upstream of this gene was isolated by TAIL-PCR and found to possess promoter activity. This promoter was fused with GFP in a transient expression experiment, which showed that this promoter responded to light, sugars, ABA, and elicitors.

Wheat transformants (T₀) with introduced 1-SST gene coding for the synthesis of fructan were obtained in "Bobwhite," a spring wheat cultivar, and "Akadaruma," a winter wheat cultivar. NO T₀ plants showed morphological changes such as malformation; seeds from the T₀ plants germinated nearly 100%; and T₁ plants from them were not observed to have morphological abnormalities. Some of the individual T₁ plants were observed to possess the introduced genes and normally produced T₂ seeds

3. Functional analysis of wheat early light-inducible protein (ELIP) and development of an Agrobacterium-mediated transformation system

for wheat

Wheat ELIP continued to accumulate under hardening conditions and mature-ELIP accumulated earlier in "Valuevskaya," a cultivar highly tolerant to freezing, than "Ibis" and "Haruyutaka," less-freezing tolerant cultivars, suggesting that ELIP accumulation was related to freezing tolerance in wheat.

ELIP did not accumulate in wheat seedlings when the seedlings were grown under dark conditions at an early stage of ELIP synthesis, indicating that light is an essential factor for the ELIP synthesis in wheat. The accumulated ELIP in wheat seedlings during hardening rapidly degraded when the seedlings were placed at 20 °C under dark conditions. However, ELIP in wheat seedlings was stable and tended to accumulate at low temperature (0.5°C) under dark conditions. In addition, comparison of mRNA and protein levels during hardening suggests that wheat ELIP expression is regulated at the translational level or at the post-translational level.

The severity of chilling injury and photoinhibition damage in photosystem II after low-temperature and strong-light treatment was greater in some rice plants with introduced antisense of ELIP cDNA than in wild types, indicating that ELIP plays an important role in defense against photoinhibition at low temperatures.

Wheat calli induced on MS medium solidified with 5-7g/L Gelrite regenerated at high frequencies and the ability of regeneration was maintained for five weeks.

Green spots on calli on the regeneration medium containing 1 mg/L Bialaphos, a herbicide, were greatly suppressed in "Chinese Spring," suggesting the bar gene is useful as a selectable marker in wheat.

A vector system, pGreen/pSoup dual plasmid system: pA1154 and pA1156, showed higher transient GUS expression in the wheat calli than the vector pMLH7133-BAR, suggesting that this vector system is highly efficient for T-DNA delivery in wheat. Some calli grew in the area of GUS expression 10-18 days after co-cultivation.

4. Analysis of characteristics relating to freezing

Tolerance and snow mold resistance in forage legumes using DNA markers

A QTL for freezing tolerance of root was detected on

LG(Linkage Group)2 in diploid alfalfa. It had LOD value of 3.3 and accounted for 16.8% of the total phenotypic variation. It was detected in the same region for three years

A total of 60 candidate genes related to freezing tolerance were isolated from tetraploid alfalfa. When PCR was performed using 34 primer pairs obtained from them, seven pairs yielded polymorphism in the mapping population and three candidate genes (PhgKinase, FtsH and S1) were mapped on the linkage group. PhgKinase was mapped at 75 cM away from the marker U212D on LG2 and close to a QTL for plant height. FtsH was located at 9 cM away from the marker U515A on LG3 and S1 at 3 cM above the marker NOD22B on LG4.

A red clover linkage map with RFLP markers was constructed in order to develop DNA markers linked to resistance to Sclerotinia trifoliorum Eriksson. QTL analysis for winter hardiness and Sclerotinia trifoliorum resistance was performed with the RFLP linkage map and 11 significant QTLs were detected.

Sequences of nine RFLP markers showed similarity to registered genes related to disease resistance and stress tolerance. Six of the nine RFLP markers were involved in the detected QTLs.

A SSR linkage map was constructed and the SSR markers were performed polymorphism analysis. Three SSR markers detected significant polymorphisms that distinguished the susceptible and resistant plants to Sclerotinia trifoliorum.

5. Evaluation of freezing tolerance and snow mold resistance in grass germplasms and their utilization for breeding

Orchardgrass cultivar "Hokkai 28" which was bred from Russian germplasms showed snow mold resistance superior to Russian cultivars and freezing tolerance equivalent to them. Some new lines developed from the Russian germplasms were also superior in freezing tolerance and snow mold resistance to cultivars developed at National Agricultural Research Center for Hokkaido Region (NARCH) in Japan. These results indicate that the utilization of the Russian germplasms would be effective for the improvement of orchardgrass

in freezing tolerance and snow mold resistance.

More than the half of accessions of Russian germplasms in meadow fescue was superior in freezing tolerance and snow mold resistance to "Harusakae," a cultivar developed at NARCH.

When seeds of 210 accessions of Russian germplasms were examined for endophyte infection, fungal hyphae were found in 75% of accessions collected in the former USSR and in 2.5% of accessions multiplied from collections. Endophyte infection was observed in accessions collected in regions of the former USSR except those in Far East. Every accession from the coasts of the Arctic Ocean was infected by endophytes. No loline alkaloids were detected in seeds from many accessions collected in Caucasian-Ural regions and Central Asian-Novosibirsk regions.

In "Harusakae" and "Tomosakae," plants of the Endophyte-free lines were compared with those of Endophyte-infected lines (E+) for freezing tolerance and snow mold resistance. There was no significant difference between the E+ and E- lines in freezing tolerance and snow mold resistance in both cultivars.

The effect of endophytes infection on snow mold resistance was inconsistent across meadow fescue genotypes. In some genotypes (CL102, CL243, and CL454), endophyte-infected plants were more tolerant than endophyte-free plants, but endophyte-infected plants were less tolerant than endophyte-free plants in CL470.

6. Development of freezing tolerant and snow mold

resistant breeding materials in forage crops using Russian genetic resources

In order to develop new breeding materials resistant to Sclerotinia rot and compatible with timothy on mixed sown sward, the Russian cultivar "Rannii 2" and the Japanese cultivar "Hokuseki" were crossed. Selection was made in the F₂ population based on resistance to Sclerotinia rot, persistency and flowering characteristics. In the spring of the fourth harvest year, 6 F₂ plants that had been excellent in plant vigor in each season and moderate in the flowering rate at the second cutting were selected and crossed each other in isolated conditions. The F₃ population was more resistant to

Sclerotinia rot than "Rannii 2" and equivalent to "Hokuseki."

Forage yield of "Hokkai 28," an orchardgrass cultivar developed from the Russian germplasms, was lower than that of "Wasemidori" at NARCH in Japan. However, "Hokkai 28" was equal to "Wasemidori" in forage yield at N.I. Vavilov Institute for Plant Industry (VIR) in Russia.

"Morshanskaya" and "Hokkai 28," orchardgrass cultivars excellent in freezing tolerance, were higher in residual sugar content after overwintering and better in winter hardiness than "Wasemidori," indicating that winter hardiness is related to residual sugar content after overwintering.

New orchardgrass lines having higher freezing tolerance were also developed from hybrids between Japanese and Russian cultivars by the recurrent selection for winter hardiness and freezing tolerance. New meadow fescue lines developed by the cross between Japanese and Russian cultivars were higher in winter survival than the original cultivars at VIR in Russia.

Publications:

- 1) Iriki, N., A. Kawakami, T. Takata and T. Kuwabara (2000): Top cross analysis of resistance to *T. ishikariensis* in winter wheat. *Plant Prod. Science* 62 (Supplement 2), 252-253. (In Japanese).
- 2) Iriki, N., A. Kawakami, T. Takata, T. Kuwabara and T. Ban (2001): Screening relatives of wheat for snow mold resistance and freezing tolerance. *Euphytica* 122, 335-341.
- 3) Iriki, N., Z. Nishio, A. Kawakami, K. Saito and M. Kuroki (2004): Potential of wild relatives to improve winter hardiness of wheat. *Breeding Science* 6 (Supplement 2), 293. (In Japanese).
- 4) Iriki, N., Z. Nishio, A. Kawakami, M. Yoshida, M. Kuroki, K. Funtov and T. Kawahara (2005): Fructan Content in *Aegilops cylindrica* and its relationship to snow mold resistance and freezing tolerance. *Plant Prod. Science* (in press).
- 5) Isobe, S., I. Klimenko, I. Sergey, M. Gau and N. Kozlov (2003): First RFLP linkage map of red clover (*Trifolium pratense* L.) based on cDNA probes and its transferability to other red clover germplasm. *Theor.*

- Appl. Genet. 108, 105-112.
- 6) Isobe, S., S. Sato, E. Asamizu, I. Klimentko, N. Kozlov, K. Okumura and S. Tabata (2005): A high-density SSR linkage map of red clover and its transferability to other legumes. The 4th international symposium on the molecular breeding of forage and turf. p. 137.
 - 7) Ivashuta S., R. Imai, K. Uchiyama, M. Gau and Y. Shimamoto (2002): Changes in chloroplast FtsH-like gene during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Plant Physiol. 159, 85-90.
 - 8) Ivashuta S., M. Naumkina, M. Gau, K. Uchiyama, S. Isobe, Y. Mizukami and Y. Shimamoto (2002): Genotype-dependent transcriptional activation of novel repetitive elements in alfalfa (*Medicago sativa* L.) during cold acclimation. Plant J. 31 (5), 615-627.
 - 9) Ivashuta S., K. Uchiyama, M. Gau and Y. Shimamoto (2002): Linear amplification coupled with controlled extension as a means of probe amplification in a cDNA array and gene expression analysis during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Exp. Bot. 53, 351-359.
 - 10) Klimentko, I., S. Isobe, N. Kozlov, N. Razgulayeva and S. Ivashuta (2003): QTL-analysis of Sclerotinia tolerance in red clover mapping population. Functional genomics and breeding strategies for cold tolerance in plants. p. 69.
 - 11) Nishio, N., K. Takata, T. Tabiki, M. Iriki, and T. D. Murray (2003): Influence of cold hardening temperature and soil matric potential on resistance to speckled snow mold of winter wheat. Phytopathology 93 (6) Suppl. S65.
 - 12) Okumura, K., M. Gau, S. Isobe, and K. Hiroi (2003): Traits of the F₂ population between "Hokuseki" and "RANNY2" of red clover varieties in the 3rd year. J. Hokkaido Soc. Grassl. Sci. 38, 85. (In Japanese).
 - 13) Sanada, Y., T. Takai, R. A. B. M. Golam and T. Yamada (2003): Physiological characteristics of high freezing tolerant "Hokkai 28" during hardening and wintering in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Functional Genomics and Breeding Strategies for Cold Tolerance in Plants. Abstract p. 66.
 - 14) Sanada, Y., T. Takai and T. Yamada (2004): Changes in freezing tolerance, enzyme activity and soluble carbohydrate content during cold acclimation in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). International Plant Cold Hardiness Seminar. Abstract p. 61.
 - 15) Sanada, Y., V. Chapulin, T. Takai and T. Yamada (2005): Growth habit of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) strains selected in Russia. J. Hokkaido Soc. Grassl. Sci. 39, 59. (In Japanese).
 - 16) Shimosaka, E. (2002): Toward transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* 1) An efficient method for immature embryo culture of wheat and infection of *Agrobacterium*. Reports of the Hokkaido Branch, the Japanese Society of Breeding and Hokkaido Branch, the Crop Science Society of JAPAN. 43, 61-62. (In Japanese).
 - 17) Shimosaka, E., H. Handa (2001): Expression pattern of wheat-ELIP (Early Light-Inducible Protein) under cold stress condition. Breeding Science 3 (Supplement 2), 247. (In Japanese).
 - 18) Shimosaka, E. and H. Handa (2004): Expression of early light-inducible proteins during cold hardening in wheat. 7th International Plant Cold Hardiness Seminar abstracts. p. 90.
 - 19) Shimosaka, E. and H. Handa (2004): Regulation of ELIP accumulation during cold hardening in wheat. Breeding Science 6 (Supplement 2): 294. (In Japanese).
 - 20) Takai, T., T. Shelenga, S. Sanada and T. Yamada (2003): Incidence of endophyte-like fungi in meadow fescue collected in former USSR, Europe and Japan. J. Hokkaido Soc. Grassl. Sci. 37, 95. (In Japanese).
 - 21) Uchiyama, K., S. Ivashuta, M. Naumkina, M. Gau, S. Isobe, P. Kalo and G. B. Kiss (2002): QTL analysis of traits associated with freezing tolerance and mapping of cold-induced genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Jpn. J. Grassl. Sci. 48 (Supplement), 344-345. (In Japanese).
 - 22) Yoshida, M., D. Lin and A. Kawakami (2004): A mini exon in the sucrose:sucrose 1-fructosyl-transferase gene of wheat. J. Plant Physiol. 161, 1277-1279.

第1章 コムギの低温ストレス耐性向上技術の開発

1. コムギ近縁野生種を利用した耐凍性、耐雪性素材の開発

(1) 自然環境及び人工環境下での耐凍性、耐雪性の評価

ア. 研究目的

秋播コムギへの低温ストレスは、越冬を阻害し、越冬した個体においてもその後の生育の停滞を引き起こし、生産性を不安定化させる要因である。コムギの低温ストレス耐性は耐凍性と耐雪性（雪腐病抵抗性）とに大別されるが、両耐性に関する遺伝資源は極めて限られている。そこで、コムギ近縁種における両耐性系統の検索を行った。

これまでに得られている知見では、雪腐病抵抗性に関しては *Aegilops calindrica* が抵抗性遺伝資源として有望であり、北海道農研では札幌においてその系統のスクリーニングをおこなっている。しかし、雪腐病抵抗性に関して、コムギ品種よりも高い抵抗性を示す系統は見出されていなかった。そこで、ロシアとアメリカにおいて収集された *Ae. cylindrica* を新たに供試し、札幌において雪腐病抵抗性の評価をおこなった。また、*Ae. cylindrica* のゲノム構成は C D であるが、そのどちらが雪腐病抵抗性に関与するかを明らかにするために *Ae. caudata* (C) と *Ae. squarrosa* (D) の雪腐病抵抗性を評価した。さらに、これまでのスクリーニングには雪腐病抵抗性を主体として札幌で実施されていることから、異なる野外環境での耐凍性を主とした越冬性の発現を評価するため、札幌において雪腐病抵抗性が高いと評価された系統を用いてロシアにおける野外条件での越冬性をバビロフ研で評価した。

イ. 研究方法

1) 材料

雪腐病抵抗性に関してスクリーニングされた *Ae. cylindrica* として Table1-1 に示す 12 系統 (Iriki et al. 2001) を用いた。新たに導入した、*Ae. cylindrica* 137 系統は、ロシアで収集されたものが 65 系統 (農業生物資源研ジーンバンクより導入)、アメリカで収集されたものが 72 系統 (Watanabe and Kawahara 1999) である。*Ae. caudata* は 131 系統 (ドイツ Shubert 博士、および京都大学植物生殖質研究施設より導入)、*Ae. squarrosa* (カンサス州立大学、ワシントン州立

大学、および京都大学植物生殖質研究施設より導入) は 352 系統を供試した。雪腐病抵抗性に関するコムギの比較品種として、PI 173438 (雪腐病抵抗性極強)、ホロシリコムギ (同抵抗性強)、チホクコムギ (同抵抗性やや弱) および Ibis (同抵抗性弱) を用いた。バビロフ研における耐凍性の評価では、耐凍性の比較品種として Valujevskaya (耐凍性極強) を加えた。

2) *Ae. caudata*、*Ae. squarrosa* の雪腐病抵抗性の評価

雪腐病抵抗性は、雪腐小粒菌核病菌生物型 A の圃場接種 (入来・桑原、1992) により 2 カ年 (2000 / 2001 および 2001 / 2002) にわたって評価した。栽培法は、播種が 9 月中旬、株間 10cm の 1 点 1 粒播きとし、基肥として窒素を 4g/m² 施用した。抵抗性の評価は、起生期における達観による観察により、PI 173438 (雪腐病抵抗性極強)、ホロシリコムギ (同抵抗性強)、チホクコムギ (同やや弱)、Ibis (同弱) と比較し、0 (雪腐病抵抗性極強を超える可能性のある抵抗性)、1 (雪腐病抵抗性極強) ~ 5 (同弱) のスコアを与えた。

3) 新たに導入した *Ae. cylindrica* の雪腐病抵抗性の評価

評価は 2000 / 2001 年に実施した。栽培法および評価法は 2) と同様である。

4) バビロフ研における *Ae. cylindrica* 12 系統の越冬性の評価

Pavlovsk のバビロフ研圃場において 2000 / 2001 年および 2001 / 2002 年に実施した。播種は、2000 年 8 月 30 日および 2001 年 9 月 4 日におこなった。株間 15cm の 1 粒播き、乱塊法 2 反復によりバビロフ研の慣行法により栽培した。越冬性を生存個体率 (%) で評価した。

ウ. 結果及び考察

1) 札幌における *Ae. caudata* および *Ae. squarrosa* の雪腐病抵抗性の評価

両種ともに雪腐病抵抗性の高い系統は認められなかった (Fig.1-1)。また、*Ae. squarrosa* に比べ、*Ae. caudata* には抵抗性のスコア 5 (弱) の系統が多く認められ、後者が前者よりも同抵抗性が低い傾向が見られた。したがって、*Ae. cylindrica* の雪腐病抵抗性が C、D ゲノムのどちらに由来するかは明らかにできなかったが、同抵抗性に関して両種間に差がある

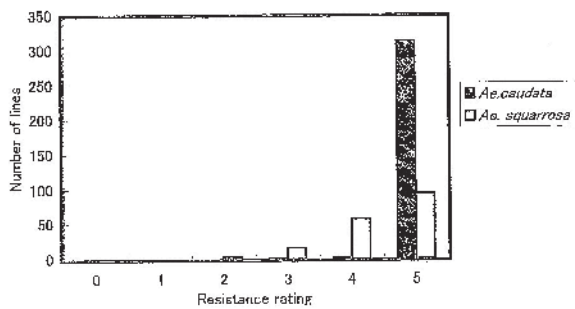


Fig. 1-1. Frequency distributions of snow mold resistance ratings among *Aegilops caudata* and *Aegilops squarrosa* accessions. Resistance rating: 0, no damage; 1, leaves were injured; 2, less than half of the stems were dead; 3, half of stem were dead; 4, most of stems dead; 5, plant dead.

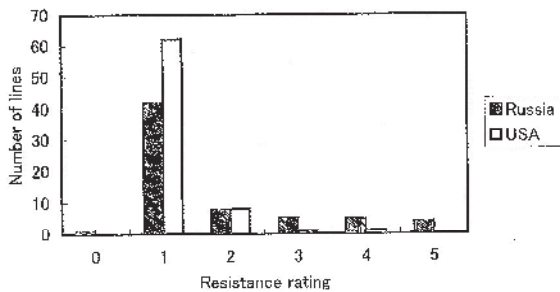


Fig. 1-2. Frequency distribution of snow mold resistance ratings among *Aegilops cylindrica* accessions collected in Russia and the USA. Resistance rating: 0, no damage; 1, leaves were injured; 2, less than half of the stems were dead; 3, half of stems were dead; 4, most of stems dead; 5, plant dead.

ことが推察された。

2) 新たに導入した *Ae. cylindrica* 系統の雪腐病抵抗性

雪腐病抵抗性には系統間差異が見られた (Fig. 1-2)。抵抗性の頻度分布はロシア、アメリカ収集のどちらでも同様な傾向を示し、コムギの最も抵抗性の強い品種である PI 173438 と同程度のものが複数認められ、*Ae. cylindrica* が *Aegilops/Triticum* complex において雪腐病抵抗性の高い種であることが確認された。PI 173438 よりも強い抵抗性のもの (スコア 0) がわずかに認められたが、2次スクリーニングの結果、その系統の抵抗性は PI 173438 と同程度であると考えられた (データ略)。コムギにおいて雪腐病抵抗性極強品種は数万品種系統のスクリーニングから 10 品種程度が知られているのみであるが (Iriki et al., 2001)、*Ae. cylindrica* においてはこれまでに得られた

Table 1-1. Snow mold resistance and freezing tolerance of *Aegilops cylindrica* accessions screened for resistance to *Typhula ishikariensis*.

Species	Accession or cultivar	Snow mold resistance ¹ (Disease severity)	Freezing tolerance ² LT ₅₀
<i>Ae. cylindrica</i>	KU 7-5	1.46 a	-18.6 e
	401414	1.25 a	-18.7 de
	KU 2440	1.24 a	-21.0 c
	401384	1.17 a	-20.6 bcd
	KU 2438	1.13 a	-18.8 de
	KU 2486	1.12 a	<-18.0
	400454	1.07 a	-20.9 bc
	400477	1.05 a	-22.0 b
	400384	1.02 a	-18.9 de
	400476	0.99 a	-19.2 cde
<i>T. aestivum</i>	KU 2441	0.93 a	-18.9 de
	400452	0.81 a	-20.5 bcde
	Horoshirikomugi	3.58 b	<-18.0
	PI 173438	1.01 a	-24.1 a
	Valjevskaya		

¹Snow mold resistance expressed as disease severity was evaluated in artificially infested plots by *Typhula ishikariensis*.

Disease severity: mean of individual snow mold resistance ratings; 0, no damage; 1, leaves were injured; 2, less than half of the stems were dead; 3, half of stems were dead; 4, most of stems dead; 5, plant dead.

²Freezing tolerance was expressed as LT₅₀ (the temperature at which 50% of plants are killed).

KU accessions were provided by Kyoto University. Dr. Yoshida, NARC, gave other *Ae. cylindrica* accessions originally collected by ICARDA.

Values followed by same letters in the same column are not significantly different at the 5% level according to Duncan's multiple range test.

Table 1-2. Winter survival of *Aegilops cylindrica* accessions at Pavlovsk, Russia during 2000/2001 and 2001/2002.

Accession or cultivar	Plant survival (%)		
	2000/2001	2001/2002	
<i>Ae. cylindrica</i>	400384	88	100
	400452	80	95
	400454	92	94
	400476	90	96
	400477	78	95
	401384	97	95
	401414	95	87
	KU 2438	87	95
	KU 2440	100	99
	KU 2441	90	89
	KU 2480	95	93
	KU7-5	93	97
<i>T. aestivum</i>	PI 173438	97	88
	Horoshirikomugi	82	88
	Chihokukomugi	83	90
	Ibis	64	91
	Valjevskaya	94	86

極強系統数がすでに 10 系統を超えており、コムギにおけるよりも極強抵抗性系統の頻度が高いと考えられる。したがって、*Ae. cylindrica* には、コムギとは異なる同抵抗性の機作等が存在すると考えられ、さらに検討する価値があると考えられる。

3) バビロフ研における *Ae. cylindrica* 12 系統の越冬性の評価

全系統が 78~100% (2000 / 2001 年) または 87~100% (2001 / 2002 年) の高い生存個体率を示した (Table 1-2)。しかし、耐凍性が低いコムギ品種である、PI 173438、Ibis もそれぞれ 88~97%、64~

91%と比較的高い生存個体率を示した。気象データによると両実験年において平均気温が最も低温であったのは2000年12月(-10.2°C)であり、しかもこの時期は積雪により平均地表面温度は-0.1°Cと記録されている。したがって、本実験では耐凍性の品種間差が現れにくい条件であったと考えられ、本実験に用いた *Ae. cylindrica* がロシアにおける耐凍性母本として有用であるかどうかは、今後さらに検討を要すると考えられる。

エ. 今後の問題点

Ae. cylindrica の雪腐病抵抗性をコムギに導入することが可能であるか、また、*Aegilops* spp. 以外の近縁種からの耐凍性および雪腐病抵抗性遺伝資源の導入の可能性を検討する必要がある。これらについては、「コムギ近縁種との交雑による耐凍性、耐雪性素材の開発」において検討をおこなった。

オ. 要約

- 1) *Ae. caudata* の 131 系統および *Ae. squarrosa* の 352 系統の雪腐病抵抗性を札幌で圃場接種検定により評価したが、抵抗性の高い系統は見い出せなかった。しかし、前考の同抵抗性が後者よりも低い傾向が認められた。
- 2) *Ae. cylindrica* 137 系統の雪腐病抵抗性を評価したが、コムギの最も抵抗性の高い品種を上回る系統は見い出せなかった。しかし、*Ae. cylindrica* における同抵抗性極強系統の頻度はコムギにおけるよりも高いと推察された。
- 3) 札幌で雪腐病抵抗性に関してスクリーニングされた *Ae. cylindrica* の 12 系統はロシアのパビロフ研圃場において高い越冬性を示したが、試験年が比較的温暖であったため、耐凍性に関してさらに検討を要する。

カ. 引用文献

- 1) 入来規雄・桑原達雄(1992):雪腐黒色小粒菌核病菌生物型 A, B および C の圃場接種に対する秋播コムギ品種の反応. 育種学雑誌 42, 843-852.
- 2) Iriki, N., Kawakami, A., Takata, T., Kuwabara, T. and Ban, T. (2001): Screening relatives of wheat for snow mold resistance and freezing tolerance. *Euphytica* 122, 335-341.
- 3) Watanabe, N. and Kawahara, T. (1999): *Aegilops*

species collected in California and Oregon, USA. *Wheat Information Service*. 89, 33-36.

(入来規雄)

Evaluation of Freezing Tolerance and Snow Mold Resistance in Wild Relatives of Wheat under Natural and Artificial Environmental Conditions

Norio Iriki¹⁾, Kirill Funtov²⁾,
Olga Mitrofanova²⁾ and Timothy D. Murray³⁾

¹⁾National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

²⁾N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry

³⁾Washington State University

Summary

Aegilops caudata (131 accessions) and *Ae. squarrosa* (352 accessions) were evaluated for their resistance to snow mold in artificially infested plots with *Typhula ishikariensis* at Sapporo. Accessions with higher resistance compared to wheat were not identified.

Ae. cylindrica (137 accessions) collected in the USA and Russia were evaluated for their resistance to snow mold in artificially infested plots with *Typhula ishikariensis* at Sapporo. Several accessions showed resistance as high as that of PI 173438, a highly resistant wheat check cultivar. However, no accession showed a higher level of resistance than that of PI 173438.

Twelve accessions of *Ae. cylindrica* screened as highly snow mold resistant at Sapporo showed good winter survival in Russia.

(2) コムギ近縁種との交雑による耐凍性、耐雪性素材の開発

ア. 研究目的

コムギの低温ストレス耐性は耐凍性と耐雪性（雪腐病抵抗性）とに大別されるが、両耐性に関する遺伝資源はきわめて限られている。両耐性に関する変異を拡大する手段として、属間交雑によりコムギの近縁種の持つ耐性遺伝子をコムギに導入することが考えられる。北海道農研では、コムギ近縁種のなかの *Aegilops* spp. および *Triticum* spp. においては、*Aegilops cylindrica* にコムギの抵抗性極強の品種と同等の抵抗性を示す系統が存在することを明らかにしている。*Ae. cylindrica* のゲノム構成は CD でコムギとは異なる Cゲノムを有することから、*Ae. cylindrica* からの抵抗性導入により、抵抗性に関する変異の拡大ができる可能性がある。また、バビロフ研究所では *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統を保存しているが、雪腐病抵抗性ならびに耐凍性の評価はおこなわれていない。さらに、雪腐病抵抗性を近縁種から導入するにあたっては、抵抗性を的確に評価する方法の確立が必要である。本項における目的は、以下のとおりである：1) *Ae. cylindrica* の雪腐病抵抗性の機作がコムギと異なるかを明らかにするために、*Ae. cylindrica* の越冬時の糖代謝を調べる；2) 戻し交雑により *Ae. cylindrica* の有する雪腐病抵抗性を北海道コムギ品種へ導入する；3) *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統の染色体構成を調べるとともに北海道コムギ品種との交配をおこない、属間雑種由来系統の耐凍性母本としての能力を評価する；4) ハードニング条件がコムギの雪腐病抵抗性に及ぼす影響を明らかにする；5) 雪腐病菌接種後のコムギ植物体内の菌 DNA 量による抵抗性評価法を開発する。

イ. 研究方法

1) 材料

(1) *Ae. cylindrica* の糖代謝

雪腐病抵抗性極強の 9 系統 (KU 2441、KU 2486、400476、400477、400384、400454、KU 2438、400452、KU 7-5) (Iriki et al., 2001)、および罹病性の 6 系統 (00089763、KU2401、KU2418、KU2661、00089764、00089770) (Iriki et al., 2001; Iriki et al. 2005)、ならびにコムギ品種 PI 173438 (雪腐病抵

抗性極強)、チホクコムギ (雪腐病抵抗性やや弱) を用いた。

(2) *Agropyron elongatum*, および *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統の越冬性の評価
ロシアのバビロフ研究所においては、Table 1-3 に示す *agropyron elongatum* 18 系統, *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来の 31 系統, ならびに

Table 1-3. Winter survival of *Agropyron elongatum* and lines derived from interspecific hybrids at Pushkin during 2001/2002.

Accession No. ¹⁾	Origin/Cultivar/Line	Plant survival (%)
<i>Agropyron elongatum</i>		
37654	Uzbekistan	70
37673	Turkey	50
37685	Uruguay	74
38901	Australia	61
38902	USA	59
39385	Canada	74
40018	Bolivia	74
43562	USA	67
44371	Portugal	77
44483	Ukraine	78
44485	Russia	90
44486	Russia	72
44719	Russia	64
45404	Yemen Arabian Republic	64
45460	Russia	54
45481	Russia	66
45482	Russia	88
45831	Australia	76
Breeding lines derived from <i>Agropyron</i> spp./Wheat crosses		
40987	PPG 54/48	97
40859	PPG60/48	87
40880	PPG 59/49	78
40870	PPG 56/49	82
40871	PPG 55/49	79
41085	PPG 57/49	90
38289	PPG 508	90
40228	PPG 1	86
40230	PPG 64	90
40231	PPG 186	94
43630	Zernol'movoi PPG 108	95
45862	PPG 391	96
46704	PPG 29	93
46888	Gibrid	94
46890	Gibrid	97
46891	Gibrid	96
46892	Gibrid	95
54691	PPG 5	98
58539	PPG 113	93
58540	PPG 115	91
58541	PPG 347	91
56873	Zemofurazhnaya 128	92
57443	PPG 827	91
61244	PPG 48	91
40612	Mnogoletnyaya N2	93
47028	Zemokormovaya otrastayushche	90
47987	Zemokormovaya otrastayushche	93
59005	Mnogoletnyaya 299	91
59006	Mnogoletnyaya 206	99
59007	Mnogoletnyaya 322	93
59008	Mnogoletnyaya 111	92
Wheat checks		
	Valujevskaya	89
	Gihokukomugi	87
	Horoshinkomugi	88

1) Accessions of No. 40612, 59006, 59008, 59007, and 59008 were obtained from the cross between *Agropyron elongatum* and *Triticum aestivum*. The rest were obtained from crosses between *Triticum aestivum* and *A. glaucum* or *A. intermedium*.

Table 1-4. Disease severity of accessions of *Agropyron elongatum* and breeding lines derived from *Agropyron* spp./wheat crosses in artificially infested plots at Sapporo during 2001/2002.

Accession No. ¹⁾	Line/cultivar	Disease severity ²⁾
<i>Agropyron elongatum</i>		
37651	WILD	5.0
37652	WILD	5.0
37653	WILD	5.0
37654	WILD	4.7
37673	WILD	5.0
37685	Commercial	4.3
38901	C P 1 - 22085	5.0
38902	Jose	5.0
39385	ORBIT	5.0
40016	BELEN	4.0
43562	CS - 7 - 57	5.0
44371	AUSTRALIA - 77362	5.0
44387	EL VIZCACHERO	5.0
44483	WILD	4.9
44485	WILD	5.0
44486	WILD	5.0
44719	WILD	4.5
45404	TARGO	4.0
45480	WILD	4.9
45481	WILD	5.0
45482	WILD	4.7
45831	Turrell	4.0
Breeding lines derived from <i>Agropyron</i> spp./wheat crosses ¹⁾		
38289	PPG 599	4.3
40230	PPG 64	3.3
43830	Zernokormovoi PPG-108	3.6
45859	PPG 407	4.9
48074	PPG 29	4.0
48888	Gibrid	4.5
48889	Gibrid	4.0
48890	Gibrid	4.6
48891	Gibrid	4.3
48892	Gibrid	4.1
54691	PPG 5	4.1
58539	PPG 113	4.4
58540	PPG 115	3.9
58541	PPG 347	4.0
59005	Mnogoletnyaya 209	3.8
56873	Zernofurazhnaya 125	4.9
57443	PPG 827	4.1
Wheat checks		
PI 173438		2.2
Horoshirikomugi		3.7
Chihokukomugi		4.5
Ibis		4.9

1)The accession of No. 59005 was obtained from the cross between *Agropyron elongatum* and *Triticum aestivum*. The rest were obtained from crosses between *Triticum aestivum* and *A. glaucum* or *A. intermedium*.

2)Disease severity: 0, no damage; 1, leaves were injured; 2, less than half of the stems were dead; 3, half of stems were dead; 4, most of stems dead; 5, plant dead.

コムギ4品種 (Valujevskaya (耐凍性極強)、チホクコムギ (耐凍性やや強および雪腐病抵抗性やや弱)、ホロシリコムギ (耐凍性やや強および雪腐病抵抗性強)、および Ibis (耐凍性弱および雪腐病抵抗性弱) を供試した。

Table 1-5. Disease severity of breeding lines derived from *Agropyron* spp./wheat crosses in artificially infested plots with *Typhula ishikariensis* during 2003/2004 at Sapporo.

Accession No. ¹⁾	Line/cultivar	Disease severity ²⁾
40697	PPG 54/49	4.6
40859	PPG 60/49	4.8
40860	PPG 59/49	4.0
40870	PPG 56/49	5.0
40871	PPG 55/49	5.0
41065	PPG 57/49	4.9
40231	PPG 186	3.8
45862	PPG 391	5.0
61244	PPG 48	5.0
40612	Mnogoletnyaya N2	5.0
47028	Zernokormovaya otrastayushchaya	5.0
47987	Zernokormovaya otrastayushchaya 38	4.0
Wheat checks		
	PI 173438	1.8
	Horoshirikomugi	4.2
	Chihokukomugi	4.8
	Ibis	4.9

1)The accession of No. 40612 was obtained from the cross between *Agropyron elongatum* and *Triticum aestivum*. The rest were obtained from crosses between *Triticum aestivum* and *A. glaucum* or *A. intermedium*.

2)Disease severity: 0, no damage; 1, leaves were injured; 2, less than half of the stems were dead; 3, half of stems were dead; 4, most of stems dead; 5, plant dead.

北海道農研においては、雪腐病抵抗性に関して、Table 1-4 および Table 1-5 に示す *A. elongatum* 22 系統、属間雑種由来 26 系統を供試した。耐凍性に関して、Table 1-6 に示す属間雑種由来 14 系統およびコムギ品種 (Valujevskaya、耐凍性極強; Münstertaler、Valjevskaya より耐凍性がやや低いが北海道の品種よりも高い耐凍性を示す) を供試した。

(3) *Ae. cylindrica* からコムギ品種への雪腐病抵抗性の導入

雪腐病抵抗性の供与親として *Ae. cylindrica* 系統 400452 を、反復親として雪腐病抵抗性がやや低いコムギ品種チホクコムギを用いた。

(4) *A. elongatum* とコムギの属間雑種系統

Mnogoletnyaya 209 の耐凍性母本としての能力の評価

コムギの交配親に北海道で栽培されている秋播コムギ品種であるホクシンを用いた。

(5) コムギのハードニング条件が雪腐病抵抗性に及ぼす影響

秋播コムギ品種の、PI 173438、Münstertaler (雪腐病抵抗性極強)、Sprague、ホロシリコムギ (同強)、勝系 30 (同やや強)、チホクコムギ、Madsen (同やや弱)、Ibis (同弱) を用いた。

(6) 植物体内の菌量による抵抗性の評価

秋播コムギ品種 PI 173438、ホロシリコムギ、チホクコムギおよび Ibis を用いた。

(7) *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統

Table 1-6. Freezing tolerance expressed as LT₅₀ among lines derived from crosses between *Agropyron* spp. and wheat at Sapporo.

Accession No. ¹⁾	line / cultivar	LT ₅₀	95% confidence limit
59005	Mnogoletnyaya 209	-24.3	-22.9 ~ -25.7
59007	Mnogoletnyaya 322	-24.7	-23.8 ~ -25.6
26419	Hussar x <i>Ae. cylindrica</i>	-19.2	-18.3 ~ -20.2
26423	Hussar x <i>Ae. cylindrica</i>	-20.2	-19.1 ~ -21.4
40612	Mnogoletnyaya N2	-17.8	-16.4 ~ -19.4
47028	Zernokormovaya otrastayushchaya	-24.2	-22.4 ~ -26.2
47987	Zernokormovaya otrastayushchaya 38	-25.0	-23.0 ~ -27.2
38239	PPG 599	-22.3	-21.2 ~ -23.5
40230	PPG 64	-21.7	-20.2 ~ -23.2
45859	PPG 407	-18.9	-18.5 ~ -19.3
48704	PPG 29	-20.3	-18.5 ~ -22.4
54691	PPG 5	-23.5	-22.8 ~ -24.3
58539	PPG 113	-26.2	-25.5 ~ -26.9
58540	PPG 115	-23.2	-23.0 ~ -23.4
58541	PPG 347	-21.5	-20.3 ~ -22.7
57443	PPG 827	-26.3	-24.5 ~ -28.3
(wheat check)	Valujevskaya	-24.5	-23.4 ~ -25.7
	Münstertaler	-19.8	-17.6 ~ -22.2

1) The accession of No. 59005 and 59007 were obtained from the crosses between *Agropyron elongatum* and *Triticum aestivum*. The rest were obtained from crosses between *Triticum aestivum* and *A. glaucum* or *A. intermedium*.

Valujevskaya, a very cold tolerant wheat check; Münstertaler, a cold tolerant wheat check.

の染色体構成

Table 1-6 に示す系統を用いた。

2) *Ae. cylindrica* の糖代謝

2002 / 2003 年および2003 / 2004 年に *Ae. cylindrica* およびコムギ品種の越冬前後の糖類含量の分析をおこなった。*Ae. cylindrica* 系統およびコムギ品種を屋外においたポットにそれぞれ、9月中旬に播種した。積雪前および積雪90日後に植物体をサンプリングし、Yoshida et al. (1998) の方法により冠部のフルクタンおよび単・2糖類含量を測定した。

3) *A. elongatum* および *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統の越冬性の評価

バビロフ研では、Pushikinの圃場において、2001 / 2002年に、*A. elongatum* および *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統の越冬性の評価を実施した。播種は、9月4日におこない、株間15cmの1粒播き、乱塊法2反復によりバビロフ研の慣行法により栽培し、越冬性を生存個体率(%)で評価した。札幌においては、雪腐病抵抗性は、2001 / 2002年 (*A. elongatum* および属間雑種由来系統) および2003 / 2004年 (属間雑種由来系統) を9月中旬に播種し (株間10cmの1粒播き、乱塊法2反復)、圃場接種検定による被害スコア(0~5)を用いて評価した。耐凍性は2003年9月12日に屋外の育苗箱に播種した材料を用い、根雪前のLT₅₀(Pomeroy and Fowler,

1973) により表した。

4) *Ae. cylindrica* からコムギ品種への雪腐病抵抗性の導入

チホクコムギ/400452 F₁ にチホクコムギを花粉親として戻し交配をおこなった。各世代の根端および成熟分裂において染色体数の計数をおこなった。BC₃F₂において、人工環境下で、雪腐黒色小粒菌核病菌生物型B (菌株:TB-12) の接種により同抵抗性を評価した。

5) *A. elongatum* とコムギの属間雑種系統

Mnogoletnyaya 209 の耐凍性母本としての能力の評価

Mnogoletnyaya 209 とコムギ品種ホクシンとの交配をおこない、後代 (F₃ 集団) の耐凍性を評価した。耐凍性は、屋外において育苗箱を用いて養成した材料の冠部を12月上旬に採取し、-22.5°C処理における生存率により評価した。

6) コムギのハードニング条件が雪腐病抵抗性に及ぼす影響

ワシントン州立大学の人工環境制御装置を用い、プレ・ハードニングを20°Cで2週間行なった後、ハードニング期間(14日、28日)、ハードニング温度(2°C、4°C)、ハードニング時の土壌水分ポテンシャル(-0.01MPa、湿潤条件; -0.1MPa、乾燥条件)が抵抗性の発現におよぼす影響を調べた。ハードニング後にエンバク粒で培養した雪腐黒色小粒菌核病

菌生物型 B (菌株 TB-12) を接種し、吸水させた脱脂綿で覆い、8°C 暗黒下に 30 日間置いた。その後温室内で再生させ、生存茎率 (%) により抵抗性を評価した。

7) 植物体内の菌量と抵抗性の関連

植物体は、プレ・ハードニングを 20°C において 2 週間、ハードニング 2°C・4 週間により養成し、ハードニング後にオオムギ粒で培養した雪腐黒色小粒菌核病菌生物型 B (菌株 TB-12) を接種し、吸水させた脱脂綿で覆い、8°C 暗黒下に置いた。1 週間ごとに 4 週後までサンプリングし、葉、冠部および根の菌量を測定した。菌量の測定は、雪腐黒色小粒菌核病菌の ITS-2 領域を用いたプライマーを用いて、Real-Time PCR によりおこなった。実験の一部をワシントン州立大学でおこなった。

8) *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統の染色体構成

根端において染色体数を計数するとともに、GISH により染色体構成を調べた。実験はワシントン州立大学が担当した。

ウ. 結果及び考察

1) *Ae. cylindrica* の糖代謝

Ae. cylindrica のフルクタン含量は、2002/2003 年には、積雪前には、雪腐病抵抗性系統と罹病性系統の平均値間に有意差が認められなかった (66.2 mg/g・fw および 62.6 mg/g・fw) が、積雪 90 日後には、抵抗性系統のほうが高い値を示した (43.6 mg/g・fw および 24.9 mg/g・fw)。2003 / 2004 年には、積雪前、積雪後ともに抵抗性系統のほうが高かった (根雪前 69.3 mg/g・fw および 33.9 mg/g・fw、積雪後 26.6 mg/g・fw および 12.3 mg/g・fw)。コムギ品種では、雪腐病抵抗性極強の PI 173438 のフルクタン含量は、根雪前、積雪後ともに同抵抗性やや弱のチホクコムギよりも高い値を示した (Fig. 1-3)。コムギ品種では、雪腐病抵抗性極強品種は積雪前のフルクタン含量が高く、その結果、積雪後でも多量のフルクタンを維持していることが明らかにされている (Yoshida et al. 1998)。*Ae. cylindrica* の雪腐病抵抗性極強系統は、コムギの場合と同様に積雪後のフルクタン含量が高いが、それには、積雪前のフルクタン含量が高い場合と、積雪前の蓄積はさほど高くはないものの積雪下でのフルクタン消費量が低いことに起因する可能性があることが認められた。したがって、*Ae. cylindrica*

にはコムギとは異なる抵抗性機作が存在すると推定され、コムギにその遺伝子を導入することで、雪腐病抵抗性に関する変異の拡大が可能と考えられた。

2) *A. elongatum* および *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統の越冬性評価

バビロフ研保存の *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統の一部は、*A. elongatum* との交配に由来するが、詳細が不明であるため、バビロフ研保存の *A. elongatum* 系統の越冬性も調べた。

バビロフ研の Pushikin 圃場では、*A. elongatum* は 50~88% の *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統は 78~98% の生存個体率を示した (Table 1-3)。しかし、比較として用いたコムギ品種の生存個体率も 87~89% と高く、1. (1) の項で示したように本試験期間の冬期間の気候が温暖に経過したために供試材料の耐凍性を正確に評価できなかったと考えられる。

札幌における評価では、雪腐病抵抗性に関しては、*A. elongatum* の被害スコアは 4.3~5.0 であり、*Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統は 3.3~4.9 (2001 / 2002) または 3.8~5.0 (2003 / 2004) であり、コムギの雪腐病極強品種 PI 173438

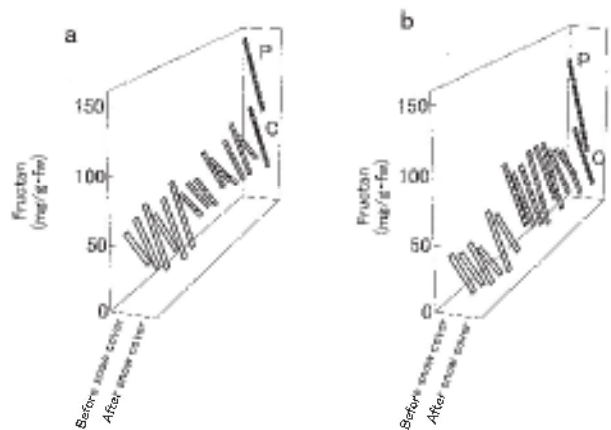


Fig. 1-3. Fructan content of snow mold resistant and susceptible accessions in *Aegilops cylindrica* before snow cover and after 90 days of snow. a: 2002/2003. b: 2003/2004. Open bars: snow mold susceptible accessions (from the lower left to the upper right, 00089763, KU2401, KU2418, KU2438, 00089764, 00089770). Hatched bars: snow mold resistant accessions (from the lower left to the upper right, KU 2441, KU 2486, 400476, 400477, 400384, 400454, KU 2438, 400452, KU 7-5). Solid bars: wheat checks; P, PI 173438 (snow mold resistant); C, Chihokukomugi (snow mod susceptible).

よりも低い抵抗性を示した (Table 1-4 および Table 1-5)。耐凍性に関する評価では、属間雑種由来系統の LT_{50} は -17.8 ~ -26.3 であり、コムギの耐凍性極強品種である Valujevskaya と同等であるものが認められた (Table 1-6)、したがって、*A. elongatum* は雪腐病抵抗性の遺伝資源としては期待できないが、耐凍性の遺伝資源として有用であることが示唆され、その耐凍性は属間雑種由来系統に導入されている可能性があると考えられた。

3) *Ae. cylindrica* からコムギ品種への雪腐病抵抗性の導入

戻し交雑により BC_3F_1 を 1 個体得た。得られた個体の染色体数は $2n=44$ で、成熟分裂における対合の観察結果から、コムギのゲノムに *Ae. cylindrica* の C ゲノムの染色体が 1 対添加されていると考えられた。自殖により得られた BC_3F_2 の雪腐黒色小粒菌核病菌接種検定における生存率は 39% で、チホコムギ (29%) より有意に高かったことから、*Ae. cylindrica* から雪腐病抵抗性が導入された素材が得られたと考えられた。

4) *A. elongatum* とコムギの属間雑種系統

Mnogoletnyaya 209 の耐凍性母本としての能力の評価

ホクシン、Mnogoletnyaya 209、および Mnogoletnyaya 209 /ホクシン F_3 各 30 個体の耐凍性を -22.5°C における生存個体率で評価したところ、それぞれの値は、ホクシンが 0%、Mnogoletnyaya 209 が 10%、 F_3 集団が 3% であった F_3 集団の耐凍性はホクシンよりも高かったことから、Mnogoletnyaya 209 には耐凍性母本としての能力があると考えられた。

5) コムギのハードニング条件が雪腐病抵抗性に及ぼす影響

これまでの報告と同様に、ハードニング時の温度は 4°C のほうが 2°C よりも効果が高く、ハードニング期間の長いほうが抵抗性は高まるが、ハードニング開始初期は抵抗性が低下する時期のあることが確認された。また、新たに、ハードニング時の土壌中の水ポテンシャルが同抵抗性の発現に影響を及ぼし、過湿条件が抵抗性を低下させることが明らかとなった (Fig. 1-4)。したがって、抵抗性の評価に際しては灌水、あるいは圃場の土壌排水に留意することが必要であることが示された。

6) 植物体内の菌量による抵抗性の評価

遠観または生存率によらない新しい評価法として、

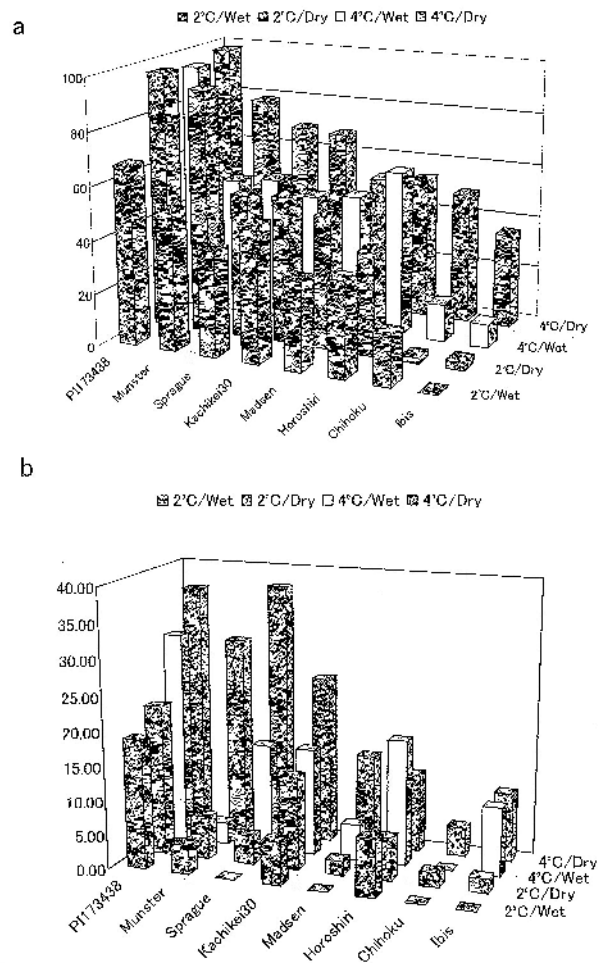
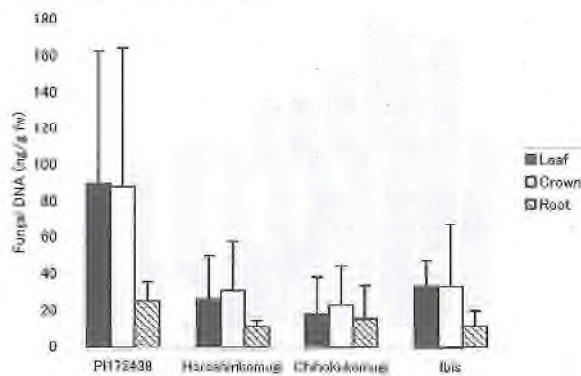


Fig. 1-4. Relationships between the hardening periods, hardening temperatures, soil matric potential and resistance to *Typhula ishikariensis*. a: hardening period = 28 days. b: hardening period = 14 days.

菌接種後の植物体内の菌量を測定することが考えられる。そこで、抵抗性の品種間差が明らかな材料を用い、接種後の葉、冠部及び根の菌 DNA 量の関連を調べた。接種 1 週間後において、雪腐病抵抗性極強の PI 173438 は、葉および冠部において他の品種よりも高い菌 DNA 量を示した (Fig. 1-5A)。接種 2 週間後も同様の傾向を示し、接種 3 週間後には菌 DNA 量の品種間差は少なくなり、接種 4 週間後には、抵抗性の低い Ibis の DNA 量が他と比べて高くなった (Fig. 1-5B)。この結果から、抵抗性の評価は菌接種 4 週間後におこなうべきであると考えられた。また、雪腐病抵抗性極強品種 PI 173438 の植物体内における菌の動態に関して、感染初期において葉において増殖が起きるといふ、興味深い結果が得られた。

7) *Agropyron* spp. とコムギの属間雑種由来系統の染

A. One week after inoculation



B. Four weeks after inoculation

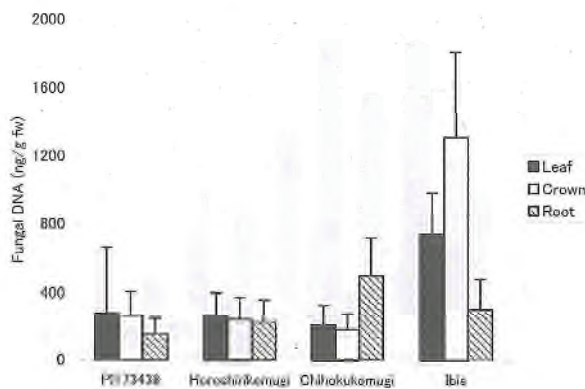


Fig. 1-5, Fungal DNA contents in wheat plants after infection with *Typhula ishikariensis*.

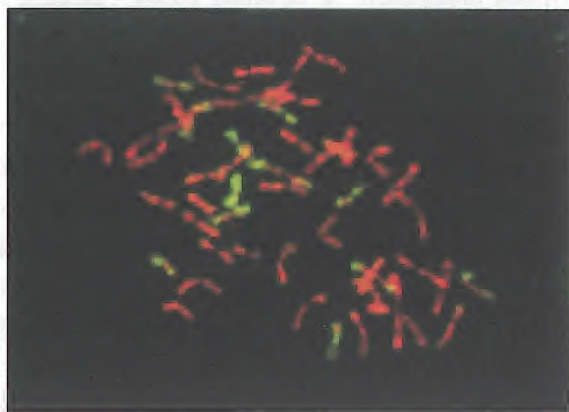


Fig. 1-6. GISH of Mnogoletnyaya 209. Chromosomes with green fluorescence are J genome from *Agropyron elongatum*.

色体構成

Table 1-7 に示すように、Mnogoletnyaya 209、Mnogoletnyaya 111 が $2n=54$ あるいは 56 の染色体数

Table 1-7. Chromosome numbers of lines derived from crosses between *Agropyron* spp. and wheat.

Accession No. ¹⁾	Line	Chromosome numbers
40230	PPG 64	42
40231	PPG 186	42
40612	Mnogoletnyaya N2	42
43830	Zemokormovai PPG-108	42
45859	PPG 407	42
48704	PPG 29	42
54691	PPG 5	42
57443	PPG 827	42
58539	PPG 113	42
58540	PPG 115	42
58541	PPG 827	42
59005	Mnogoletnyaya 209	54,56
59007	Mnogoletnyaya 322	42
59008	Mnogoletnyaya 111	56

1) Accessions of No. 59005, 59007 and 59008 were obtained from the crosses between *Agropyron elongatum* and *Triticum aestivum*. The rest were obtained from crosses between *Triticum aestivum* and *A. glaucum* or *A. intermedium*.

であったほかは、すべて染色体数は42であった GISH 法により染色体構成を調べたところ、42本の染色体数のものはすべてがコムギの染色体であり、Mnogoletnyaya 209 の染色体構成は、コムギ+8J+4JS (*A. elongatum* ゲノムは JJJ J²J²)、Mnogoletnyaya 111 はコムギ+8J+6JS であった (Fig. 1-6)。

エ. 今後の問題点

- 1) *Ae. cylindrica* において見られた、積雪下でのフルクタン消費が少ない、という糖代謝パターンがコムギ品種においても存在するかを明らかにする必要がある
- 2) Real-time PCR による植物体内の雪腐病菌定量法について、再現性を検討する必要がある
- 3) *Ae. cylindrica* からの雪腐病抵抗性の導入、*Agropyron* spp. との属間交雑由来系統からの耐凍性導入にあたっては、得られた素材の農業特性を大幅に改良する必要がある。

オ. 要約

- 1) *Ae. cylindrica* の雪腐病抵抗性系統には、従来知られていたコムギ雪腐病抵抗性品種 PI 173438 の糖代謝パターン(積雪前に多量のフルクタンを蓄積する)とは異なる、積雪下でのフルクタン消費が少ない、というものが認められた。したがって、*Ae. cylindrica* からの同抵抗性導入により抵抗性の変異の拡大が期待できると考えられた。
- 2) パピロフ研保存の、*Agropyron elongatum* または *A. glaucum* 等とコムギの属間雑由来系統の越冬性を評価したところ、雪腐病抵抗性の高いものはなかつ

たが、耐凍性に関しては、コムギで最も高い品種と同等のものが認められた。

3) *Ae. cylindrica* 系統 400452 に北海道のコムギ品種ホクシンを戻し交雑し、*Ae. cylindrica* の染色体を 1 対添加がされるとともに雪腐病抵抗性が導入された素材を作出した。

4) *Agropyron elongatum* とコムギの雑種由来系統である *Mnogoletnyaya* 209 と北海道のコムギ品種の交雑後代の越冬性の評価により、この系統が耐凍性の遺伝資源として有効であることが明らかとなった。

5) 過湿条件が雪腐病抵抗性を低下させることから、抵抗性の評価に際しては灌水、あるいは圃場の土壌排水に留意することが必要であることが示された。

6) 雪腐病菌の接種における植物体内の菌 DNA 量が同抵抗性の指標となることを示した。

方. 引用文献

- 1) Iriki, N., Kawakami, A., Takata, T., Kuwabara, T. and Ban, T. (2001): Screening relatives of wheat for snow mold resistance and freezing tolerance. *Euphytica* 122, 335-341.
- 2) Pomeroy, M. K. and Fowler, D. B. (1973): Use of lethal dose temperature estimates as indices of frost tolerance for wheat cold acclimated under natural and controlled environments. *Can. J. Plant. Sci.* 53, 489-494
- 3) Yoshida, M., Abe, J., Moriyama, M. and Kuwabara, T. (1998): Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiol. Plant.* 103, 8-16.

(入来規雄・西尾善太・高田兼則)

Development of Wheat Breeding Materials with Improved Freezing Tolerance and Snow Mold Resistance by Crossing with Wild Relatives of Wheat

Norio Iriki¹⁾, Zenta Nishio¹⁾, Kanenori Takada^{1) 2)}
Hongji Li³⁾, Timothy D. Murray³⁾, Kirill Funtov⁴⁾
and Olga Mitrofanova⁴⁾

¹⁾National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

²⁾National Agricultural Research Center for Western Region

³⁾Washington State university

⁴⁾N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Industry

S u m m a r y

It was shown that sugar metabolism in *Aegilops cylindrica* under snow in relation to snow mold resistance is different from that in wheat. Highly snow mold resistant wheat cultivar PI 173438 accumulates a higher level of fructan before snow cover, resulting in higher fructan content after snow cover compared to susceptible cultivars, whereas some resistant *Ae. cylindrica* accessions deplete fructan to low levels under snow, resulting in higher levels of fructan than susceptible ones.

Breeding lines derived from crosses of *Agropyron* spp. and wheat, which are maintained in N. I. Vavilov All-Russian Research Institute of Industry, were examined for snow mold resistance and freezing tolerance. None of them showed higher levels of snow mold resistance in artificially infested plots with *Typhula ishikariensis* at Sapporo. Some of them showed freezing tolerance as high as that of Valujevskaya, a high freezing tolerant wheat check cultivar.

By backcrossing wheat cultivar Chihokukomugi to a snow mold resistant accession of *Ae. cylindrica* 400452, a line possessing the wheat genome and a pair of chromosome of *Ae. cylindrica* was obtained. The

snow mold resistance of this line was higher than that of Chihokukomugi.

Mnogoletnyaya 209 derived from a cross between wheat and *Agropyron elongatum* was crossed with the wheat cultivar Hokushin. The F_3 population showed a higher level of freezing tolerance than Hokuhsin, so that Mnogoletnyaya 209 could be a potential source for improving freezing tolerance of wheat.

It was found that the soil moisture content affects the expression of snow mold resistance in wheat.

It was indicated that the DNA content of snow mold fungi in wheat plants inoculated with the pathogen was related to the resistance levels in wheat cultivars.

2. フルクタン合成酵素遺伝子群の機能解明と素材開発

(1) コムギのフルクタン合成酵素遺伝子群の構造と機能

ア. 研究目的

秋播コムギの越冬向上には、耐凍性と雪腐病抵抗性の双方の能力の向上が必要とされる。ハードニング中にコムギ組織に蓄積される多糖類のフルクタンは越冬のためのエネルギー源だけでなく耐凍性増加にも関わり、その蓄積量の差異が耐凍性、雪腐病抵抗性の品種間差異と相関することが示されている (Yoshida et al. 1998)。本課題は、フルクタンの合成酵素遺伝子群のゲノムDNAの構造解析からフルクタン蓄積機構を明らかにし、フルクタン合成酵素遺伝子を利用した耐凍性、雪腐病抵抗性向上のための基礎的知見を得ることを目的とする。

イ. 研究方法

1) 材料及び育成方法

秋播コムギ (*Triticum aestivum* L.), PI 173438 を人工気象下 18°C/17°C (昼/夜) で 10 日間～3 週間育成した葉組織を用いた。

2) コムギゲノムライブラリー作成および 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase) ゲノム遺伝子配列解読

10 日間育成した PI 173438 の葉から CTAB 法でゲノムDNAを抽出した。精製したゲノムDNAを制限酵素 *Sau3AI* で部分消化し、DNA断片を *Lambda* Fix II/*Xho* I Partial Fill-in Vector (Stratagene) に挿入し、ゲノムライブラリーを作成した。ライブラリーを 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase) のゲノムDNA (*wft2*, AB29888:Kawakami and Yoshida 2002) の

5' シグナルペプチドをプローブとしてスクリーニングして、ゲノムDNAクローンを単離した。コーディング領域は *wft2* の既知の塩基配列を利用してプライマーウォーキングで解読し、プロモーター領域は TAIL-PCR で単離、塩基配列を決定した。プロモーターの *cis* エlement 解析は PLACEweb サイトでおこなった。

(<http://www.DNA.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>)

3) プロモーター発現解析

単離されたプロモーター領域にレポーターとして sGFP (S65T) をつないだプラスミドを、パーティクルガンで各処理を施したコムギ第 3 切離葉に直接打ち込み、20 時間後に一定面積あたりの蛍光を発している細胞数を数えた。さらに *cis*-acting element 領域探索のため、プロモーターのデリベーションシリーズに sGFP (S65T) をつなぎ、同様の方法で発現解析を行った。sGFP (S65T) を持つベクターは静岡県立大学丹羽氏より分譲を受けた (Niwa et al. 1999)。

ウ. 結果及び考察

1) 1-SST のゲノム構造

1-SST のコーディング領域 (1989bp cDNA) にあたるゲノムの塩基配列を読みとった。全長は 3326bp で、3 つのイントロンを持っていた。第 2 エクソンは多くのインベルターゼ遺伝子に存在する植物でも大変短いエクソンとして特徴づけられている 9bp のミニエクソンと同等の配列であった (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998)。このミニエクソンはインベルターゼと同じく β -フルクトシダーゼモチーフと呼ばれる酵素活性に重要な塩基配列内に存在した (Fig. 17)。フルクタン合成酵素や分解酵素のアミノ酸配列はインベルターゼと高い相同性を持つが、本研究で単離された 1-SST はゲノム遺伝子でもインベ

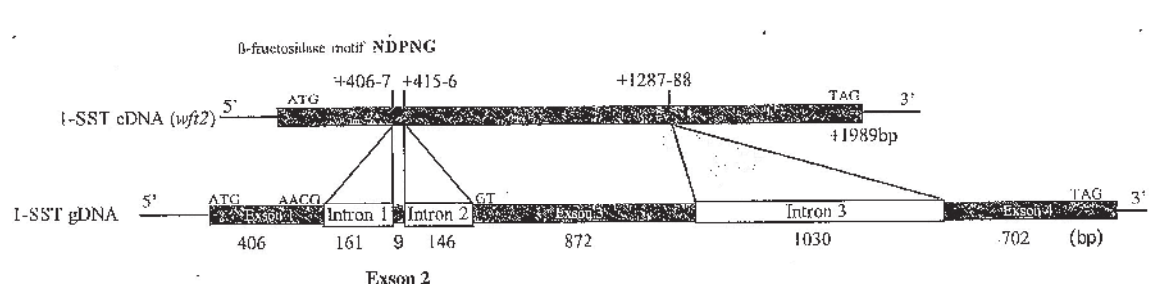


Fig 1-7. Structures of cDNA (*wft2*) and genomic DNA of wheat 1-SST. The coding regions and introns are represented as thick black lines and white boxes, respectively. NDPNG indicates the highly-conservative amino acid sequence of β -fructosidase motif.

ルターゼと同様のミニエクソンの存在を持つことが証明された。この9bpのミニエクソンは、ペレニアルライグラスの酵素特性が未同定の推定フルクトシルトランスフェラーゼ(Lidgett et al. 2002)とチョコレリーのフルクタン分解酵素ゲノム遺伝子でも存在が報告されている(Michiels et al. 2004)。一方でオオムギの6-SFTやトールフェスクの1-SSTのゲノム遺伝子にはミニエクソンは存在しない(Lücher et al. 2000)。イントロンの数はインベルターゼが5-7程度持つのに比較して、本遺伝子は3個であった。オオムギ(Lücher et al. 2000)、ペレニアルライグラス(Lidgett et al. 2002, Chalmers et al. 2003)でみられるようにフルクタン代謝遺伝子のイントロンの数は比較的少ない。一方で、チョコレリーのフルクタン分解酵素(1-FEH)は6つのイントロンを持っていることが報告されている。トールフェスクの1-SSTとwft2はcDNAレベルでは約79%の相同性があるにもかかわらず、コムギ1-SSTの第1、第3イントロンと、トールフェスクの1-SSTの第1、第2イントロンの相同性は57%および55%と低かった。

2) プロモーターの構造

TAIL-PCRにより、上記ゲノム1-SSTの5'上流域から1342bpのプロモーターを単離した。このプロモーター内にはデータベース解析により環境および病害感染応答に関連するエレメントが存在することが推察された(Fig. 1-8)。この5'上流域にGFPを連結させたベクターを用いてコムギ葉内で一過的に発現させたところ、GFP蛍光発現が検出されたことから、プロモーターとして働いていることが明らかになった。

3) プロモーター一過性発現解析

1-SSTプロモーター活性は、プラスミド導入処理前に葉を暗黒4日処理するとほとんどGFPの一過性発現が検出されなくなるが、その後光をあてると発現が回復した。また2日暗黒では完全に遺伝子発現



Fig 1'8. Analyses of putative cis-acting elements on 5'

flanking region of 1-SST gene. 1, PALbox; 2, ELRE(elicitor responsive element); 3, G box; 4, Myc; 5, Myc; 6, 1Box(light responsive)core; 7, TMAbox.

が抑えられなかったことから、光誘導よりも光合成による同化産物である糖による発現誘導を受けていることが示唆された。1-SSTのプロモーター活性の糖誘導を調べた結果、グルコース、フルクトース、スクロース処理によってGFP発現が増加した。また、グルコース(またはヘキソース)により応答することが示された。さらに、上記1-SSTプロモーターは、ABAと雪腐病菌細胞壁抽出物処理によってGFP発現が増加したので、デリーションおよびサイトミュレーションを行い応答領域を調べた結果、それぞれは既知の応答エレメントであるMYCとELREが機能して、GFP発現増加に関与していることが明らかになった(注:プロモーター解析については論文未発表データ)。

プロモーターが単離されたフルクタン関連遺伝子としては、オオムギの6-SFT(Nagaraj et al., 2001)とチョコレリーのFEH(Michiels et al. 2004)がある。両遺伝子ともスクロースで発現誘導されることが証明または示唆されているが、オオムギの6-SFTのプロモーターには既知のスクロース誘導cisエレメントが存在しないのに対してチョコレリーのFEHではスクロース誘導因子配列がプロモーター上に存在する。今回、当研究で単離されたプロモーターにも基質となるスクロースの誘導因子はなく、別の糖誘導cisエレメントの働きが示唆される。また、近年ABAとグルコースの遺伝子誘導に関するクロストークの報告もなされている。

エ. 今後の問題点

1-SSTはハードニング中、コムギの組織で発現が誘導され、持続的にその発現量が増加することが証明されている。今後、コムギの1-SST発現機構の解明のためにプロモーター上のcisエレメントの詳細な位置や機能及びその上流因子等の発現機構解析を行う必要がある。さらにこの解析は、低温下持続的発現プロモーター、選抜培地上などで利用する糖誘導プロモーター開発として、生物工学的利用にも有用な知見となる。

オ. 要約

ハードニング中にコムギ組織に蓄積される多糖類のフルクタンは秋播コムギの耐凍性と雪腐病抵抗性の向上に関与する。当研究室でcDNAを単離したフルクタンの合成キー酵素(1-SST)遺伝子の塩基配列

を用いて、コムギゲノムライブラリーから、1-SST ゲノムDNAクローンを単離し、塩基配列を決定した。1-SSTのゲノム遺伝子は3つのイントロンと4つのエクソンから構成されていた。第2エクソンはインベルターゼゲノム遺伝子で多く報告されている9bpのミニエクソンで、 β -フルクトシダーゼモチーフ内に存在した。また、この遺伝子の5'上流域をTAIL-PCRにより単離し、その断片はプロモーター活性を持っていることを明らかにした。このプロモーターをGFPにつないだ一過性発現実験で、本プロモーターは光、糖、ABA、エリシターに応答することが示された。

カ. 引用文献

- 1) Chalmers J., Johnson x., Lidgett A., Spangenberg G (2003): Isolation and characterization of a sucrose, sucrose 1-fructosyltransferase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Plant Physiol.* 160: 1385-1391.
- 2) Kawakami A., Yoshida M. (2002): Molecular Characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6 fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2297-2305.
- 3) Lidgett A., Jennings K., Johnson K., Guthrie K., Jones E., Spangenberg G (2002): Isolation and characterization of a fructosyltransferase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Plant Physiol.* 159, 1037-1043.
- 4) Lüscher M., Hochstrasser U., Vogel G., Aeschbacher R., Galati v., Nelson C.J., Boller T., Wiemken A. (2000): Cloning and functional analysis of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from Tall Fescue. *Plant Physiol.* 124, 1217-1227.
- 5) Michels A., Van Laere A., Van den Ende, W. Toker M. (2004): Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *J. Exp. Bot.* 55, 1325-1333.
- 6) Nagaraj V.J., Riedl, R., Boller, T., Wiemken, A. and Meyer A.D. (2001): Light and sugar regulation of barley sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme fructan synthesis in barley leaves. *J. Plant Physiol.* 158, 1601-1607.

- 7) Niwa, Y., Hirano T., Yoshihiko K., Shimizu M., Kobayashi H. (1999): Non invasive quantitative detection and applications of non-toxic, S65T type green fluorescent protein in living plants. *Plant J.* 11, 53-62.
- 8) Tymowska-Lalanne Z., Kreis M (1998): The plant invertase physiology, biochemistry and molecular biology. *Adv. Bot. Res.* 28, 71-117.
- 9) Yoshida M., Abe J., Moriyama M., Kuwabara T. (1998): Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiol. Plant.* 103, 8-16.

(吉田みどり)

Cloning and Characterization of Wheat Fructan Synthesis Genes

Midori Yoshida

National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

Summary

Fructan, a polysaccharide accumulated in wheat tissue during hardening, is related to the resistance of winter wheat to freezing and snow mold. Using the nucleotide sequence of a cDNA coding for a key enzyme (1-SST) involved in fructan synthesis, we isolated the 1-SST genomic gene from the wheat genome library and determined its sequence. The 1-SST genomic gene consisted of three introns and four exons. The second exon was a 9 bp mini-exon that had often been reported to exist in the invertase genomic gene and was present in the β -fructosidase motif. In addition, the 5' upstream of this gene was isolated by TAIL-PCR and found to possess promoter activity. This promoter was fused with GFP in a transient expression experiment, which showed that this promoter responded to light, sugars, ABA, and elicitors.

(2) フルクトタン合成酵素遺伝子導入による耐凍性、耐雪性形質転換コムギの作出

ア. 研究目的

近年コムギにおいても遺伝子導入による形質転換植物の作出が報告されるようになったが、コムギの形質転換は未だ困難をきたしており、確立された技術とはなっていない。しかしながら、コムギ耐凍性・耐雪性を大幅に向上させるためには、従来の育種法では限界があり、有用な遺伝子を用いた形質転換による育種素材の開発が急がれる。本課題では、高度耐凍性、雪腐病抵抗性と関連が深いことが証明されている蓄積多糖類であるフルクトタン (Yoshida, et al. 1998) の合成酵素遺伝子を導入したコムギ形質転換体作出技術開発を行う。

イ. 研究方法

- 1) 材料：赤だるま、農林12号、Daws (秋播3品種)、Turbo、Bobwhite (春播2品種) の未熟胚。
- 2) 導入遺伝子：コムギのフルクトタン合成酵素 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase 及び 6-SFT (sucrose:fructan 6-fructosyltransferase) の cDNA 遺伝子、wft2 及び wft1 (Kawakami and Yoshida, 2002)。
- 3) 形質転換用ベクター：コトランスフォーメーションには 1-SST/pE7133 (CaMV35S プロモーター系ベクター) と NPTII/pUC18 (Ubiquitin プロモーター系ベクター) を、また 1 ベクターで目的遺伝子と選抜マーカー遺伝子を導入する方法には 1-

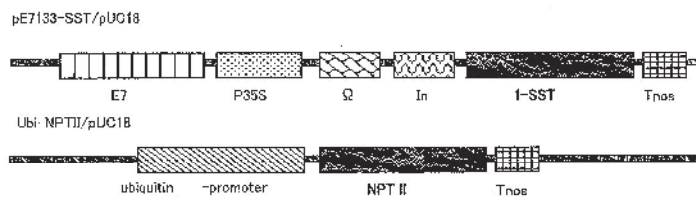
SST/pMLH7133、6-SFT/pMLH7133 (pBI ベクター) を試みた (Fig. 1-9)。pE7133 および pMLH7133 ベクターは生物資源研究所、大橋氏及び光原氏より分譲を受けた (Mitshara et al. 1996)。

4) 遺伝子導入、再生個体選抜方法：開花後約 10 日から 2 週間の未熟胚 (10mm-12mm) を胚盤を上面にし、選抜薬剤なしの LS 培地上に置床後、1-5 日後にパーティクルガンで遺伝子導入した。遺伝子導入は BIORAD パーティクルデリバリーシステム PDS-1000/He で行い、打ち込みは Takumi and Shimada (1997) の方法に従った。本研究では選抜マーカーに NPTII 遺伝子を利用し、G418 を含む LS 培地上選抜を行った。遺伝子導入 1 日後に選抜培地 (LS+G418) に胚を置床し、その際に、プライマリーシュートとなる胚の部分を切り取った。1 週間暗所 (G418、20mg/l)、その後明所 (G418、30mg/l、2 週間) でカルス誘導培養した。

グリーンスポットをホルモンを抜いた培地 (G418、30mg/l、2 週間) に置床してシュート再生及び選抜後、生き残ったシュートを MS 培地上で発根、パーミキュライト上で順化し、鉢上げした。

5) 導入遺伝子検出：検出個体のコムギ葉からゲノム DNA を DNeasy Kit (QIAGEN) で抽出精製を行い、CaMV35S プロモーターから遺伝子 ORF 内部までの 748bp を PCR で増幅し、導入ベクターから同産物に Alkphos Direct (Amersham Bioscience) で蛍光標識したプローブを用いて PCR サザンプロット法により導入遺伝子を検出した。

(1) co-transformation



(2) one plasmid transformation

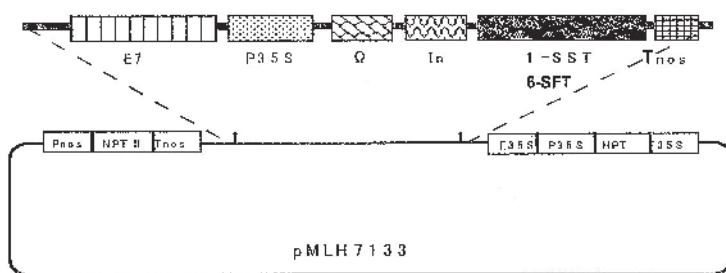


Fig 1-9. Constructs of transformation vectors for bombardment.

P35S, CaMV35S promoter core(-90 ~-1); E7, Partial and repeated sequence of 35S promoter 5' upstream; In, phaseolin first intron; Ω, 5' upstream sequence of TMV; Tnos, Terminator of nopalanthynthetase; 1-SST, sucrose sucrose 1-fructosyltransferase cDNA(wft2); 6-SFT, sucrose fructan 6-fructosyltransferase cDNA(wft1); NPTII, neomycin phosphotransferase gene.

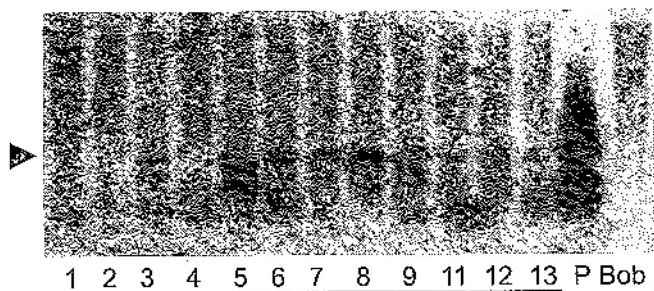


Fig 1-10. PCR Southern detection of 1-SST (*wft2*) in *To* derived from Bobwhite.

Arrow points 748bp PCR amplified fragments. Plants with underbars carried *wft2* in the genomic DNA. P and Bob indicate plasmid (positive control) and Bobwhite (WT), respectively.

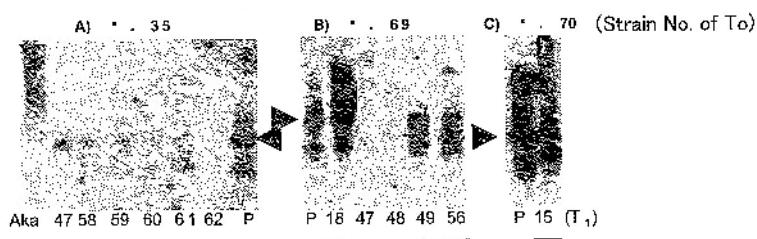


Fig 1-11. A)B)C). PCR Southern detection of 1-SST (*wft2*) in *T₁* derived from Akadaruma.

Arrows point 748bp PCR amplified fragments. Plants with underbars carried *wft2* in the genomic DNA. Aka and P indicate Akadaruma (WT) and plasmid (positive control), respectively.

Table1-8. Number of immature embryos, regenerated plants, seed-harvested plants and *wft2*(1-SST)-detected plants (*T₀*) on transformation by particle bombardment.

(1) Co-transformation using 1-SST/pE7133(pUC) and NPTII/pUC				
Cultivar	Immature embryos	Regenerated plants	Seed-harvested plants	Gene-detected plants
Akadaruma	2477	95	50	14
Norin12	2088	32	17	0
DAWS	252	0	0	0
Turbo	1339	5	3	0
Bobwhite	245	25	22	1

(2) Transformation using 1-SST/pMLH7133				
Cultivar	Immature embryos	Regenerated plants	Seed-harvested plants	Gene-detected plants
Akadaruma	3651	73	72	2
Norin12	3459	26	26	1
DAWS	3035	14	14	0
Turbo	5443	48	47	0
Bobwhite	9244	141	133	22

Table1-9. Number of immature embryos, regenerated plants, seed-harvested plants and *wft1*(6-SFT)-detected plants (*T₀*) on transformation by particle bombardment.

(1) Transformation using 6-SFT/pMLH7133				
Cultivar	Immature embryos	Regenerated plants	Seed-harvested plants	Gene-detected plants
Akadaruma	6280	114	105	-
Norin12	4728	12	12	-
DAWS	3044	10	-	-
Turbo	890	0	0	- continued
Bobwhite	4467	35	31	-

ウ. 結果及び考察

1) フルクトタン合成酵素 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase) 導入

(1) T_0 再生体の PCR サザンブロット解析により、赤だるま 16 個体、Bobwhite 23 個体、農林 12 号 1 個体から導入遺伝子を検出した (Table 1-8, Fig. 1-10)。遺伝子導入報告の多い Bobwhite と本遺伝子導入方法で形質転換体が得られている赤だるまの両者において 2 桁の数の遺伝子導入個体を得たが、これらの品種への遺伝子導入効率は 0.25% 程度であった。

(2) 形質転換候補個体について T_1 種子を播種育成し、遺伝子抽出を行っている。 T_1 はどの個体でも発芽率及び生長は原品種との差異は観察されていない。導入遺伝子を持つ T_1 個体の割合は今のところ低いが、赤だるまと Bobwhite で、それぞれ 33 個体と 8 個体の T_1 において導入遺伝子を検出され (継続中)、それらから T_2 の種子も得られている。(Fig. 1-11)。

2) 合成酵素 6-SFT (sucrose : fructan 6-fructosyltransferase) 導入

現在、再生個体 (T_0) の育成を終了し、遺伝子抽出を継続中であるが、検出個体は得られていない (Table 1-9)。

エ. 今後の問題点

本プロジェクトで得られた、 T_1 個体の遺伝子検出、育成および採種を引き続き行う。

形質転換体作成は今後も方法を改良して継続する。コムギでは導入遺伝子のサイレンシングが起こる確率が高いとされている。導入遺伝子発現個体を得るためには、プロモーターや導入遺伝子の植物の由来なども検討課題になると予想される。

オ. 要約

近年コムギにおいても遺伝子導入による形質転換植物が報告されるようになったが、コムギの形質転換はまだ困難をきたしており、確立された技術とはなっていない。本研究では従来の育種法では実現が難しいコムギの耐凍性、耐雪性の大幅な向上を目指して、これらの耐性と深く関連する蓄積多糖のフルクトタン合成酵素 1-SST と 6-SFT のコムギの遺伝子を導入し、コムギの形質転換体を得る技術を確立する

ことを試みた。遺伝子導入に 5 品種のコムギの未熟胚を用いたところ、形質転換の成功例多い Bobwhite と今回の用いた遺伝子導入方法で形質転換が成功している赤だるまとで 1-SST 導入遺伝子が検出された T_0 が得られた。 T_0 には奇形などの形態以上は観察されなかった。これらの T_0 から得られた種子はほぼ 100% 発芽し、その T_1 にも形態異常は観察されていない。実験継続中であるが、 T_1 から導入遺伝子検出個体を得られており、正常に T_2 が採種されている。

力. 引用文献

- 1) Kawakami A., Yoshida M. (2002): Molecular Characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2297-2305
- 2) Mitsuhashi L., Ugaki M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose Y., Nakamura S., Honkura R., Nishimiya S., Ueno, K., Mochizuki A., Tanimoto, H., Tsugawa H., Otsuki Y., Ohashi Y. (1996): Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37, 49-59
- 3) Takumi S., Shimada T. (1997): Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues. *Genes and Genetic Systems* vol. 72, 63-69
- 4) Yoshida M., Abe J., Moriyama M., Kuwabara T. (1998): Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiol. Plant.* 103, 8-16

(吉田みどり)

Production of Wheat Transgenic Plants with Introduced Wheat Fructan Synthesis Genes

Midori Yoshida

National Agricultural Research Center for
Hokkaido Region

Summary

Aiming to breed wheat cultivars excellent in resistance to freezing and snow mold, which had been difficult to achieve by conventional breeding methods, an attempt was made to establish techniques for producing wheat transformants with introduced 1-SST and 6-SFT genes coding for the synthesis of fructan, an accumulated polysaccharide related to the resistance. Immature embryos of five different cultivars were used for the gene introduction to successfully obtain regenerated plants with introduced 1-SST gene (T_0) from Bobwhite, which had often been used for transformation, and Akadaruma, which had been reported to be transformed by the gene introduction method used this time. No T_0 plants showed morphological changes such as malformation; seeds from the T_0 plants germinated nearly 100%; and T_1 plants from them were not observed to have morphological anomalies. Some of the individual T_1 plants were observed to possess the introduced genes and normally produced T_2 seeds.

3. 低温応答性 ELIP 遺伝子群の機能解明と素材開発

(1) コムギの ELIP 遺伝子群の構造と機能

ア. 研究目的

秋播コムギが十分な耐凍性、耐雪性を得るためには、秋からの低温環境に伴うハードニング期間中の光合成が重要な要因となる。通常、低温環境下における光ストレスは、容易に植物葉内に光過剰状態を生じさせる。この過剰な光エネルギーは葉緑体成分を酸化によって分解し、光障害を発生させるため、光合成効率の著しい低下を引き起こす。本研究は、光障害の防御とその修復機構に関与するとされる葉緑体タンパク質 ELIP (Early Light-inducible Protein) の発現・機能解析を行うことで、ハードニング中の光障害の発生とその修復・再合成機構におけるコムギ ELIP の役割を明らかとし、低温下での光合成機能の維持に関与する遺伝子の利用による耐凍性、耐雪性向上技術の開発を目指すものである。

イ. 研究方法

1) コムギ ELIP のハードニング環境における発現解析

(1) タンパク質レベルの解析に用いるため、コムギ低温応答性遺伝子 *wcr12* (コムギ ELIP をコード) の cDNA 配列情報をもとに抗原性が高いと推定される親水性領域を発現ベクター pGEX (GST Gene Fusion System) に組み込んだ。大腸菌を用いた発現系により組換えタンパク質として大量発現させ、ウサギ免疫抗体 (抗 WCR12 抗体) を作製した。

ハードニング過程での ELIP の蓄積様式を解析するため、コムギ品種 Valuevskaya (耐凍性強) に対し、ハードニング処理 (2°C/0.5°C、400 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、10 時間日長) を 14 日間行い、経時的に解析した。また、耐凍性の異なる品種間における ELIP 発現の違いを調べるために、上記品種に Ibis (耐凍性弱) 及びハルユタカ (春播) の 2 品種を加えた 3 品種に対して同様のハードニング処理を行い、ノーザンブロットニングによる転写解析及びウェスタンブロットニングによるタンパク質の解析に供した。また、ハードニング中に蓄積した ELIP タンパク質の安定性を調査するために、ハードニング処理後、低温 (0.5°C、暗黒) あるいは常温 (20°C、暗黒) 条件へ移行し、ELIP の挙動を調査した。

(2) 低温及び光に対するコムギ ELIP の応答特性

を解析するために、低温・弱光処理 (4°C、50 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) 及び強光処理 (1000 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) を行った。さらに、暗黒下における ELIP の発現誘導の有無を明らかにするために、低温単独による ELIP 発現誘導について、黄化実生及び実生に対して経時的な暗黒下低温処理 (4°C) 及び光処理 (250 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) を行い、葉部より粗タンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析を行った。

2) 形質転換イネを用いたコムギ ELIP の機能解析

コムギ ELIP をコードする cDNA *wcr12* をバイナリーベクター pMLH7133 にセンス (発現強化)、アンチセンス (発現抑制: イネ ELIP cDNA との比較から保存性の高い領域を使用) 方向に組み込み、イネに遺伝子導入を行った。得られた形質転換イネ後代系統 (T₁) 及び後代ホモ系統 (T₂) について、発芽後 10 日の幼苗に低温・強光処理 (8°C/2°C、1200 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) を行った。処理 4 日後、25°C/19°C へ戻し、7 日後に障害発生度及び電気伝導度を調査した。また、アンチセンス後代ホモ系統 (T₂) *wcr12-anti-11-1* を 5 週間生育させた展開葉に低温・強光ストレス処理 (10°C、1500 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) を行った後、クロロフィル蛍光値を測定し、光化学系 II における光障害の度合いを調査した。

ウ. 結果及び考察

1) コムギ ELIP のハードニング環境における発現解析

(1) 供試した 3 品種ともに ELIP の蓄積量はハードニングに伴い、徐々に増加する傾向を示した (Fig. 1-12)。コムギ ELIP は葉緑体移行のためのトランジットペプチドを持ち、細胞質では precursor-ELIP (17.7kDa) として存在し、プロセッシングの後 mature-ELIP (13.7kDa) としてチラコイド膜上に蓄積する (Fig. 1-13)。他の 2 品種に比べ valuevskaya では、ハードニング初期に mature-ELIP の蓄積レベルが高まる傾向を見せ、処理 7 日後には最大値に達した。また、14 日後には precursor の比率が mature に比較して高くなったが、他の 2 品種では mature 比が高く、ハルユタカでは mature-ELIP はまだ増大傾向を示していた。転写パターンに関しては、3 品種間には顕著な差は認められず、翻訳後調節を含む転写以降の調節機構の関与が示唆された。低温下の光ストレスは光障害によるダメージを光化学系 II に引き起

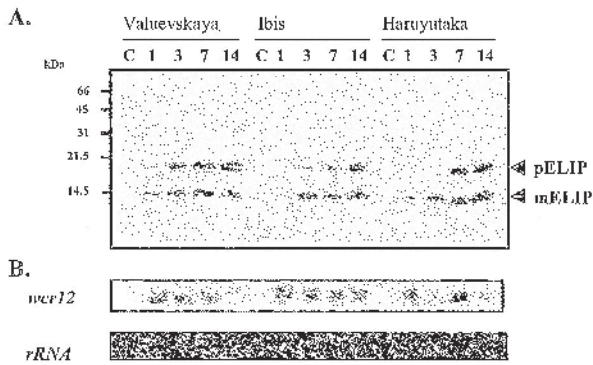
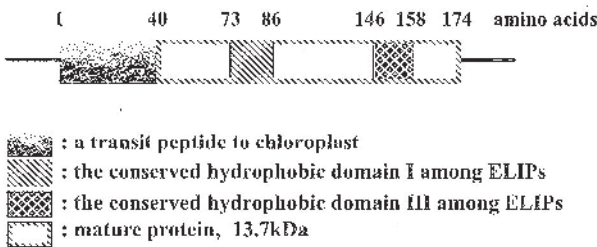


Fig. 1-12. ELIP and transcript accumulation during cold hardening.

A. Western blotting with the anti-wheat ELIP antiserum. B. Northern blotting with the *wcr12* cDNA encoding wheat ELIP. Samples were collected 4 h after light on.



こすことが知られているが、ライムギやコムギにお
Fig. 1-13. Deduced structure of WCR12.

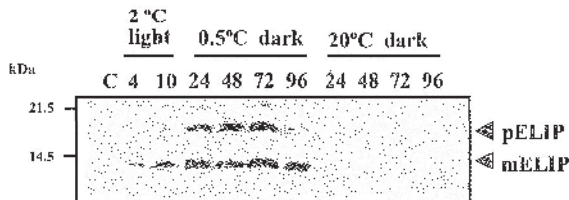


Fig. 1-14. Stabilization of ELIP protein at different temperatures.

Seedlings were treated with cold temperature at 2 °C with a light intensity of 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 10 h. After cold and light treatment seedlings were incubated at 0.5 °C or 20 °C for 96 h in darkness.

いては、ハードニング処理によって光障害耐性が増大することが報告されている¹⁾。ELIPは光障害の防御機能への関与が示唆されており^{2),3)}、ハードニングによる光障害耐性の付与とELIPの蓄積との関連性は興味深い。また、低温(0.5°C、暗黒)及び常温(20°C、暗黒)条件下におけるELIPの安定性を調査したところ、常温条件では、24時間後には全く検出されず、すでに分解が進行していると推定されたが、

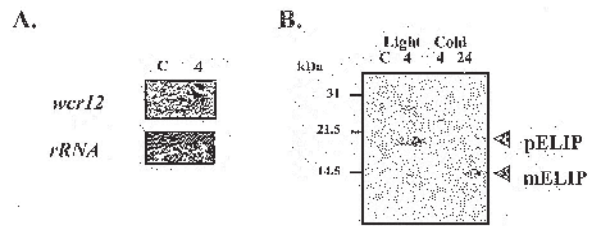


Fig. 1-15. Effect of cold temperature on ELIP accumulation under light or dark conditions.

A. Northern blotting with the *wcr12* cDNA encoding wheat ELIP. Seedlings were treated with cold temperature at 4 °C for 4 h in darkness. B. Western blotting with the anti-wheat ELIP antiserum. Seedlings were treated with high light stress at 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 4 h (Light) and cold temperature at 4 °C with a light intensity of 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 4 h or 24 h (Cold).

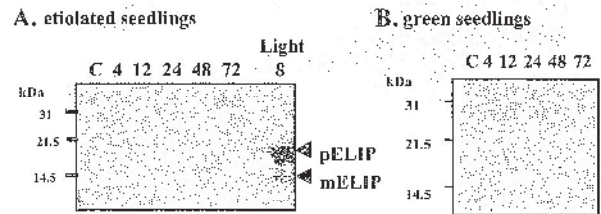


Fig. 1-16. Effect of cold temperature on ELIP accumulation under dark conditions.

Seedlings (A: etiolated, B: green) were treated with cold temperature at 4 °C for 72 h in darkness.

Etiolated seedlings were also treated with high light stress at 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for 8 h (Light 8) as a control.

低温条件下では安定性が高く、少なくとも72時間後までは増加傾向を示した(Fig. 1-14)。

(2) ELIPは一般に強光にตอบสนองし、夏作物であるエンドウELIPでは転写誘導のために光が必須要因とされるが⁴⁾、コムギELIPは、暗黒下においても低温環境にตอบสนองし転写が誘導される⁵⁾(Fig. 1-15)。そこで、タンパク質レベルでのELIPの誘導要因について解析を行った。強光及び低温・光処理によるELIPの蓄積パターンを比較すると、強光処理(1000 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)では、開始4時間後にはprecursor-ELIP比率が高い高発現が認められた。対して、低温・光処理では開始4h後では検出レベル以下であったが、24時間後にはmature-ELIPの比率が高い蓄積パターンが認められた(Fig. 1-15)。しかしながら、暗黒下低温処理区においては、処理72時間後も黄化実生、実生ともにELIPの蓄積は認められなかった(Fig. 1-16)。転写レベルでは、暗黒下低温処理後4hで転写

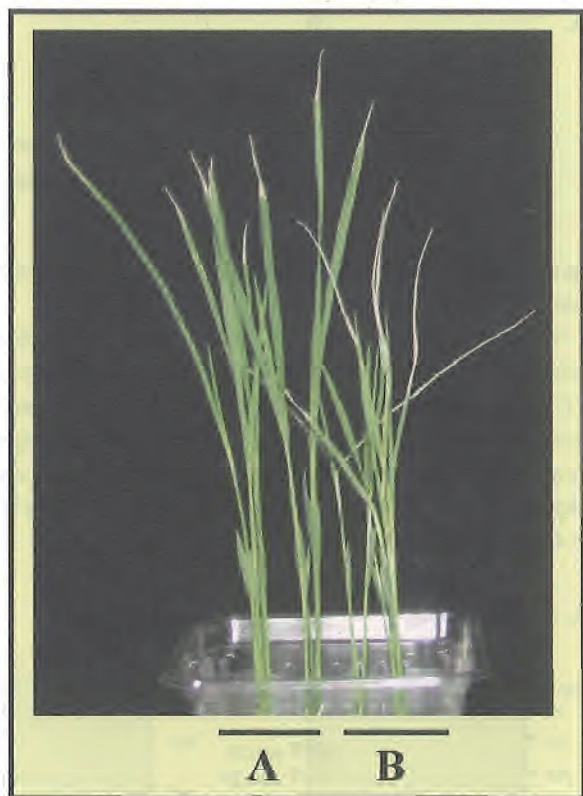


Fig.1-17. Cold and light-induced visible damage of transgenic rice plants.

A. wild-type B. plant from wcr12-anti-7 transgenic lines

Table 1-10. Comparison of the chilling injury between the wild-type and wcr12-Anti-7 transgenic lines.

	Degree of chilling injury ^a (%)	E.C. ^b (%)
wild-type	10.1 ± 2.6	42.8 ± 3.3
wcr12-anti-7	45.3 ± 6.5	63.8 ± 3.2

^a (wilted or damaged area of the 3rd leaves after cold and light treatments) / (total area of the 3rd leaves before treatments) × 100

^b Electric conductivity: (conductance of leaves after cold and light treatments) / (final conductance after killing) × 100

±SD

産物の蓄積が認められていることから (Fig. 1-15)、ELIP の発現には転写以降の調節機構が存在し、何らかの形で光が必須要因として関与していることが明らかになった。また、ハードニング処理後に暗黒条件へと移行した際には、ELIP の蓄積レベルが 72 時間後まで継続的に高まった点から (Fig. 1-14)、光要因が必要とされるのは ELIP 合成の誘導時あるいは初期に限定されると考えられた。

2) 形質転換イネを用いたコムギ ELIP の機能解析

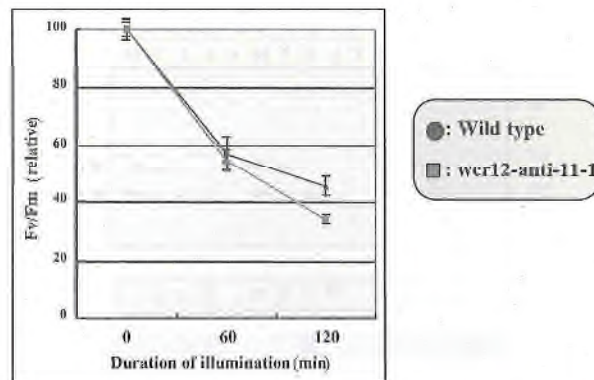


Fig.1-18. Time course of PSII photoinhibition (measured by the decrease in the Fv/Fm chlorophyll fluorescence ratio) during cold and light stress treatments.

Young expanded leaves were detached from 5-week old plants and were incubated at 10 °C under light at 1500 μ molm⁻²s⁻¹.

形質転換イネ個体について、センス 56 個体、アンチセンス 19 個体の組換え体より後代育成を行った。センスホモ (T₂) 13 系統について、低温・強光処理を行った結果、生存率及び障害発生度において野生型イネとの間に有為な差を示す系統は認められなかったが、アンチセンス導入後代 (T₁) wcr12-anti-7 においては、低温・強光処理 1 日後の障害発生度合い及び電気伝導度 (EC %) とともに高い値を示した (Fig. 1-17, Table 1-10)。また、wcr12-anti-7 後代ホモ系統の調査は行っていないが、他のアンチセンス導入後代ホモ系統 (T₂) wcr12-anti-11-1 について、クロロフィル蛍光の測定を行ったところ、光化学系 II における光障害のダメージが野生型よりも大きく、光障害耐性の低下が認められた (Fig. 1-18)。シロイヌナズナ変異体を用いた解析からも ELIP の欠損が光障害耐性の低下を引き起こすことが報告されており³⁾、アンチセンス導入により ELIP 発現が抑制された結果、光障害耐性に影響を与えたと考えられ、ELIP は低温下光障害に対する防御機構に重要な役割を持つと考えられた。

エ. 今後の問題点

今回コムギ ELIP 遺伝子をセンス導入したイネ形質転換体において、低温あるいは光障害耐性の顕著な向上は確認されなかった。その原因の一つは、本研究で明らかになった転写以降の調節機構の存在にあるとも考えられる。それらは、コムギとイネとの間で異なった機構を持つ可能性があることから、低

温下における光障害の防御機能の強化に関しては、コムギ形質転換体を用いた解析が必要とされる。

wheat cold-regulated cDNA encoding an early light-inducible protein (ELIP): its structure, expression and chromosomal location. *Plant and Cell Physiology*, 40 (3), 319-325

(下坂悦生)

オ. 要約

コムギ ELIP は、ハードニング環境下で持続的に蓄積し、耐凍性強品種 Valuevskaya では他の 2 品種と比較して、mature-ELIP が早期に蓄積した。ハードニング処理による光障害耐性の向上と ELIP の蓄積との関連性が示唆された。コムギ ELIP は、蓄積後常温下では分解が急速に進行したが、低温下では安定性が高く暗黒下でも蓄積レベルは高まった。しかしながら、暗黒下低温処理の結果から ELIP 合成初期に光環境を欠くとタンパク質の蓄積は認められず、光が必須要因として関与していることが明らかとなった。また、これらコムギ ELIP の発現調節は、転写レベルではなく翻訳後調節を含む転写以降の発現調節機構によると考えられた。

ELIPcDNA のアンチセンス導入イネにおいて、低温・強光処理後の障害発生度、電気伝導度値及び光化学系 II における光障害度が野生型よりも高く、光障害耐性の低下が認められたものがみられたことから、ELIP は低温下における光障害に対する防御機構に重要な役割を持つと考えられた。

カ. 引用文献

- 1) Öquist, G. Vaughan, M. H. and Huner, N. P. A. (1993): Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant Physiol.* 101, 245-250.
- 2) Montané, M-H. and Kloppstech, K. (2000): The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene*. 258, 1-8
- 3) Hutin, C. Nussaume, L. Moise, N. Moya, I. Kloppstech, K. and Havaux, M. (2003): Early light-induced proteins protect Arabidopsis from photooxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100, 4921-4926.
- 4) Adamska, I. and Kloppstech, K. (1994): Low temperature increases the abundance of early light-inducible transcript under light stress condition. *J. Biol. Chem.* 269, 30221- 30226.
- 5) Shimosaka, E. Sasanuma, T. and Handa, H. (1999): A

Expression and Functional Analysis of Wheat Early Light-Inducible Protein

Etsuo Shimosaka

National Agricultural Research Center for
Hokkaido Region

Summary

Wheat ELIP accumulation was sustained under hardening condition and mature-ELIP accumulated earlier in Valuevskaya, a variety highly tolerant to freezing, than in the other two varieties. It indicated ELIP accumulation was related to increased tolerance to photoinhibition of photosynthesis during hardening. Although the accumulated wheat ELIP rapidly degraded at ordinary temperatures, it was highly stable at low temperatures and it rose in accumulation level even in the dark. However, result of the low-temperature treatment in the dark clearly showed the protein did not accumulate in the absence of adequate environment of light at an early stage of ELIP synthesis and light was involved as an essential factor. In addition, comparison of mRNA and protein levels during hardening suggests that wheat ELIP expression is regulated at the translational level or at the post-translational level.

Damage frequency, electric conductivity value, and photoinhibition damages in photosystem II after treatment with low temperature and strong light were higher in some rice plants with introduced antisense of ELIP cDNA than in wild types. This indicates that ELIP play an important role in defense mechanism against photoinhibition at low temperatures.

(2) ELIP 遺伝子導入による耐凍性、耐雪性形質転換
コムギの作出

ア. 研究目的

本研究は、耐凍性、耐雪性の獲得のための重要な要因の一つであるハードニング期間中の光合成の維持機能を高めるために、ELIP (Early Light-inducible Protein) 遺伝子を導入したコムギ形質転換体を作成し、低温環境下における光障害防御機能の強化技術を開発することを目的とする。しかしながら、コムギにおける形質転換体の作出には、不安定な要素が多いうえに、現在利用されているパーティクルガンを用いた直接導入法は遺伝子が断片化された形で多重に導入されるため、コムギにおいてもジーンサイレンシングなどが生じやすいことが指摘されている。アグロバクテリウム法は、比較的高い効率で低コピーの遺伝子導入が行えるため広く使用されているが、コムギを対象とした報告は極めて少ない。そこで、安定的・効率的なコムギ形質転換技術の開発のため、アグロバクテリウム法の確立を図ることを目的とした。

イ. 研究方法

1) コムギ未熟胚培養系の効率化

コムギ品種ハルユタカ、Chinese Spring、Bobwhite を材料として、開花後9日～15日目の未熟胚を供試した。MS+2 mg/l 2,4-D+2% Sucrose pH5.8を基本培地とし、支持体濃度(ゲルライト2 g/l, 5 g/l, 7g/l)の異なる培地上へ採取した未熟胚を置床した。各培地で誘導された未熟胚由来カルス(誘導後2週間)を、ホルモン無添加の再分化培地へ移植し、4週間後の不定芽形成率及び植物体形成率を調査した。

2) 選抜条件の検討

コムギ未熟胚由来カルスに対して、アグロバクテ

リウム感染によるGUS遺伝子(pMLH7133:生物研より分譲)の導入を行い、G418(50 mg/l)添加培地を用いて選抜を行った。4週間後、G418(25 mg/l)添加再分化培地へ移植した。得られた再分化個体については、GUSアッセイを行った。さらに、選抜マーカーとして除草剤ピアラホスの利用を図るため、ユビキチンプロモーター下流にピアラホス耐性(bar)遺伝子(明治製菓より分譲)を連結し、pMLH7133-BARを作成、導入を行った。また、ピアラホス添加培地(1,3,5,7 mg/l)置床6週間後のカルスのgreen spot 形成率を調査し、選抜に効果的なピアラホスの濃度を検討した。

3) アグロバクテリウム感染条件及び高効率バイナリーベクター利用の検討

アグロバクテリウム感染条件について、アグロバクテリウム濃度、アセトシリゴン濃度、展着剤等の感染条件の検討を行った。アグロ感染及びT-DNA挿入効率の向上を図るために、pGreen/pSoup dual plasmid systemを用いた。pAL154(virB、C、G領域を含む)及びpAL156(GUS、bar 遺伝子を含む)(John Innes Centre, UKより分譲)を導入したアグロ株AGL1を未熟胚由来カルスに対して接種を行った。共存培養後、GUSアッセイを行い、pMLH7133-BARを用いた場合との比較を行った。

ウ. 結果及び考察

1) コムギ未熟胚培養系の効率化

5 g/l及び7g/lの高濃度ゲルライト下で誘導された

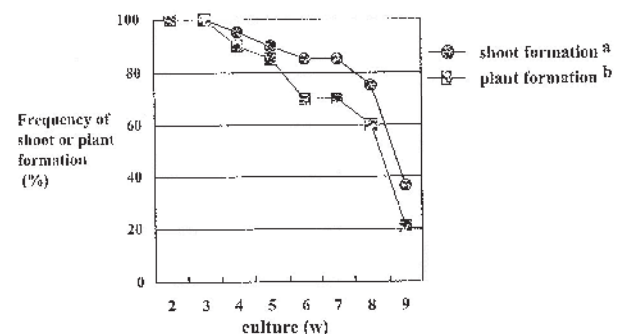


Fig. 1-19. Effect of length of culture on plant regeneration in wheat cv. Haruyutaka.

Calli were induced and cultured on MS media containing 5 g/l gelrite.

a. No. of calli with shoots / No. of calli induced × 100

b. No. of calli regenerated to plants / No. of calli induced × 100

Table 1-11. Effect of gelrite concentration on plant regeneration.

cv.	Concentration of gelrite (g/l)	No. of embryos tested	Frequency of		
			Calli with Green spots (%)	Shoots formation (%)	Plants formation (%)
Haruyutaka	2	35	97.1	82.9	71.4
	5	25	100.0	100.0	100.0
	7	35	100.0	97.1	97.1
Chinese Spring	2	29	100.0	93.1	69.0
	5	28	100.0	96.4	92.9
	7	26	100.0	100.0	91.3
Bob white	2	30	95.0	73.3	60.0
	5	27	96.3	85.2	77.8
	7	27	96.3	88.9	88.9

カルスは、2g/l 濃度下のカルスが水浸状を示すのに対し、比較的乾燥状態にあった。これらは高い再分化率を示し、その再分化能は、5週間は維持された (Table 1-11, Fig. 1-19)。また、再分化に有効な未熟胚は開花後 11~12 日前後の直径 0.8~1.3mm であった。

2) 選抜条件の検討

アグロバクテリウム感染を行ったハルユタカ 2971、Chinese Spring 1109 及び Bob White 1066 カルスに対する G418 選抜の結果、ハルユタカ 77 個体、Chinese Spring 4 個体及び Bob White 21 個体の G418 耐性と考えられる再分化個体を得た。各個体の葉片に対して GUS アッセイを行ったが、GUS 発現個体は認められず、エスケープ個体と判断された。また、NPTII (G418 耐性遺伝子) の導入を行っていないコントロールカルスからも G418 選抜培地上でほぼ同率の個体が出現しており、G418 の選抜効果は低いと判断された。コムギ形質転換体の作出においては、除草剤ピアラホスの選抜効果が比較的高いことが報告されている¹⁾。Bob White 及び Chinese Spring カルスでは、ピアラホスの再分化阻害効果は高く、green spot 形成率は 1mg/l の濃度でも著しく抑制され、再分化過程での選抜に効果的と判断された (Table 1-12) そこで、Bob White (7466)、Chinese Spring (5645)

Table 1-12. Effect of bialaphos concentration on green spots formation from calli.

cv.	Calli with Green spots (%)				
	Concentration of bialaphos (mg/l)				
	0	1	3	5	7
Haruyutaka	100.0	66.7	50.0	0.0	14.3
Chinese Spring	60.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bob White	88.9	11.1	0.0	11.1	0.0

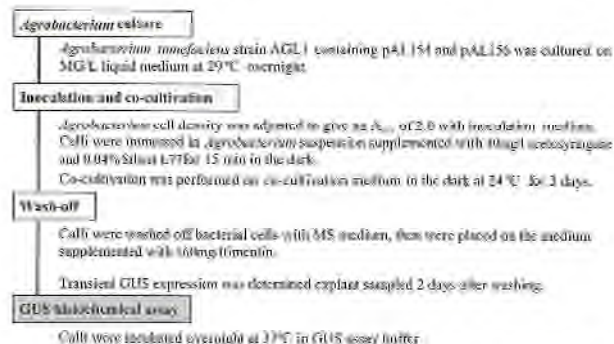


Fig. 1-20. Assay for GUS activity following co-cultivation of wheat calli with *Agrobacterium* containing pAL154 and pAL156.

の未熟胚由来のカルスに対してアグロバクテリウム感染を行ったが、ピアラホス耐性再分化個体は得られなかった。

3) アグロバクテリウム感染条件及び高効率バイナリーベクター利用の検討

当初の感染手法では、胚、カルスの褐変・枯死率が非常に高く、良好な T-DNA 挿入が生じていないと判断されたことから、T-DNA 挿入効率が高いとされる高効率ベクターシステムである pGreen/pSoup dual plasmid system: pAL154、pAL156 の利用を試みた。pAL154 (pSoup) には、T-DNA の切り出しと転移に関与するアグロバクテリウムの vir 領域が連結さ

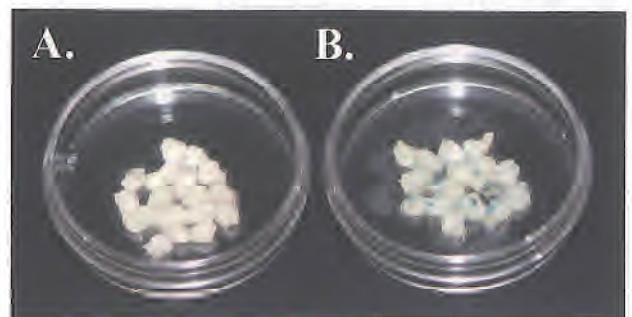


Fig. 1-21. Effect of different vector systems in the same *Agrobacterium* strain (AGL1), bacterium cell density and other conditions on GUS expression.

A. Binary vector : pMLH7133-BAR

B. pGreen/pSoup dual plasmid system: pAL154/ pAL156

Table 1-13. Effect of pGreen/pSoup dual plasmid system on GUS expression.

Vectors	No. of calli inoculated	Calli with GUS spots (%)	GUS spots /explant
pMLH7133-BAR	20	0 (0)	0
pAL154/pAL156	33	32 (97.0)	21.2



Fig. 1-22. *Agrobacterium*-mediated transient expression of GUS in wheat calli from immature embryos.

A. Transient GUS expression in wheat calli 4 days after inoculation. B. Close-up of callus surface showing individual foci of transient GUS expression. C. Transient GUS expression in callus 18 days after inoculation.

れており、その多重性によってT-DNA挿入効率を高めることが可能となる²⁾³⁾⁴⁾。このベクターシステムを用い、未熟胚由来カルスに対してアグロバクテリウム感染を行ったところ、同一感染条件下においてpMLH7133-BARと比較して、良好な感染と高効率のGUS発現が確認された(Fig. 1-20、Fig. 1-21、Fig. 1-22、Table 1-13)。GUS発現カルス割合は、14日～21日間培養カルスではほぼ100%であった。(Table 1-14)。また、共存培養後10～18日の時点でGUS発現カルス割合は、33～65%であり、GUS発現部分の増殖が見られるカルスも一部認められた(Fig. 1-22、Table 1-15)。そこで、Bob White (431)、Chinese Spring (599)の未熟胚由来のカルスに対して、このベクターシステムを用いてアグロバクテリウム感染を行い、共存培養後3～4週間ピアラホスを添加した選抜培地(1～4 mg/l)に置床した後、再分化培地へ移行したが、それらのカルスから再分化個体を得ることはできなかった。その原因としては、アグロバクテリウム感染の対象である未熟胚由来カルスの分裂活性の低さやアグロバクテリウム除菌用抗生物質とピアラホスの添加によって、培養中のカルスの再分化能が低下することが挙げられるが、高頻度の一過的遺伝子発現と遺伝子導入カルスは確認されていることから、今後さらに条件検討を進めることにより、形質転換体の作出及び安定的な形質転換系の確立が期待される。

エ. 今後の問題点

アグロバクテリウム感染を行う材料である未熟胚及び未熟胚由来カルスの状態が重要な要因の一つと

Table 1-14. Effect of length of culture on GUS expression.

Length of culture(d)	No. of calli inoculated	Calli with GUS spots(%)	GUS spots /explant
5	19	6 (31.6)	5.3
14	30	29 (96.7)	19.1
21	66	64 (97.0)	19.8
35	41	23 (56.1)	10.5

Table 1-15. Proportion of calli with GUS stain on media containing 4 mg/l bialaphos.

cv.	No. of calli inoculated	Calli with GUS spots 2 days after co-cultivation(%)	Calli with GUS spots 10-18 days after co-cultivation(%)
Chinese Spring	88	-	33.3(18)
Bob White	67	-	53.3(10)
Bob White	79	-	37.5(10)
Bob White	78	94.5	35.7(14)
Bob White	61	85.0	65.9(11)

考えられる。また、アグロバクテリウム感染後のピアラホス選抜及び長期培養により低下する再分化能の向上に関して、より効果的な手法の検討が必要とされる。

オ. 要約

コムギ形質転換系確立のため、未熟胚培養系の効率化を検討した結果、5 g/l～7g/lの高濃度ゲルライト下で誘導されたカルスは、高い再分化率を示し、その再分化能は5週間は維持された。また、選抜薬剤として、除草剤ピアラホスの再分化阻害効果は高く、Chinese Springではgreen spot形成率が1mg/lの濃度でも著しく抑制され、再分化過程での選抜に効果的と判断された。さらに、良好なアグロバクテリウム感染及び遺伝子導入のために、T-DNA挿入効率が高いとされる高効率ベクターシステムであるpGreen/pSoup dual plasmid system: pAL154、pAL156の利用を試みた。このベクターシステムは、未熟胚由来カルスに対し、pMLH7133-BARと比較して、高効率のGUS発現が確認され、共存培養後10～18日の時点でGUS発現部分の増殖が見られるカルスも認められた。これらの手法はアグロバクテリウムによるコムギ形質転換体作出の端緒となり、今後さらに検討を進めることにより、安定的な形質転換系の確立が期待される。

カ. 引用文献

- 1) Weeks, J.T. Anderson, O.D. and Blechl, A.E. (1993): Rapid Production of Multiple Independent Lines of Fertile Transgenic Wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol.* 102, 1077-1084.
- 2) Hellens, R.P. Edwards, E.A. Leyland, N.R. Bean, S. and Mullineaux, P.M. (2000): pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol.* 42, 819-832.
- 3) Amoah, B.K. Wu, H. Sparks, C. and Jones, H.D. (2001): Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *J Exp Bot.* 52, 1135-1142.
- 4) Wu, H. Sparks, C. Amoah, B. and Jones, H.D. (2003): Factors influencing successful *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat. *Plant Cell Rep.* 21, 659-668.

(下坂悦生)

Toward Establishment of Wheat
Transformation System Mediated by
Agrobacterium tumefaciens

Etsuo Shimosaka

National Agricultural Research Center for
Hokkaido Region

S u m m a r y

To establish a wheat transformation system, efficient methods to culture immature embryo was investigated. The result showed that calli induced with gelrite at the concentrations of 5-7 g/L regenerated at high frequencies and the ability was maintained for five weeks. Bialaphos, a herbicide, was effective for selection at regeneration stage. Green spots were markedly suppressed in Chinese Spring even at the concentration of 1 mg/L. Furthermore, in order to facilitate *Agrobacterium* infection and gene introduction, a highly efficient vector system (pGreen/pSoup dual system: pA1154 and pA1156) considered highly efficient for T-DNA delivery was used. As a result, transient GUS expression in the calli derived from the immature embryo was confirmed to be more highly efficient than pMLH7133-BAR. And then, some calli were observed to grow in the area of GUS expression 10-18 days after co-cultivation. The result obtained by this method is expected to lead to the establishment of stable *Agrobacterium* mediated transformation system of wheat through further studies in the future.

第2章 牧草類の低温ストレス耐性向上技術の開発

1. 分子マーカーを利用した牧草類の耐凍性、耐雪性関連形質の解析

(1) 分子マーカーを利用したアルファルファの耐凍性関連形質の解析

ア. 研究目的

北方圏において重要な畜産を支えるアルファルファ等の牧草においては、生産性および適応性を制限する最も重要な要因は越冬性である。広義の越冬性のなかで最も重要な構成要素が耐凍性である。耐凍性は多くの生理的形態的要因が複雑に関与しており、その遺伝的解析はあまり進んでいない。また、栽培されているアルファルファは4倍体であり、その解析をさらに複雑にしている。

この課題では、ハンガリーで開発された2倍体アルファルファのマッピング集団とその遺伝地図情報をもとにして、分子マーカーを利用した耐凍性のQTL解析を行い、耐凍性アルファルファの効率的育種法を開発する。また、耐凍性発現過程で誘発される遺伝子群を地図上にマッピングし、QTL情報との相違を評価する。

イ. 研究方法

1) 耐凍性のQTL解析およびそれを利用した選抜法の開発

供試材料には黄花の *Medicago sativa* ssp. *quasifalcata* ($2n=2x=16$, Mqk93) × 紫花の *M. sativa* ssp. *coerulea* ($2n=2x=16$, Mcw2) の1個体の F_1 の自殖による F_2 マッピング集団 (Kalo et al. 2000) 137 個体のうち 92 個体を導入し、茎差し法により増殖し QTL の解析集団とした。

耐凍性の検定: 2000 から 2002 年の 3 年間、親個体、 F_1 、 F_2 集団を圃場で養成し、十分なハードニングをかけた後の 11 月下旬から 12 月上旬に掘取った。凍結処理はプログラムフリーザーを用いて行い、根は 2000 年には -8°C 、2001 と 2002 年には -13°C で、葉は 2000 年は -7 、 -9 、 -11 、 -13°C 、2001 年と 2002 年は -13°C の温度設定とした。細胞からの電解質の漏出を電気伝導度計により測定し、耐凍性を評価した。耐凍性の指標は、(各凍結処理温度でのイオン漏出/ -80°C で処理後のイオン漏出) × 100 とした。休眠性の指標であり越冬性と深い関連がある早秋の草丈も測定した。

データ処理には JoinMAP および mapQTL を用い、地図の構築および QTL 解析を行った。

2) ハードニング誘導性遺伝子のスクリーニング

4倍体アルファルファ品種 Rambler よりハードニング過程で新たに誘導され、発現量に変化する mRNA (cDNA) 断片を Differential Display-AFLP 法 (Ivashuta et al. 1999) によりスクリーニングした。その cDNA 断片の塩基配列を決定し、それをもとにプライマーを設計した。また、マメ科植物のデータベース情報をもとに、プライマーを設計した。ゲノム DNA を抽出し、多型を検出できる遺伝子をスクリーニングし、地図上に位置づけた。

ウ. 結果および考察

1) 耐凍性のQTL解析およびそれを利用した選抜法の開発

2000 年には耐凍性の検定において、葉の処理温度を 4 水準設けたが、 -7°C では親および F_2 の耐凍性の分布幅が小さく処理温度として不十分であった (Fig. 2-1)。葉の -9 、 -11 、 -13°C では処理が厳しくなるにつれて親および F_2 の耐凍性の分布幅が大きくなり、QTL 解析のための処理としては -11°C と -13°C が適当と考えられた。根の -8°C も同様にして不十分と考えられた。

根の耐凍性は LG2 の 5cM に Lod 値 3.31、寄与率 16.8% の QTL がみられた (Table 2-1)。これは 3 年間同じ位置に検出された。葉の耐凍性は 3 年間で 2 回同じ位置に見られることはあったが、LOD 値が小さかった (Table 2-1)。

8 月下旬から 9 月上旬にかけての草丈は 3 年同じ位置に検出された QTL が 2 か所認められた (Table 2-1)。

2) ハードニング誘導性遺伝子のスクリーニング

合計で 60 の遺伝子候補を単離し、ここから得た 34 プライマーペアで PCR を行ったところ、マッピング集団で多型が得られたのは 7 ペアであった。3 つの耐凍性関連遺伝子候補が連鎖群上に位置づけられ、PhgKinase は LG2 の 75cM であり、草丈の QTL の近傍であった (Fig. 2-2)。FtsH は LG3 の 9cM のところに位置した。S1 は LG4 上で N0D22B の上 3cM に位置した。また、上記の 3 つの遺伝子候補を含む 16 の遺伝子候補については、全塩基配列を決定した。

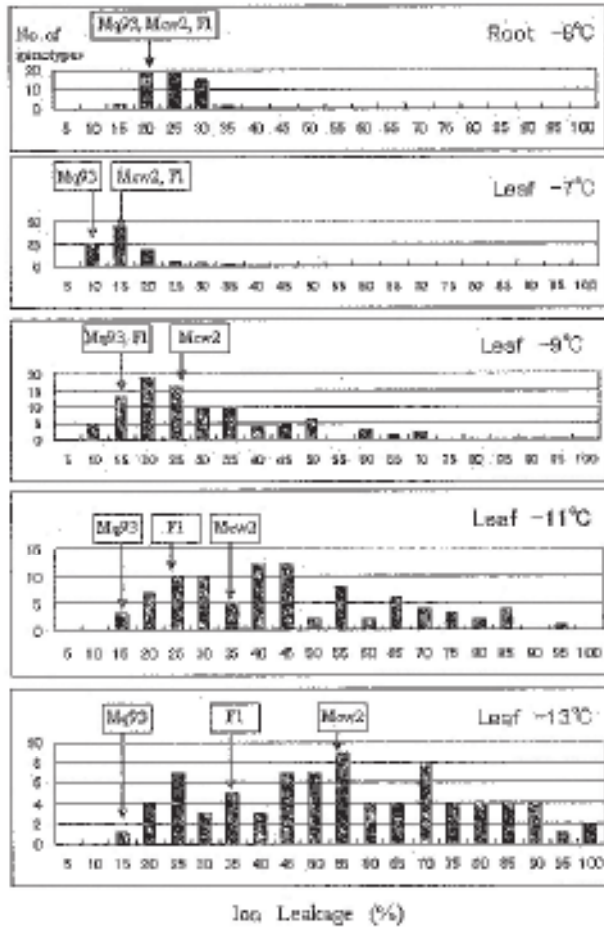


Fig. 2-1. Segregation of ion leakage, a freezing tolerance character, in F_2 population.

Table 2-1. QTL analysis of freezing tolerance and plant height in autumn in alfalfa F_2 plants.

Trait	df	LG1		LG2		LG4		LG5	
		cM	LOD	cM	LOD	cM	LOD	cM	LOD
Freezing tolerance(Root)	2002	60	3.19	5	3.31				
Freezing tolerance(Leaf)	2001					47	2.16		
Plant height 2002.8.21				71	3.25				
Plant height 2002.11.6						62	2.92		
Plant height 2001.8.5		53	2.32	71	2.75	50	2.82		
Plant height 2000.8.1				70	3.4	53	3.72	4	2.78

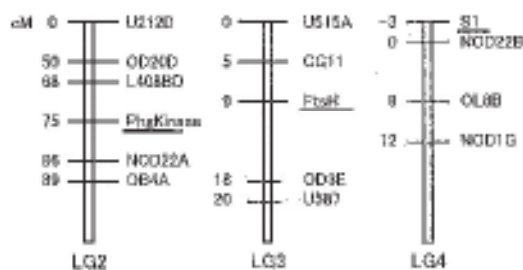


Fig. 2-2. Map position of three candidate genes of freezing tolerance in diploid alfalfa.

エ. 今後の問題点

形質個々のQTL検出耐凍性関連遺伝子の地図上への位置づけはできたが、まだ情報が少なく、選抜に利用するマーカーの開発にはいたらなかった。マーカー開発のためにはQTL情報をさらに蓄積することが重要であるが、材料の耐病性や F_2 の個体数を考慮する必要がある。

オ. 要約

- 1) 根の耐凍性はLG2の5cMにLod値3.31、寄与率16.8%のQTLがみられた。これは3年間同じ位置に検出された。葉の耐凍性は3年間で2回同じ位置に見られることはあったが、Lod値が小さかった。8月下旬から9月上旬にかけての草丈は3年間同じ位置に検出されたQTLが2カ所認められた。
- 2) 合計で60の遺伝子候補を単離し、ここから得た34プライマーペアでPCRを行ったところ、マッピング集団で多型が得られたのは7ペアであった。3つの耐凍性関連遺伝子候補が連鎖群上に位置づけられ、PhgKinaseはLG2の75cMであり、草丈のQTLの近傍であった。FtsHはLG3の9cMのところに位置した。S₁はLG4上でNOD22Bの上3cMに位置した。
- 3) 形質個々のQTL検出耐凍性関連遺伝子の地図上への位置づけはできたが、まだ情報が少なく、選抜に利用するマーカーの開発にはいたらなかった。マーカー開発のためにはQTL情報をさらに蓄積する必要がある。

カ. 引用文献

- 1) Kalo, P. et al. (2000): Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100, 641-657.
- 2) Ivashuta et al. (1999): The coupling of differential display and AFLP approaches for nonradioactive mRNA Fingerprinting. *Molecular Biotechnology* 12, 137-141.

(廣井清貞・内山和宏・磯部祥子・我有満)

Analysis of Traits Relating to Freezing
Tolerance and Snow Blight Resistance Using
Molecular Markers in Alfalfa

Kiyosada Hiroi¹⁾, Kazuhiro uchiyama^{1,2)}, Sachiko
Isobe ¹⁾and Mitsuru Gau ^{1,3)}

¹⁾National Agricultural Research Center for
Hokkaido Region

²⁾National Institute of Animal and Grassland Science

³⁾National Agricultural Research Center for Kyushu
Okinawa region

Summary

A QTL for freezing tolerance of root was detected on LG(Linkage Group)2 in diploid alfalfa. It had LOD value of 3.3 and accounted for 16.8% of the total phenotypic variation. It was detected in the same region for three years. A QTL for freezing tolerance of leaf was detected, but the LOD value was small. Two QTLs for plant height from late in August to early in September were detected in the same regions for three years.

A total of 60 candidate genes related to freezing tolerance were isolated from tetraploid alfalfa. When PCR was performed using 34 primer pairs obtained from them, seven pairs yielded polymorphism in the mapping population and three candidate genes (PhgKinase, FtsH, and S1) were mapped on the linkage group. PhgKinase was mapped at 75 cM away from the marker U212D on LG2 and close to a QTL for plant height. FtsH was located at 9 cM away from the marker U515A on LG3 and S1 at 3 cM above the marker NOD22B on LG4. Although the candidate genes related to freezing tolerance were located on the linkage map, available information was still limited and did not lead to the development of markers to be used for selection.

(2) 分子マーカーを利用したアカクローバの耐凍性、耐雪性関連形質の解析

ア. 研究目的

アカクローバ (*Trifolium pratense* L.) は初期生育性、耐湿性、耐酸性土壌性などに優れ、冷涼地帯を中心に世界で広く栽培されているマメ科牧草であるが、永続性に欠けるといふ欠点があり、その克服が最も重要な育種目標になっている。アカクローバの永続性が欠如する要因の3～8割が耐病性であり

(Novosiolova, 2002)、中でも最も重要な病害は子う菌 *Sclerotinia trifoliorum* Eriksson によってひきおこされる菌核病であるとされている (Baldin et al 2001)。菌核病は秋に感染したのち積雪下において序々に進行し、翌春の融雪後気温の上昇とともに一気に茎葉や根が灰白色に腐敗する (成田 1959)。菌核病抵抗性は病原菌に対する真性抵抗性のみならず、積雪下の越冬性も含めた様々な要因が関与していると考えられ、抵抗性遺伝子座は QTL (量的形質座) であると推定される。

近年のめざましい DNA マーカー技術の開発は、連鎖地図の作成と地図作成集団の形質評価によって QTL に支配されている遺伝子座の検出を可能にした。さらに検出された QTL 近傍の DNA マーカーにより選抜 (MAS) を行うことで、表現型の選抜だけ

では困難な抵抗性遺伝子座の集積を図ることが可能である。本課題は菌核病抵抗性を中心とした越冬性に関する選抜 DNA マーカーの開発を目的として 1) アカクローバの連鎖地図の作成と菌核病抵抗性を中心とした越冬性の QTL 解析 2) 菌核病抵抗性選抜 DNA マーカーの開発と実証を行った。

イ. 研究方法

試験 1. RFLP 連鎖地図による菌核病および越冬性に関する QTL の検出

全ロシアウィリアムス飼料研究所 (以下ウィリアムス研) で作成した解析集団、「272×WF1680」(WF1680 による BCFI 集団) 167 個体を用いて RFLP 連鎖地図を作成し、それをもとに菌核病抵抗性と越冬性に関する QTL 解析を行った。種子親「272」は早生で、花粉親「W F 1680」は晩生で耐冬性強である (ウィリアムス研における事前評価)。RFLP 連鎖地図はアカクローバ cDNA をプローブとして JoinMAPVer2.0 により北農研が中心となって開発した。またアルファルファ耐凍性に関する STS マーカーも作出し、地図上に位置づけた。

菌核病の室内および圃場での菌核病抵抗性検定はウィリアムス研で行った。室内検定は解析集団 68 個体について *Sclerotinia trifoliorum* Eriksson の培養液を葉の表面にスポットし、14 - 16 度のグロスチャ

Table 2-2. Summary of experiments and statistical results for *Sclerotinia* resistance and winter hardiness.

	Year	Location	Trait name	No. of tested genotypes	Mean (%)	STD	Range (Min-Max)	K ^{2a}	Function ^b
<i>Sclerotinia</i> resistance									
Laboratory experiment ^d	2001	ARWFCI ^c	SRL01	56	72	22.7	(0-100)	5.52*	square
Laboratory experiment ^d	2003	ARWFCI	SRL03	36	38.7	18	(11.1-70.4)	2.26	
Field experiment ^c	2002	Moscow region	SFRFR	59	25.5	28.9	(14.8-100)	8.45**	square root
Winter hardiness									
Green part ratio of crown	2001	Sapporo	GPRJ	139	7.3	7.6	(0-59.2)	126.5***	Log
Plant height in early spring	2002	Sapporo	PHIJ	152	6.3	1.7	(2-10.3)	0.37	

*p<0.1, **p<0.05, ***p<0.01 Significant different to normal distribution.

^a D'Agostino-Pearson K2 test.

^b Function for transformation of variable to fit normal distribution.

^c All-Russian Williams Fodder Crop Institute.

^d Attack percent on leaves.

ンバー内に一週間おき葉の罹病程度を算出することにより行った。圃場検定は解析集団 72 個体各 6 反復を 2001 年 9 月に菌核病検定圃場へ移植し、2002 年 4 月に各個体の罹病程度を算出して行った。北農研では 2001 年と 2002 年にそれぞれ前年度秋に圃場へ移植した解析集団の写真撮影を融雪直後に行い、画像解析により緑色部割合を算出して株の損傷程度を評価した。また、融雪直後の株の大きさおよび融雪直後と 2 週間後の草丈調査を行った。なお、2001 年は各個体 1 反復、2002 年度は 3 反復で調査を行った。すべての形質評価項目は Table 2-2 にまとめた。

RFLP 連鎖地図と形質データをもとに菌核病抵抗性および越冬性に関する QTL 解析を MapQTLver3.0 を用いて行った。

試験 2. 菌核病抵抗性選抜 DNA マーカーの開発と実証

「ホクセキ」[Rannij2] の北農研における播種 4 年目の残存株各 25 株を用いた品種間交雑の第 2 世代を選抜基礎集団とし、越冬 1 年目の春に越冬性スコアにより菌核病抵抗性強と弱個体各 12 個体を選抜し DNA を抽出した。また越冬 3 年目の夏に圃場に生存している全ての個体から DNA を抽出した(圃場形質、生存率などの詳細は「耐凍性、耐雪性マメ科牧草育種素材の開発」の章を参照)。試験 1 で検出した QTL 近傍の RFLP マーカーを用いて越冬性強・弱各 12 個体の DNA による多型解析を行った。また、新たな集団「HR×R130」を用いて SSR 地図を新たに開発し、QTL が座乗した RFLP 近傍の SSR マーカーによる多型解析もを行い、菌核病抵抗性に関する選抜 DNA マーカーのスクリーニングを行った。スク

リーニングされた DNA マーカーを用いて越冬 4 年目の春に基礎集団から育種素材として選抜された個体と越冬 1 年目に越冬性弱として選抜された個体の DNA による多型解析を行った。

ウ. 結果及び考察

試験 1. RFLP 連鎖地図による菌核病および越冬性に関する QTL の検出

243 の RFLP マーカーと 6 の STS マーカーによる 7 つの連鎖群(染色体と同数)の連鎖地図を作製した。全長は 528.7cM、マーカー間の平均距離は 2.1cM(最小 0cM、最大 12.4cM)である(Fig.2-3)。

ウィリアムス研で行った菌核病抵抗性検定による罹病程度は、室内検定が集団の平均で 73% (最大 100%、最小 14%、272 : 63%、WF1680 : 70%)、圃場検定が集団の平均で 24% (最大 100%、最小 0%、272 : 33.3%、WF1680 : 33.3%) だった。北農研では融雪直後の株の緑色部割合は集団の平均で 7.2% (最大 59%、最小 0%、272 : 11.7%、WF1680 : 20.2%) であり(2001 年調査結果)、ウィリアムス研、北農研の両地点で調査集団の菌核病抵抗性・越冬性に関する形質は分離していた。一方、耐雪性、耐凍性に関するすべての調査項目間(菌核病抵抗性、株の緑色部割合および草丈)に有意な相関は認められなかった。

RFLP 連鎖地図を用いた QTL 解析において有意な QTL (インターバルマッピングで LOD 値 2.7 以上または Kruskal-Wallis 解析で $P=0.05$) は圃場検定による菌核病抵抗性に関して 8 つ、室内検定による菌核病抵抗性に関して 10、融雪直後の緑色部割合に関

Table 2-3. Result of similarity search between cDNA probes and candidate genes that related stress tolerance.

Probe	Accession No. ^a	Candidate gene	Score	E-value	Traits ^b
C675	U21105	X.laevis mRNA for cortical granule lectin	1804	0.0	SRL01
C16	M97476	Pisum sativum L. aldolase gene	1423	0.0	SRL03
C618	X82626	Pisum sativum alphacpn60 precursor mRNA	137	0.0	PHIJ SRFR
C1965	AF403292	AKIP1:RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase	577	e-161	SRL03 GPRJ
C1961	X52953	PAL1: phenylalanine ammonia-lyase 1	1265	0.0	GPRJ
C2139	AJ311087	sts1 : Pisum sativum mRNA for stachyose synthase	389	e-104	GPRJ
C1551	Z37540	P.sativum mRNA encoding arginine decarboxylase	1104	0.0	
C559	Z37540		2520	0.0	
C1942	Z37540		2575	0.0	

^a Genbank accession number.

^b The traits of significant QTL.

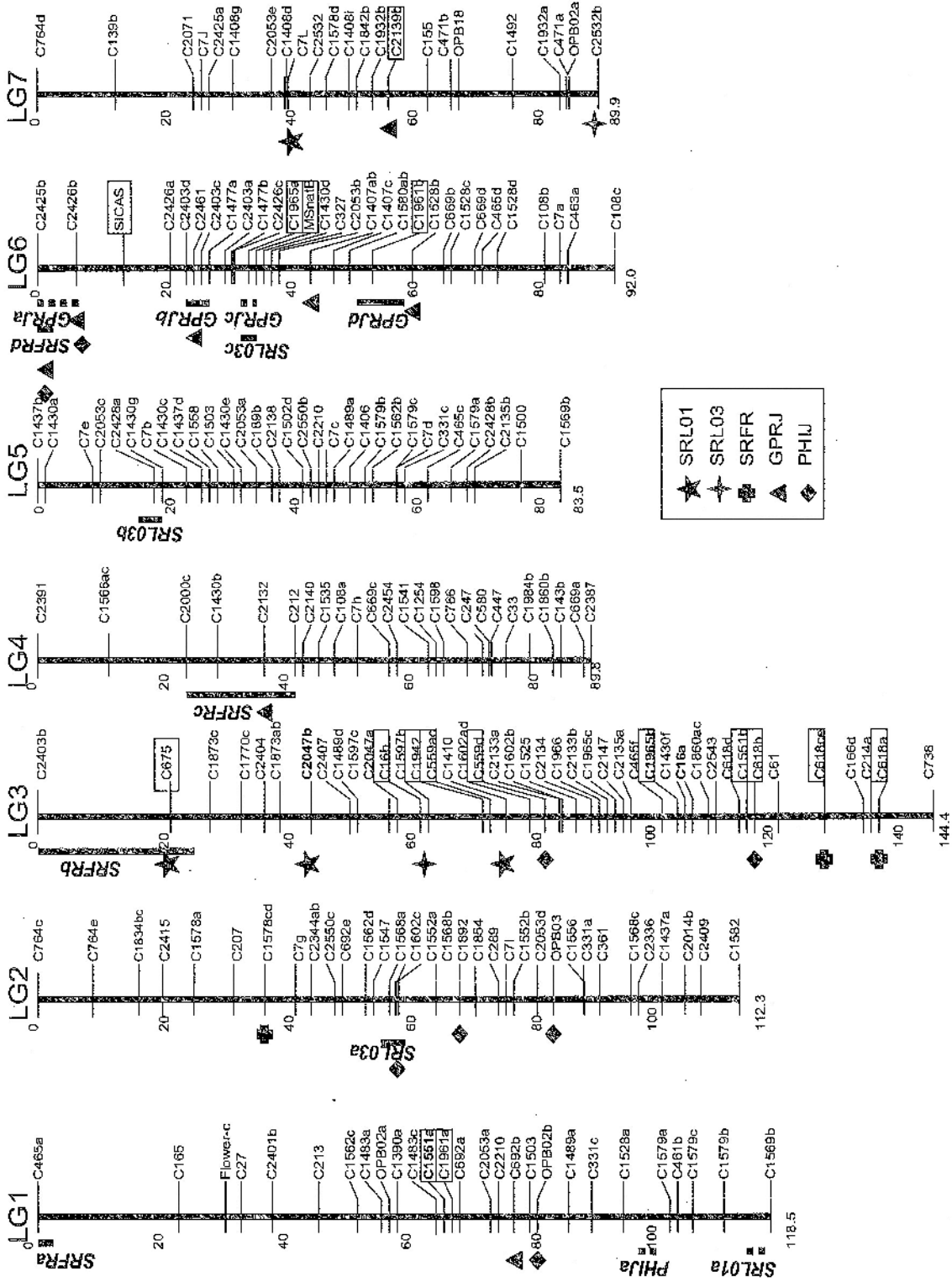


Fig. 2-3. Genetic linkage map of the 272 X WF1680 BC1F1 population and localization of putative QTLs for *S. tritiformis* resistance in laboratory test 2001 (SRL01), laboratory test 2003 (SRL03), field test (SRFR) and relating to winter hardiness estimated by green part ratio of crown (GPRJ) and plant height (PHU). Significant interval QTLs ($3.1 \leq \text{LOD}$) are indicated by vertical solid bars. Suggested interval QTLs ($2.7 \leq \text{LOD} < 3.1$) are indicated by vertical dotted bars. Significant QTLs ($P \leq 0.05$) detected by Kruskal-Wallis analysis are identified by symbols (shown in the figure).

して8つ、草丈に関して8つ検出された (Fig. 2-3)。LG6において株の緑色度と草丈のQTLが検出された位置の近傍にアルファルファ耐凍性関連遺伝子候補由来のSTS マーカーMSnatBがマップされた。

RFLP マーカーによって地図上に位置づけられた cDNA プローブをシーケンスしたところ9つのマーカーが既知の耐ストレス耐性、耐病性に関する遺伝子と高い相同性があった。そのうち6つのマーカーは菌核病抵抗性・越冬性に関する QTL が近傍に検出された (Table 2-3)。

試験 2. 菌核病抵抗性選抜 DNA マーカーの開発と実証

試験 1 で検出した QTL 近傍の RFLP マーカー、既知のストレス耐性、耐病性遺伝子と高い相同性のある RFLP マーカーおよびアルファルファ耐凍性に関する STS マーカーを用いて越冬 1 年目の春に選抜した越冬性強・弱の 12 個体による多型解析を行ったが、両者を区別する明確な多型を得ることができなかった。そこで解析マーカーを増やすために 144 RFLP マーカーと 1153 SSR マーカーによる SSR 連鎖地図を再構築した。QTL が検出された RFLP 近傍の SSR マーカーを用いて越冬性強・弱個体による多型解析を行い、3つの SSR マーカー RCS0397、RCS3587 および RCS5826 を選抜した。これらのマーカーは育種素材として選抜された 6 つの個体と越冬性弱個体との間でも多型が認められた (Fig. 2-4)、これらの 3 つのマーカーは SSR 連鎖地図においては *Pisum sativum* における arginine decarboxylase をコードする遺伝子と高い相同性にある RFLP マーカー C1942w

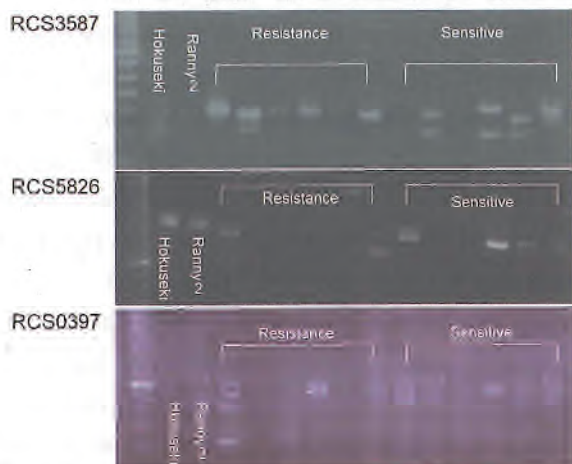


Fig. 2-4. SSR marker polymorphisms between resistant and sensitive red clover plants to *S. trifoliorum*.

(C1942 はマルチ遺伝子座を検出し、C1942w はそのうちのひとつ遺伝子座である) を 1 cM 内に挟みこんでいた (Fig. 2-5) また、挟みこまれた C1942w から 3cM 離れた場所に菌核病抵抗性 (室内検定) に関する QTL が検出された RFLP マーカー C16 が位置づけられていた。以上から 3 つの SSR マーカー、RCS0397、RCS3587 および RCS5826 は菌核病抵抗性選抜 DNA マーカーとしての可能性が示唆された。

エ. 今後の問題点

選抜 DNA マーカーとして有用性が示された 3 つの SSR マーカーはいずれも室内菌核病抵抗性検定の結果から検出された QTL 近傍に位置づけられている。これらのマーカーの QTL に対する寄与率を明らかにするためには、SSR 連鎖地図作成集団を用いて QTL 解析を行う必要があり、現在形質評価を行っている。

オ. 要約

アカクローバの菌核病抵抗性に関する選抜 DNA マーカー開発のため、RFLP 地図を作成した。この地図と解析集団を用いて菌核病抵抗性と越冬性に関する QTL を行ったところ有意な QTL が 11 個検出された。また、9 つの RFLP マーカーは既知の耐病性・ストレス耐性に関する遺伝子と高い相同性があり、

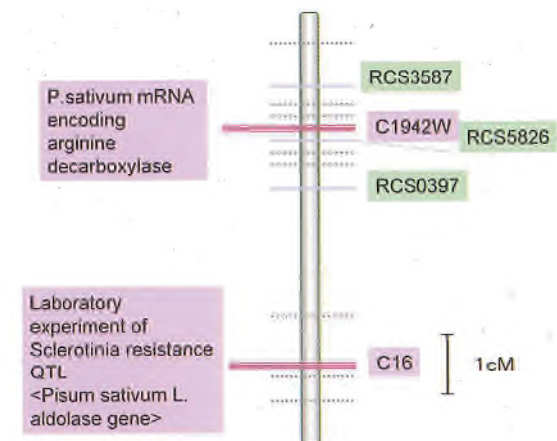


Fig. 2-5. The mapping position of SSR markers those showed polymorphisms between resistant and sensitive red clover plants to *S. Trifoliorum* on a SSR linkage map. The markers with alphabet "RCS" are SSR markers. The markers with alphabet "C" were RFLP markers those are detected a QTL and had homology to candidate genes related stress tolerance.

そのうち6つは菌核病抵抗性・越冬性に関するQTLに
関与していた。さらにアルファルファ耐凍性に関
する1つのSTSマーカーが検出されたQTL近傍に位
置づけられていた。これらのマーカーと菌核病抵抗
性に関する基礎集団から選抜した越冬性強・弱の個
体のDNAを用いて多型解析を行ったところ、両者
を区分する多型を有するマーカーは選抜できなかつ
た。そこでRFLP連鎖地図より詳細なSSR連鎖地図
を用いてQTLが検出されたRFLPマーカー近傍の
SSRマーカーによる多型解析を行ったところ、3つ
のSSRマーカーが検出された。この3つのSSRマ
ーカーは菌核病抵抗性選抜DNAマーカーとして有用
であると考えられる。

力. 引用文献

- 1) Novosiolova, A (2002): Increasing of red clover
resistance to disease and pests. Clover in Russia —
Voronej 126.
- 2) Bardin, S and H Hauang (2001): Research on biology
and control of Sclerotinia disease in Canada. Plant
Pathol. 23, 88-98.
- 3) 成田武四 (1959): 荳科及び禾本科牧草の病害短報
(II) 北海道立農業試験場集報 4, 54-70
(磯部祥子・我有満・廣井清貞)

Analysis of Traits Relating Winter Hardiness And Sclerotinia Trifoliorum Eriksson Resistance Using Molecular Markers in Red Clover

Sachiko Isobe¹⁾, Mitsuru Gau^{1,2)} and Kiyosada Hiroi¹⁾

¹⁾National Agricultural Research Center for
Hokkaido Region

²⁾National Agricultural Research Center for
Kyushu and Okinawa Region

Summary

A red clover linkage map with RFLP markers was
constructed in order to develop DNA markers related to
resistance to Sclerotinia trifoliorum Eriksson. QTL
analysis for winter hardiness and Sclerotinia trifoliorum
resistance was performed with the RFLP linkage map,
and then 11 significant QTLs were detected. On the
other, sequence of nine RFLP markers showed similarity
to registered genes related to disease resistance and
stress tolerance. Six of the nine RFLP markers were
involved in the detected QTLs. A STS marker related to
alfalfa freezing tolerance was mapped on the position
close to the detected QTL.

The all RFLP and STS markers related to disease
resistance and stress tolerance was performed
polymorphism analysis with the DNAs of red clover
individuals which shown sensibility and resistance to
Sclerotinia trifoliorum in the field. No markers were
detected significant polymorphisms which distinguished
the sensitive and resistant individuals. Then, a SSR
linkage map that mapped more dense markers than the
RFLP linkage map was constructed. The SSR markers
that closely located to the RFLP markers which related
to disease resistance and stress tolerance was performed
polymorphism analysis, then three SSR markers
detected significant polymorphisms which distinguished
the sensitive and resistant individuals to Sclerotinia
trifoliorum. These three SSR markers were considered
as efficient DNA markers for the selection of resistant
individuals to Sclerotinia trifoliorum

2. エンドファイトと耐凍性、耐雪性との関係解明

(1) イネ科牧草遺伝資源の耐凍性、耐雪性の評価と利用

ア. 研究目的

北海道地域における牧草栽培において生産性を維持するためには、越冬性が安定していることがもっとも重要である。特に、根釧地域など北海道東部では、しばしば冬枯れにより牧草の収量が減少することが報告されている。チモシーに次ぐ主力草種であるオーチャードグラスは、越冬性がチモシーより劣ることから、道東地域での安定栽培に向けて、越冬性の改良が最大の育種目標とされてきた。一方、メドウフェスクは、従来はチモシーなどとの混播草種として採草利用されてきたが、最近の研究で集約放牧においてはペレニアルライグラスと同程度の生産性があることが明らかとなった(須藤ら、2001)。そのため、ペレニアルライグラスが利用できない道東地域での放牧専用草種として、メドウフェスクの利用が拡大しつつある。メドウフェスクは、越冬性がチモシーよりやや劣るので、道東地域での安定栽培に向けて越冬性をさらに改良する必要がある。北海道と同様に北方圏に属するロシアは、広大な国土を有し気象条件も多岐にわたり、冬季の気象条件が北海道より厳しい地域が多い。ロシアのN. I. バビロフ植物生産研究所(バビロフ研)は、約32万点の遺伝資源を保有する世界有数のジーンバンクであり、北方圏由来の遺伝資源を多数保存している。北農研とバビロフ研は、国際共同研究によりイネ科牧草の遺伝資源を交換し、越冬性などについて特性評価を行った。この研究の中で、オーチャードグラスのロシア由来の遺伝資源は、北農研育成品種に比べて耐凍性と耐雪性(雪腐病抵抗性)に優れることが明らかとなり(Nakayama and Abe 1996)、これを利

Table 2-4. New strains developed from Russian germplasm in orchardgrass.

	Year of rearing	Maturity	Number of parental clones	Origin of parental clone (Number of clones)
Hokkai 28	1996	Early	8	Russia (5), Japan (3)
Hokuiku 64	1996	Early	9	Russia (4), Japan (4), Denmark (1)
Hokuiku 66	1996	Medium	12	Japan (6), Russia (4), Finland (1), France (1)
Hokuiku 68	1996	Medium	9	Japan (8), Russia (1)
Hokuiku 78	2000	Early	11	Russia (10), Japan (1)
Hokuiku 79	2000	Early	7	Russia (6), Japan (1)
Hokuiku 80	2000	Medium	7	Russia (5), Japan (2)
Hokuiku 81	2000	Medium	6	Russia (3), Japan (2), Canada (1)
Hokuiku 82	2000	Medium	6	Japan (3), Russia (2), Canada (1)
Hokuiku 83	2000	Late	6	Russia (2), France (2), Japan (1), Sweden (1)

用して「北海28号」(旧系統名「北育63号」)が育成された。「北海28号」を北農研とバビロフ研で特性評価したところ、「北海28号」は日ロ両地域で優れた越冬性を示した(Yamada et al., 2005)。このように、オーチャードグラスではロシア遺伝資源の活用により、越冬性に優れた系統が育成できる可能性が明らかとなった。そこで、本研究では、オーチャードグラスについてロシア遺伝資源を活用して、新たな系統を作出し「北海28号」とともにこれらの耐凍性と耐雪性を明らかにして、ロシア遺伝資源の有効性を確認することを目的とした。また、メドウフェスクについては、ロシアから新たに遺伝資源を導入し、これらについて耐凍性と耐雪性を評価して、育種素材としての可能性を検討することを目的とした。

イ. 研究方法

1. オーチャードグラス「北海28号」および新規育成系統の耐凍性と耐雪性の評価

1) 日ロ交雑系統の育成

ロシア品種とロシアエコタイプおよび北海道エコタイプと北農研品種の合計48品種・系統960個体から、2000年5月に越冬性に優れた個体を選抜し、6群に分けて隔離圃場と育成温室で多交配した。栄養系ごとに採種し種子を等量混合して、「北育78~83号」を付した(Table 2-4)。これらの系統の耐凍性と耐雪性(雪腐病抵抗性)を評価した。また、Table 2-4の「北海28号」から「北育68号」は、1996年にロシア遺伝資源を用いて育成されたものであり、耐

Table 2-5. Resistance to *Typhula* snow blight (*Typhula ishikariensis* Imai var. *ishikariensis*) under natural infection in Russian and Japanese cultivars of orchardgrass.

Cultivar/Strain	Origin ¹⁾	Typhula snow blight		Index of damage by <i>Typhula</i> snow blight ³⁾ (%)	Control	
		Survival rate (%)	Regrowth vigor ²⁾		Survival rate (%)	Regrowth vigor ²⁾
Hokkai 28	NARCH	94	4.0	17.6	96	4.9
Hokuiku 64	NARCH	92	3.1	14.4	96	3.6
Hokuiku 66	NARCH	94	2.8	22.0	98	3.6
Hokuiku 68	NARCH	94	2.4	22.6	92	3.1
Wasumidori	NARCH	96	2.4	24.7	94	3.2
Okamidori	NARCH	92	2.3	19.9	98	2.8
Toyomidori	NARCH	98	2.6	5.9	92	2.7
Khutorskaya	Russia	90	2.6	30.5	96	3.7
Kievskaya	Russia	86	2.2	27.2	86	3.0
Dzhugulinskaya	Russia	92	2.4	20.8	90	3.1
Leningradskaya	Russia	88	2.3	28.8	98	3.3
L.S.D.(0.05)		n.s.	1.0	n.s.	n.s.	0.9

1) NARCH: National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

2) 1: very poor-9: very good.

3) 100-(regrowth vigor by natural infection of snow mold / regrowth vigor by chemical control of snow mold × 100)

凍性と耐雪性を評価した。

2) 雪腐病の自然発生による耐雪性の評価

「北海 28 号」と 1996 年育成の日ロ交雑系統 3 点、北農研品種 3 点、ロシア品種 4 点の合計 11 品種・系統を供試した (Table 2-5)。2000 年 8 月 22 日にペーパーポットに播種して育苗後、同年 10 月 10 日に 0.2×0.2m、25 個体 2 反復で圃場に定植し、雪腐病防除区と雪腐病発生区を設けた (Takai et al. 2004)。雪腐病防除区 (対照区) では 1、イミノクタジン酢酸塩とトルクロホスメチルを処理して雪腐黒色小粒菌核病 (*Typhula ishikariensis* Imai va. *ishikariensis*) と紅色雪腐病 (*Monographella nivalis* (Schaffnit) Müller) を防除し、雪腐病発生区ではイミノクタジン酢酸塩のみを処理して紅色雪腐病を防除して、雪腐黒色小粒菌核病を多発させた。殺菌剤は、根雪前の同年 11 月 27 日に散布した。融雪直後の 2001 年 4 月 16 日に再生を調査した。雪腐病発生区と対照区との再生の比率を雪腐病被害指数として算出した。

3) 幼苗による越冬性の評価

「北海 28 号」と 2000 年育成の日ロ交雑系統 6 点、北農研品種 2 点、ロシア品種 2 点、温暖地育成品種 3 点の合計 13 点を供試した (表 3)。2000 年 8 月 22 日にペーパーポットに播種して育苗後、同年 10 月 10 日に 1 区 0.8×0.8m、12 個体 2 反復で圃場に定植した。融雪直後の 2001 年 4 月 16 日に再生を調査した。

4) 耐凍性の評価

Table 2-7 の 17 品種・系統を供試した。2000 年 8 月 31 日にペーパーポットに播種し温室内で育苗後、同年 9 月 22 日屋外に搬出し、同年 12 月 5 日に耐凍性検定を実施した。冠部 3cm を採取し、各温度水準につき 20 個体の 2 反復とした。-2℃6 時間植氷後、プログラムフリーザーで 1 時間当たり 1℃降下させて温度 5 段階で凍結処理した。4℃で 1 晩解氷後、バーミキュライトに移植し、3 週後に生死を判定しプロビット法により半数個体致死温度 (LT₅₀) を算出した。

2. メドウフェスクロシア遺伝資源の耐凍性と耐雪性の評価

1) メドウフェスク遺伝資源の耐凍性の評価

バビロフ研から導入したロシア遺伝資源 82 点を供試し、標準品種として「ハルサカエ」を用いた。播種後発芽試験器 (20/30℃、12 時間日長) で 1 週間、クリオトロンの常温室 (15/20℃、15 時間日長) で

Table 2-6. Winter hardiness in Russian and Japanese cultivars of orchardgrass.

Cultivar/Genus	Origin ¹	Survival rate ² (%)	Regrowth vigor ³
Belkai 75	MARCH	95 ^a	3.8
Belkai 76	MARCH	75 ^a	4.8
Belkai 79	MARCH	95 ^a	3.7
Belkai 81	MARCH	95 ^a	5.8
Belkai 81	MARCH	95 ^a	4.7
Belkai 82	MARCH	95 ^a	2.8
Belkai 83	MARCH	95 ^a	2.8
Wesenski	MARCH	95 ^a	5.5
Toyomidori	MARCH	95 ^a	7.2
Dzhugitinskaya	Russia	95 ^a	5.8
Mordvinskaya	Russia	95 ^a	2.7
Krasnaya	Russia	95 ^a	2.7
Kirskaya	Russia	95 ^a	2.8
Patens	U.S.A.	95 ^a	3.1
Ukmiter	MICH	95 ^a	2.5
Luh	France	95 ^a	6.5

¹ MARCH: National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

² MICH: National Institute of Livestock and Fisheries Sciences

³ Same value with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

⁴ 1 tray per 3 trays plot.

Table 2-7. Freezing tolerance in Russian and Japanese cultivars.

Cultivar/Genus	LT ₅₀ (°C)
Belkai 75	-32.6
Belkai 81	-32.6
Belkai 85	-31.5
Belkai 86	-18.9
Belkai 81	-24.2
Belkai 79	-28.6
Belkai 80	-28.1
Belkai 81	-24.9
Belkai 82	-28.5
Belkai 83	-28.5
Wesenski	-28.8
Chamiskoi	-28.8
Toyomidori	-21.0
Krasnaya	-21.8
Kirskaya	-23.0
Dzhugitinskaya	-22.7
Lesninskaya	-22.7
L.S.D. (0.05)	0.3

2 週間、同ハードニング室 (2℃、10 時間日長) で 2 週間生育させた。幼苗を 3cm の高さで切りプログラムフリーザーに移し、-3℃ 8 時間保持した後 5 段階の温度で凍結処理し、温室内で 4 週間生育させた後に生存個体を調査して、LT₅₀ を算出した。

2) メドウフェスクロシア遺伝資源の耐雪性の評価

前述のロシア遺伝資源を供試して、耐凍性検定と同じ条件で生育・ハードニングさせた。幼苗を雪腐黒色小粒菌核病菌 (Ty-12) を 1 バット 100 ml で接種し、湿らせた脱脂綿をかけて黒色ビニール袋で包み、3℃の恒温室に置き、8、10、12 週間後に取り出し、12℃、24 時間照明で再生させ、生存率を調査した。

Table 2-8. Freezing tolerance and Resistance to *Typhula ishikariensis* Imai in meadow fescue populations introduced from former USSR.

Accession No.	Passport No. in N.I.		Origin Country	Province	Freezing tolerance LT ₅₀ (°C)	Resistance to <i>Typhula ishikariensis</i>	
	Vavilov Institute of Plant Industry	Cultivars				Survival rate of plants(%)	
64	46690	Narymskaja-1	Russia	Tomsk reg.	-12.9		93.0
55	45380	Wild	Russia	Kuibyshev reg.	-12.9		78.0
56	46767	Wild	Russia	Karchija	-12.9		75.7
24	42824	Wild	Russia	Kirov reg.	-12.9		61.5
49	34242	Sort-823	Russia	Moskow reg.	-12.6		71.8
57	44434	Wild	Russia	East-Kazakhstan	-12.5		70.5
17	38683	Tulunskaja	Russia	Irkutsk reg.	-12.4		60.0
59	40782	Wild	Russia	Dagestan republic	-12.3		64.8
32	41227	Wild	Russia	Leningrad reg.	-12.2		Non
51	28953	Wild	Russia	Altai reg.	-12.2		79.3
9	37140	Vostochnaja	Russia	Primorskij reg.	-12.2		65.2
26	43085	Wild	Russia	Yaroslavl reg.	-12.2		64.2
77	20260	Wild	Russia	Leningrad reg.	-12.2		49.8
30	46325	Wild	Russia	Tomsk reg.	-12.1		87.6
43	34240	Wild	Russia	Moskow reg.	-12.1		81.0
62	40667	Wild	Russia	Novosibirsk reg.	-12.1		64.7
42	39396	Wild	Russia	Tyumen reg.	-12.0		78.3
63	27870	Kamalinskaja-95	Russia	Krasnojarsk reg.	-12.0		71.8
27	45982	Wild	Russia	Omsk reg.	-11.9		64.4
71	33494	Wild	Russia	Georgia	-11.8		73.6
41	28517	Wild	Russia	Novgorod reg.	-11.8		53.8
31	46465	Wild	Russia	Burjatia	-11.7		Non
3	34019	Wild	Russia	Kirov reg.	-11.7		65.8
47	31747	CD-130	Russia	Arhangelsk reg.	-11.7		63.2
68	34122	Wild	Russia	Novgorod reg.	-11.6		81.0
7	46201	Wild	Russia	Sakhalin	-11.6		73.1
37	34129	Wild	Russia	Novgorod reg.	-11.6		69.9
25	44086	Garmonija	Russia	Primorskiy reg.	-11.6		55.5
78	28421	Wild	Russia	Krasnodar reg.	-11.6		50.8
33	46686	Wild	Russia	Kurgan reg.	-11.5		75.1
8	25876	Morsehanskaja-1304	Russia	Tambov reg.	-11.5		60.1
1	46218	Aznikkip-1	Russia	Azerbaijdzhan	-11.5		59.9
22	29779	Jigeva-47	Estonia		-11.5		59.5
65	48354	Wild	Russia	Rjazan reg.	-11.4		68.7
50	40733	Wild	Russia	Komi republic	-11.4		31.6
6	27335	Wild	Russia	Kaliningrad reg.	-11.3		68.5
79	41223	Wild	Russia	Penza reg.	-11.3		68.3
29	48369	Wild	Russia	Primorskiy reg.	-11.3		65.8
16	37137	Saharovskaja	Russia	Kalinin reg.	-11.3		58.7
66	45370	Lubava	Russia	Leningrad reg.	-11.2		87.6
13	48358	Wild	Russia	Rjazan reg.	-11.2		78.0
54	45375	Wild	Russia	Chelyabinsk reg.	-11.2		77.4
18	45374	Wild	Russia	Chelyabinsk reg.	-11.2		57.3
38	47059	Lazur	Russia		-11.2		55.7
70	34740	Jigeva-519	Russia	Estonia	-11.1		81.7
12	43685	Wild	Russia	Gorkii	-11.1		79.1
82		Harusakac	Japan	Hokkaido	-11.1		66.0
11	46689	Salaiskaja	Russia	Tomsk reg.	-11.1		55.4
46	28734	Wild	Russia	Leningrad reg.	-11.0		83.6
36	45510	Loreysjaka	Armeniya		-11.0		64.8
76	42943	Wild	Russia	Altai	-11.0		64.8
23	46200	Wild	Russia	Sakhalin	-11.0		57.3
15	41089	Wild	Russia	Irkutsk reg.	-11.0		49.1
48	23039	Wild	Russia	North Osetija	-10.9		61.0
80	31928	Wild	Russia	Sverdlovsk reg.	-10.9		39.6
52	45983	Wild	Russia	Omsk reg.	-10.9		37.0
81	43118	Wild	Russia	Voogda reg.	-10.8		Non
2	39443	Wild	Russia	Vladimir reg.	-10.8		71.7
21	46466	Wild	Russia	Burjatia	-10.8		59.5
40	34188	Wild	Russia	Arhangelsk reg.	-10.8		17.0
67	44299	Wild	Russia	Krasnojarsk reg.	-10.7		Non
45	44436	Wild	Russia	Pskov reg.	-10.7		63.4
10	41041	Samenskaja-134	Belorussiya		-10.7		61.7
20	41068	Wild	Russia	Vladimir reg.	-10.7		57.2
73	34020	Wild	Russia	Komi reg.	-10.7		49.3
74	40743	Wild	Russia	Irkutsk reg.	-10.7		35.1
61	42944	Wild	Russia	Marijskaja reg.	-10.6		Non
69	42749	Pojma	Russia		-10.6		88.2
60	44838	Wild	Russia	Krasnojarsk reg.	-10.6		87.0
5	48353	Wild	Russia	Vladimir reg.	-10.6		64.8
19	22858	Moskovskaja-62	Russia	Moskow reg.	-10.6		59.6
44	32875	Wild	Russia	Stavropol reg.	-10.6		57.6
35	15891	Wild	Russia	Moskow reg.	-10.5		64.7
39	38684	Mujkopskaja-5	Russia	Krasnodar reg.	-10.5		38.7
75	35059	Suidinskaja	Russia	Leningrad reg.	-10.4		67.3
53	30216	Wild	Russia	Stavropol reg.	-10.4		66.0
28	46199	Wild	Ukraina		-10.2		62.7
34	43097	Wild	Russia	Ivanovo reg.	-10.0		63.2
58	43087	Wild	Russia	Yaroslavl reg.	-10.0		39.3
14	43100	Wild	Russia	Ivanovo reg.	-9.6		38.9
72	46334	Wild	Russia	Altai	-9.3		40.6
4	48374	Wild	Russia	Altai	Non		63.4

Non: no experiment.

ウ. 結果及び考察

1. オーチャードグラス「北海28号」および新規育成系統の耐凍性と耐雪性の評価

「北海28号」は、雪腐病発生区での再生がロシア品種や標準品種「ワセミドリ」より優れ、雪腐病被害指数はこれらより低かった (Table 2-5)。したがって、耐雪性 (雪腐病抵抗性) はロシア品種や「ワセミドリ」より優れていた。1996年にロシア遺伝資源から育成した系統は、再生と雪腐病被害指数ともに北農研品種並みで、耐雪性は北農研品種と同程度であった。2000年にロシア遺伝資源から育成した系統の生存率と再生草勢は、ロシア品種並みかやや優れ越冬性はロシア品種並みかやや優れていた (Table 2-6)。「北海28号」の耐凍性は、標準品種「ワセミドリ」より優れており、ロシア品種と同程度であった。ロシア遺伝資源から育成した系統の耐凍性は、「北育64号」、「北育78号」、「北育81号」が北農研育成品種より優れ、ロシア品種並みであった。その他の系統は、北農研品種と同程度の耐凍性を示した。構成栄養系に占めるロシア遺伝資源の割合が低い「北育68号」と「北育83号」の耐凍性は、北農研品種より劣った。

以上の結果から、ロシア遺伝資源はオーチャードグラスの越冬性の改良に有効であり、特に耐凍性の改良には効果が高いことが明らかになった。また、耐凍性の高い系統を育成する場合は、構成栄養系の半数以上をロシア遺伝資源由来とする必要があることが示された。耐雪性 (雪腐病抵抗性) の改良は、雪腐病が多発する北海道の日本海側の多雪地帯向けに重要である。耐凍性の改良は、凍害の発生する北海道東部の土壤凍結地帯向けに重要である。オーチャードグラスは、北海道全域で栽培されるので耐雪性と耐凍性の両形質を改良する必要がある。また、オーチャードグラスの耐凍性は、土壤凍結地帯で多発する雪腐大粒菌核病 (*Myriosclerotinia borealis* (Bubak & Vleugel) Kohn) に対する抵抗性と相関があることが知られている (新発田・嶋田 1986)。育成地の北農研 (札幌) では、雪腐大粒菌核病の発生が少ないので雪腐大粒菌核病抵抗性の選抜はできない。したがって、耐凍性を改良することにより間接的に雪腐大粒菌核病抵抗性を改良することができる。ロシア遺伝資源の利用は、オーチャードグラスの耐凍性と耐雪性の改良に効果的であったので、今後はこれらを活用して道東地域でも安定して越冬できる品

種が効率的に育成できると考えられる。

2. メドウフェスクロシア遺伝資源の耐凍性と耐雪性の評価

クリオトロンを利用した簡易法により、メドウフェスクのロシア遺伝資源の耐凍性と耐雪性 (雪腐黒色小粒菌核病抵抗性) を評価した (Table 2-8)。耐凍性では、 LT_{50} が -11.5°C 以下で標準品種「ハルサカエ」より高い耐凍性を示す系統が 33 点あった。耐雪性では、「ハルサカエ」より高い生存率 70% 以上を示す系統が 23 点あった。耐凍性と耐雪性は、有意な相関 ($r = -0.44$, $n = 75$) があり、耐凍性が高い系統は耐雪性も高い傾向があった。特に、Tomsk 地域原産の 2 系統は、耐凍性が -12°C 以下、耐雪性が 90% 前後の優れた特性を示した。このように「ハルサカエ」より優れた特性を示した遺伝資源は、メドウフェスクの越冬性の改良のための素材として有望であると考えられた。オーチャードグラスでは、原産地の 1 月の平均気温と越冬性との間に有意な相関があることが知られている (阿部 1986)。本試験で供試した遺伝資源の原産地は、旧ソ連地域を含むロシア全土に由来しており、原産地の気候と耐凍性および耐雪性との関連を検討したが、関連は明確ではなかった。本試験の遺伝資源は、北極圏に近い高緯度から黒海沿岸の中緯度まで分布している。一般に高緯度原産の系統は、中緯度の北海道で栽培した場合は夏以降短日条件に反応して、生育適温であるにもかかわらず生育量が低下し、早期に休眠に入ることが知られている (Eagles 1967, 阿部 1986)。高緯度の素材を育種に利用した場合、夏以降の収量性が低下することが予測されるので、夏以降の収量性を確保するためには、中緯度原産の系統を利用することが望ましい。本試験の遺伝資源の中では、北海道の緯度に近い Altai 地方や沿海地方原産の系統の中に「ハルサカエ」以上の耐凍性・耐雪性を示す系統がみられた。これらの系統は、越冬性に優れ夏以降の生育にも優れた系統の育成のための素材として、利用が可能であると考えられた。

エ. 今後の問題点

オーチャードグラスとメドウフェスクともに、新規育成系統については北農研より冬季の気象条件の厳しい道東地域で越冬性を評価する必要がある。また、ロシア遺伝資源には耐病性に劣る系統があり (Nakayama and Abe 1996)、育種に利用する場合は耐

病性の素材と交雑して選抜を繰り返す必要がある。

オ. 要約

ロシア遺伝資源を利用して育成された「北海28号」は、ロシア品種並の耐凍性を示し、耐雪性はロシア品種より優れていた。ロシア遺伝資源を利用して育成された系統については、耐凍性と耐雪性はともに北農研育成品種と同程度かやや優れていた。ロシア遺伝資源の活用は、オーチャードグラスの耐凍性と耐雪性の改良に効果的であった。

メドウフェスクのロシア遺伝資源は、半数以上の系統が耐凍性と耐雪性ともに標準品種「ハルサカエ」より優れていた。これらの系統は、メドウフェスクの越冬性の改良のための素材として有望である。

カ. 引用文献

- 1)阿部二郎(1986):寒地型イネ科牧草の耐凍性と雪腐病抵抗性に関する品種間変異. 北海道農試研報, 146, 89-143.
- 2)Eagles, C. F. (1967):The effect of temperature on vegetative growth in climatic races of *Dactylis glomerata* in controlled environments. *Ann. Bot.*, 31, 31-39.
- 3)Nakayama, S. and J. Abe (1996):Winter hardiness in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations introduced from former USSR. *J. Japan. Grassl. Sci.*, 42, 235-241.
- 4)新発田修治・嶋田徹(1986):土壌凍結地帯におけるオーチャードグラスの越冬性と体内成分の関係 I. 貯蔵性炭水化物含有率,耐凍性および雪腐病抵抗性の品種間変異. 日草誌, 32, 102-108.
- 5)須藤賢司・落合一彦・池田哲也(2001):メドウフェスクおよびペレニアルライグラス草地の集約放牧利用による産乳性とその比較. 日草誌, 47, 386-392.
- 6)Takai, T., Y. Sanada and T. Yamada (2004):Varietal differences of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds) in resistance to *Typhula* snow mold. *Grassl. Sci.* 49, 571-576.
- 7)Yamada, T., T. Takai, Y. Sanada, V. F. Chapurin and S. Nakayama. (2005): Comparison of the field performance of cultivars and strains in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) at the two locations, St. Petersburg and Sapporo. *Misc. Pub. NARCH.*, 65, 69-

75.

(眞田康治・高井智之・山田敏彦)

Evaluation of Freezing Tolerance and Snow Mold Resistance in Grass Germplasms and their Utilization for Breeding

Yasuharu Sanada¹⁾, Tomoyuki Takai^{1,2)}
and Toshihiko Yamada^{1,3)}

¹⁾National Agricultural Research Center for
Hokkaido Region

²⁾Nagano Prefectural Livestock Experiment Station

³⁾Hokkaido University Field Science Center for
Northern Biosphere

Summary

Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivar "Hokkai 28" which was bred from Russian germplasms showed freezing tolerance as high as Russian cultivars and was even more resistant to *Typhula* snow mold than them. Freezing tolerance and *Typhula* snow mold resistance of new strains which were bred from Russian germplasms were equal to those of NARCH cultivars and some of them showed higher freezing tolerance and more *Typhula* snow mold resistance than NARCH cultivars. Utilization of Russian germplasm in orchardgrass breeding was effective in improving freezing tolerance and *Typhula* snow mold resistance.

More than the half of the accessions from Russian germplasms in meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) showed higher freezing tolerance and more resistance to *Typhula* snow mold than the NARCH cultivar "Harusakae". These germplasms would be good breeding materials for the improvement of freezing tolerance and *Typhula* snow mold resistance in meadow fescue.

(2) エンドファイトの分離と耐凍性、耐雪性との関係解明

ア. 研究目的

エンドファイトは、植物に内生する微生物の総称で、とくにイネ科牧草のエンドファイトは環境耐性に関係していることから注目されている (Bacon et al., 1997)。メドウフェスクに内生する *Neotyphodium uncinatum* (Gams, Petrini&Schmidt) Glenn, Bacon, Price&Hanlin (Glenn et al., 1996) は、耐旱性、他の草種との競合力、アブラムシに対する耐虫性で報告がある (Malinowski et al., 1997ab, Schmidt, 1994)。本研究では、豊富な遺伝資源を有するバビロフ植物生産研究所と共同してイネ科牧草のメドウフェスクについてロシアにおけるエンドファイトの分布、エンドファイトと耐凍性、耐雪性との関係を明らかにする。

イ. 研究方法

1) ロシア遺伝資源のエンドファイト感染率とアルカロイド有無の調査

バビロフ植物生産研究所が保存しているロシア遺伝資源 210 点を用いた。エンドファイト感染率は、種子を用いて 1 点当たり 50 粒を観察した。また、エンドファイトが産生するロリンアルカロイド含有量はガスクロマトグラフィーで測定した (岡崎ら

1998)。

2) 種子乾熱殺菌法による品種レベルにおける耐凍性、耐雪性の影響評価

エンドファイトの感染が確認されている「ハルサカエ」および「トモサカエ」を用いた。これらの合成 1 代および 2 代種子について乾熱殺菌法 (70℃、5 日間処理) でエンドファイトを殺菌し、耐凍性および耐雪性を、それぞれ、Moriyama et al. (1995) と Nakayama and Abe (1996) の手法で評価した。

3) 殺菌処理による栄養系レベルにおける耐凍性、耐雪性の影響評価

「ハルサカエ」および「トモサカエ」の構成栄養系についてペノミルでエンドファイトを除菌した植物体 (E-) を作出し、耐凍性、耐雪性を評価した。一部の栄養系では後代でもエンドファイトを有する植物 (E+) と E- で評価した。供試材料は、株分けし、15/20℃・15 時間日長の人工気象室で 3~4 週間、2℃・10 時間日長の人工気象室で 3~4 週間、それぞれ生育させた後、耐凍性は -12、-14、-16、-18、-20℃ で凍結処理後、また、耐雪性はエンバク種子で培養した雪腐黒色小粒菌核病菌 (Ty-12) を 1 バット 100ml で接種し、湿らせた脱脂綿をかけて黒色ビニール袋で包み、8、10、12、14、16 週間、3℃ で放置後、12℃ の常温、24 時間照明で再生させ、半数個体致死温度 (LT₅₀) および生存率を調査した。

Table 2-9. Endophyte infection status and loline alkaloids of meadow fescue germplasm collected in the former USSR.

Country or region	Number of accessions screened	Number of accessions with viable endophyte in seeds	infection percentage	Number of accessions with loline alkaloids in seeds	% of accessions with loline alkaloids in seeds
The Arctic Ocean coast	5	5	100	3	60
Baltic Sea coast	6	4	67	3	75
Moscow	9	6	67	6	100
Caucasus	5	3	60	1	33
The Urals	5	4	80	0	0
Novosibirsk	10	9	90	4	44
Irkutsk	4	3	75	2	67
The Far East	1	0	0	0	-
Belorussia	1	1	100	1	100
Ukraine	6	4	67	4	100
Kazakhstan	3	2	67	0	0
Total	55	41	75	24	44

The Arctic Ocean coast: Arhangelsk, Karelija, Komi and Murmansk reg. in Russia.

Baltic Sea coast: Estonia, Latvia, Lithuania. Leningrad reg. in Russia.

Moscow: Ivanovsky, Moskovsky Penzensky, Rjazan, Smolensky, Tambovsky, Vologodsky and Voronejsky reg. in Russia.

Caucasus: North Osetija, Karachaevo-cherch, Krasnodarsky, Stavropolsky reg. in Russia.

The Urals: Sverdlovsky, Tobolsky Tumensky reg. in Russia.

Novosibirsk: Altaisky, Kemerovsky, Novosibirsky, Omsky Tomsk reg. in Russia.

Irkutsk: Irkutsky Kranojarsky reg. in Russia.

The Far East: Petropavlovsk-K in Russia.

ウ. 結果及び考察

1) ロシア遺伝資源のエンドファイト感染率とアルカロイド有無の調査

ロシア遺伝資源、210点についてエンドファイト感染率を種子で調査したところ、収集種子では75%の系統(Table2-9)、増殖種子では2.5%の系統でエンドファイトの菌糸が確認された(データ省略)。エンドファイトの感染が確認できた系統について、発芽させて、植物体で菌糸の有無を調査したが、確認できなかった(データ省略)。増殖系統のエンドファイト感染率が低かった理由として、種子貯蔵中に菌が枯死し、枯死した個体から種子を採種したことが原因として考えられる。エンドファイトに感染していた収集系統の44%からロリンアルカロイドを検出した。エンドファイトが産生するアルカロイドの含有量は、エンドファイト菌株や植物の遺伝子型で異なることが報告されており(Bush et al., 1997)、ロシアにおいても多様なエンドファイト菌株があると考えられる。エンドファイトの地理的分布では、極東を除く旧ソ連より確認され、北極海沿岸ではすべての系統でエンドファイトに感染していた。ロリンアルカロイドでは、コーカサス～ウラル・カザフスタン～ノボシビルスクにかけてロリンアルカロイドを産生しない系統が多数みられた。

2) 種子乾熱殺菌法による品種レベルにおける耐凍性、耐雪性の影響評価

「ハルサカエ」および「トモサカエ」のエンドファイト感染率は、52%であった。これらの合成1代と2代の種子を乾熱殺菌法でエンドファイトを除菌し、耐凍性を評価したところ、E-のLT₅₀は、E+と同じ

-20℃前後で有意性が認められなかった(Table 2-10)。同様に耐雪性においてもエンドファイト除菌の影響は認められなかった。高井ら(2004)は、「トモサカエ」と「ハルサカエ」について種子乾熱殺菌法でE-系統を作出し、採種性を評価し、エンドファイトの効果を報告している。しかし、本研究では、品種レベルでエンドファイトの耐凍性、耐雪性に及ぼす影響は確認できなかった。

3) 殺菌処理による栄養系レベルにおける耐凍性、耐雪性の影響評価

栄養系レベルにおけるエンドファイトの耐凍性への影響は、CL. 243, CL. 454 と CL. 470 で耐凍性が向上し、それ以外の多くの栄養系で低下がみられ、すなわち、栄養系によってエンドファイトの効果は異なっていた(Fig. 2-6)。また、E+とE-間のLT₅₀の差は、2℃前後と小さかった。エンドファイトの耐雪性への影響は、CL. 470 で耐雪性が低下し、CL. 102、CL. 233、CL. 243、CL. 454、CL. 465 で向上がみられ、耐凍性と同様に栄養系によってエンドファイトの効果は異なっていた(Fig. 2-7)。また、E+とE-間の生存茎率の差は、10%前後と小さかった。エンドファイトの効果を確認するために後代で再度、E+とE-を作出して耐凍性を評価したところ、エンドファイトの効果は減少し、当代および後代で傾向が一致していたのはCL. 470のみであった。以上のことから、エンドファイトの耐凍性、耐雪性への影響は小さいと考えられる。エンドファイトの菌糸の伸長速度は5℃ではほとんど認められない(Koga et al., 1994)。このことから、エンドファイトの耐凍性、耐雪性への影響が小さかった理由として、低温条件下では、

Table 2-10. The effect of the heat treatment on freezing tolerance and snow mold resistance in meadow fescue.

Cultivars	Heat treatment in seeds		Endophyte infection rate (%)	Freezing tolerance	Snow mold resistance
	Syn. 1	Syn. 2		LT ₅₀ (°C)	Plant survival rate (%)
Tomosakae	Not treated	Not treated	52	-20.5	84
	Not treated	Treated	0	-19.9	86
	Treated	Not treated	0	-20.0	92
	Treated	Treated	0	-20.7	88
Significance				N.S.	N.S.
Harusakae	Not treated	Not treated	52	-20.7	100
	Not treated	Treated	0	-20.0	98
	Treated	Not treated	0	-19.5	96
	Treated	Treated	0	-20.7	98
Significance				N.S.	N.S.

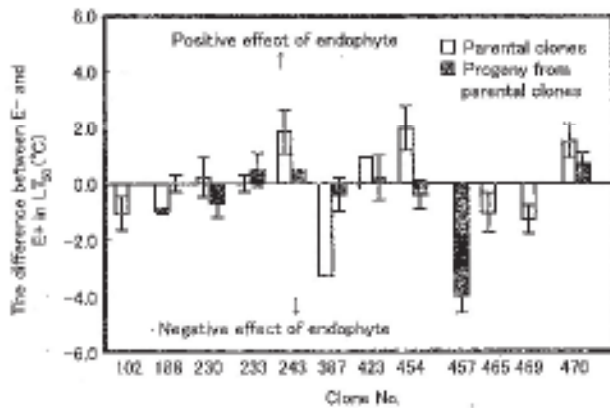


Fig. 2-6. The effect of endophyte infection on freezing tolerance in meadow fescue plants. Bars indicate standard errors.

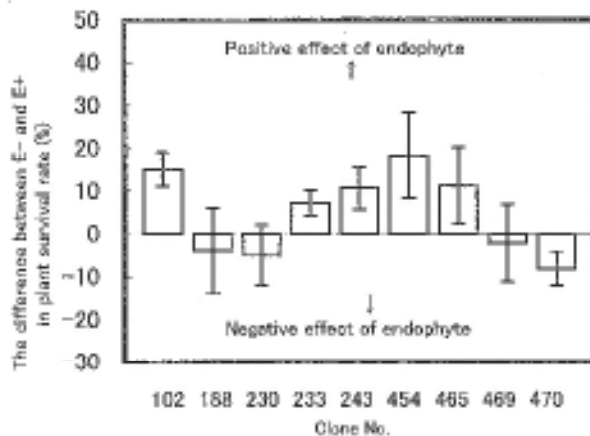


Fig. 2-7. The effect of endophyte infection on snow mold resistance. Bars indicate standard errors.

エンドファイトの活性が低かったことが考えられる。

エ. 今後の問題点

本研究では、エンドファイトと耐凍性、耐雪性との間に関係を認められなかった。しかし、多くのロシア遺伝資源はエンドファイトに感染しており、エンドファイトは植物と共生関係にあり、エンドファイトが植物に対して付与している効果を解明する必要がある。その場合、菌と植物と間の交互作用を明らかにするためにもエンドファイトの接種技術の確立が必要である。エンドファイトの接種技術は、発芽直後の幼植物で報告がある (Latch and Christensen, 1985)。この接種法では、接種した幼植物について、株分けし、再度除菌して E-植物を作出する必要がある。今後、エンドファイトの研究を推進するためにも株分けが可能な植物で接種技術の確立が必要で

ある。

オ. 要約

本研究では、メドウフェスクにおいて、ロシア遺伝資源のエンドファイト感染状況を調査するとともにエンドファイトと耐凍性、耐雪性との関係解明を行った。

ロシア遺伝資源、210点についてエンドファイト感染率を種子で調査したところ、収集種子では75%の系統で、増殖種子では2.5%の系統で菌糸が確認された。エンドファイト感染種子の地理的分布をみると、極東を除く旧ソ連の遺伝資源で確認され、北極海沿岸のものでは、すべての系統でエンドファイトに感染していた。ロリンアルカロイドについては、コーカサス～ウラル・中央アジア～ノボシビルスクにかけてロリンを産生しない系統が多数みられた。

エンドファイトの感染が確認されている「ハルサカエ」と「トモサカエ」を種子乾熱殺菌法でエンドファイトを除菌した系統 (E-) を作出し、エンドファイトを有する系統 (E+) との間で耐凍性、耐雪性を比較したところ、両品種ともに E+ と E- 間に明瞭な差異は認められなかった。

栄養系レベルでのエンドファイトの影響は、耐凍性と耐雪性ともに栄養系によって効果の方向が異なっていた。エンドファイトの効果を確認するために後代で再度、E+ と E- を作出して耐凍性を評価したところ、エンドファイトの効果は減少し、当代および後代で傾向が一致していたのは CL. 470 のみであった。以上の結果から、エンドファイトが耐凍性、耐雪性に及ぼす影響は小さいと考えられる。

カ. 引用文献

- 1) Bacon, C.W., M.D. Richardson and J.F. White, Jr. (1997): Modification and uses of endophyte-enhanced turfgrasses: a role for molecular technology. *Crop Sci.* 37, 1415-1425.
- 2) Bush, L.P., H. H. Wilkinson, and C. L. Schardl (1997): Bioprotecalkaloids of grass fungal endophyte symbioses. *Plant Physiol.* 114, 1-7.
- 3) Glenn AE, C.W. Bacon, R. Price and R. Hanlin (1996): Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia* 88, 369-383.
- 4) Koga, H., Tsukibishi, T and Uematsu, T. (1994): Incidence of the endophytic fungus, *Acremonium*

- uncinatum, in meadow fescue (*Festuca pratensis*) ecotypes in Hokkaido. Bull. Natl. Grassl. Inst. 49, 35-41.
- 5) Latch, G. C. M. and M. J. Christensen (1985): Artificial infection of grasses with endophytes. Ann. Appl. Biol. 107, 17-24.
- 6) Malinowski, D., Leuchtman, A., Schmidt, D. and Nösberger, J. (1997a): Growth and water status in meadow fescue is affected by *Neotyphodium* and *Phialophora* species endophytes. Agron. J. 89, 673-678.
- 7) Malinowski, D., Leuchtman, A., Schmidt, D. and Nösberger, J. (1997b): Symbiosis with *Neotyphodium uncinatum* endophyte may increase the competitive ability of meadow fescue. Agron. J. 89, 833-839.
- 8) Moriyama, M., J. Abe, M. Yoshida, Y. Tsurumi and S. Nakayama (1995): Seasonal changes in freezing tolerance, moisture content and dry weight of three temperate grasses. Grassl. Sci. 41, 21-25.
- 9) Nakayama, S., and J. Abe (1996): Winter hardiness in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations introduced from the former USSR. Grassl. Sci. 42, 235-241.
- 10) 岡崎博・長谷川寿保・植田精一(1998): エンドファイト感染トールフェスクおよびペレニアルライグラスのロリン, エルゴペリン, ロリトレムBの分析. 日草誌 44, (別) 174-175.
- 11) Schmidt, D. (1994): Du nouveau sur les endophytes de la fétuque des pré. Revue Suisse Agric. 26, 57-63.
- 12) 高井智之・眞田康治・山田敏彦(2004): メドウフェスクにおけるエンドファイトが採種性に及ぼす影響. 育種学研究 6 (別1), 303.

(高井智之・眞田康治・山田敏彦)

Relationships between Endophyte Infection and Freezing Tolerance and Snow Mold Resistance in Meadow Fescue

Tomoyuki Takai^{1,2)} Yasuharu Sanada¹⁾
and Toshihiko Yamada^{1,3)}

¹⁾National Agricultural Research Center
for Hokkaido Region

²⁾Nagano Prefectural Livestock Experiment Station

³⁾Hokkaido University Field Science Center
for Northern Biosphere

S u m m a r y

In this study, meadow fescue was used to investigate the endophyte infection of the Russian genetic resources and elucidate relationship between endophyte infection and resistance to freezing and snow mold.

When seeds of 210 accessions of the Russian genetic resources were examined for endophyte infection, fungal hyphae were found in 75% of accessions collected in the former USSR and in 2.5% of accessions multiplied from collections. Endophyte infection was observed in accessions collected in regions of the former USSR except those in Far East. Every accession from the coasts of the Arctic Ocean was infected by endophytes. No loline alkaloids were detected in seeds from many accessions collected in Caucasian-Ural regions and Central Asian-Novosibirsk regions.

Seeds of "Harusakae" and "Tomosakae," varieties that had been confirmed to be infected by endophytes, were treated with dry heat to produce Endophyte-free (E-) lines. Plants of the Endophyte-free lines were compared with those of Endophyte-infected lines (E+) for freezing tolerance and snow mold resistance. There was no significant difference between the E+ and E- lines in freezing tolerance and snow mold resistance in both varieties.

The effect of endophytes infection on snow mold resistance was inconsistent across meadow fescue

genotypes. In some genotypes (CL102, CL243, and CL454), endophyte-infected plants were more tolerant to snow mold than endophyte-free plants, but endophyte-infected plants were less tolerant than endophyte-free plants in CL470.

3. 分子マーカー、ロシア遺伝資源利用による耐凍性、耐雪性育種素材の開発

(1) 耐凍性、耐雪性マメ科牧草育種素材の開発

ア. 研究目的

アカクロバは播種翌年に生育が最も旺盛となり、3年目以降は急速に衰弱、枯死する短年生である。混播では2年目まではイネ科牧草を抑制し、その後は枯死したアカクロバの株付近が裸地化して草地の荒廃を招く。このためアカクロバの最重要の育種目標は永続性の改良である。永続性の要因としては、北海道では菌核病などの雪腐病を主な原因とする耐雪性と積雪前および融雪後の耐凍性が強く関わっている。そこで本研究では、ロシアで育成された越冬性に優れる2倍体早生品種 Rannii 2 を母材として、北海道の環境への適応性を付与するため北海道農業研究センターで育成され、現在の道内主要品種であり、永続性の高いホクセキとの交配集団を作出し、クロバ菌核病を中心に耐雪性および永続性を指標として選抜を行う。合わせて実用形質としてチモシーとの混播適性を向上させるために Rannii 2 のもう一つの特徴である2番草の生育が穏やかである特性を残した素材を開発する。また、選抜個体についてはその後代で簡易検定法により菌核病抵抗性を評価する。

イ. 研究方法

供試集団は、ホクセキ(Hokuseki)およびRannii 2を条播栽培し、播種後4年目の残存優良株各25個体を選抜、これらの個体を品種間で交配、さらに次代を隔離条件で任意交配した交配第2代((HxR)2)である(Fig 2-8)。これらの品種間交配第2代(668個

体)、比較対照に親品種であるホクセキ(45個体)およびRannii 2(45個体)、さらに晩生の対照品種としてAltaswade(25個体)を2001年6月15日に80cm間隔の個体植えて播種した。評価特性としては秋草勢、萌芽、開花期、草丈、頭花数、病害程度、2番草再生程度、2番草開花程度などを2001年から2004年にかけて調査し、評価結果に基づき優良個体を選抜し、隔離交配を行った。

選抜個体の隔離交配から母系毎に交配第3代((HxR)3)を採種し、採種量の多かった3母系について菌核病の接種試験を行った。接種法は松村ら(1997)の簡易検定法に準じて行った。供試系統は交配第3代に加えて、親品種であるホクセキとRannii 2、そして菌核病に対する抵抗性の高いMarsを用いた。感染源は、平成16年春にシロクロバより採集した菌核をPDA培地上で培養後、菌糸を分離し、さらに麦粒培地で菌糸を増殖したものをを用いた。接種は、供試植物を発芽後に4℃でハードニングを行い、幼苗の株元に菌糸の付着した麦粒により行った。抵抗性の評価は接種4、7、10日後に殺菌剤で菌糸の進行を止め、その後の植物の再生の有無による生存率で行った。

ウ. 結果及び考察

供試系統の播種年から3年目秋までの生存率の変化をFig. 2-9に示した。2年目春の生存率ではホクセキ(HK)が36%と最も低くなった。Rannii2(RN2)も40%と生存率は高くなかったものの、両品種の交配後代である交配第2代((HxR)2)は50%と最も高い値を示した。山口ら(2004)は、ホクセキは菌核病に抵抗性が高いと報告しているが、今回の結果からは抵抗性の発現が顕著でなかった。2年目の秋

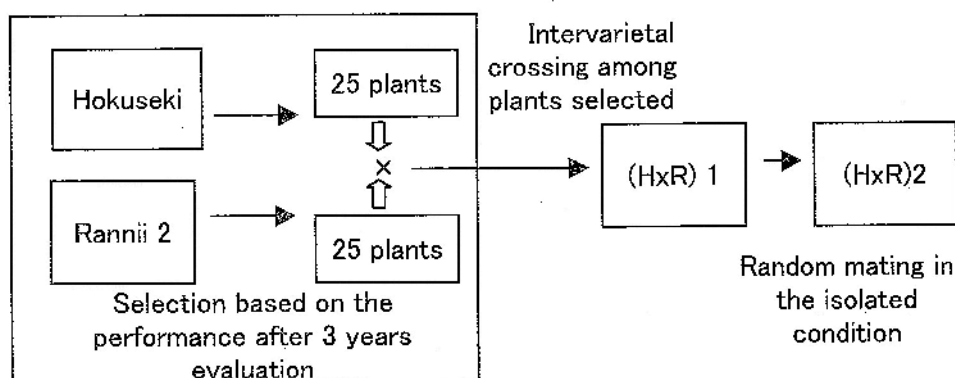


Fig 2-8. Development scheme of the intervarietal hybrid population.

以降の生存率では、Rannii 2 は2年目秋で27%、3年目秋で16%と低下が最も著しくなった。一方、ホクセキは2年目秋で27%に低下したが、その後の生存率は変化がみられなかった。晩生系統の Altaswade は生存率が安定して高く、3年目秋でも37%と最も高い値を示した。3年目の生存率の低下の主要因は、茎割病であり、Rannii 2 と Altaswade の導入品種で発病個体が多くみられた（データ省略）。交配第2代は2年目越冬中と3年目春以降の茎割病による枯死のため生存率を21%と低下させたが、同様の傾向がみられた Rannii2 の16%より若干高い値であった。

さらに、1年目秋の草勢と越冬後の生存の関係を図 2-10 に示した。秋の草勢は評点5を中心とすると、Rannii 2 が左（草勢の弱い）、ホクセキは右（草勢の強い）方向に偏って分布するのに対して、交配第2代は正規分布に近い分布となった。ホクセキは秋の草勢にかかわらず春に枯死する個体のみられ、一方 Rannii 2 は草勢の高い個体で枯死率が低くなった。この要因としては、ホクセキは菌核病により、

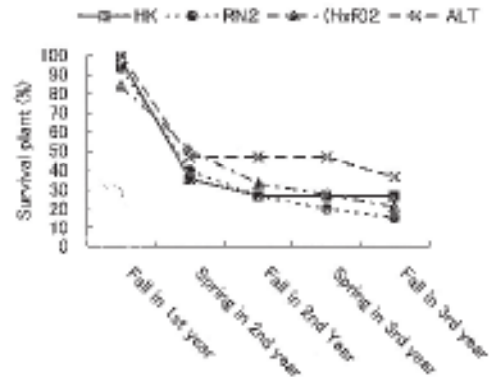


Fig. 2-9. Changes of survival plant percent of 4 populations for 3 years.

Rannii 2 は秋の草勢の弱さや越冬前の病害により衰弱した個体が越冬中に枯死することが多いと考えられる。

交配第2代の1番草の開花日を Fig. 2-11 に示した。両親品種のホクセキと Rannii 2 はともに早生品種であり、2年目では Rannii 2 が6月10日、ホクセキが16日、3年目では Rannii 2 が6月22日、ホクセキが27日であった。3年目の開花が遅れた要因としては

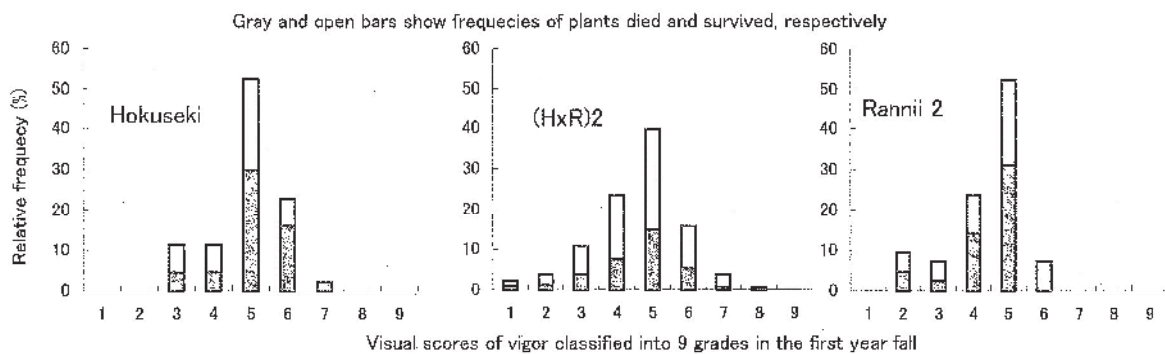


Fig. 2-10. Relationship between vigor in 1st year fall and survival in 2nd year spring.

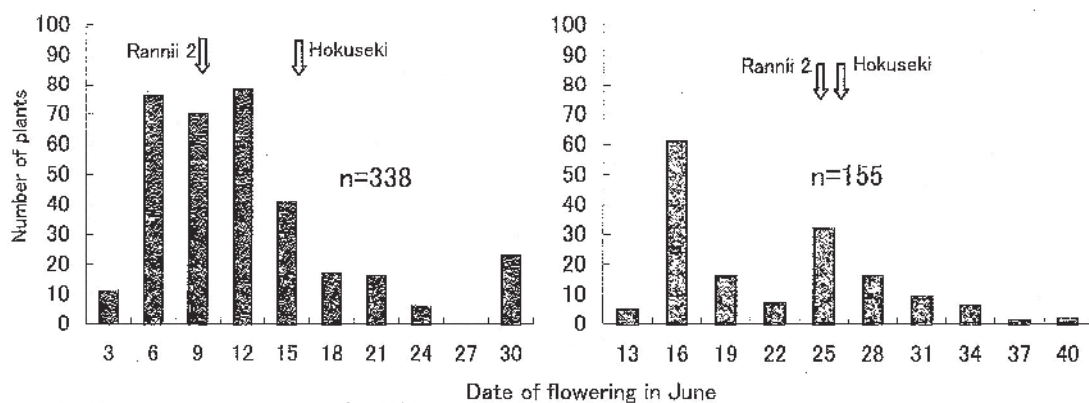


Fig. 2-11. Flowering data of (HxR)2 in the second year and third year.

融雪後から1番草開花までの気温が低かったことと、3年目で植物体そのものも衰弱していたことが考えられる。交配第2代については、両年ともに分布が両親品種より大きく広がり、晩生と同様に開花しない個体もみられた。

3年目の2番草の開花程度についてはホクセキでは30%以上の茎で開花がみられる個体が約6割を占めたが、Rannii 2では15%程度と低くなり、逆に70%の個体で開花がみられなかった (Fig. 2-12)。晩生品種のAltaswadeでは90%の個体が2番草では開花しなかった。交配第2代ではおよそ半数の個体が30%以下であったが、50%以上の茎で開花がみられる開花程度の高い個体が11%を占めホクセキ並となった。また、データは示していないが、2年目についても2番草の開花程度については同様の傾向で

あった。

本研究の目的は菌核病を主要因とする耐雪性に優れ、混播に重要な実用形質として1番草は早生で2番草の開花程度が低い素材を開発することであり、交配第2代より目的にあった個体を選抜した (Table 2-11)。選抜個体の特性基準は、各季節の草勢が親品種ならびに交配第2代集団の平均より1ポイント以上優れ、開花期は早生、2番草の開花程度が穏やかな個体とした。その結果、選抜個体は、草丈ではRannii 2より高くなっているが、ホクセキと交配第2代集団の平均値では大きな差はなく、草姿も平均値では大きな違いはみられなかった。2番草の開花程度はホクセキおよび交配第2代集団より低く、Rannii 2よりやや高く、Altaswadeより高くなった。これらの選抜個体間で隔離交配を行い、交配第3代

Table 2-11. Traits of selected plants from (HxR)2 in 2003.

Line/Plant	Vigor in spring	Flowering date in spring	Vigor at the 1st cutting	Plant habitat at the 1st cutting	Plant height at the 1st cutting	Flowering date in summer	Score of stems with flowers	Vigor in fall
Hokuseki	3.7	6/27	4.3	4.5	50.3	8/6	3.5	3.0
(HxR)2	4.5	6/20	4.7	4.9	51.0	8/7	2.8	3.9
Rannii 2	3.7	6/23	3.4	5.6	35.6	8/24	1.0	3.0
Altaswade	4.1	7/8	4.1	5.3	50.5	8/29	0.1	2.6
Selected plant								
(HxR)3-0131	6	6/15	7	7	50.3	7/27	3	7
(HxR)3-0925	3	6/16	4	4	55.7	8/10	2	4
(HxR)3-1326	6	6/16	5	5	51.3	8/11	2	6
(HxR)3-1423	6	6/17	6	5	47.3	8/13	1	4
(HxR)3-1617	6	6/17	6	7	56.7		0	5
(HxR)3-1819	7	6/17	7	3	71.3	8/10	1	3
Average	5.7	6/16	5.8	5.2	55.4	8/8	1.5	4.8

Scores of Vigor, 1:poor - 9:excellent; Plant habitat, 1:prostrate - 9: erect; Scores of flowering, 0: no flower - 1:10% of stems with flowers - 9: 90% of stems with flowers

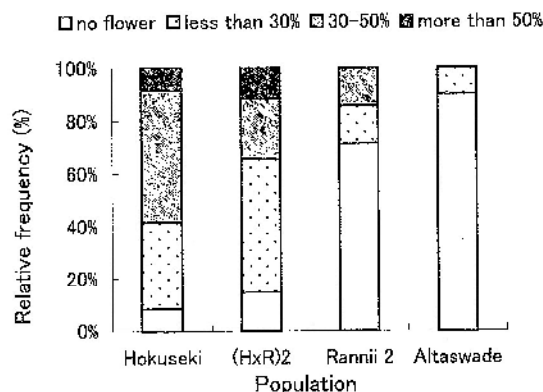


Fig. 2-12. Ratio of stems with flowers at the second cutting.

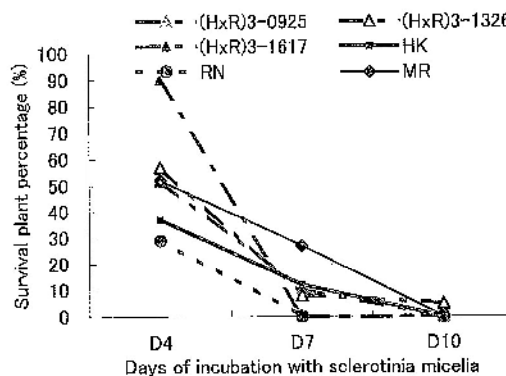


Fig. 2-13. Survival of progeny plants after inoculation of *Sclerotinia*.

種子を得た。この第3代を用いて菌核病に対する抵抗性を評価するため、菌核病の幼苗簡易検定試験を行った。4日間の接種では選抜個体後代の1母系で90%と高い生存率を示し、また3母系ともに親品種を上回った (Fig. 2-13)。しかし、7日間の接種では対照に用いた Mars が最も高く 27%、続いてホクセキが 12%、2母系が 10% および 8% であった。1母系と Rannii 2 では生存個体はなかった。

山口ら (2004) は収量性により北海道の系統適応性検定試験地を2つのグループに分け、積雪の多い試験地グループでは収量性と菌核病抵抗と正の有意な相関が認められたと報告している。また、供試品種の中ではホクセキは4倍体のタイセツに次いで高い抵抗性を示したとしている。本試験の交配第3代の3母系のうち2母系は菌核病簡易検定でホクセキ並の生存率を示しており、もちろん圃場による評価も必要であるが、耐雪性の主要因である菌核病についてはある程度の抵抗性をもつと推定できる。さらに、北海道内のアカクローバ栽培に重要な特性である混播適性についても、2番草の開花程度が穏やかな個体を選抜していることから向上が期待できる。今後は母系間で交配する第4代を育成し、圃場評価を進め、育種計画に組み入れていく予定である。

エ. 今後の問題点

交配第3代については採種量が十分でなかったもので、さらに第4代の採種を行っており、この第4代を用いて菌核病を主とする耐雪性ならびに開花特性について圃場評価を行う必要がある。また、今後はこの素材を育種計画の中に取り込み活用していく。DNA マーカーの利用については本成果の 212 にまとめられているが、選技法の一つとして育種効率向上への可能性が示唆されてきている。これについても圃場評価の精度を上げることでより詳細かつ有用なマーカーの開発を今後とも進める必要がある。

オ. 要約

チモシーとの混播適性をもった耐雪性育種素材を開発するため、ロシアで育成された越冬性に優れ、2番草の開花が穏やかな品種 Rannii 2 と北海道の環境への適応性を付与するため永続性の高いホクセキの交配集団を作出し、クローバ菌核病を中心に耐雪性、開花特性等を指標として選抜を行った。交配第2代集団は生存率では Rannii 2 より高く、1番草開

花日では個体間の変異が大きく、2番草の開花程度はホクセキより低く、Rannii 2 より高い中間の分布を示した。4年目春には交配第2集団より早生で、草丈、草型には親品種と大きな差はみられないが、各季節で草勢に優れ、2番草の開花程度が穏やかであった6個体を選抜した。選抜した個体間で隔離交配を行い、得られた第3代の菌核病抵抗性は簡易検定の結果、Rannii 2 より高く、ホクセキと同程度であった。今後は耐雪性、開花特性について圃場評価を行い、育種素材として活用する。

カ. 引用文献

- 1) 松村哲夫・中島・米丸淳一・樋口誠一郎 (1995): 雪を用いない低温での接種によるシロクローバ菌核病抵抗性の簡易検定法. 草地飼料作物研究成果最新情報, 10, 25-26.
- 2) 山口秀和・澤井晃・内山和宏・我有満 (2004): 北海道におけるアカクローバ品種の地域適応性. 日草誌 49, 645-65 1.

(奥村健治・我有満・廣井清貞・磯部祥子)

Improvement of Freezing Tolerance and Sclerotinia Rot Resistance in Red Clover Using a Russian Germplasm

Kenji Okumura¹⁾, Mitsuru Gau^{1, 2)}, Kiyosada Hiroi¹⁾
and Sachiko Isobe¹⁾

¹⁾National Agricultural Research Center
for Hokkaido Region

²⁾National Agricultural Research Center
for Kyushu Okinawa region

S u m m a r y

In order to develop new breeding materials resistant to Sclerotinia rot and compatible with timothy on mixed sown sward, we conducted an intervarietal crossing between the Russian cultivar "Rannii 2" and the Japanese cultivar "Hokuseki". "Rannii 2" shows superior winter hardiness and moderate regrowth after the first cutting. "Hokuseki" is a most productive and persistent cultivar in Hokkaido. Selection was made in the F₂ population derived from the intervarietal crossing based on resistance to Sclerotinia rot, persistency and flowering characteristics. The F₂ population was higher in survival rate than "Rannii 2" and varied significantly in the flowering time in spring; the flowering rate at the second cutting was lower than "Hokuseki" and higher than "Rannii 2": In the spring of the fourth harvest year, 6 F₂ plants that had been excellent in plant vigor in each season and moderate in the flowering rate at the second cutting were selected and crossed each other in isolated conditions. The F₃ population obtained was evaluated for resistance to Sclerotinia rot by artificial inoculation. The F₃ population was more resistant to the disease than "Rannii 2" and equivalent to "Hokuseki". The F₃ population will be evaluated for winter hardiness and flowering characteristics in a field and used as a breeding material in the future.

(2) 耐凍性、耐雪性イネ科牧草育種素材の開発

ア. 研究目的

ロシア遺伝資源を利用して育成されたオーチャードグラスの「北海 28 号」の耐凍性と耐雪性は、標準品種「ワセミドリ」より優れ、ロシア品種並であることが明らかとなった。日ロ両地域では、これまでに遺伝資源を個体植して越冬性などについて特性調査しているが、イネ科牧草品種を日ロ両地域で栽培して、特性を比較した例はない。本研究では、「北海 28 号」を日本とロシアの両地域で栽培して、収量性と生育特性を明らかにする。また、メドウフェスクのロシア遺伝資源は、標準品種「ハルサカエ」より耐凍性と耐雪性に優れるものが多いことが明らかとなった。メドウフェスクについても、ロシア遺伝資源の利用により耐凍性と耐雪性の向上が期待される。本研究では、メドウフェスクの日ロ交雑系統を育成し、ロシアの N. I. バビロフ植物生産研究所 (バビ

ロフ研) で生育特性を、北農研で耐凍性を評価し、メドウフェスクにおけるロシア遺伝資源利用の効果を確認する。

牧草育種においては、育成地より生育条件の厳しい現地で選抜を実施することにより、越冬性などに優れた品種が育成されている。本研究では、オーチャードグラスについて北農研より冬季の気象条件の厳しいロシアで選抜された系統について、越冬性や耐凍性などを評価して現地選抜の効果を確認する。また、牧草育種では選抜と交配を繰り返し優良遺伝子の集積を図る循環選抜が一般的である。オーチャードグラスの日ロ交雑系統について、選抜を繰り返すことにより、耐凍性と耐雪性の向上を図り新たな育種素材を育成する。

イネ科牧草を含む越冬性作物では、可溶性糖類などの貯蔵養分や秋季休眠性など秋の生育特性が耐凍性や耐雪性と関連していることが知られている。ロシア遺伝資源を利用して育成した系統について、秋

Table 2-12. Yield and winter hardiness of orchardgrass cultivars in Japan and Russia.

National Agricultural Research Center for Hokkaido Region (Japan)													
Cultivar/ Strain	Winter hardiness ¹⁾	2003					Total	2004					Total yield
		Dry matter yield (kg/a)						Dry matter yield (kg/a)					
		1st	2nd	3rd	4th	5th		1st	2nd	3rd	4th	5th	
Hokkai 28	6.8 ^a	51.4	17.6 ^b	13.5 ^b	7.1	89.6 ^b	6.0 ^a	57.0 ^a	11.1 ^b	15.9	6.6 ^b	90.5	180.1 ^b
Hokkai 29	6.8 ^a	51.6	20.7 ^a	17.4 ^a	10.5	100.2 ^a	5.3 ^b	56.1 ^a	14.1 ^a	19.7	8.1 ^a	97.9	198.2 ^a
Wasemidori	5.8 ^b	50.6	20.6 ^a	17.9 ^a	8.9	98.0 ^a	5.0 ^b	50.3 ^b	14.3 ^a	19.2	7.3 ^{ab}	91.2	189.2 ^{ab}
		18-Apr	29-May	9-Jul	21-Aug	7-Oct		15-Apr	1-Jun	12-Jul	25-Aug	7-Oct	

N.I.Vavilov Research Institute of Plant Industry (Russia)						
Cultivar/ Strain	Winter hardiness ¹⁾	Fresh matter yield (kg/a)				
		2003		2004		
		1st	2nd	Total	Total	Total
Hokkai 28	7.0	59.9	100.3	26.5	126.8	186.7
Hokkai 29	6.5	54.2	90.4	29.9	120.3	174.5
Wasemidori	6.5	61.5	104.2	31.9	136.1	197.6
		3-Jul	18-Jul	28-Aug		

1) 1:(very poor)-9:(very good).

Mean values with different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2-13. Growth habits of selected strains and original cultivars.

Trait	Origin in Russia			Origin in Japan		
	Selected strain	Original cultivar	P ⁴⁾	Selected strain	Original cultivar	P ⁴⁾
Date of head emergence ¹⁾	29.9	28.9	0.65	33.4	33.3	0.98
Winter hardiness ²⁾	5.0	4.9	0.41	5.1	5.1	0.97
Plant vigor in autumn ²⁾	4.7	4.6	0.47	5.1	5.8	<0.01
Leaf streak ²⁾	3.4	4.0	0.03	2.8	2.8	0.94
Stem rust ³⁾	6.0	6.1	0.66	5.6	5.5	0.86
Freezing tolerance(LT ₅₀ :°C)	-19.3	-20.2	-	-19.6	-18.9	0.27

1) Date from 1st May. 2) 1:very poor-9:very good. 3) 1:resistance-9:susceptible.

4) Probability by t-test between selected strains and original cultivars.

季の生育特性と耐凍性や耐雪性との関連を明らかにして、今後さらに高度な越冬性を示す系統を育成するための指標とする。

イ. 研究方法

1. イネ科牧草日ロ交雑系統の日本およびロシアでの収量性と生育特性の評価

1) オーチャードグラス「北海28号」の日ロ両地域での収量性の評価

北農研およびロシア・バビロフ研バプロフスク試験地で、オーチャードグラスの「北海28号」、「北海29号」、「ワセミドリ」を1区条長4.0m×条間0.3m×4条=4.8m²,4反復で播種した。播種日は、北農研は2002年5月15日、バビロフ研は同年6月27日で、播種量は200g/aとした。収量性と生育特性を評価した。

2) オーチャードグラスのロシア現地選抜系統の生育特性

ロシア・バビロフ研において、オーチャードグラスの北農研育成品種・系統（日本品種）10点とロシア品種10点の計800個体を1997～1999年の3年間特性調査した。2001年春にこれらの品種・系統から越冬性に優れた個体を選抜して、圃場内において放任条件で多交配して、品種・系統ごとに採種しこれを選抜系統とした。選抜系統20点と原品種20点を2002年7月4日に1区0.6×0.8m,15個体2反復で北農研圃場に定植した。特性調査は、遺伝資源特性調査マニュアルにしたがって実施した。耐凍性検定は、日本品種8点とロシア品種2点および選抜系統10点合計20点を供試して、2002年12月に実施した。温度処理は5段階で、処理後3週目に生死を判断して半数個体致死温度（LT₅₀）を算出した。

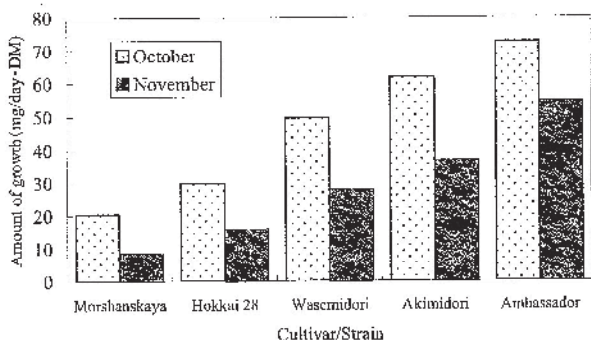


Fig. 2-14. Amount of growth in autumn for orchardgrass cultivars.

3) メドウフェスク日ロ交雑系統の生育特性の評価

メドウフェスクのロシア遺伝資源の耐凍性および雪腐病抵抗性検定で生存した7個体を、2001年に「ハルサカエ」と交雑して個体ごとに採種した。この日ロ交雑系統7点と原品種7点および「ハルサカエ」を2003年6月にロシア・バビロフ研において1区10個体4反復で定植した。2004年に生存率などを調査した。2004年12月に北農研において、日ロ交雑系統7点と「ハルサカエ」を供試して、耐凍性検定を実施した。温度処理は5段階で、処理後3週目に生死を判断して半数個体致死温度（LT₅₀）を算出した。

4) 耐凍性、耐雪性に優れた新たなイネ科牧草の育種素材の開発

2001年8月8日に耐凍性に優れたオーチャードグラスの日ロ交雑系統「北育78号」、「同79号」、「同80号」、「同81号」、「同82号」を計2511個体定植し、2002年6月に越冬性と秋の草勢および黒さび病抵抗性に優れた個体を選抜して、早生と中生の2群に分けて多交配し集団採種した。この2系統を2002年10月9日に定植し、2004年6月に越冬性と耐病性に優れた個体を選抜し多交配し早生と中生の2系統を育成した（越冬性選抜系統）。また、2000年12月に「北海28号」、「北育78号」、「北育81号」の3系統について、各処理につき60個体を供試して-24,-25,-26℃の温度処理をして、もっとも低い温度で生存した個体を選抜した。さらに生存個体を2002年6月に多交配して、2002年12月に同様の温度処理をして2回目の選抜を実施した。これらの個体を2004年6月に交配して、3系統を育成した（耐凍性選抜系統）。これらの5系統について、2004年12月に耐凍性検定を実施するとともに、冠部の糖含

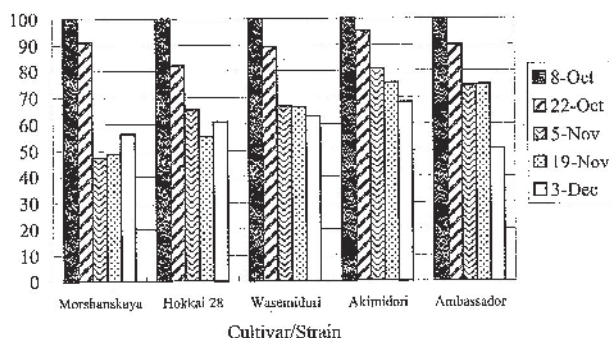


Fig. 2-15. Ratio of etiolated growth at 1st week against total etiolated growth in autumn.

量を測定した。

2. イネ科牧草の耐凍性・耐雪性育種素材の生理的特性

オーチャードグラスの越冬性の異なる5品種を供試して、2002年7月25日にペーパーポットに播種し同年9月9日に圃場に1区50個体2反復で定植した。2週おきに5個体を採取し、茎葉を地際から3cmで切除した個体をパーミキュライトを詰めたシードリングケースに移植して、25℃の暗黒条件で数週間培養して1週ごとに再生量を測定した。同時に圃場から4個体を採取して、冠部（地際より3cm）と根部（地際より5cm）の可溶性糖含量、乾物率、乾物重を測定した。12月3日に耐凍性（LT₅₀）を前報と同様の方法で調査した。融雪後の2003年4月に、越冬性と生存率を調査し、さらに冠部と根部を採取し糖の残存量を測定した。

ウ. 結果及び考察

1. イネ科牧草日ロ交雑系統の日本およびロシアでの収量性と生育特性の評価

1) オーチャードグラス「北海28号」の日ロ両地域での収量性の評価

「北海28号」の越冬性は、日ロ両地域において標準品種「ワセミドリ」より優れた (Table 2-12)。収量は、北農研では1番草は「ワセミドリ」より高かったが、2番草以降は「ワセミドリ」より低く、合計では「ワセミドリ」より低かった。ロシア・バビロフ研では、「北海28号」の収量は「ワセミドリ」並みかやや低かった。以上の結果から、「北海28号」は越冬性と1番草収量は「ワセミドリ」より優れるが、2番草以降の生育が劣るために年間合計では「ワセミドリ」より低収となることが明らかとなった。一般に高緯度地域で育成された品種は、日長に反応して早期に休眠に入り、夏以降は生育が低下することが知られている (阿部 1986)。「北海28号」の構成栄養系8点のうち5点がロシア品種由来であり、原品種と同様に秋季の休眠開始が早いと考えられた。今後、ロシア遺伝資源を活用して越冬性の改良を図るためには、北農研など中緯度原産の素材と交雑し、季節生産性を考慮して循環選抜を行う必要があると

Table 2-14. Freezing tolerance and growth habit of meadow fescue strains crossed between Harusakae and Russian germplasms.

Cultivar/ Strain	Original cultivar	NARCH Freezing tolerance (LT ₅₀ , °C)	VTR			
			Survival rate (%)		Percentage of vigorous plants (%)	
			Crossed strain	Original cultivar	Crossed strain	Original cultivar
R14	Wild (Ivanovo)	-23.4	85.4	91.6	85	80
R17	Tulunskaja	-22.5	81.2	83.3	100	55
R39	Majkupskaja-5	-23.6	81.2	77	85	81
R42	Wild (Tyumen)	<-24.0	95.8	75	84	84
R51	Wild (Altai)	-19.7	95.8	93.7	85	71
R55	Wild (Kuibyshev)	-22.3	95.8	89.6	85	58
R72	Wild (Altai)	<-24.0	100	81.2	82	62
Harusakae	-	-23.3	-	92.6	-	83

Table 2-15. Freezing tolerance and soluble sugar content of new strains bred from Russian germplasms.

Cultivar/Strain	Maturity	Freezing tolerance LT ₅₀ (°C)	Soluble sugar content in crown (mg/gFW)		
			Mono and disaccharide	Fructan	Total
Selected by winter hardiness	Early	-18.3	16.8	50.1	66.9
Selected by winter hardiness	Medium	-17.9	14.8	42.5	57.3
Selected by freezing tolerance	Early	-18.6	12.3	55.0	67.3
Selected by freezing tolerance	Medium	-17.5	13.0	45.4	58.4
Hokkai 28 freezing tolerance selection	Early	-18.1	7.8	38.7	46.6
Hokkai 28	Early	-17.2	13.8	23.0	36.8
Wasemidori	Early	-16.8	13.6	27.7	41.3
Leningradskaya	Early	-19.3	11.6	37.3	48.9
Dzhegutinskaya	Early	-17.8	15.3	55.3	70.5
Harujiman	Medium	-16.4	11.5	42.7	54.2
CV(%)		7.2	27.6	27.6	26.6
L.S.D.(0.05)		-0.2	ns	13.8	15.8

考えられた。

2) オーチャードグラスのロシア現地選抜系統の生育特性

ロシア選抜系統の越冬性は、原品種と大差はなかった(Table 2-13)。選抜系統の特性を由来品種ごとに比較すると、ロシア品種由来の選抜系統はすじ葉枯れ病の罹病程度が原品種より低かった。ロシア品種は、これまでの研究で越冬性は優れているが、耐病性が劣ることが明らかとなっている

(Nakayama and Abe 1996)。耐病性に優れた日本品種との交雑により、ロシア品種のすじ葉枯れ病抵抗性が改良された。一方、日本由来の選抜系統は秋の草勢が原品種より有意に劣り、耐凍性は原品種よりやや向上した。耐凍性は、一部の系統では約1℃改良されており、現地選抜とロシア品種との交雑の効果が現れていた。ロシアでの現地選抜は、越冬性の改良には効果は無かったが、日本品種の耐凍性の改良には効果が認められた。これらの系統は、越冬性改良のための素材として活用できると考えられた。越冬性をさらに改良するためには、現地選抜を活用するとともに循環選抜を取り入れる必要があると考えられた。

3) メドウフェスク日ロ交雑系統の生育特性の評価

ロシア遺伝資源と「ハルサカエ」を交雑した系統(日ロ交雑系統)の耐凍性は、R42とR72の2系統が「ハルサカエ」より優れ、生存率も「ハルサカエ」より優れた(Table 2-14)。また、日ロ交雑系統の草勢は、いずれの系統も原品種より優れた。ロシアでは越冬性は調査されていないので、生存率や草勢を越冬性の指標とすると、日ロ交雑系統はいずれも原品種より越冬性が向上した。メドウフェスクについても、オーチャードグラスと同様にロシア遺伝資源との交雑により耐凍性や越冬性の向上が確認されたので、今後はロシア遺伝資源を活用して高度な越冬性を示すメドウフェスク系統の育成が期待される。この場合についても季節生産性を考慮して選抜を進める必要があると考えられる。

4) 耐凍性、耐雪性に優れた新たなイネ科牧草の育種素材の開発

2000年に育成した日ロ交雑系統について、越冬性と耐凍性について2回の循環選抜を実施した。越冬性による選抜については、季節生産性を考慮して秋の草勢に優れた個体を選抜したが、耐凍性は耐凍性選抜系統と比較して同程度であった(Table 2-15)。このことは、秋季の生育性に優れ越冬性と耐凍性にも優れた系統が育成可能であることを示唆している。

Table 2-16. Seasonal changes in soluble sugar content of crown in orchardgrass cultivars.

Cultivar/Strain	Soluble sugar content (mg/g FW)									Freezing tolerance (LT ₅₀ , °C)
	8-Oct			5-Nov			3-Dec			
	Mono and disaccharide	Fructan	Total	Mono and disaccharide	Fructan	Total	Mono and disaccharide	Fructan	Total	
Morshanskaya	11.8	30.7	42.5	19.2	34.9	54.1	44.4	82.3	126.7	-22.6
Hokkai 28	16.3	52.8	69.1	20.7	42.9	63.6	33.0	87.6	120.6	-20.3
Wasemidori	13.4	44.1	57.4	25.2	35.8	61.0	36.7	53.3	90.0	-19.6
Akimidori	9.0	30.7	39.7	24.6	47.9	72.4	36.4	57.8	94.2	-16.8
Ambassador	7.1	28.2	35.3	20.8	59.8	80.6	42.5	93.2	135.7	-17.3
L.S.D.(0.05)	3.6	20.5	28.6	5.9	23.5	26.0	ns	ns	ns	-1.7

Table 2-17. Soluble sugar content after wintering and winter hardiness in orchardgrass cultivars.

Cultivar/Strain	Provenance	Crown			Root		Survival rate %	Winter hardiness ²⁾
		Soluble sugar content mg/gFW	Residual rate ¹⁾ %	Consumed sugar mg/gFW	Soluble sugar content mg/gFW	Residual rate ¹⁾ %		
Morshanskaya	Russia	12.4	9.8	114.3	4.8	10.3	100.0	5.8
Hokkai 28	NARCH	12.5	10.4	108.1	3.8	7.4	95.0	5.4
Wasemidori	NARCH	7.3	8.2	82.6	2.2	3.4	82.5	4.8
Akimidori	NIRGS	6.3	6.7	87.9	2.5	8.5	87.5	2.9
Ambassador	U.S.A.	5.0	3.7	130.7	4.5	8.3	82.5	3.4
L.S.D.(5%)		5.6	4.2	26.2	ns	ns	*	0.8
Date		11-Apr	11-Apr		11-Apr	11-Apr	18-Apr	18-Apr

1) Soluble sugar content after wintering / soluble sugar content before wintering × 100. 2) 1:(very poor)-9:(very good).

今後は、この系統を栽培し季節生産性を評価する必要がある。また、「北海28号」を耐凍性について選抜率4~5%で2回選抜した系統では、耐凍性が0.9℃向上し、糖含量が約27%増加した。幼苗を利用した耐凍性検定による選抜効果はこれまでも確認されている(大同・寺田1986)ので、今後もこの方法を活用して効率的に育種を進めることができると考えられた。

2. イネ科牧草の耐凍性・耐雪性育種素材の生理的特性

耐凍性の高い「Morshanskaya」と「北海28号」は耐凍性の低い「アキミドリ」と「Ambassador」に比べて、秋季(10月と11月)の生育量は少なかった(Table 2-16, Fig. 2-14)。秋季に生育を停止する時期は各時期の暗黒下再生量に占める1週目の比率から推測できる(Moriyama et al. 2003)。高度耐凍性の「Morshanskaya」は11月5日に、「北海28号」は11月19日に1週目の再生量が低下した(Fig. 2-15)。一方「ワセミドリ」、「アキミドリ」、「Ambassador」の3品種は12月3日に1週目の再生量が低下した。これらの結果から、高度耐凍性2品種は11月上旬から中旬に休眠に入り、他の3品種より休眠開始が早いことが明らかとなった。この結果は、収量性評価試験で「北海28号」の秋季の生育が劣ったことと一致する。冠部の糖含量は、いずれの品種も12月3日にもっとも含量が高くなった(Table 2-16)。耐凍性と糖含量との関連は、明確ではなかった。

越冬前後の冠部の糖含量を比較すると、「Morshanskaya」と「北海28号」は糖の消費量は高かったが、越冬後の糖の残存量と残存率が高く、越冬性と生存率も高かった(Table 2-17)。

「Ambassador」は、越冬前は糖含量が高かったが越冬後は糖含量が低く、越冬性は劣った。これらの結果から、オーチャードグラスの越冬性の良否は越冬後の糖の残存量と関連があると示唆された。したがって、オーチャードグラスの越冬性を改良するためには、越冬後の糖の残存量を高めるように選抜を行う必要があると考えられた。糖は牧草の再生のための養分として利用されるので、糖が多く残っている品種は融雪後の再生が良好であると推察される。このような形質は、根雪期間の長い多雪地帯やアイスシート害の発生する道東向けに重要であると考えられる。オーチャードグラスは、チモシーに比べて低温・低酸素条件に対する耐性が低く糖の消費が多い

ことが報告されている(Bertrand et al, 2003)。また、コムギの冠部の糖含量と糖の組成は、耐凍性や雪腐病抵抗性と密接に関連していることが知られている(Yoshida et al 1998)。オーチャードグラスの越冬性を改良するためには、越冬前の糖含量を高めて越冬中の糖消費量を低下させることが必要であり、そのためには越冬中の糖代謝などについて生理学的な研究をさらに進める必要がある。

エ. 今後の問題点

ロシア遺伝資源を利用した系統は、越冬性は優れたが夏以降の生育が劣った。ロシア遺伝資源を利用する場合は、合成品種の構成栄養系に直接利用するのではなく、北農研の素材と交雑して表現型循環選抜法などにより選抜を繰り返して育種を進める必要がある。

オ. 要約

ロシア遺伝資源を利用した「北海28号」の収量性を日ロ両地域で評価した。「北海28号」の収量は、北農研では「ワセミドリ」より低く、バビロフ研では「ワセミドリ」並みであった。「北海28号」は、夏以降の収量が低かった。

オーチャードグラスの日ロ交雑系統の越冬性を北農研で評価したところ、原品種と同程度であった。メドウフェスクの日ロ交雑系統の特性をバビロフ研で評価したところ、生育は原品種より良好であった。オーチャードグラスの日ロ交雑系統から、耐凍性に優れる素材を育成した。

耐凍性に優れるロシア品種「Morshanskaya」と「北海28号」は、秋季の休眠開始が「ワセミドリ」より早かった。「Morshanskaya」と「北海28号」は、越冬後の糖の残存量が「ワセミドリ」より多く、越冬性が「ワセミドリ」より優れた。越冬後の糖の残存量と越冬性について関連が見られた。

カ. 引用文献

- 1) 阿部二郎(1986): 寒地型イネ科牧草の耐凍性と雪腐病抵抗性に関する品種間変異. 北海道農試研報, 146, 89-143.
- 2) Bertrand, A., Y. Castonguay, P. Nadeu, S. Laberge, R. Michaud, G. Belanger and P. Rochette(2003): Oxygen deficiency affects carbohydrate reserves in overwintering forage crops. J. Exp. Bot., 54, 1721-

1730.

- 3) 大同久明・寺田康道(1986):メドウフェスク耐寒性
幼苗検定法と選抜効果. 北草研報, 20, 239-241.
- 4) Moriyama, M., J. Abe and M. Yoshida (2003):
Etiolated growth in relation to energy reserves and
winter survival in three temperate grasses. Euphytica
129, 351-360.
- 5) Nakayama, S. and J. Abe (1996): Winter hardiness in
orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations
introduced from former USSR. J. Japan. Grassl. Sci.,
42, 235-241.
- 6) 新発田修治・嶋田徹(1986): 土壤凍結地帯における
オーチャードグラスの越冬性と体内成分の関係
I. 貯蔵性炭水化物含有率, 耐凍性および雪腐病抵抗
性の品種間変異. 32, 102-108.
- 7) Yoshida, M., J. Abe, M. Moriyama and T. Kuwabara
(1998): Carbohydrate levels among winter wheat
cultivars varying in freezing tolerance and snow mold
resistance during autumn and winter. Physiol. Plant.,
103, 8-16.

(眞田康治・高井智之・Vladimir F. Chapurin・
田村健一・山田敏彦)

Development of Breeding Materials for the Improvement of Freezing Tolerance and Snow Mold Resistance in Orchardgrass and Meadow Fescue

Yasuharu Sanada¹⁾, Tomoyuki Takai,^{1,2)}
Vladimir F. Chapurin³⁾, Ken-ichi Tamura¹⁾
and Toshihiko Yamada^{1,4)}

¹⁾National Agricultural Research Center
for Hokkaido Region

²⁾Nagano Prefectural Livestock Experiment Station

³⁾N. I. Vavilov Research Institute of Plant Industry

⁴⁾Hokkaido University Field Science Center
for Northern Biosphere

S u m m a r y

Productivity of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) cultivar "Hokkai 28" which was bred from Russian germplasm was evaluated at two locations in Japan and Russia. Total yield of "Hokkai 28" for two years was lower than that of "Wasemidori" at NARCH in Japan and was equal to "Wasemidori" at VIR in Russia. The yield of "Hokkai 28" from summer to autumn was lower than that of "Wasemidori"

New strains of orchardgrass and meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) were developed by the cross between Japanese and Russian cultivars. Winter hardiness of crossed strains in orchardgrass was equal to the original cultivars at NARCH in Japan. Survival rate of crossed strains in meadow fescue was higher than that of the original cultivars at VIR in Russia.

New strains which showed high freezing tolerance were developed from populations crossed between Japanese and Russian cultivars by the recurrent selection for winter hardiness and freezing tolerance in orchardgrass.

The start of fall dormancy of "Morshanskaya" and "Hokkai 28" which showed high freezing tolerance was earlier than that of "Wasemidori". "Morshanskaya" and "Hokkai 28" which showed higher winter hardiness than "Wasemidori" had more water soluble

carbohydrate than "Wasemidori" after wintering. The amount of the residual of water soluble carbohydrate in the crown after wintering was related to the degree of winter hardiness in orchardgrass.

北海道プロジェクト研究成果シリーズNo.3

平成 18 年 3 月 24 日 印刷
平成 18 年 3 月 30 日 発行

北海道農業研究センター
062-8555 札幌市豊平区羊ヶ丘 1 番地 電話(011)851-9141
印刷 株式会社 サンキ
065-0012 札幌市東区北 12 条東 5 丁目 電話(011)711-2800

本研究成果から転載・複製する場合は、北海道農業研究センターの許可を得て下さい。