

学 位 論 文 要 旨

氏 名 磯部 祥子

題 目 アカクローバ(*Trifolium pratense* L.)における DNA マーカーの開発とその育種的利用に関する研究 (Development of DNA markers of red clover (*Trifolium pratense* L.) and its potential to breeding)

本研究は選抜 DNA マーカーを用いたアカクローバ育種法の開発の資とすることを目的として、第一に交雑育種法による新品種の育成と育種素材の開発について論じ、第二に RFLP およびマイクロサテライト配列を利用した DNA マーカーの開発と連鎖地図の作成を行い、第三に開発した DNA マーカーの育種素材に対する応用性の検証を行った。

1. 母系選抜法を用いて永続性とチモシーに対する混播適性に優れるアカクローバ品種「ナツユウ」を育成した。

2. 4 倍体アカクローバと近縁野生種ジグザグクローバの種間雑種に 4 倍体アカクローバによる戻し交雑を 4 回行い、圃場における戻し交雑後代の稔性と永続性を評価した。戻し交雑第 4 代はアカクローバ永続性改良の育種素材として有用であった。

3. cDNA 由来の RFLP マーカーと戻し交雑集団を用いて 158 座による全長 535.7cM のクローバ属で初となる連鎖地図を作成した。

4. マイクロサテライトマーカーを中心とした 1434 座による全長 868.7cM の高密度連鎖地図を作成した。また、マメ科モデル植物 *Lotus japonicus* と *Medicago truncatula* とのマクロシンテニーを明らかにした。

5. マイクロサテライトマーカーは多型性が高く、異なるマッピング集団間における連鎖地図上の位置が安定していることから、育種素材に対する応用性が高いことが明らかとなった。

6. 菌核病抵抗性を中心とした越冬性に関する QTL 解析を行い、異なる集団間の QTL の位置を比較した。LG6 上の QTL は越冬性に関する選抜マーカーの候補領域として最も有力であると考えられた。

以上より、本研究においてはアカクローバの DNA マーカーと連鎖地図を作成し、交雑育種法との比較を交えながら育種的利用法について考察した。本研究の成果は DNA マーカーを用いた効率的なアカクローバ育種法の開発の基盤となる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Sachiko ISOBE

題 目 Development of DNA markers of red clover (*Trifolium pratense* L.) and its potential to breeding (アカクローバ(*Trifolium pratense* L.)における DNA マーカーの開発とその育種的利用に関する研究)

With the aim of facilitate the red clover breeding methodology with DNA markers, we developed DNA markers of red clover and estimated its potential to breeding.

1. 'Natsuyu', a new diploid variety of red clover (*Trifolium pratense* L.), was developed by maternal line selection.
2. We hybridized zigzag clove (*T. medium*, $2n=80$) and red clover (*T. pratense*, $2n=28$) backcrossed four times to red clover (BC₁, BC₂, BC₃, and BC₄), and assessed the backcross progenies for seed production and vigor under field conditions.
3. To facilitate basic and applied genetics in red clover, we constructed a genetic linkage map of red clover (*Trifolium pratense* L., $2n=2x=14$) using RFLP markers from cDNA probes of a backcrossed mapping population.
4. We generated a high-density genetic linkage map with gene-associated microsatellite markers.
5. RFLP and microsatellite markers were investigated their transferability to other red clover germplasm. The microsatellite markers were considered to have high transferability and universality to breeding materials.
6. QTL analysis for winter hardiness and *Sclerotinia trifoliorum* resistance was performed with the RFLP and microsatellite linkage maps.

In conclusion, we developed RFLP and microsatellite markers and constructed two linkage maps of red clover. Our result suggested that the information had high potential to improve red clover breeding methodology.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	磯部 祥子
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 明石 良
	副査 宮崎 大学 教授 藪谷 勤
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 宮崎 大学 教授 赤尾 勝一郎
	副査 佐賀 大学 助教授 鈴木 章弘
審査協力者	かずさDNA研究所 副所長 田畑 哲之
題目	アカクローバ (<i>Trifolium pratense</i> L.) におけるDNAマーカーの 開発とその育種的利用に関する研究 (Development of DNA markers of red clover (<i>Trifolium pratense</i> L.) and its potential to breeding)
<p>アカクローバ (<i>Trifolium pratense</i> L.) は、世界の冷涼地帯において栽培されるマメ科牧草であり、わが国では北海道を中心にイネ科牧草と混播栽培され、家畜の飼料として利用されている。しかしながら、アカクローバは永続性に劣り草地荒廃の原因となりやすいことから、永続性を向上した新品種の育成が求められている。ところが、アカクローバは自殖率が低く、従来の交雑育種法を用いた育種では選抜の効率化が困難であり、育種の効率化を図るためにはゲノム情報を生かした新しい育種法の開発が期待されている。本研究はアカクローバの交雑育種法における有用性とその問題点を明らかにするとともに、本種におけるDNAマーカーの開発と連鎖地図の作成を行い、DNAマーカーの育種的利用への可能性を検証したものである。</p> <p>初めに、永続性とチモシーとの混播適性に優れているアカクローバ新品種「ナツユウ」を交雑育種法により育成し、その諸特性について明らかにした。「ナツユウ」は母系選抜により育成された4母系の多交配による品種であり、永続</p>	

性と混播適性は従来の基幹品種「ホクセキ」に比べて優れていた。しかしながら、この育成には 20 年を要したため、育成年限を短縮するための新たな育種法の改良が必要であると考えられた。また、交雑育種法による育種素材の開発として、近縁野生種ジグザグクローバとアカクローバの種間雑種を利用した永続性育種素材の作出も試みた。その結果、アカクローバによる戻し交雑を 4 回行うことで雑種弱勢が回復し稔性と永続性が向上した。しかしながら、ジグザグクローバの優良形質である地下茎をアカクローバに導入することが困難であったことから、野生種の優良形質のみを効率的に導入する方法の開発が必要となった。

次に、アカクローバの RFLP マーカーおよびマイクロサテライト (SSR) マーカーを開発し連鎖地図の作成を試みた。RFLP マーカーは、アカクローバの cDNA クローンをプローブとして 249 のマーカーを開発し、戻し交雑集団を用いて連鎖解析を行ったところ、158 座による全長 535.7cM の連鎖地図を作成することができた。一方、SSR マーカーについては、ゲノムおよび cDNA SSR 濃縮ライブラリー、メチルフィルトレーションゲノムライブラリーおよび均一化 cDNA ライブラリー由来の配列から 1577 のマーカーを開発した。これらのマーカーと 167 RFLP マーカーを含む 1724 マーカーを用い、 F_1 集団で解析したところ、1434 座による全長 868.7cM の高密度連鎖地図を作成することができた。また、マメ科モデル植物 *Lotus japonicus* と *Medicago truncatula* とのマクロシンテニーの存在も明らかにすることができた。

最後に、開発した DNA マーカーを用いて、連鎖地図を作成した戻し交雑集団および F_1 集団を用いて、札幌とロシア・モスクワにおいて菌核病抵抗性を中心とした越冬性に関する QTL 解析を行った。その結果、両連鎖地図ともに第 6 連鎖群 (LG6) 上に越冬性に関する QTL が多く検出され、これらの QTL は越冬性に関する選抜マーカーの候補領域として最も有力であると考えられた。

以上のことから、本研究は交雑育種法により育成された品種の特性解明とアカクローバ由来 DNA マーカーの開発およびこれを基にした連鎖地図の作成、さらにはこの連鎖地図から越冬性に関する QTL 解析を行い、その育種的利用法について考察した。このような成果は、アカクローバにおける DNA マーカーを用いた効率的な育種法の開発およびその研究基盤となるものであり、本研究論文は学位論文として十分価値あるものと判断した。

学力確認結果の要旨	
学位申請者 氏名	磯部 祥子
審査委員	主査 宮崎 大学 教授 明石 良
	副査 宮崎 大学 教授 藪谷 勤
	副査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 宮崎 大学 教授 赤尾 勝一郎
	副査 佐賀 大学 助教授 鈴木 章弘
審査協力者	かずさDNA研究所 副所長 田畑 哲之
実施年月日	平成 18年 7月 13日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="radio"/> 口答 <input checked="" type="radio"/> 筆答	
<p>主査、副査および審査協力者の6名は、平成18年7月13日の公開審査会において、学位論文申請者に対し学位申請論文についての説明を求め、その内容および関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>また、筆記により、外国語(英語)の学力を確認した。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士(農学)の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。</p>	

学位申請者
氏名

磯部 祥子

[質問 1] QTL解析において菌核病抵抗性を中心に解析を行った理由は。

[回答 1] 越冬性は寒冷地におけるアカクローバの永続性に関わる重要な形質であり、特に積雪下において進行する菌核病は永続性および収量性に大きなダメージを与える。また、菌核病抵抗性は抵抗性検定の手法が確立していることから、菌核病抵抗性に関するQTL解析を行った。

[質問 2] DNAマーカーを利用することで、育種の年数の短縮はどの程度可能か。

[回答 2] DNAマーカーの利用により、最低4~5年はかかる永続性の評価は大幅に短縮できるものと考えられる。また、本論文において育成した「ナツユウ」は4回の選抜を行うことで育成に20年を要したが、DNAマーカーによる選抜を組み込むことで育成年数を10年程度に短縮することが可能であると考えている。

[質問 3] アカクローバがチモシーを抑圧する問題に対して、栽培法で対応することはできないのか。

[回答 3] チモシーに対するアカクローバの推奨播種量は、アカクローバの抑圧問題が表面化してから減少が続き、現在の推奨播種量はチモシー：アカクローバ=5:1となっている。これ以上の播種量の減少は草地の安定維持にとって危険であるため、栽培法による対処は難しいものと考えられる。そのため、育種による問題の解決が望まれている。

[質問 4] マッピング集団にロシアの材料を使った理由を述べよ。

[回答 4] ロシアは広大な国土を有することから様々な環境に適応した遺伝資源を保有しており、かつアカクローバ育種の歴史が日本に比べて長いことから保有遺伝資源に関する造詣が深い。マッピング集団はQTL解析への応用を含め、遺伝子型や越冬性などの形質が分離する必要があることから、ロシアの優れた遺伝資源から両親個体を選抜した。

[質問 5] QTL解析により遺伝子を同定した後に遺伝子組換え体を作成することは可能か。

[回答 5] アカクローバは培養系が確立されており、遺伝子組換え体の作出は可能である。しかしながら、アカクローバの改良形質である越

冬性のような効果の小さいQTLが多数関与している形質においては、異なる種類の遺伝子を多数導入する必要があるため、現実の遺伝子組換え技術では不可能である。したがって、このような形質に対してはDNAマーカーによる選抜育種が有効であるものと考えられる。

[質問6] 種間雑種を戻し交雑したとき、異なる種間で染色体対合が生じた可能性は考えられるか。

[回答6] 本研究において染色体対合に関する評価を行っていないので、可能性は否定できないが、理論的には染色体対合は生じていないと考える。その理由として、種間交雑に用いた材料が10倍体のジグザグクロバと4倍体のアカクロバであり、戻し交雑に4倍体のアカクロバを用いたことから、染色体対合が生じた可能性は低いものと考えられる。

[質問7] 異なる集団由来の連鎖地図を比較した場合、マーカーの位置が移動していた理由は何か。

[回答7] 異なる連鎖地図間におけるマーカーの位置の移動については、ソフトウェアによる計算アルゴリズムの問題と染色体置換など染色体の構造変化の2つの理由が考えられる。ソフトウェアの影響については、計算法の違いでマーカー位置が異なることを確認している。また、本研究においてマッピング集団の両親間で染色体の構造変化がFISH解析により観察された。このことから、個体間の染色体構造の違いは高い割合で起きていることが推定される。一方、マーカー位置の移動が計算法と構造変化のどちらに起因するかという問題に対する推定は困難であるが、複数のマッピング集団による連鎖地図の比較を重ねることで、ある程度の推定を行えるものと考えられる。

[質問8] 効果の小さいQTL解析結果の信頼性はどの程度であるか。

[回答8] 例えば、効果が小さくかつ環境要因の影響を受けやすい形質のQTLの位置は、単独の評価や解析結果における信頼度は低いものと考えられる。しかしながら、複数の集団や形質の評価手法を用いたり、形質の評価回数を重ねることにより、同一箇所に同一の方向性を持つQTLが検出されることを確認することで、効果の小さいQTLにおいても信頼度を上げることが可能と考えられる。