

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

磯部祥子

2006

目 次

序 章

第1章 交雑育種法によるアカクローバ永続性向上のための育種的展開

第1節 アカクローバ品種「ナツユウ」の育成とその特性

1. 緒 言
2. 材料および方法
3. 結 果
4. 考 察
5. 摘 要

第2節 野生種との種間雑種を利用した育種素材の開発

6. 緒 言
7. 材料および方法
8. 結 果
9. 考 察
10. 摘 要

第2章 アカクローバにおける DNA マーカーの開発と連鎖地図の作成

第1節 RFLP マーカーによる連鎖地図の作成

1. 緒 言
2. 材料および方法
3. 結 果
4. 考 察
5. 摘 要

第2節 マイクロサテライトマーカーによる連鎖地図の作成

6. 緒 言
7. 材料および方法
8. 結 果
9. 考 察
10. 摘 要

第3章 アカクローバにおける DNA マーカーの育種的利用法

第1節 RFLP およびマイクロサテライトマーカーの育種素材への応用性

1. 緒言
2. 材料および方法
3. 結果
4. 考察
5. 摘要

第2節 アカクローバの越冬性に関する QTL 解析

1. 緒言
2. 材料および方法
3. 結果
4. 考察
5. 摘要

第4章 総合考察

要約

英文要約

謝辞

引用文献

序 章

Trifolium 属は約 250 種あり、そのうち約 25 種が栽培作物として利用され、中でもアカクローバ (*Trifolium pratense* L.) は多年生のマメ科作物に分類される (福岡ら 1985)。日本で栽培されている *Trifolium* 属は主にアカクローバとシロクローバ (*T. repens*) で牧草として利用されている。そのほか、アルサイクローバ (*T. hybridum*)、クリムソンクローバ (*T. incarnatum*)、アローリーフクローバ (*T. vesiculosum*) などが牧草、緑肥、景観作物として栽培されている。*Trifolium* 属の原産地はユーラシア大陸が 61% でアメリカ大陸が 26%、アフリカ大陸が 13% と 3 大陸に広く分布し、その生態も 1 年生から多年生、自殖生から他殖性と多岐にわたる。

アカクローバはユーラシア大陸東南部および地中海沿岸が原産地で、西暦 3~4 世紀にはヨーロッパで栽培が行われており、13 世紀にはスペインで最初の品種が育成されたことが記録されている (Sjodin 1966, Merckenschleager 1934)。本種は初期生育や再生が旺盛で、収量性が高く、耐酸性土壌や耐湿性に優れ、栽培が容易であるなどの特性から 16 世紀にはヨーロッパを中心に栽培地が広がり、その後アメリカ大陸、オセアニア大陸へと伝播していった。また、本種は飼料作物としてのみならず、三圃式休閑地の解消など土壌改良草として近代農業の発展に不滅の功績を残している (山田 1963)。

アカクローバは真正クローバ (True clover) として 3 小葉、頭状花、筒状小花などの特徴があり、主茎は伸長せず冠部から叢生する分枝と太く長い直

根をもつ (Leffel 1963、山田 1963)。本種の生殖様式は、他殖性で自殖率が極めて低く、通常ヘテロ接合体であるため形質の変動が大きい。個体の生存期間は3年程度とされており、一般に多年生 (perennial) として分類されるものの、2年で枯死する個体もしばしば見受けられることから、短年性 (short-lived perennial) に分類される場合もある。染色体数は野生種が2倍体 ($2n=14$) であるのに対して、多収性や永続性向上のために染色体を倍加した4倍体の栽培品種も育成されている (山口ら 2000)。

アカクローバが牧草として最初に日本へ導入されたのは1874年 (明治7年) で、開拓使により北海道の七重開墾場で試作が開始された (村上 1967)。1914年 (大正3年) には牧草および緑肥作物として北海道の普及奨励種となり、その後本種の栽培が北海道・東北を中心に広がった (我有 1998)。しかしながら、アカクローバは耐暑性に劣るため関東以南では作付面積が少なく、現在の主たる栽培地は北海道であり、道内においてはマメ科牧草種子流通量の約45%を占めている (北海道農政部 2005)。その主な利用法は採草用であり、イネ科牧草チモシーとの混播栽培が最も一般的である。

アカクローバを初めとするマメ科牧草は草地の収量性を向上させ、根粒菌との共生による空中窒素の利用によって肥料費を削減させるなど草地の生産性向上に寄与する。また、一般にマメ科牧草はイネ科牧草に比べてタンパク質とミネラル含有量が高いため、飼料の品質と栄養バランスや嗜好性の向上にも寄与する (Taylor and Quesenberry 1996)。さらに、アカクローバは人体の必須栄養素である α -リノレン酸の生乳中における割合を高めるなど高機能成分

保有に関する特性も着目されつつある (Dewhurst ら 2003)。

一方、アカクローバは永続性に劣り草地から消失しやすいため、草地の栄養生産性を下げることが問題となっている。これは、北海道のみならず世界のアカクローバ栽培地帯における共通の問題であることから、アカクローバの永続性の改良が各国で試みられている。現在、OECD リストに登録されているアカクローバの品種数は 245 品種で、多国籍企業を中心とした民間会社や公的機関など様々な機関で育種が行われている。しかしながら、これまで育成された品種の永続性は長くて 4 年であり、草地の栄養生産性維持のためには少なくとも 1~2 年の生存年数の延長が必要とされている (我有 1998)。

日本の品種育成の歴史は浅く、1966 年に国産初のアカクローバ品種「サッポロ」が北海道農業試験場において、また「ハミドリ」が雪印種苗において育成されたのが始まりである。両品種は、いずれも多収性を育種目標として育成された早生品種であった。1970 年代から 80 年代にかけては、染色体倍加による永続性や収量性および耐病性の改良が注目され、国内では 4 倍体品種として北海道農業試験場で「タイセツ」が、雪印種苗で「ハミドリ 4n」が、ホクレンと海外種苗会社の共同で「ハヤキタ」がそれぞれ育成された (山口ら 2000)。しかしながら、これらの 4 倍体品種は採種性が低いために種子生産のコストが高く、イネ科牧草に対する競合力が非常に高いことから、現在ではほとんど栽培されていない。その後、「サッポロ」および「ハミドリ」の後継品種として、1989 年から 1993 年にかけて永続性を改良した 2 倍体早生品種「ホクセキ」(北海道農業試験場)、「エムアールワン」(三井東圧化学)、「マキミドリ」(雪印種

苗)が育成された(山口ら 2000)。現在、国内において「ホクセキ」および「マキミドリ」が最も広く栽培されている品種である。

先に述べた様に、永続性は一貫して改良すべき育種目標であるが、その他の育種目標は栽培体系の変化により変わりつつある。中でも収量性は、アカクローバの育種開始時から 1990 年代まで重要視された形質であり、1970 年代から 90 年代においては、海外導入品種を含めた全ての国内栽培品種は収量性の高い早生品種となった。しかしながら、その後北海道では混播相手であるイネ科牧草の草種が再生性に優れるオーチャードグラスから品質、越冬性に優れるが再生性に劣るチモシーへと変遷した。この様なことから、現在では「収量性」とは逆の選抜方向を必要とする「再生の穏やかな」アカクローバ品種が求められている。

アカクローバは自殖率が低く、優良個体の保持が困難であることから、集団選抜法あるいは母系選抜法といった育種法が用いられている。これらの育種法は品種のヘテロ性を維持しながら目的の形質について選抜を行う方法である。言い換えれば、系統内において目的形質に関する方向性を揃えつつ同時に多様な遺伝的背景をもつ個体を混在させなければならない。従って、他の育種法よりも目的形質に対する選抜効率が低い育種法であるとも言える。しかしながら、コントラクターによる大規模栽培から放牧を主体とする家族経営まで様々な酪農経営に伴う草地の栽培体系の多様化から、今日では社会情勢に応じた多彩な品種が求められており、様々な形質についてより効率的に選抜できる育種法の開発が望まれている。

近年のめざましいゲノム学の進展は植物の遺伝学にも劇的な変化を及ぼした。シロイヌナズナ、イネ、ミヤコグサなどのモデル植物を中心に大規模なゲノミック DNA や cDNA の塩基配列解読が行われ、遺伝子機能の解析が塩基配列を中心としてゲノムワイドに行われている。これらの情報は従来の遺伝学ではとらえることの出来なかった多くの知見をもたらし、新たな生物学的発見のみならず産業への応用として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 (Kang 2002)。現在、ゲノム情報を利用した育種法の開発には大きく外来遺伝子導入による遺伝子組換え体の作出と DNA マーカーを用いた有用形質の選抜 (MAS: Marker Assisted Selection) が考察されている。収量性やストレス耐性など重要な育種目標の多くは QTL (Quantitative Trait Loci: 量的遺伝子座) に支配されており、複数の遺伝子が複雑に関与している。そのため、これらの形質の改良には DNA マーカーを用いた MAS による改良が有効であると考えられている。

DNA マーカーとは遺伝子型の異なる系統、あるいは個体間のゲノムの塩基配列の違い (多型) をマーカーとしてゲノム上に目印をつけるものであり、多型の判別法により RFLP (Restriction fragment length polymorphism)、RAPD (Random amplified polymorphic DNA)、AFLP (Amplified fragment length polymorphism)、マイクロサテライト、SNP (Single nucleotide polymorphism) などいくつかの種類が存在する。塩基配列は生物種で大きく異なるため、配列の違いを検出する DNA マーカーは生物種ごとに作成するのが一般的である。作物を対象とした DNA マーカーの開発は 15 年ほど前からイネ、

トウモロコシ、ダイズなど主要作物を中心に行われてきた。しかしながら、DNA マーカーの開発は費用と技術を必要とすることから、主要作物以外の各作物ではその整備が遅れている。また、他殖性の牧草類は自殖性の作物に比べて遺伝様式が複雑であることから、イネなどで確立されたマーカーの開発法と応用理論を直接利用することが難しいため、マーカーの整備を一層遅らせる要因となっていた。*Trifolium* 属においても Barret ら (2004) や Herrmann ら (2006) による DNA マーカー開発の報告があるものの、公表されているマーカー数が極めて少なく、目的形質の選抜マーカーを開発するには十分でない。

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アカクローバの DNA マーカーの開発とその育種的利用法について論ずる。第一に、交雑育種法により混播適性と永続性を改良した新品種の育成と野生種との種間雑種を利用した育種素材の開発について述べ、交雑育種法の有用性と問題点を明かにした。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った。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と越冬性に関する QTL 解析を行い、DNA マーカーの育種的利用法について論述した。

第1章 交雑育種法によるアカクローバの永続性向上のための育種的展開

アカクローバを含む他殖性植物は、異なる対立遺伝子が組み合わさってできるヘテロ接合体がホモ接合体よりも適応上有利な特性のヘテロ優位性を有している。そのため育種において生産性に有利なヘテロシス（雑種強勢）を高度に表す集団を開発するのが一般的である（藤巻ら 1992）。ヘテロシスを効果的に発現させる育種法として一代雑種育成法および集団合成法などが挙げられるが、これらの育種法は自殖系統の作成、あるいはエリートクローンの保存が必要であることから、自家不和合性が極めて高く、また、クローンの長期保存が不可能なアカクローバでは適用できない。

このような現状のもとアカクローバの交雑育種においては、集団のヘテロ性を維持しながら複数の形質の選抜を行う集団選抜法と母系選抜法が用いられてきた。集団選抜法とは基礎集団から表現型のみにもとづいて個体を選抜し相互交配を行う育種法であり、母系選抜法とは基礎集団の中で母系を認識し、優良母系からさらに優良個体を選抜する育種法である。アカクローバは選抜の各段階で多交配を繰り返すため、優良個体を選抜しても交配された花粉親の組み合わせによっては後代の表現型が選抜親と著しく異なるケースも起こりうる。そのために、基礎集団の段階で母系を認識する母系選抜法は花粉親が異なる場合の表現型の違いをあらかじめ予想することが可能であり、集団選抜法に比べてより確実な選抜を行うことができる。このことから、近年においてアカクローバの育種法は集団選抜法から母系選抜法に変わりつつある。

一方、実際の育種においては母系選抜法など確立された育種法を基本とするものの、対象とする育種母材や育種目標によって選抜・採種の各段階に応用を加える。また、育種法のみならず育種母材にも選抜以外の変異を加えるなど状況に応じた工夫が求められている。特に、ストレス耐性や耐病性に関する有用遺伝子は野生種が栽培化する過程で失なわれることも多いことから、近縁野生種との交雑を利用してこれらの有用遺伝子に関する育種素材の変異幅を広げることは有効な方法の一つである。

以上のことから、本章では交雑育種法によるアカクローバ育種の実例として、第 1 節では母系選抜法を基本としイネ科牧草・チモシーに対する混播適性と永続性を改良した品種「ナツユウ」の育成と特性について報告し、第 2 節では近縁野生種との種間交雑を利用したアカクローバにおける永続性育種素材の開発について論述する。

第 1 節 アカクローバ品種「ナツユウ」の育成とその特性

1. 緒言

北海道では、最近 15 年の間にアカクローバの混播相手であるイネ科牧草がオーチャードグラスから再生力の低いチモシーへと変遷した。これを境に既存の早生品種より競合力が小さく、越冬性および永続性に優れるアカクローバ品種の育成が求められてきた(磯部 2000)。これまでのアカクローバの主たる育種目標は永続性と収量性であり、競合力、すなわち再生が穏やかな品種の育成は収量性の向上を目指していた育種とは対局にあった。一方、永続性は古く

から改良すべき重要な形質であるものの複数の遺伝的要因が関与し、環境により遺伝子の発現が異なることから選抜が非常に困難な形質である。一般に、未選抜の新たな形質について育種を行う場合は、育種母材の遺伝的変異を広げることが有効であるが、その際には、永続性のような複数の形質の高度なバランスの上に成り立つ形質を損なう危険性が高い。

そこで、本節は国内外の多数の系統を母材として育種母材の変異を広げ、母系選抜法を用いて複数回かつ複数の場所で選抜を行うことにより育成された競合力が穏やかで永続性に優れる品種「ナツユウ」の育成経過と特性について述べる。

2. 材料および方法

(1) 育種母材および育種法

供試材料は「Kuhn」、「Lakeland」および「サッポロ」とトルコから導入した極早生系統などからなる 44 系統・品種の計 3600 個体の 2 倍体基礎集団を育種母材として用いた。育種法には母系選抜法を適用した。

(2) 系統適応性検定試験および特性検定試験による特性評価

1) 供試系統と品種

同時に育成した「北海 9 号」（以下、ナツユウ）から「北海 12 号」までの 4 系統を系統適応性検定試験および特性検定試験に供試して栽培適地における特性を評価した。標準品種として早生の「ホクセキ」を、参考品種として

晩生の「クラノ」を用いた。

2) 系統適応性検定試験

系統適応性検定試験は道内の5場所において1998年から3年間行った。検定場所は農林水産省北海道農業試験場（現独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター）、北海道立根釧農業試験場、北海道立天北農業試験場、北海道立北見農業試験場、北海道立畜産試験場（以下北海道農試、根釧農試、天北農試、北見農試、道立畜試）である（Fig.1）。

Table 1 は系統適応性検定試験の実施場所と試験設計の概要を示した。すべての試験地でチモシー早生品種「ノサップ」との混播試験を行い、さらに北海道農試と北見農試においてはアカクロバ単播試験とチモシー中生品種「キリタツプ」との混播試験を行った。

3) 特性検定試験

根釧農試において耐寒性特性検定試験、新潟県農業総合研究所（以下新潟県農総研）において耐雪性特性検定試験、北海道農試において採種性検定試験および個体植特性調査を実施した。

耐寒性特性検定試験は雪腐病の薬剤防除のみを行った無除雪防除区、雪腐病の薬剤防除と除雪を行った除雪防除区、雪腐病無防除で無除雪の無除雪無防除区の3処理区を設けた。除雪する区では越冬期間中、降雪の度に小型除雪機により除雪し、積雪深をおおむね10cm以下に保った。また、薬剤防除区

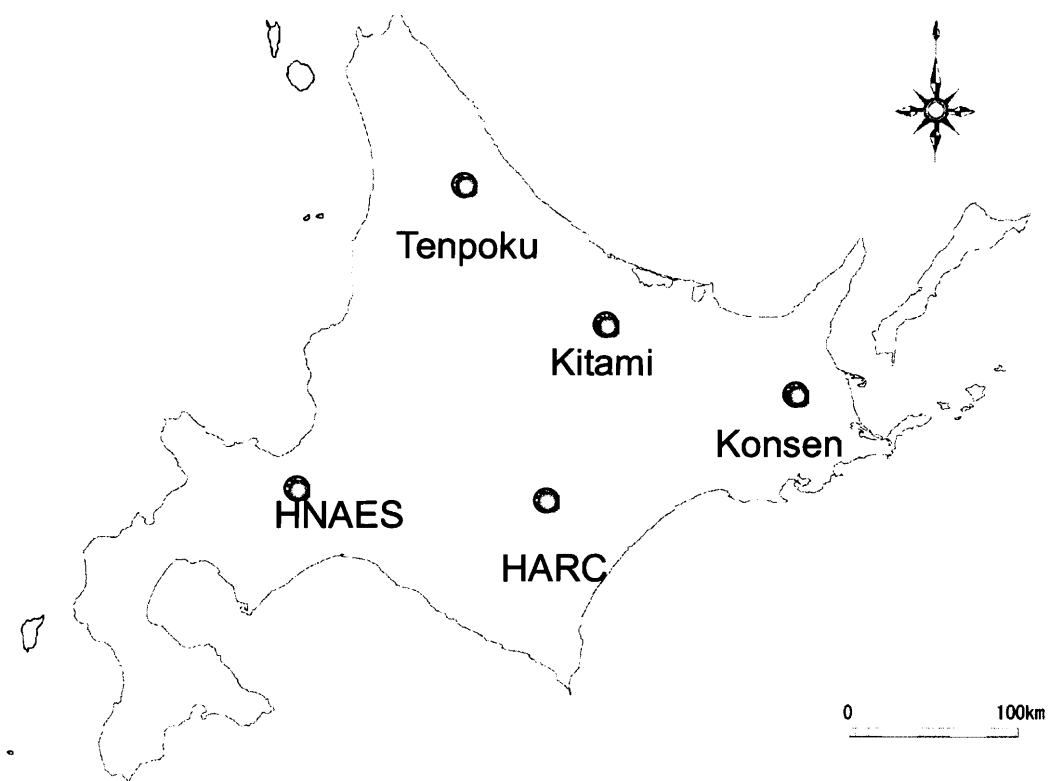


Fig. 1. Experiment fields of regional adaptability traits of 'Natsuyu' in Hokkaido.

HNAES :Hokkaido National Agricultural Experiment Station.

Kitami :Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station.

Konsen : Hokkaido Prefectural Konsen Agricultural Experiment Station.

Tenpoku : Hokkaido Prefectural Tenpoku Agricultural Experiment Station.

HARC : Hokkaido Animal Research Center.

Table 1. Methods for regional test.

Name of test	Station ¹⁾	Seeding				Plot size (m ²)	No. of reps	No. of harvests		
		Date	Type	Rate(g/a)				1998	1999	2000
Pure stand	HNAES	May 12	row	RC 100		6.0	4	2	3	3
	Kitami	May 27	row	RC 30		6.0	4	2	3	3
Mixed sown sward with 'Nosappu'	HNAES	May 12	sward	RC 30	TY 150	6.0	4	2	3	3
	Kitami	May 27	sward	RC 30	TY 120	6.0	4	2	3	3
	Tenpoku	May 13	sward	RC 30	TY 150	6.0	4	1	3	3
	Konsen	Jun 10	sward	RC 30	TY 150	6.0	4	1	2	2
	HARC	May 26	sward	RC 30	TY 150	6.0	4	2	3	3
Mixed sown sward with 'Kiritappu'	HNAES	May 12	sward	RC 30	TY 150	6.0	4	2	3	3
	Kitami	May 27	sward	RC 30	TY 120	6.0	4	2	2	2

¹⁾ HNAES: Hokkaido Natinal Agricultural Experiment Station

Kitami: Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station

Konsen : Hokkaido Prefectural Konsen Agricultural Experiment Station

Tenpoku : Hokkaido Prefectural Tenpoku Agricultural Experiment Station

HARC : Hokkaido Animal Research Center

ではチオファネートメチル水和剤 1000 倍希釈液とメプロニル水和剤 1000 倍希釈液を根雪前に 10 La⁻¹の割合で散布した。検定は 2 回（1998 年播種および 1999 年播種）行い、判定は「ホクセキ」を「中」として 7 段階評価で行った。

耐雪性特性検定試験は 1998 年および 1999 年の秋に標準播きと晩播きを行い、消雪直後の葉腐面積率と消雪後 1～2 週間後の枯死面積率から「ホクセキ」を「中」として 5 段階で判定を行った。

飼料成分については 2000 年の試料について CP（粗蛋白）含有量をケルダール法により、ADF（酸性デタージェント繊維）含有量と NDF（中性デタージェント繊維）含有量をデタージェント法により分析した。なお、これらの分析は十勝農業協同組合連合会農産化学研究所に委託した。

採種性検定試験は 1 区 6m²・3 反復 の条播で行い、個体植特性調査は 1 区 26 個体・2 反復で種苗特性分類調査基準（日本種苗協会）に基づいて調査した。

3. 結果

(1) 育成経過

「ナツユウ」の育成経過を Fig.2 に示した。1980 年に「Kuhn」、
「Lakeland」および「サッポロ」とトルコから導入した極早生系統等からなる 44 系統・品種の計 3,600 個体の 2 倍体基礎集団を養成し、1983 年に 198 個体を選抜した。1984 年にミツバチによる多交配採種を行い、1985 年に採種量の

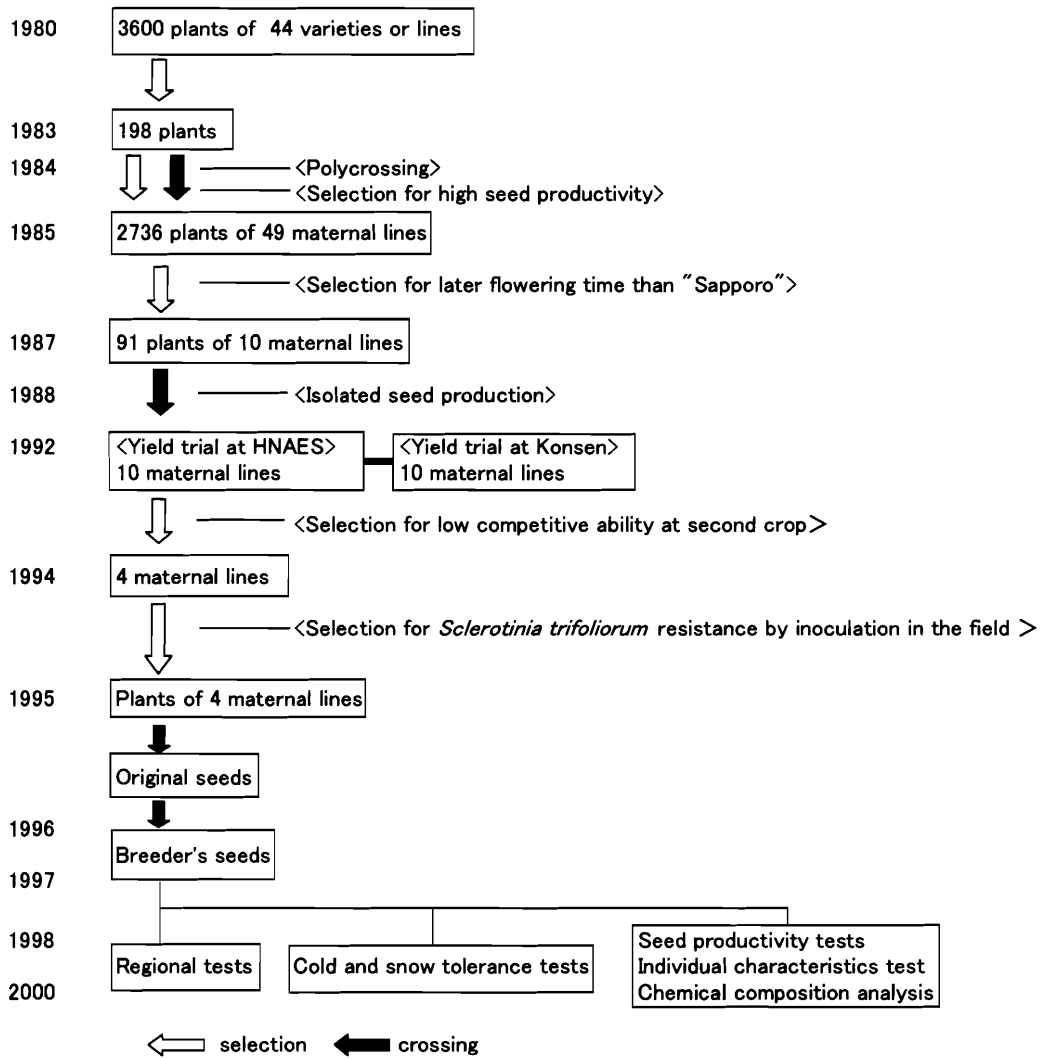


Fig. 2. Breeding scheme of 'Natsuyu'

多い 49 母系を選抜した。これに由来する 2,736 個体を用いて 2 サイクル目の個体評価を行い、1987 年に「サッポロ」より晩生の 10 母系 91 個体を選抜し、1987 年と 1988 年に隔離採種を行った。1992 年から根釧農試と連携して 10 母系の生産力を検定し、北海道農試と根釧農試において 2 番草の競合力が穏やかな 4 母系を選抜した。選抜した 4 母系について、病気の発生率を高めるために北海道農試で菌核病病原菌 (*Sclerotinia trifoliorum* Eriksson) を圃場接種し、1995 年に萌芽に優れる個体を選抜して隔離採種し、種子を等量混合して系統を合成して増殖 1 代とした。1996 年と 1997 年に育種家種子 (増殖 2 代) を生産し、1998 年より系統の各地における適応性の評価 (系統適応性検定試験および耐寒性と耐雪性、採種性に関する特性検定試験) を行った。2000 年に新品種としての提案を行い、2001 年に品種名を「ナツユウ」として命名登録した (磯部ら 2002a)。

(2) 特性評価

1) 収量性

単播試験における「ナツユウ」の収量は、北海道農試、北見農試ともに「ホクセキ」と同程度で「クラノ」より高かった (Table 2)。混播試験における総乾物収量は、各試験地において「ホクセキ」と同程度で、「クラノ」と比較すると同程度か、もしくはやや高い値を示していた (Table 3)。これらの結果から、「ナツユウ」の収量性は「ホクセキ」と同程度で、「クラノ」よりやや高い結果であることが判明した。

Table 2. Annual dry matter yields of pure stands (kg a⁻¹).

Cultivar	HNAES				Kitami			
	1998	1999	2000	Total	1998	1999	2000	Total
Natsuyu	82.0 (99) ¹⁾	86.7 (101)	59.6 (109)	227.2 (102)	31.6 (86)	102.8 (102)	85.3 (151)	221.2 (114)
Hokuseki	82.8	85.8	54.7	222.7	36.7	100.8	56.5	194.0
Kurano	76.2 (92)	66.1 (77)	27.9 (51)	169.3 (76)	30.8 (84)	110.9 (110)	49.2 (87)	192.1 (99)
Lsd (5%) ²⁾	ns	10.2	6.8	13.8	ns	ns	24.8	ns

¹⁾ Numbers in parentheses are the ratios (%) to yields of 'Hokuseki'.

²⁾ 'Lsd (5%)' shows the least significant difference at the 5% level in the t-test, and 'ns' stands for 'not significant'.

Table 3. Total dry matter yields of two timothy cultivars and red clover in the mixed sown swards for three years.

Cultivar	Nosappu						Kiritappu		
	HNAES	Kitami	Tenpoku	Konsen	HARC	Average	HNAES	Kitami	Average
Natsuyu	98.4	94.8	101.6	96.4	101.2	98.4	100.3	98.2	99.2
Hokuseki	(264.6) ¹⁾	(276.5)	(206.8)	(203.0)	(262.8)	(237.3)	(293.0)	(292.6)	(292.8)
Kurano	87.9	92.3	90.5	93.3	105.6	94.0	99.5	94.7	97.1
Lsd (5%) ²⁾	8.65	ns	4.83	4.69	ns		ns	ns	

¹⁾ Numbers in parentheses are dry matter yields (kga⁻¹) of timothy and red clover with 'Hokuseki' for three years, and numbers for other cultivars are the ratios (%) to yields of timothy and red clover with 'Hokuseki'.

²⁾ Lsd (5%) 'shows the least significant difference at the 5% level in the t-test, and 'ns' stands for 'not significant

2) 混播適性

混播区のアカクローバ品種により、それぞれ「ナツユウ」区、「ホクセキ」区および「クラノ」区とし、各区におけるチモシー早生品種「ノサップ」および中生品種「キリタップ」の収量を Table 4 にまとめた。3年間の「ナツユウ」区におけるチモシーの全収量は「ホクセキ」区比で「ノサップ」が 108%、「キリタップ」で 112%であり、チモシー両品種で高かった。年次別にみると3年目にその傾向が最も顕著であり、「ナツユウ」区の3年目の「ノサップ」の収量は「ホクセキ」区比 120%であった (Table 4)。また、試験地別にみると、少雪地帯に位置する北見農試、根釧農試で「ナツユウ」区のチモシー収量が「ホクセキ」区より顕著に高かった。なお、天北農試では 1999 年に「ナツユウ」区においてチモシーの収量が減少しているが、この原因は干ばつの影響であるものと判断されており、2000 年のチモシーの生育は回復している。

アカクローバがチモシーの生育を抑圧する傾向が最も大きい 2 年目 2 番草におけるアカクローバの乾物重割合 (マメ科率) は「ホクセキ」区が 63% と最も高く、次いで「ナツユウ」区の 54% であった (Table 5)。マメ科率の品種間差は北見農試および道立畜試において顕著であった。混播区におけるチモシー収量とマメ科率の結果からチモシーに対する「ナツユウ」の競合力は「ホクセキ」より弱く、「クラノ」より強いと考えられ、チモシー主体の管理を行う草地において「ナツユウ」は「ホクセキ」より混播適性に優れると判断した。

Table 4. Annual dry matter yields of timothy in the mixed sown swards.

Cultivar	Nosappu											
	HNAES				Kitami				Tenpoku			
	1998	1999	2000	Total	1998	1999	2000	Total	1998	1999	2000	Total
Natsuyu	85	98	111	100	87	107	172	124	91	74	100	91
Hokuseki	(25.2) ¹⁾	(44.7)	(47.1)	(91.8)	(33.3)	(37.9)	(38.8)	(110.0)	(9.5)	(27.4)	(53.7)	(90.6)
Kurano	76	114	107	103	91	121	90	101	101	109	96	100
Lsd (5%) ²⁾	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	22.2	ns	ns

Cultivar	Nosappu											
	Konsen				HARC				Average of the five locations			
	1998	1999	2000	Total	1998	1999	2000	Total	1998	1999	2000	Total
Natsuyu	94	105	126	114	108	110	106	108	95	101	121	108
Hokuseki	(18.5)	(29.5)	(50.9)	(98.9)	(47.8)	(63.9)	(50.1)	(161.8)	(26.8)	(40.7)	(48.1)	(115.7)
Kurano	92	119	130	120	111	121	151	127	96	118	116	112
Lsd (5%) ²⁾	ns	ns	ns	ns	8.7	19.7	41.2	19.0				

Cultivar	Kiritappu											
	HNAES				Kitami				Average of the two locations			
	1998	1999	2000	Total	1998	1999	2000	Total	1998	1999	2000	Total
Natsuyu	108	107	101	104	96	134	130	121.0	100	119	114	112
Hokuseki	(20.4)	(47.1)	(66.7)	(134.2)	(36.5)	(35.9)	(51.5)	(123.9)	(28.5)	(41.5)	(59.1)	(129.1)
Kurano	95	149	105	100	102	139	125	122	99	145	114	121
Lsd (5%)	ns	43.3	ns	ns	ns	ns	ns	ns				

¹⁾ Numbers in parentheses are the annual dry matter yields (kg/a) of timothy in the mixed sown swards with 'Hokuseki' and numbers for other cultivars are the ratios (%) to yields of timothy with 'Hokuseki'.

²⁾ 'Lsd (5%)' shows the least significant difference at the 5% level in the t-test, and 'ns' stands for 'not significant'.

Table 5. Red clover ratio (%) on the dry matter basis of 2nd crop in 1999.

Cultivar	HNAES		Kitami		Tenpoku	Konsen	HARC	Average
	Nosappu	Kiritappu	Nosappu	Kiritappu				
Natsuyu	60	54	65	64	88	84	32	54
Hokuseki	67	66	77	73	83	85	45	63
Kurano	47	44	55	52	74	74	13	40
Lsd (5%) ¹⁾	14.9	14.5	12.1	7.8	7.3	ns	12.4	

¹⁾ Lsd (5%) shows the least significant difference at the 5% level in the t-test, and 'ns' stands for 'not significant'.

3) 永続性

アカクローバは一般に年間収量が播種翌年（2年目）に最も高くなり、その後の収量の低下程度が永続性の指標となる。単播試験における2年目に対する3年目の収量比は北海道農試と北見農試の平均で「ナツユウ」が76%であり、「ホクセキ」の60%と「クラノ」の44%より高い傾向を示した（Table 6）。また、単播試験における3年目の「ナツユウ」の被度（北海道農試）は8月および10月ともに「ホクセキ」と同程度で、「クラノ」より高い値であった。一方、「ナツユウ」の欠株率（北見農試）は全ての調査日において「ホクセキ」および「クラノ」より若干低い値であった（Table 7）。

以上のことから「ナツユウ」の永続性は「ホクセキ」および「クラノ」より優れているものと判断した。

4) 開花特性

Table 8に単播試験における1番草の開花始日と生育型を示した。「ナツユウ」の1番草の開花始日は試験場所により「ホクセキ」との関係が異なり、北海道農試では「ホクセキ」より0.4日遅く北見農試では0.6日早かったが、平均すると「ホクセキ」より0.1日早く、ほぼ同日であるものと判断した（Table 8）。1年目秋の生育型で値が最も高かったのは「ホクセキ」の5.5で、次いで「ナツユウ」の4.3であり、「クラノ」は1.4であったことから、「ナツユウ」は「ホクセキ」より非開花型で「クラノ」より開花型であるものと判断した。

Table 6. Ratio (%) of red clover dry matter yield of the third year to that of the second year in the pure stand.

Cultivar	HNAES	Kitami	Average
Natsuyu	69	83	76
Hokuseki	64	56	60
Kurano	42	45	44

Table 7. Coverage degree (%) and mortality rate (%) of red clover in the pure stand in the third year.

Cultivar	Coverage degree(%) ¹⁾		Mortality(%) ²⁾		
	8-Aug	18-Oct	12-May	5-Jun	1-Nov
Natsuyu	94.5	96.3	34.5	11.0	20.5
Hokuseki	94.5	95.5	49.3	13.5	26.0
Kurano	87.5	89.3	53.3	14.8	18.3
Lsd (5%) ³⁾	2.51	4.00	18.80	ns	ns

¹⁾ Results for HNAES.

²⁾ Results for Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station.

³⁾ 'Lsd (5%)' shows the least significant difference at the 5% level in the t-test, and 'ns' stands for 'not significant'.

Table 8. Flowering date of the first crop¹⁾ and growth type in the pure stand.

Cultivar	HNAES	Kitami	Average	Growth type ³⁾
Natsuyu	+0.4	-0.6	+0.1	4.3
Hokuseki	17-Jun	23-Jun	0	5.5
Kurano ²⁾	-	-	-	1.4

¹⁾ Average of 2nd and 3rd year. Numbers for Hokuseki are flowering dates and numbers for other cultivars are comparative dates to those of 'Hokuseki'. '+' and '-' mean earlier and later flowering dates than those of 'Hokuseki', respectively.

²⁾ Kurano had not reached blooming stage during growing period of the first crop.

³⁾ Rated on a scale of 1 (rosette type) to 9 (full flowering type) and evaluated on Sep. 11, 1998 at HNAES.

Table 9はアカクローバ3品種における開花程度(開花茎の多さの程度)をまとめたものである。「ナツユウ」の開花程度は単播試験および混播試験ともに、各番草で「ホクセキ」より小さく、「クラノ」より大きかった。「ホクセキ」との開花程度の差が最も異なるのは2番草で、その傾向は北見農試、根釧農試、道立畜試で顕著であった。

以上の結果から「ナツユウ」は早生に属し、2番草の開花程度が「ホクセキ」より小さいものと判断した。

5) 障害抵抗性

① 越冬性

越冬中の傷害に関する抵抗性を評価するため、越冬性(融雪直後の株の傷害程度)、萌芽の良否、春の草勢および早春の被度を指標として異なる試験地で調査をした結果をTable 10にとりまとめた。混播試験では耐冬性、萌芽良否および春の草勢は「ホクセキ」および「クラノ」と同程度であったが、早春の被度は「ホクセキ」および「クラノ」より優れており、「ナツユウ」の越冬性は「ホクセキ」「クラノ」より優れていると判断した。

② 病害抵抗性

Table 11は異なる試験地における病害発生結果の品種間差異について示したものである。うどんこ病抵抗性および菌核病抵抗性は「ナツユウ」が最も高く、ついで「ホクセキ」、「クラノ」の順であった。ウイルス病抵抗性は

Table 9. Flowering degree of the three cultivars in the pure stand and the mixed sown sward.¹⁾

Cultivar	Pure stand			Mixed sown sward							
	Average of HNAES and Kitami			Average of five stations			HNAES ³⁾	Kitami ³⁾	Tenpoku	Konsen	HARC
	1st ²⁾	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	2nd	2nd	2nd	2nd	2nd
Natsuyu	3.7	6.3	2.4	4.1	4.7	1.3	5.5	5.5	5.8	4.8	2.9
Hokuseki	3.7	6.9	3.1	4.4	5.8	2.0	6.5	6.8	6.1	6.5	4.1
Kurano	1.2	2.1	1.3	1.0	1.7	1.0	2.2	1.8	2.1	1	1.0
Lsd(5%) ⁴⁾							0.48	0.38	0.38	0.76	0.94

¹⁾ Rated on a scale of 1 (no stem with flowers) to 9 (many stems with flowers). Average of 1999 and 2000.

²⁾ 1st, 2nd and 3rd mean the first, second and third crop, respectively.

³⁾ Average of 'Nosappu' and 'Kiritappu'

⁴⁾ 'Lsd (5%)' shows the least significant difference at the 5% level in the t-test'.

Table 10. Characteristics related to overwintering of the three cultivars.¹⁾

Cultivar	Winter hardiness ²⁾		Sprout ²⁾		Regrowth in spring ²⁾		Coverage degree in early spring (%)	
	Pure ³⁾	Mixed ⁴⁾	Pure	Mixed	Pure	Mixed	Pure	Mixed
Natsuyu	8.5	5.5	5.1	5.5	4.6	5.8	93.8	55.4
Hokuseki	7.3	5.5	4.0	5.4	3.8	5.6	83.8	45.6
Kurano	6.5	5.6	3.5	4.3	3.3	5.0	85.0	48.4
Locations	HNAES	Konsen, Tenpoku HARC	HNAES Kitami	HNAES, Kitami, Konsen Tenpoku, HARC	Kitami	Konsen, Tenpoku HARC	HNAES	HNAES Tenpoku

¹⁾ Average of each locations.

²⁾ Rated on a scale of 1 (poor) to 9 (good).

³⁾ Pure stand.

⁴⁾ Mixed sown sward.

Table 11. Susceptibility to disease of the three cultivars.¹⁾

Cultivar	Powdery mildew	crown and stem rot	Virus disease	Black leaf bright	Rust	Stemphylium leaf spot
Natsuyu	1.8 ²⁾	2.6	1.0	1.9	2.6	3.4
Hokuseki	2.3	3.3	1.0	1.0	2.4	3.5
Kurano	3.0	4.0	3.0	1.3	2.7	3.5
No. of investigations	20	2	1	2	3	21
No. of locations	3	1	1	1	7	2

¹⁾ Rated on a scale of 1 (slight) to 9 (severe).

²⁾ Average of each investigation.

「ホクセキ」と同程度で、「クラノ」より強かった。「ナツユウ」の黒葉枯病およびさび病抵抗性は「ホクセキ」と同程度かやや弱く、「クラノ」と同程度だった。輪紋病抵抗性は「ホクセキ」および「クラノ」と同程度であった。

③ 耐寒性

耐寒性は根釧農試で行われた特性検定試験により評価を行った。なお1998年の根雪日数、最大積雪深はともに平年並であったが、1999年は降雪量が多く、根雪日数は平年比+22日で最大積雪深は平年比+44cmであった。1998年の播種および1999年の播種ともに越冬後における「ナツユウ」の被度、萌芽良否および春の草勢が「ホクセキ」より高く、「ナツユウ」の耐寒性は「やや強」と判定された (Table 12)。

④ 耐雪性

耐雪性は、新潟県農総研で行われた特性検定により評価した。1998年播種試験区と、1999年種播試験区はともに枯死面積率と葉腐面積率に系統間差が認められず、「ナツユウ」の耐雪性は「中」と判定された (Table 13)。

⑤耐倒伏性

「ナツユウ」の耐倒伏性は「ホクセキ」と同程度で、「クラノ」より弱かった (Table 13)。

Table 12. Cold hardiness of the three cultivars in the pure stand.¹⁾

Cultivar	Plant cover (%) in early spring		Sprout		Vigor in early spring ²⁾		Raw yield ratio (%) Rem / Snow ³⁾	Cold hardiness ⁴⁾
	Snow ²⁾	Rem ²⁾	Snow	Rem	Snow	Rem		
Natsuyu	89	68	5.5	2.9	6.4	6.0	63	LH
Hokuseki	83	53	5.6	2.0	6.4	5.8	62	M
Kurano	86	52	6.3	2.4	6.4	5.9	66	LH~M

¹⁾ Average of 1999 and 2000 at Konsen Station.

²⁾ 'Snow' means snow-covered plots. 'Rem' means snow-removed plots. Both plots were *Sclerotinia trifoliorum* controlled by pesticide.

³⁾ The ratios (%) of raw yields of 'Rem' to those of 'Snow'.

⁴⁾ Seven levels : VH, H, LH, M, LS, S, VS (H : hardy, M : intermediate, S : susceptible, V : very, L : a little.).

Table 13. Snow endurance and lodging of the three cultivars in the pure stand.

Cultivar	Snow endurance at Niigata Inst.						Lodging ³⁾
	Leaf rot area (%) in early spring ¹⁾		Mortality (%) in early spring ¹⁾		Snow endurance ²⁾		
	1999	2000	1999	2000	1999	2000	
Natsuyu	85	63	45	63	M	M	4.0
Hokuseki	82	73	58	77	M	M	3.9
Kurano	87	43	53	53	M	M	2.7

¹⁾ Result of standard sowing.

²⁾ Five levels : VH, H, M, S, VS (H : hardy, M : intermediate, S : susceptible, V : very.).

³⁾ Rated on a scale of 1 (slight) to 9 (severe). Average of Kitami, Tenpoku, Kosen and HARC.

6) 形態的特性

Table 14 は形態的特性についてまとめたものである。単播試験および混播試験における「ナツユウ」の草丈は「ホクセキ」より若干低く、「クラノ」より高い傾向を示し、このことは 2 番草において顕著に認められた。小葉の大きさは長さ、幅ともに「ホクセキ」より若干大きく、「クラノ」と比較すると長さは同程度で幅が若干狭かった。茎の太さは「ホクセキ」と比べて同程度で、「クラノ」より細かった。

7) 採種性

採種量は「ナツユウ」、「ホクセキ」、「サッポロ」がそれぞれ 24.6 kg/a、26.2 kg/a、17.9 kg/a であり「ナツユウ」は「ホクセキ」と同程度で、同じく早生品種である「サッポロ」より高かった (Table 15)。「ナツユウ」の採種性に関する収量構成要素についても「ホクセキ」と同程度で「サッポロ」より優れていた。以上のことから「ナツユウ」の採種性は「ホクセキ」と同程度で「サッポロ」より優れると判断した。

8) 飼料成分

Table 16 に各品種の飼料成分を示した。「ナツユウ」の CP 含有率は「ホクセキ」と同程度であり有意差が認められなかった。また、ADF 含有率および NDF 含有率は「ホクセキ」との間で有意差が認められなかったことから「ナツユウ」の飼料成分は「ホクセキ」と同程度であるものと判断した。

Table 14. Morphological traits of the three cultivars.

Cultivar	Plant length ¹⁾ (cm)						Leaf length ²⁾ (mm)	Leaf width ²⁾ (mm)	Stem diameter ²⁾ (mm)
	Pure stand			Mixed sown sward					
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd			
Natsuyu	76.5	62.0	30.5	79.1	67.4	34.3	60.0	31.0	4.8
Hokuseki	75.3	70.5	32.5	78.4	70.3	35.1	56.9	30.7	5.0
Kurano	62.0	50.0	26.3	75.1	59.1	31.4	60.9	36.0	5.5
No. of investigations	4	4	4	14	14	10	3	3	1
No. of locations	2	2	2	5	5	4	2	2	1

¹⁾ Average of 2nd and 3rd years.

²⁾ Average of each investigation.

Table 15. Seed productivity of the three cultivars in the pure stand¹⁾.

Cultivar	No. of stems /m ²	No. of flower heads / stem	No. of florets / head	No. of seeds / head	Fertility (%)	Pure seed yield kg/a
Natsuyu	90.1	4.8	110.3	64.6	58.5	24.6
Hokuseki	95.8	5.3	105.5	64.4	61.8	26.2
Sapporo	87.4	4.5	105.2	66.9	63.5	17.9
Lsd (5%) ²⁾	ns	ns	8.87	ns	6.64	3.75

¹⁾ Average of 1999 and 2000 data.

²⁾ 'Lsd (5%)' shows the least significant difference at the 5% level in the t-test, and 'ns' stands for 'not significant'.

Table 16. Chemical composition of the three cultivars.¹⁾

Cultivar	Crude protein			ADF ²⁾			NDF ³⁾		
	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd
Natsuyu	16.0	22.5	20.7	26.0	24.9	31.6	38.2	37.0	44.2
Hokuseki	15.7	19.7	19.8	28.4	27.5	34.8	40.8	39.8	47.8
Kurano	18.8	22.4	22.5	26.3	23.8	33.1	38.5	35.8	45.8
Lsd (5%) ⁴⁾	ns	ns	1.80	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹⁾ Dry mater basis (%). Sampled at HNAES in 2000.

²⁾ Acid detergent fiber.

³⁾ Neutral detergent fiber.

⁴⁾ 'Lsd (5%)' shows the least significant difference at the 5% level in the t-test, and 'ns' stands for 'not significant'.

4. 考 察

一般に混播草地における理想的なマメ科率は 30%前後とされているが、本試験では全ての試験地でマメ科率が 40%以上の高い値を示した。その中で「ナツユウ」のマメ科率とチモシー収量はともに「ホクセキ」と「クラノ」の間であったことから、「ナツユウ」のチモシーに対する競合力は「ホクセキ」より穏やかで「クラノ」より高いものと判断した。中島ら（1992）が根釧農試で行った試験結果では、北海道の優良早生品種のなかでは「ホクセキ」の競合力がもっとも穏やかであったと報告している。「ホクセキ」よりさらに競合力が穏やかな「ナツユウ」は、既存の北海道の早生品種の中で競合力が最も穏やかな品種であり、チモシーの植生維持を優先する場合に利点があると考えられる。

「ナツユウ」の競合力が穏やかな要因として 2 番草の開花程度が小さく、草丈が低いことが考えられる。その理由として、基礎集団から「ホクセキ」より開花日が遅いものが選抜され、その中から早生の系統が選抜されたことが挙げられる。山口ら（1991）はアカクローバにおいて開花の早晩と開花程度の間には正の相関があることを指摘しているが、本育成経過においては両形質の間で遺伝的な組み換えが生じたことで、開花の早晩と開花程度の相関が打破され、早生で開花程度の低い母系が選抜されたものと推察した。さらに生産力検定により競合力について選抜したことで、競合力の穏やかな特性が付与されたものと考えられる。

競合力に対する「ナツユウ」と「ホクセキ」の差異は、特に北見農試、根釧農試および道立畜試で明確に現れた。山口ら（1991）は 10 品種系統の収量

の反応性の違いから道内を 2 つのグループ、すなわち道央、道北に位置する天北農試、北海道農試および道立畜試からなるグループと、道東に位置する根釧農試、北見農試のグループに二分した。このなかで、開花が遅く 2 番草の開花程度が小さい品種は後者において収量が低い傾向にあることを指摘している。本節においても、特に北見農試、根釧農試、道立畜試で 2 番草の開花程度が小さい「ナツユウ」の生長が緩やかになったと推察され、このことが競合力の地域間差の要因となったものと考えられる。一方、北見・根釧地域は 2 番草の生長が旺盛な従来の早生品種によるアカクローバの抑圧問題が多発している地域である。このことから、北見・根釧地域における 2 番草の開花茎発生程度の品種・系統間差異は他の地域に比べて大きく現れることが推察された。

「ナツユウ」の永続性の高さには優れた越冬性が関与していると考えられる。品種・系統本来の特性が評価される単播試験において越冬性に関する全ての項目で「ナツユウ」は「ホクセキ」「クラノ」より優れていた。「ナツユウ」が越冬性に優れる要因としては菌核病抵抗性と耐寒性の向上があげられる。積雪下病害の一つである菌核病は罹病の甚だしい時は枯死に至り、枯死に至らない場合もその後の生育に大きな影響を与える重要病害である(Matsu-ura ら 1985)。菌核病抵抗性について、育種過程の中では自然条件下で越冬した個体・母系を 3 回選抜し、さらに病原菌を接種して個体を選抜している。また、菌核病抵抗性は 2 番草の開花程度と負の相関があることが指摘されており(山口ら 1992)、「ナツユウ」の 2 番草の開花程度が小さいことも菌核病抵抗性の向上に影響していると推察した。

また、耐寒性の向上については「ナツユウ」は国内育成品種では初めて冬期の土壌凍結が厳しい根釧地域で選抜された品種であり、その選抜効果が現れたものだと考えられる。本節における試験では「ホクセキ」を「中」として「やや強」と判定したが、従来「ホクセキ」は北海道優良品種の中では耐凍性が「強」に判定された品種であり、それを上回る耐凍性を示したことから、「ナツユウ」の耐凍性は北海道優良品種の中で最も高い品種であると判断した。永続性の向上はアカクローバ育種において不可欠の育種目標であり、冬期の条件が厳しい北海道においては多雪地帯では菌核病抵抗性が、少雪地帯においては耐凍性が大きな影響を与える（山口 1995）。本研究の結果から単播区の被度と 2 年目の収量に対する 3 年目の収量比から「ナツユウ」の永続性は「ホクセキ」よりやや優れていると判断した。さらに、「ナツユウ」は「ホクセキ」より菌核病抵抗性と耐凍性が高く、優れた越冬性を示したことから 3 年目以降の永続性について「ホクセキ」よりさらに優れる可能性が高いものと考えられる。

一般に、多くの要因が関与する永続性の改良は困難であるとされているが、母系選抜法により永続性と混播適性に優れる「ナツユウ」の育成に成功した。母系選抜法は永続性や混播適性の改良に有効であり、今後も同様の選抜を行うことでさらに永続性が高くかつ再生性に特色のある品種の育成は可能であると考えられる。一方、「ナツユウ」の育成には 20 年の歳月を要している。社会情勢の変動が著しい今日において品種育成にも効率化が求められており、今後は育成年限を短縮できるような新たな育種法の改良にも取り組む必要があると考えられる。

以上のことから、北海道農試および根釧農試において母系選抜法を用いて共同育成された品種「ナツユウ」は、混播適性と永続性に優れる特性を有していることが明らかとなった。

5. 摘 要

アカクローバ品種「ナツユウ」は農林水産省北海道農業試験場および北海道立根釧農業試験場で育成され、2001年に命名登録された。「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、44品種・系統に由来し、1回の個体選抜と3回の母系選抜を経て育成された。

「ナツユウ」の収量性は早生品種「ホクセキ」と同程度であるが、混播区でのチモシー収量が高く、3年目のチモシー収量は「ホクセキ」比の120であった。また、マメ科率は「ホクセキ」より低く、晩生品種「クラノ」より高く、「ナツユウ」のチモシーに対する競合力は「ホクセキ」と「クラノ」の間中間であると考えられた。「ナツユウ」の競合力が「ホクセキ」に比べ弱いのは2番草の開花程度と草丈が「ホクセキ」より低いことが要因であると考えられた。「ナツユウ」の萌芽良否および早春の草勢は「ホクセキ」より若干優れる。また、耐寒性は「ホクセキ」を「中」として「やや強」で菌核病が「ホクセキ」および「クラノ」より強いことから越冬性に優れると判断された。「ナツユウ」は永続性にも優れるが、越冬性の高さがその要因であった。

「ナツユウ」の育成により母系選抜法が永続性と競合力の改良に有効であることが明らかとなった。一方、育成には20年を要していることから今後

は育成年限を短縮できるような新たな育種法の改良にも取り組む必要があると
考えられた。

第2節 野生種との種間雑種を利用した育種素材の開発

1. 緒言

アカクローバの重要な育種目標である永続性は様々な要因が関与し、かつ種内変異が小さいため、選抜育種を用いた改良により飛躍的に向上させるのは困難な形質である。一方、クローバ属の中には20年以上の永続性を示す野生種があり、これらの野生種から永続性に関与する形質を導入すればアカクローバの永続性を改良できる可能性がある。このような考えのもとに、これまでアカクローバと野生種の間でいくつかの種間雑種が作出された。最初に種間雑種の作出に成功したのはTaylor(1963)らで *Trifolium diffusum* との間であった。そのほか、アカクローバとの雑種の作出が報告された種は、*T. pallidum* (Armstrongら1970)、*T. hirtum* (Schwerら1972)、*T. sarosiense* (Phillipsら1982、Collinsら1983)、*T. alpestre* (Markerら1988、Phillipsら1992) および *T. medium* (Markerら1982、Nedbalkovaら1995、Sawaiら1990、1995) である。中でも地下茎を有し20年以上生存する特性を有している *T. medium* (ジグザグクローバ) とアカクローバとの種間雑種は永続性育種素材として最も期待されている。

一方、これらの種間雑種は実用的な育種素材として従来育種法による育種プログラムの中に取り入れられた報告がない。その理由として、作出された種間雑種の多くは雑種弱勢により稔性が著しく低下し、植物体の獲得に胚培養等を必要とするなど育種素材としての直接的な利用が困難であることが挙げら

れる（磯部ら 1997a）。Anderson ら（1991）は雑種弱勢の回復のため *T. ambiguum* × *T. repens*（シロクローバ）の種間雑種にシロクローバによる戻し交雑を行い、通常の育種サイクルに組み込める程度まで稔性が回復した戻し交雑第 3 代を作出した。このことは、戻し交雑によって稔性と草勢の回復が可能であることを示している。

Sawai ら（1995）はジグザグクローバとアカクローバとの種間雑種にアカクローバを戻し交雑し、戻し交雑第 2 代を得た。戻し交雑後代の稔性と草勢は後代になるにつれて回復したが、実用的な育種素材として育種サイクルへ組み込めるほどには至らず、実用化のためにはさらなる戻し交雑を行う必要があることを示唆した。

本節では Sawai ら（1995）が作出したアカクローバの戻し交雑第 2 代を用いて更なる戻し交雑を行い、圃場条件下における稔性と草勢を評価して戻し交雑後代の育種素材としての実用性を評価した。

2. 材料および方法

（1）材料

Sawai ら（1995）が作出したジグザグクローバ／アカクローバの種間雑種にアカクローバを戻し交雑し、戻し交雑第 3 代および第 4 代を作出した。

Fig.3 はその交雑の概略を示したものである。

種間雑種の種子親はスウェーデンから導入したジグザグクローバ（5947-14, $2n=80$ ）でアカクローバとの交雑親和性の高さによって選抜された

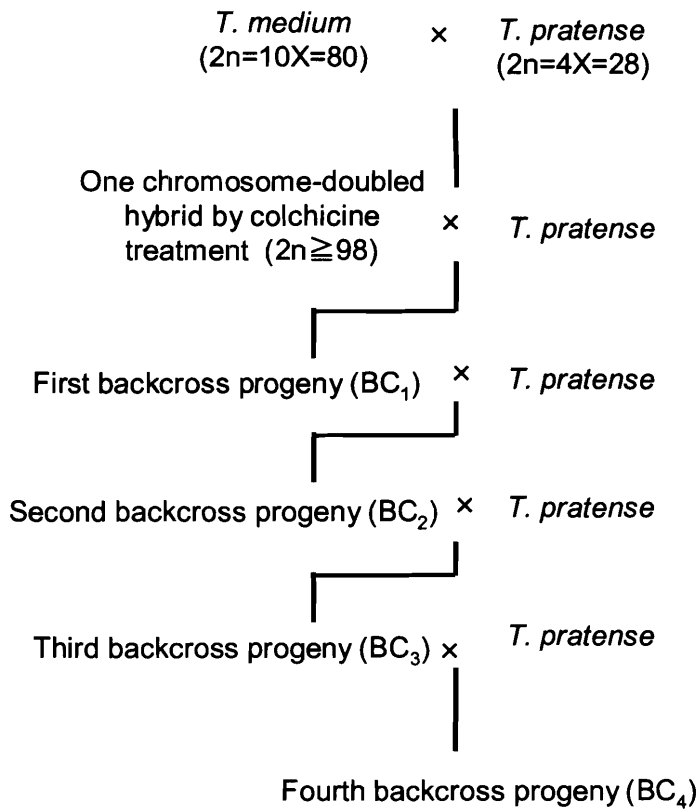


Fig.3. A scheme of backcrossing of the hybrid and the backcross progenies.

個体である (Isobe et al 1998)。雑種および戻し交雑後代の花粉親には 4 倍体アカクローバ品種「タイセツ」(2n=28) の 12 個体を用いた。ジグザグクローバとアカクローバとの雑種は、受精後 11~14 日後に稔性を向上させるためにコルヒチンで染色体を倍加した。得られた雑種個体はアカクローバと交配し、戻し交雑第 1 代 (BC₁) を得た。その後アカクローバによる戻し交雑を 3 回行い、最終的に戻し交雑第 4 代 (BC₄) を 50 個体得た。種間雑種および BC₁、BC₂ は完熟種子が得られなかったため、胚培養により作出した。BC₃ と BC₄ は完熟種子が得られたため種子より養成した。

得られた植物体は、開花を誘導するために 20°C 18 時間日長の温室内で生育させた。交配は、種子親側の除雄を行わず翼弁と竜骨弁を取り除いて、アカクローバの花粉を 70% エタノールで滅菌した鉛筆を用いて雌ずいに受粉した。なお、近交弱勢をさけるために雑種および戻し交雑後代の交配は種子親 1 個体につき 4 個体以上のアカクローバを用いて交配した。

(2) 圃場条件下における永続性の評価

戻し交雑後代の各世代は株の充実を図るために、圃場での永続性を評価する前に 20°C 18 時間日長の温室内で 1~2 年間生育させた。その後、各世代の個体を順次圃場へ個体植 (80cm×50cm) で移植し、通常の栽培管理の下で生存率を 4 年間調査した。圃場へ移植した個体数は BC₁ が 4 個体、BC₂ が 6 個体、BC₃ が 75 個体、BC₄ が 50 個体である。

(3) 圃場条件下における採種性試験

圃場での採種性は BC₃ および BC₄ 世代でのみ評価した。永続性の評価終了後に圃場に生存していた BC₃ の 6 個体と BC₄ の 29 個体をナイロンネットで隔離した屋外ケージへ移植した。移植個体は、開花期にケージ内でミツバチ箱を設置して個体間による多交配を行い、未熟および完熟種子数を個体ごとに調査した。

(4) 染色体数

雑種および戻し交雑後代の各個体の根端をサンプリングし、氷水 (0°C) に 24 時間浸漬したのちメタノール-酢酸 3:1 混合溶液に一晩浸漬して固定した。その後、根端を 5N 塩酸に 12 分 60°C の条件で浸漬して加水分解し、蒸留水で洗浄後フォイルゲン染色を行って 45%酢酸中で押しつぶした。雑種と BC₁、BC₂ および BC₄ の染色体数は温室内で成熟した植物体を用いて計測し、BC₃ の染色体数は圃場で 2 年間生育した個体を用いて計測した。調査を行った個体数は BC₁ が 7 個体、BC₂ が 7 個体、BC₃ が 21 個体および BC₄ が 49 個体である。なお、各個体の染色体数は異なる細胞から 5 回計測した値を平均し算出した。

(5) 稔性および葯上の花粉量

種子稔性は、各個体につき 5 頭花を 4 倍体のアカクローバと交配させ、活性のある胚数を計測し求めた。

花粉稔性と葯上の花粉量は 5 頭花から 25 小花をサンプリングして算出

した。小花のサンプリングは各小花の開花日とし、スライドグラス上で葯を2%アセトカーミン溶液により染色し、十分に染色された成熟した花粉の割合から花粉稔性を推定した。また、葯上の花粉の量は評点により3段階で評価した(1:花粉なし、2:花粉量小、3:アカクローバと同程度の花粉量)。花粉なしと判定された葯は未開であるとみなした。

(6) 小葉

小葉は、ジグザグクローバ、アカクローバ、BC₁、BC₃ および BC₄ についてその形態を調査した。BC₂は測定時に全個体が枯死していたため調査を行わなかった。開花期直前に葉の展開が完了した若い複葉5枚について中央の小葉の最大長と最大幅を測定した。小葉の大きさの指標として小葉長×小葉幅の積で、形の指標として小葉長/小葉幅の除で算出した。

3. 結果

Table 17 は戻し交雑後代における種子および花粉稔性について示したものである。種子稔性はBC₁で1.4%、BC₂で9.2%、BC₃で20.1%、BC₄で21.3%であり、花粉稔性はBC₁で2.0%、BC₂で9.8%、BC₃で21.1%、BC₄で65.4%であった。花粉稔性はBC₁からBC₄まで世代が進むにつれて高くなった。種子稔性はBC₁からBC₃までは世代が進むにつれて高くなったがBC₃とBC₄の間には差異がなかった。戻し交雑第1代から第3代においてはほぼ全ての個体の葯が開花時に開かなかった。BC₄では31%の葯が開かず葯上に花粉が認め

Table 17. Seed and pollen fertility of the backcross progenies.

	Female fertility			
	BC ₁	BC ₂	BC ₃	BC ₄
Number of plants	7	7	58	50
Mean value (%)	1.4	9.2	20.1	21.3
Range (%)	0-3.6	1.6-28.6	4.9-34.5	7.2-39.1
SD	1.5	9.1	10.5	9.8
	Pollen fertility			
	BC ₁	BC ₂	BC ₃	BC ₄
Number of plants	7	7	58	50
Mean value (%)	2.0	9.8	21.1	65.4
Range (%)	0-4.6	2.3-36.8	0-89.7	5.4-96.1
SD	1.9	12.2	20.1	19.6

られなかったが、残りの 69%の個体は葯が開き、そのうち 39%の個体は葯上でアカクローバに匹敵する花粉量が認められた (Table 18)。

圃場条件下における採種性試験において BC₃は供試した 6 個体のうち完熟種子を得たのは 1 個体で、1 個体は未熟種子のみであり、残りの 4 個体は全く種子を得ることができなかった。BC₄は、供試した 25 個体の全てで完熟種子を得ることができた (Table 19)。BC₄の個体あたりの平均の採種数は 124.6 粒で、そのうち完熟種子数の割合は 44.3%であった。BC₄の中における個体あたりの採種数の変異幅は大きく、4~634 粒の範囲であった。

BC₁は圃場移植後 3 年以内に、BC₂は 2 年以内にそれぞれ全ての個体が枯死した。BC₃の圃場における生存率は移植後 1~3 年目にかけて急速に減少し、4 年間生存した個体は全体の 7%であった (Fig. 4)。BC₄の生存率は BC₃よりも高く、4 年間を通じて 4 倍体アカクローバと同等であり、その生存率は 61%であった。

Table 20 に種間雑種と戻し交雑後代の染色体数を示した。染色体数の平均値は BC₁が 64.6 本であるのに対し BC₃が 33.5 本であり、BC₁から BC₃の世代が進むにつれて染色体数が急速に減少した。一方、BC₄の染色体数の平均値は 30.9 本で BC₃との差はほとんど認められなかった。各世代における染色体数の平均値は期待値より少なく、BC₃でその差が 4.5 となり最大であった。BC₁と BC₂では 4 倍体アカクローバと同数の染色体数 (28 本) を有する個体は認められなかったが、BC₃では 20% (20 個体中 4 個体) の個体が、BC₄では 21% (49 個体中 10 個体) の個体がアカクローバと同数の染色体を有していた。

Table 18. Amount of pollen on the anthers of BC₄ plants¹⁾.

Amount of pollen	1	2	3
Number of plants ²⁾	15	15	19
(%)	30.6	30.6	38.8

¹⁾Twenty-five florets (5 florets x 5 flower heads) were examined from each plant.

²⁾1: no pollen, 2: a small amount of pollen, 3: as much pollen as on *T. pratense*

Table 19. Seed number of each BC₄ plant pollinated by honey bees under field conditions.

	Total number of seeds/plant	Number of mature seeds/plant	Number of undeveloped seeds/plant	Ratio of matured seeds to total seeds (%)
Mean value	124.6	46.8	77.8	44.3
Range	4-634	1-215	0-526	12.9-100
SD	166.8	55.9	123.1	21.6

Twenty-five BC₄ plants were polycrossed in a nylon cage.

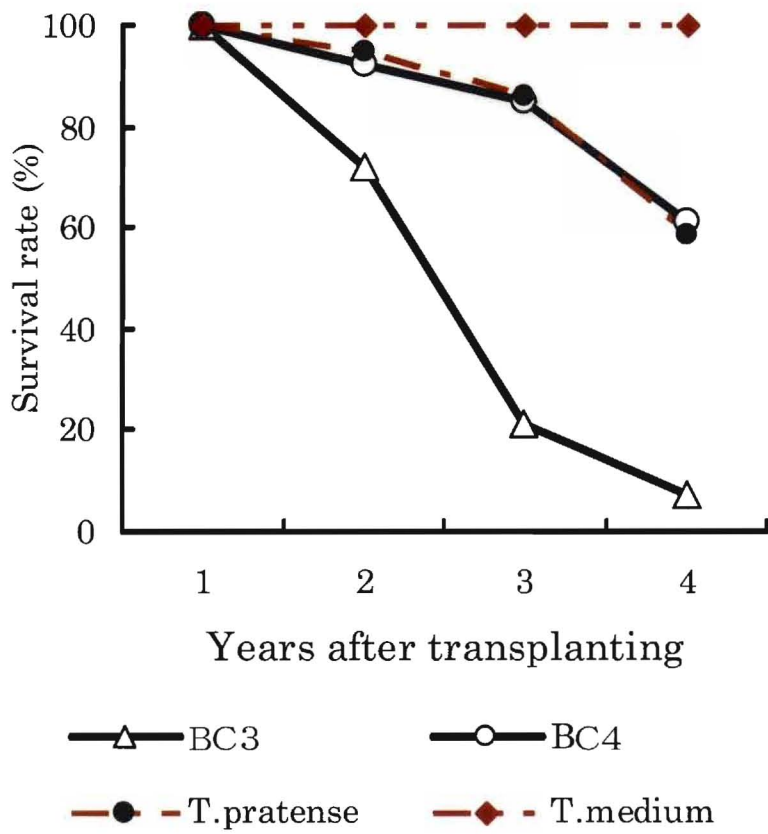


Fig. 4. Survival rate of field-grown backcross progenies. The plants were transferred to the field after grown in the greenhouse for one year.

Table 20. Chromosome number of the hybrid between *T. medium* X *T. pratense* and backcross progenies.

	Hybrid	BC ₁	BC ₂	BC ₃	BC ₄
Number of plants	1	7	7	21	49
Mean value	≥98	64.6	44.9	33.5	30.9
Range		60-68	42-46	28-40	28-36
SD		2.93	1.57	4.19	2.20
Expected value ¹⁾	108	68	48	38	33
Difference between mean and expected values		-3.4	-3.1	-4.5	-2.1

¹⁾Expected value were calculated by $(P1+P2)/2$.

P1: The chromosome number of female parents.

P2: The chromosome number of male parents.

Table 21 はアカクローバ、ジグザグクローバおよび戻し交雑後代の小葉の形態について示したものである。4 倍体アカクローバにおける小葉はジグザグクローバの小さく丸い形とは異なり大きく細長い形状であり、小葉長×小葉幅ではアカクローバで 22.1、ジグザグクローバで 6.2 であった。一方、戻し交雑後代では世代が進むにつれて小葉長×小葉幅は大きくなり、BC₄では 15.1 であった。小葉長／小葉幅はアカクローバで 1.4、ジグザグクローバで 2.4 であった。小葉長／小葉幅は戻し交雑後代の世代が進むにつれて小さくなり、BC₄では 1.5 であった。ジグザグクローバにおいて発生する地下茎は 7 個体中 3 個体の BC₁ で認められたが BC₂以降の世代では認められなかった。

4. 考察

Taylor と Quesenberry (1996) は、アカクローバの基本染色体が 7 であり、ジグザグクローバが 8 であることから、両者のゲノム構造は異なり、交雑を行っても両種の染色体の対合は困難であり、種間雑種の稔性は著しく低下することを報告している。本研究においても種間雑種の稔性は低下したが、アカクローバを戻し交雑したところ、後代になるにつれて稔性が回復し、特に花粉稔性は BC₄で 65.4%であった。一方、種子稔性は BC₁から BC₃の間では回復が認められたものの、BC₃と BC₄の間での平均では差異が認められなかった。この原因として、戻し交雑に用いた 4 倍体アカクローバ自体の種子稔性が低い場合、稔性回復が頭打ちになっていることが考えられる。山口ら (2000) は、「タイセツ」の種子稔性が 33.3%であることを報告している。本研究にお

Table 21. Leaflet length and width of backcross progenies.

	<i>T. medium</i>	BC ₁	BC ₃	BC ₄	<i>T. pratense</i>
Number of plants	1	2	63	50	20
Length (cm)	3.9	3.2	3.7	4.8	5.6
Width (cm)	1.6	2.0	2.4	3.2	4.0
Length × width Mean value	6.2	6.3	9.3	15.1	22.1
Range	Range	5.4-7.1	3.4-28.8	6.4-27.5	16.3-28.5
SD	SD	1.23	4.72	5.34	3.67
Length / width Mean value	2.4	1.6	1.6	1.5	1.4
	Range	1.3-1.7	1.4-2.2	1.3-1.9	1.3-1.5
	SD	0.03	0.27	0.21	0.04

No data was available for BC₂, because all of the plants died prior to the time of measurement.

ける BC₄の中には「タイセツ」と同程度の稔性を示す個体も認められたことから、BC₄世代での選抜により 4 倍体アカクローバと同等の種子稔性を有する集団を育成することが可能であるものと考えられた (Isobe et al 2001a)。

クローバ属は一般に虫媒花であり、アカクローバの流通種子の生産には主にミツバチを用いる。したがって開花時の開葯程度と葯上の花粉量は品種の採種性に重要な要因である。BC₁から BC₃までは開花時にほとんどの葯が開かず、交配には葯の切開が必要であった。それに対して BC₄では 69%の個体で開花時に葯が開いており、39%は葯上に十分量の花粉があったことからミツバチによる交配が可能であると考えられた。本研究では実際の圃場におけるミツバチによる多交配において BC₃個体はほとんど種子が得られなかったのに対して BC₄個体では多くの種子を得ることができた。このことから、BC₄の稔性と開葯程度が自然条件下における採種が可能である程度まで回復したと判断した。しかしながら、BC₄の個体間では採種性にかなりの変異があったことから、雑種弱勢の克服は個体により異なること、また、BC₄の育種母材化にあたっては世代内で稔性と開葯程度についてさらに選抜を行う必要があることが考えられた。

種間交雑による雑種弱勢は草勢および永続性の低下も引き起こした。全ての BC₁および BC₂個体と 93%の BC₃個体は圃場移植後 4 年以内に枯死した。一方、BC₄個体の圃場移植後 4 年目の生存率は 61%であり、生存率の推移は 4 倍体アカクローバと同程度であった。このことから、雑種弱勢による草勢の低下は BC₄において解消され、BC₄の草勢が通常の育種サイクルに組み入れ

られるまで回復していると判断した。

アカクローバのゲノムにジグザグクローバのゲノムを導入するには両種の染色体が対合し、組換えが生じる必要があることが報告されている (Taylor と Quesenberry 1996)。しかしながら、本研究においては雑種をコルヒチンにより倍加処理し、また戻し交雑に 4 倍体アカクローバを用いたことから、戻し交雑世代の染色体対合は同種由来同士の染色体で生じ、染色体間で組み換えが生じるケースは希であったと推察される。一方、79%の BC₄ 個体が 4 倍体アカクローバの染色体数である 28 本よりも多くの染色体を持っていたことから、これらの個体にはジグザグクローバ由来の染色体が残存しているものと考えられる。また、BC₄ とアカクローバの間で小葉サイズと形が異なっていたことからジグザグクローバ由来の遺伝子が BC₄ 個体で発現していた可能性が考えられる。このことから、戻し交雑によりジグザグクローバ由来のゲノムは序々に失われていくものの、BC₄ 世代においてもジグザグクローバ由来のゲノムは残存していることが示唆された (磯部ら 1997b)。

地下茎はジグザグクローバの永続性をもたらす重要形質のひとつである。本研究で得られた戻し交雑後代は BC₂ 以降の世代では地下茎が発生しなかった。Marker ら (1985) はジグザグクローバとアカクローバの種間雑種において、いくつかの雑種が地下茎を有しており、その形態がジグザグクローバと異なっていたことを報告している。本研究の結果と Marker らの報告は、種間交雑によりアカクローバにジグザグクローバの地下茎を導入することは困難であることを示唆している。

戻し交雑後代を何世代まで進めるかという問題は雑種弱勢からの回復と有用遺伝子脱落の可能性のバランスを見極めて決定されなければならない。本研究の結果から、BC₄は4倍体アカクローバと同程度の稔性と永続性を有し、かつジグザグクローバ由来のゲノムが残存しているものと考えられる。このことから、BC₄が種間雑種を利用した育種素材として最もバランスのとれた世代であることが判明した。本研究で得られたBC₄個体は、今後BC₄個体間で多交配を行い、稔性と永続性に優れた個体の選抜を行うことで従来アカクローバの範囲を超えた永続性を有する品種・系統が得られる可能性があり、アカクローバに高い永続性を付与する育種素材として有用であるものと考えられる。

5. 摘要

4倍体アカクローバ(2n=28)と近縁野生種ジグザグクローバ(*Trifolium medium*, 2n=80)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。種子稔性と花粉稔性はともに戻し交雑世代が進むにつれて回復し、戻し交雑第4代(BC₄)の種子稔性と花粉稔性はそれぞれ21.3%と65.3%であった。BC₄は圃場におけるミツバチによる採種試験で完熟種子を得ることができた。戻し交雑第1代から第3代は、ほとんどの個体が圃場移植後4年目以内に枯死したのに対し、BC₄の61%が4年間も生存していた。

BC₄の79%は4倍体アカクローバの染色体数である28本より多い染色体数を有していた。また、BC₄の小葉はアカクローバより小さくかつ細長い

傾向にあり、BC₄においてジグザグクローバ由来の形質が導入されたものと考えられる。

以上のことから、本研究で得られた BC₄ はアカクローバの永続性を高める形質の改良素材として有用であるものと考えられる。

第2章 アカクローバにおける DNA マーカーの開発と連鎖地図の作成

DNA マーカーとはゲノム上の特定の塩基配列の違いを表す目印であり、それ自体は染色体の位置情報としての役割をもつ。一方、QTL 解析や相同性解析によって特定の形質や遺伝子を DNA マーカーに関連づけることで形質の遺伝様式の解明、選抜マーカーとしての利用、また品種・個体の識別などが可能になることから、DNA マーカーは新しい育種技術としての活躍が期待されている (Kang 2002)。反面、ゲノム上の塩基配列の違いと保存性が植物種により異なるため、DNA マーカーは植物種ごとに整備するのが基本である。したがって、DNA マーカー整備の最初のステップは対象作物種内で多型（塩基配列の違い）を示すマーカーの開発と各マーカーのゲノム上の位置情報を推定するための連鎖地図を作成することである。

DNA マーカーの多型検出法には数種類があるが、初期に開発されたのは主として RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) を利用したものである。RFLP マーカーはヘテロ型を検出できる共優性マーカーで遺伝子領域から比較的低コストに作出することができ、同一種の異なる解析集団において応用性の高い DNA マーカーである。しかしながら、RFLP は DNA をメンブレンに転写し、それに目的の DNA 断片をハイブリダイゼーションさせる過程を必要とするために多くの労力を要する欠点がある。その後、比較的短い塩基配列からなるオリゴヌクレオチドをプライマーとし PCR (Polymerase Chain Reaction) を利用して多型を検出する RAPD (Random Amplified Polymorphic

DNA) マーカーや、また、PCR によって増幅した DNA 断片を制限酵素で切断して多型を検出する AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) マーカーが開発されるようになった。これらのマーカーは他の DNA マーカーに比べて多型検出率が高く、開発コストが低く、かつ簡便に解析を行えるという長所があり、短所としてはヘテロ型を検出できない優性マーカーであること、また安定性に欠け、異なる解析集団への応用性が低いなどが挙げられる。

一方、マイクロサテライトマーカーは 2~4 塩基の短いモチーフの繰り返し配列による多型を利用したマーカーであり、様々な植物種で開発されている。本マーカーは共優性マーカーとしてヘテロ座の検出が可能であり、解析が簡便であるという利点があるものの、開発には濃縮ライブラリーの作成や多量のシーケンス解析など高度な技術を要する。さらにマイクロサテライトマーカーで多型が検出されにくい植物種、またはゲノム領域において SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を利用したマーカーも開発されている。SNP マーカーは共優性で多型検出率が高く、発現が安定しているが、解析費用が他のマーカーと比べてかなり高いという欠点がある。

DNA マーカーが開発された後、染色体上のマーカーの位置を組換え価により連鎖解析を行うことで連鎖地図を作成することができる。その方法としては、解析集団の両親間で多型を示すマーカーをスクリーニングし、これらのマーカーの遺伝子型を解析集団の各個体について調べることで、マーカー間の組換え価を算出し、これをもとにマーカーの座位を決定し連鎖地図を作成することができる (Fig. 5)。一方で、マーカーの座位はあくまでも統計処理による

推定値であることから、根拠となるマーカーの分離データの取得はできるだけ誤差を無くするために単純で明解な方法を用いることが有効である。

マーカーの分離比データがより単純かつ明解に取得できるのは自殖性で2倍体の植物種である。例えば、2つのゲノムがホモである個体 A と A とは異なるゲノムをホモにもつ個体 B を交配させた F₁ 個体の自殖後代 F₂ は、メンデルの法則にしたがって A 型ホモ : AB 型ヘテロ : B 型ホモが 1 : 2 : 1 の割合で分離する。一方、高次倍数体の植物種や個体内のゲノムがヘテロである他殖性の植物種は解析集団内で扱うゲノムの遺伝型が多くなるため、後代の遺伝型の分離比は多様になり、遺伝解析が複雑となる。このことから、連鎖地図の作成は自殖性で2倍体の比較的解析しやすい作物種を中心に作成されてきた。

マメ科植物における連鎖地図がミヤコグサ (*Lotus japonicus*)、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*)、ダイズおよびエンドウなど数種の作物で密度の高い連鎖地図の作成が報告されている (Sandal ら 2002, Hayashi ら 2001, Choi ら 2004, Song ら 2004, Yamanaka ら 2005, Loridon ら 2005)。一方、他殖性の牧草類では連鎖地図の作成が遅れており、マメ科牧草では通常4倍体のアルファルファ (*Medicago sativa*) を2倍体化した集団を用いて、Kiss ら (1993) が最初の連鎖地図を作成したが、4倍体の集団を用いて染色体数と同数に連鎖群を収束させた地図の作成は未だ公表されていない。

本章では新しい育種技術の整備を目的としてアカクローバの DNA マーカーの開発と連鎖地図の作成を行う。第1節では RFLP マーカーによる連鎖地図の作成について述べる。また、第2節においてはアカクローバにおけるマイ

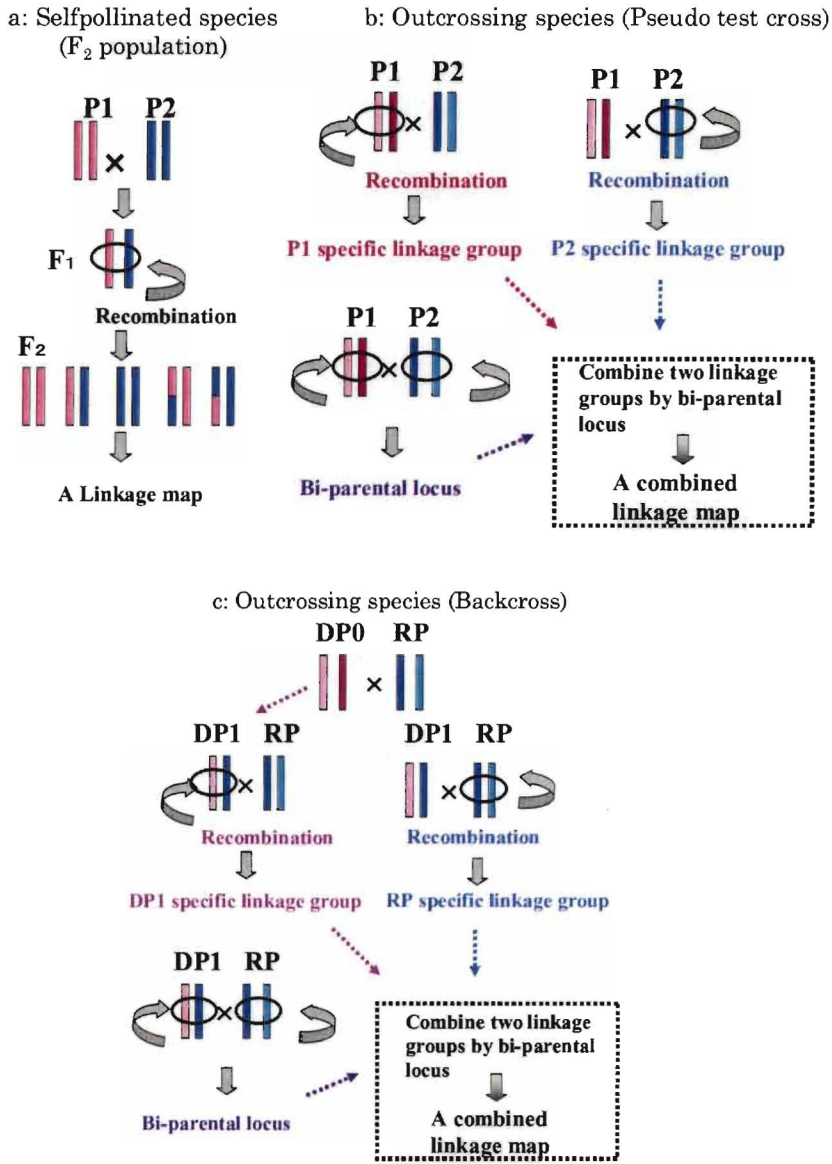


Fig. 5. Scheme of construction of linkage maps. a: selfpollinated species (F₂ population) , b: outcrossing species (pseudo test cross population), c: outcrossing species (back cross population). P1 and P2 indicate parents of crosses. DP0 and DP1 indicate donor parents of a cross and RP indicate a recurrent parent of a cross. Bars represent chromosomes and bar color represent chromosomes origins.

クロサテライトマーカーによる高密度連鎖地図の作成について述べる。

第1節 RFLP マーカーによる連鎖地図の作成

1. 緒言

連鎖地図の作成はマーカーの遺伝子型の分離をもとに組換え価を算出するのが基本であるが、対象とする作物種のゲノム構造や開発費の規模に応じて解析集団やマーカーの種類など状況に応じた作成方法を選択する必要がある。例えば、遺伝子領域の塩基配列、すなわち遺伝情報物質である mRNA を鋳型として人工的に作る cDNA をもとに作成できるマーカーは RFLP マーカー、マイクロサテライトマーカーおよび SNP マーカーの3種類がある。このうち、マイクロサテライトマーカーと SNP マーカーは配列の違いを含む DNA 断片を増幅して多型判別を行うため、開発には大量の DNA 断片の塩基配列解読と 20 塩基程度のオリゴヌクレオチドからなるプライマーの合成が必要であり、高度な技術と高い費用を必要とする。一方、RFLP マーカーは多型判別に労力を要するという欠点があるものの、多型を含む DNA 断片を直接ゲノム DNA に貼り付けるという方法をとることから、シーケンスやプライマー合成が不要であり開発コストも比較的安価で行うことができる。そこで、本節は RFLP マーカーの開発とこれを用いた連鎖地図の作成について報告する。

2. 材料および方法

(1) マッピング集団の作成

連鎖地図作成は通常 F_2 集団を用いて作成するが、自殖できない植物種では F_1 集団を用いて両親ごとの染色体の組換え価をもとにマーカーの位置を決定するのが一般的である (Rirrer ら 1994、Grattapaglia と Sederoff 1994、Hemmat ら 1994、Malepaared ら 1997、Fig.5)。その結果、一つのマッピング集団から両親 (P1、P2) に対応する 2 種類の連鎖群が形成されるが (P1 および P2 特異的な連鎖群)、マーカーの中には P1、P2 のどちらにおいても多型が検出されるマーカー (共通マーカー) が存在するので、この共通マーカーを橋渡しにして各両親の連鎖群を統合し、一つの連鎖地図とする。したがって、より多くの共通マーカーを得ることは連鎖地図の精度を高めるのに重要である (Isobe et al 2002b)。共通マーカーの割合の高さは両親のゲノムの相似の高さに比例するので、戻し交雑第 2 代をマッピング集団として用いれば、戻し交雑第 1 代であるドナー親と戻し交雑親が理論上同一ゲノムを 1 セット持つことから、同一ゲノム内に存在する特異的な塩基配列が共通マーカーとして検出されることになる (Fig. 5)。そこで、本研究では共通マーカーの数を増やすために戻し交雑集団をマッピング集団として用いることにした。

アカクローバ 2 個体「WF1680」と「1588」による F_1 集団の作成を 1997 年に全ロシアウィリアムス飼料作研究所で行った (Table 21)。花粉親として用いた「WF1680」はロシアの中心部で栽培される品種由来の個体であり、晩生で白花 (劣性) をつけるという特性を持つ。種子親に用いた「1588」はロシアの

Table 21. Phenotype of parental plants evaluated in Russia in 1997.

	1588	272 ¹⁾	WF1680 ²⁾
Plant type	winter type ³⁾	winter type ³⁾	spring type ⁴⁾
Flowering time	very early	early	very late
Flower color	bright pink	bright pink	white
Plant height	short	short	tall
Winter hardiness	tolerant	unknown	medium
Size and shape of spots on leaflet	small, round	medium, triangular	large, triangular

¹⁾ '272' = '1588' (♀) X 'WF1680' (♂) ; maternal parent of mapping population.

²⁾ Paternal parent of mapping population.

³⁾ Spring regrowth is moderate and fall dormancy is low.

⁴⁾ Spring regrowth is vigorous and fall dormancy is high.

アルハンゲルスク地帯（北緯 65 度東経 40 度）由来の野生個体であり早生でピンク色の花をつける。「WF1680×1588」の F₁ 集団から「1588」に形態が似ている個体を選び「272」と名付けて種子親とし、「WF1680」による戻し交雑を行って後代 167 個体をマッピング集団として用いた。

（2）RFLP 解析

DNA は葉齢の若い葉から抽出した。抽出法は Doyle ら(1990)が報告した CTAB（臭化セチルトリメチルアンモニウム）法を一部改良したものをを用いた。すなわち、2%CTAB 溶液に 100mM Tris-HCl (pH8.0)、20mM EDTA、0.7M NaCl、0.3M ソルビトール、0.5% ポリビニルピロリドン、2%ポリエチレングリコール、0.3%メルカプトエタノールを混合した溶液である。各 30g の DNA を *Bam*HI、*Dra*I、*Eco*RI、*Hind*III、*Kpn*I および *Pst*I の 6 種類の制限酵素で切断し、0.6%アガロースで電気泳動した後にナイロン膜（Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotec 社）上に転写した。

RFLP 解析におけるサザンハイブリダイゼーションのプロープにはアカクローバの cDNA 由来の断片を用いた。アカクローバ品種「ホクセキ」の幼苗から TRIzol 溶液（Life Technologies 社）を用いて全 RNA を抽出した。cDNA ライブラリーの作成は cDNA ライブラリー作成キット (Stratagene 社) を用い、マニュアルに従って作成した。全 2213 の cDNA クローンより、マッピング集団から任意に選んだ 8 個体の DNA 上でサザンハイブリダイゼーションにより多型を示し、かつ明瞭な RFLP 断片が検出できるクローンのスクリーニングを行

った。サザンハイブリダイゼーションには Amersham Pharmacia Biotec 社の ECL direct labeling system で標識されたプローブを用い、シグナルを X 線フィルムに感光させてバンドの検出を行った。スクリーニングした cDNA についてマッピング集団の全個体に対する RFLP 解析を行った。

(3) 連鎖解析

連鎖地図は解析ソフトウェア JoinMap version 2.0 (Stam and Van Ooijin 1995) により各マーカーの両親の遺伝子型の分離比データを用いて作成した。各座の分離比はカイ 2 乗検定により JMSLA モジュールを用いて検出した。データの群分けは JMGRP モジュールを用いて LOD 値 4.0 で計算した。この段階でどのグループにも属さなかったデータセットは解析から除外した。組換え価は JMREC モジュールにより閾値を LOD 値を 0.01、REC 値を 0.49 とし て計算した。連鎖群内の座の並びは JMMAP モジュールによりコサンビの関数 で閾値を LOD 値で 2.0、REC 値で 0.35 とし て行った。この段階で連鎖群内の 並びが決定しなかったマーカーは解析から除外した。

3. 結果

(1) マーカー開発

スクリーニングを行った 2213 の cDNA プローブのうち 36%(808)の cDNA プローブがマッピング集団の 8 個体間で明瞭なバンドが認められ、5.5% (121) の cDNA プローブが多型バンドを検出した。これら 121 の cDNA プロ

ープを用いて全マッピング集団に対する多型解析を行ったところ、65 の cDNA プローブによりマルチバンドが検出された。これらのマルチバンドは異なるマーカーとして扱い、連鎖地図上で同一座に位置づけられた場合には同一マーカーとみなした。cDNA プローブの大きさは約 800bp~3kbp の間であり、平均値は 1.7kb であった。

121 の cDNA プローブから 249 マーカーの遺伝型データを取得し、JoinMAP の JNGRP モジュールにより群分けしたところ、191 マーカーが7つの連鎖群に分けられ、58 マーカーはどの連鎖群にも属さなかった。群分けされた 191 マーカーの連鎖群内の並びを JMMAP モジュールで決定したところ、33 マーカーがデータ解析から除外され、158 マーカーの連鎖地図上の位置を決定した (Fig 6)。各連鎖群は、距離の長い順に LG1 から LG7 までの番号を付与し、21 のマルチバンドは同一座に位置づけられたことから、10 マーカーとみなした。なお、1つのマーカーが複数の座に位置づけられることはなかった。位置が決定した 158 マーカーのうち 1 マーカーは劣性形質である白花の形態マーカー (Flower-c) で残りの 157 マーカーが RFLP マーカーである。Flower-c は LG1 の末端から 8.0cM に位置づけられた。

連鎖地図上の RFLP マーカーは 90 個の cDNA プローブに由来した。そのうち 41 の cDNA プローブはマルチバンドを検出し、残りのプローブはシングルバンドを検出した (Table 22)。1つの cDNA から検出されたマルチバンドの数は 2~6 個で、全体の 45% が 2 個のマルチバンドを検出した cDNA プローブであった。4~6 個のマルチバンドを検出した cDNA プローブは同一プローブ由

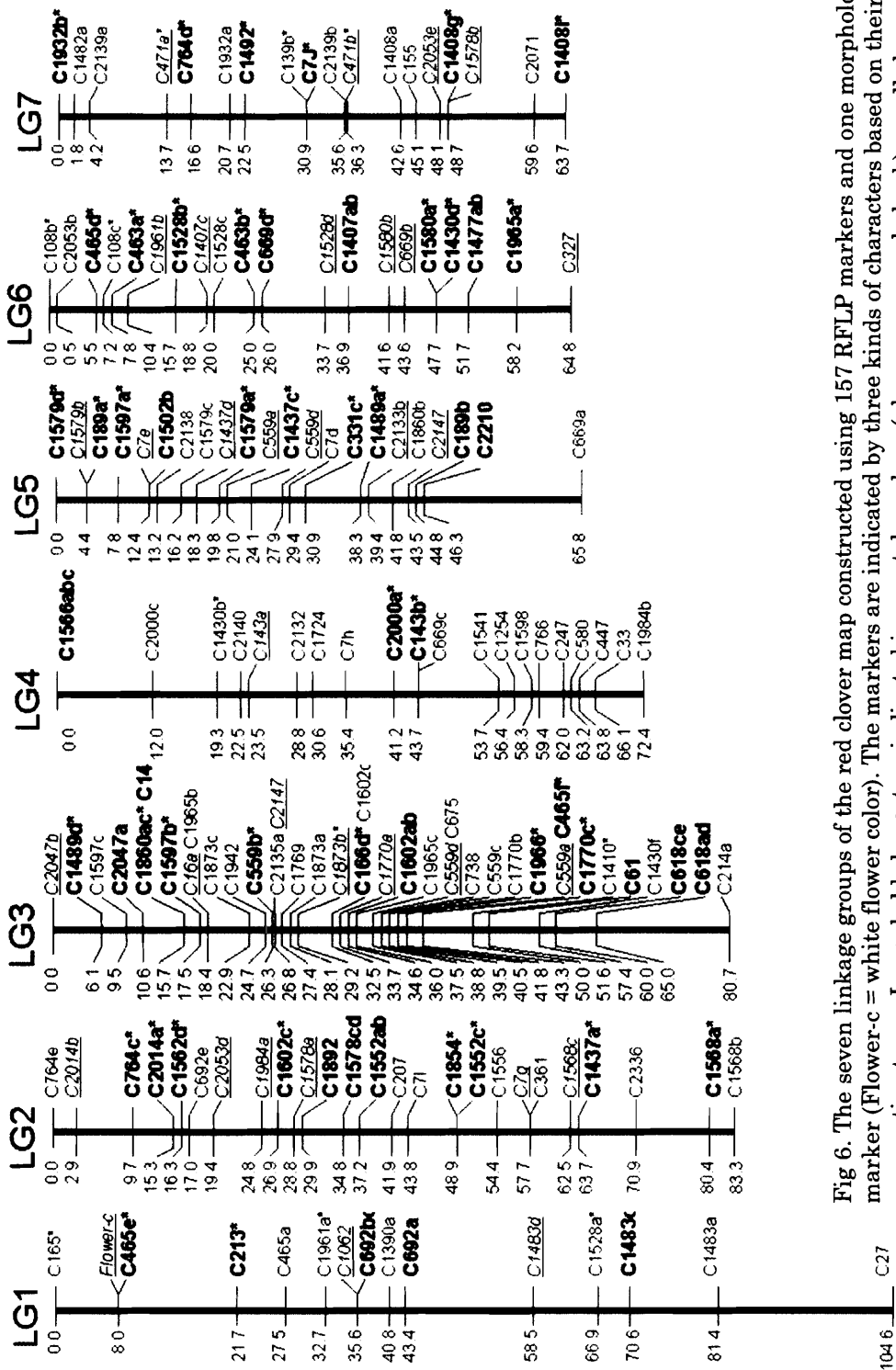


Fig 6. The seven linkage groups of the red clover map constructed using 157 RFLP markers and one morphological marker (Flower-c = white flower color). The markers are indicated by three kinds of characters based on their segregation types: Large bold characters indicate bi-parental markers (abxax and abxab), small characters indicate mono-donor parental markers (abxaa), and italicized characters indicate mono-recurrent parental markers (aaxab). The markers derived from multiple polymorphic bands are indicated by xa, xb, etc. (e.g., C7a, C7b). If several multiple polymorphic bands were taken as one marker, they are indicated with plural alphabets (e.g., C1407ab). Distorted markers are indicated by asterisks.

Table 22. Number of cDNA probes those detected multiple polymorphic bands.

Number of bands ¹⁾	Number of cDNA probes		
	Total	Within LG ²⁾	Among LGs ³⁾
Single bands	49	49	—
Multiple bands			
2	22	17	5
3	14	4	10
4	4	0	4
6	1	0	1

¹⁾ Number of polymorphic bands those were individually detected by one cDNA probe.

²⁾ Number of cDNA probes those multiple polymorphic bands identified markers located on the same linkage group.

³⁾ Number of cDNA probes those multiple polymorphic bands identified markers located on several linkage groups.

来の複数のマーカーが異なる連鎖群に位置づけられた。一方、2つのマルチバンドを検出した cDNA プローブでは同一プローブ由来のマーカーで全て同一連鎖群内に位置づけられた。

連鎖地図の全長は 535.3cM で各連鎖群の長さは 63.7cM (LG7) から 104.6cM (LG1) であった (Table 23)。2つの座 (マーカーにより位置づけられた座位) の平均距離は 3.4cM で、座間の距離が最も長いのは LG1 上の C1483a と C27 の間で 23.2cM であった。ドナー親 (種子親: 272) に特異的な座位と反復親 (花粉親: WF1680) に特異的な座位および共通に有する座位は、それぞれ 7つの連鎖群上に分散した (Table 23)。連鎖地図上の全ての座位はその 41% がドナー親に特異的で、22% が反復親に特異的であり、残りの 37% が両親に共通な座位であった。共通の座位の分離の型は abxac、aoxao および abxab に分けられるが、aoxao 型のマーカーが最も多かった。

分離の歪みは地図上の 37% の座位で認められ、地図上に分散して位置づけられた (Table 24、Fig. 6)。分離比が歪んだ座位の割合はその分離型によって異なり、共通に存在する座位の中では abxab、aoxao 型でほぼ全て分離が歪み、abxac 型では 36% が歪んでいた。両親に特異的な座位は共通の座位に比べて分離の歪みが少なく、ドナー親に特異的な座位で 9.4%、反復親に特異的な座位で 5.7% だった。

4. 考察

本節では、157RFLP マーカーと 1 形態マーカーによる 7つの連鎖群に

Table 23. Map distance and number of locus of 7 red clover linkage groups.

Linkage groups	Length (cM)	Mean distance (cM)	Number of locus					Total
			abxaa ¹⁾	aaxab	abxac	aoxao	abxab	
LG1	104.6	7.0	7	3	1	4	0	15
LG2	83.3	3.3	8	6	3	8	0	25
LG3	80.7	2.1	16	8	3	10	1	38
LG4	72.4	3.6	16	1	1	2	0	20
LG5	65.8	3.0	5	7	1	9	0	22
LG6	64.8	3.2	4	6	2	8	0	20
LG7	63.7	3.5	8	4	0	6	0	18
Total	535.3	3.4	64	35	11	47	1	158
(%)			40.5	22.2	7.0	29.7	0.6	

¹⁾ Segregation type of the locus. abxaa and aaxab were derived from donor and recurrent parents, respectively (mono-parental locus). abxac, aoxao and abxab were derived from both parents (bi-parental locus).

Table 24. Number of distorted segregation markers and distortion ratio.

Segregation types	Number of locus		Distortion ratio (%)
	Normal ^{a)}	Distorted ^{a)}	
abxaa	58	6	9.4
aaxab	33	2	5.7
abxac	7	4	36.4
aoxao	1	46	97.9
abxab	0	1	100.0
Total	99	59	37.3

^{a)} Significant at $P < 0.05$.

分かれたアカクローバの連鎖地図を作成した。本連鎖地図はクローバ属で最初に作成された連鎖地図である (Isobe et al 2003)。アカクローバの基本染色体数は 7 本であり、連鎖群と同数であることから各連鎖群は各染色体に対応すると考えられる。連鎖地図の全長は 535.3cM であったが、この値はアカクローバとゲノムサイズがほぼ同一である *Lotus japonicus* の連鎖地図 (Hayashi ら 2001) の全長 487.3~481.3cM を考慮すると、有効な値であるものと考えられた。

158 マーカーが地図上に位置づけられ、91 マーカーが解析から除外された。このことは、各両親の連鎖地図を統合して一つの連鎖地図にする過程において、両親共通のマーカーが十分でない場合に起こり、その数も増加する。例えば、LG3 上の末端から 43.4cM の位置に座乗する共通マーカー、C1770c(aoxao 型) を除外して LG3 の連鎖群の並びを計算した場合に、LG3 は 38 座による 80.7cM の連鎖群から 23 座による 67.9cM の連鎖群へ縮小した。このことは、今後共通マーカー数が増加するにつれてこれらの 91 マーカーも連鎖地図上に位置づけられる可能性を示唆している。

分離型の中ではドナー親に特異的な座位の割合が高かった。ドナー親 (272) のゲノムの 1 セットは高緯度地帯であるロシア・アルハンゲルスク地帯の野生個体(1588)に由来し、もう 1 セットは栽培品種由来の反復親(WF1680)に由来する。個体内の 2 つのゲノムの由来が異なることがドナー親の多型性が反復親に比べて高いことに影響していると考えられる。本研究で得られた共通座の割合は *Salix* のシュードテストクロスで得られた 22% より高く (Tsarouhas ら 2002)、*Eucalyptus globules* で得られた 40% より低かった (Thamarus ら

2002)。本研究では共通座の割合を高めるため、シュードテストクロスではなく戻し交雑集団をマッピング集団として用いたが、その効果は明確に現れなかった。その要因としてドナー親内のゲノム間多型性の高さが影響しているものと考えられる。

地図上の座の分離比の歪みは様々な種で報告されている。分離比の歪みの原因については、統計的なバイアスや遺伝型解析のスコアミスなどのデータ解析にかかわる要因や染色体の欠失、致死遺伝子、遺伝的隔離作用など生物的要因など様々な理由が考えられている (Plomin ら 1995、Bradshaw と Stettler 1994)。本研究では分離比が歪んだ座の割合は分離型によって異なり、abxab および aoxao 型ではほぼ全ての座の分離比が歪みヘテロ型にシフトしていた。同様の傾向は 2 倍体アルファルファの F₂ 集団による連鎖地図でも認められており (Brummer ら 1993、Kiss ら 1993、Kaló ら 2000)、ホモ型を避ける何らかの生理的要因が働いていることが推定された。本連鎖地図作成で生じた分離比の歪みの原因を現時点で明確に述べることは難しく、解明にはさらに詳細な検討が必要であるものと考えられる。

連鎖地図上の座は LG1、LG3、LG4 および LG5 の末端領域を除いてほぼ均等に分布していた。Darvashi ら (1993) は地図上の座間の距離が 10~20cM であれば信頼のできる QTL の検出をインターバルマッピングによって行えると報告している。本連鎖地図は、LG1 上で座間の距離が 23.2cM 離れた領域があるものの、他の領域では 2 つの座の間に 20cM 以上の距離が認められなかったことから、QTL 解析を行う上で十分な座の密度を有しているものと判断できる。

したがって、マッピング集団の形質評価を行い、本連鎖地図を用いた QTL 解析を行うことで、農業形質に関わる有用な QTL が同定される可能性が高い。

本研究で作成した連鎖地図は、今後アカクローバの QTL 解析により形質に連鎖した選抜マーカーを開発していく上での重要な情報である。また、本連鎖地図はクローバ属ではじめて作成されたことから、アカクローバのみならずクローバ属全体のゲノム情報を用いた育種法の開発に有益な情報を提供したものと考えられる。

5. 摘要

cDNA 由来の RFLP マーカーと戻し交雑集団を用いてアカクローバの連鎖地図を作成した。作成した連鎖地図は 7 つの連鎖群上に 157 の RFLP マーカーと 1 つの形態マーカーが位置づけられた。連鎖地図の全長は 535.7cM、2 つの座の間の平均距離は 3.4cM であった。本連鎖地図はクローバ属ではじめて作成されたものであり、アカクローバのみならずクローバ属全体のゲノム情報を用いた育種法の開発に有益な知見を提供したものと考えられる。

第2節 マイクロサテライトマーカーによる連鎖地図の作成

1. 緒言

マイクロサテライトマーカーは、2~6塩基の短い塩基配列を単位（モチーフ）とした繰り返し配列（Simple Sequence Repeat, SSR）においてモチーフの繰り返し数の違いにより多型を検出する DNA マーカーである。マイクロサテライトマーカーの特徴として、共優性であること、多型アレルの検出率が高いこと、遺伝子領域内外に関わらずマーカーを作出できること、ひとつのマーカーが検出できるアレルの種類が多いことなどの利点がある。また、検出法の利点として、PCRにより増幅された DNA 断片の長さの違いで多型の検出を行うことから操作が簡便であること、SNP マーカーのように蛍光標識を用いなくても多型が検出できるので解析費用を抑えることなどがある。これらの利点から、最近5年間のあいだにマイクロサテライトマーカーの開発は急速に進み、マイクロサテライトマーカーによる連鎖地図が様々な作物種で作成されている (Varshney ら 2005)。クローバ属ではシロクローバとアカクローバでマイクロサテライトマーカーの作出が報告されているが、その数はそれぞれ30および27マーカーと非常に少なく、育種への応用は困難である (Barrett ら 2005、Kolliker ら 2005)。

本節は、マイクロサテライトマーカーの開発を行い、前節で開発した RFLP マーカーとともに高密度連鎖地図の作成を試みた。また、FISH 法 (Fluorescence *in situ* hybridization) により、連鎖群と実際の染色体との対応も行い、さらにマメ科モデル植物 *Lotus japonicus* と *Medicago truncatula* との

マクロシンテニー解析も行った。

2. 材料および方法

(1) 材料

マッピング集団にはアカクローバ個体 HR を種子親とし、R130 を花粉親とした F₁ 後代 188 個体を用いた。HR は日本の品種「ホクセキ」とスイスの品種「Renova」に由来し、形態は早生、立型で花色はピンク色、葉の大きさは中である。R130 は第 2 章の第 1 節で述べた RFLP 地図のマッピング集団から選抜した個体でロシア・アルハンゲルスク地域の野生個体とロシアの栽培品種に由来する。形態は晩生で匍匐型、花色は白で葉は小さい。

(2) マイクロサテライトマーカーの開発

マイクロサテライトマーカーは 4 種類のライブラリー、すなわちゲノム 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、cDNASSR 濃縮ライブラリーおよび均一化 cDNA ライブラリーを用いて開発した。

ゲノム濃縮ライブラリー作成には HR と R130 の DNA を用いた。800 ~1000bp の DNA 断片を pBluescriptII SK-プラスミドベクター(Stratagene, USA)に導入し、Kijas ら (1994) が報告した方法を用いて SSR 濃縮ライブラリーを作成した。濃縮に用いたモチーフは遺伝子領域に比較的多いとされる (AAC)、(AAG)、(ATC)、(GGA) および (GGT) である (田畑ら 未発表)。メチルフィルトレーションゲノムライブラリーは超音波により分解した 1kb 以

下のゲノム DNA を pBluescriptII SK プラスミドベクターへ導入し、3 種類の *mcrBC+* *E.coli*cc、すなわち JM109、DH5 α および XLI-Blue に導入して作成した (Rabinowicz 1999)。

cDNA 濃縮ライブラリーの作成には品種「ホクセキ」の幼苗を用いた。RNA の抽出と cDNA の合成は Asamizu (1999) らが報告した方法を用いた。500~1000b の cDNA 断片を pBluescriptII SK-プラスミドベクターに導入して濃縮ライブラリーを作成した。濃縮に用いたモチーフは、(AAC)、(AAG)、(ATC)、(GGA)、(GGT)、(CT) および (AAAG) である。均一化 cDNA ライブラリーは HR の葉と葉柄、および R130 の葉を用いて作成した。プラスミド DNA から TempliPhi DNA amplification キット (アマシャム社) を用いて直接増幅・シーケンスを行った。シーケンスは片側のみ解読し、cDNA 濃縮ライブラリーと同じモチーフの SSR を探索した。マイクロサテライトマーカのプライマーの設計には設計プログラム Primer 3 を用い (Steve と Helen 2000)、増幅断片の大きさが 90~300bp となるように設計した。

シーケンス解析は生データについてデータの質の評価を Phred program により評価したのち (Ewing ら 1998)、BLAST プログラムの BLASTN を用いて公開データベース上の *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ)、*L. japonicus*、*M. truncatula* およびダイズの遺伝子配列との相同性を解析した。なお、検索の閾値は $E \leq 10^{-5}$ またはビットスコア ≥ 30 とした。*L. japonicus* および *M. truncatula* については相同性の高いゲノミッククローンについて各連鎖地図上の位置を確認し、アカクローバマイクロサテライトマーカの連鎖地

図上の位置と比較することによりマクロシテニーを推定した。

(3) マイクロサテライトマーカークの多型解析

PCR は反応液の全量を $5\mu\text{l}$ とし、 0.5ng のアカクローバゲノム DNA、 $1\times$ PCR バッファー (Takara Bio 社)、 0.2U Takara Taq (Takara Bio 社)、 0.2mM dNTPs、 $0.8\mu\text{M}$ プライマーペアの混合溶液を用いた。PCR 反応はタッチダウン PCR 法 (Don ら 1991) を一部修正し、以下のプログラムで行った。すなわち、 94°C 3 分に続いて 94°C 30 秒+ 68°C 30 秒を 3 サイクル終了ごとにアニーリング温度を 2°C 低下させるラウンドを 3 回、続いて 94°C 30 秒+ 62°C 30 秒+ 72°C 30 秒を 3 サイクル終了ごとにアニーリング温度を 2°C 低下させるラウンドを 4 回、続いて 94°C 30 秒+ 55°C 30 秒+ 72°C 30 秒を 30 サイクル、最後に 72°C 10 分である。PCR 増幅産物は 3% の MetaPhor agarose gels (BMA 社) と 10% のアクリルアミドゲルを用いて電気流動し、マッピング集団の両親および 188 F_1 個体から任意に選んだ 10 個体の間で多型を示すマーカークを選抜した。選抜したマーカークによるマッピング集団全個体の多型解析は 3% のアガロースゲルを用いて行い、多型検出が困難なマーカークに限り 10% アクリルアミドゲルによる再解析を行った。

(4) RFLP 解析

第 2 章の第 1 節で開発した RFLP マーカークを用いて第 2 章の第 1 節と同様な解析法でマッピング集団の任意の個体 14 個体で多型解析を行った。解析

方法は第 2 章の第 1 節と同様である。多型が検出された RFLP マーカーはマッピング集団全個体に対する多型解析に供試した。

(5) 連鎖解析

RFLP マーカーおよびマイクロサテライトマーカーの遺伝子型データ解析はカラーマッピング法 (Kiss ら 1998) および解析プログラム JoinMap ver3.0 (<http://www.kyazma.nl>) を用いて行った。得られた遺伝子型は色分けしてデータのマトリクスを作成し、データの並び替えによってマーカーを 7 つのグループに分けた。各グループのデータセットは集団のタイプを cp として、JoinMap の群分け機能により LOD 値 5 で再度群分けの解析を行い、同一グループ内に再分類されたデータセットについてひとつの連鎖群とみなした。各連鎖群内のマーカーの並びは JoinMap のマッピング機能を用いて $LOD \geq 2.0$ 、 $REC \leq 0.35$ で計算した。

(6) FISH による染色体の解析

染色体のサンプル調製と DAPI 染色は Ohmido ら (2002) が報告した方法を用いて行い、染色体を識別した。FISH 解析のプロープには 28S rDNA、5S rDNA および各連鎖群に座乗しているマーカー配列を含む BAC クローンを用いて行った。28S rDNA と 5S rDNA のプロープはアカクローバゲノムの rDNA と 5S rDNA 遺伝子のシーケンスをもとに作成したプライマーを用いて PCR により増幅した。BAC プロープは HR のゲノム DNA 由来の BAC ライブ

ラリーを CopyControl pCC1BAC (Epicentre 社) により作成し、3-D DNA プールを構築した中から SSR を含む BAC を選抜して作成した。

3. 結果

(1) マイクロサテライトマーカーの開発

アカクローバのゲノム領域内の SSR を同定するために作成したゲノム 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、cDNASSR 濃縮ライブラリー、および均一化 cDNA ライブラリーのクローンの数のリストを Table 25 に示した。4種類のライブラリーから 83,172 クローンを同定した。ゲノミックおよび cDNA の SSR 濃縮ライブラリーではそれぞれ 15,427 (56%) および 6,568 (57%) のクローンが 15 塩基以上の SSR を含み、メチルフィルトレーションゲノムライブラリーでは 533 (28%) のクローンが、均一化 cDNA ライブラリーでは 6,801 (25%) のクローンが同様の SSR を含んでいた。これら SSR を含むクローンの塩基配列をもとに全 7,244 のマイクロサテライトマーカーのプライマーペアを設計した。プライマーペアを設計した 7244 クローンの塩基配列に対して相同性の検索を行ったところ、5,970 のクローンが既知の遺伝子と類似性があることが判明した。

7,159 のプライマーペアを用いて HR、R130 およびマッピング集団 10 個体間で 3%アガロースゲルによる多型解析を行ったところ、1,488 プライマーペアで多型を検出した。多数のマルチバンドを検出するプライマーペアについてはデータ取得上の混乱を避けるために以降の解析から排除した。残りのプラ

Table 25. List of libraries for identification of SSRs.

	Number of clones sequenced	Number of clones containing SSR	Number of primer pairs designed	Number of clones with similarity to genes
SSR-enriched genomic library	37,248	15,427	3,094	1,889
Methyl-filtration genomic library	3,264	533	175	156
SSR-enriched cDNA library	13,440	6,568	919	896
Normalized cDNA library	29,184	6,801	3,056	3,029
Total	83,172	28,796	7,244	5,970

イマーペアについてマッピング集団全個体に対して多型解析を行ったところ、1,305 のプライマーペアについて明確な多型を得ることができた。そのうち1,024 プライマーペアは3%アガロースゲルで多型判別が可能であり、残りの281 プライマーペアは10%アクリルアミドで判別することができた。

(2) RFLP マーカーのスクリーニング

121 cDNA プローブを用いて HR、R130 およびマッピング集団 14 個体間の多型解析を行ったところ 95 プローブが多型を検出した。そのうち 37 プローブは2~6個のマルチバンドを検出し、これらのバンドは異なるマーカーとみなした。その結果、全部で 167 RFLP マーカーの遺伝子型データを取得することができた。

(3) 連鎖地図の作成

1,472 マーカー (1305 マイクロサテライトマーカーおよび 167 RFLP マーカー) の遺伝子型データを用いて連鎖解析を行ったところ 1,399 マーカーによる 1434 座位が連鎖群上に位置づけられた (Fig. 7、Table26)。うち 1,286 座位はマイクロサテライトマーカーに由来し、148 座位は RFLP マーカーに由来することが判明した。連鎖地図の全長は 868.7cM で各連鎖群の長さは 108.2cM (LG 6) から 149.7cM (LG2) である。このことから、2つの座位間の平均距離は全体で 0.6cM であり、連鎖群内では 0.46cM (LG3) から 0.81cM (LG5) であった。座位の密度は連鎖群の末端で粗になる傾向にあった。34 マ

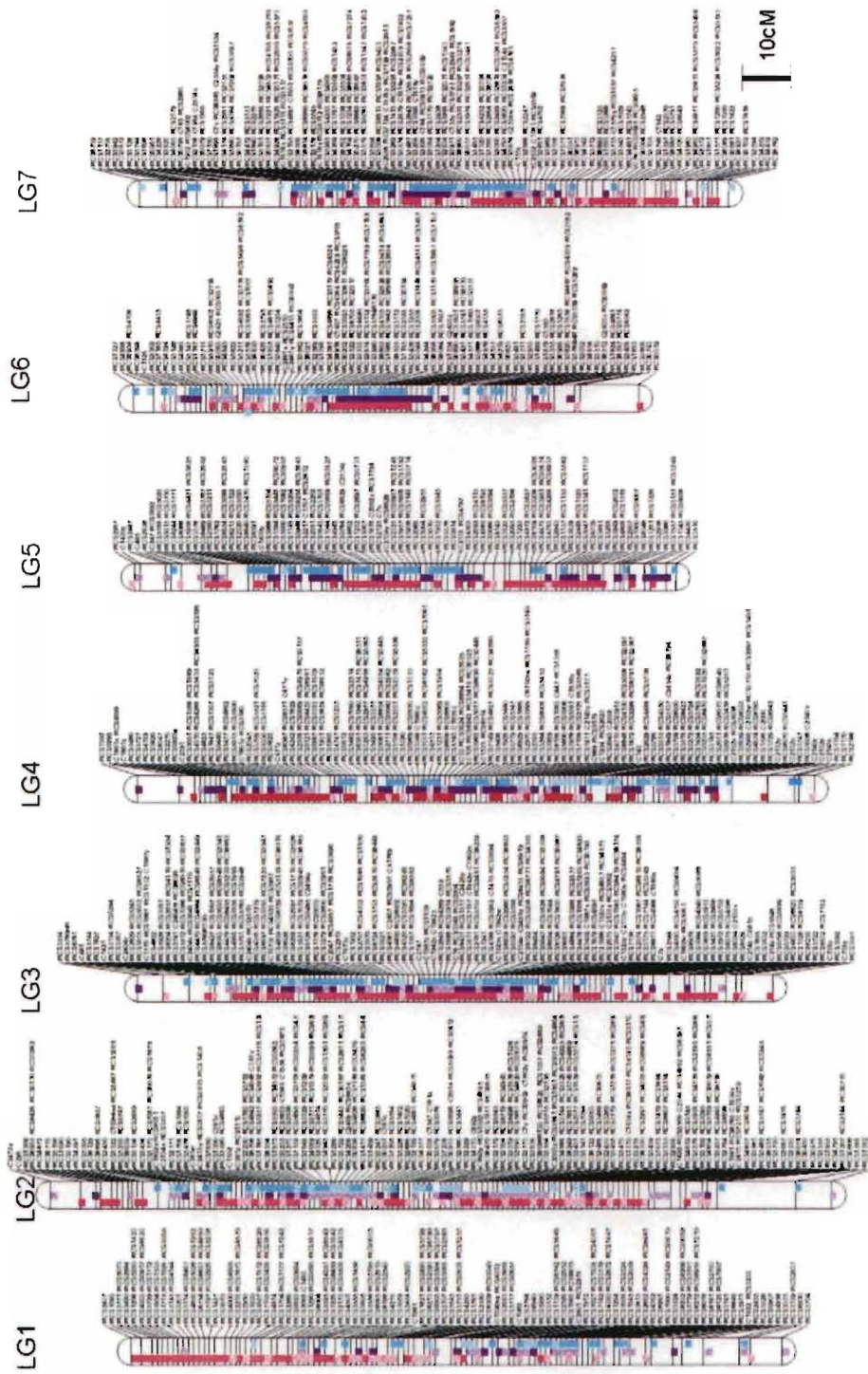


Figure 7. Genetic linkage map of the red clover genome. Each linkage group corresponds to that in the previously reported linkage map. Positions of bi-parental, HR-specific, and R130-specific marker loci are indicated by purple, pink and blue boxes, respectively. Distorted loci are represented by dotted color and preferentially represented when multiple markers including the distorted loci are closely located.

Table 26. Description of the integrated linkage map.

	Length(cM)	Number of locus ¹⁾			Total	Marker loci density ²⁾	Distortion ratio(%) ³⁾
		bi-parental	HR specific	R130 specific			
LG1	136.7	29 (17.2)	108 (63.9)	32 (18.9)	169	0.81	40.8
LG2	149.7	83 (29.5)	121 (43.1)	77 (27.4)	281	0.53	52.3
LG3	113.6	71 (28.6)	106 (42.7)	71 (28.6)	248	0.46	19.8
LG4	126.6	74 (33.9)	83 (38.1)	61 (30.0)	218	0.58	19.3
LG5	113.5	41 (28.9)	60 (42.2)	41 (28.9)	142	0.80	7.7
LG6	108.2	46 (30.1)	56 (36.6)	51 (33.3)	153	0.71	25.5
LG7	120.4	61 (27.4)	77 (34.5)	85 (38.1)	223	0.54	13.9
Total	868.7	405 (28.2)	611(42.6)	418 (29.1)	1434	0.61	27.1

¹⁾ A number in the parentheses shows the ratio (%) to total number of locus.

²⁾ Average distance between two loci.

³⁾ A Significant at P<0.05.

一カーが複数の座位を検出し、そのうち 17 マーカーは同一連鎖群内に、17 マーカーは異なる連鎖群に検出された複数の座位が位置づけられた。

連鎖地図上の 43%にあたる 611 座位は HR 特異的であり、418 座位 (29%) が R130 特異的、405 座位 (28%) が共通の座位であった (Table 27)。LG1 は HR 特異的な座位の割合が 64%と高かった。共通座位の分離タイプは abxcd、efxeg、hkxhk タイプがそれぞれ 167, 160, 78 座位だった。全体の 27%の座位について分離比の歪みが認められた ($P < 0.05$, Table 26)。分離の歪みは全ての連鎖群で認められたが、連鎖群によってその割合は異なり LG5 では 7.7%の座位の分離が歪んでいたのに対し、LG2 では 52%が歪んでいた。分離タイプ別では hkxhk が 67.9%と歪んだ座位の割合が高かったが、そのほかの分離タイプは 22.7~31.9%と大きな差は認められなかった。

(4) 染色体の構造と連鎖群との関連性

Fig. 8a に DAPI 染色によるアカクローバの染色体像を示した。アカクローバの染色体の長さは 5.1~7.4 μm で不均一な濃縮パターン (CP) により染色体を識別することができた。FISH 解析では 28S rDNA (緑色の蛍光シグナル) が染色体 1 番の短腕部の核小体形成部 (NORs) において強く検出され、染色体 6 番の短腕においても弱く検出された (Fig. 8b)。また HR の染色体 5 番の片側にもシグナルが検出されたが、R130 では検出されなかった。5S rDNA (赤色のシグナル) は染色体 1 番の中心部から NORs にかけての領域と染色体 2 番の短腕に 2カ所検出された (Fig. 8c)。

Table 27 Number of locus and distortion ratio at each segregation type.

		Number of markers ¹⁾	Distortion ratio(%)
bi-parental	<abxcd>	167 (11.6)	28.1
	<efxeg>	160 (11.2)	31.9
	<hkxhk>	78 (5.4)	67.9
HR specific	<lmxll>	611 (42.6)	22.7
R130 specific	<nnxnp>	418 (29.1)	23.4

¹⁾ A number in the parentheses shows the ratio (%) to total number of locus.

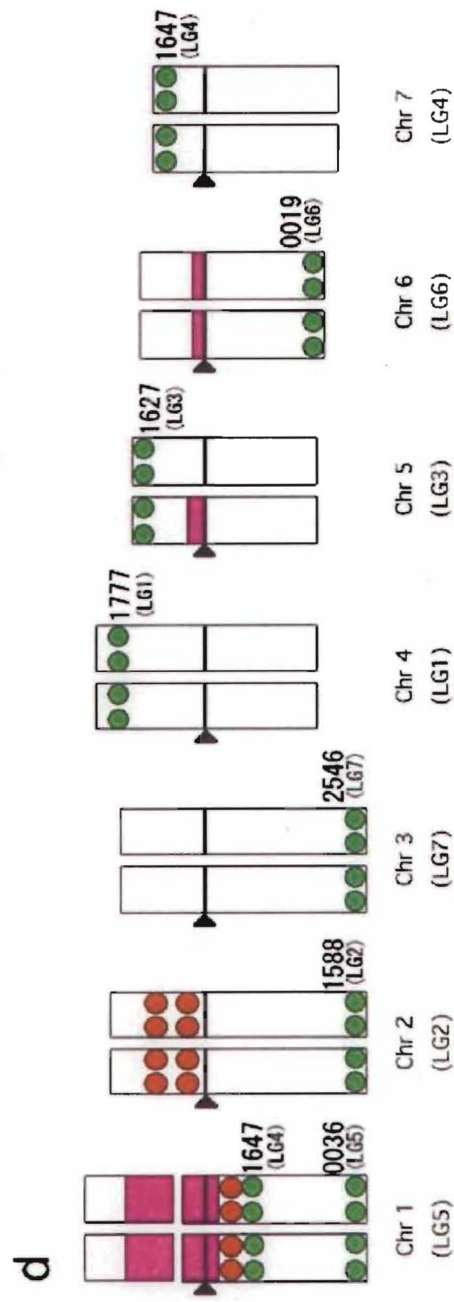


Fig. 8. Cytological analysis of the red clover genome. a: Red clover chromosomes stained by DAPI. b: FISH analysis using 28S rDNA (green signals) and 5S rDNA (red signals) in R130. Arrows and arrowheads indicate 28S rDNA loci on Chromosome 1 and 6, respectively. Open arrows indicate 5S rDNA loci on Chromosomes 1 and 2. c: FISH analysis using RCS2546 (green signals indicated by open arrowheads) and 28S rDNA (red signals indicated by chromosome number) in HR. d: Chromosome map of the red clover genome. Green circles: loci of seven BACs corresponding to LG-specific markers, red boxes: 28S rDNA loci, orange circles: 5S rDNA loci.

各連鎖群から以下のマーカー配列を含む BAC クローンを BAC ライブラリーの 3-D プールから選抜し、FISH 解析を行った。すなわち RCS1777 (LG1)、RCS1588 (LG2)、RCS1627 (LG3)、RCS1647 (LG4)、RCS0036 (LG5)、RCS0019 (LG6) および RCS2546 (LG7) である。RCS1777、RCS1588、RCS1627、RCS0036、RCS0019 および RCS2546 はそれぞれ染色体 4、2、5、1、6 および 3 番で検出された (Fig. 8d)。RCS1647 は染色体 7 番の末端と 1 番の中心部の NOR の近くに検出された。

(5) *L. japonicus* および *M. truncatula* との比較

連鎖地図上に座乗した 1,286 マイクロサテライトマーカーのうち 434 マーカーが *L. japonicus* と、566 マーカーが *M. truncatula* と、257 マーカーが両種のゲノム配列と相同性を示した。相同性を示した配列は他のマメ科植物の連鎖群上での位置を比較することでマクロシンテニーの推定を行った (Fig. 9)。3 種間のマクロシンテニーはアカクローバ (以下 rc) の LG1、*L. japonicus* (以下 Lj) の Chr5 および *M. truncatula* (以下 Mt) の Chr1 の間で認められた。また、Lj chr1 は rc LG6-Mt chr7 および rc LG7-Mt chr3 の間でもマクロシンテニーが認められた。そのほかの連鎖群においては、rc LG 2 - Lj chr2 - Mt chr6 および rc LG 3 - Lj chr4 - Mt chr4 の間で一部関連が認められたものの、全体的には明確な関連が認められなかった。

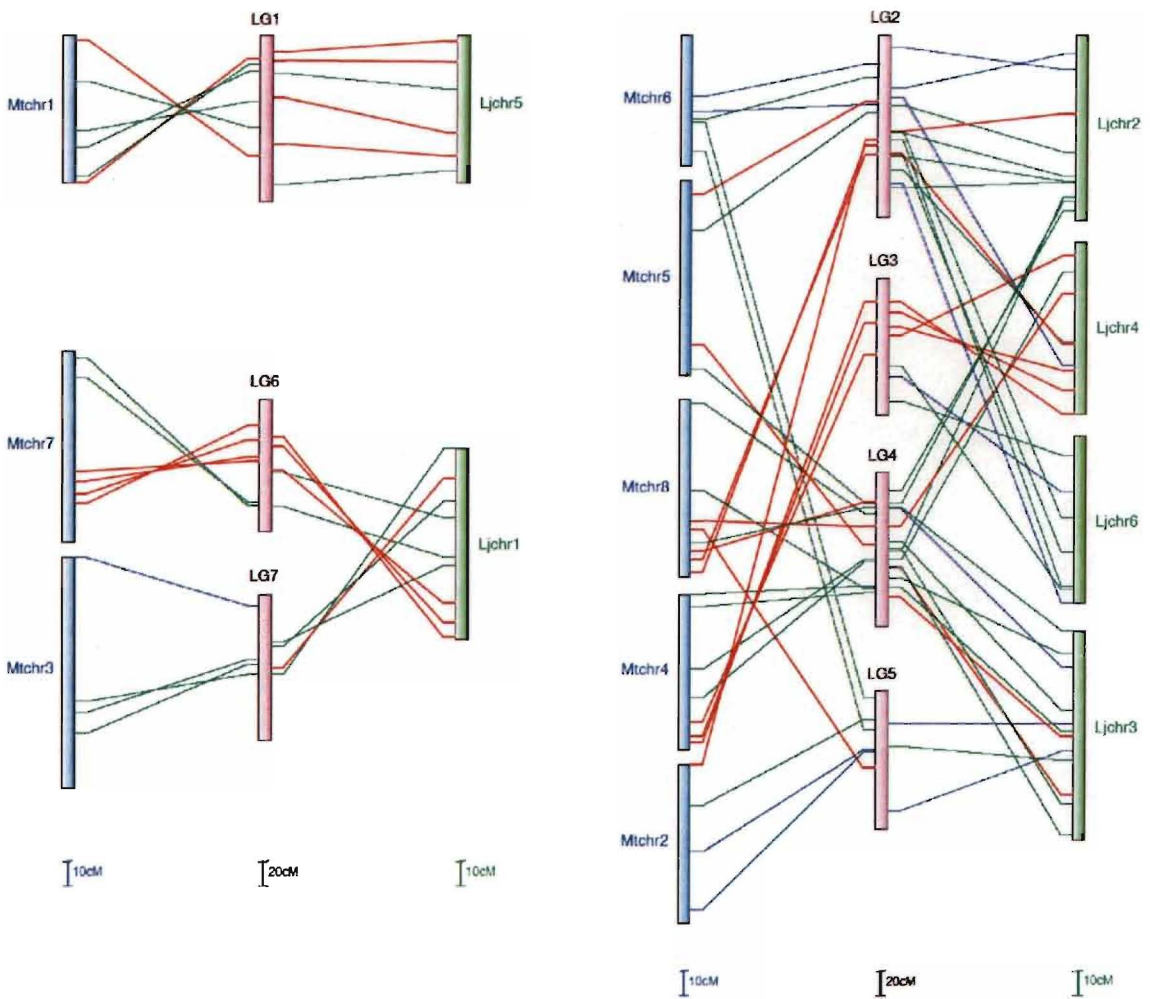


Fig. 9. Macrosynteny between the genomes of red clover and two model legumes.

Putative syntenic relations were estimated by ordering the red clover DNA markers along with the linkage map positions of the corresponding best-hit genomic clones of *L. japonicus* and *M. truncatula*. In cases where multiple red clover LGs were assigned in a region of the *L. japonicus* and *M. truncatula* linkage maps, a representative red clover LG was selected for every 10 cM interval. For each represented syntenic region, one or two representative pairs were drawn with the color code indicating the number of assigned homologous sequence pairs represented by colored lines, blue: one ; green: two to four ; red: five or more.

4. 考察

SSR 同定のために作成した 4 種類のライブラリーのうち、ゲノムおよび cDNA 濃縮ライブラリーではそれぞれ 53%と 57%のクローンに SSR が含まれていたが、SSR 濃縮を行わなかったライブラリーでも十分量の SSR を含むクローンの選抜を行うことができた。2 種類のゲノムライブラリーのうちメチルフィルトレーションゲノムライブラリーは 90%のクローンが既知遺伝子と相同性を示し、フィルター処理の及ぼす効果の高さが明らかとなった。一方、ゲノム SSR 濃縮ライブラリーでも遺伝子領域に多いとみなされたモチーフを濃縮に用いることで 60%以上のクローンが既知遺伝子と相同性を示した。2 種類の cDNA ライブラリーでは 80%のクローンが既知遺伝子と相同性を示したことから、これらのライブラリーは遺伝子に関連したマイクロサテライトマーカの作成に有用なソースであると考えられる。

マーカの多型検出法については取り扱いの容易なアガロースゲルで多型が分離できるマーカの作成を目指した (Isobe et al 2004)。設計した 7,159 プライマーペアのうち 1,488 ペアがマッピング集団で多型を示し、そのうち約 70%がアガロースで多型検出が可能であった。本研究で設計したプライマーペアに対するスクリーニング効率は 21%であり、Barett ら (2004) が報告したシロクロバマイクロサテライトマーカでのスクリーニング効率 (63%) に比べて低い値であった。これは検出バンドの長さの差が大きい配列を厳選して選抜したことによると考えられる。

近年、より精度の高いゲノム解析を目的として密度の高い連鎖地図が数

種の作物で開発されている。本節で作成した連鎖地図の locus の密度は平均で 0.6cM/loci だった。この結果は McCouch ら (2002) によるイネの連鎖地図 (electronic-PCR、157 kb/loci)、Menz ら (2002) によるソルガムの連鎖地図 (AFLP マーカー、0.6 cM/loci) Song ら(2004)によるダイズの統合連鎖地図 (マイクロサテライトマーカー、1.4 cM/loci) など報告されている主要な高密度連鎖地図に比べて遜色がなく、十分な密度を有した連鎖地図であると判断できる。また複数の座を検出したマーカーの割合は全体の 2.3%と低く、本節において開発したマーカーは異なる集団の連鎖解析において高い精度で応用できるものと考えられる。

連鎖地図の全体の長さは 868.7cM であり、第 2 章 1 節で述べた RFLP 連鎖地図の 535.3cM より長かった。距離が長くなった要因のひとつはマーカー数の増加によるゲノムカバー率の増大であると考えられる。また、マッピング集団のゲノムのヘテロ性の違いも関与している可能性がある。本節で用いた集団は日本、スイスおよびロシアに由来していたが、RFLP 連鎖地図集団はロシアのみに由来した。特に、日本とスイスに由来する HR 特異的なマーカーの割合は 43%と R130 の 29%より高く、HR はゲノムのヘテロ性が高いと推察される。

アカクローバのゲノム量を 440.1Mb とした場合 (Sato と Isobe ら 2005)、遺伝距離と物理距離の関係は 507kb/cM となった。この結果は近縁のマメ科植物 *M. truncatula* の 970 kb/cM (Choi ら 2004)、*L. japonicus* の 907 kb/cM (Hayashi ら 2001) およびシロクローバの 835 Kb/cM (Barret ら 2004) に

比べて連鎖距離あたりの物理距離が短い。一般に自殖性植物は他殖性植物に比べて種内の多型性が低いとされており、自殖性である *M. truncatula* や *L. japonicus* とアカクローバの違いはゲノムの多型性に由来している可能性もある。シロクローバとの違いはシロクローバのゲノムサイズが 956Mb (Barret ら 2004) とアカクローバに比べて大きいことが要因であると推察された。

FISH 解析により連鎖地図と染色体地図の統合を行ったところ、染色体 7 番と 1 番に検出された LG4 上の RCS1647 以外のマーカーは各染色体上に 1 箇所ずつ検出された。RCS1647 の染色体 1 番上のシグナルはゲノムが進化の過程で倍加した領域であると考えられる。解析に用いたマーカーは各連鎖群の末端に位置づけられたが、染色体上でも末端にシグナルが検出されており位置の対応にも矛盾がなく、連鎖群の精度の高さが証明された。

L. japonicus および *M. truncatula* のシーケンス情報はそれぞれ全体の約半分が公開されているにすぎないが、アカクローバのクローン配列の約 2/3 と相同性を示し、マクロシンテニー解析を行うことが可能であった。アカクローバ、*L. japonicu* および *M. truncatula* はそれぞれ基本染色体数が 7、6、8 本と異なるものの、アカクローバの 3 つの連鎖群は比較した 3 種のマメ科植物種間で保存性が高いことが推察された。残りの連鎖群においても部分的なマクロシンテニーが認められており、マメ科モデル植物のゲノム情報は高い確率でアカクローバへ応用することが可能であると考えられた。

本節で作成したマイクロサテライトマーカーによる連鎖地図は、マメ科作物の中では最も密度が高くかつ遺伝子由来のマーカーであるため応用性が高

い。また、連鎖地図だけでなく多数の SSR を含む塩基配列情報や染色体との対応、マメ科間でのマクロシンテニーなど本節で蓄積したゲノム情報は DNA マーカーを利用したアカクローバ育種技術の開発の基盤になると考えられる。

5. 摘要

遺伝子領域の配列に由来しアガロースゲルで多型検出が可能なマイクロサテライトマーカーの作出と連鎖地図の作成を行った。4 種類のライブラリーを作成し、SSR 配列を含むクローンの同定を行って 7,244 の SSR プライマーペアを設計した。プライマーを設計した配列のうち 82% が既知遺伝子の配列と同一性があった。マッピング集団で多型をもつプライマーペアをスクリーニングし、188 個体の F1 集団を用いて連鎖解析を行い、既報の RFLP マーカーと合わせて 1,434 座による全長 868.7cM の連鎖地図を作成した。FISH により染色体と連鎖群の 1 対 1 の対応づけを行った。また、マメ科モデル植物 *L. japonicus* と *M. truncatula* とのマクロシンテニーを明らかにした。これらのゲノム情報は DNA マーカーを利用したアカクローバ育種技術の開発の基盤になるものと考えられた。

第3章 アカクローバにおける DNA マーカーの育種的利用法

DNA マーカーは新しい育種技術として期待されており、多くの作物種で整備が行われている。一方、実際に DNA マーカーを利用して育成された品種は現時点では認められていない。その理由としては、DNA マーカーと選抜形質との関連性が必要であることがあげられる。DNA マーカーの実用化へのステップはマーカーの種類や対象とする作物の生殖様式、育種素材の変異の大きさ、育種目標などで異なるが、大きく 2 つのステップに分けることができる。すなわち、開発した DNA マーカーの育種素材に対する多型性の確認と、育種目標に関連する DNA マーカーの同定である。特に、育種目標に関連する DNA マーカーの同定は形質の遺伝様式が複雑になるほど困難であり、QTL 解析、シンテニーを利用したモデル植物の情報利用など様々な手法やゲノムリソースを駆使して行わなければならない (Rajeev ら 2005)。中でも、他殖性植物は DNA マーカー解析の事例が少なく、育種的利用への適用と技術に関する理論開発も遅れていることから、DNA マーカーを用いた育種への利用効率を上げるためにはその特性を多面的に証明する必要がある。

本章は、アカクローバにおける DNA マーカーを育種へ利用するための第一段階として、第 2 章で開発した RFLP マーカーおよびマイクロサテライトマーカーの育種素材に対する応用性と選抜 DNA マーカーとしての可能性を検討する。そこで、第 1 節では DNA マーカーの育種素材に対する応用性を明らかにするために異なる遺伝子型をもつ個体に対するマーカーの移行性と連鎖地図

上のマーカー位置の安定性を評価する。第2節では目的形質に関連する DNA マーカーの同定の最初のステップとして、越冬性をターゲット形質とし、QTL 解析による候補領域の検出を行う。

第1節 RFLP およびマイクロサテライトマーカーの育種素材への応用性

1. 緒言

実際に DNA マーカーを育種の場面で利用する際に重要なことはそのマーカーの育種素材に対する移行性 (Transferability) である。すなわち、各マーカーの検出する多型性が異なる遺伝子型をもつ個体においても保持されているか否かである。

アカクローバの育種現場ではその最初のステップである基礎集団評価において通常 2000~4000 個体を素材として取り扱うため、この時点で 4000~8000 のハプロタイプが比較されることになる。これに対して1つの連鎖地図が1種類の F₁ 集団から作成されるとすれば、連鎖地図上のマーカーは4つのハプロタイプの多型を比較して作成されたにすぎない。すなわち、ひとつの連鎖地図上のマーカーの多型情報はそのままでは育種素材の多様性に対して非常に限定されていると考えられる。

また、他殖性の牧草類は一般に系統間の多様性より品種・系統内の多様性が高いことが指摘されており、アカクローバにおいても RAPD マーカーや AFLP マーカーにより系統内の多様性の高さが証明されている (Milligan

1991、Kongkiatngam ら 1995、Camois-de-Quiroz ら 2001、Kölliker ら 2003、Herrman ら 2005)。このことはアカクローバの育種素材は遺伝的多様性が高く、DNA マーカーを育種現場に導入する際には様々な遺伝資源に対応できる移行性の高いマーカーが求められていることを意味する。

一方、DNA マーカーの育種素材に対する応用性を検討する際には、移行性の高さだけでなく、連鎖地図上の位置の安定性に関する情報も必要とされる。Hayashi ら (2001) は *L. japonicus* の連鎖地図を Miyakojima MG-20 と Gifu B-129 の 2 系統を用いて作成し、両系統の染色体 1,2 番の間で転座が生じていることを明らかにした。*L. japonicus* は自殖性であるが、他殖性で遺伝的多様性が高いアカクローバにおいては転座などの染色体構造の変異がさらに高い頻度で生じている可能性が考えられる。また、解析集団の多型性やマーカーの数により組み換え価の結果は異なることから、染色体構造に変化がなくても各連鎖地図でマーカーの位置が変化することも予想される。

以上の背景から、本節においては第 2 章で開発した RFLP マーカーとマイクロサテライトマーカーの育種素材に対する移行性を解析する。また、RFLP 連鎖地図上とマイクロサテライト高密度連鎖地図上のマーカーの位置を比較し、異なるマッピング集団間でのマーカーの位置の安定性を検討する。

2. 材料および方法

(1) RFLP マーカーの多型解析

供試材料は日本の育成品種である「ホクセキ」、ロシアの「ラーニイ 2」

およびカナダの「アルタスウェード」の3品種を用いた。各品種から4個体ずつゲノムDNAを抽出し、全12個体について90のcDNAプローブによるRFLP解析を行った。RFLP解析は第2章第1節と同様の方法で行い、多型バンドの数の評価とRFLP連鎖地図のマッピング集団の両親である「272」、「WF1680」とのバンドサイズの比較を行った。バンドサイズの違いを異なるアレルとみなし、バンドを検出できなかった座はホモ座のnull（該当する遺伝子座を持たない）であるとみなした。

(2) マイクロサテライトマーカーの多型解析

異なる11カ国で育成されたアカクローバ品種・系統を多型解析に用いた。用いた品種・系統は以下の通りで、()内は育成国を示す。「ナツユウ」(日本)、「ホクセキ」(日本)、「サッポロ」(日本)、「北育20号」(日本)、「ラーニイ2」(ロシア)、「スタート」(チェコスロバキア)、「クラノ」(デンマーク)、「レノバ」(スイス)、「メルビー」(ベルギー)、「ケンランド」(アメリカ合衆国)、「アルタスウェード」(カナダ)。各品種8個体からゲノムDNAを抽出し、全88個体について連鎖群をカバーするマイクロサテライトマーカーに対応する268プライマーペアを用いてPCRを行った。PCRの反応液組成とプログラムは第2章第2節と同様である。PCR増幅産物を10%アクリルアミドゲルで泳動し、エチジウムブロマイド染色によりバンドを検出した。バンドのサイズの違いを異なるアレルとみなし、バンドを検出できなかった座はホモ座のnullであるとみなした。バンドが1本のみ検出された場合、遺伝子型はホモ型(aa)かnullアレ

ルとのヘテロ座 (ao) と推察できるが、その判断はホモ座の null が 88 個体中に検出された割合から推定した。各マーカーについてアレルの数と以下の式による PIC の算出を行った。

$$PIC_i = 1 - \sum_j P_{ij}^2$$

(P_{ij} は i マーカーにおける j アレルの頻度を示す)。

(3) RFLP 地図とマイクロサテライト地図の比較

第 2 章の第 1 節で開発した RFLP マーカーは第 2 章の第 2 節においてマイクロサテライト地図上に位置づけられているので、マイクロサテライトマーカーを RFLP 地図上に位置づけた方法について述べる。

RFLP 連鎖地図を作成した解析集団「272×WF1680」から任意に抽出した 94 個体および両親のゲノム DNA を用いてマイクロサテライト連鎖地図全体をカバーしている 177 プライマーペアについて PCR を行った。PCR の反応液組成とプログラムは第 2 章の第 2 節と同様である。アガロースゲルを用いて多型を判別し、カラーマッピング法 (Kiss ら 1998) および解析プログラム JoinMap ver3.0 (<http://www.kyazma.nl>) を用いて解析した。また、1 形態マーカー、8 RAPD マーカー (Oerpn 社 10mer kit) および 6 STS (Sequence Tag-Sites) マーカーのデータも連鎖解析に加えた。STS マーカーは Ivashuta ら (2002) により同定されたアルファルファ耐凍性に関する候補遺伝子の領域から設計されたマーカーである。連鎖解析の手順と条件は第 2 章の第 2 節と同様である。

3. 結果

(1) RFLP マーカーの多型解析

Table 28 に 90 cDNA プローブにより検出されたアカクローバ 12 個体間における多型バンドの数を示した。90 中 85 のプローブが 12 個体間で多型を検出したが 5 プローブは多型を検出しなかった。78 プローブはマッピング後代と同じ大きさのバンドを検出したが、残りの 7 プローブはマッピング集団と同じサイズのバンドを検出しなかった。「ホクセキ」「アルタスウェード」および「ラーニイ 2」の各品種内で多型を検出したプローブの数はそれぞれ 79、83、83 だった。3 つの品種間で品種特異的なアレルが検出されたプローブの数は 33 だった。全体でみると、1 プローブあたりのアレルの数は 3.3 であり、最大は 10、最小は 1 だった。

(2) マイクロサテライトマーカーの多型解析

多型解析を行った 268 プライマーペア全てが 88 個体間で多型を示した。Fig.10 にマイクロサテライトマーカーのアレルの数および PIC の頻度分布を示した。1 マーカーあたりの平均のアレルの数は 6.5 で最大が 19、最小が 2 だった。各マーカーのプライマーペアにおいて 1 個体以上がバンドを検出しなかったプライマーペアは供試した 268 プライマーペア中 78 プライマーペアだった。PIC の平均値は 0.6 で最大が 0.89、最小が 0.05 だった。PIC の頻度がもっとも高かったのは 0.7~0.8 の間だった。

Table 28. Number of cDNA probes detecting polymorphic alleles among twelve germplasms from three red clover varieties.

	Monomorphi	Polymorphic		Total
	c	Same ¹⁾	Different ²⁾	
Among twelve plant	5	78	7	85
Within varieties				
Hokuseki'	11	66	13	79
'Altaswede'	7	72	11	83
'Runny-2'	7	75	8	83
<u>Among varieties</u>	<u>57</u>	<u>15</u>	<u>18</u>	<u>33</u>

Ninety cDNA probes tested in all.

¹⁾ Numbers of cDNA probes detectable the same allele at least either parents of the RFLP linkage map population: 272 and WF1680.

²⁾ Numbers of cDNA probes detectable polymorphic alleles were strictly different from both mapping parents.

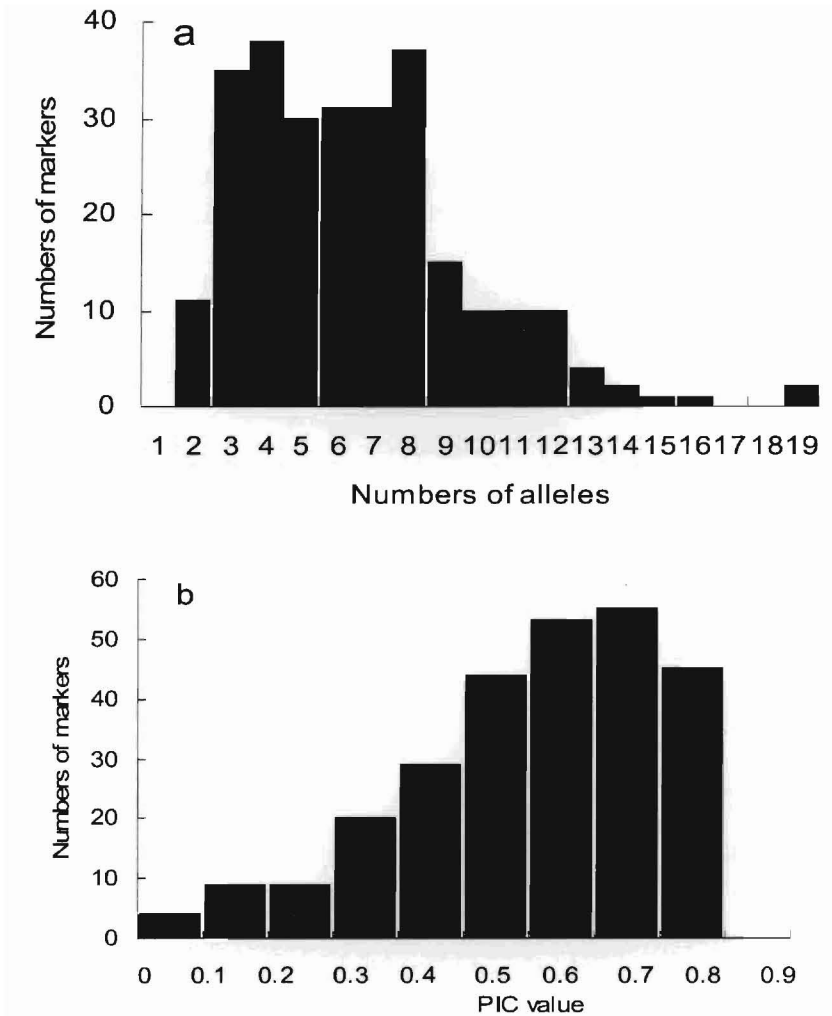


Figure 10. Distribution of allele frequency of 268 microsatellite markers in 88 red clover germplasms.

a: The number of alleles per markers; b: PIC values.

(3) RFLP 地図とマイクロサテライト地図の比較

RFLP 連鎖地図の作成集団「272×WF1680」について 121cDNA プローブ由来の 249RFLP マーカー、128 マイクロサテライトマーカー、8RAPD マーカー、6STS マーカーおよび 1 形態マーカーによる連鎖解析から 301 座位による全長 747.5cM の地図を作成した。Table 29 に連鎖地図上の座位の数と RFLP マーカーとしてハイブリダイズされた cDNA プローブの数を示す。連鎖地図上の 301 座位のうち RFLP マーカーの座位の数は 87cDNA プローブに由来する 197 座位であり、マイクロサテライトマーカーの座位の数は 98、その他のマーカーによる座位が 6 であった。1 マーカーから 2 つ以上の座位が位置づけられたマーカーは認められなかった。連鎖地図上に位置づけられなかったマーカーの数は 91 であり、解析したマーカー数の 23%を占めていた。

「272×WF1680」集団により再構築された地図（以下、「272×WF1680」地図）に位置づけられたマイクロサテライトマーカーは、全て第 2 章の第 2 節で作成した「HR×R130」集団による高密度連鎖地図（以下、「HR×R130」地図）にマップされたマーカーである。「272×WF1680」地図の各連鎖群に位置づけられたマイクロサテライトマーカーは、全て「HR×R130」地図の同一連鎖群に位置づけられた。一方、RFLP マーカーとしてハイブリダイズされた 140 cDNA プローブのうち 65 プローブ（46%）は「272×WF1680」地図と「HR×R130」地図において同一連鎖群に位置づけられたものの、22 プローブ（16%）プローブは異なる連鎖群に位置づけられた（Table 29）。同一連鎖群に位置づけられたプローブの割合が最も高かったのは LG4 で、異なる連鎖群に位置づけら

Table 29 Number of locus and hybridized cDNA probes on a re-constructed linkage map of 272xWF1680 mapping population.

Linkage group	Number of locus				Length (cm)	Number of hybridized cDNA probes ²⁾			
	RFLP	Microsatellite	Others ¹⁾	Total		Same ³⁾	Different ⁴⁾	Un-hybridized ⁵⁾	Total
LG1	20	11	3	34	97.3	4 (21)	6 (32)	9 (47)	19
LG2	33	17	2	52	99.8	13 (54)	2 (8)	9 (38)	24
LG3	45	17	0	62	124.2	13 (46)	4 (14)	11 (39)	28
LG4	28	15	0	43	123.4	17 (74)	0 (0)	6 (26)	23
LG5	24	11	0	35	113.5	5 (33)	2 (13)	8 (53)	15
LG6	29	13	0	42	100.5	6 (35)	5 (29)	6 (35)	17
LG7	17	14	1	32	88.8	7 (50)	3 (21)	4 (29)	14
Total	196	98	6	300	747.5	65 (46)	22 (16)	53 (38)	140

¹⁾ Morphological, RAPD and STS markers.

²⁾ Numbers in parentheses are percentages to total numbers.

³⁾ cDNA probes hybridized on same linkage groups of the microsatellite high-density linkage map by HRxR130 mapping population.

⁴⁾ cDNA probes hybridized on different linkage groups of the microsatellite high-density linkage map by HRxR130 mapping population.

⁵⁾ cDNA probes those did not be hybridized on the microsatellite high-density linkage map by HRxR130 mapping population.

れたプローブの割合が最も高かったのはLG1だった。

Fig.11 に 272×WF1680 地図と HR×R130 地図のマーカの位置関係を示した。マーカの並びの保存性は連鎖群により異なった。LG2、3、4、6 はマーカの並びの保存性が高かったが、LG1、5、7 は異なる位置に位置づけられるマーカが多く認められた。

4. 考 察

本節では RFLP マーカおよびマイクロサテライトマーカの育種素材に対する移行性と 2 つの連鎖地図間におけるマーカの位置の比較から、第 2 章で開発した DNA マーカの応用性の検証を行った。

RFLP マーカについては多型解析を行った 90cDNA プローブの 74% が 12 個体間で多型を示し、87% がマッピング集団「272×WF1680」と同じサイズのバンドを検出した。このことから、アカクローバ cDNA プローブ由来の RFLP マーカは育種素材に対して十分な移行性があると考えられた。また、各品種内で多型を検出した cDNA プローブの数が 79~83 と品種間の差が小さかったことから、解析した 3 品種が異なる地域で育成されたにも関わらず、品種内の多様性が同じ程度であったことが示唆された。

マイクロサテライトマーカについては、多型解析を行った全 268 プライマーペアが育成国の異なる 11 品種で多型バンドを検出したことから、由来の異なる育種素材においても多型検出が可能であることが明らかとなった。バンドの多型性に品種間で明確な差は認められなかった。1 マーカあたりのアレル

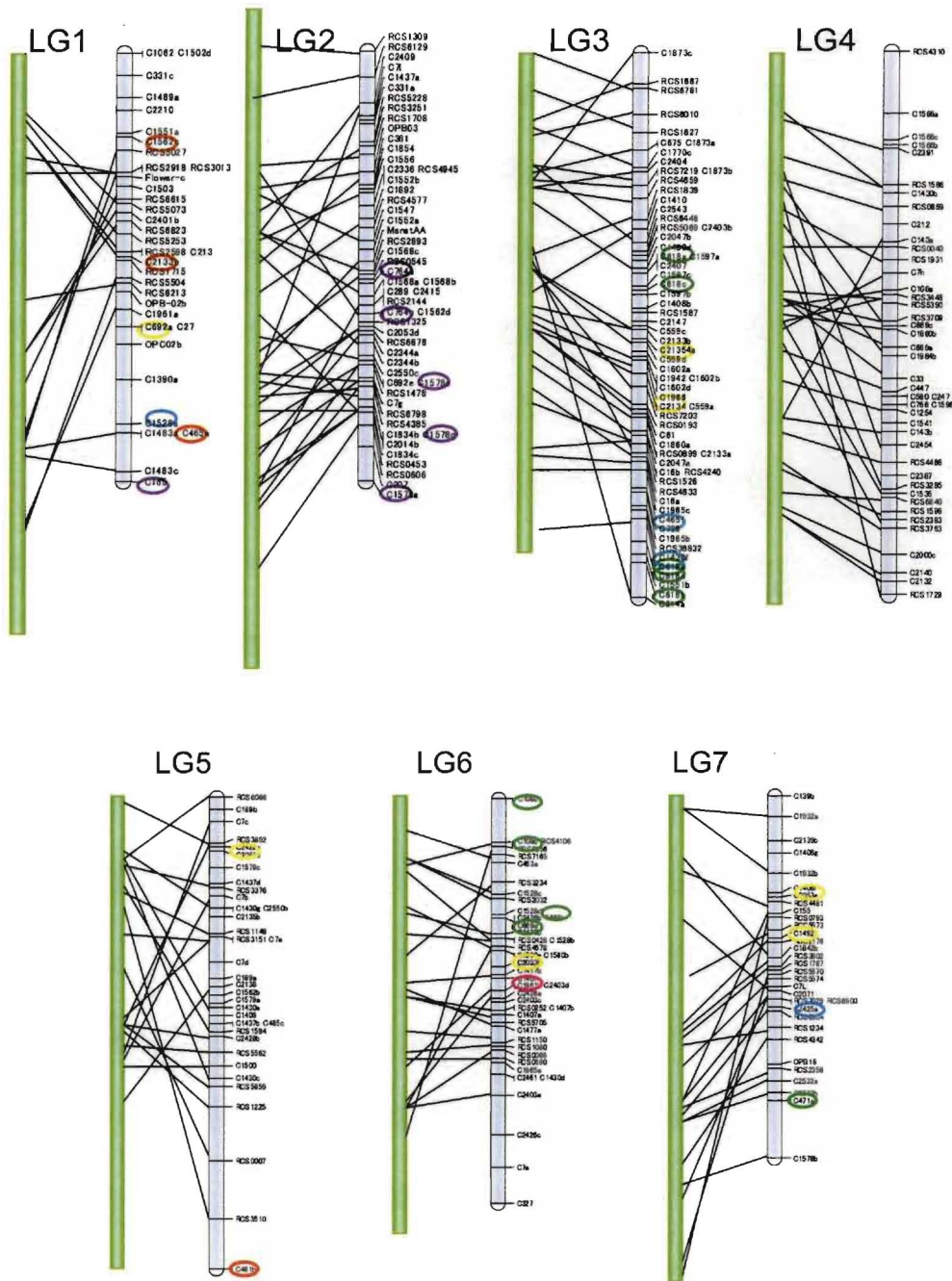


Fig. 11. A comparative linkage map between two F_1 mapping populations, HRxR130 and 272xWF1680. Green (left) bars indicate linkage groups of HRxR130 and blue (right) bars indicate linkage groups of 272xWF1680. Black lines indicate positional relationships of locus between two linkage groups. RFLP markers are compared their loci positions by the hybridized cDNA probes. Circles on locus on 272xWF1680 linkages indicate that the loci are mapped on different linkage groups of HRxR130. Circle colors represent each linkage groups of HRxR130 linkages; pink LG1, yellow LG2, Orange LG3, green LG4, aqua LG5, blue LG6 and purple LG7. Loci name with C and RCS represent RFLP and microsatellite, respectively.

数は2~19で平均は6.5だったが、これはRFLPマーカ-の平均のアレル数(3.1)より多く、マイクロサテライトマーカ-はRFLPマーカ-に比べて多型性が高いと判断した。

マーカ-の多型性の指数である PIC は各マーカ-のアレルの数と多型アレルの分布による均一性をもとに算出される。マイクロサテライトマーカ-の PIC は平均で 0.6 だったが、このことは、これらのマーカ-がヘテロ座を検出する確率が平均で 60%であることを意味している。F₁集団を用いた遺伝解析においては各両親のもつヘテロ座が解析の対象となることから、本マイクロサテライトマーカ-は平均で 60%の個体に対して適用可能であり、移行性の高いマーカ-であることが解った。一方、Kölliker ら(2005)が開発したゲノム DNA に由来する 27 マイクロサテライトマーカ-は、24 アカクローバ個体での多型解析においてアレル数が 2~25 で、ヘテロ座を検出したマーカ-の割合は 71%であり、本節で解析を行ったマーカ-にくらべて多型性が若干高かった。一般に、遺伝子領域は遺伝子が存在しない領域に比べて配列の保存性が高いとされており、このことが遺伝子領域由来の割合の高い本マイクロサテライトマーカ-と Kölliker らのマーカ-との多型性の違いに影響したと考えられる。

マイクロサテライトマーカ-のアレルの数と PIC の分布の形を比較すると、アレルの数の分布は平均値 6.5 よりも少ない数で分布のピークが認められたのに対し、PIC は平均値 0.6 よりも高い PIC で分布のピークが認められた。このことは、アレルの数が多いマーカ-はアカクローバの集団内において異なるアレルが比較的同程度の割合で存在していることを示唆している。マーカ-

の多型解析を行ううえで、より均一に多型アレルが分布しているマーカーは選抜効率が高く、多型アレルの分布が偏っているマーカーより有用性が高い。このことから、本節で開発したマーカーは選抜効率が高く使いやすいマーカーであると考えられた。

「272×WF1680」集団において連鎖地図の再構築に供試した RFLP マーカーの数は第 2 章の第 1 節と同じ 249 マーカーであるが、地図上に位置づけられた RFLP マーカーの座の数は 156 から 197 に増加した。これは解析マーカー数の増加により両親に共通の座位が増えたことで、連鎖地図計算の過程で除外されるマーカーの割合が減少したためと考えられる。また、連鎖地図の距離が 535.31cM から 747.5cM と長くなったことから、マイクロサテライトマーカーが追加されたことで連鎖地図のゲノムに対するカバー率が上がったことが示唆された。

「272×WF1680」地図と「HR×R130」地図では、座の並びの保存性が連鎖群により異なり、LG2、3、4、6 は保存性が比較的高く、LG1、5、7 は低かった。LG2、3、4、6 は「272×WF1680」地図において連鎖群上の座の数が 42～63 であったのに対し、LG1、5、7 は 32～35 と少なく、連鎖群上の座の数がマーカーの並びの保存性に影響を与えていると考えられる。第 2 章の第 1 節で述べたように、座の数が少ない連鎖群は解析から 1 マーカーを除外するだけで連鎖群の計算結果が大きく変わることもあり、解析結果が安定しない。このことから、連鎖地図間の座の位置の比較には少なくとも 50 以上の座が各連鎖群に座乗している必要があると考えられた。また、LG1 と LG5 は高密度な

「HRxR130」地図においても比較的座の密度が低く、LG1 は個体により多型性が異なる連鎖群で、LG5 は大きな rDNA 領域を有する最も長大な染色体 1 番に相当する連鎖群だった。このことはゲノム構造も座の並びの保存性に影響を与えていることを示唆している。「272×WF1680」地図上の座の数をさらに増加させ、座の数による位置の安定性の影響を排除することで、転座が起きやすい領域を同定できる可能性が高い。

「272×WF1680」地図上のマイクロサテライトマーカーは全て「HRxR130」地図上の同一連鎖群に座乗していたが、RFLP マーカーは 16% の cDNA プロブが異なる連鎖群上に座が位置づけられていた。これは 1 つの cDNA プロブから検出された複数のバンドについて各バンドを異なるマーカーとみなしたことが影響したと考えられる。また、RFLP マーカーは DNA 断片とゲノム DNA の結合により多型を検出することから、PCR をベースとするマイクロサテライトマーカーに比べて異なる配列に対する検出の許容性が高く、このことも RFLP マーカーが異なる連鎖群に位置づけられたことに関与していると考えられた。

第 2 章で開発した RFLP マーカーとマイクロサテライトマーカーはともに育種素材に対して十分な多型性を有していたが、マイクロサテライトマーカーの方が多型性が高く、また連鎖群上の座乗位置が安定していた。今後、選抜マーカーなど育種に対するマーカーの実用化を図る上でマイクロサテライトマーカーの利用がより有効であるものと考えられる。

5. 摘要

第2章で開発した RFLP およびマイクロサテライトマーカークの育種素材への応用性を明らかにすることを目的として、異なるアカクローバ遺伝型に対するマーカークの移行性と 2 つの連鎖地図間のマーカークの位置の保存性を検討した。RFLP マーカークについては多型解析を行った 90cDNA プローブの 74% が 12 個体間で多型を示し、87% がマッピング集団「272×WF1680」と同じサイズのバンドを検出した。1 プローブあたりのアレルの数は 3.3 であり、最大は 10、最小は 1 だった。マイクロサテライトマーカークについては多型解析を行った 268 プライマーペア全てが 88 個体間で多型を示し、1 マーカークあたりの平均のアレルの数は 6.5 で PIC の平均値は 0.6 だった。

RFLP 連鎖地図を作成した「272×R130」集団について、マイクロサテライト地図全体をカバーする 177 プライマーペアの多型解析を行い、全長 747.5cM の 301 座による連鎖地図を再構築した。地図上のマーカーク位置をマイクロサテライト地図と比較したところ、RFLP マーカークについては 16% のプローブが両地図間において異なる連鎖群に位置づけられていた。一方、マイクロサテライトマーカークは両連鎖地図において全て同一連鎖群に位置づけられた。RFLP マーカークとマイクロサテライトマーカークはともに育種素材に対して十分な多型性を有していたが、マイクロサテライトマーカークの方が多型性が高く、また連鎖群上の座乗位置が安定しており、育種技術としてのマーカークの実用化を図る上では、マイクロサテライトマーカークの利用がより有効であるものと考えられた。

第2節 アカクローバの越冬性に関するQTL解析

1. 緒言

DNA マーカーを用いた育種法として最も期待されているのは、目的形質に関与する DNA マーカーを用いて育種素材の選抜を行う MAS (Marker Assisted Selection) である。特に、収量やストレス耐性などある形質に関して複数の遺伝子が関与している量的遺伝子座 (QTL: Quantitative Trait Loci) は発現に環境要因の影響を受けやすく、表現型での効率的な選抜が困難であり、DNA マーカーによる MAS が選抜の効率化につながると考えられている。MAS への第1歩は選抜に用いる DNA マーカーの開発、すなわち目的形質に関連する DNA マーカーの探索である。一般に QTL に支配されている形質に関連する DNA マーカーの探索は QTL 解析と称されているが、QTL 解析にはいくつかの手法が存在する。最も広く行われている方法はインターバルマッピング法であるが、これは連鎖地図と連鎖地図を作成した集団を用いて QTL を連鎖地図上に位置づける方法であり、形質に関与する QTL の数、連鎖地図上の位置、および作用力を検出することが可能である (鵜飼 2000)。

越冬性とは越冬時に生じる生物的・非生物的複合ストレス耐性と定義される (北海道農業研究センター、2001)。中でも生物的ストレス、すなわち病害による影響は全体の 3~8 割を占めていると報告されている (Novosiolova, 2002)。越冬中に生じる最も重要な病害は積雪下において子のう菌 (*Sclerotinia trifoliorum* Eriksson) によって発生する菌核病である (Baldin et al 2001)。

菌核病は秋に感染したのち積雪下で徐々に進行し、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）。本種において、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 であると推定されている。一方、越冬性に関与する主な非生物学的ストレスは耐凍性であり、耐凍性もまた QTL に支配される形質であることが明らかにされている（Alonso-Blanc ら 2005）。しかしながら、個体レベルでのアカクローバの耐凍性検定は検定の系が確立されておらず、現在のところ評価が非常に難しい。

以上の背景から本節では菌核病抵抗性を中心とした越冬性に関する選抜 DNA マーカーの開発の最初のステップとして、2 つの連鎖地図作成集団「272×WF1680」および「HR×R130」を利用してこれらの形質に関する QTL 解析を行った。また前節の地図の比較結果をもとに、2 つの連鎖地図上にマッピングされた QTL の位置を比較して、異なる解析集団における QTL 発現の差異を検討した。

2. 材料および方法

(1) RFLP 連鎖地図による解析

第 2 章の第 1 節で作成した 158 座による RFLP 連鎖地図と解析集団「272×WF1680」を用いて QTL 解析を行った。解析集団の各個体を挿し木または腋芽培養により増殖し、北海道農業研究センター（以下北農研、所在地札幌市）および全ロシアウィリアムス飼料作研究所（以下ウィリアムス研、所在地

ロシア・モスクワ地域)において形質評価を行った。両場所における形質評価項目および解析に用いたアカクローバの遺伝型の数を Table 30 にまとめた。

ウィリアムス研では菌核病の室内および圃場での菌核病抵抗性検定を行った。室内検定では解析集団 36 個体について、*S. trifoliorum* の培養液を葉の表面にスポットし、14-16 度のグロスチャンバー内に一週間放置して、葉の罹病程度を算出した。圃場検定は解析集団 59 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 月に各遺伝型の罹病程度を算出した。

北農研では 2000 年 6 月に解析集団を 1 反復で圃場へ移植し、2001 年の融雪直後に各株の写真撮影を行い、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。2001 年 6 月に前年とは異なる圃場に解析集団を 3 反復で移植し、翌年の融雪 2 週間後に草丈を測定した。

QTL の検出は解析ソフトウェア MapQTL ver4.0 (Van Ooijen ら 2002) を用いて Kruskal-Wallis analysis (Lehmann ら 1975) およびインターバルマッピング (Lander と Botstein 1989) を行った。Kruskal-Wallis analysis とは連鎖地図の情報を利用せず分散分析法をベースとしてマーカーと形質の関係を解析する方法であり、インターバルマッピング法は連鎖地図の情報を利用して最尤法をベースに QTL の候補領域を検出する方法である。QTL 検出の閾値は Kruskal-Wallis analysis では $P \leq 0.01$ としインターバルマッピングでは LOD 値 ≥ 2.7 とし、両法による検出領域が一致した領域を QTL の候補領域とした。なお、インターバルマッピングの LOD 値の閾値は Van Ooijen (1999) が作成したシミュレーション表より算出した。

Table 30. Summary of experiments and statistical results for *Sclerotinia* resistance and winter hardiness in 272xWF1680 mapping population.

	Year	Location	Trait name	No. of tested genotypes	Mean (%)	Range (Min-Max)
<i>Sclerotinia</i> resistance						
Laboratory experiment ¹⁾	2003	ARWFCI	SRL	36	38.7	(11.1-70.4)
Field experiment ²⁾	2002	Moscow region	SRFR	59	25.5	(14.8-100)
Winter hardiness						
Green part ratio of crown (%)	2001	Sapporo	GPRJ	139	7.3	(0-59.2)
Plant height in early spring (cm)	2002	Sapporo	PHIJ	152	6.3	(2.0-10.3)

¹⁾ Attacked percent on leaves.

²⁾ Attacked percent on crown.

³⁾ All-Russian Williams Fodder Crop Institute.

RFLP 連鎖地図に位置づけられた 135cDNA プローブのシーケンスを行い、耐病性およびストレス耐性に関する遺伝子との相同性解析を行った。100 プローブのシーケンスは北海道システムサイエンス社において ABI Prism 3100 Genetic Analyzer により BigDye terminator v2.0 (ABI 社) を用いて行った。35 プローブはドラゴンジェノミクスセンター (タカラバイオ社) において MegaBACE 1000 により DYEnamic ET dye termination キット (Amasham bioscience 社) を用いて行った。シーケンスは片側解読のみを行い、BLAST プログラムの BLASTX を用いて公開データベース上の既知遺伝子との相同性解析を行った。また、RFLP 連鎖地図上にアルファルファの耐凍性に関連する 2 つの遺伝子候補 SICAS (Genbank accession No. L13415, Wolfraim と Dhindsa,1993) および MSnat (Genbank accession No. AF439379, Ivashuta ら 2002) を位置づけた。SICAS と MSnat のプライマー配列はそれぞれ 5'-TAGAGGAGTTGTGGACAAGA / 5'-TAGATACATGAGGTGATAAGA および 5'-GTCAGGCTGGACGGTCG / 5'-GGATTCATACTCGGGTGGAG である。

(2) マイクロサテライト連鎖地図による解析

第 2 章の第 2 節で作成した集団「HR×R130」と 1434 座によるマイクロサテライト連鎖地図を用いて QTL 解析を行った。「272×WF1680」集団による解析と同様に、各個体を挿し木または腋芽培養により増殖し、ウィリアムス研および北農研において形質評価を行った。形質評価に用いたアカクローバのクローン数はウィリアムス研が 96、北農研が 188 である。

ウィリアムス研では 2004 年 9 月に菌核病罹病性および萎ちょう病 (*Fusarium oxysporum*) 検定圃場にそれぞれ 6 反復で個体を移植し、2005 年 5 月に各個体の罹病程度を算出するとともに、株の生存率から越冬性を評価した。北農研では 2003 年 6 月に 5 反復で圃場へ個体を移植し、2004 年 5 月に菌核病抵抗性を 9 段階の評点 (1:病徴無-9 : 病徴甚) で 2005 年 4 月に越冬性を 9 段階の評点 (1:極弱-9:極強) で評価した。QTL の検出法は RFLP 連鎖地図を用いた解析と同様である。

第 3 章の第 1 節で再構築した 301 座による「272×WF1680」集団の連鎖地図 (197 RFLP および 98 マイクロサテライト座) を用いて、「272×WF1680」集団における QTL の再解析を行った。解析に用いた形質データは、RFLP 連鎖地図による解析で用いたデータと同一であるが、遺伝子型の数は異なり、菌核病室内検定が 26、菌核病圃場検定が 45、株の緑色部割合が 86、草丈が 88 だった。検出された QTL について、前節で作成した比較地図によりマイクロサテライト地図上の QTL との位置を比較した。

3. 結果

(1) RFLP 連鎖地図による解析

Table 30 に菌核病および越冬性に関する形質値の概要を示した。菌核病の罹病程度 (ウィリアムス研) は、室内検定では平均で 38.7%(最大 70.4%、最小 11.1%、272 : 42.6%、WF1680 : 50.0%)であり、圃場検定では平均で 25.5% (最大 100%、最小 14.8%、272 : 33.3%、WF1680 : 33.3%)であった。北農研

における融雪直後の株の緑色部割合は平均で 7.3%(最大 59.2%、最小 0%、272: 11.7%、WF1680:20.2%)であり、草丈は平均で 6.3cm(最大 10.3cm、最小 2.0cm、272: 8.3cm、WF1680: 11.1cm)であった。全ての形質は解析集団内で分離していることから、QTL 解析に適していると判断した。調査を行った項目間において全ての組み合わせで有意な相関が認められなかった (Table 31)。

Table 32 および Fig.12 に RFLP 連鎖地図上に検出された有意な QTL (インターバルマッピングで $LOD \geq 2.7$ かつ Kruskal-Wallis analysis で $P \leq 0.05$) を示した。検出された QTL は合計で 7 つあり、その内訳は室内検定による菌核病抵抗性 (SRL) に関して 3 つ、圃場検定による菌核病抵抗性 (SRFR) に関して 1 つ、株の緑色部割合 (GPRJ) に関して 2 つ、早春の草丈 (PHIJ) に関して 1 つであり、異なる形質の QTL が同一箇所を検出されることはなかった。連鎖群別にみると LG6 上に検出された QTL が 3 つと最も多く、ついで LG1 上の 2 つであった。LG3 と LG7 上には QTL が検出されなかった。最も効果の高い QTL は圃場検定による菌核病抵抗性で、表現型の分散に対する説明割合が 82.6%であった。検出された 7 つの QTL のうち 5 つは WF1680 特異的な QTL で、残りの 2 つは両親に共通な QTL であり、272 特異的な QTL は検出されなかった。

アルファルファの耐凍性に関与する候補遺伝子から設計した STS マーカー、SICAS と MSnat はそれぞれ LG6 上の 13.8cM と 34.7cM に位置づけられた (Fig.12)。cDNA プローブのシーケンスを用いた相同性解析において、ストレス耐性に関する候補遺伝子と高い相同性を示したプローブは 9 つあった

Table 31. Pearson phenotypic correlation among traits in 272 of WF1680 mapping population.

	SRL	SRFR	GPRJ
SRFR	0.221		
GPRJ	-0.159	-0.071	
PHIJ	-0.118	0.129	0.071

Table 32. Summary of significant QTLs affecting *Sclerotinia trifoliorum* resistance in laboratory test (SRL), field test (SRFR) and winter hardiness estimated by green part ration of crown (GPRJ) and plant height (PHIJ) in 272xWF1680 mapping population.

Trait	QTL	Marker interval	Peak position		Maximum LOD	EXP % ¹⁾	Specific site ²⁾
			LG	cM			
SRL	<i>SRLa</i>	C1568a-C1552a	2	58.3	3.8	40.0	WF1680
	<i>SRLb</i>	C2428a-C1430g	5	17.7	3.3	41.4	WF1680
	<i>SRLc</i>	C1965a-MsnatB	6	32.6	3.0	51.5	bi-parental
SRFR	<i>SRFR</i>	C465	1	0.0	3.0	82.6	WF1680
GPRJ	<i>GPRJa</i>	C1407a-C1528b	6	55.7	4.9	18.8	WF1680
	<i>GPRJb</i>	C1528d-C108c	6	75.9	6.6	29.9	WF1680
PHIJ	<i>PHIJ</i>	C1579a-C461b	1	102.0	3.0	12.4	bi-parental

¹⁾ Percentage of the total phenotypic variance explained by the QTL.

²⁾ Maternal (272) or paternal (WF1680) specific sites detected as significant QTLs.

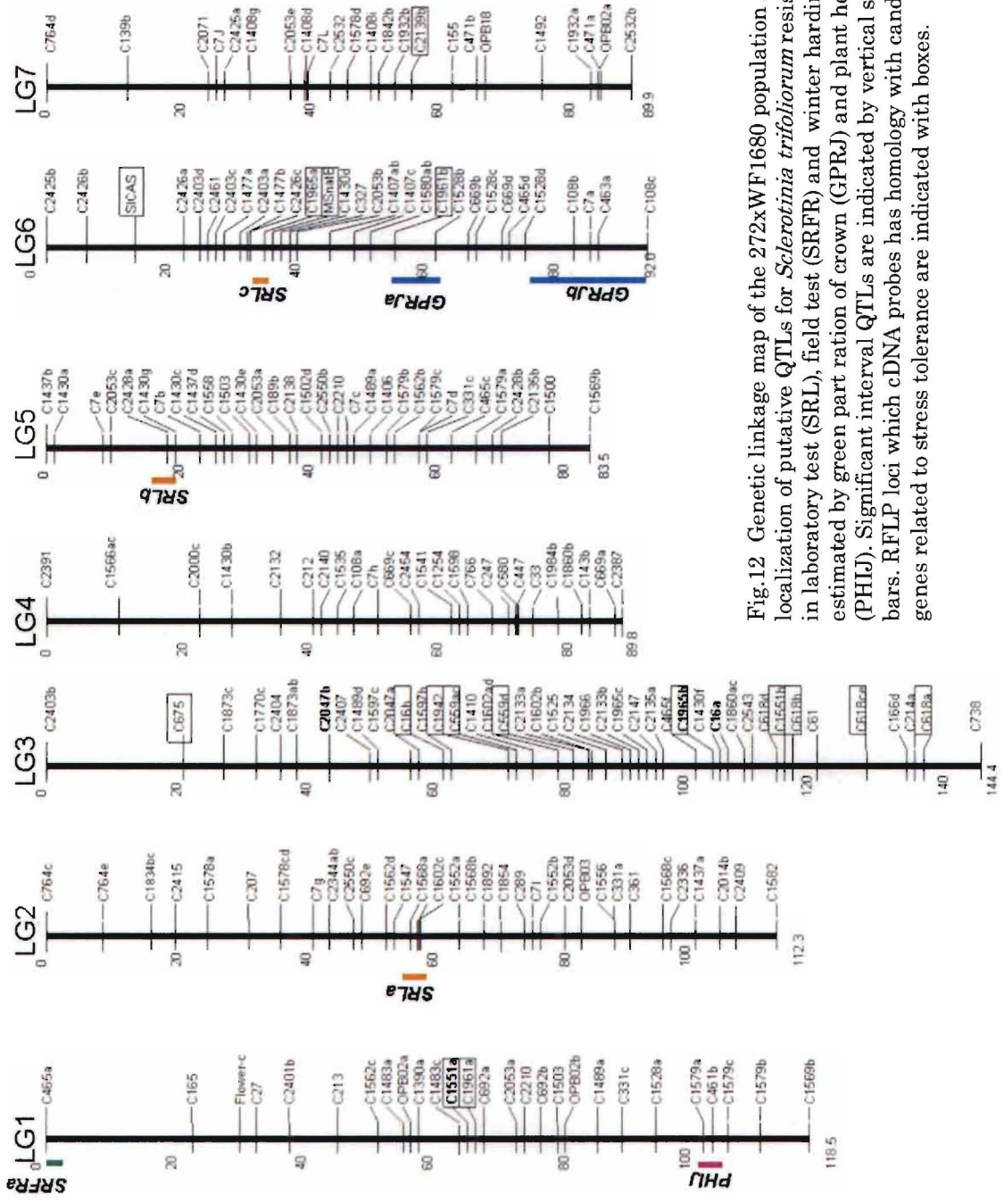


Fig.12 Genetic linkage map of the 272xWF1680 population and localization of putative QTLs for *Sclerotinia trifoliorum* resistance in laboratory test (SRL), field test (SRFR) and winter hardiness estimated by green part ration of crown (GPRJ) and plant height (PHJ). Significant interval QTLs are indicated by vertical solid bars. RFLP loci which cDNA probes has homology with candidate genes related to stress tolerance are indicated with boxes.

(Table 33)。これらの cDNA プローブに由来する RFLP 座は LG3 上に 10 座、LG1 上に 2 座、LG6 上に 2 座、LG7 上に 1 座が位置づけられた。また、9 つのうち 2 つのプローブは RFLP 座が室内検定による菌核病抵抗性に関する QTL を、1 つのプローブは RFLP 座が株の緑色割合に関する QTL を検出した。

(2) マイクロサテライト連鎖地図による解析

Table 34 に評価を行った形質値の概要を示した。ウィリアムス研における菌核病罹病程度は平均で 66.1%(最大 100%、最小 0%、HR : 71.4%、R130 : 80.0%)で、萎ちょう病罹病程度は平均で 15.9%(最大 100%、最小 0%、HR : 14.3%、R130 : 20.0%)であり、菌核病が萎ちょう病に比べて多発していた。越冬後の株の生存率は平均で 18.0%(最大 100%、最小 0%、HR : 14.3%、R130 : 0%)であった。北農研における菌核病抵抗性 (9 段階評点) は平均で 6.8(最大 9.0 最小 3、HR : 5、R130 : 5)であり、越冬性 (9 段階評点) は平均で 4.0(最大 7.5、最小 1.0、HR : 3、R130 : 2)であった。全ての形質は解析集団内で値が分離していることから QTL 解析を行うことができると判断した。越冬後の株生存率と菌核病罹病率、菌核病罹病率と萎ちょう病罹病率の間には有意な相関が認められたがその他の形質間に有意な関係は認められなかった (Table 35)。

マイクロサテライト連鎖地図による QTL 解析では各形質において多数の有意な QTL が検出された (Table 36)。北農研での菌核病抵抗性に関する QTL の数が 14 で最も多く、次いで多かったのがウィリアムス研での株の生存率と菌核病罹病率に関する QTL でそれぞれ 10 であった。萎ちょう病罹病率に

Table 33. Result of similarity search between cDNA probes and candidate genes related to stress tolerance.

Probe	Accession No. ¹⁾	Candidate gene	Score	E-value	QTL ²⁾
C675	U21105	X.laevis mRNA for cortical granule lectin	1,804	0.0	SRL
C1961	X52953	PAL1: phenylalanine ammonia-lyase 1	1,265	0.0	GPRJ
C1965	AF403292	AKIP1:RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase	577	e-161	SRL
C16	M97476	Pisum sativum L. aldolase gene	1,423	0.0	
C618	X82626	Pisum sativum alphacpn60 precursor mRNA	137	0.0	
C2139	AJ311087	sts1 : Pisum sativum mRNA for stachyose synthase	389	e-104	
C1551	Z37540	P.sativum mRNA encoding arginine decarboxylase	1,104	0.0	
C559	Z37540		2,520	0.0	
C1942	Z37540		2,575	0.0	

¹⁾ Genbank accession number.

²⁾ Significant QTL detected by the cDNA probe.

Table 34. Summary of experiments and statistical results for *Sclerotinia trifoliorum* resistance and winter hardiness in HRxR130 population.

Trait	Estimated year	Location	Trait name	No. of tested genotypes	Mean (%)	Range (Min-Max)
<i>Sclerotinia</i> resistance ¹⁾	2005	Moscow region	SRFR	96	66.1	(0-100)
<i>Sclerotinia</i> resistance ²⁾	2004	Sapporo	SRFJ	178	6.8	(3.0-9.0)
<i>Fusarium</i> resistance ¹⁾	2005	Moscow region	FRFR	96	15.9	(0-100)
Winter survival ³⁾	2005	Moscow region	WSR	96	18.0	(0-100)
Winter hardiness ⁴⁾	2005	Sapporo	WHJ	177	4.0	(1.0-7.5)

¹⁾ Attack percent on crown.

²⁾ Rated on a scale of 1(slight) to 9 (severe).

³⁾ Survival rate of clones.

⁴⁾ Rated on a scale of 1(susceptible) to 9 (hardy).

Table 35. Pearson phenotypic correlation among traits in HRxR130 mapping population.

	FRFR	WSR	SRFJ	WHJ
SRFR	0.615**	0.706**	0.011	0.136
FRFR		0.124	0.023	0.085
WSR			0.034	0.095
SRFJ				0.007

** shows significant at the 1% level.

Table 36. Summary of significant QTLs affecting disease resistance and winter hardiness in HRxR130 mapping population.

	No. of QTLs	LOD		Exp(%) ¹⁾	
		Mean	Range	Mean	Range
Moscow Region					
SRFR	10	3.6	3.4-5.4	24.9	23-64
FRFR	2	3.3	3.0-3.8	19.1	13-18
WSR	10	3.6	3.9-4.1	25.1	29-37
Sapporo					
SRFJ	14	4.7	3.3-7.2	13.6	9-59
WHJ	7	4.7	4.1-5.5	23.2	10-18

¹⁾ See Table 32.

関する QTL の数は 2 と少なかった。各形質で検出された QTL の平均の LOD 値は 3.3~4.7 の間にあり、全表現型分散に対する説明割合は 13.6~25.1% の間にあった。最も効果の大きい QTL はウィリアムス研における株の生存率で、その説明割合は 64% だった。ウィリアムス研における菌核病罹病率と北農研における越冬性の説明割合が 10~18% であり、効果の大きい QTL は検出されなかった。

Fig.13 に連鎖地図上の QTL の位置を示した。最も多く QTL が検出された連鎖群は LG6 で 12 の QTL が検出された。次いで多くの QTL が検出されたのは LG2 の 9 つと LG3 の 8 つだった。LG1 と LG7 は検出された QTL の数が少なかった。連鎖地図上のいくつかの領域においては形質の異なる QTL が同一カ所に検出された。特に LG6 の 35cM 付近には北農研の越冬性を除く全ての形質の QTL が検出された。

「272×WF1680」集団による RFLP 連鎖地図にマイクロサテライトマーカーを座乗させ再構築した地図を用いて「HR×R130」集団によるマイクロサテライト連鎖地図と QTL の位置を比較した (Fig.14)。「272×WF1680」集団においては連鎖地図上の座の数が 158 座から 301 座に増加したことにより、検出された QTL の数が菌核病抵抗性および越冬性の両方で増加した (菌核病抵抗性には室内および圃場検定の結果を、越冬性には株の緑色割合と早春の草丈を含む)。「HR×R130」集団と「272×WF1680」集団の QTL の位置を比較すると多くの領域で QTL が対応する領域に位置づけられていた。特に LG6 と LG3 については両集団において多くの QTL が検出された。

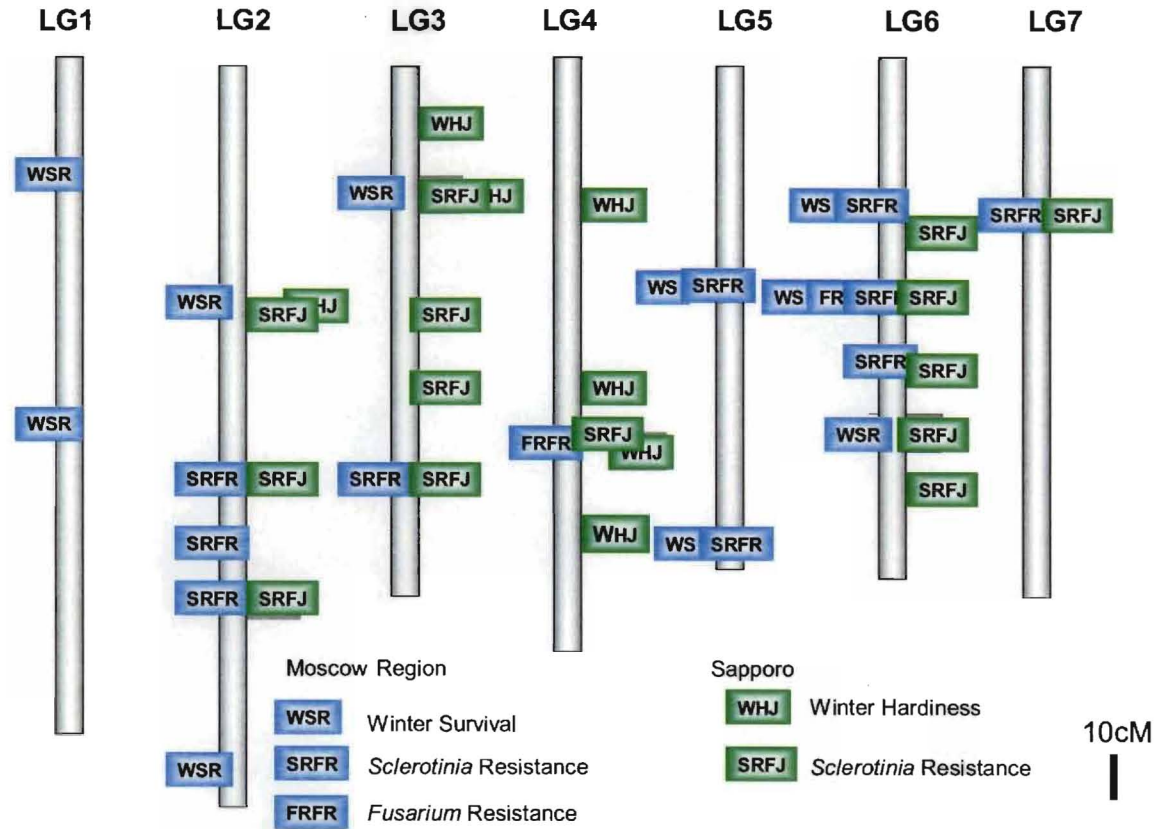


Fig.13. Localization of putative QTLs for *Sclerotinia trifoliorum* resistance (SRFR), *Fusarium oxysporum* resistance (FRFR) and winter survival rate (WSR) in Moscow region and *Sclerotinia trifoliorum* resistance (SRFJ) and winter hardiness (WHJ) in Sapporo on the HR X R130 mapping population. Significant interval QTLs are indicated by squares with characters.

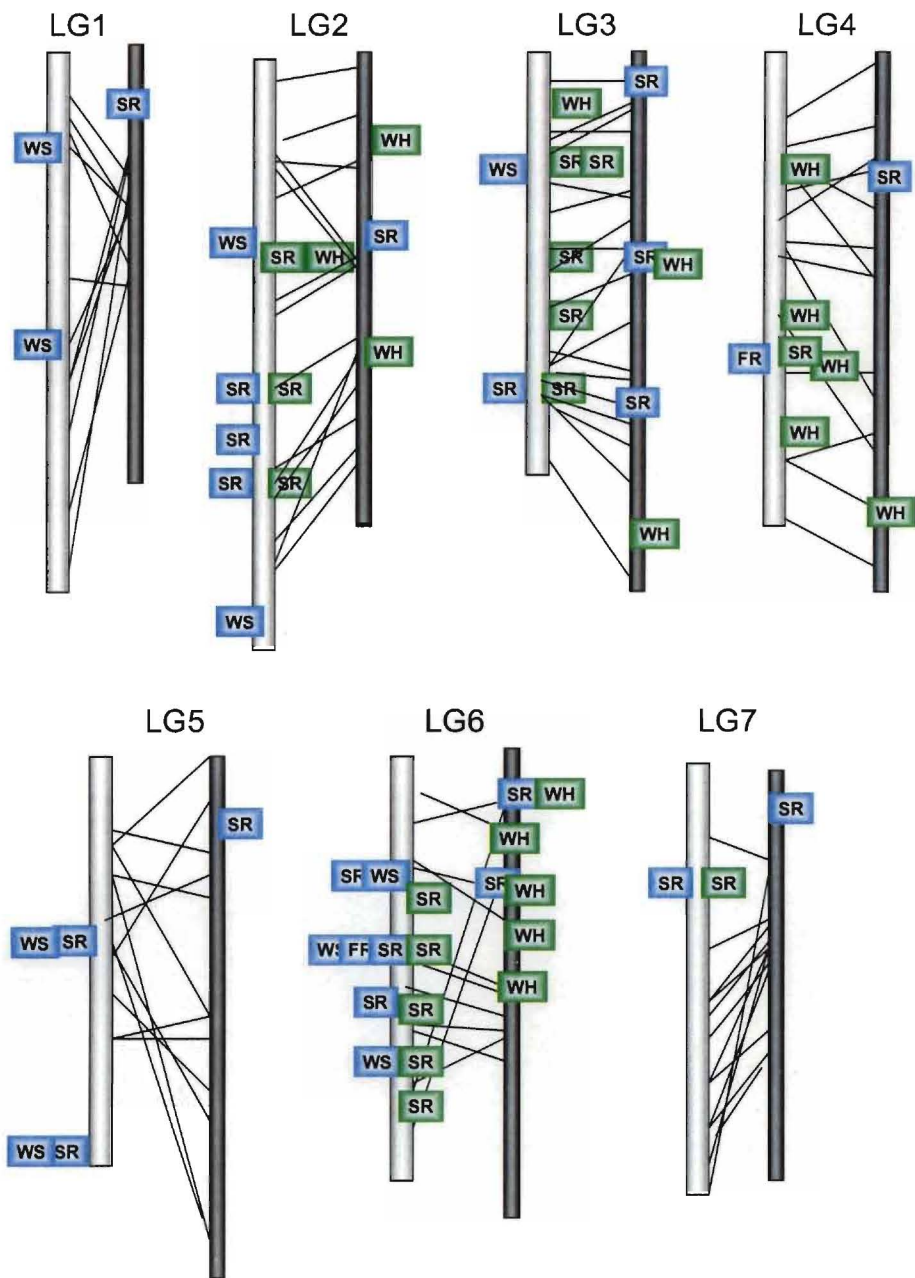


Fig.14. Comparison of putative QTLs for *Sclerotinia trifoliorum* resistance, *Fusarium oxysporum* (FRFR) and winter survival / hardiness between HRxR130 and 272xWF1680 mapping populations. Left and right bars indicate linkage groups of HRxR130 and 272xWF1680, respectively. A linkage map of 272 X WF1680 is based on a re-constructed linkage map with 196 RFLP, 98 microsatellite, 1 STS, 4 RAPD and 1 morphological loci. SR, FR, WS and WH indicate putative QTLs of *Sclerotinia* resistance, *Fusarium* resistance, winter survival and winter hardiness, respectively. Green part ratio of crown and plant height in early spring are represented as winter hardiness. Blue and green squares indicate QTLs estimated in Moscow region and Sapporo, respectively.

4. 考 察

菌核病はアカクローバの栽培適地である冷涼地帯において重要な病害であり、抵抗性品種の育成は各国で試みられてきた。アカクローバの菌核病抵抗性に関する遺伝学的な研究はこれまでほとんどなされてこなかったが、育種現場の経験から病害抵抗性に関する主働遺伝子は存在せず、多数の遺伝子が関与していると推定されていた。多数の遺伝子が関与するという事は、すなわち抵抗性の発現が環境要因の影響を受けやすいことを示唆しており、単一場所での形質データに基づく QTL 解析では検出されない QTL が存在する可能性が高い。そのために、本節では異なる 2 試験場である北農研とロシア・モスクワ地域に位置するウィリアムス研において形質の評価を行った。

北農研では菌核病抵抗性検定圃場がないため、菌核病抵抗性の評価は自然発生により行ったが、顕著な発病が認められたのは「HR×R130」集団の移植翌年のみであった。また、ウィリアムス研における「272×R130」集団を用いた菌核病抵抗性検定においては室内検定と圃場検定の結果の間には有意な相関はなく、本研究においても菌核病抵抗性の安定した評価は困難であった。菌核病は病害力が強く一度発生すると株に著しい損傷を与えるが、その発生には積雪深、積雪期間や融雪時の気象条件など様々な要因が影響する（磯部ら 2001b）。病害力の調節の困難さと環境要因が与える影響の大きさが菌核病抵抗性の安定した評価を困難にしていると考えられた。また、「HR×R130」集団でのモスクワにおける菌核病抵抗性と越冬後の個体生存率および菌核病抵抗性と萎ちょう病抵抗性の間には有意な相関が認められたが、その他の形質間には有意な関係

が認められなかったことから、菌核病のみならず越冬性に関する形質は一般に再現性のある評価が難しいと思われる。

越冬性および菌核病抵抗性に関する有意な QTL の数は解析に用いた連鎖地図により異なった。「272×R130」集団においては 158 座からなる RFLP 連鎖地図においては検出された QTL の数は 4 つの評価項目に対して合計で 7 つであったのに対し、同一集団でも再構築により 301 座となった連鎖地図では検出された QTL の数が合計で 20 となった。また、1304 座からなる「HR×R130」集団の連鎖地図では越冬性と菌核病に関する QTL の数は各評価項目について 7 ～14 と多数の QTL が検出された。以上の結果は、マーカー密度の高い連鎖地図は密度の低い連鎖地図に比べて QTL の検出力が高いことを示唆している。一方、密度の高い「HR×R130」集団の連鎖地図においても萎ちょう病抵抗性に関する QTL は 2 カ所と少なかった。これらの QTL の全分散に対する寄与率は 13 ～18% と低く、今回の解析では検出されなかった QTL が多く存在すると考えられる。萎ちょう病は解析集団内において罹病程度が分離していたものの、平均の罹病率が 15.9% と低かったことが QTL の検出力の低さに影響していたと考えられた。

菌核病抵抗性に関する QTL 解析について、アカクローバの病原菌である *S. trifoliorum* に関する報告はないものの、同属である *S. sclerotiorum* 抵抗性についてはいくつか報告されている。Arahana ら (2001) はダイズを用いて QTL 解析を行い、抵抗性に関して 28 と多数の QTL を検出した。その他、ヒマワリ (Bert ら 2002)、ナタネ (Zhao ら 2006) でもそれぞれ 15 および 8 と多

数の QTL が検出されている。本節においても「HR×R130」集団で多数の菌核病抵抗性に関与する QTL が検出されており、*S. sclerotiorum* 抵抗性に関与する QTL 解析の結果と一致した。また、菌核病抵抗性に関与する QTL の数の多さは、抵抗性には多数の遺伝子に関与しているという育種家の従来の予想とも一致する。

QTL が多数検出された「HR×R130」集団では連鎖地図上のいくつかの領域において相関が認められなかった複数の形質の QTL が同一カ所に検出された。このような領域は LG6 上で最も多く、LG1 と LG5 上では認められなかった。また、比較地図を利用して 2 つの集団間の QTL の位置を比較したところ、多くの領域で QTL が対応する領域に位置づけられており、特にその傾向は LG6 と LG3 で顕著であった。LG6 は RFLP 連鎖地図においてアルファルファの耐凍性に関する候補遺伝子が位置づけられており、LG3 はストレス耐性に関与する遺伝子配列と高い相同性を示した cDNA プローブに由来する RFLP 座が多数位置づけられていた。以上のことから、LG6 と LG3 上には越冬性に関与する遺伝子が多数座乗している可能性が示唆された。

越冬性に関して再現性の高い評価を行うのは難しく、本節における形質評価も精度が高かったとは言い難い。一方で、相関が認められなかった複数の評価形質の QTL が同一カ所に検出されたことから、形質評価を複数回行うことで共通して発現している QTL を浮かび上がらせることが可能であると考えられた。越冬性に関連する QTL は多数存在するが、選抜マーカーの開発は汎用性を考慮に入れると比較的安定して発現する QTL 領域から行っていくことが望まし

いと思われる。本研究の結果は、複数の QTL が同一箇所を検出された LG6 上の領域が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判断した。

5. 摘要

菌核病抵抗性を中心とした越冬性に関する選抜 DNA マーカーの開発の最初のステップとして、2 つの連鎖地図作成集団「272×WF1680」および「HR×R130」を利用してこれらの形質に関する QTL 解析を行い、両集団間の QTL の位置を比較した。越冬性は環境の影響を受けやすい形質であるため、形質の評価は北海道農業研究センター（札幌市）および全ロシアウィリアムス飼料作研究所（ロシア・モスクワ地域）で行った。「272×WF1680」集団と RFLP 連鎖地図を用いた解析では 4 つの評価項目間に有意な相関は認められなかった。また、検出された QTL は合計で 7 つだった。「HR×R130」集団とマイクロサテライト連鎖地図を用いた解析では 5 つの評価項目間において菌核病罹病性（ウィリアムス研）が越冬性（ウィリアムス研）および萎ちょう病抵抗性（ウィリアムス研）との間で有意な相関を示したが、その他の項目間に有意な関係は認められなかった。菌核病抵抗性と越冬性に関する QTL は各評価形質につき 7～10 箇所多数検出された。また相関のない複数の形質について QTL が同一箇所に多数位置づけられており、その傾向は LG6 で顕著であった。マイクロサテライトマーカーを利用して再構築した「272×WF1680」集団の連鎖地図と「HR×R130」集団の連鎖地図上に検出された QTL の位置を比較したところ、

多くの領域で QTL が対応する領域に位置づけられており、特に LG6 と LG3 でその傾向が顕著であった。以上のことから、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判断した。

総合考察

大家畜経営における飼料の自給率は、草地面積が比較的広い北海道においても 54%と低く、飼料自給率向上には単位面積あたりの栄養生産性の向上が必須であるとされている（農林水産省 2006）。一方、牧草の栄養生産性が最も高い刈り取り適期に全農家が刈り取りを行ったとしても、北海道の現状の草地における TDN（可消化養分総量）自給可能割合は 62%であると試算されており、栄養生産性向上のためにはマメ科牧草の増産が欠かせない（北海道農政部 2000）。しかしながら、現在の混播草地のマメ科牧草の割合は北海道平均で約 10%であり、適正割合とされる 30%に比べて低いことから、安定して栽培できるアカクローバ品種の育成が求められている。

混播草地におけるアカクローバの割合はイネ科牧草の種類や栽培管理により変動する。栽培イネ科牧草のほとんどがチモシーである北海道においてはチモシーに対する競合力の高さからアカクローバの栽培が敬遠され、このことがマメ科牧草の栽培割合を減少させる原因の一つとなっていた（我有 1998）。本研究において母系選抜法により育成した品種「ナツユウ」は、アカクローバの安定栽培に対して最も重要な形質である永続性を改良し、かつチモシーに対する混播適性を高めた品種であり、今後草地のマメ科牧草の割合向上に貢献することが期待される。

母系選抜法は系統の中に遺伝的多様性を残したまま選抜を行うことから、自殖が可能な作物の育種法に比べると効率の良い選抜法であるとはいえないが、母系の選抜を繰り返すことで改良が困難な永続性や未選抜の形質であっ

た混播適性を改良できることが明らかとなった。一方、「ナツユウ」の育成には 20 年もの歳月を要しており、社会情勢の変化が激しく 20 年先の需要を見越して育種目標を設定することが難しい現在においては、より効率的な育種法の開発が強く望まれる。

DNA マーカーは育種の効率化を推進する技術として多くの作物で期待されている。DNA マーカーを用いた選抜、MAS の利点については Koebner ら (2003) が以下の四点にまとめている。すなわち、1) 遺伝率が低く、遺伝様式が複雑で表現型による選抜が困難である形質の選抜効率の向上、2) 劣性遺伝子に支配される形質の戻し交雑後代からの選抜、3) 耐病性遺伝子のピラミディングによる病原菌の異なる系統に対する耐性の付与、4) ピラミディングを行うことのできる育種母材の選定である。アカクローバは品種内の多型性が品種間よりも高いとされており (Milligan 1991)、本研究においても開発した DNA マーカーに品種特異的な多型は認められなかった。これは表現型のみで選抜する従来の育種法が、育種素材の内包している多型性の僅かな部分を選抜していたにすぎなかったことを示唆している。したがって、アカクローバにおいて DNA マーカーの活躍が最も期待されるのは MAS の 4 つの利点のうち「遺伝率が低く、遺伝様式が複雑で表現型による選抜が困難である形質の選抜効率の向上」であろう。

開発する DNA マーカーの種類や育種法への MAS の組み込み方については、従来の交雑育種法が作物の特性により異なっていたのと同じように作物の生物学的な特性や社会的な状況に合わせて考えていく必要がある。MAS を用い

た育種の進め方として代表的なものに Peleman ら (2003) が提唱している Breeding by Design™ という概念がある。これは育種素材に対して目標形質に関わる全ての遺伝子座とアレルのコンビネーションを明らかにするという考え方であり、多型マーカーが得られやすい AFLP マーカーを中心に高密度な連鎖地図を作成し、育種素材に対する多型解析を大量に行うとともに、詳細かつ正確な形質データの評価を行うという手法に基づいて行う。このような概念は育種の歴史が長く、利用する育種素材の遺伝型がほぼ確定されているイネなどの作物においては有効であるが、育種素材内の多型性が高く、かつ自殖種子が得られないため各遺伝型の詳細な形質データの取得が困難であるアカクローバにおいては非現実的である。したがって、他殖性作物については MAS の組み込み方について Breeding by Design™ のような明確な概念は未だ提示されていないが、どのような種類の DNA マーカーを開発し、どのような方法で実用化に導き、どのように育種の中で用いていくかという概念を積み上げていく必要がある。

アカクローバはゲノム上の多型が比較的高い確率で検出されることから、無計画に多型を検出するマーカーを多数開発することはマーカーの実用化を図る段階で混乱が生じる恐れがある。それよりは遺伝子領域など表現型の変異に直接関わるゲノム領域の由来のマーカーを作出することが、効率的なマーカーの実用化に繋がると考えた。そのため、本研究における RFLP とマイクロサテライトマーカーの開発にあたっては、各々が遺伝子領域由来のマーカーとなることを開発の条件とした。一方、遺伝子領域はその他の領域にくらべて配列の保存性が高いことから、一般に遺伝子領域由来のマーカーは育種素材に対

する移行性が若干劣るものの、本研究で開発したマーカーは育種素材に対して十分な移行性を有しており、実用性に問題がないことが明らかとなった。さらに、マイクロサテライトマーカーの開発にあたっては、取り扱いに高度な技術が必要としないアガロースゲルで多型判別ができるマーカーを開発し、育種現場に対する DNA マーカーの普及性も考慮に入れた。

選抜 DNA マーカーの開発においては、一般に目的形質と DNA マーカーの形質を関連づける QTL 解析が最初の段階となる。精度の高い QTL 解析のためには詳細な表現型のデータの取得が欠かせないとされているが、環境要因の影響を受けやすい形質は再現性の高い表現型データの取得が困難である。本研究においても 2 場所において様々な手法を用いて菌核病抵抗性を中心とした越冬性の評価を行ったが、ほとんどの評価形質の項目間で相関が認められなかった。一方、QTL 解析を行うと相関のない評価形質の QTL がいくつかの領域において同一箇所位置づけられ、異なる集団由来の連鎖地図においてはそれらの QTL 候補領域を対応づけることができた。このことは環境要因の影響を受けやすい形質でもデータ取得を重ねることで QTL の候補領域を検出することが可能であることを示している。

選抜マーカー開発の手順において、目的の QTL 領域を検出した後は目的領域のみを別の遺伝子型に置換した準同質遺伝子系統 (NILs) を作出し、個々の QTL の作用力を評価するのが一般的である。しかしながら、自殖率が低いアカローバでは NILs を作成するのは不可能であることから、一般に用いられている手法で選抜マーカーの開発をさらに推し進めていくのは不可能である。お

そらくアソシエーション解析などの、多数の遺伝子型からなる集団とマーカー多型のデータから表現型と DNA マーカーの関係を解析する手法を用いて選抜マーカーの開発を推し進めていく必要があると考えられる。本研究で作出したマイクロサテライトマーカーは異なる遺伝子型に対する移行性が高く、連鎖地図上の位置も比較的安定していたことから、アソシエーション解析に適していると考えられる。今後は、本研究で検出した越冬性に関する QTL 候補領域周辺に座乗しているマイクロサテライトマーカーを用いて越冬性の異なる品種に対してアソシエーション解析を進めることで、越冬性に関わる選抜マーカーの開発が可能になるものと考えられた。

DNA マーカーの育種的利用法として選抜マーカーを利用した MAS の他にもいくつかの手法が考えられるが、そのひとつとして有力なのが種間雑種を利用した育種素材の効率的な選抜である。本研究において近縁野生種ジグザグクローバの永続性に関わる形質をアカクローバに導入することを試みたが、遠縁交雑による雑種弱勢の回復を図るために戻し交雑を第 4 代まで行う必要があった。今後の方向性として、戻し交雑第 4 代を多交配することでジグザグクローバの永続性に関する形質を導入した育種素材の開発が可能であると考えられたが、多交配後に後代の選抜を行う際において稔性のみを考慮して選抜を行うと、ジグザグクローバ由来のゲノムが導入された個体を排除することが考えられる。そこでジグザグクローバの永続性に特異的な DNA マーカーを選抜し、その DNA マーカーを指標としてジグザグクローバ由来のゲノムが残存し、かつ稔性の高い個体を選抜すれば、より永続性の高い素材を得られる可能性が高い。

特異的な配列に対する検出力の高いマイクロサテライトマーカーを用いれば種特異的なマーカーを開発することは可能であり、DNA マーカーの利用により近縁野生種を用いた育種を効率的に推し進めることができると考えられる。

本研究においては DNA マーカーの開発と連鎖地図の作成に伴って、連鎖地図上に座乗しているマーカー情報だけでなく、様々なゲノムリソースが整備された。すなわち、SSR を含む領域の同定の過程で生じた EST 情報や、地図に座乗しなかった配列を含む SSR 領域を増幅するプライマーペア情報、FISH 解析の過程で作成された BAC ライブラリーなどである。アラビドプシスやイネ、などモデル植物と称されている種に比べれば、これらのゲノムリソースの情報量は多くはないが、作物種レベルとしては十分であると考えられる。本研究では、マイクロサテライト連鎖地図の作成によりアカクローバゲノムとマメ科のモデル植物である *L. japonicus* や *M. truncatula* との間にマクロシンテニーが存在することが明らかとなった。また、開発されたゲノムリソースは、モデル植物のゲノム情報を併用することで、DNA マーカーの開発のみならず遺伝子単離など分子生物学に関する様々な研究に対して応用することが可能であると考えられた。

本研究ではアカクローバで最初の DNA マーカーによる連鎖地図を作成し、その育種的利用法について考察した。DNA マーカーの育種的利用法については解決しなければいけない課題が多く残されており、本研究で作成したマーカーを速やかに育種に用いることが出来ない。本研究の成果は DNA マーカーを用いた新たなアカクローバ育種法の基盤になるものと考えられる。

要 約

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り混播適性と永続性を改良した新品種の育成と野生種との種間雑種を利用した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と越冬性に関する QTL 解析を行うことでアカクローバの DNA マーカーの開発とその育種的利用法について論述したものである。以下にその概略を記す。

1. 母系選抜法を用いて永続性とチモシーとの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。「ナツユウ」は 4 母系の多交配による品種で、44 品種・系統に由来し、1 回の個体選抜と 3 回の母系選抜を経ており、農林水産省北海道農業試験場および北海道立根釧農業試験場で育成された。「ナツユウ」は早生品種であり、2 番草の開花程度と草丈が従来の早生品種「ホクセキ」より低くチモシーに対する競合力が穏やかであることから、混播草地におけるチモシー収量が増加した。また、菌核病に対する選抜と根釧農試における選抜を経たことで越冬性が向上し、永続性に優れる品種となった。永続性は改良が困難な形質であるが、20 年の歳月をかけて選抜を繰り返すことで母系選抜法により改良できることが明らかとなった。

2. 4倍体アカクローバ ($2n=28$) と近縁野生種ジグザグクローバ (*Trifolium medium*, $2n=80$) 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。種子稔性と花粉稔性は戻し交雑世代が進むにつれて回復し、戻し交雑第4代 (BC_4) の種子稔性と花粉稔性はそれぞれ 21.3%と 65.3%であり、ミツバチによる採種試験においても完熟種子を生産した。戻し交雑第1代から第3代ではほとんどの個体が圃場移植後4年目以内に枯死したのに対し、 BC_4 の61%が4年間生存していた。 BC_4 の79%は4倍体アカクローバの染色体数である28本より多い染色体数を有していた。また、 BC_4 の小葉はアカクローバより小さくかつ細長い傾向にあり、 BC_4 においてジグザグクローバ由来の形質が導入されたものと考えられる。以上のことから、本研究で作成した BC_4 はアカクローバ永続性改良の育種素材として有用であると考えられた。

3. cDNA 由来の RFLP マーカーと戻し交雑集団を用いてアカクローバの連鎖地図を作成した。作成した連鎖地図は7つの連鎖群上に157の RFLP マーカーと1つの形態マーカーがマップされた。連鎖地図の全長は、535.7cM で2つの座の間の平均距離は3.4cM であった。本連鎖地図はクローバ属ではじめて作成された地図である。

4. 遺伝子領域の配列に由来しアガロースゲルで多型検出が可能なマイク

ロサテライトマーカーの作出と連鎖地図の作成を行った。4種類のライブラリーを作成し、SSR配列を含むクローンの同定を行って7,244のSSRプライマーペアを設計した。プライマーを設計した配列のうち82%が既知遺伝子の配列と相性があった。マッピング集団で多型をもつプライマーペアをスクリーニングし、188個体のF₁集団を用いて連鎖解析を行い、既報のRFLPマーカーと合わせて1,434座による全長868.7cMの連鎖地図を作成した。FISHにより染色体と連鎖群の1対1の対応づけを行った。また、アカクローバゲノムとマメ科モデル植物*Lotus japonicus*と*Medicago truncatula*との間にマクロシテンニーの存在を明らかにした。

5. RFLPおよびマイクロサテライトマーカーの育種素材への応用性を明らかにすることを目的として、異なるアカクローバ遺伝型に対するマーカーの移行性と2つの連鎖地図間のマーカーの位置の保存性を検討した。RFLPマーカーの1プローブあたりのアレルの数は3.3、マイクロサテライトマーカーは6.5だった。RFLP連鎖地図を作成した「272×WF1680」集団についてマイクロサテライト地図全体をカバーする177プライマーペアの多型解析を行い、全長747.5cMの301座による連鎖地図を再構築した。RFLPマーカーについては16%のプローブが両地図間において異なる連鎖群に位置づけられていたが、マイクロサテライトマーカーは全てが両連鎖地図の同一連鎖群に位置づけられた。マイクロサテライトマーカーは多型性が高く、また連鎖群上の座乗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選抜 DNA マーカーの開発を行うために、2つの連鎖地図作成集団「272×WF1680」および「HR×R130」を利用してこれらの形質に関する QTL 解析を行い、両集団間の QTL の位置を比較した。形質の評価は北海道農業研究センター（札幌市）および全ロシアウィリアムス飼料作研究所（ロシア・モスクワ地域）で行った。多くの評価項目間において有意な相関が認められなかったものの、相関のない複数の形質について QTL が同一カ所に多数位置づけられており、その傾向は LG6 で顕著であった。以上のことから、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。

以上により、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、母系選抜法と種間雑種を利用した育種素材の開発との比較しながら育種的利用法について論述した。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。

**Development of DNA markers of red clover (*Trifolium pretense* L.)
and its potential to breeding**

Sachiko Isobe

Summary

With the aim of facilitating the red clover breeding methodology with the aid of DNA markers, DNA markers of red clover were developed and their potential to breeding were estimated. Firstly, development of a new variety and breeding materials of red clover (*Trifolium pretense* L.) were done by crossbreeding in order to investigate performance of conventional breeding. Secondly, with the aim of establishing genetic/genomic resources of red clover, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) and microsatellite markers were developed, followed by construction of two genetic linkage maps. Thirdly, for estimation of potential to breeding, the transferability and universality of the DNA markers to breeding materials and mapping QTLs related to winter hardiness with two mapping populations were investigated.

1. 'Natsuyu', a new diploid variety of red clover, which was developed by

maternal line selection program at National Agricultural Research Center for Hokkaido Region and Hokkaido Prefectural Kosen Agricultural Experiment Station. 'Natsuyu' was bred by random crossing of four maternal lines that were selected from 44 varieties or lines.

'Natsuyu' has the characteristics of low competitive ability to timothy and perenniality due to good overwintering ability. It seemed that the reasons of the low competitive ability of 'Natsuyu' to timothy were lower degree of flowering and lower plant height in the second crop. 'Natsuyu' showed better vigorous and regrowth in the early spring than 'Hokuseki' and 'Kurano'. It was revealed that improvement of perenniality was possible by maternal line selection within 20 years.

2. Zigzag clover (*T. medium*, $2n=80$) and red clover were hybridized and backcrossed four times to red clover (BC₁, BC₂, BC₃, and BC₄), then assessed the backcross progenies for seed production and vigor under field conditions. Both seeds and pollen fertility of the backcross progenies increased as the backcross generations advanced. Female and pollen fertility of BC₄ were 21.3% and 65.3%, respectively. When honey bees were used as pollinators, almost all BC₄ plants produced mature seeds in the field. Most of the BC₁, BC₂, and BC₃ plants died by the end of the fourth year in the field, whereas 61% of the BC₄ plants survived for four years. The number of

chromosomes in 79% of the BC₄ plants was more than 28, which is greater than that of red clover. Differences in leaflet size and shape between BC₄ plants and red clover suggested that genes from *T. medium* were expressed in the BC₄ plants. These results indicate that BC₄ plants may be useful for the improvement of the persistence of red clover.

3. To facilitate basic and applied genetics in red clover, a genetic linkage map of red clover with RFLP markers with cDNA probes and a backcrossed mapping population was constructed. The map contains 157 RFLP markers and one morphological marker on 7 linkage groups. The total map distance was 535.7cM and the average distance between two markers was 3.4cM. This is the first report to construct a linkage map of *Trifolium* species.

4. A high-density genetic linkage map with gene-associated microsatellite markers was generated. A total of 7,159 primer pairs were designed to amplify simple sequence repeats (SSRs) identified in four different types of libraries. Based on sequence similarity, 82% of the SSRs were likely to be associated with genes. The selected 1,305 microsatellite markers as well as the previously developed 167 RFLP markers were subjected to linkage analysis. A total of 1,434 loci detected by 1,399 markers were successfully mapped onto seven linkage groups totaling 868.7 cM in

length. Each genetic linkage group was linked to a corresponding chromosome by FISH analysis using seven microsatellite markers specific to each of the linkage groups as probes. Macrosynteny at the segmental level was observed between the genomes of red clover and two model legumes, *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula*, strongly suggesting that the genome information for the model legumes is transferable to red clover for genetic investigations and experimental breeding.

5. RFLP and microsatellite markers were investigated with report to their transferability to other red clover germplasm. The mean value of allele numbers per a RFLP and microsatellite marker were 3.3 and 6.5, respectively. When a linkage map was re-constructed with 90 cDNA probes of RFLP markers and 177 primer pairs of microsatellite markers by 272xWF1680 mapping population, 301 loci were mapped onto the linkage map totaling 747.5cM in length. All primer pairs of microsatellite markers were mapped onto same linkage groups of HRx130 mapping population, while 16% of cDNA probes of RFLP markers were mapped onto the different linkage groups. Therefore, 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. The phenotypic traits of the mapping populations, 272xWF1680 and HRxR130, were estimated at National agricultural research center for Hokkaido region located in Sapporo and All-Russian Williams fodder crop research institute located in Moscow region, Russia. Most phenotypic traits showed no significant correlation. However, many of them detected significant QTLs on the same locus of the maps, especially on LG6. It was considered that the QTLs on LG6 were potent region where candidate selection markers related to winter hardiness had been mapped.

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

謝 辞

本論文の作成に当たって終始懇切な指導を賜った宮崎大学フロンティア科学実験総合センター教授明石 良博士、同大学農学部教授藪谷 勤博士、琉球大学農学部教授川本康博博士、宮崎大学農学部教授赤尾勝一郎博士ならびに佐賀大学農学部助教授鈴木章弘博士に心より感謝の意を表す。また、本研究の遂行にあたり多大な援助と、懇切な指導を賜った財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所田畑哲之博士、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター山口秀和博士ならびに奥村健治博士、九州沖縄農業研究センター我有 満博士に謹んで謝意を表す。さらに、研究の遂行にあたり多大な援助を賜ったウィリアムス飼料作研究所ニコライ・コズロフ博士ならびにイリーナ・クリメンコ博士、モンサント社セルゲイ・イヴァシュタ博士、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター内山和宏氏、九州沖縄農業研究センター澤井 晃氏、前日本芝草研究開発機構眞木芳助氏、前日本草地畜産種子協会松浦正宏氏、前日本草地畜産種子協会植田精一氏、北海道立上川農業試験場竹田芳彦氏、北海道畜産試験場堤 光昭氏、北海道農政部中島和彦氏、神戸大学教育学部助教授近江戸伸子博士、片岡遼平氏、かずさディー・エヌ・エー研究所佐藤修正博士、浅水恵理香博士、中村保一博士、金子貴一博士、櫻井望博士、笹本茂美氏、小原光代氏、藤代継一氏、和田津由子氏、渡辺安希子氏に心より感謝の意を表す。最後に、本研究の遂行に際し、種々御協力下さった北海道農業研究センター寒地飼料作育種研究チーム

マメ科牧草育種グループの廣井清貞博士、石井 実氏、三好達也氏、佐藤勝彦氏、柴田豊子氏、豊川春子氏、福井久美子氏、渡辺美栄子氏、村田曜子氏には対し厚く御礼申し上げたい。ここに記して関係各位に対する謝辞とする次第である。

引用文献

- Alonso-Blanco, C., C. Gomez-Mena, F. Llorente, M. Koornneef, J. Salinas and J.M. Martinez-Zapater (2005) Genetic and molecular analyses of natural variation indicate CBF2 as a candidate gene for underlying a freezing tolerance quantitative trait locus in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 139: 1304-1311.
- Anderson, J.A., N.L. Taylor and E.G. Williams (1991) Cytology and fertility of the interspecific hybrid *Trifolium ambiguum* x *T. repens* and backcross populations. *Crop Sci.* 31: 683-687.
- Arahana, V.S., G.L. Graef, J.E. Specht, J.R. Steadman and K.M. Eskridge (2001) Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Crop Sci.* 41: 180-188.
- Armstrong, K.C. and R.W. Cleveland (1970) Hybrids of *T. ratense* x *T. pallidum*. *Crop Sci.* 10: 354-357.
- Asamizu, E., Y. Nakamura, S. Sato, H. Fukuzawa and S. Tabata (1999) A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags. *DNA Res.* 6: 6369-6373.
- Bardin, S. and H. Hauang (2001) Research on biology and control of *Sclerotinia* disease in Canada. *Plant Pathol.* 23: 88-98.

Barrett, B., A. Griffiths, M. Schreiber, N. Ellison, C. Mercer, J. Bouton, B. Ong, J. Forster, T. Sawbridge, G. Spangenberg, G. Bryan and D. Woodfield (2004) A microsatellite map of white clover. *Theor. Appl. Genet.* 109: 596-608.

Bert, P.F., I. Jouan, D. Tourvieille de Labrouhe, F. Serre, P. Nicolas and F. Vear (2002) Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theor. Appl. Genet.* 105: 985–993.

Blanc, G., A. Barakat, R. Guyot, R. Cooke and M. Delseny (2000) Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell* 12: 1093-1101.

Bradshaw, H.D. and R.F. Stettler (1994) Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II Segregation distortion due to genetic load. *Theor. Appl. Genet.* 89: 551-558.

Brummer, E.C., J.H. Bouton and G. Kochert (1993) Development of an RFLP map in alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 86: 329-332.

Campos-de-Quiroz, H. and F. Ortega-Klose (2001) Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. *Euphytica* 122: 61-67.

Choi, H.K., D. Kim, T. Uhm, E. Limpens, H. Lim, J.H. Mun, P. Kalo, R.V. Penmetsa, A. Seres, O. Kulikova, B.A. Roe, T. Bisseling, G.B. Kiss and D.R. Cook (2004) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and

comparison of marker colinearity with *M. sativa* Genetics 166: 1463-1502.

Collins, G.B., N.L. Taylor and G.C. Phillips (1983) Successful hybridization of red clover with perennial *Trifolium* species via embryo rescue. Proc. 13th Intern. Grass. Cong. 14: 168-170. Westview Press, Boulder, CO.

Darvasi, B.W., A. Weinreb, V. Minke, J.I. Weller and M. Soller (1993) Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using saturated genetic map. Genetics 134: 943-951.

Dewhurst, R.J., W.J. Fisher, J.K.S. Tweed and R.J. Wilkins (2003) Comparison of grass and legume silages for milk Production. 1. Production responses with different levels of concentrate. Journal of Dairy Science 86: 2598-2611.

Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker and J.S. Mattick (1991) Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 19: 4008.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Ewing, B. and P. Green (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res. 8: 186-194.

藤巻 宏・鶴飼保雄・山本皓二・藤本文弘 (1992) 植物育種学応用編. 培風館, 東京.

Gale, M.D. and K.M. Devos (1998) Plant comparative genetics after 10 years.

Science 282: 656-659.

我有満 (1998) 北海道における作物育種. 北海道共同組合通信社編 264-281.

Grattapaglia, D. and R. Sederoff (1994) Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* 137: 1121-1137.

Hayashi, M., A. Miyahara, S. Sato, T. Kato, M. Yoshikawa, M. Taketa, M.

Hayashi, A. Pedrosa, R. Onda and H. Imaizumi-Anraku *et al* (2001)

Construction of a genetic linkage map of the model legume *Lotus japonicus* using an intraspecific F₂ population, *DNA Res* 8: 301-310.

Hemmat, M., N.F. Weeden, A.G. Manganaris and D.M. Lawson (1994)

Molecular marker linkage map for apple. *J. Hered.* 85: 4-11.

Herrman, D., B. Boller, F. Widmer and R. Kölliker (2005) Optimization of

bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. *Genome* 48: 474-486.

Herrmann, D., B. Boller, B. Studer, F. Widmer and R. Kölliker (2006) QTL

analysis of seed yield components in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theor. Appl. Genet.* 112: 536-45.

北海道農業研究センター 低温農業研究のことば (2001).

北海道農政部食の安全推進室畜産振興課 (2005) 飼料作物種子の流通状況.

北海道農政部酪農畜産課 (2000) 牧草の栄養価および収量向上による自給飼料向上促進事業報告書.

- 北海道農政部 (2000) 北海道の採草地における牧草生産の現状と課題.
- 北海道農政部/道立農業・畜産試験場 (2004) 草地の簡易更新マニュアル.
- 北海道農政部酪農畜産課 (1999) 牧草の栄養価及び収量向上による飼料自給率向上促進事業報告書.
- 福岡嘉夫・若松敏一・山田俊彦 (1985) *Trifolium* 属の起源と分化. 育種学最近の進歩第 26 :44-54.
- 磯部祥子・我有 満・内山和宏 (1997a) 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の諸特性. 育種学雑誌 47 別 (1) :441
- 磯部祥子・澤井 晃・山口秀和・我有 満・内山和宏 (1997b) アカクローバとジグザグクローバの雑種および戻し交雑後代の稔性と染色体数. 日本草地学会誌 43 別(1):94-95.
- Isobe., S., A. Sawai, H. Yamaguchi, M. Gau and K. Uchiyama (1998) Fertility of interspecific hybrids and cross compatibility between *Trifolium medium* and *T. pratense*. Proceeding of 15th international Trifolium conference. p27.
- 磯部祥子 (2000) アカクローバ新品種「北海 9 号」. 北農 68:56.
- Isobe, S., A. Sawai, H. Yamaguchi, M. Gau and K. Uchiyama (2001a) Breeding potential of the backcross progenies of a hybrid between *Trifolium medium* X *T. pratense* to *T. pratense*. Canadian J. of Plant Sci. 82: 395-399.
- 磯部祥子・I. Klimenko・N. Rzgoulaeve・S. Ivashuta・我有 満・N. N. Kozlov (2001b) 簡易検定法を用いたアカクローバ菌核病に関する QTL 解析. 北海道草地研究会報 36:71.

- 磯部祥子・我有 満・山口秀和・内山和宏・眞木芳助・松浦正宏・植田精一・澤井 晃・堤 光昭・竹田芳彦・中島和彦(2002a)アカクローバ品種「ナツユウ」の育成とその特性. 北海道農業研究センター研究報告 177:1-14.
- Isobe, S., I. Klimenko, S. Ivashuta, M. Gau, and N. Kozlov (2002b) Construction of a linkage map of red clover with seven linkage groups. Proceedings of 17th International Trifolium conference p26.
- Isobe, S., I. Klimenko, S. Ivashuta, 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.
- Isobe, S., S. Sato, E. Asamizu, I. Klimenko, N. N. Kozlov, K. Okumura and S. Tabata (2004) Construction of a high density linkage map of red clover based on SSR and RFLP markers. 2nd International conference on Legume genomics and genetics p174.
- Ivashuta, S., M. Naumkina, M. Gau, K. Uchiyama, S. Isobe, Y. Mizukami and Y. Shimamoto (2002) Genotype-dependent transcriptional activation of novel repetitive elements during cold acclimation of alfalfa (*Medicago sativa*). Plant J. 31: 615-627.
- Zhao, J., J. A. Udall, P. A. Quijada, C. R. Grau, J. Meng and T. C. Osborn (2006) Quantitative trait loci for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and its association with a homeologous non-reciprocal transposition in *Brassica*

napus L. Theor. Appl. Genet. 112: 509-516.

Kang, M.S. (2002) Quantitative Genetics, Genomics and Plant Breeding. CABI Publishing, England.

Kaló, P., G. Endre, L. Zimányi, G. Csanádi and G.B. Kiss (2000) Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Theor. Appl. Genet. 100: 641-657.

Kijas, J.M., J.C. Fowler, C.A. Garbett and M.R. Thomas (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. Biotechniques 16: 656-662.

Kiss, G.B., G. Csanadi, K. Kalman, P. Kalo and L.Okresz (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. Mol. Gen. Genet. 238: 129-137.

Kiss, G.B., A. Kereszt, P. Kiss and G. Endre (1998) Colormapping; a non-mathematical procedure for genetic mapping. Act Biol. Hun. 49: 125-142.

Kölliker, R., D. Herrmann, B. Boller and F. Widmer (2003) Swiss Mattenkleelandraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (*Trifolium pratense* L.). Theor. Appl. Genet. 107: 306-315.

Kölliker, R., J. Enkerli and F. Widmer (2005) Characterisation of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched

genomic libraries. Mol. Ecol. Notes DOI 10.1111/J.1471-8286.2005.01133.

Kongkiatngam, P., M.J. Waterway, M.G. Fortin and B.E. Coulman (1995) Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. Euphytica 84: 237-246.

根釧農業試験場研究部作物科 (1994) 根釧地域における熟期別チモシー品種とマメ科牧草のくみあわせ. 北海道農業試験会議資料平成6年度.

Lander, E.S. and D. Botstein (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199.

Leffel, R.C. (1963) Pseudo-self-compatibility and segregation of gametophytic self-incompatibility alleles in red clover, *Trifolium pratense* L. Corp Sci. 3: 377-380.

Lehmann, E.L. (1975) Nonparametrics. McGraw-Hill, New York.

Loridon, K., K. McPhee, J. Morin, P. Dubreuil, ML. Pilet-Nayel, G. Aubert, C. Rameau, A. Baranger, C. Coyne, I. Lejeune-Henaut and J. Burstin (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). Theor. Appl. Genet. 111: 1022-1031.

Maliepaard, C., J. Jansen and J.W. Van Ooijen (1997) Linkage analysis in full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. Genet. Res. 70: 237-250.

Masterson, J. (1994) Stomatal size in fossil plants; evidence of polyploidy in

majority of angiosperms. *Science* 264: 421-424.

Matsu-ura, M., M. Matsumoto, A. Sawai, M. Gau and S. Ueda (1985) Resistance of red clover cultivars to clover rot in pure and mixed stands with reference to breeding work. *Proceed. 15th. Inst. Grassl. Cong.* 288-290.

McCouch, S.R., L. Teytelman and Y. Xu et al. (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for Rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 9: 199-207.

Menz, M.A., R.R. Klein, J.E. Mullet, J.A. Obert, N.C. Unruh and P.E. Klein (2002) A high-density genetic map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench based on 2926 AFLP, RFLP and SSR markers. *Plant Mol. Biol.* 48: 483-499.

Merkenschlager, F. (1934) Migration and distribution of red clover in Europe. *Herb. Rev.* 2: 88-92.

Merker, A. (1982) Hybrids between *Trifolium medium* and *Trifolium pratense*. *Hereditas* 101: 267-268.

Merker, A. (1988) Amphidiploids between *Trifolium alpestre* and *Trifolium pratense*. *Hereditas* 108: 267.

Milligan, B.G. (1991) Chloroplast DNA diversity within and among population of *Trifolium pratense*. *Curr. Genet.* 19: 411-416.

村上馨 (1967) 北海層農業研究史. 北海道農業試験場編. 421-429.

中島和彦・竹田芳彦・堤 光昭 (1993) 混播草地におけるチモシーおよびマメ科草種の動態 5. 混播条件下における草種割合とアカクローバ品種の特性. 北

海道草地研究会報:27: 97-98.

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.

Nedbalkova, B., J. Repkova and L. Bartosova (1995) Germplasm TBZP1,
TBZP2, TBZP3 and TBZP4 of interspecific *Trifolium hybrids*. Scientific
Studies-Research Institute for Fodder Plants 13: 129-131.

日本種苗協会 種苗特性分類調査基準.

農林水産省 (2006) 飼料をめぐる情勢 平成 18 年 2 月.

農林水産省 (2005) 平成 16 年度 食料・農業・農村白書.

Novosiolova, A. (2002) Increasing of red clover resistance to disease and
pests. Clover in Russia –Voronej 126. Ohmido, N. and K. Fukui (2002) FISH
analysis. In: Manual on Biotechnology. (Ed. Murooka, Y.). Baifukan Co., Ltd.,
Tokyo 187-193.

Ohmido, N. and K. Fukui (2002) FISH analysis. In: Manual on Biotechnology.
(Ed. Murooka, Y.). Baifukan Co., Ltd., Tokyo 187-193.

Peleman, J.D. and J.R. van der Voort (2003) Breeding by design. Trends
Plant Sci. 8: 330–334.

Phillips, G.C., C.B. Collins and N.L. Taylor (1982) Interspecific hybridization
of red clover (*Trifolium pratense* L.) with *T. sarosiense* Hazsl using *in vitro*
embryo rescue. Theor. Appl. Genet. 62: 17-24.

Phillips, G.C., J.W. Grosser, S. Berger, N.L. Taylor and G.B. Collins (1992)

Interspecific hybridization between red clover and *Trifolium alpestre* using in vitro embryo rescue. *Crop Sci.* 32: 1113-1115.

Plomopm, C., D.M. O'Malley and C.E. Duel (1995) Genomic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*). Comparison of two RAPD maps using selfed and open-pollinated seeds of the same individual. *Theor. Appl. Genet.* 90: 1028-1034.

Rabinowicz, P.D., K. Schutz and N. Dedhia (1999) Differential methylation of genes and retrotransposons facilitates shotgun sequencing of the maize genome. *Nat. Genet.* 23: 305-308.

Rajeev K., B. Varshneya, A. Granera and M.E. Sorrells (2005) Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Science* 10: 621-630.

Ritter, E., C. Gebhardt and F. Salamini (1990) Estimation of recombination frequencies and construction of RFLP linkage maps in plants from crosses between heterozygous parents. *Genetics* 125: 645-654.

Sandal, N., T.R. Petersen, J. Murry, Y. Umehara, B. Karas, K. Yano, H. Kumagai, M. Yoshikawa, K. Saito and M. Hayashi (2006) Genetics of symbiosis in *Lotus japonicus*: recombinant inbred lines, comparative genetic maps and map position of 35 symbiotic loci. *Mol. Plant Microbe Interact* 19: 80–91.

Sato., S., S. Isobe, E.. Asamizu, N. Ohmido, R. Kataoka, Y. Nakamura, T.

- Kaneko, N. Sakurai, K., I. Klimenko, S. Sasamoto, T. Wada, A. Watanabe, M. Kohara, T. Fujishiro and S. Tabata (2005) Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.). DNA Research 12: 301-364.
- Sawai, A., S. Ueda, M. Gau and K. Uchiyama (1990) Interspecific hybrids of *Trifolium medium* L. x 4X *T. pratense* L. obtained through embryo culture. J. Jpn. Grass. Sci. 35: 267-272.
- Sawai, A., H. Yamaguchi and K. Uchiyama (1995) Fertility and morphology of the chromosome-doubled hybrid *T. medium* x *T. pratense* (red clover) and backcross progeny. J. Jpn. Grass. Sci. 41: 122-127.
- Schwer, J.F. and R.W. Cleveland (1972) Tetraploid and triploid interspecific hybrids of *Trifolium pratense* L., *T. diffusum* Ehrh., and some related species. Crop Sci. 12: 321-324.
- Sjodin, J. (1996) Red clover Science. In N.L Taylor and K.H. Quesenberry (ed) Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Song, Q.J., L.F. Marek, R.C. Shoemaker, K.G. Lark, V.C. Concibido, X. Delannay, J.E. Specht and P.B. Cregan (2004) A new integrated genetic linkage map of the soybean Theor. Appl. Genet. 109: 122-128.
- Stebbins, G.L. (1996) Chromosomal variation and evolution: polyploidy and chromosome size number shed light on evolutionary processes in higher plants. Science 152: 1463-1469.

Steve, R. and J.S. Helen (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386.

Sturtevant, A.H. (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. J. Exptl. Zool. 14: 43-59.

Taylor, N.L., W.H. Stroube, G.B. Collins and W.A. Kendall (1963) Interspecific hybridization of red clover (*Trifolium pratense* L.). Crop Sci. 3: 549-552.

Taylor N.L and K.H. Quesenberry (1996) Red clover science. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Thamarus, K.A., K. Groom, J. Murrell, M. Byrne and G.F. Moran (2002) A genetic linkage map for Eucalyptus globules with candidate loci for wood, fiber, and floral traits. Theor. Appl. Genet. 104: 379-387.

Tsarouhas, V., U. Gullberg and U. Lagercrantz (2002) An AFLP and RFLP linkage map and quantitative trait locus (QTL) analysis of growth traits in *Salix*. Theor. Appl. Genet. 105: 277-288.

鶴飼保夫 (2000) ゲノムレベルの遺伝解析. 東京大学出版会, 東京.

Van Ooijen, J.W., M.P. Boer, R.C. Jansen and C. Maliepaard (2002) MapQTL® 4.0, Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. Plant Research International. Wageningen, The Netherlands.

Varshney, R.K., A. Graner and M.E. Sorrells (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23: 48-55.

Wolfrain, L.A. and R.S. Dhindsa (1993) Cloning and sequencing of the cDNA for cas17, a cold acclimation-specific gene of alfalfa *Plant Physiol.* 103: 667-668.

山田豊一 (1963) 牧草の栽培と利用. 養賢堂, 東京.

山口秀和・澤井 晃・内山和宏・我有 満 (1991) アカクローバ育成系統の地域適応性と生育特性. *北海道草地研究会報.* 25: 115-118.

山口秀和・澤井 晃・内山和宏・松本直幸 (1992) 菌核病抵抗性に関するアカクローバ品種の評価. *北海道草地研究会報.* 26: 47-49.

山口秀和 (1995) マメ科牧草の品種特性の解析及び育種法に関する研究. *北海道草地研究会報.* 29: 1-4.

山口秀和・澤井晃・我有満・内山和宏・植田精一・眞木芳助・松浦正宏・杉信賢一・早川力夫 (2000) アカクローバ品種「タイセツ」の育成とその特性 *北海道農業試験場研究報告* 171: 1-15.

山口秀和・澤井晃・我有満・内山和宏・植田精一・眞木芳助・松浦正宏・杉信賢一・早川力夫 (2000) アカクローバ品種「ホクセキ」の育成とその特性. *北海道農業試験場研究報告* 171: 17-32.

Yamanaka, N., S. Watanabe, K. Toda, M. Hayashi, H. Fuchigami, R. Takahashi and K. Harada (2005) Fine mapping of the FT1 locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a

recombinant inbred line. *Theor. Appl. Genet.* 110: 634-639.