

チモシー (*Phleum pratense* L.) とオーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L.) の遠縁雑種の作出^{*1}

中住 晴彦^{*2} 古谷 政道^{*3} 下小路英男^{*4} 藤井 弘毅^{*5}

チモシーの持つ優れた越冬性とオーチャードグラスのもつ優れた再生力を組合せ、越冬性と再生力に優れるイネ科牧草を育成する目的で両草種の交雑を行った。交雑は、チモシーを種子親、オーチャードグラスを花粉親として行った。交雑の結果、オーチャードグラスの花粉管の先端がチモシーの胚珠に到達し、受精していることが確認された。得られた種子は胚乳の発達が悪いため胚を摘出して培養したところ、最終的に4個体の雑種植物が得られた。得られた雑種植物の染色体数は両親の中間の35本で、エステラーゼのザイモグラムから雑種個体には花粉親のオーチャードグラス由来のバンドが確認された。これらのことから、得られた雑種個体はチモシーとオーチャードグラスの雑種であると確認された。チモシーはコヌカグサ族アワガエリ属、オーチャードグラスはウシノケグサ族カモガヤ属に分類され、族を異にする。この遠縁雑種の作出はイネ科牧草の育種に新しい可能性を開くものである。

緒 言

チモシーは北海道の全草地面積の80%を占める最も重要な寒地型イネ科牧草であり、越冬性に優れているなど多くの優点を持っているが、寒地型イネ科牧草の中では再生力に劣るという欠点も有している。そのため、再生力の改良はチモシーの重要な育種目標となっている⁹⁾。しかし、再生力と越冬性の両方に優れたチモシーの品種育成には、従来の手法に加えて全く新しい遺伝資源の導入等の手法が必要である。

そこで、チモシーに比べて越冬性は劣るが再生力に優れる特徴を有するオーチャードグラスに着目し、オーチャードグラスの持つ優れた再生力を遠縁交雑によりチモシーに導入することを計画した。

本研究では、胚培養の技術を用いることにより、族を異にするチモシーとオーチャードグラスの雑種個体の作出に成功したので報告する。

材料および方法

交雑はチモシーを種子親、オーチャードグラスを花粉親として行った。種子親として用いたチモシーのクローンは、除雄の手間を省くために雄性不稔あるいは自家不和合性のクローンを用いた。すなわち、雄性不稔クローンの「1646」（「北見在来」由来）、自家不和合性クローンの「545」（「Clair」由来）および「Kun-2」（「クンプウ」由来）である。花粉親として用いたオーチャードグラスのクローンは、「キタミドリ」由来の「K-2」、「K-3」および「K-4」である。交雑は隔離温室内で手交配で行った。

チモシー柱頭上でのオーチャードグラス花粉の発芽と花粉管の伸長の観察には、チモシー雄性不稔クローンの「1646」、オーチャードグラス「K-2」、「K-3」、「K-4」および対照としてチモシー「N 410」（「ノサップ」由来のクローン）を用いた。交配から8時間後にカルノア液（エタノール：クロロフィル：氷酢酸=6:3:1 v/v）に浸漬・固定し、その後、小穂から雌ずいを取り出し蛍光顕微鏡を用いて Ahmad & Comeau¹⁾の方法で花粉の発芽と花粉管の伸長を観察した。

チモシーとオーチャードグラスの雑種個体を得るために胚培養の手法を適用した。交雑後20~30日目の交雑種子から胚を摘出し、Norstog培地（ショ糖25.7g/l）に置床し、25°Cで培養した。その後、3~4葉期に1/2 MS培地に移植し20°C、18時間日長で培養した。さらに、生長が良好な個体については順化後パーミキュライトを充填したポリ鉢に鉢上し、20°C、18時間日長で培養した。

雑種個体の染色体の観察は、酢酸カーミン染色を行っ

1997年1月6日受理

^{*1} 本報の一部は、1991年度北海道草地研究会講演会1992年日本草地学会講演会で発表した。

^{*2} 北海道立北見農業試験場（現北海道立花・野菜技術センター、073 滝川市東滝川）

^{*3} 同上（現農林水産省東北農業試験場、020-01 岩手県盛岡市）

^{*4} 同上、099-14 常呂郡訓子府町

^{*5} 同上（現北海道立根釧農業試験場、086-11 標津郡中標津町）

た根端組織を用いて押しつぶし法で行った。

エステラーゼアイソザイムの観察は、展開したばかりの若い葉を用いてポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって行った。

結 果

1. 花粉の発芽および花粉管伸長

チモシー「1646」の柱頭上において、オーチャードグラスの花粉の発芽が観察された(図1)。チモシー「1646」の柱頭上でのオーチャードグラス花粉の発芽率は、比較のチモシー「N 410」花粉の発芽率に比べて、オーチャードグラス「K-2」, 「K-3」の花粉では低く, 「K-4」の花粉ではほぼ同率であった(表1)。これらのことから、チモシーは族を異にするオーチャードグラスの花粉の発芽に対して強い不和合性を持たないことが示唆された。また、オーチャードグラスのクローン別に見た花粉の発芽率は「K-4」が最も高く、次いで「K-3」, 「K-2」の順となり、花粉の発芽率にはクローン間で差があることが認められた。

チモシー「1646」の雌ずいにおいて、オーチャードグラスの花粉管が伸長し、先端が胚珠に達していることが確認された(図1)。交配から8時間後におけるチモシー

およびオーチャードグラス花粉管のチモシー「1646」の胚珠への到達率は、チモシー「N 410」が78%であるのに対し、オーチャードグラスでは最も高いクローンでも20%であった(表2)。これらのことから、チモシーの雌ずい内では、オーチャードグラスの花粉管はチモシーの花粉管に比べて伸長が抑制されることが確認され、両者の間にはある程度の不和合性が存在していることが示唆された。

また、花粉管の胚珠への到達率をオーチャードグラスのクローン別に見ると、花粉の発芽率と同様のクローン間差が見られ、花粉の発芽率が高いクローンは胚珠への到達率も高い傾向が認められた。

2. 雑種個体の作出

オーチャードグラスの花粉管がチモシーの胚珠へ到達していることが確認されたので、次に雑種個体の作出を試みた。交雑した小穂のうち9.4~13.1%の小穂で交雑種子が得られた(表3)。交雑種子は両親の組合せによる差はあるものの全ての交配組合せで得られた。得られた交雑種子の約19%で胚の形成が見られたが、それらの種子の胚乳はほとんど発達していなかった。そこで、胚の枯死が起こることが想定されたため、胚を抽出し、培養した。培養した166の雑種胚のうち13個が発芽した(図

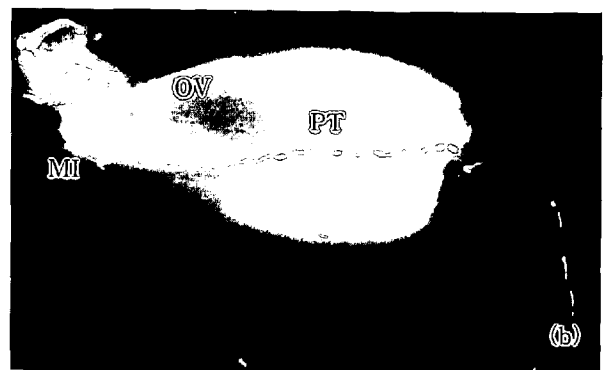


Fig. 1 (a, b). *Dactylis glomerata* L. pollen tube characteristics in *Phleum pratense* L. pistils.
(a) *P. pratense* (1646) pistil showing *D. glomerata* (K-3) pollen germination and pollen tube growth.
(b) A *D. glomerata* (K-4) pollen tube have penetrated to the micropyle of the *P. pratense* (1646) and enter the ovule. PG: pollen grain, PT: pollen tube, MI: micropyle, OV: ovule

Table 1. The total number and percentage *Dactylis glomerata* and *Phleum pratense* pollen grain germination on stigmas of *P. pratense* 1646 after 8 hours of pollination.

Male parent	Number of ovules	Total number of pollen grains			
		examined	germinated	ungerminated	% germination
<i>D. glomerata</i> K-2	20	500	195	305	39.0
<i>D. glomerata</i> K-3	20	500	247	253	49.4
<i>D. glomerata</i> K-4	20	500	379	121	75.8
<i>P. pratense</i> N410	20	500	370	130	74.0

Table 2. The number of ovaries with pollen tubes at the style, ovary wall and ovule in *Phleum pratense* 1646 × *Dactylis glomerata* and *P. pratense* 1646 × *P. pratense* N410 at 8 hours after pollination.

Male parent	Number of ovaries examined	Number of ovaries with pollen tubes at the		
		style	ovary wall	ovule
<i>D. glomerata</i> K-2	50	29 (58.0) ¹	19 (38.0)	2 (4.0)
<i>D. glomerata</i> K-3	50	27 (54.0)	19 (38.0)	4 (8.0)
<i>D. glomerata</i> K-4	50	16 (32.0)	24 (48.0)	10 (20.0)
<i>P. pratense</i> N410	50	5 (10.0)	6 (12.0)	39 (78.0)

¹% of observed ovaries / examined ovaries

Table 3. Results of crosses between *Phleum pratense* L. and *Dactylis glomerata* L.

Parents		No. of florets pollinated ¹	No. of hybrid seeds obtained	No. of hybrid embryos		No. of hybrids obtained
<i>P. pratense</i> (♀)	<i>D. glomerata</i> (♂)			cultured	germinated	
1646	K-2	610	62 (10.2) ²	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	K-3	2360	310 (13.1)	21 (0.9)	5 (0.2)	2 (0.08)
	K-4	2360	222 (9.4)	52 (2.2)	4 (0.2)	2 (0.08)
545	K-2	900	34 (3.8)	22 (2.4)	2 (0.2)	0 (0)
Kunpu4	K-3	1500	259 (17.3)	63 (4.2)	2 (0.1)	0 (0)
	K-4	480	8 (1.7)	8 (1.7)	0 (0)	0 (0)

¹Estimate number [Ear length × florets density (number of florets / 1cm ear length)]

²Percentages



Fig. 2 Germination of Intergeneric hybrid between *Phleum pratense* L.(545) and *Dactylis glomerata* L.(K-2) on artificial medium.

2)。発芽率が低いのは、雑種胚がごく小さく、置床する際に胚の向きをコントロールすることができなかったことも関係していると思われる。チモシー「1646」とオーチャードグラス「K-2」、「K-3」および「K-4」の組合せでの雑種胚の獲得率は、花粉の発芽率および花粉管の胚珠への到達率が高い「K-4」が最も高率であった。

発芽した個体のほとんどは発芽直後に枯死し、生存した個体は4個体のみであった(表4)。それら4個体のうち2個体は鉢上後間もなく枯死したが、残りの2個体(No.3とNo.4)は生育が旺盛であり、特にNo.4は2年以上生存した。

Table 4. Description of hybrids between *Phleum pratense* L. and *Dactylis glomerata* L.

Hybrid No.	Parents		Chromosome number 2n	Heading ¹	Tillering ²	Rooting ³	Remarks
	<i>P. pratense</i> (♀)	<i>D. glomerata</i> (♂)					
1	1646	K-4	Not studied	-	-	±	Died in three MAG ⁴
2	1646	K-3	Not studied	-	+	±	Died in five MAG
3	1646	K-3	35 (constantly)	-	++	++	Died in five MAG
4	1646	K-4	35 (constantly)	-	++	++	viable until 24 MAG

¹ - = Not heading

² - = No tillering; + = 5~10 tillerings; ++ = 10~20 tillerings

³ ± = Very poor rooting, Cytological analysis was impossible; ++ = good rooting

⁴ Months after germination

3. 雑種個体の形態

得られた4個体の雑種植物はいずれも出穂しなかった(表4)。オーチャードグラスは花芽形成に低温を必要とすることが知られており²⁾, 雑種植物が出穂しなかったのは低温処理を行わなかったことも原因のひとつと考えられる。花器の形態を観察することができなかったため, 茎基部横断面の形態の観察を行った。チモシーの茎の横断面はほぼ円形であり, オーチャードグラスはラグビーボール形である。それに対し雑種個体の茎の横断面は楕円形であり, 両草種のほぼ中間的な形態を示した(図3)。

4. 雑種個体の染色体数

得られた雑種個体4個体のうち, 生育の旺盛なNo.3とNo.4の個体について根端細胞における染色体数を調査した(表4, 図4)。これら2個体の染色体数は, 計15回の観察において, いずれも35本であった。雑種個体の持つ35本の染色体数は, チモシー「1646」の染色体数42本, オーチャードグラス「K-3」, 「K-4」の染色体数28本の中間である。このことから, 得られた雑種個体はチモシーとオーチャードグラスのゲノムをあわせ持つ遠縁雑種であることが示唆された。

5. 雑種個体のアイソザイム分析

雑種個体とその両親のエステラーゼザイモグラムを図5に示した。雑種個体には, 明らかに花粉親由来のバンドが観察された。このことは, 雑種個体には花粉親であるオーチャードグラス由来の遺伝子が組み込まれていることを示している。

これらのことを総合すると, 得られた雑種個体はチモシーとオーチャードグラス間の遠縁雑種であると結論された。

考 察

チモシーに関する遠縁交雑は, チモシー×メドウフォックステイル⁴⁾, イタリアンライグラス×チモシー⁷⁾の組合せで雑種作出の成功例が報告されている。また, オーチャードグラスに関するものでは, トールフェスク×オーチャードグラス³⁾の組合せで雑種作出の成功例が報告されている。しかし, チモシーとオーチャードグラスの雑種の作出は他に例がなく, 本報告が最初の成功例である。

チモシーの柱頭にオーチャードグラスの花粉を交雑した場合, オーチャードグラス花粉の発芽に関してチモシー雌ずいには不和合性がほとんどみられなかったが, 花粉管の伸長に対してある程度不和合性がみられた。しかし, その不和合性は受精の抑制までは至らず, 両草種間では低率ながら正常に受精が行われ, 雑種胚が形成されることが明らかになった。これは, 両草種間の生殖的隔離が完全ではないことを示唆している。チモシーは

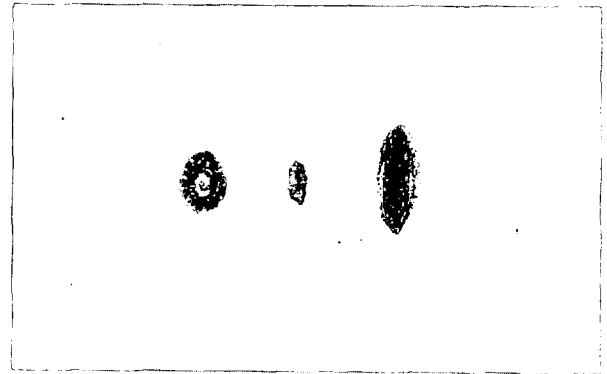


Fig. 3 The sections of stem in *Phleum pratense* L. (left), *Dactylis glomerata* L. (right) and intergeneric hybrid (middle).

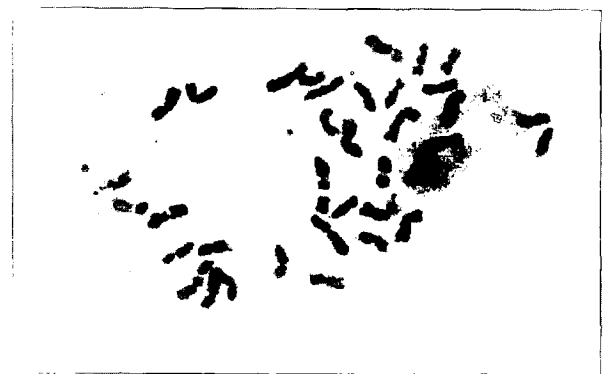


Fig. 4 Root-tip cell of the *Phleum pratense* L. × *Dactylis glomerata* L. hybrid with the somatic chromosome number of 35.

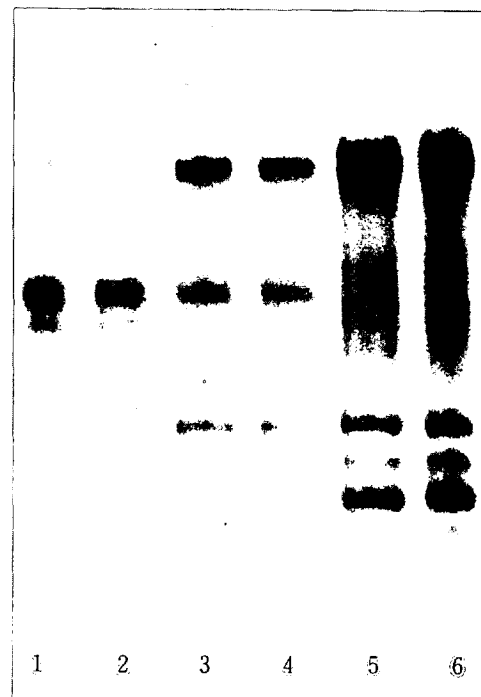


Fig. 5 The electrophoretic banding patterns of leaf esterase isozymes in *Phleum pratense* L., female parent (1, 2), *Dactylis glomerata* L., male parent (5, 6) and intergeneric hybrid (3, 4).

コヌカグサ族アワガエリ属、オーチャードグラスはウシノケグサ族カモガヤ属に分類されており、両者の植物分類学上の類縁関係は遠いが、これらの族間での雑種の作出は、イタリアンライグラス×チモシー⁷⁾でも行われており、コヌカグサ族とウシノケグサ族の遺伝的な類縁関係を示すものとして興味深い。

また、チモシーおよびオーチャードグラスのクローン(遺伝子型)の違いにより花粉の発芽率、花粉管の伸長量および雑種植物の獲得率に差がみられた。このことは、両草種間での不和合性には各草種の遺伝子型も関係していることを示していると同時に、雑種植物を得やすい組合せがあることを示唆しており、組合せを選択することにより雑種植物の獲得率を上げることができるものと考えられる。

北海道では、越冬性と再生力の両方に優れたイネ科牧草が求められている。本研究による両草種の雑種植物作出の成功は、チモシー並の優れた越冬性とオーチャードグラス並の優れた再生力を持つイネ科牧草開発の可能性を期待させる。

しかし、得られた雑種植物は出穂しなかったうえ、越冬性や再生力などの農業形質については未検討である。この点は今後の研究に待ちたい。

引用文献

- 1) Ahmad, F. and A. Comeau. "Wheat×pearl millet hybridization: consequence and potential". *Euphytica*. 50, 181-190 (1990).
- 2) 池谷文夫, 佐藤信之助, 川端習太郎. "オーチャードグラスの出穂制御に関する研究 V. 幼若期の完了後における春化感応力の増大". *日本草地学会誌*. 27, 147-151 (1981).
- 3) Matzk, F. "Successful crosses between *Festuca arundinacea* Schreb. and *Dactylis glomerata* L.". *Theor. Appl. Genet.* 60, 119-122 (1981).
- 4) 中住晴彦, 古谷政道, 下小路英男, 川村公一. "チモシー (*Phleum pratense* L.)×メドウフォックステイル (*Alopecurus pratensis* L.) の属間雑種について". *北海道草地研究会報*. 24, 128-131 (1990).
- 5) 中住晴彦, 古谷政道, 下小路英男, 藤井弘毅. "チモシー (*Phleum pratense* L.)×オーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L.) の交雑で得られた植物体について". *北海道草地研究会報*. 26, 69-72 (1992).
- 6) 中住晴彦, 古谷政道, 下小路英男, 藤井弘毅. "胚培養によるチモシー (*Phleum pratense* L.)×オーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L.) の属間雑種の作出". *日本草地学会誌別号*. 38, 111-112 (1992).
- 7) Park, B. H. and Kim, M. H. "Studies on inter-

specific and intergeneric hybridization in herbage grasses. I. Effects of hybrid embryo age on callus formation and plant regeneration". *Journal of the Korean Society of Grassland Science*. 9(2), 62-67 (1989).

- 8) Ueda, S. "Timothy breeding in Japan". *JARQ*. 24(3), 195-201 (1990).

Wide Hybridization between Timothy (*Phleum pratense* L.) and Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)*¹

Haruhiko NAKAZUMI*², Masamichi FURUYA, Hideo SHIMOKOUJI and Hiroki FUJII

Summary

Crosses between *P. pratense* and *D. glomerata* (crosses were done between *P. pratense* for a female parent, and *D. glomerata* for a male parent.) were made to combine the good winter hardiness of *P. pratense* and the regrowth ability of *D. glomerata*. The pollen tubes of *D. glomerata* inserted into the *P. pratense* ovules. The hybrid embryos were excised and cultured on artificial medium. Finally four regenerated plants were obtained. The hybrids were analyzed cytologically for counting the number of somatic chromosomes. Intergeneric hybrids possessed 35 chromosomes, it was suggested that the hybrids possess the genome of *P. pratense* ($2n=42$) and *D. glomerata* ($2n=28$). The presence in the hybrids of esterase bands derived from *D. glomerata* as the male parent gives one of the good evidences for the hybridity.

These two species belong to a different tribe, *P. pratense* belongs to Tribus Agrostae Nees and *D. glomerata* to Tribus Festuceae Dumortier, respectively. The investigation offers a new possibility for grasses breeding programs.

*¹ A part of this work was presented at the 26th meeting (December 1991) of the Hokkaido Society of Grassland Science.

The outline of this work was presented at the 47th meeting (October 1992) of the Japanese Society of Grassland Science.

*² Hokkaido Prefectural Kitami Agricultural Experiment Station, Kunneppu, Hokkaido, 099-14 Japan (present; Hokkaido Ornamental Plants and Vegetables Research Center, Takikawa-shi, Hokkaido, 073 Japan)