

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19380148

研究課題名（和文） 低温耐性牧草の開発に向けた分子育種

研究課題名（英文）

Molecular breeding for cold stress tolerant forage grasses

研究代表者

山田 敏彦 (Yamada Toshihiko)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：70343952

研究代表者の専門分野：農学

科研費の分科・細目：畜産草地

キーワード：草地利用、飼料作物育種

1. 研究計画の概要

低温耐性に関連する複数のフルクタン合成酵素遺伝子や CBF 遺伝子が、寒地型イネ科牧草から単離・同定されている。そこで、フルクタン合成能力のないシバ (*Zoysia japonica*) への効率的な遺伝子導入技術の確立を行いながら、これら寒地型イネ科牧草由来の遺伝子のシバへの導入を図る。得られる形質転換植物体の解析から、関連遺伝子の代謝ネットワーク等における機能を明らかにする。また、シバは低温耐性がないため、導入された遺伝子により低温耐性の向上も期待できる。

2. 研究の進捗状況

(1) シバにおける迅速かつ効率的な組織培養技術を確立した。完熟種子由来の胚を外植片に用い、5mg/L 2,4-D と 0.2mg/L ベンジルアミノプリン(BA)を含むMS培地でカルスを誘導し、1mg/L チジアズロン(TDZ)を含む培地でシュートを誘導した後、1mg/L BA の培地に移し替えることにより、植物体が容易に再生され、カルス誘導から植物体再生までわずか 18 週間を要するのみで、既報培養法より時間が短縮され、遺伝子導入に関する実験の迅速化および効率化が可能になった。

(2) 完熟種子から取り出した胚を7日間前培養し、アグロバクテリウムを7日間共培養させた後、1mg/L BA、1mg/L 2,4-D の植物ホルモンを含む培地で培養することにより、効率的に数多くの組換えシュートを形成させる遺伝子導入系を確立した。

(3) エンブリオジェニックカルスについて、パーティクルガン法による遺伝子導入に関する最適条件を明らかにした。

(4) ペレニアルライグラスから単離したフルクタン合成酵素遺伝子(*prft1*, *prft2*, *prft3*)を組み込んだベクターを導入して得られた組換え体を得ており、遺伝子発現を確認中である。

(5) ペレニアルライグラスから単離された2つの CBF 遺伝子(*LpCBF1b*, *LpCBF1Va*)をシロイヌナズナに導入して、過剰発現させ、その機能の違いを明らかにした。*LpCBF1b*は成長を阻害したが、*LpCBF1Va*は開花を遅らせるが、耐凍性を向上させることを確認した。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている

シバは遺伝子導入系実験技術の確立が難しく、当初予定よりその確立が遅れたため、研究進捗にやや遅れがみられた。

4. 今後の研究の推進方策

シバにおける遺伝子導入技術の開発に手こずったが、安定して遺伝子を導入できる手法を3年目によく確立することができた。そのため、研究3年目終了時に組換え植物体での導入遺伝子の発現確認と特性評価を予定していたが、まだ完了していない。残り研究期間1年間で、これらの調査を行い、優良な組換え個体の選抜を行う。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計4件)

① X. Wang, Y. Hoshino, T. Yamada, Rapid and efficient callus induction and plant regeneration from seeds of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.), Grassland Science, 査読有,印刷中

- ② X. Wang, F.J. Kong, Y. Hoshino, T. Yamada, T. Yamada, Rapid *in vitro* culture and Agrobacterium-mediated transformation system in zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.), Proceedings of Joint 14th Austrasian Plant Breeding Conference and 11th SABRAO Congress, (2009) CD 版ページ数無
- ③ Y.-D. Guo, H. Hisano, Y. Shimamoto, T. Yamada, Transformation of androgenic-derived Festulolium plants (*Lolium perenne* L. x *Festuca pratensis* Huds.) by *Agrobacterium tumefaciens*, Plant Cell Tissue Organ Culture, 査読有, 96: 219-227 (2009)
- ④ H. Hisano, A. Kanazawa, M. Yoshida, M. O. Humphreys, M. Iizuka, K. Kitamura, T. Yamada, Coordinated expression of functionally diverse fructosyltransferase genes is associated with fructan accumulation in response to low temperature in perennial ryegrass, New Phytologist, 査読有, 178: 766-780 (2009)

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① T. Yamada, K. Tamura, Molecular breeding to improve tolerance to abiotic stress in forage grasses (plenary lecture) 6th International Symposium on the Molecular Breeding of Forage and Turf, 2010 年 3 月 15 日 - 18 日, アルゼンチン, ブエノスアイレス市
- ② X. Wang, Y. Hoshino, T. Yamada, Rapid *in vitro* callus induction and regeneration of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) and miscanthus (*Miscanthus sinensis* Anderss.), 第 65 回日本草地学会, 2009 年 3 月 29 日 - 30 日, 藤沢市 (日本大学)
- ③ X. Wang, Y. Hoshino, T. Yamada, Establishing abundant and efficient explants system for Agrobacterium - mediated transformation in zoysiagrass, XXI International Grassland Congress, 2008 年 6 月 29 日 - 7 月 5 日, 中国, フフホト市
- ④ H. Hisano, K. Tamura, M. Yoshida, A. Kanazawa, T. Yamada, Functional genomics for winter hardiness in forage grasses. Plant & Animal Genome XVI, 2008 年 1 月 12 日, アメリカ合衆国, サンエゴ市

〔図書〕 (計 3 件)

- ① T. Yamada, K. Tamura, X. Wang, Y. Aoyagi, Transgenesis and genomics in forage crops, S.M. Jain & D.S. Brar (eds.), "Molecular Techniques in Crop Improvement, 2nd Edition", Springer, the Netherlands, 719-744 (2010).
- ② T. Yamada, G.S. Spangenberg, Molecular Breeding of Forage and Turf, Springer, New York, 352 (2009)
- ③ Z.-Y. Wang, T. Yamada, Cool Season Forage Grasses, in Kole, C. and Hall, T. C. (eds.), "Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Cereals and Forage Grasses", Blackwell Publishing, Oxford, UK, 199-210 (2008).