Genetic Analysis of the Restoration of Male Fertility in Italian Ryegrass (Lolium multiflorum Lam.)

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2019-03-22
	キーワード (Ja):
	キーワード (En): Italian ryegrass, Cytoplasmic male sterile, Restorer gene, Inheritance model
	作成者: 荒川, 明, 藤森, 雅博, 小松, 敏憲, 内山, 和宏, 杉田, 紳一
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001979

イタリアンライグラスにおける雄性不稔性の遺伝解析

荒川　明・藤森雅博・小松敏憲・内山和宏・杉田紳一

飼料作物開発部

要　約

イタリアンライグラス雄性不稔系統を育成するために，雄性不稔維持系統の育成および雄性不稔性維持能について遺伝様式の推定を行った。雄性不稔細胞質を持ち，表現型が完全雄性不稔の個体CL1を検定親として，雄性不稔性維持能についての選抜のための検定交配を行い，W59系統より５個体を選抜・多交配して維持系統（Ｂ系統）を得た。雄性不稔細胞質を持つ１回親にこのＢ系統を反復戻し交雑して，雄性不稔系統（Ａ系統）とした。Ａ系統のBC_2およびBC_3世代における雄性不稔個体割合は86.4および87.7%であった。CL1と，W59系統中の１個体であるW59－11との交雑後代は完全雄性不稔個体と完全雄性可稔個体が分離した。雄性不稔維持能の遺伝様式の推定のため，完全雄性不稔個体（11S2および11S3）と完全雄性可稔個体（11F3）との間で検定交配を行った。11S2×11F3および11S3×11F3後代における花粉稔性の分離はそれぞれ不稔：可稔＝１：１および１：３に分離したので，雄性不稔性の発現には２つの補足的な遺伝子座が関与していると考えられた。しかし，これに基づいて推定されるＡ系統のBC_2およびBC_3世代における雄性不稔個体割合を観察された雄性不稔個体割合とを比較すると，観察された雄性不稔個体割合は推定値を下回った。従って，雄性不稔性の発現には，さらに別の雄性不稔性に関与する遺伝子の存在が示唆された。

キーワード：イタリアンライグラス，細胞質雄性不稔，稔性回復遺伝子，遺伝様式

緒　言

細胞質雄性不稔の現象は多くの植物種で知られており，タマネギ，ソルガム，テンサイなどでF_1採種に利用されている。イタリアンライグラスにおける雄性不稔系統の利用は，種子親としてトールフェスク を花粉親とするフェストロリウム一代雑種品種の育成や，花粉の出ない品種育成による花粉症対策としてもその実用化が期待されている。これまでにLolium属植物で細胞質雄性不稔の存在や，雄性不稔性に関する遺伝様式について，いくつかの報告があり[2) 3) 8) 10) 11) 13)]，これらのうち，Connolly *et al.*[2)] およびWit[13)]，はライグラス類とメドウフェスクとの属間交雑から得られた雄性不稔個体にペレニアルライグラスを戻し交雑して雄性不稔系統の作出を試みた。しかし，今日までに商業的に利用可能な雄性不稔系統は未だに育成されていない。

ライグラス類とフェスク類の属間雑種であるフェストロリウムには，ライグラス類と酷似したものからトールフェスクに近いものまで様々なものがあるが，イタリアンライグラスとトールフェスクのF_1は我が国の温暖地の永年草地向けの牧草として農業特性に優れている[6) 7)]。F_1フェストロリウムを商業的に採種することを考慮した場合，その種子親のライグラスは，花粉親のトールフェスクと交雑親和性が高いことが必要である。イタリアンライグラスはペレニアルライグラスと比較して，トールフェスクとの交雑親和性が高いことが知られており[1)]，また，イタリアンライグラスとトールフェスクとの交雑における種子稔性は，少なくともトールフェスク品種「ナンリョウ」を花粉親とする限り十分高いことが確認されている（杉田，未発表）。従って，イタリアンライグラスはペレニアルライグラスよりF_1フェストロリウムの種子親として優れており，イタリアンライグラスにおいて細胞質雄性不稔を利用した完全雄性不稔系統を育成する意義は大きいと言える。

2002年12月２日受付

小松[9]は，イタリアンライグラスにおける細胞質雄性不稔（品種「ワセアオバ」）を見出し，不稔性の発現が細胞質と核内遺伝子の相互作用によるものであることを明らかにした。一方，稔性に関与する核内遺伝子が明らかになれば，これら不稔型核内遺伝子を持ち，細胞質が正常である系統（維持系統）を作出することにより，種子増殖できる完全雄性不稔系統の育成が可能になると期待される。しかし，これまでに，花粉稔性に関与する核内遺伝子の数やその遺伝様式については明らかにされていない。本報では，細胞質雄性不稔個体と，雄性不稔性維持能の高い個体間の交配後代を用いた兄弟交配後代での雄性不稔性の発現を調べ，関連する遺伝子の解析を試みた。

材料と方法

交配及び検定材料

1）雄性不稔性維持能に関する検定（試験1）：イタリアンライグラス品種「ワセアオバ」から，雄性不稔細胞質を持ち，表現型も完全不稔である個体（CL1）を選抜し，温室で株分け増殖した。次に，品種「ワセユタカ」から，細胞質が正常型であるが，雄性不稔細胞質を持つ個体との交雑後代が高い不稔個体率を示す2個体（WY5とWY9）を選抜し，2個体を単交配した後代（W59系統）を得た。1995年にCL1とW59系統の21個体間で検定交配・採種を行った。これら21の交配後代を1995年秋に播種・養成し，翌春花粉稔性を調査した（表1）。

2）雄性不稔系統の育成（試験2）：CL1×W59系統21後代のうち，完全可稔個体が出現しなかった5組み合わせについて，それらの花粉親5個体間で多交配を行い，これらのうち雄性不稔性維持能に最も優れると考えられたW59-10から採種して，これを維持系統（B系統）とした。CL1×W59-10を雄性不稔系統（A系統）育成のための1回親とし，これに1997年にB系統を交配して，A系統のF_1世代を得た。以後，1999年，2000年，2001年にB系統を反復親として戻し交雑を行い，それぞれBC_1，BC_2，BC_3世代を得，各世代における花粉稔性を調査した。

3）雄性不稔性維持能の遺伝様式推定のための検定交配（試験3）：CL1×W59-11の後代からは完全可稔（CF）個体が出現した。この後代の中から，完全不稔（CS）の2個体（11S2，11S3）とCFの1個体（11F3）間で交配を行い，後代を得た。以上の材料の育成経過は図1に示すとおりである。1998年に，11S2×11F3および11S3×11F3交配後代の花粉稔性を調査した。

花粉稔性の調査法：試験1の花粉稔性の調査は，葯の長さと充実度の観察により10段階の評点を与えて行った（1：CS－10：CF)。葯の観察は，各個体につき2回行った。第1回目は5月の出穂期に行い，その後地際から約10cmの高さで刈り取りを行った。第2回目は再生草の出穂期に行った。2回の平均をその個体の評点とした。

試験2および試験3での花粉稔性の調査法は以下の通りとした。開花した小花を含む小穂中の，開花直前の小花から葯を採取した。葯をスライドグラス上で酢酸カーミン溶液に浸し，カバーグラスをかけて叩いて葯を押しつぶし，検鏡した。観察された花粉粒のうち，濃色に染色され，正常な大きさの花粉粒を可稔花粉粒と判定し，100粒の観察花粉粒中の可稔花粉粒数を可稔花粉割合（%）とした。これらの調査は，各個体毎に1番草と再生草の出穂期の2回行った。個体別の花粉稔性は，それぞれ異なる3穂からの小花の平均値とし，2回の調査の平均値を可稔花粉割合（%）とした。

BC_1世代以降のA系統に関しては，葯の裂開の有無のみを観察した（BC_1のデータなし）。

以上のように，花粉稔性調査法はいくつかの方法を採ったが，それらの相互の関係は以下の通りである。試験1における10の評点においては，一部の個体の検鏡から，評点5以下がCSと考えられた。ここで，CSは検鏡により葯中に可稔花粉粒が含まれないことを意味する。すな

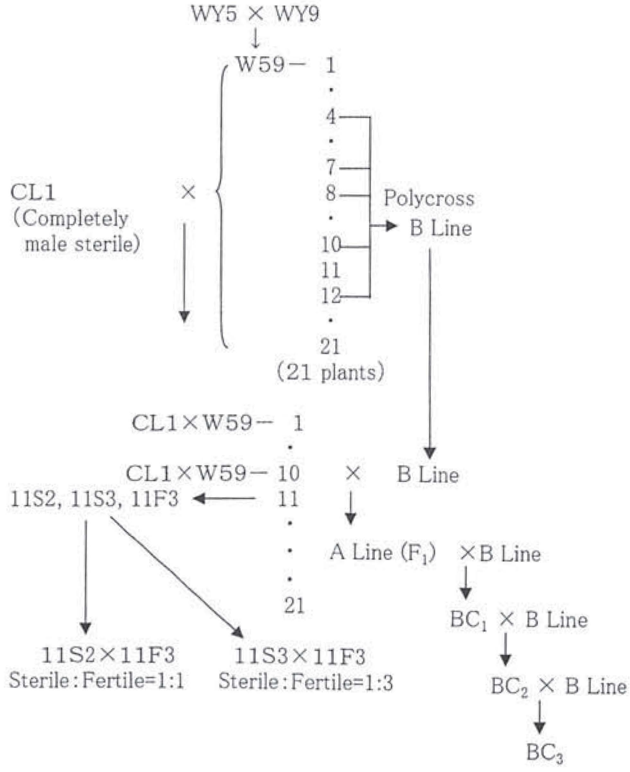

Figure 1. Procedure of developing plant materials

わち，可稔花粉割合0％と同義である。検鏡により可稔花粉割合が約20％以上の時，葯は裂開する。したがって，葯が裂開しない個体にも，葯中に20％以下の可稔花粉粒を持つものがある。このことにより，CS個体割合＜葯が裂開しない個体の割合となる。CFは正常可稔と同義であり，試験1における10段階の評点において9以上がCFと考えられた。1％以上の可稔花粉粒を持ち，CFでない個体は部分可稔（PF）とした。PF個体は葯が裂開する個体と裂開しない個体を含む。

結　果

1）検定交配次代の花粉稔性（試験1）

表1に，CL1×W59系統交配後代21組み合わせの花粉稔性の調査結果をCS，PF，CFの個体割合で示した。観察による誤差を補正するため，各個体の2回の評点の平均値が1.0－4.0，1.0－5.0および1.0－6.0を与えた個体の割合の平均をCS個体割合（％）とした。CF個体割合についても同様に，各個体の2回の評点の平均値が9.0以上の個体割合と評点10.0の個体割合の平均をCF個体割合とした。100からCS個体割合とCS個体割合を差し引いてPF個体割合とした。CS個体割合のレンジは32～88％，CF個体割合のレンジは0～32％であった。21組み合わせのうち，9組み合わせでCF個体がみられなかった。これら9組み合わせのうち，5組み合わせの花粉親，W59－4，8，10，17，19の5個体間で多交配を行い，それらの個体うち不稔性維持能が最も優れると考えられたW59－10のみから採種した種子をB系統とした。

2）B系統の反復戻し交雑によるA系統各世代の花粉稔性（試験2）

表2に，A系統（F_1）120個体の花粉稔性を，可稔花粉割合の別に示した。CS個体の割合は77.5％であった。BC_2およびBC_3世代において葯が裂開しなかった個体の割合はそれぞれ86.4および87.7％であった。

3）遺伝様式推定のための交配後代における花粉稔性（試験3）

図2に，11S2×11F3および11S3×11F3後代の花粉稔性の調査結果を評点別の個体数で示した。「CS個体数」：「それ以外の個体数」の比は，χ^2検定により11S2×11F3（128個体）では1：1，11S3×11F3（87個体）では1：3に適合した（表3）。

Table 1. Male fertility of test cross progenies for CL1×W59s.

	No. of plants	Ratio of CS plants (%) (Fertility 1.0～5.0)	Ratio of PF plants (%) (Fertility 5.5～8.5)	Ratio of CFplants (%) (Fertility 9.0～10.0)
CL1×W59-1	12	61	31	8
CL1×W59-2	31	51	46	3
CL1×W59-3	32	43	49	8
CL1×W59-4	33	76	24	0
CL1×W59-5	32	49	48	3
CL1×W59-6	11	42	26	32
CL1×W59-7	32	68	32	0
CL1×W59-8	29	70	30	0
CL1×W59-9	9	48	41	11
CL1×W59-10	33	88	12	0
CL1×W59-11	27	51	40	9
CL1×W59-12	20	58	42	0
CL1×W59-13	31	60	38	2
CL1×W59-14	31	49	39	11
CL1×W59-15	33	47	46	6
CL1×W59-16	20	32	41	28
CL1×W59-17	8	88	13	0
CL1×W59-18	23	54	44	2
CL1×W59-19	24	63	38	0
CL1×W59-20	29	66	34	0
CL1×W59-21	5	67	33	0
Ave. of CL1×W59s (min. - max)		59 (32-88)	36 (12-48)	6 (0-32)

CS: completely male sterile; PF: partially male sterile; CF: completely male fertile

Table 2. Male fertility in (CL1xW59-10) x B line.

Male fertility (%)	0	～3	～10	～25	～50	～80	～100	Total
No. of plant	93	12	4	4	2	2	3	120
Ratio of plant (%)	77.5	10.0	3.3	3.3	1.7	1.7	2.5	

考　　察

1）雄性不稔性を支配する遺伝様式の推定

これまでの研究で，イタリアンライグラスの雄性不稔性は，細胞質と核内遺伝子に支配されていることが明らかになっている[9)]。また，この雄性不稔細胞質は，ミトコンドリアDNAをプローブとしたRFLP分析によって特定することができ，藤森ら[4)]によってⅡ型細胞質に分類されている。本報における雄性不稔性細胞質もⅡ型細胞質である。一方，集団として完全雄性不稔である系統を作出するためには，不稔となる核遺伝子型を持つ維持系統を育成することが必要で，その遺伝様式を知る必要がある。

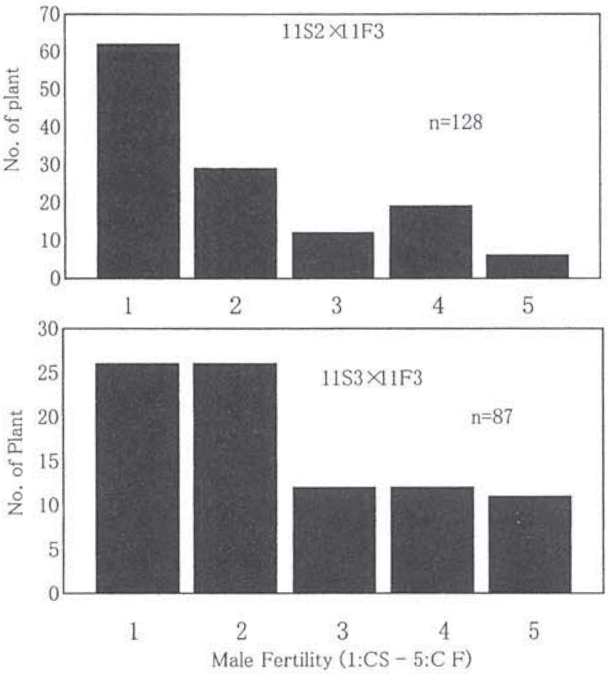

Figure 2. Male Fertility of 11S2x11F3 and 11S3x11F3.
Pollen fertility (%) of each 1-5 are 1:0%; 2:1-25%; 3:26-50%; 4:51-75%; 5:76-100%, respectively.

試験3で得られた，花粉親を共通とする2つのF_1集団の花粉稔性の分離比をもとに，雄性不稔性の遺伝様式を以下のように推定した。

まず，11S3×11F3の分離比により，この雄性不稔性が一遺伝子座支配でないことは明らかである。すなわち，1対の対立遺伝子Rf−rfによる支配で，Rfを稔性回復遺伝子とすると，表現型に1：3の分離がみられるのはRfrf×Rfrf後代集団であり，本実験においては両親の表現型が異なる（CSおよびCF）ことを説明できない。次に，独立した2遺伝子座支配の遺伝様式について検討した。2つの遺伝子座間における相互作用は7種の基本パターンに分けられる[12) 14)]が，それらの内2つの遺伝子座が補足的に作用する遺伝様式を仮定することにより，本実験の分離比を解釈し得た。すなわち，花粉稔性に関係している2つの核遺伝子座の対立遺伝子が，Rf_1-rf_1およびRf_2-rf_2であり，Rf_1およびRf_2が可稔型，rf_1およびrf_2が不稔型である。この場合，表3に示す様に，2つの遺伝子座のうち少なくとも1つが不稔型ホモ（rf_1rf_1 --または-- $rf_2\,rf_2$）であるとき表現型がCS，また，Rf_1- Rf_2-　のように，2つの遺伝子座で可稔型ホモ，またはヘテロのときにPFまたはCFである（表4）。この仮定を下に，11S2×11F3＝1：1，11S3×11F3＝1：3と一致する遺伝子型の組み合わせとしては，11S2は$Rf_1Rf_1\ rf_2rf_2$，$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$および$rf_1rf_1\ rf_2rf_2$の3通り，11S3が$rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$，11F3が$Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$である組み合わせがある（表5）。これらの組み合わせのうち，11S2が$Rf_1Rf_1\ rf_2rf_2$または$rf_1rf_1\ rf_2rf_2$の場合には，11S2×11F3後代の遺伝子型は可稔型と不稔型でそれぞれ1種しか出現しない（表5のaの1）および3））。これは，可稔とした表現型個体間で可稔花粉割合が大きく変動する（図2）ことを説明しにくく，11S2の遺伝子型は可稔後代が2種の遺伝子型となる$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$（表5のaの2））であると考えるのが妥当であろう。CL1×W59-11の後代に以上の遺伝子型が全て出現するのは，CL1の遺伝子型が$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$か

Table 3. Male ferility of the progeny from 11S2×11F3 and 11S3×11F

Combinations	No. of CS plants	No. of fertile plants	Total	χ^2	P(%)
11S2×11F3	62	66	128	0.125 (1:1)	72.4
11S3×11F3	26	61	87	1.107 (1:3)	29.3

χ^2 is the degree for agreeing with the ratio (in the parenthesis) for the number of plants

Table 4. A hypothesis explaining control of male fertility by two loci

Genotype	Phenotype	Genotype	Phenotype
$Rf_1\ Rf_1\ R_2f_2$ −	CF	− − $rf_2\ rf_2$	CS
Rf_1 − $Rf_2\ Rf_2$	CF	$rf_1\ rf_1$ − −	CS
$Rf_1\ rf_1\ Rf_2\ rf_2$	PF		

$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$，W59-11の遺伝子型は$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$の場合である。しかし，CL1の表現型が完全不稔でCL1≠$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$なので，遺伝子型は$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$であると考えられる。以上の推定結果をまとめて表6に示した。

２）検定交配後代系統の稔性別個体頻度によるW59系統各個体の遺伝子型の推定

試験1のCL1×W59交配後代の花粉稔性の分離比から，父本であるW59系統各個体の遺伝子型を推定した（表7）。ここで，$Rf_1Rf_1\ Rf_2Rf_2$，$Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$，$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$の遺伝子型を持つときにCF，$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$のときにPFとなると仮定した。CS，PF，CFの割合（表1）から，W59系統各個体の遺伝子型は$rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$，$rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$，$Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$，$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$，$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$のいずれかに対応すると推定された。それぞれの遺伝子型に対応する稔性の分離比の理論値を表7に示す。表1に示した交配後代の稔性の分離比と表7に示した推定された遺伝子型による後代の分離比の理論値との間には，CL1×W59－3，5，15，18後代においてはχ^2検定により有意差が認められ，理論値が実際と大きく異なっている（表7）。従って，実際の花粉稔性の表現型は，本報で推定した2つの遺伝子座以外の遺伝子によっても影響されると考えられた。

３）A系統各世代の遺伝子型と花粉稔性

これまでの考察により，CL1の遺伝子型は$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$，また，B系統を構成する5つの個体はいずれも$rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$であると推定された（表7）。これにより推定されるA系統各世代の遺伝子型の割合，CS個体割合および

Table 5. Genotypes of 11S2, 11S3 and 11F3 explaining the segregation ratio of male fertility in 11S2x11F3 and 11S3x11F3

a. The progeny from 11S2x11F3

1) 11S2 = $Rf_1Rf_1\ rf_2rf_2$, 11F3 = $Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$

		11F3 gametes	
		$Rf_1\ Rf_2$	$Rf_1\ rf_2$
11S2	gametes $Rf_1\ rf_2$	$Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$ (F)	$Rf_1Rf_1\ rf_2rf_2$ (S)

2) 11S2 = $Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$, 11F3 = $Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$

		11F3 Gametes	
		$Rf_1\ Rf_2$	$Rf_1\ rf_2$
11S2	Gametes $Rf_1\ rf_2$	$Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$ (F)	$Rf_1Rf_1\ rf_2rf_2$ (S)
	$rf_1\ rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$ (F)	$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$ (S)

3) 11S2 = $rf_1rf_1\ rf_2rf_2$, 11F3 = $Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$

		11F3 gametes	
		$Rf_1\ Rf_2$	$Rf_1\ rf_2$
11S2	gametes $rf_1\ rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$ (F)	$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$ (S)

b. The progeny from 11S3x11F3

11S3 = $rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$, 11F3 = $Rf_1Rf_1\ Rf_2rf_2$

		11F3 gametes	
		$Rf_1\ Rf_2$	$Rf_1\ rf_2$
11S3	gametes $rf_1\ Rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$ (F)	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$ (F)
	$rf_1\ rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$ (F)	$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$ (S)

Table 6. Estimated genotype for 11S2, 11S3, 11F3, CL1 and W59－11, based on the hypothsis.

Plant	Genotype
11S2	$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$
11S3	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$
11F3	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$
CL1	$Rf_1rf_1\ rf_2rf_2$
W59－11	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$

Table 7. Estimated genotypes for W59s, theroretical ratio of phenotypes for progenies with CL1 and degree for agreeing with the observation.

	Genotype	Theoretical Ratio(%)			$\chi 2$	P(%)
		CS	PF	CF		
W59-1	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	62.5	25	12.5	0.32	85.3
W59-2	$rf_1\ rf_1\ Rf_2Rf_2$	50	50	0	0.00	95.2
W59-3	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	62.5	25	12.5	10.24	0.6
W59-4	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	0.01	92.0
W59-5	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	62.5	25	12.5	9.91	0.7
W59-6	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$	50	25	25	0.33	84.6
W59-7	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	0.91	34.1
W59-8	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	0.37	54.3
W59-9	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	62.5	25	12.5	1.20	54.8
W59-10	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	2.92	8.8
W59-11	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	62.5	25	12.5	3.31	19.1
W59-12	$rf_1\ rf_1\ Rf_2Rf_2$	50	50	0	0.56	45.6
W59-13	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	3.05	8.0
W59-14	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	62.5	25	12.5	3.40	18.3
W59-15	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	62.5	25	12.5	8.37	1.5
W59-16	$Rf_1r_1\ Rf_2Rf_2$	25	50	25	0.74	69.0
W59-17	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	0.67	41.4
W59-18	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	4.79	2.9
W59-19	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	2.00	15.7
W59-20	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	1.39	23.8
W59-21	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	75	25	0	0.19	66.7

観察されたCSまたは非裂開個体割合を表8に示す。BC_2およびBC_3世代における葯の不裂開個体には，20％以下の可稔花粉粒を持つ個体が含まれると考えられる。BC_2およびBC_3世代における完全不稔個体の割合は，2つの補足遺伝子で説明される割合より低く，この点からも雄性不稔性に関与する他の遺伝子の存在が示唆された。

4）その他の検定交配への遺伝様式の適用

藤森ら[5]は，本報と材料の一部が共通している検定交配により，表9に示す花粉稔性の分離比を得た。表中のWY9は，本報で用いたものと同一の個体である。この結果に，本報により推定された遺伝様式を適用すると，雄性不稔細胞質を持ち，表現型が可稔であるWY7，および雄性不稔細胞質を持ち，表現型が不稔である4-4-24の遺伝子型を表10のように推定することが出来る。個々の交配組み合わせからは，多数の遺伝子型が推定されるが，4-4-24×WY9より，WY9はRf_1rf_1 Rf_2rf_2と推定される。これにより，WY7はRf_1Rf_1 Rf_2rf_2 またはRf_1rf_1 Rf_2Rf_2，4-4-24はrf_1rf_1 rf_2rf_2またはRf_1rf_1 rf_2rf_2であると推定される。このように，一部が共通である他の検定交配において，その結果をもとに本報で推定された遺伝様式を仮定して，交配に用いた材料の遺伝子型や後代の稔性の分離比を矛盾なく推定することが出来た。したがって，藤森ら[5]の検定交配の結果も，本報で推定された雄性不稔性の遺伝様式を支持しているとみられる。

田瀬ら[11]は，雄性不稔細胞質を持つCS個体とCF個体の交雑後代（F_1）がすべて可稔になった3組み合わせについて，CS個体にF_1を授粉して得られたBC_1およびF_1を自殖して得られたF_2集団の花粉稔性を調査し，2つの組み合わせでBC_1が不稔：可稔＝1：3に，F_2で1：15に適合した。これにより，花粉稔性がRf1－rf1およびRf_2－rf_2の2つ重複遺伝子の関係にある対立遺伝子に支配されると推定した。しかし，3つの組み合わせのうち1つの組み合わせでは，BC_1の稔性の分離は1：3に適合しなかった（F_2はデータなし）。田瀬らが提示した仮説は，2重劣性すなわち rf_1rf_1 rf_2rf_2のみがCSとなる重複遺伝のモデルであり，補足関係にある2遺伝子座による支配を仮定している本報のモデルとは，2遺伝子座の間で相互作用が異なる。しかし，2遺伝子の関与を基本としていること，仮説に当てはまらない分離が出現し，さらにこれ以外の遺伝子の関与の可能性がある点が一致している。

以上により，イタリアンライグラス雄性不稔型細胞質（Ⅱ型細胞質）の花粉稔性を支配する核内の稔性回復遺伝子の遺伝子座は，2つもしくはそれ以上存在することが示唆された。また，2遺伝子座支配の本仮説により，本報で扱った検定交配集団の稔性の分離を比較的よく説明することが出来た。しかし，2遺伝子座のみでは説明できない事象も多くあり，他の遺伝子座も存在する可能性が高く，今後より詳細に検討する必要がある。

引用文献

1）Buckner, R. C.（1960）. Cross-compatibility of annual and perennial ryegrasses with tall fescue, Agron. J., 52, 409-410.

2）Connolly, V. and Wright-Turner, R.（1984）. Induction of cytoplasmic male-sterility into ryegrass（*Lolium perenne*）, Theor. Appl. Genet., 68, 449-453.

3）Gaue, I.（1977）. Ms-based hybrid breeding in *Lolium perenne* L. In：Proc. 13th Int. Grassl. Congr., Leipzig, 435-437.

Table 8. Genotypes and CS ratio for each generation of A lines.

Generation	No. of plants	Ratio of genotype			Ratio of CS plant (Theoretical)	Ratio of CS plant (Observed)
		$Rf_1-rf_2rf_2$	rf_1rf_1--	Rf_1-Rf_2-		
CL1	1	100	0	0	100	100
CL1xW59-10	33	25	50	25	75	87.8
F_1	120	9.4	75	15.6	84.4	77.5
BC_1	-	3.9	87.5	8.6	91.4	－
BC_2	162	1.8	93.8	4.5	95.5	86.4※
BC_3	187	0.8	96.9	2.3	97.7	87.7※

※Ratio of CS plant（observation）of BC_2 and BC_3 are the ratio of plants whose anthers were not dehiscent.

Table 9. Single cross combination betweens WY7, WY9 and 4-4-24 and male fertility of progenies.

Combinations	No. of CS plants	No. of fertile plants	Total indivuals	$\chi 2$	P(%)
WY7×WY9	5	15	20	0 (1:3)	100
4-4-24×WY7	8	11	19	0.474 (1:1)	49.1
4-4-24×WY9	7	2	9	0.500 (3:1)	48.0
				0.896 (5:3)	34.4

χ^2 is the degree for agreeing with the ratio (in the parenthesis) for the number of plants（CS：Fertile）.

Table 10. Estimation of genoptypes for WY7, WY9 and 4-4-24

Segrigation ratio of fertility (sterile : fertile)	Genotype	
	WY7	WY9
1:3	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$
	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$
	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$
	$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$
	$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$	$Rf_1rf_1\ rf_2\ rf_2$
	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$
	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$
	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$
	4-4-24	WY7
1:1	$rf_1\ rf_1\ rf_2\ rf_2$	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$
	$rf_1\ rf_1\ rf_2\ rf_2$	$Rf_1rf1\,Rf_2Rf_2$
	$Rf_1rf_1\ rf_2\ rf_2$	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$
	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$
	$Rf_1Rf_1rf_2\ rf_2$	$Rf_1Rf_1Rf_2rf_2$
	$rf_1\ rf_1\ Rf_2Rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2Rf_2$
	$Rf_1Rf_1rf_2\ rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$
	$rf_1\ rf_1\ Rf_2Rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$
	4-4-24	WY9
3:1	$rf_1\ rf_1\ rf_2\ rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$
5:3	$Rf_1rf_1\ rf_2\ rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$
	$rf_1\ rf_1\ Rf_2rf_2$	$Rf_1rf_1\ Rf_2rf_2$

4）藤森雅博・小松敏憲・秋山典昭・片岡博行・奥村健治（1998）．イタリアンライグラスとトールフェスクの雑種における細胞質の影響，日草誌，44（別），128-129.

5）藤森雅博・高溝　正・杉信賢一（1994）．ＲＦＬＰを用いた細胞質雄性不稔イタリアンライグラスの同定，育雑，44（別2），33.

6）藤森雅博・杉信賢一・小松敏憲・高溝　正（1996）．トールフェスクとイタリアンライグラスとの属間雑種のF1利用　Ⅲ，利用４年目までの生産力検定，日草誌，42（別）：110-111.

7）藤森雅博・杉信賢一・高溝　正・塩谷　繁（1994）．トールフェスクとイタリアンライグラスとの属間雑種のF1利用　Ⅰ，利用１年目の生産力検定および品質評価，日草誌，40（別），89-90.

8）Kiang, A. -S., Connolly, V., and Kavanagh, T. A.（1993）. Cytoplasmic male sterity （CMS） in *Lolium perenne* L.：1. Development of a diagnostic probe for the male−sterile cytoplosm, Theor. Appl. Genet., 86, 781-787.

9）小松敏憲（1987）．イタリアンライグラス（*Lolium multiflorum* Lam.）で見いだされた雄性不稔性，日草誌，33（3），289-290.

10）Nitzsche, von W.（1971）. Cytoplasmatische mannliche sterilitat bei Weidelgras（*Lolium* spp.）, Z. Pflanzenzuchtg., 65, 206-220.

11）田瀬和浩・吉沢　晃・大沢　良・伊藤誠治（1998）．イタリアンライグラスの細胞質雄性不稔の遺伝様式，日草誌，44（別），132-133.

12）鵜飼保雄（2002）．量的形質の遺伝解析，医学出版，東京，149-172.

13）Wit, F.（1974）. Cytoplasmic male sterility in ryegrasses （*Lolium* spp.） detected after intergeneric hybridization, Euphytica, 23, 31-38.

14）藪野友三郎・木下俊郎・村松幹夫・三上哲夫・福田一郎・坂本寧男（1987）．植物遺伝学，朝倉書店，東京，23-68.

Genetic Analysis of the Restoration of Male Fertility in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.)

Akira ARAKAWA, Masahiro FUJIMORI, Toshinori KOMATSU,
Kazuhiro UCHIYAMA and Shin-ichi SUGITA

Department of Forage Crop Breeding

Summary

To facilitate a program focused on the development of a cytoplasmic male-sterile (cms) Italian ryegrass, attempts are underway to develop a male-sterility maintainer 'B' line. Testcrosses between a cms individual (CL1) and W59 individuals (normal cytoplasm) were performed to generate a 'B' line which could be used to maintain male-sterility. A male sterile line ('A' line) was obtained following recurrent backcrossing between non-recurrent cms parents and a 'B' line (recurrent parent). Hybrids obtained from this backcrossing resulted in the generation of male-sterile individuals at a frequency of 86.4% and 87.7%, in the BC_2 and BC_3 generation, respectively. Progeny tests utilizing male-sterile x male-fertile sibs, originally derived from the CL1 x W59 hybridization, generated segregation ratios of 1:1 and 1:3 (sterile:fertile). These observations, suggest that two complementary loci may be involved in the expression of male sterility. However, the frequency of male-sterile individuals obtained following the backcrossing of the 'A' line with the 'B' line, suggest that another gene (s) are affecting the outcome of the anticipated, simple two locus model. Additional research is underway to further elucidate the complex inheritance and expression of cms restoration in Italian ryegrass.

Key words: Italian ryegrass, Cytoplasmic male sterile, Restorer gene, Inheritance model

Present Address: 768 Senbonmatsu, Nishinasuno, Tochigi, 329-2793 Japan