

RAPD マーカーによるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園産実生苗の花粉親識別

後藤 晋¹⁾・宮原文彦²⁾・井出雄二³⁾

(¹⁾東京大学・農学生命科学研究科附属北海道演習林, ²⁾福岡県森林林業技術センター, ³⁾東京大学・農学生命科学研究科生圏システム学専攻)

RAPD マーカーを用いて, 16 クローンで構成されるマツノザイセンチュウ抵抗性クロマツ採種園産実生苗の花粉親識別を試みた。320 プライマーの中から, 再現性があり採種園クローン間で多型の計 28 個のフラグメントを有する 21 プライマーを選抜した。各クローンについて, 倍数体の針葉と半数体の雌性配偶体を分析し, フラグメントごとの遺伝子型を決定した。これらの 28 個のフラグメントを利用し, 採種園クローン「田辺-ク 54 号」[=Tanabe-(t)54] を母親とする自然交配実生苗の花粉親を識別した。各実生苗の表現型と各クローンの遺伝子型を比較した結果, 調査した 85 個体中 82 個体の花粉親を決定できた。

花粉汚染率と自殖率は, それぞれ 2.4% と 1.2% であった。採種園における交配は, 均等な状態から著しく偏っており, 半数以上の花粉親がわずか 2 クローンで占められていた。一方, 7 クローンは花粉親として全く交配に寄与していなかった。交配の偏りの主な原因は, クローン間の距離, 花粉飛散量の違い, 開花期のズレ, であると考察された。また, 針葉樹採種園の花粉親識別における RAPD マーカーの可能性と限界について議論した。

Breeding Science 52: 71-77 (2002)

AFLP によるハマダイコンの東アジア野生集団の遺伝的多様性と遺伝的類縁関係の研究

許 萬奎・大西近江

(京都大学・農学研究科)

日本および韓国に自生するハマダイコンの野生集団 13 集団について, 遺伝的多様性と遺伝的類縁関係を AFLP 変異を用いて解析した。各集団 5 個体について調べ, 8 組のプライマーペアを用いて合計 315 のバンドを検出し, 平均で 77.4% のマーカーが多型を示した。日本, 韓国の各集団は集団内に高い変異を保有していた(多型を示す AFLP の割合, Shannn の Information index H_o , 遺伝的多様度 H_{EP} はそれぞれ平均で 66.9%, 3.486, 0.128 であった)。しかし, 変異の大部分 (96.7%) は集団内におけるものであった。この AFLP 解析のデータは集団間の遺伝的類縁関係を推測するには不向きであるが, AFLP のデータに基づいて近隣結合法によって系統樹を作成したところ, 一

部の例外を除き単系的なクラスターを形成し, 地理的分布との間でも, 一致がみられた。AFLP マーカーにおける変異はアロザイム変異よりも大きいことから, 系統類縁関係の分析に有効な手法であると考えられる。カザフスタンにおける栽培および野生ダイコン各 1 集団, および, ロシアの *Raphanus raphanistrum* を加えて分析した結果, カザフスタンのダイコン(栽培, 野生の両方)は東アジアのハマダイコンよりも *R. raphanistrum* に近縁であることから, *R. raphanistrum* のダイコンの成立における関与が推測される。

Breeding Science 52: 79-88 (2002)

楕円フーリエ記述子を用いたカンキツ品種の葉形変異に関するダイアレール分析

岩田洋佳¹⁾・根角博久²⁾・二宮正士³⁾・高野 泰⁴⁾・鵜飼保雄⁴⁾

(¹⁾森林総合研究所, ²⁾果樹研究所, ³⁾中央農業総合研究センター, ⁴⁾東京大学大学院・農学生命科学研究科)

カンキツ 5 品種・系統のダイアレール交配後代を用いて, カンキツ葉形の遺伝解析を行った。葉の輪郭を画像解析により抽出し, 楕円フーリエ記述子を用いて定量化した。これら記述子の主成分分析により, 数学的に独立な形状特徴を抽出した。第 1, 2, 3, 4 主成分は, 全形状変動のうちの, それぞれ 51%, 20%, 10%, 6% を説明し, 長幅比, 重心位置, 曲がりの度合い, 翼

葉の大きさを評価していた。ダイアレール分析の結果, 遺伝様式はこれら形状特徴によって異なることが分かった。広義の遺伝率は, 第 2 ならびに第 4 主成分で特に高く, 第 1 主成分においても高かった。狭義の遺伝率は, 第 2 主成分でのみ高かった。第 3 主成分では, いずれの遺伝効果も統計的に有意でなかった。第 1, 第 2, 第 4 主成分は, それぞれ, 超優性, 不完全優性, 完

全優性の遺伝を示した。以上の結果から、楢岡フーリエ記述子がカンキツ葉形の量的遺伝解析に十分適用できることが示され

た。
Breeding Science 52: 89-94 (2002)

イネ品種‘Dee-geo-woo-gen’に由来する矮性遺伝子の収量とその関連形質に及ぼす作用

村井正之¹⁾・高牟禮逸朗²⁾・佐藤茂俊³⁾・徳留智和¹⁾・佐藤泰永¹⁾

(¹⁾高知大学・農学部, (²⁾北海道大学大学院・農学研究科, (³⁾琉球大学・農学部)

sd1 およびそれと同一座の矮性遺伝子は、東南アジア、米国、日本などにおいて、短稈耐倒伏性水稻品種の育成に用いられている。本研究では、‘Dee-geo-woo-gen’(‘低脚烏尖’)に由来する *sd1* が収量とその関連形質に及ぼす作用を調べた。実験には、‘台中65号’(T65と略称)ならびに‘しおかり’を反復親に用いて育成した *sd1* に関する同質遺伝子系統(T^dならびにS^dと略称)およびそれらの反復親を用いた。T^dとT65は、高知大学農学部において、1995年は1肥料水準、1998年には3肥料水準で栽培された。S^dと‘しおかり’は、北海道大学農学部において、1996年に1肥料水準で栽培された。T65とT^dの収量(精玄米重/m²)は、肥料水準の増加に伴って増加した。すべての栽培条件において、T^dの収量はT65より低かった。また、S^dの収量は、‘しおかり’より低かった。T^dならびにS^dの1穂穎花数は、いずれの栽培条件においても、T65ならびに‘しおかり’より有意に少

なかった。穂数/m²においては、1995年を除いて、T^dの方がT65より多かったものの両者間に有意差はなかった。S^dの穂数/m²は、‘しおかり’より多かった。T^dの登熟歩合は、T65より高かった。T^dの千粒重は、T65より小さかった。しかし、T^dの籾長と籾幅は、T65とほぼ同じであった。他方、S^dの登熟歩合と千粒重は、‘しおかり’とほぼ同じであった。穎花数/m²とシンクサイズ(1粒重×穎花数/m²)においては、T^dならびにS^dは、T65ならびに‘しおかり’より小であった。穂揃期のLAIと葉重/m²においては、T^dとT65の間に有意差はなかった。以上を総括すると、*sd1* は、1穂穎花数を減少させることによりシンクサイズを減少し、その結果、T65ならびに‘しおかり’の遺伝的背景において5~13%ならびに6%収量を低下せしめた。

Breeding Science 52: 95-100 (2002)

同一酒米品種における心白粒と無心白粒の中央部のタンパク質組成の差異

山田仁美¹⁾・秋山征夫¹⁾・高原美規¹⁾・大島正弘²⁾・山元皓二¹⁾

(¹⁾長岡技術科学大学・工学部生物系, (²⁾中央農業総合研究センター・北陸研究センター)

米粒の心白部位に特異的に存在するタンパク質を調査するため、同一酒米品種の心白を持つ粒(心白粒)の心白部位と心白を持たない粒(無心白粒)の中心部のタンパク質を、2次元電気泳動システム(1次元目等電点電気泳動, 2次元目SDS-PAGE)を用いて分析した。実験には栽培年度の異なる山田錦と五百万石を使用した。1995年の山田錦を用いて分析したとき、心白部分の貯蔵タンパク質(グルテリン, プロラミン)は無心白粒中心部と同様に含まれていることが示された。また、分子量60 kDa付近, 等電点4.5付近に心白部位特異的なタンパク質のスポッ

トを確認した。1998年, 2000年の山田錦と五百万石を使用して同様の実験を行なったところ、1995年の山田錦と同様に心白部位特異的なタンパク質を分子量60 kDa付近, 等電点4.5付近に存在することを確認した。山田錦においては3カ年, 五百万石においては2カ年を通じて心白部位特異的に存在するタンパク質スポットを検出することができた。栽培年度が違っても心白粒心白部位にのみ存在することから、このタンパク質が心白の形成に関与していると考えられる。

Breeding Science 52: 101-105 (2002)

ヘテロシス育種における異なる生態類型の稲品種の利用

Tingbo Jiang^{1,2)}・Renhua Li^{1,3)}・Chuanqing Sun¹⁾・Xiangkun Wang¹⁾

(¹⁾中国農業大学・植物遺伝育種研究科, (²⁾現: 電力中央研究所・我孫子研究所・生物科学部, (³⁾現: Statistical Genetics Group, The Jackson Laboratory, USA)

栽培イネの日本型とインド型にはいろいろな生態類型の品種があり、ハイブリッド・ライス育種の遺伝資源として有望と考えられる。本研究ではRFLPマーカーと形質指数法を併用する

ことによって、4日長(温度)感応性雄性不稔系統と9生態類型の49品種を、明確に日本型とインド型に分類した。その結果を用いて、4日長(温度)感応性雄性不稔系統を母本とし、49品

種を花粉親とするF₁雑種の収量を解析すると、生態類型グループ別の平均収量は、グループ間で有意に異なった。特に対照品種の収量を超える組合せ数、standard heterosisの程度、heterobeltiosisの差異が大きく、日印交雑で対照品種を超える組合せが多くheterobeltiosisに高い値が認められた。LS2Sを除いて母本にはそれぞれ最適の生態類型の花粉親があり、Peiai64は中国北東と中国華北の日本型品種、および日本型稔性回復系統と、

N422Sは中国および韓国のインド型品種と、108Sは米国の最近の品種、中国北東の日本型品種、中国のインド型品種との組合せが優れていた。LS2Sの組合せ能力は弱かった。以上の結果は二系法ハイブリッド・ライス育種に多くの生態類型のイネ品種が利用できることを示唆している。

Breeding Science 52: 107-113 (2002)

SSR分析によるアジアのナシの同定

木村鉄也¹⁾・史永忠²⁾・正田守幸²⁾・壽和夫²⁾・松田長生²⁾・林建樹²⁾・伴義之¹⁾・山本俊哉²⁾

(¹⁾種苗管理センター、²⁾果樹研究所)

ナシ由来の9種類のSSRマーカーを用いて、アジア地域で栽培または自生しているナシ属6種からの60品種・系統を遺伝的に解析した。9種類のSSR座の合計133種類の推定対立遺伝子を用いて分析した結果、実験に供試した品種・系統のうち58が明確に識別可能であった。識別できなかったものは、異名同種及びクローンであった。すべてのSSRマーカーは二倍体では1または2本の増幅バンドを生じ、また三倍体品種ではいくつかのSSRマーカーで3本のバンドが得られた。1つのSSR座当たりの推定対立遺伝子数は7~20で、平均で14.8であった。対立遺伝子の出現頻度には大きな差異が観察され、全体の40%程度を占める対立遺伝子が存在する一方、31種類の対立遺伝

子は1%以下の頻度であった。ヘテロ接合度の観察値(observed heterozygosity)及びPD値(power of discrimination)は、0.39~0.86及び0.84~0.95であり、平均値はそれぞれ0.63、0.91であった。SSR遺伝子型から得られたフェノグラムでは、ニホンナシ、チュウゴクナシ及びセイヨウナシの3つのグループに大別された。チュウゴクナシ3種(*Pyrus bretschneideri*, *P. ussuriensis*, *P. sinkiangensis*)は明確にグループ分けができず、遺伝的に混じり合っている可能性が示唆された。本実験から、SSRマーカーは多型頻度が高く、アジアのナシの識別や同定の手段として有効であった。

Breeding Science 52: 115-121 (2002)

イネ種間交雑(*Oryza sativa*×*O. minuta*と*O. sativa*×*O. officinalis*)での異常な胚発育と効率な胚救出

Pannanee Rodrangboon¹⁾・Pradit Pongtongkam²⁾・Saowanee Suputtitad²⁾・足立泰二³⁾

(¹⁾宮崎大学・農学部、²⁾タイ国・カセサート大学・理学部、³⁾大阪府立大学大学院・農学生命科学研究科)

栽培イネ(*Oryza sativa*, 2n=24, AA)と2種の野生種(*O. minuta*, 2n=48, BBCCと*O. officinalis*, 2n=24, CC)との受粉で種間雑種が得られた。これらの種間雑種胚の崩壊の様相を詳細に観察した。全ての雑種で胚乳崩壊を伴う異常な胚発育か、胚自体の発育遅延のいずれかを呈した。異常発育した胚は受粉後7日頃から観察され、その異常性は7日から14日になるに従い増加した。7日から14日目の胚を摘出し、1, 3, 5 mg/lベンジルアミノプリン、1 g/lカゼイン加水化物、0.8%寒天、およ

び3%スクロースを加えたMS培地で培養した。胚救出の最適時期は受粉後11~14日と判明した。これらの交雑組み合わせでの摘出した胚の分化効率には救出時期で有意差があったが、培地の違いではなかった。雑種第1代植物は形態的に両親の中間を示し、完全な不稔性だった。分蘖枝にコルヒチン処理をすることによって染色体倍加を試みた結果、処理個体は母本に近い形態をし、稔性も示した。

Breeding Science 52: 123-129 (2002)

イネ胚乳中のアミロース含量を低下させる人為突然変異遺伝子*Wx-mq*の分子生物学的解析

佐藤宏之・鈴木保宏・坂井真¹⁾・井辺時雄

(作物研究所、¹⁾現：青森県農業試験場・藤坂支場)

「コシヒカリ」の突然変異原処理により育成された品種「ミルキークイーン」の低アミロース性は、モチ(*wx*)座の対立遺伝子

*Wx-mq*に支配されることが知られている。本研究では、分子生物学的見地から*Wx-mq*遺伝子を解析することを目的に、まず

「ミルキークイーン」と野生型である「コシヒカリ」から、*Wx-mq* 遺伝子及び、その対立遺伝子である *Wx-b* 遺伝子の cDNA をそれぞれクローニングし、両者間で塩基配列を比較した。その結果、*Wx-mq* 遺伝子のコーディング領域内には、2カ所で塩基置換変異が生じており (497G→A; 595T→C)、それぞれアルギニン及びチロシンがヒスチジンに置換していることが分かった (エクソン4; Arg-158→His-158 及び、エクソン5; Tyr-191→His-191)。しかしながら本研究では、これら2つのミスセンス突然変異のうち、どちらの変異が低アミロース性に関与するかは確認できなかった。次に *Wx-mq* 遺伝子の塩基配列情報を基に、この遺伝子の簡易検定法の開発を試みた。2カ所の塩基置換変異のうち、ヌクレオチド497A 変異に3'末端が対応する W1 プライマーを設計し、さらに、W1 プライマーに対応するリバースプライマーと共に PCR 反応を行った。また PCR 反応

のコントロールとして *Wx-mq* 遺伝子と *Wx-b* 遺伝子に共通な塩基配列部位に W3 及び W4 プライマーを設計し、併せて実験に供試した。その結果4つのプライマーを用いた PCR 反応において、「ミルキークイーン」並びに、「ミルキークイーン」の系譜に属する品種・系統である「ミルキープリンセス」、「上育436号」及び「越南190号」では741 bp 及び469 bp の2本のバンドが増幅した。一方、*Wx-b* 遺伝子を保有する「コシヒカリ」や、「ミルキークイーン」とは系譜が異なる低アミロース性品種・系統である「スノーパール」及び「NM391」では469 bp のバンドのみしか増幅しないことが確認できた。以上の結果より、これらのプライマーを用いて PCR 反応を行うことにより、DNA レベルで *Wx-mq* 遺伝子を保有する品種・系統の判別が可能になった。

Breeding Science 52: 131-135 (2002)

Q染色体が *Nicotiana tabacum* と *N. suaveolens* の種間雑種における致死性を制御している

丸橋 亘・小野里桂
(茨城大学・農学部)

Nicotiana tabacum (2n=48; SSTT ゲノム) と *N. suaveolens* (2n=32) の種間雑種は致死性を発現する。本研究の目的はこの交雑組合せにおいて雑種致死性をもたらす遺伝子が座乗する *N. tabacum* の染色体を特定することである。10種類のモノソミック系統 (2n=47; Haplo-M から Z まで、ただし P と V は除く) と *N. suaveolens* を交雑し、試験管内受粉と胚珠培養により雑種を作出した。178胎座 (13から62胎座/交雑) に受粉して、5215個の受精胚珠 (136から840胚珠/交雑) を得て、総数85個体の実生を作出した。これら85個体の実生の内、81個体は双葉の時

期および本葉が展開して間もなく枯死したが、Haplo-Q系統 (Q染色体を欠失している) との交雑に由来する4個体の実生が致死せずに成長した。4個体のうち3個体が成熟し花をつけ、1個体は糸状菌の感染により枯死した。染色体数の調査、RAPD分析およびLSC分析の結果から3個体は真の雑種であることが確認された。これらの結果はSゲノムに属するQ染色体上に、*N. tabacum* と *N. suaveolens* の交雑で雑種実生を致死させる遺伝子が座乗していることを示唆している。

Breeding Science 52: 137-142 (2002)

ジベレリン合成酵素である20酸化酵素遺伝子 (*GA20ox2*) の機能欠失が「緑の革命」イネをもたらした

芦荊基行¹⁾・佐々木章江¹⁾・上口(田中)美弥子¹⁾・伊藤博紀¹⁾・西村明日香²⁾・Datta Swapan³⁾、石山賀奈子⁴⁾・斉藤臣雄⁵⁾・小林正智⁴⁾・北野英己⁶⁾・Gurdev S. Khush³⁾・松岡 信¹⁾

¹⁾名古屋大学・生物分子応答研究センター、²⁾(株)本田技術研究所・和光基礎技術研究センター、³⁾国際イネ研究所、⁴⁾理化学研究所・筑波研究所・バイオリソースセンター、⁵⁾理化学研究所・筑波研究所、⁶⁾名古屋大学・生命農学研究科)

1960年代、フィリピンの国際イネ研究所 (IRRI) は半矮性品種「IR8」を育成した。ミラクルライスと呼ばれた「IR8」は、単位面積当たりの収量を画期的に向上させ、またその普及によってアジアでの食糧危機を救い「緑の革命」をもたらした。このミラクルライスに最も寄与した遺伝子が半矮性遺伝子 *sd1* である。本研究では *sd1* 遺伝子を単離しその生理学的、分子遺伝学的、生化学的な解析を行ったので報告する。はじめに *sd1* 変異体と植物ホルモンの1つジベレリン (GA) の関係を明らかにするため、GA に対する伸長反応性と内生 GA 含量を調べた。その結果、*sd1* 変異体は外生 GA₃ の投与で野生型の草丈に復帰したこと、

sd1 変異体は野生型に比べ内生 GA₅₃ 量は等しいが GA₂₀ 量が低下していたことから、*sd1* 変異体は GA₅₃ から GA₂₀ への反応を触媒する20酸化酵素遺伝子に変異があると推測した。これまで、イネの20酸化酵素遺伝子は1例報告されていたが (*GA20ox1*)、その遺伝子の染色体座乗位置は *sd1* 座と異なることが確認された。そこで、新規な20酸化酵素遺伝子 (*GA20ox2*) を単離し、その座乗位置を決定したところ第1染色体上の *sd1* 座乗位置にほぼ一致することが明らかとなった。これまで *sd1* 変異体であることが確認されていた5種類の系統について *GA20ox2* 遺伝子の塩基配列を決定したところ、すべてのアリル

について本遺伝子内に塩基の欠失あるいは1塩基置換による1アミノ酸置換が存在する事が確認された。また、*sd1*変異体に野生型由来のGA20ox2遺伝子を導入した形質転換体は草丈が野生型に回復した。さらに、大腸菌で発現させたGA20ox2タンパク質は、GA₅₃からGA₂₀への反応を触媒した。これらの結果から、*SD1*遺伝子はGA20酸化酵素をコードしていると結論した。

また、イネ20酸化酵素遺伝子発現の器官特異性を調べたところ、GA20ox1遺伝子は開花前の花に、GA20ox2遺伝子は葉、莖、開花前の花で発現していた。さらに、GA20ox2遺伝子はGA20ox1遺伝子同様GA₃によって発現抑制を受けることが明らかとなった。

Breeding Science 52: 143-150 (2002)

珪藻土とスピンフィルターを用いた迅速で広範な植物種に適応可能なDNA抽出法

田中淳一¹⁾・池田 滋²⁾

(¹⁾野菜茶業研究所・枕崎茶業研究拠点, ²⁾香川大学・遺伝子実験施設)

分子生物学的実験において高品質なDNAの抽出は避けて通れない。一方、育種現場におけるDNAマーカーを用いた選抜の実用化のためには、簡便迅速で安全かつ安価なDNA抽出法が不可欠である。本報は珪藻土とスピンフィルターを用いた汎用性の高い植物DNA抽出法の詳述である。本方法により得られたチャのDNAはLong-PCR、制限分解、その後のアダプターの連結、それを鋳型にしたPCRに使用でき、かつ長時間の保存にも耐え得る品質であった。また、チャヤツバキ等、DNA抽出が困難な植物種を含む48の植物種の葉を対象に、本方法による抽出実験を行った結果、44の植物種より分解の少ないDNAサンプルが得られ、得られたすべてのDNAサンプルは

RAPDの検出に問題なく使用することができた。本方法には以下の利点がある。(1)得られるDNAが種々の実験や長期保存に耐え得る品質であること。(2)遠心によるペレットを溶解する工程がないため迅速であること。(3)一般的なPlasmid抽出KITに近い費用で抽出可能であること。(4)クロロフォルムやフェノール等の危険な有機溶媒を使用しないこと。これらの特性により、本方法はDNA抽出が困難な植物種における分子生物学実験を容易にするにとどまらず、多くの作物においてDNAマーカー選抜を実用化する上で有効である。

Breeding Science 52: 151-155 (2002)

タマネギBACクローンの効率的な保存およびスクリーニングシステム

鈴木 剛・都 琴淑・向井康比己

(大阪教育大学)

タマネギのゲノムサイズは約15,000 Mbと大きく、シロイヌナズナの100倍もあるために分子レベルの詳細なゲノム解析が困難である。近年ではバクテリア人工染色体(BAC)ベクターが植物ゲノムの解析に広く利用されているが、タマネギ全ゲノムをカバーするBACライブラリーを構築し利用するには、従来の一般的な方法ではクローンの保存およびスクリーニングに莫大な労力を必要とした。この問題を解消するために、BACクローンの効率的な保存およびスクリーニングシステムを開発した。タマネギ(*Allium cepa*)韓国品種、天主大高を用いて、平均挿入長100 kbのBACライブラリーを作製し、0.32ゲノム分にあたる48,000クローンから10クローンずつ集めて培養したものを100クローン分まとめてプールとして保存し、同時にスクリーニング用のDNAを単離した。この方法により、保存する容量は100分の1になり、48,000クローンを5枚の96穴

プレートに保存することができた。この保存方法では、10クローン集めて培養する際に菌の生育に偏りが生じることが危惧されるため、培養後の各クローンの存在頻度を調べた。その結果、最高10倍程度の偏りが見られたものの、消失するクローンはなく、スクリーニングに利用できると考えられた。次に、このライブラリーが遺伝子単離に利用できるかどうかを確かめるために、多重遺伝子族を形成している*alliinase*遺伝子のスクリーニングを試みた。480のプールに相当するDNAを3次元に集め、PCR法によりスクリーニングしたところ、2つの陽性プールを見出し、それぞれの陽性プールから陽性クローンを得ることができ、この保存方法とスクリーニングシステムが十分機能することが証明された。本バルク法は小さな研究室でBACライブラリーを利用する場合に有効であると考えられる。

Breeding Science 52: 157-159 (2002)