

原著論文

陸地綿の DNA フィンガープリントに最適な農業形質に連鎖した SSR マーカーのコアセット

Chengqi Li • Bihua Chen • Xinjuan Xu • Dandan Li • Jinyuan Dong

(Collaborative Innovation Center of Modern Biological Breeding, Henan Province/Cotton Research Institute, Henan Institute of Science and Technology, China)

遺伝資源の遺伝的差異を科学的かつ正確に分析することは、代表的な系統群の選定をはじめ、新品種の識別や種子の純度検定に欠かせない。しかしながら、表現型だけでは遺伝的に異なる系統を識別するには十分ではない。本研究では、我々が開発した陸地綿 (*Gossypium hirsutum* L.) の SSR マーカーや既報のマーカーで農業形質に連鎖した 83 種類のなかから、26 本の染色体に相当する 26 種類のマーカーを DNA フィンガープリント用のコアセットとして選定した。これら 26 種類のマーカーは明瞭で再現性のあるバンドパターンを示し、高い多型率を示した。対立遺伝子頻度、遺伝的多様度、多型情報量の平均値はそ

れぞれ 3.12, 0.4312 および 0.3830 であった。各コアプライマーの DNA フィンガープリントと DNA バーコードは陸地綿の標準系統である TM-1 から取得した。26 コアプライマーから得られた遺伝距離行列と先行研究に由来する 335 種類のプライマーから得られた遺伝距離行列との間に有意な正の相関が認められたことから、コアプライマーは陸地綿の DNA フィンガープリントに最適であると考えられる。本研究はワタ品種の品種鑑定をはじめ、品種の信憑性や種子の純度を評価するための分子基盤を提供する。

Breeding Science 68: 393–403 (2018)

トウガラシ (*Capsicum annum* L.) の細胞質雄性不稔系統の育成と複数環境下における評価

Om Prakash Meena<sup>1)</sup> • Major Singh Dhaliwal<sup>2)</sup> • Salesh Kumar Jindal<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>Department of Vegetable Science, Punjab Agricultural University, India, <sup>2)</sup>Directorate of Research, Punjab Agricultural University, India)

温度条件に安定なトウガラシの CMS 系統を育成するために、‘CCA4261’を CMS ドナーに用いて 2009 年に育種を開始した。11 の検定交雑の後代をスクリーニングし、‘SL461’, ‘SL462’, ‘SD463’に由来する雄性不稔維持系統を見いだした。維持系統を 6 回戻し交雑し、遺伝背景の異なる CMS 17 系統を育成した。2014–2015 年と 2015–2016 年に、低温条件の E<sub>1</sub> と E<sub>3</sub> および高温条件の E<sub>2</sub> と E<sub>4</sub> の 4 種類の環境条件下で CMS 系統を評価した。花粉不稔性 (%), 花粉放出スコア, 着果率 (%) および果実あたりの種子数に関する遺伝子型と環境条件の平均平方値は 1% 水準で有意差を示した。GE 交互作用は、花粉不稔性

(%), 着果率および果実あたりの種子数で検出されたが、花粉放出スコアでは認められなかった。‘CMS4611A’, ‘CMS4614A’, ‘CMS4622A’, ‘CMS4624A’, ‘CMS4626A’, ‘CMS46213’, ‘CMS463D2A’, ‘CMS46313A’, ‘CMS463D14A’, ‘CMS463L5’の 10 系統はどの環境条件下でも完全な雄性不稔を示した。放任受粉条件下では、これらの系統における着果と種子形成は正常であった。多様な遺伝背景への CMS の導入は、トウガラシにおける CMS 遺伝資源の拡大につながる。

Breeding Science 68: 404–412 (2018)

## 日本の主要水稻品種のもみ枯細菌病菌によるもみ枯抵抗性の評価および基準品種の選定

溝淵律子<sup>1)</sup>・福岡修一<sup>1)</sup>・對木千加子<sup>1)</sup>・對馬誠也<sup>2)</sup>・佐藤宏之<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>農研機構, (<sup>2)</sup>東京農大)

イネもみ枯細菌病は、日本におけるイネの重要病害の一つであるが、抵抗性育種が進んでいない。我々は、「切り穂検定法」を用いて、世界のコアコレクション品種 (World Rice Collection; WRC) にもみ枯抵抗性の品種間差があることをすでに報告している。本研究において、我が国の主要な栽培品種のもみ枯抵抗性を比較したところ、ほとんどの栽培品種が「やや弱」と判定され、「強」または「やや強」と評価された品種はなかった。今回の接種結果を基に熟期別のもみ枯抵抗性基準

品種を選定した。また、我が国の栽培品種には抵抗性の遺伝資源が見当たらないため、今後の抵抗性育種には、抵抗性 QTL を有するインディカや熱帯ジャポニカから遺伝子の導入が必要であることが示された。我々が作出したインディカ品種「kele」の抵抗性 QTL (*RBG2*) を導入したひとめぼれ同質遺伝子系統 *RBG2-NIL* のもみ枯抵抗性は“やや強”レベルであり、十分な抵抗性を持っていることが明らかになった。

**Breeding Science** 68: 413–419 (2018)

## 遺伝子発現プロファイルデータベース「RiceXPro」の網羅的スクリーニングにより同定された薬特異的プロモーターを用いた雄性不稔トランスジェニックイネの開発

赤坂舞子<sup>1,2)</sup>・谷口洋二郎<sup>3)</sup>・大嶋雅夫<sup>3,4)</sup>・阿部清美<sup>3,5)</sup>・田部井豊<sup>3)</sup>・田中淳一<sup>1,6)</sup>

(<sup>1)</sup>農研機構・次世代作物開発研究センター, (<sup>2)</sup>現:農研機構・東北農業研究センター, (<sup>3)</sup>農研機構・生物機能利用研究部門, (<sup>4)</sup>現:筑波大学・つくば機能植物イノベーション研究センター, (<sup>5)</sup>現:(株)日本バイオセラピー研究所, (<sup>6)</sup>筑波大学・生命環境科学研究科)

ゲノミックセレクションは他殖性作物の集団育種のためにデザインされているため、イネ (*Oryza sativa* L.) のような自殖性作物においてゲノミックセレクションを効率的に実施するには、連続的な他殖システムが必要になる。優性のトランスジェニック雄性不稔は、自殖性作物の効率的な他殖に適したツールである。これまでに、トランスジェニック技術を用いた優性の雄性不稔イネの開発の報告はあるが、開花特性に課題があった。本研究では、致死遺伝子に連結することで、優れた開花特性を示す優性の雄性不稔を誘導する発現プロモーターを単離するために、「RiceXPro」データベースを用いて薬特異的に発現する 38 の候補遺伝子を抽出した。我々は、これらの遺伝子の上

流領域の雄性不稔誘導能を評価するために、致死性遺伝子バルナーゼと連結して雄性不稔を誘導し、イネ品種「日本晴」に導入した。38 のプロモーターのうち 7 つのプロモーターは、明瞭な優性の雄性不稔を誘導した。また、薬の発達の後期段階で発現するプロモーターは、初期段階で発現するものと比較して、より優れた開花特性を示す雄性不稔を誘導した。本研究で単離された 7 つのプロモーターは、イネの効率的な他殖ベースの育種システムの開発を促進するために利用することができるであろう。

**Breeding Science** 68: 420–431 (2018)

## *superwoman1-cleistogamy1* 変異によるイネの閉花受粉性は鱗被形成期における低温に感受性である

大森伸之介<sup>1,5)</sup>・小池説夫<sup>2)</sup>・林 高見<sup>2,3)</sup>・山口知哉<sup>2,6)</sup>・黒木 慎<sup>3,4)</sup>・吉田 均<sup>4,7)</sup>

(<sup>1)</sup>農研機構・中央農業総合研究センター北陸研究センター, (<sup>2)</sup>農研機構・東北農業研究センター, (<sup>3)</sup>農研機構・北海道農業研究センター, (<sup>4)</sup>農研機構・作物研究所 (現:次世代作物開発研究センター), (<sup>5)</sup>現:農研機構・本部, (<sup>6)</sup>現:農林水産省技術会議事務局, (<sup>7)</sup>現:農研機構・生物機能利用研究部門)

我々はこれまでに、イネの *superwoman1-cleistogamy1* (*spw1-clsl1*) 変異による閉花受粉性が、遺伝子組換えイネ品種と一般的な品種との間において花粉飛散を介した遺伝子拡散や系統

の純度低下をもたらす自然交雑を抑制できることを報告した。*spw1-clsl1* の閉花受粉性は、変異型 SPW1 タンパク質とそのパートナータンパク質との相互作用能の低下によってもたらされ

る。重要な点として、低温条件下ではこの相互作用能が回復するが、このことが閉花受粉性に与える影響は明らかにされていない。そこで本研究では、*spw1-clsl* を日本国内の様々な地域で栽培し、低温下で開花することを確認した。さらに、様々な温度環境で形成された鱗被の形態を比較した。これらの結果は、*spw1-clsl* 変異の閉花受粉性が温度感受性であり、温度が低くなるに従って表現型が弱まることを示している。このことは、以前に報告した変異型 SPW1 のタンパク質間相互作用能の

パターンと相関していた。また、*spw1-clsl* の表現型が低温の影響を受けやすい期間を明らかにし、一日の気温変化パターンが閉花受粉性に与える影響を調査した。これらの結果は、様々な温度環境に対する *spw1-clsl* の表現型のシミュレーションや、自然交雑を抑制するために同変異を安定的に使用できる地域の子測を促進するものである。

**Breeding Science** 68: 432–441 (2018)

## ダイズにおける染色体断片置換系統を用いた百粒重 QTL の同定と検証

Dequan Liu<sup>1,2)</sup>・Yongliang Yan<sup>1,3)</sup>・藤田泰成<sup>1,2)</sup>・許 東河<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 国際農林水産業研究センター, (<sup>2)</sup> 筑波大学・生命環境科学研究科, (<sup>3)</sup> Institute of Crop Germplasm Resources, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, China)

百粒重 (100SW) は、ダイズの収量を制御する最も重要な形質の一つである。百粒重の量的形質遺伝子座 (QTL) を同定するため、120 の BC<sub>3</sub>F<sub>5</sub> 染色体断片置換系統 (CSSL) を 3 年続けて栽培し、百粒重を調査した。用いた CSSL 分離集団は、栽培ダイズ品種「Jackson」と野生ダイズ系統「JWS156-1」間の交配を行い、「Jackson」を反復親として連続的に戻し交配で育成した。QTL 解析の結果、計 9 つの QTL (*qSW8.1*, *qSW9.1*, *qSW12.1*, *qSW13.1*, *qSW14.1*, *qSW16.1*, *qSW17.1*, *qSW17.2*, および *qSW20.1*) が 8 つの染色体に検出された。そのうち、*qSW12.1* (LOD=6.78–12.31) が第 12 染色体に 3 年連続で検

出され、効果が大きい安定した新規 QTL であった。*qSW12.1* の効果を検証するために、BC<sub>3</sub>F<sub>5</sub> 集団から *qSW12.1* 領域でヘテロを示したヘテロ残余系統 (RHL), RHL564 を選抜した。RHL564 の自殖より得た 2 種類のホモ遺伝子型の後代個体において、「Jackson」遺伝子型の個体は「JWS156-1」遺伝子型の個体よりも高い百粒重を示した。*qSW12.1* は第 12 染色体の BARCSOYSSR\_12\_1282 と BARCSOYSSR\_12\_1347 マーカーの間の約 1,348 kb の領域に決定した。

**Breeding Science** 68: 442–448 (2018)

## 日本の優良イネ品種における割れ粉と粒形に関する QTL のコロカリゼーション

藤野賢治<sup>1)</sup>・平山祐治<sup>2)</sup>・小原真理<sup>1)</sup>・池ヶ谷智仁<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 農研機構・北海道農業研究センター, (<sup>2)</sup> (地独) 道総研・上川農業試験場)

穀物の生産および貯蔵において、穀粒を食害する害虫の管理は重要である。粉がさけるイネの割れ粉は、水田でも貯蔵中でも害虫の標的になりやすい。割れ粉率の低い品種の開発は、害虫被害およびイネの農業による環境リスクを回避するための最も経済的かつ効果的な手段になる。本研究では、同一系譜上の遺伝的に近縁な北海道のイネ優良品種間の組み換え自殖系統を用いて、割れ粉および粒形に関する QTL が同一の染色体領域に存在することを明らかにした。これらの QTL は日本晴参照

ゲノムの第 5 染色体上の、1,101,675 bp 離れた異なる分子マーカーの近傍に検出された。加えて、割れ粉と粒形との間には、低い相関が認められた。これらの結果から、割れ粉率は粒形と独立であることが示唆された。これらの QTL を用いることで、粒形を変化させずに、割れ粉の少ない品種を開発することができる。

**Breeding Science** 68: 449–454 (2018)

## ホウレンソウにおけるゲノムワイドなマイクロサテライトの解析と中国遺伝資源における遺伝的多様性の評価

Shu-Fen Li • Bing-Xiao Wang • Yu-Jiao Guo • Chuan-Liang Deng • Wu-Jun Gao

(College of Life Sciences, Henan Normal University, China)

ホウレンソウは緑色の栄養野菜であるが、性染色体の進化研究のためのモデルとしても利用される。遺伝子マーカーの開発やゲノム構造解析は、ホウレンソウの育種や理論的な進化研究において重要である。本研究では、最近公開されたホウレンソウのドラフトゲノムにおける反復数の異なるマイクロサテライトの頻度および分布を解析した。261,1002のマイクロサテライトが同定された（頻度：262.1座/Mbp）。4塩基と3塩基の繰り返し配列が最も多く、検出された全マイクロサテライト数の33.2%と27.7%を占めた。105のプライマーセットをデザインし、スクリーニングした結果、34がホウレンソウ品種におい

て多型を示した。既報の7つのプライマーセットと併せた41のプライマーセットを用いて、中国の43品種の遺伝的多様性を解析した。41マーカーの多型情報含有値の平均は0.43と中間レベルを示した。ホウレンソウ品種の遺伝的多様性は低く、UPGMA系統樹の各グループで共有される共通の因子は検出されなかった。本研究における知見は、ホウレンソウゲノムにおけるマイクロサテライトの構造の更なる解析を促進し、中国におけるホウレンソウ育種へ応用するための糸口を提供する。

**Breeding Science** 68: 455–464 (2018)

## DNA型トランスポゾンに基づく分子マーカーによるトウモロコシ連鎖地図の構築と農業関連形質QTLの同定

Rahul Vasudeo Ramekar<sup>1)</sup> • Kyu Jin Sa<sup>1)</sup> • Kyong-Cheul Park<sup>2)</sup> • Neha Roy<sup>3)</sup> • Nam-Soo Kim<sup>3)</sup> • Ju Kyong Lee<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>Department of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Korea, (<sup>2)</sup>Department of Agriculture and Life Industry, Kangwon National University, Korea, (<sup>3)</sup>Department of Molecular Bioscience, Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Korea)

転移因子 (TE) は真核生物ゲノムのかなりの割合を占め、全体的なゲノム構造に影響を及ぼすが、分子マーカー開発としての豊富な変異源である。我々は重要な農業形質に連鎖した量的形質遺伝子座 (QTLs) を連鎖地図に位置づけることを目的に、ミューターターによるトランスポゾンディスプレイ (*Mu*-TD), SSR および 1塩基多型による CACTA-由来の SCAR などの利用を検討した。デントコーンとワキシコーンとの交配に由来する組換え自殖系統を解析した。これらを用いて構築した連鎖地図は 258 種類の *Mu* アンカー断片, 34 種類の SCARs および 614 種類の SSR からなり, 10 本のトウモロコシ染色体上に広く分布していた。連鎖解析では, トウモロコシの育種で重要と

される穀粒のデンプン合成遺伝子 (*sh2, su1, wx1*) に見られる 3 種類の SNP と連鎖した *Mu*-TD 座もしくは SSR マーカーが見つかった。さらに, 我々は子実収量と子実品質に関連性のある染色体領域を決定するため QTL 解析を行った。その結果, トウモロコシの 10 染色体中 9 つの染色体上に, 9 種類の形質に関連する 24 種類の QTL を見出した。そのうち 13 種類の QTL は *Mu*, 2 種類の QTL は SCAR と関連性があった。このように本研究では DNA 型トランスポゾンベースの分子マーカーによる連鎖地図の構築や農業形質に連鎖した QTL の同定への利用可能性を実証している。

**Breeding Science** 68: 465–473 (2018)

## *Oryza sativa* L. と *Leersia perrieri* (A. Camus) Launert の属間雑種の獲得

Ma. LaRue E. Ballesfin • Ricky B. Vinarao • Janice Sapin • Sung-Ryul Kim • Kshirod K. Jena

(Novel Gene Resources Laboratory, Strategic Innovation Platform, International Rice Research Institute, Philippines)

本研究で, *Oryza sativa* L. (IRRI 154) と *Leersia perrieri* (A. Camus) Launert の属間雑種を胚培養によって獲得した。交雑による稔実率が低い (0.07%) ことから, これらの 2 種間には高度の不和合性があることが予想された。F<sub>1</sub> 雑種の形態は両親

の中間を示したが, 草丈は極めて低かった。直立型の草姿は種子親とした IRRI 154 と似ていたが, 葉の形態は *L. perrieri* と似ていた。細胞学的解析で, F<sub>1</sub> 植物の染色体対合は見られず 24 本の一価染色体が観察され, 2 種の染色体が高度な非同源性

を持つことが明らかになった。新規に設計した *O. sativa* と *L. perrieri* の 11 個の indel マーカーによる PCR 解析で、 $F_1$  個体であることも確認できた。この属間雑種の獲得により、*L. perrieri*

の持つ新規有用形質をイネに導入できる可能性が示された。

**Breeding Science** 68: 474–480 (2018)

## カーネーションのオレンジ花色形成には *I* 遺伝子座の 2 つのカルコンイソメラーゼ遺伝子が関与する

宮原 平<sup>1)</sup>・杉下奈津<sup>1)</sup>・石田 (出井) 万都香<sup>1)</sup>・岡本えみ<sup>1)</sup>・河野宇伸<sup>2)</sup>・Emilio A. Cano<sup>3)</sup>・佐々木伸大<sup>4,5)</sup>・渡辺藍子<sup>4)</sup>・田崎啓介<sup>4,6)</sup>・西原昌宏<sup>4)</sup>・小関良宏<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>東京農工大学・工学研究院生命工学専攻, <sup>2)</sup>ジャパンアグリバイオ株式会社, <sup>3)</sup>バルブレ&プラン, <sup>4)</sup>岩手生物工学研究センター, <sup>5)</sup>現: 東洋大学・食環境科学部, <sup>6)</sup>現: 東京農業大学・農学部)

カーネーションにおいて *I* 遺伝子が劣性であることにより黄色色素であるカルコノナニンゲニン 2-グルコシド (Ch2'G) を合成・蓄積して黄色花を生じ、一方、*I* 遺伝子が優性であることにより赤色色素であるアントシアニンを合成・蓄積して赤花を生じる。この *I* 遺伝子により制御される代謝流の切り替えが、黄色花と赤花を生じると説明されるが、Ch2'G とアントシアニンの両者が同時に蓄積されることで生じるオレンジ色花の形成理由については不明であった。カーネーション全ゲノム解読の成果により、2 つのカルコンイソメラーゼ (*CHI*) 遺伝子が存在し、一方の Dca60979 が *I* 遺伝子として知られていたが、もう 1 つの Dca60978 の役割は不明であった。本研究にお

いて、Dca60979 は赤色花で高い発現をして高い酵素活性を有していたのに対し、オレンジ色花において Dca60979 遺伝子は *Tdic1* の挿入イベントにより、その転写産物が検出されない状態になっていた。Dca60978 は低いながらも発現しており、また低いながら酵素活性を有していた。このことから、CHI 活性によってカルコンの一部はナリンゲニンに代謝され、アントシアニン合成まで代謝が進むのに対し、残りのカルコンはカルコン 2'-グルコシルトランスフェラーゼによって Ch2'G となり、アントシアニンと Ch2'G が同時に蓄積されることで、オレンジ色となることが示された。

**Breeding Science** 68: 481–487 (2018)

## 植物育種に向けた一塩基多型遺伝子座の高分解能融解曲線分析における頑健性を最大化するための選択基準

山形悦透<sup>1)</sup>・吉村 淳<sup>1)</sup>・穴井豊昭<sup>2)</sup>・渡辺啓史<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>九州大学・農学部, <sup>2)</sup>佐賀大学・農学部)

DNA マーカーは遺伝子の同定や新規の遺伝研究および育種素材の開発に有用である。高分解能融解曲線 (HRM) 解析はゲル電気泳動などの追加の実験を必要とせず、PCR 断片に含まれる一塩基多型 (SNP) を融解温度 (T<sub>m</sub> 値) の差分として検出することが可能である。SNP を含むホモ接合型の対立遺伝子を識別できる信頼性の高い HRM マーカーを開発するための手法として、2 本鎖 DNA の熱力学に基づく新規の評価指標を検討し、PCR 断片の T<sub>m</sub> 値の差分を最大化する指標を見出した。すなわち、ギブズ自由エネルギーの変化によって生じる差分が実際の T<sub>m</sub> 値の差分と関連を示すことを見出した。また、プラ

イマーの塩基配列に対し塩基置換の導入による SNP の最近接塩基の最適化と、PCR 断片長の減少の両方によって、実際の T<sub>m</sub> 値の差分は増大した。最近接塩基対の置換を伴う HRM マーカー (NNNs-HRM) によって作製した DNA マーカーは連鎖解析によってダイズの染色体の正しい位置に位置づけられることを確認した。私たちは大規模な NNNs-HRM マーカーの設計が自動的に可能な Perl によるパイプラインを開発した。これは誰でも利用可能であり、他の作物における実際の育種プログラムに役立つものと期待される。

**Breeding Science** 68: 488–498 (2018)