

A Study of the Application of Recurrent Backcrossing using DNA Marker Selection to a Wheat Breeding Program

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): Wheat, Marker-assisted selection, Recurrent backcrossing 作成者: 齋藤, 美香, 小林, 史典, 伊藤, 裕之, 新畑, 智也, 乙部 (桐淵), 千雅子, 石川, 直幸, 藤田, 雅也, 石川, 吾郎, 中村, 俊樹 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001258

連続戻し交雑による品種育成におけるDNAマーカー選抜の 効率的適用に関する一考

齊藤 美香^{*1)}・小林 史典^{*2)}・伊藤 裕之^{*1)}・新畑 智也^{*2)}
乙部千雅子^{*3)}・石川 直幸^{*4)}・藤田 雅也^{*5)}・石川 吾郎^{*1)}
中村 俊樹^{*1)}

抄 録：3つのWxタンパク質と3つのSSIaタンパク質を欠く甘味種コムギおよびその育成過程で分離してくる姉妹系統は、新たな食品素材として期待されており、早期の品種育成が望まれている。そのため、DNAマーカーを用いた効率的な連続戻し交雑により国内各地域に適するそれらの実用品種の迅速な育成を進めている。短期間で品種育成を進めるために、DNAマーカーを用いた連続戻し交雑の効率性について検討した。その結果、変異型GBSSI、SSIaそれぞれ3遺伝子ずつを導入し、それぞれの準同質遺伝子系統同士を交雑する方法が、交配および選抜の作業効率が良いと考えられた。また、播性の高い系統を反復親とした場合、未熟胚を発芽させることで1回の戻し交雑期間を短縮させ、年3回の交雑が可能になった。さらに、DNAマーカー選抜の効率化に資するマルチプレックスPCR用のマーカーを開発した。

キーワード：コムギ、DNAマーカー選抜、連続戻し交雑

A Study of the Application of Recurrent Backcrossing using DNA Marker Selection to a Wheat Breeding Program : Mika SAITO^{*1)}, Fuminori KOBAYASHI^{*2)}, Hiroyuki ITO^{*1)}, Tomoya SHIMBATA^{*2)}, Chikako OTOBE^{*3)}, Naoyuki ISHIKAWA^{*4)}, Masaya FUJITA^{*5)}, Goro ISHIKAWA^{*1)} and Toshiki NAKAMURA^{*1)}

Abstract : Sweet wheat (SW) was selected from a cross between two starch mutants, waxy (Wx) and high amylase (HA). Wx and HA lack the functions of three homoeologous GBSSI and SSIa genes, respectively, and SW possesses six totally null alleles, three null alleles for each of the two genes. SW was selected by using six co-dominant markers to detect each null allele. Its seed compositions are very distinct features mainly characterized by high sugar content. In addition, from the crossing, not only SW but 63 other haplotypes with different combinations of wild and null alleles of the two genes are selected by the markers. It was revealed that some of the haplotypes also possess starch with unique properties. Along with SW, these new lines were thought to be useful materials for food industries throughout the world. However, to prove this possibility, it is necessary to develop new commercial cultivars adaptable to a wide range of Japanese environments and provide their flour to food industries as soon as possible. Therefore, we planned to use recurrent backcrossing with marker-assisted selection (MAS) and conducted several trials to adapt the MAS breeding for this selection effectively. We discussed the following three points: first, the number of flowers required to be crossed to save labor; second, how to save the time needed for one generation of winter wheat, which requires a long low-temperature treatment for vernalization; third, the re-design of primers for multiplex PCR to save time and cost in the marker selection process. In this case, we concluded that introgression of the three null alleles, either Wx or HA, separately into the same

* 1) 農研機構 東北農業研究センター (NARO Tohoku Agricultural Research Center, Morioka, Iwate 020-0198, Japan)

* 2) 日本製粉株式会社 (Nippon Flour Mills Co. Ltd., Atsugi, Kanagawa 243-0041, Japan)

* 3) 農研機構 作物研究所 (NARO Institute of Crop Science, Tsukuba, Ibaraki 305-8518, Japan)

* 4) 農研機構 近畿中国四国農業研究センター (NARO Western Region Agricultural Research Center, Fukuyama, Hiroshima 721-8514, Japan)

* 5) 農研機構 九州沖縄農業研究センター (NARO Kyusyu Okinawa Agricultural Research Center, Chikugo, Fukuoka 833-0041, Japan)

2011年11月2日受付、2012年1月16日受理

recurrent parent could save labor in the crossing compared with simultaneous introgression of the six alleles using SW as a donor parent. Whereas low vernalization cultivars (class I or II) could run three generations in a year without any rescue process, in a variety that required high vernalization (class V), the germination of immature embryos, 14 days after crossing, on agar medium made it possible to reduce the time required to run a single generation from six months to around four months. Furthermore, although a multiplex PCR assay for all six loci could not be performed, success in a multiplex assay for three *SSIIa* loci reduced the total number of PCRs from five to three in a single generation and could save time and cost in the screening process.

Key Words : Wheat, Marker-assisted selection, Recurrent backcrossing

I 緒 言

農研機構・東北農業研究センターにおいて、コムギ (*Triticum aestivum* L.) 胚乳デンプン中のアミロース合成を司る顆粒結合型デンプン合成酵素I型 (Granule-bound Starch synthase I; GBSSI) 3種を欠くモチコムギ (Wx) およびアミロペクチン合成に関与する可溶性デンプン合成酵素IIa型 (Starch Synthase IIa; SSIIa) 3種を欠く高アミロースコムギ (high amylose; HA) の交雑により、計6つの酵素を欠失した甘味種コムギ (sweet wheat; SW) を開発した (Nakamura *et al.* 2006)。このSWは皺粒になり、マルトースや多糖類のフルクタンおよび遊離アミノ酸を多く含むという従来のコムギにない特徴を持つ (Nakamura *et al.* 2006, Shimbata *et al.* 2011)。さらに、WxとHAの交雑の過程において、各酵素の有無により64タイプのコムギができる (図1)。SWの育成過程で得られる姉妹系統には、そ

れぞれ3つのGBSSIおよびSSIIaの発現の組み合わせの違いによりデンプン特性が微妙に異なるものが存在し、その詳しい特性解明が進められ、用途開発が期待されている (新畑・中村 2010)。このように、SWおよび姉妹系統はコムギの新たな需要を生み出す可能性があるものの、これらはまだ実験系統であり、耐病性や収量性などの農業特性に関しては不十分な状態である。そのため、用途開発を進める上で実用品種の迅速な育成が望まれている。

迅速に品種育成を行う方法の一つとして、戻し交雑育種法がある。この方法は、優良品種の遺伝子をほぼそのままにして、ピンポイントで形質を改良したい場合に有効である。イネではササニシキやコシヒカリにイもち病抵抗性遺伝子や早生化のための遺伝子領域を導入するために同手法が用いられ、実用品種が育成されている (佐々木ら 2002、小島ら 2003、竹内ら 2008、石崎 2007)。また、戻し交雑育種法の長所として、扱う個体数が比較的少なく、済み、労力を節約できるという点が挙げられる。この利点を生かし、温室等での栽培により世代促進をすることで、育種年限の短縮が可能となる。

近年、コムギにおいて利用できるDNAマーカーの数は増加し、品種育成の際の選抜への利用が増えている。SWの育成にも、3つのGBSSIおよび3つのSSIIaをコードする遺伝子に生じた変異部分を検出可能なDNAマーカーが選抜に用いられた (Nakamura *et al.* 2006)。DNAマーカー選抜 (marker-assisted selection; MAS) の利点の一つとして、表現型による選抜をすることなく、目的の形質を持つ個体を選抜できることが挙げられる。例えば、小麦粉の品質に関わる成分や、病害抵抗性などの選抜は、胚乳成分の分析や、圃場試験や接種試験による検定が必要であり手間と時間がかかるが、

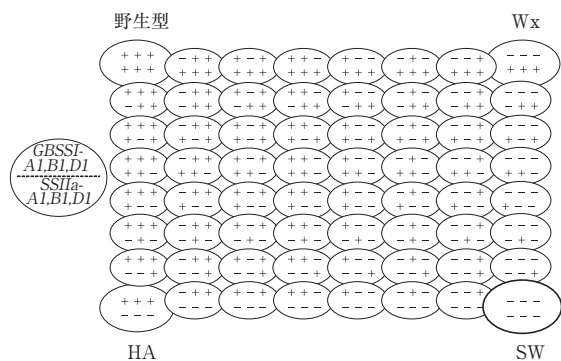


図1 モチコムギ (Wx) と高アミロースコムギ (HA) の交雑により得られる甘味種コムギ (SW) と姉妹系統

注. +, - はそれぞれ野生型、変異型を表す。

MASを用いることで、植物組織を選ばず、幼苗などから抽出したDNAを用いて選抜ができる。また、測定誤差も生じないことから正確な選抜ができ、初期世代においても個体選抜が可能となる。さらに、DNAは一度抽出すると、複数の形質の選抜が可能であり、効率的である。以上から、DNAマーカーは品種育成において欠かすことのできないツールになりつつある。

DNAマーカーのもう一つの利点として、共優性マーカー化が可能となり、ヘテロ接合体を正確に判定できる点も挙げられる。前述の戻し交雑育種法において、導入する形質が1遺伝子支配の優性形質であれば BC_nF_1 世代での表現型による選抜が可能であるが、SWのように劣性遺伝子が原因の劣性形質の場合、目的とする遺伝子型について BC_nF_2 世代を用いた後代検定により確かめる必要がある。しかしながら、共優性のDNAマーカーを用いることで劣性形質であっても BC_nF_1 世代でのヘテロ接合体の選抜が可能となり、連続戻し交雑に供することができ、育成期間の短縮に有効である。

以上より、共優性のDNAマーカーを用いた連続戻し交雑育種法（Marker-assisted backcrossing；MABC）は、SWおよびその姉妹系統の迅速な品種育成に有効な手段と考えられた。そこで我々は、農研機構・東北農業研究センター、作物研究所、近畿中国四国農業研究センター、九州沖縄農業研究センターと共同で、それぞれの地域に適した品種・系統を反復親としてMABCにより迅速な実用品種の育成を計画した。しかしながら、その効率的適用にあたり、いくつかの考慮すべき点が浮かび上がってきた。第一に、1回の戻し交雑あたりの導入遺伝子数および1回の戻し交雑における交配親花数である。選抜対象遺伝子数（マーカー数）が増えると同時に、それによって必要な交雑親花数が増加する。この問題に関しては、戻し交雑において導入遺伝子をヘテロに持つ個体の頻度を p とすると、 α の確率で少なくとも1個体以上のヘテロ型を含むために必要な個体数 (m) は $m \geq \log(1 - \alpha) / \log(1 - p)$ により求められるという報告がある（菊池・藤巻 1974）。コンピュータシミュレーションによる導入遺伝子数や交雑手順の指標が提唱されている（Ishii and Yonezawa 2007）が、コムギにおいてその実証はされていない。事業育種にこの手法を適用するためには、より効率的に作業を進めるための交配作業量

やMASの作業量に関する考慮は必要不可欠であり、そのような体系を確立する必要がある。第二に、従来の育種においても連続戻し交雑を行う場合に利用される世代促進についての考慮である。コムギの世代促進としては、播性が低い場合は年3世代程度の世代促進が可能である。しかしながら、北海道や東北地域で栽培される秋播き品種・系統は、高い播性を持っており、低温処理に必要な日数が長期化することにより、播性が低い品種系統と同様な世代促進効果は望めない。これは、寒冷地の場合、温暖地に比べ、MABCを用いれば迅速な品種育成を図れるという利点を最大限に活用することができないということになる。第三として、MASを行う際に、用いるマーカーの数が作業効率やコストに影響を与える点が挙げられる。現在広範囲に用いられているPCRによるマーカーを考えた場合、それぞれの選抜マーカー毎に遺伝子型判定を行えば、PCR作業及びその結果の解析回数がマーカー数とともに増加し、それに伴って作業時間やコストも大きくなるという問題が予想される。特に、コムギはA、B、Dゲノムからなる6倍体のため、 W_x や HA のように一つの形質の発現に3つの遺伝子が関与する場合が多く、一つの形質の発現を確認するのに3つのマーカーが必要になる。また、今後マーカーによる選抜可能な形質も増えることが予想される。そこで一度のPCRで複数の遺伝子型を判定できるDNAマーカーのマルチプレックス化は選抜の効率化に大きな役割を果たすものと考えられる。

本稿では、以上の点について効率化を検討し、その結果を踏まえて行った実用品種の育成経過について報告する。

本研究は農林水産省「新農業展開ゲノムプロジェクト（FBW1203）」の支援を受けて実施した。

II 材料と方法

1. 植物材料

一度に6遺伝子座の選抜を行った場合の交配数と選抜個体数の関係に関しては、実験系統である「Chinese Spring (CS)」(播性I～II)を反復親に、甘味種小麦を1回親として用いた。戻し交雑種子は、96穴のセルトレイに播種し、その実生を遺伝子型調査に用いた。

甘味種およびその姉妹系統の育成には、東北農業研究センター、作物研究所、近畿中国四国農業研究

表1 連続戻し交雑に用いたコムギ品種・系統

育成研究所	反復親	播性	Wx 形質供与品種・系統	HA 形質供与系統
東北農研 作物研	盛系 D-B004 バンドウワセ	V I ~ II	もち姫 あけぼのもち	東北農研育成実験系統 東北農研育成実験系統
近中四農研	ミナノカオリ	I	モチ性春のあけぼの	東北農研育成実験系統
九州沖縄農研	シロガネコムギ	II	モチ性チクゴイズミ	東北農研育成実験系統

Wx: モチ
HA: 高アミロース

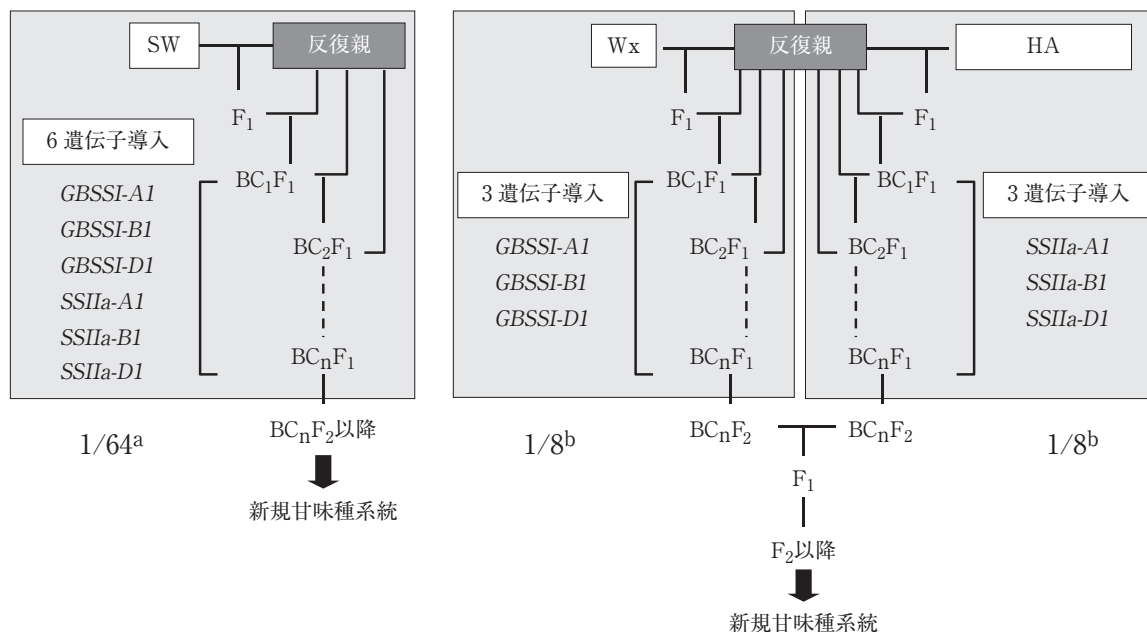


図2 交雑組み合わせによる導入遺伝子数とヘテロ接合体出現率

SW: 甘味種コムギ, Wx: モチコムギ, HA: 高アミロースコムギ

a: 6 遺伝子全てがヘテロ接合である個体が得られる確率

b: 3 遺伝子全てがヘテロ接合である個体が得られる確率

センターおよび九州沖縄農業研究センターにおいて、それらの地域に適した主要品種・系統を反復親とし、WxあるいはHA系統を1回親として用いた(表1)。

2. 連続戻し交雑

連続戻し交雑は図2に示す手順で行った。BC_nF₁について、DNAマーカーにより、GBSSI、SSIIaの6遺伝子座全てヘテロ接合体(1回親がSWの場合)、または3つのGBSSI(1回親がWx)もしくはSSIIa(1回親がHA)遺伝子座が全てヘテロ接合の個体を選抜し、次の花粉親とした。BC_{n-1}F₂において3遺伝子全てヘテロ接合の個体が得られなかった場合、3遺伝子全てヘテロ接合のBC_{n-1}F₂より3遺伝子のnull変異個体を選び出し花粉親として用いることでBC_nF₁種子を得た。材料の栽培は温室内で行い、およそ4か月のサイクルで播種から交配、収

穫を進めた。なお、作物研究所のWx準同質遺伝子系統(near-isogenic line; NIL)の育成については、モチ品種である「あけぼのもち」を1回親、バンドウワセを反復親としたNILが先行して育成されていたため、本研究での戻し交雑および選抜は行わなかった。また、「シロガネコムギ」を反復親としたHA系統については、先行して戻し交雑を1回行い、変異型SSIIa遺伝子であることを確認済みのBC₁F₄をBC₂F₁の花粉親として用いた。

3. 世代促進のための改良

播性Vの「盛系D-B004」系統に関しては、他の系統に合わせて年3回の戻し交雑を行うために、世代促進法の改良を図った。交雑後14~20日目の種子を1.5%次亜塩素酸ナトリウムにより滅菌し蒸留水で洗浄した後、胚を取り出し、MS培地上に無菌的に置床した。胚は23℃、24時間照明のインキュベーター

表2 SSIIa 遺伝子変異判定用プライマーセット

遺伝子	プライマー名	塩基配列 (5'-3')
SSIIa-A1	SSII-AF1 ^{a)}	GCGTTTACCCACAGAGC
	SSII-AR5	AGGTCCGGAATCATGGTTCTGGTGA
SSIIa-B1	SSII-BF1L	ACAGTTATTCTTCTTCGGTACACATTGGCTA
	SSII-BR4	GCTTGCCGGAGTCCAGCGTCCC
SSIIa-D1	SSII-DF2	AAGGGGAGCTGAAATTTTATTGCTTATTGTC
	SSII-DR2	AGGTTGTCAATTGAGTTGGAGAGATACCTCA

注. a) Shimbata *et al.* (2005)

内において発芽させた。20日程度培地上で生育を続け、3～4葉が展開した後、園芸用粒状培土に移植した。生育の状況を見て、移植後約10日から15日に低温処理（10℃、9時間、7℃、15時間）を開始した。低温処理終了後、ガラス室において長日条件下（16時間日長）で栽培した。

上記系統の春化に必要な最適期間の検討には、25、30、35、40、45日間の低温処理の後、長日条件下（16時間日長）で栽培し、出穂までの日数を算定した。

4. DNAマーカーの改良および選抜

3葉期のコムギからのDNA抽出は、Gene Prep Star PI-80X（クラボウ）を用いた。3GBSSI遺伝子の選抜は、Nakamura *et al.* (2002)、Saito *et al.* (2009) にて報告されているマーカーおよび反応条件により行った。SSIIa-A1、-B1、-D1遺伝子の選抜は、Shimbata *et al.* (2005) の塩基配列情報より、一部のプライマーを新たに設計し、マルチプレックスPCR用のマーカーとした（表2）。PCRは、25 μ Lあたり50ng DNA、1 $\times$ ExTaq Buffer、0.2mM dNTPs、0.05% DMSO、0.625U ExTaq Hot Start Version（Takara）、0.4 μ M SSII-AF1、0.4 μ M SSII-AR5、0.28 μ M SSII-BF1L、0.28 μ M SSII-BR4、0.2 μ M SSII-DF2、0.2 μ M SSII-DR2を含む反応系で行った。反応サイクルはGBSSI遺伝子判定用マーカーと同じ条件を用いた。PCR産物の確認は、4%（GBSSI）または2%（SSIIa）アガロースゲルを用いた電気泳動により行った。

Ⅲ 結 果

1. 6遺伝子導入における必要穎花数の検討

MABCによる品種育成において複数の遺伝子を導入する場合、1回の戻し交雑で導入する遺伝子数と、それに応じて、目的の遺伝子を持つ個体を得るために必要な交配数が、育成期間や交配作業の効率性に大きく影響することが予想される。そこで、甘

表3 6 遺伝子導入時の分析個体数と全遺伝子ヘテロ接合体数

	1 ^{a)}	2	3	4	計	P ^{c)}
BC ₂ F ₁	1/96 ^{b)}	4/95	5/96	2/95	12/382	0.013
BC ₃ F ₁	3/96	4/92			7/188	0.017
BC ₄ F ₁	1/95	4/94	0/95		5/284	0.789
BC ₅ F ₁	1/96	2/96	5/94		8/286	0.092
BC ₆ F ₁	0/96	3/96	1/82		4/274	0.891

注. a) 戻し交雑種子を播種したトレイの整理番号

b) GBSSI-A1、GBSSI-B1、GBSSI-D1、SSIIa-A1、SSIIa-B1ならびにSSIIa-D1が全て6遺伝子ヘテロ接合体数/分析個体数

c) 6遺伝子座について期待値を野生型：ヘテロ接合＝63：1とした場合の χ^2 乗検定による確率

味種コムギを1回親として3つのGBSSI遺伝子および3つのSSIIa遺伝子の計6遺伝子を「CS」に戻し交雑により導入する場合について検討した（図2A、表3）。

選抜に用いた交雑種子数は1回あたり188～382（平均282.8）個であり、6遺伝子ヘテロ個体は4～12個得られた。1遺伝子座の野生型：ヘテロ接合の割合は1遺伝子（BC₄F₁のGBSSI-B1座）を除く全ての世代で1：1に分離している（データ省略）。また、全遺伝子座ヘテロ接合である個体の出現率は、BC₄F₁、BC₅F₁およびBC₆F₁では1/64に適合し（ $P > 0.05$ ）、またBC₂F₁およびBC₃F₁においては有意水準1%ではあるものの上記分離比に適合していると考えられた。（表3）。

表3に示す通り、遺伝子型決定の際に96個体毎に管理したセルトレイ別に結果を検証すると、6遺伝子ヘテロ接合体が5個体得られた場合があったが、1個体も得られない場合も見受けられた。

2. 未熟胚利用による交配期間の短縮

上記で反復親として用いた「CS」は播性がI～IIと低く、また、品種育成に用いた関東以南の反復親についても全て播性I～IIであり、年3回の戻し

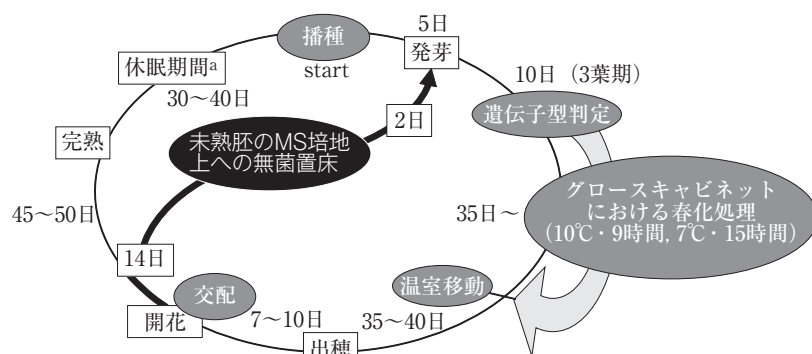


図3 未熟胚利用による交配期間の短縮

a: 過酸化水素を用いた休眠打破により短縮可能

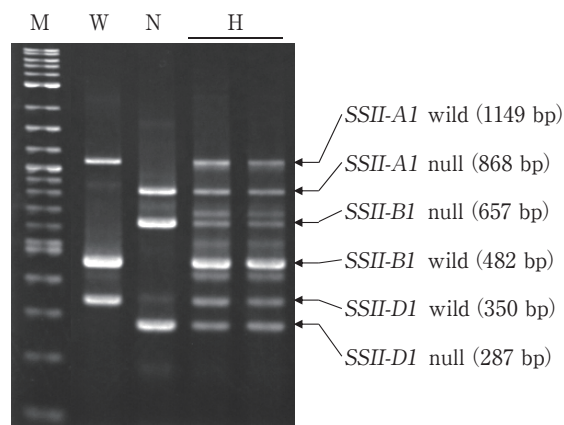
表4 低温処理日数を変化させた場合に出穂に要する日数

低温処理 (日数)	低温処理終了－出穂 (日数)	低温処理開始－出穂 (日数)
25	53	78
30	48	78
35	39	74
40	40	80
45	37	82

交雑を行うことが可能である。ところが、東北農業研究センターにおいて反復親として用いた「盛系D-B004」は播性Vであることから、他の品種に比べ長期間の低温処理を必要とする。そのため、通常は播種から交配、採種まで5か月～6か月程度を要し、他の反復親を使った系統に比べ育成が大幅に遅れることが予想された。これは、MABCが迅速に進められるという利点の制約となる部分である。そこで、この問題を解決するために、1回の戻し交雑期間の短縮を目的に、交配後の未熟胚を培地上に置床し発芽させることで登熟期間の短縮を図った(図3)。交配後14日目の胚を培地上で発芽させることで、完熟に要する期間のうち約1か月を短縮することができた。

また、「盛系D-B004」の春化に要する日数を正確に把握するため、25日～45日の低温処理を行った後、出穂までの日数を調査した。表4に示す通り、35日間の低温処理を行ったものが、低温処理開始から出穂までの日数が74日と最も短いことが判明した。

以上により、「盛系D-B004」を反復親に用いる場合においても、未熟胚からの発芽と適切な低温処理期間を組み合わせることにより、1世代が123日～

図4 *SSIIa* 遺伝子型のマルチプレックス PCR による判定

W: 3 遺伝子ともに野生型、N: 3 遺伝子ともに変異型、H: 3 遺伝子ともにヘテロ接合、M: 2-Log DNA Ladder (NEB)。

126日程度となり、年に3回の交雑が可能となった。

3. *SSIIa* 遺伝子選抜用マーカーの改良

本研究で用いた *GBSSI-B1* および *GBSSI-D1* 遺伝子選抜用マーカーは、マルチプレックスPCRにより1度のPCRで両遺伝子座の判別が可能である。一方、従来の3種の *SSIIa* 遺伝子選抜用マーカー (Shimbata *et al.* 2005) を用いてマルチプレックスPCRを試みた結果、増幅が不均一であった(データ省略)。そこで、遺伝子配列情報を基に、同一のアニーリング温度で利用可能なマルチプレックスPCR用の新たなプライマーを設計した(表2)。これらのプライマーにより *SSIIa-A1* の野生型では1149bp、null変異型で868bp、*SSIIa-B1* の野生型で482bp、null変異型で657bp、*SSIIa-D1* の野生型で350bp、null変異型で287bpの断片が増幅される(図4)。こ

れにより、*SSIIa-A1*、*-B1*、*-D1*遺伝子全ての遺伝子型を1度のPCRで判定することが可能であり、また、ヘテロ接合体も正確に判定できた。

4. 甘味種および姉妹系統の育成におけるMABC利用

前述のとおり、SWを1回親とし、一度に6遺伝子の導入を図った場合、その交配作業や選抜に多大の労力を必要とするため非効率的であると考えられた。そこで、実用品種の育成においては作業の効率性を重視し、Wx、HA系統を1回親として用い、3遺伝子ずつの導入を行い、最終的な両者のNILの交雑によりSW、および姉妹系統を選抜するという手順を計画した(図2B)。この中で、全ての交雑組み合わせで年3回のMABCを行い、3年で5回以上の戻し交雑を行ったWx、HA特性を持つNILを作出できるか検討した。

反復親は各育成者により選定されたそれぞれの地域に適した主要品種・系統を用い、各育成地で戻し交雑・採種を進め、東北農業研究センターもしくは日本製粉にてDNAマーカー選抜を行った。17粒～125粒の交雑種子から、2つの交配組み合わせ(反復親が「盛系D-B004」、1回親が「もち姫」の BC_4F_1 および反復親が「バンドウワセ」、1回親が「高アミロース実験系統」の BC_4F_1 と BC_6F_1)を除いた全ての組み合わせで、1～21個体の3遺伝子のヘテロ接合体が得られた(表5)。なお、「盛系D-B004」のWx_ BC_4F_1 については、余剰の BC_3F_1 種子を用いて戻し交雑を再度行い、3遺伝子ヘテロ接合体が6個体得られた(表5)。また、「バンドウワセ」の BC_4F_1 および BC_6F_1 に関しては、それぞれ BC_3F_3 および BC_5F_2 より3つの変異型*SSIIa*遺伝子をホモ接合で持つ個体を選抜し、それらを「バンドウワセ」との交配で花粉親として用いることで BC_4F_1 および BC_6F_1 とした。一遺伝子座について野生型ホモ接合体：ヘテロ接合体の分離比は、一部系統・世代を除き、期待値に適合した(表5)。また、*GBSSI*遺伝子座または*SSIIa*遺伝子座における3遺伝子座全てヘテロ接合体である確率は、期待通り1/8であった。

交配の失敗や3遺伝子座について全てヘテロ接合体である個体得られなかった場合を除き、全ての組み合わせにおいて1世代あたり約4か月のサイクルで連続戻し交雑を進めることができた。例として表6に播性Vの「盛系D-B004」および播性Iの「ミ

ナミノカオリ」系統の戻し交雑の工程を示した。両者ともに3年間で5回以上の戻し交雑を終えたWxおよびHAに関するNILを作出、および甘味種および姉妹系統作成のための交雑まで進めることができた。

IV 考 察

連続戻し交雑は、有用形質を優良品種・系統に迅速に導入するための方法として有効である。近年、コムギにおいてさまざまな形質の原因遺伝子もしくは連鎖する領域が明らかになり、それらの形質を判別できるDNAマーカーの開発が進められていることから、マーカー選抜により複数の形質(遺伝子)を集積することが可能となっている(Gupta *et al.* 2010)。このような集積系統を1回親とし、栽培する地域に適した品種・系統を用いてMABCを行うことにより、複数の有用形質(遺伝子)を一度に導入することができ、迅速に品種育成が進められる。本研究ではMABCを実際の品種育成に適用するに当たり、その効率性を上げることを目的に問題点を考慮した交配および選抜手順を検討した。今回の場合に考慮すべき点の一つとして、導入する遺伝子数が挙げられる。導入遺伝子が1、2、3、・・・、*n*と増えるに従い、目的の遺伝子型の頻度は $1/2$ 、 $(1/2)^2$ 、 $(1/2)^3$ 、・・・、 $(1/2)^n$ と減少する。ゆえに、導入遺伝子数の増加に伴い、交雑額花数を相乗的に増やす必要がある。本研究において、6遺伝子を導入する場合、1回親の数としては最大で目的遺伝子を1つずつ持つものを6個体、最小で6つ持つ1個体の使用が考えられたが、既に6遺伝子変異が集積された甘味種コムギ、もしくは3遺伝子変異が集積されたWx、HA系統をそれぞれ1回親として利用することができたため、両者の検討のみ実施した。また、1もしくは2遺伝子を持つ1回親を3～6個体使う場合に比べ、3もしくは6遺伝子の集積系統を1、2個体用いる方が目的系統の育成に必要な世代数が少なく済むことから、迅速な品種育成を行うという点で前者の検討をする必要はないと判断した。ただし、あらかじめ集積系統が存在していない場合には、遺伝子の集積作業に入る前に各系統別に戻し交雑を並列に進める方法が効率的であろう(Ishii and Yonezawa 2007)。

本研究において、全ての目的遺伝子でヘテロ接合体が得られる確率は6遺伝子導入で1/64、3遺伝子導入で1/8と期待値通りであった(表3、表5)。

表5 戻し交雑第1世代におけるGBSSI及びSSIIa各遺伝子型の個体数

反復親	遺伝子	世代	分析数	全ヘテロ 個体 ^{a)}	$P^{b)}$	AI		$P^{c)}$	BI		$P^{c)}$	DI		$P^{c)}$
						W	H		W	H		W	H	
盛系 D-B004	GBSSI	BC ₁ F ₁	72	9	1.00	40	32	0.35	32	40	0.35	40	32	0.35
		BC ₂ F ₁	44	6	0.83	29	15	0.03	19	25	0.37	17	27	0.13
		BC ₃ F ₁	35	1	0.11	20	15	0.40	18	17	0.87	22	13	0.13
		BC ₄ F ₁	17	0	0.14	15	2	0.00	8	9	0.81	6	11	0.23
			37	6	0.52	17	20	0.620	18	19	0.87	19	18	0.87
		BC ₅ F ₁	42	3	0.33	25	17	0.22	24	18	0.35	24	18	0.35
		BC ₆ F ₁	46	4	0.47	24	22	0.77	23	23	1.00	22	24	0.77
		BC ₇ F ₁	32	7	0.11	15	17	0.72	12	20	0.16	12	20	0.16
	SSIIa	BC ₁ F ₁	60	7	0.86	25	35	0.20	42	18	0.00	30	30	1.00
		BC ₂ F ₁	39	10	0.02	20	19	0.87	8	31	0.00	19	20	0.87
		BC ₃ F ₁	35	4	0.86	21	14	0.24	11	24	0.01	17	18	0.87
		BC ₄ F ₁	21	3	0.82	9	12	0.51	6	15	0.05	13	8	0.28
		BC ₅ F ₁	46	6	0.92	20	26	0.38	28	18	0.14	25	21	0.56
		BC ₆ F ₁	40	8	0.18	18	22	0.53	15	25	0.11	16	24	0.21
		BC ₇ F ₁	47	7	0.64	25	22	0.67	23	24	0.88	22	25	0.66
		BC ₈ F ₁	45	5	0.78	24	21	0.66	23	22	0.88	24	21	0.66
	SSIIa	BC ₁ F ₁	37	4	0.77	26	11	0.01	19	17	0.71	20	17	0.62
		BC ₂ F ₁	25	5	0.29	9	16	0.16	9	16	0.16	11	14	0.55
		BC ₃ F ₁	20	2	0.75	6	12	0.16	11	9	0.65	12	8	0.37
		BC ₄ F ₁ ^{d)}												
		BC ₅ F ₁	63	7	0.76	37	26	0.17	37	26	0.17	30	33	0.71
		BC ₆ F ₁ ^{e)}												
		BC ₇ F ₁	17	1	0.44	11	6	0.23	11	6	0.23	10	7	0.47
ミナミノカオリ	GBSSI	BC ₁ F ₁	120	12	0.44	61	59	0.86	66	54	0.27	72	48	0.03
		BC ₂ F ₁	124	13	0.53	62	62	1.00	58	66	0.47	72	52	0.07
		BC ₃ F ₁	123	20	0.24	63	60	0.79	57	66	0.42	62	61	0.93
		BC ₄ F ₁	125	11	0.24	68	57	0.33	73	52	0.06	56	69	0.24
		BC ₅ F ₁	120	14	0.80	64	56	0.47	61	59	0.86	61	59	0.86
		BC ₆ F ₁	120	12	0.44	65	55	0.36	53	67	0.20	57	63	0.58
		BC ₇ F ₁	93	9	0.44	37	56	0.08	47	46	0.92	49	44	0.60
		BC ₈ F ₁	90	8	0.33	48	42	0.53	44	46	0.83	44	46	0.83
	SSIIa	BC ₁ F ₁	120	11	0.30	68	52	0.14	65	55	0.36	57	63	0.58
		BC ₂ F ₁	115	19	0.22	48	67	0.08	57	58	0.93	52	63	0.31
		BC ₃ F ₁	123	15	0.92	55	68	0.24	66	57	0.42	57	66	0.42
		BC ₄ F ₁	125	17	0.73	62	63	0.93	64	61	0.79	54	71	0.13
		BC ₅ F ₁	120	10	0.20	60	60	1.00	61	59	0.86	56	64	0.47
		BC ₆ F ₁	120	21	0.12	52	68	0.14	65	55	0.36	51	69	0.10
		BC ₇ F ₁	96	8	0.25	55	41	0.15	46	50	0.68	50	46	0.68
		BC ₈ F ₁	90	10	0.71	43	47	0.67	45	45	1.00	45	45	1.00
	GBSSI	BC ₁ F ₁ ^{f)}												
		BC ₂ F ₁	32	3	0.62	18	14	0.48	18	14	0.48	17	15	0.72
		BC ₃ F ₁	40	4	0.65	26	14	0.06	18	22	0.53	24	16	0.21
		BC ₄ F ₁	37	7	0.27	14	23	0.14	19	18	0.87	15	22	0.25
		BC ₅ F ₁	32	3	0.62	19	13	0.29	18	14	0.48	19	13	0.29
		BC ₆ F ₁	44	10	0.06	18	26	0.23	22	22	1.00	16	28	0.07
		BC ₇ F ₁	43	8	0.26	17	26	0.17	20	23	0.65	21	22	0.88
	SSIIa	BC ₃ F ₁	62	7	0.79	33	29	0.61	27	35	0.31	31	31	1.00
		BC ₄ F ₁	74	13	0.22	34	40	0.49	30	44	0.10	38	36	0.82
		BC ₅ F ₁	40	5	1.00	15	25	0.11	29	11	0.00	21	19	0.75
		BC ₆ F ₁	39	3	0.40	19	20	0.87	24	15	0.15	20	19	0.87
		BC ₇ F ₁	38	4	0.73	18	20	0.75	24	14	0.10	23	15	0.19
		BC ₈ F ₁	44	10	0.06	18	26	0.23	16	28	0.07	24	20	0.55
		BC ₉ F ₁	38	7	0.30	18	20	0.75	12	26	0.02	21	17	0.52

注. a) 3つのGBSSIもしくはSSIIa遺伝子がヘテロ接合である個体数

b) 3遺伝子座について期待値を野生型：ヘテロ接合=7:1とした場合の χ^2 二乗検定による確率c) 1遺伝子座について期待値を野生型：ヘテロ接合=1:1とした場合の χ^2 二乗検定による確率d) BC₃F₃より選抜したHA個体を花粉親としたため、全てヘテロ接合e) BC₅F₂より選抜したHA個体を花粉親としたため、全てヘテロ接合f) F₂より選抜したWx個体を花粉親としたため、全てヘテロ接合

W：野生型

H：ヘテロ接合

表6 「盛系 D-B004」および「ミナミノカオリ」系統の戻し交雑行程

	交配年月						
	F ₁	BC ₁ F ₁	BC ₂ F ₁	BC ₃ F ₁	BC ₄ F ₁	BC ₅ F ₁	BC ₆ F ₁
盛系 D-B004							
Wx	2008.6	2008.10	2009.2	2009.8	2010.5	2010.9 ^{a)}	
HA	2008.6	2008.10	2009.2	2009.8	2009.12	2010.5	2010.9 ^{a)}
ミナミノカオリ							
Wx	2008.6	2008.9	2009.1	2009.5	2009.9	2010.1	2010.5 ^{b)}
HA	2008.6	2008.9	2009.1	2009.5	2009.9	2010.1	2010.5 ^{b)}

 注. a) Wx_BC₅F₁/HA_BC₆F₁より甘味種および兄弟系統を作出

 b) BC₆F₂よりWx、HAの準同質遺伝子系統を選抜

99%の確率で6 遺伝子または3 遺伝子座のヘテロ接合体を少なくとも1 個体得るためには、前出の計算式(菊池・藤巻 1974)により、それぞれ293個体、35個体の交雑種子が必要であると試算される。実際には6 遺伝子を導入する場合においては200粒弱の交雑種子からも目的個体が得られた。しかし、選抜に用いた個体数を比較すると、次の戻し交雑に用いる個体を確実に選抜するためには、6 遺伝子導入系統では3 遺伝子導入系統に対して5 倍以上の多くの交雑種子が必要であった(表3、表5)。交配による結実数を1 穂あたり10から20粒程度を前提とすると、6 遺伝子導入系統では最低でも15~30穂以上の交配が必要であるのに対し、3 遺伝子導入系統では各系統2~4 穂(2系統合わせて4~8 穂)以上の交配で失敗なく次の戻し交雑に必要な個体が得られ、より省力的であることがわかる。

MASを用いない戻し交雑によるNILの育成(藤田ら 1995)には、温室での世代促進を組み合わせても、最初の交配からBC₅F₂を得るまでに約5 年を要した。これは、F₂もしくはF₃世代を用いた後代検定を行った結果によるもので、本研究では、2 年以内に5 回の戻し交雑を完了できた(表6)。WxやHAのような劣性形質を戻し交雑により導入する場合は、後代検定による劣性遺伝子の確認が必須であったが、MASを用いることでその作業が不要となり、連続的な戻し交雑を進めることができた。そのため、研究開始3 年半の現在、5 回以上の戻し交雑により遺伝的背景が反復親の90%以上まで置換されたWx、HAのNIL同士を交雑したF₂が得られており、目標のSW及びその姉妹系統の選抜が可能となっている。従って、今回の方法が育種現場のコムギの品種育成期間の短縮に大いに役立つ手法と確信する。

MABCにより迅速に品種を育成するに当たり、

もう一つ大きな問題点がある。前述の通りDNAマーカーを使うことで、圃場検定や後代検定をする必要がないため世代促進に有効であるが、播性程度がそのスピードの制約事項となる。本研究では、播性Vの「盛系D-B004」において、未熟胚を培地上で発芽させることで1 世代の生育期間を短縮させ、約4 か月で次の交配に供することができた。百足ら(1975)により、播性IVの「アオバコムギ」を反復親とした連続戻し交雑において、高温による強制的な登熟、過酸化水素による発芽、ならびに1 葉期緑体春化処理などを組み合わせることによって、1 世代を平均79日で年間4.5世代進められたことが報告されている。また、上記の春化方法よりも止葉展開までの日数が少ない種子-緑体春化法により、促進世代数をさらに高めることができる可能性を示唆している。これらの方法は、世代促進には有効であるが、1 穂あたりの採種数が極端に少なく(平均4.2粒程度)、また、反復親である「盛系D-B004」を用いた予備調査により発芽率が低いことが判明し、本研究における連続戻し交雑にそのまま適用できないと判断されたため、培地上での発芽法を採用した。しかしながら、上記方法を改良することで、1 世代の育成期間を短縮し、かつ十分な量の種子を得ることが可能になるであろう。このような方法は、播性の高い東北の品種・系統を反復親に用いる場合、播性程度の低いものと同じスピードでMABCを進めるための一助になると考えられる。

MASによる育種を行う場合、複数の形質(遺伝子)を同じDNAサンプルを用いて選抜できるという利点があるが、マーカー数が増えるにつれ、そのコストや作業時間が増えるという問題が出てくる。複数遺伝子の同時選抜には、マルチプレックスPCRによりPCRと電気泳動の回数を減らすことで低コスト化・省力化を図ることができ、実際にマルチ

ブレックスPCRに適したマーカーが開発されている (Zhang *et al.* 2008, Wang *et al.* 2010)。マルチブレックスPCRを行う際には、それぞれのプライマーセットから増幅される断片がアガロースゲルで簡単に分離できること、単一のアニーリング温度で利用可能なプライマーを用いること、それぞれのプライマー量が最適化されていることが重要な点である (Zhang *et al.* 2008)。本研究においても、上記条件を満たす3遺伝子を一度のPCRで判定できるマーカーを作成できた (図4)。これにより、通常3回のPCRの後に3回の電気泳動により遺伝子型判定を行うところを、3分の1に減らすことでコストの削減および作業効率の向上を図ることができた。また、アガロースゲルを用いた電気泳動に比べ多少コストがかかるものの、遺伝子型の判定をQIAxcel (QIAGEN) などのDNA電気泳動自動化装置を用いることで作業効率はさらに上がり、分析個体数の増加にも耐えられると考える (Saito *et al.* 2011)。

以上より、本研究では既に3遺伝子ずつの集積系統を1回親として利用可能なこと、また、マルチブレックスPCRによる選抜が可能になったことを考慮すると、3遺伝子ずつ並列に戻し交雑を進め、最終的に6遺伝子を集積する方法が、扱う個体数が少なく、より迅速に育成を進められるという点で効率的であると結論付けられた。数多くの系統、世代を同時に扱う現在の品種育成の現場における交配作業の効率性と品種育成のスピードのバランスを考慮すると、この方法が実情に即したものであると考えられる。

戻し交雑による品種育成では、反復親の一部を改良することを目的に1回親に由来する優良遺伝子を導入するため、できるだけ反復親に遺伝的背景を近づけ、目的優良遺伝子に関係のない1回親のゲノム領域を排除し、不良形質を持ちこまないことが重要となる。近年、染色体全域に分布するDNAマーカーを用いた選抜法 (marker-assisted background selection; MABS) を用いた海外におけるコムギ品種育成法が報告されている (Kumar *et al.* 2010, Randhawa *et al.* 2009, Xue *et al.* 2010)。通常、2回の戻し交雑における1回親に由来する染色体領域は12.5%であり、反復親への置換程度は87.5%である。しかし、MABSにより目的遺伝子に加え、多数のマーカーにより反復親に由来する染色体領域を選抜することで、2回の戻し交雑で97%の反復親ゲ

ノムを持つ個体を選抜できる (Randhawa *et al.* 2009) など、少ない回数の戻し交雑で理想とする反復親ゲノムをより多く持つ系統を選抜でき、既存優良品種を用いて新たな形質を付与した品種育成を迅速に進めることが可能になる。しかしながら、この手法を国内のコムギ品種育成に適用するためには、染色体全体のマーカー情報と、低コストかつ高効率な選抜方法が必要不可欠である。国内においては、「コシヒカリ関東HD1号」(竹内ら 2008) など水稻品種での適用例はあるものの、コムギでの報告はなされていない。SWおよびその姉妹系統の育成にあたっては、各育成地で戻し交雑を行い、DNAの抽出から遺伝子型の判定は1か所で行うことで、育成者の負担が少なくコストの面でも効率的に進められたと感じる。今後、MABSのようにさらに進んだゲノム情報に基づく選抜方法を利用した品種育成法の発展が予想され、国内の事業育種にそれらを適用していくためには、育成部門とMASを専門に行う部門の分業体制の必要性が考えられる。高額な分析機器に関しては、後者に集約し各育成系統のMASを行うことで、育成者は少ない負担で効率的な選抜法を利用でき、品種育成がより加速すると予想される。

引用文献

- 1) 藤田雅也, 谷口義則, 氏原和人, 佐々木昭博. 1995.コムギ極早生品種の秋播型準同質遺伝子系統における幼穂分化と節間伸長. 育種 45: 97-104.
- 2) Gupta, P.; Langridge, P.; Mir, R. 2010. Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. Mol. Breed. 26: 145-161.
- 3) Ishii, T.; Yonezawa, K. 2007. Optimization of the marker-based procedures for pyramiding genes from multiple donor lines: I. Schedule of crossing between the donor lines. Crop Sci. 47: 537-546.
- 4) 石崎和彦. 2007. 新潟県におけるコシヒカリのいもち病真性抵抗性マルチラインの実用化に関する研究. 新潟農総研研報 8: 1-37.
- 5) 菊池文雄, 藤巻 宏. 1974. 戻し交雑育種法 (松尾高嶺監修, 育種ハンドブック). 養賢堂

- p.635-641.
- 6) 小島洋一郎, 蛭谷武志, 金田 宏, 土肥正幸, 石橋岳彦, 木谷吉則, 向野尚幸, 山口琢也, 表野元保, 石本良孝. 2003. 水稻新系統「コシヒカリ富山BL」の育成と有効活用 I. 「コシヒカリ富山BL 1号～6号」の育成. 富山県農技セ研報 20 : 13-32.
- 7) Kumar, J.; Mir, R. R.; Kumar, N.; Kumar, A.; Mohan, A.; Prabhu, K. V.; Balyan, H. S.; Gupta, P. K. 2010. Marker-assisted selection for pre-harvest sprouting tolerance and leaf rust resistance in bread wheat. Plant Breed. 129 : 617-621.
- 8) 百足幸一郎, 神尾正義, 細田 清. 1975. 耐さびコムギ育種における世代促進技術の開発研究. 東北農試研報 51 : 1-50.
- 9) Nakamura, T.; Shimbata, T.; Vrinten, P.; Saito, M.; Yonemaru, J.; Seto, Y.; Yasuda, H.; Takahama, M. 2006. Sweet wheat. Genes. Genet. Syst. 81 : 361-365.
- 10) Nakamura, T.; Vrinten, P.; Saito, M.; Konda, M. 2002. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers. Genome 45 : 1150-1156.
- 11) Randhawa, H. S.; Mutti, J. S.; Kidwell, K.; Morris, C. F.; Chen, X. M.; Gill, K. S. 2009. Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker-assisted background selection. Plos One 4 : 11.
- 12) Saito, M.; Vrinten, P.; Ishikawa, G.; Graybosch, R.; Nakamura, T. 2009. A novel codominant marker for selection of the null *Wx-B1* allele in wheat breeding programs. Mol. Breed. 23: 209-217.
- 13) Saito, M.; Vrinten, P.; Ishikawa, G.; Nakamura, T. 2011. Marker-assisted selection (MAS) of wheat lines for udon noodle production. QIA-GEN Application Note 1067972 : 4p
- 14) 佐々木武彦, 阿部眞三, 松永和久, 岡本栄治, 永野邦明, 丹野耕一, 千葉芳則, 狩野 篤, 植松克彦, 滝沢浩幸, 早坂浩志, 涌井 茂, 黒田倫子, 薄木茂樹, 千葉文弥, 宮野法近, 佐々木都彦, 遠藤貴司. 2002. ササニシキの多系品種「ササニシキBL」について. 宮城古川農試報 3 : 1-35.
- 15) Shimbata, T.; Inokuma, T.; Sunohara, A.; Vrinten, P.; Saito, M.; Takiya, T.; Nakamura, T. 2011. High levels of sugars and fructan in mature seed of sweet wheat lacking GBSSI and SSIIa enzymes. J. Agric. Food Chem. 59 : 4794-4800.
- 16) 新畑智也, 中村俊樹. 2010. 甘味種コムギの開発と利用. 創立50周年記念・澱粉研究懇談会資料集 : 7-14.
- 17) Shimbata, T.; Nakamura, T.; Vrinten, P.; Saito, M.; Yonemaru, J.; Seto, Y.; Yasuda, H. 2005. Mutations in wheat *starch synthase II* genes and PCR-based selection of a SGP-1 null line. Theor. Appl. Genet. 111 : 1072-1079.
- 18) 竹内善信, 加藤 浩, 根元 博, 太田久稔, 佐藤宏之, 平山正賢, 平林秀介, 出田 収, 青木法明, 坂井 真, 蛭谷武志, 田口文緒, 山本敏央, 矢野昌裕, 井辺時雄, 安藤郁夫. 2008. コシヒカリと同質の遺伝的背景を持つ極早生の水稲品種「コシヒカリ関東HD1号」の育成. 作物研報 9 : 1-25.
- 19) Wang, L. H.; Li, G. Y.; Pena, R. J.; Xia, X. C.; He, Z. H. 2010. Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for *Glu-A3* alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Cereal Sci. 51 : 305-312.
- 20) Xue, S. L.; Li, G. Q.; Jia, H. Y.; Lin, F.; Cao, Y.; Xu, F.; Tang, M. Z.; Wang, Y.; Wu, X. Y.; Zhang, Z. Z.; Zhang, L. X.; Kong, Z. X.; Ma, Z. Q. 2010. Marker-assisted development and evaluation of near-isogenic lines for scab resistance QTLs of wheat. Mol. Breed. 25 : 397-405.
- 21) Zhang, X. K.; Liu, L.; He, Z. H.; Sun, D. J.; He, X. Y.; Xu, Z. H.; Zhang, P. P.; Chen, F.; Xia, X. C. 2008. Development of two multiplex PCR assays targeting improvement of bread-making and noodle qualities in common wheat. Plant Breed. 127 : 109-115.