

A genetic and breeding study for the production of self-compatible buckwheat cultivars :
Self-compatible buckwheat cultivars

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): buckwheat, self-incompatibility, shattering, abscission, genetic analysis, marker assisted breeding 作成者: 松井, 勝弘 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001964

自殖性普通ソバ品種育成のための異形花型自家不和合性 および子実脱落性の遺伝育種学的研究

松井勝弘

(2005年9月26日 受理)

要 旨

松井勝弘：自殖性普通ソバ品種育成のための異形花型自家不和合性および子実脱落性の遺伝育種学的研究。九州沖縄農研報告 47：1-42, 2006.

普通ソバ (*Fagopyrum esculentum*) は1個体では種子を生産することができない自家不和合性作物であり、結実には蜜蜂などの昆虫を媒介した交配が必要である。本研究では効率的に安定多収良質品種を開発するため、自家和合性ソバ品種の開発に向けての基礎的研究を行った。普通ソバと近縁野生種 *F. homotropicum* を交配して自家和合性系統を作出した。この系統の普通ソバとの交雑和合・不和合性を調査した結果、自家和合性対立遺伝子 S^h は S supergene 内の組換えにより生じたと推定できた。また、普通ソバから選抜された Pennline 10 は高自殖稔性を示すが、長花柱花と同じ s 対立遺伝子を持っており、Pennline 10 の短等花柱花は S supergene 以外の量的遺伝子により支配されていると推定された。一方、作出した自家和合性系統に多く見られたソバの子実脱落性は2つの独立に遺伝する優性の補足遺伝子 ($sht1$ および $sht2$) により支配されていることが分かった。 $sht1$ 遺伝子座はほとんどの栽培種に劣性のホモ型で保持され、 S 遺伝子座と連鎖していることが分かった。 $sht2$ 遺伝子座に関しては、 $Sht2$ および $sht2$ の両方の対立遺伝子が普通ソバ集団中には存在していることが分かった。効率的に子実非脱落性の系統を選抜するため $sht1$ 遺伝子座に連鎖する DNA マーカーを開発した。

キーワード：ソバ、異形花型自家不和合性、脱粒性、離層、遺伝解析、マーカー育種。

目 次

I 緒言	1	4. まとめ	
II <i>Fagopyrum homotropicum</i> に由来する自家和合性遺伝子の解析	4	V 子実非脱落自家和合性系統の効率的選抜手法の開発	27
1. 材料および方法		1. 材料および方法	
2. 結果		2. 結果	
3. 考察		3. 考察	
4. まとめ		4. まとめ	
III Pennline 10 における高自殖稔性の遺伝様式解明	14	VI 総合考察	34
1. 材料および方法		1. 自家和合性普通ソバ品種育成の可能性	
2. 結果		2. 自家和合性ソバ品種栽培の安定化および新育種方法開発に向けて	
3. 考察		VII 摘要	36
4. まとめ		引用文献	37
IV 子実脱落性の遺伝学的解明	20		
1. 材料および方法			
2. 結果			
3. 考察			

I. 緒 言

普通ソバ (*Fagopyrum esculentum* 以下単にソバ
と言えば普通ソバを指す) はタデ科 (*Polygonaceae*) に属する染色体数が $2n=2x=16$ または

2n = 4x = 32の1年生草本作物であり、日本、中国を始めとするアジアからドイツ、イギリス、フランスなどのヨーロッパ、さらにはアメリカ合衆国やカナダなどの北米に至るまで、世界の広い温帯および亜寒帯地域で栽培されている (Campbell 1997)。

普通ソバは1個体では種子を生産することができない自家不和合性作物であり、結実には蜜蜂などの昆虫を媒介した交配が必要である。昆虫の活動は降雨などの天候に大きく左右されるため、開花期に昆虫が活動できないような悪天候が続いた年には、ソバの収量は減少することが考えられる。また、自家不和合性であるため、アレルゲンフリー等の特徴的な品質を持つ系統の開発が遅れてきた。

自家不和合性はダーウィンの時代から注目されてきた形質の1つであり、雄蕊および雌蕊の機能は正常であるにもかかわらず、同一個体内または同じ遺伝子型を持つ個体間では受精ができない現象を言う。自家不和合性は不和合性反応が花型と関係する異形花型と花型とは関係ない同形花型に大別される。同形花型はさらに孢子体型と配偶体型に分けられるが、異形花型は現在のところ孢子体型のみ知られる。ソバは異形花型の自家不和合性を特徴としている。孢子体型とは、花粉の不和合性の表現型が植物体の遺伝子型で決定されるもので、アブラナ科などにみられる。一方、配偶体の自家不和合性は配偶体自身が持つ遺伝子型により不和合性が決定されるもので、ナス科およびバラ科などにみられる。普通ソバ、アブラナ科、ナス科等多くの植物の自家不和合性は、遺伝学的解析から1遺伝子座の対立遺伝子あるいは複対立遺伝子により説明されていて、この遺伝子座は*S*と名付けられている。アブラナ科にみられる同形花孢子体型およびナス科バラ科にみられる配偶体型の自家不和合性機構は、分子レベルでその機構が解明されつつある。とくにアブラナ科では雌蕊側および雄蕊側の不和合性因子が単離され、それぞれ*S*-receptor kinase (*SRK*) (Nasrallah et al. 1985, Takasaki et al. 2000) および*S* locus protein 11/*S* locus cysteine rich (*SP11* /*SCR*) と名付けられている (Schopfer et al. 1999, Takayama et al. 2000)。バラ科などにみられる配偶体型自家不和合性は雌蕊側の因子はRNA分解酵素 (RNase) ということが分かり、*S*-RNase と名付けられている (Anderson et al. 1986, Cornish et al. 1987, McClure et al. 1989)。

また、近年、花粉側の不和合性決定因子は*S* haplotype-specific F-box protein (*SLF/SFB*) ということが明らかとなった (Entani et al. 2003, Ushijima et al. 2003, Sijacic et al. 2004)。

異形花柱型の自家不和合性には2形花型および3形花型の2型が存在する。ソバは2形花型で、雌蕊が長く雄蕊が短い長花柱花 (Pin 型) と雌蕊が短く雄蕊が長い短花柱花 (Thrum 型) の2つの花形が存在する。自家不和合性はこの花形と密接に連鎖し、受精はこの2つの花形間のみで行われる (Darwin 1877, Eghis 1924, Garber & Quisenberry 1927)。異形花型の自家不和合性を持つ主要作物は普通ソバのみであるが、園芸植物には数種存在が確認されている。サクラソウ (*Primula*) はその代表的植物であり、ソバと同じ2形花型自家不和合性を示す。この植物は古くから2形花型の自家不和合性研究の材料として利用されており、サクラソウの研究で得られた成果がソバの研究に広く反映されている。自家不和合性および花型を支配している遺伝子は*S* 遺伝子座に座乗しているとされ、長花柱花の遺伝子型は劣勢ホモの*ss*であり、短花柱花はヘテロの*Ss*である。そのため、自然界では長花柱花と短花柱花が常に1:1に存在している (Eghis 1924, Garber & Quisenberry 1927)。

自家不和合性は花粉管伸長が停止する部位によっても2つに大別できる。第1は花粉管伸長が柱頭上で阻止される型であり、アブラナに見られる。第2は花粉管伸長が柱頭および花柱の中で停止するものである。これにはナス科やバラ科などの配偶体型自家不和合性やソバおよびサクラソウなどの2形花孢子体型の自家不和合性が含まれる。ソバの花粉管伸長は適法組合せである長花柱花個体の雌蕊に短花柱花個体の花粉をかけた場合とその逆の場合では花粉管が20分以内に胚まで達すると報告されている (Schoch-Bodmer 1934, Morris 1951, 建部 1956)。一方、短花柱花の雌蕊に短花柱花の花粉を受粉した場合は柱頭内で花粉管伸長が停止するのに対し、長花柱花に長花柱花の花粉を受粉した場合は花粉管が雌蕊の約2/3まで伸長した時に停止することが知られている (Schoch-Bodmer 1934, Morris 1951, 建部 1956)。古くから花柱の違いにより花粉管伸長の停止部位が異なることは花粉の大きさの差異と雌蕊の長さとの相互関係によると考えられているが、これ

らと自家不和合性が関係しているかは未だに明らかにされていない。

ソバにおける自家和合性品種作出の試みは大きく2つに分けられる。第1は自家和合性種の利用であり、第2は突然変異の利用である。ソバ属は普通ソバを始め18種ほどあることが報告されており、アロザイム、葉緑体DNA、核遺伝子の塩基配列に基づく系統類縁関係の分析から、*cymosum* グループと *urophyllum* グループの2つに大別されている (Ohnishi 1998a; Ohsako & Ohnishi 1998; Ohsako et al. 2002.)。多くの種は異形花型の自家不和合性を示すが、数種は自家和合性である。その代表種がダツタン種 (*F. tataricum* 以降ダツタンソバ) である。ダツタンソバは苦ソバとよばれ、日本では北海道や東北地域等の一部での栽培に限られているが、寒さに強いことから、海外では中国やロシアなどの広い地域で栽培されている。ダツタンソバは安定多収性であり、高ルチン性を示すが、その苦さと製麺適性が劣るため麺用には適していない。そこで、多くの研究者および育種家により、ダツタンソバが保有する自家和合性を普通ソバに導入する試みが行われてきた (Samimy 1991, Samimy et al. 1996)。Samimy et al. (1996) は胚培養によりダツタンソバと普通ソバの雑種ソバの作出に成功したが、その雑種は自家不和合性を示し、現在までにダツタンソバ由来の自家和合性遺伝子が普通ソバに導入されたという正式な報告はない。

自家和合性を示す野生種に *F. homotropicum* がある。この種は1991年に Ohnishi (1998b) により発見された種で、自家和合性と雄蕊と雌蕊の長さが等しい長等花柱花 (Long Homostyle) の花型である点以外は普通ソバの祖先種 *F. esculentum* ssp. *ancestralis* と似ている。また、*F. homotropicum* は分類学的研究から、普通ソバの祖先種である *F. esculentum* ssp. *ancestralis* に由来すると報告されている (Ohnishi & Matsuoka 1996; Yasui & Ohnishi 1998)。Campbell (1995) は普通ソバと *F. homotropicum* を交配し、*F. homotropicum* と同じ長等花柱性の花をもつ自家和合性系統の作出に成功している。この自家和合性系統を長花柱花に交配して得られた雑種の後代から、自家和合性は花柱性と共分離し、1遺伝子支配であることが明らかになっている (Woo et al. 1999)。このことから、この対

立遺伝子は S^h と名付けられている。この S^h 対立遺伝子は s に対しては優性であるが S に対しては劣性であることが分かっている (Woo et al. 1999)。しかしながら、この S^h 対立遺伝子がなぜ自家和合性を引き起こすのかは分かっておらず、なぜこのような優劣関係にあるかも分かっていない。

人工的に自家和合性突然変異体を作成する普通ソバにおける試みは Sharma & Boys (1961) によって初めて行われた。彼らはガンマ線処理およびエチルメタンサルフォネイト (EMS) をそれぞれ異なる系統に処理し、自家和合性系統の作出に成功している。また自然集団の中から発生したものを選抜し、それを固定した例も存在する。Garber & Quisenberry (1927) は初めて普通ソバ集団中から自家和合性個体を見つけた。建部 (1953) は長花柱花で高い自殖稔性を示す個体を選抜し、その個体の交配特性を調査している。また、Marshall (1969, 1970) は短等花柱花 (Short Homostyle) の高い自殖稔性を示す個体を選抜し、Pennline10と名付けた品種を育成している。Marshall (1979) はこの Pennline10をさまざまな栽培種に交配し、遺伝的背景が異なるさまざまな自殖系統を作成しているが、すべての自殖系統は交配親に比べ、自殖弱勢によって草丈、収量性が低下したと報告している。Pennline10の高自殖稔性については、その重要性にもかかわらず、Marshall (1979) がおそらく2つ以上の変異遺伝子が存在するだろうと予測している以外の報告は見あたらない。

F. homotropicum は、自家和合性であるが、野生種であるため脱粒性を示す。この脱粒性は登熟期に多くの種子を脱落させる (Ohnishi 1999)。このことから、*F. homotropicum* から自家和合性を導入した場合には脱粒性が問題となる。このことは、この形質を取り除かない限り自家和合性の品種開発はあり得ないことを示している。一方、脱粒性個体が脱粒性を示す登熟期には既に花粉を飛散しているため、集団中の脱粒性対立遺伝子の頻度を下げることが困難であること、さらに、登熟期に一斉に脱粒するため圃場に多くの種子を落とすことが栽培上の難点である。効率的に育種を行うためには、幼苗期に難脱粒性が判定できる方法が必要となる。

ソバにおける脱粒性は大きく分けて2種類ある。第1は離層を形成し、登熟期にはほぼ完全に種子が

脱粒するもので、野生種にみられる (Oba et al. 1998a)。第2は栽培種にみられ、離層の形成はみられず、登熟期に完全に落ちることはないが、種間や品種間でその程度に差が見られる (Oba et al. 1998b)。

筆者は以上の観点から普通ソバの自家不和合性が *S supergene* により支配されていることを実証し、 $S > S^h > s$ の優劣関係が存在する理由を明らかにした。また、 S^h 対立遺伝子以外の遺伝子によっても高自殖稔性を示すことを明らかにした。さらに、普通ソバの子実脱落性は2つの独立遺伝する補足遺伝子により支配されていることを明らかにし、早期に子実非脱落性個体を選抜できる DNA マーカーの開発を行った。

本研究は、2000年から2004年にかけて九州沖縄農業研究センター作物機能開発部において行った一連の研究を (Matsui et al. 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 松井・手塚 2005) を取りまとめたものである。

本研究を遂行するにあたり、岐阜大学教授・古田喜彦博士に終始懇切なる御指導と激励を賜った。また、本研究の企画、遂行および取りまとめにあたっては東北大学教授・西尾剛博士ならびに農業生物資源研究所・小松田隆夫博士に格別の御指導を賜った。また、京都大学教授・大西近江博士には貴重な材料を提供して頂いた。また、本研究の遂行にあたり、九州沖縄農業研究センター・手塚隆久氏には終始親切的な御助言を戴いた。さらに中央農業研究センター所長・松井重雄博士、食品総合研究所・大谷敏郎博士、日本大学・倉内伸幸博士、九州沖縄農業研究センター・原貴洋氏、東北大学植物遺伝育種学研究室の関係各位、岐阜大学遺伝育種学研究室の関係各位、日本大学熱帯農業研究室の関係各位、並びに九州沖縄農業研究センターの関係各位には終始協力の労を惜しまず多大なご支援をいただいた。ここに各位に対し深甚なる感謝の意を表する。

II. *Fagopyrum homotropicum* に由来する 自家不和合性遺伝子の解析

普通ソバの祖先種 *F. esculentum* ssp. *ancestralis* に似た近縁野生種 *F. homotropicum* と普通ソバの種間交雑により、自家不和合性ソバが作出されている (Campbell 1995)。この自家不和合性系統の花型は長等花柱花 (Long Homostyle) であり、1遺伝子支配

とされている (Campbell 1995, Woo et al 1999)。この長等花柱花を支配している対立遺伝子は S^h と名付けられ、長花柱花の対立遺伝子 s と短花柱花をもたらす対立遺伝子 S との間に $S > S^h > s$ の優劣関係があることが明らかにされている (Woo et al 1999)。しかしながら、 S^h 対立遺伝子が自家不和合性を示す理由、すなわち、自家不和合性が花粉側の S 機能の欠失によるものなのか、雌蕊側の S 機能の欠失によるものか、あるいはその両方によるもののかなどが全く明らかにされていない。また $S > S^h > s$ の優劣関係をもたらす理由も明らかにされていない。

Dowrick (1956) は同じ2形花型自家不和合性を示すサクラソウ (*Primula*) で、自家不和合性を支配する S 遺伝子座には花粉側の認識特異性を決定する遺伝子、雌蕊側の認識特異性を決定する遺伝子、雄しべの長さ、雌蕊の長さ、花粉の大きさ、柱頭表皮細胞の大きさを支配する遺伝子が座乗しているとする *S supergene* 説を唱えた。その根拠は、これら全ての形質が全て一緒に分離するからである。また、長等花柱花は雄蕊の長さと雌蕊の長さを支配している遺伝子間の組換えにより発現し、長等花柱花個体の多くが自家不和合性を示すのは、花粉側の認識特異性を決定する遺伝子と雄蕊の長さを支配する遺伝子、雌蕊側の認識特異性を決定する遺伝子と雌蕊の長さを支配している遺伝子が密接に連鎖しているためと考察している。

Sharma & Boyes (1961) は *S supergene* がソバにも存在すると考えた。ソバにおいても花型と自家不和合性は密接に関係があることが既に知られており、また長花柱花の花粉は短花柱花の花粉よりも小さい事が知られていた。そこで、彼らはソバの *S supergene* には5つのサブ遺伝子、 G : 雌蕊長、 I^s : 雌蕊側 S 遺伝子、 I^p : 花粉側 S 遺伝子、 P : 花粉サイズおよび A : 雄蕊長が座乗していると仮定した。 S 遺伝子座上の長花柱花に連鎖している遺伝子は全て劣性で短花柱花に連鎖している遺伝子は全て優性で働くと考えられ、長花柱花の遺伝子型は $gi^s i^p pa / gi^s i^p pa$ となり、対立遺伝子 s は劣性の状態で雌蕊の長さを長くし、雄蕊を短くする。また、雌蕊および雄蕊側の自家不和合性因子は共に s になる。一方、短花柱花の遺伝子型は $GI^s I^p PA / gi^s i^p pa$ となり、対立遺伝子 S は優性の状態で雌蕊の長さを短くし、雄蕊を長くする。また、雌蕊および雄蕊の自家不和合

性の表現型は共にSになる (Fig.1)。しかしながら、ソバのみならずサクラソウにおいてもこれらサブ遺伝子の存在やそれらの順序および連鎖距離はまだはっきり分かっていない。

もし、普通ソバにこの *S* supergene が存在すると

仮定した場合、長等花柱花個体の遺伝子型は i^s と i^p の間で組換わったものと考えられる。そこで、長等花柱花が *S* supergene 内で組換わってできたのかを明らかにすると同時に、対立遺伝子間の優位性が $S > S^h > s$ となることを解明するために次の研究を行った。

1. 材料および方法

1) 胚培養を用いた自家和合性ソバの作出

自家和合性のソバを作出するため、普通ソバの牡丹そば (BTN) に野生種の *F. homotropicum* (C9139, C9255および C9414) を交配した。*F. homotropicum* の種子は京都大学の西大教授より分譲頂いた。交配後5～7日後に胚を摘出し、70%エタノールで1分間処理した後、2%の次亜塩素酸ナトリウムで5分間処理した。その後、3%ショ糖、1 mg / INAA (naphthalene acetic acid) および0.8%寒天を加えた1/2 MS (Murashige & Skoog) 培地上に置床した。培養は25℃12時間日照のもとで行った。胚培養で得られた自殖系統のうち牡丹そばとC9255を交配して得られた系統をF₈まで自家受粉し、花形と自家和合性がホモ型の系統を作出し、九系SC2(KSC2)と名付けた。この系統を用いて以下に続く実験を行った。

2) 種子稔性、花粉粒径、雌雄蕊長の測定

自家和合性の種子稔性および花器の形態の特徴を調べるために自殖系統のKSC2、普通ソバの牡丹そばと信濃1号および牡丹そばとKSC2を交配したF₁を用いて、それぞれの系統の種子稔性、花粉粒径、雌蕊長および雄蕊長を測定した。種子稔性は花房に袋をかけ、その中で咲いた花数に対する獲得種子数で計算した。雌雄蕊長は1系統あたり3個体を用い、1個体あたり3花利用した。花粉粒径は1系統あたり3個体を用い、1個体あたり50粒の平均で示した。測定は顕微鏡下で写真を撮った後、コンピュータソフトウェア (Mac SCOPE, Mitani Co., Fukui, Japan) を用いて行った。

3) 連鎖解析

S 遺伝子座内に座乗すると考えられる雌雄蕊長、花粉粒径および自家不和合性の遺伝子が連鎖しているかを明らかにするため連鎖解析を行った。解析には長花柱花の牡丹そばに長等花柱花を交配してできたF₁を自殖して得られた140個体からなるF₂分離

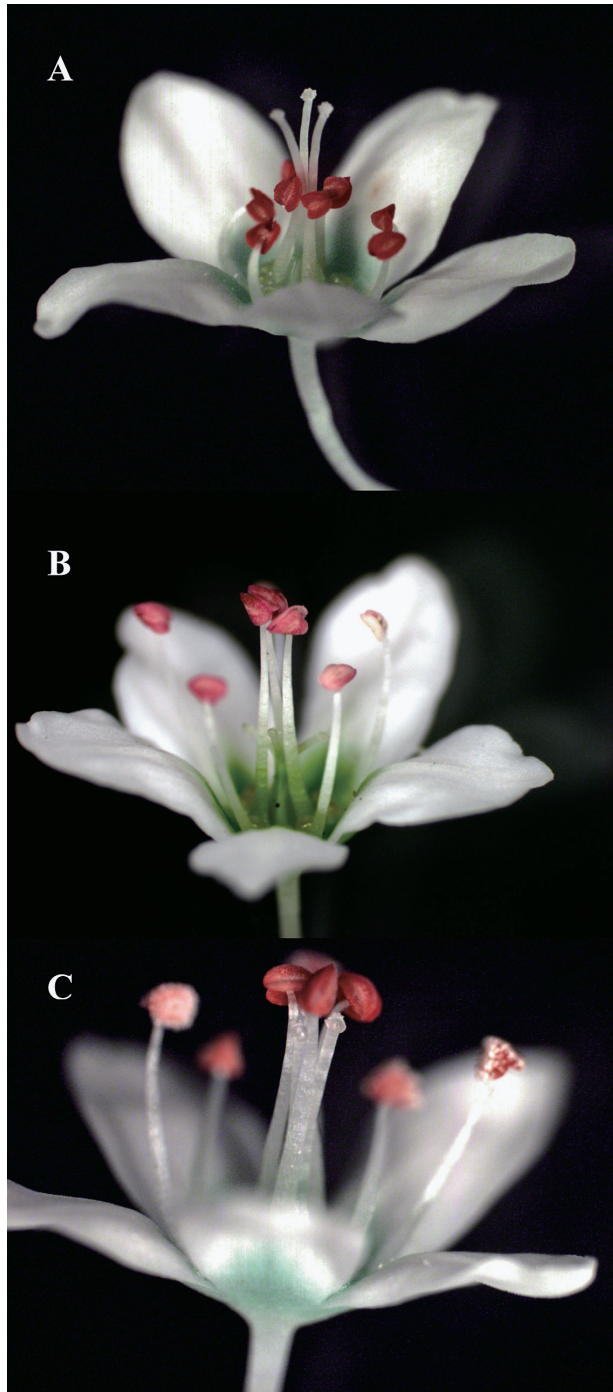


Fig. 1 Flower morphology of pin, thrum and long homostyle. The plants with pin or thrum flower morphology are self-incompatible, and the plant with long-homostyle is self-compatible. A, Pin; B, Thrum; C, Long-homostyle.

集団を用いた。

4) 花粉管伸長観察

自家和合性系統の交雑和合・不和合性を判定するため、花粉管伸長の観察を行った。蕾が付いた枝を切り取り、水を入れたフラスコに立て一晚20℃の暗室に置いた。翌朝、花が咲き始めた時に花を枝から切り離して除雄を行い、0.8%の寒天培地に置床した。除雄後交配を行い、交配してから6および24時間後、雌蕊を切り取り、60℃の1 N 水酸化ナトリウム溶液で30分間処理した後、60℃の0.1%のアニリンブルーで1時間染色した。観察は蛍光顕微鏡(Leica)を用いて行い、1交配組合せ当たり、少なくとも3つの花で行った。

5) 交配試験

花粉管伸長観察で判定した交雑和合性および不和合性が実際の種子生産に反映しているかを明らかにするため、人工交配と昆虫による交配実験を行った。交配母本には遺伝的背景の違いによる影響を考慮し、牡丹そば、信濃1号および鹿屋在来の3品種を用いた。九州地域において、牡丹そばは早生、信濃1号は中生、鹿屋在来は晩生である。手交配は母本に不和合性個体を用いて、除雄することなしに行った。自然環境下において、ソバは普通昆虫を媒介した交配が行われるので、本研究でも蜂およびハエを用いた交配実験を行った。蜜蜂を用いた交配は、1区が畦長4 m、畦幅60cmの2畦からなる区を2反復行った。区は片方の畦には自家和合性個体を10個体、もう片方の畦には短花柱花または長花柱花の自家不和合性個体を10個体植え、外部から虫が入らないように防虫網で覆った。交配は開花期に蜂を網の中に放すことにより行った。ハエを用いた交配は、自家和合性個体と不和合性個体を1個体ずつ密接に植え、外部から虫が入らないように防虫網で覆い、開花期にハエを網の中に放すことにより行った。

6) DNA 分析

短花柱花とKSC2を交配してできた植物体がこの間の交配によってできたことを確認するためにDNA分析を行った。判定はS遺伝子座に連鎖するマーカーを用いて、F₁植物体が両系統の対立遺伝子を持っているかで行った。全DNAはDNeasy Plant Mini Kit (キアゲン)を用いてその説明書に従って抽出した。Aii et al. (1999)に従ってS遺伝子に連鎖しているマーカーSCQ7₈₀₀のプライマーを

合成した。プライマーのシーケンスはフォワードプライマーが5'CCCGATGGTGAATTTGGAGG-3'でありリバースプライマーが5'-CCCGA-TGGTCACTCAAGGTT-3'である。バンドの増幅はAii et al. (1999)の方法に従い、電気泳動はPCR産物をAluIで消化した後、2%のアガロースゲルを用いて行った。

2. 結果

1) 胚培養を用いた自家和合性ソバの作出

3つの*F. homotropicum*系統の花粉を牡丹そばの長花柱花および短花柱花に交配し、雑種ソバの作出を試みた。胚発生は短花柱花または長花柱花と*F. homotropicum*を交配したすべての組合せで確認できた。F₁雑種は短花柱花を母本として交配した方が長花柱花を母本として交配するよりも効率的に雑種を作出することができた(Table 1)。短花柱花を母本にして交配した方が効率的であることはWoo et al (1999)によっても報告されている。作出された自家和合性ソバ系統のうち、C9255を交配することによってできた系統をF₈まで自家受粉し、花型および自家和合性が固定できた系統を九系SC2(KSC2)とし、花粉管伸長観察および交配試験に用いた。

2) 稔性および花の形質

KSC2の花形は雌蕊と雄蕊の長さがほぼ等しい長等花柱花であった(Fig. 1, Table 2)。花房に袋をかけて、それぞれの系統が作出する自殖種子数を調べた結果、長花柱花および短花柱花は全く生産しなかったのに対し、KSC2は自殖種子を生産した(Table 2)。この結果から、*F. homotropicum*の自家和合性対立遺伝子S^hがKSC2に導入されたと考えられた。しかしながら、KSC2の雌蕊は牡丹そばの長花柱花より短く、また、雄しべは短花柱花よりも短かった。これらは遺伝的背景の違いによるものと考えられた。

長花柱花の花粉粒径はSchoch - Bodmer (1934)や建部(1949)の報告にあるように、短花柱花の花粉粒径よりも有意に小さかった(Table 2, Fig. 2)。また、KSC2の花粉粒径とKSC2と牡丹そばを交配してできたF₁の花粉粒径が有意に異ならなかったことから、花粉粒径は主に1つの優性遺伝子によって支配されていることが考えられた。

Table 1. Hybrid seed production by the cross between *F. esculentum* and *F. homotropicum*

Flower morphology of egg parent (<i>F. esculentum</i>)	Pollen parent (<i>F. homotropicum</i>)	No. of pollinations	No. of ovules developed and excised (%)	No. of F ₁ hybrid
Pin	C9139	1105	17 (1.54)	0
Thrum	C9139	3561	273 (7.66)	33
Pin	C9255	2151	107 (4.97)	8
Thrum	C9255	2640	178 (6.74)	37
Pin	C9414	189	7 (3.70)	1
Thrum	C9414	2504	139 (5.55)	25

Table 2. The morphology and seed set of self-incompatible and self-compatible common buckwheat variety

Variety	Flower type	Seed set ^{a)}		Flower morphology		
		No. of bagged flower	No. of obtained seed (%)	Pollen size (μ m) $\pm$ standard error ^{b)}	Style length ^{a)} (mm)	Anther height ^{a)} (mm)
BTN	P	52	0 (0.0)	37.6 $\pm$ 0.4 a ^{c)}	2.08 $\pm$ 0.16	1.03 $\pm$ 0.11
BTN	T	116	0 (0.0)	51.3 $\pm$ 1.5 b	0.66 $\pm$ 0.07	1.97 $\pm$ 0.07
SINA1	P	269	0 (0.0)	37.1 $\pm$ 0.5 a	1.99 $\pm$ 0.10	1.09 $\pm$ 0.05
SINA1	T	317	0 (0.0)	50.9 $\pm$ 0.3 b	0.66 $\pm$ 0.02	1.98 $\pm$ 0.11
KSC2	LH	517	91 (17.4)	48.1 $\pm$ 0.1 bc	1.33 $\pm$ 0.09	1.50 $\pm$ 0.21
BTN/KSC2 (F1)	LH	767	279 (34.0)	45.2 $\pm$ 0.5 c	1.86 $\pm$ 0.06	1.89 $\pm$ 0.05

a) Seed set, style length and anther height were measured using three flowers in 3 plants of each line.

b) Diameter of 50 pollen grains was measured using 3 plants of each line.

c) The same letter indicates that the values are not significantly different according to Tukey's HSD test

(P = 0.05).

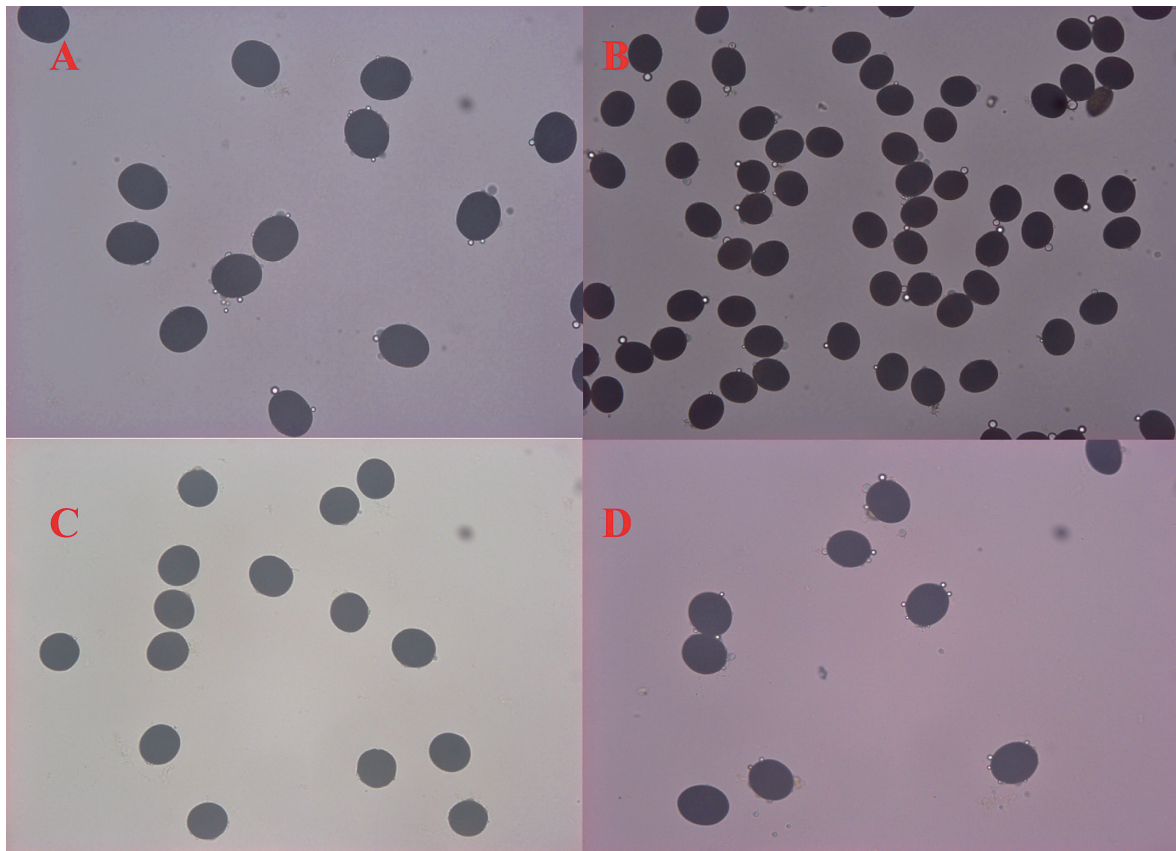


Fig. 2 Pollen grains of pin, thrum, long homostyle and F_1 plants between pin and long homostyle. A, Thrum; B, Pin; C, Long-homostyle; D, F_1 of pin/long homostyle.

3) 連鎖解析

牡丹そばの長花柱花と KSC2 を交配してできた F_2 集団の花型は、長等花柱花と長花柱花が 106 : 34 に分離し、単因子優性の期待分離比 3 : 1 ($\chi^2 = 0.038$, $0.80 < P < 90$) に適合した。自殖稔性および花粉の大きさもそれぞれ 3 : 1 の期待分離比に適合し、すべての形質が完全に連鎖していることが分かった。これらのことから、 S^a 遺伝子座は S 遺伝子座と対立遺伝子であり、自家和合性は S 遺伝子座外の遺伝子によるものでないことが分かった。しかしながら、分離個体の花粉の大きさは短花柱花型と判定された中でも直径 $44.5\mu\text{m}$ から $48.1\mu\text{m}$ まで存在したことから、花粉粒の大きさは環境に応答しやすいかまたは花粉粒径を支配する微働遺伝子が他に存在することが考えられた。

4) 花粉管伸長観察および交配試験による和合・不和合性の検定

長等花柱花の自家和合性が花粉または雌蕊の S 機能の欠如によるものか、または S 遺伝子座内の組換えによるものかを明らかにするため、3つの花形間

で相互交配を行い、花粉管伸長観察を行った。予想される和合性の反応を Fig. 3 に示した。もし、自家和合性系統の花粉管が全ての花型の胚珠までに達した場合、それは花粉の S 機能が欠如していることを意味し、また、自家和合系統の胚珠が全ての花型の花粉管を受け入れるならば雌蕊の S 機能が失われていると考えられる。また、自家和合性が花粉および雌蕊の自家不和合性を保持し、その遺伝子間の組換えに生じていると仮定した場合、自家和合性系統の花粉は長花柱花の雌蕊に対しては和合性であり、短花柱花の雌蕊に対しては不和合性を示す。また、長花柱花の花粉は自家和合性系統の雌蕊に対しては、不和合性であり、短花柱花の花粉は和合性になる。

本実験では、柱頭上における花粉の発芽は 6 時間後、全ての組合せにおいて観察され、長花柱花に短花柱花の花粉をかけた場合およびその逆では、花粉管が胚まで到達するのが確認された。一方、短花柱花に短花柱花の花粉を用いた場合、花粉管の伸長は柱頭内で止まるのに対し、長花柱花に長花柱花の花粉を用いた場合には花粉管の伸長が花柱の約 $2/3$

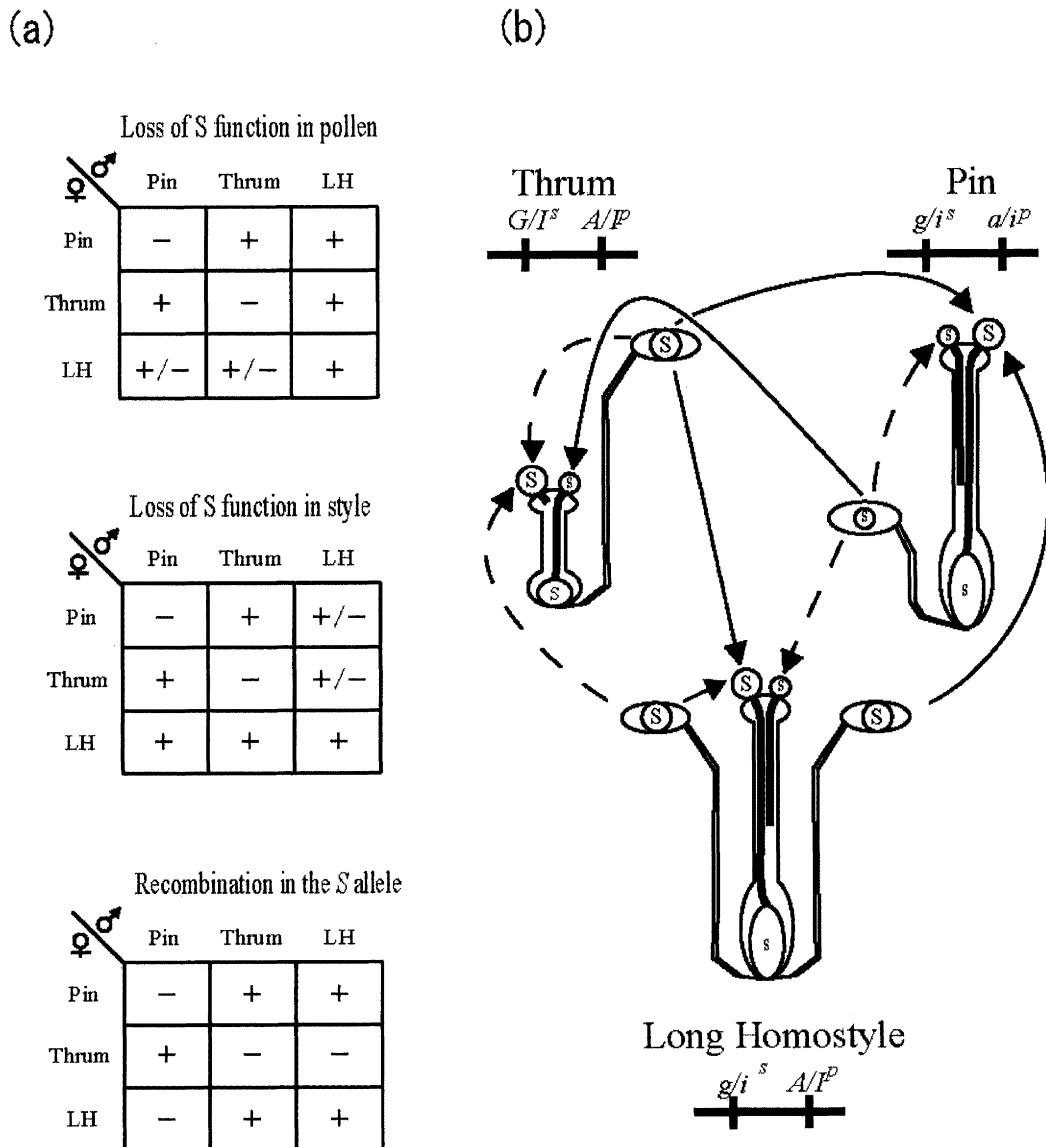


Fig. 3 Expected compatibility interactions between a pin, thrum and long homostyle plant. Expected compatibility interactions caused by loss of S function in pollen or style or recombination in the S allele (a). Model for cross-incompatibility/compatibility by recombination in the S allele (b). Crosses shown by arrows are compatible and by arrows with broken lines are incompatible.

程度のところで止まった。これらの結果は Schoch - Bodmer (1930), 建部 (1950) および Morris (1951) の報告と一致している。

短花柱花の花粉を自家和合性系統 KSC2 に交配した場合、花粉管は 6 時間後の観察で胚珠まで到達したのが確認されたが、長花柱花の花粉を KSC2 に交配した場合は胚珠まで到達しなかった (Fig. 4, Table 3)。また、KSC2 の花粉を長花柱花に交配した場合は、花粉管が胚まで到達しているのに対し、短花柱花に交配した場合は花粉管が胚まで到達していなかった。これらの結果は自家和合性系統におい

ても依然異形花型の自家不和合性機構が働いていることを意味している。すなわち、 S^h 対立遺伝子は S supergene 内の組換えにより生じていることが明らかとなった。

しかしながら、短花柱花の雌蕊に牡丹そばと KSC2 を交配した F_1 の花粉を交配した場合、 F_1 の雌蕊に長花柱花の花粉を交配した場合および短花柱花に KSC2 の花粉を交配した場合に花粉管がまれに胚まで達成していることが確認された (Table 3)。遺伝解析は行っていないが、おそらくこれらは遺伝的背景すなわち自家不和合性の強さを支配する複数

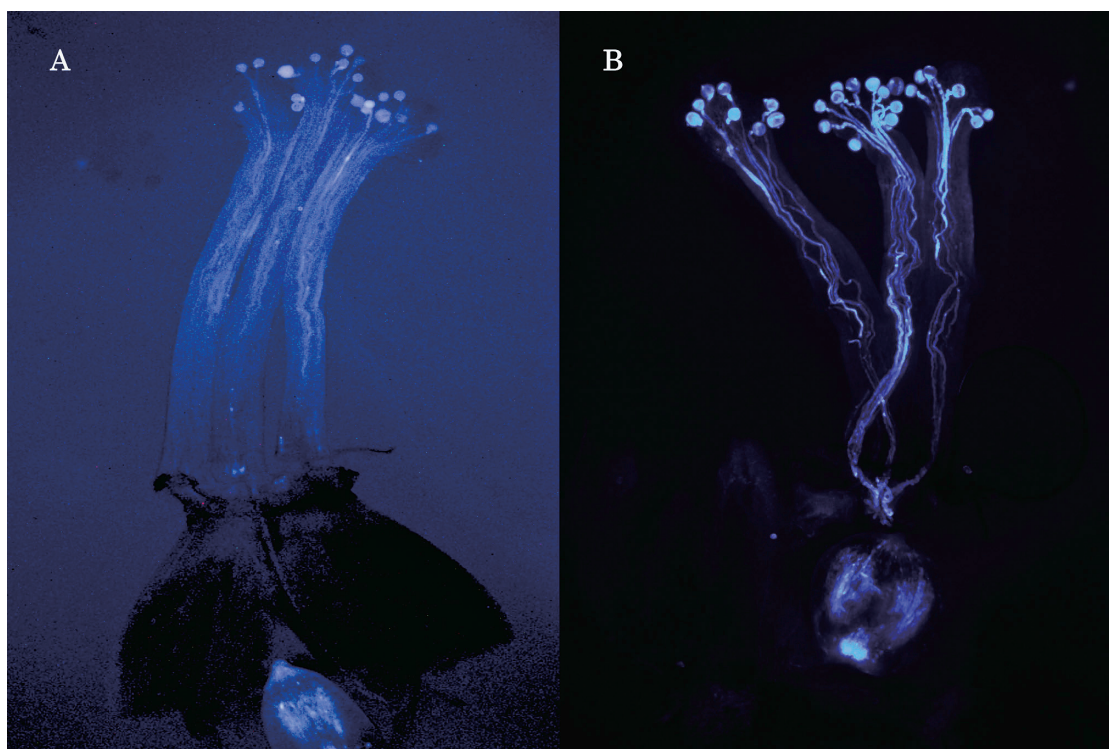


Fig. 4 Pollen tube growth on a long-homostyle self-compatible plant. When self-compatible line was used as female plant, pollen tube growth of pin was stopped in the style (A), pollen tubes of thrum reached the ovule (B).

Table 3. Pollen tube growth in each cross combination

Egg parent	Pollen parent			
	BTN (P)	BTN (T)	KSC2	BTN/KSC2 (F ₁)
BTN (P)	0/3 ^{a)}	3/3	3/3	3/3
BTN (T)	3/3	0/3	0/3 (3/5) ^{b)}	1/3
KSC2	0/3	3/3	3/3	NT
BTN/KSC2 (F ₁)	1/3	3/3	NT	NT

a) Data were show as no. of pollen tubes reaching the ovule/no. of flowers tested.

b) Values in parenthesis is at 24h after pollination.

の微動遺伝子 (Horisaki&Niikura 2004) によるものと推測した。

5) 手交配および昆虫を用いた交配による種子生産
手交配および蜂を用いた交配とも、長花柱花に KSC2 の花粉を交配した場合の獲得種子量は短花柱花に KSC2 の花粉を交配した場合よりも多かった (Table 4)。しかしながら、短花柱花に KSC2 を交配した場合でも、種子が生産された (Table 4, 5)。そこで、ハエの交配で得られた 2 粒を播種し、花型を調査した。その結果 1 粒発芽し、短花柱花の花を付けた。この個体が本当に短花柱花の個体と KSC2 の交配によりできたものかを明らかにするため、*S* 遺伝子座に連鎖する DNA マーカーを用いて確認した。その結果、この植物体は、短花柱花植物由来の遺伝子と KSC2 由来の遺伝子を保有していた (Fig. 5)。おそらく、この個体は先の花粉管伸長観察でも見られた、不和合性反応から逃れて受精した個体と考えられた。

3. 考察

自家不和合性植物が自家和合性植物になるにはさまざまな原因がある。例えば、突然変異による花粉または雌蕊の認識特異性の消失、*S* 遺伝子座外の変異遺伝子による変異または *S* 遺伝子座内の雌蕊の認識特異性を支配する遺伝子と花粉の認識特異性を支配する遺伝子の間での組換えによるものなどである。*F. homotropicum* に由来する *S^a* 対立遺伝子が自家和合を発現する理由は明らかとなっていない。本研究で、自家和合性系統の花粉は短花柱花の雌蕊に対しては不和合性で長花柱花の雌蕊に対しては和合性であることを見出し、さらに、長花柱花の花粉は自家和合性系統の雌蕊に対して不和合性であり、短花柱花の花粉は自家和合性系統の雌蕊に対して和合性であることを明らかにした。

また、本研究から、自家和合性が花型および花粉粒大と組換えることなく共に分離することを明らかにした。この結果は雌蕊の不和合性遺伝子 *i^r* が雌蕊の長さを支配している遺伝子と密接に連鎖している、或いは、多面発現していることを意味し、また花粉の不和合性遺伝子 *i^r* が雄蕊の長さを支配する遺伝子 *a* と同じく密接に連鎖しているか多面発現しているかを意味する。すなわち、ソバの自家不和合性は明らかに *S* supergene により支配され、*S^a* 遺伝子は *i^r*

と *i^r* の間の組換えによると説明できる。*S* 遺伝子座間の優劣関係もこれらの遺伝子型で説明できる (Fig. 6)。すなわち、花の形態はこれらの遺伝子個々の優劣関係で説明できる。これら 5 つの遺伝子の正確な順序は推定できなかったが、自家和合性系統の花粉の大きさが短花柱花型 (Table 2) であることを考えると、花粉粒の大きさを支配する遺伝子 *p* は花粉の不和合性遺伝子 *i^r* および雄蕊の長さを支配する遺伝子 *a* に近いと推測された。

Ohnishi & Matsuoka (1996) および Yasui & Ohnishi (1998) は分類学的研究から *F. homotropicum* は普通ソバの祖先種である *F. esculentum* ssp. *ancestralis* に由来する可能性が高いと報告している。*S^a* 対立遺伝子は *S* supergene 内の組換えにより生じているとする本研究の結果はこれらの報告を支持するものである。ソバ以外で *S* supergene 内の組換えにより和合種ができたと推測されている植物にはサクラソウがある。サクラソウ属にはソバ属と同じく同形花と異形花を示す種が存在する。Ernst (1955) は、同形花種と異形花種の交雑不和合性を調査した結果からいくつかの同形花種は異形花種から由来すると推定し、Wedderburn & Richards (1992) は複数の同形花種は *S* 遺伝子座内の組換えにより生じたと報告している。

F. esculentum と *F. homotropicum* を交配して *F₁* 雑種を作出する際、短花柱花を母本とした方が長花柱花を母本とした時よりも高い率で成功した。同じような現象が Woo et al. (1999) によって報告されている。これはおそらく *S* 遺伝子と連鎖した胚発生を支配する遺伝子が post-zygotic に働いたためと考えられる。post-zygotic に働く自家不和合性はいくつかの植物で報告されている (Crowe 1971, Lipow & Wyatt 2000)。ソバの *S* supergene にはおそらく現在までに報告されている 5 つの遺伝子の他に、まだ複数の遺伝子が連鎖していると考えられる。実際サクラソウでは花粉粒の大きさの優劣性を決定する遺伝子や致死遺伝子その他にも複数の遺伝子が *S* supergene に座乗していると報告されている (Kurian & Richards 1997)。

本研究では、一般に不適法組合せと考えられる組合せの短花柱花雌蕊と長等花柱花の花粉、長等花柱花雌蕊と長花柱花の花粉および *F. esculentum* 雌蕊と *F. homotropicum* の花粉の組合せで種子を得るこ

Table 4. Seed set obtained in the cross between self-incompatible lines and the self-compatible line by hands.

Female	Male	No. of flowers crossed	No. of obtained	F ₁ seeds	(%)
BTN (P)	KSC2	33	7		21.2
BTN (T)	KSC2	30	0		0.0
BTN (P)	BTN/KSC	22	5		22.7
BTN (T)	BTN/KSC	26	1		3.9
SNA (P)	KSC2	65	5		7.7
SNA (T)	KSC2	63	1		1.6
SNA (P)	BTN/KSC	47	15		31.9
SNA (T)	BTN/KSC	53	5		9.4
KNY (P)	KSC2	38	13		34.2
KNY (T)	KSC2	62	2		3.2

Table 5. Seed set obtained in the cross between self-incompatible lines and the self-compatible line with bees and flies.

Egg parent	Pollen parent	Bees			Flies				
		No. of plants	Repeat	Average no. of F ₁ seeds	F ₁ seeds		Flower morphology		
					No. of seeds	No. of seeds germinated	P	T	LH
BTN (P)	KSC2	10	2	8.8	24	22	1	0	21
BTN (T)	KSC2	10	2	4.5	2	1	0	1	0

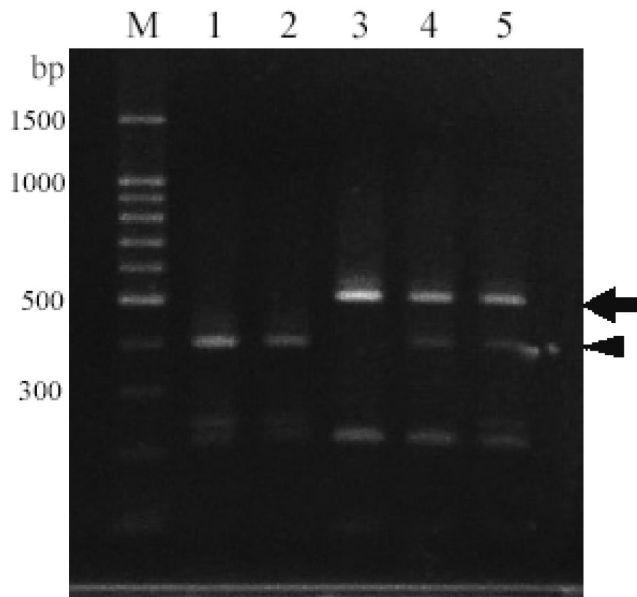


Fig. 5 Confirmation of hybridity with the *S* locus-linked marker. Lane M shows molecular markers. Lanes 1 and 2 are pin and thrum plants, respectively, of *F. esculentum*. Lane 3 is line KSC2. Lanes 4 and 5 are F_1 hybrids produced by the cross between pin and KSC2, and between thrum and KSC2, respectively. The arrow indicates a polymorphic band derived from KSC2, and the arrowhead indicates a polymorphic band derived from *F. esculentum*.

とができた。SI x SC ルール (de Nettancourt 2001) によると、自家不和合性種の雌蕊に和合種を交配した場合は不和合となるがその逆の組合せでは和合になる。ここでは、*F. esculentum* に *F. homotropicum* を交配した場合に不適法組合せとなる (Hirose et al 1995)。今回の結果は、これらの不和合性の障壁から逃れて来た結果と考えられる。建部 (1953) は長花柱花型で高自殖稔性を見出した。その系統は自家和合性系統と短花柱花個体の相反交雑で種子を作ると報告している。Sharma & Boyes (1961) は短花柱花型の和合性系統を見出している。この系統は和合性系統と短花柱花個体の相反交雑では種子を作出できなかったと報告している。ソバはサクラソウが持っているのと同じような不和合性の強弱を支配する量的遺伝子を持っている (Mather & de Winton 1941) と推測される。

4. まとめ

普通ソバは長花柱花と短花柱花を持つ2形花型の自家不和合性作物である。ソバの自家不和合性、花型および花粉粒の大きさは *S* supergene により支配されていると考えられている。

本研究において、*F. esculentum* と *F. homotropicum* を交配して胚培養技術で自家和合性のソバ系統を作出した。自家和合性系統の花形は長等花柱花

Genotype of the <i>S</i> locus					
	<i>s/s</i>	<i>S/s</i>	<i>S^h/s</i>	<i>S/S^h</i>	<i>S^h/S^h</i>
Genotype of style length (<i>g</i>) and anther height (<i>a</i>)	<i>ggaa</i>	<i>GgAa</i>	<i>ggAa</i>	<i>GgAA</i>	<i>ggAA</i>
Phenotype of style length (<i>g</i>) and anther height (<i>a</i>)	ga	GA	gA	gA	gA
Flower morphology	Pin	Thrum	Long Homostyle	Thrum	Long Homostyle
Dominance relationship of the <i>S</i> allele	—	$s < S$	$s < S^h$	$S^h < S$	—

Fig. 6 Dominance relationships between *s*, *S* and *S^h* alleles based on the dominance relationships of the style length, *g*, and anther height, *a*, genes.

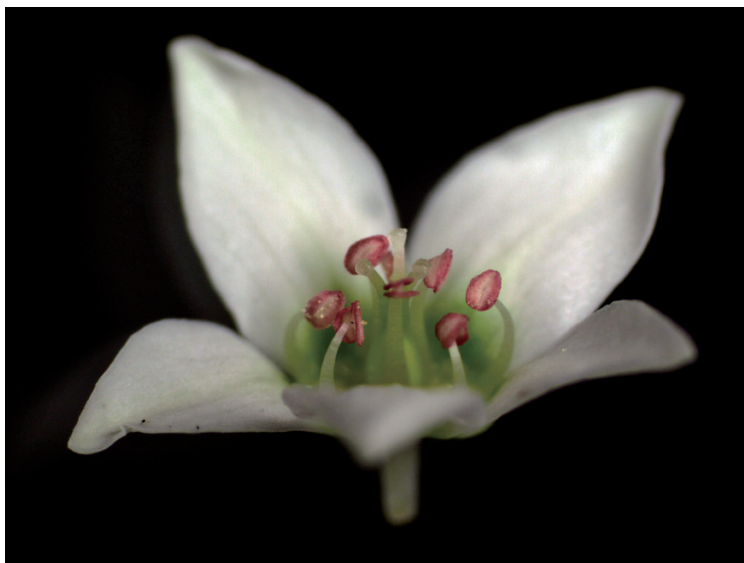


Fig. 7 Flower type of Pennline 10. Flower morphology is short homostyle.

型で花粉サイズは短花柱花のものに近かった。長花柱花と長等花柱花を交配してできた F_1 の花粉粒の大きさは長等花柱花型に近く、花粉粒の大きさは花型と組換えることなく分離した。自家和合性植物の花粉は長花柱花の雌蕊に対しては和合性であり、短花柱花のそれには不和合性であった。しかしながら、長花柱花の花粉は自家不和合性植物の雌蕊に対しては不和合性であり、短花柱花の花粉は和合性であった。

これらの結果から自家和合性対立遺伝子 S^h は異形花型の不和合性機構を保持しており、それは S supergene 内の組換えにより生じたと推定された。

Ⅲ. Pennline 10における高自殖稔性の 遺伝様式説明

現在までに自然または人工的によって高い自殖稔性を示すソバ系統が作出されたという例がいくつか報告されている。Schoch-Bodmer (1934) は長花柱花をもつ自家和合性の存在を初めて報告している。建部 (1953) も自然集団中から長花柱花の自殖種子稔性が高い系統を見出している。また、Sharma & Boyes (1961) は普通ソバに突然変異を起こし、短花柱花の自家和合性系統を作出している。しかしながら、彼らが作出した系統を用いて新しく育成された登録品種は存在しない。Marshall (1970) は普通ソバ集団中に高い自殖稔性を示す変異系統を見つけ、Pennline 10と名付け、品種登録している。Marshall

(1979) は Pennline 10を始めとする多くの自殖系統を作出し、自殖系統は原系統に比べ、自殖弱勢が原因と思われる形態的特性や収量性などの面において減少が見られたと報告している。その為かは明らかでは無いが、この Pennline 10が保有する高自殖稔性遺伝子を利用して、自家和合性の品種開発は彼以降全く行われていない。さらに、Pennline 10が保有する自殖性遺伝子についての遺伝情報は彼自身がおそらく2つ以上の遺伝子に支配されていると推測している以外は全く無い。

そこで、本研究では Pennline 10が保有する高自殖稔性が S^h 対立遺伝子と同じように S 遺伝子座の対立遺伝子の1つによるものか、または S 遺伝子座以外の遺伝子により制御されているのかを明らかにするために、花粉管伸長観察と F_1 および F_2 分離集団における花型の分離を調査した。

1. 材料および方法

1) 植物材料

高い自殖稔性を示す系統には Pennline 10および九系 SC2(KSC2) の2つを用いた。Pennline 10は米国農務省農業研究所 (USDA-ARS) より、分譲頂いた。これらの自殖性系統に加え、普通ソバの牡丹そばおよび信濃1号を使用した。Pennline 10は雌雄蕊長が共に短い短等花柱花である (Fig. 7)。

この Pennlin 10を牡丹そばまたは信濃1号に交配し F_1 を得た。信濃1号と Pennline 10を交配して得

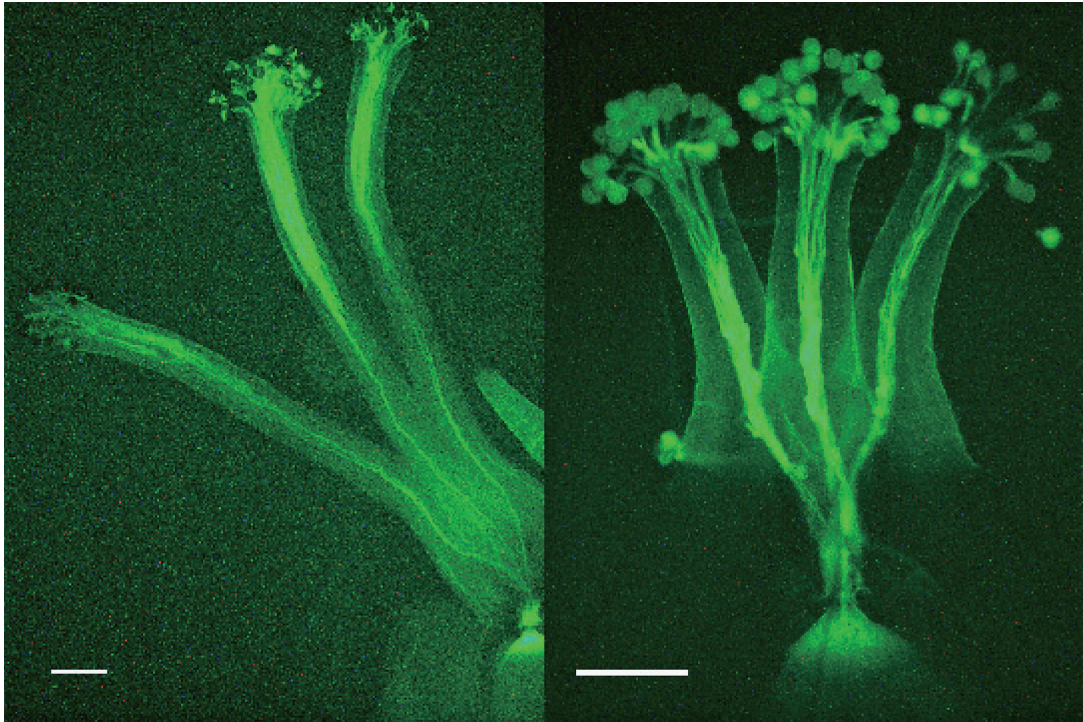


Fig. 8 Pollen tubes of Pennline 10 reaching the base of the pin style (A) and the thrum style (B). Bars indicate 0.2mm.

られた長花柱花型の F_1 を F1P と名付け、短花柱花型の F_1 を F1T と名付けた。さらにこれら F_1 を自殖して F_2 を得た。

2) 花粉管伸長観察

Pennline 10の交雑和合および不和合性を明らかにするため、花粉管伸長観察を行った。花粉の伸長観察は前節で行った方法を改良して行った。蕾が付いた枝を切り取り、水を入れたフラスコに立て一晚 20°C の暗室に置いた。翌朝、花が咲き始めた時に花を枝から切り離し除雄を行い、0.8%の寒天培地に置床した。除雄後交配を行い、交配してから6および24時間後、雌蕊を切り固定液（酢酸：エタノール = 3 : 7）に浸し固定した。蒸留水で15分間洗浄後、 60°C の1 N 水酸化ナトリウム溶液で120分間処理した。蒸留水で濯いだ後、 60°C の0.1%のアニリンブルーで1時間染色した。染色後、蒸留水で洗浄し、蛍光顕微鏡（Leica）を用いて観察した。

2. 結果

1) Pennline 10の交雑和合・不和合性

Pennline 10の花粉を長花柱花、短花柱花および長等花柱花の雌蕊に交配した時、花粉管は胚珠まで到達した（Fig. 8, 9）。すなわち、Pennline 10の花

粉は明らかに全ての花柱型に対して和合性であり、これは Pennline 10の花粉側の認識特異性機能が失われていることを示唆している。一方、さまざまな花形の花粉を Pennline 10に交配した場合、花粉管伸長は不安定であった（Fig. 9）。さらに、長花柱花と F1P、F1P と F1P および KSC2 と F1P を交配した場合も花粉管伸長による不和合性判定は不安定であった。しかしながら、他の交配組合せにおける花粉管伸長の不和合性判定は明確であった。

2) F_1 および F_2 植物における花型調査

花粉側の S 機能の欠失が *S* supergene 内の *i^p* 遺伝子の欠失によるものかまたは *S* supergene 以外の遺伝子によるものかを明らかにするため、 F_1 および F_2 植物の花形を調査した。牡丹そばと信濃1号の長花柱花および短花柱花のそれぞれの雌蕊に、Pennline 10の花粉を手交配することにより合計25粒の F_1 種子を得た。これをポットに植え、ガラス室またはグロースチャンバー内で栽培した。短花柱花を母本に用いた場合、 F_1 植物の花形は短花柱花と長花柱花が分離した（Table 6）。そして、長花柱花を母本にした場合には、 F_1 植物の花型は全て長花柱花であった（Table 6）。牡丹そばと Pennline 10の交配によってできた F_1 は全て自殖種子を作った。しかし、

Table 6. Flower morphology of F₁ plants

Cross-combination		Flower type of F ₁ plants		
Egg parent	Pollen parent	Thrum	Pin	Total
Botansoba (T)	Pennline 10 (SH)	3	2	5
Botansoba (P)	Pennline 10 (SH)	0	4	4
Shinano 1 (T)	Pennline 10 (SH)	6	3	9
Shinano 1 (P)	Pennline 10 (SH)	0	7	7

Table 7. Flower type of F₂ plants

Line (Cross combination)	Flower type					
	F ₁	F ₂				Total
		Thrum	Pin	Short-Pin	Short-Homostyle	
02AL10	Thrum	6	2	3	0	11
02AL11	Thrum	19	7	9	2	37
02AL12	Pin	0	48	27	1	76
02AL13	Thrum	33	21	3	0	57
02AL14	Pin	0	24	7	3	33
02AL15	Pin	0	17	1	1	19
02AL16	Pin	0	18	14	7	39
02AL17	Pin	0	25	4	2	31

花粉は長等花柱花の雌蕊に対して不和合性となり、その相反交雑においても不和合性となるはずである (Fig.10)。さらに、短花柱花と短等花柱花の交配によってできた F_1 は短花柱花か短等花柱花になり (Fig.11)、長花柱花と短等花柱花を交配した場合、 F_1 は全て短等花柱花になるはずである (Fig.11)。しかしながら、本研究において Pennline 10 の花粉は全ての花形に対して和合性であり、しかも、短花柱花と Pennline 10 を交配した F_1 には短等花柱花個体は現れなかった。さらに、長花柱花と Pennline 10 を交配した場合の F_1 には唯一、長花柱花のみが現れ、短等花柱花は現れなかった。これらの結果が

ら Pennline 10 が保有する短等花柱花は *S* supergene 内の組換えによって生じたものではないと推定された。

Pennline 10 の自家和合性が *S* supergene 内の I^P および *A* の欠失によって起ったとすると、短等花柱花と Pennline 10 を交配してできた F_1T はその次代では短花柱花と短等花柱花が 3 : 1 に分離するはずである。また、短花柱花または長花柱花と Pennline 10 を交配してできた長花柱花型の F_1 (F_1P) は次代では短等花柱花と長花柱花が 3 : 1 に分離するはずである。しかしながら、 F_1T 由来の F_2 には長花柱花個体が現れ、さらに全ての F_2 集団に長

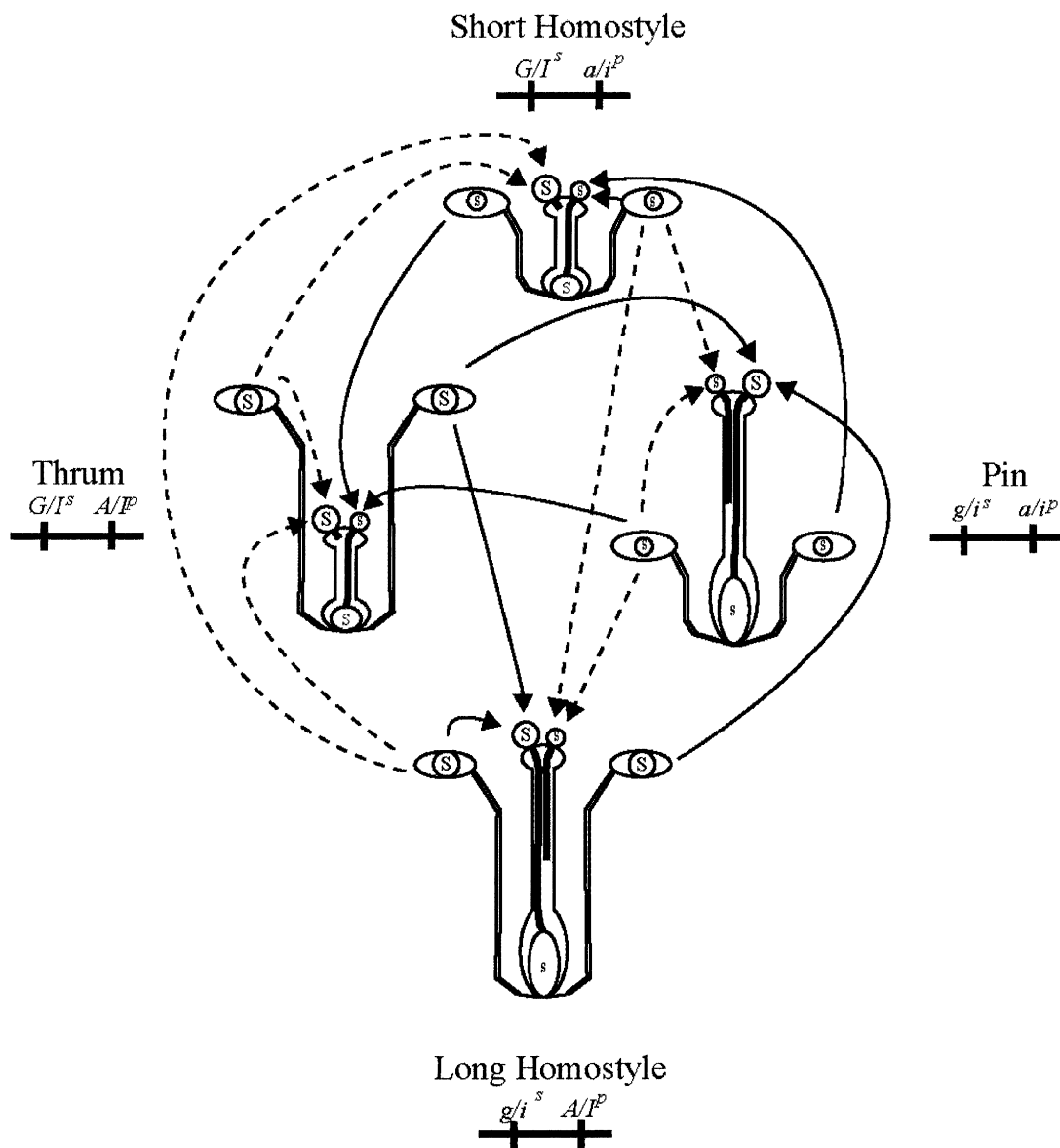


Fig. 10 Expected compatibility interactions among a pin, thrum, long homostyle and short homostyle plant. Crosses shown by arrows are compatible cross and arrows with broken lines are incompatible cross.

	Genotype of the <i>S</i> locus *									
	<i>s/s</i>	<i>S/S</i>	<i>S^h/S^h</i>	<i>S^{sh}/S^{sh}</i>	<i>S/s</i>	<i>S^h/s</i>	<i>S^{sh}/s</i>	<i>S/S^h</i>	<i>S/S^{sh}</i>	<i>S^h/S^{sh}</i>
Genotype of style length (<i>g</i>) and anther height (<i>a</i>)	<i>ggaa</i>	<i>GGAA</i>	<i>ggAA</i>	<i>GGaa</i>	<i>GgAa</i>	<i>ggAa</i>	<i>Ggaa</i>	<i>GgAA</i>	<i>GGaa</i>	<i>GgAa</i>
Phenotype of style length (<i>g</i>) and anther height (<i>a</i>)	ga	GA	gA	Ga	GA	gA	Ga	GA	GA	GA
Flower morphology	Pin	Thrum	LH	SH	Thrum	LH	SH	Thrum	Thrum	Thrum
Dominance relationship of the <i>S</i> allele	—	—	—	—	<i>S</i> > <i>s</i>	<i>S^h</i> > <i>s</i>	<i>S^{sh}</i> > <i>s</i>	<i>S</i> > <i>S^h</i>	<i>S</i> > <i>S^{sh}</i>	—

Fig. 11 Expected dominance relationships among *s*, *S*, *S^h* and *S^{sh}* alleles based on the dominance relationships of the style length, *g*, and anther height, *a*, genes. The *S^{sh}* are tentatively designated here if short homostyle are occurred by the recombination in the *S* supergene.

* : Genotypes of *S/s* is normal type for thrum under natural environment. Genotypes of *S/S* and *S^h/S^{sh}* plants are tentatively designed here, because these plants should not be produced by self-incompatibility action.

花柱花よりも雌蕊が短い花型が出現した。以上のことと、F1Pの自殖後代に短花柱花の個体が出現しなかったことを考えると、Pennline 10の*S*遺伝子座は長花柱花型の*s*であり、*S*遺伝子座以外に雌蕊長を支配する遺伝子が存在すると考えられた。

*S*遺伝子座以外の主働または微働遺伝子により、自家不和合性が失われることは多くの植物で報告されており、アルサイクロローバ (Townsend 1969)、アブラナ科植物 (Nasrallah & Wallace 1968, Hinata et al. 1983) およびペチュニア (Tsukamoto et al. 2003) などがあげられる。本研究ではF₁の花型が長花柱花または短花柱花であったため、これらの変更遺伝子はヘテロのため働かなかったと考えられた。しかしながら、長花柱花にF1P, F1PにF1PおよびKSC2にF1Pの交配組合せの場合花粉管伸長は安定していなかったことを考えると、自家不和合性は不完全優性かまたは環境に左右されると考えられる。F₂集団でみられた中間型の花型はおそらく変更遺伝子のいくつかホモ化して出てきたと考えられる。そして、完全な短等花柱花はこれらの量的遺伝子がすべてホモの状態になったときに出現すると考えられた。

本研究ではPennline 10を雌蕊側とした場合の他の花型との和合性・不和合性反応を明らかにすることができなかった。Pennline 10を自殖した場合に花粉管が胚までに到達しなかった理由は、量的遺伝子や様々な環境により影響されたのかもしれない。

Pennline 10を雌蕊とした場合の和合性および不和合性を明らかにするには新たな研究が必要である。

自家不和合性の強弱は量的遺伝子により支配されているとする報告は多い (Nasrallah & Wallace 1968, Crowe 1971, Richards & Thurling 1973, Horisaki & Niikura 2004)。おそらくPennline 10の高自殖稔性はこれらの遺伝子によるものと推測した。さらに、ソバの種子生産は日長や温度に影響され、遺伝子の発現はさまざまな環境条件に影響される。自家不和合性の強弱のQTL解析はまだソバでは行われていない。QTL解析は異形花型自家不和合性機構を解明するためのさらなる情報を提供してくれると考えられる。

4. まとめ

異形花型自家不和合性花型、花粉粒径および自家不和合性は*S* supergeneにより支配されていると考えられている。本章では長等花柱花の九系SC2と短等花柱花のPennline 10の2つの高自殖稔性系統を用いて、Pennline 10の高自殖稔性が九系SC2と同じであるかを調査した。

Pennline 10の花粉は全ての花型の雌蕊に対して和合性であった。長花柱花または短花柱花とPennline 10を交配してできたF₁は長花柱花と交配した場合は全て長花柱花であったのに対し、短花柱花と交配した場合は長花柱花と短花柱花個体が出現した。F₁を自殖してできたF₂集団の花型の分離を調

査したところ、全ての集団に長花柱花個体が見られ、また花柱の長さが長花柱花より短い短等花柱花より長い中間型の花型が見られた。また、長花柱花と Pennline 10 を交配してできた F₂ 集団には短花柱花個体が出現してこなかった。

これらのことから、Pennline 10 の高自殖稔性は九系 SC2 の機構とは異なり、長花柱花と同じ *s* 対立遺伝子を持っており、Pennline 10 の短等花柱花は *S* 遺伝子座とは異なる量的遺伝子により支配されていることが推定された。

Ⅳ. 子実脱落性の遺伝学的解明

前章までに、普通ソバと交配が可能な自家和合性ソバ系統を作出したことを報告した。しかしながら、交配親に脱粒性である近縁野生種 *F. homotropicum* を使用したため、ほとんどの自家和合性系統が脱粒

性を示した。ソバの脱粒性は生理形態学的に大きく分けて2つに分類することができる。第1は枝梗に離層を形成 (Fig.12) して容易に切断が生ずる型で、野生種に見られる (Oba et al. 1998a)。第2は離層を形成しない型で栽培種に見られる (Oba et al. 1998b)。本稿では混乱を避けるため、前者を子実脱落性と呼び、後者を脱粒性と呼ぶ。また、子実を脱落しないことを非脱落性と呼び、脱粒程度が低いことを難脱粒性と呼ぶ。一般に野生種由来の子実脱落性は1ないし2つの遺伝子に制御されていることが多く (Hancock 1992)、オオムギでは2つの補足遺伝子により制御されている (Takahashi 1955, 1963)。この子実脱落性とは異なり、脱粒性は量的遺伝子に支配されていることが多い。子実脱落性は登熟期になると、ほとんどすべての種子を落とす (Ohnishi 1999) ため収穫は皆無となる。すなわち、

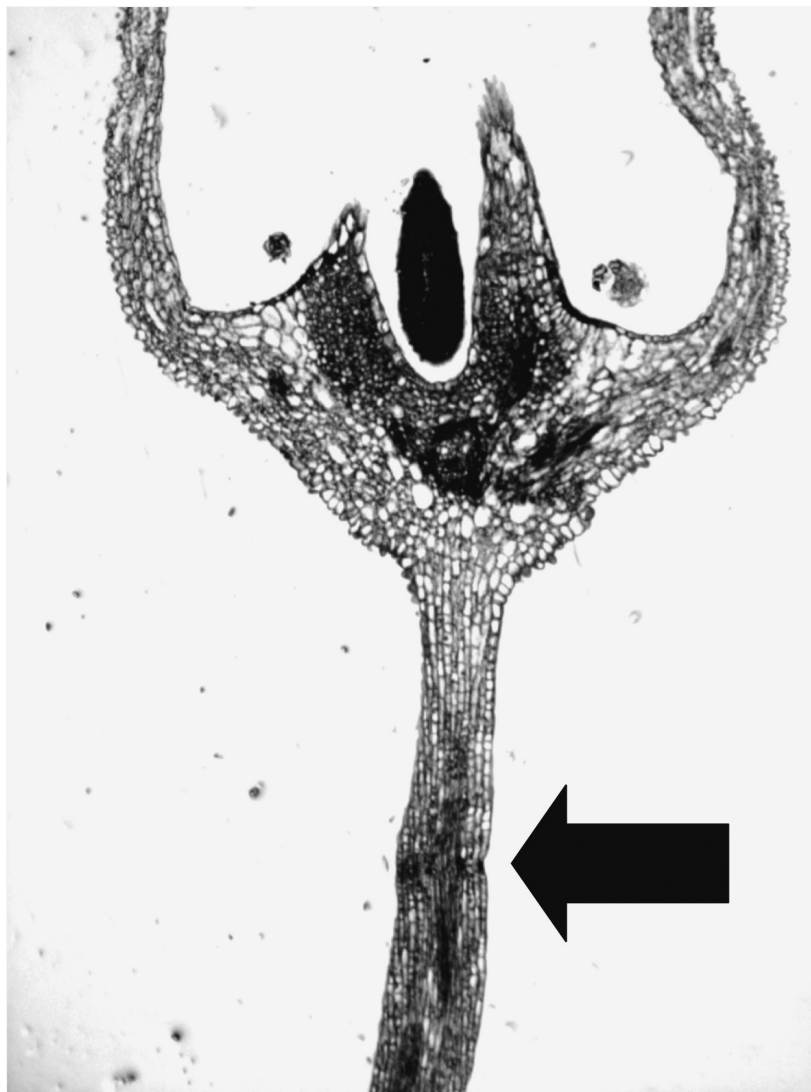


Fig. 12 Abscission zone of brittle pedicel line in buckwheat. An arrow indicate the abscission zone.

この形質を取り除かない限り *F. homotropicum* を交配親とした自家和合性品種の開発はあり得ない。

ソバの脱粒性に関する栽培生理学的研究は現在までに多く成されてきた。Oba et al. (1998b) はソバの脱粒性は枝梗の強度と関係し、その強度は種子の成熟の段階により影響されると報告している。また枝梗の強度はその直径と高い相関があることを明らかにしている。また、Funatsuki et al. (2000) は種子の成熟と脱粒性の関係について調査し、脱粒は種子が成熟する前に始まることを明らかにしている。その一方で、子実脱落性に関する研究はそれほど多くは成されていない。しかしながら、Ohnishi (1999) は、普通ソバの祖先種である *F. esculentum* ssp. *ancestralis* の非脱落性は劣性の 1 遺伝子に支配されていると報告している。また、Yasui et al. (2004) は、*F. homotropicum* に由来する子実脱落性は 1 つの優性遺伝子により制御され、その遺伝子は *S* 遺伝子座に連鎖していると報告している。

筆者らは子実非脱落性の自家和合性ソバ系統を作出する過程でソバの子実脱落性は 1 遺伝子支配でないことを確認した。そこで、子実非脱落性の自家和合性系統を確実に育成するため、この子実脱落性の遺伝様式を遺伝解析により明らかにすることとした。

なお以下に解析する遺伝子に関しては、*F. homotropicum* 由来の子実脱落性を解析するため離層形成の子実脱落性を脱落性と呼び、栽培型を非脱落性と呼ぶ。

1. 材料および方法

1) 植物材料および連鎖解析

普通ソバの牡丹そば、自家和合性の九系 SC2 (KSC2) および 01AMU2 を脱落性の遺伝様式解明のための材料とした。KSC2 と 01AMU2 は兄弟系統であり、第 2 章でも述べたが、これらの系統は牡丹そばと *F. homotropicum* を交配して胚培養を用いて F_1 を養成し、その後自家受粉により育成された。両系統は脱落性と非脱落性が依然分離する F_5 世代で分けられ、KSC2 は F_8 世代まで、01AMU2 は F_7 世代までさらに自殖を進めた。KSC2 は非脱落性であり、01AMU2 は脱落性である。KSC2 の染色体の数は 16 (Fig.13) で普通ソバと同数であり、また、第 2 章において KSC2 と長花柱花の牡丹そばを交配して作出された F_2 集団の花型の分離が長等花柱花と長花柱花が 3 : 1 に分離したことから、KSC2 は 4 倍体でないことが分かる。 F_2 集団は KSC2 および 01AMU2 を牡丹そばへ交配し、開花期に F_1 の蕾に

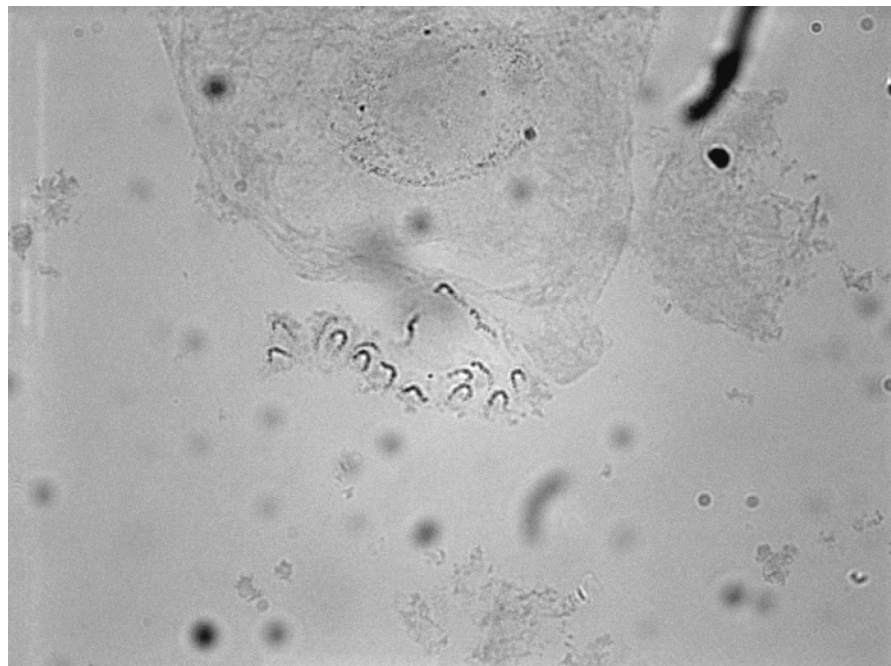


Fig. 13 Mitotic chromosomes of the self-compatible buckwheat line, KSC2. Chromosome samples were prepared by the acetocarmine squash technique. Number of chromosome of KSC2 is 16 same as common buckwheat ($2n=16$).

袋をかけ、自殖により作成した。脱落性の調査は F_1 および F_2 両世代で行い、また同時に花型の分離も調査した。 S 遺伝子座と子実脱落性遺伝子座の *sht1* との連鎖距離は牡丹そばと01AMU2を交配してできた394個体よりなる F_2 分離集団を用いて、最尤法により求めた。

2) 子実脱落性の判定

脱落性は自家和合性系統および F_1 植物においてはそれぞれの花房に袋をかけ、登熟期に自殖種子中何粒枝についているかで判定した。自家不和合性系統については登熟前種子に袋をかけ、登熟期に登熟種子中何粒が枝についているかで判定した。 F_2 植物においては、成熟期に植物体を軽く叩いた後の、登熟種子の枝への付着の有無で判定した。

3) 普通ソバ集団中における対立遺伝子 *Sht2* 存在有無の調査

普通ソバ集団中における子実脱落性遺伝子座の *sht2* に *Sht2* と共に *sht2* 対立遺伝子が存在するか否かを確かめるため、普通ソバ6品種、Bol' shevik 4, Minchanka, Kazanskaya Krupnozernaya, 関東1号, 信濃1号および開田在来それぞれ1個体をKSC2と交配し、その F_1 が脱落性か非脱落性かを調査した。旧ソビエトに由来する Bol' shevik 4, Minchanka および Kazanskaya Krupnozernaya の種子は生物資源研究所より分譲頂いた。

2. 結果

脱落性系統の種子はほとんどすべて枝から落ちるため、脱落性の判定は容易にできた (Fig.14, Table 8)。牡丹そばは64粒中59粒が、またKSC2は自殖種子55粒中53粒が枝に付着し、非脱落性であることが確認された (Table 8)。しかしながら、その F_1 および牡丹そばと01AMU2を交配してできた、両 F_1 植物はすべて脱落性を示した (Table 8)。

牡丹そばと01AMU2を交配してできた F_2 分離集団の脱落性と非脱落性は293:101に分離し、1遺伝子支配の期待分離比3:1に高い確率で一致した (Table 9)。このことから、牡丹そばの非脱落性は劣性の1遺伝子に支配されていると考えられた。ここでは、この遺伝子を Ohnishi(1999) および Yasui et al. (2004) によって名付けられた *non-seed shattering* (*sht*) に番号を付け *non-seed shattering 1* (*sht1*) と名付けた。一方、牡丹そばにKSC2を交

配してできた分離集団では脱落性と非脱落性が266:197に分離し、2つの独立遺伝する期待分離比9:7に高い確率で当てはまった (Table 9)。このことから、KSC2の非脱落性は牡丹そばの非脱落性遺伝子とは異なる劣性の1遺伝子に支配されていることが分かった。ここでは、*non-seed shattering 2* (*sht2*) と名付けた。すなわち、牡丹そばとKSC2を交配してできた F_1 の脱落性は独立遺伝する *Sht1* と *Sht2* の2つの補足遺伝子の働きによることと推定された (Table 8)。牡丹そばと01AMU2を交配してできた F_2 集団の分離から、脱落性と自家和合性が連鎖していることが推定された。この集団を用いて、花型の分離を調査した。先の章でも述べたが長等花柱花を支配する対立遺伝子 S^h は長花柱花を支配する対立遺伝子 s に対して優性である (Woo et al. 1999)。分離調査の結果、長等花柱花をもつ個体と長花柱花を持つ個体が296:98に分離し、1遺伝子支配の期待分離比に高い確率で当てはまった (Table 10)。そこでこの集団を用いて、非脱落性遺伝子座 *sht1* と自家不和合性遺伝子座 S の間の組換え価を推定したところ、 S 遺伝子座と *sht1* 遺伝子座の組換え価は最尤法より 5.46 ± 1.18 (%) と推定できた。

さらに、普通ソバ集団中での *sht2* 対立遺伝子存在の有無を知るため、KSC2を普通ソバと交配し、 F_1 世代で脱落性を調査した。普通ソバ個体に *sht2* 遺伝子が存在すれば F_1 で非脱落性となり、*Sht2* 遺伝子が存在すれば F_1 個体は脱落性を示す。日本の品種系統と交配してできた F_1 には脱落性および非脱落性個体がほぼ同数現れた。また、旧ソビエト由来の3系統と交配してできた F_1 個体には脱落性個体のみが出現する場合と、脱落性と非脱落性の両形質が観察された (Table 11)。このことから、普通ソバには *Sht2* および *sht2* の両方の対立遺伝子が存在することが明らかとなった。脱落性と非脱落性の両個体が分離した系統は使用した個体の遺伝子型が *Sht2sht2* のヘテロ型であり、脱落性のみが現れた系統は使用した個体の遺伝子型が *Sht2 Sht2* のホモ型と考えられた。

3. 考察

作物における脱落性は、収量の低下を引き起こし、栽培上の不良形質であると同時に、その作物の進化



Fig. 14 Buckwheat seeds with stem. Brittle pedicels (A), non-brittle pedicels (B).

Table 8. Shattering habit and designated genotype of parental and F₁ buckwheat lines

Line	Flower morphology ^{a)}	SI or SC ^{b)}	Pedicel	Deduced genotype	No. of seeds attached to branches/total seeds produced
Botansoba	P	SI	Non-brittle	<i>sht1sht1Sht2Sht2</i> or <i>sht1sht1Sht2sht2</i>	59/64 ^{c)}
KSC2	LH	SC	Non-brittle	<i>Sht1Sht1sht2sht2</i>	53/55
01AMU2	LH	SC	Brittle	<i>Sht1Sht1Sht2Sht2</i>	5/51
Botansoba / 01AMU2	LH	SC	Brittle	<i>Sht1sht1Sht2Sht2</i>	1/66
Botansoba / KSC2	LH	SC	Brittle	<i>Sht1sht1Sht2sht2</i>	0/32

a) P, pin; LH, long homostyle.

b) SI, self-incompatible; SC, self-compatible.

c) Young seeds were bagged before maturing in the SI line, and buds were bagged before flowering in the SC lines.

Table 9. Segregation of brittle-pedicel phenotype in two F₂ populations

Original cross	No. of progeny	Phenotype frequencies (brittle:non-brittle)		χ^2	P
		Observed	Expected		
Botansoba/01AMU2	394	293:101	3:1	0.08	$0.70 < P < 0.80$
Botansoba/KSC2	463	266:197	3:1	76.04** ^{a)}	$P < 0.01$
			9:7	0.27	$0.60 < P < 0.70$

a) ** Significant of $P = 0.01$

Table 10. Linkage relationship between flower morphology (*S*) and brittle pedicel (*sht1*) in the F₂ population derived from the Botansoba/01AMU2 cross^{a)}

Long homostyle		Pin		$\chi^2 (P)$		$\chi^2_{L(P)}^{\text{b)}$
Brittle	Non-brittle	Brittle	Non-brittle	Flower morphology	Brittleness	
284	12	9	89	0.00	0.08	291.57
				($0.90 < P$)	($0.70 < P < 0.80$)	($P < 0.01$)

a) The recombination frequency between the *S* and *sht1* loci was estimated as 5.46 ± 1.18 (%) by the maximum-likelihood method.

b) * Independence (9:3:3:1)

Table 11. Evidence for the presence of the allele *sht2* in buckwheat cultivars using KSC2 (*Sht1Sht1sht2sht2*) as the tester pollen parent.

Female	Origin	No. of F ₁ plants	
		Brittle	Non-brittle
Kanto 1	Japan	4	3
Shinano 1	Japan	2	2
Kaida Zairai	Japan	4	4
Bol'shevik 4	Former USSR	2	0
Minchanka	Former USSR	5	0
Kazanskaya Krupnozernaya	Former USSR	3	1

と栽培化の過程を明らかにするための重要な形質でもある。オオムギには小穂脱落性を支配する2つの優性補足遺伝子 *Btr1* および *Btr2* が存在し、第3同祖群の短腕に密接に連鎖して座乗していることが知られている (Takahashi & Hayashi 1964, Komatsuda & Mano 2002)。オオムギ野生種の遺伝子型は *Btr1Btr1Btr2Btr2* であり、栽培種は片方の遺伝子座が変異を起こしており、西域型が *btr1* 遺伝子座に、東亜型が *btr2* 遺伝子座に変異が生じている。このことから、東亜型と西域型の品種を交配してできた F₁ は小穂脱落性を示す。ソバにおいては品種・系統間の交配により脱落性を示したという報告は今までない。このことからおそらくほとんど全ての栽培種は劣性の遺伝子 *sht1* 遺伝子を持っていると考えられる。Ohnishi (1999) は *F. esculentum* ssp. *ancestralis* に由来する脱落性の遺伝を *F. esculentum* ssp. *esculentum* と交配した後代の解析により、非脱落性は劣勢の1遺伝子支配と報告している。Yasui et al. (2004) は、*F. homotropicum* 由来の脱落性は1つの優性の遺伝子に支配され、*S* 遺伝子と連鎖していると報告している。今回の実験により2つの非脱落性遺伝子座、*sht1* および *sht2* が存在することが明らかとなったが、以上のことを考えると、

Ohnishi (1999) および Yasui et al. (2004) が報告した *sht* は本研究で報告した *sht1* と同じ遺伝子座であることが推測された。この推測により、本研究でも *sht* という遺伝子記号を用いた。しかしながら、依然これらが違う遺伝子座という可能性は残されているため、今後対立性検定を行う必要があると考えられる。

4. まとめ

ソバの脱粒性には離層形成の有無による二つの型がある。離層を形成する型は野生種に見られるが、栽培種には見られない。本稿では離層を形成する脱粒性を子実脱落性とし、形成しない型を脱粒性とした。普通ソバと子実脱落性系統01AMU2を交配してできた F₁、および普通ソバと子実非脱落性系統 KSC2を交配してできた F₁ は脱落性を示した。普通ソバと脱落性系統01AMU2の交配に由来する F₂ 集団は脱落性と非脱落性が期待分離比 3 : 1 に高い確率で当てはまり、牡丹そばに存在する非脱落性は劣性の1遺伝子 (*sht1*) 支配であると考えられた。普通ソバと非脱落性系統 KSC2の交配に由来する F₂ 集団は脱落性と非脱落性が期待分離比 9 : 7 に高い確率で当てはまり、KSC2の非脱落性を支配している

遺伝子 (*sht2*) は *sht1* 遺伝子とは異なっていた。すなわち、ソバの脱落性は2つの独立遺伝する優性の補足遺伝子により支配されていた。*sht1* 遺伝子座は *S* 遺伝子と連鎖しており、その組換え価は 5.46 ± 1.18 (%) であると推定された。補足遺伝子の片方である *sht2* について、*Sht2* および *sht2* の両、対立遺伝子が普通ソバ集団中には存在していた。

V. 子実非脱落自家和合性系統の 効率的選抜手法の開発

子実脱落性の判定は成熟期にならないと分からないことから、育種を行う際に多くの支障を来す。例えば、圃場で脱粒した種子が翌年出芽し、圃場内のある集団に混入してしまう。また、圃場で脱落性と判断できる時には既にその個体は花粉を飛散させているため、その花粉が他の植物体にかかり脱落性の汚染を広げる。このようなことから、開花前に脱落性か非脱落性かを判定できる方法が必要となる。その方法の1つにDNAマーカーを利用した選抜方法が考えられる。DNAマーカーは目的形質を支配している遺伝子そのものやそれに連鎖する遺伝子のDNA塩基の差異を検出するもので、その植物体がどのような形質を保有しているかをその差異から推測できる。その差異は塩基配列を読んで検出することができるが、一般にマーカーとして利用するには簡易に検出できる電気泳動での移動度の違い、すなわち多型として検出する。近年分子生物学的技術が発展し、比較的容易に分子マーカーの開発ができるようになった。その中でもRAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) 法は簡易なため多くの作物で使用されている。また、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法は再現性の高さや多型の検出能の高さから、高密度の遺伝子連鎖地図作成や近傍のマーカー作成に多く利用されている。その他にもSSR (Simple Sequence Repeat) マーカーやSSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) マーカーなど多くの方法が開発されており、材料や目的に応じて使用するマーカーの種類を変えるのが一般的である。

近傍のマーカーを作出する方法の1つにバルク法 (BSA; Bulk Segregant Analysis) がある。この方法は、分離集団の個体を、着目する遺伝子の表現型または遺伝子型により選抜グループ化し、その間

で多型を見つける方法であるため、両親の系統が存在しなくても効率的にマーカーを作出することができる。実際多くの作物でこのバルク法とAFLP法を組み合わせると連鎖マーカーが作出されている。例えば、トウモロコシゴマ葉枯れ病抵抗性遺伝子 *rhm* (Cai et al. 2003) や、アブラナ科の種皮色遺伝子 *B* (Negi et al. 2000)、ササゲの *Striga gesnerioides* race 1 に対する抵抗性遺伝子 *Rsg3* (Ouedraogo et al. 2002) などがある。

実際の育種でマーカーを用いて選抜する場合、問題となるのがコストと手間である。AFLPマーカーは再現性が高いものの手間とコストがかかる。そこで、多く行われているのが、マーカーのSTS (Sequence Tagged Site) 化である。STS化は多型を示したバンドの塩基配列を読み、そのバンドだけをPCR法で増幅させる方法である。AFLPおよびRAPDマーカーは優性マーカーであるが、STS化後に共優性マーカーにできる場合もある (Matsui et al. 2001)。

目的遺伝子近傍に連鎖するDNAマーカーは育種における選抜マーカーだけでなく、遺伝子をクローニングするためのマーカーとしても利用できる (Map based cloning)。アラビドプシスやトマトなどではPolygalacturonaseや2,4-beta-glucanase等の脱落性に関係する遺伝子が既に単離されているが、ソバではまだ単離されていない。

IV. 章において脱落性は2つの独立遺伝する遺伝子 *sht1* と *sht2* により支配されていることを明らかにした。また、普通ソバ間の交配では脱落性個体が出現しないことから、普通ソバは対立遺伝子 *sht1* を劣性のホモ型で保有していることも推測した。すなわち、普通ソバと交配しても脱落性を示さない系統の作出はその系統に対立遺伝子 *sht1* を劣性のホモ型で持たせることで可能となる。そこで、本研究ではAFLP法とBSAを組み合わせると共に実際の育種およびマップベースクローニングに利用するため、このAFLPマーカーをSTSマーカーに換えることとした。

1. 材料および方法

1) 植物材料およびDNAの抽出

第4章で使用した、普通ソバと自家和合性系統

01AMU2の交配に由来する F_2 集団から無作為に10個体の非脱落性個体および10個体の脱落性個体を選んだ。DNAは植物体の若い葉から抽出した。圃場の植物体から採取した葉は水道水で良く洗った後、蒸留水で濯ぎ、100mg定量した後、マイクロチューブに入れ、液体窒素で瞬時に凍らせた。液体窒素にマイクロチューブを頻繁に浸し、解凍しないように、ペッスルを用いて葉を粉末状にした。以後の操作はDNeasy Plant mini kit (キアゲン) を用い、説明書に従って抽出した。脱落性および非脱落性のそれぞれの個体から抽出したDNAはそれぞれ5個体ずつ等量混ぜて2組のバルク集団を作成した。脱落性のバルク集団をB1およびB2と名付け、非脱落性の集団をN1およびN2と名付けた。多型の検出にはまずB1およびN1を用い、その後多型が検出できたものに関してB2およびN2を用いた。

2) AFLP 分析

AFLP分析は市販のキット (Gibco BRL) を用いて、Mano et al.(2001)の方法を改良して行った。全DNAは *EcoRI* および *MseI* の2つの制限酵素を用いて37℃16時間で完全に消化した。*EcoRI* および *MseI* で消化された部位にそれぞれの制限酵素認識部位を持つアダプターを付加した。アダプター付加は37℃6時間で行った。アダプターを付加されたDNAを鋳型DNAとし、予備増幅をユニバーサルプライマーE0およびM0プライマーを用いて行った。E0およびM0プライマーのシーケンスはTable12に示した。選択的増幅に使用したプライマーはアダプターのシーケンスに3塩基を付加したのものを用いた。プライマーは *EcoRI* 側が13, *MseI* 側が24の合計312の組合せを用いた。電気泳動は7%ポリアクリルアミド変性ゲルを用い40℃のインキュベーターの中で、まず、サンプルを添加する前に200Vで30分間予備泳動を行い、その後300Vで4時間行った。ゲルの染色はシルベストステインキット (ナカライ) を用いて行った。多型の検出は目視で行った。

3) 連鎖解析

F_2 集団から無作為に102個体を選びDNAを抽出した。これらのDNAはAFLP分析に使用できるように、制限酵素処理およびアダプターを付加した。これらの中からまず14個体を用いて、多型を示したDNAの連鎖の有無を推定した。このうち完全に連鎖しているものについてのみ残り88個体を用いて連鎖

解析した。組換え価はコサンビ関数 (Kosambi 1944) で地図距離に変換した後、Mapmaker/exp 3.0 (Lander et al. 1987) を用いて算出し、それを用いて連鎖地図を作成した。

4) マーカーの STS 化

連鎖していると推定されたバンドはペーパーナイフを用いて切り出し、チップの先でゲルを砕いた後、マイクロチューブの中に入れ10分間氷上に置いた。その後、20分間94℃で熱処理し、再度、氷上にサンプルの温度が下がるまで静置した。14000rpmで10分間遠心を行い、上澄み液をDNA抽出液とした。抽出されたDNAはまずユニバーサルプライマーE0およびM0を用いて94℃1分55℃1分72℃2分のサイクルを20回行ってDNAを増殖し、これを鋳型DNAとして、再度多型を示したプライマーを用いて増幅した。増幅されたDNAはTAクローニングキット (Invitrogen) を用いてpCR2.1ベクターにクローニングした。クローニング部位の増幅にはpCR2.1ベクター上に存在する遺伝子配列を利用したM13プライマーを用いた。増幅されたDNAは精製後ダイレクトシーケンスまたは、プラスミドを抽出してシーケンスを行った。シーケンスはBig Dye Terminator version 1.1を用い、ABI310シーケンサー (Applied Biosystems) で検出した。

2. 結果

1) 花型および脱落性の分離

無作為に選んだ F_2 個体は長等花柱花と長花柱花が75:27に分離し、期待分離比3:1に高い確率 ($\chi^2 = 0.118$, $0.70 < P < 0.80$) で当てはまり、また、脱落性と非脱落性が71:31に分離し期待分離比3:1 ($\chi^2 = 1.518$, $0.20 < P < 0.30$) に当てはまった。これらの結果から花型を支配している遺伝子 *S* および非脱落性を支配している遺伝子 *sht1* はそれぞれが1遺伝子で分離していると判断した。

2) AFLP による多型の検出とその連鎖解析

Sht1 を保有する植物体に現れる70を越える多型を示すバンドが1つのバルクから得られた。これらの多型に再現性があるのか、また連鎖している可能性があるのかを調べるために、もう一つのバルク集団を用いて調査した。その結果、明瞭な10の多型が得られた。連鎖の有無を推測するため、14個体の F_2 集団を用いて調査 (Fig.15) した結果、すべて

Table 12. Selective primers

<i>EcoRI</i>		<i>MseI</i>	
Primer name	Sequence	Primer name	Sequence
e51	E0 ^{a)} +TAG	m03	M0 ^{b)} +AAG
e52	E0+TAT	m10	M0+AGC
e53	E0+TCA	m21	M0+CCA
e54	E0+TCC	m35	M0+GAG
e55	E0+TCG	m45	M0+GTA
e56	E0+TCT	m46	M0+GTC
e57	E0+TGA	m47	M0+GTG
e58	E0+TGC	m48	M0+GTT
e59	E0+TGG	m49	M0+TAA
e60	E0+TGT	m50	M0+TAC
e61	E0+TTA	m51	M0+TAG
e62	E0+TTC	m52	M0+TAT
e63	E0+TTG	m53	M0+TCA
e64	E0+TTT	m54	M0+TCG
		m55	M0+TCG
		m56	M0+TCT
		m57	M0+TGA
		m58	M0+TGC
		m59	M0+TGG
		m60	M0+TGT
		m61	M0+TTA
		m62	M0+TTC
		m63	M0+TTG
		m64	M0+TTT

a) E0, 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

b) M0, 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'

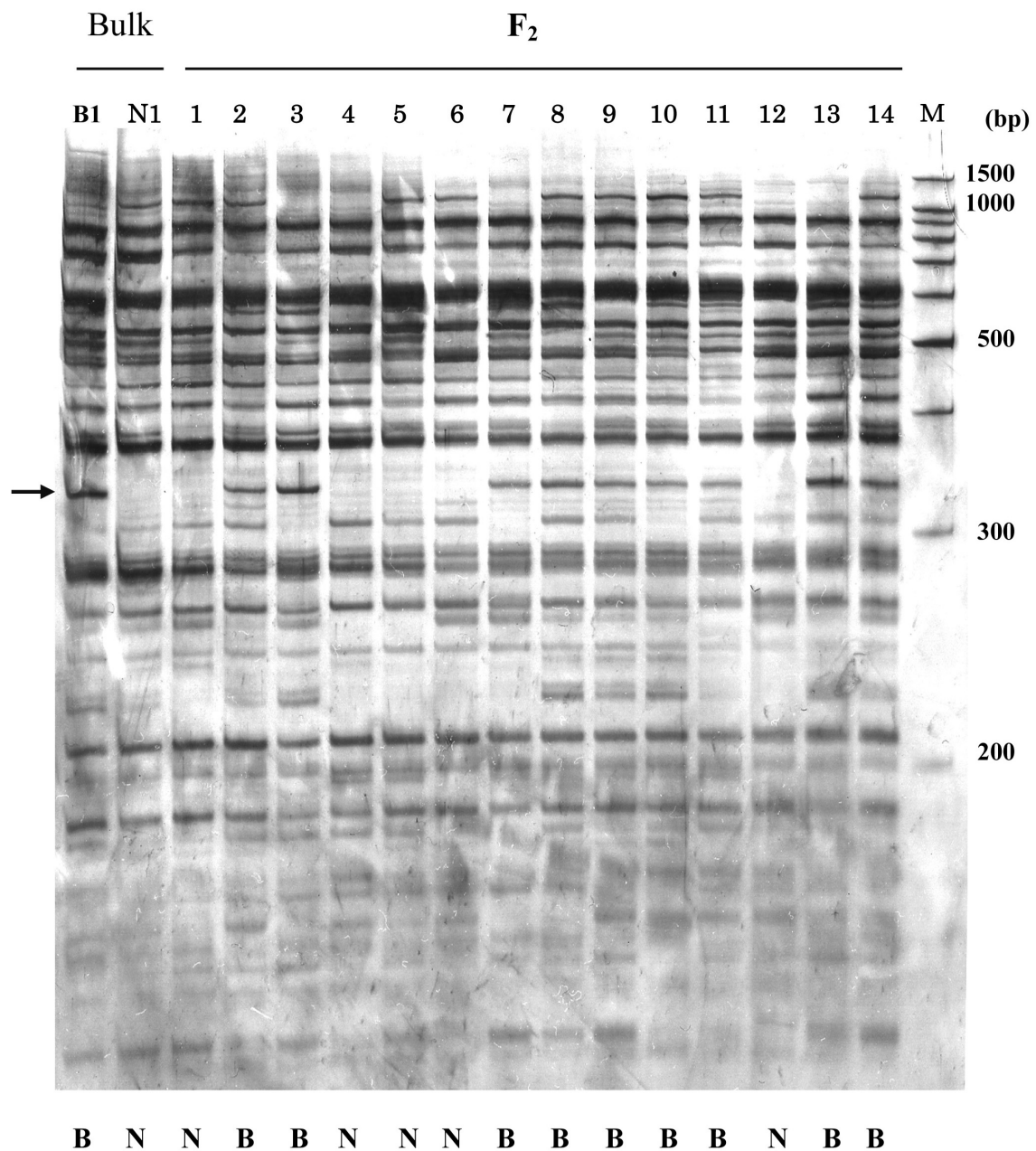


Fig. 15 Representative AFLP fragments derived from the bulk of brittle plants (B1) and non-brittle plants (N1), and estimation linkage relationships using 14 F₂ individuals. B is brittle plant and N is non-brittle plant. M is size marker. The arrow indicates the polymorphic fragments which were produced using primers e56 and m21.

のバンドが連鎖していると推定できた。これらのうち全く組換えないバンドについて残り88個体を用いて連鎖解析を行った。その結果、*Sht1* と連鎖する5つのマーカーが検出された。またそのうちの2つのマーカー (e55m48/590および e55m46/320) は非脱落性遺伝子と組換えることなく分離した。その他のマーカー全ての連鎖距離も 2 cM 以内であった (Fig.16)。

3) AFLP マーカーの STS 化

選抜マーカーとして、実際の育種に利用するために完全連鎖した2つの AFLP バンド (e54m58/610 および e55m46/320) の STS 化を試みた。e54m58/610 および e55m46/320 ともクローニング後シーケンスを解読できた (Fig.17)。シーケンス情報を基にプライマーを合成した (Table13)。e54m58/610 および e55m46/320 とも、優性マーカーで

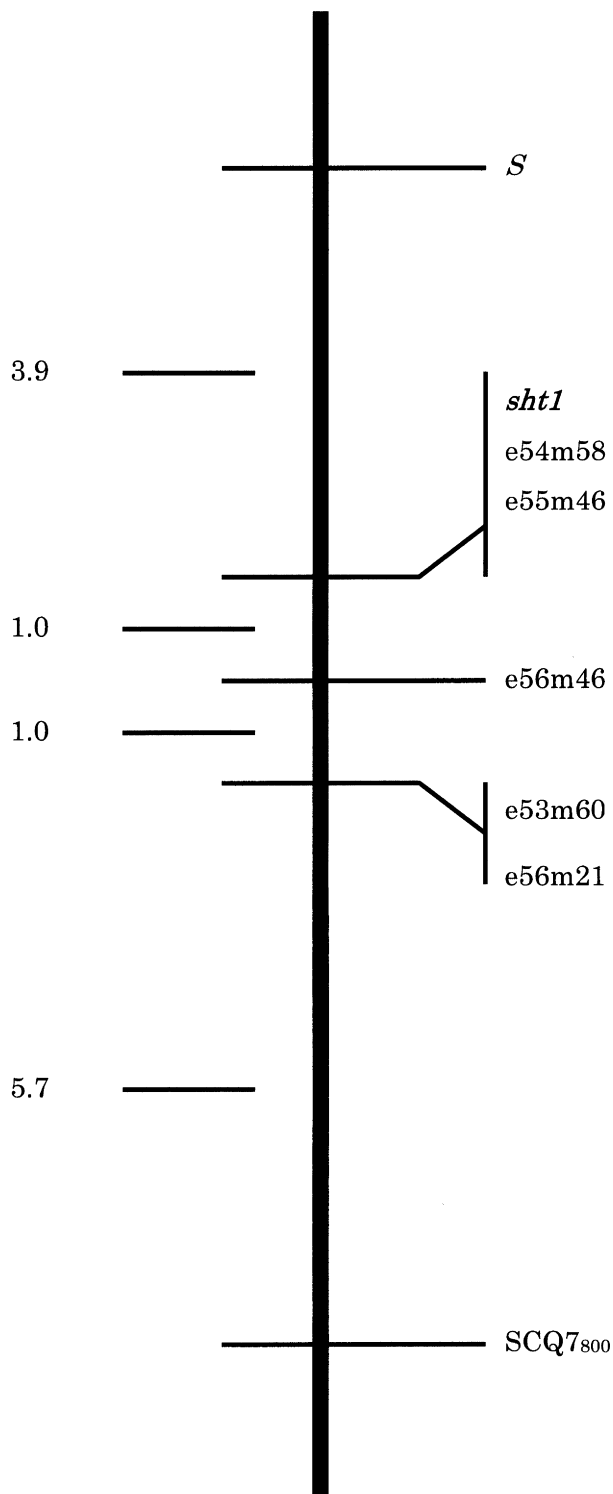


Fig. 16 Linkage map of AFLP markers linked to the *sht1* locus. Distances (cM) between successive marker pairs are shown to the left of the schematic chromosome segment. SCQ7₈₀₀ is STS markers developed by Aii (1998).

あった (Fig.18)。それぞれのプライマーのシーケンスおよびPCRの条件を Table13に示した。これらのマーカーが AFLP マーカーを間違いなく STS 化したものであるかを確かめるために、AFLP マーカーで使用した分離集団中の56個体を用いて連鎖解析を行った。その結果 STS マーカー全てのデータが AFLP マーカーの結果と一致した。

3. 考察

第4章で報告したように、*sht1* 遺伝子座は *S* 遺伝子座と連鎖している。本研究からその地図距離は 3.9cM であると推定できた。Aii et al. (1998) は *S* 遺伝子座に連鎖する RAPD マーカーを検出し、全てが同じ側に座乗したと報告している。本研究でも全て *sht1* 側に座乗した。そこで、*S* と *sht1*、および今回開発したマーカーと Aii et al. (1998) が開発したマーカーの位置関係を知るために、Aii et al. (1998) が開発したマーカーの1つである SCQ7₈₀₀を用いて、連鎖解析を行った。その結果、筆者らが見つけたマーカーは彼らが見つけたマーカーと同じ側に座乗することが分かった。この結果は *S* 遺伝子座およびその付近の領域の DNA が高い保存性を有していることを示している可能性がある。先の章でも触れたが、ソバの *S* 遺伝子座は *S* supergene とも呼ばれ、少なくとも5つの遺伝子が座乗していることが推定されている。しかも、*S* supergene はソバのみに限らずサクラソウなど属を超えて似たような構造を持っている (Dowrick 1956)。以上のことからこの遺伝子近傍はおそらくある何かの要因により組換えが強く押さえられてきたと考えられる。近年 Yasui et al. (2004) は *F. esculentum* と *F. homotropicum* を交配してできた F₂ 集団を用いて AFLP の遺伝地図を作成し、*S* と *sht* は動原体付近に座乗すると報告している。おそらく、このことが、*S* と *sht* 付近の遺伝子の組換えが抑えられてきた理由の1つであると考えられる。

種間交雑は野生種に存在する環境の変化に対する広域適応性や本研究での目的である自家和合性などを普通ソバに導入するに際し有効な方法である。しかしながら、野生種を交配母本に用いるため、種間交雑によって育成された系統は多くの場合脱落性が問題となる。私たちが普通ソバと *F. homotropicum* を交配して育成した系統は強い脱落性を示すが、脱

A. STS-e54m58

GACTGCGTACCAATTCTCCAAGATAGGGAATCTGTTGGATTTGATATAAATATAAAGGGTAGAT
 TTTTACTTTTGATTCTCCATTTTAGAGAAGAGTTTAGGGAAGCTGTTGGGGATGCTCTTAGATCC
 CTTAGCTCCATATCGCTCCAAAAAGGCTTAGGAACCAGCGGTAAGGGGGACCGAGGCGGGTTT
 TGGGAGATTCTCGTGTCAACAACAAAAGTTGAATTAGAACAGGATATGACCTAATAAATAAAGAT
 AATAAACTGGACTTGTTGTTGAGCATGATTATGTGATGTAAGCTGTTTGAGTGTGTATGTGCCTT
 CACCTTGTTTCTAATGCTTCGAATATGAGCTAATGGTTTTATACCGATTGTGATAGATTGCCTTTC
 AGGTTAGGAATGCGGCCGAGAGATCCGGAAGAGTGGGCAACCGGGGTCCGTACATTTTAGGAA
 GGGTTTTTGGTTGGAGTTGAGTTGTGTTTTGTCCTTCGGTTGTTGTGATTGTATGCCGCGTGTA
 TGGAGCTTGGCCTTCGAGTTGTATCTCAGCTGAAGTCTTTTGTGTTGTTCTTTTCGGGTTTCCTT
ACCATTTGCACTACTCAGGACTCATC

B. STS-e55m46

GACTGCGTACCAATTCTCGAACTTTATGAATCCTTATATAGGTGAGTTTCCTAGAAGATAAAA
 GACTAAAATAATCCTACAAAATATAGGATAGAAAAATATAGCCTCTAGAATGTTCAAAGCTTTGT
 ATAAAAATAACTAACGAGACTCTTGACTAGATATGTCGAAATCTCGGCTGGATGCTAGTGAATCT
 CGACTAGCCACTTTTCTTGCTTCCTTGATCATCCTCACTCGTGTTTGGCATTTCCTCAAGTCTTCC
 TTTGCTACACATGTCCTAATGTGACTAAGGAAA**ACTTGGACTTACTCAGGACTCATC**

Fig. 17 DNA sequences of AFLP fragment. Sequences with under line are primers for AFLP and bold typed sequences are primers for STS markers.

落性は同じ圃場を用いてソバを栽培した場合、新しく播種した種子と脱粒種子との混合を起こす。また、脱落性個体の花粉が他系統にかかることにより、脱落性を引き起こす可能性も高い。そこで、開花前に栽培している個体が脱落性かまたは非脱落性かを判定する方法が必要であったが、*sht1* 遺伝子座に連鎖

する分子マーカーを作出することにより可能となった。

STS マーカーはその簡便さから実際の育種に際し利用しやすいマーカーである。今までに、大豆の 7 S グロブリンタンパク欠失を AFLP で判定する方法や大麦の稔性回復遺伝子に連鎖する RAPD マー

Table 13. Primer Sequence of two STS markers

Marker	Primer Sequence	Product size (bp)	Cycles
STS-e54m58/610	TCCAAGATAGGGAATCTGTTGGAT GTAAGGAACCCGAAAGAATACAAC	564	94°C (1min) → 65°C (1min) → 72°C (2min) 30 cycles
STS-e55m46/320	TGAATCCTTATATAGGTGAGTTTCC GTCCAAGTTTTCTTAGTCACATT	275	94°C (1min) → 60°C (1min) → 72°C (2min) 30 cycles

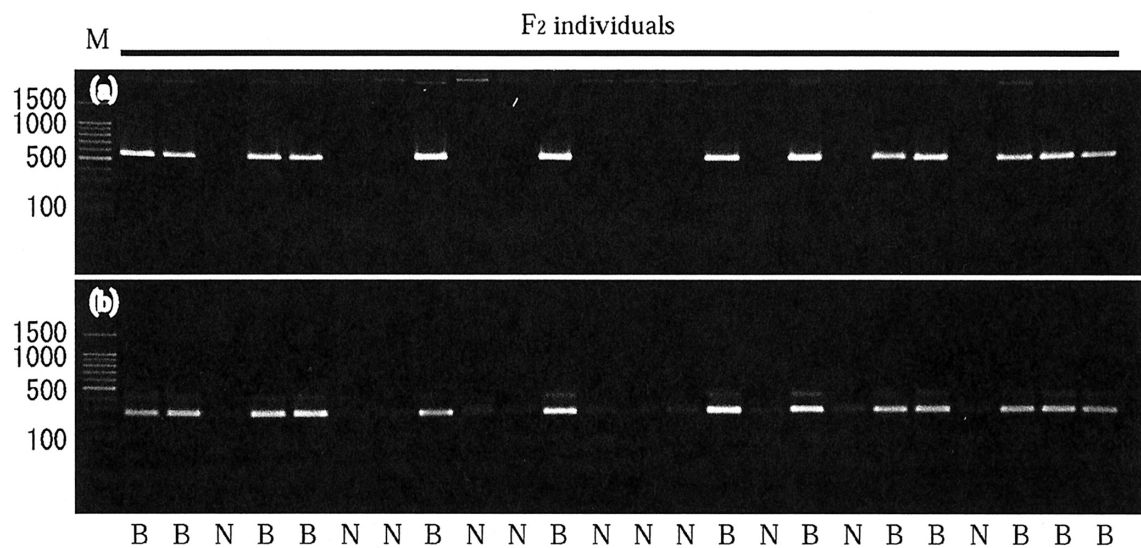


Fig. 18 PCR products in F₂ population using the STS-e54m58/610 primer (a), and the STS-e55m46/320 (b). B is brittle pedicel plant and N is non-brittle pedicel plant. M is size marker.

カーの開発およびイネにおける穂いもち病抵抗性遺伝子に連鎖する RFLP などの多くの分子マーカーが報告され、その多くが STS マーカーへ変換された。本研究では、*sht1* 遺伝子座と組換えない 2 つのマーカーを優性の STS マーカーへ変換することができた。このマーカーは育種で選抜を行うに際し有効であると考えられる。

4. まとめ

個体の脱落性を開花前に判定するため、*sht1* 遺伝子座に連鎖する分子マーカーの開発を試みた。非脱落性の普通ソバと脱落性の自家和合性ソバとを交配してできた F₂ 分離集団から DNA を抽出し、脱落性および非脱落性のバルクを作成した。AFLP を用いて、合計 336 のプライマー組合せでスクリーニングを行い、F₂ 12 個体を用いて連鎖の推定を行った。脱落性遺伝子に連鎖していると考えられる 10 の AFLP が確認できた。これらの内、組換え型が出なかった 5 つのマーカーについて残り 88 個体を用いて連鎖解析を行った結果、e54m58/610 および e55m46/320 の 2 つのマーカーが *sht1* 遺伝子座と組換えることなく分離した。残りの 3 つのマーカーも全て *sht1* から 2 cM 以内に連鎖していた。組換わらなかった 2 つのマーカーをクローニングし、塩基配列を解読することによりこれらのマーカーを優性の STS マーカーとして利用することが可能になった。これらのマーカーを使うことにより、分離集団の中から効率的に脱落性および非脱落性の個体が開花前に選抜できると考えられる。

VI. 総合考察

本研究は他殖性作物である普通ソバを自殖性作物へ改良し、その品種化を図るために必須な、自家和合性の遺伝学的解明、脱落性の遺伝様式解明および非脱落性系統の効率的選抜技術の開発を行ったものである。

1. 自家和合性普通ソバ品種育成の可能性

自家和合性普通ソバ品種を育成するために、まず考慮しなくてはならないのが高自殖稔性遺伝子の選択である。本研究から普通ソバが高自殖稔性になる機構は少なくとも 2 つ存在することが明らかとなった。まず第 1 は *F. homotropicum* に存在する自家和

合性機構、すなわち *S* supergene 内の組換えによるものであり、第 2 が Pennline 10 の高自殖稔性機構、すなわち、自家不和合性を働かせるために必要な遺伝子を抑制させることによるものである。自家和合性の品種を育成するためには *F. homotropicum* に由来する自家和合性遺伝子を利用することが望ましいと考えられる。その主な理由として、次の 2 つが上げられる。まず、第 1 に *F. homotropicum* に由来する自家和合性が 1 遺伝子支配であることであり、育種に際し選抜および固定が容易なためである。Pennline 10 の高自殖稔性は主動な遺伝子が存在すると考えられるが、微動な複数の遺伝子も存在することが推測されるため育種の推進には不向きである。第 2 は、*F. homotropicum* に由来する自家和合性が花型と連鎖している事である。花型も自家不和合性遺伝子が座乗する *S* supergene に支配されているため、この形質を見ることにより自家和合性か不和合性かを判定することが可能である。すなわち、自家和合性品種を育成する際の選抜マーカーとして利用でき、さらに他殖した場合に不和合性個体を排除するための形態マーカーとしても利用できる。しかしながら、この形質は形態マーカーとしては完全でないことを理解しておく必要がある。完全でない理由は、*S^h* 遺伝子は *s* 遺伝子に対しては優性であるため、ヘテロ個体を完全に排除することができないことや、この形質は開花時の形質であるため、混じり個体と判定できたときには、既に他の個体と交配している可能性があるためである。自家和合性品種を維持するためには開花期以前の形態で判定できる形態形質を自殖系統に付加することが望まれる。

自家和合性の利用に際し考慮しなくてはならないのが自殖弱勢の問題である。Marshall (1979) は Pennline 10 の他にこの遺伝子を利用していくつかの自殖系統を作成している。しかしながら、育成してできた系統はすべて自殖弱勢を示したと報告している。おそらく、*F. homotropicum* 由来の *S^h* 対立遺伝子を利用したとしても遺伝的背景が普通ソバであるため自殖弱勢が起きる可能性は高いと予想される。しかしながら、現在栽培されている普通ソバには大きな変異が存在し、例えば植物体は大きく収量が多いが極晩生で倒伏しやすい系統や、結実が日長や温度に制限される系統等が存在する。これらの系統と交配し様々な生理遺伝的特徴を持つ自殖系統を作出

し、栽培方法を工夫することにより、栽培期間内に収量が多く得られる程度に植物体を大きくすることは可能であると考えられる。とくに、九州や沖縄地域では栽培可能期間が長いと多様な栽植様式が想定できるので関東や東北地域と比較すると、自殖性ソバ品種活用の方は大きいと考えられる。また、ダッタンソバは自殖性であるにも関わらず、普通ソバと同程度の収量性がある。ダッタンソバがなぜ高い収量性を示すのかは未だ未解明であるが、様々な遺伝子の組み合わせにより普通ソバもダッタンソバと同じようにできる可能性は高い。

F. homotropicum に由来する自家和合性遺伝子を利用する際にとくに育成初期世代で問題となるのが、脱落性の問題である。本研究から脱落性は少なくとも2つの遺伝子に支配されている事が分かり、そのうちの1つは *S* 遺伝子座と連鎖していることが分かった。すなわち、*F. homotropicum* から *S^h* 対立遺伝子を導入する際には高い確率で *Sht1* 脱落性対立遺伝子も取り込むことになる。普通ソバは *Sht2* 対立遺伝子を保有している場合が多いので、育種操作の過程で脱落性を示さないようにするには *sht1* 対立遺伝子をホモに持たせる必要がある。脱落性の判定は種子が熟した時に判定するため、脱落性個体の種子は圃場に多くの種子を落とし、次の栽培時期に出芽してくるため、新しく播いた種子と脱粒種子との混合を引き起こす。そこで、本研究では幼植物の段階で選抜するために *sht1* 遺伝子座に連鎖するマーカーを開発した。これらを利用することにより、*sht1* 対立遺伝子をホモに持つ個体の選抜が容易にできるようになった。

このようなDNAマーカーを利用した育種は多くの作物で行われている。ソバの脱落性の場合、一度 *sht1* 対立遺伝子に支配される非脱落性の自殖系統が育成されれば、これを交配母本に用いることにより、育成過程で全く脱落性を示すことなく育成することが可能となる。今後 *F. homotropicum* が保有する耐霜性や高抗酸化性などの有用形質を導入する際には必ずこの脱落性は問題となるため、それらの育種にも今回開発したマーカーは有用であると考えられる。

また、非脱落性にする方法に *sht2* 遺伝子をホモに持たせる方法があるが、これは育種および栽培する上でいくつかの問題および利点を持っている。

まず、問題点であるが、第1に *F. homotropicum* の自殖性遺伝子 *S^h* は脱落性対立遺伝子 *Sht1* と連鎖するため、*sht2* 対立遺伝子をホモ化するまでに脱落が多く現れ、採種が困難であり、育種が困難であることが挙げられる。第2は *Sht1* 遺伝子を持つために、この花粉が普通ソバと交配すると、次の代で交配個体は脱落性を示す可能性が高いことすなわち、普通ソバの産地を短期間で崩壊させる恐れがあることが考えられる。この系統を栽培するときには周りの産地がどのような品種をどのような地域でどのように栽培しているかを確認したのちに栽培する必要がある。利点はこの自殖系統が広く普及した場合、普通ソバの花粉がかかった場合に脱落性を示せば、その個体は交雑個体と判定できるので、自殖系統を高純度で維持することが可能となることである。交雑個体が多い場合には脱落性がひどくなるため種子の更新をする必要が出てくるので、品種を高純度で維持することが可能になる。

2. 自家和合性ソバ品種栽培の安定化および新育種方法開発に向けて

自家和合性ソバを広く普及させるために自家和合性品種が保有することが望ましい形質は多い。第1に、先の自家和合性普通ソバ品種育成の可能性の所でも簡単に触れたが、自家和合性系統と判定できる形態形質を持たせることである。このような形質を持たせることにより、栽培管理また、他殖性種子の混合率を軽減することができる。多くの作物では実際の育種の現場で形態マーカーを使用して選抜および品種の維持に利用されている。開花前の形質には多くの形質があるので、今後マーカーとして使用できる形質が見つかる可能性は高いと考えられる。

自家和合性ソバ系統を屋外で普通に栽培した場合、その系統は自家和合であるため自殖種子を形成するが、開花をするため昆虫などにより他殖も行ふ。そこで、望まれるのが閉花受粉性である。閉花受粉性は他殖を困難にして自殖率を高めることから、自殖系統の維持には有用な形質である。イネやオオムギなどにはこのような形質が存在するがソバには存在しないため、今後遺伝資源の探索や突然変異育種法などを利用して作出する必要がある。

摘 要

普通ソバ (*Fagopyrum esculentum*) はタデ科 (*Polygonaceae*) に属する1年生草本作物である。普通ソバは主要穀物ではないものの、世界の広い地域で栽培され、ソバの持つ機能性を考えると今後さらに栽培面積が増加すると予想される重要作物の1つである。

普通ソバは1個体では種子を生産することができない自家不和合性作物であるため、結実には蜜蜂などの昆虫を媒介した交配が必要である。また、自家不和合性であるため、新しい優良品種開発が難しい。そこで、効率的な安定多収良質ソバ品種開発のため、自家和合性ソバ系統を作出し、自家和合性ソバ品種開発実現に向けての基礎的研究を行った。得られた結果は以下の通りである。

1. 自家和合性ソバ系統の作出および自家和合性遺伝子の遺伝学的解明

F. esculentum と *F. homotropicum* を交配し胚培養技術を用いて自家和合性のソバ系統を作出した。この自家和合性ソバ系統と普通ソバ系統間の花粉管伸長観察および種子結実性より、不和合性反応を調査した。また、自家和合性系統と不和合性系統を交配してできたF₂集団を用いた自家不和合性と花型および花粉粒径の分離も調査した。その結果、*F. homotropicum* に由来する自家和合性対立遺伝子 *S^h* を保有するソバ系統 (九系 SC2) は異形花型の不和合性機構を保持しており、その花粉は長花柱花の雌蕊に対しては和合であったが、短花柱花の雌蕊に対しては不和合であった。また、九系 SC2の雌蕊は長花柱花の花粉に対しては不和合性であったが、短花柱花の花粉に対しては和合性であった。このことから、自家和合性対立遺伝子 *S^h* は *S* supergene 内の組換えにより生じたと推定した。同時に、*F. homotropicum* は普通ソバの祖先種 *F. esculentum* ssp. *ancestralis* よりも後にできたと推測された。

2. Pennline 10に存在する自家和合性遺伝子の遺伝学的解明

長等花柱花の九系 SC2と短等花柱花の Pennline 10の2つの自家和合性系統を用いて、Pennline 10の自家和合性が九系 SC2と同じであることを調査した。

Pennline 10の花粉は全ての花形の雌蕊に対して和合性であった。長花柱花または短花柱花と Pennline 10を交配してF₁を作出した。Pennline 10と長花柱花と交配したできたF₁は全て長花柱花であったのに対し、短花柱花と交配してできたF₁には長花柱花と短花柱花個体が出現した。F₁を自殖してできたF₂集団の花形の分離を調査したところ、全ての集団に長花柱花個体が見られ、また花柱の長さが長花柱花より短い短等花柱花より長い中間型の花形が見られた。また、長花柱花と Pennline 10の交配に由来するF₁個体を自殖して作出したF₂集団には短花柱花個体が確認されなかった。これらのことから、Pennline 10は長花柱花と同じ *s* 遺伝子を持っており、Pennline 10の短等花柱花は *S* 遺伝子座外の量的遺伝子により支配されていることが推定された。

3. 子実脱落性の遺伝学的解明

ソバの脱粒性には離層を形成する型と形成しない型の2種類がある。離層を形成する型は野生種に見られるが、栽培種には見られない。本稿では、離層を形成する型を子実脱落性と呼び、形成しない型を脱粒性と呼ぶ。普通ソバと *F. homotropicum* との交配により作出した多くの系統が脱落性を示したことから、本研究では脱落性の遺伝解析を行い脱落性がどのような遺伝様式をするかを明らかにすることとした。材料には普通ソバと *F. homotropicum* との交配により作出された2つの自家和合系統 (01AMU2およびKSC2) を用いた。普通ソバと脱落性系統01AMU2を交配してできたF₁、および普通ソバと非脱落性系統KSC2を交配してできたF₁は脱落性を示した。普通ソバと脱落性系統01AMU2の交配に由来するF₂集団は脱落性と非脱落性が期待分離比3:1に高い確率で当てはまった。このことから牡丹そばに存在する非脱落性は劣性の1遺伝子 (*sht1*) 支配であることが考えられた。普通ソバと非脱落性系統KSC2の交配に由来するF₂集団は脱落性と非脱落性が期待分離比9:7に高い確率で当てはまった。このことからKSC2の非脱落性を支配している遺伝子 (*sht2*) は *sht1* 遺伝子とは異なることが分かった。すなわち、ソバの脱落性は2つの独立遺伝する優性の補足遺伝子により支配されていることが分かった。*sht1* 遺伝子座は *S* 遺伝子と連鎖し

ていることがわかり、その組換え価は 5.46 ± 1.18 (%)であることが推定できた。補足遺伝子の片方である *sht2* は普通ソバ6品種と KSC2を交配した結果から、*Sht2* および *sht2* の両、対立遺伝子が普通ソバ集団中には存在していることが分かった。

4. 子実非脱落自家和合性系統の効率的選抜手法の開発

個体の脱落性を開花前に判定するため、*sht1* 遺伝子座に連鎖する分子マーカーの開発を試みた。脱落性および非脱落性のバルクを作成し、AFLPを用いて、脱落性個体特異的に現れるバンドの探索を行った。合計336のプライマー組合せでスクリーニングを行い、12個体のF₂を用いて連鎖の推定を行った結果、脱落性遺伝子に連鎖していると考えられる10のAFLPが確認できた。これらの内、組換え型が出てこなかった5つのマーカーについて残り88個体を用いて連鎖解析を行った。その結果、e54m58/610およびe55m46/320の2つのマーカーが*sht1* 遺伝子座と組換わることなく分離した。また、残りの3つのマーカーも全て*sht1* から2 cM以内に連鎖していた。*sht1* 遺伝子座と組換わることなく分離した2つのマーカーをクローニングし、塩基配列を解読することによりこれらのマーカーを優性のSTSマーカーとして利用することが可能になった。これらのマーカーにより、効率的に脱落性および非脱落性の個体が開花前に選抜できると考えられる。

引用文献

- 1) AIL, J., NAGANO, M., PENNER, G.A., CAMPBELL, C.G., and ADACHI, T. (1998) Identification of RAPD markers linked to the homostylar (*Ho*) gene in buckwheat. *Breeding Sci.* 48: 59-62.
- 2) AIL, J., NAGANO, M., WOO, S.H., CAMPBELL, C., and ADACHI, T. (1999) Development of the SCAR markers linked to the *S^h* gene in buckwheat. *Fagopyrum* 16: 19-22.
- 3) ANDERSON, M.A., CORNISH, E.C., MAU, S.L., WILLIAMS, E.G., HOGGART, R., ATKINSON, A., BONIG, I., GREGO, B., SIMPSON, R., ROCHE, P.J., HALEY, J.D., PENSCHOW, J.D., NIAL, H.D., TREGGAR, G.W., COGHLAN, J.P., CRAWFORD, R.J., and CLARKE, A.E. (1986) Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 321: 38-44.
- 4) CAI, H.W., GAO, Z.S., YUYAMA, N., and OGAWA, N. (2003) Identification of AFLP markers closely linked to the *rhm* gene for resistance to Southern Corn Leaf Blight in maize by using bulked segregant analysis. *Mol. Genet. Genomics* 269: 299-303.
- 5) CAMPBELL, C. (1995) Inter-specific hybridization in the genus *Fagopyrum*. *Proc. 6th. Intl. Symp. On Buckwheat, Japan.* 255-263.
- 6) CAMPBELL, C.G. (1997) Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 19. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- 7) CORNISH, E.C., PETTITT, J.M., BONIG, I., and CLARKE, A.E. (1987) Developmentally controlled expression of gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 326: 99-102.
- 8) CROWE, L.K. (1971) The polygenic control of outbreeding in *Borago officinalis*. *Heredity* 27:111-118.
- 9) DARWIN, C. (1877) The different forms on plants of the same species. Murray, Lond.
- 10) DOWRICK, V.P.J. (1956) Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. *Heredity* 10: 219-236.
- 11) EGHIS, S.A. (1924) Experiments on the drawing up of a method of buckwheat breeding. *Trudy Prikl. Bot. I Selek.* 14: 235-251.
- 12) ENTANI, T., IWANO, M., SHIBA, H., CHE, F.S., ISOGAI, A. and TAKAYAMA, S. (2003) Comparative analysis of the self-incompatibility (*S⁻*) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells*. 8: 203 - 213.
- 13) ERNST, A. (1955) Self-fertility in monomorphic primulas. *Genetica* 27: 391-448.
- 14) FUNATSUKI, H., MARUYAMA-FUNATSUKI, W., FUJINO, K. and AGATSUMA, M. (2000) Ripening habit of buckwheat. *Crop Sci.* 40: 1103-1108.
- 15) GARBER, R.J. and QUISENBERRY, K.S. (1927) The inheritance of length of style in buckwheat. *J. Agric. Res.* 34: 181-183.
- 16) HANCOCK, J.F. (1992) Plant Evolution and the Origin of Crop Species. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.

- 17) HINATA, K., OKAZAKI, K., and NISHIO, T., (1983) Gene analysis of self-compatibility in *Brassica campestris* var. Yellow Sarson (a case of recessive epistatic modifier) Proceedings of the 6th International Rapeseed Conference, Paris 1: 354-359.
- 18) HIROSE, T., UJIHARA, A., KITABAYASHI, H., and MINAMI, M. (1995) Pollen tube growth behavior to self-incompatibility in interspecific cross of *Fagopyrum*. Breeding Sci. 45: 65-70.
- 19) HORISAKI, A., and NIIKURA, S. (2004) Effectiveness of Insect-pollination to Evaluate the Level of Self-incompatibility and Genetic Variation in *Brassica rapa*. Breeding Sci. 54: 291-295.
- 20) KOMATSUDA, T., and MANO, Y. (2002) Molecular mapping of the intermedium spike-c (*int-c*) and non-brittle rachis 1 (*btr1*) loci in barley (*Hordeum vulgare* L.) Theor. Appl. Genet. 105: 85-90.
- 21) KOSAMBI, D.D. (1944) The estimation of map distance from recombination values. Ann. Eugen. 12: 172-175.
- 22) KURIAN, V., and RICHARDS, V. (1997) A new recombinant in the heteromorphy "S" supergene in *Primula*. Heredity 78: 383-390.
- 23) LANDER, E.S., GREEN, P., ABRAHAMSON, J., BARLOW, A., DALY, M.J., LINCOLN, S.E., and NEWBURG, L. (1987) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.
- 24) LIPOW, S.R., and WYATT, R. (2000) Single gene control of postzygotic self-incompatibility in pole milkweed, *Asclepias exaltata* L. Genetics 154: 893-907.
- 25) MANO, Y., KAWASAKI, S., TAKAIWA, F., and KOMATSUDA, T. (2001) Construction of a genetic map of barley (*Hordeum vulgare* L.) cross 'Azumamugi' 'Kanto Nakate Gold' using a simple and efficient amplified fragment-length polymorphism system. Genome 44: 284-292.
- 26) MARSHALL, H.G. (1969) Isolation of self-fertile, homomorphic forms in buckwheat, *Fagopyrum sagittatum* Gilib. Crop Sci. 9: 651-653.
- 27) MARSHALL, H.G. (1970) Registration of 'Pennline 10' buckwheat. Crop Sci. 10: 726.
- 28) MARSHALL, H.G. (1979) Studies of inbreeding depression, breeding behavior, and heterosis with inbred lines of buckwheat. Crop Sci. 19: 110-114.
- 29) MATHER, K., and de WINTON, D. (1941) Adaptation and counteradaptation of breeding system in *Primula*. Ann. Bot. 5: 297-311.
- 30) MATSUI, K., MANO, Y., TAKETA, S., KAWADA, N., and KOMATSUDA, T. (2001) Molecular mapping of a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. 102: 477-482.
- 31) MATSUI, K., TETSUKA, T., NISHIO, T., and HARA, T. (2003a) Heteromorphic incompatibility retained in self-compatible plants produced by a cross between common and wild buckwheat. New Phytologist 159: 701-708.
- 32) MATSUI, K., TETSUKA, T., and HARA, T. (2003b) Two independent gene loci controlling non-brittle pedicels in buckwheat. Euphytica 134:203-208.
- 33) MATSUI, K., KIRYU, Y., KOMATSUDA, T., KURAUCHI, N., OHTANI, T., and TETSUKA, T. (2004a) Identification of AFLP markers linked to non-seed shattering locus (*sht1*) in buckwheat and conversion to STS markers for marker assisted selection. Genome 47:469-474.
- 34) MATSUI, K., NISHIO, T., and TETSUKA, T. (2004b) Genes outside the S supergene suppress S functions in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) Ann. Bot. 94:805-809.
- 35) 松井勝弘・手塚隆久 (2004) 自殖性普通ソバに関する研究と品種開発. 農業技術 60: 112-116.
- 36) MCCLURE, B.A., HARING, V., EBERT, P.R., ANDERSON, M.A., SIMPSON, R.J., SAKIYAMA, F., and CLAREKE, A.E. (1989) Style self-Incompatibility gene - Products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. Nature 342: 955-957.
- 37) MORRIS, M.R. (1951) Cytogenetic studies on buckwheat. J. Heredity 42: 85-89.
- 38) NASRALLAH, M.E., and WALLACE, D.H. (1968) The influence of modifier genes on the intensity and stability of self-incompatibility in cabbage. Euphytica 17: 495-503.
- 39) NASRALLAH, J.B., KAO, T.H., GOKDGERG, M.L., and NASRALLAH, M.E. (1985) A cDNA encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. Nature 318:263-267.
- 40) NEGI MS, DEVIC M, DELSENY M, and LAKSHMIKUMARAN M (2000) Identification of AFLP fragments linked to seed coat colour in *Brassica juncea* and conversion to a SCAR marker for rapid selection. Theor. Appl. Genet.

- 101: 146-152.
- 41) de NETTANCOURT, D. (2001) Incompatibility and Incongruity in wild and cultivated plants. Springer, Berlin Heidelberg New York.
 - 42) OBA, S., OHTA, A. and FUJIMOTO, F. (1998a) Grain shattering habit of buckwheat. In: C. Campbell and R. Przybylski (Eds.), *Advances in Buckwheat Research*, pp 70-75. Winnipeg, Canada.
 - 43) OBA, S., SUZUKI, Y. and FUJIMOTO, F. (1998b) Breaking strength of pedicel and grain shattering habit in two species of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) *Plant Prod. Sci.* 1: 62-66.
 - 44) OHNISHI, O. (1998a) Search for the wild ancestor of buckwheat III. The wild ancestor of cultivated common buckwheat, and of tatary buckwheat. *Economic Botany* 52: 123-133.
 - 45) OHNISHI, O. (1998b) Search for the Wild Ancestor of Buckwheat. I. Description of new *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) species and their distribution in China and the Himalayan hills. *Fagopyrum* 15: 18-28.
 - 46) OHNISHI, O. (1999) Non-shattering habit gene (*sht*), chlorophyll-deficient and other detrimental genes concealed in natural populations of the wild ancestor of common buckwheat. *Fagopyrum* 16: 23-28.
 - 47) OHNISHI, O., and MATSUOKA, Y. (1996) Search for the wild ancestor of buckwheat II. Taxonomy of *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) species based on morphology, isozymes and cpDNA variability. *Genes Genet. Syst.* 71: 383-390.
 - 48) OHSAKO, T., and OHNISHI, O. (1998) New *Fagopyrum* species revealed by morphological and molecular analyses. *Genes Genet. Syst.* 73: 85-94.
 - 49) OHSAKO, T., YAMANE, K., and OHNISHI, O. (2002) Two new *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) species, *F. gracilipedides* and *F. jinshaense* from Yunnan, China. *Genes Genet. Syst.* 77: 399-408.
 - 50) OUEDRAOGO, J.T., TIGNEGRE, J.B., TIMKO, M.P., and BELZILE, F.J. (2002) AFLP markers linked to resistance against *Striga gesnerioides* race 1 in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Genome* 45: 787-793.
 - 51) RICHARDS, R.A. and THURLING, N. (1973) The genetics of self-incompatibility in *Brassica campestris* L. ssp. *oleifera metzg.* Genotypic and environmental modification of *S*-locus control. *Genetica* 44: 439-453.
 - 52) SAMIMY, C. (1991) Barrier to interspecific crossing of *Fagopyrum esculentum* with *Fagopyrum tataricum*: I. Site of pollen-tube arrest. II. Organogenesis from immature embryos of *F. tataricum*. *Euphytica* 54: 215-219.
 - 53) SAMIMY, C., BJORKMAN, T., SIRITUNGA, D., and BLANCHARD, L. (1996) Overcoming the barrier to interspecific hybridization of *Fagopyrum esculentum* with *Fagopyrum tataricum*. *Euphytica* 91: 323-330.
 - 54) SCHOCH-BODMER, H. (1930) Zur Heterostylie von *Fagoprum esculentum*. *Schweizerische Bot. Ges. Berichte* 39: 4-15.
 - 55) SCHOCH-BODMER, H. (1934) Zum Heterostylieproblem : Griffelbeschaffenheit und Pollenschlauchwachstum bei *Fagoprum esculentum*. *Planta* 22: 149-152.
 - 56) SCHOPFER, C.R., NASRALLAH, M.E., and NASRALLAH, J.B. (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286: 1697-1700.
 - 57) SHARMA, K.D., and BOYES, J.W. (1961) Modified incompatibility of buckwheat following irradiation. *Can J Bot* 39: 1241-1246.
 - 58) SIJACIC, P., Wang, X., Skirpan, A.L., Wang, Y., Dowd, P.E., McCubbin, A.G., and Kao, S.H.T. (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429: 302-305.
 - 59) TAKAHASHI, R. (1955) The origin and evolution of cultivated barley. In: M. Demerec (Ed.) *Advances in Genetics* 7, pp 227-266. Academic Press, New York.
 - 60) TAKAHASHI, R. (1963) Further studies on the phylogenetic differentiation of cultivated barley. *Barley Genet.* 1: 19-26.
 - 61) TAKAHASHI, R., and HAYASHI, J. (1964) Linkage study of two complementary genes for brittle rachis in barley. *Ber. Ohara Inst. Landw. Biol., Okayama Univ.* 12: 99-105.
 - 62) TAKASAKI T, HATAKEYAMA K, SUZUKI G, WATANABE M, ISOGAI A, and HINATA K (2000) The *S* receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature* 403: 913-916.
 - 63) TAKAYAMA, S., SHIBA, H., IWANO, M., SHIMOSATO, H., CHE, F.S., KAI, N., WATANABE, M., SUZUKI, G., HINATA, K., and ISOGAI, A. (2000) The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA 97: 1920-1925.
- 64) 建部民雄 (1949) ソバの受精力に関する生理学的研究. (I) 花器の形態と受精力に就いて. 育種研究 3 : 91-95.
- 65) 建部民雄 (1950) ソバの受精力に関する生理学的研究. (II) 花粉管の成長速度について. 育種研究 4 : 71-74.
- 66) 建部民雄 (1953) ソバの受精力に関する生理学的研究. (III) 自家可稔長柱花個体について. 育種学雑誌 2 : 240-244.
- 67) 建部民雄 (1956) ソバの受精力に関する生理学的研究. (V) 花粉および花粉管の行動に関する研究. 育種学雑誌 6 : 156-162.
- 68) TOWNSEND, C.E. (1969) Self-compatibility studies with diploid alsike clover, *Trifolium hybridum* L. IV. Inheritance of type II self-compatibility response to temperature and the segregation of *S*-alleles in diploid alsike clover. Crop Sci. 9: 443-446.
- 69) TSUKAMOTO, T., ANDO, T., KOKUBUN, K., WATANABE, H., SATO, T., MASADA, M., MARCHESI, E., and KAO, T. (2003) Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaries* caused by a modifier locus that suppresses the expression of an *S-RNase* gene. Sex. Plant Reprod. 15: 255-264.
- 70) USHIJIMA, K., SASSA, H., DANDEKAR, A. M., GRADZIEL, T. M., TAO, R., and HIRANO, H. (2003) Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: Identification of a pollen-expressed F-Box Gene with haplotype-specific polymorphism. Plant Cell 15: 771-781.
- 71) WEDDERBURN, F.M., and RICHARDS, A.J. (1992) Secondary homostyly in *Primula* L.; evidence for the model of the *S* supergene. New Phytol. 121: 649-655.
- 72) WOO, S.H., ADACHI, T., JONG, S.K., and CAMPBELL, C.G. (1999) Inheritance of self-compatible and flower morphology in an interspecific buckwheat hybrid. Can. J. Bot. 483-490.
- 73) YASUI, Y., and OHNISHI, O. (1998) Phylogenetic relationships among *Fagopyrum* species revealed by the nucleotide sequences of the ITS region of the nuclear rRNA gene. Genes Genet. Syst. 73: 201-210.
- 74) YASUI, Y., WANG, Y.J., OHNISHI, O., and CAMPBELL, C.G. (2004) Amplified fragment length polymorphism linkage analysis of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and its wild self-pollinated relative *Fagopyrum homotropicum*. Genome 47: 345-351.

A genetic and breeding study for the production of self-compatible buckwheat cultivars (Self-compatible buckwheat cultivars)

Katsuhiko MATSUI

Summary

Common buckwheat (*F. esculentum*) is an annual crop and is widely cultivated in the northern hemisphere. The cultivated areas of buckwheat have been increasing because it can be grown in relatively less fertile fields and buckwheat provides high nutrition. Common buckwheat exhibits heteromorphic sporophytic self-incompatibility and needs insects or wind to mediate cross-pollination between pin and thrum plants. The yield of buckwheat is influenced by insects because the movement of insects is restricted by the weather. The breeding of buckwheat is also difficult because of self-incompatibility. In this study, I have combined the basic science of genetics and breeding in order to produce a highly constant yield of cultivar in buckwheat.

1. Production of self-compatible buckwheat lines and a genetic analysis of a self-compatible gene

Self-incompatibility, flower morphology, and pollen size are governed by the *S* supergene. We have produced self-compatible buckwheat lines by an interspecific cross between *F. esculentum* and *F. homotropicum* by embryo rescue. The flower morphology of these lines is a long homostyle, and the pollen size is similar to that of thrum. The pollen size of F₁ plants produced by a cross between a pin plant and the self-compatible plant was similar to that of the self-compatible line and segregated together with flower morphology without exception. The pollen tubes of the self-compatible plants were compatible with styles of the pin plants but incompatible with the styles of thrum plants. On the other hand, the pollen tubes of pin flowers were incompatible with the styles of self-compatible plants, but the pollen tubes of thrum flowers were compatible with the styles of self-compatible plants. These results indicated that the self-compatibility allele, *S^h*, retains heteromorphic incompatibility and suggests that the *S^h* allele was derived from a recombination in the *S* supergene.

2. A genetic analysis of the self-compatible gene in Pennline 10

The *S* supergene is thought to govern self-incompatibility, flower morphology, and pollen size in buckwheat. Using two self-fertile lines, one with long homostyle flowers (KSC2) and the other with short homostyle flowers (Pennline 10), I investigated whether the locus controlling flower morphology and self-compatibility of Pennline 10 is the same as that of KSC2. I assessed the pollen-tube growth in styles and flower morphology of F₁ and F₂ plants produced by crosses between plants with pin, thrum, or long-homostyle flower types and Pennline 10. The pollen grains of Pennline 10 were compatible with the style of all flower types. Both plants with short-pin flowers, whose ratio of style length to anther height was lower than that of the pin, and pin plants appeared in F₂ populations of thrum x Pennline 10 as well as in those of pin x Pennline 10. These results suggested that Pennline10 possesses the *s* allele as does the pin and that the short style length of Pennline 10 is controlled by multiple genes outside the *S* locus.

3. Genetic analysis of brittle pedicels in buckwheat

Shattering in buckwheat occurs because of brittle or weak pedicels. Brittle pedicels have been observed in wild buckwheat but not in cultivated buckwheat. Using two self-compatible lines, 01AMU2 with brittle pedicels and Kyukei SC2 (KSC2) with non-brittle pedicels, produced by an interspecific cross between *Fagopyrum esculentum* cv Botansoba (non-brittle) and *F. homotropicum* (brittle), we investigated the inheritance of brittle pedicels. F₁ plants derived from crosses between Botansoba x 01AMU2 and Botansoba x KSC2 had brittle pedicels. The F₂

population derived from the cross between Botansoba x 01AMU2 exhibited a segregation of brittle and non-brittle pedicels that fit the expected 3:1 ratio, suggesting that non-brittle pedicels in Botansoba are controlled by a single recessive gene (*sht1*). Another F₂ population, derived from the cross between Botansoba and KSC2, exhibited a segregation of brittles and non-brittle pedicels that fit an expected ratio of 9:7, suggesting that non-brittle pedicels in KSC2 are controlled by a different single recessive gene (*sht2*). Thus, brittle pedicels are achieved by two complementary genes *Sht1* and *Sht2*. The *sht1* locus is linked to the *S* locus with a recombination frequency of 5.46 ± 1.18 (%). We investigated whether common buckwheat has the allele *sht2* by crossing six common buckwheat lines with KSC2. An analysis of the preliminary data demonstrated that some of the F₁ had brittle pedicels and others had non-brittle pedicels, suggesting that some common buckwheat lines possess both the *Sht2* and *sht2* alleles.

4. Identification of DNA markers for rapid selection of non-brittle pedicel plants

Brittle pedicels in buckwheat are produced by two complementary, dominant genes, *Sht1* and *Sht2*. The *sht1* locus is linked to the *S* locus; almost all common buckwheat cultivars possess the allele *sht1*. To detect molecular makers linked to the *sht1* locus, we used an amplified fragment-length polymorphism (AFLP) analysis in combination with a bulked-segregant analysis of segregating progeny of a cross between a non-brittle common buckwheat line and a brittle self-compatible buckwheat line. We screened 312 primer combinations and constructed a linkage map around the *sht1* locus by using 102 F₂ plants. Five AFLP markers were linked to the *sht1* locus. Two of these, e54m58/610 and e55m46/320, co-segregated with the *sht1* locus without recombination. The two AFLP markers were converted STS markers according to the sequence of the AFLPs. The STS markers are useful for marker-assisted selection of non-brittle pedicel plants and provide a stepping-stone for map-based cloning and the characterization of the gene encoding non-brittle pedicels.

Key words: buckwheat, self-incompatibility, shattering, abscission, genetic analysis, marker assisted breeding.