

マルチプレックスPCRによる小麦種皮色遺伝子型判定の簡便法

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 公開日: 2019-03-22 キーワード: マルチプレックスPCR, 遺伝子型判定, Tamyb10, 種皮色, 小麦, 穂発芽耐性 作成者: 栗原, 志保, 松中, 仁 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002276

マルチプレックスPCRによる小麦種皮色遺伝子型判定の簡便法

栗原志保¹⁾・松中仁²⁾

摘 要

小麦 (*Triticum aestivum* L.) の種皮色遺伝子 *Tamyb10* の遺伝子型判定は、白粒系統を効率的に選抜するために有用である。*Tamyb10* の遺伝子型判定には、これまでHimiら (2011) の方法による10種類のプライマーを用いた1検体につき5反応のPCRが必要だった。

既報の4種類のプライマーと新たに設計した1種類のプライマーの合計5種類のプライマーからなるセット、及び既報の2種類のプライマーと新たに設計した2種類のプライマーの合計4種類のプライマーからなるセットを考案した。これらプライマーセットを用いて1検体につき2反応のマルチプレックスPCRを行うことにより、*Tamyb10-A1*、*Tamyb10-B1*、及び*Tamyb10-D1*の遺伝子型を簡便に判定できる方法を確認したので紹介する。

キーワード：マルチプレックスPCR、遺伝子型判定、*Tamyb10*、種皮色、小麦、穂発芽耐性

I. 緒 言

種皮色が白い白粒小麦には製粉時の種皮混入による粉色のくすみへの影響が少なく、製粉歩留まりを高められるというメリットがある。一方、一般的に白粒小麦は、種皮が赤い赤粒小麦より穂発芽耐性が低い。我が国では、湿潤な気候のため小麦が収穫前に立毛で穂発芽を発生し、小麦粉の品質低下を招きやすい。そのため、穂発芽耐性の強い白粒小麦品種の開発が望まれている。

小麦の種皮色遺伝子座であるR座については、古くから遺伝解析が行われてきた。その対立遺伝子について整理するとTable 1のようになる。R座は異質6倍体作物である小麦のA, B, 及びDゲノムに1個ずつ座乗し (MetzgerとSilbaugh, 1970), その形質はメンデルの法則に従い遺伝する。赤が優性、白が劣性形質である。近年の表記法では、A, B, 及びDゲノムに座乗する赤粒遺伝子をそれぞれ*R-A1b*, *R-B1b*, 及び*R-D1b*, 白粒の対立遺伝子を*R-A1a*, *R-B1a*, 及び*R-D1a*と表す (McIntoshら, 1998)。3つのうち1つでもR座の遺伝子型が赤粒型だと種皮色は赤になり、種皮色白は劣性ホモ (*R-A1a/R-B1a/*

R-D1a) の表現型である。また、交雑後代の場合、種皮は母株の組織なので種子が登熟するまでその世代の表現型は分からない。これらのことから、育種において、親系統の種皮色の遺伝子型を判定するためだけでなく、幼植物のうちに交配後代の分離集団から白粒を効率的に選抜するためにも、遺伝子マーカーの開発が望まれていた。

R座の候補遺伝子として、*Tamyb10*が報告された (Himiら, 2011)。その中で、推定アミノ酸配列がR2R3タイプのMYBドメインを持つことから、TaMYB10は種皮色素のフラボノイド生合成系遺伝子の発現を制御する転写因子であると推測された。栗原と安倍

Table 1 R loci controlling seed coat color in wheat

Chromosome	Allele	
	Dominant	Recessive
3AL	<i>R-A1b</i> (R_2)	<i>R-A1a</i> (r_2)
3BL	<i>R-B1b</i> (R_3)	<i>R-B1a</i> (r_3)
3DL	<i>R-D1b</i> (R_1)	<i>R-D1a</i> (r_1)

- Seed coat color is a Mendelian inheritance trait.
- Two notations have been used for the alleles, the older of which is shown in parentheses (McIntosh et al. 1998; Heyne and Livers 1953; Metzger and Silbaugh 1970).
- Phenotypes of seed coat color are not identified until one generation later because the seed coat is a maternal tissue.

平成30年11月28日 原稿受理

1) 北海道農業研究センターリスク管理室
2) 九州沖縄農業研究センター水田作研究領域

(2015) が赤粒品種「ゼンコウジコムギ」から単離した *Tamyb10-D1* を遺伝子組換え技術により白粒品種「Fielder」に導入したところ「Fielder」が赤粒に変わったことから、*Tamyb10* 遺伝子がR座の原因遺伝子であることが証明された。現在のところ、*Tamyb10-A1*、*Tamyb10-B1*、*Tamyb10-D1* 遺伝子には、それぞれ3つ（機能型1つと機能欠失型2つ）の複対立遺伝子、2つ（機能型と機能欠失型）、及び2つ（機能型と機能欠失型）の対立遺伝子が報告されている（Himiら, 2011）。そのため、品種や固定系統において *Tamyb10* の遺伝子型には少なくとも $3 \times 2 \times 2$ の12通りの組み合わせが存在する。交配後代の分離集団においては *Tamyb10-A1*、*Tamyb10-B1*、*Tamyb10-D1* 遺伝子のそれぞれにヘテロの遺伝子型が存在するため、さらに多くの組み合わせが存在し複雑である。そのうち白粒の表現型を示す組み合わせは機能欠失型の $2 \times 1 \times 1$ の2通りのみである。

Tamyb10 の遺伝子型を判定するための方法として、Himiら (2011) には、10種類のプライマーを用いた1検体につき5反応のPCRを行う方法が、プライマー塩基配列情報とともに記載されている。この方法はR座を活用した小麦の育種に活用することができるが、1検体につき5反応のPCRを行うのは煩雑であるため、より簡便な方法の開発が望まれていた。

II. 材料および方法

1. 供試品種・系統およびDNA抽出

Table 2に示す小麦7品種：「Fielder」（アイダホ農業試験場育成，文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して京都大学大学院農学研究科より提供，系統番号KT020-061），「タマ

イズミ」（農研機構・作物研究所育成），「ゼンコウジコムギ」（長野県農業試験場育成），「AUS1408」（オーストラリア品種），「ゆめちから」（農研機構・北海道農業研究センター育成），「きたほなみ」（道総研・北見農業試験場育成），及び「Chinese Spring」（遺伝学上の標準品種）を供試した。このうち「ゼンコウジコムギ」，「ゆめちから」，「きたほなみ」，及び「Chinese Spring」の4品種は赤粒である。「ゼンコウジコムギ」と「Chinese Spring」のA，B，DゲノムのR座の遺伝子型は，それぞれ *R-A1a/R-B1b/R-D1b*，*R-A1a/R-B1a/R-D1b* である（Miuraら，2002；HeyneとLivers，1953）。「ゆめちから」と「きたほなみ」のR座については報告が無い。残り3品種：「Fielder」，「タマイズミ」，及び「AUS1408」は白粒である。「タマイズミ」と「AUS1408」の遺伝子型は *R-A1a/R-B1a/R-D1a* である（Himiら，2011）。「Fielder」のR座についてはこれまでに報告が無いが，白粒が劣性ホモの表現型であることから *R-A1a/R-B1a/R-D1a* と推定される。

また，白粒系統へ「ゼンコウジコムギ」を戻し交配した系統の分離集団を供試した。

幼植物の葉から，QIAGEN社のDNeasy Plant Kitを用い付属のプロトコールに従ってDNAを抽出した。

2. PCRによる *Tamyb10* の遺伝子型判定

最初に，種皮色遺伝子型が既知または推定されている「Fielder」（白粒），「タマイズミ」（白粒），「ゼンコウジコムギ」（赤粒），及び「AUS1408」（白粒）の4品種について，Himiらの方法（2011）（以下，従来法と記す）によって10種類のプライマーを用いて1検体につき5反応のPCRにより *Tamyb10* の遺

Table 2 Genotypes of R loci in white- or red-grained wheat varieties used in this study

Variety	Genotype			Phenotype	
	<i>R-A1</i>	<i>R-B1</i>	<i>R-D1</i>	Grain color	Reference
Fielder	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	White	-
Tamaizumi	<i>a</i> (CS type)	<i>a</i>	<i>a</i>	White	Himi et al. (2011)
Zenkoujikomugi	<i>a</i> (CS type)	<i>b</i>	<i>b</i>	Red	Miura et al. (2002)
AUS1408	<i>a</i> (<i>GeST</i> insertion)	<i>a</i>	<i>a</i>	White	Himi et al. (2011)
Yumechikara	No information	No information	No information	Red	-
Kitahonami	No information	No information	No information	Red	-
Chinese Spring	<i>a</i> (CS type)	<i>a</i>	<i>b</i>	Red	Heyne and Livers (1953)

a: non-functional. There are two types of non-functional *Tamyb10-A1* genes linked with *R-A1a*: Chinese Spring type (CS type) and *Genome Surfing Trader* insertion (*GeST* insertion) (Himi et al. 2011).

b: functional.

伝子型判定を行った。従来法に用いるプライマーの遺伝子上のおおよその位置と方向をFig. 1左図に示す。

次に、同じ4品種について、本報で紹介する新規簡便法の2反応のマルチプレックスPCRにより *Tamyb10* の遺伝子型判定を行った。第1のマルチプレックスPCRの方法をTable 3に示す。すなわち、従来法で用いられる4種類のプライマー (Tamyb10-

LP6, Tamyb10-LP7, Tamyb10-RP4, 及びTamyb10-LP8), 及び新たに設計したプライマー (ARP1) の合計5種類のプライマーからなるセットと鋳型DNAを共存させてPCRを行うことにより, *Tamyb10-A1* の遺伝子型判定を行った。第2のマルチプレックスPCRの方法をTable 4に示す。すなわち、従来法で用いられる2種類のプライマー (Tamyb10-LP2及びTamyb10-RP1), 及び新たに設計した2種類のプライ

Table 3 Method of multiplex PCR 1 for genotyping of *Tamyb10-A1*

Primers, amplicon sizes, and functionality

Gene	Multiplex primers	Amplicon size	Functional/non-functional
A(1)' Tamyb10-LP6	Tamyb10-RP4	1,059 bp	Functional
A(2) Tamyb10-LP7		536 bp	Non-functional (Chinese Spring type)
A(3)' Tamyb10-LP8	ARP1	412 bp	Non-functional (<i>GeST</i> insertion)

Primers information

Primer	Reference/sequence
Tamyb10-LP6	
Tamyb10-LP7	Himi et al. (2011)
Tamyb10-RP4	
Tamyb10-LP8	
ARP1	CCGCAGCATTAACTTGTAGC

Composition of the reaction mixture for multiplex PCR 1

Reaction mixture for multiplex PCR 1 (total 20 ul)	Final concentration
100 ng/ul genomic DNA	5 ng/ul genomic DNA
10X <i>Ex Taq</i> Buffer (Mg ²⁺ plus)*	1X <i>Ex Taq</i> Buffer (Mg ²⁺ plus)
2.5 mM dNTP Mixture	200 uM dNTP Mixture
50% Glycerol	10% Glycerol
10 uM Tamyb10-LP6	0.2 uM Tamyb10-LP6
10 uM Tamyb10-LP7	0.2 uM Tamyb10-LP7
10 uM Tamyb10-RP4	0.2 uM Tamyb10-RP4
10 uM Tamyb10-LP8	0.2 uM Tamyb10-LP8
10 uM ARP1	0.2 uM ARP1
<i>TAKARA EX Taq</i> HS (5 U/ul)**	0.025 U/ul <i>TAKARA EX Taq</i> HS
Distilled water	up to 20

*, **: Supplied by Takara Bio Inc..
According to the cool start method.

Multiplex PCR 1

94°C	2 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
61°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	7 min	

Table 4 Method of multiplex PCR 2 for genotyping of *Tamyb10-B1* and *Tamyb10-D1*

Primers, amplicon sizes, and functionality				
Gene	Multiplex primers		Amplicon size	Functional/non-functional
B	Tamyb10-LP2	Tamyb10-RP1	282 bp	Functional
			263 bp	Non-functional (19-bp deletion form exon 3)
D	DLP7	DRP7	209 bp	Functional

Primers information

Primer	Reference/sequence
Tamyb10-LP2	Himi et al. (2011)
Tamyb10-RP1	
DLP7	CATCGAGCTGGGCTTCAT
DRP7	TCTGGCATTTTGACAGTTCC

Composition of the reaction mixture for multiplex PCR 2

Reaction mixture for multiplex PCR 2 (total 20 ul)		Final concentration
100 ng/ul genomic DNA	1 ul	5 ng/ul genomic DNA
10X <i>Ex Taq</i> Buffer (Mg ²⁺ plus)*	2	1X <i>Ex Taq</i> Buffer (Mg ²⁺ plus)
2.5 mM dNTP Mixture	1.6	200 uM dNTP Mixture
50% Glycerol	4	10% Glycerol
10 uM Tamyb10-LP2	0.4	0.2 uM Tamyb10-LP2
10 uM Tamyb10-RP1	0.4	0.2 uM Tamyb10-RP1
10 uM DLP7	0.4	0.2 uM DLP7
10 uM DRP7	0.4	0.2 uM DRP7
<i>TAKARA EX Taq</i> HS (5 U/ul)**	0.1	0.025 U/ul <i>TAKARA EX Taq</i> HS
Distilled water	up to 20	

*, **: Supplied by Takara Bio Inc.
According to the cool start method.

Multiplex PCR 2

94°C	2 min	} 30 cycles
94°C	30 sec	
63°C	30 sec	
72°C	20 sec	
72°C	7 min	

マー (DLP7及びDRP7) の合計4種類のプライマーからなるセットと鋳型DNAを共存させてPCRを行うことにより, *Tamyb10-B1*及び*-D1*の遺伝子型判定を行った。2反応のマルチプレックスPCRに用いるプライマーの遺伝子上のおおよその位置と方向をFig. 2左図に示す。

これら従来法による1検体につき5反応のPCRと本報で紹介する簡便法による1検体につき2反応のマルチプレックスPCRのそれぞれの判定から得られる遺伝子型が一致するかどうか確かめた。

さらに, 種皮色遺伝子型がこれまでに調べられて

いない北海道小麦2品種: 「ゆめちから」(赤粒)と「きたほなみ」(赤粒), 及び対照品種として遺伝子型が既知である「Chinese Spring」(赤粒)の3品種について, 新規簡便法により, *Tamyb10-A1*, *-B1*, 及び*-D1*の遺伝子型判定を行った。

最後に, 以下のように新規簡便法の実用性の検証を行った。筆者らは穂発芽極難の形質を持つ赤粒品種「ゼンコウジコムギ」の白粒準同質遺伝子系統を育成している。すなわち, 一回親の白粒系統に「ゼンコウジコムギ」を交配し, その後戻し交配と後代検定または白粒選抜を繰り返した。これらのBC₉お

よびBC₁₀世代の分離集団について、マルチプレックスPCRにより *Tamyb10* の遺伝子型判定を行い、白粒選抜を行った。

Ⅲ. 結果

1. 従来法による *Tamyb10* の遺伝子型判定

最初に、従来法により4品種：「Fielder」（白粒）、「タマイズミ」（白粒）、「ゼンコウジコムギ」（赤粒）、「AUS1408」（白粒）の *Tamyb10-A1* の遺伝子型を判定するため、PCR 1, PCR 2, 及びPCR 3の3反応を行った (Fig. 1)。「Fielder」, 「タマイズミ」, 及び「ゼンコウジコムギ」では、PCR 1により機能型遺伝子断片A(1)の増幅産物は検出されず、PCR 2により機能欠失型遺伝子断片A(2)の増幅産物が検出された。A(2)は、第1エキソンが *Tamyb10* とは異なる配列に組換わって機能が欠失した、Chinese Springタイプの遺伝子断片である。また、PCR 3により遺伝子断片A(3)の2種類のうち短い方の増幅産物 (565 bp) が検出された。これらの結果から、これら3品種の *Tamyb10-A1* の遺伝子型は Chinese Springタイプの機能欠失型 *R-A1a* である。一方、「AUS1408」では、PCR 1により第1エキソンを含む機能型遺伝子断片A(1)の増幅産物が検出され、PCR 2により機能欠失型遺伝子断片A(2)の増幅産物は検出されなかった。また、PCR 3により遺伝子断片A(3)の2種類のうち長い方の増幅産物 (2,750 bp) が検出された。この増幅産物は、第2イントロンへの2.2 kbの自律性を失ったトランスポゾン様配列 *Genome Surfing Trader* (以下 *GeST* と略す) の介在を示し、*GeST* の存在が *Tamyb10-A1* の正常な発現を妨げると考えられる。すなわち、「AUS1408」（白粒）は機能型A(1)の配列を持っているが、機能型A(1)は機能欠失型A(3)により打ち消される。このことから、「AUS1408」（白粒）の *Tamyb10-A1* の遺伝子型は機能欠失型 *R-A1a* であるが、他の3品種とは異なり *GeST* 挿入による機能欠失である。

次に、従来法により4品種の *Tamyb10-B1* の遺伝子型を判定するためPCR 4を行った (Fig. 1)。白粒3品種：「Fielder」, 「タマイズミ」, 及び「AUS1408」では、赤粒品種の「ゼンコウジコムギ」のそれに比べ短い遺伝子断片の増幅産物が検出された。これは、白粒3品種の *Tamyb10-B1* の第3エキソンに19 bpの欠失があるが、「ゼンコウジコムギ」にはその欠失が無い事を示す。このことから、白粒3品種の

Tamyb10-B1 の遺伝子型は機能欠失型 *R-B1a*, 「ゼンコウジコムギ」は機能型 *R-B1b* である。

最後に、従来法により4品種の *Tamyb10-D1* 遺伝子型を判定するためPCR 5を行った (Fig. 1)。赤粒品種の「ゼンコウジコムギ」のみで増幅産物が検出され、白粒3品種では検出されなかった。このことから「ゼンコウジコムギ」の *Tamyb10-D1* の遺伝子型は機能型 *R-D1b*, 「Fielder」, 「タマイズミ」, 及び「AUS1408」は機能欠失型 *R-D1a* である。

以上より、供試4品種の *Tamyb10-A1/-B1/-D1* の遺伝子型をまとめると、白粒品種の「Fielder」, 「タマイズミ」, 「AUS1408」はいずれも *R-A1a/R-B1a/R-D1a*, 赤粒品種の「ゼンコウジコムギ」は *R-A1a/R-B1b/R-D1b* である (Fig. 1 右下表)。そのうち *R-A1a* には2タイプがあり、「Fielder」, 「タマイズミ」, 及び「ゼンコウジコムギ」は Chinese Spring タイプ、一方、「AUS1408」は *GeST* 挿入タイプの機能欠失型である。

2. 新規簡便法による *Tamyb10* の遺伝子型判定

1.において従来法により判定を行った4品種の *Tamyb10* の遺伝子型を、以下のように新規簡便法により再判定した。

まず、*Tamyb10-A1* の遺伝子型を1反応のPCRで判定するため、Table 3に示す方法で第1のマルチプレックスPCRを行った (Fig. 2)。「Fielder」（白粒）, 「タマイズミ」（白粒）, 及び「ゼンコウジコムギ」（赤粒）では、長さ536 bpの遺伝子断片A(2)の増幅産物が検出された。これは、従来法のPCR 2 (Fig. 1)でも検出された、第1エキソンが機能型の *Tamyb10* とは異なる配列に組換わった Chinese Springタイプの遺伝子断片である。この結果より、これら3品種の *Tamyb10-A1* の遺伝子型は Chinese Springタイプの機能欠失型 *R-A1a* である。一方、「AUS1408」では、長さ1,059 bpの遺伝子断片A(1)'の増幅産物と長さ412 bpの遺伝子断片A(3)'の増幅産物が検出された。A(1)'は機能型遺伝子断片である。A(3)'の増幅産物の有無は、それぞれ第2イントロンの *GeST* 挿入の有無に対応するので、この品種の第2イントロンに *GeST* の挿入が有り *Tamyb10-A1* の正常な発現を妨げると考えられる。すなわち、機能型A(1)'は、機能欠失型A(3)'により打ち消される。このことから、「AUS1408」（白粒）の *Tamyb10-A1* の遺伝子型は *GeST* 挿入による機能欠失型 *R-A1a* である。

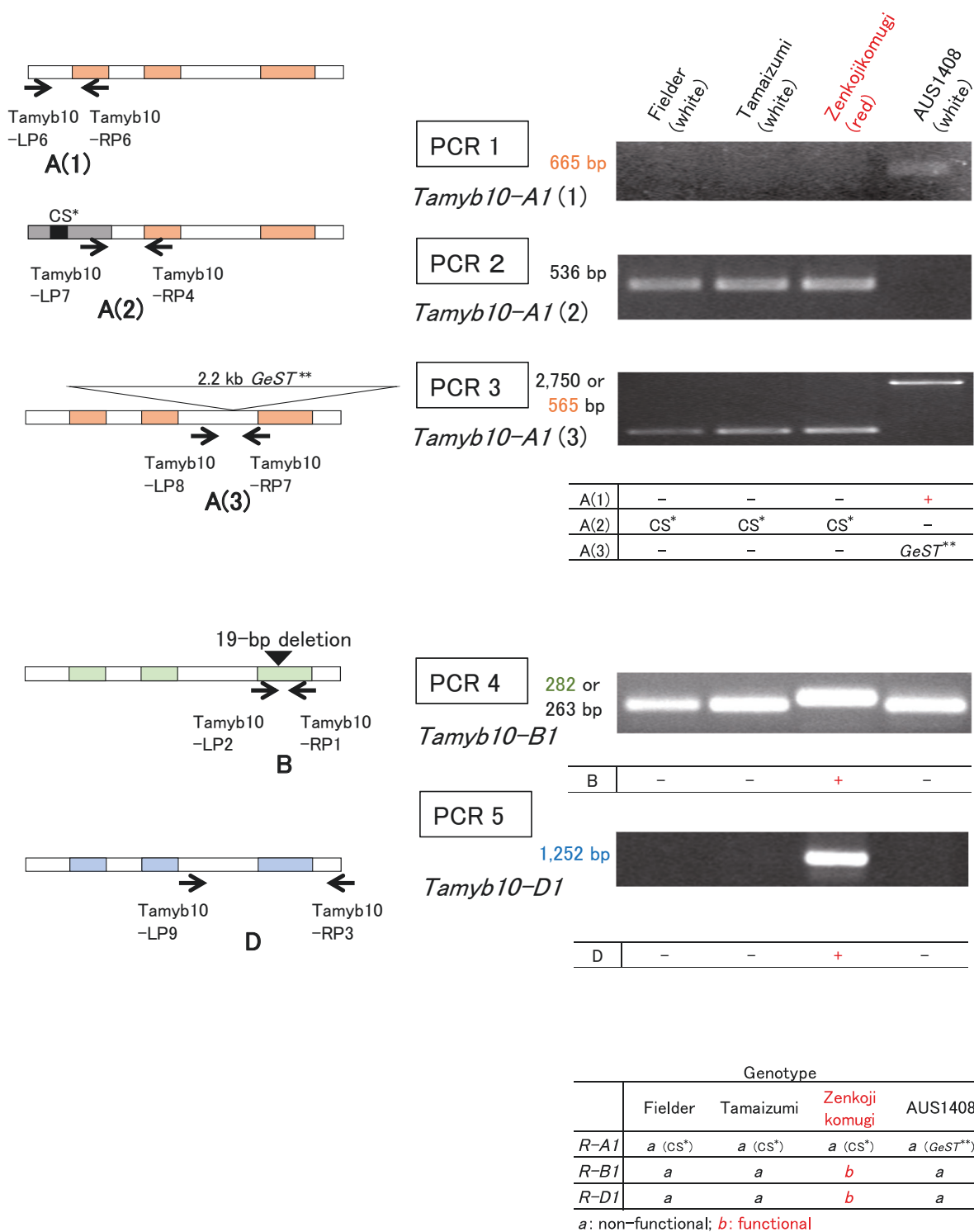


Fig. 1 PCR genotyping of *Tamyb10* genes in four wheat varieties, using the previous method.

Five PCRs were required for genotyping according to Himi et al. (2011). Left figures indicate genomic structures of *Tamyb10* genes. Colored boxes indicate exons, empty boxes indicate introns or untranslated regions, and black and gray boxes indicate a non-functional sequence of Chinese Spring type. Arrows represent orientation and approximate locations of primers used for PCRs. CS*: Chinese Spring type; *GeST****: insertion of a transposon-like sequence as a non-autonomous form.

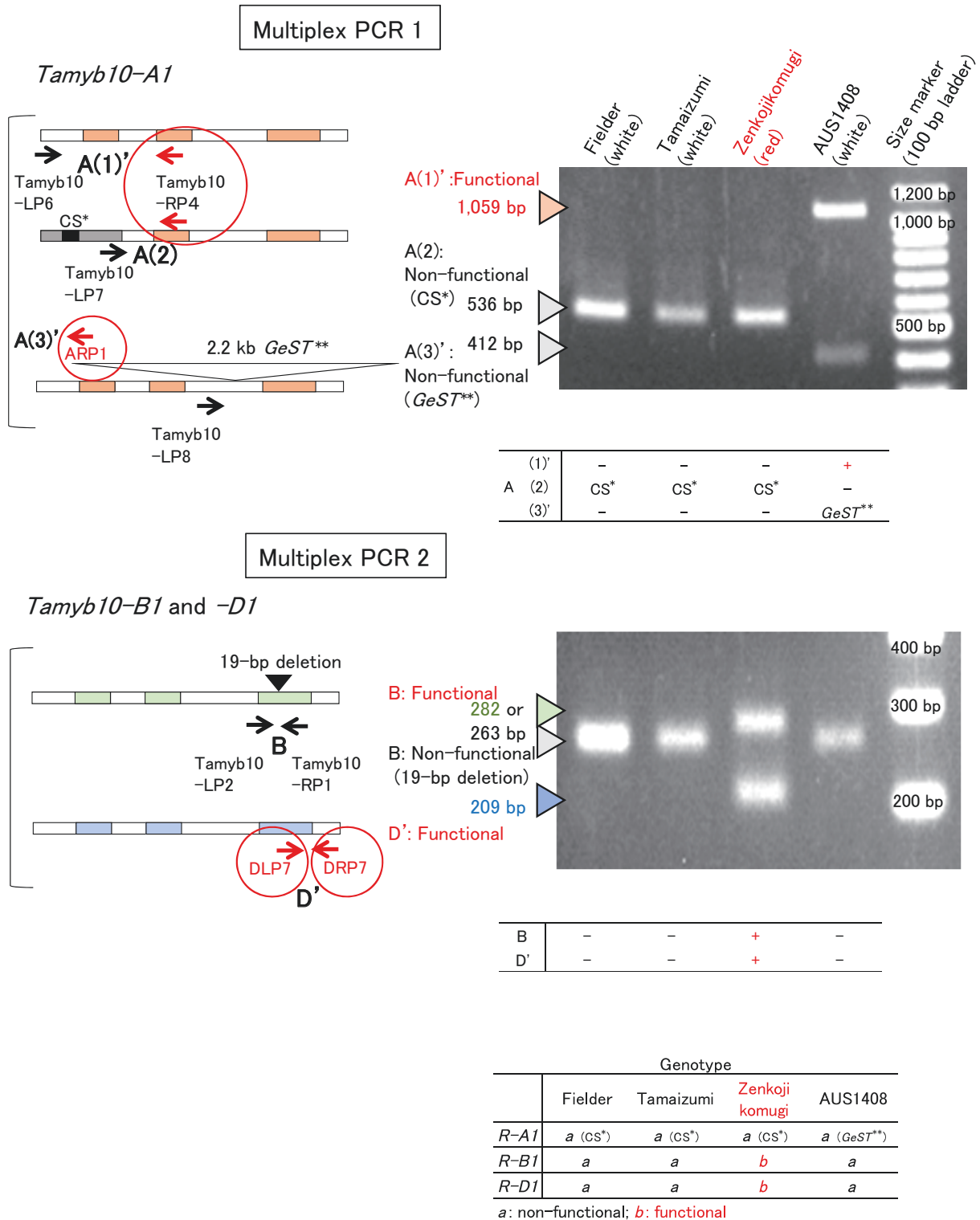


Fig. 2 Multiplex PCR genotyping of *Tamyb10* genes in four same wheat varieties as Fig. 1, using the new method. Two Multiplex PCRs were carried out according to the methods in Tables 3 and 4. Left figures show genomic structures of *Tamyb10* genes. Colored boxes indicate exons, empty boxes indicate introns or untranslated regions, and black and gray boxes indicate a non-functional sequence of Chinese Spring type. Arrows represent orientation and approximate locations of primers used for multiplex PCRs. Tamyb10-RP4 is a common reverse primer used to distinguish between A(1)' and A(2). ARP1 is a reverse primer designed in this study to detect *GeST* in *Tamyb10-A1*, and DLP7 and DRP7 are a primers' pair designed in this study to detect exon 3 of *Tamyb10-D1*. CS*: Chinese Spring type; *GeST*** : insertion of a transposon-like sequence as a non-autonomous form.

次に*Tamyb10-B1*と*-D1*の遺伝子型を1反応のPCRで判定するため、Table 4に示す方法で第2のマルチプレックスPCRを行った (Fig. 2)。白粒3品種：「Fielder」, 「タマイズミ」, 及び「AUS1408」では、長さ263 bpの遺伝子断片の増幅産物のみが検出された。赤粒品種「ゼンコウジコムギ」では、長さ282 bpと209 bpの2種類の遺伝子断片増幅産物が検出された。263 bpと282 bpの増幅産物は、それぞれ*Tamyb10-B1*第3エキソンの19 bp欠失の有無と対応している。また、209 bpの増幅産物は*Tamyb10-D1*の第3エキソンが存在しこの遺伝子が機能型であることを示す。このことから、白粒3品種の*Tamyb10-B1*と*-D1*の遺伝子型は共に機能欠失型*R-B1a/R-D1a*, 「ゼンコウジコムギ」は共に機能型*R-B1b/R-D1b*である。

以上の2反応のマルチプレックスPCRの結果より、供試4品種の*Tamyb10-A1/-B1/-D1*の遺伝子型をまとめると、白粒品種の「Fielder」, 「タマイズミ」, 「AUS1408」が*R-A1a/R-B1a/R-D1a*, 赤粒品種の「ゼンコウジコムギ」が*R-A1a/R-B1b/R-D1b*である (Fig. 2 右下表)。そのうち、*R-A1a*については、「Fielder」, 「タマイズミ」, 及び「ゼンコウジコムギ」の3品種はChinese Springタイプ, 「AUS1408」は*GeST*挿入タイプの機能欠失型である。この新規簡便法による遺伝子型判定は、1. に述べた従来法による判定結果と一致した (Fig. 1 右下表)。

3. 簡便法による*Tamyb10*の遺伝子型判定例：「ゆめちから」と「きたほなみ」

北海道の小麦2品種：「ゆめちから」と「きたほなみ」の*Tamyb10*の遺伝子型を判定するために、遺伝子型が既知である「Chinese Spring」(*R-A1a/R-B1a/R-D1b*) (HeyneとLivers, 1953 ; MetzgerとSilbaugh, 1970) を対照品種として、新規簡便法の2反応のマルチプレックスPCRを行った。供試品種と対照品種はいずれも赤粒である。

まず、*Tamyb10-A1*の遺伝子型を1反応のPCRで判定するため、Table 3に示す方法で第1のマルチプレックスPCRを行った (Fig. 3)。「ゆめちから」と「Chinese Spring」では長さ536 bpの遺伝子断片A(2)の増幅産物が検出され、一方、「きたほなみ」では長さ1,059 bpの遺伝子断片A(1)'の増幅産物が検出された。3品種のいずれから長さ413 bpの*GeST*挿入タイプの機能欠失型遺伝子断片A(3)'は

検出されなかった。このことから、「ゆめちから」と「Chinese Spring」の*Tamyb10-A1*の遺伝子型はChinese Springタイプの機能欠失型*R-A1a*, 「きたほなみ」は機能型*R-A1b*である。

次に*Tamyb10-B1*と*-D1*の遺伝子型を1反応のPCRで判定するため、Table 4に示す方法で第2のマルチプレックスPCRを行った (Fig. 3)。「ゆめちから」では長さ282 bpと209 bpの遺伝子断片の増幅産物が検出された。前者は*Tamyb10-B1*の機能型、後者は*Tamyb10-D1*の機能型を示すので、遺伝子型は*R-B1b/R-D1b*である。一方、「きたほなみ」と「Chinese Spring」では長さ263 bpと209 bpの遺伝子断片の増幅産物が検出された。前者は*Tamyb10-B1*の機能欠失型、後者は*Tamyb10-D1*の機能型を示すので、遺伝子型は*R-B1a/R-D1b*である。

以上の2反応のマルチプレックスPCRの結果より供試3品種の*Tamyb10-A1/-B1/-D1*の遺伝子型をまとめると、「ゆめちから」は*R-A1a/R-B1b/R-D1b*, 「きたほなみ」は*R-A1b/R-B1a/R-D1b*, 「Chinese Spring」は*R-A1a/R-B1a/R-D1b*である (Fig. 3 下表)。なお、「Chinese Spring」の遺伝子型は既報と一致した。また、「ゆめちから」の*R-A1a*はChinese Springタイプの機能欠失型である。

4. 簡便法による*Tamyb10*の遺伝子型判定例：分離集団からの白粒の選抜

「ゼンコウジコムギ」(赤粒)の白粒準同質遺伝子系統の育成過程で新規簡便法を用いて白粒個体を選抜することにより、その実用性を検証した。

BC₉世代の分離集団36個体について幼植物のうちに第2のマルチプレックスPCRを行ったところ、遺伝子型*R-B1a/R-D1a*を持つ3個体が選抜された(データ未提示)。「ゼンコウジコムギ」の*Tamyb10*の遺伝子型は*R-A1a/R-B1b/R-D1b*なので、BC₈世代の白粒個体へ「ゼンコウジコムギ」を交配した分離集団から*R-B1a/R-D1a*が分離する期待値は1/16であり、その出現頻度は期待値に近かった。緒言に述べたように種皮は母株の組織なので種子が登熟するまでその世代の表現型は分からないが、遺伝子型からこれらの個体から白粒が得られることが推測された。そこで、これらの個体に当代のうちに10回目の戻し交配を行うことができ、また、種子の登熟後に種皮表現型が実際に白であることを確認した。

次に、BC₁₀世代の分離集団212個体について、遺

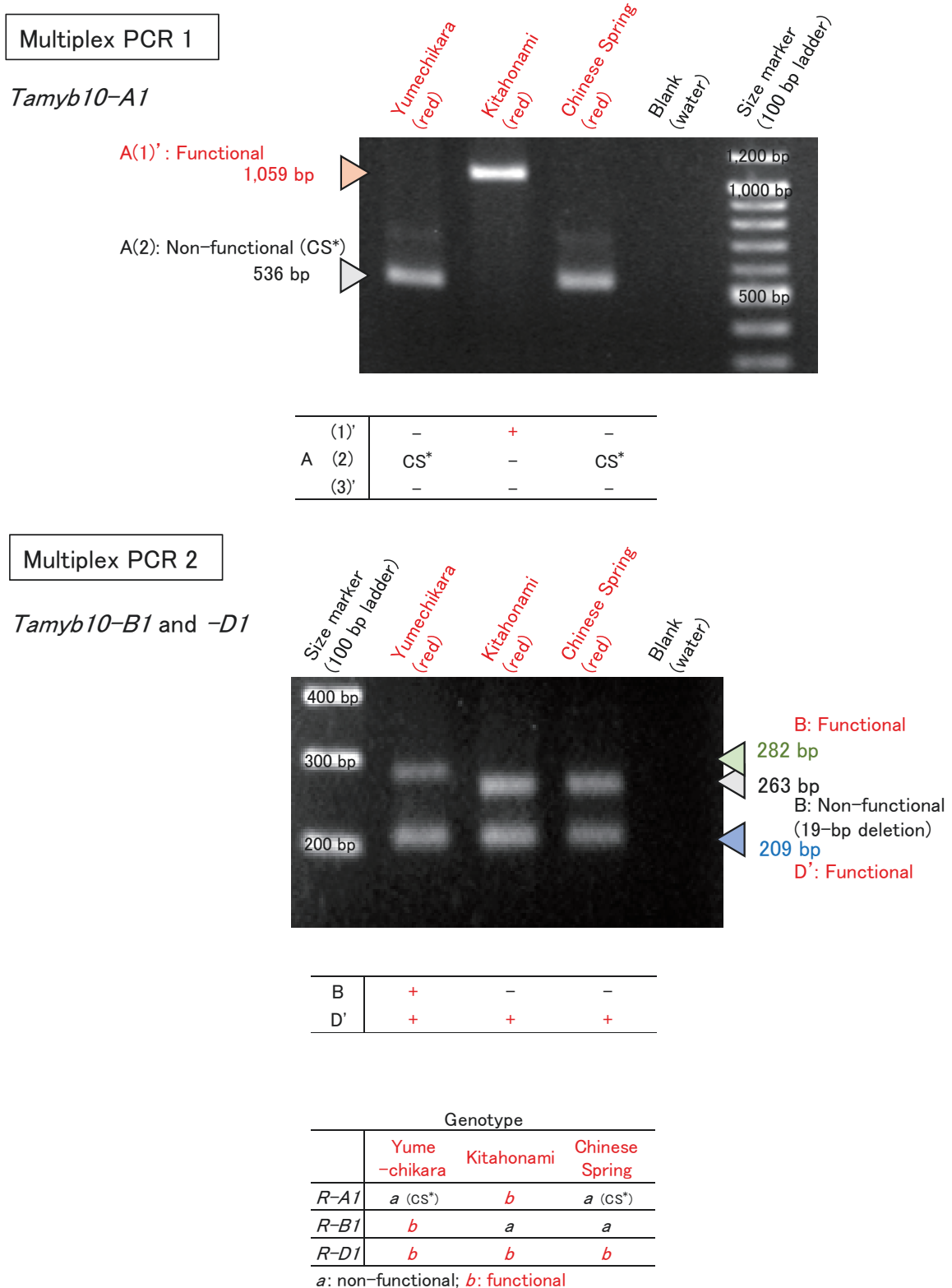


Fig. 3 Multiplex PCR genotyping of *Tamyb10* genes in two leading varieties from Hokkaido, using the new method.

Two multiplex PCRs were carried out according to the methods in Tables 3 and 4. Two leading varieties from Hokkaido, “Yumechikara” and “Kitahonami”, with unknown *Tamyb10s* genotypes, were analyzed with “Chinese Spring” as a control that genotype. CS*: Chinese Spring type.

伝子型が既知である赤粒品種「ミナミノカオリ」(*R-A1a/R-B1b/R-D1b*)と西海203号(*R-A1b/R-B1a/R-D1a*)を対照品種に用いて検定を行った(Fig. 4)。第1のマルチプレックスPCRを行ったところ、全個体からChinese Springタイプの*R-A1a*の遺伝子型が検出された(Table 5)。第2のマルチプレックスPCRを行ったところ、*Tamyb10-B1*については38個体から*R-B1a*、43個体から*R-B1b*の遺伝

子型が、また131個体からヘテロ型が検出された。*Tamyb10-D1*については53個体から*R-D1a*、159個体から*R-D1b*の遺伝子型が検出された。また、15個体からは*R-B1a*かつ*R-D1a*の遺伝子型が検出された(Table 5)。すなわち、これら15個体の遺伝子型は*R-A1a/R-B1a/R-D1a*である(Fig. 4 黄色でマーク; Table 5 右表)。これらの種皮色表現型はいずれも白を呈した。

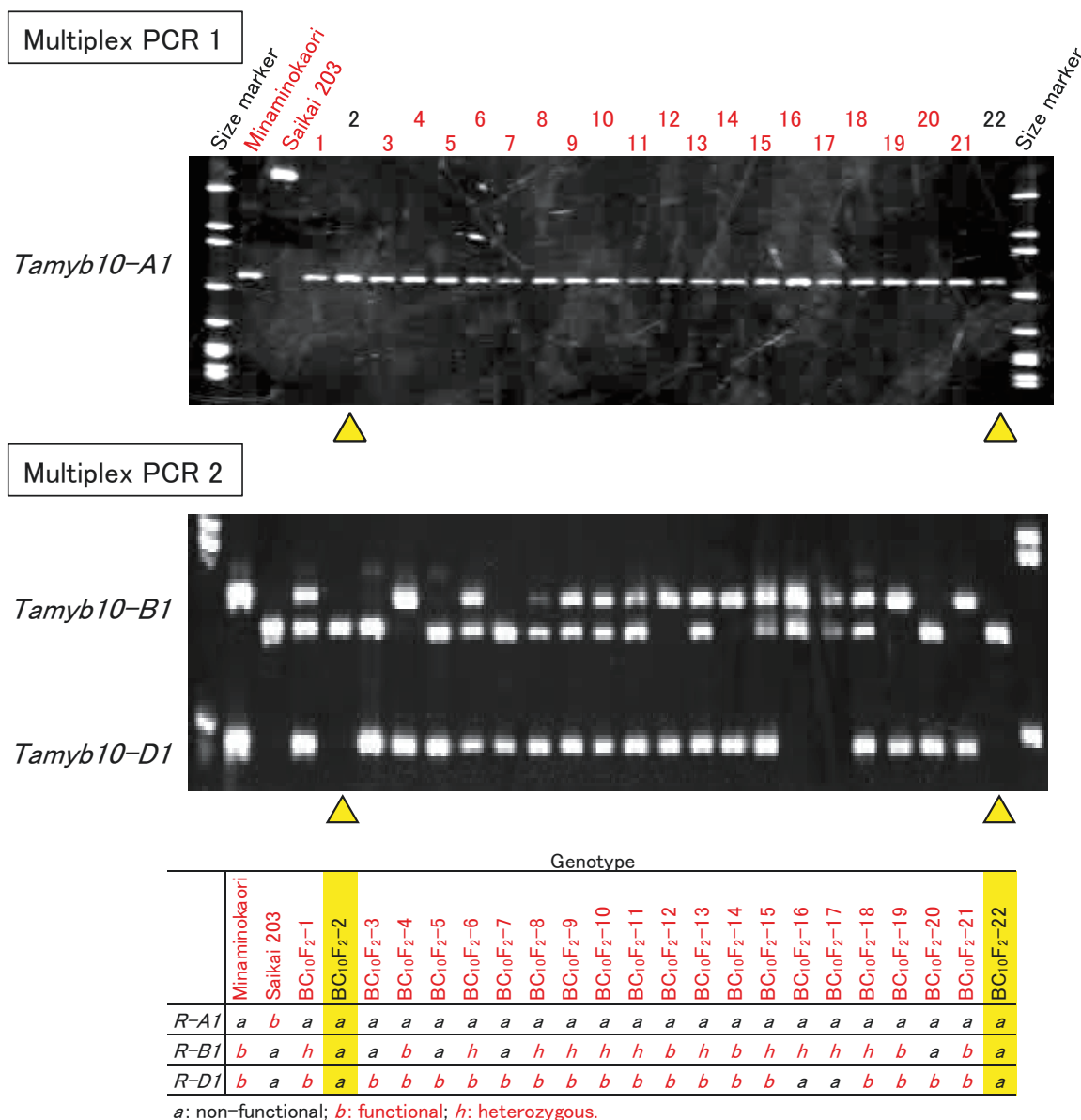


Fig. 4 A practical utilization example for the multiplex PCR genotyping of *Tamyb10* genes in a backcross population.

212 F₂ segregants from a tenth backcross population (a white-grained line × 11 times of “Zenkujikomugi” (a red-grained variety)) were genotyped according to the multiplex PCR. This figure shows a part of the gel electrophoresises. 1-22: “BC₁₀F₂-1 to -22”. “Minaminokaori” and “Saikai 203” were control varieties with known *Tamyb10s* genotypes. The size marker “φX174/Hinc II digest” was applied at the lanes at each end of each gel.

BC₁₀F₂-2 and BC₁₀F₂-22 plants marked in yellow showed the genotype *R-A1a/R-B1a/R-D1a* and their seed coat exhibited white color.

Table 5 Genotype segregation of the seed coat color genes in 212 F₂ plants from a backcross population

	<i>R-A1</i>	<i>R-B1</i>	<i>R-D1</i>	<i>R-D1</i>		Total		
				<i>a</i>	<i>b</i>			
<i>a</i>	212	38	53	<i>R-B1</i>	<i>a</i>	15	23	38
<i>b</i>	0	43	159		<i>b</i>	9	34	43
<i>h</i>	0	131	-		<i>h</i>	29	102	131
Total	212	212	212	Total	53	159	212	

a: non-functional; *b*: functional; *h*: heterozygous.

IV. 考察

1. 新規簡便法の特徴

本研究では、従来法と新規簡便法の2つの方法で「Fielder」, 「タマイズミ」, 「ゼンコウジコムギ」, 及び「AUS1408」の4品種の*Tamyb10*の遺伝子型を判定したところ、同じ判定結果が得られた (Fig. 1右下表; Fig. 2右下表)。新規簡便法による2反応のマルチプレックスPCRは、従来法による5反応のPCRと比較すると労力が5分の2で済む。新規簡便法は、小麦育種において親系統の種皮色遺伝子型を省力的に判定するためや、交配後代の分離集団から白粒系統を省力的に選抜するための遺伝子マーカーとして活用できる。

第1のマルチプレックスPCRの特徴は、*Tamyb10-A1*の遺伝子型判定を行うには、従来法では3反応のPCRが必要だったが、1反応で可能になったことである (Fig. 1 PCR 1, PCR 2, 及びPCR 3; Fig. 2 Multiplex PCR 1)。機能型に特異的な5'非翻訳領域のフォワードプライマーTamyb10-LP6, またはChinese Springタイプの機能欠失型に特異的な配列のフォワードプライマーTamyb10-LP7から、機能型と機能欠失型に共通する第2エキソンに特異的な配列のリバースプライマーTamyb10-RP4までを増幅するPCRを行う (Fig. 2 Multiplex PCR 1)。従来法のPCR 1において用いた機能型第1エキソンに特異的な配列のリバースプライマーTamyb10-RP6 (Fig. 1左上) については、これを使用しない。このことにより、Tamyb10-LP6からTamyb10-RP4までの1,059 bpが増幅される機能型遺伝子断片A(1)', あるいはTamyb10-LP7からTamyb10-RP4までの536 bpが増幅されるChinese Springタイプの機能欠失型遺伝子断片A(2)のいずれかが検出される (Fig. 2 Multiplex PCR 1; Fig. 3 Multiplex PCR 1)。同時に、第2イントロンの*GeST*の有無は、*GeST*挿入箇所より上流域

に特異的な配列のフォワードプライマーTamyb10-LP8から、新規に設計した*GeST*に特異的な配列のリバースプライマーARP1までの長さ412 bpが増幅される遺伝子断片A(3)'の有無により確認できる (Fig. 2 Multiplex PCR 1)。これに対し、従来法のPCR 3 (Fig. 1) では、*GeST*の有無の判定を、第2イントロンの*GeST*挿入箇所を挟んで上流域と下流域に特異的な配列のプライマー対を用いてPCRを行い、その増幅産物のサイズから*GeST*の全長約2.2 kb分の長さの違い (2,750 bpまたは565 bp) により判定したので、その点が相違点である。また、長さ412 bpの遺伝子断片A(3)'が検出されたら、A(1)'とA(2)の有無に関わらず*Tamyb10-A1*の遺伝子型は機能欠失型*R-A1a*と判定される (Fig. 2 AUS1408)。

第2のマルチプレックスPCRの特徴は、*Tamyb10-B1*と*Tamyb10-D1*の遺伝子型判定が従来法ではそれぞれPCRが必要だったが、1反応で可能になったことである (Fig. 1 PCR 4及びPCR 5; Fig. 2 Multiplex PCR 2)。現在のところ*Tamyb10-D1*の機能欠失型の塩基配列情報は無い。そこで様々な位置にプライマーを設計してPCRを試みた結果、機能欠失型では第2イントロンの全域が存在するが第3エキソンから下流域が存在せず他の配列に組換わっていると推測された (データ未提示)。Wangら (2016) もSTSマーカー開発に係る論文の中で同様に考察している。このことから第2のマルチプレックスPCRでは、*Tamyb10-D1*の第3エキソンに特異的な配列のプライマーDLP7と3'非翻訳領域に特異的な配列のプライマーDRP7を新規に設計し、従来法の*Tamyb10-B1*のプライマー組と併せ4種類のプライマーを混合してPCRを試みた。その結果、*Tamyb10-D1*の機能型を持つ品種からは長さ209 bpの遺伝子断片が、同時に*Tamyb10-B1*の機能型・機能欠失型を持つ品種からはそれぞれ282 bp・263 bpの遺伝子断片が検

出され、非特異的増幅は見られなかった (Fig. 2 Multiplex PCR 2; Fig. 3 Multiplex PCR 2)。なお、DLP7とDRP7の代わりに従来法PCR 5で用いた *Tamyb10-D1* のプライマー組Tamyb10-LP9とTamyb10-RP3 (Fig. 1 左下) を *Tamyb10-B1* のプライマー組と混合してPCRを試みたところ、*R-D1b* の遺伝子型を持つ「ゼンコウジコムギ」や「Chinese Spring」などでは3種類の遺伝子断片が検出される等、遺伝子マーカーとしては不相当であった (データ未提示)。これは、従来法PCR 5で用いた3' 非翻訳領域のリバースプライマーTamyb10-RP3が *Tamyb10-D1* の他に *Tamyb10-B1* にもアニーリングし *Tamyb10-B1* から2種類の遺伝子断片が増幅されることが原因と考えられた。

さらに簡便化するために、第1のマルチプレックスPCRに用いた5種類と第2のマルチプレックスPCRに用いた4種類の合計9種類のプライマーを共存させたマルチプレックスPCRを試みた。その結果、多くの非特異的増幅産物が検出され、遺伝子型判定はうまく行かなかった (データ未提示)。これは *Tamyb10* のA, B, Dゲノムの3つの遺伝子の塩基配列の相同性が高いためと考えられる。

2. 新規簡便法の用途

従来法は、最初に *Tamyb10* の遺伝子型判定を可能にした点で学術的意義を持つ。一方、新規簡便法は、育種現場でその遺伝子型判定を利用可能にした点で産業的意義を持つ。

緒言に述べたように、穂発芽耐性の強い白粒小麦品種の開発が望まれている。予め親系統・品種の種皮色遺伝子型を明らかにすることは育種を効率的に行うために役立ち、新規簡便法は、この過程をより省力的に行う方法として貢献できる。種皮色R座に着目して交配後代から白粒系統を得るためには、機能欠失型遺伝子 *R-A1a*, *R-B1a*, *R-D1a* の3つを揃える必要がある。そのためには、交配片親に白粒品種を用いるか、あるいは機能型遺伝子 *R-A1b*, *R-B1b*, *R-D1b* のそれぞれについて同じものを持たない赤粒同士を交配する必要がある。ひとつでも共通した機能型遺伝子を持つ赤粒同士を交配した場合は、後代は全て赤粒であり白粒が分離することはない。

このことを本研究に供試した赤粒品種を例に述べると以下のようなになる。「ゼンコウジコムギ」

と「ゆめちから」の *Tamyb10* の遺伝子型構成は同じ *R-A1a/R-B1b/R-D1b* であり (Fig. 2; Fig. 3), 「きたほなみ」の遺伝子型は *R-A1b/R-B1a/R-D1b*, 「Chinese Spring」は *R-A1a/R-B1a/R-D1b* である (Fig. 3)。これら赤粒4品種は共通して機能型遺伝子 *R-D1b* を持つため、どの組み合わせで交配しても後代から白粒は分離しないことが予測できる。これらの品種を育種素材に用いて白粒後代を得るためには、少なくとも機能欠失型遺伝子 *R-D1a* を持つ品種・系統を使用しなければならない。

本研究以外でも種皮色R座については、古くからモノソミック分析等の異数体遺伝学的手法を利用して対立性検定が行われてきた。以下に述べる既報の情報と本研究で得られた赤粒小麦の *Tamyb10* の遺伝子型を整理するとTable 6のようになる。1953年にHeyneとLiversが「Chinese Spring」と「Pawnee」の種皮色遺伝子型は $R_1R_1r_2r_3r_3$ であると報告している。その後1970年に、MetzgerとSilbaughが R_1 座は染色体3Dに、 R_2 座は染色体3Aに、また R_3 座は染色体3Bに座乗していることが明らかにするとともに、「Kharkof」は染色体3Dと3Bにそれぞれ R_1 座と R_3 座を、「Red Bobs」は染色体3Aに R_2 座を持つ等、供試品種のR座の解析結果を報告している。表記法の新旧対比はTable 1に示す通りなので、新表記法 (McIntoshら, 1998) で記すと、「Chinese Spring」と「Pawnee」の遺伝子型構成は *R-A1a/R-B1a/R-D1b*, 「Kharkof」は *R-A1a/R-B1b/R-D1b*, 「Red Bobs」は *R-A1b/R-B1a/R-D1a* となる。国内品種については、Kanekoら (1994) が、遺伝子型が既知の品種との交配により、「農林66号」と「フクワセコムギ」が r_1, R_2, r_3 (すなわち *R-A1b/R-B1a/R-D1a*), 「農林10号」と「アサカゼコムギ」の遺伝子型が R_1, R_2, r_3 (すなわち *R-A1b/R-B1a/R-D1b*), 「キタカミコムギ」が R_1, r_2, R_3 (すなわち *R-A1a/R-B1b/R-D1b*), 「フクホコムギ」が r_1, R_2, R_3 (すなわち *R-A1b/R-B1b/R-D1a*), 及び「農林61号」が R_1, R_2, R_3 (すなわち *R-A1b/R-B1b/R-D1b*) であると同定した。また、Miuraら (2002) が、白粒品種との交配後代の分離比、モノソミック分析、及び遺伝子型が既知の品種との交配により、「ゼンコウジコムギ」の遺伝子型構成は *R-A1a/R-B1b/R-D1b* であると報告した。

例えば北海道品種「ゆめちから」 (*R-A1a/R-B1b/R-D1b*) を育種素材に用いて後代で白粒系統を得

Table 6 Genotypes of the seed coat color genes in red varieties

Variety	Genotype			Reference
	<i>R-A1</i>	<i>R-B1</i>	<i>R-D1</i>	
Chinese Spring	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	Heyne and Livers (1953)
Pawnee	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	
Kharkof	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	Metzger and Silbaugh (1970)
Red Bobs	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	
PI 178383	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	
Norin 66	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	
Fukuwasekomugi	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	Kaneko et al. (1994)
Norin 10	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	
Asakazekomugi	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	
Kitakamikomugi	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	
Fukuhokomugi	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	
Norin 61	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	
RL4137	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	Miura et al. (2002)
Zenkogikomugi	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	
Yumehikara	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	
Kitahonami	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	This study (Fig. 3)

るためには、交配親に白粒系統を用いるか、もしくはTable 6の赤粒品種の中では*R-B1a/R-D1a*を持つ「Red Bobs」「農林66号」「フクワセコムギ」を選ぶとよい。一方、北海道品種「きたほなみ」(*R-A1b/R-B1a/R-D1b*)を育種素材に用いて後代で白粒系統を得るためには、交配親に白粒系統を用いるか、もしくは*R-A1a/R-D1a*を持つ赤粒品種を交配親に選ぶとよいがTable 6の赤粒品種の中には該当するものは無い。この場合は、三元交配等で*R-A1a*と*R-D1a*の2つを別々の品種から取り込む必要がある。

また、新規簡便法は、交配後代の分離集団から幼植物のうちに白粒系統を省力的に選抜することにも貢献できる。一例として、種皮色の準同質遺伝子系統の育成が挙げられる (Fig. 4; Table 5)。得られた「ゼンコウジコムギ」の白粒準同質遺伝子系統は、*Tamyb10*遺伝子がどのようなメカニズムで穂発芽耐性に影響を及ぼすのか等の研究材料として用いる予定である。

新規簡便法によって交配後代の分離集団の遺伝子型を判定する場合、それぞれの機能型・機能欠失型のホモかヘテロかの判定の可否については以下の通りである。第1のマルチプレックスPCRでは、*Tamyb10-A1*の機能型とChinese Springタイプの機能欠失型については、それぞれ別のサイズの増幅産物が検出できるのでホモかヘテロかの判定ができ

る。一方、機能型と*GeST*挿入による機能欠失型については、共通して1,059 bpの遺伝子断片が増幅されるのでその判定はできない。第2のマルチプレックスPCRでは、*Tamyb10-B1*の機能型と機能欠失型については、それぞれ別のサイズの増幅産物が検出できるのでホモかヘテロかの判定ができ、Fig. 4のようにヘテロ型では2本の増幅産物が検出される。一方、*Tamyb10-D1*については、機能型の有無しか判定できないのでその判定はできない。今後改良を加えることにより、*Tamyb10-A1*と*Tamyb10-D1*のそれぞれのヘテロとホモを完全に判定できるマルチプレックスPCRが開発できるだろう。そのためには*Tamyb10-D1*については、機能欠失型のシーケンスを明らかにすることが必要である。

3. *Tamyb10*以外の種皮色に係わる遺伝子は存在するか

赤粒品種から単離した*Tamyb10-D1*を遺伝子組換え技術により白粒品種に導入したところ、種皮色素合成系遺伝子*CHS*、*CHI*、*F3H*、及び*DFR*の発現が劇的に増加し種皮色が赤に変わったことから、TaMYB10がこれらの遺伝子の発現を制御して種皮色を決定していることが明らかになった (栗原と安倍, 2015; 栗原と安倍, 2016)。しかし逆に、*Tamyb10*の機能欠失型以外に白粒表現型を示す系統はないのだろうかという疑問が残る。*Tamyb10*の遺

伝子型に関わらず、もし種皮色素合成経路のいずれかの遺伝子が機能欠失していれば理論的には白粒になる。しかしながら、現在のところそのような品種・系統が存在するという報告はない。栗原は由来の異なる白粒系統同士を交配してR座の対立性検定を試みたが、いずれの後代からも赤粒が分離することはなく、供試系統の白粒遺伝子は同じR座の対立遺伝子のみであった（未発表）。

このことから、白粒小麦の育成には、遺伝子組換え技術の活用を除けば、現在のところ本報のマルチプレックスPCRを活用して*Tamyb10*の機能欠失型を揃えることが最も効率的である。

一方、現存する白粒品種の*Tamyb10*の遺伝子型を網羅的に調べたことはこれまでないので、この手法を用いることにより新規白粒因子が発見される可能性はある。*Tamyb10*が赤粒の遺伝子型を示し、かつ表現型が白粒の品種が見つければ、その品種は新規白粒因子を持つ。新規白粒因子の中に穂発芽耐性低下に多面的影響を与えないものがあれば、育種への利用価値は大きい。

V. 結論

穂発芽耐性の高い白粒小麦品種の開発のため効率的に育種を行うには、*Tamyb10*の遺伝子型情報が必要である。本報で紹介したマルチプレックスPCRを用いると*Tamyb10*の遺伝子判定を省力的に行うことができる。

謝辞

本研究の遂行のため、高度な技術をもって実験補助を務めてくださった北海道農業研究センター契約職員檜山久美子さん、九州沖縄農業研究センター契約職員諸岡博美さんに感謝する。

引用文献

- Heyne, E. G. and Livers, R. W. (1953) Monosomic analysis of leaf rust reaction, awnedness, winter injury and seed color in Pawnee wheat. *Agron. J.*, 45(2), 54-58.
- Himi, E., Maekawa, M., Miura, H. and Noda, K. (2011) Development of PCR markers for *Tamyb10* related to *R-1*, red grain color gene in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 122(8), 1561-1576.
- Kaneko, S., Komae, K., Nagamine, T. and Yamada, T. (1994) Development of an extraction procedure for wheat red coat pigments and determination of varietal differences for this trait. *Breed. Sci.*, 44(3), 263-266.
- 栗原志保, 安倍史高 (2015) 種皮色候補遺伝子を白粒小麦に導入した遺伝子組換え赤粒系統の作出. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報. 56, 104-105.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/hdanwakai/56/0/56_104/_article/-char/ja/
- 栗原志保, 安倍史高 (2016) 小麦遺伝子組換え赤粒系統の種皮色合成系遺伝子の発現、及び種子休眠性. 日本育種学会・日本作物学会北海道談話会会報. 57, 48-49.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/hdanwakai/57/0/57_48/_article/-char/ja/
- McIntosh, R. A., Hart, G. E., Devos, K. M., Gale, M. D. and Rogers, W. J. (1998) Catalogue of gene symbols for wheat. *Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp.*, Vol. 5., ed. A.E. Slinkard. 1998, Univ. Saskatchewan, Saskatchewan, Canada: Univ. Exten. Press.
- Metzger, R. J. and Silbaugh, B. A. (1970) Location of genes for seed coat color in hexaploid wheat, *Triticum aestivum* L. *Crop Sci.*, 10(5), 495-496.
- Miura, H., Sato, N., Kato, K. and Amano, Y. (2002) Detection of chromosomes carrying genes for seed dormancy of wheat using the backcross reciprocal monosomic method. *Plant Breed.*, 121(5), 394-399.
- Wang, Y., Wang, X. L., Meng, J. Y., Zhang, Y. J., He, Z. H. and Yang, Y. (2016) Characterization of *Tamyb10* allelic variants and development of STS marker for pre-harvest sprouting resistance in Chinese bread wheat. *Mol. Breed.*, 36(11), 148. doi: 10.1007/s11032-016-0573-9

A Simple Method for Genotyping of Wheat Seed Coat Color Genes by Multiplex PCRs

Shiho KURIHARA-YONEMOTO¹⁾, Hitoshi MATSUNAKA²⁾

Summary

White-grained wheat varieties have an advantage that powder dullness is small and milling yield is high. They have, however, a tendency to be less tolerant to pre-harvest sprouting than red-grained wheat varieties. Pre-harvest sprouting in wheat represents a major constraint to the production of high-quality grain. Thus, it is desired to develop white-grained varieties with high tolerance against pre-harvest sprouting. Red-grained varieties have red seed coats. The ‘R loci’ for seed coat color are located one each in the A, B, and D genomes in wheat, which is an allohexaploid crop. Red coat color is dominant and white coat color is a recessive trait. Seed coat color is a Mendelian inheritance trait. If at least one R locus is red grain type, the seed coat color will be red. In addition, the phenotype of the grain color is not identified until one generation later because seed coat is a maternal tissue. Therefore, genetic markers are useful in wheat breeding not only to decide the R loci genotypes of the parents’ lines but also to select white-grained segregants efficiently from siblings at the seedling stage.

This report introduces a simple, labor-saving method for the genotyping of wheat seed coat color genes, *Tamyb10-A1*, *Tamyb10-B1*, and *Tamyb10-D1*. This method consists of two multiplex PCRs per sample. Multiplex PCR 1 was carried out with five types of primers for genotyping of *Tamyb10-A1*. Then, multiplex PCR 2 was carried out with four types of primers for genotyping of *Tamyb10-B1* and *Tamyb10-D1*. This is more labor-saving than the method reported previously by Himi et al. (2011), which required five PCRs for each sample.

First, *Tamyb10s* in four varieties were analyzed by the previous method and this new method. The results showed the same genotypes detected by the two methods. Next, two leading varieties from Hokkaido, “Yumehikara” and “Kitahonami”, with unknown *Tamyb10s* genotypes, were analyzed by multiplex PCRs. The results showed that their genotypes were *R-A1a/R-B1b/R-D1b* and *R-A1b/R-B1a/R-D1b*, respectively. This new method contributes to selecting white-grained segregants from backcross populations of a white-grained line × “Zenkojikomugi” (a red-grained variety).

Genotypes of 16 red-grained varieties are shown as examples. The information is useful in making the three genes *R-A1a/R-B1a/R-D1a* match to select white-grained lines from siblings with high tolerance against pre-harvest sprouting in wheat breeding.

Key word: Multiplex PCR, genotyping, *Tamyb10*, seed coat color, wheat (*Triticum aestivum* L.), tolerance against pre-harvest sprouting

1) Office of Risk Management, Hokkaido Agricultural Research Center, NARO

2) Division of Lowland Farming Research, Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO

