

## 学位論文題名

Marker-Assisted Breeding in Maize for  
Cold Regions of Japan

(寒地適応型飼料用トウモロコシ育種における  
DNA マーカーの利用に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

雑種強勢を利用した飼料用トウモロコシ育種において、育種材料内の遺伝的多様性に関する情報は、育種母材の選択、自殖系統のヘテロティックグループへの系列分けおよび組合せ能力検定試験のテスター選択に不可欠である。さらに、育成自殖系統と代表的な自殖系統との近縁関係に関する情報は、育成自殖系統内の遺伝的多様性の評価および新たな育種材料の導入の検討に利用できる。また、外国や温暖地域で育成された育種材料の導入は、寒地での育種材料の遺伝的多様性の拡大および改良に有効な方法である。しかし、ヨーロッパF<sub>1</sub>品種由来自殖系統は、デント種およびフリント種の遺伝子が混在するため、ヘテロティックグループへの系列分けが難しい。また、寒地での育種材料として温暖地域育成デント種の導入には、開花期の改良が必要であるものの、デント種には優れた早生系統が極めて少ない。そのため、フリント種から早生性を導入することが望まれている。

本研究では、DNAマーカーによる近縁度解析により、寒地適応型トウモロコシ自殖系統の近縁関係を解明するとともに、新たな優良育種材料を効率的に導入するため、DNAマーカーによるヨーロッパF<sub>1</sub>品種由来自殖系統の効率的系列分け法および温暖地域育成デント種自殖系統の開花期の効率的改良法を開発することを目的とした。得られた結果は、以下のごとく要約される。

## 1) SSRマーカーによる北海道育成寒地適応型トウモロコシ自殖系統間の近縁度解析

寒地適応型トウモロコシ自殖系統間の近縁関係を明らかにするため、染色体上に偏り無く分布する60個のSSR (Simple Sequence Repeat) マーカーを選定した。これらのSSRマーカーは、遺伝的多様性の指標であるPolymorphic-index contentの平均値が0.69と、これまでの報告より高い値を示した。また、このSSRマーカーセットにより推定した自殖系統間の近縁度と系譜に基づき算出した近交係数との間に有意な相関関係を示した ( $r=0.70^{**}$ )。以上の結果から、このSSRマーカーセットは自殖系統間の近縁関係の解析に利用できると考えられた。自殖系統間の近縁関係を明らかにするため、推定した近縁度を用い、樹形図(UPGMA)、Principal-coordinate analysisおよび平均近縁度による解析を行った。いずれの解析方法でも、北海道で育成されたデント種自殖系統とフリント種自殖系統は明確に分類された。さらに、代表的な自殖系統との近縁関係では、北海道育成北方型フリント種およびデント種自殖系統は、カナダ育成北方型フリント種CO12およびBSSS系列デント種とそれぞれ近縁であった。しかし、北海道育成の両系列の遺伝的多様性は、代表的なデント種自殖系統より低かった。また、北海道育成自殖系統は、ヨーロッパフリント種自殖系統F2

やLSC系列デント種およびカナダ育成デント種と比較的遠縁であった。したがって、これらの系列に属する育種材料の導入は、北海道の育種材料の遺伝的多様性の拡大および改良に有効であると考えられた。ヨーロッパF<sub>1</sub>品種由来自殖系統の近縁度解析の結果は、これまでの育種経験と一致していたことから、このSSRマーカーセットは、これらの自殖系統の系列分けに有効な方法であると結論された。

## 2) ヨーロッパF<sub>1</sub>品種由来自殖系統の系列分けに有効なSSRマーカーセットの選定

本研究に供試した60個のSSRマーカーによる近縁度解析は、1)の結果からヨーロッパF<sub>1</sub>品種由来自殖系統(混在型自殖系統)の系列分けに有効であることが示された。本実験では、より簡便な系列分け法を開発するため、両系列間での多型の出現頻度の差(40%および50%)に基づき、2つのSSRマーカーセット(セット1およびセット2)を選定した。セット1およびセット2のSSRマーカー数は、それぞれ25個および14個であった。これらのセットの多型数も60個のSSRマーカーに比べ、38%および21%と大幅に少なく、60個のSSRマーカーより簡便な解析が可能だと考えられた。これらのSSRマーカーセットによる系列分けの精度を評価するため、混在型32自殖系統における系列分けの結果を比較検討した。その結果、セット1による系列分けは、60個のSSRマーカーに基づく結果にほぼ一致した。セット2による系列分けは、60個のSSRマーカーに基づく結果とは若干異なる様相を示した。セット1の系列分けでは、混在型4自殖系統による組合せ能力検定試験の結果ともほぼ一致していたことから、SSRマーカーセット1による系列分けは、育種利用の観点から十分な精度を有していると考えられた。

## 3) 北方型フリント種の早生性に関するQTL解析

フリント種自殖系統の早生性を、効率的にデント種自殖系統に導入するため、早生性に関する選抜マーカーの開発を目的として実験を行った。本実験では、北方型フリント種の早生系統To85とデント種の晩生系統Mi29の交雑後代F<sub>2:3</sub>150系統を供試した。MaizeGDBに登録されている110個のSSRマーカー、イネの開花期関連遺伝子の相同遺伝子である*ck2a*の遺伝子内変異を識別するCAPSマーカーおよびトウモロコシで開花期への影響が示唆されている*an1*、*d8*および*vp1*の遺伝子内変異をそれぞれ識別するInDelマーカーを用い、全長1287cM、平均遺伝距離12.4cMの連鎖地図を作成した。QTL解析は、LOD値の閾値を3.6に設定し、Composite interval mappingにより絹糸抽出期、雄穂開花期、稈長および着雌穂高について行った。その結果、開花期に関する合計7つQTLを、第1染色体長腕、短腕、第3染色体短腕、第8染色体長腕および第9染色体長腕に検出した。*an1*遺伝子および*epc*遺伝子の連鎖マーカー*bnlg1067*の近傍にそれぞれ開花期に関するQTLを検出した。本実験で検出した開花期に関するQTLについては、いずれも稈長および着雌穂高への大きな影響が認められなかった。以上の結果から、本実験で検出した開花期に関するQTLは、温暖地域育成デント種自殖系統の開花期の改良に利用できるものと考えられた。また、これらの情報は、早生化に関わるQTLの候補遺伝子を選択する際にも有効であると考えられた。

本研究では、DNAマーカーを利用して寒地適応型トウモロコシ自殖系統内の遺伝的多様性の解明および拡大に有効な方法を開発した。これらの方法は、遺伝的多様性の経時的調査、自殖系統のプロファイリングおよび優良な育種材料(ヨーロッパF<sub>1</sub>品種および温暖地域育成デント種自殖系統)の導入に利用できる。DNAマーカーを利用した選抜技術が、寒地適応型飼料用トウモロコシ育種において、育種材料の遺伝的多様性の拡大および優良遺伝子の集積に利用されることにより、寒地適応型優良F<sub>1</sub>品種育成に大きく寄与することが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 芳 雄  
副 査 教 授 喜 多 村 啓 介  
副 査 准教授 奥 野 員 敏 (農業生物資源研究所)  
副 査 助 教 授 貴 島 祐 治

学 位 論 文 題 名

## Marker-Assisted Breeding in Maize for Cold Regions of Japan

(寒地適応型飼料用トウモロコシ育種における  
DNA マーカーの利用に関する研究)

ゲノム情報を利用した効率的育種法の開発は世界的に育種の最重要課題の一つとなっている。しかしながら、農業上重要な形質の多くは、単純な遺伝子の変換によりもたらされるものではなく、どのようにして分子マーカーを従来の育種選抜に利用するかが緊急の問題点として提起されている。作物の多くは、他殖性植物であり、生産性向上の上で雑種強勢が広く利用される。雑種強勢の原因については、動植物を問わず不明の点が多く、系統の遺伝的類似度を指標とした自殖系統の系列分けおよび組合せ能力検定に頼っている。本研究は、寒冷地イネ栽培の飼料用トウモロコシ育種において、雑種強勢の発現予測に分子マーカーを利用して選抜効率を高めることを検討した。得られた結果は以下のように要約される。

### 1) SSR マーカーによる北海道育成寒地適応型トウモロコシ自殖系統間の近縁度解析

寒冷地での育種素材の遺伝的多様度の拡大には、外国や温暖地域で育成された育種素材の導入が有効である。しかし、ヨーロッパF<sub>1</sub>品種由来自殖系統は、デント種およびフリント種の遺伝子が混在するため、雑種強勢予測のための系列分けが難しい。染色体上に偏り無く分布する60個のSSR (Simple Sequence Repeat) マーカーを用いて近縁度を評価した。これらのSSR マーカーを用いると、遺伝的多様性の指標 (Polymorphic-index content) の平均は0.69と、従来の値より高かった。また、推定された自殖系統間の近縁度と実際の系譜に基づく近交係数の間には高い相関関係が認められた。自殖系統間の類縁関係を樹形図(UPGMA)などの手法で調査したところ、北海道で育成されたデント種自殖系統とフリント種自殖系統は明確に区別できた。

さらに、代表的な自殖系統の類縁関係を調査したところ、北海道育成北方型フリント

種とデント種自殖系統は、カナダ育成北方型フリント種 C012 または BSSS 系列デント種と近縁であった。北海道育成自殖系統は、ヨーロッパフリント種自殖系統、LSC 系列デント種およびカナダ育成デント種と比較的類縁度の低いことが判明した。したがって、これらの系列に属する育種材料の導入は、北海道の育種材料の遺伝的多様性の拡大および改良に有効であると考えられた。これらの結果は、従来の育種経験からも支持されることから、本手法はトウモロコシの自殖系統の系列分けに極めて有効な方法であると結論された。

## 2) ヨーロッパF<sub>1</sub>品種由来自殖系統の系列分けに効率的な SSR マーカーセットの選定

本実験は、より簡便な系列分け法を開発することを目的として行った。多型の出現頻度の差に基づき、25 個および 14 個の SSR より構成される 2 つのセットを選定し、それぞれのマーカーセットによる系列分けの精度を比較した。その結果、25 個の SSR マーカーセットを用いた系列分けは、60 個の SSR マーカーに基づく結果にほぼ一致した。さらに、25 個のマーカーによる系列分けは、実際の交雑によって評価した組合せ能力検定試験の結果ともほぼ一致していた。したがって、本簡便法による系列分けは、育種的利用の観点から十分な精度を有している判断された。

## 3) 北方型フリント種の早生性に関する QTL 解析

早生特性は寒地適応性を決定する最も重要な形質の 1 つである。本実験では、フリント種自殖系統の早生性をデント種自殖系統に導入するため、早生性に関する選抜マーカーを開発することを目的とした。北方型フリント種の早生系統 To85 とデント種の晩生系統 Mi29 の交雑後代 150 系統を供試し、開花期関連遺伝子を含む 114 個の分子マーカーに基づいて、全長 1287cM、平均遺伝距離 12.4cM の連鎖地図を作成した。絹糸抽出期、雄穂開花期、稈長および着雌穂高について、QTL 解析を行った。その結果、開花期に関する計 7 つの QTL が、第 1 染色体長腕、短腕、第 3 染色体短腕、第 8 染色体長腕および第 9 染色体長腕に検出された。検出された開花期に関する QTL は、いずれも稈長および着雌穂高への大きな影響は認められず、温暖地域育成デント種自殖系統の開花期の改良に利用できるものと考えられた。

本研究では、DNA マーカーを利用して寒地適応型トウモロコシ自殖系統内の遺伝的多様性の解明および拡大に有効な方法を開発した。これらの手法は、遺伝的多様性の経時的調査、自殖系統の評価および優良な育種材料(ヨーロッパF<sub>1</sub>品種および温暖地域育成デント種自殖系統)の導入にも利用できる。さらに、DNA マーカーを利用した選抜技術は、寒地適応型飼料用トウモロコシの効率的育種を進める上で有効であることを示したことは、高く評価される。

よって審査員一同は、榎 宏征が博士(農学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。