

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21609

研究課題名(和文) 牧草への家畜育種法 - BLUP法 - の応用

研究課題名(英文) Application of best linear unbiased prediction in forage breeding

研究代表者

田中 常喜 (Tanaka, Tsuneki)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部畜産試験場・研究主任

研究者番号：80506593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：家畜育種の分野で発展した最良線形不偏予測(BLUP)法および制限付き最尤推定(REML)法について、牧草育種への適用を検討した。BLUP/REML法は、遺伝資源のスクリーニング、従来は評価が困難であった形質の遺伝解析に利用できる。収量性の改良については、従来の後代検定を省略できるほどの育種価の予測精度ではなかった。その他、DNAマーカーを用いた父子検定により、選抜後の親の偏りの矯正や不良な父親の淘汰に利用できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study assessed applicable of best linear unbiased prediction (BLUP) and/or restricted maximum likelihood (REML), that have been developed in animal breeding, to breeding of forage grasses. The BLUP/REML approaches were useful in screening of germplasms, and genetic analyses for complex traits. The predictability of breeding values for forage yields was not so high as to omit the breeding scheme of progeny tests. Apart from that, this study also indicated that implementation of a marker-based paternity test in timothy polycross breeding could improve the selection of superior paternal parents and redress problems of parental imbalance.

研究分野：植物育種

キーワード：育種方法 最良線形不偏予測(BLUP) 制限付き最尤推定(REML) 父子検定 収量性 チモシー

1. 研究開始当初の背景

最良線形不偏予測法 (BLUP 法、Best linear unbiased prediction) は、家畜育種の分野で発展した、測定値に隠れた真の遺伝的能力 (育種価) を、個体間の血縁関係の情報と様々な環境要因をモデルに組み込んで補正しながら推定する解析手法である。様々な状況に対応した汎用性があり、植物育種の分野においても、トウモロコシ (*Zea mays* L.)、ダイズ [*Glycine max* (L.) Merr.]、バレイショ (*Solanum tuberosum* L.)、マツ (*Pinus* spp.) など様々な植物種での応用事例が報告され、育種価に基づいた交配組合せの選択・優良個体の選抜、選抜計画に重要な情報となる遺伝率の推定、育種事業の成果 (遺伝的な改良の度合い) の評価に利用されている。近年の牧草を含む植物育種では、多くの交配・選抜計画が重複した世代を持つ複雑な構造に変化しつつあり、長年の育種事業で蓄積された複数の世代のデータを有効に利用する必要が生じている。したがって、欠測値の多い不完全な実験デザインのデータも解析可能な BLUP 法の植物育種における活用は、一層重要性を増している。

他殖性・多年生・種子繁殖性を特徴とする牧草の育種では、優良個体の選抜とそれらの交配による集団の再構築を繰り返して、集団の遺伝的構成を段階的に改良する手法が基本的に採用されている。この育種方式は、家畜育種における通常の方式とほぼ同じであり、血縁関係の情報 (系譜情報) があるならば、BLUP 法の直接的な利用が可能である。しかしながら、牧草の交配は風媒あるいは虫媒による放任受粉により行なうため、父親が特定できないことが背景にあり、BLUP 法の利用が困難であった。

風媒による放任受粉を行う他殖性、六倍体を特徴とするイネ科牧草チモシー (*Phleum pratense* L.) では、genomic-SSR (simple sequence repeat) マーカーが開発され、それらのマーカーを利用した親の推定が可能であることが示されている。チモシーにおいても BLUP 法が応用できる状況が整いつつある。

2. 研究の目的

本研究では、多年生・他殖性・種子繁殖性・六倍体を特徴とするチモシーの育種集団について、DNA マーカーを利用して血縁関係を推定し、牧草育種に適した BLUP 法のモデルを明らかにする。ただし、遡及する系譜情報の世代数の検討は、系譜情報が整っているデータが必要であるため、バレイショの育種データを用い、チモシー育種データでの解析に反映させるものとする。

チモシー材料間の血縁関係を DNA マーカーで推定するためには、検定する個体と親の候補となる個体群の植物体が保存されている必要がある。そのため、限られた DNA マーカー情報と育種事業での母個体の記録で解析

可能なモデルを選択する必要がある。また、BLUP 法の適用に際しては、解析に用いた材料群の血縁関係の構造や育種事業での選抜などに影響を受けることが想定されるため、推定された父個体の特徴についても明らかにする。

熟期は、様々な形質との関連 (遺伝相関) が強い形質である。そのため、従来の遺伝解析では、熟期を揃えた材料群を用いるなど、熟期の影響を極力排除するように試験を設計している。一方、BLUP 法では、遺伝相関のある形質を取り込んだ複形質モデルによって、単一形質のモデルよりも正確度を高めた解析が可能であるため、特に熟期関連形質について取り込んだモデルについて検討する。

3. 研究の方法

(1) 遡及する系譜情報の世代数の検討 (バレイショ育種データでの解析)

業務加工用途、病害虫抵抗性、早生、多収を目標にしたバレイショの育種データを用いて、収量関連形質の遺伝パラメータを算出し、遡及する系譜情報の世代数の検討を中心に最適なモデルの検討を行った。北見農業試験場 (北海道常呂郡訓子府町) において 2006 ~ 2011 年に実施した系統選抜試験、生産力検定予備試験のバレイショ 1325 品種系統、1553 データについて解析した。解析対象形質は、枯凋期 (1: 極早生 ~ 9: 極晩生)、上いも数 (個/株)、上いも平均重 (g/個)、上いも重 (kg/10a)、でん粉価 (%) の 5 形質とした。系譜情報を可能な限り遡及して血縁係数行列を求め、制限付き最尤推定 (REML) 法により分散成分を推定し、遺伝率および遺伝相関を算出した。育種価は、それら情報をもとに BLUP 法により推定した。適当であったモデルにおいて、系譜情報を遡及する世代数について検討するため、6 通り (可能な限り遡る、5 世代まで、3 世代まで、2 世代まで、1 世代まで、系譜情報を用いない) の血縁係数行列をもとに算出した遺伝率と育種価、赤池情報量規準 (AIC、モデルの当てはまりの悪さ) について比較した。解析は統計ソフト BLUPF90 program family を用いた。

(2) SSR マーカーによる父子鑑定

多交配 (隔離条件下での任意の親株による無作為交配) 8 群に由来する後代 145 個体について、多交配に供試した親との父子検定を行った。ジェノタイプピングは、チモシーの genomic-SSR マーカーから 2 倍体染色体地図上に散在するように選定した 27 マーカーを用いて、キャピラリー電気泳動 (GenomeLab GeXP, Beckman Coulter) によりフラグメント解析を行った。検定する後代個体の父親の推定方法は、父親由来であると明らかなフラグメント (検定する後代個体のフラグメントから既知の母親と共通するものを除いた) のうち、候補親がもつ割合を指標として用いた。検定個体毎に、指標の最大値について

Sminov-Grubbs の方法による外れ値検定 (5% 水準) を行い、有意であった場合にその候補親を父親とした。

本研究で用いた材料群は、育種事業での選抜時に母の情報は既知であったため、母個体は、後代検定により直接的に選抜されている (母系選抜) が、父の情報は未知であったため、父個体は間接的に選抜されている。そこで、材料数が多く、同時期に交配・選抜試験を行った 2 群 (親 64 個体、後代 80 個体) を用いて、育種工程で間接的に選抜された父親について、選抜された頻度、育種目標となっている形質の特徴について調査した。多交配に供試した全ての親候補の父親として選抜された頻度を調査し、カイ二乗検定により期待値に対する適合度検定を行った。また、育種事業において調査された親個体の出穂始日 (6 月の日)、越冬性 (1 極不良~9 極良)、2 番草草勢 (1 極不良~9 極良)、2 番草の節間伸長茎割合 (1 極不良~9 極多)、罹病程度平均 (1 無~9 甚)、1 番草倒伏程度 (1 無~9 甚)、水溶性炭水化物 (WSC、%)、低消化性繊維 (Ob、%)、総繊維 (OCW) 中の Ob 割合、後代検定での収量性 (2 か年合計乾物収量、Mg/ha) の値について、線形混合モデル (母数効果: 試験、変量効果: 個体) にあてはめ、変量効果の値について、母個体と父個体を t 検定により比較した。

(3) BLUP 法のモデルの検証

従来法による遺伝率を算出するため、親栄養系評価試験と多交配後代検定試験を同一環境下 (同一年、同一圃場) で実施した。材料は、後代検定での値が未知である 60 個体を選定し、多交配試験を 2 群 (20、40) に分けて行った。親個体は株分けし、乱塊法 2 反復に配置し、2016 年 5 月に移植した。多交配により得た種子を用いて、乱塊法 4 反復に配置し、単条播 (0.64m²/区) で、2016 年 5 月に後代検定試験圃場を造成した。播種後 2 年目に 3 回の刈取り調査を行い、年間合計乾物収量、出穂始、越冬性、2 番草の草勢、2 番草の節間伸長茎程度、1 番草の WSC、1 番草の Ob/OCW について調査し、従来法による遺伝率と育種価を算出した。狭義の遺伝率は、栄養系評価試験と後代検定試験で調査した値の親子回帰により推定した。広義の遺伝率は、栄養系評価試験での分散分析から推定した。従来法による育種価は、後代検定で調査した値とした。

BLUP/REML 法の遺伝解析に向けて、北見農業試験場 (北海道常呂郡訓子府町) で 1989~2015 年に実施した個体選抜試験、栄養系評価試験、多交配後代検定試験の育種データから 16 試験 531 材料 1862 データを収集した (欠測値を含む)。個体植条件での出穂始日、越冬性、草勢、倒伏程度、病害罹病程度、1 番草茎数密度、1 番草草高、2 番草節間伸長茎割合、1 番草水溶性炭水化物 (WSC) 含量、1 番草低消化性繊維 (Ob) 含量、1 番草細胞壁

物質 (OCW) 含量、Ob/OCW と、条播条件での多交配後代の年間合計乾物収量、出穂始日を解析対象とした。BLUP アニマルモデルの解析は、i) 母数効果とする環境要因 (試験年次など) の検討、ii) 系譜情報 (なし、母親のみ、両親) の検討、iii) 単形質モデルと複形質モデル間の比較のため、それぞれのモデルについて、分散成分、遺伝率 (h^2)、遺伝相関、AIC を REML 法により算出した。血縁係数行列は、系譜情報を可能な限り遡り算出した。

4. 研究成果

(1) 遡及する系譜情報の世代数の検討 (バレイショ育種データでの解析)

単形質モデルにおいて推定された遺伝率は、0.62~0.85 と中程度から高く、BLUP 法で算出した育種価による品種改良が有効であると考えられた。複形質モデルにおいて推定された遺伝相関のうち、育種的な負の相関がみられた形質は、枯凋期と上いも平均重 (0.60)、枯凋期と上いも重 (0.60)、上いも数と上いも平均重 (-0.96) であった。

枯凋期が晩生になるにつれて多収になる傾向がみられた上いも重の育種価の推定に関して、枯凋期の影響を除くために、枯凋期を要因 (変量モデル) として加えたモデルについて検討した。その結果、変量モデルとした分散成分中、枯凋期の影響は 8% を占め、狭義の収量性とすべき遺伝分散は 62% であった。早生、多収育種の選抜には、枯凋期を要因として加えたモデルが妥当であると考えられた。

本研究で用いたバレイショの育種データは、系譜情報を最大で 10 世代以上遡ることができた。遡及する世代数が増えるに従い、遺伝率が高く、AIC が低くなる傾向があり、系譜情報を利用しない場合と比較すると明らかにモデルの当てはまりが高まった。また、2 世代の系譜情報を取り込むことで育種価の推定値が安定することが示唆された。以上から、1 世代の系譜情報でも育種価の推定精度が高まること、2 世代の系譜情報で推定値が安定することが明らかとなった。

(2) SSR マーカーによる父子鑑定

父子鑑定により、145 個体中 127 個体の父親を特定した。その結果、一部で系譜情報がない材料も含まれるが、育種価を算出したい材料の血縁関係を概ね 2~3 世代遡及できた。

父親個体の選抜頻度について調査した多交配群 2 群のうち、ひとつで適合度検定が有意であったことから、父親が偏っている材料群があることが明らかとなった (図 1)。間接的に選抜された父親に偏りが生じた理由として、(i) 後代の選抜試験時のある形質の選抜基準や選抜圧が材料群の水準よりも高く、特定の親由来の後代個体のみが選抜された可能性と、(ii) 開花時期のズレや花粉量や種子生産性の遺伝変異により交配時に既に偏りが生じていた可能性が考えられる。父

親の選抜に偏りが生じた群 (B 群) の選抜個体の両親間の比較において、2 番草の草勢や 2 番草の節間伸長茎割合や 1 番草の Ob、Ob/OCW で、父親のほうが有意に優れた (表 1)。一方、交配・選抜をほぼ同様な環境下で実施したものの、父親の選抜に偏りが認められなかった群 (A 群) では、父親のほうが明らかに優れるような形質はみられなかった (表 1)。以上の結果から、後代個体の選抜が、父親の選抜に偏りが生じた一因であると考えられた。育種家が意図しない親の選抜の偏りは、近交弱勢や母集団の遺伝変異が狭くなるなどの問題が生じる恐れがある。DNA マーカーを用いた父子検定は、選抜後の親の偏りの矯正に利用できると考えられた。

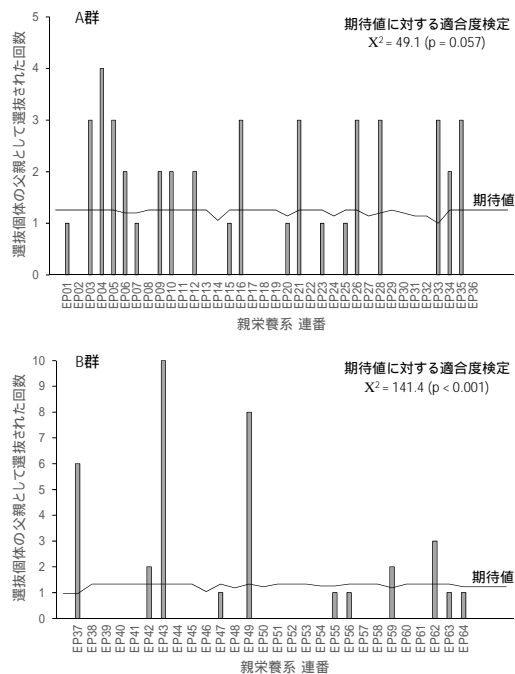


図 1 多交配 A 群 (上段) と B 群 (下段) の父親の選抜頻度

表 1 選抜された母親、父親の平均値

形質	単位	多交配A群				多交配B群			
		親候補 平均±SD	母親 平均	父親 平均	t ¹⁾	親候補 平均±SD	母親 平均	父親 平均	t ¹⁾
年間合計乾物収量のGCA ²⁾	Mg/ha	0.0±4.1	4.8	0.5	***	0.0±5.1	6.8	1.4	***
出穂始	6月の日	18.4±1.79	18.2	18.5		17.7±1.64	17.1	16.3	**
越冬性	1-9:極良	4.4±0.24	4.4	4.5		4.3±0.29	4.4	4.5	*
2番草の草勢	1-9:極良	5.7±0.36	5.6	5.8	*	5.6±0.60	5.8	6.1	*
2番草の節間伸長茎程度	1-9:極多	5.6±0.26	5.7	5.6		5.4±0.41	5.4	5.7	***
罹病程度	1-9:甚	2.9±0.28	2.8	2.8		2.9±0.38	2.9	2.7	*
倒伏程度	"	1.5±0.28	1.5	1.5		1.7±0.54	1.5	1.6	
WSC	%	9.3±1.56	10.4	8.9	*	9.3±1.52	9.4	8.8	
Ob	"	53.8±1.22	53.7	54.2		54.3±1.38	55.1	53.9	***
Ob/OCW	"	80.3±0.71	80.2	80.5		80.5±0.77	80.8	80.1	***

1) t検定. ***: p < 0.001, **: p < 0.01, *: p < 0.05. 2) 一般組合せ能力.

調査した多交配群の全てにおいて、父親の収量性 (多交配後代の年間合計乾物収量) は、母親に比べて有意に低く、父親の平均値は、群平均値と同程度であった (表 1)。このことは、既知である母親は、後代検定により直接的に選抜されている (母系選抜) ののに対して、未知である父親については未選抜であることを反映した結果であると考えられる。DNA マーカーを用いた父子検定により、収量性が劣る不良な父親の淘汰に利用できる可能性が示された。Riday (2011) は、父子検

定の選抜シミュレーションによる選抜圧と選抜効果について報告している。チモシー育種での父子検定を組み入れた母系選抜の工程に関して、父親が未知である時点での選抜圧 (母系選抜と母系内個体選抜) と、選抜個体の父子検定による父親の選抜圧については、検討の余地が残されている。

(3) BLUP 法のモデルの検証

本試験において調査した年間合計乾物収量の従来法による広義および狭義の遺伝率 (表 2) は、既往の報告 (Tanaka et al. 2015) と比較すると同程度であった。WSC と Ob/OCW については、足利ら (2008) の報告よりもやや低かった。

表 2 遺伝率および BLUP 法による育種価の予測精度

形質名	単位	従来法			BLUP/REML法 ¹⁾	
		広義の 遺伝率 ¹⁾	狭義の 遺伝率 ²⁾	r _{po} ³⁾	遺伝率 h ²	r ⁴⁾
年間合計乾物収量	Mg/ha	0.75	0.06	0.19	0.34	0.31
出穂始	6月の日	0.74	0.74	0.74	0.68	0.69
越冬性	1-9:極良	0.15	0.34	0.36	0.14	0.10
2番草の草勢	"	0.45	0.21	0.21	0.38	0.09
2番草の節間伸長茎程度	1-9:極多	0.70	0.10	0.10	0.44	0.39
WSC	%	0.65	0.30	0.52	0.60	0.42
Ob/OCW	%OCW	0.76	0.32	0.38	0.53	0.32

1) 栄養系評価試験の分散分析結果による。2) 親子回帰による。3) 親栄養系と後代系統間の相関係数。4) 年間合計乾物収量:多形質モデル、その他の形質:単形質モデルによる。5) 推定育種価と後代検定試験での値の相関係数。

BLUP/REML 法の遺伝解析では、いずれの形質においても、試験、年次、播種後年数を母数効果とするモデルが適当であると考えられた。年間合計乾物収量に関しては、さらに出穂始を環境要因として加えたモデルがより適していた。系譜情報を加えることにより、AIC が低くなり、遺伝分散が大きくなる傾向が見られたが、データ数の少ない形質では判断としなかった。

個体植条件で調査した各形質について最良であった単形質モデルの h² は 0.14 ~ 0.68 で、概ね広義の遺伝率と狭義の遺伝率の中間の値であった (表 2)。BLUP/REML 法で推定する遺伝率は、反復率 (多環境データの全分散中に占める遺伝分散の割合) に近い値であると考えられた。出穂始 (h²=0.68) と WSC (h²=0.60) Ob/OCW (h²=0.53) の遺伝率は比較的高い値で、推定育種価と後代検定での値との相関係数は、親子間の相関係数 (r_{po}) と同程度であった。出穂始や、飼料成分などでは、単形質モデルでの育種利用 (複雑な試験計画で、様々な材料が複数試験で調査されていた場合の評価など) が可能と考えられた。越冬性と 2 番草の草勢では、BLUP 法での推定育種価と多交配後代の値の相関係数が、従来法での親子相関よりも低かった。越冬性は、凍害や病害などの影響を受けるため、試験により要因が異なったことが、BLUP/REML 法での予測精度が低かった理由であると考えられた。2 番草の草勢は、BLUP/REML 法の解析に用いたデータがシロクローバとの競合条件下での調査であったのに対して、本研究での親栄養系評価試験と多交配後代検定試験

は無競合条件下であったことが、予測精度が低かった要因であると考えられた。今後、これらの広義の意味での遺伝子型×環境の交互作用を要因に加えた検証が必要であると考えられた。

得られた系譜情報全てを用いた場合の多形質モデルにおける個体植条件下での形質と条播条件下での乾物収量との遺伝相関は、既知の収量性との関係性と概ね一致した(表3)。年間合計乾物収量の遺伝率は、単形質モデルと比較して、ほぼ同程度であった。多形質モデルにおける年間合計乾物収量の育種価の予測精度は、母の一般組合せ能力(従来

表3 BLUP法多形質モデルでの遺伝分散・共分散および遺伝率

形質名	略記	遺伝分散・共分散行列(上段)/遺伝相関(下段)										遺伝率 (h ²)
		AY	WH	VSpr	V1st	V2nd	V3rd	SD1st	E2nd	PH1st		
年間合計乾物収量	AY	0.096	0.030	0.074	0.102	0.126	0.109	0.118	0.124	0.036	0.34	
越冬性	WH	0.23	0.179	0.222	0.227	0.269	0.234	0.246	0.153	0.484	0.15	
早春の草勢	VSpr	0.37	0.81	0.424	0.338	0.404	0.392	0.416	0.207	0.402	0.19	
1番草草勢	V1st	0.47	0.76	0.73	0.501	0.604	0.489	0.493	0.582	0.712	0.24	
2番草草勢	V2nd	0.38	0.59	0.58	0.79	1.159	0.887	0.752	1.289	0.990	0.41	
3番草草勢	V3rd	0.35	0.55	0.60	0.69	0.82	1.003	0.681	0.848	0.748	0.40	
1番草茎数密度	SD1st	0.47	0.72	0.79	0.86	0.86	0.84	0.652	0.722	0.717	0.32	
2番草節間伸長茎割合	E2nd	0.30	0.27	0.24	0.62	0.91	0.64	0.68	1.731	1.019	0.43	
1番草草高	PH1st	0.08	0.79	0.43	0.70	0.64	0.52	0.61	0.54	2.084	0.59	

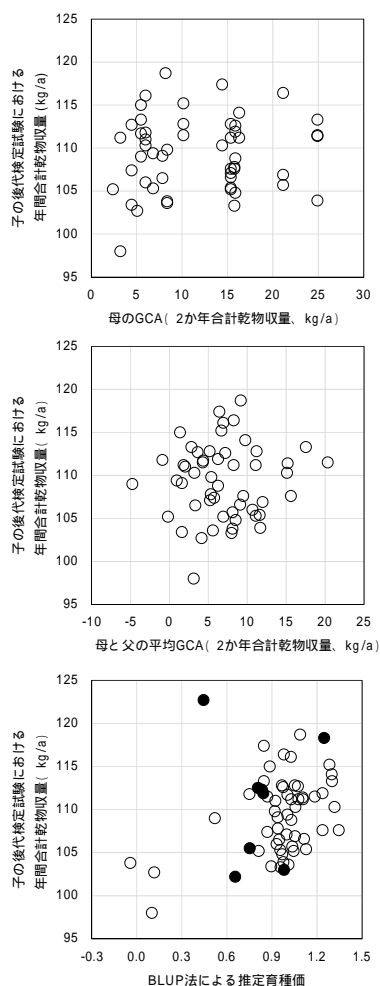


図2 年間合計乾物収量の育種価の予測精度
BLUP法と従来法の比較

後代検定試験の年間合計乾物収量の母の一般組合せ能力(GCA)による予測(上段)、母および父のGCA平均値による予測(中段)、BLUP法による育種価による予測(下段)は系譜情報のある材料、は系譜情報のない材料を示す。

法)、あるいは、母と父の一般組合せ能力からの予測と比較すると高い傾向が見られた(図2)。

育種価と実際に調査した多交配後代検定での値との相関係数は、0.31と低く、多交配後代検定試験を省略するほどの推定精度ではなかった。特に、系譜情報がない材料で推定精度が劣った(図2下段)、極端に不良な個体の淘汰など、選抜試験前のスクリーニングに利用できると考えられた。

本研究で扱った材料群は、いずれも育種事業で選抜されたものであった。そのため、極めて劣る材料はほとんどなく、育種事業で淘汰された材料の記録も少なかったことが、推定育種価の予測精度の向上の妨げになったと考えられる。しかしながら、有望な材料のみでの解析においても、BLUP/REML法の有用性を示し、長年に渡り蓄積された育種データの価値や、淘汰された材料のデータの価値を示すことができたものと考えている。

<引用文献>

Riday, H, Paternity testing: A non-linkage based marker-assisted selection scheme for outbred forage species, Crop Science, Vol.51, 2011, p.631-641
DOI: 10.2135/cropsci2010.07.0390

Tanaka, T., H. Tamaki, K. Ashikaga, H. Fujii, K. Tamura, T. Yamada, Chapter 12 Use of SSR markers to increase forage yield in timothy (*Phleum pratense* L.), Molecular Breeding of Forage and Turf: The Proceedings of the 8th International Symposium on Molecular Breeding of Forage and Turf, 2015, p.131-142
DOI: 10.1007/978-3-319-08714-6_12

足利和紀、玉置宏之、出口健三郎、佐藤公一、チモシー(*Phleum pratense* L.) 1番草における栄養価の遺伝率、日本草地学会誌、Vol.54、No.1、2008、p.19-23、
DOI: 10.14941/grass.54.19

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

田中常喜、田村健一、足利和紀、藤井弘毅、山田俊彦、Marker-based paternity test in polycross breeding of timothy、Crop Science、査読有、Vol.58、No.1、2018、p.273-284、
DOI: 10.2135/cropsci2017.08.0485

[学会発表](計3件)

田中常喜、田村健一、足利和紀、藤井弘毅、山田俊彦、Paternity test for forage

yield improvement in timothy breeding,
EUCARPIA Joint meeting Breeding Grasses
and Protein Crops in the Era of Genomics,
2017 年 9 月 11-14 日, Vilnius, Lithuania

田中常喜、田村健一、足利和紀、藤井弘毅、
BLUP 法アニマルモデルのチモシー育種へ
の適用の試み、2017 年度日本草地学会弘前
大会、2017 年 3 月 20-22 日、弘前大学（青
森県弘前市）

田中常喜、藤田涼平、鹿島聖志、大波正寿、
バレイショ育種における BLUP 法アニマル
モデルの適用 1. 最適なモデルの構築、日
本育種学会第 129 回講演会、2016 年 3 月
21-22 日、横浜市立大学八景キャンパス（神
奈川県横浜市）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

田中 常喜 (TANAKA, Tsuneki)
北海道立総合研究機構・畜産試験場・研究
主任
研究者番号：80506593