

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580003

研究課題名（和文） 自家和合性普通ソバ系統を母本とした種間雑種の育成と遺伝子解析

研究課題名（英文） Interspecific hybrid production and genetic analysis using self-compatible common buckwheat line as female parent

研究代表者

南 峰夫（MINAMI MINEO）

信州大学・農学研究科・教授

研究者番号：30174098

研究成果の概要（和文）：

本研究は、自家不和合性を持つため育種における選抜効率が悪い普通ソバ (*F. esculentum*) に、自家和合性をもつ近縁野生種 (*F. homotropicum*) およびダツタンソバ (*F. tataricum*) との種間交雑により自家和合性を導入して自家和合性の普通ソバ系統を育成し、選抜効率の向上と、種間交配による有用形質の導入を組み合わせることににより、普通ソバの欠点を克服した画期的な新品種の開発を可能にする有用系統を育成することを目的とした。

胚珠培養によりダツタンソバ (*F. tataricum*) と普通ソバの種間雑種を新たに作出した。両種間の雑種は作出が困難で、屋外で旺盛な生育を示し、 $F_2$  種子を得たのは世界で初めてであり、大きな成果である。*F. t* は自家和合性の栽培種であり、種子の脱粒性が無く、ルチン含量が高いことから野生種 *F. homotropicum* との種間雑種由来の自家和合性系統よりも有用性が高い。

また、ダツタンソバは耐湿性、耐寒性に優れた宿根ソバ (*F. cymosum*) との交雑親和性が高いことから、この種間雑種は普通ソバに *F. c* の持つ有用特性を導入するための橋渡し植物としての有用であると考えられる。

この種間雑種のルチン含量を測定したところ、 $F_1$  植物は普通ソバと同等の含量を示し、ダツタンソバの高ルチン含量特性が劣性であることを明らかにした。

$F_2$  において同形花型自家和合性個体と長柱花型自家不和合性個体が分離し、ダツタンソバの持つ自家和合性遺伝子を  $S^*$  と仮定すると、普通ソバの持つ自家不和合性遺伝子  $S, s$  に対して  $S \triangleright S^* \triangleright s$  の優劣関係であると推察した。さらに、この種間雑種と *F. h* 由来の自家和合性普通ソバ系統を交配して、 $S, s$  および自家和合性遺伝子  $S^*$  と  $S^*$  を併せ持つ3元種間雑種を作出した。 $F_2$  世代以降における自家和合性の分離を調査することでソバ属全体における自家（不）和合性の遺伝様式を解明できる有用な研究材料を育成した。

普通ソバとダツタンソバはともに栽培種であり、種子の脱粒性が無いにもかかわらず、 $F_1$  植物において脱粒性が発現した。 $F_2$  において非脱粒性個体と脱粒性個体に分離し、 $F_3$  において非脱粒性の固定系統が得られた。したがって、（非）脱粒性は少数の主動遺伝子により支配されていることが明らかになった。そこで、特異的プライマーを用いて脱粒性遺伝子を同定し、ソバ属における脱粒性について考察するために、それぞれの種間雑種からDNAを抽出した。

ソバ属の脱粒性は *Sht1, Sht2, Sht3* の3つの遺伝子座により支配されていると報告されており、普通ソバは非脱粒性遺伝子 *sht1* をホモに持つことで非脱粒性を発現しているとされている。したがって、ダツタンソバは *sht2*, または *sht3* をホモに持つと予想された。そこで *sht1* と連鎖するSTSマーカーを用いて脱粒性遺伝子の同定を行った。その結果、ダツタンソバは *SHT1* を持たないことが確認された。したがって、ダツタンソバと普通ソバの種間雑種で発現した脱粒性は、これまでの説では説明できないことが明らかになった。

そこで、ソバ属における脱粒性および自家不和合性、異型花柱性の遺伝様式を統一的に把握す

るために、普通ソバとダツタンソバ、*F. homptropicum*、および宿根ソバ (*F. cymosum*) との種間雑種との間の交配を行い、3元、あるいは4元種間雑種の作出を行った。作出したこれらの雑種における表現型とDNAマーカーによる遺伝子の解析を22年度から開始する予定である。

研究成果の概要 (英文) :

Improvement in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) is behind those in the other self-compatible crop species because its heteromorphic self-incompatibility cause low screening efficiency. The objective of the present research is to develop self-compatible common buckwheat lines having desirable characters through interspecific hybridization with self-compatible related species, *F. homotoropicum* and tartary buckwheat (*F. tataricum*).

New interspecific hybrid between *F. t* and *F. e* was produced using ovule culture. This is the first successful hybrid having vigorous growth and seed fertility through self pollination. Tartary buckwheat is a cultivated buckwheat with high rutin content and cold tolerance, therefore this self-compatible hybrid is more valuable than that between *F. e* and *F. h* which is a wild buckwheat with many undesirable traits. However, rutin content in  $F_1$  was low same as that in *F. e*. This result suggests that trait of high rutin content is recessive. Furthermore, *F. t* may be used as bridge species for cross between *F. e* and *F. cymosum*, a wild perennial buckwheat, which has desirable traits such as excess water tolerance and cold tolerance.

In  $F_2$  generation segregation to homomorphic self-compatible plants and long-style self-incompatible plants was observed illustrating that self-compatible gene of *F. t*, temporally designated  $S^t$ , may be  $S^tS^t > s$  relationship with heteromorphic self-incompatible gene of *F. e*,  $S$  and  $s$ .

In addition, triple hybrid was produced by cross (*F. h* x *F. e*) and (*F. t* x *F. e*). Segregation to self-compatible and self-incompatible plants in  $F_2$  and advanced generation of this triple hybrid having both  $S^t$  and  $S^e$  will give us valuable information to discuss inheritance system of self-(in)compatibility in genus *Fagopyrum*.

Although *F. e* and *F. t* are both cultivated buckwheat and have no seed shattering habit, seed shattering was observed in  $F_1$ . Segregation to seed shattering and non-seed shattering plants in  $F_2$  and non-shattering fixed lines were obtained in  $F_3$ , therefore seed shattering habit is controlled by one or two major genes.

For systematic elucidation of seed shattering habit, self-(in)compatibility and hetrostyly in genus *Fagopyrum*, triple and tetraple hybrid among *F. e*, *F. t*, *F. h* and *F. c* are now grown under ovule culture, genetic analysis using these interspecific hybrids through phenotypic observation and specific DNA marker will be start soon.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：植物品種改良

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：ソバ、種間雑種、遺伝子、

### 1. 研究開始当初の背景

普通ソバ (*F. esculentum*, 以下 *F. e*) は、近年、水田転作作物としての栽培が急増しており、作物としての重要性が著しく高まっている。またソバは毛細血管を強化して、脳溢血を予防する薬理効果を持つルチンを含む唯一の穀類であることから、機能性食品素材としての需要が増大している。

しかし、普通ソバは、異型花型自家不和合性を持つ典型的な虫媒他殖性作物であるために、収量が開花期の気象条件に影響されやすく、収量性も低い。栽培諸形質についても欠点が多く、耐湿性、耐霜性、耐倒伏性などの育種の改良が求められている。特に耐湿性は水田転作作物として必須の形質である。

一方、ルチン含量については、ダツタンソバ (*F. tataricum*, 以下 *F. t*) が普通ソバの約100倍のルチン含量を持っており、ダツタンソバ並みの超高ルチン含量品種の育成が求められている。

ところが、普通ソバの育種は他の穀類に比べ大きく遅れている。その原因は自家不和合性であるため、主に表現型による集団内個体選抜が行われてきたことによる。表現型に基づく個体選抜は、収量や成分のような量的形質については的確でない。しかも、他殖による自然交雑種子を混合して次世代集団とするために、選抜効果はさらに低い。

そこで研究代表者は、普通ソバに自家和合性を導入して、選抜効率を向上すること、および自殖性の付与による収量の安定多収を目的として、(1)胚珠培養により自家和合性種 *F. homotropicum* (以下 *F. h*) との種間雑種を作出し、(2)後代から自家和合性普通ソバ系統を育成し(品種登録準備中)、(3)遺伝様式を解明して受精様式の遺伝的制御を可能にした。

さらに、個体選抜で育成した自家不和合性普通ソバ高ルチン系統に自家和合性を導入し、他殖放任受粉と自殖によるルチン含量の選抜効率を比較調査し、自殖性の導入により選抜効率が高まることを確認している(科研、平成15~17年度)。

一方、耐湿性、超高ルチン含量特性については、普通ソバ (*F. e*) の種内に有用な育種素材は見いだせないが、ソバ属近縁種には、渓谷沿いに自生し耐湿性を持つ宿根ソバ (*F. cymosum*, 以下 *F. c*)、超高ルチン含量特性を持つ *F. t* がある。したがって、種間交雑

によりこれらの特性を取り入れることが可能である。

### 2. 研究の目的

本研究は、上記のような背景のもとに、これまでの研究成果を基盤として、自家和合性の導入による選抜効率の向上と、種間交配による有用形質の導入を組み合わせることにより、普通ソバの欠点を克服した画期的な新品種の開発を可能とするブレークスルーとなる系統を育成することを大きな目標としている。

具体的に、この研究課題では、これまでの研究において育成した自家和合性普通ソバ系統 No. 87 (*F. e* x *F. h* 由来) を交配母本として活用し、

- (1) 新たにダツタンソバ (*F. t*) および宿根ソバ (*F. c*) との種間雑種を獲得すること、
- (2) 得られた種間雑種について、No. 87 を連続戻し交配して、*F. c* から耐湿性、*F. t* から超高ルチン含量特性を導入した自家和合性普通ソバ系統を選抜すること、
- (3) 選抜系統を材料として耐湿性と超高ルチン含量特性についての遺伝子解析を行うこと

を目的とした。

### 3. 研究の方法

普通ソバ (*F. e*) と自家和合性の近縁野生種 (*F. h*) の種間交雑を行い、胚珠培養で作出した種間雑種  $F_1$  に *F. e* を戻し交配して ( $B C_5 F_2$ ) 育成した自家和合性系統 (No. 87) を交配母本として用いる (科研、平成7~8年度、15~17年度)。

耐湿性を持つ交配親として *F. c* を、超高ルチン含量特性の交配親として *F. t* を用いる。

研究代表者らはソバ属の種間交配において、片側交雑不和合性が存在することを明らかにしており (Hirose ら 1994, 1995)、自家和合性種を種子親にした場合に交雑親和性が高いことを認めている。

そこで、自家和合性の No. 87 を種子親とし、*F. c* と *F. t* を花粉親とした種間交配を行い、これまでに確立した胚珠培養法 (科研、平成7~8年度) を用いて種間雑種  $F_1$  個体の作出を行う。雑種性の確認には、種特異的 DNA マーカーを用いる。

作出した種間雑種  $F_1$  に自家和合性の No. 87 ( $F. e$ ) を連続戻し交配し、耐湿性および超高ルチン含量特性を導入した自家和合性普通ソバ系統を選抜する。戻し交配には環境制御温室を使用して1年2～3世代の選抜を進める。

耐湿性の検定には、長野県中信農業試験場ソバ育種指定試験地が確立した検定方法を用いる。検定方法の実際については同試験場の指導を得て行う。

個体別ルチン含量の測定にはHPLC（現有）および近赤外分析装置を用いる。

最終年度に選抜育成した耐湿性系統および超高ルチン含量系統と親系統の交雑  $F_2$  集団を養成し、DNAマーカーを用いた遺伝子座の解析を行う。

#### 4. 研究成果

19年度に、胚珠培養によりダツタンソバ ( $F. tataricum$ ) と普通ソバの種間雑種を新たに作出し、その特性を明らかにした。

この種間雑種  $F_1$  は自家和合性を示し、 $F_2$  種子を大量に得ることができた。これまで両種間の雑種は作出が困難で、屋外で旺盛な生育を示し、 $F_2$  種子が得られたのは世界で初めてである。 $F. t$  は自家和合性の栽培種であり、種子の脱粒性が無く、ルチン含量が高いことから、 $F. e$  と  $F. t$  の種間雑種由来の自家和合性系統は、上記の野生種  $F. h$  との種間雑種由来の自家和合性系統よりも有用性が高い。

また、ダツタンソバは耐湿性、耐寒性に優れた宿根ソバ ( $F. cymosum$ ) との交雑親和性が高いことから、この種間雑種は普通ソバに  $F. c$  の持つ有用特性を導入するための橋渡し植物としての利用が考えられる。

さらに、この種間雑種と自家和合性普通ソバ系統との交配と胚珠培養により雑種を作出して、現在試験管内で育成中である。この雑種は  $F. e$  と  $F. h$  および  $F. t$  由来の遺伝子を併せ持つ3系種間雑種であり、 $F. h$  および  $F. t$  由来の自家和合性遺伝子を持つことから、 $F_2$  世代以降における自家和合性の分離を調査することでソバ属全体における自家（不）和合性の遺伝様式を解明できる有用な研究材料を育成した。

20年度には、胚珠培養により作出したダツタンソバ ( $F. tataricum$ ) と普通ソバの種間雑種の  $F_2$  を栽培し、諸形質の分離を調査するとともに、 $F_3$  種子を獲得した。同時に普通ソバを母本として戻し交配を行い、 $BC_1$  種子を獲得した。

$F_1$  植物より得た  $F_2$  種子を用いてルチン含量を測定したところ、 $F_1$  植物は普通ソバと同等の含量を示し、ダツタンソバの高ルチ

ン含量特性が劣性であることを明らかにした。

$F_2$  において同形花型自家和合性個体と長柱花型自家不和合性個体が分離し、ダツタンソバの持つ自家和合性遺伝子を  $S^a$  と仮定すると、普通ソバの持つ自家不和合性遺伝子  $S, s$  と  $S^a > s$  の優劣関係であることが推察された。

野生種  $F. h$  の持つ自家和合性遺伝子は  $S^a > s$  の優劣関係であることから、 $S^a$  と  $S^a$  の関係を明らかにすることでソバ属全体の自家（不）和合性の遺伝システムを解明できると考えられた。

また、普通ソバとダツタンソバはともに栽培種であり、種子の脱粒性が無いにもかかわらず、 $F_1$  植物において脱粒性が発現した。そこで、特異的プライマーを用いて脱粒性遺伝子を同定し、ソバ属における脱粒性について考察するために、それぞれの種間雑種からDNAを抽出した。

21年度には、これまでに胚珠培養により作出したダツタンソバと普通ソバの種間雑種の  $F_2$ 、 $F_3$  を栽培し、諸形質の分離を調査した。同時に普通ソバを母本として戻し交配を行い、 $BC_1$  種子を獲得した。

$F_1$  では脱粒性が発現したので、 $F_2$  における脱粒性の発現を調査したところ、非脱粒性個体と脱粒性個体に分離した。 $F_3$  においては非脱粒性の固定系統が得られたことから、（非）脱粒性は少数の主動遺伝子により支配されていると考えられた。

ソバ属の脱粒性は  $Sht1$ 、 $Sht2$ 、 $Sht3$  の3つの遺伝子座により支配されているとされてきた。普通ソバは非脱粒性遺伝子  $sht1$  をホモに持つことで非脱粒性を発現しているため、ダツタンソバは  $sht2$ 、または  $sht3$  をホモに持つと予想された。そこで  $sht1$  と連鎖するSTSマーカーを用いて脱粒性遺伝子の同定を行った。その結果、ダツタンソバは  $SHT1$  を持たないことが確認された。したがって、ダツタンソバと普通ソバの種間雑種で発現した脱粒性は、これまでの説では説明できないことが明らかになった。

そこで、ソバ属における脱粒性および自家不和合性、異型花柱性の遺伝様式を統一的に把握するために、普通ソバとダツタンソバ、 $F. homptropicum$ 、および宿根ソバ ( $F. cymosum$ ) との種間雑種間の交配を行い、3元、あるいは4元種間雑種の作出を行った。作出したこれらの雑種における表現型とDNAマーカーによる遺伝子の解析を22年度から開始する予定である。

## 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2件)

- ① M. Asaduzzaman, M. Minami, K. Matsushima, K. Nemoto, Characterization of interspecific hybrid between *F. tataricum* and *F. esculentum*, Journal of Biological Sciences, vol.9, 137-144, 2009, 査読有
- ② M. Asaduzzaman, M. Minami, K. Matsushima, K. Nemoto, An *in vitro* ovule culture technique for producing interspecific hybrid between tartary buckwheat and common buckwheat, Journal of Biological Sciences, vol.9, 1-11, 2009, 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 南峰夫・O. Saritnum・山元久明・河村篤紀・林憲弘・松島憲一・根本和洋, ダツタンソバと普通ソバの種間雑種における脱粒性の発現, 第117回日本育種学会, 2010.3.26, 京都
- ② M. Asaduzzaman, M. Minami, K. Matsushima, K. Nemoto, An *in vitro* ovule culture technique for producing interspecific hybrid between tartary buckwheat and common buckwheat, 第113回日本育種学会, 2008.3.28, 東京

[その他]

ホームページアドレス

<http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/lab/plantbreeding/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南 峰夫 (MINAMI MINEO)

信州大学・農学研究科・教授

研究者番号：30174098