

Triticum 属および *Aegilops* 属における
突然変異形質に関する遺伝育種学的研究

Genetic studies on the mutant phenotypes in the genera *Triticum* and *Aegilops*

2016.3

東京農工大学大学院

連合農学研究科

生物生産科学専攻

雨谷 弓弥子

目次

第1章 緒論	1
第2章 実験方法	11
第3章 小穂の形態変異に関する研究.....	21
第1節 一粒系コムギにおける真性分枝穂遺伝子および柔らかい穎/半密穂遺伝子のマイクロサテライトマッピングおよび分枝穂形質の収量への効果	
第1項 緒言	21
第2項 材料と方法	23
第3項 結果	25
第4項 考察	27
第5項 要約	30
第2節 四倍性コムギにおける擬似分枝穂および過剰護穎遺伝子の マイクロサテライトマッピング	
第1項 緒言	42
第2項 材料と方法	43
第3項 結果	44
第4項 考察	47
第5項 要約	49
第4章 穂の形態変異に関する研究.....	56
第1節 六倍性コムギにおける Screwed spike rachis 遺伝子による形態的特性およびマイクロサテライトマッピング	
第1項 緒言	56
第2項 材料と方法	57
第3項 結果	61
第4項 考察	65
第5項 要約	68

第2節 日本在来品種“軍配”における密穂遺伝子のマッピング	
第1項 緒言	82
第2項 材料と方法	83
第3項 結果	84
第4項 考察	87
第5項 要約	89
第5章 葉の生長変異に関する研究	95
第1節 四倍性コムギにおける葉耳を決定する遺伝子のマッピング	
第1項 緒言	95
第2項 材料と方法	96
第3項 結果	97
第4項 考察	98
第5項 要約	100
第2節 六倍性コムギにおける葉身の形成を阻害する 突然変異遺伝子のマッピング	
第1項 緒言	104
第2項 材料と方法	105
第3項 結果	106
第4項 考察	106
第5項 要約	108
第6章	
第1節 タルホコムギおよび合成コムギにおける突然変異に関する遺伝的解析	
第1項 緒言	112
第2項 材料と方法	114
第3項 結果	118
第4項 考察	122
第5項 要約	126
第7章 総合考察	140
摘要	146
謝辞	149
引用文献	151

第1章 緒論

コムギはイネ (Poaceae) 科, イチゴツナギ (Pooideae) 亜科, コムギ (Triticeae) 連, コムギ (*Triticum*) 属に属する一年生の植物種であり, コムギ属には 20 種以上の種が含まれる. A, B, D および G ゲノム構成を基準にして, 二倍性は一粒系 (*Triticum monococcum* L., A^mA^m), 四倍性は二粒系 (*T. turgidum* (L.) Thell., BBA^uA^u) およびチモフェービ系 (*T. timopheevii* Zhuk., GGA^uA^u), 六倍性は普通系 (*T. aestivum* (L.) Thell., BBA^uA^uDD) およびジュコブスキー系 (*T. zhukovskyi* Men. et Er., GGA^uA^uA^mA^m) の 5 系 5 種とする分類法が提唱されている (国分 2010). コムギ属の小穂は 4~6 小花よりなるが, そのうち最も基部の 1 小花だけが結実するもの, 2 小花だけ結実するもの, 3~4 小花が結実するものに分けられ, それぞれ一粒系, 二粒系および普通系と呼ばれ分類の大きな目安とされる. また, 基本染色体数を 7 とし, これら 3 系の染色体数は, それぞれ二倍性は $2n = 14$, 四倍性は $2n = 28$, 六倍性は $2n = 42$ である. チモフェービ系とジュコブスキー系はゲノム構成が異質で B ゲノムの代わりに G ゲノムを有す. 上記の栽培種の多くは, 六倍性のパンコムギ (普通系, *T. aestivum*) と四倍性のマカロニコムギ (*T. durum* Desf.) の改良品種の普及に伴い, 極めて少なくなった. パンコムギは現在栽培されるコムギ類の大部分を占めている代表種である. マカロニコムギや一粒系コムギに比べ, 作物として種々の栽培条件に適し, 収量も優れ, 粉質もパン用に最適で食味も優れるため, 現在は食用作物の中でも最も広域に栽培され, 地球上の人口の半数近くの人々の主食とされている (国分 2010).

Aegilops 属はイネ科に属する一年生の植物種であり, 20 種以上の亜種が属する. なかでもタルホコムギ (*Aegilops tauschii* (Coss.) Schmal., DD) はパンコムギ (*T. aestivum*, BBA^uA^uDD) の D ゲノム供与種であることから重要な野生種である.

栽培コムギは野生種から複雑な倍数性進化を経て生じた。A ゲノムをもつ野生一粒系コムギから栽培一粒系コムギ (*T. monococcum*, $2n = 14$, $A^m A^m$) が分化し、野生のクサビコムギ (*Ae. speltooides* Tausch, BB) と野生一粒系コムギ (*T. urartu* Tumanian ex Gandilyan, $2n = 14$, $A^u A^u$) から野生二粒系コムギ ($BBA^u A^u$) と野生チモフェービ系コムギ ($GGA^u A^u$) が生じ、さらにそれぞれの栽培型が分化して、原始的栽培二粒系コムギ ($BBA^u A^u$) と野生のタルホコムギ (*Ae. tauschii*, DD) からパンコムギ ($BBA^u A^u DD$) が生じた (McFadden and Sears. 1944, 1946). このことは栽培二粒系コムギとタルホコムギから普通系コムギを合成することによって証明された (Kihara 1951).

2014 年度において、コムギの世界生産量は 7 億 2549 万トンであり、トウモロコシ (12 億 9742 万トン) およびイネ (4 億 7881 万トン) と並んで世界三大作物の一つとされている。コムギの作付面積は 2 億 2290 万ヘクタールであり、1960 年を基準として、作付面積の伸び率はほぼ横ばいである (米農務省 USDA “World Markets and Trade” 発表資料). 一方、世界の人口は 2014 年に 72 億 6579 万人であり、アジアやアフリカを中心に人口は増え続け 2100 年には 112 億人に到達すると予測されている (国連人口部 “World Population Prospects, the 2015 Revision”). これにより、食糧不足が深刻化し、世界の飢餓人口は増加の一途をたどっているにもかかわらず、世界に残された未利用の耕作可能地は少ない。したがって、コムギにおいて単位面積当たりの収量性の向上が飢餓や食料不安を軽減するのに常に取り組むべき最優先の課題である。

生産性を上げるために植物に肥料を多く与えると稈の伸長や穂の重量増加を招き倒伏の原因となり兼ねず、倒伏すると収穫物の品質低下や収量の減少が生じる。この問題に対し、草丈を短縮させるが穂の長さには与える影響の少ない半矮性形質が注目され、見出されたのが ‘農林 10 号’ であった。この品種は日本で育成されたパンコムギ品種であり、半矮性であるにもかかわらず、穂は大きく、肥料を充分施した条件でも

倒伏しないという特徴をもっていた。農林 10 号は, *Rht-B1b* (*Rht1*) (Reduced height) および *Rht-D1b* (*Rht2*) 遺伝子によって決定される半矮性形質をもつ。我が国では農林 10 号自体は病害に弱く, 東北地方を除き広くは普及しなかった。そこでこの品種に代わる半矮性品種およびその他の半矮性遺伝子が探された。1946 年にアメリカ合衆国の S. C. Salmon 博士によりもたらされ, 国際農業研究機関 CIMMYT (国際トウモロコシ・コムギ改良センター) において, N. E. Borlaug 博士をリーダーとする研究グループによりメキシコ系コムギとの交配に用いられた。それは, コムギにおける緑の革命の原動力となり, これによりコムギの収量は在来品種に比べ 2~4 倍の水準に達することに成功した。また, これまでに, DNA の多型解析などによって 30 以上の半矮性遺伝子および対立遺伝子が見出され, 四倍性および六倍性コムギの 9 つの異なる染色体上の 22 の遺伝子座 (*Rht1-Rht22*) に割り当てられている (Konzak et al. 1987, Watanabe 2004, Ellis et al. 2005, McIntosh et al. 2008, Watanabe et al. 2008, Peng et al. 2011, Haque et al. 2012)。現在, 世界で登録されているコムギ品種の 70%以上, また, アメリカで栽培されているコムギ品種の 90%が *Rht-B1b* または *Rht-D1b* 遺伝子をもつ (Kihara 1983, Evans 1998, Guedira et al. 2010)。これらの遺伝子はジベレリン酸シグナル伝達障害を引き起こす優性の機能獲得型突然変異である (Peng et al. 1999)。一方, ヨーロッパおよびアジアにおける半矮性品種のほとんどは, 日本の在来品種 ‘アカコムギ’ 由来の半矮性遺伝子 *Rht8* をもつ (Borojevic K. and Borojevic K. 2005)。*Rht8* 遺伝子と密接に連鎖する 2D 染色体短腕上のマイクロサテライトマーカー *Xgwm261* は南ヨーロッパに分布する半矮性コムギの *Rht8* 遺伝子の診断マーカーとして利用された (Worland et al. 1998, Korzun et al. 1998)。この遺伝子をもつ個体は植物の生長や細胞伸長の重要な調節因子でもあるブラシノステロイドに対して非感受性である (Gasparini et al. 2012)。

限られた地球の耕作適地の中で増加する人口に対応できる収穫量の確保のため,

以上に述べた耐倒伏性の改善例のほか、さまざまなバイオマス生産量の高い品種の開発が行われ、有用な形質を決定する遺伝子の座乗染色体が明らかにされてきた。Austin et al. (1980, 1989) は 1900 年代にイギリスの農家で栽培されていた古いコムギ品種と 1980 年代までの近代品種の収量性を比較し、近代品種ほど収量性は増加し、草丈は約 40% 低下したこと、バイオマスはそれほど増大しないが、結果として高い収穫指数（全重に対する種子重の割合）を得られたことを示した。ただし、収穫指数は限界に近付いていることから、収量性向上の持続には有用な遺伝的変異の検出や、品種開発が必要であると考察した (Austin et al. 1980)。その一方法として、バイオマスの向上が挙げられることから、穂当たりの種子数の増加、穂の巨大化、光合成能力の向上などは重要である。

コムギ属において形態的形質を決定している遺伝子が、ゲノムの何処に位置しているかを決定することは、特定の形質をもつ系統を選抜する際の見印となる DNA マーカーの作出や有用な遺伝子の単離に必要不可欠なものである。遺伝子座を特定することによって、農業的・経済的に価値のある形質を決定する遺伝子の遺伝子導入を効率よく行うことができる。2014 年にコムギゲノムの塩基配列の概要が明らかにされた。これにより、コムギのおおよその遺伝子数や位置が示され、遺伝子の特定や品種改良のための DNA マーカー開発が効率的に進むと考えられる。これまでに、一塩基多型 (SNP)、制限酵素断片長多型 (RFLP)、増幅断片長多型 (AFLP)、マイクロサテライト (SSR) などを用いた DNA マーカーによって作物の高密度連鎖地図の作製や、有用形質の遺伝解析が行われてきた。中でもマイクロサテライトマーカーは、高密度連鎖地図の作製に非常に有用である。マイクロサテライトは、通常 2~4 塩基の単純反復配列で構成されている (Weber and May 1989, Morgante and Olivier 1993, Wang et al. 2003)。マイクロサテライトの機能は解明されておらず、遺伝子としての働きは明らかに

なっていない。しかし、1 Mbpごとに5～6個の高頻度で存在することや変異が起りやすいことから多型が多く認められる。また、マイクロサテライトは情報量が多いため、正確な地図ができるという利点がある。コムギにおいては、*Xgwm* (Röder et al. 1998a, b), *Xgdm* (Pestsova et al. 2000), *Xwmc* (Wheat Microsatellite Consortium <http://wheat.pw.usda.gov>, Somers et al. 2004), *Xbarc* (Song et al. 2005), *Xhb* (Torada et al. 2006), *Xstms* (Hayden et al. 2006) などさまざまなマイクロサテライトマーカーが作製され、連鎖地図作製に利用されている。

本研究では、コムギ品種改良に貢献することを目的とし、特に穂当たりの種子数を増加させることによりバイオマスの向上が期待される変異形質に着目した。以下に示すコムギの未利用遺伝資源を中心に、系統育成およびマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖分析を行った。

コムギの穂の小穂数増加や穂の重量増加などの特性は収穫高や育成効率に関連する。分枝穂をもつコムギは古くから知られており (Ball and Leighty 1916, Percival. 1921, Kirby 1975), それは *miracle wheat* と名づけられるほど、穂当たりあるいは面積当たりの種子数の増加を見込める形態の一つである。コムギの穂は穂軸に対し小穂が互生する。1 穂軸節から 1 小穂を形成する正常型 (Fig. I -1; “Normal spike”) に対し、分枝穂に関わる形質は、1 穂軸節から 2 つ以上の小穂を形成する “真性分枝穂” (Fig. I -1; “Branched spike”) および 1 穂軸節から 1 小穂を形成し、分枝しないが小穂軸が伸長する “擬似分枝穂” の 2 つの型がある。さらに、擬似分枝穂には、各小穂に過剰な護穎を 2 枚ずつ着生する型 (Fig. I -1; “Sham ramified spike 1”) と着生しない型 (Fig. I -1; “Sham ramified spike 2”) がある。1 小花当たり 3 つの雌蕊をもつ *Three pistil mutant* (Peng 2003) を除いて、いずれの型においても、1 小花当たり 1 穎果が結実する。

真性分枝穂は supernumerary spikelets (SS) とも総称され、1 穂軸節に 2 つもしくは 3 つの小穂が水平に重なる horizontal spikelets (HSs) や 1 穂軸節に複数の小穂が密集して着生する multirow spike (MRS) 等の型が含まれる。HSs 型には branched head, twin spikelets および triple spikelet がある。穂軸節当たりの小穂数の遺伝的決定には第 2 同祖群染色体が関与することが知られ (Klindworth et al. 1990a, b, 1997, Peng et al. 1998, Muramatsu 2009), これまでに、四倍性コムギの HSs 型を決定する 2A 染色体短腕上の *bh* (branched head) 遺伝子や、六倍性コムギの MRS 型を決定する 2D 染色体短腕上の *mrs1*(multirow spike1) 遺伝子などが報告されている (Klindworth et al. 1990a, Martinek and Bednář 2001, Dobrovolskaya et al. 2009, Haque et al. 2012, Li et al. 2012). しかしながら、二倍性コムギにおいて真性分枝穂遺伝子の座乗位置は明らかではなかった。そこで、第 3 章第 1 節では、*T. monococcum* の HSs 変異系統を用い、この形質を決定する遺伝子をマッピングした。また、単位面積当たりの収量性におよぼす真性分枝穂の効果をも、MRS 型の準同質遺伝子系統を利用し検証した。

擬似分枝穂は小穂軸が伸長し、小穂軸節から小花ではなく小穂を生じることがあり、それにより正常な穂より多くの小花を形成する。この付加的な小花に稔性がある場合、シンク能は増加する。擬似分枝穂形質は六倍性コムギ *T. vavilovii* (Thum.) Jakubz. においては典型的な形態であるが、系統の数はごく少ない。また、この形態を決定する遺伝子の座乗染色体は不明であった。そこで、第 3 章第 2 節では四倍性コムギ *T. turgidum* PI 67339 および *T. jakubzineri* のもつ擬似分枝穂遺伝子をマッピングした。

穂の構造は送受粉効率や種子 (穎花) の配置構成に大きく関わり (Shitsukawa et al. 2009), 穂の維管束の構造は種子形成に影響をおよぼす (Sreenivasulu and Schnurbusch 2012). また、穂軸節当たりの小穂数は、コムギ属において分類学上重要な特徴である (Sakuma et al. 2011). 単位面積当たりの種子数と粒重は重要な収量の経済パラメーターであり (Millet 1988), 在来種を用いて粒大を増大させることが

可能である (Giura and Saulescu 1996). しかし, 種子数および粒重の増加は生長する種子間に競争を生じ, 互いに増大を妨げ合うことがある. この競合を避けるため, また, 各小花の生長空間を確保するため, 小花の空間的配置を変更する新たな遺伝的変異が必要である. 穂軸がねじれることにより, 小穂の着生する角度に変化を生じ, 効率的に種子の生長空間を確保できる可能性がある. 六倍性コムギの *screwed spike rachis* (SCR) 変異体には, 穂軸および花柄がねじれる型 (Scr1) と, 穂軸のみがねじれる型 (Scr2) があり (Smoček 1991), これらの形質を決定する遺伝子の座乗位置は判っていなかった. 第4章第1節ではSCR形質を有する系統の形態的特性を評価し, *Scr1* 遺伝子をマッピングした. また, ねじれとともに生じる半矮性化の要因を探った.

六倍性コムギにおいて, 穂軸の節間が短く穂の単位長さ当たりの種子数が増加する密穂形質について, 3つの主要な遺伝子 *Q*, *S* および *C* が知られている (Sears 1947, Rao 1977, Koba and Tsunewaki 1978, Salina 2000, Simons et al. 2006, Johnson et al. 2008, Zhang et al. 2011). 日本の在来品種には “軍配” と称される品種がいくつかあるが, これらの密穂形質を制御する遺伝子の座乗位置やその他の密穂遺伝子との関係は明らかではなかった. 第4章第2節では, 軍配品種のうち供試した5品種について, 対立性検定, 連鎖地図および物理地図の作製によって遺伝子の座乗位置を調べた.

コムギの葉は光エネルギーおよび CO_2 を獲得するための重要な器官であり, 物質生産の中心的役割を果たしている. Gifford et al. (1984) は作物における品種の変遷と収量との関係を調べ, 近代品種による収量増の第一の要因は, 光合成産物の収穫部位への分配割合 (収穫指数) にあったとしている. 葉の傾斜角は, 光強度, 葉面積指数と深く関連し, 群落の光合成速度に大きな影響を与える. イネ, コムギおよびオオムギにおいて, 葉身が直立すると, 群落内部への光透過がよく, 光の分布が均一になることが光合成に有利である (Tanaka et al. 1969, Angus et al. 1972, Austin et al. 1976,

小野 1976). 葉耳および葉舌を欠損する“無葉耳”変異体は、葉身が稈を包み直立するように生長する。トウモロコシ、イネ、オオムギおよびライムギなどの二倍性イネ科作物における無葉耳形質は単一の劣性遺伝子によって決定されている (Ahn and Tanksley 1993, Causse et al. 1994, Pratchett and Laurie 1994, Korzun et al. 1997). しかし、倍数性コムギの無葉耳変異体は、葉耳の有無を決定する因子が一つではないため、分析が困難であった。第5章第1節および第6章第1節では、準同質遺伝子系統および合成コムギ (*XAegilotriticum* P. Fourm) を用い、四倍性および六倍性コムギの葉耳形成に関わる遺伝子について連鎖地図を作製した。また、タルホコムギにおいて無葉耳突然変異系統が育成されたことから、この形質を支配する遺伝子の連鎖地図を作製した。さらに、2D 染色体の葉耳に関わる遺伝子の DNA 配列の決定を試みた。

幼苗期においてより葉が大きくなることで、個体のバイオマスや葉面積の増加には有効である (Zhang L. et al. 2014). 六倍性コムギにおいて、葉が萎縮し、生育に深刻な影響をおよぼす突然変異体が生産された (Zhogin et al. 1985). この形質は葉身形成の決定的な要因を明らかにするうえで重要な遺伝形質であることから、第5章第2節では、この形質を決定する遺伝子の座乗位置を明らかにした。

タルホコムギは病害抵抗性や環境ストレス耐性など有用な特性をもつが、その多くは遺伝的解析がなされず未利用のままである。*Aegilops* 属はコムギ属と近縁関係にあることから、添加系統や遺伝子移入系統を育成し、相互転座を誘導することによって目的の遺伝子をコムギ栽培種に導入することができる。遺伝子移入の手段には、タルホコムギから六倍性コムギへの直接的な交配 (Gill and Ruup 1987, Cox et al. 1990, Fritz et al. 1995a, b, Sehgal et al. 2011) や、四倍性コムギ (*T. turgidum*) とタルホコムギを交配し、染色体数の倍加によって合成コムギを育成し、母本とする方法がある。タルホコムギにおいて小穂に過剰な護穎を1枚生じる *triple glume* 突然変異が人為的に作出さ

れた。過剰な護穎を伴う形質は四倍性や六倍性コムギにおいて見出されているが (Gowayed 2009), タルホコムギにおいて過剰な花器官に関する遺伝的解析例は少ない。第 6 章第 1 節では triple glume 形質を支配する遺伝子をマッピングした。

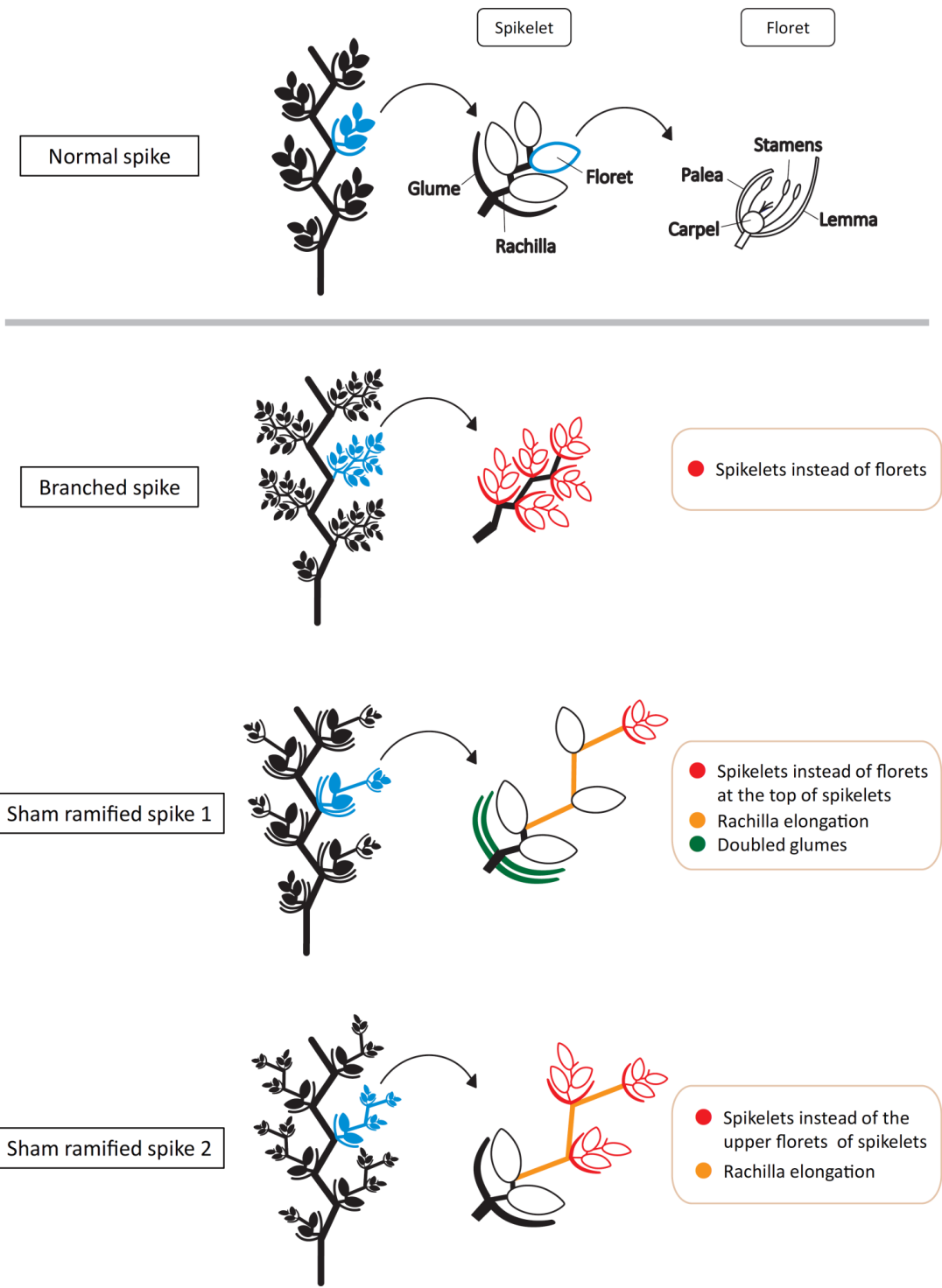


Fig. I -1. Various types of *Triticum* spike

第 2 章 実験方法

第 3 章から第 6 章における植物材料については各章において詳述することにして、本章では共通する方法について述べる。なお、供試した植物材料は特に記述のないものは全て渡部信義教授の育成した系統あるいは所有していた系統である。

植物体からの核 DNA の抽出

Dellaporta et al. (1983) の方法に基づき、以下の方法を用いて核 DNA を抽出した。使用した試薬の組成を Table II-1 に示す。まず、植物の葉身を 0.05 g 程度採取し、乳鉢に入れ、液体窒素を加え凍結粉砕した。そこに、予め抽出緩衝液 (750 μ l/個体) およびメルカプトエタノール (0.5 μ l/個体) をチューブに入れ、ボルテックスで攪拌した溶液 (A) を 500 μ l 加えよく磨砕し、1.5 ml チューブに移した。乳鉢に 250 μ l の溶液 (A) を加えて共洗いし、1.5 ml チューブに加えた。チューブに 50 μ l の 20%SDS を加え、穏やかに混ぜ均一にし、65°C に温めた恒温水槽で 10 分間保温した。次に 250 μ l の 5M 酢酸カリウムを加え穏やかに混ぜ均一にし、氷上で 10 分間整置した。その後、遠心機を用い 17,860~18,800 \times g, 4°C 条件で 20 分間遠心した。遠心分離した上澄み 600 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移し、等量のイソプロパノールを加え穏やかに混ぜ均一にし、17,860~18,800 \times g, 20°C 条件で 15 分間遠心した。その後、上澄みを除き、チューブを逆さにして軽く乾燥させ、100 μ l の溶解緩衝液を加え沈殿を溶かした。10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウムを加え均一に混合し、100 μ l のイソプロパノールを加え穏やかに混ぜ均一にし、17,860~18,800 \times g, 20°C 条件で 15 分間遠心した。その後、沈殿をとらないように注意深く上澄みを除き、沈殿を 400 μ l の 70%エタノールですすぎ、17,860~18,800 \times g, 20°C 条件で 5 分間遠心した。上澄みをできるだけ除き乾燥さ

せ, エタノールを完全に気化させ, 200 μ l の 1/10 TE 緩衝液に溶解した. 抽出した DNA はフリーザー内に -30°C 条件で保存した.

マイクロサテライトの増幅

マイクロサテライトの増幅には PCR 法を用いた. PCR の反応組成 (10 μ l) は, 1.0 μ l の 1 \times Ammonium Buffer (Mg free) (Ampliqon), 2 mM MgCl_2 (Ampliqon), 200 μ M dNTP mix (Promega), 2 Unit *Taq* DNA polymerase (Ampliqon), 各 0.25 μ M primer (Forward および Reverse), 200 ng 核 DNA, 滅菌水および 37% Glycerol (w/w)とした (Table II-2). サーマルサイクラー GeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems) にセットし, Touch Down プログラムによって PCR を行った (Fig. II-1).

電気泳動

primer 対ごとに増幅された PCR 産物を用い, 電気泳動を行った. 電気泳動には, ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 AE - 6530P/M (アトー株式会社) を用い, ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った. 使用した試薬の組成を Table II-3 に示した. 泳動ゲルは 30%アクリルアミド溶液 : 蒸留水 : 1.5 M Tris - HCl (pH8.8) = 28 : 10 : 13, 濃縮ゲルは 30%アクリルアミド : 蒸留水 : 0.5 M Tris - HCl (pH6.8) = 5 : 18 : 8 の比率で混合し working solution とした.

泳動ゲルを作製するため, 泳動ゲル working solution : 10%APS : TEMED (N, N, N', N' - tetramethyl ethylenediamine) を 1000 : 4 : 1 の比率で混合し, マグネチックスターラーで十分に攪拌した. その後, 組み立てておいた泳動プレートの約 7 割まで混合液を流し込み, 重合によりできたゲルの表面を水平にするため, 蒸留水を穏やかに入れた. 濃縮用ゲルを作製するため, 濃縮ゲル working solution : 10%APS : TEMED を 1000 : 8 : 1 の比率で混合し, マグネチックスターラーで十分に攪拌した. 泳動ゲルの

ゲル化を確認し、蒸留水を流し捨てた後、泳動ゲルの上に混合液を入れ、サンプル用ウェルを作製するためにコームを挿した。ゲル化したらコームを外し、ウェルに残った液体を注射器で吸い取り、1×Tris - Glycine でウェルを満たした。

PCR 産物 10 μ l 当たり 4 μ l の試料緩衝液を加え、約 5 秒間ボルテックスによって攪拌した。各サンプル 2 μ l ずつをウェルに注入し、ローディングコントロールとして等量の EZ Load (Bio Rad, 20~1,000 bp, 50 バンド) を注入した。泳動槽に泳動プレートを設定し、1×Tris - Glycine を泳動緩衝液として入れ、電圧 150 V で約 90 分間通電した。

銀染色法

DNA バンドの検出には銀染色法を用いた。0.4 g の硝酸銀を蒸留水で 200 ml にメスアップし 0.2%硝酸銀溶液を作製した。同様に 6.0 g の水酸化ナトリウムを蒸留水で 400 ml にメスアップして 1.5%水酸化ナトリウム溶液を作製し、使用前に 800 μ l のホルムアルデヒドを加えた (Table II-4)。

電気泳動の終わったゲルをゲル板から外し、0.2%硝酸銀溶液の入ったトレイに入れ、振とう機にセットし約 15 分間振とうした。ゲルを 0.2%硝酸銀溶液から取り出し蒸留水の入ったトレイに入れ、振とう機にセットし約 10 分間振とうした。その後ゲルを蒸留水の入ったトレイから取り出し 1.5%水酸化ナトリウム溶液に入れ、振とう機にセットし約 20 分間振とうした。バンドを検出したゲルは、ビニール袋に入れシーラーを用いて密封し、4°Cで冷蔵保存した。

連鎖地図の作製

銀染色によって検出されたバンドのパターンから遺伝子型を判別した (Fig. II -2)。Map Manager QTX (Manly et al. 2001) のプログラムを用いて遺伝子距離

centiMorgans (cM) を計算し (Kosambi 1944), 3.0 以上の LOD 値を適用し, 連鎖地図を作製した.

Table II-1. Composition of reagents for DNA extraction by SDS method

DNA extraction buffer	
1.0 M Tris HCl (pH 8.0)	50 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	50 ml
NaCl	14.6 g
DW	
	500 ml
1.0 M Tris HCl (pH 8.0)	
Tris (Hydroxymethyl) aminomethan	121.1 g
HCl (add for pH 8.0)	
DW	
	1000 ml
0.5 EDTA (pH 8.0)	
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	186.1 g
NaOH (add for pH 8.0)	
DW	
	1000 ml
20% SDS solution	
Sodium dodecyl sulphate	20.0 g
DW	
	100 ml
5 M KOAc (Potassium acetate) solution	
Potassium acetate	245.4 g
DW	
	500 ml
DNA resolution buffer	
1.0 M Tris HCl (pH 8.0)	5.0 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2.0 ml
DW	
	100 ml
3 M NaOAc (Sodium acetate) (pH 5.2)	
Sodium Acetate	20.4 g
DW	
Acetate (add for pH 5.2)	
	50 ml
TE buffering solution	
1.0 M Tris HCl (pH 8.0)	1.0 ml
0.5 M EDTA	200 µl
DW	
	100 ml

Table II -2. Components of PCR reaction mixture

Component	Vol./reaction	Final Conc.
Distilled Water	3.0 μ l	---
37% Glycerine	0.96 μ l	---
10 \times Ammonium Buffer (Mg free)	1.0 μ l	1 \times
25 mM MgCl ₂	0.8 μ l	2 mM
10 mM dNTP mix	0.2 μ l	200 μ M
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.04 μ l	2 Unit
Primer mix (2.5 μ M)	2.0 μ l	0.5 μ M
Genome DNA	2.0 μ l	200 ng
	10.0 μ l	---

Table II-3. Composition of reagents used for gel making for electrophoresis

30% acrylamide	
Acrylamide	150 g
Methilenebis (Acrylamide)-HG	4.0 g
DW	
	500 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	
Tris (Hydroxymethyl) aminomethan	181.7 g
DW	
HCl (add for pH 8.8)	
	1000 ml
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	
Tris (Hydroxymethyl) aminomethan	60.0 g
DW	
HCl (add for pH 6.8)	
	1000 ml
10% APS	
Ammonium persulphate	1.0 g
DW	
	10 ml
10 × Tris Glycine	
Tris (Hydroxymethyl) aminomethan	30.3 g
Glycine	144.1 g
DW	
	1000 ml
Sample buffer solution	
Xylene cyanol	0.25 g
Bromophenol blue	0.25 g
Sucrose	40.0 g
DW	
	100 ml

Table II -4. Composition of reagents used for silver stain

0.2% Silver nitrate (AgNO₃) solution

Silver nitrate	0.4 g
DW	
<hr/>	
	200 ml

1.5% Sodium hydroxide (NaOH) solution

Sodium hydroxide	6.0 g
DW	
<hr/>	
*Add Formaldehyde solution (800 µl) when used	400 ml

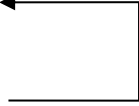
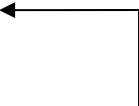
Pre-heating	94°C for 2 min	
Touch Down PCR	94°C for 15 sec 63 → 56°C for 30 sec 68°C for 15 sec	 -1°C/cycle 7 cycle
*after 7cycle the temperature reach 56°C for 15 sec, then next step		
PCR	94°C for 15 sec 55°C for 30 sec 68°C for 15 sec	 35 cycle
Storage	20°C for keeping	

Fig. II -1. Touch Down program

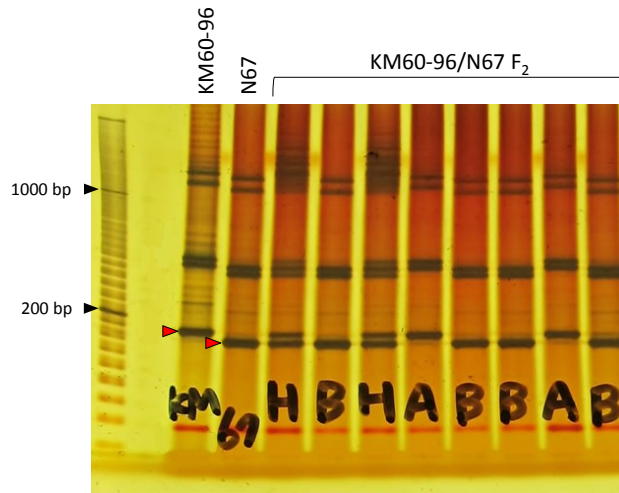


Fig. II-2. One case of electrophoretic pattern. A, B and H indicate maternal type ('KM' = KM60-96), paternal type ('67' = Novosibirskaya 67) and heterozygous type, respectively (please refer to chapter five), with a pen on vinyl bag. Red arrow heads indicate band patterns where were used to confirm polymorphic

第3章 小穂の形態変異に関する研究

第1節 一粒系コムギにおける真性分枝穂遺伝子および柔らかい穎/半密穂遺伝子の マイクロサテライトマッピングおよび分枝穂形質の収量への効果

Microsatellite mapping of genes for branched spike and soft glumes

in *Triticum monococcum* L. and the effect of multirow spike gene on yield potential

第1項 緒言

一つの穂軸節から二つ以上の小穂を形成し、一般的なコムギの穂に比べかなり大型となる穂を真性分枝穂という。穂の小穂数増加や穂の重量増加などの特性はコムギの収穫高や育成効率に関連することから生産性の向上が期待される形質である。真性分枝穂の形態発現は環境条件によって変動するが (Sharman 1944, Pennell and Halloran 1983), 遺伝的に決定される劣性形質である (Pennell and Halloran 1983, Klindworth et al. 1990a, Peng et al. 1998, Martinek and Bednár 2001)。四倍性コムギにおいて真性分枝穂を決定する *bh* (branchhead) 遺伝子および六倍性コムギにおいて triple spikelet を決定する *qTS2A-1* 遺伝子座はいずれも 2A 染色体短腕上に座乗する (Klindworth et al. 1990a, Li et al. 2012, Haque et al. 2012)。また、六倍性コムギの 2A もしくは 2D 染色体を欠損するナリソミック系統は twin spikelets を生じ、この形質を制御する遺伝子は 2A 染色体長腕上および 2D 染色体短腕上に存在する (Sears 1954)。また、化学的突然変異誘発処理を通して育成された六倍性コムギ変異系統 Ra1 の分枝穂形質は 2D 染色体短腕上の *mrs1*(multirow spike1) 遺伝子によって決定されている (Martinek and Bednár 2001, Dobrovolskaya et al. 2009)。

一粒系コムギは、人類の農耕活動が先駆的に行われていた肥沃な三日月地帯において広く栽培されていた。トルコ南東部の Karacadag 山脈付近において、その野生種

T. boeoticum Boiss ($2n = 2x = 14$, AA) から栽培化された (Heun et al. 1997). *T. monococcum* の A^m ゲノムは *T. zhukovskyi* にのみ存在し (Dvorak et al. 1993, Dubcovsky et al. 1996, Baum and Bailey 2004), 最も重要な倍数性コムギ品種 *T. turgidum*, *T. timopheevii* および *T. aestivum* の A ゲノム供与種である *T. urartu* の A^u ゲノムとは近縁である (Mori et al. 2003). A^u ゲノムと A^m ゲノム間の染色体の対合は完全に不對合になることもある. 一粒系コムギの遺伝的多様性の開拓や新種の変異遺伝子の発見は, さらなるコムギの遺伝的改良のために期待されている (Valkoun 2001). 一粒系コムギは, 種子にタンパク質, 亜鉛, 鉄およびルチン, トコフェノールおよびトコトリエノールのような抗酸化化合物が多く蓄えられている (Hidalgo et al. 2006, Hidalgo and Brandolini 2008). Celiac 病患者の腸粘膜に対して一粒系コムギの粉は毒性が低く (Pizzuti et al. 2006), 葉さび病やうどん粉病抵抗性と組み合わせた良い製パン特性をもつ一粒系コムギ系統が見つけられている (Saponaro et al. 1995). このような利点を活かすために, 一粒系コムギを現代のコムギ栽培に適合させることが必要である. そのために必要な形質は, 早生であること, 脱穀しやすいこと, 半矮性, 小穂に2粒以上稔る特性である. 一粒系コムギには四倍性種および六倍性種と同祖であると思われる遺伝子が確認されている. 黒色穎 (black glume) (*Bg*) および穎毛 (hairy glume) (*Hg*) を決定する遺伝子は $1A^m$ 染色体に座乗する (Dubcovsky et al. 1996, Goncharov et al. 2007, Jing et al. 2007). また, 青粒 (blue aleurone) (*Ba*) 遺伝子は $4A^m$ 染色体上に座乗し (Singh et al. 2007), クロリナ突然変異遺伝子 (*cn-A1*) は $7A^m$ 染色体上に座乗する (Kosuge et al. 2011). 一粒系コムギの突然変異系統は Multani et al. (1992) および山下博士により育成され (<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/quickSearchAction.do>) (2016/1/22 閲覧), 小穂に2粒以上稔る真性分枝穂突然変異系統は山下博士により育成された系統の一つである.

Filatenko and Kurkiev (1975) は, Zhukovskii によってトルコの沿岸域で採集された系統 *T. monococcum* K-20970 の中から, 自然裸性突然変異である *T. sinskajae* を見出し *T. sinskajae* Filat. et Kurkiev ($2n = 2x = 14, A^m A^m$) と名付けた. Kuspira et al. (1989) は, *T. sinskajae* の半密穂を決定する遺伝子と脱穀のしやすさに関わる柔らかい穎 (soft glume) の形質を決定する *sog* 遺伝子が完全に連鎖するとした. また, 各小穂の護穎と外穎の間に存在する false glume を決定する *fg* 遺伝子が *sog* 遺伝子と強く連鎖することを示したが, 座乗染色体までは明らかにできなかった. Lebedeva and Rigin (1994) は, 穎の柔らかさに関わる遺伝子が 2A 染色体の劣性遺伝子であるとし, Taenzler et al. (2002) も, AFLP マーカーを用いて $2A^m$ 染色体短腕上に *sog* 遺伝子が存在するとした. Goncharov et al. (2007) は fissile inner (flower) glume 遺伝子 (*fig*) が半密穂性と連鎖することを示した. fissile inner (flower) glume は false glume と同じ形質を指すと考えられる. Sood et al. (2009) は突然変異系統を用いて *T. monococcum* の *sog* 遺伝子が $2A^m$ 染色体短腕のマイクロサテライトマーカー *Xgwm71* と連鎖していることを明らかにした.

本節では *T. monococcum* における真性分枝穂遺伝子に着目しマッピングした. また, 柔らかい穎/半密穂をもつ *T. monococcum* の人為突然変異系統および *T. sinskajae* が同一の遺伝子によって決定されるか対立性検定を行い, false glume 遺伝子との関係も探った. さらに, 六倍性コムギの *multirow* 準同質遺伝子系統を用い, 真性分枝穂が単位面積当たりの収量性向上において有効な形質であるか考察した.

第2項 材料と方法

植物材料

T. monococcum の6系統および *T. sinskajae* の2系統を表現型の分離分析および連鎖地図の作製に用い, *T. aestivum* Novosibirskaya 67 (N67) およびN67を遺伝背景とし

た分枝穂の準同質遺伝子系統ANBW 6Aを収量性検定に用いた (Table III-1-1, Fig. III-1-1, Fig. III-1-4). *T. monococcum* #252およびCItr 13962は正常な穂をもち、#252は早生型の系統である。 *T. monococcum* KT 3-24 は分枝穂突然変異系統、 *T. monococcum* KT 3-21はクロリナ変異系統であり、いずれも山下博士によって育成された。 *T. monococcum* mm09は柔らかい穎および半密穂をもち、この形質は2A^m染色体短腕上の*sog*遺伝子によって決定されている (Sood et al. 2009)。 *T. sinskajae* PI 418587, *T. sinskajae* k-48993および*T. monococcum* PI 584654は柔らかい穎および半密穂をもつ晩生の系統であり、PI 584654は*T. monococcum*/*T. sinskajae*より選抜された34系統のF₅集団に由来する (Vallega 1996)。 N67は故S. F. Koval博士 (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia) から分譲していただいた。 分枝穂 (*bh^m*), 柔らかい穎および半密穂 (*sog*) およびfalse glume (*fg*) を決定する遺伝子の連鎖地図作製および対立関係を確認するため、PI 418587/KT 3-24, PI 584654/KT 3-24, #252/PI 418587, KT 3-21/PI 418587, mm09/#252, mm09/PI 418587, mm09/PI 584654およびk-48993/CItr 13962の8つのF₂集団を育てた。 実験に用いた材料は茨城大学農学部の実験圃場において栽培した。

bh^m, *sog* および *fg* 遺伝子の連鎖地図作製

DNA は 4 集団 KT 3-24/PI 418587, #252/PI 418587, KT 3-21/PI 418587 および k-48993/CItr 13962 の F₂ の各幼苗の葉から抽出した。 *bh^m* および *sog* 遺伝子のマッピングのため、2A 染色体のコムギマイクロサテライトマーカーを用いた。 PCR 条件および PCR 産物の電気泳動、増幅した断片の検出方法は第 2 章の記述と同様である。

分枝穂形質の収量におよぼす効果

真性分枝穂のもつ収量への効果を調べるため、六倍性コムギの *multirow* 準同質遺

伝子系統 ANBW 6A および N67 を比較した. 全 9 項目 (稈長, 個体当たりの穂数, 個体当たりの稈重, 個体当たりの穂重, 全重, 個体当たりの種子重, 百粒重, 穂当たりの種子数および個体当たりの種子数) について 2011 年から 2015 年の 5 年間 (稈長および稈重については 2012 年から 2015 年の 4 年間), 2 系統を毎年約 20 個体ずつ育て, その中から無作為に選んだ各 6 個体のデータを記録した. 重量は個体を収穫後乾燥させて測定した. また, 収穫指数は種子重/全乾物重から算出した.

第 3 項 結果

Table III-1-2 は 8 集団の F₂ における分枝穂, 柔らかい穎/半密穂, false glume の分離を示す. 分枝穂形質は PI 418587/KT 3-24 F₂ において 85 正常穂:30 分枝穂の比に分離し ($\chi^2 = 0.073$, df = 1, 0.5 < p < 0.9), PI 584654/KT 3-24 F₂ において 201 正常穂:72 分枝穂の比に分離した ($\chi^2 = 0.274$, df = 1, 0.5 < p < 0.9). χ^2 検定の結果 3:1 の分離比に適合した. 柔らかい穎/半密穂において, PI 418587/KT 3-24, PI 584654/KT 3-24, #252/PI 418587, KT 3-21/PI 418587, mm09/#252 および k-48993/Citr 13962 の F₂ は固い穎/正常穂:柔らかい穎/半密穂がいずれも 3:1 の比に分離した. mm09/PI 418587 および mm09/PI 584654 の F₂ はすべて柔らかい穎/半密穂を示したことから, mm09, PI 418587 および PI 584654 の柔らかい穎/半密穂を決定する遺伝子是对立関係にある. false glume において, KT 3-21/PI 418587 および k-48993/Citr 13962 の F₂ は false glume 無し:有りが 3:1 の比に分離した. mm09/PI 418587 および mm09/PI 584654 の F₂ は全個体が false glume のもっていたことから, mm09, PI 418587 および PI 584654 の false glume を決定する遺伝子是对立関係にある.

分枝穂, 柔らかい穎/半密穂および false glume における連鎖関係

Table III-1-3 は 4 組み合わせの F₂ における分枝穂, 柔らかい穎/半密穂および false

glume の連鎖関係を示す. 分枝穂および柔らかい穎/半密穂については, 正常穂/硬い穎:正常穂/柔らかい穎:分枝穂/硬い穎:分枝穂/柔らかい穎が PI 418587/KT 3-24 において 60:25:28:2 ($\chi^2 = 6.55$, $df = 3$, $0.05 < p < 0.1$) に分離し, PI 584654/KT 3-24 において 141:60:68:4 ($\chi^2 = 18.07$, $df = 3$, $p < 0.05$) に分離した. 組換え価はそれぞれ 0.267 と 0.243 となり, bh^m 遺伝子と sog 遺伝子が連鎖することを確認した. PI 584654/KT 3-24 において得られた分枝穂および柔らかい穎/半密穂形質を併せもつ 4 個体を F_3 後代で検定し, 判定が正しいことを確認した. 組換え型の穂は *T. sinskajae* に類似して穂全体が半密穂となり, 穂の下部 3~6 小穂が分枝していた (Fig. III-1-2).

柔らかい穎/半密穂および false glume については, false glume の無い固い穎/正常穂:false glume のある固い穎/正常穂: false glume の無い柔らかい穎/半密穂: false glume のある柔らかい穎/半密穂が KT 3-21/PI 418587 F_2 において 94:2:1:25 ($\chi^2 = 88.94$, $df = 3$, $p < 0.05$) に分離し, k-48993/Citr 13962 F_2 において 109:1:0:43 ($\chi^2 = 178.45$, $df = 3$, $p < 0.05$) に分離した. いずれも 9:3:3:1 の分離比に適合せず, sog と fg 遺伝子は強く連鎖することを示し, 組換え価はそれぞれ 0.026, 0.006 であった (Table III-1-3). 122 個体の KT 3-21/PI 418587 F_2 において 3 個体, 153 個体の k-48993/Citr 13962 F_2 において 1 個体の組換え型を確認した. false glume のある固い穎/正常穂の組換え型の遺伝子型は *Sog-fgfg* であると考えられる. 一方, false glume の無い柔らかい穎/半密穂の組換え型の遺伝子型は *sogsogFg*-であると考えられる.

***bh^m*, *sog* および *fg* 遺伝子の連鎖地図作製**

sog 遺伝子は Taenzler et al. (2002) および Sood et al. (2009) により $2A^m$ 染色体短腕上に座乗することが判っている. PI 418587/KT 3-24 の F_2 において, $2A^m$ 染色体の 20 個の多型のあったマーカーを bh^m 遺伝子と *sog* 遺伝子のマッピングに用いた. 連鎖地図は二つの断片に分かれ, 大きな断片において bh^m 遺伝子および *sog* 遺伝子が 18 個のマ

一カーと連鎖した (Fig. III-1-3). *bh^m* 遺伝子および *sog* 遺伝子はそれぞれ 2A^m 染色体短腕上のマーカー *Xgwm122* および *Xwmc644* の末端側に連鎖し, 二遺伝子はいずれも 2A^m 染色体短腕上に座乗した. Taenzler et al. (2002), Sood et al. (2009) および Haque et al. (2012) によって, *Xgwm71* が *sog* 遺伝子および *bh* 遺伝子に隣接する重要なマーカーであると報告されたが, PI 418587/KT3-24 および k-48993/Citr 13962 の F₂ においてこのマーカーは両親間に多型がなかった. #252/PI 418587 の F₂ において *sog* 遺伝子は *Xgwm558* および *Xgwm71* の間に, それぞれ 5.2 cM, 5.3 cM の距離で連鎖し, KT 3-21/PI 418587 の F₂ において, *sog* 遺伝子は *Xgwm71* の末端側に 15.3 cM の距離で連鎖した. *sog* 遺伝子および *fg* 遺伝子間の距離は KT 3-21/PI 418587 の F₂ において 1.6 cM であり, k-48993/Citr 13962 においては 1.0 cM であった.

分枝穂形質の収量におよぼす効果

収量性検定の結果を Table III-1-4, Fig. III-1-4 および Fig. III-1-5 に示した. 5 年間の平均において, N67 に対し *multirow* 型真性分枝穂の準同質遺伝子系統 ANBW 6A の‘個体当たりの種子数’は 1.4 倍 (df = 8, 0.01 < p < 0.05), ‘百粒重’は, 0.74 倍であり (df = 8, 0.01 < p < 0.05), その他の形質に有意な差はなかった (Fig. III-1-4). 一方, 年次別平均において, 2013 年および 2015 年の‘個体当たりの穂数’は二系統間に大きな差はなかったが‘個体当たりの種子数’は ANBW 6A が有意に多かった (Fig. III-1-5). 穂が分枝することにより増加した小花の稔性は良く, 環境による変動はあるが, 有効分げつ数が多いとき収量は向上する傾向にあった.

第 4 項 考察

本節では, *T. monococcum* の分枝穂が劣性の単一遺伝子 *bh^m* により決定され, 2A^m 染色体短腕上に座乗していることを示した. Klindworth et al. (1997) および Haque et al.

(2012) は四倍性コムギの *bh* 遺伝子が2A染色体短腕上に座乗することを示し, Dobrovolskaya et al. (2009, 2015) は六倍性コムギの *mrs1* 遺伝子が2D染色体短腕上に座乗することを示した (Fig. III-1-6). したがって, 二倍性, 四倍性および六倍性において真性分枝穂遺伝子はいずれも第二同祖群染色体短腕に座乗するという結果から, これらがオーソログな遺伝子座にあると考えられる. また, この推察はコムギ属における穂軸節当たりの小穂数の遺伝的決定に第2同祖群染色体が関与するとした Muramatsu (2009) の結果とも一致している.

T. sinskajae の自然突然変異遺伝子 *sog* と *T. monococcum* の人為誘発変異遺伝子 *sog* が対立関係にあることを確認した. *sog* 変異体は false glume 形質と関連する. Kuspira et al. (1989) および Goncharov et al. (2007) による観察と一致し, 柔らかい穎/半密穂および false glume 遺伝子は密接に関わる遺伝子領域に存在した.

分枝穂形質は, 小花の分裂組織が小穂の分裂組織へと置き換わることによって生じる (Shitsukawa et al. 2009). 穂の構造は送粉のプロセスや種子形成に影響することから, 種子数の決定に重要な役割を果たす. 六倍性コムギにおける分枝穂形質 multirow spike は穂当たりの小穂数および小花数に増加をもたらす (Martinek and Bednár 2001, Dobrovolskaya et al. 2009, Martinek et al. 2011). 穀物収量能を改良するために生殖器官数の増加を招く遺伝子の開発が強く望まれ (Reynolds et al. 2005, Miralles and Slafer 2007), コムギの収量には一般にシンク制約があることから (Wang et al. 1998), 分枝穂は重要な形質である. 本節において, *mrs1* 遺伝子における multirow 準同質遺伝子系統 ANBW 6A を用い正常穂系統 N67 と比較することで, 分枝穂形質が収量に与える効果を検討した. ANBW 6A は N67 に比べ個体当たりの種子数が約1.4倍となり, 年次別の平均値の種子重も上回った. 環境による変動はあったが, 正常型に比べ MRS 型真性分枝穂は, 有効分げつ数が同程度あるいは上回り, 小花稔性もよく, 単位面積当たりの収量性向上において有効な形質であるといえる.

したがって、multirow 型真性分枝穂は、正常型に比べ分枝穂による小花数の増加が反映され、年次によっては収量が向上した。

*T. monococcum*がヒツブコムギと言われる所以は、1小穂当たり1粒種子が結実するためであるが、希に1小穂当たり2粒の結実がみられることがある。つまり、ヒツブコムギは形成される小花のうち1小花が稔性を示す。したがって、*T. monococcum*の種子収量の増加のためには不稔小花を結実させることが必要である。*T. monococcum* subsp. *aegilopoides* (syn. *T. boeoticum* Boiss. subsp. *thaouidar* (Hauskn.) E. Schiem.) および *T. boeoticum*の*thaouidar*型は1小穂当たり2粒結実することが知られている (Bor 1968)。この特性は量的遺伝子座に支配されるが利用可能な方法である。*T. monococcum*の*bh^m*遺伝子を利用する場合、*bh^m*遺伝子の効果による小花数の増加が稔実種子数の増加に貢献しているかどうか吟味する必要がある。*T. boeoticum*の*thaouidar*型と*bh^m*遺伝子をともに利用することも収量増への一方法となるだろう。

第5項 要約

T. monococcum ($2n = 2x = 14$, $A^m A^m$) の分枝穂突然変異における分枝穂形質および *T. sinskajae* Filat. et Kurkiew ($2n = 2x = 14$, $A^m A^m$) の柔らかい穎/半密穂形質を決める遺伝子をマイクロサテライトマーカーを用いマッピングした。 *T. sinskajae* PI 418587/*T. monococcum* KT3-24 の真性分枝穂遺伝子 *bh^m* (branched head in *T. monococcum*) および柔らかい穎/半密穂遺伝子 *sog* (soft glume) は、それぞれ単一の劣性対立遺伝子によって制御されており、二遺伝子の組換え価は 0.267 であった。 *bh^m* 遺伝子は $2A^m$ 染色体短腕上の *Xgwm122* の末端側に座乗した。自然突然変異である *T. sinskajae* の *sog* 遺伝子は、人為誘発変異である *T. monococcum* mm09 および PI 584654 の *sog* 遺伝子と対立関係にあった。 *sog* 遺伝子は *Xwmc644* の末端側に座乗した。 *T. monococcum* #252/PI 418587 および *T. monococcum* KT 3-21/PI 418587 の F_2 において、 *sog* は *Xgwm71* と連鎖し、 *T. monococcum* k-48993/ *T. monococcum* CItr 13962 の F_2 においては *Xgwm558* と連鎖していた。 *false glume* を決定する *fg* 遺伝子は $2A^m$ 染色体短腕上で *sog* 遺伝子と強く連鎖し、KT 3-21/PI 418587 F_2 では 1.6 cM, k-48993/CItr 13962 F_2 では 1.0 cM の距離にあった。分枝穂形質が収量におよぼす効果を探るため、六倍性コムギ N67 を遺伝的背景とする真性分枝穂遺伝子 *mrs1* の準同質遺伝子系統 ANBW 6A と N67 を比較した。結果、分枝穂形質は個体当たりの種子数を増加させ、種子は小さくなる傾向を示したが、収穫指数はほぼ同等であり、年次によっては正常型より上回ることを明らかにした。

Table III-1-1. Plant materials used in this study

Species (Chromosome number, Genome type)	Plant name	Gene
<i>T. monococcum</i> (2n = 2x =14, A ^m A ^m)	#252	-
	CItr 13962	-
	KT 3-24 ^a	<i>bh^m</i>
	KT 3-21 ^a	<i>cn-A1</i>
	mm09	<i>sog, fg</i>
	PI 584654	<i>sog, fg</i>
<i>T. sinskajae</i> (2n = 2x =14, A ^m A ^m)	PI 418587	<i>sog, fg</i>
	k-48993	<i>sog, fg</i>
<i>T. aestivum</i> (2n = 6x =42, BBA ^u A ^u DD)	Novosibirskaya 67 (N67) ^b	-
	ANBW 6A	<i>mrs1</i>

Seeds were obtained from: ^a Dr. K. Yamashita (Biological Laboratory and Institute of Food Science Kyoto Univ., Kyoto, Japan), ^b Dr. S. F. Koval (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia)

Table III-1-2. Segregation of branched spike, soft glume/semi-compact spike and false glume in eight F₂ hybrids between A^m genomes

(1) Branched spike

Cross combination	Spike		Total	χ^2 analysis (3:1)
	Normal	Branched		
<i>T. sinskajae</i> PI 418587/ <i>T. monococcum</i> KT 3-24	85	30	115	0.073
<i>T. monococcum</i> PI 584654/ <i>T. monococcum</i> KT 3-24	201	72	273	0.274

(2) Soft/semi-compact spike

Cross combination	Glume/spike		Total	χ^2 analysis (3:1)
	Hard/normal	Soft/ semi-compact		
<i>T. sinskajae</i> PI 418587/ <i>T. monococcum</i> KT 3-24	88	27	115	0.142
<i>T. monococcum</i> PI 584654/ <i>T. monococcum</i> KT 3-24	209	64	273	0.353
<i>T. monococcum</i> #252/ <i>T. sinskajae</i> PI 418587	131	50	181	0.665
<i>T. monococcum</i> KT 3-21/ <i>T. sinskajae</i> PI 418587	96	26	122	0.885
<i>T. monococcum</i> mm09/ <i>T. monococcum</i> #252	104	41	145	0.830
<i>T. sinskajae</i> k-48993/ <i>T. monococcum</i> CIt 13962	110	43	153	0.786
<i>T. monococcum</i> mm09/ <i>T. sinskajae</i> PI 418587	0	166	166	-
<i>T. monococcum</i> mm09/ <i>T. monococcum</i> PI 584654	0	181	181	-

(3) False glume

Cross combination	False glume		Total	χ^2 analysis (3:1)
	Absent	Present		
<i>T. monococcum</i> KT 3-21/ <i>T. sinskajae</i> PI 418587	95	27	122	0.536
<i>T. sinskajae</i> k-48993/ <i>T. monococcum</i> CIttr 13962	109	44	153	1.153
<i>T. monococcum</i> mm09/ <i>T. sinskajae</i> PI 418587	0	166	166	-
<i>T. monococcum</i> mm09/ <i>T. monococcum</i> PI 584654	0	181	181	-

Note: We did not record presence/absence of false glume in F₂ plants of #252/PI 418587 and PI 418587/KT 3-24

¹⁾ Value for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1)

Table III-1-3. Linkage relationship among branched spike, soft/semi-compact spike and false glume in four F₂ hybrids between A^m genomes

Cross combination	Locus		Number of plants with phenotype				χ^2 value	Linkage	Recombination rate
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>A-B-</i>	<i>A-bb</i>	<i>aaB-</i>	<i>aabb</i>	9:3:3:1 (df = 3)	(df = 1)	
<i>T. sinskajae</i> PI 418587/ <i>T. monococcum</i> KT 3-24	<i>Bh</i>	<i>Sog</i>	60	25	28	2	6.55*	6.34*	0.267
<i>T. monococcum</i> PI 584654/ <i>T. monococcum</i> KT 3-24	<i>Bh</i>	<i>Sog</i>	141	60	68	4	18.07*	17.44*	0.243
<i>T. monococcum</i> KT 3-21/ <i>T. sinskajae</i> PI 418587	<i>Sog</i>	<i>Fg</i>	94	2	1	25	88.94*	87.52*	0.026
<i>T. sinskajae</i> k-48993/ <i>T. monococcum</i> CIt 13962	<i>Sog</i>	<i>Fg</i>	109	1	0	43	178.45*	176.51*	0.006

Note: The recombination rate between two loci was calculated by the maximum likelihood method χ^2 value for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1) and 7.81 (df = 3). *: significant at 5% level

Table III-1-4. The average annual values and the average values for the last five years for morphological traits of *T. aestivum* N67 and ANBW 6A which is a branched spike near-isogenic line of N67

Year	Plant name	Plant height (cm)	Number of spikes per plant	Straw weight per plant (g)	Spike weight per plant (g)	Plant weight (g)	Grain weight per plant (g)	Harvest index	100-grain weight (g)	Number of grains per spike	Number of grains per plant
2011	N67	-	8.2	17.1	14.9	32.0	10.7	0.337	3.2	41.2	338.0
	ANBW 6A	-	12.2	25.2	18.0	43.2	12.4	0.292	2.2	45.9	562.6
2012	N67	121.4	10.0	25.8	25.8	51.6	19.3	0.372	3.9	49.2	488.8
	ANBW 6A	120.8	9.8	23.8	17.4	41.3	12.7	0.312	2.9	45.6	445.8
2013	N67	141.6	11.3	32.1	27.2	59.3	20.9	0.355	3.9	47.6	535.0
	ANBW 6A	139.9	12.0	34.7	25.8	60.5	19.7	0.325	3.0	56.2	669.2
2014	N67	163.3	11.6	36.6	18.5	55.1	13.7	0.252	3.0	40.6	463.3
	ANBW 6A	151.0	16.6	47.6	22.0	69.6	16.8	0.242	2.2	47.8	755.5
2015	N67	130.2	7.8	29.2	18.9	48.1	15.0	0.311	4.2	45.8	356.0
	ANBW 6A	120.5	9.7	33.9	22.9	56.8	18.8	0.346	3.2	63.4	618.7
Average	N67	139.1	9.79	28.2	21.1	49.2	15.9	0.325	3.64	44.9	436.2
	ANBW 6A	133.0	12.06	33.0	21.2	54.3	16.1	0.303	2.68	51.8	610.4

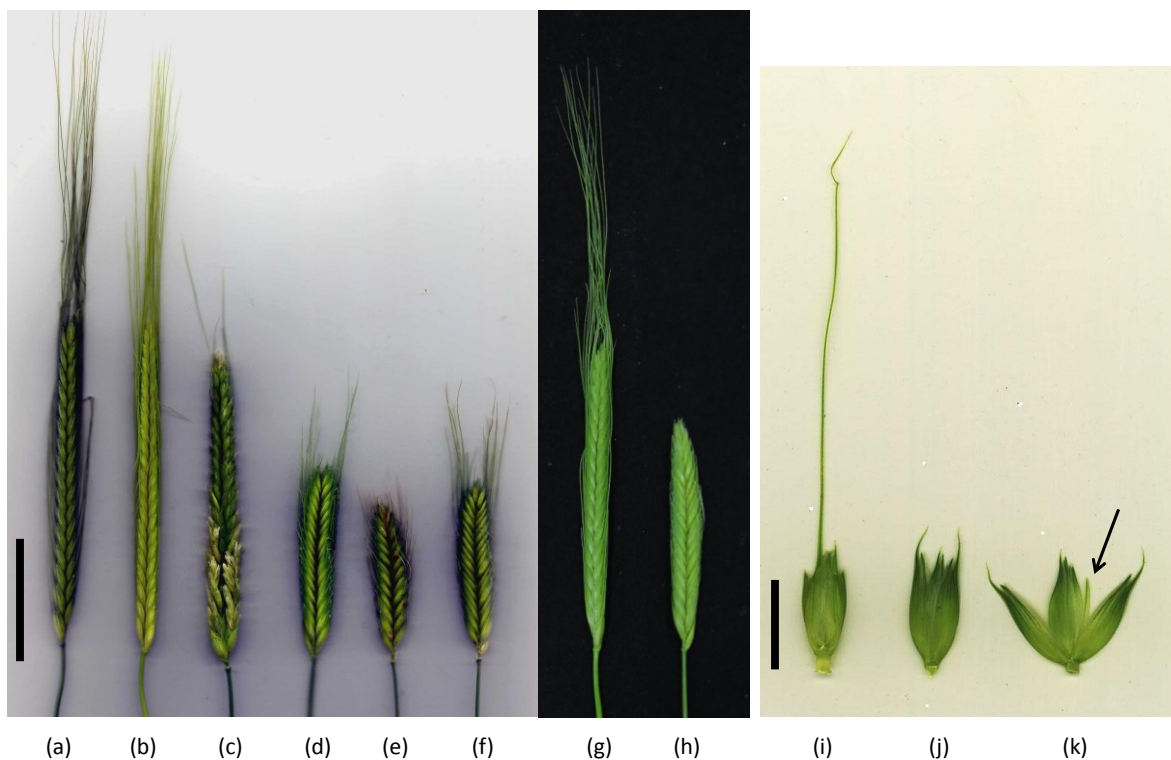


Fig.III-1-1. The spike features of (a) *T. monococcum* #252, (b) *T. monococcum* KT 3-21, (c) *T. monococcum* KT 3-24, (d) *T. sinskajae* PI 418587, (e) *T. monococcum* mm09, (f) *T. monococcum* PI 584654, (g) *T. monococcum* CIttr 13962 and (h) *T. sinskajae* k-48993 and spikelets of (i) *T. monococcum* KT 3-21 and (j, k) *T. sinskajae* PI 418587 (left to right).

Arrow in spikelet (k) indicates the false glume, a glume-like structure located between the glume and lemma of the outer florets of each spikelet of PI 418587. (Scale bar = 5 cm (a-h) or 1 cm (i-j))



Fig. III -1-2. The spike feature of a recombinant of *T. sinskajae* PI 418587/*T. monococcum* KT 3-24 F₂ which has branched spike, soft glumes and false glumes trait

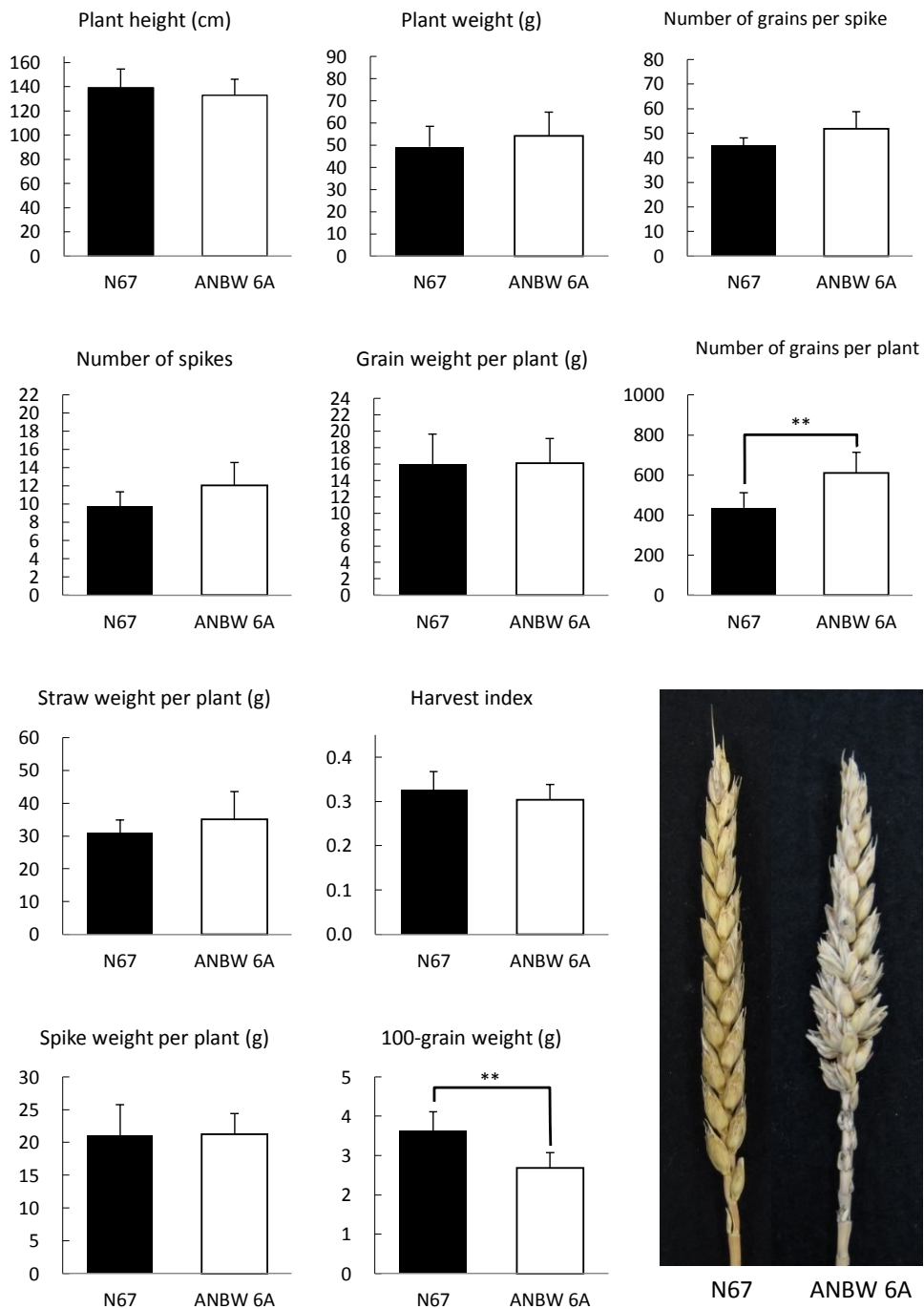


Fig.III-1-4. The average values for the last five years for morphological traits of *T. aestivum* N67 and ANBW 6A which is a branched spike near-isogenic line of N67.

All traits were measured six plants per year from 2011 to 2015 except for “plant height”, that was measured from 2012 to 2015. Error bars indicate one standard deviation. A student’s *t*-test was used to generate the *P*-values. **: $p < 0.01$

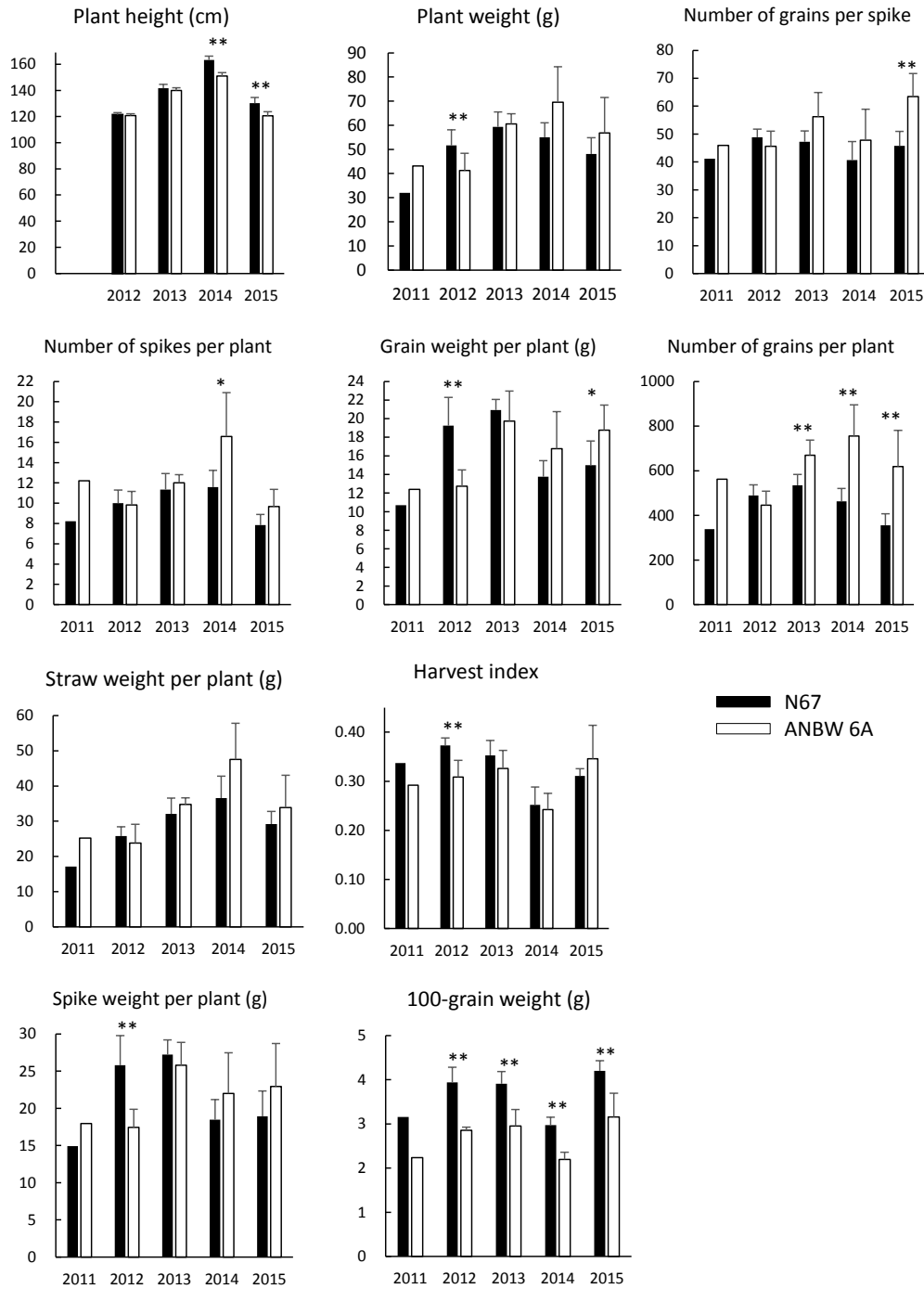


Fig.III-1-5. The annual average values for morphological traits of *T. aestivum* N67 and ANBW 6A which is a branched spike near-isogenic line of N67.

All traits were measured six plants per year from 2011 to 2015 except for “plant height”, that was measured from 2012 to 2015. The data for 2011 indicate only the average values. Error bars indicate one standard deviation. A student’s *t*-test was used to generate the *P*-values. **, *; $p < 0.01, 0.05$

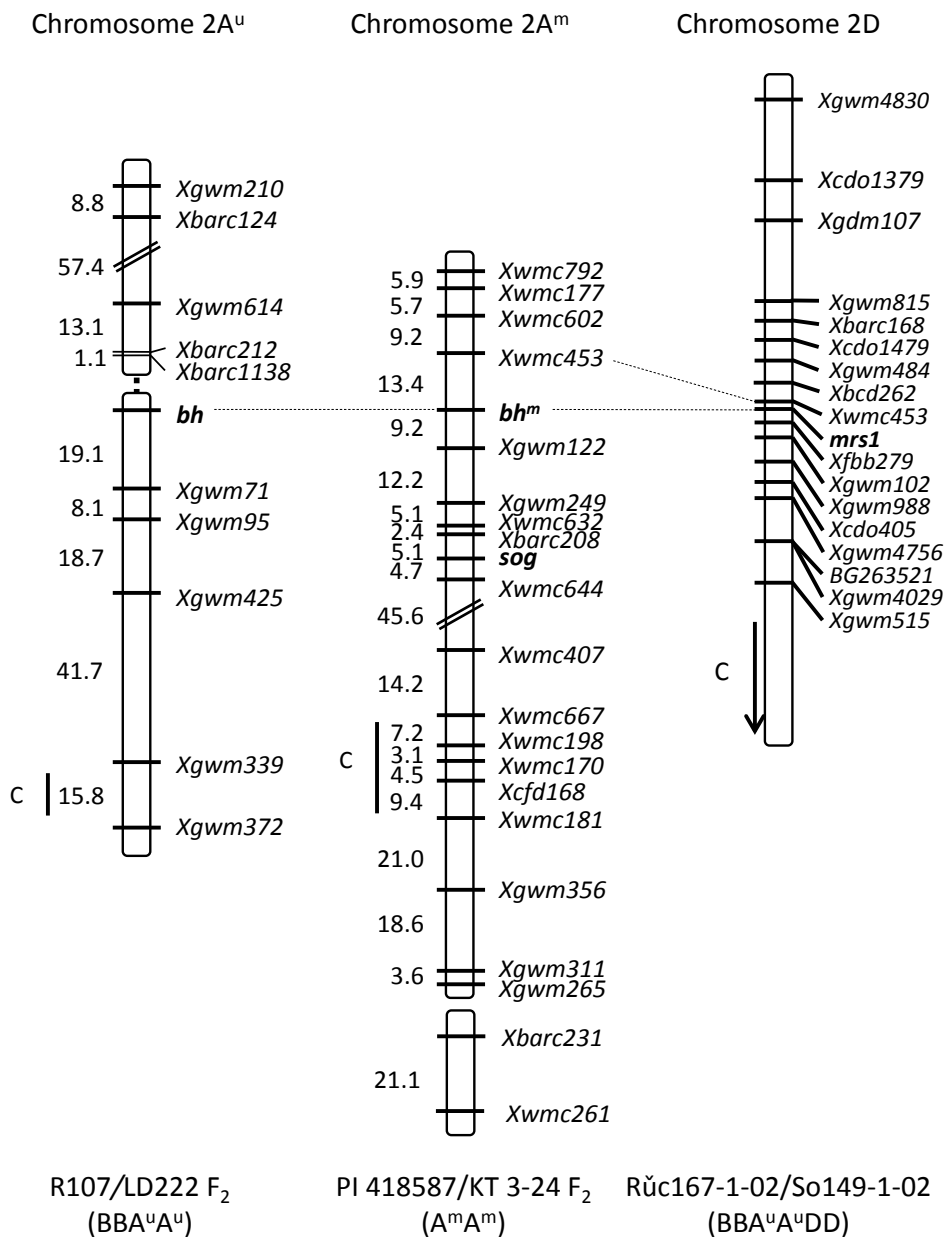


Fig.III-1-6. Linkage maps of chromosome 2A^u of *T. durum* R107/*T. durum* LD222 F₂ in tetraploid wheat (Haque et al. 2012), chromosome 2A^m of *T. sinskajae* PI 418587/*T. monococcum* KT 3-24 F₂ in diploid wheat and chromosome 2A^u of Rüc167-1-02/So149-1-02 F₂ in hexaploid wheat (Dobrovolskaya et al. 2015).

An arrow and vertical lines in linkage map indicate putative position of centromere. The unit of distance is cM

第2節 四倍性コムギにおける擬似分枝穂および過剰護穎遺伝子の

マイクロサテライトマッピング

Microsatellite mapping of genes for sham ramification and extra glume in spikelets of tetraploid wheat

第1項 緒言

小穂軸が伸長し、正常な穂より多くの小花を形成する穂を擬似分枝穂という。六倍性コムギ *T. vavilovii* (BBA^uA^uDD) では典型的な形態であることから“vavilovii type”と呼ばれることもある。四倍性コムギにおいては、擬似分枝穂形質を誘発した“vavilovoid”変異体がいくつか報告されている。Barabas (1959) はガンマ線照射により誘導した *T. carthlicum* Nevski (2n = 4x = 28, BBA^uA^u) の vavilovoid 変異体が単一の劣性遺伝子によって決定されているとした。また、D'Amato et al. (1964) は *T. durum* の vavilovoid 変異体を誘導し、この形質も単一の劣性遺伝子により決定されているとした。Desai (1968) は *T. durum* から、細い稈と短い芒、難脱穀性の特徴をもつ vavilovoid 変異体を誘導し、Upadhaya and Swaminathan (1969) はスペルト型の穂をもつ *T. durum* に属する系統 *T. pyramidale* (Del.) Perc. の vavilovoid 変異体を見出した。Castagna et al. (1993) は *T. monococcum* (A^mA^m) の伸長した小穂軸節をもつ二つの変異体を育成した。

通常、コムギの小穂には護穎が左右に1枚ずつ形成されるが、2枚ずつ形成され、さらに擬似分枝穂を伴う変異体を Udachin and Shakhmedov (1976, 1977) は *T. turgidum* k-11597 の中から見出し、*T. jakubzineri* Udacz. et Schachm. と命名した。k-11597 は1924年に N. I. Vavilov によってアゼルバイジャンにおいて採集された系統である。護穎が過剰に形成される特徴は、ホーリーグラス (Holy grass; *Hierochloa odorata* L.) やキャナリーグラス (canary grass; *Phalaris canariensis* Linnaeus), クサヨシ (reed canary grass;

Phalaris arundinacea L.) などを含むカラスムギ連 (Aveneae) においてみられるが、コムギ連では *T. jakubzineri* においてのみみられる。これらの形質を決定する遺伝子の位置は判っていない。本節では *T. jakubzineri* のもつ特徴的形質を過剰護穎 (extra glume) と名付けた。

USDA - The National Small Grains Collection (NSGC) (http://www.ars-grin.gov/npgs/acc/acc_queries.html) のデータベースには保存されているコムギ系統の穂あるいは種子の写真が掲載され、品種の穂の特性を知ることができる。このwebサイトから *T. jakubzineri* の特性によく似る系統 *T. turgidum* PI 67339を見出した。この系統は擬似分枝穂形質をもつが過剰護穎をもたない。また、*T. jakubzineri* における擬似分枝穂形質は穂の全体に現れるのに対し、PI 67339においては、穂の下部に多く現れるのが特徴である。*T. jakubzineri* とPI 67339のもつ擬似分枝穂遺伝子が同一であるかは定かではなかった。真性分枝穂遺伝子 *bh* は2A染色体短腕上に座乗するが (Klindworth et al. 1990a, b, Klindworth et al. 1997, Haque et al. 2012), 分枝穂系統R107と *T. jakubzineri* PI 585014の交雑後代の観察の結果、*bh* 遺伝子と擬似分枝穂遺伝子是对立関係になかった (未発表)。

本節では、*T. jakubzineri* のもつ擬似分枝穂と過剰護穎遺伝子およびPI 67339のもつ擬似分枝穂遺伝子の連鎖関係について検討した。

第2項 材料と方法

植物材料

擬似分枝穂形質の遺伝解析のため4系統の四倍性コムギを用いた (Table III-2-1, Fig. III-2-1)。3系統の擬似分枝穂系統 (*T. jakubzineri* PI 585014, *T. jakubzineri* R101-03 および *T. turgidum* PI 67339) および正常穂の系統 *T. durum* LD222 である。PI 585014 および PI 67339 の種子は USDA-ARS (National Small Grain Collection,

Aberdeen, Idaho, USA) より取り寄せ, R101-03 は P. Martinek 博士 (Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd., Kroměříž, Czech Republic) より分譲いただいた. PI 585014 および R101-03 は有芒であり, 過剰護穎形質をもつ. 一方, PI 67339 は無芒であり非帯白性である.

PI 67339 を胚のう親, PI 585014 を花粉親とした F_2 を育て, 擬似分枝穂, 過剰護穎, 芒および帯白性形質の分離を記録した. PI 585014 を胚のう親, LD222 を花粉親とした F_2 および R101-03 を胚のう親, LD222 を花粉親とした F_2 を育て, 5A 染色体の連鎖地図作製に用いた. また, PI 585014/LD222 F_2 の擬似分枝穂および過剰護穎形質をもつ個体を胚のう親, LD222 を花粉親とした B_1F_2 を育て, 擬似分枝穂, 過剰護穎および芒形質の分離を記録した. さらに, PI 67339 を胚のう親, LD222 を花粉親とした F_2 を育て, 擬似分枝穂, 過剰護穎および帯白性の分離を記録し, 連鎖地図作製に用いた. 全 5 集団の F_2 および両親系統は茨城大学農学部の実験圃場で栽培した.

擬似分枝穂遺伝子および過剰護穎遺伝子の連鎖地図作製

PI 585014/LD222, R-101-03/LD222 および PI 67339/LD222 の F_2 の各幼苗の葉から DNA を抽出した. 擬似分枝穂遺伝子の座乗位置はそれぞれ未知であったので, 連鎖解析の結果をもとに, 座乗する可能性のある A および B ゲノムの染色体腕に特異的なマイクロサテライトマーカーを用い, 連鎖地図を作製した. PCR 条件および PCR 産物の電気泳動, 増幅した断片の検出方法は第 2 章の記述と同様である.

第 3 項 結果

擬似分枝穂, 過剰護穎, 非帯白性および芒の遺伝

PI 67339/PI 585014 F_1 の表現型は PI 67339 型に似た擬似分枝穂形質を示し, 同一の遺伝子によりこの形質が決定されていると考えられた. しかし, 142 個体の F_2 におい

て、正常穂:PI 67339 型 (擬似分枝穂/過剰護穎無し) :PI 585014 型 (擬似分枝穂/過剰護穎有り) は 76:32:34 ($\chi^2 = 1.374$, $df = 2$, $0.1 < p < 0.5$) に分離し、9:3:4 の分離比に適合した (Table III-2-2). また、正常穂:PI 585014 型は 108:34 ($\chi^2 = 0.085$, $df = 1$, $0.5 < p < 0.9$), 正常穂:PI 67339 型は 102:40 ($\chi^2 = 0.761$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$) に分離し、それぞれ 3:1 の比に適合した (Table III-2-3). この結果は、*T. jakubzineri* および PI 67339 のもつ擬似分枝穂遺伝子が異なり、いずれも単一の劣性遺伝子であることを示した。したがって、*T. jakubzineri* における擬似分枝穂遺伝子を *shr1* (sham ramification 1) とし、遺伝子型は *shr1shr1Shr2Shr2* であるとした。また、PI 67339 における擬似分枝穂遺伝子を *shr2* (sham ramification 2) とし、遺伝子型は *Shr1Shr1shr2shr2* であるとした。F₂ の分離は 9 *Shr1-Shr2-* : 3 *Shr1-shr2shr2* : 4 (3 *shr1shr1Shr2-* + 1 *shr1shr1shr2shr2*) であり、*Shr1* 遺伝子は *Shr2* 遺伝子に対して上位性の効果をもつと考えられた (Table III-2-2). また、過剰護穎無し:過剰護穎有りは 108:34 ($\chi^2 = 0.085$, $df = 1$, $0.5 < p < 0.9$), 帯白性:非帯白性は 102:40 ($\chi^2 = 0.761$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$), 芒無し:芒有りは 102:40 ($\chi^2 = 0.761$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$) に分離し、それぞれ 3:1 の比に適合した (Table III-2-3). 連鎖解析の結果、*shr1* 遺伝子と芒抑制遺伝子 *BI* の遺伝子座間の組換え価は 0.39 であった。また、*shr1* 遺伝子と非帯白性遺伝子 *w1* は独立の関係にあった (Table III-2-4).

PI 585014/LD222 F₂ において、穂の形態は 101 正常穂: 37 擬似分枝穂 ($\chi^2 = 0.242$, $df = 1$, $0.5 < p < 0.9$) に分離し、過剰護穎は 101 無し:37 有り ($\chi^2 = 0.242$, $df = 1$, $0.5 < p < 0.9$) に分離した (Table III-2-3). いずれも 3:1 の分離比に適合し、*shr1* および過剰護穎遺伝子 *exg* (extra glume) がそれぞれ単一の劣性遺伝子であることを確認した。また、*shr1* 遺伝子は *exg* 遺伝子と完全連鎖した (Table III-2-4).

PI 585014/LD222 BC₁F₂ において、正常穂:擬似分枝穂および過剰護穎無し:過剰護穎有りはいずれも 206:80 ($\chi^2 = 1.347$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$) に分離し、芒の有無につ

いては 206 無し:80 有り ($\chi^2 = 1.347$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$) に分離し, いずれも 3:1 の分離比に適合した (Table III-2-3). また, *shr1* と *B1* の遺伝子座間の組換え価は 0.36 となったことから, *shr1* 遺伝子は 5A 染色体長腕上の *B1* 遺伝子と連鎖する (Table III-2-4).

R101-03/LD222 F₂ において, 正常穂:擬似分枝穂および過剰護穎無し:過剰護穎有りはいずれも 104:39 ($\chi^2 = 0.394$, $df = 1$, $0.5 < p < 0.9$) に分離し, 芒の有無については 111 無し:32 有り ($\chi^2 = 0.524$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$) に分離した (Table III-2-3).

PI 67339/LD222 F₂ においては, 正常穂:擬似分枝穂および帯白性:非帯白性の分離はいずれも 239:79 ($\chi^2 = 0.004$, $df = 1$, $p > 0.9$) となり, 3:1 の比に適合した (Table III-2-3). この結果より, PI 67339 の擬似分枝穂形質および非帯白性形質は単一の劣性遺伝子により決定されていることを確認した. 連鎖解析の結果, *shr2* 遺伝子は 2B 染色体短腕上の *w1* 遺伝子と独立の関係にあった (Table III-2-4).

擬似分枝穂および過剰護穎遺伝子の連鎖地図作製

PI 585014/LD222 BC₁F₂ における *shr1* および *B1* 遺伝子の組換え価 (0.36) から, *shr1* 遺伝子が 5A 染色体上に座乗することが示唆された. 連鎖解析の結果をもとに, 各染色体腕に特異的な少数のマーカーを用い連鎖を検討していった結果, *shr1* 遺伝子は 5A 染色体上, *shr2* 遺伝子は 2A 染色体上のマーカーと連鎖し, 連鎖地図作製に至った (Fig. III-2-2).

shr1 および *exg* 遺伝子は PI 585014/LD222 F₂ および R101-03/LD222 F₂ において完全連鎖し 5A 染色体長腕上のマーカー *Xbarc319* と最も密接に連鎖した (それぞれ 3.0 cM および 4.3 cM). 2 集団において *shr1/exg* 遺伝子周辺のマーカーの順番に違いが見られたが, *shr1/exg* 遺伝子は 5A 染色体長腕上に座乗する. PI 67339/LD222 F₂ において *shr2* 遺伝子は 2A 染色体長腕上において *Xwm819* および

Xwmc794 の間に, それぞれ 18.4 cM, 19.3 cM の距離で連鎖した.

第4項 考察

本節では, 四倍性コムギにおいて2つの型の擬似分枝穂形質があり, 基本的に2劣性遺伝子によって決定されることを明らかにした. そのうち*shr1*遺伝子は*exg*遺伝子と完全連鎖していることから, 2つの型の形質の判別は過剰護穎の有無であるため決して困難ではない. 非帯白性を決定する*wI*遺伝子は2B染色体上に存在することが Yoshiya et al. (2011) によって報告されている. PI 67339/PI 585014 F₂におけるPI 585014型および帯白性形質の分離は*shr1/exg*と*wI*遺伝子が独立であることを示した (Table III-2-4). PI 67339/PI 585014 F₁の表現型は, 優性の法則に従い正常穂を示すと考えられたが, PI 67339型の擬似分枝穂を示した. PI 585014/LD222 F₁, R101-03/LD222 F₁およびPI 67339/LD222 F₁の穂型はいずれも正常型であった. すなわち, F₁の遺伝子型が*Shr1shr1Shr2Shr2*および*Shr1Shr1Shr2shr2*であれば正常型 [*Shr1Shr2*]となり. *Shr1shr1Shr2shr2*ではPI 67339の穂型に類似した. 一方で, PI 585014/PI 67339 F₂は正常型:PI 67339型:PI 585014型が9:3:4となり二遺伝子による表現型の分離比に適合した. 34個体のPI 585014型の中に*shr1/exg*と*shr2*形質の両方をもつ組換え型が8個体存在した (Fig. III-2-3). これらの個体は, 過剰護穎形質を確認したためPI 585014型とした. この8個体は共通して擬似分枝穂形質の発現が不安定であり, 小穂の先端が縮れ, 小穂の内部に潜り込むような形質を示した. 2つの擬似分枝穂遺伝子がいずれも劣性ホモ型の場合生じると考えられた.

T. jakubzineri において5A染色体長腕上で*shr1/exg*遺伝子と連鎖したマーカーのうち*Xbarc319*, *Xgwm179*および*Xgwm126*は, *Cp1*遺伝子 (Kosuge et al. 2008) や *Rht12*遺伝子 (Korzun et al. 1997) 近傍のマーカーと共通する. したがって, *Cp1*遺

伝子を有するANW22Aや, *Rht12*遺伝子を有するANW16Cなどを利用し, 5A染色体上における*shr1/exg*遺伝子との連鎖関係をさらに詳細に調べることができるだろう.

擬似分枝穂は小穂軸が伸長し通常より多くの小花を着生する. この付加的な小花に稔性がある場合, 植物のシンク能は増加する. 2つの擬似分枝穂形質に関する研究は準同質遺伝子系統を育成し, それを利用したアプローチが適切である.

第5項 要約

擬似分枝穂は真性分枝穂に似ているが、小穂軸が伸長し、正常な穂より多くの小花を形成する。四倍性コムギにおいては *T. jakubzineri* Udacz. et Schachm. ($2n = 4x = 28$, BBA^uA^u) PI 585014, R101-03 および *T. turgidum* L. PI 67339 がこの形質をもつことが見出されている。 *T. jakubzineri* の擬似分枝穂の小穂では左右に2枚ずつ護穎を形成する“過剰護穎”が存在する。マイクロサテライトマーカーを用いた関連遺伝子マッピングによって、 *T. jakubzineri* における擬似分枝穂形質は 5A 染色体長腕上の *shr1* (sham ramification 1) 遺伝子、PI 67339 における擬似分枝穂形質は 2A 染色体長腕上の *shr2* (sham ramification 2) 遺伝子が決定することを明らかにした。擬似分枝穂の遺伝子型は *T. jakubzineri* においては *shr1shr1Shr2Shr2*, PI 67339 においては *Shr1Shr1shr2shr2* であり、 *T. durum* LD222 においては *Shr1Shr1Shr2Shr2* である。また、 *shr1* 遺伝子は過剰護穎遺伝子 *exg* (extra glume) と完全連鎖し、いずれも単一の劣性遺伝子であった。 *shr1/exg* 遺伝子は、5A 染色体長腕上のマーカー *Xbarc319* と密接に連鎖し、 *shr2* 遺伝子は 2A 染色体長腕上において *Xwm819* および *Xwmc794* の間に存在していた。

Table III-2-1. Plant materials used in this study

Species (Chromosome number, Genome type)	Plant name	Gene (Chromosome)
<i>T. jakubzineri</i> (2n = 4x =28, BBA ^u A ^u)	PI 585014 ^a	<i>shr1</i> <i>exg</i> <i>Bl</i> (5A)
	R101-03 ^b	<i>shr1</i> <i>exg</i> <i>Bl</i> (5A)
<i>T. turgidum</i> (2n = 4x =28, BBA ^u A ^u)	PI 67339 ^a	<i>shr2</i> <i>wI</i> (2B)
<i>T. durum</i> (2n = 4x =28, BBA ^u A ^u)	LD222	-

Seeds were obtained from: ^a National Small Grain Collection (NSGC, Aberdeen, Idaho, USA), ^b Dr. P. Martinek (Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd. Genetics and Breeding, Kroměříž, Czech Republic)

Table III-2-2. Segregation of sham ramification in F₂ of PI 67339/PI 585014

Normal	Spikelet rachilla		Total	χ^2 analysis	
	Elongated			(9:3:4)	(3:1)
	Without extra glume (PI 67339 type)	With extra glume (PI 585014 type)		df = 2	df = 1
76	32	34	142	1.374	-
108		34	142	-	0.085

Note: Values for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1) and 5.99 (df = 2), respectively.

Table III-2-3. Segregation of sham ramification, extra glume, non-glaucousness and awnlessness in five F₂ hybrids

(1) Sham ramification				
Cross combination	Spikelet rachilla		Total	χ^2 analysis (3:1)
	Normal	Elongated		
PI 585014/LD222	101	37	138	0.242
PI 585014/LD222*2 BC ₁ F ₂	206	80	286	1.347
R101-03/LD222	104	39	143	0.394
PI 67339/LD222	239	79	318	0.042

(2) Extra glume				
Cross combination	Extra glume		Total	χ^2 analysis (3:1)
	Absent	Present		
PI 585014/LD222	101	37	138	0.242
PI 585014/LD222*2 BC ₁ F ₂	206	80	286	1.347
R101-03/LD222	104	39	143	0.394
PI 67339/PI 585014	108	34	142	0.085

(3) Non-glaucousness				
Cross combination	Glaucousness		Total	χ^2 analysis (3:1)
	Glaucous	Non-glaucous		
PI 67339/LD222	239	79	318	0.004
PI 67339/PI 585014	102	40	142	0.761

(4) Awnlessness				
Cross combination	Awn		Total	χ^2 analysis (3:1)
	Awnless	Awned		
PI 585014/LD222*2 BC ₁ F ₂	206	80	286	1.347
R101-03/LD222	111	32	143	0.524
PI 67339/PI 585014	102	40	142	0.761

Note: We did not record the segregations for awnlessness in the F₂ of PI 585014/LD222 and R101-03/LD222. Value for significance at p = 0.05; 3.84 (df = 1)

Table III-2-4. Linkage relationships among traits in five F₂ hybrids

Cross combination	Locus		Number of plants with phenotype				χ^2 value for linkage (df = 1)	Recombination rate
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>AB</i>	<i>Ab</i>	<i>aB</i>	<i>ab</i>		
PI 585014/LD222	<i>Shr1</i>	<i>Exg</i>	101	0	0	37	151.66*	0
R101-03/LD222	<i>Shr1</i>	<i>Exg</i>	104	0	0	39	160.86*	0
PI 585014/LD222*2 BC ₁ F ₂	<i>Shr1</i>	<i>Exg</i>	206	0	0	80	333.13*	0
PI 67339/PI 585014	<i>Shr1</i>	<i>B1</i>	74	34	28	6	2.63	0.39
PI 585014/LD222*2 BC ₁ F ₂	<i>Shr1</i>	<i>B1</i>	161	45	45	35	16.49*	0.36
PI 67339/PI 585014	<i>Shr1</i>	<i>WI</i>	77	31	25	9	0.08	0.48
PI 67339/LD222	<i>Shr2</i>	<i>WI</i>	179	60	60	19	0.04	0.49

Note: The recombination rate between two loci was calculated by the maximum likelihood method. Value for significance at p = 0.05; 3.84 (df = 1)



Fig.III-2-1. The features of (a) spike and (b) spikelet of *T. durum* LD222, *T. jakubzineri* PI 585014, *T. jakubzineri* R-101-03 and *T. turgidum* PI 67339.

The spikelet features indicate the rachilla elongation in the spikelet of PI 585014, R-101-03 and PI 67339, and a grain, a lemma and a glume(s) that constitute the first floret or the second floret were detached from the base. Arrowheads indicate the glumes in the spikelet

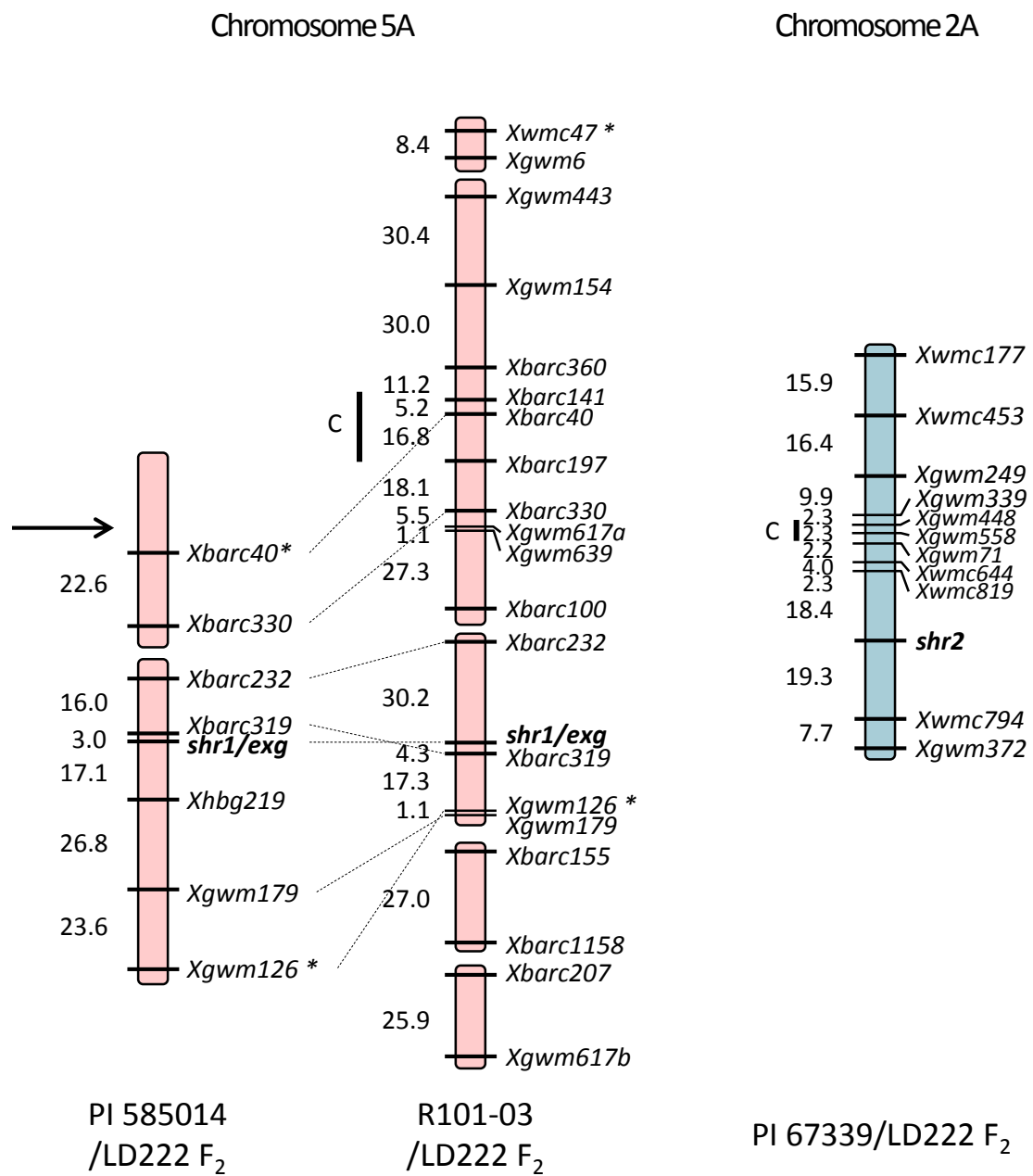


Fig.III-2-2. Linkage maps of the genes for sham ramification (*shr1*) and extra glume (*exg*) on chromosome arm 5AL and the gene for sham ramification (*shr2*) on chromosome arm 2AL.

Arrows and a vertical line indicate putative position of centromere. The unit of distance is cM



Fig.III-2-3. The feature of spike of recombinant in PI 585014/PI 67339 F₂ supposed to have both *shr1/exg* and *shr2* genes.

The plant has the extra glumes and the unstably sham ramification

第4章 穂の形態変異に関する研究

第1節 六倍性コムギにおける Screwed spike rachis 遺伝子による形態的特性

およびマイクロサテライトマッピング

Microsatellite mapping of the gene for screwed spike rachis phenotype

in *Triticum aestivum* L.

第1項 緒言

Smoček (1991) によって穂軸がねじれ、小穂が穂軸の周りにらせん状に互生する Screwed spike rachis (SCR) 変異形質が見出された。この形質は穂軸に小穂を効率的に配置させ、隣接する小穂や種子間の発育競争を緩和し、より高い生産性を実現できる可能性がある。SCR 形質を決定する遺伝子は 2 つあり、*T. aestivum* ZG K 242-82 から“*Scr1*”, イタリアのパンコムギ品種 Chiarno から“*Scr2*”が繰り返し選抜により得られた (Smoček 1991)。*Scr1* は穂と花柄にねじれを生じるが、*Scr2* は穂軸のみにねじれが観察される。Vinod et al. (2009) は四倍性コムギ (*T. durum*) における小穂の配置角度が単一の劣性遺伝子によって決定されていることを発見したが、SCR 形質とは異なる特性と考えられる。

Scr1 遺伝子を有するコムギ KM60-96 および KM304-97 はいずれも草丈が低い傾向にある。イネ (*Oryza sativa* L.) やテフ (*Eragrostis tef* (Zuccagni) Trotter), シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) においては、細胞分裂期における紡錘体の形成などに関わる微小管の異常が植物全体にねじれや半矮性を引き起こすことが知られ、*α-tubulin* 関連遺伝子のアミノ酸置換によって生じる (Furutani et al. 2000, Thitamadee et al. 2002, Buschmann et al. 2004, Ishida et al. 2007, Wang and Li 2008, Sunohara 2009, Jöst et al. 2014)。Jöst et al. (2014) は、テフにおいて、コルヒチンと同

様に α -tubulin に特異的に結合し、微小管の形成を阻害することが知られる oryzalin や propyzamide, 微小管の重合を促進し安定化・過剰形成させる taxol (paclitaxel) を用い、 α -tubulin による遺伝変異であることを明らかにした。半矮性形質を決定する遺伝子は農林 10 号由来の *Rht-B1b* および *Rht-D1b*, アカコムギ由来の *Rht8* などが知られる。*Rht-B1b* および *Rht-D1b* をもつ変異体はジベレリンに対し非感受性であり、*Rht8* をもつ変異体はブラシノステロイドに対し非感受性である。

本節では、*T. aestivum* において SCR 形質を有する系統の形態的特性の評価および *Scr1* 遺伝子のマッピングを行った。また、ねじれとともに生じる半矮性が *Rht-B1b* もしくは *Rht-D1b*, *Rht8* により生じるのか、ねじれに関して戻し交雑を行うことで半矮性形質の除外を試みると同時に、試薬反応試験や DNA マーカーを用いてこれらの遺伝子の有無を確認した。さらに、 α -tubulin1 遺伝子との関連を α -tubulin 特異性試薬反応により探った。

第 2 項 材料と方法

植物材料

SCR 形質をもつ 2 系統の異なる六倍性コムギ *T. aestivum* KM60-96 および KM304-97, 正常穂を有する草丈の高い六倍性コムギ N67 および四倍性コムギ *T. turgidum nigrobarbatum* #517 ($2n = 4x = 28$, BBA^uA^u) を用いた (Table IV-1-1, Fig. IV-1-1a, b)。また、ジベレリン酸感受性試験には半矮性遺伝子 *Rht-D1b* における N67 の準同質遺伝子系統 ANK-12 を用いた。KM60-96 は ZG K 242-82 より選抜された系統であり、Slavko Borojević 教授によって 1980 年代に Kroměříž の種子コレクションからもたらされた。ZG は Zagreb (現在の Croatia), K は Svetka Korič 博士によって作製されたことに由来する (Korič 1980)。一方、KM304-97 は ZG K 242-82/Hana の雑種に由来する。Hana は 1985 年にチェコ共和国において品種登録された系統である。した

がって、KM60-96 および KM304-97 はごく近縁の *Scr1* 遺伝子を有する系統と思われる。二つの SCR 系統は P. Martinek 博士 (Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd. Genetics and Breeding, Kroměříž, Czech Republic) より分譲いただいた。また、N67 および ANK-12 は故 S. F. Koval 博士 (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia) より分譲いただいた。

KM60-96 を胚のう親、N67 を花粉親とする F₂、および KM304-97 を胚のう親、N67 を花粉親とする F₂、KM60-96 を胚のう親、#517 を花粉親とした F₂ を育て、SCR 形質の分離を記録した。いずれも茨城大学農学部の実験圃場において秋播き栽培し、2012 年から 2013 年にかけて育てた。また、KM60-96/N67 BC₂F₂ を 2014 年から 2015 年にかけて育て、ねじれの有無、節間長を記録した。

SCR 系統の形態的特徴

SCR 変異体 (KM60-96) および正常型 (N67) の登熟期、各系統 10 個体における稈長、節間長、ねじれの程度を記録した。ねじれの程度の測定は、各節間もしくは穂の基部の一点 (A 点) から表皮の筋を次の節間もしくは穂の先端 (B 点) までたどり、紙面上に描いた円に A 点および B 点を垂直に落として記入し、分度器を用い角度を求めた (°/cm)。

半矮性遺伝子をもたない N67 による戻し交雑によって *Rht-B1b*、*Rht-D1b* および *Rht8* のような半矮性遺伝子は除外されると考えられるが、*α-tubulin1* 遺伝子変異は微小管の異常によって植物体全体にねじれや半矮性化をもたらすことから、KM60-96/N67 BC₂F₂ の形態が SCR であって草丈が低ければ *α-tubulin1* 遺伝子の効果による半矮性形質である可能性もある。

半矮性遺伝子 *Rht-B1b* または *Rht-D1b* 特異的なマーカーを用いた PCR 増幅

KM60-96 および KM304-97 の草丈が低い要因が半矮性遺伝子 *Rht-B1b* または *Rht-D1b* によるものか調べるため、対立遺伝子特異的な完全マーカー; *Rht-B1b* (BF - MR1), *Rht-D1b* (DF - MR2), *Rht-B1a* (BF - WR1) および *Rht-D1a* (DF2 - WR2) (Ellis et al. 2002, Nalini et al. 2005) (Table IV-1-2) を使用し, KM60-96, KM304-97, N67 および ANK-12 における PCR 増幅を確認した.

PCR 反応は反応液 (10 μ l) の組成を 1 \times Ammonium Buffer (Mg free) (Ampliqon), 2 mM MgCl₂ (Ampliqon), 200 μ M dNTP mix (Promega), 2.5 Unit *Taq* DNA polymerase (Ampliqon), 各 0.2 μ M primer (Forward および Reverse), 200 ng 核 DNA および滅菌水とした. 反応条件は最初に 94°C で 5 分間の熱変性を行い, 続いて 94°C 30 秒間, 65°C 30 秒間, 72°C 1 分 20 秒間を 7 サイクル, 1°C ずつアニーリング温度を下げながらタッチダウン PCR を行い, 94°C 15 秒間, 58°C 15 秒間, 72°C 50 秒間を 30 サイクル行った.

また, DF2-WR2 の組み合わせにおいては, 最初に 95°C で 5 分間の熱変性を行った後, 94°C 20 秒間, 58°C 30 秒間, 72°C 10 秒間を 42 サイクル, 最後に 72°C で 2 分間の伸長反応とした. DNA 増幅装置は Gene Amp PCR System 2700 (Applied Biosystems) を用いた.

増幅産物 5 μ l を 6 \times Loading Buffer Double Dye (ニッポンジーン) 1 μ l と混合し, TAE 緩衝液中の 2% アガロースゲルで電気泳動した (100V, 30 分間). DNA 分子量マーカーは 100 bp DNA Ladder を用いた. 電気泳動装置はサブマリンゲル電気泳動装置 (Mupid-2plus, アドンバンス) を使用した. 泳動後のゲルをエチジウムブロマイド溶液に約 20 分間浸漬して染色し, 紫外線透過し撮影を行った.

半矮性遺伝子 *Rht8* 特異的なマーカーを用いた PCR 増幅

KM60-96/N67 BC₂F₂ の各幼苗の葉から DNA を抽出し, *Rht8* 遺伝子周辺マーカーおよび *Rht8* 連鎖マーカー *Xgwm261* (Korzun et al. 1998, Gasperini et al. 2012) を用い遺伝子型を確認した (Table IV-1-3). PCR 反応に用いた反応液および反応条件は第 2 章の記述と同様である.

薬品処理に用いた試薬および生育条件

ジベレリン酸 (ナカライ) は蒸留水に溶かし, *epi-Brassinolide* ($\geq 85\%$, SIGMA), oryzalin (和光純薬), propyzamide (和光純薬) および taxol (paclitaxel) (和光純薬) は Dimethylsulphoxide (DMSO) (和光純薬) に溶かし反応試験に使用した. また, 種子をシャーレに播種し, 一週間低温条件 (4°C) で発芽を揃え実験に用いた.

ジベレリン酸に対する反応を見るため, KM60-96, KM304-97, N67 および ANK-12 を各 5 個体, 培養土を 6 cm 入れたポットに播種し, 常時点灯 (96 W) 24°C 条件下で育てた. 播種後 5 日目から 0.1 mM GA₃ 溶液 (40 mg/l) (処理区) もしくは水 (対照区) を毎日灌水および葉にミスト散布し, 処理開始から 12 日目に草丈を測定した. 処理開始から 5 日目における処理区ごとの各系統の草丈の写真を Fig.IV-1-3b に示す.

epi-Brassinolide, oryzalin, propyzamide および taxol はいずれも, 蒸留水に 0.7% 寒天を電子レンジで加熱して溶解し, 攪拌した後, 冷却したものに加え, 未処理区は処理区の指示量と等量の DMSO を加えた.

epi-Brassinolide, propyzamide および taxol については 0~2 μ M の濃度で 24°C 常時蛍光灯照射下 (300W) および 24°C 暗黒下の 2 条件で 7 日間育成し, 草丈と根長を測定した.

oryzalin に対する反応は 25°C 14 時間の蛍光灯照射下 (300W), 21°C 10 時間の暗黒下の人工気象器内で, 0, 0.05 および 0.1 μ M の濃度の培地で 10 日間育てた後, 0 μ M

濃度の培地へ移動させ 6 日間育てた。各濃度条件につき KM60-96, N67 および ANK-12 を各 8~10 個体育て、10 日目、16 日目に草丈を測った。

epi-Brassinolide, oryzalin, propyzamide および taxol に対する反応はいずれも、各濃度条件につき KM60-96, N67 および ANK-12 を各 3~6 個体育て評価した。

Scr1 遺伝子の連鎖地図作製

KM60-96/N67 F₂ 世代の各個体および両親系統の葉身から抽出した DNA を *Scr1* 遺伝子のマッピングに用いた。五倍性雑種 KM60-96/#517 F₂ の分離から、D ゲノム染色体上に遺伝子が座乗する可能性が低いと推察されたことから、A ゲノムおよび B ゲノム染色体上のマイクロサテライトマーカーを用い、連鎖地図を作製した。

第 3 項 結果

SCR 変異体の形態的特徴

Fig.IV-1-1a に KM304-97, KM60-96, #517 および N67 の穂の形態を示した。また、各穂軸節から小穂を取り除き、穂軸のねじれを観察した (Fig.IV-1-1b)。KM60-96 の穂軸は平均 19.1 %/cm のねじれを生じ、N67 は平均 4.8 %/cm であった (Fig.IV-1-2a)。Fig.IV-1-1d は第一節間のねじれを示し、Fig.IV-1-1e および f は Fig.IV-1-1d の黄色い四角で囲んだ部分をさらに拡大した図である。赤い線は稈の表皮の筋を示している。節間は第一節間に顕著なねじれがみられ、KM60-96 は 17.3 %/cm, N67 は 1.4 %/cm であった (Fig.IV-1-2a)。第二節間より下の節間に差は見られなかった。右巻き (上から見たときに時計回り)、左巻き (上から見たときに反時計回り) ともにあり、ねじれの方に統一性はなく、個体内でも分けつ毎にねじれの方が異なる場合もあった。SCR 変異体の穂のねじれは稈にも生じていたことから、Smoček (1991) が報告した二つのねじれに関する遺伝子 *Scr1* および *Scr2* のうち、*Scr1* が KM60-96 および KM304-97

の SCR 形質を決定していることを確認した.

SCR 系統は N67 に比べ短稈傾向にあり KM60-96 の草丈の平均は 96.1 cm, N67 は 123.7 cm であった (Fig.IV-1-1c, Fig.IV-1-2b). KM60-96 の第一節間長は平均 37.3 cm であり N67 は 57.5 cm であった. また, 第二節間長の平均は, KM60-96 は 22.0 cm, N67 は 30.9 cm であった (Fig.IV-1-2b).

SCR 変異体の低い草丈は半矮性遺伝子 *Rht-B1b* または *Rht-D1b* に起因するか

播種後 5 日目から 0.1 mM GA₃ 溶液の処理を開始し 12 日目の草丈は, 対照区に対し KM60-96 では 1.6 倍 (対照区 23.3 cm, 処理区 37.2 cm), KM304-97 では 1.4 倍 (対照区 26.5 cm, 処理区 35.8 cm), N67 では 1.6 倍 (対照区 24.3 cm, 処理区 38.8 cm) 高く, t 検定を用いた平均値の比較では 3 系統はいずれも 1% の有意水準で有意差が認められた (Fig.IV-1-3a, b). 一方, ANK-12 は顕著な差が見られなかった (対照区 20.9 cm, 処理区 21.6 cm). したがって, KM60-96, KM304-97 および N67 はジベレリン酸に対し感受性を示した一方, ジベレリン酸非感受性半矮性遺伝子 *Rht-D1b* をもつ ANK-12 は非感受性を示した (Fig.IV-1-3a, b).

また, *Rht-B1* および *Rht-D1* の完全マーカーを使用し, 対立遺伝子のバンドの有無を確認した結果, KM60-96, KM304-97 および N67 には *Rht-B1a* および *Rht-D1a* のバンドが検出された (Fig.IV-1-3c). したがって *Rht-B1b* および *Rht-D1b* 遺伝子は KM60-96 および KM304-97 の半矮性の要因ではない.

SCR 変異体の低い草丈は半矮性遺伝子 *Rht8* に起因するか

半矮性遺伝子 *Rht8* の効果が SCR 変異体の草丈の低さの要因となっているのか確認するため, ブラシノステロイドに対する反応を観察した. 0, 0.1 および 1 μM の濃度で 7 日間処理を行った. KM60-96 および N67 の草丈および根長はいずれも, 濃度が濃く

なるにつれ短くなったが、2系統間に顕著な差は見られなかった (Fig.IV-1-4).

KM60-96/N67 BC₂F₂の各個体から抽出したDNAを用い、*Rht8* 遺伝子周辺のマイクロサテライトマーカー18個 (Table IV-1-3) および *Rht8* 遺伝子連鎖マーカー *Xgwm261* との連鎖関係を調べるために多型を調べた。その結果、周辺マーカー18個のうち増幅した14個のマーカーはすべて両親系統の KM60-96 と N67 に多型がなかった。一方、*Xgwm261* は両親系統間に明確な多型を示したが、80個体の BC₂F₂ はすべて N67 と同じ位置のバンドであった (Fig.IV-1-5a)。

BC₂F₂ 世代の穂軸節のねじれは 54 screwed : 26 normal となり 3 : 1 の比に分離した ($\chi^2 = 2.400$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$) (Table IV-1-4)。Fig.IV-1-5b に screwed グループと normal グループに分けた際の BC₂F₂ 世代における草丈の頻度分布を示した。screwed グループにおける草丈の平均は 128.2 cm、一方 normal グループは 122.8 cm であり 5.4 cm の差があった。t 検定の結果、screwed グループおよび normal グループの2グループ間には 1% の有意水準で有意差があった。また、KM60-96 の平均草丈は 96.1 cm であり、N67 は 123.7 cm であった。これらの結果から、KM60-96 は *Rht8* 遺伝子をもつが、2回の N67 による戻し交雑の結果、BC₂F₂ 世代では *Rht8* 遺伝子が欠落し、半矮性形質を示さなかったと考えられる。Fig.IV-1-5c に示すように、N67 に比べ、穂の形態で選抜した BC₂F₂ 個体には screwed 形質が導入されていることから、準同質遺伝子系統の作製は可能である。また、ねじれの方法はランダムであった。

ねじれは α -*tubulin1* 遺伝子変異に起因するか

oryzalin, propyzamide および taxol に対する SCR 変異体および正常型の反応から、SCR 変異体のねじれが α -*tubulin1* 遺伝子に起因するか確認した。

Jöst et al. (2014) によると、テフの半矮性遺伝子変異においては、 α -*tubulin1* 遺伝子の変異と関連する oryzalin, propyzamide および taxol に対する特異的な反応があった。

そこで、本節では、KM60-96 および N67 の oryzalin, propyzamide および taxol に対する反応から、SCR 変異体のねじれが *α-tubulin1* 遺伝子に起因するか確認した。

本実験においても同様に、対照区 (0 μM), 0.05 および 0.1 μM oryzalin を含む培地上で KM60-96 および N67 を 10 日間育て、草丈を測定した後に oryzalin を含まない培地上へ移し 6 日後の草丈を記録した (Fig.IV-1-6a, b). その結果、2 系統とも対照区 (0 μM) に比べ 0.05 μM の濃度条件では草丈が短くなり、0.1 μM 濃度ではさらに短くなった。その後の oryzalin を含まない培地の草丈は、0.05 μM から移した 2 系統とも生長を取り戻し、KM60-96 は 2.54 cm, N67 は 3.53 cm 生長した。0.1 μM から移した場合は、KM60-96 は 1.10 cm, N67 は 3.09 cm 生長した (Fig.IV-1-6c, d). 高濃度の oryzalin による異常は KM60-96 のほうが大きかったと推定される。

propyzamide の 0 (対照区), 0.25, 0.5, 1 および 2 μM の濃度条件で 24°C 常時蛍光灯照射下 (300W) と 24°C 暗黒下でそれぞれ 7 日間育て、草丈と根長を測定した。その結果、明暗に関わらず KM60-96 も N67 と同様に濃度が高まるにつれ草丈および根長は短くなった (Fig.IV-1-7a, b). 蛍光灯照射条件下では、propyzamide 処理によって特に根長が抑制された (Fig.IV-1-7c). 暗所では、草丈と根長の生長が特に 1 および 2 μM 条件において著しく抑制された (Fig.IV-1-7b, d).

KM60-96 と N67 を 24°C 常時蛍光灯照射下 (300W) と 24°C 暗黒下で taxol の濃度を対照区 (0 μM), 2 および 4 μM 条件で、それぞれ 7 日間育て、草丈および根長を測定した。草丈においては、taxol を処理した際の系統間に大きな差は見られなかったが (Fig.IV-1-8a, b), 根長においては、taxol 処理によって 2 系統とも短い傾向にあった (Fig.IV-1-8c, d).

以上の結果をまとめると、KM60-96 と N67 の間では、oryzalin, propyzamide および taxol に対する反応は明確な差がなかった。したがって、KM60-96 における SCR の変異と *α-tubulin1* 遺伝子変異を関連づける証拠は得られなかった。

Scr1 遺伝子のマッピング

五倍性雑種 KM60-96/#517 F₂ の穂軸節のねじれは 110 screwed:32 normal で 3:1 の比に分離した ($\chi^2 = 0.460$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$) (Table IV-1-4). この結果は Scr1 遺伝子が A もしくは B ゲノム染色体いずれかに座乗することを示唆した. KM60-96/N67 F₂ は 103 screwed:35 normal ($\chi^2 = 0.010$, $df = 1$, $0.9 < p < 0.975$), KM304-97/N67 F₂ は 139 screwed:38 normal ($\chi^2 = 1.177$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$) となり, いずれも 3:1 の比に分離した (Table IV-1-4). これらの結果は単一の優性遺伝子 Scr1 が穂軸のねじれを決定していることを示した.

マッピングには KM60-96/N67 F₂ および A もしくは B ゲノム染色体の長腕, 短腕それぞれに特異的なマイクロサテライトマーカーを用いた. Fig.IV-1-9 に示すように, Scr1 遺伝子は 5B 染色体長腕上の Xgwm191 および Xgwm371 に挟まれた位置に存在した. その距離はそれぞれ 16.6 cM, 13.2 cM であった.

第 4 項 考察

SCR 形質は穂軸と第一節間が右巻きもしくは左巻きにねじれる形質である. 穂軸のねじれは小穂を穂軸に効率的に配置させ, その結果, 種子の生長空間を拡大できる可能性がある.

SCR 形質は Smoček (1991) によって最初に発見され, Martinek and Bednář (1998) はコムギにおいて標準的ではない穂形態をもつ遺伝資源の一つとして報告した. しかし, SCR 形質の活用例はまだない. 近年, 微小管に影響を与える変異がシロイヌナズナの草丈を矮化させることが明らかとなった (Wang and Li 2008). アクチンフィラメントとともに微小管は植物の生長や発育の多くの過程における重要な構成要素である. 微小管に影響を与える変異体は植物の構造に影響を与える. α -tubulin1 遺伝子の非同義的アミノ酸置換はイネの *twisted dwarf 1 (tid1)* 変異形質を生じ, 葉のねじれを示す

(Sunohara et al. 2009). また, 同祖遺伝子によるシロイヌナズナの変異体は, 地上部の器官や根が短く, 螺旋状に生長する特徴をもち, 左巻きの変異体を生じた. (Thitamadee et al. 2002, Ishida et al. 2007). 類似する形質は, シロイヌナズナにおいて微小管結合タンパク質 (microtubule-associated proteins, MAPs) の変異によって生じる *spiral 1 (spr1)* や *tortifolia 1 (tor1)* がみつまっている (Furutani et al. 2000, Buschmann et al. 2004).

形態的特徴を評価することにより, KM60-96の第一節間長は正常型の約60%, 第二節間長は正常型の約70%の長さであった. 植物全体のねじれと半矮性形質を同時にもつ特徴は, *α-tubulin1* 遺伝子の変異に起因する可能性があるが, *α-tubulin* 特異性試薬 (oryzalin, propyzamide および taxol) に対する反応試験によって, *α-tubulin1* 遺伝子の変異を示す肯定的な証拠は得られなかった. イネのような二倍性種においては, *α-tubulin1* 遺伝子の変異体は深刻な矮性化を生じ脆弱となる. Jöst et al. (2014) は四倍性種のテフの半矮性形質は *α-tubulin1* 遺伝子の突然変異であることを発見した. 四倍性種テフは二つの同祖染色体のうち, 一方に *α-tubulin1* 遺伝子変異が存在しても, もう一方は正常であることから, 同祖遺伝子の相互作用によって農業上有益な半矮性形質となった, と考えられる. 本節で用いたパンコムギは六倍性種であり, *α-tubulin1* 遺伝子の効果は穂軸および第一, 第二節間長のねじれが現れたのみで, 草丈は正常な二つの同祖染色体により軽減されてしまった可能性もある. Farajalla and Quick (2007) は, *T. aestivum* には *α-tubulin* 遺伝子ファミリーがあり, それらが, 多様に働き寒冷条件順化していると考察した. これらの遺伝子のいくつかは第5同祖染色体上に存在する. *Scr1* 遺伝子は5B染色体上にあるので, 四倍性コムギに導入したとき, 草丈に矮性効果が存在するか検討することも興味深い.

変異体はジベレリン酸に対し感受性を示し, 完全マーカーによる増幅産物の有無からも, *Rht-B1b* および *Rht-D1b* 遺伝子に起因はしていなかった. また, *epi-Brassinolide*

の反応は変異体と正常型の違いが明瞭ではなかったが, *Xgwm261* マーカーによる増幅産物の多型から KM60-96 に *Rht8* 遺伝子が存在することが明らかとなった. KM60-96 の *Rht8* 遺伝子および *Scr1* 遺伝子を N67 に導入することを目的とし, 穂軸のねじれの形質に注目した, N67 による 2 回の戻し交雑によって, *Scr1* 遺伝子と矮性効果には関連性はなく, *Rht8* 遺伝子が除外された (Fig.IV-1-5b). したがって, *Scr1* 遺伝子をもつ準同質遺伝子系統の育成によって, 穂のねじれの効果を草丈の影響を考慮せずに検討できることを示している.

五倍性雑種の分離において *screwed:normal* が 3:1 に分離し, *Scr1* 遺伝子が 5B 染色体長腕上に座乗したことから, SCR 形質を四倍性コムギへ導入することが可能である. この *Scr1* 遺伝子の近くには倍数体進化の上で極めて重要な役割をもつ同祖染色体対合を抑制する遺伝子 (*Ph1*) (Khan et al. 2011) が存在する. この遺伝子の抑制は, 野性コムギからパンコムギへの新しい有用な遺伝子の導入にかなり重要な実用性をもつ (Rogalska et al. 2010). もしそれが十分密接に *Scr1* 遺伝子と連鎖し, 対合の抑制を生じる組換え個体を育成できるならば, SCR の発現が実用的な育種のために利用可能な形態学的指標になると考えられる. 本節では, *Ph1* 遺伝子近傍のマーカーにおいて多型が得られず, それ以上の分析は行えなかった. コムギにおいて, ねじれの大きさが穂に着生する種子数を変えると考えられることから, 今後, k検定などのさらなる研究を実施し, SCR 形質の農業形質としての有効性を実証する必要がある.

第5項 要約

コムギにおいて、小穂は互生する。Screwed spike rachis (SCR) は穂軸がねじれることにより、小穂が穂軸の周りにらせん状に着生する自然突然変異形質である。穂の長さが限られる時、穂当たりあるいは単位面積当たりの穀粒数、穀粒大の増加は収量性を向上するための一つの方法である。しかし、穂内では種子の生長に伴って種子間に空間的競争が起こる。SCR 形質は小穂を効率的に配置させることによって、空間内の隣接する小穂や種子間の競争を回避し、高い生産性を実現できる可能性がある。また、半矮性形質を併せもつことから、有用な農業形質として期待される。本節では SCR 変異体の形態的特性ならびに SCR 形質を決定する遺伝子のマッピング、半矮性形質との関連を探った。SCR 変異体のねじれは穂と第一節間に強く発現し、穂軸のねじれは平均 19.1 %/cm に対し、正常型は平均 4.8 %/cm であり、第一節間のねじれは変異体が 17.3 %/cm に対し、正常型は 1.4 %/cm であった。矮化は第一節間長および第二節間長に生じ、正常型の 6~7 割程度になった。ねじれと半矮性形質を同時にもつ効果が *α-tubulin1* 遺伝子の変異に起因するか調べるため、特異性試薬 (oryzalin, propyzamide および taxol) における反応試験を行ったが、*α-tubulin1* 遺伝子の変異を示す決定的な証拠を得られなかった。また、変異体はジベレリン酸に対し感受性を示し、完全マーカーによる増幅産物の有無からも、*Rht-B1b* および *Rht-D1b* 遺伝子に起因はしていなかった。DNA マーカー *Xgwm261* を用いた解析により半矮性形質は *Rht8* 遺伝子に起因することが明らかとなった。また、変異系統を正常型の四倍性および六倍性コムギと交配し、F₂ 世代の分離から SCR 形質が単一の優性遺伝子 *Scr1* (Screwed spike rachis 1) により決定されていることを示した。*Scr1* 遺伝子は 5B 染色体長腕上のマイクロサテライトマーカー *Xgwm191* および *Xgwm371* の間に座乗していた。矮性効果が除外された戻し交雑集団は、ねじれの効果を草丈の影響を考慮せずに検討することを可能にする。

Table IV-1-1. Plant materials used in this study

Species (Chromosome number, Genome type)	Plant name	Gene
<i>T. aestivum</i> (2n = 6x =42, BBA ^u A ^u DD)	KM60-96 ^a	<i>Scr1</i>
	KM304-97 ^a	<i>Scr1</i>
	Novosibirskaya 67 (N67) ^b	-
	ANK-12 ^b	<i>Rht-D1b</i>
<i>T. turgidum nigrobarbatum</i> (2n = 4x =28, BBA ^u A ^u)	#517	-
<i>T. durum</i> (2n = 4x =28, BBA ^u A ^u)	LD222	-

Seeds were obtained from: ^a Dr. P. Martinek (Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd. Genetics and Breeding, Kroměříž, Czech Republic), ^b Dr. S. F. Koval (Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia)

Table IV-1-2. List of perfect markers used for verifying whether SCR mutant have the *Rht-B1b* and the *Rht-D1b* (Ellis et al. 2002, Nalini et al. 2005)

Name	Primer
BF	GGTAGGGAGGCGAGAGGCGAG
MR1	CATCCCATGGCCATCTCGAGCTA
DF	CGCGCAATTATTGGCCAGAGATAG
MR2	CCCATGGCCATCTCGAGCTGCTA
WR1	CATCCCATGGCCATCTCGAGCTG
DF2	GGCAAGCAAAAGCTTCGCG
WR2	GGCCATCTCGAGCTGCAC

Table IV -1-3. List of markers used for verified whether SCR mutant and KM60-96/N67 BC₂F₂ plants have the *Rht8* (Gasperini et al. 2012)

Marker	Forward primer	Reverse primer
DG025	ACACGCACACATGAGCAAAT	ACGGGTCAGGAAGATGTTG
DG032	AGGAGGCAGATGCAGAAGC	CCTGATCAAGACACCGTAAGC
DG035	CATATGGCAGGAGCAGGAGT	TCCATCAGTCATAACCTCTTCTG
DG048	GGAATGGCTTTTTCCCTGTT	TGGCGATAAGCCTTGAAAAT
DG057	TGGACTCAACCATTTGGAGAA	CGATCACTTGCTGTTGTTC
DG062	GCAGGCATGGTTACTTCCAT	CCCTCTGACCTCCAGTTCC
DG072	CGTTCAATGTCTGGATCGAC	GGGTCACTGAGTTTCGCAAT
DG086	TCAATGGCCATATTAAGGCTCTA	AGCAATCTTTGTGTCCATATCAA
DG087	GATCTGCACTGCTCCATCAA	TCCACTGCGACATAAAAACCA
DG118	GCCTTCCGGAACAGGTACT	GCAGCTAGGACCCTCAAATG
DG236	CATCCAGACGCATGGATACT	CCATGCTTTCCAGTTCTTCC
DG241	TCCCTGCAGGCGTAAGTAAC	GGGTCACTGAGTTTCGCAAT
DG244	GTTTCAGATCAGGCGAGGAAG	GGAGGTCGTGATCGAGAAGA
DG260	ACCATTGGCTCCCTTCAGTA	TGGAGGCCTGATTCTGTTC
DG273	CTTGACGAGCTTGAAATGG	GCAACAAGTGCTTCTGTTCG
DG274	GGAGTCGCAGCCTTTGTTC	GCTCTCCATGTAAATCCATGTACTC
DG279	TGCTCAAGGGAAAGACCATC	AAAGCCTGAGCCTGCTTCTA
DG371	CCACTTGACAAGCAAATTAAGA	ATCACGAGGCTGGTGTTCG

Table IV-1-4. Segregation of screwed spike rachis in three F₂ hybrids and a BC₂F₂ hybrid

Cross combination	Screwedness		Total	χ^2 analysis (3:1)
	Screwed	Normal		
KM60-96/N67	103	35	138	0.010 ^{NS}
KM60-96/N67 BC ₂ F ₂	54	26	80	2.400 ^{NS}
KM304-97/N67	139	38	177	1.177 ^{NS}
KM60-96/#517	110	32	142	0.460 ^{NS}

Note: Value for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1).

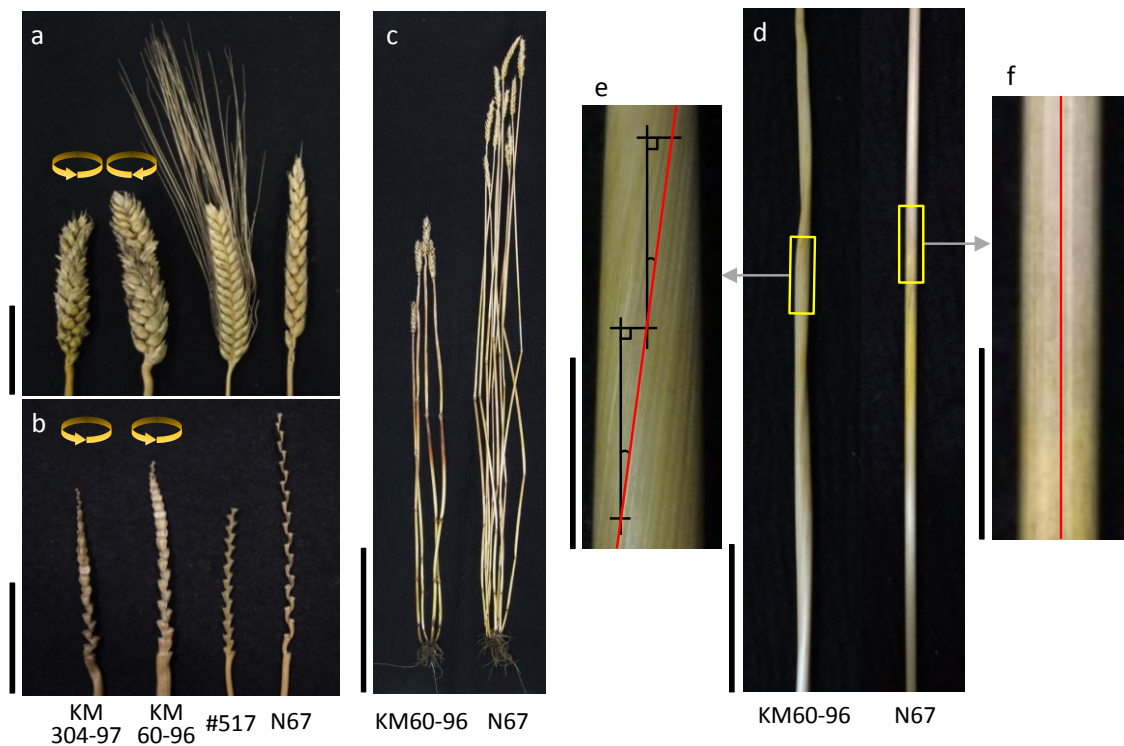


Fig.IV-1-1. Spike and plant phenotypes of normal type and SCR type lines.

(a) The spike features of *T. aestivum* KM304-97, *T. aestivum* KM60-96, *T. turgidum* #517 and *T. aestivum* N67. Arrows indicate the direction of twisting. KM304-97 forms left-handed helix and KM60-96 forms right-handed helix. (Scale bar = 5 cm)

(b) Spike rachides where the spikelets were removed. Arrows indicate the direction of twisting. Both KM304-97 and KM60-96 form left-handed helices. (Scale bar = 5 cm)

(c) Culm morphology of KM60-96 and N67. (Scale bar = 30 cm)

(d) Screwdness in the region of the 1st internode of KM60-96 and N67. (Scale bar = 5 cm)

(e, f) Enlarged views of the regions of 1st internode of KM60-96 and N67 showed in yellow boxes of (d). Red lines indicate cell files in the epidermis. The alignment of epidermal cells in the normal type is almost straight, whereas in the mutant type this cell shows the screwdness. The distance between the horizontal axis of (e) is 1 cm. (Scale bar = 1 cm)

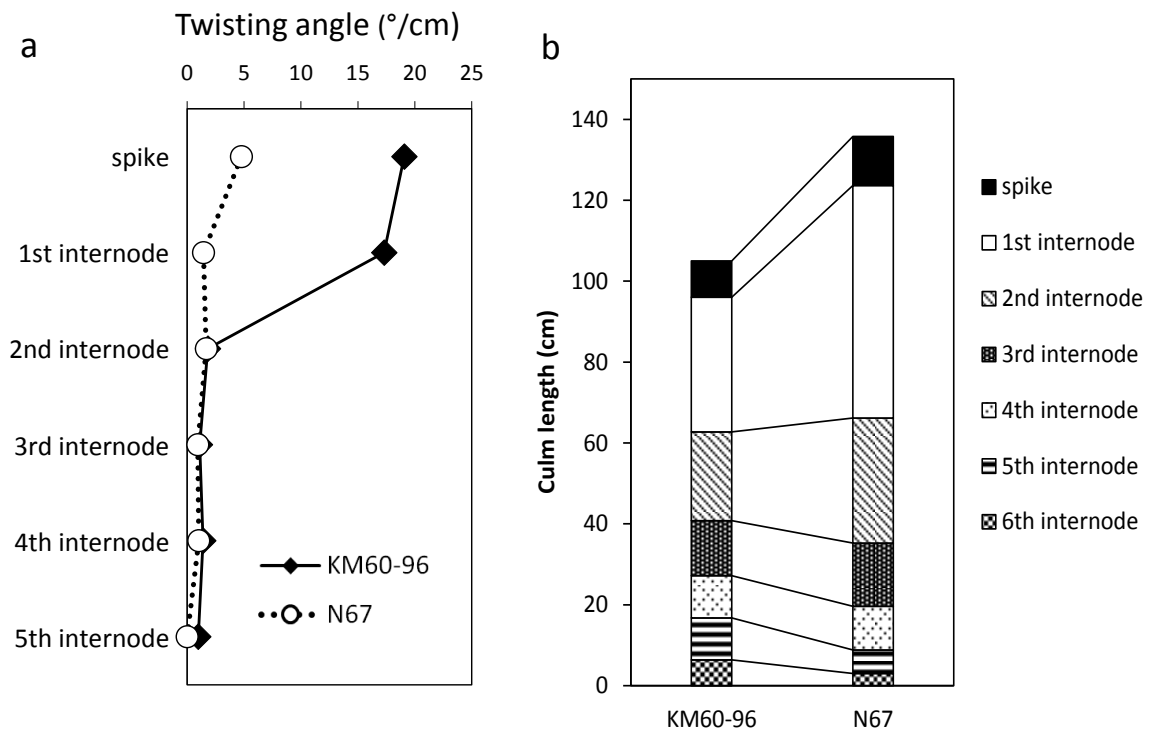


Fig.IV-1-2. Morphological characteristics of N67 and KM60-96.

(a) Twisting angle of the spike and internodes of N67 and KM60-96. Observation was made on 10 plants per line

(b) Length of spike and internodes of N67 and KM60-96. Observation was made on 10 plants per line

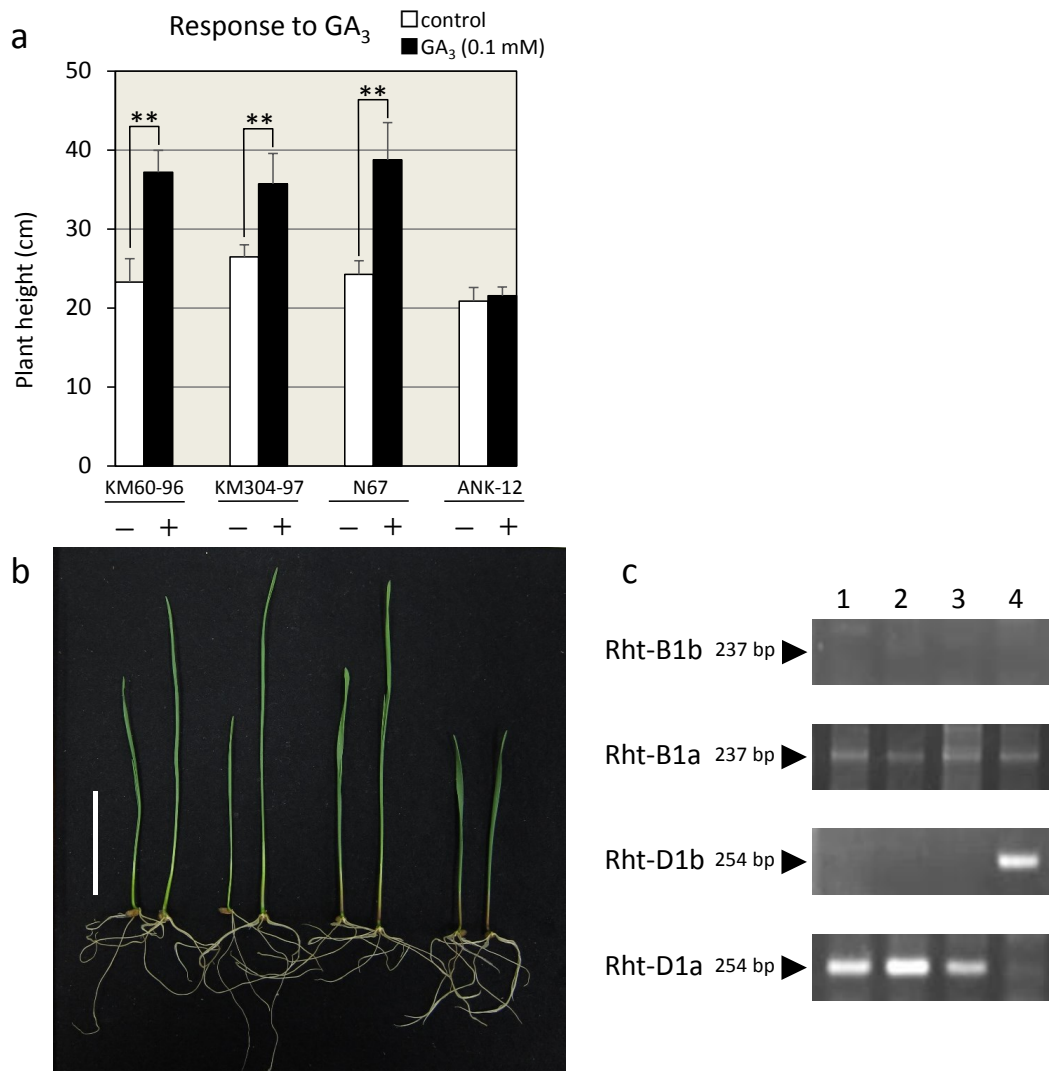


Fig.IV-1-3. GA₃ response of SCR and normal types.

(a) Effect of different levels of gibberellic acid (GA₃) on the plant height length of KM60-96, KM304-97, N67 and ANK-12 plants grown in the pot for 12 days. Five plants per treatment were measured. Error bars indicate one standard deviation. A student's *t*-test was used to generate the P-values. **: p<0.01

(b) The seedling phenotype of SCR mutants and N67 in 5-day-old treated with 0.1 mM GA₃. (Scale bar = 5 cm)

(c) PCR analysis of SCR and normal types. PCR products were separated on 2% agarose gels after amplification with the following primer sets: *Rht-B1b* (BF-MR1), *Rht-B1a* (BF-WR1), *Rht-D1b* (DF-MR2) and *Rht-D1a* (DF2-WR2). Lane 1, 2, 3 and 4 indicate KM60-96, KM304-97, N67 and ANK-12, respectively

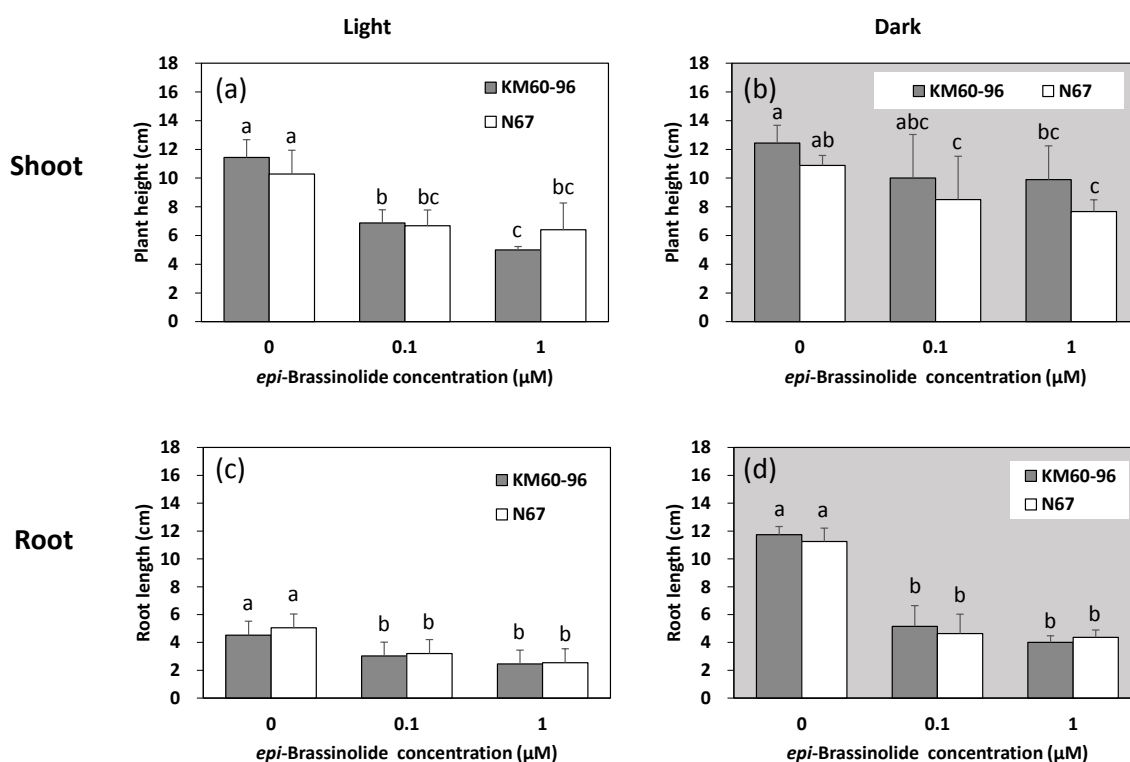


Fig.IV-1-4. Effect of different concentrations (0, 0.1 and 1 μM) of *epi*-Brassinolide on the shoot and root length of KM 60-96 and N67 plants grown *in vitro* for seven days.

Plant height for light (a) and dark (b); and root length for light (c) and dark (d) grown plants. Three to six plants per treatment were measured. Values with the same letters are not significantly different at the $p < 0.05$ level after *t*-test. Error bars indicate one standard deviation

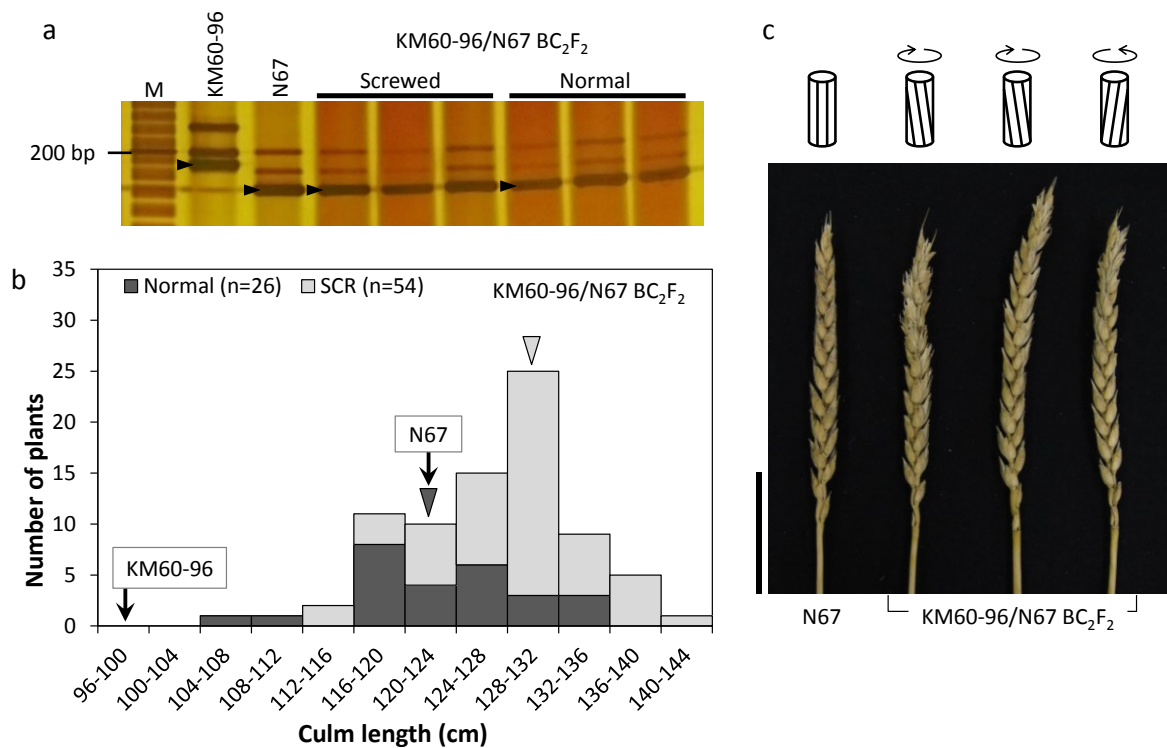


Fig.IV-1-5.

(a) The PCR amplification profiles using *Xgwm261* marker associated with *Rht8* gene. Lanes represent a size marker (M), KM60-96, N67, the SCR type plants and the normal type plants of the KM60-96/N67 BC₂F₂ (left to right)

(b) The histogram of culm length in KM60-96/N67 BC₂F₂ population. BC₂F₂ plants were classified by the spike types; normal and SCR. Dark and light gray triangles indicate mean values of culm length of normal group (122.8 cm) and SCR group (128.2 cm). The supposed genotype of SCR type was heterozygous *Scr1scr1* or homozygous *Scr1Scr1*. Arrows indicate mean values of culm length for KM60-96 (96.1 cm) and N67 (123.7 cm)

(c) The spike features of N67 and KM60-96/N67 BC₂F₂ plants. (Scale bar = 5 cm) Model above the figure shows the direction of twisting of each plant

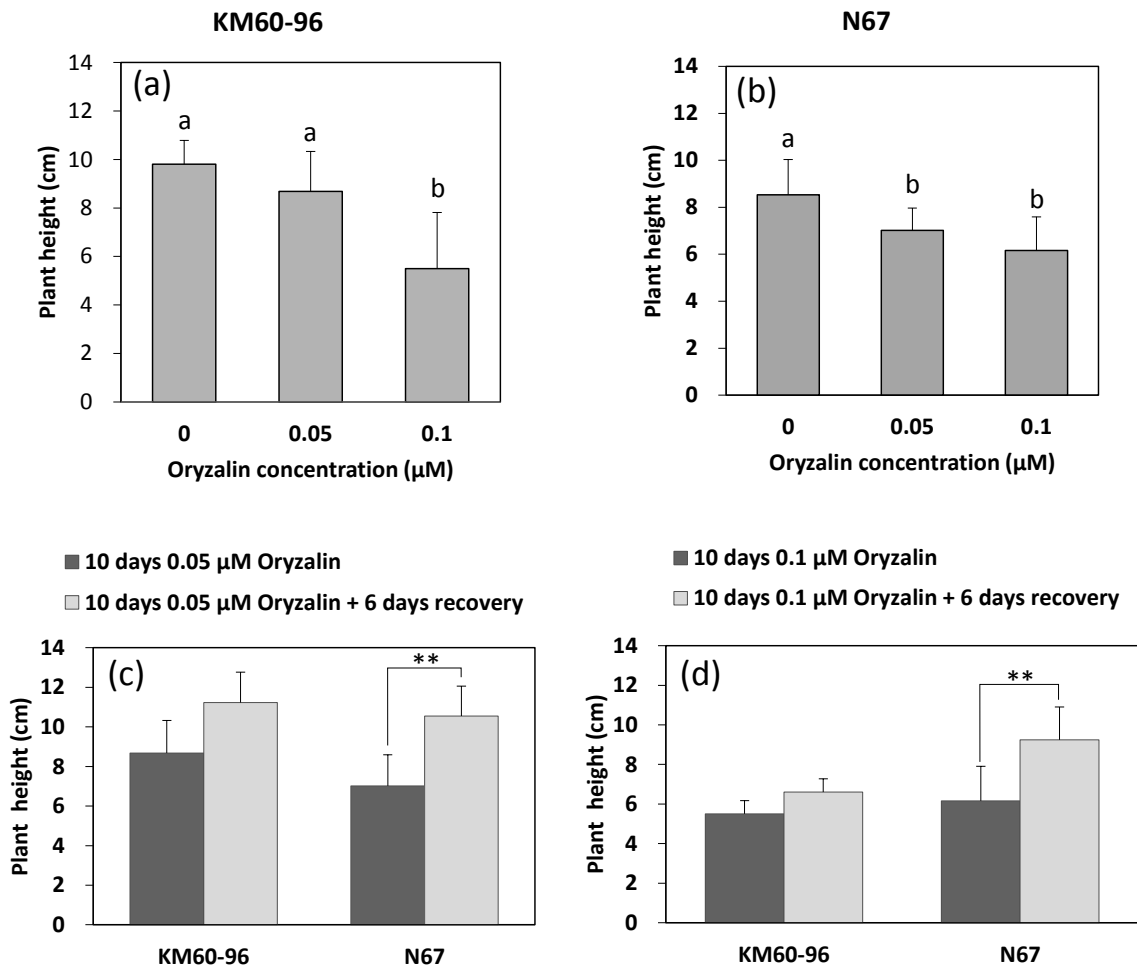


Fig.IV-1-6. The response of SCR to different concentrations (0, 0.05 and 0.1 μM) of Oryzalin on the height of (a) KM 60-96 and (b) N67 plants grown for 10 days in the continuous light. Values with the same letters are not significantly different at the $p < 0.05$ level after t -test. The height of seedlings transferred to the medium without Oryzalin and grown for an additional 6 days to recover from (c) 0.05 μM and (d) 0.1 μM Oryzalin. A student's t -test was used to generate the P-values. **: $p < 0.01$

Eight to 10 plants per treatment were measured. Error bars indicate one standard deviation

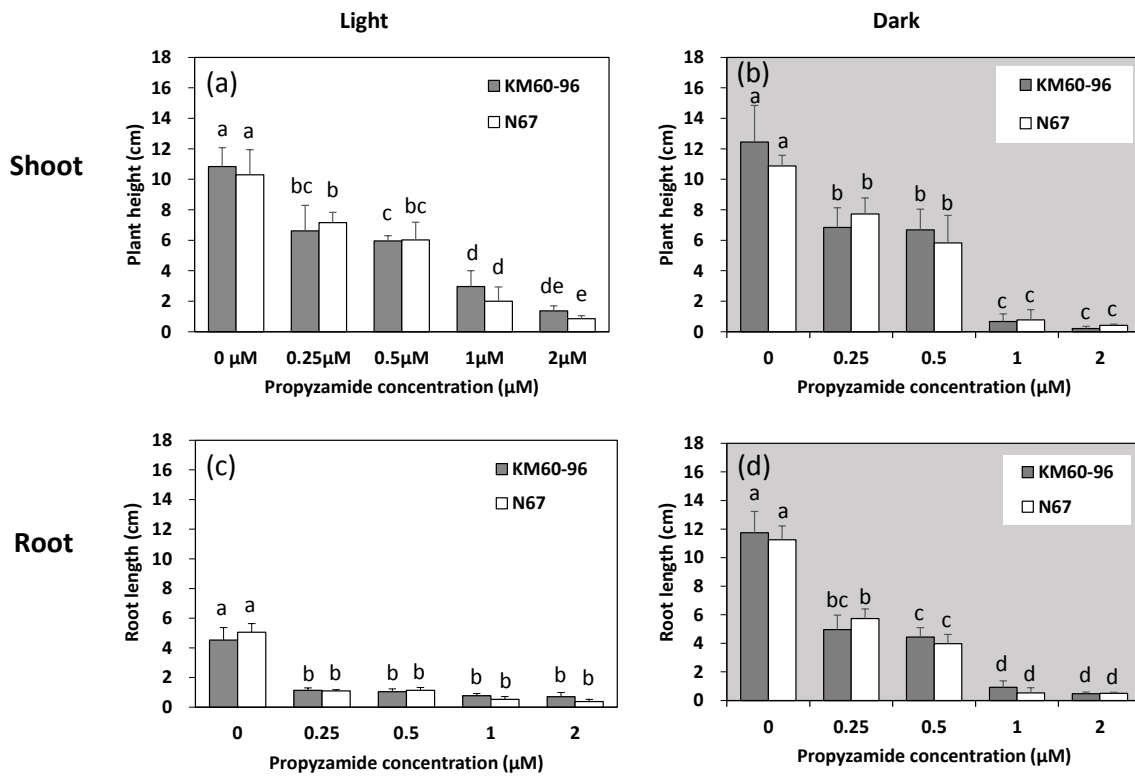


Fig.IV-1-7. Effect of different concentrations (0, 0.25, 0.5, 1 and 2 μM) of Propyzamide on the shoot and root length of KM 60-96 and N67 plants grown *in vitro* for seven days.

Plant height for light (a) and dark (b); and root length for light (c) and dark (d) grown plants. Three to six plants per treatment were measured. Values with the same letters are not significantly different at the $p < 0.05$ level after *t*-test. Error bars indicate one standard deviation

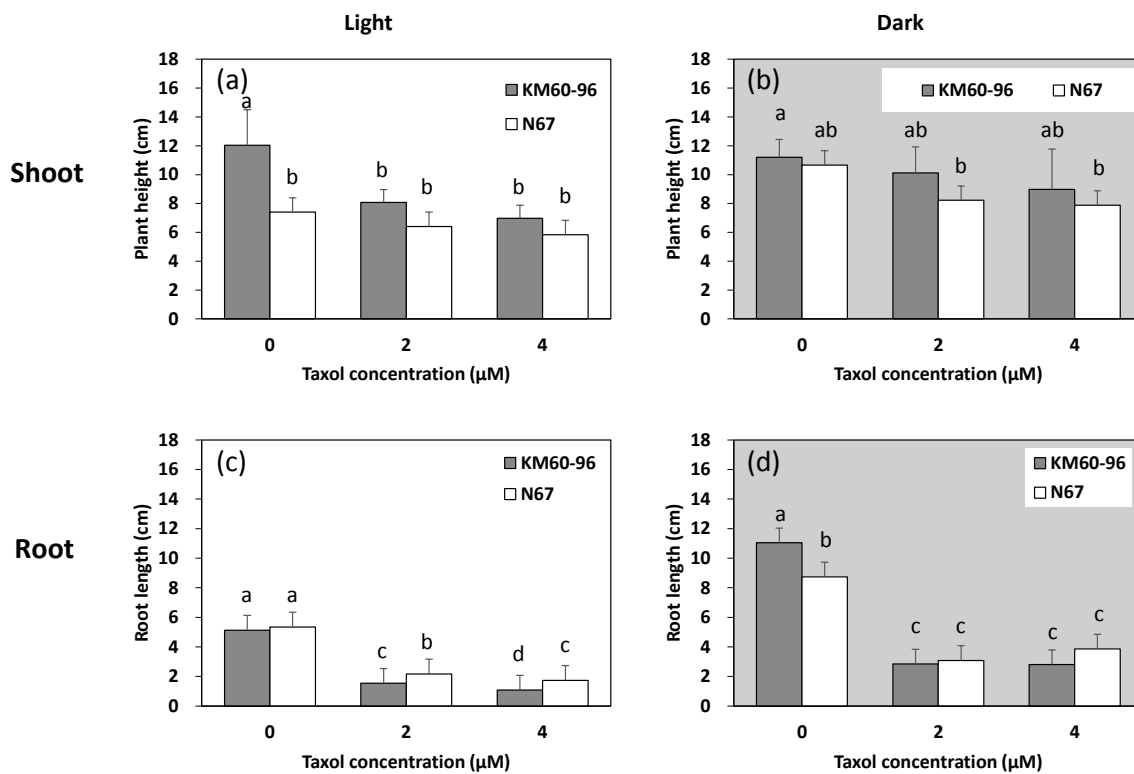


Fig.IV-1-8. Effect of different concentrations (0, 2 and 4 μM) of Taxol on the shoot and root length of KM 60-96 and N67 plants grown *in vitro* for seven days.

Plant height for light (a) and dark (b); and root length for light (c) and dark (d) grown plants. Three to six plants per treatment were measured. Values with the same letters are not significantly different at the $p < 0.05$ level after *t*-test. Error bars indicate one standard deviation

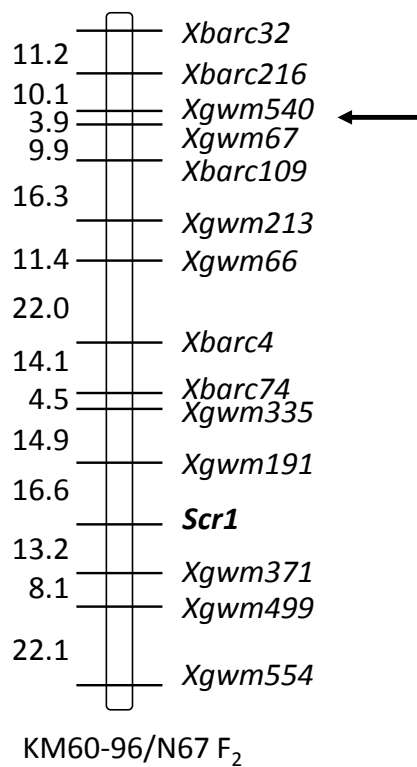


Fig.IV-1-9. Linkage map of the gene for screwed spike rachis (*Scr1*) on chromosome arm 5BL.

Genetic distances are given in centiMorgans (cM). The putative locations of centromere are indicated by arrow

第2節 日本在来品種“軍配”における密穂遺伝子のマッピング

Genetic mapping of the gene for compact spike in Japanese club-like landraces

“Gumbai” of common wheat

第1項 緒言

六倍性コムギにおいて、穂軸の節間が短く穂の単位長さ当たりの種子数が増加する密穂形態について3つの主要な遺伝子 *Q*, *S* および *C* が知られている。*Q* 遺伝子は、穂の長さや形だけでなく、脱穀性や穎の硬さ、穂軸の折れやすさ、草丈、出穂期など多面的な効果をもち (Huskins 1946, Unrau et al. 1950, Sears 1952, 1954, MacKey 1954, Muramatsu 1963, 1979, 1985, 1986, Kato et al. 1999, 2003, Faris and Gill 2002, Faris et al. 2003, Simons et al. 2006, Zhang et al. 2011), 5A 染色体上に座乗する。また、*Q* 遺伝子は植物特異的な転写因子である *APETALA2* (*AP2*) ドメイン遺伝子の一つである (Simons et al. 2006, Zhang et al. 2011)。 *T. sphaerococcum* の密穂および丸い種子は、3D, 3B および 3A 染色体にそれぞれ座乗する *s1*, *s2* および *s3* 遺伝子が決定している (Sears 1947, Rao 1977, Koba and Tsunewaki 1978, Salina 2000)。クラブコムギ (*T. compactum* Host, $2n = 42$, BBA^uA^uDD) の穂は一般的なコムギの穂より著しく小穂間が密になる (Rao 1973)。この形質は 2D 染色体上の優性対立遺伝子 *C* (*Compactum*) により決定されている (Johnson et al. 2008)。クラブコムギは商業的に栽培されているが、その分布はアメリカ太平洋北西部、オーストラリア、ヨーロッパおよびトルコの一部に限定されている。主な理由の1つは、これらの地域がクラブコムギにおいて農業に最適な気候にあるためと考えられる。日本において *T. compactum* が実用的に栽培された記録はない。日本在来品種の1つである“軍配”は穂が密であり、平面が軍配の形によく似ることから命名されたと推定される。5 品種 (中生軍配, 木下小麦, 赤毛軍配, 赤毛軍配 22, 軍配 22) がこのグループに属し、いずれも山梨県を起源と

する。“軍扇”と名付けられた品種も山梨県由来であり、軍配品種に類似する穂の形態をしていたと推定されるが、その系統は保存されていない。これらの品種の遺伝的起源、軍配の密穂を決定する遺伝子の位置および *C* 遺伝子との関係は判っておらず、同祖遺伝子に起因するか明らかにすることは興味深い。四倍性および六倍性コムギにおいて 5A 染色体上の遺伝子に決定される新しい密穂形質をもつ遺伝資源が見出されている (Mitrofanova 1997, Kosuge et al. 2008, Kosuge et al. 2012)。Koval (1997) によってこれらの密穂遺伝子における準同質遺伝子系統が育成された。また、Diederichsen et al. (2013) は北欧春コムギ *T. aestivum* Dalarna の密穂の変異体 *milturumcompactoides* を見出した。

本節では在来の軍配品種のうち 5 品種の密穂遺伝子の染色体上の位置を決定し、マイクロサテライトマーカーを用い連鎖関係を明らかにした。

第 2 項 材料と方法

植物材料

密穂形質の遺伝解析のため *T. aestivum* の日本在来品種である中生軍配、木下小麦、赤毛軍配、赤毛軍配 22 および軍配 22 を六倍性コムギ N67 と交配した。また、密穂遺伝子の対立性検定のため、中生軍配、ANK-38、ANK-15 および ANBW 5A を軍配品種と交配した (Table IV-2-1, Fig.IV-2-1)。ANK-38 は Chinese Spring (CS) (*T. compactum* Poso 2D) から導入した密穂遺伝子 *C* をもつ N67 の準同質遺伝子系統であり、ANK-15 は *T. aestivum* Skala の squarehead spike 変異体から導入した密穂遺伝子をもつ N67 の準同質遺伝子系統である (Koval 1997)。この遺伝子 (仮に C^{L5} とした) の座乗位置は明らかではない。また、ANBW 5A は *T. durum* Altaiskaya Niva の人為突然変異体 MA 17648 から導入した密穂遺伝子 *Cp1* をもつ N67 の準同質遺伝子系統である (Kosuge et al. 2008)。N67、ANK-38 および ANK-15 は故 S. F. Koval 博士

(Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia) から分譲していただいた. 2B 染色体のマイクロサテライトマーカーの物理的座乗位置の決定のため CS, CS dt 2BL ($2n = 40 + 2t_L$), 4 系統の CS 2B 染色体短腕部分欠損系統および 4 系統の CS 2B 染色体長腕部分欠損系統を用いた. 染色体部分欠損系統の断片長 (FL) はそれぞれ 2BS-7 (FL = 0.89), 2BS-3 (FL = 0.75), 2BS-1 (FL = 0.53), 2BS-11 (FL = 0.27), 2BL-11 (FL = 0.19), 2BL-7 (FL = 0.48), 2BL-1 (FL = 0.69) および 2BL-6 (FL = 0.89) である. これらの CS 染色体部分欠損系統はカンサス州立大学 WGGRC (Wheat Genetic and Genomic Resources Center, Manhattan, Kansas, USA) より取り寄せた. 全 27 集団の F₂ および両親系統は茨城大学農学部の実験圃場において栽培した.

Cg 遺伝子の連鎖地図および物理地図の作製

N67/中生軍配 F₂, 両親系統および染色体部分欠損系統の各幼苗の葉から DNA を抽出した. Cg 遺伝子のマッピングのため, コムギの 2A および 2B 染色体に特異的なマイクロサテライトマーカーを用い, 連鎖地図を作製した. PCR 条件および PCR 産物の電気泳動, 増幅した断片の検出方法は第 2 章の記述と同様である. 物理地図作製のため, 連鎖地図にもとづいて Cg 遺伝子と連鎖した 10 個のマーカーを用い, 欠損系統の PCR 増幅を確認した.

第 3 項 結果

軍配品種の特徴

5 品種の軍配品種の穂は全て, 一般的な穂に比べ穂軸節間が短く, 隣接する小穂同士が密に接し上の小穂に押し倒されるような状態となり, 全体的にずんぐりとした幅広の穂型をしていた (Fig.IV-2-1). これはクラブコムギと似た穂型である. 中生軍配を

除いて4品種には芒があり, 赤毛軍配および赤毛軍配 22 は芒の色が赤かった. 木下小麦の穎の色は白く, 他の4品種は赤い. 種子色は全て赤色であった. また, 軍配品種はいずれも出穂が早く, 10月31日に播種したところ, 翌年5月1日までに全ての品種が出穂した.

他の密穂遺伝子との対立関係

4品種(木下小麦, 赤毛軍配, 赤毛軍配 22 および軍配 22)を中生軍配と交配したF₂(各152~172個体)の穂は全て密穂形質であったことから, 軍配品種の密穂遺伝子は共通することが示唆された(Table IV-2-2). また, ANK-15に5品種の軍配品種をそれぞれ交配したF₂(各149~171個体)の穂も全て密穂であった(Table IV-2-2). それはANK-15のもつ密穂遺伝子C¹⁵が軍配品種の密穂遺伝子と対立関係にあることを示す. しかし, これらの穂型を比較すると, 軍配品種の方がより密で, ANK-15は密の程度が弱い(Fig. IV-2-1). これはANK-15の変異が複対立遺伝子であり, なおかついくつかの遺伝子が関与して穂の形態に影響を及ぼしている可能性がある.

一方, ANBW 5Aと軍配品種における5集団のF₂(各143~163個体)およびANBW 5A/ANK-15 F₂の175個体において密穂:正常穂が15:1の分離比に適合し, χ^2 値は0.007~0.448(df=1)であった(Table IV-2-2). また, ANK-38と軍配品種における5集団のF₂(各147~341個体)およびANK-38/ANK-15 F₂の304個体の分離比も密穂:正常穂が15:1の分離比に適合し, χ^2 値は0.197~2.021(df=1)であった(Table IV-2-2). これらの結果は軍配品種の密穂遺伝子が, ANK-38のもつ2D染色体上のC遺伝子およびANBW 5Aのもつ5A染色体上のCp1遺伝子とは異なる遺伝子座であることを示した.

軍配品種の密穂遺伝の連鎖地図作製

N67と軍配品種における6集団のF₁雑種の穂はいずれも密穂形質であったことから、軍配品種の密穂は優性形質である。N67との交雑F₂集団は全て密穂:正常穂が3:1の分離比に適合し、全集団を合計すると1498個体において1121密穂:377正常穂に分離し、 χ^2 値は0.022 (df = 1)となった (Table IV-2-3)。したがって、軍配品種のもつ密穂遺伝子は単一の優性遺伝子である。この遺伝子を *Cg* (Compact spike of Gumbai) とした。

対立性検定の結果から、*Cg*はANK-15のもつ*C*¹⁵と同じ遺伝子座に座乗し、5Aおよび2D染色体に座乗しないことが推定された。しかし、2D染色体に*C*遺伝子をもつクラブコムギの穂に、軍配品種の穂はよく似ていることから、第2同祖群染色体に座乗すると推定した。151個体のN67/中生軍配F₂を用い、2Aおよび2B染色体に特異的なマイクロサテライトマーカーと*Cg*遺伝子の連鎖関係を調べた。Fig.IV-2-2の連鎖地図に示すように*Cg*遺伝子は2B染色体長腕上の*Xhbg410/Xhbg440*および*Xgwm47*の間に座乗し、周辺の連鎖関係は短腕末端側から*Xbarc55* – (17.0 cM) – *Xhbg405* – (17.1 cM) – *Xhbg410* – (0.0 cM) – *Xhbg440* – (18.1 cM) – *Cg* – (15.3 cM) – *Xgwm47* – (3.8 cM) – *Xhbg391*となった

染色体部分欠損系統を用いた物理地図作製

2B染色体連鎖地図において*Cg*遺伝子と連鎖した10個のマーカー (Fig.IV-2-2) におけるPCR増幅の有無をTable IV-2-4に示す。Torada et al. (2006)によると、*Xhbg410*および*Xhbg440*は2B染色体動原体周辺領域に存在するが、*Xhbg405*、*Xhbg410*および*Xhbg440*は2BL-7 (FL = 0.48) と2BL-1 (FL = 0.69) の間の領域に存在した。また、*Xgwm47*および*Xhbg391*は2BL-1 (FL = 0.69) と2BL-6 (FL = 0.89) の間の領域に存在した。したがって、*Cg*遺伝子は*Xgwm47*および*Xhbg410/Xhbg440*の近くに連鎖することか

ら, 2B 染色体長腕上の 2BL-7 (FL = 0.48) および 2BL-6 (FL = 0.89) の間の欠損部位に存在する (Fig.IV-2-2).

第 4 項 考察

本節で用いた 5 品種の日本在来軍配品種の密穂形質はすべて 2B 染色体上の *Cg* 遺伝子によって決定されていた. Arbuzova et al. (1998) は, *T. aestivum* Skala の squarehead spike 変異体に由来する ANK-15 の密穂遺伝子 C^{15} は *Cg* 遺伝子と対立関係にあるとした. しかし, 対立性検定の結果, C^{15} は *Cg* 遺伝子と対立関係にあつた. 木下小麦は “KOMUGI – Wheat Genetic Resources Database (<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/>) (2015/9/16 閲覧)” において *T. compactum* KU-1263 として登録されていることから, 同一の系統であるか標本を比較し確認する必要がある. Johnson et al. (2008) は染色体欠損系統を用い, クラブコムギのもつ *C* 遺伝子の詳細な座乗位置を調べた. しかし, *C* 遺伝子と完全連鎖もしくは隣接したマーカーが動原体周辺部位 (*C*-2DS1 および *C*-2DL3) の染色体 bin であることから長腕もしくは短腕のどちらに座乗するか明確にできなかった. 野生エンマーコムギにおいて, Faris et al. (2014) によって見出された密穂形質における QTL は 2A 染色体長腕上に存在し, *Cg* 遺伝子は 2B 染色体長腕上に座乗すると考えられることからこれらはオーソログな遺伝子領域にある.

雨天条件下で登熟中の密穂は, 吸水率が正常穂に比べ約 25%高まる (King and Richards 1984). したがって, 登熟期と雨季が重なることは収穫量や品質に重大な影響を与える. しかし, 軍配品種は早生型であることから日本の梅雨期を避けることができる. 日本のコムギ系統には多様な変異がある. 例えば, 農林 10 号由来の *Rht-B1b* および *Rht-D1b*, アカコムギ由来の *Rht8* および Saitama 27 由来の *Rht-B1d* は世界的な農業革命の原動力となった半矮性遺伝子であり, いずれも日本のコムギ品種が重要

な提供親となった (Worland and Petrovic 1988, Borojevic and Borojevic 2005). 密穂遺伝子 *Cg* をもつ軍配品種は山梨県において保存された自然突然変異体である. Diederichsen et al. (2013) は Nordic Gene Bank において保存されている *T. aestivum* Dalarna の変異体 *milturumcompactoides* (NGB24306) を見出しており, これも自然突然変異体である. NGB24306/ANK-38 の F₂ は 198 個体すべて密穂であったことから, *C* 遺伝子と対立関係にある. 軍配品種は, 世界のコムギ育種に貢献してきた日本の遺伝資源の一つとして, 利用されることが期待される.

第5項 要約

“軍配”は日本在来のパンコムギとして分類される品種の一つである。日本の山梨県を起源とした密穂をもつことから軍配と呼ばれる。クラブコムギの穂 (*T. compactum*, $2n = 42$) は優性対立遺伝子 Compactum (*C*) の働きにより正常なコムギの穂より顕著に密になる。軍配品種の密穂を制御する遺伝子の知見はわずかであり、*C* 遺伝子や同祖遺伝子に起因するかの決定に関心がもたれていた。本節では、5 品種の軍配品種を用い、他の密穂コムギとの対立性検定、連鎖地図および物理地図の作製を行った。軍配品種と N67 の F_2 集団は密穂:正常穂が 3:1 の比で分離したことから、密穂形質が単一の優性遺伝子により決定されていることが明らかとなり、この遺伝子を *Cg* (Compact spike of Gumbai) と命名した。対立性検定の結果、*Cg* 遺伝子は 2D 染色体上の *C* 遺伝子および 5A 染色体上の *Cp1* 遺伝子とは対立関係になかった。マイクロサテライトマーカーを利用し、N67/中生軍配 F_2 において *Cg* 遺伝子が *Xhbg410/Xhbg440* と *Xgwm47* に挟まれた 2B 染色体長腕上に座乗することを示した。また、染色体部分欠損系統を用いた物理地図の作製により 2BL-7 (FL = 0.48) および 2BL-6 (FL = 0.89) の間の領域に存在した。

Table IV-2-1. Plant materials used in this study

Plant name	Original source of gene	Gene (Chromosome)
Nakate Gumbai	a local variety	<i>Cg</i>
Kinoshita Komugi	a local variety	<i>Cg</i>
Akage Gumbai	a local variety	<i>Cg</i>
Akage Gumbai 22	a local variety	<i>Cg</i>
Gumbai 22	a local variety	<i>Cg</i>
Novosibirskaya 67 (N67) ^a		-
ANK-38 ^a	<i>T. compactum</i>	<i>C</i> (2D)
ANK-15 ^a	a mutant of <i>T. aestivum</i> ‘Skala’	<i>C</i> ¹⁵
ANBW 5A	MA 17648, a mutant of <i>T. durum</i> ‘Altaiskaya Niva’	<i>Cp1</i> (5A)

Seeds were obtained from: ^a Dr. S. F. Koval (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia)

Table IV -2-2. Allelic relationships among compact spike phenotypes in F₂ populations

Cross combination	Spike		Total	χ^2 value (15:1)
	Compact	Normal		
Nakate Gumbai/Kinoshita Komugi	172	0	172	-
Nakate Gumbai/Akage Gumbai	152	0	152	-
Nakate Gumbai/Gumbai 22	156	0	156	-
Nakate Gumbai/Akage Gumbai 22	153	0	153	-
<i>Total</i>	<i>633</i>	<i>0</i>	<i>633</i>	<i>-</i>
ANK-15/Nakate Gumbai	149	0	149	-
ANK-15/Kinoshita Komugi	171	0	171	-
ANK-15/Akage Gumbai	151	0	151	-
ANK-15/Gumbai 22	155	0	155	-
ANK-15/Akage Gumbai 22	152	0	152	-
<i>Total</i>	<i>778</i>	<i>0</i>	<i>778</i>	<i>-</i>
ANBW 5A/Nakate Gumbai	154	9	163	0.148
ANBW 5A/Kinoshita Komugi	142	8	150	0.215
ANBW 5A/Akage Gumbai	139	9	148	0.007
ANBW 5A/Gumbai 22	136	7	143	0.448
ANBW 5A/Akage Gumbai 22	135	8	143	0.105
ANBW 5A/ANK-15	165	10	175	0.086
<i>Total</i>	<i>871</i>	<i>51</i>	<i>922</i>	<i>0.812</i>
ANK-38/Nakate Gumbai	316	25	341	0.681
ANK-38/Kinoshita Komugi	141	8	149	0.197
ANK-38/Akage Gumbai	140	7	147	0.556
ANK-38/Gumbai 22	146	6	152	1.375
ANK-38/Akage Gumbai 22	146	8	154	0.293
ANK-38/ANK-15	291	13	304	2.021
<i>Total</i>	<i>1180</i>	<i>67</i>	<i>1247</i>	<i>1.637</i>

Note: Value for significance at p = 0.05; 3.84 (df = 1)

Table IV-2-3. Segregation for compact spike phenotype in five F₂ populations of N67/Japanese landraces “Gumbai”

Cross combination	Spike		Total	χ^2 value (3:1)
	Compact	Normal		
N67/Nakate Gumbai	253	86	339	0.025
N67/Kinoshita Komugi	234	90	324	1.333
N67/Akage Gumbai	259	92	351	0.274
Akage Gumbai/N67	151	45	196	0.435
N67/Gumbai 22	115	32	147	0.819
N67/Akage Gumbai 22	109	32	141	0.399
<i>Total</i>	<i>1121</i>	<i>377</i>	<i>1498</i>	<i>0.022</i>

Note: Value for significance at p = 0.05; 3.84 (df = 1)

Table IV-2-4. Deletion-based mapping of ten polymorphic markers in chromosome 2B.

(+) indicates the presence of PCR product, and (-) indicate the absence of PCR product

		Line									
		CS	2BS-7	2BS-3	2BS-1	2BS-11	dt 2BL	2BL-11	2BL-7	2BL-1	2BL-6
FL		1.00	0.89	0.75	0.53	0.27	0.00	0.19	0.48	0.69	0.89
2BS	<i>Xgwm154</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Xgwm148</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	<i>Xbarc18</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>Xwmc272</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	<i>Xbarc55</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
2BL	<i>Xhbg405</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	<i>Xhbg410</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	<i>Xhbg440</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	<i>Xgwm47</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	<i>Xhbg391</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+



Fig.IV-2-1. Spike features of five landraces of “Gumbai”, Novosibirskaya 67 (N67), ANK-38, ANK-15 and ANBW 5A

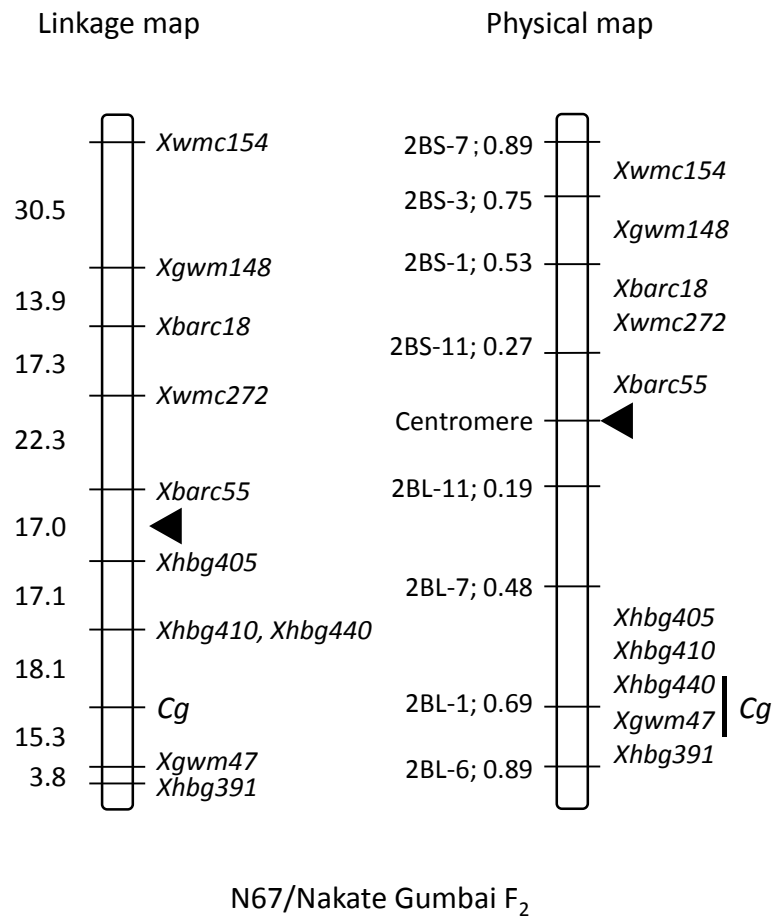


Fig.IV-2-2. Linkage map of compact spike gene *Cg* of “Gumbai” landrace on chromosome 2B (*left*) and Chromosome 2B deletion-based physical map (*right*).

Triangles in the linkage map indicate putative position of centromere. The unit of distance is cM

第5章 葉の生長変異に関する研究

第1節 四倍性コムギにおける葉耳を決定する遺伝子のマッピング

Genetic mapping for the genes governing liguled formation in tetraploid wheat

第1項 緒言

コムギの葉は葉身、葉鞘、葉耳および葉舌と呼ばれる4つの部位から構成されている。葉耳は葉身と葉鞘の間で蝶つがいのような役割を果たす肥厚した部位であり、葉身がより水平姿勢を維持しながら生長することを可能にする。葉舌は葉鞘の先端から稈に沿って立ち上がる薄い膜状の表皮組織である。葉耳および葉舌を欠損する“無葉耳”変異体は、葉身が稈を包み直立するように生長する。

二倍性イネ科作物における無葉耳変異はトウモロコシ (*Zea mays* L.) の *lg₁* 遺伝子 (Ahn and Tanksley 1993), イネ (*Oryza sativa* L.) の *lg* 遺伝子 (Causse et al. 1994), オムギ (*Hordeum vulgare* L.) の *li* 遺伝子 (Pratchett and Laurie 1994), ライムギ (*Secale cereale* L.) の *al* 遺伝子 (Korzun et al. 1997) のように単一の劣性遺伝子によって決定されている。

一粒系コムギ (*T. monococcum*, $2n = 2x = 14$, $A^m A^m$) の無葉耳形質も、単一の劣性遺伝子によって決定されている (Multani et al. 1992)。一方、二倍性野生種タルホコムギ (*Ae. tauschii*, $2n = 2x = 14$, DD) の無葉耳形質は単一の優性遺伝子 *Lg^l* によって決定されている (第6章第1節)。六倍性コムギにおいては2B染色体上の *Lg₁* (*Liguleless 1*) 遺伝子および2D染色体上の *Lg₂* (*Liguleless 2*) 遺伝子のいずれかが存在すると葉耳が形成される (McIntosh and Baker 1968)。四倍性コムギ (*T. durum*) においては単一の劣性遺伝子が無葉耳形質を決定するとされていたが (Ausemus et

al. 1946, Bagnara and Rossi 1972, Bagnara et al. 1972), 2B 染色体上の Lg_1 遺伝子および 2A 染色体上の Lg_3 (*Liguleless 3*) 遺伝子のいずれかが存在すると葉耳が形成される (Watanabe et al. 2004). すなわち, Lg_1 遺伝子座および Lg_3 遺伝子座がともに劣性ホモ型になるとき無葉耳となる. Lg_3 遺伝子の染色体座乗位置は遺伝子型 $lg_1lg_1Lg_3Lg_3$ をもつ遺伝資源が得られず明らかではなかった. この要因の一つは, 葉耳をもつ *T. durum* の遺伝子型は $Lg_1Lg_1lg_3lg_3$ であり, マッピングが困難なためであった. Watanabe et al. (2004) により野生エンマーコムギ *T. dicoccoides* Körn ($2n = 4x = 28$, BBA^uA^u) および栽培エンマーコムギ *T. dicoccon* Schrank ($2n = 4x = 28$, BBA^uA^u) には Lg_3 遺伝子が存在することが明らかとなり, これらの系統を用いることにより, 遺伝子型 $lg_1lg_1Lg_3Lg_3$ を有する準同質遺伝子系統が育成された.

本節では系統 ANW 12E ($lg_1lg_1Lg_3Lg_3$) および ANW 12F ($Lg_1Lg_1lg_3lg_3$) を用い, 葉耳を決定する Lg_3 および Lg_1 遺伝子をマッピングした.

第 2 項 材料と方法

植物材料

葉耳形質の遺伝解析のため 3 系統の四倍性コムギを用いた (Table V-1-1, Fig. V-1-1). *T. durum* LD222 を遺伝背景とする準同質遺伝子系統 ANW 12E および ANW 12F はそれぞれ遺伝子型が $lg_1lg_1Lg_3Lg_3$ および $Lg_1Lg_1lg_3lg_3$ であり, 正常な葉耳をもつ. 無葉耳突然変異系統 *T. durum* PI 370751 の遺伝子型は $lg_1lg_1lg_3lg_3$ であり, 種子は USDA-ARS (National Small Grain Collection, Aberdeen, Idaho, USA) より取り寄せた.

PI 370751 を胚のう親, ANW 12E を花粉親とした F₂, および PI 370751 を胚のう親, ANW 12F を花粉親とした F₂ を育て, それぞれ Lg_3 および Lg_1 遺伝子の連鎖地図作製に用いた. 2 集団の F₂ および両親系統は茨城大学農学部の実験圃場において栽培し

た.

葉耳を決定する遺伝子の連鎖地図作製

PI 370751/ANW 12E F₂, PI 370751/ANW 12E F₂ および両親系統の各幼苗の葉から DNA を抽出した. *Lg₃* および *Lg₁* 遺伝子のマッピングのため, それぞれコムギの 2A および 2B 染色体に特異的なマイクロサテライトマーカーを用い, 連鎖地図を作製した. PCR 条件および PCR 産物の電気泳動, 増幅した断片の検出方法は第 2 章の記述と同様である.

第 3 項 結果

PI 370751/ANW 12E F₂ において葉耳の有無は, 164 有り:43 無しに分離し, 3:1 の分離比に適合した ($\chi^2 = 1.973$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.25$) (Table V-1-2). 2A 染色体長腕上のマイクロサテライトマーカーを *Lg₃* 遺伝子のマッピングに用いた. 連鎖地図は二つの断片に分かれ, *Lg₃* 遺伝子は多型のあった 7 つのマーカーのうち 4 つと連鎖し, *Xgwm312* から 18.6 cM 末端側に連鎖した (Fig.V-1-2a). また, 同じ集団を用い, 2B 染色体のマーカーとの連鎖関係を調べたところ, 多型のあった 13 個のマーカーはいずれも *Lg₃* 遺伝子と連鎖しなかった (Fig.V-1-2c).

PI 370751/ANW 12F F₂ において葉耳の有無は, 147 有り:45 無しに分離し, 3:1 の分離比に適合した ($\chi^2 = 0.250$, $df = 1$, $0.5 < p < 0.75$) (Table V-1-2). 2B 染色体長腕上のマイクロサテライトマーカーを *Lg₁* 遺伝子のマッピングに用いた. 連鎖地図は二つの断片に分かれ, *Lg₁* 遺伝子は多型のあった 13 個のマーカーのうち 9 つと連鎖し, *Xgwm47* から 17.5 cM 末端側に連鎖した (Fig.V-1-2d). また, 同じ集団を用い 2A 染色体のマーカーと連鎖関係を調べたところ, 多型のあった 7 個のマーカーはいずれも *Lg₁* 遺伝子と連鎖しなかった (Fig.V-1-2b).

第4項 考察

本節では、準同質遺伝子系統 ANW 12E ($lg_1lg_1Lg_3Lg_3$) および ANW 12F ($Lg_1Lg_1lg_3lg_3$) を用い、葉耳を決定する Lg_3 および Lg_1 遺伝子をマッピングした。2 遺伝子の座乗する第 2 同祖群染色体長腕領域は、トウモロコシの lg_1 遺伝子 (Ahn and Tanksley 1993), イネの lg 遺伝子 (Nagao and Takahashi 1952, Causse et al. 1994), オオムギの li 遺伝子 (Pratchett and Laurie 1994), ライムギの al 遺伝子 (Korzun et al. 1997), ソルガムの $lg-1$ 遺伝子 (Zwick et al. 1998) およびタルホコムギの Lg' 遺伝子 (第 6 章第 1 節) の座乗領域と一致する。したがって、葉耳の存在はイネ科植物内で幅広く同祖遺伝子によって決定されている。*T. durum* では遺伝子型が $Lg_1Lg_1lg_3lg_3$ であり、一遺伝子 Lg_1 により葉耳の発現が決定される (Watanabe et al. 2004)。一方、*T. dicoccoides* および *T. dicoccon* では遺伝子型が $Lg_1Lg_1Lg_3Lg_3$ であり、2 遺伝子 Lg_1 および Lg_3 が葉耳の発現を決定する。四倍性および六倍性コムギへの進化の過程のどの時点で生じた変異であるのかは不明である。

葉耳の有無を含む、葉の形態や着生する順番はホメオティック遺伝子によって決定されている (Alvarez-Buylla et al. 2000)。頂点分裂組織の *knotted1* 遺伝子の発現抑制は葉の形成に必要不可欠であることが知られるが、*knotted* ファミリーに属す遺伝子の発現を低下させ、葉の発達を中断させる変異体は、主に *Myb-like* サブファミリーのホメオティック遺伝子が関与している (Theodoris et al. 2003, Hay and Hake 2004)。トウモロコシにおける葉の表現型の発現は DNA 結合タンパク質 *liguleless1* ($lg1$) および *liguleless2* ($lg2$) の相互作用によって調節されている (Becraft and Freeling 1991)。*LGI* は SBP (*SQUAMOSA* Promoter Binding Protein) ドメインを含む推定転写因子をコードし (Moreno et al. 1997), *LG2* は bZIP (basic-leucine zipper) 転写因子をコードしている (Walsh et al. 1998)。*LGI* 遺伝子を用いた比較遺伝学的解析において、オオム

ギ (Rossini et al. 2006) およびソルガム (Zwick et al. 1998) における推定候補領域が特定された。また、イネの無葉耳変異体 (*oslg1*) は T-DNA 挿入集団より単離および同定され、OsLG1 は SBP 転写因子ドメインを含むタンパク質をコードしていた (Lee et al. 2007)。本節で用いた準同質遺伝子系統はトウモロコシやイネ、オオムギにおける無葉耳形質についての情報をもとに、倍数性コムギにおいて、さらなる分子遺伝学的研究を可能にするだろう。

第5項 要約

コムギにおける無葉耳形質は、個体の全ての葉身において葉耳と葉舌を欠損する。四倍性コムギにおいては、二つの優性遺伝子 (Lg_1 および Lg_3) が、葉耳の存在を決定し、両方の遺伝子型が劣性ホモ型であると無葉耳形質となる。 Lg_3 遺伝子の染色体座乗位置は 2A 染色体上にあると考えられているが、遺伝子型 $lg_1lg_1Lg_3Lg_3$ をもつ遺伝資源が得られていなかったため、明らかではなかった。本節では、準同質遺伝子系統 ANW 12E ($lg_1lg_1Lg_3Lg_3$) および ANW 12F ($Lg_1Lg_1lg_3lg_3$) を用い、葉耳を決定する 2 遺伝子のマッピングを試みた。 Lg_3 遺伝子は四倍性無葉耳コムギ PI 370751 と ANW 12E の F_2 において、2A 染色体長腕上の $Xgwm312$ から 18.6 cM 末端側に連鎖した。また、 Lg_1 遺伝子は PI 370751/ANW 12F の F_2 において、2B 染色体長腕上の $Xgwm47$ から 17.5 cM 末端側に連鎖した。四倍性コムギにおける葉耳を決定する 2 遺伝子は、トウモロコシ、イネ、オオムギ、ライムギ、ソルガムおよびタルホコムギと相同な遺伝子によって決定されている可能性がある。

Table V-1-1. Plant materials used in this study

Species (Chromosome number, Genome type)	Plant name	Ligule	Suggested genotype
<i>T. durum</i> (2n = 4x = 28, BBA ^u A ^u)	ANW 12E	<i>Present</i>	<i>lg₁lg₁Lg₃Lg₃</i>
	ANW 12F	<i>Present</i>	<i>Lg₁Lg₁lg₃lg₃</i>
	PI 370751 ^a	<i>Absent</i>	<i>lg₁lg₁lg₃lg₃</i>

Seeds were obtained from: ^a National Small Grain Collection (NSGC, Aberdeen, Idaho, USA)

Table V-1-2. Segregation of the ligule trait in two F₂ hybrids

Cross	Ligule		Total	χ^2 analysis ¹ (3:1)
	Present	Absent		
PI 370751/ANW 12E	164	43	207	1.973
PI 370751/ANW 12F	147	45	192	0.250

¹⁾ Value for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1)



Fig.V-1-1 The plant features of *T. durum* LD222, ANW 12E, ANW 12F and PI 370751 (a) at heading, and (b) at the seedling stage

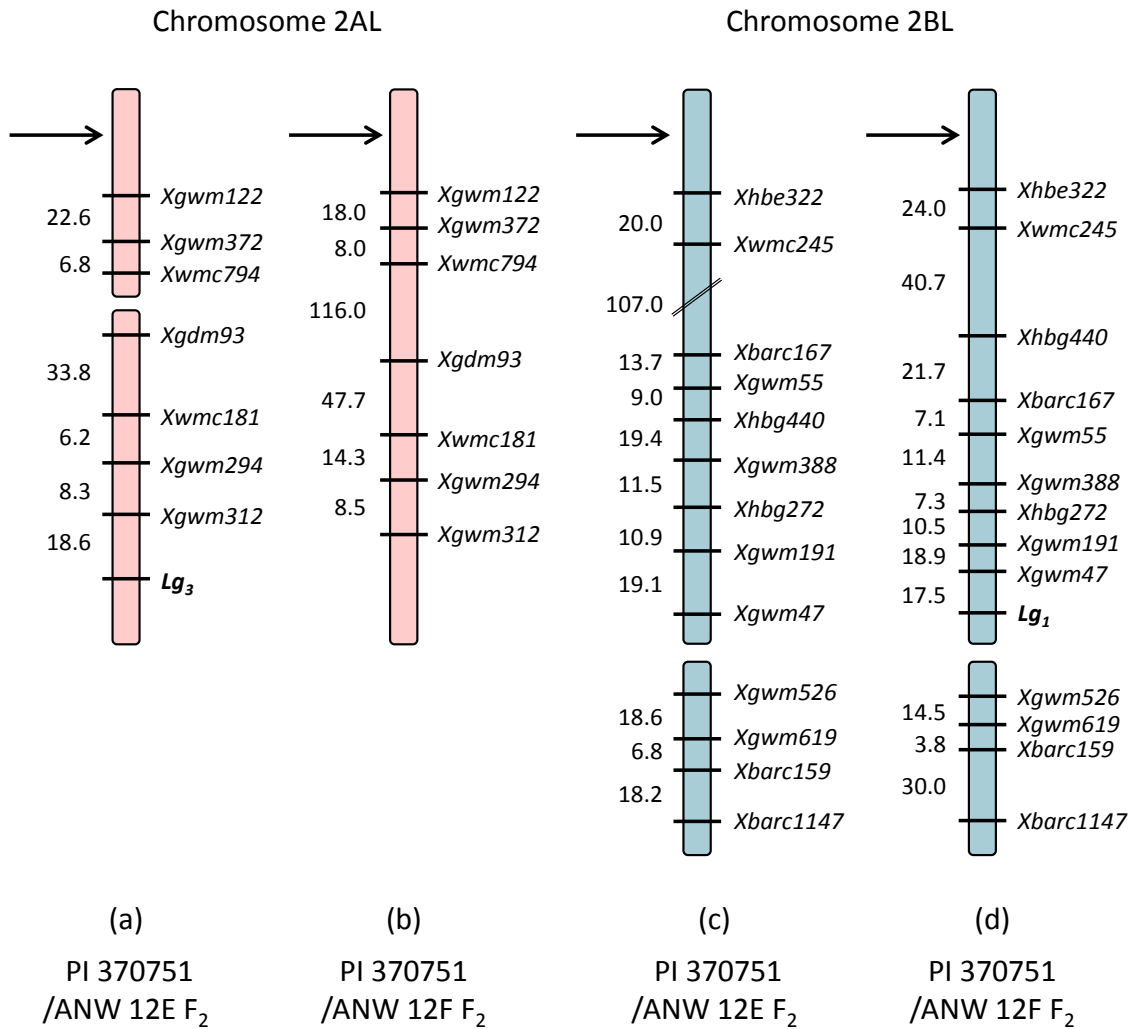


Fig.V-1-2 Linkage maps for *Lg₃* on chromosome arm 2AL (a, b) and *Lg₁* on chromosome arm 2BL (c, d).

Distances are shown in cM. Arrows indicate putative positions of centromeres

第2節 六倍性コムギにおける葉身の形成を阻害する

突然変異遺伝子のマッピング

Genetic mapping of the mutant gene conferring interrupted development of leaf blade in *Triticum aestivum* L.

第1項 緒言

作物において、土壌窒素 (Pang et al. 2014) やリン (Ryan et al. 2014) の摂取量が増えると作物栄養利用効率が向上し、雑草との生長競争にも有利となる。このためには、幼苗期においてより葉を大きくすることが重要であり、それが個体のバイオマスや葉面積の増加につながる (Coleman et al. 2001, Zhang L. et al. 2014). Zhogin et al. (1985) は *T. aestivum* の一品種 Polukarlikovaya 49 から葉が萎縮した突然変異体を作成した。この変異は、生育速度が第三葉期ごろから遅くなり、葉の形成が深刻に阻害され、それに伴い有効分げつ数、穂の長さや小穂数の減少、草丈の矮化などが生じる。植物は生長に伴って葉面積が拡大することが一般的であり、葉が萎縮すると生育維持や生長速度に深刻な問題を引き起こす。Mitrofanova (1994) はこの形質が単一の劣性遺伝子によって決定されていることを確認し、*rlb* (reduced leaf blade) と命名した。Koval (1997) は春コムギ *T. aestivum* N67 を遺伝的背景とする *rlb* 形質に関する準同質遺伝子系統 ANK-31 を育成した。*rlb* 遺伝子は葉身形成に関する負の決定因子であり、育種において有益ではないことから、これまで注目されてこなかった。しかし、葉身の形成の決定的な要因を明らかにするうえでは重要な遺伝子と考えるので、本節ではマイクロサテライトマーカーを用いて *rlb* 遺伝子をマッピングし、ANK-31 の利用の可能性を検討した。

第 2 項 材料と方法

植物材料

実験には六倍性コムギ *T. aestivum* CS および N67 の 2 系統および N67 を遺伝背景とした *rlb* 形質に関する準同質遺伝子系統 ANK-31 を用いた (Table V-2-1, Fig. V-2-1). ANK-31 の葉は *rlb* 遺伝子によって幼苗期から深刻な阻害を受ける一方で CS や N67 の葉は正常である. N67 および ANK-31 は故 S. F. Koval 博士 (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia) から分譲していただいた. ANK-31 は自殖によって種子を十分に採取することが困難であることから, 系統維持には正常個体と同程度の稔性をもつ雑種 ANK-31/N67 のヘテロ個体を用いた (遺伝子型: *Rlbrlb*). これらは全て N67 の遺伝的背景である. ヘテロ型個体は N67 と同程度の草丈となるが, 葉の縁に切れ込みが入り, 先端が巻く特徴があるので, ホモ型との判別が容易である (Fig. V-2-1e, f). 登熟期 (Zadoks scale: 92) (Zadoks et al. 1974) に ANK-31 と N67 の各 5 個体における草丈および節間長を測定した. ANK-31/N67 のヘテロ個体 (*Rlbrlb*) を胚のう親, CS (*RlbRlb*) を花粉親として交配し, 得られた F₁ 個体のうち, 葉の先端の巻き具合や葉の縁の切れ込みの有無の判定に基づいてヘテロ型の個体 (*Rlbrlb*) を選抜し自殖した. F₂ 世代を 2013 年から 2015 年にかけて 2 シーズンに茨城大学農学部の実験圃場で秋播き栽培した.

rlb 遺伝子の連鎖地図作製

ANK-31/CS F₂ の葉を幼苗期および出穂期の 2 度 (= 回) 観察・記録した. DNA は F₂ 世代の各個体および CS の葉身から抽出し, *rlb* 遺伝子のマッピングに用いた. 座乗位置が未知であったので, コムギの A, B および D ゲノムの全染色体腕に特異的なマイクロサテライトマーカーを用い, 連鎖地図を作製した. PCR 条件および PCR 産物の

電気泳動, 増幅した断片の検出方法は第 2 章の記述と同様である.

第 3 項 結果

ANK-31 の葉身の生長は幼苗から出穂まで阻害され, 出穂期にはまったく葉が残っていなかった (Fig. V-2-1g). 植物体は極端に小さく, 穂長の平均は N67 (12.1 cm) に対し ANK-31 (2.5 cm) は 20.7%, 出穂期における平均草丈は N67 (120.7 cm) に対し ANK-31 (43.7 cm) は 36.2%であった (Fig. V-2-2a, b). また, ANK-31 の各節間長は N67 に対し, 第一節間から第四節間まで順に 27.1%, 43.7%, 44.2%, 39.8%となり全節間長が短くなった (Fig. V-2-2b). 721 個体の ANK-31/CS F₂ の葉身の形態は, 559 正常:162 *rlb* の比に分離した. χ^2 検定の結果 3:1 の分離比に適合し ($\chi^2 = 2.464$, $df = 1$, $0.1 < p < 0.5$), *rlb* 形質が単一の劣性遺伝子に決定されていることを示した. したがって, コムギにおける A, B および D ゲノムの各染色体腕に特異的なマイクロサテライトマーカーを適用し, *rlb* 遺伝子との連鎖関係を調べた. その結果, 6D 染色体上の 5 マーカーが *rlb* 遺伝子と連鎖し, 連鎖関係は短腕末端側から *Xbarc54* – (15.5 cM) – *Xgwm133* – (3.0 cM) – *rlb* – (10.7 cM) – *Xgwm582* – (15.3 cM) – *Xbarc96* – (9.1 cM) – *Xbarc204* となった (Fig. V-2-2c).

第 4 項 考察

F₁ 雑種を低い温度 (8-15°C) で育成したとき *rlb* 変異体は劣性であり, 高い温度 (18-20°C) で育成したとき優性を示す (Zhogin et al. 1985, Zhogin 1995). このことはヘテロ型の発現が温度依存的であることを示す. 本節では冬季に圃場で育成し, F₁ は正常型であったので Zhogin et al. (1985, 1995) の結果と一致した. ANK-31/N67 および ANK-31/CS のヘテロ型は優性ホモ型や劣性ホモ型と区別することが容易である. *rlb* 遺伝子は植物個体の全生育過程において, 反復器官である葉身の形成を全て阻害

した。生育初期段階の葉身の生長はその後の植物体の形成に重要であり、葉面積は生育に伴って増加する。したがって、全ての葉が萎縮することは生育維持や生長速度に深刻な問題を引き起こす。その結果として *rlb* 変異体は草丈の矮性化も誘導し非常に極端な形態となる。Sethi and Bhateria (1977) はオオムギ (*Hordeum vulgare* L.) において完全な不稔性の“reduced leaf-blade”変異体を得、この遺伝子を *rlb* とした。オオムギの *rlb* 変異体は第二、第三葉期に葉鞘の暗緑色化やちぢれ、葉耳の白色化を示す。また、コムギの *rlb* 変異体と同様に葉身の萎縮や草丈、葉の長さ、幅、穂長、穂当たりの小穂数に顕著な減少を生じる。オオムギのこの変異体は不稔であるため途絶えたが、“葉身形成を阻害”する遺伝的要因がコムギやオオムギに存在することは分類学上非常に重要である。

本節では、コムギにおける *rlb* 遺伝子が 6D 染色体長腕上にあることを明らかにした。*rlb* 遺伝子は幼苗期から成熟期まで反復的に葉身を萎縮させる。その結果、草丈、穂長、穂当たりの小穂数が極端に減少する。ANK-31 は植物体の形態に深刻なダメージを与える葉身形成の負の決定因子を探るための有望なツールであり、稔実困難な *rlb* 変異体を維持するためには ANK-31/N67 の雑種のヘテロ個体を利用することができる。N67 と ANK-31 のアイソジーニック対系統を利用して *rlb* 遺伝子のシーケンスやクローニング、さらには発現解析によって葉身の形成の決定因子や、葉身の生育過程の遺伝子ネットワークの解析が展開できると期待される。

第5項 要約

葉身の生長は植物のライフサイクルにおける重要な制限要素の一つであり、生長初期段階での葉の伸長が植物の形成に多大な影響を与える。*T. aestivum* の *rlb* (reduction of leaf blade) 変異体は葉身形成に深刻な障害を引き起こし、有効分げつ数や小穂数の減少、穂の長さや草丈の縮小などをもたらす。ANK-31 (*T. aestivum* N67 を遺伝背景とした *rlb* の準同質遺伝子系統) と N67 の雑種のヘテロ個体には葉の縁に切れ込みが入るという特徴があり、正常個体と同程度の稔性があることから *rlb* 変異体の系統維持に用いた。

本節では葉身形成の負の決定因子を探るため、ANK-31 の利用の可能性を検討した。ANK-31 は正常な系統より登熟期に草丈は3分の1程度、穂の長さは5分の1程度となり、種子稔性は極めて低かった (一個体当たり 5~6 粒)。ANK-31/*T. aestivum* CS F₂ の葉身の形態は 559 正常: 162 *rlb* で 3:1 の比に分離したことから、*rlb* 形質は単一の劣性遺伝子により決定されていることが示された。マイクロサテライトマーカーを用いたマッピングの結果、*rlb* 遺伝子は 6D 染色体長腕上の *Xgwm133* と *Xgwm582* の間に座乗していた。

Table V-2-1. Plant materials used in this study

Species (Chromosome number, Genome type)	Plant name	Gene
<i>T. aestivum</i> (2n = 6x =42, BBA ^u A ^u DD)	Chinese Spring (CS)	-
	Novosibirskaya 67 (N67) ^a	-
	ANK-31 ^a	<i>rlb</i>

Seeds were obtained from: ^a Dr. S. F. Koval (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia)

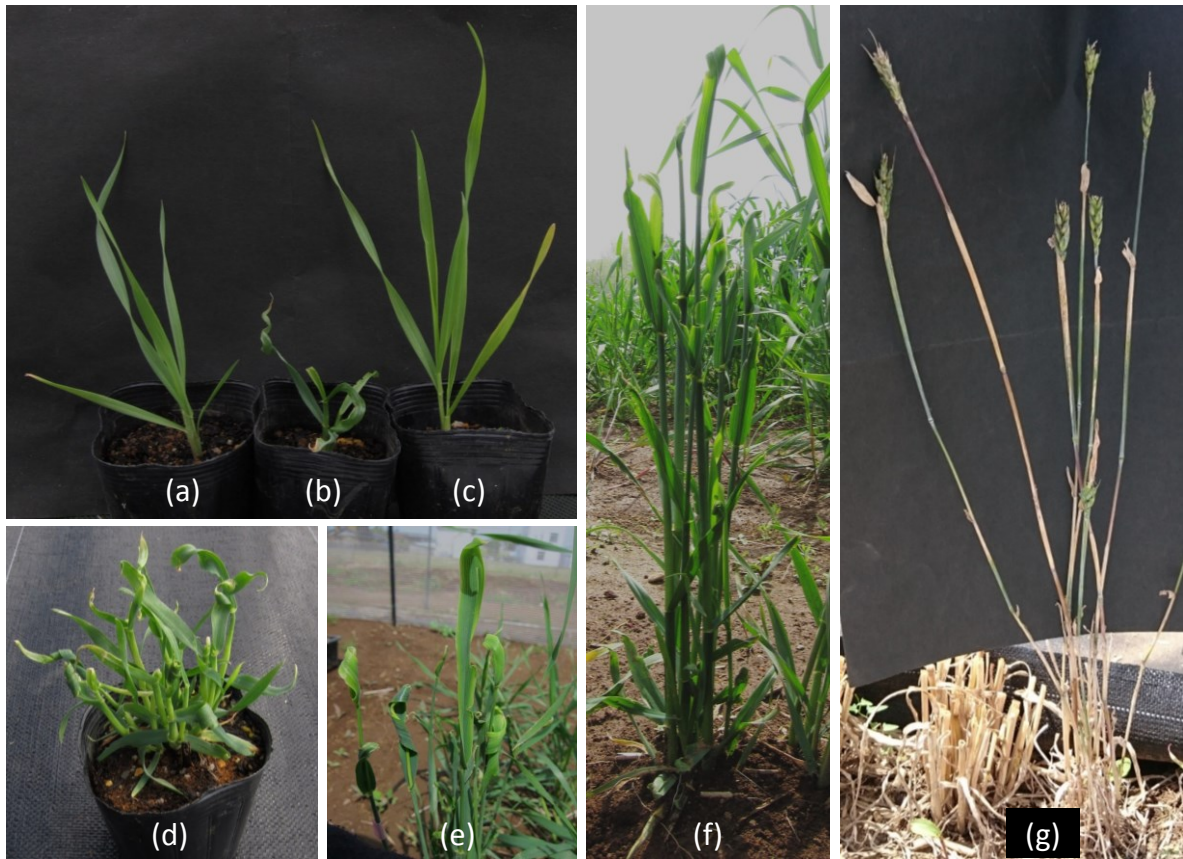


Fig. V -2-1. The plant features of (a) N67, (b) a homozygous recessive plant of the F₂ hybrid of ANK-31/CS, (c) CS and (d) ANK-31 at seedling stage, (e) a heterozygous ANK-31/N67 plant, some incisions on the leaf edge and are curled up the leaf tip, (f) the whole of plant of heterozygous ANK-31/N67 at booting stage and (g) a homozygous recessive plant at ripening stage

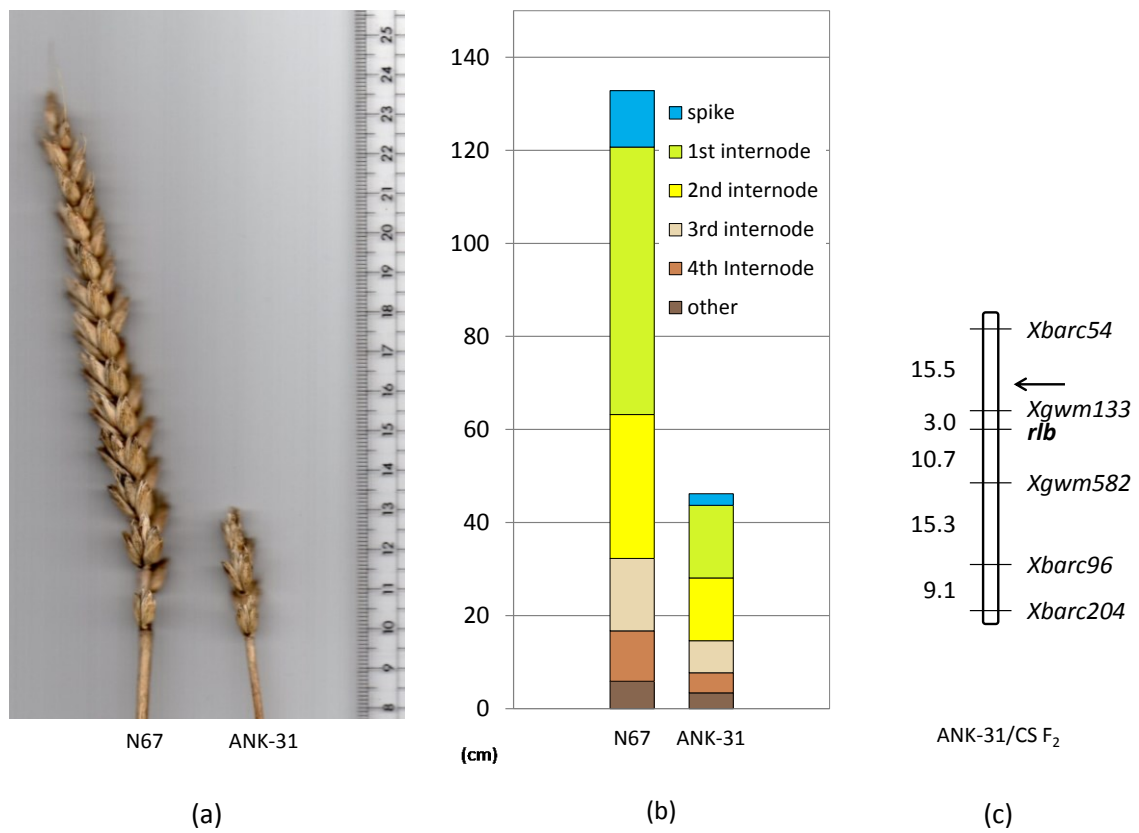


Fig.V-2-2. (a) The spike features of N67 and ANK-31, (b) the length of spike and internode of N67 and ANK-31at heading stage and (c) linkage map of *rlb* gene on chromosome arm 6DL.

Arrow in (c) linkage map indicates putative position of centromere. The unit of distance is cM

第 6 章

第 1 節 タルホコムギおよび合成コムギにおける突然変異に関する遺伝的解析

Genetic analysis on mutant in *Aegilops tauschii* and synthetic hexaploid wheat

第 1 項 緒言

コムギ祖先野生種であるタルホコムギは、コムギの新品種の開発において有用な遺伝資源である。タルホコムギにおいて葉身に蠟質の粉を帯びる帯白性変異体 (Glaucous mutant) はイランのアルボルズ山脈周辺で、京都大学カラコラム・ヒンズークシ学術探検隊 (KUSE: Kyoto University Scientific Expedition to Karakoram and Hindukush) によって採集された (Kihara et al. 1965). Dudnikov (2011) はタルホコムギの帯白性変異系統の自然生育地に関して考察し、Watanabe et al. (2005) は帯白性の抑制遺伝子 *Iw2* を 2D 染色体短腕上にマッピングした。

タルホコムギの穂軸は節で折れ、樽型の小穂を生じ、この特徴が和名の由来でもあるが、Metzger and Silbaugh (1968/1969) は KU2086 の穂軸が丈夫で折れにくいことを見出し、Watanabe et al. (2005) および Li and Gill (2006) はこの形質を決定する遺伝子 *Br^f* (Brittle rachis in *Ae. tauschii*) は 3D 染色体上にあるとした。

タルホコムギ系統 KU20-9 から農業研究センターの牧野徳彦博士によって、Triple Glume Mutant, Liguleless Mutant および Lazy Mutant を含むいくつかのガンマ線照射誘発における突然変異系統が育成された。Triple Glume Mutant は小穂において穂軸と反対側に小穂を覆うような三枚目の護穎を生じる triple glume 形質をもつ。コムギ属において、*T. jakubzineri* は 4 枚の護穎を生じ (Udachin and Shakhmedov 1976, 1977), この形質を決定する *exg* (extra glume) 遺伝子は 5A 染色体長腕上に座乗した (第 3 章第 2 節). Gowayed (2009) は小穂の片側に 1 枚多く護穎を生じる third glume 形質

が *T. turgidum* convar. *compositum* の 12 亜種, *T. vavilovii* の 2 亜種, *T. dicoccon* の 5 亜種, *T. durum* の 5 亜種, *T. polonicum* の 2 亜種に存在することを見出した. *Liguleless Mutant* は葉身と葉鞘の境界にある葉耳と葉舌が形成されず, その結果, 葉身は稈をくむように直立する. 一般に二倍性イネ科作物において一对の劣性遺伝子が無葉耳変異を決定している. イネ (*Oryza sativa* L.), オオムギ (*Hordeum vulgare* L.), トウモロコシ (*Zea mays* L.), ソルガム (*Sorghum bicolor* L.) およびミナトカモジグサ (*Brachypodium distachyon* L.) における無葉耳遺伝子については, すでに原因遺伝子が特定され, 高い相同性をもつ SQUAMOSA PROMOTER-BINDING protein (SBP) ドメインが存在し, 特にイネ (OsLG1), トウモロコシ (ZmLG1) およびソルガム (Sb06g31290) の SBP ドメインは完全に一致する (Moreno et al. 1997, Zwick et al. 1998, Rossini et al. 2006, Lee et al. 2007, Zhu et al. 2013). イネにおいて, 開いた穂 (穂軸と枝梗の角度が大きい) をもつ野生種から, 閉じた穂 (穂軸と枝梗の角度が小さい) をもつ栽培種への変化は, 成熟した種子を落ちにくくし, 開花の際に外から花粉を受け取ることがをさまたげ, 自殖率を高くすると考えられ, この穂の開閉度合には無葉耳遺伝子 *oslg1* が関わっている (Ishii et al. 2013, Zhu et al. 2013). *T. monococcum* の無葉耳形質も, 単一の劣性遺伝子によって決定されている (Multani et al. 1992). 六倍性コムギにおいては, McIntosh and Baker (1968) が 2B 染色体上の *Lg1* (*Liguleless1*) 遺伝子および 2D 染色体上の *Lg2* (*Liguleless2*) 遺伝子のいずれかが存在すると葉耳が形成されるとした. 四倍性コムギ (*T. durum*) の葉耳の存在は単一の遺伝子が決定していると考えられていた (Ausemus et al. 1946, Bagnara and Rossi 1972, Bagnara et al. 1972) が, 2B 染色体上の *Lg1* 遺伝子および 2A 染色体上の *Lg3* (*Liguleless3*) 遺伝子のいずれかが存在すると葉耳が形成される (Watanabe et al. 2004, 第 5 章第 1 節). *Lazy Mutant* は重力非感受性の変異体であると考えられるが, 詳しいことは明らかではない.

本節の目的はタルホコムギの *triple glume* および無葉耳形質を決定する遺伝子、および合成コムギによって 2D 染色体上の *Lg₂* 遺伝子をマッピングすることである。また、六倍性コムギ、タルホコムギおよび合成コムギの 2D 染色体において、オオムギの無葉耳遺伝子 *HvLG* と相同性の高い領域の塩基配列を比較し、遺伝子の特定を試みた。

第 2 項 材料と方法

植物材料

タルホコムギおよび合成コムギにおける突然変異形質の遺伝解析のため、6 系統のタルホコムギ (Triple Glume Mutant, Liguleless Mutant, G3489, KU2126, Lazy Mutant および KU20-9), 2 系統の六倍性コムギ (ANK-33 および N67) および 2 系統の四倍性コムギ (ANW 12A および LD222) を用いた (Table VI-1, Fig. VI-1, 2, 3). 本節で用いたタルホコムギおよび育成した合成コムギの表現型 (葉耳有り/無し, *triple glume* 有り/無し, 折れやすい穂軸/丈夫な穂軸, 帯白性/非帯白性) を Table VI-2 に示す。KU20-9 および帯白性変異系統 KU2126 の種子は河原太八博士 (Plant Germplasm Institute, Kyoto University) より分譲いただいた。丈夫な穂軸をもつ変異系統 G3489 は J. G. Waines 教授 (University of California, Riverside, California, USA) から、ANK-33 および N67 は故 S. F. Koval 博士 (Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia) (Koval 1997) から分譲された。

G3489 を胚のう親, Triple Glume Mutant を花粉親とした F₂, G3489 を胚のう親, Liguleless Mutant を花粉親とした F₂ および KU2126 を胚のう親, Liguleless Mutant を花粉親とした F₂ を育て, *triple glume* および無葉耳遺伝子の連鎖地図作製に用いた。帯白性形質は出穂期において葉身に蠟質の粉を帯びるか、また、穂軸の折れやすさは成熟後自然に小穂が落下するかどうかで判別した。

六倍性コムギにおける無葉耳準同質遺伝子系統 ANK-33 の遺伝子型評価のため、

ANK-33を胚のう親, 四倍性コムギにおける無葉耳準同質遺伝子系統 ANW 12A を花粉親とした F₂, ANK-33 を胚のう親, 正常型の LD222 を花粉親とした F₂, 正常型の N67を胚のう親, ANW 12A を花粉親とした F₂ および ANK-33 を胚のう親, N67 を花粉親とした F₂ を育て, 葉耳の有無を記録した.

合成コムギの育成

合成コムギの形態を確認するため, ANW 12A を胚のう親, G3489 を花粉親とした SynW-5, および ANW 12A を胚のう親, KU2126 を花粉親とした SynW-6 を得た. また, LD222 を胚のう親, Liguleless-G3489 を花粉親とした SynW-1 を得, さらに N67 を交配して合成コムギを育てた. Liguleless-G3489 は G3489 を遺伝背景とした Liguleless Mutant の準同質遺伝子系統である.

発芽した F₁ の染色体数を, 酢酸カーミン染色による押しつぶし法を用い, 21 対 (2n = 3x = 21, BAD) であることを確認した. 非還元配偶子を形成して稔性のあった個体から生じた F₂ 後代は, 自然に染色体倍加し合成六倍性コムギを生じる. これを確認するため, 発芽した F₂ の根端細胞の染色体数を再び酢酸カーミン染色による押しつぶし法で記録した.

合成コムギの育成を通し見出された2D染色体上の葉耳の形成に関わる遺伝子の連鎖地図作製のため, ANK-33を胚のう親, Syn-W5を花粉親としたF₂を育てた. 実験に用いた材料は茨城大学農学部の実験圃場において栽培した.

突然変異遺伝子の連鎖地図作製

G3489/Triple Glume Mutant F₂, KU2126/Liguleless Mutant F₂ および ANK-33/SynW-5 F₂, および両親系統の各幼苗の葉から DNA を抽出した. triple glume 遺伝子のマッピングには3D染色体, タルホコムギおよび六倍性コムギの葉耳の

形成に関わる遺伝子のマッピングには 2D 染色体に特異的なマイクロサテライトマーカーを用い, 連鎖地図を作製した. PCR 条件および PCR 産物の電気泳動, 増幅した断片の検出方法は第 2 章の記述と同様である.

推定無葉耳遺伝子領域の増幅

3 系統のタルホコムギ (Liguleless Mutant, G3489 および KU2126), 2 系統の六倍性コムギ (ANK-33 および N67) および 2 系統の合成コムギ (SynW-5 および SynW-6) の 2D 染色体上におけるオオムギの無葉耳遺伝子と相同な領域の配列を比較し, タルホコムギおよび六倍性コムギの葉耳の形成に関わる遺伝子の特定を試みた. なお, SynW-5 の 2D 染色体は G3489 の 2D 染色体と共通であり, SynW-6 の 2D 染色体は KU2126 の 2D 染色体と共通である.

それぞれの系統について第 2 章に示す方法によって DNA を抽出した. 無葉耳遺伝子の増幅は Simons et al. (2006) に準じて行った. “URGI” (<https://urgi.versailles.inra.fr/blast/blast.php>)(verified on 7 November) の blastn 検索を, オオムギの無葉耳遺伝子 *HvLG* (Rossini et al. 2006) (AM117950; <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=sequence;name=AM117950>) (verified on 31 October 2015) の塩基配列に対して実施した. *HvLG* の塩基配列は全長 2138 bp であり, 途中長めの SSR が存在するため遺伝子領域が 2 つのコンティグに分かれる. その前半領域 (1~576 bp) と 90% の相同性をもつ配列を, International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) が公開している *T. aestivum* CS の 2D 染色体長腕の配列データから得 (IWGSC_chr2DL_ab_k71_contigs_longerthan_200_9900868), “TaLG_CS_2DL” と命名した. 得られた全長 1971 bp の配列について primer 設計ソフト “Primer3” (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)(verified on 9 November 2015) を用い, 216 bp の

重なりをもつ *Fragment1* (973 bp) および *Fragment2* (760 bp) を増幅させる primer を作製した (Table VI-3).

PCR の反応液組成 (50 μ l) は, 1 \times Ammonium Buffer (Mg free) (Ampliqon), 2 mM MgCl₂ (Ampliqon), 200 μ M dNTP mix (Promega), 2.5 Unit *Taq* DNA polymerase (Ampliqon), 各 0.2 μ M primer (Forward および Reverse), 200 ng 核 DNA および滅菌水とした (Table VI-4). サーマルサイクラーGeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems) にセットし, Touch Down プログラムによって PCR を行った (Fig.VI-4). 増幅産物 50 μ l を 6 \times Loading Buffer Double Dye (ニッポンジーン) 10 μ l と混合し, TAE 緩衝液中の 1% アガロースゲルで電気泳動した (50V, 60 分間). 電気泳動装置はサブマリンゲル電気泳動装置 (Mupid-2plus, アドンバンス) を使用した. 泳動後のゲルをエチジウムブロマイド溶液に約 20 分間浸漬して染色し, 紫外線透過下で目的のバンドの位置を確認し切り出した.

無葉耳遺伝子の塩基配列の決定

PCR 産物を, FastGene[™] Gel/PCR Extraction kit でカラム精製し, Qubit[®] fluorometer (Invitrogen) で濃度を測定した. シーケンス反応には BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い, primer は無葉耳遺伝子の増幅時の primer を用いた. 反応液組成 (10 μ l) を 5 \times SEQ Buffer (1.8 μ l), Big Dye V3.1 (1.0 μ l), 1 μ M primer (1.6 μ l) および 150-300 ng 鋳型 DNA とし滅菌水で反応液全体が 10 μ l になるようにした (Table VI-5). 反応液を 0.2 ml 96 穴プレートに注入し, ボルテックスによって約 5 秒間攪拌した後, サーマルサイクラーGeneAmp[®] PCR System 2700 (Applied Biosystems) にセットし, サイクルシーケンス反応を行った (Fig.VI-5). シーケンス産物をエタノール沈殿により濃縮し, 得られた PCR 産物に Hi-Di Formamide (20 μ l) を加え, DNA シーケンサー3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い

2つの断片について塩基配列を決定した.

タルホコムギの Liguleless Mutant に見出された DNA 配列の 19 塩基の欠損を含む primer の作製, 増幅および連鎖地図作製

Liguleless Mutant の 2D 染色体において見出された DNA 配列の 19 塩基の欠損を含む 132 bp の領域を挟む primer (“lg2DL_WT_19del_2F”および“lg2DL_WT_19del_2R”) を, Primer3 を用い作製した (Table VI-6). この primer 対をマーカー (*Atlg2DL19del*) として用いタルホコムギの無葉耳遺伝子との連鎖関係を調べるため, KU2126/Liguleless Mutant F₂ において, 増幅産物の分子量の差から遺伝子型を判別し連鎖地図を作製した. また, G3489, KU2126, Liguleless Mutant, Triple Glume Mutant, Lazy Mutant および KU20-9 の各幼苗の葉から抽出した核 DNA において, 増幅産物の泳動パターンを調べた. PCR 条件および PCR 産物の電気泳動, 増幅した断片の検出方法は第 2 章の記述と同様である.

第 3 項 結果

triple glume および穂軸の折れやすさの遺伝および連鎖地図作製

G3489/Triple Glume Mutant F₁ には triple glume は見られなかったことから, triple glume は劣性形質である. この形質を決定する遺伝子を *trg* (triple glume) と命名した. F₂ における triple glume と穂軸の折れやすさの形質の分離はいずれも 3:1 の期待比に適合し (それぞれ $\chi^2 = 0.955$, $\chi^2 = 0.038$), 2 遺伝子の組換え価は 0.207 となった (Table VI-7). 穂軸の折れやすさの遺伝子 *Br¹* は 3D 染色体上に座乗することから (Watanabe et al. 2005, Li and Gill 2006), *trg* 遺伝子も同染色体上に座乗することが示唆された. したがって, 3D 染色体特異的なマーカーを用い, *trg* 遺伝子との連鎖関係を調べた. 12 個の多型のあったマイクロサテライトマーカーは, *Br¹* と *trg* 遺伝子が 3D

染色体長腕上に座乗することを示し、2 遺伝子周辺の連鎖関係は、動原体から長腕末端方向に *Xgwm191* – (16.7 cM) – *Br^l* – (7.9 cM) – *Xgwm645* – (15.7 cM) – *Xgwm383* – (16.4 cM) – *Xwmc656* – (8.6 cM) – *trg* – (36.1 cM) – *Xcfd211* であった (Fig.VI-6).

タルホコムギにおける無葉耳、穂軸の折れやすさおよび非帯白性の遺伝と連鎖地図作製

G3489/Liguleless Mutant F₁ および KU2126/Liguleless Mutant F₁ は葉耳が存在しなかったことから、タルホコムギにおける無葉耳は優性形質である。この形質を決定する遺伝子を *Lg^l* (Liguleless in *Ae. t*auschii) と命名した。G3489/Liguleless Mutant F₂ における無葉耳と穂軸の折れやすさの形質の分離はいずれも 3:1 の期待比に適合し (それぞれ $\chi^2 = 3.298$, $\chi^2 = 1.133$), 2 遺伝子は独立の関係にあった (Table VI-8).

KU2126/Liguleless Mutant F₂ において、無葉耳形質の分離比は 3:1 の期待値に適合した ($\chi^2 = 0.002$, $df = 1$) (Table VI-9). 一方、非帯白性形質の分離は、121 非帯白性:26 帯白性に分離し、3:1 の比に適合せず ($\chi^2 = 4.193$, $df = 1$), 帯白性の F₂ 個体数が期待値より少なかった。しかし、KU2126 のもつ帯白性形質は単一の優性遺伝子が決定していることは明らかである (Watanabe et al. 2005). 2 遺伝子の連鎖関係は、9:3:3:1 の分離比に適合し、2D 染色体短腕末端上に座乗する帯白性抑制遺伝子 *Iw2* と *Lg^l* 遺伝子は独立の関係にあった。しかし、六倍性および四倍性コムギにおいて、葉耳の存在を決定する遺伝子は第 2 同祖群染色体長腕上に座乗することから (McIntosh and Baker 1968, Watanabe et al. 2004), *Lg^l* は 2D 染色体長腕上に座乗する可能性があった。多型のあった 2D 染色体特異的な 18 個のマーカーを用い *Lg^l* および *Iw2* 遺伝子をマッピングした。*Lg^l* は 2D 染色体長腕末端上のマーカー *Xbarc159* と 9.3 cM の距離で連鎖し、*Iw2* 遺伝子は Watanabe et al. (2005) の結果と一致し、2D 染色体短腕末端上のマーカー *Xbarc124* と 13.0 cM の距離で連鎖した (Fig.VI-6).

合成コムギの形態

合成コムギ SynW-5 および SynW-6 はいずれも葉耳を形成した (Table VI-2, Fig.VI-3). 四倍性コムギでは Lg_1 および Lg_3 遺伝子がともに劣性ホモ型になるとき無葉耳となることから, SynW-5 および SynW-6 の遺伝子型は A, B ゲノムは ANW 12A に由来し遺伝子型は $lg_1lg_1lg_3lg_3$ であり, D ゲノムは葉耳の有るタルホコムギに由来するため遺伝子型は Lg_2Lg_2 であると考えられた. 一方, SynW-1 は無葉耳であり, この特性は Liguleless Mutant のもつ優性の無葉耳遺伝子 Lg^l に由来することが示唆された (Table VI-2, Fig.VI-3c, d). また, SynW-6 は帯白性であり, KU2126 のもつ劣性の帯白性抑制遺伝子 $iw2$ に由来すると考えられた (Table VI-2). SynW-1, SynW-5 および SynW-6 の穂軸はいずれも丈夫だった. SynW-1 の丈夫な穂軸は Liguleless-G3489, SynW-5 の丈夫な穂軸は G3489 のもつ br^l 遺伝子に由来すると考えられた. しかし, SynW-6 の D ゲノムは穂軸の折れやすい KU2126 に由来するが穂軸は丈夫だった (Table VI-2).

六倍性コムギにおいて葉耳の存在を決定する遺伝子の遺伝および連鎖地図作製

ANK-33/ANW 12A の F_2 は 283 個体全て無葉耳であった (Table VI-10). 一方, ANK-33/LD222 の F_2 において葉耳の有無は, 245 有り:71 無しに分離し 3:1 の比に適合した ($\chi^2 = 1.080$, $df = 1$). また, N67/ANW 12A の F_2 において葉耳の有無は, 385 有り:19 無しに分離し 15:1 の比に適合した ($\chi^2 = 1.650$, $df = 1$). ANK-33/N67 の F_2 においても 455 葉耳有り:36 葉耳無しに分離し 15:1 の比に適合した ($\chi^2 = 0.981$, $df = 1$). これらの結果は ANK-33 の遺伝子型が $lg_1lg_1lg_2lg_2lg_3lg_3$ であることを示した (Table VI-11).

ANK-33/SynW-5 の F_2 は 141 葉耳有り:51 葉耳無しに分離し 3:1 の比に適合した (χ^2

= 0.250, df = 1) (Table VI-10). 2D 染色体に特異的なマーカーを用い, Lg_2 遺伝子との連鎖関係を調べた. 18 個の多型のあったマイクロサテライトマーカーは, Lg_2 遺伝子が 2D 染色体長腕上に座乗することを示した. Lg_2 遺伝子は 2D 染色体長腕上のマーカー $Xbarc228$ および $Xgdm6$ の間に, それぞれ 21.4 cM, 13.0 cM の距離で連鎖した (Fig.VI-6).

2D 染色体における無葉耳遺伝子の塩基配列

オオムギの無葉耳遺伝子 ($HvLG$) と相同なコムギの 2D 染色体長腕上の塩基配列と, 3 系統のタルホコムギ (Liguleless Mutant, G3489 および KU2126), 2 系統の六倍性コムギ (ANK-33 および N67), 2 系統の合成コムギ (SynW-5 および SynW-6) の配列を比較した. 遺伝子型 Lg^lLg^l をもつ Liguleless Mutant と lg^l/lg^l をもつその他の系統における配列の違い, あるいは遺伝子型 lg_2lg_2 をもつ ANK-33 と Lg_2Lg_2 をもつその他の系統における配列の違いを比較することで, 無葉耳遺伝子に特異的な配列の変異が明らかになると考えられた (Table VI-11).

$HvLG$ と相同なコムギの塩基配列 1971 bp において配列決定した 1519 bp を基準配列 (Ta2DL_ $HvLG$) とした. Liguleless Mutant 固有の変異は 3 箇所あり, 32 番目の塩基が A から C へ, 600 番目から 618 番目の 19 塩基 (GGCTCTCCGTTGTGTGATC) が欠損し, 772 番目の塩基が C から A へ変異し, 配列の長さは 1500 bp であった. G3489 および SynW-5 固有の変異は 13 箇所あり, 44 番目の塩基が C から G へ, 309 番目の塩基が C から T へ, 482 番目の塩基が C から T へ, 487 番目から 498 番目の 12 塩基 (GTAATACAAAAT) が欠損し, 506 番目の塩基が G から A へ, 508 番目の塩基が T から C へ, 592 番目の塩基が T から C へ, 806 番目の塩基が A から G へ, 891 番目の塩基が C から G へ, 929 番目の塩基が C から G へ, 965 番目の塩基が C から T へ, 978 番目から 988 番目の 11 塩基 (ACAGTGAAAGA) が欠損し, 1083 番

目の塩基がTからCへ、1206番目に1塩基 (T) の挿入があり、配列の長さは1497 bpであった。KU2126 および SynW-6, および 2 系統の六倍性コムギ, ANK-33 および N67 は基準配列と一致した (Fig.VI-7)。

Liguleless Mutant は Triple Glume Mutant および Lazy Mutant とともに, KU20-9 から人為誘発突然変異系統であるので, これらの系統における 19 塩基の欠損の有無を確認することによって, Lg^l 遺伝子の変異であるか明確にできると考えられた。その結果, 対照の G3489 および KU2126 と比較すると, KU20-9, Triple Glume Mutant および Lazy Mutant は Liguleless Mutant と同じ位置にバンドを示した (Fig.VI-8)。したがって, 19 塩基の欠損は野生型 KU20-9 にもともと存在していた欠損であったと考えられる。この結果から, Liguleless Mutant に見られる 19 塩基の欠損は, 無葉耳変異とは関連しないと考えられた。一方, 19 塩基の欠損は 2A 染色体上の Lg_1 遺伝子や 2B 染色体上の Lg_3 遺伝子と同祖の Lg_2 遺伝子座の位置を示すと考えられた。現在, 劣性無葉耳遺伝子 lg_2 をもつタルホコムギの突然変異系統は得られていないので, 葉耳の存否と 2D 染色体上のマーカーの分離から lg_2 遺伝子の位置を決定できない。19 塩基の欠損は 2D 染色体上の Lg_2 遺伝子診断マーカーとなりうるので, 19 塩基の欠損を含む領域 (132 bp) を挟む primer を作製した (Table VI-6)。2D 染色体上のマーカーとの連鎖関係を調べるため, 作製した primer 対をマーカー *Atlg2DL19del* として用い, KU2126/Liguleless Mutant F₂ においてマッピングを試みたところ, *Atlg2DL19del* は 2D 染色体長腕上のマーカー *Xgdm6* と *Xgwm311* との間に存在し, *Xgdm6* との距離は 11.3 cM であった (Fig.VI-6)。

第 4 項 考察

本節において, タルホコムギにおける二つの人為誘発突然変異遺伝子, および合成コムギの 2D 染色体長腕上の葉耳の形成に関わる遺伝子 Lg_2 をマッピングした。

タルホコムギの triple glume 形質を決定する *trg* 遺伝子は穂軸の折れやすさを決定する *Br'* 遺伝子と共に 3D 染色体長腕上に座乗した (Fig.VI-6). *Br'* 遺伝子は長腕上の動原体周辺領域のマーカールと連鎖し, 短腕上に座乗するとした Watanabe et al. (2005) の結果とは異なった. 座乗位置を明確にするには, 組換え頻度の少ない領域のマッピングにも有効とされる放射線雑種 (RH: radiation hybrids) マッピングを利用することが一つの方法であろう. Kumar et al. (2012) は γ 線照射した合成コムギと四倍性コムギの交雑後代を用い RH パネルを作製し, タルホコムギ由来の全 D ゲノム染色体のマッピングを行った. マッピング解像度は 140 kb 以下と推定された.

四倍性コムギにおける葉耳の存在は, 2A 染色体上の *Lg₃* 遺伝子および 2B 染色体上の *Lg₁* 遺伝子によって決定されている (Watanabe et al. 2004). 一方, 六倍性コムギにおける葉耳の存在は, 2A 染色体上の *Lg₃* 遺伝子, 2B 染色体上の *Lg₁* 遺伝子および 2D 染色体上の *Lg₂* 遺伝子によって決定されていた. 四倍性コムギの無葉耳準同質遺伝子系統 ANW 12A と葉耳のあるタルホコムギの交配から育成した合成コムギ SynW-5 (ANW 12A/G3489) および SynW-6 (ANW 12A/KU2126) には葉耳が存在した. この結果は, 六倍性コムギの無葉耳形質は, 2A 染色体上の *Lg₃*, 2B 染色体上の *Lg₁* および 2D 染色体上の *Lg₂* 遺伝子がすべて劣性ホモ型であることを示唆した. したがって, Syn-W5 および Syn-W6 の遺伝子型は *lg₁lg₁Lg₂Lg₂lg₃lg₃* であり, 六倍性の無葉耳準同質遺伝子系統 ANK-33 は *lg₁lg₁lg₂lg₂lg₃lg₃* であると考えられた (Table VI-11). ANK-33/SynW-5 F₂ を用いたマッピングの結果, *Lg₂* 遺伝子は 2D 染色体長腕上に存在した (Fig.VI-6). 四倍性コムギの無葉耳遺伝子 *Lg₁* および *Lg₃* 遺伝子はそれぞれ 2B 染色体および 2A 染色体上の長腕領域に存在することから (第 5 章第 1 節), *Lg₂* 遺伝子は同祖遺伝子であると考えられる.

葉耳の有無を決定するタルホコムギの *Lg'/lg'* 遺伝子および六倍性コムギの *Lg₂/lg₂* 遺伝子はいずれも 2D 染色体長腕上に位置づけられた (Fig.VI-6). しかし, *Lg₂* 遺伝

子に連鎖した二つのマーカー (*Xbarc228* および *Xgdm6*) は *Lg'* 遺伝子と連鎖しなかった. “Wheat Génoplante SSR Mapping Data Release” (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical/> 2004) (verified on 19 October 2015) によると, *Lg₂* 遺伝子の動原体側に連鎖した *Xbarc228* は C-2DL3-0.49 の領域にあり, *Lg'* 遺伝子と連鎖した *Xgdm6* は 2DL9-0.76-1.00 の領域に存在する. したがって, *Lg₂* および *Lg'* は異なる遺伝子座に存在する.

Lg' 遺伝子には 2D 染色体上のマーカー *Xbarc159* が連鎖した (Fig.VI-6). USDA の “GrainGene” (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>) (verified on 18 October 2015) に掲載されている情報によると, *Xbarc159* は 2D 染色体長腕末端に特異的なマーカーである. *Liguleless Mutant* は KU20-9 の人為誘発突然変異であるから, *Xbarc159* の部位に相互転座が生じたことも考えられる. 二倍性種トウモロコシの無葉耳変異には, 劣性遺伝子 (*lg1* および *lg2*) および優性遺伝子 (*Lg3* および *Lg4*) が決定している 4 つの型があり, 第 2 染色体短腕上の *lg1* 遺伝子は SBP ドメイン転写因子をコードし (Moreno et al. 1997), 第 3 染色体長腕上の *lg2* 遺伝子は Basic-Leucine Zipper (bZIP) 転写因子をコードする (Walsh et al. 1998). また, 第 3 染色体短腕上の *Lg3* 遺伝子および第 8 染色体長腕上の *Lg4* 遺伝子はクラス I KNOTTED1 様ホメオボックス (KNOX) 転写因子をコードする (Kerstetter et al. 1994, Muehlbauer et al. 1999, Bauer et al. 2004). 二倍性種タルホコムギの無葉耳性にも, 優性 *Lg'* 遺伝子が存在し, 劣性 *lg₂* 遺伝子の位置も推定できたことから, 葉耳の形成には多様な変異が存在する可能性がある. コムギの 2D 染色体上において, オオムギ *HvLG* と相同性の高い *Liguleless Mutant* の領域には, 19 塩基の DNA 配列の欠損があり, この欠損は *Lg'* 遺伝子による無葉耳形質とは関連しなかった (Fig.VI-8). 19 塩基の欠損を含むマーカー (*Atlg2DL19del*) と *Lg₂* 遺伝子それぞれに最も近く連鎖したマーカー (*Xgdm6*) が共通したことから, 作製したマーカーが *Lg₂* 遺伝子の位置を特定するマーカーの一つ

であることが確認できた (Fig.VI-6). 一方, lg_2 遺伝子をもつ ANK-33 に特異的な変異は見つからなかった (Fig.VI-7).

本節で塩基配列を決定した 1519 bp の領域の周辺には *T. aestivum squamosa promoter-binding-like protein 8 (SPL8)* mRNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF447883.1>) (verified on 5 November 2015) をコードする領域がある (Zhang et al. 2014). イネ (*OsLGI*), オオムギ (*HvLGI*), トウモロコシ (*ZmLGI*), ソルガム (*Sb06g31290*) およびミナトカモジグサ (*BdSPL8*) の無葉耳遺伝子がコードする SBP ドメインは互いに高い相同性をもつことから (Moreno et al. 1997, Zwick et al. 1998, Rossini et al. 2006, Lee et al. 2007, Zhu et al. 2013), この領域に Lg_2 遺伝子の原因となる変異が存在する可能性がある. 合成コムギ SynW-1 と六倍性コムギ N67 との F_1 は無葉耳であったことから, タルホコムギの優性無葉耳遺伝子 Lg^f を六倍性コムギに導入可能であり, Lg^f 遺伝子と Lg_2 遺伝子の比較研究が効率的に実施できると期待される.

第5項 要約

パンコムギのDゲノム供与種であるタルホコムギ (*Ae. tauschii*, $2n = 2x = 14$, DD) において、小穂に過剰な護穎を一枚生じる Triple Glume Mutant および葉耳が形成されない Liguleless Mutant が人為誘発処理によって育成された。G3489 (Tough Rachis Mutant)/Triple Glume Mutant の F₂ において、*trg* (triple glume) 遺伝子は 3D 染色体長腕上のマーカー *Xwmc656* の末端側に連鎖した (8.6 cM)。また、KU2126 (Glaucous Mutant)/Liguleless Mutant の F₂ において優性の無葉耳遺伝子 *Lg*^l (Liguleless in *Ae. tauschii*) は 2D 染色体長腕上のマーカー *Xbarc159* と連鎖した (9.3 cM)。

四倍性の無葉耳準同質遺伝子系統 ANW 12A と葉耳の有るタルホコムギを交雑し、育成した合成コムギ (*XAegilotriticum* P. Fourm) (SynW-5 および SynW-6) は葉耳を形成したことから、タルホコムギの 2D 染色体上に *Lg*₂ (Liguleless 2) 遺伝子が存在すると考えられた。六倍性の無葉耳準同質遺伝子系統 ANK-33 と SynW-5 の F₂ を用いマッピングした結果、*Lg*₂ 遺伝子は 2D 染色体長腕上のマーカー *Xbarc228* および *Xgdm6* の間に、それぞれ 21.4 cM, 13.0 cM の距離で連鎖した。

タルホコムギの突然変異系統および六倍性コムギの 2D 染色体長腕上において、オムギの無葉耳遺伝子 (*HvLG*) と相同な領域の配列を比較し、*Lg*^l および *Lg*₂ の特定を試みた。Liguleless Mutant に存在する 19 塩基の欠損は *Lg*^l 遺伝子に特異的な欠損ではなく、野生型に存在していた欠損であった。

Table VI-1. Plant materials used in this study

Species (Chromosome number, Genome type)	Plant name	Gene (chromosome)
<i>Ae. tauschii</i> (2n = 2x = 14, DD)	Triple Glume Mutant	<i>trg</i>
	Liguleless Mutant	<i>Lg^l</i>
	G3489 ^a	<i>br^l</i> (3D)
	KU2126 ^b	<i>iw2</i> (2D)
	Lazy Mutant	?
	KU20-9 ^b	-
<i>T. aestivum</i> (2n = 6x =42, BBA ^u A ^u DD)	ANK-33 ^c	<i>lg₃</i> (2A), <i>lg₁</i> (2B), <i>lg₂</i> (2D)
	Novosibirskaya 67 (N67) ^c	-
<i>T. durum</i> (2n = 4x =28, BBA ^u A ^u)	ANW 12A	<i>lg₃</i> (2A), <i>lg₁</i> (2B)
	LD222	-

Seeds were obtained from: ^a Prof. J.G. Waines (University of California, Riverside, California, USA), ^b Dr. T. Kawahara (Plant Germplasm Institute, Kyoto University), ^c Dr. S. F. Koval (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia)

Table VI-2. Phenotypes of *Ae. tauschii* and synthetic hexaploid wheat lines

Combination	Phenotype			
	Ligule	Triple glume	Rachis	Glauousness
Triple Glume Mutant	Present	Present	Brittle	Non-glaucous
Liguleless Mutant	Absent	Absent	Brittle	Non-glaucous
G3489	Present	Absent	Tough	Non-glaucous
KU2126	Present	Absent	Brittle	Glaucous
Lazy Mutant	Present	Absent	Brittle	Non-glaucous
KU20-9	Present	Absent	Brittle	Non-glaucous
SynW-5 (ANW 12A/G3489)	Present	Absent	Tough	Non-glaucous
SynW-6 (ANW 12A/KU2126)	Present	Absent	Tough	Glaucous
SynW-1 (LD222/Liguleless-G3489)	Absent	Absent	Tough	Non-glaucous
SynW-1/N67 F ₁	Absent	Absent	Tough	Non-glaucous

Table VI-3. The sequences of primers used for comparison between sequences of the liguleless gene on chromosome arm 2DL

	Primer	Sequence	Product size
<i>Fragment1</i>	lg2DL_1F	AGAGAGATGCTTGCGACTGC	973 bp
	lg2DL_1R	TCCCTCAATAGATTCCGAAGG	
<i>Fragment2</i>	lg2DL_4F	GCTATGCAGAGGCCAAGTGT	760 bp
	lg2DL_4R	CTGATCGACCGATTCGCTAT	

Table VI-4. Components of PCR reaction mixture

Component	Vol./reaction	Final Conc.
Distilled Water	32.75 μ l	---
10 \times Ammonium Buffer (Mg free)	5.0 μ l	1 \times
25 mM MgCl ₂	4.0 μ l	2 mM
10 mM dNTP mix	1.0 μ l	200 μ M
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.25 μ l	2.5 Unit
Primer mix (20 μ M)	2.0 μ l	0.4 μ M
Genome DNA	5.0 μ l	200 ng
	50.0 μ l	---

Table VI-5. Components of cycle sequencing reaction

Component	Vol./reaction	Final Conc.
5 \times SEQ Buffer	1.8 μ l	
Big Dye V3.1	1.0 μ l	
1 μ M Primer	1.6 μ l	
Genome DNA	5.6 μ l	15~30 ng
Distilled Water		
	10.0 μ l	

Table VI-6. The sequences of primers used for verifying 19 bp deletion on chromosome arm 2DL in Liguleless Mutant

Primer	Sequence	Product size
lg2DL_WT_19del_2F	GATGAATCTTGCTTTCCACA	132 bp
lg2DL_WT_19del_2R	AAGATGCACACAGCCAACAC	

Table VI-7. Joint segregation of triple glume and tough rachis in an F₂ population of *Ae. tauschii* G3489/Triple Glume Mutant

Rachis	Glume		χ^2 analysis	
	Normal	Triple	Ratio	Value ¹
Brittle	166	68	Dihybrid (9:3:3:1)	21.717*(df = 3)
			Glume (3:1)	0.955
Tough	77	3	Rachis (3:1)	0.038
			Linkage χ^2	20.723*

Recombination: 0.207 \pm 0.054, 22.0 \pm 5.9 cM

¹Values for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1) and 7.81 (df = 3)

*Significant at P = 0.05

Table VI-8. Joint segregation of ligules and tough rachis in an F₂ population of *Ae. tauschii* G3489/ Liguleless Mutant

Rachis	Ligule		χ^2 analysis	
	Absent	Present	Ratio	Value ¹
Brittle	58	10	Dihybrid (9:3:3:1)	5.248 (df = 3)
			Ligule (3:1)	3.298
Tough	13	4	Rachis (3:1)	1.133
			Linkage χ^2	0.817

¹Values for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1) and 7.81 (df = 3)

Table VI-9. Joint segregation of ligules and non-glaucousness in an F₂ population of *Ae. tauschii* KU2126/Liguleless Mutant

Non-glaucousness	Ligule		χ^2 analysis	
	Absent	Present	Ratio	Value ¹
Non-glaucous	92	29	Dihybrid (9:3:3:1)	4.595 (df=3)
			Ligule (3:1)	0.002
Glaucous	18	8	Non-glaucousness (3:1)	4.193*
			Linkage χ^2	0.400

¹Values for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1) and 7.81 (df = 3)

*Significant at P = 0.05

Table VI-10. Segregation of ligules in F₂ populations of three pentaploid and two hexaploid hybrids

Cross	Ligule in F ₁	Ligule		χ^2 analysis ¹	
		Present	Absent	(3:1)	(15:1)
Pentaploid					
ANK-33/ANW 12A F ₂	Absent	0	283	-	-
ANK-33/LD222 F ₂	Present	245	71	1.080	141.857*
N67/ANW 12A F ₂	Present	385	19	88.766*	1.650
Hexaploid					
ANK-33/N67 F ₂	Present	455	36	81.744*	0.981
ANK-33/SynW-5 F ₂	Present	141	51	0.250	135.200*

¹Value for significance at P = 0.05; 3.84 (df = 1) *Significant at P = 0.05

Table VI-11. Plant materials used for sequence comparison

Plant name	Supposed genotype for polyploid wheat			Supposed genotype for <i>Ae. tauschii</i>	Phenotype
	2A	2B	2D	2D	Ligule
<i>Ae. tauschii</i>					
Liguleless Mutant	-	-	Lg_2Lg_2	Lg^1Lg^1	Absent
G3489	-	-	Lg_2Lg_2	lg^1lg^1	Present
KU2126	-	-	Lg_2Lg_2	lg^1lg^1	Present
<i>XAegilotriticum</i>					
SynW-5 (ANW 12A/G3489)	lg_3lg_3	lg_1lg_1	Lg_2Lg_2	lg^1lg^1	Present
SynW-6 (ANW 12A/KU2126)	lg_3lg_3	lg_1lg_1	Lg_2Lg_2	lg^1lg^1	Present
SynW-1 (LD222/Liguleless-G3489)	lg_3lg_3	Lg_1Lg_1	Lg_2Lg_2	Lg^1Lg^1	Absent
SynW-1/N67 F ₁	Lg_3-	Lg_1Lg_1	Lg_2- (?)	Lg^1Lg^1	Absent
<i>T. durum</i>					
ANW 12A	lg_3lg_3	lg_1lg_1	-	-	Absent
LD222	lg_3lg_3	Lg_1Lg_1	-	-	Present
<i>T. aestivum</i>					
ANK-33	lg_3lg_3	lg_1lg_1	lg_2lg_2	lg^1lg^1	Absent
Novosibirskaya 67 (N67)	Lg_3Lg_3	Lg_1Lg_1	?	lg^1lg^1	Present

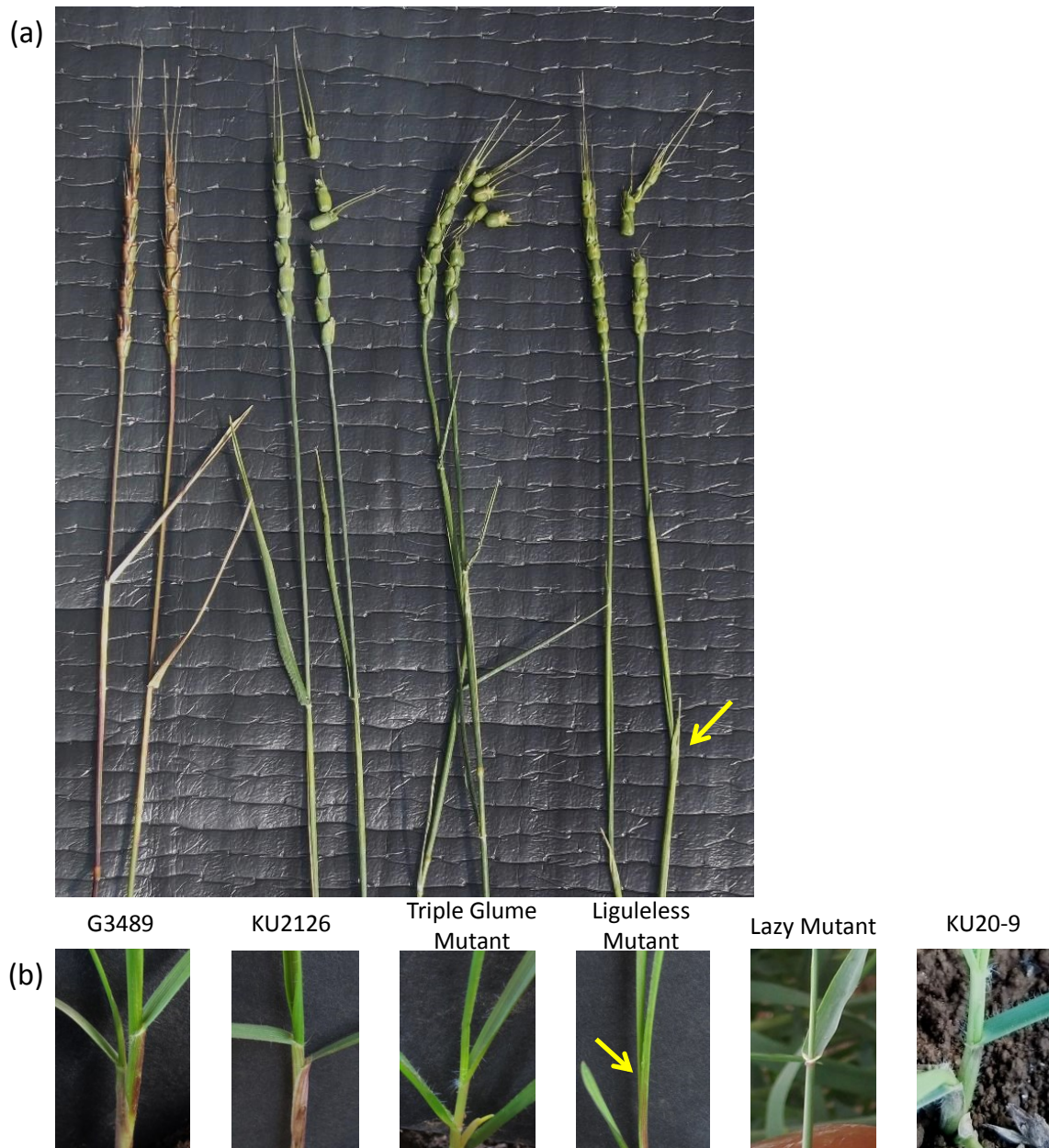


Fig.VI-1. Phenotypes of *Ae. tauschii* G3489, KU2126, Triple Glume Mutant and Liguleless Mutant at heading (a) and their ligular regions at seedling, Lazy Mutant at booting and KU20-9 at seedling (b).

Arrows point to missing ligule regions

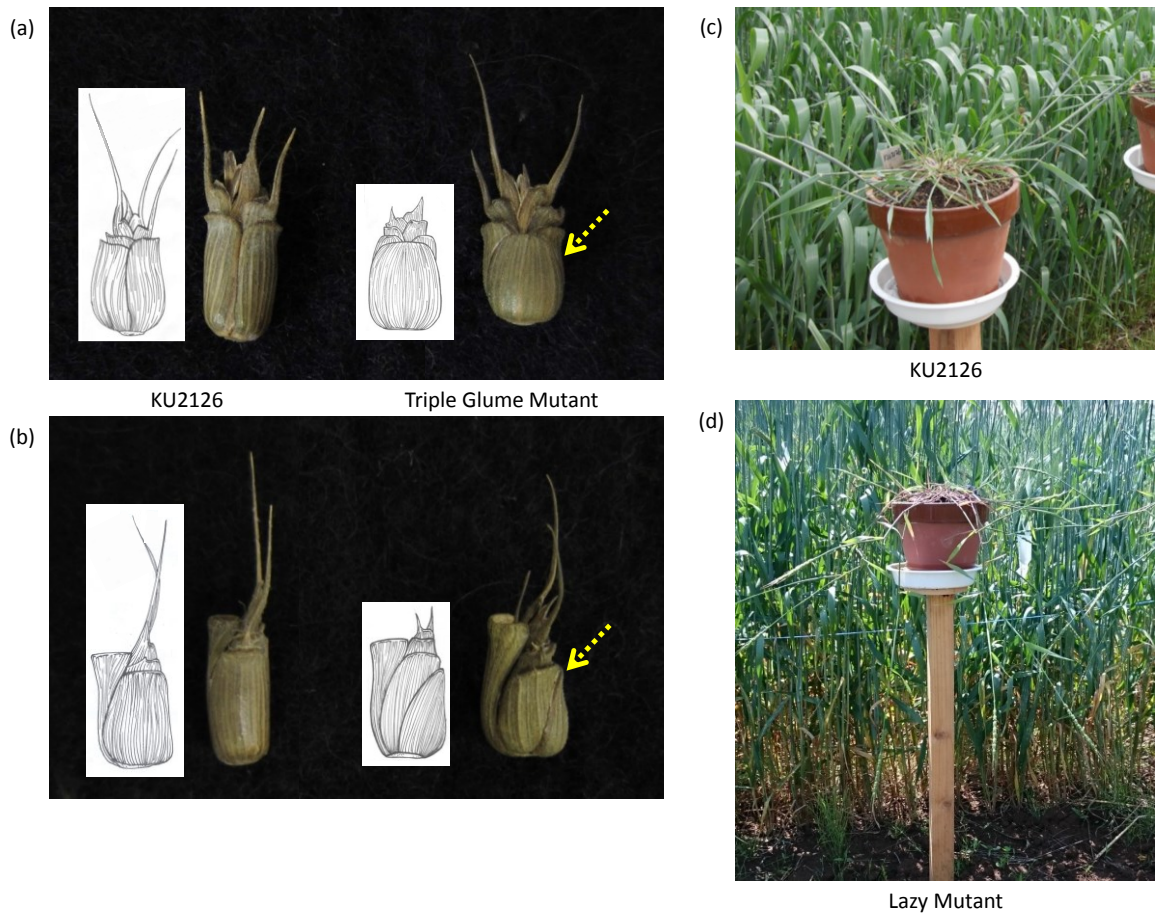


Fig.VI-2. The features of front (a) and side (b) views of spikelets of KU2126 and Triple Glume Mutant.

Dotted lines indicate the presence of extra glume covering the spikelet in Triple Glume Mutant. The plant features of KU2126 (c) and Lazy Mutant at booting stage (d)

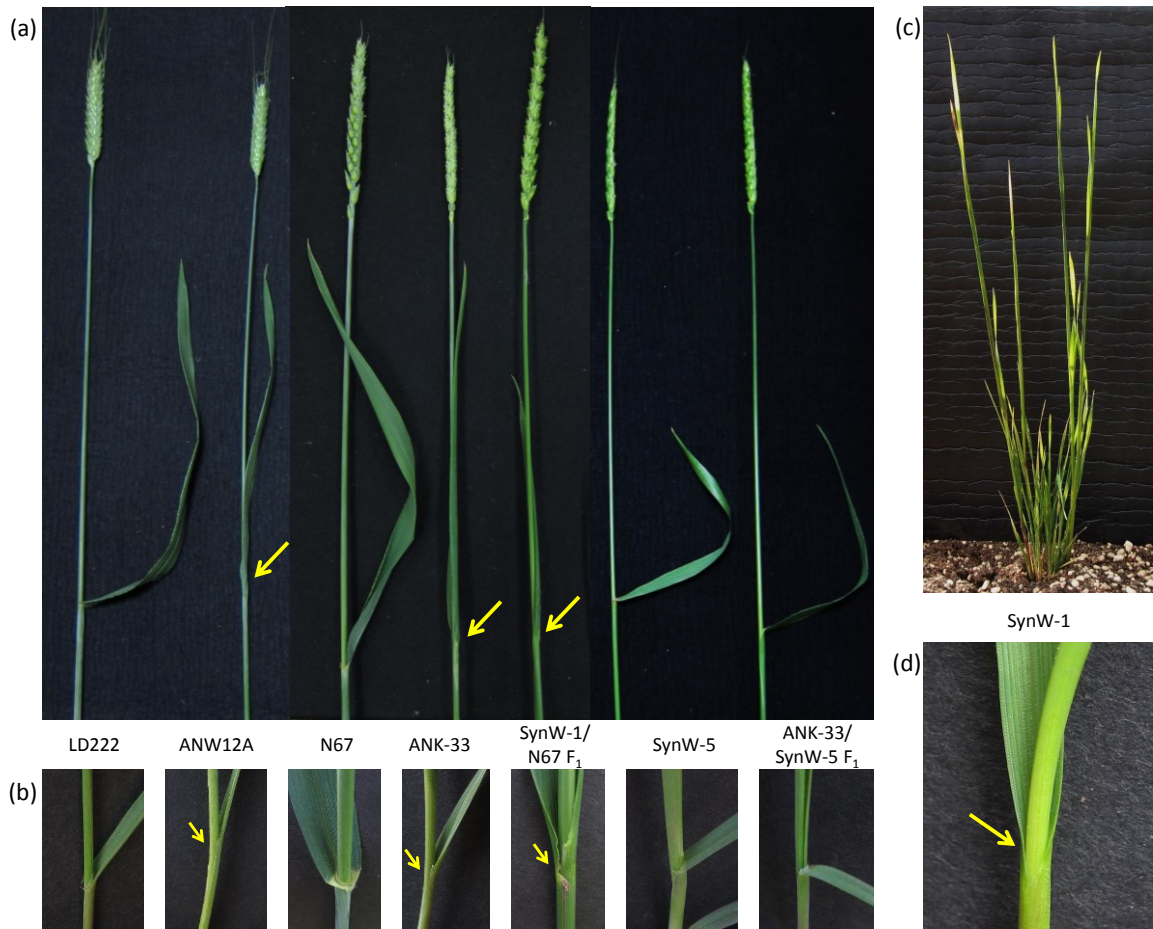


Fig.VI-3. Phenotypes of *T. durum* LD222, ANW 12A, *T. aestivum* N67, ANK-33, F₁ of SynW-1 (LD222/Liguleless-G3489) /N67, SynW-5 (ANW 12A/G3489) and F₁ of ANK-33/SynW-5 at heading (a) and their ligular regions at seedling (b). Plant phenotype during stem extension (c) and ligular region (d) of SynW-1 (LD222/Liguleless-G3489).

Arrows point to missing ligule regions

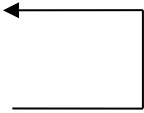

Pre-heating	94°C for 2 min
Touch Down PCR	94°C for 15 sec 63→56°C for 30 sec 68°C for 1 min  -1°C/cycle 7 cycle
*after 7cycle the temperature reach 56°C for 15 sec, then next step	
PCR	94°C for 15 sec 55°C for 30 sec 68°C for 1 min  35 cycle
Storage	20°C for keeping

Fig.VI-4. Touch Down program

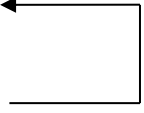
Pre-heating	96°C for 30 sec
PCR	96°C for 10 sec 50°C for 5 sec 60°C for 4 min  25 cycle
Storage	20°C for keeping

Fig.VI-5. Program for cycle sequencings

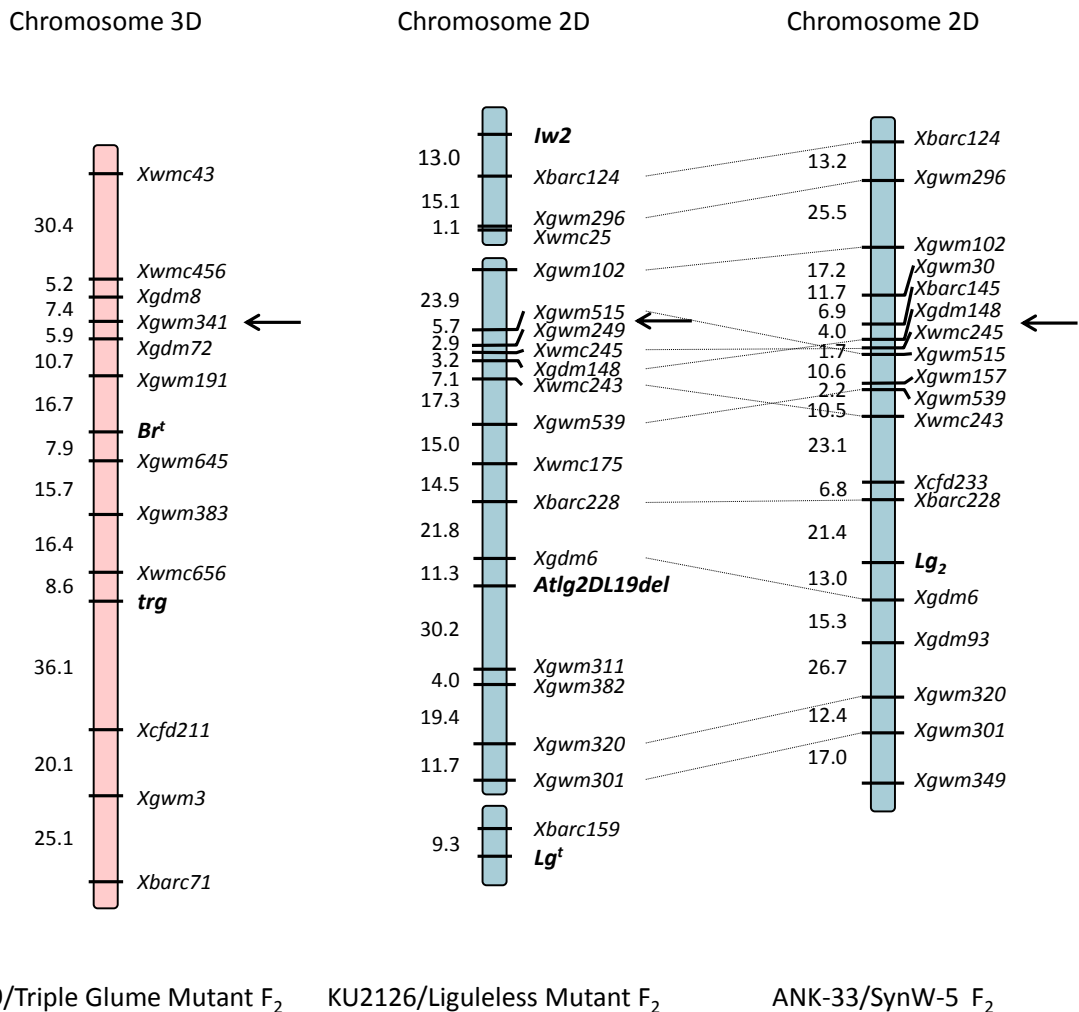


Fig.VI-6. Linkage maps of *trg* gene for triple glume on chromosome 3D (*left*), *Lg^t* gene for dominant liguleless and the 19 bp-deletion of Liguleless Mutant (*Atlg2DL19del*) (*middle*) and *Lg₂* gene for dominant liguled on chromosome 2D (*right*).

Arrows indicate putative positions of centromeres

TaLG_CS_2DL
Liguleless M.
G3489
SynW-5
KU2126
SynW-6
ANK-33
N67

10 20 30 40 50 60 70

GTACGTACGTTTCGTACGTGGTACAAACTTGC AATACTTAGGGACAAAGTAGCCATGCTTCTCTGACTTTCG
GTACGTACGTTTCGTACGTGGTACAAACTTGC C AATACTTAGGGACAAAGTAGCCATGCTTCTCTGACTTTCG
GTACGTACGTTTCGTACGTGGTACAAACTTGC AATACTTAGGGAGAAAGTAGCCATGCTTCTCTGACTTTCG
GTACGTACGTTTCGTACGTGGTACAAACTTGC AATACTTAGGGAGAAAGTAGCCATGCTTCTCTGACTTTCG
GTACGTACGTTTCGTACGTGGTACAAACTTGC AATACTTAGGGACAAAGTAGCCATGCTTCTCTGACTTTCG
GTACGTACGTTTCGTACGTGGTACAAACTTGC AATACTTAGGGACAAAGTAGCCATGCTTCTCTGACTTTCG
GTACGTACGTTTCGTACGTGGTACAAACTTGC AATACTTAGGGACAAAGTAGCCATGCTTCTCTGACTTTCG

TaLG_CS_2DL
Liguleless M.
G3489
SynW-5
KU2126
SynW-6
ANK-33
N67

80 90 100 110 120 130 140

GGAGGCCAATGCATGTACAGACAGGTCACACTGTTTGAAGTAACCACTCAAAACATGCATGCGAAGGAGAA
GGAGGCCAATGCATGTACAGACAGGTCACACTGTTTGAAGTAACCACTCAAAACATGCATGCGAAGGAGAA
GGAGGCCAATGCATGTACAGACAGGTCACACTGTTTGAAGTAACCACTCAAAACATGCATGCGAAGGAGAA
GGAGGCCAATGCATGTACAGACAGGTCACACTGTTTGAAGTAACCACTCAAAACATGCATGCGAAGGAGAA
GGAGGCCAATGCATGTACAGACAGGTCACACTGTTTGAAGTAACCACTCAAAACATGCATGCGAAGGAGAA
GGAGGCCAATGCATGTACAGACAGGTCACACTGTTTGAAGTAACCACTCAAAACATGCATGCGAAGGAGAA
GGAGGCCAATGCATGTACAGACAGGTCACACTGTTTGAAGTAACCACTCAAAACATGCATGCGAAGGAGAA

TaLG_CS_2DL
Liguleless M.
G3489
SynW-5
KU2126
SynW-6
ANK-33
N67

150 160 170 180 190 200 210

GTGAAGCAAAAAATAAATGGCAAGGAGAGCAGCAAGCAATGGAGGAGAGAGAAAGAGGAGCAACTCAAAGGA
GTGAAGCAAAAAATAAATGGCAAGGAGAGCAGCAAGCAATGGAGGAGAGAGAGAAAGAGGAGCAACTCAAAGGA
GTGAAGCAAAAAATAAATGGCAAGGAGAGCAGCAAGCAATGGAGGAGAGAGAGAAAGAGGAGCAACTCAAAGGA
GTGAAGCAAAAAATAAATGGCAAGGAGAGCAGCAAGCAATGGAGGAGAGAGAGAAAGAGGAGCAACTCAAAGGA
GTGAAGCAAAAAATAAATGGCAAGGAGAGCAGCAAGCAATGGAGGAGAGAGAGAAAGAGGAGCAACTCAAAGGA
GTGAAGCAAAAAATAAATGGCAAGGAGAGCAGCAAGCAATGGAGGAGAGAGAGAAAGAGGAGCAACTCAAAGGA
GTGAAGCAAAAAATAAATGGCAAGGAGAGCAGCAAGCAATGGAGGAGAGAGAGAAAGAGGAGCAACTCAAAGGA

TaLG_CS_2DL
Liguleless M.
G3489
SynW-5
KU2126
SynW-6
ANK-33
N67

220 230 240 250 260 270 280

CAACATGTCTGCGTATAAAGTGTTCCTACATGTGATACATGGACTCTTGTCAATTACGGGCAGAGCGAAA
CAACATGTCTGCGTATAAAGTGTTCCTACATGTGATACATGGACTCTTGTCAATTACGGGCAGAGCGAAA
CAACATGTCTGCGTATAAAGTGTTCCTACATGTGATACATGGACTCTTGTCAATTACGGGCAGAGCGAAA
CAACATGTCTGCGTATAAAGTGTTCCTACATGTGATACATGGACTCTTGTCAATTACGGGCAGAGCGAAA
CAACATGTCTGCGTATAAAGTGTTCCTACATGTGATACATGGACTCTTGTCAATTACGGGCAGAGCGAAA
CAACATGTCTGCGTATAAAGTGTTCCTACATGTGATACATGGACTCTTGTCAATTACGGGCAGAGCGAAA
CAACATGTCTGCGTATAAAGTGTTCCTACATGTGATACATGGACTCTTGTCAATTACGGGCAGAGCGAAA

TaLG_CS_2DL
Liguleless M.
G3489
SynW-5
KU2126
SynW-6
ANK-33
N67

290 300 310 320 330 340 350

TATGTAGAAAGGAGGAGATCACATGAATCTTTGATCATATTTGGATGGCTGAATCATGGAGCACCACATA
TATGTAGAAAGGAGGAGATCACATGAATCTTTGATCATATTTGGATGGCTGAATCATGGAGCACCACATA
TATGTAGAAAGGAGGAGATCACATGAATCTTTGATCATATTTGGATGGCTGAATCATGGAGCACCACATA
TATGTAGAAAGGAGGAGATCACATGAATCTTTGATCATATTTGGATGGCTGAATCATGGAGCACCACATA
TATGTAGAAAGGAGGAGATCACATGAATCTTTGATCATATTTGGATGGCTGAATCATGGAGCACCACATA
TATGTAGAAAGGAGGAGATCACATGAATCTTTGATCATATTTGGATGGCTGAATCATGGAGCACCACATA
TATGTAGAAAGGAGGAGATCACATGAATCTTTGATCATATTTGGATGGCTGAATCATGGAGCACCACATA

TaLG_CS_2DL
Liguleless M.
G3489
SynW-5
KU2126
SynW-6
ANK-33
N67

360 370 380 390 400 410 420

ATCTGTCAGTTTATTGTAATAATACATTCTGACTTATTATGATTTTGCCTATTCTAATCTGTAATAATTAAG
ATCTGTCAGTTTATTGTAATAATACATTCTGACTTATTATGATTTTGCCTATTCTAATCTGTAATAATTAAG
ATCTGTCAGTTTATTGTAATAATACATTCTGACTTATTATGATTTTGCCTATTCTAATCTGTAATAATTAAG
ATCTGTCAGTTTATTGTAATAATACATTCTGACTTATTATGATTTTGCCTATTCTAATCTGTAATAATTAAG
ATCTGTCAGTTTATTGTAATAATACATTCTGACTTATTATGATTTTGCCTATTCTAATCTGTAATAATTAAG
ATCTGTCAGTTTATTGTAATAATACATTCTGACTTATTATGATTTTGCCTATTCTAATCTGTAATAATTAAG
ATCTGTCAGTTTATTGTAATAATACATTCTGACTTATTATGATTTTGCCTATTCTAATCTGTAATAATTAAG

TaLG_CS_2DL
Liguleless M.
G3489
SynW-5
KU2126
SynW-6
ANK-33
N67

430 440 450 460 470 480 490

CTACTTAAAAATTGTACACTAACAAATAGTATCGAGACAAAATTTAAGACAAGTAATTTGGGACGGAGGTTAA
CTACTTAAAAATTGTACACTAACAAATAGTATCGAGACAAAATTTAAGACAAGTAATTTGGGACGGAGGTTAA
CTACTTAAAAATTGTACACTAACAAATAGTATCGAGACAAAATTTAAGACAAGTAATTTGGGACGGAGGTTAA
CTACTTAAAAATTGTACACTAACAAATAGTATCGAGACAAAATTTAAGACAAGTAATTTGGGACGGAGGTTAA
CTACTTAAAAATTGTACACTAACAAATAGTATCGAGACAAAATTTAAGACAAGTAATTTGGGACGGAGGTTAA
CTACTTAAAAATTGTACACTAACAAATAGTATCGAGACAAAATTTAAGACAAGTAATTTGGGACGGAGGTTAA
CTACTTAAAAATTGTACACTAACAAATAGTATCGAGACAAAATTTAAGACAAGTAATTTGGGACGGAGGTTAA

TaLG_CS_2DL
Liguleless M.
G3489
SynW-5
KU2126
SynW-6
ANK-33
N67

500 510 520 530 540 550 560

TACAAAAATTGTAGAGGATGAAATGTTTACATATACATTACATGCAAAATAAAGCGATGAATCTTGCCTTTC
TACAAAAATTGTAGAGGATGAAATGTTTACATATACATTACATGCAAAATAAAGCGATGAATCTTGCCTTTC
-----TGTAGAGAAACGAAATGTTTACATATACATTACATGCAAAATAAAGCGATGAATCTTGCCTTTC
-----TGTAGAGAAACGAAATGTTTACATATACATTACATGCAAAATAAAGCGATGAATCTTGCCTTTC
TACAAAAATTGTAGAGGATGAAATGTTTACATATACATTACATGCAAAATAAAGCGATGAATCTTGCCTTTC
TACAAAAATTGTAGAGGATGAAATGTTTACATATACATTACATGCAAAATAAAGCGATGAATCTTGCCTTTC
TACAAAAATTGTAGAGGATGAAATGTTTACATATACATTACATGCAAAATAAAGCGATGAATCTTGCCTTTC
TACAAAAATTGTAGAGGATGAAATGTTTACATATACATTACATGCAAAATAAAGCGATGAATCTTGCCTTTC

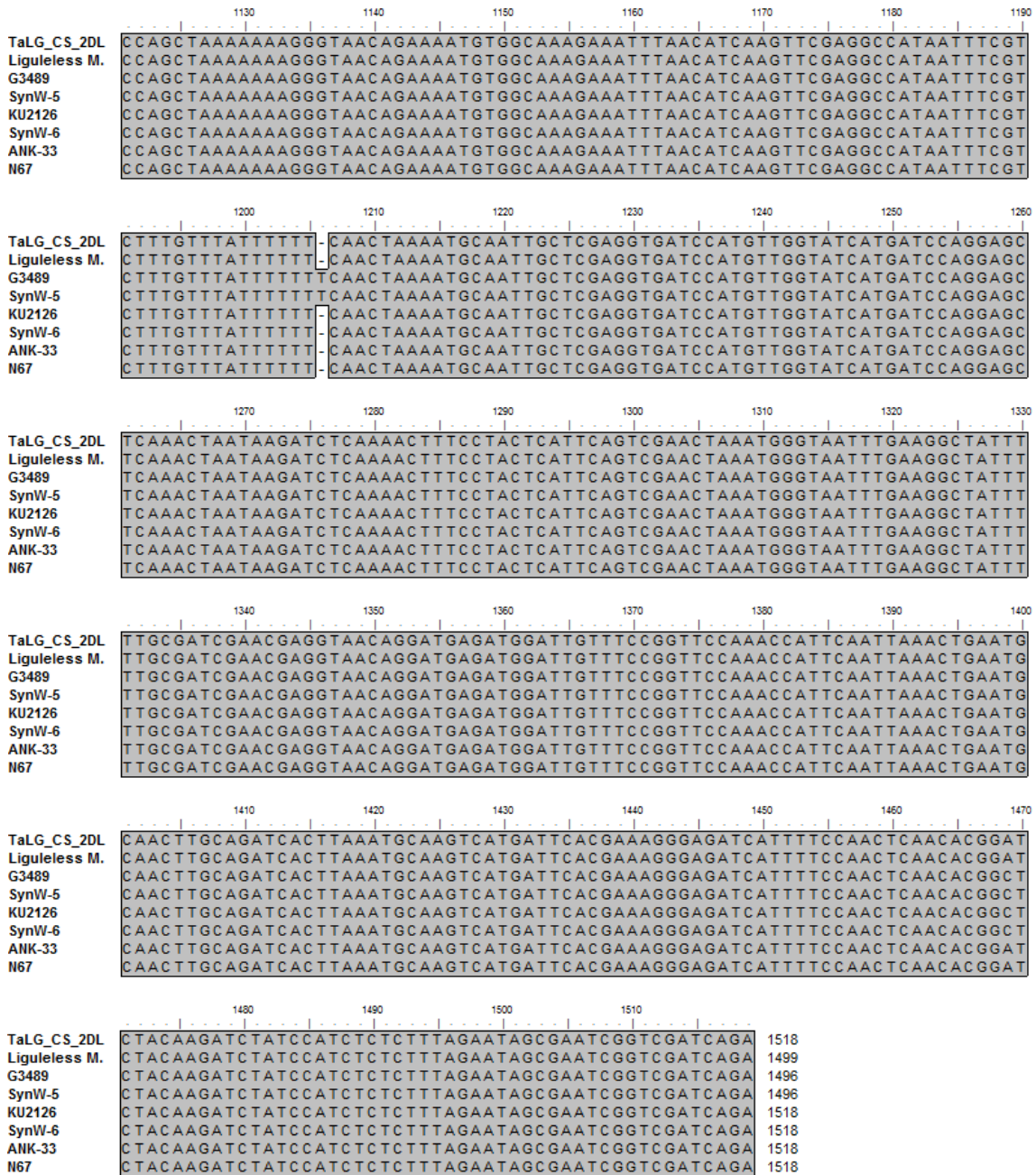


Fig.VI-7. Deduced DNA sequence alignment of the HvLG1-like ortholog from chromosome arm 2DL of the genetic stocks Liguleless Mutant, G3489, SynW-5, KU2126, SynW-6, ANK-33 and N67.

The positions of mutations in the genomic DNA sequence are not indicated by the grey box

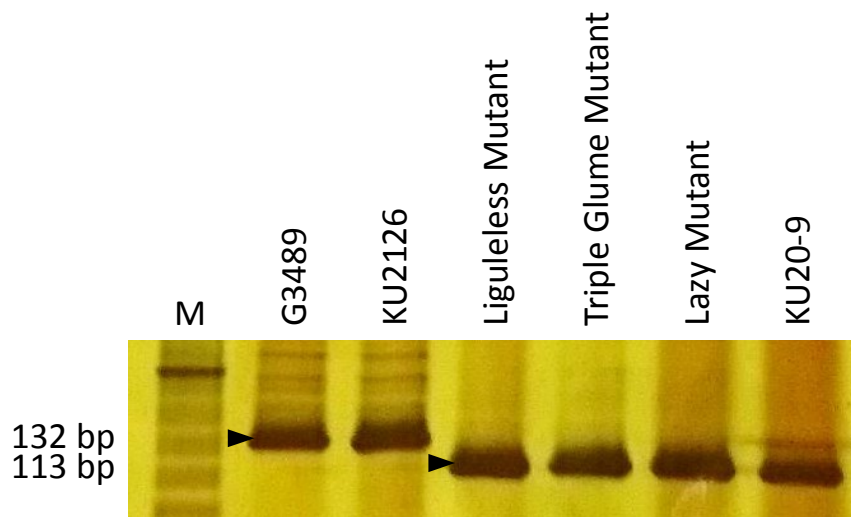


Fig.VI-8. The PCR amplification profiles for confirming the 19 bp-deletion. Lanes represent a size marker (M), G3489, KU2126, Liguleless Mutant, Triple Glume Mutant, Lazy Mutant and KU20-9

第7章 総合考察

コムギは世界で最も重要な食用作物であり、単位面積当たりの収量向上に貢献する有用形質の開発が重要である。1960年代に起こった緑の革命のように、収穫指数や耐倒伏性などを改善した品種改良に匹敵する形質が求められる。そこで本研究では、二倍性、四倍性および六倍性コムギにおける小穂および穂の形態変異、葉の生長変異、および六倍性コムギの祖先野生種タルホコムギおよび合成コムギにおける形態変異に関する遺伝育種学的研究を行った。

穂にみられる分枝は穂当たりの種子数の増加あるいは単位面積当たりの収量の増加が見込める形質の一つであった。1つの穂軸節から2つ以上の小穂を形成する真性分枝穂において、一粒系コムギの真性分枝穂遺伝子 bh^m は 2A 染色体短腕上に座乗した。四倍性コムギの bh 遺伝子は 2A 染色体短腕上に座乗し (Klindworth et al. 1997, Haque et al. 2012), 六倍性コムギの $mrs1$ 遺伝子は 2D 染色体短腕上に座乗することから (Dobrovolskaya et al. 2009, 2015), これらの遺伝子と bh^m 遺伝子はオーソログな遺伝子座にあると考えられる。また, *multirow* 準同質遺伝子系統の利用によって真性分枝穂が有益な形質であることを示した。分枝穂は正常型に比べ種子が小さくなる傾向にあったが, 結実種子数が約 37%増加し, 収穫指数は同等あるいは年次によって上回った。HSs 型とは異なり MRS 型の穂は, 穂の下部 4 分の 1 程度の小穂の形成が不完全であり稔実種子を得られないことが多い (Fig.III-1-4)。したがって, HSs 型の準同質遺伝子系統を育成し, 高い収穫指数を得られるか検定することが望まれる。腋芽の形成や伸長を調節し, 茎の数を制御するイネの *MONOCULM 1 (MOCI)* 遺伝子 (Li et al. 2003), トマトの *Lateral suppressor (Ls)* 遺伝子 (Schumacher et al. 1999) およびシロイヌナズナの *LATERAL SUPPRESSOR (LAS)* 遺伝子 (Greb et al. 2003)

は GRAS ファミリーに属す同祖遺伝子であるとされ (Pysh et al. 1999, Li et al. 2003), これらの遺伝子をもつ植物は分枝しないため茎を一本しか生じない. 近年, イネの *MOC1* 遺伝子のオーソログであるコムギの *TaMOC1* は, 7A 染色体に存在し, 穂当たりの小穂数の決定に関与していることが判った (Zhang et al. 2015). また, コムギの日長反応性遺伝子 *Ppd-1* は, 生殖発育初期段階に花成促進シグナル *FLOWERING LOCUS T (FT)* の強さを調節することによって twin spikelets の形成の調節に重要な阻害効果を与えることが示された (Boden et al. 2015). *Ppd-1* の非感光性はコムギを早生化させ, 出穂が早い系統ほど単位面積当たりの種子数が少なくなり, 非感光性の極早生系統が感光型の晩生系統より有意に減収する (Matsuyama et al. 2015). また, *Ppd-1* 遺伝子は 2D 染色体にあり, 半矮性遺伝子 *Rht8* と密接に連鎖している (Gasperini et al. 2012). したがって, *mrs1* 遺伝子, *Ppd-1* 遺伝子および *Rht8* 遺伝子の関連を探ることは興味深い.

小穂軸が伸長し, 正常より多くの小花を形成する擬似分枝穂形質を支配する遺伝子の座乗染色体は未知であった. 本研究では *T. jakubzineri* および *T. turgidum* PI 67339 のもつ擬似分枝穂はそれぞれ異なる劣性遺伝子 (*shr1*, *shr2*) により決定されていることを明らかにした. *T. jakubzineri* における擬似分枝穂の小穂には過剰な護穎が 2 枚存在し, その形質を決定する *exg* 遺伝子は *shr1* 遺伝子と完全連鎖し, 5A 染色体長腕上に座乗した. 栽培化関連遺伝子 *Q* や密穂遺伝子 *Cp1* が 5A 染色体長腕上に存在することから連鎖関係を求めることは興味深い. 一方, *shr2* 遺伝子は 2A 染色体長腕上に座乗した. 本研究では達成できなかったが, 第 3 章第 1 節において明らかになった一粒系コムギにおける真性分枝穂遺伝子 *bh^m* および四倍性コムギにおける *bh* 遺伝子を有する系統と *T. turgidum* PI 67339 をそれぞれ交配することによって, 2A 染色体上の連鎖関係を調べることができるだろう. 擬似分枝穂は小穂軸が伸長することから, 種子の生長空間を確保できる可能性がある. 正常な穂より多くの小花を形成すること

から、この付加的な小花に安定した稔性をもたせることができればシンク能は増加する。また、小穂が伸長し重量を増した穂を支えるため、草丈の矮性化や丈夫な稈の獲得も重要になると推定される。六倍性コムギにおいて唯一擬似分枝穂をもつとされる *T. vavilovii* において、この形質を決定する vavilovoid 遺伝子 *v* は古くから *Q* 遺伝子との関連などが議論されているが (Singh et al. 1957, Rao and Swaminathan 1963, Desai and Bhatia 1975), 未だ座乗位置は明らかではない。 *shr1* および *shr2* 遺伝子との関連性も遺伝的に解明する必要がある。

六倍性コムギにおいて穂軸にねじれを生じる Screwed spike rachis は、小穂を穂内に効率的に配置させることができるので、種子の生長を助け高い生産性を実現できる可能性がある。本研究ではこの形質を決定する *Scr1* 遺伝子は 5B 染色体長腕上に座乗することを明らかにした。SCR 系統は草丈が短くなり、この矮性形質は *Rht8* 遺伝子に起因した。四倍性作物であるテフにおいて *α -tubulin1* 遺伝子は、微小管に異常を引き起こすことにより植物全体にねじれと半矮性化を生じ、結果として高い生産性をもたらす (Jöst et al. 2014)。一方、二倍性作物のイネにおいては、 *α -tubulin1* 遺伝子の効果は深刻な矮性化を生じる (Sunohara et al. 2009)。六倍性コムギにおいて、 *α -tubulin1* 遺伝子をもつ変異体は見出されていないが、植物体のねじれと半矮性形質を生じることは SCR 変異体と共通する。したがって、SCR 形質が *α -tubulin1* 遺伝子に起因するか調べるため、 *α -tubulin* 特異性試薬 (oryzalin, propyzamide および taxol) に対する反応試験を行った。ところが、 *α -tubulin1* 遺伝子の変異を示す肯定的な証拠を得られなかった。SCR 変異体は六倍性であり、正常な二つの同祖染色体によって *α -tubulin1* 遺伝子による矮性効果が軽減されてしまった可能性もある。四倍性コムギへ *Scr1* 遺伝子を導入した時、矮性効果が得られるかどうかによって、*Scr1* 遺伝子と *α -tubulin1* 遺伝子の関係について明らかにできるだろう。

コムギにおいて密穂形質については、3 つの主要な遺伝子 *Q*, *S* および *C* が知られ

ているが、日本在来の“軍配”と称される品種のもつ密穂遺伝子の座乗位置は明らかではなかった。本研究では、軍配品種のうち供試した 5 品種 (中生軍配, 木下小麦, 赤毛軍配, 赤毛軍配 22, 軍配 22) の密穂形質がすべて 2B 染色体長腕に存在する *Cg* 遺伝子によって決定され, *Q*, *S* および *C* 遺伝子とは座乗染色体が異なることを明らかにした。また, *Cg* 遺伝子は準同質遺伝子系統 ANK-15 のもつ密穂遺伝子と同座であった。野生エンマーコムギにおいて見出された密穂性 QTL は 2A 染色体長腕上に存在することから (Faris et al. 2014) これらの遺伝子はオーソログな遺伝子座にある。一方, *T. sinskajae* の半密穂および脱穀のしやすさに関わる柔らかい穎 (soft glume) の形質を決定する *sog* 遺伝子は 2A^m 染色体短腕上に座乗したので, *Cg* 遺伝子と同祖ではない。密穂形質は多湿多雨の環境では穂発芽を生じやすくなることが指摘されているが, 軍配品種は早生型であるため日本の梅雨期における登熟を避けることができ, また, 短稈の傾向があるため倒伏しにくい。日本のパンコムギは現在世界で栽培されているコムギ品種の有用な遺伝形質の提供親であり, 本研究で取り上げた軍配品種もまた, 新たな遺伝資源としての利用が期待される。

葉は光エネルギーおよび CO₂ を獲得するための重要な器官であり, 葉の面積や傾斜角は受光量や受光面積などに関連し, 収量に影響をおよぼす。六倍性コムギにおいて, 幼苗期から成熟期まで反復的に葉身を萎縮させ, その結果, 草丈, 穂長, 穂当たりの小穂数に顕著な減少を生じる *rlb* 遺伝子は 6D 染色体長腕上に座乗した。バイオマスや葉面積の増加には幼苗期においてより大きく葉を生長させることが有効であることから (Zhang L. et al. 2014), *rlb* 変異体は葉身形成の負の決定因子を探るための有望な手段となるだろう。

四倍性コムギにおいて, 2B 染色体上の *Lg₁* 遺伝子および 2A 染色体上の *Lg₃* 遺伝子のいずれかが存在すると葉耳が形成される (Watanabe et al. 2004)。しかし, *Lg₃* 遺伝子の染色体座乗位置は遺伝子型 *lg₁lg₁Lg₃Lg₃* をもつ遺伝資源が得られず明らか

ではなかった. エンマーコムギの Lg_3 遺伝子を四倍性コムギの無葉耳準同質遺伝子系統 ANW 12A ($lg_1lg_1lg_3lg_3$) に導入し育成された系統 ANW 12E ($lg_1lg_1Lg_3Lg_3$) を用いることで, Lg_3 遺伝子が 2A 染色体長腕上に座乗することを明らかにした. また, 同時に育成された, エンマーコムギの Lg_1 遺伝子を遺伝的背景にもつ ANW 12F ($Lg_1Lg_1lg_3lg_3$) を用い, Lg_1 遺伝子が 2B 染色体長腕上に座乗することを明らかにした.

一方, 六倍性コムギにおいて, 2A 染色体上の Lg_3 遺伝子, 2B 染色体上の Lg_1 遺伝子および 2D 染色体上の Lg_2 遺伝子のいずれかが存在すると葉耳が形成される. ANW 12A と葉耳のあるタルホコムギの交配から育成した合成コムギと, 六倍性コムギの無葉耳準同質遺伝子系統 ANK-33 ($lg_1lg_1lg_2lg_2lg_3lg_3$) を用いることで, Lg_2 遺伝子が 2D 染色体長腕上に座乗することを明らかにした. また, タルホコムギの *Liguleless Mutant* のもつ優性の無葉耳遺伝子 Lg^l は 2D 染色体長腕上のマーカーと連鎖した. したがって, 本研究では四倍性, 六倍性およびタルホコムギにおける葉耳形成に関わる 4 つの遺伝子がいずれも第二同祖群染色体長腕上に座乗することを示した. Lg_1 , Lg_2 および Lg_3 遺伝子座は, トウモロコシの lg_1 遺伝子 (Ahn and Tanksley 1993) やイネの lg 遺伝子 (Causse et al. 1994), オオムギの li 遺伝子 (Pratchett and Laurie 1994), ライムギの al 遺伝子 (Korzun et al. 1997) のように単一の劣性遺伝子によって決定されている無葉耳形質の遺伝子座と同祖領域にある. オオムギ *HvLG* と相同性の高い領域の DNA 塩基配列の解析では, *Liguleless Mutant* 固有の 19 塩基の DNA 配列の欠損が認められ, この欠損を含むマーカー (*Atlg2DL19del*) を設計し, 連鎖関係を調べ, 連鎖地図と比較したところ Lg_2 遺伝子座近傍にあり, Lg_2 と Lg^l は異なる遺伝子座であった. また, 正常型の個体でも *Atlg2DL19del* の利用によって Lg_2 遺伝子座の位置を特定することが可能である. イネ (OsLG1), トウモロコシ (ZmLG1) およびソルガム (Sb06g31290) で見出された無葉耳変異体の遺伝子情報を考慮すると, Lg_1 , Lg_2 およ

び *Lg₃* 遺伝子の配列特定は、それぞれ 2B, 2D および 2A 染色体の SPL8 mRNA をコードする領域を詳しく調べることが第一である (Moreno et al. 1997, Zwick et al. 1998, Rossini et al. 2006, Lee et al. 2007, Zhu et al. 2013). また、葉が直立するコムギの無葉耳変異体が光合成にどの程度有効な形質であるか明らかにするために、本研究で用いた準同質遺伝子系統を利用し、群落における光透過率の調査や、収量性を検定する必要がある。

タルホコムギにおいて小穂に過剰な護穎を 1 枚生じる *triple glume* 突然変異を決定する *trg* 遺伝子は、穂軸の折れやすさを決定する *Br¹* 遺伝子と約 21.6 cM の遺伝子間距離で連鎖し、3D 染色体長腕上に座乗した。また、*T. sinskajae* のもつ外穎と護穎の間に生じる *false glume* 形質を決定する *fg* 遺伝子は柔らかい穎/半密穂遺伝子 *sog* と 1.0 cM で密接に連鎖し、2A^m 染色体短腕上に座乗した。さらに、*T. jakubzineri* において過剰護穎遺伝子 *exg* は 5A 染色体長腕上に座乗した。Gowayed (2009) は小穂の片側に護穎を 1 枚多く生じる *third glume* 形質を四倍性および六倍性コムギの 5 種から見出し、分枝穂形質と深く関与することを示した。*triple glume*, *false glume*, *extra glume* および *third glume* はそれぞれ異なる護穎の形態を伴い、*trg*, *fg* および *exg* 遺伝子はいずれも異なる染色体に座乗していることから、過剰な花器官を伴う形質には多様な変異があるといえる。*third glume* 形質を決定する遺伝子の座乗位置の特定および分枝穂との関連を探ることが求められる。

以上、本研究の結果より、小穂、穂の形態変異、葉の生長変異、また、タルホコムギおよび合成コムギの花器官や葉の形態に影響を与える変異遺伝子の座乗位置が系統育成とマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析によって明らかになった。これらの遺伝子の位置情報ならびに育成系統は、コムギゲノムの塩基配列の概要が明らかになった今日、それぞれの遺伝子の単離や機能解析のための重要なツールとなり、バイオマス生産量の高い品種の開発に役立つものと期待できる。

摘要

コムギ(*Triticum* spp.)は世界で最も重要な食用作物のひとつである。地球の人口が急激に増加し、一方で耕作適地は限られるので、単位面積当たり収量の向上が求められる。本研究では、コムギ品種改良に貢献することを目的とし、コムギおよび祖先野生種タルホコムギ(*Aegilops tauschii*, $2n=2x=14$, DD)における小穂および穂を構成する器官数の増減、葉の構成要素の欠損などの遺伝的要因に関して育種学的観点から分析した。主として系統育成と DNA マーカーを用いた連鎖分析を行った。

(1) 1 穂軸節から 2 つ以上の小穂を形成する形質を真性分枝穂という。一粒系コムギ($2n=2x=14$, $A^m A^m$)の真性分枝穂遺伝子 bh^m は $2A^m$ 染色体短腕に座乗し、四倍性および六倍性コムギの真性分枝穂遺伝子座とオーソログであった。六倍性コムギの *multirow* 準同質遺伝子系統を用いて収量性を検定したところ、分枝穂による小花数の増加が反映し、対照系統と同等の収量が得られ、年次によっては上回った。有効分げつ数が多い年次は特に収量性は向上した。

(2) 一方、分枝しないが小穂軸が伸長する擬似分枝穂は、正常な穂より多くの小花を形成し、小花の生長空間を確保できる可能性がある。四倍性コムギ *T. jakubzineri*($2n=4x=28$, BBAA)の小穂には過剰な護穎が 2 枚生じ、この形質を決定する *exg* 遺伝子と擬似分枝穂を決定する *shr1* 遺伝子は 5A 染色体長腕上にあり、完全連鎖した。また *T. turgidum* PI 67339($2n=4x=28$, BBAA)の擬似分枝穂は *shr2* 遺伝子により決定され、2A 染色体長腕に座乗した。

(3) 穂軸にねじれを生じる *Screwed spike rachis* は、小穂を限られた長さの穂内に効率的に配置させ、粒の生長にゆとりを与えるので、生産性を高める可能性がある。六倍性コムギ(*T. aestivum*, $2n=6x=42$, BBAADD)において、この形質を決定する *Scr1* 優性遺伝子は 5B 染色体長腕に座乗した。

(4) 日本在来の“軍配”と称される品種の穂は密穂である。この密穂形質は *T. compactum* のもつ 2D 染色体の *C* 遺伝子とは異なり, 2B 染色体長腕に存在する優性遺伝子 *Cg* が決定していた。野生エンマーコムギにおいて見出された 2A 染色体長腕上に存在する密穂性 QTL と同祖の位置関係にあった。

(5) 六倍性コムギにおいて, 幼苗期から成熟期まで反復的に葉身を萎縮させ, その結果, 草丈, 穂長および穂あたりの小穂数に顕著な減少を生じる特性は単一の劣性遺伝子 *rlb* に起因し, 6D 染色体長腕に座乗した。

(6) 四倍性コムギ(*T. durum*, BBAA)においては, *Lg₁* および *Lg₃* 遺伝子のいずれかが存在すると葉耳が形成される。*T. durum* LD222 を遺伝的背景にもつ準同質遺伝子系統 ANW 12E(*lg₁lg₁Lg₃Lg₃*)および ANW 12F(*Lg₁Lg₁lg₃lg₃*)を用い 2 遺伝子をマッピングした。*Lg₃* および *Lg₁* 遺伝子はそれぞれ 2A 染色体長腕および 2B 染色体長腕に座乗した。また, ANW 12A(*lg₁lg₁lg₃lg₃*)と葉耳のあるタルホコムギの交配から育成した合成コムギは葉耳を形成したので, 六倍性コムギにおいては *Lg₁*, *Lg₂* および *Lg₃* 遺伝子いずれかの存在によって葉耳が形成されることが示唆された。合成コムギと六倍性コムギの無葉耳準同質遺伝子系統 ANK-33(*lg₁lg₁lg₂lg₂lg₃lg₃*)を用いマッピングしたところ, *Lg₂* 遺伝子は 2D 染色体長腕に座乗した。これらの遺伝子座はいずれもイネ, オオムギ, ソルガムなどの二倍性イネ科作物の無葉耳遺伝子座と同祖領域にあった。一方, タルホコムギの *Liguleless Mutant* の無葉耳は優性形質であり, この形質を制御する *Lg^l* 遺伝子は 2D 染色体長腕末端部のマーカーと連鎖した。オオムギ無葉耳遺伝子 *HvLG* と相同性の高い領域の塩基配列の解析によって, *Liguleless Mutant* に 19 塩基の配列欠損が認められた。この欠損を含むマーカーを作製し連鎖関係を調べたところ, *Lg₂* 遺伝子近傍に存在した。また, この配列の欠損は *Liguleless Mutant* の野生型にも存在し, *Lg^l* は *Lg₂* 遺伝子とは異なる遺伝子座にあることを確認した。

(7) タルホコムギにおいて, 小穂に過剰な護穎を 1 枚生じる *trg* 変異遺伝子は, 穂軸

の折れやすさを決定する *Br'* 遺伝子と約 21.6 cM の距離で連鎖し, 3D 染色体長腕に座乗した. また, 一粒系コムギ *T. sinskajae* において護穎と外穎の間に生じる false glume を決定する *fg* 遺伝子は, 2A^m 染色体短腕上で柔らかい穎および半密穂形質を決定する *sog* 遺伝子と 1.0~1.6cM の距離で連鎖した.

以上, 本研究では *Triticum* 属および *Aegilops* 属における遺伝資源の育種的利用の可能性を探るため, マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析によって, 変異遺伝子の座乗位置を明らかにした. また, 真正分枝穂については, 収量性検定によって, その実用性を検討した. 本研究の結果は, 穂当たりの種子数の増加を中心としたコムギ品種育成のため, 新たな遺伝子の位置情報を提供する.

謝辞

本研究の遂行と論文作成にあたり、多大なるご指導と激励を賜りました主指導教官であります茨城大学農学部 渡部 信義 教授，第一副指導教官として日々の確な御指導を賜りました茨城大学農学部 久保山 勉 教授に心より御礼を申し上げます。また，第二副指導教官として，御指導の御校閲を賜りました宇都宮大学農学部 房 相佑 教授に深く感謝いたします。さらに，東京農工大学農学部 金勝 一樹 教授，茨城大学農学部 井上 栄一 准教授には本論文の御校閲を賜りました。深く御礼申し上げます。

チェコ共和国 Kromeriz 農業研究所 (Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd. Genetics and Breeding, Kroměříž, Czech Republic) P. Martinek 博士，アゼルバイジャン共和国バクー市アゼルバイジャン科学アカデミー 遺伝資源研究所 (Genetic Resources Institute, Azerbaijan National Academy of Sciences, Baku, Azerbaijan) N. Kh. Aminov 教授および A. J. Aliyeva 博士には種子の分譲ならびに論文執筆に当たりさまざまな御協力，御指導を賜りましたこと，心より感謝申し上げます。ロシア連邦ノボシビルスク市ロシア科学アカデミーシベリア支部 細胞学・遺伝学研究所 (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia) 故 S. F. Koval 博士，カリフォルニア大学 J.G.Waines 教授，京都大学農学部 河原 太八 博士には種子の分譲を賜りましたこと，深謝いたします。Russian Foundation of Basic Researches (RFBR) による若手研究者育成プログラムに 2013 年 10 月より 2 ヶ月間参加させていただき，ロシア連邦ノボシビルスク市ロシア科学アカデミーシベリア支部 細胞学・遺伝学研究所 (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division, Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia) O. Dobrovolskaya 博士には多大なるご支援，ご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。

圃場の整備に御協力，御支援賜りました茨城大学農学部職員 吉田 徹 氏，農学部
附属 FS センター職員 橋本 浩平 氏に深く御礼申し上げます。

最後に，茨城大学農学部 植物育種細胞工学研究室，植物資源制御学研究室の皆様，
著者が茨城大学大学院農学研究科，東京農工大学連合大学院在学中にともに
研究させていただいたすべての皆様に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Ahn SN, Tanksley SD (1993) Comparative linkage map of the rice and maize genomes. Proc Natl Acad Sci USA 90: 7980–7984
- Alvarez-Buylla ER, Liljegren SJ, Pelaz S, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Vergara-Silva F, Yanofsky MF (2000) MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. Plant J 24: 457–466
- Angus JF, Jones R, Wilson JH (1972) A comparison of barley cultivars with different leaf inclinations. Crop and Pasture Science 23: 945–957
- Arbuzova VS, Maystrenko OI, Popova OM (1998) Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar ‘Saratovskaya 29’. Cereal Res Commun 26: 39–46
- Ausemus ER, Harrington JB, Reitz LP, Worzella WW (1946) A summary of genetic studies in hexaploid and tetraploid wheats. J Am Soc Agron 38: 1082–1099
- Austin RB, Ford MA, Edrich JA, Hooper BE (1976) Some effects of leaf posture on photosynthesis and yield in wheat. Annals of applied Biology 83: 425–446
- Austin RB, Bingham J, Blackwell RD, Evans LT, Ford MA, Morgan CL, Taylor M (1980) Genetic improvements in winter wheat yields since 1900 and associated physiological changes. The Journal of Agricultural Science 94:675–689
- Austin RB, Ford MA, Morgan CL (1989) Genetic improvement in the yield of winter wheat: a further evaluation. Journal of Agricultural Science 112:295–301
- Bagnara D, Rossi L (1972) A liguleless mutation radioinduced in *Triticum durum* Desf. Wheat Inform Serv 33: 1–3
- Bagnara D, Rossi L, Ligato L (1972) Induced liguleless mutation in durum wheat. Genet Agr 26: 278–290
- Ball CR, Leighty CE (1916) Alaska and stoner, or “miracle,” wheats: two varieties much misrepresented (No. 357). US Dept of Agriculture
- Barabas Z (1959) An induced mutant in *Triticum carthlicum* with a diagnostic feature of *T. vavilovii*. Nature 183: 1349
- Bauer R, Lehmann C, Martini J, Eckardt F, Hoch M (2004) Gap junction channel protein innexin 2 is essential for epithelial morphogenesis in the *Drosophila* embryo. Mol Biol Cell 15: 2992–3004

- Baum BR, Bailey LG (2004) The origin of the A genome donor of wheats (*Triticum: Poaceae*) - a perspective based on the sequence variation of the 5S DNA gene units. *Genet Res Crop Evol* 51: 183–196
- Becraft RW, Freeling M (1991) Sectors of *liguleless-1* tissue interrupt an inductive signal during maize leaf development. *Plant Cell* 3: 801–807
- Boden SA, Cavanagh C, Cullis BR, Ramm K, Greenwood J, Finnegan EJ, Trevaskis B, Swain SM (2015) *Ppd-1* is a key regulator of inflorescence architecture and paired spikelet development in wheat. *Nature Plants* 1, 14016. doi:10.1038/nplants.2014.16
- Borojevic K, Borojevic K (2005) The transfer and history of “reduced height genes” (*Rht*) in wheat from Japan to Europe. *J Hered* 96: 455–459
- Bor NL (1968) Flora of Iraq: Gramineae (Vol. 9). Baghdad: Ministry of Agriculture and Agrarian Reform of the republic Iraq
- Buschmann H, Fabri CO, Hauptmann M, Hutzler P, Laux T, Lloyd CW, Schaffner AR (2004) Helical growth of the *Arabidopsis* mutant trigolia reveals a plant-specific microtubule-associated protein. *Current Biol* 14: 1515–1521
- Busov VB, Brunner AM, Strauss SH (2008) Genes for control of plant stature and form. *New Phytol* 177: 589–607
- Castagna R, Borghi B, Bossinger G, Salamini F (1993) Induction and characterization of *Triticum monococcum* mutants affecting plant and ear morphology. *J Genet Breed* 47: 127–138
- Cause M, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongs J, Wu K, Xiao J, Yu D, Ronald PC, Harrington SB, Second GA, McCouch SR, Tanksley SD (1994) Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138: 1251–1274
- Coleman RK, Gill GS, Rebetzke GJ (2001) Identification of quantitative trait loci (QTL) for traits conferring weed competitiveness in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Agricultural Research* 52:1235–1246
- Cox TS, Hatcher JH, Gill BS, Raupp WJ, Sears RG (1990) Agronomic performance of hexaploid wheat lines derived from direct crosses between wheat and *Aegilops squarrosa*. *Plant Breed* 105: 271–277

- D'Amato F, Scarazzia Mungnozza T, Bozzini A (1964) Viable mutations in durum wheat induced by radiation and chemicals. *Wheat Inform Serv* 17/18: 2–5
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1: 19–21
- Desai PA (1968) Vavilovoid mutant in *Triticum durum* Desf. *Curr Sci* 37: 56–57
- Desai RM, Bhatia CR (1975) Frequency of vavilovoid mutants induced by radiation and chemical mutagen treatments in durum wheat. *Wheat Inform Serv* 40: 13–14
- Diederichsen A, Solberg SØ, Jeppson S (2013) Morphological changes in Nordic spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars released from 1982 to 1994 and a comparison with landraces. *Genet Resour Crop Evol* 60: 569–585
- Dobrovolskaya O, Martinek P, Voylokov AV, Korzun V, Röder MS, Börner A (2009) Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*). *Theor Appl Genet* 119: 867–874
- Dobrovolskaya O, Pont C, Sibout R, Martinek P, Badaeva E, Murat F, Chosson A, Watanabe N, Prat E, Gautier N, Gautier V, Poncet C, Orlov YL, Krasnikov AA, Bergès H, Salina E, Laikova L, Salse J (2015) *FRIZZY PANICLE* drives supernumerary spikelets in bread wheat. *Plant physiology* 167: 189–199
- Dubcovsky J, Luo MC, Zhong JY, Bransteitter R, Desai A, Kilian A, Kleinhofs A, Dvorak J (1996) Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. *Genetics* 143: 983–999
- Dudnikov AJ (2011) Waxiness in *Aegilops tauschii*: its occurrence in natural habitats of the species. *Cereal Res Commun* 39: 283–288
- Dvorak J, Diterlizzi P, Zhang HB, Resta P (1993) The evolution of polyploid wheats - Identification of the A-genome donor species. *Genome* 36: 21–31
- Ellis M, Spielmeyer W, Gale K, Rebetzke G, Richards R (2002) "Perfect" markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat. *Theor Appl Genet* 105: 1038–1042
- Ellis MH, Rebetzke GJ, Azanza F, Richards RA, Spielmeyer W (2005) Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat. *Theor Appl Genet* 111: 423–430
- Evans LT (1998) Feeding the ten billion: plant and population growth. Cambridge

University Press, Cambridge, UK

- Farajalla MR, Quick RJ (2007) The α -tubulin gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and differential gene expression during cold acclimation. *Genome* 50: 502–510
- Faris JD, Gill BS (2002) Genomic targeting and high-resolution mapping of the domestication gene *Q* in wheat. *Genome* 45: 706–718
- Faris JD, Fellers JP, Brooks SA, Gill BS (2003) A bacterial artificial chromosome contig spanning the major domestication locus *Q* in wheat and identification of a candidate gene. *Genetics* 164: 311–321
- Faris JD, Zhang Z, Garvin DF, Xu SS (2014) Molecular and comparative mapping of genes governing spike compactness from wild emmer wheat. *Mol Genet Genomics* 289: 641–651
- Filatenko AA, Kurkiev UK (1975) A new species – *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk. *Trudy po Prikl Bot, Genet i Selektiv* 54: 239–241 (in Russian)
- Fritz AK, Cox TS, Gill BS, Sears RG (1995a). Molecular marker-facilitated analysis of introgression in winter wheat x *Triticum tauschii* populations. *Crop Sci* 35: 1691–1695
- Fritz AK, Cox TS, Gill BS, Sears RG (1995b). Molecular marker-based analysis of quantitative traits in winter wheat x *Triticum tauschii* populations. *Crop Sci* 35: 1695–1699
- Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suz K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T (2000) The *SPIRAL* genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127: 4443–4453
- Gasperini D, Greenland A, Hedden P, Dores R, Harwood W, Griffiths S (2012) Genetic and physiological analysis of *Rht8* in bread wheat: an alternative source of semi-dwarfism with a reduced sensitivity to brassinosteroids. *J Exp Bot* 63: 4419–4436
- Gifford RM, Thorne JH, Hitz WD, Giaquinta RT (1984) Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science* 225: 801–808
- Gill BS, Raupp WJ (1987) Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Sci* 27: 445–450

- Giura A, Saulescu NN (1996) Chromosomal location of genes controlling grain size in a large grained selection of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 89: 77–80
- Goncharov NP, Kondratenko EJa, Bannikova SV, Konovalov AA, Golovnina KA (2007) Comparative genetic analysis of diploid naked wheat *Triticum sinskajae* and the progenitor *T. monococcum* accession. *Rus J Genet* 43: 1248–1256
- Gowayed S (2009) Egyptian wheat. Doctoral Dissertation, University Kassel, Witzenhausen, Cuvillier Verlag, Göttingen, Germany
- Greb T, Clarenz O, Schäfer E, Müller D, Herrero R, Schmitz G, Theres K (2003) Molecular analysis of the *LATERAL SUPPRESSOR* gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Development* 17: 1175–1187
- Guedira M, Brown-Guedira G, Van Sanford D, Sneller C, Souza E and Marshall D (2010) Distribution of Rht genes in modern and historic winter wheat cultivars from the eastern and central USA. *Crop Sci* 50: 1811–1822
- Haque MA, Martinek P, Kobayashi S, Kita I, Ohwaku K, Watanabe N, Kuboyama T (2012) Microsatellite mapping of genes for semi-dwarfism and branched spike in *Triticum durum* Desf. var. *ramosoobscurum* Jakubz. “Vetvistokoloskaya”. *Genet Res Crop Evol* 59: 831–837
- Hay A, Hake S (2004) The dominant mutant *Wavy auricle in blade1* disrupts patterning in a lateral domain of the maize leaf. *Plant Physiol* 135: 300–308
- Hayden MJ, Stephenson P, Logojan AM, Khatkar D, Rogers C, Elsdén J, Koebner RMD, Snape JW, Sharp PJ (2006) Development and genetic mapping of sequence-tagged microsatellites (STMs) in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 113: 1271–1281
- Heun M, Schäfer-Pregl R, Klawan D, Castagna R, Accerbi M, Borghi B, Salamini F (1997) Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278: 1312–1314
- Hidalgo A, Brandolini A, Pompei C, Piscozzi R (2006) Carotenoids and tocopherols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.). *J Cereal Sci* 44: 182–193
- Hidalgo A, Brandolini A (2008) Protein, ash, lutein and tocopherols distribution in einkorn

- (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*) seed fractions. Food Chemistry 107: 444–448
- Huskins CL (1946) Fatuoid, speltoid and related mutations of oats and wheat. Botan Rev 12: 457–514
- Ishida T, Kaneko Y, Iwano M, Hashimoto T (2007) Helical microtubule arrays in a collection of twisting mutants of *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci, USA 104: 8544–8549
- Ishii T, Numaguchi K, Miura K, Yoshida K, Thanh PT, Htun TM, Yamasaki M, Komeda N, Matsumoto T, Terauchi R, Ishikawa R, Ashikari M (2013) *OsLGI* regulates a closed panicle trait in domesticated rice. Nat Genet 45: 462–465
- Jing H-C, Korniyukhin D, Kanyuka K, Orford S, Zlatska A, Mitrofanova OP, Koebner R, Hammond-Kosack K (2007) Identification of variation in adaptively important traits and genome-wide analysis of trait-marker associations in *Triticum monococcum*. J Exp Bot 58: 3749–3764
- Johnson ER, Nalam VJ, Zemetra RS, Riera-Lizarazu O (2008) Mapping the *compactum* locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relationship to other spike morphology genes of the Triticeae. Euphytica 163: 193–201
- Jöst M, Esfeld K, Burian A, Cannazozzi G, Chanyalew C, Kuhlmeier S, Assefa K, Tadele Z (2014) Semi-dwarfism and lodging tolerance in tef (*Eragostis tef*) is linked to a mutation in the α -*Tublin* 1 gene. J Exp Bot doi:10.1093/jxb/eru452
- Kato K, Miura H, Sawada S (1999) QTL mapping of genes controlling ear emergence time and plant height on chromosome 5A of wheat. Theor Appl Genet 98: 472–476
- Kato K, Sonokawa R, Miura H, Sawada S (2003) Dwarfing effect associated with the threshability gene *Q* on wheat chromosome 5A. Plant Breed 122: 489–492
- Kerstetter R, Vollbrecht E, Lowe B, Veit B, Yamaguchi J, Hake S. (1994) Sequence analysis and expression patterns divide the maize knotted1-like homeobox genes into two classes. The Plant Cell 6: 1877–1887
- Khan UW, Shan MM (2011) Physical and genetic analysis of *Phl* gene region on the long arm of chromosome 5B in wheat and related cereals. Pakistan J Bot 43: 2519–2525

- Kihara H (1951) Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations. *Cytologia* 16: 177–193
- Kihara H, Yamashita K, Tanaka M (1965) Morphological, physiological and cytological studies in *Aegilops* and *Triticum* collected from Pakistan, Afghanistan and Iran. In: Yamashita, K. (Ed.), *Cultivated plants and their relatives (Results of the Kyoto University Scientific Expedition to the Karakoram and Hindukush, 1955)*, Vol. 1, pp. 1–140. The Committee of the Kyoto University Scientific Expedition to the Karakoram and Hindukush, Kyoto University, Kyoto, Japan
- Kihara H (1983) Origin and history of “Daruma” – A parental variety of Norin 10. Proc. 6th Intern. Wheat Genet Symp, Kyoto, Japan 13–19
- King RW, Richards RA (1984) Water uptake in relation to pre-harvest sprouting dormancy: ear characteristics. *Aust J Agric Res* 35: 327–336
- Kirby EJM, Rymer JL (1975) The vascular anatomy of the barley spikelet. *Annals of Botany* 39: 205–211
- Klindworth DL, Williams ND, Joppa LR (1990a) Inheritance of supernumerary spikelets in a tetraploid wheat cross. *Genome* 33: 509–514
- Klindworth DL, Williams ND, Joppa LR (1990b) Chromosomal location of genes for supernumerary spikelets in tetraploid wheat. *Genome* 33: 515–520
- Klindworth DL, Klindworth MM, Williams ND (1997) Telosomic mapping of four genetic markers in durum wheat. *J Hered* 88: 229–232
- Koba T, Tsunewaki K (1978) Mapping of the *s* and *Ch2* genes on chromosome D of common wheat. *Wheat Inf Serv* 45–46:18–20
- 国分牧衛 (2010) 新訂 食用作物. 養賢堂 pp. 138–145
- Konzak CF (1987) Mutations and mutation breeding. In: Heyne EG (ed) *Wheat and Wheat Improvement*. 2nd Edition. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 428–443
- Korić S (1980) Study of branched gene complex of *T. aestivum* ssp. *vulgare* and its significance for wheat breeding. *J Sci Agric Res* 142: 272–282
- Korzun V, Malyshev S, Voylokov A, Börner A (1997) RFLP-based mapping of three mutant loci in rye (*Secale cereale* L.) and their relation to homoeologous loci within Gramineae. *Theor Appl Genet* 95: 468–473

- Korzun V, Röder M, Worland AJ, Börner A (1997) Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breeding* 116: 227–232
- Korzun V, Roder MS, Ganal MW, Worland AJ, Law CN (1998) Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat. (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 96: 1104–1109
- Kosambi DD (1944) The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugenics* 12: 172–175
- Kosuge K, Watanabe N, Kuboyama T, Melnik VM, Yanchenko VI, Rosova MA, Goncharov NP (2008) Cytological and microsatellite mapping of mutant genes for spherical grain and compact spikes in durum wheat. *Euphytica* 159: 289–296
- Kosuge K, Watanabe N, Kuboyama T (2011) Comparative genetic mapping of the chlorina mutant genes in genus *Triticum*. *Euphytica* 179: 257–263
- Kosuge K, Watanabe N, Melnik VM, Laikova LI, Goncharov NP (2012) New sources of compact spike morphology determined by the genes on chromosome 5A in hexaploid wheat. *Genet Resour Crop Evol* 59: 1115–1124
- Koval SF (1997) The catalogue of near-isogenic lines of Novosibirskaya 67 common wheat and principles of their use in experiments. *Russ J Genet* 33: 995–1000
- Kumar A, Simons K, Iqbal MJ, Michalak de Jiménez M, Bassi FM, Ghavami F, Al-Azzam O, Drader T, Wang Y, Luo MC, Gu YQ, Denton A, Lazo GR, Xu SS, Dvorak J, Penny MA, Kianian DMA, Kianian SF (2012) Physical mapping resources for large plant genomes: radiation hybrids for wheat D-genome progenitor *Aegilops tauschii*. *BMC Genomics* 13: 597 (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/597>)
- Kuspira J, MacLagen J, Bhambhani RN, Sadasivaiah RS, Kim N-S (1989) Genetic and cytogenetic analyses of the A genome of *Triticum monococcum* L. V. Inheritance and linkage relationships of genes determining the expression of 12 qualitative characters. *Genome* 32: 869–881
- Lebedeva TV, Rigin BV (1994) Inheritance of some morphological characteristics, growth habit, and powdery mildew resistance in einkorn *Triticum monococcum* L.

- Russ J Genet 30: 1383–1387
- Lee J, Park JJ, Kim SL, Yim J, An G (2007) Mutations in the rice liguleless gene result in a complete loss of the auricle, ligule, and laminar joint. *Plant Mol Biol* 65: 487–499
- Li J, Wang Q, Wei H, Hu X, Yang W (2012) SSR mapping for locus conferring on the triple-spikelet trait of the Tibetan triple-spikelet wheat (*Triticum aestivum* L. conv. *tripletum*). *Triticeae Genomics and Genetics* 2: 1–6
- Li W, Gill BS (2006) Multiple genetic pathways for seed shattering in the grasses. *Funct Integr Genomics* 6: 300–309
- Li X, Qian Q, Fu Z, Wang Y, Xiong G, Zeng D, Wang X, Liu X, Teng S, Hiroshi F, Yuan M, Luo D, Han B, Li J (2003) Control of tillering in rice. *Nature* 422: 618–621
- Mackey J (1954) Neutron and X-ray experiments in wheat and revision of the speltoid problem. *Hereditas* 40: 65–180
- Manly KF, Cudmore RH Jr, Meer JM (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mam Genome* 12: 930–932
- Martinek P, Bednář J (1998) Gene resources with non-standard spike morphology in wheat. *Proc 9th International Wheat Genet Symp, Saskatoon, Saskatchewan, Canada* 2: 286–288
- Martinek P, Bednář J (2001) Changes of spike morphology (multirow spike-MRS, long glumes-LG) in wheat (*Triticum aestivum* L.) and their importance for breeding. In: *The proceedings of international conference “Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines”*, Novosibirsk, Russia, pp 192–194
- Martinek P, Dobrovolskaya OB, Pokorova P, Vanova M (2011) Gene resources of wheat (*Triticum aestivum* L.) with changed spike morphology and their utilisation. In: *Seed and Seedlings (Pazderu K, Edited): Scientific and Technical Seminar, Prague*: 62–69
- Martinek P, Dobrovolskaya OB, Watanabe N, Peng Z-S, Vyhnánek T (2012) Influence of the spike morphological structure of wheat on yield formation and relevant genetic resources. *Biodiversity in Agricultural Land and Ecosystem, International Conference of the REVERSE project - INTERREG IVC, 13 June 2012, Piešťany,*

Slovakia, pp.35–43 (in Czech)

- Matsuyama H, Fujita M, Seki M, Kojima H, Shimazaki Y, Matsunaka H, Chono M, Hatta K, Kubo K, Takayama T, Kiribuchi-Otobe C, Oda S, Watanabe Y, Kato K (2015) Growth and yield properties of near-isogenic wheat lines carrying different photoperiodic response genes. *Plant Production Science* 18: 57–68
- McFadden ES, Sears ER (1944) The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Rec Genet Soc Am* 13: 26–27
- McFadden ES, Sears ER (1946) The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J Hered* 37: 81–90, 107–116
- McIntosh RA, Baker EP (1968) A linkage map for chromosome 2D. In: Findlay KW, KW Shepherd (eds) Proc 3rd Int Wheat Genet Symp, Australian Academy of Science, Canberra, Australia, pp305–309
- McIntosh RA, Devos KM, Dubcovsky J, Rogers WJ, Appels R, Somers DJ, Anderson J (2008) Catalogue of gene symbols for wheat. In: Appels R, Eastwood R, Lagudah E, Langridge P, Mackay M, McIntyre L, Sharp P (eds) Proc 11th Int Wheat Genet Symp, Brisbane, Australia, pp. 59
- Metzger RJ, Silbaugh BA (1968/69) Aneuploid studies at Oregon State University. *Eur Wheat Aneuploid Cooperative Newslett* 2: 60
- Millet E (1988) Grain weight is largely determined by genes for spike morphology. Proc. 7th international Wheat Genet Symp, Cambridge, England 593–596
- Miralles DJ, Slafer GA (2007) Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced? *J Agric Sci* 145: 139–149
- Mitrofanova OP (1994) Creation of a genetic collection of common wheat in Russia: A basis for further development of particular genetics and breeding. *Russ J Genet* 30: 1306–1316
- Mitrofanova OP (1997) The inheritance and effect of *Cp* (Compact plant) mutation induced in common wheat. *Russ J Genet* 33: 393–398
- Moreno MA, Harper LC, Krueger RW, Dellaporta SL, Freeling M (1997) *Liguleless1* encodes a nuclear-localized protein required for induction of ligules and auricles during maize leaf organogenesis. *Genes Dev* 11: 616–628

- Morgante M, Olivier AM (1993) PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3: 175–182
- Mori N, Ishii T, Ishido T, Hirosawa S, Watatani H, Kawahara T, Nesbit M, Belay G, Takumi S, Ogihara Y, Nakamura C (2003) Origins of domesticated emmer and common wheat inferred from chloroplast DNA fingerprinting. 10th International Wheat Genetics Symposium Paestum 25–28
- Muehlbauer GJ, Fowler JE, Girard L, Tyers R, Harper L, Freeling M (1999) Ectopic Expression of the Maize Homeobox Gene *Liguleless3* Alters Cell Fates in the Leaf. *Plant physiology*, 119: 651–662
- Multani DS, Sharma SK, Dhaliwal HS, Gill KS (1992) Inheritance of induced morphological mutants in *Triticum monococcum* L. *Plant Breed* 109: 259–262
- Muramatsu M (1963) Dosage effect of the *spelta* gene *q* of hexaploid wheat. *Genetics* 48: 469–482
- Muramatsu M (1979) Presence of the *vulgare* gene, *Q*, in a densespikes variety of *Triticum dicoccum* Schubl. Report of the Plant Germ-Plasm Institute, Kyoto University, No. 4 pp 39–41
- Muramatsu M (1985) Spike type in two cultivars of *Triticum dicoccum* with the *spelta* gene *q* compared with the *Q*-bearing variety *liguliforme*. *Jpn J Breed* 35: 255–267
- Muramatsu M (1986) The *vulgare* super gene, *Q*: its universality in durum wheat and its phenotypic effects in tetraploid and hexaploid wheats. *Can J Genet Cytol* 28: 30–41
- Muramatsu M (2009) A presumed genetic system determining the number of spikelets per rachis node in the tribe Triticeae. *Breed Sci* 59: 617–620
- Nagai S, Takahashi M (1952) Genetical studies on rice plant XIV. The order and distance of some genes belonging to *PI*-linkage group in rice. *Jap J Breed* 1: 237–240
- Nalini E, Bhagwat SG, Jawali N (2005) Validation of allele specific primers for identification of *Rht* genes among Indian bread wheat varieties. *Cereal Res Commun* 33: 439–446
- 小野信一 (1976) 草姿, 草型と光合成産物の配分, 北除良 夫, 星川清親編 作物—その形態と機能 上 巻. 農業技術協会 304–316

- Pang J, Palta JA, Rebetzke GJ, Milroy SP (2014) Wheat genotypes with high early vigour accumulate more nitrogen and have higher photosynthetic nitrogen use efficiency during early growth. *Functional Plant Biology* 41: 215–222
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD Harberd NP (1999) ‘Green Revolution’ genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256–261
- Peng ZS, Yen C, Yang JL (1998) Chromosomal location of genes for supernumerary spikelet in bread wheat. *Euphytica* 103: 109–114
- Peng ZS (2003) New mutation in wheat producing three pistils in a floret. *J Agron Crop Sci* 189: 270–272
- Peng ZS, Li X, Yang ZJ and Liao ML (2011) A new reduced height gene found in the tetraploid semi-dwarf wheat landrace Aiganfanmai. *Genet Mol Res* 10: 2349–2357
- Pennell AL., Halloran GM (1983) Inheritance of supernumerary spikelets in wheat. *Euphytica* 32: 767–776
- Percival J (1921) *The wheat plant: a monograph*, London
- Pestsova E, Ganal MW, Röder MS (2000) Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43: 689–697
- Pizzuti D, Buda A, D’Odorico A, D’Inca R, Chiarelli S, Curioni A, Martines D (2006) Lack of intestinal mucosal toxicity of *Triticum monococcum* in celiac disease patients. *Scand J Gastroenterol Suppl* 41: 1305–1311
- Plaschke J, Ganal MW, Röder MS (1995) Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet* 91: 1001–1007
- Pratchett N, Laurie DA (1994) Genetic map location of barley developmental mutant liguleless in relation to RFLP markers. *Hereditas* 120: 35–39
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D, Benfey PN (1999) The GRAS gene family in Arabidopsis: Sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J* 18: 111–119
- Rao MP (1977) Mapping of the *Sphaerococcum* gene 'S' on chromosome 3D of wheat.

Cereal Research Communications 15–17

- Rao MVP, Swaminathan MS (1963) Vavilovoid mutant in *Triticum aestivum* and the origin of *T. vavilovii*. *Curr Sci* 32: 132–133
- Rao MVP (1973) Mapping of the compactum gene *C* on chromosome 2D of wheat. *Wheat Inform Serv* 35: 9
- Reynolds MP, Pellegrineschi A, Skowmand B (2005) Sink limitation to yield and biomass: a summary of some investigations in spring wheat. *Ann Appl Biol* 146: 39–49
- Röder MS, Korzun V, Gill BS, Ganal MW (1998a) The physical mapping of microsatellite markers in wheat. *Genome* 41: 278–283
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998b) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007–2023
- Rogalska SM, Achrem M, Kalinka A (2010) *Ph1* locus, a suppressor of homoeological pairing of chromosomes in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Postepi Biologii Komorki* 37: 297–305
- Smoček J (1991) Screwedness of the spike rachis – A new phenomenon in wheat spike morphology. *Rostlinná Výroba* 37: 507–514
- Rossini L, Vecchietti A, Nicoloso L, Stein N, Franzago S, Salamini F, Pozzi C. (2006) Candidate genes for barley mutants involved in plant architecture: an in silico approach. *Theor Appl Genet* 112: 1073–1085
- Ryan P, Liao M, Delhaize M, James RA, Richardson A, Weligama K, Spielmeyer W, Rebetzke GJ (2014) Effect of vigour and dwarfing genes on early phosphorus acquisition in wheat. *Plant and Soil*
- Sakuma S, Salomon B, Komatsuda T (2011) The domestication syndrome genes responsible for the major changes in plant form in the Triticeae crops. *Plant Cell Physiol* 52: 738–749
- Salina E, Börner A, Leonova I, Korzun V, Laikova L, Maystrenko O, Röder MS (2000) Comparative microsatellite mapping of the induced sphaerococcoid mutation genes in *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet* 100: 686–689
- Saponaro C, Pogna NE, Castagna R, Pasquini M, Cacciatori P, Redaelli R (1995) Allelic variation at the *Gli-A1^m*, *Gli-A2^m* and *Glu-A1^m* loci and breadmaking quality in diploid wheat *Triticum monococcum*. *Genet Res* 66: 127–137

- Schumacher K, Schmitt T, Rossberg M, Schmitz G, Theres K (1999) The *Lateral suppressor (Ls)* gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 290–295
- Sears ER (1947) The *sphaerococcum* gene in wheat. *Genetics* 32: 102–103
- Sears ER (1952) Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma* 4: 535–550
- Sears ER (1954) The aneuploids of common wheat. *Missouri Agric Exp Stn Res Bull* 572: 59
- Sehgal SK, Kaur S, Gupta S, Sharma A, Kaur R, Bains NS (2011) A direct hybridization approach to gene transfer from *Aegilops tauschii* Coss. to *Triticum aestivum* L. *Plant Breeding* 130: 98–100
- Sethi GS, Bhatnagar SD (1977) Morphology and cytogenetics of some new macro-mutants in barley. *Ind J Genet Plant Bred* 37: 73–79
- Sharman BC (1944) Branched heads in wheat and wheat hybrids. *Nature* 153: 497–498
- Shitsukawa N, Kinjo H, Takumi S, Murai K (2009) Heterochronic development of the floret meristem determines grain number per spikelet in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Ann Bot* 104: 243–251
- Simons KJ, Fellers JP, Trick HN, Zhang Z, Tai Y-S, Gill BS, Faris JD (2006) Molecular Characterization of the Major Wheat Domestication Gene *Q*. *Genetics* 172: 547–555
- Singh HB, Anderson E, Pal BP (1957) Studies in the genetics of *Triticum vavilovii* Jakub. *Agron J* 49: 4–11
- Singh K, Ghai M, Garg M, Chhuneja P, Kaur P, Schnurbusch T, Keller B, Dhaliwal HS (2007) An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* × *T. monococcum* RIL population. *Theor Appl Genet*. 115: 301–312
- Smoček J (1991) Screwedness of the spike rachis – A new phenomenon in wheat spike morphology. *Rostlinná Výroba* 37: 507–514
- Somers DJ, Isaac P, Edwards K (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 109: 1105–1114
- Song QJ, Shi JR, Singh S, Fickus EW, Costa JM, Lewis J, Gill BS, Ward R, Cregan PB (2005) Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor Appl Genet* 110: 550–560

- Sood S, Kuraparthi V, Bai G, Gill BS (2009) The major threshability genes soft glum (*Sog*) and tenacious glume (*Tg*) of diploid and polyploidy wheat, trace their origin to independent mutations at non-orthologous loci. *Theor Appl Genet* 119: 341–351
- Sreenivasulu N, Schnurbusch T (2012) A genetic playground for enhancing grain number in cereals. *Trend Plant Sci* 17: 91–101
- Sunohara H, Kawai T, Simizu-Sato S, Sato Y, Sato K, Kitano H (2009) A dominant mutation of *TWISTED DWARF 1* encoding α -tubulin protein causes severe dwarfism and right helical growth in rice. *Genes Genet Syst* 84: 209–281
- Taenzler B, Esposti RF, Vaccino P, Brandolini A, Effgen S, Heun M, Schäfer-Pregl, Borghi B, Salamini F (2002) Molecular linkage map of einkorn wheat: mapping of storage-protein and soft-glume genes and bread-making quality QTLs. *Genet Res Camb* 80: 131–143
- Tanaka T, Matsushima S, Kojyo S, Nitta H (1969) Analysis of Yield-Determining Process and Its Application to Yield-Prediction and Culture Improvement of Lowland Rice: XC. On the relation between the plant type of rice plant community and the light-curve of carbon assimilation. *日本作物學會紀事* 38: 287–293
- Theodoris G, Inada N, Freeling M (2003) Conservation and molecular dissection of *ROUGH SHEATH2* and *ASYMMETRIC LEAVES1* function in leaf development. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6837–6842
- Thitamadee S, Tuchiara K, Hashimoto T (2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis*. *Nature* 417: 193–196
- Torada A, Koike M, Mochida K, Ogihara Y (2006) SSR-based linkage map with new markers using an intraspecific population of common wheat. *Theor Appl Genet* 112: 1042–1051
- Udachin RA, Shakhmedov ISh (1976) New materials in the research of genus *Triticum*. *Trudy po Prikl Bot, Genet i Selekt* 56: 147–150 (in Russian)
- Udachin RA, Shakhmedov ISh (1977) New wheat species, *Triticum jakubzineri*. *Vestn S kh Nauki Mosc* 2: 41–43 (in Russian)
- Unrau J, Smith WE, McGinnis RC (1950) Spike density, speltoidy and compactoidy in

- hexaploid wheat. *Can J Res Com* 28: 273–276
- Upadhaya MD, Swaminathan MS (1969) Mutations induced by ethyl methane sulphonete in *Triticum pyramidale*. *Indian J Genet Plant Breed* 29: 338–341
- Valkoun J (2001) Wheat pre-breeding using wild progenitors. Book from Conference: 6IWC Budapest, Hungary, Jun 05-09, 2000, Wheat in a Global Environment (Bedo Z, Lang L Editors), Book Series Development in Plant Breeding 9: 699–707
- Vallega V (1996) Registration of partially free-threshing diploid wheat germplasm. *Crop Sci* 36: 1717
- Vinod, Singh B, Sinha P, Asad A, Tomar RS, Sharma JB, Tomar SMS (2009) Inheritance of angled spikelet arrangement in *Triticum durum* Desf. *Indian J Genet Plant Breed* 69: 243–246
- Walsh J, Waters CA, Freeling M (1998) The maize gene *liguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf blade-sheath boundary. *Genes Dev.* 12: 208–218
- Wang YH, Li JY (2008) Molecular basis of plant architecture. *Annual Review of Plant Biology* 59: 253–279
- Wang ZL, Yin YP, He MR, Cao HM (1998) Source-sink manipulation effects on postanthesis photosynthesis and grain setting on spike in winter wheat. *Photosynthetica* 35: 453–459
- Watanabe N (2004) *Triticum polonicum* IC12196: a possible alternative source of GA3-insensitive semi-dwarfism. *Cereal Res. Commun.* 32: 429–434
- Watanabe N, Nakayama A, Ban T (2004) Cytological and microsatellite mapping of the gene for liguleless phenotype in durum wheat. *Euphytica* 140: 163–170
- Watanabe N, Takesada N, Shibata Y, Ban T (2005) Genetic mapping of the genes for glaucous leaf and tough rachis in *Aegilops tauschii*, the D-genome progenitor of wheat. *Euphytica* 144: 119–123
- Watanabe N, Kosuge K and Kuboyama T (2008) Genetic mapping of the genes and development of near-isogenic lines in durum wheat. *EWAC Newslet.* pp. 27–28
- Weber JL, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American journal of human*

genetics 44: 388

- Worland AJ, Korzun V, Roder MS, Ganal MW, Law CN (1998) Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening. *Theor Appl Genet* 96: 1110–1120
- Worland AJ, Petrovic S (1988) The gibberellic acid insensitive dwarfing gene from the wheat variety Saitama 28. *Euphytica* 38: 55–63
- Yen C, Yang JL (1992) The essential nature of organs in Gramineae, multiple secondary axes theory: A new concept *J Sichuan Agric Univ* 10: 544–565
- Yoshiya K, Watanabe N, Kuboyama T (2011) Genetic mapping of the genes for non-glaucous phenotypes in tetraploid wheat. *Euphytica* 177: 293–297
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res* 14: 415–421
- Zhang B, Liu X, Zhao G, Mao X, Li A, Jing R (2014) Molecular characterization and expression analysis of *Triticum aestivum* squamosa-promoter binding protein-box genes involved in ear development. *Journal of integrative plant biology* 56: 571–581
- Zhang B, Liu X, Xu W, Chang J, Li A, Mao X, Zhang X, Jing R (2015) Novel function of a putative *MOCI* ortholog associated with spikelet number per spike in common wheat. *Scientific reports* 5 doi: 10.1038/srep12211
- Zhang L, Richards RA, Condon AG, Liu DC, Rebetzke GJ (2014) Recurrent selection for wider seedling leaves increases early biomass and leaf area in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot* 66: 1215–1226
- Zhang ZC, Belcram H, Gornicki P, Charles M, Just J, Huneau C, Magdelenat G, Couloux A, Samain S, Gill BS, Rasmussen JB, Barbe V, Faris JD, Chalhoub B (2011) Duplication and partitioning in evolution and function of homoeologous *Q* loci governing domestication characters in polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 18737–18742
- Zhogin AF, Puchkov Y, Alfimov VA (1985) Winter common wheat mutants with reduced and bulbous leaf. *Vest Skh Nauki (Moscow)* No.10: 85–90 (in Russian)
- Zhogin AF (1995) Induced mutations for leaf surface as breeding material of winter

bread wheat. *Sel'skokh Biol* 1: 27–31 (in Russian)

Zhu Z, Tan L, Fu Y, Liu F, Cai H, Xie D, Wu F, Wu J, Matsumoto T, Sun C (2013) Genetic control of inflorescence architecture during rice domestication. *Nat Commun* 4: 1–8

Zwick MS, Islam-Faridi MN, Czeschin DG Jr, Wing RA, Hart GE, Stelly DM, Price HJ (1998) Physical mapping of the *liguleless* linkage group in *Sorghum bicolor* using rice RFLP-selected sorghum BACs. *Genetics* 148: 1983–1992