

報 告

気候変動に対応する育種学の課題と展開



平成29年（2017年）9月27日

日本学術会議

農学委員会

育種学分科会

この報告は、日本学術会議農学委員会育種学分科会における審議結果を取りまとめ公表するものである。

日本学術会議農学委員会育種学分科会

委員長	倉田 のり	(第二部会員)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構理事、大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所名誉教授
副委員長	奥野 員敏	(連携会員)	元筑波大学生命環境系教授
幹事	西尾 剛	(連携会員)	東北大学大学院農学研究科教授
幹事	吉村 淳	(連携会員)	九州大学大学院農学研究科教授
	大杉 立	(第二部会員)	東京農業大学客員教授
	石毛 光雄	(連携会員)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構フェロー
	一井 眞比古	(連携会員)	香川大学名誉教授
	祝前 博明	(連携会員)	新潟大学研究推進機構朱鷺・自然再生学研究センター特任教授
	江面 浩 ^{※1}	(連携会員)	筑波大学生命環境系教授、つくば機能植物イノベーション研究センター・センター長
	國分 牧衛	(連携会員)	東北大学名誉教授
	佐々木 卓治	(連携会員)	東京農業大学総合研究所教授
	辻本 壽	(連携会員)	鳥取大学乾燥地研究センター教授
	夏秋 啓子	(連携会員)	東京農業大学副学長
	西澤 直子	(連携会員)	石川県立大学生物資源工学研究所特任教授
	村井 耕二	(連携会員)	福井県立大学生物資源学部教授
	矢野 昌裕	(連携会員)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構次世代作物開発研究センター所長

※平成 28 年 11 月 25 日から

本件の作成にあたっては、以下の職員が事務を担当した。

事務局	井上 示恩	参事官 (審議第一担当)	(平成 29 年 3 月まで)
	西澤 立志	参事官 (審議第一担当)	(平成 29 年 4 月から)
	渡邊 浩充	参事官 (審議第一担当) 補佐	(平成 28 年 12 月まで)
	齋藤 實寿	参事官 (審議第一担当) 補佐	(平成 29 年 1 月から)
	加藤 真二	参事官 (審議第一担当) 付審議専門職	(平成 28 年 4 月まで)
	山石 あや	参事官 (審議第一担当) 付審議専門職	(平成 28 年 5 月から)

要 旨

1 背景と目的

温暖化をはじめとする気候変動は、農業生産にとって大きなリスク要因であり、世界各地で作物の高温障害、干ばつ害、塩害などが頻繁に発生し、作物の生産性と品質に甚大な被害を及ぼしている。気候変動下において、持続的な農業生産を確保することは、世界が共有する喫緊の課題である。

本提言は、気候変動に対応して育種学が取り組む課題と展開方向についての議論及びわが国の育種学における発展を踏まえ、今後の国際連携による育種学研究強化の必要性及び育種学と環境農学の融合への展望を示すものである。

2 気候変動が農林業と畜産業に及ぼす影響

大気中のCO₂濃度など気象要因の変化は作物の生産性を変動させる。気候変動に伴う作物への影響の程度には作物種や栽培地域により差異がある。今後は、気候変動による作物収量への影響評価について、遺伝学的、生理学的、作物学的研究を強化する必要がある。温暖化は作物の品質にも大きな影響を及ぼす。わが国では夏季の高温により米品質の劣化が顕在化し、高温耐性品種の開発が急ピッチで進められている。永年性の果樹類では、温暖化による果実品質の低下が世界で問題になっている。また、気候変動により新規の病害虫の発生・飛来や激発地帯の北上などが予測されることから、より広い地域を対象に国際共同研究の強化が求められる。

気候変動により家畜の生産は負の影響を受ける一方、反芻家畜が温室効果ガスのメタンを放出するため、畜産業は温暖化の原因にもなっている。そのため、家畜や飼料作物の生産に及ぼす温暖化影響評価、環境負荷の低減化、メタン放出の抑制、気候変動に対応する家畜育種などに関する研究と技術開発が進められている。

3 気候変動に対応する作物育種と遺伝育種研究

気候変動の中で、世界の作物生産にとっての最大の脅威は高温と干ばつ、集中豪雨などである。特に、冷涼な環境を好み乾燥地で栽培されているコムギ、雨水のみに頼る天水田で栽培されるイネなどでは、気候変動に伴う干ばつは深刻な問題である。そのため、干ばつなどの気候変動への適応策としてストレス耐性品種の開発は重要な課題である。今後、世界における食料の安定生産を可能にするためには、育種研究の強化はもとより第二の緑の革命ともいべき画期的な農業生産技術開発のための研究の強化が必要である。

1960年代にコムギやイネで推進された緑の革命において、育種学は半矮性品種などの開発に貢献した。緑の革命の成果は世界中に普及したものの、収量増を達成するためには多大の資源を投入する必要があることから、環境への負荷が大きい。第二の緑の革命では、気候変動下における増収を目指すとともに、環境への負荷が小さく持続的な農業生産を目指すものでなければならない。

2000 年以降、作物のゲノム解読が急速に進展し、ゲノム情報を活用してストレス耐性機構の解明や耐性品種の開発が進展している。本報告では、乾燥耐性、塩害耐性、高温耐性、冠水耐性、洪水耐性及び湿害耐性に関する最近の研究を紹介し、気候変動に対応する遺伝育種研究の今後の展望について論議している。

これらの研究成果は、世界における気候変動下での食料問題の解決に貢献することが期待される。今後、国際農業研究機関、海外の大学や研究所などとの国際連携による気候変動に対応する遺伝育種研究の強化が必要である。

遺伝育種研究の成果を速やかに作物育種につなげるためには、ゲノム情報を利用して得られたストレス耐性遺伝子や QTL の集積、DNA マーカーを利用した突然変異体選抜や組換え体選抜などのゲノム育種技術の開発が重要である。また、従来の遺伝子組換え技術に加えて、任意の遺伝子に突然変異を起こさせることができるゲノム編集など新育種技術の開発も重要な課題であり、今後の新育種技術の発展への期待も大きい。

4 育種学と多分野を融合する新たな環境農学により生産を守る取り組み

育種学は、多様な遺伝資源から有用形質を導入して、動植物の新たな品種・系統を開発することを目的とする学問分野である。作物や家畜の生産環境に共存する微生物は、作物や家畜の生育や生産性に大きく影響するにもかかわらず、作物と微生物との共生、寄生や相互作用に関する基本情報はほとんど解析されていない。次世代シーケンサーによるメタゲノム解析が可能になった今、育種学、土壌学、植物病理学などの生産農学分野と分子生物学やゲノム科学を糾合し、新たな分野の融合研究を推進するための環境農学基盤を構築することは、今後の農学と環境科学にとって極めて重要である。

作物の生産環境には、作物に共生してストレス耐性や生産性の向上に寄与する微生物、作物に感染して病気を発症させる微生物など、多様な微生物種が共存している。気候変動下における微生物資源との相互作用を最大限に利用して作物の生育を最大化し、農業環境を改良・保全するためには、まず微生物など微小生物の基本情報を収集し解析する必要がある。これらの基本情報を解析することにより、植物と共生微生物との相互作用機構の解明に結び付けることが可能になるとともに、作物の遺伝的改変への適用も可能になることが期待される。

また、世界規模で進行中の土壌微生物のメタゲノム解析により生み出される成果は、耕作地の効率的利用や保全、気候変動に伴う耕作不適地の改良や緑化などに役立つことが期待される。動植物・微生物間相互作用を利用した農業環境基盤構築の研究には、国際連携による共同研究体制の整備が不可欠である。

目 次

1	背景と目的	1
(1)	気候変動予測	1
(2)	生物多様性への影響	1
(3)	育種研究で考えるべき気候変動の諸問題	2
2	気候変動が農林業と畜産業に及ぼす影響	3
(1)	世界とわが国の農業への影響	3
(2)	世界とわが国の林業への影響	5
(3)	世界とわが国の畜産業への影響	5
3	気候変動に対応する作物育種と遺伝育種研究	8
(1)	気候変動への適応性強化のための育種学研究の視点	8
(2)	気候変動への適応に関する遺伝育種研究	9
(3)	植物育種研究における技術の進展と利用	12
4	育種学と多分野を融合する新たな環境農学により生産を守る取り組み	14
(1)	これからの育種学に必要な多分野を融合する新たな環境農学基盤	14
(2)	農学の多分野を融合する環境農学基盤としての共生微生物研究の展開	14
(3)	共生研究の環境農学への適用と育種学の役割	15
<参考資料1>	育種学分科会審議経過	17
<参考資料2>	用語解説	18
<参考資料3>	引用文献	23
<参考資料4>	ストレス耐性遺伝子研究現状の解説	28
<参考資料5>	育種技術の詳細解説	36

1 背景と目的

気候変動により人間の生存や生活が脅かされている。国連による人口推移予測によると、現在 70 億の世界人口が 2050 年には 96 億人に達する。人口増加に伴うエネルギー消費と CO₂ 排出量の増加、生存環境の劣化及びそれらに伴う気候変動はますます激しさを増し、特に、近年の温暖化による作物の生産性低下は、世界人口の増加に伴う食料の需給ギャップを拡大させ、今後一層深刻な問題になると考えられる。

地球規模での温暖化は乾燥地の砂漠化を進行させ、人間の生活圏が奪われるリスクがある。一方、気候変動に伴う温暖化は、局地的に猛暑、豪雨、豪雪などの異常気象による災害を起こし、時に人間の生存そのものが危険にさらされることになる。また、気候変動は農業生産にとっても大きなリスク要因であり、特に近年、温暖化に伴って世界各地で作物の高温障害、干害、水害、塩害などが頻繁に発生し、作物の生産性や品質に甚大な被害を及ぼしている。したがって、気候変動下において持続的な農業生産を確保することは、食料安全保障の視点から世界に共通する喫緊の課題である。また、農業生産者にとって、気候変動の農業への影響は最大の関心事となっている。

(1) 気候変動予測

2013 年 9 月に公表された IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change、気候変動に関する政府間パネル) 第 5 次評価報告書によると、21 世紀末には地球の平均気温は 0.3~4.8℃の範囲で上昇すると予測されている。温室効果ガスの排出削減対策が講じられない場合、21 世紀末には地球の平均気温は 2.6~4.8℃ (平均 3.7℃) 上昇すると予測され、地球規模での温暖化は一層深刻化すると警告されている。

2015 年 12 月、第 21 回国連気候変動枠組み条約締約国会議 (COP21) において、2020 年以降の地球温暖化防止の新たな枠組みとなるパリ協定が採択された。パリ協定は、全体目標として世界の平均気温の上昇を産業革命前と比較して 2℃未満に抑えること、長期目標として今世紀後半には人間活動による温室効果ガスの排出量を実質的にゼロにすることなどを掲げている。目標達成のために国別の国内対策が義務付けられているものの、楽観視できない。また、局地的変動はすでに始まっており、気候変動に対応する作物育種では、最大の気温上昇をも想定した目標と戦略を設定して取り組む必要がある。

(2) 生物多様性への影響

気候変動は生物種の多様性に対しても大きな影響を及ぼすことが懸念されている。温暖化の影響は、最も早期に熱帯地域の生物多様性の変化に現れると予測されている [1]。季節的な気候変動が小さい熱帯地域に生息する生物種は、特に温度変化に対する適応力が弱く、温暖化の影響を最も受けやすいと考えられている。このような温暖化による生物多様性影響が熱帯地域の作物やその近縁野生種にも早期に現れるかは不明であるが、将来の育種における持続的利用の観点から、作物とその近縁野生種の賦存状況に関して定期的にモニタリングすることは重要な課題である。

(3) 育種研究で考えるべき気候変動の諸問題

気候変動下の農業において、乾燥、高温、塩害は、作物に同時に影響することが多く、これらの相互関係は複雑である。例えば乾燥に耐える性質については、耕作が降雨にのみ依存するか、灌漑できるか、地下水位が高いか低いかなどによって、条件は全く異なる。例えば夏雨型で地下水位が高い中国北部のコムギでは、より深根性で地下水位に達することのできる遺伝子型が有利である。また、種子を深播きにして土壌深部の水分を利用して発芽させる必要があり、子葉鞘が長く伸長できる深播き耐性の遺伝子型が重要である。これに対し、冬雨型で地下水位が低い地中海性気候地域のコムギでは、秋から冬の雨季に土壌に蓄えられた水で春の成長を行わねばならないため、水を節約しながら最後まで生育し子実を結ぶ性質が有利である。従って、この地域では、根圏の発達が旺盛で初期栄養成長に優れた系統は、生育の途中で水切れを起こし十分に種子を生産できない可能性があり、全生育期間を通じて節水性は最重要形質である。その他に、乾燥に敏感に反応し、大気湿度が低下する日中に気孔を閉鎖し葉を巻き上げる性質、葉の老化・枯死を遅延して緑色を保つ能力（ステイグリーン）、さらには、生育初期に葉が土壌表面に広がり土壌水分の蒸発を抑える形質も育種上重要と考えられる。

これら形質には品種間差があり明らかに遺伝的なものであるが、それに関与する遺伝子は主働遺伝子ではなく、多数の量的形質遺伝子座（Quantitative Trait Loci, QTL）が関与する。そのため、これらの性質を増強するためには、QTL を集積した系統を育成するか、野生植物などの遠縁な遺伝資源から遺伝効果の高いQTL を探す必要がある。そのためには、QTL に連鎖する DNA マーカーの開発や、大胆な遺伝資源開発が求められる。

このような現在と将来の気候変動に対応して、日本学術会議農学委員会育種学分科会では、第22期より気候変動に対応して育種学が取り組む課題と展開方向について論議を積み重ねてきた。本報告は、育種学分科会における議論の結果を取りまとめたものであり、わが国の育種学における発展を踏まえ、今後の国際連携による育種学研究の発展方向を示すものである。

また、国連では、持続可能な開発のための教育（Education for Sustainable Development, ESD）において、地球環境などの現代社会の課題に取り組むことのできる担い手育成のための教育の重要性を提唱している。本報告で提唱する、地球温暖化対策としての遺伝育種研究の意義や育種学の役割が、地球環境問題に関する教育目標の達成のために活用されることを期待する。

2 気候変動が農林業と畜産業に及ぼす影響

(1) 世界とわが国の農業への影響

① 作物の生育と生産性への影響

大気 CO₂濃度増加、気温上昇及び降水量など主要な気象要因の変化は、作物の生理機能・生育に影響を及ぼし、結果として収量の変動をもたらす。温度上昇に対する主要作物の収量応答については多くの解析研究がなされてきた。1980年から2008年間の気候変動が主要作物の収量に及ぼした影響を解析した結果では、世界平均収量はコムギでは3.8%、トウモロコシでは5.5%低下した一方、イネとダイズでは増加した地域と低下した地域が均衡し、世界全体では有意な変化はないとしている[2]。気象と作物収量モデルを用いた将来の主要作物の収量変動のシミュレーション結果によると、CO₂増加による増収効果を見込んだ場合でも、イネ、コムギ、トウモロコシのいずれにおいても、低緯度地帯では1℃以上の気温上昇により、高緯度地帯において3℃以上の気温上昇により、いずれも収量が低下すると予測している[3]。わが国では、今後の気候変動がイネの収量に及ぼす影響について、過去の収量変動と気象条件との関係から、あるいは実験データを基礎とした収量予測モデルを用いて解析されている。いずれの解析方法においても、収量の増減程度は異なるものの、温暖化によりイネ収量は西日本では大幅に低下し、北日本では低下がみられないか、増加する地域もあるとの結果が示されている。

大気 CO₂濃度は急激に上昇を続けており、ついに400ppmに達した。大気 CO₂は光合成の素材であり、一般に濃度上昇により作物の光合成は促進される。促進程度はC3型光合成回路を持つ作物（イネ、コムギ、ダイズ、寒地型牧草種など）で顕著であるが、C4型作物（トウモロコシ、サトウキビ、暖地型牧草種など）では小さい。光合成促進程度には、品種間差異も認められるが、その遺伝的・生理的機作は詳細には解明されていない。CO₂増加による光合成促進程度は、生育前半で大きい、後半では低下する抑制現象がみられる。抑制の主要な生理的要因は、葉内における光合成産物の過剰な蓄積によるソース能の低下、あるいはシンクの光合成産物受容能低下と推測されている[4]。

気温上昇は、冷温地帯においては、低温障害の軽減、生理機能の昂進などによりバイオマスを増加させる。一方、熱帯・亜熱帯においては、適温域を超えた高温では生理機能の抑制、呼吸量の増大、生育期間の短縮、水ストレスの増加など、バイオマス生産に負の影響を与える。イネでは開花期の気温が約35℃以上で花粉の活性低下を主因とした受精障害による不稔増加により収量低下の危険性が高まること、登熟期の高温はシンク能の低下などにより粒の肥大を抑制することが明らかになっている。ムギ類など越冬性の作物では、冬期の温暖化は幼穂の成長を早め、生殖成長時の低温遭遇の危険性を増し、登熟期の高温は品質低下と病害発生につながる。マメ科作物では地温上昇は根粒活性低下を引き起こし、窒素吸収については成長抑制を招くことが報告されている。これら高温に伴う諸障害への遺伝的耐性強化と栽培システムの改良が求められる。高CO₂条件では複合要因の影響が考えられるが、不明な点が多く、多要因の影響を包括した総合的な解明は今後の研究に依存する。

降雨量は畑作物の生育に大きく影響し、極端な降雨量の変化は干ばつや洪水を引き起こし、作物の生産性を低下させる。特に近年、世界各地で干ばつと洪水が頻発しており、作物生産に大きな被害をもたらしている。乾燥耐性や冠水耐性は遺伝的形質でもあり、育種による耐性強化が期待できる。

果樹は多様な種や品種で構成され、かつ多年性であり、気候変動の影響は種により多様である。落葉果樹では、越冬時の気温上昇は果樹の休眠覚醒の低温要求量を満たすことを妨げ、休眠打破が不十分になる可能性が懸念される。低温要求量と休眠打破の関係に関してはいくつかの予測モデルが提唱されており、冬期の気温上昇により休眠打破が強く影響されるとするモデル (Chilling Hours Model, Utah Model) と、影響は小さいとするモデル (Dynamic Model) とがあり、見解は分かれている [5]。正確な対応法を知るため、早期の評価法開発と評価結果を説明するための遺伝的・生理的研究が必要である。

② 作物の品質への影響

気候変動、特に温暖化による作物品質への影響の問題も顕在化している。イネでは、近年、夏期の高温年においては温度依存的な不稔籾、未熟米、白未熟粒、胴割粒などの発生が頻発している。これらは高温により受精、初期細胞分裂、デンプンの合成、転流、蓄積などに障害が起こることで発生することが知られており、未熟粒発生などのより詳細な機構解明により、耐性品種育成が加速されることが期待される [6]。

果樹での様々な高温障害も報告されている。アントシアニンなどの色素合成には一定の低温や日較差が必要であるため、ブドウでは着色系品種において着色不良が発生している。ヨーロッパのワイン用品種栽培地においても、高温による品質低下が見られている。ウンシュウミカンでは生育期の高温により浮き皮の発生が問題となっている。野菜では作物種により影響の出方は多様である。果菜類では、夏期高温による着果不良、果実肥大不良、着色不良、日焼け果・尻腐れ果の発生、花芽分化の遅れなどの障害が発生している。葉根菜類では、抽だい、葉の先端部の枯れ、軟弱・徒長化、結球不良などが問題となっている [5]。

③ 生産環境への影響

気候変動は、作物生産地の病原体や害虫の生息動向にも影響している。作物の有害生物 612 種類について、1960 年以降約 50 年間の発生データを解析した結果、年平均約 2.7km の速度で極域へ発生が拡大していることが指摘された [7]。イネの重要病害であるいもち病は平均気温 20~21℃、湿潤条件下で発症するが、より高温で日照時間が長くなると病気の進展は抑制される。このことから、高温化により、激発地帯は現在の東北地方から北海道に移行すると予測されている。イネ紋枯病やイネ白葉枯病も高温・多湿で多発することから、温暖化に伴い多発地帯の移動や拡大が予測される。コムギの赤かび病菌はかび毒を産出することから、赤かび病に罹病したコムギは食用に利用できない。この病原菌は収穫期の湿潤条件で多発するので、降雨量が増加すると予測される

地帯で発生増加が危惧される。気候変動により、土着の病原菌から新規の病原菌系統が出現する可能性が指摘されている。

わが国で発生が認められるイネミズゾウムシ、イモゾウムシ、ウリミバエ、数種のカメムシなどの害虫は、温暖化に伴い低緯度地帯からわが国に進入したものと推定される。ウンカ類は東南アジアや中国本土から日本に飛来してイネに吸汁害を与えるとともに、イネ縞葉枯病などの病原菌を媒介する。カンキツグリーンング病はミカンキジラミによって媒介されて発生する。これら広域移動性害虫に関しては、発生源での発生状況や使用農薬に対する抵抗性獲得の有無がわが国における発生や防除対策に影響する[8]。今後、温暖化の進行に伴い、これらの害虫発生地帯の北上と、新たな害虫の進入が危惧される。このように、気候変動に伴い病虫害の発生動向は変動することから、従来よりも広域な地帯を視野に入れた国際的な共同研究と対応策が求められる。

(2) 世界とわが国の林業への影響

森林分野と地球温暖化などの気候変動との関係は、林業へのネガティブな影響というよりも、森林・林業・木材利用という流れのなかで、森林による吸収・蓄積と木材利用による排出削減という両面から地球温暖化対策などへの貢献という方向で検討されている。

京都議定書の温室効果ガス削減目標は、2008～2012年において、基準年（1990年）と比較して6%の削減である。このうち、3.8%を間伐などの森林管理、木材の有効利用などによる森林吸収量で達成することとしていたが、2011年度には森林吸収量が4.0%に達し、約束期間の5年間で6%の削減目標を達成した。その後、政府は2013年11月に2020年までの新たな削減目標を3.8%とし、そのうち2.5%を森林吸収量により達成することとしており、森林分野への期待は依然として大きい。

短期的対応に加えて森林吸収量の中長期的な対策を検討するために、モデルを使って炭素吸収量の予測を行った結果、2050年まで人工林は吸収源であり続けるが、徐々に減少していくと予測された。また、木材製品の炭素について、ベースラインシナリオでは中期的に排出源になるが、利用促進シナリオでは吸収源となることが予測された。このような予測から、積極的な伐採・更新、成長の良い新品種の導入、木材利用の促進が森林分野での効果的な温暖化緩和策と考えられている[9]。

森林の更新のために、温暖化に強くCO₂吸収能力の高い品種の育成も進められている。北海道での利用を念頭に、生育の最適温度がグイマツより高いカラマツとグイマツのF₁雑種「クリーンラーチ」の実用化を目指す技術開発や、人工林の4割を占めるスギを対象に従来よりも成長に優れた「新世代林業種苗」を短期間で作出する技術開発などが進められている。

(3) 世界とわが国の畜産業への影響

地球温暖化による気候変動は、家畜・家禽（以下、家畜）の生産に対しても負の影響を及ぼす。一方で、反芻家畜は地球温暖化ガスのメタンを放出するため、温暖化の原因でもある。そこで、温暖化が家畜生産や牧草・飼料作物生産に及ぼす影響評価に加えて、

環境負荷の低減化対策、メタン放出の抑制などに関する研究と技術開発に精力が注がれているほか、気候変動に対応する家畜の育種に関連した研究も推進されている。

① 気候変動が家畜生産に及ぼす影響

これまでの地球温暖化の影響評価では、熱中症による斃死（へいし）や暑熱ストレス・酸化ストレスの進行などによる繁殖障害の増加、受胎率の低下、飼料摂取量の減少、乳用牛の産乳量の減少と乳成分量への影響、肉用牛や豚での増体量・肉質の低下、家禽での産肉量の低下などが認められている。また、マダニやワクモのような外部寄生虫、ハエのような衛生害虫の増加の傾向なども認められているほか、飼料作物では夏枯れなどによる減収や害虫の増加が報告されている。今後は、その地域に存在しなかった病原菌や病原菌媒介生物が増加し、家畜に新たな疾病がもたらされるケースも想定され得る[10]。

② 気候変動の時代における家畜育種の方向性

世界の食料生産は、今世紀の半ばには現在の水準の70%の増産が必要となる[11]。したがって、これからの家畜生産とその拡大が今後の食料問題の克服において果たすべき役割は極めて大きい[12]。しかし、一方では、地球温暖化による気候変動の悪影響の進行や種々の環境変化の到来が想定される。このような背景の下で、21世紀においては、環境への負荷の低減を図りつつ、家畜の生産効率、強健性及び畜産物の品質の向上を図るための育種の推進が重要であると考えられる。家畜の生産効率の改良を図る上では、生産形質のみならず、繁殖性、健全性、長命性、強健性などの改良による生涯生産性の改良が必要である。家畜の強健性とは、気候変化や様々な環境変動の下でも等しく高い能力を発揮できる特性のことであり、強健性の優れた家畜の育種は、今後の世界的な課題の一つであると考えられる。畜産物の品質の向上は、食品の食味や安全性の観点のみならず、アニマルウェルフェアと生命倫理の観点からも育種と関連した課題である。

③ 気候変動に対応した乳牛の育種（わが国における動向）

わが国の乳用牛はその99%がホルスタイン種であり、残りの1%はジャージー種やブラウンスイス種などである。ホルスタイン種は、他の乳用種よりも乳生産量が高い一方、相対的に暑熱に弱いことが欠点とされている。わが国のホルスタイン種では、2010年のような猛暑の年には乳生産が低迷し、飲用乳やバターなどが不足に陥る状況である。

北米を中心としたこれまでの研究報告[13]によると、乳用牛における暑熱ストレスの大きさは、温度と湿度から算出する温湿度指数（Temperature-Humidity Index：THI）で表すことが可能であり、THIが72を超えたあたりから乳量が低下する。Hagiyaら[14]は、海外の文献において示された暑熱ストレス区分を日本の8月の平均THIに応用し、北海道（暑熱ストレスなし）、東日本（軽度）、西日本（中程度）に3区分して、それらの間の季節効果の大きさを比較した。その結果、乳量は冬から春分娩で高く、秋分娩

で低いものの、暑熱ストレス区分間の差は小さかった。一方、雌牛の健全性の指標である体細胞スコアは、夏季に上昇し、その変化の大きさは西日本で特に顕著であった。繁殖性にも同様の傾向が認められたことから、乳用牛における暑熱ストレスの大きさは、乳量よりも健全性や繁殖性において明確に現れることが明らかとなった。これらのことから、個体間の耐暑性の違いは、乳量の変化よりもむしろ、健全性を指標にした数値化により明確になると考えられる。

暑熱ストレスは、乳量に加え、雌牛の健全性や繁殖性に対してより大きな影響を及ぼすことから、これまで考えられてきた以上に乳用牛へのダメージが大きいと推察される。今後、耐暑性の個体差を適切に評価できる指標を開発し、暑熱環境への耐性を遺伝的に高めるための準備を進める必要がある。また、ホルスタイン種における暑熱ストレスは、わが国と同様に湿潤気候の東アジアやより過酷な環境にある東南アジアの諸国にも共通の課題である。したがって、ホルスタイン種の暑熱耐性を遺伝的に改良する方法を確立させることは、その方法の応用により、東・東南アジア地域における乳生産能力の向上にも寄与すると考えられる。

④ 環境負荷の低減のための家畜育種の追求

ウシのような反芻家畜が排出するメタンの地球温暖化に対する影響は、CO₂の20倍以上も大きく、家畜生産は地球温暖化ガスの発生に相当に関わっている。しかし、家畜からのメタン発生量を多数の個体について正確に測定し、家畜の選抜に利用することは現段階では未だ難しい状況であり、育種的应用には間接的な測定値や指標が必要である。

これまでのライフサイクル・アセスメントやバイオエコノミックモデルなどによる検討により、家畜からのメタン発生量は、個体当たりではなく、生産物当たりの単位で評価すべきとされていることから、家畜の飼料利用効率や生産効率を向上させ、生産物単位当たりのメタン発生量を低減させることが重要である[15]。繁殖性や長命性のより一層の遺伝的改良も、更新率を低減させ、生産に寄与しない若齢の個体数を減らすことで、生産物当たりのメタン発生量の低減に寄与すると期待できる。

今後、ゲノムと環境との相互作用に関するエピジェネティクス研究や、メタゲノム解析により反芻家畜の反芻胃におけるマイクロバイオームの遺伝的ダイナミクスの解明が進展すれば、それらの研究成果とゲノムデータとの総合的な利用により、反芻家畜におけるメタンの発生量を低減させるための育種も現実味を帯びてくる。

3 気候変動に対応する作物育種と遺伝育種研究

(1) 気候変動への適応性強化のための育種学研究の視点

① 今後の食料生産

今後、発生が予測される気候変動のうち、作物生産に深刻に影響を及ぼすのは、高温及び降水量の極端現象に伴う干ばつである。これらは冷涼な環境を好み乾燥地に多く作られるコムギなどの作物では特に深刻であり、既に気候変動による負の影響が見られている。今後、地球温暖化の防止策をとらなければ、例えば地中海周辺やアフリカのサハラ砂漠の南などで穀物の生産が半減すると予想されており、特にサハラ以南のアフリカは1980年比で2080年には栄養不足人口が3倍になるとされる[16]。これらを抑えるために、気候変動に適応できる品種の開発はきわめて重要であり、育種にかかる期間を考えると今から実施する必要がある。人口の純増と経済発展による肉食化に伴う家畜の増加により、2050年には食用と飼料用を合わせ、現在の1.6~1.7倍の穀物が必要とされる。必要な生産ができなければ、穀物は投機の対象になり価格が高騰する。必要な食料の安定生産を可能にするため、第二の緑の革命の必要性が提唱されている。

② 緑の革命との比較

1960年代に顕著になった緑の革命は、様々な農業技術を含む技術パッケージであった。これにより、1960年から2010年の50年間に、穀物生産は約3倍になり、人口増(2.4倍)を上回った。この緑の革命の中で、育種の役割は圃場に投入される灌漑水や化学肥料に敏感に反応して収量を上げることのできる半矮性品種や雑種品種の開発であった。つまり、緑の革命のコンセプトはハイインプット・ハイアウトプットであり、耕地面積を増やさずに行う集約的農業である。この時のハイインプットは人為的で予測可能な資源の投入である。緑の革命の成果は世界中に普及したものの穀物生産増は頭打ちである。これを打開する第二の緑の革命では、気候変動下における増収を目指す一方、温室効果ガスの抑制など環境への負荷が低く持続的な生産を目指すものでなければならない。第二の緑の革命の難しさは、対象とする因子が気候という変動する自然現象の中で行わねばならない点である。気候は、長期的には予測できても、毎年の温度や降水量を事前に予想できない。また、気候に関わる因子が複雑で、それらが互いに関係している点にある。そのために、緑の革命において取られた、半矮性遺伝子の利用による育種のように、単純な遺伝資源の利用だけでは解決できない。

(2) 気候変動への適応に関する遺伝育種研究

① 育種学研究の過去10年の動き

2000年以降、イネをはじめとして作物のゲノム解読が急速に進展し、品種改良に有用遺伝子の研究成果が即座に適用され、ゲノム情報を活用した画期的品種の育成が作物の安定生産や品質維持に大きく貢献すると期待されている[17]。特にこの10年では、作物の安定生産に貢献する環境ストレス耐性のメカニズム解明が進展している[18]。作物の品種や系統、特に在来品種や近縁野生種から見いだされた乾燥耐性、塩害耐性、高

温障害耐性（品質、稔性）ならびに異常気象によって生じる局地的な冠水や洪水に関する耐性に焦点をあてた研究で、多様な遺伝子の関与が解明されている。それらの遺伝子の利用により、ストレス耐性の付与やストレス回避への効果が実験的に証明されている。

② 気候変動適応へのストレス耐性植物科学と遺伝育種学研究

耐性植物の開発には、2つの代表的研究手法がある。一つ目の手法は、まず植物のストレス応答を分子レベルで詳細に調べ、その理論に基づいて耐性作物を開発する方法、もう一つは、多様な遺伝資源の中から耐性系統を見だし、交配実験から QTL を特定し、育種に利用して新規品種を開発する方法である。前者についての研究としては、細胞内の適合溶質の産生を増加させ、あるいは抗酸化酵素の活性を高めて光合成を保護するものである。耐性関連遺伝子の発現を誘導するタンパク質 DREB による乾燥耐性植物の開発もその例である。この研究手法の場合、耐性植物の開発には関与する遺伝子の遺伝子組換えによる強発現系統やゲノム編集による遺伝子の機能欠損系統などが利用できる。一方、後者については、イネの QTL 解析による遺伝子発見の貢献は大きく、以下のような乾燥耐性、塩害耐性、高温耐性、冠水耐性、湿害耐性などのストレス耐性遺伝子が発見され、利用が進められている。これらの耐性遺伝子と系統開発については、詳細を参考資料4で紹介する。

ア 乾燥耐性

近年、フィリピンの古い陸稲品種を利用して、イネの深根性に関与する遺伝子 *DRO1* (*DEPPER ROOTING 1*) が単離された[19]。*DRO1* は、オーキシシンによって転写が抑制され細胞伸長を促進する遺伝子である。*DRO1* をマーカー選抜で導入した系統は実験的な乾燥条件下において、深根になり、乾燥による収量低下を著しく改善できることが明らかとなった[19]。

イ 塩害耐性

イネには耐塩性が極めて強い在来品種 ‘NonaBokra’ や ‘Pokkali’ の存在が古くから知られている。‘NonaBokra’ の塩害耐性に関与する QTL 解析により、複数の QTL が見いだされ、そのうち第1染色体の QTL *SKCI* はナトリウムトランスポーターをコードし、地上部の K, Na 濃度の制御によって塩害耐性を高めていることが明らかになった[20]。*SKCI* 単独では、十分な耐性を付与できないことから、さらに複数の遺伝子の関与が想定される。コムギにおいてもナトリウムトランスポーターが塩害耐性に関与していることが明らかにされ、コムギの近縁種ヒトツブコムギのナトリウムトランスポーター *TmHKT1;5-A* をデュラムコムギに導入した系統では、顕著な収量増加が観察されている[21, 22]。

アズキは *Vigna* 属に分類されるマメ科作物であるが、*Vigna* 属の近縁野生種 *V. marina* は海岸沿いの砂浜に生育する種で、特に強い塩害耐性を示し、効果の大きな塩害耐性関連 QTL が見いだされている[23]。

ウ 高温耐性

高温によるストレスは作物の生育ステージによって様々な障害を引き起こす。イネの生育初期、開花期及び登熟期の高温障害に関与する遺伝子について解析が進んでいる。

生育初期の高温障害耐性：イネは苗の時期に高温を受けると枯死する。アフリカの栽培種 *Oryza glaberrima* が障害耐性を持つ。アジア栽培種 *O. sativa* は弱く、この高温耐性の違いを決定している効果の大きな QTL として *TT1* が単離された[24]。グラベリマから *TT1* をアジア栽培種に導入すると、高温障害耐性は著しく改善することが明らかとなった[24]。

高温による種子不稔及び外観品質低下：イネの開花期の高温は葯の裂開や花粉の受粉能力に影響し、種子不稔を引き起こす。また登熟時期の高温は、澱粉合成や転流への影響により、未熟種子などの玄米品質の低下を引き起こす。種子不稔を引き起こす開花時期の高温障害耐性 QTL が、インド型品種 ‘N22’ で複数見いだされ[25]、効果の大きな *qHTSF4.1* 領域をアジア広域栽培イネ ‘IR64’ に導入した系統は、高温時の種子不稔を減少させることが証明された[26]。さらに、登熟期の高温は、デンプン合成の低下や分解の促進など、登熟障害を引き起こす。この障害は玄米の外観品質を著しく低下させ、心白や背白種子が顕著になる。外観品質の維持に効果が確認されている QTL は、4 か所の染色体上で見いだされている[27]。

エ 冠水耐性・洪水耐性

局所的な大雨や洪水によって一定期間植物体が水没すると、一般に作物は酸素不足で枯死する。冠水は一時的な水没であるが、この冠水条件に耐えることができるイネの在来インド型品種の解析によって、冠水抵抗性遺伝子 *SUB1A* が単離された[28]。*SUB1A* はエチレン応答性因子で、冠水条件になると生育抑制を引き起こし、2週間程度の冠水時のエネルギーロスを最小限に抑えることで、消耗に耐えて生き残る。この遺伝子は、アジアとアフリカの大規模栽培品種群に導入されている。

一方、長期間洪水状態が継続する条件では、急速に茎を伸長させて、水面上から酸素を得ることで枯死を回避する浮きイネ性をもつイネも存在する。浮きイネ性に関与する QTL 解析から、エチレン応答性の2つの遺伝子 *SNORKEL1* (*SK1*) 及び *SNORKEL2* (*SK2*) が見つかった[29]。洪水条件になると、嫌氣的条件で発生するエチレンが *SK1* 及び *SK2* の発現を誘導し、ジベレリンの生成を介した節間伸長を引き起こすことによって、水没を回避すると考えられている[30]。

これらの *SUB1A* と *SK* 遺伝子は冠水や深水依存的な条件で生成するエチレンを介した遺伝子発現制御によって、生育を停止あるいは促進することによって、ストレスを回避する戦略をとっているため、嫌氣的ストレスがない条件での生育への影響は最小限にとどめられている。このことが育種で問題になるトレードオフを回避でき、他の形質への負の影響が最小限に抑えられ、育種上利用価値が高い。

オ 酸素漏出バリアによる湿害耐性

湿性条件で生育する植物は、還元状態になる根の活性を保って生育するために、根の通気性組織の発達、還元耐性及び根からの酸素の水中への拡散を防ぐスベリン化された皮下組織（ROL バリア）を作物に導入して、湿害耐性を強化する試みが進められている。トウモロコシは湿害耐性に弱く、我が国の局地的な降雨による冠水や湿潤状況での生産性の安定化は今後の飼料作物生産において重要な目標である。QTL 解析を用いて、トウモロコシへの野生種で湛水低地に生育するテオシントの耐湿性の導入・育成や、コムギへのオオムギ属雑草の ROL バリアの導入などが進んでいる。

③ 気候変動への適応性を強化した作物開発戦略と世界の食料生産

上記で紹介した多くの例は、現在、広く栽培されている品種に、遺伝的に遠縁な遺伝資源の特性を取り込んで、育種に利用しようとするものである。今後、世界のジーンバンクにある多様な在来品種や近縁野生種の遺伝資源がもつ有用遺伝子を積極的に見いだすための技術開発も必要である。作物の近縁野生種のなかには、きわめて強い乾燥条件下や塩類土壌で自生している種があり、ストレス耐性育種のための有望な遺伝資源である。しかし、野生種の形態は栽培品種と大きく異なり、特にストレス耐性のような量的形質の場合は、野生種の特性が栽培品種の育種に利用可能であるとの確証を得るのは容易でない。そこで、野生種の染色体の一部分のみを栽培品種の遺伝的背景に導入し、目的形質以外は栽培品種に均質化した系統の開発が必要である。この場合、野生種の 1 系統を扱うのではなく、ジーンバンクの中に存在する多様な野生種遺伝資源の中から有用遺伝子を見つけ出す方法が必要である。イネではすでに複数の野生種から栽培品種への導入が進み、染色体断片置換系統や組換え自殖系統群が作出されている。また、これらの系統を利用してストレス耐性遺伝子の発見と利用が進んでいる。パンコムギにおいても多数の野生種の交配による混系集団が開発され、高温に対して応答性の異なる系統が選抜されている [31]。

イネやコムギのような自殖性作物であっても、在来品種は純系が混合された集団であり、品種内に多様性を保持している。在来品種は環境変動に最も適合度を上げる比率で混合されている集団と考えることもできるので、在来品種に内在する多様性を利用する育種は、自殖性作物の環境変動に対する適応策として有効である。近代育種は在来品種の純系混系集団の中から、優れた純系を選抜するところから始まったが、環境変動に強い品種開発では在来品種が混系であることの意味を再評価してもよい。

わが国は、気候変動による影響が比較的少ない地域に位置している。しかし、既に白未熟米の発生や果樹の着色障害など高温障害が大きな問題になっている。また、世界では干ばつが毎年発生しているが、わが国はコムギやトウモロコシなど多くの穀物を気候変動の影響を大きく受ける地域より輸入している。わが国は先進国の一員として、農学や植物科学分野でこれまで世界をリードする存在であったが、これらの技術力を、国内の問題とともに国外での食料生産にも積極的に結び付け、世界的な食料問題の解決に貢

献することが期待される。そのためには、気候変動への対応体制を強化し、育種を大規模に実施している国際農業研究機関などとの強い連携による情報の共有が欠かせない。

(3) 植物育種研究における技術の進展と利用

① 従来の育種技術の利用と展開

古くから行われ、現在も多くの品種の育成に利用されているのは、品種や系統の間で交雑し、その子孫から両親の優れた特性を併せ持つ品種を育成する交雑育種法である。異なる品種・系統間で交雑し、 F_2 世代で個体選抜し、次世代以後を系統として選抜する系統育種法や、最初の個体選抜を F_4 世代以後から行う集団育種法が多く利用される。遺伝的にある程度均一になった段階で、各地域における適応性や、環境ストレス耐性などの特性が評価され、 F_{10} 世代程度で新品種となる。古い品種や海外の品種などの遺伝資源が持つ一点だけ優れた特性を主要品種に導入するために、遺伝資源を一回親とし、主要品種を反復親として連続戻し交雑を行う戻し交雑育種法も用いられる。交雑育種法により、耐冷性が強いイネ品種が多数育成されてきた。交雑育種では、通常、品種育成に8～10年程度必要となる。

交雑育種法では、雑種作成が可能な植物が持つ遺伝変異しか、育種に利用することが出来ないため、新たな遺伝子の変異を人為的に作成して育種に利用する突然変異育種法もよく利用されている。放射線や化学変異剤などの変異原の処理によって突然変異を誘発し、突然変異体を選抜して、直接品種とする、あるいは、主要品種に交雑して突然変異遺伝子を育種に利用する。変異原処理では、狙った特定の遺伝子に突然変異を誘発することが出来ず、突然変異はゲノム上で無作為に起こるため、目的とした突然変異形質を持つ個体を大規模な集団から選抜する必要がある。わが国では、塩害耐性が強いイネ[32]や、カドミウム低吸収性のイネ[33]などが作出され、その突然変異形質が育種に利用されている。

1990年代に遺伝子組換え技術を用いた育種が実際に行われるようになり、既にダイズやワタでは、世界における遺伝子組換え品種の比率が非遺伝子組換え品種より高くなっている。遺伝子組換え品種は、トウモロコシやセイヨウナタネでも広く利用され、除草剤耐性と耐虫性の遺伝子を利用したものが多い。微生物やウイルスのDNAが育種に利用でき、人為的に合成した遺伝子でも利用できるため、育種技術としてのポテンシャルは極めて高い。遺伝子組換え育種はその可能性が大きい反面、その危険性についての懸念もあるため、食品安全性評価や生物多様性影響評価が求められる。グリシンベタインなどの適合溶質の合成酵素の遺伝子を高発現させること[34]や、乾燥条件での遺伝子発現誘導に関与する遺伝子を高発現[35]させることにより、多くの植物種で乾燥耐性や塩害耐性が向上することがわかっている。

② ゲノム情報を利用した育種の効率化と短縮

日本が先導して行ったイネゲノム塩基配列の解読[36]の後、多くの作物種で全ゲノム解読の成果[37, 38, 39]が得られている。ゲノム塩基配列の解読は、その種が持つ遺伝子

の同定を大きく促進し、現在では、イネをはじめ多くの作物種で多数の形質に関連する遺伝子が同定されている。育種目標の特性に関連する遺伝子に連鎖した DNA マーカーによる選抜 (Marker-assisted selection) は、検定に多大の労力を必要とする特性の選抜には極めて有用である。形質変異をもたらす塩基配列変異は、一塩基の置換や欠失などの一塩基多型 (SNP) である場合が多いので、低コスト簡易 SNP 分析技術[40]を利用すれば、DNA マーカーと原因遺伝子との間の組換えによる選抜ミスがなく、より精度の高い選抜を行うことが可能となる。このようなゲノム情報を利用した育種がゲノム育種と呼ばれる。環境ストレス耐性は多数の QTL に制御される場合が多いので、一つの QTL では効果が不十分であっても、それを集積することによって、明確な差をもたらすことができる。DNA マーカーを用いて QTL を集積することは QTL ピラミディング[41]と呼ばれ、イネの耐冷性育種にも利用されている[42]。

突然変異育種においても、ゲノム育種の手法が発展している。ミスマッチ部位を切断する酵素を用いた SNP 分析で突然変異体を選抜する方法が TILLING[43]と呼ばれ、世界中で突然変異体作出に利用されている。国内でも、高オレイン酸ダイズなどが作出されている[44]。この方法では、遺伝子の塩基配列情報から突然変異体を獲得するので、環境ストレス耐性などの効果が小さい QTL による突然変異体でも、耐性個体の選抜が可能である。次世代シーケンサーを用いた逆遺伝学的突然変異体選抜法[45]も開発されており、育種利用が期待される。

③ ゲノム編集の重要性と今後の展開

ゲノム上の特定の塩基配列を認識して切断する方法の開発が、近年急激に進歩し、zinc finger nucleases (ZFNs) [46]や TAL effector nucleases (TALEN) [47]、CRISPR/Cas9[48]を用いた方法がある。特に CRISPR/Cas9 では、切断したい塩基配列に相補的な RNA と DNA 切断タンパク質の複合体を細胞に入れるだけなので、容易に任意の塩基配列を切断できるようになった。DNA の二本鎖切断が起こると、それと相同な塩基配列を用いて修復されるが、修復ミスも起こり、突然変異遺伝子となる。特定の遺伝子を狙って突然変異を起こさせるのは、従来の突然変異誘発法では不可能であったが、これらの方法では可能となった。さらには、切断した位置に、遺伝子を挿入することも可能となる[49]。これは、従来の形質転換技術では染色体上に挿入する遺伝子の位置を限定できず、形質転換体ごとに導入した遺伝子の発現レベルが異なるという問題を解決できる手段となることが期待される。このような部位特異的ヌクレアーゼを用いて任意のゲノム塩基配列を改変する技術はゲノム編集技術と呼ばれ、作物の育種にも利用されようとしている。特定の塩基配列に任意の塩基置換を起こさせる手段として、oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM) という方法[50]も開発されている。また、ゲノム配列に直接変更を加えず、RNA などで遺伝子の発現だけを制御する方法なども開発されている。このように、従来の形質転換技術より後に開発された種々の遺伝子改変技術は new breeding techniques (NBT) と呼ばれ、その技術を利用したことの検知が難しく、遺伝子組換え作物としては認識されなくとも、慎重な取り扱いが求められている。

ゲノム編集技術やODMなどは、その開発者により多くの特許が申請されており、日本はこれらの技術の開発においては遅れを取ったことから、日本ですぐに育種技術として利用するには、解決すべき問題も存在する。しかしながら、ゲノム編集技術は、その扱いやすさ、組み入れた変異の選抜マーカーを簡便に除去できること、自然変異と同等の変異を作出できるという点において、今後広く展開すべき育種学の方法論となることが期待される。

なお、育種技術の進展と利用についての詳細を参考資料5で紹介する。

4 育種学と多分野を融合する新たな環境農学により生産を守る取り組み

(1) これからの育種学に必要な多分野を融合する新たな環境農学基盤

育種学は、動植物に各種遺伝資質からより良い形質を導入し、新たな品種や系統を開発することを目的に展開されている。作物を改良するため、これまで育種学は作物や家畜のみをターゲットに改良・選抜を行ってきた。一方、環境農学は、食料を通して行われるヒトの栄養、機能性成分、微生物などの摂取や、農業生産の環境整備に向けた作物栽培における方法論まで、多様かつ多分野が関与する研究分野である。近年、ヒトの健康医療の分野においては、急速に次世代シーケンサーによるメタゲノム解析が進み、腸内細菌、各種臓器や皮膚に存在する常在細菌が網羅的に解析されている。共存細菌なくしては、ヒトや動物の生存は極めて困難であること、共存細菌の移植などにより、健康が大きく左右されることが明らかにされつつある[51]。同様に、植物も土壌細菌や植物内外の共生及び共存細菌の有無によってその生育が大きく影響を受ける。経験的には土壌環境などの重要性は認識されてはいたものの、ほとんどの微生物の単離・培養が極めて困難なこともあり、植物と微生物との共生・寄生や相互作用についての、微生物の種類や存在比、動態などの基本情報はほとんど得られていない。次世代シーケンサーによる包括的解析が可能になった今、栽培学、作物学、育種学、微生物学、土壌科学、植物生理学、植物病理学、昆虫学、分子生物学などを糾合して、このような新たな環境農学の基盤を形成し、育種学との融合研究を推進することが、今後の農学や環境科学にとって極めて重要であり、農学の使命であると思われる。研究構想については、育種学のみならず農学の総力をあげて取り組むべき研究課題として、すでに大型研究計画で提案しているが、「農業環境の持続的な保持と安定的な生産の両者を同時に達成できるような農業基盤の確立」の重要性に関して、ここで重ねて気候変動に対応するこの提案の意義と育種学の役割を述べる。

(2) 農学の多分野を融合する環境農学基盤としての共生微生物研究の展開

植物と微小生物との共生及び相互共存関係は、直接、間接を問わず多義にわたる。植物体内に共生するエンドファイトの中には、その産物により植物を壮健にし、病害虫などの環境ストレスから植物を守り、作物の生産を支える微生物が存在する[52]。これとは逆に、植物病原菌や昆虫の幾つかは作物に甚大な被害をもたらすものがあり、これらと共生あるいは対抗するための作物側の遺伝子の探索は、育種学上の大きな課題の一つでもある。また、植物を食害する昆虫では、その昆虫に共生する微生物の種類が変わることで植物の

嗜好性を変える場合があることも明らかにされている[53]。土壌中では、植物の根に共生する多様な菌根菌が、植物の合成する炭素化合物を養分として利用することにより地球上の多量の二酸化炭素を消費し、代わりに土壌中のリンや窒素を分解し植物に養分を供給している[54]。また、マメ科植物への共生に限られるものの、根粒菌は古くから窒素固定を行う微生物として知られており、共生メカニズムなどの研究も進んでいる。その他にも、有用物質生産菌や、間接的に植物との相互作用を支える多様な土壌細菌が存在する。微生物以外にも線虫やミミズ、アリ、モグラなどの多種類の小動物も土壌中に存在し、植物を含んだ土壌中の食物連鎖を構成している。線虫は、多様な作物生産に甚大な被害をもたらすことが知られている土壌微生物の捕食者[55]でもあるが、植物への寄生害虫としての限られた一面しか知られていない。土壌中の菌根菌や他の有用及び有害微生物全体の存在量や比率のみならず、微生物、小生物相互の関係、植物や作物と微小生物との共生、寄生、相互作用などの基盤的情報は、現在殆ど無いに等しい。これらの生物資源の存在と相互作用を最大限に利用して、作物の生育を最大化し、農業環境を改良、保全するためには、まずこれらの基本情報を収集、解析する必要がある。植物と植物体内、地上・地下の植物表層、植物根圏における微小生物などの種類、存在量、存在比、季節や作物生育と連動した変動、生育環境ごとの構成などの基本情報は不可欠である。

これらの情報を分析することで、有用な微生物を用いた生物肥料や生物による病害虫の防除・軽減法などの開発が可能になる。すでに試行的解析で、土壌微生物の種類や存在比が変わると作物の生育が大きく変わるという証拠も得られている[56]。それらの情報から、植物と有用共生微生物との相互作用メカニズムを知り、共生相互作用に必要な植物側の受容反応系を育種的に強化することも可能となる。また、病害虫の侵入・拡散メカニズムや病害虫に対抗できる植物表層や体内の微生物の存在などを解明することにより、植物側としてどのような育種が可能かについて新たな視点が供給される。さらに一歩進めて、植物側の情報を利用することで、植物との相互作用に必要な新たな機能を昆虫や微生物に付加したり、欠落させたりするような育種改変も可能になると期待される。もちろん生物多様性の観点から、環境への影響評価は必須であることは言うまでもない。

(3) 共生研究の環境農学への適用と育種学の役割

一方、土壌微生物のメタゲノム解析自体は、2012年から地球微生物プロジェクト(Earth Microbiome Project)として世界規模で進行中であり[57]、世界各国における土壌微生物の種類が明らかになると思われる。しかしながら、土壌微生物の種類のみでは情報は限定的で、植物や微小生物との関係性の全体像を炙り出すような、より基盤的かつ包括的な相互作用や存在動態などの解析を進めるべきである。このような取り組みの成果は、日本でだけでなく、また通常耕作地の高効率利用や保全に利用するのみならず、世界に広がる高温、乾燥、低温、高濃度塩などの荒廃耕作地の改良や緑化、栽培適地化にも役立つことが期待される。この意味で、動植物・微生物間相互作用を利用した農業環境基盤構築の研究は、国内のみならず海外に展開できるものとして、その意義は大きい。CGIAR(国際農業研究協議グループ)下の国際農業研究機関や特にアジア地域における連携可能な

大学、研究所などとの共同研究を通じて、様々な地域と条件下での栽培環境の保全及び作物の改良を実現するための実証実験が必要である。

このためには、速やかに国内外で広範な農学、基礎生物学における研究領域が形成され、栽培環境に存在する全生物のゲノム、発現遺伝子、プロテオーム・メタボロームなどの生物学的データ、さらに土壌成分、気象条件などの物理・化学的データが包括的に収集され、多様な見地からの大規模データ解析により基盤形成が行われる必要がある。さらに重要な問題は、有用微生物が検出された場合、いかにして培養・増殖させるかを解決しなくてはならないことである。ほとんどが難培養性である環境微生物を産業レベルで増殖させる技術は必須となるが、単純な単離・培養では解決できない場合、適切な組み合わせによる共培養や土壌成分や植物成分の添加など、個別の解決策が必要となり、これもまた重要な研究テーマとなる。

これらの基盤データが形成され、有用微生物の培養が確立されることが、そこからの大きな飛躍に繋がると期待する。第一の目標は、微生物大量培養による生物肥料や生物防除剤としての利用、その結果としての環境保全型農業の展開である。次には、基盤データを利用した個別研究、例えば植物-微生物相互作用メカニズムの多様性、それぞれのメカニズムを用いた植物や昆虫、微生物の嗜好性の改変など、研究及び育種目的別の改変を様々な組み合わせで試すことができ、基礎研究も応用研究も多様な展開が可能になる。この課題は、現代社会に突きつけられた問題の解決のため早急に取り組む必要があり、気候変動への対策として必須のものである。

<参考資料 1> 育種学分科会審議経過

平成 27 年

7 月 2 日

第 2 回分科会

第 23 期における分科会提言について検討

平成 28 年

3 月 7 日

第 3 回分科会

分科会提言の内容とスケジュールについて検討

6 月 9 日

第 4 回分科会

分科会提言案の項目について検討

11 月 11 日

第 5 回分科会

分科会提言たたき台の検討

シンポジウム「気候変動に打ち克つ育種戦略」の開催

平成 29 年

8 月 31 日

日本学術会議幹事会（第 251 回）

報告「気候変動に対応する育種学の課題と展開」について承認

＜参考資料2＞用語解説

アニマルウェルフェア (AW) :

AW とは、動物が生活している環境にうまく対応している態様のことである。家畜がそのような態様にあるためには、家畜の快適性に配慮した飼養管理を行うことにより、ストレスや疾病を減らすことが重要である。。

エピジェネティクス :

DNA の塩基配列の変化を伴わず、DNA やヒストンへの後天的な化学修飾によって遺伝子発現が制御・伝達されるシステム（およびその機能を研究する学術分野）。

エンドファイト :

エンドファイト (endophyte) は、「endo=内部の」と「phyte=植物」をつなぎ合わせた「植物内部」という意味の合成語で、植物の体内に共生する多数の微生物を表す総称である。エンドファイトとしては、性質が異なる糸状菌(かび)とバクテリア(細菌)が知られており、植物に様々な病害抵抗性などを付与するものもある。

温湿度指数 (THI) :

$THI=0.8 \times T + 0.01 \times H \times (T - 14.4) + 46.4$ 、ここでTは気温(°C)、Hは相対湿度(%)と定義されており、乳牛では気温と湿度とを勘案したこのような指数が暑熱ストレスの評価に活用されている。

逆遺伝学的突然変異体選抜 :

表現形質に基づく突然変異体の選抜ではなく、突然変異形質の原因となる遺伝子のDNA分析により突然変異体を選抜する方法。

共生・寄生 :

2種類あるいはそれ以上の生物が、互いに相手から利益を受けつつ、同所的に生活することを共生という。これらの関係性の中で、双方の生物種が互いに利益を得る場合を相利共生といい、片方のみが利益を得て、相手側が被害を受ける場合を寄生という

共生研究 :

一般名称として共生研究という語彙を単独で用いることは少ないが、植物共生研究、動物共生研究、環境共生研究等、共生研究の上に植物や動物等の名称を加えて、それらの生物(事象)と同所、同時的に共存することに関する研究のこと。社会科学的な共生(共棲)現象の研究にも使われる。

ゲノム編集 :

部位特異的ヌクレアーゼを用いて任意のゲノム塩基配列を改変すること。

抗酸化酵素：

活性酸素種による細胞傷害を抑制する酵素の総称。

在来品種：

古くから特定の地域で栽培されてきた作物品種の総称。生産性は低いですが、それぞれの地域の環境や食文化に密接に関連した特徴ある品種が含まれる。

次世代シーケンサー：

Illumina シーケンサー、454 シーケンサーなど、多数の短い DNA 断片の塩基配列を一度に決定できる DNA シーケンサー。従来の Sanger 法に基づく DNA シーケンサーの次の世代のシーケンサー。

主働遺伝子：

ショウジョウバエの目の色のように、おもに質的形質に関与し、1つの遺伝子で形質に大きい影響を及ぼす遺伝子。

深根性：

深根性とは、根が地中深く入る性質である。根が横に浅く広がるものや地中深く入るものなど、同じ作物の中にも品種による差がある。本報告では、イネの深根性遺伝子を利用した乾燥耐性強化に関する遺伝育種研究を紹介している。

体細胞スコア：

乳汁中の体細胞（大部分が白血球）の数は、多くの場合 1ml 当たりの細胞数によって表示されるが、集計上の扱いやすさから、この体細胞数を対数変換してスコア化した値。体細胞スコアは、乳房炎リスクと関連している。

抽だい：

植物の生長点で花芽が分化し、その花芽をつけた花茎が伸長する現象。

適合溶質：

細胞内の浸透圧調節作用がある物質で、乾燥や塩ストレスがあると細胞内に蓄積する。

天水田：

灌漑システムがない、雨水だけでイネの生育を維持する水田。

登熟期：

開花期（出穂期）から成熟期までの期間。イネでは、受精後、胚と胚乳の形成が開始され、胚乳では澱粉やタンパク質が蓄積されて、水分が減少して成熟期を迎える期間。気温により登熟期間長さは異なるが、品種では開花後約 40 日程度。

バイオエコノミックモデル：

生物生産のバイオ、物質循環（肥料や農薬など）などの物的な情報と農家の経済行動を説明する経済学とを統合的に結びつけたモデル。

反芻家畜：

一度飲み込んで胃の中にある内容物を再び口腔に戻して再しゃくし、唾液と混合させて再び飲み込む行為を繰り返すことを反芻と呼び、この反芻を行うウシ、ヒツジ、ヤギなどの偶蹄類の家畜を反芻家畜という。反芻家畜の胃（反芻胃）は、四つ（第一胃、第二胃、第三胃、第四胃）に分かれており、第一胃内には細菌やプロトゾア（原虫）などの微生物が多く生息し、重要な役割を果たしている。

半矮性品種：

イネやコムギにおいて、成熟期に草丈あるいは稈長が通常の品種に比較して半分程度の品種。稈長が低いことから、倒伏に強く、多肥条件での収量の向上が期待できる。緑の革命に寄与したイネやコムギ品種は先駆的な半矮性品種。

不稔籾、未熟米、白未熟粒、胴割粒：

不稔籾は受精障害により胚や胚乳が発達しないため発芽・生育できない種子。未熟米は胚乳の発達が不良な米粒。白未熟粒は澱粉蓄積が不完全で胚乳の一部が白濁する米粒、白濁する部位により心白、腹白、背白、乳白に分けられる。胴割粒は胚乳に亀裂が生じている米粒。

プロテオーム：

ゲノム解析の中で、特定の時期や種類の生物の細胞内で発現しているタンパク質の種類（セット）、あるいはある生物が発現するすべてのタンパク質のセットをさす。例えば、植物と微生物の共生で特異的に発現するようなタンパクを調べ（プロテオーム解析し）、共生に有利な植物側の因子を同定し、育種利用することも可能となる。

マイクロバイオーム：

体内に棲息している微生物（マイクロブ）の集合体（オーム）のこと。

マーカー選抜：

有用な遺伝子に連鎖する、あるいはその遺伝子そのものの DNA マーカーを指標として、育種過程の個体選抜を行うこと。形質評価を行うことなく、目的の個体を種子から成熟個体のどのステージでも選抜できる手法。

ミスマッチ部位：

二本鎖 DNA ではグアニンはシトシン、アデニンはチミンと対になっているが、対になるべき塩基とは異なる塩基と対になっている部位。

メタゲノム解析：

メタゲノムとは、生物の遺伝情報全体を意味する「ゲノム」と、個を超えることを意味する「メタ」とを重ね合わせてできた言葉である。ある環境中の微生物群集のゲノムを、培養という過程を経ずにすべて抽出、収集し、これらの構造(塩基配列)を網羅的に調べる手法をメタゲノム解析という。

メタボローム：

生体内の低分子化合物の総体をいい数千種におよぶ。一次代謝産物と二次代謝産物に分類できる。一次代謝産物は糖、有機酸、アミノ酸などの、生体の基本成長、発達などに必要なもので、二次代謝産物は、特に植物や微生物においては、生態学的に生存力に寄与する機能物質などが含まれる。植物の感染防御や種間防御、繁殖力などに重要な物質が知られている。

緑の革命：

高収量品種や化学肥料の投入などにより穀物の生産が大幅に向上した農業革命の一つ。緑の革命の効果は1960年代に顕著になり、世界の食料不足を解決した。これを指揮した育種家、ノーマン・ボーローグはノーベル平和賞を受賞した。

ライフサイクル・アセスメント (LCA)：

当該の製品や生産物に関わる資源の採取から製造、使用、廃棄、輸送などのすべての段階を通して、投入資源あるいは排出環境負荷およびそれらによる地球や生態系への環境影響を定量的・客観的に評価する手法。

量的形質遺伝子座 (Quantitative trait loci, QTL)：

量的な特性の差をもたらす遺伝子が座乗する染色体上の位置。

量的形質遺伝子座のピラミディング：

作物の収量やストレス耐性などは、複数の遺伝子の効果の総和によって決定されている (QTL：用語解説参照)。そのような形質の改良には、複数の遺伝子を組み合わせることが必要で、DNA マーカー選抜を利用して、組み合わせたい QTL を特定の品種に集積することを示す。

CRISPR/Cas9：

特定の DNA の塩基配列に特異的に結合する RNA に DNA 分解酵素の Cas9 を結合するように設計し、その RNA と Cas9 タンパク質を細胞内で同時に発現させることで目的遺伝子の DNA を特異的に切断する技術。

DNA マーカー :

交雑育種に用いる両親間で塩基配列に差がある場合に、その差を分析することによって、両親間の特性の差をもたらす遺伝子の遺伝子型が判定（あるいは推定）できる DNA。

F₁ 雑種 :

一代雑種ともいう。遺伝的に異なる品種間の交配により得られた第一代の雑種。両親より優れた特徴（雑種強勢）を示すことが多く、農作物、家畜、林木などの品種育成に用いられている。

Oligonucleotide-directed mutagenesis :

目標とした遺伝子の塩基配列を一部改変した合成オリゴヌクレオチドを細胞に直接導入し、組換えにより塩基配列を改変する技術。合成オリゴヌクレオチドが細胞内で分解されにくいように環状にして、また直鎖状のオリゴヌクレオチドでは末端を修飾して用いられる。

TAL effector nucleases :

DNA の 1 塩基をそれぞれ認識するポリペプチドを組み合わせて特定の塩基配列に結合するタンパク質を設計し、その末端に DNA 分解酵素を結合させることで、特定の塩基配列の DNA を特異的に切断するようにした酵素。

Zinc finger nucleases :

DNA の 3 塩基を認識するポリペプチドを組み合わせて特定の塩基配列に結合するタンパク質を設計し、その末端に DNA 分解酵素を結合させることで、特定の塩基配列の DNA を特異的に切断するようにした酵素。

<参考資料3> 本文参考文献

- [1] Huntingford C, Mercado L, Post E (2013) The timing of climate change. *Nature* 502:174-175.
- [2] Lobell DB, Schlenker W, Costa-Roberts J (2011) Climate trends and global crop production since 1980. *Science* 333:616-620.
- [3] IPCC Fourth Assessment Report (2007).
<http://www.ipcc.ch/ipccreports/assessments-reports.htm>
- [4] Sage RF (1994) Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: the gas exchange perspective. *Photosynthesis Research* 39:351-368.
- [5] 米森敬三 (2014) 園芸作物栽培に及ぼす気候変動の影響と対策—果樹栽培を中心にして—。日本学術会議農学委員会農学分科会及び農業生産環境工学分科会記録「気候変動に対応した作物栽培技術の現状と展望」. 6-9.
- [6] 長谷川利拡 (2009) 第2章 気候変化がイネを中心とした作物栽培におよぼす影響と適応策. 日本農学会編「シリーズ21世紀の農学 地球温暖化問題への農学の挑戦」 養賢堂. 27-47.
- [7] Bebbler DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ (2013) Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change* 3:985-988.
- [8] 白石友紀 (2014) 作物病害における温暖化の影響と対策技術. 日本学術会議農学委員会農学分科会及び農業生産環境工学分科会記録「気候変動に対応した作物栽培技術の現状と展望」. 11-14.
- [9] Matsumoto M, Oka H, Mitsuda Y, Hashimoto S, Kayo C, Tsunetsugu Y, Tonosaki M (2016) Potential contributions of forestry and wood use to climate change mitigation in Japan. *J. Forest Res.* 21:211-222.
- [10] 中央環境審議会 地球環境部会 気候変動影響評価等小委員会 (2015) 「日本における気候変動による影響に関する評価報告書」 3. 日本における気候変動による影響の評価結果, 3.1 農業・林業・水産業, (5) 畜産.
- [11] FAO (2006) *World Agriculture: Towards 2030/2050-Interim Report*. FAO, Rome, Italy.
- [12] Steinfeld H, Gerber P (2010) Livestock production and the global environment:
Consume less or produce better? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:18237-18238.
- [13] Bohmanova J, Misztal I, Tsuruta S, Norman HD, Lawlor TJ (2008) Genotype by environment interaction due to heat stress. *J. Dairy Sci.* 91:840-846.
- [14] Hagiya K, Hayasaka K, Yamazaki T, Shirai T, Osawa T, Terawaki Y, Nagamine Y, Masuda Y, Suzuki M (2016) Effects of heat stress on production, somatic cell score and conception rate in Holsteins. *Anim. Sci. J.* DOI: 10.1111/asj.12617.

- [15] Wall E, Simm GG, Moran D (2010) Developing breeding schemes to assist mitigation of greenhouse gas emissions. *Animal* 4: 366–376.
- [16] Tubiello FN, Fisher G (2007) Reducing climate change impact on agriculture: global and regional effects on mitigation, 2000–2080. *Technological Forecasting and Social Change* 74:1030–1056.
- [17] Abberton M, Batley J, Bentley A, Bryant J, Cai H, Cockram J, Oliveira AC, CsekeLJ, Dempewolf H, Pace CD, Edwards D, Gepts P, Greenland A, Hall AE, Henry R, Hori K, Howe GT, Hughes S, Humphreys M, Lightfoot D, Marshall A, Mayes S, Nguyen HT, Ogbonnaya FC, Ortiz R, Paterson AH, Tuberosa R, Valliyodan B, Varshney RK, Yano M. (2016) Global agricultural intensification during climate change: a role for genomics. *Plant Biotechnol. J.* 14:1095–1098.
- [18] Mickelbart MV, Hasegawa PM, Bailey-Serres J (2015) Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet.* 16:237–251.
- [19] Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, Rane J, Ishitani M, Hara N, Kitomi Y, Inukai Y, Ono K, Kanno N, Inoue H, Takehisa H, Motoyama R, Nagamura Y, Wu J, Matsumoto T, Takai T, Okuno K, Yano M (2013) Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. *Nat. Genet.* 45:1097–1102.
- [20] Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX (2005) A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* 37:1141–1146.
- [21] Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M, Plett D, Gilliland M (2012) Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nat. Biotechnol.* 30:360–364.
- [22] Yang C, Zhao L, Zhang H, Yang Z, Wang H, Wen S, Zhang C, Rustgi S, von Wettstein D, Liu B (2014) Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111: 11882–11887.
- [23] Chankaew S, Isemura T, Naito K, Ogiso-Tanaka E, Tomooka N, Somta P, Kaga A, Vaughan DA, Srinives P (2014) QTL mapping for salt tolerance and domestication-related traits in *Vigna marina* subsp. *Theor. Appl. Genet.* 127: 691–702.
- [24] Li XM, Chao DY, Wu Y, Huang X, Chen K, Cui LG, Su L, Ye WW, Chen H, Chen HC, Dong NQ, Guo T, Shi M, Feng Q, Zhang P, Han B, Shan JX, Gao JP, Lin HX (2015) Natural alleles of a proteasome $\alpha 2$ subunit gene contribute to thermotolerance and adaptation of African rice. *Nat. Genet.* 47: 827–833.

- [25] Ye C, Tenorio FA, Redoña ED, Morales-Cortezano PS, Cabrega GA, Jagadish KS, Gregorio GB (2015) Fine-mapping and validating *qHTSF4.1* to increase spikelet fertility under heat stress at flowering in rice. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1507-1517.
- [26] Ye C, Tenorio FA, Argayoso MA, Laza MA, Koh HJ, Redoña ED, Jagadish KS, Gregorio GB (2015) Identifying and confirming quantitative trait loci associated with heat tolerance at flowering stage in different rice populations. *BMC Genetics* 16: 41.
- [27] Ishimaru T, Hirabayashi H, Sasaki K, Ye C, Kobayashi A (2016) Breeding efforts to mitigate damage by heat stress to spikelet sterility and grain quality. *Plant Prod. Sci.* 19:12-21.
- [28] Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ. (2006) Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705-708.
- [29] Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song XJ, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Mori H, Ashikari M (2009) The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460:1026-1030.
- [30] Ayano M, Kani T, Kojima M, Sakakibara H, Kitaoka T, Kuroha T, Angeles-Shim RB, Kitano H, Nagai K, Ashikari M (2011) Gibberellin biosynthesis and signal transduction is essential for internode elongation in deepwater rice. *Plant Cell Environ. Plant Cell Environ.* 37: 2313-2324.
- [31] Mohammed A Y S, Tahir A I S, Kamal N M, Eltayeb A E, Ali A M, Tsujimoto H (2016) Impact of wheat-Leymus racemosus added chromosomes on wheat adaptation and tolerance to heat stress. *Breeding Science* 63:450-460.
- [32] Takagi H, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Uemura A, Yaegashi H, Obara T, Oikawa K, Utsushi H, Kanazaki E, Mitsuoka C, Natsume S, Kosugi S, Kanzaki H, Matsumura H, Urasaki N, Kamoun S, Terauchi R (2015) MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nature Biotech* 33:445 - 449.
- [33] Ishikawa S, Ishimaru Y, Igura M, Kuramata M, Abe T, Senoura T, Hase Y, Arai T, Nishizaki NK, Nakanishi H (2012): Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:19166-19171.
- [34] Sakamoto A, Murata N (2002) The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment* 25:163-171.

- [35] Liua Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10:1391-1406.
- [36] International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793-800.
- [37] Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T et al. (2010) Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature* 463:178-183.
- [38] The International Barley Genome Sequencing Consortium (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491:711-717.
- [39] The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635-641.
- [40] Shirasawa K, Shiokai S, Yamaguchi M, Kishitani S, Nishio T (2006) Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice. *Theor. Appl. Genet.* 113:147-155.
- [41] Ashikari M, Matsuoka M (2006) Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. *TRENDS Plant Sci* 11:344-350.
- [42] Endo T, Chiba B, Wagatsuma K, Saeki K, Ando T, Shomura A, Mizubayashi T, Ueda T, Yamamoto T, Nishio T (2016) Detection of QTLs for cold tolerance of rice cultivar 'Kuchum' and effect of QTL pyramiding. *Thoeer Appl Genet* 129: 631-640.
- [43] Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Young K, Taylor NE et al. (2003) Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res.* 13: 524-530.
- [44] Hoshino T, Takagi Y, Anai T (2010) Novel GmFAD2-1b mutant alleles created by reverse genetics induce marked elevation of oleic acid content in soybean seeds in combination with GmFAD2-1a mutant alleles. *Breed Sci* 60:419-425.
- [45] Rigola D, van Oeveren J, Janssen A, Bonne A, Schneiders H, van der Poel HJA, van Orsouw J, Hogers RCJ, de Both MTJ, van Eijk MJT (2009) High-throuput detection of induced mutations and natural variation using KeyPoint™ technology. *PLoS ONE* 4:e4761.
- [46] Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161:1169-1175.

- [47] Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E., Hinkley SJ et al. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotech* 29: 143–150.
- [48] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821.
- [49] Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E (2012) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotech* 30:231–239.
- [50] Sauer NJ, Mozoruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Walker KA, Beetham PR, Schopke CR, Gocal GFW (2016) Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotech J* 14:496–502.
- [51] Drew L (2016) Microbiota: Reseeding the gut. *Nature* 540: S109–S112.
- [52] Ardanov P, Sessitsch, Haggman H, Kozyrivska N, Pirttila AM (2012) Methylobacterium-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack. *PLoS One*. 7(10): e46802.
- [53] Hosokawa T, Kikuchi Y, Shimada M, Fukatsu T (2007) Obligate symbiont involved in pest status of host insect. *Proc. Biol. Sci. (Proceedings of The Royal Society B)* 274: 1979–1984.
- [54] 秋山康紀、林英雄 (2003) 「植物とアーバスキュラー菌根菌との共生を制御する植物化学因子」 *化学と生物*. 41:591–597.
- [55] 水久保隆之 (2016) 「有害線虫の被害と対策」 *牧草と園芸*. 64 卷 3 号:11–16.
- [56] 池田成志、鶴丸博人、大久保卓、岡崎和之、南澤究. (2013) 「植物共生科学の新展開と農学研究におけるパラダイムシフト」 *化学と生物*. 51: 462–470.
- [57] <http://www.earthmicrobiome.org>

<参考資料4> ストレス耐性遺伝子研究現状の解説

(本文3(2)②気候変動適応へのストレス耐性植物科学と遺伝育種学研究：補足資料)
(育種学分科会作成)

気候変動に伴う気温上昇、乾燥、洪水、病虫害の増加などによって作物生産は今後不安定になると予想され、世界的な食料安全保障における大きな問題となる。作物の品種改良はこのような劣悪な生産環境における作物生産の安定化を図るための有効な適応策の一つである。2000年以降、イネをはじめとして作物のゲノム解読が急速に進展し、品種改良に有用な遺伝子の研究が加速され、ゲノム情報を活用した画期的品種の育成が作物の安定生産や品質維持に大きく貢献すると期待されている[1]。特にこの10年では、作物の安定生産に貢献する環境ストレス耐性のメカニズム解明が進展している[2]。ここでは、作物の品種や系統、特に在来品種や近縁野生種から見いだされた乾燥耐性、塩害耐性、高温障害耐性(品質、稔性)ならびに異常気象によって生じる局地的な冠水や洪水に関する耐性に焦点をあてて、ストレス耐性や回避への効果が実験的に証明されている遺伝子について紹介する。

1 乾燥耐性

乾燥ストレス条件下でも、一定の生育を確保し、収量の低下を最小限に抑えることが、乾燥回避として重要となる。作物は、地上部からの水分漏出を最小限にすることで、根からの水分吸収を増加させて乾燥ストレスに耐える戦略が必要となる。土壌からの水分吸収については、地下のより深層にある水分を利用するために、より深根にすることが望ましいと考えられる。近年、フィリピンの古い陸稲品種を利用して、イネの深根性に関与する遺伝子 *DRO1* (*DEPPER ROOTING 1*) が単離された[3]。*DRO1* は、詳細な生化学的機能は明らかになっていないが、オーキシンによって転写が抑制され細胞伸長を促進する遺伝子であることが判明した。アジアで広く栽培されているインド型品種‘IR64’はこの *DRO1* の機能を欠損しており、より水平に根が伸長することで、浅根になるが、‘IR64’に機能がある *DRO1* をマーカー選抜で導入した同質遺伝子系統は実験的な乾燥条件下において、深根になり、乾燥による収量低下を著しく改善できることが明らかとなった[3]。根量の増加による吸水能力の向上も、乾燥回避の一つの戦略であるが、根量の増加はしばしば地上部の乾物量とのトレードオフの関係があり、短期間の乾燥の回避のための戦略としては効果的ではない。*DRO1* は根の伸長角度を変えることで深根化させており、根量を増やして水分吸収量を増加させているのではないことから、地上部への影響もほとんどなく、水田条件での研究から、肥料吸収能の向上から、収量の増大にも寄与することが実験的に示されている[4]。

IR64 は機能欠損型の *DRO1* 遺伝子をもつことから、極端に浅根になる特徴をもつことから、機能型の *DRO1* 遺伝子の導入によって深根型に改変できるが、一般に多くのインド型や日本型品種は機能型 *DRO1* 遺伝子を持つことから、有効な遺伝子とはならない。深根性に関与する QTL は、*DRO1* 遺伝子以外にも複数検出されており、第4染色体上に *DRO2* 遺伝子が見いだされて、遺伝子の単離が進行している[5]。

2 塩害耐性

イネには塩害耐性が極めて強い在来系統‘NonaBokra’や‘Pokkali’の存在が古くから知られている。‘NonaBokra’を用いた塩害耐性に関与するQTL解析により、複数のQTLが見いだされ、そのうち第1染色体のQTL *SKC1*はナトリウムトランスポーターをコードし、地上部のK、Na濃度の制御によって塩害耐性を高めていることが明らかになった[6]。また第7染色体上にも効果の大きなQTLが見いだされ、地上部のNa⁺濃度の制御に関わっていることが示唆されている。‘Pokkali’の耐塩性についても、研究が進み第1染色体 *Slto11*が見いだされているが、この遺伝子座は *SKC1* と同じだと考えられている[7]。*SKC1* 単独では、十分な耐性を付与できないことから、さらに複数の遺伝子の関与が想定される。コムギにおいてもナトリウムトランスポーターが塩害耐性に関与していることが明らかにされている。コムギの近縁種であるヒトツブコムギのナトリウムトランスポーターTmHKT1;5-A をコードする *Max2* 座をデュラムコムギに導入した同質遺伝子系統では、葉のNa⁺が低下し、*Max2* 座を持たない準同質遺伝子系統と比較して顕著な収量増加が観察されている[8, 9]。

アズキは *Vigna* 属に分類されるマメ科作物であるが、*Vigna* 属の近縁野生種は多様性に富んでおり、通常、作物が栽培できない厳しい環境に適応している種が存在する[10]。中でも *V. marina* は海岸沿いの砂浜に生育する種で、特に強い塩害耐性を示したことから、耐塩性が弱い種との種間交雑後代を用いて、効果の大きな塩害耐性関連QTLを見いだしている[11]。この遺伝子はまだ単離されていないが、*Vigna* 属のゲノム解読も進展しており、見いだしたQTLの単離が進められている。

3 高温耐性

高温によるストレスは作物の生育ステージによって様々な障害を引き起こす。ここではイネの研究から、生育初期、開花期及び登熟期の高温障害に関与する遺伝子について紹介する。

(1) 生育初期の高温障害耐性

イネは苗の時期に高温を受けると枯死する。この高温障害耐性については、イネのアフリカの栽培種 *Oryza glaberrima* が障害耐性を持つことが知られている。生育途中の苗を45°Cで52時間栽培し、その後常温の28°Cにもどした場合の枯死の程度が、グラベリマでは極端に低く、アジア栽培種 *O. sativa* では高い。この高温耐性の違いを決定しているQTLのうち効果の大きなQTLとして *TTI1* が単離され、*TTI1* は26Sプロテアソームの α サブユニットをコードしていることが明らかとなった[12]。高温耐性の強いグラベリマは機能型のアリルをもち、弱いアジア栽培種は機能が低下したアリルをもち、グラベリマから *TTI1* をマーカー選抜によってアジア栽培種に導入すると、高温障害耐性は著しく改善することが明らかとなっている[12]。

(2) 高温による種子不稔及び外観品質低下

高温ストレスは様々な生育障害を引き起こすが、イネの開花期の高温は葯の裂開や花粉の受粉能力に影響し、不稔を引き起こす。また登熟時期の高温は、澱粉合成や転流などへの影響により、未熟種子や心白・背白などの玄米品質の低下を引き起こす。これらの高温障害は、収量の低下や、低品質による米の販売価格の低下をまねき、経済的な影響が甚大である。

種子不稔を引き起こす開花期の高温障害回避に有効な QTL が、高温障害に耐性があるインド型品種 ‘N22’ を利用して複数見いだされており [13]、そのうち効果の大きな第 4 染色体の *qHTSF4.1* 領域をアジアで広域に栽培されている ‘IR64’ に導入した準同質遺伝子系統は、高温時の種子不稔を減少させることが証明され、遺伝子単離が進められている [14]。一方、気温が上昇しない早朝に開花させて、葯の裂開と受粉を安定化させることも、高温不稔を回避する一つの戦略として検討されている。イネの近縁野生種のひとつ *O. officinaris* は早朝に開花する特徴を持つ。この性質に関与する QTL を検出し、栽培品種に導入することで、早朝開花性を付与し、その結果として不稔の程度を軽減することに成功している [15, 16]。

登熟期の高温は、澱粉合成の低下や分解の促進など、登熟障害を引き起こす。この障害は不稔を引き起こさないまでも、玄米の外観品質を著しく低下させる。心白や背白は、通常の登熟条件でも、しばしば生じることがある。また心白や背白は種子の大きさにも大きく影響をうけるが、高温によって障害が顕著になる。これまで登熟期の高温によって生じる種子の白濁（心白、背白など）に関与する QTL が報告されている。一般に、日本のジャポニカ品種は高温による品質の低下は、インド型品種と比較して、耐性レベルは高いが、日本の品種間においてもその品質低下の程度は異なる。これまでに、粒大には大きく影響せず、その外観品質の維持に効果が確認されている QTL としては、背白型白濁に関して第 6 染色体上に *qWB6*、第 1 染色体上に *qWK1-1* 及び *qWK1-2*、第 7 染色体上に *Apq1* が見いだされている [17]。また種子休眠性を高め、穂発芽を抑制する第 7 染色体上の遺伝子 *Sdr4* は、背白型白濁を軽減できることが報告されている [17]。種子の白濁は、種子の大きさや出穂期などにも大きく影響を受けることから、見いだされた効果の大きな QTL が、どの品種においても有効に利用できるとは限らない点は留意する必要がある。

登熟期間の高温で変化する種子内の遺伝子発現や代謝産物を網羅的に解析した結果、澱粉合成関連酵素の発現低下とともに澱粉分解に関与する α -アミラーゼの発現上昇が観察され [18]、 α -アミラーゼの発現を抑制することで、乳白粒の発生を抑えることができた [19]。 α -アミラーゼ遺伝子の発現は発芽などの作物の生育にも大きく影響を与えることから、現在、複数の α -アミラーゼ遺伝子の発現が低下した突然変異を作出し、その生育への影響や乳白粒の発生への効果を確認中である。

4 冠水耐性・洪水耐性

局所的な大雨や洪水によって一定期間植物体が水没すると、一般に作物は酸素不足で枯死する。冠水は一時的な水没であるが、この冠水条件に耐えることができるイネの在来インド型品種の解析によって、冠水抵抗性遺伝子 *SUB1A* が単離されている [20]。*SUB1A* は AP2/ERF

ドメインをもつエチレン応答性因子で、冠水条件になると、 α -アミラーゼや細胞伸長に関与する遺伝子の発現を一時的に抑制することで、生育抑制を引き起こし、2週間程度の冠水時のエネルギーロスを最小限に抑えることで、冠水後の消耗に耐えて、枯死を回避する。また *SUB1A* 遺伝子は、ジベレリンの情報伝達を負に制御する *SLR1* 遺伝子の発現を高めて、結果として、ジベレリンの作用を抑制することで、成長を抑制していることが明らかとなっている。*SUB1A* 遺伝子は、マーカー選抜育種により、アジアやアフリカで大規模に栽培されている品種群に導入されている。

一方、長期間、洪水状態が継続する条件では、イネは急速に茎を伸長させて、水面上から酸素を得ることで枯死を回避する浮きイネ性と呼ばれる特徴をもつ。浮きイネ性をもつ栽培種あるいは近縁野生種を用いて、浮きイネ性に関与する QTL 解析が行われ、複数の QTL が検出されている。その中でも、第 12 染色体に座乗する *SNORKEL1* (*SK1*) 及び *SNORKEL2* (*SK2*) はエチレン応答性の AP2/ERF ドメインを保持した転写因子をコードしていることを明らかとなった[21]。洪水条件になると、嫌氣的な条件で発生するエチレンが *SK1* 及び *SK2* の発現を誘導し、最終的にはジベレリンの生成を介した節間伸長を引き起こすことによって、水没を回避すると考えられている[22]。

これらの *SUB1A* や *SK* 遺伝子はいずれも冠水や深水依存的な条件で生成するエチレンを介した遺伝子発現制御によって、生育を停止したり促進したりすることにより、ストレス回避をする戦略をとっているため、嫌氣的ストレスがない条件での、生育への影響は最小限にとどめられている。このことが育種で問題になるトレードオフを回避でき、他の形質への負の影響が最小限に抑えられ、育種上利用価値が高い。

5 酸素漏出バリアによる湿害耐性

湿性条件で生育する植物が還元状態になる根の活性を保って生育するために、根の通気性組織の発達、還元耐性及び根からの酸素の水中への拡散を防ぐスベリン化された皮下組織 (ROL バリア) を作物に導入して、湿害耐性を強化する試みが進められている。

トウモロコシは湿害に弱く、我が国の局地的な降雨による冠水や湿潤状況での生産性の安定化は今後の飼料作物生産の安定化において重要な目標である。この湿害耐性を改善する上で、ニカラグアの水浸しの低地に自生するニカラグアテオシント (*Zea nicaraguensis*) が注目されている[23]。このテオシントは根系の耐性関連形質として、恒常的な通気組織形成能、湛水・還元状態耐性及び地表根形成能を保有している[24]。また最近、イネで解析が進んでいる根での酸素の漏出を抑える ROL バリアを形成できる性質をこのテオシントが保有することが明らかとなった[25, 26]。これらの湿害耐性関連形質については、トウモロコシにテオシントの染色体の位置を置換した置換系統群[27]の利用により、関与する量的形質遺伝子座が明らかにされ、それらの QTL を集積した耐湿性トウモロコシが育成されつつある。特に浅根性の QTL を導入した実用 F₁ 品種も育成されている。形成に関与する遺伝子はまだ単離されていないが、関与する染色体の導入による耐湿性の獲得は、コムギでも試みられている。オオムギ属の雑草ハマムギクサ *Hordeum marinum* は根の通気組織の発達がよ

く、ROL バリアが形成される特徴があり、ハマムギクサとコムギの交雑によって得られた複二倍体が ROL バリアを形成することが確認されている [28]。

<参考資料4 引用文献>

- [1] Abberton M, Batley J, Bentley A, Bryant J, Cai H, Cockram J, Oliveira AC, Cseke LJ, Dempewolf H, Pace CD, Edwards D, Gepts P, Greenland A, Hall AE, Henry R, Hori K, Howe GT, Hughes S, Humphreys M, Lightfoot D, Marshall A, Mayes S, Nguyen HT, Ogonnaya FC, Ortiz R, Paterson AH, Tuberosa R, Valliyodan B, Varshney RK, Yano M. 2016. Global agricultural intensification during climate change: a role for genomics. *Plant Biotechnol. J.* 14:1095-1098.
- [2] Mickelbart MV, Hasegawa PM, Bailey-Serres J. 2015. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet.* 16:237-251.
- [3] Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, Rane J, Ishitani M, Hara N, Kitomi Y, Inukai Y, Ono K, Kanno N, Inoue H, Takehisa H, Motoyama R, Nagamura Y, Wu J, Matsumoto T, Takai T, Okuno K, Yano M. 2013. Control of root system architecture by *DEEPER ROOTING 1* increases rice yield under drought conditions. *Nat. Genet.* 45: 1097-1102.
- [4] Arai-Sanoh Y, Takai T, Yoshinaga S, Nakano H, Kojima M, Sakakibara H, Kondo M, Uga Y. 2014. Deep rooting conferred by *DEEPER ROOTING 1*, enhances rice yield in paddy fields. *Sci. Rep.* 4: 5563
- [5] Uga Y, Yamamoto E, Kanno N, Kawai S, Mizubayashi T, Fukuoka S. 2013. A major QTL controlling deep rooting on rice chromosome 4. *Sci Rep.* 3: 3040.
- [6] Ren ZH, Gao JP, Li LG, Cai XL, Huang W, Chao DY, Zhu MZ, Wang ZY, Luan S, Lin HX. 2005. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nat. Genet.* 37:1141-1146.
- [7] Thomson M. J, Ocampo M, Egdane J, Rahman MA, Sajise AG, Adorada DL, Tumimbang-Raiz E, Blumwald E, Seraj ZI, Singh RK, Gregorio GB, Ismail AM. 2010. Characterizing the Saltol quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. *Rice* 3: 9053.
- [8] Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M, Plett D, Gilliam M. 2012. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nat. Biotechnol.* 30:360-364.
- [9] Yang C, Zhao L, Zhang H, Yang Z, Wang H, Wen S, Zhang C, Rustgi S, von Wettstein D, Liu B. 2014. Evolution of physiological responses to salt stress in hexaploid wheat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111: 11882-11887.
- [10] 内藤健 2016. Vigna 属植物 アズキのなかまがもつ多様性と可能性 化学と生物 54 : 464-470.
- [11] Chankaew S, Isemura T, Naito K, Ogiso-Tanaka E, Tomooka N, Somta P, Kaga A, Vaughan DA, Srinives P. 2014. QTL mapping for salt tolerance and

- domestication-related traits in *Vigna marina* subsp. *Theor. Appl. Genet.* 127: 691-702.
- [12] Li XM, Chao DY, Wu Y, Huang X, Chen K, Cui LG, Su L, Ye WW, Chen H, Chen HC, Dong NQ, Guo T, Shi M, Feng Q, Zhang P, Han B, Shan JX, Gao JP, Lin HX. 2015. Natural alleles of a proteasome $\alpha 2$ subunit gene contribute to thermotolerance and adaptation of African rice. *Nat. Genet.* 47: 827-833.
- [13] Ye C, Tenorio FA, Redoña ED, Morales-Cortezano PS, Cabrega GA, Jagadish KS, Gregorio GB. 2015. Fine-mapping and validating *qHTSF4.1* to increase spikelet fertility under heat stress at flowering in rice. *Theor. Appl. Genet.* 128: 1507-1517.
- [14] Ye C, Tenorio FA, Argayoso MA, Laza MA, Koh HJ, Redoña ED, Jagadish KS, Gregorio GB. 2015. Identifying and confirming quantitative trait loci associated with heat tolerance at flowering stage in different rice populations. *BMC Genetics* 16: 41.
- [15] Ishimaru T, Hirabayashi H, Ida M, Takai T, San-Oh YA, Yoshinaga S, Ando I, Ogawa T, Kondo M. 2010. A genetic resource for early-morning flowering trait of wild rice *Oryza officinalis* to mitigate high temperature-induced spikelet sterility at anthesis. *Ann. Bot.* 106: 515-520.
- [16] Hirabayashi H, Sasaki K, Kambe T, Gannaban RB, Miras MA, Mendioro MS, Simon EV, Lumanglas PD, Fujita D, Takemoto-Kuno Y, Takeuchi Y, Kaji R, Kondo M, Kobayashi N, Ogawa T, Ando I, Jagadish KS, Ishimaru T. 2015. qEMF3, a novel QTL for the early-morning flowering trait from wild rice, *Oryza officinalis*, to mitigate heat stress damage at flowering in rice, *O. sativa*. *J. Exp. Bot.* 66: 1227-1236.
- [17] Ishimaru T, Hirabayashi H, Sasaki K, Ye C, Kobayashi A. 2016. Breeding efforts to mitigate damage by heat stress to spikelet sterility and grain quality. *Plant Prod. Sci.* 19:12-21.
- [18] Yamakawa H, Hirose T, Kuroda M, Yamaguchi T. 2007. Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. *Plant Physiol.* 144: 258-277.
- [19] Hakata M, Kuroda M, Miyashita T, Yamaguchi T, Kojima M, Sakakibara H, Mitsui T, Yamakawa H. 2012. Suppression of α -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotech. J.* 10: 1110-1117.
- [20] Xu K, Xu X, Fukao T, Canlas P, Maghirang-Rodriguez R, Heuer S, Ismail AM, Bailey-Serres J, Ronald PC, Mackill DJ. 2006. Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442: 705-708.

- [21] Hattori Y, Nagai K, Furukawa S, Song XJ, Kawano R, Sakakibara H, Wu J, Matsumoto T, Yoshimura A, Kitano H, Matsuoka M, Mori H, Ashikari M. 2009. The ethylene response factors *SNORKEL1* and *SNORKEL2* allow rice to adapt to deep water. *Nature* 460: 1026-1030.
- [22] Ayano M, Kani T, Kojima M, Sakakibara H, Kitaoka T, Kuroha T, Angeles-Shim RB, Kitano H, Nagai K, Ashikari M. 2011. Gibberellin biosynthesis and signal transduction is essential for internode elongation in deepwater rice. *Plant Cell Environ.* *Plant Cell Environ.* 37: 2313-2324.
- [23] 間野吉郎、大森史恵. 2008. 植物の根に関する諸問題—テオシントを利用したとうもろこしの耐湿性育種—. *農業及び園芸* 83 : 689—695.
- [24] Mano Y, Omori F. 2007. Breeding for flooding tolerant maize using “teosinte” as a germplasm resources. *Plant Root* 1: 17-21.
- [25] 渡邊宏太郎、西内俊策、大森史恵、間野吉郎、中園幹生 2013. トウモロコシとテオシントを用いた酸素漏出バリア関連形質の解析. *根の研究* 22 : 161
- [26] Abiko T, Kotula L, Shiono K, Malik AI, Colmer TD, Nakazono M. 2012. Enhanced formation of aerenchyma and induction of a barrier to radial oxygen loss in adventitious roots of *Zea nicaraguensis* contribute to its waterlogging tolerance as compared with maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Plant Cell Environ.* 35: 1618-1630.
- [27] Mano Y, Omori F. 2013. Flooding tolerance in interspecific introgression lines containing chromosome segment from teosinte (*Zea nicaraguensis*) in maize (*Zea mays* subsp. *Mays*). *Ann Bot.* 112:1125-1139.
- [28] Malik AI, Islam AKMR, Colmer TD. 2011. Transfer of the barrier to radial oxygen loss in roots of *Hordeum marinum* to wheat (*Triticum aestivum*): evaluation of four *H. marinum*-wheat amphiploids. *New Phytol.* 190: 499-508.

<参考資料5> 育種技術の詳細解説

(本文3(3)植物育種研究における技術の進展と利用：補足資料) (育種学分会作成)

最も古くから行われ、多くの品種の育成に貢献した育種技術は、交雑育種法である。優れた品種、あるいは品種になる前の系統の間で交雑し、その子孫から両親の優れた特性を併せ持つ品種を育成することが古くから行われた交雑育種であり、現在も広く利用されている。イネ、ムギ類やダイズなどの自殖性作物では、ほとんどの品種は自殖を続けて作成した純系であり、異なる品種を交雑した場合、 F_2 世代において特性の分離が見られるようになる。 F_2 世代で優良個体を選抜し、選抜個体ごとに採種した F_3 世代をそれぞれの系統として選抜し、 F_4 世代以後も同様に選抜する系統育種法が広く利用される。イネやコムギでは、 F_2 世代から F_4 世代までを集団で維持し、最初の個体選抜を F_4 世代、系統選抜を F_5 世代から行う集団育種法がより多く利用されるようになった。選抜された系統が、自殖が進んで遺伝的にほぼ均一になった(固定した) F_7 世代程度の段階で、各地域における適応性検定や、耐病性や環境ストレス耐性などの特性検定で評価され、品種として優れていることがわかれば、 F_{10} 世代程度で新品種となるので、最初の交雑から品種になるまで、10年程度必要となる。

このような従来の技術を使った育種であっても、環境ストレス耐性を強化する育種が成功している。そこで最も重要となるのは、精度の高い検定技術である。夏期の低温によってイネが不稔となる障害型冷害に対する耐冷性の検定技術は、古くから様々な方法が提案されてきたが、水深20~30 cmで水温19°C以下に制御して夏期の長期間にわたって低温処理をする恒温深水法が開発され[1]、日本国内のみでなく、海外でもこの検定技術が使われている。この方法で、‘コシヒカリ’は耐冷性が強いことがわかり、‘コシヒカリ’の耐冷性を持ち早生化した‘ひとめぼれ’が育成された[2]。その後も耐冷性が更に強化された品種が育成されている。近年、イネの高温障害が問題となっており、登熟期の高温によって、デンプンの蓄積が不十分となり、米の品質が低下する[3]。検定技術が確立できていないため、評価の年次変動が大きい、高温障害が出にくいイネ品種が複数育成されている[4]。

品種同士の交雑による育種では、育種目標が既存の品種に含まれる遺伝的特性に限定されてしまう。古い品種や海外の品種、あるいは同種の野生植物が持つ一点だけ優れた特性をその地域に適した主要品種に導入するために、それらを親とした交雑育種も行われるようになり、在来品種や海外品種等が遺伝資源として利用されるようになった。そのため、多数の品種や野生系統が収集され、ジーンバンクに保存されている。優れた特性が一遺伝子によって支配される場合は、その特性を持つ遺伝資源を一回親とし、主要品種を反復親として連続戻し交雑を行う戻し交雑育種法が用いられる。一般に、4~5回程度の戻し交雑が行われる。5回程度の戻し交雑では、目的とした一遺伝子だけでなく、多数の遺伝子が一回親由来となってしまいうため、得られた系統は、適応性検定や特性検定が必要であり、この育種法でも新品種の育成に8年程度はかかる。環境ストレス耐性などのように多数の微働遺伝子に支配される特性の導入には、この育種法は利用しにくい、耐冷性が極めて強い海外のイネ品種から耐冷性を導入したイネ系統が既に多数育成されている[5]。

戻し交雑育種法に用いる一回親には、別の種を用いることも出来る。異種の間でも、通常の交雑で雑種種子が得られることがある。このような遠縁交雑で雑種が得られない場合は、胚培養などの雑種胚を無菌的に培養する方法が雑種作成に有効に利用されている。異種間の雑種では、多くの場合、両親のゲノムが異なるので、減数分裂時の染色体対合が正常に起こらず、不稔となる。この雑種不稔を解消するには、コルヒチンなどを用いて染色体倍加を行い、二つのゲノムを2組ずつ持つ複二倍体（異質倍数体）とすることによって可稔とし、それに主要品種を戻し交雑する方法が、コムギなどの耐病虫性育種に有効に利用されてきた。遠縁交雑の場合、一回親が品種として不良な遺伝子を同種の遺伝資源よりも多く持つので、より多くの戻し交雑が必要となり、育種に年数がかかる。体細胞からプロトプラストを作成し、異種間で融合して培養し、植物体にする細胞融合法は、胚培養法よりも遠縁の組合せの雑種作出を可能とすることから期待されるが、遠縁種の特定の遺伝子を主要品種に導入する技術としてはまだあまり利用されていない。

交雑育種では、純系にするための固定に年数がかかることから、半数体を作成して染色体倍加し、全ての遺伝子をホモ接合とする半数体育種法が利用されている。染色体倍加の方法は古くから確立されているが、半数体作出法が、植物種によって適した方法が異なる。薬を無菌的に培養して、小孢子から植物体を作成する薬培養法は、イネやアブラナ科野菜などでよく用いられている方法である[6]が、半数体作出効率が低く適用できない植物種も多い。セイヨウナタネなどでは、小孢子を取り出して細胞培養する単離小孢子培養も用いられる[7]。異種の花粉やガンマ線照射した花粉を交配して、半数体の種子を得る、あるいは胚培養して半数体を得る方法も、オオムギやコムギ、タマネギなどで用いられる[8,9]。無菌培養技術を用いず、栽培方法を工夫して、小さく育てて短期間に世代を進める世代促進法も、イネで広く利用されている。高温短日条件で育てることで、1年に3世代以上進めることができる。集団育種法において、無選抜で世代を進める F_2 から F_4 世代の栽培に利用されている。これらの技術の利用により、交雑育種に必要な期間を2, 3年短くすることが出来る。

育種技術として作物の収量向上に最も貢献した方法は、一代雑種育種法である。多数の自殖系統を育成し、それらの間で交雑して、最も優れた F_1 を作る両親を選抜し、両親系統を増殖して一代雑種種子を農家に提供するものである。 F_1 では雑種強勢が強く表れ、均一性も高い。これは他殖性作物のトウモロコシの育種法として発達したものであるが、セイヨウナタネやテンサイ、多くの野菜の育種にも利用されている。自殖性作物であるイネでも、中国において一代雑種品種が広く利用されている。この育種法では、一代雑種種子の生産が効率よく行えることが必要である。雌雄同株のトウモロコシでは、雄花を切り取ることによって雑種種子が生産できるが、両性花を持つものでは、自殖を防ぐ手段が必要である。タマネギやイネなどでは、細胞質雄性不稔性が利用されている。ハクサイなどのアブラナ科野菜では、自家不和合性が利用される。一代雑種品種は、生育旺盛であることから、不良環境にも一般的に強い。

以上のような交雑育種法では、雑種作成が可能な植物が持つ遺伝変異しか、育種に利用することが出来ない。新たな遺伝子の変異を人為的に作成して、育種に利用するのが突然変異育種法である。放射線や化学変異剤などの変異原の処理によって突然変異を誘発し、突然変

異体を選抜して、直接品種とする、あるいは、主要品種に交雑して突然変異遺伝子を育種に利用する。変異原処理では、狙った特定の遺伝子に突然変異を誘発することが出来ず、突然変異はゲノム上で無作為に起こる。また、多くの場合、遺伝子の機能を失わせるあるいは低下させる突然変異となるため、突然変異遺伝子は劣性となる。そのため、目標とした特性を持った突然変異体を作成するには、数千個体以上の多数の個体に変異原処理を行い、自殖次代で劣性対立遺伝子がホモ接合となって表れた突然変異形質を持つ個体を選抜する必要がある。大規模な集団での選抜が必要なため、形態特性などの突然変異体作成は容易であるが、成分特性の突然変異体作成は容易ではない。対立遺伝子がホモ接合となりにくい他殖性植物や、同一機能の遺伝子を複数持つ倍数性植物では、突然変異形質が表れにくく、突然変異育種が困難である。環境ストレス耐性は、大規模に精度の高い選抜を行うことが困難なことから、突然変異体作成の成果があまり多くないが、耐塩性が強いイネ系統は得られており、その原因遺伝子も同定されている[10]。イネでは、カドミウム低吸収性の突然変異体が得られており、その突然変異形質が育種に利用され、注目されている[11]。不良環境下で品質が低下しないものも環境ストレス耐性があるものと見なせば、カドミウム低吸収性も環境ストレス耐性に含めることができる。

1980年代に種々の作物の形質転換技術が開発され、1990年代に遺伝子組換え技術を用いた育種が実際に行われるようになり、既にダイズやワタでは、世界における遺伝子組換え品種の比率が非遺伝子組換え品種より高くなっている。遺伝子組換え品種は、トウモロコシやセイヨウナタネでも広く利用されており、除草剤耐性と耐虫性の遺伝子を利用したものが多く、イネなどの直接食用とする作物では、実用品種ではなく研究段階のものが多い。微生物やウイルスのDNAが育種に利用できることから、遺伝子組換え育種における遺伝資源は、動物や微生物を含めあらゆる生物とウイルスにまで広がる。更には、人為的に合成した遺伝子まで育種に利用できる。そのため、育種技術としてのポテンシャルは極めて高い。まだ、作物の育種に利用されている遺伝子の種類は多くないが、科学の進歩によって、今後、作物育種に有用性がある遺伝子が多数見いだされると考えられる。

遺伝子組換え育種技術は、その可能性が大きい反面、その危険性についての懸念も大きい。そのため、遺伝子組換え作物の食品としての利用には、食品安全性評価が求められる。また、遺伝子組換え作物が生態系に影響を及ぼす可能性が懸念されることから、その栽培には生物多様性影響評価が求められる。現在利用されている植物の形質転換法では、DNA断片を植物の染色体のどこかに挿入するものであり、挿入する位置を限定することが出来ない。挿入される位置によって導入した遺伝子の発現レベルに差が出る。そのため、食品安全性評価と生物多様性影響評価は、同じ作物に同じ遺伝子を入れた品種であっても、その形質転換イベントごとに行われる。微生物や動物の遺伝子を用いると、安全性に不安が持たれやすいので、交雑可能な植物、あるいは同種の遺伝子のみを用いた遺伝子組換え育種が国内でよく行われている¹⁰。同種の遺伝子による遺伝子組換えはシスジェネシスと呼ばれるが、これらも食品安全性評価と生物多様性影響評価が求められる。また、播種から開花までの時間がかかる果樹などで、育種の過程で早く開花させるために花成ホルモン遺伝子 *FT* を導入し、早く開花させて交雑育種を行い、最終的には導入した遺伝子が残っていない個体（ヌルセグリガン

ト) を作出しても、現在は食品安全性評価と生物多様性影響評価が求められる。従来の形質転換法で *FT* 遺伝子を植物に導入するのではなく、ウイルスに *FT* 遺伝子を挿入して植物に感染させ、早く開花させて交雑育種に利用する方法も開発されている [12]。

遺伝子組換え育種で環境ストレス耐性を強化するために利用できる遺伝子はいくつか知られている。マンニトールやプロリン、グリシンベタインなどの適合溶質と呼ばれる物質は、細胞機能の保護作用を持ち、高濃度に蓄積することによって浸透圧ストレスに耐性をもたらす。適合溶質の合成酵素の遺伝子を高発現あるいは条件的に発現させることにより、耐乾性、耐塩性、耐凍性などの耐性植物が得られることが知られている [13]。乾燥条件での遺伝子発現誘導に関与するタンパク質である DREB の遺伝子を高発現あるいは条件的に発現させることにより、耐乾性や耐塩性が多くの植物種で高まることがわかっている。DREB による環境ストレス耐性強化は日本の研究成果であり [14]、その作物育種における普及が期待される。しかし、遺伝子組換えにより環境ストレス耐性を強化した植物は、競合における優位性があることから生物多様性影響があると評価される可能性が高いため、栽培する地域に近縁の野生植物がないことなどを考慮して、育種計画を立てる必要がある。

日本が先導して行ったイネゲノム塩基配列の解読は、農作物のゲノム研究として最初の成果である [15]。その後、多くの作物種で全ゲノム解読の成果が得られている [16, 17, 18]。ゲノム塩基配列の解読は、連鎖地図上にマッピングされた遺伝子の同定を効率化し、その種が持つ遺伝子の同定を大きく促進する。植物でゲノム解読が最初に行われたシロイヌナズナだけでなく、現在では、イネをはじめ多くの作物種で多くの特性の遺伝子が同定されている。育種目標とする特性の遺伝子が連鎖地図上にマッピングされていれば、交雑育種における集団での個体選抜において、その遺伝子に連鎖した DNA マーカーによる選抜 (MAS, marker-assisted selection) が可能で、耐病性などのように検定に労力がかかる特性の選抜には極めて有用である。しかし、その特性に関わる遺伝子と DNA マーカーとの間で、減数分裂時に組換えが起これば、その DNA マーカーによる選抜は誤選抜をもたらす。また、異なる交雑組合せでは、同じ DNA マーカーが使えるかどうかわからない。その特性の変異をもたらす原因遺伝子の塩基配列変異を同定し、その DNA 多型を選抜マーカーと出来れば、以上のような問題はない。ただし、特性の変異をもたらす塩基配列変異は、一塩基の置換や欠失などの一塩基多型 (SNP) である場合が多いので、育種で使える低コスト簡易 SNP 分析技術が必要であり、いくつかの方法が開発されている [19]。このようなゲノム情報を使った育種がゲノム育種と呼ばれる。

環境ストレス耐性は量的形質であるため、QTL 解析がその遺伝子の解析に用いられ、イネの耐冷性などでは、多数の QTL が見いだされている [20]。QTL 解析で見いだされる遺伝子座は、染色体上の広い領域であり、それから QTL の原因遺伝子を同定するのは時間がかかる。次世代シーケンサーの普及によって、多数の品種について多数の SNP の遺伝子型分析が短時間で出来るようになり、各品種の特性と対応づけるゲノムワイドアソシエーション解析 (GWAS) も広く行われている [21]。GWAS の方が QTL 解析よりも、QTL を狭い領域に絞り込むことが出来るとされる。QTL は効果の大きいものから小さなものまで様々であり、一つの QTL では効果が不十分であっても、それを集積することによって、はっきりした差をもたら

すことができる。DNA マーカーを用いて QTL を集積することは QTL ピラミディングと呼ばれ[22]、イネの耐冷性育種にも利用されている。

突然変異育種においても、ゲノム育種の手法が発展している。ミスマッチ部位を切断する酵素で DNA のヘテロ二本鎖を処理して分析し、突然変異体が含まれる個体集団を見いだして、突然変異の塩基配列を決定して突然変異体を選抜する方法が TILLING と呼ばれ、世界中で突然変異体作出に利用されている[23]。国内でも、高オレイン酸ダイズなどが作出されている[24]。この方法では、遺伝子の塩基配列情報から突然変異体をとるので、逆遺伝学的方法であり、表現型によって突然変異体を選抜する従来の突然変異育種法では不可能であった突然変異体選抜も可能となる。例えば、分析が煩雑なため多数個体のスクリーニングが行えない成分の突然変異体や、環境ストレス耐性などの効果が小さい QTL の遺伝子の突然変異体は、この方法であれば選抜可能である。また、倍数性植物などで重複遺伝子がある特性の突然変異体作出にも有効である[25]。次世代シーケンサーを用いた逆遺伝学的突然変異体選抜法も開発されている[26]。このように、突然変異育種において最も困難であった突然変異体の選抜が効率的に行えるようになり、今後の活発な育種利用が期待される。

ゲノム上の特定の塩基配列を認識して切断する方法が、近年、急激に進歩した。zinc finger nucleases (ZFNs) は比較的古くから研究されてきたが[27]、一つの zinc finger モチーフが 3 塩基を認識するので、任意の塩基配列に利用する場合、多種類のモチーフが必要で、その酵素遺伝子の構築が容易ではない。その後、一塩基ごとに認識するモチーフを組み合わせる TAL effector nucleases (TALEN) が開発され[28]、任意の塩基配列を切断する酵素の遺伝子の設計が容易に行えるようになった。しかし、TALEN では、一塩基ごとに認識するモチーフが 34 アミノ酸であり、その塩基長に応じて構築する必要があり、まだ技術的に難しかった。しかし、2012 年に CRISPR/Cas9 が発表され[29]、この方法では、切断したい塩基配列に相補的な RNA と DNA 切断タンパク質の複合体を細胞に入れるだけなので、容易に任意の塩基配列を切断できるようになった。植物の場合は、これらの酵素を細胞内で構築するための遺伝子を染色体に導入して、遺伝子発現させ、塩基配列切断を行うが[30]、タンパク質や RNA を植物細胞に導入することでも行えるようになった[31]。DNA の二本鎖切断が起こると、それと相同な塩基配列を用いて修復されるが、修復ミスも起こり、突然変異遺伝子となる。特定の遺伝子を狙って突然変異を起こさせるのは、従来の突然変異誘発法では不可能であったが、これらの方法では可能となった。さらには、切断した位置に、遺伝子を挿入することも可能となる[32]。これは、従来の形質転換技術では染色体上に挿入する遺伝子の位置を限定できず、形質転換体ごとに導入した遺伝子の発現レベルが異なるという問題を解決できる手段となることが期待される。このような部位特異的ヌクレアーゼを用いて任意のゲノム塩基配列を改変する技術はゲノム編集技術と呼ばれ、作物の育種にも活発に利用されている。特定の塩基配列に任意の塩基置換を起こさせる手段として、oligonucleotide-directed mutagenesis (ODM) という方法も開発されている。普通のオリゴヌクレオチドを細胞に導入すると両端から分解されるので、この方法では両端を修飾する、あるいは環状にして導入する[33]。small RNA を発現する DNA を導入して特定遺伝子をサイレンシングする方法はエピゲノム編集と呼ばれ、small RNA の遺伝子組換え植物に非遺

伝子組換え植物を接ぎ木し、small RNA の篩管輸送により非遺伝子組換え植物の遺伝子にメチル化を起こさせて遺伝子発現を抑制した植物の作出も行われている[34]。このように、従来の形質転換技術より後に開発された種々の遺伝子改変技術は new breeding techniques (NBT) と呼ばれ、その技術を利用したことの検知が難しく、遺伝子組換え作物として扱うべきか論議があるところである。現在は、その栽培や食品としての利用について遺伝子組換え作物として審査を受ける必要がある。ゲノム編集技術や ODM などは、その開発者により多くの特許が申請されており、日本はこれらの技術の開発においては遅れを取ったことから、日本ですぐに育種技術として利用するには、解決すべき問題が多い。

<参考資料5 引用文献>

- [1] 松永和久 2005. イネ穂ばらみ期耐冷性の高精度検定法「恒温深水法」の確立と耐冷性遺伝子集積による高度耐冷性品種の育成. 宮城県古川農業試験場研究報告 4 : 1-78
- [2] 佐々木武彦・阿部真三・松永和久・岡本栄治・永野邦明・丹野耕一・千葉芳則・狩野篤・植松克彦 (1994): 水稻新品種「ひとめぼれ」について. 宮城県古川農業試験場研究報告, 2, 1-17
- [3] Kobayashi A, Bao G, Ye S, Tomita K (2007) Detection of quantitative trait loci for white-back and basal-white kernels under high temperature stress in *japonica* rice varieties. *Breed Sci* 57:107-116
- [4] 農研機構九州沖縄農業研究センター「にこまる」「きぬむすめ」育成グループ (2014) 高温登熟耐性を有する西日本向け良食味・良質・安定多収水稻品種「にこまる」「きぬむすめ」の育成. *育種学研究* 16:180-185
- [5] Saito K, Miura K, Nagano K, Hayano-Saito Y, Araki H, Kato A (2001) Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. *Theor Appl Genet* 103: 862-868
- [6] Endo T, Chiba B, Wagatsuma K, Saeki K, Ando T, Shomura A, Mizubayashi T, Ueda T, Yamamoto T, Nishio T (2016) Detection of QTLs for cold tolerance of rice cultivar 'Kuchum' and effect of QTL pyramiding. *Theor Appl Genet* 129: 631-640
- [7] 木下 厚・岡本吉弘・石村 櫻・佐竹徹夫 (2000) 「イネの薬培養におけるカルス形成に最適の花粉発育時期の決定」 *育種学研究* 2:73-79
- [8] Takahashi, Yokoi S, Takahata Y (2011) Improvement of microspore culture method for multiple samples in *Brassica*. *Breeding Science* 61: 96-98
- [9] Dore C, Marie F (1993) Production of gynogenetic plants of onion (*Allium cepa* L.) after crossing with irradiated pollen. *Plant Breeding* 11:142-147

- [10] Takagi H, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Uemura A, Yaegashi H, Obara T, Oikawa K, Utsushi H, Kanazaki E, Mitsuoka C, Natsume S, Kosugi S, Kanzaki H, Matsumura H, Urasaki N, Kamoun S, Terauchi R (2015) MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nature Biotech* 33:445 - 449
(2015) MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nature Biotech* 33:445 - 449
- [11] Ishikawa S, Ishimaru Y, Igura M, Kuramata M, Abe T, Senoura T, Hase Y, Arao T, Nishizaki NK, Nakanishi H (2012): Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:19166-19171
- [12] Yamagishi N, Sasaki S, Yamagata K, Somori S, Nagase M, Wada M, Yamamoto T, Yoshikawa N (2011) Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana* *FT* gene using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Mol Biol* 75: 193-204
- [13] Sakamoto A, Murata N (2002) The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment* 25:163-171
- [14] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1391-1406
- [15] International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793-800
- [16] Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T et al. (2010) Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature* 463:178-183
- [17] The International Barley Genome Sequencing Consortium (2012) A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491:711-717
- [18] The Tomato Genome Consortium (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485:635-641
- [19] Shirasawa K, Shiokai S, Yamaguchi M, Kishitani S, Nishio T (2006) Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice. *Theor. Appl. Genet.* 113:147-155

- [21] Courtois B, Audebert A, Dardou A, Roques S, Ghneim-Herrera T, Droc G, Frouin J, Rouan L, Gozé E, Dingkuhn M (2013) Genome-wide association mapping of root traits in a Japonica rice panel. *PLoS One* doi: 10.1371/journal.pone.0078037
- [22] Ashikari M, Matsuoka M (2006) Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. *TRENDS Plant Sci* 11:344-350
- [23] Till BJ, Reynolds SH, Greene EA, Codomo CA, Enns LC, Johnson JE, Burtner C, Odden AR, Young K, Taylor NE et al. (2003) Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res.* 13: 524-530
- [24] Hoshino T, Takagi Y, Anai T (2010) Novel GmFAD2-1b mutant alleles created by reverse genetics induce marked elevation of oleic acid content in soybean seeds in combination with GmFAD2-1a mutant alleles. *Breed Sci* 60:419-425
- [25] Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D (2005) A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotech* 23:75-81
- [26] Rigola D, van Oeveren J, Janssen A, Bonne A, Schneiders H, van der Poel HJA, van Orsouw J, Hogers RCJ, de Both MTJ, van Eijk MJT (2009) High-throughput detection of induced mutations and natural variation using KeyPoint™ technology. *PLoS ONE* 4:e4761
- [27] Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161:1169-1175
- [28] Ma L, Zhu F, Li Z, Zhang J, Li X, Dong J, Wang T (2015) TALEN-based mutagenesis of lipoxygenase LOX3 enhances the storage tolerance of rice (*Oryza sativa*) seeds. *PLoS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0143877
- [29] Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalan C, Cho SW, Kim H, Kim S-G, Kim S-T, Choe S, Kim J-S (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotech* 33:1162-1164
- [30] Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E., Hinkley SJ et al. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotech* 29: 143-150
- [31] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816-821
- [32] Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E (2012) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotech* 30:231-239

- [33] Sauer NJ, Mozoruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Walker KA, Beetham PR, Schopke CR, Gocal GFW (2016) Oligonucleotide-directed mutagenesis for precision gene editing. *Plant Biotech J* 14:496-502
- [34] Lewsey MG, Hardcastle TJ, Melnyk CW, Molnar A, Valli A, Urich MA, Nery JR, Baulcombe DC, Ecker JR (2016) Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* E801-E810