



Title	ダイズ (Glycine max) における種子低温裂開抵抗性及び早熟性に関する育種学的研究
Author(s)	山口, 直矢
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第6990号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6990
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61872
Type	doctoral thesis
File Information	Naoya_Yamaguchi.pdf



ダイズ (*Glycine max*) における種子低温裂開抵抗性
及び早熟性に関する育種学的研究

北海道立総合研究機構 十勝農業試験場

山口 直矢

目 次

第一章 緒論	p1
第二章 ダイズ低温裂開粒の発生条件の解明および検定法の開発	p9
1) 目的	p9
2) 材料と方法	p10
3) 結果	p11
4) 考察	p14
第三章 ダイズ低温裂開抵抗性の遺伝解析	p28
1) 目的	p28
2) 材料と方法	p29
3) 結果	p33
4) 考察	p37
第四章 海外ダイズ品種を利用した早熟系統の開発と遺伝要因の解析	p57
1) 目的	p57
2) 材料と方法	p58
3) 結果	p63
4) 考察	p67
第五章 総合考察	p85
摘 要	p91
Summary	p93
引用文献	p96
謝 辞	p110

略語一覧

Chr	chromosome
CHS	chalcone synthase gene
CS	cracked seed
CSI	cracked seed index
CTI	chilling tolerance index
Gm	<i>Glycine max</i>
HH	soybean cultivar Hayahikari
Ic	Inhibitor of cold-induced seed coat discoloration
IR	inverted repeat
KM	soybean cultivar Kitamusume
LG	linkage group
LOD	logarithm of the odds
NIL	near-isogenic line
PTGS	post-transcriptional gene silencing
QTL	quantitative trait locus
RIL	recombinant inbred line
SSR	simple sequence repeat
T1067	soybean breeding line Tokei 1067
T1141	soybean breeding line Tokei 1141
T1142	soybean breeding line Tokei 1142
T225	soybean breeding line Toiku 225
T238	soybean breeding line Toiku 238
T239	soybean breeding line Toiku 239
T240	soybean breeding line Toiku 240
T248	soybean breeding line Toiku 248
T251	soybean breeding line Toiku 251
TH	soybean cultivar Toyohomare
TK	soybean cultivar Toyokomachi
TM	soybean cultivar Toyomusume
YH	soybean cultivar Yukiomare
YP	soybean cultivar Yukipirika

第一章 緒論

ダイズは日本型の食生活に欠かせない豆腐、煮豆、納豆、味噌、醤油などに加工される主要作物であり、輪作体系を維持するためにも重要な作物である。ダイズは全国で 131,600ha 栽培されており、そのうち北海道では 28,600ha 栽培され、都道府県では全国 1 位の作付面積である（2014 年度 農林水産省）。ダイズの収量は全国平均で 176kg/10a であるのに対し、北海道平均は 257kg/10a と大きく上回り、収量レベルが高い（2014 年度 農林水産省）。このように北海道は日本におけるダイズの一大産地である。しかしながら、北海道はダイズ栽培の北限に位置し、しばしば冷害に見舞われるため（Funatsuki and Ohnishi 2009）、生産が安定しない。生産コストの低減や自給率向上のためにも、北海道のダイズ栽培における冷害対策の確立は重要である。

1. ダイズの冷害と耐冷性育種

特に厳しい冷害は北海道北部と東部で 4 年に一度の割合で発生している（田中 1997）。例えば、1993 年、2003 年は冷害によって北海道のダイズ平均収量は著しく低下した（1993 年：112kg/10a, 2003 年：185kg/10a 農林水産省）。1993 年と 2003 年の十勝農試圃場におけるダイズ収量は平年と比べてそれぞれ 36%, 78%であった（角田ら 1993; 萩原ら 2003）。低温（10-18℃）の影響は、初期生育時であれば生育不良（生育不良型冷害）、開花期では花と莢の脱落（障害型冷害）、粒肥大期では粒の充実不良（遅延型冷害）として現れる（山本ら 1966）。特に花と莢の脱落は最も収量に影響するため（松川 1994）、最も重要な耐冷性形質の一つと考えられている。この「開花期耐冷性」には遺伝変異があることが報告されており（Kurosaki and Yumoto 2003; Kurosaki et al. 2003, 2004）、人工気象室を用いた開花期耐冷性検定によって耐冷性品種が育成されてきた（Kurosaki and Yumoto 2003）。北海道では、開花期耐冷性が‘強’の品種として、「ハヤヒ

カリ」(湯本ら 2000) , 「トヨハルカ」(田中ら 2015) , 「ゆきびりか」(萩原ら 2009) , 「とよみづき」(山口ら 2014) などが育成されている。また, 開花期よりも前の花粉形成期の低温ストレスも莢形成に関与することが明らかにされており (Ohnishi et al. 2010) , この時期の耐冷性が強い系統として「十系 952 号」等が育成されている (大西 2012) 。

2. 耐冷性に関与する遺伝形質

三分一 (1979) は冷害年では初期生育の栄養生長量が劣ることを明らかにし, 初期生育量は生育不良型冷害の選抜基準になることを示した。初期生育量は百粒重と正の相関関係があることから, 粒大の大きい系統が生育不良型冷害に強い (三分一 1979) 。また, 毛じ性に関する準同質遺伝子系統 (NILs) を用いて, 無毛系統は有毛系統に比べて初期生育が劣り, 生育不良型冷害に弱いことを明らかにした (三分一 1979) 。Funatsuki et al. (2003) は活性酵素消去酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ 1 を欠失する品種系統群は冷涼地圃場でも収量性が高いことを明らかにした。北海道品種「トヨハルカ」の開花期耐冷性については, 低温下での種子肥大に関与する量的形質遺伝子座 (QTL) が臍色を決定する *I* 座近傍に検出されている (Ikeda et al. 2009) 。多くの研究において, 開花期耐冷性と早晩性に関与する熟性遺伝子座との関連が明らかにされている (Kurosaki et al. 2004; Funatsuki et al. 2005; Takahashi et al. 2005) 。

ダイズの毛じ色決定遺伝子座である *T* 遺伝子座は耐冷性との関連が報告されている。Kurosaki et al. (2004) および Takahashi et al. (2005) は毛じ色に関する NILs を用いて, 褐毛 (*T*) が白毛 (*t*) よりも開花期耐冷性が強いことを明らかにした。また, 冷涼地圃場においても, 褐毛の耐冷性の効果が確認されている (Kurosaki et al. 2004) 。*T* 遺伝子座の責任遺伝子として Flavonoid 3' hydroxylase が単離され (Toda et al. 2002; Zabala and Vodkin 2003) , 褐毛は白毛よりも抗酸化作用が強く, 低温下で葉に障害を受けにくいことが明らかにされた (Toda et al. 2011) 。褐毛品種は耐冷性が強い一方で, 臍色が黄色の黄ダイ

ズでは種皮のくすみが発生する (Takahashi 1997) . 褐毛品種に由来する耐冷性を黄ダイズに導入するため, 「トヨハルカ」由来の *I* 座を組合せることにより, くすみを改善できる可能性が見いだされている (Oyoo et al. 2011; Rodriguez et al. 2013) .

3. 低温が種子の外観品質に与える影響

低温はダイズ種子の外観品質にも悪影響を与える. 冷害年において, 低温着色の発生が問題となる. 低温着色は臍周辺に着色物質が蓄積し, 外観品質を低下させる現象である (Srinivasan and Arihara 1994; Morrison et al. 1998; Funatsuki and Ohnishi 2009; Kasai et al. 2009) . また, 低温着色に伴って臍周辺部に裂皮を生じることが報告されている (Takahashi and Abe 1994, 1999) . 低温着色の発生メカニズムは近年, 多くの研究により明らかにされてきている. 黄ダイズにおいて, 種皮の着色はカルコンシンターゼ遺伝子 (*CHS*) の転写後ジーンサイレンシング (Post-transcriptional gene silencing, PTGS) によって阻害されているが (Senda et al. 2004; Kasai et al. 2009) , 低温によって *CHS* の PTGS が抑制されることにより, 低温着色が発生すると報告されている (Kasai et al. 2009; Senda et al. 2012) . 臍色・種皮が黄色のダイズにおいては, *CHS* の逆位反復配列 (*Glycine max* inverted-repeat *CHS* pseudogene, *GmIRCHS*) が *I* 座である可能性が示され, *CHS* の 2 本鎖 RNA が *CHS* PTGS を引き起こすと考えられている (Kasai et al. 2007; Senda et al. 2012) .

北海道では, 低温着色粒に関する低温感受性時期が明らかにされ, 人工気象室を用いた低温着色抵抗性の検定法が確立された (岡ら 1989; 湯本・佐々木 1990) . 開発された検定法を活用し, 臍周辺着色抵抗性が‘強’の品種として「トヨコマチ」(佐々木ら 1990) , 「トヨホマレ」(湯本ら 1995) , 「ユキホマレ」(田中ら 2003) などが育成されている. 特に「トヨハルカ」(田中ら 2015) はこれまで育成された品種の中で最も強い抵抗性を持つ. 「トヨハルカ」に由来する着色抵抗性については DNA マーカーが開

発され、人工気象室を用いた検定法よりも前の世代で選抜に用いられている (Ohnishi et al. 2011) . その他にも低温着色抵抗性に関する遺伝解析の報告があるが, QTLs の効果が小さい, もしくは熟性遺伝子座や *T* 遺伝子の効果であり, 育種での利用には至っていない (Takahashi 1997; Takahashi and Abe 1999; Benitez et al. 2004; Githiri et al. 2007) .

近年では, 低温着色粒とは別に北海道東部および北部で冷害年に発生する「裂開粒 (Cracked Seed, CS)」が問題となっている (Fig. I-1) . 裂開粒は種子の背側種皮が大きく裂けて子葉が露出し, 2 枚の子葉接合部が付着せず乖離する障害粒である (大西ら 2007) . 低温着色粒においても種子の臍周辺部に限定して小さな裂皮が生じるが (Takahashi and Abe 1994, 1999) , 裂開粒の多くは種子の背側が大きく裂ける点が異なっている (Fig. I-1) . 裂開粒は収穫後の選別では屑粒として扱われるため, 裂開粒の発生により生産者の歩留まりが大きく低下する. 現在の北海道の基幹品種である「ユキホマレ」 (田中ら 2003) は早熟で, 開花期耐冷性も‘やや強’であることから, 北海道東部および北部でも作付されてきた. しかし, 「ユキホマレ」は低温により裂開粒が発生しやすく (大西ら 2007) , 2008 年のオホーツク地域では圃場によって 30%以上の裂開粒が発生した.

4. 熟性遺伝子と耐冷性の関係

ダイズにおいて, 早晩性に関わる遺伝子座が多数報告され, *E* 遺伝子座と呼ばれている (Cober et al. 1996) . 現在までに報告されているのは, *E1* および *E2* (Bernard 1971) , *E3* (Buzzell 1971) , *E4* (Buzzell and Voldeng 1980) , *E5* (McBlain and Bernard 1987) , *E6* (Bonato and Vello 1999) , *E7* (Cober and Voldeng 2001) , *E8* (Cober et al. 2010) , *E9* (Kong et al. 2014) である. *E1-E4* については遺伝子が単離されており (Liu et al. 2008; Watanabe et al. 2009, 2011; Xia et al. 2012) , DNA マーカーを利用して遺伝子型を推定できる. *E1* は長日条件下で光受容体であるフィトクローム A が働いている場合に発現し,

フロリゲン遺伝子の発現を抑制して開花を抑制する (Xia et al. 2012) . *E1* の機能欠損型にはアミノ酸に変異が生じた *e1-as* 型, 1塩基の欠失によるフレームシフトが生じた *e1-fs* 型, *E1* 全体が欠失した *e1-nl* 型の 3 タイプが報告されている (Xia et al. 2012) . *E2* はシロイヌナズナの *GIGANTEA* 遺伝子のオーソログであり, フロリゲン遺伝子の発現を抑制して開花を制御する (Watanabe et al. 2011) . *E3* と *E4* はそれぞれ光受容体であるフィトクローム A3 とフィトクローム A2 をコードする (Liu et al. 2008; Watanabe et al. 2009) . *E1-E4* はいずれも劣性遺伝子 *e* が優性遺伝子 *E* よりも早熟化の効果を持つ (McBlain et al. 1987; Saindon et al. 1989) . 九州地域の品種の多くは *E1/E2/E3/E4* 型であるが, 高緯度地域になるに従い, 機能欠損型が優先する (Tsubokura et al. 2014) . 北海道品種においては, 「ユキホマレ」が *e1-nl/e2/E3/e4* 型, 「トヨムスメ」が *e1-nl/e2/E3/E4* 型, 「スズマル」が *e1-as/e2/E3/E4* 型, 「ハヤヒカリ」が *E1/e2/e3/e4* 型であり (Tsubokura et al. 2014) , 現在作付されている品種の多くは, この 4 タイプに分類される.

多くの研究において, 熟性遺伝子座と耐冷性との関連が報告されている. Funatsuki et al. (2005) は北海道品種「トヨムスメ」と「ハヤヒカリ」を使った開花期耐冷性の遺伝解析により, *E1* 座と *E3* 座に QTLs を検出している. Kurosaki et al. (2004) は *E1* 座に関する NILs を用いて, *E1* 型は *e1* 型よりも開花期耐冷性が強いことを報告している. Takahashi et al. (2005) はカナダ品種「Harosoy」を遺伝背景とする NILs を用いて, *E1/e3/e4* 型は *e1/E3/E4* 型よりも開花期耐冷性が強いことを明らかにした. 低温着色に関して, Takahashi and Abe (1999) は「Harosoy」を遺伝背景とする *E1-E5* の NILs を用いて, *E1* 型, *E5* 型は低温着色に強く, *E1* 型, *e4* 型, *E5* 型は低温着色に伴う臍周辺裂皮に強いことを報告している. また, Benitez et al. (2004) は「Harosoy」を遺伝背景とする *E7* の NILs を用いて, *E7* 型は *e7* 型よりも低温着色および臍周辺裂皮に強いことを報告している.

5. 早熟性と収量性の関係

北海道は無霜期間が短く降雪が早いため、ダイズの生育期間が制限されてしまう。このため、成熟が遅い品種は未成熟のまま霜害を受けてしまい、種子の外観品質が低下する。また、冷害年においては、通常年に比べて2～3週間成熟が遅れる（萩原ら 2003）。未成熟なダイズは含水量が高く、そのためコンバイン収穫の際は植物体がリールに絡まり、収穫に支障を来す。北海道の優良品種で最も早熟な「ユキホマレ」であっても、冷害年においては成熟期が大きく遅れることがあり、コンバイン収穫が困難となる事例があった（山口ら 2015a）。これらの理由から、北海道のダイズ品種には更なる早熟性が求められる。しかしながら、早熟品種は栄養生長期間も生殖生長期間も短いため、晩生品種よりも収量が低下する傾向にある。北海道で育成された系統において、成熟までの日数と子実収量の間に明らかな正の相関が認められた（大西ら 2012; 小林ら 2013）。このように、北海道のダイズ育種では早熟性と多収性の両立が課題として残されている。

6. 海外の遺伝資源の利用

カナダでは早熟品種の開発が積極的に行われているが、新しい品種では成熟期が約10日早くなっているのにも関わらず、収量は60 kg/10a（30年前の約120%）増加している（Cober and Voldeng 2012）。この早熟性及び収量性の向上に寄与した重要な母本の一つとして、1976年育成の「Maple Arrow」が挙げられている（Cober and Voldeng 2012）。「Maple Arrow」はスウェーデンで育成された系統「Fiskeby 840-7-3」を片親に持っているが（Cober and Voldeng 2012）、この「Fiskeby」系統群は耐冷性が強いことが報告されている（三分一 1979）。大西ら（2004）は障害型冷害の回避に有効とされるカナダ品種「Labrador」の側状花房（Schori et al. 1993; Gass et al. 1996）の北海道における有効性を検証した。この「Labrador」の片親は前述の「Maple Arrow」である（Park and Bradner

1988) . 近年では, カナダ品種, スイス品種の中から開花期耐冷性の強い品種がスクリーニングされ, それらは共通して「Fiskeby」を系譜上に持っていることが明らかにされた (山口ら 2015b) . このように, 高緯度地域における早熟性及び耐冷性の育種において「Fiskeby」系統群は有用な遺伝資源と考えられる. ポーランド品種は「Fiskeby」と近縁であり (Hudcovicová and Kraic 2003) , 長日条件でも開花し, 耐冷性も強いと報告されている (Konieczny and Shimamoto 1989) . 実際に北海道の圃場においても, ポーランド品種は北海道品種より開花が早く, 成熟が早かった (Konieczny and Shimamoto 1989) .

本論文では, 北海道のダイズの安定生産に重要な形質である低温裂開抵抗性および早熟性に関して育種学的研究を行った. 第二章で裂開粒の低温感受性時期を明らかにし, 低温裂開抵抗性検定法を開発した. また第三章では, 低温裂開抵抗性に関する DNA マーカーの開発を目指して, 第二章で開発した検定法を活用し, 低温裂開抵抗性の遺伝解析を行った. さらに第四章では, 海外の遺伝資源としてポーランド品種に着目し, 北海道品種とポーランド品種の交配により, 収量性を損なわずに早熟かつ耐冷性の強い系統を育成した. 育成した系統について, 熟性遺伝子座に近接する DNA マーカーを用いてポーランド品種の熟性に関する遺伝因子を推定した.

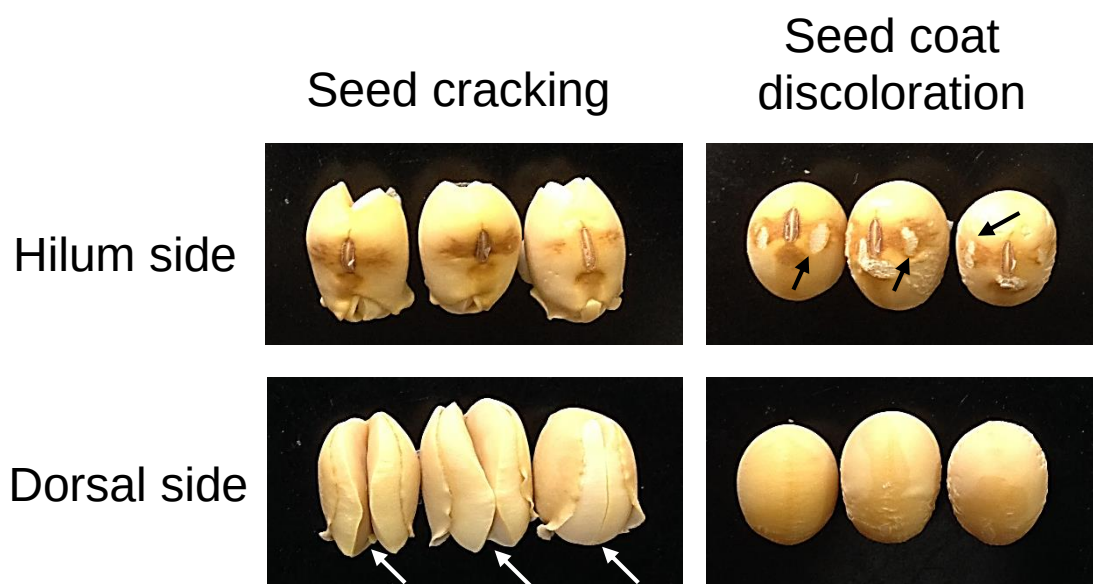


Fig. I-1. Pictures of representative seeds of Yukihomare. Seed coats of cracked seeds are severely split on the dorsal side, and the cotyledons are exposed and frequently separated. White arrows indicate the presence of seed cracking on the dorsal side. Black arrows indicate the presence of seed coat cracking around the hilum region.

第二章 ダイズ低温裂開粒の発生条件の解明および検定法の開発

1) 目的

近年、北海道東部および北部で冷害年に発生する「裂開粒 (Cracked Seed, CS)」が問題となっている。裂開粒は種子の背側種皮が大きく裂けて子葉が露出し、2 枚の子葉接合部が付着せず乖離する障害粒である (大西ら 2007)。裂開粒は収穫後の選別では屑粒として扱われるため、裂開粒の発生により生産者の歩留まりが大きく低下する。現在の北海道の基幹品種である「ユキホマレ」(田中ら 2003) は早熟で、開花期耐冷性も‘やや強’であることから、北海道東部および北部でも作付されてきた。しかし、冷害年において「ユキホマレ」に裂開粒が発生しやすいことが明らかになっており (大西ら 2007)、安定生産ができていない状況である。

これまでに人工気象室を用いた様々な耐冷性検定法が開発されている (岡ら 1989; 湯本・佐々木 1990; Kurosaki and Yumoto 2003; Funatsuki et al. 2004)。これらの検定法を活用して、低温裂開抵抗性の品種間差を評価する試みがされてきた。低温着色抵抗性検定法 (湯本・佐々木 1990) では開花 7 日後から 14 日間の低温処理、開花期耐冷性検定法 (Kurosaki and Yumoto 2003) は開花始から 28 日間の低温処理を行うが、年次によっては裂開粒が発生しない。また、開花期開花期耐冷性検定については、耐冷性の弱い系統が着莢しないことから、低温裂開抵抗性の品種間差を評価するのに適していない。これらの理由から、裂開粒の低温感受性の高い時期を明らかにし、低温裂開抵抗性の品種間差を検定する手法を新たに開発する必要がある。

そこで本章では、低温により発生する裂開粒について、圃場試験における裂開粒発生率と気温の関係から低温感受性の高い時期を明らかにするとともに、低温裂開抵抗性の品種間差の評価方法を検討し、人工気象室を用いた検定方法を確立する。

2) 材料と方法

1. 供試材料

圃場試験には「ユキホマレ (YH)」, 「トヨムスメ (TM)」, 「トヨホマレ (TH)」, 「トヨコマチ (TK)」, 「ゆきぴりか (YP)」, 「キタムスメ (KM)」, 「ハヤヒカリ (HH)」の7品種および「十育 238 号 (T238)」, 「十育 239 号 (T239)」, 「十育 240 号 (T240)」の3系統を用いた。これらの品種系統はすべて有限伸育型であり、熟期に大きな差はない。圃場での品種間差の確認と検定法開発のためにはYH, TM, T238, THの4品種系統を用いた。使用した品種および系統はすべて十勝農試で育成されたものである(佐々木ら 1988, 1990; 湯本ら 1995, 2000; 田中ら 2003)。

2. 圃場試験における低温裂開抵抗性の品種間差

圃場試験は北海道内の十勝地域の芽室町, 上士幌町, オホーツク地域の訓子府町, 網走市, 津別町, 上川地域の比布町で行った。これら3つの地域は緯度が高く, 栽培期間中の平均気温が低いため, ダイズの冷害が発生しやすい地域である。2001年から2012年の間にこれら圃場で合計27試験を行った。全ての試験の栽植密度は16.7本/m²とし, 乱塊法2反復以上で行った。播種は5~6月に行い, 全ての品種は9~10月に登熟した。開花期は試験区内の50%以上の個体で花が咲いた日と定義し, 播種日から開花期までの日数で示した。試験区毎に以下の式に従い, 裂開粒重率(%)を算出した。

$$(\text{裂開粒重率}(\%)) = (\text{裂開粒重}) / (\text{全子実重}) \times 100$$

統計処理を行う際には裂開粒重率の逆正弦変換値を用いた。Tukey-Kramer法による多重比較で有意差検定を行った。平均気温は気象庁から公開されている値を用いた(<http://www.jma.go.jp/jma/>)。

3. 人工気象室を用いた検定法の確立

人工気象室を用いて最適な低温処理期間の検討を 2009 年に行った。25L のプラスチックポットに十勝農試圃場の淡色黒ボク土を詰め、基肥として化成肥料 S353 を 40g ずつ添加した (N, 0.12 g; P₂O₅, 1.00 g; K₂O, 0.52 g /ポット) 。1 条件につき 2~3 ポットずつ供試した。1 ポットにつき種子 10 粒を播種した (播種日 5 月 18 日) 。出芽 2 週間後に間引きを行い、1 ポット 2 本立ちとした。開花まではコンクリートポーチで雨よけ栽培し、ポット毎に開花日を記録した。開花 0, 7, 10, 14, 21, 28 日後にポットを人工気象室に移動し、14 もしくは 21 日間の低温処理を行った。低温処理条件は開花期耐冷性検定や低温着色抵抗性検定と同じ、昼 18 °C (08:00–18:00) , 夜 13 °C (18:00–08:00) で、55%の遮光処理を行った。低温処理後、ポットをコンクリートポーチに戻し、成熟期まで栽培した。収穫後、以下の式に従い、ポット毎に裂開粒率 (%) を算出した。

$$(\text{裂開粒率}(\%)) = (\text{裂開粒数}) / (\text{全粒数}) \times 100$$

統計処理を行う際には裂開粒率の逆正弦変換値を用いた。一元配置の分散分析により、処理条件の有意差を検定し、Tukey–Kramer 法による多重比較を行った。

2010~2012 年には設定した処理条件で圃場での品種間差が再現されるか検証した。実験方法は上記と同様で、播種日は 2010 年 5 月 17 日、2011 年 5 月 23 日、2012 年 5 月 16 日である。1 品種につき 3 ポット供試した。2009 年の試験で検討し、設定した条件に従い、開花 10 日後から 21 日間の低温処理を行った。品種と試験年度を因子とする二元配置の分散分析により、品種間差の有意差を検定し、Tukey–Kramer 法による多重比較を行った。

3) 結果

1. 低温と裂開粒発生頻度との関係

裂開粒は、A：子葉接合部の周囲の一部が付着せず乖離、B：子葉接合部の周囲は付着

しているが背面の種皮が大きく裂けている強裂皮粒, C: 背面の種皮が大きく裂け, 子葉接合部の周囲の一部が付着せず乖離, D: 背面の種皮が大きく裂け, 子葉接合部の周囲の半分以上が付着せず乖離, の4つのタイプに分けられるが (Fig. II-1), いずれも収穫後の選別で屑粒として扱われるため, 商品価値はない. このため, 本研究では A~D 全ての種子を裂開粒と定義した (Fig. II-1). 2001 年から 2012 年まで十勝農試圃場で行った品種 YH の圃場試験において, 開花期前後の低温と CS 発生を調査した. 裂開粒重率が 1.0%以上の年を発生年 (2001 年, 2002 年, 2012 年) とし, 下回った年を無発生年 (2003 年から 2011 年) とした. 発生年においては, 開花期後の平均気温が無発生年と比べて低かった (Fig. II-2). さらに十勝, オホーツク, 上川の3つの地域において開花期後の平均気温と裂開粒率の相関を調べた. YH の裂開粒重率と開花期は 2001 年から 2012 年の 27 試験で調査した. その結果, 開花期 14~21 日後の平均気温と裂開粒重率の間には有意な負の相関がみられた ($r = -0.73^{***}$, Fig. II-3; Table II-1). 開花期 0~7 日後の平均気温と裂開粒重率の間には有意な相関が見られなかった (Table II-1). 開花期 7~14 日後, 21~28 日後の平均気温と裂開粒重率の間にも負の相関が見られたが, 相関は強くなかった (Table II-1). これらの結果より, YH の裂開粒発生に関与する低温感受性時期は開花期 14~21 日後頃であることが示された.

2. 圃場試験における裂開粒重率の品種間差

まず, 裂開発生年である 2001 年の十勝農試圃場で 10 品種系統の低温裂開抵抗性の品種間差を調べた (Table II-2). 低温裂開抵抗性は裂開粒が 1.0%以上発生した系統を‘弱’, それ未満の系統を‘強’と判定した. YH, TM, T239, YP の抵抗性は‘弱’であったのに対し, T238, TH, KM, HH, TK, T240 の抵抗性は‘強’であった (Table II-2). これらうち, 農業特性の揃った YH, TM 及び T238, TH をそれぞれ低温裂開抵抗性‘弱’及び‘強’の標準品種として選定した.

次に、上述の4品種について、十勝、オホーツク、上川の3地域における低温裂開抵抗性の品種間差を調査した。27試験のうち、YHの裂開粒重率が1.0%以上であったのは10試験であった。このうち、2012年の芽室は低温裂開抵抗性‘強’のTHとT238を供試していなかったため、データから除いた。したがって、統計処理には9試験の結果を用いた。分散分析の結果、圃場試験における裂開粒発生には有意な品種間差が認められ ($p < 0.001$, Table II-3), また多重比較の結果、THとT238の裂開粒重率はYHとTMよりも有意に低かった (Table II-4)。以上の結果から、THやT238における低温裂開抵抗性はYH、TMよりも強く、地域によらず安定して発現されるものと考えられる。

3. 人工気象室を用いた低温裂開抵抗性検定法の開発

人工気象室を用いた検定法を確立するために、YHを用いて低温の処理条件を検討した。なお、圃場試験では裂開粒重率を指標として評価を行ってきたが、裂開粒と通常種子の間で重さに違いがなかったことから、以降は裂開粒率を指標とした。育種プログラムにおいて裂開粒数を計測するのは裂開粒重を測定するよりも簡便であり、多くの系統の低温裂開抵抗性を評価するのに適していると判断した。

開花0, 7, 10, 14, 21, 28日後にポットを人工気象室に移動させ、14もしくは21日間の低温処理を行ったところ、処理条件間で裂開粒率に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。14日間の低温処理条件において、裂開粒率は0~18%であったことから (Table II-5), 14日間の低温処理は低温裂開抵抗性を評価するには不十分と考えられた。21日間の低温処理条件においては、裂開粒率は20~40%であった (Table II-5)。最も裂開粒率が高かったのは開花10日後から低温処理を行った場合であった (Table II-5)。この低温処理条件 (開花10-31日) は圃場で裂開粒が発生した年次の低温に該当していた (Table II-1; Fig. II-2)。これらの結果から、低温裂開抵抗性を評価するためには開花10日後から21日間の処理が適していると判断した。

次に、上述の試験結果から最適と考えられた処理条件で圃場での品種間差を再現できるか検討した。YH, TM, T238, TH を開花 10 日後から 21 日間の低温処理を行った。分散分析の結果、裂開粒率に有意な品種間差があることが明らかとなった ($p < 0.001$, Table II-6)。多重比較の結果、TH と T238 の裂開粒率は YH と TM よりも有意に低かった (Table II-7)。したがって、人工気象室での低温処理で圃場試験での品種間差を再現できることが明らかとなった (Tables II-3 and II-6)。

開発した検定法で子実収量を比較した。2011 年では、子実収量に有意な品種間差はなかった (Table II-7)。2012 年においては、TH の子実収量は TM よりも有意に高かった (Table II-7)。百粒重においても同様の試験を行ったが、同様の結果となった (データ省略)。さらに 2011 年と 2012 年に合計 10 品種 48 系統を低温裂開抵抗性検定に供試し、子実収量と百粒重を調査し、低温裂開抵抗性との関係を調べた ($n = 58$)。その結果、子実収量と裂開粒率の間には有意な相関がなかった ($r = -0.05$, Fig. II-4)。また、百粒重と裂開粒率の間にも有意な相関がなかった ($r = 0.10$, Fig. II-5)。

4) 考察

本章では、人工気象室を用いて開花 10 日後から 21 日間の低温処理を行うことにより、低温裂開抵抗性を評価できることを明らかにした。また、低温裂開抵抗性と子実収量や百粒重との間に負の相関は認められなかったことから (Figs II-4 and II-5)、低温裂開抵抗性は収量に影響しないと考えられた。この検定法は現在、北海道のダイズ育種に用いられ、低温裂開抵抗性‘強’の品種として「とよみづき」が育成された (山口ら 2014)。

ダイズの生殖成長期間は R1 から R8 として定義されている (Fehr et al. 1971)。これまでに生殖成長期間に低温処理を行い、開花期耐冷性を評価する検定法が開発されているが (Kurosaki and Yumoto 2003; Funatsuki et al. 2004)、これらの検定法では、開花始である R1 期から低温処理を行っている。本研究で開発した低温裂開抵抗性検定法は開

花 10 日後から低温処理を行うので, R1 期は含まれていない. したがって, 本検定法は花粉形成や落花に対する耐冷性とは独立して低温裂開抵抗性を評価することが可能と考えられる.

裂開粒発生メカニズムについては不明な点が多い. 「ユキホマレ」において, 圃場で裂開粒が多発しやすい開花 14~28 日後の期間 (Table II-1) は, 生育ステージとしては莢伸長期~粒肥大初期である. 開花期 28 日後以降 (生育ステージとしては粒肥大期~登熟期) に低温処理を行っても裂開粒が発生しないこと (Table II-5), 種子重が 700-900mg まで肥大した後に裂開することが多いことから (千田ら 2015), 莢伸長期の低温が種皮に何らかの影響を与え, その後粒の肥大に耐えられなくなって裂開粒が発生することが推測される. また, 開花期後に低温に遭遇していないのにも関わらず裂開粒が多発した事例もあり (山口ら 2010), 低温裂開とは別のメカニズムで裂開粒が発生する可能性もある. 裂開粒発生メカニズムが解明できれば, より精度の高い検定が可能となり, 低温裂開抵抗性育種が加速できるであろう.

Table II-1. Correlation between average temperature after flowering and cracked seed (CS) weight ratio of Yukihomeare in field tests in three areas from 2001 to 2012.

Period (days) ¹	Correlation coefficient (<i>r</i>)
0–7	–0.29 ns ²
7–14	–0.48*
14–21	–0.73***
21–28	–0.44*

¹The flowering date was defined as 0.

²ns: not significant ($p > 0.05$). *Significant at $p = 0.05$.

***Significant at $p = 0.001$.

Table II-2. Differences in cracked seed (CS) weight ratio among soybean cultivars in the TAES field in 2001.

Cultivar or line	CS weight ratio (%)	Estimated tolerance level ¹	Selection for field tests
Yukihomare	10.3	Weak	Selected
Toyomusume	2.4	Weak	Selected
Toiku 239	2.1	Weak	
Yukipirika	2.3	Weak	
Toiku 238	0.0	Strong	Selected
Toyohomare	0.0	Strong	Selected
Kitamusume	0.1	Strong	
Hahahikari	0.0	Strong	
Toyokomachi	0.0	Strong	
Toiku 240	0.0	Strong	

¹Tolerance level was rated as 'Weak' if the CS weight ratio was greater than 1.0%, and 'Strong' otherwise.

Table II-3. ANOVA for the effects of cultivar on cracked seed (CS) weight ratio in field tests.

Factor	df	Sum of Squares	Mean Square	F	<i>p</i> -value
Cultivar	3	564.45	188.15	18.93	<0.001
Field	8	146.94	18.37	1.85	0.13
Error	18	178.95	9.94		
Total	29	945.90			

Table II-4. Differences in cracked seed (CS) tolerance among soybean cultivars in field tests.

Cultivar or line	CS weight ratio (%)										Tolerance Level
	Field ¹										
	01-Me	02-Me	03-Ka	08-Ka	03-Pi	02-Ts	02-Ab	02-Ku	08-Ku	Mean	
YH	10.3	1.4	2.3	11.8	1.6	4.8	8.0	3.2	2.5	5.1 a ²	Weak
TM	2.4	0.0	2.6	1.9	3.9	2.4	-	2.7	-	2.3 a	Weak
T238	0.0	0.0	0.3	-	0.1	0.3	-	0.1	-	0.1 b	Strong
TH	0.0	0.0	0.1	1.3	0.0	-	0.1	0.2	0.2	0.2 b	Strong

¹Among the field tests from 2001 to 2012, there were ten in which the CS weight ratio of YH was greater than 1.0%. We excluded one set of results (from Memuro in 2012) because neither TH nor T238, both CS-tolerant, were assayed. Fields are denoted by year and location. Years are abbreviated as follows: 01, 2001; 02, 2002; 03, 2003; and 08, 2008. Locations are abbreviated as follows: Me, Memuro; Ka, Kamishihoro; Pi, Pippu; Ts, Tsubetsu; Ab, Abashiri; and Ku, Kun-neppu. Me and Ka are located at Tokachi; Pi at Kamikawa, and Ts, Ab, and Ku at Okhotsk.

²Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level (Tukey–Kramer multiple comparison test).

Table II-5. Differences in cracked seed (CS) occurrence in Yukihomare among chilling periods determined in the controlled phytotron experiment.

Treatment Period (days)	Start–end (days from flowering date) ¹	CS number ratio (%)
0	No treatment	0.0 d ²
14	0–14	4.1 cd
	7–21	13.1 bc
	14–28	18.4 abc
	21–35	4.2 cd
	28–42	0.0 d
21	7–28	22.7 ab
	10–31	40.8 a
	14–35	30.5 ab

¹The flowering date was defined as 0.

²Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level (Tukey–Kramer multiple comparison test).

Table II-6. ANOVA for effects of cultivar and year on cracked seed (CS) number ratio.

Factor	df	Sum of Squares	Mean Square	F	<i>p</i> -value
Cultivar	3	8222.01	2740.67	30.67	<0.001
Year	2	130.73	65.36	0.73	0.49
Error	30	2680.37	89.35		
Total	35	11033.11			

Table II-7. Differences in cracked seed (CS) tolerance and seed yield among soybean cultivars as determined in the controlled phytotron experiment.

Cultivar or line	CS tolerance					Seed yield (g plant ⁻¹)		
	CS number ratio (%)							
	Year					Year		
	2010	2011	2012	Mean	Level	2011	2012	Mean
YH	21.9 b ¹	45.9 a	29.3 a	32.4 a	Weak	17.2 a	17.2 ab	17.2 ab
TM	66.1 a	23.4 ab	53.3 a	47.6 a	Weak	16.9 a	13.4 b	15.2 b
T238	2.2 c	5.4 bc	6.0 b	4.5 b	Strong	16.6 a	20.5 ab	18.6 ab
TH	1.4 c	0.6 c	4.2 b	2.1 b	Strong	17.2 a	22.9 a	20.1 a

¹Means followed by the same letters are not significantly different at the 5% level (Tukey–Kramer multiple comparison test).



A

B

C

D

Fig. II-1. Representative examples of cracked seeds (CS). In this study, four types of seeds were defined as CS. They all have no commodity value.

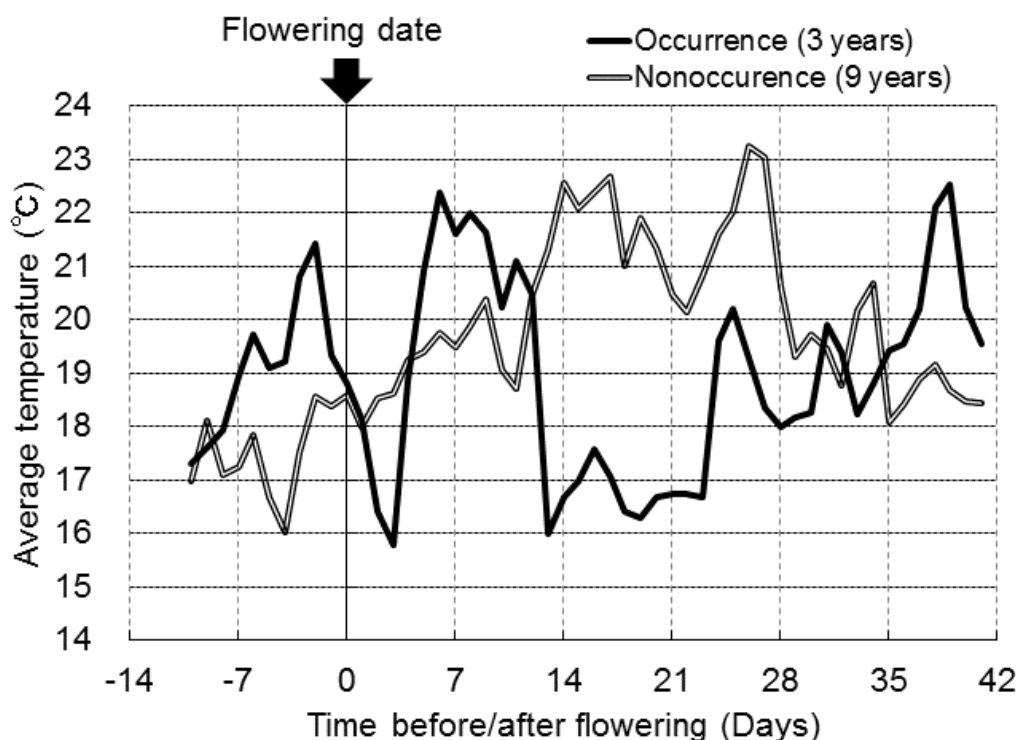


Fig. II-2. Average temperatures before and after flowering in the years of cracking seeds occurrence. Field tests were conducted at Tokachi Agricultural Experiment Station from 2001 to 2012. ‘Occurrence’ (defined as a cracked seed (CS) weight ratio of Yukihomare (YH) greater than 1.0%) was recorded in 2001, 2002, and 2012. ‘Nonoccurrence’ (defined as a CS weight ratio of YH less than 1.0%) was recorded in 2003–2011.

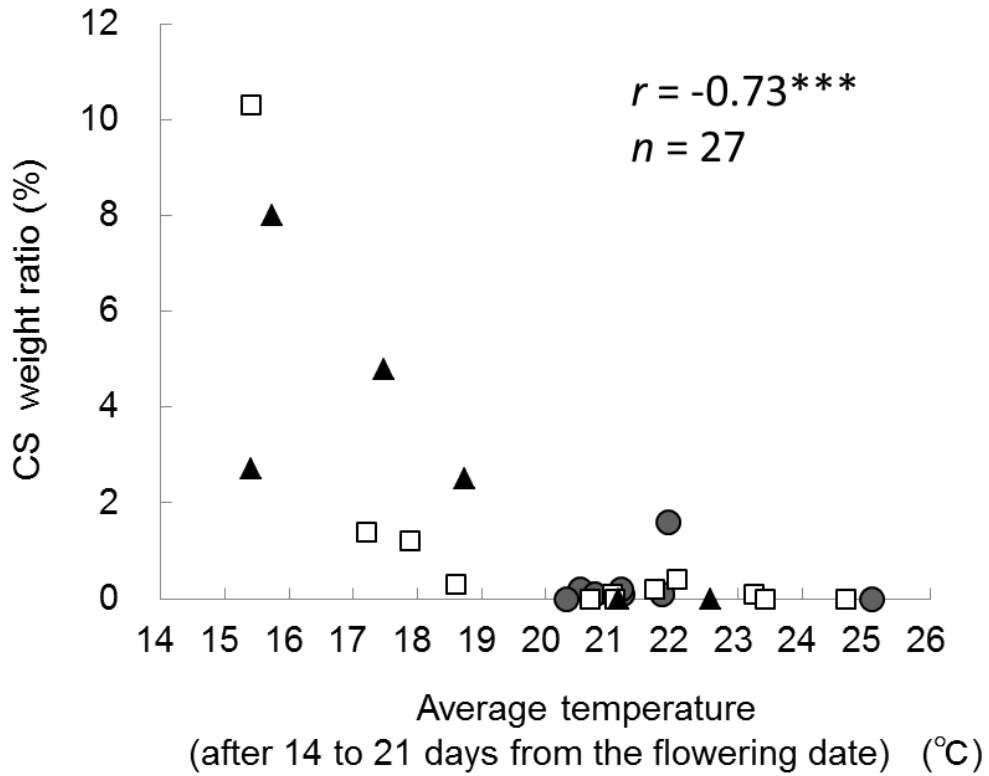


Fig. II-3. Correlation between average temperature after flowering and cracked seed (CS) weight ratio of Yukihomare in field tests in three areas (Tokachi, Okhotsk (eastern part of Hokkaido) and Kamikawa (northern part of Hokkaido)) from 2001 to 2012. □:Tokachi ($n = 12$), ▲:Okhotsk ($n = 9$), ●:Kamikawa ($n = 6$). ***Significant at $p = 0.001$.

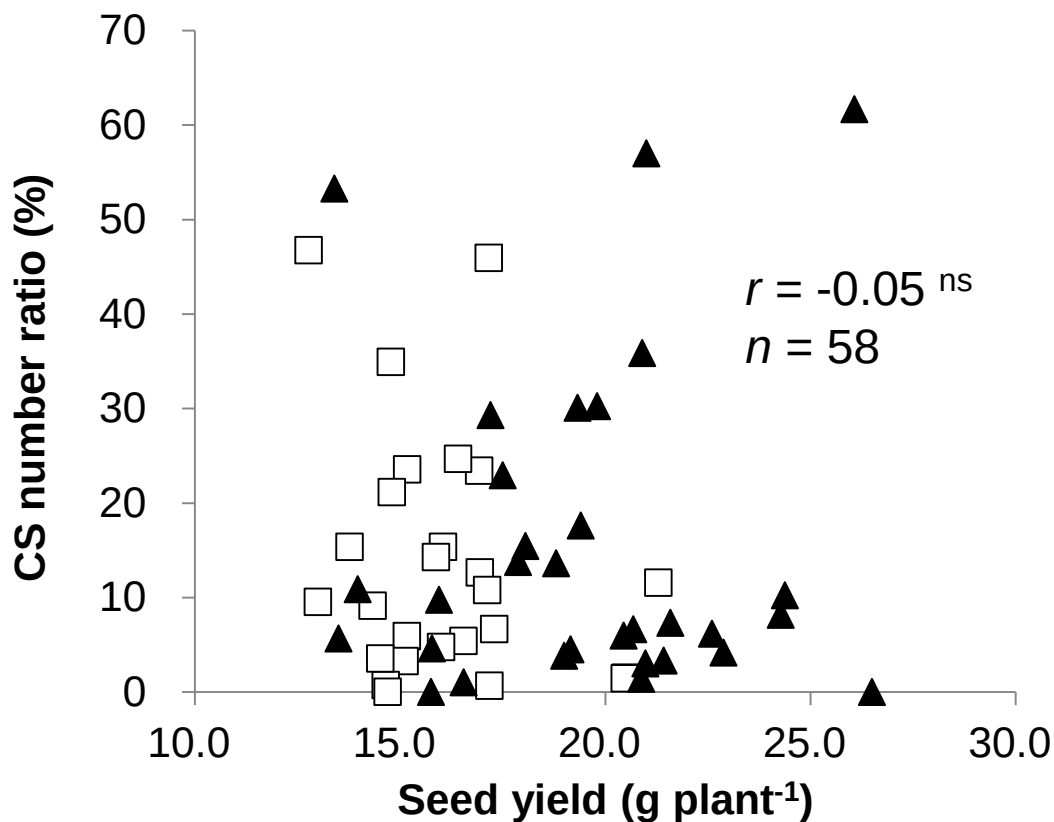


Fig. II-4. Correlation between seed yield and cracked seed (CS) number ratio of the 10 cultivars and 48 breeding lines evaluated by the selection method. $\square$:2011 ($n = 26$), $\blacktriangle$:2012 ($n = 32$).
^{ns}Not significant ($p > 0.05$).

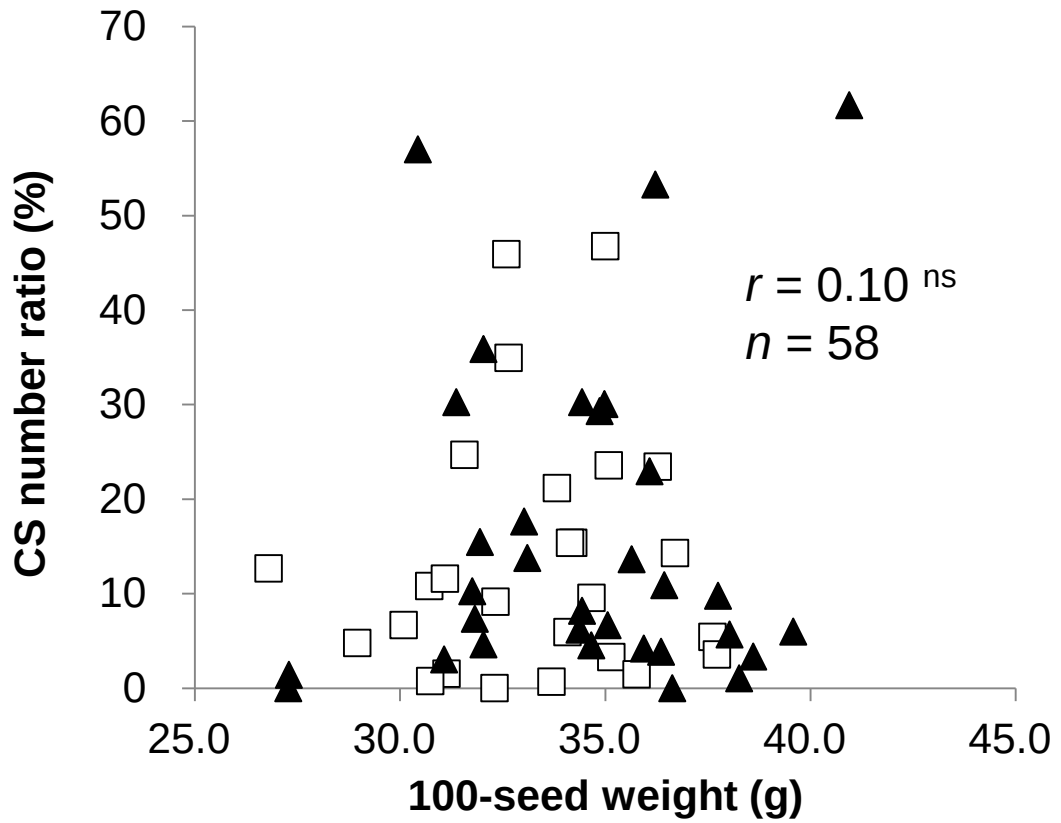


Fig. II-5. Correlation between 100-seed weight and cracked seed (CS) number ratio of the 10 cultivars and 48 breeding lines evaluated by the selection method. $\square$:2011 ($n = 26$), $\blacktriangle$:2012 ($n = 32$). ^{ns}Not significant ($p > 0.05$).

第三章 ダイズ低温裂開抵抗性の遺伝解析

1) 目的

低温は種子の外観に悪影響を与え、その代表的な例として、低温着色粒の発生が挙げられる。低温着色は臍周辺に着色物質が蓄積し、外観品質を低下させる現象である (Srinivasan and Arihara 1994; Morrison et al. 1998; Funatsuki and Ohnishi 2009; Kasai et al. 2009)。低温着色抵抗性の育種を進めるため、低温着色粒に関する低温感受性時期が明らかにされ、人工気象室を用いた低温着色抵抗性の検定法が確立された (岡ら 1989; 湯本・佐々木 1990)。開発された検定法を活用し、様々な品種が育成され、さらに近年では、品種「トヨハルカ」に由来する低温着色抵抗性について育種に利用可能な DNA マーカーを開発し (Ohnishi et al. 2011)、初中期世代から積極的に選抜を行うことが可能となった。低温着色抵抗性の DNA マーカーが開発される前までは、 $F_6 \sim F_7$ 世代を中心とした 30~40 系統の形質評価にとどまっていたが、DNA マーカー開発後には $F_4 \sim F_5$ 世代を中心とした 600~800 系統の遺伝子型調査が可能となった。また DNA マーカーはヘテロ型を識別できるため、初中期世代から抵抗性型の固定系統を選ぶことも可能となった。このため、DNA マーカー開発により、初中期世代から約 20 倍の系統数の評価ができ、低温着色抵抗性の強い系統を効率的に選抜していくことが可能となった。

第二章において、「ユキホマレ」の裂開粒は圃場において開花後 14~21 日頃の低温によって生じ、圃場において裂開粒発生の多少には品種間差があることを明らかにした。また、人工気象室を用いて開花 10 日後から 21 日間の低温処理を行うことによって、圃場での品種間差を再現する低温裂開抵抗性検定法を開発した。試験を行った 3 年ともに低温裂開抵抗性の強弱を判定することができたため、低温裂開抵抗性検定法の精度は高いと考えられるが、低温着色抵抗性検定と同様に、設備の面積と労力の都合上、大量の系統を選抜するのには適していない。このため、育種プログラムでは低温着色抵抗

性と同様に F₆～F₇ 世代の系統に限り検定を行うことになる。初中期世代から積極的に選抜を行うためには DNA マーカーの開発が必要とされるため、本章では低温裂開抵抗性の量的形質遺伝子座 (QTL) の解析を行った。検出した QTL については、不良形質の有無を調べ、育種に利用可能かどうか判断した。

2) 材料と方法

1. 供試材料

使用した品種および系統はすべて十勝農試で育成されたものである。低温裂開抵抗性が強い系統として、「十育 248 号 (T248)」「十育 238 号 (T238)」を、弱い品種として、「ユキホマレ (YH)」「トヨムスメ (TM)」を用いた。これら 4 品種系統の系譜を Fig. III-1 に記す。T248×YH の組み合わせから単粒系統法 (Brim 1966) を用いて組換え自殖系統群 (RILs) , T248Y-RILs 117 系統を育成した (Fig. III-1) 。T248Y-RILs の世代は 2013 年が F₆, 2014 年が F₇ である。T238×TM の組み合わせから単粒系統法を用いて T238T-RILs 69 系統を育成した (Fig. III-1) 。T238T-RILs の世代は 2009 年時に F₇ である。RILs の親品種系統は全て有限伸育型で臍色が白色で白毛である (*II tt*) 。全ての試験は十勝農試で実施した。

2. RILs の低温裂開抵抗性評価

第二章で定めた低温裂開抵抗性検定に従い、T248Y-RILs の低温裂開抵抗性を評価した。1/5000a のワグネルポットに十勝農試圃場の淡色黒ボク土を詰め、あらかじめ化成肥料 S353 を 20g ずつ添加した (N, 0.06 g; P₂O₅, 0.50 g; K₂O, 0.26 g /ポット)。親品種系統は 3 ポットずつ、RIL は 1 ポットずつ供試した。播種日は 2013 年 6 月 7 日, 2014 年 5 月 29 日である。開花 10 日後から人工気象室で 21 日間の低温処理を行い、ポット毎に裂開粒率を算出した。本章では裂開粒率の逆正弦変換値を CSI (Cracked Seed Index) と定義し

た.

3. 広義の遺伝率の算出

広義の遺伝率は 2013 年と 2014 年の T248Y-RILs の CSI を用いて算出した. 環境分散は RILs の両親の CSI から, 表現型分散は T248Y-RILs の CSI から算出した. 遺伝分散と広義の遺伝率は以下の式によって算出した.

$$(\text{遺伝子型分散}) = (\text{表現型分散}) - (\text{環境分散})$$

$$(\text{広義の遺伝率}) = (\text{遺伝子型分散}) / (\text{表現型分散})$$

4. DNA マーカーの解析と連鎖地図作成

ゲノム DNA は F₆ 世代の T248Y-RILs について 1 系統あたり 3 粒の種子を混合して BioSprint 96 DNA Plant Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した. DNA 抽出と単純反復配列 (Simple Sequence Repeat, SSR) マーカーを用いた PCR の方法は過去の文献に従って行った (Hwang et al. 2009; Sayama et al. 2010). DNA マーカーの多型は農業生物資源研究所が開発した SSR ゲノムパネルシステム (Sayama et al. 2011) を用いて解析した. 黄ダイズにおいては, カルコンシンターゼ遺伝子 (*CHS*) の逆位反復配列 (*Glycine max* inverted-repeat *CHS* pseudogene, *GmIRCHS*) が *I* 座である可能性が示されているため (Kasai et al. 2007; Senda et al. 2012), *I* 座の遺伝子型の判定には *GmIRCHS* の構造を決定する 'Ic (Inhibitor of gold-induced seed coat discoloration) マーカー' を用いた (Kasai et al. 2009; Ohnishi et al. 2011). 連鎖地図は両親で多型の見られた SSR マーカーと Ic マーカーを用いて作成した. Ic マーカーのプライマー配列は以下の通りである. T248 型で特異的に増幅するプライマーセットは 5'-GAG TTT GAA AAA TGT ATT CTT TCT CTT CC-3' および 5'-GTA TCG CAG ATT CCT CCT GC-3' であり, YH 型で特異的に増幅するプライマーセットは 5'-GCA AAC CAA ATC AAG TAA GAG CG-3' および 5'-CCC ATT CCT

TGA TTG CCT TA-3' である (Ohnishi et al. 2011) . 本章で多く利用する SSR マーカー GMES0027 のプライマー配列は 5'-GCA GAT GCG GTT ACG AAT TT-3' および 5'-AAA CCG TCA ACC TGG TCA AG-3'である (Sayama et al. 2011) . 連鎖群と多型マーカーの位置の決定には MAPMAKER/EXP 3.0b (Lincoln et al. 1993) を用いた.

5. QTL 解析

CSI の QTL 解析は QTL Cartographer version 2.5 (Wang et al. 2007) を用いて行った. 最小 LOD 値を 2.0 としてコンポジットインターバルマッピング法 (Zeng, 1994) を用いて QTL 解析を行った. 本研究では, 2 ヶ年に渡って QTL 解析を行い, 2 回の試験とも同じ染色体領域に QTL が検出された場合 (10 cM 以内), その QTL は実際に存在する QTL, すなわち陽性であると判断した.

6. 準同質遺伝子系統 (NILs) の低温裂開抵抗性評価

NILs は RIL から残余ヘテロ系統を選抜することにより育成可能である (Tuinstra et al. 1997; Yamanaka et al. 2005; Ikeda et al. 2009) . 本章では, 見いだした QTLs の近傍マーカーがヘテロ型である RILs を T248Y-RILs から選抜し, 2 つのペアの NILs を育成した. *qCS8-1* 座の NILs を育成するために, T248Y-RIL No.52 の F₆ 世代種子から DNA を抽出した. 種子は Ic マーカーで T248 型, YH 型, ヘテロ型に分け, その F₆ 世代種子を増殖した F₇ 世代を NILs とした. T248 型を N52-8T, YH 型を N52-8Y と命名した. 両系統の *qCS11-1* 座は YH 型である. *qCS11-1* 座の NILs を育成するために, T248Y-RIL No.71 の F₇ 世代種子から DNA を抽出した. 種子は SSR マーカー GMES0027 で T248 型, YH 型, ヘテロ型に分け, その F₇ 世代種子を増殖した F₈ 世代を NILs とした. T248 型を N71-11T, YH 型を N71-11Y と命名した. 両系統の *qCS8-1* 座は YH 型である. 開花 10 日後から人工気象室で 21 日間の低温処理を行い, 個体毎に CSI を算出した ($n = 6$) . QTL の効果を確認する

ために、一元配置の分散分析により、系統間の有意差を検定し、Tukey–Kramer 法による多重比較を行った。

育成した NILs を十勝農試圃場に 2014 年 5 月 21 日に播種した。施肥は北海道の施肥標準に従った ($0.2 \text{ N}-1.8 \text{ P}_2\text{O}_5-0.9 \text{ K}_2\text{O}-0.4 \text{ MgO kg a}^{-1}$)。1 系統につき、畦幅 60cm×株間 10cm の 1 本立ちで 3.0 m×1 畦の試験を行った (栽植密度 $16.7 \text{ plants m}^{-2}$)。開花期は試験区内の 50%以上の個体で開花した日と定義し、播種日から開花期までの日数で示した。成熟期は試験区内の 80%以上の個体が枯れて黄色に変色し、莢を振ったときに音が鳴る日と定義し、播種日から成熟期までの日数で示した。成熟期に 1 系統につき 20 個体を収穫し、そのバルク種子を子実収量と百粒重の算出に用いた。種子蛋白含量は近赤外分析機 (インフラテック 1241 グレインアナライザー FOSS 社) を用いて測定した。

7. 異なる遺伝的背景下における *qCS8-1* の効果の検証

69 系統の T238T-RILs を用いて、異なる遺伝背景下における *qCS8-1* 座の効果を検証した。両親である T238 と TM について、*qCS11-1* の近傍マーカーである GMES0027 は多型が見られなかった (Fig. III-1)。*qCS8-1* 座の最近傍マーカーである Ic を遺伝子型の決定に用いた。25L のプラスチックポットに十勝農試圃場の淡色黒ボク土を詰め、基肥として化成肥料 S353 を 40g ずつ添加した (N, 0.12 g; P_2O_5 , 1.00 g; K_2O , 0.52 g/ポット)。親品種系統は 3 ポットずつ、RIL は 1 ポットずつ供試した。播種日は 2009 年 5 月 29 日である。開花 7 日後から人工気象室で 21 日間の低温処理を行い、ポット毎に CSI を算出した。低温処理条件が若干異なっているのは、2009 年の時点では低温裂開抵抗性検定は確立していなかったためである。スチューデントの *t* 検定によって、*qCS8-1* の遺伝子型の効果を検定した。

8. 低温着色粒の評価

低温裂開抵抗性を評価した T248Y-RILs について、種子の着色程度を調査した。各 RIL10 粒ずつランダムにとり、Ohnishi et al. (2011) の方法に従い、着色した面積に応じて、0（無）から 4（甚）までの 5 段階で評価して平均値を算出し、QTL 解析を行った。

9. 「十育 248 号」「ユキホマレ」の系譜上の系統の低温裂開抵抗性評価

T248 および YH の系譜上の 10 系統について、2009～2014 年の間に第二章で定めた低温裂開抵抗性検定に供試した。CSI の平均値により、‘弱’、‘中’、‘強’の 3 段階で抵抗性を判定した。

3) 結果

1. RILs の低温裂開抵抗性評価

低温処理による典型的な YH と T248 の種子を Fig. III-2 に示す。YH は裂開粒が発生しやすいのに対し、T248 は発生しにくい (Fig. III-2)。両親系統である T248, YH 及び T248Y-RILs の CSI を 2013 年と 2014 年に調査した。2 ヶ年ともに T248 の CSI は YH よりも有意に低かった (Table III-1)。また、T248Y-RILs の CSI は 2013 年と 2014 年の間で有意な正の相関があった ($r = 0.63^{***}$, Fig. III-3)。この結果より、両年で T248Y-RILs の CSI は精度良く評価できていることが示唆された。CSI の広義の遺伝率を算出したところ、2013 年 0.76, 2014 年 0.68 となった。これらの結果より、CSI は比較的高い遺伝率を示すことが明らかとなった。

CSI とその他の農業形質との関係を調べるため、子実収量、種子数、百粒重、開花期を調査した。2 ヶ年ともに T248 の開花期は YH よりも 3～4 日有意に遅かった (Table III-1)。2014 年において、T248 の百粒重は YH よりも有意に重かった (Table III-1)。T248 と YH の間で子実収量と種子数に有意差はなかった (Table III-1)。T248Y-RILs の CSI

は子実収量、種子数と有意な負の相関が認められた (Table III-2) . これらの結果より、この組合せにおいては、CSI が低い、すなわち低温裂開抵抗性が強い RIL の農業形質が劣ることはないことが確認された.

2. CSI の QTL 解析

T248 と YH について合計 391 マーカーの遺伝子型を調査した. その結果, 158 マーカーで多型が検出され, 多型率は 40.4%であった. これらのマーカーを用いてゲノム全体をカバーする全長 1,826 cM, マーカー間の平均距離は 11.6 cM の連鎖地図を作成した.

QTL 解析は 2013 年 116 系統, 2014 年 117 系統の T248Y-RILs の CSI データを用いて行った. 2 ヶ年ともに同一領域に検出された QTLs は 2 つあり, 染色体 8 上に検出された QTL を *qCS8-1*, 染色体 11 上に検出された QTL を *qCS11-1* と命名した (Table III-3; Fig. III-4) . *qCS8-1* の LOD 値は, 2013 年は 6.2, 2014 年は 2.7 であった (Table III-3) . *qCS11-1* の LOD 値は, 2013 年は 3.3, 2014 年は 3.2 であった (Table III-3) . 染色体 2 上に検出された QTL は 2013 年でのみ検出され, 2014 年では検出されなかった (Table III-3) . *qCS8-1*, *qCS11-1* とともに T248 型が CSI を低下させる効果を示した (Table III-3) . また, *qCS8-1* と *qCS11-1* の遺伝子型が YH 型の RILs が最も高い CSI を示した ($P < 0.05$, Table III-4) .

3. *qCS8-1* と *qCS11-1* に関する NILs の低温裂開抵抗性の評価

qCS8-1 もしくは *qCS11-1* 領域がヘテロ型の RILs (No.52 および No.71) の次世代から, 近傍マーカーを用いて NIL となる 2 系統を選抜した. *qCS8-1* に関する NILs については, *qCS8-1* の遺伝子型が T248 型の系統を N52-8T, YH 型の系統を N52-8Y とした (Table III-1) . また, *qCS11-1* に関する NILs については, *qCS11-1* の遺伝子型が T248 型の系統を N71-11T, YH 型の系統を N71-11Y とした (Table III-1) .

低温裂開抵抗性検定に供試したところ, N52-8T の CSI は N52-8Y よりも有意に低かつ

た (Fig. III-5A; Table III-1) . 子実収量, 種子数, 百粒重, 開花期といった農業形質については NILs 間で同様の値となった (Table III-1) . また, N71-11T の CSI は N71-11Y よりも有意に低かった (Fig. III-5B; Table III-1) . N71-11T の百粒重は N71-11Y よりも有意に重かった (Table III-1) . その他, 子実収量, 種子数, 開花期については NILs 間で同様の値となった (Table III-1) . 発生した裂開粒を観察したところ, N52-8Y は臍周辺部に着色が見られたのに対し, N52-8T では着色が見られなかった (Fig. III-6) . 一方, N71-11T と N71-11Y の間では着色程度に差が見られなかった (Fig. III-6) .

圃場試験においても, NILs の農業特性を評価した. N52-8T と N52-8Y では, 開花期, 成熟期, 子実収量, 百粒重, 蛋白含量は同様の値となった (Table III-5) . N71-11T の百粒重は N71-11Y よりもやや重かった (Table III-5) . 百粒重以外の農業形質は N71-11T と N71-11Y の間で同様の値となった (Table III-5) .

以上の結果より, *qCS8-1*, *qCS11-1* とともに T248 型で低温裂開抵抗性を向上させる効果があることが確かめられた. そして, 両 QTLs とともに他の農業形質に負の影響を与えることがないことが確認された.

4. 異なる遺伝的背景下における *qCS8-1* の効果検証

T238 の *qCS8-1* の遺伝子型は T248 型であり, TM の *qCS8-1* の遺伝子型は YH 型であった (Fig. III-1) . *qCS11-1* の近傍マーカーでは多型が見られなかったことから (Fig. III-1) , *qCS8-1* の効果のみ検証した. 低温裂開抵抗性検定の結果, T238 の CSI は 10.3 で, TM の CSI は 42.4 であった (Fig. III-7) . 低温処理期間は開花 7~28 日後であり, これまでの処理条件 (開花 10~31 日後) とは若干異なっているが, 両親間で CSI に大きな差があり, 低温裂開抵抗性を精度良く評価できたと判断した. T238T-RILs の CSI の頻度分布を Fig. III-7 に示す. *qCS8-1* の遺伝子型が T238 型である RILs の CSI 平均値は 11.2 であるのに対し, TM 型である RILs の CSI 平均値は 38.5 であった ($P < 0.001$) . これらの結果

より、異なる遺伝的背景下においても *qCS8-1* は低温裂開抵抗性の向上に効果があると考えられた。

低温処理を行った T238T-RILs の子実収量、種子数、百粒重、開花期についても調査した。その結果、子実収量、種子数、百粒重は CSI との間に有意な負の相関が認められた (Table III-2)。このため、異なる遺伝的背景下においても、CSI が低い、すなわち低温裂開抵抗性が強い RIL の農業形質が劣ることはないことが確認された。

5. 百粒重および低温着色に関する QTL 解析

T248Y-RILs について十勝農試圃場における百粒重の QTL 解析を行った結果、染色体 3 上に効果の大きい QTL が検出された (Table III-6)。また、この QTL の次に効果の大きい QTL が *qCS11-1* 近傍に検出された (Table III-6)。

T248Y-RILs について裂開抵抗性検定における種子の着色程度の QTL 解析を行った結果、2 ヶ年ともに *qCS8-1* 近傍に効果の大きな QTL が検出された (Table III-7)。

6. 「十育 248 号」「ユキホマレ」の系譜上の系統の低温裂開抵抗性評価

T248 および YH の系譜上の 10 品種系統について低温裂開抵抗性検定に供試した (Table III-8)。その結果、T248, 「十育 225 号」(T225), T238 を‘強’, 「十育 239 号」を‘中’, その他の 6 品種系統を‘弱’と判定した (Table III-8)。また、これらの系統の *qCS8-1* の遺伝子型を調査したところ、抵抗性‘弱’の 6 系統は全て YH 型であった (Table III-8)。検定と遺伝子型の結果を系譜図に当てはめたところ、T225 の *qCS8-1* は、交配親がどちらも YH 型であったが、T248 型となっていた (Fig. III-8)。また、T225 の低温裂開抵抗性は、交配親がどちらも‘弱’であったが、‘強’であった (Fig. III-8)。

4) 考察

1. 育種プログラムにおける DNA マーカー選抜

本章では、低温裂開抵抗性に関して安定した効果を示す QTLs, *qCS8-1* 及び *qCS11-1* を検出し (Table III-3; Fig. III-4), NILs を用いて両 QTLs の有効性を検証した (Fig. III-5; Table III-1) . また, NILs を用いて, 両 QTLs とともに T248 型が開花期などの他の農業形質に負の影響を与えないことを明らかにした (Tables III-1 and III-5) . さらに遺伝的背景下によらず, *qCS8-1* が有効に作用することを検証できた (Fig. III-7) . これらの結果から, *qCS8-1* と *qCS11-1* の近傍マーカーは育種プログラムで低温裂開抵抗性系統を選抜するのに有効であると考えられた.

2. 裂開粒発生の要因

低温を受けた場合の種子の裂開のし易さには, 子葉の大きさや種皮の物理特性などが関係していると考えられる. 第二章において, 様々な遺伝背景の育成系統では, 百粒重と裂開粒率の間には有意な相関関係は認められていない (Fig. II-5) . 本章でも, T248Y-RILs では百粒重と CSI の間に相関はなかった (Table III-2) . また, T238T-RILs では逆に百粒重と CSI の間に有意な負の相関があり (Table III-2) , *qCS11-1* の NILs についても, 低温裂開抵抗性検定 (Table III-1) , 圃場試験 (Table III-5) の両方で, T248 型の NIL は YH 型の NIL よりも百粒重が重かった. これらの結果は, 必ずしも百粒重が重い, すなわち子葉が大きいほど裂開しやすいわけではないことを示している.

3. *qCS8-1* の効果

qCS8-1 は *I* 座近傍に検出されたが (Table III-3; Fig. III-4) , *Ic* マーカーの解析により, T248 の *I* 座の構造は YH とは異なることが明らかとなった (Fig. III-1) . 低温処理後の T248 の臍周辺は着色していないのに対し, YH は着色していた (Fig. III-2) . また, *qCS8-1*

の NILs 間で臍周辺部の着色程度に差がみられた (Fig. III-6) . 着色程度に関する QTL 解析においても, *qCS8-1* 近傍に効果の大きな QTL が検出された (Table III-7) . *Ic* への変異は「ツルコガネ」×*TM* の組み合わせから生じたと報告されている (大西 2012) . 「ツルコガネ」, *TM* とともに低温裂開抵抗性は‘弱’であったが, この組み合わせから選抜された T225 は抵抗性‘強’であった (Fig. III-8) . このため, *Ic* の突然変異と低温裂開抵抗性‘強’への変化は一致しており, *qCS8-1* は低温着色抵抗性に関与する *Ic* の多面発現の可能性が高いと考えられた. 臍周辺の着色に伴って臍周辺部に裂皮を引き起こすことがあるため (Takahashi and Abe 1994, 1999) , 着色物質は種皮の物理特性を変化させると考えられる. 例えば, 裂開抵抗性の弱い YH では, 臍周辺に蓄積した着色物質が背側まで分布し, 背側種皮の物理特性にも影響を与えることは十分考えられる. 一方, *qCS8-1* の近傍には, 低温下における種子肥大に関与する QTL も報告されており (Ikeda et al. 2009) , 種子の裂開のし易さには, 低温下における種子と種皮の肥大速度のバランスなどが関係している可能性もある.

4. *qCS11-1* の効果

qCS8-1 が低温着色抵抗性に関与する一方, *qCS11-1* 近傍には着色程度の QTL は検出されず (Table III-7), NILs 間で着色程度に差が見られなかったことから (Fig. III-6), *qCS11-1* は低温着色抵抗性に関与のない QTL と考えられた. *qCS11-1* 近傍には, 種皮の裂皮に関与する QTL, *qSCC11-1* が報告されている (Ha et al. 2012) . この *qSCC11-1* は圃場条件下における裂皮に対する耐性の QTL として同定されており (Ha et al. 2012) , 本研究で扱っている背側で生じる種子の裂開とは直接関係していないように思われる. しかし, 裂皮の開始部位がどのように決定されているかについては, まだよくわかっていない. 裂開粒発生のメカニズムを解明するためには, 検出された QTLs を単離して, その機能を解析する必要があるが, まずは本研究で育成した NILs を用いて組織レベルでの詳細な

研究が待たれる。この他, *qCS11-1* の近傍には成熟期に関する QTL が報告されている。Komatsu et al. (2012) は開花から成熟期までの期間の QTL として *qDfm1*, Zhang et al. (2004) は成熟期までの日数の QTL として *md3* を報告している。本研究では, T248Y-RILs と T238T-RILs の両組み合わせにおいて, CSI と開花期の間に相関は見られず (Table III-2), また, 十勝農試圃場において, *qCS11-1* の NILs 間で開花期と成熟期に差が見られなかったことから (Table III-5), *qCS11-1* が *qDfm1* や *md3* 座の遺伝子である可能性は低いと考えられる。

細胞壁タンパク質のエクспанシンは細胞壁の緩みを誘導して, 細胞伸張をもたらすことが報告されている (McQueen-Manson et al. 1992; Cosgrove et al. 2002)。エクспанシンは細胞の拡張に関与するだけでなく, 植物の形態形成や果物の軟化などにも関与する (Civello et al. 1999; Rose et al. 2000; Ruan et al. 2001)。ダイズには 75 のエクспанシン遺伝子が存在している (Zhu et al. 2014)。リンゴの裂果現象において, 果肉組織と果皮組織でエクспанシン遺伝子の発現量に差があり, 果肉組織の細胞伸張が果皮組織の細胞伸張を上回ることによって細胞伸張の不均衡が生じ, 亀裂発生の引き金となる (Kasai et al. 2008)。ダイズの裂開粒は粒肥大盛期に発生することから (千田ら 2015), ダイズにおいてもリンゴの裂果現象と同様に, 種皮と子葉の細胞伸張の不均衡が裂開に関与しているかもしれない。また, バレイショにおいて, エクспанシンは塊茎肥大に関与し, 低温によってエクспанシン遺伝子の発現量が減少する (田坂ら 2013)。ダイズの裂開粒も低温が引き金となることから, YH は低温によって種皮のエクспанシン遺伝子の発現量が下がる, もしくはエクспанシンの機能が低下し, 子葉の細胞伸張が種皮の細胞伸張を上回ることによって, 種皮の亀裂発生の引き金となることは十分考えられる。興味深いことに, *qCS11-1* 近傍には *GmEXPA24* (Glyma11g14800), *GmEXB6* (Glyma11g17160) という 2 つのエクспанシン遺伝子が報告されている (Zhu et al. 2014)。*GmEXPB6* は根粒でのみ発現し, *GmEXPA24* は根, 葉, 莢, 種子で発現することか

ら (Zhu et al. 2014) , 特に *GmEXPA24* が興味深い.

qCS11-1 の NILs について, 低温裂開抵抗性検定 (Table III-1) , 圃場試験 (Table III-5) の両方で, T248 型の NIL は YH 型の NIL よりも百粒重が重かった. T248Y-RILs の十勝農試圃場における百粒重の QTL 解析において, *qCS11-1* 近傍に QTL が検出されている (Table III-6) . この百粒重に対する効果が *qCS11-1* に連鎖した別遺伝子のものなのか, それとも *qCS11-1* の多面発現なのかは明らかではないが, 日本で煮豆に加工される際には百粒重が重いものが好まれる傾向にあり (Kato et al. 2014; Yamaguchi et al. 2014) , 少なくとも育種を行う上で障害となる形質ではない.

Table III-1. The cracked seed index (CSI) of the parents and near isogenic lines (NILs).

Year	Cultivar or line	Genotype ¹			Seed yield (g plant ⁻¹)	Number of seeds (plant ⁻¹)	100-seed weight (g)	Flowering time (days)
		<i>qCS8-1</i>	<i>qCS11-1</i>	CSI ²				
2013	T248	T248	T248	4.5 a	11.7 a	31.3 a	37.5 a	50.0 b
	YH	YH	YH	28.1 b	9.0 a	27.5 a	32.1 a	45.8 a
	N52-8T	T248	YH	8.6 a	11.0 a	31.3 a	35.4 a	46.2 a
	N52-8Y	YH	YH	23.7 b	6.7 a	19.0 a	33.7 a	45.6 a
2014	T248	T248	T248	1.4 a	15.0 a	41.7 a	36.4 c	49.7 b
	YH	YH	YH	24.7 b	14.7 a	46.8 a	31.0 ab	46.7 a
	N71-11T	YH	T248	7.7 a	11.3 a	34.0 a	34.1 bc	47.3 a
	N71-11Y	YH	YH	24.5 b	11.7 a	41.8 a	28.6 a	48.2 ab

¹T248, the Toiku 248 allele; YH, the Yukihomare allele. The nearest markers, Ic and GMES0027, were used for *qCS8-1* and *qCS11-1*, respectively.

²In each year, means followed by the same letter are not significantly different according to the Tukey–Kramer multiple comparison test ($P \geq 0.05$).

Table III-2. Correlation coefficients between cracked seed index (CSI) and other agronomic traits in T248Y-RILs and T238T-RILs.

Agronomic trait	T248Y-RILs		T238T-RILs
	F ₆ in 2013	F ₇ in 2014	F ₇ in 2009
Seed yield	-0.231*	-0.258**	-0.671***
Number of seeds	-0.240**	-0.272**	-0.614***
100-seed weight	-0.068	-0.042	-0.532***
Flowering time	0.085	0.054	0.054

*, **, ***Significant at $P < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

Table III-3. Quantitative trait locus (QTL) analysis of cracked seed index (CSI) in T248Y-RILs.

Year	Chr (LG) ¹	Position (cM)	Nearest marker	LOD ²	R ² * (%)	Additive effect ³	QTL name
2013	8 (A2)	2.0	Ic	6.2	20.4	-6.8	<i>qCS8-1</i>
	11 (B1)	63.0	GMES0027	3.3	10.9	-5.0	<i>qCS11-1</i>
	2 (D1b)	65.1	Sat_227	2.3	8.6	-4.4	
2014	11 (B1)	68.0	Satt597	3.2	10.0	-4.7	<i>qCS11-1</i>
	8 (A2)	0.0	Ic	2.7	7.6	-4.1	<i>qCS8-1</i>

¹Chr, chromosome; LG, linkage group.

²LOD, logarithm of odds determined by composite interval mapping.

³Effect of the T248 allele on the QTL.

*Percentage phenotypic variance explained by the QTL.

Table III-4. Relationship between the *qCS* genotype and cracked seed index (CSI) in T248Y-RILs.

Genotype ¹		F ₆ in 2013		F ₇ in 2014	
		Number of		Number of	
<i>qCS8-1</i>	<i>qCS11-1</i>	RILs	CSI ²	RILs	CSI
T248	T248	27	5.5 ± 1.6 a ³	27	8.0 ± 2.2 a
T248	YH	21	9.5 ± 1.9 a	21	10.3 ± 2.0 a
YH	T248	22	13.2 ± 2.5 a	23	14.1 ± 2.8 a
YH	YH	28	27.7 ± 3.3 b	28	25.4 ± 3.0 b

¹T248, the Toiku 248 allele; YH, the Yukihomeare allele. The nearest markers, *Ic* and *GMES0027*, were used for *qCS8-1* and *qCS11-1*, respectively.

²Data are presented as means ± standard error.

³Within columns, means followed by the same letter are not significantly different according to the Tukey-Kramer multiple comparison test ($P \geq 0.05$).

Table III-5. Field test of the near isogenic lines (NILs).

Cultivar or line	Genotype ¹		Flowering time (days)	Maturing time (days)	Seed yield per plant (g)	100-seed weight (g)	Seed protein Content (%)
	<i>qCS8-1</i>	<i>qCS11-1</i>					
T248	T248	T248	58	127	20.9	42.7	43.7
YH	YH	YH	55	124	31.7	37.2	42.6
N52-8T	T248	YH	57	124	21.3	38.0	43.8
N52-8Y	YH	YH	58	125	21.2	37.4	43.6
N71-11T	YH	T248	55	125	26.9	38.2	42.2
N71-11Y	YH	YH	56	125	27.3	36.4	42.5

¹ T248, the Toiku 248 allele; YH, the Yukihomare allele. The nearest markers, Ic and GMES0027, were used for *qCS8-1* and *qCS11-1*, respectively.

Table III-6. Quantitative trait locus (QTL) analysis of 100-seed weight in the field in T248Y-RILs.

Year	Chr (LG) ¹	Position (cM)	Nearest marker	LOD ²	R ² * (%)	Additive effect ³	Nearby QTL
2013	3 (N)	98.5	GMES4417	6.8	17.1	-1.7	
	13 (F)	11.5	Sct_033	3.5	14.4	1.5	
	11 (B1)	58.6	Gm11one	3.1	8.5	1.2	<i>qCS11-1</i>
2014	3 (N)	102.6	GMES4417	4.2	13.7	-1.2	
	11 (B1)	61.0	GMES0027	2.9	9.4	1.0	<i>qCS11-1</i>

¹Chr, chromosome; LG, linkage group.

²LOD, logarithm of odds determined by composite interval mapping.

³Effect of the T248 allele on the QTL.

*Percentage phenotypic variance explained by the QTL.

Table III-7. Quantitative trait locus (QTL) analysis of index of seed coat discoloration in T248Y-RILs.

Year	Chr (LG) ¹	Position (cM)	Nearest marker	LOD ²	R ² * (%)	Additive effect ³	Nearby QTL
2013	8 (A2)	0.0	Ic	23.2	50.2	-0.93	<i>qCS8-1</i>
2014	8 (A2)	0.0	Ic	21.3	51.4	-0.86	<i>qCS8-1</i>

¹Chr, chromosome; LG, linkage group.

²LOD, logarithm of odds determined by composite interval mapping.

³Effect of the T248 allele on the QTL.

*Percentage phenotypic variance explained by the QTL.

Table. III-8. Tolerance to seed cracking in the pedigree breeding lines of Toiku 248 and Yukihomare.

Cultivar or line	<i>qCS8-1</i> genotype ¹	CSI ² (n)	Tolerance to seed cracking
Toiku 248	T248	10.9 (5)	Strong
Toiku 225	T248	11.1 (2)	Strong
Toiku 238	T248	12.2 (4)	Strong
Toiku 239	T248	21.5 (2)	Medium
Tsurukogane	YH	24.9 (2)	Weak
Toyokomachi	YH	26.0 (2)	Weak
Toiku 230	YH	26.6 (1)	Weak
Yukihomare	YH	33.1 (6)	Weak
Toyomusume	YH	34.7 (6)	Weak
Toiku 222	YH	36.3 (1)	Weak

¹T248, the Toiku 248 allele; YH, the Yukihomare allele. The nearest markers, Ic, was used for *qCS8-1*.

²CSI, cracked seed index. n, number of tests in 2009 to 2014.

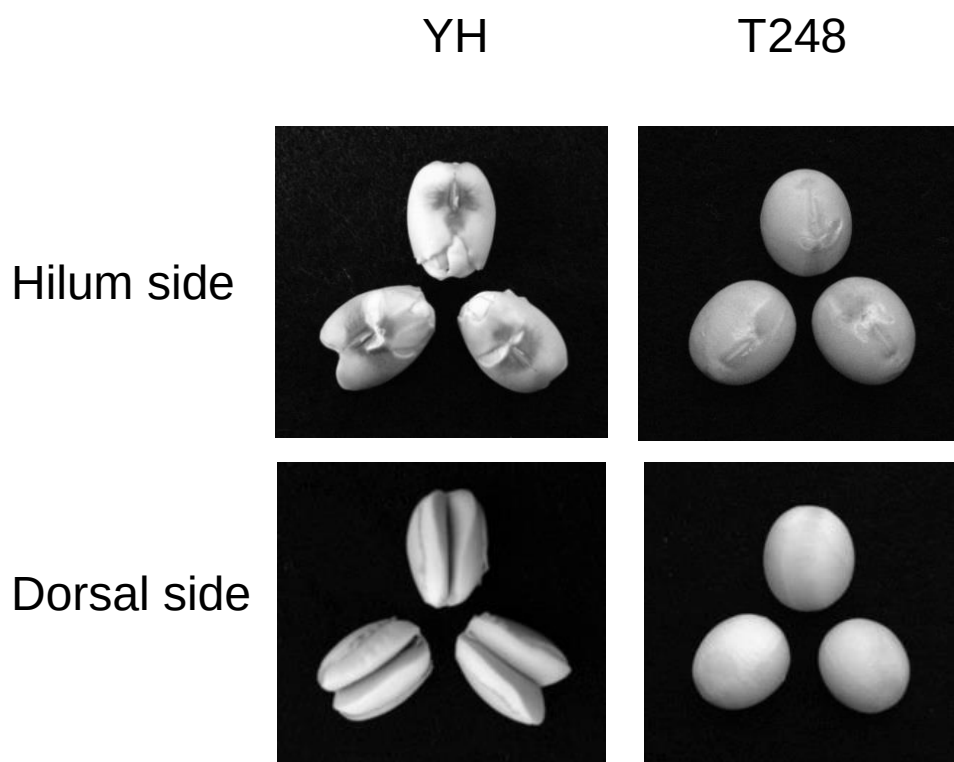


Fig. III-2. Representative seeds of Yukihomare (YH) and Toiku 248 (T248) under chilling temperature. YH: CS-sensitive cultivar; T248: CS-tolerant breeding line.

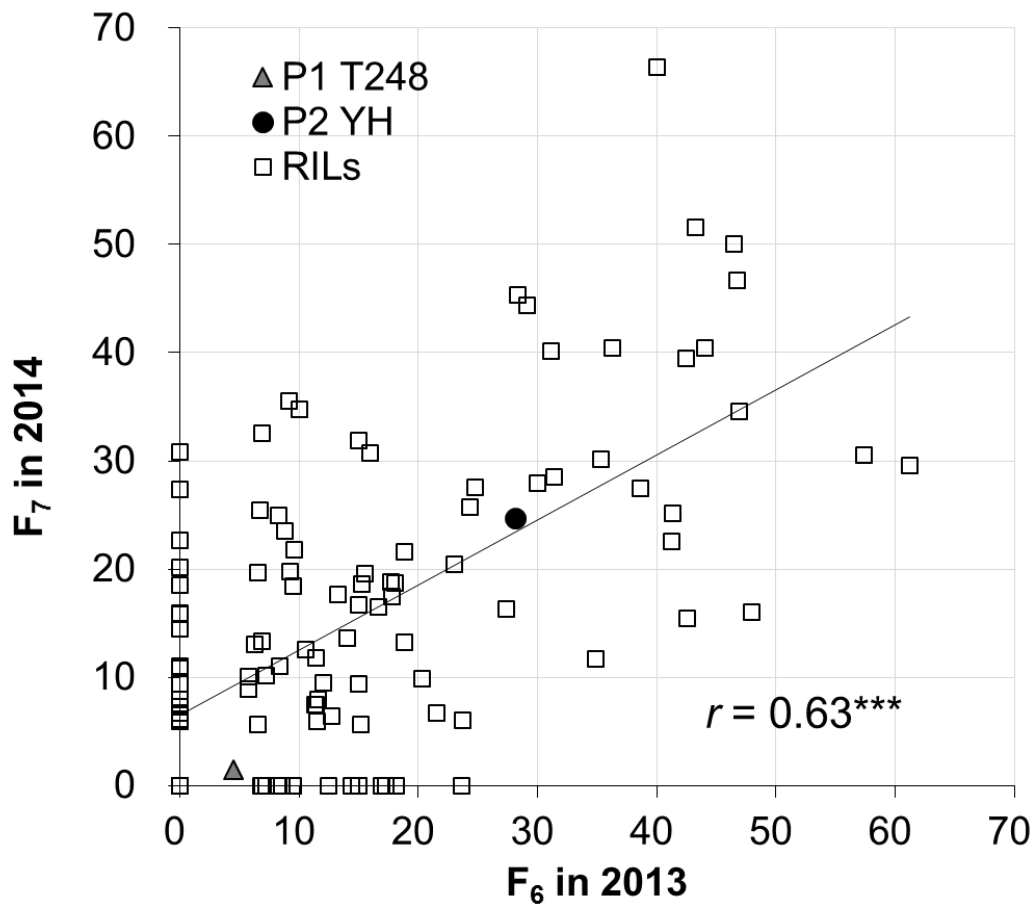


Fig. III-3. Correlation coefficients between the cracked seed indexes (CSIs) of the T248Y-RILs in 2013 and 2014. ***Significant at $P < 0.001$.

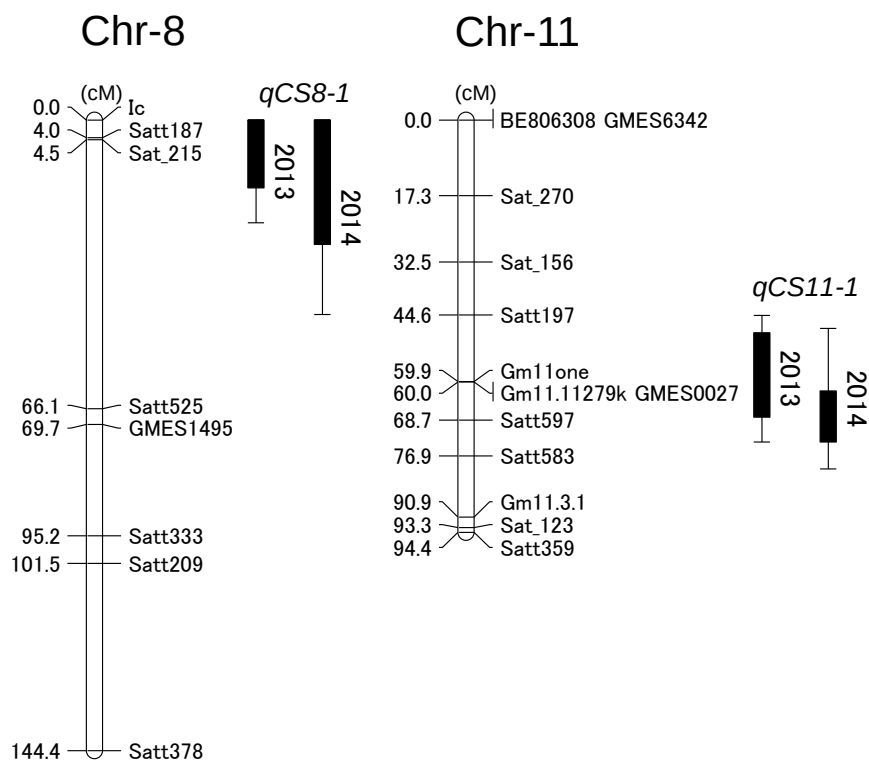


Fig. III-4. Locations of the quantitative trait loci (QTLs) for cracked seed index (CSI) detected in both years. The bar and line indicate 1–LOD and 2–LOD confidence interval (Ooijen 1992), respectively.

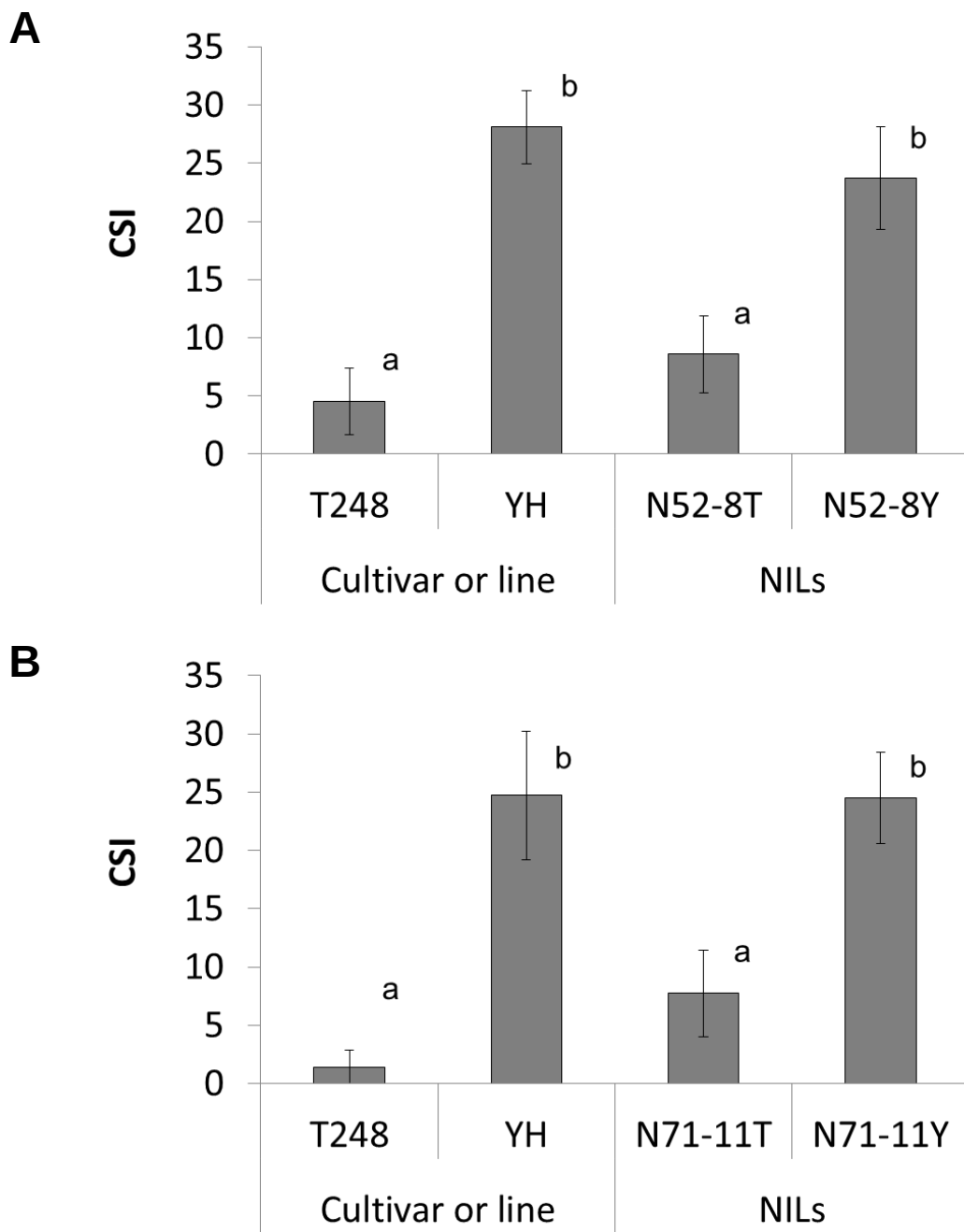


Fig. III-5. Cracked seed indexes (CSIs) of the parents and near isogenic lines (NILs) in the phytotron testing method. Error bars indicate standard error. In each year, means followed by the same letter are not significantly different according to the Tukey–Kramer multiple comparison test ($P \geq 0.05$). T248: CS-tolerant breeding line, YH: CS-sensitive cultivar. The NILs were bred from the RILs heterozygous at *qCS8-1* or *qCS11-1*. (A) The CSIs of the NILs at *qCS8-1*. The *qCS8-1* genotypes of N52-8T and N52-8Y are the T248 and YH alleles, respectively. The test was conducted in 2013. (B) The CSIs of the NILs at *qCS11-1*. The *qCS11-1* genotypes of N71-11T and N71-11Y are the T248 and YH alleles, respectively. The test was conducted in 2014.

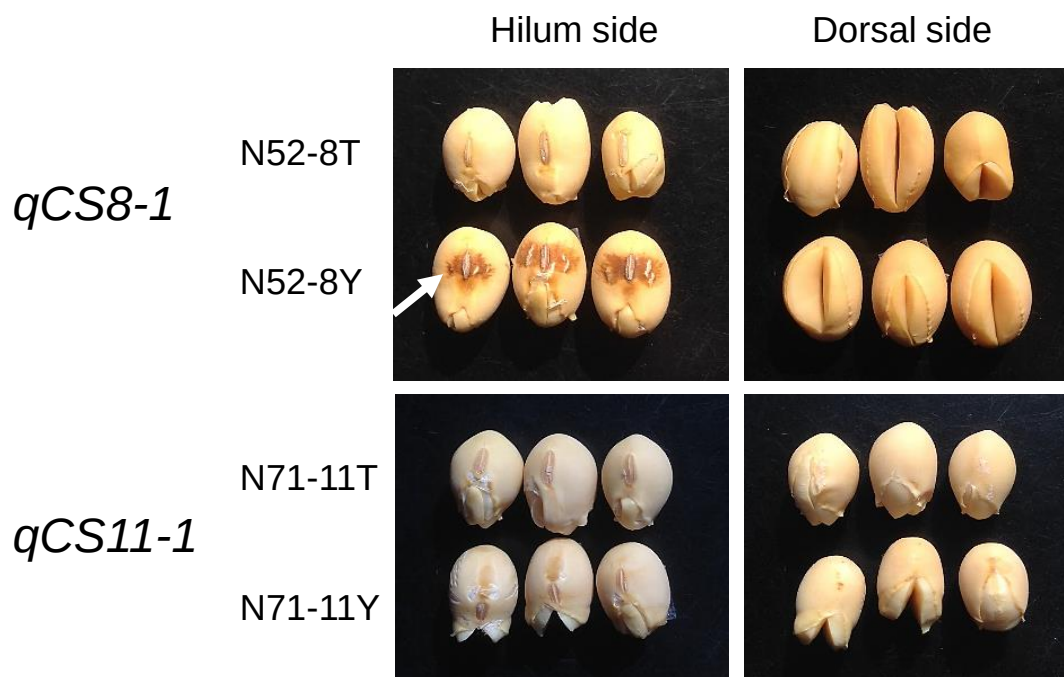


Fig. III-6. Representative cracked seeds of near-isogenic line (NILs). The *qCS8-1* genotypes of N52-8T and N52-8Y are the T248 and YH alleles, respectively. The test was conducted in 2013. The *qCS11-1* genotypes of N71-11T and N71-11Y are the T248 and YH alleles, respectively. The test was conducted in 2014. The arrow indicates seed coat discoloration around the hilum region.

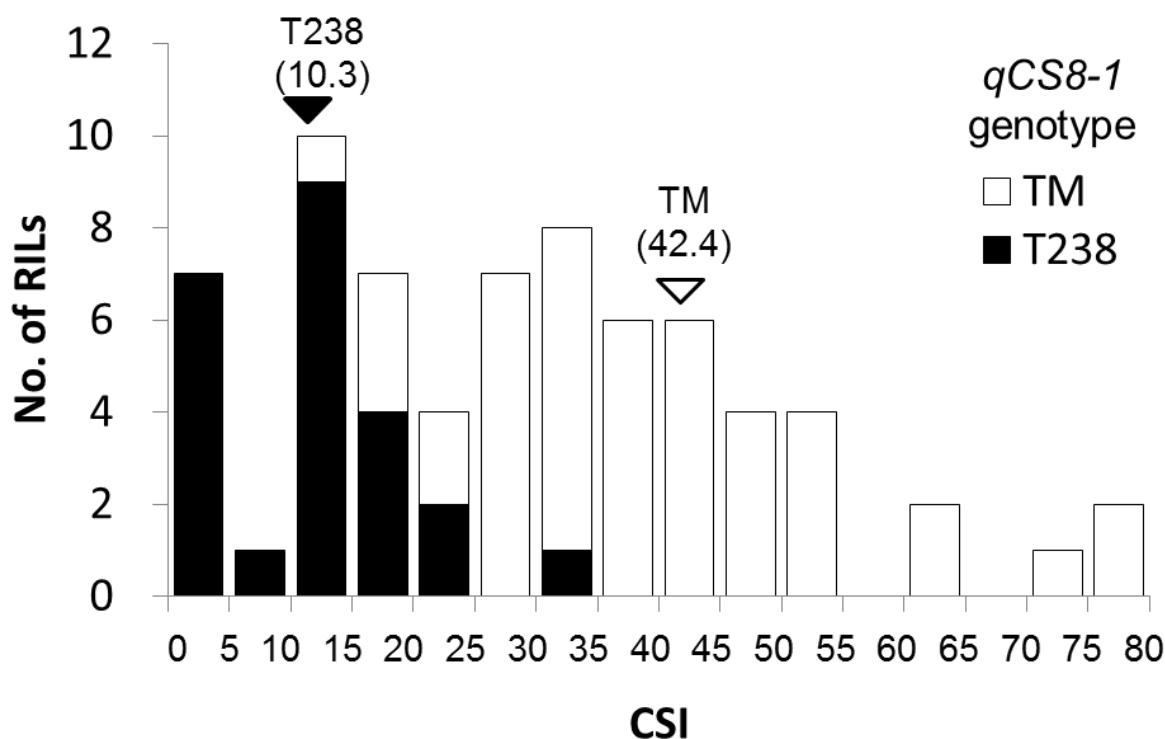


Fig. III-7. Frequency distribution of the cracked seed index (CSI) in T238T-RILs. The *qCS8-1* genotype was determined according to the nearest marker, Ic. The CSIs of T238 and TM are shown in parentheses. The average CSI of the RILs with the T238 and TM alleles at *qCS8-1* was 11.2 and 38.5, respectively ($P < 0.001$).

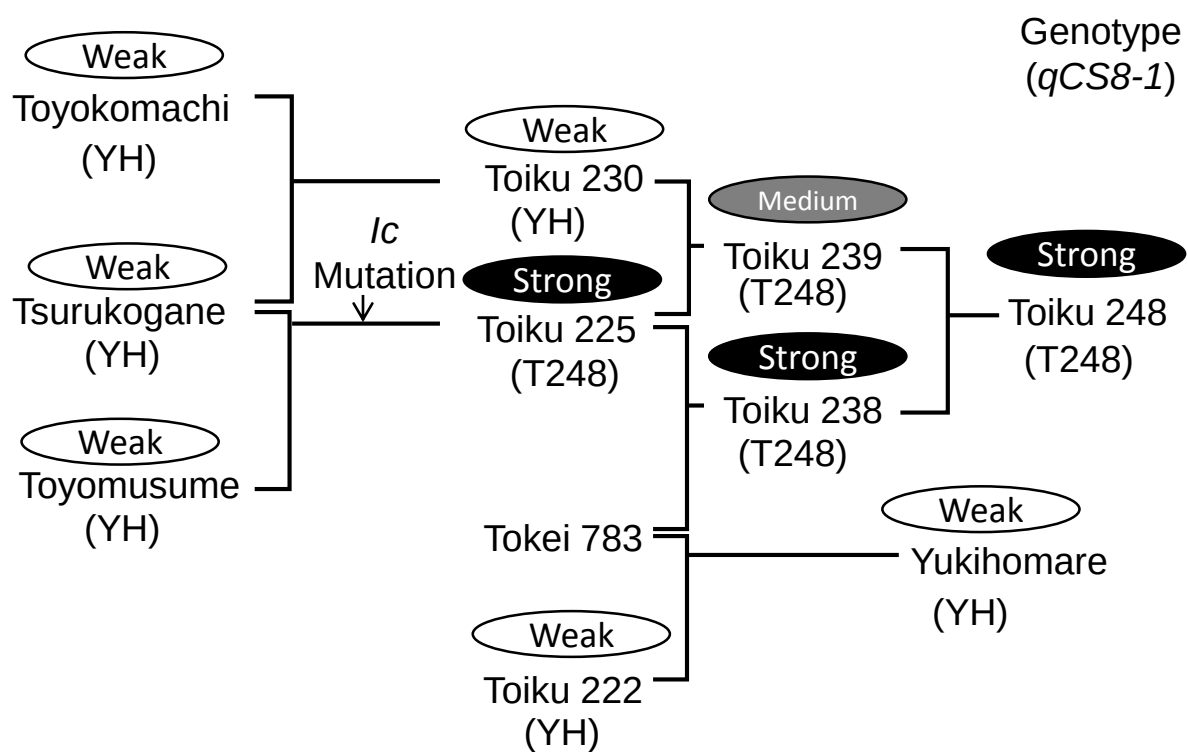


Fig. III-8. Pedigree of soybean lines. The lines used in this study are underlined. The nearest markers, *Ic*, was used for *qCS8-1*. T248, the Toiku 248 allele; YH, the Yukihomare allele. Strong, medium and weak indicate the phenotypes of the tolerance to seed cracking (Table III-8).

第四章 海外ダイズ品種を利用した早熟系統の開発と遺伝要因の解析

1) 目的

北海道は無霜期間が短く降雪が早いため、ダイズの生育期間が制限されてしまう。このため、成熟が遅い品種は霜害を受けやすく、種子の外観品質が低下する。また、冷害年においては、通常年に比べて成熟が遅れるため、コンバイン収穫が困難になる事例も報告されている。これらの理由から、北海道のダイズ品種には更なる早熟性が求められる。しかしながら、早熟品種は栄養生長期間も生殖生長期間も短いため、晩生品種よりも収量が低い。北海道で育成された系統において、成熟までの日数と子実収量の間に明らかな正の相関が認められた（大西ら 2012; 小林ら 2013）。このように、早熟性と多収性の両立は課題であるが、一方で、遠縁の遺伝資源は多収系統の選抜のために有効との報告が多数ある（Li et al. 2008; Palomeque et al. 2009a, 2009b; Kim et al. 2012）。アメリカでは、海外の遺伝資源を用いて既存品種よりも収量性が優れる系統を育成している（Nelson and Johnson 2012）。北海道においても、日本品種とアメリカ品種の交配から得られた系統は、日本品種同士の交配から得られた系統よりも収量性が優れていた（大西ら 2012）。高緯度地域における早熟性及び耐冷性の育種において、スウェーデンで開発された「Fiskeby」系統群は有用な遺伝資源である（三分一 1979; 山口ら 2015b）。「Fiskeby」と近縁であるポーランド品種は、長日条件でも開花し、耐冷性も強いと報告されている（Konieczny and Shimamoto 1989）。

ダイズにおいて、早晩性に関わる遺伝子座が多数報告され、*E* 遺伝子座と呼ばれている（Cober et al. 1996）。*E1-E4* については遺伝子が単離されており（Liu et al. 2008; Watanabe et al. 2009, 2011; Xia et al. 2012）、DNA マーカーを利用して遺伝子型を推定することができる。*E8* 座はスウェーデンで開発された系統「Fiskeby 840-7-3」から見いだされ、近傍の DNA マーカーを利用して遺伝子型の推定が可能である（Cober et al. 2010）。

本章では、海外の遺伝資源としてポーランド品種を育種に活用し、収量性を損なわずに早熟かつ耐冷性の強い系統を育成できるか検証した。さらに、育成した系統の遺伝的要因を探るため、近傍 DNA マーカーの解析により、*E1-E4* および *E8* の遺伝子型を推定した。また、多くの研究において、耐冷性は熟性遺伝子座と関連があることが報告されているため (Kurosaki et al. 2004; Funatsuki et al. 2005; Takahashi et al. 2005) , 育成した系統の耐冷性が熟性遺伝子座と関与があるのか検証した。

2) 材料と方法

1. 供試材料

「Polan」と「Progres」はポーランドで育成された早熟品種である (Konieczny and Shimamoto 1989; Szyrmer and Boros 1996) . その他の品種系統は全て十勝農試で育成されたものである。本章で用いた品種系統は全て有限伸育型である。「十系 1067 号」(T1067) は反復親を「ユキホマレ」(YH) , 1 回親を「Polan」とする BC₁ 戻し交配集団 (Tc1347) から育成した (Fig. IV-1A) . 「十系 251 号」(T251) は反復親を「ユキホマレ」(YH) , 1 回親を「Progres」とする BC₁ 戻し交配集団 (Tc1348) から育成した (Fig. IV-1A) . 「十系 1141 号」(T1141) および「十系 1142 号」(T1142) は「十系 248 号」と T251 の組合せ (Tc2113) から育成した (Fig. IV-1A) . また, Tc2113 から, 単粒系統法 (Brim 1966) で 116 系統の組換え自殖系統 (RILs) を育成し (Fig. IV-1A) , 熟性遺伝子の解析および準同質遺伝子系統 (NILs) の育成に用いた。

2. 圃場試験

T251 および T1067 の圃場試験は北海道十勝地域の芽室町 (十勝農試圃場) と上士幌町で行った。2 カ所の平均気温を Table IV-1 に記す。上士幌は芽室に比べて冷涼である。両圃場ともに淡色黒ボク土である。芽室圃場では, 2008 年 5 月 23 日, 2009 年 5 月 21 日,

2010 年 5 月 19 日に播種した (Table IV-1) . 株間 20cm×畦幅 60cm の 2 本立ち (16.7 本/m²) で, 1 試験区 3m×3 畦 (2008 年) もしくは 3.5m×4 畦 (2009 年, 2010 年) を設置した. 施肥は北海道の施肥標準に従った (0.2 N–1.8 P₂O₅–0.9 K₂O–0.4 MgO kg a⁻¹) . 上士幌圃場では, 2008 年 5 月 30 日, 2009 年 5 月 28 日, 2010 年 6 月 6 日に播種した (Table IV-1) . 株間 18cm×畦幅 66cm の 2 本立ちで (16.8 本/m²) , 1 試験区 3m×2 畦 (2008 年) もしくは 3m×3 畦 (2009 年, 2010 年) を設置した. 施肥は北海道の施肥標準に従った (0.1 N–2.2 P₂O₅–0.2 K₂O kg a⁻¹) . 両試験ともに乱塊法 2 反復以上での試験を行った. 開花期, 成熟期の調査方法は第三章と同じである. 収穫前に試験区毎に生育が中庸な 5 個体の主茎長 (子葉節から最上位節までの長さ) を測定した. 年次を反復とし, 品種と圃場を二因子とする二元配置の分散分析を行い, 品種間差の検定を行った. また, それぞれの圃場において, 品種と年次を二因子として Tukey-Kramer 法による多重比較を行い, 品種間差の検定を行った.

T1141 および T1142 の圃場試験は北海道オホーツク地域の網走市で 2012 年および 2013 年に行った. 2 カ年の播種日と平均気温を Table IV-1 に記す. 株間 18cm×畦幅 66cm の 2 本立ちで (16.8 本/m²) , 1 試験区 3m×2 畦 (2012 年) もしくは 3m×4 畦 (2013 年) を設置した. 施肥は北海道の施肥標準に従った (0.6 N–4.8 P₂O₅–0.6 K₂O kg a⁻¹) . 乱塊法 2 反復での試験を行った. 品種と年次を二因子として Tukey-Kramer 法による多重比較を行い, 品種間差の検定を行った.

3. T251 の収量構成要素の調査

圃場試験は十勝農試で 2015 年に行った. 播種日および平均気温を Table IV-1 に記す. 株間 20cm×畦幅 60cm の 2 本立ち (16.7 本/m²) で, 1 試験区 3.5m×2 畦を設置した. 施肥は北海道の施肥標準に従った (0.2 N–1.8 P₂O₅–0.9 K₂O–0.4 MgO kg a⁻¹) . 乱塊法 2 反復で試験を行い, 各試験区から生育が中庸な 6 個体を収穫し, 計 12 個体の形態および収量

構成要素の調査を行った。スチューデントの t 検定によって、YH と T251 の差を検定した ($n = 12$) 。

4. 熟性遺伝子型の解析

DNA 抽出, PCR の方法は第三章と同じである。熟性遺伝子 *E1-E4* を識別する DNA マーカーについては、既往の報告に従って設計した (Yamanaka et al. 2001, 2005; Liu et al. 2008; Watanabe et al. 2009, 2011; Xia et al. 2012) 。これらのマーカーセットは *E1-E4* に近接する単純反復配列 (Simple Sequence Repeat, SSR) マーカーである。*E1* の遺伝子型を識別するマーカーとして combi33 (Fw 5'-TTT TCA CTG ACA CAC CAA GGT C-3', Rv 5'-ACC TGC CAA AAG TGT ACC AAT C-3') と combi12 (Fw 5'- ATT CGA CGT CTT CTC TCG TAT T-3', Rv 5'- TTG TAC AGA GAC CAG GGG AAA G-3') を用いた。*E2* の遺伝子型を識別するマーカーとして E2at_U46k (Fw 5'-CGA TAA TTT TCT GCA GCC ATG-3', Rv 5'-TCG AAC CTT TGA GTG CAT TTC-3') , E2at (Fw 5'-GTG CCT TTC CTG CCT TTT CA-3', Rv 5'-TCG GCC ATT TTT AAC TTG TG-3') , E2at_D82k (Fw 5'-CGT CTA TTC TAT GTT TCG TG-3', Rv 5'-GAA TGG ACA TTT TGT TGG ATC-3') , GMES4019 (Fw 5'-TCA ATT CGT TAA ATC TGT TGT TCC-3', Rv 5'-ATG GTA CGT GTG TGT GGT CC-3') を用いた (Yamada et al. 2012) 。*E3* の遺伝子型を識別するマーカーとして E3at_U113k (Fw 5'-CAA CCT AAC TCG TGA CCA C-3', Rv 5'-CAC AAA GCC GTT GTT ATC CTT A-3') , FT3SSR4 (Fw 5'-GCC TAT TTA GAA ACC AAT CCA-3', Rv 5'-CCG CTA GCA ACT TTA CTG-3') , FT3SSR1dom (Fw 5'-ATT AAT TCG TTG ACT CGG TAC TCC-3', Rv 5'-GGA CTT AGA ATG GAG GGC ATA AA-3') , FT3SSR3 (Fw 5'-CAT TTC CAT TTG TGC CTA CCA C-3', Rv 5'-TTT CTT CCT TCT CTC ACC CAC T-3') を用いた (Yamada et al. 2012) 。*E4* の遺伝子型を識別するマーカーとして LGIESSR1 (Fw 5'- CGG TAT GAG CTG GTC ATG AAA-3', Rv 5'-GCA CGT GAT CAC ACA GAC AA-3') と Scaffold_1_31 (Fw

5'-ACA AAT TCT CAA CAT TGT AGC ATC A-3', Rv 5'-TGA AAT TCA TGT CCA GAA CAC A-3') を用いた. 「トヨハルカ」(田中ら 2015), 「ハヤヒカリ」(湯本ら 2000) を *E1-E4* の遺伝子型の比較として用いた.

熟性遺伝子座 *E8* を識別するマーカーについては, Cober et al. (2010) に従い, Sat_404 (Fw 5'-GCG GAT GCG CTT AGC CAG AAG ATG AGT-3', Rv 5'-GCG TTC TCC CCC AAT GTA CAT ACT TCT ACC A -3') および Satt136 (Fw 5'-CCC CAT ATA TTC AAC ATA TCT TCA-3', Rv 5'-AAC TAA GCC AAA TCT TTT CCT ACT A -3') を用いた. *E8* 座はこれから 2 マーカー間に座乗する (Cober et al. 2010) .

YH, T248, 「Progres」, T251, T1141, T1142 の 6 品種系統については, ゲノム全体をカバーする SSR ゲノムパネルシステム (Sayama et al. 2011) を用いて, 合計 262 マーカーの解析を行った.

5. RILs および *E8* 座に関する NILs の成熟期評価

F₇ 世代の Tc2113-RILs 116 系統について開花期および成熟期を調査した. 圃場試験は十勝農試で 2015 年に行った. 播種日および平均気温を Table IV-1 に記す. 株間 10cm×畦幅 60cm の 1 本立ち (16.7 本/m²) で, 1 系統につき 1.8m×1 畦を栽植した. F₆ 世代の 3 個体の葉を混合して DNA を抽出し, 前述の SSR マーカーで *E8* 座の遺伝子型を調査した. F₆ 世代で遺伝子型が分離した系統については, F₇ 世代で再度 DNA を抽出し, 遺伝子型を調査した.

第三章と同じ手法で *E8* 座に関する NILs を育成した. Tc2113-RILs から Sat_404 と Satt136 がヘテロ型の RILs を選抜し (M62 および M83), 2 つのペアの NILs を育成した. F₆ 世代の葉から DNA を抽出した. Sat_404 と Satt136 がともに T248 型 (*E8*), T251 型 (*e8*), の個体を選抜し, その F₆ 世代種子を増殖した F₇ 世代を NILs とした. T248 型を M62-*E8*, M83-*E8*, T251 型を M62-*e8*, M83-*e8* と名付けた. M62, M83 はそれぞれ同じ遺伝背景を持

つ. 圃場試験は Tc2113-RILs と同様の方法で行った. 乱塊法 3 反復で試験を行い, 開花期および成熟期を調査した. 系統と反復を二因子として Tukey-Kramer 法による多重比較を行い, 系統間の開花期および成熟期の差の検定を行った.

6. 開花期耐冷性検定

T1067 と T251 の開花期耐冷性検定は既往の報告 (Kurosaki and Yumoto 2003) に従い, 2010 年に実施した. 「トヨハルカ」を‘強’, 「トヨムスメ」(佐々木ら 1988) を‘中’の基準品種として用いた. 1/2000a のワグネルポットに十勝農試圃場の淡色黒ボク土を詰め, あらかじめ化成肥料 S353 を 40g ずつ添加した (N, 0.12 g; P₂O₅, 1.00 g; K₂O, 0.52 g /ポット). 低温区・対照区それぞれを育成系統は 3 ポットずつ, 比較品種は 5 ポットずつ供試した. 1 ポットにつき種子 10 粒を播種した (播種日 5 月 17 日). 出芽 2 週間後に間引きを行い, 1 ポット 2 本立ちとした. 開花まではコンクリートポーチで雨よけ栽培し, 開花始に人工気象室に移動した. 低温区は昼 18 °C (08:00–18:00), 夜 13 °C (18:00–08:00) で, 55%の遮光処理を行った. 対照区は昼 25 °C (08:00–18:00), 夜 20 °C (18:00–08:00) の処理を行った. 28 日後, 処理が終わったポットをコンクリートポーチに戻し, 成熟まで栽培した. 得られた子実収量について品種間差の検定を行うために Tukey-Kramer 法で多重比較を行った. 耐冷性の指標 (Chilling Tolerance Index, CTI) は低温処理による収量減の割合として以下のように算出し, 評価した (三分一 1979; Kurosaki et al. 2004) .

$$CTI = (\text{低温区の子実収量}) / (\text{対照区の子実収量}) \times 100$$

E8 座に関する NILs の開花期耐冷性検定については 2015 年に実施した. 低温区・対照区それぞれを 2 ポットずつ供試した (播種日 5 月 19 日) .

3) 結果

1. T1067 と T251 の育成経過

T1067 と T251 の育成経過は以下のとおりである。まず, 2001 年に交配を行い, 2002 年に F₁ に YH を戻し交配した。2003 年に芽室圃場で BC₁F₁ を養成し, バルクで収穫した。2004～2006 年 (BC₁F₂～BC₁F₄) は集団育種法で世代を進めた。2005 年は上士幌圃場, 2006 年は芽室圃場で早熟個体を選抜した。2007～2010 年 (BC₁F₅～BC₁F₈) は系統育種法で世代を進めた。2007 年は十勝農試圃場で Tc1347 を 31 系統, Tc1348 を 42 系統栽培し, 早熟系統を選抜した。2008 年には Tc1347 を 4 系統, Tc1348 を 5 系統, 合計 9 系統を芽室圃場・上士幌圃場で収量試験を行った。なお, T251 は 2009 年の時点では, 「十系 1068 号」の名で試験を実施した。

2008 年の上士幌圃場の積算気温は芽室圃場よりも低かった (Table IV-1) 。したがって, 生育期間が延び, 上士幌における YH の成熟期は芽室よりも遅くなった (Figs. IV-2 and IV-3) 。芽室では 9 系統中 7 系統の成熟期が YH や国内由来の育成系統よりも早かった (Fig. IV-2) 。T1067 は芽室で試験した全ての系統の中で最も早熟であるため, 選抜した (Fig. IV-2) 。上士幌においても, 9 系統中 7 系統の成熟期が YH や国内由来の育成系統よりも早かった (Fig. IV-3) 。T251 は上士幌で試験した全ての系統の中で最も早熟であり, かつ収量性が YH と同等であったため, 選抜した (Fig. IV-3) 。T1067 と T251 の種皮色, 臍色は改良され, 外観品質は YH と同等であった (Fig. IV-1B) 。

2. 早熟系統の成熟期と収量性の評価

T1067 と T251 の圃場試験は 2008～2010 年に芽室と上士幌の 2 カ所で行った。試験を行った 3 か年において, 毎年, 上士幌の積算気温は芽室よりも低かった (Table IV-1) 。圃場試験で調査した農業形質全てにおいて, 有意な品種間差があることを確認した (Table IV-2) 。圃場間では有意な品種間差はなく, 品種・圃場間での交互作用も検出されなか

った（データ省略）．芽室において、T1067 と T251 は有意に開花期が早く、また両圃場において有意に成熟期が早かった（Table IV-2）．上士幌での成熟期は芽室での成熟期よりも、YH が 4 日、T1067 が 2 日遅かった（Table IV-2）．一方、T251 は芽室での成熟期と上士幌での成熟期は同等であった（Table IV-2）．これらの結果は T251 の成熟期が比較的安定していることを示唆している．

上士幌における子実収量は芽室のおおよそ 80%であった（Table IV-2）．芽室、上士幌のどちらにおいても、T1067 の子実収量は YH よりも有意に低かった（Table IV-2）．一方、T251 の子実収量は YH と同等であった（Table IV-2）．T251 の主茎長は YH と同等で、T1067 の主茎長は YH よりも有意に長かった（Table IV-2）．芽室、上士幌のどちらにおいても、T1067、T251 の百粒重は YH よりも有意に軽かった（Table IV-2）．しかし、T251 の百粒重は T1067 よりも有意に重かった（Table IV-2）．これらの結果を総合し、T251 は T1067 よりも農業形質が YH に近いと考えられた．

早熟かつ子実収量が優れる T251 の百粒重の軽さを改良するため、百粒重が重い T248 と T251 を交配し、T1141、T1142 の 2 系統を育成した（Fig. IV-1A）．2 ヶ年の収量試験の結果、T1141 と T1142 はともに YH より成熟期が 5 日早く、子実収量および百粒重は YH と同等であった（Table IV-3）．

3. T251 の収量構成要素

T251 が早熟かつ収量性が優れた原因を探るため、主茎と分枝に分けて収量構成要素を調査した．調査した 2015 年十勝農試圃場では、T251 は YH よりも 6 日早く成熟した（Table IV-4）．2008 年から 2010 年の結果とは異なり（Table IV-2）、T251 の主茎長は YH よりも有意に低かった（Table IV-4）．節数および一莢内粒数は主茎・分枝ともに有意差はなかった（Table IV-4）．主茎莢数は YH が有意に多く、分枝莢数は T251 が有意に多く、百粒重は主茎・分枝ともに YH が有意に重かった（Table IV-4）．主茎の子実収量は

YH が有意に高かった (Table IV-4) .

4. 熟性遺伝子型の解析

熟性遺伝子 *E1* の機能欠損型には *e1-as*, *e1fs*, *e1-nl* の 3 つのタイプが存在し (Xia et al. 2012), YH の熟性遺伝子型は *e1-nl/e2/E3/e4* と報告されている (Tsubokura et al. 2014) . 近接する SSR マーカーを用いて *E1-E3* の多型調査を行ったところ, YH, 「Polan」, 「Progres」, T1067, T251 間では全て多型がなく, これらの 5 品種系統は全て *e1-nl/e2/E3* と推定した (Table IV-5) . PCR 産物の断片長が比較品種である「トヨハルカ」(*E4* 型) , 「ハヤヒカリ」(*e4* 型) のどちらとも異なっていたため, 「Polan」の *E4/e4* の遺伝子型は推定できなかった (Table IV-5) . そこで, 「Polan」型の *E4/e4* のについては *e4^P* と命名した. *E4* に近接するマーカー遺伝子型より, T1067 の *E4* の遺伝子型は *e4^P*, YH, 「Progres」, T251 は *e4* と推定された (Table IV-5) . 同様の方法で T248, T1141, T1142 の *E1-E4* の遺伝子型を調査したところ, YH と多型が見られず, 3 系統ともに *e1-nl/e2/E3/e4* と推定した (Table IV-5) .

系譜情報から, 「Progres」由来の早熟性に関与するゲノム領域は T251, T1141, T1142 の 3 系統に残されていると考えられる (Table IV-1A) . そこで, YH, T248, 「Progres」, T251, T1141, T1142 の 6 品種系統について, ゲノム全体をカバーする合計 262 マーカーの解析を行った. その結果, 染色体 4 上に「Progres」型のゲノム領域が T251, T1141, T1142 の 3 系統に共通して残っていた (Table IV-6) . この領域は *E8* 座 (Cober et al. 2010) の近傍で同座の可能性が高いため, 以降はこの領域を *E8/e8* 座と呼ぶ. *E8* 座以外に T251, T1141, T1142 とともに「Progres」型であったのは染色体 9 上の Satt559, 染色体 13 上の Sat_417 の 2 マーカーであった.

5. RILs の成熟期評価

T251 の早熟性に *E8* 座が関与しているか検証するため, Tc2113-RILs 116 系統を栽植し, *E8* 座近傍マーカーの遺伝子型と成熟期を調査した. Tc2113-RILs の遺伝子型別の成熟期の頻度分布を Fig. IV-4 に記す. *E8* 型の RILs の成熟期は平均で 125.7 日であったのに対し, *e8* 型の RILs は 121.2 日であり, 4.5 日早熟であった ($P<0.001$, Fig. IV-4). このため, *e8* 座は T251 の早熟性に関与していると考えられた.

6. NILs の成熟期評価

遺伝背景を揃えて *E8/e8* 座の効果を検証するため, Tc2113-RILs の中から NILs を育成し, 開花期および成熟期を調査した. その結果, M62, M83 の NILs とともに *e8* 型と *E8* 型で開花期に差がなく, 同日であった (Table IV-7). また, 2 組の NILs とともに成熟期は *e8* 型が *E8* 型より 5.7 日早かった (Table IV-7). これらの結果より, T251 の *e8* 座は開花期の早晩には影響を与えず, 成熟期を早くする効果を持つことが示唆された.

7. 育成系統の開花期耐冷性評価

T1067 と T251 の開花期耐冷性検定は 5 品種系統を用いて 2010 年に行った (Table IV-8). 対照区においては子実収量の品種間差は見られなかったが, 低温区においては「トヨハルカ」の子実収量は YH よりも有意に多かった (Table IV-8). 耐冷性‘強’の「トヨハルカ」の CTI は 106, 耐冷性‘中’の「トヨムスメ」の CTI は 61 であった (Table IV-8). YH の耐冷性は‘やや強’であり, CTI は 71 であった (Table IV-8). これらの結果より, これら 3 品種の検定結果は既往の報告と同様であった (田中ら 2003, 2015). したがって, 2010 年の耐冷性検定は精度良く評価できていると判断した. 対照区・低温区のどちらにおいても, T1067 と T251 の成熟期は YH よりも早かった (Table IV-8). T1067 と T251 の CTI はそれぞれ 90 と 91 であり, 両系統ともに耐冷性‘強’と判断した (Table IV-8). 同

様の品種系統を用いて 2009 年にも試験を行ったが、同様の結果が得られた（データ省略）。以上のことから、T1067, T251 とともに YH よりも開花期耐冷性が強いことが示された。

8. NILs の開花期耐冷性評価

NILs の開花期耐冷性検定は 2 系統群 4 系統を用いて 2015 年に行った（Table IV-9）。どちらの NILs のペアにおいても、対照区、低温区ともに *E8* 型が *e8* 型よりも成熟期が遅かった（Table IV-9）。対照区、低温区ともに、NILs のペア間で子実収量に差は見られなかったが、M83-E8 の対照区がやや低かった（Table IV-9）。M62-E8 および M62-e8 の CTI はそれぞれ 40, 41 と差はなかった（Table IV-9）。M83-E8 および M83-e8 の CTI はそれぞれ 72, 38 であり、*E8* 型が *e8* 型よりも優れていた（Table IV-9）。

4) 考察

1. 早熟性と収量性

一般的に、栄養生长期間と生殖生长期間が長いため、熟期の遅いダイズは熟期の早いダイズよりも多収である。例えば、北海道で育成された系統において、成熟までの日数と子実収量の間に正の相関がある（大西ら 2012; 小林ら 2013）。また、カナダにおける NILs を使った解析では、早熟系統の収量は晩生系統の収量の 60%程度しかなかった（Cober et al. 2010）。これらの理由から収量を下げずに早熟系統を育成するのは難しいと考えられてきた。本章において、T1067 と T251 は YH よりも有意に成熟期が早かった（Table IV-2）。そして、T251 の収量性は YH と同等であった（Table IV-2）。したがって、収量性を損なうことなく、早熟系統を育成することに成功した。日本で煮豆に加工する際には大粒品種が望まれる傾向があるが（Kato et al. 2014; Yamaguchi et al. 2014）、T251 の百粒重は YH より軽かった（Table IV-2）。そこで、T251 の百粒重の改良を目指して、

T1141 と T1142 を育成した。これら 2 系統は収量性と百粒重は YH 並で、YH よりも早熟だった (Table IV-3)。カナダの研究グループは、冷涼地で収量性を向上させるためには、百粒重を重くせず、種子数を増やすことが重要と報告しているが (Morrison et al. 2000)、早熟性と収量性を維持しながら、百粒重の改良も可能と考えられた。

遠縁の遺伝資源は多収系統の選抜のために有効との報告が多数ある (Li et al. 2008; Palomeque et al. 2009a, 2009b; Kim et al. 2012)。日本品種とポーランド品種は SSR マーカーを使ったクラスター解析により、同じグループには入らないことが報告されている (Hudcovicová and Kraic 2003)。したがって、ポーランド品種は日本のダイズ育種において、遠縁の遺伝資源と見なすことができるであろう。本章において、ポーランド品種「Progres」と日本品種 YH の多収遺伝子を集積できたため、T251 の育成につながったものと考えられる。ダイズの多収は子実への乾物蓄積速度が速い、粒肥大期が長い、もしくはその両方によって達成される (McBlain and Hume 1980)。T251 の百粒重は YH よりも有意に軽かったことから (Table IV-2)、T251 の粒肥大期は YH よりも短いことが推定される。この仮説通りであれば、T251 は子実への乾物蓄積速度が YH よりも速いのかもしれない。今後、生理学的な研究が必要と考えられる。

YH と T251 の収量構成要素の比較では、主茎莢数は YH が有意に多く、分枝莢数は T251 が有意に多かった (Table IV-4)。一莢内粒数は YH と T251 で同等であり、百粒重は YH が有意に重かったことから (Table IV-4)、T251 は分枝莢数を増やすことにより、早熟でも収量性を維持しているものと考えられた。過去の事例において、「Progres」などポーランド品種の分枝数は日本品種よりも多く、個体当たりの分枝莢数は多かった (Konieczny and Shimamoto 1989)。したがって、T251 はポーランド品種由来の分枝莢数を増やす遺伝子を持っていることが示唆された。2008 年から 2010 年では T251 と YH は同程度の主茎長であったが (Table IV-2)、収量構成要素を調査した 2015 年において、T251 の主茎長は YH よりも有意に低かった (Table IV-4)。この理由として、2015 年の 6

～7月は降水量が少なく、干ばつとなったため、生育が抑制された可能性がある。7月の降水量を比較すると、2008年は134mm、2009年は248mm、2010年は204mmであるのに対し、2015年は55mmと極端に少なかった。YHの主茎莢数および主茎の子実収量がT251よりも上回ったのは（Table IV-4）、干ばつの影響でT251の主茎の生育が抑制されたのかもしれない。いずれにしても、年次を重ねて収量構成要素を調査し、T251がどのようなメカニズムで分枝莢数を増やしているのか解明する必要がある。

*e8*座がT251の早熟性に関与することが示唆されたが（Fig IV-4; Table IV-7）、カナダにおける*E8*座のNILsを使った収量試験では、*e8*型は*E8*型の60%程度の収量であった（Cober et al. 2010）。このため、T251の早熟性に関わる遺伝子と収量性に関わる遺伝子の責任遺伝子は別である可能性が高い。

2. 早熟性の遺伝的要因

熟性遺伝子*E4*の機能欠損には様々なタイプがある（Tsubokura et al. 2013）。本章において、「Polan」とT1067の*E4*近傍のマーカー遺伝子型はYHとは異なっていた（Table IV-5）。従って、T1067の早熟性の遺伝的要因の一つとして、*e4*の遺伝的変異が考えられる。すなわち、「Polan」とT1067の*e4^p*はYHの*e4*の機能欠損の程度が大きい可能性がある。この仮説を検証するためには、今後、NILs等を用いて、*e4^p*と*e4*で熟期に差があるか調査する必要があるであろう。

T251の*E1-E4*の熟性遺伝子型はYHと同じ*e1-nl/e2/E3/e4*と推定できた（Table IV-5）。したがって、T251の早熟性の遺伝的要因は*E1-E4*以外であることが示唆された。開発した早熟系統を用いてDNAマーカーの解析を進め、YHとT251は*E8*座近傍のマーカーで多型があることを見いだした（Table IV-6）。RILsおよびNILsを用いた効果検証により、*e8*座がT251の早熟性に関与することが示唆された（Fig IV-4; Table IV-7）。*e8*型のRILsが*E8*型のRILsよりも約5日早熟であり（Fig. IV-4）、*e8*型のNILsが*E8*型のNILsよ

りも約 5 日早熟であった (Table IV-7) . このため, T248×T251 の組合せにおいて, *e8* 座は約 5 日成熟期を早める効果を持つと考えられた. RILs の親系統である T251 は T248 よりも 8 日早熟であったことから (Table IV-7) , *e8* 座は T251 の早熟性に関与する主要な遺伝子座と言える. 育種において, T251, T1141 および T1142 の交配後代においては, *e8* 座近傍の DNA マーカーである Sat_404 と Satt136 を利用することにより, 効率的に早熟系統を選抜することができるであろう.

E8 座は成熟期を指標として同定されたため, *E8* 座が開花期に与える影響については解析されていない (Cober et al. 2010) . 本研究において, T251 の開花期は YH よりも約 2 日早く (Table IV-2) , T251 は T248 よりも約 5 日早かった (Table IV-7) . このため, T251 は開花期を早くする遺伝子を持つことが推察されるが, *e8* 型の NILs と *E8* 型の NILs の開花期に差はなかった (Table IV-7) . このため, *e8* 座は開花期には影響を与えず, 成熟期のみを早くする効果を持つと考えられる. 佐山ら (2015) は *E1-E3* 及び新規の開花期関連遺伝子座について機能を明らかにし, 開花期と登熟期間の両方に影響を与える *E1*, *E2*, *qFT12-1*, 開花期に影響を与える *E3*, 登熟期間に影響を与える *qFT11-1* の 3 タイプがあることを報告している. この報告に従うと, *e8* 座は *qFT11-1* と同じタイプに分類できる.

ゲノム全体をカバーする DNA マーカーの解析により, *e8* 座以外にも染色体 9 上の Satt559, 染色体 13 上の Sat_417 が早熟性に関与する領域の候補として挙げられた. Satt559 周辺領域には ‘Pod maturity 5-3’ (Lee et al. 1996) と呼ばれる成熟期関連 QTL が座乗しており, Sat_417 周辺領域には開花期や成熟期に関連する QTL の報告はない. これらの領域については, 本研究で RILs や NILs を用いた解析は行っていないため, 今後開花期や成熟期に関与する遺伝子が座乗しているのか検証が必要であろう.

SSR マーカーを用いたクラスター解析において, ポーランド品種とスウェーデン品種は近縁であった (Hudcovicová and Kraic 2003) . 実際, T251 の早熟性の由来である

「Progres」はスウェーデン系統群「Fiskeby」の中から純系分離されて育成されている (Szyrmer and Boros 1996)。「Fiskeby」はスウェーデンの育種家 Dr. Holmberg が樺太の遺伝資源を用いて育成した系統群であり、2700 種類以上あると言われている (SoyInfo Center 2010)。*e8* 座の変異は「Fiskeby」の中の 1 系統である「Fiskeby 840-7-3」に由来している (Cober et al. 2010)。本研究において、「Fiskeby 840-7-3」は DNA マーカーの解析に用いていないが、「Progres」と「Fiskeby 840-7-3」は極めて近縁であることが推定され、T251 に由来する染色体 4 上の早熟性遺伝子座は *e8* 座と同座である可能性は高いと考えられる。

3. 開花期耐冷性

ポーランドはダイズ作の北限地域であるため、ポーランド品種は長日条件でも開花し、耐冷性も強いと報告されている (Konieczny and Shimamoto 1989)。本章において、T1067 と T251 の開花期耐冷性は YH を上回る‘強’であった (Table IV-8)。このことから、T1067 と T251 の育成過程において、ポーランド品種と日本品種の耐冷性遺伝子を集積させることに成功したと考えられる。多くの研究において、耐冷性は熟性遺伝子座と関連があることが報告されている (Kurosaki et al. 2004; Funatsuki et al. 2005; Takahashi et al. 2005)。例えば、北海道品種を使った開花期耐冷性の QTL 解析では、*E1* 座と *E3* 座に QTL が検出されている (Funatsuki et al. 2005)。本章において、YH, T1067, T251 の遺伝子型はいずれも *e1-nl/e2/E3* 型と推定されたが (Table IV-5)、T1067 と T251 の開花期耐冷性は YH を上回っていた (Table IV-8)。これらの結果より、*E1*~*E3* は T1067 と T251 の開花期耐冷性には関与していないことが示唆された。また、T251 と YH は *e4* 型であること (Table IV-5)、*e8* 型の NILs の開花期耐冷性は *E8* 型の NILs と同等もしくは劣ったことから (Table IV-9)、T251 の開花期耐冷性は *e4* および *e8* 座とも関与していないものと推察される。

Table IV-1. Sowing dates and average temperatures in the field test locations.

Field	Year	Sowing date	Average temperature (°C)				Accumulated temperature from June to September (°C)
			June	July	August	September	
Memuro	2008	23 May	14.5	18.5	18.7	16.7	2089
	2009	21 May	14.4	17.6	19.2	15.1	2026
	2010	19 May	17.2	20.4	22.8	17.4	2377
	2015	20 May	14.9	20.2	19.6	15.7	2152
Kamishihoro	2008	30 May	13.7	17.5	17.5	15.7	1967
	2009	28 May	13.9	16.9	18.8	14.4	1956
	2010	6 June	16.8	19.7	22.2	16.3	2292
Abashiri	2012	1 June	12.3	17.4	20.4	19.8	2135
	2013	3 June	13.6	19.7	20.2	17.1	2158

Table IV-2. Field tests of the early-maturing soybean lines in the two field test locations.

Field	Cultivar or line	Flowering time (days)	Maturing time (days)	Main stem length (cm)	Seed yield (Kg 10a ⁻¹)	100-seed weight (g)
Memuro	Yukihomare	58.7±3.2 a ¹	123.3±3.8 a	61.9±5.5 b	316±28 a	34.8±1.2 a
	Tokei 1067	55.7±3.5 b	115.7±2.9 c	78.4±8.0 a	288±19 b	27.9±1.1 c
	Toiku 251	56.3±3.5 b	118.7±4.6 b	61.6±3.2 b	315±8 a	31.9±1.4 b
Kamishihoro (cool region)	Yukihomare	ND ²	127.3±6.2 a	ND	260±51 a	32.3±1.6 a
	Tokei 1067	ND	118.7±6.8 b	ND	220±40 b	26.5±0.5 c
	Toiku 251	ND	119.7±6.3 b	ND	253±48 a	29.9±1.9 b
ANOVA (Cultivars) ³		*	***	*	*	***

All the numbers are the averages $\pm$ standard errors of the values obtained from 2008 to 2010.

¹The Tukey–Kramer multiple comparison test was used to evaluate the significance of differences among the cultivars in each field. Values within a trait with the same letters were not significantly different at the 5% level.

²ND: no data.

³Two-way analysis of variance with repeated measures was used to test differences among the cultivars. * and ***: significantly different at $P < 0.05$ and 0.001 .

Table IV-3. Field tests of the early-maturing lines, Tokei 1141 and Tokei 1142.

Cultivar or line	Maturing time (days)	Seed yield (Kg 10a ⁻¹)	100-seed weight (g)
Yukihomare	123 a ¹	398 a	35.7 a
Tokei 1141	118 b	368 a	38.1 a
Tokie 1142	118 b	381 a	37.2 a

The field tests were conducted in Abashiri in 2012 to 2013.

¹The Tukey–Kramer multiple comparison test was used to evaluate the significance of differences among the cultivars. Values within a trait with the same letters were not significantly different at the 5% level.

Table IV-4. Seed yield components of Yukihomare and Toiku 251.

Agronomic traits	Position	Yukihomare	Toiku 251	
Maturing time (days)		123	117	
Main stem length (cm)		63.4	57.9	*
Number of branches (plant ⁻¹)		3.2	3.8	Ns ¹
Number of nodes (plant ⁻¹)	Main stem	10.8	10.4	Ns
	Branch	15.5	18.4	Ns
	Total	26.3	28.8	Ns
Number of pods (plant ⁻¹)	Main stem	20.3	15.9	**
	Branch	15.0	19.8	*
	Total	35.3	35.7	Ns
Number of seeds per pod	Main stem	1.77	1.84	Ns
	Branch	1.90	1.81	Ns
	Total	1.83	1.83	Ns
100-seed weight (g)	Main stem	33.8	31.2	**
	Branch	34.1	29.3	***
	Total	33.8	30.2	***
Seed yield (g plant ⁻¹)	Main stem	12.1	9.2	**
	Branch	9.7	10.5	Ns
	Total	21.7	19.6	Ns

The field tests were conducted in Memuro in 2015.

¹Ns means not significant.

*Significant at the 0.05 probability level.

**Significant at the 0.01 probability level.

***Significant at the 0.001 probability level.

Table IV-5. Estimated genotype of the *E1-E4* genes in soybean cultivars and breeding lines.

Origin	Cultivar or line ¹	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>		
					PCR products (bp) ²		Estimated genotype ³
					LGI ESS R1	Scaffold_1 _31	
Japan	Yukihomare	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	355	185	<i>e4</i>
	Toiku 248	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	355	185	<i>e4</i>
	Toyoharuka	<i>e1-n1</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	361	193	<i>E4</i>
	Hayahikari	<i>E1</i>	<i>e2</i>	<i>e3</i>	355	185	<i>e4</i>
Poland	Polan	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	328	183	<i>e4^P</i>
	Progres	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	355	185	<i>e4</i>
Japan × Poland	Tokei 1067	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	328	183	<i>e4^P</i>
	Toiku 251	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	355	185	<i>e4</i>
	Tokei 1141	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	355	185	<i>e4</i>
	Tokei 1142	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3</i>	355	185	<i>e4</i>

¹Toyoharuka and Hayahikari were used as the references for *e1-nl/e2/E3/E4* and *E1/e2/e3/e4*, respectively.

²Product size was determined with the use of a fluorescence-based sequencer.

³The allele at the *E4/e4* locus of Polan was named as *e4^P*.

Table IV-6. Estimated genotype of the *E8*-locus in soybean cultivars and breeding lines.

		<i>E8</i>				Estimated genotype ³
		PCR products (bp) ²				
Origin	Cultivar or line ¹	Satt718	Sat_404	Satt136	AW277661	
Japan	Yukihomare	351	196	313	236	<i>E8</i>
	Toiku 248	343	210	313	233	<i>E8</i>
Poland	Progres	294	183	358	216	<i>e8</i>
Japan ×	Toiku 251	294	183	358	216	<i>e8</i>
Poland	Tokei 1141	294	183	358	216	<i>e8</i>
	Tokei 1142	294	183	358	216	<i>e8</i>
Marker position (kb) ⁴		13537	13613	16984	21673	

¹The *E1* – *E4* genotypes of all cultivars and lines were *e1-nl/e2/E3/e4*.

²Product size was determined with the use of a fluorescence-based sequencer.

³The *E8* gene was mapped on chromosome 4 between Sat_404 and Satt136 (Cober et al. 2010).

⁴The marker position was determined according to SoyBase (Glyma 2.0).

Table IV-7. Maturity of near isogenic lines (NILs) at the *E8/e8* locus.

Line ¹	Genotype	Flowering time (days)	Maturing time (days)
Toiku 248	<i>E8</i>	56.7 a ²	125.7 a
Toiku 251	<i>e8</i>	53.0 c	117.7 c
M62-E8	<i>E8</i>	53.0 c	121.7 b
M62-e8	<i>e8</i>	53.0 c	116.0 d
M83-E8	<i>E8</i>	54.0 b	122.7 b
M83-e8	<i>e8</i>	54.0 b	117.0 cd

The field tests were conducted in Memuro in 2015.

¹The *E8/e8* genotypes of NILs were developed by the nearest markers, Sat_404 and Satt136.

²The Tukey–Kramer multiple comparison test was used to evaluate the significance of differences among the lines. Values within a trait with the same letters were not significantly different at the 5% level.

Table IV-8. Chilling tolerance at the flowering stage in soybean cultivars and breeding lines.

Cultivar or line ¹	Maturing time (days)		Seed yield (g plant ⁻¹)			Tolerance level
	Control	Treatment	Control	Treatment	CTI ²	
Toyoharuka	124	135	14.1 a ³	14.9 a	106	Strong
Toyomusume	127	140	17.2 a	11.9 ab	61	Medium
Yukihomare	114	134	14.0 a	10.0 b	71	Somewhat strong
Tokei 1067	107	126	16.3 a	14.7 ab	90	Strong
Toiku 251	111	131	13.6 a	12.4 ab	91	Strong

¹Toyoharuka and Toyomusume are standard cultivars.

²CTI = (seed yield in the chilling treatment) / (seed yield in control) × 100.

³The Tukey–Kramer multiple comparison test was used to evaluate the significance of differences among the cultivars. Values within control or treatment with the same letters were not significantly different at the 5% level.

Table IV-9. Chilling tolerance at the flowering stage in the near isogenic lines (NILs)

NIL ¹	Maturing time (days)		Seed yield (g plant ⁻¹)		
	Control	Treatment	Control	Treatment	CTI ²
M62-E8	114	124	14.6 a ³	5.8 a	40
M62-e8	107	121	11.5 ab	4.7 a	41
M83-E8	115	138	10.7 b	7.8 a	72
M83-e8	111	136	12.7 ab	4.8 a	38

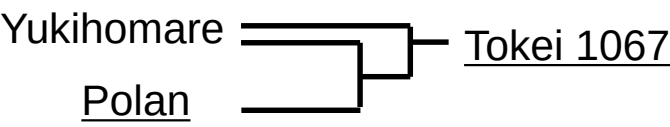
¹The *E8/e8* genotypes of NILs were developed by the nearest markers, Sat_404 and Satt136.

²CTI = (seed yield in the chilling treatment) / (seed yield in control) × 100.

³The Tukey–Kramer multiple comparison test was used to evaluate the significance of differences among the cultivars. Values within control or treatment with the same letters were not significantly different at the 5% level.

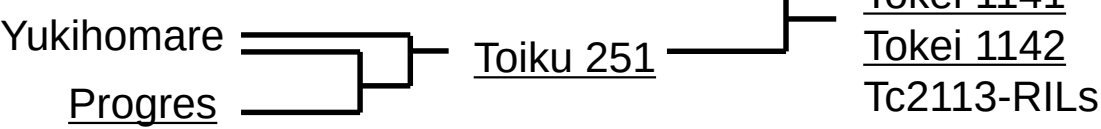
A

Cross number: Tc1347



Cross number: Tc2113

Cross number: Tc1348



B

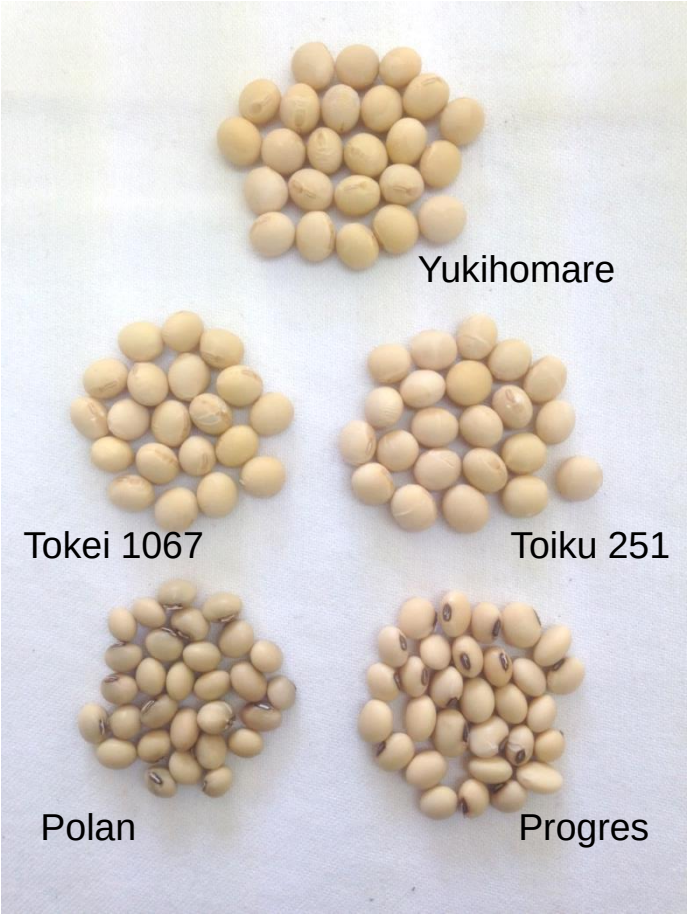


Fig. IV-1. Breeding lines derived from crosses between Japanese and Polish cultivars. (A) Pedigree of the soybean lines. The early-maturing lines are underlined. (B) Appearance of the soybean seeds from the various lines.

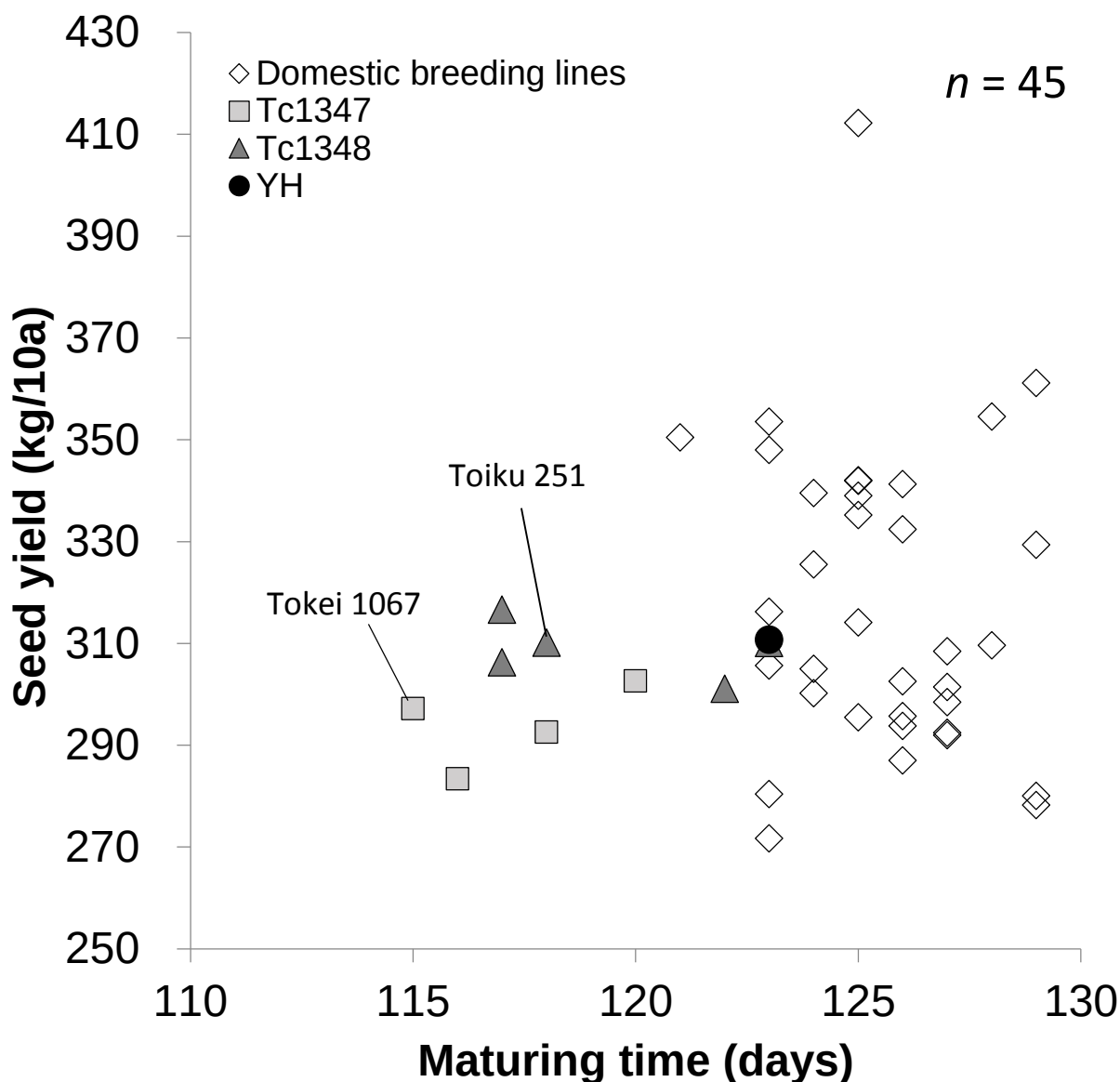


Fig. IV-2. Selection of early-maturing lines in Memuro (2008). YH: Yukihome: a standard cultivar. Tc1347: four breeding lines selected from the BC_1 population derived from the YH (a recurrent parent) $\times$ Polan (a donor parent) cross. Tc1348: five breeding lines selected from the BC_1 population derived from the YH (a recurrent parent) $\times$ Progres (a donor parent) cross. The total number of the lines used for the field test was 45 ($n = 45$).

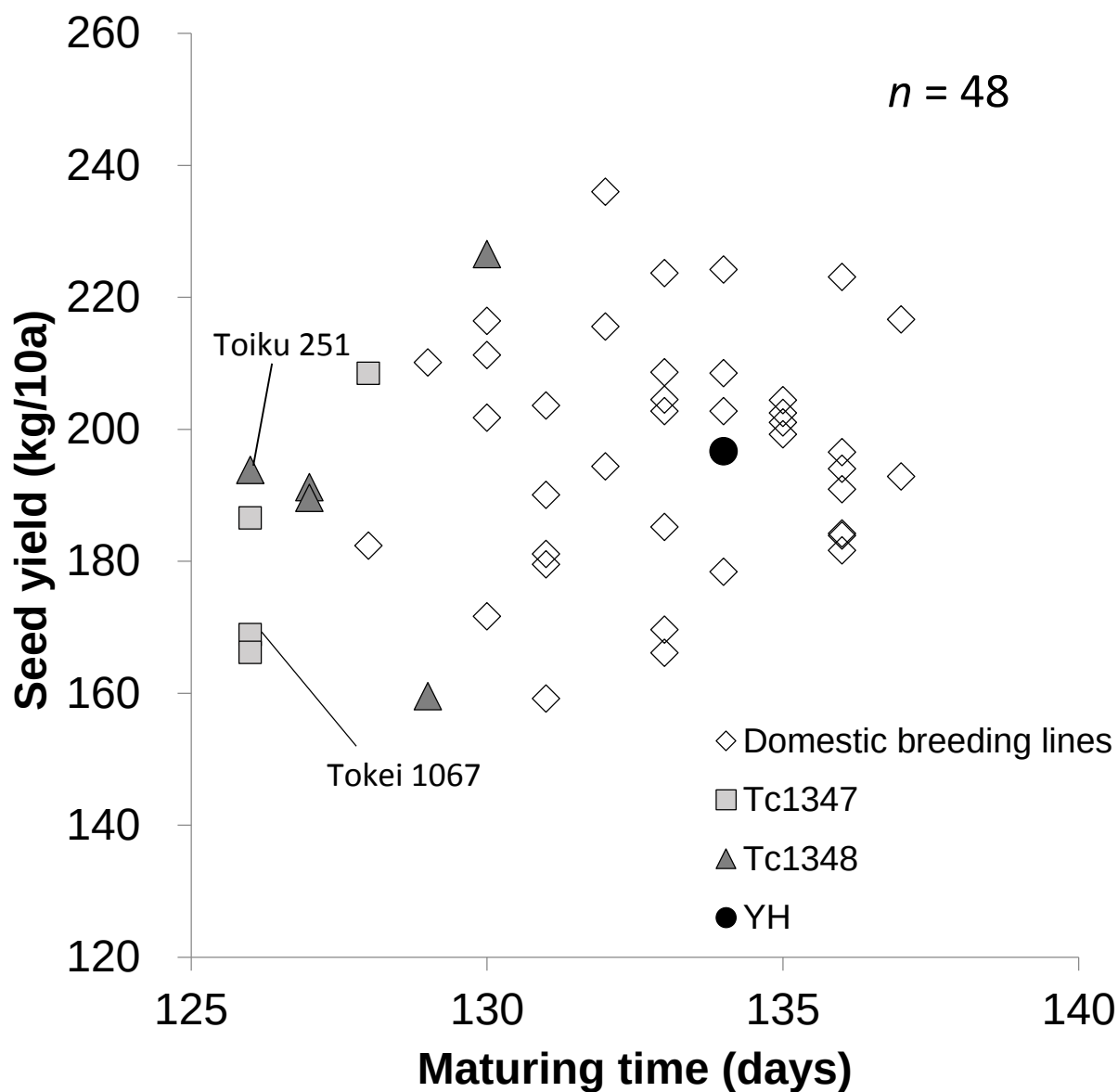


Fig. IV-3. Selection of early-maturing lines in Kamishihoro (2008). YH: Yukihomare, a standard cultivar. Tc1347: four breeding lines selected from the BC_1 population derived from the YH (a recurrent parent) $\times$ Polan (a donor parent) cross. Tc1348: five breeding lines selected from the BC_1 population derived from the YH (a recurrent parent) $\times$ Progres (a donor parent) cross. The total number of the lines used for the field test was 48 ($n = 48$).

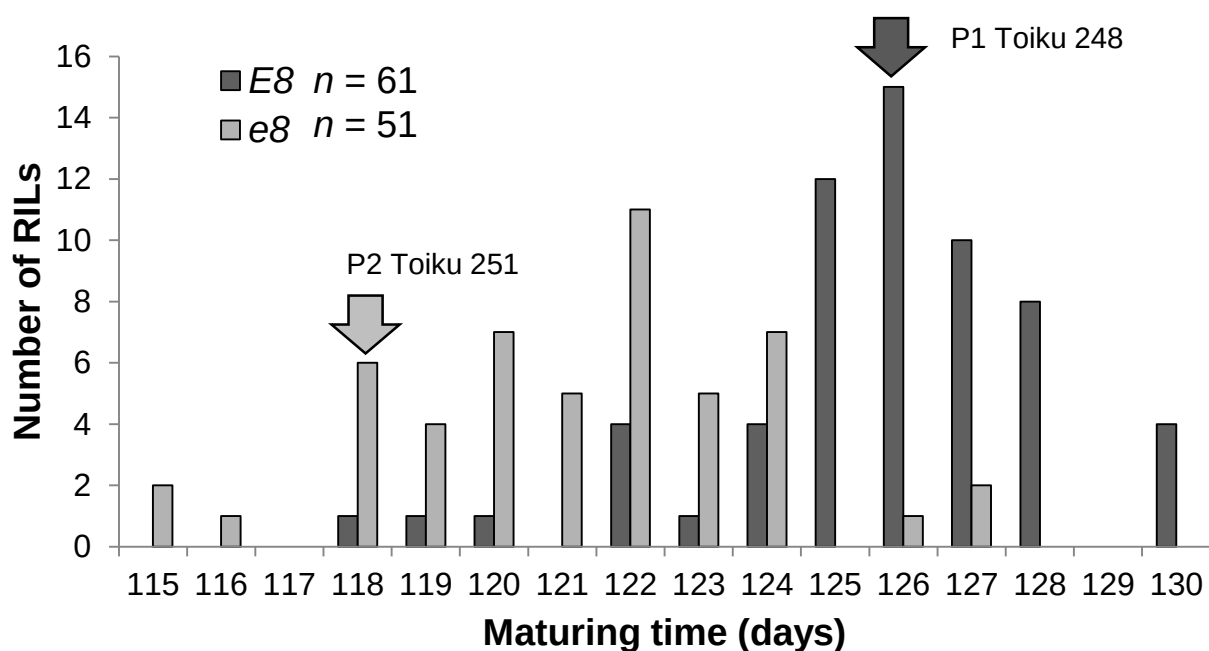


Fig. IV-4. Frequency distribution of the maturing time in the Tc2113-RILs. The *E8/e8* genotypes were determined according to the nearest markers, Sat_404 and Satt136. The average maturing times of the RILs with the *E8* and *e8* alleles was 125.7 and 121.2, respectively ($P < 0.001$).

第五章 総合考察

北海道、特に道東・道北はダイズ栽培の北限であり、耐冷性および早熟性は重要な形質である。近年では、開花期耐冷性、低温着色抵抗性に加えて低温裂開抵抗性が重要な耐冷性形質である。しかしながら、裂開粒発生にどの時期の低温が関与するか、低温裂開抵抗性に品種間差が存在するか不明であった。そこで本研究の第二章では、まず初めに低温感受性の高い時期を明らかにし、圃場試験で低温裂開抵抗性に品種間差があることを明らかにした。裂開粒の発生被害はおおよそ 3~4 年に一度であるため、人工気象室を用いて圃場での品種間差を再現する検定法を開発した。開発した検定法により毎年精度よく検定することが可能となり、実際に検定法を活用して、2012 年には低温低温裂開抵抗性が強い品種「とよみづき」を育成している（山口ら 2014）。このため、開発した検定法は育種に利用することが可能と考えられる。

開発した検定法により、毎年低温裂開抵抗性を評価することが可能となったが、設備の面積と労力の都合上、大量の系統を選抜することは困難である。このため、育種では中後期世代の系統に限って検定を行うことしかできない。初期世代から積極的に選抜を行うためには DNA マーカーの開発が必要とされるため、第三章では低温裂開抵抗性の遺伝解析を行った。その結果、染色体 8 及び 11 上に「十育 248 号」型で低温裂開抵抗性増大させる効果のある量的形質遺伝子座 (QTLs), *qCS8-1* 及び *qCS11-1* を見だし、準同質遺伝子系統 (NILs) を用いて、その効果を検証した。これら 2 つの QTLs 近傍マーカーを育種に用いることで初期世代から低温裂開抵抗性を選抜することが可能になるであろう。

収量を下げずに早熟系統を育成するのは難しいと考えられてきたが、第四章において、ポーランド品種「Progres」を育種に用いることにより、早熟かつ収量性が同等の「十育 251 号」を育成することができた。これは日本品種とは遠縁である「Progres」の多収

遺伝子と日本品種の多収遺伝子を集積することができたためと考えられる。収量構成要素の解析から、「十育 251 号」の収量性には分枝莢数が関与していることを推定した。さらに、ポーランド品種に由来する開花期耐冷性を北海道品種に導入することにも成功した。

北海道で安定生産できる品種を育成するためには、低温裂開抵抗性を含む耐冷性形質と早熟性の複合化が必要である。本章では、これら形質の複合化に必要とされることを総合的に考察した。

1. 育種プログラムにおける低温裂開抵抗性マーカーの利用

第三章で見出した *qCS8-1* は、臍色や種皮色に関与する *I* 座の極近傍に位置しており (Table III-3; Fig. III-4) , 着色程度の QTL 解析, NILs の着色程度の差異および系譜解析の結果から (Table III-7; Figs III-6 and III-8) , 低温着色抵抗性遺伝子 *Ic* の多発現である可能性が高いと考えられた。*I* 座近傍には他の有用な遺伝子が多数報告されており (Alcivar et al. 2007; Liang et al. 2010; Manavalan et al. 2015) , その一つがダイズシストセンチュウ・レース 1 抵抗性に必要な遺伝子, *Rhg4* である (Liu et al. 2012; Suzuki et al. 2012) . *Rhg4* と *I* 座は強連鎖しており、その遺伝距離は 0.8cM である (鈴木ら 2010) . また, *I* 遺伝子座は臍色に関与するため、褐目大豆や黒豆は「十育 248 号」型の *qCS8-1* を持つことはできないと考えられる。このようなダイズシストセンチュウ・レース 1 抵抗性と低温裂開抵抗性を複合化する場合、褐目大豆・黒豆に低温裂開抵抗性を付与する場合に、もう一つの QTL である *qCS11-1* を利用することが有効ではないだろうか。

2. 低温裂開抵抗性と「十育 251 号」に由来する早熟性の複合化

本研究の第四章では、ポーランド品種を育種に用いることにより、「ユキホマレ」より早熟で「ユキホマレ」と収量性が同等の「十育 251 号」を開発した。さらに開花期耐

冷性も‘強’ランクであり，早熟性・耐冷性を期待して北海道のダイズ育種で中間母本として利用されている．しかしながら，「十育 251 号」の低温裂開抵抗性は‘弱’であり (Table V-1)，早熟性と低温裂開抵抗性を複合化が必要とされている．第三章において，低温裂開抵抗性に関与する QTLs, *qCS8-1* と *qCS11-1* を見いだしている (Table III-5)．また，第四章において，熟性遺伝子座 *e8* が「十育 251 号」の早熟性に関与していることを明らかにした (Tables IV-6 and IV-7; Fig. IV-4)．*e8* 座は染色体 4 上に座乗する (Cober et al. 2010)．したがって，染色体 8, 11 上に座乗する *qCS8-1*, *qCS11-1* とともに別の染色体であり，これら 3 遺伝子座を集積させることは可能と考えられる．実際に育種プログラムの中で，「十育 248 号」×「十育 251 号」の組合せから，低温裂開抵抗性かつ早熟の「十系 1141 号」を育成した (Table V-1)．したがって，「十育 248 号」由来の低温裂開抵抗性と「十育 251 号」由来の早熟性の集積は可能であり，「十系 1141 号」は今後の育種に有用な中間母本と考えられる．

3. DNA マーカーを活用した耐冷性形質の集積

現在，育種の対象とされている耐冷性形質は開花期耐冷性，低温着色抵抗性，低温裂開抵抗性の 3 つである．「十育 248 号」は低温着色抵抗性と低温裂開抵抗性を兼ね備えた系統であり (Table V-2)，「十育 248 号」を交配に用いて *qCS8-1* および *qCS11-1* が「十育 248 号」型の系統を選抜すれば，低温着色抵抗性と低温裂開抵抗性の集積が可能と考えられる．これまでに「十育 248 号」を親に持つ 8 系統が育成されており，そのうち 7 系統の *qCS8-1* の遺伝子型は「十育 248 号」型であった (Table V-2)．これら 7 系統のうち 6 系統については低温着色抵抗性も‘強’であった (Table V-2)．したがって，*qCS8-1* の DNA マーカー選抜により，低温裂開抵抗性と着色抵抗性を効率良く集積することが可能と考えられる．「十系 1141 号」のみ臍着色抵抗性が‘中’判定となった (Table V-2)．この原因として，*qCS8-1* 周辺とは異なる染色体上に第 2 の低温着色抵抗性 QTL の存在

が報告されているため（鈴木ら 2010; Ohnishi et al. 2011）, その影響が考えられる. 開花期耐冷性も含め, 耐冷性 3 形質全てを集積した系統として「十系 1166 号」「十系 1167 号」が育成できており（Table V-2）, 耐冷性母本としての活用が期待される.

第四章において, 「十育 251 号」の開花期耐冷性は「ユキホマレ」よりも強かったが（Table IV-8）, その遺伝的要因は明らかになっていない. 多くの研究において, 耐冷性は熟性遺伝子座と関連があることが報告されている（Kurosaki et al. 2004; Funatsuki et al. 2005; Takahashi et al. 2005）. 第四章において, *E1*~*E4* および *E8* 座は「十育 251 号」の開花期耐冷性には関与していないことが示唆された（Tables IV-5 and IV-9）. 北海道品種「トヨハルカ」の開花期耐冷性については, 低温下での種子肥大に関与する QTL が *qCS8-1* の近傍に検出されている（Ikeda et al. 2009）. 「十育 251 号」の *qCS8-1* 周辺のマーカー遺伝子型は「ユキホマレ」と同じであり（データ省略）, Ikeda et al. (2009) が見いだした耐冷性 QTL も関与していないと考えられる. 育種で利用可能な開花期耐冷性の DNA マーカーの情報は少ないため, 「十育 251 号」由来の開花期耐冷性を選抜できる DNA マーカーが開発できれば, 早熟性とともに関与する開花期耐冷性の効率的な導入が可能となるであろう.

Table V-1. Development of the pyramiding line with early-maturing and tolerant to seed cracking.

Cultivar or line	Year of development	<i>E8</i> genotype	Maturity	<i>qCS8-1</i> genotype ¹	Tolerance to seed cracking
Yukihomare	2001	<i>E8</i>	Early	YH	Weak
Toiku 248	2008	<i>E8</i>	Early	T248	Strong
Toiku 251	2010	<i>e8</i>	Very early	YH	Weak

Tokei 1141	2013	<i>e8</i>	Very early	T248	Strong

¹T248, the Toiku 248 allele; YH, the Yukihomare allele.

Table V-2. Development of the pyramiding lines with chilling tolerance.

Breeding line	Year of development	Cross combination	<i>qCS8-1</i> Genotype ¹	Tolerance to seed cracking	Tolerance to seed coat discoloration (hilum/ around hilum)	Chilling tolerance at flowering stage
Toiku 248	2008	Toiku 239/Toiku 238	T248	Strong	Strong/Strong	Medium
Tokei 1123	2012	Toiku 248/Tokei 1014	T248	Strong	Strong/Strong	ND ²
Tokei 1125	2012	Toiku 244/Toiku 248	T248	Strong	Strong/Strong	ND
Tokei 1141	2013	Toiku 248/Toiku 251	T248	Strong	Medium/Strong	Strong
Tokei 1142	2013	Toiku 248/Toiku 251	YH	Medium	Weak/Weak	ND
Tokei 1149	2013	1656-1/Toiku 248	T248	Strong	Strong/Strong	ND
Tokei 1166	2014	Toiku 248/Toyomizuki	T248	Strong	Strong/Strong	Strong
Tokei 1167	2014	Toiku 248/Toyomizuki	T248	Strong	Strong/Strong	Strong
Tokei 1204	2015	Toiku 248/Toyomizuki	T248	Strong	Strong/Strong	Somewhat strong

¹T248, the Toiku 248 allele; YH, the Yukihomeare allele.

²ND: no data.

摘 要

1) 「ユキホマレ」の裂開粒は圃場において開花後 14～21 日頃の低温によって生じることが明らかにした.

2) 「ユキホマレ」「トヨムスメ」は裂開粒が発生しやすいのに対し, 「トヨホマレ」「十育 238 号」は裂開粒が発生しにくく, 裂開粒発生の多少には品種間差があることを明らかにした.

3) 人工気象室を用いて開花 10 日後から 21 日間の低温処理を行うことによって, 2) の品種間差を再現する低温裂開抵抗性検定法を開発した.

4) 3) の方法を用いて, 低温裂開抵抗性が強い「十育 248 号」と弱い「ユキホマレ」の組換え自殖系統群を用いて, 低温裂開抵抗性に関与する 2 つの QTLs ($qCS8-1$, $qCS11-1$) を検出した.

5) $qCS8-1$ および $qCS11-1$ の準同質遺伝子系統を育成し, 2 つの QTLs の効果を検証した.

6) $qCS8-1$ の近傍には着色程度の QTL, $qCS11-1$ の近傍には百粒重の QTL を検出したが, 「十育 248 号」型で着色抵抗性が強くなる効果, 百粒重が重くなる効果であり, 両 QTLs 近傍には不良形質の連鎖は見られなかった.

7) ポーランド品種「Polan」と「Progres」を育種に用いて、早熟かつ開花期耐冷性の強い系統を開発することができた.

8) 「ユキホマレ」とポーランド品種「Progres」の組合せから育成した「十育 251 号」は「ユキホマレ」よりも早熟で、「ユキホマレ」と同等の収量性を持つことを明らかにした. 「十育 251 号」は分枝莢数を多くすることにより、早熟でも収量性を維持していると推定された.

9) 「十育 251 号」の早熟性には熟性遺伝子座 *E8* が関与することを明らかにした. 「十育 251 号」型の *e8* 座は、開花期には影響を与えず、成熟期を早くする効果を持つ.

10) 「十育 251 号」の開花期耐冷性には、熟性遺伝子 *E1-E4* および *E8* は関与していないことを明らかにした.

Summary

Studies on tolerance to seed cracking under chilling temperature and early maturity in soybean (*Glycine max*)

Naoya Yamaguchi

In Hokkaido, northern Japan, soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] crops are damaged by cold weather. Chilling temperatures result in the appearance of cracked seeds (CS) in soybean crops, especially those grown in eastern and northern Hokkaido. The seed coats of CSs are severely split on the dorsal side, and the cotyledons are exposed and frequently separated. The occurrence of CSs causes unstable production because these seeds have no commodity value. However, little is known about the CS phenomenon such as physiological mechanism of CS, inheritance model of tolerance to seed cracking, and so on.

Early maturity is also an important trait for soybean in Hokkaido where the growing period is restricted because of the short fall season and early snowfall. Development of an early-maturing line without decreased seed yield is difficult because of the positive correlation between days to maturity and seed yield. Recently, exotic germplasms have been recognized as a source of new alleles that can improve yield. Polish cultivars have been considered as useful exotic germplasms because they exhibit climate-specific characteristics such as tolerance to a long daylight period and tolerance to chilling temperatures.

The aims of this study were to develop a method to select CS-tolerant lines, to identify the quantitative trait loci (QTL) associated with CS tolerance, and to develop the early-maturing lines derived from the crosses between Japanese and Polish cultivars.

1) The average temperature 14 to 21 days after flowering was negatively correlated with the rate of CS. The varietal differences in CS tolerance were observed in field tests. ‘Toyohomare’ and ‘Toiku 238’ were more CS-tolerant than ‘Yukihomare’ (YH) and ‘Toyomusume’. A selection method in which plants were subjected to a 21-day chilling-temperature treatment from 10 days after flowering in a phytotron was developed. This enabled comparisons of CS tolerance among cultivars.

2) A recombinant inbred line population was bred from a cross between a CS-tolerant breeding line, Toiku 248 (T248), and a CS-sensitive cultivar, YH. Two stable QTLs, *qCS8-1* and *qCS11-1*, were identified by QTL analysis using the cracked-seed index (CSI), the arcsine transformed CS ratio. Two pairs of near-isogenic lines (NILs) were bred for the *qCS8-1* and *qCS11-1* loci to validate the effects of the QTLs. The CSIs of the NILs with the T248 allele were significantly lower than those with the YH allele at both the *qCS8-1* and *qCS11-1* loci. The T248 alleles at *qCS8-1* and *qCS11-1* had no negative influence on flowering time or other agronomic traits in the NILs.

3) Two breeding lines, Tokei 1067 (T1067) and Toiku 251 (T251), that were derived from crosses between Japanese and Polish cultivars, were developed. T1067 and T251 had a significantly earlier maturing time than YH. The seed yield of T251 was similar to that of YH. The chilling tolerance levels of the T1067 and T251 lines at the flowering stage were greater than the tolerance level of YH. The *E1-E4* genotypes of YH and T251 were both estimated as *e1-nl/e2/E3/e4*, which indicated the presence of other genetic factors for early maturity in T251, rather than the *E1*, *E2*, *E3*, and *E4* loci. Moreover, the three candidate genomic regions for early maturity in T251 were identified using the simple sequence repeat markers. The RIL population

and NILs derived from a cross T248×T251 were used for the validation of the effects of the *E8* locus. The maturing time of the NILs with the T251 allele was significantly shorter than that with the T248 allele at the *E8* locus. These results indicate that the *E8* locus is one of the genetic factors for early maturity in T251.

From the above, it is possible to develop the early-maturing cultivars with tolerance to seed cracking using the selection method, the DNA markers and the breeding lines derived from the crosses between Japanese and Polish cultivars.

引用文献

- Alcivar, A., J. Jacobsen, J. Rainho, K. Meksem, D. Lightfoot and M. Kassem (2007) Genetic analysis of soybean plant height, hypocotyl and internode lengths. *J. Ag. Food and Env. Sci.* 1: 1–20.
- Benitez, E.R., H. Funatsuki, Y. Kaneko, Y. Matsuzawa, S.W. Bang and R. Takahashi (2004) Soybean maturity gene effects on seed coat pigmentation and cracking in response to low temperatures. *Crop Sci.* 44: 2038–2042.
- Bernard, R.L. (1971) Two major genes for time of flowering and maturity in soybeans. *Crop Sci.* 11: 242–244.
- Brim, C.A. (1966) A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Sci.* 6: 220.
- Bonato, E.R. and N.A. Vello (1999) E6, a dominant gene conditioning early flowering and maturity in soybeans. *Genet. Mol. Biol.* 22: 229–232.
- Buzzell, R.I. (1971) Inheritance of a soybean flowering response to fluorescent-daylength conditions. *Can. J. Genet. Cytol.* 13: 703–707.
- Buzzell, R.I. and H.D. Voldeng (1980) Inheritance of insensitivity to long daylength. *Soybean Genet. Newsl.* 7: 26–29.
- Civello, P.M., L.T. Powell, A. Sabehat and A.B. Bennett (1999) An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* 121: 1273–1279.
- Cober, E.R., J.W. Tanner and H.D. Voldeng (1996) Genetic control of photoperiod response in early-maturing near-isogenic soybean lines. *Crop Sci.* 36: 601–605.
- Cober, E.R. and H.D. Voldeng (2001) A new soybean maturity and photoperiod-sensitivity locus linked to E1 and T. *Crop Sci.* 41: 698–701.
- Cober, E.R., S.J. Molar, M. Charette and H.D. Voldeng (2010) A new locus for early maturity in soybean. *Crop Sci.* 50: 524–527.

- Cober, E.R. and H.D. Voldeng (2012) A retrospective look at short-season soybean cultivar development in Ontario. *Can. J. Plant Sci.* 92: 1239–1243.
- Cosgrove, D.J., L.C. Li, H.T. Cho, S. Hoffmann-Benning, R.C. Moore and D. Blecker (2002) The growing world of expansins. *Plant Cell Physiol.* 43: 1436–1444.
- Fehr, W.R., C.E. Caviness, D.T. Burmood and J.S. Pennington (1971) Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merr. *Crop Sci.* 11: 929–931.
- Funatsuki, H., H. Kurosaki, T. Murakami, S. Matsuba, K. Kawaguchi, K. Yumoto and Y. Sato (2003) Deficiency of a cytosolic ascorbate peroxidase associated chilling tolerance in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 106: 494–502.
- Funatsuki, H., S. Matsuba, K. Kawaguchi, T. Murakami and Y. Sato (2004) Methods for evaluation of soybean chilling tolerance at the reproductive stage under artificial climatic conditions. *Plant Breed.* 123: 558–563.
- Funatsuki, H., K. Kawaguchi, S. Matsuba, Y. Sato and M. Ishimoto (2005) Mapping of QTL associated with chilling tolerance during reproductive growth in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 111: 851–861.
- Funatsuki, H. and S. Ohnishi (2009) Recent advances in physiological and genetic studies on chilling tolerance in soybean. *JARQ-Jpn. Agr. Res. Q.* 43: 95–101.
- Gass, T., A. Shori, A. Fossati, A. Soldati and P. Stamp (1996) Cold tolerance of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during the reproductive phase. *Eur. J. Agron.* 5: 71–88.
- Githiri, S.M., D. Yang, N.A. Khan, D. Xu, T. Komatsuda and R. Takahashi (2007) QTL analysis of low temperature-induced browning in soybean seed coats. *J. Hered.* 98: 360–366.
- Ha, B.K., H.K. Kim, and S.T. Kang (2012) Mapping QTLs with epistatic effects and QTL-by-environment interactions for seed coat cracking in soybeans. *Euphytica* 186: 933–942.

- 萩原誠司・大西志全・白井滋久・山崎敬之・鈴木千賀（2003）2003 年の冷害年における十勝管内の大豆生育. 育種・作物学会北海道談話会報. 44: 39–40.
- 萩原誠司・白井滋久・湯本節三・松川勲・山崎敬之・鈴木千賀・大西志全・田中義則・黒崎英樹・角田征仁（2009）低温抵抗性でイソフラボン含量が高いダイズ品種「ゆきびりか」の育成. 育種学研究. 11（別2）: 129.
- Hudcovicová, M. and J. Kraic (2003) Utilisation of SSRs for characterization of the soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic resources. Czech J. Genet. Plant Breed. 39: 120–126.
- Hwang, T.Y., T. Sayama, M. Takahashi, Y. Takada, Y. Nakamoto, H. Funatsuki, H. Hisano, S. Sasamoto, S. Sato, S. Tabata, I. Kono, M. Hoshi, M. Hanawa, C. Yano, Z. Xia, K. Harada, K. Kitamura and M. Ishimoto (2009) High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean. DNA Res. 16: 213–215.
- Ikeda, T., S. Onishi, M. Senda, T. Miyoshi, M. Ishimoto, K. Kitamura and H. Funatsuki (2009) A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). Theor. Appl. Genet. 118: 1477–1488.
- Kasai, A., K. Kasai, S. Yumoto and M. Senda (2007) Structural features of *GmIRCHS*, candidate of the *I* gene inhibiting seed coat pigmentation in soybean: implications for inducing endogenous RNA silencing of chalcone synthase genes. Plant Mol. Biol. 64: 467–479.
- Kasai, A., S. Ohnishi, H. Yamazaki, H. Funatsuki, T. Kurauchi, T. Matsumoto, S. Yumoto and M. Senda (2009) Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean. Plant Cell Physiol. 50: 1090–1098.
- Kasai, S., H. Hayama, Y. Kashimura, S. Kudo and Y. Osanai (2008) Relationship between fruit cracking and expression of the expansin gene *MdEXPA3* in 'Fuji' apples (*Malus domestica* Borkh.) Sci. Hortic. 116: 194–198.

- Kato, S., T. Sayama, K. Fujii, S. Yumoto, Y. Kono, T.Y. Hwang, A. Kikuchi, Y. Takada, Y. Tanaka, T. Shiraiwa and M. Ishimoto (2014) A major and stable QTL associated with seed weight in soybean across multiple environments and genetic backgrounds. *Theor. Appl. Genet.* 127: 1365–1374.
- Kim, K.S., B.W. Diers, D.L. Hyten, M.A. Rouf Mian, J.G. Shannon and R.L. Nelson (2012) Identification of positive yield QTL alleles from exotic soybean germplasm in two backcross populations. *Theor. Appl. Genet.* 125: 1353–1369.
- 小林聡・山口直矢・品田博史・三好智明（2013）北海道ダイズ育成系統における成熟期を考慮した収量性評価. 育種・作物学会北海道談話会報. 54: 69–70.
- Komatsu, K., T.Y. Hwang, M. Takahashi, T. Sayama, H. Funatsuki, N. Oki and M. Ishimoto (2012) Identification of QTL controlling post-flowering period in soybean. *Breed. Sci.* 61: 646–652.
- Kong, F., H. Nan, D. Cao, Y. Li, F. Wu, J. Wang, S. Lu, X. Yuan, Cober E.R., J. Abe and B. Liu (2014) A new dominant gene *E9* conditions early flowering and maturity in soybean. *Crop Sci.* 54: 2529–2535.
- Konieczny, G. and Y. Shimamoto (1989) New Polish soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes as potential cross components for selecting early ripening forms. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 64: 35–42.
- Kurosaki, H. and S. Yumoto (2003) Effects of low temperature and shading during flowering on the yield components in soybeans. *Plant Prod. Sci.* 6: 17–23.
- Kurosaki, H., S. Yumoto and I. Matsukawa (2003) Pod setting pattern during and after low temperature and the mechanism of cold-weather tolerance at the flowering stage of soybeans. *Plant Prod. Sci.* 6: 247–254.
- Kurosaki, H., S. Yumoto and I. Matsukawa (2004) Correlation of cold-weather tolerance with

- pubescence color and flowering time in yellow hilum soybeans in Hokkaido. *Breeding Sci.* 54: 303–311.
- Lee, S.H., M.A. Bailey, M.A.R. Mian, E.R. Shipe, D.A. Ashley, W.A. Parrott, R.S. Hussey and H.R. Boerma. Identification of quantitative trait loci for plant height, lodging, and maturity in a soybean population segregating for growth habit. *Theor. Appl. Genet.* 92: 516–523.
- Li, D., T.W. Pfeiffer and L. Cornelius (2008) Soybean QTL for yield and yield components associate with *Glycine soja* alleles. *Crop Sci.* 48: 571–581.
- Liang, H., Y. Yu, S. Wang, Y. Lian, T. Wang, Y. Wei, P. Gong, X. Liu, X. Fang, and M. Zhang (2010) QTL mapping of isoflavone, oil and protein contents in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Ag. Sci. China* 9: 1108–1116.
- Lincoln, S.E., M.J. Daly and E.S. Lander (1993) MAPMAKER/EXP. Whitehead Institute of Biomedical Research, Cambridge, MA.
- Liu, B., A. Kanazawa, H. Matsumura, R. Takahashi, K. Harada and J. Abe (2008) Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of phytochrome A gene. *Genetics* 180: 995–1007.
- Liu, S., P.K. Kandoth, S.D. Warren, G. Yeckel, R. Heinz, J. Alden, C. Yang, A. Jamai, T. El-Mellouki, P.S. Juvala, J. Hill, T.J. Baum, S. Cianzio, S.A. Whitham, D. Korkin, M.G. Mitchum and K. Meksem (2012) Soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature* 492: 256–260.
- Manavalan, L.P., S.J. Prince, T.A. Musket, J. Chaky, R. Deshmukh, T.D. Vuong, L.Somg, P.B. Cregan, J.C. Nelson, J.G. Shannon, J.E. Specht and H.T. Nguyen (2015) Identification of novel QTL governing root architectural traits in an interspecific Soybean population. *PLoS ONE* 10(3): e0120490. doi:10.1371/journal.pone.0120490
- 松川勲（1994）平成 5 年北海道における農作物異常気象災害に関する緊急調査報告書

- 畑作編. 北海道立農業試験場資料. 23: 36–41.
- McBlain, B.A. and D.J. Hume (1980) Physiological studies of higher yields in new, early-maturing soybean cultivars. *Can. J. Plant Sci.* 60: 1315–1326.
- McBlain, B.A. and R.L. Bernard (1987) A new gene affecting the time of flowering and maturity in soybeans. *J. Hered.* 78: 160–162.
- McBlain, B.A., J.D. Hesketh and R.L. Bernard (1987) Genetic effects on reproductive phenology in soybean isolines differing in maturity genes. *Can. J. Plant Sci.* 67: 105–116.
- McQueen-Mason, S., D.M. Durachko and D.J. Cosgrove (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *Plant Cell* 4: 1425–1433.
- Morrison, M.J., L.N. Pietrzak, and H.D. Voldeng (1998) Soybean seed coat discoloration in cool-season climates. *Agron. J.* 92: 471–474.
- Morrison, M.J., H.D. Voldeng and E.R. Cober (2000) Agronomic change from 58 years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. *Agron. J.* 92: 780–784.
- Nelson, R.L. and E.O.C. Johnson (2012) Registration of the high-yielding soybean germplasm line LG04-6000. *J. Plant Reg.* 6: 212–215.
- 大西志全・黒崎英樹・湯本節三 (2004) 耐冷性品種「Labrador」の開花様式を有するダイズ系統の育成. 育種・作物学会北海道談話会報. 45: 87–88.
- 大西志全・山崎敬之・三好智明・田中義則 (2007) ダイズ裂開粒の発生要因の解明と品種間差. 育種・作物学会北海道談話会報. 48: 99–100.
- Ohnishi, S., T. Miyoshi and S. Shirai (2010) Low temperature stress at different flower developmental stages affects pollen development, pollination, and pod set in soybean. *Environ. Exp. Bot.* 69: 56–62.
- Ohnishi, S., H. Funatsuki, A. Kasai, T. Kurauchi, N. Yamaguchi, T. Takeuchi, H. Yamazaki, H. Kurosaki, S. Shirai, T. Miyoshi, H. Horita and M. Senda (2011) Variation of *GmIRCHS*

- (*Glycine max* inverted-repeat *CHS* pseudogene) is related to tolerance of low temperature-induced seed coat discoloration in yellow soybean. *Theor. Appl. Genet.* 122: 633–642.
- 大西志全 (2012) ダイズの生殖生長期間における低温並びにウイルス感染による障害発生機作の解析. 北海道大学博士論文. 6819.
- 大西志全・鴻坂扶美子・藤田正平 (2012) 近年の北海道ダイズ育成系統の収量性と外来遺伝資源の導入効果の検証. 育種・作物学会北海道談話会報. 53: 65–66.
- 岡啓・高橋幹・王連敏 (1989) 白目大豆のへそ周辺着色粒の発生に及ぼす低温時期と期間の影響. 育種・作物学会北海道談話会報. 29: 22.
- Ooijen, J.W. (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theor. Appl. Genet.* 84: 803–811.
- Oyoo, M.E., E.R. Benitez, H. Kurosaki, S. Ohnishi, T. Miyoshi, C. Kiribuchi-Otobe, A. Horigane and R. Takahashi (2011) QTL analysis of soybean seed coat discoloration associated with II TT genotype. *Crop Sci.* 51: 464–469.
- Palomeque, L., L. Li-Jun, W. Li, B. Hedges, E.R. Cober and I. Rajcan (2009a) QTL in mega-environments: I. Universal and specific seed yield QTL detected in a population derived from a cross of high-yielding adapted × high-yielding exotic soybean lines. *Theor. Appl. Genet.* 119: 417–427.
- Palomeque, L., L. Li-Jun, W. Li, B. Hedges, E.R. Cober and I. Rajcan (2009b) QTL in mega-environments: II. Agronomic trait QTL co-localized with seed yield QTL detected in a population derived from a cross of high-yielding adapted × high-yielding exotic soybean lines. *Theor. Appl. Genet.* 119: 429–436.
- Park, S.J. and N.R. Bradner (1988) KG 30 soybean. *Can. J. Plant. Sci.* 68: 215–216.
- Rodriguez, T.O., F.R. Rodas, M.E. Oyoo, M. Senda and R. Takahashi (2013) Inverted repeat of

- chalcone synthase 3 pseudogene is associated with seed coat discoloration in soybean. *Crop Sci.* 53: 518–523.
- Rose, J.K., D.J. Cosgrove, P. Albersheim, A.G. Darvill and A.B. Bennett (2000) Detection of expansin proteins and activity during tomato fruit ontogeny. *Plant Physiol.* 123: 1583–1592.
- Ruan, Y.L., D.J. Llewellyn and R.T. Furbank (2001) The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell* 13: 47–60.
- Saindon, G., W.D. Beversdorf and H.D. Voldeng (1989) Adjustment of the soybean phenology using the *E4* locus. *Crop Sci.* 29: 1361–1365.
- 三分一敬 (1979) 大豆の耐冷性に関する育種学的研究. 北海道立農業試験場報告. 28: 1–57.
- 佐々木紘一・砂田喜興志・土屋武彦・酒井真次・紙谷元一・伊藤武・三分一敬 (1988) だいでず新品種「トヨムスメ」の育成について. 北海道立農業試験場集報. 57: 1–12.
- 佐々木紘一・砂田喜興志・紙谷元一・伊藤武・酒井真次・土屋武彦・白井和栄・湯本節三・三分一敬 (1990) だいでず新品種「トヨコマチ」の育成について. 北海道立農業試験場集報. 60: 45–58.
- Sayama, T., T.Y. Hwang, H. Yamazaki, N. Yamaguchi, K. Komatsu, M. Takahashi, C. Suzuki, T. Miyoshi, Y. Tanaka, Z. Xia, Y. Tsubokura, S. Watanabe, K. Harada, H. Funatsuki and M. Ishimoto (2010) Mapping and comparison of quantitative trait loci for soybean branching phenotype in two locations. *Breed. Sci.* 60: 380–389.
- Sayama, T., T.Y. Hwang, K. Komatsu, Y. Takada, M. Takahashi, S. Kato, H. Sasama, A. Higashi, Y. Nakamoto, H. Funatsuki and M. Ishimoto (2011) Development and application of a whole-genome simple sequence repeat panel for high-throughput genotyping in soybean. *DNA Res.* 18: 107–115.

佐山貴司・加賀秋人・渡辺啓史・羽鹿牧太・山田哲也・高橋浩司・菱沼亜衣・石本政男

(2015) ダイズの開花期関連遺伝子型構成の改変による収量性向上の可能性. 育種学研究. 17 (別 1) : 137.

Schori, A., A. Fossati, A. Soldati and P Stamp (1993) Cold tolerance in soybean (*Glycine max* L. Merr.) in relation to flowering habit, pod set and compensation for lost reproductive organs. Eur. J. Agron. 2: 173–178.

Senda, M., C. Masuta, S. Ohnishi, K. Goto, A. Kasai, T. Sano, J.S. Hong and S. MacFarlane (2004) Patterning of virus-infected *Glycine max* seed coat is associated with suppression of endogenous silencing of chalcone synthase genes. Plant Cell 16: 807–818.

Senda, M., T. Kurauchi, A. Kasai and S. Ohnishi (2012) Suppressive mechanism of seed coat pigmentation in yellow soybean. Breed. Sci. 61: 520–530.

千田峰生・平岡未帆・山口直矢 (2015) ダイズ低温裂開を引き起こす低温処理開始時期についての検討. 育種学研究. 17 (別 1) : 17.

SoyInfo Center (2007) History of soybeans and soyfoods in Europe (incl. Eastern Europe and the USSR (1597 - Mid 1980s). Part5.

(<http://www.soyinfocenter.com/HSS/europe5.php>)

Srinivasan, A., and J. Arihara (1994) Soybean seed discoloration and cracking in response to low temperatures during early reproductive growth. Crop Sci. 34: 1611–1617.

Szyrmer, J. and L. Boros (1996) Progress in breeding and introduction into cultivation new soybean cultivars. Biuletyn IHAR N 198: 5–12.

鈴木千賀・竹内徹・木口忠彦・山口直矢・三好智明・大西志全 (2010) ダイズの低温着色抵抗性とシストセンチュウレース 1 抵抗性を合わせ持つ系統の選抜. 育種学研究. 12 (別 1) : 152.

Suzuki, C., Y. Tanaka, T. Takeuchi, S. Yumoto and S. Shirai (2012) Genetic relationships of

- soybean cyst nematode resistance originated in Gedenshirazu and PI84751 on *Rhg1* and *Rhg4* loci. *Breed. Sci.* 61: 602–607.
- 田中義則（1997）異常気象と畑作物生産に関する調査報告書. 北海道立農業試験場資料. 29: 34–41.
- 田中義則・富田謙一・湯本節三・黒崎英樹・山崎敬之・鈴木千賀・松川勲・土屋武彦・白井和栄・角田征仁（2003）だいず新品種「ユキホマレ」の育成について. 北海道立農業試験場集報. 84: 13–24.
- 田中義則・白井滋久・湯本節三・松川勲・萩原誠司・黒崎英樹・山崎敬之・鈴木千賀・大西志全・角田征仁（2015）ダイズ新品種「トヨハルカ」の育成. 北海道立総合研究機構農業試験場集報. 99: 47-60.
- Takahashi, R. and J. Abe (1994) Genetic and linkage analysis of low temperature-induced browning in soybean seed coats. *J. Hered.* 85: 447–450.
- Takahashi, R. (1997) Association of soybean genes *I* and *T* with low-temperature induced seed coat deterioration. *Crop Sci.* 37: 1755–1759.
- Takahashi, R. and J. Abe (1999) Soybean maturity genes associated with seed coat pigmentation and cracking in response to low temperatures. *Crop Sci.* 39: 1657–1662.
- Takahashi, R., E.R. Benitez, H. Funatsuki and S. Ohnishi (2005) Soybean maturity and pubescence color genes improve chilling tolerance at high latitude regions. *Crop Sci.* 45: 1387–1393.
- 田坂恭嗣（2013）根域の環境調節による根菜類の水耕栽培技術の開発. 科学研究費助成事業研究成果報告書.
(<https://kaken.nii.ac.jp/pdf/2012/seika/F-19/82626/23658037seika.pdf>)
- Toda, K., D. Yang, N. Yamanaka, S. Watanabe, K. Harada and R. Takahashi (2002) A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray

- pubescence color. *Plnat Mol. Biol.* 50: 187–196.
- Toda, K., R. Takahashi, T. Iwashima and M. Hajika (2011) Difference in chilling-induced flavonoid profiles, antioxidant activity and chilling tolerance between soybean near-isogenic lines for the pubescence color gene. *J. Plnat Res.* 124: 173–182.
- Tsubokura, Y., H. Matsumura, M. Xu, B. Liu, H. Nakashima, T. Anai, F. Kong, X. Yuan, H. Kanamori, Y. Katayose, R. Takahashi, K. Harada and J. Abe (2013) Genetic variation in soybean at the maturity locus *E4* is involved in adaptation to long days at high latitudes. *Agronomy* 3: 117–134.
- Tsubokura, Y., S. Watanabe, Z. Xia, H. Kanamori, H. Yamagata, A. Kaga, Y. Katayose, J. Abe, M. Ishimoto and K. Harada (2014) Natural variation in the genes responsible for maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean. *Annals of Botany* 113: 429–441.
- 角田征仁・黒崎英樹・湯本節三・田中義則・松川勲（1993）大豆における 1993 年冷害の被害状況と今後の育種戦略 第 1 報 十勝農試作況による被害型の解析. 育種・作物学会北海道談話会報. 34: 36–37.
- Tuinstra, M.R., G. Ejeta, and P.B. Goldsbrough (1997) Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1005–1011.
- Wang, S., C.J. Basten and Z.B. Zeng (2007) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
(<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)
- Watanabe, S., R. Hideshima, Z. Xia, Y. Tsubokura, S. Sato, Y. Nakamoto, N. Yamanaka, R. Takahashi, M. Ishimoto, T. Anai, S. Tabata and K. Harada (2009) Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3*. *Genetics* 182: 1251–1261.
- Watanabe, S., Z. Xia, R. Hideshima, Y. Tsubokura, S. Sato, N. Yamanaka, R. Takahashi, T. Anai,

- S. Tabata, K. Kitamura and K. Harada (2011) A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics* 188: 395–407.
- Xia, Z., S. Watanabe, T. Yamada, Y. Tsubokura, H. Nakashima, H. Zhai, T. Anai, S. Sato, T. Yamazaki, S. Lü, H. Wu, S. Tabata and K. Harada (2012) Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 2155–2164.
- Yamada, T., M. Hajika, N. Yamada, K. Hirata, A. Okabe, N. Oki, K. Takahashi, K. Seki, K. Okano, Y. Fujita, A. Kaga, T. Shimizu, T. Sayama and M. Ishimoto (2012) Effects on flowering and seed yield of dominant alleles at maturity loci *E2* and *E3* in a Japanese cultivar, Enrei. *Breed. Sci.* 61: 653–660.
- 山口直矢・鈴木千賀・萩原誠司・三好智明・田中義則（2010）2010 年の高温が十勝地方のダイズ収量に与えた影響. 育種・作物学会北海道談話会報. 51: 85–86.
- Yamaguchi, N., T. Sayama, H. Yamazaki, T. Miyoshi, M. Ishimoto and H. Funatsuki (2014) Quantitative trait loci associated with lodging tolerance in soybean cultivar ‘Toyoharuka’. *Breed. Sci.* 64: 300–308.
- 山口直矢・三好智明・萩原誠司・鈴木千賀・小谷野茂和・白井滋久・湯本節三・田中義則・黒崎英樹・山崎敬之・大西志全（2014）豆腐加工適性と耐冷性に優れる大豆新品種「とよみづき」の育成. 育種学研究. 16（別 2）: 126.
- 山口直矢・黒崎英樹・青山聡・石本政男・三好智明・千田峰生（2015a）ポーランドのダイズ品種を用いた早生耐冷性系統の開発と早生に関与するゲノム領域の推定. 育種学研究. 17（別 1）: 16.
- 山口直矢・大西志全・三好智明（2015b）海外ダイズ品種の開花期耐冷性スクリーニング. 育種・作物学会北海道談話会報.（印刷中）

- 山本正・成河智明（1966）豆類冷害の作物生態的解析. 昭和 39 年度冷害調査報告. 農林水産技術会議事務局. 161-180.
- Yamanaka, N., S. Ninomiya, M. Hoshi, Y. Tsubokura, M. Yano, Y. Nagamura, T. Sasaki and K. Harada (2001) An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. *DNA Res.* 8: 61–72.
- Yamanaka, N., S. Watanabe, K. Toda, M. Hayashi, H. Fuchigami, R. Takahashi and K. Harada (2005) Fine mapping of the *FT1* locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a recombinant inbred line. *Theor. Appl. Genet.* 110: 634–639.
- 湯本節三・佐々木紘一（1990）白目大豆の低温処理による着色粒発生程度の検定. 育種・作物学会北海道談話会報. 30: 39.
- 湯本節三・松川勲・田中義則・黒崎英樹・角田征仁・土屋武彦・白井和栄・富田謙一・佐々木紘一・紙谷元一・伊藤武・酒井真次（1995）ダイズ新品種「トヨホマレ」の育成について. 北海道立農業試験場集報. 68: 33–49.
- 湯本節三・田中義則・黒崎英樹・山崎敬之・鈴木千賀・松川勲・土屋武彦・白井和栄・富田謙一・佐々木紘一・紙谷元一・伊藤武・酒井真次・角田征仁（2000）ダイズ新品種「ハヤヒカリ」の育成について. 北海道立農業試験場集報. 78: 19–37.
- Zabala, G. and L.O. Vodkin (2003) Cloning of the pleiotropic *T* locus in soybean and two recessive alleles that differentially affect structure and expression of the encoded flavonoid 3' hydroxylase. *Genetics* 163: 295–309.
- Zeng, Z. B (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. *Genet.* 136: 1457–1468.
- Zhang, W.K., Y.J. Wang, G.Z. Luo, J.S. Zhang, C.Y. He, X.L. Wu, J.Y. Gai and S.Y. Chen (2004) QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 1131–1139.
- Zhu, Y., N. Wu, W. Song, G. Yin, Y. Qin, Y. Yan and Y. Hu (2014) Soybean (*Glycine max*)

expansin gene superfamily origins: segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies. BMC Plant Biol. 14: 93.

謝 辞

本論文を執筆するにあたって、懇切丁寧なご指導を賜った北海道大学大学院農学研究院教授の増田税博士、阿部純博士、講師の犬飼剛博士に謝意を表したい。

本研究を進める上で、農業生物資源研究所ダイズゲノム育種研究ユニットの石本政男博士、加賀秋人博士、田口文緒博士、佐山貴司博士、弘前大学農学生命科学部教授の千田峰生博士、准教授の川崎通夫博士、助教の前多隼人博士、北海道農業研究センターの船附秀行博士（現：近畿中国四国農業研究センター）、小松邦彦博士（現：農林水産省）、北海道立総合研究機構・中央農試の藤田正平博士、鴻坂扶美子氏（現：十勝農試）、山下陽子氏、北見農試の青山聡氏、十勝農試の三好智明氏、萩原誠司氏（現：北見農試）、黒崎英樹博士（現：中央農試）、山崎敬之氏（現：道総研本部）、鈴木千賀氏（現：中央農試）、大西志全博士（現：北見農試）、小林聡氏、品田博史博士には多くのご助言を頂いた。特に石本博士と千田博士には投稿論文の執筆について懇切丁寧にご指導頂いた。皆様にはこの場を借りて御礼申し上げたい。また、学位論文の執筆にあたって激励いただいたカルピス株式会社研究戦略部長の山本直之博士、十勝農試場長の柳沢朗氏、部長の高宮泰宏氏、研究主幹の島田尚典氏、田中義則氏に心より御礼申し上げたい。

十勝農試での圃場試験および人工気象室を用いた試験が実施できたのは、十勝農試の研究支援チームおよび契約職員の皆様のおかげであり、謝意を表したい。本研究で行った DNA マーカー実験の大部分は、道総研の国内研修制度において、2012 年 12 月から 2013 年 3 月の期間に農業生物資源研究所で実施した。外来研究員として受け入れて頂いた農業生物資源研究所の石本博士に重ねて感謝の意を表したい。また、研修期間中に不在となることをご配慮頂いた十勝農試の三好氏、萩原氏に御礼申し上げたい。

本論文の一部は、農林水産省ゲノム情報を活用した農畜産物の次世代生産基盤技術の開発プロジェクト（SFC1006）の支援により行ったものである。

最後に、研究を進める上で家族として支えてくれた、るみ子、蒼に感謝したい。