

## 第1章 緒論

### 第1節 低温がダイズに与える影響

ダイズ (*Glycine max* L. Merr.) は日本を含む熱帯から亜寒帯まで様々な地域で作付けされている作物であるが、冷涼な地域ではその収量はしばしば低温の影響を受ける。これはダイズが比較的温暖な気候を好み、低温により生育遅延、莢数の減少、子実の充実・登熟不良などを生じることによる(斎藤・高沢 1962, 三分一 1979, 後藤・山本 1972, 佐々木・紙谷 1984, 角田ら 1993, 松川ら 1993, Hashimoto and Yamamoto 1976, Hume and Jackson 1981, Musser et al 1986, Kurosaki and Yumoto 2002, Funatsuki et al 2004, Ikeda et al 2009)。このため、冷涼な地域ではダイズの耐冷性育種は重要であり、日本、ヨーロッパを含む各地でダイズの耐冷性に関する様々な研究が行われてきた。三分一(1979)は、冷害年および冷涼地における減収程度の解析から、低温下での着莢能力の重要性を見出した。黒崎・松川(1994)は人工気象室を用いた試験で、低温下での着莢能力の重要性を確認するとともに低温処理期間終了後の開花数・着莢数の回復程度に品種間差異があることを明らかにした。スイスの研究グループによって、中心花房と側状花房の開花のずれが大きく開花期間が長い方が補償効果の点で有利であるとする説が提唱されており(Schori et al 1993, Gass et al 1996)、北海道でも同形質の導入が図られている(大西ら 2004)。毛茸色を決定する *T* 遺伝子座において *T* アリル(褐毛)をもつ品種は *t* アリル(白毛)の品種より耐冷性が強いが(Takahashi and Asanuma 1996)、これは *T* アリルがコードする Flavonoid 3'-hydroxylase (Toda et al 2002, Zabala and Vodkin 2003)によって合成されるフラボノイドの抗酸化力によると考えられている(Toda et al 2011)。また、機作は不明であるが栄養生長量を決定する熟性遺伝子座 *EI* において、野生型である *EI* アリルをもつ品種の方が耐冷性が優れる(Funatsuki et al 2005, Takahashi et al 2005)。低温条件下での登熟能力も耐冷性の品種間差において重要な役割を果たしていることが知られており、臍色を決定している *I* 遺伝子座近傍に寄与率の高いQTLが見出されている(Ikeda et al 2009)。

低温による著しい収量の低下は冷害と呼ばれ、ダイズでは受精率・着莢率の低下により莢数が減少する障害

型冷害、生育の遅延により秋期の低温に遭遇し登熟が不良となる生育遅延型冷害、生育初期の低温により生育量が小さくなり莢数が減少する生育不良型冷害の3つに分類されている(佐々木・紙谷 1984)。この中で、障害型冷害は最も被害が大きくなることが多い。1993年の大冷害は障害型冷害であり、十勝管内では子実重が平年の8~23%となる圃場が見られた(角田ら 1993, 松川ら 1993)。

### 第2節 ダイズの低温感受性期

ダイズでは開花前から長期の低温処理をすることにより、花粉側の原因で受精率低下と着莢率低下が起こることが観察されている(後藤・山本 1972, Saito et al 1970, Hashimoto and Yamamoto 1976, Kurosaki et al 2003)。また、低温に遭遇したときの着莢率の低下が少ない品種の方が低温遭遇時の収量低下が小さい(三分一 1979, Lawn and Hume 1985, 黒崎・松川 1994, Gass et al 1996, Kurosaki et al 2003)。しかし、低温に対する感受性を詳細に検討する場合、ダイズにおいてはいくつかの問題がある。ダイズは蕾が非常に小さいため外観から花の生育ステージを定義するのが難しく(Lauxen et al 2003)、さらに同一個体の中で花の生長ステージが同調していない。また、莢間の栄養競合による落莢と低温による着莢障害の区別がつけにくい。こういった理由から、ダイズにおける低温感受性期の詳細については必ずしも十分に解明されていない。

北海道では24,400 haのダイズ作付けがあり、ダイズは輪作体系を維持する上で欠かせない作物である。また、10アールあたりの収量は北海道では240kg前後と府県の1.5倍を超えており生産性が高く、北海道のダイズ生産量は国内生産量の25%を占める(平成22年農林水産省大豆都道府県別生産状況)。また、粒が大きく糖含量が多いなど府県産にはない特徴から、煮豆用途を中心に品質面での評価も高い。一方で北海道は世界的にみても最も低温の影響を受けやすいダイズ栽培地域の1つであり、精力的に耐冷性育種に取り組んできた。現在の耐冷性育種では、人工気象室で開花期から4週間の低温処理を行い、子実重の低下程度を調査し耐冷性を評価しており、この検定法では耐冷性の強い「キタムスメ」

と弱い「トヨムスメ」の品種間差を安定的に再現できる（北海道立十勝農業試験場 1998）。この検定法は、低温処理期間に開花前の花から子実の肥大盛期までの様々なステージを含み、総合的な耐冷性の評価方法と言える。その反面、耐冷性の要素を受精不良、登熟不良など個別の要素に分解して、より深く追求する目的には適さない。さらにこの検定法では、イネで重要視される花粉形成時期の低温感受性がほとんど考慮されていない。ダイズにおいて効率的に耐冷性育種を進めるためには、低温感受性期を特定し、そのステージを対象とした選抜技術を開発することが重要である。また、生殖生長における低温の影響は、イネ（丹野 2004, Hayase et al 1969, Mamun et al 2006）、アズキ（島田 1997, 島田・村田 1994）、トマト（Patterson et al 1987）、オオムギ（Koike et al 2003）、ヒヨコマメ（Srinivasan et al 1998, Srinivasan et al 1999, Clarke and Siddique 2004, Nayyar et al 2005）など様々な作物で研究されており、低温感受性期を作物間で比較することによって新たな知見が得られる可能性がある。

本論文の第 2 章では、障害型冷害の原因である低温による着莢障害について、これまで着莢障害の指標として用いられることが多かった着莢率ではなく、開花直後の莢の伸長の有無の観察により求めた受精率を指標として用いることによって、生殖成長期間における低温感受性期を正確に決定した。また、決定された低温感受性期について品種間差異があるかどうか、およびその品種間差異がダイズ品種耐冷性の向上に寄与するかどうか検討した。併せて、柱頭上の花粉数と葯から採取した花粉粒の形態を観察することにより、生殖成長期間の着莢障害の機作を明らかにした。

### 第 3 節 低温による種皮の着色

低温がダイズに与えるもう 1 つの影響は、低温による種皮の着色である。北海道を含む冷涼地のダイズ栽培では、開花後の低温により子実の臍と、臍の周辺の種皮が褐色に着色し、子実の外観品質が著しく低下する（岡ら 1989, Srinivasan and Arihara 1994, Morrison et al 1998, Funatsuki and Ohnishi 2009）。褐色を呈する色素はカテコールメラミンであることが報告されているが

（Takahashi and Akiyama 1993）、加熱に対して安定であり、乾燥子実のみならず煮豆などに加工した後も着色が消えず、煮豆用途として評価の高い北海道産ダイズにおいては非常に大きな問題である。種皮の低温着色は、開花 5~10 日後の極若い莢が日平均気温 15°C 前後の低温に曝されることにより生じ（湯本・佐々木 1990, 岡ら 1989, Takahashi and Abe 1994, Takahashi 1997）、明瞭な品種間差があることが知られている（湯本・佐々木 1990, Srinivasan and Arihara 1994）。このため、種皮の低温着色に対する抵抗性（以下低温着色抵抗性）は、北海道のダイズ育種において最も重要な育種目標の 1 つである。低温着色抵抗性は、開花始 1 週間後からの 14 日間の人工気象室を使った低温処理（昼 18°C/夜 13°C）によって評価できることが報告されており（湯本・佐々木 1990）、この評価法を活用して「トヨコマチ」（佐々木ら 1990）、「ユキホマレ」（田中ら 2003）、「ユキシズカ」（山崎ら 2004）、「トヨハルカ」（北海道立十勝農業試験場 2004）といった低温着色抵抗性の強い品種が育成されてきた。しかし、人工気象室で年間に評価できる品種数は限られており、DNA マーカーによる選抜など、多くの材料を評価できる選抜手法が求められている。その中で *E1* などの熟性遺伝子や、いくつかの QTL が低温着色抵抗性に関与することが報告されているのは特筆すべきであるが（Takahashi and Abe 1994, Takahashi and Abe 1999, Benitez et al 2004, Githiri et al 2007）育種プログラムの中で活用するには、これらによる低温着色抵抗性の強さは不十分である。

### 第 4 節 種皮の低温着色のメカニズム

低温で種皮に着色が生じる根本的な原因は、黄大豆の種皮色の決定メカニズムにある。ダイズの野生種であるツルマメに見られるようにダイズの種皮色は本来黒色であるが、現在栽培されている多くの品種の種皮色は黄色である。この種皮色の黄色は、種皮における色素合成系のキーエンザイムであるカルコンシンターゼ (*CHS*) をコードする *CHS7*, *CHS8* など複数の遺伝子（以下 *CHS* 遺伝子と表記）の mRNA が RNAi により分解されることにより維持されている（Todd and Vodokin 1996, Kasai et al 2004, Senda et al 2004, Kasai et al 2009,

Kurauchi et al 2009, Tuteja et al 2009) . この種皮における RNAi は *I* 遺伝子座における *I* アレル(種皮, 臍ともに黄白色), *i<sup>i</sup>* アレル(種皮は黄白色で臍は黒または褐色)により引き起こされていると考えられ, いずれも複数コピーの *CHS* 遺伝子が複雑に配置されたものである (Senda et al 2002a, Senda et al 2002b, Tuteja et al 2004, Kasai et al 2007, Kurauchi et al 2009, Tuteja et al 2009) . このうちの *I* アレルは *CHS* をコードする *CHS3* の逆位反復配列を含む構造であることが証明され, *GmIRCHS* (*Glycine max* inverted-repeat *CHS* pseudogene) と命名された (Kasai et al 2007) . また, *i<sup>i</sup>* アレルについては, 全ゲノム配列が報告されている Williams 82 の解析結果から, *CHS* 遺伝子の複雑な高度反復配列であるとされている (Clough et al 2004) . 種皮が黄白色のダイズ種皮 (*I* アレルおよび *i<sup>i</sup>* アレル) においては, 上述の RNAi により, *CHS* 遺伝子に対する siRNA (Kasai et al 2009) が検出される. 種皮の低温着色は, 低温により *I* アレルによる RNAi が一時的に抑制され *CHS* 遺伝子の発現が回復することが原因であるとされており (Kasai et al 2009) , 低温着色抵抗性が弱い「トヨムスメ」では低温処理によって siRNA の蓄積量が減少し *CHS* 遺伝子の mRNA の蓄積量が上昇するが, 低温着色抵抗性が非常に強い「トヨハルカ」(北海道立十勝農業試験場 2004) ではこういった変化が小さく, これが低温着色抵抗性の差となって現れていると推測されている (Kasai et al 2009) . 非常に興味深いことに, 「トヨハルカ」においては上述の *GmIRCHS* の構造が「トヨムスメ」などその他の品種と大きく異なる (Kasai et al 2009) . 「トヨハルカ」では, *GmIRCHS* がもつ逆位反復配列を構成している 2 つの *CHS3* 配列のうちの 1 つが欠損し, 逆位反復配列が解消されているとともに, DnaJ 様タンパク質をコードしている *GmJI* の 5'側の配列が挿入されている (Kasai et al 2009) . この「トヨハルカ」型の *GmIRCHS* の構造は, *CHS* のアンチセンス RNA が検出されることから, *GmASCHS* (*Glycine max* antisense *CHS* pseudogene) と名づけられている (Kasai et al 2009) . *CHS* 遺伝子の siRNA の蓄積量が低温着色および低温着色抵抗性の品種間差と深く関連すること, ダイズ種皮において *GmIRCHS* が *CHS* 遺伝子に対する唯一の siRNA

の供給源であること (Senda et al 2004, Kasai et al 2007, Kurauchi et al 2009) を併せて考えると, この *GmIRCHS* 遺伝子座の多型 (*GmASCHS*) が低温着色抵抗性の原因であるという仮説が考えられるが, Kasai ら (2009) の研究では, この仮説を検証するまでにはいたらなかった. 本論文の第 3 章ではこの仮説を検証するために, 「トヨハルカ」を片親にもつ組換え自殖系統 (RILs: Ricombinatn inbred lines) について *GmIRCHS* の遺伝子型と低温着色抵抗性の強弱を評価し, *GmIRCHS* が低温着色抵抗性の原因遺伝子かどうかを明らかにするとともに, QTL 解析を用いて *GmIRCHS* 以外に低温着色抵抗性に影響を与えるゲノム領域があるかどうかを検証した. また, 異なる遺伝的背景をもつ品種・育成系統を使って, *GmIRCHS* が低温着色抵抗性選抜のための DNA マーカーとして利用可能か検討した.

## 第 5 節 ウイルスの感染による種皮の褐斑

ダイズ種皮の低温着色と類似の現象として, 植物ウイルス感染により生じる褐斑粒が知られている. CMV (キュウリモザイクウイルス), SMV (ダイズモザイクウイルス), あるいは PSV (ピーナッツおい化ウイルス) などに感染した場合, 低温着色と同様に種皮に褐斑を生じる (Kennedy and Kampmeier 1967) . 北海道においては, 上記ウイルスのダイズへの感染頻度が低く大きな問題になることはないが, 東北以南においては褐斑粒が多発するとダイズの商品価値が低くなるため大きな問題となっている. 近年, 栽培ダイズの一般的な種皮色である黄色は RNAi によって保たれていること (Todd and Vodokin 1996, Kasai et al 2004, Senda et al 2004, Kasai et al 2009, Kurauchi et al 2009, Tuteja et al 2009) および CMV, SMV など褐斑を誘導するウイルスは, 宿主の RNAi を抑制するサプレッサーをコードしていることが明らかになってきた (Kasschau and Carrington 1998, Lucy et al 2000, Li and Ding 2001, Guo and Ding 2002) . これらの知見を併せると, SMV, CMV などのウイルスが *CHS* 遺伝子の RNAi を抑制することによって, 褐斑を生じている可能性が考えられる. もしそうであれば, RNAi とウイルスの RNAi サプレッサーの交互作用が, 実際の農業において問題となっている非常に興味深い

事例であるが、これまでウイルス RNAi サプレッサーと褐斑の関係が検証されたことはなかった。本論文の第4章では、ウイルスの RNAi サプレッサーがダイズ種皮の RNAi を抑制することにより種皮に褐斑が生じるという仮説を検証するため、感染により褐斑を生じる CMV ダイズ系統と褐斑を生じないシュードリコンビナント CMV

の間でキメラウイルスを作成し、CMV の褐斑誘導に RNAi サプレッサーである 2b 遺伝子が関わっているかどうかを明らかにした。また、2b 遺伝子のもつ RNAi サプレッサー以外の機能を解明するために、2b 遺伝子が特定のダイズ品種に全身感染するかどうかに関与しているか検証した。

## 第2章 ダイズにおける低温着莢障害の機作および低温感受性の品種間変異の解析

### 第1節 生殖生長期間における低温感受性期の特定

#### 1) 目的

ダイズは北海道のような冷涼な地域においては、しばしば低温により収量が低下する。これは、開花前後の低温により莢数が減少すること、子実の充実・登熟が阻害されることがその大きな要因である(斎藤・高沢 1962, 三分一 1979, 後藤・山本 1972, 佐々木・紙谷 1984, 角田ら 1993, 松川ら 1993, Hashimoto and Yamamoto 1976, Hume and Jackson 1981, Musser et al 1986, Kurosaki and Yumoto 2002, Funatsuki et al 2004, Ikeda et al 2009)。低温による著しい収量の低下は冷害と呼ばれ、ダイズにおいては障害型、生育遅延型、生育不良型の3つに分類されている(佐々木・紙谷 1984)。この中で、障害型冷害は、開花期前後の低温による着莢率の低下や登熟期間中の低温による子実肥大の不良により生じ(後藤・山本 1972, 三分一 1979, 佐々木・紙谷 1984, 角田ら 1993, 松川ら 1993, Hashimoto and Yamamoto 1976, Ikeda et al 2009)、冷害の中で最も被害が大きくなる(角田ら 1993, 松川ら 1993)。耐冷性の強い系統を選抜するため、育種プログラムでは、開花始から28日間低温処理を行う耐冷性検定方法が用いられてきた(北海道立十勝農業試験場 1998)。この検定方法は実用上非常に優れるが、イネで重要視される花粉形成時期の低温感受性がほとんど考慮されていない。このため、ダイズの生殖生長期間における低温感受性について感受性期を明らかにした上で、既存の検定法に加えて別途評価する必要がある。低温に対する感受性期を詳細に検討する場合、ダイズでは蕾が小さいため外観から花の生育ステージを定義するのが難しく(Lauxen et al 2003)、また莢間の栄養競合による落莢と低温による着莢障害の区別がつけにくいなどの問題がある。こういった理由から、ダイズにおける低温感受期の詳細については必ずしも十分に解明されていない。本節では、障害型冷害の原因となる低温による着莢障害について、着莢障害の指標として用いられることの多い着莢率ではなく、開花直後の莢の伸長の有無の観察により求めた受精率を指標として用いて、生殖成長期間における低温感受性期を正確に決定する。併せて、柱頭上の花粉数と葯から採取した花粉粒の形態を観察することにより、生殖成長期間の低温感受性の機作を明らかにする。

#### 2) 材料および方法

##### ダイズの生育条件と低温処理

本研究では、開花期耐冷性の評価が“中”のダイズ品種「トヨムスメ」(Kurosaki and Yumoto 2002)を材料として用いた。植物は2005年に十勝農試場内(芽室町, 42°54'N, 143°2'E)の無加温ガラス室および場内の人工気象室においてポット栽培した。高さ30cm, 直径25cmのワグネルポットに場内の乾性火山性土(前作えん麦)を充填し, 化成肥料(N:0.12g, P<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:1g, K<sub>2</sub>O:0.52g/ポット)を混和した。10粒の種子を播き, 出芽後にポットあたり2個体となるように間引いた。また, 様々なステージの植物体と花を得るために, 播種時期をずらして複数回播種した(表II-1)。それぞれの処理区は4ポット(8個体)×3反復であり, 4ポットのうちの2ポットを受精率および見かけの受精率の調査用とし, 残りの2ポットを柱頭上の花粉数および花粉の形態の調査用として用いた。播種後のポットはガラス室で管理し, 低温処理開始の30日前以降は人工気象室で管理した。低温処理の前後は昼間は25°C(7:00-19:00), 夜間は20°C(19:00-7:00)で自然光のみで管理した。低温処理は7日間行い, 昼間15°C(7:00-19:00)および夜間10°C(19:00-7:00)で, 加えて日射による温度上昇を避けるために, 低温処理中は55%の遮光を行った。対照区は, 低温処理+遮光処理を省略した他は全て同一条件である。人工気象室内では, 条件の局所的な偏りを避けるために, 低温処理中は2日に1回, その他は5日に1回ポットの位置のローテーションを行った。

表 II-1. 各試験区における試験条件

播種日	試験区	低温処理 <sup>†</sup>	開花始
5月23日	1C	無	7月6日
	1T	有	7月6日
5月30日	2C	無	7月13日
	2T	有	7月13日
6月7日	3C	無	7月19日
	3T	有	7月24日
6月13日	4C	無	7月24日
	4T	有	7月28日

<sup>†</sup>低温処理は7月13日～7月20日に行った。

### 莢の伸長、受精率、柱頭上の花粉数および花粉粒の形態の観察

各ポットのサイズに開花した花に日付ごとに異なる色の刺繍糸で目印をつけ、開花後7-12日後前後に莢の伸長の有無を調査した。若莢が少しでも花卉からはみ出ていれば、受精があったとみなし、開花日ごとに受精率 (percentage of fertilized pod) を (伸長のあった莢数) / (調査花数) ×100 で算出した (表 II-2)。成熟後、刺繍糸の色ごとに莢を収穫し、開花日ごとのみかけの受精率 (apparent fertilization rate) を算出した (表 II-2)。芥子粒大の茶色の胚珠の痕跡は、受精していない胚珠とし、それ以外の正常肥大粒、中途生育停止粒、少しでも子葉もしくは種皮の分化が観察される粒を受精した胚珠とし、(成熟期における受精した胚珠数) / (成熟期の総胚珠数) ×100 をみかけの受精率とした。サイズの場合、胚珠が1つも受精しなかった花は落花すること、全胚珠が受精した花でも、栄養競合により途中で脱落する莢が多いことから、真の受精率を調査することは非常に困難である。ただし、この見かけの受精率と真の受精率の相関は高いと考えられるため、低温の影響を評価する1つの指標となり得る。また、成熟期に開花日ごとに莢数を調査し、着莢率を (成熟期における莢数) / (開花数) ×100 で算出した (表 II-2)。各反復あたり4~12花から、開花日の15:00 - 19:00の間に葯を集めた。葯は10μlの50%グリセロール溶液 (v/v) をあらかじめ分注した2mlのマイクロチューブに集め、10μlのラクトフェノール・アニリンブルー染色液 (Hauser and Morrison 1964) を加えた後、花粉粒を分散させる目的で超音波洗浄器 (Bransonic 5510, Branson

Ultrasonics co USA) を使って室温で15分間超音波処理した。30秒間ボルテックミキサーにかけた後、1μlの液滴をとり、顕微鏡下で花粉粒の形態を観察した。異常花粉率は、(異常花粉粒数) / (観察花粉粒数) ×100 で算出し、4個の花粉粒が結合する異常花粉粒は、花粉粒4個分に相当するものとして計算した。

また、葯を集めるのと同時に4~12花から柱頭の先端部を採取した。柱頭は10μlの50%グリセロール溶液 (v/v) をあらかじめ分注した2mlのマイクロチューブに集め、ラクトフェノール・アニリンブルー染色液を、溶液の最終体積が1柱頭あたり10μlとなるように加えた。花粉粒を柱頭から引き剥がし、溶液中に分散させるために、上述のとおり15分間室温で超音波処理した。各反復あたり6μl (1μl × 6滴) について顕微鏡下で花粉粒数をカウントし、1柱頭あたりの平均花粉粒数を算出した。柱頭から回収した花粉粒においては、形態が異常な花粉粒はほとんど存在しなかった。花粉管の発芽により染色されなくなっている花粉粒が多いことから、形態や染色の異常の有無に関わらず柱頭上の花粉数として計算した。

### 統計解析

受精率、みかけの受精率、異常花粉率および柱頭上花粉数について、各開花日ごとに低温処理区 (表 II-1, 1T, 2T, 3T および 4T) の平均値と対照区 (1C, 2C, 3C および 4C) の平均値の間でウェルチのt検定 (異なる分散を仮定) により検定した。P値の算出には JMP v. 8.02 (SAS institute Inc USA) を使った。

表 II-2. 着莢障害に関する判定基準

項目	英訳	定義	備考
受精率	percentage of fertilized pod	[受精が生じた莢数] / [開花数] ×100 ※本研究で定義	本研究では、[受精が生じた莢数]として[開花7~12日後時点で少しでも莢の伸長が見られた莢数]を用いた。
着莢率	pod set percentage	[成熟期における莢数] / [開花数] ×100	低温の影響以外に栄養競合の影響などを含む
受精率	fertilization rate	[受精した胚珠数] / [総胚珠数] ×100	(本研究では調査せず)
みかけの受精率	apparent fertilization rate	[成熟期における受精した胚珠数] / [成熟期における総胚珠数] ×100 ※本研究で定義	

3) 結果

低温感受性期の特定

障害型冷害の主な原因は、着莢障害（受精不良）である。生殖生長期間中の低温に感受性が最も高いステージを明らかにするために、様々なステージの花（蕾、莢の状態も含む）が混在する状態で、昼 15/夜 10°Cで7日間低温処理を実施した（表 II-1）。個々の花は開花日ごとに識別し、低温処理の中心日から開花日までの日数を低温処理時の花のステージの指標とした（Fig. II-1 x軸）。着莢障害の指標として莢の伸長を調査し、受精率（pod elongation percentage）を算出した。莢が伸長したか、落花したかを7-12日後に調査することにより、栄養競合による落莢の影響を排除した。

様々なステージで低温に遭遇した花と、対照区の花の受精率を Fig. II-1A および B に示す。低温処理していないことを除いて条件が同じ対照区では、受精率は70~90%と大きな変動は見られなかった（Fig. II-1A）。低温処理区では、低温処理開始3日後に開花した花において受精率の低下が観察され、低温処理開始4日後に開花した花では40%程度まで低下した。低温処理の後半では開花そのものが抑制され、低温処理開始6日後および7日後では受精率は評価できなかった。低温処理終了後も受精率は40%前後と低かったが、低温処理終了4日後に元の水準に回復した（Fig. II-1B）。

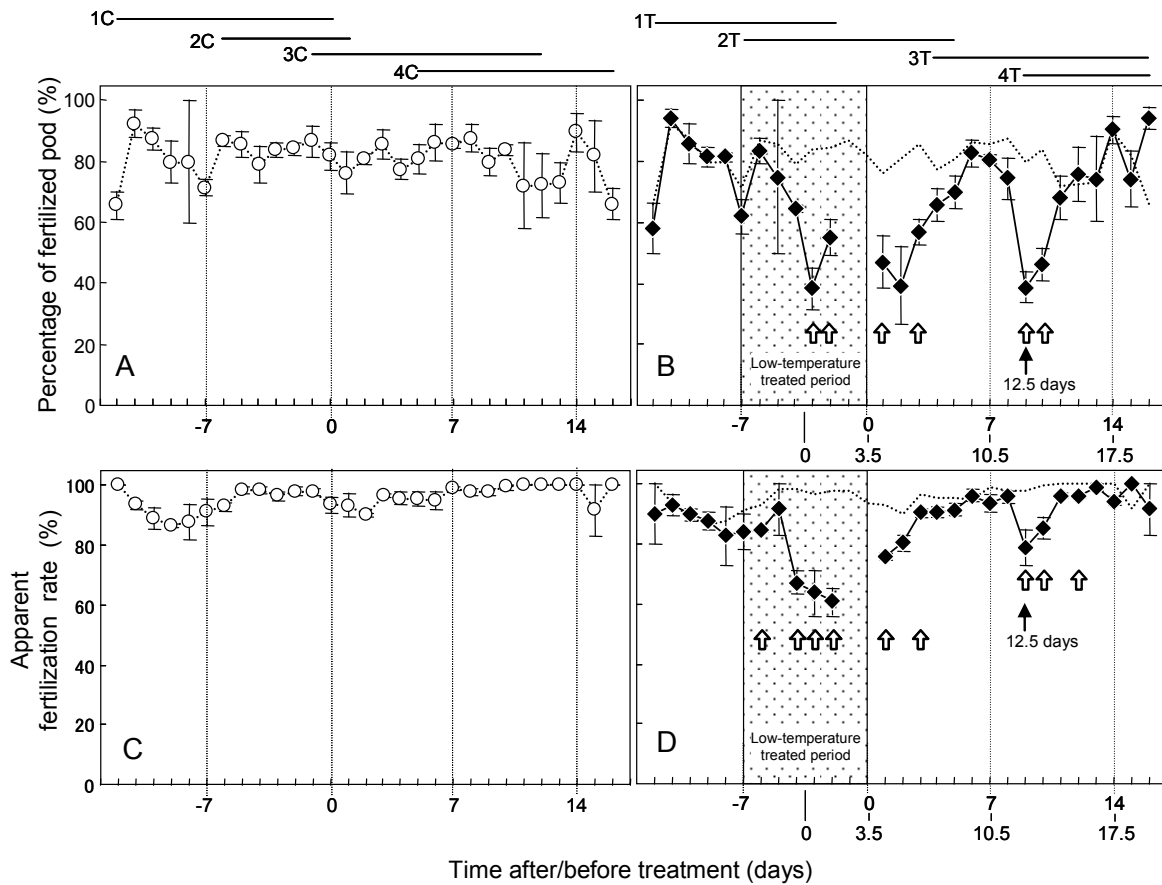


Fig. II-1. Percentage of fertilization and apparent fertilization rate with or without low temperature treatment at various flower developmental stages. Time after treatment is shown in two ways. Upper: start from the end of low temperature treatment. Lower: measurement midway through the 7 day treatment. (A) Percentage of fertilization without low temperature treatment. (B) Percentage of fertilization of low temperature treated flowers. (C) Apparent fertilization rate without low temperature treatment. (D) Apparent fertilization rate of low temperature treated flowers. Dotted zones indicate low temperature treated period. The dashed lines in (B) and (D) indicate the values of the control group shown in (A) and (C). The open arrows represent the differences between the mean values of the low temperature-treated (1T, 2T, 3T, and 4T) and control (1C, 2C, 3C, and 4C) group; these differences are statistically significant at the level of 0.05 with Welch's corrected t test. The horizontal bars above the plot areas indicate the period in which the observations were made at each plot corresponding to Table II-1. The left end of the bar represents the beginning of anthesis. Standard error of the mean is represented by the bars ( $n = 3-6$ ).

低温処理終了9~10日後に急激な受精率の落ち込みが観察され、低温処理終了11~12日後に再度急激な回復がみられた。この結果から、着莢障害からみた低温感受性期は、2つのステージに明瞭に分けられることが明らかになった。1つめのステージは個々の花の開花3~4日前である。この3日前という数字は、低温処理開始から受精率の落ち込み開始が3日後であることから、また4日前という数字は、低温処理終了4日後には受精率が回復しており4日より前には低温感受性が観察されないことから導き出される (Fig. II-1B)。2つめの低温感受性が高まるステージは、開花の12.5~13.5日前を中心としたステージであり、低温処理終了9~10日後の受精率の落ち込みに対応する。これは、低温処理終了9~10日後に開花した花は、7日間の低温処理の中心日において開花12.5~13.5日前であったことより導き出される。成熟期に調査した“見かけの受精率”を用いても、受精率と同様の時期に2つの低温感受性のピークが観察できた (Fig. II-1C および D)。

**着莢障害が生じる原因**

過去の研究から低温着莢障害の原因は花粉側にあるとされている (後藤・山本 1972)。着莢障害が生じる原因を解明するために、柱頭上の花粉数および葯から採集した花粉粒の形態を調査した。低温処理区においては、低温処理開始2日後から柱頭上花粉数の減少が見られ、低温処理終了後3~4日後に一旦回復し、さらに低温処理終了8~10日後

に再び減少が見られた (Fig. II-2)。これは、上述の受精率の低下と完全に一致した。このことから、2つの感受性期のいずれにおいても、柱頭上の花粉数の減少が着莢障害の原因の1つと考えられた。

次に、開花当日に葯から採取した花粉粒の形態を観察したところ、低温処理区において2種類の形態異常が観察された (Fig. II-3)。1つはアニリンブルーによる細胞の染色が不均一または染色されないタイプ (不染色型異常) で (Fig. II-3B)、もう1つは四分子期以降の四分子の分離が起こらず、四分子が結合したままになったと考えられるタイプ (四分子型異常) である (Fig. II-3C~F)。また、開花日ごとに異常花粉率の発生を示したのが Fig. II-4 であるが、いずれのタイプの形態異常も対照区ではほとんど観察されなかった (Fig. II-3A, C)。それぞれのタイプの形態異常別に異常花粉率を開花日ごとにみていくと、不染色型異常では異常率のピークは低温処理終了10~11日後であり (Fig. II-4B)、四分子型異常では異常率のピークは低温処理終了9日後であった (Fig. II-4D)。2つのタイプの異常を合計すると70~55%に及んだ。また、異常花粉粒が観察されたのは2つの低温感受性のステージのうちの開花12.5~13.5日前のステージに低温に遭遇した花のみであった (Fig. II-4B および D)。このことから、開花12.5~13.5日前の低温感受性期においては花粉の発達異常が着莢障害の原因と考えられた。

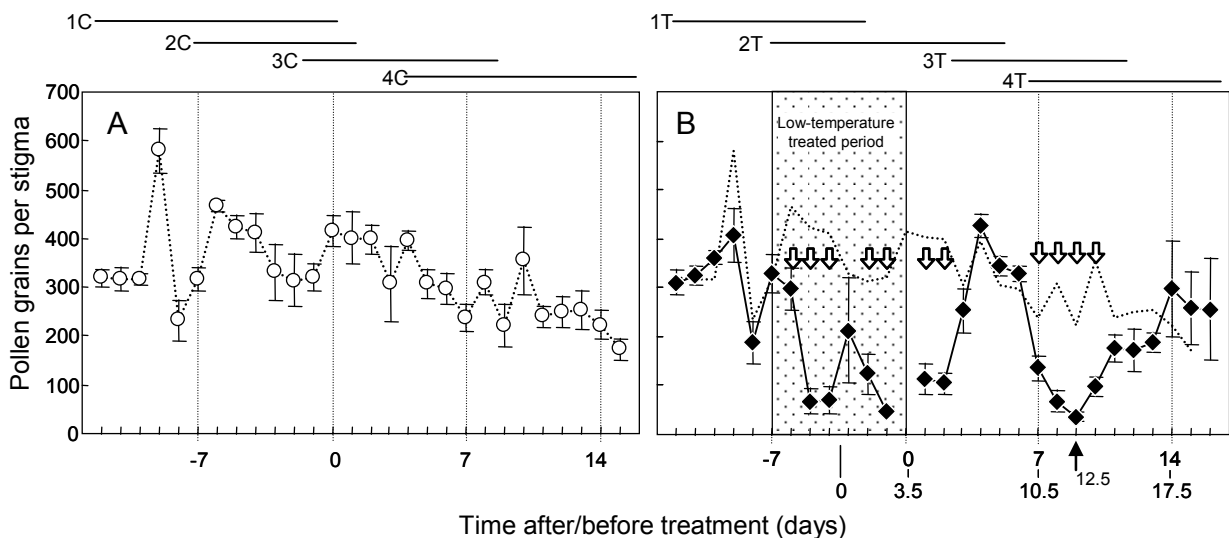


Fig. II-2. Fluctuations of pollen grain number on stigma with low temperature treatment at various flower developmental stages. (A) Flowers without low temperature treatment. (B) Flowers low temperature treated at various flower developmental stages. Dotted area, symbols and bars are the same as in Fig. II-1



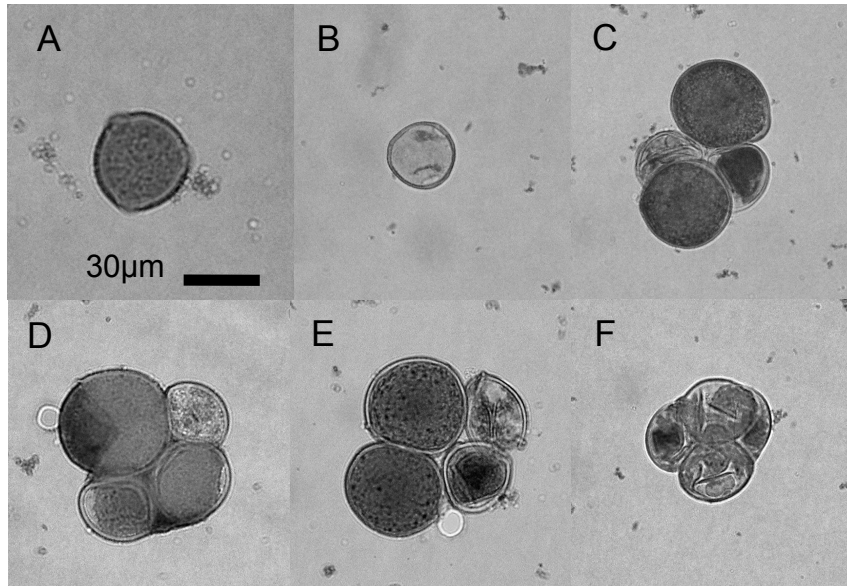


Fig. II-3. Morphologically abnormal pollen grains with or without low temperature treatment. (A) A normal pollen grain collected from a dehiscent anther on the day of anthesis. (B) to (F) Abnormal pollen grains collected on the day of anthesis from flowers that were low temperature treated about 12.5 days before anthesis. (B) Smaller and unstained. (C), (D), and (E) tetrad-like in shape and two of the four cells are unstained and smaller. (F) tetrad-shaped and all grains are smaller and unstained.

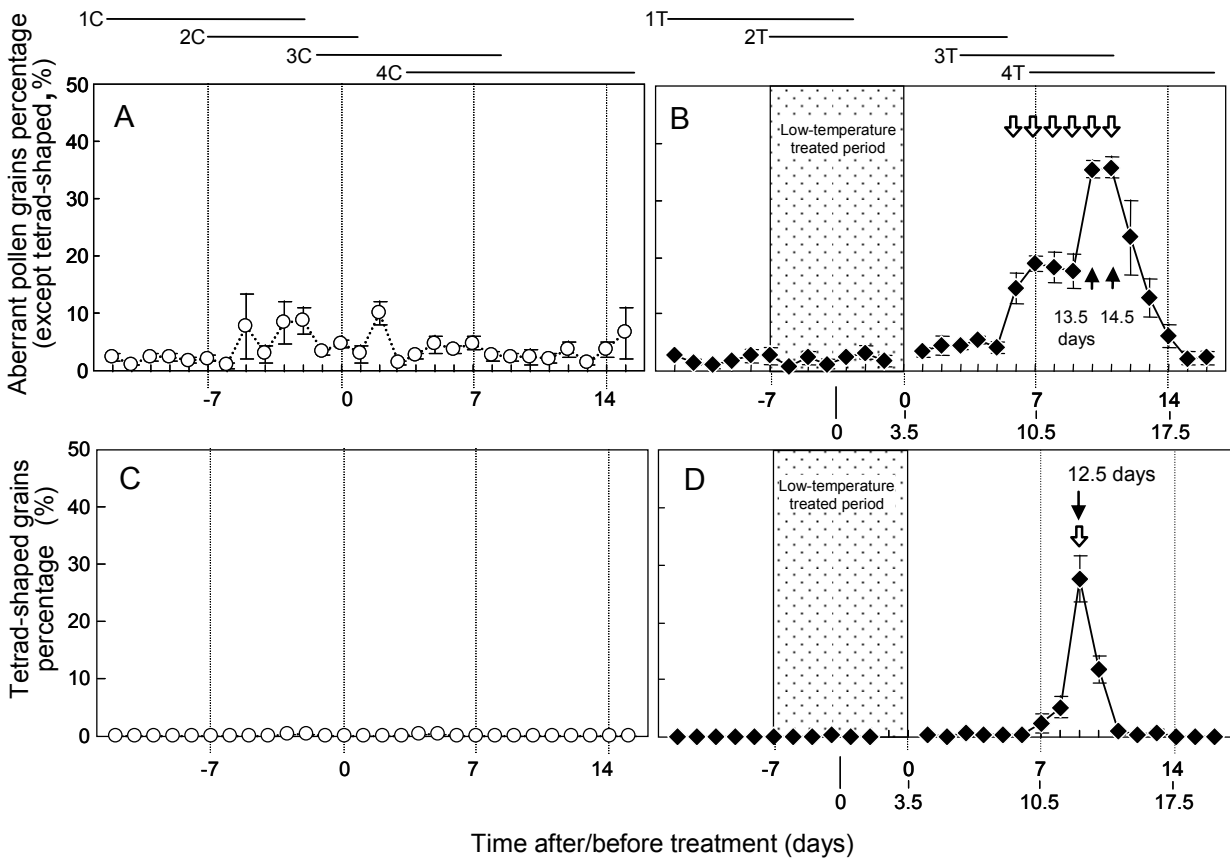


Fig. II-4. Percentage of abnormal pollen grains collected from anthers on the day of anthesis with or without low temperature treatment at various flower developmental stages. (A) Percentage of unstained abnormal pollen grains without low temperature treatment. (B) Percentage of unstained abnormal pollen grains. (C) Percentage of tetrad-type abnormal pollen grains without low temperature treatment. (D) Percentage of tetrad-type abnormal pollen grains. Dotted area, symbols and bars are the same as in Fig. II-1.

低温以外の影響による落莢

ダイズにおいて、光合成産物などの競合が花と莢の落下に関係していることが知られている (Heitholt et al 1986a, 1986b). 本研究においては、成熟期の莢ではなく開花後すぐの莢の伸長の有無を調査することによって栄養競合による落莢の影響を排除したが、成熟期に調査した場合、栄養競合による落莢の影響が大きかった。対照区において、成

熟期に調査した着莢率は個体の開花始においては 80%程度を有していたが、開花始以降日数が経過するにつれて着莢率が低下し、開花の終盤ではほぼ 0%となった (Fig. II-5A). さらに低温処理区では、上述の中途での落莢 (Fig. II-5A) と本来の低温による着莢障害 (Fig. II-1B) を合成したようなパターンを示し、低温感受性期は不明瞭になった (Fig. II-5B).

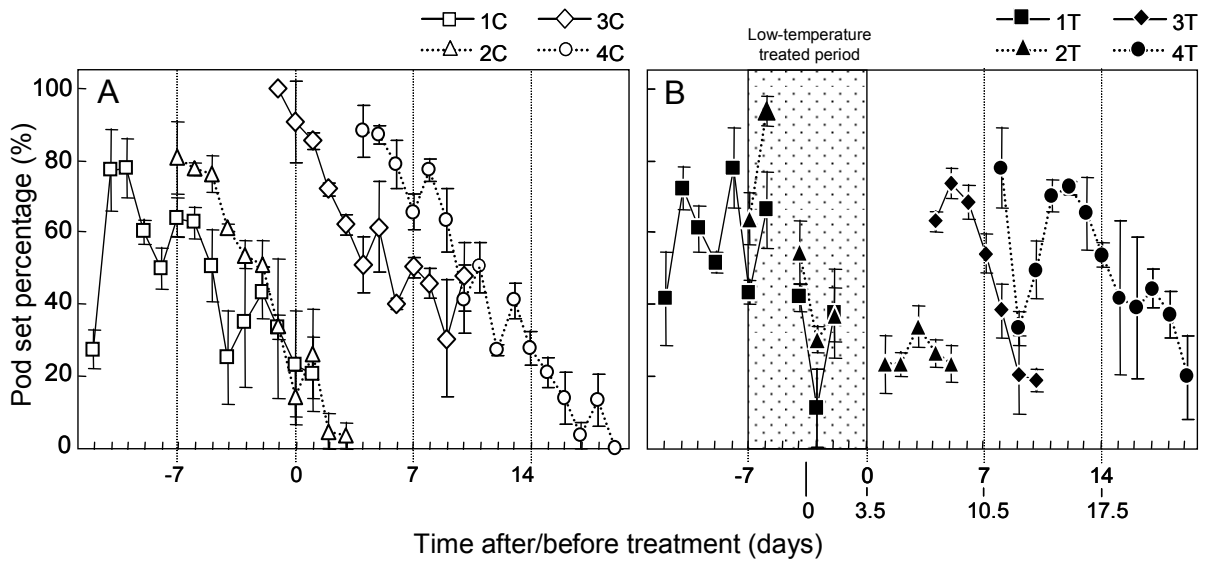


Fig. II-5. Pod set percentages at maturity with or without low temperature treatment at various flower developmental stages. (A) Pod set percentage without low temperature treatment. (B) Pod set percentage of low temperature treated flowers. Dotted zones indicate low temperature treated period. The open squares, triangles, diamonds and circles refer to flowers of plot 1C, 2C, 3C and 4C in Table II-1. The closed squares, triangles, diamonds and circles refer to flowers of plot 1T, 2T, 3T and 4T in Table II-1. Standard error of means is showed by the bars ( $n=3$ ).

第2節 低温感受性の品種間変異

1) 目的

前節において、生殖生長期間における低温感受性期は、開花12.5～13.5日前と開花3～4日前であることが明らかになった。本節では、過去の障害型冷害年に子実重の低下の程度が小さかった育成系統「十系978号」および「十系952号」と子実重の低下の程度が大きかった「トヨムスメ」および「十育240号」などを用いて、既存の耐冷性評価法でほとんど評価の対象になっていない開花12.5～13.5日前の低温感受性の高低について品種間差異があるかどうかを人工気象室を用いた試験および圃場での低温遭遇事例の調査により検証する。また、既存の耐冷性の評価結果、障害型冷害年における子実重の低下の程度および開花12.5～13.5日前の低温感受性の高低を比較することによって、ダイズ品種の耐冷性向上における開花12.5～13.5日前の低温感受性の重要性を検討する。

表 II-3. 試験に用いた品種・系統の耐冷性の既往の評価

品種・系統名	人工気象室による開花期耐冷性検定	2003年の上土幌町耐冷性現地選抜圃場における子実重(kg/10a)
トヨムスメ	中	18-52†
トヨコマチ	やや強	22-62†
十系978号	やや強	141
トヨハルカ	強	60
十育240号	強	20
十系952号	強	122

†試験により異なる

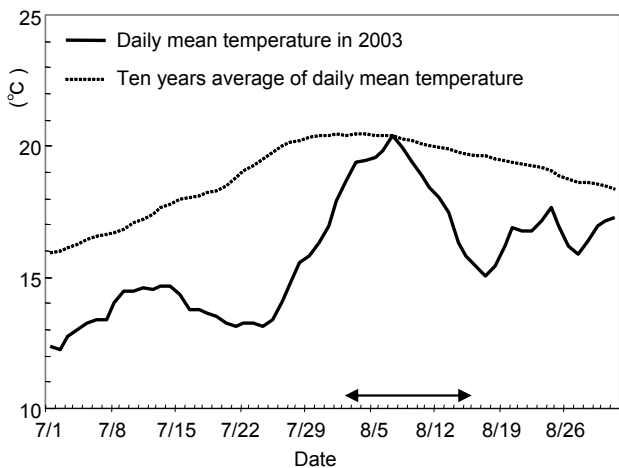


Fig. II-6. Fluctuations of daily mean temperature in Kamishihoro-cho in 2003. Daily mean temperature are smoothed by the moving average with a 7 days window size. Thirty years average of daily mean temperature in Memuro-cho, where Tokachi Agricultural Experiment Station is stand, is shown by dotted line. Horizontal arrows represent a estimated period in which most cultivars and lines would reached to the first flower opening.

2) 材料および方法

現在の耐冷性の評価法（開花期から28日間の昼18℃/夜15℃の低温処理）において評価が定まっており、かつ近年の障害型冷害年であった2003年の冷涼地（上土幌町）における評価データの存在する品種・系統を用いた（表II-3）、2003年の上土幌町における日平均気温の推移と品種・系統の開花期が分布すると推測される期間はFig. II-6のとおりである。

人工気象室を使った受精率の低下の品種間差の評価は、前節の方法に準じて2006年に行った。1品種あたり1区3ポット×3反復で、低温処理は中位節の蕾が2-3mm程度の長さに達した段階で開始した。

圃場における評価は、7月下旬が日平均気温15℃前後の低温で推移した2006年の十勝農試圃場において行った。交配用に時期をずらして播種した試験区（5/18, 6/1, 6/9に播種）において、品種「トヨコマチ」については当日開花した花を異なる色の刺繍糸で毎日ラベルし、開花日ごとに受精率を調査した。また、「トヨムスメ」、「トヨハルカ」、「十育240号」、「十系952号」、「十系978号」については6/1に播種した試験区について同様に調査した。日平均気温データはアメダスの芽室町の観測値を用いた。

3) 結果

前節では、着莢障害から見た低温感受性期は花の開花の3～4日前と開花12.5～13.5日前のステージに存在することを明らかにした。現在の耐冷性の評価法（開花始より28日間の低温処理）においては、ダイズの開花数は開花始から3～4日後にピークに達する（大西ら2004）ことを考慮すると、これらの2つのステージのうち開花3～4日前に低温に遭遇している花は多いと推測される。しかし、開花12.5～13.5日前のステージに低温に遭遇している花はほとんどないと考えられる。このことから、本節では開花12.5～13.5日前のステージに焦点を絞り、まず前節同様に人工気象室を用いて、このステージにおける低温感受性の品種間変異を調査した。試験に用いた「トヨムスメ」および「十系978号」は、いずれも低温処理の中心日から12.5日後に受精率が最も低下した（Fig. II-7）。また2003年の試験結果（表II-3）から障害型冷害に強いと推測された「十系978号」の方が、受精率の低下が有意に低かった（Fig. II-7）。このように、開花12.5日前における低温感受性に品種間変異が

認められた。

2006 年は長期的な低温傾向はなく低温による減収はなかったことから、いわゆる冷害年ではないが、十勝地方においては7月下旬の5日間前後が低温（日平均気温 15℃）に経過し、低温による着莢障害が観察された。播種時期が異なる「トヨコマチ」において、人工気象室での試験に準じて受精率（%）を調査したところ、5日間の低温期間の中心日から数えて13.5日後に受精率の低下のピークが確認された（Fig. II-8）。さらに、調査したその他の品種・

系統全てにおいて、同じく13.5日後に受精率低下のピークが観察された（Fig. II-9）。しかし、受精率低下の程度は、品種・系統によって大きく異なり、「トヨコマチ」と「十育 240 号」は「トヨムスメ」よりも受精率低下の程度が大きく、「トヨハルカ」は「トヨムスメ」と同等で、「十系 978 号」と「十系 952 号」は受精率低下の程度が小さかった（Fig. II-9）。この結果は、上述の人工気象室における品種間差（Fig. II-7）および2003年の障害型冷害年における試験結果（表 II-3）と一致した。

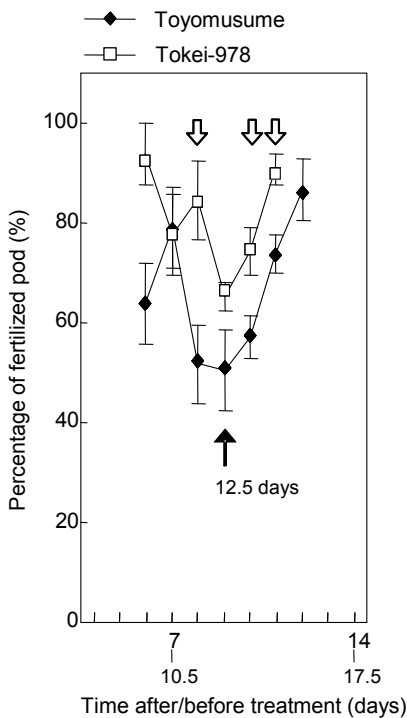


Fig. II-7. Difference of low temperature sensitivity at pollen developmental stages between low temperature tolerant or sensitive cultivars. Time after treatment is shown in two ways. Upper: start from the end of low temperature treatment. Lower: measurement midway through the 7 day treatment. The open arrows represent the differences between the mean values of the pod set percentage between two cultivars; these differences are statistically significant at the level of 0.05 with Welch's corrected t test. Standard error of the mean is represented by the bars ( $n = 3$ ).

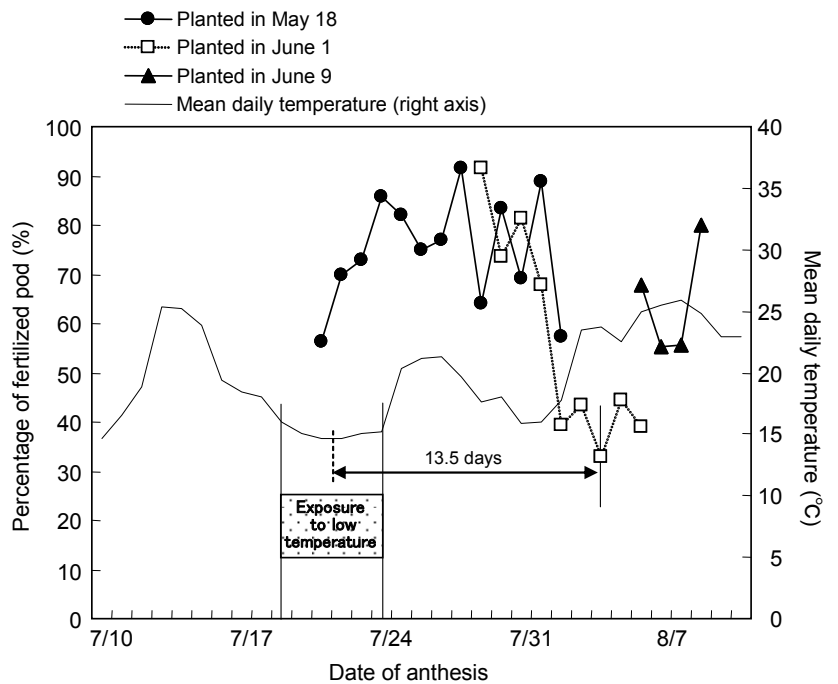


Fig. II-8. Fluctuations of the percentage of fertilized pod of cv. Toyokomachi in the field in 2006. Dotted rectangle represent exposure to low temperature around 15°C in the field. Horizontal arrows show that the interval between the midway of low temperature period and the bottom of the percentage of fertilized pod is approximately 13.5 days.

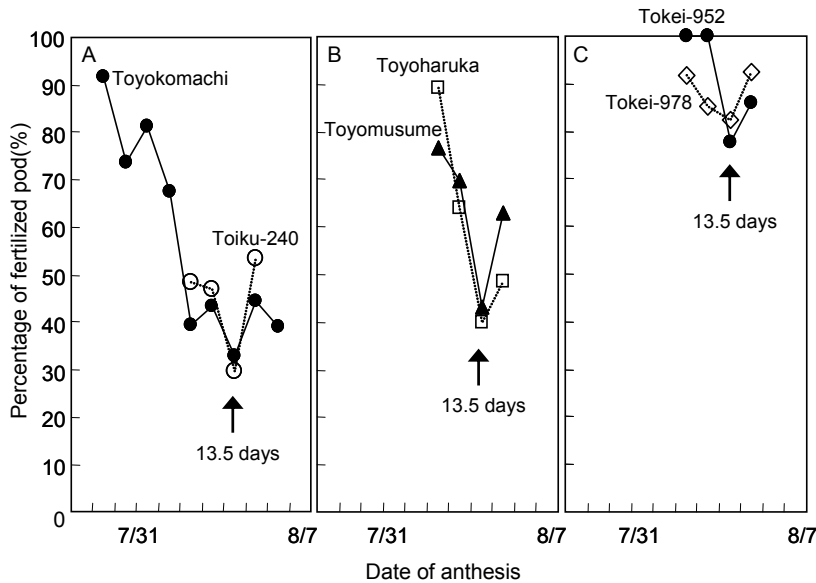


Fig. II-9. Fluctuations of the percentage of fertilized pod of cultivars with low temperature exposure in the field in 2006. The arrow shows period from the midway of low temperature to the bottom of pod elongation percentage. Cultivars are categorized to (A) lower (B) the same level and (C) higher pod elongation percentage than cv. Toyomusume. Toyokomachi in (A) is the same data as in the fig. II-8.

### 第3節 考察

#### 着莢障害からみた低温感受性期

ダイズの生殖生長期間における低温による着莢障害を受精率を用いて解析することで、2つの低温感受性期が存在することが明らかになった。1つは開花3~4日前で、もう1つは開花12.5~13.5日前である。これよりさらに前のステージにおいては、調査した開花20日前までの範囲で低温感受性期は見出されなかった。低温による受精率と着莢率の低下は、低温処理区と対照区の花粉および除雄した花を使った人工授粉試験によって花粉側の原因であることが報告されているが(後藤・山本 1972)、本研究でも低温による受精率の低下は花粉の形成異常と柱頭上の花粉数の減少によることが示唆されており、過去の報告と矛盾しなかった。

本研究では開花12.5~13.5日前に明瞭な低温感受性期があることを明らかにしたが、開花より以前に低温感受性期があることはすでにいくつか報告がある(Saito et al 1970, Hashimoto and Yamamoto 1976)。Saito et al (1970)は開花の15日前から開花までの継続的な低温処理により、着莢率と受精率が低下することを報告している。しかし、Saito et al (1970)の実験では5日刻みで低温処理をずらした処理区を設けるものであり、正確に感受性の高い時期を特定したり感受性の高い2つのステージを分離するにはいたらなかった。また、Hashimoto and Yamamoto (1976)は、開花数を制限し、短い低温処理期間(6-9日間)を用いたアプローチで、低温感受性が高い時期を開花9~13日前であると

推測したが、ある程度の幅をもった推測にとどまった。また低温処理と同時に培養液に窒素源を加えることにより着莢障害を促進するという特殊な方法であった。本研究では、短期間の低温処理後、開花日ごとに花をマークして追跡し、かつ受精率を調査することにより栄養競合による落莢の影響を排除した。これにより、開花12.5~13.5日前が低温感受性のピークであることを明らかにした。ただし、これは低温処理期間(昼15°C/夜10°C)と無処理期間(昼25°C/夜20°C)が混在する条件である。Hashimoto and Yamamoto (1976)は低温処理期間の蕾の成長速度は通常の半分と見積もっていることから、これに従って無処理条件における生育日数に補正すると、開花12.5~13.5日前は9~10日前に換算されHashimoto and Yamamoto (1976)らの結果と矛盾なく、さらに正確に低温感受性期を推定していることになる。

この時期の低温処理により、四分子が分離せず一部の花粉粒が成熟を継続している異常花粉(四分子型異常花粉)が観察された。これは、四分子期に続いて起こる四分子の分離が正常に起こっていないため生じたものと考えられ、このことから開花12.5~13.5日前の低温感受性が高いステージは四分子期か、少なくともそれ以前のステージであると推定できる。タペートから分泌されるカロース分解酵素カラゼによって四分子のカロース壁が分解され、四分子が分離することが知られており(McCormick 1993)、低温によりタペート組織が影響を受けている可能性が考えられる。後藤・山本(1972)は、開花の15日前から開花まで連

続低温処理した場合、対照区と比較して四分子期で停滞する期間が長くなることを報告している。また、イネにおいても、四分子期とそれに続く小孢子前期が低温に対する感受性が最も高く、開花の 11~13 日前であることが知られており (Hayase et al 1969, Satake and Hayase 1970)、本試験の結果とこれらの報告を総合すると、ダイズにおいて低温感受性が高い開花 12.5~13.5 日前は四分子期であると推測される。また、後藤・山本 (1972) は四分子期から花粉成熟までを、15°C 低温処理の条件では 15 日間、非低温処理条件では 9 日間と見積もっている。本試験における開花 12.5~13.5 日前は、10~15°C の低温処理と 20~25°C が混在する条件下であり、開花 12.5~13.5 日前を四分子期と仮定しても矛盾しない。花粉形成時期における低温感受性は、イネだけでなく、ヒヨコマメ (減数分裂~四分子期, Clarke and Siddique 2004)、トマト (開花 9~15 日前, Patterson et al 1987) やその他の様々な作物 (Thakur et al 2009) で報告されている。花粉形成時期における低温感受性は、亜熱帯~熱帯を起源とする作物に共通の現象であると考えられる。興味深いのは、花粉形成時期における低温感受性のピークが、本研究におけるダイズ (開花 12.5 日前)、イネ (11 日前, Hayase et al 1969) では鋭い 1 つのピークをもつものに対して、ヒヨコマメ (10.5 日前と 6.5 日前, Clarke and Siddique 2004) とトマト (14.7 日前と 9.1 日前, Patterson et al 1987) では 2 つのピークがあることである。

本研究では、開花 12.5 日前の低温への遭遇で、花粉の形態異常に加えて、柱頭上の花粉数の減少も観察された。正常に発達できなかった花粉を含む葯の裂開の不良または花粉の飛散の不良が生じている可能性が考えられる。

開花の直前である開花 3~4 日前の低温に遭遇した花においても受精率の低下が観察された。柱頭上の花粉数から判断すると、低温処理開始 2 日後から既に低温の影響が出始めており、総合的に判断すると低温感受性期は開花 2~4 日前であると結論できる。この開花直前の低温感受性については、これまでのダイズを用いた試験では見出されず (Saito et al 1970, Hashimoto and Yamamoto 1976) 本研究が最初の報告である。

四分子期前後の低温障害と異なり、開花 2~4 日前の低温による花粉粒の形態的な変化は観察されなかった。その一方で、柱頭上の花粉数は低温への遭遇で劇的に減少していた。このことから、この時期に低温に遭遇することにより

花粉の飛散や葯の裂開が阻害されて、受精率に影響していると推測される。同様の機作による受精障害は、イネの高温障害において報告されている (Satake and Yoshida 1978, Matsui et al 2000)。上述のとおり、減数分裂から四分子期にかけての花粉形成時期における低温感受性は多くの作物で共通の現象であるが、開花直前の低温感受性は作物間で共通性がない。本研究では、開花 2~4 日前に低温感受性が検出されたが、同様の試験を行ったヒヨコマメの事例では観察されていない (Clarke and Siddique 2004)。また、イネにおいては、ダイズ同様に開花直前に低温に対する感受性が知られているが (丹野 2004, Satake and Koike 1983)、イネの場合柱頭上の花粉数は減少しないなど機作の違いが見られ、本質的には別の現象である可能性もある。

#### 低温による着莢障害を評価する指標

低温による着莢障害は受精不良が原因であるが (後藤・山本 1972)、ダイズでは胚珠が 1 つも受精しなかった莢は落莢すること、胚珠が受精しても栄養競合で落莢することから、受精率 (表 II-2) を調査するためには受精直後の莢を顕微鏡下で観察する必要がある。しかし着莢障害を評価するために受精率を調査することは、多くの材料を扱う上で実用的でない。そのため、低温による着莢障害を評価するためには別の判定基準を用いる必要がある。本研究では、受精率、見かけの受精率および着莢率を調査した (表 II-2)。このうち、着莢率については栄養競合による落莢の影響が非常に大きく、低温による着莢障害を評価するには適さなかった (Fig. II-5)。一方、受精率は開花直後に観察するため栄養競合による落莢の影響を排除でき、着莢障害の評価のための指標として有用であると考えられた (Fig. II-1)。見かけの受精率も低温による着莢障害の指標となりうるが (Fig. II-1)、少なくとも 1 つの胚珠が受精していないと成熟期まで莢が残らないため最小値が 50% となりレンジが狭いこと、また重要視されるべき 1 つの胚珠も受精していない莢が中途の落莢により調査の対象にならないことから、受精率より検出力が劣る可能性が高い。ただし、見かけの受精率は成熟期になってからも調査可能であり、成熟期に開花前の低温の影響を遡って調査できるという利点がある。また、柱頭上の花粉数や異常花粉率 (Fig. II-2 および II-4) は間接的な指標ではあるが比較的簡便に調査でき、予備的な選抜などに利用できる可能性がある。

### 生殖生長期間における低温感受性と高温感受性の関係

花粉形成時期においては、低温だけでなく高温によっても受精障害が生じることが、イネ、インゲンマメ、ピーマン、大麦、および様々な作物で知られている (Sakata et al 2000, Suzuki et al 2001, Erickson and Markhart 2002, Kitano et al 2006). 花粉形成時期における高温感受性の高いステージは、低温感受性の高いステージと同一であると考えられ、花粉形成時期は低温・高温いずれにおいても温度感受性が高いステージであるといえる。また、加えて開花直前～直後にも高温に対する感受性が高いステージが知られている。具体的には、ピーマンでは受精 2 日後 (Erickson and Markhart 2002), イネとインゲンマメでは開花当日 (Satake and Yoshida 1978, Suzuki et al 2001), ダイズでは開花 4~5 日前 (Kitano et al 2006) である。本研究ではダイズの開花直前 (開花 2~4 日前) に低温感受性を見出したが、低温および高温に感受性となるステージが共通である可能性があり興味深い。

### 花粉形成期耐冷性の評価の必要性

現在、北海道のダイズ育種では耐冷性を開花始から 4 週間の低温処理による減収率を主な指標として評価している (北海道立十勝農業試験場 1998)。この評価法は、低温による着莢障害や登熟不良を含めた生殖生長期間における耐冷性を総合的に評価できる優れた手法であり、多くの材料を再現性よく低温処理する上で開花始を低温処理開始の基準日とするのは理にかなっている。しかし、北海道のダイズ品種は開花始から 5 日程度で開花数のピークを迎えてしまうこと (大西ら 2004) を考えると、開花の 1 週間以上前になる花粉形成期の低温感受性は耐冷性の評価にほとんど考慮されていない。本研究の実験条件 (低温処理期間: 昼 15/夜 10°C, それ以外の期間: 昼 25/夜 20°C) では、花粉形成期の低温感受性は開花 12.5 日前で最も高くなり、この時期の低温感受性に品種間変異が認められた。既存の開花期耐冷性の評価法に加えて、本研究で明らかにした花粉形成期の耐冷性の評価法を確立する必要がある。

ダイズの花粉形成期の耐冷性はイネの穂ばらみ期耐冷性と対応すると考えられるが、イネでは穂ばらみ期と開花

期前後の耐冷性は必ずしも一致しないことが報告されている (丹野 2004)。ダイズにおいても花粉形成期の耐冷性と開花期以降の耐冷性は必ずしも一致しないことが本研究の結果から示された (表 II-3, Fig. II-9)。2003 年は十勝地方の冷涼地 (山麓と沿海部) を中心に障害型冷害年であった (萩原ら 2003)。この年の耐冷性現地選抜圃場 (上士幌町) では、開花前からの低温 (Fig. II-6) による著しい着莢障害で減収が観察された (表 II-3)。しかし、「十育 240 号」は耐冷性の評価が“強”であったにも関わらず 2003 年の耐冷性現地選抜圃場における子実重の低下が大きく、一方で「十系 978 号」は耐冷性の評価が“やや強”であったにも関わらず子実重の低下はその他の“強”の品種より小さかった。これは花粉形成期の耐冷性を考慮すると説明可能である。すなわち、「十育 240 号」は花粉形成期の耐冷性が弱い (Fig. II-9)、2003 年の耐冷性現地選抜圃場で大きく減収し、一方「十系 978 号」は花粉形成期の耐冷性が強い (Fig. II-9) 耐冷性現地選抜圃場での減収程度が小さかったと推測できる。また、花粉形成期の耐冷性と開花期耐冷性の両方が優れる「十系 952 号」は、耐冷性現地選抜圃場での減収程度は小さかった (表 II-3)。2003 年のように開花前に激しい低温に遭遇するような典型的な障害型冷害においては、花粉形成期の耐冷性の向上が被害回避に効果的であると考えられる。

上述のとおり、花粉形成期の耐冷性の評価が重要であるが、本研究で使った個々の花を糸で毎日マークして受精率を調査する手法は、育種プログラムの中でルーチンに用いるには労力がかかりすぎる。花粉形成期の耐冷性については簡易な評価法の開発することが最も重要であり、加えて遺伝解析を進め DNA マーカーを開発するなどのアプローチも検討する必要がある。

### 第3章 ダイズ種皮における低温着色抵抗性の原因遺伝子の解明

#### 第1節 種皮における低温着色抵抗性と *GmIRCHS* の逆位反復構造との関係の解明

##### 1) 目的

前章ではダイズにおける低温による収量低下について取り上げたが、北海道のダイズ栽培においてそれに次いで重要な低温の影響は、種皮の低温による着色である。種皮の低温着色は開花後の低温により子実の臍と臍の周辺が褐色に着色する現象で、子実の外観品質を著しく低下させる（岡ら 1989, Srinivasan and Arihara 1994, Morrison et al 1998, Funatsuki and Ohnishi 2009）。ダイズの種皮色は野生種では黒色であるが、現在栽培されている多くの品種は種皮色は黄色である。この種皮色の黄色は、種皮における色素合成系のキーエンザイムであるカルコンシンターゼ（*CHS*）をコードする *CHS7*, *CHS8* など複数の遺伝子（以下 *CHS* 遺伝子と表記）が RNAi により抑制されることにより維持されている（Todd and Vodokin 1996, Kasai et al 2004, Senda et al 2004, Kasai et al 2009, Kurauchi et al 2009, Tuteja et al 2009）。北海道の黄色の種皮をもつダイズ品種では、種皮における *CHS* 遺伝子の RNAi は *I* アレルにより引き起こされており、この *I* アレルは *CHS3* の逆位反復配列を含む構造をもつことから、*GmIRCHS* (*Glycine max* inverted-repeat *CHS* pseudogene) と命名されている（Kasai et al 2007）。種皮の低温着色は、低温により *I* アレルによる RNAi が一時的に抑制され *CHS* 遺伝子の発現が回復することが原因である（Kasai et al 2009）。低温着色の発生には明瞭な品種間差異があり、近年この低温着色抵抗性が優れた品種「トヨハルカ」が育成された。興味深いことに「トヨハルカ」では、上述の *GmIRCHS* の構造が「トヨムスメ」などその他の品種と大きく異なる（Kasai et al 2009）。「トヨハルカ」では *GmIRCHS* がもつ逆位反復配列を構成している2つの *CHS2* 配列のうちの1つが欠損し、逆位反復配列が解消されている（Kasai et al 2009）。種皮における *CHS* 遺伝子に対する siRNA の蓄積量が低温着色および低温着色抵抗性の品種間差と深く関連すること、*GmIRCHS* が *CHS* 遺伝子に対する siRNA の唯一の供給源であること（Senda et al 2004, Kasai et al 2007, Kurauchi et al 2009）を併せて考えると、「トヨハルカ」のもつ *GmIRCHS* の構造の違いが低

温着色抵抗性の原因であるという仮説が立てられるが、Kasai ら（2009）の研究ではこの仮説の検証までにはいたらなかった。本節では、この仮説を検証するために「トヨハルカ」を片親とする組換え自殖系統について *GmIRCHS* の遺伝子型と低温着色抵抗性の強弱を評価し、*GmIRCHS* が低温着色抵抗性の原因遺伝子かどうかを明らかにする。さらに、QTL 解析を用いて *GmIRCHS* 以外に低温着色抵抗性に影響を与えるゲノム領域があるかどうか検討する。

##### 2) 材料及び方法

本研究では、解析材料として低温着色抵抗性が強い「トヨハルカ」（北海道立十勝農業試験場 2004）と低温着色抵抗性が弱い「トヨムスメ」（佐々木ら 1998）および中程度の「十系 924 号」を用いた。いずれも臍色、種皮色は黄白色で、毛茸色は白 (*I*, *i*) であり、北海道の気象条件に向くよう選抜された品種・系統である。解析用の組換え自殖系統（以下 RILs : Recombinant inbred lines）として、TR-TM および TR-924 を用いた。TR-TM は、「トヨハルカ」×「トヨムスメ」、TR-924 は「トヨハルカ」×「十系 924 号」の交配組み合わせから養成した RILs である。いずれの RILs も F<sub>4</sub> 世代まで単粒系統法で世代を進め、TR-TM は 144 系統、TR-924 は 118 系統養成した。低温着色抵抗性の表現型の評価と遺伝子型の評価は F<sub>5</sub> 世代で行った。ゲノム全体の QTL 解析については、TR-TM の F<sub>4</sub> 世代から派生した姉妹系統の遺伝子型を用いた。これは、姉妹系統については既に遺伝子型が決定されていたためである（Ikeda et al 2009）。

##### RILs における *GmIRCHS* の遺伝子型の決定

*GmIRCHS* は、ダイズ種皮色を決定する *I* 遺伝子座の *I* アレル（臍・種皮が黄白色）と考えられているが、*GmIRCHS* の構造は、「トヨハルカ」と「トヨムスメ」で異なる（Kasai et al 2009）。「トヨハルカ」型 *GmIRCHS*（GenBank accession no. AB480069）を特異的に増幅するプライマーとして、5'-GAG TTT GAA AAA TGT ATT CTT TCT CTT CC -3' および 5'-GTA TCG CAG ATT CCT CCT GC -3' を、「トヨムスメ」型 *GmIRCHS*（AB480070）を特異的に増幅するプライマーとして 5'-GCA AAC CAA ATC AAG TAA GAG CG -3' および 5'-CCC ATT CCT TGA TTG CCT TA -3' を用いた。また、



「十系 924 号」はサザンプロットの結果により「トヨムスメ」型の *GmlRCHS* を持っていることが明らかになっている (千田私信)。

### 低温着色抵抗性の評価

湯本・佐々木 (1990) によって、低温着色抵抗性の評価方法として開花期の 7 日後から 21 日後までの低温処理 (昼 18°C/夜 13°C) が有効であることが報告されており、北海道の育種プログラムではこの方法によって低温着色抵抗性を評価している。本研究でも品種・系統の低温着色抵抗性の評価法として本手法を用いた。5 月に直径 30cm のワグネルポットに湿性火山性土 (十勝農試圃場の土, 前作えん麦) を詰め、硫酸アンモニウム 5.7g および硫酸カリウム 10.8g を混和した後、各品種・系統を播種した。ポットは、十勝農試 (芽室町, 42°54'N, 143°2'E) において屋外で雨よけ管理した。開花期の 7 日後に人工気象室に移し、低温処理を開始した。低温処理は昼間 18°C (7:00 -19:00) および夜間 15°C (19:00 -7:00) で、日射による温度上昇を避けるために低温処理中は 55% の遮光を行った。低温処理終了時点で未開花の蕾を切除し、人工気象室で昼間 25°C (7:00 -19:00) および夜間 20°C (19:00 -7:00) で 7 日間管理した後、成熟期まで屋外の雨よけ栽培とした。成熟期に収穫した種子は、臍周辺の着色 (Fig. III-1a インデックス 2~5 に相当) と臍の着色 (同インデックス 1) に分けて調査した。また、人工気象室の中での温度分布の偏りの影響を最小限にするため、低温処理期間中は 3 日ごとにポットの場所のローテーションを行った。各品種・系統あたり 2 ポットで試験を実施し、平均した値を後の解析に用いた。

Takahashi (1997) は、低温着色においてその程度が最も顕著になるのは、個々の花において開花 3-8 日後に低温処理が開始された場合であることを報告している。そこで、本研究では、RILs の低温着色抵抗性の評価に Takahashi (1997) の知見を元に改良した方法を用いた。具体的には、RILs である TR-TM と TR-924 について、F<sub>5</sub> 世代において 1 個体/ポットで低温着色抵抗性の評価を行った。4 粒/ポットで播種し、1 個体/ポットとなるように間引いた。ポットは直径 19cm のワグネルポットで、土は上述の品種・系統の評価と同じものを使った。肥料はポットあたり硫酸アンモニウムを 2.3g、硫酸カリウムを 4.3g を施肥した。各 RILs ともに 1 個体/系統を供試し、RILs の親については 5~7 個

体を供試した。TR-TM については 144 系統を、TR-924 については 118 系統を評価した。屋外で雨よけ栽培したダイズは、開花期以降は低温処理の期間を除いて昼間 25°C (7:00 -19:00) および夜間 20°C (19:00 -7:00) の人工気象室で栽培した。TR-TM RILs については開花期 10 日後から昼 15°C/夜 10°C で 12 日間の低温処理を行った。低温処理を開始する日に、その日開花した花とその時点でまだ蕾である花を切除し低温処理に遭遇していない花が生じないようにした。成熟期後に子実を収穫し、低温着色指数 (Takahashi and Abe 1994 を改変して作成, Fig. III-1a) に基づいて個々の種子を評価し、その平均値 (低温着色指数, Mean seed discoloration index) を系統の低温着色抵抗性の表現型とし、QTL 解析などに用いた。各系統あたり 7~20 粒の種子が収穫できた。この評価手法では、開花 1~10 日後 (Takahashi 1997 の定義する 1~10 DAO ; days after opening of individual flowers) に低温への遭遇が開始した花が評価の対象になっていることになる。TR-924 RILs については「十系 924 号」が中程度の低温着色抵抗性をもっていることから、よりシビアな低温処理を行った。具体的には、開花 8 日後から 14 日間昼 15°C/夜 10°C の低温処理を行った。この場合、開花 1~8 日後 (DAO1~8) から低温に遭遇した花を評価の対象にしていることになる。

### 連鎖地図の構築

連鎖地図は、TR-TM RILs の F<sub>4</sub> 世代から派生した姉妹系統の RILs の F<sub>5</sub> 世代を使って作成されたものを用いた (Ikeda et al 2009)。また、TR-924 RILs については連鎖群 A2 の *GmlRCHS* 周辺について Song et al (2004) の SSR マーカーを用いて連鎖地図を作成した。

### *GmlRCHS* 近傍の QTL 解析

TR-924 RILs について *GmlRCHS* 周辺における QTL のインターバルマッピングを行った。Map Manager QTX Windows 版 (Manly et al 2001) を使い、低温着色抵抗性に関する形質値として低温着色指数 (Mean seed discoloration index) を用いた。

### ゲノム全体の QTL 解析

低温着色抵抗性について、ゲノム全体を対象としたコンジョイントインターバルマッピングによる QTL 解析を行った。この解析には上述の TR-TM RILs の姉妹系統を用いて

作成した連鎖地図と姉妹系統の遺伝子型を用いた。コンポジットインターバルマッピングには、QTL Cartographer ver. 2.5 (Wang et al 2005) を用いた。

**連鎖群 B2 の QTL 解析**

TM-TR RILs および TR-924 RILs 用いて、単マーカー解析を上述の全ゲノムに対するコンポジットインターバルマッピングで LOD 値が 2.0 以上を示した連鎖群 B2 領域に対して行った。また、解析は Map Manager QTX を用いて行った。

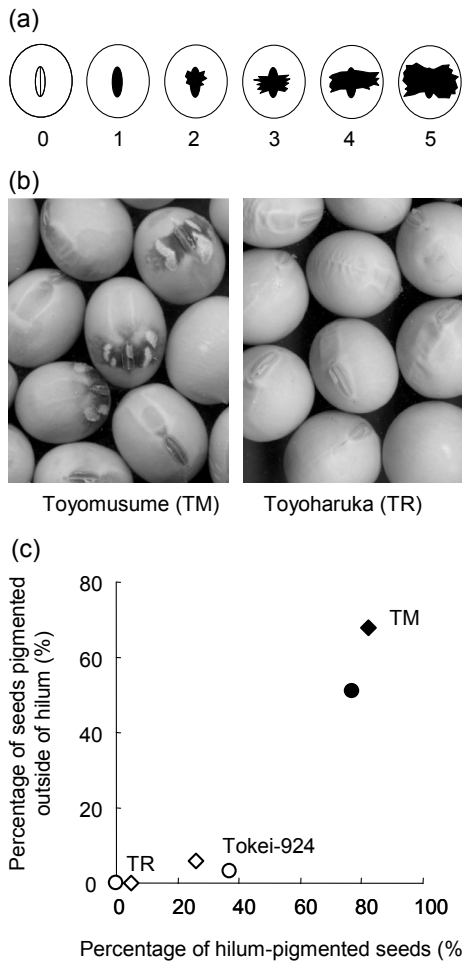


Fig. III-1. Example of CD tolerant phenotype. (a) Indices for CD for single seeds. (b) Example of CD in field-grown soybeans. Toyomusume (TM) is CD sensitive, Toyoharuka (TR) is CD tolerant. (c) Evaluations of CD tolerance by 14-day low-temperature treatment applied from 7 days after anthesis. Open circle and diamond indicate TR; halftone circle and diamond indicate Tokei-924 (moderately CD tolerant breeding line); solid circle and diamond indicate TM. Circles and diamonds represent evaluations carried out in 2000 and 2001, respectively. Hilum-pigmented seed corresponds to 1 in (a) and seed pigmented outside corresponds to 2-5 in (a).

**3) 結果**

**品種の低温着色抵抗性**

「トヨハルカ」は、種皮の低温着色に対して強い抵抗性を示す品種であり、「トヨムスメ」で種皮に低温着色が生じるような気象条件であっても着色がほとんど生じなかった (Fig. III-1b)。また、開花期 7~21 日後の低温処理 (昼 18°C/夜 13°C) によって、「トヨムスメ」では 40%以上の種子で臍の周辺に着色を生じるが、「トヨハルカ」ではほとんど生じない (Fig. III-1c)。また、「十系 924 号」は十勝農試で選抜された育成系統であるが、低温着色抵抗性は「トヨムスメ」と「トヨハルカ」の中間的な表現型を示した (Fig. III-1c)。

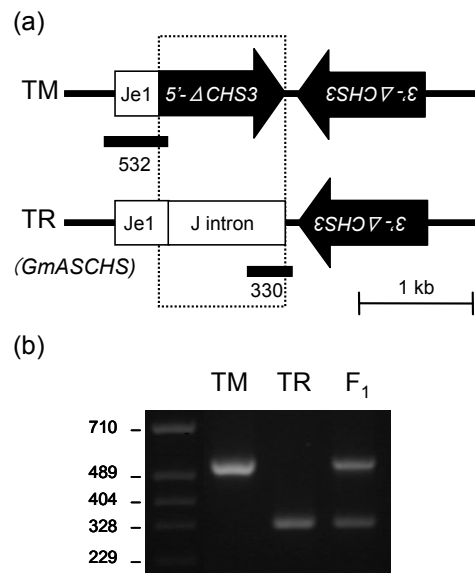


Fig. III-2. Structure of *GmIRCHS* in TR and TM, and specifically amplified fragments obtained using specific primer sets. (a) Structure of *GmIRCHS* in TM and TR (*GmASCHS*) as reported by Kasai (2009). Positions and orientations of *CHS* pseudogenes shown by black arrows. Inserted partial sequence of *GmJI* (*Glycine max* DnaJ like protein) exon 1 and intron (Je1 and J intron, respectively) shown in white boxes. Dotted frame shows region that differs between TM and TR. Regions specifically amplified from TM or TR using specific primers shown by hatched bars. Predicted nucleotide lengths shown below bars. (b) Fragments amplified by PCR using mixture of TM and TR specific primer sets. F<sub>1</sub>; F<sub>1</sub> plant derived from TM × TR cross.

***GmIRCHS* 座の遺伝子型判別マーカーの作成**

*GmIRCHS* は連鎖群 A2 に座上しており、ダイズの種皮色と臍色を決定する *I* 遺伝子座の *I* アリルだと考えられている (Kasai et al 2009)。「トヨハルカ」と「トヨムスメ」はいずれも種皮および臍色が黄白色で、*I* アリルをもっている

ことになるが、塩基配列レベルでみると *GmIRCHS* の構造が異なることが明らかにされ、「トヨハルカ」型 *GmIRCHS* は *GmASCCHS* と名づけられている (Kasai et al 2009). 両者の構造の違いを PCR ベースの DNA マーカーとするためにプライマーを設計した (Fig. III-2a). これらのプライマーセットを用いて、*GmIRCHS* の「トヨムスメ」型、「トヨハルカ」型およびヘテロ型を断片長によって識別できた (Fig. III-2b).

***GmIRCHS* と低温着色抵抗性との関係**

Kasai et al (2009) は、ダイズ種皮の低温着色が種皮における *CHS* 遺伝子の RNAi によるものであること及び *GmIRCHS* の逆位反復構造と関連のあることを示唆した. 本研究では、「トヨハルカ」と「トヨムスメ」の RILs である TR-TM と、「トヨハルカ」と「十系924号」の RILs である TR-924 を用いて、種皮の低温着色抵抗性と *GmIRCHS* との関連を調べた. *GmIRCHS* の遺伝子型は上述の PCR ベースの

DNA マーカーで評価し、低温着色抵抗性は低温処理により生じた着色の程度を低温着色指数によって評価した. 昼 15°C/夜 10°C の低温処理は、TR-TM については 12 日間とし、中程度の低温着色抵抗性をもつ「十系924号」を親とする RILs の TR-924 については 14 日間とした. *GmIRCHS* の遺伝子型と低温着色抵抗性の関係を Fig. III-3 に示した. 図に示されているとおり、*GmIRCHS* の遺伝子型（「トヨハルカ」型および「トヨムスメ」型）は低温着色抵抗性の表現型に強く影響を及ぼした. *GmIRCHS* がトヨハルカ型の系統の多くは、TR-TM では低温着色指数 0.6 以下に、TR-924 では 1.5 以下に分布した. また、低温着色指数が「トヨハルカ」並の系統 (Fig. III-3a および b で低温着色指数 0.0, Fig. III-3d および e で 0.0~0.9) は、大部分の系統は *GmIRCHS* が「トヨハルカ」型であった. しかし、*GmIRCHS* の遺伝子型だけで低温着色抵抗性の全てを説明できるわけではなかった. 例えば、Fig. III-3a の低温着色指数 0.6~3.3 および Fig. III-3c の 1.2~5.0 で *GmIRCHS* が「トヨハルカ」型の系統であった.

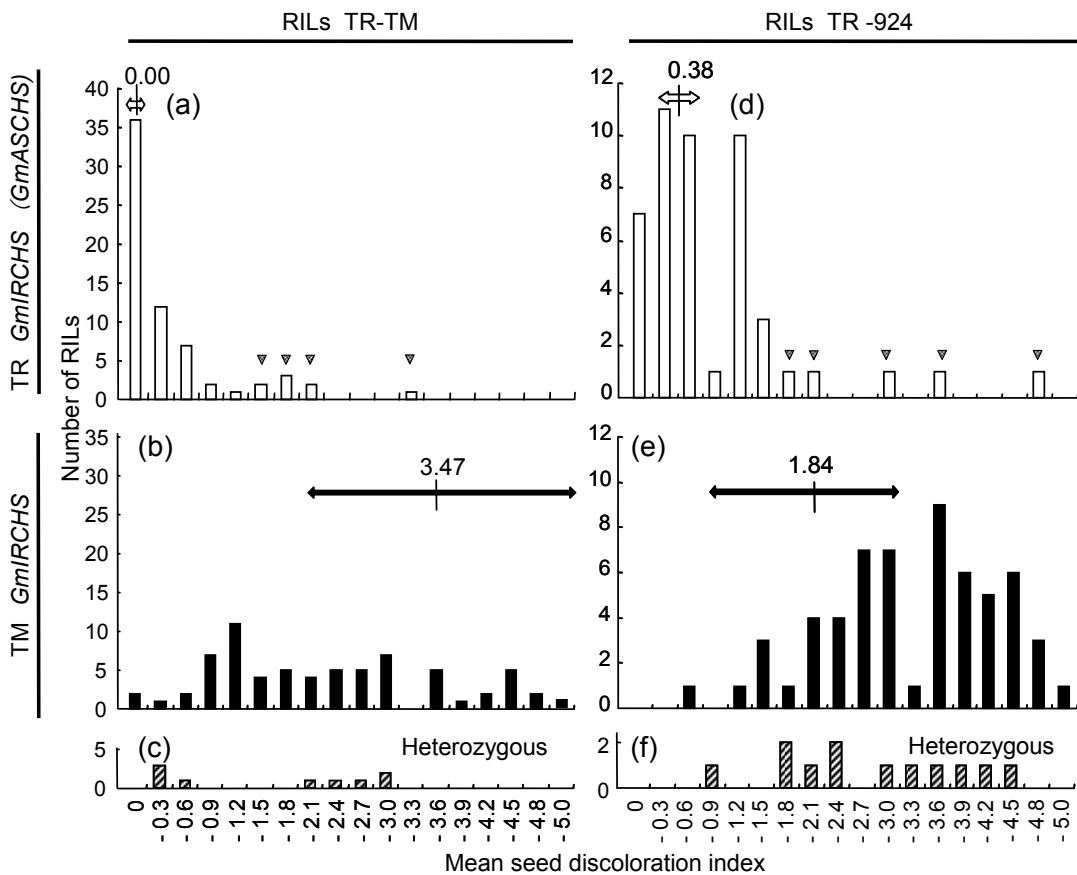


Fig. III-3. Effect of *GmIRCHS* genotype on frequency distribution for seed discoloration indices in F<sub>5</sub> RILs derived from TR × TM (a, b, c) or TR × Tokei-924 (d, e, f). (a, d) Lines with TR *GmIRCHS* (*GmASCCHS*), (b, e) TM *GmIRCHS*, and (c, f) heterozygous. Triangles represent lines poorly explained by *GmIRCHS* genotype. Horizontal arrows and values beside them indicate ranges (max–min) and averages of parents (*n*=7 for TR-TM, *n*=5 for TR-924).

**GmIRCHS 周辺領域のインターバルマッピング**

前述の結果から、低温着色抵抗性を支配する原因遺伝子は *GmIRCHS* と別に存在する可能性が出てきたため、*GmIRCHS* 周辺領域のインターバルマッピングを行った。TR-TM RILs ではこの領域にはほとんど多型がないため、材料として TR-924 RILs を使った。低温着色指数を形質値として用いたインターバルマッピングでは、*GmIRCHS* の位置に LOD カーブのピークが現れた (Fig. III-4)。以上の結果から、*GmIRCHS* そのものが低温着色抵抗性の原因遺伝子であるか、別の原因遺伝子が *GmIRCHS* に連鎖しているのであれば非常に強く連鎖しているものと考えられた。

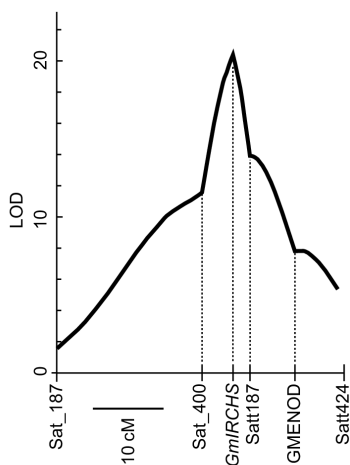


Fig. III-4. Interval analysis of QTL for CD tolerance around *GmIRCHS* in TR-924 RILs. CD tolerance was evaluated by determining mean CD indices after low temperature treatment.

**低温着色抵抗性 QTL の検出**

次に、*GmIRCHS* 領域の QTL 以外にも低温着色抵抗性に関する QTL が存在するかどうか調べるため、TR-TM RILs を用いた全ゲノムを対象とする QTL の検出を行った。この QTL の検出においては、TR-TM RILs の遺伝子型ではなく、

TR-TM RILs の姉妹系統の遺伝子型を用いた。全ゲノムをカバーする 105 マーカーを用いたコンポジットインターバルマッピングの結果、*GmIRCHS* 領域に LOD 値 14 程度の QTL が検出された他に、LOD 値が 2.0 を超える QTL が連鎖群 A2 と B2 に見出された (Fig. III-5)。この 2 つの QTL の存在を確かめるために改めて TR-TM RILs の遺伝子型を調べ、単マーカー解析を行った。その結果を Table III-1 に、さらに *GmIRCHS* をバックグラウンドに指定して同様に解析した結果を Table III-2 に示した。連鎖群 A2 の Sat\_383 周辺に検出された QTL の LOD 値は 0.8 であったことから (Table III-2)、この QTL は擬陽性であると判断された。しかし、連鎖群 B2 の Sat\_342 から Sct\_034 の領域に存在する QTL は LOD 値 2.1~4.0 を示し (Table III-2)、正確な位置は明らかではないものの、この領域に低温着色抵抗性に関する QTL の存在が確認された。上述の RILs について、この連鎖群 B2 に見つかった 2 つめの QTL の遺伝子型 (候補領域の中央に存在する Sat\_287 の遺伝子型を使用)、*GmIRCHS* の遺伝子型および低温着色指数の関係を解析したのが Fig. III-6 である。両方の RILs において、2 つめの QTL の遺伝子型は低温着色抵抗性の表現型に大きく影響していた。*GmIRCHS* が「トヨハルカ」型であるにも関わらず低温着色指数が小さかった (低温着色抵抗性が弱かった) 系統 (Fig. III-3a と d で三角形で示された系統) が存在したが、これらの系統では 2 つめの QTL の遺伝子型は「トヨムスメ」型であった (Fig. III-6a と c の三角で示した系統)。また、*GmIRCHS* が「トヨムスメ」型であっても、2 つめの QTL の遺伝子型が「トヨハルカ」型である系統は低温着色指数が小さかったことから、*GmIRCHS* の遺伝子型に関わらず 2 つめの QTL は効果があると考えられた (Fig. III-6b と d)。

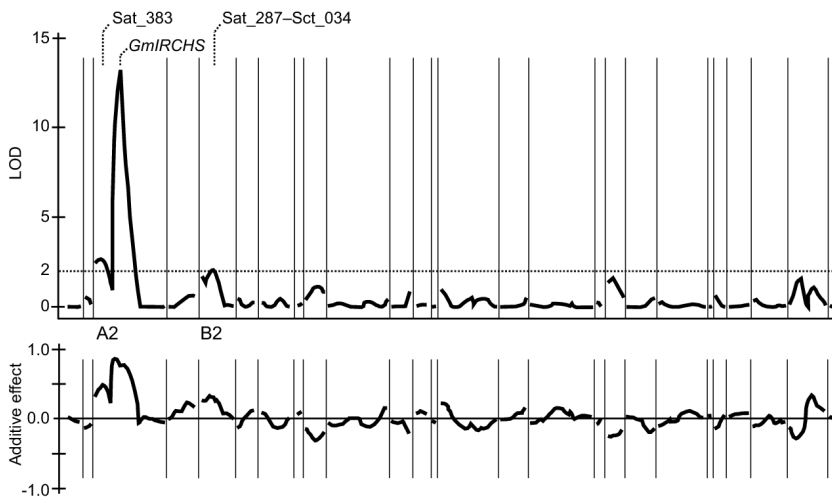


Fig. III- 5. Composite interval analysis of CD tolerance QTL for whole genome using a set of TR-TM RILs. CD tolerances were evaluated by determining mean CD index. Regions partitioned by two vertical lines represent each linkage group. Dotted vertical lines show regions with LOD scores >2.0. Additive effect indicates effect of TR alleles in comparison to TM..

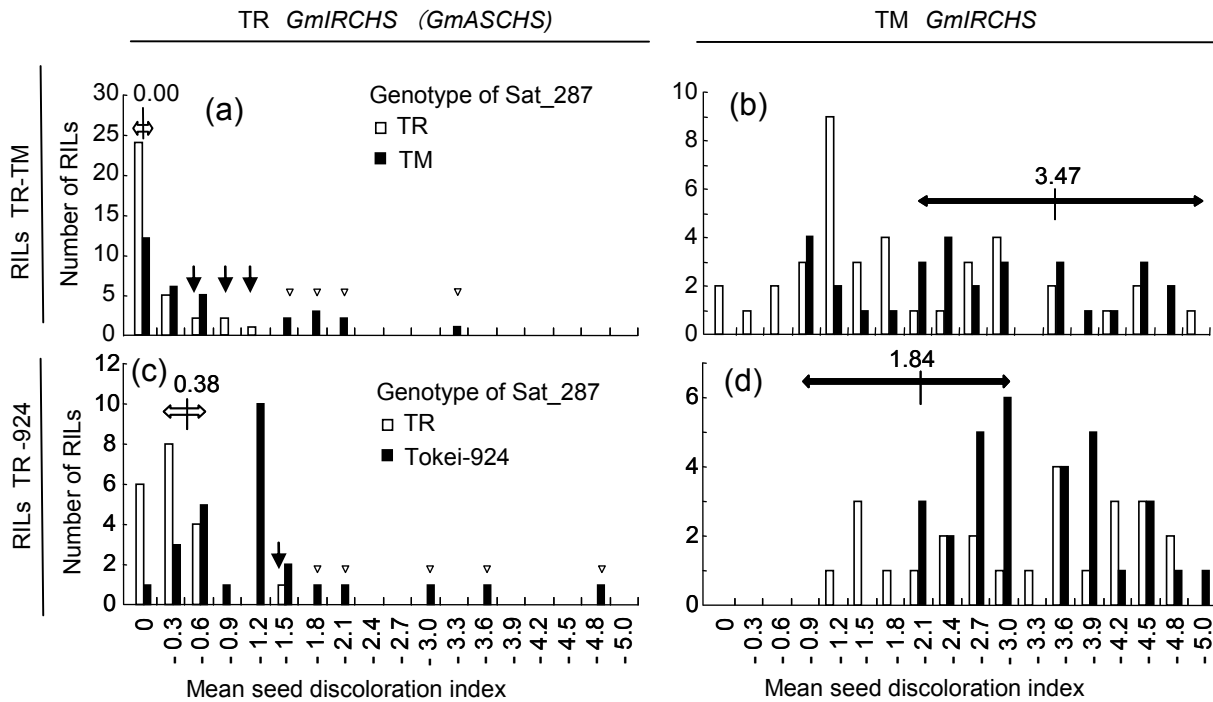


Fig. III-6. Effect of second QTL (Sat\_287) on frequency distributions of CD indices in different *GmIRCHS* genotype backgrounds. (a) Relationship between CD indices and Sat\_287 genotype in TR-TM RILs with TR *GmIRCHS*. (b) TR-TM RILs with TM *GmIRCHS*. (c) TR-924 RILs with TR *GmIRCHS*. (d) TR-924 RILs with Tokei-924 (= TM) *GmIRCHS*. Open bars represent lines with TR genotype at second QTL. Solid bars represent RILs with TM or Tokei-924 genotype at second QTL. Triangles represent the same lines indicated with triangles in Fig. III-3 (i.e., those poorly explained by *GmIRCHS* genotype). Vertical arrows indicate lines poorly explained by both *GmIRCHS* genotype and second QTL. Horizontal arrows and values are the same as in Fig. III-3 except for number of replicates of the parents ( $n=7$  for TR-TM,  $n=5$  for TR-924).

Table III-1. Results of single marker regression for mean seed discoloration index.

LG <sup>a</sup>	Marker	TR-TM RILs			TR-924 RILs		
		LOD	Variance (%)	Additive effect <sup>b</sup>	LOD	Variance (%)	Additive effect <sup>b</sup>
A2	<i>GmIRCHS</i>	16.6	41	0.91	20.2	56	1.19
	Sat_383	1.5	5	0.31	n.d.	n.d.	n.d.
B2	Sat_342	1.1	3	0.26	0.6	2	0.24
	Sat_287	1.4	4	0.29	0.4	2	0.19
	Sct_034	1.8	6	0.36	1.8	7	0.44

a Linkage groups designated according to Song et al (2004).

b Effect of Toyoharuka (TR) allele.

c n.d.; not determined.

Table III-2. Results of single marker regression for mean seed discoloration index with *GmIRCHS* background.

LG <sup>a</sup>	Marker	TR-TM RILs			TR-924 RILs		
		LOD	Variance (%)	Additive effect <sup>b</sup>	LOD	Variance (%)	Additive effect <sup>b</sup>
A2	Sat_383	0.8	1	0.17	n.d.	n.d.	n.d.
B2	Sat_342	4.0	7	0.38	1.4	2	0.24
	Sat_287	3.0	6	0.32	1.4	2	0.23
	Sct_034	2.7	5	0.33	2.1	4	0.32

a Linkage groups designated according to Song et al (2004).

b Effect of Toyoharuka (TR) allele.

c n.d.; not determined.

第2節 *GmIRCHS*のDNAマーカーとしての利用の可能性

1) 目的

種皮の低温着色は、開花 5~10 日後の極若い莢が日平均気温 15℃程度の低温に曝されることにより生じ（湯本・佐々木 1990, 岡ら 1989, Takahashi and Abe 1994, Takahashi 1997), 明瞭な品種間差がある（湯本・佐々木 1990, Srinivasan and Arihara 1994). このため、種皮の低温着色に対する抵抗性（低温着色抵抗性）は北海道のダイズ育種において最も重要な育種目標の 1 つである。低温着色抵抗性は、開花 1 週間後からの 14 日間の人工気象室を使った低温処理（昼 18℃/夜 13℃）によって評価できるが、人工気象室で年間に評価できる品種数は限られており、DNA マーカーによる選抜など多くの材料を評価できる選抜手法が求められている。前節において、「トヨハルカ」の低温着色抵抗性を決定しているのは *GmIRCH* または *GmIRCHS* に強く連鎖している遺伝子であることが示された。しかし、特定の交雑集団で見出された QTL は遺伝的背景が変わった場合効果が消失する場合がある。このため、本節では異なる遺伝的背景をもつ品種・育成系統を使って、*GmIRCHS* による効果の安定性を見るとともに低温着色抵抗性選抜のための DNA マーカーとして利用可能か検証する。

2) 材料及び方法

北海道の育種プログラムにおける低温着色抵抗性特性検定（2008 年）に供試した北海道立十勝農試および中央農試（現北海道総合研究機構十勝農試および中央農試）で育成された 7 品種（「トヨムスメ」と「トヨハルカ」を含む）と 33 の有望系統を用いた。低温着色抵抗性は特性検定の結果を用い、臍周辺の着色粒率と臍そのものの着色粒率を指標とした。低温着色抵抗性特性検定の方法は、前節に記述されている 18℃昼/13℃夜の 14 日間処理と同一である。*GmIRCHS* の遺伝子型は、上述の PCR による DNA マーカーで識別した。

3) 結果

前述の結果により、*GmIRCHS* は低温着色抵抗性の原因遺伝子であるか、低温着色抵抗性遺伝子に強く連鎖していることが明らかになった。そこで、*GmIRCHS* の遺伝子型が、低温着色抵抗性系統の選抜のための DNA マーカーと

して有効かどうか明らかにするために、由来の異なる品種・育成系統（7 品種 33 系統）を用いて *GmIRCHS* の遺伝子型と低温着色抵抗性の表現型との関係を調査した。*GmIRCHS* の遺伝子型と低温着色抵抗性の表現型の関係は Fig. III-7 のとおりで、低温処理条件において臍および臍の周辺着色粒率が低い系統では、*GmIRCHS* が「トヨハルカ」型の系統が多かった。特に、臍周辺着色粒率が 20%以下かつ臍着色粒率が 0%の低温着色抵抗性が極めて強い品種・系統は全て *GmIRCHS* が「トヨハルカ」型であった。これらのことから、*GmIRCHS* は低温着色抵抗性の DNA マーカーとして十分利用可能であることが示された。

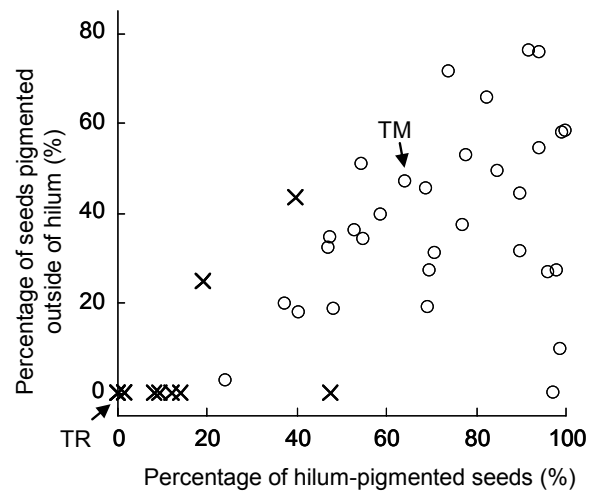


Fig. III-7. Effects of *GmIRCHS* genotype on CD tolerance among elite breeding lines. Low temperature treatment and axis labels are the same as in Fig. III-1c. Open circles and crosses represent breeding lines with TM and TR genotype, respectively, at *GmIRCHS*. Plots of Toyomusume (TM) and Toyoharuka (TR) are indicated with arrows.

第 3 節 考察

*GmIRCHS* と種皮の低温着色抵抗性

低温着色抵抗性の品種間差と、低温処理時の *CHS* 遺伝子に対する siRNA の蓄積量の品種間差に関連があることが報告されている（Kasai et al 2009）。また、*GmIRCHS* 構造を失うような突然変異体では *CHS* 遺伝子に対する siRNA が種皮で蓄積されなくなることから（Senda et al 2004, Kasai et al 2007, Kurauchi et al 2009）*GmIRCHS* または *GmIRCHS* を含む領域は、種皮における *CHS* 遺伝子に対する siRNA の唯一の供給源であると考えられる。これ

らの報告と本研究の結果から、*GmIRCHS* の構造の違いが「トヨハルカ」と「トヨムスメ」の間の低温着色抵抗性の差の原因である可能性が高い。また、本研究では *GmIRCHS* が「トヨハルカ」型であっても、ある程度種皮の低温着色を生じる系統が出現したが (Fig. III-6 および III-7)、これは「トヨハルカ」型 *GmIRCHS* による低温着色抵抗性が量的なものであるためと考えられた。実際に、2003 年の大樹町における試験栽培においては「トヨハルカ」で明瞭な低温着色が確認されており、さらに「トヨハルカ」を開花 1 週間後から昼 15°C/夜 10°C で 4 週間低温処理した場合、昼 18°C/夜 13°C で 2 週間低温処理した「トヨムスメ」と同程度の低温着色が観察されている。低温により RNAi が阻害されることは一般的に知られており (Kalantidis et al 2002, Szitty et al 2003)、種皮の低温着色も低温により *CHS* 遺伝子の RNAi が阻害されることにより生じると推測されている (Kasai et al 2009)。本研究において、*GmIRCHS* の構造が異なると低温による RNAi の阻害の程度が異なる可能性が示唆されたが、「トヨハルカ」型 *GmIRCHS* と「トヨムスメ」型 *GmIRCHS* の構造上の違いは、逆位反復配列の有無並びに *GmJ1* (*Glycine max* DnaJ like protein) のエクソンおよびイントロンの挿入の有無であった (Fig. III-2)。これらの構造上の違いがどのように低温着色抵抗性の品種間差に結びついているのか非常に興味深い、トランスジェンによる RNAi において低温感受性の高低が存在する事例が報告されており (Sós-Hegedus, 2005)、共通のサイレンシングを制御するメカニズムを有する可能性も考えられる。

ダイズの成熟期や開花期を支配する熟性遺伝子が、低温着色抵抗性に影響を与えることが知られている (Takahashi and Abe 1999, Benitez et al 2004)。本研究で用いた材料では、既存の熟性遺伝子の近傍に低温着色抵抗性の QTL は見出されなかった。これは、RILs の親は全て北海道に高度に適応した品種・育成系統であるため、同じ熟性遺伝子のセットをもっていたからであると考えられる。Githiri et al (2007) は低温着色抵抗性の QTL を本研究で見出された QTL とは異なる領域に見出している。これは、低温着色抵抗性の母本が異なるからであると思われるが、「トヨハルカ」の低温着色抵抗性は Githiri et al (2007) が用いた「コガネジロ」より強いため、本研究で見出された *GmIRCHS* は Githiri et al (2007) の発見した QTL よりさら

に実用性が高い。

#### *GmIRCHS* 以外の QTL

*GmIRCHS* の遺伝子型で低温着色抵抗性の全てを説明できるわけではなかった (Fig. III-3a で低温着色指数 >0.3, Fig. III-3d で >0.9 の系統)。これらのことから *GmIRCHS* 以外の低温着色抵抗性の QTL の存在が予想されたが、本研究では連鎖群 B2 の Sat\_342 から Sct\_034 の近傍領域に 2 つめの QTL が検出された。この QTL の寄与率はそれほど高くはないが、この 2 つめ QTL を考慮すると、*GmIRCHS* の遺伝子型のみで十分な説明がつかなかった系統の表現型がうまく説明できる (Fig. III-7a および c)。ただし 2 の QTL を用いても説明がつかない系統も残されている (Fig. III-7 の矢印の系統)。この原因として環境変異の他、今回の QTL 解析では見つけることができなかった QTL が存在している可能性が考えられた。連鎖群 B2 に見出された QTL は、RNAi に関する遺伝子、低温生理に関する遺伝子および色素合成系に関する遺伝子などの可能性が考えられ、今後のファインマッピングとコードされている遺伝子の機能の解明が望まれる。

#### *GmIRCHS* の低温着色抵抗性選抜マーカーとしての利用

本研究の結果から、*GmIRCHS* は種皮の低温着色抵抗性の DNA マーカーとして有用であると示された。現在の低温着色検定法では人工気象室を使うため、年間に評価できる系統数は 50 系統程度であり、初中期世代における低温着色抵抗性の選抜は偶発する低温着色多発年の圃場での選抜に頼らざるをえない。しかし、*GmIRCHS* を DNA マーカーとして利用することによって、より早い世代から多くの系統を確実に選抜できる。また、「トヨハルカ」のもつ耐冷性のうち、低温条件での種子の肥大性についても *GmIRCHS* の近傍に大きな QTL が見出されており (Ikeda et al 2009)、*GmIRCHS* による選抜は種皮の低温着色と低温下での種子の肥大性の両方を同時に付与できる可能性がある。

#### *GmIRCHS* の由来

「トヨハルカ」型の *GmIRCHS* が低温着色抵抗性の原因遺伝子であると示唆されたが、上述の *GmIRCHS* に関する DNA マーカーを用いると、「トヨハルカ」の両親である「十

系 793 号」および「十交 6225F6」のいずれも「トヨムスメ」型の *GmIRCHS* を持つと推測される (Fig. III-8). また Fig. III-7 に用いた品種系統の「トヨハルカ」型 *GmIRCHS* の由来は, 系譜をたどると, ほぼ例外なく「トヨハルカ」または「十育 225 号」に行き当たる. しかし「十育 225 号」の両親のいずれも「トヨムスメ」型 *GmIRCHS* を持つと推測される (Fig. III-8). 「トヨハルカ」および「十育 225 号」の持つ「トヨハルカ」型 *GmIRCHS* は, 突然変異またはアウトクロスによってもたらされたと考えられるが, 育種プログラムにおいてアウトクロスの頻度はそれほど高くはないことから, 少なくとも 1 回の突然変異を経て「トヨハルカ」型 *GmIRCHS* が生じた可能性が考えられる. 商業的な採種および育種プログラムの中で, 「トヨムスメ」型 *GmIRCHS* から *i* アレル (種皮全面が茶色に着色する) への突然変異が非常に高率で生じるのが観察されており, 「トヨムスメ」型 *GmIRCHS* から「トヨハルカ」型 *GmIRCHS* への突然変異が生じる可能性は十分あると考えられる.

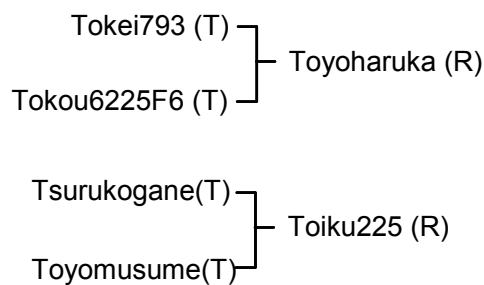


Fig. III-8. Parental lines of Toyoharuka and Toiku225. Sign in the parenthesis indicates the genotype for the *GmIRCHS* locus (R: Toyoharuka-type; T: Toyomusume-type).



## 第4章 キュウリモザイクウイルスの感染による種皮異常着色の原因解明

### 第1節 皮異常着色の原因となるCMV遺伝子の同定

#### 1) 目的

前章ではダイズ種皮の低温着色を研究の対象としたが、これと類似する現象としてウイルス感染により生じる種皮の褐斑が知られている。CMV (キュウリモザイクウイルス), SMV (ダイズモザイクウイルス) などに感染した場合、低温着色と同様に種皮に褐斑を生じる (Kennedy and Kampmeier 1967)。ウイルス感染による褐斑の発生はダイズ特有の現象であり、その機作については不明な点が多い。しかし、前章で述べたとおり栽培ダイズの一般的な種皮色である黄色は種皮においてカルコンシンターゼ (CHS) の mRNA が RNAi によって分解されることにより保たれていることが明らかになっている (Todd and Vodokin 1996, Kasai et al 2004, Senda et al 2004, Kasai et al 2009, Kurauchi et al 2009, Tuteja et al 2009)。一方、CMV, SMV など褐斑を誘導するウイルスは、宿主の RNAi を抑制する サプレッサー をコードしていることも明らかになってきた (Kasschau and Carrington 1998, Lucy et al 2000, Li and Ding 2001, Guo and Ding 2002)。これらの知見を併せると、SMV, CMV などがコードする RNAi サプレッサーが CHS 遺伝子の RNAi を抑制することによって褐斑を生じているという仮説が考えられるが、これまでウイルスの RNAi サプレッサーと褐斑の関係に注目した研究は行われてこなかった。本章では、この仮説を検証するために、感染により褐斑を生じる CMV と生じないシュードリコンビナン CMV の間でキメラウイルスを作成し、CMV の褐斑誘導に CMV の RNAi サプレッサーである 2b 遺伝子が関わっているかどうかを明らかにする。

#### 2) 材料及び方法

##### CMV ダイズ系統の感染性 RNA の構築

キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV) のゲノムを再構成して組換えウイルスを作成するため、ウイルスゲノム全長をカバーする cDNA を用いた。CMV の Y 系統 (CMV-Y) については cDNA を挿入した既存のプラスミド pCY1, pCY2, および pCY3 を用いた (Suzuki et al 1991)。CMV ダイズ C 系統 (CMV-SC) につ

いては、CMV-Y の例 (Suzuki et al 1991) に基づいて cDNA クローンを作成した。方法を簡単に述べると、*Nicotiana benthamiana* に CMV-SC を接種し、全身病徴が現れた葉を収穫し、定法によりウイルス粒子を純化した。純化ウイルスよりクロロホルム/フェノール法によりタンパク質を除去し、得られた RNA を RT-PCR のテンプレートとした。5' のプライマーには RNA 転写用の T7 プロモーター配列である GATTAATACGACTCACTTATA を余分に付加し、Takara RNA LA PCR kit (Takara, Japan) により RT-PCR を行って cDNA を得た。cDNA はプラスミドベクターである pUC119, pGEM-T Easy または pBluescript KS (-) のいずれかに、あらかじめ 5' および 3' のプライマーに付加した制限酵素サイトとベクターのマルチクローニングサイトを使って挿入した。ただし、RNA2 および RNA1 については一度のライゲーションでは全長 cDNA を挿入できなかったため、ウイルス cDNA 内部に存在する制限酵素サイトを使って断片化し、サブクローニングした後、再度つなぎ合わせて全長 cDNA とした。完成した感染性全長 cDNA を Fig. IV-1 に示した。感染性全長 cDNA からの転写は、Ahluquist and Janda (1984) の方法を元に、キャップアナログ (Invitrogen life technology, Tokyo, Japan) を使った手法 (Suzuki et al 1991) で行った。キメラウイルスは、CMV-Y および CMV-SC の cDNA が共通してもつ制限酵素サイトを使って制限酵素サイト間の断片を入れ替えることによって作成した。RNA2 に関するキメラウイルスの作成に使った制限酵素サイトは Fig. IV-1 に示した。キメラウイルスになっていることの確認は、作成したクローンをシーケンスすることによって行った。RNA1, RNA2, RNA3 に対応する cDNA から転写した RNA を混合して *N. benthamiana* に接種し、全身感染が確認された個体の葉を収穫し、純化したものをダイズへの接種源とした。

##### 接種試験

植物は温室で 24~26°C で 16 時間日長で育成した。ダイズの初生葉に傷をつけるためのカーボランダムを振りかけた後、0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) 中に 10µg/ml に調整した純化ウイルスを滴下し、薄手のラテックス製指サツ

クで擦り接種した。ダイズへの全身感染は、モザイク病徴および抗 CMV 抗体を使った ELISA (double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay) により確認した。ダイズ品種「白豆」(褐毛, 種皮色緑, 臍色黒, 子葉色黄) を用いた。

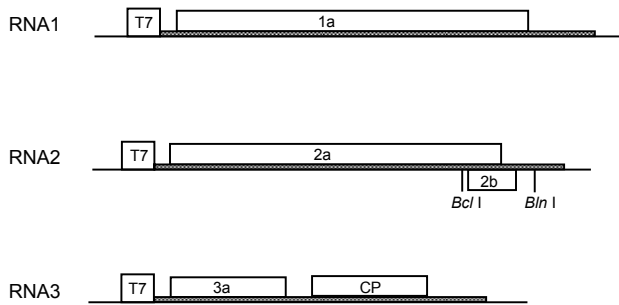


Fig. IV-1. Schematic representation of infectious cDNA clone of CMV-SC. T7 represent T7 promoter for RNA transcription *in vitro*. Hatched rectangles are cDNAs from virus genome. Open rectangles show ORFs of virus coded genes. The restriction sites used to generic chimeric viruses are shown by vertical bars in RNA2.

#### 種皮からのウイルスの検出

若いダイズ種子を臍の長辺方向と直角に剃刀をいれて断面をむき出しにし、ニトロセルロースメンブレン (Hybond C pure, Amersham, UK) に強く押し付けてブロットした。ブロットしたメンブレンを IgG-AP コンジュゲート抗 CMV 抗体を含むブロットング溶液中でインキュベーション後、PBS-tween で 3 回洗浄し、nitro blue tetrazolium chloride (NBT) によりアルカリフォスファターゼ活性を可視化しフラットヘッドスキャナーで画像を取り込んだ。

#### 種皮の褐斑の評価

上述の条件で、CMV-SC, CMV-Y, シュードリコンビナントウイルスまたはキメラウイルスをダイズに接種し、病徴および ELISA によりウイルスの全身感染を確認した。その後成熟したダイズの種子を収穫し、褐斑を調査した。[(褐斑が認められた粒数) / (調査粒数) × 100] により褐斑粒率 (%) を算出した。

### 3) 結果

#### 褐斑粒の発生を決定しているウイルスゲノム RNA

CMV-Y はダイズに感染することはできないが、その RNA3 を CMV-SC 由来に交換するとダイズに全身感染でき

ようになる (Hong et al 2007)。RNA3 を CMV-SC 由来に固定し、RNA1 および RNA2 を CMV-Y または CMV-SC 由来としたシュードリコンビナントウイルスを作成し、ダイズ品種「白豆」に接種した。ダイズが成熟後、種子に発生した褐斑を調査したところ、RNA2 が CMV-SC 由来であった場合のみ、種皮に褐斑が発生した (Fig. IV-2 Virus C と CMV-SC)。

ウイルスが種皮に移行できずに褐斑粒が発生しない可能性が考えられたため、ウイルスの種皮からの CMV の検出を試みた。Mock 接種したダイズの種皮からは CMV は検出されなかったが、全てのシュードリコンビナントウイルスで種皮から CMV が検出された (Fig. IV-2)。また、いずれのシュードリコンビナントウイルスでも種皮において一様に存在しているわけではなく、ウイルス量の多い部分と、ほとんど検出されない部分が見られた。さらに、CMV-SC では次世代の組織である子葉からウイルスが検出された。これは、CMV-SC が高頻度で種子伝染するウイルスであることと関係があると思われた。

#### 褐斑粒の発生を決定しているウイルス遺伝子

CMV の 2b 遺伝子が、ダイズ種皮における *CHS* 遺伝子の RNAi を抑制し、褐斑粒を生じている可能性が考えられたことから、2つの制限酵素サイト *Bcl I* および *Bln I* に挟まれた 2b 遺伝子を含む領域を、CMV-Y と CMV-SC の間で交換したキメラウイルスを作成し、ダイズに接種した場合の褐斑粒の発生を調査した。2b 遺伝子を含む領域が CMV-Y 由来であった場合、その他の領域が CMV-SC 由来であっても褐斑は全く生じなかった (Fig. IV-3 SC-Y2b)。その一方で、2b 遺伝子を含む領域が CMV-SC 由来であれば、RNA1 と RNA2 のそのほかの領域が CMV-Y 由来であっても褐斑を生じた (Fig. IV-3 Y-SC2b)。このことから、CMV-SC がダイズ種皮に褐斑を生じる上で 2b 遺伝子を含む領域が重要な働きをしていることが明らかになった。

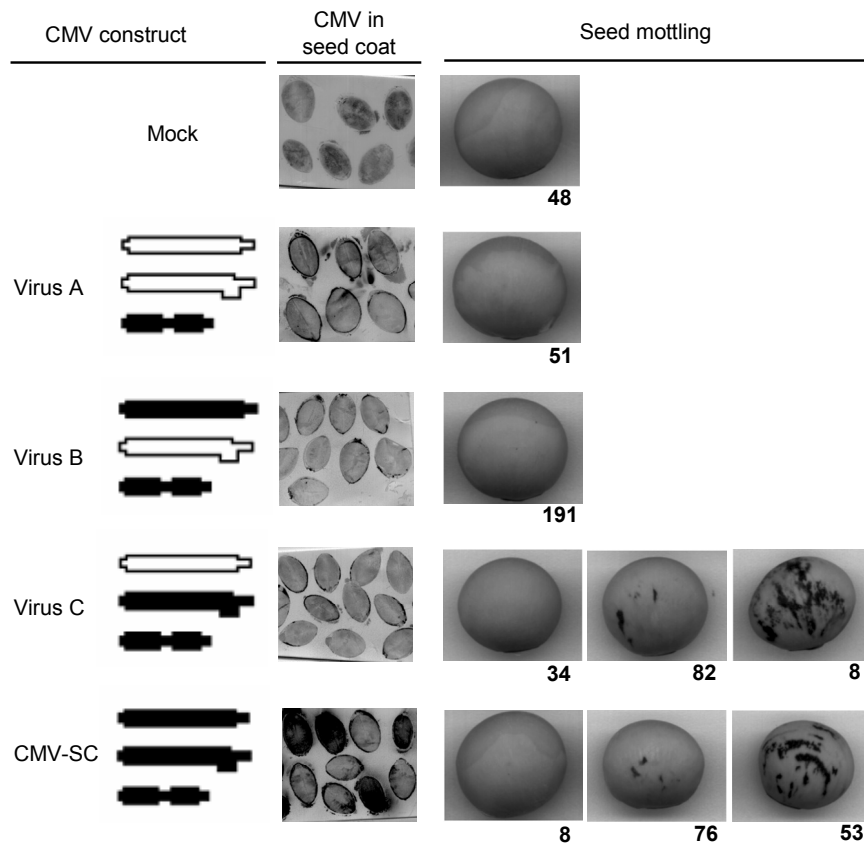


Fig. IV-2. Seed mottling caused by CMV-SC or pseudorecombinant viruses between CMV-SC and CMV-Y. A schematic representation of virus genome represented in the left column. RNA1, RNA2 and RNA3 are shown from top to bottom. Broader parts represent ORFs 1a, 2a, 2b, 3a and CP gene. Virus genome derived from CMV-Y is shown by open rectangle and from CMV-SC is shown by solid rectangle. Virus coat protein detected in seed coat with tissue immunoblotting is represented in the next column. Seed mottling symptoms caused by pseudorecombinant viruses are shown in the right columns. Seed mottling symptom were shown in three categories; no mottling, faint mottling and severe mottling from left to right. The number at the corner of the pictures shows the number of the seeds in observed symptom.

CMV genome composition	Seed mottling percentage (%)
Mock	0
Virus A	0
SC-Y2b	0
Y-SC2b	68
CMV-SC	99

Fig. IV-3. Seed mottling caused by CMV-SC or chimeric recombinants between CMV-SC and CMV-Y. A schematic representation of virus genome structures are represented in the left column. Restriction sites used for developing chimeric viruses are shown in Fig. IV-1. Genomic representations are same as in Fig. IV-2. Seed mottling percentages caused by the chimeric viruses are shown in the right column.

第 2 節 ダイズへの全身感染を決定している CMV 遺伝子の同定

1) 目的

CMV のダイズ系統は、特定の品種に全身感染できるかどうかの違いにより CMV-SC, CMV-SD などいくつかの系統に分類されている (高橋ら 1987). CMV-SD はダイズ品種「Harosoy」に全身感染できるのに対して, CMV-SC は全身感染できない. 前節において, RNAi サプレッサーである 2b 遺伝子がダイズ種皮における褐斑の誘導に重要な役割を果たしていることが示唆されたが, 2b 遺伝子には宿主の抵抗性応答を抑制するなど RNAi サプレッサー以外の機能も知られている (Ji and Ding 2001). 本節では 2b 遺伝子の RNAi サプレッサー以外の機能に対する理解を深めるため, CMV-SC と CMV-SD の間でシュードリコンビナントウイルスおよびキメラウイルスを作成し, それらが「Harosoy」に全身感染するかどうかを調査することによって 2b 遺伝子が特定のダイズ品種に全身感染するかどうかの決定因子であるかどうかを検証する.

2) 材料及び方法

シュードリコンビナントウイルスおよびキメラウイルスの作成

前節と同様の方法を使って CMV のダイズ D 系統 (CMV-SD) の感染性 cDNA クローンを構築し, さらに, CMV-SC と CMV-SD の間でシュードリコンビナントウイルスおよびキメラウイルスを作成した. ただし, RNA2 の 2b

遺伝子領域の組換えに使った制限酵素サイトは *FbaI* と *BlnI* である.

ウイルスの接種

前節と同様の方法で行った. CMV-SD は全身感染するが, CMV-SC が全身感染しないダイズ品種として「Harosoy」を, いずれの系統も全身感染するダイズ品種として「出来過」を用いた.

3) 結果

「Harosoy」への全身感染を決定しているウイルスゲノム RNA

CMV のダイズ系統が特定の品種に全身感染するかどうかを決定しているウイルス側の遺伝子を明らかにするため, CMV-SC と CMV-SD の間で構築したシュードリコンビナントウイルスをダイズ品種「Harosoy」および「出来過」に接種した. 「出来過」は CMV-SC および CMV-SD のいずれのウイルス系統も全身感染できる品種で, 「Harosoy」は CMV-SC は全身感染できないのに対して CMV-SD は全身感染できる品種である (Fig. IV-4). 両ウイルス間のシュードリコンビナントウイルスである CD1~CD6 は全て, 「出来過」に全身感染した (Fig. IV-4). しかし, 「Haarosoy」には RNA2 および RNA3 の両方が CMV-D 由来である CD2 のみが全身感染した. このことから, 「Harosoy」へ全身感染するかしないかは RNA2 と RNA3 の両方が関与していることが明らかになった.




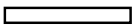


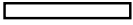
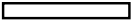

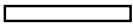

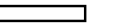












Virus name	Genome composition			Systemic infection at		
	RNA1	RNA2	RNA3	Soybean cv.		<i>Nicotiana benthamiana</i>
				Harosoy	Dekisugi	
CMV-SD				14/14	3/3	2/2
CD2				11/12	2/2	2/2
CD3				0/12	2/2	2/2
CD1				0/12	2/2	2/2
CD4				0/4	2/2	2/2
CD5				0/4	2/2	2/2
CD6				0/4	2/2	2/2
CMV-SC				0/14	1/1	1/2

Fig. IV-4. Schematic representation of the genome structure and infectivity of the pseudorecombinants constructed between CMV-SC and CMV-SD. Sequences corresponding to CMV-SC and CMV-SD are indicated with hatched and black boxes, respectively. Soybean cultivars tested are Harosoy and Dekisugi. Infectivity is indicated as number of systemically-infected plants/number of plants inoculated. The purified virus was inoculated at 100 µg/ml and systemic infection was confirmed by ELIS

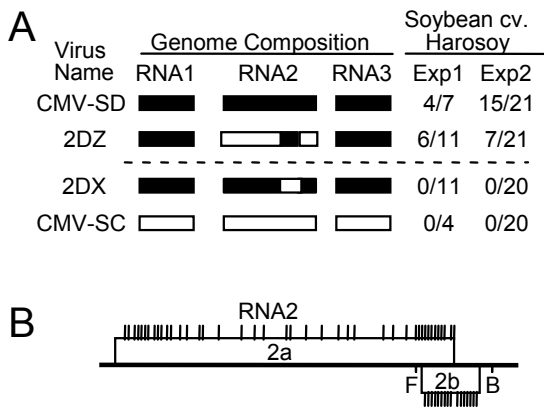


Fig. IV-5. Schematic representation of the genome structure and infectivity of the chimeric recombinants constructed between CMV-SC and CMV-SD. A, Chimeric RNA2 transcripts were inoculated with RNAs 1 and 3 of CMV-SD. B, Schematic map of the genome structure of RNA2. Restriction sites used are B (*BlnI*) and F (*FbaI*). Vertical bars above the ORFs are positions of different amino acids between CMV-SC and CMV-SD. For other details, see the legend to Fig. IV-4.

#### 「Harosoy」への全身感染を決定しているウイルス遺伝子

シュードリコンビナントウイルスを使った実験で、「Harosoy」へ全身感染するかしないかはCMVダイズ系統のRNA2とRNA3の両方が関与していることが明らかになった。本研究では、RNA2に注目し、RNA2にコードされている2つの遺伝子2aおよび2bのうち、2b遺伝子を含む領域を交換したキメラウイルスを作成し、「Harosoy」に接種した。このとき、RNA1とRNA3はCMV-SD由来に固定した。CMV-SDの2b遺伝子を含む領域のみをCMV-SCに入れ替えたキメラウイルス2DXはCMV-SDと異なり「Harosoy」に全身感染できなかった (Fig. IV-5)。一方で、RNA2の大部分がCMV-SCであるにも関わらず、2b遺伝子周辺をCMV-SDとしたウイルス2DZは、CMV-SDと同じように「Harosoy」に全身感染できた (Fig. IV-5)。これらのことから、「Harosoy」に全身感染できるかどうかを決定しているRNA2上の遺伝子領域は2b遺伝子を含む領域であることが明らかになった。

### 第3節 考察

#### CMVの感染がダイズ種皮に褐斑を生じる機作

RNA3をCMV-SC由来に固定し、RNA1およびRNA2の由来が異なる様々なシュードリコンビナントウイルスとキ

メラウイルスをダイズに接種した結果、2b遺伝子を含む領域が種皮に褐斑を生じるか生じないかを決定していた。つまり、CMV-SCの2b遺伝子を含む領域はダイズ種皮に褐斑を生じる能力を有し、CMV-Y由来の同領域は褐斑を誘導する能力を持たないということが明らかになった。CMVの2b遺伝子は2a遺伝子とオーバーラップしており、今回キメラウイルスの作成に用いた領域では、CMV-YとCMV-SC間で2b遺伝子と2a遺伝子の両方に多くのアミノ酸配列に差異があった。このことから、褐斑の原因が2b遺伝子なのか2a遺伝子なのか断定できない。また、RNAレベルでこの領域が何らかの働きをしている可能性も考えられる。しかし、ダイズ種皮の黄色はRNAiによって*CHS*遺伝子が抑制されることにより保たれていること (Todd and Vodokin 1996, Kasai et al 2004, Senda et al 2004, Kasai et al 2009, Kurauchi et al 2009, Tuteja et al 2009)、CMVの2b遺伝子は宿主のRNAiに対する強力なサプレッサーであること (Lucy et al 2000, Li and Ding 2001)、及び本研究の結果を合わせると、CMVの感染によるダイズ種皮の褐斑は、CMVの2b遺伝子によりダイズ種皮でのRNAiが抑制され、サイレンスしていた*CHS*遺伝子の発現が部分的に回復することにより生じているのではないかと推測できる。また、この場合、ダイズ種皮においてCMV-SCとCMV-Yでは2b遺伝子のRNAiを抑制する能力に差があることになる。RNAiおよびウイルスのRNAiサプレッサーとダイズ種皮の褐斑関係については、今後別の角度からの検証が必要である。猿田ら (2010) は、SMVによる褐斑が発生しない品種を使って、褐斑の発生に必要なダイズ側のQTLを連鎖群Kに見出ししており、ダイズ側の関与遺伝子が明らかにされることによってRNAiおよびウイルスのRNAiサプレッサーとダイズ種皮の褐斑関係が明らかにできる可能性がある。

シュードリコンビナントを使った実験では、CMV-SCで種皮だけでなく子葉からウイルスが検出された (Fig. IV-2)。その他のシュードリコンビナントでは子葉から検出されず、非常に興味深い現象である。CMV-SCは高頻度で種子伝染することが知られており、このように子葉から高い濃度でウイルスが検出されるのは種子伝染性と関係が深いと考えられる。また、この子葉へのウイルスの移行には、Virus B, Virus CおよびCMV-SCの比較から、RNA1とRNA2の両方が関与していると考えられる (Fig. IV-2)。

### CMV の 2b 遺伝子の果たす役割

ダイズ品種「Harosoy」に全身感染するかどうかにも CMV の 2b 遺伝子の関与が示唆された。CMV の 2b 遺伝子は植物の RNAi のサプレッサーであり、宿主の RNAi によるウイルスに対する防御反応に干渉することによって全身感染を容易にしていると考えられている (Lucy et al 2000, Li and Ding 2001)。また、宿主側には 2b 遺伝子産物のターゲットとなるタンパク質が存在すると考えられることから (Hamera et al 2011)、CMV の 2b 遺伝子産物のウイルス系統間での変異と 2b 遺伝子産物のターゲットとなる宿主遺伝子産物の品種間での変異とのマッチングによって全身感染するかしないかが決定されていても不思議ではない。2b 遺伝子はいわゆる R 遺伝子による動的抵抗性に対するサプレッサーの機能を持つことが知られており (Ji and Ding

2001)、RNAi を介さずに宿主の動的抵抗性に干渉することで CMV のダイズにおける全身感染に関わっている可能性もある。

このように CMV の 2b 遺伝子は、褐斑の誘導や全身感染成立など育種的にみても興味深い現象に関わっている可能性が示唆された。育種的な観点から見ると、2b 遺伝子産物のターゲットとなる宿主の遺伝子産物(または 2b 遺伝子産物と相互作用のある宿主遺伝子産物)は褐斑の誘導およびウイルス抵抗性という観点から興味深い。実際、猿田ら (2010) によって、SMV に感染しても褐斑を生じないという表現型の原因遺伝子がファインマッピングされているが、こういった遺伝子は 2b 遺伝子産物のターゲットまたは相互作用を有する遺伝子の可能性がある。また、CMV の全身感染に関しても QTL が見つかっている (Ohnishi et al 2011)。

## 第5章 総合考察

本研究は、まずダイズの低温着莢障害の解析からスタートした。着莢障害に加えて、低温によって顕著に現れる障害として種皮の斑紋（種皮の低温着色）があり、次にこのメカニズムの解明と抵抗性品種の選抜手法の確立を目指した。種皮の斑紋はウイルスの感染によっても誘導されるため、低温およびウイルス感染による斑紋の形成に共通するメカニズムが存在すると考え、後半部ではウイルス遺伝子と斑紋の形成の関係を解析している。最後にこれらを総合した考察を以下に述べる。

### ダイズ耐冷性のさらなる向上の可能性

世界的に見ても、北海道は最も低温の影響を受けるリスクが高いダイズ栽培地域の1つであるが、その中で冷害による収量の低下と種皮の低温着色による外観品質の低下が最も重要な低温による障害である。これまで、北海道におけるダイズ育種プログラムの中では耐冷性の検定法の開発および耐冷性による選抜を中心に取り組みがなされ、「ユキホマレ」、「トヨハルカ」、「ゆきぴりか」の育成など大きな成果を上げてきた。一方2003年の十勝地方において、開花前からの低温への遭遇により山麓地帯や沿海部では着莢障害が見られ、上士幌町に設置した耐冷性現地選抜圃場でも、激しい着莢障害と収量の低下が観察されたが、その収量低下の品種間差にはこれまでの耐冷性の評価では説明できないものもあった。本研究では、低温による着莢障害からみた低温感受性期を明らかにするとともに、これまであまり評価されてこなかった四分前期前後における低温感受性についても品種間変異があることを明らかにした。この四分前期前後の耐冷性（“花粉形成期の耐冷性”と定義）を考慮することによって、2003年の上士幌町での収量低下程度の品種間差をよりよく説明できた。このことから、これまでの開花期の耐冷性の評価に加えて花粉形成期の耐冷性を評価することで、より耐冷性の優れた品種を育成することが可能になると考えられる。本研究で実施した受精率を指標とした評価方法は、育種プログラムの中でルーチンで利用するにはやや煩雑であり、今後さらに簡便な花粉形成期耐冷性の評価法の開発が必要である。

種皮の低温着色については、湯本・佐々木（1990）の開

発した評価法を用いることで、「ユキホマレ」、「トヨハルカ」、「ゆきぴりか」など低温着色抵抗性の品種が育成されてきた。しかし、低温着色抵抗性による初中期世代における選抜は圃場で偶然低温に遭遇した場合に限定され、それ以外の方法がなかった。また、「ユキホマレ」や「ゆきぴりか」の低温着色抵抗性はポリジーンにより支配されていると考えられ、必ずしも選抜効率が良い形質ではなかった。本研究では、「トヨハルカ」の低温着色抵抗性が主に1遺伝子によって支配される形質で、*GmIRCHS*をDNAマーカーとして使うことによって選抜できることを明らかにした。また、ほぼ同じ領域には「トヨハルカ」の耐冷性（低温下での子実の登熟不良に対する耐冷性）QTLが存在することが明らかになっており（Ikeda et al 2009）、*GmIRCHS*は低温着色抵抗性と耐冷性の両方を付加できるDNAマーカーとして期待できる。ただし、Ikeda et al（2009）は同じ領域に、「トヨハルカ」型でポット試験の収量が低下するQTLを見出しており注意を要する。

このように、本研究で見出された花粉形成期の耐冷性と種皮の低温着色抵抗性に関する新たな知見は、今後のダイズ品種育成にフィードバックすることによって冷害による収量の低下と種皮の低温着色による外観品質の低下を防ぎ、北海道におけるダイズの安定生産に貢献できると考えられる。

### 種皮の低温着色とウイルス感染による褐斑の共通点と相違点

ダイズの野生種では種皮は着色し黒色であるが、栽培ダイズの多くは色素が蓄積しない黄色であり、これは*CHS*遺伝子のmRNAが発現していないことによる（Senda et al 2002）。ダイズの種皮では*CHS7*および*CHS8*など複数の*CHS*遺伝子が発現しており（Tuteja et al 2004）、通常の“Loss of function”による変異体が発現しにくいものと考えられる。このため、複数の遺伝子座から発現した*CHS*遺伝子のmRNAをRNAiにより配列特異的に全て分解できるようになった変異体が、種皮色が黄色の栽培種として利用されていると考えられる。このことから、RNAiに影響を与える低温や植物ウイルスのコードするRNAiサプレッサーが、種皮における色素合成の回復を引き起こし、農業的な被害

に結びついていると考えられる。

Kasai et al (2009) は、種皮における *CHS* 遺伝子に対する siRNA を調査することによって、低温着色が RNAi の一時的抑制によるものであると証明した。本研究では、*CHS* 遺伝子に対する siRNA の供給源である *GmIRCHS* が着色抵抗性の原因遺伝子であることを示唆し、低温着色が RNAi の一時的抑制であるという説をより強固にした。加えて、本研究では CMV の感染による種皮の褐斑には RNAi のサプレッサーである CMV の 2b 遺伝子が強く関わっていることを明らかにした。これらのことを合わせると、種皮の低温着色とウイルス感染による褐斑の発生は RNAi を抑制するのが低温なのかウイルスのコードする RNAi サプレッサーなのかの違いを除くと極めて類似した現象であると推測される (表 V-1)。本研究では *GmIRCHS* が「トヨハルカ」型の場合、低温による着色が抑制されることを示したが、*GmIRCHS* が「トヨハルカ」型の場合 SMV による褐斑の発生も抑制されることが明らかにされている (千田私信, 千田ら 2009)。さらに「トヨムスメ」型 *GmIRCHS* を持つ「鶴の子」で CMV の感染による種皮の褐斑粒が 100% 発生する条件において、「トヨハルカ」では褐斑粒の発生率が 40% と低く (北農研 2011)、*GmIRCHS* が「トヨハルカ」型の場合 CMV による褐斑の発生も抑制される可能性がある。これらの報告は、種皮の低温着色とウイルス感染による褐斑の発生が共通のメカニズムによることを強く示唆している。

表 V-1. 種皮の低温着色とウイルス感染による褐斑の比較

現象	RNAi の抑制 の原因	着色抵抗性を もたらす遺伝子座
種皮の低温着色	低温 (Kasai et al 2009 および本研究)	・ <i>GmIRCHS</i> (本研究)
ウイルス感染 による褐斑	ウイルスのコー ドする RNAi サ プレッサー (本研究)	・ <i>GmIRCHS</i> (千田ら 2009) ・ 連鎖群 K に存在 (猿田ら 2010)

本研究では、低温着色抵抗性遺伝子として *GmIRCHS* を明らかにした。一方、猿田ら (2010) はウイルス感染による褐斑発生に対する抵抗性 QTL を *GmIRCHS* と異なる連鎖群 K に検出している (表 V-1)。「トヨハルカ」型の *GmIRCHS* の存在は北海道の極限られた品種・系統に限定されており、

猿田らが解析に用いた実験材料は「トヨハルカ」型の *GmIRCHS* を持たないと推測される。このため、猿田らの実験材料では *GmIRCHS* に QTL が検出されなかったと考えられる。また、猿田らが見出した QTL は、ウイルス感染による褐斑だけでなくウイルスの種子伝染にも関わっていることから (近畿中国四国農業研究センター年報, 2010)、*CHS* 等の色素合成系に関連する遺伝子ではなく、RNAi に関連する遺伝子またはウイルスの増殖・移行に関する遺伝子の可能性が考えられる。連鎖群 K の褐斑抵抗性の QTL が、種皮の低温着色に効果があるかどうかを検証することによって、種皮の低温着色とウイルス感染による褐斑の間で何が共通で何が異なるかを、より詳細に解析できる可能性がある。

ダイズの種皮色に関係する遺伝子座として、*I* 遺伝子座 (*GmIRCHS*) および毛茸色決定遺伝子座である *T* 遺伝子座 (*GmF3'H*, Zabala and Vodkin 2003) が知られている。今回試験に用いた「トヨムスメ」は種皮と臍の色が黄となる [*I*, *t*] (*I* 遺伝子座アリル, *T* 遺伝子座アリルで表記, 以下同様) であり、低温によって臍の着色および臍を中心とした茶色の色素斑が生じ、CMV の感染によっても類似した色素斑が生じる (北農研 2011)。しかし、「Williams82」や「キタムスメ」のような種皮が黄色で臍に色素を有し毛茸色が褐の品種 [*i*, *T*] では、ウイルスの感染による褐斑は [*I*, *t*] の品種と同様に生じるが、種皮の低温着色は生じず臍の色素の存在範囲が広がるのみである (Takahashi 1997)。さらに、 [*I*, *T*] の品種では低温への遭遇による色素斑は生じず (Takahashi 1997)、元々くすんだ黄色である種皮が低温への遭遇によりさらに強いくすみとなる。これらの報告と過去の十勝農試における観察結果を表 V-2 にまとめた。種皮の低温着色は *I* 遺伝子座または *T* 遺伝子座の遺伝子型の影響を受けているのがわかる (表 V-2)。*T* 遺伝子は酵素 Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) をコードしているが、F3'H は色素合成系路で *CHS* の下流に位置し、アントシアニンの修飾に関与する酵素である (Toda et al 2002, Zabala and Vodkin 2003)。このことから、 [*I*, *T*] のダイズで低温着色が起らないのは、*T* 遺伝子が RNAi に影響を与えているのではなく、低温により部分的に回復した色素の最終産物の性質 (可溶性や輸送性) が *T* アリルと *t* アリルで異なることにより、種皮における色素の分布が異なっている可能性が考えられる。 [*i*, *T*] のダイズにおいて低温着色が起こ



らないことを説明できる仮説としては、上述のとおり *T* 遺伝子座の遺伝子型の影響が考えられ、この仮説の検証のためには、 $[i^i, t]$ のダイズが低温着色抵抗性を示すかどうかを確認することが必要である(表 V-2)。一方、 $[i^i, T]$ のダイズで低温着色が起こらないことに *i^i* アレルが関与して

いるかは現時点で不明であるが、*i^i* アレルは複雑で巨大な *CHS* 遺伝子のクラスターとされており (Tuteja et al 2008, 2009), どのような経路で RNAi を誘導しているの非常に興味深い。

表 V-2. *I* 遺伝子座および *T* 遺伝子座の遺伝子型とウイルス感染・低温による着色の関係

遺伝子型 ( <i>I</i> 遺伝子座, <i>T</i> 遺伝子座)	種皮色の表現型	ウイルスによる褐斑	種皮の低温着色
<i>I</i> ( <i>GmIRCHS</i> ) *1, <i>t</i>	黄色	種皮に色素斑	種皮に色素斑
<i>I</i> ( <i>GmAsCHS</i> ) *2, <i>t</i>	黄色	種皮に色素斑 (頻度・程度は小さい)	種皮に色素斑 (頻度・程度は小さい)
<i>i^i, t</i>	黄色, 臍は褐色	-	-
<i>i^i, T</i>	黄色, 臍は褐色	種皮に色素斑	種皮に色素斑を生じない (臍の着色範囲の拡大が生じる)
<i>I</i> ( <i>GmIRCHS</i> ) , <i>T</i>	種皮全体と臍が くすんだ黄色	-	種皮全体のくすみが 強くなる
<i>I</i> ( <i>GmAsCHS</i> ) , <i>T</i>	種皮全体と臍がくすんだ黄色 ( <i>GmIRCHS</i> より くすみが少ない)	-	種皮全体のくすみが強くなるが <i>GmIRCHS</i> よりくすみが少ない

\*1:「トヨムスメ」型, \*2:「トヨハルカ」型. “-”は観察事例がないことを示す.

## 要約

- 1) 低温による着莢障害を解析するため、播種時期をずらして得た様々な生育ステージの植物体を 7 日間 15°C (昼) / 10°C (夜) で低温処理し、開花 7~12 日後の莢の伸長により判定して算出した“受精率”を用いて個々の花における低温の影響を評価する手法を確立した。
- 2) 1) の方法を用いて、生殖成長期間における低温感受性期は四分子期前後 (開花 12.5~13.5 日前) と開花直前 (開花 2~4 日前) に存在することを明らかにした。さらに、低温による受精率の低下は、開花直前の低温では葯の裂開不良または花粉の飛散不良が、四分子期前後の低温については花粉の発達異常とこれに伴う葯の裂開不良または花粉の飛散不良が受精率低下の原因であると推定した。
- 3) 障害型冷害年に子実重の低下が小さかった「十系 978 号」と子実重の低下が大きかった「トヨムスメ」について、1) の方法を用いて四分子期前後の低温による受精率の低下程度を調査し、「十系 978 号」の受精率の低下程度は「トヨムスメ」より小さく、四分子期の低温感受性が低いことが示された。また、圃場での低温遭遇事例において受精率を調査することでも同様の結果を得た。
- 4) 3) における四分子期の低温に対する抵抗性の評価、障害型冷害年の子実重の低下程度および従来の耐冷性検定法による評価の 3 者を比較した結果、従来の耐冷性検定方法に四分子期前後の抵抗性の評価を加えることにより、これまでより障害型冷害に強い品種の育成が可能になることを明らかにした。
- 5) CHS 遺伝子の逆位反復配列である *GmIRCHS* を有し低温着色抵抗性が弱い「トヨムスメ」と、*GmIRCHS* の対立遺伝子で逆位反復構造をとらない *GmASCHS* を有し低温着色抵抗性が強い「トヨハルカ」との間で作成した組換え自殖系統 (RILs) について、*GmIRCHS* 座の遺伝子型と低温着色抵抗性との関連を調査した。その結果低温着色抵抗性の品種間差は *GmIRCHS* の遺伝子型によるものであることが示唆された。
- 6) 由来の異なるダイズ 40 品種・育成系統を使って *GmIRCHS* の遺伝子型と低温着色抵抗性の強弱との関連を調査し、*GmIRCHS* の遺伝子型が「トヨハルカ」型の品種・系統は全て一定のレベル以上の低温着色抵抗性を示すことから、*GmIRCHS* は低温着色抵抗性の選抜 DNA マーカーとして利用できることを明らかにした。
- 7) ウイルス感染によるダイズ種皮の褐斑の発生メカニズムを明らかにするため、感染により褐斑を生じる CMV ダイズ系統と、褐斑を生じない CMV シュードリコンビナントの間でキメラウイルスを作成し、それらの感染による褐斑の発生を調査した結果、褐斑が生じるかどうかは 2b 遺伝子を含む領域によって決定されていることを明らかにした。CMV の 2b タンパクは RNAi のサプレッサーであることから、これによりダイズ種皮における CHS 遺伝子の RNAi が阻害された結果、種皮における色素合成が部分的に活性化されて種皮に褐斑が生じている可能性が示唆された。
- 8) ダイズ品種「Harosoy」において、全身感染する CMV-SD と全身感染しない CMV-SC の間でキメラウイルスを作成し、それらの「Harosoy」におけるの全身感染能力を調査した結果、2b 遺伝子を含む領域が「Harosoy」における全身感染決定因子の一つであることを明らかにした。

## Summary

### **Analysis of the pod abortion caused by low temperature and of the seed coat discoloration induced by low temperature or virus infection in soybean.**

**OHNISHI Shizen**

- 1) This study has shown that there are two stages during flower development in soybean that are sensitive to low temperature by investigating 'percentage of fertilized pod' of low temperature treated flowers.
- 2) The first sensitive stage is during early flower development, 12.5 days before anthesis, and might include the tetrad stage or the stage prior to the tetrad. Low temperature stress at this stage reduces pod set by interfering with normal pollen development and pollination. The second is during late flower development, 3 to 4 days before anthesis. Low temperature stress at the second stage interrupts pollen diffusion and reduces the number of pollen grains on stigma.
- 3) The difference in cold tolerance among soybean cultivars is in part explained by the difference of low temperature sensitivity at the early flower developmental stage.
- 4) This study has demonstrated that a *CHS* gene cluster named *GmIRCHS* genotype is related to the tolerance to low temperature-induced seed discoloration in soybean by using RILs between seed coat discoloration tolerant cultivar Toyoharuka and sensitive cultivar Toyomusume.
- 5) This study concluded that the variation in *GmIRCHS* can serve as a useful DNA marker for marker-assisted selection for breeding seed coat discoloration tolerance by investigating the genotype and seed coat discoloration tolerance phenotype of 40 elite soybean lines and cultivars.
- 6) The seed coat discoloration induced by cucumber mosaic virus infection is deduced to be caused with the 2b gene of cucumber mosaic virus.

## 引用文献

- Ahlquist P, Janda M (1984) cDNA cloning and in vitro transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol. Cell Biol.* 4: 2876-2882.
- Benitez ER, Funatsuki H, Kaneko Y, Matsuzawa Y, Bang SW, Takahashi R (2004) Soybean maturity gene effects on seed coat pigmentation and cracking in response to low temperatures. *Crop Sci.* 44: 2038-2042.
- Clarke HJ, Siddique KHM, (2004) Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development. *Field Crops Res.* 90: 323-334.
- Clough SJ, Tuteja JH, Li M, Marek LF, Shoemaker RC, Vodkin LO (2004) Features of a 103-kb gene-rich region in soybean include an inverted perfect repeat cluster of *CHS* genes comprising the *I* locus. *Genome* 47: 819-831.
- Erickson AN, Markhart AH (2002) Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant Cell Environ.* 25: 123-130.
- Funatsuki H, Matsuba S, Kawaguchi K, Murakami T, Sato Y (2004) Methods for evaluation of soybean chilling tolerance at the reproductive stage under artificial climatic conditions. *Plant Breed.* 123: 558-563.
- Funatsuki H, Kawaguchi K, Matsuba S, Sato Y, Ishimoto M (2005) Mapping of QTL associated with chilling tolerance during reproductive growth in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 111: 851-861.
- Funatsuki H, Ohnishi S (2009) Recent advances in physiological and genetic studies on chilling tolerance in soybean. *JARQ* 43: 95-101.
- Gass T, Schori, A, Fossati A, Soldati A, Stamp P (1996) Cold tolerance of soybean (*Glycine max* L. Merr.) during the reproductive phase. *Eur. J. Agron.* 5: 71-88.
- Githiri SM, Yang D, Khan NA, Xu D, Komatsuda T, Takahashi R (2007) QTL analysis of low temperature induced browning in soybean seed coats. *J. Heredity* 98: 360-366.
- 後藤和男・山本正 (1972) 豆類の冷害に関する研究. (3) 大豆の開花前低温が花粉の発芽および受精に及ぼす影響. *北海道農試葉報.* 100: 15-19.
- Guo HS, Ding SW (2002) A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.* 21: 398-407.
- 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.
- Hamera S, Song X, Su L, Chen X, Fang R (2011) Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J.* doi: 10.1111/j.1365-3113.2011.04774.x. (Epub ahead of print).
- Hashimoto K, Yamamoto T (1976) Studies on cool injury in bean plants. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 45: 288-297.
- Hauser EJP, Morrison JH (1964) The cytochemical reduction of nitro blue tetrazolium as an index of pollen viability. *Am. J. Bot.* 51: 748-752.
- Hayase H, Satake T, Nishiyama I, Ito N (1969) Male sterility caused by cooling treatment at the meiotic stage in rice plants: 2. The most sensitive stage to cooling and fertilizing ability of pistils. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 38: 706-711.
- Heitholot JJ, Egli DB, Legget JE (1986a) Characteristics of reproductive abortion in soybean. *Crop Sci.* 26: 589-595.
- Heitholot JJ, Egli DB, Legget JE, MacKown CT (1986b) Role of assimilate and carbon-14 photosynthate partitioning in soybean reproductive abortion. *Crop Sci.* 26: 999-1004.
- 北海道立十勝農業試験場 (1998) 大豆における開花期低温抵抗性の機作と検定条件および間接選抜指標. *平成10年度北海道農業研究成果情報.*
- 北海道立十勝農業試験場 (2004) 低温着色に強く機械収穫向きの大粒だいず新品種「トヨハルカ」. *作物研究所平成16年度成果情報 夏畑作物部会.*
- 北海道農研 (2011) ダイズ萎縮病の褐斑粒率と種子伝搬率を減少させるサテライト RNA. *平成22年度北海道農業研究成果情報.*
- Hong JS, Ohnishi S, Masuta C, Choi JK, Ryu KH (2007) Infection of soybean by cucumber mosaic virus as determined by viral movement protein. *Arch. Virol.* 21: 933-937.
- Hume DJ, Jackson AKH (1981) Pod formation in soybeans at low temperatures. *Crop Sci.* 21: 933-937.
- Ikeda T, Ohnishi S, Senda M, Miyoshi T, Ishimoto M, Kitamura K, Funatsuki H (2009) A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). *Theor. Appl. Genet.* 118: 1477-1488.
- Ji LH, Ding SW (2001) The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol. Plant Microbe Interact* 14: 715-724.
- 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.
- Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, Tsagris M (2002) The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 826-833.
- Kasai A, Watarai M, Yumoto S, Akada S, Ishikawa R, Harada T, Niizeki M, Senda M (2004) Influence of PTGS on chalcone synthase gene family in yellow soybean seed coat. *Breed Sci.* 54: 355-360.
- Kasai A, Kasai K, Yumoto S, Senda M (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, Ohnishi S, Yamazaki H, Funatsuki H, Kurauchi T, Matsumoto T, Yumoto S, Senda M (2009) Molecular mechanism of seed coat discoloration induced by low temperature in yellow soybean. *Plant Cell Physiol.* 50: 1090-1098.

- Kasschau KD, Carrington JC (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-470.
- Kennedy BW, Kampmeier GE (1967) Association of virus infection with mottling of soybean seed coats. *Phytopathology* 57: 35-37.
- 近畿中国四国農業研究センター. (2010) 褐斑形成・種子伝染に着目したダイズモザイクウイルス性の遺伝様式の解明と DNA マーカーの開発. 近畿中国四国農業研究センター年報. p10.
- Kitano M, Saitoh K, Kuroda T (2006) Effects of high temperature on flowering and pod set in soybean. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture (Okayama University)* 95: 49-55.
- Koike S, Yamaguchi T, Nakayama K, Hayashi T (2003) Cool tolerance of barley (*Hordeum vulgare* L.) at the young microspore stage. *Plant Prod. Sci.* 62: 132-133.
- Kurauchi T, Matsumoto T, Taneda A, Sano T, Senda M (2009) Endogenous short interfering RNAs of chalcone synthase genes associated with inhibition of seed coat pigmentation in soybean. *Breed Sci.* 59: 419-426.
- 黒崎英樹・松川勲 (1994) 大豆の障害型冷害に関する研究 第1報 開花前後の低温下における開花習性. 35: 108-109.
- Kurosaki H, Yumoto S (2002) Effects of low temperature and shading during flowering on the yield components in soybeans. *Plant Prod. Sci.* 6: 17-23.
- Kurosaki H, Yumoto S, Matsukawa I (2003) Pod setting pattern during and after low temperature and the mechanism of cold-weather tolerance at the flowering stage in soybeans. *Plant Prod. Sci.* 6: 247-254.
- Lauxen MS, Kaltchuk-Santos E, Hu C, Callegari-Jaques SM, Bodanese-Zanettini MH (2003) Association between floral bud size and developmental stage in soybean microspores. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 515-520.
- Lawn RJ, Hume DJ (1985) Response of tropical and temperate soybean genotypes to temperature during early reproductive growth. *Crop Sci.* 25: 137-142.
- Li WX, Ding SW (2001) Viral suppressors of RNA silencing. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 150-154.
- Lucy AP, Guo HS, Li WX, Ding SW (2000) Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J.* 19: 1672-1680.
- Mamun EA, Alfred S, Cantrill LC, Overall RL, Sutton BG (2006) Effects of chilling on male gametophyte development in rice. *Cell Biol. Int.* 30: 583-591.
- Matsui T, Omasa K, Horie T (2000) High temperature at flowering inhibit swelling of pollen grains, a driving force for thecae dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Prod. Sci.* 3: 430-434.
- 松川勲・角田征仁・黒崎英樹・湯本節三・田中義則 (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2報 十勝地方の被害実態と地域性. 育種・作物学会北海道談話会報. 34: 38-39.
- Manly KF, Cudmore JRH, Meer JM (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm. Genome* 12: 930-932.
- McCormick S (1993) Male gametophyte development. *Plant Cell* 5: 1265-1275.
- Morrison MJ, Pietrzak LN, Voldeng HD (1998) Soybean seed coat discoloration in cool-season climates. *Agron. J.* 90: 471-474.
- Musser RL, Kramer PJ, Thomas JF (1986) Periods of shoot chilling sensitivity in soybean flower development, and compensation in yield after chilling. *Ann. Bot.* 57: 317-329.
- Nayyar H, Bains T, Kumar S (2005) Low temperature induced floral abortion in chickpea: relationship to abscisic acid and cryoprotectants in reproductive organs. *Environ. Exp. Bot.* 53: 39-47.
- 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: 57-88.
- Ohnishi S, Echizenya I, Yoshimoto E, Boumin K, Inukai T, Masuta C (2011) Multigenic system controlling viral systemic infection determined by the interactions between Cucurbit mosaic virus genes and quantitative trait loci of soybean cultivars. *Phytopathology* 101: 575-82.
- 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. 29: 22.
- Patterson BD, Mutton L, Paull RE, Nguyen VQ (1987) Tomato pollen development: stages sensitive to chilling and a natural environment for the selection of resistant genotypes. *Plant Cell Environ.* 10: 363-368.
- 斎藤正隆・高沢寛 (1962) 大豆の低温に対する影響. (2) 生育時期別の低温処理が生育並びに収量に及ぼす影響. 北海道農試業報. 78: 26-31.
- Saito M, Yamamoto T, Gotou K, Hashimoto K (1970) The Influence of cool temperature before and after anthesis, on pod-setting and nutrients in soybean plants. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 39: 511-519.
- Sakata T, Takahashi H, Nishiyama I, Higashitani A (2000) Effects of high temperature on the development of pollen mother cells and microspores in barley *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Res.* 113: 395-402.
- 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. 29: 1-57.
- 佐々木紘一・紙谷元一 (1984) 過去の主な冷害年における十勝の大豆の被害型解析. 育種・作物学会北海道談話会報. 24: 26.
- 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. 北海道立農試集報. 60: 45-58.
- 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 (1998) だいでず新品種「トヨムスメ」の育成について. 北海道立農試集報. 57: 1-12.
- Satake T, Hayase H (1970) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: 5. Estimations of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 39: 468-473.

- Satake T, Yoshida S (1978) High temperature induced sterility in indica rices at flowering. *Jpn. J. Crop Sci.* 47:6-17.
- Satake T, Koike S (1983) Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants. 1. The stage and organ susceptible to cool temperature. *Jpn. J. Crop Sci.* 52: 207-214.
- 猿田正恭・高田吉丈・岡部昭典・佐山貴司・笹間博子 (2010) ダイズの褐斑抵抗性に関するQTL解析. 育種学研究別冊. 12: 326.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J, Xu D, Hellsten U, May GD, Yu Y, Sakurai T, Umezawa T, Bhattacharyya MK, Sandhu D, Valliyodan B, Lindquist E, Peto M, Grant D, Shu S, Goodstein D, Barry K, Futrell-Griggs M, Abernathy B, Du J, Tian Z, Zhu L, Gill N, Joshi T, Libault M, Sethuraman A, Zhang XC, Shinozaki K, Nguyen HT, Wing RA, Cregan P, Specht J, Grimwood J, Rokhsar D, Stacey G, Shoemaker RC, Jackson SA (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- Schori A, Fossati A, Soldati A, Stamp P (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, Jumonji A, Yumoto S, Ishikawa R, Harada T, Niizeki M, Akada S (2002) Analysis of the duplicated *CHS1* gene related to the suppression of the seed coat pigmentation in yellow soybeans. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1086-1091.
- Senda M, Kasai A, Yumoto S, Akada S, Ishikawa R, Harada T, Niizeki M (2002) Sequence divergence at chalcone synthase gene in pigmented seed coat soybean mutants of the Inhibitor locus. *Genes Genet. Syst.* 77: 341-350.
- 千田峰生 (2009) ダイズにおける低温着色抵抗性識別マーカーの開発. 科学研究費補助金 2009 年度研究実績報告書. 科学研究費補助金データベース (<http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/20380001/2009/3/ja>)
- 島田尚典・村田吉平(1994)小豆の耐冷性に関する研究. 第2報 開花期の低温が受粉・受精に及ぼす影響. 育種・作物学会北海道談話会報. 35: 110-111.
- 島田尚典 (1997) アズキの障害型耐冷性の品種間差異. 東北農業研究. 50: 83-84.
- Song QJ, Marek LF, Shoemaker RC, Lark KG, Concibido VC, Delannay X, Specht JE, Cregan PB (2004) A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theor. Appl. Genet.* 109:122-128.
- Sós-Hegedus A, Lovas A, Kondrák M, Kovács G, Bánfalvi Z (2005) Active RNA silencing at low temperature indicates distinct pathways for antisense-mediated gene-silencing in potato. *Plant Mol. Biol.* 59:595-602.
- Srinivasan A, Arihara J (1994) Soybean seed discoloration and cracking in response to low temperatures during early reproductive growth. *Crop Sci.* 34: 1611-1617.
- Srinivasan A, Johansen C, Saxena NP (1998) Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): characterization of stress and genetic variation in pod set. *Field Crops Res.* 57: 181-193.
- Srinivasan A, Saxena NP, Johansen C (1999) Cold tolerance during early reproductive growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.): genetic variation in gamete development and function. *Field Crops Res.* 60: 209-222.
- Suzuki M, Kuwata S, Kataoka J, Masuta C, Nitta N, Takanami Y (1991) Functional analysis of deletion mutants of cucumber mosaic virus RNA3 using an in vitro transcription system. *Virology* 183: 106-13.
- Suzuki K, Tsukaguchi T, Takeda H, Egawa Y (2001) Decrease of pollen stainability of green bean at high temperatures and relationship to heat tolerance. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 126: 571-574.
- Szittyta G, Silhavy D, Molnár A, Havelda Z, Lovas A, Lakatos L, Bánfalvi Z, Burgyán J (2003) Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *EMBO J.* 22: 633-640.
- 高橋幸吉・長沢次男・田中敏夫・飯塚典男 (1987) ダイズモザイクウイルス及びダイズ萎縮ウイルスの各系統に対するダイズ品種の反応. 東北農業試験場研究資料. 7: 1-35.
- Takahashi R, Akiyama T (1993) Characterization of a melanin associated with low temperature-induced browning in soybean seed coats. *Phytochemistry* 34: 587-588.
- Takahashi R, Abe J (1994) Genetic and linkage analysis of low temperature-induced browning in soybean seed coats. *J. Heredity* 85: 447-450.
- Takahashi R, Asanuma S (1996) Association of T gene with chilling tolerance in soybean. *Crop Sci.* 36: 559-562.
- Takahashi R (1997) Association of soybean genes *I* and *T* with low-temperature induced seed coat deterioration. *Crop Sci.* 37: 1755-1759.
- Takahashi R, Abe J (1999) Soybean maturity genes associated with seed coat pigmentation and cracking in response to low temperatures. *Crop Sci.* 39: 1657-1662.
- Takahashi R, Benitez ER, Funatsuki H, Ohnishi S (2005) Soybean maturity and pubescence color genes improve chilling tolerance. *Crop Sci.* 45: 1387-1393.
- 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) だいでず新品種「ユキホマレ」の育成について. 北海道立農試集報. 84: 13-24.
- 丹野久 (2004) 水稻における開花期耐冷性の簡易検定法の確立と遺伝資源の評価. 北海道立農業試験場報告. 104: 1-49.
- Thakur P, Kumar S, Malik JA, Berge JD, Nayyar H (2009) Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 67: 429-443.
- Toda K, Yang D, Yamanaka N, Watanabe S, Harada K, Takahashi R (2002) A single-base deletion in soybean flavonoid 3'-hydroxylase gene is associated with gray pubescence color. *Plant Mol. Biol.* 50: 187-196.
- Toda K, Takahashi R, Iwashina T, Hajika M (2011) Difference in chilling-induced flavonoid profiles, antioxidant activity and chilling tolerance between soybean near-isogenic lines for the pubescence color gene. *J. Plant Research* 124: 173-182.
- Todd JJ, Vodkin LO (1996) Duplications that suppress and deletions that restore expression from a chalcone synthase multigene family. *Plant Cell* 8: 687-699.

- Tuteja JH, Clough SJ, Chan WC, Vodkin LO (2004) Tissue-specific gene silencing mediated by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *Plant Cell* 16: 819-835.
- Tuteja JH, Vodkin LO (2008) Structural features of the endogenous *CHS* silencing and target loci in the soybean genome. *Crop Sci.* 48: 49-69.
- Tuteja JH, Zabala G, Varala K, Hudson M, Vodkin LO (2009) Endogenous, tissue-specific short interfering RNAs silence the chalcone synthase gene family in *Glycine max* seed coats. *Plant Cell* 21: 3063-3077.
- Wang SCJ, Basten CJ, Zeng Z-B (2005) Windows QTL cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA.
- 山崎敬之・湯本節三・田中義則・黒崎英樹・鈴木千賀・松川勲・土屋武彦・白井和栄・富田謙一・角田征仁 (2004) だいず新品種「ユキシズカ」の育成について. 北海道立農試集報. 87: 21-32.
- 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.
- Zabala Z, Vodkin L (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.

## 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増田税教授、犬飼剛講師、上田一郎教授、阿部純教授に深甚なる謝意を表したい。

本研究の内容は、白井滋久氏、三好智明氏、山口直矢氏、竹内徹氏、山崎敬之氏、黒崎英樹氏、堀田治邦氏、弘前大学の千田峰生准教授、葛西厚史氏、倉内佑氏、北海道農業研究機構の船附秀行氏と共同で行った研究をまとめたものである。改めて、共同研究者の皆様に感謝の意を表したい。加えて、船附氏と千田教授においては投稿論文のまとめ方を懇切丁寧にご指導いただいた。この場を借りてお礼申し上げたい。

十勝農試において、圃場試験および人工気象室を使った試験が無事遂行できたのは管理科職員・臨時職員の皆様と大豆科臨時職員の皆様のご尽力のおかげであり改めて感謝の意を表したい。十勝農試大豆科在籍時に試験遂行にご協

力・激励いただいた田中義則氏、鈴木千賀氏、萩原誠司氏に感謝の意を表したい。十勝農試において、課題の応募から研究の取りまとめにいたるまで、場長の菊地治巳氏、作物研究部長の白井和栄氏、主任研究員の田中英彦氏および大豆科長の白井滋久氏をはじめ、多くの方からご指導とご助言をいただいた。この場を借りてお礼申し上げたい。

さらに、中央農試では学位論文の執筆にあたって激励をいただいた作物開発部長の柳沢朗氏、作物グループ主幹の前野真司氏、主査の藤田正平氏、グループの鴻坂扶美子氏、相馬ちひろ氏および西村努氏に心よりお礼申し上げたい。

十勝農試在籍時には、場長であった尾崎政春氏と菊地治巳氏および同僚の笛木伸彦氏に、論文を書くことと学位を取得することについて叱咤激励いただいた。この場を借りてお礼申し上げたい。