

第1章 緒論

農業生産における各種問題解決において、植物育種が果たしてきた役割は大きい。アジアの食料危機回避に貢献した緑の革命での短幹品種の育成はその代表例であり(Gurdev 2001)、各作物・地域毎に視点を絞れば、こうした事例について枚挙に暇はない。今後も、現状の、または今後予想される農業生産上の各種問題の解決手段に、品種改良が担う役割は大きいと考えられる(Gurdev 2005、McKersie 2015)。

植物の品種育成は栽培しようとする地域への適応性の付与を基本とする。地域への適応性には気候風土等の地理的要素のみならず、その地域で導入されている栽培技術、また、市場ニーズなどの社会的要素も関わっている。従って、これらを踏まえ品種がもつべき特性は地域ごとに多様化する。また、品種がもつべき特性が経時的に変化することも避けられない。例えば、気象条件の変化(森田 2008)、新規栽培体系技術や農薬・化学肥料の登場(Gurdev 2001、村井ら 1983)、あるいは市場ニーズの変化(萩原 2000、北海道立中央農業試験場 1988)は、各地域・年代で散見され、求められる品種のあり方を変えてきた。ゆえに各地域の育種においては、それぞれの年代に固有の育種目標が設定され、これに合致する品種育成を実現するための独自の選抜手法ならびに遺伝資源を利用し、品種育成が行われてきた。その結果、同じ作物種であっても各地域の育種集団内には、ある程度の多様性が存在するとともにその地域固有の遺伝構造ならびに有用遺伝子群が集積していると予想される(Kaga *et al.* 2012、Yamasaki and Ideta 2013、Yonemaru *et al.* 2012)。このような地域固有の有用遺伝子を明らかにし、その来歴や集積過程を追跡することは、品種育成の過程を遺伝育種学的に紐解くことに他ならない。これまでに行われた品種育成から得られる情報は、将来行われる品種育成に資するところが大きいと考える。例えば、有用遺伝子の来歴解明は効率的な遺伝資源選定に貢献するかもしれない。また、これまで地域適応を果たした遺伝子型の動態を解明できれば、育種における表現型に基づく選抜から DNA マーカー選抜およびゲノミックセレクションなどのゲノムレベルへの選抜への転換をより進めるための足がかりが得られる可能性がある。

栽培イネ(*Oryza sativa* L.)は熱帯原産の作物であり(Huang *et al.* 2012)、世界各地で品種改良が進められ、熱帯地域のみならず温帯～亜熱帯地域(北緯 50° ~南緯 40°)にも栽培が拡大されている(Juliano 1993)。現在、世界人口の半分以上がコメを主食として消費している状況である(Muthayya *et al.* 2014)。イネの各地域に適応した育成集団内には比較的広い遺伝変異が確認されている。例えば、愛知県では 1933 年からイネのいもち病抵抗性育種を実施し、多様な遺伝資源に由来する多数の品種・系統が育成されている(井澤ら 2001、坂ら 2007・2010)。このように、イネの地域適応集団には長い育成過程の中である程度の遺伝的変異およびそれに伴う形質変異が蓄積されていると期待でき、これら育成集団の育種素材としてのポテンシャルを遺伝解析で吟味すれば今後の育種目標の達成に役立つと考えられる。その一方、地域ごとに育種事業の規模は異なっており、まずは地域における遺伝的変異の多寡を見極めることも必要である。

北海道は日本の最北に位置し(北緯 41.2° ~45.3°)、イネ栽培の北限地域の一つである。元来、夏期の天候が長日・低温で推移する北海道ではイネの栽培は不適であったが、栽培技術の改良ならびに品種改良により、現在ではわが国有数の大規模稲作地帯となっている(農林水産省/長期累年統計情報)。北海道にイネ栽培が定着した端緒は、1800 年代後半に耐冷性に優れる「赤毛」種が導入されたことによる(北農会 1994)。それ以降、農家や試験研究機関による在来種からの純系分離による優良品種の選定がはじまり、さらに 1913 年から現在に至るまで交雑育種による品種改良が行われている(村井ら 1983)。1950 年半ばより集団育種法が取り入れられ(北農会 1994)、また、近年ではγ線照射や組織培養を利用した突然変異育種により新たな形質を保持した系統の育成も試みられ、成果をあげている(安東ら 2006、荒木ら 1996)。選抜手法についても 1950 年代頃から冷水掛け流しによる耐冷性選抜、さらに 1980 年代には、理化学分析値を指標とした良食味系統の選抜(北海道立中央農業試験場 1988)などさまざまな選抜技術を導入し、育種ニーズに合致する品種育成を行ってきた。このような育種手法の改良や新たな選抜技術を取り入れた結果、近年の北海道のイネ反収レベルは 500kg/10a 以

上(平成 15~24 年平均 532.4kg/10a)まで増加し、本州イネ栽培(平成 15~24 年平均 528.4kg/10a)と収量レベルの差は認められなくなってきた(農林水産省/長期累年統計情報)。また、食味レベルも向上し、主要品種の「ななつぼし」や「ゆめぴりか」が(財)日本穀物検定協会の食味評価において複数年連続で最高評価の特 A を獲得するなど(日本穀物検定協会)、現在では、良食味米生産地としての評価も確立しつつある。

このように、北海道のイネ品種は作物の地域適応性向上に関するモデルケースと言って良い。そうであるなら、北海道育成品種のゲノム構造はどのように変遷してきたのだろうか。この問いに対する解答(北海道におけるイネ育種経過に対応したゲノム動態解明)は、地域適応性向上に必要な遺伝的要因を明らかにする手がかりになると考えられ、さらに在来品種に始まり現在の優良品種に至るまでの品種育成の過程をゲノムの変化としてとらえることで、今後の北海道イネ育種の戦略を立てる上で有用な知見となると考えられる。

一方で、将来の北海道のイネ品種が具備すべきと考えられる形質も多い。例えば、生育ステージ毎の耐冷性の向上や良食味と病害抵抗性を兼ね備えた品種の育成など、複数の要望が生産現場から上がってきており、喫緊の育種課題となっている。なかでも病害抵抗性については、いもち病抵抗性の強化が大きな課題である。いもち病は、*Magnaporthe oryzae* を病原とするイネの主要病害の一つである(Ou 1985)。高温・多湿条件で発生が増加する病害で、冷涼な気候の北海道では、従来本州に比べて発生は少なく、抵抗性の強化は永らく育種目標の最優先事項とはなかってこなかった。しかしながら、最近の地球温暖化に伴う気象変動と主要品種のいもち病抵抗性が弱いことが影響し、北海道でも近年多発年が認められ(広田ら 2011、木俣 2011)、将来の重要な育種目標と想定されている(丹野 2012)。また、耐冷性については、生育ステージ全般の耐冷性強化が課題の一つである。イネは熱帯原産であるため、発芽から登熟までの一連の生育期間において低温の影響を強く受ける(Cruz *et al.* 2013)。北海道のイネ育種では、圃場での大規模選抜が可能な冷水掛け流し検定を用いた選抜により、道内育成品種の穂ばらみ期耐冷性を向上させてきた。しかし、他の生育ステージの耐冷性については検定手法がいく

つか開発されているものの(丹野ら 2000、佐々木 1968、Baruah *et al.* 2009)、労力やコストの面で大規模選抜が不可能な状況にある。これまでの北海道イネ品種や系統の中に、いもち病抵抗性や、穂ばらみ期以外の生育ステージの耐冷性に対する遺伝変異が存在するかどうかは育種的に重要な問題である。すなわち、これまでに未選抜であった形質に関しても遺伝変異が認められるなら、北海道イネジーンプールは高く評価されてもよく、さらにそれが将来損なわれることがあってはならない。

以上のことから、寒地イネ栽培の適応性拡大に寄与した北海道新旧イネ品種群のゲノム動態を把握し、今後改良が必要な農業形質についてどの程度の遺伝的変異が北海道イネジーンプールに内在されているか検討することは、将来の北海道イネ育種の方向性や戦略を検討する際に非常に有益であると考えられる。また、これら情報を整理するにあたり、表現型の調査や系譜の整理とともにゲノムレベルでの検討を加えることにより、詳細なゲノム動態、有益な QTL および遺伝子といった多くの遺伝的要素の解明が可能となり、より有益な情報を提供すると考えられる。そこで本研究では、第 II 章において、北海道新旧イネ品種群で多型が生じる DNA マーカーを用いて、これまでに北海道で育成された品種の遺伝的多様性を解明し、「品種育成」がどのように行われてきたのかをゲノムレベルで調査した。さらに育成系譜や農業形質を加味し、育種の過程を考察した。第 III 章ならびに第 IV 章において生産現場の新たな要望に応える新品種育成のための新規育種素材を既存の道内品種群に求めることが可能かどうか、開花期耐冷性といもち病圃場抵抗性を例として検討した。第 V 章では、得られた結果を総合し、北海道に適応したイネ品種群が内包する遺伝的なポテンシャルについて論ずる。

第Ⅱ章 北海道イネ品種の遺伝的集団構造の解析

作物育種においては原則としてあたらしい品種は既存の品種を上回る特性か、当時発生していた問題点を克服するような形質が付与されており、特性の後退はありえない。北海道のイネ品種は赤毛を嚙矢とし、爾来多くの品種がリリースされてきた（北海道立農業試験場 1960、北海道農政部 2014）。この間、北海道の気候風土に対する適応性の強化が恒常的に達成されてきたのはいうまでもない。しかしながら、北海道イネ育種の長い歴史の中で加えられる選抜の方向は一定ではなく、例えば、良食味に関する選抜が強く加えられるようになったのは 1980 年代以降である（北海道立中央農業試験場 1988）。また、耐冷性の選抜方法も随時改良が加えられ、1950 年代より冷水掛け流し検定による耐冷性選抜が開始され、近年では同手法を用いた穂ばらみ期の耐冷性選抜が積極的に行われている。さらに、稲作技術の進歩に応じて栽培様式も変化しており、各栽培手法で求められるイネ品種の草型も変化してきた（村井ら 1983）。北海道の品種群とは以上のような複雑な選抜の産物の複合とみることができよう。

個々の品種に加えられた選抜は、主動遺伝子支配の形質のみならず、微動遺伝子のエピスタシスが関わるような複雑な形質を標的にしたと考えられるが、その実態は明らかではない。これらを明らかにすることが育種に重要であるのは論を俟たないが、そうした研究の基盤となる北海道イネ品種の遺伝背景を複雑に入り組んだ系譜情報のみからとらえることは不可能である。これに対し、ゲノム構造解析を通じて、北海道イネ品種群内における集団遺伝学的な構造化の有無を確認できれば、北海道イネ品種群の遺伝的フレームワークを把握できる。また、在来品種に始まり現在の優良品種に至るまでの品種育成の過程をゲノムの変化として明らかにすることができ、系譜情報を相補できる。これらは、育種を進める際に、または、重要形質に関する遺伝解析を行う際に試験戦略を立てる上で重要な情報を与える。

イネ近交系の遺伝解析については多型マーカーをそろえることが難しく、大きな障壁となっていたが、近年、遺伝子工学的技術の進歩により、多くの単純反復配列マーカー（以下「SSR マーカー」：single sequence repeat マ

ーカー）情報の整備に加えて多様な一塩基多型マーカー（以下「SNP マーカー」：single nucleotide polymorphism）セットが開発されており、近交系の多型判定が可能となっている（IRGSP 2005、McCouch *et al.* 2002、Nagasaki *et al.* 2010）。これらのツールを利用すれば、北海道イネ品種群の DNA 多型解析が可能である。

以上の研究背景に基づき、本章ではまず北海道のイネ品種群内における遺伝的構造化の解明を行い、構造化の生ずる要因として道外品種からのゲノム領域導入の可能性を検討した。続いて、明らかになった各遺伝的グループの農業特性を調査して比較解析し、遺伝グループの変遷と品種育成過程について考察した。

材料および方法

1. 供試材料

表Ⅱ-1 に示す 68 品種を用いた。このうち 63 種（供試番号 1～63）が道内新旧品種・系統（以下道内新旧主要品種・系統群）である。これら 63 品種系統のうち 5 品種が在来種であり、58 品種・系統が 1895 年から 2008 年の間に開発された育成品種系統である。さらに道外品種として、日本晴（本州品種）、Cody（アメリカ品種）、中生愛国（本州品種）、銀坊主（本州品種）および関東 53 号（本州品種）を用いた。供試材料の系譜図を図Ⅱ-1 に示す。

2. 各種農業形質の調査

7 種（出穂期、穂ばらみ期耐冷性、成熟期の穂数、成熟期の一穂粒数、千粒重およびアミロース含有率）の農業形質を調査した。出穂期、穂数、一穂粒数および千粒重の調査については上川郡比布町の上川農業試験場で行った。4 月下旬に中苗マットに播種を行い、播種後 30 日の苗を条間×株間=30cm×15cm の間隔で水田圃場（窒素施肥 8kg/10a）に移植した。1 品種・系統あたり 15 個体を移植した。出穂期については、播種日から系統内の半数以上の個体が出穂するまでの日数を調査した。各個体の出穂日については主幹の穂先が葉鞘より抽出した日とした。成熟期の穂数、一穂粒数については 1 品種・系統あたり 5 個体を調査して平均化した。成熟期後

1 系統あたり 8 株の刈り取り、乾燥、脱穀を順次行い千粒重および整粒歩合を調査した。整粒歩合については収穫した玄米 500 粒を用い、穀粒判別機 RGQI 10B(サタケ; 広島県 日本)により調査した。穂ばらみ期耐冷性およびアミロース含有率については札幌市にある北海道農業研究センターで調査を行った。穂ばらみ期耐冷性の評価は Kuroki *et al.*(2007) の方法に従って圃場での冷水掛け流し検定により行った。アミロース含有率の測定は、Ando *et al.*(2010) の方法に従って行った。

各形質の平均値についての品種・系統間の有意差判定 (Tukey-Kramer 多重比較検定) は、統計解析ソフト JMP10(SAS; NC USA)を用いて行った。穂ばらみ期耐冷性検定によって得られた種子稔実率、アミロース含有率および精粒歩合については、データのアーカイブ変換を行った後、統計解析に供した。

3. マーカー解析

CTAB 法により葉片より全 DNA を抽出した (Murray and Thompson 1980)。SSR マーカーのジェノタイピング方法は、Fujio *et al.*(2004)の手法に準じて行い、各 SSR マーカーの増幅断片長については横×長さ=33cm×42cm のアクリルアミドゲル (6%) を用いて決定した。

実験に供した SSR マーカーは、McCouch *et al.*(2002)および IRGSP (2005)より報告のあったマーカーリストより選定した(表 II-2)。多型情報含有値(PIC 値)は以下のように算出した (Anderson *et al.* 1993) :

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \quad (1)$$

p_i は、ある遺伝子座における i アリルの頻度である。Anderson *et al.*(1993)によれば、式(1)は Botstein *et al.*(1980)の原案を自殖作物向けに修正したものであり、結果的にヘテロ接合体率 (e.g. Nei 1987) と同じである。調査した遺伝子座全てについて各々の PIC 値を計算して、全体の平均値を算出した。

ハプロタイプブロック決定のための遺伝子型調査については、63 種の SSR マーカーの遺伝子型と

Nagasaki *et al.*(2010)によって開発された 768 種の SNPs タイピングアレイセット(J-core SNPs セット)の遺伝子型データを用いて行った。J-core SNPs セットについては、コシヒカリ - 日本晴、日本晴-栄光、日本晴-陸羽 132 号間のゲノムシーケンス情報より選出した 3000 種の SNPs の中から、日本稲コアコレクションで 1-2 品種のみの多型でないこと、さらにゲノム上での散らばり具合を確認して選抜された 768 箇所の SNPs を検出できるアレイセットである。SNPs の検出については Bead Station 500G システム(Illumina; San Diego CA USA)を用いて行い、実験手法は Illumina 社のプロトコルに準じて行った。

4. クラスタ解析

系統樹の作成はコンピュータプログラム PHYLIP ver 3.69 (Felsenstein 2010)を用いて行った。進化距離 d については、Junkes-Cantor 法により算出を行い、非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean : UPGMA 法) により得られた計算結果を用いて、コンピュータソフト Njplot ver.2.3 により系統樹を作成した。併せてブートストラップ値の計算についても PHYLIP で行った。コンピュータプログラム Structure ver 2.3.4 を用いた解析は Pritchard *et al.*(2000)に従った。ここでは、与えられた遺伝子型データセットについて、 K 個 ($K=1$ から 10) のクラスターに由来すると仮定した場合 (モデル) の事後確率がベイズ推定により計算される。解析には混合モデル (admixture model) を採用し、各クラスターに由来するゲノム領域の割合が、品種・系統別に与えられる (これは由来に関する情報であって、遺伝的な均一性を示しているのではない)。各 K について、最初の慣らし(burn-in)50,000 回の後、1,000,000 回のマルコフ連鎖モンテカルロシミュレーションを独立に 10 回試行した。

表Ⅱ-1 供試材料リスト

供試				いもち病圃場抵抗性	
番号	品種・系統名	育成年	交配組合せ	Group ^a	GWAS供試 ^b
1	赤毛	-	在来種	I	○
2	北海早生	-	在来種	I	○
3	黒毛	-	在来種	I	○
4	水口稲	-	在来種	I	○
6	胆振早生	-	在来種	I	○
5	坊主	1895	赤毛純系分離	I	○
7	坊主6号	1919	坊主純系分離	II	○
8	走坊主	1924	魁/坊主	I	○
9	富国	1935	中生愛国/坊主6号	III a	○
10	早生坊主	1936	坊主純系分離	I	○
11	早生富国	1936	中生愛国/坊主6号	III a	○
12	農林9号	1937	早生チンコ/走坊主	I	○
13	農林11号	1937	胆振早生/早生坊主	I	○
14	農林15号	1940	銀坊主/走坊主	IV	○
15	農林19号	1941	走坊主/二節	I	○
16	巴錦	1941	農林1号純系分離	II	○
17	大野中稲	1941	畿内早生22号/坊主6号	III a	○
18	農林20号	1941	農林1号/胆振早生	II	○
19	石狩白毛	1941	関山8号/早生富国	III a	○
20	栄光	1941	鶴亀/早生富国	III a	○
21	共和	1941	陸羽132号/早生富国	III a	○
22	農林34号	1941	石狩白毛/北海84号	III a	○
23	南栄	1951	巴錦/農林20号	II	○
24	新栄	1951	巴錦/農林20号	II	○
25	北海112号	1951	陸羽132号/農林15号	IV	○
26	巴まさり	1951	東北14号/北海87号	II	○
27	豊光	1953	早生愛国/農林15号	II	○
28	北斗	1953	功モチ/共和	III a	○
29	新雪	1954	亀田早生/石狩白毛	III a	○
30	ふくゆき	1958	北海112号/農林34号	IV	○
31	みまさり	1959	巴錦/上育142号//大野中稲/農林34号	III a	○
32	ささほなみ	1961	藤坂5号/農林15号	IV	○
33	ユーカラ	1962	関東53号/栄光	III b	○
34	しおかり	1963	目黒栄モチ/共和//共和	III a	○
35	そらち	1967	空育12号/みまさり	III a	○
36	はやゆき	1968	新栄/農林19号	II	○
37	マツマエ	1970	ふ系51号/北海183号	III b	○
38	イシカリ	1971	北海182号/空育4号	IV	○
39	きたこがね	1973	北海182号/上育230号	III b	○
40	キタヒカリ	1975	しおかり/ユーカラ	III b	○
41	はやこがね	1977	北斗/上育272号	III a	○
42	ともゆたか	1977	北海222号/道北5号	IV	○
43	しまひかり	1981	コシホマレ/そらち	III b	○
44	みちこがね	1982	空育99号/北海230号	IV	○
45	ともひかり	1983	北海230号/巴まさり//空育99号	IV	○
46	キタアケ	1983	永系7361/道北5号	V	○
47	ゆきひかり	1984	北海230号/巴まさり//空育99号	IV	○
48	はやまさり	1986	永系75169突然変異系統/永系76251	IV	○
49	きらら397	1988	東北214号/道北36号	V	○
50	はくちょうもち	1989	上育糯381/おんねもち	III b	○
51	ほのか224	1990	東北214号/空育110号//空育114号	IV	○
52	ハヤカゼ	1990	北育74号/道北36号	V	○
53	彩	1991	永系84271/キタアケ	-	○
54	きたいぶき	1993	上育395号/上育397号(きらら397)	V	○
55	あきほ	1996	上育394号/空育133号	V	○
56	ほしのゆめ	1996	あきたこまち/道北48号//上育397号(きらら397)	V	○
57	北海287号	1998	きらら397突然変異系統	V	○
58	ななつぼし	2001	ひとめぼれ/空系90242A//空育150号	V	○
59	ふっくりんこ	2003	空系90242B/上育418号(ほしのゆめ)	V	○
60	おぼろづき	2003	空育150号/北海287号	V	○
61	大地の星	2003	空育151号/上育418号(ほしのゆめ)	V	○
62	ほしまる	2005	上育428号/空育159号	V	○
63	ゆめびりか	2008	札系96118/上育427号	V	○
64	日本晴	1963	幸風/ヤマビコ	-	○
65	中生愛国	-	愛国突然変異系統	-	○
66	銀坊主	-	愛国突然変異系統	-	○
67	関東53号	1951	農林10号/荔枝江	-	○
68	Cody	-	アメリカ合衆国栽培種	-	○

^a本研究で見いだした道内品種・系統群の遺伝的グループ。彩はいずれのグループにも属さない。

^b○印はIV章で、いもち病圃場抵抗性に関するGWASに用いた材料。

表Ⅱ-2 供試SSRマーカーのアリル数およびPIC値

マーカー	染色体	マーカーボジ ション ^a (bp)	全体		Group I		Group II		Group IIIa		Group IIIb		Group IV		Group V	
			アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値
RM1282	1	549,641	3	0.526	3	0.595	3	0.406	2	0.497	2	0.278	2	0.463	1	0.000
RM1320	1	2,177,733	6	0.570	3	0.512	1	0.000	4	0.675	2	0.278	3	0.645	1	0.000
RM1195	1	6,154,019	4	0.509	4	0.678	3	0.594	3	0.272	2	0.278	3	0.579	2	0.142
RM1032	1	9,318,464	4	0.642	3	0.512	2	0.469	4	0.604	2	0.278	2	0.298	1	0.000
RM6740	1	17,281,795	7	0.644	3	0.562	2	0.469	4	0.556	2	0.278	3	0.661	2	0.142
RM3241	1	27,073,689	7	0.755	4	0.694	1	0.000	6	0.757	2	0.278	3	0.562	2	0.426
RM1297	1	28,613,212	3	0.536	3	0.595	1	0.000	2	0.497	2	0.500	3	0.430	2	0.497
RM5501	1	34,548,947	4	0.626	2	0.165	2	0.375	3	0.462	3	0.500	2	0.165	2	0.142
RM6407	1	42,377,077	2	0.455	2	0.463	2	0.500	2	0.473	1	0.000	1	0.000	2	0.497
RM6911	2	9,009,029	6	0.771	6	0.81	4	0.656	5	0.769	3	0.611	3	0.430	1	0.000
RM1358	2	10,185,526	8	0.767	7	0.826	3	0.594	3	0.592	4	0.722	2	0.496	2	0.142
RM6374	2	15,187,984	4	0.584	3	0.43	1	0.000	2	0.142	2	0.444	2	0.165	1	0.000
RM1379	2	20,056,672	8	0.803	5	0.694	2	0.500	5	0.651	3	0.500	3	0.579	3	0.272
RM3874	2	23,842,982	7	0.674	4	0.545	2	0.469	3	0.521	2	0.444	2	0.165	5	0.698
RM1920	2	25,467,312	6	0.655	5	0.562	3	0.594	2	0.473	3	0.611	3	0.645	3	0.556
RM1385	2	26,646,465	9	0.590	7	0.793	3	0.531	4	0.485	3	0.500	2	0.463	3	0.272
RM3774	2	34,444,317	3	0.293	2	0.165	1	0.000	2	0.142	2	0.444	2	0.397	2	0.355
RM4108	3	536,517	9	0.686	7	0.843	3	0.406	2	0.142	2	0.278	2	0.298	3	0.651
RM3372	3	1,457,491	4	0.564	3	0.595	3	0.406	1	0.000	1	0.000	2	0.165	3	0.568
RM3802	3	1,959,825	5	0.544	4	0.694	5	0.688	1	0.000	1	0.000	4	0.694	1	0.000
RM3807	3	3,531,267	4	0.601	4	0.694	3	0.594	3	0.604	2	0.444	2	0.165	2	0.260
RM5442	3	5,529,248	4	0.566	3	0.314	3	0.625	1	0.000	2	0.444	2	0.496	3	0.639
RM3766	3	6,934,586	4	0.706	2	0.463	3	0.531	2	0.260	2	0.444	3	0.562	3	0.568
RM3461	3	8,350,099	3	0.485	2	0.165	1	0.000	2	0.142	1	0.000	2	0.496	3	0.556
RM1334	3	17,422,644	3	0.386	3	0.512	1	0.000	2	0.142	1	0.000	2	0.463	2	0.355
RM5626	3	24,866,271	2	0.061	2	0.298	1	0.000	1	0.000	1	0.000	1	0.000	1	0.000
RM3601	3	25,959,692	3	0.334	2	0.165	1	0.000	1	0.000	2	0.278	2	0.496	2	0.473
RM1038	3	33,660,363	7	0.640	4	0.645	3	0.594	3	0.615	1	0.000	3	0.314	2	0.142
RM7200	4	4,042,524	5	0.608	2	0.298	3	0.406	2	0.355	3	0.611	2	0.397	2	0.260
RM3524	4	22,893,791	7	0.740	4	0.645	2	0.219	3	0.473	2	0.278	4	0.694	3	0.521
RM1018	4	26,967,205	2	0.490	1	0	2	0.469	2	0.473	2	0.500	2	0.165	2	0.142
RM3648	4	33,306,479	3	0.647	3	0.562	2	0.375	3	0.592	3	0.611	2	0.463	2	0.426
RM1248	5	93,969	3	0.648	2	0.496	2	0.500	3	0.272	2	0.444	3	0.628	2	0.142
RM1127	5	16,015,462	2	0.328	2	0.165	1	0.000	1	0.000	2	0.278	2	0.165	2	0.426
RM1386	5	20,057,139	7	0.517	6	0.661	2	0.375	3	0.379	3	0.611	1	0.000	2	0.426
RM1271	5	22,478,305	5	0.688	2	0.397	2	0.219	3	0.592	2	0.278	1	0.000	3	0.544
RM1369	6	1,563,617	6	0.660	3	0.314	3	0.594	2	0.142	2	0.444	4	0.727	2	0.142
RM5754	6	5,234,113	5	0.644	3	0.645	2	0.469	2	0.260	4	0.722	3	0.661	2	0.142
RM1169	6	7,661,599	2	0.455	1	0	1	0.000	2	0.142	1	0.000	2	0.463	1	0.000
RM5752	7	2,567,818	4	0.573	2	0.298	2	0.469	2	0.260	2	0.278	2	0.298	3	0.379
RM1243	7	3,555,641	9	0.722	5	0.645	4	0.719	4	0.556	2	0.500	3	0.512	3	0.379
RM1253	7	6,968,820	3	0.562	2	0.496	2	0.500	3	0.604	2	0.444	2	0.165	2	0.260
RM1048	7	20,165,312	3	0.524	3	0.628	1	0.000	2	0.355	2	0.444	2	0.165	1	0.000
RM1306	7	28,947,956	9	0.643	5	0.694	3	0.594	5	0.722	1	0.000	3	0.562	1	0.000
RM3181	8	7,553,778	2	0.225	2	0.165	1	0.000	1	0.000	2	0.278	1	0.000	2	0.500
RM3481	8	9,136,135	3	0.503	3	0.512	1	0.000	2	0.260	2	0.500	2	0.397	2	0.142
RM5485	8	24,072,904	6	0.765	3	0.645	2	0.375	3	0.462	3	0.611	4	0.562	4	0.391

^a各マーカーポジションは日本晴ゲノム配列情報(buid1.0)に基づく。

表 II-2 供試SSRマーカーのアリル数およびPIC値(つづき)

マーカー	染色体	マーカーポジ ション ^a (bp)	全体		Group I		Group II		Group IIIa		Group IIIb		Group IV		Group V	
			アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値	アリル 数	PIC値
RM3609	9	1,157,791	5	0.591	3	0.314	2	0.219	3	0.379	1	0.000	3	0.512	3	0.615
RM5526	9	7,314,035	2	0.146	1	0.000	1	0.000	1	0.000	2	0.444	2	0.165	1	0.000
RM1328	9	9,206,385	3	0.485	1	0.000	1	0.000	3	0.473	2	0.278	2	0.397	2	0.142
RM1553	9	21,003,925	4	0.683	2	0.165	3	0.625	4	0.627	1	0.000	3	0.512	4	0.627
RM3283	10	12,383,411	2	0.408	2	0.463	2	0.375	2	0.355	1	0.000	2	0.298	2	0.426
RM6704	10	18,005,491	3	0.656	1	0.000	2	0.469	3	0.592	2	0.444	2	0.496	2	0.444
RM1374	10	21,644,592	9	0.703	4	0.645	3	0.594	4	0.627	1	0.000	3	0.314	3	0.521
RM1124	11	3,855,192	3	0.430	3	0.430	2	0.469	2	0.260	1	0.000	2	0.397	2	0.355
RM3137	11	6,188,794	3	0.451	1	0.000	3	0.594	2	0.497	3	0.500	2	0.298	2	0.497
RM6091	11	13,869,005	2	0.490	2	0.165	1	0.000	2	0.473	2	0.278	2	0.298	2	0.142
RM1355	11	19,816,431	2	0.270	1	0.000	1	0.000	1	0.000	2	0.440	2	0.460	2	0.260
RM5354	11	21,796,072	2	0.090	1	0.000	1	0.000	1	0.000	1	0.000	1	0.000	2	0.350
RM7654	11	27,666,335	5	0.617	3	0.314	2	0.469	2	0.497	2	0.444	2	0.397	3	0.462
RM7619	12	4,829,808	4	0.459	2	0.165	1	0.000	1	0.000	3	0.611	2	0.496	3	0.556
RM1036	12	8,797,117	5	0.742	3	0.314	2	0.500	2	0.473	3	0.611	2	0.397	2	0.355
RM1264	12	26,173,358	2	0.472	2	0.397	2	0.500	2	0.142	2	0.444	2	0.298	2	0.260
平均			3.50	0.481	2.00	0.211	1.81	0.30	2.19	0.337	1.81	0.281	2.13	0.358	2.31	0.376

^a各マーカーポジションは日本晴ゲノム配列情報(build1.0)に基づく

結果

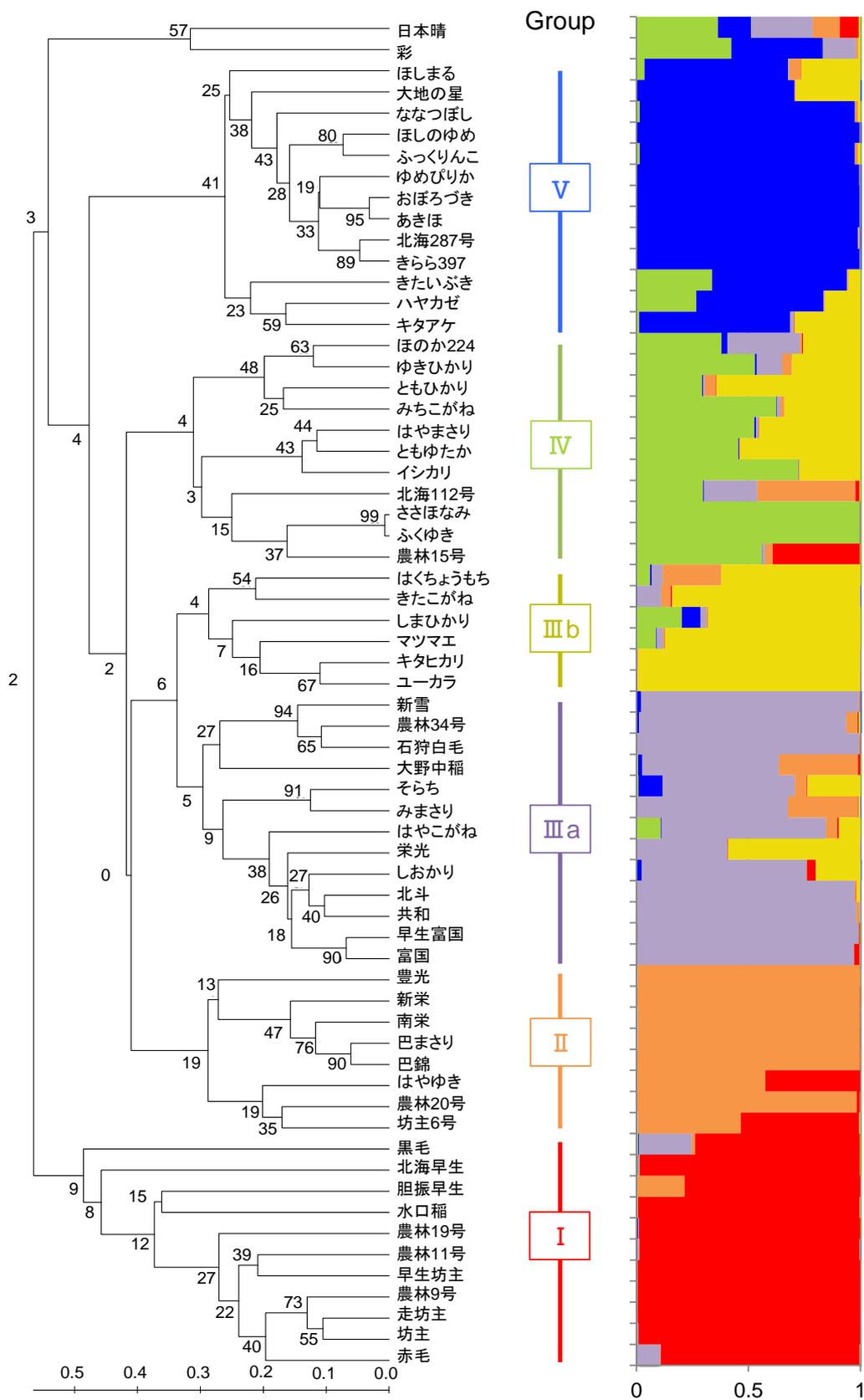
1. 道内新旧主要品種・系統群のクラスター解析

道内新旧主要品種・系統群の遺伝的クラスタリングを行うために、まず134種のSSRマーカー(IRGSP 2005、McCouch *et al.* 2002のリストより選定)を使って道内育成の6品種(「赤毛」、「栄光」、「ユーカラ」「イシカリ」、「きたいぶき」および「ほしのゆめ」)について遺伝子型調査を行い、品種間で遺伝子型多型が認められた78種のSSRマーカーを選び出した。続いて、63品種・系統群の解析を行って極端に多いアリル数(10型以上)を示した15種のSSRマーカーについては系譜を反映した遺伝子型結果が得られない可能性が考えられたため解析より除いた。以上の各工程を経て、最終的に63種のSSRマーカーの遺伝子型多型データを用いてクラスター解析を行った。これら63種のマーカーは、染色体当たり3個以上配置されている(表II-2)。

各染色体に位置する63種のSSRマーカーの遺伝子型に基づき、UPGMA法による系統樹の作成を行った(図II-2)。アウトグループの品種としては「日本晴」を用いた。結果、道内新旧主要品種・系統群は大きくGroup IからVの5つのグループに分かれ、Group IIIをサブグ

ループIIIaとIIIbに分けるならば6つの遺伝的グループに分類された。試験に用いた品種・系統群のうち唯一「彩」はこの6グループ内には含まれず、「日本晴」と同一グループに分類された。図II-1に示すとおり「彩」は日本晴後代の品種であり、系譜関係が影響していると思われる。

同一の遺伝子型データセットを用いてStructureプログラムによる遺伝的クラスタリングを行った。モデルに対する事後確率を対数変換した $\lambda \ln(L)$ 値はKの増加とともに増加し、道内新旧主要品種・系統群に有意な集団遺伝構造が存在することが示唆される(図II-3)。K=6と仮定したときのStructure解析結果は、系統樹作成による遺伝的クラスタリング結果と良く一致した(図II-2)。さらに、以下に示すように、各クラスターは品種の育成系譜にも良く一致する。以上の遺伝的クラスタリング、集団構造結果、および以下に示す育成系譜情報から、本試験に用いた道内新旧主要品種・系統群は、遺伝的に大きく6つのグループ(Group I、II、IIIa、IIIb、IV、およびV)に分けられると結論付けた。



図Ⅱ-2 道内新旧主要品種・系統群のUPGMA法による系統樹ならびにStructure解析結果
 右棒グラフはK=6としたときのStructure解析結果。各品種・系統における各Groupの遺伝構造の混ざり具合を示す。
 赤:Group I 橙:Group II 紫:Group IIIa 黄:Group IIIb 緑:Group IV 青:Group V。系統樹内数値はBootstrap値。

Group Iは「赤毛」他5種の在来種とその後代6品種で構成されるグループである(表II-1、図II-4)。「胆振早生」のゲノム構成は、Group I由来およびII由来の複合タイプであり、また、「赤毛」と「黒毛」は、Group I由来およびIIIa由来の複合タイプであった(図II-2)。

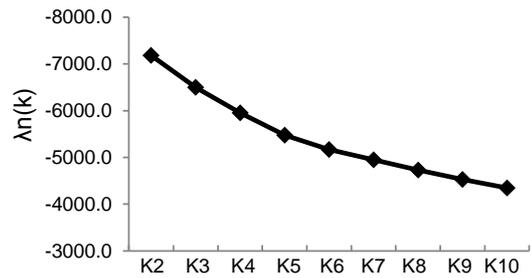
Group IIを構成する8品種は1919年～1968年の間に育成された。この8品種の育成系譜上の祖先品種は、「胆振早生」、「坊主」、「東北14号」、「農林1号」、「銀坊主」および「早生愛国」などと多様であり(図II-4)、後4者は道外品種である。Group IIのうち、「農林20号」、「新栄」、「はやゆき」、「巴まさり」および「南栄」は「胆振早生」の後代であり、「はやゆき」と「坊主6号」(いずれもGroup Iの品種の後代)のゲノム構成はGroup Iとの複合タイプの遺伝構造を保持していた(図II-2)。

Group IIIaは1935～1977年の間に育成された13品種で構成されており、そのうち11品種が「早生富国」およびその後代品種である(図II-5)。ここでは、「栄光」をはじめ6品種が複合タイプであり、Group I、II、III b、IVあるいはV由来ゲノムを構成要素として持つ(図II-2)。

Group IIIbは、1962～1989年の間に育成された6品種で構成されており、そのうち4品種が「ユーカラ」およびその後代品種である(図II-5)。ここでは、4品種がGroup II、IIIa、IVあるいはGroup Vを構成要素として持つ複合タイプであった(図II-2)。

Group IVは、1940～1990年の間に育成された11品種で構成されており、「農林15号」およびその後代品種である(図II-6)。ここでは、「ささほなみ」と「ふくゆき」を除いた9品種が複合タイプで(図II-2)、最も複合タイプの多いグループである。構成要素となっているのは、主にGroup I、II、IIIa およびIIIb 由来ゲノムである。

Group Vは、1983年以降に育成された13品種で構成されており、全てが「キタアケ」およびその後代品種である(図II-6)。ここでは、5品種が複合タイプで、Group IIIb、あるいはGroup IV由来ゲノムを構成要素として持つ(図II-2)。



図II-3 Structure解析より得られた $\ln(k)$ 値 (K=2～10)

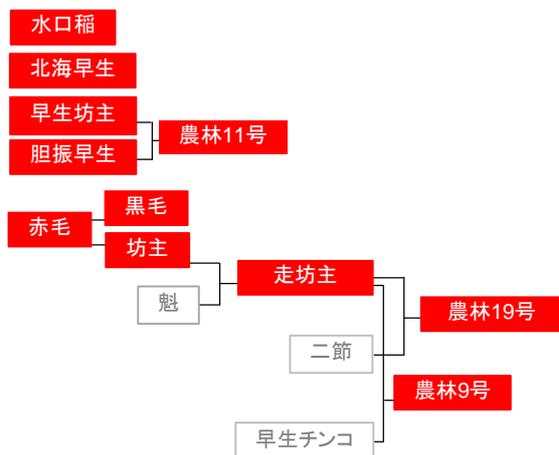
2. グループ間の遺伝的分化に寄与したゲノム領域

各グループはそれぞれが特徴的なゲノム構造を保持しており、それが集団構造をもたらす原因となっていると推測されるが、グループ間の遺伝的分化に寄与しているゲノム領域を推定するために全ての品種のゲノム構造を解析するのは現実的ではない。そのため、系譜的に明確なつながりが認められるGroup IIIa、IIIb、IVおよびVの4グループに焦点を絞り、各々についてグループの代表品種となりうる育成系譜上の重要品種(以下キープ品種)を選び出し、そのキープ品種のゲノム構造の特徴づけを試みた。Group IIIaは13品種中11品種が「早生富国」の後代品種であることから、「早生富国」がキープ品種と推察される(図II-5)。Group IIIbは6品種中4品種が「ユーカラ」の後代であることから「ユーカラ」を(図II-5)、さらにGroup IVおよびGroup Vは、グループの全ての品種・系統がそれぞれ「農林15号」と「キタアケ」の後代であることから、これら2品種をキープ品種とした(図II-6)。

これら4種のキープ品種は府県品種あるいは外国稲を交配親としており(図II-4、5、6)、少なからぬゲノム領域が道外品種から導入され、それらがグループ間のゲノム分化に寄与していると推測される。そこで、4つのキープ品種に加え、府県品種と外国稲を含む交配親9品種(「中生愛国」、「坊主6号」、「関東53号」、「栄光」、「銀坊主」、「走坊主」、「Cody」、「そらち」および「ふくゆき」)を供試してゲノム構造解析を行いキープ品種における府県品種と外国稲由来のゲノム領域の推定を行った。

解析にあたって、先述の63種のSSRマーカーではマーカー密度が低く目的とするゲノム構造解析には不十分である。そこでSSRの遺伝子型判定と併せ、768

Group I



Group II

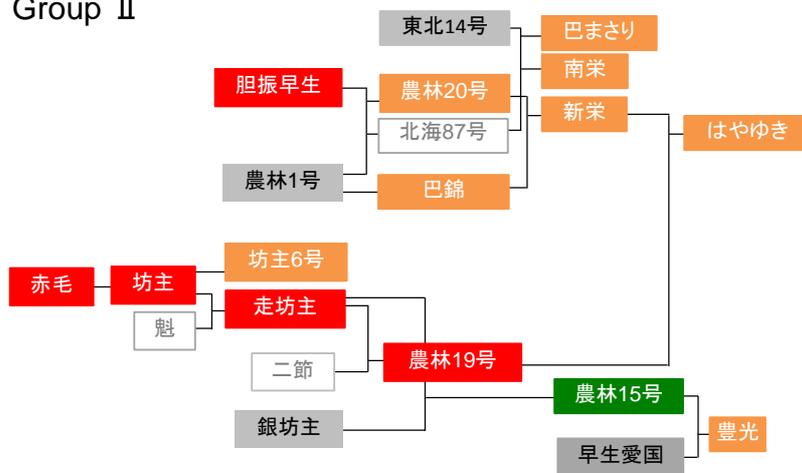
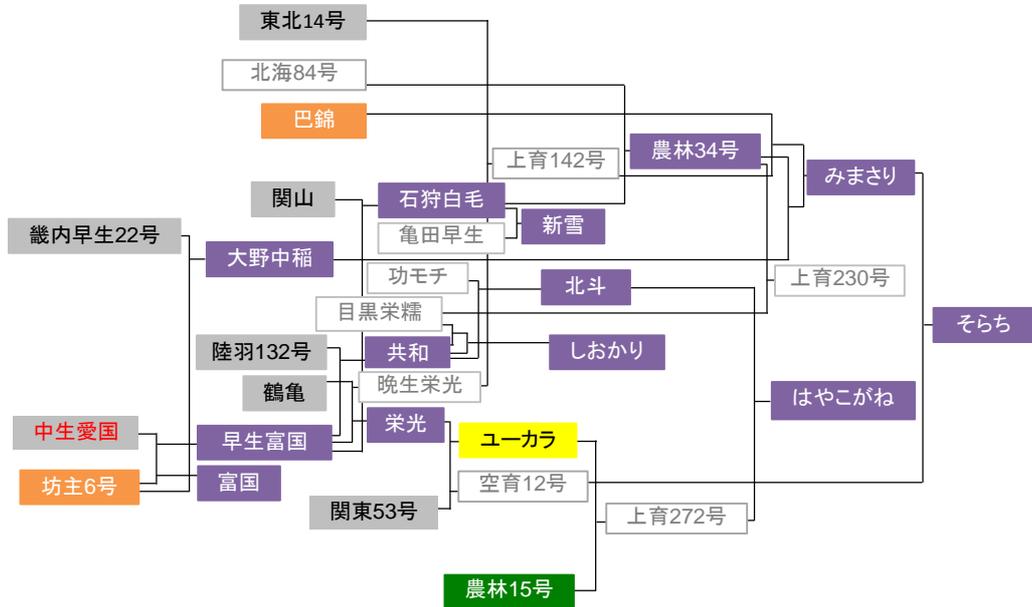


図 II-4 Group I および II の構成品種・系統の系譜図

同一背景色は同一グループであることを示す。

赤: Group I、橙: Group II、緑: Group IV、グレー: 道外品種・系統

Group IIIa



Group IIIb

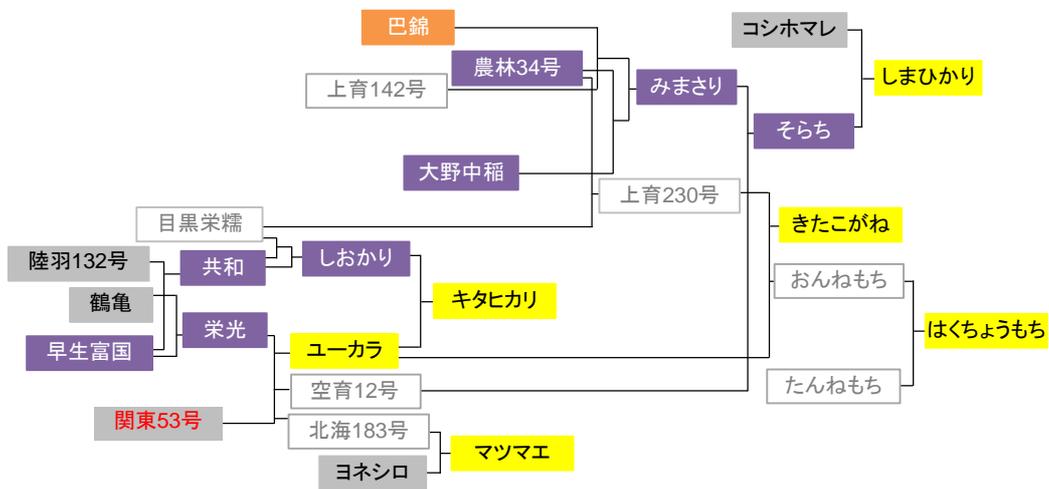
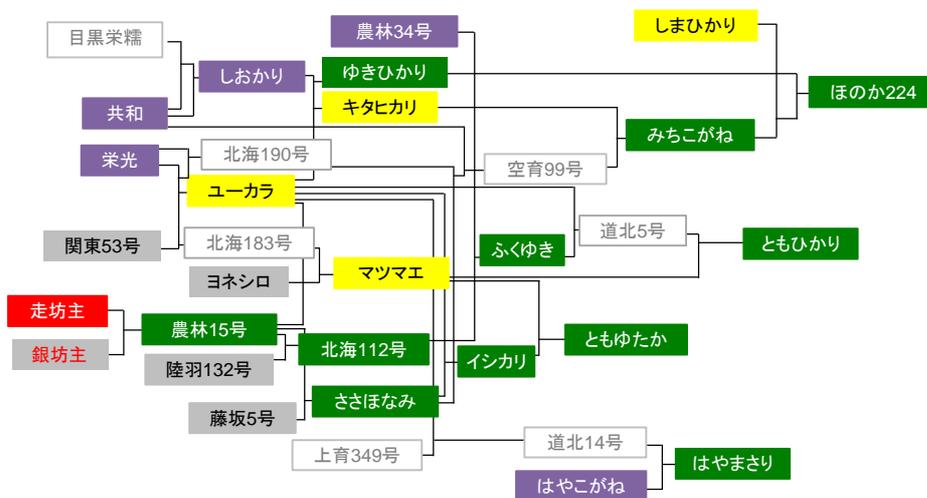


図 II-5 Group IIIaおよびIIIb構成品種・系統の系譜図

同一背景色は同一グループであることを示す。

橙: Group II、紫: Group IIIa、黄: Group IIIb、緑: Group IV、グレー: 道外品種・系統

Group IV



Group V

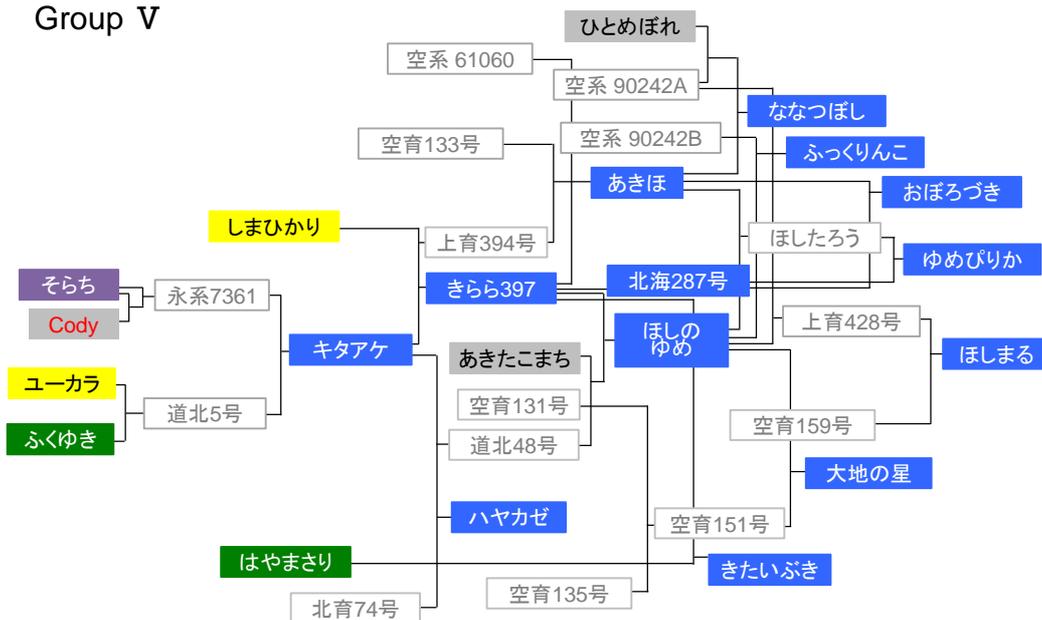


図 II-6 Group IIIaおよびIIIb構成品種・系統の系譜図

同一背景色は同一グループであることを示す。

赤: Group I、紫: Group IIIa、黄: Group IIIb、緑: Group IV、青: Group V
 グレー: 道外品種・系統

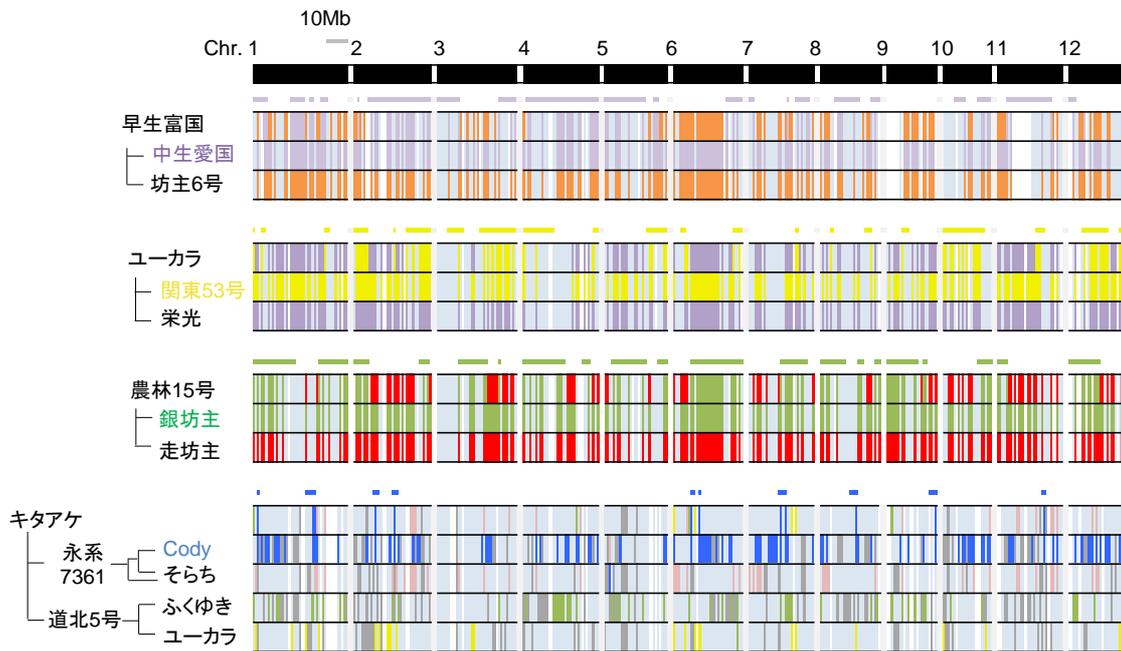


図 II-7 早生富国、ユーカラ、農林15号およびキタアケの各染色体領域の由来の推定
 一番上の黒横棒はイネの12染色体を示す。同一色は同一ゲノム構造である。紫、黄、緑、青の横棒は「早生富国」、「ユーカラ」、「農林15号」および「キタアケ」内に含まれる道外品種・系統由来のゲノム領域。「中生愛国」、「関東53号」、「銀坊主」および「Cody」が各品種育成に用いられた道外品種・系統。

個のSNPsの遺伝子型判定を行った。これより、平均でゲノムDNAの500 kbpあたり1カ所の遺伝子型を知ることができた。これらジェノタイプングデータを用いて4種のキー品種とその交配親についてウインドウサイズ1Mbp (オフセット0.51Mbp)のゲノム領域内に含まれるSNPsタイプとSSRマーカー対立遺伝子型を比較し、キー品種に含まれる道外品種由来ゲノム領域を決定した(図II-7)。

4つのキー品種において、いずれも複数の道外品種・系統由来染色体領域の導入が確認された(図II-7)。最も多かったのが、「農林15号」で合計21箇所、全ゲノム領域の少なくとも53%が道外品種「銀坊主」由来の領域と推定された。「早生富国」については合計21箇所、全ゲノム領域の少なくとも52%が道外品種「中生愛国」由来の領域であり、「ユーカラ」については少なくとも合計21箇所、全ゲノム領域の35%が道外品種「関東53号」由来の領域であると推定された。「キタアケ」については、他の3品種に較べて道外品種(ここ

では「Cody」)由来の領域は少なく、合計10箇所、全ゲノム領域の少なくとも7%であった。

3. 各遺伝的グループの遺伝的多様性

Group I～V間の遺伝的多様性を比較するため、各SSRマーカーのアリル数と多型情報含有値(PIC値)の比較を行った(表II-3)。全63品種・系統の63種のSSRマーカーのアリル数については最大数が9、最小数が2、平均数が4.46であった。PIC値については最小値が0.06、最大値が0.80、平均値が0.55であった。各グループで最も多様性が大きかったのはGroup Iで、アリル数およびPIC値の平均が2.98および0.42であった。Group II～Vについては、アリル数およびPIC値の変化について一定の傾向は認められず、ほぼ同等の値であった。

表Ⅱ-3 63SSRマーカーの多型情報を用いた各グループの遺伝的多様性の比較

Group	品種 系統数	マーカーアليل数			PIC値		
		平均	最小	最大	平均	最小	最大
全体	63	4.46	2	9	0.55	0.06	0.80
Group I	11	2.98	1	7	0.42	0.00	0.84
Group II	8	2.06	1	5	0.33	0.00	0.72
Group III a	13	2.51	1	6	0.36	0.00	0.77
Group III b	6	2.02	1	4	0.34	0.00	0.72
Group IV	11	2.30	1	4	0.38	0.00	0.73
Group V	13	2.19	1	5	0.31	0.00	0.70

4. 各グループの農業形質の特徴

6つのグループを育成年代順に並べると、概ね Group I から Group V の順になり(表Ⅱ-1、図Ⅱ-1)、育種の結果としてグループ間に農業特性の違いがあるものと期待された。そこで、各品種・系統の出穂期、穂ばらみ期耐冷性、一穂粒数、千粒重、穂数、アミロース含有率および精粒歩合の7形質を測定し、グループ毎の平均の比較を行った(図Ⅱ-8、表Ⅱ-4)。その結果、5形質(穂ばらみ期耐冷性、一穂粒数、穂数、アミロース含有率および精粒歩合)でグループ間の平均に有意差が認められた。

穂ばらみ期耐冷性の指標は冷水掛け流し検定後の種子稔実率であるが、全品種・系統群の種子稔実率の平均は32.7%で、最小値は「豊光」の1.9%、最大値は「ほしのゆめ」の74.5%と大きな差異が認められた(表Ⅱ-4)。グループ毎に種子稔実率の平均を比較すると Group V が54.7%と最も高く、Group I (23.4%)、II (19.8%)、IIIa (27.4%)、およびIV (35.1%)との比較で有意差が認められた($P<0.05$) (図Ⅱ-8、表Ⅱ-4)。また、Group I～IV については65%以上の種子稔実率を示す品種がなかったが、Group V では13品種・系統中、6品種・系統が65%以上の種子稔実率を示す結果となった(表Ⅱ-4)。

アミロース含有率については、全品種・系統群の平均が20.4%で、最小値は「おぼろづき」の14.3%、最大値は「イシカリ」の23.9%であった(表Ⅱ-4)。「はくちょうもち」は糯品種であるため調査対象から除いた。グループ毎の平均については、Group V が18.5%で、他の5グループより有意に低かった($P<0.05$) (図Ⅱ-8、表Ⅱ-4)。Group V に属する「北海287号」、「おぼろづき」、「ゆめびりか」は、特にアミロース含有率が低く、それぞれ14.9、14.3、および16.2%であった。これら3系統は低アミロース遺伝子 *Wx1-1* の保持が確認されてい

る(Ando *et al.* 2010)。Group V については、この3品種・系統を除いた場合でもアミロース含有率の平均が19.5%であり、Group I (21.5%)、II (21.1%)、IIIa (21.2%)、あるいはIIIb (22.2%)に較べて有意に低かった($P<0.05$) (表Ⅱ-4)。

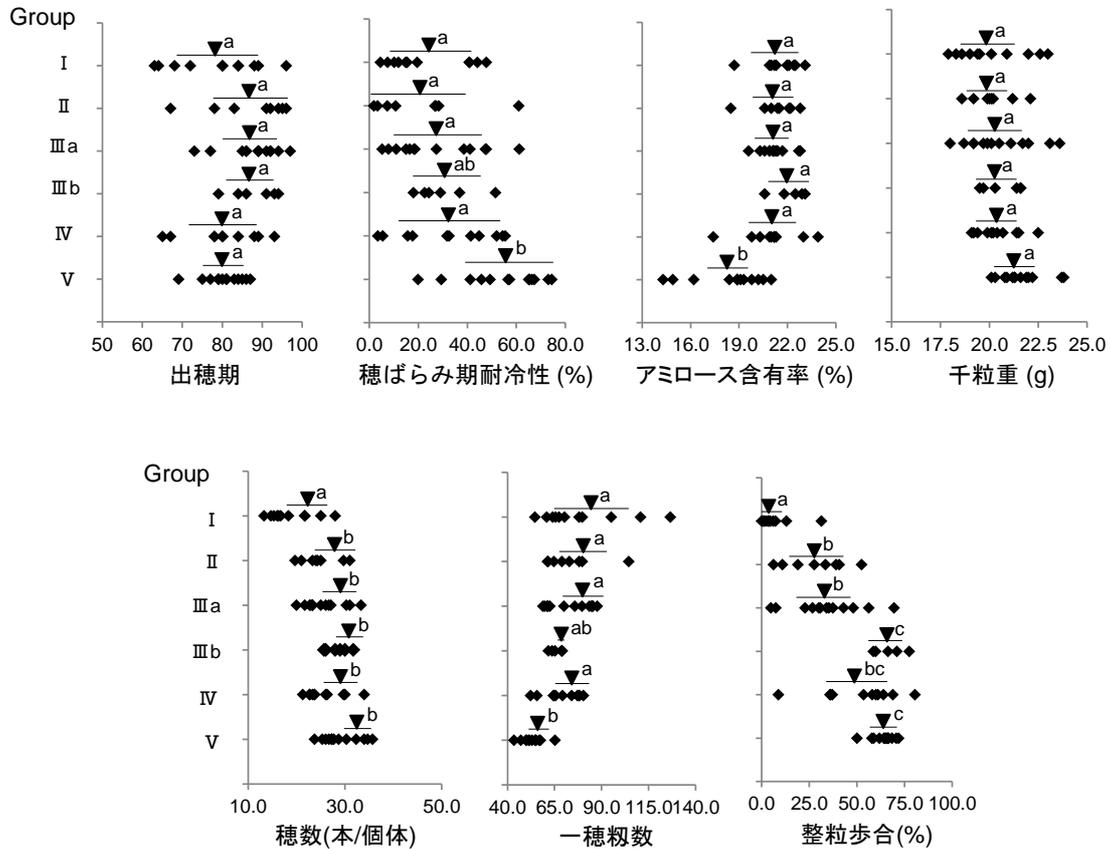
穂数については、全品種・系統群の平均が25.3本で、最小値は「黒毛」の13.3本、最大値は「ハヤカゼ」の35.7であった(表Ⅱ-4)。グループ毎の平均については、Group I が17.9本で最も低く、他の5グループ(25.1～29.2本)との比較で有意差が認められた($P<0.05$) (図Ⅱ-8、表Ⅱ-4)。

一穂粒数については、全品種・系統群の平均が68.8で、最小値は「ほしまる」の43.5、最大値は「胆振早生」の126.5であった(表Ⅱ-4)。グループ毎の平均については、Group V が53.2で最も低く、Group I (80.2)、II (75.4)、IIIa (72.5)、およびIV (68.2)との比較で有意差が認められた($P<0.05$) (図Ⅱ-8、表Ⅱ-4)。またグループ内の変異幅は Group I から V と育成年代が進むにつれて減少する傾向にあった。

整粒歩合については、全品種・系統群の平均が40.5%で、最小値は「水口稲」の0%、最大値は「ほのか224」の80.4%であった(表Ⅱ-4)。グループ毎の平均については、Group I から V と育成年代が進むにつれて増加する傾向にあり、Group I が6.6%で、他の5グループより有意に低かった($P<0.05$) (図Ⅱ-8、表Ⅱ-4)。Group III b と V の精粒歩合はそれぞれ66.6%と64.0%と高く、Group I のみならず、Group II (29.2%)およびIIIa (34.9%)とも有意差が認められた($P<0.05$) (図Ⅱ-8、表Ⅱ-4)。

出穂期については、全品種・系統群の平均が90.7日、最小値は63日、最大値97日、グループ間の有意差

は認められなかった(図II-8、表II-4)。千粒重についてはグループ間の有意差は認められず、平均が20.6g、最小値は17.9g、最大値23.8gであった(図II-8、表II-4)。



図II-8 道内新旧主要品種・系統群のグループ毎の各種農業形質

横軸は各形質値。縦軸はグループ。グラフ内矢頭は各グループ平均値。横線は標準偏差。異なるアルファベットは平均値に5%水準で有意差があることを示す(Tukey-kramerの多重検定)。精品種である「はくちょうもち」のアミロース含有率および整粒歩合については、データに含めなかった。各形質値は下記の通り。

- ・出穂期: 播種日から出穂日までの日数。
- ・穂ばらみ期耐冷性: 冷水掛け流し後の種子稔実率(稔実粒数/総粒数×100)。
- ・アミロース含有率: 白米精粉に含まれるアミロースの割合(%)。
- ・千粒重: 玄米1000粒当たりの重さ。
- ・穂数: 個体当たりの穂数平均。
- ・一穂粒数: 一穂当たり総粒数の平均。
- ・整粒歩合: 玄米500粒当たりに整粒が占める割合(%)。

表Ⅱ-4 道内新旧主要品種・系統の各種農業形質

Group	品種	出穂期	穂ばらみ期	アミロース	千粒重	穂数	一穂粒数	整粒
			耐冷性(%)	含有率(%)	(g)	(本/株)		歩合(%)
I	赤毛	88	19.5	22.0	18.3	28.0	70.3	0.6
	坊主	89	14.9	21.0	19.4	14.7	60.8	6.0
	走坊主	80	11.9	21.2	17.9	21.7	65.5	13.0
	農林9号	68	7.5	22.0	20.9	25.0	54.5	4.6
	早生坊主	64	47.8	23.1	20.1	18.3	64.0	2.2
	農林11号	63	10.2	22.4	19.5	16.7	78.1	3.4
	農林19号	72	44.2	22.5	19.0	21.7	79.7	3.6
	水口稲	96	40.9	21.3	18.6	16.3	110.7	0.0
	胆振早生	84	4.5	20.9	23.0	16.0	126.5	1.2
	北海早生	80	40.9	18.7	22.0	15.3	95.1	7.2
	黒毛	84	15.4	22.1	22.6	13.3	67.3	31.4
	最小値	63	4.5	18.7	17.9	13.3	54.5	0.0
	最大値	96	47.8	23.1	23.0	28.0	126.5	31.4
	平均値±標準偏差	88.8±4.5	23.4±16.4	21.5±1.1	20.1±1.8	17.9±4.7	80.2±22.5	6.6±8.9
II	坊主6号	83	10.8	22.8	20.0	21.0	104.5	6.2
	農林20号	78	3.4	21.0	20.2	24.3	78.1	40.6
	はやゆき	67	61.0	22.2	21.2	19.7	61.6	10.8
	巴錦	94	7.3	18.5	18.6	31.0	64.6	19.0
	巴まさり	96	26.8	20.6	19.2	29.7	68.9	52.4
	南栄	95	27.2	21.5	22.1	24.0	61.2	33.4
	新栄	92	28.3	21.4	20.1	23.3	79.7	27.6
	豊光	91	1.9	22.1	19.9	25.0	72.9	39.0
	最小値	67	1.9	18.5	18.6	19.7	61.2	6.2
	最大値	97	61.0	22.8	22.1	31.0	104.5	52.4
	平均値±標準偏差	93.9±5.6	19.8±18.3	21.1±1.3	20.0±1.1	25.1±3.8	75.4±13.0	29.2±14.2
IIIa	富国	89	18.2	20.9	23.6	20.0	58.8	4.8
	早生富国	86	7.8	20.9	21.7	23.3	84.6	22.8
	栄光	92	18.6	20.3	19.7	23.3	79.6	56.2
	共和	92	41.1	19.6	18.0	26.0	83.6	34.0
	北斗	77	5.2	21.7	19.2	21.7	85.4	7.4
	しおかり	89	15.0	21.4	18.7	30.3	75.7	30.8
	はやこがね	73	61.2	20.6	19.9	27.1	70.0	69.4
	みまさり	89	47.4	22.7	22.0	33.3	60.9	30.0
	そらち	91	47.8	21.2	20.5	31.0	62.5	43.0
	大野中稲	97	27.4	21.3	19.2	23.0	85.0	26.6
	石狩白毛	86	16.5	21.1	21.1	22.7	87.6	37.4
	農林34号	85	11.0	22.8	23.1	26.7	61.6	48.0
	新雪	94	38.6	21.1	20.1	25.0	59.8	35.2
	最小値	77	5.2	19.6	18.0	20.0	58.8	4.8
	最大値	94	61.2	22.7	23.6	33.3	87.6	69.4
平均値±標準偏差	91.8±4.0	27.4±18.7	21.2±0.9	20.6±1.5	25.9±3.9	72.5±11.0	34.9±18.4	
IIIb	ユーカーラ	94	18.0	22.9	20.3	30.0	63.7	66.2
	キタヒカリ	91	36.9	21.8	21.4	25.7	65.2	71.0
	マツマエ	93	29.0	22.5	21.6	29.0	68.9	77.4
	しまひかり	84	24.3	20.6	19.7	26.0	68.8	58.6
	きたこがね	79	22.6	23.1	21.6	31.7	61.7	59.8
	はくちようもち	86	51.5	-1.3	19.5	28.0	69.0	-
	最小値	79	18.0	20.6	19.5	26.0	61.7	58.6
	最大値	94	51.5	23.1	21.6	31.7	69.0	77.4
	平均値±標準偏差	93.2±3.6	30.4±12.2	22.2±1.0	20.7±1.0	28.4±2.3	66.2±3.2	66.6±7.8

表 II-4 道内新旧主要品種・系統の各種農業形質(つぎ)

Group	品種	出穂期	穂ばらみ期	アミロース	千粒重	穂数	整粒	
			耐冷性(%)	含有率(%)	(g)	(本/株)	一穂粒数	歩合(%)
IV	農林15号	65	5.5	21.2	20.4	23.7	64.4	8.8
	ふくゆき	80	32.5	21.0	19.1	30.0	78.2	36.2
	ささほなみ	78	41.5	21.3	19.4	22.7	78.1	35.8
	北海112号	80	3.5	21.2	19.2	29.7	77.2	37.0
	インカリ	78	52.0	23.9	22.5	23.7	64.4	60.0
	ともゆたか	80	55.5	23.0	21.4	34.0	55.7	63.8
	はやまさり	67	54.4	20.9	20.2	26.0	52.3	68.8
	みちこがね	89	31.7	19.8	20.7	22.7	80.4	53.4
	ともひかり	84	17.7	21.2	19.9	26.3	74.1	58.0
	ゆきひかり	88	44.9	20.3	20.1	23.3	69.2	61.0
	ほのか224	93	15.7	17.4	21.5	21.3	65.5	80.4
	最小値	65	5.5	17.4	19.1	21.3	52.3	8.8
	最大値	93	55.5	23.9	22.5	30.0	80.4	80.4
	平均値±標準偏差	89.6±4.6	35.1±17.6	21.0±1.7	20.5±1.0	25.4±3.9	68.2±9.6	52.6±20.5
V	キタアケ	81	65.1	21.0	22.2	34.0	53.0	58.8
	ハヤカゼ	69	57.3	20.5	20.3	35.7	47.1	50.0
	きたいぶき	79	19.9	19.3	20.1	27.7	49.9	66.6
	きらら397	85	41.2	19.8	21.9	27.3	56.8	65.4
	北海287号	83	29.4	14.9	20.8	30.3	55.2	68.4
	あきほ	77	65.5	20.2	21.6	28.7	54.7	71.8
	おぼろづき	86	66.4	14.3	21.3	27.3	65.3	66.0
	ゆめびりか	80	45.8	16.2	20.9	32.3	51.6	57.8
	ななつぼし	84	56.7	18.9	21.2	23.7	57.5	64.8
	ほしのゆめ	81	74.5	18.9	21.3	26.7	51.3	70.6
	ふっくりんこ	87	73.1	18.9	22.0	25.3	54.9	61.8
	大地の星	79	67.4	18.4	23.7	26.0	50.2	66.2
	ほしまる	75	49.3	19.1	23.8	34.7	43.5	64.2
	最小値	69	19.9	14.3	20.3	23.7	43.5	57.8
	最大値	87	74.5	21.0	23.8	35.7	65.3	68.4
	平均値±標準偏差	80.5±4.9	54.7±16.8	18.5±2.0	21.6±1.1	29.2±3.8	53.2±5.4	64.0±5.8
	全体	最小値	63	1.9	14.3	17.9	13.3	43.5
最大値		97	74.5	23.9	23.8	35.7	126.5	80.4
平均値±標準偏差		90.7±4.5	32.7±20.6	20.4±3.1	20.6±1.4	25.3±5.1	68.8±15.3	40.5±24.9

考察

本章では、これまでに北海道で育成された品種の遺伝的多様性を解明し、系譜や農業形質と対応させることで、ゲノムレベルで品種育成過程の遡及を行うための基盤構築を試みた。その結果、対立遺伝子頻度に基づく集団構造モデルおよび育種系譜から、北海道の新旧主要品種系統群は育種系譜に対応した 6 つの遺伝グループに分けられることが明らかになった。

イネにおいては、過去に、本章と同様な手法を用いた解析結果が複数報告されている。Garris *et al.* (2005)や Glaszmann (1987)は世界各地より様々なイネ品種を収集してクラスター解析を行ったところ、*Indica* や *Japonica* といった 5~6 種のイネ品種グループに関連した集団遺伝構造を見出している。同じくアルゼンチン(Giarrocco

et al. 2007)、タイ(Chakhonkaen *et al.* 2012)、アメリカ合衆国(Lu *et al.* 2005)、およびヨーロッパ(Courtois *et al.* 2012) 品種におけるクラスター解析でも品種グループに関連した集団遺伝構造が見出された。以上の研究が本章よりも大まかな集団構造の発見にとどまっている理由としては、供試マーカー数や材料の違いが考えられる。

これに対し Yonemaru *et al.* (2012)は、日本のイネ品種群内に集団構造があることを報告している。報告された集団構造は、品種の栽培型(水稲 vs. 陸稲)、育成年次、あるいは育成地に対応していた。彼らが供試した 177 系統・品種の中には本章と共通な北海道品種は 16 しか含まれていない。しかも、解析スケールの違い(陸稲を含めた日本全体 vs. 北海道)を考慮すると、この報告と本章の結果を直接比較することはできないだろう。本章で明らかにしたようなイネにとって過酷と言える環境に

適応する品種群に集団構造が存在するという結果は、以下のような育種的に重要な議論につながる点で、新規の重要な知見を与える。

北海道品種群に遺伝グループを生じせしめた要因は、育種系譜より類推できる。Group Iは「赤毛」をはじめとする1800年代後半に北海道内で栽培されていた在来種とその後代で構成される(表II-1、図II-4)。これらは他グループに比べて遺伝的多様性が高いグループである。Group IIは在来種同士もしくは在来種と本州品種との交配後代である(図II-4)。本研究でGroup IIIaのキー品種とした「早生富国」は、Group IIの「坊主6号」と本州品種「中生愛国」の交配より育成された(図II-5)。「早生富国」には「中生愛国」のゲノム領域が少なくとも52%含まれている。「ユーカーラ」は本研究でGroup IIIbのキー品種としたが、これはGroup IIIaの「栄光」と本州品種「関東53号」の交配に由来する(図II-5)。「ユーカーラ」には「関東53号」のゲノム領域が少なくとも35%含まれている。Group Iの「走坊主」と本州品種「銀坊主」の交配より「農林15号」(Group IVのキー品種)が育成された(図II-6)。「農林15号」には「銀坊主」のゲノム領域が少なくとも53%含まれている。Group Vのキー品種とした「キタアケ」は「そらち」(Group IIIa)、「ユーカーラ」(Group IIIb)、「ふくゆき」(Group IV)、および外国稲の「Cody」の交配後代で(図II-6)、これらの品種のゲノム領域が取り込まれている。このうち、「Cody」のゲノム領域は少なくとも7%以上含まれている。これより各年代で交配に多用されるような品種は道外品種を用いて育成され、それが北海道イネ品種・系統群の集団遺伝構造分化に少なからず影響したことが示唆される。この仮説を検証するため各キー品種で導入された道外品種由来のゲノム領域がその他品種・系統にどの程度保存されているか、さらに、道外品種のゲノム領域の導入に伴って導入された遺伝子の意義について検討する必要がある。

本章では、7つの農業形質についてグループ間の比較を行った。その結果、5形質(穂ばらみ期耐冷性、一穂粒数、穂数、アミロース含有率および整粒歩合)について有意差が確認され、新しく発生したグループほど、草姿や耐冷性等いくつかの形質が栽培上望ましい方向に改良されていた。アミロース含有率についてはGroup V

が他のグループと比較して低い結果となった。整粒歩合についてはグループの変遷に伴って継続的な向上が認められる。低アミロース性と外観品質の向上については良食味・高品質米生産を達成するのに重要な形質であり、アミロースについては1980年代より積極的な選抜を行ってきた(北海道立中央農業試験場1988)。Group Vは1983年以降にリリースされた品種群であり、このことと符合する。

草型については、株当たり穂数がGroup IからIIへの変遷の過程で有意に増加している。Group II~Vの過程でも有意差はないもののグループの平均値は増加傾向である。その一方で、一穂粒数は徐々に減少する傾向にある。一穂粒数の増加は、弱勢穎花の増加につながり品質の低下をもたらす(高橋2007)。収量と品質レベルの増加を同時に果たしていくため、北海道の育種過程においては継続的に、穂数は増やす方向に、一穂粒数は減らす方向に育種選抜圧がかかってきているのではないかと予想される。

低温ストレスに対する抵抗性は冷涼な北海道におけるイネ栽培に必須事項である(北農会1994)。穂ばらみ期耐冷性は、着実に向上しており、Group Vは、Group I、II、IIIaもしくはIVとの比較において有意差が認められた。

一方、出穂期ならびに千粒重についてはグループ間での有意差および遺伝変異の傾向は認められなかった。北海道イネ品種内における出穂期の早晩は北海道稲作初期の栽培地拡大と関係しており、在来種に内在していた遺伝変異を利用することで、北海道稲作の拡大(栽培地の北進)が達成された(北農会1994)。本研究でも、Group Iで出穂期について多様な遺伝変異が存在することが確認された。Fujino *et al.* (2013)は、Group Iの「坊主」に由来する変異型 *qDTH8* が、近年育成された北海道イネ品種・系統内の熟期の多様性に関与していることを明らかにしている。各種農業形質において改良が見られる一方で、出穂期については、Group Iにおける遺伝的多様性がその後成立したグループにおいても保存されていることは興味深い。

以上のようにいくつかの農業特性についてグループ間で有意差が認められることから、集団遺伝構造の分化との相関が示唆される。集団構造分化の大きな要因の一

つが道外品種からのゲノム領域導入とするなら、これらの導入領域に農業特性向上に関わる遺伝子が含まれている可能性は否定できない。すなわち、外来品種が地域適応性の向上に一定の役割を果たしてきた可能性がある。以上に基づき、北海道新旧品種群の集団構造について図II-9のような仮説をたてた。まず在来種群 (Group I) から近代育種黎明期の品種群が作出された (Group II)。両グループは少なくとも穂数および整粒歩合に違いがあり、これは育種の成果であろう。Group IIIa の構造化要因について、「中生愛国」の果たす役割が大きいと考えられる。Group IIIb は、「ユーカラ」を中心とするグループである。「ユーカラ」の交配親の一つは「栄光」で、これは「早生富国」を祖先とする。「ユーカラ」のもう一つの交配親が「関東 53 号」(本州品種)で、ここから導入された 35% に及ぶゲノム領域が構造化の要因となっている可能性がある。Group IV は、「農林 15 号」を中心とするが、その起源は「走坊主」(Group I) と「銀坊主」(本州品種)で、後者からのゲノム領域導入が構造化の要因の一つと考えられる。Group IV は、「農林 15 号」(1940 年リリース)から「ほのか 224」(1990 年リリース)まで、およそ 50 年間の品種が含まれており、系譜的には Group IIIb の後継というよりは、Group II から IIIb と側系統の関係にあるかもしれない。Group V は、1983 年以降の品種群で構成さ

れる。中心となる品種は「キタアケ」であり、構造化の要因の一つは、海外品種「Cody」から導入されたゲノム領域かもしれない。ただし、「キタアケ」祖先系統には、「そらち」(Group IIIa)、「ユーカラ」、および「ふくゆき」(Group IV)が含まれており、他グループからのゲノム領域集積も構造化要因となっている可能性がある。Group V は、穂ばらみ期耐冷性、アミロース含有率および一穂粒数で他グループと異なる。

本研究で示したように北海道のイネ品種・系統群においては長年にわたる育種選抜の結果、各種農業形質に多様な遺伝変異が認められる。これは 100 年にわたる北海道イネ育種の成果であるが、各年代で育種目標達成に貢献した重要遺伝因子を一つ一つ明らかにし、それらの由来となった遺伝資源を特定することは容易ではない。これに対して本研究では、北海道新旧イネ品種・系統群における集団遺伝構造を明らかにし、いくつかの品種から集団遺伝構造分化の要因となりうる道外品種由来ゲノム領域を明らかにした。各遺伝グループ間に各種農業形質に差が認められること、さらに、年代が進む毎に向上が認められることは、道外品種由来ゲノム領域の存在と相関があるようにみえる。今後、これら道外品種由来ゲノム領域と各種農業形質との関連を調査することで北海道での地域適応性向上に関わった重要遺伝子を明らかにすることができるかもしれない。

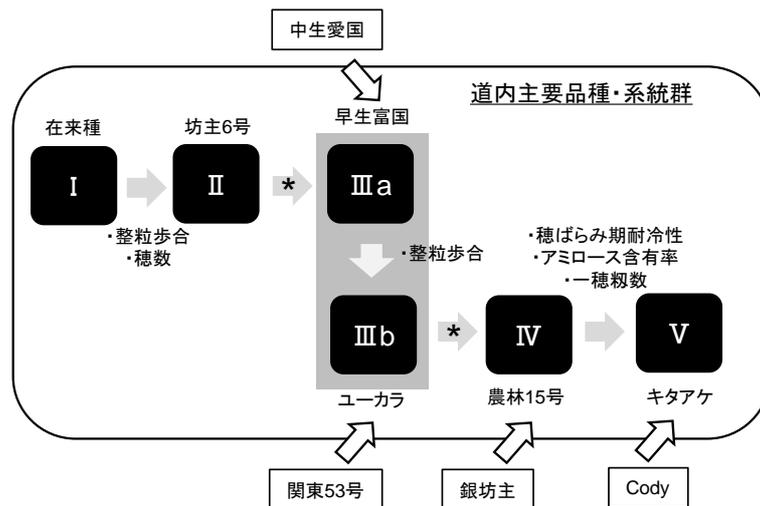


図 II-9 道内新旧主要品種群における遺伝的グループ変遷のモデル図

*グループ変遷に伴い、PIC値が増加していたケース。
グループの変遷に伴い、有意差が生じた農業形質を矢印近傍に示した。

第三章 開花期耐冷性に関する遺伝解析

イネの生殖成長期間は温度感受性が高く、過度の低温や高温は様々な形態・生理的異常を誘発し、種子不稔の原因となる(Satake and Hayase 1970, Satake and Koike 1983)。丹野 (2004) は 1955~2004 年の気象ならびにイネの生育概況を分析し、北海道ではイネの生育期間において低温被害を受ける冷害年が計 14 回発生し、そのうち 10 回が生殖成長期間中の低温によるものと推測している。温暖化が進んでいると言われている近年でも、2003 年や 2009 年に生殖成長期間中の低温による冷害が発生しており(北海道米麦改良協会 2011)、生殖期間の耐冷性強化は依然北海道イネ育種の最重要課題であると言える。

イネの生殖期間には 2 つの低温感受性ステージがあることが明らかになっている。一つは花粉形成期にあたる穂ばらみ期(Satake and Hayase 1970)で、もう一つは開花・受精が起こる開花期である(Satake and Koike 1983)。穂ばらみ期においては、低温の影響による花粉母細胞の減数分裂異常およびタペト層の異常肥大(酒井 1949)、あるいは糖代謝異常(Kawaguchi *et al.*1996)が起こることが明らかになっており、種子不稔との関連が示唆されている。一方、開花期は花粉成熟後から受精までの時期であり、雌性器官に比べて雄性器官が低温の影響を受けやすく、花粉発芽が異常を起こし不稔が生じると考えられている(Satake and Koike 1983)。

開花期耐冷性については人工気象室を用いた検定法が確立され、広い品種間差異があることが明らかである(丹野ら 2000)。しかしながら人工気象室の使用が避けられないことと、穂ばらみ期の低温ストレスの影響を排除するため出穂期を揃えなければならないことが主要なネックとなり、積極的な育種選抜はされておらず、開花期耐冷性品種間差に関わる遺伝要因も全く明らかになっていない。穂ばらみ期耐冷性において明らかな育種の効果が確認される中で、近年育成された北海道イネジェーンプール内に開花期耐冷性遺伝変異ならびに関連形質の変異がどの程度内在されているのか検証すること

は、イネ生育ステージ全般における耐冷性強化を進めていく上で非常に重要である。

以上の背景から、本章では、道内育成材料を試験材料に、未選抜形質であった開花期耐冷性の遺伝変異ならびにそれに関与する QTL の検出を行った。さらに検出した QTL をもとに DNA マーカー選抜(以下「MAS」 : **marker assisted selection**) による耐冷性強化が可能かどうかの検証を行った。

材料および方法

1. 供試材料

北海道内で育成された 19 のイネ品種・系統を選定した(表III-1)。これら品種・系統は 1983 年から 2007 年の間に育成され、道内のイネ育種において交配親として重要な役割を果たしている品種・系統である。戻し交雑自殖系統群 (以下「BILs」 ; **backcross inbred lines**) については、まず「永系 88223」と「彗星」との交配で得られた F₁ 個体に「彗星」を交配し、BC₁F₁ 世代 120 個体を得た。単粒系統法(**single seed descent** ; SSD)による世代促進ののち、BC₁F₃ 世代と BC₁F₄ 世代を得た。QTL 効果検証実験では、「永系 88223」と「彗星」を交配親に用いた F₂ 世代 1754 個体を養成し、SSR マーカーにより 151 個体を選抜し、F₃ 世代を育成した。

2. 開花期耐冷性の評価

開花期耐冷性評価は丹野ら(2000)の方法に準じて行い、個体毎に種子稔実率を測定した。材料養成には縦 15 × 横 5 × 高さ 10cm のプラスチック製の有穴方形ポットを用いた。各ポットに、同一品種を直列に 8 株、各 2 粒播きし、播種後約 40 日後に分げつを切除して 1 本立てとし、主幹のみの密植栽培とした。低温処理前の材料は、穂ばらみ期の低温による影響を排除するため、幼穂形成期直前から出穂期までの約 40 日間は、平均 23.0°C (昼 26.0-夜 20.0°C、昼は朝 9 時から夕方 5 時まで)に設

表Ⅲ-1 道内育成19品種系統の開花期耐冷性

No.	品種・系統名	育成年	低温処理区			対象区		
			調査 個体	調査 種子数	種子 稔実率(%) ^a	調査 個体	調査 種子数	種子 稔実率(%) ^a
1	ほしまる	2006	11	272	92.6±5.9	16	327	95.5±4.8
2	北海302号	2005	15	358	88.9±7.6	16	375	98.1±3.8
3	永系88223	1988	12	364	87.8±7.0	16	417	97.9±3.6
4	しろくまもち	2007	10	313	82.0±12.5	16	473	97.0±2.5
5	きたいぶき	1993	10	369	81.2±11.2	16	239	98.4±1.8
6	北育糯87号	1992	13	340	79.0±13.0	16	432	96.8±4.1
7	ななつぼし	2001	9	224	78.4±9.9	16	382	97.9±3.6
8	初雫	1998	11	283	75.3±9.9	16	317	99.4±1.7
9	ほしのゆめ	1996	15	413	75.3±13.1	16	385	98.1±3.1
10	キタアケ	1983	10	278	73.0±11.1	16	452	98.4±2.0
11	はくちょうもち	1988	19	531	68.9±11.3	15	371	95.3±8.2
12	上育455号	2006	12	292	66.1±9.9	16	377	98.9±2.0
13	きらら397	1988	15	365	64.8±20.1	16	442	98.9±2.0
14	AC99084	1999	9	245	62.4±11.2	16	385	98.2±2.6
15	風の子もち	1995	16	479	48.2±15.0	16	445	98.5±1.7
16	あやひめ	2001	13	395	44.5±23.1	15	371	95.3±8.2
17	彩	1992	7	152	32.8±11.9	8	153	97.2±4.8
18	吟風	2000	14	426	11.6±8.1	15	394	95.9±11.1
19	彗星	2006	12	317	7.5±7.9	16	355	98.3±2.4
平均					64.2±24.2	97.5±1.2		

^a個体毎の種子稔実率(個体あたり稔実粒数/個体あたり総粒数×100)。平均±標準偏差。

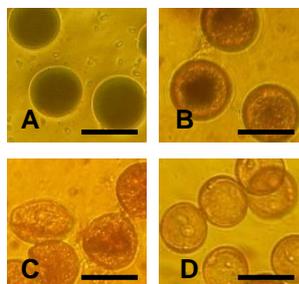
定した自然光型人工気象室で養成した。低温処理は自然光型人工気象室を用い、17.5℃・15日間で行った。直射日光によるイネ本体の温度上昇を防ぐため人工気象室の天井部を遮光率 50%の遮光幕で覆った。各個体の穂先が止葉葉鞘の先端からわずかに抽出した日を出穂日として、ポットあたり 3 個体以上の個体が出穂した時点で低温処理を開始し、ポット内で低温処理開始日に出穂した個体を試験対象とした。各品種・系統試験対象個体が 5 個体以上になるように処理を行った。さらにコントロール区として、植物体を幼穂形成期より常時平均 23.0℃(昼 26.0℃夜 20.0℃、昼は朝 9 時から夕方 5 時まで)に設定した自然光型人工気象室で養成した。低温処理後の植物体は再び平均 23.0℃(昼 26.0℃夜 20.0℃、昼は朝 9 時から夕方 5 時まで)に設定した自然光型人工気象室に移動させて成熟期まで養成した。成熟期後に触診による個体毎の種子稔実率調査を行い、種子稔実率平均値を算出した。MAS 選抜個体の耐冷性評価については、

500cc の円形プラスチックポット内を用いて個体養成を行い、上記温度条件で、低温処理等を行った。分けつ切除は行わず、各個体 2~3 穂が出穂した時点で低温処理を開始した。低温処理開始時において処理開始前に開花した穎花ならびに未出穂の穂は切除した。日数は上記条件と同様である。

3. 花粉充実度調査

低温処理中の未開花穎花より未裂開の葯をサンプリングし、スライドガラス上でカバーガラスをのせ、指圧により葯をつぶし、ヨウ素液(I₂-KI: 0.2% ヨウ素、2% ヨウ化カリウム液)染色の後、光学顕微鏡 IMT-2(オリンパス; 東京都 日本)により観察した。一つの葯当たり 40~80 粒の花粉を観察した。本研究においてはヨウ素液により花粉全体が黒く染色される花粉(図Ⅲ-1 A)を‘充実花粉’とした。花粉中央部のみ染色される花粉(図Ⅲ-1 B)および赤く染色され形態も異なる花粉(図Ⅲ-1

C)を‘分解花粉’とした。さらに全く染色されない花粉(図III-1 D)は‘非充実花粉’ (未熟花粉)とした。



図III-1 低温処理条件下の花のヨウ素染色像
 染色の異なる4種の花粉が観察され、以下のように分類した。
 図内黒横線はScale bar (50μm)
 A: 充実花粉(全体が黒く染色される花粉)
 B: 分解花粉(花粉中央部のみが染色される花粉)
 C: 分解花粉(赤く染色され、形態もいびつな花粉)
 D: 非充実花粉(全く染色されない花粉) Scale bar = 50μm

4. 柱頭上での花粉発芽ならびに花粉管伸長確認試験

穎花より、開花翌日の雌ずいをサンプリングし、EAA溶液(エタノール:酢酸=3:1)で固定を行った。その後、1N水酸化カリウム溶液中で、15分・55°Cの軟化処理を行ったのち、滅菌水により洗浄を行った。洗浄後、0.1%(w/v)濃度になるようにアニリンブルーを溶解したリン酸カリウム buffer (pH8.5)を用い、室温2時間の染色を行った。その後、再び滅菌水により洗浄を行い、50%グリセロール液上にめしべをのせ、蛍光顕微鏡 BX-63(オリンパス; 東京都 日本)により柱頭上での花粉発芽ならびに花粉管伸長の観察を行った。

5. マーカー解析

DNA抽出方法ならびにSSRマーカー判定手法については第II章に準ずる。McCouch *et al.* (2002)およびIRGSP (2005)より報告のあったマーカーリストより949種のSSRマーカーを選定し、「永系88223」と「彗星」間で多型の認められた87種をQTL解析に用いた(図III-2)。さらに、道内品種・系統のQTL近傍のハプロタイプパターンを検出するために19種のSSRマーカーを用いた(表III-2)

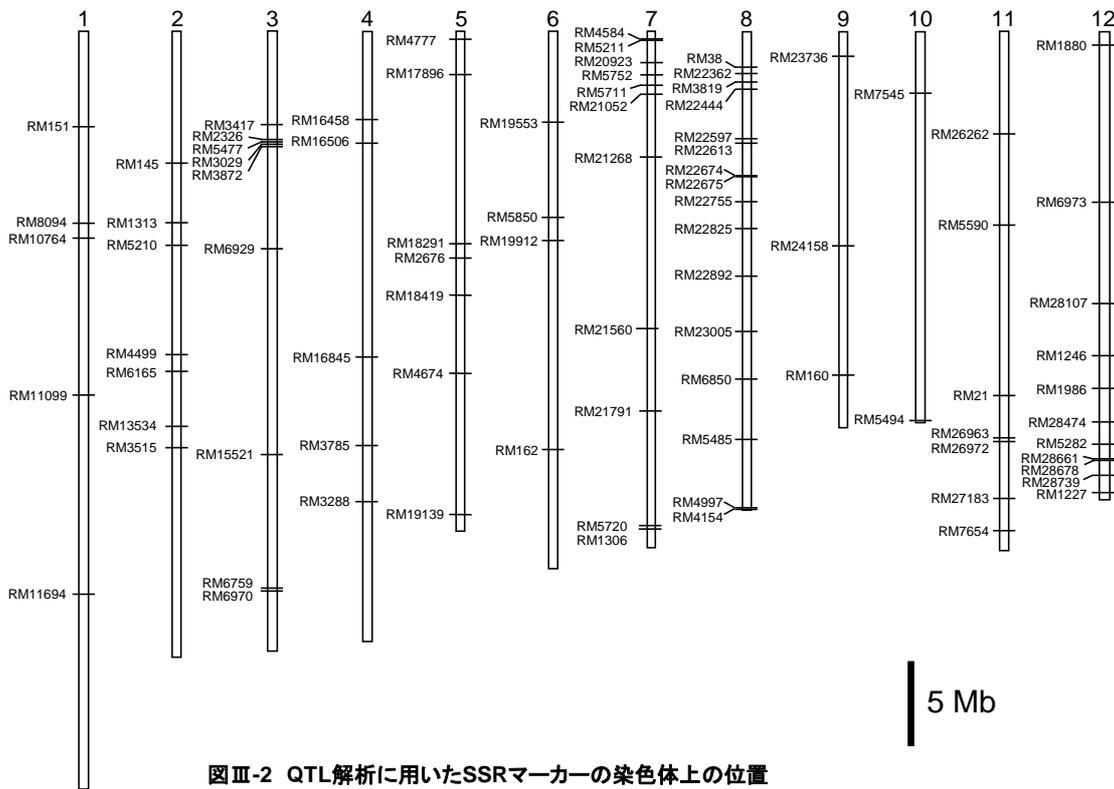
表III-2 QTL領域のハプロタイプパターンの決定に用いたSSRマーカー

番号 ^a	関連			
	QTL	マーカー名	染色体	Mb ^a
1	<i>qCTF7</i>	RM20875	7	1274594
2	<i>qCTF7</i>	RM3196	7	2044182
3	<i>qCTF7</i>	RM5752	7	2567835
4	<i>qCTF7</i>	RM20973	7	2769872
5	<i>qCTF7</i>	RM5711	7	3142182
6	<i>qCTF7</i>	RM21030	7	3501838
7	<i>qCTF7</i>	RM21052	7	3770854
8	<i>qCTF7</i>	RM21076	7	4028088
9	<i>qCTF7</i>	RM21078	7	4028504
10	<i>qCTF8</i>	RM22674	8	8497582
11	<i>qCTF8</i>	RM22679	8	8580070
12	<i>qCTF8</i>	RM22684	8	8806132
13	<i>qCTF8</i>	RM22780	8	10798009
14	<i>qCTF12</i>	RM3331	12	23494367
15	<i>qCTF12</i>	RM28580	12	24324659
16	<i>qCTF12</i>	RM28669	12	25556762
17	<i>qCTF12</i>	RM28678	12	25736141
18	<i>qCTF12</i>	RM1227	12	27338833
19	<i>qCTF12</i>	RM28825	12	27466157

^a日本晴ゲノム配列情報(build1.0)に基づく。

6. 連鎖解析、QTL解析および統計解析

連鎖解析には、MAPMAKER/EXP ver3.0を用いた(Lander *et al.* 1987)。マーカー間の組み換え頻度は、Kosambi 関数により遺伝距離に変換した(Kosambi 1944)。QTL解析は、ソフトウェア QTL CARTOGRAPHER ver2.5を用いて composite interval mapping 法により行った(Basten *et al.* 1998、Wang *et al.* 2007)。有意性を示す LOD 値(閾値)は、QTL CARTOGRAPHER の permutation テストモード(1,000回)により算出し、 $p < 0.05$ のとき LOD 値 2.74 を閾値とした。各種統計解析については、解析ソフト JMP10(SAS; NC USA)を用いて行った。各個体・系統の種子稔実率についてはアークサイン変換を行った後に、解析に利用した。



図Ⅲ-2 QTL解析に用いたSSRマーカーの染色体上の位置
各QTLの物理位置は日本晴ゲノム配列情報(build1.0)に基づく。のべ87種の多型SSRマーカーを用いて連鎖地図を作成した。

結果

1. 北海道育成材料の開花期耐冷性品種間差異

北海道内で育成されたイネ品種・系統の開花期耐冷性強度の品種間差異を調べるため、開花期耐冷性簡易検定手法(丹野ら 2000)を用いて表Ⅲ-1 に示す 19 品種・系統を検定した。まず供試した 19 品種・系統はコントロール区では一様に 95%以上の種子稔実率を示し、品種間差は認められなかった(表Ⅲ-1)。その一方で、低温処理区では、種子稔実率に大きな品種間差が認められた。19 品種・系統の低温処理区での種子稔実率の平均は64.2%で、最も高い種子稔実率を示したのは「ほしまる」で92.6%、最も低い種子稔実率を示したのは、「彗星」で7.5%であった。育成年あるいは系譜と、種子稔実率の高低に関連は認められなかった。

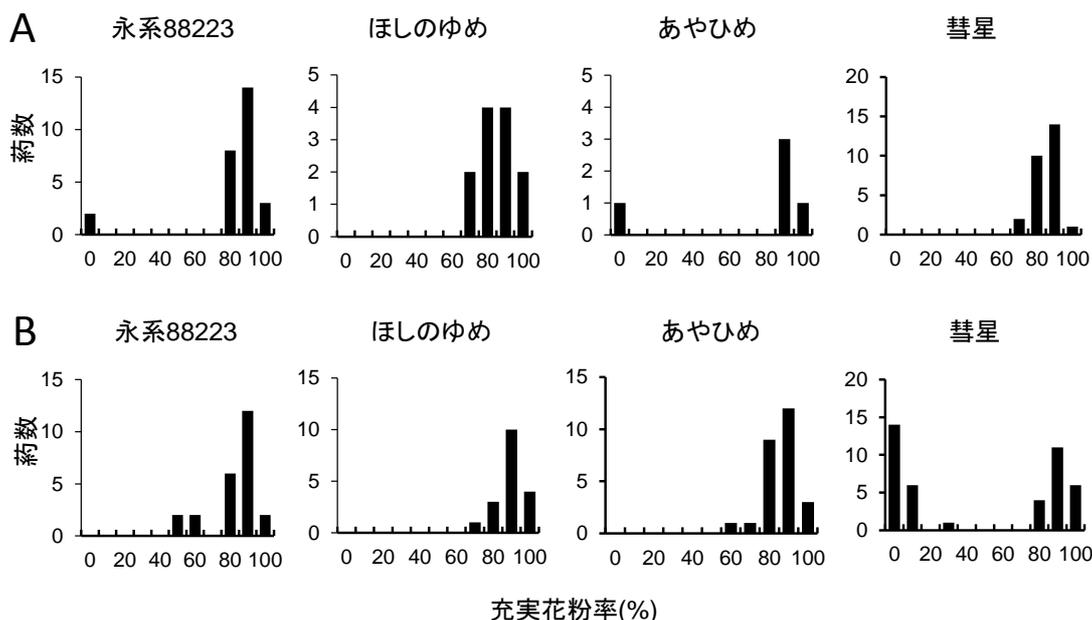
2. 低温処理条件下における花粉稔性の差異

前項で明らかになった開花期耐冷性の違いは、花粉の形態や機能に現れる可能性が高い。そこで、開花期耐冷

性が異なる「永系 88223」(耐冷性“極強”)、「ほしのゆめ」(強)、「あやひめ」(弱)および「彗星」(極弱)の 4 品種・系統を用い、低温処理が及ぼす花粉充実度、花粉発芽ならびに花粉管伸長への影響を調査した(図Ⅲ-3、4)。

花粉充実度を葯内容物のヨウ素液染色像に基づく充実花粉率の割合により調べた。花粉低温処理開始直後は、「永系 88223」と「あやひめ」で充実花粉が全く含まれず非充実花粉のみを含む葯(充実花粉 20%以下)が少数認められたのを除き、いずれの品種・系統も葯内の充実花粉の割合が高い結果となった(図Ⅲ-3A)。低温処理開始 10 日後においても「永系 88223」、「ほしのゆめ」および「あやひめ」については葯内の充実花粉率はほとんどが 70%以上を示し、高いままであった。その一方で、「彗星」においては充実花粉の割合の低下が認められ、調査した半数の葯が 80%以上の分解花粉を含んでいた(図Ⅲ-3B)。

低温処理中に開花した穎花の柱頭上での発芽・伸長の様子を観察し、花粉発芽ならびに花粉管伸長を確認した。コントロール区においては供試した 4 品種・系統

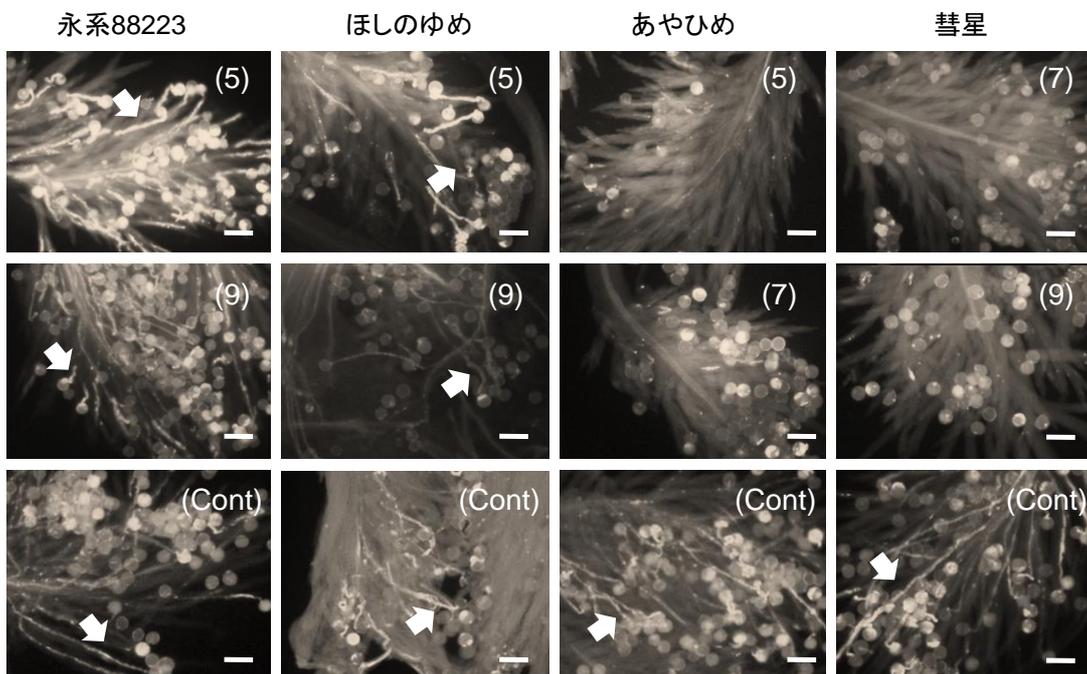


図Ⅲ-3 開花期耐冷性が異なる4品種・系統の葯内充実花粉率

縦軸は葯数。横軸は各葯内に含まれる充実花粉の割合。未開花穎花より採種した葯サンプルを試験に用いた。

A: 低温処理開始直後にサンプリングした葯

B: 低温処理10日後にサンプリングした葯



図Ⅲ-4 低温処理条件下の柱頭における花粉管発芽・伸長の様子

低温処理5、7もしくは9日後に開花した穎花をサンプリングし、柱頭上での花粉発芽および花粉伸長を調査した。()内の数値は低温処理日数。(Cont):コントロール区。白線: Scale bar (100 μ m)。「永系88223」および「ほしのゆめ」では低温処理区でも旺盛な花粉管伸長(糸状の発光; 図中矢印)が認められる一方、「あやひめ」および「彗星」では、低温処理区で同様な現象が認められない。

全てにおいて旺盛な花粉発芽と花粉管伸長が観察された(図III-4)。「永系 88223」と「ほしのゆめ」については、低温処理 5 日目および 9 日目においてもコントロール区と変わらない花粉発芽と花粉管伸長が観察された。その一方、「あやひめ」と「彗星」については低温処理 5 日目、7 日目および 9 日目で旺盛な花粉管伸長を示す花粉はほとんど認められなかった。

3. 開花期耐冷性に関する QTL 同定

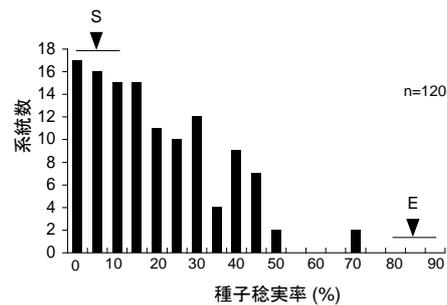
「永系 88223」と「彗星」については低温処理後の種子稔実率に極端な品種間差が認められた。この品種間差を司る QTL を同定するため、「永系 88223」と「彗星」を交配親に用いた BILs を育成した(BC₁F₃と BC₁F₄に相当する)。解析に利用した BILs については通常の圃場条件で、全てが 80%以上の種子稔実率を示すことを確認した。

BILs (BC₁F₄) について開花期耐冷性検定を行ったところ、種子稔実率は両親の値の間で連続的な分布を示したが、全体に低い種子稔実率に偏っており、種子稔実率 20%以下の系統が 5 割を占める(図III-5)。種子稔実率の平均は 22.0%、最大値が 73.7%、最低値は 1.2%であった。

BILs の連鎖地図を構築するため、全染色体に散在する 949 種の SSR マーカー(マーカー間の平均インターバル約 450kb)より、両親間で多型を示す SSR マーカーのスクリーニングを行った。これらの SSR マーカーの多型率は低く、多型を示したのは 87 種であった(図III-2)。87 種のマーカーは概ね全ての連鎖群に均等に配置されている。「永系 88223」と「彗星」はともに道内育成材料であり、近縁関係にある(図III-6)。よって多型マーカーが見つからなかった領域については同一のゲノム DNA 構造である可能性が高いと推察される。

両親間で多型を示した 87 種の SSR マーカーを用いて、BILs (BC₁F₃) のジェノタイプングを行い、得られた連鎖地図ならびに開花期耐冷性判定結果を用いて QTL 解析を行った。その結果、第 7、8 および 12 染色体の計 3 カ所に QTL が検出された(図III-7)。3 つの QTL はいずれも「永系 88223」アレルが開花期耐冷性を向上

させる。最も作用力が大きいのは第 7 染色体短腕末端の SSR マーカー RM5711 近傍に位置する *qCTF7* で、寄与率が 19.2%であった(表III-3)。次に寄与率が高かったのが、第 12 染色体長腕末端の SSR マーカー RM28611 近傍に位置する *qCTF12* で、寄与率が 14.8%であった。第 8 染色体 RM22613 近傍に位置する *qCTF8* については寄与率が 7.9%であった。



図III-5 マッピング集団(BILs)における開花期耐冷性の変異
縦軸:各種子稔実率を示した系統数。横軸:種子稔実率。
矢印および横線は、それぞれ「永系88223」(E)と「彗星」(S)の種子稔実率の平均および標準偏差を示す。

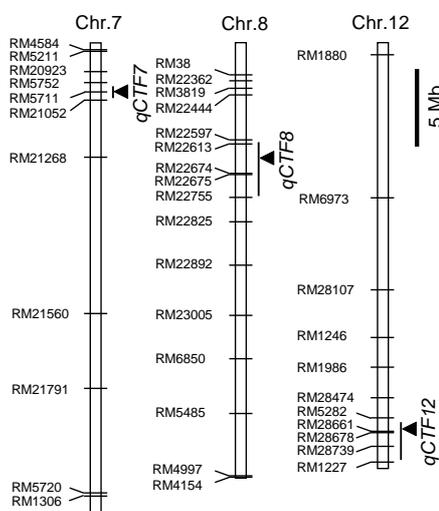
4. マーカー選抜を用いた開花期耐冷性強化の実証

同定した 3 つの QTL の効果を検証するために、「永系 88223」と「彗星」の交雑後代 F₂ 集団を養成し、そのうち各 QTL 近傍の 3 種の SSR マーカーがいずれもホモで固定していた 151 個体を選抜した。選抜には、各 QTL の Lod ピーク近傍に位置する RM5711 (*qCTF7*)、RM22613 (*qCTF8*)、および RM28661 (*qCTF12*) を用いて各 QTL の保持を推測した。選抜した個体を保持 QTL の違いに基づいて 8 つに class 分けした。それらは以下の通りである。

- class 7+8+12, : *qCTF7*, 8, 12 がいずれも永系 88223 型ホモ接合
- class 7+12, : *qCTF7*, 12 が永系 88223 型ホモ接合
- class 8+12, : *qCTF8*, 12 が永系 88223 型ホモ接合
- class 7+8 : *qCTF7*, 8 が永系 88223 型ホモ接合
- class 7 : *qCTF7* が永系 88223 型ホモ接合
- class 8 : *qCTF8* が永系 88223 型ホモ接合
- class 12 : *qCTF12* が永系 88223 型ホモ接合
- class 0 : *qCTF7*, 8, 12 がいずれも彗星型ホモ接合。



図Ⅲ-6「永系88223」と「彗星」の系譜関係

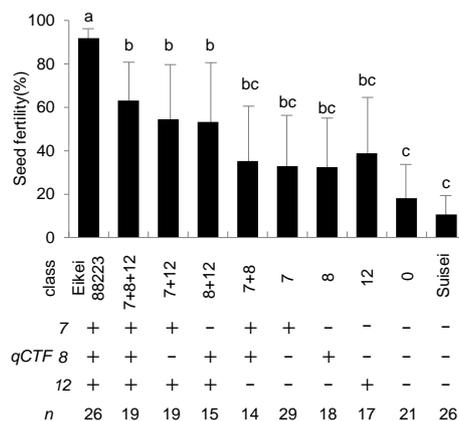


図Ⅲ-7 検出された3つの開花期耐冷性関連QTLの染色体位置
矢印は、各QTLのLODピーク位置を示す。縦線はLODピーク値・1.0以上の領域。

以上のうち、記述のないQTLはいずれも彗星型ホモ接合である。これらの個体を自殖してF₃世代を得、個体別に耐冷性検定を実施した（各classの個体数は14～29個体）。class毎での種子稔実率の平均を比較したところ保持QTLの増加に併せて種子稔実率の増加が認められた(図Ⅲ-8)。最も種子稔実率平均が高かったclassは、class 7+8+12で62.1%、最も低かったclassはclass 0で18.2%であった(図Ⅲ-8)。class 7+8+12の種子稔実率は、「永系88223」よりも有意に低い ($p < 0.05$)。

単一QTLのみを保持する3つのclass (class 7, class 8, およびclass 12)の種子稔実率平均は32.9～38.9%でclass 0よりも高いものの4つのclass間で有意差は認められない。その一方でQTLを2つ保持するclassのうち、class 7+12、およびclass 8+12は、QTLを1つ保持するclassよりも種子稔実率が高く(class 7+12 ;

54.5%, class 8+12 ; 53.3%)、class 0とも有意差が認められた ($p < 0.05$)。一方で、class 7+8については、種子年実率がQTLを1つ保持するclassと同程度であった(図Ⅲ-8)。



図Ⅲ-8 永系88223/彗星F₃集団の開花期耐冷性検定結果
保持QTLにより分類したグループ毎の種子稔実率の平均値と標準偏差を示す。nは各classの個体数。異なるアルファベットは5%水準で有意差有り(Steel Dwas検定)。各QTLの保持については近傍SSRマーカーによって確認した。

5. 北海道育成系統における各QTL分布の推定

前項で同定したQTLと、本実験で明らかにした道内育成材料の耐冷性品種間変異の関連を調査するため、耐冷性検定に供試した19品種・系統のうち「永系88223」と「彗星」を含む17品種・系統についてQTL周辺のSSRマーカーの遺伝子型判定を行い、各QTLの有無を推定した(表Ⅲ-4)。解析には「永系88223」と「彗星」間で多型を示す19マーカーを用いた。17品種・系統中qCTF7領域が「永系88223」と同一なのは7品種・系統、qCTF8領域が同一なのは2品種・系統、qCTF12領域が同一なのは5品種・系統であった。3つのQTL

関連が示唆される。注目すべきは「あやひめ」で、低温条件下において花粉充実度は「永系 88223」や「ほしのゆめ」と遜色がないが、花粉発芽と伸長が著しく劣る。このことは、開花期耐冷性の機構が花粉形成と、花粉発芽・花粉管伸長の、少なくとも二つのステージを含むことを示唆する。発生的には、花粉形成には孢子体（タペート細胞など）の関与が大きいのにに対し、花粉発芽や花粉管伸長は配偶体（花粉）が主体となるから、これらの組織毎に耐冷性程度が異なると考えると、この結果に対する説明が付けられると考えられる。

開花期耐冷性が極強の「永系 88223」と極弱の「彗星」を交配親に用いたマッピング集団より 3 つの QTL を同定した。穂ばらみ期耐冷性については、冷水掛け流し検定や人工気象室を利用した遺伝解析が複数行われ、多くの穂ばらみ期耐冷性関連 QTL が同定されている (Andaya and Mackill 2003, Dai *et al.* 2004, Kuroki *et al.* 2007, Mori *et al.* 2011, Li *et al.* 1997, Oh *et al.* 2004, Saito *et al.* 1995, Shirasawa *et al.* 2012, Suh *et al.* 2010, Takeuchi *et al.* 2001, Xu *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2010)。しかしながら本研究で見いだされた 3 つの QTL 領域については、これらの QTL 領域とはいずれも異なっていた。穂ばらみ期耐冷性と開花期耐冷性ともに種子稔実率を指標として耐冷性の強弱を判断するがその作用機作は異なる可能性がある。先述の発生的な観点では、穂ばらみ期耐冷性は専ら孢子体の耐冷性を問題にしていることになり、開花期耐冷性（孢子体と配偶体）とは異なる。本研究で新規の QTL が同定されたのは、首肯できる結果である。

開花期耐冷性の品種間差異については、低温条件下における花粉発芽・伸長の違いが原因である可能性が示唆された。イネの花粉発芽・花粉管伸長の抑制については高温条件下(38°C)でも生じる。高温耐性の強い品種は、弱い品種に比べて、花粉発芽・花粉管伸長に高温の影響を受けにくいという (Jagadishi *et al.* 2010)。花粉発芽や花粉管伸長の温度感受性について、詳細な調査が必要である。

「永系 88223」と「彗星」を用いた F₃ 集団を使った解析で、各 QTL の効果を検証できた。その結果、各 QTL 単独の作用は限定的で、種子稔実率の向上は概ね 10～15%に過ぎない。しかしながら、複数 QTL を集積する

ことで明瞭な耐冷性向上が認められた。各 QTL の近傍には分子マーカーが見つかったので MAS による集積が可能である。従って、北海道イネ品種の開花期耐冷性の強化に MAS が有効であることが推測される。その一方で *qCTF7* と *qCTF8* を集積させたケースでは、単独の QTL の効果と違いが認められない。両者にはエピスタシスがあるか、あるいは、*qCTF7* と *qCTF8* は発現ステージが同一なために集積効果が小さいことが理由として考えられる。開花期耐冷性については本研究で明らかにしたように、少なくとも花粉成熟ステージと、花粉管発芽・花粉管伸長ステージを含んでいる。いずれか一つのステージのみ耐冷性が向上しても、もう一つが律速となるのであれば全体の開花期耐冷性はそれほど上がらない可能性がある。今後、各ステージにおける各 QTL の効果を調べることで、各 QTL の相互関係を明らかにすることができると考えられる。

道内育成材料には QTL マッピングの交配親に用いた「永系 88223」の他に、「ほしまる」、「北海 302 号」および「きたいぶき」など複数の高度耐冷性保持品種があるが、本研究で同定した 3 つの QTL 周辺の SSR マーカー遺伝子型は、同一ではなかった。従って、「ほしまる」、「北海 302 号」もしくは「きたいぶき」の開花期耐冷性の起源は、「永系 88223」とは異なる可能性が高い。あくまでも推測であるが、これら品種・系統は本研究で同定した QTL とは異なる遺伝因子の作用により高度耐冷性を示している可能性がある。そうであるなら、開花期耐冷性発現の遺伝機構は複数存在することになり、育種戦略もそれを加味していく必要がある。今後道内育成材料の開花期耐冷性に関して、さらなる遺伝解析が進むことにより、より高度な開花期耐冷性を保持する品種育成につながることを期待される。

第四章 いもち病圃場抵抗性に関する遺伝解析

イネいもち病の病害防除には品種抵抗性の利用が効果的で、古くから抵抗性育種が進められてきた。遺伝解析も盛んに行われてきており、現在では約 90 種にもおよぶいもち病抵抗性遺伝子の存在が明らかである (Gramene database)。いもち病抵抗性については、1 つの遺伝子が関与し、レース特異的に強力な抵抗性を発揮する真性抵抗性と、複数の遺伝子が関与し、広い範囲のレースにマイルドな効果を安定的に発揮する圃場抵抗性 (Ezuka 1972) の 2 種類に区分されている。真性抵抗性については、これまでに多数の関与遺伝子が同定され、品種開発も行われてきた。しかしながら、いもち病菌レースの交代により、開発した品種の抵抗性が普及後数年で崩壊するケースが多く認められている (村井ら 1983、八重樫 1994)。一方、圃場抵抗性については、抵抗性の程度は限定的であるものの、持続的な効果が期待されることから、近年圃場抵抗性を導入したイネ品種開発が積極的に進められている。個々の圃場抵抗性遺伝子の効果は限定的であり、いもち病菌レースにより効果が異なるケースもあることから (Sato *et al.* 2006)、圃場抵抗性遺伝子の利用には複数を集積することが重要であり、DNA マーカー選抜を用いた遺伝子集積がより効率的である。しかしながら、圃場抵抗性遺伝子については *pi21*、*Pb1* および *Pi35* など陸稲や外国稲に由来する少数について単離同定の報告があるに過ぎない (Fukuoka *et al.* 2009、2014、Hayashi *et al.* 2010)。高度いもち病圃場抵抗性品種の開発には、依然多様な抵抗性遺伝子同定が必要である。

北海道イネ育種において、いもち病抵抗性の強化は、これまで被害がそれほど多くなかったことから優先順位が低く、目標とする抵抗性レベルもそれほど高くなかった。しかしながら最近の栽培現場における多発傾向を受けて、選抜を強化する方向で検討が行われている。面白いことに北海道のイネ品種には、いもち病圃場抵抗性に大きな品種間差異が認められており (木下ら 2006)、北海道の地域適応品種がいもち病圃場抵抗性のソースとして利用できる可能性を示唆する。そこで本章では、北海道の品種群の遺伝変異全体をカバーする 60 品種か

らなるコアパネルを構築し、いもち病圃場抵抗性の評価を行った。あわせて DNA マーカーの遺伝子型データを用いて、いもち病圃場抵抗性にかかわるゲノムワイド関連解析 (以下「GWAS」; **Genome wide association study**) を行い、道内育成材料が保持するいもち病圃場抵抗性関連領域の抽出を行い、最も作用力の大きい領域について、詳細な検証を行った。

材料および方法

1. 供試材料

第 II 章で用いた道内新旧主要品種・系統群のうち 60 種を用いた (表 II-1)。抵抗性関連領域の効果の検証には、表 IV-1 に示す「キタアケ」に関連する 16 品種・系統を供試した。この 16 品種・系統の系譜を図 IV-1 に示す。

いもち病抵抗性 QTL のマッピングには、「上育 462 号」 (いもち病圃場抵抗性“強”) と「上系 06214」 (いもち病圃場抵抗性“弱”) の交配によって得られた F₁ 個体に由来する倍加半数体系統 (以下「DHLs」; **doubled haploid lines**) を用いた。薬培養については Niizeki and Oono (1968) の方法に従った。A₂ 世代 88 系統を試験に供試した。

2. マーカー解析

DNA 抽出、SSR マーカー、SNP マーカーの遺伝子型判定方法については第 II 章に準ずる。実験に用いた SSR マーカーについては、McCouch *et al.* (2002) および IRGSP (2005) より報告のあったマーカーリストより選定した。SNP マーカーについては Nagasaki *et al.* (2010) によって開発された 768SNPs タイピングアレイセット (J-core SNPs セット) を用いた。GWAS に用いたマーカーについては Shihada *et al.* (2015b) 参照。QTL 解析に用いたマーカーについては図 IV-2 に示す。Pi-cd 領域の絞り込みについては 7 種の SSR マーカーを用いた (表 IV-6)。PIC 値の算出については第 II 章の方法に準じた。

表IV-1 *Pi-cd*効果検証に用いた「キタアケ」関連品種・系統

供試 番号	品種・系統名	育成年	交配組合せ・由来	いもち病 発病指数
1	Cody	-	アメリカ合衆国	0
2	そらち	1967	空育12号/みまさり	74.4
3	ユーカラ	1962	関東53号/栄光	98.5
4	ふくゆき	1958	北海112号/農林34号	82.2
5	吟風	1999	八反錦/上育404号//きらら397	31.6
6	彗星	2006	初雫/吟風	34
7	空育162号	1997	空系90242B/上育414号	36.8
8	空育171号	2005	北海287号/空育160号	90
9	空育172号	2006	ふ系187号/空育162号//ふっくりんこ	32.4
10	空育179号	2009	ななつぼし/大地の星	49.6
11	空育180号	2010	上育455号/大地の星	43.8
12	上育452号	2005	上系98029/上系98264	55.8
13	上育455号	2006	上系99059/AC99084	86.4
14	上育462号	2008	北海302号/上育452号	38
15	上育463号	2009	上系04045/北海302号	35.2
16	上系06214	2008	上系04501//ほしのゆめ//ほしのゆめ//ほしのゆめ	100.1

3. いもち病圃場抵抗性の判定

各品種・系統のいもち病圃場抵抗性の判定については上川農業試験場内の圃場で行った。6月下旬に各系統の乾籾5gを条間50cmとなるように筋播きし、発病ムラを補正するため圃場抵抗性が中の農林20号を10系統置きに設置した。試験区周辺に、いもち病の誘発源として抵抗性が弱い「ほしのゆめ」、「北海112号」および「彩」の混植区を設けた。7月上旬にいもち病罹病藁(レース037菌接種)を設置し、いもち病を蔓延させるため適宜散水を行った。試験区内で発病が認められた7月下旬より1週間おきに計3回、浅賀(1981)の方法に従い、11段階の葉いもち罹病程度を判定した。発病ムラを補正するため近接する「農林20号」の葉いもち罹病程度合計を100としたときの発病指数を計算し、各品種・系統のいもち病抵抗性強度を判断した。GWASに供試した60品種・系統、「Cody」ならびに「キタアケ」後代の12品種・系統については2反復、マッピング集団については1反復で試験を行った。

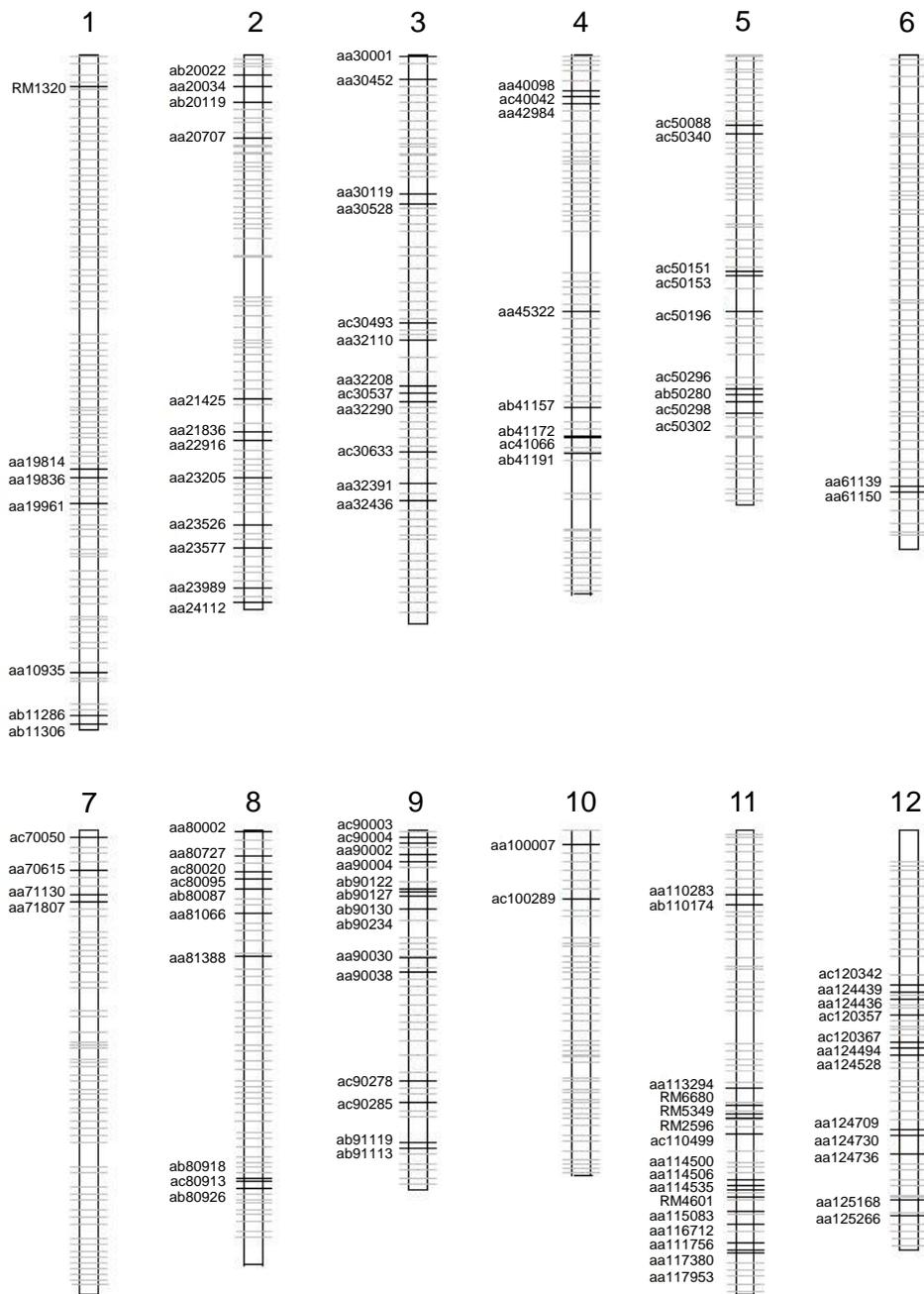
4. GWAS

コンピュータプログラムTassel ver.3.0を用いて行った(Bradbury et al. 2007)。Structure解析から推定される

集団構造(K-matrix)に対する補正を行う **General Linear Model** (以下「GLM」) と集団構造およびよりミクロな遺伝構造(家系構造、**Q-matrix**)を含めた補正を行う **Mixed Linear Model** (以下「MLM」)によりゲノムワイド関連解析を行った。Structure解析については、コンピュータプログラム Structure ver.2.3.4を用いて行った。第II章の結果より、 $K=6$ として、第II章の方法に準じてStructure解析を行いK-matrixの値を得た。家系構造の解析についてはTassel ver.3.0を用いて行った。GWAS結果の閾値の設定については、 q 値を用いた(Storey and Tibishiran 2003)。各SNP・SSRマーカーの q 値の計算については、コンピュータプログラムRを用いて行い、 q 値 <0.05 となるマーカーを有意ないもち病抵抗性関連マーカーとした。

5. 連鎖解析およびQTL解析

連鎖解析およびQTL解析は第三章の方法に準じた。有意性を示すLOD値は、QTL CARTOGRAPHERのpermutationテストモード(1,000回)により算出し、 $p<0.05$ のときLOD値6.24を閾値とした。



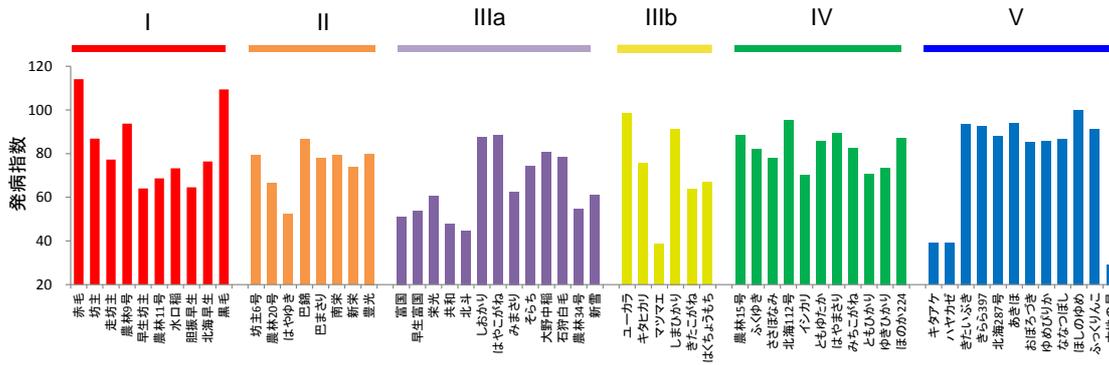
図IV-2 QTL解析に用いたSNP・SSRマーカー

各染色体横線は上育462号、上系06214間の多型マーカースクリーニングに用いた768 SNP および 38 SSR マーカーを示す。このうち多型が認められた130マーカー(125 SNP ・ 5 SSRマーカー)をQTL解析に用いた(黒線)。各マーカーの物理位置は日本晴ゲノム配列情報(build1.0)に基づく。

結果

1. 北海道育成材料のいもち病圃場抵抗性品種間差異
 第二章で用いた品種・系統から選び出した 60 種は、Group I から V までを網羅している(以後、これら 60

品種をコアパネルとする)。コアパネルについて、いもち病抵抗性圃場検定を行った。コアパネルの発病指数を図IV-3、表IV-2 に示す。いもち病発病指数に大きな品種間変異が認められた(平均 76.0 ; 29.2~114.1)。グループ毎の平均値は、65.0 (Group IIIa) から 82.0 (Group I, IV)



図IV-3 コアパネルのいもち病発病指数

II章のクラスター解析によって分類されたグループ毎で色分けして示す。発病指数が大きいほどいもち病圃場抵抗性は弱い。

まで幅がある(表IV-2)。

いもち病発病指数のグループ内変異については、グループ毎に異なる傾向が認められた。まず Group IV では全ての品種・系統のいもち病抵抗性は弱い(発病指数平均 82.0 ; 70.1~95.2)。その一方、育成年の古い品種群(Group I~IIIb)では連続的な抵抗性変異が存在した。また、Group V では抵抗性に優れる品種(3品種 発病指数平均 35.7 ; 29.2~39.1)と弱い品種・系統(9品種・系統 発病指数平均 90.7 ; 85.4~100)に2極化する傾向が認められた(図IV-3、表IV-2)。

2. コアパネルを用いたいもち病圃場抵抗性について GWAS 解析

第II章で見たようにコアパネルに含めた品種のゲノム全体にある程度の遺伝的多様性が認められる。そこで、いもち病圃場抵抗性に関するGWASを行い、前項で明らかにしたいもち病圃場抵抗性の原因遺伝子領域を調べることとした。今回用いているような遺伝的に構造化した集団に対してGWASを行うと擬陽性のおそれがあるが、イネであれば交配実験によって抽出された関連領域の効果を検証することができる。

まず、GWASに十分なDNAマーカー多型情報を得ることとした。供試した768SNPマーカーのうち、223マーカーについてはコアパネル内で多型が認められないか、もしくは10%以上の品種でシグナル未検出かヘテロとして検出されたため解析より排除した。SSRについては、第II章の63種のマーカー情報に加え、新た

に26種のマーカーから多型情報を得た。以上より、545のSNPと89のSSRマーカーについてコアパネルの遺伝子型を得た。Yamamoto *et al.* (2010)の報告では、日本の主要品種の連鎖不平衡は約2Mbpと推定されている。マーカー間の平均距離は0.58Mbpで、9ヶ所の領域で2Mbp以上のマーカー間のギャップが認められたが、それ以外の領域では、ほぼ均等に多型マーカーを得ることができた(図IV-4)。各マーカーのPIC値の平均は0.36であった。

コアパネルの遺伝子型データといもち病発病指数のデータを用いて、いもち病圃場抵抗性に関するGWASを行った。解析モデルとしてGLMを選択した場合は第3、4、5、10および11染色体上の5ヶ所の領域で、いもち病圃場抵抗性とマーカー遺伝子型に有意な関連が認められた(図IV-5、表IV-3)。このうち第11染色体の短腕末端から19Mbに位置するRM5349で最も強い関連が確認された。コアパネル内ではRM5349について2つの遺伝子型が認められた。1つは「キタアケ」とその後代である「ハヤカゼ」および「大地の星」が保持する遺伝子型で、3品種ともに強い圃場抵抗性を保持する(発病指数平均 35.6 ; 29.2~39.1)(表IV-3)。残りの57品種・系統(発病指数平均 77.7 ; 38.7~114.1)はいずれももう一つの遺伝子型を示した。解析モデルとしてMLMを選択したGWAS解析においては q value < 0.05となるマーカーは認められなかったが、GLMと同様にRM5349で最も高い関連が認められた(図IV-5)。

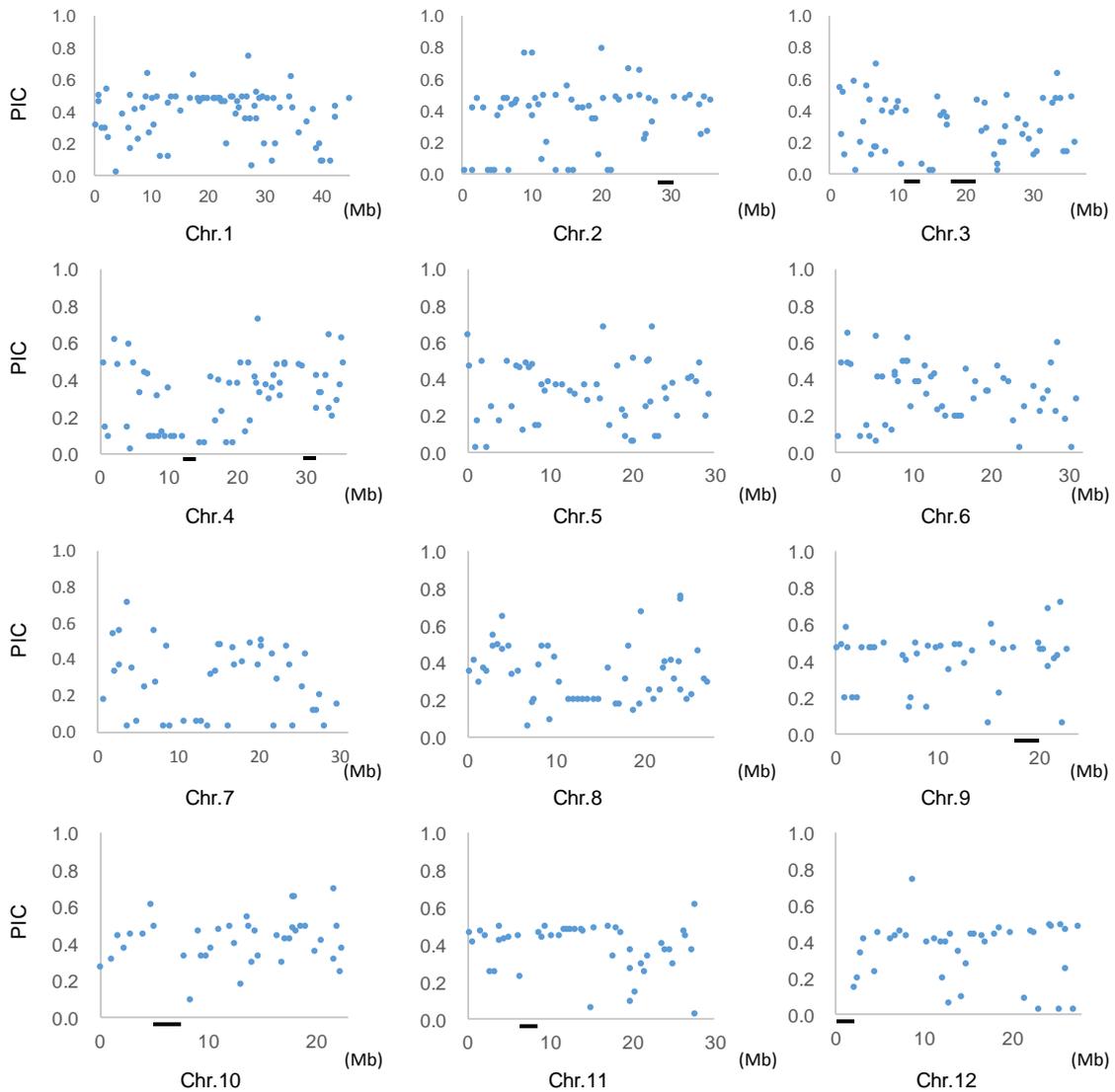
表IV-2 コアパネルのいもち病発病指数

Group	品種	いもち病 発病指数	Group	品種	いもち病 発病指数	
I	赤毛	114.1	IIIb	ユーカーラ	98.5	
	坊主	86.8		キタヒカリ	75.4	
	走坊主	77.3		マツマエ	38.7	
	農林9号	93.7		しまひかり	91.4	
	早生坊主	64.0		きたこがね	64.0	
	農林11号	68.6		はくちょうもち	66.9	
	水口稲	73.3		最小値	38.7	
	胆振早生	64.6		最大値	91.4	
	北海早生	76.4		平均値±標準偏差	72.5±19.5	
	黒毛	109.4		IV	農林15号	88.2
	最小値	64.0			ふくゆき	82.2
	最大値	114.1			ささほなみ	77.7
	平均値±標準偏差	82.0±16.3			北海112号	95.2
	II	坊主6号			79.1	イシカリ
農林20号		66.5	ともゆたか		85.6	
はやゆき		52.3	はやまさり		89.4	
巴錦		86.6	みちこがね		82.3	
巴まさり		77.8	ともひかり		70.6	
南栄		79.1	ゆきひかり		73.5	
新栄		73.7	ほのか224		87.2	
豊光		79.9	最小値		70.1	
最小値		52.3	最大値		95.2	
最大値		86.6	平均値±標準偏差		82.0±7.8	
平均値±標準偏差		74.4±9.9	V	キタアケ	39.1	
IIIa		富国		51.2	ハヤカゼ	38.9
		早生富国		53.7	きたいぶき	93.6
		栄光		87.7	きらら397	92.8
	共和	60.5		北海287号	88.0	
	北斗	47.7		あきほ	93.9	
	しおかり	44.7		おぼろづき	85.4	
	はやこがね	88.3		ゆめびりか	85.8	
	みまさり	62.6		ななつぼし	86.4	
	そらち	74.4		ほしのゆめ	100.0	
	大野中稲	80.7		ふっくりんこ	91.1	
	石狩白毛	78.4		大地の星	29.2	
	農林34号	54.7		最小値	29.2	
	新雪	60.8		最大値	100.0	
	最小値	51.2	平均値±標準偏差	77.9±23.5		
最大値	88.3	all	最小値	29.2		
平均値±標準偏差	65.0±14.5		最大値	114.1		
			平均値±標準偏差	76.0±18.0		

3. RM5349 領域のいもち病圃場抵抗性の効果の検証

RM5349 領域のいもち病圃場抵抗性の効果を検証するため、いもち病圃場抵抗性が異なる「キタアケ」後代品種・系統と「キタアケ」祖先品種である4品種(「ユーカーラ」、「そらち」、「ふくゆき」および「Cody」；図IV-1)について、RM5349 周辺のハプロタイプパターンといもち病発病指数の比較を行った(表IV-4)。「キタアケ」後代では、ac11000499-aa11004155 間のハプロタイ

プパターンが「キタアケ」と同一な8品種・系統が、低いいもち病発病指数を示し(発病指数 31.6~55.8)、この領域内にいもち病圃場抵抗性遺伝子の存在が示唆された。「キタアケ」祖先品種と「キタアケ」のハプロタイプパターンの比較から、この領域は「Cody」と「そらち」のゲノム構造が組み換えを起こし「キタアケ」に遺伝していると推定される。「キタアケ」祖先品種では「Cody」が唯一高度のいもち病抵抗性を保持することから、



図IV-4 コアパネルにおける各SNP・SSRマーカーのPIC値

横軸は各マーカーの染色体上の物理位置を示す。縦軸はPIC値を示す。各グラフ下部の横線は2Mb以上のマーカー間ギャップ領域

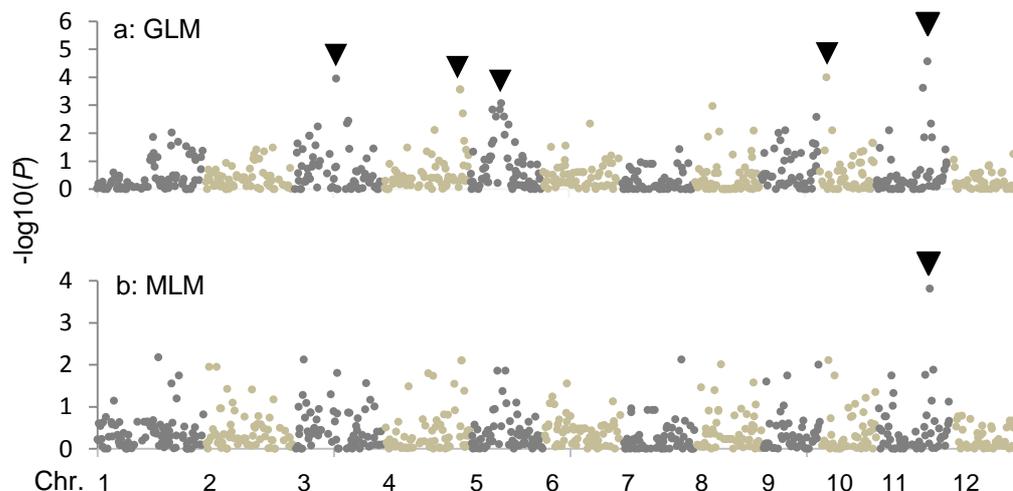
この領域に存在するいもち病圃場抵抗性遺伝子は「Cody」に由来することが推測された。

4. 「キタアケ」後代を用いたいもち病圃場抵抗性のQTLマッピング

RM5349 領域におけるいもち病圃場抵抗性遺伝子の存在を確認するため、まず ac11000499-aa11004155 間のハプロタイプパターンが「キタアケ」と同一でいもち病抵抗性が強い「上育 462 号」とハプロタイプパターンが

異なるいもち病抵抗性も弱い「上系 06214」を交配した(表IV-4)。これより DHLs を育成し、A₂ 集団 (88 系統) を用いていもち病抵抗性に関する QTL 解析を行った。

DHLs88 系統についていもち病圃場抵抗性検定を行ったところ、いもち病発病指数は両親間の連続的な分布を示した(平均 66、最小 31、最大 106)(図IV-6A)。DHLs の連鎖地図を構築するため、GWAS 解析に用いた 768 種の SNPs からなるマーカーセットと 89 種の SSR マーカーより、両親間で多型を示すマーカーのスクリーニ



図IV-5 GWAS解析によって得られた各マーカーのマンハッタンプロット図
 a:GLMによるGWAS結果。b:MLMによるGWAS結果。横軸は各マーカーの染色体上の位置を示す。縦軸は $-\log_{10}(P)$ 値。グラフ内の矢印は q value<0.05 (a), <0.1 (b)となったマーカーを示す。

表IV-3 GWASにより検出されたいもち病圃場抵抗性関連マーカー

Model	マーカー名	Chr.	物理位置 (Mb)	Permutation $-\log_{10}P$	p 値	q 値 ^a	ランク ^b	遺伝		発病指数平均*	
								子型数	遺伝子型 A	遺伝子型 B	
GLM	ac03000493	3	17.3	3.94	0.00011	0.022	3	2	71.2(48)	92.4(12)	
	aa04009401	4	32.1	3.55	0.00027	0.026	4	2	60.1(13)	79.7(47)	
	ab05000132	5	13	3.07	0.00083	0.026	5	2	71.7(48)	90.4(12)	
	aa10000871	10	2.8	3.99	0.0001	0.022	2	2	69.2(39)	87.1(21)	
	RM5349	11	19.6	4.56	0.00002	0.015	1	2	35.6 (3)	77.7 (57)	
MLM	RM5349	11	19.6	3.81	0.00015	0.099	1	2	35.6 (3)	77.7 (57)	

* 括弧内数値は各遺伝子型を示すコアパネル内の品種・系統数。

^a FDR制御法の指標。 p 値より算出した。

^b p 値の大小に基づく各マーカーの連関強度の順位。

ングを行った。このうち、多型を示したのは130個(SNPマーカー125種、SSRマーカー5種)であった(図IV-2)。

「上育 462号」と「上系 06214」はともに道内育成材料であり、近縁関係にある(図IV-1)。多型マーカーの物理位置については偏りがあり(図IV-2)、多型マーカーが見つからなかった領域については同一のゲノムDNA構造である可能性が高いと推察される。

両親間で多型を示した130個のマーカーを用いて、DHLsのジェノタイプングを行い、得られた連鎖地図ならびにいもち病発病指数を用いてQTL解析を行った。その結果、第11染色体のRM5349付近に寄与率の大きいQTLが検出され、これを *Pi-cd* と名付けた(図IV-6B)。検出されたQTLは「上育 462号」アリルがいも

もち病抵抗性を向上させ、寄与率が64.7%であった(表IV-5)。

*Pi-cd*の座乗領域を絞り込むため、「キタアケ」後代8品種7系統のRM5349周辺のSSRマーカーの遺伝子型といもち病発病指数を比較したところRM26851、RM5349およびRM26871のマーカー遺伝子型といもち病発病指数の大小が完全に一致しRM26830-RM2596間の714kbの領域に *Pi-cd* が座乗することが示唆された(表IV-6)。

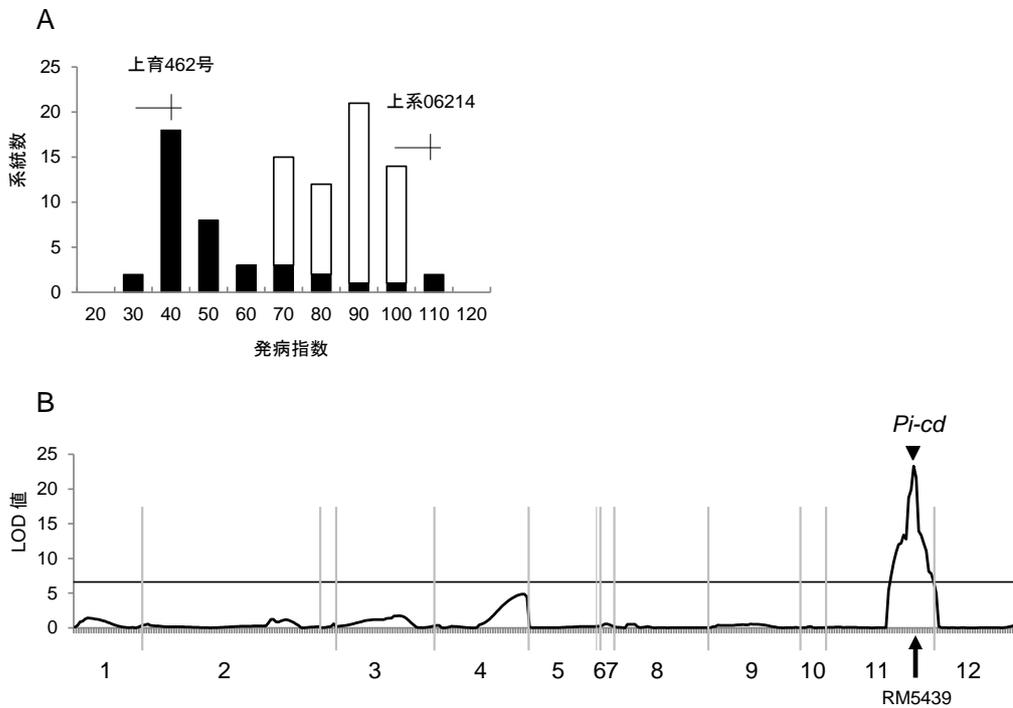
表IV-4 「キタアケ」関連系統におけるRM5349周辺マーカーのハプロタイプパターン

		マーカー遺伝子型 ^c											
		いもち病	chr.	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
		品種・系		aa11004053	ac11000499	RM5349	ac11000537	aa11004155	aa11004494	aa11004500	aa11004506	aa11005083	aa11005455
Group	統名 ^a	発病指数	Mb ^b	18	18.5	19.6	19.6	20.3	21	21.6	21.8	23.6	23.9
IIIb	ユーカーラ	98.5		C	A	A	A	T	G	G	A	C	G
IV	ふくゆき	82.2		T	G	A	G	T	G	G	A	C	A
IIIa	そらち	74.4		C	G	A	A	T	G	G	A	A	A
—	<i>Cody</i>	0		C	A	B	G	T	A	A	G	C	A
V	キタアケ	39.1		C	G	B	G	T	A	G	A	A	A
—	空育162号	36.8		C	G	B	G	T	A	G	A	C	A
—	上育452号	55.8		T	G	B	G	T	A	G	A	A	A
—	吟風	31.6		T	G	B	G	T	A	G	A	C	A
—	彗星	34		T	G	B	G	T	A	G	A	C	A
—	上育462号	38		T	G	B	G	T	A	G	A	C	A
—	上育463号	35.2		C	G	B	G	T	A	G	A	A	A
—	空育179号	49.6		C	G	B	G	T	A	G	A	A	A
—	空育180号	43.8		C	G	B	G	T	A	G	A	A	A
—	上育455号	86.4		T	A	A	G	T	A	A	G	A	A
—	空育171号	90		T	A	A	G	T	A	A	G	A	A
—	上系06214	100.1		T	A	A	G	T	A	A	G	A	A

^a「ユーカーラ」以下4品種は「キタアケ」の祖先品種(Italic標記)。「空育162号」以下11品種・系統は、「キタアケ」の後代品種系統。

^b各マーカーの物理位置は日本晴ゲノム配列情報(build1.0)に基づく。

^c黒塗りつぶしは「Cody」由来と推定されるハプロタイプブロック。灰色塗りつぶしは「そらち」由来と推定されるハプロタイプブロック。



図IV-6 DHLsを用いたいもち病圃場抵抗性に関するQTL解析結果

A:「上育462号」×「上系06214」交配由来DHLsにおけるいもち病発病指数の頻度分布。縦軸が各発病指数を示す系統数。横軸が発病指数。黒塗りの棒グラフはRM5349の遺伝子型が「キタアケ」と同一な系統数を示す。発病指数が大きいほどいもち病抵抗性は弱い。

B: QTL解析より得られたLOD曲線。横軸は各マーカーの連鎖地図上での位置。RM5349近傍で高いピークが検出される。グラフ内横線は閾値を示す(LOD=6.24)。

表IV-5 いもち病抵抗性に関するQTL解析結果

Chromosom	e	マーカー区間	Mb ^a	LOD値	寄与率(%)	相加効果 ^b
	11	RM6680*RM5349	19,650,332	23.3	64.7	6.2

^a マーカーの物理位置は日本晴ゲノム配列情報(build 1.0 <http://rapdb.dna.affrc.go.jp>)に基づく。

^b 「上育462号」型の対立遺伝子の効果

*LODピークの最近傍マーカー

表IV-6 「キタアケ」関連系統における*Pi-cd*領域のハプロタイプパターン

品種・系統名	いもち病 発病指数	RM6680	RM26830	RM26851	RM5349	RM26871	RM2596	RM26890	マーカー名 Mb ^b
		19.0	19.2	19.6	19.6	19.7	19.9	20.2	
Cody	0	a	a	a	a	a	a	a	
キタアケ	39.1	a	a	a	a	a	a	a	
ハヤカゼ	38.9	a	a	a	a	a	a	a	
大地の星	29.2	a	a	a	a	a	a	a	
彗星	31.6	a	a	a	a	a	a	a	
吟風	34.9	a	a	a	a	a	b	a	
空育162号	36.8	a	a	a	a	a	b	a	
空育172号	32.4	b	c	a	a	a	e	a	
空育179号	49.6	a	a	a	a	a	a	a	
空育180号	43.8	a	a	a	a	a	a	a	
上育452号	55.8	a	b	a	a	a	d	a	
上育462号	38	a	b	a	a	a	d	a	
上育463号	35.2	a	b	a	a	a	c	b	
あきほ	93.9	b	d	b	b	b	f	b	
ふっくりんこ	91.1	b	d	b	b	b	c	b	
ほしのゆめ	100	b	d	b	b	b	c	b	
きらら397	92.8	b	g	b	b	b	c	b	

^a灰色塗りつぶしは「キタアケ」と同一のハプロタイプパターン

^b各マーカーの物理位置は日本晴ゲノム配列情報に基づく

考察

植物において量的形質を支配する遺伝子の検出はQTL解析が主流であり、イネにおいてもこのようなアプローチで数々のQTL検出に成功している(Yamamoto *et al.* 2009)。QTL解析は系統間の形質差に関するQTLを検出するので、単交配に由来する系統群ならびに染色体置換系統群といった遺伝分離集団を利用する。そのため、本研究で扱うような分離形質を保持する地域適応集団や品種群を直接扱うことはできない。このような場合は、連鎖不平衡に基づく原因遺伝子座の探索(すなわちGWAS)が適切であろう。GWASは人為的な交雑実験集団の作出が困難なヒトでの遺伝解析手法として考案され、多くの新規疾患感受性遺伝子座に貢献している

(National Human Genome Research Institute)。近年、植物においてもゲノム情報の解読が進んでいるアラビドプシスやイネを中心に同手法を用いた遺伝解析が積極的に行われ、集団内の遺伝変異に関する遺伝領域の検出に成功している(Brachi *et al.* 2011)。しかしながら、1地域の育種集団のような遺伝的多様性の乏しい材料を用いた解析事例はほとんどない。今回、GWAS解析が本研究で扱うような集団から直接遺伝子座を選び出すのに有効であることを示すことができた。選び出した遺伝子座の検証が必要なのは、QTL解析も同様である。

本章では北海道の育成集団とわずか634種のDNAマーカー情報を用いてGWAS解析を行い複数のいもち病抵抗性関連領域を検出することに成功した。自殖性作

物であるイネにおいて連鎖不平衡領域は比較的大きく、交配親の有用遺伝子周辺のゲノム領域はその後代においても保存されていくと予測される(Yamamoto *et al.* 2010、Shinada *et al.* 2015a)。このことが少数のマーカーによる GWAS を可能にしたと考えられる。実際、本研究で検出した *Pi-cd* 周辺領域についても保持系統で遺伝子座周辺ゲノム構造がよく保存されていることが確認された。

いもち病はイネ栽培における最大の病害であり、いもち病抵抗性品種の育成は安定生産のみならず、減農薬栽培や低コスト化の実現など、イネ栽培における多大なメリットをもたらす。いもち病圃場抵抗性遺伝子については個々の効果は限定的であるが、抵抗性遺伝子を集積させることにより高度の抵抗性を発揮することが可能である(Fukuoka *et al.* 2015)。従っていもち病圃場抵抗性に関する多様な遺伝資源をそろえることが重要である。本章では、まず北海道育成集団にいもち病抵抗性に関する遺伝変異があることを明らかにした。いもち病圃場抵抗性に関する GWAS を行い、育成集団全体で内包されている抵抗性遺伝因子として 5 ヶ所のいもち病圃場抵抗性関連領域を検出した。*Pi-cd* 以外の遺伝子座については詳細な解析が必要である。一方、最も作用力の大きい第 11 番染色体上の抵抗性遺伝子 *Pi-cd* は、遺伝的分離集団においてもその高い抵抗性が実証された。*Pi-cd* 領域近傍には、中部 32 号が保持する *Pi34*(Zenbayashi *et al.* 2007)ならびに陸稲農林 12 号が保持する *qBFR11*(Sato *et al.* 2006)などが存在することが明らかになっている。

「キタアケ」とこれら品種のゲノム構造を詳細に比較することで、各遺伝子の異同を明らかにする必要がある。

系譜情報を用いた連鎖解析により、*Pi-cd* は外国稲「Cody」より「キタアケ」に導入されたと推定され、「キタアケ」以前の品種・系統は同 QTL を保持していない。ところが「キタアケ」以前の品種群(Group I～III b)においてもいもち病圃場抵抗性の変異が認められるので、これは *Pi-cd* と異なる遺伝子が作用していると考えられる。おそらく、GWAS 解析で検出された *Pi-cd* 以外の 4 領域が作用しているのだろう。今後、各々の領域がいもち病圃場抵抗性を付与するかどうか検証するとともに、それらの起源について明らかにする必要がある。

第V章 総合論議

イネは日本の気候風土に適応した主食作物として、全国各地で収量性の向上やコシヒカリ以上の良食味を目標とした品種開発が行われ(結城ら 2010、木下 2013)、日本の基幹となる水田農業の活性化に寄与してきた。しかしながら、時代背景とともに育種目標は常に変化している。今後最も重要となる問題は気候変動への対応であり、従来の収量性や良食味の向上とともに、気候変動により各地域で問題となると予想される病害ならびに環境ストレス耐性の強化が重要になってくる(農林水産省農林水産技術会議 2007、丹野 2012)。こうした複合的な育種目標を達成するにあたり、イネにとっての極限環境に適応した北海道イネ品種群から得られる情報は少なくないだろう。

北海道イネ品種群におけるゲノム動態

北海道のイネ品種群は育種経過に対応する 6 つの遺伝グループに分けられると推定された。本研究では、北海道新旧主要イネ品種・系統群の遺伝的構造化の主な原因は「中生愛国」、「関東 53 号」あるいは「銀坊主」といった本州品種や、外国稲「Cody」(総称して外来品種・系統)との交配であることを明らかにした。これら外来品種・系統は、各グループの育成において中心的な役割を果たした品種(「ユーカーラ」、「農林 15 号」など)のゲノム構成に大きく寄与している。従って、北海道イネ育種が持続的に発展してきた背景には、外来品種・系統からのゲノム領域の導入が育種集団の多様性維持に貢献してきたことがあげられる。

外来品種・系統導入が集団の構造化の主な原因であったとするなら、北海道のイネ育種について以下のようなシナリオも考えられる。まず、限られた生育期間での登熟を可能にする早生(感光性)遺伝子や夏季の低温を克服できる耐冷性遺伝子が北海道のイネ品種に必須である。これらの必須遺伝子を最低限揃えることで Group I が成立したが、Group I が内包する遺伝的ポテンシャルでは Group II までの品種育成が限界であり、Group IIIa 以降は遺伝変異の拡大が不可欠だったのではないだろうか。イネのような自殖性作物で少数のエリート系統を用いた育種を継続すると遺伝変異は低下す

ると思われるが、PIC 値からはそのような徴候はうかがえない。むしろ、遺伝変異は最も新しい Group V においてもそれまで同様のレベルに保たれている。これまでの過程において、適度に外来遺伝子(領域)が導入され、遺伝変異の大きさを保てたことが、北海道イネ育種が持続的に成功を収めてきた要因の一つのように思える。

今後の課題として北海道への適応に関わるゲノム領域の同定が未解明であることが挙げられる。また、本研究においてグループ間で改良の痕跡が認められた 5 つの形質以外にも、例えば良食味に関わる低蛋白性、炊飯米の外観品質やテクスチャーの変化は最近の品種が新たに獲得した形質である。こうした形質の導入には、どのようなゲノム領域が関わるのかを明らかにする必要がある。また、各グループ間で継続して維持されているゲノム領域には、北海道への地域適応に必須の遺伝子が含まれている可能性がある。こうした遺伝子の存在は個別の遺伝解析でもとらえることが可能ではあるが、本研究で示したようなゲノムレベルのデータの利用や GWAS を用いた集団の遺伝ポテンシャルの推定を行うと、その補足は容易になるだろう。それがいかなる遺伝子であるのか、また、その遺伝子は将来の地域適応性向上に対しても必須であり続けるのか、検討する必要がある。

以上の議論は、あくまでもゲノム構造の視点に基づいた品種分化過程に関する仮説である。北海道品種群のゲノム構造、集団構造、あるいは遺伝的多型には外来品種・系統の果たす役割が大きいと考えるが、個々の北海道品種の表現型全体に対する寄与の程度については、今後の詳細な解析が必要である。

今後の品種改良における北海道イネ品種群の遺伝的ポテンシャルの有用性

開花期耐冷性やいもち病圃場抵抗性は、これまでに北海道では継続して強い選抜をかけてこなかった形質である。それ故、新たに生じた問題を解決するため形質を改良するにあたり地域適応品種の遺伝的ポテンシャルを知るためのモデルケースとみてよい。本研究では、これらの形質に関して北海道イネ品種群に大きな変異が

あることを明らかにした。これは、第 II 章で明らかにしたゲノムレベルの多様性と矛盾しない。

「キタアケ」より後代系統に遺伝しているいもち病圃場抵抗性遺伝子（すなわち *Pi-ta*）については「Cody」由来であることがわかった。前項では道外品種からのゲノム領域の導入の意義を論じたが、ここでは実際に外来系統が遺伝変異のソースとなることを示すことができた。近年積極的な選抜対象となっていなかったいもち病抵抗性に関する遺伝子が、北海道の系統に残されていた理由は、劣悪形質の連鎖がなかったことで中立的に説明できる可能性がある。これは開花期耐冷性の遺伝変異についても同様である。本研究の試験結果は北海道の品種群が保持するいもち病圃場抵抗性ならびに開花期耐冷性改良についての遺伝的ポテンシャルを推測するのに役立ち、あらたな QTL 検出の機会を与えるとともにイネ育種における効率的ないもち病圃場抵抗性遺伝子ならびに開花期耐冷性遺伝子の集積に非常に有用である。

本研究により、これまで未選抜であった形質に関しても北海道イネ品種群には十分な遺伝変異がある可能性を示すことができた。従って、今後新たに改良が必要となる形質について北海道イネ品種群の遺伝的ポテンシャルにはある程度期待して良いと考えられる。開花期耐冷性やいもち病圃場抵抗性以外の形質についてもさらに調べる必要がある。その一方で、遺伝変異が期待できない形質も見極める必要がある。例えば、北海道イネ品種群で多様性が低いゲノム領域に座乗する遺伝子や、北海道イネ品種に必須な遺伝子に連鎖する遺伝子については遺伝変異が期待できないだろう。まずは、北海道イネ品種群のゲノム情報を精査することが必要である。

北海道イネ育種における「イノベーション」と今後

北海道のイネ育種の歴史はおよそ 100 年であるが、収量・品質ともに本州品種に劣らぬ品種を発表するに至った。その意味で、地域適応性向上に成功しているといえる。本研究で明らかにした 6 つの北海道イネ品種群グループの間には、DNA マーカーから類推した集団構造のみならず、いくつかの形質については不連続な飛躍が認められる。例えば、穂ばらみ期耐冷性、一穂粒数およびアミロース含有率で Group V の値が他グループとは明確に異なる。一方、穂数については Group I と

Group II 以降の間で明らかに異なるし、整粒歩合では Group IIIb 以降が飛び抜けて高い。このようなグループ間で認められる形質の飛躍は、グループ内の漸進的な改良とは分けて考えた方が良いかもしれない。

本研究では、グループ間における形質の飛躍が生産性や品質向上などの地域適応性向上のための一種の遺伝的「イノベーション」であった可能性を提示する。本研究で示したように、地域適応性向上には外来品種のゲノム領域の導入が大きな役割を果たした可能性が高い。そうであるなら、こうしたイノベーションに外来品種のゲノム領域の導入が大きな役割を果たしたのかもしれない。作業仮説として、選抜に供される有用遺伝子の組合せパターンを増やしたことにより、結果としてより高い地域適応性を発揮する遺伝子の組合せを保持した品種の選抜につながったとすることもできるが、これについては今後の検討が必要である。特に、この一連の過程において重要な役割を果たしてきたと考えられる「早生富国」、「ユーカーラ」、「農林 15 号」および「キタアケ」を中心とした解析が必要と考えられる。

一方、各グループ内においても形質の多様性が認められる。例えば、「ゆめぴりか」が「キタアケ」より優れた品種であるのは論を俟たないが、これらはいずれも Group V に属する。このような例は育種の成果として漸進的なグループ内における形質の改良があったことを示している。本研究では、グループ間の形質差に焦点を絞り解析・議論を進めてきたが、グループ内における品種の進歩についても改めて詳細な解析が必要であろう。地域適応性向上に役立った遺伝的要因解明にはグループ間のみならずグループ内の形質多様性も検討する必要がある。

Group V のキー品種である「キタアケ」が育成されてから 30 年近く経過しており、今後さらなる形質向上を行うためには、道外品種などを用いて、再度意図的な遺伝変異拡大をはかり、選抜に供される遺伝子の組合せパターンを増やす必要があると考えられる。しかしながら、集団構造を変えれば必ず形質向上のイノベーションが起こせると言うわけではない。近年、北海道総合研究機構では、イネ育種において複数の新規な本州品種や外国稲を交配親に用いて、北海道向け品種育成を試みてきたが、いずれも満足のいく成果は得られていない（未発

表データ)。一つの原因として、目標とする表現型のレベルが先鋭化されているために、これを凌駕するための遺伝子組み合わせをそろえることが難しくなっている可能性が考えられる。先例に倣い、闇雲に外来品種を交配利用することのみでは、膨大な時間と作業がかかることが見込まれる。従って、多様な遺伝子組み合わせを作出し、それがもたらす形質変化を効率的に調べることが必要である。近年、イネでは多系交配系統群(Multiple-parent advanced generation inter-cross : MAGIC)が作られ、GWAS を用いた有用遺伝子の同定や育種利用が想定されている(Bandio *et al.* 2013)。この MAGIC 系統群においては複数系統由来のゲノム領域が混合されるので、効率的にイノベーションを可能にする遺伝子組み合わせを探索するのに有効と推定される。こうした新規育種技術の導入も今後の北海道イネ育種には必要になってくると考えられる。

本研究では、北海道イネ品種・系統群におけるゲノム動態ならびに今後の品種改良における北海道イネ品種群の遺伝的ポテンシャルの評価を行った。今後、育種目標が高度化・複雑化すると予想されるイネ育種の現状において、育成中の系統の表現型調査のみではなく、適応性向上に関わったゲノム動態や育成材料内(ジーンプール)における変異の大きさを確認することは各地域の育種を進めるにあたり、非常に重要であると考えられる。本研究の試験結果は、今後の北海道イネ育種の方向性、戦略の検討並びに育種の効率性を高める手段として大いに活用できるとともに、他地域の育成集団を材料に同様な調査を行う際のモデルとなると考えられる。

摘 要

第Ⅱ章 北海道イネ品種の遺伝的集団構造の解析

- (1)北海道で育成されたイネ品種の遺伝的多様性を解明し、育成系譜や農業形質と対応させることで、ゲノムレベルで品種育成過程の遡及を行うための基盤構築を試みた。その結果、対立遺伝子頻度に基づく集団構造モデルおよび育種系譜から道内新旧主要品種・系統群は 6 つの遺伝グループに分けられることを明らかにした。
- (2)本研究では、7 つの農業形質について 6 つの遺伝グループ間で比較を行った。その結果、5 形質(穂ばらみ期耐冷性、一穂粒数、穂数、アミロース含有率、および整粒歩合)について有意差が確認され、新しく発生したグループほど、草姿や耐冷性等いくつかの形質が栽培上望ましい方向に改良されていることを明らかにした。
- (3) 道内新旧主要品種・系統群の遺伝的分化に道外ならびに外国稲品種の遺伝領域の導入が重要であることが示唆された。
- (4) 道内新旧主要品種・系統群における集団遺伝学的な構造解析結果より、北海道イネ品種群の遺伝的フレームワークが把握することができた。このことは、今後さらにイネ育種を進める際に、または、重要形質に関する遺伝解析を行う際に、試験戦略を立てる上で重要な情報を与える結果と考えられる。

第Ⅲ章 開花期耐冷性に関する遺伝解析

- (1)1983 年以降に育成された北海道イネ品種・系統において、低温処理後の種子稔実率を指標にした検定により、開花期耐冷性に関する多様な遺伝変異があることを明らかにした。
- (2)開花期耐冷性に関する変異の機構を検討するため、関連形質の可能性のある花粉の形態と機能に着目し

た。その結果、低温条件下において花粉発芽と伸長の抑制程度に品種・系統間差があることが確認された。

「永系 88223」や「はしのゆめ」といった開花期耐冷性が強い品種ほどこれらの形質は低温の影響を受けないことから、開花期耐冷性との関連が示唆される。

- (3)開花期耐冷性が「極強」の「永系 88223」と「極弱」の「彗星」を交配親に用いたマッピング集団より開花期耐冷性に関する 3 つの QTL を同定した。
- (4)「永系 88223」と「彗星」を交配親に用いた F₃ 集団を使った解析で、各 QTL の効果を検証できた。その結果、本研究で同定した各 QTL 単独の作用は限定的で、種子稔実率の向上は概ね 10~15%に過ぎないものの、複数の QTL を集積することで明瞭な耐冷性向上が可能であることが確認された。
- (5)道内育成イネ品種・系統について本研究で同定した 3 つの QTL 周辺のマーカー遺伝子型を調査した。QTL マッピングの交配親に用いた「永系 88223」の他に、「ほしまる」、「北海 302 号」および「きたいぶき」など複数の高度耐冷性保持品種があるが、3 つの QTL 周辺の SSR マーカー遺伝子型は同一ではなかった。「ほしまる」、「北海 302 号」および「きたいぶき」の開花期耐冷性の起源は、「永系 88223」とは異なる可能性が高いことを示した。

第Ⅳ章 いもち病圃場抵抗性に関する遺伝解析

- (1)道内新旧主要イネ品種・系統群において、いもち病圃場抵抗性に多様な遺伝変異があることを明らかにした。
- (2) 634 種の DNA マーカー情報を用いて GWAS 解析を行い、5 か所のいもち病抵抗性関連領域を検出した。そのうち第 11 染色体の関連領域について、QTL マッピングにより、いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi-cd* の存在を確認した。

- (3)系譜情報ならびに *Pi-cd* 周辺領域のマーカー遺伝子型より、*Pi-cd*が外国稲品種の Cody より導入されたことを明らかにした。さらに北海道の育成イネ品種・系統群のうちどの品種・系統が *Pi-cd*を保持しているか明らかにした。

引用文献

- Andaya, V.C. and D.J., Mackill (2003) QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from a *japonica* × *indica* cross. *Theor Appl Genet* 106:1084-1090
- Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Sutriq, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186
- 安東 郁男、荒木 均、清水 博之、黒木 慎、三浦 清之、永野 邦明、今野 一男(2006) 極良食味低アミロース米水筒品種「おぼろづき」. 北海道農業研究センター研究報告 第186号
- Ando I., H. Sato, N. Aoki, Y. Suzuki, H. Hirabayashi, M. Kuroki, H. Shimizu, T. Ando, and Y. Takeuchi (2010) Genetic analysis of the low-amylose characteristics of rice cultivars Oborozuki and Hokkai-PL9. *Breed Sci* 60:187-194
- 荒木 均、今野 一男、永野 邦明、三浦 清之、高岩 文雄(1996)培養変異から育成された水稻の低アミロース系統. 育種・作物学会北海道談話会報 37 : 32-33
- 浅賀 宏一 (1981) イネ品種のいもち病に対する圃場抵抗性の検定方法に関する研究 農事試験場研究報告 35 : 51-138
- Bandillo, N., C. Raghavan, P.A. Muyco, M.A. Sevilla, I.T. Lobina, C.J. Dilla-Ermita, C.W. Tung, S. McCouch, M. Thomson, R. Mauleon, *et al.* (2013) Multiple-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice :progress and potential for genetics research and breeding. *Rice(NY)* 6:11
- Baruah, A.R., N. Ishigo-Oka, M. Adachi, Y. Oguma, Y. Tokizono, K. Onishi and Y. Sano (2009) Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. *Euphytica* 165: 459-470
- Basten, C.J., B.S. Weir and Z.B. Zeng (1998) QTL CARTOGRAPHER: a reference manual and tutorial for QTL mapping. Department of Statics, North Carolina State University, Raleigh, N.C.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331
- Brachi, B., G.P. Morris and J. O. Borevitz (2011) Genome-wide association studies in plants: the missing heritability is in the field. *Genome Biol.* 12:232
- Bradbury, P. J., Z. Zhang, D. E. Kroon, T. M. Casstevens, Y. Ramdoss and E. S. Buckler (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse sample. *Bioinformatics* 23:2633-2635
- Chakhonkaen S, K. Pitnjam, W. Saisuk, K. Ukoskit and A. Muangprom (2012) Genetic structure of Thai rice and rice accessions obtained from the International Rice Research Institute. *Rice* 5:19
- Courtois B, J. Frouin, R. Greco, G. Bruschi, G. Droc, C. Hamelin, M. Ruiz, G. Clément, J-C Evrard, S. Coppenole *et al.* (2012) Genetic diversity and population structure in a European collection of rice. *Crop Sci* 52:1663-1675
- Cruz, R.P., R.A. Sperotto, D. Cargenelutti, J.M. Adamski, T. FreltasTerra and J.P. Fett (2013) Avoiding damage and achieving cold tolerance in rice plants. *Food and Energy Security* 2:96-119
- Dai, L.Y., X. Lin, C.R. Ye, K. Ise, K. Saito, A. Kato, F.R. Xu, T. Yu and D. Zhang (2004) Identification of quantitative trait loci controlling cold tolerance at the reproductive stage in Yunnan landrace of rice, Kunmingxiaobaigu. *Breed Sci* 54:253-258
- Ezuka, A. (1972) Field resistance of rice varieties to rice blast disease. *Rev Plant Prot Res.* 5: 1-21
- Felsenstein J (2010) PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.69. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Fujino, K., H. Sekiguchi, T. Sato, H. Kiuchi, Y. Nonoue, Y. Takeuchi, T. Ando, S.Y. Lin and M. Yano (2004) Mapping of quantitative trait loci controlling low-

- temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 126:611-618
- Fujino, K., U. Yamanouchi and M. Yano (2013) Roles of the Hd5 gene controlling heading date for adaptation to the northern limits of rice cultivation. *Theor Appl Genet* 108:794-799
- Fukuoka, S., N. Saka, H. Koga, K. Ono, T. Shimizu, K. Ebana, N. Hayashi, A. Takahashi, H. Hirochika, K. Okuno and M. Yano (2009) Loss of function proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325:998-1001
- Fukuoka, S., S. Yamamoto, R. Mizobuchi, U. Yamanouchi, K. Ono, N. Kitazawa, N. Yasuda, Y. Fujita, T. T. T. Nguyen, S. Koizumi, *et al.* (2014) Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Sci Rep* 4:4550
- Fukuoka, S., N. Saka, Y. Mizukami, H. Koga, U. Yamanouchi, Y. Yoshida, N. Hayashi, K. Ebana, R. Mizobuchi and M. Yano (2015) Gene pyramiding enhances durable disease resistance in rice. *Sci Rep* 5:7773
- Garris A.J., T. H. Tai, J. Coburn, S. Kresovich and S. McCouch (2005) Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics* 169:1631-1638
- Giarrocco, L.E., M.A. Marassi and G.L. Salerno (2007) Assessment of the genetic diversity in Argentine rice cultivars with SSR markers. *Crop Sci* 47:853-860
- Glaszmann J.C. (1987) Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor Appl Genet* 74: 21-30
- Gramene database: <http://www.gramene.org/> (2015年4月10日閲覧)
- Gurdev, S.K. (2001) Green revolution : the way forward. *Nature Reviews Genetics* 2: 815-822
- Gurdev, S.K. (2005) What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Mol. Bio.* 59:1-6
- 萩原 俊嗣(2000)農業技術体系 第4巻 野菜編 一般社団法人 農山漁村文化協会
- Hayashi, N., H. Inoue, T. Kato, T. Funao, M. Shirota, T. Shimizu, H. Kanamori, H. Yamane, Y. Hayano-Saito, T. Matsumoto, *et al.* (2010) Durable panicle blast-resistance gene Pb1 encodes an atypical CC-NBS-LRR protein and was generated by acquiring a promoter through local genome duplication. *Plant J* 64:498-510
- 広田 知良、古賀 伸久、岩田 幸良、井上 聡、根本 学、濱寄 孝弘 (2011) 北海道における 2010 年の気象と農作物への影響要因. 北海道農業研究センター研究資料 第 69 号
- 北海道米麦改良協会 (2011) 北海道の米作り 2011 年版
- 北海道農政部 (2014) 米に関する資料 平成 26 年 5 月版 3. 品種
- 北海道立農業試験場 (1960) 農作物優良品種の開発. 北海道立農業試験場資料第 3 号
- 北海道立中央農業試験場 (1988) 優良米早期開発プロジェクトチーム第 I 期(昭和 55~61 年度)の試験研究成果. 北海道立農業試験場資料第 19 号
- 北農会 (1994) 北海道の稲作 第 3 章 第 2 節 '水稲の育種
- Hunag, X., N. Kurata, X. Wei, Z. Wang, A. Whong, Q. Zhao, Y. Zhao, K. Lin., H. Lu, W. Li, *et. al.* (2012) A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature* 490: 497-501
- IRGSP (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436:793-800
- 井澤 敏彦、朱宮 昭男、工藤 悟、坂 紀邦、加藤 恭宏、杉浦 直樹、藤井 潔、遠山 孝通、中嶋 泰則、辻 孝子ら(2001)イネ縞葉枯病・穂いもち抵抗性を導入した水稲準同質遺伝子系統「あいちのかおり SBL」. 愛知農総試研報 33 : 33-40
- Jagadish, S.V.K., Muthurajan, R., Oane, R., Wheeler, T.R., Heuer, S., Bennet, J. and P. Q., Craufurd (2010) Physiological and proteomic approaches to address heat tolerance during anthesis in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot* 61:143-156
- Juliano, B. O (1993) in Rice in human nutrition. International Rice Research Institute and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Los Ban-os. 1-15
- Kaga, A., T. Shimizu, S. Watanabe, Y. Tsubokura, Y. Katayose, K. Harada, D.A. Vaughan and N. Tomooka (2012) Evaluation of soybean germplasm conserved in

- NIAS genebank and development of mini core collection. *Breed Sci* 61:566-592
- Kawaguchi, K., N. Shibuya and T. Ishii (1996) A novel tetrasaccharide, with a structure similar to the terminal sequence of an arabinogalactan-protein, accumulates in rice anthers in a stage-specific manner. *Plant J* 9:777-785
- 木下 雅文、沼尾 吉則、木内 均、前川 利彦、相川 宗嚴、吉村 徹、平山 裕治、菊池 治己、田中 一生、丹野 久ら(2006) 水稻新品種「大地の星」の育成. 北海道立農試集報 90:1-11
- 木下 雅文 (2013) 北海道における新旧水稻品種の食味官能評価と理化学特性. 北農第 80 : 10-19
- Kosambi, D. D. (1944) The estimation of map distance from recombination values. *Annuaire of Eugenetics* 12: 172-175
- 木俣 栄 (2011)平成 22 年のいもち病多発要因と本年の対策について. 農家の友 4 : 40-41
- Kuroki, M., K. Saito, S. Matsuba, N. Yokogami, H. Shimizu, I. Ando and Y. Sato (2007) A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8. *Theor Appl Genet* 115:593-600
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181
- Li, H.B., Wang, J., Liu, A.M., Zhang, Q. and J.S., Zou (1997) Genetic bases of low-temperature-sensitive sterility in indica-japonica hybrids of rice determined by RFLP analysis. *Theor Appl Genet* 95:1092-1097
- Lu, H., M.A. Redus, J.R. Coburn, J.N. Rutger, S. McCouch and T.H. Thomas (2005) Population structure and breeding patterns of 145 U. S. rice cultivars based on SSR marker analysis. *Crop Sci* 45:66-76
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, *et al.* (2002) Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res* 9:199-207
- McKersie B. (2015) Planning for food security in a changing climate. *J Exp Bot* *First published online* : doi: 10.1093/jxb/eru547 (2015 年 4 月 10 日時点)
- 森田 敏(2008)イネの高温登熟障害の克服にむけて. 日作記 77: 1-12
- 村井 正之, 木下 俊朗, 石村 桜 (1983) 北海道の水稻新旧品種における草型ならびに収量性. 北海道大学農学部邦文紀要 14(1):64-75
- Murray M.G. and W.F. Thompson (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res* 8:4321-4326
- Muthayya S., J.D. Sugimoto, S. Montgomery and G.F. Maberly (2014) An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann N Y Acad Sci* 1324:7-14
- Mori, M., K. Onishi, Y. Tokizono, H. Shinada, T. Yoshimura, Y. Numao, H. Miura and T. Sato (2011) Detection of novel quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage derived from a *tropical japonica* rice variety Silewah. *Breed Sci* 61:61-68
- Nagasaki H, K. Ebana, T. Shibaya, J. Yonemaru and M. Yano (2010) Core single-nucleotide polymorphisms-a tool for genetic analysis of the Japanese rice population. *Breed Sci* 60:648-655
- National Human Genome Research Institute, A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies : <https://www.genome.gov/26525384> (2015 年 4 月 10 日閲覧)
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY
- 日本穀物検定協会 <http://www.kokken.or.jp/inspect.html> (2015 年 4 月 10 日閲覧)
- Niizeki, H. and K. Oono (1968) Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc Japan Acad* 554-557
- 農林水産省 / 長期累年統計情報 <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?bid=000001024932&cycocode=0> (2015 年 4 月 10 日閲覧)

- 農林水産省農林水産技術会議 (2007) 地球温暖化が農林水産行に与える影響と対策. 農林水産研究開発レポート 23
- Oh, C.S., Y.H. Choi, S.J. Lee, D.B. Yoon, H.P. Moon and S.N. Ahn (2004) Mapping quantitative trait loci for cold tolerance in weedy rice. *Breed Sci* 54:373-380
- Ou, S. H. (1985) *Rice Diseases*, 2nd edn. (Commonwealth Agricultural Bureaux, 1985)
- Pitchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Saito, K., Miura, K., Nagano, K., Hayano-Saito, Y., Saito, A., Araki, H. and K., Kato (1995) Chromosomal location of quantitative trait loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. *Breed Sci* 45:337-340
- 坂 紀邦, 寺島 竹彦, 工藤 悟, 加藤 恭宏, 杉浦 和彦, 遠藤 征馬, 城田 雅毅, 井上 正勝, 大竹 敏也 (2007) いもち病高度圃場抵抗性を有する水稻新品種「みねはるか」の育成. 愛知農総試研報 39:95-109
- 坂 紀邦, 福岡 修一, 工藤 悟, 城田 雅毅, 安東 郁男, 杉浦 和彦, 佐藤 宏之, 前田 英郎, 遠藤 征馬, 加藤 博美ら (2010) いもち病高度圃場抵抗性と極良食味特性を併せ持つ水稻新品種「中部 125 号」の育成. 愛知農総試研報 42:171-183
- 酒井 寛一(1949)冷害におけるイネ不稔性の細胞組織学的並に育種学的研究特に低温によるタペート肥大に関する実験的研究.北農試研報 43:1-46
- Sato, H., Y. Takeuchi, H. Hirabayashi, H. Nemoto, M. Hirayama, H. Kato, T. Imbe and I. Ando (2006) Mapping QTLs for field resistance to rice blast in Japanese upland rice variety Norin 12. *Breed Sci*. 56:415-418
- 佐々木 多喜雄 (1968) 水稻品種の低温発芽性と初期生育との関係. 北海道立農業試験場集報 17 : 34-45
- Satake, T. and H. Hayase (1970) Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plant. V. Estimation of pollen development stage and the most sensitive stage to coolness. *Proc Crop Soc Jpn* 39:468-473
- Satake, T. and S. Koike (1983) Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants. *Japan J Crop Sci* 52:207-214
- Shinada, H., T. Yamamoto, E. Yamamoto, K. Hori, Y. Hirayama, T. Maekawa, H. Kiuchi, H. Sato and T. Sato (2015a) Quantitative trait loci for whiteness of cooked rice detected in improved rice cultivars in Hokkaido. *Breed Sci* 65:201-207
- Shinada, H., T. Yamamoto, H. Sato, E. Yamamoto, K. Hori, J. Yonemaru, T. Sato and K. Fujino (2015b) Quantitative trait loci for rice blast resistance detected in a local rice breeding population by genome-wide association mapping. *Breed Sci* 65:388-395
- Shirasawa, S., T. Endo, K. Nakagomi, M. Yamaguchi and T. Nishio (2012) Delimitation of a QTL region controlling cold tolerance at booting stage of a cultivar, 'Lijiangxintuanheigu', in rice, *Oryza sativa* L. *Theor Appl Genet* 124:937-46
- Storey, J.D. and R. Tibshiran (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9440-9445
- Suh, J.P., J.U. Jeung, J.L. Lee, Y.H. Choi, J.D. Yea, P.S. Virk, D.J. Mackill and K.K. Jena (2010) Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerance genotypes of rice (*Oryza sativa* L.) *Theor Appl Genet* 120:985-995
- 高橋 涉 2007.高温による白未熟粒の発生と登熟期間の葉色の影響.高温登熟に強いイネ.日本作物学会北陸支部・北陸育種談話会編.養賢堂.東京. 47-58
- Takeuchi, Y., H. Hayasaka, B. Chiba, I. Tanaka, T. Shimono, M. Yamagishi, K. Nagano, T. Sasaki and M. Yano (2001) Mapping quantitative trait loci controlling cool-temperature tolerance at booting stage in temperate *Japonica* rice. *Breed Sci* 51:191-197
- 丹野 久, 木内 均, 平山 裕治, 菊地 治己 (2000) 人工気象室を用いた水稻開花期耐冷性の簡易検定法の開発. 日作紀 69:43-48

- 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
場報告第 104 号
- 丹野 久 (2012) 水稻における影響予測. 地球温暖化が
道内主要作物に及ぼす影響とその対応方向(2013 年
代の予測). 北農 79 : 72-81
- 八重樫 博志(1994) 抵抗性品種利用と水稻病害の防除.
農及園 69:150-154
- Xu, L.M., L. Zhou, W. Zeng, F.M. Wang, H.L. Zhang, S.Q.
Shen and Z.C. Li (2008) Identification and mapping of
quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage
in a japonica rice near-isogenic line. *Plant Sci* 174:340-347
- Yamamoto T., J. Yonemaru and M. Yano (2009) Towards the
understanding of complex traits in rice: Substantially or
superficially? *DNA Research* 16:141-154
- Yamamoto T, Nagasaki H, Yonemaru J, Ebana K, Nakajima M,
Shibaya T, Yano M (2010) Fine definition of the pedigree
haplotypes of closely related rice cultivars by means of
genome-wide discovery of single-nucleotide
polymorphisms. *BMC Genomics* 11:267
- Yamazaki, M. and O. Ideta (2013) Population structure in
Japanese rice population. *Breed Sci* 63:49-57
- Yonemaru J, Yamamoto T, Ebana K, Yamamoto E, Nagasaki
H, Shibaya T, Yano M (2012) Genome-wide haplotype
changed produced by artificial selection during modern
rice breeding in Japan. *Pros One* 7-3:e32982
- 結城 和博, 佐藤 久実, 中場 勝他, 櫻田 博, 佐野 智
義, 本間 猛俊, 渡部 幸一郎, 水戸部 昌樹, 宮野 齊
ら(2010) 水稻新品種「つや姫」(山形 97 号)の育成.
山形県農業研究報告 2 : 19-40
- Wang, S., Basten C.J. and Zeng Z.B. (2007) Windows QTL
cartographer 2.5 Department of Statistics, North Carolina
State University, Raleigh, NC, 2007
- Zenbayashi-Sawata K., S. Fukuoka, S. Katagiri, M. Fujisawa,
T. Matsumoto, T. Ashizawa and S. Koizumi (2007)
Genetic and physical mapping of the partial resistance gene,
Pi34, to blast in rice. *Phytopathology* 97:598-602
- Zeng, Z.B. (1993) Theoretical basis of separation of
multiple linked gene effects on mapping
quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:
10972-10976
- Zhou, L., Zeng, Y., Zheng, W., Tang, B., Yang, S., Zhang, H.,
Li, J. and Z., Li (2010) Fine mapping a QTL *qCTB7* for
cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 7
using near-isogenic line. *Theor Appl Genet* 121:895-905

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始暖かい激励とご指導、ご鞭撻をいただきました北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻教授 久保友彦博士ならびに北海道立総合研究機構十勝農業試験場場長 柳沢朗氏に心より感謝申し上げます。また、学位論文審査において、貴重なご指導とご助言をいただきました同教授 貴島祐治博士ならびに同教授 阿部純博士に心よりお礼申し上げます。

本研究において、独立行政法人北海道農業研究センター藤野賢治博士には、実験計画の立案からデータの取得・まとめまで、細部にわたり、数多くの温かいご指導とご助言を賜りました。また、独立行政法人農業生物資源研究所(現：農業生物先端ゲノム研究センター)での長期研修時に、同研究所山本敏央博士、米丸惇一博士、堀清純博士、山本英司博士(現：野菜茶業研究所)より実験手法ならびに遺伝解析の基礎に関して数多くのご指導とご助言を賜りました。心より感謝申し上げます。

本研究の実験実施において、ホクレン農業総合研究所 岩田夏子氏、北海道農業研究センター 松葉修二氏、北海道立総合研究機構中央農業試験場 佐藤博一氏の熱心なご協力をいただきました。また、本研究の環境を整備し、数多くのご助言と激励をいただきました北海道立総合研究機構上川農業試験場 佐藤毅博士、前川利彦氏、平山裕治氏、木内均氏、北海道立総合研究機構中央農業試験場 木下雅文氏ほか、北海道立総合研究機構上川農業試験場および十勝農業試験場の皆さまに心より感謝申し上げます。

上川農業試験場水稻グループならびに農業生物資源研究所(現：農業生物先端ゲノム研究センター)イネゲノム育種研究ユニットの契約職員の皆さまのご協力なくしては、本研究の実施は不可能であったことを記すとともに厚くお礼申し上げます。