

農業生物資源研究所 研究資料

第2号

平成15年3月

水稻直播適性品種育成のための種子発芽性および
苗立ち性に関する遺伝育種学的研究..... 1
三浦 清之



National Institute of Agrobiological Sciences

独立行政法人 農業生物資源研究所

Tsukuba, Ibaraki, Japan

生物研究資料 No. 2

Misc. Publ. Natl. Inst.

Agrobiol. Sci.

ISSN 1347-9393

水稻直播適性品種育成のための種子発芽性および 苗立ち性に関する遺伝育種学的研究

三浦 清之

(2002年10月22日受理)

Synopsis

To breed rice varieties for direct seeding culture in Japan, the introduction of low temperature germinability (LTG), seed longevity and accelerated coleoptile growth from foreign varieties to Japanese elite varieties is necessary. However, undesirable traits in foreign varieties, such as, low yielding ability and bad grain appearance, make it difficult. To overcome this difficulty, we tried to establish backcross breeding to introduce these traits with marker-assisted selection (MAS). The objectives of this study were to identify quantitative trait loci (QTLs) for LTG and seed longevity using backcross inbred lines derived from a cross between *indica* and *japonica* varieties in order to facilitate MAS of these traits. Five putative QTLs controlling LTG were detected on chromosome 2, 4 and 11. The QTL with the large effect for seed longevity was detected on chromosome 9. Moreover, we bred a near isogenic line for coleoptile growth by backcross between Kitaibuki as the recurrent parent and Arroz da Terra as the donor parent to have longer coleoptile and higher seedling establishment rate than Kitaibuki.

From the above experimental data, I conclude that backcross breeding with MAS is effective to introduce genes for adaptability to direct seeding from foreign varieties in Japanese rice breeding programs.

Key words: Direct seeding culture, Germination, Rice (*Oryza sativa* L.), Quantitative trait loci, Marker-assisted selection, Low temperature germinability, Seed longevity, Coleoptile

目 次

緒 言	3	第2章 種子の貯蔵性に関する量的形質遺伝子 座(QTLs)の検出.....	22
第1章 低温発芽性に関する遺伝資源の再評価 およびその量的形質遺伝子座(QTLs)の 検出	4	第1節 種子の貯蔵性に関するイネ遺伝資源 の検察	23
第1節 イネ種子の2次休眠性に関する誘導 条件の検討	4	材料および方法	23
材料および方法	4	結 果	23
結 果	5	考 察	23
考 察	7	第2節 種子の貯蔵性に関する量的形質遺伝 子座(QTLs)の検出.....	23
第2節 イネ種子の2次休眠の誘導に及ぼす 種子の登熟温度の影響および打破条件 の検討	7	材料および方法	25
材料および方法	7	結 果	28
結 果	8	考 察	31
考 察	9	第3章 苗立ち性向上のための子葉鞘の低温伸 長性に優れた中間母本の開発	32
第3節 低温発芽性に関するイネ遺伝資源の 再評価	9	材料および方法	33
材料および方法	10	結 果	34
結 果	10	考 察	35
考 察	12	第4章 総合考察	36
第4節 低温発芽性に関する量的形質遺伝子 座(QTLs)の検出.....	13	謝 辞	38
材料および方法	16	摘 要	38
結 果	16	引用文献	39
考 察	21	Summary	43

緒 言

近年、食生活の多様化による米の消費の減少に伴う生産調整や米価の低迷による離農者の増加、さらには65歳以上の就農者が5割を超える高齢化が進み、農業労働力は減少の一途を辿っている。また、1995年12月のガット・ウルグアイラウンド農業合意により、我が国は米についてミニマム・アクセスを受け入れ、さらに、1999年4月には関税化に移行したため、海外からの低価格米の輸入は必至となり、稲作はかつてない厳しい局面を迎えている。

このような状況下で稲作を維持、発展させるためには、生産コストの低減に向けた直播栽培が必要であるが、その普及率は現在0.5%と極めて低い。この原因は出芽・苗立ちの不安定性にあり、既存の品種では克服できない問題である。従って、直播栽培を定着させるためには直播適性品種の開発は不可欠であるとされている(山本1990)。

水稲の直播栽培確立のための取り組みはかなり以前に行われている。1960年代には政府の国民所得倍増計画等一連の経済政策による好景気により、農村から都市部への労働力の流失が生じ、手植え労力の不足から稲作の省力化の必要性が生じた。これを背景に、直播適性品種育成について全国的な取り組みが行われた。1970年以降の田植え機の急激な普及によって直播栽培の普及は伸び悩んだため、この取り組みは途絶え、直播栽培を確立させる品種の育成には至らなかった。

堀末(1995)は、都道府県農業試験研究機関の水稲育種・栽培研究者に対する直播適性品種に関するアンケートをとりまとめ、直播適性品種の具備すべき特性として低温出芽・苗立ち性を最優先に挙げている。低温出芽・苗立ち性に関わる形質として、低温発芽性(佐々木1974)、低温初期伸長性(Carnahan et al. 1972, David and Peterson 1976, Li and Rutger 1980)が報告されている。また、Yamauchi and Winn(1996)は嫌気性土壌における直播栽培において、加齢による種子の発芽力の低下が苗立ち率に影響を及ぼすことを報告した。直播栽培では移植栽培以上に種子の発芽力が求

められるため、種子の貯蔵性も直播適性品種が具備すべき特性として挙げられる。

低温発芽性、低温初期伸長性および種子の貯蔵性は日本品種内では変異は小さく、それらの改良には広範な遺伝資源の利用が不可欠である(榎淵1981, 小林1992, 堀末1995)。しかし、外国品種を単交配により品種育成に用いた場合、食味不良などの劣悪形質の随伴によって、後代は育成途中で棄却される場合が多く、現在、外国品種由来の直播適性を導入した品種は普及されていない(堀末1995)。随伴する劣悪形質を排除しつつ、有用形質のみを確実に導入するための戻し交配の有用性は報告されているが(Harlan and Pope 1922)、低温発芽性および種子の貯蔵性といった評価が困難な量的形質の改良について戻し交配を導入するのは難しい。しかし、最近、量的形質を支配する遺伝子座(Quantitative Trait Loci: QTLs)と連鎖するDNAマーカーによる選抜の有効性が報告されている(Tanksley 1993, Yano and Sasaki 1997)。

低温発芽性に関するイネ遺伝資源の検索に関する既往の報告をみると、インド型品種を主とする低緯度地方の品種の低温発芽性が、日本品種を含む高緯度地方の品種より劣るとする報告が多い(永松1943, 岡1954, 李・田口1969, 小高・阿部1989)。一方、インド型品種の一部には、1次休眠が破れた後に、吸水した種子が一定期間低温下に置かれると、その後、常温に戻されても発芽が認められない現象、すなわち、2次休眠誘導性を有する品種がある。低温発芽性の検定では、低温条件による発芽歩合の検定は必須であり、特に、低温条件で誘導される2次休眠は、正確な判定に大きな支障となる。池橋(1973)が指摘するように、1次および2次休眠の影響を考慮した上で、低温発芽性に関するイネ遺伝資源の評価を再検討する必要がある。

低温発芽性の改良に戻し交配を導入するためには、この形質を支配する遺伝的要因を明らかにする必要がある。この問題について、佐々木(1974)は低温発芽性に関する遺伝子は5個前後であり、第 , , , 連鎖群と連鎖することを報告したが、以降、それ以上の解明はなされていない。

種子の貯蔵性は、ジーンバンクにおける種子の保存に関わる形質として重要であり、その品種間差異につ

いて多数の報告がある(岡・蔡 1955, 池橋 1973, Siddique et al. 1988, Chang 1991, Ellis et al. 1992, Kameswara Rao and Jackson 1997)。また, Roberts (1972) は種子の活性低下の機構について詳細に報告している。しかし, 現在までに, この形質に関する遺伝解析の報告, さらには品種改良への利用は行われていない。これは, この形質が種子の登熟条件および採種条件の影響を受けやすく (Ellis et al. 1993), 更に, 高温, 高湿条件による加齢処理によっても評価に数ヶ月の期間を要するため, 表現型による個体評価および育種の選抜が困難であることに起因すると考えられる。

低温初期伸長性を支配する要因のうち, 寒冷地の湛水直播栽培において最も苗立ち率に影響を及ぼす形質は子葉鞘 (Coleoptile) の伸長性であることが報告されている (Ogiwara and Terashima 2001)。この形質に関して, ヨーロッパ品種などが有用な母本になることも報告されている (伊藤 1962, 桜木・金 1990, Ogiwara and Terashima 2001)。さらに, 子葉鞘は低酸素条件で伸長することが報告されている (Kordan 1977)。

本研究は, 外国品種の有する直播適性を, 随伴する劣悪形質を排除しつつ, 日本品種へ導入するための育種法の開発を目的として, 低温発芽性および種子の貯蔵性に関しては簡易検定法としての DNA マーカーを指標とする選抜のための量的形質遺伝子座 (QTLs) の検出, 子葉鞘の低温初期伸長性に関しては戻し交配による中間母本の育成を行った。

本研究は, 1993 年から 1999 年まで, 農林水産省北海道農業試験場作物開発部稲育種研究室 (現独立行政法人農業技術研究機構北海道農業研究センター - 作物開発部稲育種研究室), 1999 年から 2002 年まで, 独立行政法人農業生物資源研究所ジーンバンク植物資源研究チームに在籍中に行った研究成果をとりまとめたものである。その結果の一部はすでに, Breeding Science (Miura and Araki 1996, Miura and Araki 1999, Miura et al. 2001), Theoretical and Applied Genetics (Miura et al. 2002), Plant Production Science (Miura et al. 2002) で報告した。

第 1 章 低温発芽性に関する遺伝資源の再評価およびその量的形質遺伝子座 (QTLs) の検出

第 1 節 イネ種子の 2 次休眠性に関する誘導条件の検討

池橋 (1973) は, イネにおいて常温下で発芽しうる種子が 15 日の吸水状態を一定期間経た後に, 常温に戻しても発芽が認められなくなる現象, すなわち 2 次休眠の存在を認め, 2 次休眠性が低温発芽性の評価に影響を及ぼす可能性を指摘している。しかし, イネに関しては, 2 次休眠に関する詳細な誘導条件の報告はなく, この形質を有する遺伝資源の地理的分布も明らかにされていない。また, レタス, オナモミ, カエデ類において, 2 次休眠の誘導に関する種皮の役割が報告されており (Ikuma and Thimann 1963, Esashi and Leopold 1968, Webb and Wareing 1972), イネ種子の 1 次休眠の誘導に関しても穎および種皮の役割が報告されている (Roberts 1961, Ikeda 1963, Seshu and Sorells 1986)。Mayer and Poljakoff-Mayber (1982) は 2 次休眠誘導の機構は一般に 1 次休眠と同様であると推論している。

本節では, イネ種子の 2 次休眠の誘導に関する温度条件を詳しく調査し, 低温発芽性の評価に対する 2 次休眠の影響を検討した。また, 外国品種を主とする遺伝資源を用いて, 2 次休眠を有する品種の検索を行った。さらに, 低温発芽性の評価のための 2 次休眠の打破および誘導の機構を解明するための基礎知見を得るために, 2 次休眠の誘導に関する穎および種皮の役割について検討した。

次に休眠打破に効果がある薬剤について検討した。次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) は種子の殺菌処理に一般的に用いられている。Mikkelsen and Sinah (1961) は, 次亜塩素酸ナトリウム処理がイネの発芽を速めることを報告した。本節では, 次亜塩素酸ナトリウム処理の 2 次休眠の打破に及ぼす影響を調査した。

材料および方法

1. 2 次休眠の誘導に関する低温処理条件の検討

インド型品種「Kasalath」の種子を用いた。1994 年

に北海道農業試験場において、5000分の1ワグネルポットに1ポットあたり2個体を播種し、25以上を保証する温室内で生育させた。出穂期を揃えるために、10時間日長で3週間の短日処理を行った。出穂40日後に収穫した種子を、35、7日間の乾燥後、1次休眠を打破するため、室温下でシリカゲルを入れたデシケーター内に30日間貯蔵した。25、7日間の発芽試験により、1次休眠の打破を確認した後、種子を5にて保存した。発芽試験は、暗黒条件下、 ± 0.5 の精度で制御できる恒温器内で、直径9cmのシャーレ内の2重に敷いた濾紙上に100粒の種子を置床し、種子が浸る程度の蒸留水を加えて行った。胚の一部が穎より突き出した段階をもって発芽とし、発芽速度の評価は発芽速度指標（GRI）〔Evetts and Burnside 1972〕を用いて行った。算出法を以下に示す。

$$GRI = G_1/T_1 + G_2/T_2 + \dots + G_{n-1}/T_{n-1} + G_n/T_n$$

G_1 : 置床後、 T_1 日後の発芽歩合

G_n : T_{n-1} 日から T_n 日の間に増加した発芽歩合

吸水下での低温処理期間が2次休眠の誘導に及ぼす影響は、5、10、15の3段階の温度条件下で、0日から20日の間処理を行った後、25、7日間の発芽速度によって2次休眠の程度を評価した。2次休眠の誘導に及ぼす温度条件の検討は、5、8、10、15、18、19、20の温度条件で行った。各温度で14日間の処理を行った後、25、7日間の発芽試験により、2次休眠の程度を評価した。10から15の温度範囲における検討は1995年に1994年と同条件で行った。

2. 2次休眠誘導性品種の検索

小高・安部(1989)は、中国、ハンガリー、インド、ロシア、朝鮮および韓国などから導入した外国品種207品種を含む762品種の低温発芽性について報告している。この報告の中で、低温発芽性が極低と評価された品種を主とする81品種を2次休眠誘導性品種の検索に供試した。内訳は、日本品種14、中国品種24、フィリピン品種10、インド品種20、韓国品種6、イタリア品種5、ルーマニア品種2である。採種方法は「Kasalath」に準じた。15、14日間の低温処理後の25、7日間の発芽試験における発芽歩合とGRIにより2次休眠程度を評価した。

3. 2次休眠の誘導に関する穎、果皮および種皮の役割の検討

2次休眠の誘導における穎の役割を確かめるために、「Kasalath」種子からピンセットにより注意深く穎を除いた。その除穎種子100粒に、吸水状態で15、16日間の低温処理を行い、その後の25、7日間の発芽試験によって、2次休眠の誘導の有無を調査した。果皮から胚の一部が抽出した時点をもって発芽とした。また、果皮および種皮の役割を明らかにするために、2次休眠状態にある除穎種子の胚の表面の果皮および種皮を針を用いて注意深く取り除いた。果皮と種皮は分離することが難しいため、両者の影響を個別に検討することはできなかった。剥皮後の種子を用いた25、7日間の発芽試験により、剥皮処理が2次休眠の打破に及ぼす影響を調査した。

次亜塩素酸ナトリウム溶液処理の2次休眠の打破に及ぼす影響は、2次休眠状態にある「Kasalath」の除穎種子100粒を2.5%の次亜塩素酸ナトリウム水溶液で10分間処理した後、蒸留水にて3回洗浄し、処理後の種子を用いた25、7日間の発芽試験によって調査した。

結 果

1. 2次休眠の誘導に関する低温処理条件の検討

吸水状態での10および15処理において、5日間以上処理された種子の発芽速度は急激に低下し、10日以上処理によって、殆どの種子は発芽不能となり、2次休眠が誘導された。一方、5での処理では発芽速度への影響は認められなかった(図1)。

2次休眠の誘導に関する処理温度の影響を表1に示した。8での処理によって、発芽歩合は27%に低下した。10～15での処理では、殆どの種子が発芽不能となった。19処理の種子の発芽歩合は56%にとどまった。以上から、8～19の温度範囲において、2次休眠が誘導されることがわかった。

2. 2次休眠誘導性品種の検索

2次休眠誘導性品種の検索の結果を表2に示した。低温発芽性が弱とされる81品種の内、8品種が2次休眠誘導性を有し、これらは、すべてインド原産の品種であった。

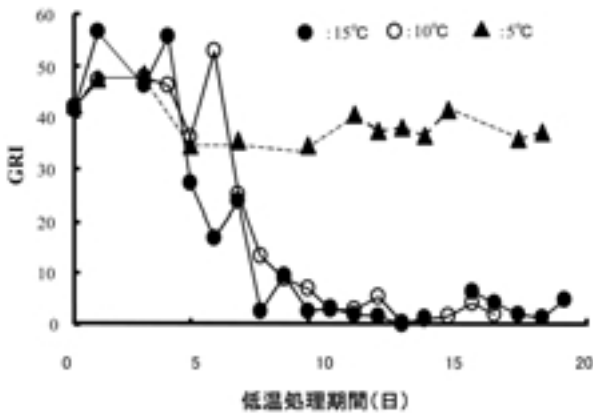


図1 「Kasalath」種子の2次休眠誘導に及ぼす低温処理期間の影響

GRI: 低温処理後の不発芽種子を用いた25℃, 7日間の発芽試験における発芽速度指標

3. 2次休眠の誘導に関する穎, 果皮および種皮の役割の検討

15℃, 16日間の低温処理期間における除穎種子の発芽歩合は13%であり, その後, 25℃に移しても, 7日間で発芽歩合は30%に留まった. 一方, 無処理の除穎種子は25℃, 2日間で発芽歩合は100%に達し, 低温処理により除穎種子の発芽は抑制された(図2). この結果より, 穎が除去された状態でも, 2次休眠は誘導されることがわかった. また, 剥皮処理および次亜塩素酸ナトリウム溶液処理を行った2次休眠誘導種子の発芽歩合は, 25℃, 2日間で100%に達し, それぞれの処理によって2次休眠が打破されることがわかった(図3).

表1 「Kasalath」種子における2次休眠誘導に及ぼす処理温度の影響

年次	処理温度 (°C)	発芽歩合 (%)		GRI ³⁾
		低温処理 ¹⁾	発芽試験 ²⁾	
1994	5	0	99	37.8
	8	0	27	12.4
	10	0	1	0.2
	15	1	9	2.2
	18	14	4	1.6
	19	52	4	1.0
	20	100	-	-
1995	10	0	0	0
	13	1	1	0.2
	15	1	0	0

¹⁾ 各低温処理期間, 14日間の発芽歩合

²⁾ 低温処理後の不発芽種子を用いた25℃, 7日間の発芽試験における発芽歩合

³⁾ 25℃, 7日間の発芽試験における発芽速度指標

表2 2次休眠誘導性を有する品種

品種名	発芽歩合 (%)		GRI ³⁾
	低温処理 ¹⁾	発芽試験 ²⁾	
Brown Gora	13	39	21.4
Mudo Long	28	11	5.2
Lax Milata	47	17	17.4
Dhenga	13	5	1.7
Kada Chopa	4	63	20.1
Kestokel	23	54	29.0
Ratul	23	47	29.4
Kasalath	9	39	17.4

¹⁾ 15℃, 14日間の低温処理における発芽歩合

²⁾ 低温処理後の不発芽種子を用いた25℃, 7日間の発芽試験における発芽歩合

³⁾ 25℃, 7日間の発芽試験における発芽速度指標

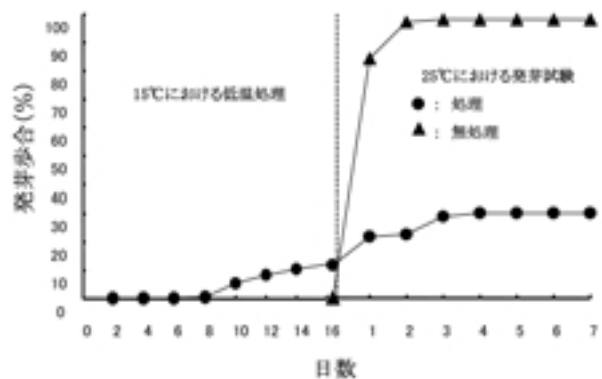


図2 除穎種子における低温処理による2次休眠の誘導

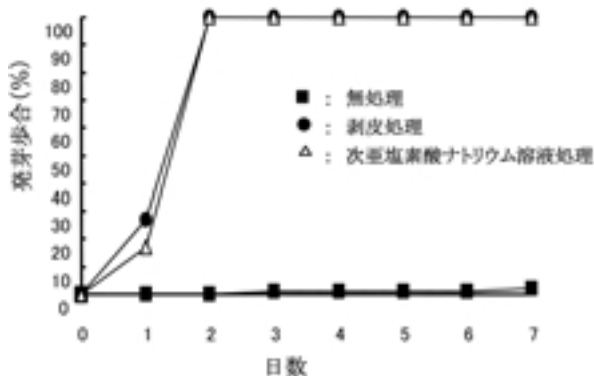


図3 イネ胚の果皮および種皮の剥皮および次亜塩素酸ナトリウム溶液処理による2次休眠の打破

考 察

池橋(1973)は、「Tadukan」および「IR8」種子において、15、21日間の処理によって2次休眠が誘導されたことを報告した。本節において、種子の2次休眠は、8～19の温度範囲で誘導されることがわかり、池橋の報告を支持する結果となった。佐々木(1974)は、低温発芽性の検定温度として、最も品種間差異が捉えられる15を適当としている。本節の結果より、2次休眠は8～19の温度範囲で誘導されるため、低温発芽性に関する評価に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、低温発芽性が極低と評価された品種グループの中に2次休眠性を示す品種が存在したことから、池橋(1973)の指摘のように、種子休眠の影響を除いた低温発芽性に関する遺伝資源の再評価の必要性が示唆された。

他の作物において、2次休眠は胚と種皮の相互作用によって、誘導されることが報告されている。すなわち、Webb and Wareing(1972)は、カエデ類(*Acer Pseudoplatanus* L.)の種子において、種皮が胚から分泌される発芽抑制物質の種子外への拡散を抑えることにより、2次休眠が誘導されることを報告した。Esashi and Leopold(1968)はオナモミ(*Xanthium*)種子においては、種皮の物理性の変化によって、生長した胚が種皮から抽出できなくなることにより、休眠が誘導されることを報告した。高橋(1962)は、台湾のイネ品種において、胚部要因が1次休眠の誘導に関わることを報告している。本節では、イネ種子における

2次休眠誘導に関して、果皮および種皮が重要な役割を果たすことを明らかにしたが、胚の役割についても今後の検討が必要であろう。また、本節では、次亜塩素酸ナトリウム溶液処理によって2次休眠が打破されることを明らかにした。Mikkelsen and Sinah(1961)は次亜塩素酸ナトリウム溶液処理の発芽促進効果について、処理による発芽抑制物質の効果の抑制を要因として推論している。2次休眠の誘導に関する機構を知る上で、2次休眠の打破に効果がある次亜塩素酸ナトリウムの作用は有効な知見となる。

第2節 イネ種子の2次休眠の誘導に及ぼす種子の登熟温度の影響および打破条件の検討

前節において、イネ種子の2次休眠は8～19の温度範囲で誘導されることがわかり、低温発芽性に関する評価に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、低温発芽性が極低と評価された品種グループの中に2次休眠性を示す品種が存在したことから、種子休眠の影響を除いた低温発芽性に関する遺伝資源の再評価の必要性が示唆された。池橋(1973)は1次および2次休眠の影響を除いた低温発芽性の評価には、種子を30、乾燥条件で2～3ヶ月貯蔵することが必要であることを報告している。しかし、完全に影響を除去するために必要な貯蔵期間は2次休眠の程度によって異なることが推測され、2次休眠の誘導程度に影響を及ぼす環境条件を明らかにする必要がある。1次休眠に関しては、種子の登熟温度が誘導程度に影響を及ぼすことが報告されている(池橋1973, 林・日高1979)。種子休眠の誘導程度に及ぼす種子の登熟温度の影響は、他の植物においても報告がある(Kigel et al. 1977, Wurzbürger and Koller 1976, Junttila 1973, Fenner 1991)。本節においては、2次休眠の強弱に影響を及ぼす要因として、登熟温度の影響を調査し、その知見を基に、低温発芽性の評価から2次休眠の影響を除くための条件の検討を行った。

材料および方法

1. 2次休眠の誘導程度に及ぼす種子の登熟温度の影響
インド型品種「Kasalath」および「Dhenga」の種子

を用いた。1996年に北海道農業試験場において、5000分の1ワグネルポットに1ポットあたり10個体を播種し、25℃以上を保証する温室内で生育させた。出穂期を揃えるために、10時間日長にて3週間の短日処理を行った。出穂直後にポットは人工気象室に移された。登熟期の温度処理区は、高温区(昼温32℃/夜温27℃)、常温区(昼温25℃/夜温19℃)の2区を設定した。各品種あたり10ポットを各処理区に配置した。出穂後の積算気温が1000℃に達した段階で、種子を収穫した。収穫した種子は、35℃、7日間の乾燥後、1次休眠を打破するためシリカゲルを入れたデシケーター内に室温下で30日間貯蔵した。この時点で1次休眠が完全に打破されていなかったため、さらに30℃の通風乾燥器にて1カ月間処理し、1次休眠を完全に打破した。各ポットあたり100粒の種子を用い、シャーレ内にペーパータオルを敷き、十分に水分を吸収させた上に置床した。試験はすべて温度を±0.5℃の精度で制御できる恒温器内で行い、15℃、14日間の低温処理により2次休眠の誘導を行った。その後、25℃で7日間の発芽試験を行い、その時点の最終発芽歩合を調査して2次休眠誘導の程度を把握した。高温区および常温区における最終発芽歩合の平均値を算出し、その処理区間差の有意性検定(t検定)によって、処理区の違いによる2次休眠の程度の差を確かめた。

2. 2次休眠の誘導程度の差が休眠打破に及ぼす影響

2次休眠の誘導程度の差が休眠打破に及ぼす影響を調査するため、各処理区の「Kasalath」種子を30℃の通風乾燥器内で1~8ヶ月間貯蔵した。貯蔵した種子は1ヶ月おきに、15℃、14日間の発芽試験に供した。発芽速度の評価は前節で用いたGRIによって行った。

結 果

1. 2次休眠の誘導程度に及ぼす種子の登熟温度の影響

「Kasalath」種子では、15℃、14日間の低温処理期間において、常温区に比べて高温区の方が明らかに発芽が劣ることを認めた。その後の25℃、7日間の発芽試験では各処理区ともほとんど発芽がみられず、不発芽種子は2次休眠に入ったものと推定した。最終発芽歩合は高温区で18%、常温区で72%であった。「Dhenga」種子においてもほぼ同様の傾向を認めた(図4)。

高温区および常温区の各ポット群の最終発芽歩合の平均値と、その処理区間差の有意性検定結果を表3に示した。両品種とも、15℃、14日間の低温処理後の25℃、7日間の発芽試験において、高温で登熟した種子の発芽歩合は常温で登熟した種子より有意に低かった($P < 0.001$)。以上より、2次休眠性は種子の登熟期の温度条件に大きな影響を受け、高温で登熟した種子は、より強度の2次休眠性を誘起することがわかった。

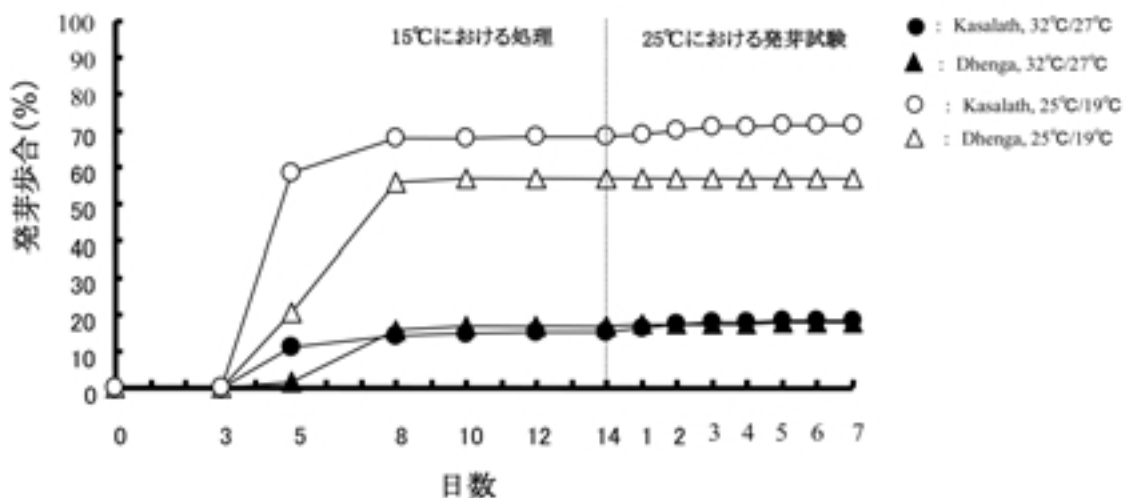


図4 「Kasalath」および「Dhenga」種子における2次休眠の誘導に及ぼす登熟温度の影響

表3 高温区および常温区の種子の最終発芽歩合におけるポット群の平均値の比較

品種名	登熟温度()	ポット数	最終発芽歩合(%) ¹⁾
Kasalath	32 /27	9	18.3***
	25 /19	11	71.7
Dhenga	32 /27	10	17.8***
	25 /19	9	57.0

***: 平均値の差が0.1%の水準で有意であることを示す。

¹⁾ 15 ,14 日間の低温処理後の 25 ,7 日間の発芽試験における発芽歩合のポット群の平均値

表4 「Kasalath」種子の 30 , 乾燥条件下での各貯蔵期間における 15 , 14 日間の発芽歩合の推移

貯蔵期間 (月)	発芽歩合(%)	
	高温区(32 /27)	常温区(25 /19)
1	18.3	71.7
2	26.4	81.0
4	92.0	99.0
5	96.5	89.8
6	95.5	99.8
8	99.6	99.7

2. 2次休眠の誘導程度の差が休眠打破に及ぼす影響

貯蔵期間における 15 , 14 日間の発芽試験における発芽歩合の推移を表4に示した。貯蔵後4ヶ月目に発芽歩合は高温区, 低温区ともに90%以上となり, 15 での発芽力は回復した。発芽速度の推移は図5に示した。各処理区ともに, 貯蔵月数が長くなるに従い, 15 での発芽速度は速まった。高温区の種子の発芽速度は常温区の種子に比べて明らかに遅かった。貯蔵期間6ヶ月目まで, 両者の差は0.1%で有意であった。その差は貯蔵月数が長くなるに従い減少し, 8ヶ月目には殆ど消失した。

考 察

本節において, 「Kasalath」および「Dhenga」種子ともに, 2次休眠の誘導は登熟温度の影響を受け, 高温下で登熟した種子の方がより強い2次休眠性を示した。また, 「Kasalath」種子の乾燥条件下30 での貯蔵において, 4ヶ月目には, 15 , 14 日間における発芽歩合は高温区, 常温区とも90%以上に達し, 発芽力は回復した。しかし, 発芽速度に及ぼす2次休眠の影響

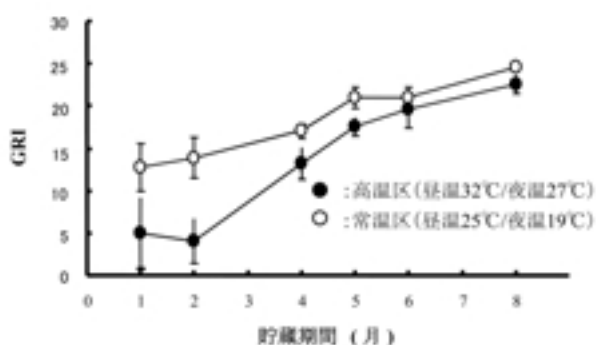


図5 登熟温度の異なる「Kasalath」種子における貯蔵中の低温下での発芽速度の変化

GRI: 15 , 14 日間の発芽試験における発芽速度指標

は残存し, 8ヶ月目に至るまで, 高温登熟により強く誘導された2次休眠の影響は消失しなかった。この結果より, 休眠打破が確認された種子においても, 発芽速度への2次休眠の影響は残存し, 低温発芽性の評価には, この残存する影響を完全に除く必要があることがわかった。池橋(1973)は1次および2次休眠の影響を除いた低温発芽性の評価には, 種子を30 , 乾燥条件下で2~3ヶ月貯蔵することが必要であることを報告している。しかし, 本節において, 2次休眠誘導への登熟温度の影響が明らかにされ, 2次休眠の影響を除いた低温発芽性の評価には, 品種あるいは採種年ごとに種子の貯蔵期間を検討する必要があることが示された。

第3節 低温発芽性に関するイネ遺伝資源の再評価

低温発芽性に関するイネ遺伝資源の検索に関する既往の報告をみると, インド型品種を主とする低緯度地方の品種の低温発芽性が, 日本品種を含む高緯度地方の品種より劣るとする報告が多い(永松1943, 岡1954, 李・田口1969, 小高・阿部1989)。一方, 池橋(1973)は, 種子休眠の影響を除いた場合には, インド型品種の低温発芽性は日本型品種より高いことを示唆した。また, Morishima and Oka(1981)はインド型品種における種子の発芽速度が日本型品種より速いことを示し, イネ品種をインド型と日本型に分ける際に, 発芽速度を指標にできることを報告した。以上の

ように、低温発芽性に関するイネ遺伝資源の評価については、未だ論議がある。前節において、低温発芽性の評価に低温で誘導される2次休眠性が影響を及ぼすことが確認された。この影響を除くには品種あるいは採種年次ごとに異なる貯蔵処理期間が必要であることが示されたため、本節では、過去に低温発芽性が評価された品種について、種子休眠の影響を除くための貯蔵処理期間を検討しつつ、低温発芽性に関する再評価を行うことを目的とした。

材料および方法

過去の報告(西川・三上 1945, 李・田口 1969, 佐々木 1974, 川合 1984, 小高・安部 1989)において、低温発芽性の評価が行われた品種を含む内外 140 品種を供試した。供試品種を、2000 年につくば市にある農業生物資源研究所の水田圃場に栽植した。出穂 40 日目に種子を収穫した。収穫直後に 25℃, 7 日間の発芽試験を行い、1 次休眠の程度を調査した。種子を 30℃, 乾燥条件で 12 ヶ月間貯蔵し、2 ヶ月おきに、15℃, 14 日間の発芽試験により低温下での発芽速度を調査した。発芽速度の評価は GRI を用いて行った。貯蔵 1.5 ヶ月後に 1 次休眠の打破を確認した後、2 次休眠の程度を調査した。貯蔵期間において、種子休眠の影響が消失した段階の発芽速度を最高発芽速度とし、この値を用いて低温発芽性の評価を行った。

結 果

種子の貯蔵期間中における低温での発芽速度の変化の代表的な例を図 6 に示した。1 次休眠が極めて弱い「大理白谷」種子は、採種直後から最高発芽速度を示し、10 ヶ月以上の貯蔵では発芽力が急激に低下した。1 次休眠が弱い「Italica Livorno」および「胆振早生」においては、種子の発芽速度は、貯蔵 6 ~ 8 ヶ月までなだらかに上昇し、最速発芽速度に達した後、徐々に低下した。1 次休眠が強い「水原 294 号」においては、採種直後から 2 ヶ月間で、発芽速度は急激に上昇し、6 ヶ月で最高発芽速度となり、その後徐々に低下した。強い 2 次休眠を有する「Kasalath」種子は、貯蔵 4 ヶ月まで、発芽速度の大きな変化は認められなかったが、4 ヶ月から 6 ヶ月の間に急激に上昇し、10 ヶ月

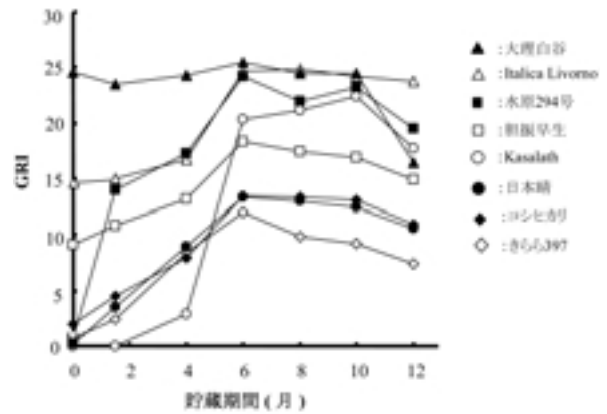


図 6 原産地を異にするイネ品種の貯蔵過程における種子の低温下発芽速度の変化

GRI: 貯蔵種子の 15℃, 14 日間の発芽試験における発芽速度指標

で最高発芽速度を示した。日本品種である「日本晴」、「コシヒカリ」および「きらら 397」種子の変化過程は類似しており、貯蔵開始より発芽速度が上昇し、6 ヶ月後に最高発芽速度に達した後、徐々に低下した。品種によって種子休眠の影響が除かれた最高発芽速度に達するまでの貯蔵期間が異なるため、広範な遺伝資源においては、貯蔵期間の 1 時点において、全ての供試品種の低温発芽性を評価することは困難であることがわかった。そのため、全ての供試品種について貯蔵期間中の低温における発芽速度の変化過程を調査し、最高発芽速度を捉えることとした。

供試した 140 品種の 1 次休眠および 2 次休眠の程度、また、貯蔵期間における最高発芽速度は表 5 - 1 ~ 表 5 - 4 に示した。さらに、低温発芽性が高および低と評価された品種グループにおける最高発芽速度に関する頻度分布を図 7 に示した。従来の評価で高と評価された品種グループ内では、最高発芽速度が高い品種の頻度が高かった。また、低と評価された品種グループは、最高発芽速度が高い品種と低い品種に分かれ、前者は、主に、インド、中国、韓国の中のインド型品種であり、「密陽 54 号」、「春川 83239」等 1 次休眠が強い品種や「Ban Shpata」、「Main Puri」、「Kasalath」等の 2 次休眠の強い品種が含まれた(表 6)。これら、インド型品種の最高発芽速度は、低温発芽性改良のための母本として育種に広く用いられている「Italica

表 5 - 1 低温発芽性に関するイネ遺伝資源の再評価

品種名	1次休眠 ¹⁾	2次休眠 ²⁾	月 ³⁾	最高発芽 ⁴⁾ 速度(GRI)	原産国	従来の評価	文献
Italica Livorno	90	98	8	24.8	イタリア	極高	小高・安部(1989)
Alborio	92	100	8	19.5	イタリア	極高	小高・安部(1989)
USSR-22	100	100	0	25.7	ロシア	極高	小高・安部(1989)
USSR-14	96	100	6	23.2	ロシア	極高	小高・安部(1989)
USSR-30	12	88	8	15.3	ロシア	極高	小高・安部(1989)
USSR-15	82	96	6	20.2	ロシア	極高	小高・安部(1989)
USSR-25	100	100	6	21.3	ロシア	極高	小高・安部(1989)
USSR-17	44	100	6	19.2	ロシア	極高	小高・安部(1989)
USSR-44	50	98	12	23.4	ロシア	極高	小高・安部(1989)
Santahezekiji 52	88	100	6	18.3	ロシア	極高	小高・安部(1989)
観音種	92	100	6	25.0	中国	極高	小高・安部(1989)
尾崎赤毛	28	100	10	17.2	中国	極高	小高・安部(1989)
G-371	50	96	6	23.4	ハンガリー	極高	小高・安部(1989)
KAKAI203	100	98	6	19.9	ハンガリー	極高	小高・安部(1989)
684Y	18	100	8	22.5	ハンガリー	極高	小高・安部(1989)
Szarvasikarsu	90	98	6	22.7	ハンガリー	極高	小高・安部(1989)
Primorskij7	100	96	8	24.3	ハンガリー	極高	小高・安部(1989)
USSR-5	92	100	6	24.8	ロシア	極高	小高・安部(1989)
USSR-8	100	98	6	23.5	ロシア	極高	小高・安部(1989)
USSR-3	80	98	6	22.5	ロシア	極高	小高・安部(1989)
Nauox Sallana	96	94	6	22.5	スペイン	極高	小高・安部(1989)
G-466	32	82	6	18.3	ハンガリー	極高	小高・安部(1989)
CHD	54	98	8	22.0	ハンガリー	極高	小高・安部(1989)
臨明川	66	100	8	22.8	韓国	極高	小高・安部(1989)
Lusitano	78	98	6	16.5	ポルトガル	極高	小高・安部(1989)
Arroz da Terra	62	100	8	22.3	ポルトガル	極高	小高・安部(1989)
Portugues	58	100	6	20.1	ポルトガル	極高	小高・安部(1989)
胆振早生	96	100	6	18.3	日本	極高	小高・安部(1989), 佐々木(1974)
魁	56	98	6	18.7	日本	極高	佐々木(1974)
野崎赤毛	94	100	8	19.8	日本	極高	小高・安部(1989)

1) 採種直後の種子の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

2) 30℃, 乾燥条件で1.5ヶ月貯蔵した種子を15℃, 14日間処理した後の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

3) 最高発芽速度に達するまでの貯蔵期間

4) 貯蔵種子を用いた15℃, 14日間の発芽試験における発芽速度指標

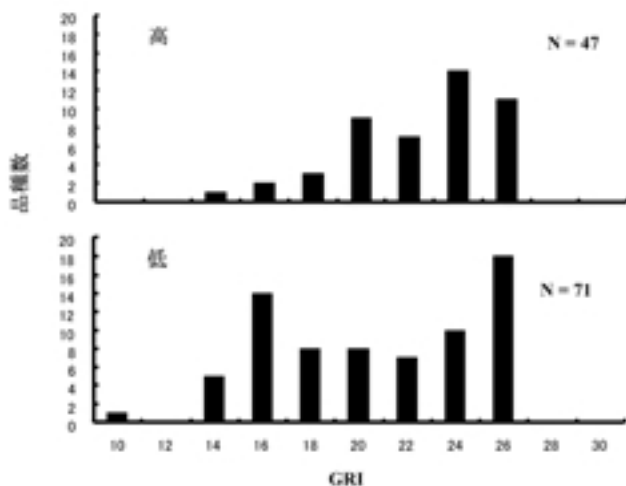


図 7 過去に低温発芽性が高および低と評価された品種グループにおける最高発芽速度に関する頻度分布

GRI: 貯蔵種子を用いた15℃, 14日間の発芽試験における発芽速度指標

表5 - 2 低温発芽性に関するイネ遺伝資源の再評価

品種名	1次休眠 ¹⁾	2次休眠 ²⁾	月 ³⁾	最高発芽 ⁴⁾ 速度(GRI)	原産国	従来の評価	文献
岩手胡桃早生1号	98	88	6	24.7	日本陸稲	極高	小高・安部(1989)
旭糯	0	100	6	17.4	日本陸稲	極高	小高・安部(1989)
チヨミノリ	98	96	8	20.1	日本陸稲	極高	小高・安部(1989)
イワテハタモチ	84	90	6	22.6	日本陸稲	極高	小高・安部(1989)
ハタニシキ	88	94	10	22.3	日本陸稲	極高	小高・安部(1989)
ハタホナミ	94	100	6	19.4	日本陸稲	極高	小高・安部(1989)
陸稲農林糯4号	98	72	6	13.2	日本陸稲	極高	小高・安部(1989)
大宝早生	98	94	6	23.8	日本陸稲	極高	小高・安部(1989)
AK-Saly	44	100	8	21.7	不明	極高	小高・安部(1989)
赤毛	54	92	8	23.3	日本	高	小高・安部(1989)
北斗	68	84	6	21.0	日本	高	
はやゆき	90	98	6	15.1	日本	高	
白穀粘	70	100	6	24.3	中国	高	川合(1984)
帽子頭	96	100	6	25.5	中国	高	川合(1984)
嘉農秣11号	20	100	10	26.0	中国	高	川合(1984)
愛達	100	90	8	24.8	韓国	高	李・田口(1969)
黒太郎	96	98	6	24.2	韓国	高	李・田口(1969)
栄光	24	94	6	14.2	日本	中	佐々木(1974)
ふくゆき	26	98	8	16.0	日本	中	佐々木(1974)
丹陽粳	98	100	8	24.2	中国	中	西川(1945)
Bason Takakal	34	100	6	17.1	インド	低	西川(1945)
ハウネンワセ	42	82	6	14.8	日本	低	李・田口(1969)
越路早生	42	100	8	15.6	日本	低	李・田口(1969)
越ひびき	40	98	8	15.5	日本	低	李・田口(1969)
Bhutmuri-36	92	100	10	26.0	インド	低	李・田口(1969)
単農1号	38	98	6	17.8	中国	極低	小高・安部(1989)
K選4号	98	96	6	24.5	中国	極低	小高・安部(1989)
通交-17	22	98	8	14.8	中国	極低	小高・安部(1989)
密矮早1号	60	98	6	25.0	中国	極低	小高・安部(1989)
紅410	86	96	8	25.0	中国	極低	小高・安部(1989)

¹⁾ 採種直後の種子の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

²⁾ 30℃, 乾燥条件で1.5ヶ月貯蔵した種子を15℃, 14日間処理した後の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

³⁾ 最高発芽速度に達するまでの貯蔵期間

⁴⁾ 貯蔵種子を用いた15℃, 14日間の発芽試験における発芽速度指標

Livorno」,「Arroz da Terra」に匹敵し,日本品種より明らかに速かった。

考 察

供試された品種において,種子休眠の影響を除くために必要な貯蔵処理期間は,6~8ヶ月である場合が多かった。しかし,1次休眠が強い品種および2次休眠誘導性を有する品種は10ヶ月の貯蔵処理を必要とした。池橋(1973)は種子の貯蔵中の発芽性の変化過程を「休眠期」,「遅発芽期」,「最速発芽期」,「発芽衰退期」,「発芽力喪失期」の5段階に区分することを提

案した。従来低温発芽性に関する品種比較試験は,このような変化過程の1断面を捉えて,品種間差異として扱っており,休眠の強い品種は,休眠の影響が残る「遅発芽期」に,休眠の弱い品種は「最速発芽期」にとそれぞれ異なる変化段階にあるものを比較していた可能性がある。従って,従来,低温発芽性が高いと評価された品種の中には,1次休眠が極めて弱い品種が含まれているものと思われる。藤井ら(1992)は,低温発芽性の良好な品種の始とは穂発芽性が易であり,穂発芽米の発生が問題となる温暖地平坦部への導入は現状では実用的でないことを述べている。本節で

表5 - 3 低温発芽性に関するイネ遺伝資源の再評価

品種名	1次休眠 ¹⁾	2次休眠 ²⁾	月 ³⁾	最高発芽 ⁴⁾ 速度(GRI)	原産国	従来の評価	文献
西南 175	50	94	8	15.0	中国	極低	小高・安部(1989)
広解 9号	74	98	8	20.2	中国	極低	小高・安部(1989)
China	100	100	8	24.3	中国	極低	小高・安部(1989)
Oing Gang Huang	74	100	6	24.7	中国	極低	小高・安部(1989)
晋紅 1号	18	100	8	15.8	中国	極低	小高・安部(1989)
長香稻	92	100	8	24.5	中国	極低	小高・安部(1989)
広陸矮 4号	94	96	6	23.1	中国	極低	小高・安部(1989)
Leng Kwang	100	96	8	25.0	中国	極低	小高・安部(1989)
Triveni	90	96	8	25.0	インド	極低	小高・安部(1989)
Main Puri	24	56	10	25.1	インド	極低	小高・安部(1989)
T-1668	98	96	6	19.5	インド	極低	小高・安部(1989)
Brown Gora	30	92	10	25.5	インド	極低	小高・安部(1989)
Phul Chari	2	42	6	18.7	インド	極低	小高・安部(1989)
Mudo	6	54	10	17.8	インド	極低	小高・安部(1989)
Lax Milata	8	92	10	20.5	インド	極低	小高・安部(1989)
Dahi	6	100	6	24.0	インド	極低	小高・安部(1989)
Dhenga	0	68	10	23.4	インド	極低	小高・安部(1989)
Kele	2	100	10	20.8	インド	極低	小高・安部(1989)
Mudo Long	0	32	6	19.1	インド	極低	小高・安部(1989)
Hari Muda	0	66	10	19.8	インド	極低	小高・安部(1989)
Kada Chopra	0	108	6	19.0	インド	極低	小高・安部(1989)
Kala Sini	0	84	10	22.3	インド	極低	小高・安部(1989)
Kestokel	0	44	10	18.7	インド	極低	小高・安部(1989)
Ratul	2	74	10	24.7	インド	極低	小高・安部(1989)
Barad hadeu	0	28	10	20.4	インド	極低	小高・安部(1989)
Rasoolpur Dest	0	72	6	21.3	インド	極低	小高・安部(1989)
Ban Shpata	0	4	6	22.0	インド	極低	小高・安部(1989)
春川 83229	80	100	6	25.0	韓国	極低	小高・安部(1989)
密陽 54号	0	98	6	24.0	韓国	極低	小高・安部(1989)
春川 83305	14	90	10	21.0	韓国	極低	小高・安部(1989)
水原 294号	0	104	6	24.2	韓国	極低	小高・安部(1989)

¹⁾ 採種直後の種子の 25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

²⁾ 30℃, 乾燥条件で 1.5ヶ月貯蔵した種子を 15℃, 14日間処理した後の 25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

³⁾ 最高発芽速度に達するまでの貯蔵期間

⁴⁾ 貯蔵種子を用いた 15℃, 14日間の発芽試験における発芽速度指標

は、供試したすべての品種について池橋の報告にある「最速発芽期」、すなわち、休眠の影響を除いた段階での最高発芽速度を以って低温発芽性を評価し、改良に利用できる遺伝資源として、インド型品種を発見した。この結果は、種子休眠の他に、低温下での発芽速度を決定する要因が存在することを示しており、穂発芽性を抑える1次休眠性を有しつつ、低温発芽性が良好な品種の育成が可能であることを示唆するものである。

第4節 低温発芽性に関する量的形質遺伝子座(QTLs)の検出

前節では、種子休眠の影響を除いた低温発芽性に関するイネ遺伝資源の再評価を行い、池橋(1973)および Morishima and Oka(1981)が報告したように、インド型品種が優れた低温発芽性を有することを明らかにした。しかし、このインド型品種の低温発芽性を支配する遺伝的機構は未だ解明されていない。また、低温発芽性の評価には、品種および採種年次ごとに異なる

表5 - 4 低温発芽性に関するイネ遺伝資源の再評価

品種名	1次休眠 ¹⁾	2次休眠 ²⁾	月 ³⁾	最高発芽 ⁴⁾ 速度(GRI)	原産国	従来の評価	文献
春川 83239	0	86	6	25.0	韓国	極低	小高・安部(1989)
福州大早	80	96	10	22.8	台湾	極低	小高・安部(1989)
Zenith	68	96	8	25.0	アメリカ	極低	小高・安部(1989)
Caloro	40	96	8	17.5	アメリカ	極低	小高・安部(1989)
Jamaica	70	100	8	24.8	ペルー	極低	小高・安部(1989)
Maratelli	100	92	6	19.0	イタリア	極低	小高・安部(1989)
Roma	88	76	6	16.7	イタリア	極低	小高・安部(1989)
Bonni	100	94	6	22.1	イタリア	極低	小高・安部(1989)
L-111-116	94	96	6	23.1	ルーマニア	極低	小高・安部(1989)
L-111-125	100	96	6	19.2	ルーマニア	極低	小高・安部(1989)
IR-9965-53-3	34	96	6	14.1	フィリピン	極低	小高・安部(1989)
IR-24312-R-R-19-1	4	100	8	22.9	フィリピン	極低	小高・安部(1989)
IR-8324	12	92	8	24.2	フィリピン	極低	小高・安部(1989)
梅江早3号	94	96	6	23.4	中国	極低	小高・安部(1989)
新潟早生	70	100	6	14.2	日本	極低	小高・安部(1989)
アキニシキ	10	100	10	15.0	日本	極低	小高・安部(1989)
コチヒビキ	22	98	10	13.0	日本	極低	小高・安部(1989)
コシヒカリ	70	98	6	13.5	日本	低	小高・安部(1989)
藤坂5号	16	100	6	13.7	日本	極低	小高・安部(1989)
ウゴニシキ	82	98	8	15.5	日本	極低	小高・安部(1989)
チョウカイ	90	98	8	13.9	日本	極低	小高・安部(1989)
ハツニシキ	10	100	8	16.2	日本	極低	小高・安部(1989)
アキユタカ	78	86	8	8.4	日本	極低	小高・安部(1989)
ヨネシロ	92	100	8	14.2	日本	極低	小高・安部(1989)
ヒデコモチ	94	100	8	16.7	日本	極低	小高・安部(1989)
コチミノリ	10	92	10	14.2	日本	極低	小高・安部(1989)
日本晴	2	100	6	13.4	日本	極低	小高・安部(1989)
黄金晴	2	100	8	14.9	日本	極低	小高・安部(1989)
初星	66	102	8	17.4	日本	極低	小高・安部(1989)
青い空	10	100	6	13.5	日本	極低	小高・安部(1989)
Kasalath	0	12	10	22.4	インド		
Chinsurah Boro II	68	100	6	30.5	インド		
道人橋	94	100	10	24.6	中国		
台中秈3号	18	98	6	25.0	台湾		
大理白谷	100	100	6	25.5	中国		
金果銀	100	98	8	26.3	中国		
TOg5500	0	0	10	19.7	アフリカ		
TOg5923	0	0	10	17.7	アフリカ		

¹⁾ 採種直後の種子の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

²⁾ 30℃, 乾燥条件で1.5ヶ月貯蔵した種子を15℃, 14日間処理した後の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

³⁾ 最高発芽速度に達するまでの貯蔵期間

⁴⁾ 貯蔵種子を用いた15℃, 14日間の発芽試験における発芽速度指標

る貯蔵処理期間が必要とされるため、育種に必要な多検体の評価は困難である。最近、低温発芽性のように測定が難しい量的形質を支配する量的形質遺伝子座(QTLs)の検出を可能にするDNAマーカーが開発されている(Tanksley 1993, Yano and Sasaki 1997)。例と

して、出穂期に関する多くのQTLが検出され、それぞれのQTLの近傍にあるDNAマーカーを指標とする選抜(Marker-assisted selection: MAS)によって、各QTLを単独で有する準同質遺伝子系統が育成されている(Yano et al. 1997, Yamamoto et al. 2000, Lin et al.

表 6 過去に低温発芽性が低と評価された品種グループにおいて高い最高発芽速度を示した品種

品種名	1 次休眠 ¹⁾	2 次休眠 ²⁾	月 ³⁾	最高発芽速度 ⁴⁾ (GRI)	原産国
Ban Shpata	0	4	6	22.0	インド
Kala Sini	0	84	10	22.3	インド
Dhenga	0	68	10	23.4	インド
Dahi	6	100	6	24.0	インド
Ratul	2	74	10	24.7	インド
Triveni	90	96	8	25.0	インド
Main Puri	24	56	10	25.1	インド
Brown Gora	30	92	10	25.5	インド
Bhutmuri-36	92	100	10	26.0	インド
福州大早	80	96	10	22.8	中国
広陸矮4号	94	96	6	23.1	中国
梅江早3号	94	96	6	23.4	中国
China	100	100	8	24.3	中国
K選4号	98	96	6	24.5	中国
長香稻	92	100	8	24.5	中国
Qing Gang Huang	74	100	6	24.7	中国
紅410	86	96	8	25.0	中国
Leng Kwang	100	96	8	25.0	中国
密陽54号	0	98	6	24.0	韓国
水原294号	0	100	6	24.2	韓国
密矮早1号	60	98	6	25.0	韓国
春川83229	80	100	6	25.0	韓国
春川83239	0	86	6	25.0	韓国
IR-24312-R-R-19-1	4	100	8	22.9	フィリピン
IR8324	12	92	8	24.2	フィリピン
Bonni	100	94	6	22.1	イタリア
L-111-116	94	96	6	23.1	ルーマニア
Jamaica	70	100	8	24.8	ペルー
Zenith	68	96	8	25.0	USA
比較品種					
日本晴	2	100	6	13.4	日本
コシヒカリ	30	100	8	14.7	日本
藤坂5号	16	100	6	13.7	日本
黄金晴	2	100	8	14.9	日本
Italica Livorno	90	98	8	24.8	イタリア
Arroz da Terra	62	100	8	22.3	ポルトガル
胆振早生	96	100	6	18.3	日本
Kasalath	0	12	10	22.4	インド

¹⁾ 採種直後の種子の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

²⁾ 30℃, 乾燥条件で1.5ヶ月貯蔵した種子を15℃, 14日間処理した後の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合(%)

³⁾ 最高発芽速度に達するまでの貯蔵期間

⁴⁾ 貯蔵種子を用いた15℃, 14日間の発芽試験における発芽速度指標

2000). 本節では、インド型品種の有する低温発芽性を日本品種に導入することを目的として、低温発芽性に関する簡易検定法としてのMASを確立するために、DNAマーカーとしてRFLP(制限酵素断片長多型)マ-

ーカーを利用して、低温発芽性に関する量的形質遺伝子座(QTLs)の検出を行った。さらに、検出されたQTLに関する染色体断片置換系統および個体集団を用いて、各QTLの影響を確かめた。

材料および方法

1. 供試品種および系統

インド型品種「Kasalath」および日本型品種「日本晴」と、「Kasalath」に「日本晴」を戻し交配して得られた戻し交雑自殖系統(BIL)(BC₁F₉), 98系統を用いた。「Kasalath」は、前節において日本品種より優れた低温発芽性を示し、さらに、染色体全般に渡るRFLPマーカーの多型情報が整備されているQTL解析が容易な品種として選定した。検出されたQTLの確認は、「Kasalath」を1回親、「日本晴」を反復親とし、MASを伴う戻し交配育種により育成された4つの染色体断片置換系統(SL)(BC₄F₃)(矢野・林 未発表)および「Kasalath」を1回親、「コシヒカリ」を反復親とし、MASを伴う戻し交配により養成された100個体からなる染色体断片置換個体集団(BC₄F₂), 00KF₂₋₄(姥谷ら2000)の分譲を受け、これらを用いて行った。BILおよびSLを1999年に、00KF₂₋₄は2000年に、「Kasalath」、「日本晴」および「コシヒカリ」と共に、つくば市にある農業生物資源研究所の水田圃場に栽植した。出穂後40日目に、BILに関しては系統ごとに、SLに関しては各系統7個体より、種子を収穫した。収穫した種子を、種子休眠の影響を除くため、30の通風乾燥器内に貯蔵した。

2. 低温発芽性の評価

発芽試験は、暗黒条件下、±0.5℃で制御できる15℃の恒温器内で、直径6cmのシャーレ内の2重に敷いた濾紙上に50粒の種子を置床し、種子が浸る程度の蒸留水を加えて行った。池橋(1973)は、高い低温発芽性を有するインド型品種の15℃における平均発芽日数は4日であると報告している。そこで、本節において、15℃、4日後の発芽歩合を調査して各系統の低温下における発芽性を評価した。貯蔵期間において、種子休眠の影響が消失した段階の発芽歩合を最高発芽歩合とし、この値を用いて低温発芽性の評価とした。QTL解析に関して、適当な貯蔵処理期間を決定するために、BILの両親である「Kasalath」および「日本晴」の貯蔵中の発芽歩合の変化を調査した。

3. RFLP分析

各BILのRFLP分析はLin et al.(1998)の報告に従った。各系統および個体からのDNA抽出はCTAB法(Murray and Thompson 1980)を用いて行った。抽出したDNAを、8種類の制限酵素、*Bam*H^I、*Bgl*I、*Eco*R、*Hind*III、*Apa*I、*Dra*I、*Eco*R、*Kpn*Iを用いて切断した。電気泳動およびサザンブロッティングは、Kurata et al.(1994)の方法に従った。RFLPの検出は、アマシャム社のECL遺伝子検出システムを利用した。

4. QTL解析

QTL解析は各BILの逆正弦変換した発芽歩合と各BILにおける245個のRFLPマーカーの遺伝子型データ(<http://rgp.dna.affrc.go.jp/publicdata/genotypedataBILs/genotypedata.html>)をもとに、分散分析法(SAS Institute 1989)および解析用ソフトウェアMAPMAKER/QTL(Lander and Botstein 1989, Lincoln et al. 1992)により行った。分散分析により発芽歩合における遺伝子型間の平均値の差が有意である($P < 0.01$)RFLPマーカーをQTLに最も隣接するマーカーとして検出した。検出したQTLの全体の変異に対する寄与率および「日本晴」の対立遺伝子の効果を0とした時の「Kasalath」の対立遺伝子の相加効果はMAPMAKER/QTLにより求めた。

結 果

1. BILにおける低温発芽性の頻度分布

「日本晴」および「Kasalath」の貯蔵処理期間における15℃、4日間の発芽歩合の変化を図8に示した。「日本晴」においては、貯蔵7ヶ月目に発芽歩合は最高となり、7ヶ月以上の貯蔵においては、種子の活性が低下して、発芽歩合は低下した。一方、「Kasalath」においては、貯蔵8ヶ月目に発芽歩合は最高となった。「Kasalath」の最高発芽歩合は「日本晴」より高く、「Kasalath」の低温発芽性が「日本晴」より高いことを確認した。「Kasalath」が最高発芽歩合を示す貯蔵8ヶ月目には、「日本晴」において種子の活性低下が生じ始めており、この時点での発芽歩合による各BILの低温発芽性の評価に、種子の活性低下という新たな影響が

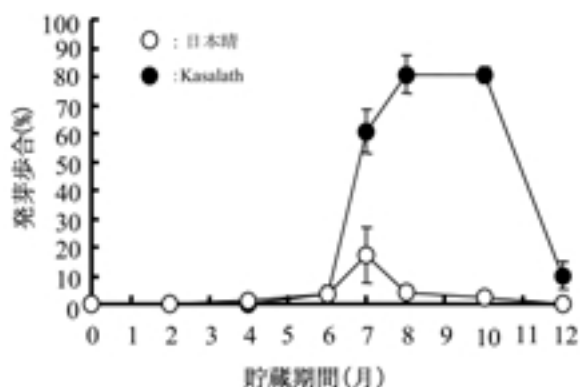


図8 「日本晴」および「Kasalath」種子の30 での貯蔵過程における15 , 4日間の発芽歩合の変化
点は個体間の平均値、範囲は標準偏差を示す。

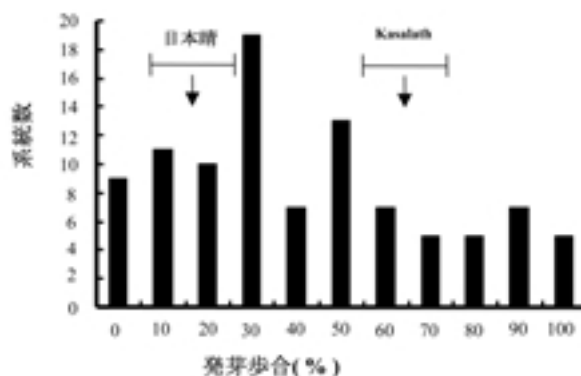


図9 貯蔵7ヶ月目におけるBIL, 98系統の15 , 4日間の発芽歩合の頻度分布
矢印は個体間の平均値、範囲は標準偏差を示す。

加わる可能性がある。よって、「日本晴」において、種子休眠の影響が消失し、最高発芽歩合を示す貯蔵7ヶ月目に、QTL解析のための各BILについての発芽試験を行うこととした。

貯蔵7ヶ月目におけるBILの15 , 4日間の発芽歩合の頻度分布は図9に示した。両親である「日本晴」および「Kasalath」の発芽歩合は、それぞれ、17%および61%であり、BIL98系統の発芽歩合は、0%から100%までの連続分布を示した。

2. 低温発芽性に関するQTL解析

分散分析の結果、低温発芽性に関わる5つのQTLが検出された。これらのQTLは、第2染色体のRFLPマーカーG1327、第4染色体のC946およびC513、第5染色体のR830、第11染色体のG1465近傍に位置付けられ、それぞれ、qLTG-2、qLTG-4-1、qLTG-4-2、qLTG-5、qLTG-11と命名された(図10、表7)。また、MAPMAKER/QTLにおいても、これらのQTLと各マーカーとの連鎖の確かさを示すLOD値は2.0以上を示し、QTLの存在が確認された。「Kasalath」型の対立遺伝子が低温発芽性を高めるqLTG-2、qLTG-4-1、qLTG-11における「Kasalath」型の対立遺伝子の相加効果は、逆正弦変換した発芽歩合で、それぞれ、16.0%、10.7%、14.6%であった。一方、「Kasalath」型の対立遺伝子が低温発芽性を低めるqLTG-4-2とqLTG-5における「Kasalath」型の対立遺伝子の相加効

果は、それぞれ、12.8%、11.6%であった。各QTLの全体の変異に対する寄与率は、10.1%から14.9%の範囲であり、5つのQTLの総計で、全体の変異の40.7%を説明した。

3. 染色体断片置換系統(SL)によるqLTG-4-1、qLTG-4-2、qLTG-5、qLTG-11の確認

4つのSLについてのグラフィカルジェノタイプを図11に示した。「SL44」、「SL79」、「SL28」はそれぞれ、qLTG-11を含む第11染色体、qLTG-4-1を含む第4染色体、qLTG-5を含む第5染色体について「Kasalath」の染色体断片を置換した系統であり、各QTLのみを有する。「SL68」はqLTG-4-1およびqLTG-4-2のみを併せ持つ系統である。これらSLの貯蔵後7ヶ月における発芽歩合を図12に示した。「SL68」、「SL79」、「SL28」、「SL44」および日本晴の15 , 4日間における発芽歩合は、それぞれ、6.3%、46.9%、14.3%、66.9%および17.2%であった。「Kasalath」の対立遺伝子が低温発芽性を高めるqLTG-4-1およびqLTG-11をそれぞれ有する「SL79」および「SL44」の発芽歩合はともに「日本晴」より高かった。一方、「Kasalath」の対立遺伝子が低温発芽性を低めるqLTG-4-2に関して、qLTG-4-1とqLTG-4-2を有する「SL68」の発芽歩合は、qLTG-4-1のみを有する「SL79」より低く、また、qLTG-5を有する「SL28」の発芽歩合は「日本晴」より低かった。以上の結果より、これらのQTLの存在は確認された。

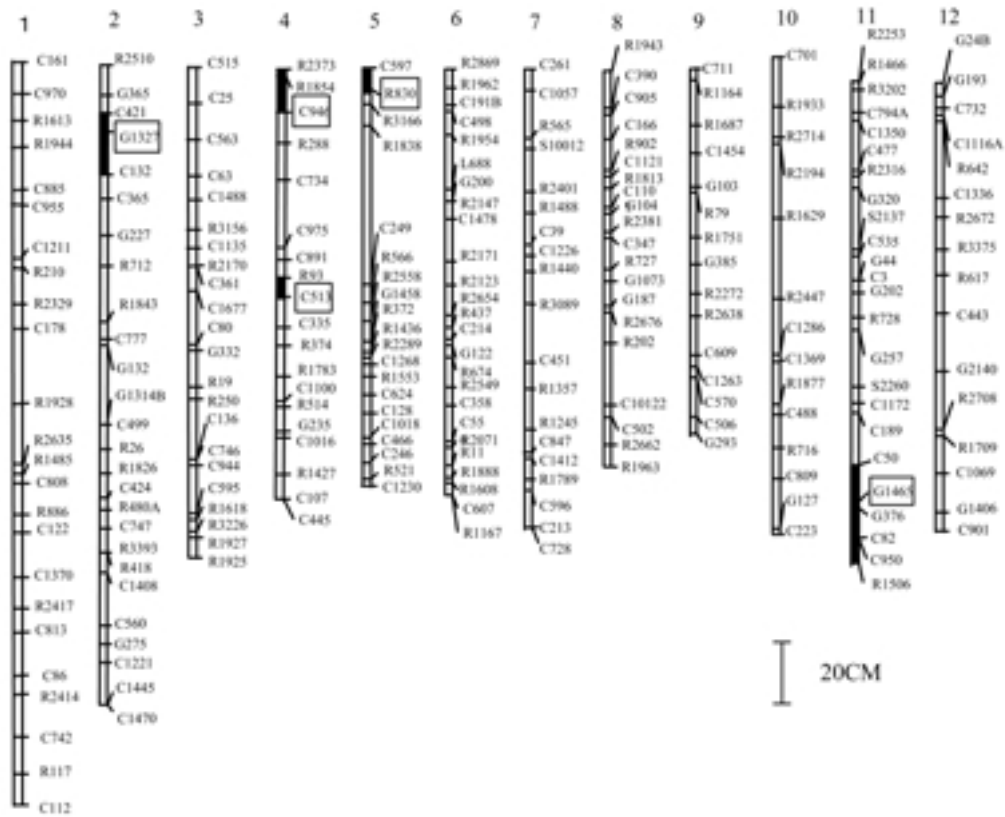


図10 RFLP連鎖地図と低温発芽性に関するQTLの位置

四角の囲いで示したマーカーは、QTLに最も隣接するマーカーを示した。これらのマーカーのMAPMAKER/QTLによるLOD値から0.5のLOD値が減少する両側の範囲を関与領域と仮定し、黒い領域で示した。

表7 イネ種子の低温発芽性に関するQTL

QTL	マーカー名 ¹⁾	染色体番号	分散分析		MAPMAKER/QTL			方向 ⁴⁾
			Probability	R ² ²⁾	LOD	%寄与率 ²⁾	相加効果 ³⁾	
qLTG-2	G1327	2	<0.0001	0.288	2.434	11.9	15.8	K
qLTG-4-1	C946	4	0.0039	0.086	2.794	14.9	10.7	K
qLTG-4-2	C513	4	0.0054	0.081	2.031	10.1	-12.8	N
qLTG-5	R830	5	0.0014	0.105	2.345	10.6	-11.6	N
qLTG-11	G1465	11	0.0009	0.114	2.672	11.8	14.6	K
総計 ⁵⁾						40.7		

1) QTLに最も隣接するRFLPマーカー

2) 各QTLの全体の変異に対する寄与率

3) 「Kasalath」型の対立遺伝子の相加効果

4) NおよびKはそれぞれ「日本晴」と「Kasalath」型の対立遺伝子が発芽歩合を増加させることを示す。

5) 検出された5つのQTLの寄与率の総計

貯蔵7ヶ月目においては、「Kasalath」の種子休眠の影響が残存する可能性があるため、これらのSLの最高発芽歩合をもって作用の大きさを比較した。貯蔵処理期間における「SL44」、「SL79」および「日本晴」の発芽歩合の変化は図13に示した。「SL44」の発芽歩合

は貯蔵8ヶ月目に、「SL79」および「日本晴」は貯蔵7ヶ月目に最高となった。「SL44」、「SL79」および「日本晴」の最高発芽歩合は、それぞれ、69.1%、46.8%および17.2%であった。「SL44」および「SL79」の低温発芽性は「日本晴」より高く、qLTG-11およびqLTG-

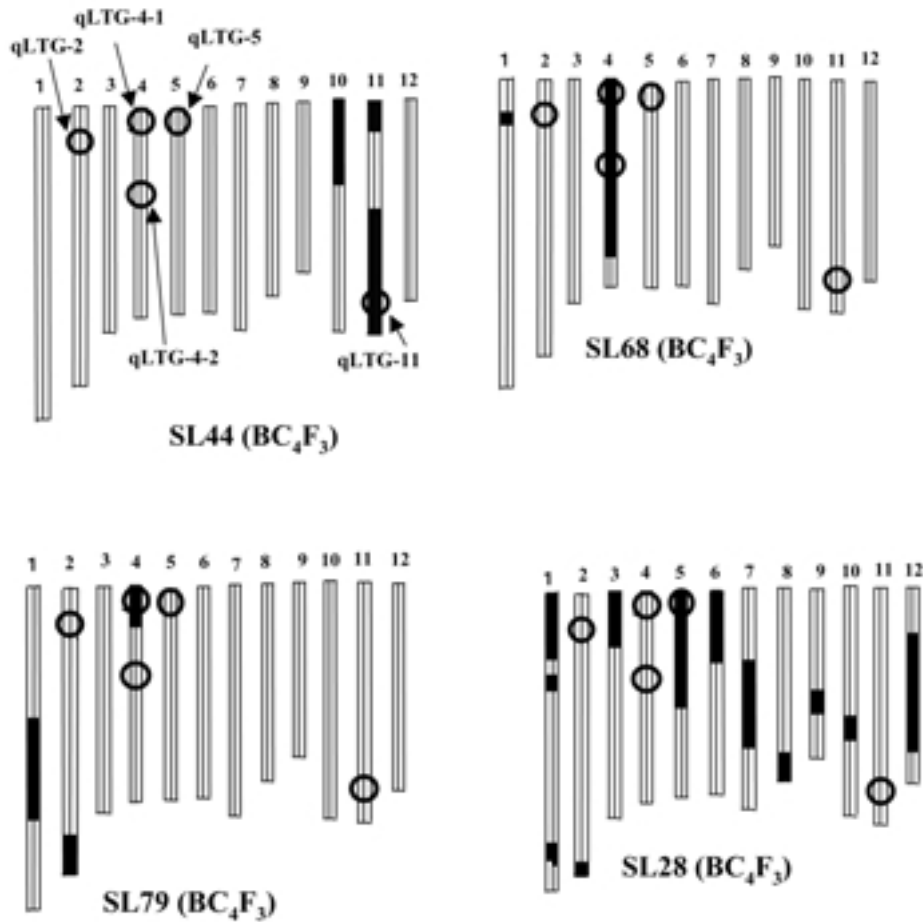


図 11 RFLP マーカーによる選抜を行いながら「Kasalath」を一回親、「日本晴」を戻し交雑親とする戻し交雑により育成した染色体断片置換系統のグラフィカルジェノタイプ

：「日本晴」の染色体領域 ：「Kasalath」の染色体領域 ○：QTL を含む領域

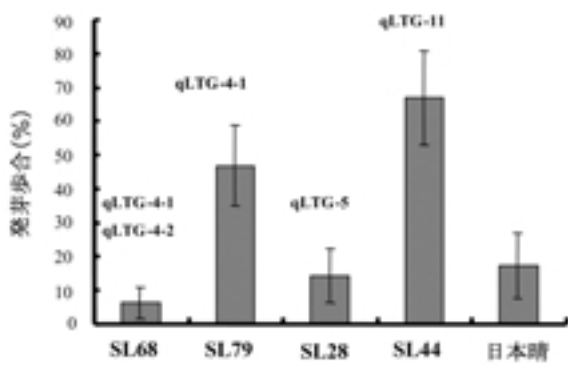


図 12 qLTG-4-1, qLTG-4-2, qLTG-5, qLTG-11 を含む「Kasalath」の染色体領域を有する染色体置換系統間の発芽歩合の比較

発芽歩合(%)は7ヶ月間の貯蔵種子を用いた15, 4日間の発芽試験により調査した。棒上の範囲は標準偏差を示す。

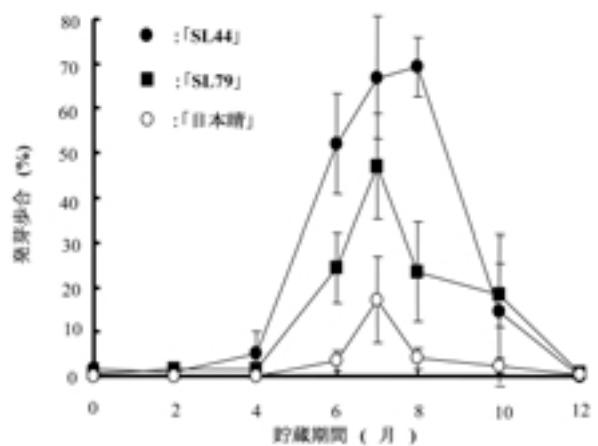


図 13 「日本晴」、「SL44」、「SL79」種子の30 での貯蔵過程における15, 4日間の発芽歩合の変化

点は個体間の平均値、範囲は標準偏差を示す。

4-1 が低温発芽性に関する QTL であることを確認し、qLTG-11 の作用は qLTG-4-1 より大きかった。

qLTG-4-2 の作用を確かめるために、貯蔵処理期間における「SL68」、「SL79」および「日本晴」の発芽歩合の変化を比較した(図 14)。qLTG-4-1 および qLTG-4-2 を併せ持つ「SL68」の発芽歩合は、貯蔵 7 ヶ月目において「日本晴」より低かったが、貯蔵 8 ヶ月目で最高となり、その値は qLTG-4-1 のみを持つ「SL79」の貯蔵 7 ヶ月目における最高発芽歩合とほぼ等しかった。このことは、「Kasalath」の対立遺伝子が発芽を抑制する qLTG-4-2 の作用は一時的であり、貯蔵 7 ヶ月から 8 ヶ月の間に消失したことを示す。この発芽抑制作用の消失は、種子休眠の打破によるものと思われ、qLTG-4-2 は種子休眠を支配する QTL であると推測される。

qLTG-5 の作用を確かめるために、貯蔵処理期間における「SL28」と「日本晴」の発芽歩合の変化を比較した(図 15)。15 における 4 日間では両者の発芽歩合は極めて低く、その差を捉えることが難しいため、6 日間の発芽歩合を調査した。貯蔵 6 ヶ月目で、「SL28」の発芽歩合は 59.0% に達し、最高を示した。一方、「日本晴」の発芽歩合は貯蔵 7 ヶ月目に最高に達し、その値は 87.5% であった。SL28 の最高発芽歩合は「日本晴」より明らかに低かった。種子休眠の影響が除かれた最高発芽歩合においても、「Kasalath」の対立遺伝子が発芽を抑制する qLTG-5 の作用が認められ

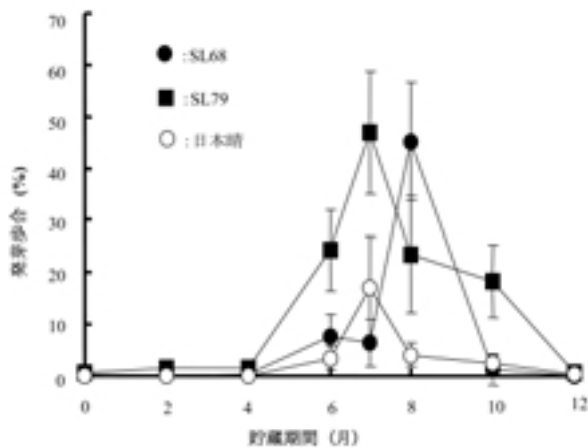


図 14 「日本晴」、「SL68」、「SL79」種子の 30 での貯蔵過程における 15 日間の発芽歩合の変化
点は個体間の平均値、範囲は標準偏差を示す。

ることから、qLTG-5 は種子休眠ではなく、低温発芽性に関わる QTL であることが推測された。

4. 染色体断片置換個体集団(BC₄F₂)による qLTG-2 の確認

染色体断片置換個体 (BC₄F₁) のグラフィカルジェノタイプを図 16 に示した。この個体の後代である 100 個体の染色体断片置換個体集団 (BC₄F₂)、00KF₂₋₄ を用いて、各個体における第 2 染色体上の 11 個の RFLP

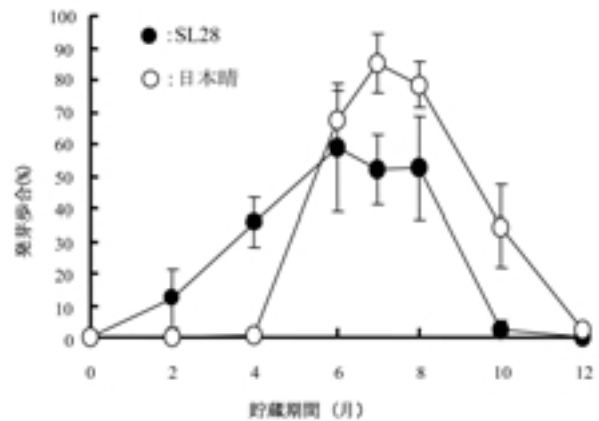


図 15 「日本晴」および「SL28」種子の 30 での貯蔵過程における 15 日間の発芽歩合の変化
点は個体間の平均値、範囲は標準偏差を示す。

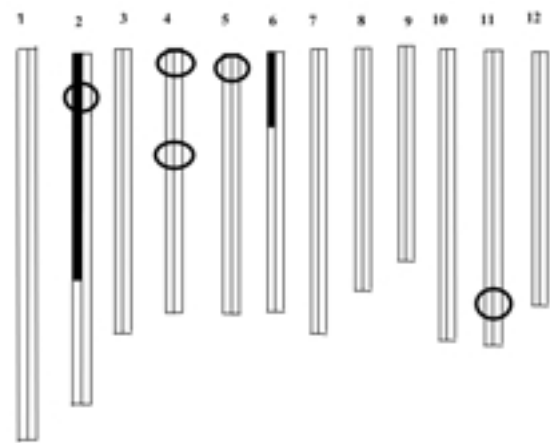


図 16 RFLP マーカーによる選抜を伴う「Kasalath」を一回親、「Koshihikari」を戻し交雑親とする戻し交雑により育成した染色体断片置換個体(BC₄F₁)のグラフィカルジェノタイプ
■:「Koshihikari」の染色体領域 □:「Kasalath」の染色体領域
○: QTL を含む領域

マーカーの遺伝子型と貯蔵7ヶ月目の15, 5日間の発芽歩合により, qLTG-2の確認を行った。00KF₂-4における発芽歩合の頻度分布を図17に示した。100個体の発芽歩合は, 6%から96%までの連続分布を示した。表現型より各個体の遺伝子型を識別することは困難であったため, qLTG-2をRFLPマーカー間に位置付けるための連鎖分析はできなかった。よって, 分散分析により逆正弦変換した発芽歩合における遺伝子型間の平均値の差が有意である($P < 0.01$) RFLPマーカーの検出を試みた。RFLPマーカーG277, C2168, R712において, 日本晴型ホモ, ヘテロ型, Kasalath型ホモの遺伝子型間で有意な平均値の差($P = 0.0002$)が検出された。C132とR1589では, 有意な差が検出されないことから, このマーカー間の領域にqLTG-2が存在するものと推測される(図18)。この領域内にあるG227の遺伝子座において, 「Kasalath」型ホモの個体の低温発芽性が優れ, 「Kasalath」型の対立遺伝子が低温発芽性を高める効果を持つことを確認した(図19)。

考 察

本節において, Kasalath型の対立遺伝子が低温発芽性を高める3つのQTL, qLTG-2, qLTG-4-1, qLTG-11を検出した。これらのQTLは, 日本品種の低温発芽性の改良に役立つものと思われる。福岡ら(1999)は, 品質や食味に関する劣悪形質を除き, 低温発芽性のみを外国品種より日本品種内に導入するための戻し交配

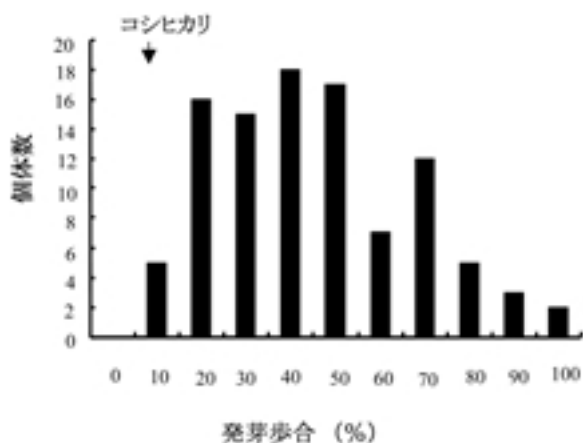


図17 貯蔵後7ヶ月目の染色体断片置換個体集団(BC₄F₂)種子における15, 5日間の発芽歩合の頻度分布

の有効性を報告している。表現型による低温発芽性の評価では, 品種および採種年次ごとに異なる貯蔵処理期間が必要とされるため, 育種への導入は難しい。低温発芽性の改良において, 簡易検定法としてのMASは有効と思われる。本節では, 低温発芽性の改良における戻し交配育種確立のために, 「Kasalath」から有効な遺伝領域を見出し, その領域の有無の識別を可能とするDNAマーカーを検出した。

Lin et al. (1998)は, 第5染色体のR830近傍に種子休眠に関わるQTLを検出した。この染色体領域は, 種子休眠の影響が除かれた状態において「Kasalath」の対立遺伝子が発芽を抑制するqLTG-5を含む。今後は, Lin et al. (1998)が検出したQTLとqLTG-5との関係を明らかにする必要がある。

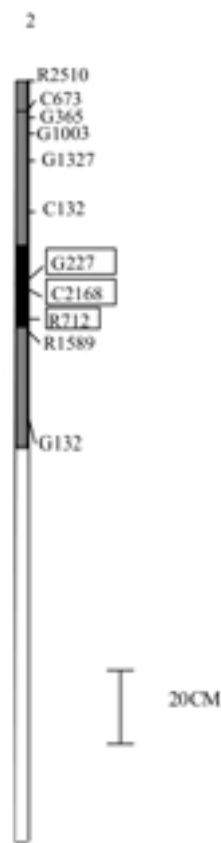


図18 遺伝子型間の平均値の差が有意である($P=0.0002$) RFLPマーカーの連鎖地図上の位置

マーカーは四角の囲いに示した。

■: 「Kasalath」の染色体領域 □: 「日本晴」の染色体領域
 ■: qLTG-2の存在領域

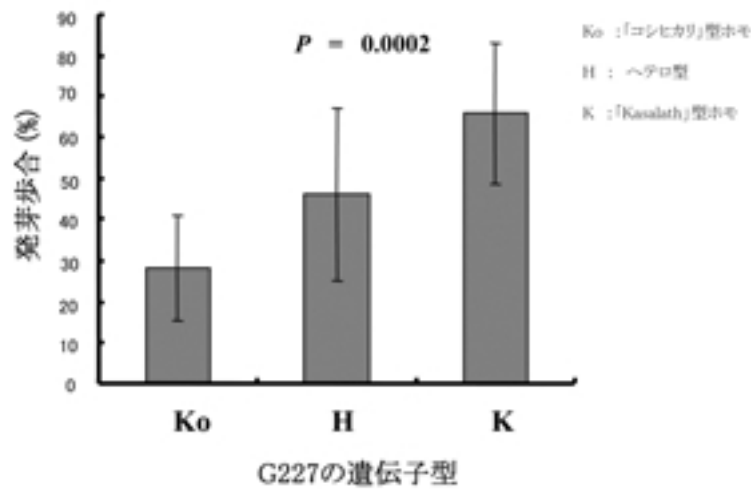


図19 染色体断片置換個体 (BC₄F₂) における RFLP マーカー G227 の遺伝子型別の発芽歩合の平均値の比較
棒上の範囲は標準偏差を示す。

佐々木 (1974) は、日本型稲の標識遺伝子系統を用いて、標識遺伝子と低温発芽性に関する遺伝子との連鎖関係を調査し、低温発芽性に関与する遺伝子は5個前後であり、第6染色体の *wx* (糯性) 座、第1染色体の *d2* (稈矮性)、第7染色体の *d6* (稈矮性)、第9染色体の *I-Bf* (穎縦筋褐色抑制) と連鎖することを報告した。これらの標識遺伝子が存在する染色体は、本節で検出された5つのQTLが存在する染色体と異なるため、佐々木 (1974) が報告した日本型品種の持つ低温発芽性は、「Kasalath」の有する低温発芽性とは異なる遺伝子により支配されていることが推測される。

Yamamoto et al. (1998) は、MASにより育成された後代を用いて、出穂性に関与する3つのQTLについて高精度連鎖解析に成功した。今後は、さらに詳細なQTL近傍のDNAマーカー間の組換え系統を育成することにより、これらQTLと密接連鎖するDNAマーカーを検出し、より効率的なMASの確立を目指す必要がある。

第2章 種子の貯蔵性に関する量的形質遺伝子座 (QTLs) の検出

種子の貯蔵性は、遺伝資源の保存に直接関係するだけでなく、実際栽培において大きな影響を及ぼしている。Yamauchi and Winn (1996) は嫌気性土壌におけ

る直播栽培において、加齢によるイネ種子の発芽力の低下が苗立ち率に影響を及ぼすことを報告した。また、北海道における直播用極早生品種の採種は成苗移植栽培により行なわれるが、苗代日数感応による不時出穂に起因する種子の発芽力の低下が問題となっており、古原・菅原 (1998) は、直播用極早生品種の採種法について検討している。採種時の刈り遅れや劣悪な貯蔵条件によって生じる種子の発芽力の低下は直播栽培での苗立ちの確保の上で大きな問題となるため、直播用品種が具備すべき特性として種子の貯蔵性の改良は必要である。イネにおいて、種子の貯蔵性に関する品種間差異についての報告は多数あるが (岡・蔡 1955, 池橋 1973, Siddique et al. 1988, Chang 1991, Ellis et al. 1992), この形質に関する遺伝解析の報告、さらには品種改良への利用は行われていない。これは、前章で報告した低温発芽性と同様に、この形質が種子の登熟条件および採種条件の影響を受けやすく (Ellis et al. 1993), 更に、高温、高湿条件による加齢処理によっても評価に数ヶ月の期間を要するため、表現型による個体評価および育種の選抜が困難であることに起因すると考えられる。また、種子の貯蔵性と1次休眠との関係について、1次休眠と貯蔵性との間の相関があるとする報告 (大田・竹村 1970, Siddique et al. 1988), および、1次休眠が弱い品種にも貯蔵性に優れる品種が存在するという報告 (Roberts 1963,

池橋 1973, Juliano et al. 1990) がある。本章では、種子の貯蔵性に関する遺伝資源の検索を行い、有用な母本の選定を試みた。また、前章において、DNA マーカーの利用により、低温発芽性に関する QTL を検出し、簡易検定法としての MAS の有効性を確かめた。この結果をふまえ、本章では、種子の貯蔵性に関する簡易な検定法として、MAS を確立するために、RFLP マーカーによる種子の貯蔵性に関する QTL の検出を目的とした。さらに、1 次休眠に関する QTL との比較により、種子の貯蔵性と 1 次休眠との関係の検討を行った。

第 1 節 種子の貯蔵性に関するイネ遺伝資源の検索

イネにおける種子の貯蔵性に関する遺伝資源の地理的分布について、大陸型品種が島型品種より貯蔵性が高い(岡・蔡 1955)、日本型品種はインド型品種およびジャワ型品種に比べ種子の寿命が短いこと(Chang 1991, Ellis et al. 1992)が報告されている。本節では、種子の貯蔵性改良のための有用な母本の選定を目的として、遺伝資源の検索を行った。

材料および方法

世界の 24 カ国から導入した代表的な品種 162 品種を用いた。内訳は、中国 42、日本 37、フィリピン 11、インド 9、アメリカ 8、インドネシア 8、ラオス 5、ネパール 4、ミャンマー 4、タイ 4、バングラデシュ 4、ブラジル 4、韓国 3、ブータン 3、マダガスカル 3、ベトナム 3、ロシア 2、カンボジア 2、ナイジェリア 2、スリランカ 1、西アフリカ(国名不明) 1、ペルー 1 である。これらの品種は、1999 年に、つくば市にある農業生物資源研究所の水田圃場に栽植された。出穂後 40 日に各品種を採種した。発芽力の喪失を図るため、30 日の通風乾燥器内で種子を保存した。保存 12 ヶ月後では、系統間の発芽力の低下に差が認められなかったため、さらに、池橋(1973)の方法により 2 ヶ月間の加齢処理を加えた。すなわち、デシケーター内に種子と K_2CrO_4 飽和溶液(水分含量約 16%)を入れ、両者の間の水分含量の平衡関係を利用して、種子水分含量を 15 ~ 16% に維持しつつ、30 日で貯蔵した。加齢処理後

に発芽試験を行い、25 ℃, 7 日後の発芽歩合により貯蔵性を評価した。発芽試験の方法は前章に準じた。

結 果

種子の貯蔵性に関するイネ遺伝資源の検索結果は表 8 - 1 ~ 表 8 - 4 に示した。また、主要な国の品種における種子の貯蔵性に関する頻度分布を図 20 に示した。インド原産の品種グループには発芽力の低下が少ない品種の頻度が高く、逆に日本品種グループでは、発芽力を失った品種が殆どであった。中国原産の品種グループには種子の貯蔵性に関する広い変異が認められた。発芽歩合が 100% を示した品種は、インド原産の「Surjumkhi」、「Kasalath」、「Chinsurah Boro」, バングラデシュ原産の「Tupa7-1」、「Tupa729」、フィリピン原産の「IR2061-214-3」、「Tadukan」、アメリカ原産の「Labelle」、カンボジア原産の「Neanh Chhouk」であった。

考 察

Kameswara Rao and Jackson(1997)はインドの Aus(夏イネ)およびバングラデシュの Boro(春イネ)を主とする Glaszmann(1987)のアイソザイムグループ型の品種において種子の寿命が長いことを報告した。インド原産の品種において、種子の寿命が長いことは池橋(1973)も報告している。本節の結果はこれらの報告とほぼ一致し、種子の貯蔵性に関する育種および遺伝解析の母本として、インド原産の品種が有望であることを示した。

第 2 節 種子の貯蔵性に関する量的形質遺伝子座(QTLs)の検出

前節では、種子の貯蔵性に関するイネ遺伝資源の検索を行い、池橋(1973)および Kameswara Rao and Jackson(1997)が報告したように、インド原産の品種が優れた種子の貯蔵性を有することを明らかにした。この種子の貯蔵性を支配する要因について、1 次休眠との相関関係が報告されているが(大田・竹村 1970, Siddique et al. 1988)、一方、1 次休眠が弱い品種にも貯蔵性に優れた品種が存在するという報告(Roberts

表8-1 種子の貯蔵性に関するイネ遺伝資源の検索

品種名	貯蔵後の ¹⁾ 発芽歩合 (%)	水分含量 ²⁾	加齢処理後 ³⁾ の発芽歩合 (%)	原産国
Muha	49	15.4	88	インド
Surjumkhi	50	13.9	100	インド
Dular	50	13.4	98	インド
Pusur	49	13.5	88	インド
T246	50	13.6	96	インド
Kasalath	50	13.1	100	インド
Chinsurah Boro II	50	13.6	100	インド
Jhona2	50	15.0	30	インド
Co13	50	14.5	48	インド
Dakanalo	50	15.8	82	スリランカ
ネパール No.1	50	13.1	96	ネパール
ネパール No.8	50	13.7	54	ネパール
ネパール No.18	49	14.0	80	ネパール
ネパール No.555	50	14.3	0	ネパール
Ma sho	50	13.8	14	ミャンマー
In Sitt	49	14.1	34	ミャンマー
Khauk Yoe	49	13.2	8	ミャンマー
Shwe War	50	14.0	22	ミャンマー
Jaguary	50	15.2	62	ブラジル
Kinandang Puti	50	14.9	20	フィリピン
IR24	50	14.6	78	フィリピン
IR29	49	14.1	12	フィリピン
IR36	49	14.0	94	フィリピン
IR58	50	14.5	98	フィリピン
IR2061-214-3	50	13.9	100	フィリピン
Canabongbong	50	14.0	36	フィリピン
Basilanon	48	14.9	98	フィリピン
CS-S4	45	14.3	0	フィリピン
Dinalaga	49	14.3	60	フィリピン
Sinaba	49	15.5	84	フィリピン
密陽 23 号	50	14.7	98	韓国
水原 258 号	50	14.1	68	韓国
統一	49	14.3	10	韓国
宣昌米	50	13.5	98	中国
柳州包芽早	50	15.0	8	中国
細粒穀	50	13.6	92	中国
矮脚南特	49	13.8	90	中国
紅米	50	13.8	98	中国

¹⁾ 30℃, 乾燥条件で12ヶ月貯蔵した種子の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合

²⁾ 加齢処理1ヶ月目と2ヶ月目の種子の水分含量の平均値

³⁾ 加齢処理2ヶ月目の種子の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合

1963, 池橋 1973, Juliano et al. 1990) もある。また, この形質を支配する遺伝的機構も未だ解明されていない。前節で示したように, 種子の貯蔵性の評価には, 加齢処理を施しても長期間が必要とされるため, 育種に必要な多検体の評価は困難である。前章では, DNA

マーカーにより, 測定が難しい量的形質である低温発芽性を支配する量的形質遺伝子座 (QTLs) を検出した。本節では, インド原産品種が有する種子の貯蔵性を日本品種に導入するための MAS を確立するために, DNA マーカーとして RFLP (制限酵素断片長多型)

表 8 - 2 種子の貯蔵性に関するイネ遺伝資源の検索

品種名	貯蔵後の ¹⁾ 発芽歩合 (%)	水分含量 ²⁾	加齢処理後 ³⁾ の発芽歩合 (%)	原産国
暹秈	48	14.8	6	中国
紅血糯	48	14.7	66	中国
湖南秈	50	14.6	60	中国
低脚烏尖	49	14.5	4	中国
道人橋	50	14.4	0	中国
短広花螺	50	14.5	0	中国
八月糯	41	13.5	36	中国
礼緬尼	50	14.4	6	中国
Hong Cheuh Zai	50	14.0	38	中国
精油	50	14.8	12	中国
烏殼花螺	50	14.8	10	中国
低脚花螺	49	14.4	36	中国
Deng Pao Zha	48	14.5	0	中国
唐干	50	14.2	0	中国
Tadukan	50	13.6	100	中国
卷吐白	50	14.1	96	中国
China 830	50	13.3	14	中国
窄叶青 8 号	49	14.1	50	中国
桂朝 2 号	49	14.3	36	中国
滇渝 1 号	49	14.9	0	中国
南京香稻	46	14.4	0	中国
毫剛	43	15.2	2	中国
納西	49	13.4	0	中国
黄殼	43	14.7	0	中国
北支 16 号	41	15.0	24	中国
李子紅	50	15.3	2	中国
広陸矮 4 号	49	14.7	72	中国
台中秈 3 号	49	13.9	24	中国
台中育 204 号	48	14.6	6	中国
南京 11 号	49	14.2	20	中国
台中在来 1 号	50	13.7	0	中国
豪海	50	13.7	68	中国
矮脚糯	50	13.7	0	中国雲南省
大白谷	47	14.4	36	中国雲南省
大理白谷	46	15.0	0	中国雲南省
金果銀	50	14.0	0	中国雲南省
Mu Bang Gu	50	13.8	96	中国雲南省
Simedel	50	14.6	22	インドネシア

¹⁾ 30℃, 乾燥条件で 12 ヶ月貯蔵した種子の 25℃, 7 日間の発芽試験での発芽歩合

²⁾ 加齢処理 1 ヶ月目と 2 ヶ月目の種子の水分含量の平均値

³⁾ 加齢処理 2 ヶ月目の種子の 25℃, 7 日間の発芽試験での発芽歩合

マーカーを利用して、種子の貯蔵性に関する量的形質遺伝子座 (QTLs) の検出を行った。さらに、検出された QTL に関する染色体断片置換系統 (SL//BC₄F₃) を用いて、各 QTL の影響を確かめた。また、1 次休眠に関する QTL の検出も試み、種子の貯蔵性に関与する QTL

と比較することにより、両者の間の関係を調査した。

材料および方法

種子の貯蔵性が高い品種としてインド原産の品種「Kasalath」および低い品種として日本型品種「日本

表8-3 種子の貯蔵性に関するイネ遺伝資源の検索

品種名	貯蔵後の ¹⁾ 発芽歩合 (%)	水分含量 ²⁾	加齢処理後 ³⁾ の発芽歩合 (%)	原産国
Siampang	50	14.2	2	インドネシア
Ladang	50	14.1	84	インドネシア
Simanoek	50	13.7	2	インドネシア
Bodat Mayang	49	13.5	86	インドネシア
Masumikir	50	13.8	52	インドネシア
Padi Kenikir Puti	50	14.0	18	インドネシア
RM	48	13.5	4	インドネシア
Mack Kheua	48	14.0	62	ラオス
Vista	50	13.7	92	アメリカ
North Rose	50	13.2	68	アメリカ
Labelle	50	13.2	100	アメリカ
Texas Fortuna	48	13.2	50	アメリカ
Tambo	50	13.2	68	アメリカ
Rexmont	50	14.1	98	アメリカ
PI312777	50	14.1	84	アメリカ
PI338355	49	15.0	30	アメリカ
KU 70-1	41	15.9	40	タイ
Daw Dam	47	15.5	16	タイ
Col/Thailand/1990 /MA/FF/12	50	13.3	66	タイ
Khao Hang	50	13.8	40	タイ
Dourada Precoce	49	15.2	82	ブラジル
Geraldine	43	14.8	0	ブラジル
K78	49	13.9	20	ブラジル
Khao Nok	46	14.1	68	ラオス
Deng Mak Tek	49	14.0	66	ラオス
Dam Ngo	50	14.5	82	ラオス
Lep Xang	48	14.7	40	ラオス
Moroberekan	50	14.7	98	西アフリカ
Afgha WYR-5088	49	16.3	30	ロシア
Wzbeuskij 2	50	14.1	0	ロシア
Romeo	44	14.8	4	イタリア
黄玉	49	13.7	4	日本
旭	50	14.1	0	日本
赤毛	43	13.9	0	日本
白川	47	13.9	8	日本
信州金子	46	14.8	0	日本
信州	45	14.8	0	日本
大場	50	14.7	2	日本
関山	46	14.1	0	日本
嘉平	48	14.9	48	日本
穀良都	49	15.0	6	日本

¹⁾ 30℃, 乾燥条件で12ヶ月貯蔵した種子の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合

²⁾ 加齢処理1ヶ月目と2ヶ月目の種子の水分含量の平均値

³⁾ 加齢処理2ヶ月目の種子の25℃, 7日間の発芽試験での発芽歩合

表 8 - 4 種子の貯蔵性に関するイネ遺伝資源の検索

品種名	貯蔵後の ¹⁾ 発芽歩合 (%)	水分含量 ²⁾	加齢処理後 ³⁾ の発芽歩合 (%)	原産国
玉錦	49	15.2	0	日本
十石	49	13.6	0	日本
銀坊主	49	13.9	0	日本
万才	45	13.5	0	日本
亀治	48	13.6	0	日本
神力	50	14.4	0	日本
農林 1 号	49	14.0	4	日本
農林 8 号	46	14.6	0	日本
台中 65 号	49	14.3	0	日本
藤坂 5 号	49	14.2	0	日本
北斗	45	13.8	0	日本
トドロキワセ	50	14.9	8	日本
ササニシキ	49	15.0	0	日本
レイメイ	50	15.5	4	日本
アキヒカリ	47	15.1	4	日本
トヨニシキ	50	14.5	0	日本
キヌヒカリ	50	14.8	20	日本
ハバタキ	47	14.2	56	日本
コシヒカリ	50	14.3	30	日本
オワリハタモチ	48	14.5	0	日本
日本晴	50	14.2	0	日本
農林 29 号	50	14.2	0	日本
あそみのり	49	13.5	0	日本
レイホウ	50	13.7	0	日本
オオチカラ	40	14.1	0	日本
愛知旭	50	14.8	0	日本
阿波赤米	50	14.6	24	日本
Tupa7-1	50	13.8	100	バングラデシュ
Tupa729	50	13.6	100	バングラデシュ
Aus 32	50	13.3	34	バングラデシュ
Aus 38	49	14.0	48	バングラデシュ
Hasu	50	14.5	44	ブータン
91-382	50	14.3	0	ブータン
Thapa Chinni	49	14.4	38	ブータン
Bei Khe	50	13.9	0	カンボジア
Neanh Chhouk	50	14.2	100	カンボジア
Manan Elatla	50	14.6	52	マダガスカル
Vary Futsy	50	13.7	86	マダガスカル
Oazalahy	48	14.4	14	マダガスカル
Bie Blau	50	14.3	78	ベトナム北西部
Khau Van Lanh	50	14.5	52	ベトナム北西部
Khan Tan Chiem	50	14.9	88	ベトナム北西部
TOg5500	49	14.1	98	アフリカ
TOg5923	49	14.3	98	アフリカ
Jamaica	49	14.2	98	ペルー

¹⁾ 30℃，乾燥条件で 12 ヶ月貯蔵した種子の 25℃，7 日間の発芽試験での発芽歩合

²⁾ 加齢処理 1 ヶ月目と 2 ヶ月目の種子の水分含量の平均値

³⁾ 加齢処理 2 ヶ月目の種子の 25℃，7 日間の発芽試験での発芽歩合

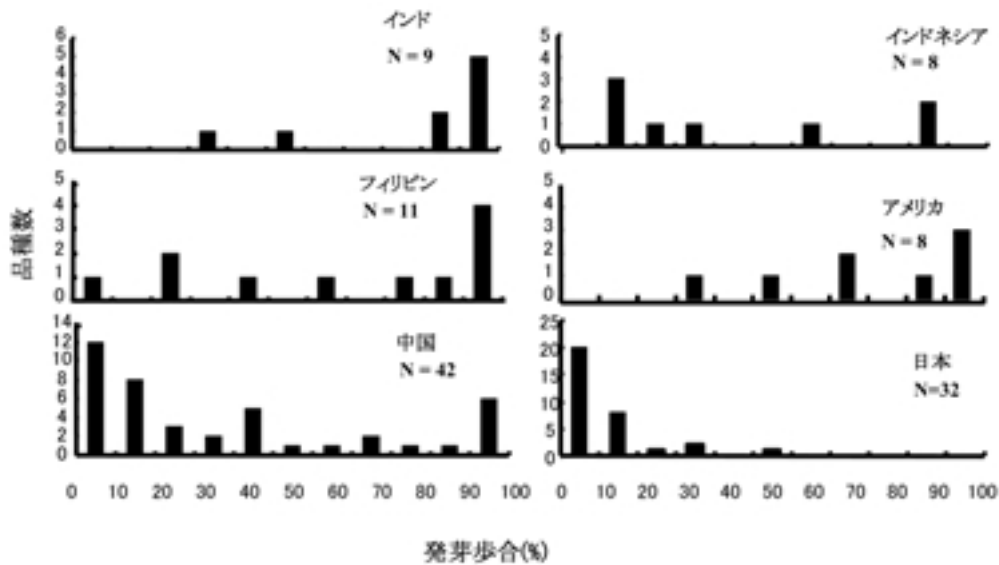


図20 イネ品種の種子の貯蔵性に関する原産国別の頻度分布

晴」を選定した。種子の貯蔵性に関する QTL の検出には「日本晴」/「Kasalath」//「日本晴」に由来する 98 の戻し交雑自殖系統(BIL)(BC₄F₉)および両親を用いた。検出した QTL の確認には、前章と同様の方法で育成された 4 つの SL (BC₄F₉)を用いた。すべての材料を、1999 年に、つくば市にある農業生物資源研究所の水田圃場に栽植した。

出穂 40 日目に、BIL に関しては系統ごとに、SL に関しては各系統 7 個体より、種子を収穫した。採種直後に、25℃、7 日間の発芽試験により供試種子の 1 次休眠の程度を調査した。発芽試験は、暗黒条件下、±0.5℃で制御できる恒温器内で、直径 9cm のシャーレ内の 2 重に敷いた濾紙上に 50 粒の種子を置床し、種子が浸る程度の蒸留水を加えて行った。採種種子は発芽力を喪失させるため、30℃、通風乾燥器内で 12 ヶ月間貯蔵した。貯蔵後の発芽歩合は、「日本晴」と「Kasalath」において、それぞれ、92.0%と 99.1%で、BIL においては、96%から 100%の範囲であった。この時点では、種子の貯蔵性について供試品種間における差が認められなかったため、池橋(1973)の方法に従って加齢処理を行った。すなわち、デシケーター内に種子と K₂CrO₄ 飽和溶液(水分含量約 16%)を入れ、両者の間の水分含量の平衡関係を利用して、種子水分含量を 15 ~ 16%に維持しつつ、30℃で貯蔵した。加

齢処理後に発芽試験を行い、25℃、7 日後の発芽歩合により、貯蔵性を評価した。種子の発芽力の低下に及ぼす種子の水分含量および貯蔵温度の影響が報告されているため(Roberts 1972, Justice and Bass 1978)、種子水分計(Kett Riceter-D)を用いて、供試種子の水分を確認した。

BIL についての RFLP 分析および種子の 1 次休眠および貯蔵性に関する QTL の検出は、前章の 4 節、低温発芽性に関する量的形質遺伝子座(QTLs)の検出の項で示した方法に従った。

結 果

1. BIL における種子の 1 次休眠および貯蔵性の頻度分布

1 次休眠の程度を示す収穫時における発芽歩合は、「Kasalath」および「日本晴」がそれぞれ 7.4%および 2.3%であり、BIL においては 0%から 100%の連続分布を示した(図 21A)。加齢処理後、BIL における種子の水分含量および発芽歩合を測定した。水分含量と発芽歩合の間に有意な相関は認められなかったため($r = 0.195, P > 0.05$)、種子の貯蔵性の評価について、水分含量の差を考慮する必要はないものと判断した。BIL および両親の「日本晴」および「Kasalath」の加齢処理後の発芽歩合の頻度分布を図 21B に示した。

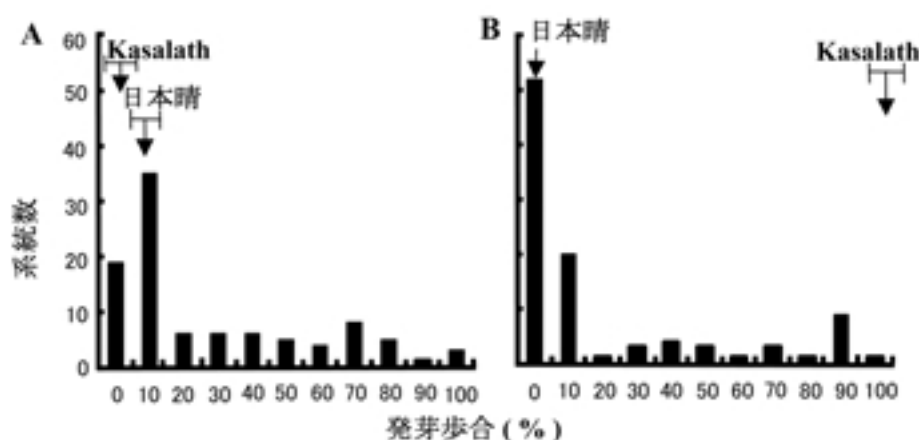


図 21 BIL, 98 系統における種子の 1 次休眠 (A) および種子の貯蔵性 (B) に関する頻度分布
矢印は平均値, 範囲は標準偏差を示す.

「日本晴」および「Kasalath」の発芽歩合は、それぞれ 0% および 96.7% であり、「Kasalath」の種子の貯蔵性は「日本晴」より明らかに高かった。BIL においては、0% から 100% の連続分布を示した。

2. 1 次休眠に関する QTL の検出

分散分析の結果、1 次休眠に関する 5 つの QTL が検出された (表 9, 図 22)。これらの QTL は、第 1 染色体の RFLP マーカー R1613, 第 3 染色体の C25, 第 5 染色体の R1838, 第 7 染色体の R1357, 第 11 染色体の C189 近傍に位置付けられ、それぞれ、qSD-1, qSD-3, qSD-5, qSD-7, qSD-11 と命名された。また、MAPMAKER/QTL において、qSD-1, qSD-3, qSD-5, qSD-11 と各マーカーとの連鎖の確かさを示す LOD 値が 2.0 以上を示し、これら QTL の存在が確認された。しかし、qSD-7 はこの閾値では確認できなかった。qSD-1, qSD-3, qSD-11 において、「Kasalath」型の対立遺伝子が発芽歩合を高め、「Kasalath」型の対立遺伝子の相加効果は、逆正弦変換した発芽歩合で、それぞれ、14.5%, 13.7%, 13.3% であった。一方、qSD-5 および qSD-7 においては、「Kasalath」型の対立遺伝子が発芽歩合を低め、「Kasalath」型の対立遺伝子の相加効果は、それぞれ、13.6%, 10.7% であった。各 QTL の全体の変異に対する寄与率は、6.8% から 13.6% の範囲であり、5 つの QTL の総計で、全体の変異の 41.1% を説明した。

3. 種子の貯蔵性に関する QTL の検出

分散分析の結果、種子の貯蔵性に関する 3 つの QTL が検出された (表 9, 図 22)。これらの QTL は、第 2 染色体の RFLP マーカー C1470, 第 4 染色体の R514, 第 9 染色体の R79 近傍に位置付けられ、それぞれ、qLG-2, qLG-4, qLG-9 と命名された。また、MAPMAKER/QTL において、これらの QTL と各マーカーとの連鎖の確かさを示す LOD 値が 2.0 以上を示し、QTL の存在が確認された。これらの QTL において、「Kasalath」型の対立遺伝子が発芽歩合を高め、「Kasalath」型の対立遺伝子の相加効果は、逆正弦変換した発芽歩合で、それぞれ、14.4%, 15.1%, 25.5% であった。各 QTL の全体の変異に対する寄与率は、11.6% から 59.5% の範囲であり、qLG-9 は 59.5% と大きい寄与率を示した。3 つの QTL の総計で、全体の変異の 68.2% を説明した。

4. 染色体断片置換系統 (SL) による qLG-9 の確認

確認に用いた 4 つの SL についてのグラフィカルジェノタイプを図 23 に示した。「SL36」および「SL39」は、qLG-9 を含む「Kasalath」の第 9 染色体の断片を「日本晴」の遺伝背景に置換した系統で、種子の貯蔵性に関する他の QTL は有さない。「SL14」および「SL68」は qLG-4 を含む「Kasalath」の第 4 染色体の断片を「日本晴」に置換した系統である。qLG-2 を単独で有する SL は未だ育成されておらず、本節ではこの QTL の存在は確認できなかった。これら SL と両親で

表9 イネ種子の1次休眠および種子の貯蔵性に関するQTL

形質	QTL	マーカー名 ¹⁾	染色体番号	分散分析		MAPMAKER/QTL		
				Probability	LOD	%寄与率 ²⁾	相加効果 ³⁾	方向 ⁴⁾
1次休眠	qSD-1	R1613	1	0.0006	2.63	11.6	14.5	K
	qSD-3	C25	3	0.0014	2.44	11.3	13.7	K
	qSD-5	R1838	5	0.0001	3.1	13.6	-13.6	N
	qSD-7	R1357	7	0.0076	1.49	6.8	-10.7	N
	qSD-11	C187	11	0.0018	2.12	9.7	13.3	K
総計 ⁵⁾						41.1		
種子の貯蔵性	qLG-2	C1470	2	0.0007	2.809	13.4	14.4	K
	qLG-4	R514	4	0.0012	2.428	11.6	15.1	K
	qLG-9	R79	9	<0.0001	13.883	59.5	25.5	K
総計 ⁵⁾						68.2		

1) QTLに最も隣接するRFLPマーカー

2) 各QTLの全体の変異に対する寄与率

3) 「Kasalath」型の対立遺伝子の相加効果

4) NおよびKはそれぞれ「日本晴」と「Kasalath」型の対立遺伝子が発芽歩合を増加させることを示す。

5) 検出されたQTLの寄与率の総計

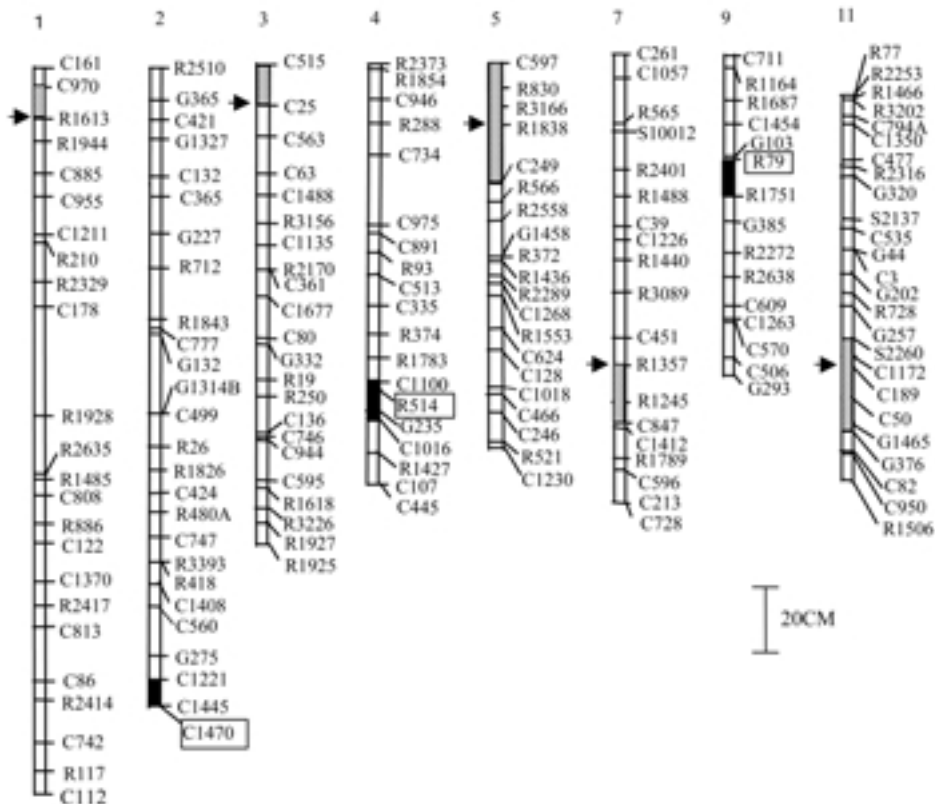


図22 「Kasalath」と「日本晴」の交雑後代である戻し交雑自殖系統(BC₁F₉)を用いた連鎖地図、並びに、1次休眠および種子の貯蔵性に関するQTLの位置

四角の囲いで示したマーカーおよび矢印で示したマーカーは、それぞれ、種子の寿命および種子休眠に関するQTLに最も隣接するマーカーを示す。これらのマーカーのMAPMAKER/QTLによるLOD値から0.5のLOD値が減少する両側の範囲を関与領域とした。斜線の領域は1次休眠、黒い領域は種子の貯蔵性に関する領域を示す。QTLが検出されない染色体は省略した。

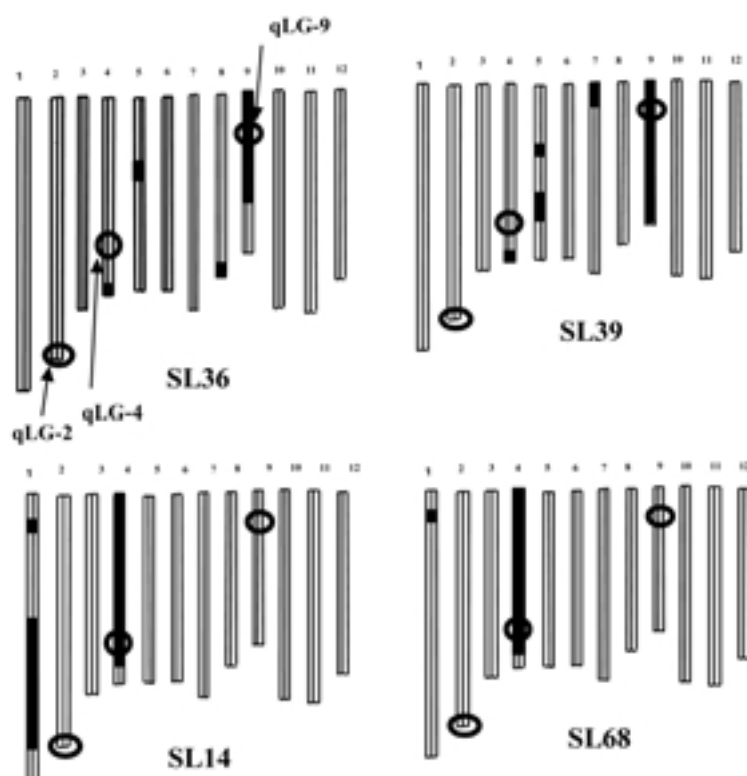


図 23 RFLP マーカーによる選抜を行いながら「Kasalath」を一回親、「日本晴」を戻し交雑親とする戻し交雑により育成した染色体断片置換系統のグラフィカルジェノタイプ

○：「日本晴」の染色体領域 ○：「Kasalath」の染色体領域 ○：QTL を含む領域

ある「日本晴」および「Kasalath」の加齢処理後の発芽歩合および水分含量を表 10 に示した。これらの供試材料間に種子水分含量の差はなく ($P > 0.05$)、SL および両親における種子の貯蔵性の評価について、水分含量の差を考慮する必要はないものと判断した。「SL36」、「SL39」、「日本晴」、「Kasalath」の発芽歩合は、それぞれ 77.3%、77.0%、0%、96.7%であり、「日本晴」が発芽力を失った時点においても、「SL36」お

よび「SL39」とともに発芽力を有していた。以上より、「Kasalath」型の対立遺伝子が種子の貯蔵性を高める qLG-9 の効果が確認された。「SL14」および「SL68」の発芽歩合は、「日本晴」と同様に 0%を示し、qLG-4 の効果は確認できなかった。

考 察

これまで、イネにおいて種子の貯蔵性と 1 次休眠との間の相関が報告されている (大田・竹村 1970, Siddique et al. 1988)。一方, Roberts (1963) は、インド型品種、日本型品種、*O. glaberrima* を用いた実験でこの相関が認められなかったことを報告した。また、池橋 (1973) は、インド型品種の一部には、1 次休眠が弱いにも関わらず種子の貯蔵性の高い品種が存在することを報告した。本節において、1 次休眠に關与する 5 つの QTL が第 1, 3, 5, 7 染色体上に検出された。また、Lin et al. (1998) は、本節と同じ BIL を用いた

表 10 染色体断片置換系統、「日本晴」および「Kasalath」種子の貯蔵性

品種名 系統名	水分含量 (%) (平均 ± 標準偏差)	発芽歩合 (%) (平均 ± 標準偏差)
SL36	15.0 ± 0.2	77.3 ± 6.7
SL39	14.8 ± 0.2	77.0 ± 9.7
日本晴	14.9 ± 0.3	0
Kasalath	14.5 ± 0.2	96.7 ± 4.8

1次休眠に関する QTL 解析により、第3, 5, 7, 8染色体上に、5つの QTL を検出している。種子の貯蔵性に関しては、本節において第2, 4, 9染色体上に、3つの QTL を検出した。これらの結果より、「Kasalath」において、種子の貯蔵性と1次休眠とが異なる遺伝領域により支配されていることがわかり、1次休眠が弱い品種にも貯蔵性に優れた品種が存在するという報告 (Roberts 1963, 池橋 1973, Juliano et al. 1990) を支持する結果となった。

Lin et al. (1998) は、1995年に、本節と同じ圃場に栽植した「日本晴」/「Kasalath」//「日本晴」に由来する98の戻し交雑自殖系統(BIL \times BC $_1$ F $_5$)を用いて、1次休眠に関与する QTL を検出した。本節で検出した qSD-5 および qSD-7 の位置は、Lin et al. (1998) によって検出された2つの QTL とほぼ一致した。しかし、Lin et al. (1998) によって検出された第3染色体の C1488, 第7染色体の R1440, 第8染色体の C390 近傍にある QTL は、本節では検出されなかった。また、本節で検出された qSD-1, qSD-3, qSD-11 は Lin et al. (1998) によって検出されていない。Lin et al. (1998) の報告と比較すると、本節で用いた「日本晴」種子は強い1次休眠を示している。1次休眠の誘導程度は、登熟温度、登熟の程度および収穫後の種子の乾燥条件等の環境の影響を受けることが報告されている (Seshu and Sorrells 1986, Roberts 1962, 池橋 1973, 林・日高 1979)。Lin et al. (1998) の試験が行なわれた1995年および本節の試験を行なった1999年の BIL の登熟期における平均気温は、それぞれ 21.9 および 25.1 であり、その差は大きい。池橋 (1973) は1次休眠の誘導程度は登熟温度に影響され、温度に対する反応の程度は品種間で差があることを報告した。1995年と1999年の登熟期の平均気温の差を考慮すると、本節と Lin et al. (1998) の報告における結果の違いは、1次休眠を支配する遺伝子の発現と環境との相互作用により生じたものと推測される。

本節では SL において qLG-4 の効果は確認できなかった。qLG-4 の単独の効果が確認されない理由として、qLG-4 と他の遺伝子座との補足作用の存在が推測される。しかし、本節で用いた BIL, 98 系統のような小さい規模の集団における解析では、他の遺伝子座と

の補足作用を有する QTL の検出は困難であることが報告されている (Yano and Sasaki 1997)。本節では qLG-4 の単独の効果が確認されない理由を説明することは難しいが、qLG-4 および qLG-2 の存在の確認は今後の課題である。

本節において、BIL における全変異の 59.5% を説明する大きな効果を持つ qLG-9 を検出した。また、qLG-9 を単独で有する SL を用いて、この QTL における「Kasalath」型の対立遺伝子が種子の貯蔵性を高めることを確認した。qLG-9 における「Kasalath」型の対立遺伝子は日本品種の種子の貯蔵性の改良に役立つものと思われる。種子の貯蔵性の評価は、種子の登熟条件および採種条件の影響を受けやすく、更に、高温、高湿条件による加齢処理によっても評価に数ヶ月の期間を要し、表現型による個体評価および育種の選抜が困難であるため、qLG-9 に隣接する DNA マーカーによる MAS は、この形質に関する簡易検定法として有効な手段となろう。今後は、さらに詳細な qLG-9 近傍の DNA マーカー間の組換え系統を育成することにより、この QTL と密接連鎖する DNA マーカーを検出し、より効率的な MAS の確立を目指す必要がある。

第3章 苗立ち性向上のための子葉鞘の低温伸長性に優れた中間母本の開発

寒冷地における湛水直播栽培において、低温下での幼植物の生長性が苗立ちへ影響することが報告されている (Carnahan et al. 1972, David and Peterson 1976, Li and Rutger 1980)。Ogiwara and Terashima (2001) は、幼苗の生長性に関わる要因のうち子葉鞘の低温伸長性が苗立ちの向上に大きく貢献することを報告した。子葉鞘の低温伸長性は日本品種内では変異が小さいため (桜木・金 1990)、この形質の改良には、母本として外国品種を含む広範な遺伝資源を用いる必要がある。ヨーロッパ品種の子葉鞘の低温伸長性が優れることが報告されている (Ogiwara and Terashima 2001)。しかし、品質、収量等の農業形質が劣るヨーロッパ品種を単交配の母本に用いて育成された普及品種は我が国では未だない。

第1章および第2章において、直播適性品種が具備

すべき低温発芽性および種子の貯蔵性に関する QTL を検出し、表現型での評価が難しい両形質において MAS の有効性を確かめた。Redona and Mackill (1996) は、インド型品種「Black Gora」の有する子葉鞘の低温伸長性を日本型品種に導入するための MAS の確立を目的として、この形質に関する QTL 解析を試みたが、作用力の大きい QTL を検出することができず、日本型品種における子葉鞘伸長性の改良にインド型品種を用いる困難性を指摘した。また、優れた子葉鞘の低温伸長性を示す「Italica Livorno」などのヨーロッパ品種と日本品種との間の RFLP マーカーの多型頻度は、「Kasalath」等のインド型品種と日本品種との間の多型頻度の 39% にすぎず (佐藤ら 1999)、現在のところ、ヨーロッパ品種の有する子葉鞘の低温伸長性に関する QTL 解析は難しい。

水中では子葉鞘のみが伸長することが報告されており (Takahashi 1978)、蒸留水を満たした試験官を用いることによって、子葉鞘の低温伸長性の評価が可能と思われる。本章では、ヨーロッパ品種の有する優れた子葉鞘の低温伸長性を日本品種に導入することを目的として、試験官を用いた選抜を伴う戻し交配により、苗立ち性向上のための子葉鞘の低温伸長性に優れた中間母本の育成を試みた。

また、苗立ち性向上のための育種においては、手間のかかる圃場での選抜が行われており、効率的に多検体の検定を可能とする簡易検定法の開発が望まれる。本章では、苗立ち性向上のための簡易検定法の確立を目的として、試験管を用いた子葉鞘の低温伸長性評価の有効性を確認した。

材料および方法

1. 供試材料

極早生、良食味の日本品種「きたいぶき」とポルトガル原産の品種「Arroz da Terra」を用いた。「きたいぶき」は北海道における良食味の直播用極早生品種である (前田ら 1996)。「Arroz da Terra」は優れた子葉鞘の低温伸長性を有するが (Ogiwara and Terashima 2001)、やや大粒で外観品質が悪く、少収という劣悪形質を持つ (表 11)。

2. 子葉鞘の低温伸長性の評価

子葉鞘の低温伸長性の評価は田中ら (1988) の方法を参考にした。出穂後 40 日目に収穫した種子を 45 の通風乾燥器で 7 日間処理し、種子休眠を打破した。その後、種子を浸漬し、幼芽が 1mm に達するまで 25 で放置した。暗黒条件下、15 一定の人工気象器内の滅菌水を満たした長さ 20cm の試験管の底に発芽種子を入れた。7 日後に子葉鞘の長さを測定し、低温伸長性を評価した。戻し交配育種の各世代における選抜に、試験管による子葉鞘の低温伸長性の評価を用いた。

3. 戻し交配育種による子葉鞘の低温伸長性の導入過程

「Arroz da Terra」の持つ子葉鞘の伸長性を「きたいぶき」へ導入するための戻し交配育種過程を図 24 に示した。1994 年に「Arroz da Terra」を母、「きたいぶき」を父とする人工交配を行った。同年、冬に温室で F₁ を栽培し F₂ 種子を採種した。1995 年に F₂ 132 個体から子葉鞘の低温伸長性に優れる 1 個体を選抜し、「きたいぶき」を反復親として交配した。1996 年から 1997

表 11 「Arroz da Terra」と「きたいぶき」の湛水直播栽培における農業特性

年次	品種名	出穂期	成熟期	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	全量 (kg/a)	玄米重 (kg/a)	千粒重 (g)	玄米の ¹⁾ 外観品質
1994	Arroz da Terra	8月7日	9月18日	73	15.1	535	131.0	36.8	26.3	8.0
	きたいぶき	8月5日	9月18日	64	15.4	589	122.0	54.4	22.4	3.0
1999	Arroz da Terra	8月21日	-	79	13.7	684	160.0	9.2	20.8	9.0
	きたいぶき	8月18日	10月13日	68	15.1	803	149.0	49.2	20.8	3.0

¹⁾ 1(上の上)・9(下の下)(井上 1995)

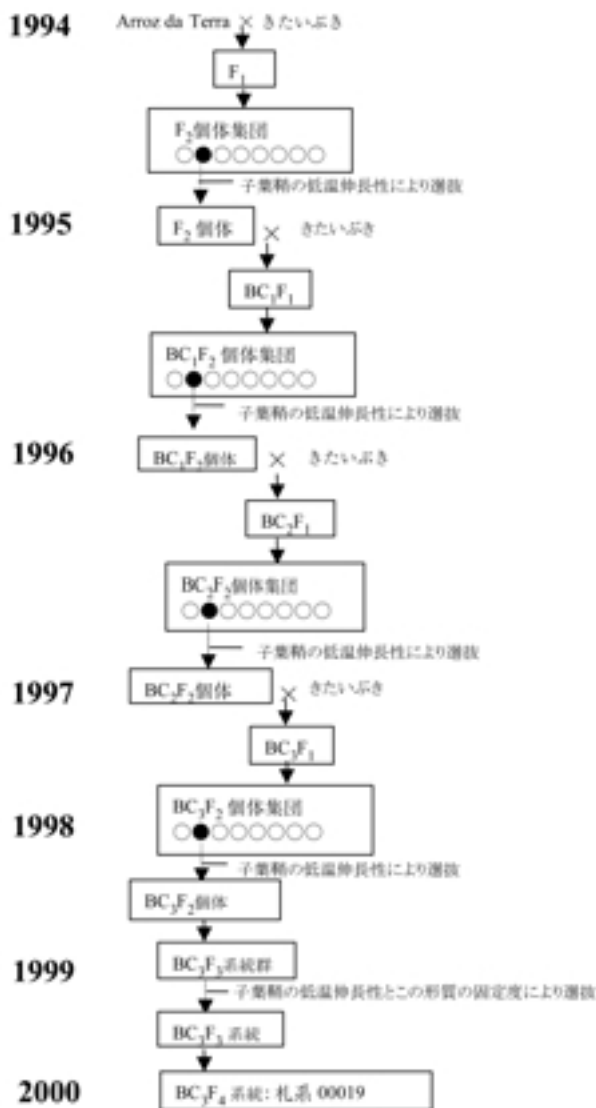


図24 戻し交配育種による子葉鞘の低温伸長性の導入過程

年には、同様に F₂ 集団からの選抜と選抜個体への反復親の交配を繰り返した。1998 年には BC₃F₂100 個体から伸長性に優れる 13 個体を選抜し、1999 年にはこれらから養成した BC₃F₃13 系統のうち、子葉鞘の伸長性と諸形質の固定度により、1 系統を選抜した。2000 年には、この系統を BC₃F₄ 世代で「札幌系 00019」と命名し、湛水直播栽培試験に供試した。

4. 湛水直播栽培試験

湛水直播栽培試験を2000年5月下旬に北海道農業試験場の試験圃場で行った。「札幌系 00019」、「きたいぶ

き」、「Arroz da Terra」の種子を、15 ~ 20 で4日間浸漬し、その後、32 で1日間処理し、催芽させた。試験は分割区法、2反復で行い、1反復は4.8m²、0.3m間隔の4列の試験区よりなる。施肥は全量基肥とし、成分でN、P₂O₅、K₂Oをそれぞれ1、1.21、0.56 kg/a施用した。5月16日に、耕起、代掻きをした圃場表面に種子を400粒/m²の密度で徒手により条播し、播種7日後に湛水した。播種30日後に各区、2列において出芽した幼植物数を数え、播種粒数を基に苗立ち率を算出した。苗立ち率の品種間差の有意性検定はSAS(SAS Institute 1989)による最小有意差(LSD)の検定により行った。また、各区、2.4m²の坪刈りを行い、「札幌系 00019」と「きたいぶき」の農業形質を比較するための収量試験を行った。「Arroz da Terra」は成熟が遅く、未登熟であったため、収量試験から除外した。

「札幌系 00019」と「きたいぶき」の食味を比較するための食味試験は、「ほしのゆめ」を基準品種として行った。「ほしのゆめ」は北海道における中生品種に属し、直播栽培では熟期が遅く、収穫できないため、食味試験用の材料は移植栽培により生産した。5月23日に、5葉期の苗を2本植えて、33.3cm × 12.5cmの栽植密度で移植した。施肥量および施肥時期は直播栽培に準じた。食味試験の方法は福井・小林(1995)に準じた。

結 果

F₂ 個体集団および BC₃F₃ 系統群における子葉鞘の長さに関する頻度分布を図25に示した。「きたいぶき」および「Arroz da Terra」の子葉鞘の長さは、それぞれ20mmおよび26mmであった。F₂ 個体集団における子葉鞘の長さは6mm ~ 35mmの範囲で連続分布を示し、長短両方向に超越分離が認められた。また、子葉鞘の長さについての選抜と「きたいぶき」を反復親とする戻し交配により養成された13のBC₃F₃系統群から選抜した1系統内の20個体において、79%の個体が「きたいぶき」より長い子葉鞘を示し、選抜の効果が確認された。

「札幌系 00019」、「きたいぶき」、「Arroz da Terra」の子葉鞘の長さとの湛水直播栽培における苗立ち率を表12に示した。「札幌系 00019」、「きたいぶき」、「Arroz da Terra」

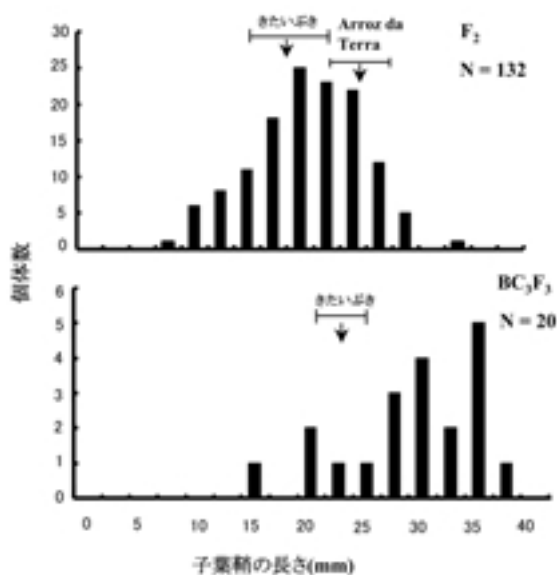


図 25 F₂ 個体群および BC₃F₃ 個体群における子葉鞘の長さに関する頻度分布

矢印および範囲は、それぞれ平均値と標準偏差を示す。

の子葉鞘の長さはそれぞれ、23.6mm、11.4mm、27.2mm であり、これらの間の差は有意であった ($P < 0.05$)。また、「札系 00019」、「きたいぶき」、「Arroz da Terra」の湛水直播栽培における苗立ち率は、それぞれ、76.4%、57.6%、70.2% であり、これらの間の差は有意であった ($P < 0.05$)。以上より、子葉鞘の伸長性が湛水直播栽培における苗立ち率の向上に寄与することが示された。

表 12 「札系 00019」、「きたいぶき」、「Arroz da Terra」の子葉鞘の長さおよび湛水直播栽培における苗立ち率

品種名 系統名	子葉鞘の長さ(mm) ¹⁾	苗立ち率(%) ²⁾
札系 00019	23.6 ^{b 3)}	76.4 ^a
きたいぶき	11.4 ^c	57.6 ^b
Arroz da Terra	27.2 ^a	70.2 ^{ab}

¹⁾ 暗黒および水中条件下で、15、7 日後の子葉鞘の長さ

²⁾ 湛水直播栽培における苗立ち率

³⁾ 表中の a, b, c において、同一の文字の場合は、最小有意差 (LSD) による検定において有意水準 5% で差が認められないことを示す。

「札系 00019」および「きたいぶき」の農業形質の比較を表 13 に示した。「札系 00019」の玄米千粒重は「きたいぶき」より重かった。「札系 00019」の食味評価はやや「きたいぶき」より優った。「札系 00019」の外観品質は、腹白米の発生が多く、「きたいぶき」よりやや劣った。滝田 (1985) は、粒の幅の大きい品種は、腹白米の発生などの登熟障害を受けやすいことを報告した。「札系 00019」にみられる腹白米の発生はその大粒性によるものと推測される。しかし、出穂期や収量性のような他の重要形質においては、両者の間に差は認められなかった。

考 察

本章において、試験管による子葉鞘の低温伸長性の選抜を行い、子葉鞘の低温伸長性に関する「きたいぶ

表 13 「札系 00019」と「きたいぶき」の農業特性の比較

品種名	出穂期	成熟期	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本/m ²)	全重 (kg/a)
きたいぶき	8 月 4 ± 0.7 日	9 月 10 ± 0.7 日	69 ± 2	15.3 ± 1.6	767 ± 24	131.7 ± 7.7

品種名	玄米重 (kg/a)	千粒重 (g)	外観品質		食味 ⁴⁾ 評価値
			腹白 ²⁾	総合 ³⁾	
札系 00019	50.0 ± 0.6	23.4 ± 0.1	2.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	-0.45*
きたいぶき	46.7 ± 1.2	20.6 ± 0.1	0.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	-0.80**

¹⁾ 2 反復の平均値 ± 標準偏差

²⁾ 0 (無)5 (甚)(井上 1995)

³⁾ 1 (上の上)9 (下の下)(井上 1995)

⁴⁾ 標準品種である「ほしのゆめ」を 0 として、-5 (極端に不良) -5 (極端に良) で評価した。* および ** は、それぞれ分散分析において有意水準 5% および 1% で標準品種との間に差があることを示す。

き」の準同質遺伝子系統「札系 00019」を戻し交配により育成した。「札系 00019」は反復親の「きたいぶき」より苗立ち率が優った。このことから、寒地における湛水直播栽培での苗立ちの向上には、子葉鞘の低温伸長性についての選抜が有効であることがわかり、試験管を用いた子葉鞘の伸長性の評価が苗立ち性についての簡易検定法として利用しうることを確認した。

楠淵(1981)は外国品種の持つ直播適性を日本品種に導入するための育種法の必要性を指摘した。山本(1990)は、寒地における直播適性品種育成の第1段階として、高い苗立ち率を有する中間母本の育成が必要であることを述べた。本章において、高い苗立ち性をもつ「札系 00019」を戻し交配により育成した。「札系 00019」は「きたいぶき」より玄米の外観品質はやや劣るものの、食味、出穂期、収量等の主要な農業形質に関しては「きたいぶき」と差が認められなかった。このことより、ヨーロッパ品種の有する子葉鞘の低温伸長性のみを日本品種に導入にするための戻し交配の有用性を確認した。また、2001年より「札系 00019」は「北海 PL8」と命名され、直播適性品種育成のための中間母本として都道府県の水稲育種関係試験研究機関に配布された。

子葉鞘の低温伸長性の他に、湛水直播栽培における苗立ちに関わる要因として、低温発芽性(佐々木 1974)、種子根の土壌貫入性(Inoue et al. 1997)、酸素欠乏耐性(Sasahara and Ikarashi 1989)、葉の緑化の遅速(趙・高橋 1999)が報告されている。これらの要因が相互に作用して、苗立ちに影響を及ぼすと思われる。これら要因の個別の影響を確かめるためには、各要因に関する準同質遺伝子系統を育成し、反復親と比較することが必要である。本章では、子葉鞘の低温伸長性に関する「きたいぶき」の準同質遺伝子系統「札系 00019」を用いることにより、湛水直播栽培の苗立ちに対する子葉鞘の低温伸長性の寄与を確認した。

本章において、「札系 00019」の玄米千粒重は「きたいぶき」より重かった。Li and Rutger (1980)は、低温下での幼植物の生長力と粒重との間の相関を報告した。寒地における湛水直播栽培用品種の外観品質の向上をはかるためには、粒重と子葉鞘の低温伸長性との間の相関を克服する必要がある。この問題について、

秋田ら(1998)は、日本品種間においては、胚重と苗立ち率との間の相関が認められないことを報告し、胚が小さく、外観品質の良い日本型の直播適性品種育成の可能性を示唆している。

本章において、子葉鞘の長さについての F_2 個体集団における頻度分布は、連続分布を示し、長短両方向に超越分離が認められた。Li and Rutger (1980)は、イネにおける幼植物の低温生長は、少なくとも4~5個の優性の遺伝子により支配されていることを報告した。本章での頻度分布はLi and Rutger (1980)の報告を支持するものであり、子葉鞘の低温伸長性は複数の遺伝的要因に支配されることが推測された。しかしながら、この形質に関する詳しい遺伝的な機構は解明されていない。本章で育成された子葉鞘の低温伸長性に関する準同質遺伝子系統は直播適性品種育成のみならず、子葉鞘の低温伸長性に関する遺伝的および生理的機構の解明に役立つことが期待される。

第4章 総合考察

現在、我が国において低温発芽性の改良に広く用いられている母本は、小高・安部(1989)が報告した「Italica Livorno」、「Arroz da Terra」などヨーロッパ品種の一部にすぎない。本研究における種子休眠の影響を除いた遺伝資源の再評価によって、従来、低温発芽性が低と評価されていたインド型品種の中にも、低温発芽性に極めて優れる有用品種が多数存在することが明らかとなり、低温発芽性の改良に利用しうる新たな遺伝資源を発掘した。特に、インド原産の品種「Kasalath」は、ヨーロッパ品種に匹敵する低温発芽性を有する。本研究では、「Kasalath」の有する低温発芽性に関するQTLを検出し、近接するRFLPマーカーを明らかにした。強い2次休眠誘導性を有する「Kasalath」を母本とした交配後代から、表現型によって低温発芽性に優れる個体を選抜することは難しいが、低温発芽性に関するQTLに近接するRFLPマーカーを指標とする選抜は簡易検定法として有効であり、「Kasalath」から低温発芽性を支配する遺伝領域のみを日本品種に導入しうる。

また、種子の貯蔵性に関する遺伝資源の検索を行

い、インド原産品種の種子の寿命が長いことを確かめた。池橋（1973）は、インドにおいて、休眠の弱い春イネ群品種は夏イネ群品種より寿命が長いこと、また、休眠形成が弱いにもかかわらず、寿命は比較的長いという「IR-8」や「Tadukan」など一群の品種が存在することを示し、極端に強い休眠性と切り離して長期間の種子の保存に適する品種の育成が可能であることを示唆した。本研究では、「Kasalath」の優れた種子の貯蔵性に関して、休眠性を支配する領域とは異なる作用力の大きいQTLを検出し、近接するRFLPマーカーを明らかにした。Yano and Sasaki（1997）は複数の有用形質に連鎖するRFLPマーカーを組み合わせることで、これらを同時に選抜できることを報告した。本研究で明らかにした有用なRFLPマーカーを組み合わせる評価・選抜により、「Kasalath」から随伴する劣悪形質を排除しつつ、低温発芽性および種子の貯蔵性を同時に日本品種に導入することが可能になる。また、RFLPマーカーの塩基配列を基にPCRマーカーを作成することにより、極めて少量のサンプルによる選抜が可能となり、選抜の効率化が進むものと思われる。

最近、遺伝地図情報を利用した実用形質に関する遺伝子の単離（矢野 2001）が進み、トマトにおける果重と収量（Frery et al. 2000）、イネにおける出穂期（Yano et al. 2000）に関する遺伝子が単離されている。本研究で検出したイネの低温発芽性および種子の貯蔵性に関するQTLについて、高精度連鎖解析によるDNAマーカー連鎖地図上への位置付けを進めることにより、両形質に関する遺伝子の単離が可能になると思われる。イネの低温発芽性について、胚部のカタラーゼ活性との関係が報告されており（Tanida 1996）、イネのカタラーゼ遺伝子を形質転換により導入し、この遺伝子を過剰発現させて低温発芽性を向上させることに成功している（伊藤ら 1999）。qLTG-2、qLTG-4-1、qLTG-11における遺伝子の単離により、これらQTLの作用とカタラーゼ遺伝子との関係が明らかになることも含め、今後、低温発芽性に関する遺伝子発現の機構の解明が進むことが期待される。

Roberts（1972）は、種子の活性低下の原因を、外因として放射線や微生物などの影響、内因として、生長

抑制物質など有毒物質の蓄積、核酸、タンパク質、膜など高分子の変性、新陳代謝物質の消耗に整理して説明している。しかし、特に内因については未だ明らかになっていない。単独で強い作用を持つqLG-9における遺伝子が単離され、作用が明らかにされることにより、種子の活性維持の機構が明らかにされることが期待される。また、遺伝子の塩基配列を基に作成したDNAマーカーによる遺伝子診断により、遺伝資源における種子の寿命の予測が可能になり、ジーンバンクでの遺伝資源の再増殖の効率化に役立つことが期待される。

本研究では、ヨーロッパ品種「Arroz da Terra」の子葉鞘の低温伸長性を表現型による選抜と戻し交配によって日本品種に導入することに成功した。子葉鞘の低温伸長性に関する「きたいがき」の準同質遺伝子系統である「北海PL8」は、食味および収量性を低下させることなく、子葉鞘の低温伸長性のみを改良する中間母本として、直播適性品種育成に役立つものと期待される。

現在、「コシヒカリ」を主とする良食味品種の作付けは全体の90%を占めると推定される。直播適性品種が普及するためには、消費者のニーズに合わせた良食味性を有することが必要条件となる（古川 2000）。一方、外国品種を単交配による品種育成に用いた場合、食味不良などの劣悪形質の随伴によって、後代は育成途中で棄却される場合が多く、現在、外国品種由来の直播適性を導入した普及品種は育成されていない（堀末 1995）。本研究の成果から、まず、日本品種間の交配から早生、良食味、耐倒伏性強、耐冷性強の優良系統を育成し、その系統を反復親とする戻し交配により、外国品種から、低温発芽性、貯蔵性および子葉鞘の低温伸長性のみを簡易検定法としてのMASを利用しつつ導入するという明確な直播適性品種育成に関する育種戦略を提示できた。本研究が直播適性品種育成の一助となって、直播栽培の確立による稲作の省力化が実現されることにより、我が国の稲作が将来にわたって維持されることを願ってやまない。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導ならびに原稿校閲の労をとっていただきました東北大学大学院農学研究科教授国分牧衛博士ならびに同研究科教授西尾剛博士、南條正巳博士に対しまして厚く感謝いたします。この研究を行うにあたり、終始あらゆる面でご指導くださいました農業生物資源研究所・ジーンバンク・ジーンバンク長宮崎尚時博士、上席研究官長峰司博士、ならびに同研究所・分子遺伝研究グループ・応用遺伝研究チーム長矢野昌裕博士に心から感謝の意を表します。また、貴重な材料をご分譲いただきました本田技術研究所林少揚博士、富山県農業技術センター・農業試験場・作物課蛭谷武志主任研究員に心から感謝の意を表します。「北海 PL8」の試験にご協力いただきました北海道農業研究センター・作物開発部・稲育種研究室安東郁男室長、清水博之主任研究官、黒木慎研究員に厚くお礼申し上げます。貴重なご助言をいただきました北海道農業研究センター・地域基盤研究部長・奥野員敏博士ならびに作物研究所・企画調整室長荒木均博士に心から感謝の意を表します。また、植物資源研究チームの同僚、石井卓郎主任研究官、江花薫子博士、福岡修一博士、ならびに、業務科職員および非常勤職員の方々には実験の遂行にあたり多大な協力と助言をいただきました。ここに記して深く感謝いたします。

摘 要

我が国における水稻直播適性品種の育成を目的として、外国品種の有する直播適性を、随伴する劣悪形質を排除しつつ日本品種へ導入するための育種法を確立するために、低温発芽性および種子の貯蔵性に関する DNA マーカーを指標とする選抜のための QTL の検出、さらに、子葉鞘の低温伸長性に関する中間母本の開発を行った。以下にその概要を述べる。

1. インド型品種の一部には、1 次休眠が破れた後に、吸水した種子が一定期間低温下に置かれると、その後、常温に戻されても発芽が認められない現

象、すなわち、2 次休眠誘導性を有する品種がある。2 次休眠は、8 ~ 19 の温度範囲で誘導されることがわかり、低温発芽性に関する評価に影響を及ぼすことが明らかとなった。

2. 2 次休眠誘導性品種の検索を行い、低温発芽性が極低と評価された品種グループ内に 2 次休眠誘導性を有する品種が含まれることがわかり、それらは「Kasalath」などのインド原産の品種であった。
3. イネ種子において、穎が除去された状態でも 2 次休眠は誘導され、また、2 次休眠状態にある種子の胚の表面の果皮および種皮を除去することにより、2 次休眠は打破された。以上より、イネ種子における 2 次休眠誘導に関して、果皮および種皮が重要な役割を果たすことがわかった。
4. 2 次休眠の誘導程度は種子の登熟期の温度条件に大きな影響を受け、高温で登熟した種子は、より強度の 2 次休眠を誘起することがわかった。従って、低温発芽性の評価から 2 次休眠の影響を除くための打破処理について、品種あるいは採種年次ごとに、その貯蔵処理期間を検討する必要があることを明らかにした。
5. 過去に低温発芽性が評価された品種について、種子休眠の影響を除くための貯蔵処理期間を検討しつつ、低温発芽性に関する再評価を行った。従来の評価で高と評価された品種グループ内では、最高発芽速度が高い品種の頻度が高かった。また、低と評価された品種グループは、最高発芽速度が高い品種と低い品種に分かれ、前者は、主に、インド、中国、韓国の中のインド型品種であり、これらの最高発芽速度は低温発芽性改良のための母本として育種に広く用いられている「Italica Livorno」、「Arroz da Terra」に匹敵し、日本品種より明らかに速かった。
6. インド型品種の有する低温発芽性を日本品種に導入するための DNA マーカーを指標とする選抜を確立するために、インド型品種「Kasalath」および日本型品種「日本晴」と、「Kasalath」に「日本晴」を戻し交配して得られた戻し交雑自殖系統(BIL) (BC₁F₉)、98 系統および、各系統の RFLP マーカーの多型情報を用い、低温発芽性に関する QTL の検出を試みた。その結果、第 2 染色体の RFLP マーカー G1327、第

- 4 染色体の C946 および C513, 第5 染色体の R830 第 11 染色体の G1465 近傍に低温発芽性に関する QTL を検出し, それぞれ, qLTG-2, qLTG-4-1, qLTG-4-2, qLTG-5, qLTG-11 と命名した. qLTG-2, qLTG-4-1, qLTG-11 においては「Kasalath」型の対立遺伝子が, qLTG-4-2 と qLTG-5 においては「日本晴」型の対立遺伝子が低温発芽性を高めた. さらに, 検出された QTL に関する染色体断片置換系統および個体集団を用いて, 各 QTL の効果を確認した.
7. 採種時の刈り遅れや劣悪な貯蔵条件によって生じる種子の発芽力の低下は直播栽培での苗立ちの確保の上で大きな問題となるため, 直播適性品種が具備すべき特性として種子の貯蔵性の改良は必要である. 種子の貯蔵性に関する遺伝資源の検索を行った結果, 育種および遺伝解析の母本として, インド原産の品種が有望であることがわかった.
8. インド原産の品種の有する種子の貯蔵性を日本品種に導入するための DNA マーカーを指標とする選抜を確立するために, インド型品種「Kasalath」および日本型品種「日本晴」と, 「Kasalath」に「日本晴」を戻し交配して得られた戻し交雑自殖系統(BIL)(BC₁F₉), 98 系統および, 各系統の RFLP マーカーの多型情報を用い, 種子の貯蔵性に関する QTL の検出を試みた. その結果, 第2 染色体の RFLP マーカー C1470, 第4 染色体の R514, 第9 染色体の R79 近傍に位置付けられ, それぞれ, qLG-2, qLG-4, qLG-9 と命名された. これらの QTL において, 「Kasalath」型の対立遺伝子が発芽歩合を高め, 特に, qLG-9 は効果が大きく, 全体の変異の 59.5% を説明した. これらの QTL は 1 次休眠に関与する QTL と位置が異なるため, 種子の貯蔵性と 1 次休眠が異なる遺伝領域により支配されていることがわかった. さらに, 検出された QTL を単独で有する染色体断片置換系統を用いて, qLG-9 の影響を確認した.
9. 試験管を用いた子葉鞘の低温伸長性の選抜と戻し交配により, この形質に関する準同質遺伝子系統「札系 00019」を育成した. 「札系 00019」は反復親の「きたいぶき」より苗立ち率が優った. このことから, 寒地における湛水直播栽培での苗立ちの向上には, 子葉鞘の低温伸長性についての選抜が有効であ

ることがわかり, 試験管を用いた子葉鞘の低温伸長性の評価が苗立ち性についての簡易検定法として利用しうることを確認した. 「札系 00019」は「北海 PL8」と命名し, 直播適性品種育成のための中間母本として都道府県の水稲育種関係試験研究機関に配布した.

以上の結果にもとづき, 外国品種由来の直播適性を日本品種に導入するため育種法として, DNA マーカーによる選抜を伴う戻し交配を提示し, 直播適性品種育成のための育種戦略について論じた.

引用文献

- 秋田重誠, 尹炳星, 椛木信幸 1998 低温, 湛水土壤中下でのイネの出芽速度と胚重の関係. 日作紀 67: 318-322
- Carnahan HL, Erickson JR, Mastenbroek JJ 1972 Tolerance of rice to cool temperatures-USA. In Rice Breeding, Int Rice Res Inst, Los Banos, Philippines 535-540
- Chang TT 1991 Findings from a 28-yr seed viability experiment. Int Rice Res News 16: 5-6
- David BJ, Peterson ML 1976 Rice seedling vigor at sub-optimal temperatures. Crop Sci 16: 102-105
- 蛭谷武志, 竹内善信, 山本敏英, 矢野昌裕 2000 Kasalath の染色体断片をコシヒカリに導入したイネ置換系統群の育成. 育種学研究 (別 1): 64
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH 1992 The low-moisture-content limit to the negative logarithmic relation between seed longevity and moisture content in three subspecies of rice. Ann Bot 69: 53-58
- Ellis RH, Hong TD, Jackson MT 1993 Seed production environment, time of harvest, and the potential longevity of seeds of three cultivars of rice. Ann Bot 72: 583-590
- Esashi Y, Leopold AC 1968 Physical forces in dormancy and germination of *Xanthium* seeds. Plant Physiol 43: 871-876
- Evett LL, Burnside OC 1972 Germination and seedling development of common milkweed and other

- species. *Weed Sci* 20: 371-378
- Fenner M 1991 The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Sci Res* 1: 75-84
- Frary A, Nesbitt TC, Frary A, Grandillo S, van der Knaap E, Cong B, Lin J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD 2000 *fw22*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 289: 85-88
- 藤井 潔, 久保田重正, 小松勝夫, 朱宮昭男, 工藤 悟 1992 水稲湛水直播における出芽, 苗立ちの生態種及び品種間差異と最適催芽程度の解明. *愛知農総試研報* 24: 1-9
- 福井清美, 小林 陽 1995 食味官能検査 山本隆一, 堀末 登, 池田良一共編 *イネ育種マニュアル*. 農研センター研究資料 30: 74-76
- 福岡律子, 西村 実, 小川紹文, 梶 亮太, 平林秀介, 深浦壮一 1999 低温発芽性の水稲良食味品種への導入. *日作紀* 68: 231-234
- 古川嗣彦 2000 寒冷地における直播栽培技術の現状と展望 5. 乾田直播栽培技術(4) 技術開発の今後の展望. *北農* 67: 157-159
- Glaszmann JC 1987 Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor Appl Genet* 74: 21-30
- Harlan HV, and Pope MN 1922 The use and value of back-crosses in small-grain breeding. *J Hered* 13: 319-322
- 林 満, 日高洋一郎 1979 稲種子の休眠性および発芽性に関する研究 登熟中並びに収穫後の温度条件が種子の休眠および穎の変性に及ぼす影響. *鹿大農学術報告* 29: 21-32
- 堀末 登 1995 直播適性水稲品種の開発. *直播稲作研究の最前線* 第2巻 農林水産技術情報協会, 東京 115-131
- Ikeda M 1963 Studies on the viviparous germination of rice seed. *Bull Fac Agr Kagoshima Univ* 13: 89-115
- 池橋 宏 1973 稲の発芽諸特性の品種間差異および環境変動に関する育種学的研究. *農事試研報* 19: 1-60
- Ikuma H, Thimann KV 1963 The role of the seed coats in germination of photosensitive lettuce seeds. *Plant Cell Physiol* 4: 169-185
- 井上正勝 1995 玄米外觀品質 *イネ育種マニュアル* 山本隆一, 堀末登, 池田良一共編 農研センター研究資料 30: 115-118
- Inoue N, Amano T, Khoko K 1997 Seedling establishment of rice sown on soil surface in flooded paddy field. Varietal difference in seedling establishment. *Jpn J Crop Sci* 66: 632-639
- 伊藤美奈子, 竹澤利和, 亀谷七七子, 神崎洋之, 寺内良平, 中村郁郎 1999 *イネカタラーゼ遺伝子の過剰発現による低温耐性イネの作出*. *育種学研究* 1(別2): 60
- 伊藤隆二 1962 直播機械化栽培用水稲品種の改良と問題点. *農業技術* 17: 360-365
- Juliano BO, Perez CM, Chang TT (1990) Varietal differences in longevity of tropical rough rice stored under ambient conditions. *Seed Sci and Technol* 18: 361-369
- Junttila O 1973 Seed and embryo germination in *Syringa vulgaris* and *S reflexa* as affected by temperature during seed development. *Physiol Plant* 29: 264-268
- Justice O Land Bass LN 1978 Principles and practices of seed storage. USDA Agricultural Handbook No506, Washington, D C
- 椛木信幸, 金 忠男 1990 *イネの初期生育に関する生理的要因の解明* 1 各生育段階における生長速度の品種間差異. *北陸作物学会報* 25: 25-27
- Kameswara Rao N, Jackson MT 1997 Variation in seed longevity of rice cultivars belonging to different isozyme groups. *Genet Res Crop Evol* 44: 159-164
- 川合通資 1984 中国稲種ならびに日本稲幼植物の生育解析に関する研究. *愛媛大学農学部紀要* 29: 115-167
- Kigel J, Ofir M, Koller D 1977 Control of the germination responses of *Amaranthus retroflexus* L seeds by their parental photothermal environment. *J Exp Bot* 28 (106): 1125-1136
- 小林 陽 1992 直播適性 榑淵欽也監修 日本の稲育種. 農業技術協会, 東京 243-252

- 小高真一, 安部信行 1989 低温条件下における出芽, 苗立の安定機構の解明. 農林水産技術会議事務局 研究成果 229 : 8-23
- 古原 洋, 菅原圭一 1998 水稲直播用極早生品種の採種栽培における育苗法. 北海道立農試集報 75 : 1-6
- Kordan HA 1977 Coleoptile emergence in rice seedlings in different oxygen environments. Ann Bot 41: 1205-1209
- Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K, Harushima Y, Sue N, Wu J, Antonio BA, Shomura A, Shimizu T, Lin SY, Inoue T, Fukuda A, Shimano T, Kuboki Y, Toyama T, Miyamoto Y, Kirihara T, Hayasaka K, Miyao A, Monna L, Zhong HS, Tamura Y, Wang ZX, Momma T, Umehara Y, Yano M, Sasaki T, Minobe Y 1994 A 300-kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. Nature Genet 8: 365-372
- 榑淵欽也 1981 直播栽培におけるイネ品種の生態と育種への応用. 農事試研報 35 : 1-50
- Lander ES, Botstein D 1989 Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185-199
- Li CC, Rutger JN 1980 Inheritance of cool-temperature seedling vigor in rice and its relationship with other agronomic characters. Crop Sci 20: 295-298
- 李弘柘, 田口啓作 1969 稲種子の低温発芽性に関する研究 第 報 低温発芽性の品種間差異および親植物の栽培環境の影響. 北大農学部紀要 7 : 63-71
- Lin HX, Yamamoto T, Sasaki T, Yano M 2000 Characterization and detection of epistatic interactions of 3 QTLs, *Hd1*, *Hd2*, and *Hd3*, controlling heading date in rice using nearly isogenic lines. Theor Appl Genet 101: 1021-1028
- Lin SY, Sasaki T, Yano M 1998 Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L, using backcross inbred lines. Theor Appl Genet 96: 997-1003
- Lincoln S, Daly M, Lander ES 1992 Mapping Genes Controlling Quantitative Traits with MAPMAKER/QTL 11. Whitehead Institute Technical Report, 2nd ed Massachusetts
- 前田 博, 相川宗殿, 柳川忠男, 佐々木一男, 田縁勝洋, 丹野 久, 菅原圭一, 吉田昌幸, 菊地治巳 1996 水稲新品種「きたいぶき」の育成について. 北海道立農試集報 71 : 49-63
- Mayer AM, Poljakoff-Mayber A 1982 The germination of seeds - 3rd ed Pergamon Press Oxford
- Mikkelsen DS, Sinah MN 1961 Germination inhibition in *Oryza sativa* and control by preplanting soaking treatment Crop Sci 1: 332-335
- Miura K, Araki H 1996 Low temperature treatment during the imbibition period for the induction of secondary dormancy in rice seeds (*Oryza sativa* L) Breed Sci 46: 235-239
- Miura K, Araki H 1999 Effect of temperature during the ripening period on the induction of secondary dormancy in rice seeds (*Oryza sativa* L). Breed Sci 49: 7-10
- Miura K, Lin SY, Yano M, Nagamine T 2001 Mapping quantitative trait loci controlling low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L). Breed Sci 51: 293-299
- Miura K, Lin SY, Yano M, Nagamine T 2002 Mapping quantitative trait loci controlling seed longevity in rice (*Oryza sativa* L). Theor Appl Genet 104: 981-986
- Miura K, Kuroki M, Shimizu H, Ando I 2002 Introduction of the long-coleoptile trait to improve the establishment of direct-seeded rice in submerged fields in cool climates. Plant Prod. Sci. 5 (3): 219-223
- Morishima H, Oka HI 1981 Phylogenetic differentiation of cultivated rice, XXII Numerical evaluation of the *indica-japonica* differentiation. Jpn J Breed 31: 402-413
- Murray MG, Thompson WF 1980 Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res 8: 4321-4325
- 永松士巳 1943 栽培稲の地理的分化に関する研究 種生態学に見たる発芽性の分化について.

- 遺伝雑 19 : 47-56
- 西川五郎, 三上藤三郎 1945 低温発芽に関し, 日本
水稲稈, 中国水稲稈, 同種および印度稲の比較.
日作紀 15 : 38-41
- Ogiwara H, Terashima K 2001 A varietal difference in
coleoptile growth is correlated with seedling
establishment of direct seeded rice in submerged
field under low-temperature conditions. Plant Prod
Sci 4: 166-172
- 岡 彦一 1954 稲種子の発芽最低温度と温度恒数の
品種間差異. 育雑 4(3): 140-144
- 岡 彦一, 蔡国海 1955 稲種子の休眠と寿命に関す
る品種間差異. 育雑 5 : 22-26
- 太田保夫, 竹村儀子 1970 米穀の貯蔵と種子の休眠
性. 農業技術 25 : 218-222
- Redona ED, Mackill DJ 1996 Mapping quantitative trait
loci for seedling vigor in rice using RFLPs. Theor
Appl Genet 92: 395-402
- Roberts EH 1961 Dormancy in rice seed II The influence
of covering structures. J Exp Bot 12: 430-445
- Roberts EH 1962 Dormancy in rice seed III The influence
of temperature, moisture and gaseous environment.
J Exp Bot 13: 75-94
- Roberts EH 1963 An investigation of inter-varietal
differences in dormancy and viability of rice seed.
Ann Bot 27: 365-369
- Roberts EH 1972 Storage environment and the control
of viability In Roberts, E H ed. "Viability of Seeds"
Chapman and Hall, London, pp14-58
- SAS Institute 1989 SAS/STAT user's guide: version 6,
vol 2, 4th ed. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina
- Sasahara T, Ikarashi H 1989 Differences in seedling
emergence and growth among rice (*Oryza sativa* L)
ecospecies under reduced soil conditions. Japan J
Breed 39: 495-498
- 佐藤 毅, 藤野賢治, 木内 均, 菊地治巳, 野々上慈
徳, 竹内善信, 林少揚, 矢野昌裕 1999 「はやま
さり」と「Italica Livorno」から由来する BC1F5
系統群を用いた RFLP 連鎖地図の作成. 育種学研
究 1(別2): 123
- 佐々木多喜雄 1974 稲品種の低温発芽性に関する育
種学的研究. 北海道立農試報 24 : 1-90
- Seshu DV, Sorells ME 1986 Genetic studies on seed
dormancy in rice, In "Rice Genetics" IRRI, Los
Banos 369-382
- Siddique SB, Seshu DV, Pardee WD 1988 Rice cultivar
variability in tolerance for accelerated aging of
seed. IRRI Res Pap Ser 131: 2-7
- 高橋成人 1962 稲種子の発芽に関する生理遺伝学的
研究 とくに発芽を支配する遺伝要因につい
て. 東北大農学研究所彙報 14 : 1-87
- Takahashi N 1978 Adaptive importance of mesocotyl
and coleoptile growth in rice under different moisture
regimes. Aust J Plant Physiol 5: 511-517
- 滝田 正 1985 イネの粒大の遺伝および粒大と諸形
質との関係. 農研センター研報 3 : 55-71
- 田中英彦, 山崎信弘, 天野高久 1988 湛水直播栽培
における低温苗立ち性と低温伸長性の品種間差
異. 日作紀 57(別1) 311-312
- Tanida M 1996 Catalase activity of rice seed embryo
and its relation to germination rate at a low
temperature. Breed Sci 46: 23-27
- Tanksley SD 1993 Mapping polygenes. Annu Rev Genet
27: 205-233
- Webb DP, Wareing PF 1972 Seed dormancy in *Acer
Pseudoplatanus* L: The role of the covering structures.
J Exp Bot 23: 813-829
- Wurzburger J, Koller D 1976 Differential effects of the
parental photothermal environment on development
of dormancy in caryopses of *Aegilops Kotschy*. J
Exp Bot 27: 43-48
- 山本隆一 1990 水稲直播栽培用品種開発の道標. 農
業技術 45 : 385-391
- Yamamoto T, Kuboki Y, Lin SY, Sasaki T, Yano M 1998
Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2*
and *Hd-3*, controlling heading date of rice, as
single Mendelian factors. Theor Appl Genet 97: 37-
44
- Yamamoto T, Lin HX, Sasaki T, Yano M 2000
Identification of heading date quantitative trait locus

Hd6 and characterization of its epistatic interactions with *Hd2* in rice using advanced backcross progeny. *Genetics* 154: 885-891

Yamauchi M, Winn T 1996 Rice seed vigor and seedling establishment in anaerobic soil. *Crop Sci* 36: 680-686

Yano M, Sasaki T 1997 Genetic and molecular dissection of quantitative traits in rice. *Plant Mol Biol* 35: 145-153

Yano M, Harushima Y, Nagamura Y, Kurata N, Minobe Y, Sasaki T 1997 Identification of quantitative trait loci controlling heading date in rice using a high-density linkage map. *Theor Appl Genet* 95: 1025-1032

Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki, T 2000 *Hd1*, a major photoperiod sensitivity QTL in rice, is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell* 12: 2473-2483

矢野昌裕 2001 イネ，マップベースクローニング法 植物細胞工学シリーズ14 植物ゲノム研究プロトコール．監修 佐々木卓治，田畑哲之，島本 功秀潤社 東京 89-94

趙志超，高橋 清 1999 栽培イネ (*Oryza sativa* L) の出芽，苗立ちに關与する 2, 3 の要因．日作紀 68 : 379-384

Summary

Genetical Studies on Germination of Seed and Seedling Establishment for Breeding of Improved Rice Varieties Suitable for Direct Seeding Culture.

Kiyoyuki Miura

Department of Hokuriku Rice Research, NARC
1-2-1 Inada, Joetsu, Niigata, 943-0193, Japan

For the establishment of direct seeding culture to reduce rice production costs in Japan, breeding rice varieties exhibiting a high seedling-stand is a high priority. We recognize three traits to be necessary for

rice varieties with stable seedling establishment; low temperature germinability (LTG), seed longevity and accelerated coleoptile growth. The introduction of these traits from foreign varieties to Japanese elite varieties is necessary to breed varieties for direct seeding culture. However, undesirable traits in foreign varieties, such as, low yielding ability and bad grain appearance, make it difficult. To overcome this difficulty, we tried to establish backcross breeding to introduce these traits with marker-assisted selection (MAS). The objectives of this study were to identify quantitative trait loci (QTLs) for LTG and seed longevity using backcross inbred lines (BILs) derived from a cross between *indica* and *japonica* varieties in order to facilitate MAS of these traits and to confirm the efficiency of backcross breeding to introduce accelerated coleoptile growth into japonica elite varieties from foreign variety. Here the results are summarized.

1 . Conditions of low temperature treatment for the induction of secondary dormancy

Some foreign varieties were able to go through secondary dormancy at low temperature. Secondary dormancy was induced by temperature treatments in the range of 8 to 19 . Therefore, secondary dormancy should be an inevitable problem in case of estimating low temperature germinability.

2 . Screening of varieties able to go through secondary dormancy

81 varieties to be estimated to have a low level of LTG were used to screen the varieties for the induction of secondary dormancy. Among the varieties, 8 varieties were found to go through secondary dormancy. These varieties originated from India.

3 . Role of husk, pericarp and testa in the induction of secondary dormancy

Secondary dormancy was induced at a low temperature even in the dehusked seeds. Peeling of the pericarp and the testa from the dehusked secondary dormant seeds enabled the seeds to completely recover their

germinability. The results indicated that the pericarp and the testa played an important role in the induction of secondary dormancy.

4 . Effect of temperature during the ripening period on the induction of secondary dormancy

The induction of secondary dormancy was affected by the temperature conditions during ripening. A deeper secondary dormancy was induced by high temperature. A preliminary test of breaking of dormancy should be carried out to estimate the low temperature germinability in consideration of the effect of environmental condition, in particular the temperature during the ripening period.

5 . Re-assessment of rice genetic resources for low temperature germinability after removing the effect of seed dormancy

140 varieties previously estimated for LTG were re-assessed. The varieties with high germination rate at low temperature after removing the effect of seed dormancy belonged to *indica* varieties originating from India, China and Korea. Their LTG were, same level as *Italica livorno* and *Arroz da terra* utilized as parent for the improvement of LTG in rice breeding programs, higher than LTG of *japonica* varieties.

6 . Mapping QTLs controlling LTG

QTLs controlling LTG in rice were identified using 98 backcross inbred lines (BILs) derived from a cross between a *japonica* variety *Nipponbare* and an *indica* variety *Kasalath* in order to facilitate MAS of LTG in *japonica* rice varieties. Five putative QTLs, qLTG-2, qLTG-4-1, qLTG-4-2, qLTG-5 and qLTG-11, were detected on chromosome 2 (G1327: nearest marker locus), 4 (two regions, C946 and C513), 5 (R830) and chromosome 11 (G1465). In the case of qLTG-2, qLTG-4-1 and qLTG-11, *Kasalath* alleles increased the LTG, while *Nipponbare* alleles increased it in the case of qLTG-4-2 and qLTG-5. The effects of them were verified by using chromosome segment substitution lines and plants.

7 . Screening of rice genetic resources for seed longevity

162 varieties from all over the world were used. The results of screening showed that the varieties originating from India had long seed longevity and Japanese varieties had poor seed longevity. The varieties originating from India should be suitable as parents for genetic analysis and breeding of seed longevity.

8 . Mapping QTLs controlling seed longevity

QTLs controlling seed longevity in rice were identified using 98 backcross inbred lines (BILs) derived from a cross between a *japonica* variety *Nipponbare* and an *indica* variety *Kasalath* originating from India in order to facilitate MAS of seed longevity in *japonica* rice varieties. Three putative QTLs for seed longevity, qLG-2, qLG-4 and qLG-9, were detected on chromosome 2, 4 and 9, respectively. *Kasalath* alleles increased the seed longevity at these QTLs. QTL with the largest effect, qLG-9, explained 59.5% of total phenotypic variation in BILs. The effect of *Kasalath* allele of qLG-9 was verified by using chromosome segment substitution lines. Based on the comparison of chromosomal location of QTLs for seed longevity and seed dormancy, these traits seem to be controlled by different genetic factors.

9 . Introduction of accelerated coleoptile growth by backcross breeding into Japanese elite rice

A near isogenic line for coleoptile growth, bred by backcross between *Kitaibuki* as the recurrent parent and *Arroz da Terra* as the donor parent, had longer coleoptile and higher seedling establishment rate than *Kitaibuki*. From the results, a large contribution of coleoptile growth to the seedling establishment in direct seeding culture in submerged field under cool condition and the efficiency of the backcross method to introduce accelerated coleoptile growth were confirmed.

From the above experimental data, I conclude that backcross breeding with MAS is effective to introduce genes for adaptability to direct seeding from foreign varieties in Japanese rice breeding programs.

**Miscellaneous Publication of The National Institute of
Agrobiological Sciences**

**No. 2
(March 2003)**

CONTENTS

Miura K

Genetical Studies on Germination of Seed and Seedling Establishment
for Breeding of Improved Rice Varieties Suitable for Direct Seedling
Culture 1

ISSN 1347-9393

平成15年3月1日 印刷・発行

農業生物資源研究所研究資料 第2号

編集・発行 独立行政法人 農業生物資源研究所

〒305-8602 茨城県つくば市観音台2-1-2

電話 029 (838) 7832 (情報資料課)

URL <http://www.nias.affrc.go.jp>

印刷・製本 佐藤印刷株式会社

