

令和 3 年 4 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05589

研究課題名(和文) ダイズ品種「とよみづき」が有する新規な低温裂開抵抗性メカニズムの解明

研究課題名(英文) A novel mechanism of tolerance for cold-induced seed cracking in soybean cultivar Toyomizuki

研究代表者

千田 峰生 (Senda, Mineo)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：30261457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：低温裂開(裂開)が粒肥大最大期における背側種皮のプロアントシアニン蓄積に関与することが報告されている。しかしながら、裂開抵抗性強の「とよみづき」では、背側種皮までプロアントシアニン蓄積が見られた。種皮物性を調査したところ、「とよみづき」では低温による特有の物性変化が見られた。そのため「とよみづき」は新規の裂開抵抗性を有する可能性が示唆された。QTL解析により「とよみづき」の裂開抵抗性遺伝子座を特定した。一方、「とよみづき」の新規裂開抵抗性とは別に毛茸色遺伝子が裂開抵抗性に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄ダイズにおいて、低温による種皮着色(低温着色)が裂開に関与することが示唆されており、実際に低温着色抵抗性遺伝子Icが裂開抵抗性を付与する可能性が高い。しかしながら、Icの導入だけでは裂開抵抗性選抜には不十分であり、新規な裂開抵抗性の探索および導入が必要である。本研究により、裂開抵抗性品種とよみづきが新規裂開抵抗性を有することが示唆された。一方、とよみづきの新規裂開抵抗性とは別に、毛茸色遺伝子Tが裂開抵抗性に関与すること、さらにIcとTを集積することにより、高度の裂開抵抗性が実現できる可能性が示された。強裂開抵抗性品種の開発により、冷涼なオホーツク地域でも安定したダイズ生産が期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that cold-induced seed cracking (SC) is associated with proanthocyanidin (PA) accumulation to the dorsal side of the seed coat at the full-sized seed stage. However, a SC-tolerant cultivar "Toyomizuki" detected PA accumulation to the dorsal side of the seed coat by low temperature treatment. Physical properties of the seed coat were analyzed using a texture analyzer, and specific alteration of the seed coat properties by low temperature was detected in Toyomizuki. From these results, it was suggested that Toyomizuki may have a novel SC tolerance. Furthermore, quantitative trait loci (QTLs) related to the SC tolerance was identified in Toyomizuki by QTL analysis. Meanwhile, we revealed that a pubescence color gene enhances tolerance to SC.

研究分野：作物育種遺伝学

キーワード：ダイズ品種 とよみづき 新規低温裂開抵抗性 量的形質遺伝子座 毛茸色遺伝子

1. 研究開始当初の背景

低温裂開（以降、裂開と省略）とは、開花後数週間の低温により背側種皮が大きく裂け、中身の子葉が剥き出して頻繁に乖離する低温障害である。このような裂開種子（裂開粒）は品質低下がひどく、屑粒として扱われることから、裂開粒の発生は寒冷地におけるダイズの安定生産を損なう。そのため、裂開粒が発生する北海道オホーツク地域のような寒冷地においては低温裂開抵抗性のダイズ品種の育成が必要となる。裂開発生メカニズムとして肥大最大期での背側種皮におけるプロアントシアニジン (PA) 蓄積との関連が示唆されている。そのため、低温でも PA 蓄積を抑制する *Ic* 遺伝子は裂開抵抗性に寄与する。実際、*Ic/Ic* 遺伝子型を有する「十育 248 号」は、裂開抵抗性が強である (Senda et al. 2018)。しかしながら、*Ic* 遺伝子による種皮背側の PA 蓄積抑制だけでは裂開抵抗性には不十分であり、裂開抵抗性の更なる向上のためには裂開抵抗性強のダイズ品種から新規の裂開抵抗性を探索し、導入することが必要である。裂開抵抗性強のダイズ品種である「とよみづき」は *IcIc* 遺伝子型ではなく、裂開抵抗性弱のダイズ品種「ユキホマレ」と同様に *II* 遺伝子型を有しており、十育 248 号とは異なる新規な裂開抵抗性を有することが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、裂開抵抗性強のダイズ品種である「とよみづき」が *IcIc* 遺伝子型を有する十育 248 号とは異なる裂開抵抗性を有していることを明らかにする。*Ic* 遺伝子以外の「とよみづき」由来の新規裂開抵抗性遺伝子を探索する。その一方で、毛茸色遺伝子等のダイズ低温耐性関連遺伝子が裂開抵抗性にも効果があるのかを検討し、*Ic* 遺伝子と集積することで高度の裂開抵抗性が実現できるかを検討する。以上のように新規の裂開抵抗性遺伝子や裂開抵抗性に関連する低温耐性遺伝子を探索し、*Ic* 遺伝子と集積することで高度の裂開抵抗性品種を育成する方法を開発するのが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 裂開抵抗性検定は Yamaguchi et al. (2014) の方法に従った。開花後 10 日の植物体を人工気象室に移し、18°C 明 10 時間/13°C 暗 14 時間で低温処理を行った。低温処理後、外に戻し、種子を収穫した。裂開粒率 (%) = (裂開粒数/全粒数) × 100 で算出し、裂開抵抗性程度を評価した。

(2) 種皮における PA 蓄積の調査は Senda et al. (2017) の方法に従った。すなわち PA 染色剤である 4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) を用いた組織染色により、青色に染色された PA の蓄積を明らかにした。開花 10 日後に「とよみづき」植物体を 21 日間の低温処理後、肥大最大期の種子 (生重量 700mg から 900mg) から種皮を単離した。種皮を寒天包埋後、ビブラトームで切片を作製して、1%DMACA 溶液で染色し、光学顕微鏡観察により PA 蓄積を観察した。

(3) 種皮の物性分析は Senda et al. (2017) の方法に従った。テクスチャーアナライザーを用いた突き刺し法により、破断荷重 (g)、破断伸び (mm) を測定した。

(4) 「とよみづき」に由来する新規の裂開抵抗性遺伝子を検出するために、「ユキホマレ」(抵抗性弱) × 「とよみづき」(抵抗性強) の組換え自殖系統群 92 系統について、上記の方法に従い、2 年間裂開抵抗性検定を行った。QTL 解析は両親間で多型の見られた 63 の SSR マーカーを用いて、Single Marker Analysis 法により行った。

(5) 毛茸色遺伝子 *T* についての準同質遺伝子系統 (NILs) については、*iii* 遺伝子型背景の NILs (To-NILs) である To7B (*TT* 遺伝子型) および To7G (*tt* 遺伝子型) を用いた。さらに *IcIc* 遺伝子型背景の NILs (2304-NILs) である 2304-9-B (*TT* 遺伝子型) および 2304-9-G (*tt* 遺伝子型) を用いた。これら NILs の系譜を図 1 に示す。

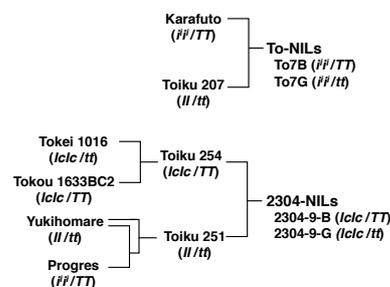


図1 準同質遺伝子系統の系譜

4. 研究成果

(1) とよみづき種皮における PA 蓄積の分布

裂開のメカニズムとして、肥大最大期での背側種皮における PA 蓄積との関連が示唆されている。裂開抵抗性ダイズ系統「十育 248 号」は低温処理でも種皮全面の PA 蓄積が抑制されており、その裂開抵抗性メカニズムとして、肥大最大期での種皮全面における PA 蓄積抑制の可能性

が示唆されている (Senda et al. 2018)。本研究に用いる裂開抵抗性強のダイズ品種「とよみづき」は「十育 248 号」と異なり、裂開抵抗性弱のダイズ品種「ユキホマレ」と同様、21 日間の低温処理によって、臍および周辺の種皮が褐色に着色する。しかしながら、種皮の褐色着色は PA が多く蓄積する臍および周辺の種皮しか目視で確認することができず、背側種皮での PA 蓄積を観察するには PA を青く染色する DMACA 法が必要である。PA 蓄積を DMACA 法で比較観察した結果、「とよみづき」でも「ユキホマレ」と同様、背側種皮まで青色染色部分が見られた、つまり PA が背側種皮まで蓄積している可能性が高い。以上の結果により、「とよみづき」は「十育 248 号」とは異なる新規裂開抵抗性機構を有している可能性が支持された (図 2)。

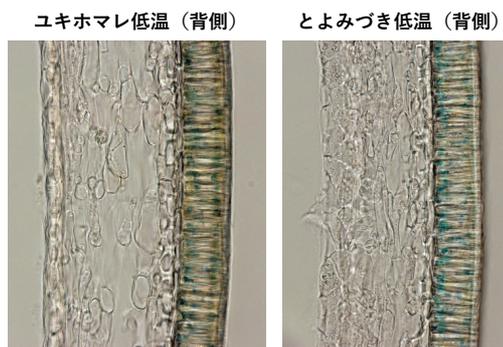


図2 低温処理後の肥大最大期種子における背側種皮のDMACA染色

(2) とよみづき種皮の物性分析

「とよみづき」の裂開抵抗性メカニズムを解明するためにテクスチャーアナライザーを用いた種皮物性 (破断荷重、破断伸び) の測定を行い、裂開抵抗性弱の「ユキホマレ」と比較した。その結果、「ユキホマレ」では低温処理によって、破断荷重と破断伸びが有意に低下するのに対して、裂開抵抗性強の「とよみづき」では有意な低下が見られなかった。以上の結果より、「とよみづき」では低温処理によっても種皮物性が変化しづらく、この特性が裂開抵抗性に関与する可能性が示唆された (図 3)。

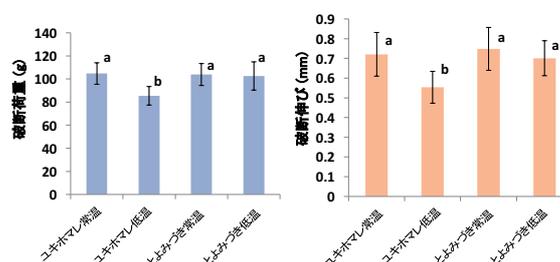


図3 低温処理が「ユキホマレ」と「とよみづき」の種皮物性に及ぼす影響
異なるアルファベットでは1%水準で有意差がある (Tukey-Kramer's test)
バーは標準誤差

(3) QTL 解析による「とよみづき」裂開抵抗性遺伝子座の同定および NILs を用いた効果検証

第 8 染色体と第 1 染色体に「とよみづき」型で裂開粒率を下げる効果の QTL を検出し、これらを *qCS8-2* および *qCS1-1* と名付けた。このうち、*qCS8-2* は 2 年連続で同一領域に QTL が見出されたため、安定した効果を持つと考えられた。これらの QTL の効果を検証するために、QTL 解析に用いた組換え自殖系統群から NILs 4 系統を育成した。裂開抵抗性検定を行ったところ、*qCS8-2* に効果が見出された (表 1)。一方、*qCS1-1* の効果は判然としなかった。そこで、安定した効果を持つ *qCS8-2* 近傍に 4 つの多型マーカーを作成し、この領域内で組換えが生じた 6 系統を選抜した。今後、これら 6 系統の裂開抵抗性を評価することにより、「とよみづき」に由来する新規裂開抵抗性遺伝子を同定し、育種に利用可能な DNA マーカーを開発する予定である。

表 1 準同質遺伝子系統を用いた新規裂開抵抗性 QTL の効果検証

品種系統名	<i>qCS8-2</i> (Satt424)	<i>qCS1-1</i> (Satt179)	裂開粒率 (%)
ユキホマレ	A	A	13.9
とよみづき	B	B	3.5
YT2-1-7	A	A	15.6
YT2-1-25	B	A	2.4
YT2-1-20-6	A	B	9.8
YT2-1-20-4	B	B	3.3

(4) 毛茸色遺伝子 *T* の裂開抵抗性に及ぼす効果

黄ダイズにおいて、莢や茎の毛（毛茸）の色を支配する遺伝子 *T* が低温種皮着色や低温裂皮などの低温障害防止に効果のあることが報告されている (Takahashi and Asanuma 1996, Takahashi 1997)。そのため、本研究では *T* が裂開抵抗性に効果があるかどうかについて調査を行った。その結果、*IcIc/tt* 遺伝子型を有する十育 238 号や十育 248 号に比べて、*IcIc/TT* 遺伝子型を有する十育 254 号や十系 1105 号では裂開粒率の減少が見られた (表 2)。さらに *T* 遺伝子座の対立遺伝子が異なる NILs についても比較を行った。*i¹i¹* 遺伝子型背景の To-NILs 間の比較において、*TT* 遺伝子型を有する To7B では *tt* 遺伝子型を有する To7G よりも有意な裂開粒率の減少が見られた (図 4)。また *IcIc* 遺伝子型背景の 2304-NILs 間の比較において、*TT* 遺伝子型を有する 2304-9-B では *tt* 遺伝子型を有する 2304-9-G よりも有意な裂開粒率の減少が見られた (図 5)。以上のことから、毛茸色遺伝子 *T* は *Ic* 遺伝子と同様、裂開抵抗性に正の効果と及ぼす可能性が高い。

表 2 裂開抵抗性検定によるダイズ 7 つの品種・系統の裂開粒率

Cultivar or line	Genotype		Cracked seed rate (%)			Note
	<i>Ic/I</i>	<i>T/t</i>	2010	2011	2012	
Yukihomare	<i>II</i>	<i>tt</i>	21.9	45.9	29.3	Susceptible cultivar (reference)
Toyomusume	<i>II</i>	<i>tt</i>	66.1	23.4	53.3	
Toiku 251	<i>II</i>	<i>tt</i>	21.5	-	-	Parental line of 2304-NILs
Toiku 238	<i>IcIc</i>	<i>tt</i>	2.2***	5.4**	6.0**	
Toiku 248	<i>IcIc</i>	<i>tt</i>	7.4**	-	8.4*	
Toiku 254	<i>IcIc</i>	<i>TT</i>	-	0.0***	0.0***	Parental line of 2304-NILs
Tokei 1105	<i>IcIc</i>	<i>TT</i>	-	1.4**	-	

*, **, and *** denote values significantly lower than Yukihomare at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

Dunnett's test was performed in each year using Yukihomare as a reference.

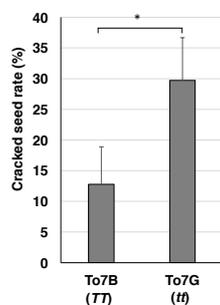


図4 To-NILs間における裂開粒率の比較

* 5%水準で有意差あり

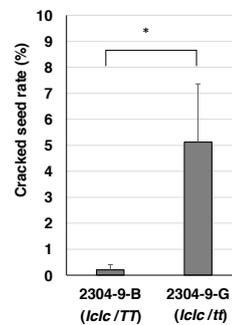


図5 2304-NILs間における裂開粒率の比較

* 5%水準で有意差あり

(5) *Ic* 遺伝子と *T* 遺伝子の集積による高度裂開抵抗性実現の可能性

裂開抵抗性に効果がある *Ic* 遺伝子と *T* 遺伝子を集積することで高度な裂開抵抗性が実現できるかについて検討を行った。*IcIc/tt* 遺伝子型である十育 238 号や十育 248 号は裂開粒率が 2.2% から 8.4% であり低い裂開粒率であった (表 2)。2304-NILs のうち *IcIc/tt* 遺伝子型を有する 2304-9-G でも 5.1% という低い裂開粒率であった (図 5)。これら系統で示された裂開抵抗性は *Ic* 遺伝子によるものと考えられた。それに対して *IcIc/TT* 遺伝子型を有する十育 254 号や十系 1105 号は裂開粒率が 0.0% から 1.4% であり、さらに低い値を示した (表 2)。とくに十育 254 号では 2 年間でいずれも裂開が完全に抑制された。同じく *IcIc/TT* 遺伝子型を有する 2304-9-B でも 0.2% というかなり低い裂開粒率であった (図 5)。以上のことから、*Ic* 遺伝子と *T* 遺伝子を集積することで高度の裂開抵抗性を実現できる可能性が示唆された。*Ic* 遺伝子は *Ic* マーカー、*T* 遺伝子は褐色の毛茸色により選抜できる。そのため、裂開抵抗性個体を比較的容易に選抜できる可能性がある。今後はさらに多くの *IcIc/TT* 遺伝子型の黄ダイズ個体について裂開抵抗性検定を行い、裂開抵抗性程度について調査を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Senda, M., M. Kawasaki, M. Hiraoka, K. Yamashita, H. Maeda and N. Yamaguchi	4. 巻 248
2. 論文標題 Occurrence and tolerance mechanisms of seed cracking under low temperatures in soybean (<i>Glycine max</i>).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 369-379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-018-2912-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山口直矢・鈴木千賀・山下陽子・千田峰生
2. 発表標題 低温着色抵抗性遺伝子Icおよび毛茸色遺伝子Tの集積は白目黄ダイズにおいて高度の低温裂開抵抗性をもたらす
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千田峰生・川崎通夫・佐藤優美・山口直矢
2. 発表標題 ダイズ品種とよみづきが有する新規な低温裂開抵抗性
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口直矢・加賀秋人・関根大輔・田口文緒・佐藤優美・千田峰生・石本政男
2. 発表標題 ゲノムワイドSNPパネルを活用したダイズ低温裂開抵抗性遺伝子座のマッピング
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamaguchi, N., S. Ohnishi, S. Hagihara, D. Hirai, H. Funatsuki and M. Senda
2. 発表標題 Quantitative Trait Loci Associated with Tolerance to Cold-Induced Seed Coat Discoloration in Soybean.
3. 学会等名 International Plant & Animal Genome XXVIII (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 直矢 (Yamaguchi Naoya) (20536586)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部 十勝農業試験場・研究主任 (80122)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関