

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580009

研究課題名（和文）大豆の難裂皮性の遺伝・生理機構の解明

研究課題名（英文）Genetic and physiological studies on seed coat cracking in soybean

研究代表者

高橋 良二（TAKAHASHI RYOJI）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所畑作物研究領域・上席研究員

研究者番号：90360445

研究成果の概要（和文）：

圃場で自然発生する大豆の裂皮には2個のQTL（D1b連鎖群のcr1とM連鎖群のcr2）が関与していた。網目状裂皮には、62cMの距離で連鎖した2個のQTL（C1連鎖群）が関与しており、両者は異なる遺伝要因に支配されていた。cr1に関する準同質遺伝子系統間では難裂皮性に差があったが、早晩性や粒大に差はなく、マーカーとして有用なことが明らかになった。準同質遺伝子系統の種皮での遺伝子発現量を比較したところ、抵抗性系統が高い発現量を示した遺伝子（Gma.26856、Gma.16827、Gma.173）と感受性系統が高い発現量を示した遺伝子（Gma.48109、Gma.49562）が見出された。

研究成果の概要（英文）：

The seed coat of soybean cracks under field conditions. Two QTLs, cr1 (molecular linkage group (MLG) D1b and cr2 MLG M) were identified. The cr1 was not associated with seed size or maturity in near-isogenic lines (NILs). Therefore, markers around the QTL may be useful for breeding to reduce cracking symptoms without altering seed size or maturity. In contrast, two QTLs for net-like cracking (ncr1 and ncr2) were identified in MLG C1 with a distance of about 62 cM. These results suggest that genetic control of seed coat cracking occurring under field conditions was different from net-like cracking. Microarray of the NILs revealed genes highly expressed in the tolerant NIL (Gma.26856, Gma.16827, Gma.173) and genes highly expressed in the sensitive NIL (Gma.48109 and Gma.49562).

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：大豆、裂皮、種子品質、量的形質遺伝子座、DNAマーカー

1. 研究開始当初の背景

乾燥、高温等の環境ストレスによって大豆の種子に裂皮（種皮の亀裂）が発生し、外観品質が著しく悪化して商品価値が低下する。

特に、納豆、煮豆等、種子の形で流通する商品においては裂皮の発生は致命的であるため、実需者から難裂皮性品種の育成が強く求められているが、年次によって裂皮が多発し、

農業生産上大きな問題になっている。そのため、難裂皮性品種の育成と裂皮発生の生理的メカニズムの解明は重要な研究開発課題である。

2. 研究の目的

大豆の難裂皮性の遺伝様式と生理的メカニズムを解明する。本研究では、難裂皮性品種と易裂皮性品種の交雑後代を供試し、DNAマーカーを用いて難裂皮性の詳細な遺伝分析を行う。さらに、難裂皮性を支配する主要なQTL (量的形質遺伝子座) に関する準同質遺伝子系統を育成し、QTLの効果を確認する。さらに、準同質遺伝子系統に裂皮処理を行って、種皮で変動するタンパク質あるいは遺伝子をプロテオーム解析あるいはマイクロアレイ解析の手法で解析することにより、裂皮発生の生理的メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) QTL 解析

難裂皮性品種「エンレイ」と易裂皮性品種「ナスシロメ」とを交配して育成した組換え自殖系統 (RIL) を圃場で栽培し、個体ごとに開花日を調査する。開花始 40 日後に上位半数の莢を摘除し、裂皮の発生を促す。成熟期に種子の裂皮指数 (裂皮無:0~甚:4) を 1 粒ごとに評価し、個体および系統の難裂皮性 (平均裂皮指数) を算出する。アメリカ農務省が開発した 1015 個の SSR マーカーを使って両親の多型解析を行い、明確な分離を示したマーカーで RIL の遺伝子型を評価し、MAPMAKER / EXP. ver. 3.0 で連鎖地図を作成する。さらに、QTL Cartographer ver. 2.0 を用いて平均裂皮指数の QTL 解析を行う。

一方、一部の系統に見られる網目状裂皮に関して、網目状裂皮を示す在来種「うずらまめ」と裂皮の見られない「Clark-i」を交配して育成した F₂ 集団と F₃ 系統を供試し、SSR マーカーを用いて平均裂皮指数の QTL 解析を実施する。

(2) 準同質遺伝子系統 (NIL) の育成

年次および世代間で再現性が見られた難裂皮性 QTL 近傍の SSR マーカーの遺伝子型がヘテロの系統を自殖し、QTL 領域が感受性親の「ナスシロメ」型に固定した NIL と抵抗性親の「エンレイ」型に固定した NIL を育成する。それらの NIL を圃場栽培し、摘莢処理によって裂皮の発生を促す。そして、成熟種子の難裂皮性を裂皮指数によって評価するとともに、収量形質を測定して分散分析によって NIL 間の差異の有無を調査する。

(3) ゲノム情報を利用した候補遺伝子の探索

難裂皮性 QTL の候補遺伝子を明らかにするため、ダイズゲノムデータベース

(Phytozome、<http://www.phytozome.net/soybean.php>) に保存されている米国品種 Williams 82 の全ゲノム配列より、QTL 領域に座乗する遺伝子を調査し、候補遺伝子を明らかにする。

(4) マイクロアレイ解析

年次間で再現性を示した主要な難裂皮性 QTL に関する NIL を圃場で栽培し、摘莢処理の 1 週間後に種皮をサンプリングして RNA を抽出し、ロシュ・ダイアグノスティクス社に依頼して、NCBI UNIGENE に登録された 32,944 個のダイズ遺伝子の発現量をマイクロアレイ解析によって調査する。

4. 研究成果

(1) QTL 解析

難裂皮性品種「エンレイ」と易裂皮性品種「ナスシロメ」とを交配して育成した RIL (F₇ 世代、各 24 個体) を圃場で栽培し、個体ごとに開花日を調査した。開花始 40 日後に上位半数の莢を摘除し、裂皮の発生を促した。成熟期に種子の裂皮指数を 1 粒ごとに評価し、個体および系統の難裂皮性を評価した。1015 個の SSR マーカーを使って両親の多型解析を行ったところ、190 個のマーカーで多型が見いだされ、そのうち 114 個のマーカーが明確な分離を示した。それらのマーカーの遺伝子型データを用いて MAPMAKER / EXP. ver. 3.0 で連鎖地図を作成したところ、24 個の連鎖群が見いだされ、全長が 1232cM であった。QTL Cartographer ver. 2.0 を用いて F₆ 世代の平均裂皮指数の QTL 解析を行ったところ、2 個の QTL (cr1 と cr2) が D1b 連鎖群と M 連鎖群に見いだされた (図 1)。それぞれ LOD 値は 4.78 と 4.10、寄与率は 27.2% と 16.2% であった。F₇ 世代では cr1 が同様の位置に見出

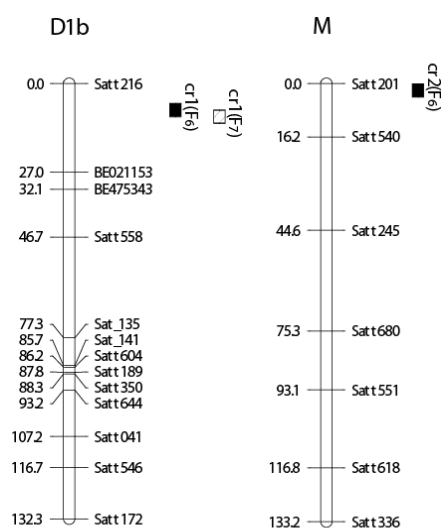


図 1. 摘莢裂皮性の QTL 解析結果

されたが、cr2 は検出されなかった。cr2 の LOD 値は 4.77、寄与率は 23.5%であった。cr1 と cr2 は開花日、莢数等の収量関係の QTL とは異なる位置に見いだされ、収量形質とは関連がないと考えられた。

一方、網目状裂皮を持った在来種「うずらまめ」と裂皮の見られない「Clark-i」を交配して育成した F₂ 集団と F₃ 系統を供試して網目状裂皮の QTL 解析を行ったところ、62cM の距離で連鎖した 2 個の QTL が摘莢裂皮とは異なる連鎖群 (C1 連鎖群) に見いだされた (図 2)。以上の結果より、摘莢裂皮と網目状裂皮とは異なる遺伝要因に支配されることが明らかになった。

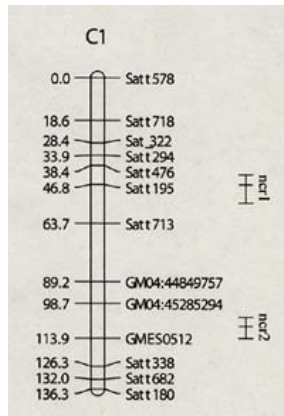


図 2. 網目状裂皮の QTL 解析結果

(2) 準同質遺伝子系統 (NIL) の育成

年次および世代間で再現性が見られた難裂皮性 QTL である cr1 近傍の SSR マーカー Satt216 の遺伝子型を個体別に調査し、Satt216 がヘテロになっている F₇ 系統 (#86-26) より Satt216 が感受性親の「ナスシロメ」型に固定した 4 系統と抵抗性親の「エンレイ」型に固定した 4 系統の NIL を育成した。それらの NIL を圃場栽培して摘莢処理によって裂皮の発生を促した。そして、成熟種子の難裂皮性を裂皮指数によって評価するとともに、収量形質を測定して分散分析によって系統間差異の有無を調査した。その結果、cr1 は難裂皮性を制御している (エンレイ型系統の裂皮指数: 0.26、ナスシロメ型系統の裂皮指数: 0.94) ことが確認された。一方、NIL 間で早晩性、子実重、100 粒重等の収量関連形質に差は認められなかった。以上の結果より、cr1 近傍のマーカーを用いることにより、早晩性とは無関係に、また粒大を減少させることなく難裂皮性を向上させることが可能であり、選抜マーカーとして有用であることが確かめられた。

表 1. 難裂皮性 QTL に関する準同質遺伝子系統の収量関連形質

| 系統名 | 遺伝子型 | 開花日数 | 登熟日数 | 主莖長 | 莢数 | 100粒重 | 裂皮指数 |
|-----------|------|------|-------|------|------|-------|------|
| AB6-26-3 | EE | 48.1 | 129.0 | 45.5 | 37.4 | 26.1 | 0.21 |
| AB6-26-4 | EE | 48.7 | 129.0 | 49.3 | 40.8 | 27.2 | 0.23 |
| AB6-26-8 | EE | 48.3 | 129.0 | 39.4 | 26.7 | 27.0 | 0.26 |
| AB6-26-29 | EE | 48.0 | 130.8 | 32.7 | 21.4 | 26.4 | 0.31 |
| 平均 | | 48.3 | 129.5 | 30.5 | 32.3 | 26.7 | 0.26 |
| AB6-26-2 | HW | 48.1 | 128.9 | 32.5 | 31.4 | 26.2 | 0.86 |
| AB6-26-6 | HW | 48.3 | 128.8 | 45.9 | 27.9 | 27.0 | 1.06 |
| AB6-26-22 | HW | 47.7 | 131.5 | 39.3 | 35.0 | 26.7 | 1.01 |
| AB6-26-30 | HW | 47.9 | 131.9 | 39.8 | 25.2 | 26.9 | 0.82 |
| 平均 | | 48.0 | 130.3 | 39.9 | 29.9 | 26.7 | 0.94 |
| | | ** | ** | ** | ** | ** | ** |

(3) ゲノム情報を利用した候補遺伝子の探索

cr1 の候補遺伝子を明らかにするため、cr1 の両側の SSR マーカー Satt216 と BE021153 との間に位置する遺伝子をダイズゲノムデータベースによって網羅的に調査したところ、難裂皮性との関連が示唆されるパーオキシダーゼ遺伝子が 2 個 (Glyma02g05930.1 と Glyma02g05940.1) 存在することが明らかになった。両親から上記の遺伝子のゲノミッククローンを PCR で増幅してプラスミドベクターにクローニングして塩基配列を比較したが、差は認められなかった。

(4) マイクロアレイ解析

年次間で再現性を示した主要な QTL (cr1) に関する NIL (難裂皮性 NIL の #86-26-3-4 と易裂皮性 NIL の #86-26-22-10) を圃場で栽培し、摘莢処理の 1 週間後に種皮をサンプリングして RNA を抽出し、ロシュ・ダイアグノスティックス社に依頼して、NCBI UNIGENE に登録された 32,944 個のダイズ遺伝子の発現量をマイクロアレイ解析によって調査した。NIL 間で種皮での遺伝子発現量を比較したところ、発現量の差は最大 8.08 倍であった (図 3)。抵抗性 NIL の方が高い発現量を示した遺伝子は Gma.26856、Gma.16827、Gma.173 で、発現量の比はそれぞれ 6.98 倍、6.67 倍、6.18 倍であった。一方、感受性 NIL の方が高い発現量を示した遺伝子は Gma.48109、Gma.49562 で、発現量の比はそれぞれ 8.08 倍、6.52 倍であった。それらの遺伝子の推定される機能は、Gma.26856 が NAC domain protein NAC3、Gma.16827 が Iron-superoxide dismutase、Gma.173 が Seed maturation polypeptide であった。一方、Gma.48109 と Gma.49562 の機能は不明であった。

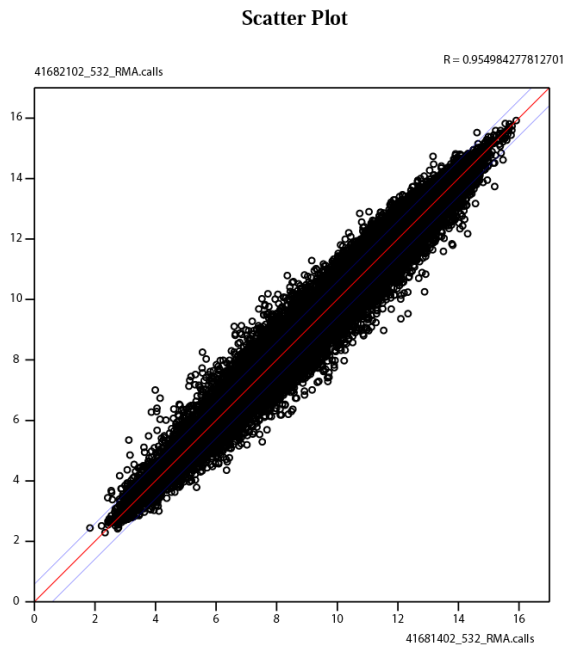


図3. 難裂皮性QTLに関する準同質遺伝子系統のマイクロアレイ分析の結果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Oyoo ME, Benitez ER, Kurosaki H, Ohnishi S, Miyoshi T, Otobe C, Horigane A, Takahashi R (2011) QTL analysis of soybean seed coat discoloration associated with *HIT* genotype. *Crop Science* 51:464-469.

② Oyoo ME, Githiri SM, Benitez ER, Takahashi R (2010) QTL analysis of net-like cracking in soybean seed coats. *Breeding Science* 60:28-33.

③ Oyoo ME, Benitez ER, Matsumura H, Takahashi R (2010) QTL analysis of seed coat cracking in soybean. *Crop Science* 50:1230-1235.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 良二 (TAKAHASHI RYOJI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所畑作物研究領域・上席研究員

研究者番号：90360445