

ダイズの収穫損失低減を目指した  
青立ち性および裂莢性に関する  
遺伝・育種学的研究

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
博士（農学）学位論文

山田 哲也

## 目次

第 1 章	緒言	頁
1-1	ダイズの栽培化および作物としての特性 . . . . .	1
1-2	大豆の用途と需要 . . . . .	7
1-3	日本における大豆生産の課題 . . . . .	9
1-4	米国近代品種の多収性とその要因 . . . . .	13
1-5	多収性育種の課題 . . . . .	15
1-6	日本品種の収穫損失問題 . . . . .	18
第 2 章	裂莢性の改善による収量の安定化に関する遺伝・育種学的研究 . . . .	21
2-1	裂莢性の遺伝解析 . . . . .	21
2-1-1	材料および方法 . . . . .	23
2-1-2	結果 . . . . .	27
2-1-3	考察 . . . . .	29
2-2	難裂莢性 DNA マーカーの汎用性 . . . . .	38
2-2-1	材料および方法 . . . . .	39
2-2-2	結果 . . . . .	42
2-2-3	考察 . . . . .	44
2-3	難裂莢性品種の導入による収量の安定化 . . . . .	51
2-3-1	材料および方法 . . . . .	51
2-3-2	結果 . . . . .	54

2-3-3	考察	56
第3章	青立ち性の改善による収量の安定化に関する遺伝・育種学的研究	65
3-1	早晩性改変に伴う青立ち性およびその他の栽培特性の変化	65
3-1-1	材料および方法	67
3-1-2	結果	71
3-1-3	考察	73
3-2	主力品種の青立ち性 QTL とリスク回避マーカーの開発	91
3-2-1	材料および方法	92
3-2-2	結果	96
3-2-3	考察	98
第4章	総合考察	110
4-1	本研究の意義	110
4-1-1	難裂莢性の特性の解明と利用	110
4-1-2	青立ち性の特性の解明と対策	112
4-1-3	収穫損失低減による増収効果	115
4-2	ダイズ育種における DNA マーカー利用の得失と将来展望	116
摘要		119
Summary		122
謝辞		125
引用文献		126

## 略語

GSD : 青立ち障害 (Green stem disorder)

HIF : ヘテロ自殖集団 (Heterogeneous inbred family)

LOD : 対数オッズ (Log of the odds)

MAS : DNA マーカー利用選抜 (Marker assisted selection)

NIL : 準同質遺伝子系統 (Near-isogenic line)

QTL : 量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus)

RHL : 残余ヘテロ接合系統 (Residual heterozygous line)

RIL : 組換え自殖系統 (Recombinant inbred Lines)

SSR : 単純反復配列 (Simple sequence repeat)

## 第1章 緒言

### 1-1 ダイズの栽培化および作物としての特性

作物としてのダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の歴史は古く、日本や中国など東アジアに広く自生しているつる性の1年性植物、ツルマメ (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) から栽培化されたと考えられている (国分 2000)。また、ツルマメは東アジアに広く分布し、日本以外にも中国南東部からロシア南東部にかけて遺伝資源が収集・登録されている (農業生物資源データベース, <https://www.gene.affrc.go.jp/maps/>)。ダイズおよびツルマメとも染色体数は  $2n = 40$ 、ゲノムサイズは約 1.1Gbp (Schmutz *et al.* 2010) であり、両種は容易に交雑する (国分 2000)。 *Glycine* 属の近縁野生種は複数存在し (South Australian Seed Conservation Centre, [http://saseedbank.com.au/index.php?action=open\\_genus&genus=Glycine](http://saseedbank.com.au/index.php?action=open_genus&genus=Glycine))、ツルマメ以外の近縁野生種との交配は一般にはできないが、胚培養による F<sub>1</sub> 養成と複数回の戻し交雑により、ダイズに *Glycine tomentella* Hayata のゲノム断片を取り込むことに成功した事例が報告されている (Akperley *et al.* 2017)。

ツルマメ自体が食用とされていた痕跡は、土器片などに確認されており、栽培化が起こった地域については諸説あるが、東アジアの複数の地域に由来する遺伝的多様性の獲得の痕跡が報告されている (島本 2003)。ツルマメはつる性の一年草であり、大型の草本に巻き付く形で群落の最上部に葉群を形成する特性を持ち自立することはできない (Photo 1-1-1)。栽培化に伴い蔓性を含む多数の表現型に関与する遺伝子座の変異 (Kuroda *et al.* 2013) を経て現在のダイズ (Photo 1-1-2) となったが、生育旺盛な開花期前後に多雨を受けると容易に倒

伏し、減収につながる（齊藤ら 2012）ことから、一部では摘心栽培による倒伏防止技術（林ら 2008）が採用されている。また、野草であるツルマメが、種子の拡散のために保有していた強い裂莢性は、栽培化に伴い部分的に喪失したが（Liu *et al.* 2007、Kuroda *et al.* 2013、Funatsuki *et al.* 2014）、わが国の多くの品種は弱い裂莢性が残存しており、これらの品種は莢の成熟後に圃場に放置しておくことで自然裂莢が発生する（城田ら 2001、山田ら 2017）。

ダイズは古倍数体であり、ゲノム構造がイネに比べてやや複雑であるが、近年、ゲノム研究の進歩に伴い、米国のダイズ品種である 'Williams 82' の全塩基配列情報 (Schmutz *et al.* 2010) が公開されたことで重要形質の DNA マーカー開発が容易になり、全塩基配列情報のみならず育種および研究に活用できる幅広い情報が、インターネット上のポータルサイト Soybase (Grant *et al.* 2010, <https://soybase.org/>) や Phytozome (Goodstein *et al.* 2012, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) を通じて容易に入手することが可能である。

2018 年 11 月現在では、難裂莢性、青立ち性の他に、ダイズモザイクウイルス抵抗性 (Kato *et al.* 2016、Ma *et al.* 2018)、落花生モザイクウイルス抵抗性 (Saruta *et al.* 2012)、インゲン豆南部モザイクウイルス抵抗性 (猿田ら 2009)、カドミウム蓄積性 (Benitez *et al.* 2010、Lošák *et al.* 2015)、蒸煮大豆適性 (Hirata *et al.* 2014、Toda *et al.* 2015)、ダイズシスト線虫抵抗性 (Kandoth *et al.* 2011、Suzuki *et al.* 2012、Zhao *et al.* 2017、Liu *et al.* 2017)、茎疫病抵抗性 (Sugimoto *et al.* 2008、Cheng *et al.* 2017)、ハスモンヨトウ抵抗性 (Oki *et al.* 2015、Oki *et al.* 2017)、など多くの形質について原因遺伝子座が報告され、これら有用な特性を選抜するための DNA マーカーが開発されている。農研機構次世代作物開発研究センターのホームペ

ージ (<http://www.naro.affrc.go.jp/genome/database/daizu/index.html>) では育種現場で利用しやすい形でマーカー情報が提供されており、これらの情報を基に DNA マーカーを利用した遺伝子型情報に基づく選抜 (Marker assisted selection; MAS) が実施されている。ダイズは古倍数体 (palaeopolyploid) であり、過去に生じたゲノム重複の結果、遺伝子の約 75% が複数のコピーを有するという、高度に重複したゲノム構造となっている (Schmutz *et al.* 2010)。また、最も遺伝解析の進んだマメ科作物であることから、ゲノム解析においてはモデル作物としての位置付けを担っている。ダイズで得られた知見や技術については、アズキ (*Vigna angularis* (Wild.) Ohwi et Ohashi) やインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) における遺伝解析および品種改良へ比較的容易に利用することが可能であると考えられる。また、マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (*Lotus corniculatus* L. var. japonicus Regel) について得られた情報 (Hashiguchi *et al.* 2012, <https://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/lotus/>) を横断的に利用可能な点もダイズの利点である。

ダイズは子実タンパク質を貯蔵するという点が、利用面において、その他のマメ科作物との大きな相違点である。主要な子実貯蔵タンパク質には、 $\beta$ -コングリシニンおよびグリシニンが存在する (Tsukada *et al.* 1986)。 $\beta$ -コングリシニンのうち、 $\alpha$  および  $\alpha'$  サブユニットを欠失した低アレルギー性品種 ‘ゆめみのり’ および ‘なごみまる’ (羽鹿ら 2009)、逆に  $\beta$ -コングリシニン含有率を増加させた機能性強化品種 ‘ななほまれ’ (矢ヶ崎ら 2010) が開発された。また、ツルマメから見いだされた  $\beta$ -コングリシニン欠失性の優性遺伝子 (Hajika *et al.* 1996) の利用も進められている。その他に食品の風味に関する成分改変育種として、青臭

みの原因であるリポキシゲナーゼを欠失した大豆品種‘いちひめ’（羽鹿ら 2001）他、複数の品種が開発された。さらに、えぐ味の原因であるグループ A アセチルサポニン欠失した大豆品種として‘きぬさやか’（加藤ら 2005）他、複数の品種が開発されている。これらの成分改変品種の開発には、在来品種やツルマメに由来する変異の他、 $\gamma$ 線照射等による突然変異が利用されており、いずれもダイズにおける遺伝的な多様性を拡大する上で重要な手法である。

伸育性に寄与する遺伝子としては *Dt1* 座（Liu *et al.* 2010）および *Dt2* 座（Ping *et al.* 2014）が単離されている。日本におけるほぼ全ての品種は有限伸育性であり、両座とも機能欠失型の劣性アリルを保有する。北米地域で利用される品種は、高緯度地域では無限伸育性もしくは半無限伸育性品種が栽培され、低緯度地域では有限伸育性品種が栽培される傾向が強い（United States Department of Agriculture, U.S. National Plant Germplasm System, <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx>）。ダイズは赤道直下からロシアやスウェーデン等の高緯度地域まで広く栽培され、本来ツルマメが自生していた緯度を遥かに越えて栽培されている。一方、ダイズは短日性植物であることから、低緯度地域における栽培では生育量の減少が問題であったが、日長不感受性期間の長い特性「Long Juvenile 性」を利用することにより、現在では赤道直下の地域においてもダイズ栽培が可能となっている（Destro *et al.* 2001、Yue *et al.* 2017）。





**Photo. 1-1-1.** Wild soybean plant in maturity climbing up on other plant.



**Photo. 1-1-2.** Soybean plant cultivated in rotated paddy field in Japan.

## 1-2 大豆の用途と需要

ダイズは世界的に主要なマメ科作物であり、乾燥した子実は「大豆」として、未成熟の子実は「枝豆」として、スプラウトは「豆もやし」として幅広く利用される。世界的には、搾油用途の加工が8割を超え(国際連合食糧農業機関, FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/>)、搾りかすは飼料として利用されることから油糧作物および飼料作物としての役割が大きい。現在は、起源地である東アジアを離れ、世界中で重要な油糧・飼料作物となっている。

歴史的には、ダイズは子実に多量のタンパク質を蓄積することから、古来よりタンパク質源としてアジア各地で利用されてきた。日本においては、水に浸漬した大豆を破碎し加熱することで、子実中のタンパク質を抽出する工程からは「豆乳」「豆腐」「湯葉」「凍豆腐」として、また、浸漬後に蒸煮した大豆は「煮豆」「浸し豆(ひたしまめ)」として利用され、煮豆からは納豆、味噌、醤油などさらに多くの食品に加工される。インドネシアで食される「テンペ」や「オンチョム」(松本 1988)、タイの「トアナオ」、ネパールの「キネマ」も大豆の発酵食品である(国分 2000)。

近年は、健康志向の向上と関連し、「大豆および大豆由来食品等は、良質のタンパク質源であるだけでなく、カルシウム等にも富む重要な栄養源」として、厚生労働省のホームページ(厚生労働省 2006)では食生活の中でバランスよく摂取することが推奨されている。

国内で生産される大豆の主な用途については、平成27年においては豆腐(451千t)、味噌(133千t)、納豆(132千t)であり(農林水産省,大豆のホームページ, <http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/>)、豆腐用途の需要が相対的に大きいことから、

国内で栽培される大豆品種には豆腐の凝固性に重要な高タンパク質性が求められてきた。また、納豆、煮豆、味噌、醤油など、豆腐以外の用途でも利用できる汎用性の高さが流通上好まれるため、全糖含有率や、外観上の障害が少ないこと、大粒性（納豆用は小粒性）なども重要な要素である。

現在は、アジア地域に限らず世界各地に栽培地域が拡大され、2016 年度の輸出量上位 3 か国はブラジル（59,500 千 t）、米国（55,792 千 t）、アルゼンチン（9,000 千 t）である。日本の生産量（240 千 t）では国内需要を満たすことはできないため、日本は大量の大豆（2016 年度、3131 千 t）を輸入しており、主に搾油用に利用されている（大豆のホームページ, 2018 年 11 月閲覧）。また、油以外の食品用に利用される非遺伝子組換え大豆については、混入を防止するために特別な流通システム「IP ハンドリング」により割り増し価格で取引されている（厚生労働省 2007）。

世界におけるダイズの収穫面積および収量はいずれも増加傾向にあり、それらの積である生産量も増加傾向にある。一方で、世界における輸出入の総量についても増加しており、主に中国の輸入数量が近年増加している影響が大きい。今後は、発展途上国の生活水準の向上と食生活の欧米化・肉食化に伴い、大豆の消費量のさらなる増加による需給の逼迫が予想されることから、我が国における大豆の安定供給のためには日本国内における大豆生産の安定化が求められる。

### 1-3 日本における大豆生産の課題

国内の主力品種は、2015 年の上位 3 品種は、‘フクユタカ’ (35,571ha)、‘ユキホマレ’ (14,069ha)、‘エンレイ’ (11,595ha) であった。九州から東海を中心に栽培される ‘フクユタカ’ は 1980 年登録、北陸を中心に栽培される ‘エンレイ’ は 1971 年登録であり、主力品種が長く更新されていない状況にある。近年、北海道における ‘ユキホマレ’ の普及および、新品種 ‘里のほほえみ’ へ置き換えなどにより、次第に主力品種の置換えが進みつつあるが、‘フクユタカ’ や ‘エンレイ’ は豆腐加工適性に優れることから依然として根強い人気があり、品種更新が遅れる一因となっている。

日本国内において、北海道以外の地域では水田転換畑で栽培されている。日本の単位面積当たりの子実収量は約 180kg/10a であり、主要生産国の子実収量に大きく引き離されている状況である。低収要因として、湿害、病虫害、地力低下、収穫ロスなどが報告されており、排水対策、防除、堆肥施用、などの耕種的な対策が講じられている（農林水産省、大豆のホームページ）が、収量水準の推移を見る限り、現時点におけるそれらの効果は十分ではない。このように、主力品種の低収要因に対して耕種的対策の効果が限定的であることから、遺伝的な改良による対策、すなわち新品種開発による収量ポテンシャルの向上が期待される。

安定的にダイズの高い収量を実現するには、収量ポテンシャルの向上に加え、収穫損失の低減も重要な課題である。特に近年のコンバイン収穫機の普及により裂莢損失が減収の大きな要因となり、愛知県の ‘フクユタカ’ では、全収量の 2 割程度を圃場に落としているという報告がある（城田ら 2003）。国内の主力品種は裂莢し易い性質（易裂莢性）を有するために、

成熟後に長期間圃場に放置しておくと、自然裂莢により収量損失が発生する (Photo 1-3-1)。

機械化以前の作業体系では、手刈りで収穫、叩いて脱穀という作業であったために、圃場における裂莢損失は問題にならず、むしろある程度の裂莢性が必要であったと考えられるが、機械作業体系の普及した現在においては裂莢性の軽減が必要であると考えられる。さらに、近年の気候温暖化に伴い、主力品種の青立ち障害（莢の成熟時に茎葉部の組織が生きたまま残る現象、Photo 1-3-2）が問題となる事例が多数発生しているために、茎葉部の汁液が子実が付着することを避け、収穫を遅らせる対策が取られることで、裂莢による収穫損失の増大を招いている。青立ち性の改善については、気候温暖化に伴う生育特性の変化という側面が大きいことから、品種更新による根本的な解決が必要である。



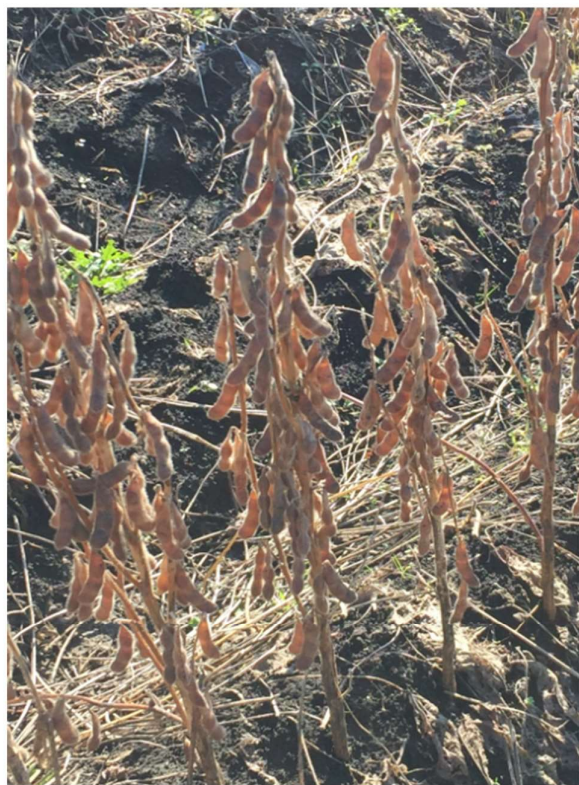
**Photo. 1-3-1.** Soybean pods shattering before harvesting.



A)



B)



**Photo. 1-3-2.** Matured soybean plant under A) Green stem disorder, and B) normal condition.



#### 1-4 米国近代品種の多収性とその要因

世界で高いダイズの収量性を示している国は、2016 年時点において、トルコ：432kg/ha、ジョージア：376kg/ha、イタリア：375kg/ha、米国：350kg/ha の順であるが、生産量では米国：1.1 億 t、ブラジル：0.96 億 t、アルゼンチン：0.58 億 t の順であり、4 位以下の国と地域を大きく引き離している。世界最大の生産量を誇る米国のダイズが高い収量性を実現している理由として、広い国土の中で大豆生産に適した土壌と気象条件を備える五大湖周辺やミシシッピ川流域にダイズ生産地が集中している（United States Department of Agriculture, [https://www.nass.usda.gov/Charts\\_and\\_Maps/Crops\\_County/sb-pr.php](https://www.nass.usda.gov/Charts_and_Maps/Crops_County/sb-pr.php)）ことが多収要因の一つであると考えられるが、実際に近年育成された米国品種を日本で栽培した場合でも、国内の主力品種よりも高い収量性を示す事例が複数存在する（Shiraiwa *et al.* 2004、義平ら 2010、白岩 2015、阿古ら 2015、Kawasaki *et al.* 2016、Kumagai 2018）。また、米国における多収要因については、気象、品種および土壌環境を含む栽培技術的観点からの多面的な考察（白岩ら 2011、島田ら 2012）が報告されており、それらの複合的な要因による増収が示唆されている。

子実成分については、米国では主に油糧作物として利用されることから高脂質性であることが望まれ、日本では豆腐加工用途が約半数を占めることから高タンパク質性であることが望まれる。この子実タンパク質を合成する窒素源として、日本品種は米国品種と比較して、共生する根粒菌による窒素固定に依存する割合が高いという報告（野原ら 2005）があるが、根粒による窒素固定の際にダイズの光合成産物が使用されるというコストを伴う（寿崎・西

田 2016) ことから、高タンパク質性は子実収量に対して負の影響を持つことが示唆される。

また、子実の粒大については、米国の搾油用品種は 100 粒重が 15g 前後 (島田ら 2012) であり、日本品種の約半分程であることが報告されているが、小粒であることは苗立ちの安定化や虫害に対するリスク分散以外に、一定の苗密度を確保するための種子に係る費用についても低コストとなるメリットがある。一方、我が国における大豆流通の場面では、大粒であること (少なくとも 100 粒重が 25g 以上) が重視されている (農林水産省 2005、農林水産省 2015、日本特産農産物協会, <http://www.jsapa.or.jp/soy03/index.html>)。流通する国産大豆の大半が加工用であることから、消費者がその子実を目にする機会は少ないが、粒大や子実外観は流通時の価格に影響するため、品種開発においても、遺伝的に大粒であることや子実外観に係わる特性は重要な選抜要素となっている。

## 1-5 多収性育種の課題

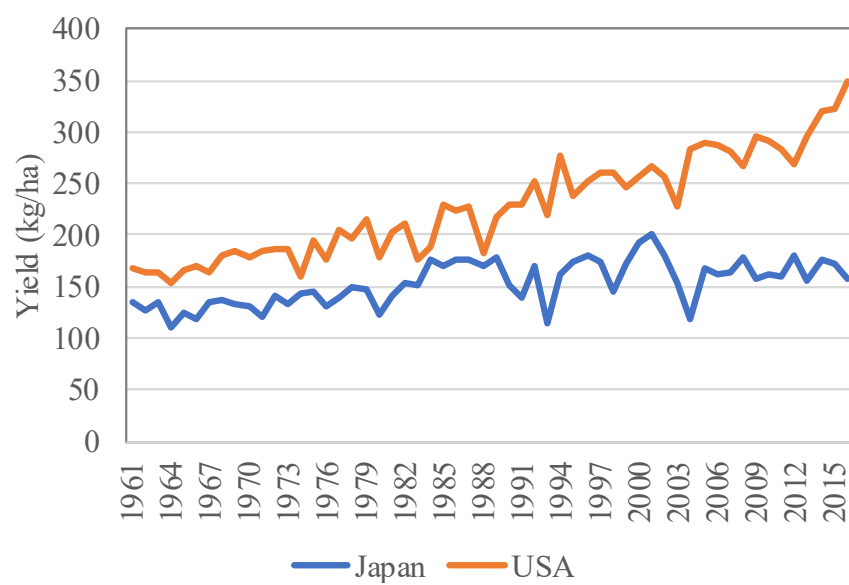
米国における上記の多収要因は、日本品種と米国品種の収量性ポテンシャルの差異を部分的に説明するが、米国におけるダイズの収量性は、1920年代には約100kg/ha（中村 1978）であったのが、現在では350kg/haを超え、特に2000年以降は収量性の向上率自体も増加していたのに対し、日本においては収量性が2000年代以降改善されず、160kg/ha前後で推移している（Fig. 1-5-1）。この状況を打破するためには、育種材料や育種システム自体の抜本的見直しが求められていると考えることもできる。

従来から海外遺伝資源も一部で交配母本として利用されてきたが、米国品種の特性を受け継ぐ交雑後代の特徴として、臍が着色（淡黒色～黒色）、タンパク含有率が低い、100粒重が流通上の規格（農林水産省 2001）に沿わないなどの問題を保有する系統が出現しやすいため、海外遺伝資源を用いた単交配から品種化を目指すことは困難であった。また、北米地域では一般に無限伸育性の品種が利用されているが、日本の本州以南では水田転換畑での栽培が想定され、台風や大雨による耐倒が問題となることから、飼料用青刈りダイズ品種の一部を除くほぼ全ての登録品種が有限伸育性である（農林水産省、品種登録ホームページ、<http://www.hinshu2.maff.go.jp/>）。

近年、農林水産省委託プロ「海外遺伝資源等を活用した極多収大豆育種素材の開発」の一環として、米国で育成された極多収品種（‘LD00-3309’、‘UA4910’、‘NC-Raleigh’等）を導入して交配母本とした交雑後代から、収量性を重視した選抜が実施され、画期的な多収性を示す複数の系統が全国の育成地において開発されている（農研機構 2017）。但し、これら

の多収系統は、子実成分および外観品質に対する選抜は緩めに実施されたため、臍色の着色や、低タンパク質性など、国内需要に向かない特性を同時に保有する場合が多い。海外の多収品種を交配母本とする第一世代の多収系統をさらに交配母本として用いて、収量性・外観品質・子実成分ともに優れた第二世代の有望系統を得るためには、さらに 10 年近くの年数が必要である。また、収量性とトレードオフの関係にある特性の存在が判明した場合は、品種化までにさらなる困難が予想される。

また、持続的な収量の向上のためには優秀な交配母本を持続的に導入することが有効と思われるが、導入の際には、育成品種の育成権のみならず、生物多様性条約の精神に則り、遺伝資源に掛かる原産国の権利に留意する必要がある（農林水産省 2014）。



**Fig. 1-5-1.** Soybean yield of Japan and USA

Data was sited from FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/en/>)

## 1－6 日本品種の収穫損失問題

多収性育種は、品種の収量性ポテンシャルに注目されることが多いが、高い収量性ポテンシャルをそのまま発揮するために必要な各種の抵抗性や生育特性についても広義の多収性要因と考えられる。また、搾油および飼料としての利用が大半を占める北米産大豆と異なり、国産大豆では収量性を定義する上で、高品質の子実が収穫できることを前提としている。そのため、収量性ポテンシャルが十分に発揮できない要因として、病虫害のように、1) 成熟時における植物体上の子実が正常時と比較して減少している場合と、収穫損失として、2) 植物体上に十分な子実が存在するが、国産大豆としての価値を有する品質の子実の回収効率が低下している場合、以上、2通りに大別される。

裂莢に伴う収穫損失は明らかに後者であるが、青立ちに伴う収穫損失は、茎葉部の枯凋を待たずに機械収穫を実施した場合には、子実外観品質の低下に伴う流通価格の低下として表れ、茎葉部の枯凋を待ったために莢が刈遅れの条件となった場合には、裂莢が促進されることによる収穫損失として表れる。このように、青立ち性と難裂莢性は関連性の高い特性であり、子実が植物体上の収穫可能な位置に形成されているのにも関わらず回収できないという減収が「青立ちと裂莢」の問題である。病虫害や各種ストレスによる収量損失は、着生する子実の量をどのように増加させるかという問題であるが、「青立ちと裂莢」に係る収穫損失については、既に植物体上に存在する子実をどのように回収するかという問題であるため、増収の実現可能性はより高いと考えられる。

難裂莢性については、従来から複数の難裂莢性品種が海外から導入され、主に病虫害抵抗性付与等を目的とした交配母本として利用されてきた (Yamada *et al.* 2009、Kato *et al.* 2016、農業生物資源ジーンバンク, <https://www.gene.affrc.go.jp/>)。難裂莢性を保有する海外品種に由来する後代品種は多数存在し、北海道では‘カリユタカ’ (田中ら 1993)、『ハヤヒカリ’ (湯本ら 2000) 等、海外からの導入品種に由来する難裂莢性品種が開発され、比較的速やかに普及されたが、本州地域においては、「里のほほえみ」 (加藤ら 2009) 以前の品種では限定的であった。このことから、本州地域における難裂莢性の有用性および効果が発揮される条件については検証を行う必要があると考えられる。

青立ち症状の発生原因については、ソース能が過剰となりバランスが乱れた場合に生じる現象であると考えられている (Egli and Bruening 2006、Sato *et al.* 2007、藤井ら 2012、白岩 2015、中村ら 2015、山崎ら 2018)。青立ち特性の品種間差異について複数の報告 (Pierce *et al.* 1984、松本ら 1986、古屋・梅崎 1993、羽鹿 2005、望月ら 2005、Hill *et al.* 2006、山崎ら 2018) があるが、未だに主力品種においても青立ちの問題は解決されていない (羽鹿 2005、竹田ら 2007、島田ら 2007)。

そこで本研究では、収穫可能な位置に着生するダイズ子実を、品質低下を最小限に抑えながらその収穫損失を遺伝的に低減させることにより大豆収量の安定化を図ることを目的とした。より具体的には、刈遅れによる品質低下の主因となりうる青立ち性の改善と収穫損失の低減が期待できる難脱粒性についての遺伝様式および生育特性としての理解を深めることとした。これらの形質に係わる DNA マーカーを開発し、その DNA マーカーを用いた MAS と

複数の主力品種を反復親とした戻し交雑により、収穫損失に関する欠点を改良した品種群を開発した。さらに、収量性ポテンシャルの改善等、量的形質の選抜を想定した個別形質用 DNA マーカーの発展的な使い方についても考察を行った。



## 第2章 裂莢性の改善による収量の安定化に関する遺伝・育種学的研究

### 2-1 裂莢性の遺伝解析

ダイズの祖先種であるツルマメは、莢が弾けることにより種子を拡散する。この莢が弾ける性質（裂莢性）は野生環境下における適応のためには重要であるが、栽培化された後もダイズはある程度の裂莢性を保有し、この裂莢性のために収量損失が生じている。

難裂莢性は北米地域を含め、大規模な栽培が行われている複数の地域において主力品種に利用されてきた (Bailey *et al.* 1997)。一方、それ以外の地域においては依然として裂莢による収量損失が存在する (Bhatnagar and Karmakar 1995、Jiang *et al.* 1991、Tiwari *et al.* 1991、Tukamuhabwa *et al.* 2002)。

日本においては、大豆の収穫期は秋の湿潤な環境下であることが比較的多く、裂莢性の問題はそれほど顕在化してこなかった。しかし、近年の気候変動と機械収穫の普及に伴い、裂莢損失が見過ごせない規模になり (城田ら 2003)、難裂莢性大豆品種開発が求められるようになった。

土屋ら (1986) は北海道における難裂莢性大豆品種開発に利用できる遺伝資源として、1) タイ国遺伝資源、2) 北米遺伝資源、3) 中国遺伝資源、という3つのグループを示した。

これまでに、これらの難裂莢性遺伝資源と北海道育成系統間の交雑に由来する複数の難裂莢性品種が北海道向け品種として開発されてきた。しかし、北海道向け品種は極早生に区分され、本州品種との交雑後代は早晚性が大きく分離することが、交配母本としての利用を妨げてきた。そのため、本州における難裂莢性の利用は限定的であった。

裂莢性の遺伝様式については、比較的少数の遺伝子座により支配されていることが土屋ら (1986) により報告されているが、難裂莢性が不完全優性であることから、戻し交雑の際には後代検定が必要であった。そのため、戻し交雑による難裂莢性品種の効率的な育成に利用するための DNA マーカーの開発は重要な課題であった。

近年、裂莢性の異なる品種間の交雑に由来する組換え自殖系統 (Recombinant Inbred Lines; RIL) を用いた、裂莢率の量的形質遺伝子座 (Quantitative trait locus ; QTL) の解析 (Funatsuki *et al.* 2006) により、裂莢性に寄与する主要な QTL 領域 *qPDH1* が Sat\_366 (連鎖群 J, 第 16 染色体) の近傍に位置し、寄与率は 50% を超えることが報告された。続いて、この交雑における難裂莢性の母本として用いた北海道品種 ‘ハヤヒカリ’ の難裂莢性はタイ国品種 ‘SJ2’ に由来する (湯本ら 2000) ことが明らかとなった。しかし、この QTL 領域の情報を難裂莢性品種開発に汎用的に利用するためには、さらに、1) 高精度の MAS を実施する上で必要であるとされる (Langridge and Chalmers 2004) QTL 領域を挟み込む 2 個の DNA マーカーを得ること、2) ‘SJ2’ に由来にする領域を判別するための DNA マーカー自体が複数の品種群に対して多型性を示すこと、3) ‘SJ2’ に由来する難裂莢性 QTL 領域が、QTL 解析に用いた ‘トヨムスメ／ハヤヒカリ’ に由来する RILs とは異なる遺伝背景においても難裂莢性を発現すること、の 3 つの条件が必要であった。

そこで本研究では、難裂莢性に寄与する主要な QTL 領域 *qPDH1* について、1) *qPDH1* 領域のみが分離する残余ヘテロ接合系統 (Residual heterozygous line; RHL) に由来する分離集団を用いた候補領域の絞り込み、2) 候補領域近傍マーカーについて、複数の難裂莢性品

種と易裂莢性品種における多型性の確認、3) 異なる交雑に由来する 4 集団を用いた、複数の環境条件下における検証により、座上位置の絞り込みおよびその効果の検証を実施した。

## 2-1-1 材料および方法

### 1) 供試材料

これまでに *qPDH1* が検出された、‘トヨムスメ／ハヤヒカリ’ に由来する RILs (Funatsuki *et al.* 2005) を近傍マーカーの解析用に供試した。また、QTL 効果の汎用性の検証用として、易裂莢性品種と難裂莢性品種の交配組合せとなる、4 組合せに由来する後代系統を供試した。この分離集団の交配母本として用いた ‘タチナガハ’ および ‘サチユタカ’ は本州における易裂莢性の主力品種であり、‘タチナガハ／ハヤヒカリ’ および ‘サチユタカ／ハヤヒカリ’ の F<sub>4</sub> 世代系統群は当初、難裂莢性品種開発を目的として品種育成の中で展開されていた材料であり、F<sub>2</sub> および F<sub>3</sub> 世代において、早晩性、草型、100 粒重等、育種における主要な生育特性について選抜が加えられている。これら F<sub>4</sub> 世代系統群の中で、*qPDH1* 領域の遺伝子型が固定していることが確認された系統のみを裂莢率の検定に用いた。‘キタムスメ／ハヤヒカリ’ および ‘十系 992／植系 32 号’ の交雑に由来する RILs については、いずれの交配母本とも北海道品種・系統であるが、‘キタムスメ’ および ‘植系 32 号’ については、‘トヨムスメ’ とは系譜的に遠縁である。

QTL 領域近傍の DNA マーカーを用いて、Table 2-1-1 に示す 22 品種・系統のマーカー遺伝子型を調査した。‘ハヤヒカリ’、‘十育 238 号’、‘十育 239 号’、‘ユキホマレ’ は ‘SJ2’ に由

来する難裂莢性を保有する。その他の日本の育成品種・系統については、いずれも易裂莢性である。北米品種 ‘Young’、‘Clark’、‘Williams 82’、‘Harosoy’については ‘SJ2’ とは異なる系譜を持つ難裂莢性品種である。

## 2) 候補領域の絞り込み

‘トヨムスメ／ハヤヒカリ’ の交雑に由来し、*qPDH1* 領域がヘテロ型である RHL、‘HC1-85’の後代は、*qPDH1* 領域近傍の単純反復配列（Simple sequence repeat; SSR）マーカー以外に、複数の領域に座する SSR マーカーについても多型を示した。そこで、F<sub>8</sub>世代の集団から *qPDH1* 領域のみが分離し、他の染色体領域については遺伝子型が固定した 1 個体を選抜して以降の実験に用いた。選抜個体から収穫された種子は *qPDH1* 領域近傍の 4 つの SSR マーカー、Satt529、Sat\_093、Sat\_366、Sat\_350 を用いて遺伝子型を判定し、これらのマーカー間に組み換えが生じた個体を細分化系統として保存した。各細分化系統については 16 個体ずつ栽培し、遺伝子型の固定化した個体については、収穫後に裂莢性検定に供試した。裂莢性検定の比較として、‘HC1-85’ の後代の内、‘トヨムスメ’ 型もしくは ‘ハヤヒカリ’ 型に固定した個体群を、それぞれ ‘85-T’ および ‘85-A’ として裂莢性検定に用いた。

## 3) 耕種概要

栽培試験は、以下の通り国内の 3 試験地において供試した。前述の ‘トヨムスメ／ハヤヒカリ’ の交雑に由来する RHL 細分化系統および、‘キタムスメ／ハヤヒカリ’ の交雑に由来し、

F<sub>4</sub>世代個体の自殖種子をそれぞれ展開した F<sub>5</sub>世代系統 (n = 96) の RILs は北海道農業研究センター (北海道札幌市) において 2006 年に供試した。‘十系 992/植系 32 号’の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団については、2006 年に北海道立十勝農業試験場 (北海道河西郡芽室町) において供試した。‘サチユタカ/ハヤヒカリ’ および ‘タチナガハ/ハヤヒカリ’ の交雑に由来する F<sub>4</sub> 系統群については、農研機構作物研究所 (茨城県つくばみらい市、現：次世代作物開発研究センター) において供試した。詳細な耕種概要については Table 2-1-2 に示す通りである。

#### 4) 裂莢性検定

裂莢性の評価には、加熱試験による評価法が従来用いられてきた (土屋 1986、Jiang *et al.* 1991、Tukamuhabwa *et al.* 2002、Funatsuki *et al.* 2006)。本研究では、土屋 (1986) の手法に従い、60°C に余熱した通風乾燥機を用いて、3 時間加熱処理した後に、裂開した莢の割合 (裂莢率) として評価した。RHL に由来する細分化系統群については 2 ~ 10 個体から、それぞれ 10 ~ 20 莢を紙封筒に入れて裂莢性検定に供試した。‘キタムスメ/ハヤヒカリ’ の交雑に由来する F<sub>5</sub> 世代の RILs については、各系統 10 個体から、各 10 莢を紙封筒に入れて裂莢性検定に供試した。それ以外の収穫物については、全個体の全莢を裂莢性検定に供試し、各個体の裂莢率を調査した。

#### 5) DNA マーカー解析

解析に用いた DNA は、RHL、RIL、F<sub>2</sub> については若い葉から、F<sub>4</sub> 系統群および品種につい

ては、種子から抽出した。SSR マーカーは Song *et al.* (2014) の報告に基づいて選択した。

葉からの DNA 抽出およびジェノタイピングは、Funatsuki *et al.* (2005) の手法に基づき以下の通り実施した。鋳型 DNA には、‘Fast DNA Kit’ (Qbiogene, Irvine, CA, USA) を用いて抽出した DNA を用いた。PCR は、40 ng DNA、1×PCR Buffer、0.2 mM dNTP mixture (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)、0.2  $\mu$ M プライマーペア、および 0.25 units HotStarTaq (Qiagen, Hilden, Germany) を含む、合計 10  $\mu$ l の混合液で、96 well thermal cycler (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて行った。温度サイクルは、95°C・15 分間の処理の後、(92°C・30 秒、 47°C・30 秒、 68°C・30 秒)×40 サイクル、72°C・5 分とした。PCR 産物は両親品種間のバンドサイズの差に基づいて、3.5% (w/v) アガロースゲル、6% (w/v) 未変性ポリアクリルアミドゲル (Wang *et al.* 2003)、もしくは、6% (w/v) 変性ポリアクリルアミドゲル (Echt *et al.* 1996) を用いた電気泳動により分画し、エチジウムブロマイドもしくは、Sybr Gold (MolecularProbes, Eugene, OR, USA) により染色を行い、泳動度の差により多型を検出した。

種子からの DNA 抽出は、Kamiya and Kiguchi (2003) の手法に基づいて以下の通り実施した。種子粉末 (10-30 mg) に、0.2ml の分解液 [10mM Tris-HCl (pH 7.8)、5mM EDTA、0.5% SDS、0.5% NP-40、0.5% Tween-20] および 16  $\mu$ g の proteinase K を添加し、55°C 20 分保温。その後、0.2 ml の フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:24:1) を添加して混和し、14,000rpm で 5 分間遠心。上清に等量のイソプロパノールを加えて再度 14,000rpm で 5 分間遠心し、ペレットの乾燥後に蒸留水で希釈した。

## 6) 統計解析

裂莢率の統計解析は、アークサイン変換を行った後に、一般線形回帰モデルを用いて一元配置の分散分析を実施した。解析は SAS 統計パッケージ (SAS Institute 1996) を用い、多重比較については Tukey-Kramer の手法を採用した。

## 2-1-2 結果

### 1) *qPDH1* 近傍マーカーの検証

過去の研究では、裂莢性に関する QTL は Sat\_093 と Sat\_366 の中間に座上するとして報告されている (Funatsuki *et al.* 2006)。本研究では、該当 QTL、*qPDH1* の再現性について、近傍領域のみが分離する RHL (Yamanaka *et al.* 2005) に由来する細分化系統群を用いて検証を実施した。これら細分化系統群における *qPDH1* 近傍領域の 4 つの SSR マーカー、Satt529、Sat\_093、Sat\_366、Sat\_350 のグラフ遺伝子型は Fig. 2-1-1 に示す通りであり、Sat\_093 と Sat\_366 に挟まれる領域が ‘トヨムスメ’ 型となる場合に有意に高い裂莢率となることが明らかとなり、*qPDH1* の座上位置が Sat\_093 と Sat\_366 の中間にあることが再確認された。

### 2) DNA マーカーの汎用性

Sat\_093 と Sat\_366 の多型性について、Fig. 2-1-2 に 22 品種・系統の PCR 増幅産物のバンドパターンを示す。Sat\_093 は品種・系統間における多型性が高く多様なパターンの存在が確

認されたが、Sat\_366 については供試材料について ‘SJ2’ に由来する難裂莢性品種と国内の易裂莢性品種の間で、明瞭に二分されるマーカー遺伝子型を示した。米国品種については、‘Young’ は ‘SJ2’ と同じタイプであったが、それ以外の品種については国内の易裂莢性品種と同じタイプであった。

Sat\_366 が裂莢性とマーカー遺伝子型の共分離を示したことから、このマーカーが *qPDH1* の極近傍に座上がることが予想されたため、‘キタムスメ／ハヤヒカリ’ F<sub>5</sub> 世代 RILs、‘十系 992／植系 32 号’ F<sub>2</sub> 集団、‘サチユタカ／ハヤヒカリ’ F<sub>4</sub> 系統群、および ‘タチナガハ／ハヤヒカリ’ F<sub>4</sub> 系統群を用いて、このマーカー遺伝子型を判定し、裂莢率との共分離を確認した。その結果、いずれの集団においてもマーカー遺伝子型間で有意な裂莢率の差異が確認された (Fig. 2-1-3 および Table 2-1-3)。ただし、‘サチユタカ／ハヤヒカリ’ および ‘タチナガハ／ハヤヒカリ’ に由来する易裂莢性型グループについては、難裂莢性型グループと比較すると明らかに裂莢率が高いが、易裂莢性親品種と比較するとやや裂莢率が低い傾向が認められた (Table 2-1-3)。



### 2-1-3 考察

これまで多く作物の重要形質について QTL 解析が実施されており、コムギうどんこ病、イネ縞葉枯れ病、ダイズシストセンチュウなど、既に幾つかの病害について真性抵抗性の DNA マーカー（農研機構, <http://www.naro.affrc.go.jp/genome/database/daizu/index.html>）が育種で利用されている一方で、量的形質については選抜用 DNA マーカーの開発例は少ない。量的形質の DNA マーカー利用が遅れている原因として、QTL 領域の絞り込みが困難であることの他に、環境や遺伝的背景の相互作用の影響、近縁品種間の交雑に由来する分離集団では多型性の高い DNA マーカーを得にくいことなどの問題が存在する。

本研究により、タイ国品種 ‘SJ2’ に由来する難裂莢性の QTL 領域が Sat\_093 と Sat\_366 の間に座上し、Sat\_366 のマーカー遺伝子型が裂莢性と連鎖することが再確認された (Table 2-1-3)。さらに、‘SJ2’ に由来する難裂莢性が複数の遺伝背景において利用可能であることが、複数環境間における試験によって実証された (Table 2-1-3)。

また、RHL に由来する分離集団を用いた実験により、*qPDH1* の再現性が確認された (Fig. 2-1-1)。RHL を用いる検証法については複数の報告が存在する (Yang *et al.* 1995、Tuinstra *et al.* 1997、Ismail *et al.* 1999)。また、その有用性についても複数の報告があり、Yamanaka *et al.* (2005) の報告の通り、遺伝背景との相互作用を検討する需要が無い限り、RHL に由来する準同質遺伝子系統 (Near-isogenic lines; NILs) を QTL の検証に用いる手法は有用であると考えられる。

QTL 領域における正確な遺伝子型の判定のためには、QTL 領域の両側から挟みこむように

DNA マーカーを設計して、MAS を実施する必要があるが、Sat\_366 の遺伝子型のみでグループ分けした場合でも比較的高精度に表現型を予測することが可能であった (Table 2-1-3) ことから、Sat\_366 単独でも一定の効果が期待できる。

また、*qPDH1* については、1 領域のみで高度な難裂莢性を付与することが可能と思われたが、‘ハヤヒカリ／キタムスメ’ の RIL の中で、難裂莢性個体群の裂莢率の幅がかなり広いこと (Fig. 2-1-3)、また、‘サチユタカ’ や ‘タチナガハ’ の後代 F<sub>4</sub> 系統群からは、*qPDH1* が易裂莢性型であっても、‘サチユタカ’ や ‘タチナガハ’ よりも難裂莢性を示すこと (Table 2-1-3) から、*qPDH1* 以外の染色体領域にも弱い難裂莢性 QTL が複数存在する可能性が示唆された。これら効果の弱い難裂莢性 QTL については、*qPDH1* がもたらす難裂莢性の程度が過剰な場合に裂莢性度を緩和する素材として利用できる可能性がある。このような効果の弱い難裂莢性の QTL を検出するためには、室温条件下で相対湿度を複数段階に調整することにより裂莢性を評価する Romkaew and Umezaki (2006) の手法等を検討する必要がある。

Sat\_366 のマーカー遺伝子型について、‘SJ2’ と ‘Young’ が同じタイプであったこと、また、‘Young’ と易裂莢日本品種との交雑に由来する RILs を用いた研究 (Bailey *et al.* 1997) では、*qPDH1* の近傍領域に QTL が検出されていることから、‘Young’ についても *qPDH1* 領域に難裂莢性 QTL が座し、この難裂莢性 QTL は ‘SJ2’ と同一の由来を持つ可能性がある。一方で、‘Harosoy’ など他の難裂莢性米国品種群については、Sat\_366 のマーカー遺伝子型が日本の易裂莢性品種と同じであること (Fig. 2-1-2) から、これら品種群の保有する難裂莢性については異なる祖先品種に由来する可能性が示唆された。

結論として、‘SJ2’ に由来する難裂莢性 QTL である *qPDH1* は Sat\_093 と Sat\_366 の間に存在し、Sat\_366 のマーカー遺伝子型は、‘SJ2’ に由来する難裂莢性品種・系統と日本国内の易裂莢性品種群を識別することが可能であった。また、‘SJ2’ に由来する難裂莢性は異なる遺伝背景および環境条件下においても、難裂莢性を発現することが確認された。

**Table 2-1-1.** Cultivars and lines used for the analysis of the alleles at the Sat\_366 and Sat\_093 marker loci

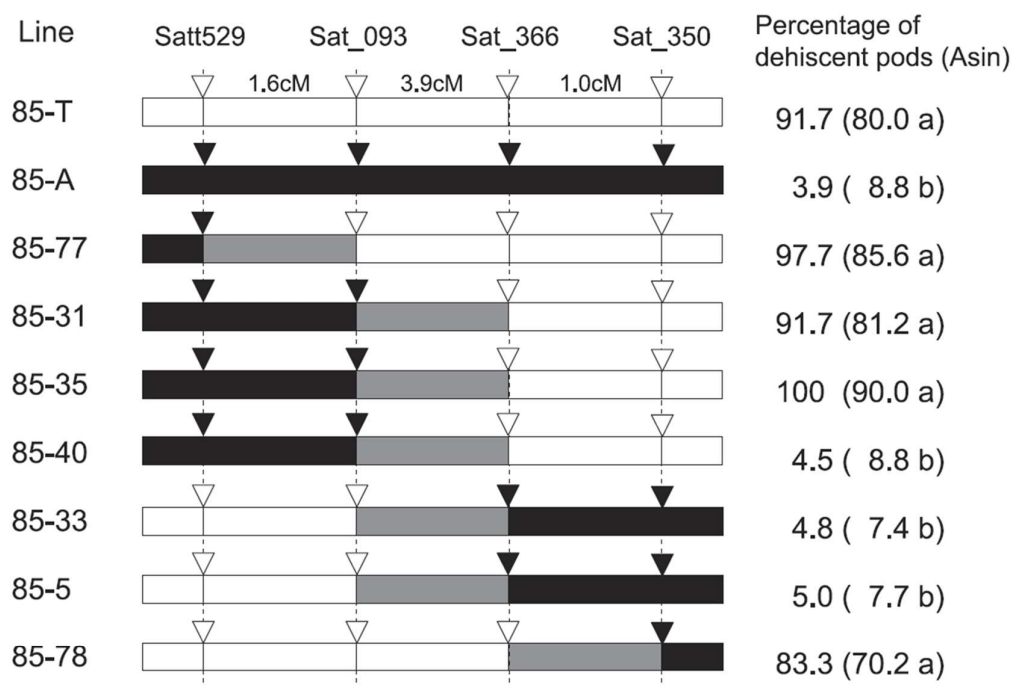
Cultivar/line	Origin <sup>1)</sup>	Pod shattering <sup>2)</sup>	Lane <sup>3)</sup>
SJ 2	Thailand	R (SJ2)	1
Hayahikari	Hokkaido	R (SJ2)	2
Yukihomare	Hokkaido	R (SJ2)	3
Toiku 238	Hokkaido	R (SJ2)	4
Toiku 239	Hokkaido	R (SJ2)	5
Young	USA	R	6
Williams 82	USA	R	7
Clark	USA	R	8
Harosoy	USA	R	9
Toyomusume	Hokkaido	S	10
Toyohomare	Hokkaido	S	11
Toyoharuka	Hokkaido	S	12
Ryuhou	Tohoku	S	13
Suzuyutaka	Tohoku	S	14
Oosuzu	Tohoku	S	15
Enrei	Kanto-Tozan	S	16
Ootsuru	Kanto-Tozan	S	17
Nakasennari	Kanto-Tozan	S	18
Tachinagaha	Kanto-Tozan	S	19
Sachiyutaka	Kyushu	S	20
Fukuyutaka	Kyushu	S	21
Kotoyutaka	Kyushu	S	22

- 1) Location at which the cultivar/line was developed.
- 2) R: resistant, S: susceptible. SJ2 within parentheses indicates that the origin of the pod-shattering resistance gene(s) is known to be SJ2. Susceptible cultivars include those ranked as “shattering-resistance-medium”.
- 3) Lane number in Fig. 2-1-2.

**Table 2-1-2.** Growth conditions at the research farms for evaluation of pod shattering resistance

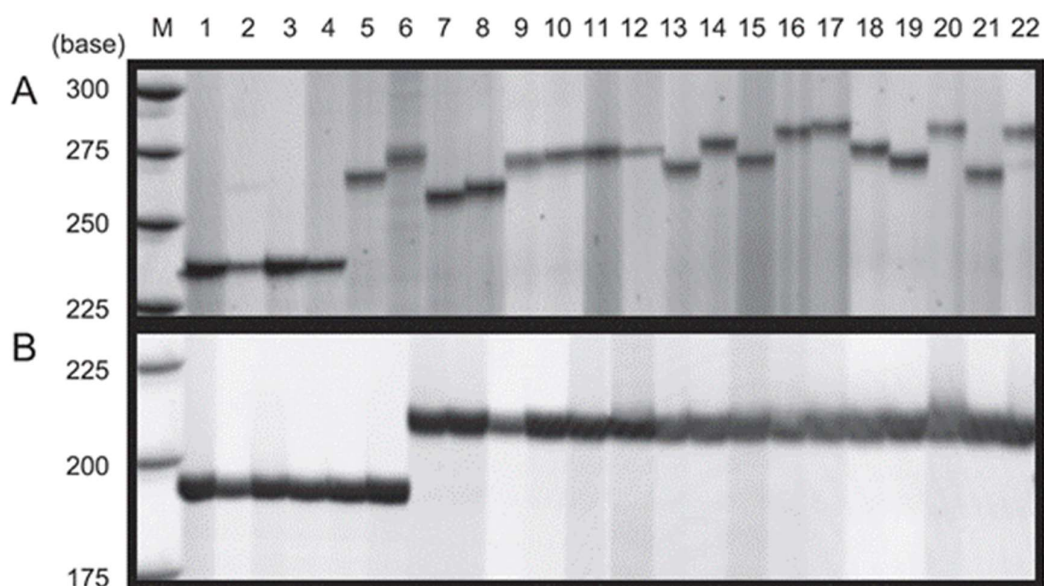
	Soil	Fertilizer <sup>1)</sup> (N-P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> -K <sub>2</sub> O, g/m <sup>2</sup> )	Density (plants/m <sup>2</sup> )	Year	Sowing date
Sapporo	Humus-rich Andosol	4-19-10	16.7	2006	22-May
Memuro	Light colored Andosol	2.1-17.5-9.1	8.3	2006	22-May
Tsukuba	Fluvaquents	3-10-10	5.5	2005	8-July

1) In addition, fused magnesium phosphate (100 g/m<sup>2</sup>) and magnesium line (100 g/m<sup>2</sup>) were applied to the soil in Tsukuba, while only magnesium lime (100 g/m<sup>2</sup>) was applied in Sapporo.



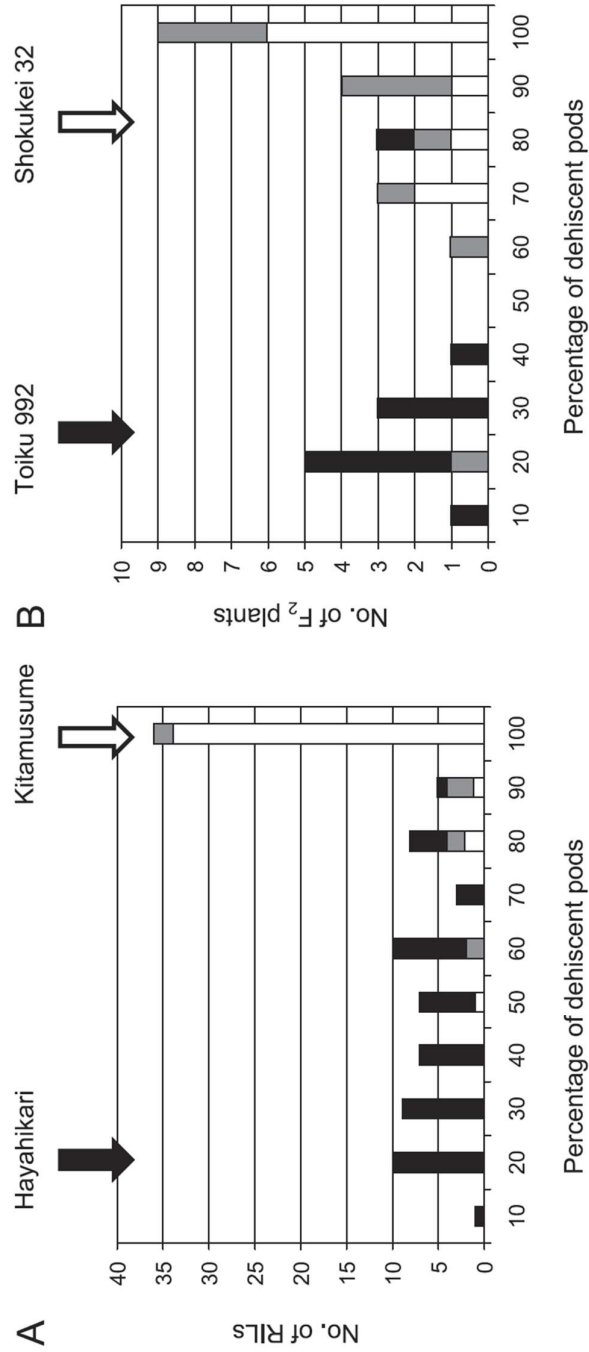
**Fig. 2-1-1.** Graphical genotype and shattering resistance degree of NILs derived from an RHL produced from HCL-F<sub>6;7</sub>-85, carrying a heterozygous genomic region around the Sat\_366 marker locus

85-A and 85-T: lines in which the genomic regions were fixed for the 'Hayahikari' (resistant) and for the 'Toyomusume' (susceptible) genotypes, respectively. Black and white triangles indicate the 'Hayahikari' and the 'Toyomusume' genotypes at the marker loci, respectively. Black, and white bars indicate the genomic fragments derived from 'Hayahikari' and 'Toyomusume', respectively. Gray bar shows that a recombination occurred somewhere in the region. Figures in the parentheses indicate the mean of the arcsine-transformed values of the percentage of dehiscent pods. Means with the same letter are not significantly different ( $P = 0.05$ ).



**Fig. 2-1-2.** PCR products for the SSR markers flanking *qPDH1* resolved on denatured polyacrylamide gels. (A) Sat\_093. (B) Sat\_366

Lane M, molecular marker. Lane 1, 'SJ2'. Lane 2, 'Hayahikari'. Lane 3-5, SJ2-derived, shattering-resistant cultivars/lines. Lane 6-9, shattering-resistant cultivars from USA. Lane 10-22, Japanese shattering-susceptible cultivars. The name of each cultivars/lines is listed in Table 2-1-1.



**Fig. 2-1-3.** Frequency distribution of populations from a cross between SJ2-derived, shattering-resistant cultivar/line and shattering-susceptible cultivar/line in terms of shattering resistance

A,  $F_{4:5}$  from the cross Hayahikari x Kitamusume. B,  $F_2$  from the cross Toiku 992 x Shokukei 32. Black, grey, and white bars indicate the genotypes of the resistant parent, the heterozygous and the susceptible parent at the Sat\_366 marker locus, respectively. In the experiment for B, ten plants were randomly selected from each genotype.



**Table 2-1-3.** Association between the Hayahikari allele at the Sat\_366 marler locus and shattering resistance in F<sub>4</sub> populations derived from the cross between Hayahikari and cultivars from the southwestern and central regions of Japan

Cultivar/line <sup>1)</sup>	Genotype at Sat_366	No. of plants	Percentage of dehiscient pods <sup>2), 3)</sup>	
Sachiyutaka		8	96.0 ± 5.2	(81.4 a)
F <sub>4</sub> (Sachiyutaka/Hayahikari)	Sachiyutaka	6	72.3 ± 13.9	(59.0 b)
F <sub>4</sub> (Sachiyutaka/Hayahikari)	Hayahikari	10	5.4 ± 8.0	(5.4 c)
Tachinagaha		10	86.0 ± 6.0	(68.5 ab)
F <sub>4</sub> (Tachinagaha/Hayahikari)	Tachinagaha	18	64.9 ± 24.1	(55.4 b)
F <sub>4</sub> (Tachinagaha/Hayahikari)	Hayahikari	11	0.3 ± 0.8	(1.4 c)

1) Hayahikari matured too early to evaluate its pod dehiscence degree.

2) Mean ± SD

3) Values in parenthesis indicate the mean arcsine-transformed values of the percentage of dehiscient pods. Means with the same letter are not significantly different (P = 0.05) by the Tukey-Kramer test.

## 2-2 難裂莢性 DNA マーカーの汎用性

QTL 領域 *qPDHI* 近傍の DNA マーカー、Sat\_366 を用いることで、‘SJ2’ に由来する難裂莢性品種・系統と日本国内の易裂莢性品種群を識別することが可能であったが、マーカー遺伝子型と裂莢性が一致しない品種が存在した (Funatsuki *et al.* 2008)。前述の裂莢性検定では通風乾燥機を用いて裂莢を促進したが、この加熱処理は自然条件下における裂莢を促進する条件とはメカニズムが異なる可能性が考えられる。また、‘ハヤヒカリ’ に由来する *qPDHI* 領域は国内の易裂莢性品種に対して有効な QTL であると考えられたが、DNA マーカーの高精度化および汎用性の確認が必要であった。

これまでに、国内では北海道において ‘SJ2’ 以外にも複数の難裂莢性遺伝資源が利用されてきた (Tsuchiya 1987)。米国品種 ‘Clark-Dt2 (L62-1251)’ は ‘カリユタカ’ の育成に用いられた (田中ら 1993)。また、‘ワセコガネ’ の難裂莢性は中国品種 ‘Zihua4 (紫花 4 号)’ に由来する (日本豆類基金協会 1991)。カナダ品種 ‘Harosoy’ は、モザイクウイルス抵抗性の導入を主な目的として導入された。これら複数の難裂莢性品種の導入経歴が存在する一方で、本州での栽培に適する品種への難裂莢性の導入は限定的であった。

育種の現場において、病害抵抗性 DNA マーカーと共に難裂莢性 DNA マーカーを利用することで、育種効率の改善につながると期待される。但し、米国品種 ‘Young’ に由来する難裂莢性の QTL が *qPDHI* と同じ領域に座上する (Bailey *et al.* 1997) 一方で、その他の米国難裂莢性品種については、難裂莢性 QTL の座上領域が不明である。そこで本研究では、‘SJ2’ 以外の難裂莢性品種に由来する難裂莢性が分離する集団を用いた QTL 解析および、由来の

異なる難裂莢性品種同志の交雑後代を用いた相補性検定により、それらの異なる遺伝資源に由来する難裂莢性 QTL 領域を明らかにすることを目的とした。

## 2-2-1 材料および方法

### 1) 植物材料

Table 2-2-1 の品種を用いて、以下の 6 種類の交雑に由来する分離集団および系統を養成した。

- 1) ‘トヨムスメ／Harosoy’ の交雑に由来する F<sub>5</sub> 世代 RILs および F<sub>2</sub> 集団
- 2) ‘カリユタカ／Harosoy’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団
- 3) ‘カリユタカ／ハヤヒカリ’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団
- 4) ‘ワセコガネ／ユキホマレ’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団
- 5) ‘カリユタカ／サチユタカ’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団
- 6) ‘ワセコガネ／サチユタカ’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団

これらの交雑に由来する集団を栽培試験および遺伝解析に供試した。

### 2) 栽培方法および収穫物の管理

栽培試験は農研機構北海道農業研究センター（以降「北農研」、北海道札幌市）および農研機構作物研究所（以降「作物研」と表記、茨城県つくば市）の 2 ヲ所で実施した。本州品種‘サチユタカ’を交配した後代集団は作物研において栽培し、その他の材料は北農研において

栽培した。栽培条件は前述の耕種概要 (Table 2-1-2) と同様であり、‘トヨムスメ/Harosoy’ の RILs は 2004 年、その他の材料は 2007 年に栽培試験を実施した。

いずれの植物材料についても成熟期に収穫を行い、収穫した植物体は屋外の乾燥舎で 1~3 カ月保管し、全ての材料の水分状態を揃えることで、成熟期の早晩性が裂莢率に与える影響を低減した。裂莢性検定の際は、周囲の気温および湿度が裂莢率に影響を与える可能性を考慮し、比較が必要なサンプルについては同時に処理を実施した。

### 3) 裂莢性の評価

F<sub>2</sub> 集団の各個体については、各個体から 10~20 莢をサンプリングした。また、RILs については、各系統の 10 個体から 10 莢ずつサンプリングし、各個体の裂莢率を調査した。通風乾燥器は 60°C に余熱し、ステンレスラックに莢を入れた紙封筒を吊り下げ、1 時間後および 3 時間後に取り出して、裂莢率を調査した。

### 4) 統計解析

裂莢率の統計解析は、アークサイン変換後に SAS 統計パッケージ (SAS Institute 1996) の一般線形回帰モデルを用いて一元配置の分散分析を実施した。

### 5) DNA マーカー解析

DNA 抽出については、Funatsuki *et al.* (2005) の手法に従い、葉もしくは種子から抽出し、

PCR および電気泳動は Funatsuki *et al.* (2005) および Ikeda *et al.* (2009) の手法に従い実施した。‘カリユタカ／サチユタカ’ および ‘ワセコガネ／サチユタカ’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団については、連鎖群 J (*qPDH1* が座上) のみの解析を実施し、それ以外の材料については全ゲノム領域を対象に解析を実施した。

DNA は前述の通り、種子もしくは葉から Funatsuki *et al.* (2008) の手法に基づいて抽出した。SSR マーカーを用いた PCR、および電気泳動については、前述の Funatsuki *et al.* (2005) の手法に加えて、Ikeda *et al.* (2009) の手法に基づいて、使用するサーマルサイクラーに、384-well thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を追加し、DNA 増幅酵素を AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems) へ変更して実施した。

## 6) 連鎖群の構築

‘トヨムスメ／Harosoy’ の F<sub>2</sub> 集団については、既報の文献でダイズ連鎖群の構築に用いられた SSR マーカー (Yamanaka *et al.* 2001、Song *et al.* 2004) の内、位置的な重複が無く、多型が認められた 161 個の SSR マーカーを用いてジェノタイピングを実施した。各個体の遺伝子型については「MAPMAKER/EXP 3.0b」(Lander and Botstein 1989) を用いてマーカー間の連鎖距離を算出し、「MapManager QTX」(Manly *et al.* 2001) を用いて連鎖地図を構築した。RILs については、ソフトウェアの仕様にに基づき、ヘテロ型を除外した上で計算を実施した。その他の分離集団についても同様の手順で、遺伝距離の計算および連鎖群の構築を実施

した。なお、F<sub>2</sub>集団および RILs の連鎖距離の計算には、それぞれ Kosambi 関数および Haldane 関数を使用した。

## 7) QTL 解析

裂莢性の QTL 解析については、裂莢率(%)をアークサイン変換した値を用いて実施した。個別マーカーについての統計解析は、「MapManagerQTX」を用いて実施し、Composite interval mapping (CIM) 法により解析を行った。CIM 解析では「QTL Cartographer ver.2.5」(Wang *et al.* 2007, <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>) の Model 6 を用い、遺伝背景のコントロールとして、10cM のウィンドウサイズで 5 個のマーカーを設定し、2cM 間隔で QTL の探索を実施した。対数オッズ (Log of the odds; LOD) 値の閾値については、1000 回の Permutation-test (並べ替え検定) を行い、ゲノムワイドの 5%有意水準に対応する値とした。

## 2-2-2 結果

### 1) 'Harosoy' に由来する難裂莢性の QTL 解析

‘トヨムスメ/Harosoy’の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団では、合計 2,780cM の連鎖地図を構築することができたが、多型を示すマーカーが得られない領域が複数存在し、全 20 本の染色体が 26 連鎖群に分割された。この連鎖地図を用いて CIM 解析を行ったところ、Permutation-test による閾値は LOD = 3.8 となり、連鎖群 J (第 16 染色体) および連鎖群 A2 (第 8 染色体)

に QTL が検出された。連鎖群 J に検出された QTL は、*qPDH1* の近傍領域であり、LOD = 10.2、寄与率は 31%であった (Table 2-2-2)。さらに、この QTL の検証として、同じ組合せに由来する F<sub>5</sub> 世代 RILs を用いた解析の結果、*qPDH1* 近傍の Satt621 のみに QTL が検出され、LOD = 9.7、寄与率は 34%であった (Table 2-2-2)。

## 2) その他の遺伝資源に由来する難裂莢性の QTL 解析 (連鎖群 J)

‘Harosoy’ に由来する難裂莢性 QTL についても ‘ハヤヒカリ’ と同様に、*qPDH1* 近傍領域に座上がることが示唆されたため、その他の難裂莢性品種を用いた F<sub>2</sub> 分離集団については、連鎖群 J のみについて検証を行った。その結果、‘カリユタカ／サチユタカ’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 分離集団については、LOD 値のピークは Satt620 と Sat\_350 の間に検出され、LOD = 50.1 であった (Fig. 2-2-1)。同様に、‘ワセコガネ／サチユタカ’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 分離集団についても同じ領域にピークが確認され、LOD = 42.6 であった (Fig. 2-2-1)。

F<sub>2</sub> 集団を用いた QTL 解析の結果から、難裂莢性アリルが劣性を示すことが示唆された (Table 2-2-2)。また、遺伝子型間の裂莢率を比較したところ、ヘテロ型グループの裂莢率が易裂莢性の親品種型グループと同様の値を示した (Fig. 2-2-2)。これらのデータから、これらの難裂莢性 QTL は劣性効果を有することが示唆された。

## 3) SSR マーカーを用いた対立性検定

‘SJ2’ に由来する難裂莢性遺伝子と比較するため、片親を ‘SJ2’ 由来の難裂莢性品種、もう

一方を、由来の異なる難裂莢性品種とする 2 組の F<sub>2</sub> 集団（‘カリユタカ／サチユタカ’ および ‘ワセコガネ／サチユタカ’）を用いて、Sat\_366 の遺伝子型によりグループ分けして裂莢率を比較した。その結果、両親型グループおよびヘテロ型グループとも同程度の裂莢率を示し、グループ間に有意な差異は認められなかった（Fig. 2-2-3）。

### 2-2-3 考察

ダイズの裂莢性については、品種間差異が大きいことが複数報告されている（Caviness 1965）。また、裂莢性の異なる品種間の交雑に由来する分離集団を用いた QTL 解析から、難裂莢性に寄与する主要な QTL が存在することが報告されている（Bailey *et al.* 1997、Funatsuki *et al.* 2006）。本研究では、‘トヨムスメ／Harosoy’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団を用いた QTL 解析により、主要な QTL を検出した。この F<sub>2</sub> 集団を用いて構築した連鎖群の規模 2,780cM については、従来の報告（Yamanaka *et al.* 2001、Song *et al.* 2004）の 90% 以上であることから、ほぼ全ゲノムについて QTL の存在を検討できたと考えられる。‘カリユタカ／サチユタカ’、および ‘ワセコガネ／サチユタカ’ の交雑に由来する F<sub>2</sub> 集団については、連鎖群 J のみを対象として解析を実施したが、検出された QTL の LOD 値および寄与率が十分に大きいことから、他の領域には主要な QTL は存在し得ないと考えられる。全体を通して、一つの主要な QTL と複数の効果の小さい QTL の存在が示唆された。この主要な QTL については、Bailey *et al.* (1997) および Funatsuki *et al.* (2006) によって報告されている通り、両者が用いた遺伝資源は異なり、QTL 最近傍の DNA マーカーも異なるが、両者は近接し、*qPDH1* 領域に位置す



る。このことから、*qPDH1* が主要な難裂莢性の QTL であり、従来から難裂莢性品種育成において世界的に重要な役割を担ってきたと考えられる。

この仮説を検証するため、由来の異なる難裂莢性の 3 品種間の相互交雑に由来する F<sub>2</sub> 分離集団について解析を実施した結果からは、全個体とも難裂莢性を示し、両親型とヘテロ型の間に有意な裂莢率の差異は認められず、‘ハヤヒカリ’、‘カリユタカ’ および ‘ワセコガネ’ の保有する難裂莢性遺伝子はいずれも *qPDH1* 領域に座上することが示唆された。*qPDH1* 領域の SSR マーカーである、Sat\_366、Satt621、Sat620 については、品種育成における MAS に利用可能な DNA マーカーと考えられる。*qPDH1* の効果は大きい、その他にも効果の小さい複数の QTL が存在する可能性がある。Tsuchiya *et al.* (1986) および Bailey *et al.* (1997) は、連鎖群 J 以外の領域にも効果の小さい複数の QTL が存在する可能性について報告している。本研究においても、‘トヨムスメ/Harosoy’ に由来する分離集団について、効果の小さい QTL を検出した。これら効果の小さい QTL については、検証が困難ではあるが、栽培環境との相互作用に係わる可能性があり、今後詳細な解析が必要である。

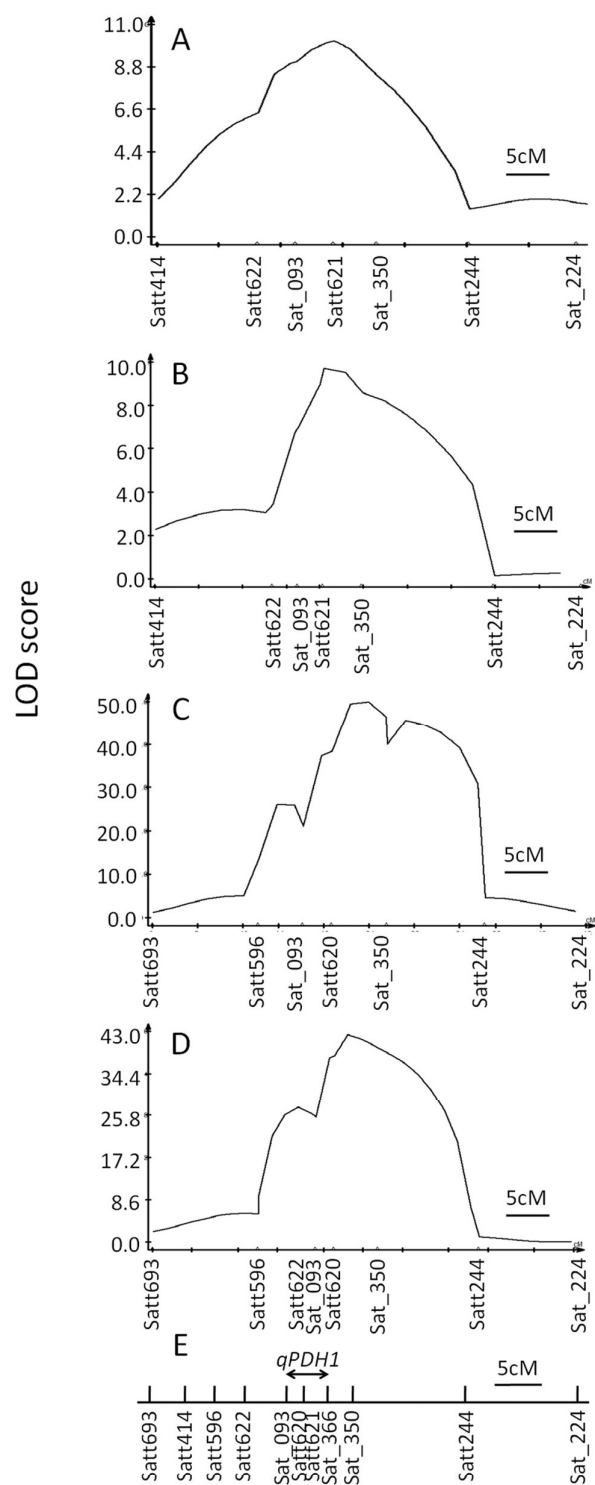
結論として、難裂莢性品種はその難裂莢性の由来が異なっても *qPDH1* 近傍に難裂莢性遺伝子を有することが明らかとなった。これらの原因遺伝子は *qPDH1* のアレルであると考えられる。*qPDH1* 近傍の DNA マーカーは、難裂莢性品種と易裂莢性品種間の交雑に由来する多様な分離集団において、MAS に利用することが可能である。難裂莢性が劣性遺伝であることから、これらの DNA マーカーは、連続戻し交雑による難裂莢性の導入に特に有効である。

**Table 2-2-1.** Soybean cultivars used as shattering-resistant and -susceptible parents

Cultivar	Shattering resistance	Source of resistance	Allele at SSR marker loci			Location <sup>1)</sup>
			Sat_366	Satt620	Satt621	
Hayahikari	Resistant	SJ2 (Thailand)	A	A	A	Hokkaido
Yukihomore	Resistant	SJ2	A	A	A	Hokkaido
Kariyutaka	Resistant	Clark-Dt2 (U.S.) <sup>2)</sup>	B	B	B	Hokkaido
Wasekogane	Resistant	Zihua 4 (China)	B	B	B	Hokkaido
Harosoy	Resistant	Unknown	B	B	B	Canada
Toyomusume	Susceptible	-	B	C	C	Hokkaido
Sachiyutaka	Susceptible	-	B	C	C	Kyushu

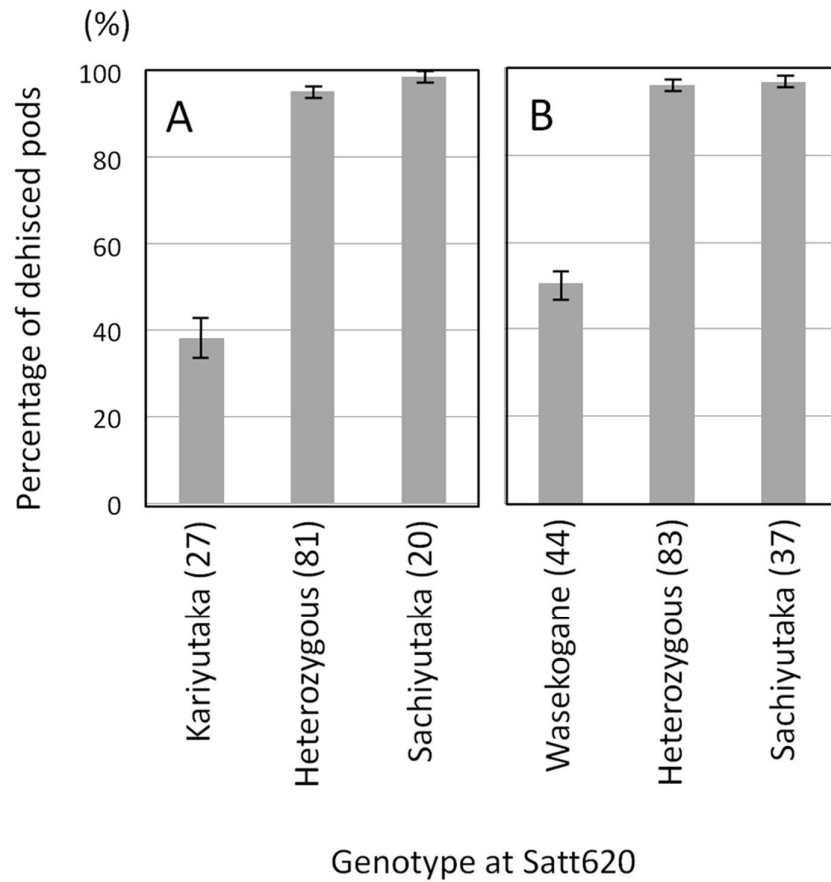
1) Location at which the cultivar/line was developed.

2) Line name: L62-1251.



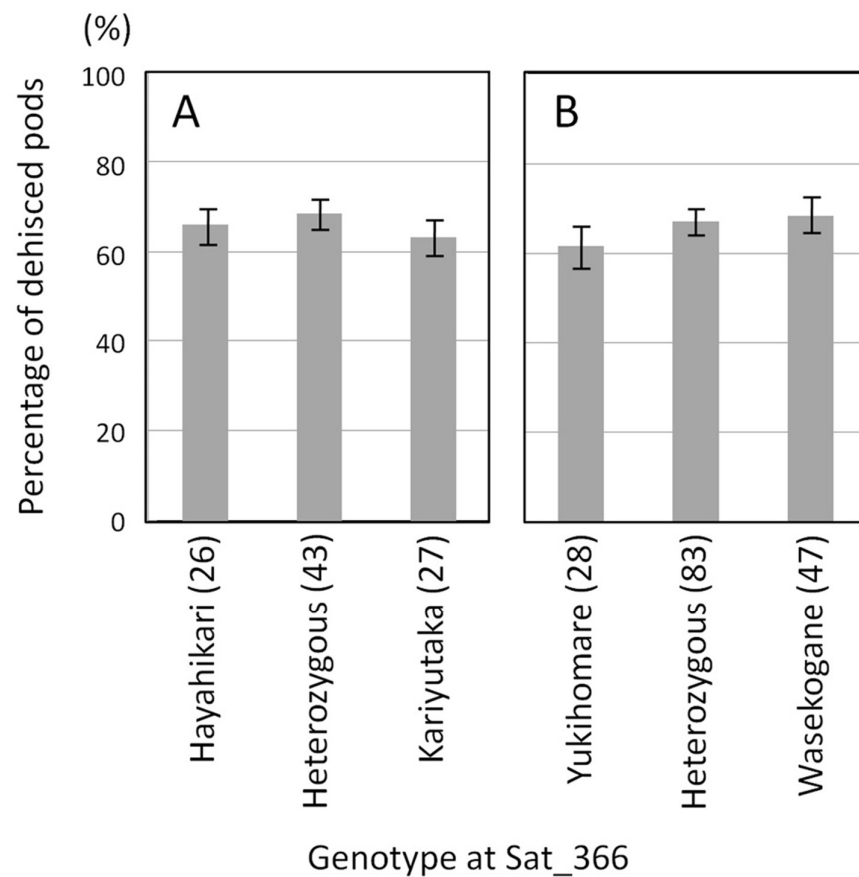
**Fig. 2-2-1.** LOD score plot on LG J for the QTL associated with shattering resistance in four segregating populations

A,  $F_2$  plants derived from a cross of Toyomusume x Harosoy. B,  $F_5$  RILs derived from a cross of Toyomusume x Harosoy. C,  $F_2$  plants derived from a cross of Kariyutaka x Sachiutaka. D,  $F_2$  plants derived from a cross of Wasekogane x Sachiutaka. E, Consensus linkage map of SSR markers used for analyses based on the study of Song *et al.* (2004) with a modification in the positions of Satt620 and Satt621, which were calculated with the population used in Funatsuki *et al.* (2008).



**Fig. 2-2-2.** Association between marker genotype at Satt620 and shattering resistance in the  $F_2$  populations derived from crosses between shattering-resistant and -susceptible cultivars

A, Kariyutaka (resistant) x Sachiyutaka (susceptible). B, Wasekogane (resistant) x Sachiyutaka (susceptible). Bars indicate standard errors. Numbers in parentheses indicate the numbers of individuals.



**Fig. 2-2-3.** Effect of marker genotype at Sat\_366 on shattering resistance in  $F_2$  populations derived from crosses between shattering-resistant cultivars

A, Hayahikari x Kariyutaka. B, Yukihomare x Wasekogane. Bars indicate standard errors. Numbers in parentheses indicate the numbers of individuals.

**Table 2-2-2.** Summary of quantitative trait loci (QTLs) for shattering resistance

Parents		Gene- ration	Position		LOD	$r^2$	Additive effect <sup>3)</sup>	Dominance effect <sup>4)</sup>
Susceptible	Resistant		LG <sup>1)</sup>	Marker <sup>2)</sup>				
Toyomusume (f) <sup>5)</sup>	Harosoy (m)	F <sub>2</sub>	J	Satt621	10.2	0.31	-16.2	7.3
			A2	Satt409	3.8	0.11	-10.3	1.7
		F <sub>4:5</sub>	J	Satt621	9.7	0.34	-8.8	-
Sachiyutaka (m)	Kariyutaka (f)	F <sub>2</sub>	J	Sat_350	50.1	0.86	25.7	24.8
Sachiyutaka (m)	Wasekogane (f)	F <sub>2</sub>	J	Satt620	42.6	0.65	22.3	18.5

1) Linkage groups (LG) were designated according to Song et al. (2004).

2) The marker closest to the QTL

3) Arcsine-transformed value. The additive effect indicates the effect of alleles from the male parent.

4) Arcsine-transformed value.

5) f: female parent, m: male parent

## 2-3 難裂莢性品種の導入による収量の安定化

これまでに、難裂莢性遺伝子 *pdh1* およびその近傍の塩基配列の多型に基づく DNA マーカーを利用して、難裂莢性に関与する QTL が座乗する染色体断片を‘フクユタカ’および‘サチユタカ’に、戻し交雑により置換した難裂莢性品種‘フクユタカ A1 号（旧、関東 120 号）’および‘サチユタカ A1 号（旧、関東 114 号）’が育成された（山田ら 2013）。今後、*pdh1* を用いた品種育成やその普及を進めるにあたり、1) 同遺伝子による難裂莢性が、実際の圃場条件下における収量にどの程度効果を及ぼし得るのか、2) 自然裂莢損失や機械頭部における収穫時の裂莢損失など、どのプロセスにおける収量損失の軽減に寄与し得るのか、3) どの程度の莢が脱穀されないまま収穫機から排出されるのか等の難裂莢性に起因する新たな課題の有無について明らかにしておく必要がある。

本研究では‘フクユタカ’および‘サチユタカ’と、その裂莢性を改善した‘フクユタカ A1 号’および‘サチユタカ A1 号’を、異なる 5 県において大規模栽培するとともにコンバイン収穫試験を行い、難裂莢性新品種への更新の効果について検証した。

### 2-3-1 材料および方法

#### 1) 植物材料

‘サチユタカ’および‘フクユタカ’を反復親として、いずれも MAS と 5 回の戻し交雑により、それぞれ北海道育成の大豆品種‘ハヤヒカリ’由来の難裂莢性を導入した‘サチユタカ A1 号’‘フクユタカ A1 号’（山田ら 2013）を供試し、複数の地域で複数の品種を用いた現地試験

を行い、コンバイン収穫により収量損失を評価した。

## 2) 調査方法

各栽培試験は、Table 2-3-1 に示す各県の現地圃場および農研機構作物研究所の試験圃場（作物研圃場）において実施した。現地試験におけるその他の耕種概要およびコンバイン収穫条件については、それぞれの地域の慣行法に従った(Table 2-3-1)。

コンバイン収穫に伴う調査の工程については Fig. 2-3 に示す通りである。「収穫前調査区」、「排出損失調査区」、「収穫後調査区」を設置し、生育特性および収量損失に関する調査を実施した。各試験における調査区の詳細は Table 2-3-2 に示す通りである。成熟期から収穫までの期間は、現地圃場では約 2～4 週間、作物研圃場では刈遅れ時の収量損失程度を評価するために約 6 週間とした。裂莢による収穫時の損失に関連する用語として、以下の定義を用いた。

1. 自然裂莢率 (Pod shattering rate before harvesting) : コンバイン収穫前に裂莢していた莢の割合 (%)、個体別に調査)
2. 自然裂莢損失 (Yield loss before harvesting) : コンバイン収穫前に「収穫前調査区」の土壌表面に粒として落下した単位面積あたりの子実の重量 ( $\text{g m}^{-2}$ )
3. 排出損失 (Discharge loss) : コンバインが「排出損失調査区」を通過する際に、後部の排出口から排出される子実の重量で、莢として排出された子実および粒として排出された面積あたりの子実の合計 (作物研のみで実施)( $\text{g m}^{-2}$ )



4. 全裂莢損失 (Total yield loss caused by shattering) : コンバイン収穫後に粒として「収穫後調査区」の土壌表面に落下および土壌表層に埋没していた面積あたりの子実の重量 ( $\text{g m}^{-2}$ )
5. 収穫時裂莢損失 (Yield loss caused by shattering at harvesting) : 全裂莢損失と自然裂莢損失の差分として算出された単位面積あたりの子実の重量 ( $\text{g m}^{-2}$ )
6. コンバイン収量 (Machine harvested yield) : 各品種・系統について栽培面積全体におけるコンバインで収穫した面積あたりの子実の重量 ( $\text{g m}^{-2}$ )
7. 収量損失率 (Total yield loss rate caused by shattering) : コンバイン収量に対する各収量損失の割合 (%)

現地圃場における全裂莢損失については、自然裂莢損失、コンバインの接触に伴う裂莢損失、粒として排出される子実、圃場に刈り残した莢および収穫時に刈り落した莢のうち、コンバインの踏圧により莢から押し出された子実粒が含まれる。現地圃場と作物研圃場における調査法の相違点として、作物研圃場では全裂莢損失に排出損失中の脱穀された子実粒が含まれない。

子実のタンパク質含有率については、近赤外分光光度計 (FOSS、Infratec 1241 Grain Analyzer) を用いて測定を実施した。窒素－タンパク質変換係数は 6.25 を使い、乾物重当たりの値として示した。

### 3) 統計処理

統計処理については、各試験の収量等の形質データについて、‘サチユタカ A1 号’ と ‘サチユタカ’ を ‘サチユタカ’ 群、‘フクユタカ A1 号’ と ‘フクユタカ’ を ‘フクユタカ’ 群として、関連 2 群の差の検定 (t 検定) により遺伝子型間の差を検定した。解析には R 言語の基本パッケージを用いた。コンバイン収量、各収量損失および収量損失率については片側 5% 有意水準で検定し、その他の形質データについては両側 5% 有意水準で検定した。各収量損失については、元データに「+1」した上で常用対数変換し、収量損失率については、アークサイン変換した値を用いた。

## 2-3-2 結果

### 1) 生育特性

概して、‘サチユタカ A1 号’ ‘フクユタカ A1 号’ については、生育特性および子実品質関連形質について、元品種と大きな差異は認められなかった。一方、難裂莢性戻し交雑品種の裂莢性程度は元品種に比べて小さく、収量損失の軽減が認められた。

難裂莢性品種である ‘サチユタカ A1 号’ のコンバイン収穫における子実収量は原品種よりも有意に高く、両品種の収量が低かった 2012 年の岡山現地圃場および 2012 年の兵庫現地圃場では、両品種の収量が高かった 2013 年の岡山現地圃場および 2013 年の作物研圃場に比べて、原品種との差異が拡大した (Table 2-3-3) 。 ‘フクユタカ’ 群のコンバイン収量については、品種間に有意差は認められなかったが、 ‘サチユタカ’ 群と同様に、両品種の収量が低かった

2013 年の愛知現地圃場では品種間差異が拡大し、‘フクユタカ A1 号’が多収となった (Table 2-3-3)。主な生育特性 (主茎長、分枝数、主茎節数、最下着莢節位高) および子実特性 (100 粒重、タンパク質含有率) については、難裂莢性品種と原品種の間に有意な差異は認められなかった (Table 2-3-4)。ただし、最下着莢節位高についてのみ ‘サチユタカ A1 号’が原品種よりも高かった (Table 2-3-4)。成熟期については、難裂莢性品種と原品種に大きな差異は認められなかった。

## 2) 裂莢率および収量損失

作物研圃場 (2013 年) の生育調査区の個体調査による自然裂莢率については難裂莢性品種が原品種よりも有意に低く (Table 2-3-4)、収量損失については全品種とも裂莢に伴う収量損失が発生したが、難裂莢性品種はそれぞれの原品種と比較し、自然裂莢、収穫時裂莢および全裂莢に係る収量損失および収量損失率について、ほぼ全ての試験において低かった (Table 2-3-3)。その結果、全裂莢損失については両品種群とも遺伝子型間に有意な差異が認められ、原品種の全裂莢損失率が高い条件下で収量損失率の差異が増加する傾向が認められた (Table 2-3-3)。一方、自然裂莢損失については ‘フクユタカ’ 群のみに有意な差異が認められ、‘サチユタカ’ 群では有意な差異が認められなかったが、両品種群とも難裂莢品種では自然裂莢損失がほぼ発生しない傾向が観察された (Table 2-3-3)。作物研圃場において測定された排出損失については、‘サチユタカ’ 群と ‘フクユタカ’ 群の各一試験であるが、全品種とも排出損失はコンバイン収量の 4% 以下であり、裂莢損失および排出損失を含めた全子実重に対

しても 3%以下であった (Table 2-3-3)。

### 2-3-3 考察

‘サチユタカ A1 号’ ‘フクユタカ A1 号’ については、生育特性に元品種と大きな差異は認められず、従来の栽培指針を用いた栽培が可能である。子実品質についても元品種と同等であり、従来の加工方法が適用可能である。また、易裂莢性品種であっても、環境条件によっては裂莢損失が少ない場合がある点については、以前の報告と一致する。難裂莢性の懸念材料として考えられていた、コンバイン排出口からの子実の排出（排出ロス）については、難裂莢性品種と易裂莢性品種で一定の傾向は認められず、全子実重における割合も微小であったため、実用上の問題は無いと考えられた。粒大がやや大きく、やや晩性であるなど若干の差異が認められ、これらは難裂莢性領域に連鎖した領域の効果と考えられたが、試験間の差異に比べて微小であり、流通上の支障は無いと考えられた。本研究では、供試した難裂莢性品種と原品種との間に、裂莢性以外の生育特性に明瞭かつ大きな差異は認められず、これは既往の報告（山田ら 2013）と一致するものであった。‘サチユタカ A1 号’ については最下着莢節位高が ‘サチユタカ’ よりもやや高い傾向が認められた。*pdh1* に連鎖する他の遺伝子の効果である可能性も考えられるが、コンバイン収穫適性が改善される方向であり、実用品種としての問題にはなりにくいと思われた。いずれの試験においても、全品種において自然裂莢損失および収穫時裂莢損失が発生したが、難裂莢性の 2 品種は全試験において双方の損失率が低く、特に収穫が遅れた場合など、原品種に自然裂莢が多発した試験ほど減収軽減効果が大

きかった。特に‘サチユタカ A1 号’では、本研究において、原品種と比較して 40%以上の減収軽減効果が認められた (Table 2-3-3)。*‘フクユタカ’* 群では試験数が少ないことと全体的に収量損失が少なかったこともあり、統計的に有意な減収軽減効果の差異が認められなかったが、*‘サチユタカ’* 群に類似する傾向が観察されていることから、より裂莢しやすい条件下での栽培では‘サチユタカ A1 号’と同様に減収軽減効果を持つと考えられる。*‘サチユタカ’* 群の自然裂莢損失および自然裂莢損失率について、統計的に有意な差異が認められなかったが、難裂莢性品種の自然裂莢損失および自然裂莢損失率は一貫して小さかった。難裂莢性品種の自然裂莢損失が常に僅かである一方で、易裂莢性品種の試験間分散が大きいことが関連 2 群の差の検定における有意差を低減していると考えられる。*pdh1* による自然裂莢損失の軽減効果として、裂莢しやすい条件下では難裂莢性品種と原品種の収量損失率の差異が大きくなり、裂莢しにくい条件下では差異が小さくなることがその機作から容易に推測される。これは、城田ら (2003) が、*‘フクユタカ’* を用いた試験において、自然裂莢損失は圃場間や年次の変動が大きく、年次によってはほとんど裂莢しないことがあるという報告と一致する。難裂莢性品種への置き換えは、刈り遅れによる収穫損失を軽減することで、収量安定性を改善する効果があると考えられる。ただし、‘サチユタカ A1 号’については自然裂莢損失率が少ない試験においても原品種より多収となっていることについては、難裂莢性以外にも品種として‘サチユタカ’から改良されている可能性が示唆された (Table 2-3-3、Table 2-3-4)。難裂莢性の欠点として、コンバイン内でも裂莢せず、排出口から未脱粒として子実が排出される損失が想定されている (北海道立総合研究機構 2002)。本研究では、全品種とも排出損失はコン

バイン収量の 4%以下、裂莢損失および排出損失を含めた全子実重に対しても 3%以下であり、収量に与える影響は軽微であった。また、全子実重を対象とした場合でも遺伝子型間の排出損失率に一定の傾向は認められず、コンバイン収量を対象とした場合は難裂莢品種の排出損失率が小さい傾向であった。さらに、脱穀性能の高い機種のコムバインを用いる（山口ら 2010）、もしくは収穫時の作業速度を下げる（北海道立総合研究機構 2002）ことで、未脱莢の発生を抑制する対策が報告されていることから、排出損失は難裂莢性品種の致命的な問題とはならないと判断された。

本研究では、日本国内の大規模ダイズ栽培における *pdh1* を利用した難裂莢性の付与に伴う減収軽減効果が確認された。今後、降雨直後や早朝など湿潤条件下での収穫が未脱莢の増加に及ぼす影響についても検討する必要があるが、本研究では各試験地の標準的な条件下でコムバイン収穫を実施することにより、*pdh1* による難裂莢性が裂莢による収量損失を効果的に抑制することが明らかとなった。また、難裂莢性品種であっても機械収穫時には比較的容易に裂莢し収量損失が発生するが、排出損失は収量損失と比較して少ない傾向が示された。

これらのことから、*pdh1* による適度な難裂莢性が機械収穫に適していることを示唆すると考えられる。山口ら（2010）がコムバイン脱穀部の性能の差が排出損失に影響する点を指摘しているように、コムバイン性能の向上に伴い、コムバイン収穫時の裂莢および排出損失は収穫機の改良等により軽減される余地があるが、裂莢に伴う収量損失については品種特性として対応することが重要である。農業経営の大規模化に伴い、難裂莢性品種の需要は北米等大規模生産地域と同様に日本国内においても今後高まると思われる。また、‘サチユタカ’ など

裂莢と青立ちが発生しやすい品種の普及地域や、作業の競合により刈り遅れが生じ易い地域では、難裂莢性導入品種の優位性がより大きくなると予測される。ただし、永島・篠崎（2009）が難裂莢性遺伝子の有無による品質劣化程度に差異が無いことを報告していることから、原品種と同様に刈り遅れによる品質劣化には留意する必要がある。本研究により、*pdh1*を利用した難裂莢性品種には、収量損失を軽減することで実質的な多収化に寄与できる潜在力があることが確認された。現行の主力品種に難裂莢性を戻し交配で導入した難裂莢性品種へ置き換えることにより、栽培や加工における対応の必要性を最小限に抑えながら、実質的な増収とその安定性をもたらすことが期待できる。

**Table 2-3-1.** Cultivation methods of field experiments

Experimental sites	Year	Cultivars <sup>1)</sup>	inter row ×inter hill (cm)	Machine harvesting area (m <sup>2</sup> )	Sowing date <sup>2)</sup>	Harvest date	Field type	Intertillage / Earthing up	Harvesting	
									Combine machines	Operation speed (km h <sup>-1</sup> )
Farmer's field in Okayama	2012	Sachiyutaka A1 gou	30×30	20000	6/11	11/22	Paddy	None	Yanmar, GS360	Low (0~2.3)
	2013	Sachiyutaka A1 gou	30×18	655	6/17	11/20	Paddy	None	Yanmar, GS360	Low (0~2.3)
Farmer's field in Hyogo	2012	Sachiyutaka A1 gou	30×13	30000	7/2	11/27	Paddy	None	Mitsubishi, VCH650XS	3.6~4.7
Farmer's field in Aichi	2013	Fukuyutaka A1 gou	70×15	1264	6/30	12/6	Paddy	Both	Kubota, RH380	2.5
Experimental field of NICS	2013	Sachiyutaka A1 gou	70×10	192	7/3	12/3	Upland	Both	Kubota, ARH430	3.0~4.0
	2013	Fukuyutaka A1 gou	70×10	767	7/3	12/24	Upland	Both	Kubota, ARH430	3.0~4.0
Farmer's field in Chiba	2014	Fukuyutaka A1 gou	75×15	3600	7/15	12/15	Paddy	Intertillage	Kubota, WRH1000	5.0

1) 'Sachiyutaka' and 'Fukuyutaka' were also evaluated with 'Sachiyutaka A1 gou' and 'Fukuyutaka A1 gou', respectively as controls.

2) In 2012, 'Sachiyutaka A1 gou' was sown one day before the control in Okayama, and one day after the control in Hyogo.



**Table 2-3-2.** Designs of field experimental plots

Experimental sites	Year	Survey plot area (m <sup>2</sup> )			Number of replications
		Pod Shattering loss		Discharge loss <sup>1)</sup>	
		Before harvesting	After harvesting		
Farmar's field in Okayama	2012	1.4	1.4	-	4
Farmar's field in Okayama	2013	1.4	1.4	-	4
Farmar's field in Hyogo	2012	1.4	1.4	-	4
Farmar's field in Aichi	2013	2.1	2.1	-	4
Experimental field of NICS	2013	4.2	4.2	14.0	4
Farmar's field in Chiba	2014	2.3	2.3	-	4

1) Yield loss discharged with crop residue was surveyed only in NICS.

**Table 2-3-3.** Machine harvested yields and yield losses of cultivars

Experimental sites	Year	Cultivars	Machine harvested yield (g m <sup>-2</sup> )	Yield loss before harvesting (g m <sup>-2</sup> )	Yield loss rate before harvesting (%)	Yield loss caused by shattering at harvesting (g m <sup>-2</sup> )	Yield loss rate caused by shattering at harvesting (%)	Total yield loss caused by shattering (g m <sup>-2</sup> )	Total yield loss rate caused by shattering (%)	Discharge loss (g m <sup>-2</sup> )
Farnar's field in Okayama	2012	Sachiyutaka A1 gou	182	0.1	0.1	14.6	8.0	14.7	8.0	
		Sachiyutaka	110	0.0	0.0	27.2	24.7	27.2	24.7	
	2013	Sachiyutaka A1 gou	235	0.3	0.1	4.8	2.0	5.1	2.2	
		Sachiyutaka	197	1.6	0.8	9.2	4.7	10.8	5.5	
Farnar's field in Hyogo	2012	Sachiyutaka A1 gou	205	0.6	0.3	35.3	17.2	35.9	17.5	
		Sachiyutaka	120	2.0	1.7	37.7	31.4	39.7	33.1	
Farnar's field in Aichi	2013	Fukuyutaka A1 gou	184	2.4	1.3	17.1	9.3	19.5	10.6	
		Fukuyutaka	127	31.3	24.6	23.8	18.7	55.1	43.2	
Experimental field of NICS	2013	Sachiyutaka A1 gou	218	2.8	1.3	40.4	18.5	43.2	19.8	8.2
		Sachiyutaka	167	77.9	46.6	28.2	16.8	106.1	63.4	6.7
		Fukuyutaka A1 gou	251	1.5	0.6	14.5	5.8	16.0	6.4	1.6
		Fukuyutaka	236	17.4	7.4	13.4	5.7	30.8	13.0	2.2
Farnar's field in Chiba	2014	Fukuyutaka A1 gou	228	0.1	0.0	27.6	12.1	27.7	12.1	
		Fukuyutaka	237	3.1	1.3	38.3	16.2	41.5	17.5	
Paired t-test		Sachiyutaka A1 gou	210 ± 11.1	1.0 ± 0.6	0.4 ± 0.3	23.8 ± 8.4	11.4 ± 3.9	24.7 ± 8.9	11.9 ± 4.1	
		Sachiyutaka	149 ± 20.3	20.4 ± 19.2	12.3 ± 11.4	25.5 ± 5.9	19.4 ± 5.7	45.9 ± 20.9	31.7 ± 12.0	
		P value	0.005 **	0.107 ns	0.150 ns	0.207 ns	0.066 ns	0.022 *	0.022 *	
		Fukuyutaka A1 gou	221 ± 19.6	1.3 ± 0.7	0.6 ± 0.4	19.7 ± 4.0	9.1 ± 1.8	21.1 ± 3.5	9.7 ± 1.7	
		Fukuyutaka	200 ± 36.4	17.3 ± 8.1	11.1 ± 7.0	25.2 ± 7.2	13.5 ± 4.0	42.5 ± 7.0	24.6 ± 9.4	
		P value	0.195 ns	0.010 *	0.058 ns	0.144 ns	0.125 ns	0.033 *	0.088 ns	

1) Yield loss caused by shattering at harvesting in NICS did not contain discharged loss, because of the examination for discharge loss conducted along with harvesting.

2) Yield losses were added with "+1" and transformed to common logarithm and yield loss rate values were arcsine transformed before statistic analysis.

3) \* and \*\* indicate significant difference at 5% and 1%, whereas "ns" indicates not significant (p>0.05).

**Table 2-3-4.** Field agronomic traits and seed traits of tested cultivars

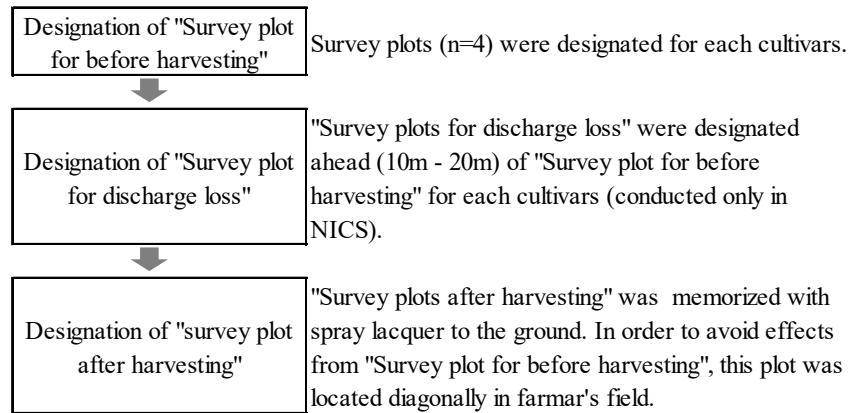
Experimental sites	Year	Cultivars	Field agronomic traits <sup>1)</sup>					Seed traits <sup>1)</sup>		
			Main stem length (cm)	Number of branches (Plant <sup>-1</sup> )	Number of nodes (Plant <sup>-1</sup> )	Minimum height of node with pods from soil surface (cm)	Pod shattering rate before harvesting <sup>2)</sup> (%)	100 seeds weight (g)	Seed protein content (%)	
Farmor's field in Okayama	2012	Sachiyutaka A1 gou	45.8 ± 3.1	4.5 ± 0.5	14.2 ± 0.3	12.1 ± 0.7	-	30.0 ± 0.6	44.3 ± 0.2	
		Sachiyutaka	40.1 ± 2.7	5.5 ± 0.6	14.6 ± 0.3	6.7 ± 0.3	-	30.1 ± 0.4	44.4 ± 0.5	
	2013	Sachiyutaka A1 gou	59.3 ± 0.5	1.9 ± 0.1	14.9 ± 0.2	17.2 ± 0.9	-	33.4 ± 0.4	43.3 ± 0.2	
		Sachiyutaka	50.2 ± 3.4	3.2 ± 0.2	13.4 ± 0.5	11.4 ± 1.6	-	31.8 ± 0.5	44.0 ± 0.0	
Farmor's field in Hyogo	2012	Sachiyutaka A1 gou	61.0 ± 1.7	1.8 ± 0.2	15.4 ± 0.2	14.3 ± 0.6	-	31.6 ± 1.0	44.8 ± 0.5	
		Sachiyutaka	43.7 ± 0.7	4.9 ± 0.2	14.3 ± 0.2	9.6 ± 0.2	-	32.7 ± 0.3	47.0 ± 0.3	
Farmor's field in Aichi	2013	Fukuyutaka A1 gou	62.5 ± 3.3	4.2 ± 0.5	15.2 ± 0.1	11.0 ± 1.2	-	26.5 ± 0.3	39.8 ± 0.6	
		Fukuyutaka	61.7 ± 3.2	4.7 ± 0.6	16.2 ± 0.6	11.6 ± 1.0	-	24.5 ± 0.8	39.7 ± 0.6	
Experimental field of NICS	2013	Sachiyutaka A1 gou	48.7 ± 4.5	3.3 ± 0.3	13.5 ± 0.1	11.2 ± 1.0	1.6 ± 0.4	31.4 ± 0.7	43.0 ± 0.2	
		Sachiyutaka	47.5 ± 1.8	4.0 ± 0.1	12.9 ± 0.3	8.4 ± 0.5	29.5 ± 8.5	30.8 ± 0.6	44.6 ± 0.1	
		Fukuyutaka A1 gou	76.7 ± 2.4	3.0 ± 0.2	16.6 ± 0.5	18.1 ± 1.1	3.1 ± 9.3	27.0 ± 0.6	42.1 ± 0.5	
		Fukuyutaka	72.8 ± 2.4	3.1 ± 0.3	15.9 ± 0.4	16.3 ± 0.6	13.9 ± 7.6	26.6 ± 0.2	42.2 ± 0.7	
Farmor's field in Chiba	2014	Fukuyutaka A1 gou	64.3 ± 2.9	4.6 ± 0.2	14.3 ± 0.4	13.2 ± 1.3	-	31.6 ± 0.6	46.4 ± 0.2	
		Fukuyutaka	69.5 ± 1.8	4.4 ± 0.3	14.4 ± 0.2	14.9 ± 1.8	-	29.8 ± 0.7	46.0 ± 0.3	
	Paired t-test	Sachiyutaka A1 gou	53.7 ± 3.8	2.9 ± 0.7	14.5 ± 0.4	13.7 ± 1.3	1.6 ± 0.4	31.6 ± 0.7	43.8 ± 0.4	
		Sachiyutaka	45.4 ± 2.2	4.4 ± 0.5	13.8 ± 0.4	9.0 ± 1.0	29.5 ± 8.5	31.3 ± 0.6	45.0 ± 0.7	
		P value	0.092 ns <sup>3)</sup>	0.071 ns	0.200 ns	0.006 **	0.003 **	0.674 ns	0.077 ns	
		Fukuyutaka A1 gou	67.8 ± 4.5	3.9 ± 0.5	15.4 ± 0.7	14.1 ± 2.1	3.1 ± 9.3	28.4 ± 1.6	42.8 ± 1.9	
		Fukuyutaka	68.0 ± 3.3	4.1 ± 0.5	15.5 ± 0.5	14.2 ± 1.4	13.9 ± 7.6	27.0 ± 1.5	42.6 ± 1.8	
	P value		0.960 ns	0.441 ns	0.811 ns	0.903 ns	0.014 *	0.113 ns	0.377 ns	

1) Field agronomic traits and seed traits are shown as Mean±MSE.

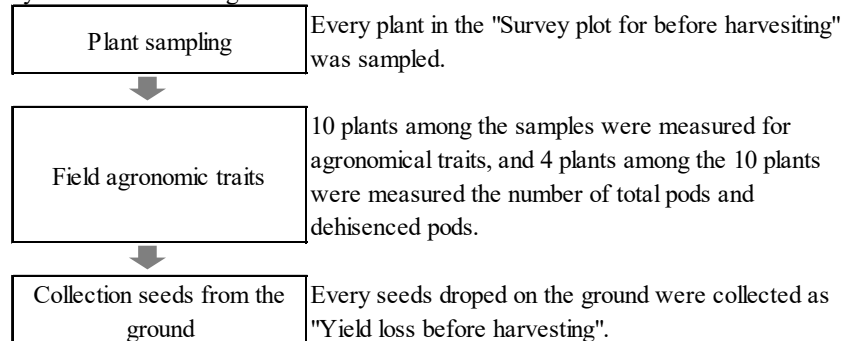
2) Pod shattering rate values for each plot ( $n = 4$ ) were arcsine transformed before statistic analysis.

3) \* and \*\* indicate significant difference at 5% and 1%, whereas "ns" indicates not significant ( $p > 0.05$ ).

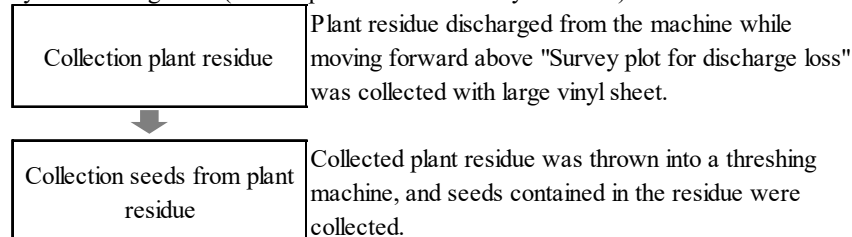
1. Designation of survey area (Details are described in Table and figures at lower right)



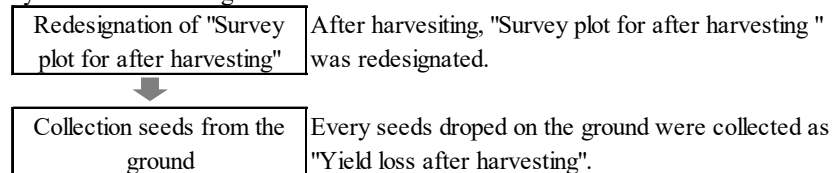
2. Survey for before harvesting



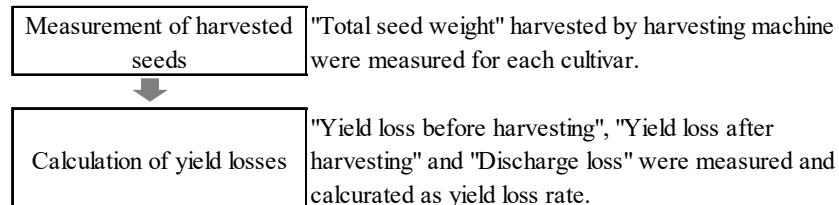
3. Survey for discharge loss (This step was conducted only in NICS.)



4. Survey for after harvesting



5. Measurement and analysis



**Fig.2-3.** Survey process of field agronomic traits and yield losses

### 第3章 青立ち性の改善による収量の安定化に関する遺伝・育種学的研究

#### 3-1 早晩性改変に伴う青立ち性およびその他の栽培特性の変化

大豆の青立ち障害（Green Stem Disorder; GSD）は莢先熟とも呼ばれ、大豆栽培における重要な問題である。青立ちが発生した際には、莢が成熟しても茎葉部が枯れずに残り、大豆が青立ちしている状態で、機械収穫を行うと、茎葉部の汁液が種皮に付着し、子実の外観品質を大きく損なう原因となる（Hill *et al.* 2006、守田ら 2006）。子実の外観品質の低下は、流通上の等級の低下を引き起こし、生産農家の利益の減少につながる。そのため、生産農家は青立ち状態での機械収穫を避け、コンバイン収穫に適した状態である茎水分含量が 40%を下回るまで圃場に放置する（農林水産省 1999）。その際に、日本の主力品種の大半が易裂莢性であるために、刈遅れに伴い自然裂莢が始まり裂莢損失が増加するというジレンマが存在した。この裂莢損失については、前述の通り難裂莢性 DNA マーカーの開発および、難裂莢性品種群の開発により軽減可能であった。一方、刈遅れに伴う経時的な外観品質の低下については抑制することができず、青立ちした場合の機械収穫の問題については依然として解決されていない。

青立ちの直接的な原因については諸説あるが、概してシンクサイズがソースサイズに比べて小さい時に引き起こされる（Egli and Bruening 2006、Shiraiwa *et al.* 2005）と説明されている。また、青立ちに関連する障害として、虫害が成熟期の遅延に影響すること（Boethel *et al.* 2000）、また、干ばつストレスは茎の成熟を遅らせることが報告されている（坂下ら 2003）。また、一般に早生品種は青立ちが発生しやすいことが知られている（羽鹿ら Personal

communication 2006)。つまり、高緯度地域（冷涼・長日条件）に適する品種を低緯度地域（高温・短日条件）で栽培した場合に、青立ちが多発することになるが、1) 品種の早晩性が直接的に青立ちに影響している、2) 晩生品種は青立ちしにくい特性を早晩性とは独立して保有している、という 2 つの可能性が予想される。もし、早晩性遺伝子単独の置換により青立ち特性の改善が可能であるならば、前述の通り MAS を利用した戻し交雑により、主力品種を反復親として戻し交雑系統を迅速に育成することが可能となるが、主茎長や耐倒伏性等の栽培特性の変化が許容できる範囲に収まることが、実際の品種育成に活用するための前提条件となる。

本研究では、はじめに、早晩性遺伝子座 *E2* 座および *E3* 座近傍の DNA マーカーを利用した戻し交雑により、遺伝情報が充実している代表的な主力品種‘エンレイ’の早晩性遺伝子型を改変した系統群を開発し、複数の地域における生育特性の調査を行い、遺伝子型改変の効果を検証した。

前述の通り、‘エンレイ’は高いタンパク質含有率を有することから、豆腐加工用原料として好まれ、国内で 2 番目の栽培面積を誇る主力品種である。また、近年全ゲノム配列が報告されたことで、遺伝解析や栽培試験における標準品種としての利用価値が高まっている。‘エンレイ’の栽培適地は新潟県を中心とした北陸地域やその周辺各県であり、他の大豆品種と同様に南北方向への広域適応性は低い。そのため、‘エンレイ’の有する開花・成熟に係わる遺伝子型を改変することで、‘エンレイ’銘柄として南北方向への栽培適地を拡大することは、流通上のロットサイズの拡大および同一銘柄品種の流通量の安定化につながる可能性を有す

る。

Cober and Morrison (2010) は大豆品種 ‘Harosoy’ の早晩性を改変することで幅広い緯度地域への適応可能性を示した。彼らは早晩性遺伝子型を改変した NILs を 20 系統用いて開花・成熟特性および子実重を調査し、生育期間が 112 日までは、生育期間と子実重の間に正の相関が認められるが、それ以降は生育期間の延長に伴う子実重の増加が無いことを報告した。また、早晩性の多様性は広域な緯度地域への適応を可能にすると同時に生育特性への多面的な影響をもたらすと結論している。

大豆の早晩性遺伝子座として、*E1* から *E10* および *J* が報告されており (Samanfar *et al.* 2017)、その他にも多数の早晩性に関与する QTL の存在が報告されている (Watanabe *et al.* 2012)。それらの中で、*E1*、*E2*、*E3*、*E4*については、国内品種における早晩性の差異に係わる主要な遺伝子座であり、それぞれ原因遺伝子が特定されていることから遺伝子上に設計された高精度な DNA マーカーを用いた選抜が可能となっている (Tsubokura *et al.* 2014)。

### 3-1-1 材料および方法

#### 1) 植物材料

‘エンレイ’の *E2*座および *E3*座を改変した NILs の作成には、晩生型 *E2*を‘サチユタカ’から、晩生型 *E3*を‘フクユタカ’から連続戻し交雑により導入した。戻し交雑および選抜経緯の詳細については Table 3-1-1 に示す通りである。BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub>世代では、全ゲノムをカバーする SSR マーカーパネルを用いて、目的領域がヘテロ型を示し、それ以外の染色体領域について

はできる限り‘エンレイ’に近づいた個体を花粉親として交配に用いた。‘サチユタカ’は‘フクユタカ’に‘エンレイ’を2度交配した後代から育成された品種である。‘エンレイ’、‘サチユタカ’、‘フクユタカ’の *E2*座および *E3*座の早晩性遺伝子型は、「*E1, e2-ns, e3-tr, E4* (以降 *E1, e2, e3, E4* と表記)」、「*E1, E2, e3-tr, E4* (以降 *E1, E2, e3, E4* と表記)」、「*E1, E2-dl, E3-Mi, E4* (以降 *E1, E2, E3, E4* と表記)」であり、‘フクユタカ’はいずれも晩生型アリルを有するが、‘サチユタカ’は *E3*座が早生型、‘エンレイ’は *E2*および *E3*座が早生型である (Tsubokura *et al.* 2014)。

また、‘フクユタカ’を反復親として、‘ハヤヒカリ’に由来する *e2*および *pdh1*を導入することにより早生化した‘作系 168 号 (フクユタカ\_*e2*)’を育成した。戻し交雑は *e2* 保有系統 (BC<sub>7</sub>) と *pdh1* 保有系統 (BC<sub>9</sub>) に分けて実施し、両系統の交雑後代から *e2*および *pdh1*を保有する個体の選抜を実施した。

## 2) DNA マーカー解析

*E2*座および *E3*座の遺伝子型判別については、*E2*座および *E3*座近傍領域の配列情報に基づく DNA マーカー (Table 3-1-2) を複数設計し MAS に用いた。また、全ゲノムをカバーする SSR マーカーパネルとして、‘エンレイ’と‘フクユタカ’の間に多型性を示す SSR マーカー (Hwang *et al.* 2009) を、およそ 12cM 間隔で合計 245 個選択して用いた。鋳型 DNA は葉から Biorobot EZ1 (Qiagen, Valencia, CA, USA) および Biosprint 96 (Qiagen) を用いて抽出した。プライマーはそれぞれ異なる蛍光色素で標識した。これらの DNA マーカーを用いて



以下の通り Sayama *et al.* (2011) の手法に基づいてサンプルの多型判別を実施した。PCR は 50 nM の蛍光標識プライマーペア、5ng の鋳型 DNA、2.5  $\mu$ l の 2 $\times$ Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany) を含む、合計 5.5  $\mu$ l の混合液を、サーマルサイクラー、GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて行った。温度サイクルは、95°C・15 分、(95°C・30 秒、50°C・90 秒、60°C・90 秒)  $\times$ 35 サイクル、60°C・30 分とした。反応後の 1  $\mu$ l の混合液と、0.3  $\mu$ l of GeneScan 600 LIZ Size Standard (Applied Biosystems) および、10  $\mu$ l の Hi-Di ホルムアミド (Applied Biosystems) を混合し、95°C・3 分間の加熱後、4°C に急冷して保存した。増幅されたフラグメントのサイズ解析は、3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) により、36cm の Capillary Array および POP-7 Polymer (Applied Biosystems) を用いて行った。

### 3) 栽培試験

‘エンレイ’ 早晩性 NILs の栽培試験は、2009 年および 2010 年にかけて Fig. 3-1-1 および Table 3-1-3 に示す 5 試験地（新潟県、長野県、香川県および茨城県内の 2 試験地）において実施した。栽培条件は各試験地における慣行法に従った。‘エンレイ’ および ‘エンレイ\_E2’ については、全ての試験において供試した。‘エンレイ\_E3’ については、作物研において 2009 および 2010 年、香川県において 2010 年に供試した。なお、各品種・系統は、大豆品種育成の中期世代の収量性を評価するための手法に基づき、2 反復での試験を実施した。

‘フクユタカ’ 系の早晩性 NIL である ‘フクユタカ\_e2’ についても、上記と同様に 2014 年

に作物研において栽培し、青立ち特性およびその他の農業特性について予備的な調査を実施した。耕種概要について、播種日が7月15日である他は、2010年の作物研に準じた。

#### 4) 生育調査

各生育特性の評価については以下の通りに実施した。開花期は試験区の中の50%の個体が開花した日とした。成熟期は試験区の中の80%の個体が成熟に至った日とした。これらの評価に基づき、開花まで日数は播種から開花期までの日数、生育期間は播種から成熟期までの日数、登熟期間は開花期から成熟期までの日数とした。主茎節数は子葉節から最上位節までの数とした。主茎長は子葉節から最上位節までの長さとした。子実収量は各試験区の面積当たりの子実重を15%の含水率に換算した重量とした。100粒重は2度計測した値の平均値を用いた。子実のタンパク質含有率については、近赤外分光光度計（Infratec 1241 Grain Analyzer; FOSS Tecator AB, Höganäs, Sweden）を用いて測定した。

#### 5) 青立ち指数の評価

青立ち指数の調査は莢が成熟した時点で、圃場での達観調査により評価した。古屋・梅崎（1993）は、茎葉と莢の成熟程度の整合性という観点から、青立ち指数を5段階に分類した。本研究では上記の判定法を改変し、莢の成熟した時点における茎葉部の状態を6段階に区分し、達観調査に基づく青立ち指数の評価を実施した。各個体における青立ち指数の評価は以下の基準に基づき評価した（Photo. 3-1）。0：葉身および葉柄は脱落し、主茎は乾いて褐色を

呈する。1: 葉身および葉柄は脱落し、主茎は水分を含み黄褐色を呈する。2: 葉身および葉柄は脱落し、主茎は水分を含み褪せた黄緑色を呈する。3: 葉身および葉柄は脱落し、主茎は鮮やかな緑色を呈する。4: 大半の葉身は脱落しているが、葉柄の一部は残り、主茎は鮮やかな緑色を呈する。5: 大半の葉身が残り、主茎は鮮やかな緑色を呈する。群落についての青立ち指数の評価は、群落内の個体の内、最も頻度の高い青立ち指数を基準として、それ以上の青立ち指数の個体が存在する場合は、+1とした。不稔の個体や莢の成熟前に枯死した個体については、青立ち指数の評価からは除外した。

## 6) 統計処理

圃場における生育特性および子実特性について、解析には SPSS17.0 (SPSS 2008; SPSS Inc, Tokyo, Japan) を用いて統計処理を実施した。各特性値については、系統および試験地を変数とした混合モデルを用いた F 検定により平均値を比較した。また、子実収量については、北寄り試験地（新潟県、長野県、茨城県水戸市）と南寄り試験地（香川県、茨城県つくばみらい市）に分けて、その他の特性値との相関分析により、早晩性別の最適条件を検討した。子実収量の品種間差異については、Tukey 法を用いた一元配置分散分析により解析を実施した。

## 3-1-2 結果

### 1) 晩生化系統の育成

全ゲノム領域をカバーする 245 個の SSR マーカーの内、‘エンレイ’と‘フクユタカ’の間

では、206 個が多型を示した。BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 世代の材料では、その 206 個のマーカーの中で、‘サチユタカ’ からの戻し交雑では 12 個 (8 染色体)、‘フクユタカ’ からの戻し交雑では 51 個 (17 染色体) のマーカーが遺伝子供与親型を示した。さらに、BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 世代では、‘サチユタカ’ からの戻し交雑では目的領域以外には ‘サチユタカ’ 型を示す領域が見当たらない 1 個体が得られたため、その自殖世代から目的領域を固定した BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> 世代の固定系統を NIL ‘エンレイ\_E2’ とした。‘フクユタカ’ からの戻し交雑では、BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 世代の固定系統を同様に NIL ‘エンレイ\_E3’ とした (Table 3-1-1)。

## 2) 早晩性遺伝子座の開花、成熟および子実収量に及ぼす効果

*E2* および *E3* を導入した両系統とも、‘エンレイ’ と比較して開花の晩生化が認められた (Table 3-1-4、Table 3-1-5、Table 3-1-6)。同様に、登熟期間および生育期間全体についても ‘エンレイ’ と比較して *E2* を導入した系統では延長効果が認められたが、いずれも試験との交互作用が存在した (Table 3-1-5)。晩生型 *E2* アリルの効果は、比較的長日条件であった新潟県、長野県、茨城県 (水戸市) において有意であり、比較的短日条件であった香川県と茨城県 (つくばみらい市、晩播) における試験では *E2* アリル間の差異は認められなかった (data not shown)。晩生型 *E3* アリルの登熟期間および生育期間全体に及ぼす効果については有意差が認められなかった (Table 3-1-6)。

生育量に関連する主茎節数や主茎長については、両晩生化系統が ‘エンレイ’ に比べて全ての試験において大きな値を示した (Table 3-1-4)。また、子実収量についても晩生化系統と

‘エンレイ’の間には品種間差異が認められた (Table 3-1-5、Table 3-1-6、Fig. 3-1-2)。一方、短日条件下では 両晩生化系統と ‘エンレイ’ の GSD index の差異が拡大し、晩生化系統が相対的に低い GSD index を示した (Table 3-1-8)。2010 年のつくばみらい市における試験では、‘エンレイ’の生育量関連形質および子実収量は特に低い値を示し、逆に GSD index は大きな値を示した (Table 3-1-4、Table 3-1-8)。

子実収量に関して、‘エンレイ\_E2’は短日条件下において相対的に多収となり、‘エンレイ’は長日条件下において相対的に多収となった (Table 3-1-4)。「エンレイ」と‘エンレイ\_E2’の収量性の順序に着目し、全ての試験を「南寄り／短日条件」と「北寄り／長日条件」に二分し、早晩性と子実収量の関係について解析した場合、開花まで日数と子実収量について、「南寄り／短日条件」で正の相関関係が認められた (Table 3-1-7, Fig. 3-1-3)。生育期間と子実収量についても同様の傾向が認められたが有意差は認められなかった。一方、北寄りの3試験では早晩性と子実収量の関係について負の相関が認められた (Table 3-1-7, Fig. 3-1-3)。

### 3) 早晩性改変系統の子実品質

エンレイを遺伝背景として保有する供試品種・系統間において、100 粒重およびタンパク質含有率に有意な差異は認められなかったが、試験地の効果は有意であった (Table 3-1-4、Table 3-1-5、Table 3-1-6)。

フクユタカを遺伝背景として保有する早生化系統 ‘Fukuyutaka\_e2’については、開花期および成熟期の早生化および、主茎長をはじめとする生育量関連形質の減少が認められ、逆に

青立ち程度については増加が認められた (Fig. 3-1-4)。

### 3-1-3 考察

#### 1) 全ゲノム領域を対象とした MAS による準同質遺伝子系統の開発

本研究では、全ゲノム領域を対象に MAS を実施することで、遺伝子供与親に由来する領域の分布と割合を把握することが可能であった。Table 10 に示すように、MAS を用いた戻し交雑を一年に 3 回実施することで、BC<sub>3</sub>~BC<sub>4</sub> 世代の戻し交雑系統を 3 年以内に収量性検定に供試することが可能であった。仮に、目的領域のみを識別する DNA マーカーのみを使用した場合、戻し交雑系統の完成度を高めるために追加で複数回の戻し交雑が必要となり、さらに戻し交雑系統の完成度を把握するために複数回の予備的な栽培試験が必要であった。今後は、全ゲノム領域を対象とした MAS により、育成年数の短縮と同時に複数の遺伝子座の選抜が可能になることが予想される。

#### 2) 早晩性遺伝子座の開花、成熟および子実収量に及ぼす効果

McBlain *et al.* (1987) は、開花後の生育ステージの進行が晩生型 *E2* および *E3* アリルによって遅延することを報告しているが、本研究においても、晩生型 *E2* アリルによって開花期以降の生育ステージの進行が遅延することが確認された。一方で、晩生型 *E3* アリルが開花期以降に及ぼす影響については効果が不明瞭であった。しかし、晩生型 *E2* アリルの効果が北寄りで長日条件に相当する試験において顕著であったことから類推すれば、仮に新潟県や長野県

において‘エンレイ\_E3’が供試されていれば、晩生型 E3 アリルについても効果が認められた可能性が高いと思われる。

晩生品種は早生品種に比べて必然的に積算受光量が多くなるため、潜在的な生産性は有利である。しかし、本研究では北寄りで長日条件となる試験において、生育期間と子実収量の間にやや負の相関が認められた。この晩生型 E2 アリルの減収傾向は倒伏程度の増加と相互遮蔽による部分が大きいと推察され、実際に北寄りの試験では‘エンレイ\_E2’は‘エンレイ’と比べて倒伏程度が大きいたことが観察されている。草姿関連形質である主茎節数や主茎長については、‘エンレイ’と比較して両晩生化系統が大きな値を示し、これらの草姿関連形質の差異は倒伏程度や相互遮蔽程度の差異につながっていることが推察される。

Cober and Morrison (2010) は、早晩性によって最適な栽培地域が存在することを指摘している。各地域における最適な早晩性遺伝子型を決定するためには、異なる試験地において、早晩性の遺伝子型タイプの異なる複数の戻し交雑系統の収量性を評価する必要がある。近年、E2座およびE3座に加えて、E1座およびE4座についても原因遺伝子が特定され、著者らは遺伝子上に設計されたDNAマーカーを用いた戻し交雑により、これらの遺伝子座について総当たり組合せで‘エンレイ’の早晩性遺伝子型を改変した系統群も開発しており、今後、各地域における最適な早晩性遺伝子型組合せが明らかとなることを期待している。

### 3) 晩生化系統の子実品質

晩生化系統の100粒重やタンパク質含有率、豆腐加工適性は元品種である‘エンレイ’と有

意な差異は無く、同等に扱うことが可能と思われた。そのため、早晩性改変育種による系統開発は、ある地域で優れた新品種が開発された際に、他の地域に対しても迅速に早晩性改変系統を開発できるという利点のみならず、元品種と同等の品質を持つ「品種群」としての栽培適地を拡大し、流通上のロットを増加させることができる可能性がある。

#### 4) 早晩性改変系統の青立ち特性

晩生化系統は元品種‘エンレイ’と比較して青立ち指数が増加しにくい傾向が認められ、早晩性は青立ちに対して直接的に影響すると考察された。特に、2010年のつくばみらい市のように、‘エンレイ’の収量性が少なく、青立ち指数が大きい場合に、晩生化系統との差異が拡大した。一方で、晩生化系統は元品種の栽培適地において増収効果が認められず、過繁茂に伴う倒伏程度の増加も観察されたことから、青立ち性の改善に晩生型遺伝子を利用するためには、耐倒伏性に優れた育種素材や矮性遺伝子等を同時に利用する必要があると考えられた。また、作期分散等の栽培面のニーズから早生化系統を利用する際には、青立ち指数が増加しやすくなる危険性を考慮する必要がある。

開花および着莢のタイミングを変えることで、開花および莢の伸長時の日長および気温、虫害の程度、莢が何らかのダメージにより脱落した際に再び着莢できる期間、等複数の要因が同調して変化するため、それらの要因を切り離して検証することは困難であり、晩生化系統が青立ちしにくい直接的な原因については明らかではない。しかし、晩生化に伴うバイオマス量の増加に起因する増収効果が期待されるのは、元品種の生育適地より南の地域であり、



元品種を栽培した際に青立ち指数が高く、生育量が不足するような場合に、その晩生化系統を利用するメリットがあると考えられる。

## 5) 早晩性改変育種の展望

本研究では、‘エンレイ’の早晩性遺伝子型の改変により、異なる緯度地域（南寄り・短日条件）における子実収量を改善することができることが明らかとなった。2010年香川県善通寺市における試験において‘エンレイ\_E2’の収量性は、収量性に優れる主力品種‘サチユタカ’と同程度となり、これら品種系統の早晩性遺伝子型はいずれも、「*E1, E2, e3, E4*」であったことから、この試験条件に適した遺伝子型であったと考えられる。一方、北寄り・長日条件における試験では、有意差無しもしくは若干の減収傾向であり、さらに、成熟期を降雪地帯における収穫晩限に間に合わせるためにも‘エンレイ’の早い成熟特性を晩生側に改変することは困難であると考えられた。従って、各環境条件や栽培体系に適した早晩性遺伝子型を調査し、その早晩性遺伝子型を有する育種素材に的を絞った圃場選抜を実施することで、育種効率の高精度化を図ることができると思われる。

**Table 3-1-1.** Summary of back-crossing for *E2* and *E3* in ‘Enrei’

	Parent <sup>1)</sup>	BC <sub>0</sub> <sup>2)</sup>	BC <sub>1</sub>	BC <sub>2</sub>	BC <sub>3</sub>	BC <sub>4</sub>
Name of parent carrying <i>E2</i>	Sachiyutaka					
Number of plants genotyped at F <sub>1</sub>		20	19	2	80	
Number of plants developing next generation after DNA marker-assisted selection		20	9	2	1	
Sowing year and month	2007.2	2007.7	2007.11	2008.2	2008.7	
Number of plants genotyped at F <sub>2</sub>					73	
Number of samples carrying donor allele in homozygote at <i>E2</i>					19	
Sowing year and month					2008.11	
Name of parent carrying <i>E3</i>	Fukuyutaka					
Number of plants genotyped at F <sub>1</sub>		10	35	4	30	98
Number of plants developing next generation after DNA marker-assisted selection		10	21	1	1	1
Sowing year and month	2007.2	2007.7	2007.11	2008.2	2008.7	2008.11
Number of plants genotyped at F <sub>2</sub>						111
Number of samples carrying donor allele in homozygote at <i>E3</i>						23
Sowing year and month						2009.2

1) ‘Enrei’ was crossed as recurrent parent in every generation.

2) BC<sub>0</sub> indicates single-cross.

**Table 3-1-2.** The marker panels for estimating *E2* and *E3* genotypes used in the multiplex PCRs

Marker name	Dye <sup>1)</sup>	Forward sequence (5' to 3')	Reverse sequence (5' to 3')	Location in Phytozome database <sup>2)</sup>	Amplicon size (bp) <sup>3)</sup>	
					Enrei	Fukuyutaka
E2at_U46k	6-FAM	GGATAATTCTTCTGCAGCCATG	TCGAACCTTTGAGTGCAATTC	34 kb upstream away from <i>E2</i> region	214	204
E2at	PET	GTGCCTTTCCTGCCTTTTCA	TCGGCCATTTTAACTTG TG	Inside of <i>E2</i> region	305	311
E2at_D82k	NED	CGTCTATTCTATGTTTCGTG	GAATGGACATTTTGTGGATC	70 kb downstream away from <i>E2</i> region	223	225
GMES4019	PET	TCAATTCGTTAAATCTGTTGTCC	ATGGTACGTGTGTGGTCC	189 kb downstream away from <i>E2</i> region	ND <sup>4)</sup>	155
E3at-U113k	NED	CAACCTAACTCGTGACCAC	CACAAAGCCGTTGTATCCTTA	113 kb upstream away from <i>E3</i> region	379	352
FT3SSR4	VIC	GCCTATTTAGAAACCAATCCA	CCGCTAGCAACTTTACTG	1 kb upstream away from <i>E3</i> region	306	304
FT3SSR1dom	VIC	ATTAAATCGTTGACTCGGTACTCC	GGACTTAGAATGGAGGGCATAAA	1 kb downstream away from <i>E3</i> region	ND	283
FT3SSR3	PET	CATTTCCATTGTGCCTACCAC	TTTCTTCCTTCTCTCACCCTACT	19 kb downstream away from <i>E3</i> region	ND	344

1) Fluorescent material referred to Applied Biosystems was attached together with the tail of several nucleotides before 5' end of forward primer.

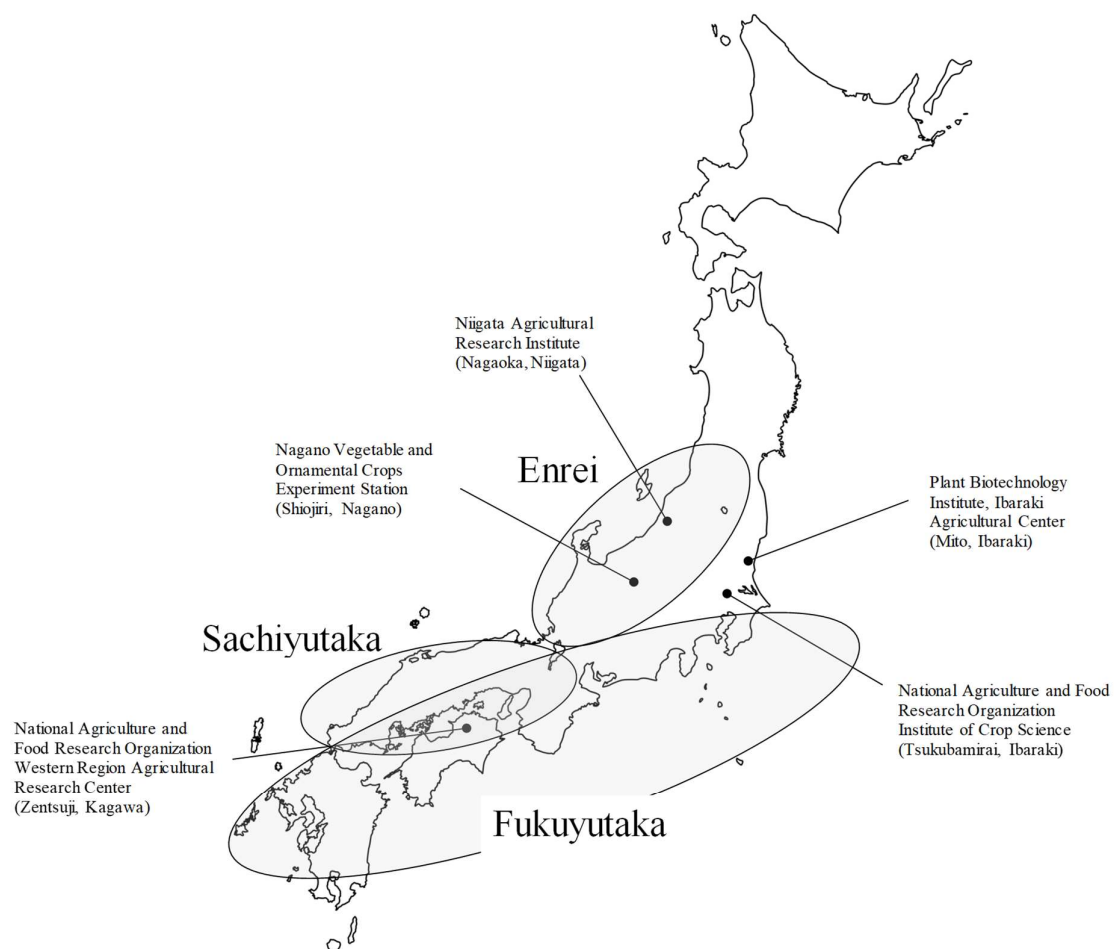
2) <http://www.phytozome.net/soybean> (Schmutz et al. 2010)

3) 'Sachiyutaka' showed the same pattern as 'Fukuyutaka' around *E2* and 'Enrei' around *E3*.

4) No amplicons.

**Table 3-1-3.** Experimental sites and growth conditions

Experimental sites	GPS	Year	Day of sowing	Inter-low (cm)	Intra-low (cm)	Number of plants per hill	Measurement area				Amount of fertilizer applied				
							Low length (m)	Number of rows	Number of plants	Plot area (m <sup>2</sup> )	Number of replication	Soil type	N:P:K (kg/ha)	MgCl <sub>2</sub> (kg/ha)	Compost (t/ha)
Niigata Agricultural Research Institute (Nagatsuka, Niigata)	37°26'14N, 138°52'26E	2009	21-May	75	15	1	3.0	3	60	11.25	2	Andosol	16:40:60	—	—
Nagano Vegetable and Ornamental Crops Experiment Station (Shiojiri, Nagano)	36° 6'11N, 137°56'0E	2010	1-Jun	75	16.7	1	2.0	2	24	9.00	2	Andosol	36:144:72	600	10
Plant Biotechnology Institute, Ibaraki Agricultural Center (Mito, Ibaraki)	36°26'24N, 140°26'57E	2010	22-Jun	60	15	1	2.7	5	30	9.00	2	Andosol	30:100:100	—	10
National Agriculture and Food Research Organization Institute ofCrop Science (Tsukubamirai, Ibaraki in 2009)	36° 0'26N, 140° 1'19E	2009	26-Jun	70	13	1	3.0	4	92	8.40	2	gray lowland soil	30:100:100	1000	—
National Agriculture and Food Research Organization Institute ofCrop Science (Tsukubamirai, Ibaraki in 2010)	36° 0'26N, 140° 1'19E	2010	15-Jul	70	13	1	3.0	4	92	8.40	2	gray lowland soil	30:100:100	100	—
National Agriculture and Food Research Organization Western Region Agricultural Research Center (Zentsui, Kagawa)	34°13'47N, 133°46'36E	2010	11-Jun	70	13	1	2.5	3	90	5.25	2	gray lowland soil	30:100:100	1000	10



**Fig. 3-1-1.** Locations of experimental sites and cultivation areas of Enrei, Sachiutaka and Fukuyutaka



0 1 2 3 4 5

**Photo. 3-1.** Matured soybean plants in deferent GSD conditions (0-5).

**Table 3-1-4.** Averages and standard deviations of agronomic traits of 'Enrei' and its NIL for maturity genes, *E2* and *E3*

Experimental sites	Lines	Flowering time (day)	Seed-filling period (day)	Maturity (day)	MSN <sup>1)</sup> (plant <sup>-1</sup> )	MSL <sup>2)</sup> (cm)	Lodging (0-5)	Seed productivity (kg/a)	100-seed weight (g)	Protein (%)
Nagaoka, Niigata	Enrei_E2	67.0 ± 1.4	82.0 ± 2.8	149.0 ± 4.2		76.7 ± 5.6	2.0 ± 0.0	31.1 ± 4.0	35.7 ± 2.4	45.9 ± 1.8
	Enrei	59.0 ± 0.0	73.5 ± 0.7	132.5 ± 0.7		66.0 ± 3.6	0.0 ± 0.0	32.3 ± 2.4	34.7 ± 2.5	44.6 ± 0.5
Shiojiri, Nagano	Enrei_E2	62.0 ± 2.8	95.0 ± 2.8	157.0 ± 0.0	17.5 ± 0.2	75.0 ± 4.0	2.5 ± 0.5	31.5 ± 1.1	30.6 ± 0.1	46.1 ± 0.4
	Enrei	53.0 ± 0.0	78.0 ± 0.0	131.0 ± 0.0	15.2 ± 0.2	66.1 ± 0.8	0.5 ± 0.5	35.1 ± 2.9	30.1 ± 0.1	46.5 ± 0.1
Mito, Ibaraki	Enrei_E2	44.5 ± 0.7	78.0 ± 4.2	122.5 ± 3.5	15.8 ± 0.7	71.1 ± 4.5	1.8 ± 0.3	32.9 ± 0.6	28.6 ± 2.6	44.2 ± 1.8
	Enrei	39.0 ± 0.0	69.5 ± 0.7	108.5 ± 0.7	12.7 ± 0.1	50.5 ± 4.0	0.3 ± 0.3	36.6 ± 1.2	29.9 ± 1.8	43.9 ± 1.3
Tsukubamirai, Ibaraki in 2009	Enrei_E2	45.5 ± 0.7	69.0 ± 0.0	114.5 ± 0.7	16.2 ± 0.2	76.5 ± 3.3	4.0 ± 0.0	44.0 ± 5.1	33.0 ± 0.6	46.9 ± 1.5
	Enrei_E3	43.5 ± 0.7	69.0 ± 1.4	112.5 ± 2.1	15.0 ± 0.7	71.7 ± 0.2	3.0 ± 0.0	35.6 ± 1.7	31.2 ± 2.9	46.6 ± 1.2
	Enrei	39.0 ± 0.0	65.0 ± 2.8	104.0 ± 2.8	12.2 ± 0.2	53.8 ± 0.8	3.0 ± 0.0	31.5 ± 6.8	29.6 ± 2.8	46.2 ± 1.5
	Enrei_E2	44.0 ± 0.0	88.0 ± 0.0	132.0 ± 0.0	14.1 ± 0.1	59.3 ± 0.4	2.5 ± 0.5	40.9 ± 2.2	28.7 ± 0.6	44.2 ± 0.0
Zentsuji, Kagawa	Enrei_E3	44.0 ± 0.0	85.5 ± 2.1	129.5 ± 2.1	13.7 ± 0.6	61.6 ± 4.1	2.0 ± 1.0	33.3 ± 2.8	29.3 ± 0.6	46.7 ± 0.5
	Enrei	38.0 ± 0.0	91.5 ± 2.1	129.5 ± 2.1	12.1 ± 0.3	50.2 ± 3.5	0.0 ± 0.0	24.6 ± 3.9	30.7 ± 0.3	47.7 ± 0.6
	Enrei_E2	39.0 ± 0.0	72.5 ± 4.9	111.5 ± 4.9	13.9 ± 0.4	59.5 ± 6.9	1.5 ± 0.5	24.8 ± 1.0	28.1 ± 1.9	44.1 ± 0.1
Tsukubamirai, Ibaraki in 2010	Enrei_E3	37.5 ± 0.7	70.0 ± 0.0	107.5 ± 0.7	13.3 ± 0.8	54.2 ± 1.8	0.0 ± 0.0	22.1 ± 0.8	27.8 ± 0.8	44.6 ± 0.3
	Enrei	33.0 ± 0.0	69.0 ± 0.0	102.0 ± 0.0	11.9 ± 0.1	49.4 ± 0.4	1.0 ± 0.0	16.3 ± 1.6	29.1 ± 1.0	45.8 ± 1.1

1) The number of nodes on the main stem (MSN) was measured as the number of nodes on main stem from the cotyledonary node to the top node without the top peduncle for ten normally grown plants.

2) Main stem length (MSL) was measured as the length from the cotyledonary node to the top node without the top peduncle for ten normally grown plants. Average ± SE.

3) Each trait value was displayed in 'average ± SE'.

**Table 3-1-5.** Mean squares of agronomic traits of 'Enre1 and its NIL for maturity gene, *E2*

Mean square	Flowering time (day)	Seed-filling period (day)	Maturity (day)	MSN (plant <sup>-1</sup> )	MSL (cm)	Seed productivity (kg/a)	100-seed weight (g)	Protein (%)
Line	280.2 *** <sup>1)</sup>	240.7 **	1040.2 ***	36.7 ***	1127.5 ***	151.5 *	0.1	1.7
Experimental site	458.7 ***	320.8 ***	1049.6 ***	7.5 ***	221.4 **	225.6 **	22.4 *	3.6
Line * Experimental site	1.9	46.7 **	62.2 ***	0.7 **	39.2	72.4 **	3.9	3.1
Error	0.9	6.0	5.8	0.1	14.1	10.7	3.0	1.2

1) F-test using mixed model. \*, \*\* and \*\*\* indicate significant difference at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.



**Table 3-1-6.** Mean squares of agronomic traits of 'Enrei' and its NIL for maturity gene, *E3*

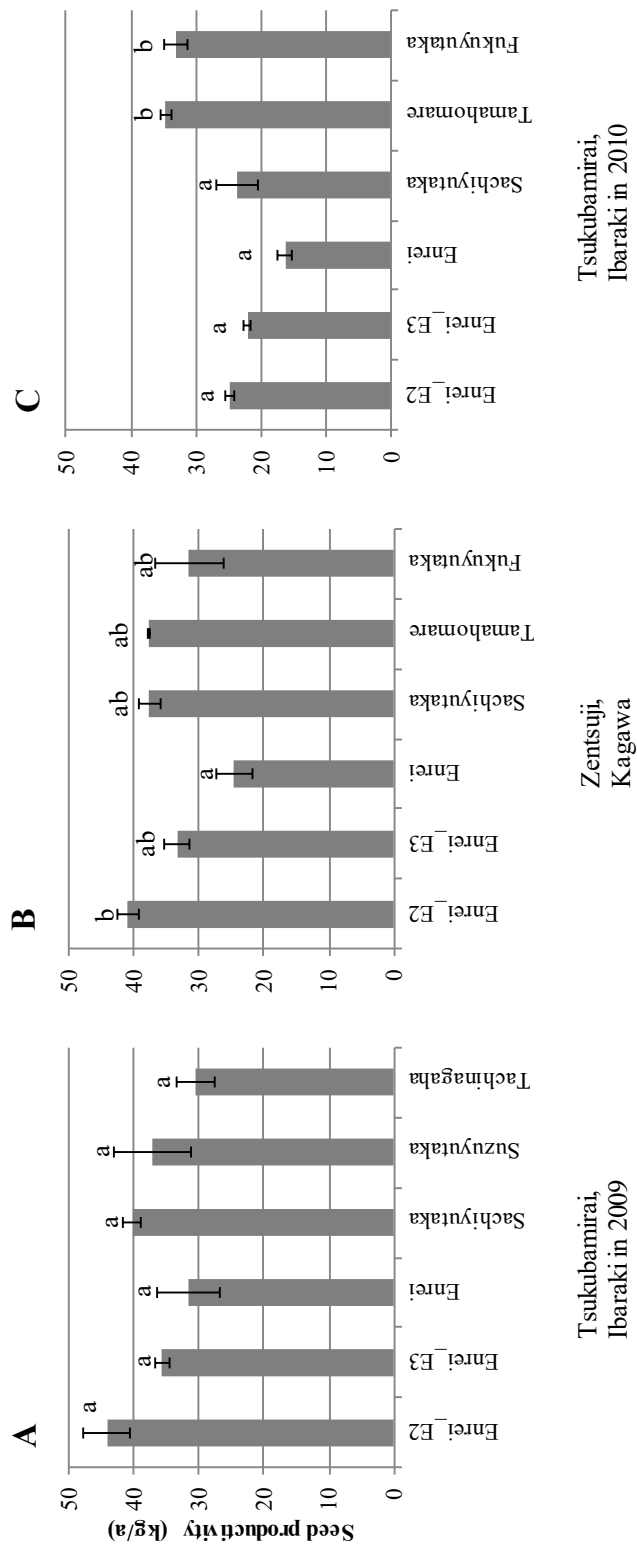
Mean square	Flowering time (day)	Seed-filling period (day)	Maturity (day)	MSN (plant <sup>-1</sup> )	MSL (cm)	Seed productivity (kg/a)	100-seed weight (g)	Protein (%)
Line	75.0 ** <sup>1)</sup>	0.3	65.3	11.6 *	387.6	115.3 *	0.4	1.0
Experimental site	46.1 *	553.0 *	717.6 *	1.0	121.8	213.8 *	4.2	4.0
Line * Experimental site	0.8	26.3 *	18.6	0.6	43.2 *	5.6	3.0	0.7
Error	0.2	3.2	3.7	0.3	5.5	12.5	3.1	1.0

1) F-test using mixed model. \*, \*\* and \*\*\* indicate significant difference at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.

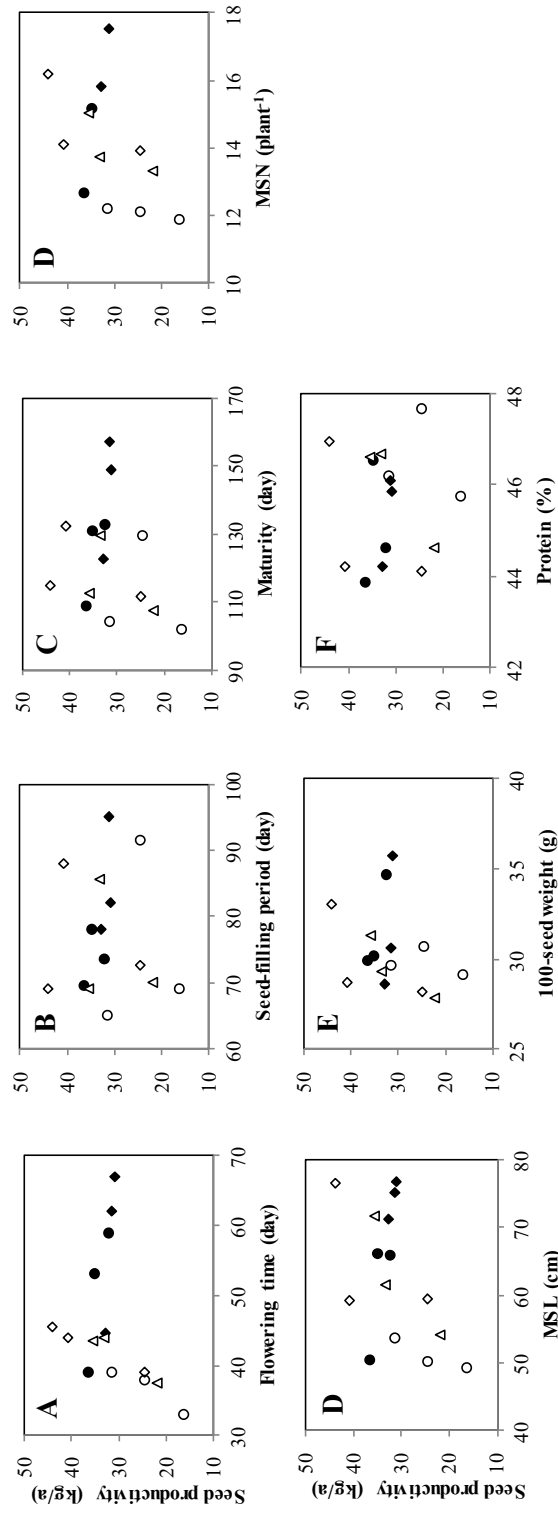
**Table 3-1-7.** Coefficient of correlation between seed productivity and other agronomical traits

Lines / sites	Flowering time (day)	Seed-filling period (day)	Maturity (day)	MSN (plant <sup>-1</sup> )	MSL (cm)	100-seed weight (g)	Protein (%)
Total	0.03	-0.14	-0.07	0.13	0.27	0.29	0.02
Northern sites	-0.44	-0.72 **	-0.64 *	-0.73 *	-0.41	0.20	-0.55
Southern sites	0.91 *** <sup>1)</sup>	0.13	0.43	0.70 **	0.71 **	0.51	0.26

1) \*, \*\* and \*\*\* indicate significant difference at 5%, 1% and 0.1% levels, respectively.



**Fig. 3-1-2.** Seed productivity of 'Enrei' and its NILs for maturity genes, *E2* and *E3*, and Japanese leading cultivars  
 Error lines represent standard error of the mean. Different letters indicate significantly different ( $P > 0.05$ ).

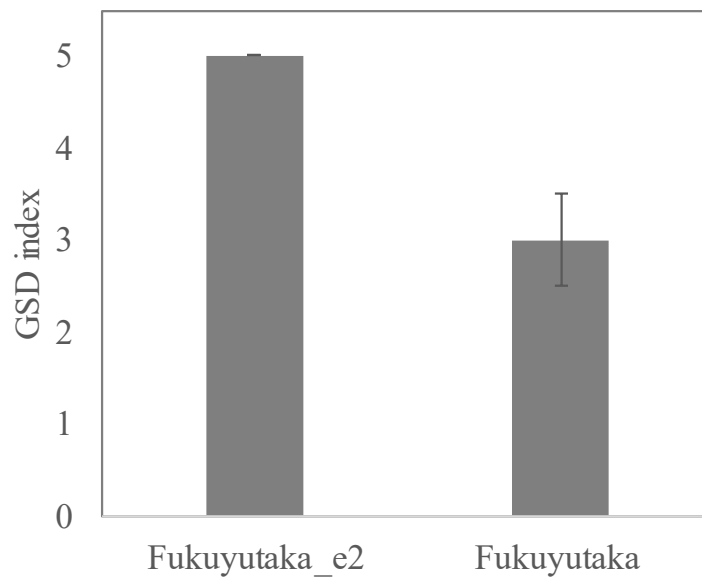


**Fig. 3-1-3.** Relationship between agronomical traits and seed productivity for 'Enrei' and its near-isogenic lines (NILs) for maturity gene, *E2* and *E3*

Circle, Square and triangle legends indicate 'Enrei', 'Enrei\_ *E2*' and 'Enrei\_ *E3*', respectively. Open and closed legends indicate southern and northern sites, respectively. MSN, number of nodes on the main stem; MSL, main stem length.

**Table 3-1-8.** GSD index of cultivar and lines

Experiments	Plant materials	GSD index (0-5)
Nagaoka,	Enrei_E2	2.0
Niigata	Enrei	1.0
Shiojiri, Nagano	Enrei_E2	1.0
	Enrei	3.5
Mito, Ibaraki	Enrei_E2	1.0
	Enrei	0.0
Tsukubamirai, Ibaraki in 2009	Enrei_E2	1.0
	Enrei_E3	1.5
	Enrei	1.5
Zentsuji, Kagawa	Enrei_E2	1.0
	Enrei_E3	3.5
	Enrei	5.0
Tsukubamirai, Ibaraki in 2010	Enrei_E2	2.5
	Enrei_E3	3.5
	Enrei	4.5



**Fig. 3-1-4.** GSD incidence for 'Fukuyutaka' and it's NIL of early flowering gene *e2*. Significantly different from each other at 5% level (t-Test, n=2). Error lines represent standard error of the mean.

### 3-2 主力品種の青立ち性 QTL とリスク回避マーカーの開発

前述の通り、早晩性遺伝子の置換による晩生化は青立ち性の軽減および生育適地の拡大および作期の分散に有効である一方、その利用条件は限定的であった。そのため、青立ち耐性に係わる遺伝的な要因の解明、および青立ち耐性に対してより直接的に寄与する DNA マーカーの開発が必要であった。青立ちに類する障害については品種間差異が存在することが報告されている（古屋・梅崎 1993、Hill *et al.* 2006、松本ら 1986、望月ら 2005、Pierce *et al.* 1984）。また、青立ちに関係する生育特性として、無限伸育性型の方が有限伸育性型に比べて青立ちしにくいことが報告されている（羽鹿 2005、Pierce *et al.* 1984）。しかし、ほぼ全ての国内の主力品種は有限伸育性であり、この知見を品種開発に利用することは困難であった。羽鹿ら（2005）は伸育性以外の遺伝的要因が青立ちに寄与する可能性について示唆しているが、再現性のある結果は得られていない。

実際の育成品種・系統における青立ち性に関して、関東地方の主力品種であった‘タチナガハ’は子実品質および耐倒伏性に優れるが、近年、著しい青立ちが重要な問題となっている。一方、‘東北 129 号’は難裂莢性およびダイズモザイクウイルス（レース C,D）抵抗性を有する多収系統であり、青立ちしにくい特性を有し、近年栽培面積を急速に拡大しつつある新品種‘里のほほえみ’の母本でもある（菊池ら 2011）。生育特性としては、‘東北 129 号’は青立ちしにくい性質を有する点が‘タチナガハ’と大きく異なるが、成熟期、タンパク含有率および 100 粒重等については‘タチナガハ’と同程度であり、遺伝解析用の交配母本として相応しいと考えられた。

そこで、本章における研究では、これら品種・系統の交雑に由来する RILs を用いて、青立ち指数および生育特性の調査を実施し、その結果について QTL 解析を実施し、1) 青立ち耐性に寄与する QTL 領域の探索、2) 検出された QTL 領域がその他の生育特性へ及ぼす効果を確認することを目的とした。

### 3-2-1 材料および方法

#### 1) 植物材料

‘タチナガハ／東北 129 号’の交雑に由来する F<sub>2</sub> 分離集団に由来する RILs を作成した。この RILs は F<sub>2</sub> 個体に由来する Single seed descent (SSD) 法により育成した F<sub>6</sub> 世代であり、確率的に全染色体領域について 99% 以上固定していると判断した。この F<sub>6</sub> 世代系統を集団採種し、以降の表現型調査、DNA 解析、および QTL 解析に用いた。

RILs の中で、青立ち指数に最も効果の大きい QTL 領域が遺伝的に分離するヘテロ自殖集団 (Heterogeneous inbred family; HIF) については、RILs の中から DNA マーカー遺伝子型に基づいて選抜した。該当 QTL 領域の効果の検証に当たっては、この HIF を、該当 QTL 領域を除くほぼ全ての染色体領域の遺伝子型が固定化されている NILs として供試した。

2009 年に HIF を 49 個体 (ホモ型およびヘテロ型を含む) と両親品種を栽培し、それらを個体別に採取し、2010 年に個別の系統として栽培した。生育特性の調査には、両親品種型に固定した系統のみ用いた。2011 年には両親品種型に固定した 2 グループ (‘タチナガハ’ 型および ‘東北 129 号’ 型) に分けて栽培試験を実施した。



## 2) 栽培条件

生育特性の調査は 2005 年から 2011 年にかけて、作物研究所の試験圃場「谷和原圃場（茨城県つくばみらい市）」および「観音台圃場（茨城県つくば市）」において実施した。播種日および供試した材料の世代は Table 18 に示す通りである。両試験圃場の土壌とも「黒ぼく土」である。谷和原圃場では畝間 70cm×株間 13cm、観音台圃場では畝間 70cm×株間 10cm とした。RILs は 1.5m 畦で反復無し、2 粒播種した後、初生葉展開後に間引きを行い 1 本立てとした。HIF に由来する NILs については、2009 年には分離集団として栽培、2010 年には各系統を 2m×1 畦×1 反復で栽培、2011 年には各グループを 0.65m×1 畦×15 反復で栽培した。施肥は、谷和原圃場では  $N:P_2O_5:K_2O = 3:20:10$  (g/m<sup>2</sup>)、観音台圃場では  $N:P_2O_5:K_2O = 3:10:10$  (g/m<sup>2</sup>) を播種の約 1 週間前に全層施肥とした。播種後に土壌処理型の除草剤（ラッソー・ロロックス）を散布し、中耕および培土は播種から 1 カ月後に 1 度実施した。その他の薬剤散布について、開花期後から 9 月の最終週まで毎週、殺虫剤の散布を行い、ハダニの発生時には殺ダニ剤を散布したが、いずれの試験においても殺菌剤は使用しなかった。

## 3) 青立ち指数の評価

青立ち指数については、前述の通り達観評価による 6 段階評価を実施した。また、青立ち指数が「3」以上の場合を、青立ち障害の発生とし、全試験の内で青立ち障害の発生した試験の割合（%）を「青立ち発生率」とした。

#### 4) 生育特性の評価

各系統および分離集団の、開花期および成熟期を調査した (Table 3-2-5)。開花期は系統の中の半数の個体が開花した日とし、成熟期は系統の中の 8 割の莢が成熟した日とし、登熟期間は開花期から成熟期までの期間とした。HIFs では、全子実重、100 粒重、タンパク質含有率、脂質含有率について調査を実施した (Table 3-2-5)。HIFs の全子実重については、2009 年には各個体について、2010 年および 2011 年には群落として調査した。子実成分については、近赤外分光光度計 (Infratec 1241 Grain Analyzer; FOSS Tecator AB, Höganäs, Sweden) を用いて測定した。推定粒数については、全子実重を 100 粒重と株数で割った値とした。

さらに、青立ちの発生がその年の環境条件によって安定しないため、上記の RILs に対して、人為的な摘莢処理によって、青立ちの発生を助長する処理区を設けた。この処理については、子実の肥大初期に達観により植物体の全体から約 50% の莢を除去することで、シンクサイズを大幅に減少させる効果を期待したものである。摘莢処理は 1cm 以上の莢を対象とした。

#### 5) DNA マーカー解析

ゲノム DNA の抽出は、F<sub>9</sub> 世代の RILs の若い葉から抽出した。DNA 抽出、PCR および増幅産物の解析については、前述の Sayama *et al.* (2011) の手法に基づいて実施した。全ゲノム領域をカバーするマーカーについては、Sayama *et al.* (2011) の SSR マーカーパネルから用いた。

## 6) QTL 解析

連鎖地図は Antmap (Iwata and Ninomiya 2006) で Kosambi 関数を用いて構築した。QTL 解析は R/QTL (Broman *et al.* 2003) により、インターバルマッピングを用いて解析した。各年次の各形質について QTL 解析を実施し、全試験の総合的な評価値である青立ち発生率についても QTL 解析を実施した。但し、青立ち指数が離散値であること、また、青立ち発生率が非正規分布であることから、これらの QTL 解析については、ノンパラメトリックデータ用の解析手法を用いた。

検出された QTL 領域の効果を検証するため、RILs を各 QTL 領域の最近傍 SSR マーカーの遺伝子型に基づいてグループ分けし、遺伝子型間の青立ち発生率の平均値の差異を t 検定により解析した。さらに、効果が最も大きい QTL 領域が、その他の生育特性に及ぼす影響について調査するため、NILs についても同様に QTL 領域の遺伝子型でグループ分けし、青立ち指数、およびその他の生育特性の平均値の差異を比較した。その際、連続値については t 検定を用い、離散値については Wilcoxon 検定を用いた。QTL 解析以外の統計処理については、5%有意水準を採用し、SPSS 17.0 (SPSS 2008; SPSS Inc, Tokyo, Japan) により実施した。

さらに、検出された QTL 領域の汎用性を確認するため、‘サチユタカ’ および ‘エンレイ’ を反復親として、それぞれ 5 回の戻し交雑により ‘東北 129 号’に由来する低青立ち性型の QTL 領域 (*qGSD1*、後述) を保有する系統 ‘B101-004’ および ‘B102-005’ を育成し、青立ち程度の調査に用いた。

### 3-2-2 結果

#### 1) 連鎖地図の構築

合計 220 個のマーカー（SSR マーカー：217 個、表現型マーカー：2 個、*E3* 遺伝子特異的マーカー：1 個）を用いて連鎖地図を構築した。全染色体領域の中で、5 領域については多型を示すマーカーが得られなかったために連鎖群が断裂した。

#### 2) 青立ち性関連 QTL

青立ち性に関する形質として、青立ち指数および青立ち発生率の両形質について、主要な QTL が連鎖群 H（第 12 番染色体）上に検出された（Table 3-2-2）。谷和原圃場および観音台圃場における青立ち指数の分布は Fig. 3-2-1 に示す通りであり、青立ち指数および青立ち発生率の平均値について、観音台圃場と比較し、谷和原圃場の方が高い傾向であった。青立ち発生率に関して 2 個の有意な QTL が検出され、それぞれ *qGSD1*（連鎖群 H）および *qGSD2*（連鎖群 F）と命名した（Table 3-2-2）。青立ち指数については 6 個の QTL が検出され、連鎖群 L に検出された QTL については再現性が認められたことから *qGSD3* と命名した（Table 3-2-2）。青立ち性に関するこれら 2 形質について、その他にも複数の QTL が検出されたが、擬陽性を除外するために再現性の低い QTL については詳細な検討は見送り、以降は主要な 3 個の QTL に的を絞って解析を実施した。

これら主要な 3 個の QTL の青立ち指数に与える効果を検証するため、各 QTL について、LOD 値のピークに最も近いマーカーの遺伝子型で RILs をグループ分けし、青立ち指数の平

均値を比較したところ、各 QTL の効果の大きさは、 $qGSD1 > qGSD2 > qGSD3$  の順であった (Table 3-2-3)。これらの QTL については、いずれも ‘東北 129 号’ 型の RILs のグループで青立ち指数が有意に低かった (Table 3-2-3)。また、3 領域とも ‘東北 129 号’ 型である RILs のグループでは、‘東北 129 号’ と同程度の青立ち発生率を示した (Table 3-2-3)。一方、3 領域とも ‘タチナガハ’ 型である RILs のグループでは、‘タチナガハ’ と同程度の青立ち発生率を示した (Table 3-2-3)。

### 3) 早晩性と青立ち性の関係

開花まで日数については、 $qGSD3$  近傍領域にのみ QTL が検出された (Table 3-2-2)。登熟期間と開花まで日数は、 $qGSD1$  と  $qGSD3$  の近傍領域に検出され、 $qGSD1$  が ‘東北 129 号’ 型のグループでは、登熟期間が有意に短縮する傾向が認められた (Table 3-2-1)。しかし、 $qGSD3$  が登熟期間に及ぼす影響は一定ではなく、開花まで日数とは一致しなかった (Table 3-2-2)。 $qGSD3$  領域の効果に関連して、この領域が ‘東北 129 号’ 型である RILs のグループでは、全 10 試験の内、4 試験において有意に低い青立ち指数を示した (Table 3-2-4)。また、RILs の摘莢処理により青立ちを促進させた場合の効果として、青立ち指数の向上と併せて、100 粒重およびタンパク含有率についても有意な増加効果が認められた (Table 3-2-5)。

### 4) $qGSD1$ 領域が分離する NILs を用いた検証

$qGSD1$  領域について異なる NILs は、連鎖群 H の Satt469 から Sat\_206 の間の領域 (14.8cM

～64.8cM) が分離する単一の RIL 系統に由来する。青立ち指数、登熟期間、100 粒重、全子実重、推定粒数について、遺伝子型間に有意な差異が認められ、*qGSD1* 領域が‘東北 129 号’型である NIL では、青立ち指数の低下、登熟期間の短縮、100 粒重の減少、全子実重の増加、推定粒数の増加、という傾向であった (Table 3-2-6)。一方、タンパク質含有率および脂質含有率については、2011 年の試験でのみ有意差が認められた (Table 3-2-6)。開花まで日数については、2010 年および 2011 年とも有意な差異は認められなかった (Table 3-2-6)。

‘エンレイ’ および ‘サチユタカ’ の戻し交雑系統である NILs ‘B101-004’ および ‘B102-005’ については、青立ち指数に有意な差異は認められなかったが、原品種に対して青立ち指数が若干軽減される傾向であった (Fig. 3-2-2)。

### 3-2-3 考察

#### 1) 青立ち性に寄与する主要な QTL

本研究により、‘東北 129 号’ が ‘タチナガハ’ よりも低い青立ち発生率を示す遺伝的要因として、主要な 3 個の QTL 領域、*qGSD1*, *qGSD2*, および *GSD3* の寄与が推定された。また、これら 3 領域について、いずれも ‘東北 129 号’ 型である RILs のグループは、‘東北 129 号’ 型と同様の青立ち発生率を示し、いずれも ‘タチナガハ’ 型である RILs のグループでは ‘タチナガハ’ と同様の青立ち発生率を示したことから、その他の染色体領域に同等以上の効果を有する QTL 領域が存在する可能性は非常に低いと推察される。

これら主要な 3 個の QTL 領域については、いずれも青立ち性について、これまでの研究で

は報告されていない。前述の通り、青立ち指数については品種間差異が存在することが報告されているが、量的形質としての傾向が強い形質として捉えられていた。しかし、6 年間に及ぶ複数の試験により、比較的少数の QTL 領域により、青立ち性に関する品種間差異の大部分が説明できる可能性が示唆された。本研究により得られた青立ち性に関与する DNA マーカーを用いた MAS は、低青立ち性品種開発を促進するために有用である。

## 2) QTL 領域の多面的な影響

検出された QTL 領域の多面的な影響については、連鎖不平衡もしくは原因遺伝子の多面的な効果というどちらの原因であれ、品種開発において重要な問題である。青立ち性について、‘東北 129 号’型の *qGSD1* 領域は ‘タチナガハ’型と比較して、青立ち発生率を低下させる一方で、複数の形質に対する影響が同時に予想された。子実重の増加傾向については望ましい傾向であるが、100 粒重の低下やタンパク質含有率の低下が避けられない場合は、全体としての生育特性が改善しているか、詳細かつ多面的な検討が必要となる。また、青立ち性自体の理解を深めるためには、この QTL 領域のファインマッピングや、原因遺伝子の解明が必要である。

## 3) *qGSD3* と *E3*座の関係

青立ち指数について検出された QTL の内、*qGSD3*は早晩性の *E3*座 (McBlain *et al.* 1987) の近傍領域に検出された。*E3*座については開花まで日数と登熟期間について、同じ方向への

影響が報告されている (McBlain *et al.* 1987)。E3座の原因遺伝子は *GmPhyA3* であり、開花まで日数を指標としたマップベースクローニングにより Watanabe *et al.* (2009) により特定されている。‘東北 129 号’ 型の *qGSD3* は開花期の晩生化傾向を示すことから、晩生型 E3 の効果であると予想される。しかし、登熟期間については効果の方向性が安定せず、むしろ登熟期間の短縮効果が認められる事例が多い。したがって、晩生型 E3 を有すると予想される ‘東北 129 号’ 型で登熟期間が短縮する原因について検討が必要である。

前述の通り、虫害については、成熟期の遅延に影響することが報告されている (Boethel *et al.* 2000)。また、干ばつストレスは茎の成熟を遅らせることが報告されている (坂下ら 2003) ことから、シンクサイズがソースサイズに比べて小さい時に青立ち障害が引き起こされる (Egli and Bruening 2006、Shiraiwa *et al.* 2005) という説明と矛盾しない。これらのことから、本研究では、RILs の中で早生グループの開花時期が梅雨後の干ばつ時期に重なり、落花や落莢、また虫害の影響からシンクサイズの低下を介して、青立ち指数の増加に結び付いたと推察できる。また、晩生グループでは葉群が遅くまで残るために、群落内の湿潤な条件が莢から水分が抜けるのを遅らせることも考えられる。したがって、‘東北 129 号’ 型の *qGSD3* 領域が概ね短い登熟期間と低い青立ち指数を示すことは、同一の遺伝子による多面的な影響であり、*qGSD3* は E3 と一致すると考えられた。

#### 4) 大豆品種開発における青立ち性の対策

本章における研究では、複数年次の複数試験における表現型データを用いた解析により、



青立ち性に寄与する主要な 3 個の QTL 領域を特定した。単一の交配組合せに由来する材料についてのみ検討しているため、得られた QTL 領域の効果の汎用性については今後の検証が必要であるが、‘タチナガハ’は関東地域における主力品種であり、交配母本として幅広く利用されていることから、青立ちリスク低減のための DNA マーカーとして利用できると考えられる。DNA マーカーは青立ち性のように単一の栽培試験からでは評価しにくい形質について、特に有効な育種ツールである。今後、QTL 領域のファインマッピングや原因遺伝子の特定により、さらに精確な DNA マーカー開発が可能となることが期待される。

**Table 3-2-1.** Experimental sites, growth conditions, and agronomical traits

Experimental sites	Year	Sowing date	Materials (generation)	GSD index <sup>1)</sup> (0–5)	Number of days to flowering <sup>2)</sup> (day)	Seed- filling period <sup>3)</sup> (day)
Yawara Experimental Field	2005	14-Jun	RIL (F6)	○ <sup>4)</sup>		
	2006	27-Jun	RIL (F7)	○	○	○
	2007	26-Jun	RIL (F8)	○		
	2008	25-Jun	RIL (F9)	○		
	2009	25-Jun	RIL (F10)	○	○	○
	2009	26-Jun	HIF (F8)	○		
	2010	22-Jun	RIL (F11)	○	○	○
	2011	28-Jun	HIF (F10)	○	○	○
Kannondai Experimental Field	2006	13-Jun	RIL (F7)	○	○	○
	2007	12-Jun	RIL (F8)	○	○	○
	2008	11-Jun	RIL (F9)	○	○	○
	2009	5-Jun	RIL (F10)	○	○	○
	2010	3-Jun	HIF (F9)	○	○	○

1) GSD index was classified into six levels; 0: GSD tolerant, 5: GSD intolerant.

2) Number of days to flowering was defined as the number of days from the sowing date to the first flowering date.

3) Seed-filling period was defined as a differentiation between the first flowering date and the maturity date. The maturity date was defined as a date of the day when 80% plants had matured pods in a plot.

4) Circle indicates for evaluation conducted in the experiment.

**Table 3-2-2.** QTLs detected for the GSD index, GSD incidence, number of days to flowering, and seed-filling period for RILs derived from a cross between the soybean breeding line 'Touhoku 129' and the leading cultivar 'Tachinagaha'

Traits	Experimental sites (Year)	Linkage groups	DNA markers closest to the peak position	Peak position (cM)	LOD	QTL	Additive effect <sup>5)</sup>	R <sup>2</sup>
GSD incidence <sup>1)</sup> (%)		F	Satt114	89	3.2	<i>qGSD2</i>	+	
		H	GMES6355	70	9.8	<i>qGSD1</i>	+	
GSD index <sup>2)</sup> (0–5)	Kannondai (2009)	F	Flower color	30	4.4		-	
	Yawara (2009)	F	Satt114	80	2.9	<i>qGSD2</i>	+	
	Yawara (2005)	H	GMES6355	70	3.6	<i>qGSD1</i>	+	
	Kannondai (2006)	H	GMES6355	70	5.2	<i>qGSD1</i>	+	
	Kannondai (2007)	H	GMES6355	71	7.5	<i>qGSD1</i>	+	
	Yawara (2007)	H	Satt253	72	2.9	<i>qGSD1</i>	+	
	Kannondai (2008)	H	GMES6355	70	7.8	<i>qGSD1</i>	+	
	Kannondai (2009)	H	GMES6355	70	6.0	<i>qGSD1</i>	+	
	Yawara (2009)	H	GMES6355	71	8.2	<i>qGSD1</i>	+	
	Yawara (2010)	H	GMES6355	71	6.3	<i>qGSD1</i>	+	
	Kannondai (2007)	K_2	GMES1010	2	5.6		-	
	Kannondai (2009)	L	<i>E3</i>	167	5.4	<i>qGSD3</i>	+	
	Yawara (2010)	L	<i>E3</i>	155	6.0	<i>qGSD3</i>	+	
Number of days to flowering <sup>3)</sup> (days)	Kannondai (2006)	L	<i>E3</i>	162	34.7	<i>qGSD3</i>	-2.8	0.83
	Yawara (2006)	L	<i>E3</i>	156	24.6	<i>qGSD3</i>	-2.9	0.70
	Kannondai (2007)	L	<i>E3</i>	156	38.1	<i>qGSD3</i>	-2.9	0.81
	Kannondai (2008)	L	<i>E3</i>	156	39.7	<i>qGSD3</i>	-2.4	0.81
	Kannondai (2009)	L	<i>E3</i>	156	42.6	<i>qGSD3</i>	-3.4	0.81
	Yawara (2009)	L	<i>E3</i>	156	28.4	<i>qGSD3</i>	-1.9	0.64
	Yawara (2010)	L	<i>E3</i>	155	37.9	<i>qGSD3</i>	-2.8	0.73
Seed-filling period <sup>4)</sup> (days)	Kannondai (2007)	F	Sat_375	107	3.6	<i>qGSD2</i>	1.9	0.03
	Kannondai (2006)	H	GMES6355	71	7.5	<i>qGSD1</i>	2.1	0.18
	Yawara (2006)	H	Sat_401	69	3.7	<i>qGSD1</i>	1.5	0.13
	Kannondai (2007)	H	Sat_206	77	5.2	<i>qGSD1</i>	2.4	0.26
	Kannondai (2008)	H	GMES6355	70	5.3	<i>qGSD1</i>	1.9	0.17
	Yawara (2010)	H	Satt253	73	3.7	<i>qGSD1</i>	1.4	0.06
	Kannondai (2009)	L	<i>E3</i>	156	11.0	<i>qGSD3</i>	6.8	0.28
	Yawara (2009)	L	<i>E3</i>	168	5.8	<i>qGSD3</i>	-1.3	0.15
	Yawara (2010)	L	<i>E3</i>	156	17.2	<i>qGSD3</i>	2.6	0.54
Number of days to maturity <sup>4)</sup> (days)	Yawara (2009)	B1_1	GMES2543	61	3.5		-1.4	0.10
	Kannondai (2007)	F	Sat_375	108	3.4	<i>qGSD2</i>	2.2	0.01
	Yawara (2010)	F	Satt516	58	4.0		0.9	0.14
	Kannondai (2007)	H	Sat_206	78	3.0	<i>qGSD1</i>	2.4	0.22
	Kannondai (2008)	H	GMES6355	70	3.3	<i>qGSD1</i>	1.4	0.15
	Kannondai (2009)	H	GMES6355	70	3.0	<i>qGSD1</i>	3.1	0.08
	Yawara (2010)	H	Sat_401	68	3.5	<i>qGSD1</i>	0.8	0.08
	Yawara (2006)	J_2	Sat_224	35	3.0		1.6	0.09
	Kannondai (2007)	J_2	Sett011	21	3.0		2.3	0.07
	Kannondai (2006)	L	<i>E3</i>	164	10.3	<i>qGSD3</i>	-2.7	0.36
	Yawara (2006)	L	<i>E3</i>	165	8.0	<i>qGSD3</i>	-2.2	0.46
	Kannondai (2007)	L	<i>E3</i>	167	11.6	<i>qGSD3</i>	-3.7	0.39
	Kannondai (2009)	L	<i>E3</i>	156	3.6	<i>qGSD3</i>	3.2	0.08
	Yawara (2009)	L	<i>E3</i>	165	18.1	<i>qGSD3</i>	-2.9	0.46

1) GSD incidence was defined as an incidence ratio of  $\geq 3$  on the GSD index among experiments.

2) GSD index was classified into six levels; 0: GSD tolerant, 5: GSD intolerant.

3) Number of days to flowering was defined as the number of days from the sowing date to the first flowering date.

4) Seed-filling period was defined as a differentiation between the first flowering date and the maturity date. The maturity date was defined as a date of the day when 80% plants matured in a plot.

5) Direction of the additive effect, where "+" and "-" indicate the increasing and decreasing effects of the allele from 'Tachinagaha', respectively, for the traits. Values of additive effect and R<sup>2</sup> for GSD incidence and GSD index could not be calculated because of non-parametric method applied for QTL analysis for these traits.

**Table 3-2-3.** Comparisons of GSD<sup>1)</sup> incidence between genotypes of detected *qGSD1*, *qGSD2*, and *qGSD3* in RILs derived from a cross between the soybean breeding line 'Touhoku 129' and the leading cultivar 'Tachinagaha'

Genotype of DNA markers closest for each QTL <sup>2)</sup>	QTLs					Parental line and cultivar
	<i>qGSD3</i>	<i>qGSD2</i>	<i>qGSD1</i>	<i>qGSD1</i> and <i>qGSD2</i> <sup>3)</sup>	<i>qGSD1</i> , <i>qGSD2</i> , and <i>qGSD3</i>	
Touhoku 129	28.0 ± 3.0	22.5 ± 1.9	17.2 ± 1.8	14.0 ± 1.8	13.0 ± 3.0	12.5
Tachinagaha	34.0 ± 3.0	33.9 ± 2.7	39.8 ± 2.4	45.2 ± 3.6	52.0 ± 6.0	51.6
P value <sup>4)</sup>	0.1272	0.0058	0.0000	0.0000	0.0000	—

1) GSD incidence was defined as an incidence ratio of  $\geq 3$  on the GSD index among experiments. GSD index was classified into six levels; 0: GSD tolerant, 5: GSD intolerant.

2) GMES1506, Satt114, and *E3* were used for genotyping for *qGSD1*, *qGSD2*, and *qGSD3*, respectively.

3) Two groups of RILs harboring maternal or paternal genotypes at QTLs were compared.

4) P values of the Wilcoxon rank sum test between genotypes.

**Table 3-2-4.** Comparisons of GSD index values between *qGSD3* genotypes on RILs derived from a cross between soybean the breeding line 'Touhoku 129' and the leading cultivar 'Tachinagaha'

Experimental sites (Year)	<i>qGSD3</i> genotypes <sup>1)</sup>		p value <sup>2)</sup>
	A	B	
Yawara (2005)	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.3737
Kannondai (2006)	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.3855
Yawara (2006)	2.1 ± 0.1	2.6 ± 0.1	0.0088
Kannondai (2007)	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9453
Yawara (2007)	2.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.0663
Kannondai (2008)	1.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.0105
Yawara (2008)	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.7678
Kannondai (2009)	1.4 ± 0.1	2.3 ± 0.1	0.0000
Yawara (2009)	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	0.3399
Yawara (2010)	3.1 ± 0.2	4.1 ± 0.1	0.0000

1) Primer set reported by Xu et al. 2013 for identifying the genotype of *E3* was used. "A" indicates the 'Touhoku 129' genotype and "B" indicates the 'Tachinagaha' genotype. The gray cell indicates the genotypes more insensitive to GSD.

2) P values of the Wilcoxon rank sum test between *E3* genotypes.

**Table 3-2-5.** Effects of pod removal treatment for agronomical traits of RILs (n=56).

Treatment	GSD index (0 - 5)		100-seed weight (g)		Protein (%)	
50% pods removed	3.4	± 0.16	33.9	± 0.47	44.0	± 0.17
Control	2.4	± 0.14	33.5	± 0.45	43.7	± 0.18
P value (paired t-test)	0.0000		0.0212		0.0004	

**Table 3-2-6.** Agronomic traits of HIFs derived from a cross between the soybean breeding line 'Touhoku 129' and the leading cultivar 'Tachinagaha' for each *qGSD1* genotype<sup>1)</sup>

Experimental sites (Year)	HIF	Genotypes <sup>2)</sup>	GSD index (0-5)	Number of days to flowering (days)	Seed-filling period (days)	100-seed weight (g)	Seed protein content (%)	Seed oil content (%)	Total seed weight (kg/a)	Estimated number of seeds <sup>5)</sup> (seed/plant)
Yawara (2009)	(F8, individual)	A (n=12)	2.1 ± 0.2	— <sup>4)</sup>	—	31.2 ± 0.4	42.9 ± 0.1	19.7 ± 0.1	—	—
		B (n=6)	4.0 ± 0.3	—	—	34.2 ± 0.4	43.5 ± 0.4	19.3 ± 0.2	—	—
Kamondai (2010)	(F9, line)	p value <sup>3)</sup>	0.0010			0.0001	0.0809	0.0667		
		A (n=18)	0.9 ± 0.1	48.3 ± 0.6	106.0 ± 2.8	—	—	—	—	—
Yawara (2011)	(F10, line)	B (n=5)	1.8 ± 0.4	48.6 ± 1.3	121.0 ± 4.4	—	—	—	—	—
		p value	0.0220	0.8009	0.0181					
		A (n=15)	1.9 ± 0.3	41.5 ± 0.2	71.5 ± 0.2	34.2 ± 0.2	42.9 ± 0.2	20.7 ± 0.1	375.8 ± 13.6	100.1 ± 3.6
		B (n=15)	3.5 ± 0.2	41.1 ± 0.1	72.1 ± 0.2	37.4 ± 0.2	43.9 ± 0.2	20.4 ± 0.1	302.7 ± 11.8	73.8 ± 3.0
		p value	0.0002	0.1178	0.0436	0.0000	0.0001	0.0255	0.0000	0.0000

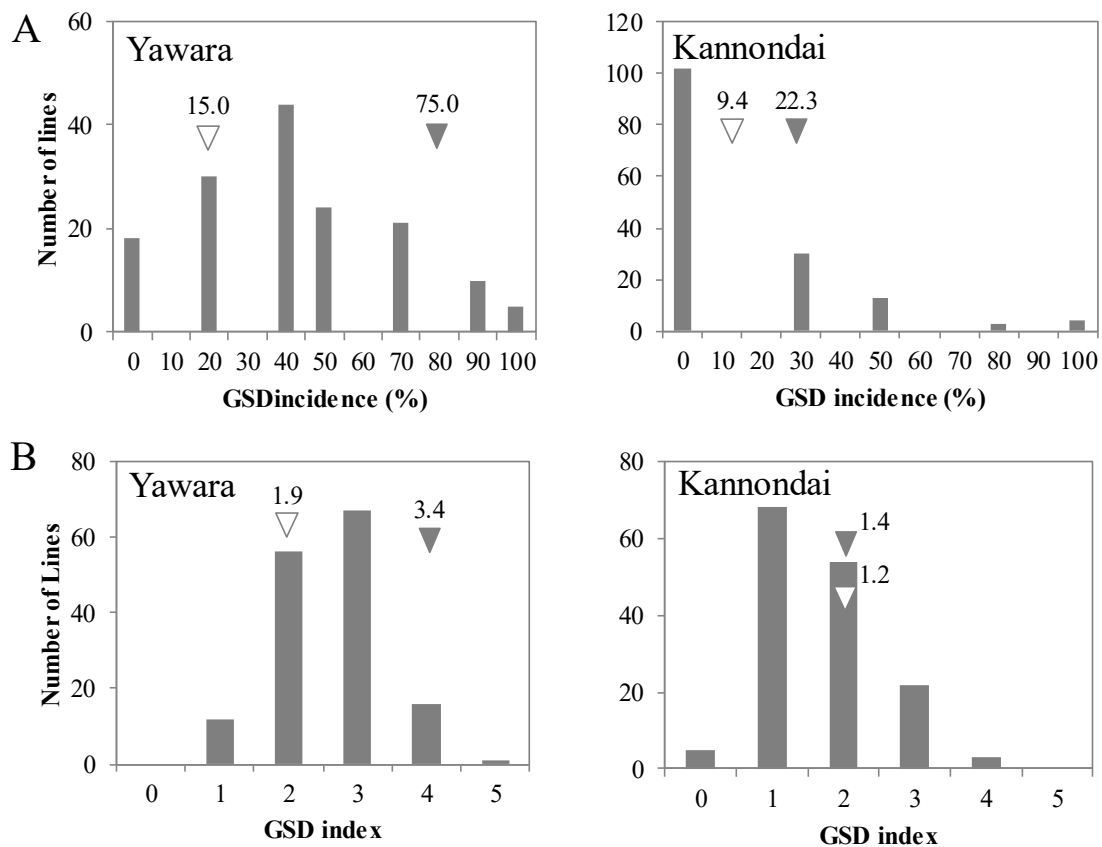
1) GMES1506 was used for genotyping and represented the *qGSD1* genotype.

2) 'A' indicates the 'Touhoku 129' genotype and 'B' indicates the 'Tachinagaha' genotype.

3) P values of the Wilcoxon rank-sum test for the GSD index and t test for the other traits between genotypes.

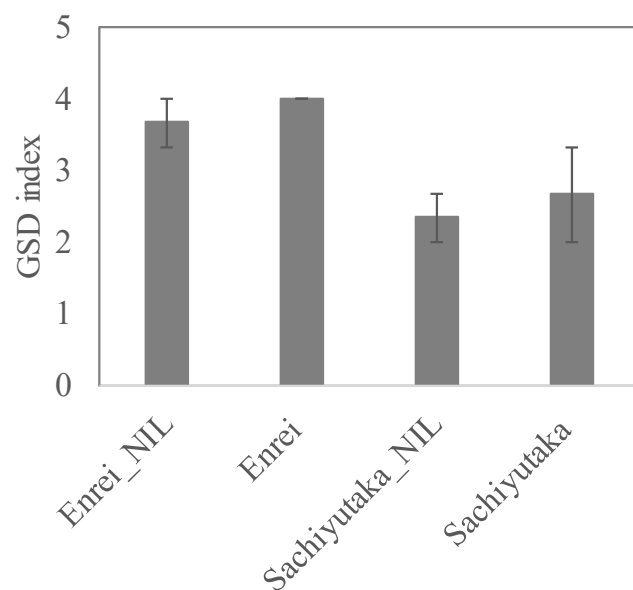
4) Trait values lacking in Table 18 were not measured.

5) Estimated total seed number was calculated as "total seed weight (g/m<sup>2</sup>)/1 seed weight (g)/number of plants (plants/m<sup>2</sup>)".



**Fig. 3-2-1.** GSD incidence and average values of the GSD index for each RIL derived from a cross between the soybean breeding line 'Touhoku 129' and the leading cultivar 'Tachinagaha' in Yawara (n=6 years) or Kannondai (n=4 years)  
A: GSD incidence, B: Average values of GSS index,  $\nabla$  : 'Touhoku 129',  $\blacktriangledown$  : 'Tachinagaha'. Numbers above traiangles indicate parental values for each trait.





**Fig. 3-2-2.** GSD incidence for leading cultivars and their NILs of "Tohoku 129" allele at *qGSD1*. Not significantly different from the parental cultivar respectively at 5% level (t-Test, n=3). Error lines represent standard error of the mean.

## 第4章 総合考察

### 4-1 本研究の意義

#### 4-1-1 難裂莢性の特性の解明と利用

本研究により、難裂莢性の遺伝様式が劣性一遺伝子により支配されていること、遺伝資源に寄らず遺伝子座およびその効果が同等であることが明らかとなった（その後の研究により、難裂莢性アリル *pdh1* は世界的に広く利用され、南アジアおよび中国の半数以上の品種、北米地域のほぼ全品種が、*pdh1* を保有することが報告されている（Funatsuki *et al.* 2014））。これらの知見を基に、難裂莢性に寄与する DNA マーカーが開発され、日本国内の主力品種を反復親とした戻し交雑によりタイ品種 ‘SJ2’ に由来する難裂莢性を導入した難裂莢性系統群が開発された（山田ら 2013）。これら難裂莢性系統群の内、これまでに 4 系統が ‘サチユタカ A1 号’、‘フクユタカ A1 号’、‘ことゆたか A1 号’、‘えんれいのそら’ として、品種登録されている（農研機構, <http://www.naro.affrc.go.jp/patent/breed/0100/0109/index.html>）。汎用コンバインを用いた大規模収穫試験からは、難裂莢性品種の普及が遅れていた日本の本州地域での機械収穫においても、難裂莢性が収量損失の低減に寄与することが確認された。但し、本研究では難裂莢性品種の収穫損失が少ない傾向ではあったが、裂莢による収穫損失が皆無という試験は存在せず、コンバインが接触する際の衝撃で裂莢する様子が観察されたことから、難裂莢性の程度については改良の余地が残ることが併せて明らかとなった。

難裂莢性の原因遺伝子については、Funatsuki *et al.* (2014) により原因遺伝子 *pdh1* が単離され、形成性操作様タンパク質 (Dirigent-like protein; DIR タンパク質に類似したタンパク

質) 遺伝子の一塩基多型により終始コドンが生じ、このタンパク質の機能が喪失していたことが明らかとなっている。また、その機構として、野生型アリル *Pdh1* のダイズの莢はねじれる方向に収縮することで裂莢を促進させる働きを持つが、難裂莢性アリル *pdh1* の莢では野生型と比べてねじれにくいために裂莢しにくいことが併せて報告されている。さらに、*pdh1* のオルソログや同様の機能を有する遺伝子を利用した、さらなる裂莢性の改良の可能性についても言及されており、収穫損失をさらに低減できる可能性があると考えられる。

ダイズにおいても各種の変異原を用いた変異集団から目的の遺伝子座に変異が生じた個体をスクリーニングする手法が開発され、新規変異アリルの探索が可能となっている (穴井 2016)。*pdh1* を保有する北米地域の近代品種は、同様に *pdh1* を保有する東南アジア地域の在来品種よりも高度な難裂莢性を保有する (Funatsuki *et al.* 2014) ことから、さらなる裂莢性の改善は可能と思われる。但し、より高度な難裂莢性品種を収穫する際には、未脱莢が後部排出口から排出されてしまうことを防ぐため、コンバイン機械の性能向上も同時に必要と考えられる。

本研究において難裂莢性遺伝子 *pdh1* を導入した戻し交雑品種群の生育特性が、元品種と同等であるということからも、*pdh1* 自体に少なくとも大きな欠点が存在する可能性は低い。また、*pdh1* は世界の大規模栽培地域で広く使われている遺伝子であることから有用な遺伝子であると考えられる。従来、日本国内に難裂莢性遺伝資源が導入されて以来、難裂莢性の普及が遅れていたことから、日本国内における難裂莢性遺伝子の有効性については、手作業主体の収穫作業 (島田 2002) においては、脱穀する際に叩き付ける力が少なくて済む易裂莢

性品種が好まれたと考えられる。コンバインを用いた収穫作業（農林水産省 1999）が一般的となった現代においては、北米地域やその他の世界の大規模栽培地域と同様に、難裂莢性はダイズ大規模栽培のための必須特性であると考えられる。

難裂莢性の導入により収穫損失が軽減可能であることが明らかとなった一方で、刈遅れに伴う子実外観品質の低下を抑えることはできない（永島・篠崎 2009）ため、刈遅れが農家の収入減少につながる事態は回避できていない。そのため、難裂莢性については収穫適期に作業ができない事態に陥った場合に被害を低減する手段としての利用が想定される。具体的には、天候不順による作業競合や、青立ち発生に伴い圃場全体の成熟前に自然裂莢が始まってしまう場合に、難裂莢性の有効性が最も発揮されることが考えられる。

#### 4-1-2 青立ち性の特性の解明と対策

本研究により、青立ち特性については、早晩性の改変により操作することができ、晩生化系統が元品種より青立ちしにくい反面、元品種の栽培に適した環境条件下では生育量が過剰となり、倒伏し易いことが明らかとなった。また、‘フクユタカ’等、青立ち障害の報告が少ない品種であっても、早生化系統は青立ちすることから、青立ちしやすさについては早晩性を考慮せずには比較が困難であることが明らかとなった。

さらに、関東地方の主力品種‘タチナガハ’が有する、青立ちし易い特性については、その主要因が *qGSD1* 領域にあることが示唆され、品種化の際に重要な要素である、粒大と蛋白

含有率の増加、耐倒伏性の向上に寄与していることが明らかとなった。従来、青立ち性はシンクとソースのアンバランスにより発現すると考えられていたことから、それぞれに係わる諸々の特性およびその原因遺伝子が青立ちに寄与し得ることになるが、本研究による QTL 解析の結果からは、青立ち性に対する抵抗性程度について両極端の遺伝背景間であっても、早晩性遺伝子座を含む比較的少数の遺伝子座に支配されていることが明らかとなった。本研究で見いだされた青立ち性 QTL に関して、青立ちが問題となっているエンレイおよびサチユタカに対しては、‘東北 129 号’のアリルが青立ち軽減効果をもたらさないということから、同等もしくはそれに近い効果のアリルを有する可能性が示唆された。そのため、青立ち軽減 DNA マーカーの有効性は、‘タチナガハ’とその近縁系統を交配母本とした交配組合せに限定されたが、近年まで関東地方における主力品種であった‘タチナガハ’はその後代系統も含め、関東地域および周辺各県に向けた交配母本として多用されてきたことから、青立ちリスク低減のための DNA マーカーとして一定の利用価値があり、実際に品種育成における MAS に利用されている。

但し、青立ち性を軽減させることにより、タンパク含有率、100 粒重、耐倒伏性については負の相関が認められていること、また、摘莢による青立ち促進と併せて、100 粒重およびタンパク含有率も同時に向上するという結果は、本研究で開発された DNA マーカーを利用する場合に限らず、青立ち性のみを改変する取り組み自体が困難であることを示唆している。この原因として、相対的に高いソース能によって合成された余剰の光合成産物が、茎葉部に蓄積すると茎葉部の老化遅延につながり、子実へ余分に蓄積すると粒大やタンパク含有率の向

上につながるというメカニズムが予想される。このことは、摘莢処理によりシンクである莢を減らすと、光合成産物は根系や茎により多く配分される（島田ら 2007）という報告と一致する。本研究の目的が、収穫可能な位置に着生する子実を、品質を損なわずにできる限り回収するということであり、戻し交雑により青立ちを軽減した際に、その他の農業特性の劣化を伴うというトレードオフの関係では本来の目的に反することになるため、青立ち性の改善については表現型全体を対象としたバランスの調整が必要である。

青立ち症状が機械収穫に適さないことは前述の通りであるが、一方で、完全に乾いた個体は立枯れによる乾燥の可能性があるため、若干の水分の残る個体を選ぶことが安全な選抜指標となり得る。若干の青立ち性が選抜時に有利になるという傾向は、複数のダイズ育種家の選抜時における嗜好を観察する中で明らかであるように思われる。*qGSD1* 領域における‘タチナガハ’型アリルでは、青立ち性は粒大およびタンパク質含有率を向上させ、さらに耐倒伏性の向上というメリットを伴い、立ち枯れ性に対しても耐性を持つような印象を観察者に与えるため、選抜に有利に働くことが予想される。

つまり、青立ち抵抗性育種においては、青立ち程度が最低となる系統が最も優れる訳ではなく、どのような環境条件下においても「少～中」程度の青立ち程度を維持できる遺伝子型が望ましく、これを実現するためには、ソース側もしくはシンク側が他方に合わせて調整する特性が必要と思われる。この調整能力について、ダイズは栄養成長と生殖生長期間が重複しており、生育後期に至るまで新しい莢の形成が観察されることから、葉面積や個葉光合成速度を調整するよりは、シンク能の向上が現実的と思われる。実際の選抜操作においては、

「青立ち程度の低さ」に特化した選抜では、立枯れ、小粒化、低タンパク化などのデメリットを伴う可能性があることから、「多収であり、青立ちしていない系統」を選抜することで、多収化と低青立ち性の両立を目指すことが重要と考えられる。

#### 4-1-3 収穫損失低減による増収効果

裂莢性については原因遺伝子およびその効果が明らかとなり、MAS の体制も次世代作物開発研究センターを中心として整備されており、今後、各育成地から開発されるほぼ全ての系統が難裂莢性を保有することが予想される。新たに育成される多収性の難裂莢性系統について、収穫損失低減による増収効果を調査することはできないが、本研究で得られた知見と同様の増収効果が、その多収性に潜在的に寄与することは明らかである。また、将来的には、より高度な難裂莢性遺伝子の開発が進むことにより、さらなる収穫損失の低減が可能となることが予想されるが、刈遅れに伴う子実外観の品質低下については避けられないことから、青立ち性の改善により、安定的に適期に収穫できる特性が必要である。

一方、青立ち性については、青立ち性を低下させる選抜が、その他の生育特性へも影響してしまうことを避けることができないと考えられるために、青立ち性を完全に喪失した系統を育成することは困難である。そのため、青立ち性を低下させる程度の選抜に留める必要があるが、そのような低青立ち性系統では、高温年や虫害の多発環境下では青立ち障害が発生することは避けられないと思われる。そのような場合は、保持させた難裂莢性により、青立ち症状が低温や降霜によって低減するのを待って収穫することができる、という二段構えの

対策により大豆生産の安定化が実現可能である。

以上のように、「青立ち」と「裂莢」の問題は、関連性の高い収穫損失であり、片方のみでは大豆の安定生産に結び付けることは困難であることから、両面に対して同時に対応することが重要である。

#### 4-2 ダイズ育種における DNA マーカーの利用と将来展望

近年、多くの有用形質を主力品種へ導入する試み（農林水産省 2015）が進められており、今後しばらくは戻し交雑育種による品種更新が可能である。本研究の目的は、ダイズ品種の収穫損失の低減により大豆収量の安定化を図るというものであったが、背景にある大きな目標である大豆の安定供給のためには、収量ポテンシャル自体の増加も重要である。

収量性の増加に寄与する QTL については、これまでに数多く報告されている（Grant et al. 2010）。早晩性や伸育性、病虫害抵抗性、タンパク含有率など、多くの形質が収量性に寄与するため、収量性は最も複雑な量的遺伝形質の一つである。本研究により開発された難裂莢性および青立ち性に係わる DNA マーカーは、直接的には収穫損失の低減に寄与するものであるが、初期選抜において DNA マーカーを活用して作用力が大きな遺伝子の選抜を実施し、その後により多くの遺伝子が関わる収量性ポテンシャルに関わる表現型選抜を実施等により、ダイズの収量性向上に向けた育種全体を大幅に効率化できる可能性がある。

一般に、量的形質の戻し交雑は MAS には向かず、戻し交雑も困難である。しかし、難裂莢性や青立ち性など重要な形質については DNA マーカーで押さえた上で、少数回の戻し交



雑により遺伝的背景に多様性を残す形で複数系統を作成し、その後代集団から優良個体を選抜し、目的となる量的形質の評価を行うという手順を採れば、元品種の優良性および必須形質が確保でき、収量性等の量的形質の改善が容易になると考えられる。また、海外の多収品種を交配母本として用いる育種においては、多型交雑や少数回の戻し交雑を行い、必須形質についてのみに MAS を加え、多収性の遺伝的要因を維持したまま、より多くの遺伝子による支配が想定される子実の品質による表現型選抜を実施することで、国内需要へ対応した多収品種の開発に繋がることが可能と思われる。

ダイズでは、戻し交雑により育成された国内品種として、‘サチユタカ A1 号’ および ‘フクユタカ A1 号’は、‘ユキホマレ R’、‘フクミノリ’ に次いで、それぞれ 3 番および 4 番目の登録品種である。2018 年 11 月現在、‘ことゆたか’ および ‘エンレイ’ にそれぞれ難裂莢性を導入した ‘ことゆたか A1 号’、‘えんれいのそら’ が開発されている。2000 年から 2015 年にかけて登録された大粒黄大豆品種では、交配から登録まで平均で 13.9 年であるが、MAS と戻し交雑による育種では、最初の交配からでは平均 11.4 年、最後の交配からでは 6.4 年である。実際に圃場で大規模に展開されるのは最後の交配後であり、交配年数の短縮のみならず、作業量についても大幅に削減できたことになる。

戻し交雑によって開発された品種は、品種の栽培指針および加工における設定がそのまま利用できるという利点が大きく、実際には、品種更新にかかる手間についても大幅に軽減されている可能性がある。主力品種の更新が遅れていたことを考慮すると、全く異なる遺伝背景を持つ新品種による更新を待つより、難裂莢性戻し交雑品種による主力品種の置換が有効

であったと考えられる。品種更新が遅れると、主力品種のブランド化が生じる。ブランド農産物自体は農業に良い影響を与えるものであるが、品種更新の遅れが収量向上の遅れにつながることで、結果的に経済的にネガティブな要因ともなる。戻し交雑で育成したピンポイント改良品種は、栽培および加工の現場に利益をもたらすだけでなく、主力品種の硬直化が発生したときに、品種更新の突破口としての役割を担うことができる。また、戻し交雑による欠点の改善は、各種の育種手法による収量ポテンシャルの向上と合わさることで、実際の農家レベルにおける継続的な増収効果が期待されることから、国産大豆の安定供給という目標を達成するためには、育成系統の収量性ポテンシャル自体を改善する取り組みも重要である。

今後さらなる世界的な大豆需要の増加に対し、我が国における大豆の安定供給を実現する品種を継続的に開発するため、本研究により開発された難裂莢性品種、難裂莢性および青立ち性に係わる DNA マーカー、およびこれらについて得られた知見は、収穫損失の低減により大豆収量の安定化を図ることを目的としたダイズ品種開発に貢献することが期待される。

## 摘要

ダイズは世界的に主要なマメ科作物であり、世界中で幅広い用途で利用されている。我が国では、豆腐、納豆、味噌、醤油を始め多くの食品に加工される。世界におけるダイズの生産量は増加傾向にあるが、今後、発展途上国の生活水準の向上と食生活の欧米化・肉食化に伴い、大豆の消費量のさらなる増加が予想される。このような状況下において、我が国における大豆の安定供給のためには日本国内における大豆生産の安定化が重要である。国内の主力品種の更新速度は遅く、単位面積当たりの子実収量は約 180kg/10a と低迷している。様々な耕種的対策が講じられている反面、その増収効果は限定的であり、現状の打開には遺伝的な改良が必要である。

国内の主力品種は裂莢し易い性質（易裂莢性）を有するために、成熟後に長期間圃場に放置しておく、自然裂莢により収穫損失が発生するが、近年の気候温暖化に伴い、主力品種の青立ち障害が問題となる事例が多数発生しているために、茎葉部の汁液が子実に付着することを避け、刈り遅れに伴う収穫損失の増大を招いており、機械作業体系の普及した現在においては裂莢性の軽減が必要である。また、青立ち性の改善については、気候温暖化に伴う生育特性の変化という側面が大きいことから、品種開発による根本的な解決が必要である。短期間に大幅な増収を目指すためには、収量性ポテンシャルの増加よりも、収穫損失の軽減の方が有効である可能性がある。また、作用力の大きな少数の遺伝子座によって支配される形質については、ダイズにおいても DNA マーカー支援選抜（Marker Assisted Selection; MAS）を用いた戻し交雑が有効であると考えられる。

はじめに、収穫損失の問題に対して、難裂莢性 DNA マーカーの開発に着手した。当初、難裂莢性品種開発の母本として用いた北海道品種‘ハヤヒカリ’の難裂莢性は、タイ国品種‘SJ2’に由来するが、難裂莢性品種はその難裂莢性の由来が異なっても *qPDH1* 近傍に難裂莢性遺伝子を有することが明らかとなった。ここから得られた知見を基に開発された難裂莢性 DNA マーカーを用いた戻し交雑により、主力品種‘フクユタカ’および‘サチユタカ’に導入した難裂莢性品種‘フクユタカ A1 号’および‘サチユタカ A1 号’が開発された。これら難裂莢性品種を用いた大規模ダイズ栽培試験により、*pdh1* を利用した難裂莢性の付与に伴う減収軽減効果が確認された。

次に、青立ち障害の問題に対して、主力品種‘エンレイ’の早晩性遺伝子 *E2* 座および *E3* 座を晩生型アリルに置き換えた晩生化系統‘エンレイ\_ *E2*’および‘エンレイ\_ *E3*’が開発された。晩生化系統は元品種‘エンレイ’と比較して青立ち指数が増加しにくい傾向が認められ、元品種を栽培適地よりも南の地域で栽培するなど、元品種の収量性が低下し、青立ち障害が増大する場合に、晩生化系統の優位性が明瞭となった。

さらに、青立ちしにくい特性を有する‘東北 129 号’に由来する青立ちしにくい特性に着目し、青立ちしやすい主力品種である‘タチナガハ’との交雑に由来する RILs を用いた複数年次の複数試験における表現型値について QTL 解析を実施した。その結果、主要な 3 個の QTL 領域、*qGSD1*, *qGSD2*, および *qGSD3* が検出された。これら 3 領域について、いずれも‘東北 129 号’型である RILs のグループは、‘東北 129 号’型と同様の青立ち発生率を示

し、いずれも‘タチナガハ’型である RILs のグループでは‘タチナガハ’と同様の青立ち発生率を示したことから、これらが青立ち性に寄与する主要な QTL 領域であると結論した。

本研究で開発された「青立ち性」と「難裂莢性」に寄与する DNA マーカーは、いずれも今後の品種開発の現場でも利用することが可能であり、連続戻し交雑による育種が可能である。また、両者は関連性の高い収穫損失であり、育成品種の保有する青立ち性のリスクを低減しながらも、青立ち症状が抑えきれないような高温年や虫害の多発環境下では、難裂莢性によって、低温や降霜によって低減するのを待って収穫することができる、という二段構えの対策により大豆生産の安定化が実現可能となることが期待される。

## Summary

Soybean is a major legume crop worldwide and is used in a wide range of applications in the world. Soybean is processed into many foods including tofu, natto, miso, soy sauce in Japan. Soybean consumption is expected to increase in the future as the living standards of developed countries are improving and dietary habits become westernized and carnivorous. Under such circumstances, stabilization of soybean production in Japan is important for the stable supply of soybeans. The renewal speed of the leading cultivars in Japan is slow, and the seed yield is low at about 1.8t/ha. While various cultivation efforts have been taken, its effect has been limited. Thus, a genetic improvement is needed to break the current condition.

Since domestic leading cultivars have pod shattering trait, harvest loss will occur when they are left in the field for a long time after maturity. Besides, due to climate warming in recent years, green stem disorder (GSD) of the leading cultivars have been a serious problem. Avoiding that the juice of the stem and leaf attach to the grain, harvest loss caused by pod shattering has been increasing due to the delay of harvesting. Thus, pod shattering tolerance is necessary. Regarding the improvement of GSD tolerance, fundamental solution by genetic development is necessary because the change in growth characteristics are accompanied to climate warming. Reduction of harvest loss may be more effective than increase of yield potential to aim for significant increase in short term. For traits dominated by a small number of genetic loci with large effect, backcrossing using DNA markers assisted selection (MAS) is effective also in soybean.

Firstly, we began to develop DNA markers associated with shattering resistance against the problem of harvest loss. The shattering resistance of the Hokkaido cultivar ‘Hayahikari’ used as a donor parent of backcrossing was derived from the Thai cultivar ‘SJ2’. And it was revealed that the causal genes of shattering resistance derived from every origin examined locate in the vicinity of *qPDH1*. By backcrossing using the DNA markers of shattering resistance, new shattering resistant cultivars ‘Fukuyutaka A1’ and ‘Sachiyutaka A1’ were developed. Large-scale cultivation experiments using these shattering resistant cultivars with *pdh1* confirmed that the effect of lessening the loss due to the pod shattering.

Secondly, for the problem of GSD, the late-flowering lines, ‘Enrei\_E2’ and ‘Enrei\_E3’, which replaced the maturity genes *E2* and *E3* of the leading cultivar ‘Enrei’ with late-flowering allele were developed. GSD index of the late-flowering lines tend to be lower as compared to the original variety ‘Enrei’. In addition, when ‘Enrei’ shows low yield and high GSD index in the south of the suitable cultivation area, the superiority of late-flowering lines became clear.

Thirdly, focusing on GSD tolerance of ‘Tohoku 129’, field experiments were conducted using RILs derived from a crossing between a leading cultivar ‘Tachinagaha’ and the ‘Tohoku 129’. And QTL analysis was performed for the phenotypes. As a result, three major QTL regions, *qGSD1*, *qGSD2*, and *qGSD3*, were detected. Regarding these three regions, the group of RILs which is ‘Tohoku 129’ type in all QTLs showed the similar rate of GSD occurrence as that of ‘Tohoku 129’. While, in the group of RILs which is ‘Tachinagaha’ type in all QTLs showed the similar rate of GSD occurrence as that of ‘Tachinagaha’. Thus, it was concluded that these

regions are the main QTL regions contributing to GSD.

In conclusion, all the DNA markers developed in this study can be used in conventional breeding programs and breeding by backcrossing. Furthermore, as shattering resistance traits ensure the stable harvesting under severe environments, such as high temperature or drought condition in flowering period enhancing GSD, soybean breeders have to care more on these traits simultaneously.



## 謝辞

本論文のとりまとめに際しては、筑波大学大学院生命環境科学研究科先端農業技術科学専攻連携大学院教授 田中淳一博士には取りまとめの構想の段階から懇切で温かいご指導を頂きました。筑波大学大学院生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻教授 大澤良博士、筑波大学大学院生命環境科学研究科先端農業技術科学専攻連携大学院教授 乙部千雅子博士、山本俊哉博士、松井勝弘博士には、論文のご校閲を頂き、多大のご助言を賜りました。

‘サチユタカ A1 号’、‘フクユタカ A1 号’ の品種化にあたっては、各県の試験研究機関の方々には特性検定試験、地域適応性検定試験、奨励品種決定試験を実施して頂きました。

農研機構次世代作物開発センターの羽鹿牧太博士には育種技術の習得から、本研究の計画、遂行まで懇切なご指導、ご協力をいただきました。農研機構次世代作物開発センターの船附秀行博士には難裂莢性の遺伝解析の遂行にあたって懇切で有益なご助言を頂きました。次世代作物開発センターの石本政男博士からは貴重なご助言と暖かい激励を頂きました。生物資源研究所の原田久也博士、北海道大学農学研究院の阿部純博士にはダイズの早晩性遺伝子に関して多大なご援助を頂きました。農研機構中央農業研究センターの島田信二博士にはダイズの青立ち性に関して貴重なご助言と暖かい激励を頂きました。

また、実験材料の管理・養成には中央農業研究センターの業務科職員の方々の多大なご協力を頂きました。実験の遂行にあたっては、次世代作物開発センター大豆育種ユニットおよび畑作物形質評価ユニットをはじめとする多くの方々に様々な形でご支援を頂きました。

ここに、これらの方々に心から感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) 阿古達木・義平大樹・白岩立彦 (2015) 栽植密度に対するダイズ品種の収量安定性に及ぼす茎伸育性の影響－分枝可塑性の品種間差異と、分枝伸長過程と受光態勢からみた要因解析－. Research of One Health: 17-38.
- 2) Akperter, A., R.J. Singh, B.W. Diers, G.L. Graef, M.A.R. Mian, J.G. Shannon, A.M. Scaboo, M.E. Hudson, C.S. Thurber, P.J. Brown and R.L. Nelson (2017) Genetic Introgression from *Glycine tomentella* to Soybean to Increase Seed Yield. Crop Science 58: 1277-1291.
- 3) 穴井豊昭 (2016) ダイズ突然変異体リソースの開発とその活用. 作物研究 61: 67-72.
- 4) Bailey, M.A., M.A.R. Mian, T.E. Carter Jr., D.A. Ashley and H.R. Boerma (1997) Pod dehiscence of soybean: identification of quantitative trait loci. Journal of Heredity 88: 152-154.
- 5) Benitez, E.R., M. Hajika, T. Yamada, K. Takahashi, N. Oki, N. Yamada, T. Nakamura and K. Kanamaru (2010) A major QTL controlling seed cadmium accumulation in soybean. Crop Science 50: 1728-1734.
- 6) Bhatnagar, P.S. and P.G. Karmakar (1995) Achievements and prospects of breeding researches on soybean (*Glycine max*) in India. Indian Journal of Agricultural Science 65: 1-9.

- 7) Boethel, D.J., J.S. Russin, A.T. Wier, M.B. Layton, J.S. Mink and M.L. Boyd (2000)  
Delayed maturity associated with southern green stink bug (*Heteroptera:*  
*Pentatomidae*) injury at various soybean phenological stages. Journal of Economic  
Entomology 93: 707-712.
- 8) Broman, K.W., H. Wu, S. Sen and G.A. Churchill (2003) R/qtl: QTL mapping in  
experimental crosses. Bioinformatics 19: 889-890.
- 9) Caviness, C.E. (1965) Effects of relative humidity on pod dehiscence in soybeans. Crop  
Science 5: 511-513.
- 10) Cheng, Y., Q. Ma, H. Ren, Q. Xia, E. Song, Z. Tan, S. Li, G. Zhang and H. Nian (2017)  
Fine mapping of a Phytophthora-resistance gene RpsWY in soybean (*Glycine max* L.)  
by high-throughput genome-wide sequencing. Theoretical and Applied Genetics 130:  
1041–1051.
- 11) Cober, E.R. and M.J. Morrison (2010) Regulation of seed yield and agronomic  
characters by photoperiod sensitivity and growth habit genes in soybean. Theoretical  
and Applied Genetics 120: 1005–1012.
- 12) Destro, D., V. Carpentieri-Pípolo, R.A. Souza Kiihl and L.A. Almeida (2001)  
Photoperiodism and Genetic Control of the Long Juvenile Period in Soybean: A  
Review. Crop Breeding and Applied Biotechnology 1: 72-92.

- 13) Echt C.S., P. May-Marquardt, M. Hseih, R. Zahorchak (1996) Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39: 1102–1108.
- 14) Egli, D.B. and W.P. Bruening (2006) Depodding causes green-stem syndrome in soybean. Online. *Crop Management* 5: 10.1094/CM-2006-0104-01-RS.
- 15) 藤井健一朗・加藤信・白岩立彦 (2012) 発育特性の違いによるダイズの莢実シンクおよびソース関連形質の変動の解析. *日本作物学会紀事* 81: 172-173.
- 16) Funatsuki, H., K. Kawaguchi, S. Matsuba, Y. Sato and M. Ishimoto (2005) Mapping of QTL associated with chilling tolerance during reproductive growth in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 851–861.
- 17) Funatsuki, H., M. Ishimoto, H. Tsuji, K. Kawaguchi, M. Hajika and K. Fujino (2006) Simple sequence repeat markers linked to a major QTL controlling pod shattering in soybean. *Plant Breeding* 125: 195–197.
- 18) Funatsuki, H., M. Hajika, S. Hagihara, T. Yamada, Y. Tanaka, H. Tsuji, M. Ishimoto and K. Fujino (2008) Confirmation of the location and the effects of a major QTL controlling pod dehiscence in soybean, *qPDH1*, in soybean. *Breeding science* 58: 63–69.
- 19) Funatsuki, H., M. Suzuki, A. Hirose, H. Inaba, T. Yamada, M. Hajika, K. Komatsu, T. Katayama, T. Sayama, M. Ishimoto and K. Fujino (2014) Molecular basis of a shattering

- resistance boosting global dissemination of soybean. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111: 17797-17802.
- 20) 古屋忠彦・梅崎輝尚 (1993) ダイズ個体における成熟整合性の簡易判定法. 日本作物学会紀事 62: 126-127.
- 21) Genebank Project, NARO (2018 年 11 月閲覧) 農業生物資源ジーンバンク.  
<https://www.gene.affrc.go.jp/maps/>
- 22) Goodstein, D.M., S. Shu, R. Howson, R. Neupane, R.D. Hayes, J. Fazo, T. Mitros, W. Dirks, U. Hellsten, N. Putnam and D.S. Rokhsar (2012) Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. Nucleic Acids Research 40: D1178–D1186.  
<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>
- 23) Grant, D., R.T. Nelson, S.B. Cannon and R.C. Shoemaker (2010) SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. Nucleic Acids Research 38: D843-D846.  
<https://www.soybase.org/>
- 24) Hajika, M., M. Takahashi, S. Sakai and K. Igita (1996) A New Genotype of 7 S Globulin ( $\beta$ -conglycinin) detected in Wild Soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.). Breeding science 46: 385-386.
- 25) 羽鹿牧太・高橋将一・異儀田和典・酒井真次・中澤芳則 (2001) ダイズ新品種「いちひめ」の育成とその特性. 九州沖縄農業研究センター報告 40: 79-94.

- 26) 羽鹿牧太 (2005) ダイズ青立ち症状の発生に関する遺伝的解析. 日本作物学会紀事 74 (別 1) : 380.
- 27) 羽鹿牧太・高橋浩司・山田哲也・小巻克巳・高田吉丈・島田尚典・境哲文・島田信二・足立大山・田淵公清・他 (2009) 豆乳用大豆新品種「なごみまる」の育成. 作物研究所研究報告 10: 1-20.
- 28) Hashiguchi, M., J. Abe, T. Aoki, T. Anai, A. Suzuki and R. Akashi (2012) The National BioResource Project (NBRP) *Lotus* and *Glycine* in Japan. Breeding science 61: 453–461. <https://www.legumebase.brc.miyazaki-u.ac.jp/lotus/>
- 29) 林元樹・濱田千裕・谷俊男・平岩確 (2008) ダイズにおける省力的摘心機の開発と処理効果. 愛知農総試研報 40: 93-97.
- 30) Hill, C.B., G.L. Hartman, R. Esgar and H.A. Hobbs (2006) Field evaluation of green stem disorder in soybean cultivars. Crop Science 46: 879–885.
- 31) Hirata, K., R. Masuda, Y. Tsubokura, T. Yasui, T. Yamada, K. Takahashi, T. Nagaya, T. Sayama, M. Ishimoto and M. Hajika (2014) Identification of quantitative trait loci associated with boiled seed hardness in soybean. Breeding science 64: 362-370.
- 32) 北海道立総合研究機構 (2002) 道央・上川地方における大豆「ユキホマレ」の栽培法とコンバイン収穫適性.  
<http://www.agri.hro.or.jp/center/kenkyuseika/gaiyosho/h14gaiyo/2002006.htm>

- 33) Hwang, T.Y., T. Sayama, M. Takahashi, Y. Takada, Y. Nakamoto, H. Funatsuki, H. Hisano, S. Sasamoto, S. Sato, S. Tabata, I. Kono, M. Hoshi, M. Hanawa, C. Yano, Z. Xia, K. Harada, K. Kitamura and M. Ishimoto (2009) High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean. *DNA Research* 16: 213–225.
- 34) Ikeda, T., S. Ohnishi, M. Senda, T. Miyoshi, M. Ishimoto, K. Kitamura and H. Funatsuki (2009) A novel major quantitative trait locus controlling seed development at low temperature in soybean (*Glycine max*). *Theoretical and Applied Genetics* 118: 1477–1488.
- 35) Ismail, A.M., A.E. Hall and T.J. Close (1999) Allelic variation of a dehydrin gene cosegregates with chilling tolerance during seedling emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 13566–13570.
- 36) Iwata, H. and S. Ninomiya (2006) AntMap: constructing genetic linkage maps using an ant colony optimization algorithm. *Breeding science* 56: 371–377.
- 37) Jiang, J.L., F.S. Thseng and M.S. Yeh (1991) Studies on the pod shattering in soybean. *Journal of the Agricultural Association of China* 156: 15–23.
- 38) Kamiya, M. and T. Kiguchi (2003) Rapid DNA extraction method from soybean seeds. *Breeding science* 53: 277–279.
- 39) Kandoth, P.K., N. Ithal, J. Recknor, T. Maier, D. Nettleton, T.J. Baum and M.G. Mitchum (2011) The Soybean Rhg1 Locus for Resistance to the Soybean Cyst

Nematode *Heterodera glycines* Regulates the Expression of a Large Number of Stress- and Defense-Related Genes in Degenerating Feeding Cells. *Plant Physiology* 155: 1960–1975.

- 40) 加藤信・高田吉丈・河野雄飛・湯本節三 (2005) 大豆新品種「きぬさやか」の特性.  
東北農業研究 58: 65–66.
- 41) 加藤信・河野雄飛・湯本節三・菊池彰夫 (2009) 大豆新品種「里のほほえみ」の特性.  
東北農業研究 62: 59-60.
- 42) Kato S., Y. Takada, S. Shimamura, K. Hirata, T. Sayama, F. Taguchi-Shiobara, M. Ishimoto, A. Kikuchi and T. Nishio (2016) Transfer of the Rsv3 locus from ‘Harosoy’ for resistance to soybean mosaic virus strains C and D in Japan. *Breeding science* 66: 319–327.
- 43) Kawasaki, Y., Y. Tanaka, K. Katsura, L.C. Purcell and T. Shiraiwa (2016) Yield and dry matter productivity of Japanese and US soybean cultivars. *Plant Production Science* 19: 257–266.
- 44) 菊池彰夫・河野雄飛・加藤信・湯本節三・高田吉丈・島田信二・境哲文・島田尚典・高橋浩司・足立大山、他 (2011) 倒伏に強く大粒良質で高蛋白なダイズ新品種「里のほほえみ」の育成. 東北農業研究センター研究報告 113: 1–15.
- 45) 国分牧衛 (2000) ダイズ, 作物学 (I) –食用作物編–. p180-194. 文英堂, 東京



- 46) 国際連合食糧農業機関 (2018 年 11 月閲覧) FAOSTAT.  
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/BC>
- 47) 厚生労働省 (2006) 報道発表資料 大豆及び大豆イソフラボンに関する Q&A について.  
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/02/h0202-1.html>
- 48) 厚生労働省 (2007) I P ハンドリング (分別生産流通管理) の運用の明確化について  
(報告) . <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2007/07/dl/s0723-3b.pdf>
- 49) Kumagai, E. (2018) Effect of early sowing on growth and yield of determinate and indeterminate soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars in a cool region of northern Japan. 農業気象 74: 18-28.
- 50) Kuroda, Y., A. Kaga, N. Tomooka, H. Yano, Y. Takada, S. Kato and D. Vaughan (2013) QTL affecting fitness of hybrids between wild and cultivated soybeans in experimental fields. Ecology and Evolution 3: 2150–2168.
- 51) Lander, E.S. and D. Botstein (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121: 185–199.
- 52) Langridge, P. and K. Chalmers (2004) The principle: identification and application of molecular markers. p3–22. Springer, Berlin
- 53) Liu B, S. Watanabe, T. Uchiyama, F. Kong, A. Kanazawa, Z. Xia, a. Nagamatsu, M. Arai, T. Yamada, K. Kitamura, C. Masut, K. Harada and J. Abe (2010) The soybean stem

- growth habit gene *Dt1* is an ortholog of Arabidopsis *TERMINAL FLOWER1*. Plant Physiology 153: 198-210.
- 54) Liu, B., T. Fujita, Z.H. Yan, S. Sakamoto, D. Xu and J. Abe (2007) QTL Mapping of Domestication-related Traits in Soybean (*Glycine max*). Annals of Botany 100: 1027–1038.
  - 55) Liu, S., P.K. Kandoth, N. Lakhssassi, J. Kang, V. Colantonio, R. Heinz, G. Yeckel, Z. Zhou, S. Bekal, J. Dapprich, B. Rotter, S. Cianzio, M.G. Mitchum and K. Meksem (2017) The soybean *GmSNAP18* gene underlies two types of resistance to soybean cyst nematode. Nature Communications 8: DOI: 10.1038/ncomms14822.
  - 56) Lošák, T., M. Pachner, D. Watanabe, L. Musilová and J. Hlušek (2015) Soybean cadmium concentration: validation of a QTL affecting seed cadmium accumulation for improved food safety. Euphytica 203: 177–184.
  - 57) Ma FF., M. Wu, YN Liu YN, Feng XY, Wu XZ, Chen JQ, Wang B. (2018) Molecular characterization of NBS-LRR genes in the soybean *Rsv3* locus reveals several divergent alleles that likely confer resistance to the soybean mosaic virus. Theoretical and Applied Genetics 131: 253-265.
  - 58) Manly, K.F., R.H. Cudmore Jr. and J.M. Meer (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. Mammalian Genome 12: 930–932.

- 59) 松本重男・古屋忠彦・松永亮一 (1986) ダイズにおける成熟異常個体の発生実態なら  
びにその識別基準について. 日本作物学会紀事 55: 333-338.
- 60) 松本重男 (1988) ダイズ (大豆). 新版食用作物学. p159-176. 文英堂, 東京
- 61) McBlain, B.A., J.D. Hesketh and R.L. Bernard (1987) Genetic effects on reproductive  
phenology in soybean isolines differing in maturity genes. Canadian Journal of Plant  
Science 67: 105-115.
- 62) 望月篤・白岩立彦・中川博視・堀江武 (2005) 生殖生長期間の温度条件がダイズの生  
殖器官の発達と莢先熟の発生におよぼす影響. 日本作物学会紀事 74: 339-343.
- 63) 守田和弘・高橋渉・鍋島弘明・野村幹雄・荒井清完・岩井昭衛 (2006) 大豆コンバイ  
ン収穫における青立ち株が汚粒指数に及ぼす影響. 北陸作物学会報 41: 107-109.
- 64) 永島宏慧・篠崎敦 (2009) 大豆難裂莢性遺伝子の有無による品質劣化程度の差異. 日  
本作物学会関東支部会報 24: 56-57.
- 65) 中村博 (1978) 米国における大豆生産の歴史, 米国大豆の研究. P21-23. 投資日報社,  
大阪
- 66) 中村卓司・岡崎圭毅・山田哲也 (2015) RILs を用いた大豆青立ち耐性機構に関わる代  
謝産物の解析. 第 239 回日本作物学会講演会要旨集 : 214.
- 67) 日本豆類基金協会 (1991) 北海道における豆類の品種 (増補版). 岩橋印刷, 札幌
- 68) 日本特産農産物協会 (2018 年 11 月閲覧) 過年次の入札取引結果.  
<http://www.jsapa.or.jp/soy03/index.html>

- 69) 野原努・中山則和・高橋幹・丸山幸夫・島田信二・有原丈二 (2005) 相対ウレイド法を用いた高窒素条件下におけるダイズ窒素固定依存度の品種間差異. 日本作物学会紀事 74: 316-324.
- 70) 農研機構次世代作物開発研究センター (2017) 海外遺伝資源等を活用した極多収大豆育種素材の開発. <https://www.naro.affrc.go.jp/brain/h27kakushin/files/kenkyu-kaihatsu-keikaku19.pdf>
- 71) 農研機構 (2018 年 11 月閲覧) ダイズ種(*Glycine max* (L.) Merr.)の品種一覧.  
<http://www.naro.affrc.go.jp/patent/breed/0100/0109/index.html>
- 72) 農研機構次世代作物開発研究センター (2018 年 11 月閲覧) ゲノム育種マーカー情報 (ダイズ). <http://www.naro.affrc.go.jp/genome/database/daizu/>
- 73) 農林水産省 (1999) 大豆のコンバイン収穫マニュアル.  
[http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d\\_combine/index.html](http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_combine/index.html)
- 74) 農林水産省 (2001) 農産物規格規程.  
<http://www.maff.go.jp/j/seisan/syoryu/kensa/sentaku/attach/pdf/index-17.pdf>
- 75) 農林水産省 (2005) 国産大豆の生産・流通の現状と課題.  
[http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d\\_kondan/pdf/data5.pdf](http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_kondan/pdf/data5.pdf)
- 76) 農林水産省 (2014) I T P G Rに基づく植物遺伝資源の利用の手引.  
<http://www.affrc.maff.go.jp/docs/pgrfa/pdf/201411itpgrtebiki.pdf>

- 77) 農林水産省 (2015) 大豆の新品種の開発・普及.  
[http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d\\_ziten/pdf/fukyu.pdf](http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_ziten/pdf/fukyu.pdf)
- 78) 農林水産省 (2018 年 11 月閲覧) 品種登録ホームページ.  
<http://www.hinshu2.maff.go.jp/>
- 79) 農林水産省 (2018 年 11 月閲覧) 大豆のホームページ.  
<http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/>
- 80) Oki, N., K. Komatsu, M. Takahashi, M. Takahashi, Y. Kono and M. Ishimoto (2015)  
Field assessment of resistance QTL to common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius)  
in soybean. Crop Science 55: 624-630.
- 81) Oki, N., A. Kaga, T. Shimizu, M. Takahashi, Y. Kono and M. Takahashi (2017) QTL  
mapping of antixenosis resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius) in  
wild soybean (*Glycine soja*). Public Library of Science one: 1-11.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189440>
- 82) Pierce, R.O., P.F. Knowles and D. Phillips (1984) Inheritance of delayed leaf  
senescence in soybean. Crop Science 24: 515-517.
- 83) Ping J., Y. Liu, L. Sun, M. Zhao, Y. Li, M. She, Y. Sui, F. Lin, X. Liu, Z. Tang, H.  
Nguyen, Z. Tian, L. Qiu, R.L. Nelson, T.E. Clemente, J.E. Specht and J. Ma. (2014)  
*Dt2* is a gain-of-function MADS-domain factor gene that specifies semideterminacy in  
soybean. Plant Cell 26: 2831-2842.

- 84) Romkaew, J. and T. Umezaki (2006) Pod dehiscence in soybean: assessing methods and varietal difference. *Plant Production Science* 9: 373–382.
- 85) 齊藤邦行・西村公仁子・北原利修 (2012) ダイズの倒伏が子実収量に及ぼす影響 - 倒伏防止処理と人為的倒伏処理 - . *日本作物学会紀事* 81: 27-32.
- 86) 坂下誠・八木美典・白岩立彦・堀江武 (2003) 子実肥大期間の温度および土壌水分条件がダイズの窒素固定および成熟整合性に及ぼす影響. *日本作物学会紀事* 72 (別 2) : 144.
- 87) Samanfar B., SJ. Molnar, M. Charette, A. Schoenrock, F. Dehne, A. Golshani, F. Belzile, E.R. Cober (2017) Mapping and identification of a potential candidate gene for a novel maturity locus, E10, in soybean. *Theoretical and Applied Genetics* 130: 377-390.
- 88) 猿田正恭・高田吉丈・岡部昭典 (2009) ダイズのインゲンマメ南部モザイクウイルスに対する抵抗性の遺伝解析. *育種学研究* 11 (別 2) : 277.
- 89) Saruta, M., Y. Takada, A. Kikuchi, T. Yamada, K. Komatsu, T. Sayama, M. Ishimoto and A. Okabe (2012) Screening and genetic analysis of resistance to peanut stunt virus in soybean: identification of the putative Rpsv1 resistance gene. *Breeding science* 61: 625–630.
- 90) SAS Institute (1996) SAS/STAT user s guide, vols. 1 and 2, version 6, 4th edn.
- 91) Sato, J., T. Shiraiwa, M. Sakashita, Y. Tsujimoto and R. Yoshida (2007) The occurrence of delayed stem senescence and trans-zeatin riboside in the xylem exudate in soybeans

- grown under excess-wet and drought soil conditions. *Plant Production Science* 10: 460-467."
- 92) Sayama, T., T.Y. Hwang, K. Komatsu, Y. Takada, M. Takahashi, S. Kato, H. Sasama, A. Higashi, Y. Nakamoto, H. Funatsuki and M. Ishimoto (2011) Development and application of a whole-genome simple sequence repeat panel for high-throughput genotyping in soybean. *DNA Research* 18: 107–115.
- 93) Schmutz, J., S.B. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, D.L. Hyten, Q. Song, J.J. Thelen, J. Cheng, D. Xu, U. Hellsten, G.D. May, Y. Yu, T. Sakurai, T. Umezawa, M.K. Bhattacharyya, D. Sandhu, B. Valliyodan, E. Lindquist, M. Peto, D. Grant, S. Shu, D. Goodstein, K. Barry, M. Futrell-Griggs, B. Abernathy, J. Du, Z. Tian, L. Zhu, N. Gill, T. Joshi, M. Libault, A. Sethuraman, X. Zhang, K. Shinozaki, H.T. Nguyen, R.A. Wing, P. Cregan, J. Specht, J. Grimwood, D. Rokhsar, G. Stacey, R.C. Shoemaker and S.A. Jackson (2010) Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178–183.
- 94) 島田尚典 (2002) 機械化適性育種, 大豆 自給率向上に向けた技術開発. 農林水産研究 文献解題 27: 40-46.
- 95) 島田信二・大矢徹治・高橋幹・中村卓司・中山則和・山本亮・島村聡・金榮厚・服部誠・春口真一・神崎正明 (2007) 大豆の青立ち発生には成熟期の根系吸水力の維持が

関係する．平成 19 年度 「関東東海北陸農業」研究成果情報

[http://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/seika/kanto19/10/19\\_10\\_41.html](http://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/seika/kanto19/10/19_10_41.html)

- 96) 島田信二・白岩立彦・桂 圭佑・島村聡 (2012) ダイズ生産技術の日米対比－なぜ単収がアメリカは増大しているのに日本は停滞しているのか？．日本作物学会紀事 81: 394-395.
- 97) 島本義也 (2003) ダイズ．食用マメ類の科学－現状と展望－. p2-14. 養賢堂, 東京
- 98) Shiraiwa, T., N. Ueno, S. Shimada and T. Horie (2004) Correlation between yielding ability and dry matter productivity during initial seed filling stage in various soybean genotypes. Plant Production Science 7: 138-142."
- 99) Shiraiwa, T., J. Sato, M. Sakashita and T. Horie (2005) The effect of soil water environment on nitrogen dynamics and plant development in soybean. Japanese Journal of Crop Science 74: 378-379.
- 100) 白岩立彦・桂圭佑・島田信二・川崎洋平・村田資治・本間香貴・義平大樹・田中朋之・田中佑 (2011) ダイズ単収の 日米地域差の拡大要因に関する作物学的調査．作物研究 56: 93-98.
- 101) 白岩立彦 (2015) ダイズの群落生産機能の品種間差異および環境応答に関する研究．第 239 回日本作物学会講演会要旨集 : 254-257.
- 102) 城田雅毅・濱田千裕・中嶋泰則・谷駿男・吉田朋史・釋一郎・内田利治 (2001) 愛知県のダイズ栽培における損失の実態．日本作物学会紀事 70 (別 2) : 23-24.



- 103) 城田雅毅・内田利治・濱田千裕 (2003) 愛知県の輪換畑ダイズ栽培における子実損失の実態. 愛知農業総合試験場報告 35: 31-37.
- 104) Song, Q.J., L.F. Marek, R.C. Shoemaker, K.G. Lark, V.C. Concibido, X. Delannay, J.E. Specht and P.B. Cregan (2004) A new integrated genetic linkage map of the soybean. Theoretical and Applied Genetics 109: 122-128.
- 105) South Australian Seed Conservation Centre (2018) Seeds of South Australia.  
<http://saseedbank.com.au/index.php?action=open-genus&genus=Glycine>
- 106) Sugimoto, T., S. Yoshida, K. Watanabe, M. Aino, T. Kanto, K. Maekawa and K. Irie (2008) Identification of SSR markers linked to the Phytophthora resistance gene *Rps1-d* in soybean. Plant Breeding 127: 154-159.
- 107) Suzuki, C., Y. Tanaka, T. Takeuchi, S. Yumoto and S. Shirai (2012) Genetic relationships of soybean cyst nematode resistance originated in Gedenshirazu and PI84751 on *Rhg1* and *Rhg4* loci. Breeding science 61: 602-607.
- 108) 寿崎拓哉・西田帆那 (2016) 根粒形成における負の制御系. 植物科学最前線 7: 230-240.
- 109) 竹田博之・大平陽一・佐々木良治 (2007) 生育初期における土壌過湿処理と莢伸長始期～粒肥大始期の土壌乾燥処理がダイズの莢先熟に及ぼす影響. 第 223 回日本作物学会講演会要旨集: 332-333.  
<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/warc/2005/wenarc05-12.html>

- 110) 田中義則・土屋武彦・佐々木紘一・白井和栄・湯本節三・紙谷元一・富田謙一・伊藤武・酒井真次・砂田喜興志 (1993) ダイズ新品種「カリユタカ」の育成について. 北海道立農試集報 65: 29-43.
- 111) Tiwari, S.P. and P.S. Bhatnagar (1991) Pod shattering as related to other agronomic attributes in soybean. *Tropical Agriculture* 68: 102–103.
- 112) Toda K., K. Hirata, R. Masuda, T. Yasui, T. Yamada, K. Takahashi, T. Nagaya and M. Hajika (2015) Relationship between Mutations of the Pectin Methylesterase Gene in Soybean and the Hardness of Cooked Beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 8870-8878.
- 113) Tsubokura Y., S. Watanabe, Z. Xia, H. Kanamori, H. Yamagata, A. Kaga, Y. Katayose, J. Abe, M. Ishimoto, K. Harada (2014) Natural variation in the genes responsible for maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean. *Annals of Botany* 113: 429-441.
- 114) 土屋武彦 (1986) ダイズの耐裂莢性に関する育種学的研究. 北海道立農業試験場報告 58: 1-53.
- 115) Tsuchiya, T. (1987) Physiological and genetic analysis of pod shattering in soybeans. *Japan Agricultural Research Quarterly* 21: 166–175.
- 116) Tsukada, Y., K. Kitamura, K. Harada and N. Kaizuma (1986) Genetic Analysis of Subunits of Two Major Storage Proteins ( $\beta$ -Conglycinin and Glycinin) in Soybean Seeds. *Japanese Journal of Breeding* 36: 390-400.

- 117) Tuinstra, M.R., G. Ejeta and P.B. Goldsbrough (1997) Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1005–1011.
- 118) Tukamuhabwa, P., P. Rubaihayo and K.E. Dashiell (2002) Genetic components of pod shattering in soybean. *Euphytica* 125: 29–34.
- 119) United States Department of Agriculture (2018 年 11 月閱覽) U.S. National Plant Germplasm System. <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx>
- 120) United States Department of Agriculture (2018 年 11 月閱覽) Soybeans: Production by Country. [https://www.nass.usda.gov/Charts\\_and\\_Maps/Crops\\_County/sb-pr.php](https://www.nass.usda.gov/Charts_and_Maps/Crops_County/sb-pr.php)
- 121) Wang, D., J. Shi, S.R. Carlson, P.B. Cregan, R.W. Ward and B.W. Diers (2003) A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA. *Crop Science* 43: 1828–1832.
- 122) Wang, S., C.J. Basten and Z.-B. Zeng (2007) Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.  
<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>
- 123) Watanabe, S., R. Hideshima, Z. Xia, Y. Tsubokura, S. Sato, Y. Nakamoto, N. Yamanaka, R. Takahashi, M. Ishimoto, T. Anai, S. Tabata and K. Harada (2009) Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3*. *Genetics* 182: 1251–1262.

- 124) Watanabe, S., K. Harada and J. Ab (2012) Genetic and molecular bases of photoperiod responses of flowering in soybean. *Breeding science* 61: 531–543.
- 125) 矢ヶ崎和弘・坂元秀彦・関功介・山田直弘・高松光生・谷口岳志・高橋浩司 (2010) ダイズ新品種「ななほまれ」の育成. *北陸作物学会報* 45: 61-64.
- 126) Yamada, T., Funatsuki, H., Hagihara, S., Fujita, S., Tanaka, Y., Tsuji, H., Ishimoto, M., Fujino, K. and Hajika, M. (2009) A major QTL, *qPDH1*, is commonly involved in shattering resistance of soybean cultivars. *Breeding science* 59: 435-440.
- 127) Yamada, T., S. Shimada, M. Hajika, K. Hirata, K. Takahashi, T. Nagaya, H. Hamaguchi, T. Maekawa, T. Sayama, T. Hayashi, M. Ishimoto and J. Tanaka (2014) Major QTLs associated with green stem disorder insensitivity of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Breeding science* 64: 331–338.
- 128) 山田哲也・船附秀行・加賀秋人・高橋浩司・山田直弘・平田香里・大木信彦・佐山貴司・石本政男・羽鹿牧太 (2013) DNA マーカーを利用した連続戻し交雑による難裂莢性および早晩性改変大豆系統の育成. *作物研究所研究報告* 14: 13-22.
- 129) 山田哲也・羽鹿牧太・船附秀行・高橋浩司・平田香里・菱沼亜衣・田中淳一 (2017) ダイズ大規模栽培における難裂莢性品種の減収軽減効果の解析. *日本作物学会紀事* 86: 251-257.

- 130) 山口昌宏・永島宏慧・湯澤正明・山田哲也・羽鹿牧太・船附秀行 (2010) 難裂莢性遺伝子を導入したダイズの機械収穫と刈遅れによる損失および品質低下. 日本作物学会紀事 79 (別 1) : 206-207.
- 131) Yamanaka, N., S. Ninomiya, M. Hoshi, Y. Tsubokura, M. Yano, Y. Nagamura, T. Sasaki and K. Harada (2001) An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. DNA Research 8: 61-72.
- 132) Yamanaka, N., S. Watanabe, K. Toda, M. Hayashi, H. Fuchigami, R. Takahashi and K. Harada (2005) Fine mapping of the FT1 locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a recombinant inbred line. Theoretical and Applied Genetics 110: 634-639.
- 133) 山崎諒・川崎洋平・片山勝之・田中朋之・白岩立彦 (2018) 栽植密度変更処理によるダイズの青立ち程度の品種間差の検出. 第 245 回日本作物学会講演会要旨集 : 47.
- 134) Yang, W.J., A. Nadolskaorczyk, K.V. Wood, D.T. Hahn, P.J. Rich, A.J. Wood, H. Saneoka, G.S. Premachandra, C.C. Bonham and J.C. Rhodes (1995) Near-isogenic lines of maize differing for glycinebetaine. Plant Physiology 107: 621-630.
- 135) 義平大樹・川崎洋平・白岩立彦 (2010) ダイズの収量および乾物生産性における日米品種間差異 ―北海道中央部における比較. 日本作物学会紀事 79(別 2) : 342-343.

- 136) Yue Y., N. Liu, B. Jiang, M. Li, H. Wang, Z. Jiang, H. Pan, Q. Xia, Q. Ma, T. Han and H. Nian (2017) A Single Nucleotide Deletion in J Encoding GmELF3 Confers Long Juvenility and Is Associated with Adaption of Tropic Soybean. *Molecular Plant* 10: 656-658.
- 137) 湯本節三・田中義則・黒崎英樹・山崎敬之・鈴木千賀・松川勲・土屋武彦・白井和栄・富田謙一・佐々木紘一・他 (2000) ダイズ新品種「ハヤヒカリ」の育成について. *北海道立農試集報* 78: 19-37.
- 138) Zhao, X., W. Teng, Y. Li, D. Liu, G. Cao, D. Li, L. Qiu, H. Zheng, Y. Han and W. Li (2017) Loci and candidate genes conferring resistance to soybean cyst nematode HG type 2.5.7. *BMC Genomics* 18: DOI: 10.1186/s12864-017-3843-y