

開花予測モデルを利用した時間的隔離による
遺伝子組換えダイズとツルマメの交雑リ
スク評価手法の確立

2020年1月

大東健太郎

開花予測モデルを利用した時間的隔離による
遺伝子組換えダイズとツルマメの交雑リ
スク評価手法の確立

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
博士（農学）学位論文

大東健太郎

目次

第1章

緒言	1
----	---

第2章

開花の重複程度を評価するための新しい指標の開発	7
2-1. 材料と方法	9
2-1-1. 交雑試験の設計	9
2-1-2. 新しい開花重複度指数の導入	11
2-1-3. パラメトリックな確率密度分布による開花の推移の近似	11
2-2-2. 結果	12
2-2-3. 考察	18

第3章

開花重複度と交雑率の関係について	20
3-1. 交雑実験の材料と方法	20
3-2. 結果	21
3-3. 考察	26

第4章

日本各地のツルマメの開花予測モデルの構築	27
4-1. 開花の観察実験の材料と方法	28
4-2. 発育指標モデルを用いた開花予測	32
4-2-1. 開花予測モデルの構築	32
4-2-2. モデルの評価	32
4-2-3. 開花予測モデルの補正	33
4-2-4. 開花シミュレーション	34
4-3. 結果	34
4-4. 考察	47

第5章

総合考察	50
5-1. 開花の重複程度を正確に評価することの重要性	51
5-2. 開花予測モデルによる開花期間全体の予測について	

て	53
5 - 3. 時間的隔離の実用化に向けて	54
引用文献	56
摘要	60
謝辞	63

開花予測モデルを利用した時間的隔離による遺伝子組換えダイズとツルマメの交雑リスク評価手法の確立

第1章

緒言

ダイズ(*Glycine max*)は世界で最も栽培されている遺伝子組換え作物の一つであるが(ISAAA 2015)、その祖先種と言われているツルマメ(*Glycine Soja* Sieb and Zucc.)(Kim et al. 2010)は、日本をはじめ、東アジアに広く分布しており、その中間的形態を持つ *Glycine gracilis* はダイズの雑草型または半野生型と言われており、2種間で繁殖能力のある交雑個体を得ることは容易であるとされている(OECD 2000)。Ellstrand et al.(1999)や、Bartsch(1999)などは、主要な作物種とその近縁野生種の交雑は世界各地で報告されており、作物種からの遺伝子流動は、野生種の遺伝的多様性や進化に対して、除草剤抵抗性の伝播による雑草性の増加や、作物種遺伝子による適応度の低下、または繁殖干渉などの重要な影響を与えることを指摘している。Stewart et al.(2003)は、特に作物が遺伝子組換え作物である場合に、除草剤抵抗性の遺伝子などが同所的に存在する野生雑草に定着することが起これば、強害雑草となる恐れがあるとして、警戒が必要であるとされている。

Kaga et al.(2005)は秋田県で、Kuroda et al. (2005)は佐賀県でそれぞれダイズとツルマメの交雑個体発見を報告している。これらの報告はツルマメの分布する地域において、ダイズ由来の遺伝子がツルマメの個体群に定着する可能性があることを示唆しているが、Kuroda et al. (2006)による野外交雑個体を発見した個体群のモニタリングや Kitamoto et al. (2012)によるシミュレーションなどの報告によれば、現在のダイズの形質であれば、その確率はそれほど高くないと考えられる。しかしながら、Hooftman et al. (2008)は、特に、病虫害耐性や乾燥耐性などの形質をもたらす遺伝子が、作物種から野生種に移入することにより、その適応度が上昇し、より大きな生態学的影響をもたらす可能性も指摘している。ダイズとツルマメの場合、実際に野外で交雑個体が観察されていることから、今後開発される遺伝子組換えダイズが持つ形質によっては、交雑個体の適応度が高まり、ツルマメ個体群への遺伝子浸透が起こる可能性もあると言える。Bartsch et al. (1996)はウイルス抵抗性を導入したテンサイと野生種の交雑個体

の栄養生殖体のバイオマスが増加したことを、Stewart et al.(1997)はセイヨウナタネで、Snow et al.(2003)は、ヒマワリで、GM 品種との交雑個体が Bt 遺伝子が入ることによって、虫食害が減少し、種子生産量が増加したことを報告している。Gepts and Papa(2003)は、ナタネやヒマワリ、テンサイに関する前述の Stewart et al.や Snow et al.の結果から、遺伝子組み換え作物を近縁野生種の近傍で栽培する場合には、その影響評価を行うことや、交雑親和性、開花フェノロジーの評価の結果、遺伝子流動リスクがあると判断された場合には、遺伝子流動リスクの低減措置を講じる必要があるとしている。

また、野生種と遺伝子組換え作物の交雑は、生物多様性保全の観点からも注目されている。例えば、中山・山口(2001)は、ツルマメのような作物種の生物資源となりえる野生種の近傍で遺伝子組換え作物を栽培することが、野生種を含めた作物の遺伝的多様性にとってリスクと成りえることを指摘し、慎重な対応が求められるとしている。国際的には生物資源の持続可能な利用のために、生物の多様性を包括的に保護することを目的とした、生物の多様性に関する条約(1992)に基づいて、2000年にバイオセーフティーに関するカルタヘナ議定書が採択された。同議定書は、2003年に、遺伝子組換えなどの生物多様性に悪影響を及ぼすおそれのある生物の移送、取り扱い、利用の手続きについて、それらの輸出入時に輸出国が輸入国に対して、情報提供を行うこと、事前同意を得ることなど義務付けた国際協定として発効した。日本においては、2004年に遺伝子組換え生物等の規制による生物の多様性の確保に関する法律(通称:カルタヘナ法)が施行され、遺伝子組み換え作物の輸入や栽培の承認において、生物多様性影響評価が行われる体制が作られた。

また野生種との交雑のみならず、非遺伝子組換え品種と遺伝子組換え品種の交雑リスクについても大きな関心が持たれている(Bucchini and Goldman 2002、Cartar and Smith 2007)。2000年には飼料用遺伝子組換えトウモロコシの種子が、食用栽培用種子に混入していた、いわゆる「スターリンク問題」が起これ、遺伝子組換え作物の流通過程での混入とともに、交雑による組換え遺伝子が流出している可能性が指摘され、遺伝子組換え作物と非遺伝子組換え作物の交雑リスクについて関心が高まった(Bucchini and Goldman 2002)。スターリンクの混入問題によって、トウモロコシの世界的な価格を少なくとも1年間6%以上低下させたことが報告されるなど(Carter and Smith 2007)、一度混入問題が起きた場合には、大きな経済的損失が起こる危険性もある。Watanabe et al. (2004)が、

遺伝子組換え作物がもたらす長期的な影響が評価されていないことや、消費者、生産者、企業などのステークホルダーの間での信頼構築が不十分であるために、日本の社会で遺伝子組換え作物への拒絶反応が強くなっているかことを指摘しているように、遺伝子組換え作物の場合においては、生態学的影響のみではなく、社会的な不安やリスクコミュニケーションのためにも、交雑実態を監視する精緻なモニタリング調査と結果の公表が求められていると言える。このような状況から作物種と近縁野生種の場合だけでなく、同じ作物種間でも、意図しない遺伝子組換え品種由来の遺伝子の拡散を低減させる措置が求められるようになり、日本の場合でも、国によって栽培実験指針(農林水産省 2004) が定められているほか、北海道(北海道 2005)、新潟県(新潟県 2006)で遺伝子組換え作物の栽培等による交雑等の防止に関する条例が定められている。

Ellstrand (2003)は、遺伝子流動リスクにもっとも強く影響するのは種子親の交雑率であるとしており、交雑率に影響を与える要因として、集団間の物理的距離、開花期の類似度、自殖率、個体群のサイズ、媒介昆虫の訪問頻度、風向きなど様々な要因を挙げている。なかでも、二つの集団の開花期が重なり、交雑可能な適切な物理的距離の範囲内に存在しない限り、その他の要因がいかような条件を取ろうとも、交雑は起こりえないため、種子親の交雑率にとって、時空間的に、種子親と花粉親が同時同所的に開花することが、最も本質的であるとしている。従って、この時間と空間の2条件のうちのどちらかを阻害する対策として、物理的距離をあける、遮蔽物で覆った状態で栽培するといった空間的隔離、開花が重複しないように栽培する、あるいは開花期が異なる品種を利用するといった時間的隔離の2つの手段が用いられる。

農林水産省による栽培実験指針、北海道や新潟県の条例では、出穂時期が比較的良好に知られているイネの場合を除き、交雑、またそれによって引き起こされる遺伝子流動リスク管理のためには、種子親と花粉親の距離を一定以上に設定する空間的隔離の手法が用いられている。これらの基準は Lu and Snow (2005)などによる花粉飛散距離に関する報告、各自治体が行った交雑試験の結果、交雑個体が発見された最大距離に基づいている。Rong et al. (2006) は、イネの交雑試験において、交雑率が距離の2乗に比例して減少していくために、たとえ小さな隔離距離設定でも大きな交雑率の抑制効果を持つことを示している。また Walklate et al. (2004)は、セイヨウアブラナの花粉飛散モデルを用いて、隔離距離と交雑率の関係が指数関数的に減少することを説明している。

一方で、時間的隔離による交雑抑制研究はそれに比べると非常に少なく、栽培における実用化には至っていない。しかし、遺伝学、生態学分野においては、交雑のタイミングが異なる時間的隔離が種の分化に強く影響することは、Dobzhansky (1937)や Mayr(1942)、Clausen(1951)らによって古くから指摘されている。また近年、植物では、ミゾハウズキ属の2種間で、開花期が異なることで生殖隔離が起こっていることを確認した Lowry et al(2008)、動物ではキングサーモンの遡上、発情のタイミングの違いなどによって、集団間の遺伝的隔離が起こっていることを報告した Quinn et al.(2000)のように、遺伝的構成と時間的隔離の相関を実際に確認した研究も増えつつあり、その効果は実証されている。

作物栽培においても、時間的隔離を用いることで、物理的距離の設定が難しい狭隘な圃場においても、交雑を忌避したい2種を共存させることが可能であり、作物と野生種の交雑のケースのように、2つの集団間の距離を開花前に把握することができない場合にも、交雑リスクを低減することができるかと挙げられる。これらのメリットにも関わらず、現在のところ利用されていない大きな理由の一つに、時間的隔離の効果が正確に評価されていないということが考えられる。前述したように、空間的隔離の場合には、ナタネやイネの研究で共通して交雑率は距離の2乗に比例して減少していくことが確認されており、花粉の空間的拡散を記述するモデルによってそれらの減少原理もうまく説明されている。しかし、時間的隔離の効果については、様々な報告の間では必ずしも一致していない。例えば Della Porta et al. (2007)では、トウモロコシの開葯開始日の差と交雑率の差を用いて、3日以内では交雑率に差は出ないが、5日でほぼ半減し、7日以上でほぼ0になったという結果を示しているが、Halsey et al. (2007)は、同じくトウモロコシで前後に1週間ずらして作付けした場合には交雑率にあまり変化がなく、前後に2週間ずらして作付けをした時に、交雑率が顕著に低下したと報告している。また自殖性のイネの例ではあるが、Shivrain et al. (2009)のように、開花の類似度がほとんど交雑率と相関しなかったという報告も存在する。

Shivrain et al. (2009)では、開花の類似度を示す指標が正確ではないという点が、Della Porta et al. (2007)と Halsey et al.(2007)では開花時での開花期の差異ではなく、作付け時の差異を基準にしているという点がそれぞれ影響していると考えられる。

従来の開花の類似度の評価は、中山・山口(2002)では開花の重複日数が、Simard and Legere (2004)や Roumet et al. (2013)では種子親の開花期全体のう

ち、花粉親の開花期と重複していた日数の割合を利用していた。例えば、開花期の重複日数では、種子親の開花日数が5日間で全期間が花粉親の開花期と重複していた場合と、種子親の開花日数が20日で、そのうちの5日間で花粉親の開花期と重複していたとした場合とで、重複日数は同じ5日であるが、種子親の交雑率は大きく異なるであろう。種子親の開花期全体のうち、花粉親の開花期と重複していた日数の割合はこの問題を改善するために導入された指標であるが、花粉親の開花期の終期と、種子親の開花期の全期間が重複していた場合と、開花の推移が完全に一致した場合とで、重複の割合はともに最大値の1となるが、期待される交雑率は大きく異なると考えられる。このような指標を使って交雑率との関係を調査した場合、開花のパターンによって結果が大きくバラつくのは避けられない。

イネなどでは、出穂期以降の高温障害を避けるため、出穂期の予測研究が盛んに行われている。例えば東北地方では、移植時期の気温が低く、1月程度移植日を遅らせても、出穂期の差は8日から23日と移植日の差ほどは出穂期の差は開かず、年次間変動も大きいことが報告されている(佐々木ら 2009)。このように、作付け時期を一定程度ずらしたことによって、開花期にどの程度の差が生じるかは、品種や、気象条件によって大きく左右されることとなる。イネの出穂のように関心が高い現象に対しては、中川ら(2011)のように、発育指標モデルを用いて、品種の違いや、気象条件の変動を考慮しながら十分な生育期間が確保できる最も遅い移植日の推定や、移植日操作による高温期出穂の回避が試みられている。しかしながら時間的隔離の効果を検証する時に、作物の開花期予測モデル等を併用した研究は行われていない。これらの要因が、先行研究において、時間的隔離の効果に関する報告の結果が一致していないと考えられる。

これらの問題を解決するために、開花期の類似度と交雑率との関係をよりよく記述する開花の類似度を示す新たな指標の開発し、作期の移動や作付け時期そのものが、開花時期に与える影響できる開花予測モデルを利用することで、時間的隔離の効果はより正確に評価できるようにする必要がある。そこで本研究では、世界で最も広く栽培されている組換え作物であるダイズと、我が国に広く分布するその近縁野生種であるツルマメを材料として、時間的隔離手法を用いた交雑リスク評価手法を確立することを目的とした。

第2章では、ツルマメとダイズの交雑実験において、開花の類似度を正確に評価するため、それぞれの種の開花数の推移を確率密度分布として扱い、2種間の

開花の類似度を2つの確率密度分布間の距離として取り扱う、新しい指標を提案する。

第3章では、ダイズとツルマメでは確認が難しい、開花類似度と交雑率の関係を評価するために、イネのウルチ・モチ系統の交雑によるキセニアを用いた実験結果について報告する。

第4章では、作付け時期を変えた時に開花の類似度を与える影響を評価するために、日本5地域のツルマメ系統の開花予測モデルを構築し、広域での開花予測の可能性を評価する。

第5章では、正確な開花の類似度指標と、気象情報を用いた開花予測モデルによる、時間的隔離手法の実現について考察する。

第2章 開花の類似度を評価するための新しい指標の開発

時間的隔離の効果が一致しない原因になっていると考えられる、開花の類似度を正確に評価できない問題を改善するために、開花類似度を示す新たな指標を導入することを試みた。

中山・山口(2002)では開花の重複日数が、Simard and Legere (2004)や Roumet et al. (2013)では、種子親の開花期間中の花粉親の開花が重複していた日数の割合が用いられていたほか、Messeguer et al. (2006)や Della Porta(2008)では開花の開始日の差、Bannert et al. (2008)ではトウモロコシの開花の最盛日の差が利用されていた。これらの指標は全て開花の類似度をある程度代表してはいるものの、完全だとは言えない。例えば、開花の重複日数が同じでも、開花の最盛期に開花が重複している場合と、開花の終期と開花の開始期が重複している場合では、花粉の供給源の開花量が全く異なるし(図2-1の左)、種子親の開花期間中の開花の重複していた日数の割合では、種子親の開花期間が非常に短く、花粉親の開花終期と完全に重複していた場合と、完全に同じ開花の推移をしていた場合で、指標はともに最大値である1を取るが、両者の交雑率は大きく異なるであろう(図2-1の中)。また開花開始日や開花最盛日の差では、開花期間自体の差による交雑可能性への影響が考慮できない(図2-1の右)。

これらの問題がある指標を利用していることが、同様の実験を行っているにもかかわらず、時間的隔離の効果が報告間で一致しない原因となると、時間的隔離が交雑率に与える影響を正確に評価しうる指標が必要である。

そこで、開花期間、開花期間中の開花量の推移の仕方を確実に評価できるようにするため、Ohigashi et al. (2014)では、開花の推移を確率密度分布として表現することで、開花の類似度を複数の確率密度分布間の距離として定義する指標を導入し、交雑率との関係を調べた。

2-1で、ダイズとツルマメの交雑試験の設計とその材料、新たに提案する類似度指標の導出、観測した開花の推移の近似について述べる。2-2では、交雑試験の結果、近似されたパラメータ、新たな開花類似度指数と交雑率の関係についての結果について述べ、2-3でそれについて考察する。

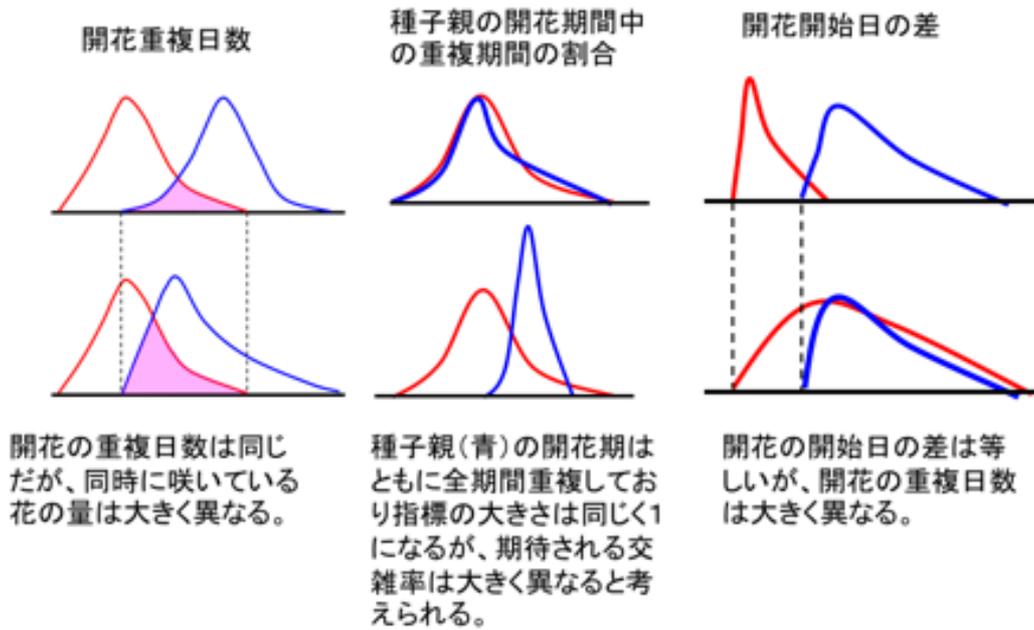


図 2 - 1 .従来利用されてきた指標の問題点についての概念図

2-1. 材料と方法

2-1-1. 交雑試験の設計

ツルマメとダイズの交雑率と、開花の類似度の関係を知るために、ラウンドアップ耐性の遺伝子組換えダイズとツルマメを同所的に栽培する実験を行った。

交雑試験は、2006年と2007年に、旧農業環境技術研究所（つくば市・現農業環境変動研究センター）内の隔離実験圃場(0.88ha)において行った。ダイズ品種として、2006年は AG3602RR(アメリカ合衆国の登熟クラス III)、AG3906RR(アメリカ合衆国の登熟クラス III)、AG4806RR(アメリカ合衆国の登熟クラス IV)、AG5905RR(アメリカ合衆国の登熟クラス V)の4品種を6月22日に、2007年は AG5905RR と、AG6702RR(アメリカ合衆国の登熟クラス VI)を6月22日、7月22日にそれぞれ播種した。ツルマメは、旧農業環境研究所内に自生していたツルマメを系統化した種子を、2006、2007年ともに5月22日播種した。その際、幅2m高さ1メートルの壁状構造物を、2.5m間隔で28枚設置し、ツルマメはその壁状構造物に這わせる形で栽培し、その壁状構造物の間に、2006年は各品種を1列10株ずつ4列のランダムブロックとして配置し、2007年は品種・播種日の組み合わせを1水準として合計4水準を、同様にランダムブロック配置した(図2-2)。そして開花期間にわたって、1-3日ごとにダイズ、ツルマメの各水準の開放花の数をカウントした。

完熟したツルマメの種子を、各年10月25日から29日の間にかけて、壁状構造物ごとに採集し、2007年、2008年の1月から5月の間に、温室内に設置した、ピートモスで満たしたバットに播種し、播種後2週間程度が経過したのち、発芽した実生数を計測し、2葉期から3葉期の各実生にグリフォサート(1.66kg/ha a.i.)を噴霧し、その後枯死せず生存した個体を交雑個体の候補とした。さらにその葉から採取した切片をイムノケミカルクロマトグラフィ試験(RUR ラテラルフローテストキット・ストラテジックディアグノティクス社)に供試し、グリフォサート抵抗性たんぱく質の存在を確認した(Ohigashi et al. 2014)。交雑個体と判定された個体は、20種のSSRマーカー(Kuroda et al.2006)を用いて、親系統を同定した。

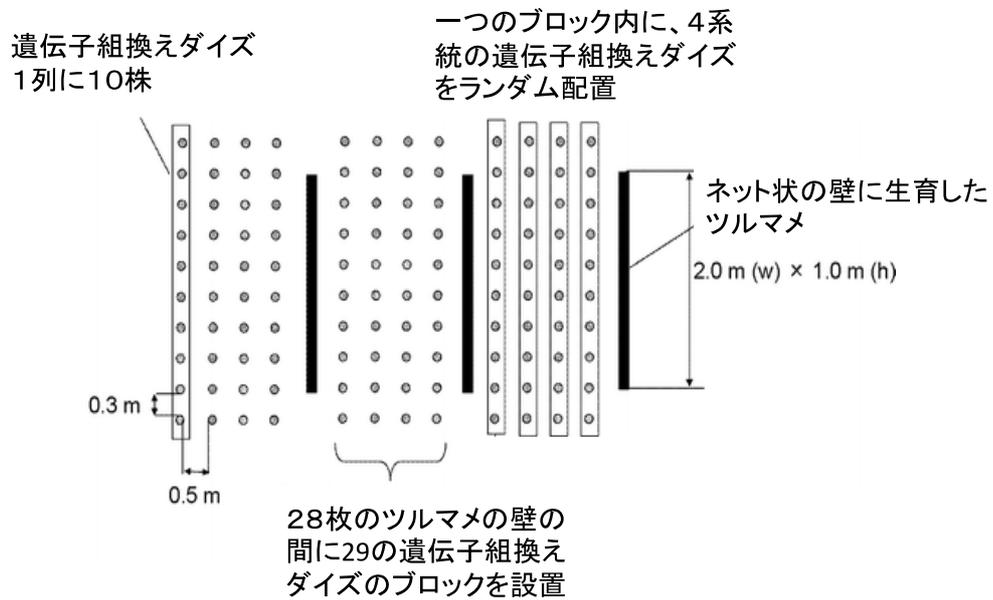


図 2 - 2 .遺伝子組換えダイズとツルマメの交雑試験の配置図



写真 1 .遺伝子組換えダイズとツルマメの交雑試験の様子

2-1-2. 新しい開花類似度指数の導入

ある時間 t にツルマメの花が受粉可能な花粉が、ダイズ由来かツルマメ由来かいずれかであるかは、その時に咲いているダイズの花数とツルマメの花数の比に影響されると考えられる。そこで、ダイズとツルマメの開花の推移を、確率密度分布に従う事象だととらえ、それぞれの開花の確率密度分布を $p(t)$ のような形で表すと、ある時 t に生まれる交雑個体の数は、以下の式で計算される。

$$\frac{N_c \cdot p_c(t)}{N_c \cdot p_c(t) + N_w \cdot p_w(t)} \cdot r \cdot N_w \cdot p_w(t) \quad (2-1)$$

ここで、 N は総開花数、 r は開花の類似度以外の要因の効果を示し、 c 、 w はそれぞれダイズとツルマメを表す添字である。この時、開花期間全体にわたって、生産される交雑個体の数の期待値は、

$$\begin{aligned} E(D_c, D_w) &= r \cdot N_w \int \frac{p_c(t) \cdot p_w(t)}{p_c(t) + (N_w/N_c) \cdot p_w(t)} dt \\ &= r \cdot N_w \int \frac{p_c(t) \cdot p_w(t)}{p_c(t) + \alpha \cdot p_w(t)} dt \end{aligned} \quad (2-2)$$

の形で記述できる。 α は総花数比、 D はダイズとツルマメの確率密度分布名を表す。この時、 r はそれぞれの種の平均的な花粉量の比、ポリネーターの影響や2種の物理的距離など様々なその他の影響を受けているが、仮に、開花の類似度以外の要因が一定だったとした場合、 r は定数とみなすことができ、この期待値を $r \cdot N_w$ で除することで、

$$S(D_c, D_w) = \int \frac{p_c(t) \cdot p_w(t)}{p_c(t) + \alpha \cdot p_w(t)} dt \quad (2-3)$$

が導出される。この S は α の値に関わらず $0 < S < 1$ を満たす。この S を開花類似度指数として定義した。この開花類似度指数は、交雑率が2種それぞれの花粉の量、花の量の比に比例するという自然な仮定から導出しているため、交雑率との相関が高くなることが期待出来る。

2-1-3. パラメトリックな確率密度分布による開花の推移の近似

交雑率との関係を検討するだけであれば、ノンパラメトリックな平滑化を用いたほうが、相関は高くなると考えられるが、開花分布の予測の問題への発展性を考え、パラメトリックな確率密度分布で近似する方法を採用した。観測さ

れた開花の推移は、概ね単峰性の、右裾が長い、開花のピークを迎えた後もしばらく開花が続いている形であった。今回の得られた開花の推移の特徴から、ガンマ分布を利用することとしたが、原理的にはどのような確率密度分布を用いても(2-3)式を計算することは可能である。

ガンマ分布は時間 t に対して、形状パラメータ $\alpha > 0$ とスケールパラメータ $\beta > 0$ の2つのパラメータを持ち、以下のような一般式で記述される。

$$\text{GammaDistribution}(t, \alpha, \beta) = t^{\alpha-1} \frac{\exp(-\frac{t}{\beta})}{\Gamma(\alpha) \cdot \beta^\alpha} = p(t, \alpha, \beta) \quad (2-4)$$

$\Gamma(\alpha)$ はガンマ関数を表す。本実験では、開花の観察は1-3日間隔で行っているため、総開花数 N も合わせて推定することとし、開花のパターンを近似するため、以下の式(5)

$$\sum_{t=1}^m (p(t, \alpha, \beta) - n(t)/N)^2 \quad (2-5)$$

を最小化する、 α 、 β 、 N を Mathematica ver.4.1 を用いて推定した。ここで $n(t)$ はある日 t に観測された花の数を表している。計算を簡略化するために、2006年と2007年の各年の最初に開花が確認された日の前日を $t=0$ とした。

2-2. 結果

2-2-1. 交雑試験の結果

2006年、2007年の遺伝子組換えダイズ、ツルマメの開花をガンマ分布で近似した時の推定されたパラメータセットを表2-1に、観測された開花数の推移と近似された確率密度分布を図2-3に示す。

表 2 - 1. 推定されたパラメータと開花の実測数との決定係数

2006	α	B	R2	N
Wild soybean	164.20	0.333	0.869	7378.6
AG3602RR	10.40	2.060	0.646	122.7
AG3906RR	7.35	2.930	0.645	133.1
AG4806RR	4.89	4.293	0.761	170.2
AG5905RR	120.20	0.260	0.978	426.4

2007	α	B	R2	N
Wild soybean	69.15	0.434	0.861	8488.9
AG5905RR-June	12.35	0.552	0.979	390.0
AG5905RR-July	145.03	0.153	0.992	292.0
AG6702RR-June	6.34	2.141	0.840	421.1
AG6702RR-July	116.13	0.197	0.939	267.4

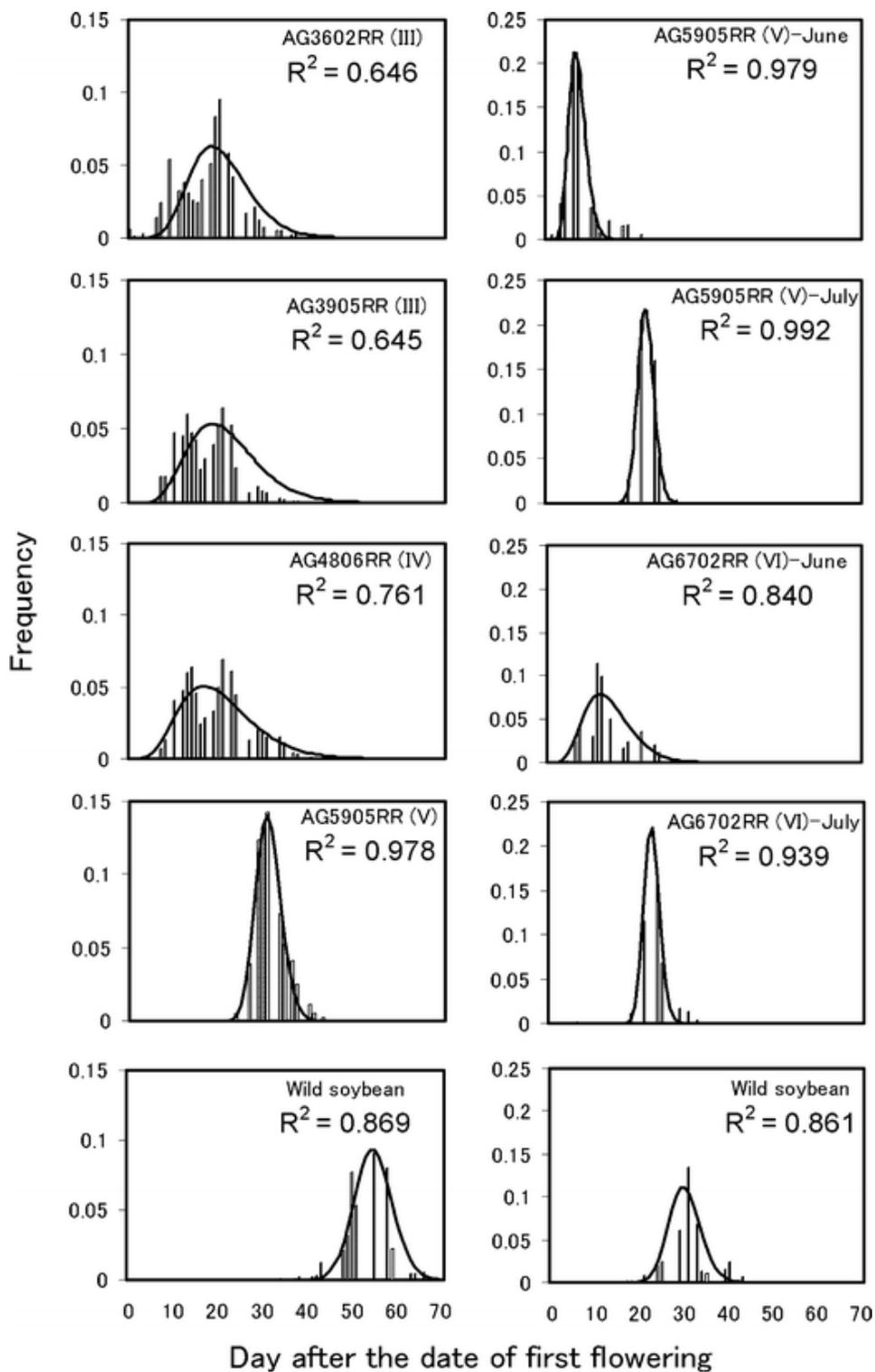


図 2 - 3. 近似された確率密度分布と開花の実測数。線グラフが推定された確率密度分布を棒グラフが開花の実測数を示している。

2006年は44, 348粒の種子、2007年は25, 741粒の種子をそれぞれ交雑個体の試験に供試した結果、2006年の種子からは交雑個体は得られず、2007年の種子中、35粒が交雑個体と同定された。2007年に得られた交雑個体と判定された個体のうち、10粒がAG5905RRの後代と推定され、25粒がAG6702RRの後代と推定された。この試験では、2006年は同時期に4品種、2007年には2品種のダイズを栽培しているため、(2-3)式を以下のように改変した。

$$E(D_c, D_w) = r \cdot N_w \cdot \int \frac{\sum_i N_{ci} \cdot p_{ci}(t) \cdot p_w(t)}{\sum_i N_{ci} \cdot p_{ci}(t) + N_w \cdot p_w(t)} dt \quad (2-6)$$

$$S(D_c, D_w) = \int \frac{p_{c-mean}(t) \cdot p_w(t)}{p_{c-mean}(t) + \alpha \cdot p_w(t)} dt \quad (2-7)$$

$$p_{c-mean}(t) = \frac{\sum_i N_{ci} \cdot p_{ci}(t)}{\sum_i N_{ci}}, \quad \alpha = \frac{N_w}{\sum_i N_{ci}}$$

であり、iは各品種を示している。(2-7)式はツルマメにとっての、ダイズ品種全体との開花類似度を示しているが、各品種の開花類似度は以下の(2-8)式で計算される。

$$S(D_{ci}, D_w) = \frac{N_{ci}}{\sum_i N_{ci}} \cdot \int \frac{p_{ci}(t) \cdot p_w(t)}{p_{c-mean}(t) + \alpha \cdot p_w(t)} dt \quad (2-8)$$

2007年の試験ではダイズの播種日を2回に分け、1月ずらしているが、SSRマーカーによる判定では、どちらの播種時期の個体由来の交雑なのかを知ることはできない。そこで、2時期の開花を合わせた推移を示す確率密度分布を以下の(2-9)式で導出し、(2-7)式に利用した。

$$p_{ci}(t) = \frac{N_{cJune} \cdot p_{cJune}(t) + N_{cJuly} \cdot p_{cJuly}(t)}{N_{cJune} + N_{cJuly}} \quad (2-9)$$

2007年の実験の推定された開花の推移を示す確率密度分布を図2-4に、推定された開花類似度と開花重複日数、得られた交雑個体の数、播種した種子のうちの交雑個体の割合を表2-2に示す。

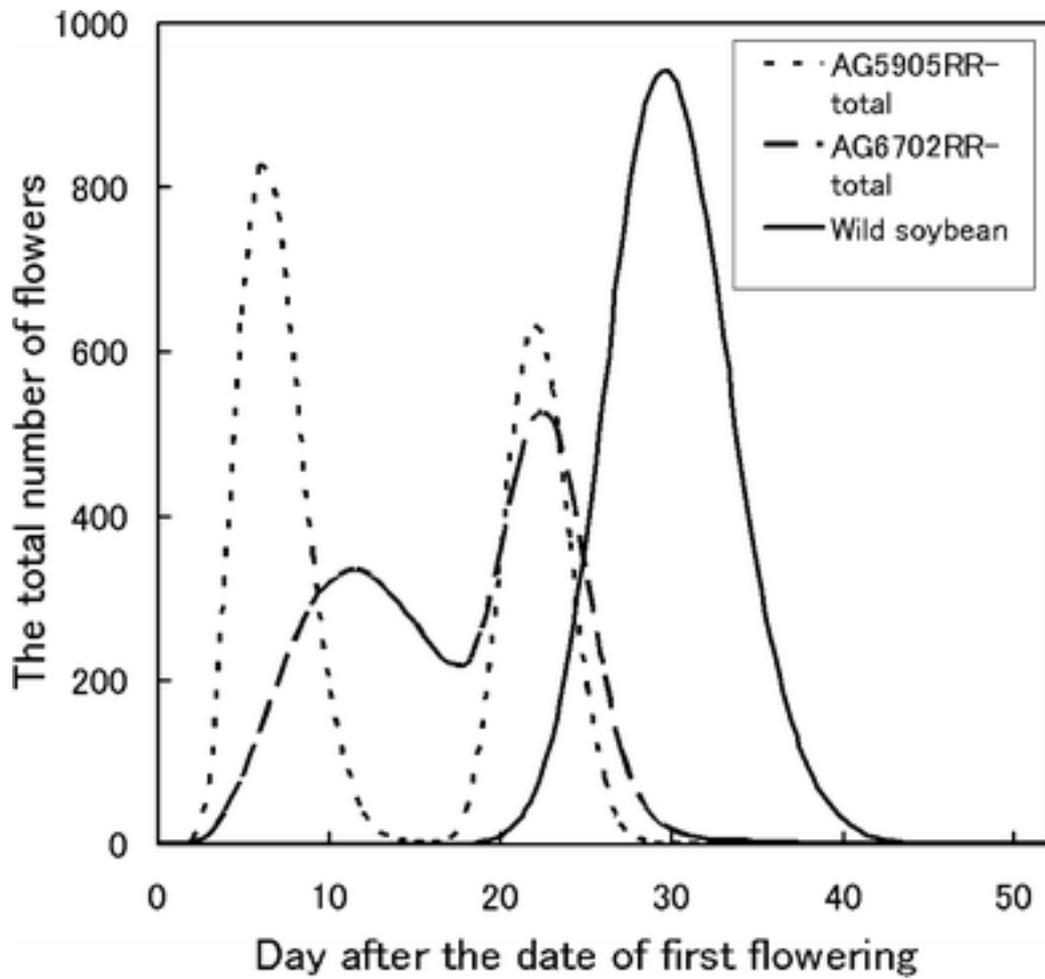


図2-4. 推定された遺伝子組換えダイズとツルマメの総開花数の推移
 ダイズはツルマメの壁1つに対し、10株配置されているため、推定されたN
 を10倍している

表 2-2. 開花類似度・開花重複日数と交雑個体数

2006	S(Dc,Dw)	開花重複日 数	交雑種子数	交雑率
AG3602RR	0.0002	16	0	0
AG3906RR	0.0007	10	0	0
AG4806RR	0.0023	16	0	0
AG5905RR	0.0003	16	0	0

2007	S(Dc,Dw)	開花重複日 数	交雑種子数	交雑率
AG5905RR-total	0.0423	21	10	0.039
June	<0.0001	12	-	-
July	0.0423	16	-	-
AG6702RR-total	0.0835	25	25	0.097
June	0.0135	24	-	-
July	0.0659	25	-	-

2006年は類似度が0.0002-0.0023、開花重複日数が10—16日、交雑種子は得られなかった。2007年は、類似度が0.0423、0.0835、開花重複日数は21日、25日、交雑種子は10、25個ずつ得られた。

2-2-3. 考察

開花を確率密度分布として、ガンマ分布を利用したが、近似された分布は、全ての例において、 $R^2 > 0.6$ と、実際の観測データによく合致していると言ってよい。しかしながら、2006年のAG3602RR、AG3906RR、AG4806RRでは、観測された開花数の推移は必ずしも単峰形とはなっておらず、この場合は、決定係数はその他の時よりも低い傾向になった。これらの3系統の開花は同時的に減少しており、2006年7月29日から8月2日の期間は降雨や低温が見られたことが原因と考えられる。

しかしながら、単峰形でないからといって、ノンパラメトリックな平滑化を施した場合、近似の精度自体が改善されてもパラメータが増えるため、開花期全体の予測への発展性を考慮するとパラメトリックな分布を用いた近似が望ましいといえるだろう。

交雑個体の検定結果をみると、開花重複日数が交雑のポテンシャルリスクを正確に代表していないことは明らかである。例えば、2006年の4品種のうち、3品種は16日間ツルマメと開花期が重複していたが、これは2007年の7月に播種したAG5905RRと同じである。しかし、AG5905RRの開花は、2006年の場合よりもより短期に集中して開花しており、開花のピークに近い時期に開花期が重複していたことが、図3からも読み取れる。開花重複日数と本研究で定義した開花類似度の、交雑率との決定係数はそれぞれ0.763、0.944であった(Ohigashi et al. 2014)。本研究で定義した開花類似度は、距離などの他の条件が一定であれば、同時に咲いていた開花数の比に交雑率が比例するという、極めて自然な仮定から出発して導出されており、交雑率とより相関が高い指標となったと考えられる。

Devaux et al. (2008)らが指摘するように、虫媒植物の場合、観測される交雑率に影響する要因は、風媒植物に比べて多いと考えられるが、我々が行った自殖性の高いダイズとツルマメの交雑試験と同様の、開花数の推移を詳細に調べた試験を行うことで、その他の条件が一定だったとした時の、開花類似度と交雑率の関係を明らかにすることも可能となるだろう。Cresswell and Hoyle

(2006)によると、代表的な訪花昆虫であるミツバチにとっては、数 m 以内の花への訪花頻度にはあまり差がないと考えられており、非常に離れた距離への移動もそれなりに起こるとされている。虫媒植物、栽培種と野生種のような、特に交雑率を十分に抑制するための物理的距離の設定をするのが難しいケースにおいて、ダイズの品種を変えることで交雑率が大きく減った我々の試験の結果から、時間的隔離は有効な交雑リスクの低減手段となると考えられる。時間的隔離を、交雑リスクの低減手段として利用するためには、作物や野生種の開花期を、事前に予測することが必要となる。次章では、ツルマメの開花予測モデルの構築を目指す。

第3章 開花類似度と交雑率の関係性について

交雑リスク、引いては遺伝子流動リスクを低減する措置の有効性を議論する上では、正確な指標を用いて、その指標がどの程度の値をとれば、許容できるリスクとなるのかを検討できなければならない。物理的距離の場合で言えば、他の諸条件が同じであれば、距離に対して指数関数的に減少することが花粉の拡散モデルから確認されており、2章で述べたように、実際にイネやトウモロコシなどでパラメータを推定する研究は数多くされており、実際の栽培実験指針の制定などに役立てられている。一方時間的隔離に関しては、そのような研究は行われていない。時間的隔離の有効性を評価するためには、2章で提案した開花類似度指標と、交雑率の間にどのような関係性が存在するのかを検証する必要がある。

2章ではツルマメとダイズの交雑をモデルにしてきたが、ツルマメは非常に他殖率が低く(Fujita et al. 1997)、交雑率として考えた時に、1つの交雑個体による影響が非常に大きい。また、ツルマメとダイズによる交雑個体を簡便に検出することも難しく、十分な量のデータを揃えることが困難で、交雑率と何らかの指標との関係性を検討する上では不向きであると考えられる。そこで、補助的な実験として、交雑個体の検出が容易な、イネのモチ・ウルチ系統の交雑によるキセニアを利用した交雑実験を行い、イネの出穂期の類似度との関係を調べる試験を行った。3章1節で実験の材料と方法について、3章2節でその結果、3章3節でそれらについての考察を加える。

3-1. 交雑実験の材料と方法

実験に供した品種は、ウルチ系統があきたこまちと農林8号、モチ系統が東京藤蔵糯、モチミノリの計4品種で、あきたこまちと東京藤蔵糯は、早稲系統であり、農林8号とモチミノリは晩生系統である。実験は、2014年、2015年に、茨城県つくば市の農業環境変動研究センター内の精密水田において行った。2014年、2015年ともに4月24日、6月10日に移植を行った。以降4月の移植を早期移植、6月の移植を晩期移植とする。

早期移植、晩期移植と早稲系統、晩生系統の2要因を考慮し、早期早稲区、

早期晩生区、晩期早稲区、晩期晩生区の4つの水準を設定し、2枚の精密水田内を2つのブロックにわけ、ブロック内でランダムに各水準を配置した。各年の実験配置は図3-1の通りである。各水準は、条間30cm4畝として、一方からウルチ、モチ、ウルチ、モチの並びで条を配置し、各条について株間15cmで移植し、出穂期に1-2日間隔で出穂数を調査し、モチ品種を種子親とした交雑率を、キセニアを用いて判定した。

出穂調査に際し、圃場内に立ち入ることから、花粉を調査者が媒介してしまう可能性を除外するために、各精密水田内で分けられた2ブロックのうちランダムに選択した片側を出穂調査区とし、もう一方のブロックには侵入せず、登熟後の交雑検証区とした。

出穂調査は、それぞれの水準について、各品種、出穂調査区内の2つの畝からランダムに選択した10株ずつ、各品種20株の出穂数の合計を算出し、その推移を、その精密水田におけるその品種の出穂パターンと定義した。

イネの出穂パターンは、出穂の最盛期からみてほぼ左右対称であったことから、出穂パターンの近似は正規分布を利用することとした。正規分布の確率密度関数は、時間 t に関する関数として以下の式で記述される。

$$NormalDistribution(t, \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(t - \mu)^2}{2\sigma^2}\right)$$

各年、各精密水田の平均 μ と分散 σ^2 を推定した。推定された出穂パターンを近似した確率密度分布を用いて、2章で提案した指標を用いて出穂の類似度を算出した。早稲品種と晩生品種は概ね1月の出穂期のズレがあるため、ほとんど出穂の重複はなかったが、晩期早稲区と早期晩生区には、若干の出穂期の重複があったため、2章の(2-9)式で述べた例と同様に、ウルチ系統、モチ系統を1つに合算した確率密度分布を花粉親の出穂パターンとした。またその際、花数比を示す $\alpha = 1$ として固定することとした。

2014年、2015年ともに、9月中旬頃に刈り取りを行い、乾燥させたのち、交雑検証区から各水準10株ずつランダムに採取し、キセニアを用いて交雑個体数を計測した。

3-2. 結果

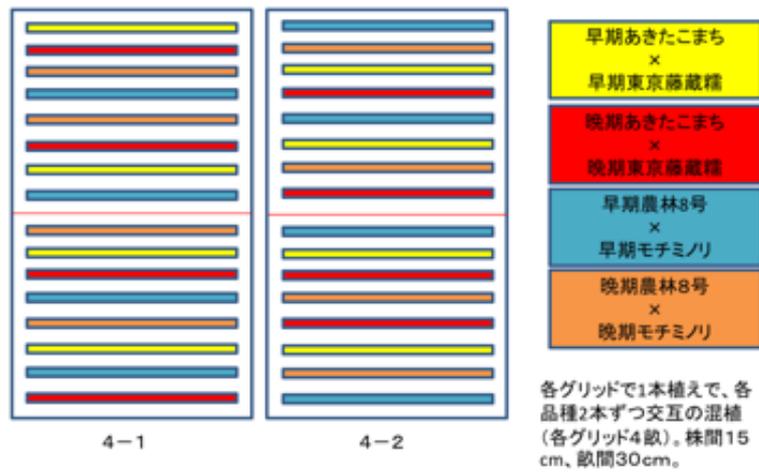
表3-1に、各水準の出穂の重複日数、出穂の重複度、平均穂数、平均総粒数、平均交雑個体数、平均交雑率を、図3-2に、出穂の重複日数と交雑率の関係、出穂の類似度と交雑率の関係を示す。早期早稲区において、交雑率が8.

3%と、イネで通常観察される交雑率よりも著しく高い株が検出されたため、それについては、外れ値として除外した。晩期移植の場合においては、総じて出穂期間が短く、出穂の重複日数、株あたりの平均穂数などが短くなったが、出穂の重複日数は3—15日、出穂の類似度は0.112-0.468と水準間で大きくばらつく結果となった。

表 3-1. 各水準の出穂類似度、株ごとの穂数、総粒数の平均と標準偏差

水準	年	圃場番号	出穂類似度	出穂重複日数	穂数	穂数のSD	総粒数	総粒数のSD	交雑個体数	交雑個体数のSD	平均交雑率
早期早稲	2014	1	0.244	15	13.5	2.0	996.9	228.1	0	0	0
		2	0.278	15	15.1	2.1	807.2	185.1	0	0	0
早期早稲	2015	1	0.249	14	14.0	3.1	764.2	192.2	7.5	23.0	0.98
		2	0.242	13	14.7	3.3	869.9	258.5	0.3	0.7	0.03
晩期早稲	2014	1	0.443	13	8.9	1.7	528.5	170.4	1.0	1.1	0.19
		2	0.351	14	9.3	1.5	519.6	108.6	0.7	1.3	0.13
晩期早稲	2015	1	0.323	10	7.2	1.5	496.8	104.4	1.5	2.0	0.30
		2	0.377	11	7.1	1.3	417.1	105.8	1.4	1.9	0.34
早期晩生	2014	1	0.413	11	11.4	2.0	806.5	184.9	4.2	3.3	0.52
		2	0.469	11	14.2	2.3	800.0	200.2	3.2	3.5	0.40
早期晩生	2015	1	0.399	13	11.5	2.0	851.3	144.0	3.2	3.4	0.38
		2	0.468	13	14.6	2.1	944.2	136.2	7.2	9.4	0.76
晩期晩生	2014	1	0.220	7	10.8	1.3	586.2	88.9	0.6	0.5	0.10
		2	0.179	7	9.8	2.4	477.1	146.2	0.4	0.7	0.08
晩期晩生	2015	1	0.112	4	5.9	2.1	442.5	171.2	0	0	0
		2	0.146	3	6.3	1.6	458.2	102.1	0.3	0.5	0.00

2014年の交雑試験配置図



2015年の交雑試験配置図

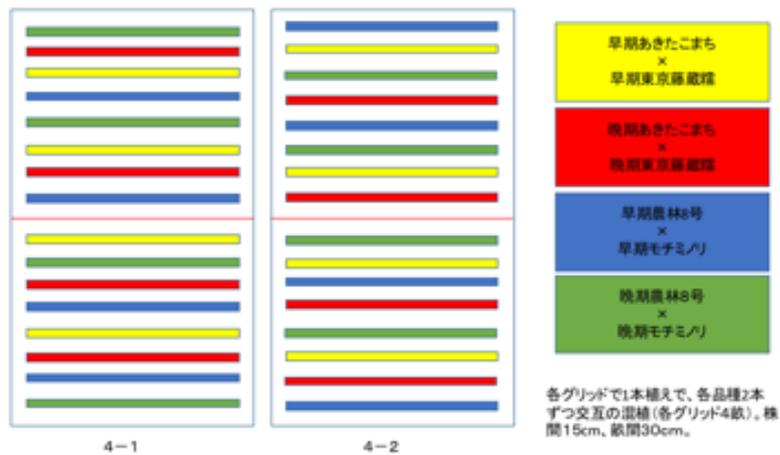


図3-1. 交雑試験の圃場実験配置図

4-1、4-2はそれぞれ 圃場番号を示す

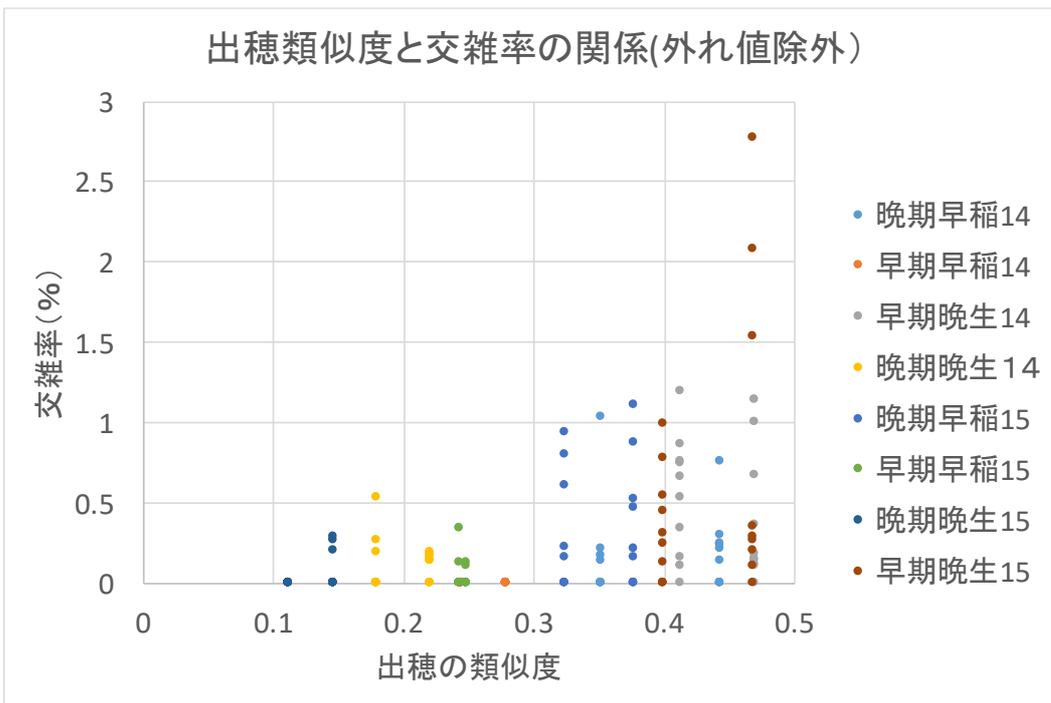
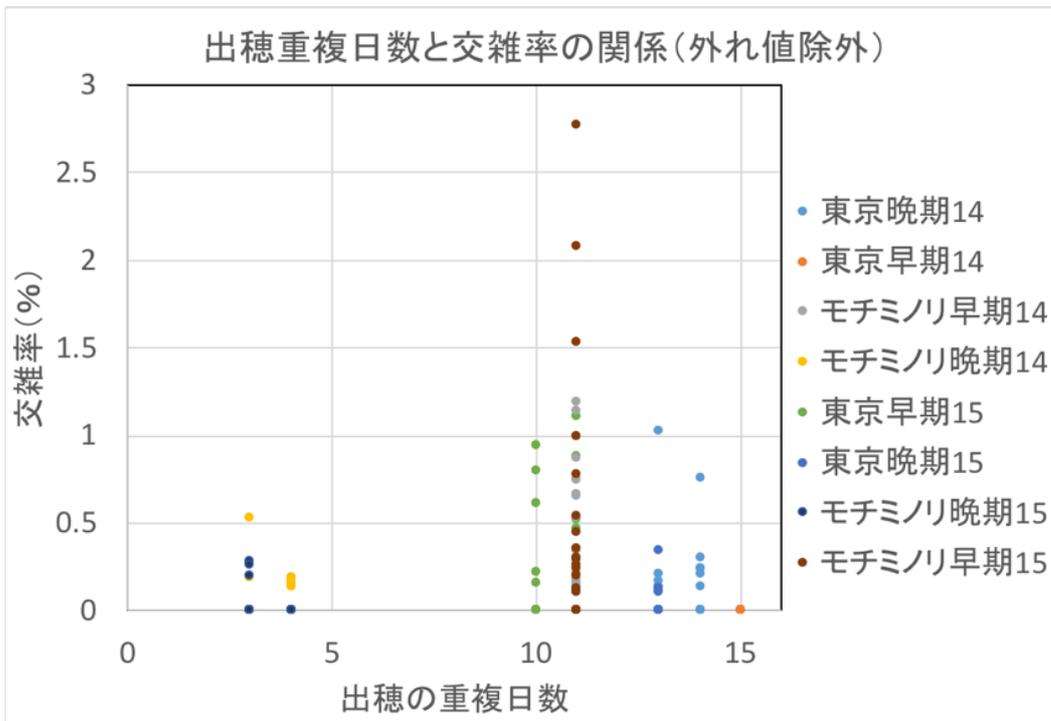


図3-3. 出穂の類似度と交雑率の関係

3-3. 考察

この実験では、出穂の類似度が0.1から0.45程度の間うまくばらつ

かせることができたため、その関係性についてははっきりとした傾向が見えた。つまり出穂の類似度が増すにつれ、平均的な交雑率は線形に増え、その分散も出穂の類似度に比例して上昇しているという関係性である。一般に、著しく高い交雑が見られた場合には、雄性不稔などによる稔実率の低下などの原因が考えられるが、当該株は穂数15、総粒数892と同じ水準内の他の株と比べてもやや多い程度であり、極端な稔実率の低下は見られなかった。この株の交雑率の上昇の原因は特定できなかつた。しかしながら、この例を除けば、本研究で提示した類似度指標はうまく機能していた。一方で、開花の重複日数と交雑率の関係については明確な関係性を見出すことはできなかつた。開花の類似度の増大とともに、分散も増大しているため、相関係数で単純には比較することはできないが、出穂重複日数と交雑率の決定係数は、0.0005であり、ほぼ無相関、出穂の類似度と交雑率の決定係数は0.181となった。出穂（開花）の重複日数は、出穂期間の長さ、単位時間あたりの出穂数の差を反映していないため、交雑率との間に明確な差が出なかつたものと考えられる。この結果は、開花の重複は交雑の必要条件であり、開花の重複が起こった際に、その他の要因によって交雑率が大きく変動する、という自然な考察と合致する結果であり、開花が重複していなければ、交雑が起こることはなく、Ellstrand(2003)が議論したように、開花の重複を回避することで、極めて高い確率で、交雑を抑制可能であることを示唆している。

第4章 日本各地のツルマメの開花予測モデルの構築

交雑リスクを低減するための手段として、時間的隔離を有効に用いるためには、作物と野生種の場合であれば、作物の開花期をコントロールすることが考えられる。作付け日によってダイズの開花がどう変動するのかは、ダイズのバイオマス、収量に直結するため、これまでも多くの研究がなされている。非線形差分方程式を用いた、乾燥と光周性を考慮した Wilkerson et al. (1983)や統計的モデルと日射量を用いたモデルの優位性を議論した Piper et al. (1996)のように、様々な開花予測モデルが提案されており、その精度に関する研究もおこなわれている。日本においては、温度と日長を基にした発育指標モデル (Development Index Model=DVI Model)を用いて、鮫島(2000)は、複数の主要なダイズ品種の開花予測モデルが提案している。

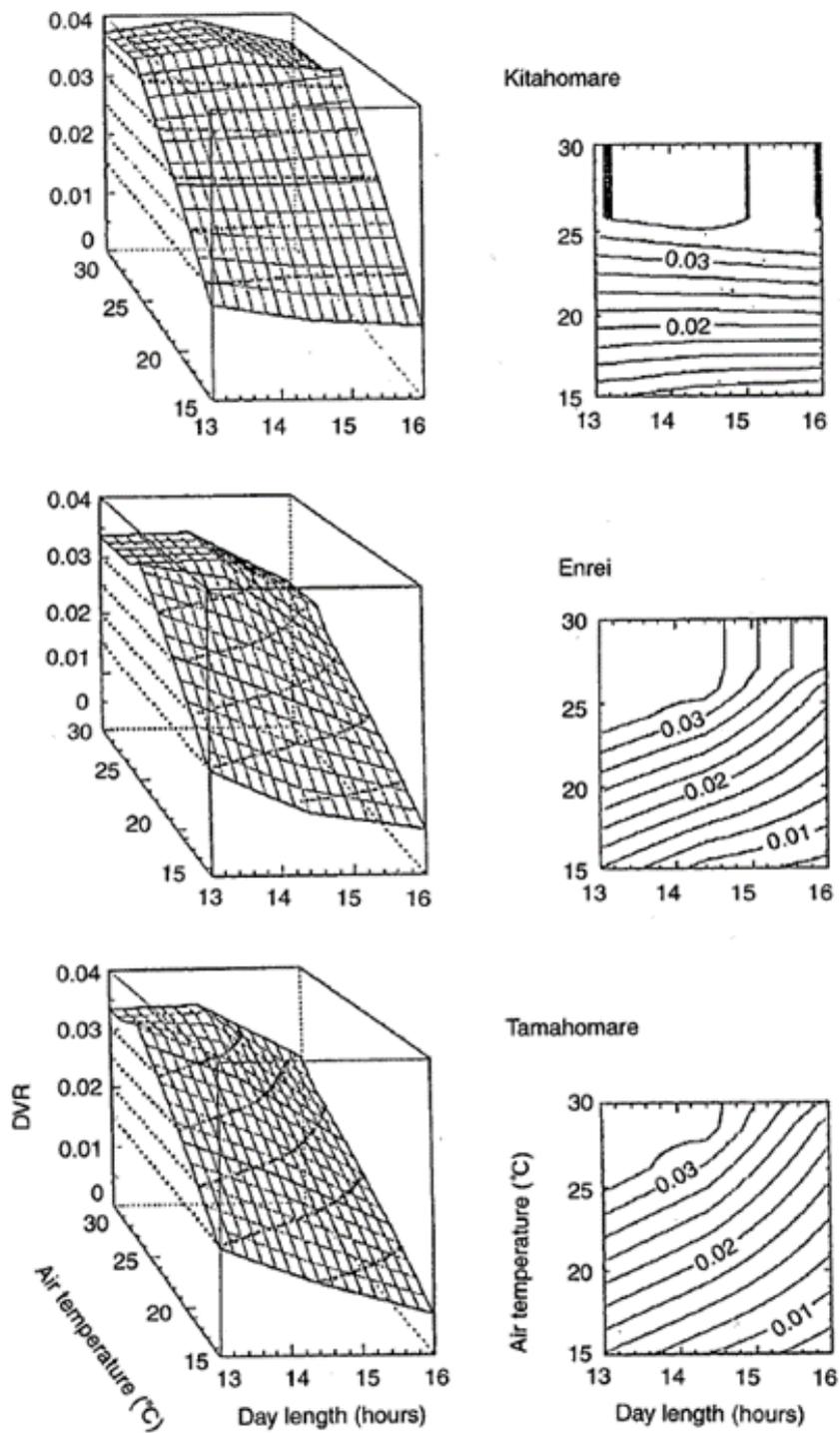


図 4-1. キタホマレ、エンレイ、タマホマレの DVI モデル (Samejima 2000)

ダイズに関しては、これらのモデルを利用することにより過去の気象情報から、開花期がどの程度変動するかについての推定を行うことができるであろう。しかしながらツルマメの開花フェノロジーに関する研究はほとんどなく、Zhang et al. (2008)や Wen et al. (2009)が中国各地域のツルマメ系統を同所的に栽培し、開花期の違いを報告した研究がいくつかある程度である。ダイズとツルマメはともに短日植物であり、開花には、主に温度と日長が影響している。Wen et al. (2009)が報告しているように、ツルマメの温度と日長への反応性には緯度によって勾配があると考えられる。つまりダイズの品種や播種日を変えた時に、十分な隔離効果が得られる条件は地域によって異なると考えられる。そこで Ohigashi et al.(2019)では、ダイズの場合と同様に、日本列島の5地域 of ツルマメの開花期を予測するモデルの構築を目的として、開花観察を行った。

4章1節では、開花観察実験の材料と方法について述べる。材料としたツルマメの種子は北海道、秋田、茨城、佐賀、宮崎県の各地で単一集団から採取したものを利用した。実験の水準については、鮫島(2000)の条件を拡大する形で採用した。4章2節では開花予測モデルの構築、精度評価、補正の手法の説明、並びに気象情報を基にしたシミュレーションについて述べる。4章3節では、構築されたモデルパラメータならびに、精度、シミュレーション結果について述べ、4章4節で、それらについて考察を加える。

4-1. 開花の観察実験の材料と方法

実験に利用したツルマメの種子は、北海道、秋田、茨城、佐賀、宮崎県の5地域の単一集団から採取され、系統化されたものを利用した。このうち、北海道を除く、4系統の種子に関しては、現在農研機構が所管する、NIAS ジーンバンクに登録されている。北海道の系統は宮崎大学の National BioResource Project のジーンバンクから提供を受けた。種子の採取地の地理的情報に関しては表4-1に記載された通りである。

表 4 - 1. 開花の観察実験に供試したツルマメ種子の採取地

Accession	Genebank JP No.	Longitude (° E)	Latitude (° N)
Hokkaido (Mukawa)	B01114*	141.93	42.57
Akita (Ohgata)	250618	139.95	39.98
Ibaraki (Tsukuba)	250619	140.12	36.02
Saga (Saga)	250620	130.32	33.25
Miyazaki (Kushima)	250621	131.23	31.43

開花の観察実験は、茨城県つくば市の農研機構中央農研センター内の日長調節温室にて、2008年から2011年にかけて行った(写真2)。日長、温度の条件はダイズの開花期予測モデルに関する鮫島(2000)を参考にし、温度条件をより細分化し、日長条件もより広範にした形で、日長10時間から16時間、温度15度から25度一定の設定とした。日長調節温室では、相対光量子密度 $177 \mu\text{mol}/\text{m} \cdot \text{s}$ 以上を保つため、夜間には補光処理を行い、相対湿度70%とした。表3-2に、開花観察実験の条件の組み合わせを示した。発芽刺激のために、種皮にヤスリがけを行ってから、0.24gの窒素、リン酸、カリウムを含んだ培養土で満たされたワグネルポッド (0.01m^2) 1つあたりに3粒ずつ播種し、各水準5反復、合計25のワグネルポッドを、ラテン方格で温室内に配置した。出芽後、3葉期程度の時に間引きを行ったほか、開花に至るまでに枯死したポッドは、実験から除外した。初葉が展開した日を出芽日、最初の解放花が観察された日を開花日と定義し、出芽、開花に至るまでの日数をポッドごとに記録した(表3-2)。120日間を過ぎても開花に至らない場合は、観察を終了した。



写真2.日長調整温室内で栽培中のツルマメ

表 4-2. ツルマメ 5 系統の開花観察実験の温度、日長条件、並びに観察された出芽、開花に至るまでの日数
 e は実験途中で除外されたサンプルの数、De は出芽に至るまでの平均日数並びに標準誤差、Df は出芽から開花に至るまでの平均日数並びに標準誤差、NF は観察期間に開花に至らなかったことを示している

Accessions		Hokkaido			Akita			Ibaraki			Saga			Miyazaki		
T (°C)	DL (h)	e	De	Df	e	De	Df	e	De	Df	e	De	Df	e	De	Df
15	12	2	15.4±0.68	70.0±3.61	2	14.2±0.60	69.3±2.43	14.2±0.20	74.0±0.40	1	14.8±0.75	71.2±2.45	1	14.8±0.75	93.5±2.00	
	13		14.0±0.36	68.8±2.19		14.4±0.24	70.4±0.98	14.2±0.20	80.6±1.70	1	15.5±0.96	88.0±0.60		14.0±0.63	NF	
	14	1	12.3±0.25	78.3±1.65		13.0±0.35	76.3±1.48	13.6±0.60	79.6±0.87		13.2±0.20	99.2±3.26		13.2±0.20	NF	
20	10		6.4±0.24	25.0±0.00		6.4±0.24	27.0±0.20	7.0±0.00	27.0±0.00		7.0±0.00	25.4±0.24		7.4±0.24	43.6±1.29	
	12		6.2±0.20	26.4±0.51		6.4±0.24	26.6±0.24	6.0±0.00	30.8±0.58		5.8±0.44	31.4±1.03		6.0±0.00	40.8±0.37	
23	10		6.4±0.24	18.6±0.24		7.0±0.00	18.8±0.20	6.2±0.20	20.4±0.51		5.4±0.24	20.6±0.24		6.2±0.24	22.4±1.12	
	12		5.0±0.00	23.2±0.73		5.0±0.00	19.8±0.37	5.0±0.00	23.8±0.49		5.0±0.00	24.8±0.20		5.0±0.00	32.0±0.00	
	14		5.8±0.20	26.2±0.20		5.6±0.24	27.0±1.22	5.0±0.20	45.0±1.14		5.0±0.00	47.0±1.14		5.6±0.24	74.3±0.33	
25	10		5.0±0.00	18.4±0.58		5.0±0.00	19.0±0.63	5.0±0.00	20.8±0.36		5.0±0.00	19.4±0.22	2	5.0±0.00	20.8±0.49	
	12		3.0±0.00	21.0±0.00		3.0±0.00	21.0±0.00	3.4±0.24	21.4±0.50		3.0±0.00	23.0±0.00		3.8±0.20	27.8±0.37	
	13		4.8±0.20	22.8±0.67		4.8±0.20	20.2±0.49	4.8±0.20	24.8±0.49		4.8±0.20	27.4±0.40		5.0±0.00	49.0±2.87	
	14		3.0±0.00	29.6±0.24		3.4±0.24	33.2±0.48	3.8±0.20	68.2±2.61		3.0±0.00	66.6±3.14		4.0±0.00	84.4±4.41	
	15		3.2±0.20	61.8±2.13		3.4±0.25	61.6±2.61	4.0±0.00	95.8±4.50		4.0±0.00	106.4±2.54		3.0±0.00	NF	
	16		5.0±0.00	NF		5.0±0.00	NF	5.0±0.00	NF		5.0±0.00	NF		5.0±0.00	NF	

4-2-1. 開花予測モデルの構築

開花などの植物のフェノロジーを予測する時に最もよく使われる手法は、有効積算温度を用いた予測であり、幅広く利用されている。しかしながら、堀江・中川(1990)が指摘するように、有効積算温度法の予測に対する有効性は、温度と日長の相関によるところが大きく、ダイズやツルマメのような日長反応性の強い種の開花予測に対しては、温度と日長の相関が崩れた条件ではうまく機能しない。そこで、開花に至る日数の逆数を発育速度と定義し、温度と日長を引数とした発育速度 (Development Rate=DVR、本文中では開花速度とする) に関する関数を定義し、そのパラメータを推定する発育指標モデル(de Wit et al. 1970)を利用する。トウモロコシでは、8時間を下回る極端な短日条件下や、平均30度を超えるような高温条件においては、開花速度が減少することが知られているが、日長が短いほど、平均温度が高いほど開花速度は早まるとされている(Warrington Kanemasu 1983 など)。ツルマメも同様の性質を持っているとして、開花速度が温度の低下と日長の延長に伴って単調減少し、限界日長以下では開花速度は0になると仮定し、以下のような関数を定義した。

$$DVR(DL, T) = \frac{1 - \exp(b(DL - DL_c))}{1 + \exp(a(T - T_h))} \cdot l \quad (DL \leq DL_c) \quad (4-1)$$

$$DVR(DL, T) = 0 \quad (DL > DL_c) \quad (4-2)$$

ここで、DLは日長、Tは温度、DL_cは限界日長、T_hは、開花速度が最大値の半分になる温度、lは線形パラメータを示しており、実験データからa、b、DL_c、T_h、lの5つのパラメータを、partial linear least square アルゴリズム (Golub and Pereyra 2003)を用いて推定した。その際120日間の観察期間中に開花に至らなかった場合の開花速度は0としている。統計処理はR ver.3.1.3によって行った。

4-2-2. モデルの評価

推定されたモデルは非線形モデルであるため、適合度を評価するための指標 quasi-R² を以下のように定義する。

$$\text{quasi-R}^2 = 1 - \frac{\sum (DVR_i - \overline{DVR})^2}{n \cdot \text{var}(DVR)} \quad (4-3)$$

\overline{DVR}_i はi番目の推定された開花速度を、 DVR_i はi番目の観測された開花速度を、 DVR は次元の開花速度のベクトルをそれぞれしめしている。右辺の分母部分は残差平方和(RSS)であり、このquasi-R²は一般的な決定係数R²と同様

に 0 から 1 の値を取る。Allen (1974) が指摘するように、 R^2 はデータセットそのものに対する適合度であり、予測の適合度には通常、残差平方和の代わりに、leave-one-out クロスバリデーションを用いた予測残差平方和 (PRESS) を用いることが望ましい。そこで、(4-3) 式にの RSS を PRESS で代替したものを、モデルの適合度とした。

非線形モデルは、線形モデルよりも複雑である以上、線形性が十分に仮定できる場合は線形モデルを用いるほうが望ましいであろう。そこで、(4-1) 式の部分を温度と日長を引数とした線形モデルを以下のように定義し、同様に推定し、その適合度と AIC を比較した。

$$DVR = \frac{(T - T_0) \cdot (DL - DL_c)}{\alpha} \quad (T \geq T_0 \text{ and } DL \leq DL_c) \quad (4-4)$$

4-2-3. 開花予測モデルの補正

鮫島 (2000) は温室内での栽培実験を基にした開花予測が、野外での栽培データの予測に対して、常に早くなることに着目し、温室内での日長と野外での日長に、実効日長の差があることを指摘しており、野外での栽培データを最もよく説明する実効日長の差を 1 時間としている。本研究においても同様に、実効日長の差が存在すると考えられるため、北海道、秋田、茨城、佐賀、宮崎県の各地域に、5 系統を栽培した時の開花データを用いて、実効日長の差を推定することとした。この相互移植実験は、北海道札幌市、秋田県秋田市、茨城県つくば市、佐賀県佐賀市、宮崎県宮崎市の野外圃場にて、種皮を削った 5 系統の種子を播種し、出芽日、開花日を記録したものである。各地域の気象データは、直近のアメダスデータを用いることとし、日長は国立天文台の日の出・日の入り時刻の差を利用した。

(4-1) 式に実効日長の差 Δ を以下のように導入し、

$$DVR(DL, T) = \frac{1 - \exp(b(DL - DL_c + \Delta))}{1 + \exp(a(T - T_h))} \cdot I(DL \leq DL_c) \quad (4-5)$$

各地域で実際に観測された開花日の時点で、開花指標 (累積の開花速度 = 1 で開花に至ると定義されている) を 1 とし、推定された開花指標との残差平方和を最小にする Δ を推定した。

4-3. 開花シミュレーション

ツルマメの出芽は一般に 4 月ごろとされているが、今回の実験では、種皮を

やすりがけしているために出芽が促進されている。そのため、出芽日が開花期に与える影響を評価するために、4月1日、5月1日、6月1日をそれぞれ出芽日とした場合の開花指標の推移を、1981年から2010年までの日平均気温の平年値を用いて予測し、開花予測日の差を調べた。

また今回実験に供した以外の地域での推定が可能かどうかを検証するため、推定されたモデルを用いて、日平均気温が15度、20度、25度、30度の場合の、日長が10時間、12.5時間、15時間での開花速度と採取地間での緯度勾配を調べた。

また開花期全体の予測可能性を検討するために、2005年から2015年の間に茨城県つくば市の農業環境変動研究センター内の圃場で行った、エンレイと茨城県のツルマメ系統の開花観察データをガンマ分布で近似し、その5%、25%、50%、75%、95%パーセンタイル点でのDVRの積算値DVIを算出し、そのバラツキを評価した。エンレイのDVRモデルは鮫島(2000)による折れ線型立体モデルを利用し、ツルマメのDVRモデルは本章の(3-5)式により算出した。

4-4. 結果

表4-2に、日長調節温室での開花観察実験の結果を示した。5系統全てにおいて、出芽に至るまでの日数は15度から20度条件への変化で急激に短縮され、その後の温度変化への反応は鈍くなっていた。120日間という観察期間は、夏至から一般的なツルマメの開花終了期である、9月までの期間を考え、設定したものであるが、全ての系統で15時間日長ではこの期間に開花に至ることはなかった。宮崎の系統は、さらに14時間日長でも開花に至ることはなかった。もっとも開花まで日数を要した個体は、佐賀の系統の110日間であった。表4-2の結果に基づいて推定されたパラメータを表4-3に示す。推定されたパラメータは複数の初期値から検証した結果、初期値に対して頑健であった。誤差分析の結果、推定されたモデルによる誤差は完全な正規分布ではなかったが、カイ二乗検定において、全ての系統において $p>0.45$ となり、その他の分布を示唆しなかった。表4-4に推定された線形モデルと非線形モデルのquasi- R^2 とAICを示す。宮崎の系統は非線形性が低く、線形モデルと大きな差がなかったが、全ての系統で、非線形モデルの適合度がより高い結果となった。これらの結果から、構築されたモデルは、日長調節温室での観察結果を忠

実に表現していると判断できる。推定された開花予測モデルの気温と日長に対する反応性を、等高線グラフを用いて表したのが図4-2である。

北海道札幌市、秋田県秋田市、茨城県つくば市、佐賀県佐賀市、宮崎県宮崎市において行った、相互移植実験の結果、並びに、実験結果を最もよく予測する実効日長の差 Δ を表4-5に示す。図4-3は、出芽日の影響がどの程度あるかを評価するために行ったシミュレーション結果 図4-4は5系統が採取された地点の緯度と、温度、日長を固定した場合の推定された開花速度の推移を示したシミュレーション結果である。またツルマメの開花速度の日長と温度への反応性の地域間での緯度勾配を見るために、ツルマメ種子の採取地の緯度と、各条件での推定された開花速度の関係を示したのが、図4-5である。

2005年から2015年にかけて、茨城県つくば市の農業環境変動研究センター内の実験圃場で栽培し、観察されたエンレイとツルマメの開花の推移をガンマ分布で近似した際の、5%、25%、50%、75%、95%パーセンタイル点でのDVRの積算値DVI、並びにその平均値、標準偏差を表4-6、7に、図4-5にその散布図を示す。その結果、エンレイは開花の開始から終了まで、どのパーセンタイル点でも0.05から0.12程度の標準偏差をとった。これは、開花時期のDVRでいうと、およそ2日から4日程度となり、開花開始の予測に比べて大きな変動はなかった。一方ツルマメでは、2005年から2008年の間のように、開花の開始が比較的精度よく予測できている年があれば、2014年、2015年のように、予測精度が非常に悪い年もある結果となり、各パーセンタイル点での標準偏差も0.17から0.25程度とエンレイの場合よりもかなりバラつきが大きかった。2014年、2015年は4月から6月にかけての平均気温が他の年に比べて高く、夏至時点でのDVIがかなり高い推定結果となっており、特に4月出芽のデータの推定精度が悪かった。Aikawa et al (2010)は、ハクサンハタザオの例において、気象条件が開花のタイミングに影響する期間は、出芽からの全期間ではなく、ある一定の期間に限定的であることを示している。そこで、開花には、夏至以降の日長・温度条件が影響しているものと仮定して、夏至前までのDVIを除いて積算値をとったのが表4-8、そのグラフが図4-6である。この結果では標準偏差は0.09から0.13程度と、日数換算で2日から4日程度と、ダイズの場合と比して、遜色のない結果となった。

表 4-3. 推定された発育指標モデルのパラメータ
括弧内の数字は 95%信頼区間を示している。

Accession	a	b	T_h	DL_c	l	Quasi- R^2 (RSS)
Hokkaido	-0.398	0.521	17.2 (16.6-17.7)	15.9 (15.8-16.0)	0.0595	0.947
Akita	-0.348	0.497	17.8 (17.0-18.4)	15.9 (15.8-16.0)	0.0626	0.945
Ibaraki	-0.312	0.251	17.5 (16.3-18.6)	15.8 (15.6-16.0)	0.0743	0.942
Saga	-0.356	0.170	17.5 (16.8-18.2)	15.8 (15.7-16.0)	0.0900	0.963
Miyazaki	-0.410	0.0282	19.8 (18.7-20.8)	15.5 (15.3-15.8)	0.3802	0.944

表 4-4. 線形モデルと非線形モデルの PRESS に基づいた quasi-R² と AIC の結果

	Quasi-R ² (PRESS)		AIC	
	Linear model	Proposed model	Linear model	Proposed model
Hokkaido	0.752	0.943	-477.3	-578.3
Akita	0.766	0.942	-488.1	-584.4
Ibaraki	0.876	0.933	-512.9	-549.7
Saga	0.931	0.963	-546.5	-580.1
Miyazaki	0.932	0.935	-514.8	-516.0

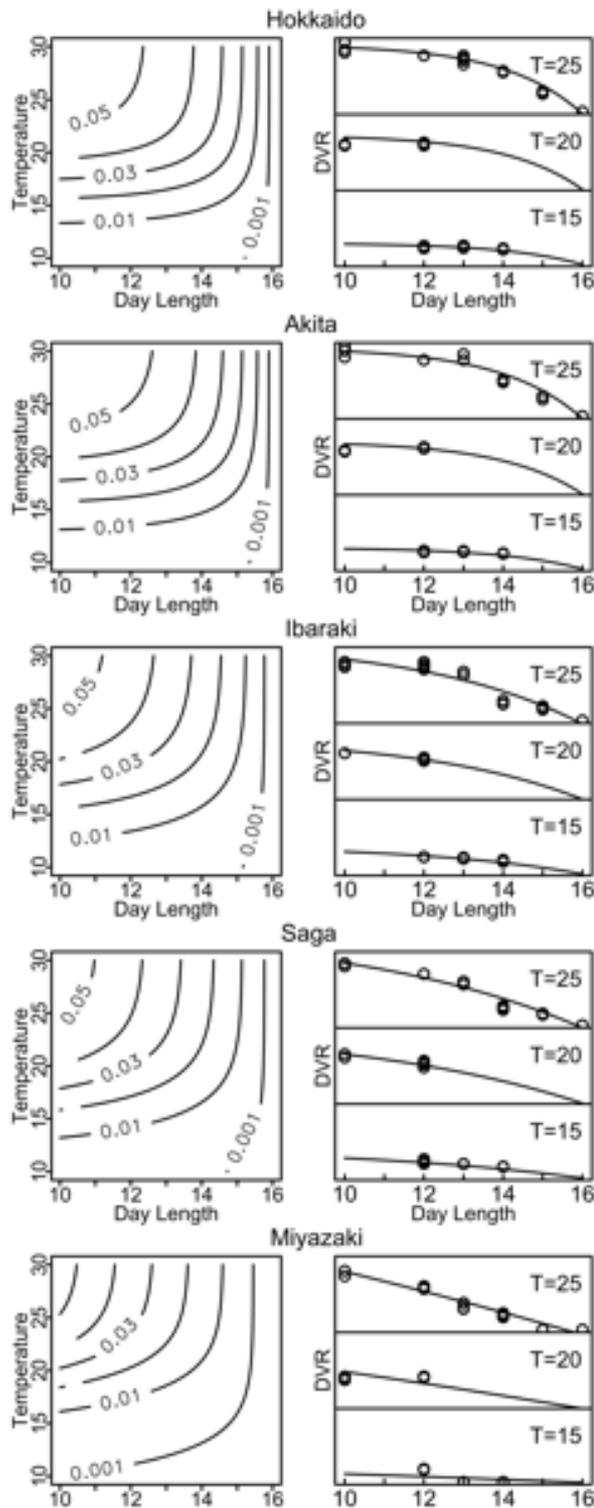


図4-2.推定された開花予測モデルによる等高線グラフ、ならびに15度、20度、25度条件下での日長反応性
右列の○は観察値を示している。

表 4-5. 相互移植実験の観察結果と、推定された開花日、推定された実効日長、並びに補正された開花日

SE は観察された出芽日、OF は野外で観察された開花日、PF は推定された開花日、CF は実効日長によって補正された開花日をそれぞれ意味する。

Accession	Planted area	SE	OF	PF	CF	Residuals days (CF-OF)	Estimated Δ (hour)
	Hokkaido(Sapporo)	6/25	8/28	8/12	9/2	5	
	Akita(Akita)	5/28	8/14	7/26	8/17	3	
Hokkaido	Ibaraki(Tsukuba)	5/1	7/3	6/23	7/11	8	0.644
	Saga(Saga)	4/14	5/27	5/26	6/4	8	
	Miyazaki(Miyazaki)	4/10	6/26	5/23	5/29	-28	
	Hokkaido(Sapporo)	6/25	9/1	8/14	9/1	0	
	Akita(Akita)	5/27	8/19	7/28	8/15	-4	
Akita	Ibaraki(Tsukuba)	5/1	6/27	6/25	7/11	14	0.571
	Saga(Saga)	4/14	6/9	5/28	6/5	-4	
	Miyazaki(Miyazaki)	4/12	5/27	5/25	5/30	3	
	Hokkaido(Sapporo)	6/26	9/8	9/1	9/12	4	
	Akita(Akita)	5/27	8/18	8/14	8/15	-3	
Ibaraki	Ibaraki(Tsukuba)	5/1	7/30	7/13	7/29	-1	0.427
	Saga(Saga)	4/14	5/27	6/9	6/4	8	
	Miyazaki(Miyazaki)	4/12	6/18	6/5	6/15	-3	
	Hokkaido(Sapporo)	6/25	9/12	9/4	10/11	29	
	Akita(Akita)	5/25	9/4	8/19	9/22	18	
Saga	Ibaraki(Tsukuba)	5/1	8/29	7/20	8/27	-2	0.864
	Saga(Saga)	4/14	8/5	6/17	7/28	-8	
	Miyazaki(Miyazaki)	4/11	9/8	6/10	8/27	-12	
	Hokkaido(Sapporo)	6/25	NF	NF	NF*	-	
	Akita(Akita)	5/28	9/26	9/18	NF*	>+30	
Miyazaki	Ibaraki(Tsukuba)	5/1	9/10	8/20	9/16	6	0.632
	Saga(Saga)	4/14	7/28	7/28	7/16	-12	
	Miyazaki(Miyazaki)	4/12	8/21	7/20	8/20	-1	

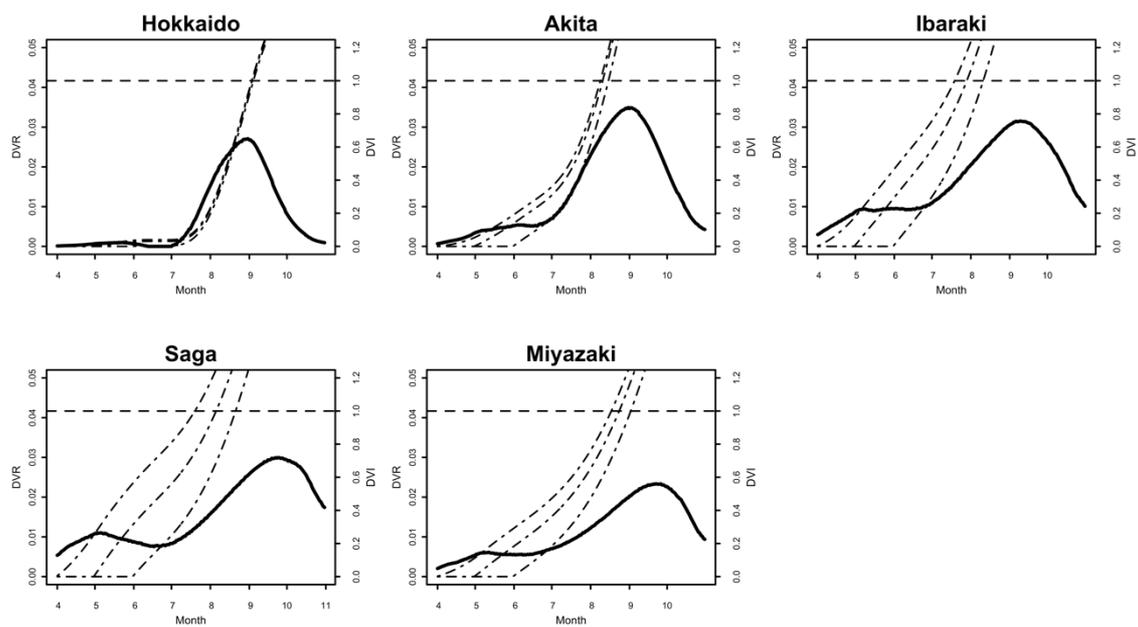


図4-3. 出芽日を4月1日、5月1日、6月1日と仮定した場合の開花速度ならびに開花指標の推移。実線は開花速度の推移を、破線は開花指標の推移を示している。

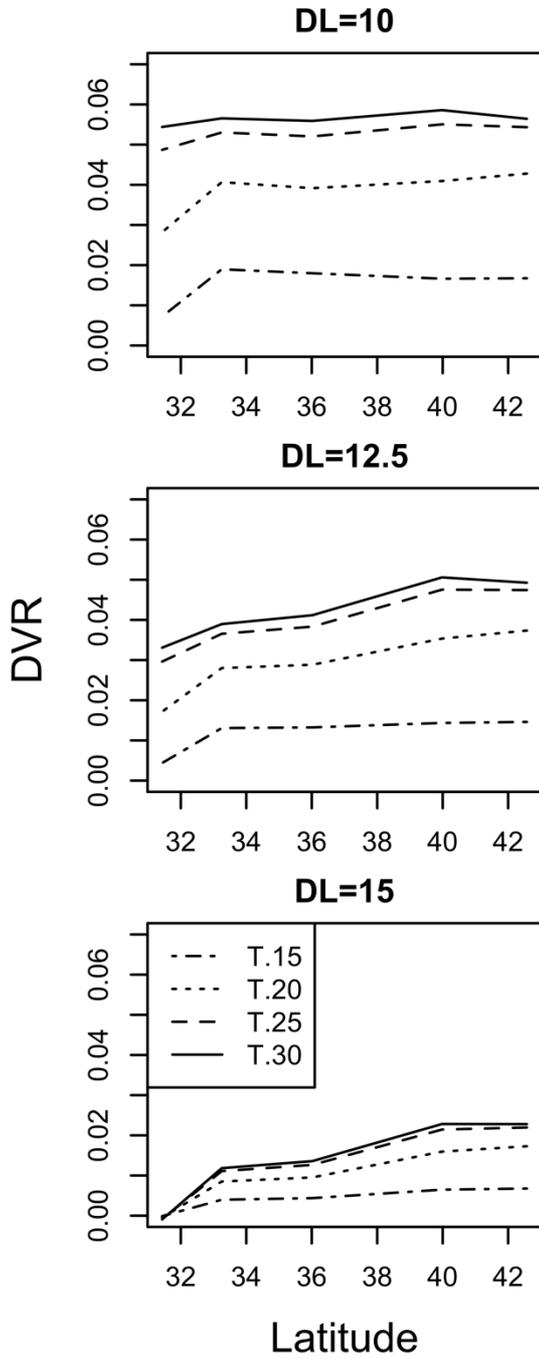


図 4-4. 推定された開花速度と緯度の関係

表 4-6. エンレイの開花分布の各パーセンタイル点での DVI

開花開始日	5%	25%	50%	75%	95%	
2006年6月	1.15	1.03	1.27	1.37	1.67	1.89
2006年7月上	1.02	1.08	1.18	1.31	1.62	1.76
2006年7月下	0.99	1.03	1.06	1.1	1.4	1.57
2007年6月	0.98	1.03	1.08	1.13	1.41	1.82
2014年6月	1.07	1.12	1.2	1.33	1.68	1.84
2015年6月	1.11	1.14	1.18	1.24	1.55	1.92
2015年7月	1.13	1.17	1.2	1.27	1.51	1.71
平均	1.06	1.09	1.17	1.25	1.55	1.79
標準偏差	0.07	0.06	0.07	0.10	0.12	0.12

表 4-7.茨城県のツルマメ系統の開花分布のパーセンタイル点での DVI

	0%	5%	25%	50%	75%	95%
2005年5月	1.05	1.26	1.37	1.53	1.78	2.09
2005年6月上	1	1.38	1.53	1.68	1.85	1.92
2005年6月下	1	1.37	1.53	1.59	1.69	1.86
2006年5月	1.21	1.5	1.68	1.81	1.95	2.14
2007年5月	1.32	1.58	1.73	1.8	1.9	2.09
2008年4月	0.96	1.68	1.83	1.92	1.99	2.17
2014年4月	1.45	1.77	2.02	2.14	2.23	2.31
2015年4月	1.64	1.94	2.02	2.17	2.29	2.39
2015年5月	1.49	1.61	1.74	1.84	1.97	2.13
平均	1.24	1.57	1.72	1.83	1.96	2.12
標準偏差	0.25	0.21	0.22	0.22	0.19	0.17

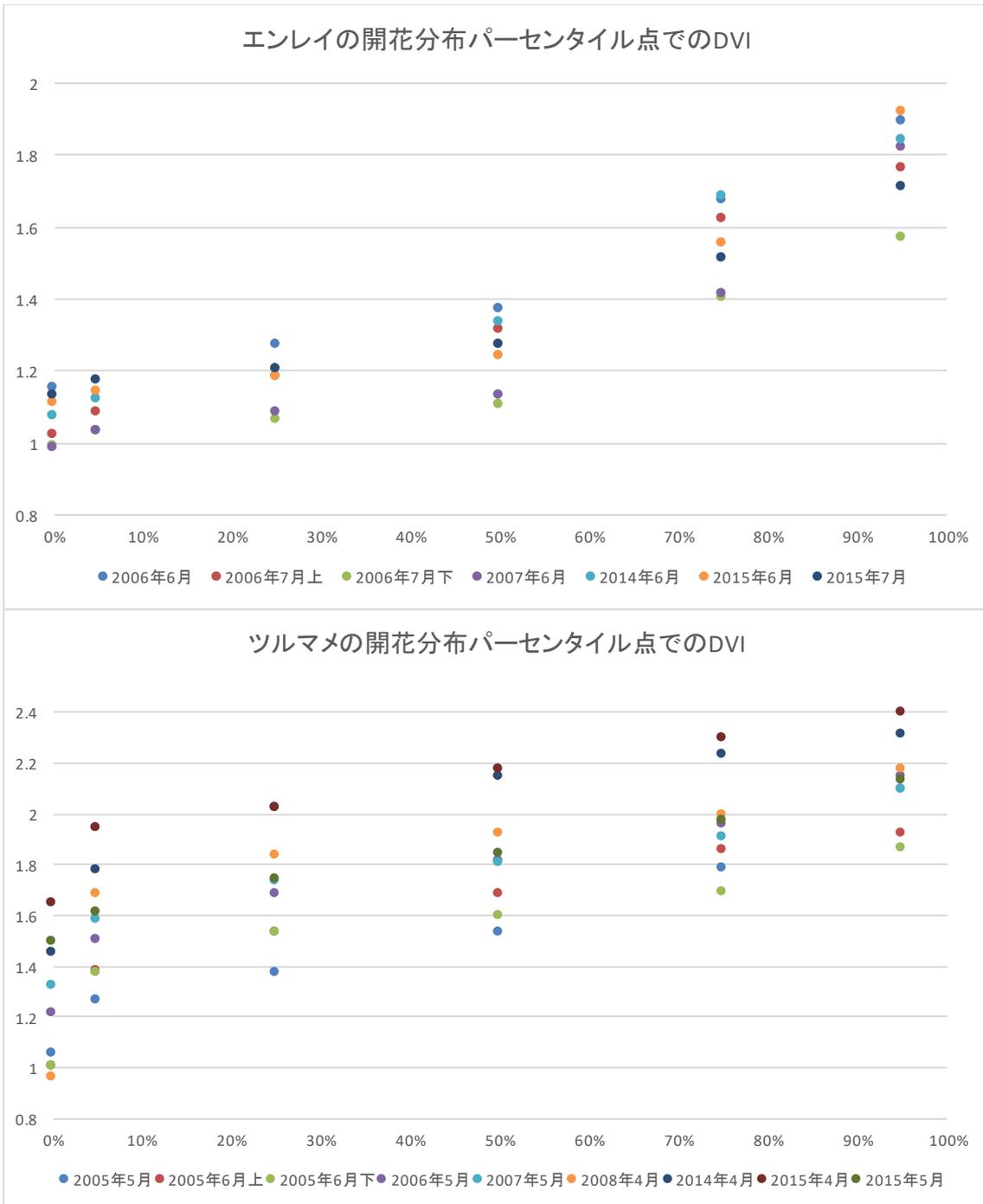


図 4-5 開花分布のパーセンタイル点での DVI

0%は最初の開花が観測された日の前日時点での DVI を示している。

表 4-8.茨城県のツルマメの開花分布のパーセンタイル点での夏至以降の DVI

	5%	25%	50%	75%	95%
2005年5月	0.98	1.09	1.25	1.5	1.81
2005年6月上	1.23	1.38	1.53	1.7	1.77
2005年6月下	1.34	1.5	1.56	1.66	1.83
2006年5月	1.3	1.48	1.61	1.75	1.94
2007年5月	1.35	1.5	1.57	1.67	1.86
2008年4月	1.17	1.32	1.41	1.48	1.66
2014年4月	1.06	1.31	1.43	1.52	1.6
2015年4月	1.2	1.28	1.43	1.55	1.65
2015年5月	1.19	1.32	1.42	1.55	1.71
平均	1.20	1.35	1.47	1.60	1.76
標準偏差	0.12	0.13	0.11	0.10	0.11

4-4. 考察

表4-4に示した、AICの指標が示す通り、ツルマメの開花予測に関しては、非線形モデルの方が、適合度が高い結果となった。また推定された quasi-R²から、観察実験を精度よく表現しているモデルになっていると言える。

図4-1の等高線グラフを見ると、北方系統ほど日長反応性が弱く、要求温度も低いことがわかる。これは北方系統の系統ほど、幅広い条件下で、開花への移行を素早く行うということの意味する。各系統で観察された最も早い開花速度は0.05程度であったが、この速度で開花に至る範囲が北方の系統ほど広いことが、図4-1から見て取れる。また温度一定条件下での日長反応性から、南方の系統には強い日長制限がかかっていることがわかる。気温の高い日本の南部では、日長による制限がないと、開花に至るまでに十分なバイオマスを増やさないことが、このような進化を促進してきたと考えられる。興味深いことに、鮫島(2000)は、ダイズの各品種においても、北日本でよく栽培されている品種では日長反応性がほぼ存在せず、南日本でよく栽培されている品種では日長反応性が強いことを報告している。日本でのツルマメの分布の北限は北海道南部である。しかしロシアや中国などでは、北海道よりもさらに高緯度地域でのツルマメの分布が確認されており、ツルマメは南方より、北方に向かって進出していると考えられているが(OECD 2000)、北海道での栽培に適したキタホマレなどが、日長反応性を全く持たないのに対し、北海道のツルマメ系統は、その他の系統に比べれば弱いながらも日長反応性を保っていることは、日長反応性が、日本におけるツルマメの北上にとって、制限要因となっている可能性を示唆している。

表4-5に示した、全てのケースにおいて、当初推定された開花日は、野外実験で観察された開花日よりかなり早くなっている。特に日長反応性が強い佐賀、宮崎の南方系統において顕著であることから、これは、鮫島(2000)が報告している通り、日長調節温室内で、実効日長が短くなっていることを示唆している。実効日長の差を仮定した補正により、現地での推定制度が飛躍的に向上したが、北海道系統を宮崎に植えたケースや佐賀・宮崎系統を北海道に植えたケースなどで、非常に大きな推定のズレが生じている。これらは、高温や低温による発育阻害のような、モデルで想定していない要因が影響しているためと考えられる。具体的にいえば、札幌の4月、5月の平均気温は8度から1

2度と、宮崎県では、ツルマメの生育期間中において経験しえないほどの低温になっており、逆に佐賀県や宮崎県の7、8月の平均気温は25度を上回り、北海道ではツルマメの生育期間中にこのような平均気温に達することはない。北海道の系統を宮崎県で栽培した場合に、開花期が予想よりも30日程度遅れた理由は高温による発育阻害の可能性も考えられるだろう。九州の系統を北海道や秋田県で栽培した場合には、予想より開花期がわたかなり早かったケースが多かったが、日長反応性が強い南日本の系統の開花速度を過小評価していた場合に、長日条件の期間が非常に長い北日本では、大きなズレとなっている可能性が考えられる。例えば開花期間が0.01と推定した条件での真の値が0.02だった場合、その条件の期間がそのまま開花期のズレとなる。本研究で提示したモデルの誤差評価は、開花速度に関わらず、一定ではあるが、予測する場所において、経験することになる期間が長い条件の誤差に補正を加えるなどの工夫をすることで、より予測が改善することも考えられ、今後の課題といえるが、いずれにせよ、採取地付近での各系統の開花日の予測に関しては、平均の絶対値で1.8日(-8日から+5日)と非常に高い精度で予測できていることからモデルの信頼性は高いと考えられる。

4-3で示したシミュレーション結果から、佐賀のケースを除いて、出芽日が開花期に与える影響はかなり小さいことが明らかとなった。佐賀の系統の開花速度の分布は夏至前にも小さなピークが存在し、他の系統と形状がかなり異なる。佐賀のモデルは採取地近くでの栽培実験の予測制度も他の系統より悪く、低温、短日条件下で、開花速度を過大評価している可能性もある。日長調節温室では、最大で110日後に開花に至っていることから、開花を促す植物生理学的反応は、かなりゆっくりとしたペースでも進行することがうかがえるが、これは一定条件下での結果であり、日長が短く温度が低い状況から、日長が長くなり、気温が上昇する夏至を迎える、という環境の変化が起きる野外では、夏至前の開花速度の影響は限定的である可能性もあるだろう。

図4-3を見ると緯度による勾配は一定のペースではないものの存在していることが確認出来る。10時間日長では宮崎を除く4系統ではほぼ差がなく、12.5時間、15時間日長では比較的是っきりとした緯度との関係が観察された。この関係性から、実験に供試した系統を採取した地域以外でも、各モデルのアンサンブルにより、特に本州内では、開花予測が可能となる可能性を示唆している。また緯度的勾配が確認できたことから、地域内での集団内変異の

程度もそれほどは大きくないのではないかという予想もできるだろう。しかしながら、各地域での個体群間のバラツキの確認は今後の課題として残っている。

表4-7、図4-4で示したように、エンレイの近似された開花分布での各パーセンタイル点でのDVIのバラツキは十分に小さく、開花開始のバラツキとほぼ同等であった。本研究で提示された開花モデルは、開花開始を予測するモデルであるが、開花分布の各パーセンタイル点でのDVIのバラツキが、開花開始のDVIのバラツキとほぼ同等であるという結果は観測されたDVIの平均値を用いて開花分布の推定をシミュレートすることが可能であることを示唆している。一方ツルマメでは、特に2014年、2015年の4月出芽のデータの推定精度が際立って悪かった。夏至前、4月、5月の日長は13時間から14時間と、気温が20度前後になればかなり早い速度で開花に至ることが、図5の結果からもわかる。2014年、2015年のつくば市での4月、5月の平均気温はその他の年と比べて2度から3度ほど高く、それが、実際の開花よりも予測時期がかなり早くなった原因だと考えられる。Aikawa et al.(2010)は、ハクサンハタザオの野外株から採取したサンプルの遺伝子解析により、開花調節遺伝子の発現に、6週間程度という比較的短期間の気温と日長の位相の差異を感知していることを報告している。本研究で利用されているような発育指標モデルは、生物時計モデルのうち、位相と外部の明暗を比較するビュンニングの仮説よりも、状態の持続により特定の物質が閾値まで蓄積する砂時計仮説の方に近い概念のモデルであるが、実際にはハクサンハタザオの例と同様に、日長と温度の位相が影響している可能性も十分ありえるだろう。このような場合に、日長が次第に長くなっていく、夏至以前では開花が促進されないという仮定は、最も単純な仮定となるだろう。この仮定の元で、開花パーセンタイル点でのDVIのバラツキが劇的に小さくなっているという結果は、出芽から開花に至るまでの全期間ではなく、その一部の期間の環境条件が影響していることを示唆している。

5章 総合考察

本研究では、交雑抑制の手段として、時間的隔離を利用するために、障害になっていると考えられた、開花の類似度を示す指標の不正確さ、作付け時期のズレがどの程度の開花期の類似度のズレを生むのかが推定できないこと、という二つの問題点に対し、それぞれ、交雑率との関係が良好な開花類似度指標の開発と、発育指標モデルを利用した開花期予測モデルを多地域について構築することで、栽培種、野生種両方での開花予測を可能とすること、という解決策を提示するものであった。

2章で提案した開花類似度指標は、交雑率が、その他の条件が一定であれば、受粉する時に同時に咲いている花の数に比例する、という極めて自然な仮定から導出したものであり、実際に交雑率との関係は従来の指標よりも優れた結果を示した。

3章ではイネのキセニアを利用して、出穂の類似度と交雑率の関係を調査した。その結果、出穂の類似度と交雑率の関係はほぼ線形で、分散が平均値の増大に伴って上昇するという、出穂（開花）の重複が、交雑にとっての必要条件となる、という自然な考察に合致する結果となった。

4章ではツルマメの開花予測モデルを5地域で採取した系統に対して構築した。本研究で提示したモデルは、観察結果に非常によくフィットしているだけでなく、野外データでのバリデーションによって、採取地域においては、ダイズのモデルと同等の予測のズレで開花日を予測することができた。

5章ではこれらの結果を受けて、時間的隔離を用いた交雑リスク抑制手法の可能性についてまとめる。

本研究では時間的隔離の実用化が進んでいない原因として、以下の2つの問題点の解決を目指した。5-1では、開花の類似度が正確でないため、交雑率と開花の類似度の関係性について再現性のある結果が得られないという問題点について議論する。5-2では、操作可能である作付け日の移動が、開花の類似度に与える影響を評価する上での開花予測モデルの可能性とこれからの展望について論ずる。5-3では、これらをまとめて、時間的隔離を用いた交雑リスク低減の実用化に向けて、問題点を整理し、展望をまとめる。

5-1. 開花の類似度を正確に評価することの重要性

開花の類似度が交雑率抑制管理のためのモニタリング指標となるためには、指標が交雑率と明確な関係性を持つこと、複数の実験間での比較検証ができること、交雑率との関係性の解明が必要であろう。

空間的隔離の場合、基準は必然的に物理的距離となるため、隔離距離として十分な距離はどの程度なのか、という観点から研究が進んできた。そのため栽培種ごとに適切だとされる隔離距離の設定が、実験結果の増大とともに精度を増す形で実現されてきたと言える。

第2章で提示した指標は、開花数の推移を確率密度分布として表現することで、開花期の類似度を正確に表現することができた。また、個体群の集団のサイズが事前に把握できる、作物同士の交雑のような場合においては、集団のサイズの効果も考慮することができる。一方で、開花重複日数やそれを基にした基準を利用した中山・山口(2002)や Simard and Legere (2004)の場合に比べて、調査の労力が大きいことは否めない。開花の観測は遠観で行われることが多く、既存のデータの多くに対して本研究の指標を適用することはできない。ダイズの場合は、同じ登熟タイプごとの類似性が期待でき、代表的な品種の開花予測モデルを転用することにより、調査の労力を軽減するなどの対策も考えられる。第3章で、イネの場合について、出穂の類似度と交雑率の関係について、その関係性を明らかにすることができたが、他の作物で同様の結果になるかはしっかり検証されなければならないだろう。特にダイズやアブラナ科作物のような虫媒性がある植物における検証は重要だと思われる。

3章における、イネの実験で見られた開花（出穂）の類似度と交雑率の関係性が普遍的であるとした場合、原点0を通る形で、線形で、分散が平均に伴って増大するモデルを想定することができる。混植状態は距離に関しては最も高い交雑率になっていると考えられることから、このような実験条件下での、開花類似度が最大となった時の交雑リスクを用いることで、95%信頼上限を求めたり、要求される交雑率（例えば1%）以下に95%以下の確率で抑制することができる開花類似度を求めたりすることが可能になる。図3-2の例で言えば、このデータを用いて分位点回帰を行うと、95%分位点は、

$$\text{交雑率} = 4.027 * \text{類似度} - 0.386$$

の式で推定される。ここで要求される交雑率を1%とすると、95%上限で1%となる出穂の類似度は約0.34と求めることができる。

空間的隔離と同様に、このような手法を利用可能にしていくことで、時間的隔離が実用化できるといえるだろう。また Devos et al.(2008)が試みているような、開花の類似度と物理的距離の複合的な措置を施した場合の交雑抑制効果に関する研究も重要になるだろう。

5-2. 開花予測モデルによる開花期間全体の予測について

開花期の類似度を制御する場合、作付け時期を動かすこと、品種を変えることが有効である。第3章で見たとおり、ツルマメのような野生種が対象の場合は、その地域性への考慮も当然必要になるだろう。しかしどの品種をどの程度ずらして栽培すれば、求められる開花類似度よりも低くなるか、という目的の達成のためには、作付け前に開花期を予測する必要がある、どの程度の時間的隔離が必要か評価するための研究においては、どのような形で開花予測モデルの導入が不可欠なものと言える。開花予測には、大別すればプロセスベースモデルと統計モデルの2つの選択肢が考えられる。本研究では鮫島(2000)にならない、統計モデルを採用した開花開始日の予測モデルを構築した。ダイズは有限生長であるため、開花の開始が最終的なバイオマス・収量にとって極めて重要になるため、開花の開始の予測に強い関心が持たれるが、イネの場合、出穂日の定義は達観で5割の穂が穂をつけている状態とされることが多い。また気象庁による観測木データを基にしたサクラの開花、満開予想モデル、白桃の成熟最盛期予測モデル(岡山県 2003)のように、発育指標モデルで指標にされる基準は開花開始日に限らない。本研究では開花開始日を1とする発育指標モデルを構築してきたが、開花の開始から最盛日を迎えるまでの生態的メカニズムに大きな変化がないとすると、開花開始日を予測するモデルを用いて、開花分布全体を予測することが可能となるだろう。実際にサクラの場合には有効積算温度法で開花開始日、満開日などの予想を行っている。ただし、ダイズやツルマメの場合、降霜などのイベントによって開花の終了が独立にもたらされる可能性もあるため、詳細な検討が必要であろう。3章4節で示したシミュレーション結果は、開花開始日以外のパーセンタイル点の予測も十分に可能であることを示唆しているが、検証にはさらなるデータが必要と言えるだろう。開花期全体を予測することが可能となれば、過去の気象条件から、作付け日、品種を決定することで開花の類似度が取りうる確率密度分布が得られる。遺伝子組換え作物の交雑を抑制するために、本研究で行った開花数の推移の調査を実際に

行うことは現実的ではない。モデルによるシミュレーションを行うことで、交雑リスクが高くなったと判断できる気象条件が実現した場合のみ、周辺刈り取りや出荷前の精密検査などの特別な措置を行うというような方向への発展が望ましい。

北海道、新潟の遺伝子組み換え作物の交雑防止措置に関する条例では、イネの場合に2週間の出穂期間のズレを要求している。出穂期間は長ければ2週間程度続くため、この基準が十分に機能するかどうかは不透明であると言えるだろう。平年値で2週間ずれると予測した栽培計画であっても、気象条件が平年値からずれ、早い出穂を想定していた側の幼穂期に低温で出穂が遅れ、遅い出穂を想定した側では順調な気象条件で出穂が早まり、出穂期が重なるというようなことは確率的に起こりうると言える。本研究で提示したような詳細な開花期類似度指標でなくとも、開花（出穂）の気象に対する反応性をモデル化してシミュレーションをすることは、交雑リスクという確率的な事象を扱う上で、欠かすことのできない要素だと言える。

5-3. 時間的隔離の実用化に向けて

本研究では時間的隔離による交雑リスクの低減を実用化するために必要な問題点の解決を試みてきた。正確な開花の類似度を、モデルを使って確率的に予測することで、交雑リスク評価が正しく運用できる。しかしながら、本研究で行ったような開花数の推移に着目して行われた研究は非常に少なく、基礎となるデータがまだまだ足りないというのが実情である。今後、トウモロコシやセイヨウアブラナなどの他の作物に対する開花数や花粉飛散量の推移など、量的な観測を伴った研究が進むことを期待したい。現段階でも、開花開始日間の差を指標として、開花予測モデルを用いてどの程度、年次間変動が見られるかを過去のデータや将来予測データから評価することは可能であろう。

ここまで見てきたように時間的隔離の実用化に向けては、まだ解決すべき問題は残っている。しかし、本研究で提示したように、作付け日の操作や品種の変更が、正確な開花の類似度をどのように変化させるかを、開花予測モデルを用いることによって確率的に評価することで、時間的隔離による交雑リスクの評価、ならびに低減を行うことは可能である。この考え方は、作物と野生種のような従来の隔離基準では対応が難しかった交雑リスクを抑制する以外にも、作物の原種管理のように、交雑を忌避したい場面で様々な応用が可能である。

特に日本のような狭い地域に複数の地権者が存在する農地では、空間的隔離基準を徹底してしまうと、事実上栽培することができなくなってしまう。このような場合に時間的隔離は非常に有用であると言える。様々なスタイルの農業の共存が可能となるように、今後の発展を期待する。

引用文献

- Aikawa S., Kobayashi, MJ, Satake, A, Shimizu, KK, Kudoh, H. (2010) Robust control of seasonal expression of Arabidopsis FLC gene in a fluctuating environment. PNAS 107 11632–11637
- Allen, D.M. (1974) The relationship between variable selection and data augmentation and a method for prediction. Technometrics 1
- Bannert M, Vogler A, Stamp P (2008) Short-distance cross-pollination of maize in a small landscape as monitored by grain color markers. Eur J Agron 29:29–32
- Bao Rong Lu and Snow A. (2005) Gene flow from genetically modified rice and its environmental consequences. BioSci. 55 669–678.
- Bartsch D, Schmidt B, Pohl-Orf M, Haag, C, Schuphan I. (1996) Competitiveness of transgenic sugar beet resistant to beet necrotic yellow vein virus and potential impact on wild beet populations. Mol Ecol 5 199–205.
- Bartsch D, Lehnen M, Clegg J, Pohl-Orf M, Schuphan I., Ellstrand N C (1999) Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. Mol Ecol 8:1733–1741
- Bucchini, L., & Goldman, L. R. (2002). Starlink corn: a risk analysis. Environmental Health Perspectives, 110, 5–13.
- Carter C.A., and Smith A.(2007), The Review of Economics and Statistics 89: 522–533
- Clausen J. (1951) Cornell University Press; Ithaca, NY: Stages in the evolution of plant species. The Quarterly Review of Biology 27:315.
- Cresswell J E and Hoyle M (2006) A mathematical method for estimating patterns of flower- to-flower gene dispersal from a simple field experiment. Funct Ecol 20:245–251.
- Della Porta G, Ederle D, Bucchini L, Prandi M, Verderio A, Pozzi C (2008) Maize pollen mediated gene flow in the Po valley (Italy): source-recipient distance and effect of flowering time., Eur J Agron 28:255–265
- Devos Y, Cougnon M, Thas O, Reheul D (2008) A method to search for optimal field allocations of transgenic maize in the context of co-existence. Environ Biosafety Res 7:97–104
- De Wit, C.T., R.Bronwer and F.W.T. Penning de Vries (1970) The simulation of photosynthetic systems Proc. Of the IBP/P1), Technical Meeting, Trebon (1969, PUDOC), Wageningen, 47 – 60.
- Dobzhansky T. (1937) Columbia University Press; New York, NY: Genetics and the origin of species. Columbia biological series, no. 11.
- Ellstrand N C (2003) Dangerous liaisons? When cultivated plants mate with their wild relatives. Johns Hopkins University Press, Baltimore 9–15.
- Ellstrand N C, Prentice H C, Hancock J F (1999) Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. Ann Rev Ecol Syst 30:539–563
- Environment Directorate Organisation for Economic Co-operation and Development Paris (2000) Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean) OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15. 16
- Fujita R, Ohara M, Okazaki K and Shimamoto Y(1997) The extent of natural cross pollination in wild soybean (*Glycine soja*). J.Hered. 88: 124–128.
- Gepts, P and Papa, R (2003) Possible effects of (trans)gene flow from crops on the

- genetic diversity from landraces and wild relatives. *Env. Biosafety Res.* 2: 89-103.
- Golub, G. and V.Pereyra (2003) Separable nonlinear least squares: the variable projection method and its applications, *Inverse Problems* 19, 1-26.
- Halsey M E, Remund K M, Davis CA Qualls M, Eppard P J, Berberich SA (2005) Isolation of maize from pollen-mediated gene flow by time and distance. *Crop Sci* 45:2172–2185
- Horie, T and H. Nakagawa (1990) Modelling and Prediction of Developmental Process in Rice : I. Structure and method of parameter estimation of a model for simulating developmental process toward heading 59:687-695.
- Kaga, A., N. Tomooka, U. Phuntsho, Y. Kuroda, S. Kobayashi, T. Isemura, M.J. Gilda and D.A.Vaughen (2005) Exploration and collection for hybrid derivatives between wild and cultivated soybean: preliminary survey in Akita and Hiroshima Prefectures, Japan. Annual Report on Exploration and Introduction of Plant Genetic Resources (in Japanese with English summary).
- Kitamoto N, A. Kaga, Y. Kuroda, R. Ohsawa (2012) A model to predict the frequency of integration of fitness-related QTLs from cultivated to wild soybean *Transgenic Research* 21. 1 pp.131-138
- Kim MY, Lee S, Van K, Kim T-H, Jeong S-C, Choi I-Y, Kim D-S, Lee Y-S, Park D, Ma J, et al (2010) Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 107:22032–22037.
- Kuroda, Y, A Kaga, J Guaf, D A Vaughanm and N Tomooka (2006) Exploration, Collection and Monitoring of Wild Soybean, Cultivated Soybean and Hybrid Derivatives between Wild Soybean and Cultivated Soybean: Based on Field Surveys at Akita, Ibaraki, Kochi and Saga Prefectures. Annual Report on Exploration and Introduction of Plant Genetic Resources. 22: 1-12. (in Japanese with English summary)
- Kuroda Y, Kaga A, Tomooka N, Vaughan DA (2006) Population genetic structure of Japanese wild soybean (*Glycine soja*) based on microsatellite variation. *Mol Ecol* 15: 959–974
- Mayr E. (1942) Columbia University Press; New York, NY: Systematics and the origin of species. 186-216.
- Messeguer J, Peñas G, Ballester J, Bas M, Serra J, Salvia J, Palaudelmàs M, Melé E (2006) Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnol J* 4:633–645
- Nakayama Y, Yamaguchi H. (2002) Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biol Manag* 2:25–30
- Ohigashi K, Mizuguti A, Yoshimura Y, Matsuo K and Miwa T. (2014) A new method for evaluating flowering synchrony to support the temporal isolation of genetically modified crops from their wild relatives. *J Plant Res.* 127:109-117
- Ohigashi K, Mizuguti A, Nakatani K, Yoshimura Y, Matsuo K (2019) Modeling the flowering sensitivity of five accessions of wild soybean(*Glycine soja*) to temperature and photoperiod, and its latitudinal cline. *Breeding Sci.* jsbbs.15-136
- Quinn T P., M J Unwin, M T Kinnison (2000) Evolution of temporal isolation in the

- wild: genetic divergence in timing of migration and breeding by introduced chinook salmon populations. *Evolution* 54:1372-85
- Rong J, Lu B R, Song Z, Su J, Snow A A, Zhang X, Sun S, Chen R, Wang F (2006) Dramatic reduction of crop-to-crop gene flow within a short distance from transgenic rice fields. *New Phytol* 173:346–353
- Roumet M, Noilhan C, Latreille M, David J and Muller H (2013) How to escape from crop-to-weed gene flow: phenological variation and isolation-by-time within weedy sunflower populations. *New Phytol.* 197: 642-654
- Sameshima R (2000) Modeling soybean growth and development responses to environmental factors. *Bull. National Agricultural Research Center.* **32:** 1-119. (in Japanese)
- Shivrain V K, Burgos N R, Sales M A, Mauromoustakos A, Gealy D R, Smith K L, Black H L and Jia M (2009) Factors affecting the outcrossing rate between Clearfield™ rice and red rice (*Oryza sativa*). *Weed Sci.* 57: 394-403.
- Simard M J and Legere A (2004) Synchrony of flowering between canola and wild radish (*Raphanus raphanistrum*) *Weed Sci.* 52:905–912.
- Snow A, D Pilson, L Rieseberg, M Paulsen, N Pleskac, M Reagon, D Wolf, S Selboa (2003) A Bt transgene reduces herbivory and enhances frequency in wild sunflower. *Ecol. App.* 13: 279-286.
- Stewart C N, J N All, P L Raymer, S Ramachandran (1997) Increased fitness of transgenic insecticidal rapeseed under insect selection pressure. *Mol. Ecol.* 6 8: 773-779
- Walklate P J, Hunt J C R, Higson H L, Sweet J B (2004) A model of pollen-mediated gene flow for oilseed rape. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 271:441–449
- Watanabe K N, T. Fujimura, K. Shimamoto, T. Hashimoto, N. Koizumi, H. Hukuda, S. Naito, K. Nakamura, T. Miura, Y. Ohhashi, K. Shimazaki, I. Terashima, H. Uchimiya and T. Yamaya. (2004) Negative fallout from public sentiment in Japan. *Nature biotechnol.* 22:943.
- Warrington, J. and E.T. Kanemasu (1983) Corn growth response to temperature and photoperiod. 1. Seedling emergence, tassel initiation and anthesis. *Agron. J.* 75, 749-754.
- Wen, Z.L., Y. Ding, T. Zhao and J. Gai (2009) Genetic diversity and peculiarity of annual wild soybean (*G. soja* Sieb. et Zucc.) from various eco-regions in China. *Theor. Appl. Genet.* 119:371-81.
- Wilkerson, G.G., J.W. Jones, K.J. Boote, K.T. Ingrain and J.W. Mishoe (1983) Modeling soybean growth for management. *Trans. ASAE* 26:63-73.
- Zhang, Q.Z., H.G. Li, R. Li, R.B. Hu, C.M. Fan, F.L. Chen, Z.H. Wang, X. Liu, Y. Fu and C.T. Lin (2008) Association of the circadian rhythmic expression of GmCRY1a with a latitudinal cline in photoperiodic flowering of soybean. *PNAS* 105: 21028-21033.
- 岡山県 平成15年度試験研究主要成果 モモ“清水白桃”の成熟日予測法
<http://www.pref.okayama.jp/norin/nousou/noushi/seikaPDF/15kaju-5.pdf>
- 佐々木次郎・小野寺博稔・関口道(2009) 宮城県における水筒出穂期の変動範囲と最近の傾向 東北農業研究 61号 21-22

中川博視・神田英司・大野裕之・吉田ひろえ・菅野洋光・鮫島良次・濱寄孝
弘・根本学・中園江・大原源二・近藤始彦・石黒潔・渡邊好昭・長谷川利拡
水稻の移植栽培における晩限期の推定について

<http://www.naro.affrc.go.jp/narc/contents/files/0428.pdf>

新潟県 (2006) 新潟県遺伝子組換え作物の栽培等による交雑等の防止に関する
条例

<http://www.pref.niigata.lg.jp/nogyosomu/1222970561636.html>

農林水産省 (2004) 第1種使用規定承認組換え作物栽培実験指針

https://www.s.affrc.go.jp/docs/committee/use_rule/07/pdf/sankou_siryous2.pdf

北海道 (2005) 北海道遺伝子組換え作物の栽培等による交雑等の防止に関する
条例

<http://www.pref.hokkaido.lg.jp/ns/shs/shokuan/gm-jourei.html>

摘要

遺伝子組換え作物と近縁野生種の交雑、慣行栽培作物品種と遺伝子組み換え作物の共存など、交雑を忌避したい場面で、そのリスクを低減するための手段は大きく3つに分類される。遮蔽物で完全に覆われた閉鎖系に対象を隔離する方法（遮蔽管理）、交雑に関与しないと考えられるほど物理的に隔離距離を設定する方法（物理的隔離）、開花期などの交雑に影響する時期が重複しないように管理する方法（時間的隔離）の3つである。このうち、遮蔽管理は実験段階で広く利用されていて、确实性は非常に高いが大規模化は難しい。大規模な開放系では、物理的隔離が主に採用されており、様々な作物種を対象とした研究がおこなわれている。それに比べると、時間的隔離に関する研究は非常に少なく、実用化に至っていない。本研究では、時間的隔離が実用化に至っていない原因と考えられる、

- （1）開花の重複程度を正確に表現する指標が用いられていないため、複数の研究を統合的に利用することができず、求められる交雑リスクを実現するために適切な時間的隔離の程度が明らかにできない問題
- （2）管理可能な条件である、作付け日、品種の変更が交雑リスクに与える影響が、気象条件によって年ごと、地域ごとに異なることによって、複数の研究の結果に統一性がない問題

の2点の解決を図るべく一連の追究を行った。以下に本研究の概要とそれにより得られた結果に関して簡単にまとめる。

（1）開花重複度指標の開発

時間的隔離の効果をバラつかせている原因と考えられる、開花の重複程度を正確に評価できない問題を改善するために、開花重複度を示す新たな指標を導入することを試みた。

先行研究調査の結果、開花の重複した日数、種子親の開花期間中の花粉親の開花が重複していた日数の割合、開花の開始日の差、開花の最盛日の差などが利用されていた。これらの指標は全て開花の重複程度をある程度代表してはいるものの、完全だとは言えない。例えば、開花の重複日数が同じでも、開花の最盛期に開花が重複している場合と、開花の終期と開花の開始期が重複している場合では、花粉の供給源の開花量が全く異なるし、種子親の開花期間が非常に短く、花粉親の開花終期と完全に重複していた場合、前述の指標では、完全に同じ開花

の推移をしていた場合と同じく開花の重複程度は最大値である 1 を取るが、両者の交雑率は大きく異なるであろう。

そこで、開花の推移を確率密度分布として表現することで、開花の重複程度を複数の確率密度分布間の距離として定義する指標を導入し、交雑率との関係を調べた。

その結果、本研究で提示された

$$S(D_c, D_w) = \int \frac{p_c(t) \cdot p_w(t)}{p_c(t) + \alpha \cdot p_w(t)} dt$$

で定義される開花重複度は従来利用されてきた開花重複日数などに比して、交雑率との相関が高いという結果が得られた。

またイネのモチ・ウルチ系統を用いた交雑試験の結果、開花（出穂）の重複程度と交雑率の間には線形の関係があり、開花の重複度の増加に伴い、観察される交雑率の分散も増加するという、合理的な結果が得られた。これは、本研究で提示した開花重複度が、優れた代表性を持った指標であることを示唆した。

(2) ツルマメの開花予測モデルの開発

交雑リスクを低減するための手段として、時間的隔離を有効に用いるためには、作物と野生種の場合であれば、作物の開花期をコントロールすることで開花期をずらすことが試みられる。作付け日によってダイズの開花がどう変動するのかは、ダイズのバイオマス、収量に直結するため、非常に関心が高く Wilkerson et al. (1983) や Piper et al. (1996) のように、様々な開花予測に関する研究がおこなわれている。日本においては鮫島(2000)により、複数の主要なダイズ品種の開花予測モデルが提案されている。これらのモデルを利用することにより過去の気象情報から、開花期がどの程度バラつくかについての推定を行うことができるであろう。しかしながらツルマメの開花フェノロジーに関する研究は、非常に少なく、Zhang et al. (2008) や Wen et al. (2009) 中国各地域のツルマメ系統を同所的に栽培し、開花期の違いを報告した研究がいくつかある程度である。ダイズとツルマメはともに短日植物であり、開花には、主に温度と日長が影響している。Wen et al. (2009) らが報告しているように、ツルマメの温度、日長への反応性には緯度によって勾配があると考えられる。つまりダイズの作付け時期を同じだけずらした時でも、ツルマメの開花期との重複程度の変化は地域によって異なると考えられる。そこで、ダイズの場合と同様

に、日本列島の5地域のツルマメの開花期を予測するモデルの構築を目的とした開花観察実験を行った。

その結果、日長調節温室内での観察結果と、野外栽培での観察結果、両方に対して、十分な精度を持って推定可能なモデルを開発することができた。またツルマメの温度と日長に対する反応性の地域差はダイズのそれと類似しており、緯度による勾配が存在し、本研究で採取した地域以外での開花の予測の可能性も示唆された。また、開花開始のみならず、推定された発育指標モデルを用いて、開花開始だけでなく、50%開花、95%開花なども、開花開始と同程度の精度で推定できることを示し、開花期全体の予測も可能であることを示した。

以上の結果は、交雑リスク、ひいては遺伝子流動リスクを低減するための時間的隔離手法の実用化に向けて、重要な報告であるといえる。本研究で提示したように、正確な開花の重複度指標を、より低減するような作物の作付け計画を立てることで、時間的隔離は、物理的隔離と同様に、非常に強力な遺伝子組換え作物と慣行栽培作物との共存にも資すると考えられる。また近縁野生種との交雑抑制においても、近縁野生種の開花フェノロジーをしっかりと把握することで、時間的隔離は実現可能であることを示唆している。

謝辞

本研究の遂行および取りまとめにあたり、始終懇切丁寧なご指導とご助言をいただきました筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 大澤良博士に深く感謝申し上げます。

本論文の取りまとめに関して、筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 丸山幸夫博士、同准教授 吉岡洋輔博士、同教授 林 武司博士、教授田中 剛博士、同助教 津田麻衣博士には、懇切丁寧なご指導と的確なご助言をいただきました。ここに謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたっては、農林水産省による、遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究プロジェクト、ならびに新農業展開ゲノムプロジェクトによるご支援をいただいた。また日本モンサント株式会社には、遺伝子組換えダイズの種子提供にご協力いただいた。圃場実験に際しては、旧農業環境技術研究所の阿部勝男氏、荒貴裕氏、飯野宏幸氏、岡野利之氏、鎌田輝志氏、松本公吉氏、渡邊浩二氏、山口弘氏ら技術支援室の職員の方々、北海道大学環境科学院教授 荒木 肇博士、秋田県立大学生物資源科学部 露崎 浩教授、京都工芸繊維大学生物資源フィールド科学研究部門教授 堀元栄枝博士、宮崎大学農学部教授 西脇亜也博士に多大なご尽力をいただいた。ここに深く感謝申し上げます。

本研究におけるモデル構築および解析にあたっては、旧農業環境技術研究所生態系計測研究領域長 三輪哲久博士、農研機構農業環境変動研究センター 櫻井玄博士には、研究の設計段階から様々にご指導いただいた。あわせて心より感謝申し上げます。