

原著論文

穂発芽耐性を強化した水稲品種コシヒカリの準同質遺伝子系統の育成と高温登熟耐性の評価

小林麻子¹⁾・杉本和彦²⁾・林 猛¹⁾・近藤始彦^{3,10)}・園田純也^{4,7)}・塚口直史⁵⁾・和田卓也⁶⁾・山内歌子²⁾・岩澤紀生^{3,8)}・矢野昌裕^{2,9)}・富田 桂¹⁾

- ¹⁾ 福井県農業試験場, 福井県福井市, 〒 918-8215
²⁾ 農業生物資源研究所, 茨城県つくば市, 〒 305-8602
³⁾ 農研機構・作物研究所, 茨城県つくば市, 〒 305-8518
⁴⁾ 鹿児島県農業開発総合センター, 鹿児島県, 〒 899-3401
⁵⁾ 石川県立大学, 石川県野々市市, 〒 921-8836
⁶⁾ 福岡県農林業総合試験場, 福岡県筑紫野市, 〒 818-8549
⁷⁾ 現: 鹿児島県農政部
⁸⁾ 現: 茨城県農業総合センター
⁹⁾ 現: 農研機構・作物研究所
¹⁰⁾ 現: 名古屋大学大学院生命農学研究科

摘 要

水稲品種コシヒカリの遺伝的背景にインド型品種 *Kasalath* に由来する穂発芽耐性遺伝子 (種子休眠関連遺伝子) *Sdr4* を含むゲノム領域を置換した準同質遺伝子系統コシヒカリ NIL [*Sdr4*] を育成した。コシヒカリ NIL [*Sdr4*] について, 生産力検定試験を行った結果, 草型, 出穂期, 収量, 食味等の主要農業形質は反復親であるコシヒカリとほぼ同等であった。コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の穂発芽性はコシヒカリより“難”であり, *Sdr4* の作用はコシヒカリの遺伝背景でも十分発揮されることを確認した。さらにコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の高温登熟耐性を評価したところ, コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の背白及び基白発生率はコシヒカリより有意に低く, 高温登熟耐性を有することが明らかとなった。開花後 14 日目の穀粒における α アミラーゼ遺伝子 *Amy1A* 及び *Amy1C* の発現レベルはコシヒカリより有意に低かった。しかし, この α アミラーゼ遺伝子の発現抑制と背白及び基白発生率の減少との関係は本研究では不明であった。コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の種子休眠性はコシヒカリより強いが貯蔵後種子の発芽率は十分高く, 翌春の育苗には支障が無いことを確認した。以上の結果から, コシヒカリ NIL [*Sdr4*] は新たな品種候補となり得るばかりでなく, 穂発芽耐性や高温登熟耐性の改変のために有効な育種母本としても利用できる。

キーワード

コシヒカリ, 穂発芽耐性遺伝子, *Sdr4*, 高温登熟耐性, 準同質遺伝子系統, アミラーゼ遺伝子

緒 言

イネやコムギで問題となる穂発芽は, 種子が収穫前の穂についた状態で発芽してしまう現象で, これにより穀粒の品質や収量が大きく損なわれる。そのため水稲育種の現場では, 穂発芽性についての形質評価が重要な選抜項目の一つとして行われている (堀内 1996)。日本で広

く栽培されている水稲品種コシヒカリは穂発芽性が“難”の品種であるが (農林水産技術情報協会 1980), 倒伏しやすいために, 収穫時に穂が水没するような状況では, 穂発芽が発生し品質の低下を引き起こす危険性がある。また出穂後の積算温度が 1,100°C 以上になると急激に穂発芽が発生するという報告があるが (城戸ら 1991), 猛暑年であった 2010 年の福井県におけるコシヒカリの出穂期から刈取り適期 (籾水分 25% の時期) までの積算気温は約 1,060°C であったことなど, 近年の登熟期間の高温化傾向のもとでは穂発芽の危険性が高まる可能性がある。

穂発芽耐性は、一般に種子休眠性の程度によって大きく左右されることが知られている（池橋 1992）。イネでは、種子休眠性の品種間差異に関する研究や遺伝解析が古くから行われており、種子休眠性に関する遺伝子座が複数検出されている（三浦 2003）。Lin *et al.* (1998) は日本晴とインド型品種 Kasalath の交雑後代を利用した量的形質遺伝子座 (QTL) 解析によって、4 つの QTL を検出した。またそれらの内、第 7 染色体長腕に存在する穂発芽耐性遺伝子 *Sdr4* (*Os07g0585700*) が単離・同定され、Kasalath の *Sdr4* 遺伝子がより休眠を深め、その結果として穂発芽耐性を強くすることが明らかとなっている (Sugimoto *et al.* 2010)。

本研究では、コシヒカリの穂発芽耐性をさらに向上させるために、Kasalath の *Sdr4* 遺伝子を含むゲノム領域をコシヒカリの遺伝背景に置換した準同質遺伝子系統、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] を育成した。コシヒカリ NIL [*Sdr4*] について、穂発芽耐性の向上を確認するとともに、生産力検定試験及び食味官能試験により反復親であるコシヒカリとの同質性を評価した。

コシヒカリの種子休眠性は登熟初期（出穂期～出穂 10 日目ないし 15 日目）の低気温及び、それ以降の高気温により深くなることが報告されている（池橋 1967）。また高温登熟年では種子休眠が深くなり、翌年の育苗時まで休眠覚醒が完全にはなされずに、発芽勢や発芽率が劣る等のトラブルが水稻採種現場でしばしばみられる。従って休眠性を深めることで穂発芽耐性を向上させた場合、特に高温登熟下では、翌年の育苗時に発芽不良などの問題が生じる可能性がある。そこで、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] について、翌春まで貯蔵した後の発芽率を調査し育苗に問題がないかを検証した。

またコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の育成過程で、*Sdr4* 領域をもつ個体・系統において、玄米外観品質がコシヒカリより良い傾向が観察されたことから、高温登熟条件下で栽培した玄米の外観品質を調査して、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の高温登熟耐性を評価した。さらに、外観品質に大きく影響すると示唆されている α アミラーゼ遺伝子 (Hakata *et al.* 2012) について、コシヒカリとコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の発現量の違いを調査した。

材料及び方法

1. コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の育成

コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の育成は国立研究開発法人農業生物資源研究所（生物研）にて行った。農林水産省イネゲノム研究プロジェクトにより生物研イネゲノムリソースセンターで開発された染色体断片置換系統 (Ebitani *et al.* 2005) のうち、コシヒカリの第 7 染色体長腕領域に Kasalath の断片が導入された SL222 とコシヒカリとの交配を行った。この F_1 個体に実った F_2 94 個体、及びコシヒカリと SL222 をコントロールとしてゲノム DNA を抽

出し、SSR マーカーを用いて合計 96 サンプルの遺伝子型を調査した。これにより *Sdr4* 近傍から長腕側、RM1365 と RM3589 間で組換えが生じた 4 個体が得られた。得られた組換え個体の中から RM1365 がヘテロ型を示した 1 個体 (#53) の自殖後代 F_3 94 個体の中から、*Sdr4* の動原体側 RM3753 と RM1365 の間で組換えが生じた 1 個体 (#53-56) を選抜した。その自殖後代から *Sdr4* を含む置換断片が Kasalath 型に固定した F_4 個体を選抜し、これをコシヒカリ NIL [*Sdr4*] とした。このコシヒカリ NIL [*Sdr4*] について、RM6326, RM6066, RM6420 及び RM3589 によるタイピングを行い、置換領域の長腕側末端を特定した。形質評価には F_5 世代以降を使用した。

さらに、育成したコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の遺伝背景を、12 種類の染色体に分布する 279 個の一塩基多型 (SNP) (Nagasaki *et al.* 2010) で調査した。

2. 生産力検定試験

2011, 2012, 2013 及び 2014 年の 4 ヶ年、福井県農業試験場（福井農試）の水田圃場で、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] 及び比較としてコシヒカリの生産力検定試験を行った。播種日は、2011, 2012, 2013 及び 2014 年においてそれぞれ 4 月 14 日, 4 月 13 日, 4 月 12 日及び 4 月 9 日、移植日はそれぞれ 5 月 6 日, 5 月 10 日, 5 月 1 日及び 5 月 2 日で、1 株 3 本植えて 1 区あたり 80 株を栽植密度 20.7 株 m^{-2} で移植した。窒素肥料は基肥として各年それぞれ 0.60, 0.30, 0.30 及び 0.30 $kg a^{-1}$ 、穂肥としてそれぞれ 0.23, 0.20, 0.38 及び 0.40 $kg a^{-1}$ 施用した。病虫害防除及び水管理は慣行栽培に準じて行った。成熟期に 72 株を刈り取り、生脱穀後、籾水分約 15% まで乾燥した。籾摺り機 (FS20G, 株式会社佐竹製作所) を用いて籾摺りした後、篩目 1.9 mm で調製し、精玄米重を測定した。玄米外観品質は、背白、基白、心白、乳白及び穂発芽について 0~5 の間を 0.5 刻みの 11 段階で達観調査し、総合的に 1~9 の 9 段階で達観評価した。試験は 2 反復で行った。

精米機 (クリーンワンパス CBS300AS, 株式会社東北佐竹製作所) で搗精歩合 90~91% 程度に精米し、食味官能試験に供試した (福井・小林 1996)。2013 及び 2014 年の精米をサンプルミル (Cyclotec™ 1093, フォス・ジャパン株式会社) で粉碎し、アミロース含有率をオートアナライザ II (ビーエルテック株式会社) で測定した。

3. 食味官能試験

炊飯方法及び官能評価方法は、一般財団法人日本穀物検定協会の方法に準じた。すなわち、白米 900 g を水道水で 5 回洗米し、白米水分 14.1% のときに白米重量の 1.38 倍となるように計算して加水し、炊飯器 (IH SR-A10C, ナショナル) で炊飯した。炊飯終了後、攪拌し布巾をかけて 30 分放置してからプリンカップで皿に盛り付けた。パネルは福井農試の職員 18 名である。コシヒカリを基準

としてコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の外観, 香り, 味, 粘り, 硬さ及び総合の各項目を, -3~+3 の7段階で評価した. 2011 及び2012 年は1反復, 2013 及び2014 年は2反復で行った.

4. 穂発芽性検定試験

イネ育種マニュアル(堀内 1996)に従って穂発芽性検定を行った. 生産力検定試験における出穂後35日目の穂を5穂サンプリングし, 水道水(水温22~25°C)をかけ流した. 処理開始後10日目に穂発芽した割合を2~8の間を0.5刻みに分けた13段階で達観評価した.

5. 発芽試験

コシヒカリ及びコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の収穫直後から翌春の播種直前までの間における発芽率の変化を調査した. 発芽試験は収穫直後及び温度調節を行わない大型倉庫で貯蔵して4ヵ月及び6ヵ月後に行った. 収穫直後の試験には2014年産種子, 貯蔵後の試験には2012及び2013年産種子を用いた. ϕ 9 cmのシャーレにろ紙を敷き, 水道水を加えてろ紙を湿らせ, コシヒカリ及びコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の種子各50粒を並べた. シャーレを25°Cの恒温器に入れ, 処理開始後4, 5, 7, 10, 14日後に発芽した種子を数え発芽率を算出した. 2反復で行った. 本研究では処理開始後5日目の発芽率を発芽勢とした.

6. 高温登熟耐性試験

福井農試, 鹿児島県農業開発総合センター(鹿児島農総セ), 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所(作物研), 福岡県農林業総合試験場(福岡農林試)の水田圃場及び公立大学法人石川県立大学(石川県大)の隔壁型温度勾配温室(TGC, 中川ら2009)において, コシヒカリ及びコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の高温登熟耐性を評価した.

福井農試の高温登熟耐性試験は, 2010~2014年の5ヵ年, 無施肥の水田圃場及びハウスで行った. 高温登熟耐性の指標となる背白及び基白の発生は窒素の施用で低減させることが可能である(若松ら2008). 逆に窒素の施用を減らすことで背白及び基白の発生を増加させることができるため, 福井農試の高温登熟耐性試験は無施肥で行った. ハウスは水田圃場に建てられたH鋼ビニルハウスで, 内部の気温が35°Cを超えると換気することによって高温になりすぎないように調節した. 作物研での高温登熟耐性試験は2012及び2013年の2ヵ年, 水田圃場及び水田圃場に建てられた簡易ハウスで行った. 施肥量は窒素成分で0.6 kg a⁻¹とした. 鹿児島農総セでの高温登熟耐性試験は, 2012及び2013年の2ヵ年, 窒素成分で0.4 kg a⁻¹を基肥のみで施用した水田圃場で行った. 福岡農林試での高温登熟耐性試験は, 2012及び2013年の2ヵ年, 窒素成分で0.5 kg a⁻¹を基肥のみで施用した水田圃場で行

い, 出穂直前から成熟期まで35°Cの温水をかけ流した. 石川県大では, 2013年, 山砂を充填した1/5000 aワグネルポットにより屋外で栽培した材料を穂揃期から1~2日後にTGCへ移動し成熟期まで高温処理を行った. 窒素成分は基肥としてポットあたり0.5 g, 追肥は出穂23日前にポットあたり0.45 g施用した. TGCではT1, T2, T3の3区を設け, T1では外気追従とし, T2からT3とより高温での試験を行った(塚口ら2012).

高温登熟耐性の評価は各試験地の常法によって行った. すなわち, 福井農試試料及び作物研の2012年試料は福井農試において, 鹿児島農総セの2012及び2013年試料は鹿児島農総セにおいて, それぞれ目視により背白, 基白, 乳心白発生率をカウントした. 複数の障害が同一粒に同時に発生した場合は, それぞれの項目にカウントした. 福井農試試料及び鹿児島農総セの2013年試料については, 千粒重と整粒歩合も測定した. 作物研の2013年試料は, 玄米品質精密判別装置(RN-330, 株式会社ケット科学研究所)で背白, 基白, 乳心白発生率を測定した. 福岡農林試及び石川県大では, 穀粒判別器(RGQI20A, 株式会社サタケ)を用いて, 乳白粒, 基部未熟粒, 腹白未熟粒, 整粒率を測定した.

7. アミラーゼ遺伝子の発現解析

福井農試の2014年の高温登熟耐性試験におけるコシヒカリ及びコシヒカリ NIL [*Sdr4*] について, 開花後14日目に登熟途上の穀粒20粒を1サンプルとし, 圃場とハウスの各処理区について4反復のサンプリングを行った. また, 吸水試験では, 2014年に栽培したコシヒカリ及びコシヒカリ NIL [*Sdr4*] を開花後4週目に収穫し, 6週間室温で貯蔵した種子の吸水前と吸水後24時間経過した種子について, 4反復のサンプリングを行った.

発現解析に用いた全RNAは, フェノール/SDSとLiClを用いた方法(早川1997)に従って抽出したRNAを, さらにQIAGEN社のカラム(RNeasy Mini Kit Cat. No. 74106)で精製した. cDNA合成は東洋紡社のキット(ReverTra Ace qPCR RT Master Mix Cat.No.FSQ-201)を用い, 取扱説明書に従って行った. 得られたcDNAをプレートに用いて, α アミラーゼ遺伝子*Amy1A*, *Amy1C*, *Amy3D*及び*Amy3E*について発現解析を行った. リアルタイムPCR反応には東洋紡社のキット(THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix Cat.No.QPS-201)を用い, Applied Biosystem社の7900HT Fast Real Time PCR Systemで解析を行った. 内在性コントロールには, ユビキチン5遺伝子を用いてデータの標準化を行った. プライマー配列は*Amy1A* (*Os02g0765600*) 5'-GAT ACG ACG TCG AAC ACC TC-3'及び5'-CGG ATC GGA TAC AGC TCG TTG-3', *Amy1C* (*Os02g0765400*) 5'-TAT CAT GGA GGC TGA CAG CG及び5'-GCT AAT TGT GCC TCT CCA CC-3', *Amy3D* (*Os08g0473900*) 5'-GTA GGC AGG CTC TCT AGC CT-3'及び5'-CCA ACG GTT ACA AAC TGC GTG A-3', *Amy3E*

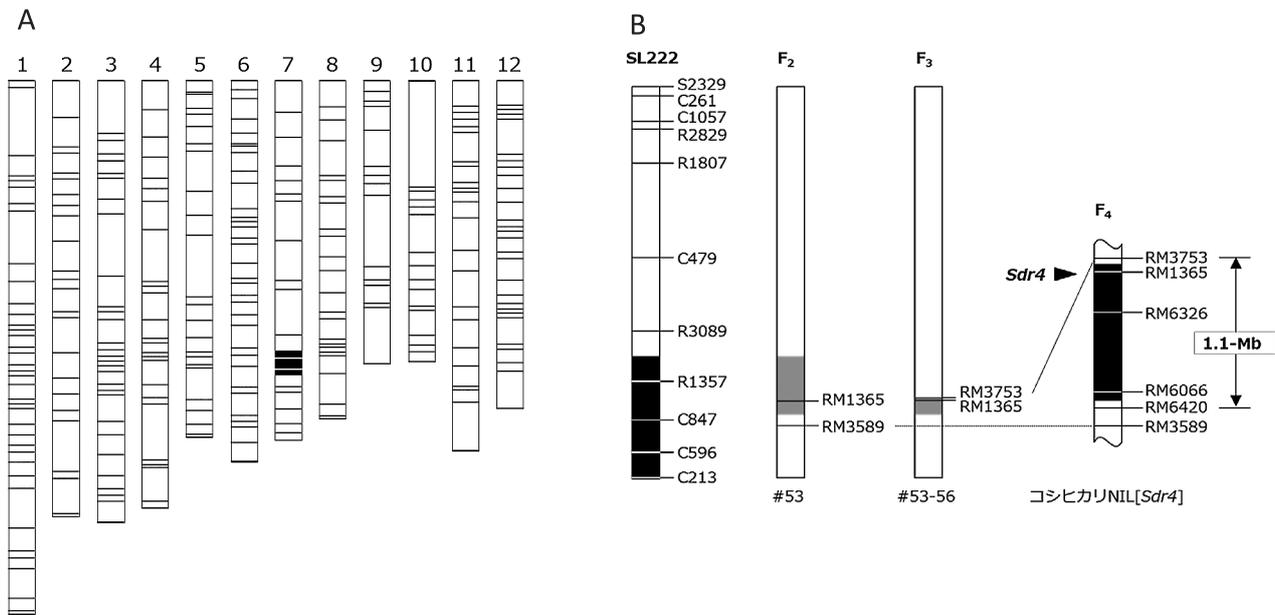


図 1. コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の全ゲノムのグラフ遺伝子型 (A) 及び育成過程に用いた個体の第 7 染色体グラフ遺伝子型 (B).

A, 白: コシヒカリ型, 黒: Kasalath 型の遺伝子型を示す.

B, 白: コシヒカリ型, 灰: ヘテロ型, 黒: Kasalath 型の遺伝子型を示す.

表 1. コシヒカリと準同質遺伝子系統コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の穂発芽程度¹⁾

年次	2011	2012	2013	2014	評価
コシヒカリ	3.0	5.0	3.0	3.0	難 ²⁾
コシヒカリ NIL [<i>Sdr4</i>]	2.0	3.0	2.5	2.5	コシヒカリより難 ³⁾

¹⁾ 出穂後 35 日目の穂について、流水処理開始後 10 日目の穂発芽程度 2-8 の間を 0.5 刻みの 13 段階で達観評価.

²⁾ 稲種苗特性分類調査報告書に基づく分類.

³⁾ Fisher の正確確率検定により 1%水準で有意.

(*Os08g0473600*) 5'-GAA GGA AGG CCT CAG GGT TC-3'及び 5'-GCT CGT ACA CAT CTC GCA GCA-3', *UBQ5* (*Os01g0328400*) 5'-ACC ACT TCG ACC GCC ACT ACT-3'及び 5'-ACG CCT AAG CCT GCT GGT T-3'である.

結果

1. 育成したコシヒカリ NIL [*Sdr4*] のグラフ遺伝子型

準同質遺伝子系統として選抜したコシヒカリ NIL [*Sdr4*] は、コシヒカリと Kasalath の間で多型を示す 279 個の SNP マーカーの内 *Sdr4* 近傍の 2 個以外は全てがコシヒカリ型であった (図 1A). 第 7 染色体の *Sdr4* 領域については、SSR マーカー RM6420-RM6066 及び RM3753-RM1365 で挟まれる約 1.1 Mb の断片が Kasalath 型に置換されていた (図 1B).

2. 穂発芽性及び貯蔵による発芽率の変化

コシヒカリ及びコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の穂発芽性検定試験における調査結果では、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の穂発芽耐性はコシヒカリより有意に高かった (表 1).

収穫直後に行った発芽試験における試験開始後 5 日目

の発芽率、すなわち発芽勢は、コシヒカリ及びコシヒカリ NIL [*Sdr4*] とともに 1%程度で有意な差はみられなかったが、試験開始後 14 日目の発芽率ではコシヒカリ NIL [*Sdr4*] はコシヒカリより有意に低かった (図 2A). 4 ヶ月貯蔵後の発芽勢は、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] ではコシヒカリより有意に低かったが (図 2B), 6 ヶ月貯蔵後の発芽勢に有意な差はみられなかった (図 2C). 14 日目の発芽率は 4 ヶ月貯蔵後及び 6 ヶ月貯蔵後のいずれにおいても 90%を超え、コシヒカリとの間に有意な差は認められなかった.

3. 生産力検定

4 ヶ年の生産力検定試験の結果を表 2 に示した. 4 ヶ年ともほぼ同じ傾向が認められ、到穂日数はコシヒカリ、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] とともに 82 日で有意な差はみられなかった. 稈長は両者とも 97 cm で有意な差はみられず、穂長はコシヒカリよりコシヒカリ NIL [*Sdr4*] が 0.4 cm 長く ($P < 0.05$), 穂数はコシヒカリ NIL [*Sdr4*] が 28 本 m^{-2} 多かったが、有意な差はみられなかった. また、成熟期の草型及び倒伏程度も同等で、精玄米重及び千粒重においてもコシヒカリ及びコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の間に有意

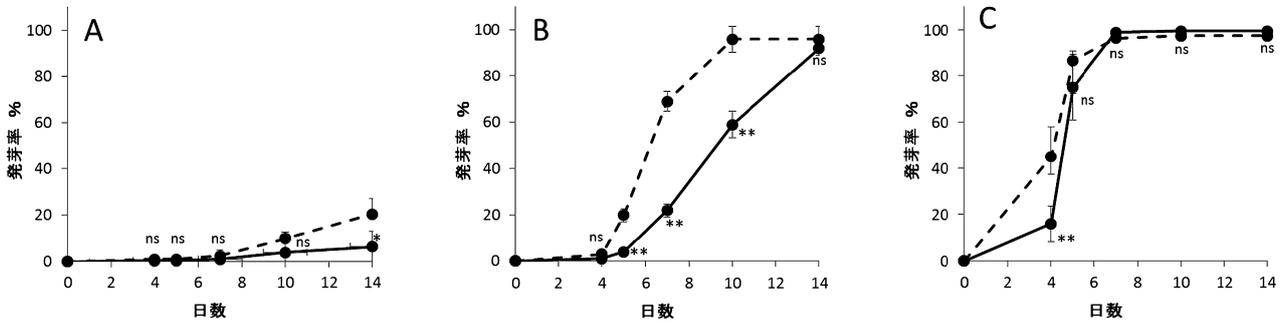


図2. コシヒカリ及びコシヒカリ NIL [Sdr4] における種子発芽率の変化。

A : 収穫直後, B : 4 ヶ月貯蔵後, C : 6 ヶ月貯蔵後。

破線 : コシヒカリ, 実線 : コシヒカリ NIL [Sdr4]。

エラーバーは標準偏差を示す。

**, *, ns : コシヒカリとコシヒカリ NIL [Sdr4] 間の *t* 検定において 1%水準で有意, 5%水準で有意, 有意でない。

表2. コシヒカリと準同質遺伝子系統コシヒカリ NIL [Sdr4] の主要農業特性

系統名 または 品種名	年次	移植日 (月,日)	出穂期 (月,日)	倒穂 日数 (月,日)	稈長 (cm)	穂長 (cm)	穂数 (本 m ⁻²)	精玄米重 (kg a ⁻¹)	標準 比 (%)	千粒 重 (g)	倒伏 (0-5)	玄米外観品質						アミロース 含有率 (%)
												総合 (1- 9)	基白 (0- 5)	背白 (0- 5)	乳白 (0- 5)	心白 (0- 5)	穂発芽 (0-5)	
コシヒカリ	2011	5/6	7/26	80	109	17.7	549	54.3	100	22.0	5.0	3.7	0.3	0.3	0.8	0.5	0.5	—
	2012	5/10	7/31	81	90	17.8	426	57.8	100	23.2	2.0	3.9	1.0	2.5	0.5	1.5	0.0	—
	2013	5/1	7/25	84	96	18.6	445	57.7	100	22.2	5.0	3.6	0.0	0.5	0.5	1.0	0.0	15.9
	2014	5/2	7/26	84	93	18.3	435	54.5	100	22.4	3.0	4.0	0.8	1.0	3.0	0.8	0.0	15.8
	平均	5/4	7/27	82	97	18.1	464	56.1	100	22.5	—	—	—	—	—	—	—	15.9
コシヒカリ NIL [Sdr4]	2011	5/6	7/25	79	110	17.9	553	54.9	101	22.2	5.0	3.7	0.3	0.0	1.3	0.5	0.0	—
	2012	5/10	7/30	80	90	18.0	441	56.7	98	22.6	2.0	3.9	1.0	1.0	0.5	2.0	0.0	—
	2013	5/1	7/25	84	95	19.2	497	59.4	103	22.4	5.0	3.6	0.0	0.3	0.5	0.8	0.0	15.7
	2014	5/2	7/26	84	94	19.0	476	55.8	102	21.6	3.0	4.0	0.8	1.0	3.0	1.0	0.0	15.6
	平均	5/4	7/26	82	97	18.5	492	56.7	101	22.2	—	—	—	—	—	—	—	15.7
	有意差 ¹⁾	—	—	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	—	—	—	—	—	—	—	—

施肥窒素成分量 (kgN a⁻¹) 2011年 : 0.83, 2012年 : 0.50, 2013年 : 0.68, 2014年 : 0.70。

¹⁾ *, ns : コシヒカリとコシヒカリ NIL [Sdr4] の間の *t* 検定において 5%水準で有意, 有意でない。

な差はみられなかった。

玄米外観品質の総合評価及び基白達観評価では, 全ての年次において差はみられなかった。一方, 背白達観評価では, コシヒカリ NIL [Sdr4] は全ての年次においてコシヒカリの評価値以下であった。乳白達観評価では, コシヒカリ NIL [Sdr4] は 2011 年ではコシヒカリより大きく, その他の 3 ヶ年ではコシヒカリと同じであった。心白達観評価では, 2011 年はコシヒカリ NIL [Sdr4] はコシヒカリと同じであり, 2012 及び 2014 年ではコシヒカリより大きく, 2013 年はコシヒカリより小さかった。2011 年の穂発芽程度は, コシヒカリ 0.5 に対し, コシヒカリ NIL [Sdr4] は 0.0 であり, その他の年次は両者とも 0.0 であった。

4. 食味官能試験

コシヒカリ NIL [Sdr4] とコシヒカリのアミロース含有率の平均値の差は 0.2 ポイントであった (表 2)。また, 4 ヶ年の食味官能試験の結果を表 3 に示した。2012 年産米及び 2014 年産米を用いた 2 回の試験のうち 1 回では, コシヒカリ NIL [Sdr4] の外観が有意にコシヒカリより優れていた。2013 年産米の 2 回の試験のうち 1 回では, コ

シヒカリ NIL [Sdr4] の味は有意にコシヒカリより優れていた。2013 年産米及び 2014 年産米の 2 回の試験のうち 1 回では, コシヒカリ NIL [Sdr4] はコシヒカリより有意に粘りが強く軟らかい結果となった。しかし 4 年間を通じて総合評価には有意な差はみられず, コシヒカリとコシヒカリ NIL [Sdr4] はほぼ同等の食味を有していると判断された。

5. 高温登熟耐性試験

高温登熟耐性試験を行った 5 試験地における登熟気温は, 全ての試験区で, 玄米外観品質の劣化が増加する閾値 26~27°C (森田 2008) 以上であった (表 4)。福井農試, 作物研及び鹿児島農総セにおけるハウス区の登熟気温は, 圃場区より 1.3°C~2.7°C 高かった。

玄米外観品質及び千粒重について, 対応のある 2 群の平均値の差の *t* 検定を行った。その結果, コシヒカリ NIL [Sdr4] の整粒歩合はコシヒカリより有意に高く, 背白発生率及び基白発生率はコシヒカリより有意に低かった (表 4)。一方, 乳心白発生率及び千粒重に関しては, 両者の間に有意な差はみられなかった。高温登熟耐性の指標としてしばしば用いられる背白+基白発生率及び乳心白発

表3. コシヒカリと比較した準同質遺伝子系統コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の食味官能試験結果

年次	外観	香り	味	粘り	硬さ	総合
2011	0.17 ns	0.00 ns	0.00 ns	-0.08 ns	-0.13 ns	-0.13 ns
2012	0.54 **	0.08 ns	0.08 ns	0.25 ns	-0.13 ns	0.08 ns
2013	0.11 ns	0.11 ns	0.22 *	0.28 *	-0.28 *	0.06 ns
	0.06 ns	0.11 ns	0.17 ns	0.00 ns	-0.06 ns	0.00 ns
2014	0.28 **	-0.11 ns	0.06 ns	0.17 *	-0.50 **	0.00 ns
	-0.06 ns	0.00 ns	0.17 ns	-0.17 ns	0.17 ns	-0.06 ns

** , * , ns : コシヒカリと比べて1%水準で有意, 5%水準で有意, 有意でない.

表4. コシヒカリと準同質遺伝子系統コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の高温登熟耐性の違い

試験地	年次	処理区	調査方法	出穂期	登熟 気温 (°C ¹⁾)	コシヒカリ					コシヒカリ NIL [<i>Sdr4</i>]				
						背白 % ²⁾	基白 % ²⁾	乳心白 % ²⁾	整粒 % ²⁾	千粒重 g	背白 % ²⁾	基白 % ²⁾	乳心白 % ²⁾	整粒 % ²⁾	千粒重 g
福井農試	2010	圃場	目視	7月26日	29.2	71.0	24.0	12.0	1.0	21.0	13.0	49.0	19.5	22.0	20.5
		ハウス	目視	7月19日	31.1	61.1	22.0	21.9	1.8	19.8	42.2	38.0	30.2	4.2	19.8
	2011	圃場	目視	7月24日	28.0	60.2	22.8	23.4	10.1	20.8	20.8	15.2	16.4	53.9	20.8
		ハウス	目視	7月19日	29.4	64.3	17.0	32.7	9.3	20.5	29.0	19.3	42.7	22.3	20.7
	2012	圃場	目視	7月29日	28.1	28.7	32.0	0.8	3.5	21.4	8.2	23.6	2.9	55.0	21.4
		ハウス	目視	7月24日	30.8	53.3	2.4	30.2	3.1	20.5	22.6	2.4	32.0	29.3	20.6
	2013	圃場	目視	7月22日	26.3	70.7	16.5	17.7	7.8	20.3	35.3	27.5	14.0	29.7	20.7
		ハウス	目視	7月18日	28.0	20.5	24.0	25.3	39.8	18.5	13.7	21.7	26.0	46.2	18.2
	2014	圃場	目視	7月29日	26.0	8.1	28.7	0.0	65.7	23.2	7.5	20.6	1.1	72.2	22.5
		ハウス	目視	7月26日	28.3	22.5	23.0	13.4	47.2	20.9	12.9	22.1	11.2	59.0	20.7
作物研	2012	圃場	目視	8月1日	27.5	29.2	51.9	9.7	— ³⁾	—	5.0	35.3	3.7	—	—
		ハウス	目視	8月5日	28.8	11.3	23.9	40.1	—	—	11.8	14.4	44.7	—	—
	2013	圃場	RN-330	8月7日	28.1	26.9	19.5	1.6	—	—	16.9	8.1	6.0	—	—
		ハウス	RN-330	8月7日	29.6	14.6	1.7	33.4	—	—	7.6	0.9	46.8	—	—
鹿児島 農総セ	2012	圃場	目視	7月17日	27.9	13.0	42.0	6.0	37.0	—	1.3	24.3	2.7	65.3	—
		ハウス	目視	7月16日	29.8	29.5	54.0	7.5	1.0	—	10.5	36.0	11.0	18.5	—
	2013	圃場	目視	7月14日	28.4	20.0	56.0	1.7	19.3	19.9	3.3	32.3	1.7	52.7	20.5
		ハウス	目視	7月11日	29.7	5.5	63.0	6.0	11.5	19.5	2.5	40.5	14.5	24.5	19.0
石川県	2013	T1	RGQI20A	8月8日	27.4	—	19.2	6.0	63.7	—	—	13.1	15.6	55.8	—
立大		T2	RGQI20A	8月8日	29.5	—	37.2	33.1	17.7	—	—	29.4	31.8	18.7	—
TGC		T3	RGQI20A	8月8日	31.0	—	21.6	61.3	5.0	—	—	18.6	65.1	4.4	—
福岡	2012	温水掛流し	RGQI20A	7月27日	28.6	—	24.2	23.5	21.7	—	—	20.5	20.6	21.5	—
農林試	2013	温水掛流し	RGQI20A	7月24日	28.9	—	14.7	8.5	60.7	—	—	4.3	8.9	70.2	—
P値 ⁴⁾										6.7E-05	0.036	0.052	3.8E-04	0.522	
有意差 ⁵⁾										**	*	ns	**	ns	

¹⁾ 出穂後20日間の平均気温.

²⁾ 目視判定では、複数の障害が同一粒に発生した場合はそれぞれの項目にカウントしたため合計は100%を超える場合がある.

³⁾ 「—」は測定していない項目.

⁴⁾ コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の形質値がコシヒカリの形質値に対して差がある確率 P を、対応のある2群の平均値の差の t 検定によって計算した.

⁵⁾ **, *, ns : 1%水準で有意, 5%水準で有意, 有意でない.

生率について、コシヒカリとコシヒカリ NIL [*Sdr4*] を比較した (図3). コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の背白+基白発生率はコシヒカリより有意に低かった ($P<0.001$). 乳心白発生率では両者の間に有意な差はみられなかった ($P=0.052$).

6. α アミラーゼ遺伝子の発現解析

コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の α アミラーゼ遺伝子 *Amy1A* の開花後14日目の穀粒における発現レベルは、圃場区、ハウス区ともにコシヒカリより有意に低かった (図4A). *Amy1C* の発現レベルでは圃場区ではコシヒカリとの有意な差はみられず、ハウス区ではコシヒカリより有意に低かった (図4B). 一方、*Amy3D* の発現レベルは圃場区で

はコシヒカリとの間で有意な差はみられず、ハウス区ではコシヒカリより有意に高かった (図4C). *Amy3E* の発現レベルでは、圃場区、ハウス区ともにコシヒカリとの有意な差はみられなかった (図4D).

コシヒカリ NIL [*Sdr4*] が休眠性を保持している開花後4週目に収穫、6週間室温保存した種子に吸水処理を施し、発芽時の α アミラーゼ遺伝子の応答を調べた. その結果、吸水処理後24時間における *Amy1A* と *Amy1C* についてはコシヒカリに対して有意な発現の抑制がみられた (図4E, F). 一方、*Amy3D* では有意な差はみられず (図4G), *Amy3E* では有意な発現の上昇がみられた (図4H).

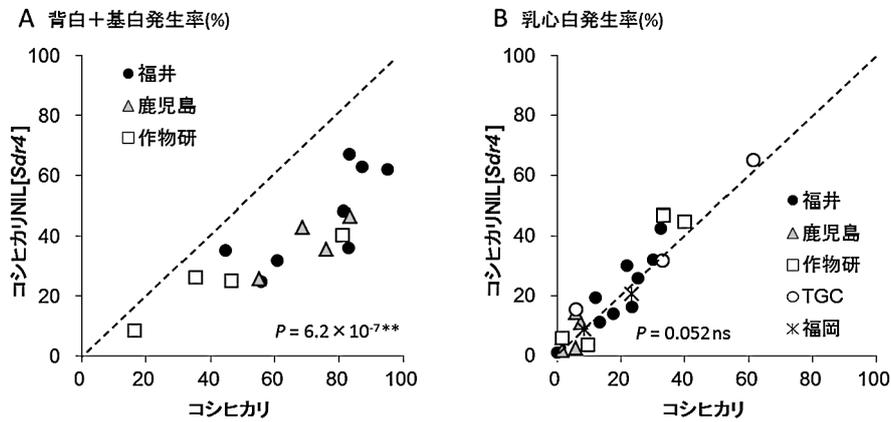


図3. 高温登熟耐性試験におけるコシヒカリ及びコシヒカリ NIL [Sdr4] の背白+基白発生率 (A) 及び乳心白発生率 (B).
それぞれの図中に、コシヒカリとコシヒカリ NIL [Sdr4] 間の t 検定における P 値を示す。

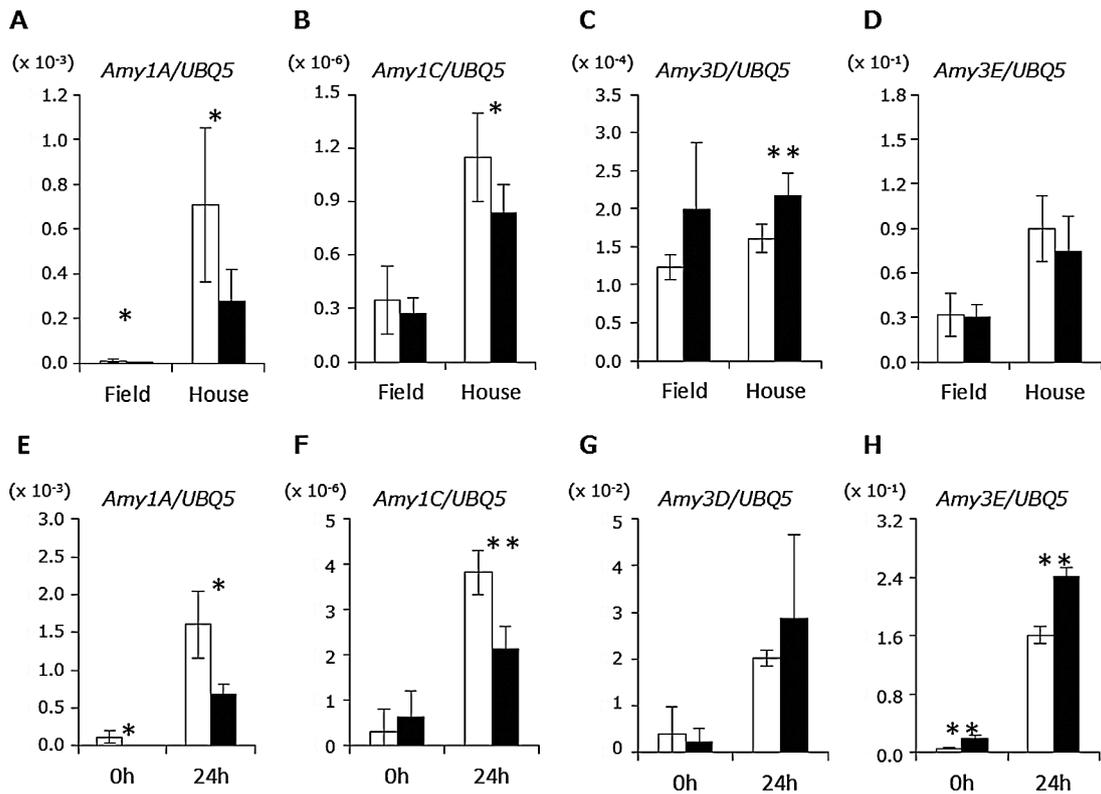


図4. 種子における α アミラーゼ遺伝子の高温あるいは吸水による発現誘導。
上段 (A, B, C, D) は α アミラーゼ遺伝子の圃場区 (Field) とハウス区 (House) による発現レベルを示し、下段 (E, F, G, H) は吸水前 (0 h) と吸水後 (24 h) の発現レベルを示した。
A, E : $Amy1A$, B, F : $Amy1C$, C, G : $Amy3D$, D, H : $Amy3E$.
□ : コシヒカリ, ■ : コシヒカリ NIL [Sdr4].
エラーバーは標準偏差を示す。
**, * : コシヒカリとコシヒカリ NIL [Sdr4] 間の t 検定において 1%水準で有意, 5%水準で有意。

考察

育成した準同質遺伝子系統コシヒカリ NIL [Sdr4] では、第7染色体の $Sdr4$ 領域 (約 1.1 Mb) 以外は Kasalath の残存領域は確認されなかった (図1)。

コシヒカリ NIL [Sdr4] の穂発芽耐性はコシヒカリより

有意に向上していたことから、Kasalath の穂発芽耐性遺伝子 $Sdr4$ の効果はコシヒカリの遺伝背景でも十分発揮されることを確認できた。コシヒカリは倒伏しやすい品種であり、2011年の生産力検定試験のコシヒカリは倒伏して穂が水没した結果、穂発芽程度は0.5となったが、コシヒカリ NIL [Sdr4] は同程度倒伏したにも関わらず穂発

芽程度は0.0であった。このように、コシヒカリの穂発芽性を向上させたコシヒカリ NIL [*Sdr4*] は、実用的な有用性を有することが明らかとなった。

生産力検定試験及び食味官能試験の結果から、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] では Kasalath 由来の *Sdr4* 遺伝子周辺にある多数の遺伝子が置換されているにも関わらず、これらの遺伝子はコシヒカリの食味も含めた主要農業形質に大きな影響を及ぼしてはいないと考えられる。

研究開始当初は *Sdr4* 領域の置換によって高温登熟耐性が変化することは想定されていなかったが、作成した NIL 系統において高温登熟耐性への影響が認められたことから、本研究において高温登熟耐性試験を行った。その結果、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の高温登熟耐性試験における背白及び基白発生率はコシヒカリより有意に低く、コシヒカリより強い高温登熟耐性を有することが示された (表4, 図3)。この原因としては、*Sdr4* の多面発現もしくは置換領域に含まれる別の Kasalath 由来の遺伝子の効果が考えられる。コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の高温登熟耐性の向上については、*Sdr4* 以外の作用も含めて、今後その原因を明らかにする必要がある。

高温条件下で登熟したコシヒカリ NIL [*Sdr4*] では、開花後14日目の穀粒における *Amy1A* 及び *Amy1C* の発現レベルがコシヒカリより有意に低かった (図4A, B)。*Sdr4* の発現により発芽後に働く遺伝子群の発現が抑制される (Sugimoto *et al.* 2010) ことから、種子の発芽に必須である α アミラーゼ遺伝子の発現も *Sdr4* によって抑制されている可能性が示唆された。そこで、吸水処理後24時間の種子における α アミラーゼ遺伝子の発現を調べた結果、*Amy1A* と *Amy1C* は発現が抑制されていた (図4E, F)。一方、高温での *Sdr4* による影響が明確ではない *Aym3D* と *Amy3E* では吸水応答に関しても有意な差がみられない、あるいは、逆の効果がみられた (図4G, H)。Yamakawa *et al.* (2007) は、高温及び平温登熟条件下での登熟関連遺伝子の発現を網羅的に解析し、高温で α アミラーゼ遺伝子の発現が上昇することを報告した。さらに、高温で発生する白濁粒の原因遺伝子の一つが α アミラーゼ遺伝子であることが明らかとなった (Hakata *et al.* 2012)。本研究では、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] において一部の α アミラーゼ遺伝子の発現が低下し、背白及び基白発生が減少した。これらの関係については現在のところ不明であるが、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] における α アミラーゼ遺伝子の高温による誘導抑制と吸水時の抑制に緩やかな相関がみられたことから、高温ストレスと発芽プロセスの間に類似したメカニズムが存在することも考えられる。本研究では準同質遺伝子系統を用いており、置換領域に座乗する *Sdr4* 以外の遺伝因子による影響である可能性は排除できないことから、*Sdr4* 変異体、あるいは、*Sdr4* 遺伝子を導入した組換え系統による検証が必要である。高温登熟耐性の改良のためには本報告で得られた知見等を基に、背白及び基白発生のメカニズムを解明する必要がある。

種子休眠性を高めて穂発芽耐性を強化する場合、翌年以降の栽培における育苗への悪影響 (発芽率の低下) は充分注意する必要がある。本研究では、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] について収穫直後と常温貯蔵後の発芽率を調査した。収穫直後はコシヒカリ、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] ともに休眠しており発芽勢は両者とも1%程度で有意な差はみられなかった (図2A)。一方コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の14日目の発芽率はコシヒカリより有意に低く、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の休眠はコシヒカリより強いことが示唆された。4ヵ月貯蔵後も種子休眠性の影響がやや残っており、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の発芽勢はコシヒカリに比べて有意に低下していた (図2B)。6ヵ月貯蔵後には、*Sdr4* の影響が軽減され、発芽勢は60%を超え、コシヒカリとの間に有意な差はみられなかった (図2C)。4ヵ月貯蔵後以降の14日目の発芽率は90%を超え、種子としての発芽に問題はないことを確認した。また、福井農試で行った生産力検定試験では4月9~14日に播種を行ったが、育苗時にコシヒカリ NIL [*Sdr4*] の発芽や生育が遅いといった問題は観察されなかった。以上のことから、コシヒカリ NIL [*Sdr4*] の休眠性は翌春の発芽にやや影響を与えているものの、6ヵ月程度の常温貯蔵によって、育苗にはほぼ支障がないレベルであると考えられた。

以上のことから、本研究で育成したコシヒカリ NIL [*Sdr4*] は、主要農業形質はコシヒカリとほぼ同等で、穂発芽耐性及び高温登熟耐性はコシヒカリより向上しており、特に背白及び基白に対して抑制効果を持つことから、今後予想される気候変動下の水稲栽培にとって、品種的な適応策に用いることのできる有望な育種素材であると考えられる。

謝辞

本研究は農林水産省の新農業展開ゲノムプロジェクト (IPG0010) 及び気候変動プロジェクト (1202) の支援を受け実施した。

引用文献

- Ebitani, T., Y. Takeuchi, Y. Nonoue, T. Yamamoto, K. Takeuchi and M. Yano (2005) Construction and evaluation of chromosome segment substitution lines carrying overlapping chromosome segments of *indica* rice cultivar 'Kasalath' in a genetic background of *japonica* elite cultivar 'Koshihikari'. *Breed. Sci.* 55: 65-73.
- 福井清美・小林 陽 (1996) 食味官能検査, “イネ育種マニュアル” 山本隆一・堀末登・池田良一 (共編), 養賢堂, 東京. 74-76.
- Hakata, M., M. Kuroda, T. Miyashita, T. Yamaguchi, M. Kojima, H. Sakakibara, T. Mitsui and H. Yamakawa (2012) Suppression of α -amylase genes improves quality of rice grain ripened under high temperature. *Plant Biotechnol. J.* 10: 1110-1117.
- 早川孝彦 (1997) 2-2-4 タバコの DNA・RNA 単離法, 細胞工学

- 別冊植物細胞工学シリーズ2 “植物のPCR 実験プロトコール” 島本功・佐々木卓治監修, 秀潤社, 東京. 45-53.
- 堀内久満 (1996) 穂発芽性の検定, “イネ育種マニュアル” 山本隆一・堀末登・池田良一 (共編), 養賢堂, 東京. 149-150.
- 池橋 宏 (1967) 環境による水稻の発芽性の変動とその検定・選抜方法 I. 登熟中の温度が発芽に及ぼす影響. 育種学雑誌 17: 144-149.
- 池橋 宏 (1992) 穂発芽性, “日本の稲育種” 榑淵欽也監修, 農業技術協会, 東京. 360-365.
- 城戸康博・松江勇次・矢野雅彦 (1991) 水稻極早生良食味品種における枝梗着生部位別の穂発芽性. 日作九支報 58: 34-36.
- Lin, Y., T. Sasaki and M. Yano (1998) Mapping quantitative trait loci controlling seed dormancy and heading date in rice, *Oryza sativa* L., using backcross inbred lines. Theor. Appl. Genet. 96: 997-1003.
- 三浦清之 (2003) 水稻直播適性品種育成のための種子発芽性および苗立ち性に関する遺伝育種学的研究. 生物研究資料 No. 2 : 1-44.
- 森田 敏 (2008) イネの高温登熟障害の克服に向けて. 日作紀 77: 1-12.
- Nagasaki, H., K. Ebana, T. Shibaya, J. Yonemaru and M. Yano (2010) Core single-nucleotide polymorphisms—a tool for genetic analysis of the Japanese rice population. Breed. Sci. 60: 648-655.
- 中川博視・塚口直史・山田浩史・山村達也 (2009) 隔壁型温度勾配温室の開発. 日作紀 8 (別 1) : 180-181.
- 農林水産技術情報協会 (1980) 稲種苗特性分類調査報告書. 35.
- Sugimoto, K., Y. Takeuchi, K. Ebana, A. Miyao, H. Hirochika, N. Hara, K. Ishiyama, M. Kobayashi, Y. Ban, T. Hattori and M. Yano (2010) Molecular cloning of *Sdr4*, a regulator involved in seed dormancy and domestication of rice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 5792-5797.
- 塚口直史・山村達也・井上裕則・中川博視・村上佳矢・北恵利佳 (2012) コシヒカリにおける胚乳断面の白濁タイプが異なる乳白粒発生率の登熟温度および炭水化物供給に対する反応性. 日作紀 81: 267-274.
- 若松謙一・佐々木修・上菌一郎・田中明男 (2008) 水稻登熟期の高温条件下における背白米の発生に及ぼす窒素施肥量の影響. 日作紀 77: 424-433.
- Yamakawa, H., T. Hirose, M. Kuroda and T. Yamaguchi (2007) Comprehensive expression profiling of rice grain filling-related genes under high temperature using DNA microarray. Plant Physiol. 144: 258-277.

Development of a near isogenic line of ‘Koshihikari’ with a seed dormancy gene and an evaluation of its resistance to heat-induced quality decline

Asako Kobayashi¹⁾, Kazuhiko Sugimoto²⁾, Takeshi Hayashi¹⁾, Motohiko Kondo^{3,10)}, Junya Sonoda^{4,7)}, Tadashi Tukaguchi⁵⁾, Takuya Wada⁶⁾, Utako Yamanouchi²⁾, Norio Iwasawa^{3,8)}, Masahiro Yano^{2,9)} and Katsura Tomita¹⁾

¹⁾ *Fukui Agricultural Experiment Station, Fukui 918-8215, Japan*

²⁾ *National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba 305-8602, Japan*

³⁾ *NARO Institute of Crop Science, Tsukuba 305-8518, Japan*

⁴⁾ *Kagoshima Prefectural Institute for Agricultural Development, Kagoshima 899-3401, Japan*

⁵⁾ *Ishikawa Prefectural University, Nonouchi 921-8836, Japan*

⁶⁾ *Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino 818-8549, Japan*

⁷⁾ *Present address: Kagoshima Prefectural government*

⁸⁾ *Present address: Ibaraki Agricultural Center*

⁹⁾ *Present address: NARO Institute of Crop Science*

¹⁰⁾ *Present address: Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University*

A near isogenic line carrying the *Sdr4* (seed dormancy 4) region from the *indica* cultivar ‘Kasalath’ on a ‘Koshihikari’ genetic background was developed and named Koshihikari NIL [*Sdr4*]. Performance tests showed that the main agricultural properties of Koshihikari NIL [*Sdr4*], including its culm length, heading date, yield, and eating quality, were not significantly different from those of ‘Koshihikari’. Koshihikari NIL [*Sdr4*] exhibited significantly less pre-harvest sprouting than ‘Koshihikari’, indicating that the *Sdr4* gene is effective on the ‘Koshihikari’ genetic background. In addition, Koshihikari NIL [*Sdr4*] demonstrated significantly lower frequencies of white-back and basal-white kernels than ‘Koshihikari’ in the presence of high temperature conditions during the ripening period. This showed that Koshihikari NIL [*Sdr4*] is more resistant to heat-induced quality decline than ‘Koshihikari’. Koshihikari NIL [*Sdr4*] displayed significantly lower kernel expression levels of the α -amylase genes *Amy1A* and *Amy1C* than ‘Koshihikari’ at 14 days after flowering. However, the relationship between the downregulation of the expression of these genes and the greater resistance to heat-induced quality decline seen in Koshihikari NIL [*Sdr4*] remains unclear. Although the seed dormancy of Koshihikari NIL [*Sdr4*] seemed to be deeper than that of ‘Koshihikari’, the germination rate of preserved Koshihikari NIL [*Sdr4*] seeds was sufficiently high for them to be used in a seedling nursery at the next spring. In summary, Koshihikari NIL [*Sdr4*] is a candidate for a new cultivar that exhibits improved pre-harvest sprouting and greater resistance to heat-induced quality decline.

Key Words: Koshihikari, pre-harvest sprouting resistance gene, *Sdr4* (seed dormancy 4), resistance to heat-induced quality decline, near isogenic line, amylase genes.
