

イネ穂ばらみ期耐冷性に関する量的形質遺伝子座の解析

黒木 慎

目 次

I. 緒論	23	IV. 北海 PL9の穂ばらみ期耐冷性・出穂期・稈長に関する QTL の検出	37
II. 染色体8の穂ばらみ期耐冷性		1. はじめに	37
QTL のマッピング	25	2. 材料および方法	37
1. はじめに	25	1) 供試材料	37
2. 材料および方法	25	2) 形質評価	37
1) 供試材料	25	3) DNA マーカー解析	38
2) 穂ばらみ期耐冷性の評価	26	4) QTL 解析ならびに統計解析	38
3) DNA 抽出と PCR 増幅	26	3. 結果	38
4) 穂ばらみ期耐冷性の QTL マッピング	26	1) 調査形質の変異	38
3. 結果	27	2) 形質間の相関	38
1) 穂ばらみ期耐冷性に関する		3) 遺伝地図の作成	40
single marker analysis	27	4) QTL の検出	40
2) 穂ばらみ期耐冷性の区間マッピング	28	(1) 穂ばらみ期耐冷性	40
3) <i>qCTB8</i> の置換マッピング	29	(2) 出穂期	42
4. 考察	31	(3) 稈長	42
III. 初雫の穂ばらみ期耐冷性 QTL 解析	32	5) 耐冷性 QTL の集積効果	42
1. はじめに	32	4. 考察	43
2. 材料および方法	32	V. 総合考察	45
1) 供試材料	32	1. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子の解析	45
2) 穂ばらみ期耐冷性の評価	33	2. 穂ばらみ期耐冷性 QTL の育種利用に向けて	46
3) 分子マーカー解析ならびに QTL 解析	33	VI. 摘要	48
3. 結果	33	謝辞	49
1) 形質変異	33	引用文献	50
2) 多型検出と連鎖地図の構築	33	英文摘要	54
3) QTL 解析	33		
4. 考察	36		

I. 緒 論

イネは亜熱帯に起源する冷温感受性の作物であり、冷温に遭遇すると不稔や生育遅延などの障害を受ける。例えば、北海道では1884～2002年の119年間に24回、平均すると4年に1回の割合で冷害が発生している(丹野, 2004)。最近でも1993年には作況

指数40, 2003年は同73, そして、2009年は同89と大きな被害が生じた。近年、地球温暖化が問題となっていることから、冷害の危険性は一見少なくなっているように感じられる。二酸化炭素をはじめとする温室効果ガス濃度の増大により、1906～2005年の100年間における全地球上の気温は0.74℃上昇したとされている(Intergovernmental Panel for Climate Change 2007)。しかし、温暖化の進行に伴って平均気温が上昇する一方で、冷害が発生する可能性はむしろ増大することがありうるとの指摘もある。下

野(2008)は北海道から九州までの13都市について過去70年間の月別平均気温を比較し、全地点の月平均気温は10年当たり平均0.20℃上昇したことを示した。しかし、地域別、月別にみると、北日本では、イネの生殖成長期にあたる7~8月の気温上昇傾向は明瞭には認められなかった。実際に観測された気温傾向を反映させた「春は昇温するが夏は昇温しない」条件では1℃の昇温で冷害強度が16%増加することが予測された。すなわち、前提とする条件次第では、温暖化の進行によって冷害が助長される危険性があることを示している。したがって、安定した稲作のためには今後とも冷害対策の向上が必要である。

イネが冷温障害によって経済的損失を被る冷害は、幼穂形成期から開花期にかけての冷温が花粉発育不良や受精不良を引き起こし不稔が生じる障害型と、冷温により生育が遅滞し登熟不良による減収が生じる遅延型に大きく分類される。このうち、障害型冷害は例外なく減収に結びつくため、北海道のような高緯度地域のみならず、中国雲南地方のような低緯度の高地地帯でも、深刻な問題となっている(DAI *et al.* 2004)。SATAKE and HAYASE(1970)は、人工気象室において均一にポット栽培したイネの主稈だけを用い、生育ステージが揃った穂のみについて穂上の位置別に穎花の稔性を調査する、という厳密な方法で、低温感受性が最大になる時期を四分子期から小孢子前期にあたる「小孢子初期」であることを特定した。出穂10~11日前にあたる小孢子初期を中心とする約1週間は穂ばらみ期と称され、冷温による不稔が生じやすい冷害危険期とされている。穂ばらみ期の冷温による障害に対して、その発生要因と発生機構に関する研究、対策技術の開発、耐性(穂ばらみ期耐冷性)を持つ品種の改良などが進められてきた(佐竹, 1994)。

穂ばらみ期耐冷性に品種間差があることは以前から認識されており、昭和初期からは冷水で植物体を冷やして耐冷性を検定する方法による耐冷性の選抜が行われてきた。検定法の改良が進み、比較的大規模かつ精度よく形質評価できる手法が開発された(蓬原・鳥山, 1964; 佐々木・松永, 1983)ことから、品種育成ならびに遺伝解析が進んでいる。統計遺伝学的方法による耐冷性の遺伝解析としては、形態的標識遺伝子系統との交配後代を用いて、耐冷性品種「染分」の耐冷性が *bc*(鎌いらず, 染色体3), *Pr*(穎

全面紫色, 染色体4), *d2*(夷矮性, 染色体1), *gh*(穎節間黄金色, 染色体5)および *nl*(穂首苞葉, 染色体5)に連鎖し、4個以上の遺伝子に支配されることを明らかにした例(FUTSUHARA and TORIYAMA, 1966)や、ダイアレル分析によって温帯ジャポニカ品種「はやゆき」の耐冷性には2遺伝子が関与していることを示した例(西村, 1995)が挙げられる。これらの解析により、耐冷性には数個の遺伝子が関与すると推定された。

その一方で、佐竹(1981)は国際イネ研究所(IRRI, フィリピン)と旧北海道農業試験場(現在の北海道農業研究センター)において耐冷性検定を行い、穂ばらみ期耐冷性が強い熱帯ジャポニカ品種「Silewah」や「Padi Labou Alumbis」などを見出した。「Silewah」はインドネシア・スマトラ島北部の高地(標高1300 m)で栽培されている品種であり、「Padi Labou Alumbis」は東マレーシアの在来種であるが、いずれも、長稈、強感光性(北海道では極晩生になる)、脱粒性などの不良形質を伴っていたため、北海道のイネを戻し交配して、「水稻中間母本農8号」(中母農8号)、「同農11号」(中母農11号)が育成された。「中母農8号」の耐冷性は、極強の基準品種「はやゆき」を1ランク上回っており、統計的手法を用いた遺伝解析の結果、耐冷性に関与する遺伝子は2個と推定された。また、「中母農11号」の耐冷性も「中母農8号」並かそれ以上であり、「中母農8号」との交配後代では穂ばらみ期耐冷性に分離が認められたことから、「中母農8号」とは異なる穂ばらみ期耐冷性遺伝子を持ち、両中間母本の穂ばらみ期耐冷性は集積可能であることが示唆された(清水ら, 2002)。耐冷性品種の育成は日本国内の既存品種が持つ耐冷性の集積によって行われてきたが、両中間母本とともに、既存品種の耐冷性に対して集積効果が期待できることから、耐冷性の新しい供与源として有望視された。

DNA レベルでの研究の進展に伴い、前述の形態的標識遺伝子よりも10倍以上の密度でDNA マーカーが開発され、量的形質を支配する遺伝子の位置や効果が推定可能なQTL(量的形質遺伝子座; quantitative trait locus)解析が適用できるようになった。DNA マーカーを利用して、外国稲由来の耐冷性について遺伝解析が行われている。「中母農8号」には「Silewah」から導入された領域が少なくとも染色体1, 3, 4および8に存在することが

明らかになり、染色体3短腕ならびに染色体4長腕が耐冷性に関与していることが明らかにされた(SAITO *et al.* 1995; SAITO *et al.* 2003)。さらに詳細な解析が行われた結果、染色体4長腕の穂ばらみ期耐冷性 QTL は密接に連鎖した2つの遺伝子(*Ctb1* と *Ctb2*) から構成されていることが明らかになった(SAITO *et al.* 2001)。*Ctb1* の候補領域は56kb 区間に絞り込まれ、F-box タンパク質をコードする遺伝子が原因遺伝子の候補の1つとされた(SAITO *et al.* 2004)。一方、耐冷性に優れたネパール原産の熱帯ジャポニカ品種「Pakhe Dhan」では、染色体3, 4, 6 および11に穂ばらみ期耐冷性 QTL が検出された(須藤ら, 2000; 須藤ら, 2001; 遠藤ら, 2009)。染色体6長腕の QTL(*qFLT-6*)は4.2cM に(須藤ら, 2004)、染色体4の *qFLT-4* は10.2cM に(神田・須藤, 2005)、それぞれ候補領域が絞り込まれている。また、外国稲ではないが、「コシヒカリ」も1980年の冷害時に被害が少なかったことから耐冷性極強の遺伝資源として注目された。その穂ばらみ期耐冷性 QTL は染色体1, 7 および11に検出され、中でも作用力が大きかったのは染色体7長腕の *qCT-7* であった(TAKEUCHI *et al.* 2001)。「コシヒカリ」は明治時代の品種「愛国」に由来する耐冷性の強い系譜に属する品種である(佐々木ら, 1985)が、「コシヒカリ」を母にして育成された「ひとめぼれ」も同じ位置に耐冷性 QTL を持つことから、*qCT-7* は日本の耐冷性品種の成立に重要な役割を果たしている可能性がある。中国雲南省在来の温帯ジャポニカ品種「昆明小白谷」でも作用力の最も大きい耐冷性 QTL が染色体7の *qCT-7* とほぼ同じ位置に検出された(DAI *et al.* 2004)ことは興味深い。

これらの QTL 研究の結果、耐冷性に関して多くの分子マーカーが開発されている。DNA マーカー選抜(marker-assisted selection; MAS) では分子マーカーを指標として従来よりも効率のよい選抜が可能となるため、高度耐冷性品種育成の有効な手段となる。SAITO ら(2001)は、*Ctb1* および *Ctb2* の両方を保有する準同質遺伝子系統(near-isogenic lines; NILs)の耐冷性が「中母農8号」よりも劣ることを観察した。このことは「中母農8号」の耐冷性は *Ctb1* および *Ctb2* だけでは完全には説明できないことを示唆している。したがって、高度耐冷性を実現するためには、複数の耐冷性 QTL の集積が必要である。新たな耐冷性 QTL が同定されれば、MAS

に利用可能な耐冷性 QTL が増えるため、耐冷性 QTL の効果的な集積に寄与するであろう。

本研究では、穂ばらみ期耐冷性に関する新たな QTL の同定を試みた。II章では、「中母農11号」の農業特性を改良した育成系統「北海 PL9」(穂ばらみ期耐冷性“極強”)が保有する穂ばらみ期耐冷性 QTL の座乗染色体領域を同定し、その区間を限定した。III章では、北海道初の酒米品種「初雫」(穂ばらみ期耐冷性“極強”)について、穂ばらみ期耐冷性 QTL の検出を行った。さらに、IV章では、II章ではカバーし切れなかった染色体領域を対象を広げて穂ばらみ期耐冷性 QTL の探索を行うと同時に、耐冷性評価に影響する形質として、出穂期ならびに稈長の QTL も探索した。V章では、耐冷性の育種改良に向けて、残された問題点について論議した。

II. 染色体8の穂ばらみ期耐冷性 QTL のマッピング

1. はじめに

前章で述べたとおり、国外の耐冷性遺伝資源に由来する高度耐冷性中間母本2系統「中母農8号」と「中母農11号」の耐冷性は集積可能であることが示されている(清水ら, 2002)。「中母農8号」の耐冷性についてはかなり詳細な解析が進み、原因遺伝子の候補が絞り込まれるまでに至っている。その一方で「中母農11号」については染色体8に耐冷性との関連が認められた報告(小松ら, 1999)がある程度で、詳細な解析は行われていない。「中母農8号」との集積効果の解析のために、さらには耐冷性集積系統の作出のためにも、「中母農11号」の耐冷性について詳細な遺伝解析を進めることが望まれる。

本章では、「中母農11号」に由来する耐冷性極強の育成系統「北海 PL9」を用いて、染色体8の穂ばらみ期耐冷性 QTL の検出を行った。従来、染色体8に穂ばらみ期耐冷性 QTL は報告されていないことから、「北海 PL9」の耐冷性には新規の遺伝子がかかわっていることが推察される。染色体8に新規の単純反復配列(simple sequence repeat; SSR)マーカーを開発し、QTL 候補領域の区間マッピングならびに置換マッピングに利用した。

2. 材料および方法

1) 供試材料

「北海 PL9」(穂ばらみ期耐冷性“極強”)と「北海

287号」(同“やや強”)を交配して得たF₂, F₃およびF₇後代を耐冷性の解析に用いた。「北海PL9」は「空育139号」(後の「ゆきまる」)／「中母農11号」／「空育147号」の交配組み合わせから育成された耐冷性“極強”の中間母本系統である。「中母農11号」は、ともに耐冷性“極強”の「Padi Labou Alumbis」(マレーシア産の熱帯ジャポニカ)ならびに「はやゆき」(北海道の温帯ジャポニカ品種)を耐冷性の供与親として戻し交雑育種で育成された。「北海287号」は北海道の主要品種「きらら397」の低アミロース含有率突然変異系統であり、耐冷性は“やや強”である。

2) 穂ばらみ期耐冷性の評価

穂ばらみ期耐冷性は恒温深水灌漑法(佐々木・松永, 1983)により、北海道農業研究センター水田圃場(札幌市)にて評価した。圃場は19.4℃に制御された冷水で幼穂形成期から出穂完了まで灌漑した(2004年は6月24日から8月25日, 2005年は6月28日から9月8日)。水深は約20cmとした。2004年には、区間マッピングのためのF₂集団ならびに連関検出のためのF₇系統群を4月19日に播種し、6月1日に移植した。2005年には置換マッピングのためのF₃およびF₇集団を4月15日に播種し、5月27日に移植した。F₂, F₃およびF₇集団は1個体植え、F₇系統群は1系統5個体植への2反復とした。登熟後、1個体・系統あたり5穂の平均稔実率に基づいて穂ばらみ期耐冷性を評価した。

3) DNA抽出とPCR増幅

DNAはMONNAら(2002)を改変した方法で葉から抽出した。SSRマーカーは、反応液量10μl中でPCR増幅した。反応液の組成は、Tris-Cl(pH 8.3) 10mM, MgCl₂ 5mM, 0.001% gelatin, dNTPs各0.1mM, プライマー各0.2μM, AmpliTaq Gold DNA polymerase(Applied Biosystems, Foster City, CA) 0.02 unit/μl, 抽出したDNA溶液1μlとした。反応温度サイクルは、はじめに94℃4分, 続いて94℃1分, 55℃または60℃1分, 72℃2分を45回繰り返した後、最後に72℃7分とした。PCR産物は4%メタファーアガロース(Cambrex, East Rutherford, NJ)で電気泳動し分離した。

染色体8短腕に新規のSSRマーカーを開発した(Table 1)。International Rice Genome Sequencing

Project(IRGSP, <http://rgp.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/statusdb/status.pl>)が公表したイネ染色体8のゲノム塩基配列情報に基づいて、Simple Sequence Repeat Identification Tool(SSRIT; TEMNYKH *et al.* 2001; <http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool>)を使用してSSR領域を探索した。SSR領域を増幅するプライマー設計にはPrimer3(ROZEN and SKALETSKY, 2000; http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)を利用した。以上の手順により作成したプライマーについて「北海PL9」と「北海287号」間の多型検出の可否を確認した。すべてのプライマーはアニーリング温度55℃となるように設計した。

4) 穂ばらみ期耐冷性のQTLマッピング

イネの全12染色体をカバーするSSRマーカー(TEMNYKH *et al.* 2001)について「北海PL9」と「北海287号」間の多型を調査した。「北海PL9」と「北海287号」の交配に由来するF₇世代59系統について、両系統間の多型を検出可能なマーカー(多型マーカー)に関する遺伝子型を決定するとともに、その耐冷性を評価した。各多型マーカーについて、「北海PL9」型ホモのF₇系統(HkPL9グループ)の平均稔実率と、「北海287号」型ホモのF₇系統(Hk287グループ)の平均稔実率を比較した。統計プログラムR ver 2.2.1(R Development Core Team 2005)を用いたWILCOXONの順位和検定により、HkPL9グループとHk287グループとの間で平均稔実率を比較した。WILCOXONの順位和検定における閾値はCHURCHILL and DOERGE(1994)の方法に従い1000回試行によって評価し、experimentwiseな誤差を0.05以下とした。

穂ばらみ期耐冷性QTLの検出には、288個体のF₂集団を用いた。コンピュータプログラムMAPL97(UKAI *et al.* 1991; 鶴飼ら, 1995)を用いて遺伝距離の算出ならびに区間マッピングを行った。

穂ばらみ期耐冷性QTLの置換マッピング(PATERSON *et al.* 1990)のために、「北海PL9」と「北海287号」間のF₆後代からQTL領域がヘテロの1個体を選抜し、その自殖F₇集団(P1-1)の遺伝子型決定を行った。また、同組み合わせのF₂後代からQTL領域内の組換え個体を5個体選抜し、それぞれの自殖F₃集団(P2-1, 2, 3, 4および5)についても遺伝子型を決定した。それぞれの集団内で、個体

を3遺伝子型グループ(HkPL9グループ, Hk287グループおよびヘテログループ)に群分けした。WILCOXONの順位和検定により, HkPL9グループとHk287グループとの間で平均稔実率を比較した。

3. 結果

1) 穂ばらみ期耐冷性に関する single marker analysis

イネゲノム上に広く分布する計487のSSRマーカーを使用して, 「北海PL9」と「北海287号」間の多型を探索した結果, 54マーカーで多型を示した(Fig. 1)。多型検出率は染色体5で最小2.4%, 染色体11で最大31.8%, 全12染色体の平均値は11.1%であった。この多型頻度は, 温帯ジャポニカとインディカ間でSSRマーカーを用いて報告された値(ANDAYA and MACKILL, 2003)よりもかなり低く, 温帯ジャポニカ間で報告されたRFLP(restriction fragment

length polymorphism)ならびにRAPD(random amplified polymorphic DNA)マーカーを用いた値(TAKEUCHI *et al.* 2001)と同程度であった。

穂ばらみ期耐冷性と多型を示したSSRマーカーとの間の連関は, 「北海PL9」と「北海287号」間で作出した59系統からなるF₇系統群を用いて調査した。F₇系統群において穂ばらみ期耐冷性は連続的に分布し, 穂ばらみ期耐冷性は量的に遺伝することが示唆された(Fig. 2)。54の多型を示したマーカーに関して, 遺伝子型が北海PL9型のF₇系統と北海287号型のF₇系統の間で, 穂ばらみ期耐冷性を比較した。WILCOXONの順位和検定を行ったところ, 染色体8に座乗するRM38でZ値が最大になったが, そのZ値は有意水準5%のexperimentwiseな閾値3.19を超えなかった。穂ばらみ期耐冷性と染色体8の間の連関を確認するために, McCOUCHら(2002)により開発された染色体8短腕に座乗する48のSSR

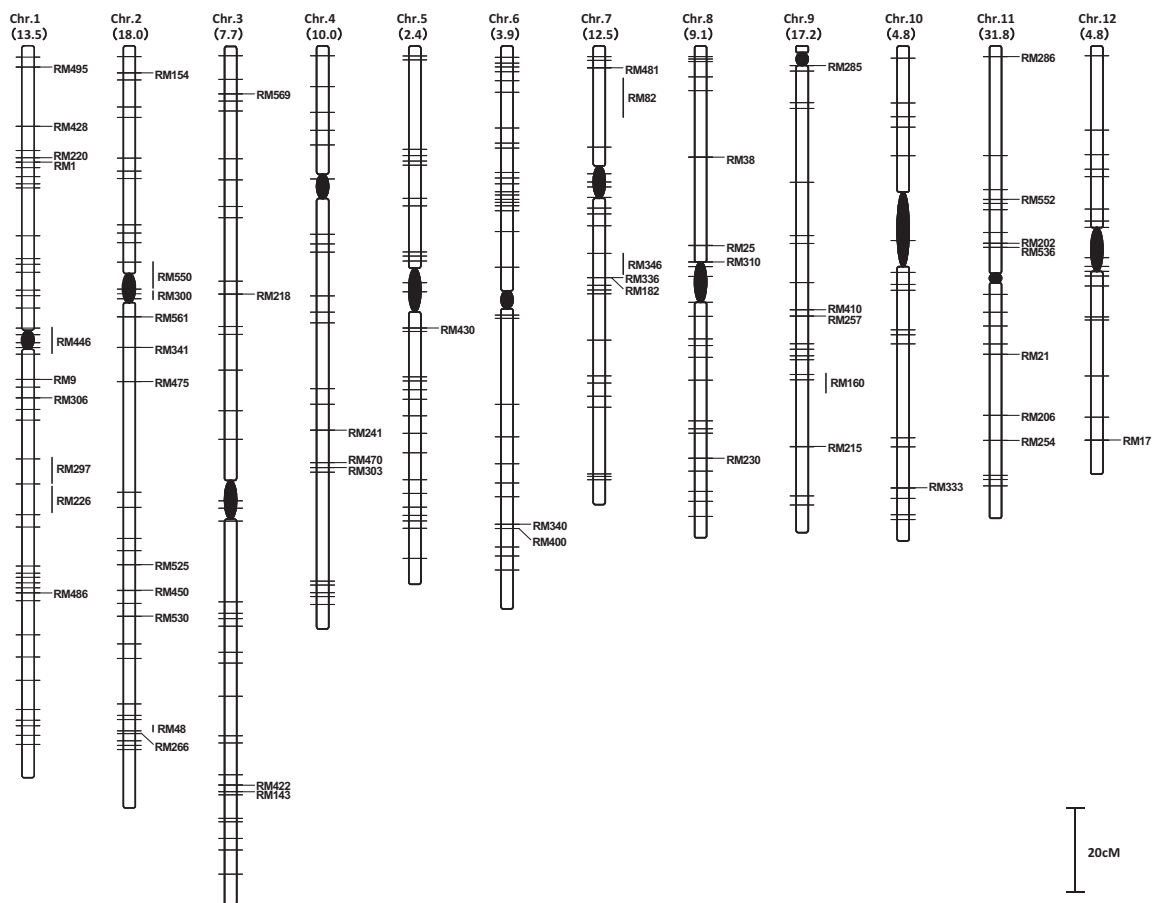


Fig. 1 Chromosomal positions of the polymorphic markers between Hokkai-PL9 and Hokkai287. The polymorphic markers are indicated by marker names, while vertical lines represent the probable intervals of the markers with low LOD score in map construction (TEMNYKH *et al.* 2001). The horizontal lines represent the positions of SSR markers used in the survey for polymorphic markers. Approximate positions of centromeres are shown by solid ellipses. The percentage of polymorphic markers on each chromosome is indicated in parenthesis.

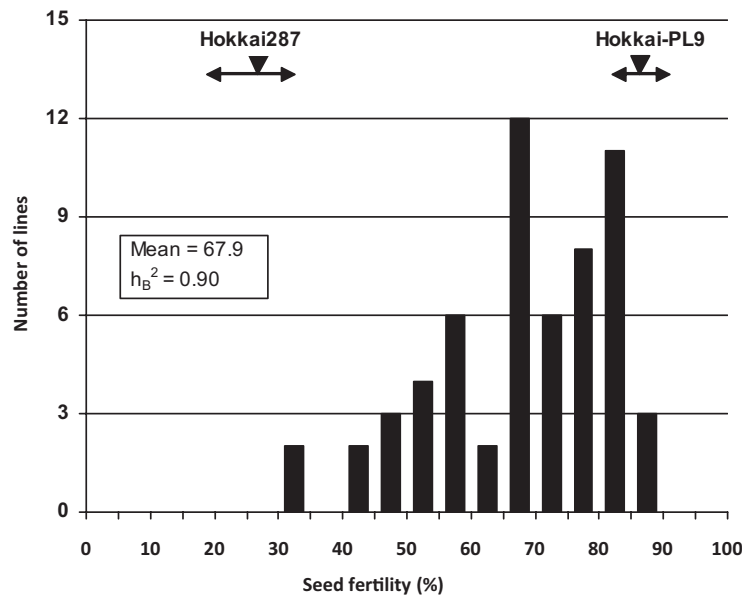


Fig. 2 Frequency distribution of cold tolerance in F₇ lines. Cold tolerance was evaluated as seed fertility after cool-water treatment. The ranges and means of the parents are represented by arrows and solid triangles, respectively.

Table 1 New SSR markers on the telomeric half of the short arm of chromosome 8.

Marker	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Motif	BAC/PAC clone (GenBank Accession No.)
RM38-2 ¹⁾	GCGCCATTGATGACTAATTG	ATGGAAGAGGCAAGCAGAAG	(tc)18	OJ1613_G04 (AP003896)
PLA53	GATCCTTGCTGCATGTTTCG	CCATGATGAAAAACCAAAAAA	(gca)8	P0473D02 (AP005542)
PLA41	ACACCCTACCAAACGAGCTG	GCCGCCATAGTATTCCTTCC	(ct)23	P0025F03 (AP004381)
PLA27	CGTAGCTATCTATAGCCACGAGAG	AATCCGATCAGGCCCTTCCCTTCG	(ag)18	P0665F09 (AP005506)
PLA46	GGCCTTGCTGCTTTAGGA	GGCTTGAGAGCGTTTGTAGG	(tcta)9	P0571B09 (AP005526)
PLA61	AAGTGGTGCCGAGACTGC	ATGAGAACCCCGTCACTGTC	(gcg)7	OJ1349_D05 (AP005467)
PLA62	TCTCCTCGACGATTATGAACA	ACCAAGAGCCACGTCGTAAG	(caga)8	OJ1349_D05 (AP005467)
PLA19	TTCGATATGCAAGTGATGATG	TACTCTCCTCCAAGAAAACAAGCA	(gt)15	P0672D01 (AP004635)
MR902B	AAAAGCATATAGAGGCACCGGGTA	CCGTCAGGTTTTTCATCTGATGAAC	(ag)16	P0455A11 (AP004692)

1) RM38-2 has the same target as that of RM38, but sequences of primers are revised for more efficient amplification of the PCR product.

マーカーから10の多型を示すマーカーを見出し、single marker analysisに利用した。その結果、4マーカーにおいて、遺伝子型グループ間で統計的に有意な穂ばらみ期耐冷性の差異が認められた (Table 2)。穂ばらみ期耐冷性 QTL は染色体 8 に報告された例はないので、染色体 8 上のマーカーが穂ばらみ期耐冷性と有意に関連していたことは注目に値する。

2) 穂ばらみ期耐冷性の区間マッピング

染色体 8 に座乗する穂ばらみ期耐冷性 QTL の区間マッピングのために、イネゲノム完全塩基配列 (IRGSP 2005) に基づいて 8 つの多型マーカーを作

出した (Table 1)。F₂ の 288 個体を 19 の SSR マーカーで遺伝子型決定するとともに、穂ばらみ期耐冷性を評価した (Fig. 3)。19 マーカーで染色体 8 短腕の末端側 (IRGSP イネゲノムシーケンスで 0.0Mb から 4.7Mb に相当) をカバーする連鎖地図を構築した。穂ばらみ期耐冷性に関する Log-likelihood (LOD) 値は、RM6670 近傍で最大値 10.6 に達した。寄与率 (PVE) ならびに相加効果 (AE) はそれぞれ 26.6% ならびに 11.4% であった (Fig. 4)。比較的大きな効果を持つこの QTL を仮に *qCTB8* (quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on chromosome 8) とした。

通常の温度条件で栽培した「北海 PL9」と「北海

Table 2 Association between cold tolerance and SSR markers on chromosome 8.

Marker	Position ¹⁾ (Mbp)	Mean seed fertility [Number of lines]		Z- value ²⁾
		HkPL9 group	Hk287 group	
		RM5911	0.1	
RM6356	1.6	72.2 [30]	64.1 [27]	2.1416
RM38	2.1	72.9 [31]	62.2 [27]	2.8917
RM5647	2.9	74.2 [28]	61.4 [29]	3.5437*
RM6670	3	75.1 [27]	61.0 [30]	3.8677*
RM3819	3	75.1 [27]	61.0 [30]	3.8677*
RM5434	3.1	75.1 [27]	61.0 [30]	3.8677*
RM5428	3.2	74.1 [27]	61.9 [30]	3.1645
RM3572	3.9	71.3 [24]	65.6 [35]	1.3579
RM6999	4	71.3 [24]	65.6 [35]	1.3579
RM5556	4.6	69.6 [26]	66.6 [33]	0.6107

1) Chromosomal positions of the markers are indicated based on the IRGSP genome sequence.

2) The significance of the difference between mean seed fertility of genotypic groups was tested by the WILCOXON rank sum test.

* Significant at 5% level by the permutation test (CHURCHILL and DOERGE, 1994).

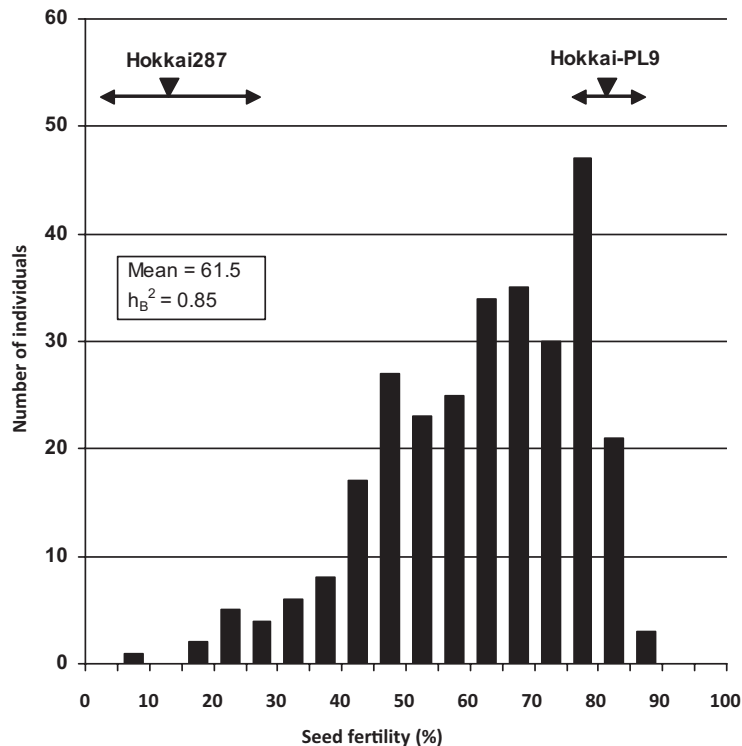


Fig. 3 Frequency distribution of cold tolerance in F₂ population. Cold tolerance was evaluated as seed fertility after cool-water treatment. The ranges and means of the parents are represented by arrows and solid triangles, respectively.

287号」間の F₂ 集団の平均稔実率は88.9%であり、その分散は低温条件栽培時に比べて有意に小さかった(F 検定における F 値は通常条件37.7に対して低温条件245.9, $P < 0.001$)。この結果は低温条件における稔実率の F₂ 集団内変異が主として穂ばらみ期耐冷性の遺伝的変異によることを示唆している。し

たがって、*qCTB8* は不稔ではなく穂ばらみ期耐冷性に関連していると考えられた。

3) *qCTB8* の置換マッピング

PLA46から RM5428までの区間内がヘテロの F₆ 個体由来する F₇ 集団(Fig. 5)において穂ばらみ

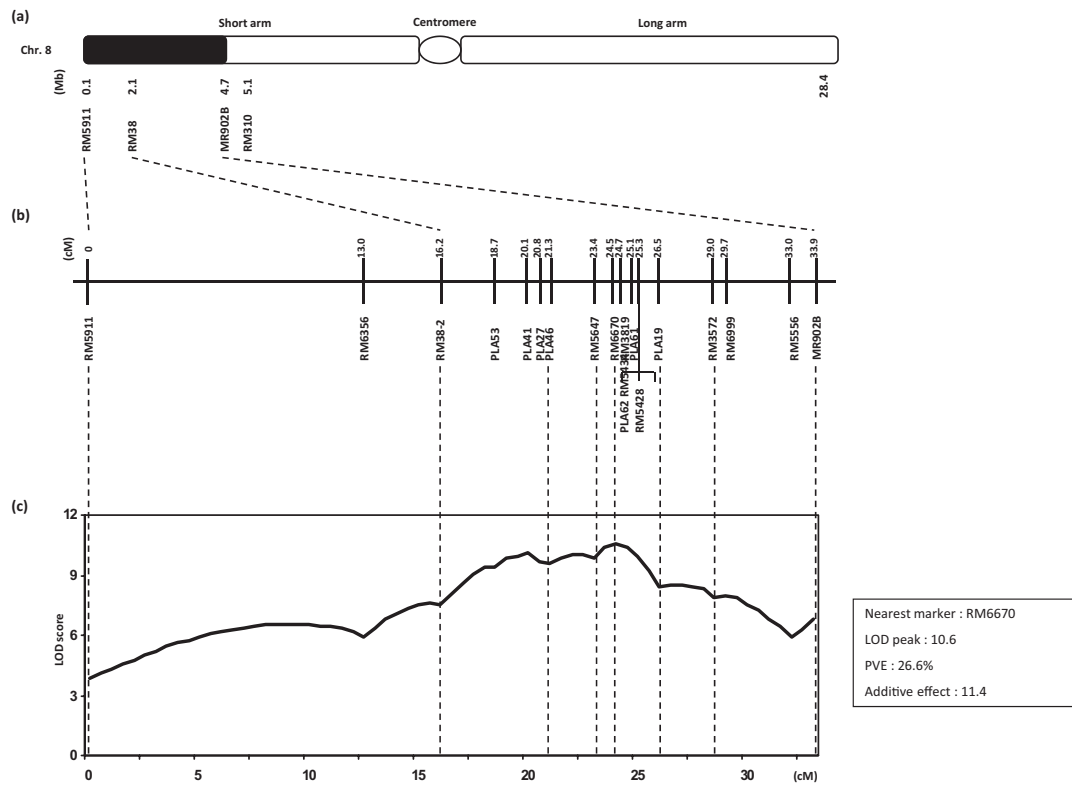


Fig. 4 Interval mapping for cold tolerance. (a) Chromosomal positions of the markers based on the IRGSP genome sequence. (b) Genetic linkage map of the markers. (c) LOD plot for cold tolerance covering the telomeric half of the short arm of chromosome 8.

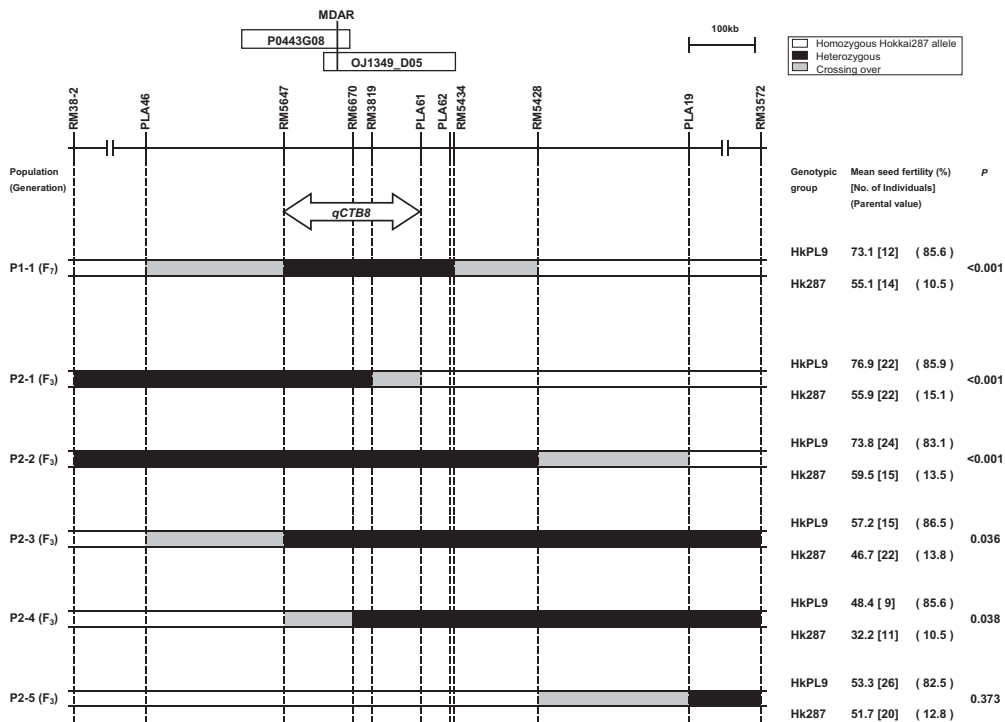


Fig. 5 Substitution mapping of *qCTB8*. Graphical genotypes of the F₃ and F₇ substitution lines are illustrated. Positions of markers are based on the IRGSP genome sequence. Solid and open boxes represent heterozygous allele and homozygous Hokkai287 allele, respectively, while the regions of potential recombination are shown as shaded boxes. Mean seed fertility of the HkPL9 group was compared with that of the Hk287 group by the WILCOXON rank sum test.

期耐冷性の分離が観察され、HkPL9グループの穂ばらみ期耐冷性はHk287グループよりも有意に優れていた(Fig. 6)。このF₆個体は、染色体8に加えて、染色体2(RM550, RM300, RM561, RM341およびRM275を含む)と染色体6(RM340とRM400を含む)にもヘテロ領域を持っていたが、これら7マーカーと穂ばらみ期耐冷性との間の連関は有意ではなかった(データ不掲載)。したがって、F₇集団における穂ばらみ期耐冷性の分離は、染色体8の注目領域(Fig. 5, PLA46 ~ RM5428)によって概ね説明されると考えられた。遺伝子型グループ間の稔実率の差は18ポイントであり、区間マッピングにより推定された相加効果11.4%とはほぼ一致した。この結果は*qCTB8*がPLA46からRM5428の区間に位置していることを示している。

qCTB8 領域を絞り込むため、RM38-2からRM3572にかけての区間に組換えを持つF₂個体を選抜し、自殖によって5つのF₃集団(P2-1, 2, 3, 4および5)を作成した。各集団で、穂ばらみ期耐冷性を遺伝子型グループ間で比較したところ(Fig. 5), P2-1ならびにP2-2の2集団では遺伝子型グループ間で穂ばらみ期耐冷性の差異が有意だった(遺伝子型グループ間の稔実率の差: P2-1では21.0ポイント, P2-2で

は14.3ポイント)のに対して、P2-5ではその差が有意ではなかったことから、*qCTB8*はPLA61よりも短腕末端側に位置することが示唆された。また、P2-3ならびにP2-4においても遺伝子型グループ間の穂ばらみ期耐冷性には有意な差異が認められたことから(遺伝子型グループ間の稔実率の差: P2-3では10.5ポイント, P2-4では16.2ポイント), *qCTB8*はRM5647よりも動原体側に位置することが示唆された。

以上の結果から、*qCTB8*はRM5647からPLA61までの1.7cM区間に位置する可能性が高い(Fig. 5)。この区間はIRGSPイネゲノム塩基配列では193kbに相当し、P1ファージ由来人工染色体(PAC)クローンP0443G08(GenBank accession No.AP004461)ならびにバクテリア人工染色体(BAC)クローンOJ1349_D05(GenBank accession No.AP005467)でカバーされる。

4. 考察

*qCTB8*は置換マッピングにより1.7cM区間にマッピングされた。1.7cMの*qCTB8*候補領域はIRGSPイネゲノム塩基配列では193kbに相当し、当該領域には約30の翻訳領域(open reading frames; ORFs)

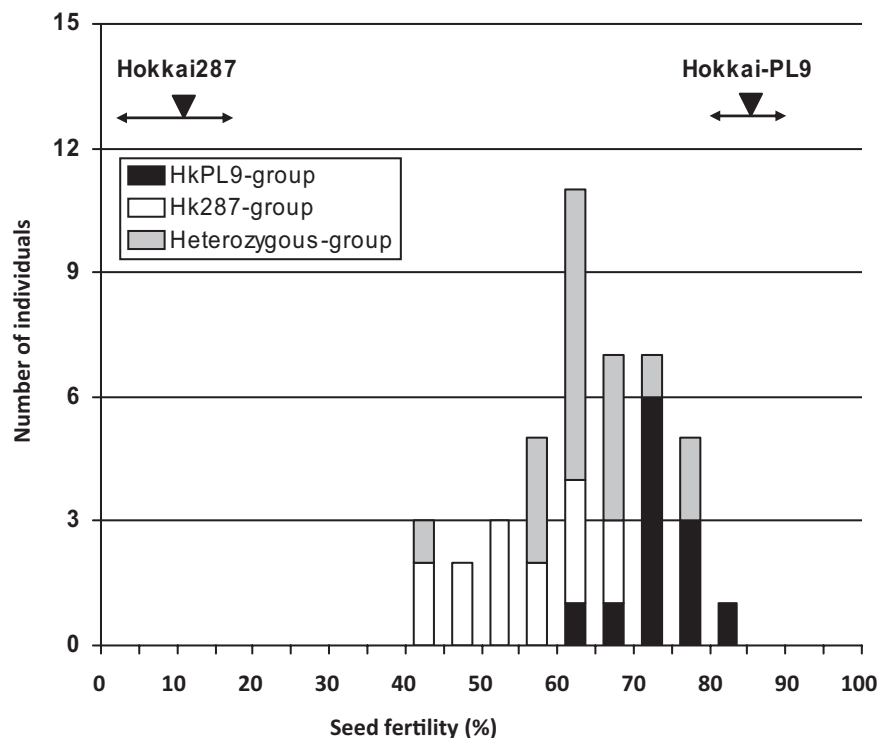


Fig. 6 Frequency distribution of cold tolerance in the P1-1 population. Frequency distribution of cold tolerance is shown classified by genotypic groups. Cold tolerance was evaluated as seed fertility after cool-water treatment. The ranges of parental values are represented by arrows.

が予測されている。そのうち1つのORFはモノデヒドロアスコルビン酸還元酵素(monodehydroascorbate reductase; MDAR)をコードしていた。イネが冷温に最も感受性が高くなる小孢子初期に低温処理をした場合に、イネの葍中でMDARの発現が増加することが報告されている(IMIN *et al.* 2006)。MDARのORFはRM5647からRM6670の間のRM6670近傍に位置しており、区間マッピングにおけるLOD値のピークが観察された位置と一致していた。したがって、MDARは*qCTB8*原因遺伝子の有力な候補の1つであると考えられる。

本章ではTEMNYKHら(2001)が開発した数百のSSRマーカーを使って、「北海PL9」と「北海287号」間の多型を探索した。しかし、多型頻度が低い材料を用いたため、それらマーカーだけではQTLの区間マッピングに不十分であった。*qCTB8*のマッピングを進めるため、イネ品種「日本晴」の公開ゲノム塩基配列を利用して、*qCTB8*領域に新たなSSRマーカーを作成するとともに、McCouchら(2002)が開発した数千のSSRマーカーのうち数個もあわせて区間マッピングに利用した。*qCTB8*領域には過去にSSRマーカーが報告されていなかったため、*qCTB8*のマッピングは新規に作成したマーカーがなければ成功しなかったであろう。イネゲノム塩基配列の完全解読により、大量のマーカーが利用可能になった。例えば、IRGSP(2005)からは約19,000のSSRマーカーが公開されている。この公開情報を利用すれば、本章で用いたジャポニカイネ同士の組み合わせに由来する集団のような多型頻度の低い集団においても、高精度なマッピングが可能になる。

*qCTB8*の供与親である「中母農11号」と、北海道の耐冷性品種である「ほしのゆめ」の間に得られたF₁植物の耐冷性は両親よりも優れていた(データ不掲載)。このことは、*qCTB8*が「ほしのゆめ」の耐冷性を向上させることに有用であることを示唆している。したがって、*qCTB8*は北海道における耐冷性育種に寄与できる可能性がある。しかしながら、「中母農11号」の後代に育成された商業品種は皆無である。SAITOら(2001)は「中母農8号」の耐冷性遺伝子*Ctb2*が晩生に連鎖していることを報告した。晩生は北海道のような夏季が短い地域には不適である。「中母農11号」が商業品種の親として利用されていない理由のひとつとして、「中母農8号」の場合と同様に、「中母農11号」の耐冷性が不良形

質と連鎖している可能性が挙げられる。従来の耐冷性育種では耐冷性検定圃場の面積に限りがあるため、供試集団の大きさが比較的小さかった。DNAマーカー選抜(MAS)による大規模かつ正確な耐冷性選抜は、耐冷性と不良形質との間の連鎖を断ち切るのに有効であろう。本章において冷温感受性の材料として利用した「北海287号」は、北海道の主力品種「きらら397」に由来する突然変異系統である。「北海287号」は食味が優れるため、その耐冷性が改良されれば商業品種になりうる。本章で作出された*qCTB8*近傍のSSRマーカーは、「北海PL9」の遺伝子型と、「北海287号」および「ほしのゆめ」の遺伝子型をPCRとアガロースゲル電気泳動により容易に判別可能である。これらのマーカーは、*qCTB8*を「北海287号」や「ほしのゆめ」に導入して優良な耐冷性品種を育成することに直ちに利用可能である。

Ⅲ. 初雫の穂ばらみ期耐冷性 QTL 解析

1. はじめに

I章で概観したとおり、耐冷性は複雑形質であり、多くの遺伝子がかかわっていることが遺伝解析によって示されてきている。耐冷性品種の多くが在来の耐冷性遺伝資源の集積によって育成されてきたが、遺伝解析されたのはその一部に過ぎない。耐冷性の集積を効果的に行うためには、できるだけ多くの遺伝資源について耐冷性の遺伝解析を行い、それぞれがどのような耐冷性関与領域を持つかを明らかにする必要がある。

本章では、北海道の耐冷性品種「初雫」の穂ばらみ期耐冷性に関するQTLを位置付けることを目的とした。「きらら397」(穂ばらみ期耐冷性“やや強”)と「初雫」(同“極強”)の組換え自殖系統群(recombinant inbred lines; RILs)を作成し、利用した。耐冷性に関連する形質として、出穂期と稈長についても分析を行った。2005年から2007年にかけて3回試験し、検出されたQTLの再現性を確認した。

2. 材料および方法

1) 供試材料

初雫は北海道の耐冷性イネ品種であり、マツマエ/上116//北海258号の組み合わせから育成された。「マツマエ」と「北海258号」は北海道の温帯ジャポニカイネであり、「上116」はインディカの育成系統

である。「きらら397」は冷温感受性の温帯ジャポニカイネであり、北海道の主要品種である。穂ばらみ期耐冷性を遺伝的に解析するために、「きらら397」と「初雫」の間に得られたF₂を単粒系統(single seed descent; SSD)法により世代促進し、114系統からなるRILsを作出した。F₆、F₇およびF₈世代をそれぞれ2005、2006および2007年に使用した。

2) 穂ばらみ期耐冷性の評価

穂ばらみ期耐冷性は耐冷性検定水田圃場(北海道農業研究センター、札幌市)において恒温深水灌漑法(佐々木・松永, 1983)により評価した。検定圃場には19.4℃に制御した水を幼穂形成期から出穂完了まで(2005年は6月28日から9月8日、2006年は6月28日から9月4日、2007年は6月29日から8月31日)灌漑した。水深は約20cmとした。RILsは1系統あたり5個体1株で検定水田に移植した。2005年は4月15日、2006年、2007年は4月20日に播種し、2005年5月27日、2006年5月26日、2007年5月28日に移植を行った。登熟後、1系統あたり5穂の平均稔実率に基づいて穂ばらみ期耐冷性(CT)を評価した。出穂日(HT)は播種日から穂が初めて抽出した日までの経過日数とし、稈長は最長稈の穂首から地際までをセンチメートル単位で計測した。

3) 分子マーカー解析ならびに QTL 解析

DNA抽出、SSRマーカーのPCR増幅、電気泳動によるPCR産物の分離については、IIに記した方法に従った。

連鎖地図はコンピュータプログラムMAPL97(UKAI *et al.* 1991; 鷗飼ら, 1995)を用いて作成し、穂ばらみ期耐冷性にかかわるQTLの検出は複合区間マッピング(composite interval mapping; CIM)によった。冷水処理後の平均稔実率の逆正弦変換値をCIMにおける耐冷性の指標として用いた。QTL検出の閾値は1000回の並べかえ検定で評価し、experimentwiseな誤差を0.05以下とした。CIMと並べかえ検定にはコンピュータプログラムWindows QTL Cartographer version 2.5(WANG *et al.* 2007)を利用した。

3. 結果

1) 形質変異

「きらら397」と「初雫」間のRILsの穂ばらみ期

耐冷性(CT)を冷水処理後の稔実率によって評価した。通常の温度条件における「きらら397」の稔実率は2005年94.1%、2006年96.5%、2007年91.4%であったことから、RILsにおける冷水処理後稔実率の変異は穂ばらみ期耐冷性の遺伝的な変異を反映していることが示唆された。「初雫」の冷水処理後稔実率は2005年82.6%、2006年74.7%、2007年72.7%であったのに対して、「きらら397」の冷水処理後稔実率は「初雫」よりも有意に低かった(2005年45.9%、2006年35.0%、2007年35.6%、Fig. 7)。RILsの冷水処理後稔実率は、両親間または両親の値を超えて連続的に分布した(2005年32.1%から89.3%、2006年9.4%から94.1%、2007年9.3%から86.4%)。出穂期(HT)や稈長(CL)においても連続的な分布が観察され、これら3形質が量的に遺伝することが示された。出穂期では超越分離が観察され、その分布は晩生方向に歪んでいた。

2) 多型検出と連鎖地図の構築

ゲノム全体に分布する合計667のSSRマーカー(McCOUCH *et al.* 2002; TEMNYKH *et al.* 2001)を用いて「きらら397」と「初雫」の間の多型を探索したところ、117マーカーで多型が検出された(Fig. 8)。染色体別の多型検出率は12.2%から35.7%であり、12染色体を平均すると17.3%であった。多型頻度は温帯ジャポニカ×インディカの組み合わせで報告された値(ANDAYA and MACKILL, 2003)よりもはるかに低く、温帯ジャポニカ同士の組み合わせよりもやや高かった(KUROKI *et al.* 2007; TAKEUCHI *et al.* 2001)。多型を示したマーカーにおけるヘテロ接合率は0から0.035で、平均0.006であった。染色体3のRM1334、RM6832、RM3513、RM3601、RM3525、染色体9のRM1328および染色体11のRM5716の計7マーカーでは分離の歪みが観察された。18連鎖群、111マーカーからなり、計1174.2cMをカバーする連鎖地図を構築した(Fig. 9)。染色体4ならびに10にはマーカーが少なく、その他の染色体にもマーカーの空白域が観察された。連鎖地図上のマーカーの順序はIRGSPイネゲノムシーケンス(IRGSP 2005)で予測された順序とほぼ一致していた。

3) QTL 解析

穂ばらみ期耐冷性QTL検出のために推定されたexperimentwiseなLODの閾値($p > 0.05$)は、2005

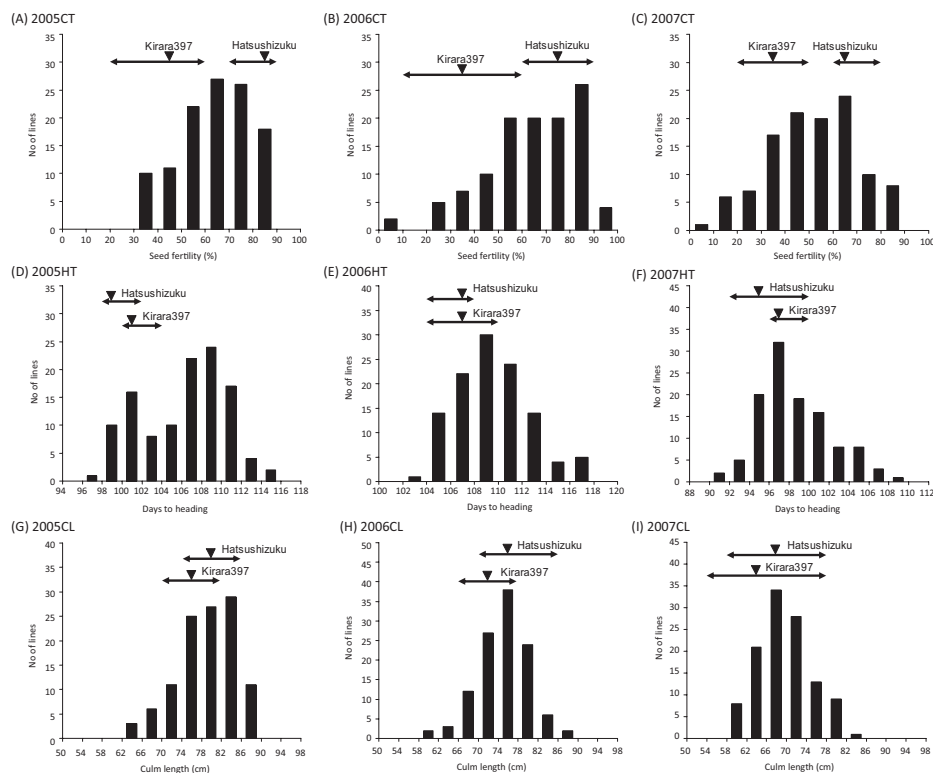


Fig. 7 Frequency distribution of cold tolerance at the booting stage (CT), heading time (HT) and culm length (CL) in RILs. CT was evaluated as seed fertility after cool-water treatment. The ranges and means of the parents are represented by arrows and solid triangles, respectively.

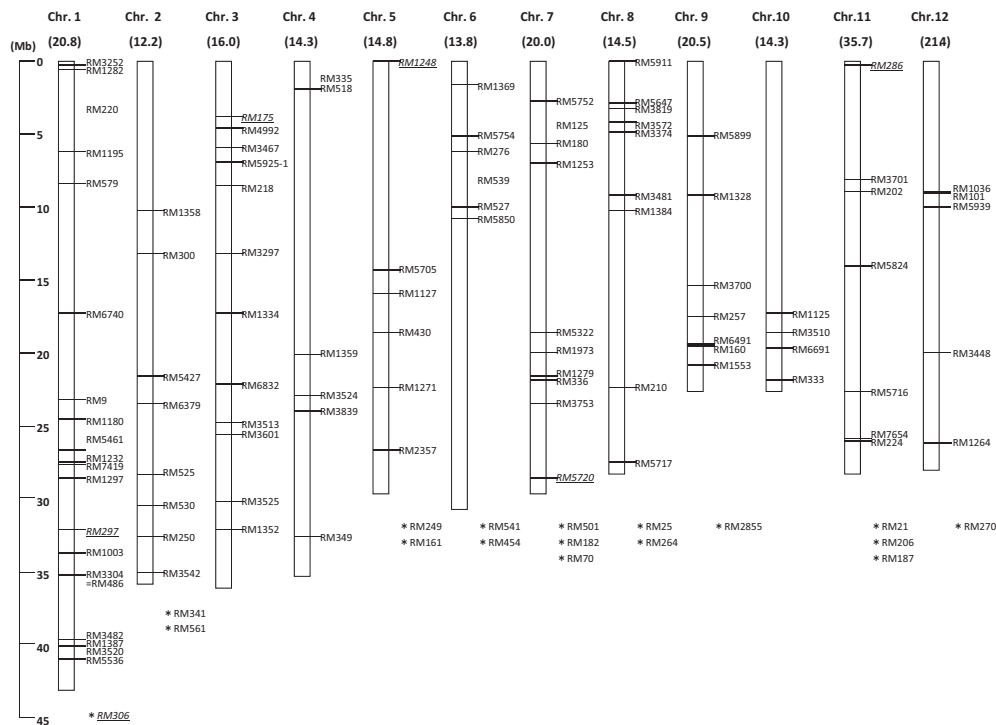


Fig. 8 Polymorphic markers between Kirara397 and Hatsushizuku on the IRGSP genome sequence. Positions of the polymorphic SSR markers between Kirara397 and Hatsushizuku are shown on the basis of the IRGSP genome sequence. Markers with asterisks are not located on the IRGSP genome sequence. The percentage of polymorphic markers on each chromosome is indicated in parenthesis.

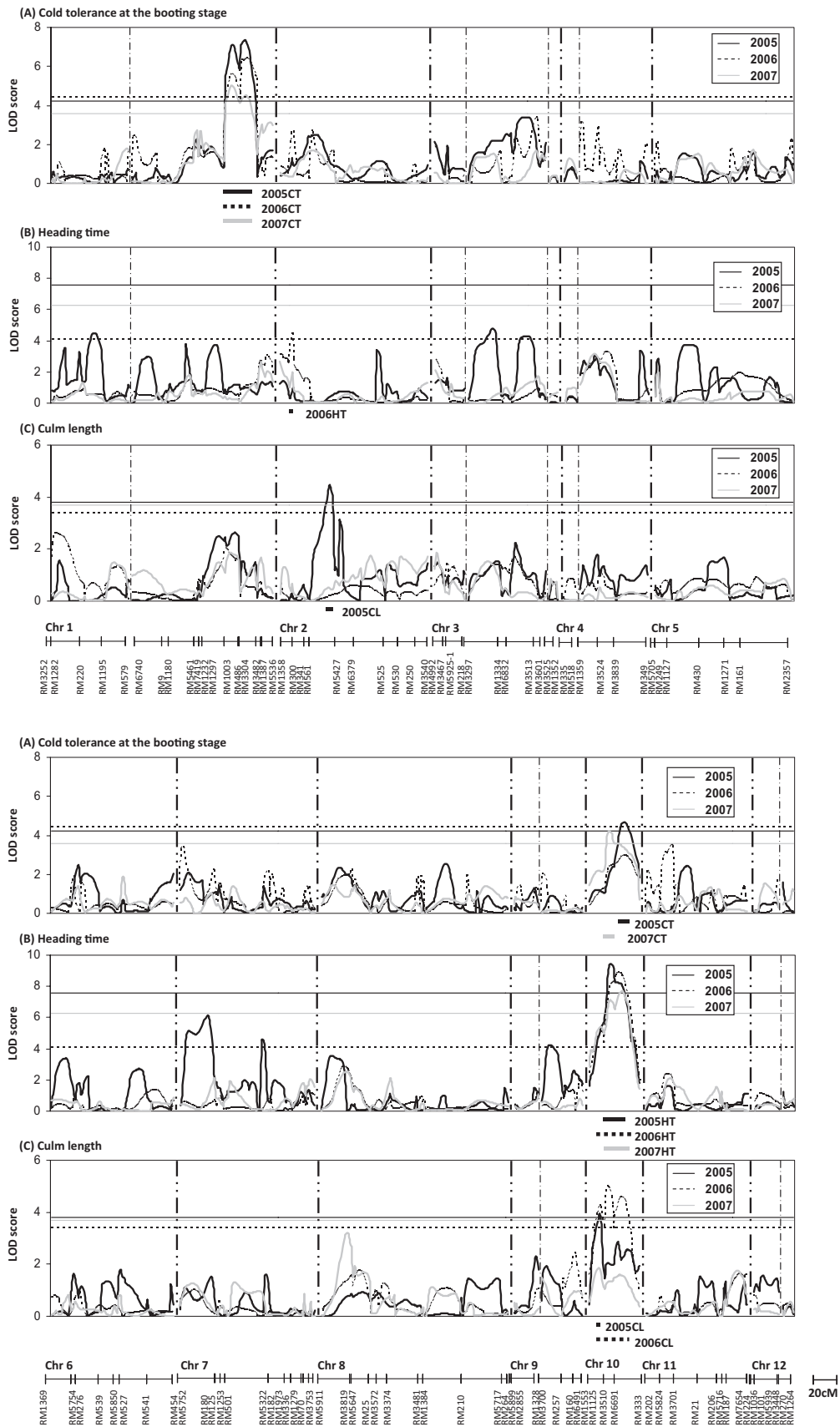


Fig. 9 Composite interval mapping for cold tolerance at the booting stage (A), heading time (B) and culm length (C). The horizontal lines indicate the intervals recording LOD > thresholds. The linkage map constructed in this study is shown on the bottom.

年4.2, 2006年4.4, 2007年3.6であった。合計5つの穂ばらみ期耐冷性 QTL が検出されたが, そのうち3 QTL は染色体1長腕の RM1003から RM3482の領域にマッピングされた(Fig. 9)。これら染色体1上の3つの穂ばらみ期耐冷性 QTL の効果はすべて「初雫」方向であり, 表現型分散の16.2から47.3%を説明していた(Table 3)。2005年と2007年に染色体10長腕で検出された穂ばらみ期耐冷性 QTL においては, 「きらら397」の対立遺伝子が耐冷性を向上させる効果をもち, 寄与率(PVE)は2005年が35.4%, 2007年は20.4%であった。

QTL 検出のための LOD の閾値($p > 0.05$)は, 出穂期については2005年7.6, 2006年4.1, 2007年6.3, 稈長については2005年3.8, 2006年3.4, 2007年3.7と推定された。4つの出穂期 QTL が染色体2ならびに10に検出された。そのうち3 QTL は3年ともに染色体10長腕の RM1125と RM333に挟まれた領域に位置しており, 表現型分散の32.7%から36.7%を説明した。「初雫」の対立遺伝子が出穂期を早める効果をもち, その相加効果は2.1から4.4日であった。出穂期 QTL は染色体2にも検出され, 表現型分散の10.5%を説明した。稈長についても3つの QTL が染色体2ならびに10に検出された。

4. 考察

3年間の試験で, 穂ばらみ期耐冷性 QTL が染色体1の SSR マーカー RM1003から RM3482の区間に同定され, その相加効果と寄与率はそれぞれ0.09から0.11, 16.2%から47.3%であった。QTL 領域に

Table 3 QTLs for cold tolerance, heading time, and culm length.

Year	Chr.	Interval ¹⁾	LOD	AE ²⁾	PVE ³⁾ (%)
<i>Cold tolerance at the booting stage (CT)</i>					
2005	1	RM1003-RM3482	7.4	0.09	25.2
2006	1	RM1003-RM3482	6.4	0.11	47.3
2007	1	RM1003-RM3482	5.0	0.09	16.2
2005	10	RM6691-RM333	4.7	-0.09	35.4
2007	10	RM3510-RM6691	4.2	-0.08	20.4
<i>Heading time (HT)</i>					
2006	2	RM300-RM341	4.5	-0.8	10.5
2005	10	RM3510-RM333	9.5	-2.7	33.6
2006	10	RM1125-RM333	8.9	-2.1	32.7
2007	10	RM3510-RM333	7.7	-4.4	36.7
<i>Culm length (CL)</i>					
2005	2	RM561-RM5427	4.5	1.1	44.6
2005	10	RM1125-RM3510	4.0	-1.8	39.0
2006	10	RM1125-RM333	5.0	-2.2	22.4

1) Markers flanking intervals in which LOD values were above the thresholds.

2) Additive effect of the Hatsushizuku allele.

3) Percentage of total phenotypic variance explained by the QTL.

座乗する RM3304の遺伝子型によって, RILs を「きらら397」型ホモと「初雫」型ホモの2群に分けた。2群間の平均稈実率には3年ともに有意な差が観察され(12.6から16.5%), 両親値の差の34.4から45.2%を説明していた。染色体1の当該領域には, 出穂期, 稈長ともに QTL は検出されなかった。2群間で稈長には小さいが有意な差が認められた(1.9から2.9cm)のに対して, 出穂期における2群間の差(0.6から1.3日)は有意ではなかった。これらの結果は, 染色体1の QTL は, 出穂期や稈長には影響せず, 「きらら397」と「初雫」間の穂ばらみ期耐冷性の変異に対して主たる効果を持っていることを示唆している。TAKEUCHI ら(2001)は穂ばらみ期耐冷性 QTL の *qCT-1* を染色体1の RFLP マーカー R494と R858の間の領域にマッピングしている。イネゲノム完全塩基配列(IRGSP 2005)におけるマーカーの位置に基づく, 本章で染色体1に検出された穂ばらみ期耐冷性 QTL 領域と *qCT-1* 領域は重複していた。本章の染色体1の QTL を精密マッピングすることは, 上記2 QTL が同一か否かを明らかにするためや QTL の機能を詳細に解析するために有用である。

染色体10の出穂期 QTL は3年間(2005年から2007年)の試験期間中毎年検出された。その相加効果はすべて「きらら397」方向であり(2.1から4.4日), 比較的大きな寄与率が観察された(32.7から36.7%)。同じ領域には稈長 QTL(2005, 2006年)と穂ばらみ期耐冷性 QTL(2005, 2007年)も検出された。さらに, 穂ばらみ期耐冷性については, 閾値(LOD = 4.4)は下回ったものの, 2006年にも LOD 値のピーク(LOD = 3.0)が観察された。染色体10の SSR マーカー RM6691の遺伝子型で RILs を群分けしたところ, 遺伝子型グループ間には出穂期($p < 0.001\%$)だけでなく稈長や穂ばらみ期耐冷性($p = 0.1-1\%$)にも有意差が観察された。「初雫」の対立遺伝子は早生, 短稈, 低温感受性に作用しており, その方向は3年間とも変化しなかった。本章で染色体10に見出された多型マーカーは4つのみであったが, さらなる多型マーカーを探索・利用して QTL 領域を絞り込むことによって, 染色体10に検出された穂ばらみ期耐冷性, 出穂期, 稈長 QTL 間の関係が明らかになるであろう。

「きらら397」と「初雫」間の多型率は, 温帯ジャポニカ間の報告例(KUROKI *et al.* 2007; TAKEUCHI *et al.* 2001)よりも高かった。その理由の1つに「初雫」がインディカに由来する品種であることが挙げ

られる。「きらら397」と「初雫」の間には、多型マーカーが存在しない大きなゲノム領域が数ヶ所あったことから、本章で構築した連鎖地図は、ゲノム全体をカバーしていないことが示唆される。本章で検出されたQTLは形質変異のすべてを説明していなかったことから、検出されなかったQTLが残されていると考えられる。推定された閾値は下回ったものの、本章で検出されたQTLとは異なる領域でもLOD値のピークが観察されている(Fig. 9)。本章よりもカバー率が高い地図を再構築することによって、穂ばらみ期耐冷性、出穂期、稈長について別のQTLが検出されるであろう。

「初雫」は、「きらら397」に比べて、穂ばらみ期耐冷性が極強であること(荒木ら, 2002)に加えて、高収量で玄米中のタンパク質含有率が低いことが特徴である。本章で作出したRILsはそれら有用形質の解析にも利用可能である。「初雫」は北海道初の酒米品種として奨励品種に採用されるほど優良な農業形質を持っていることから、品種育成において交配親として利用することに適していると考えられる。本章では、染色体1に検出された穂ばらみ期耐冷性QTLの再現性を2005から2007年の3回の試験によって確認した。この耐冷性QTLは、「初雫」からマーカー選抜を通じてQTLを導入することによって、耐冷性品種の育成に寄与することが期待される。

IV. 北海 PL9の穂ばらみ期耐冷性・出穂期・稈長に関する QTL の検出

1. はじめに

「Silewah」に由来する耐冷性の解析では、染色体4長腕には少なくとも2つの耐冷性遺伝子座(*Ctb1*, *Ctb2*)が密接連鎖して存在することが明らかとなり(SAITO *et al.* 2001), *Ctb1* の候補領域は56kbまで狭められ、F-boxタンパク質をコードする遺伝子が原因遺伝子の候補の1つとされた(SAITO *et al.* 2004)。その一方で、森ら(2007)は、「Silewah」を母本として作出した耐冷性極強系統「上系04501」において、「Silewah」由来の染色体領域を染色体1, 2, 3, 4, 5, 10および11に同定し、そのうち、染色体2, 3および5の3領域に穂ばらみ期耐冷性QTLを検出した。マーカーの染色体上の位置から推定すると、「上系04501」が持つ染色体3の「Silewah」由来領域は、「中母農8号」に導入されている「Silewah」

由来領域とは位置が異なる。このことから、「上系04501」は「中母農8号」とは異なるQTLによって穂ばらみ期耐冷性が極強になっていることが推測される。その一方でSAITOら(2001)では*Ctb1*, *Ctb2*の間に晩生遺伝子が存在することが示唆された。「中母農8号」は北海道では晩生の熟期であり(安部ら, 1989), その後代に優良な耐冷性品種は得られていない。その一因は耐冷性QTLが晩生遺伝子と密接連鎖していることにある可能性がある。以上から、耐冷性QTLを実際の育種に生かしていくためには、関与する遺伝子をできる限り多く検出・解析するとともに、それらが他の農業形質にいかに関連しているかを明らかにする必要があると考えられる。

II章では「北海 PL9」の染色体8に*qCTB8*を検出したが、その寄与率は26.6%であり、「Silewah」の*Ctb1*, *Ctb2*の場合と同様に、「北海 PL9」でも*qCTB8*以外の耐冷性QTLが存在することが推定された。本章では、「北海 PL9」(穂ばらみ期耐冷性“極強”)と「北海287号」(同“やや強”)の後代系統群を用いて、穂ばらみ期耐冷性を5ヵ年で6回評価し、各形質に関するQTLの検出を試みるとともに、検出された穂ばらみ期耐冷性QTL間の相互作用を解析した。また、耐冷性評価への関連性が高い出穂期ならびに稈長について、冷水灌漑圃場ならびに一般圃場の2環境においてQTLを探索した。出穂期、稈長QTLと穂ばらみ期耐冷性QTLとの関係を検討した。

2. 材料および方法

1) 供試材料

「北海 PL9」／「北海287号」の交配組み合わせから84系統の組換え自殖後代系統群(RILs)を作出し、本研究に利用した。供試世代はF₇(2004年)からF₁₁(2008年)である。

2) 形質評価

穂ばらみ期耐冷性は恒温深水灌漑法(佐々木・松永, 1983)により、北海道農業研究センター水田圃場(札幌市)にて評価した。耐冷性検定圃場(以下冷水灌漑圃場とする)では19.4℃に制御された冷水を幼穂形成期から出穂完了まで灌漑した(2004年6月24日～8月25日, 2005年6月28日～9月8日, 2006年6月28日～9月4日, 2007年6月29日～8月31日, 2008年6月28日～9月8日)。水深は約20cmとした。

2004年4月19日, 2005年4月15日, 2006年4月20日, 2007年4月20日, 2008年4月18日に播種し, 2004年6月1日, 2005年5月27日, 2006年5月26日, 2007年5月28日, 2008年5月28日に移植を行った。各系統5個体を1株として, 2004年のみ2反復, 2005から2008年は反復なしで栽植し, 登熟後に1系統あたり5穂の平均稔実率をもとに穂ばらみ期耐冷性(CT)を評価した。また, 冷水灌漑圃場における出穂期(HTC)は播種日から穂が初めて抽出した日までの経過日数とし, 稈長(CLC)は最長稈の穂首から地際までをセンチメートル単位で計測した。

また, 通常の用水で灌漑した一般圃場でも自殖系統群を栽培し, 出穂期, 稈長を評価した。2004年は2反復で1系統12個体について出穂期のみを評価し, 2007, 2008年は反復なしで1系統7個体について出穂期, 稈長を調査した。出穂期(HTN)は系統毎に半数以上の個体が出穂を始めた日を播種後の経過日数で評価し, 稈長(CLN)は冷水灌漑圃場と同様の調査方法で1系統5個体の平均値をもって評価した。

3) DNA マーカー解析

DNA 抽出, SSR マーカーの PCR 増幅, 電気泳動による PCR 産物の分離については, II に記した方法に従った。

4) QTL 解析ならびに統計解析

DNA マーカー解析で得られた遺伝子型情報を用いて, AntMap(IWATA and NINOMIYA, 2006)で遺伝地図を作成した。作成された遺伝地図に基づいて, 上記で評価した形質値について Windows QTL Cartographer ver. 2.5(WANG *et al.* 2007)で区間マッピングを行った。この際, 耐冷性(CT)については冷水処理後の稔実率を逆正弦変換した値を用いた。QTL 候補領域を広く捕捉するため LOD 値2.5を QTL 検出の閾値とし, 2回以上の試験で LOD 値が2.5以上になることを基準に QTL を探索した。統計解析には R version 2.10.0 (R Development Core Team 2009)を使用した。

3. 結果

1) 調査形質の変異

RILs の冷水灌漑圃場における耐冷性(CT), 出穂期(HTC)および稈長(CLC)の変異を Fig. 10に示し

た。耐冷性については, 「北海 PL9」が約90%の稔実率だったのに対して, 「北海287号」は25%前後の稔実率であり, RILs は両親間で広く連続的に分布した。出穂期については, 「北海 PL9」と「北海287号」の分布が重なる年次が多かったが, 試験期間を通してみると「北海 PL9」の方が0.4日早生であった。RILs は両親の範囲を超越して分布し, その範囲は2004年では20日前後, その他は14日程度であった。稈長については, 「北海 PL9」が「北海287号」よりも長稈になり, 2005, 2007年には両親間の差異が小さく RILs には長稈方向に超越分離が多い傾向が認められたが, それ以外の年はほぼ両親の範囲内20cm 程度に分布した。

一般圃場の出穂期(HTN)は, 「北海 PL9」が「北海287号」よりも早生であり, RILs は冷水灌漑圃場と同様に両親を超越して10~14日の範囲に分布した(Fig. 11)。稈長(CLN)については, 「北海 PL9」は「北海287号」より10cm 程度長稈であり, RILs は両親をやや超越して20cm 程度の範囲で連続的に分布した。

2) 形質間の相関

すべての調査形質においていずれの年次間にも0.1%水準で有意な相関が認められた。耐冷性(CT)では, 相関係数0.701 (2004a 対2006) ~ 0.881 (2005 対2008)と強い正の相関関係が認められた。冷水灌漑圃場における出穂期(HTC)ならびに稈長(CLC)については相関係数0.567 (2004b 対2006) ~ 0.821 (2005対2006), 0.361 (2004b 対2008) ~ 0.777 (2005 対2007)であり, 耐冷性よりはやや弱い正の相関関係が観察された。一般圃場における出穂期(HTN)では相関係数0.699 (2004b 対2007) ~ 0.851 (2004a 対2004b)で強い正の相関関係が認められたのに対して, 稈長では相関係数が0.494で相関はやや弱かった。

耐冷性(CT)と冷水灌漑圃場における出穂期(HTC)の間の相関係数は, 2005, 2008年以外の4回において5%水準で有意となり, 0.243 ~ 0.596であった(Table 4)。耐冷性(CT)と稈長(CLC)の間の相関係数は2004 ~ 2006年の4回において5%水準で有意となった(0.247 ~ 0.461)。また, 出穂期(HTC)と稈長(CLC)の間には2008年を除く5回において0.1%水準で有意な相関係数が観察され(0.355 ~ 0.615), 一般圃場における出穂期(HTN)と稈長

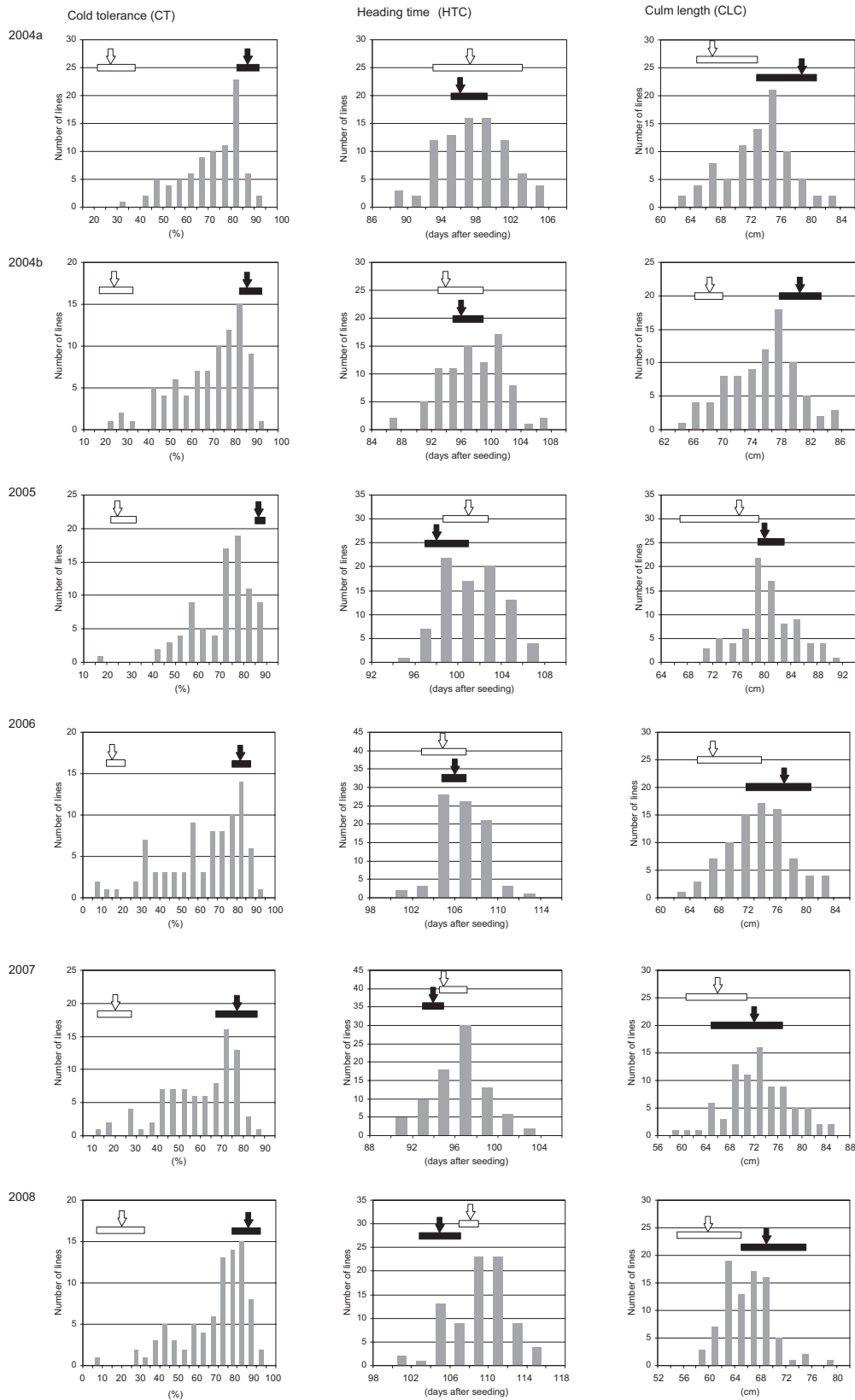


Fig. 10 Frequency distribution of cold tolerance at the booting stage (CT), heading time (HTC) and culm length (CLC) in RILs.

CT was evaluated as seed fertility after cool-water treatment. HTC and CLC were also recorded in the cool-water irrigation field. The ranges and means of Hokkai-PL9 are represented by solid bars and arrows, and those of Hokkai287 are represented by open bars and arrows, respectively.

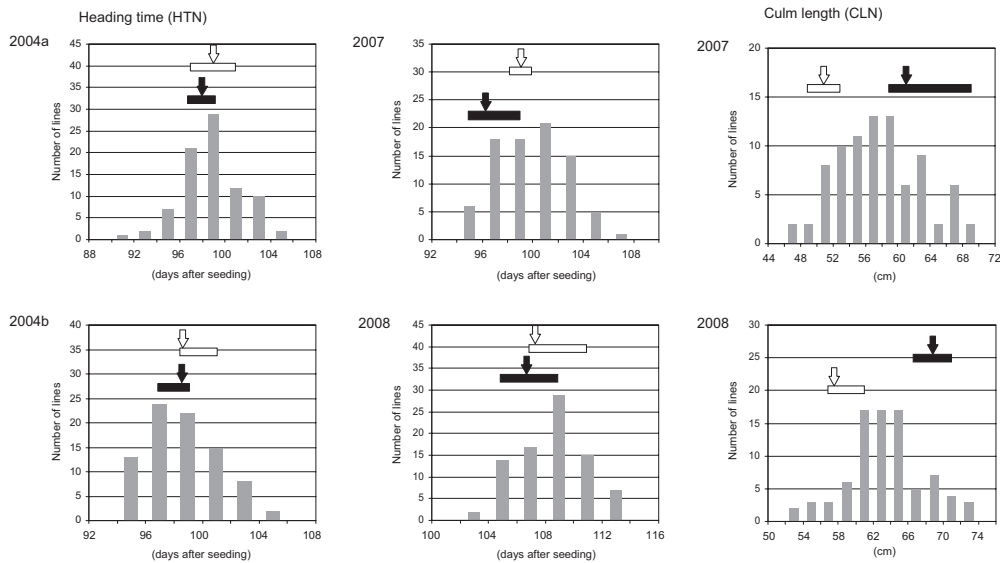


Fig. 11 Frequency distribution of heading time (HTN) and culm length (CLN) in RILs. Data was recorded in the normal-temperature water irrigation field. The ranges and means of Hokkai-PL9 are represented by solid bars and arrows, and those of Hokkai287 are represented by open bars and arrows, respectively.

Table 4 Correlation coefficients among cold tolerance (CT), heading time (HTC) and culm length (CLC).

Year	Trait	CT	HTC
2004a	HTC	0.243*	-
	CLC	0.461***	0.452***
2004b	HTC	0.348**	-
	CLC	0.321**	0.355***
2005	HTC	0.213	-
	CLC	0.247*	0.531***
2006	HTC	0.596***	-
	CLC	0.369***	0.400***
2007	HTC	0.255*	-
	CLC	0.169	0.615***
2008	HTC	0.200	-
	CLC	0.036	0.098

*, **, *** Significant at 5, 1 and 0.1% level, respectively.

(CLN)の間の相関係数は0.452 (2007年, 0.1%水準で有意), 0.259 (2008年, 5%水準で有意)であった。以上から, 耐冷性と出穂期, 耐冷性と稈長, および出穂期と稈長の間には弱い正の相関があることが示された。

3) 遺伝地図の作成

今回新たに2011のSSRマーカー (McCOUCH *et al.* 2002)を探索し, 210の多型検出可能なマーカーを同定した。三枝ら(2004), 安東ら(2007), KUROKIら(2007)で報告されたマーカーならびに「北海287号」の低アミロース性の原因変異領域を増幅するマ-

カー (安東ら, 2010)を加えた中から, 近傍に座乗するマーカーや多型が不明瞭なマーカーを除いた147マーカーを連鎖地図の作成に利用した。その結果, 147マーカーのうち141マーカーからなる, 全21連鎖群, 全長969.4cMの連鎖地図が構築された (Fig. 12)。

4) QTLの検出

(1) 穂ばらみ期耐冷性

穂ばらみ期耐冷性については, 染色体1, 2 (2ヶ所), 3 (3ヶ所), 4, 7, 8, 10および11 (2ヶ所)の計8染色体12ヶ所にQTLが検出された (Fig. 12)。

染色体8短腕には2007年を除く5回でLOD値の極大値が観察された。区間内に複数の極大値が観察された年もあったが, 各年のLOD最大値における寄与率は14.08~20.36%と2008年を除いた4回で最大であり, 相加効果は3.30~5.76であった (Table 5)。染色体11のRM552~RM5834の領域には*qCTB11.1*が2005, 2007年を除く4回で検出され, 寄与率は7.91~15.04%, 相加効果は2.98~6.52であった。また, 染色体2のRM5427~RM6379ならびに染色体10のRM1125~RM2371には, 2004a, 2004b, 2005および2008年の3ヶ年4回でQTLが検出され, 寄与率は5.64~10.99%と7.68~12.46%,

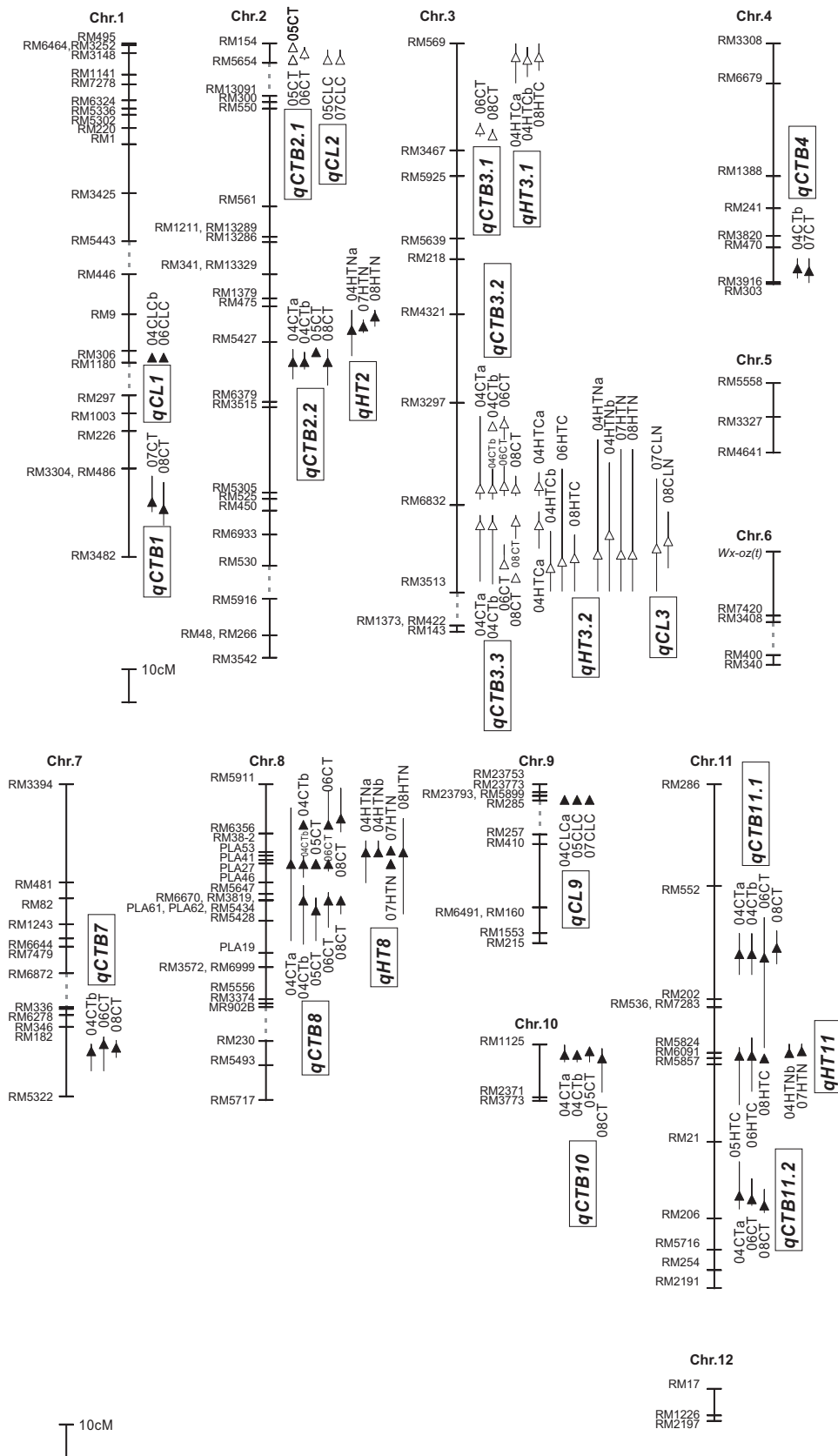


Fig. 12 Interval mapping for cold tolerance at the booting stage (CT), heading time (HT) and culm length (CL). Solid triangles indicate positions of LOD peaks of the QTLs that Hokkai-PL9 alleles increase the trait values, and open triangles indicate those of the QTLs that Hokkai287 alleles increases the trait values. The intervals recording LOD > 2.5 are shown by the vertical lines. Abbreviations are as follows: 04, 2004; 05, 2005; 06, 2006; 07, 2007; 08, 2008.

Table 5 QTLs for cold tolerance (CT), heading time (HTC, HTN) and culm length (CLC, CLN).

Trait	QTL	Chr	Year	Interval ¹⁾	LOD	AE ²⁾	PVE ³⁾ (%)
CT	<i>qCTB1</i>	1	2007	RM486 RM3482	2.90	4.97	14.90
			2008	RM486 RM3482	4.01	5.07	14.08
<i>qCTB2.1</i>	2	2005	RM154 RM5654	2.67	-1.99	5.33	
		2005	RM154 RM5654	2.64	-1.34	2.44	
		2006	RM154 RM5654	3.46	-4.24	9.31	
<i>qCTB2.2</i>	2	2004a	RM5427 RM6379	3.43	2.21	5.64	
		2004b	RM5427 RM6379	3.31	3.30	8.15	
		2005	RM5427 RM6379	2.89	2.97	10.99	
		2008	RM5427 RM6379	5.37	3.66	8.78	
<i>qCTB3.1</i>	3	2006	RM569 RM3467	3.00	-1.02	0.41	
		2008	RM569 RM3467	3.06	-1.37	1.18	
<i>qCTB3.2</i>	3	2004a	RM3297 RM6832	3.70	-1.10	1.29	
		2004b	RM3297 RM6832	2.51	-0.15	0.01	
		2004b	RM3297 RM6832	3.45	-1.30	1.17	
		2006	RM3297 RM6832	2.85	-0.34	0.04	
		2006	RM3297 RM6832	3.19	-3.56	5.08	
<i>qCTB3.3</i>	3	2004a	RM6832 RM3513	3.78	-1.50	2.37	
		2004b	RM6832 RM3513	3.39	-1.84	2.33	
		2006	RM6832 RM3513	2.94	-7.18	19.00	
		2008	RM6832 RM3513	3.34	-2.03	2.54	
<i>qCTB4</i>	4	2004b	RM470 RM3916	2.94	2.19	3.93	
		2007	RM470 RM3916	3.09	2.73	5.84	
<i>qCTB7</i>	7	2004b	RM182 RM5322	2.89	0.31	0.07	
		2006	RM182 RM5322	2.92	0.19	0.02	
		2008	RM182 RM5322	3.07	0.29	0.05	
<i>qCTB8</i>	8	2004a	RM5911 PLA19	4.17	3.30	14.08	
		2004b	RM5911 RM6356	2.62	3.69	10.85	
		2004b	RM38-2 PLA46	3.27	3.56	10.68	
		2004b	PLA46 PLA19	5.08	4.70	20.36	
		2005	PLA41 PLA46	2.58	2.70	9.35	
		2005	RM5647 PLA19	4.13	3.69	18.24	
		2006	RM5911 PLA41	4.13	5.59	14.85	
		2006	PLA41 PLA46	2.70	4.84	11.77	
		2006	PLA46 PLA19	3.68	5.76	18.23	
		2008	RM5911 RM6356	4.41	4.44	13.16	
<i>qCTB10</i>	10	2004a	RM1125 RM2371	2.66	3.28	12.46	
		2004b	RM1125 RM2371	2.63	3.27	7.82	
		2005	RM1125 RM2371	3.13	2.80	9.32	
		2008	RM1125 RM2371	4.94	3.47	7.68	
<i>qCTB11.1</i>	11	2004a	RM552 RM202	3.89	2.98	7.91	
		2004b	RM552 RM202	3.54	4.53	11.93	
		2006	RM552 RM5834	5.83	6.52	15.04	
		2008	RM552 RM202	3.52	4.47	9.98	
<i>qCTB11.2</i>	11	2004a	RM21 RM206	3.95	0.92	0.90	
		2006	RM21 RM206	2.79	3.20	4.35	
		2008	RM21 RM206	3.54	0.06	0.00	

1) Markers flanking intervals in which LOD values are above 2.5.

2) Additive effect of the Hokkai-PL9 allele.

3) Percentage of total phenotypic variance explained by the QTL.

相加効果は2.21 ~ 3.66, 2.80 ~ 3.47であった。これらはいずれも北海 PL9の遺伝子型で耐冷性が向上していた。

その一方で、染色体2および3の計4ヶ所では北海 PL9の遺伝子型で耐冷性が低下する QTL が検出された。そのうち、染色体3の RM6832 ~ RM3513の領域には *qCTB3.3* が2007年を除く5回検出され、寄与率は2.33 ~ 19.00%, 相加効果は -1.50 ~ -7.18であった。

(2) 出穂期

冷水灌漑圃場では染色体3に2ヶ所、染色体11に1ヶ所の計3ヶ所で QTL が検出された。染色体3の RM3297 ~ RM3513には2004, 2006, 2008年の3

Trait	QTL	Chr	Year	Interval ¹⁾	LOD	AE ²⁾	PVE ³⁾ (%)
HTC	<i>qHT3.1</i>	3	2004a	RM569 RM3467	3.10	-1.99	21.02
			2004b	RM569 RM3467	2.80	-2.19	21.10
			2008	RM569 RM3467	4.00	-1.40	17.12
	<i>qHT3.2</i>	3	2004a	RM3297 RM6832	2.89	-0.76	2.68
			2004a	RM6832 RM3513	2.92	-0.90	3.84
			2004b	RM6832 RM3513	4.16	-3.75	54.15
2006			RM3297 RM3513	3.78	-1.51	33.37	
<i>qHT11</i>	11	2005	RM7283 RM21	3.10	1.13	15.57	
		2006	RM7283 RM21	2.70	0.83	14.08	
		2008	RM6091 RM5857	2.70	0.84	7.45	
HTN	<i>qHT2</i>	2	2004a	RM475 RM6379	3.80	1.12	15.68
			2007	RM475 RM5427	2.80	0.94	10.41
			2008	RM475 RM5427	2.70	0.72	8.05
	<i>qHT3.2</i>	3	2004a	RM3297 RM3513	4.30	-1.69	27.28
			2004b	RM3297 RM3513	4.10	-1.43	19.97
			2007	RM3297 RM3513	5.30	-2.52	55.10
			2008	RM3297 RM3513	4.50	-2.18	53.75
	<i>qHT8</i>	8	2004a	RM6356 RM5647	3.40	1.15	17.25
			2004b	RM6356 PLA53	3.10	1.08	15.31
			2007	RM6356 PLA53	2.70	1.06	13.75
2007			PLA41 PLA46	2.60	1.02	12.46	
2008			RM5911 RM5428	4.20	1.13	20.69	
<i>qHT11</i>	11	2004b	RM7283 RM6091	2.96	0.93	11.64	
		2007	RM7283 RM6091	2.60	1.07	14.12	
CLC	<i>qCL1</i>	1	2004b	RM306 RM1180	2.98	0.38	0.50
			2006	RM306 RM1180	2.68	0.89	4.85
	<i>qCL2</i>	2	2005	RM154 RM5654	3.78	-1.03	5.15
2007			RM154 RM5654	3.28	-1.22	4.91	
<i>qCL9</i>	9	2004a	RM5899 RM285	2.50	1.39	8.95	
		2005	RM5899 RM285	2.60	0.92	4.03	
		2007	RM5899 RM285	3.60	1.41	6.53	
CLN	<i>qCL3</i>	3	2007	RM3297 RM3513	3.85	-3.41	29.35
			2008	RM6832 RM3513	3.02	-2.55	22.23

年4回で LOD 値の極大値が観察され、寄与率は2.68 ~ 95.81%, 相加効果は -0.76 ~ -4.05で北海 PL9型が出穂を早くする効果を持っていた。

一般圃場では染色体2, 3, 8および11に4 QTL が検出された。このうち染色体3には、冷水灌漑圃場と同じ領域に同じ効果の方向を持つ QTL が検出された。相加効果は -1.43 ~ -2.52, 寄与率は19.97 ~ 55.10%と比較的大きな作用力を示した。

(3) 稈長

冷水灌漑圃場では染色体1, 2および9に3 QTL が検出された。染色体2の *qCL2* は北海 PL9型で短稈になる効果をもち、相加効果は -1.03 ~ -1.22, 寄与率4.91 ~ 5.15%であった。染色体9の *qCL9* は相加効果0.92 ~ 1.41, 寄与率4.03 ~ 8.95%であり、染色体1の *qCL1* は作用力がさらに小さい QTL であった。一般圃場では染色体3の *qCTB3.3*, *qHT3.2* と重複する位置に *qCL3* が検出された。

5) 耐冷性 QTL の集積効果

2007年を除く5回で耐冷性に関して最も大きな寄与率が観察された *qCTB8* と、比較的大きな寄与率が観察された4つの耐冷性 QTL (*qCTB1*, *qCTB2.2*,

qCTB10 および *qCTB11.1*) との間で、両 QTL の遺伝子型によって供試系統を 4 つの系統群に群別し、各遺伝子型群の平均稔実率を比較した (Table 6)。これらの 5 QTL では「北海 PL9」の対立遺伝子が耐冷性向上効果を持つ。染色体 1 に検出された *qCTB1* では、*qCTB8* と同時に検出されたのは 2008 年だけであったが、全試験回において、両 QTL が北海 PL9 型系統の平均稔実率は北海 287 号型の系統に比べて有意に高かった。しかし、*qCTB1* あるいは *qCTB8* のいずれかが北海 PL9 型の系統の平均稔実率は、北海 287 号型の系統よりも高いものの両者の間に有意差は認められなかった。*qCTB10* と *qCTB11.1* についても、両 QTL が同時に検出された 2004a、2004b、2006 および 2008 年の計 4 回で、両 QTL とともに北海 PL9 型系統の平均稔実率は、北海 287 号型系統よりも有意に優れており、片方の QTL のみが北海 PL9 型の系統よりも高い値を示したがその差は有意ではなかった。その一方で、*qCTB2.2* についても同様の傾向が認められたが、2008 年以外では、いずれの遺伝子型間においても平均稔実率には有意な差は検出されなかった。

4. 考察

本研究では区間マッピング法を利用して、「北海 PL9」の穂ばらみ期耐冷性ならびに出穂期、稈長に関与する QTL を検出した上で、耐冷性については 2 QTL 間の集積効果を解析した。KUROKI ら (2007) では、「北海 PL9」と「北海 287 号」との間で多型を検出できたのは 487 マーカー中 54 マーカーであり、連鎖地図を構築するには不十分な数のマーカーしか得られなかった。耐冷性との連関が認められたのは染色体 8 の RM38 のみであり、SSR マーカー RM5647 から PLA61 の間に耐冷性 QTL (*qCTB8*) の候補領域を同定した。しかし *qCTB8* の寄与率は 26.6% であり、「北海 PL9」は *qCTB8* 以外にも耐冷性 QTL を持つことが示唆された。今回新たに 2011 マーカーを探索し、141 マーカーからなる遺伝地図を構築した結果、12 の耐冷性 QTL を検出することができた。5 年 6 回のうち 5 回の試験で染色体 8 短腕には最も効果の大きい QTL が検出され、*qCTB8* の安定した耐冷性向上効果を確認することができた。*qCTB8* 区間内には、一般圃場における出穂期に関与する QTL (*qHT8*) も検出された。本研究では冷水灌溉圃場で

Table 6 Mean seed fertility of the genetic classes of RILs between Hokkai-PL9 and Hokkai287.

Genotype ¹⁾	<i>qCTB8</i>		Hokkai-PL9		Hokkai-PL9		Hokkai287		Hokkai287	
	Counterpart QTL	Year	n ²⁾	Mean ± SD ³⁾	n ²⁾	Mean ± SD ³⁾	n ²⁾	Mean ± SD ³⁾	n ²⁾	Mean ± SD ³⁾
<i>qCTB1</i>	Counterpart QTL	2004a	12	79.6 ± 6.1 a	13	72.1 ± 10.9 ab	8	70.4 ± 14.9 ab	10	61.6 ± 10.4 b
		2004b		78.5 ± 5.8 a		70.4 ± 15.1 ab		64.2 ± 22.3 ab		59.5 ± 10.9 b
		2005		79.1 ± 5.5 a		72.6 ± 10.8 ab		71.7 ± 15.7 ab		64.2 ± 10.1 b
		2006		76.7 ± 10.6 a		64.8 ± 22.1 ab		58.3 ± 27.8 ab		50.7 ± 19.1 b
		2007		72.5 ± 8.4 a		55.6 ± 16.7 b		58.1 ± 17.2 ab		49.9 ± 14.6 b
		2008		79.4 ± 5.4 a		69.1 ± 16.3 ab		68.2 ± 20.2 ab		58.2 ± 15.1 b
<i>qCTB2.2</i>	Counterpart QTL	2004a	16	77.0 ± 9.1	8	72.9 ± 10.4	16	67.4 ± 15.6	6	60.8 ± 13.0
		2004b		75.6 ± 11.5		70.9 ± 11.6		64.8 ± 17.8		60.6 ± 20.4
		2005		77.7 ± 7.7		70.3 ± 11.5		69.6 ± 14.6		65.3 ± 12.5
		2006		72.8 ± 15.7		72.1 ± 12.5		57.9 ± 24.0		51.9 ± 23.0
		2007		64.7 ± 17.1		64.5 ± 11.0		55.7 ± 18.7		49.3 ± 15.8
		2008		78.2 ± 9.8 a		72.2 ± 10.6 ab		62.7 ± 18.4 b		60.5 ± 21.1 ab
<i>qCTB10</i>	Counterpart QTL	2004a	22	77.1 ± 9.1 a	4	77.9 ± 6.0 ab	9	67.8 ± 11.6 ab	10	59.9 ± 16.0 b
		2004b		77.0 ± 9.9 a		73.6 ± 15.0 ab		63.6 ± 19.5 ab		60.2 ± 16.8 b
		2005		77.4 ± 9.1		71.1 ± 8.3		69.0 ± 13.7		64.4 ± 13.9
		2006		73.1 ± 14.8 a		75.8 ± 12.7 ab		62.2 ± 24.6 ab		47.8 ± 21.4 b
		2007		65.8 ± 14.6		69.2 ± 14.9		54.4 ± 18.4		50.7 ± 20.9
		2008		76.6 ± 11.3 a		75.5 ± 10.4 ab		65.5 ± 18.1 ab		58.2 ± 17.9 b
<i>qCTB11.1</i>	Counterpart QTL	2004a	11	76.8 ± 7.5 a	10	73.7 ± 10.3 a	5	72.9 ± 14.5 ab	12	59.4 ± 10.9 b
		2004b		77.1 ± 8.0 a		71.5 ± 14.3 ab		73.9 ± 13.5 ab		55.1 ± 15.6 b
		2005		76.6 ± 11.7		75.4 ± 8.0		77.0 ± 10.3		62.1 ± 11.3
		2006		76.7 ± 11.2 a		66.0 ± 21.9 ab		71.3 ± 11.4 ab		42.0 ± 19.7 b
		2007		63.3 ± 15.7		65.3 ± 16.0		60.3 ± 5.1		50.8 ± 16.4
		2008		74.6 ± 13.0 a		73.1 ± 15.2 a		73.8 ± 7.8 ab		54.4 ± 19.2 b

1) RILs are grouped into the four classes by genotypes of *qCTB8* and counterpart QTLs.

Following markers are used for genotyping at *qCTB8* and counterpart QTLs: *qCTB8*, RM5911 and PLA19; *qCTB1*, RM486 and RM3482; *qCTB2.2*, RM5427 and RM6379; *qCTB10*, RM1125 and RM2371; *qCTB11.1*, RM552 and RM5524.

2) The number of lines.

3) Mean and standard deviation of seed fertility. Values followed by different letters in the same row are significantly different at P = 0.05 level by the STEEL-DWASS test.

は出穂期 QTL が検出されなかったため、*qCTB8* が出穂期の影響で検出された可能性は低いと考えられる。しかし、*qCTB8* の育種利用を考えた場合には、*qHT8* との連鎖を考慮する必要がある。

染色体1の*qCTB1*は北海道の耐冷性極強品種「初雫」の染色体1の耐冷性 QTL (KUROKI *et al.* 2009) と同じ区間に検出された。この QTL は「初雫」では3年の試験で唯一安定して検出され、出穂期や稈長への影響は小さかったことから、耐冷性に主効果を持つと推察された。それに対して、「北海 PL9」では2回の検出にとどまったものの、その相加効果は4.97～5.07、寄与率は14.08～14.90%と比較的高かった。同領域には「コシヒカリ」の耐冷性 QTL (*qCT-1*) も検出されている (TAKEUCHI *et al.* 2001)。冷水深水灌漑法では長稈個体が冷水処理を回避する可能性があるため、耐冷性評価と稈長との関係に注意を要する。TAKEUCHI ら (2001) は、*qCT-1* とほぼ同じ位置には作用力の大きい稈長の QTL (*qCL-1*) を検出し、稈長と耐冷性の間に相関が認められたことから、*qCT-1* は稈長の変異に伴って耐冷性にも変異が生じたために検出されたものである可能性を示唆した。他方、「初雫」では近傍に稈長の QTL は検出されなかった。また、「北海 PL9」では稈長の QTL (*qCL1*) が *qCTB1* 近傍に2回検出されたが、*qCTB1* と *qCL1* の位置に重複はなく、両者が同時に検出されることもなかった。したがって、「初雫」の染色体1の耐冷性 QTL と同様に *qCTB1* は耐冷性に主効果を持つ QTL であると推測された。その一方で、本研究では *qCTB2.1* と *qCL2* が染色体2の重複する位置に検出された。これら QTL では「北海 PL9」が耐冷性弱、短稈に寄与していた。TAKEUCHI ら (2001) と同様に本研究においても耐冷性と稈長の間にはやや弱い正の相関が認められたことから、稈長の QTL が耐冷性評価に影響している可能性が示唆される。

北海道のイネ品種は、札幌では4月終わりから8月半ばまで日長が14時間を超過し夏至日長は15時間を超過するなど、本来短日植物であるイネにとっては特異な環境で生育している。北海道品種は染色体7の *Hd4* (= *E1*) 座に機能欠失型対立遺伝子 *e1* を例外なく持つことにより日長反応性を失っていることが明らかにされたが (OKUMOTO *et al.* 1996; FUJINO and SEKIGUCHI, 2005)、北海道品種間の出穂期に関する遺伝的な差異の解明は不十分であった。FUJINO and SEKIGUCHI (2008) は、北海道の早生3品種と中

生品種「ほしのゆめ」との間の単交配に由来する3つの F₂ 集団を材料に、既知の出穂期 QTL 近傍の SSR マーカーを用いて北海道品種間の早晩性にかかわる QTL の検出を試みた。その結果、染色体3の *Hd9*、染色体6の *Hd3* と *Hd1* 近傍のマーカーで出穂期との有意な相関が認められた。これら北海道品種が持つ出穂期関連 QTL の効果は *Hd9* や *Hd3* および *Hd1* に比べて小さく、「ほしのゆめ」を基準とした場合、染色体3短腕に検出された *qDTH3* は6.6日早生化したのに対して、染色体6短腕の *qDTH6-1* ならびに *qDTH6-2* はそれぞれ4.0～5.0日、4.8～7.3日晩生化する効果を示した。*qDTH6-2* に対応する *Hd1* と *E1* との間には相互作用があることが示されている (NONOUE *et al.* 2008) ことから、*qDTH6-2* が北海道品種間の出穂期の変異に重要な役割を果たしていることが示唆された。本研究の連鎖地図では染色体6の一部しかカバーできなかったため、*qDTH6-1* ならびに *qDTH6-2* に対応する位置では QTL の探索ができなかったが、*qDTH3* 近傍と推定される位置に北海 PL9型で早生化する QTL (*qHT3.1*) を冷水灌漑圃場においてのみ検出した。また、冷水灌漑、一般圃場の両方で *qHT3.2* と *qHT11* を、一般圃場では *qHT8* を検出した。それぞれの QTL 周辺のマーカーの位置関係から、*qHT3.2* は *Hd6* に、*qHT8* は *Hd5* に対応する可能性がある。特に *Hd5* には *Hd4* (= *E1*) との相互作用が報告されていること (LIN *et al.* 2003) から、*qDTH6-2* と同様に *qHT8* も北海道品種間の出穂期変異に関係する QTL なのかもしれない。

qHT3.2 と重複する染色体3の領域には、耐冷性 QTL (*qCTB3.3*) ならびに一般圃場の稈長に関与する *qCL3.2* も検出された。これら QTL は、北海 PL9型で耐冷性弱、早生、短稈になる効果を持っていた。鈴木 (1982) は、分離集団において穂ばらみ期耐冷性と葯長、柱頭長との間に正の相関関係を観察したが、早生、短稈はこれら花器形質の短小化を引き起こしている可能性がある。SATO ら (1992) は早生遺伝子 *Ef-1* が葯を短くする作用を多面発現している可能性の高いことを報告している。SAITO ら (2001) は、耐冷性 QTL 領域を段階的に導入した準同質遺伝子系統 (NIL) シリーズを作出し、その葯長と穂ばらみ期耐冷性の間に正の相関関係を認めている。NIL に導入された QTL 領域には晩生をもたらし作用も観察され、耐冷性遺伝子 *Ctb1*、*Ctb2* と晩生遺伝子が密接に連鎖している可能性が示唆された。「北海 PL9」

の染色体3長腕領域において、早生または短稈遺伝子が耐冷性弱を多面発現しているのか、あるいはそれらの遺伝子が密接連鎖しているのかについては今後詳細な解析が必要であるが、耐冷性発現機構を明らかにする上で興味深い。

耐冷性は量的形質であることから、多くの遺伝子がかかわっていることを想定して解析を行った結果、本研究では、これまで報告のあった *qCTB8* の他に、11の耐冷性 QTL を検出することができた。さらに、*qCTB8* と *qCTB1*、*qCTB10* および *qCTB11.1* との間で集積効果を見出し、両 QTL を併せ持つことで有意に耐冷性が向上することを示した。本研究で検出できた QTL については、戻し交配によって QTL を導入した NIL を作出し、遺伝的背景を揃えた条件で QTL の存在を検証するとともに、効果や位置をより詳細に解析する必要がある。NIL は QTL 間の相互作用を確認するためにも有用である。

現在、耐冷性 QTL (*qCTB8*) については DNA マーカー育種に利用されているなど、「北海 PL9」の育種利用はすでに始まっているが、耐冷性以外の育種対象形質の遺伝的な評価は必ずしも十分とはいえない。「北海 PL9」は耐冷性が極強であるだけでなく、白米中のタンパク質含有率ならびにアミロース含有率が低い(安東ら2007; ANDO *et al.* 2010)など、育種的に有望な特性を兼ね備えた系統である。これらの優良特性のそれぞれを制御する遺伝子を明らかにするとともに、遺伝子間の相互作用を解明することが望まれる。その結果として、DNA マーカー選抜によって、「北海 PL9」の優良な農業特性がより効果的に育種で利用されるようになることが期待される。

V. 総合考察

北海道において、冷害の克服のため耐冷性の向上は欠かすことができない。穂ばらみ期耐冷性は量的形質で多数の遺伝子が関与する複雑形質であると推定され、遺伝的な解析は限られた材料でしか行われていなかった。本研究では、DNA マーカーを用いて、耐冷性極強の「北海 PL9」ならびに「初雫」の穂ばらみ期耐冷性に関与する遺伝子座を検出、同定した。イネゲノムの解読が完了し、PCR ベースの DNA マーカーをゲノム上に設定することが容易になったことから、耐冷性遺伝資源の遺伝解析例は着実に増えている。耐冷性遺伝子座にかかわる情報は充実し

つつあり、今後これらの情報は、遺伝解析のさらなる進展や耐冷性育種に生かされるものと期待される。

1. 穂ばらみ期耐冷性遺伝子の解析

「中母農8号」の *Ctb1* と *Ctb2*、「北海 PL9」の *qCTB8* の他にも、いくつかの耐冷性遺伝資源について、穂ばらみ期耐冷性の遺伝解析が行われ、耐冷性遺伝子の座乗位置が明らかになりつつある。

宮城県古川農業試験場・農業資源生物研究所などのグループでは「コシヒカリ」が持つ耐冷性遺伝子を染色体1, 7および11に検出した(早坂ら, 1998; TAKEUCHI *et al.* 2001)。このうち、最も効果が大きい染色体7の *qCT-7* については、共分離する DNA マーカー S1848, S778および C51334によって染色体上に位置付けられる(上田ら, 2003)とともに、「コシヒカリ」を親として育成された耐冷性品種「ひとめぼれ」も同じ位置に耐冷性 QTL を持つことが推定された(千葉ら, 2004)。また、「奥羽197号」の耐冷性 QTL を染色体4長腕に検出した(千葉ら, 2001; 千葉ら, 2007)。この QTL (*qCTB-4*) は「中母農8号」の *Ctb1*, *Ctb2* と同じ座である可能性も残されているが、*qCTB-4* 領域を「チヨホナミ」(耐冷性中～やや強)に導入した系統の稔実率は「チヨホナミ」よりも約15ポイント高く、*qCTB-4* の耐冷性向上効果が確認された(千葉ら, 2006)。

青森県農林総合研究センター藤坂稲作研究部などのグループでは、ネパール原産の熱帯ジャポニカ品種「Pakhe Dhan」の耐冷性に関する遺伝解析が続けられており、染色体3, 4, 6および11に耐冷性遺伝子座が検出された(須藤ら, 2000; 須藤ら, 2001; 神田・須藤, 2005; 遠藤ら, 2009)。このうち、染色体6の耐冷性遺伝子座(*qFLT-6*)は DNA マーカー FP0621近傍にあることが明らかになった(須藤ら, 2004)。4回の戻し交配によって「Pakhe Dhan」に由来する FP0621周辺領域を「ふ系175号」に導入した系統「03PM138」を育成し、その耐冷性を圃場で検定したところ、「ふ系175号」よりも稔実率が約21ポイント高く、*qFLT-6* の耐冷性向上効果が確認された。また、*qFLT-6* を利用することにより、耐冷性“強～極強”の高アミロース系統である「ふ系212号」が育成されている。

SATAKE and SHIBATA(1992)は小胞子の分化から受精に至るまでのイネの発育段階を小胞子分化、花

粉の成熟、柱頭への受粉、花粉管の発芽・受精の4段階に分類した。その上で、それぞれの段階において稔実率に影響する形質である、分化小孢子数、発育花粉歩合、受粉歩合および柱頭上花粉の受精率について品種間比較を行い、それらの稔実率に対する寄与度を評価した。その結果、「染分」、「赤毛」、「キタアケ」、「道北糯18号」、「中母42号」および「はやゆき」等では分化小孢子数の寄与率が大きく、「染分」、「ハマアサヒ」、「キタアケ」、「トドロキワセ」、「はやゆき」および「コチミノリ」等では発育花粉歩合の寄与率が大きく、「そらち」、「中母42号」、「はやゆき」および「キタアケ」等は受粉歩合の寄与率が大きかった。この結果は耐冷性獲得機構が品種によって異なることに加えて、耐冷性向上のためには耐冷性獲得機構にかかわる形質を単独ではなく総合的に改良する必要があることを示唆している。そのためには、①新しい耐冷性遺伝子源の探索、に始まり、②その遺伝子源について耐冷性 QTL の検出、③検出された新規の耐冷性 QTL の精密マッピング、④耐冷性遺伝子のクローニング、⑤遺伝子機能の解明、に至るまでの一連の段階を経て、新規耐冷性遺伝子の機能解明を行う必要がある。斎藤ら(2009)は、「中母農8号」が染色体4に持つ熱帯ジャポニカ由来の耐冷性遺伝子 *Ctbl1* は細胞内で不要になったタンパク質の分解にかかわる F-box タンパク質をコードすることを明らかにしている。今後は他の耐冷性 QTL においても同様の取り組みを行い、耐冷性 QTL の原因遺伝子の単離とその機能解明が進められることが期待される。その際、留意すべき点として以下が考えられる。

①耐冷性検定法

現在の穂ばらみ期耐冷性検定の大半は、冷水深水灌漑処理後の稔実率の大小で耐冷性を評価しており、冷温ストレスに反応した稔実率の変化を純粋に評価できてはいない。前述の通り、稔実率に影響する形態的形質だけを取り上げても、分化小孢子数、発育花粉歩合、受粉歩合および柱頭上花粉の受精率と多岐にわたる要素がかかわっており、そのことが耐冷性をより一層複雑な形質にしている。耐冷性に関与するとして検出された QTL の原因遺伝子の機能を解明するためには、その遺伝子が耐冷性発現のどの段階で働いているのかを詳細に明らかにする必要がある。このような詳細な解析が求められる場面においては、現在の冷水深水灌漑処理後の稔実率に

よる耐冷性評価だけでは不十分である。遺伝子単離の途中段階では大規模な分離集団の形質評価を行う必要があるため困難は伴うものの、現在の稔実率による耐冷性評価に、上述の形態的形質あるいは生理的形質による評価を加えて、より精密な形質評価法を確立する必要がある。

②遺伝子単離手法

耐冷性 QTL の原因遺伝子を単離する手法として *Ctbl1* では、QTL を遺伝地図上に位置付けた後、その近傍で詳細な組換え個体を作成して遺伝子型と形質の比較を行う、いわゆるマップベースクローニング法が用いられ成功した。しかしながら、耐冷性が上述のような複雑な要素から成り立っていることを考慮すると、耐冷性 QTL が複数の原因遺伝子で構成され、どのひとつが欠けても耐冷性が発揮されないことも想定される。それら遺伝子がゲノム上で離れて存在している場合には、マップベースクローニング法では原因遺伝子の単離が困難になることも予想される。もちろん、原因遺伝子の単離は耐冷性の作用機作の解明のみならず、劣悪形質との連鎖の解消のためにも重要である。複雑かつ環境変動も大きい耐冷性のような形質を扱う場合には、原因遺伝子が単一座にない場合もありうるという前提で、遺伝子単離の手法について考慮する必要がある。ゲノム解析手法の進展によって、ゲノム全体に一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) 等の DNA マーカーを詳細に設定することも身近になりつつある。多数の材料で詳細なマーカー情報を得ることができれば、形質評価値と連関する変異を塩基レベルで同定し、QTL 原因遺伝子の変異を網羅的にとらえることが可能になるかもしれない (ARANZANA *et al.* 2005)。

2. 穂ばらみ期耐冷性 QTL の育種利用に向けて

上述のように穂ばらみ期耐冷性の遺伝解析が進み、耐冷性にかかわる QTL や遺伝子が明らかになってきた。これらの耐冷性 QTL・遺伝子に特徴的な DNA 配列を目印(マーカー)として用いると、耐冷性の強いイネが圃場検定なしに選抜可能である。DNA マーカー選抜の特長としては、苗の段階で室内選抜が可能なることのほかに、従来の育種法では困難であった、目的の QTL 遺伝子近傍に存在する不良形質の除去が可能であることが挙げられる。例えば、陸稲に由来するいもち病圃場抵抗性遺伝子 *pi21*

の近傍には食味を不良にする遺伝子が密接に連鎖しており、従来の育種ではこの連鎖を打破することが不可能であったが、いもち病圃場抵抗性遺伝子の位置を詳細に決定することによって食味を不良にする遺伝子が外れた個体の選抜が可能になり、良食味かついもち病圃場抵抗性にも優れた品種を育成することに成功した(FUKUOKA *et al.* 2009)。「中母農8号」の密接連鎖する2つの耐冷性遺伝子 *Ctb1*・*Ctb2* に挟まれた位置には晩生遺伝子の存在が示唆されている。前項で紹介した外国稲由来の耐冷性 QTL 遺伝子は、大きな作用力が確認されながらも不良形質との連鎖があるために実用品種の育成に積極的に利用されてきたとは言い難い。しかし、DNA マーカー選抜を利用することによって不良形質を伴わずに耐冷性遺伝子を導入することが可能になり、外国稲由来の耐冷性遺伝子を優良品種の遺伝的背景に導入した耐冷性極強品種の育成が期待できる。

また、DNA マーカーを利用して複数の QTL 遺伝子の集積を図ることをピラミディングと呼んでいるが、耐冷性遺伝子をピラミディングすることによって、極強レベルを超える耐冷性を実現した高度耐冷性イネの開発も期待できる。「奥羽197号」の耐冷性 QTL(*qCTB-4*)ならびに「コシヒカリ」などの *qCT-7* を「チヨホナミ」に単独で導入した系統は、「チヨホナミ」よりもそれぞれ約12, 19ポイントの稔実率向上が認められたのに対して、*qCTB-4* と *qCT-7* を併せて「チヨホナミ」に導入すると稔実率は約30ポイント向上した(千葉ら2007)。このことから、2つの耐冷性 QTL には集積効果があることが示された。また、清水ら(2002)は「中母農8号」と「中母農11号」の交配後代に両親の耐冷性を超越する個体を認め、両中間母本の耐冷性は集積可能であるとした。

耐冷性の遺伝解析ならびに DNA マーカーの開発はまだ進行中であるので、DNA マーカー選抜を実際に利用した耐冷性品種の育成は報告されていない。2005年度から、北海道農業研究センターと農業生物資源研究所、青森県農林総合研究センター藤坂稲作研究部、宮城県古川農業試験場、農林水産先端技術産業振興センター農林水産先端技術研究所は、農林水産省委託プロジェクトの中で DNA マーカー選抜によるイネの穂ばらみ期耐冷性遺伝子集積系統の育成に取り組んでいる。この課題では、「Silewah」由来の *Ctb1*・*Ctb2*、「Pakhe Dhan」由来の *qFLT-6*、

「Padi Labou Alumbis」もしくは「はやゆき」由来の *qCTB8* を耐冷性の遺伝子源として利用する。これらの耐冷性 QTL・遺伝子を、「ひとめばれ」や「ほしのゆめ」などに単独で導入もしくは複数ピラミディングした準同質遺伝子系統を戻し交配と DNA マーカー選抜によって育成する計画である。育成された系統は品種の優良性を保ちつつ高度な耐冷性を実現した実用品種候補として期待できるほか、環境条件の異なる各育成地で *Ctb1*・*Ctb2*、*qFLT-6* および *qCTB8* を単独で導入もしくはピラミディングした系統の耐冷性を評価することにより、耐冷性向上効果についても明らかにできると期待される(黒木, 2006; 黒木・斎藤, 2007)。

2003年の冷害時には耐冷性極強品種でも大きな被害が生じ、極強を超える耐冷性を持つ品種の必要性が指摘されている(永野・千葉, 2003)。その一方で、「中母農8号」と国内品種に由来する耐冷性集積系統「中母35」の組合せから作出された「中母59」は、藤坂稲作研究部で育成された系統の中で最強レベルの耐冷性を示している(須藤ら, 1998, 坂井ら, 2003)ことから、「中母農8号」を利用することによって国内品種の耐冷性向上が可能であり、東北地域でもその効果が認められることが示唆される。松葉ら(2007)は「中母農8号」ならびに「中母農11号」から北海道の耐冷性強品種「ほしのゆめ」に耐冷性遺伝子(*Ctb1*・*Ctb2*)および耐冷性 QTL(*qCTB8*)を戻し交配によってそれぞれ導入した。その結果、*Ctb1*・*Ctb2*、*qCTB8* ともに単独での耐冷性向上効果を認めしたが、*Ctb1*・*Ctb2* には晩生、*qCTB8* には長稈との連鎖が観察された。さらに、松葉ら(2008)は前述の「Pakhe Dhan」に由来する染色体6の穂ばらみ期耐冷性 QTL(*qFLT-6*)について、「ふ系175号」を反復親として得られた BC₄ 世代の「04PM254」ならびに「ふ系212号」を供与親として用い、「ほしのゆめ」を戻し交配した。その過程で得られた F₂、BC₁F₂ および BC₂F₂ 集団について耐冷性の検定を行い、*qFLT-6* の耐冷性向上効果を検証した。*qFLT-6* 近傍の SSR マーカー FP0612の遺伝子型によって集団内個体をグループ分けし、グループ間の耐冷性の差を比較した。その結果、BC₁F₂ ならびに BC₂F₂ 集団の一部でしか遺伝子型グループ間の耐冷性に有意差は検出されず、全体として「Pakhe Dhan」型の障害型耐冷性 QTL(*qFLT-6*) 遺伝子の導入による耐冷性の向上効果は明確には認められなかった、と結

論付けている。その理由について、「04PM254」ならびに「ふ系212号」の耐冷性は北海道においても反復親「ふ系175号」よりも優れていたことから、*qFLT-6*が十分な耐冷性を発揮するには特定の遺伝的背景を要する可能性を指摘している。以上から、遺伝子によっては、特定の環境や遺伝的条件でしか耐冷性に効果を示さない可能性が示唆される。*Ctb1*・*Ctb2*、*qFLT-6*および*qCTB8*の耐冷性向上効果については上述のとおりデータが得られはじめてきており、耐冷性評価が“極強”を超えるような高度耐冷性を持った実用品種の育成も実現可能であると思われる。

耐冷性のような量的形質には複数の遺伝子が関与すると考えられ、環境による変動も受けやすいことから、解析が困難であった。しかし、近年のイネゲノム研究の進展によって、マーカーの拡充など、遺伝解析に利用可能な情報は格段に充実し、「Silewah」の耐冷性遺伝子 *Ctb1* では56kb まで狭められた候補領域中の7翻訳領域の中から、F-box タンパク質をコードする遺伝子が耐冷性の原因遺伝子であることが明らかにされた(斎藤ら, 2009)。耐冷性遺伝子が単離されると、遺伝子自体をマーカーとして用いた正確な選抜が可能になるのはもちろんであるが、単離された遺伝子の機能を解析することにより耐冷性の発現機構が明らかになり、耐冷性の生理学的解析の発展にも寄与できると考えられる。例えば、*Ctb1*・*Ctb2* 領域には葯長との関連が認められている(SAITO *et al.* 2001)が、*Ctb1* は葯を長くする効果を直接的に持つ遺伝子なのか、それとも本来は耐冷性向上に関わる別の機能を持つ遺伝子で、副次的に葯が長くなっているだけなのか、という疑問も遺伝子の単離と機能解析によって解明できるはずである。また、精密マッピングが進行中の耐冷性 QTL に関しても、その過程で精密な選抜マーカーが作出されるとともに、将来的には遺伝子の単離まで行われることが期待される。さらに、まだ解析されていない耐冷性遺伝資源について、耐冷性遺伝子を同定することも望まれる。以上に加えて、数千~数万個の遺伝子の中から冷温処理時に発現レベルの高い遺伝子を調べて耐冷性に関与する遺伝子を同定しようとするマイクロアレイ解析の試み(佐藤, 2003)に見られるように、新しい手法を利用した耐冷性遺伝子の同定や機能解析の成果を総合することによって、多数の耐冷性遺伝子の機能が解明できるとであろう。

耐冷性がどのように発現し制御されているのか、また、耐冷性遺伝子相互の関係が明らかになれば、耐冷性という形質の全体像に迫ることが可能になる。耐冷性の全体像に対する理解が深まることによって、品種改良だけではなく、冷害対策技術の開発にもつながるものと期待される。

本研究では穂ばらみ期耐冷性に注目してきたが、障害型耐冷性のもう一つの大きな要因は、開花期における耐冷性である。しかし、開花期耐冷性の遺伝解析や品種育成は、穂ばらみ期耐冷性に比べて遅れているのが現状である。その一因として、穂ばらみ期耐冷性については大量の材料が高精度で検定できる「恒温深水法」が開発されている(佐々木・松永, 1983)のに対して、開花期耐冷性に関しては人工気象室を利用した小規模検定に限られていることが挙げられる。開花期耐冷性についても品種間差異が存在することや、穂ばらみ期耐冷性との相関は必ずしも高くないことが明らかになっている(丹野ら, 2000a; 後藤ら, 2008)。また、穂ばらみ期の不稔は充実花粉数などに影響されるのに対して、開花期不稔の原因は花粉発芽不良や開花不良にあることが知られている。したがって、開花期耐冷性に関与する遺伝子は穂ばらみ期とは異なる可能性が高い。穂ばらみ期耐冷性が向上したとしても、開花期耐冷性が弱いのでは、耐冷性品種としては不十分である。開花期耐冷性に関与する遺伝子を同定することは穂ばらみ期耐冷性以上に困難であると予想されるが、丹野ら(2000b)によって開花期耐冷性の簡易検定法が提案され、インディカの開花期耐冷性品種が見出される(後藤ら, 2008)など、遺伝分析に向けた環境が整いつつある。開花期耐冷性の DNA マーカー選抜が可能になれば、困難な大規模検定の代替として DNA マーカー選抜の方が主流になることもあり得るであろう。その意味では、大規模検定法が確立している穂ばらみ期耐冷性以上に、開花期耐冷性の DNA マーカー選抜技術の開発の必要性は高い。穂ばらみ期耐冷性とともに関与する開花期耐冷性もあわせてピラミディングすることで、耐冷性が総合的に向上した高度耐冷性品種が育成できると期待される。

VI. 摘 要

イネは亜熱帯に起源する冷温感受性の作物である。特に穂ばらみ期における低温によってイネは不稔を生じ、収量が著しく減少する。穂ばらみ期耐冷

性(以下耐冷性とする)は複数の遺伝子座が関与する複雑形質であり、環境変動も大きいことから、その遺伝的改良のためには関与遺伝子座の同定が不可欠である。本研究では、イネ穂ばらみ期耐冷性の遺伝的改良に資するため、耐冷性極強イネ系統「北海PL9」ならびに同品種「初雫」の穂ばらみ期耐冷性に関する新規の量的形質遺伝子座(QTL)の解析を行った。穂ばらみ期耐冷性は冷水灌漑圃場において恒温深水法による冷水処理後の稔実率によって評価した。同時に、穂ばらみ期耐冷性の評価に影響する出穂期および稈長に関してもQTL解析を行った。「北海PL9」の穂ばらみ期耐冷性QTLを解析した。ゲノム上に分布する487の単純反復配列(SSR)マーカーを用いて「北海PL9」(穂ばらみ期耐冷性“極強”)と「北海287号」(同“やや強”)の間で多型を探索したところ、54マーカーで多型が検出できた。single marker analysisにより、染色体8に座乗するマーカーが耐冷性に連関することが明らかとなった。「北海PL9」/「北海287号」のF₂集団を用いて穂ばらみ期耐冷性の区間マッピングを行い、染色体8短腕に耐冷性QTL(*qCTB8*)を検出した。検出されたQTLは寄与率26.6%、相加効果11.4%であった。置換マッピングの結果から、QTLはSSRマーカーRM5647とPLA61の間の193kb区間に位置付けられた。

「きらら397」(穂ばらみ期耐冷性“やや強”)と「初雫」(同“極強”)の間に作出された114の組換え自殖系統群(RILs)において、冷水処理後の稔実率をもとに3年間穂ばらみ期耐冷性を評価した。耐冷性QTLを同定するために複合区間マッピングを行った。染色体1には3年間ともに再現よく耐冷性QTLが検出された。その寄与率は16.2から47.3%であり、「初雫」型対立遺伝子が耐冷性を向上させる効果を示した。染色体1には出穂期および稈長のQTLは検出されなかったが、染色体10の隣接する領域には3年ともに両形質のQTLが検出された。これらの結果から、染色体1に座乗するQTLは、出穂期および稈長には影響せず、「きらら397」と「初雫」の間の耐冷性の変異に主効果を持つQTLであることが示された。

「北海PL9」/「北海287号」の自殖後代系統群(84系統)を用いて、穂ばらみ期耐冷性QTLの検出を試みた。穂ばらみ期耐冷性については染色体1, 2(2QTL), 3(3QTL), 4, 7, 8, 10および11(2

QTL)に計12QTLが検出された。これらのうち、染色体8の耐冷性QTL(*qCTB8*)はもっとも安定して大きな効果を示し、6回中5回の試験で検出され、寄与率は14.08~20.36%であった。「初雫」と同じ区間に検出された染色体1の*qCTB1*ならびに染色体10に検出された*qCTB10*および染色体11に検出された*qCTB11.1*においても比較的大きな寄与率が検出された。これら4つの耐冷性QTLでは「北海PL9」型対立遺伝子が耐冷性の向上に寄与していた。*qCTB8*ならびに*qCTB1*, *qCTB10*および*qCTB11.1*のうち任意の耐冷性QTLがともに「北海PL9」型対立遺伝子を持つ系統の平均稔実率が、「北海287号」型対立遺伝子を持つ系統に比べていずれも有意に高かったことから、これらの耐冷性QTL間には集積効果があると考えられた。*qCTB1*近傍には「初雫」の場合と同様に出穂期および稈長に関与するQTLが検出されなかったことから、「北海PL9」の*qCTB1*も耐冷性に対して主効果をもつと考えられた。また、染色体3長腕のQTLに関して、「北海PL9」型対立遺伝子が早生、短稈、耐冷性弱に作用したことから、出穂期あるいは稈長に関わるQTLが耐冷性の評価に影響を及ぼす可能性のあることを示した。

以上により、耐冷性極強イネ系統「北海PL9」および同品種「初雫」がそれぞれ穂ばらみ期耐冷性に関与する主働遺伝子のほか、効果の小さいQTLを複数保有すること、それら一部の耐冷性QTL間には集積効果があることから、「北海PL9」および「初雫」よりも耐冷性の優れた品種が育成可能であることが示された。本研究において耐冷性QTLを位置付けたDNAマーカーは耐冷性品種の育種改良のためのDNAマーカーとして容易に利用可能である。本研究で検出された穂ばらみ期耐冷性QTLは、DNAマーカー選抜による耐冷性育種の効率化および高精度化を通じて、耐冷性イネ品種の育成に貢献することが期待できる。

謝辞

本論文の取りまとめるにあたって、京都大学大学院農学研究科教授(現・名誉教授)谷坂隆俊博士にご指導ならびにご校閲をいただいた。独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター研究管理監(現・中央農業総合研究センター北陸農業研究監)上原泰樹博士、同センター低温耐性

研究チーム長(現・寒地作物研究領域)佐藤裕博士にはご指導、激励をいただいた。ここに記して感謝申し上げます。

本研究は2004～2009年に北海道農業研究センターにおいて行った。低温耐性研究チーム(現・寒地作物研究領域)斎藤浩二博士には、研究方針の策定から実施に至るまで懇切にご指導いただいた。旧作物開発部稲育種研究室長(現・農林水産省 農林水産技術会議事務局 研究交流管理官)安東郁男氏には本研究に取り組み端緒を作っていただくとともに実験材料を提供していただいた。また、旧地域基盤研究部育種工学研究室長(現・寒地作物研究領域)入来規雄博士、低コスト稲育種研究北海道サブチーム長(現・寒地作物研究領域)清水博之氏には本研究を遂行する環境を整えていただいた上にご指導も賜った。さらに、低コスト稲育種研究北海道サブチーム(現・寒地作物研究領域)横上晴郁氏、米品質研究チーム(現・寒地作物研究領域)松葉修一氏には実験材料の育成や耐冷性検定にご協力いただいた。皆様に深く感謝する。

本研究の遂行にあたり、試験材料の栽培管理には北海道農業研究センター業務第2科の小田認氏、和田勝喜氏、吉田孝二氏、杉澤良太氏、笠井健二氏に、供試材料の遺伝子型解析ならびに耐冷性検定における稔実率調査については藤井江里子氏と西澤弥栄子氏に、また、北海道農業研究センター稲育種グループの大谷美恵子氏、南久子氏、石川良子氏にも多大なるご協力をいただいた。ここに記して感謝の意を表す。

引用文献

- 1) 安部信行、小高真一、鳥山國士、小林正男(1989)：高度障害型耐冷性「中間母本農8号」の育成とその特性。北海道農試研報, 152, 9-17.
- 2) ANDAYA, V. C. and MACKILL, D. J.(2003): QTLs conferring cold tolerance at the booting stage of rice using recombinant inbred lines from japonica × indica cross. *Theor. Appl. Genet.*, 106, 1084-1090.
- 3) 安東郁男、竹内善信、青木法明、平林秀介、黒木慎、清水博之、安藤露、佐藤宏之(2006)：稲品種「おぼろづき」の低アミロース性を支配する遺伝子の解析。育種作物北海道談話会報, 47, 35-36.
- 4) 安東郁男、佐藤宏之、梅本貴之、青木法明、平林秀介、黒木慎、清水博之、安藤露、竹内善信(2007)：イネ系統「北海PL9」の低タンパク含有率および低アミロース性に関する QTL 解析。育種学研究, 9 (別2), 193.
- 5) ANDO, I., SATO, H., AOKI, N., SUZUKI, Y., HIRABAYASHI, H., KUROKI, M., SHIMIZU, H., ANDO, T. and TAKEUCHI, Y. (2010) Genetic analysis of low amylose content of rice cultivars Oborozuki and Hokkai-PL9. *Breed.Sci.*, 60, 187-194.
- 6) 荒木均、今野一男、三浦清之、永野邦明、浜村邦夫、大内邦夫、西村実(2002)：酒米用の水稲新品種「初雫」。北海道農研報, 174, 83-97.
- 7) ARANZANA M. J., KIM S., ZHAO K., BAKKER E., HORTON M., JAKOB K., LISTER C., MOLITOR J., SHINDO C., TANG C., TOOMAJIAN C., TRAW B., ZHENG H., BERGELSON J., DEAN C., MARJORAM P. and NORDBORG M.(2005) Genome-wide association mapping in Arabidopsis identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genet.*, 1, 0531-0539.
- 8) 千葉文弥、早坂浩志、矢野昌裕、永野邦明(2001)：奥羽197号とトヨニシキの交雑に由来する組換え型自殖系統群のイネ穂ばらみ期耐冷性に関する QTL 解析。育種学研究, 3 (別2), 5.
- 9) 千葉文弥、遠藤貴司、佐々木都彦、永野邦明、上田忠正、矢野昌裕(2004)：イネ第7染色体上で見出された新たな穂ばらみ期耐冷性関連 QTL。育種学研究, 6 (別2), 68.
- 10) 千葉文弥、遠藤貴司、佐々木都彦、永野邦明、上田忠正、矢野昌裕(2006)：イネ第4, 7染色体上の穂ばらみ期耐冷性関連 QTL の集積効果。育種学研究, 8 (別1), 151.
- 11) 千葉文弥、我妻謙介、佐々木都彦、遠藤貴司、永野邦明(2007)：イネ第4染色体に見出された奥羽197号由来の穂ばらみ期耐冷性関連 QTL のマッピング。育種学研究, 9 (別1), 294.
- 12) CHURCHILL, G.A. and DOERGE, R. W.(1994)：Empirical threshold value for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138, 963-971.
- 13) DAI, L., LIN, X., YE, C., ISE, K., SAITO, K., KATO, A., XU, F., YU, T. and ZHANG, D.(2004)：Identification of quantitative trait loci controlling cold tolerance at the reproductive stage in Yunnan landrace of rice, Kunmingxiaobaigu. *Breed. Sci.*, 54, 253-258.
- 14) 遠藤貴司、中込弘二、山口誠之、片岡知守、須藤充、神田伸一郎、小野泰一(2009)：イネ第3染色体短腕に座乗する障害型耐冷性に関する QTL。育種学研究, 11 (別2), 317.
- 15) FUJINO, K. and SEKIGUCHI, H.(2005): Mapping of QTLs conferring extremely early heading in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. appl. Genet.*, 111, 393-398.
- 16) FUJINO, K. and SEKIGUCHI, H.(2008)：Mapping of quantitative trait loci controlling heading date among rice cultivars in the northernmost region in Japan. *Breed. Sci.*, 58, 367-373.
- 17) FUKUOKA, S., SAKA, N., KOGA, H., ONO, K., SHIMIZU, T.,

- EBANA, K., HAYASHI, N., TAKAHASHI, A., HIROCHIKA, H., OKUNO, K. and YANO, M.(2009) : Loss of Function of a Proline-Containing Protein Confers Durable Disease Resistance in Rice. *Science*, 325, 998-1001.
- 18) 蓬原雄三、鳥山国土(1964) : 水稻における耐冷性検定方法に関する研究. *育種*, 14, 166-172.
- 19) FUTSUHARA, Y. and TORIYAMA, K.(1966) : Genetic studies on cool tolerance in rice. III. Linkage relations between genes controlling cool tolerance and marker genes of Nagao and Takahashi. *Jpn. J. Breed.*, 16, 19-30.
- 20) 後藤明俊、笹原英樹、重宗明子、三浦清之(2008) : インド型イネにおける穂ばらみ期および開花期耐冷性の評価. *日作紀*, 77, 167-173.
- 21) 早坂浩志、竹内善信、千葉文弥、矢野昌裕、山岸真澄、佐々木卓治、永野邦明(1998) : イネ日本型品種コシヒカリの穂ばらみ期耐冷性に関する QTL 解析. *育種学雑誌*, 48(別2), 66.
- 22) IMIN, N., KERIM, T., WEINMAN, J. J. and ROLFE, B. G. (2006) : Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 274-292.
- 23) International Rice Genome Sequencing Project(2005) : The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436, 793-800.
- 24) International Rice Research Institute(1978) : Screening for cold tolerance. *IRRI annual report for 1977*, 142.
- 25) Intergovernmental Panel for Climate Change(2007) : Summary for Policymakers. *In Climate Change 2007 : The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [SOLOMON, S., QIN, D., MANNING, M., CHEN, Z., MARQUIS, M., AVERYT, K.B., TIGNOR, M. and MILLER, H.L.(eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- 26) IWATA, H. and NINOMIYA, S.(2006) : AntMap : constructing genetic linkage maps using an ant colony optimization algorithm. *Breed. Sci.*, 56, 371-377.
- 27) 神田伸一郎、須藤充(2005) : イネの第4染色体上に検出された障害型耐冷性に関する QTL のマッピング. *育種学研究*, 7(別1, 2), 277.
- 28) 小松利光、斎藤浩二、佐野芳雄、加藤明(1999) : 水稻中間母本農11号の穂ばらみ期耐冷性遺伝子座と連鎖した RFLP マーカーの同定. *育種作物北海道談話会報*, 40, 23-24.
- 29) 黒木慎(2006) : 耐冷性の遺伝的解析とピラミディング. *農及園*, 81, 128-132.
- 30) KUROKI, M., SAITO, K., MATSUBA, S., YOKOGAMI, N., SHIMIZU, H., ANDO, I. and SATO, Y.(2007) : A quantitative trait locus for cold tolerance at the booting stage on rice chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.*, 115, 593-600.
- 31) 黒木慎、斎藤浩二(2007) : イネの耐冷性の遺伝解析. *北農*, 74, 357-361.
- 32) KUROKI, M., SAITO, K., MATSUBA, S., YOKOGAMI, N., SHIMIZU, H., ANDO, I. and SATO, Y.(2009) : Quantitative trait locus analysis for cold tolerance at the booting stage in a rice cultivar, Hatsushizuku. *Japan Agric. Res. Quart.*, 43, 115-121.
- 33) 黒木慎、斎藤浩二、松葉修一、横上晴郁、安藤露、佐藤裕、安東郁男、清水博之(2011) : イネ系統「北海 PL9」の穂ばらみ期耐冷性に関する QTL の検出. *育種学研究(印刷中)*.
- 34) LIN, H. X., LIANG, Z. W., SASAKI, T. and YANO, M.(2003) : Fine Mapping and Characterization of Quantitative Trait Loci *Hd4* and *Hd5* Controlling Heading Date in Rice. *Breed. Sci.*, 53, 51-59.
- 35) 松葉修一、黒木慎、斎藤浩二、船附稚子、横上晴郁、清水博之(2007) : イネ穂ばらみ期耐冷性 QTL (*Ctb1,2* および *qCTB-8*) の「ほしのゆめ」への導入による耐冷性強化への効果. *育種学研究*, 9(別1), 263.
- 36) 松葉修一、黒木慎、斎藤浩二、横上晴郁、清水博之(2008) : ネパール原産のイネ品種「Pakhe Dhan」が持つ障害型耐冷性 QTL (*qFLT-6*) 遺伝子の「ほしのゆめ」への導入効果の検証. *北海道農研研報*, 189, 41-51.
- 37) MCCOUCH, S. R., TEYTELMAN, L., XU, Y., LOBOS, K. B., CLARE, K., WALTON, M., FU, B., MAGHIRANG, R., LI, Z., XING, Y., ZHANG, Q., KONO, I., YANO, M., FJELLSTROM, R., DECLERCK, G., SCHNEIDER, D., CARTINHOUR, S., WARE, D. and STEIN, L.(2002) : Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.*, 9, 199-207.
- 38) MONNA, L., LIN, H. X., KOJIMA, S., SASAKI, T. and YANO, M.(2002) : Genetic dissection of a genomic region for quantitative trait locus, *Hd3*, into two loci, *Hd3a* and *Hd3b*, controlling heading date in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 104, 772-778.
- 39) 森正彦、吉村徹、品田博史、佐藤毅、加藤清明、三浦秀穂(2007) : 穂ばらみ期耐冷性極強イネ系統の QTLs 解析. *育種学研究*, 9(別2), 190.
- 40) 永野邦明、千葉文弥(2003) : 宮城県古川農試におけるイネの耐冷性育種. *BRAIN テクノニュース*, 100, 23-27.
- 41) 西村実(1995) : 北海道イネ品種の穂ばらみ期耐冷性の遺伝. *育種*, 45, 479-485.
- 42) NONOUE, Y., FUJINO, K., HIRAYAMA, Y., YAMANOUCHI, U., LIN, S. Y. and YANO, M.(2008) : Detection of quantitative trait loci controlling extremely early heading in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 116, 715-722.

- 43) OKUMOTO, Y., ICHITANI, K., INOUE, H. and TANISAKA, T. (1996) : Photoperiod insensitivity gene essential to the varieties grown in the northern limit region of paddy rice (*Oryza sativa* L.) cultivation. *Euphytica*, 92, 63-66.
- 44) PATERSON, A.H., DEVERNA, J. W., LANINI, B. and TANKSLEY, S. D. (1990) : Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics*, 124, 735-742.
- 45) R Development Core Team (2005, 2009) : R : A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- 46) ROZEN, S. and SKALETSKY, H. J. (2000) : Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) : *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- 47) 三枝大樹、平林秀介、竹内善信、出田収、梅本貴之、青木法明、根本博、安東郁男、加藤浩 (2004) : イネのアミロース含有率に關与する遺伝子座の解明. 育種, 6 (別2), 267.
- 48) SAITO, K., MIURA, K., HAYANO-SAITO, Y., SAITO, A., ARAKI, H. and KATO, A. (1995) : Chromosomal location of quantitative loci for cool tolerance at the booting stage in rice variety 'Norin-PL8'. *Breed. Sci.*, 45, 337-340.
- 49) SAITO, K., MIURA, K., HAYANO-SAITO, Y., ARAKI, H. and KATO, A. (2001) : Identification of two closely linked quantitative trait loci for cold tolerance on chromosome 4 of rice and their association with anther length. *Theor. Appl. Genet.*, 103, 862-868.
- 50) SAITO, K., MIURA, K., HAYANO-SAITO, Y. and KATO, A. (2003) : Analysis of quantitative trait loci for cold tolerance at the booting stage of rice. *Japan Agric. Res. Quart.*, 37, 1-5.
- 51) SAITO, K., HAYANO-SAITO, Y., MARUYAMA-FUNATSUKI, W., SATO, Y. and KATO, A. (2004) : Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus *Ctb1* for cold tolerance at the booting stage of rice. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 515-522.
- 52) 斎藤浩二、早野由里子、黒木慎、佐藤裕 (2009) : イネの穂ばらみ期耐冷性を強くする遺伝子の同定. *BRAIN テクノニュース*, 132, 10-14.
- 53) 坂井真、須藤充、神田伸一郎 (2003) : 青森県農林総合研究センター藤坂稲作研究部におけるイネの耐冷性育種. *BRAIN テクノニュース*, 100, 18-22.
- 54) 佐々木武彦、松永和久 (1983) : 冷水によるイネの耐冷性検定方法の改善. 1. 恒温深水かんがい圃場の試作. 育種, 33 (別2), 144-145.
- 55) 佐々木武彦、松永和久 (1985) : イネ耐冷性品種の系譜的考察. 日作東北支部会報, 28, 57-58.
- 56) SATAKE, T. and HAYASE, H. (1970) : Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. V. Estimation of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.*, 39, 468-473.
- 57) 佐竹徹夫 (1981) : 印度稲の穂孕期および開花期の耐冷性. 育種作物北海道談話会報, 21, 49.
- 58) SATAKE, T. and SHIBATA, M. (1992) : Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants. XXXI. Four components participating in fertilization. *Jpn. J. Crop Sci.*, 61, 454-462.
- 59) 佐竹徹夫 (1994) : 水稲の冷害, "北海道の稲作", 石塚喜明監修, 星野達三編著, 財団法人北農会, 札幌, 203-255.
- 60) SATO, S., TAMAKI, A. and SHINJO, C. (1994) : Genetic relation between an earliness gene *Ef-1* and anther length in rice, *Oryza sativa* L. *Breed. Sci.*, 44, 127-132.
- 61) 佐藤裕 (2003) : 穂ばらみ期耐冷性の異なるイネ準同質遺伝子系統を用いたマイクロアレイ解析. *BRAIN テクノニュース*, 100, 5-8.
- 62) 清水博之、黒木慎、安東郁男 (2002) : 水稲耐冷性中間母本「水稲中間母本農8号」, 「水稲中間母本農11号」および「北海 PL5」の耐冷性集積の可能性. 育種作物北海道談話会報, 43, 27-28.
- 63) 下野裕之 (2008) : 地球温暖化が北日本のイネの収量変動に及ぼす影響. 日作紀, 77, 489-497.
- 64) 須藤充、春原嘉弘、横山裕正、川村陽一、前田一春 (1998) : 水稲耐冷性中間母本「中母59」の耐冷性評価. 東北農業研究, 51, 11-12.
- 65) 須藤充、川村陽一、春原嘉弘、矢野昌裕 (2000) : イネの第6染色体上に検出された耐冷性に関する QTL. 育種学研究, 2 (別2), 45.
- 66) 須藤充、川村陽一、春原嘉弘、矢野昌裕 (2001) : イネ品種「Pakhe Dhan」と「ふ系175号」の組み換え自殖系統群を用いた RFLP マーカー連鎖地図の作成と第11染色体上に検出された耐冷性に関する QTL. 育種学研究, 3 (別2), 47.
- 67) 須藤充、神田伸一郎、坂井真 (2004) : イネの第6染色体に座乗する障害型耐冷性遺伝子の位置. 育種学研究, 6 (別1), 89.
- 68) 鈴木正一 (1982) : イネにおける障害型耐冷性と花器形質との関係: II. 分離世代における花器移質と障害型耐冷性との関係. 育種, 32, 9-16.
- 69) TAKEUCHI, Y., HAYASAKA, H., CHIBA, B., TANAKA, I., SHIMANO, T., YAMAGISHI, M., NAGANO, K., SASAKI, T. and YANO, M. (2001) : Mapping quantitative loci controlling

cool-temperature tolerance at booting stage in temperate japonica rice. *Breed. Sci.*, 51, 191-197.

- 70) 丹野久、木下雅文、木内均、平山裕治、菊地治己(2000a) : 北海道水稲品種における開花期耐冷性の評価およびその穂ばらみ期耐冷性との関係について. *日作紀*, 69, 493-499.
- 71) 丹野久、木内均、平山裕治、菊地治己(2000b) : 人工気象室を用いた水稲開花期耐冷性の簡易検定法の開発. *日作紀*, 69, 43-48.
- 72) 丹野久(2004)水稲における開花期耐冷性の簡易検定法の確立と遺伝資源の評価. *北海道立農試報告*, 104, 1-49.
- 73) TEMNYKH, S., DECLERCK, G., LUKASHOVA, A., LIPOVICH, L., CARTINHO, S. and MCCOUCH, S. R.(2001) : Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome res.*, 11, 1441-1452.
- 74) 上田忠正、千葉文弥、遠藤貴司、蛭谷武志、竹内善信、佐々木都彦、永野邦明、矢野昌裕(2003) : イネの穂ばらみ期耐冷性遺伝子 *qCT-7(t)* の連鎖解析. *育種学研究*, 5 (別2), 4.
- 75) 上原泰樹、須藤充、横山裕正、川村陽一、館山元春(1993) : 耐冷性中間母本系統「中母59」の特性. *東北農業研究*, 46, 3-4.
- 76) UKAI, Y., OHSAWA, R. and SAITO, A.(1991) : MAPL : A package of microcomputer programs for RFLP linkage mapping. *Rice. Genet. Newsl.*, 8, 155-158.
- 77) 鵜飼保雄、大澤良、斎藤彰、林武司(1995) : DNA多型連鎖地図作成とQTL解析のためのコンピュータ、プログラムMAPL. *育種*, 45, 139-142.
- 78) WANG, S., BASTEN, C.J. and ZENG, Z. B.(2007) : Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).