

シーケンサーのフラグメント解析を利用した DNAマーカー選抜による複合病虫害抵抗性ダイズ系統の開発

加藤 信^{*1)}・佐山 貴司^{*2)}・高田 吉丈^{*3)}・湯本 節三^{*2)}
石本 政男^{*2)}・島村 聡^{*1)}・平田 香里^{*1)}・菊池 彰夫^{*1)}

抄 録：東北地域のダイズの収量安定化のため、主要病虫害であるダイズシストセンチュウ（SCN）、ダイズモザイクウイルス（SMV）、ダイズわい化ウイルス（SbDV）に対する抵抗性の付与は重要である。本研究では抵抗性遺伝子近傍から複数の単純反復配列（SSR）マーカーセットを選定し、DNAシーケンサーのフラグメント解析により複数マーカーを同時に解析することでマーカー選抜を効率化し、戻し交配により「リュウホウ」及び「おおすず」を反復親として、各々、SCN及びSMV抵抗性を導入した系統「東北173号」、SMV及びSbDV抵抗性を導入した系統「東北174号」等を開発した。生物検定の結果、SCNに対して感受性を示す系統が一部存在し、SCN抵抗性マーカーセットは改良の余地があるが、SMV及びSbDVに対して、マーカーにより選抜した系統はいずれも抵抗性が確認され、マーカーの有効性が示された。育成系統と反復親との農業形質を比較したところ、「東北173号」は「リュウホウ」とほぼ同等であったが、「東北174号」は多くの形質で「おおすず」と有意な差が認められ、導入目的の遺伝子以外のゲノム領域が「東北174号」により多く残存した可能性が考えられた。これらのことから、本マーカー選抜手法は有効であり、さらに、これら育成系統は抵抗性の育種母本として有望と考えられる。

キーワード：ダイズ、ダイズシストセンチュウ、ダイズモザイクウイルス、ダイズわい化ウイルス、東北地域、マーカー選抜

Breeding of Soybean Lines Conferred Multiple Disease and Pest Resistance by Marker-Assisted Selection with a High-Resolution PCR Fragment Analysis System : Shin KATO^{*1)}, Takashi SAYAMA^{*2)}, Yoshitake TAKADA^{*3)}, Setsuzo YUMOTO^{*2)}, Masao ISHIMOTO^{*2)}, Satoshi SHIMAMURA^{*1)}, Kaori HIRATA^{*1)} and Akio KIKUCHI^{*1)}

Abstract : In order to stabilize soybean yield in the Tohoku district, it is important to breed cultivars with resistances to soybean cyst nematode (SCN), soybean mosaic virus (SMV), and soybean dwarf virus (SbDV). In this study, we selected a series of simple sequence repeat (SSR) marker sets located near each resistance locus, and simultaneously analyzed them with a high-resolution polymerase chain reaction (PCR) fragment analysis system to promote efficiency in marker-assisted selection (MAS). With backcrossing, our 'Tohoku 173' upbringing system was developed by introducing the SCN and SMV resistance genes to 'Ryuhou,' while 'Tohoku 174' was developed by introducing the SMV and SbDV resistance genes to 'Ohsuzu.' Inoculation tests showed that a marker set for the selection of SCN needed to be improved since a breeding line selected by MAS showed susceptibility, while the marker sets for SMV and SbDV were found to be valid since all lines selected by MAS showed resistance to both viral diseases. A comparison of the agricultural characteristics of the developed lines with those of recurrent parents showed that the characteristics of 'Tohoku 173' and 'Ryuhou'

* 1) 農研機構東北農業研究センター (Tohoku Agricultural Research Center, NARO, Kariwano, Daisen, Akita 019-2112, Japan)

* 2) 農研機構次世代作物開発研究センター (Institute of Crop Science, NARO, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan)

* 3) 農研機構西日本農業研究センター (Western Region Agricultural Research Center, NARO, Zentsuji, Kagawa 765-8508, Japan)

were nearly identical to each other. However, there were many significant differences between 'Tohoku 174' and 'Ohsuzu,' indicating that 'Tohoku 174' contains many genomic regions that originated from resistant parents. In conclusion, it was demonstrated that these marker-assisted selection systems are valid, and that the developed lines are desirable materials for breeding new cultivars with resistance to SCN, SMV, and SbDV.

Key Words : Soybean, Soybean cyst nematode, Soybean mosaic virus, Soybean dwarf virus, Tohoku region, Marker-assisted selection.

I 緒 言

ダイズの収量を安定化させるため、生育中に発生する各種の病虫害に対する抵抗性を付与させることは育種上重要な課題である。特に、ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines* Ichinohe、以下、SCN (Soybean cyst nematode))、ダイズモザイクウイルス (Soybean mosaic virus、以下、SMV)、ダイズわい化ウイルス (Soybean dwarf virus、以下、SbDV) は東北地域に発生する重要病虫害である。

SCNはダイズに寄生し、黄化、萎縮症状等を引き起こし、収量を低下させる (相場 2002)。SCNは指標品種に対する寄生性から理論上16種類のレースに分別され、東北地域において発生が認められるSCN個体群の大部分はレース3である (Inagaki 1979、高田 2003)。東北農業試験場 (現、農研機構東北農業研究センター、以下、東北農研) では、レース3個体群発生圃場にて抵抗性遺伝資源のスクリーニングを行い、抵抗性の在来種「下田不知」を見出し、同材料を育種母本として用い、「ネマシラズ」、「リュウホウ」等のレース3抵抗性品種を育成している (石川 1968、中村ら 1996)。一方、北海道ではレース1の発生も認められることから、北海道立十勝農業試験場 (現、北海道立総合研究機構十勝農業試験場、以下、十勝農試) では同レースに対して抵抗性を示す抵抗性遺伝資源「PI 84751」を育種母本として用いて、レース1抵抗性品種「スズヒメ」、「ユキホマレR」を育成している (砂田ら 1981、三好ら 2010)。「PI 84751」由来の抵抗性はレース1に対しても抵抗性を示すだけでなく、レース3に対しても「下田不知」由来の抵抗性より強い抵抗性を示すことが知られていることから、SCNレース1及びレース3抵抗性育種において上記遺伝子の活用が期待される (山田 2003)。SCN抵抗性

に関する遺伝解析から、抵抗性遺伝子は*Rhg1*、*Rhg2*、*Rhg3*、*Rhg4*の4座存在することが知られており (Matson・Williams 1965)、*Rhg2*及び*Rhg3*座は「下田不知」及び「PI 84751」で同一または同等の機能を有することから、「PI 84751」由来の劣性の対立遺伝子*Rhg1* (以下、*Rhg1p*) 及び優性の対立遺伝子*Rhg4* (以下、*Rhg4p*) を「下田不知」由来の抵抗性を有する品種に導入すれば、「PI 84751」並みの抵抗性品種を開発することが可能となる (Suzuki *et al.* 2012)。

SMVは*Potyviridae*に属するウイルスで、各種アブラムシにより媒介され、ダイズモザイク病を引き起こす。症状にはモザイクや縮葉等があり、収量低下を引き起こすだけでなく種子に褐斑を生じさせ、子実の品質を低下させる (越水・飯塚 1963、山田ら 2006)。SMVは指標品種に対する病原性の差異によってA、B、A2、C、D、Eの6系統に分けられる (中野ら 1982、高橋ら 1980)。国内の発生地域は広く、東北地域北部ではA及びB病原系統、同地域中南部ではこれらの2病原系統に加え、C及びD病原系統 (以下、SMV-C、D) の発生が認められる (Hashimoto・Nagasawa 1986)。本病害の被害を軽減させるには抵抗性品種の作付けが最も有効であり、東北地域中南部向けのダイズの品種開発において、A及びB系統に加え、C及びD系統に対する抵抗性の付与は不可欠である。日本では「Harosoy」がSMV-C、Dに対する抵抗性母本として導入され、抵抗性品種「デワムスメ」、「ふくいぶき」等が育成されている (石川ら 1979、島田ら 2004)。SMV抵抗性に関する遺伝解析から、*Rsv3*座がSMV-C、Dに対する抵抗性に関わることが示されており、「Harosoy」由来の*Rsv3*を感受性品種に導入することで、SMV-C、D抵抗性系統を開発することが可能となる (Kato *et al.* 2016)。

SbDVは*Luteoviridae*に属するウイルスで、SMV

と同様、アブラムシにより媒介される（大藤ら 2005）。本ウイルスは、激しいわい化症状を引き起こす「わい化型」とわい化症状は激しくないが顕著な葉の黄化を引き起こす「黄化型」の2つの病徴型に分類され、主に発生が認められる北海道及び東北地域では、「わい化型」の発生はごく一部で、「黄化型」の発生が広く認められる（兼松ら 2003、大藤ら 2005）。いずれの病徴型においても、本ウイルスに感染すると、収量や百粒重を低下させるだけでなく、発病個体は茎水分が抜けないまま圃場に残るため、機械収穫の際、汁液により汚損粒を生じさせ、子実の品質低下を招く（大藤ら 2005）。本病害は北海道南部で発病が確認された後、道央から道東、道北一円に拡がったとされており、東北地域においても全ての県で同病の発生が確認されている（番場ら 1985、兼松ら 2003、御子柴ら 1990）。北海道立中央農業試験場（現、北海道立総合研究機構中央農業試験場、以下、中央農試）では、大豆育種指定試験が発足すると同時に、抵抗性育種に取り組み、中国の遺伝資源「黄宝珠」をSbDV圃場抵抗性母本として用い、抵抗性品種「ツルコガネ」、「ツルムスメ」、「いわいくろ」等を開発している（番場ら 1985、中村ら 1991、白井ら 2000）。しかし、「黄宝珠」由来の抵抗性は感受性の品種と比較して、減収率は低いものの、それでもなお感染すると穏やかな病徴を示し、減収することが知られており（谷村・番場 1987）、また、選抜に有効なDNAマーカーが開発されていないため、東北地域におけるわい化病抵抗性育種は停滞し、抵抗性系統はこれまで開発されてこなかった。一方、近年、700点に及ぶ抵抗性素材のスクリーニングの結果、東南アジア在来種の「Wilis」が高度抵抗性を示すことが明らかになり（田澤ら 2008）、また、Uchibori *et al.* (2009) 及びYamashita *et al.* (2013) は「Wilis」が有する抵抗性遺伝子*Rsdv1*を見出し、同遺伝子を感じ性品種に導入することで、SbDV抵抗性系統を開発することが可能となる。

東北地域の主力品種である「リュウホウ」（中村ら 1996）、「おおすず」（田淵ら 1999）は早生、大粒で豆腐や煮豆等の加工適性に優れているため、現在でも、各々、9,600ha、4,064ha栽培されている（農林水産省ダイズ関連データ集、http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_data/）。一方、両品種ともSMV-C、Dに対して感受性であることから、

栽培は東北地域北部を中心として、中南部への普及は中山間地等に限られている。また、「おおすず」がダイズの作付面積の約97%を占める青森県においては、特に太平洋側でSbDVの発生が多い傾向が認められるため（田淵ら 1999）、同品種のSbDV抵抗性の導入が望まれている。さらに、「リュウホウ」においては、「下田不知」由来のレース3抵抗性は有するものの、同品種が普及している山形県において、抵抗性を打破する寄生性の高いセンチウレース3個体群の発生が認められ、同品種へのSCNレース1抵抗性の付与が望まれる（相場 2013）。

従来、東北農研では病虫害抵抗性等のDNAマーカー選抜を行うため、アクリルアミドやアガロースゲルを用いた電気泳動により多型解析を行っていたが、PCR産物の数bpの長さの差を検出することは難しく、一日に解析可能な点数も限られていた。従って、今回の目的とする複数の病虫害抵抗性を導入した系統の開発することは労力的に困難であった。一方、DNAマーカーを用いた多型解析技術は目覚ましく進展し、Sayama *et al.* (2011) は効率的な連鎖地図作成を目的として、単純反復配列（Simple Sequence Repeat、以下、SSR）を含む領域を増幅するように設計したSSRマーカーを一度に8個程度増幅し、それらの増幅長多型を、DNAシーケンサーを用いて高精度に解析する技術を開発した。本研究では、本技術を応用して、各病虫害抵抗性遺伝子近傍から複数のSSRマーカーを選定し、同時に解析することにより、「リュウホウ」にSMV-C、D及びSCNレース1抵抗性、「おおすず」にSMV-C、D及びSbDV抵抗性を導入した系統を効率的に開発したので、選抜用マーカーセットの選定、PCRの反応条件等の実験手法、育成経過及び育成系統の特性等について紹介する。

中央農試の大西志全氏（現、北海道立総合研究機構北見農業試験場、以下、北見農試）、黒崎英樹氏（現、北見農試）、品田博史氏にはダイズシストセンチウ抵抗性検定試験を実施して頂いた。また、農研機構の兼松誠司氏、元農研機構の寺内英貴氏にはSbDV検出用のプライマー設計について助言頂いた。農研機構東北農業研究センターの技術支援センター業務第3科の技術専門職員の佐藤寿氏、藤井修氏、佐藤祐孝氏、高橋明浩氏、高貝久穂氏、

栗津晃成氏、高橋建英氏においては圃場管理業務にご尽力頂いた。ここに記して謝意を表する。なお、本研究は「新農業ゲノム展開プロジェクト」(DD-3220)、「気候変動に対応した循環型食料生産等の確立のための技術開発」(1002)のもと実施された。

Ⅱ 材料と方法

1. 材料

反復親には「リュウホウ」及び「おおすず」、抵抗性供与親としてはSMV-C, D抵抗性の「東北156号」及び「ふくいぶき」、「PI84751」由来のSCNレース1抵抗性の「To-8E」(Suzuki *et al.* 2012)、「Wilis」由来のSbDV抵抗性の「CH-001」(「ユキホマレ」/「Wilis」)を、各々、用いた(図1)。

SCN抵抗性検定には、「Lee」、「PI88788」、「Pickett71」、「Peking」、「PI90763」を指標品種として、「キタムスメ」(感受性)、「トヨムスメ」、「トヨコマチ」、「下田不知1号」(以上、レース3抵抗性)、「スズヒメ」(レース1抵抗性)を比較品種として用いた(Golden *et al.* 1970、砂田ら 1981)。

SMV-C, D抵抗性検定の指標品種には、「Peking」、「Harosoy」、「デワムスメ」(以上、C及びD系統に抵抗性)、「白豆」(C系統に抵抗性、D系統に感受性)、「ふくせんなり」(C系統に感受性、D系統に抵抗性)、「奥羽3号」、「十勝長葉」、「ネマシラズ」、「農林4号」、「つるの卵1号」(以上、C及びD系統に感受性)を用いた(Kato *et al.* 2016)。

SbDV抵抗性検定の指標品種には、「植系32号」(抵抗性「強」)、「植系3号」及び「ツルコガネ」(抵抗性「やや強」)、「中育47号」及び「ツルムスメ」(抵抗性「中」)、「トヨハルカ」(抵抗性「やや弱」)、「トヨムスメ」及び「カリユタカ」(抵抗性「弱」)を用いた(田澤ら 2008)。

2. マーカー選抜

SCNレース1抵抗性のマーカー選抜には、Di Mauro *et al.* (2004)、Meksem *et al.* (2001)、Suzuki *et al.* (2012)の情報に基づき、*Rhg1*近傍のSSRマーカーSatt309、Sat_210、*Rhg4*近傍のSatt632、Sat_162、Sat_157を用いた。また、SMV-C, D系統抵抗性のマーカー選抜には*Rsv3*近傍のSSRマーカーBARCSOYSSR_14_1392、BARCSOYSSR_14_1403、M3SattM、Satt560を用い(Kato *et al.* 2016)、SbDV抵抗性のマーカー選抜には*Rsdv1*近傍のSSRマーカーSat_11、CA782298、

Sct_13を用いた(Yamashita *et al.* 2013)(表1)。ゲノムDNAはBioSprint 96 DNA Plant Kit (Qiagen)を用いて調製し、PCR及びフラグメント解析は*Rhg1*、*Rhg4*、*Rsv3*及び*Rsdv1*近傍のSSRマーカーセットの4つに分けて実施した。PCRには、Multiplex PCR Master Mix (Qiagen)を用い、反応条件は、95℃で15分間活性化した後、変性：95℃・30秒、アニーリング：50℃・90秒、増幅：60℃・90秒を35サイクル行い、最後の伸長反応を60℃・30分で行った(Sayama *et al.* 2011)。なお、各々のプライマーの濃度、蛍光標識、及び配列を表1に示した。またフラグメント解析はDNAシーケンサー3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems)、解析ソフトGeneMapper software v4.0 (Applied Biosystems)を用いた。

3. SCN抵抗性検定試験

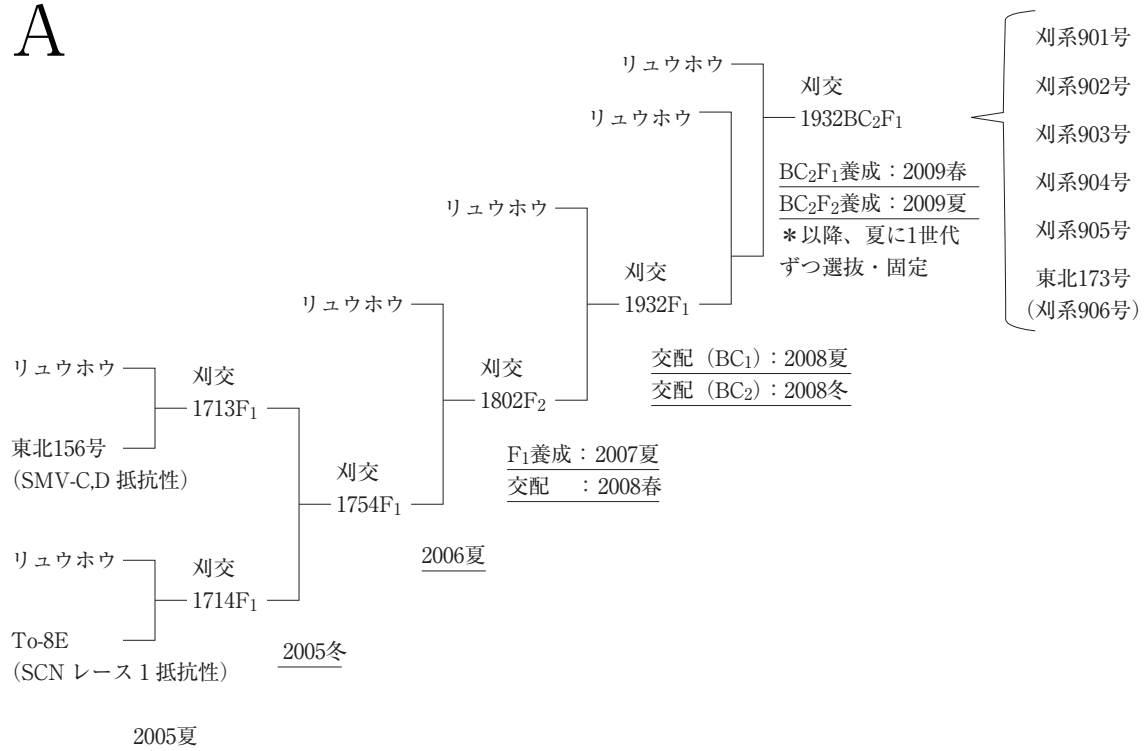
SCNレース1抵抗性検定については、レース1優占検定圃場(十勝農試内)にて、2012~2013年の2ヵ年実施した。2012年は3反復、2013年は4反復の乱塊法で実施し、開花期以降2回根部のシストの着生を1区5個体以上観察した。播種日は、2012年は5月22日、2013年は5月26日で、調査日は、2012年は7月19日及び8月20日、2013年は7月17~18日及び8月5~6日であった。

SCNレース3抵抗性検定については、レース3発生圃場(北海道更別村)にて、2013年のみ実施した。供試系統、指標及び比較品種を4反復乱塊法で栽植し、指標及び比較品種のシスト寄生指数をもとにレース3反応を示す2反復を選択し、開花期頃と開花期約2週間後の計2回根部のシスト及び根粒の着生を観察した。1区5個体以上、合計10個体以上を調査した。播種日は5月31日で、調査日は7月19~23日及び8月14~15日であった。

いずれの検定においても、個体毎に根部に着生するシスト数に応じて、0~4の少数点の値も含む16段階の階級値(0:シストなし、0.1~1.0:1~10個(1個刻み)、1.5:11~20個、1.7:21~50個、2:51~100個、3:101~500個、4:501個以上)に分類し、各調査個体の階級値から寄生指数(Ferdous *et al.* 2006、Suzuki *et al.* 2012)を次式より算出した。また、抵抗性の判定は、レース判定用指標品種及び比較品種のシスト寄生指数を参考にして行った。

寄生指数=(\sum (階級値×個体数)×100)/(4×全個体数)

A



B

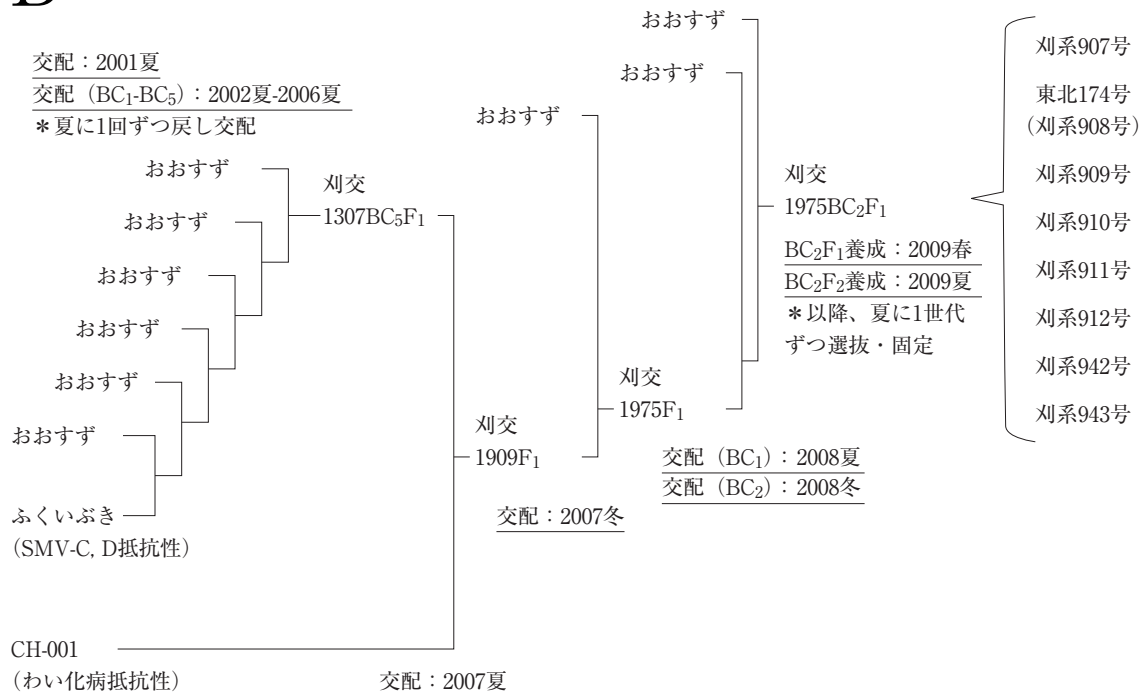


図1 育成系統の系譜

注. 春、夏、冬は、各々、当年3月～5月（温室）、当年6月～11月（圃場）、当年12月～翌年2月（温室）にて、交配または養成していることを示す。

表1 複合病虫害抵抗性の選抜に用いた SSR マーカーセット

対象 病害虫	遺伝子座・ マーカー名	Forward プライマー		配列	
		プライマーの 蛍光標識 ^{a)}	の濃度 (nM)	Forward (5'・3')	Reverse (5'・3')
ダイズシストセンチュウレース 1					
<i>Rhg1</i>	Satt309	PET	50	GCGCCTTCAAATTGGCGTCTT	GCGCCTTAAATAAAACCCGAAACT
	Sat_210	VIC	50	GCGCCAGCAACAAAGTTCCTGACAAA	GCGCATGCAAATGAAATAATAA
<i>Rhg4</i>	Satt632	PET	25	GGGCTATGAAGGGAATGGAAAGGA	CCCATATTGAAGATTTGAAGTAAT
	Sat_162	VIC	25	GCGTGGTTTTTCGCTGGATATA	GCGCATTTTCGTAACATATTTTTCAC
	Sat_157	6-FAM	50	GCGGTTTTCGAAGATGTGATGAGT	GCGCGTACGCAAAATTTATATTCA
ダイズモザイクウイルス C,D 系統					
<i>Rsv3</i>	BARCSOYSSR_14_1392	6-FAM	50	CACTCTAGAAAGCCTTCCACCT	TTCGTCTCCTGTGCATACCA
	BARCSOYSSR_14_1403	NED	100	TGCAATGGAAAAGTGATGATTC	AAACCATCTGTTGCCACCAT
	M3SattM	PET	50	GATTGAAGGGTCACCAATCG	CGTATCATCCAATGACCAA
	Satt560	VIC	50	GCGATCGTGCAAGAAAATA	GCGGTGGACTTCGCCTCAAATAAT
ダイズわい化ウイルス					
<i>Rsdv1</i>	Sat_11	PET	50	TCTTTGTTTACCTTCTTTGTGA	AAAAAGCCACATATTTTTCA
	CA782298	NED	50	ATTCGCGTTCCTTCTCTCTCT	GCTGTGATTGAGGGAGAAGTT
	Sct_13	6-FAM	50	CATCTTCACTAAATGTTTGCAC	TCTGGGAATTCATAACTGGT

注. a) 蛍光標識は Thermo Fisher Scientific Inc. による。

4. SMV抵抗性検定試験

抵抗性検定は、長沢ら (1987) の方法に従い、育成地 (東北農業研究センター) の網室にてポット栽培し実施した。超低温 (−80℃) で保存したSMV-C及びD系統感染葉を緩衝液 (40mMリン酸二水素カリウム、60mMリン酸水素二ナトリウム、pH7.0) と一緒にすり潰し、接種液とした。罹病性である「農林4号」の初生葉にカーボランダム (600メッシュ) をまぶし、接種液を浸したスポンジでこすり、SMV-C及びD系統を各々増殖した。モザイク及び縮葉症状等を呈したSMV-C及びD系統の感染葉から得られた接種液を各系統当たり 5～12個体に接種し、その感染個体率から抵抗性の判定を行った。試験は2012年及び2013年の2年間実施し、2012年の播種日は6月19日、接種は7月2日、調査は7月12～17日、2013年の播種日は6月18日、接種は6月28日、調査は7月5～12日に行った。

5. SbDV抵抗性検定試験

SbDV発生圃場 (北海道伊達市) にて、2012～2014年の3ヵ年供試した。1区当たり22個体を圃場にて栽培し、自然感染による発病個体率を調査した。2012年は指標品種4反復、供試系統3反復、2013年は指標品種、供試系統ともに3反復、2014年は指標品種5反復、供試系統4反復にて栽培した。なお、播種日は、2012年は5月15日、2013年は5月10日、2014年は5月8日で、調査日は、2012年は8月20

日、2013年は8月26日、2014年は8月27日であった。また、発生圃場におけるわい化病ウイルスの検出及び「わい化型」、「黄化型」の判別を行うため、感染葉のサンプリング及びRT-PCRによるSbDVの検出を行った。サンプリングは「おすすず」及び「トヨムスメ」の感染個体の罹病葉を各2個体ずつ、2013年8月5日に行った。罹病葉のRNAは、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) により抽出し、OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) を用い、逆転写及びPCR反応を行った。上記反応は、Terauchi *et al.* (2001) が報告しているSbDVの全長の塩基配列を元に、ORF5下流の非翻訳領域が増幅するように設計したプライマーDY3'+ (5'-GCTTCTGGTGATTA-CACTGC-3') 及びDY3'- (5'-GCCACCTTAACAA-CAAAGAGG-3') を用いた。なお、本プライマーを用いることで、「わい化型」では282bp、「黄化型」では322bpのPCR産物が増幅される。逆転写反応は50℃で30分間逆転写反応を行い、PCR反応は95℃で10分解離後、変性：94℃・30秒、アニーリング：58℃・30秒、増幅：72℃・30秒を30サイクル行い、最後の伸長反応を72℃・10分で行った。

6. 育成系統の農業特性の評価

東北番号を付与した系統について、生産力検定試験に供試した。生産力検定試験は水田転換畑及び普通畑の2条件にて2013～2015年の3ヵ年、各々、1区当たりの面積を9.0～10.5m²として3反復乱塊法

表2 生産力検定試験耕種概要

試験 年次	圃場条件	畦数	畦長 (m)	畦間 (m)	1区面積 (m ²)	播種日
2013	普通畑	4	3.5	0.75	10.5	5/27
	水田転換畑	4	3.0	0.75	9.0	6/4
2014	普通畑	5	2.5	0.75	9.4	5/27
	水田転換畑	5	2.5	0.75	9.4	6/3
2015	普通畑	5	2.5	0.75	9.4	5/27
	水田転換畑	5	2.5	0.75	9.4	6/2

注. a) いずれの試験も3反復乱塊法にて実施した。

にて実施した(表2)。調査形質は、開花まで日数、開花から成熟まで日数、倒伏程度、主茎長、主茎節数、子実重、百粒重、粗蛋白、粗脂肪及び全糖含有率の10形質を対象とした。調査は農林水産植物種類別審査基準(2012)に従い実施した。なお、主茎長、主茎節数は10株を調査対象とし、1株2個体のうち主茎長がより長い1個体を調査個体として調査した。倒伏程度は成熟期に区ごとに、倒伏の少ない区を0、倒伏が激しい区を5とする6段階の達観評価を行った。粗蛋白質、粗脂肪及び全糖含有率は近赤外分光分析装置(Infratec 1241 FOSS)により測定し、粗蛋白質含有率は窒素換算係数6.25を乗じて算出した。

Ⅲ 結 果

1. 選抜用DNAマーカーの多型解析

*Rhg1*及び*Rhg4*座近傍のSSRマーカーについて、

両親間でPCR産物の長さを比較したところ、*Rhg4*座近傍のSat_157のみ「リュウホウ」とSCNレース1抵抗性供与親である「To-8E」との間に多型は認められなかったが、その他のマーカーについては、「To-8E」は「リュウホウ」や「東北156号」とPCR産物の長さが異なることから、共優性の選抜マーカーとして利用できた(表3)。

*Rsv3*座近傍では、SMV抵抗性供与親である「東北156号」のPCR産物の長さは、いずれのマーカーにおいても「リュウホウ」や「To-8E」と異なり、もう一つのSMV抵抗性供与親である「ふくいぶき」においても「おおすず」や「CH-001」と異なることから、共優性の選抜マーカーとして利用できた(表3)。

*Rsdv1*近傍では、Sat_11では「おおすず」及び「ふくいぶき」ではPCR産物が増幅されるのに対し、SbDV抵抗性供与親である「CH-001」ではPCR産物の増幅が認められないことから、優性マーカーとして利用できた(表3)。またCA782298及びSct_13は、「CH-001」のPCR産物の長さが「おおすず」及び「ふくいぶき」と異なることから、共優性マーカーとして利用できた(表3)。

2. マーカー選抜及び戻し交配による抵抗性系統の開発

「リュウホウ」のSCNレース1及びSMV複合抵抗性系統の開発では、2005年夏季に「リュウホウ」と「東北156号」、及び「リュウホウ」と「To-8E」

表3 各SSRマーカーの増幅長多型

対象 病害虫	遺伝子座・マーカー名	フラグメント解析による PCR 産物の長さ (bp) ^{a)}					
		リュウホウ	東北156号	To8E	おおすず	ふくいぶき	CH-001
ダイズシストセンチュウレース 1							
	<i>Rhg1</i> Satt309	135	135	140	－	－	－
	Sat_210	265	268	231	－	－	－
	<i>Rhg4</i> Satt632	268	268	256	－	－	－
	Sat_162	372	368	334	－	－	－
	Sat_157	280	285	280	－	－	－
ダイズモザイクウイルス C,D 系統							
	<i>Rsv3</i> BARCSOYSSR_14_1392	151	143	151	161	143	149
	BARCSOYSSR_14_1403	107	126	115	150	126	118
	M3SattM	230	224	230	230	224	230
	Satt560	292	289	292	298	292	296
ダイズわい化ウイルス							
	<i>Rsdv1</i> Sat_11	－	－	－	232	232	増幅せず
	CA782298	－	－	－	323	323	314
	Sct_13	－	－	－	255	255	253

注. a) 太字は抵抗性供与親のPCR産物の長さ。

の交配を行い、各々、刈交1713F₁、1714F₁種子を得た (図 1 A)。同年、冬季温室において、刈交1713F₁及び1714F₁個体を両親として交配を行い、*Rsv3*、*Rhg1*、*Rhg4*座がヘテロ型の3粒の刈交1754F₁種子を得た。2006年夏季にリュウホウと刈交1754F₁を交配した後、2007年夏季に3座がヘテロ型の刈交1802F₁、1個体の養成を行った。2008年春季に、3座が抵抗性ホモ型の刈交1802F₂、3個体を花粉親として選定し、再び「リュウホウ」と交配した。2008年夏季及び冬季に「リュウホウ」との交配を2回行った後、2009年春季に世代促進し、刈交1932BC₂F₂種子を765粒得た。2009年夏季に上記、刈交BC₂F₂個体を栽植し、3座を抵抗性ホモ型で有する15個体を選抜した。2010年夏季に上記15個体由来の刈交BC₂F₃系統を栽培し、2011年に6系統に「刈系901～906号」を付し、2012年に「刈系906号」に「東北173号」を付した (表 4)。

「おおすず」のSMV及びSbDV複合抵抗性系統の開発では、2001年夏季に「おおすず」と「ふくいぶき」を交配し、2002年から2006年まで、*Rsv3*領域マーカー選抜を行いながら、「おおすず」を反復親として戻し交配を行い、刈交1307BC₅F₁を6粒得た (図 1 B)。2007年夏季に1307BC₅F₁及びCH-001を交配し刈交1909F₁を得た後、2007年冬季に再び「おおすず」と交配し刈交1975F₁を得た。2008年の

夏季及び冬季にDNAマーカー選抜を行いながら、戻し交配を行い、*Rsdv1*及び*Rsv3*領域がヘテロの刈交1975BC₂F₁種子を6粒得た。これらを2009年春季に世代促進し、刈交1975BC₂F₂種子を235粒得た。2009年夏季に235個体栽植し、両遺伝子を抵抗性ホモ型で有する19個体を選抜した。十分な種子量が得られなかった1個体を除く刈交1975BC₂F₂の18個体由来の刈交BC₂F₃系統を2010年に栽培し、2011年に6系統に「刈系907～912号」を付した (表 4)。2012年に「刈系908号」に「東北174号」を付するとともに、2013年に新たに2系統に「刈系942～943号」を付した。

3. SCN抵抗性検定試験

SCNレース 1 抵抗性検定について、2012年の2回目の調査で「Lee」や「PI 88788」で、シストの着生の少なかったものの、両年とも、判別及び指標品種のシスト着生指数は概ね既往の知見の通りとなった (表 5)。供試系統については、2012年1回目の調査で「刈系904号」では系統内で感受性を示す個体と抵抗性を示す個体に分離し、系統全体としてシスト着生指数が「PI 88788」並みであったことから、感受性と判定された。一方、その他の系統では2012年及び2013年の2回の調査でいずれもシストの着生は「スズヒメ」並で、SCNレース 1 抵抗性と判定された。

表 4 育成系統の各病虫害に対する抵抗性

系統名	戻し交配 の数	育成系統の各病虫害に対する抵抗性 ^{a)}			反復親	反復親の各病虫害に対する抵抗性 ^{a)}		
		SCN レース 1	SMV-C,D	SbDV		SCN レース 1	SMV-C,D	SbDV
刈系901号	2	R	R	S	リュウホウ	S	S	S
刈系902号	2	R	R	S	〃	〃	〃	〃
刈系903号	2	R	R	S	〃	〃	〃	〃
刈系904号	2	S	R	S	〃	〃	〃	〃
刈系905号	2	R	R	S	〃	〃	〃	〃
東北173号 (刈系906号)	2	R	R	S	〃	〃	〃	〃
刈系907号	2	S	R	R	おおすず	S	S	S
東北174号 (刈系908号)	2	S	R	R	〃	〃	〃	〃
刈系909号	2	S	R	R	〃	〃	〃	〃
刈系910号	2	S	R	R	〃	〃	〃	〃
刈系911号	2	S	R	R	〃	〃	〃	〃
刈系912号	2	S	R	R	〃	〃	〃	〃
刈系942号	2	S	R	R	〃	〃	〃	〃
刈系943号	2	S	R	R	〃	〃	〃	〃

注. a) SCN、SMV-C,D、SbDV は、各々、ダイズシストセンチュウ、ダイズモザイクウイルス C 及び D 系統、ダイズわい化ウイルスを示す。また、'R'、'S' はそれぞれ抵抗性、感受性を示す。

表5 ダイズシストセンチュウレース1とレース3に対する育成系統の寄生指数と抵抗性

	既往の評価 ^{a)}		レース1 (2012)			レース1 (2013)			レース3 (2013)		
	レース1	レース3	調査1回目 ^{b)}	調査2回目	抵抗性判定 ^{a)}	調査1回目	調査2回目	抵抗性判定	調査1回目	調査2回目	抵抗性判定
判別・比較品種											
キタムスメ	S	S	48	30	—	66	40	—	48	41	—
トヨムスメ	S	R	39	28	—	48	45	—	9	2	—
トヨコマチ	S	R	48	27	—	47	37	—	15	0	—
スズヒメ	R	R	0	1	—	3	1	—	0	0	—
下田不知1号	S	R	45	22	—	47	31	—	6	0	—
Lee	S	S	45	10	—	50	25	—	49	42	—
PI88788	S	R	15	2	—	11	21	—	2	1	—
Pickett71	R	R	4	2	—	3	0	—	0	0	—
Peking	R	R	0	0	—	0	0	—	0	1	—
PI90763	R	R	0	1	—	0	0	—	0	0	—
育成系統											
刈系901号			3	1	R	—	—	—	—	—	—
刈系902号			2	2	R	—	—	—	—	—	—
刈系903号			2	0	R	—	—	—	—	—	—
刈系904号			19	1	S	—	—	—	—	—	—
刈系905号			2	2	R	—	—	—	—	—	—
東北173号 (刈系906号)			1	3	R	2	2	R	1	0	R

注. a) R'は抵抗性、'S'は感受性を示す。なお、抵抗性の判定は、レース判定用指標品種及び比較品種のシスト寄生指数を参考にして行った。

b) 個体毎に根部に着生するシスト数に応じて、0～4の少数点の値も含む16段階の階級値（0：シストなし、0.1～1.0：1～10個（1個刻み）、1.7：21～50個、2：51～100個、3：101～500個、4：501個以上）に判別し、各調査個体の階級値から寄生指数を次式より算出した。寄生指数＝（Σ（階級値×個体数）×100）/（4×全個体数）

SCNレース3抵抗性検定については、東北番号を付与した「東北173号」のみを供試系統として試験した。1回目の調査で抵抗性の「トヨコマチ」のシストの着生がやや多かったものの、その他の判別及び指標品種のシスト着生指数は概ね既往の知見の通りとなった。「東北173号」のシストの着生は、いずれの調査においても「下田不知」由来の抵抗性を有する「トヨムスメ」、「トヨコマチ」、「下田不知1号」より同等、もしくは少ない傾向が認められた。

4. SMV抵抗性検定

2012年及び2013年に育成系統についてSMV抵抗性検定試験を実施した。指標品種のC系統に対する反応は、「Peking」、「Harosoy」、「白豆」、「デウムスメ」では発病が観察されないのに対し、「奥羽3号」、「十勝長葉」、「ネマシラズ」、「ふくせんなり」、「農林4号」、「つるの卵1号」は2012年の「ふくせんなり」を除き、全ての個体でモザイク症状が観察され、既往の知見と一致した（表6）。指標品種のD系統に対する反応は、「Peking」、「Harosoy」、「ふくせんなり」、「デウムスメ」では発病が観察されず抵抗性を示し、「奥羽3号」、「十勝長葉」、「ネマシ

ラズ」、「農林4号」、「つるの卵1号」、「白豆」は2012及び2013年の「白豆」を除いて全ての個体で発病が観察され、既往の知見と一致した（表6）。育成系統については、いずれも、SMVのC及びD系統の接種により発病せず、抵抗性を持つことが示された（表6）。

5. SbDV抵抗性検定試験

2012年に「刈系907～912号」、2013年に「東北174号」、「刈系911、912、942、943号」、2014年に「東北174号」、「刈系912、943号」を供試した。SbDVの検出、「わい化型」及び「黄化型」の判別が可能なプライマーDY3'+、DY3'-を用いて、2013年に「おおすず」及び「トヨムスメ」の感染葉から抽出したRNAよりRT-PCRを行ったところ、いずれの感染葉からも300bpより大きな増幅バンドが検出され、確認されたウイルスは「黄化型」のSbDVであることが示された（図2）。

反復親である「おおすず」の発病率は36.4～50.0%であり、抵抗性「弱」の「カリユタカ」、「やや弱」の「トヨハルカ」と同程度であった。育成系統の発病率は0～24.1%で、2012年の「刈系907号」

表6 育成系統のダイズモザイクウイルス系統別罹病個体数と抵抗性

指標品種	SMV-C					SMV-D				
	2012		2013		抵抗性 判定 ^{a)}	2012		2013		抵抗性 判定
	罹病個体数/ 供試個体数	発病 個体率	罹病個体数/ 供試個体数	発病 個体率		罹病個体数/ 供試個体数	発病 個体率	罹病個体数/ 供試個体数	発病 個体率	
Peking	0/10	0	0/10	0	R	0/10	0	0/10	0	R
Harosoy	0/10	0	0/10	0	R	0/10	0	0/10	0	R
奥羽3号	10/10	100	10/10	100	S	10/10	100	10/10	100	S
十勝長葉	10/10	100	10/10	100	S	10/10	100	10/10	100	S
ネマシラズ	10/10	100	10/10	100	S	10/10	100	10/10	100	S
ふくせんなり	4/10	40	10/10	100	S	0/10	0	0/10	0	R
農林4号	10/10	100	10/10	100	S	10/10	100	10/10	100	S
つるの卵1号	9/9	100	10/10	100	S	10/10	100	10/10	100	S
白豆	0/10	0	0/10	0	R	6/9	67	8/10	80	S
デナムスメ	0/10	0	0/10	0	R	0/10	0	0/10	0	R
育成系統										
刈系901号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
刈系902号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
刈系903号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
刈系904号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
刈系905号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
東北173号 (刈系906号)	0/10	0	0/10	0	R	0/10	0	0/10	0	R
刈系907号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
東北174号 (刈系908号)	0/10	0	0/10	0	R	0/10	0	0/10	0	R
刈系909号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
刈系910号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
刈系911号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
刈系912号	0/10	0	—	—	R	0/10	0	—	—	R
刈系942号	—	—	0/10	0	R	—	—	0/10	0	R
刈系943号	—	—	0/10	0	R	—	—	0/10	0	R

注. a) 'R'、'S' はそれぞれ抵抗性、感受性を示す。

及び2014年の「刈系943号」では有意ではなかったものの、いずれの系統の発病率も反復親の「おおすず」より低く、抵抗性「強」の「植系32号」または「やや強」の「ツルコガネ」並であった（図3）。

6. 育成系統の農業特性の評価

「東北173号」及び「東北174号」を2013～2015年に生産力検定試験に供試し、各々、その農業特性を「リュウホウ」及び「おおすず」と比較した（表7-1、2）。

「東北173号」は「リュウホウ」と比較して、主茎長、百粒重、全糖含有率のみに有意差が認められ、「東北173号」は「リュウホウ」より主茎長が3cm程度長く、百粒重は0.9g小さく、全糖含有率は、0.3%大きかった（表7-1）。しかしながら、その他の形質では有意差は認められず、「東北173号」の農業形質はほぼ「リュウホウ」と同等であっ

た。品種・系統及び畑条件の交互作用（品種・系統×畑条件）はいずれの形質においても有意な効果は認められず、品種・系統及び年次の交互作用（品種・系統×年次）は粗脂肪含有率のみで有意な効果が認められた。品種・系統、畑条件及び年次（品種・系統×畑条件×年次）は主茎節数のみで有意であり、その他の形質においては有意な効果は認められなかった。従って、年次及び畑条件といった栽培環境は調査形質に影響を及ぼしているものの、品種との交互作用は小さく、「リュウホウ」及び「東北173号」の農業形質の差異は異なる栽培環境間でも同様の傾向を有していることが示された。

一方、「東北174号」の農業特性については、「東北173号」とは対照的に、品種・系統間による有意差は倒伏程度以外の全て形質において認められた（表7-2）。「東北174号」は「おおすず」と比較し

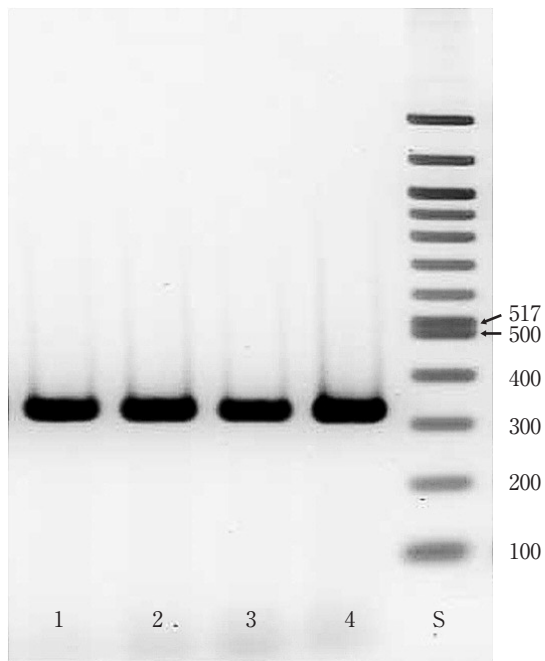


図2 RT-PCRにより増幅されたダイズわい化ウイルスのDNA断片

注. 2%アガロースゲルにより分離。解析材料は下記の通り。1, 2. 「おおすず」; 3, 4. 「トヨムスメ」。Sは100-bp DNA ladder (BioLabs)。なお、ダイズわい化ウイルスの「わい化型」では282 bp、「黄化型」では322 bpのPCR産物が増幅される。

て、開花までの日数が2日、開花から成熟までの日数が3日程度長い傾向にあり、主茎節数及び主茎長は1割程度大きかった。また、「東北174号」の百粒重は「おおすず」より2.4g小さく、「東北174号」の子実重は「おおすず」より劣った。子実の成分含量は、「東北174号」の粗蛋白質及び粗脂肪含有率は「おおすず」よりそれぞれ1%程度低い一方で、全糖含有率は1.6%高かった。品種・系統×畑条件の交互作用は主茎長、主茎節数、粗脂肪含有率、品種・系統×年次、及び、品種・系統×畑条件×年次の交互作用は粗脂肪含有率のみ有意であり、その他の形質においては有意な効果は認められなかった。従って、「東北174号」と「おおすず」の比較においては多くの形質において差異が認められ、主茎長、主茎節数、粗脂肪含有率以外の農業形質の差異は異なる栽培環境間においても同様の傾向を有していることが示された。

IV 考 察

「リュウホウ」にSMV-C, D及びSCNレース1抵

抗性、「おおすず」にSMV-C, D及びSbDV抵抗性を複合的に導入するに当たり、SSRマーカーのプライマーを蛍光標識し、複数の増幅産物をDNAシーケンサーにより高精度にフラグメント解析することで、複数マーカーを同時に解析し、効率的にDNAマーカー選抜を行った。今回使用したDNAマーカーセットは多型率が高く、また*RsdvI*選抜に用いたSat_11を除き、共優性マーカーであったことから、戻し交配の過程でDNAマーカー選抜を容易に行うことができた。従来のアクリルアミドやアガロースゲルを用いた電気泳動による多型解析では、精度及び労力的な観点から、複数の病害虫抵抗性をDNAマーカー選抜で導入することは困難で、育種上有用なDNAマーカー情報が充実したとしても、育種現場でその情報を十分に活用することができなかった。今回の用いたシステムであれば、例えば96サンプル、8マーカーの多型検出を約1時間で完了することができる。また、本システムでは1bpの差を検出することから、複数マーカーを同時に解析でき、多検体、多マーカーの遺伝子型を短時間で判定できる技術として、すでに育種現場への導入が進んでいる。

SMV-C, D及びSbDVについては、抵抗性を導入し、開発した系統は、いずれも上記病害虫に対して抵抗性を示したが、SCNレース1については、「刈系904号」において感受性個体の分離が認められた。育成当初、*Rhg4*座の選抜用DNAマーカーには、Di Mauro *et al.* (2004)、Meksem *et al.* (2001)、Suzuki *et al.* (2012) の情報に基づき、近傍領域のSSRマーカーSatt632、Sat_162、Sat_157を選定したが、近年、*Rhg4*の原因遺伝子Glyma08g11490が単離され(Liu *et al.* 2012)、当該遺伝子が選定したSSRマーカーセットで挟み込んでいる領域から下流に6～10kb離れていることが判明し (daizubase, <http://daizu.dna.affrc.go.jp/>)、今回用いたSSRマーカーでは、「刈系904号」を選抜する過程で、*Rhg4p*が導入されていなかった個体を選抜した可能性がある。そのため、*Rhg4*座の選抜用DNAマーカーセットについては、今後、対象とする遺伝子を挟み込むように再度設計し、改良する必要がある。今回の事例のように、既報の候補遺伝子領域及び候補遺伝子が必ずしも正しいとは限らないことから、中期世代での生物検定は確実に実施する必要がある。

「PI 84751」由来の抵抗性はSCNレース1のみな

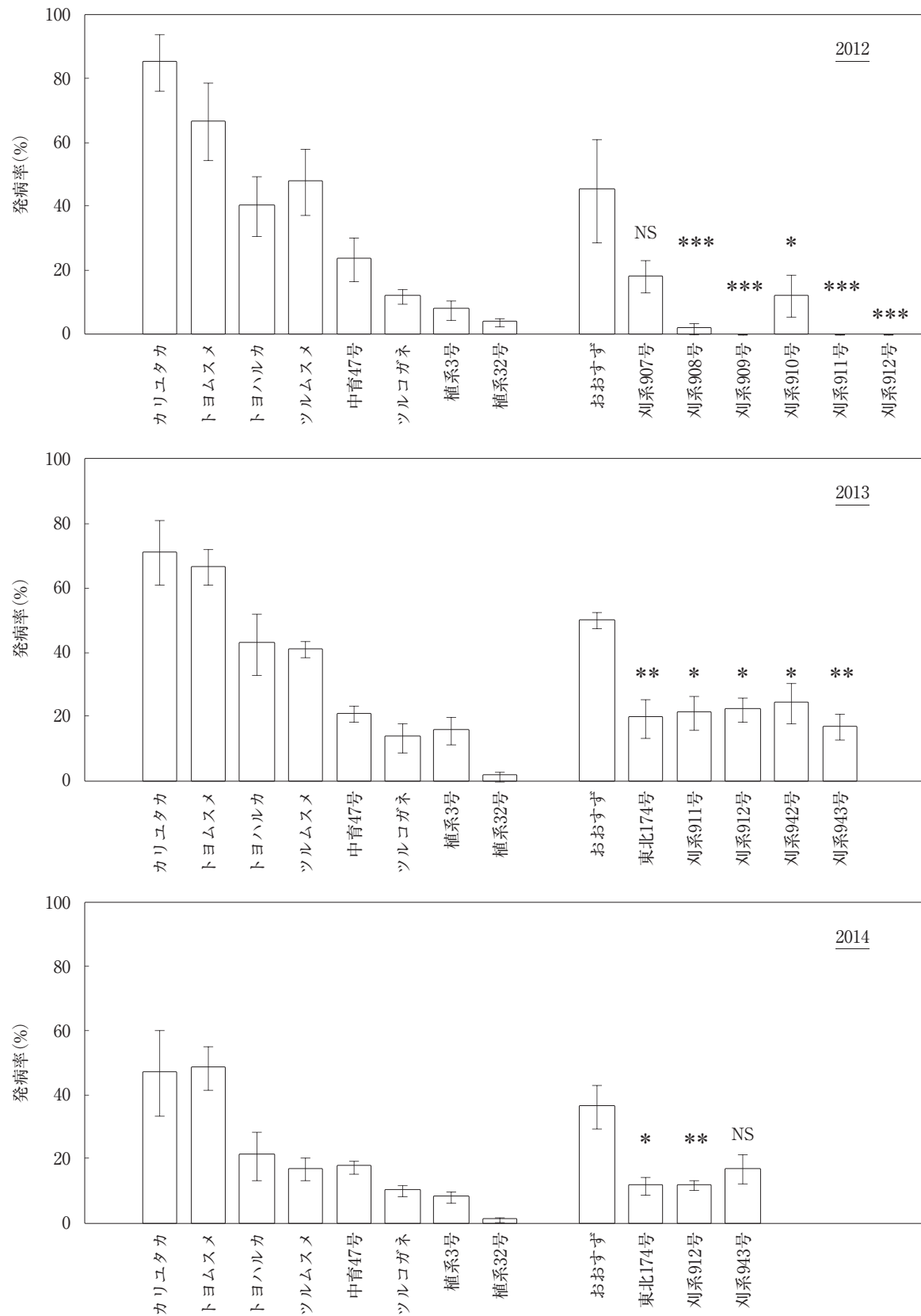


図3 SbDV 抵抗性検定試験（北海道）における発病率の品種・系統間差

注. *, **, ***は「おおすず」を比較品種として Dunnet の多重比較検定の結果、5%、1%、0.1% 水準で有意であること、NS は有意差が認められないことを示す。エラーバーは標準誤差を示し、検定は発病率を角変換した値を用いて行った。

表 7-1 生産力検定試験の分散分析結果及び各水準の平均値（「東北173号」及び「リュウホウ」との比較）

要因	水準	開花まで 日数 ^{a)} (日)	開花から成熟 まで日数 ^{b)} (日)	倒伏 程度 ^{c)}	主茎長 (cm)	主茎 節数	子実重 (kg/a)	百粒重 (g)	粗蛋白 含有率 (%)	粗脂肪 含有率 (%)	全糖 含有率 (%)
品種・系統	東北173号	57.8	70.7	2.1	76.5	15.8	35.7	33.4	43.4	19.8	22.2
	リュウホウ	57.4	70.4	2.5	73.3	15.6	37.4	34.3	43.8	19.7	21.9
畑条件	普通畑	60.8	70.1	2.5	72.8	15.5	35.8	33.9	43.3	19.9	21.9
	水田転換畑	54.3	71.1	2.1	77.0	15.9	37.3	33.8	43.9	19.5	22.1
年次	2013	57.2	70.8	1.8	70.4	15.5	35.2	33.2	43.4	20.4	21.1
	2014	55.8	71.3	2.7	77.9	15.5	36.7	33.9	43.0	19.5	22.3
	2015	59.8	69.6	2.4	76.4	16.2	37.9	34.5	44.5	19.3	22.7
分散分析	品種・系統	NS ^{d)}	NS	NS	**	NS	NS	**	NS	NS	**
	畑条件	***	NS	*	***	*	NS	NS	**	***	NS
	年次	***	*	**	***	**	NS	**	***	***	***
	品種・系統×畑条件	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	品種・系統×年次	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS
	畑条件×年次	***	*	**	NS	NS	NS	**	***	***	**
	品種・系統×畑条件×年次	NS	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS

表 7-2 生産力検定試験の分散分析結果及び各水準の平均値（「東北174号」及び「おおすず」との比較）

要因	水準	開花まで 日数 ^{a)} (日)	開花から成熟 まで日数 ^{b)} (日)	倒伏 程度 ^{c)}	主茎長 (cm)	主茎 節数	子実重 (kg/a)	百粒重 (g)	粗蛋白 含有率 (%)	粗脂肪 含有率 (%)	全糖 含有率 (%)
品種・系統	東北174号	57.9	74.9	1.4	72.5	16.4	35.0	35.2	43.2	19.5	22.4
	おおすず	56.1	72.2	1.7	65.7	14.9	37.0	37.6	44.4	20.3	20.8
畑条件	普通畑	60.7	72.3	1.8	66.3	15.5	32.9	36.4	43.3	20.1	21.6
	水田転換畑	53.3	74.8	1.3	71.8	15.8	39.0	36.4	44.4	19.6	21.6
年次	2013	56.2	72.6	1.3	64.3	15.6	35.4	33.8	42.4	20.8	21.0
	2014	55.6	75.8	1.5	72.4	15.6	34.4	37.3	44.1	19.4	21.8
	2015	59.3	72.2	1.9	70.5	15.8	38.1	38.1	44.9	19.4	22.1
分散分析	品種・系統	**	**	NS	***	***	*	***	***	***	***
	畑条件	***	**	**	***	*	***	NS	***	***	NS
	年次	***	***	*	***	NS	**	***	***	***	***
	品種・系統×畑条件	NS	NS	NS	*	*	NS	NS	NS	**	NS
	品種・系統×年次	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	***	NS
	畑条件×年次	**	NS	***	NS	NS	***	NS	***	***	**
	品種・系統×畑条件×年次	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	NS

注. a) 播種～開花までの期間。

b) 開花～成熟までの期間。

c) 圃場における達観調査により 0：無、1：微、2：少、3：中、4：多、5：甚の 6 段階評価により判定。

d) *、**、***は、各々、5%、1%、0.1% で有意差があることを示し、NS は有意な差がないことを示す。

らず、SCN レース 3 に対して極めて強い抵抗性を示すことが知られており、今回の試験でも SCN レース 1 抵抗性を有する「東北173号」等は「スズヒメ」と同様、「下田不知」由来の抵抗性を有する品種よりシストの寄生が少なく、極めて強い抵抗性を示した。寒冷地向けの SCN レース 1 抵抗性系統開発に向けた取り組みは、「スズヒメ」が開発された 1980 年前後に東北農研でも取り組みられ、「PI 84751」と同レベルの強い抵抗性を示す「Peking」を抵抗性の母本として用い、F₂～F₅ 世代までをセンチュ

ウ発生圃場にて選抜し続けることで、1991年に抵抗性極強の「東北116号」を開発している。しかし、その後、SCN発生圃場に卵寄生菌（*Peacilomyces* sp）が発生し、センチュウの密度が低下してしまったため、後続系統の開発が極めて困難になり、抵抗性極強系統の開発は停滞していた（氣賀澤・酒井 1992）。今回、「東北173号」を開発した方法は、「下田不知」由来の抵抗性を有する品種を反復親として用いることで、抵抗性極強系統を容易に開発することが可能となった。しかし、「下田不知」由来の抵

抗性を持っていない品種に、抵抗性を導入するためには*Rhg2*及び*Rhg3*座の解析も必須であり、両遺伝子座の座乗位置の解析が期待される。

SMVに対する抵抗性の導入については、*Rsv3*領域に設計されたDNAマーカーを用い、SMV-C, D系統に対して抵抗性の系統を開発することができた。従来のSMV-C, D系統に対する抵抗性育種では、育成の初期及び中期世代において、同病の激発圃場や混合大量接種圃場に栽培することで、抵抗性個体を選抜してきた(橋本ら 1984、橋本ら 1987、石川ら 1979、高橋 2003)。しかしながら、*Rsv3*座がヘテロ型の個体は抵抗性となること(重盛 1991)、全ての個体で発病するよう均一に接種することは容易ではなく、また年次、栽培環境によりSMVの病徴の差異を判別することが困難になること(重盛 1991、高橋 2003)、などが考えられ、育種の過程で感受性個体を選抜してしまう可能性を残していた。本研究では、*Rsv3*領域に設計された共優性のDNAマーカーを用いたことから、簡易かつ確実に抵抗性ホモ型個体を選抜することができた。一方、*Rsv3*の原因遺伝子はNucleotide-binding-site leucine-rich repeat (NBS-LRR)であることが分かっており、SMVに対する系統特異的な過敏反応により発病を抑制している(Suh *et al.* 2011)。前述の通り、国内のSMV-C, D抵抗性育種においては「Harosoy」由来の*Rsv3*が広く用いられてきたが、NBS-LRRによる過敏反応による抵抗性は、認識するウイルスの変異によって抵抗性が打破されるだけでなく、場合によっては認識が不完全となり全身壊死性の病徴を示すことが知られており(小林ら 2014)、SMV-C, D系統に対する抵抗性育種において*Rsv3*以外の抵抗性遺伝子の利用も検討する必要がある。一方、*Rsv4*はウイルスの短距離及び長距離の細胞間移行等に関与するSMV抵抗性遺伝子で、国内では今までほとんど利用されておらず、*Rsv4*を有する「Peking」は国内で発生するA~Eまでの全ての系統に対して抵抗性を有することから(Gunduz *et al.* 2004、重盛 1991)、抵抗性育種において有用な遺伝子である可能性が高い。今後、*Rsv4*についてもマーカー開発を進めるとともに、戻し交配系統等を作成し、効果を検証することが求められる。

東北地域において、古くからダイズわい化病の発生が認められるものの、抵抗性検定が難しいことか

ら、抵抗性系統が開発されてこなかったが、本研究では「Wilis」由来の高度抵抗性遺伝子*Rsdv1*を有する東北地域で栽培可能な初の抵抗性系統「東北174号」を開発することができた。開発された抵抗性系統は、北海道及び東北地域において発生が広く認められる「黄化型」のSbDVに対して、概ね抵抗性「やや強」の「ツルコガネ」と同等の発病率で、同品種並みの抵抗性を有することが確認でき、*Rsdv1*単独でダイズわい化病に対して、抵抗性を示すことが確認された。一方、抵抗性が「強」の「植系32号」と比較すると、発病率は高い傾向にある。Yamashita *et al.* (2013)の報告でも、わい化病発生圃場に「植系32号」、感受性品種の「トヨコマチ」及び同品種を反復親として5回戻し交配を行い*Rsdv1*を導入した準同質遺伝子系統(NILs)を栽培し、2ヵ年発病率を調査、比較したところ、育成系統の発病率は1.1%~11.5%と幅が認められるのに対し、「植系32号」は1%以下であり、NILsより強い抵抗性を示している。今後、実用上求められる抵抗性の強さを正確に把握し、「植系32号」と同等の抵抗性が必要であれば、*Rsdv1*以外の遺伝的要因を解析する必要があると考えられる。

一方、生産力検定試験の結果、「東北173号」の農業形質は主茎長、百粒重、全糖含有率を除き、「リュウホウ」とほぼ同等であったが、「東北174号」は倒伏程度以外の全ての調査形質において、「おおすず」と有意な差が認められた。「東北173号」及び「東北174号」の反復親の理論上の置換程度は、各々、約97及び94%と比較的高く、理論的には、反復親に類似することが期待されたが、「東北174号」の調査形質は「おおすず」とは必ずしも同等とは言えず、抵抗性供与親の「ふくいぶき」、「CH-001」の導入を目的とする遺伝子以外のゲノム領域が「東北174号」により多く残存した可能性が考えられる。同様の事例は、Randhawa *et al.* (2009)も報告しており、コムギ品種「Zak」にコムギ黄さび病遺伝子Yr15を導入したBC4F7系統を作成し、反復親の置換程度をゲノム全体のSSRマーカーを用いて、調査したところ、実際の反復親の置換程度は約82%で、理論上予測される約97%とは大きく異なっていた。この要因については、(1)導入遺伝子が座乗する染色体において、導入遺伝子近傍で抵抗性供与親のゲノム領域が残存する連鎖引きずり(linkage drag)、(2)それ以外の染色体においても、戻し交

配の際、花粉親を無作為に選んでしまうことで、抵抗性供与親のゲノム領域が残存してしまうこと、等が挙げられる。もちろん戻し交配の回数を増やすことで（2）の問題を解決できるが、育成地によっては冬季及び春季に十分な数の交配を実施することのできる温室等が備わっていない場合もあり、その場合には戻し交配に多くの年数を費やしてしまうことになる。そこで、Randhawa *et al.* (2009) は、目的遺伝子近傍だけでなく、染色体全域に分布するDNAマーカーを用いた選抜法（marker-assisted background selection；MABS）を提唱し、通常、2回の戻し交配を行った場合の反復親への置換程度は87.5%であるが、戻し交配の過程でMABSを適用することで置換程度を97%以上にすることができるとしている。「東北173号」及び「東北174号」は育成系統として十分な農業形質を有しているが、今後、さらに反復親に類似した系統が作出できるように、原因遺伝子を特定し、当該遺伝子そのものをマーカー化し、その上で、不良形質との連鎖を切った育種素材の開発を進めるとともに、MABSによりゲノム全体を反復親に限りなく近づけるための育種的努力が必要である。

「東北173号」及び「東北174号」は東北番号を付与した2012年から奨励品種決定調査（以下、奨決）に供試しており、「東北173号」は2016年度も奨決を継続中である。一方、「東北174号」は普及を予定していた青森県等の評価でも、「おおすず」と比較して、生育期間が長く、粗蛋白質含有率が低いことや百粒重が小さいことから、奨決の実施を中止することとなった。しかしながら、青森県では現在もわい化病が発生しており（2007青森県）、わい化病の発生する地域では、チアメトキサムを含む種子処理剤（クルーザーFS、クルーザーMAXX等）の塗布が推奨されており、わい化病抵抗性品種作付けによる耕種的防除は省力化、低コスト化の観点から期待されていることから、現在も今回開発した系統等を育種母本として抵抗性育種を継続中である。

農研機構次世代作物開発研究センターでは、ダイズの品種開発に関わる有用形質のマーカー開発、及び全国のダイズ育成拠点から集められた育種素材のマーカー選抜の多くを同センターが担っており、対象とする形質は今回対象としたSCN等の病害虫抵抗性を始めとして、開花期の制御に関わる遺伝子や食味や健康機能性に関わるサポニン組成制御遺伝子

等多岐に及び、現在、約20形質のマーカー選抜が可能で、年間10,000点以上の解析を行っている。従来、マーカー情報が充実したとしても、労力や技術的な問題から、上記情報を十分に活用できてこなかったが、本研究で開発したシーケンサーのフラグメント解析の利用により、複数形質のマーカー選抜を育種に組み込むことが可能となり、今後、ダイズの品種育成がより効率的に実施されることが期待される。

引用文献

- 1) 相場 聡. 2002. 線虫の発生生態と防除（ダイズシストセンチュウ）（農林水産省農林水産技術会議事務局，大豆（自給率向上に向けた技術開発），農林水産研究文献解題No.27）．東京都．農林統計協会．p.489-497.
- 2) 相場 聡. 2013. 2系大豆 病害虫制御を基本とした安定生産技術の開発（ダイズシストセンチュウ抵抗性品種利用のための日本型レース検定法の確立）（農林水産省農林水産技術会議事務局，低コストで質の良い加工・業務用農産物の安定供給技術の開発，研究成果第485集）．東京都．農林水産省農林水産技術会議事務局．p.108-112.
- 3) 青森県. 2007. 普及する技術・指導参考資料（畑作）．<http://www.applenet.jp/~nouken/promote/>.
- 4) 番場宏治，谷村吉光，松川 勲，後木利三，森義男，千葉一美. 1985. だいち新品種「ツルコガネ」の育成について．北海道立農試集報 52：53-64.
- 5) Di Mauro, A. O.; Uneda-Trevisoli, S. H.; Di Mauro, S. M. Z.; Costa, M. M.; Oliveira, R. C. de; Arantes, N. E. 2004. Efficiency of microsatellite markers in assisted selection for resistance to soybean cyst nematode (race 3). *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 4：28-34.
- 6) Ferdous, S. A.; Watanabe, S.; Suzuki-Orihara, C.; Tanaka, Y.; Kamiya, M.; Yamanaka, N.; Harada, K. 2006. QTL analysis of resistance to soybean cyst nematode race 3 in soybean cultivar Toyomusume. *Breed. Sci.* 56：155-163.
- 7) Golden, A.M.; Epps, J.M.; Riggs, R.D.; Duclos, L.

- A.; Fox, J.A.; Bernard, R.L. 1970. Terminology and identity of infraspecific forms of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). Plant Dis. Rep. 54 : 544-546.
- 8) Gunduz, I.; Buss, G.R.; Chen, P.; Tolin S.A. 2004. Genetic and phenotypic analysis of *Soybean mosaic virus* resistance in PI 88788 soybean. Virology 94 : 687-692.
- 9) Hashimoto, K.; Nagasawa, T. 1986. Breeding for virus resistance in soybean in Tohoku national experiment station. Misc. Publ. Tohoku Natl. Exp. Stn. 5 : 1-12.
- 10) 橋本鋼二, 長沢次男. 1987. ウイルス病抵抗性育種 (小島睦男, 我が国におけるマメ類の育種). 東京都. 明文書房. p.32-64.
- 11) 橋本鋼二, 長沢次男, 国分喜治郎, 村上昭一, 小山隆光, 中村茂樹, 松本重男, 松本定夫, 佐々木絃一. 1984. ダイズ新品種「スズユタカ」の育成. 東北農試研報 70 : 1-38.
- 12) Hauge, B. M.; Wang, M. L.; Parsons, J. D.; Parnell, L. D. 2009. Methods of introgressing nucleic acid molecules associated with soybean cyst nematode resistance into soybean. US Patent 7485770, 3 Feb 2009.
- 13) Inagaki, H. 1979. Race status of five Japanese population of *Heterodera glycines*. Jpn. J. Nematol. 9 : 1-4.
- 14) 石川正示. 1968. 大豆のシスト線虫抵抗性品種の育成に関する研究 (福井重郎, 大豆の育種). 東京都. ラテイス. p.1-37.
- 15) 石川正示, 松本重男, 長沢次男, 橋本鋼二, 小山隆光, 国分喜治郎, 村上昭一, 中村茂樹, 宮原萬芳, 松本定夫, 今野善一郎, 飯塚典男, 柚木利文. 1979. ダイズ新品種「デワムスメ」の育成. 東北農試研報 59 : 71-86.
- 16) 兼松誠司, 苫米地慶, 石黒 潔, 榊原充隆. 2003. 2002年の北東北におけるダイズわい化ウイルスの系統別発生分布. 北日本病虫研報 54 : 51-53.
- 17) Kato, S.; Takada, Y.; Shimamura, S.; Hirata, K.; Sayama, T.; Taguchi-Shiobara, F.; Ishimoto, M.; Kikuchi, A.; Nishio, T. 2016. Transfer of the *Rsv3* locus from 'Harosoy' for resistance to *Soybean mosaic virus* strains C and D in Japan. Breed. Sci. 66 : 319-327.
- 18) 氣賀澤和男, 酒井真次. 1992. ダイズシストセンチュウの卵寄生菌に関する研究 (2) 大豆圃場におけるダイズシストセンチュウ密度と卵寄生菌の動態. 北日本病虫研報 43 : 127-128.
- 19) 小林括平, 関根健太郎, 西口正通. 2014. 植物ウイルス抵抗性の打破: ウイルス抵抗性の永続性を予測したり延長させたりできるだろうか?. 日植病報 80 : 165-171.
- 20) 越水幸男, 飯塚典男. 1963. 大豆のウイルス病に関する研究. 東北農試研報 27 : 1-103.
- 21) Liu, S.; Kandoth, P. K.; Warren S. D.; Yeckel, G. H. R.; Alden, J.; Yang, C.; Jamai, A.; El-Mellouki, T.; Juvala, P. S.; Hill, J.; Baum, T. J.; Cianzio, S.; Whitham, S. A.; Korkin, D.; Mitchum, M. G.; Meksem, K. 2012. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. Nature 492 : 256-260.
- 22) Matson, A.L.; Williams, L.F. 1965. Evidence of a fourth gene for resistance to soybean cyst nematode. Crop Sci. 5 : 477.
- 23) Meksem, K.; Ruben, E.; Hyten, D. L.; Schmidt, M. E.; Lightfoot, D. A. 2001. High-throughput genotyping for a polymorphism linked to soybean cyst nematode resistance gene *Rhg4* by using TaqmanTM probes. Mol. Breed. 7 : 63-71.
- 24) 御子柴義郎, 藤澤一郎, 藤田靖久, 梶 和彦. 1990. 東北地方におけるダイズわい化病発生地域の拡大. 北日本病虫研報 41 : 58-89.
- 25) 三好智明, 白井滋久, 湯本節三, 田中義則, 萩原誠司, 黒崎秀樹, 山崎敬之, 鈴木千賀, 大西志全, 山口直矢. 2010. だいで「ユキホマレ」のセンチュウ抵抗性を強化した新品種候補「十育247号」. 北海道農業研究成果情報 (平成21年度).
- 26) 長沢次男, 高橋幸吉, 橋本鋼二, 村上昭一, 渡辺 巖. 1987. 大豆遺伝資源のダイズモザイクウイルス病原系統に対する抵抗性評価. 日作東北支部報 30 : 67-68.
- 27) 中村茂樹, 番場宏治, 松川 勲, 谷村吉光, 足立大山, 鈴木和織. 1991. ダイズ新品種「ツルムスメ」の育成について. 北海道立農試集報

- 63 : 71-82.
- 28) 中村茂樹, 湯本節三, 高橋浩司, 田淵公清, 足立大山, 菊池彰夫, 小綿美環子, 番場宏治, 高橋信夫, 岡部昭典, 渡辺 巖, 長沢次男, 村上昭一, 橋本鋼二, 酒井真次, 異儀田和典. 1996. ダイズ新品種「リュウホウ」の育成. 東北農研報 91 : 1-11.
- 29) 中野正明, 岩崎真人, 新海 昭. 1982. 九州におけるダイズモザイクウイルスの2、3の系統について(続報). 九州病害虫研究会報 28 : 24-25.
- 30) 農林水産省. 2012. 農林水産植物種類別審査基準 p.1-35.
- 31) 農林水産省. ダイズ関連データ集(都道府県別品種別作付面積(2014年産))(http://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/daizu/d_data/). 2016年9月26日アクセス.
- 32) 大藤泰雄, 阿部 陽, 小田島裕, 寺内英貴, 本多健一郎, 石黒 潔. 2005. 東北地方に発生するダイズわい化ウイルスYP型に対する抵抗性遺伝資源候補品種の選択. 東北農研報 104 : 75-82.
- 33) Randhawa, H. S.; Mutti, J. S.; Kidwell, K.; Morris, C. F.; Chen, X. M.; Gill, K. S. 2009. Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker assisted background selection. Plos One 4 : 1-11.
- 34) Sayama, T.; Hwang, T.Y.; Komatsu, K.; Takada, Y.; Takahashi, M.; Kato, S.; Sasama, H.; Higashi, A.; Nakamoto, Y.; Funatsuki, H.; Ishimoto, M. 2011. Development and application of a whole-genome simple sequence repeat panel for high-throughput genotyping in soybean. DNA Res. 18 : 107-15.
- 35) 重盛 勲. 1991. ダイズモザイクウイルス(SMV)によるダイズモザイク病の抵抗性育種に関する研究. 長野中信農試報 10 : 1-60.
- 36) 島田信二, 高田吉丈, 境 哲文, 河野雄飛, 島田尚典, 高橋浩司, 足立大山, 田淵公清, 菊池彰夫, 湯本節三, 中村茂樹, 伊藤美環子, 番場宏治, 岡部昭典, 高橋信夫, 渡辺 巖, 長沢次男. 2004. 耐病虫性・多収・高イソフラボン含量ダイズ新品種「ふくいぶき」の育成. 東北農研報 102 : 41-56.
- 37) 白井和栄, 萩原誠司, 鴻坂扶美子, 番場宏治, 中村茂樹, 村田吉平, 鈴木和織, 高宮泰宏, 松川勲, 足立大山. 2000. ダイズ新品種「いわいくろ」の育成について. 北海道立農試集報 78 : 39-58.
- 38) Suh, S.J.; Bowman, B.C.; Jeong, N.; Yang, K., Kastl, C., Tolin, S.A., Saghai Maroof, M.A.; Jeong S.C. 2011. The Rsv3 locus conferring resistance to Soybean mosaic virus is associated with a cluster of coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeat genes. Plant Genome 4 : 55-64.
- 39) 砂田喜与志, 酒井真次, 後藤寛治, 三分一敬, 土屋武彦, 紙谷元一. 1981. だいず新品種「スズヒメ」の育成について. 北海道立農試集報 45 : 89-100.
- 40) Suzuki, C.; Tanaka, Y.; Takeuchi, T.; Yumoto, S.; Shirai, S. 2012. Genetic relationships of soybean cyst nematode resistance originated in Gedenshirazu and PI84751 on *Rhgl* and *Rhg4* loci. Breed. Sci. 61 : 602-607.
- 41) 田淵公清, 足立大山, 島田尚典, 菊池彰夫, 高橋浩司, 高田吉丈, 中村茂樹, 湯本節三, 小綿美環子, 番場宏治, 高橋信夫, 岡部昭典, 渡辺巖, 長沢次男, 村上昭一, 橋本鋼二, 酒井真次, 異儀田和典. 1999. ダイズ新品種「おおすず」の育成. 東北農研報 95 : 13-26.
- 42) 高田吉丈. 2003. 虫害抵抗性育種(寒冷地におけるダイズシストセンチュウ抵抗性育種)(海妻矩彦, 喜多村啓介, 酒井真次, わが国における食用マメ類の研究, 総合農業研究叢書第44号). 茨城県. 農業技術研究機構. p.118-123.
- 43) 高橋浩司. 2003. 病害抵抗性育種(寒冷地におけるダイズモザイクウイルス抵抗性育種)(海妻矩彦, 喜多村啓介, 酒井真次, わが国における食用マメ類の研究, 総合農業研究叢書第44号). 茨城県. 農業技術研究機構. 76-80.
- 44) 高橋幸吉, 田中敏夫, 飯田 格, 津田保昭. 1980. 日本におけるダイズのウイルス病と病原ウイルスに関する研究. 東北農試研報 62 : 1-130.
- 45) 谷村吉光, 番場宏治. 1987. ダイズ矮化病抵抗性の育種的研究 V. 大豆品種「ツルコガネ」の抵抗性程度. 北海道立農試集報 56 : 83-92.
- 46) 田澤暁子, 神野裕信, 手塚光明, 三好智明, 鴻坂扶美子, 田中義則. 2008. 「WILIS」を母本

- としたダイズわい化病高度抵抗性系統「植系32号」の育成. 北海道立農試集報 92 : 51-60.
- 47) Terauchi, H.; Kanematsu, S.; Honda, K.; Mikoshiba, Y.; Ishiguro, K.; Hidaka, S. 2001. Comparison of complete nucleotide sequences of genomic RNAs of four *Soybean dwarf virus* strains that differ in their vector specificity and symptom production. Arch. Virol. 146 : 1885-1898.
- 48) Uchibori, A.; Sasaki, J.; Takeuchi, T.; Kamiya, M.; Tazawa, A.; Inukai, T.; Masuta, C. 2009. QTL analysis for resistance to *Soybean dwarf virus* in Indonesian soybean cultivar Wilis. Mol. Breed. 23 : 323-328.
- 49) 山田直弘. 2003. 虫害抵抗性育種 (温暖地におけるダイズシストセンチュウ抵抗性育種) (海妻矩彦, 喜多村啓介, 酒井真次, わが国における食用マメ類の研究, 総合農業研究叢書第44号). 茨城県. 農業技術研究機構. p.124-129.
- 50) 山田直弘, 坂元秀彦, 谷口岳志, 高松光生, 矢ヶ崎和弘. 2006. ダイズモザイクウイルスC系統抵抗性NILを用いたダイズモザイク病発病程度の推定. 北陸作物学会報 41 : 89-91.
- 51) Yamashita, Y.; Takeuchi, T.; Ohnishi, S.; Sasaki, J.; Tazawa, A. 2013. Fine mapping of the major *Soybean dwarf virus* resistance gene *Rsdv1* of the soybean cultivar 'Wilis'. Breed. Sci. 63 : 417-422.