

学 位 論 文 題 名

Genetic studies on cold tolerance
at the early growth stage in Asian cultivated
and wild rice with special reference to adaptation

(アジア栽培および野生イネにおける生育初期の低温抵抗性と
その適応性に関する遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

Recent molecular studies have greatly contributed to our understanding of various developmental processes forming phenotypic diversity in rice (*Oryza sativa*), however, our knowledge is still limited as to how various genes contribute to adaptation. It became increasingly important for breeders to understand the nature of adaptation at both the phenotypic and molecular levels since breeding is to artificially accelerate the micro-evolutionary processes. Low temperature is a major limiting factor for agricultural productivity in Asian cultivated rice. The response to cold is a complex phenomenon that includes primary and secondary injury by exposure to low temperature, depending on the stage of development. The genetic variation in cold tolerance has been reported to be associated in rice with their geographic distribution as well as with its taxonomic groups. The present study was conducted to understand the pattern of genetic variation and the genetic bases for cold tolerance, with special reference to adaptation in rice. The results obtained are summarized as follows:

- 1) A brief review on genetics of cold tolerance in rice was described in Chapter II. The two subspecies (ssp. *indica* and ssp. *japonica*) of rice are believed to have originated from *Oryza rufipogon*, showing considerable intraspecific variation for cold tolerance. The ssp. *japonica* tends to show a higher degree of cold tolerance than ssp. *indica* that suffers various types of injury due to cold stress. In addition, the genetic variation of cold tolerance has been found to be associated with their geographical distribution, suggesting that the genetic differentiation of cold tolerance has resulted partly from local adaptation. Generally, cold tolerance is under complex transcriptional regulatory network in plants. Transcriptional regulatory network involves interactions among a number of cold induced transcription factors and their cognate cis-elements in the promoters. These genes are normally referred to as *COR* (cold regulated), *rd* (responsive to desiccation), *Iti* (low temperature induced) or *kin* (cold inducible), and their expression is activated by low temperatures, as well as some other environmental (dehydration, high salinity) and chemical (abscisic acid) signals. The map-based cloning has provided some useful information on genetic controls of cold tolerance in rice, however, the role of acclimation in increasing cold tolerance remains to be studied in rice. The adaptive significance of cold tolerance in Asian rice is of special demand to the present scenario of cold tolerance breeding in rice.
- 2) In the present study, the genetic variation was investigated at the germination, plumule and seedling stages among 57 strains including cultivated rice (*Oryza sativa* ssp. *indica* and

ssp. *japonica*) and its wild progenitor (*Oryza rufipogon*). The significant differentiation of cold tolerance was observed among the taxonomically divided groups. At the germination stage, both *indica* and *japonica* subspecies tended to be more tolerant than *O. rufipogon*, whereas at the plumule and seedling stages, ssp. *japonica* tended to be more tolerant than ssp. *indica* and *O. rufipogon*. Climatic factors such as temperature tend to show latitudinal gradients, therefore, the latitudinal cline in specific phenotypes have long been used to infer adaptation to climatic variation. In cold tolerance at the plumule stage, the clinal variation across the latitude of origins was observed within *O. rufipogon* and ssp. *japonica*, suggesting that the current pattern of variation seems to have been shaped by both their phylogenetic histories and on-going adaptation to the local environments. QTL analysis between *O. sativa* ssp. *japonica* (tolerant) and *O. rufipogon* (susceptible) revealed five putative QTLs for cold tolerance at the plumule and seedling stages but not at the germination stage. Substitution mapping was also carried out to precisely locate the two major QTLs for cold tolerance at the plumule stage, which could be used for improvement of tolerance to cold stress in ssp. *indica*.

- 3) The chilling-sensitive plants acclimate when they are exposed to a low temperature slightly above the threshold chilling temperature, in a similar process found in cold acclimation. Genetic surveys for cold tolerance were carried out to examine cold tolerance in acclimated and non-acclimated plants. The present results indicated that chilling-sensitive rice plants acclimate when exposed to a low non-chilling temperature. Variation in acclimation capacity contributed to their geographical distribution of *O. rufipogon*, showing latitudinal clines in chilling tolerance. Latitudinal clines were also observed in absence of acclimation treatment at the plumule stage, indicating that intrinsic biochemical and physiological factors also contribute to variation. On the contrary, at the seedling stage, clinal variation in chilling tolerance was found only in acclimated seedlings. This suggests that acclimation capacity greatly contributed to local adaptation, giving a caution in evaluating the degree of chilling tolerance in rice. QTL analysis revealed that no major QTL contributes chilling-tolerance in both acclimated and non-acclimated plants in common indicating a complex inheritance of cold tolerance in Asian rice.
- 4) Cold tolerance at the plumule stage is known as one of the critical traits for *indica-japonica* differentiation; however, the knowledge on its genetic control is limited. The present study was conducted to finely map the two major QTLs (*qCTP11* and *qCTP12*) for plumule cold tolerance. Substitution mapping of *qCTP12* showed considerable overlapping for cold tolerance scores between the parental QTL alleles, while the effect of *qCTP11* was larger than that of *qCTP12*. High resolution mapping of *qCTP11* revealed that it resided in the region of 4.5 kb where two candidate genes (*AK073869* and *AK064585*) with unknown functions were detected. Only in *AK064585*, a replacement substitution was found between the parental strains. Functional analysis of these candidates is needed to understand their significance in controlling the cold tolerance at the plumule stage.
- 5) Natural selection for cold tolerance plays a crucial role in shaping the micro-evolutionary changes in local environments that lead to intraspecific variation in rice. The present study showed that cold tolerance at the early stages of growth is a complex trait, physiologically and genetically. The effect of cold acclimation was positive and the geographical cline for cold tolerance was detected at the plumule stage, indicating that the genetic diversity has been affected both by current patterns of micro-evolutionary forces, such as local adaptation, and by the phylogenetic history. High resolution mapping of *qCTP11* led to the identification of candidate gene of unknown function although further functional studies are needed to elucidate its molecular mechanism. The information generated in this study will throw lights for understanding of cold tolerance at the early stages of growth, and for the improvement of cold tolerance in rice breeding programs.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 芳 雄
副 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 岩 間 和 人
副 査 助 教 高 牟 禮 逸 朗

学 位 論 文 題 名

Genetic studies on cold tolerance at the early growth stage in Asian cultivated and wild rice with special reference to adaptation

(アジア栽培および野生イネにおける生育初期の低温抵抗性と
その適応性に関する遺伝学的研究)

近年、作物における多様な表現型をもたらす発育制御が分子レベルで理解されるようになってきた。しかしながら、環境適応をもたらす遺伝変化については、依然として不明な点が多い。作物の育種は人為的に小進化を促進して品種を改良すると見なされるので、作物の適応現象をもたらせる表現型変異を分子レベルで理解することが、新技術を利用した育種を進める上で、急務であると考えられる。本研究は、イネの地域適応における低温抵抗性の役割を明らかにする目的で、栽培および野生イネ系統における地理的変異とともにその遺伝的解析を行った。本研究で得られた結果は、以下に要約される。

- 1) 最初に、イネの低温抵抗性に関する過去の研究について概説した。栽培イネは、2つの亜種、インド型と日本型に大別されるが、前者は熱帯・亜熱帯に分布するのにたいして、後者は温帯や熱帯の山岳地帯に分布する。この地理的分布の違いは、後者が前者よりも低温に対して高い抵抗性をもつことによって部分的に説明されてきた。最近の研究では、低温抵抗性に関わる遺伝子の同定や単離が報告される一方、低温抵抗性をもたらす複雑な制御様式についても報告されている。また、一般に、低温抵抗性は量的遺伝を示すと考えられる。したがって、従来報告では、低温抵抗性の変化が地域環境のもとで選抜されたのか、亜種分化時に既に起こっていた前適応であるのかについては一致した見解はないと考えられる。

- 2) 地理的分布を反映する栽培イネ 24 系統と野生祖先種 23 系統を用いて、発芽、幼芽、幼苗時における低温抵抗性を調査した。発芽時では、栽培系統と野生系統間で有意な差異がみられたが、インド型と日本型間に差異は検出されなかった。幼芽および幼苗時には、日本型はインド型より高い低温抵抗性を示した。このような分類単位間に見られる差異は、低温抵抗性変異が前適応によっても説明されることを意味する。次に、低温抵抗性変異が分布の拡大に貢献したかについて検討した。高緯度地帯では、低温ストレスは厳しいため地理的勾配が起こり、一般に、この形質勾配は環境適応をしめす指標と見なされてきた。幼芽時における低温抵抗性では、栽培イネおよび野生イネ系統は明瞭な地理的勾配を示した。したがって、現在イネでみられる幼芽時の低温抵抗性の変異には、地域環境で選抜された変異と前適応的変異の両者が含まれると推定された。
- 3) 馴化現象は、あらかじめ弱い低温で前処理することによって、より厳しい低温に対する抵抗性があらわれる現象である。馴化現象は、耐凍性を示す植物で広くみられるが、熱帯起源のイネには耐凍性がないので、馴化反応については殆ど報告されていない。世界各地から収集した栽培および野生イネ系統の馴化反応を調査したところ、発芽時では認められなかったが、幼芽と幼苗時には有意な馴化反応が検出された。さらに、馴化後の低温抵抗性は、馴化しない場合と比較して、顕著な地理的勾配が検出された。この結果は、馴化反応が環境適応と密接に関連することを示すと共に、低温抵抗性を評価する際には、馴化反応を考慮しなければならないことを意味している。QTL 分析では、低温前処理の有無に関わらず共通して検出される因子は見出せなかったもので、異なる環境では低温抵抗性の遺伝制御も変化すると予想された。
- 4) 北海道産品種（日本型、A58）とインド原産野生系統（W107）の交雑後代の組換え自殖系統を用いて、低温抵抗性に関する QTL 分析を行った。合計 5 つの QTLs が発芽時と幼芽時に見出されたが、発芽時では検出されなかった。幼芽時の抵抗性は、インド型・日本型分化の鍵となる形質の 1 つであるので、2 つの主要 QTLs (*qCTP11* と *qCTP12*) について詳細にマッピングを行った。*qCTP11* と比較して、*qCTP11* の効果は大きかった。4762 個体からなる分離集団の解析から座乗位置を調査した結果、*qCTP11* は第 11 染色体の 4.5 kb の領域に存在することが分かった。この候補領域には 2 つの遺伝子 (AK073869 と AK064585) の存在が報告されている。両親間で塩基配列を比較したところ、AK064585 において置換変異が検出された。今後、候補遺伝子が特定されることが期待される。

以上のように、本研究は、生育初期における低温抵抗性は、イネの地理的分布に重要な役割をもつことを明らかにし、低温抵抗性の評価には、これまで知見のなかった馴化反応を考慮する必

要の有ることを提言している。また、発育時期や環境によっても遺伝的要因は変化し、複雑な制御を示すことが分かった。本研究の知見は、インド型品種において低温抵抗性を改良する際に、重要な示唆を与えると期待できる。よって、審査員一同は、バルア・アキール・ランジャンが博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。