

学位論文

ダイズにおける juvenile-adult 相転換に
関与する因子の解析

(Analysis of juvenile-adult phase change in soybean)

小澤 傑

目次

緒言	-1
----	----

第 1 章 ダイズにおける JA 相転換に関する形態変化の一般性

序論	-8
材料及び方法	-9
結果	-17
考察	-52

第 2 章 日長は JA 相転換のステージを制御している

序論	-61
材料及び方法	-62
結果	-66
考察	-77

第 3 章 日長に反応する JA 相転換の因子の解析

序論	-83
----	-----

材料及び方法	-85
結果	-92
考察	-111
総合考察	-118
摘要	-128
謝辞	-131
引用文献	-132

緒言

植物の栄養生長相は、幼若栄養生長相 (juvenile phase) と成熟栄養生長相 (adult phase) に分類されている。発芽後、植物は個体を成長させるための基本となる juvenile phase から adult phase へ相転換 (JA 相転換) し、環境条件に反応し、花を咲かせ種子を作る生殖生長相 (reproductive phase) へとライフサイクルを進めていく (Poethig, 2003)。juvenile phase と adult phase では、植物種によって形態が変化することが知られており、この形態の変化を指標に juvenile phase と adult phase を分類できることが報告されている (Poethig, 2003)。形態変化は植物種によって、共通するもの、種特異的なものが存在する。木本類では、古くから juvenile phase と adult phase の特徴について研究されており、明瞭な形態的变化を JA 相転換時に観察することができる (Poethig, 2010; Wang et al., 2011)。例えば、*Akacia koa* の若木において、juvenile phase では羽状の複葉を展開し、わき芽の形成が抑制されているが、adult phase になると、仮葉といわれる葉柄または葉軸が葉身と同じ形態と機能を持つことで単葉化した葉を形成し、葉腋にわき芽が分化して分枝が盛んに生長する (Poethig, 2010)。草本類においても、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) やイネ (*Oryza sativa*)、トウモロコシ (*Zea mays*) を中心に JA 相転換に関する研究がされてきた。シロイヌナズナでは、葉の裏におけるトラコームの有無が相転換の指標の代表的な形質であり、juvenile phase ではトラコームが形成されず、adult phase ではトラコームが形成される (Telfer et al., 1997)。その他に、葉柄が長くなる、葉形が丸形から楕円形になる、葉縁に切れ込みが形成さ

れる、葉柄と葉身間の角度が大きくなる、葉面積が増加する、葉身長と葉身幅の比率が変化するという形態変化がシロイヌナズナの JA 相転換によって起こることが報告されている (Wu et al., 2009; Jung et al., 2011; Li et al., 2012; Lièvre et al., 2016)。トウモロコシでは、葉の表面のワックス形質と epidermal hairs (トライコーム) が生長相によって異なり、juvenile phase では葉表面にワックスが存在するが、epidermal hairs は存在しない。adult phase では葉の表面にワックスが存在せず、epidermal hairs が形成される (Evans et al., 1994)。その他、トルイジンブルーによる葉表皮の染色、葉表皮細胞の形、節間長、アントシアニンの蓄積量、不定根の形成といった形態が juvenile phase と adult phase では異なることが報告されている (Evans et al., 1994; Lawson and Poethig, 1995)。イネにおいても相転換に関わる形態的特徴が知られ、juvenile phase では、葉が小さく、中肋が短い、shoot apical meristem (SAM) が小さく、葉間期が短い、節間がない、光合成能力が低いという特徴がみられ、adult phase になると、juvenile phase とは逆の形質を示し、葉が大きく、中肋が長い、SAM が大きい、葉間期が長い、節間がある、光合成能力が高くなるという特徴がみられる (Asai et al., 2002)。

JA 相転換によって、形態変化だけではなく、遺伝子発現などの分子生物学的な変化も起こる。JA 相転換によって発現パターンが変化する遺伝子の中で、*micro RNA (miR) 156* と *miR172* がシロイヌナズナ (Wu et al., 2009)、トウモロコシ (Lauter et al., 2005)、イネ (Tanaka et al., 2011)、木本類 (Wang et al., 2011) に共通して JA 相転換に重要な役割を持つことが報告されている。これらの植物において、juvenile phase では、*miR156* の発現量が高く、*miR172* の発現量は低い。

一方、adult phase では、*miR156* の発現量が低くなり、*miR172* の発現量が高くなる。このように、この 2 つの遺伝子は、juvenile phase と adult phase で逆の発現パターンを示すことが知られている。また、シロイヌナズナの *miR156* 過剰発現体では juvenile phase が延長し、*miR172* 過剰発現体では juvenile phase が短縮されることが報告されている (Wu et al., 2009)。*miR156* の遺伝子発現制御の経路上には *Squamosa promoter binding protein-like (SPL) s* が存在し、*SPLs* の mRNA に *miR156* が直接結合することで、*SPLs* の発現が抑制されている (Huijser and Schmid, 2011; Teotia and Tang, 2015)。シロイヌナズナにおいて、JA 相転換に関与する *SPLs* は、配列の類似性などによって、*SPL3/4/5*、*SPL9/15*、*SPL2/10/11* の 3 つのグループに分類され、グループごとに働きは異なる (Wu, 2006; Wang et al., 2008; Shikata et al., 2009)。*SPL3/4/5* はトライコームの発生、*SPL2/10/11* は葉の形に関与し、*SPL9*、*SPL10*、*SPL15* は *miR172* の発現を促進することが報告されている (Wang et al., 2008; Wu, 2006; Shikata et al., 2009; Wu et al., 2009; Chen et al., 2010)。

シロイヌナズナでは、さまざまな環境要因や遺伝的な要因が JA 相転換に影響を与え、日長や系統によって JA 相転換が起こる生育段階が異なる (Telfer et al., 1997)。シロイヌナズナの野生型である Columbia (Col) と Landsberg erecta (Ler)、Wassilewskja (Ws) の中で、Col は、他の 2 系統に比べ、最も早い生育段階で葉の裏側にトライコームが形成される (Telfer et al., 1997)。一方、これらの 3 系統を異なった日長条件で生育させると、長日条件に比べ、短日条件において葉の裏側にトライコームが形成される葉位が早くなる (Telfer et al., 1997)。また、

光受容体であるフィトクロムやクリプトクロム、概日時計に関する *GIGANTIA (GD)* などが *miR172* の発現に影響を与えることが報告されている (Jung et al., 2007)。 *miR172* の発現量は、特定のフィトクロムの変異体では増加し、クリプトクロムの変異体では減少する (Jung et al., 2007)。 *gi* 変異体では、 *miR172* の生合成に関与する *DICLER-LIKE 1 (DCL1)* や *SERRATE (SE)* の発現量が減少することで、 *pri-miR172* や *pre-miR172* から *mature-miR172* への生合成が進まず、 *mature-miR172* の発現量が減少する (Jung et al., 2007)。

近年、ハクサイでは、生育段階における形態変化や、 *Brp-miR156* と *Brp-SPL9* が JA 相転換に関与することが明らかにされた (Wang et al., 2014)。また、トマト (Zhang et al., 2011)、ジャガイモ (Bhogale et al., 2014)、タバコ (Feng et al., 2016)、アルファルファ (Aung et al., 2014)、ミヤコグサ (Wang et al., 2015) において、 *miR156* を過剰発現した場合、葉の形質 (大きさや枚数、表皮) や分枝数、草丈などの形態が野生型と異なることが報告されている。このように、草本類のさまざまな植物種においても JA 相転換に関する報告が増えてきている。

ダイズ (*Glycine max*) は世界的に重要な作物であるが、シロイヌナズナやイネに比べると JA 相転換に関する報告は少ない。Yoshikawa et al. (2013) は、日本のダイズ栽培品種である「エンレイ」を用い、葉序、葉形、葉の大きさ、葉のトライコーム数、托葉、光合成能力、shoot apical meristem (SAM) の形、 *miR156* と *miR172* の発現量について解析した。その結果、「エンレイ」の juvenile phase では、対生の葉序で単葉を形成し、葉が小さい、葉のトライコーム数が少ない、托葉が細長い、SAM の形が扁平、 *miR156* の発現量が高い、 *miR172* の発現量は低いという特徴を持ち、

一方、adult phase では、互生の葉序で複葉を形成し、葉が大きい、葉のトライコーム数が多い、托葉が三角形、SAM の形がドーム状、*miR156* の発現量が低い、*miR172* の発現量は高いことを報告した。また、juvenile phase と adult phase の中間の表現型を示す時期が存在し、この時期を intermediate と定義づけた (Yoshikawa et al., 2013)。しかし、このように JA 相転換における多くの形態変化が報告されているものの、このように多くの形態を解析したが、用いたダイズ品種は「エンレイ」のみであり、これらの形態変化がダイズの JA 相転換の一般的な形態変化であるかどうか不明である。また、ダイズの花芽形成時の *miR156* の発現量は、短日条件より長日条件で高く、ダイズの感光性に関与する *E1*、*E2*、*E3*、*E4* 遺伝子座の遺伝子型によって異なることが報告されている (Cao et al., 2015)。さらに、*miR172* の発現量も、日長や *E3*、*E4* の遺伝子型によって、変化することが報告されている (Zhao et al., 2015)。しかし、*E* 遺伝子座の遺伝子型や日長によって *miR156* や *miR172* の発現が変化することと栄養生長期 (vegetative phase) における JA 相転換の関連は分かっていない。

本研究は、ダイズにおける JA 相転換の知見を集積することを目的とした。第 1 章では、多数の系統を用いて、「エンレイ」で報告されている JA 相転換に関する形態変化がダイズに共通して起こる一般的な現象であるのかどうかを調査した。また、第 2 章では、シロイヌナズナと同様にダイズにおいても系統や日長条件によって JA 相転換が異なる時期に起こるのかを明らかにするため、異なる日長条件で「エンレイ」と「Peking」を栽培し、形態変化や *miR156* や *miR172* の発現量を調査した。さらに、第 3 章において、日長条件や品種による感光性の違いが *SPLs* の発現量や *miR172*

の生合成経路に与える影響を調査し、*E2* と *E3* 遺伝子座のそれぞれの遺伝子型によって JA 相転換が異なるのか解析した。

第 1 章

ダイズにおける JA 相転換に関する 形態変化の一般性

序論

シロイヌナズナやイネ、トウモロコシについて juvenile-adult (JA) 相転換によって変化する形態等が報告されている (Evans et al., 1994; Telfer et al., 1997; Asai et al., 2002)。一方、ダイズでは、日本のダイズ栽培品種「エンレイ」を用いて、葉序、葉形、葉の大きさ、葉のトライコーム数、托葉、光合成能力、shoot apical meristem (SAM) の形について JA 相転換による変化が解析されている (Yoshikawa et al., 2013)。しかし、現在まで解析に用いたダイズは「エンレイ」のみであり、報告されている形態変化がダイズにおける一般的な形質なのかは未解明である。

世界のダイズコアコレクションは、国立研究開発法人農業生物資源研究所 (National Institute of Agrobiological Sciences, NIAS、現 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構) で配布されているコアコレクションの1つであり、同研究所のジーンバンクに保存されている外国産のダイズ品種約4000点の中から、来歴情報、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) による遺伝的変異と形質変異によって選ばれた、少ない系統で遺伝的変異を幅広くカバーする研究用セットである (Kaga et al., 2012)。本章では、これらダイズのコアコレクションを利用することによって、Yoshikawa et al. (2013) において報告されている「エンレイ」の JA 相転換に関係する形態変化が、ダイズに共通する一般的な現象かどうかを明らかにすることを目的とした。

材料及び方法

植物材料と栽培条件

本章では、農業生物資源研究所ジーンバンク:現 農業・食品産業技術総合研究機構遺伝資源センターより分譲を受けた世界のダイズコアコレクション 80 系統 (Kaga et al., 2012)、岩手県で主に栽培されている日本ダイズ品種「ミスズダイス」、「ナンブシロメ」、「リュウホウ」、「スズカリ」の4系統および基準品種としてJA相転換が報告されている「エンレイ」(Yoshikawa et al., 2013) を用いた (Table 1-1)。

2014年の栽培は、5月27日に9cmポリポットに播種し、岩手大学農学部下台圃場のビニールハウス内で栽培を行い、各系統1個体以上を供試して葉序、葉形、葉の大きさ、葉のトライコーム数を調査した。

2015年は、6月24日に播種を行った。世界のダイズコアコレクションから前年度の調査結果から選抜した15系統と「エンレイ」(Table 1-2) を2014年と同様に各系統7個体以上をビニールハウス内で栽培し、葉序、葉形、葉の大きさ、托葉の大きさを調査した。また、世界のダイズコアコレクション 66 系統、岩手県で栽培されている日本ダイズ品種4系統と「エンレイ」を各系統6個体以上用い、下台圃場にて、株間 15 cm、畝間 70 cm で栽培し、葉序と葉形を調査した。

Table 1-1 第1章で用いたダイズ系統

ID	品種名	品種和名	来歴区分	原産地
世界のダイズコアコレクション				
GmWMC001	FISKEBY V		育成	スウェーデン
GmWMC006	KS 1034		在来	マレーシア
GmWMC011	SEITA	青太	在来	韓国
GmWMC012	MANSHUU	満州	在来	中華人民共和国
GmWMC014	KLS 203		在来	韓国
GmWMC015	CHUUHOKU 2	忠北2	在来	韓国
GmWMC018	RIGAI SEITOU	裏外青豆	在来	中華人民共和国
GmWMC019	CHOUSENSHU(CHA)	朝鮮種(茶)	在来	朝鮮半島
GmWMC020	POCHAL		在来	台湾
GmWMC022	NEZUMI META	鼠目太	在来	朝鮮半島
GmWMC024	CHIENEUM KONG		在来	韓国
GmWMC027	KONGNAMUL KONG	モヤシマメ	在来	韓国
GmWMC029	SHIROSOTA	白蔬太	在来	朝鮮半島
GmWMC035	PEKIN DAI OUTOU	北京大黄豆	在来	中華人民共和国
GmWMC036	MASSHOKUTOU(KOU 502)	秣食豆(公502号)	在来	中華人民共和国
GmWMC038	ICHIGUUHOU	一寓峰	在来	中華人民共和国
GmWMC042	MASSHOKUTOU(KOU 503)	秣食豆(公503号)	在来	中華人民共和国
GmWMC045	OKJO	玉租	在来	韓国
GmWMC046	KE 32		在来	フィリピン
GmWMC048	HEAMNAM	咸南	在来	韓国
GmWMC066	HEUKDAELIP	黒大豆	在来	韓国
GmWMC070	CHOYOUTOU	猪腰豆	在来	中華人民共和国
GmWMC071	PK 73-54		在来	インド
GmWMC072	M 581		在来	インド
GmWMC073	URONKON	ウロンコン	在来	朝鮮半島
GmWMC075	CHEONGYE MYONGTAE		在来	韓国
GmWMC083	KEUMDU		在来	韓国
GmWMC084	PEKING		在来	中華人民共和国
GmWMC086	ANTO SHOUKOKUTOU	安図小黒豆	在来	中華人民共和国
GmWMC089	BONGCHUNBAEKJAM	奉天白蚕	在来	中華人民共和国
GmWMC094	JEOKGAK	赤殻	在来	韓国
GmWMC103	SENYOUTOU	尖葉豆	在来	中華人民共和国
GmWMC107	HAKKA ZASHI	白花蹤子	在来	中華人民共和国
GmWMC108	KARASUMAME	烏豆	在来	中華人民共和国
GmWMC113	BARITOU 3 A	バリ島3A	在来	インドネシア
GmWMC115	WILLIAMS 82		育成	アメリカ合衆国
GmWMC118	OU DU	呉豆	在来	韓国
GmWMC119	HAKUBI	白眉	在来	中華人民共和国
GmWMC120	U 1416		在来	ネパール
GmWMC122	GAPSANJAE(LAE(I)	甲山在来(I)	在来	韓国
GmWMC123	N 2295		在来	ネパール
GmWMC125	BHATMAS		在来	ネパール
GmWMC129	AOKI MAME	青黄豆	在来	中華人民共和国
GmWMC132	L 2A		在来	フィリピン
GmWMC136	LOCAL VAR(SEPUTIH RAMAN)		在来	インドネシア
GmWMC138	COL/PAK/1989/IBPGR/2326(1)		在来	パキスタン
GmWMC141	PETEK		在来	インドネシア
GmWMC142	JAVA 5		在来	インドネシア
GmWMC143	M 44		在来	インド

Table 1-1 続き: 第1章で用いたダイズ系統

ID	品種名	品種和名	来歴区分	原産地
世界のダイズコアコレクション				
GmWMC144	M 918		在来	インド
GmWMC146	HM 39		在来	インド
GmWMC147	COL/THAI/1986/THAI-78		在来	タイ
GmWMC148	M 42		在来	インド
GmWMC150	U 1042-1		在来	ネパール
GmWMC151	JAVA 7		在来	インドネシア
GmWMC152	U 1290-1		在来	ネパール
GmWMC154	MANSHUU MASSHOKUTOU	満州秣食豆	在来	中華人民共和国
GmWMC156	U 8006-3		在来	ネパール
GmWMC159	COL/PAK/1989/IBPGR/2323(2)		在来	パキスタン
GmWMC160	N 2392		在来	ネパール
GmWMC162	COL/THAI/1986/THAI-80		在来	タイ
GmWMC163	N 2491		在来	ネパール
GmWMC165	KARASUMAME(SHINCHIKU)	烏豆(新竹)	在来	台湾
GmWMC166	MERAPI		育成	インドネシア
GmWMC168	L 317		在来	インド
GmWMC169	HAKUCHIKOU	薄地高	在来	中華人民共和国
GmWMC170	M 652		在来	インド
GmWMC171	U-1741-2-2 NO.3		在来	ネパール
GmWMC173	KARASUMAME(NAIHOU)	烏豆(内捕)	在来	台湾
GmWMC175	BISHUU DAIZU	徽州大豆	在来	中華人民共和国
GmWMC176	SANDEK SIENG		在来	カンボジア
GmWMC181	CHIENGMAI PALMETTO		在来	タイ
GmWMC182	LOCAL VAR.(TEGINENENG)		在来	インドネシア
GmWMC183	KARASUMAME(HEITOU)	烏豆(屏東)	在来	台湾
GmWMC186	RINGGIT		育成	インドネシア
GmWMC187	KADI BHATTO		在来	ネパール
GmWMC188	E C 112828		在来	インド
GmWMC190	SAN SAI		在来	タイ
GmWMC191	MISS 33 DIXI		在来	フィリピン
GmWMC192	U 1155-4		在来	ネパール
岩手県で栽培されているダイズ品種				
Mis	Misuzudaizu	ミスズダイズ	育成	日本
Nun	Nanbushirome	ナンブシロメ	育成	日本
Ryu	Ryuhou	リュウホウ	育成	日本
Suz	Suzukari	スズカリ	育成	日本
基準品種				
En	Enrei	エンレイ	育成	日本

Table 1-2 2015年に用いたダイズ16系統

ID	品種名	品種和名	来歴区分	原産地
世界のダイズコアコレクション				
GmWMC001	FISKEBY V		育成	スウェーデン
GmWMC019	CHOUSENSHU(CHA)	朝鮮種(茶)	在来	朝鮮半島
GmWMC048	HEAMNAM	咸南	在来	韓国
GmWMC084	PEKING		在来	中華人民共和国
GmWMC094	JEOKGAK	赤殻	在来	韓国
GmWMC108	KARASUMAME	烏豆	在来	中華人民共和国
GmWMC115	WILLIAMS 82		育成	アメリカ合衆国
GmWMC138	COL/PAK/1989/IBPGR/2326(1)		在来	パキスタン
GmWMC146	HM 39		在来	インド
GmWMC159	COL/PAK/1989/IBPGR/2323(2)		在来	パキスタン
GmWMC165	KARASUMAME(SHINCHIKU)	烏豆(新竹)	在来	台湾
GmWMC171	U-1741-2-2 NO.3		在来	ネパール
GmWMC176	SANDEK SIENG		在来	カンボジア
GmWMC182	LOCAL VAR.(TEGINENENG)		在来	インドネシア
GmWMC188	E C 112828		在来	インド
基準品種				
En	Enrei	エンレイ	育成	日本

形態の調査

葉序、葉形は、Yoshikawa et al. (2013) に準じて調査した。葉序は、各葉位間に節間が存在する場合を互生とし、節間が存在しない場合を対生とした。葉形は、各葉位について調査し、単葉、あるいは、小葉の枚数（複葉の場合）によって表記した。2014年に各系統3個体程度で調査を行ったが、個体数が少なかったために2015年は各系統10個体以上を目標に調査を行った。2014年の調査のうち5系統（GmWMC020、GmWMC066、GmWMC073、GmWMC075、GmWMC138）、2015年の調査では2系統（GmWMC046、GmWMC120）が、低発芽率や虫害によって調査個体数が少なくなった。

葉の大きさ（葉身長と葉身幅）は、2014年に84系統、2015年に16系統を用い、各葉位の葉の伸長が停止したと思われる時期の葉を採取し、15 cm 定規を用い、葉の大きさ（葉身長と葉身幅）を測定した。サイズは第3葉以降（初生葉を第1葉、第2葉とする）に複葉を形成する個体が多く、複葉を展開した葉位は、葉の調査を複葉の中央にある小葉で行った。葉の大きさの生長率は以下の式で算出した。また、葉身長、もしくは、葉身幅がそれぞれ急激に大きくなった葉位の平均値を「葉のサイズ」とした。

葉の大きさの生長率 = n 葉位の葉の大きさ / $n-1$ 葉位の葉の大きさ

各葉位のトライコーム数は、葉の伸長が停止した後に計測を行った。計測には実体顕微鏡（SZX10, OLYMPUS）を用い、それぞれの葉において表面と裏面をそれぞれ5 mm × 5 mm の方形をランダムに3か所選択した。この方形内に存在するトラ

イコム数を機械式数取機（ライン精機）によってカウントした。トライコム数の増加率は以下の式によって算出した。

トライコム数増加率 = n 葉位の葉のトライコム数 / $n-1$ 葉位の葉のトライコム数

托葉の大きさは、2015年に12系統を用い調査した。開花後に各葉位の托葉について、葉身長と葉身幅を計測し、葉身長と葉身幅の比率、生長率、変化率を算出した。生長率と変化率の算出方法は以下のとおりである。

托葉の葉身長と葉身幅の生長率 = n 葉位の托葉の葉身長、葉身幅 / $n-1$ 葉位の托葉の葉身長、葉身幅

葉身長/葉身幅（比率）の変化率 = n 葉位の托葉の比率 / $n-1$ 葉位の托葉の比率

***E* 遺伝子座の遺伝子型の解析**

E1、*E2*、*E3*、*E4*の遺伝子型の決定は、Tsubokura et al. (2014) によって報告されているDNAマーカーを用いて行った。2015年栽培の世界のダイズコアコレクション15系統と「エンレイ」を用いた (Table 1-2)。16系統の葉よりCTAB法(Murray and Thompson, 1980)によってDNA抽出を行った。PCR反応液として、全量20 μ Lとなるように抽出したDNAを3 μ L、10 pmol / μ Lのプライマー (Table 1-3) を0.4 μ L、Quick Taq® HS DyeMix (TOYOBO、大阪、日本) を10 μ L、滅菌水を6.2 μ L混合した溶液を用いた。PCR反応は、初期変性 (94°C、2分)、変性(94°C、20秒)、アニーリング (58°C、30秒)、伸長反応 (68°C、1分) を30サイクル繰り返した。*E1_TaqI/HinfI*、*E2_DraI*、*E3_MseI*のマーカーでは制限酵素処理が必要で

Table 1-3 *E*遺伝子座の遺伝子型決定に用いたプライマー (Tsubokura et al., 2014)

<i>E</i> 遺伝子座	マーカー	プライマー	配列 (5'-3')
<i>E1</i>	<i>E1_Taqal/HinfI</i>	G33snpTaqcutF	TCAGATGAAAGGGAGCAGTGTCAAAGAAGT
		G33snpTaqcutR1	TCCGATCTCATCACCTTTCC
	e1-re_STS	E1M0535_FW	CCGTTTGATTGGTTTTTGGT
		E1P0305_RV	CCCTTCAGTTTCTGCAGCTC
		e1re_0188RV	GAGAAGACAAACAATTCGAG
<i>E2</i>	<i>E2_DraI</i>	SoyGI_dCAPaMs19300FW	GAAGCCCATCAGAGGCATGTCTTATT
		SoyGI_dCAPa19440RV	GAGGCAGAGCCAAAGCCTAT
	<i>E2_InDel</i>	E2_15345FW	TGTTGATATTACATGCACATGCAT
		E2_15856RV	GGCAGTTTCACCTTCTTAGC
<i>E3</i>	<i>E3_Mix</i>	E3_08557FW	TGGAGGGTATTGGATGATGC
		E3_09908RV	CTAAGTCCGCCTCTGGTTTCAG
		E3Ha_1000RV	CGGTCAAGAGCCAACATGAG
		e3tr_0716RV	GTCCTATAACAATTCTTTACGACG
	<i>E3_MseI</i>	E3_08094FW	TTGCATGAAGTTTTGGTTGC
		E3_08417RV	CAACTGAACTGAAGACCCACAA
		E3_08420FW	TGGGTCTTCAGTTCAGTTGG
<i>E3, E4</i>	<i>E3E4_Mix</i>	E3_09908RV	CTAAGTCCGCCTCTGGTTTCAG
		E3Ha_1000RV	CGGTCAAGAGCCAACATGAG
		e3tr_0716RV	GTCCTATAACAATTCTTTACGACG
		PhyA2-for	AGACGTAGTGCTAGGGCTAT
		PhyA2-Rev/E4	GCATCTCGCATCACCAGATCA
PhyA2-Rev/e4	GTCATCCCTTCGAATTCAG		

あり、各制限酵素の使用方法に従い PCR 産物を処理した。PCR 産物は Agarose XP (ニッポン・ジーン、東京、日本) を用いた 2%アガロースゲルで分画し、各系統の遺伝子型を決定した。

結果

葉序と葉形

世界のダイズコアコレクション 80 系統、日本の栽培品種 4 系統、および基準品種の「エンレイ」を用いて、葉序と葉形を 2014 年と 2015 年に調査を行った。2014 年と 2015 年の第 3 葉と第 4 葉の葉序における対生、もしくは互生の出現頻度について、各系統で比較した (Table 1-4)。調査した 85 系統の内、42 系統は、2 年間ともすべての個体は互生葉序であった。また、17 系統では、2 年間の両年で対生の個体が存在した。残りの 26 系統は、2014 年と 2015 年のどちらか一方で第 3 葉と第 4 葉の葉序が対生である個体が存在した。

第 5 葉と第 6 葉の葉序について調査すると、69 系統は両年とも互生であったが、対生を示す系統もあった (Table 1-4)。GmWMC089 では、2014 年と 2015 年の両方で対生葉序である個体が 2 割程度の頻度で存在した。また、10 系統 (GmWMC035、GmWMC046、GmWMC125、GmWMC138、GmWMC147、GmWMC154、GmWMC160、GmWMC171、Nan、Suz) は、どちらか一方の年に対生葉序となる個体が出現した。これらの個体は、第 3 葉と第 4 葉の葉序も対生であった。一方、両年のうちどちらかの年において、第 3 葉と第 4 葉の葉序が互生であったにもかかわらず、第 5 葉と第 6 葉の葉序で対生葉序となる個体が見られたものが 9 系統 (GmWMC029、GmWMC075、GmWMC089、GmWMC118、GmWMC144、GmWMC156、GmWMC162、Nan、Suz) 存在した。

Table 1-4 世界のダイズコアコレクションにおける対生葉序の出現率

ID	第3葉と第4葉				第5葉と第6葉				第7葉と第8葉			
	2014		2015		2014		2015		2014		2015	
	対生	出現率	対生	出現率	対生	出現率	対生	出現率	対生	出現率	対生	出現率
GmWMC001 *	0/3	0%	0/14	0%	0/3	0%	0/14	0%	0/1	0%	0/4	0%
GmWMC006 **	0/3	0%	4/30	13%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC011 **	1/3	33%	0/24	0%	0/3	0%	0/24	0%	0/3	0%	0/15	0%
GmWMC012 **	1/3	33%	3/30	10%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC014 **	3/3	100%	8/30	27%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC015 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC018 **	3/3	100%	6/30	20%	0/4	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC019 *	0/3	0%	0/13	0%	0/3	0%	0/14	0%	0/3	0%	0/11	0%
GmWMC020 **	0/2	0%	0/22	0%	0/3	0%	0/22	0%	0/2	0%	0/22	0%
GmWMC022 **	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC024 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC027 **	2/3	67%	1/30	3%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC029 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	1/30	3%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC035 **	1/3	33%	27/30	90%	0/3	0%	1/30	3%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC036 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC038 **	1/3	33%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC042 **	0/3	0%	0/25	0%	0/3	0%	0/25	0%	0/3	0%	0/25	0%
GmWMC045 **	0/3	0%	1/24	4%	0/3	0%	0/20	0%	0/3	0%	0/20	0%
GmWMC046 **	1/3	33%	0/6	0%	1/3	33%	0/6	0%	0/2	0%	0/6	0%
GmWMC048 *	1/3	33%	4/35	11%	0/3	0%	0/30	0%	0/1	0%	0/25	0%
GmWMC066 **	-	-	10/29	34%	-	-	0/29	0%	-	-	0/29	0%
GmWMC070 **	2/4	50%	0/27	0%	0/4	0%	0/27	0%	0/4	0%	0/27	0%
GmWMC071 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC072 **	2/3	67%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC073 **	0/2	0%	4/29	14%	0/2	0%	0/29	0%	0/2	0%	0/29	0%
GmWMC075 **	0/2	0%	2/30	7%	1/2	50%	0/30	0%	0/1	0%	0/30	0%
GmWMC083 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC084 *	2/3	67%	8/44	18%	0/3	0%	0/35	0%	0/3	0%	0/14	0%
GmWMC086 **	0/3	0%	0/17	0%	0/3	0%	0/16	0%	0/2	0%	0/16	0%
GmWMC089 **	3/4	75%	13/30	43%	1/4	25%	6/30	20%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC094 *	0/3	0%	0/45	0%	0/3	0%	0/32	0%	0/3	0%	0/18	0%
GmWMC103 **	-	-	11/26	42%	0/1	0%	0/26	0%	0/1	0%	0/26	0%
GmWMC107 **	1/3	33%	9/30	30%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC108 *	0/3	0%	0/45	0%	0/3	0%	0/35	0%	0/3	0%	0/21	0%
GmWMC113 **	1/3	33%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC115 *	0/3	0%	0/40	0%	0/3	0%	0/32	0%	0/3	0%	0/20	0%
GmWMC118 **	0/3	0%	1/29	3%	1/3	33%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC119 **	1/3	33%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC120 **	0/3	0%	0/9	0%	0/3	0%	0/9	0%	0/3	0%	0/9	0%
GmWMC122 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC123 **	1/3	33%	1/30	3%	0/3	0%	0/30	0%	0/2	0%	0/30	0%
GmWMC125 **	1/3	33%	1/30	3%	1/3	33%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC129 **	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC132 **	0/5	0%	0/30	0%	0/5	0%	0/30	0%	0/4	0%	0/30	0%
GmWMC136 **	0/3	0%	0/15	0%	0/3	0%	0/14	0%	0/3	0%	0/14	0%
GmWMC138 *	3/3	100%	14/45	31%	3/3	100%	0/34	0%	0/3	0%	0/17	0%

2015年において*はハウス内にて栽培、**は圃場にて栽培した

Table 1-4 続き:世界のダイズコアコレクションにおける対生葉序の出現率

系統	第3葉と第4葉				第5葉と第6葉				第7葉と第8葉			
	2014		2015		2014		2015		2014		2015	
	対生	出現率	対生	出現率	対生	出現率	対生	出現率	対生	出現率	対生	出現率
GmWMC141 **	0/3	0%	1/29	3%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC142 **	0/3	0%	0/27	0%	0/3	0%	0/26	0%	0/3	0%	0/26	0%
GmWMC143 **	0/3	0%	1/29	3%	0/3	0%	0/28	0%	0/3	0%	0/28	0%
GmWMC144 **	0/3	0%	0/30	0%	2/3	67%	0/30	0%	1/3	33%	0/30	0%
GmWMC146 *	0/3	0%	0/44	0%	0/3	0%	0/32	0%	0/3	0%	0/22	0%
GmWMC147 **	1/3	33%	0/22	0%	1/3	33%	0/22	0%	0/3	0%	0/22	0%
GmWMC148 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC150 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC151 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC152 **	0/3	0%	0/24	0%	0/3	0%	0/24	0%	0/3	0%	0/24	0%
GmWMC154 **	1/3	33%	0/30	0%	1/3	33%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC156 **	0/3	0%	0/29	0%	1/3	33%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC159 *	1/3	33%	1/45	2%	0/3	0%	0/35	0%	0/3	0%	0/23	0%
GmWMC160 **	0/3	0%	1/30	3%	0/3	0%	1/30	3%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC162 **	0/3	0%	0/30	0%	1/3	33%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC163 **	0/3	0%	0/20	0%	0/3	0%	0/20	0%	0/3	0%	0/20	0%
GmWMC165 *	0/3	0%	0/45	0%	0/3	0%	0/35	0%	0/3	0%	0/23	0%
GmWMC166 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC168 **	0/3	0%	0/28	0%	0/3	0%	0/28	0%	0/3	0%	0/28	0%
GmWMC169 **	1/3	33%	1/29	3%	0/3	0%	0/28	0%	0/3	0%	0/28	0%
GmWMC170 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC171 *	1/3	33%	0/45	0%	1/3	33%	0/34	0%	0/3	0%	0/18	0%
GmWMC173 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC175 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC176 *	0/3	0%	0/44	0%	0/3	0%	0/35	0%	0/3	0%	0/21	0%
GmWMC181 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC182 *	0/3	0%	1/35	3%	0/3	0%	0/35	0%	0/3	0%	0/20	0%
GmWMC183 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC186 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/30	0%
GmWMC187 **	0/3	0%	4/29	14%	0/3	0%	0/28	0%	0/3	0%	0/28	0%
GmWMC188 *	0/3	0%	2/45	4%	0/3	0%	0/35	0%	0/3	0%	0/25	0%
GmWMC190 **	0/3	0%	0/30	0%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
GmWMC191 **	0/3	0%	0/25	0%	0/3	0%	0/22	0%	0/3	0%	0/22	0%
GmWMC192 **	1/3	33%	0/27	0%	0/3	0%	0/26	0%	0/3	0%	0/26	0%
En **	-	-	19/30	63%	-	-	0/30	0%	-	-	0/30	0%
En *	1/3	33%	6/45	13%	0/3	0%	0/35	0%	0/3	0%	0/25	0%
Mis **	0/3	0%	1/29	3%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
Nan **	1/3	33%	1/30	3%	2/3	67%	0/28	0%	0/3	0%	0/28	0%
Ryu **	2/3	67%	11/29	38%	0/3	0%	0/29	0%	0/3	0%	0/29	0%
Suz **	0/3	0%	5/30	17%	0/3	0%	1/29	3%	0/3	0%	0/29	0%

2015年において*はハウス内にて栽培、**は圃場にて栽培した

第 7 葉と第 8 葉の葉序では、2014 年に GmWMC144 で対生葉序を示す個体が見られた (Table 1-4)。残りの系統は、2014 年と 2015 年の両方ですべての個体が互生葉序を示した。

葉形についてみると、第 3 葉の葉形では、2014 年と 2015 年の両方で単葉を形成する系統は見られなかった (Table 1-5)。しかし、11 系統は、2014 年か 2015 年のどちらかで単葉を形成する個体が低い頻度で出現した。また、2015 年に 12 系統で、第 3 葉が 2 枚の小葉からなる複葉の個体が 1~6 個体見られた (Table 1-5)。4 葉以降の葉形は、2015 年の Suz において小葉を 2 枚形成する複葉のものが 1 個体存在した (Table 1-6)。他の系統では、2014 年と 2015 年の両方ですべての個体は複葉であり小葉を 3 枚以上形成した。

葉の大きさの変化

2014 年の調査では、世界のダイズコアコレクション 79 系統、ダイズ栽培品種 5 系統を用い、各葉位の葉の大きさ(葉身長と葉身幅)を測定した。「エンレイ」では、葉身長が第 4 葉から第 5 葉にかけて急激に大きくなり、葉身長の生長率も第 5 葉で 1.32 ± 0.05 と高い値を示した (Fig. 1-1A, B)。葉身幅でも、第 4 葉から第 5 葉にかけて急激に大きくなり、葉身幅の生長率も第 5 葉で 1.38 ± 0.11 と高い値を示した (Fig. 1-1C, D)。また、「エンレイ」についての葉身長と葉身幅の生長率を個体ごとに比較すると、第 5 葉、第 4.5 葉 (第 4 葉と第 5 葉の生長率の値が同じ場合があり、第 4.5

Table 1-5 世界のダイズコアコレクションにおける第3葉の葉形態

ID	2014					2015				
	単葉	複葉				単葉	複葉			
		2枚	3枚	4枚	5枚		2枚	3枚	4枚	5枚
GmWMC001 *	0	0	3	0	0	0	0	14	0	0
GmWMC006 **	0	0	3	0	0	0	2	28	0	0
GmWMC011 **	0	0	3	0	0	0	0	24	0	0
GmWMC012 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC014 **	1	0	2	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC015 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC018 **	1	0	2	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC019 *	0	0	3	0	0	0	0	12	1	0
GmWMC020 **	0	0	3	0	0	0	0	22	0	0
GmWMC022 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC024 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC027 **	0	0	3	0	0	0	2	28	0	0
GmWMC029 **	0	0	3	0	0	0	1	29	0	0
GmWMC035 **	0	0	3	0	0	0	1	29	0	0
GmWMC036 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC038 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC042 **	0	0	3	0	0	0	0	25	0	0
GmWMC045 **	0	0	3	0	0	0	0	24	0	0
GmWMC046 **	0	0	3	0	0	0	0	6	0	0
GmWMC048 *	1	0	2	0	0	0	1	33	1	0
GmWMC066 **	-	-	-	-	-	0	1	28	0	0
GmWMC070 **	0	0	4	0	0	0	0	27	0	0
GmWMC071 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC072 **	0	0	3	0	0	0	0	29	1	0
GmWMC073 **	0	0	2	0	0	1	0	27	0	1
GmWMC075 **	0	0	2	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC083 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC084 *	0	0	3	0	0	0	1	47	1	0
GmWMC086 **	0	0	3	0	0	0	0	17	0	0
GmWMC089 **	0	0	4	0	0	1	0	29	0	0
GmWMC094 *	0	0	3	0	0	0	0	41	5	2
GmWMC103 **	0	0	0	0	0	0	1	23	2	0
GmWMC107 **	0	0	3	0	0	2	1	27	0	0
GmWMC108 *	0	0	3	0	0	0	0	50	0	0
GmWMC113 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC115 *	0	0	3	0	0	0	0	38	2	0
GmWMC118 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC119 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC120 **	0	0	3	0	0	0	0	9	0	0
GmWMC122 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC123 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC125 **	0	0	3	0	0	0	0	28	2	0
GmWMC129 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC132 **	0	0	5	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC136 **	0	0	3	0	0	0	0	15	0	0
GmWMC138 *	2	1	0	0	0	0	0	43	6	1

2015年において、*はハウス内にて栽培、**は圃場にて栽培した

Table 1-5 続き:世界のダイズコアコレクションにおける第3葉の葉形態

ID	2014					2015				
	単葉	複葉				単葉	複葉			
		2枚	3枚	4枚	5枚		2枚	3枚	4枚	5枚
GmWMC141 **	0	0	3	0	0	0	0	28	1	0
GmWMC142 **	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
GmWMC143 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC144 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC146 *	0	0	3	0	0	0	0	44	0	0
GmWMC147 **	0	0	3	0	0	0	0	22	0	0
GmWMC148 **	0	0	3	0	0	0	0	29	1	0
GmWMC150 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC151 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC152 **	0	0	3	0	0	0	0	24	0	0
GmWMC154 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC156 **	0	0	3	0	0	0	0	24	5	0
GmWMC159 *	0	0	3	0	0	0	0	47	3	0
GmWMC160 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC162 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	1
GmWMC163 **	0	0	3	0	0	0	0	17	3	0
GmWMC165 *	0	0	3	0	0	0	0	44	1	0
GmWMC166 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC168 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC169 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC170 **	1	0	2	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC171 *	0	0	3	0	0	0	0	49	1	0
GmWMC173 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC175 **	0	0	3	0	0	0	1	27	1	1
GmWMC176 *	0	0	3	0	0	0	0	43	0	0
GmWMC181 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC182 *	0	0	3	0	0	1	0	29	3	2
GmWMC183 **	0	0	3	0	0	0	0	28	2	0
GmWMC186 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC187 **	0	0	3	0	0	0	1	27	1	0
GmWMC188 *	0	0	3	0	0	0	0	49	1	0
GmWMC190 **	0	0	3	0	0	0	0	29	1	0
GmWMC191 **	0	0	3	0	0	0	0	25	0	0
GmWMC192 **	0	0	3	0	0	0	0	27	0	0
En **	0	0	3	0	0	5	1	24	0	0
En *	-	-	-	-	-	1	0	47	1	0
Mis **	0	0	3	0	0	0	1	25	3	0
Nan **	0	0	3	0	0	0	6	24	0	0
Ryu **	0	0	3	0	0	1	1	26	0	0
Suz **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0

2015年において、*はハウス内にて栽培、**は圃場にて栽培した

Table 1-6 世界のダイズコアコレクションにおける第4葉の葉形態

ID	2014					2015				
	単葉	複葉				単葉	複葉			
		2枚	3枚	4枚	5枚		2枚	3枚	4枚	5枚
GmWMC001 *	0	0	3	0	0	0	0	14	0	0
GmWMC006 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC011 **	0	0	3	0	0	0	0	24	0	0
GmWMC012 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC014 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC015 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC018 **	0	0	4	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC019 *	0	0	3	0	0	0	0	13	0	0
GmWMC020 **	0	0	3	0	0	0	0	22	0	0
GmWMC022 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC024 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC027 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC029 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC035 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC036 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC038 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC042 **	0	0	3	0	0	0	0	25	0	0
GmWMC045 **	0	0	3	0	0	0	0	24	0	0
GmWMC046 **	0	0	3	0	0	0	0	6	0	0
GmWMC048 *	0	0	3	0	0	0	0	35	0	0
GmWMC066 **	-	-	-	-	-	0	0	29	0	0
GmWMC070 **	0	0	4	0	0	0	0	27	0	0
GmWMC071 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC072 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC073 **	0	0	2	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC075 **	0	0	2	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC083 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC084 *	0	0	3	0	0	0	0	42	2	0
GmWMC086 **	0	0	3	0	0	0	0	17	0	0
GmWMC089 **	0	0	4	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC094 *	0	0	3	0	0	0	0	45	0	0
GmWMC103 **	0	0	1	0	0	0	0	26	0	0
GmWMC107 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC108 *	0	0	3	0	0	0	0	45	0	0
GmWMC113 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC115 *	0	0	3	0	0	0	0	40	0	0
GmWMC118 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC119 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC120 **	0	0	3	0	0	0	0	9	0	0
GmWMC122 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC123 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC125 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC129 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC132 **	0	0	5	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC136 **	0	0	3	0	0	0	0	15	0	0
GmWMC138 *	0	0	3	0	0	0	0	44	1	0

2015年において*はハウス内にて栽培、**は圃場にて栽培した

Table 1-6 続き:世界のダイズコアコレクションにおける第4葉の葉形態

ID	2014					2015				
	単葉	複葉				単葉	複葉			
		2枚	3枚	4枚	5枚		2枚	3枚	4枚	5枚
GmWMC141 **	0	0	3	0	0	0	0	28	0	0
GmWMC142 **	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
GmWMC143 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC144 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC146 *	0	0	3	0	0	0	0	44	0	0
GmWMC147 **	0	0	3	0	0	0	0	22	0	0
GmWMC148 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC150 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC151 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC152 **	0	0	3	0	0	0	0	23	1	0
GmWMC154 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC156 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC159 *	0	0	3	0	0	0	0	45	0	0
GmWMC160 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC162 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC163 **	0	0	3	0	0	0	0	20	0	0
GmWMC165 *	0	0	3	0	0	0	0	45	0	0
GmWMC166 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC168 **	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0
GmWMC169 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC170 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC171 *	0	0	3	0	0	0	0	45	0	0
GmWMC173 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC175 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC176 *	0	0	3	0	0	0	0	44	0	0
GmWMC181 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC182 *	0	0	3	0	0	0	0	35	0	0
GmWMC183 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC186 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC187 **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
GmWMC188 *	0	0	3	0	0	0	0	45	0	0
GmWMC190 **	0	0	3	0	0	0	0	30	0	0
GmWMC191 **	0	0	3	0	0	0	0	25	0	0
GmWMC192 **	0	0	3	0	0	0	0	27	0	0
En **	-	-	-	-	-	0	0	30	0	0
En *	0	0	3	0	0	0	0	45	0	0
Mis **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
Nan **	0	0	3	0	0	0	0	29	1	0
Ryu **	0	0	3	0	0	0	0	29	0	0
Suz **	0	0	3	0	0	0	1	28	0	0

2015年において*はハウス内にて栽培、**は圃場にて栽培した

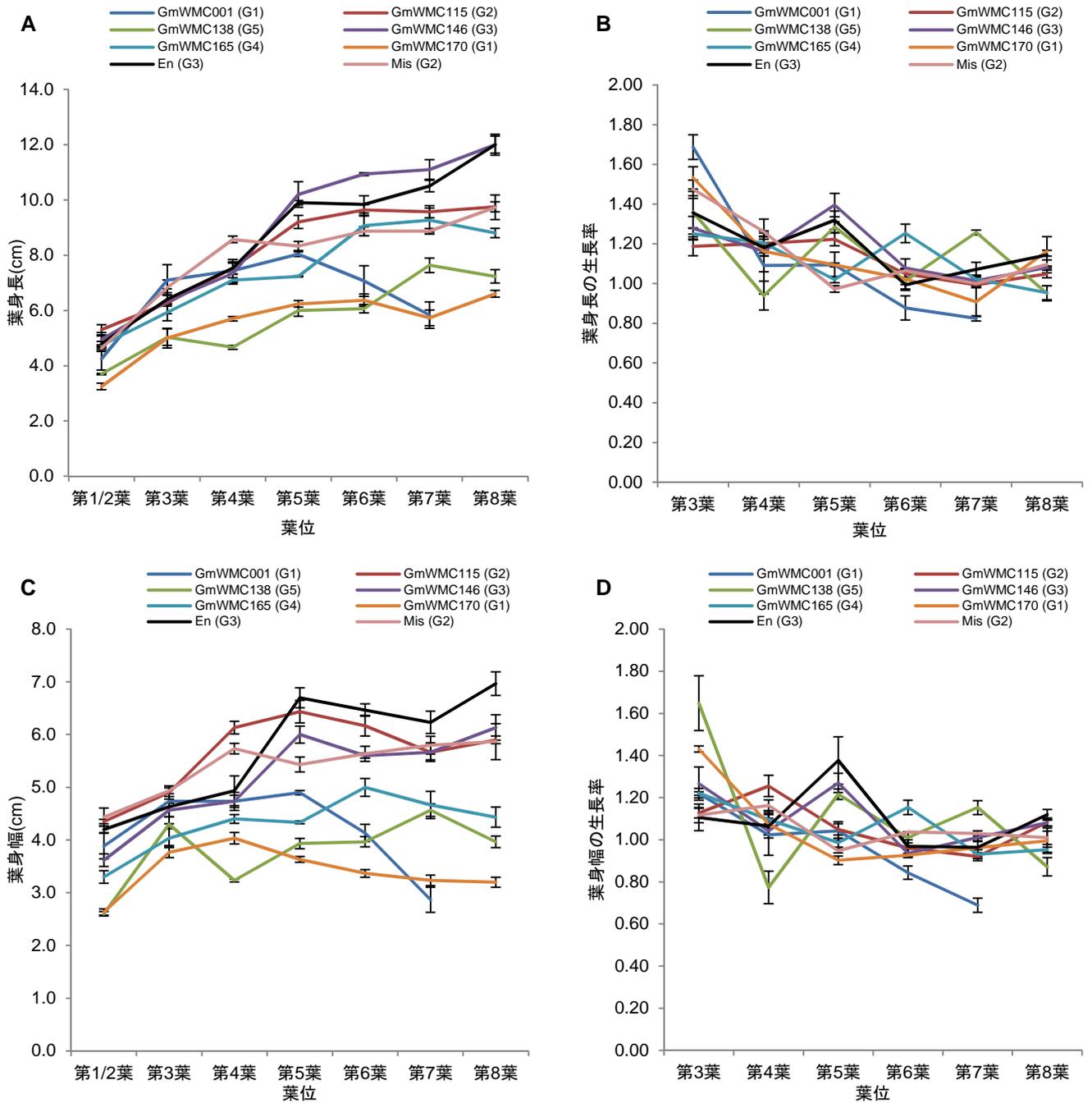


Fig. 1-1 特徴的な変化を見せた系統における葉の大きさの推移(2014年調査)

(A) エンレイとグループ1~5に分類された系統の各葉位の葉身長。

(B) エンレイとグループ1~5に分類された系統における葉身長の生長率。

(C) エンレイとグループ1~5に分類された系統の各葉位の葉身幅。

(D) エンレイとグループ1~5に分類された系統における葉身幅の生長率。

計測には各系統3個体を用い、エラーバーは標準誤差を示す。()内は各系統が分類されたグループ番号を示す。

葉と表記した) で高い値になり、個体間でばらつきが小さいことが示された (Table 1-7)。「エンレイ」の第 3 葉の葉身長の高成長率も高い値であったが、これは葉の形態が単葉である第 1/2 葉 (初生葉) から複葉である第 3 葉へと大きく変化したためと考えられる (Fig. 1-1B)。また、他の系統においても第 3 葉の高成長率に関しては「エンレイ」と同様に扱ったが、例外として、第 3 葉以降で葉の大きさが急激に変化しない場合は高成長率が高い葉位を第 3 葉とした。

世界のダイズコアコレクション 79 系統とダイズ栽培品種 4 系統に関して調査を行ったところ、葉のサイズの高成長率が高い値を示す葉位によって 6 つのグループに分類することができた (Table 1-7)。以下に 6 つのグループについて詳細に記す。

第 1 のグループは、第 3 葉付近で高い高成長率を示す系統で、2 系統 (GmWMC001、GmWMC170) が含まれた (Table 1-7)。このグループの特徴として、葉身長と葉身幅が第 1/2 葉から第 3 葉にかけて大きく変化し、その後の葉位では大きな変化が見られない傾向を示し (Fig. 1-1A, C)、葉身長と葉身幅の高成長率も第 3 葉で大きな値を示した (Fig. 1-1B, D)。

第 2 のグループは、第 4 葉付近で高い高成長率を示す系統で、16 系統 (GmWMC115、Mis 等) が含まれた (Table 1-7)。このグループの特徴として、葉身長と葉身幅が第 3 葉から第 4 葉にかけて大きく変化し、葉身長と葉身幅の高成長率も第 4 葉で大きな値を示した (Table 1-7, Fig. 1-1)。

第 3 のグループは、「エンレイ」と同様に第 5 葉付近で高い高成長率を示す系統で、24 系統 (GmWMC146 等) が含まれる (Table 1-7)。このグループの特徴として、葉身長と葉身幅が第 4 葉から第 5 葉にかけて大きく変化し、葉身長と葉身幅の高成長

Table 1-7 2014年の各系統における葉の大きさの生長率が高い葉位

系統/個体番号	葉身長				葉身幅				葉のサイズ	
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.1	No.2	No.3	No.4	Ave ¹	±SE ²
第3葉付近で生長率が高い系統 (第1グループ)										
GmWMC001	4	3	3		4	3	3		3.3	0.19
GmWMC170	3	3	4		3	3	3		3.2	0.15
第4葉付近で生長率が高い系統 (第2グループ)										
GmWMC019	5	4			4	4			4.3	0.22
GmWMC024	4				4				4.0	0.00
GmWMC029	4.5	4	4		5	4	5		4.4	0.18
GmWMC036	5	4	4		4	4	4		4.2	0.15
GmWMC042	4	4	5		4	4	5		4.3	0.19
GmWMC046	5	4	5		5	4	4		4.5	0.20
GmWMC071	5	4	4		5	4	4		4.3	0.19
GmWMC113	4	5			4	5			4.5	0.25
GmWMC115	4	5	4		4	4	4		4.2	0.15
GmWMC141	5	4	4		5	4	4		4.3	0.19
GmWMC143	4.5	5	4		4	5	4		4.4	0.18
GmWMC150	4	5	4		4	5	4		4.3	0.19
GmWMC159	4	4			4	4			4.0	0.00
GmWMC162	5	5	4		4	5	4		4.5	0.20
GmWMC192	4	4	5		4	4	5		4.3	0.19
Mis	4	4	4		4	4	4		4.0	0.00
第5葉付近で生長率が高い系統 (第3グループ)										
GmWMC014	7	5	5		7	5	5		5.7	0.38
GmWMC020	6	5	5		5	5	5		5.2	0.15
GmWMC027	5	5	6		5	5	6		5.3	0.19
GmWMC038	5				5				5.0	0.00
GmWMC045	6	5	5		6	5	5		5.3	0.19
GmWMC084	5	4	5		5	4	5		4.7	0.19
GmWMC089	5	7	5	5	5	5	5	5	5.3	0.23
GmWMC103	5				5				5.0	0.00
GmWMC107	6	5	5		5	5	5		5.2	0.15
GmWMC119	5	5	5		5	5	4		4.8	0.15
GmWMC123	6	5	5		6	5	5		5.3	0.19
GmWMC144	5	5	5		5	5	8		5.5	0.46
GmWMC146	5	5	5		5	5	5		5.0	0.00
GmWMC147	4	5	5.5		4	5	5		4.8	0.23
GmWMC148	5	4	5		5	5	5		4.8	0.15
GmWMC151	5	5	5		5	5	4		4.8	0.15
GmWMC160	5	5	5		5	5	5		5.0	0.00
GmWMC163	5	5	5		6	5	5		5.2	0.15
GmWMC169	5	5	5		5	5	5		5.0	0.00
GmWMC183	7	5	5		7	5	5		5.7	0.38
GmWMC187	5	5	5		7	5	5		5.3	0.30
En	5	4.5	5		5	5	5		4.9	0.08
Nan	5	5	5		5	5	5		5.0	0.00
Ryu	5	5	5		5	5	5		5.0	0.00

¹:平均値 ²:標準誤差

Table 1-7 続き:2014年の各系統における葉の大きさの生長率が高い葉位

系統/個体番号	葉身長				葉身幅				葉のサイズ	
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.1	No.2	No.3	No.4	Ave ¹	±SE ²
第6葉付近で生長率が高い系統 (第4グループ)										
GmWMC006	6		6		5		6		5.8	0.22
GmWMC015	6	6	6		5	5	6		5.7	0.19
GmWMC035	6	6	5		5	6	5		5.5	0.20
GmWMC075	6				6				6.0	0.00
GmWMC108	5	6	6		4	6	6		5.5	0.31
GmWMC118	6	5			6	5			5.5	0.25
GmWMC165	6	6	6		6	6	6		6.0	0.00
GmWMC190	6	6	5		6	6	5		5.7	0.19
GmWMC191	6	6	5		6	6	5		5.7	0.19
第7葉付近で生長率が高い系統 (第5グループ)										
GmWMC138	7	7	7		7	7	7		7.0	0.00
個体間で生長率が高い葉位が大きく異なる系統 (その他のグループ)										
GmWMC011	4	5	7		5	5	7		5.5	0.46
GmWMC012	5	6	4		5	6	4		5.0	0.33
GmWMC018	5	6	7		5	5	7		5.8	0.37
GmWMC022	6	4	4		6	4	5		4.8	0.37
GmWMC048	6	4	8		7	5	8		6.3	0.61
GmWMC070	4	6	5	5	4	6	5	5	5.0	0.25
GmWMC072	4	6	7		8	5	4		5.7	0.61
GmWMC073	5	8			5	7			6.3	0.65
GmWMC083	4.5	6	5		4	5	5		4.9	0.25
GmWMC086	6	5	4		6	5	4		5.0	0.33
GmWMC094	7	5	4		7	5	4		5.3	0.51
GmWMC120	4	6	5		6	6	6		5.5	0.31
GmWMC122	5	6	5		5	6	7		5.7	0.30
GmWMC125	5	7	4		5	5	4		5.0	0.41
GmWMC129	5	7	7		5	8	6		6.3	0.45
GmWMC132	6	4	6	4	5	4	5	5	4.9	0.28
GmWMC136	5	4	6		4	4	5		4.7	0.30
GmWMC142	6	4	4		6	4	8		5.3	0.61
GmWMC152	5	7	8		5	5	5		5.8	0.50
GmWMC154	6	5	5		4	4	5		4.8	0.28
GmWMC156	7	5	4		7	5	4		5.3	0.51
GmWMC166	6	4	5		6	4	4		4.8	0.37
GmWMC168	5	7	7.5		5	7	4		5.9	0.53
GmWMC171	5	7	4		5	7	4		5.3	0.51
GmWMC173	6	5	4		5	5	4		4.8	0.28
GmWMC175	6	5	5		6	4	5		5.2	0.28
GmWMC176	5	5	4		8	8	8		6.3	0.69
GmWMC181	6	6	4		6	5	4		5.2	0.37
GmWMC182	7	4	5		7	4	5		5.3	0.51
GmWMC186	6	5	5		7	4.5	4		5.3	0.40
GmWMC188	6	4.5	4		6	5	4		4.9	0.34
Suz	5	4	8		5	4	8		5.7	0.69

¹:平均値 ²:標準誤差

率も第 5 葉で大きな値を示した (Table 1-7, Fig. 1-1)。

第 4 のグループは、第 6 葉付近で高い生長率を示す系統で、9 系統 (GmWMC165 等) が含まれる (Table 1-7)。このグループの特徴として、葉身長と葉身幅が第 5 葉から第 6 葉へかけて大きく変化し、葉身長と葉身幅の生長率も第 6 葉で大きな値を示した (Table 1-7, Fig. 1-1)。

第 5 のグループには、第 7 葉付近で高い生長率を示す GmWMC138 1 系統のみ含まれた (Table 1-7)。GmWMC138 は、葉身長と葉身幅が第 6 葉から第 7 葉へかけて大きく変化し、葉身長と葉身幅の生長率も第 7 葉で大きな値を示した (Table 1-7, Fig. 1-1)。

第 6 のグループは、個体間で生長率が高い値を示す葉位が大きく異なる系統で、32 系統が含まれた (Table 1-7)。

以上の結果をまとめると、2014 年の調査では、世界のダイズコアコレクション 79 系統とダイズ栽培品種 3 系統においても、「エンレイ」と同様に葉の大きさが急激に変化する葉位が存在した。しかし、葉の大きさの生長率が高い値を示す葉位は系統によって異なり、6 つのグループに分類することができた。そのうち第 1~5 のグループは、個体間のばらつきが小さく、それぞれ 3~7 葉位の決められた葉位で生長率が高くなる系統群であり、第 6 のグループは、個体間変異が大きく、生長率の高い葉位が明瞭でない系統であった (Table 1-7)。

2015 年には、世界のダイズコアコレクション 80 系統から 15 系統を選抜し、「エンレイ」を加えた 16 系統において (Table 1-2)、2014 年よりも個体数を増やし、各系統 6 個体以上について各葉位の葉身長と葉身幅を測定した。「エンレイ」は、2014 年と同

様に葉身長が第 4 葉から第 5 葉にかけて急激に大きくなり、葉身長の生長率の平均値も第 5 葉で 1.31 ± 0.04 と高い値を示した (Fig. 1-2C, D)。葉身幅も、第 4 葉から第 5 葉にかけて急激に大きくなり、葉身幅の生長率の平均値も第 5 葉で 1.18 ± 0.04 と高い値を示した (Fig. 1-3C, D)。調査した 20 個体について、生長率が高い値を示した葉位を比較すると、第 5 葉が最大で、第 4 葉から第 5 葉に集中して分布し、標準偏差の値も低く、個体間のばらつきの程度が小さいことが示され、その平均値は葉身長で 4.6、葉身幅で 4.5、葉のサイズで 4.6 となった (Table 1-8, Fig. 1-4B)。以上のように、「エンレイ」では、2015 年においても 2014 年と同様に、生長率が第 5 葉付近で高い値を示し、個体間でのばらつきも小さかった。

ダイズコアコレクション 15 系統では、葉身長と葉身幅の生長率が高い値を示す葉位によって、3 つのグループに分類した (Table 1-8)。

第 1 のグループは、第 4 葉付近で高い生長率を示す系統であり、10 系統が含まれた (Table 1-8)。このグループの特徴は、葉身長と葉身幅が第 3 葉から第 4 葉にかけて急激に変化し、生長率も第 4 葉で高い値となった (Figs. 1-2A, B, 3A, B)。しかし、GmWMC159 の葉身幅では、第 4 葉と第 5 葉の生長率がほぼ同等の値であった (Fig. 1-3A, B)。個体間変異を見てみると、GmWMC176 と WMC188 を除く 8 系統では、葉身長と葉身幅の生長率が高い値を示した葉位は、6 割以上の個体が第 4 葉であり、第 5 葉および第 3 葉が高い値を示す個体もそれぞれ 2 割程度みられた (Table 1-8, Fig. 1-4A)。GmWMC176 と GmWMC188 においても個体間変異はみられるが、葉身長と葉身幅の生長率が高い値を示した葉位は、多くの個体で第 4 葉を中心に第 3 葉や第 5 葉となり、低い頻度で第 7 葉、もしくは、第 8 葉となった個体も

Table 1-8 2015年の各系統における葉の大きさの生長率が高い葉位

系統	葉身長					葉身幅				葉のサイズ			
	n ¹	Ave ²	±SE ³	最大	最小	Ave ²	±SE ³	最大	最小	Ave ²	±SE ³	最大	最小
第4葉付近で生長率が高い値を示す系統													
GmWMC001	15	4.1	0.11	5	3	3.9	0.15	5	3	4.0	0.09	5	3
GmWMC019	16	4.3	0.11	5	4	4.2	0.10	5	4	4.3	0.07	5	4
GmWMC084	10	4.3	0.14	5	4	4.3	0.13	5	4	4.3	0.10	5	4
GmWMC094	16	3.8	0.11	4	3	4.1	0.16	6	3	3.9	0.10	6	3
GmWMC108	16	3.9	0.11	5	3	3.9	0.11	5	3	3.9	0.08	5	3
GmWMC159	16	4.1	0.08	5	4	4.3	0.17	5	3	4.2	0.09	5	3
GmWMC165	18	4.1	0.07	5	4	4.2	0.10	5	4	4.2	0.06	5	4
GmWMC171	20	4.0	0.00	4	4	4.1	0.05	5	4	4.0	0.02	5	4
GmWMC176	15	4.1	0.06	5	4	4.5	0.26	7	3	4.3	0.14	7	3
GmWMC182	20	4.1	0.05	5	4	4.1	0.07	5	4	4.1	0.04	5	4
GmWMC188	20	4.2	0.09	5	4	4.3	0.20	8	4	4.2	0.11	8	4
第5葉付近で生長率が高い値を示す系統													
GmWMC138	7	4.7	0.17	5	4	4.7	0.17	5	4	4.7	0.12	5	4
En	20	4.6	0.11	5	4	4.5	0.11	5	4	4.6	0.08	5	4
個体によって生長率が高い値を示す葉位が異なる系統													
GmWMC048	20	4.7	0.19	6	4	5.0	0.19	6	4	4.8	0.14	6	4
GmWMC115	19	5.0	0.29	8	4	4.9	0.25	8	4	5.0	0.19	8	4
GmWMC146	20	5.7	0.22	7	4	5.7	0.17	7	4	5.7	0.14	7	4

¹:個体数 ²:平均値 ³:標準誤差

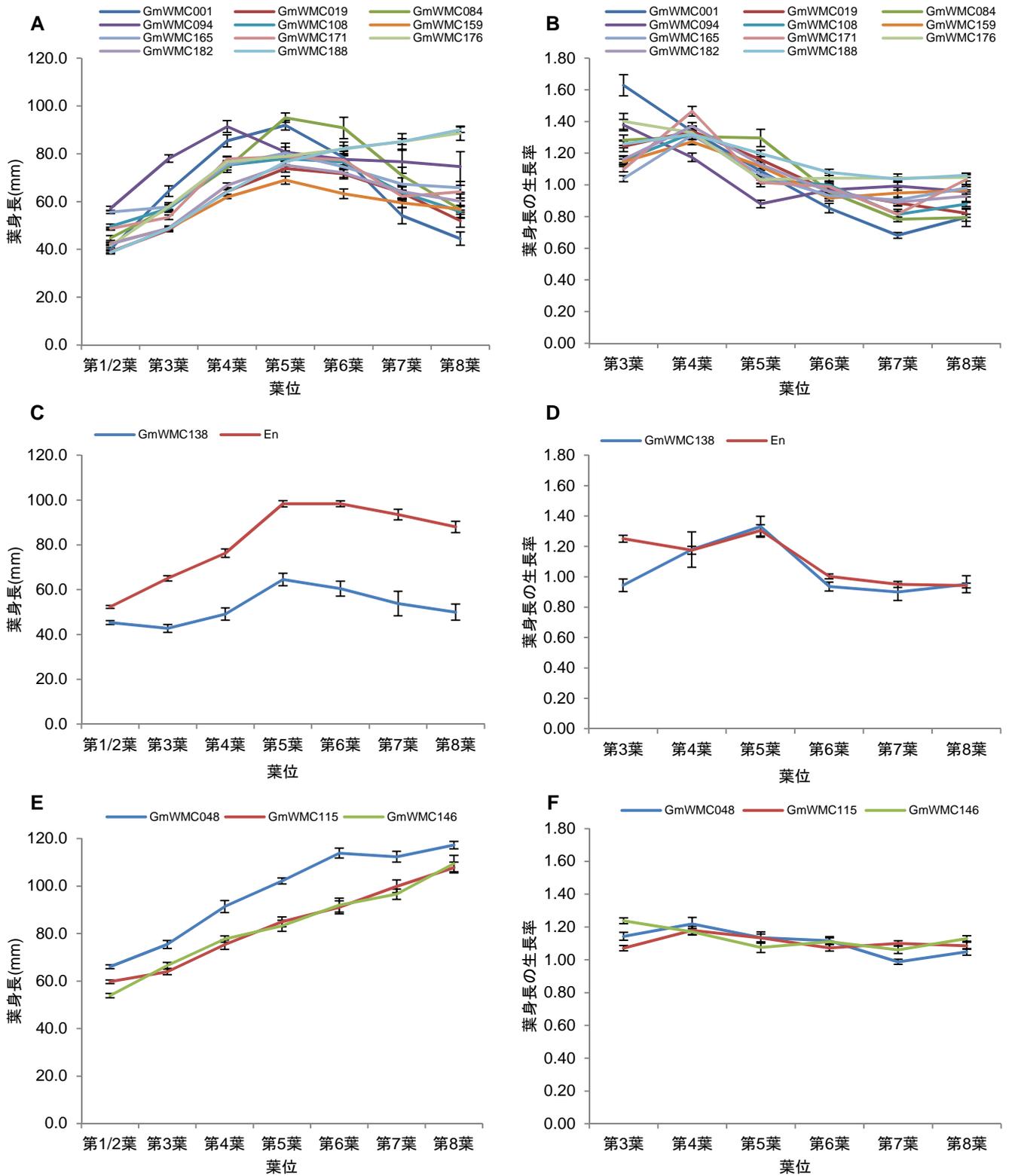


Fig. 1-2 16系統における葉身長の変化(2015年調査)

- (A) 第4葉付近で葉の大きさが急激に変化する10系統の各葉位の葉身長。
 - (B) 第4葉付近で葉の大きさが急激に変化する10系統の葉身長の生長率。
 - (C) 第5葉付近で葉の大きさが急激に変化する2系統の各葉位の葉身長。
 - (D) 第5葉付近で葉の大きさが急激に変化する2系統の葉身長の生長率。
 - (E) 個体によって異なる葉位で葉の大きさが急激に変化する3系統の各葉位の葉身長。
 - (F) 個体によって異なる葉位で葉の大きさが急激に変化する3系統の葉身長の生長率。
- 計測には各系統7個体以上を用い、エラーバーは標準誤差を示す。

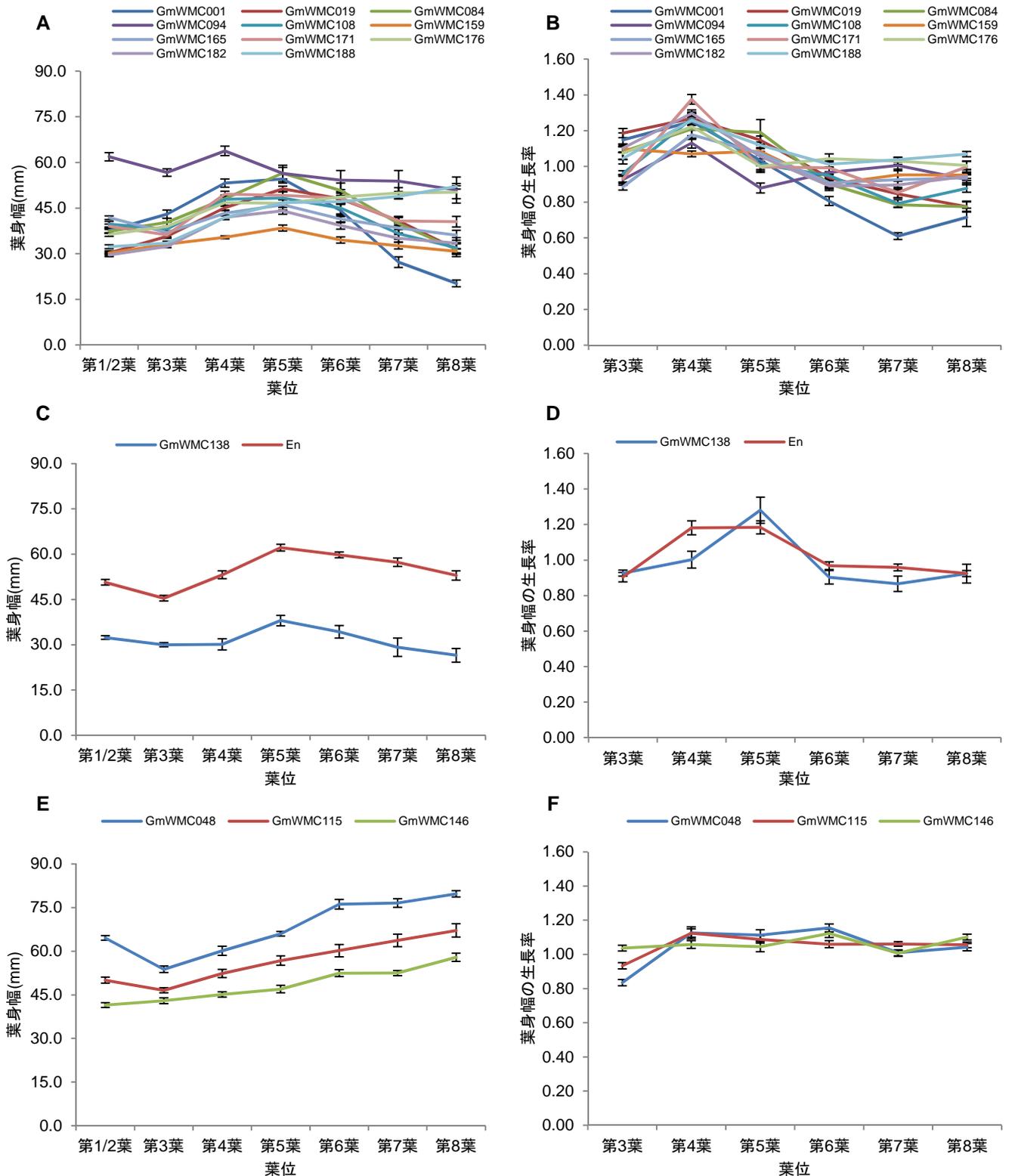


Fig. 1-3 16系統における葉身幅の変化(2015年調査)

- (A) 第4葉付近で葉の大きさが急激に変化する10系統の各葉位の葉身幅。
 (B) 第4葉付近で葉の大きさが急激に変化する10系統の葉身幅の生長率。
 (C) 第5葉付近で葉の大きさが急激に変化する2系統の各葉位の葉身幅。
 (D) 第5葉付近で葉の大きさが急激に変化する2系統の葉身幅の生長率。
 (E) 個体によって異なる葉位で葉の大きさが急激に変化する3系統の各葉位の葉身幅。
 (F) 個体によって異なる葉位で葉の大きさが急激に変化する3系統の葉身幅の生長率。
 計測には各系統7個体以上を用い、エラーバーは標準誤差を示す。

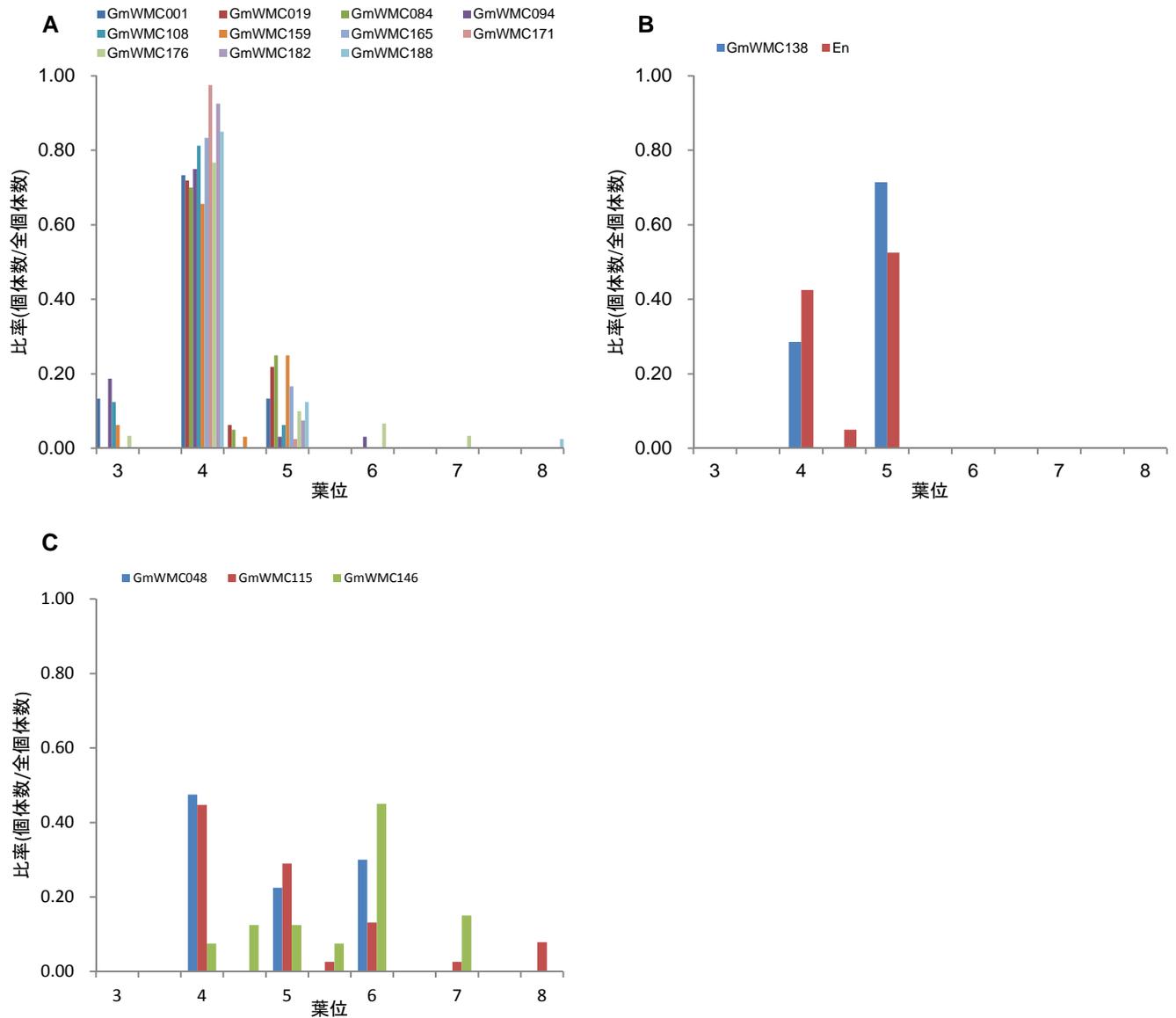


Fig. 1-4 16系統における葉の生長率が高い値を示した葉位の分布

- (A) 第4葉付近で葉の生長率が高い値になる10系統において、個体ごとに葉の生長率が高い値を示した葉位の分布を示した。
- (B) 第5葉付近で葉の生長率が高い値になる2系統において、個体ごとに葉の生長率が高い値を示した葉位の分布を示した。
- (C) 個体によって異なる葉位で葉の生長率が高い値になる3系統において、個体ごとの葉の生長率が高い値を示した葉位の分布を示した。

存在した (Table 1-8, Fig. 1-4A)。これら 10 系統では、第 4 葉で葉の大きさが急激に変化する傾向があり、個体間のばらつきが小さいことが認められた。

第 2 のグループは、「エンレイ」と同様に第 5 葉付近で高い生長率を示す系統であり、GmWMC138 が含まれた (Table 1-8)。GmWMC138 は、葉身長と葉身幅が第 4 葉から第 5 葉にかけて急激に変化し、生長率も第 5 葉で高い値となった (Fig. 1-2C, D, 3C,D)。葉身長と葉身幅の生長率が高い値を示した葉位を個体ごとに比較すると、最大葉位は第 5 葉、最小葉位は第 4 葉であり、その葉位の平均値は、葉身長で 4.7、葉身幅で 4.7、葉のサイズで 4.7 となった (Table 1-8, Fig. 1-4B)。GmWMC138 は、第 5 葉で葉の大きさが急激に変化する傾向があり、個体間のばらつきが小さいことが認められた。

第 3 のグループは、系統内の個体によって、高い生長率を示す葉位が異なる系統であり、3 系統が含まれた (Table 1-8)。このグループの特徴は、葉身長と葉身幅の平均値が徐々に大きくなっていく傾向があり、葉身長と葉身幅の生長率の平均値は、上記の 12 系統の様に一定の葉位で高い値を示すことは認められなかった (Fig. 1-2F, 1-3F)。各系統において、個体ごとに葉身長、葉身幅、葉の大きさの生長率が高い値を示した葉位を比較すると、最少葉位はいずれの系統も第 4 葉であったが、最大葉位は第 6 葉から第 8 葉と系統によって異なった (Table 1-8, Fig.1-4C)。葉の大きさが急激に変化する葉位は個体によって異なる葉位に広く分布する傾向があり、個体間のばらつきが大きいことが認められた (Fig. 1-4C)。

以上の 2015 年の結果をまとめると、調査した 16 系統で葉の大きさが急激に変化する葉位が存在し、個体間のばらつきが小さく、第 4 葉か第 5 葉のある葉位で葉の大

きさが急激に変化する系統と個体によって葉位が異なる系統に分けられた (Table 1-8)。

2014 年と 2015 年の結果より、調査した多数の品種においても、「エンレイ」と同様に葉の大きさが急激に変化する葉位が存在し、葉の大きさの急激な変化はダイズに共通した形態変化であることが明らかとなった。しかし、変化する葉位は系統によって異なり、系統によっては個体間差異が大きく、系統として明瞭な葉位が決定できないものも存在した。

2014 年と 2015 年の比較

2014 年と 2015 年の両年とも調査した 16 系統について、葉の大きさの生長率が高い値を示す葉位によって、分類したグループを比較したところ、4 系統は一致し、12 系統は年によって異なった (Fig. 1-5)。両年とも GmWMC019、GmWMC159 は第 4 葉付近で生長率が高く、「エンレイ」は第 5 葉付近で生長率が高かった。また、GmWMC048 も両年ともに個体間差が大きく、生長率の高い葉位が異なっていた。一方、GmWMC001、GmWMC094、GmWMC108、GmWMC115、GmWMC138、GmWMC146、GmWMC165、GmWMC171、GmWMC176、GmWMC182 は、両年で異なるグループに分類された。

生長率が高い値を示す葉位の平均値に着目すると、年によって、ほぼ同じ葉位となる系統(GmWMC001、GmWMC019、GmWMC159、「エンレイ」と異なる葉位となる系統(GmWMC048、GmWMC084、GmWMC094、GmWMC108、GmWMC

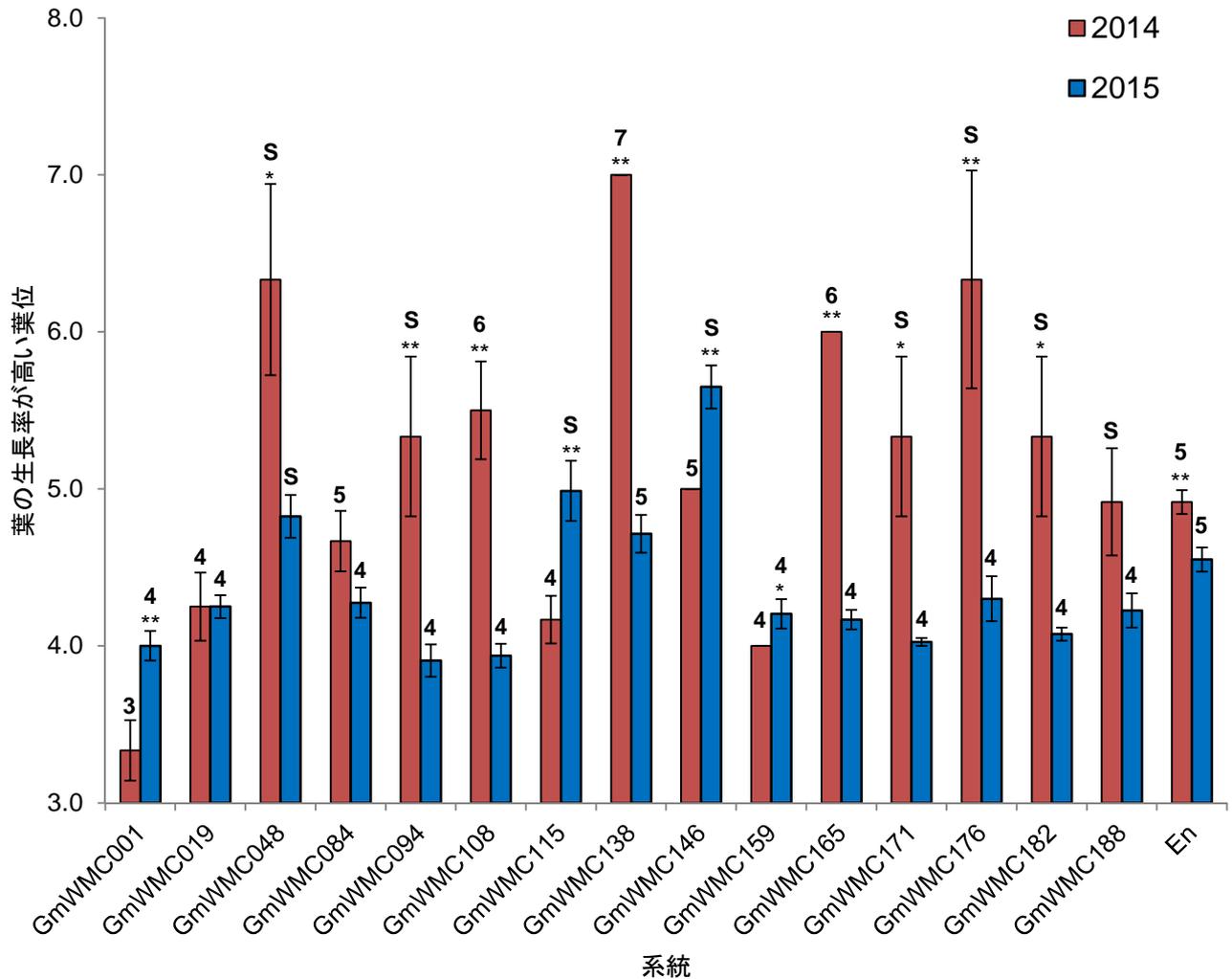


Fig. 1-5 各系統における2014年と2015年の葉の生長率が高くなる葉位の比較

2014年と2015年の両栽培条件にて生育した16系統について、葉の大きさが急激に大きくなる葉位を年度によって比較を示した。比較には、各系統で葉身長と葉身幅が急激に大きくなった葉位の平均を用いた。グラフ上の数字は両年の調査によって葉の大きさが急激に変化した葉位のグループであり、Sは個体によって葉の大きさが急激に変化する葉位が大きく異なったグループである。グラフ内の**は1%水準で、*は5%水準でt検定によって年度間に有意に差が認められたことを表す。エラーバーは標準誤差を示す。

115、GmWMC138、GmWMC146、GmWMC165、GmWMC171、GmWMC176、GmWMC182、GmWMC188)が存在した。GmWMC019 は両年間で有意差が見られず、第4葉付近で葉の大きさが急激に変化していた (Fig. 1-5, Table 1-7, 8)。「エンレイ」および GmWMC159 は、それぞれ第5葉、第4葉付近で急激に変化していると判断したが、両年間で有意差があった (Fig. 1-5, Table 1-7, 8)。しかし、その差はそれぞれ0.4葉および0.2葉と小さく、年度間で差が出た要因として、「エンレイ」は、2015年に個体数を増やして調査したため、若干のばらつきが生じ、GmWMC159は2014年の調査が2個体であったため、有意差が出たと考えられる。

GmWMC048、GmWMC094、GmWMC108、GmWMC138、GmWMC165、GmWMC171、GmWMC176、GmWMC182では、2014年に比べて、2015年の方が有意に下位の葉位で葉の大きさが急激に変化しており (生長率が高く)、1葉位分以上の差が認められた (Fig. 1-5, Table 1-7, 8)。また、有意差はなかったが、GmWMC084、GmWMC188においても、2015年は多くの個体の葉の大きさは第4葉で急激に変化しており、2014年と比較して、2015年方が下位葉で変化する傾向があった。一方、GmWMC001、GmWMC115、GmWMC146では、2014年に比べて、有意に2015年の方が上位葉で葉の大きさが変化していた。

これらの系統は、2014年と2015年ともにビニールハウス内で栽培したが、播種時期が1ヵ月程度異なるため、初期生育が2014年は14.7h日長から15.0h日長へと徐々に日長が長くなる環境での栽培、2015年は15.0hから徐々に日長が短くなる環境での栽培となった。葉の大きさが急激に変化する葉位は、日長条件や日長反応

に関する *E* 遺伝子座 (*E1*~*E4*) の遺伝子型によって左右されると推測した。そこで、16 系統の *E1* から *E4* の遺伝子型を調査し、その結果を Table 1-9 に示した。その結果、2014 年と 2015 年における葉の生長率が高い値を示した葉位に年間差が認められた系統と認められなかった系統に特異的な遺伝子型は存在しなかった (Table 1-9)。しかし、年度によって大きな差がない 3 系統 (GmWMC019、GmWMC159、「エンレイ」) では、GmWMC159 を除き、*E3* 遺伝子座が機能欠損型の *e3-Mo*、*e3-tr* であった。年度で葉の大きさが急激に変化する葉位が異なった 13 系統 (GmWMC001、GmWMC048、GmWMC094、GmWMC108、GmWMC115、GmWMC138、GmWMC146、GmWMC165、GmWMC171、GmWMC176、GmWMC182) では、GmWMC001 を除き、*E3* 遺伝子座が機能型の *E3-Mi*、*E3-Ha* であった。

トライコーム数の変化

「エンレイ」では、葉の表側のトライコーム数が第 1/2 葉から第 5 葉まで緩やかに増加したが、第 6 葉で急激に増加し、その後の第 8 葉までほぼ一定の値を示した (Fig. 1-6A, Table 1-10)。葉の裏側のトライコーム数も表側と同様の結果であった (Fig. 1-6B, Table 1-10)。個体ごとにトライコーム数が増加する葉位を比較すると、全個体で第 6 葉において急激に増加し、その後の葉位ではほぼ一定の値を示した (Table 1-10)。

ダイズコアコレクション 74 系統とダイズ栽培品種 3 系統の各葉位におけるトライコ

Table 1-9 世界のダイズコアコレクションにおける*E*遺伝子型

系統	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	引用
年度によって葉の生長率が高い葉位がほぼ一定である系統群					
GmWMC019	<i>e1-as</i>	<i>E2-in</i>	<i>e3-Mo</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC159	<i>e1-as</i>	<i>E2-dl</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	本研究
En	<i>E1</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>	Tsubokura et al. (2014)
年度によって葉の生長率が高い葉位が異なる系統群					
GmWMC001	<i>e1-nl</i>	<i>e2-ns</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-SORE-1</i>	本研究
GmWMC048	<i>E1</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Mi</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC084	<i>e1-p*</i>	<i>E2-in</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	Tsubokura et al. (2014)
GmWMC094	<i>E1</i>	<i>E2-dl</i>	<i>E3-Mi</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC108	<i>E1</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC115	<i>e1-as</i>	<i>E2-in</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC138	<i>e1-as</i>	<i>E2-dl</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC146	<i>E1</i>	<i>E2-dl</i>	<i>E3-Mi</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC165	<i>E1</i>	<i>e2-ns</i>	<i>E3-Mi</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC171	<i>e1-as</i>	<i>E2-dl</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC176	<i>E1</i>	<i>E2-dl</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC182	<i>E1</i>	<i>E2-dl</i>	<i>E3-Mi</i>	<i>E4</i>	本研究
GmWMC188	<i>E1</i>	<i>E2-dl</i>	<i>E3-Mi</i>	<i>E4</i>	本研究

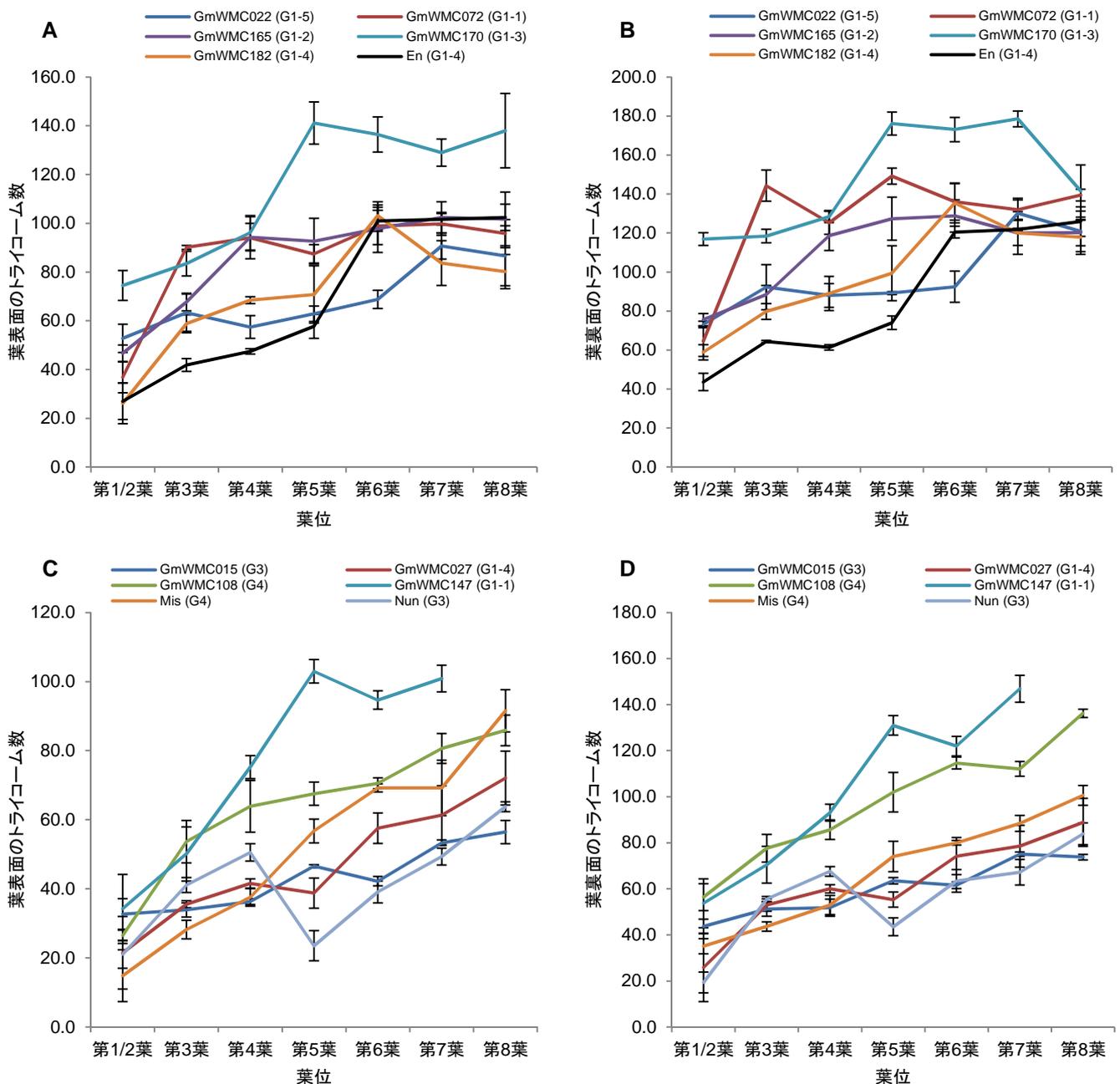


Fig. 1-6 世界のダイズコアコレクションにおけるトライコム数の変化

- (A) ある一定の葉位でトライコム数が急激に増加する系統について、葉の表面におけるトライコム数の変化を示した。
- (B) ある一定の葉位でトライコム数が急激に増加する系統について、葉の裏面におけるトライコム数の変化を示した。
- (C) トライコム数が一定の葉位で急激に増加し、その後も増加し続ける系統や2つの葉位で急激に増加する系統、徐々に増加する系統について、葉表面のトライコム数の変化を示した。
- (D) トライコム数が一定の葉位で急激に増加し、その後も増加し続ける系統や2つの葉位で急激に増加する系統、徐々に増加する系統について、葉裏面のトライコム数の変化を示した。
- 計測には各系統3個体以上を用い、エラーバーは標準誤差を示す。()内は各系統が分類されたグループ番号を示す。

Table 1-10 2014年の各系統における葉の裏表のトライコーン数が急激に変化した葉位

系統/個体番号	表面					裏面					平均値が大きく増加する葉位		平均値の増加が止まる葉位	
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	表面	裏面	表面	裏面
葉の表裏で同時にある葉位でトライコーン数が急激に増加する系統 (第1グループ)														
1. 第3葉でトライコーン数が急激に増加した系統														
GmWMC072	3	3	3, 6			3	3	5			3	3	3	3
GmWMC073	4, 6	5				4, 8	3				3	3	5	3
GmWMC113	4	3				4	3				3	3	4	4
GmWMC136	5	3	3			4	5	3			3	3	5	6
GmWMC147	3	4	3			3	4	5			3	3	5	5
GmWMC148	7	3	3			4	3	3			3	3	7	4
2. 第4葉でトライコーン数が急激に増加した系統														
GmWMC156	5	4	5			5	4	5			4.5	4	5	5
GmWMC165	4	4	4			4	4	4			4	4	4	4
GmWMC176	4, 8	4	4			4	5	4			4	4	5	4
3. 第5葉でトライコーン数が急激に増加した系統														
GmWMC045	4, 7	4	5, 7			4, 8	4	4			5	5	5	5
GmWMC086	5	3	6			5	G	6			5	5	7	6
GmWMC094	6	6	5			4	5	5			5	5	5	5
GmWMC132	7	6	4	5	5	7	6	4	5		5	5	5	7
GmWMC142	5	4	5			5	5	5			5	5	5	6
GmWMC150	5	3	5			4	5	5			5	5	5	5
GmWMC159	5	5				5	5				5	5	5	5
GmWMC162	5	5	5			5	4	5			5	5	5	5
GmWMC169	5, 7	5	4			G	5	4			5	5	7	5
GmWMC170	5	5, 8	5			5	5	5			5	5	5	5
GmWMC181	5	6	6			4	5	5			5	5	5	5
GmWMC183	5	6	4			5	5	5			5	5	5	5
GmWMC186	5	5	5			5	6	7			5	5	5	5
GmWMC187	4	5	5			4	5	5			5	5	5	5
GmWMC188	5	5	5			5	5	5			5	5	5	5
GmWMC190	4	4	5			5	4	4			5	5	5	5
GmWMC192	5	5	5			5	5	5			5	5	5	5
4. 第6葉でトライコーン数が急激に増加した系統														
GmWMC027	6	6	6			3	6	6			6	6	8 ^a	8 ^a
GmWMC029	6	6	6			6	6	6			6	6	7	7
GmWMC035	6	6	6			6	5	6			6	6	8 ^a	8 ^a
GmWMC048	6	7	6			5	7	6			6	6	6	6
GmWMC123	6	6	6			7	5	6			6	6	6	6
GmWMC125	6	4	5			6	4, 8	6			6	6	6	6
GmWMC175	6	6	6			7	6	3, 6			6	6	6	6
GmWMC182	5	6	6			4	6	6			6	6	6	6
En	6	6	6			6	6	6			6	6	6	6
Ryu	5	6	4, 6			6	5, 7	6			6	6	6	6
5. 第7葉でトライコーン数が急激に増加した系統														
GmWMC022	8	7	7			6	7	7			7	7	7	7
GmWMC042	4, 8	6	5, 7			4, 8	7	7			7	7	8 ^a	8 ^a
GmWMC118	7	7	8			8	7	8			7	7	8 ^a	8 ^a

C: 変化が見られずほぼ一定の値 G: 徐々に増加するような変化 N: 3つの葉位で急激に増加

^a: 調査を行った第8葉までトライコーン数が増加した

Table 1-10 続き:2014年の各系統におけるトライコーム数が急激に変化した葉位

系統/個体番号	表面					裏面					平均値が大きく増加する葉位		平均値の増加が止まる葉位	
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	表面	裏面	表面	裏面
葉の表と裏でトライコーム数が急激に増加する葉位が異なる系統 (第2グループ)														
GmWMC070	4, 6	3	3			5	5	4			3	5	5	6
GmWMC083	G	6	7			G	6	5, 7			6	5	7	7
GmWMC129	5	5	5			5	5	4			5	4	5	5
GmWMC146	6	5	5			6	6	6			5	6	7	6
GmWMC151	6	6	5			5	6	5			6	5	6	6
GmWMC152	5	5	4			6	6	6			5	6	5	6
GmWMC191	5	5	4			4	4	3			5	3	5	5
2つの葉位でトライコーム数が急激に増加した系統 (第3グループ)														
GmWMC006	4, 6	4, 6				4, 7	4, 6				4, 6	4, 6	7	7
GmWMC014	G	6	7			4	4, 8	4, 7			6	4, 6	7	8 ^a
GmWMC015	5, 7	5, 8	5, 7			7	5, 7	5, 7			5, 7	5, 7	7	7
GmWMC036	5, 8	7	5, 7			C	7	8			5, 7	G	7	8 ^a
GmWMC038	4, 8	4, 8	7			8	7	5, 7			4, 7	7	8 ^a	8 ^a
GmWMC089	5	4	7	6		5	4	7	6		4, 7	4, 7	7	7
GmWMC107	4, 7	4, 6	4, 7			4, 6	4, 7	4			4, 7	4, 7	7	7
GmWMC115	G	4, 7	7			6	7	7			4, 7	7	7	7
GmWMC119	5, 7	5, 7	7			5, 7	5, 7	5, 7			5, 7	5, 7	7	7
GmWMC120	4	4	4			N	4	4, 7			4	4, 7	4	7
GmWMC122	N	4, 7	5			7	N	7			5, 7	7	7	7
GmWMC141	4, 6	6	5			7	G	5, 7			6	5, 7	8 ^a	8 ^a
GmWMC143	5, 7	4	6			4	4, 6	6			4, 6	4, 6	7	7
GmWMC154	5, 8	4	4, 8			5, 8	4, 7	5			5, 8	5, 8	8 ^a	8 ^a
GmWMC171	3, 8	3, 8	3, 6			3	3, 8	6			3, 8	3	8 ^a	7
GmWMC173	5, 7	5	8			5, 7	7	3			5, 7	3, 7	8 ^a	7
Nun	3, 7	4, 6	3, 6			3, 8	3, 6	3, 6			3, 6	3, 6	8 ^a	8 ^a
Suz	3, 6	4, 7	5			3, 6	3, 7	3			4	3, 7	7	7
トライコーム数の推移が一定、あるいは徐々に増加する系統 (第4グループ)														
GmWMC001	4, 7	3, 7	4, 7			3, 6	7	5			7	G	7	8 ^a
GmWMC011	5, 7	G	5			5	4	5			5	G	7	8 ^a
GmWMC012	8	4, 7	5			5, 8	5, 7	5			G	5, 8	8 ^a	8 ^a
GmWMC018	6	6	5	4, 6		6, 8	6	5	4		6	G	6	8 ^a
GmWMC019	3, 7	N	N			6	7	8			N	7	8 ^a	8 ^a
GmWMC020	5	4, 7	5			G	4, 7	G			5	G	7	8 ^a
GmWMC046	G	G	5			4	G	5			G	G	8 ^a	8 ^a
GmWMC071	6	6	6			7	6	6			6	G	6	8 ^a
GmWMC084	7	5	6			4	5	5			G	5	-	5
GmWMC108	4, 6	5	7			6	6	5			G	G	-	-
GmWMC138	5	6, 8	5			4	C	4, 7			5	C	5	8 ^a
GmWMC144	G	5	G			G	8	5			G	G	8 ^a	8 ^a
GmWMC160	6	5				C	4				5	C	5	-
GmWMC168	G	7	7			G	N	G			G	G	8 ^a	8 ^a
Mis	4, 8	4, 8	G			G	4, 8	5			G	G	8 ^a	8 ^a

C: 変化が見られずほぼ一定の値 G: 徐々に増加するような変化 N: 3つの葉位で急激に増加

^a: 調査を行った第8葉までトライコーム数が増加した

ーム数についてみると、各葉位におけるトライコーン数の増減の推移は、4つのグループに分類された (Table 1-10)。すなわち、トライコーン数が“葉の表裏で同時にある葉位で急激に増加する” (グループ 1)、“葉の表裏が異なる葉位で急激に増加する” (グループ 2)、“2つの葉位で急激に増加する” (グループ 3)、“トライコーン数の推移が一定、あるいは徐々に増加する” (グループ 4) である。4つのグループに分類された代表的な系統について Fig. 1-6 に示す。

“葉の表裏で同時にある葉位で急激に増加する”グループ 1 に含まれるものは 39 系統あった。トライコーン数が急激に増加する葉位は第 3 葉から第 7 葉と系統によって異なっていた。第 3 葉で増加するものは 6 系統あったが (Table 1-10)、第 3 葉以降の変化で 2 つに分かれた。GmWMC072 は、第 3 葉で急激に増加した後、第 3 葉以降はほぼ一定の値を示した (Fig. 1-6A, B)。個体ごとに比較しても、トライコーン数が急激に変化する葉位は第 3 葉が中心であった。一方、GmWMC147 を含む 5 系統は、葉の表裏のトライコーン数の平均値は第 3 葉で急激に増加したが、第 3 葉以降は一定の値を示さず、増加する傾向を示し、トライコーン数が一定となる葉位は系統によって異なった (Fig. 1-6C, D, Table 1-11)。

第 4 葉で増加するものは、3 系統で認められた (Table 1-10)。GmWMC165 は、トライコーン数の平均値が第 4 葉で急激に増加し、個体変異もなく、第 4 葉以降はほぼ一定の値を示した (Fig. 1-6A, B, Table 1-10)。また、GmWMC156、GmWMC176 もトライコーン数の平均値が第 4 葉で急激に増加したが、個体によっては第 5 葉で急激に変化するものもあり、第 5 葉までトライコーン数が増加し、その後は一定の値を示した。

第 5 葉で増加する系統は 17 系統あり、そのうち GmWMC170 を含めた 13 系統では、トライコーム数の平均値が第 5 葉で急激に増加し、第 5 葉以降はほぼ一定の値を示した (Fig. 1-6A, B, Table 1-10)。個体ごとに比較すると、トライコーム数が急激に変化する葉位は第 5 葉が中心となった (Table 1-10)。また、その他の 4 系統 (GmWMC086、GmWMC132、GmWMC142、GmWMC169) でも、トライコーム数は第 5 葉で急激に増加したが、その後の葉位においてもトライコームが増加する傾向が示された。

第 6 葉で増加するパターンは、「エンレイ」も含めて 10 系統で認められた (Table 1-10)。GmWMC182 を含めた 6 系統では、「エンレイ」と同様にトライコーム数の平均値が第 6 葉で急激に増加し、第 6 葉以降はほぼ一定の値を示した (Fig. 1-6A, B)。その他の 3 系統 (GmWMC027、GmWMC029、GmWMC035) は、第 6 葉以降の葉位でも増加する傾向を示した (Fig. 1-6C, D)。

第 7 葉で増加する系統は 3 系統あり (Table 1-10)、GmWMC022 は、トライコーム数が第 7 葉で急激に増加し、それ以降はほぼ一定の値を示した (Fig. 1-6A, B, Table 1-10)。一方、GmWMC042、GmWMC118 は、第 7 葉以降の葉位においてもトライコーム数が増加する傾向がみられた。

トライコーム数が“葉の表裏が異なる葉位で急激に増加する”グループ 2 には 7 系統が含まれた (Table 1-10)。これらは、葉の表と裏で異なる葉位でトライコーム数が急激に増加したが、その違いはおよそ 1 葉位であった。GmWMC146 では、葉の表のトライコーム数は第 5 葉、葉の裏のトライコーム数は第 6 葉で急激に増加し (Fig. 1-6A, B)、個体別に比較しても、表では第 5 葉、裏では第 6 葉を中心にトライコーム

数が急激に増加する傾向が認められた (Table 1-10)。

“2つの葉位で急激に増加する”グループ 3 には 18 系統が含まれた。系統によって葉の表裏両方で、もしくは片方だけでこのような変化を示す系統も存在した (Table 1-10)。一例として、GmWMC015 と Nun について変化のパターンを述べる。GmWMC015 は、トライコーム数が第 5 葉で急激に増加し、第 6 葉のトライコーム数は第 5 葉とほぼ同じ値であり、第 7 葉で再度、急激にトライコーム数が増加した (Fig. 1-6C, D, Table 1-10,)。個体ごとにトライコーム数の推移を比較しても、2つの葉位でトライコーム数が急激に増加していた。Nun は、トライコーム数が第 3 葉で急激に増加し、第 4 葉まで増加する。しかし、第 5 葉でのトライコーム数は減少し、第 6 葉で再び急激にトライコーム数が増加し、8 葉まで増加する傾向が示された (Fig. 1-6C, D, Table 1-10)。個体間差異はみられず、いずれの個体も同様のパターンを示した。

“トライコーム数の推移が一定、あるいは徐々に増加する”グループ 4 には 15 系統が含まれた。一例として GmWMC108 と Mis があげられ、この 2 系統では、第 3 葉から第 8 葉まで徐々にトライコーム数が増加していく傾向があった (Fig. 1-6C, D, Table 1-10)。これら 15 系統では、同系統内でトライコーム数が急激に増加する葉位に個体間変異があったり、徐々に増加するなどの変化が認められたために平均値ではトライコーム数の急激に増加する葉位が見られない系統が存在した。(Table 1-10)。

以上の結果をまとめると、一部の系統でのみ一定の葉位で急激にトライコームが増加したが、トライコームの急激な増加が 2 回起こる系統や徐々に増加する系統なども存在した。これらのことより、「エンレイ」で起きる一定の葉位でトライコームが急激に増

加する現象は、ダイズ種内に共通した形態変化ではなく、系統特異的な変化であることが明らかとなった。

托葉の変化

2015 年に用いたダイズコアコレクション 15 系統の内、11 系統 (GmWMC019、GmWMC048、GmWMC084、GmWMC094、GmWMC108、GmWMC115、GmWMC146、GmWMC159、GmWMC165、GmWMC171、GmWMC188) と「エンレイ」を用い、各葉位の托葉の変化を調査した。「エンレイ」において、托葉の葉身長は、後半の葉位になるほど大きくなる傾向が見られた (Fig. 1-7A)。各葉位の生長率は、0.97 から 1.14 の間とほぼ 1.00 に近い値で、生長率の値は小さく、大きな変化が起きないことを示していた (Fig. 1-7B)。それに比べ、葉身幅は第 1/2 葉から第 3 葉にかけて大きくなり、生長率は 1.68 ± 0.07 と高かった (Fig. 1-7C, D)。その後、生長率が第 4 葉で 1.16 ± 0.02 、第 5 葉は 1.30 ± 0.04 となり、葉身幅は徐々に大きくなるが、第 6 葉以降の葉身幅はほぼ一定の値で生長率が 1.00 に近い値を示した (Fig. 1-7C, D)。托葉の葉身長と葉身幅の比率は、第 3 葉から第 5 葉まで値が 2.98 ± 0.06 から 2.04 ± 0.04 と徐々に小さくなっていったが、第 5 葉以降は一定の値を示した (Fig. 1-8A)。

11 系統の托葉の葉身長と葉身幅は、系統によって異なる値を示した (Fig. 1-7A,C)。葉位ごとに托葉を比較すると、GmWMC094 を除く 10 系統の托葉の葉身長は、第 1/2 葉から第 3 葉にかけて生長率が 1.00 以下になり、葉身長は小さくなっ

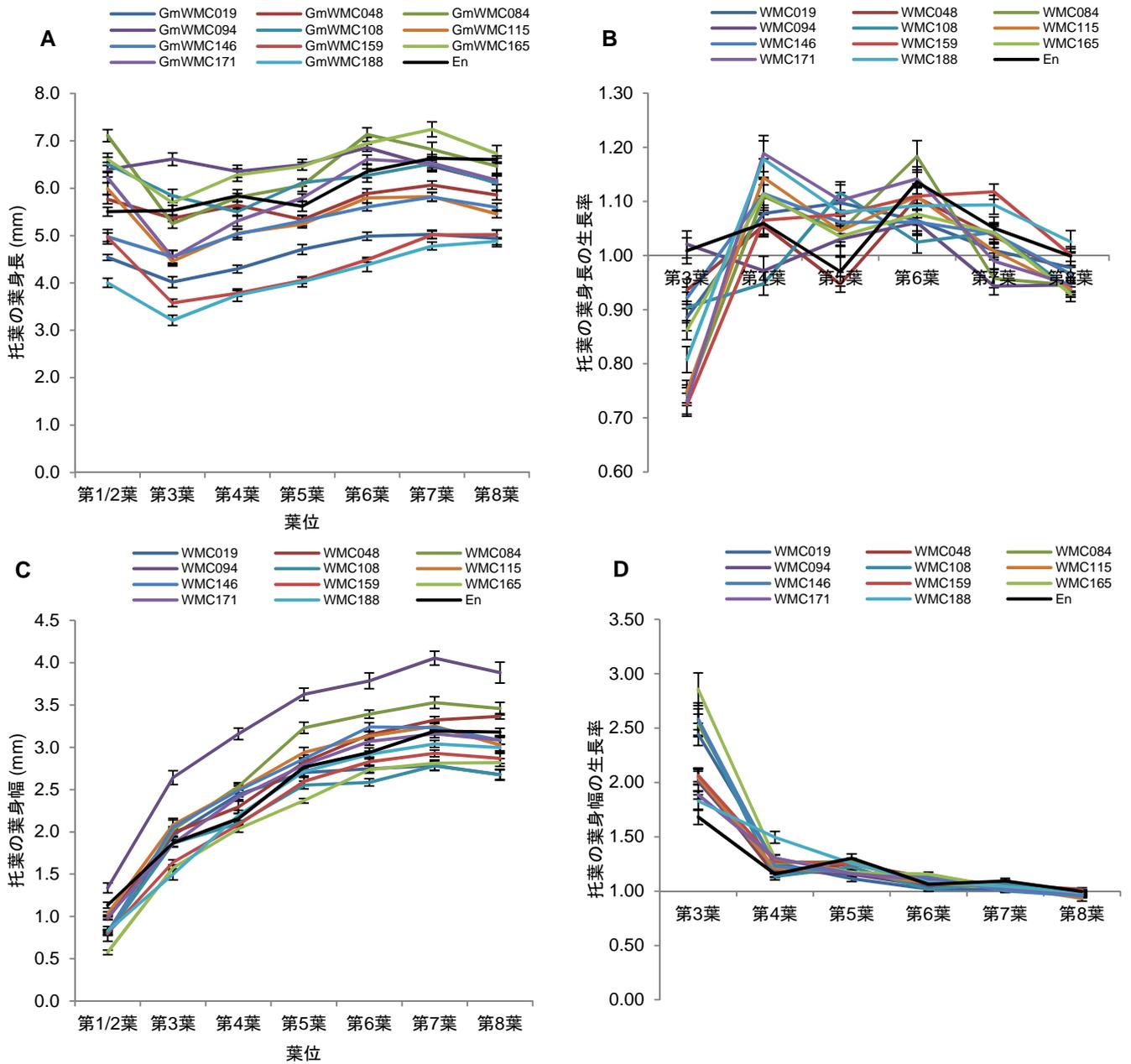


Fig. 1-7 ダイズコアコレクション12系統における托葉の葉身長と葉身幅の変化

(A) 12系統の各葉位における托葉の葉身長。

(B) 托葉の葉身長の生長率を各葉位ごとに示した。

(C) 12系統の各葉位における托葉の葉身幅。

(D) 托葉の葉身幅の生長率を各葉位ごとに示した。

計測には各系統10個体以上を用い、エラーバーは標準誤差を示す。

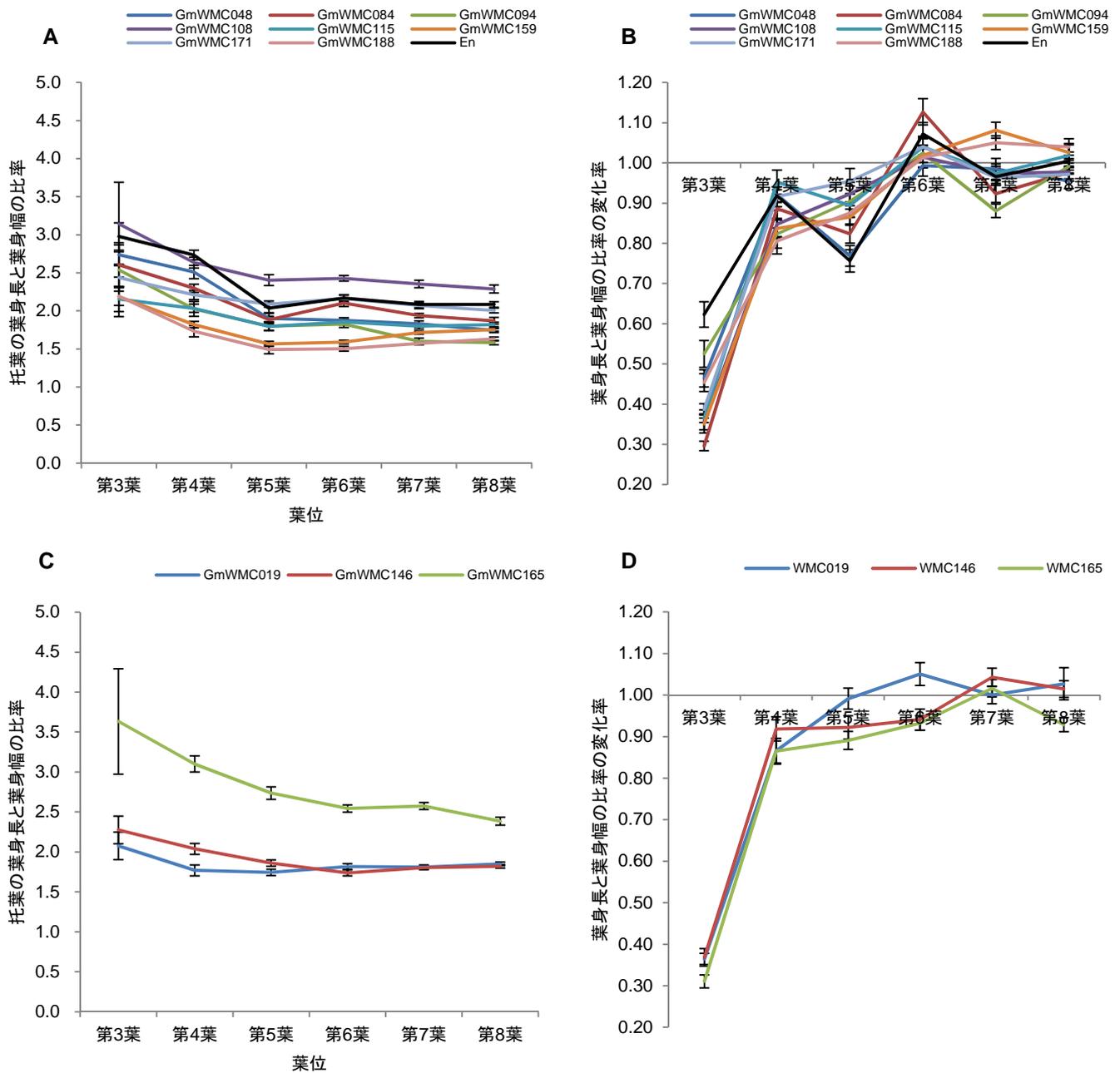


Fig. 1-8 ダイズコアコレクションにおける托葉の葉身長と葉身幅の比率の変化

- (A) 托葉の葉身長と葉身幅の比率が第5葉で一定の値となる傾向があった9系統の各葉位の比率を示した。
 (B) 9系統の托葉の葉身長と葉身幅の比率の変化率。
 (C) 托葉の葉身長と葉身幅の比率が第4葉、または、第5葉で一定の値となる傾向があった3系統の各葉位の比率を示した。
 (D) 3系統の托葉の葉身長と葉身幅の比率の変化率。
 計測には各系統10個体以上を用い、エラーバーは標準誤差を示す。

たが、GmWMC094の葉身長は、生長率が1.03となった (Fig. 1-7A,B)。これら11系統の第3葉以降の葉身長の生長率は、0.93から1.19で、「エンレイ」と同様に葉身幅と比べると大きな変化は示さなかった (Fig. 1-7B, D)。葉身幅において、GmWMC019は第4葉まで、GmWMC048、GmWMC084、GmWMC094、GmWMC108、GmWMC115、GmWMC159、GmWMC171、GmWMC188は第5葉まで、GmWMC146、GmWMC165は第6葉まで、葉身幅の増大が続き、生長率の値も1.10以上と高い値を示したが、その後はほぼ一定の値となり、生長率の値も1.00に近い値を示した (Fig. 1-7C, D)。葉身長と葉身幅の比率は、系統によって異なる値を示し、異なる葉位から一定の比率になった。GmWMC048、GmWMC084、GmWMC094、GmWMC108、GmWMC115、GmWMC159、GmWMC171、GmWMC188は「エンレイ」と同様に、第3葉から第5葉まで比率が小さく、変化率も1.00以下となるが、第6葉以降は比率が一定の値になり、変化率は1.00に近い値を示すようになった (Fig. 1-8A, B)。GmWMC019は第3葉から第4葉にかけて比率が小さくなったが、第5葉以降は一定の値を示した (Fig. 1-8C, D)。GmWMC146、GmWMC165は、第3葉から第6葉にかけて値が小さくなったが、第7葉以降は一定の値を示した (Fig. 1-8C, D)。

托葉の葉身長と葉身幅の比率が一定になる葉位と葉の大きさが急激に変化する葉位を系統ごとに比較すると、同じ葉位で変化が起こる系統と異なる葉位で起こる系統が存在した (Table1-8, Fig. 1-8)。「エンレイ」、GmWMC048、GmWMC115は第5葉、GmWMC019は第4葉、GmWMC146は第6葉で托葉の葉身長と葉身幅の比率が一定となる葉位と葉の大きさが急激に変化する葉位がほぼ一致していた

(Table 1-8, Fig. 1-8)。残りの 7 系統では、葉の大きさが急激に変化した葉位よりも托葉の葉身長と葉身幅の比率が一定となる葉位が遅れていた (Table 1-8, Fig. 1-8)。

以上の結果より、調査した多くの系統においても、「エンレイ」と同様に托葉の葉身長と葉身幅が葉位によって変化しており、托葉の葉身長と葉身幅の比率が一定になる葉位が存在することが明らかとなった。また、葉の大きさの変化する葉位と托葉の変化する葉位が一致しない系統が多数存在し、葉の大きさと托葉では、形態変化が起こる時期は同調せず、異なることが示唆された。

考察

葉序、葉の形態変化の系統間差異

「エンレイ」の葉序は、第 1/2 葉は対生であり、第 3 葉以降は互生である頻度が多いが、第 3 葉と第 4 葉の葉序は 30%の頻度で第 1/2 葉と同じ対生になることが報告されている (Yoshikawa et al., 2013)。彼らは、「エンレイ」の第 1/2 葉の葉形が単葉であり、第 3 葉以降は小葉を 3 枚持つ複葉へと変化するが、稀に第 3 葉が単葉である個体が出現することを観察し、第 3 葉は、個体によって葉形が異なり、第 1/2 葉と同様の単葉、もしくは後半の葉位と同様の複葉を形成する表現型を示すことから、juvenile phase と adult phase の中間であると考えた (Yoshikawa et al., 2013)。「エンレイ」以外のダイズ品種の初期生育における葉序や葉形の研究は少なく、(Yoshikawa et al., 2013) は、日本のダイズ数品種において、低頻度で第 3 葉と第 4 葉の葉序が対生である個体が出現することを見ているが、第 3 葉が単葉の個体を含む品種は、「エンレイ」以外で現在までに報告されていない。本章では葉序や葉の形態の変化がダイズに共通する形質であるかどうかを明らかにするために調査を行った。

世界のダイズコアコレクション 80 系統、栽培品種 4 系統、「エンレイ」について、2014 年と 2015 年の 2 年間調査した結果、第 3 葉と第 4 葉の葉序は、すべての個体が互生であった系統や対生個体が出現する系統が認められ、出現頻度は年度や系統で異なった (Table 1-4)。第 5 葉以降も系統によって対生個体は見られたが、そ

の出現頻度は異なった。第3葉の葉形では、「エンレイ」以外にも単葉や2枚の小葉といった通常みられる三出複葉よりも少ない小葉を低頻度で展開する系統が存在したが、多数の系統(67/85)の第3葉は、小葉を3枚以上形成した(Table 1-5)。このことから、生育初期の対生葉序の出現や第3葉で単葉が出現する現象は、ダイズに共通した形態ではないことが明らかとなった。また、本章で供試したダイズコアコレクションや栽培品種は遺伝的に固定された系統にもかかわらず、一部の系統では、対生葉序と単葉の出現頻度が年度間で異なり、同系統内の個体間でも異なっていた。また、第3葉と第4葉が互生葉序であったにも関わらず、第5葉と第6葉が対生葉序で出現する個体も存在した。これらの結果は、梅崎ら(1987)の、同系統でも年度によって第3葉と第4葉における対生葉序の出現率が異なるという結果と一致している。以上のことより、第3葉と第4葉が互生葉序のみ出現する系統では遺伝的に葉序が決定されていることが考えられるが、年度によって出現頻度が変化する系統が存在することは、遺伝的な支配だけではなく、環境などの他の要因がかかわっていることが推察される。

葉の大きさはダイズに共通した形態変化である

Yoshikawa et al. (2013) は、「エンレイ」の葉身長と葉身幅を調査し、第4葉から第5葉にかけてその大きさが急激に変化し、JA相転換に関与していると報告した。本研究で2年間調査した「エンレイ」においても、第5葉付近で葉身長と葉身幅の大きさが急激に変化し、Yoshikawa et al. (2013)の結果と一致し、「エンレイ」におい

て本形質が環境条件に影響されにくいことが明らかとなった。しかし、この現象の一般性については知られておらず多数の系統を用い、2年に渡り調査した。2014年では84系統を用い、葉身長と葉身幅の調査を行った結果、葉の大きさが急激に大きくなる葉位が存在したが、系統によって葉位は異なった (Table 1-7, Fig. 1-1)。2015年には「エンレイ」を含む16系統を選抜し、個体数を増やすことでさらに詳細に葉の大きさの変化について調査を行った。その結果、2014年と同様に葉の大きさが急激に大きくなる葉位が存在した (Table 1-8, Fig. 1-2, 3)。以上の結果は、ある葉位で葉の大きさが急激に変化するという現象はダイズに共通して起こる現象であることを示している。シロイヌナズナにおいても、juvenile phase では葉が小さく、adult phase になると葉が大きくなることが知られており、生長相によって変化率が異なることが報告されている (Wu et al., 2009; Li et al., 2012; Lièvre et al., 2016)。イネにおいても、juvenile phase が延長する *mori1* 変異体では、野生型の第2葉と同じような小さい葉を展開し続けることが報告されている (Asai et al., 2002)。このことから、ダイズのある葉位で葉の大きさが急激に変化することは JA 相転換によって起こる形態変化であると考えられる。一方、変化する葉位は系統によって異なったことから、ダイズ内に JA 相転換の時期に多様性があることが示唆された。2014年の調査では、個体別に葉の大きさが急激に変化する葉位について、系統内の個体間で差異が認められた (Table 1-7)。また、葉の大きさが急激に変化する葉位と開花日の早晚性をみたところ、両者間には相関がみられなかった (データ未掲載)。2015年の調査では、「エンレイ」を含む13系統において、葉の大きさが急激に変化する葉位は第4葉か第5葉が中心となり、その前後の葉位で葉の大きさが急激に変化した個体も存在した

が、ばらつきの程度は小さかった (Table 1-8, Fig. 1-4A, B)。しかし、3 系統 (GmWMC048、GmWMC115、GmWMC146) では、葉の大きさが急激に変化する葉位が第 4 葉から第 8 葉まで個体間差異がみられ、ばらつきの程度が大きかった (Table 1-8, Fig. 1-4C)。シロイヌナズナにおいても、同系統内の個体によって、JA 相転換の指標 (葉の裏にトライコームが形成される葉位) は、多少のばらつきが存在することが報告されている (Telfer et al., 1997; Lièvre et al., 2016)。これらのことより、同一系統であっても個体間で JA 相転換はばらつくことが推測される。JA 相転換には、遺伝子発現だけではなく、糖やジベレリンといった代謝産物や植物ホルモンも関与しており (Telfer et al., 1997; Yang et al., 2013; Yu et al., 2013; Teotia and Tang, 2015)、これらの内在性の要因は個体ごとに内容量が異なる。このことが同一系統内でも JA 相転換がばらつく原因ではないかと考えられる。

葉の大きさが変化する葉位の年度間差異

「エンレイ」を含む 16 系統において、2014 年と 2015 年の葉の大きさが急激に変化した葉位を比較したところ、13 系統 (GmWMC001、GmWMC048、GmWMC094、GmWMC108、GmWMC115、GmWMC138、GmWMC146、GmWMC165、GmWMC171、GmWMC176、GmWMC182) で年度によって葉の大きさが急激に変化する葉位が異なっていた (Fig. 1-5)。一方、3 系統 (WMC019、WMC159、「エンレイ」) では年度によって大きな差が見られなかった。2014 年と 2015 年では、播種時期が 1 ヶ月程異なり、初期生育時の日長に違いがあ

ることから、年度によって葉の大きさが急激に変化する葉位が異なった原因の一つとして日長条件が考えられた。長日植物であるシロイヌナズナにおいても、短日条件下で生育すると juvenile phase が延長し、長日条件下で生育すると juvenile phase が短縮されることや一部の開花に関する遺伝子が JA 相転換に関与することが報告されている (Telfer et al., 1997)。ダイズは短日植物であり、日長が短くなることに反応して開花することが知られている。この日長による開花に関連する遺伝子座として、ダイズでは *E1*、*E2*、*E3*、*E4* 遺伝子座が同定されている (Liu et al., 2008; Watanabe et al., 2009, 2011; Xia et al., 2012)。*E2* 遺伝子座はシロイヌナズナの *GIGANTIA* (*GI*) のホモログである *GmGIa* を、*E3* と *E4* 遺伝子座は *phytochrome A* 遺伝子である *GmPhyA3* と *GmPhyA2* をコードしている (Liu et al., 2008; Watanabe et al., 2009, 2011)。また、*E1* 遺伝子座はダイズ特異的な遺伝子であることが報告されている (Xia et al., 2012)。これらの遺伝子の機能が失われていると、長日条件下で開花が抑制されず、早期に開花する (Liu et al., 2008; Watanabe et al., 2009, 2011)。*E1* から *E4* の遺伝子型は、ダイズ 63 系統で遺伝子配列や DNA マーカーによって解析されており、数種類の遺伝子型が存在することが報告されている (Tsubokura et al., 2014)。本章では、用いた 16 系統の *E1* から *E4* 遺伝子座の遺伝子型を決定し (Table 1-9)、これらの遺伝子型が 2014 年と 2015 年の葉位の差異に関連するか調査した。その結果、年度間で差がない系統と年度間で葉の大きさが急激に変化する葉位が異なった系統のそれぞれに特異的な遺伝子型は見いだせなかったが、年度間で差がない 3 系統では、*GmWMC159* を除き、*E3* 遺伝子座が機能欠損型の *e3-Mo*、*e3-tr* であった。また、年度間で葉の大きさが急激に変化する葉位が異なっ

た 13 系統では、GmWMC001 を除き、*E3* 遺伝子座が機能型の *E3-Mi*、*E3-Ha* であった。このことより、*E3* 遺伝子座の遺伝子型が JA 相転換に関連し、*E3* 遺伝子座が機能型である場合、日長条件に対して、葉の大きさが急激に変化する葉位が変動する可能性が考えられた。一方、機能欠損型であると、日長に対する反応が鈍くなり、葉の大きさが急激に変化する葉位が一定となる傾向が示唆された。しかし、GmWMC001、GmWMC159 といった *E3* 遺伝子座で説明できない系統も存在した。*E* 遺伝子座は *E1*~*E4* の他に *E5*~*E10* まで存在し、*E5*~*E10* が関与している可能性があるかもしれない。シロイヌナズナでは、JA 相転換にかかわる複数の遺伝子が同定されており、ダイズにおいても *E* 遺伝子座以外の要因が考えられる。本章では、自然日長で実験を行っており、今後は日長と温度を制御できる環境条件下で栽培したダイズで比較することでさらに詳しく解析できると考えられる。

葉のトライコームの変化は共通した形態変化ではない

Yoshikawa et al. (2013) は、「エンレイ」の葉の表裏のトライコーム数は、第 1/2 葉から第 5 葉まで徐々に増加、もしくは一定の値であるが、第 6 葉から急に増加し始めることを報告した。本章においても、「エンレイ」は第 6 葉で葉の表裏のトライコームが急に増加し (Table 1-10, Fig. 1-6A, B)、(Yoshikawa et al., 2013) の結果と一致した。世界のダイズコアコレクションと栽培品種 77 系統のトラコーム数の変化を調査したところ、39 系統は「エンレイ」のように“葉の表裏で同時にある葉位で急激に増加する”、7 系統は“葉の表裏が異なる葉位で急激に増加する”、18 系統は“2 つの葉位

で急激に増加する”、15 系統は“トライコーム数の推移が一定、あるいは徐々に増加する”の 4 種類に分類された (Table 1-10)。ダイズにおけるトライコームが急激に増加する現象は、「エンレイ」を含め多数のダイズ系統で見られるが、それ以外の現象を示す系統も多くみられた。シロイヌナズナでは、多数の系統で葉の裏にトライコームが初めて形成される葉位と JA 相転換の時期が関連付けられており、葉の表は初期よりトライコームが形成されていることが報告されている (Telfer et al., 1997)。トウモロコシにおいても、葉の表皮に初めてトライコームが形成される葉位が JA 相転換の指標の1つとなっている (Evans et al., 1994)。一方、本章で用いた系統において、第 1/2 葉から葉の表で最少 4.9、最大 103.8 のトライコーム、葉の裏で最少 12.7、最大 134.4 のトライコームがみられ、初期の葉よりトライコームが発生していた (データ未掲載)。また、第 1/2 葉から葉の表よりも裏でのトライコーム数が多いことが明らかとなった。ダイズのトライコームの発生様式は、初期の葉から裏表にトライコームが見られ、トライコーム数は葉の表側に比べ、裏側の方で多くなるが、シロイヌナズナやトウモロコシでは、初期の葉の裏側にはトライコームが発生しておらず、ダイズとは大きく異なる。また、トライコーム数の急激な変化は「エンレイ」を含む多数の系統で認められたが、それとは異なる系統も多数存在した。これらのことより、トライコームの急激な増加は、ダイズに共通する JA 相転換による形態変化ではないこと、さらには植物種間で共通する形態変化ではないことが示唆された。

托葉の変化

世界のダイズコアコレクション 11 系統と「エンレイ」の托葉を調査した結果、托葉の葉身長はあまり大きな変化がなく、葉身幅が大きく変化した (Fig. 1-7)。葉身長と葉身幅の比率を各系統で比べると、「エンレイ」は Yoshikawa et al. (2013) と同様に第 5 葉以降は一定の値を示した (Fig. 1-8)。同様に、8 系統の托葉の葉身長と葉身幅の比率も第 5 葉以降は一定の値を示した (Fig. 1-8)。その他の 1 系統では第 4 葉以降、2 系統では第 6 葉以降で葉身長と葉身幅の比率が一定の値を示した (Fig. 1-8)。以上の結果より、Yoshikawa et al. (2013) が報告した托葉の葉身長と葉身幅の比率がある葉位から一定になるという現象は、ダイズに共通する形態変化であることが示唆された。ダイズの托葉は、茎頂や葉原基、発達中の葉を保護する役割があるとされている。托葉は葉原基から分化して形成され、托葉自身は同じ葉原基から発達する葉よりも生長が早く、葉の小葉が形成される頃に托葉は生育停止をすることが報告されている (Boerma and Specht, 2014)。托葉は、葉の大きさが急激に変化する葉位よりも早期、もしくは同じ葉位で変化しているはずであると予想した。「エンレイ」のように葉の大きさが変化する葉位と托葉が変化する葉位が一致する系統が存在したが、葉の大きさが急激に変化する葉位よりも、托葉が変化する葉位が遅れる系統も存在した。このことから、托葉は JA 相転換によって葉の大きさが急激に変化すると同時に、もしくは、遅れて変化することが示唆された。

第 2 章

日長は JA 相轉換のステージを制御している

序論

植物の JA 相転換に深く関与していると認識されている遺伝子として、*microRNA (miR) 156* と *miR172* が存在する。前述したようにシロイヌナズナやイネ、トウモロコシにおいて、*miR156* と *miR172* は、生育の初期と後期において相対する発現パターンを示すことが知られている (Lauter et al., 2005; Wu et al., 2009; Tanaka et al., 2011)。ダイズにおいても、同様の遺伝子発現パターンを示すことが報告されている (Yoshikawa et al., 2013)。また、シロイヌナズナでは、日長や系統によって JA 相転換が異なること、光受容体であるフィトクロムやクリプトクロム、概日時計に関する *GI* などが *miR172* の発現に影響を与えることが報告されている (Telfer et al., 1997; Jung et al., 2007)。ダイズの花芽形成時の *miR156* の発現量は、短日条件よりも長日条件で発現量が高く、その発現量は、*E1*、*E2*、*E3*、*E4* 遺伝子座の遺伝子型によって異なる (Cao et al., 2015)。また、*miR172* の発現量は、日長や *E3*、*E4* 遺伝子座によって影響されることも報告されている (Zhao et al., 2015)。しかし、*miR156* と *miR172* の発現パターンが初期の栄養生長期において、*E* 遺伝子座の遺伝子型や日長によって、影響されるのかは報告されていない。本章では、感光性の弱い品種である「エンレイ」と感光性の強い品種である「Peking」を異なった日長条件で生育させ、葉の形態、および *miR156* と *miR172* の発現量について発達段階を追って調査することによって、感光性と日長条件が JA 相転換に与える影響を明らかにすることを目的とした。

材料及び方法

植物材料と栽培条件とサンプリング

植物材料には、ダイズ品種の「エンレイ」と「Peking」を用いた。人工気象器（日本医化機械製作所、大阪、日本）にて、光強度を $495.8\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に設定し、短日条件（明期 10h／暗期 14h、25°C）、及び長日条件（明期 16h／暗期 8h、25°C）で栽培した。播種は長日条件で行い、子葉展開時（Coty 区）、第 1, 2 葉展開時（1/2 区）、第 3 葉展開時（3rd 区）、第 4 葉展開時（4th 区）、第 5 葉展開時（5th 区）、第 6 葉展開時（6th 区）、第 7 葉展開時（7th 区）に短日条件へ移行する処理区と長日条件のみで生育する処理区（LD 区）を設定した。*microRNA* の発現解析に用いる葉の試料は、Coty 区と LD 区の各葉位の葉が展開した日の明期開始時に採取した。

開花日と葉の形態調査

短日条件へ移行した「エンレイ」と「Peking」では、花芽が形成されても花弁が開かない閉鎖花となる場合があったため、各処理区と LD 区の開花を比較する際に、最初に花芽が形成された日を開花日とした。開花日数は、子葉が展開した日から開花日までの日数（Days After Cotyledon : DAC）とし、開花時葉数は、開花時まで主茎で展開した葉数を計測した。また、短日条件へ移行

してから開花するまでの日数も計測した。

葉の大きさ（葉身長と葉身幅）と葉柄長は、「Peking」の LD 区以外の全ての処理区で開花後に計測を行った。「Peking」の LD 区は開花が遅かったため、播種後 60 日目に第 1/2 葉から第 9 葉まで計測し、第 10 葉以降の葉位は開花後に計測を行った。葉の大きさは、単葉、および、複葉の中央の小葉における葉身長と葉身幅を葉位ごとに測定した。葉柄の長さは各葉位の葉柄長を測定した。開花日、及び、葉の形態調査は、各処理区（Coty~7th、LD）で 4 個体以上を用いた。葉の大きさの生長率は第 1 章と同様の式で算出し、葉のサイズ（葉身長と葉身幅）の生長率が最も高い値となる葉位を Maximum Leaf Growth Ratio (MLR) とした。最も葉柄長が長い葉位を Largest Petioles Size (LPS) とした。

RNA のポリアデニル化と Real-time qPCR

全 RNA は、サンプリングした葉から RNAiso (TaKaRa Bio, 滋賀, 日本) を用いて抽出した。Poly(A) Tailing Kit (Invitrogen, California, U.S.A) を用い、マニュアルに従って RNA のポリアデニル化を行った (Shi and Chiang, 2005)。20 μ L の反応液となるように 2 μ g の RNA に ATP、poly(A) polymerase (PAP)、MnCl₂、PAP buffer を調整し、37°C で 1 時間インキュベートした。ポリアデニル化した RNA は、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿で精製した。逆転写反応には、精製した 300 ng の RNA に 10 mM の dNTP (TOYOBO)、

50 mM Poly (T) adapter を加え、65°Cで 5 分間インキュベートした。その後、氷上で 1 分間以上インキュベートし、10 x RT buffer (TOYOBO)、25 mM MgCl₂ (TOYOBO)、0.1 mM DTT、40 U RNase Inhibitor Recombinant-type (TOYOBO)を反応液が 20 μL となるように加え、50°Cで 50 分間、85°Cで 5 分間の順でインキュベートした。さらに、12 U ribonuclease H (TaKaRa Bio)を添加し、37°Cで 20 分間インキュベートした。Real-time qPCR に用いる反応液は、100 倍希釈した cDNA 8 μL に 10 μL の THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)とそれぞれの遺伝子に対応する 6 pmol のフォワードプライマー (GmmiR156 primer_F, GmmiR172 primer_F) と 6 pmol のリバースプライマー (reverse primer) を加え、最終的に 20 μL の反応液となるようにした。実験に用いたプライマーは、Table 2-1 に示した。PCR は Thermal Cycler Dice Real Time System Single (TaKaRa Bio) を用い、初期変性 (95°C、30 秒)、変性 (95°C、15 秒)、アニーリング (遺伝子によって 58°C、もしくは、60°C、15 秒)、伸長反応 (72°C、30 秒) を 40 サイクル行った。*miRNA* の発現レベルは、Yoshikawa et al. (2013) に従って、同じ cDNA より測定した *ACT2/7* で標準化した。

Table 2-1 第2章で用いたプライマー

プライマー	配列 (5' - 3') ^a	引用
Poly (T) adapter	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGG(T) ₁₂ VN	Shi and Chiang 2005
GmmiR156 primer_F	TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	
GmmiR172 primer_F	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	
reverse primer	GCGAGCACAGAATTAATACGAC	Shi and Chiang 2005
GmACT2/7 primer_F	CTTCCCTCAGCACCTTCCAA	Jian et al. 2008
GmACT2/7 primer_R	GGTCCAGCTTTCACACTCCAT	Jian et al. 2008

^a: V=A, G, C N=A, T, G, C

結果

日長に対する反応

「エンレイ」の各処理区の開花日数（±標準誤差）を比較すると、Coty 区は 21.1 (± 0.2) DAC、1/2 区は 22.2 (± 0.6) DAC、3rd 区は 24.0 (± 0.3) DAC、4th 区は 24.1 (± 0.3) DAC、5th 区は 24.5 (± 0.4) DAC、6th 区は 25.2 (± 0.3) DAC、7th 区は 24.1 (± 0.4) DAC、LD 区は 26.6 (± 0.3) DAC となり、3rd~7th 区では、約 24 DAC で開花した (Fig. 2-1A)。3rd~7th 区に対し、Coty 区と 1/2 区では開花日数が 2~3 日程度短くなり、LD 区では開花日数が 2 日程度増加した。各処理区の開花時葉数についてみると、Coty 区は 7.6 (± 0.2)枚、1/2 区は 7.8 (± 0.2)枚、3rd 区は 8.8 (± 0.2)枚、4th 区は 9.1 (± 0.1)枚、5th 区は 8.7 (± 0.5)枚、6th 区は 9.0 (± 0.3)枚、7th 区は 8.8 ± (0.2)枚、LD 区は 8.7 (± 0.1)枚であった (Fig. 2-1B)。また、Coty 区と 1/2 区の開花時葉数は、3rd 区~7th 区や LD 区よりも若干少なかった。短日条件へ移行してから開花までの日数についてみると、Coty 区は 21.6 (± 0.2)日、1/2 区は 20.8 ± (0.4)日、3rd 区は 18.8 (± 0.2)日、4th 区は 17.1 (± 0.4)日、5th 区は 13.1 (± 0.2)日、6th 区は 9.9 (± 0.9)日、7th 区は 4.6 (± 0.5)日であった (Fig. 2-1C)。

「Peking」における各処理区の開花日数は、Coty 区で 20.8 (± 0.2) DAC、1/2 区で 21.7 (± 0.4) DAC、3rd 区で 25.3 (± 0.2) DAC、4th 区で 28.2 (± 0.8) DAC、5th 区で 33.3 (± 0.3) DAC、6th 区で 38.0 (± 0.4) DAC、7th 区で 42.3 (± 1.6) DAC

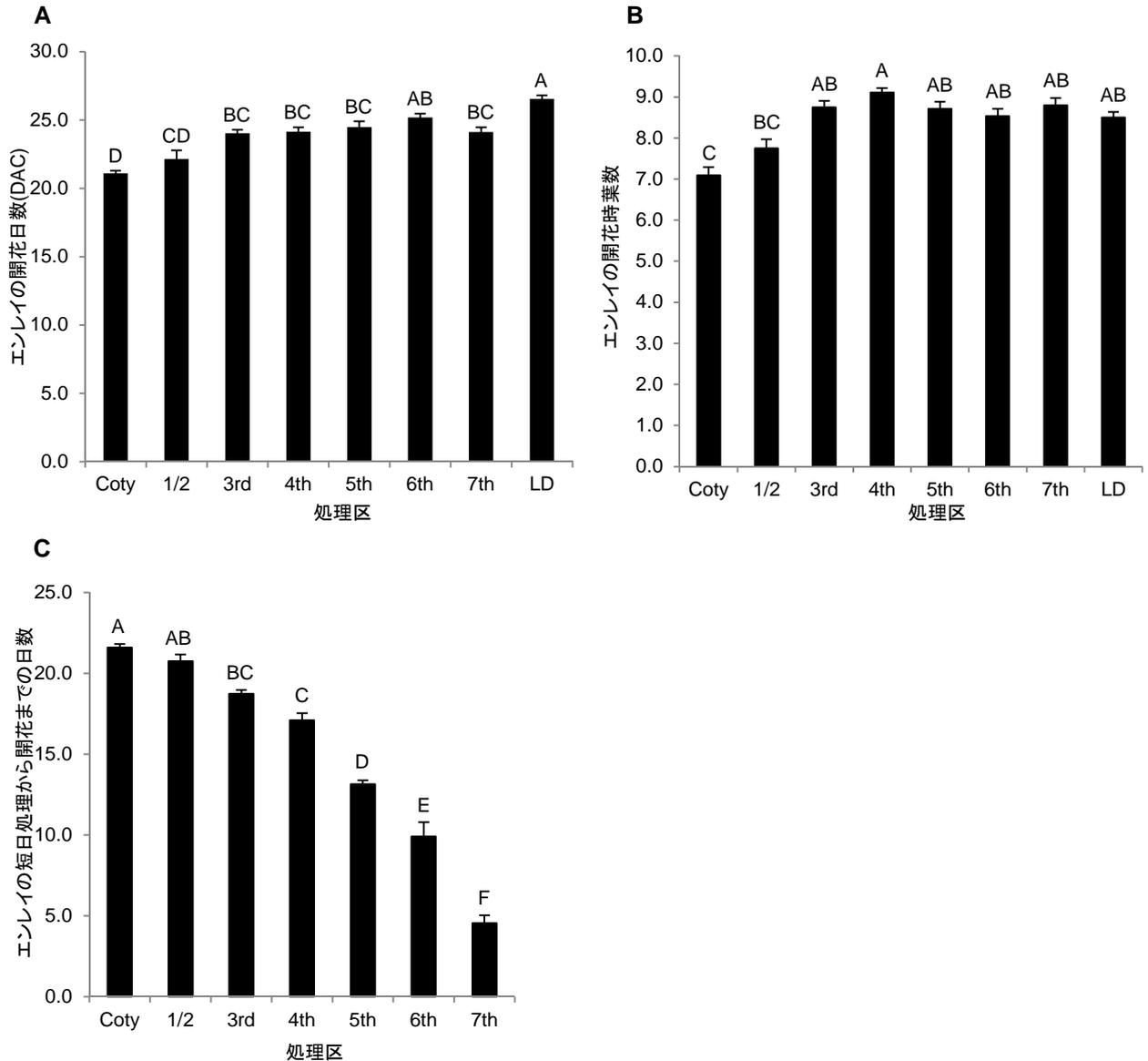


Fig. 2-1 エンレイの各処理区とLDの開花形質

(A) エンレイにおける各処理区とLDの開花日数を示した。開花日数は子葉が展開してから開花までの日数(DAC)によって評価した。

(B) エンレイにおける各処理区とLDの開花時葉数を示した。

(C) エンレイにおける各処理区とLDの短日条件へ移行してから開花するまでの日数を示した。

グラフ内の異なるアルファベットは、Tukey-Kramer HSD検定によって1%水準で有意に差が認められたことを表す。エラーバーは標準誤差を示す。

LD 区で 67.4 (± 1.1) DAC となり、生育が進んだ葉位で短日条件へ移す処理区ほど、開花日数が有意に増加した (Fig. 2-2A)。また、LD 区では、各処理区に比べ、開花日が大きく遅れた。開花時葉数を各処理区で比較すると、Coty 区は 5.8 (± 0.1)枚、1/2 区は 6.2 (± 0.2)枚、3rd 区は 7.8 (± 0.2)枚、4th 区は 8.5 (± 0.3)枚、5th 区は 9.8 (± 0.2)枚、6th 区は 10.1 (± 0.2)枚、7th 区は 10.3 (± 0.4)枚、LD 区は 17.1 (± 0.2)枚であり、開花時葉数は Coty~6th 区で 1 枚程度ずつ異なったが、6th 区と 7th 区では同様の葉数であった (Fig. 2-2B)。LD 区では、各処理区よりも開花時葉数が最も大きかった。短日条件へ移行してから開花までの日数を各処理区で比較すると、Coty 区は 20.2 (± 0.2)日、1/2 区は 20.4 (± 0.5)日、3rd 区は 19.7 (± 0.2)日、4th 区は 19.6 (± 0.2)日、5th 区は 20.7 (± 0.2)日、6th 区は 20.8 (± 0.1)日、7th 区は 20.0 (± 1.2)日であり、全処理区とも、短日条件へ移行してから 20 日程度で開花した (Fig. 2-2C)。

「エンレイ」における葉の表現型

前述したように自然日長条件下の「エンレイ」では、第 5 葉の葉身長と葉身幅が急激に大きくなり、この現象が JA 相転換の指標になると報告されている (Yoshikawa et al., 2013)。しかし、異なった日長条件において、「エンレイ」の葉の大きさを調査した報告はなく、日長条件が JA 相転換にどのような影響を与えるのかわかっていない。そこで、短日処理区と LD 区の葉身長と葉身幅、葉柄長について計測し、日長条件によって葉の大きさが急激に変化する葉位が

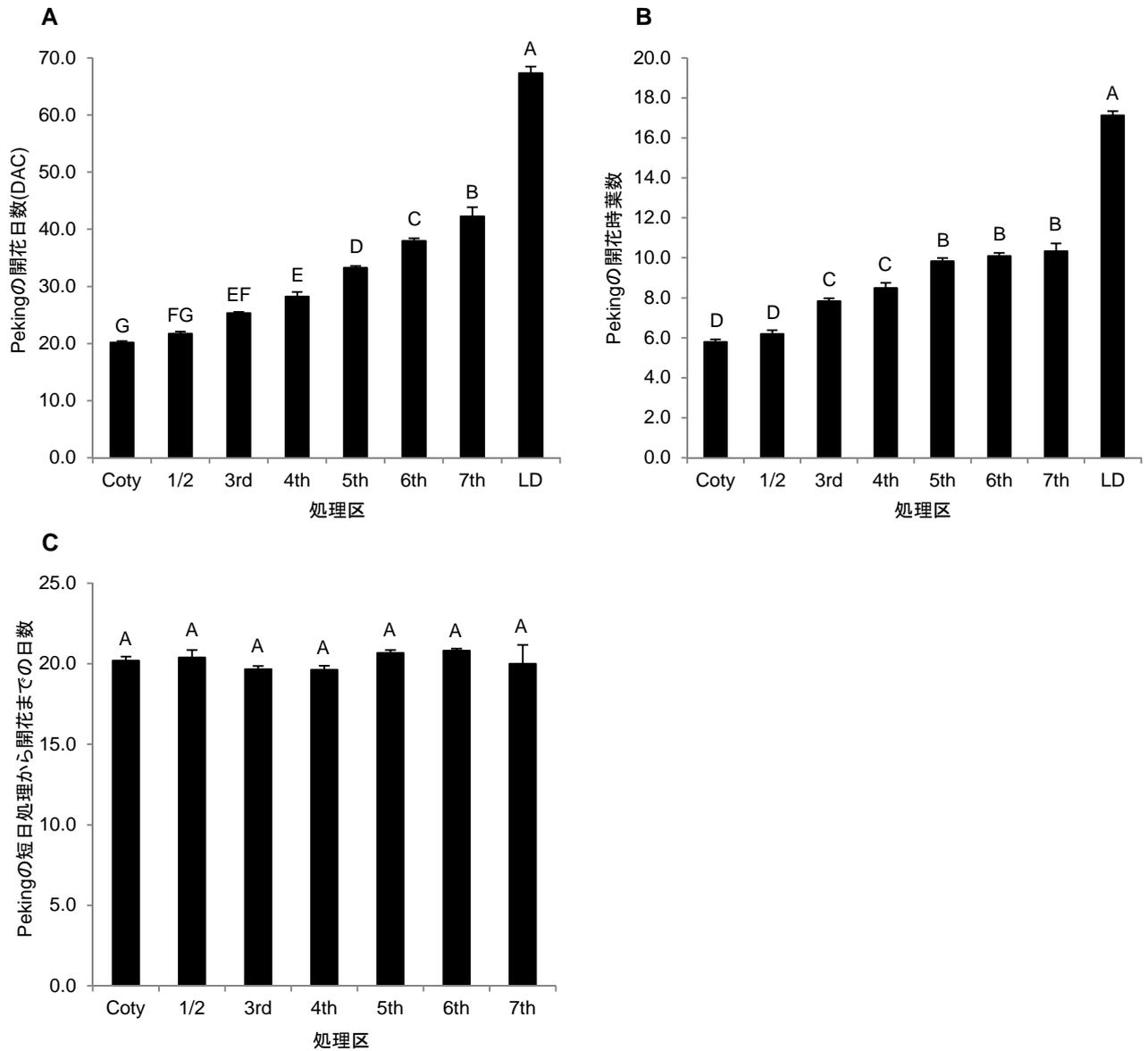


Fig. 2-2 Pekingの各処理区とLDの開花形質

(A) Pekingにおける各処理区とLDの開花日数を示した。開花日数はDACによって評価した。

(B) Pekingにおける各処理区とLDの開花時葉数を示した。

(C) Pekingにおける各処理区とLDの短日条件へ移行してから開花するまでの日数を示した。

グラフ内の異なるアルファベットは、Tukey-Kramer HSD検定によって1%水準で有意に差が認められたことを表す。エラーバーは標準誤差を示す。

異なるのかを調査した。各短日処理区の葉身長は、第 5 葉で大きさが急激に変化していた (Fig. 2-3A)。LD 区では、葉身長は第 5 葉あるいは第 6 葉で大きく変化していた (Fig. 2-3A)。すべての区において、第 3 葉においても葉身長が急激に大きくなったが、葉の形態が単葉である第 1/2 葉から複葉である第 3 葉へと大きく変化したためと考えられる (Fig. 2-3A)。葉身幅においても、葉身長の結果と同様に、短日処理区では第 5 葉で、LD 区では第 5 葉あるいは第 6 葉で急激に葉身幅が変化した (Fig. 2-3B)。MLR (葉の生長率が最も高くなる葉位) を各短日処理区で比較すると、どの処理区においても MLR はおよそ第 5 葉であった (Fig. 2-5A)。一方、LD 区の MLR は、それより少し遅れた葉位であった (Fig. 2-5A)。

葉柄は葉と茎の間に存在する部分であり、葉と同じ原基より分化する器官である。葉柄長を測定したところ、各短日処理区ではおよそ第 5 葉まで、LD では第 6 葉まで葉柄長が増加している傾向が見られた (Fig. 2-3C)。LPS (葉柄長が最大になる葉位) は、各短日処理区ではおよそ第 5 葉であり、LD では第 6 葉であった (Fig. 2-5A)。すべての処理区で、MLR と LPS が同一の葉位であったことから、葉柄長は葉の大きさと同様に JA 相転換の指標となることが示唆された。

「Peking」における葉の表現型

「Peking」に関しても同様の調査を行った。各短日処理区の葉身長を比較す

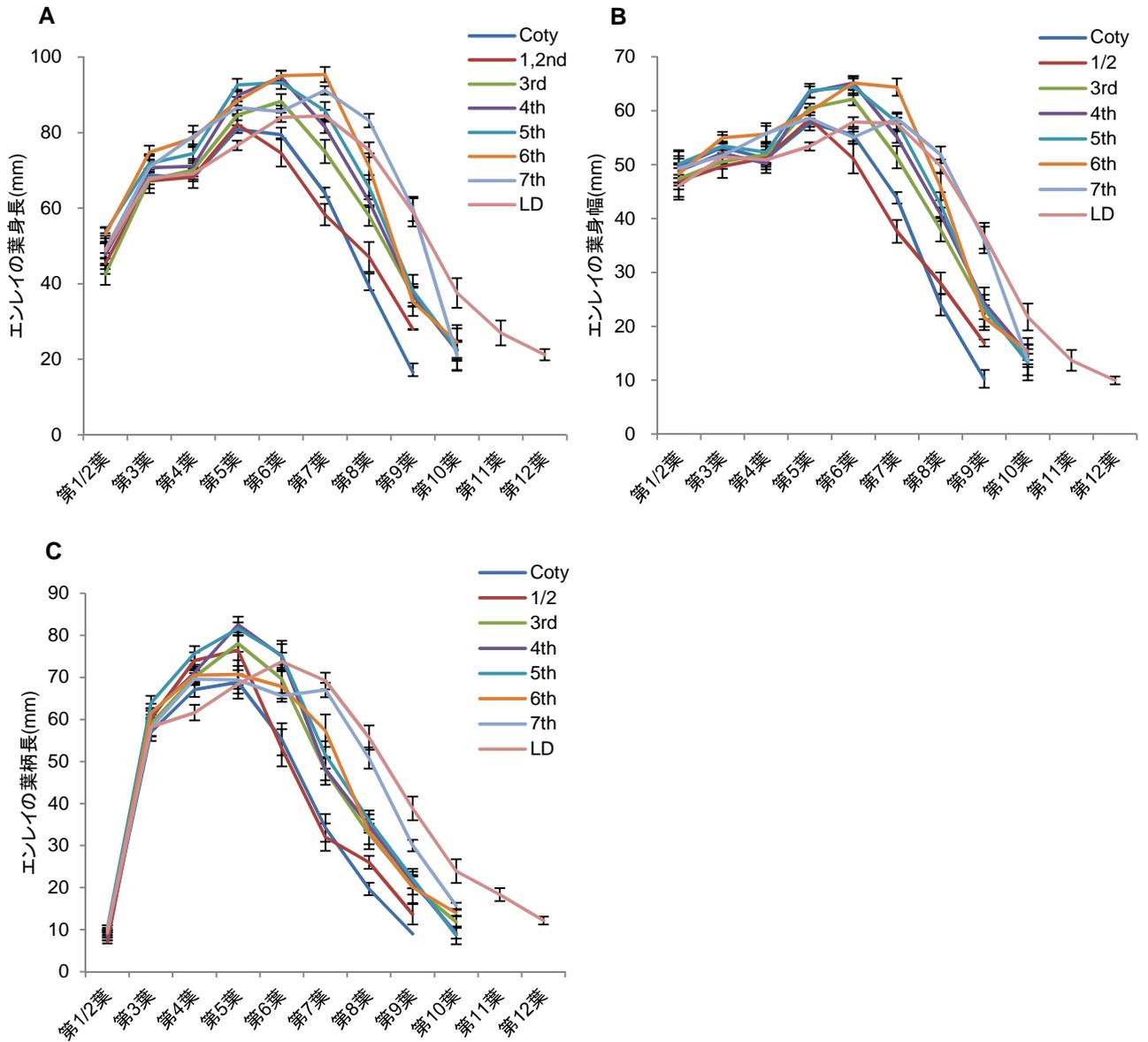


Fig. 2-3 エンレイの葉の表現型

(A) エンレイの各処理区とLDにおける各葉位の葉身長。
 (B) エンレイの各処理区とLDにおける各葉位の葉身幅。
 (C) エンレイの各処理区とLDにおける各葉位の葉柄長。
 エラーバーは、標準誤差である。

ると、処理区によって異なる葉位で葉身長が急激に大きくなることが示された (Fig. 2-4A)。Coty 区、1/2 区では、第 4 葉付近で葉身長が急激に増加した。3rd 区、4th 区、5th 区では、第 5 葉付近で葉身長が急激に増加した (Fig. 2-4A)。6th 区では第 6 葉付近、7th 区では第 7 葉付近で葉身長が急激に増加した (Fig. 2-4A)。各処理区の葉身幅は、葉身長の結果と同様であった (Fig. 2-4B)。各処理区の MLR は、後半の葉位で短日条件へ移行する処理区ほど葉位が後半にずれていた (Fig. 2-5B)。一方、LD 区において、葉身長と葉身幅は、第 5 葉と第 10 葉で急激に大きくなった (Fig. 2-4A, E, 2-5B)。葉柄長を計測すると、LPS は各短日処理区や LD 区によって異なる葉位に位置し、この結果は MLR と類似していた (Fig. 2-4A, C, 2-5B)。感光性の強い「Peking」では、処理区によって、葉の大きさと葉柄長が著しく増加する葉位が異なった。

***miR156* と *miR172* の発現量に及ぼす感光性と日長の影響**

ダイズ品種の「エンレイ」においても、栄養生長期の前半では *miR156* の発現量が高く、栄養生長期の後半になると *miR172* の発現量が高くなることが知られている (Yoshikawa et al., 2013)。また、開花期を制御する遺伝子座 *E1*、*E2*、*E3*、*E4* が花芽形成時の *miR156* の発現量に影響を与えることが報告されている (Cao et al., 2015) が、4 つの *E* 遺伝子座が栄養生長期の *miR156* と *miR172* の発現量に及ぼす影響については明らかになっていない。*E* 遺伝子座が異なる「エンレイ」 (*E1e2e3E4*) と「Peking」 (*e1-pE2E3E4*) を用いて、

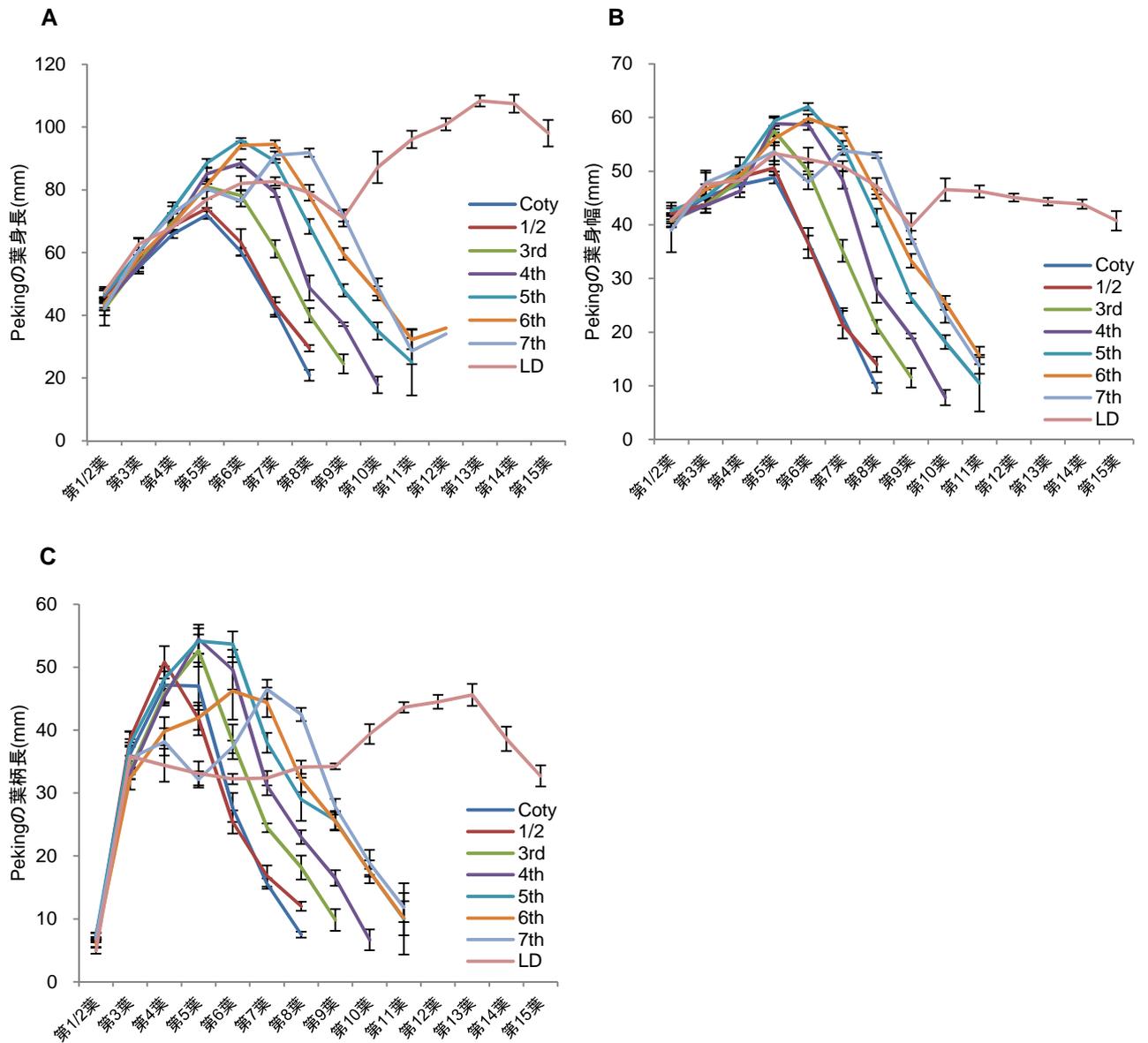


Fig. 2-4 Pekingの葉の表現型

(A) Pekingの各処理区とLDにおける各葉位の葉身長。

(B) Pekingの各処理区とLDにおける各葉位の葉身幅。

(C) Pekingの各処理区とLDにおける各葉位の葉柄長。

エラーバーは、標準誤差である。

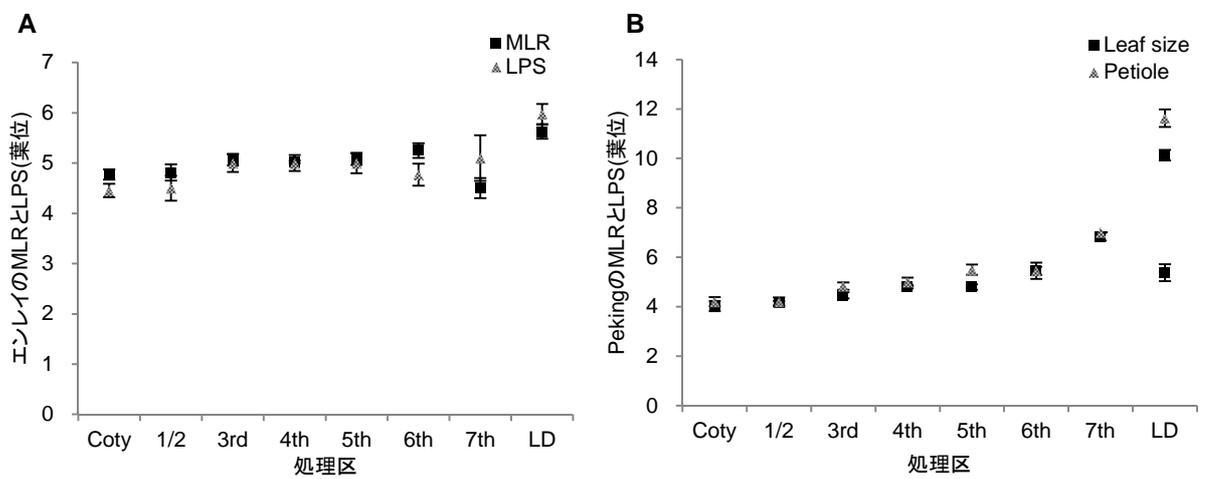


Fig. 2-5 エンレイとPekingのMLRとLPSが位置する葉位
 (A) エンレイの各短日処理区とLDにおいて、MLRとLPSが位置する葉位を示した。
 (B) Pekingの各短日処理区とLDにおいて、MLRとLPSが位置する葉位を示した。
 MLR: 葉の生長率が最も大きい葉位を表す。LPS: 葉柄長が最も大きい葉位を表す。

初期生育の各葉位展開時の *miR156* と *miR172* の発現について解析を行った。また、栄養生長期の *miR156* と *miR172* の発現に及ぼす日長の影響を調査した。

「エンレイ」において、Coty 区では、*miR156* の発現が第 4 葉まで増加するが、第 5 葉以降は発現量が減少した (Fig. 2-6A)。Coty 区に対し、LD 区の *miR156* は、第 6 葉展開時まで高い発現量を維持していた (Fig. 2-6A)。*miR172* は、Coty 区と LD 区の両方で後半の葉位になるにつれて発現量が徐々に増加したが、LD 区では第 6 葉以降は *miR172* の発現量が急激に減少した (Fig. 2-6B)。

「Peking」の *miR156* の発現は、Coty 区ではどの葉位においても非常に低かったが (Fig. 2-6C)、LD 区においては、第 4 葉まで Coty 区より 15 倍程度高く、第 5 葉以降は減少した (Fig. 2-6C)。一方、「エンレイ」の Coty 区と LD 区を比較すると「Peking」ほどの大きな差が見られなかった (Fig. 2-6A, C)。また、

「エンレイ」の Coty 区と LD 区に比べ、「Peking」は、Coty 区では *miR156* の発現量が低く、LD 区では *miR156* の発現量が高かった (Fig. 2-6A, C)。

「Peking」の Coty 区では、後半の葉位展開時になると、*miR172* の発現量が増加した (Fig. 2-6D)。LD 区では、第 4 葉展開時まで *miR172* の発現量が増加したが、第 5 葉展開時以降は減少した (Fig. 2-6D)。「エンレイ」の Coty 区と

「Peking」の Coty 区において、*miR172* は同じ発現パターンを示し、後半の葉位が展開する時期ほど増加した (Fig. 2-6B, D)。「エンレイ」の LD 区と「Peking」の LD 区とも *miR172* の発現量は後半の葉位で減少するが、「Peking」の方が早い葉位で発現量が減少した (Fig. 2-6B, D)。

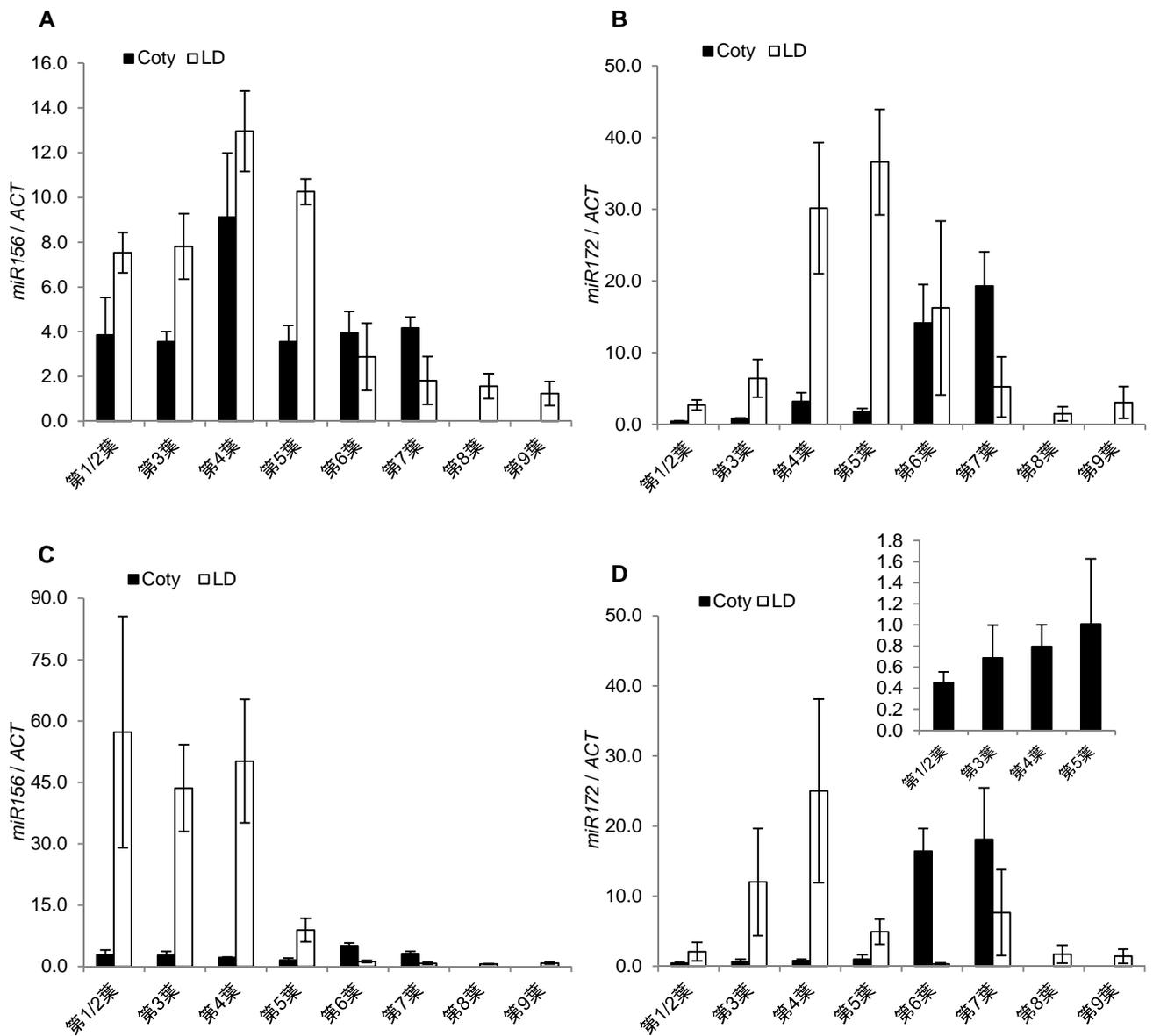


Fig. 2-6 エンレイ(A and B)とPeking(C and D)における $miR156$ と $miR172$ の発現量

(A) エンレイのCotyとLDにおける各葉位展開時の $miR156$ の発現量。

(B) エンレイのCotyとLDにおける各葉位展開時の $miR172$ の発現量。

(C) PekingのCotyとLDにおける各葉位展開時の $miR156$ の発現量。

(D) PekingのCotyとLDにおける各葉位展開時の $miR172$ の発現量を示した。内部のグラフは、Cotyにおける1/2~5th展開時の $miR172$ の発現量を表す。

$miR156$ と $miR172$ の発現量は、 $ACT2/7$ の発現量によって、ノーマライズした。発現量の測定には3個体以上を用いた。エラーバーは標準誤差を示す。

考察

「エンレイ」と「Peking」の感光性の違い

本章では、異なる日長条件区を設け、「エンレイ」と「Peking」の感光性について比較した。「エンレイ」の各短日処理区 (Coty~7th) や LD 区では、開花日数 (DAC) が 2~3 日程度、開花時葉数も 1~2 枚程度異なり、処理区間で大きな差がないことが示された (Fig. 2-2A, B)。また、多くの葉を展開した後に短日条件へ移行した処理区ほど、短日条件へ移行してから開花までの日数が短縮された (Fig. 2-2C)。「エンレイ」では、各処理区の開花日数が短日による影響をあまり受けず、おおよそ同じ日数で開花したため、多くの葉数が展開してから短日条件へ移行する処理区ほど移行後から開花までの日数が短くなっていた。一方、「Peking」において、各短日処理区と LD 区は、開花日数や開花時葉数が日長の影響を大きく受けていた (Fig. 2-3A, B)。以上のことより、「エンレイ」は開花に対する日長の影響が小さく、感光性が弱いこと、「Peking」は日長の影響を大きく受け、感光性が強いことが認められた。ダイズにおいて、*E1*、*E2*、*E3*、*E4* の 4 つの *E* 遺伝子座は開花期と成熟期をコントロールしていることが知られている (Liu et al., 2008; Watanabe et al., 2009, 2011; Xia et al., 2012)。*E1* 遺伝子座より同定された遺伝子は転写因子であるとわかっているが、シロイヌナズナなどでホモログが見つかっておらず、ダイズ特異的な遺伝子であり、長日条件において開花を抑制していることが報告されている

(Xia et al., 2012)。E2 遺伝子座は、シロイヌナズナの *GI* のオーソログである *GmGla* をコードしており、この遺伝子座が機能型であると、自然日長条件下で開花が遅れることが報告されている (Watanabe et al., 2011)。また、E3 遺伝子座は *phytochrome A* 遺伝子である *GmPhyA3* をコードしており、*GmPhyA3* の機能を失っている突然変異体では、長日条件において野生型より開花が早くなることが報告されている (Watanabe et al., 2009)。「エンレイ」の *E* 遺伝子座は *E1e2e3E4* であり、「Peking」の *E* 遺伝子座は *e1-pE2E3E4* であり、自然条件下で「Peking」は「エンレイ」よりも開花期が遅くなる (Tsubokura et al., 2014)。「Peking」では、*E1* の上流で 1 塩基の置換があり、「エンレイ」との F₂ 集団を用いた解析から、「Peking」の *e1-p* は劣性の遺伝子であると推測されている (Tsubokura et al., 2014)。また、「エンレイ」は、劣性の *e2* と *e3* によって開花が早まっていることが報告されている (Yamada et al., 2012)。以上のことより、本研究における「エンレイ」は感光性が弱く、「Peking」は感光性が強いという 2 品種間の開花に関する感光性の違いは、上記の先行研究の報告と一致する。さらに、「Peking」は、どの処理区においても短日条件へ移行してから開花に至るまでに 20 日程度の日数を要することを明らかにした。

感光性に違いによる葉の表現型の変化

「エンレイ」では JA 相転換によって第 5 葉の大きさが急激に変化すること

が報告されているが、日長条件に影響を受けるのかは明らかにされていなかった (Yoshikawa et al., 2013、本論文第 1 章)。本章において、「エンレイ」では、日長条件に依存せずに第 5 葉付近で葉の大きさが急激に変化することが示された (Fig. 2-3A, B)。この結果より、「エンレイ」の JA 相転換は日長の影響を受けず、一定の時期に起きることが推察された。一方、「Peking」では短日条件に反応して、各短日処理区や LD 区によって異なる葉位で葉の大きさが急激に変化した (Fig. 2-4A, B)。シロイヌナズナの ecotype である Col、Ler、Ws を長日条件で生育すると、短日条件で生育するよりも早い生育段階で葉の裏面にトライコームが形成されることが報告されている (Telfer et al., 1997)。これらのことより、「Peking」は、日長によって JA 相転換がコントロールされていることが示唆され、短日条件は JA 相転換を促進し、長日条件は JA 相転換を遅延させることが考えられた。

「Peking」の LD 区において、葉身長と葉身幅は、第 5 葉と第 10 葉で急激に変化することが示された (Fig. 2-4D, E)。LD 区では、開花まで日数がかかり、前半に展開した葉位の葉が黄化し、枯死しそうになったため、第 1/2 葉～第 9 葉までを播種後 60 日目に植物体から除去・採取し、他の葉位を開花後に採取した。第 1/2 葉～第 9 葉を植物体から除去したことがその後の葉位の葉の生長に影響を与え、第 10 葉で葉身長と葉身幅が急激に変化した原因になったと推測し、再度「Peking」を LD 条件にて、黄化した下位葉を除去・採取せずに生育し、開花後に葉身長と葉身幅を計測した結果、第 10 葉で葉の大きさが急激に変化することを確認した (データ未掲載)。以上のことより、LD 区で第 10

葉の葉の大きさが急激に変化した原因としては、LD 区の「Peking」でこれまでに知られていない何かしらの生長相の転換が起きたことが考えられる。

「エンレイ」と「Peking」の葉柄長の LPS は、葉の大きさの MLR と近い葉位に位置していた (Fig. 2-5A, B)。葉と葉柄は、shoot apical meristem の周辺から形成される葉原基から同じく分化する (Ichihashi and Tsukaya, 2015)。シロイヌナズナにおいて、葉の裏面にトライコームが形成される葉位と葉柄長が長くなる葉位は一致していることが報告されている (Jung et al., 2011)。これらのことより、ダイズにおいても葉柄長は JA 相転換によって起こる形質の 1 つになりうることが考えられる。

***miR156* と *miR172* の発現量に対する日長の影響**

「エンレイ」と「Peking」の Coty 区と LD 区における *miR156* と *miR172* の発現量を解析した。「Peking」において、Coty 区は *miR156* の発現量が常に低く、LD 区は Coty 区よりも顕著に *miR156* の発現量が高かった (Fig. 2-6C)。

「エンレイ」においては、Coty 区と LD 区の *miR156* の発現量に大きな差は見られなかったが、LD 区が Coty 区よりも若干 *miR156* の発現量が高い傾向にあった。花芽形成時の *miR156* の発現量は、4 つの *E* 遺伝子座 (*E1*、*E2*、*E3*、*E4*) と生育条件 (長日条件、短日条件) によって左右されることが報告されている (Cao et al., 2015)。これらの結果より、*miR156* の発現量は、栄養成長期においても感光性と日長によって変化することが示唆された。感光性の強い

「Peking」では、短日条件によって *miR156* の発現が抑制され、長日条件によって *miR156* の発現が促進されていると予想される。そのため、葉の大きさが急激に変化する葉位が処理区によって異なると考えられる。一方、「エンレイ」では、感光性が弱いために日長条件が *miR156* の発現にあまり大きな影響を与えず、一定の葉位で葉の大きさが急激に変化することが考えられる。「エンレイ」と「Peking」の Coty 区では、*miR172* の発現量が生育とともに増加し (Fig. 2-6B, D)、Yoshikawa et al. (2013) と同様の結果であった。一方、「エンレイ」と「Peking」の LD 区では、生育に伴って *miR156* の発現は減少するが、途中から *miR172* の発現も減少した (Fig. 2-6B, D)。シロイヌナズナにおいては、*miR172* の発現は *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) 9*、*SPL10* によって促進されており、*SPL9*、*SPL10* は *miR156* によって発現が抑制されていることが報告されている (Wu et al., 2009; Zhu and Helliwell, 2011)。また、*GI* が日長に反応して *miR172* 生合成に影響を与えることも報告されている (Jung et al., 2007; Zhu and Helliwell, 2011)。本研究の LD 区における *miR172* の発現量の減少は、長日条件に反応した *SPL9*、*SPL10*、*GI* による影響の可能性が考えられる。また、「エンレイ」における LD 区の *miR172* の発現が「Peking」における LD 区の *miR172* の発現より高い傾向があるのは、感光性の違いによるものだと推察される。

第 3 章

日長に反応する JA 相轉換の因子の解析

序論

シロイヌナズナでは、*miR156* によって *Squamosa promoter binding protein like (SPL)s* の発現が抑制されており、*SPLs* は *miR172* の発現や葉形、トライコームの分布に関与することが知られている (Wu, 2006; Wu et al., 2009; Shikata et al., 2009)。また、*miR172* は、*SPL9* が *miR172* の転写開始位置の上流に結合することで転写が促進され、*DICLER-LIKE 1 (DCL1)* や *SERRATE (SE)* といったタンパク質によって mRNA から *pri-miR172*、*pre-miR172*、*mature-miR172* の順に生合成が進み、*mature-miR172* はターゲット遺伝子の mRNA を分解する (Wu et al., 2009; Teotia and Tang, 2015; Zhang et al., 2015)。シロイヌナズナでは、*GI* が *DCL1* や *SE* を介し、*miR172* の発現量を調節することが知られている (Jung et al., 2007)。シロイヌナズナと同様にダイズにおいても、開花時に *GmSPL3, 9* の発現が高いことや、*GmSPLs* の塩基配列によって *miR156a/b* の発現抑制を受けるものと受けないものが存在することが報告されている (Cao et al., 2015; Tripathi et al., 2017)。しかし、ダイズの生育に伴う *GmSPLs*、*DCL1*、*SE* の発現量の変化、日長に対する反応は不明である。本章では、品種による感光性の違いや日長によってダイズの *SPLs* や *DCL1*、*SE* の発現量がどのように変化するのか解析した。

また、第 2 章では、異なる日長条件下で「エンレイ」と「Peking」の葉の大きさや *miR156* と *miR172* の発現レベルなどの JA 相転換に関する形質を解析し、*E2* と *E3* 遺伝子座が JA 相転換に関与する可能性を示唆した。しかし、*E2*、*E3* 遺伝子座それぞれの JA 相転換への効果については、不明であった。そこで、本章では、感光

性に関与している *E2*、*E3* 遺伝子座の JA 相転換における効果について解析した。

材料及び方法

植物材料と生育条件

植物材料には、ダイズ品種の「エンレイ」、「Peking」、*E* 遺伝子座の準同質遺伝子系統 (near isogenic lines、NILs)として、「エンレイ」に「Peking」の *E2*、あるいは、*E3* 遺伝子を導入した *En_E2*と *En_E3*を用いた (Table 3-1)。なお、NILs は国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構より分譲を受けた。栽培は、人工気象器 (日本医化機械製作所、大阪、日本) にて、光強度を $495.8\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 程度に設定し、明期 10h /暗期 14h、25°Cの短日 (SD) 条件、もしくは、明期 16h /暗期 8h、25°Cの長日 (LD) 条件で行った。発現解析に用いる試料は、SDとLD条件で生育した系統の各葉位の葉が展開した日の明期開始時に採取した。

RNA 抽出と逆転写

RNA は、RNAiso (TaKaRa Bio) を用い、サンプリングした葉より抽出した。抽出した RNA の逆転写には、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用い、取扱説明書に従い行った。

*miR172*の解析には、第2章と同様の方法を用い、抽出した RNA をポリアダニル化し、精製、逆転写を行った。

Table 3-1 本章で用いた系統とE遺伝子型

ID	系統	E 遺伝子座
En	エンレイ	E1e2e3E4
En_E2	E2遺伝子のNIL	E1e2e3E4
En_E3	E3遺伝子のNIL	E1e2E3E4
Pe	Peking	e1-pE2E3E4

GmSPLs, *GmDCL1*, *GmSE*, *miR172*の発現解析

発現解析には、semi-quantitative RT-PCR、または real-time qPCR で行った。本章で用いたプライマーを Table 3-2 に示す。semi-quantitative RT-PCR には、10 倍希釈した cDNA を 3 μ L、Quick Taq® HS DyeMix (TOYOBO) を 10 μ L、解析対象の遺伝子に特異的な 10 pmol プライマーを 0.4 μ L、滅菌水を 6.2 μ L と全量が 20 μ L となるように混合した。PCR 反応は、GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, California, U.S.A) を用い、初期変性 (94°C、2 分)、変性 (94°C、30 秒)、アニーリング (遺伝子によって 55°C、もしくは 60°C、30 秒)、伸長反応 (68°C、30 秒) を 30 サイクル繰り返した。PCR 産物は 2%アガロースゲル (Agarose XP、ニッポン・ジーン) で電気泳動し、確認した。遺伝子発現量の内部標準として、*GmACTIN (ACT) 2/7* を用いた。real-time qPCR に用いる反応液は、100 倍希釈した cDNA 8 μ L、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を 10 μ L、*SPL9c* と *SPL9d* に対応する 6 pmol プライマーを 0.6 μ L、滅菌水を 1.88 μ L 加えて、全量が 20 μ L となるように混合した。PCR 反応は Thermal Cycler Dice Real Time System Single (TaKaRa Bio) を用い、初期変性 (95°C、30 秒)、変性 (95°C、15 秒)、アニーリング (55°C、15 秒)、伸長反応 (72°C、30 秒) を 40 サイクル行った。miRNA の発現は、同じ cDNA より測定した *GmACT2/7* で標準化した。

miR172 の RT-PCR には、10 倍希釈した cDNA を 5 μ L、Quick Taq® HS

Table 3-2 第3章において用いたプライマー

プライマー	配列(5'-3')*	参考文献
GmSPL3a_F	GTATCACGGACTTTGATGAGA	Cao et al., 2015
GmSPL3a_R	TACCCACAGCAATTTTAGC	Cao et al., 2015
GmSPL3b_F	GTAGGAAAAAGAAGGTGGTG	Cao et al., 2015
GmSPL3b_R	CGTTGGTGCTGGTCTCCAAT	Cao et al., 2015
GmSPL3c_F	TCCTTCCGTACACATGGCAG	Cao et al., 2015
GmSPL3c_R	GAAATCATTGTCCATGGTAGC	Cao et al., 2015
GmSPL3d_F	TGGACACAAGCAGGTATGAG	Cao et al., 2015
GmSPL3d_R	GACCCTGATCTCTTCCATGGA	Cao et al., 2015
GmSPL9a_F	AATTTGCTGTGGCGTCTTTG	Cao et al., 2015
GmSPL9a_R	AGGCACAGATTCCTCATA	Cao et al., 2015
GmSPL9b_F	GTGTCCCGATCTTGGTCTA	Cao et al., 2015
GmSPL9b_R	GTAACAGATAGCATAGAAGTG	Cao et al., 2015
GmSPL9c_F	GAGCTAGCGCCTGGAAATCA	Cao et al., 2015
GmSPL9c_R	GGTGGTGACCCAGTGTAAGTT	Cao et al., 2015
GmSPL9d_F	CATTTGTGGAAGTTTCAGGC	Cao et al., 2015
GmSPL9d_R	AGAGGCTGTCCTCCCAATC	Cao et al., 2015
GmSPL2a_F	ACTGGGAGCACTTATTCTTCTTC	
GmSPL2a_R	AACATTCCAACGTTGATTTCCC	
GmSPL2b_F	GACTGGGAGCACTTATTCTTCAA	
GmSPL2b_R	ACAACAGTCCAACATTGATTTCTG	
GmDCL1_F	GTGCTAGAAAGCCTGGATCTG	
GmDCL1_R	GTCTGTTCTCTCTATTGCTTCTTTG	
GmSE_F	GTTGTGGAGCTAAGGGCTG	
GmSE_R	CTTCTGAGGTTGCTGCATGA	
Poly (T) adapter	GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGG(T)12VN	Shi and Chiang 2005
GmmiR172 primer_F	AGAATCTTGATGATGCTGCAT	
reverse primer	GCGAGCACAGAATTAATACGAC	Shi and Chiang 2005
GmACT2/7 primer_F	CTTCCCTCAGCACCTTCCAA	Jian et al., 2008
GmACT2/7 primer_R	GGTCCAGCTTTCACACTCCAT	Jian et al., 2008

*: V=A, G, C N=A, T, G, C

DyeMix (TOYOBO) を 10 μL 、10 pmol プライマー (GmmiR172 primer_F と reverse primer) を 0.4 μL 、滅菌水を 6.2 μL とし、全量が 20 μL の反応液を用いた。PCR 反応は、初期変性を 94°C で 2 分間行い、変性:94°C で 30 秒、アニーリング:60°C で 30 秒、伸長反応:68°C で 30 秒を 40 サイクル繰り返した。PCR 産物は前述した 2%アガロースゲルで電気泳動した。

シーケンス解析

GmmiR172 primer_F と reverse primer 用いて PCR によって増幅した断片を Mighty TA-cloning Kit (TaKaRa) の手順に従って TA クローニングを行い、環状プラスミドを作成した。作成したプラスミドは、大腸菌 (DH-5 α) へ形質転換を行い、100 μL LB 液体培地 (Trypton pepton:5.0 g、Bact yeast Ex Tract:2.5 g、NaCl₂:2.5 g、蒸留水:450 mL) へ植菌し、200 μL アンピシリン、300 μL x-gal、50 μL IPTG を加えた 200 mL の 1.5%アガーLB 培地に散布し、32°C・暗黒化で 16 時間程度培養した。大腸菌を選抜するためにブルーホワイトセレクションとコロニーPCR を行った。コロニーPCR は、Quick Taq® HS DyeMix (TOYOBO) を 10 μL 、10 pmol M13 プライマーを 0.4 μL 、滅菌水を 9.2 μL と全量が 20 μL となるように混合し、初期変性 (94°C、2 分)、変性 (94°C、30 秒)、アニーリング (60°C、30 秒)、伸長反応 (68°C、30 秒) を 40 サイクル繰り返した。コロニーPCR による増副産物は、2%アガロースゲルで電気泳動し、目的の断片と同じ長さの配列が挿入されている大腸菌を選抜し、その大腸菌を 16 時間程度、液体 LB 培地で振盪培養した。振盪培養後、

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) によって、プラスミドを抽出した。抽出したプラスミドを用い、目的断片の配列決定を行った。シーケンス反応には、M13 forward プライマーと BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、変性:96°Cで 10 秒、アニーリング:50°Cで 5 秒、伸長反応:60°Cで 4 分を 25 サイクル繰り返し、シーケンス反応産物は、エタノール沈殿で精製した。その後、ホルムアルデヒドを加え、95°Cで 2 分間の加熱後、氷上で急冷し、Applied Biosystems™ 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。

開花日と葉の形態調査

SD 条件下で生育した「エンレイ」、En_E2、En_E3、「Peking」は、第 2 章と同様に閉花受粉したため、各系統の開花を比較する際に、最初に花芽が形成された日を開花日とした。LD 条件下で生育した系統では、花卉が開いた日を開花日とした。開花日数の調査は、各系統で 3 個体以上を用い、子葉が展開した日から開花日までの日数 (Days After Cotyledon : DAC) を計測した。開花時葉数は、開花日までに主茎で展開した葉数を計測した。

葉の大きさ (葉身長と葉身幅) の調査は、LD 条件下で生育した En_E3 と「Peking」を除き、開花後に各葉位の葉を採取し、計測を行った。LD 条件下の En_E3 と「Peking」については、開花が遅いため開花前に葉を採取せずに計測し、開花後に再度葉の大きさを計測した。各系統で 3 個体以上を用い、単葉、もしくは、

複葉の中央の小葉における葉身長と葉身幅を葉位ごとに測定した。葉の大きさが急激に変化する葉位は、葉の大きさの生長率を以下のように算出し、値が高い葉位を個体ごとに決定し、系統、処理区ごとに平均値を示した。

$$\text{葉の大きさの生長率} = n^{\text{th}} \text{葉位の葉の大きさ} / (n-1)^{\text{th}} \text{葉位の葉の大きさ}$$

結果

*GmSPLs*の発現解析

シロイヌナズナの *SPL3* と *SPL9* のホモログとして、ダイズでは *GmSPL3a~d* と *GmSPL9a~d* が報告されている (Cao et al., 2015)。*SPL2/10/11* のダイズにおけるホモログに関しては報告がないため、本章において phytozome v12.0 (https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Gmax) を用い、TBLASTN によってダイズにおけるホモログを検索した。*SPL2/10/11* は、*Glyma.11G251500* および *Glyma.18G005600* と相同性を示し、それぞれを *GmSPL2a*、*GmSPL2b* とした。

SD、LD 条件で生育した「エンレイ」と「Peking」において、semi-quantitative RT-PCR によって *GmSPL3a~d*、*GmSPL9a~d*、*GmSPL2a,b* の発現量を調査した。*GmSPL3a* は、SD 条件において、「エンレイ」では後半の葉位で発現量が上昇する傾向を示したが、「Peking」では、検出限界以下で発現を確認することはできなかった (Fig. 3-1)。SD 条件での *GmSPL9b* は、「エンレイ」において後半の葉位で発現が増加し、「Peking」においても、発現量が非常に低いですが、後半の葉位で発現が増加する傾向が見られた (Fig. 3-1)。また、LD 条件下では、「エンレイ」と「Peking」の両系統で *GmSPL3a* は第 6 葉と第 9 葉でのみ発現しており、*GmSPL9b* は連続した葉位で発現が検出できなかった (Fig. 3-2)。*GmSPL3b* は、日長条件に関わらず、両品種とも発現が検出できなかった (Figs. 3-1, 2)。SD 条件

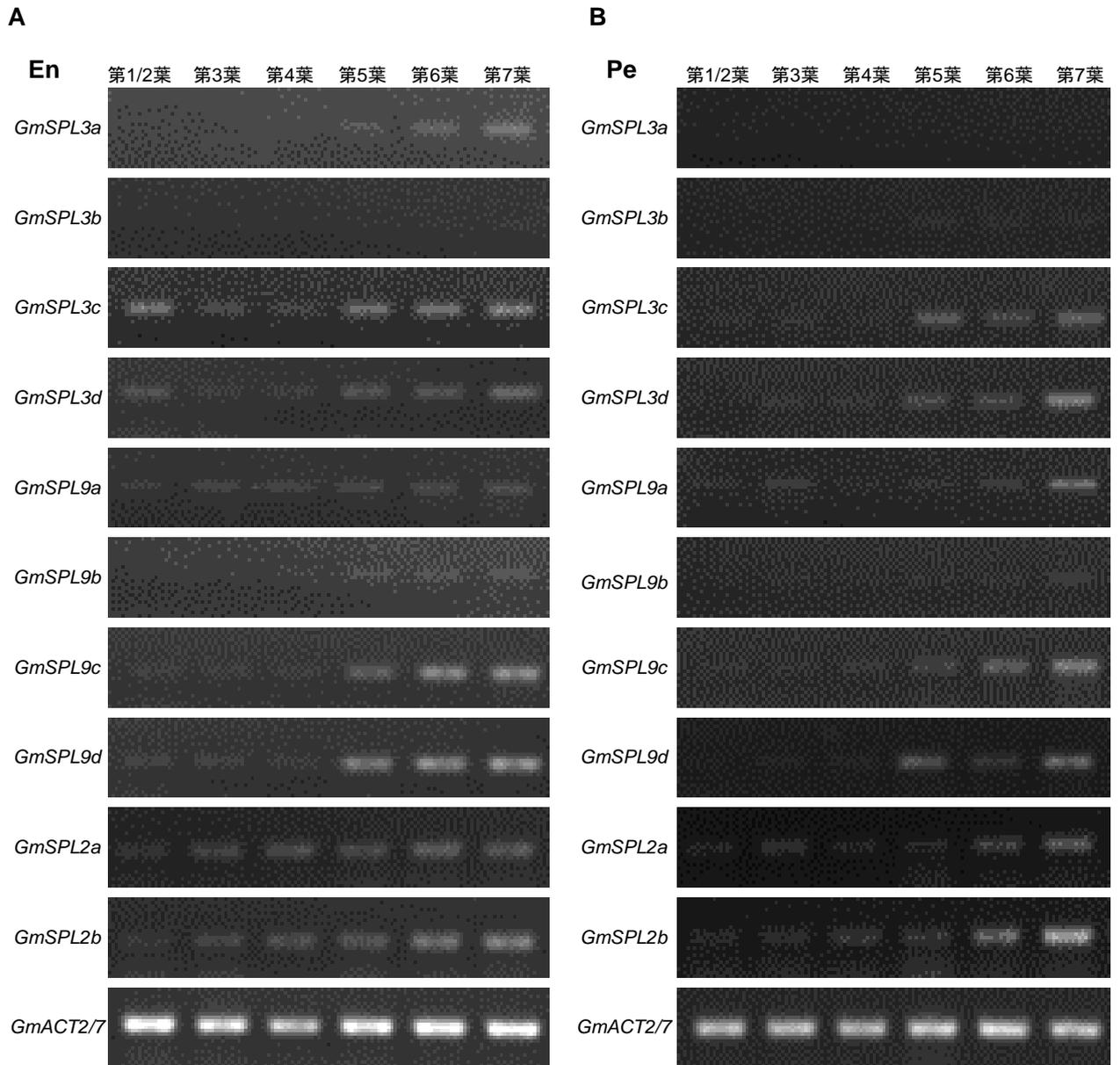


Fig. 3-1 SD条件下で生育した「エンレイ」と「Peking」におけるRT-PCRによる*GmSPLs*の発現解析
 (A) 「エンレイ」における*GmSPLs*の発現の解析。
 (B) 「Peking」における*GmSPLs*の発現の解析。
 インナーコントロールとして*GmACT2/7*を用いた。
 En:エンレイ Pe:Peking

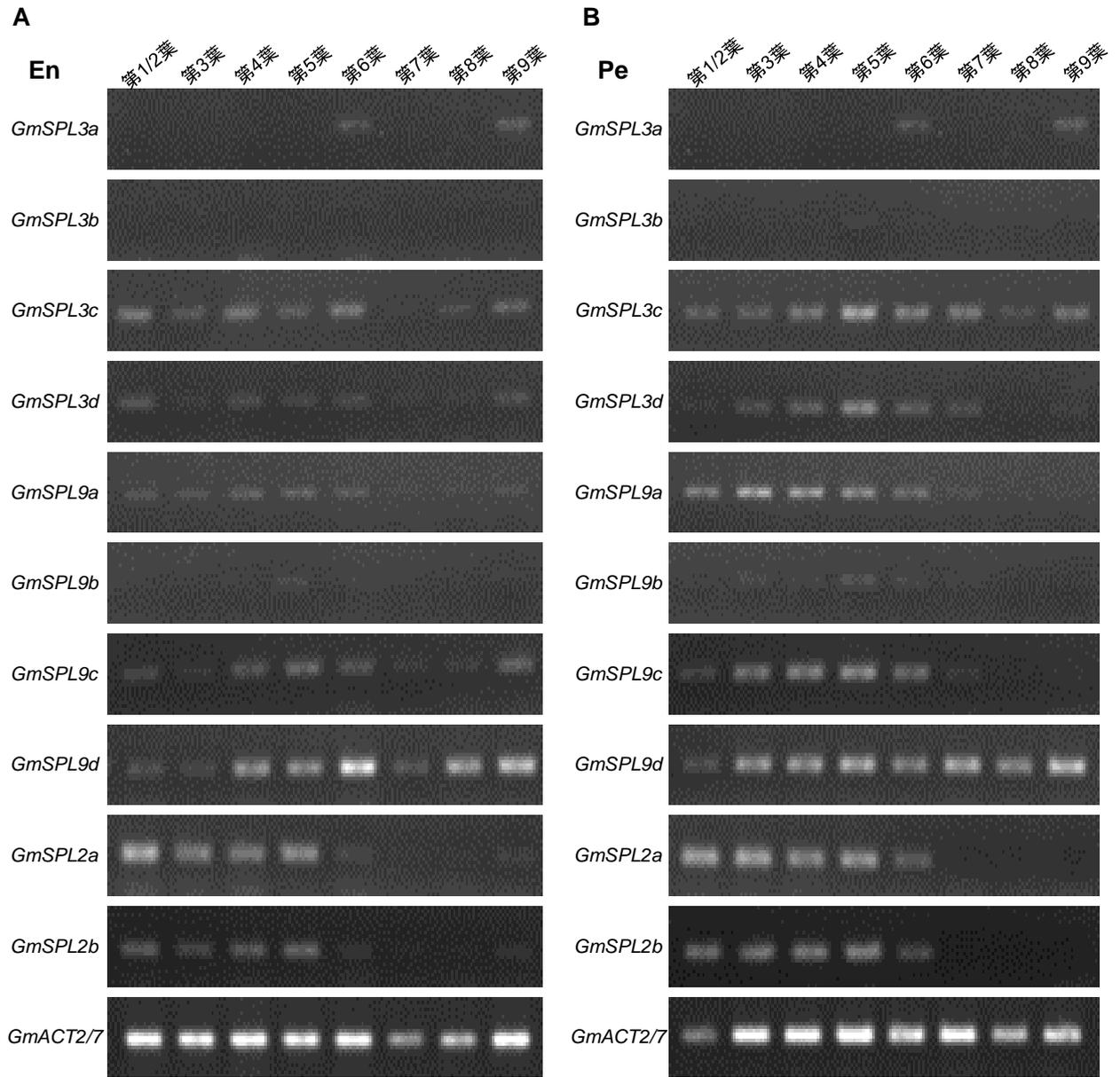


Fig. 3-2 LD条件下で生育した「エンレイ」と「Peking」におけるRT-PCRによるGmSPLsの発現解析
 (A) 「エンレイ」におけるGmSPLsの発現の解析。
 (B) 「Peking」におけるGmSPLsの発現の解析。
 インナーコントロールとしてGmACT2/7を用いた。
 En:エンレイ Pe:Peking

下の「エンレイ」と「Peking」において、*GmSPL3c,d*、*GmSPL9a,c,d*、*GmSPL2a,b* は、後半の葉位にかけて徐々に発現量が増加する傾向があった (Fig. 3-1)。一方、LD 条件下では、両品種とも *GmSPL3c*、*GmSPL9d* の発現量は一定、もしくは、上昇する傾向があったが、*GmSPL3d*、*GmSPL9a*、*GmSPL2a,b* は後半の葉位で発現量が減少した (Fig. 3-2)。また、後半の葉位において *GmSPL9c* の発現量は、「エンレイ」で一定となる傾向が認められたが、「Peking」では減少した (Fig. 3-2)。

GmSPL9c,d の発現を real-time PCR によって詳細に解析した。*GmSPL9c* の発現量は、SD、LD 条件の「エンレイ」と SD 条件の「Peking」において、生育が進むと発現量が上昇する傾向があった (Fig. 3-3A)。一方、LD 条件の「Peking」では、第 7 葉展開時から *GmSPL9c* の発現量が減少した (Fig. 3-3A)。*GmSPL9d* の発現量は、SD、LD 条件の「エンレイ」と「Peking」で後半の葉位が展開するとともに発現量が上昇することが認められた (Fig. 3-3B, C)。以上のように、real-time PCR によって示された *GmSPL9c,d* の発現パターンは、前述の semi-quantitative RT-PCR による発現解析とほぼ同様の結果であった。

mature-miR172 の生合成

LD 条件で生育した「Peking」において、RT-RCR によって *mature-miR172* の検出を試みた結果、第 1/2 葉から第 5 葉までは、Positive control と同様に 60 bp から 80 bp の間に PCR 産物が検出でき、*mature-miR172* の発現が認められた (Fig. 3-4)。また、第 6 葉では、微量の *mature-miR172* が発現していた。一方、第 7

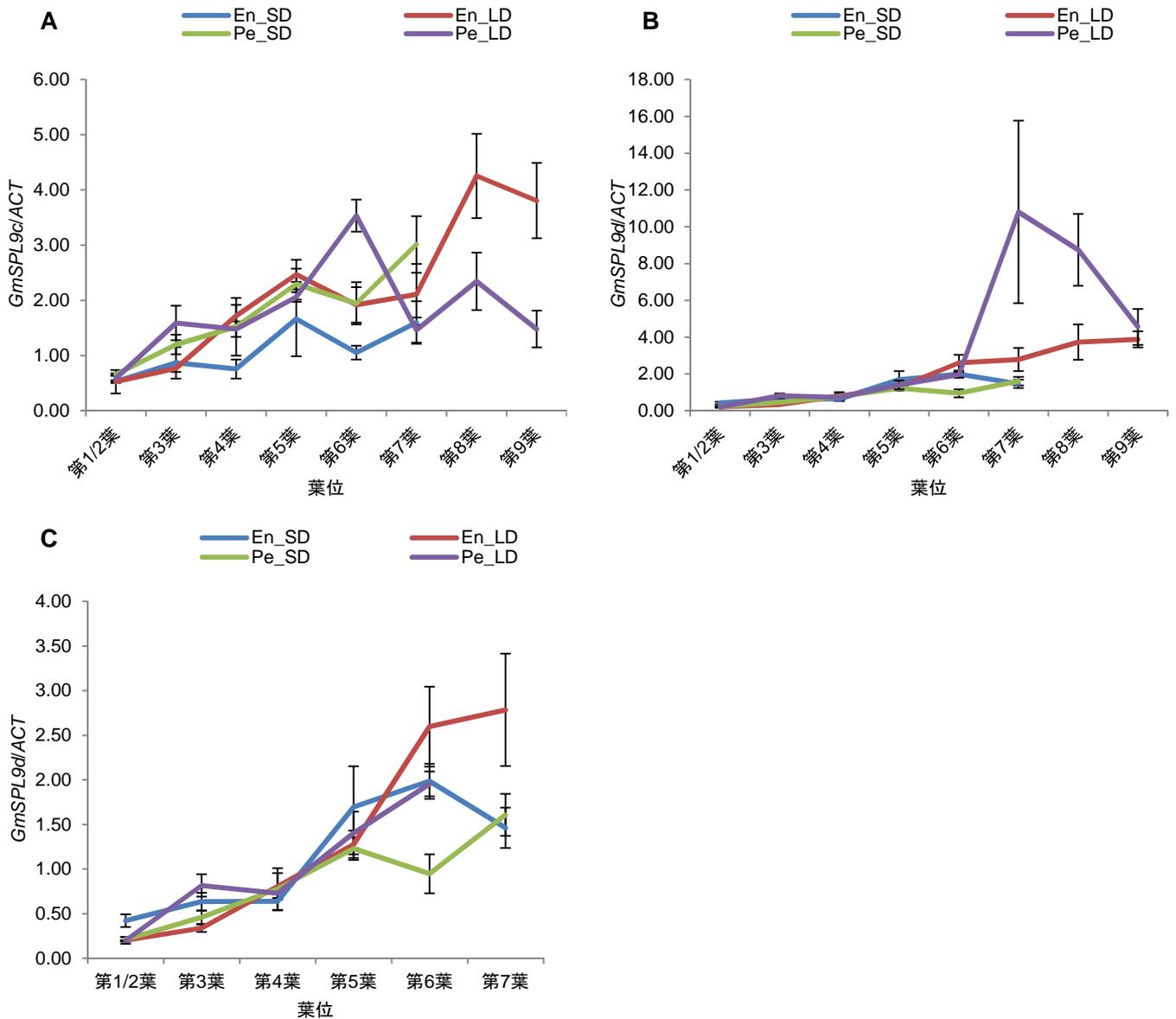


Fig. 3-3 「エンレイ」と「Peking」における各葉位のGmSPL9cとGmSPL9dの発現解析

(A) 各葉位におけるGmSPL9cの発現パターン

(B) 各葉位におけるGmSPL9dの発現パターン

(C) (B)の第1/2葉～第7葉におけるGmSPL9dの発現パターンの拡大図

発現解析には各葉位で3個体以上を供試し、エラーバーは標準誤差を示す。

En:エンレイ Pe:Peking

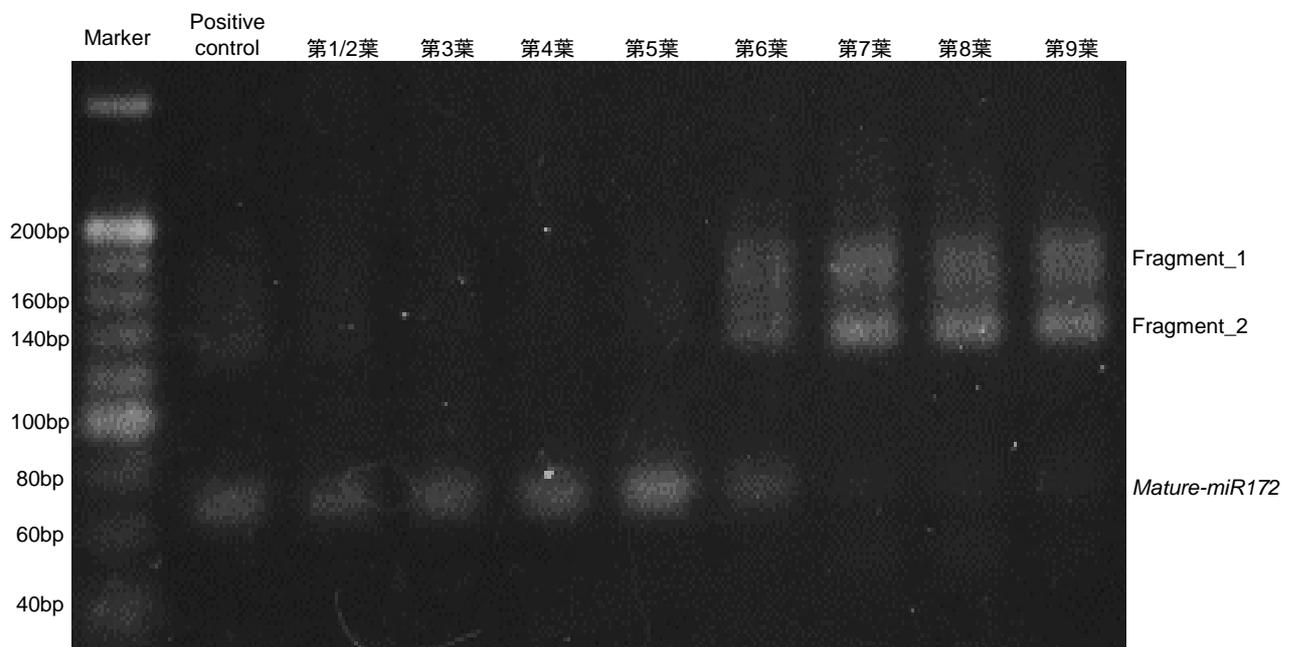


Fig. 3-4 LD条件下で生育した「Peking」におけるRT-PCRによる各葉位の*miR172*のバンドパターン
 Markerは20bp markerを使用し、Positive controlとして*mature-miR172*を挿入したプラスミドを用いた。

葉から第9葉において、*mature-miR172*の発現は認められなかったが、第6葉から第9葉において100 bp から200 bp の間に2つの断片を検出し、長い断片をFragment_1、短い断片をFragment_2とした (Fig. 3-4)。

miRbase (<http://www.mirbase.org/>) において、ダイズゲノムには *miR172*が12遺伝子座 (*miR172a~miR172l*)存在するとされている。また、*miRNA*は、各遺伝子座より転写され、*pri-miRNA*、*pre-miRNA*、*mature-miRNA* の順に塩基配列が短くなり、生成される (Zhang et al., 2015)。*mature-miR172f* の前駆体である *pre-miR172f*の配列情報を miRbase より取得し、phytozome v12.0 を用い、ダイズゲノムにおいて BLASTN 検索を行った。その結果、*pre-miR172f* は、*Glyma.11G195600* の第1イントロンと5' UTR、第1エクソンにかけて塩基配列が相同であり、*miR172f*が *Glyma.11G195600*に存在することが明らかとなった (Fig. 3-5A)。Fragment_1 の塩基配列を決定したところ、3'側に存在する逆転写時に用いた Poly (T) adapter の配列を除くと、110 bp の長さとなった (Fig. 3-5A)。この Fragment_1 の5'側の塩基配列は、*mature-miR172f*を含む *pre-miR172f* の3'側の25 bp と完全に一致した (Fig. 3-5A)。また、*Glyma.11G195600*とは110 bp のうち108bp の領域と相同であったが、2bp の塩基配列の違いがあることが認められた (Fig. 3-5A)。これらのことより、Fragment_1 は、*miR172f*に関する配列であり、*pre-miR172f* より3'側に長い配列持つことから、*pri-miR172f*であるとした。上記の手法と同様に、*miR172a* について解析すると、*pre-miR172a* は、*Glyma.12G078700*の5' UTRと相同であり、*miR172a*は *Glyma.12G078700*の5' UTR 上に存在した (Fig. 3-5B)。また、Fragment_2 の塩基配列を決定したところ、

A

		1st intron	5' UTR	1st exon→
<i>Glyma.11G195600</i>	971	GCGGATGTAG	CATCATCAAGATTCA	CATGCAAACGCAGGTGGTGGGTGGGAC
<i>pre-miR172f</i>	1	GCGGATGTAG	CATCATCAAGATTCA	CATGCAAACGCAGGTGGTGGGTGGGAC
Fragment_1		-----	-----	-----
<i>Glyma.11G195600</i>	1023	TGTGATGCAATCTAAGTGCTACTGTGCCAACCAAAGCCATAGGTCTTTTGGGA		
<i>pre-miR172f</i>	53	TGTGATGCAATCTAAGTGCTACTGTGCCAACCAAAGCCATAGGTCTTTTGGGA		
Fragment_1		-----		
			mature-miR172f	
<i>Glyma.11G195600</i>	1055	AGTGAGAATCTTGATGATGCTGCATCAGCCATAAACGACTTCAACTTTAAAA		
<i>pre-miR172f</i>	55	AGTGAGAATCTTGATGATGCTGCATCAGC-----		
Fragment_1	-4	AGAACTCTTGATGATGCTGCATCAGCCATAAACGACTTCAACTTTAAAA		
<i>Glyma.11G195600</i>	1157	AGTTGGATAAGGACTATTCTAACCTCAACAAGTGGGCAAGAAAAAATATAA		
<i>pre-miR172f</i>		-----		
Fragment_1	49	AGTTGGATAAGGACTATTCTAACCTCAACAAGTGGGCAAGAAAAAATATAA		
<i>Glyma.11G195600</i>	1209	AAAAGAATTGAAAAACCAAAAAAACTGTTGTTGGGGGATACACACATGA		
<i>pre-miR172f</i>		-----		
Fragment_1	101	AAAAGAATGC-----		

B

<i>Glyma.12G078700_5'UTR</i>	625	TTAACAGTCGTTATTTGCGGATGTAGCATCATCAAGATTCACATGCAAGCGCAGGT		
<i>pre-miR172a</i>	1	TTAACAGTCGTTATTTGCGGATGTAGCATCATCAAGATTCACATGCAAGCGCAGGT		
Fragment_2		-----		
<i>Glyma.12G078700_5'UTR</i>	682	GGTGGGTGGGACTTGATGCAATCTAAGTGCTGTGCCAGCCAAGCCATAGGTCTTTT		
<i>pre-miR172a</i>	57	GGTGGGTGGGACTTGATGCAATCTAAGTGCTGTGCCAGCCAAGCCATAGGTCTTTT		
Fragment_2		-----		
			mature-miR172a	
<i>Glyma.12G078700_5'UTR</i>	736	GGAAGTGAAGAATCTTGATGATGCTGCATCAGCCATAAACGACTTCACTTTAAAAAAG		
<i>pre-miR172a</i>	112	GGAAGTGAAGAATCTTGATGATGCTGCATCAGCCATAAACGACTTCAC-----		
Fragment_2	-7	AGAACTCTTGATGATGCTGCATCAGCCATAAACGACTTCACTTTAAAAAAG		
<i>Glyma.12G078700_5'UTR</i>	791	TTAGATAAGGACTATTCTAACCTCAACAAGTGGGCAAAAAAAAAAACATA		
<i>pre-miR172a</i>		-----		
Fragment_2	50	TTAGATAAGGACTATTCTAACCTCAACAAGTGGGC-----		

Fig. 3-5 Fragment_1とFragment_2の塩基配列

(A) Fragment_1と*pre-miR172f*の塩基配列の比較。

(B) Fragment_2と*pre-miR172a*の塩基配列の比較。

灰色の背景は、2つの間で塩基配列が異なることを示す。黄色の背景は、3つで相同の配列を示す。赤線のボックスは、*mature-miR172f, a*の配列を示す。

3'側に存在する逆転写時に用いた Poly (T) adaptor を除くと 84 bp の長さであり、*mature-miR172a* を含む *pre-miR172a* の 3'側の 40 bp、*Glyma.12G078700* の領域と完全に一致した (Fig. 3-5B)。このことより、Fragment_2 は、*miR172a* に関する配列であり、*pre-miR172a* より 3'側に長い配列であったことから、*pri-miR172a* とした。

SD および LD 条件で生育した「エンレイ」と「Peking」において、*mature-miR172* の発現を調査した。SD 条件下では、両品種ともすべての葉位で発現が見られた (Fig. 3-6)。また、個体によって、前半の葉位 (第 1/2 葉～第 4 葉) で *pri-miR172f* の断片がみられたが、*pri-miR172a* は、いずれの個体でも検出されなかった (Fig. 3-6)。LD 条件下での発現は両品種で差が見られた。「エンレイ」では、すべての葉位で *mature-miR172* の発現を確認したが、個体によっては後半の葉位 (第 7 葉～第 9 葉) で発現量が低下し、*pri-miR172f* の発現が認められた (Fig. 3-7A)。*pri-miR172a* は、LD 条件の「エンレイ」では検出されなかった (Fig. 3-7A)。一方、「Peking」では、第 5 葉から *mature-miR172* の発現量が急激に減少し、発現量は SD 条件の「エンレイ」と「Peking」、LD 条件の「エンレイ」よりも低い傾向にあった (Fig. 3-7A,B)。*mature-miR172* の発現量が減少した葉位では、*pri-miR172f* の発現量が多く、*pri-miR172a* の発現もみられた (Fig. 3-7B)。

mature-miR172 は、DCL1 や SE といったタンパク質によって、mRNA から切り出されていくことが報告されている (Zhang et al., 2015)。ダイズでは、GmDCL1a と GmDCL1b が相加的に働くことが知られている (Curtin et al., 2015)。また、SE のホモログは、ダイズに 3 つ存在している。SD、LD 条件で生育させた「エンレイ」と

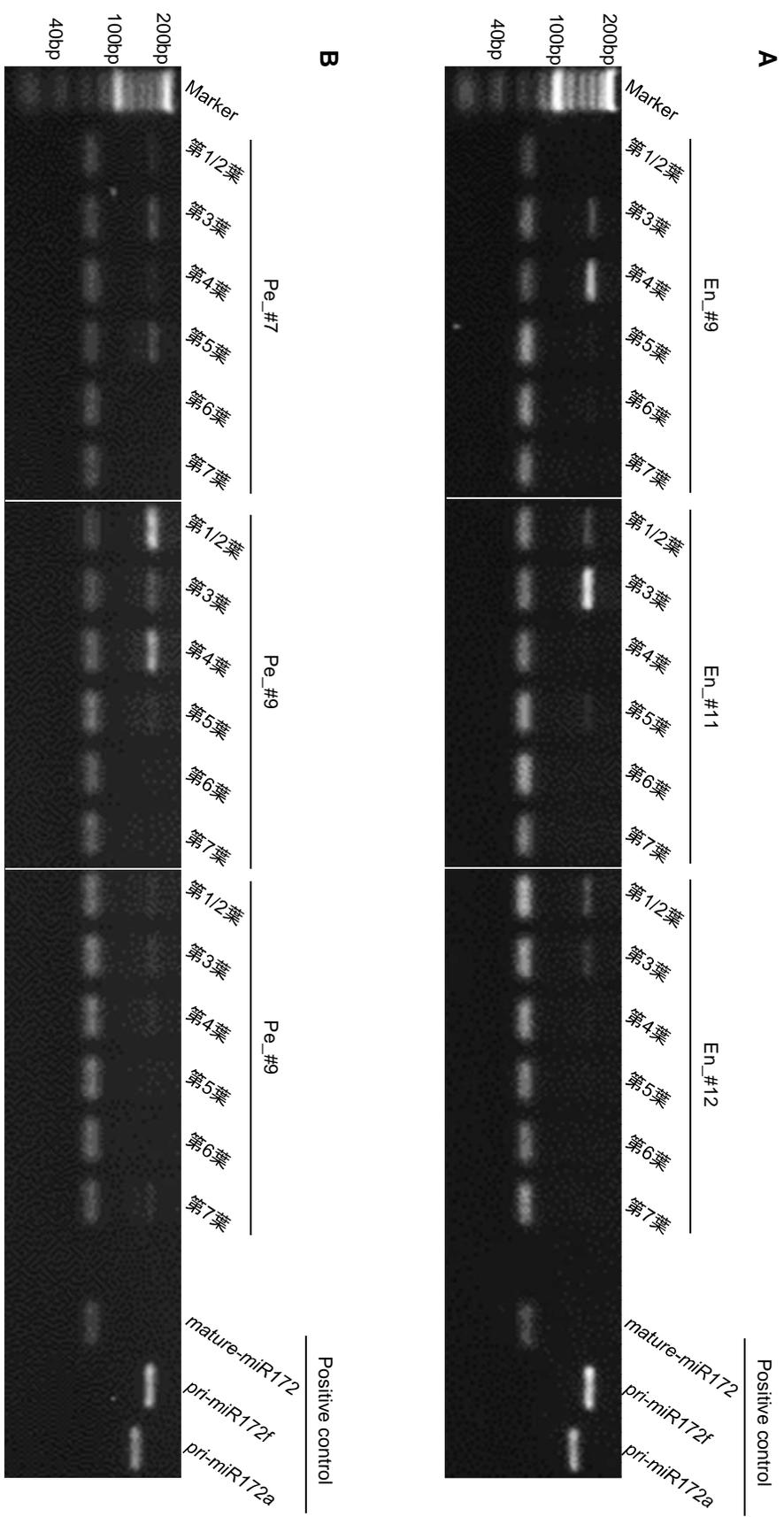


Fig. 3-6 SD条件下で生育した「エンレイ」と「Peking」におけるRT-PCRによる各葉位のmiR172のバンドパターン
 A「エンレイ」の3個体における各葉位のバンドパターン。
 B「Peking」の3個体における各葉位のバンドパターン。
 Positive controlとして、*mature miR172*、*pri-miR172f*の断片(Fragment_1)、*pri-miR172a*の断片(Fragment_2)を挿入したプラスミドを用いた。

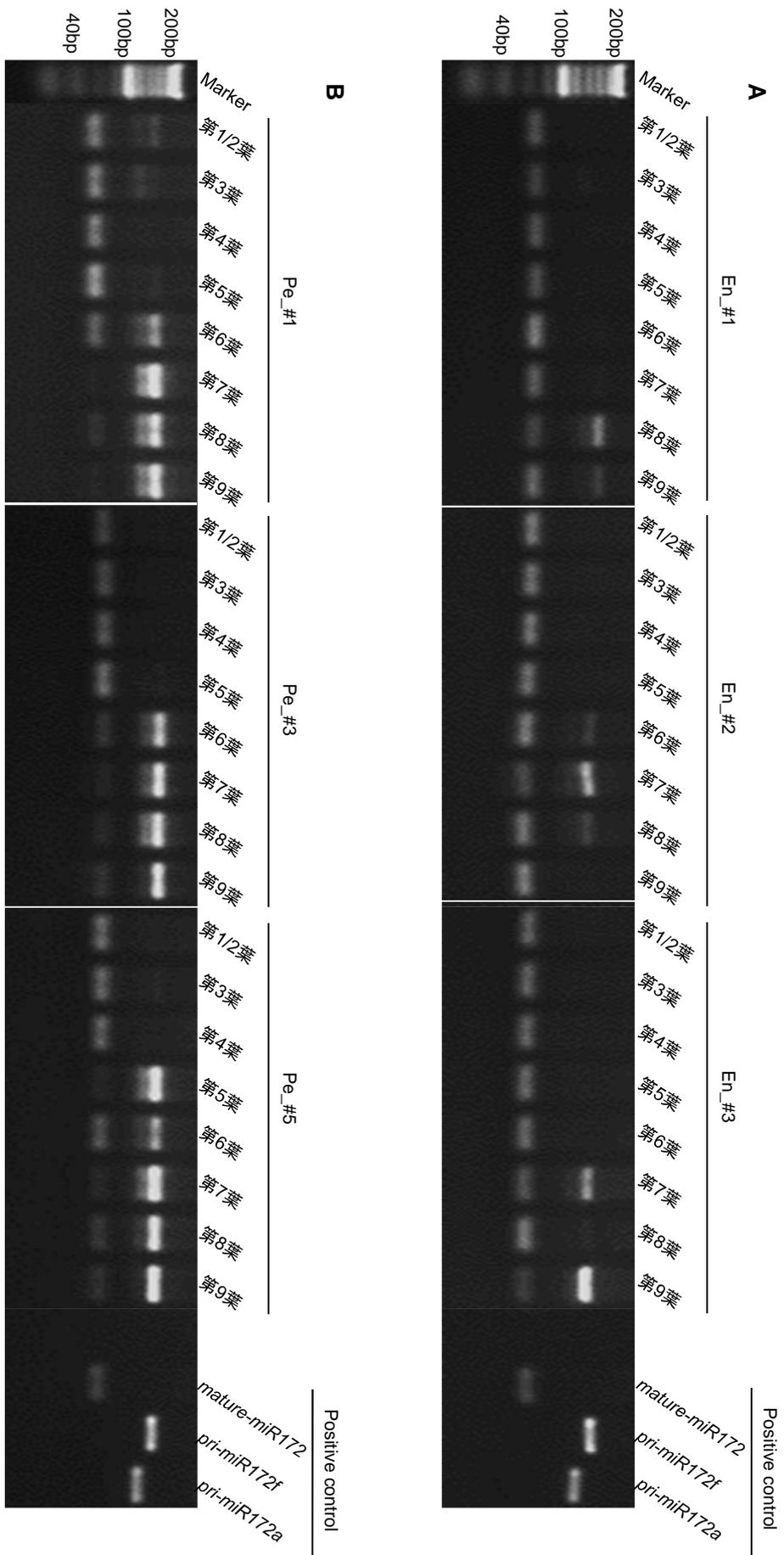


Fig. 3-7 LD条件下で生育した「エンレイ」と「Peking」におけるRT-PCRによる各葉位のmiR172のバンドパターン

A 「エンレイ」の3個体における各葉位のバンドパターン。

B 「Peking」の3個体における各葉位のバンドパターン。

Positive controlとして、*mature miR172*、*pri-miR172f*の断片(Fragment_1)、*pri-miR172a*の断片(Fragment_2)を挿入したプラスミドを用いた。

「Peking」において、*GmDCL1* (*GmDCL1a* と *GmDCL1b*)、*GmSE* (*GmSEa*、*GmSEb*、*GmSEb*) の発現量を比較した。「エンレイ」では、両生育条件とも *GmDCL1* の発現量に各葉位で大きな差は認められなかった (Fig. 3-8A)。また、*GmSE* は、LD 条件で各葉位の発現量が高かったが、発現量の変化の推移は LD 条件と SD 条件で同様の傾向を示した (Fig. 3-8B)。SD 条件で生育した「Peking」は、他のものに比べ *GmDCL1* と *GmSE* の発現量が常に高かった (Fig. 3-8)。一方、LD 条件では、*GmDCL1* と *GmSE* の発現量は第 1/2 葉から第 6 葉までほぼ一定の値であったが、第 7 葉以降から発現量が減少することが認められた (Fig. 3-8)。以上の結果より、「Peking」では、後半の葉位において、LD によって *GmDCL1*、*GmSE* の発現量が抑制されることによって、*miR172* の生合成経路が強く阻害され、*mature-miR172* の発現量が減少することが示唆された。

***E2*、*E3* 遺伝子の NILs における表現型**

「エンレイ」を背景に「Peking」の *E2*、*E3* 遺伝子を導入した NILs を用い、*E2*、*E3* 遺伝子座が JA 相転換位にかかわっているのかを明らかにするために SD 条件、LD 条件での表現型を調査した。

SD 条件で生育した「エンレイ」と「Peking」の開花日数 (±標準誤差) は、「エンレイ」が 21.3 (±0.3) DAE、「Peking」が 18.8 (±0.2) DAE であり、「Peking」の開花日数が「エンレイ」よりも有意に 3 日程度早くなった (Fig. 3-9A)。置換系統の開花日

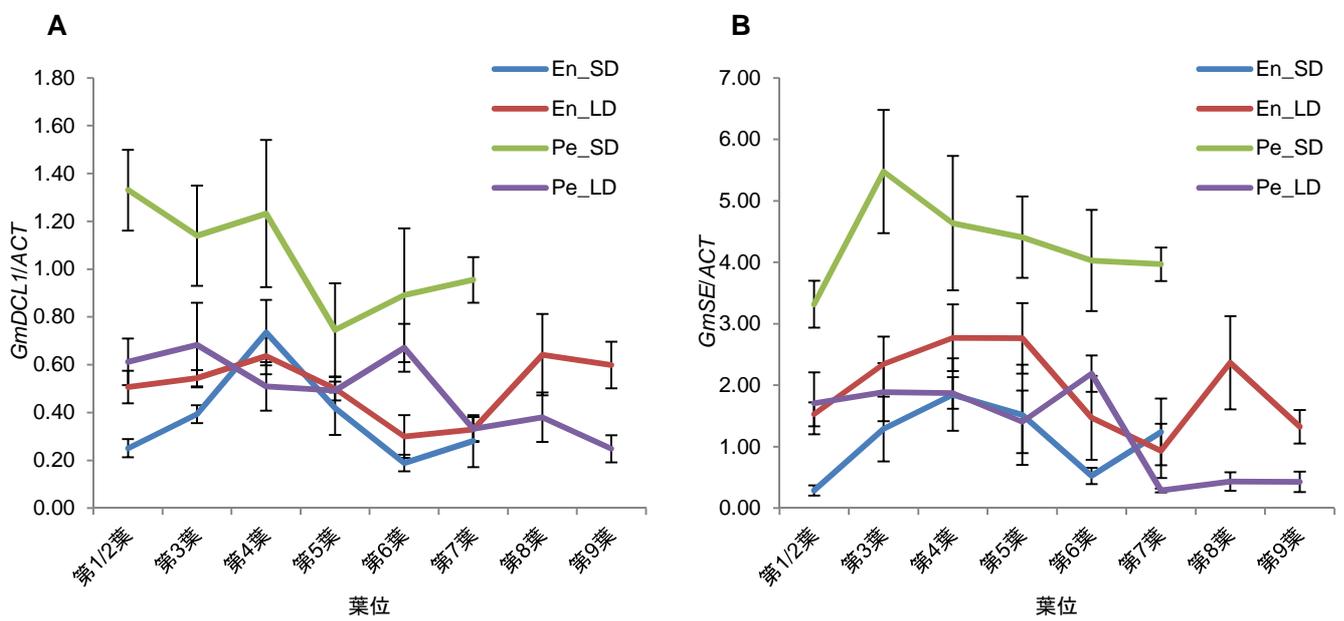


Fig. 3-8 「エンレイ」と「Peking」における各葉位のGmDCL1とGmSEの発現解析
 (A) 各葉位におけるGmDCL1の発現パターン。
 (B) 各葉位におけるGmSEの発現パターン。
 発現解析には各葉位で3個体以上を供試し、エラーバーは標準誤差を示す。

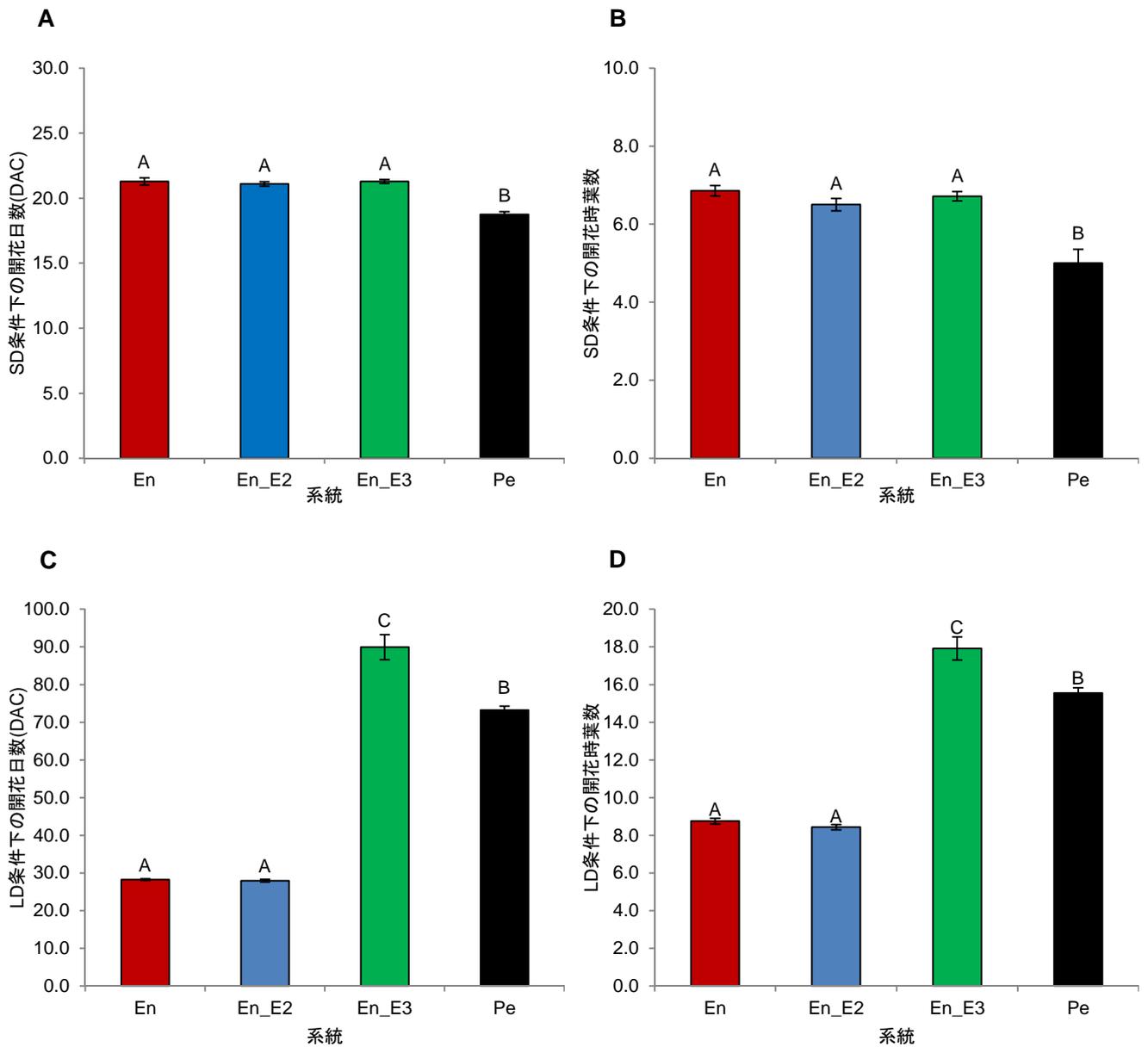


Fig. 3-9 *E*遺伝子型が異なる4系統の開花形質

(A) SD条件下の子葉展開から開花まで日数 (DAC)。

(B) SD条件下の開花時に主茎で展開した葉数。

(C) LD条件下の子葉展開から開花まで日数 (DAC)。

(D) LD条件下の開花時に主茎で展開した葉数。

各系統で3個体以上を供試し、エラーバーは標準誤差を示す。グラフ内の異なるアルファベットは、Tukey-Kramer HSD検定によって1%水準で有意に差が認められたことを表す。

数は、En_E2が 21.1 (±0.2) DAE、En_E3が 21.3 (±0.2) DAE であり、「エンレイ」、En_E2、En_E3 間の開花日数に有意な差はなかった (Fig. 3-9A)。主茎の開花時葉数 (±標準誤差)においても、「エンレイ」は 6.9 (±0.1)枚、「Peking」は 5.0 (±0.4)枚となり、「Peking」は「エンレイ」よりも有意に 2 葉早い生育段階で開花した (Fig. 3-9B)。また、En_E2は 6.5 (±0.2)枚、En_E3は 6.7 (±0.1)枚であり、「エンレイ」と有意な差が認められなかった (Fig. 3-9B)。LD 条件下で生育した各系統の開花日数は、「エンレイ」は 28.3 (±0.2) DAE、En_E2は 27.9 (±0.4) DAE であり、2 系統間に有意な差はみられなかった (Fig. 3-9C)。一方、「Peking」は 73.2 (±1.0) DAE、En_E3は 89.9 (±3.3) DAE となり、開花日数が有意に遅延していることが認められた (Fig. 3-9C)。また、主茎の開花時葉数においても、「エンレイ」は 8.8 (±0.2)枚、En_E2は 8.4 (±0.5)枚と葉数は有意な差が見られなかったが、「Peking」は 15.6 (±0.3)枚、En_E3は 17.9 (±0.6)枚と前者 2 系統よりも有意に多かった (Fig. 3-9D)。以上の結果より、「Peking」では、E2、E3 遺伝子座とは異なる要因が SD によって開花促進に働くことが考えられた。LD 条件において、En_E2 は、本研究の環境条件(明期 16h/暗期 8h、25°C)では、「エンレイ」と同等の開花日数、開花時葉数であり、E2 遺伝子座は LD による開花抑制へ効果が小さいことが示唆された。一方、En_E3と「Peking」は、LD 条件で開花が大幅に遅れたことから、E3 遺伝子座の開花抑制の効果が大きいことが認められた。

「エンレイ」において、個体ごとに JA 相転換に関する形質である“葉の大きさが急激に変化する葉位”を比較すると、SD 条件では第 5 葉に 70%程度と第 4 葉に 3 割程度、LD 条件では第 5 葉が 50%程度と第 4.5 葉が 40%程度となり、両条件とも第 5

葉を中心に分布した (Fig. 3-10A)。葉の大きさが急激に変化する葉位の平均値 (±標準誤差) においても、SD 条件では 4.6 (±0.2) 葉位、LD 条件では 4.9 (±0.1) 葉位であり、SD 条件と LD 条件の間に有意な差は認められなかった (Fig. 3-11)。

一方、「Peking」、En_E2、En_E3 において、LD 条件で栽培した個体は、SD 条件よりも遅れた葉位で葉の大きさが急激に変化することが認められた (Fig. 3-11)。

「Peking」の葉の大きさが急激に変化する葉位を比較すると、SD 条件では、4 個体中、第3葉が3個体 (75%) と第4葉が1個体 (25%)、LD 条件では、第5葉が70%程度となり、SD 条件よりも LD 条件の個体は後半の葉位で葉の大きさが急激に変化した (Fig. 3-10D)。葉の大きさが急激に変化する葉位の平均値についてみると、SD 条件は 3.3 (±0.2) 葉位であったのに対し、LD 条件は 4.8 (±0.1) 葉位となり、LD 条件では、SD 条件と比較して有意に後半の葉位で葉の大きさが急激に変化する個体の割合が多く認められた (Fig. 3-11)。En_E2では、葉の大きさが急激に変化する葉位が SD 条件は第5葉が40%程度であり、残りの個体は第4.5葉～第3葉の間であったが、LD 条件は第5葉で80%程度の個体の葉の大きさが変化していた (Fig. 3-10B)。平均値についてみると、SD 条件では、第4.4 (±0.2) 葉であったが、LD 条件では、5.3 (±0.2) 葉と1枚多い葉位で変化することが認められた (Fig. 3-11)。En_E3においても、葉の大きさが急激に変化する葉位が SD 条件は第5葉に40%程度、残りの個体は第4.5葉～第3葉の間に存在し、LD 条件は第5葉に60%程度となり、残りの個体は5.5葉以降に分布した (Fig. 3-10C)。その平均値についてみると、SD 条件では、第4.4 (±0.2) 葉、LD 条件では、5.5 (±0.2) 葉と1枚多い葉位

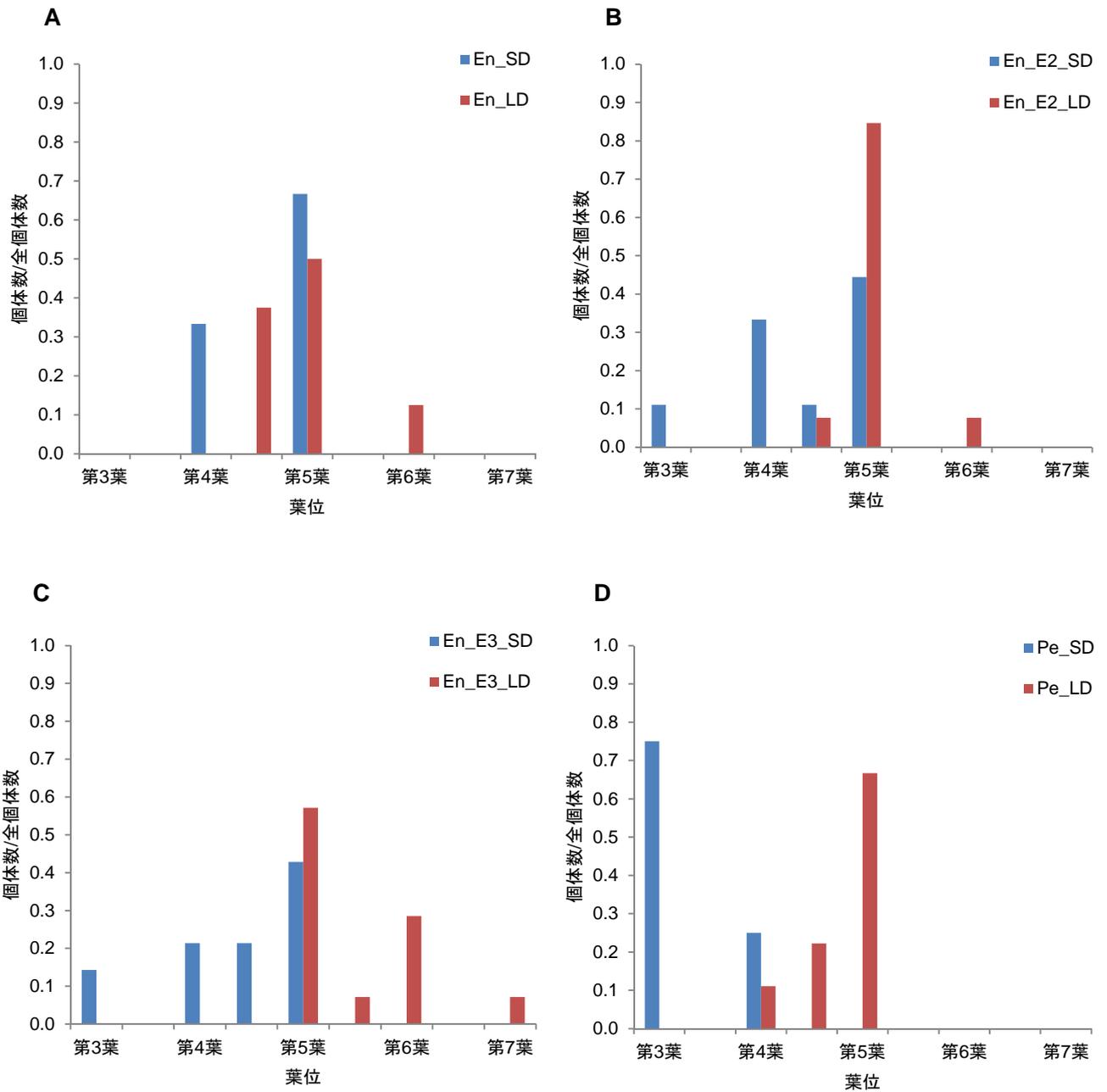


Fig. 3-10 各系統の個体ごとにおいて葉が急激に変化する葉位の分布
 (A) 「エンレイ」におけるSD条件 (n=6) とLD条件 (n=8) で生育した個体の分布。
 (B) En_E2におけるSD条件 (n=9) とLD条件 (n=13) で生育した個体の分布。
 (C) En_E3におけるSD条件 (n=14) とLD条件 (n=14) で生育した個体の分布。
 (D) 「Peking」におけるSD条件 (n=4) とLD条件 (n=9) で生育した個体の分布。

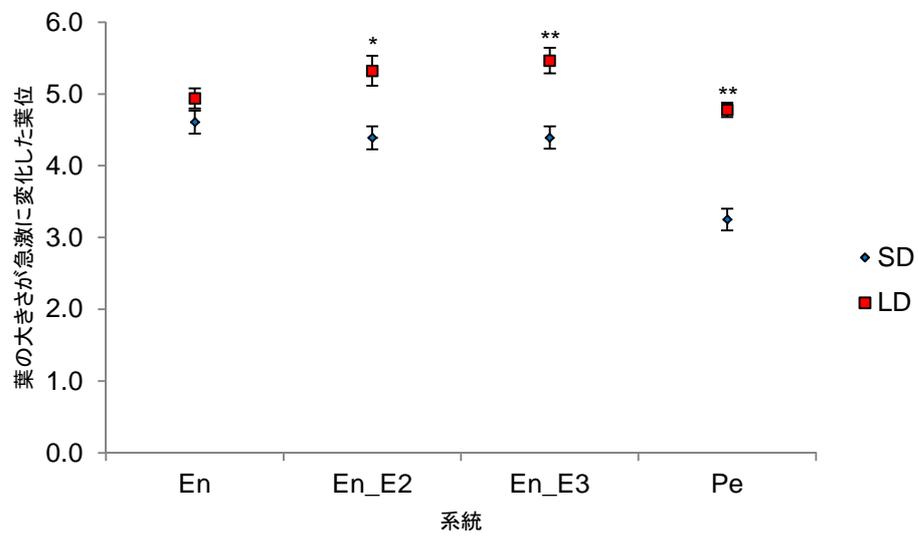


Fig. 3-11 SD条件とLD条件下における4系統の葉の大きさが急激に変化する葉位の比較
 各系統で4個体以上を供試し、エラーバーは標準誤差。
 t-testによって、**は1%、*は5%水準で各系統のSDとLDの値が有意に異なる。

で変化することが認められた (Fig. 3-11)。また、SD 条件で生育した 4 系統の葉の大きさが急激に変化する葉位を比較すると「Peking」は、他の 3 系統よりも 1 葉位分早い成長段階で葉の大きさが急激に変化していたが、LD 条件では系統間で有意な差は認められなかった (Fig. 3-11)。E2、もしくは、E3 遺伝子を機能型にした NILs (En_E2、En_E3) は、葉の大きさが急激に変化する葉位が早期に起こらなかった。このことより、SD 条件において、E2 と E3 遺伝子が両方機能型であること、もしくは、SD に反応して他の要因が働くことによって、「Peking」は「エンレイ」よりも葉の大きさが急激に大きくなる葉位が早くなり、JA 相転換も早期に起こることが示唆された。また、「Peking」において、LD 条件によって JA 相転換が遅れる現象に E2、E3 遺伝子座が関与していることが考えられた。

考察

生育段階における *SPL* の発現の変化

シロイヌナズナの *SPLs* は、JA 相転換に関与し、*SPL3/4/5*、*SPL9/15*、*SPL2/10/11* の 3 つに分類されており、グループごとに働きは異なる (Wu, 2006; Wang et al., 2008; Shikata et al., 2009)。また、*SPLs* は、*miR156* によって発現が抑制されるが (Rhoades et al., 2002)、*SPL9* や *SPL10* は、*miR172* の発現を促進することが報告されている (Wu et al., 2009)。ダイズにおいても、*GmmiR156b* 過剰発現体で *GmSPL3a~d*、*GmSPL9a~d* の発現量が減少することから、*GmmiR156* が *GmSPL* の発現量を抑制すると考えられているが (Cao et al., 2015)、通常のダイズの生育段階での *GmSPLs* の発現量の変化に関しては報告されていない。本章では、*GmSPL3a~d*、*GmSPL9a~d*、*GmSPL2a, b* について、「エンレイ」と「Peking」を用い、生育段階による発現量の変化を解析した。

SD 条件において、両品種で *GmSPL3a* は発現パターンが異なり、*GmSPL9b* は後半の葉位で増加する傾向を示したが、LD 条件において、*GmSPL3a*、*GmSPL9b* は連続した葉位で発現が認められなかった (Figs. 3-1, 2)。*GmSPL3b* は、日長条件に関わらず、両品種とも発現が認められなかった (Figs. 3-1, 2)。*GmSPL3c, d*、*GmSPL9a~d*、*GmSPL2a, b* の mRNA には *miR156* と結合する配列が存在するが、*GmSPL3a, b* では見つかっていない (Tripathi et al., 2017)。第 2 章において、生育の後半で *miR156* の発現量は、日長条件に関わらず減少したが、

本章では *miR156* の発現量の減少に伴って、*GmSPL3a, b, GmSPL9b* の発現量は増加しなかった。以上のことより、*GmSPL3a, b* が *miR156* との結合領域が見つかっていないという Tripathi et al., (2017) の結果を支持した。また、*GmSPL9b* については、*miR156* による制御を受けていない、もしくは、転写が相転換と異なる経路に調節されているのかもしれない。両品種において、*GmSPL3c, d, GmSPL9a, c, d, GmSPL2a, b* は、日長条件に関わらず第 6 葉付近まで発現量が徐々に増加した (Figs. 3-1, 2)。*GmSPL3c, GmSPL9d* は、SD 条件と LD 条件の後半の葉位でも発現量が増加した (Figs. 3-1, 2, 3)。*GmSPL3d, GmSPL9a, GmSPL2a, b* は、SD 条件では後半の葉位においても発現量が増加したが、LD 条件では *miR156* の発現が低いにも関わらず、*GmSPL3d, GmSPL9a, GmSPL2a, b* の発現量の減少が認められた (Figs. 3-1, 2)。以上の結果より、前半の葉位では、日長条件に依らずに *miR156* が *GmSPL3c, d, GmSPL9a, c, d, GmSPL2a, b* の発現を抑制するが、後半の葉位においては、*miR156* の発現の減少に伴って、*GmSPL3c, GmSPL9d* の発現量が増加することが明らかとなった。生育後期に *SPL3d, SPL9a, SPL2a, b* の発現量が減少することは、これまでに報告されておらず、ダイズにおいて開花が抑制される LD 条件では、*miR156* とは異なる経路によって *SPLs* が制御、転写調節されることが示唆された。また、*GmSPL9c* は SD 条件の「エンレイ」と「Peking」、LD 条件の「エンレイ」では発現量が増加したが、LD 条件の「Peking」でのみ後半の葉位で発現量が減少した (Figs. 3-1, 2, 3)。感光性の強い「Peking」でのみ *GmSPL9c* の発現が減少したことから、生育後期における *GmSPL9c* の発現は、日長条件によって左右されることが示唆された。

ダイズにおける *miR172* の生合成経路の解析

miR172 は、植物に共通して、生育が進むにつれて発現量が増加する (Lauter et al., 2005; Wang et al., 2011; Tanaka et al., 2011; Wu et al., 2009; Yoshikawa et al., 2013; Teotia and Tang, 2015)。*miR172* による遺伝子発現の抑制は、ターゲット遺伝子の *mRNA* に *miR172* と相同な塩基配列が存在する時、*miR172* が結合し、*mRNA* を切断、分解することでおこる。ターゲット遺伝子として、開花関連遺伝子の発現を抑制する *AP2* 様の遺伝子などが存在する (Teotia and Tang, 2015)。本研究では、LD 条件で生育した「Peking」において、後半の葉位で *miR172* の発現量が減少し、異なった長さの増幅断片が 2 つ検出された (Fig. 3-4)。ダイズの *miR172* は、miRBase において *miR172a~miR172l* の 12 遺伝子が登録されている。12 遺伝子の *miR172* は、*mature-miR172* の塩基配列の長さや違いによって、*miR172a/b/h*、*miR172c*、*miR172d/e*、*miR172f*、*miR172g*、*miR172i/j*、*miR172k*、*miR172l* と 8 つのグループに分類される。LD 条件で生育した「Peking」において、*mature-miR172* と異なる長さの断片が 2 つ (Fragment_1、Fragment_2) 得られ、塩基配列を解析した結果、それらの断片には *mature-miR172a/b/f/h* の配列が存在し、3'側の配列によって、Fragment_1 は *pri-miR172f*、Fragment_2 は *pri-miR172a* であることを明らかにした (Figs. 3-4, 5)。Fragment_1 と *Glyma.11G195600* における 2 塩基の差異は、Fragment_1 は「Peking」に由来するが、*Glyma.11G195600* は Williams 82 に由来するものである

ことから、系統による違いによるものであると考えられる。

SD 条件で生育した「エンレイ」と「Peking」において、*mature-miR172* の発現が低い前半の葉位では、*pri-miR172f* の発現が認められ (Fig. 3-5)、生育初期に *miR172* の生合成は阻害されていることが示唆された。LD 条件の時、両品種は、後半の葉位において *miR156* の発現量が減少するが (Fig. 2-6)、*miR172* の発現量は、「Peking」が「エンレイ」よりも低かった (Fig. 3-6)。また、「Peking」では、*mature-miR172* の前駆体となる *pri-miR172f* の発現量が多くなり、*pri-miR172a* の発現も認められた (Fig. 3-6)。このことより、感光性の強い「Peking」は、生育の後半において LD により *miR172* の生合成が強く阻害されていることが示唆された。

miR172 は、DNA より転写された *pri-miR172* が DCL1 や SE といったタンパク質の働きによって、*pre-miR172* (stem loop 構造)、*miR172/miR172** duplex へと変化し、最終的に一本鎖である *mature-miR172* となる (Zhang et al., 2015)。シロイヌナズナの *gi* 変異体では、*DCL1*、*SE* の発現量が減少するため、*miR172* の発現量も低下することが報告されている (Jung et al., 2007)。本研究においても、各葉位の *GmDCL1* と *GmSE* の発現量を解析した結果、SD 条件と LD 条件の「エンレイ」を比較すると大きな差が認められなかった (Fig. 3-8)。一方、SD 条件の「Peking」では、*GmDCL1* と *GmSE* は常に高い発現量を示し、LD 条件では、後半の葉位より発現量が減少した。以上のことより、日長条件と品種の感光性の違いによって *GmDCL1* と *GmSE* の発現量が変わることが考えられた。また、LD 条件下で生育した「Peking」は、*GmDCL1* と *GmSE* の発現量が減少したために、*miR172* の生合成が阻害され、*mature-miR172* の発現量も減少したことが示唆された。

***E2*, *E3* 遺伝子の NILs における開花の表現型**

「エンレイ」と「Peking」では、感光性に関する *E1*~*E4* 遺伝子座の遺伝子型が異なり、「エンレイ」では *E1e2e3E4*、「Peking」では *e1-pE2E3E4* である (Tsubokura et al., 2014)。*E2* は *GmGIa* であり、*E3* は *GmPhyA3* であり、*E2* もしくは、*E3* の機能欠損型は自然日長で開花が早くなることが報告されている (Watanabe et al., 2009, 2011)。本章では、「エンレイ」に「Peking」の *E2*, *E3* をそれぞれ導入した NILs (En_*E2*, En_*E3*) を用い、日長の違い反応する開花に関連する表現型について調査した。

SD 条件下において、「Peking」は、「エンレイ」よりも有意に開花日数が早くなることが認められ、短日に反応し、開花を促進する因子が存在すると考えられた。「Peking」のように *E2* または *E3* 遺伝子座が機能型であると短日条件で開花が促進されると考え、SD 条件下で「エンレイ」、En_*E2*, En_*E3* の開花日数を比較したが、有意差は認められなかった。開花時葉数も有意差はなく、開花までの生育速度は同等であった。以上のことより、「Peking」において、*E2*, *E3* 遺伝子座は SD 条件による開花促進に関与しないことが明らかとなり、他の要因によって開花が促進されていることが示唆された。

自然条件下で、「エンレイ」にサチユタカの *E2* 遺伝子を導入した NIL を栽培すると開花が「エンレイ」よりも遅れることが報告されている (Yamada et al., 2012)。しかし、本章において LD 条件下で調査したところ、「エンレイ」と En_*E2* の開花日数、開

花時葉数に差はなかった (Fig. 3-9C)。本実験では植物体を一定の日長や温度条件で栽培しているが、自然条件下では日長や温度が変化しており、*E2* 遺伝子座は、日長や温度が変化することによって開花抑制の効果を発揮する可能性が示唆された。一方、「Peking」と *En_E3* は、LD 条件下で開花日数と開花時葉数が他の 2 系統よりも有意に多くなることが認められ、特に *En_E3* は大幅に開花が遅延した。光周性開花経路において、*E3* と *E4* 遺伝子の下流に存在する *E1* 遺伝子は、長日条件下で開花を抑制することが知られている (Xia et al., 2012)。「Peking」は機能欠損型の *e1-p* であり、「エンレイ」は機能型の *E1* を持つ (Xia et al., 2012; Tsubokura et al., 2014)。*En_E3* の遺伝子型は、*E1e2E3E4* となり、*E1* 遺伝子により *e1-p* の遺伝子をもつ「Peking」よりも開花が大きく遅延したと考えられる。また、LD 条件下での開花抑制には、*E1* と *E3* 遺伝子座の効果が大きいことが明らかとなった。

***E2*, *E3* 遺伝子の NILs における JA 相転換に関する形質の表現型**

第 2 章において、感光性の強い「Peking」は、感光性の弱い「エンレイ」に比べ、葉の大きさや *miR156* と *miR172* の発現量といった JA 相転換に関する形質が日長条件の影響を大きく受けることを明らかにしたが、原因となった遺伝子の特定までは至らなかった。シロイヌナズナでは、日長条件や *PhyA* などの光受容体に関する遺伝子は、JA 相転換に関する形質 (トライコーム形成、*miR172* 発現量) の制御に関わっていることが報告されている (Telfer et al., 1997; Jung et al., 2007)。また、ダイズにおいても、*miR156* および *miR172* の発現量が *E1*~*E4* 遺伝子座および *E3*, *E4*

遺伝子座の遺伝子型によって異なることが報告されている (Cao et al., 2015; Zhao et al., 2015)。以上のことより、「エンレイ」と「Peking」で異なる *E2*、*E3* 遺伝子が JA 相転換に関与していると予想し、SD 条件、LD 条件で生育した「エンレイ」、En_*E2*、En_*E3*、「Peking」の葉の大きさが急激に変化する葉位を比較することで、*E2*、*E3* 遺伝子が JA 相転換に関与するのかを調査した。SD 条件の「エンレイ」、En_*E2*、En_*E3* の間では、葉位に有意な差が認められなかったが、En_*E2*、En_*E3* は第 3 葉～第 4.5 葉位に分布する個体が「エンレイ」よりも若干多かった (Fig. 3-10)。「Peking」は、他の系統と比べ、1 葉位分早い生育段階で葉の大きさが急激に変化した (Fig. 3-9B)。また、「Peking」の開花時葉数も、他の系統よりも 1 葉分少なかった (Figs. 3-9B, 11)。これらのことより、「Peking」のように SD 条件で JA 相転換が早くなる原因として、2 つの要因が考えられる。1 つ目は、*E2* と *E3* 遺伝子座の両方が機能的でない、葉の大きさが急激に変化する現象が早い段階の葉位でおこらないこと、2 つ目は、開花を促進する SD 条件においても *E2*、*E3* 遺伝子単独での関与が見られなかったことから *E2*、*E3* 遺伝子とは異なる要因が開花経路と JA 相転換を促進することである。一方、LD 条件では、「エンレイ」よりも En_*E2*、En_*E3* が遅い葉位で葉の大きさが急激に変化する傾向があった (Fig. 3-11)。また、LD 条件の En_*E2*、En_*E3*、「Peking」は、SD 条件よりも遅い葉位で葉の大きさが急激に変化することが認められた (Fig. 3-11)。これらのことより、*E2*、*E3* 遺伝子が LD に反応して JA 相転換の時期を遅らせていることが示唆された。

総合考察

juvenile-adult 相転換 (JA 相転換) は、juvenile phase から adult phase への相転換のことを示し、古くから木本類において、JA 相転換によって形態変化が起こるのは有名である (Poethig, 2003, 2010; Wang et al., 2011)。シロイヌナズナやトウモロコシ、イネといった草本類においても精力的に JA 相転換に関する形態学的、分子生物学的解析が行われている (Evans et al., 1994; Lawson and Poethig, 1995; Telfer et al., 1997; Asai et al., 2002; Wu et al., 2009; Jung et al., 2011; Li et al., 2012; Lièvre et al., 2016)。また、最近では、他の植物種においても juvenile phase や adult phase についての研究が報告されている (Zhang et al., 2011; Aung et al., 2014; Bhogale et al., 2014; Wang et al., 2014, 2015; Feng et al., 2016)。一方、ダイズでは、栽培品種である「エンレイ」を用いて、葉序、葉形、葉の大きさ、葉のトライコーム数、托葉の大きさ、光合成能力、SAM、*miR156* と *miR172* の発現量、などが JA 相転換によって変化すると報告されているが (Yoshikawa et al., 2013)、ダイズの JA 相転換に関する知見は、シロイヌナズナやトウモロコシ、イネと比べて、圧倒的に少ない。本研究では、ダイズにおける JA 相転換の知見を集積することを目的とした。

ダイズコアコレクションや栽培品種を用い、Yoshikawa et al. (2013) が「エンレイ」で報告した形態変化 (葉序、葉形、トライコーム数、托葉、葉の大きさ) がダイズで一般的であるのか調査を行った。葉序、葉形、トライコーム数の変化は、ダイズに共通した形態変化ではなかったが、托葉や葉の大きさは、ダイズコアコレクションや栽培品

種において、「エンレイ」と同様にある葉位で変化する傾向が認められ、ダイズに共通した形態変化であることが示唆された。

特に葉の大きさは、シロイヌナズナやイネにおいても、生長相によって異なることが報告されており (Asai et al., 2002; Wu et al., 2009; Li et al., 2012; Lièvre et al., 2016)、JA 相転換によって葉の大きさが変化する現象は、ダイズでも一致し、植物種に共通した形態変化であることが示唆された。また、葉の大きさが急激に変化する葉位は系統によって異なり、ダイズ内で JA 相転換の時期の多様性の存在が示唆された。以上のことより、ダイズにおいて、葉の大きさが急激に変化する葉位は、JA 相転換の指標となることが考えられる。

また、シロイヌナズナにおいて、JA 相転換の指標として知られている葉の裏にトライコームが形成される葉位は、同一系統内の個体によって多少のばらつきが存在することが報告されている (Telfer et al., 1997)。本研究においても、同じ系統であっても、個体によって JA 相転換の時期のばらつきが認められた。この現象は、JA 相転換を制御する遺伝子発現の変化と代謝産物 (糖、ジベレリン) や植物ホルモンの内生量が個体ごとに異なるためであると考えられる (Telfer et al., 1997; Yang et al., 2013; Yu et al., 2013; Teotia and Tang, 2015)。

2014 年と 2015 年に異なる自然日長条件下で栽培したダイズ 16 系統は、葉の大きさが急激に変化する葉位が年度間で異なる系統群と大きな差がない系統群の 2 つに分類された。シロイヌナズナの野生型は、日長条件によって、葉の裏側にトライコームが形成される葉位が異なることが報告されている (Telfer et al., 1997)。このことから、年度間で葉の大きさが急激に変化する葉位が異なる系統群は、日長に対する反

応が強く、年度間で大きな差がない系統群は、日長に対する反応が弱いと考えられる。ダイズの感光性に関与する遺伝子として *E1~E4* 遺伝子座が同定されており (Liu et al., 2008; Watanabe et al., 2011, 2009; Tsubokura et al., 2014)、供試した 16 系統において *E1~E4* 遺伝子座について解析を行った。それぞれの系統群に特異的な遺伝子型は明瞭に見られなかったが、年度間で大きな差がない系統群では *E3* 遺伝子座が機能欠損型であり、年度間で異なる系統群では *E3* 遺伝子座は機能型である傾向があった。また、シロイヌナズナでは、感光性に関与する遺伝子以外にも *miR156* や *miR172*、*SPLs* などの JA 相転換を制御する遺伝子が報告されており (Teotia and Tang, 2015)、本研究においても *E3* 遺伝子座のみでは説明できない系統も存在したことから、他の *E* 遺伝子やシロイヌナズナで報告されている JA 相転換に関係する遺伝子の関与が示唆された。これらの実験は、野外の自然日長条件下で行っており、2014 年と 2015 年で栽培時期が異なったため日長条件が異っていた。また、温度も異なっており、温度条件によって、JA 相転換の起こる葉位が異なることがシロイヌナズナで報告されていることから (Kim et al., 2012)、さまざまな環境要因が JA 相転換に影響を与えている可能性が考えられた。そのため、人工気象器などを用い、日長などの環境条件を制御した条件下でさらに詳しく感光性と JA 相転換の関連を解析する必要があると考えられた。

感光性と JA 相転換の関連性を詳細に解析するために感光性が弱い「エンレイ」(*E1e2e3E4*) と感光性が強い「Peking」(*e1-pE2E3E4*) を日長条件のみが異なる環境制御下で栽培し、葉の形態、および *miR156* と *miR172* の発現量について発達段階を追って調査した。「エンレイ」では、感光性が弱いために日長条件が異なっ

も、*miR156*の発現にあまり大きな差がみられず、そのため日長条件に関わらず一定の葉位で葉の大きさが急激に変化することが考えられた (Fig. 4-1)。一方、「Peking」では、SD 条件によって *miR156*の発現が抑制され、LD 条件によって *miR156*の発現が促進されていたために葉の大きさが急激に変化する葉位が日長条件によって異なると考えられた。前述の結果において推察された *E3*遺伝子だけではなく、*E2*遺伝子も日長に反応し、JA 相転換に影響を与えることが示唆された。

次に *E2*、*E3*遺伝子それぞれの JA 相転換に対する影響を調査するために、「エンレイ」に「Peking」の *E2*、または *E3*遺伝子を導入した NILs (En_*E2*、En_*E3*) を用い、解析した。その結果、LD 条件下で En_*E2*と En_*E3*は、「エンレイ」よりも遅い葉位で葉の大きさが急激に変化した。このことから、LD 条件下の「Peking」では、*E2*と *E3* 遺伝子がそれぞれ LD 条件に反応し、生育初期より *miR156*の発現量を増加させているため、JA 相転換が起こる生育ステージが SD 条件下で生育するよりも遅延すると考えられた (Fig. 4-1)。一方、SD 条件下では、「エンレイ」、En_*E2*、En_*E3*の3系統間では、有意な差が認められず、「Peking」は他の3系統よりも JA 相転換が下位の葉位で認められた。この原因として、以下の2つが考えられた。第1としては、*E2*と *E3* 遺伝子座の両方が機能的でないと、*miR156*の発現を抑制できず JA 相転換が早い段階の葉位でおこらない (Fig. 4-1)。第2としては、SD 条件においても *E2*、*E3* 遺伝子単独での関与が見られなかったことから、*E2*、*E3* 遺伝子とは異なる要因によって *miR156*の発現を抑制することで、「Peking」は「エンレイ」よりも早期に JA 相転換が起こることが考えられた (Fig. 4-1)。

*miR172*は、生育段階が進むにつれ発現量が増加し、開花を促進する働きがある

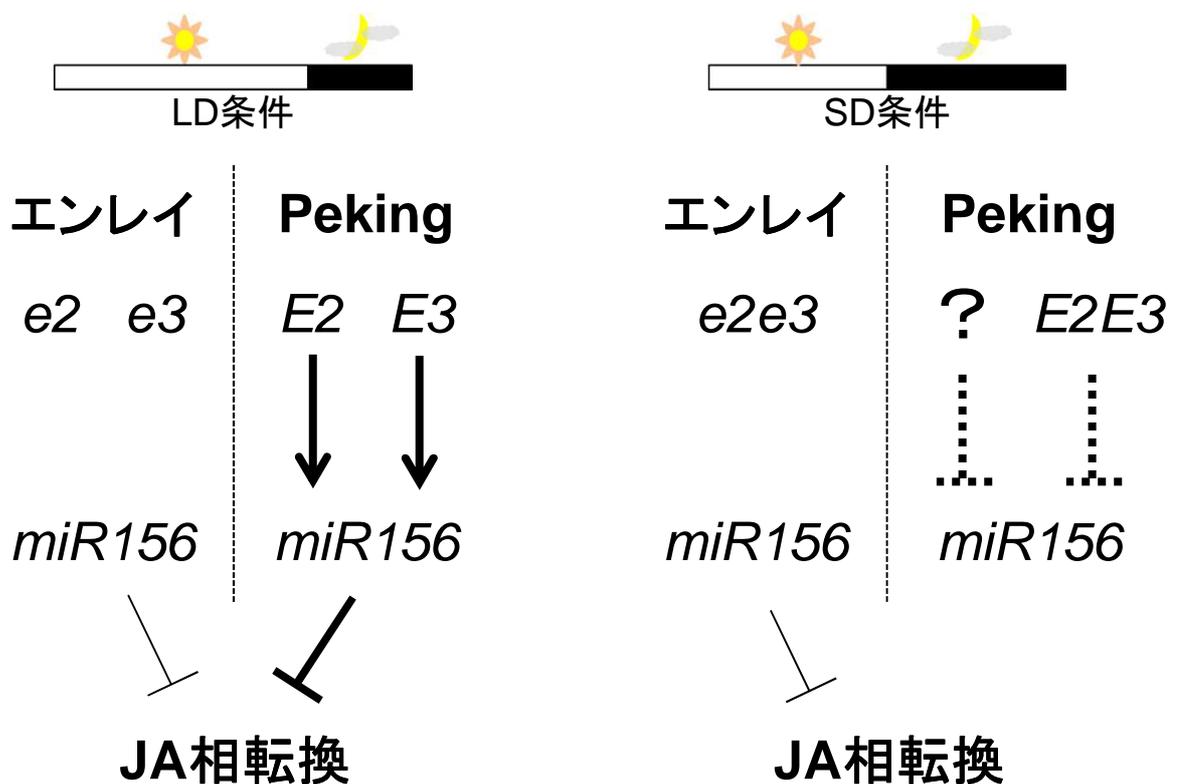


Fig. 4-1 日長条件による「エンレイ」と「Peking」のJA相転換の経路

「エンレイ」では、機能欠損型の*e2*、*e3*遺伝子が日長条件に反応せず、内在的な要因によって徐々に*miR156*の発現量が減少するため、日長条件に関わらず、ほぼ一定の生育ステージでJA相転換が起こる。

一方、「Peking」では、機能型の*E2*、*E3*遺伝子が日長条件に反応し、日長条件によってJA相転換が起こる生育ステージが異なる。LD条件下では、*E2*、*E3*遺伝子がそれぞれLDに反応し、生育初期より*miR156*の発現量を増加させるため、JA相転換が起こる生育ステージが遅れる。SD条件下では、*E2*と*E3*遺伝子の相加効果、または他の要因によって、生育初期より*miR156*の発現量が低く、早期の生育ステージでJA相転換が起こる。

矢印は促進、T字は抑制を示し、線の太さはその効果の強さを表す。また、実線は本研究で明らかになったことを、波線は本研究より推察されたことを意味する。

(Lauter et al., 2005; Wang et al., 2011; Tanaka et al., 2011; Wu et al., 2009; Yoshikawa et al., 2013; Teotia and Tang, 2015)。また、シロイヌナズナでは、*miR172* は、*SPL9*, *10* によって発現が促進されることや *DCL1* や *SE* といったタンパク質の働きによって生合成されることが報告されている (Wu et al., 2009; Zhang et al., 2015)。本研究において、LD 条件下の「エンレイ」と「Peking」では、生育後期において、*miR172* の発現量が減少した。また、その発現量は、「エンレイ」よりも「Peking」で大きく減少していた。この現象の要因を明らかにするため、ダイズにおける *GmSPLs* や *GmDCL1*, *GmSE* の発現を調査した。

SPLs の発現は、*miR156* によって抑制され、生育後期にはその発現量が増加することが報告されているが (Rhoades et al., 2002)、本研究において、LD 条件下の「エンレイ」と「Peking」では、生育後期での *SPL3d*, *SPL9a*, *SPL2a*, *b* の発現量が減少していた。これらの *SPLs* は、生育後期において LD 条件によって制御、転写調節されることが考えられた。また、*GmSPL9c* は LD 条件の「Peking」でのみ後半の葉位で発現量が減少したことから、生育後期における *GmSPL9c* の発現は、品種の感光性に関わる *E2*, *E3* 遺伝子に左右されることが示唆された。

LD 条件下の「Peking」では、*GmDCL1*, *GmSE* の発現量が減少し、*miR172* の前駆体である *pri-miR172f* の発現量が多くなり、*pri-miR172a* の発現も認められた。一方、「エンレイ」においても、*pri-miR172f* の発現がみられたが、*pri-miR172a* は検出されなかった。このことより、LD 条件は、「エンレイ」と「Peking」の *miR172* の生合成経路を阻害し、「エンレイ」と比べ、「Peking」はその阻害の程度が強く、*E2E3* 遺伝子も関与することが示唆された。

以上のことより、ダイズの開花抑制に働くLD条件下で生育すると、生育後期にいくつかの *GmSPLs* の発現が抑制され、*pri-miR172* の発現が促進されず、*miR172* の生合成も阻害されるために *Pri-miR172f* の状態で生合成が止まることが明らかとなり、結果的に *Mature miR172* の発現量が減少することが考えられた (Fig. 4-2)。また、*E2E3* 遺伝子が機能型であると、前述の *SPL* の発現の抑制や生合成経路の阻害に加え、*SPL9c* の発現が抑制され、*GmDCL1* と *GmSE* の発現量も抑制されるために生合成経路の阻害が強くなり、さらに *Mature miR172* の発現量が減少することが示唆された (Fig. 4-2)。

本研究では、ダイズにおいて、葉の大きさが急激に変化する葉位が JA 相転換の指標となる可能性を見出した。また、日長条件や感光性の違いによって *miR156* の発現が変化するなどの現象が起こり、JA 相転換に影響を与えることが明らかとなったが、他の植物に比べるとその知見はまだ少ない。現在までにシロイヌナズナでは、葉の裏にトライコームが形成される葉位を JA 相転換の形質マーカーとして利用し、温度などの環境要因 (Kim et al., 2012) や糖 (Yang et al., 2013; Yu et al., 2013)、ジベレリン (Telfer et al., 1997) といった内在的要因が JA 相転換に関わっていること、*SPLs* (Huijser and Schmid, 2011) や JA 相転換に影響を与える *HASTY*、*HYPONASTIC LEAVES1*、*TEMPRANILLO* といった遺伝子 (Telfer and Poethig, 1998; Li et al., 2012; Sgamma et al., 2014) などが同定されている。ダイズにおいても、葉の大きさの変化を JA 相転換形質マーカーとして利用できることが本研究で明らかとなったことから、今後 JA 相転換に関する研究が進み、基礎的な知見が集積されることが期待される。さらに、トウモロコシにおいて、*adult phase* は、

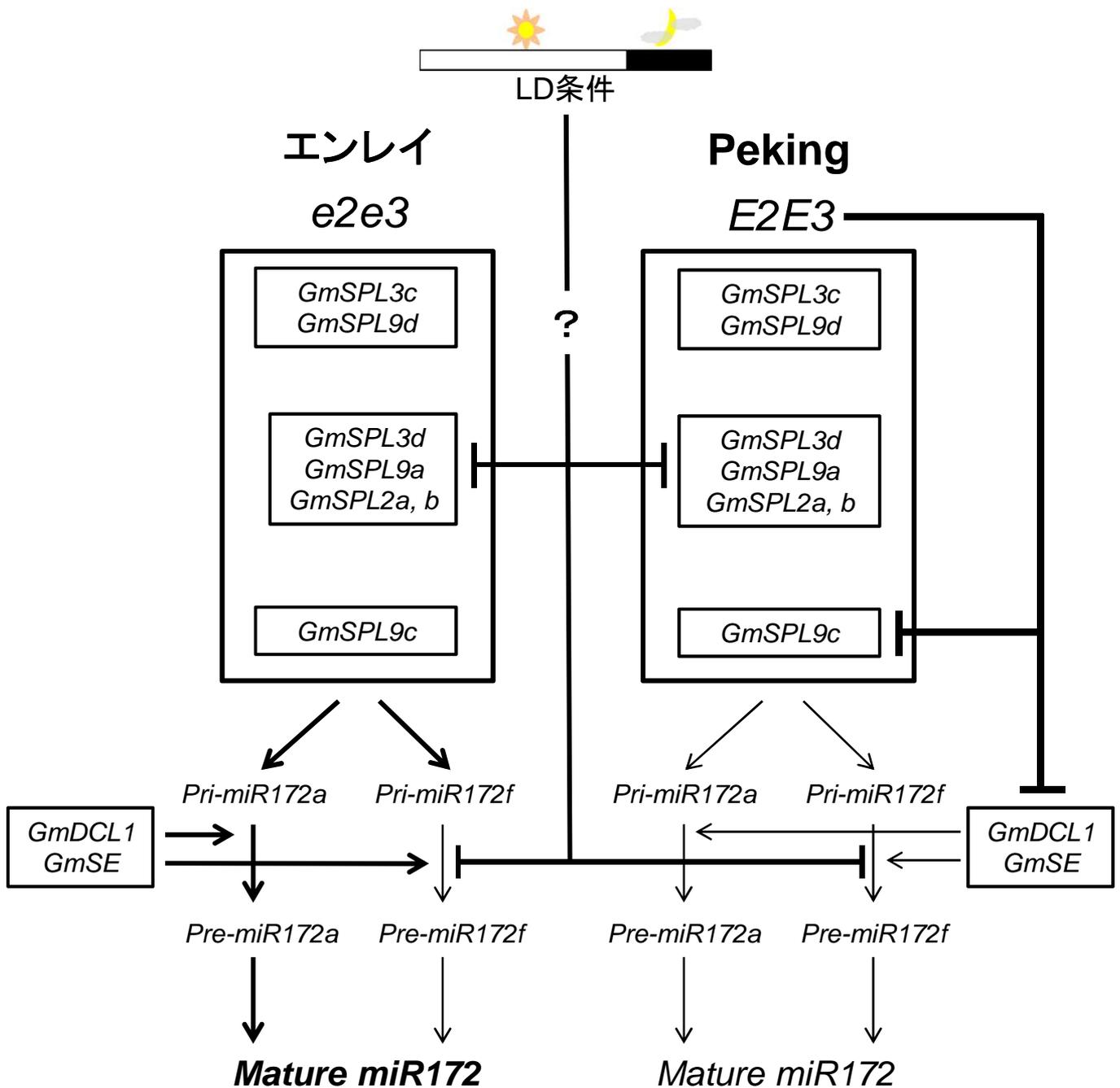


Fig. 4-2 LD条件下における「エンレイ」と「Peking」のmiR172の発現経路

「エンレイ」と「Peking」において、生育が進むにつれ、miR156の発現量が下がり、GmSPL3c, d, GmSPL9a, c, d, GmSPL2a, bの発現は増加していく。しかし、LD条件下では、生育後期においてGmSPL3d, GmSPL9a, c, GmSPL2a, bの発現量が減少することで、miR172の転写量も減少する。また、Pri-miR172からPre-miR172fへの生合成も阻害されるためにLD条件下では生育後期にMature miR172の発現量が減少することが示唆された。さらに、E2E3遺伝子が機能型の「Peking」は、GmSPL9cの発現量も減少し、GmDCL1, GmSEの発現量が減少することでPri-miR172a, fからPre-miR172a, fへの生合成が阻害される。このことにより、「Peking」は、「エンレイ」よりもMature-miR172の発現量が低いと考えられた。

矢印は促進、T字は抑制を示し、線の太さはその効果の強さを表す。

juvenile phase に比べ、病害虫へ対する抵抗性が強くなることが報告されている (Riedeman et al. 2008)。この現象の詳細な機構はよくわかっていないが、JA 相転換によって植物体内の遺伝子発現が変化することで、病害虫抵抗性に関する遺伝子の発現や二次代謝産物の合成量も変化していることが推測される。このように JA 相転換の理解は、生産現場へ応用可能であり、ダイズにおいても、JA 相転換の知見を蓄積、応用することで栽培方法の開発や新品種の育成などを行い、ダイズ生産へ貢献できると考えられる。例として、JA 相転換と耐病性の関係性を解明することで、初期生育時の病害抵抗性を強めた健全な苗の栽培技術や品種育成が可能となる。また、juvenile phase は、花芽形成を行わない性質を持っており、juvenile phase が通常よりも長い期間続く新品種を開発することで、ダイズ栽培に適さない日長が短い地域や時期においてもダイズ生産を行える可能性がある。この新品種は、一般の品種にとって開花を促進する環境条件であっても、延長した juvenile phase によって栄養生長を続け、茎葉を増加させることで収穫、出荷可能な種子を生産するのに必要な生育量を確保させ、十分に植物体が生育した頃に JA 相転換を行い、環境条件に反応することで開花することができる。

草本植物における JA 相転換の研究は、比較的歴史が浅く、様々な研究に使われるモデル植物のシロイヌナズナであっても JA 相転換は未知の部分が多く存在し、さらにダイズの JA 相転換の知見は Yoshikawa et al. (2013) と本研究のみである。シロイヌナズナに比べ、ダイズの生態に関する報告数は少ないが、最近ではダイズの開花に関する報告が徐々に増えている。今後は、開花だけではなく、開花前の栄養生長相に関する研究も盛んに行われることが予想される。そのような中で、本研究が

ダイズの栄養生長相の解明の一助になることを期待する。

摘要

植物の栄養生長相では、幼若栄養生長相 (juvenile phase) から成熟栄養生長相 (adult phase) へ相転換 (JA 相転換) が起こる。シロイヌナズナやイネ、トウモロコシを中心にこの JA 相転換に関する研究が進められており、juvenile phase と adult phase では、形態が異なることが報告されている。また、分子生物学的な解析も精力的に行われており、*micro RNA (miR) 156* や *miR172* の発現の変化が重要であることや JA 相転換の制御に関わる遺伝子が同定されている。さらに、日長や温度などの外的要因、ジベレリンや糖などの内的要因なども JA 相転換に影響を与えることが報告されている。近年では、上記の 3 種以外の植物種においても、juvenile phase や adult phase に関する報告は増加している。しかし、世界的に重要な作物であるダイズの JA 相転換に関する知見は少ない。本研究は、ダイズにおける JA 相転換の知見を集積することを目的とした。

第 1 章では、ダイズ 85 系統用いて「エンレイ」で報告された JA 相転換に関連する形態変化がダイズで一般的であるのか否かを調査した。その結果、葉序、葉形、トライコームは、ダイズに共通した形態変化ではないことが明らかとなった。一方、葉の大きさと托葉は、ダイズに共通する形態変化であり、特に葉の大きさはダイズの JA 相転換の指標となることが示唆された。葉の大きさが変化する葉位は系統によって異なり、JA 相転換が起こる時期には多様性が認められた。日長条件が異なる 2 ヶ年の調査を行ったが、葉の大きさが急激に変化する葉位が年度間で異なる系統群と大きな差がない系

統群の2つに分類された。分類した系統群では、感光性に関する *E3* 遺伝子座の遺伝子型が異なる傾向が認められ、*E3* 遺伝子座の遺伝子型と日長が JA 相転換の制御に関わることが示唆された。

第2章では、感光性の弱い「エンレイ」(*E1e2e3E4*) と感光性の強い「Peking」(*e1-pE2E3E4*) を異なる日長条件で生育し、日長条件と感光性が JA 相転換に与える影響について詳細に解析した。「エンレイ」は、日長条件にかかわらず一定の葉位で葉の大きさが変化しており、*miR156* の発現量に大きな差が認められなかった。一方、「Peking」は、日長条件によって、葉の大きさが変化する葉位が異なり、*miR156* の発現量も異なっていた。これらのことより、JA 相転換は日長の影響を受けるが、その程度は品種の感光性によって異なることが考えられた。また、「エンレイ」と「Peking」は感光性に関する *E2* と *E3* 遺伝子の遺伝子型が異なることから、*E2*、*E3* が JA 相転換の制御に関与することが示唆された。ダイズの生育後期では、長日条件下において *miR172* の発現量が減少し、品種によってその程度が異っており、発現パターンがシロイヌナズナと異なるという新たな知見も得られた。

第3章では、長日条件下の生育後期に *miR172* の発現量が減少する原因を明らかにするため、*miR172* の転写を促進する *Squamosa promoter binding protein-like (SPL)s* や *miR172* の生合成経路に関わる遺伝子の発現パターンを調査した。一部の *GmSPLs* は、長日条件下で生育後期の発現量が減少し、特に、*GmSPL9c* は「Peking」でのみ発現量

が減少した。また、「Peking」では、*miR172* の前駆体の発現が認められるものの、生合成に関わる *Dicer-Like 1* と *SERRATE* の発現量が減少していた。これらのことより、ダイズにとって開花が抑制される長日条件では、生育後期に一部の *GmSPLs* の発現が抑制されることに加え、*miR172* の生合成経路が阻害されるために *miR172* の発現量が減少していると考えられた。また、これらの減少の程度は、品種の感光性によって異なることが示唆された。さらに、「エンレイ」に「Peking」の *E2* と *E3* 遺伝子をそれぞれ導入した準同質遺伝子系統 (NILs) を用い、*E2* と *E3* 遺伝子の JA 相転換への影響を調査した。長日条件下の NILs は「エンレイ」よりも JA 相転換が遅延し、それぞれ *E2* と *E3* 遺伝子は長日条件下で JA 相転換が遅延させることが示唆された。一方、短日条件下の NILs は、「Peking」よりも後期の生育段階で JA 相転換が起きており、「エンレイ」とほぼ同等の生育段階であった。*E2* と *E3* 遺伝子の両方が機能型になると、短日条件下で「Peking」のように早期に JA 相転換が起きる可能性が示唆された。本研究では、「Peking」の *E2*、*E3* 遺伝子の両方を導入した NIL を扱っておらず、今後、この材料を用い、解析を進めることによって短日条件における JA 相転換と *E2*、*E3* 遺伝子の関係性が明らかになると考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、岩手大学高畑義人教授並びに畠山勝徳准教授、大阪府立大学横井修司教授には、終始丁寧なご指導、ご鞭撻を頂き、深謝する。帯広畜産大学三浦秀穂教授並びに山形大学笹沼恒男准教授には、副査として本論文を審査し、ご助言を頂き、感謝申し上げます。また、岩手大学特任助教北本尚子氏には、多くのご助言を頂き、謝意を表したい。国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 次世代作物開発研究センター加賀秋人氏には、実験材料を分譲して頂き、感謝する。最後に本研究の円滑な遂行にご協力頂いた岩手大学植物育種学研究室の各位に深く御礼申し上げます。

引用文献

- Asai, K., Satoh, N., Sasaki, H., Satoh, H., and Nagato, Y. (2002). A rice heterochronic mutant, *mori1*, is defective in the juvenile-adult phase change. *Development* 129: 265–273.
- Aung, B., Gruber, M.Y., Amyot, L., Omari, K., Bertrand, A., and Hannoufa, A. (2014). *MicroRNA156* as a promising tool for alfalfa improvement. *Plant Biotechnol. J.*: 1–12.
- Bhogale, S., Mahajan, A.S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H. V, and Banerjee, A.K. (2014). *MicroRNA156*: a potential graft-transmissible *microRNA* that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiol.* 164: 1011–1027.
- Boerma HR, Specht JE (2004) SOYBEANS; Improvement, Production and Uses, 3rd edn. Amer Soc Agron Inc, Crop Sci Soc Amer Inc, Soil Sci Soc Amer Inc, Wisconsin, USA
- Cao, D., Ying L., Jialin W., Haiyang N., Youning Wang., Sijia L., Qiong J., Xiaoming L., Danning S., Chao F., Xiaohui Y., Xiaohui Z., Xia L., Baohui L., and Fanjiang K. (2015). *GmmiR156b* overexpression delays flowering time in soybean. *Plant Mol. Biol.* 89: 353–363.
- Chen, X., Zhang, Z., Liu, D., Zhang, K., Li, A., and Mao, L. (2010). SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: Star players for plant growth and development. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 946–951.
- Curtin, S.J., Jean-Michel M., Benjamin W. C., Javier G., Sandra M. M., Reza H., Juan J. G., Ryan C. D., Michael B. K., Andrew L. E., Blake C. M., Daniel F. V and Robert M. S. (2015). *MicroRNA* maturation and *microRNA* target gene expression regulation are severely disrupted in soybean *dicer-like1* double mutants. *G3 (Bethesda)*. 6: 423–433.
- Evans, M.M., Passas, H.J., and Poethig, R.S. (1994). Heterochronic effects of *glossy15* mutations on epidermal cell identity in maize. *Development* 120: 1971–81.
- Feng, S., Xu, Y., Guo, C., Zheng, J., Zhou, B., Zhang, Y., Ding, Y., Zhang, L., Zhu, Z., Wang, H., and Wu, G. (2016). Modulation of *miR156* to identify traits associated with vegetative phase change in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *J. Exp. Bot.* 67: 1493–1504.

- Huijser, P. and Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. *Development* 138: 4117–4129.
- Ichihashi, Y. and Tsukaya, H. (2015). Behavior of leaf meristems and their modification. *Front. Plant Sci.* 6: 1060.
- Jian, B., Liu, B., Bi, Y., Hou, W., Wu, C., and Han, T. (2008). Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 9: 59.
- Jung, J.H., Seo, Y.-H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.-H., and Park, C.-M. (2007). The *GIGANTEA*-regulated *microRNA172* mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 2736–2748.
- Jung, J.H., Seo, P.J., Kang, S.K., and Park, C.M. (2011). *miR172* signals are incorporated into the *miR156* signaling pathway at the *SPL3/4/5* genes in *Arabidopsis* developmental transitions. *Plant Mol. Biol.* 76: 35–45.
- Kaga, A., Shimizu, T., Watanabe, S., Tsubokura, Y., Katayose, Y., Harada, K., Vaughan, D.A., and Tomooka, N. (2012). Evaluation of soybean germplasm conserved in NIAS genebank and development of mini core collections. *Breed. Sci.* 61: 566–592.
- Kim, J.J., Lee, J.H., Kim, W., Jung, H.S., Huijser, P., and Ahn, J.H. (2012). The *microRNA156* - *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN* - *LIKE3* module regulates ambient temperature-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 159: 461–478.
- Lauter, N., Kampani, A., Carlson, S., Goebel, M., and Moose, S.P. (2005). *microRNA172* down-regulates *glossy15* to promote vegetative phase change in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 9412–9417.
- Lawson, E.J.R. and Poethig, R.S. (1995). Shoot development in plants: time for a change. *Trends Genet.* 11: 263–268.
- Li, S., Yang, X., Wu, F., and He, Y. (2012). *HYL1* controls the *miR156*-mediated juvenile phase of vegetative growth. *J. Exp. Bot.* 63: 2787–2798.
- Lièvre, M., Granier, C., and Guédon, Y. (2016). Identifying developmental phases in the *Arabidopsis thaliana* rosette using integrative segmentation models. *New Phytol.* 210: 1466–1478.

- Liu, B., Kanazawa, A., Matsumura, H., Takahashi, R., Harada, K., and Abe, J. (2008). Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the *phytochrome A* gene. *Genetics* 180: 995–1007.
- Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4326.
- Poethig, R.S. (2003). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250: 923–930.
- Poethig, R.S. (2010). The past, present, and future of vegetative phase change. *Plant Physiol.* 154: 541–544.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). Prediction of plant *microRNA* targets. *Cell* 110: 513–520.
- Riedeman E. S., Chandler M. A. and Tracy W.F. (2008) Divergent recurrent selection for vegetative phase change and effects on agronomic traits and corn borer resistance. *Crop Sci.* 48:1723–1731.
- Sgamma, T., Jackson, A., Muleo, R., Thomas, B., and Massiah, A. (2014). *TEMPRANILLO* is a regulator of juvenility in plants. *Sci. Rep.* 4: 3704.
- Shi, R. and Chiang, V. (2005). Facile means for quantifying *microRNA* expression by real-time PCR. *Biotechniques* 39: 519–525.
- Shikata, M., Koyama, T., Mitsuda, N., and Ohme-Takagi, M. (2009). *Arabidopsis SBP-Box* genes *SPL10*, *SPL11* and *SPL2* control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase. *Plant Cell Physiol.* 50: 2133–2145.
- Tanaka, N., Itoh, H., Sentoku, N., Kojima, M., Sakakibara, H., Izawa, T., Itoh, J.-I., and Nagato, Y. (2011). The *COP1* ortholog *PPS* regulates the juvenile-adult and vegetative-reproductive phase changes in rice. *Plant Cell* 23: 2143–2154.
- Telfer, A, Bollman, K.M., and Poethig, R.S. (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 645–654.
- Telfer, A. and Poethig, R.S. (1998). *HASTY*: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 1889–1898.

- Teotia, S. and Tang, G. (2015). To bloom or not to bloom: role of *MicroRNAs* in plant flowering. *Mol. Plant* 8: 359–377.
- Tripathi, R.K., Goel, R., Kumari, S., and Dahuja, A. (2017). Genomic organization , phylogenetic comparison, and expression profiles of the *SPL* family genes and their regulation in soybean. *Dev. Genes. Evol.* 227: 101–119.
- Tsubokura, Y., Watanabe, S., Xia, Z., Kanamori, H., Yamagata, H., Kaga, A., Katayose, Y., Abe, J., Ishimoto, M., and Harada, K. (2014). Natural variation in the genes responsible for maturity loci *E1*, *E2*, *E3* and *E4* in soybean. *Ann. Bot.* 113: 429–441.
- 梅崎 輝尚、中司 祐典、松本 重男(1987) ダイズにおける対生葉の出現について : 第 1 報対生個体出現の実態 日作九支報 54:69-71
- Wang, J.W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E., and Weigel, D. (2008). Dual effects of *miR156* - targeted *SPL* genes and *CYP78A5/KLUH* on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 1231–1243.
- Wang, J.W., Park, M.Y., Wang, L.J., Koo, Y., Chen, X.Y., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2011). *MiRNA* control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genet.* 7: 21–25.
- Wang, Y., Wu, F., Bai, J., and He, Y. (2014). *BrpSPL9* (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* *SPL9*) controls the earliness of heading time in Chinese cabbage. *Plant Biotechnol. J.* 12: 312–321.
- Wang, Y., Wang, Z., Amyot, L., Tian, L., Xu, Z., Gruber, M.Y., and Hannoufa, A. (2015). Ectopic expression of *miR156* represses nodulation and causes morphological and developmental changes in *Lotus japonicus*. *Mol. Genet. Genomics* 290: 471–484.
- Watanabe, S., Hideshima, R., Xia, Z., Tsubokura, Y., Sato, S., Nakamoto, Y., Yamanaka, N., Takahashi, R., Ishimoto, M., Anai, T., Tabata, S., and Harada, K. (2009). Map-based cloning of the gene associated with the soybean maturity locus *E3*. *Genetics* 182: 1251–1262.
- Watanabe, S., Xia, Z., Hideshima, R., Tsubokura, Y., Sato, S., Yamanaka, N., Takahashi, R., Anai, T., Tabata, S., Kitamura, K., and Harada, K. (2011). A map-based cloning strategy employing a residual heterozygous line reveals that the *GIGANTEA* gene is involved in soybean maturity and flowering. *Genetics* 188: 395–407.

- Wu, G. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. *Development* 133: 3539–3547.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.W., Weigel, D., and Poethig, R.S. (2009). The sequential action of *miR156* and *miR172* regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138: 750–759.
- Xia, Z., Watanabe, S., Yamada, T., Tsubokura, Y., Nakashima, H., Zhai, H., Anai, T., Sato, S., Yamazaki, T., Lu, S., Wu, H., Tabata, S. and Harada, K. (2012). Positional cloning and characterization reveal the molecular basis for soybean maturity locus *E1* that regulates photoperiodic flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 2155–2164.
- Xu, M., Hu, T., Smith, M.R., and Poethig, R.S. (2015). Epigenetic regulation of vegetative phase change in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 28: 28–41.
- Yamada, T., Hajika, M., Yamada, N., Hirata, K., Okabe, A., Oki, N., Takahashi, K., Seki, K., Okano, K., Fujita, Y., Kaga, A., Shimizu, T., Sayama, T. and Ishimoto, M. (2012). Effects on flowering and seed yield of dominant alleles at maturity loci *E2* and *E3* in a Japanese cultivar, Enrei. *Breed. Sci.* 61: 653–660.
- Yang, L., Xu, M., Koo, Y., He, J., and Poethig, R.S. (2013). Sugar promotes vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana* by repressing the expression of *MIR156A* and *MIR156C*. *Elife* 2.
- Yoshikawa, T., Ozawa, S., Sentoku, N., Itoh, J.-I., Nagato, Y., and Yokoi, S. (2013). Change of shoot architecture during juvenile-to-adult phase transition in soybean. *Planta* 238: 229–237.
- Yu, S., Cao, L., Zhou, C.-M., Zhang, T.-Q., Lian, H., Sun, Y., Wu, J., Huang, J., Wang, G., and Wang, J.-W. (2013). Sugar is an endogenous cue for juvenile-to-adult phase transition in plants. *Elife* 2.
- Zhang, S., Liu, Y., and Yu, B. (2015). New insights into *pri-miRNA* processing and accumulation in plants. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 6: 533–545.
- Zhang, X., Zou, Z., Zhang, J., Zhang, Y., Han, Q., Hu, T., Xu, X., Liu, H., Li, H., and Ye, Z. (2011). Over-expression of *sly-miR156a* in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the *sft* mutant. *FEBS Lett.* 585: 435–439.
- Zhao, X., Cao, D., Huang, Z., Wang, J., Lu, S., Xu, Y., Liu, B., Kong, F., and Yuan, X. (2015). Dual functions of *GmTOE4a* in the regulation of

photoperiod-mediated flowering and plant morphology in soybean. *Plant Mol. Biol.* 88: 343–355.

Zhu, Q.-H. and Helliwell, C.A. (2011). Regulation of flowering time and floral patterning by *miR172*. *J. Exp. Bot.* 62: 487–495.