

## Contents

<b>Chapter No.</b>	<b>Title</b>	<b>Page number</b>
<b>Chapter 1</b>	Introduction	1
<b>Chapter 2</b>	QTL Analysis for grain shape and seedling characteristics	
	Introduction	4
	Materials and Methods	4
	Results	6
	Discussion	18
<b>Chapter 3</b>	QTL Analysis for leaf senescence in rice	
	Introduction to leaf senescence in rice	24
	Materials and Methods	25
	Results	28
	Confirmation of some QTLs for senescence	36
	Discussion	40
<b>Chapter 4</b>	General discussion	43
<b>Summary (in English)</b>		46
<b>Summary (in Japanese)</b>		50
<b>Literature cited</b>		54
<b>Acknowledgments</b>		58

## English Summary

Since fertile hybrids were obtained between *indica* and *japonica* rice, utilization of the enhanced heterosis has been attempted in the inter-subspecific hybrid in the hybrid rice breeding. But the genetic basis for the heterosis has not been adequately analyzed. To specifically compare the effect of heterozygotes and homozygotes at each quantitative trait locus (QTL) in *indica-japonica* hybrids, two backcrossed populations ( $BC_1F_1$ ), *indica/japonica //japonica* and *indica/japonica//indica*, were produced using IR36 as the *indica* parent and Nekken-2 (NK2) as the *japonica* parent, and mapped with a set of simple sequence repeat (SSR) markers. Several QTLs for grain shape traits, seedling characteristics and leaf senescence were found in the  $BC_1F_1$  or  $BC_1F_1$  lines with a LOD score of 2.5 as threshold. The effects of genotypes on respective traits were analyzed at these QTLs to analyze genetic basis of the heterosis.

### *Materials and methods*

An *indica* variety IR36 showing early senescence was crossed with a *japonica* line NK2 showing late senescence and possessing 'wide compatibility gene', which relieves the resulting hybrids from hybrid sterility. A set of  $BC_1F_1$  populations, IR36/NK2//IR36 and IR36/NK2//NK2, were mapped using SSR markers. Twenty seeds from each  $BC_1F_1$  lines were used to determine QTLs for such grain shape traits as width, 1000-grain weight and thickness. From each of the two  $BC_1F_2$  populations, 120 to 143 lines were also surveyed to evaluate their seedling characteristics. The length of the first leaf, seedling height, fresh and dry seedling weight were measured at 25 days after seeding (DAS).

Further, to characterize senescence of plants with five plants from each  $BC_1F_2$  line, chlorophyll content of leaf was estimated by SPAD values with Minolta Chlorophyll Meter SPAD-502. The leaf chlorophyll content was measured at flowering and 25 days after flowering (DAF). The reduction in chlorophyll content was estimated by the difference between the chlorophyll content at flowering and at 25 DAF, and the number of late-discoloring leaves per panicle at 25 DAF was measured in five plants from each  $BC_1F_2$  line. These plants were initially grown in pots (one plant per pot) under a fertilizer condition, to avoid the interaction between nitrogen and the senescence. To ensure a uniform temperature at the grain-filling stage, each plant was moved into a growth cabinet at the emergence of the third panicle, and was maintained for 25 days in the growth cabinet under a 28/21 °C 12-h day/night cycle. To confirm the effects of QTLs for

the chlorophyll content, contrasting genotypes at each QTL were tested for their phenotypic effects in the BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> under a field condition.

## *Results*

### *Linkage maps of the two back crossed populations*

In IR36/NK2//IR36, 105 SSR markers were mapped on 12 chromosomes with a total of 1835.5 cM. In IR36/NK2//NK2, 117 SSR markers were mapped with a total of 1739.5 cM. A common set of SSR markers was applied for both populations for the mapping. However, the mapping distance of the primers differed in the two populations. This might have been partly due to sampling errors. In addition, a few of the primers were mapped only in one population and not in the other probably due to segregation distortions and other reasons. Some SSR markers were added to clarify LOD scores for certain QTLs.

### *QTLs for grain shape traits*

A total of ten QTLs were found in BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> for grain shape traits: two QTLs for grain weight in IR36/NK2//IR36, five QTLs for grain width in IR36/NK2//IR36 and IR36/NK2//NK2, and three QTLs for grain thickness in IR36/NK2//NK2. Any effect of super dominance was not observed in these determinate traits.

### *QTLs for seedling characteristics*

A total of seven QTLs were found in BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> for the seedling characteristics: one QTL for length of first leaf in IR36/NK2//NK2, one QTL for seedling height in IR36/NK2//NK2, one QTL for chlorophyll content in IR36/NK2//NK2, one QTL for shoot fresh weight in IR36/NK2//IR36, two QTLs for shoot dry weight in IR36/NK2//IR36 and one QTL for water content at seedling in IR36/NK2//IR36. Positive effects were contributed from either one of the parents in the form of partial dominance.

### *QTLs for leaf senescence*

A total of eleven QTLs were found in BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> for leaf senescence: three QTLs for a high chlorophyll content at flowering in IR36/NK2//NK2, two QTL for a high chlorophyll content at 25 DAF in IR36/NK2//IR36 and IR36/NK2//NK2, one QTL for reduction of chlorophyll content in IR36/NK2//NK2, one QTL for an increased number of late-discoloring leaves per panicle in IR36/NK2//NK2, and four QTLs for an increased number of late-discoloring leaves per plant in IR36/NK2//NK2 and IR36/NK2//IR36. Significant QTLs for the senescence traits

were found on the short arm of chromosome 6 and on the long arm of chromosome 9.

#### *Confirmation of the effects of three QTLs for the leaf senescence*

An initial comparison of the BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> lines revealed that the IR36- and NK2-homozygotes showed higher chlorophyll contents at 25 DAF compared with the alternative genotypes at qCCAI-9 and qCCAJ-9 on the long of chromosome 9. The genotypic effects were then tested in the BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub>. Both the IR36- and NK2-homozygotes showed notably higher phenotypic values than the heterozygous, although the level of statistical significance was relatively low, probably due to the further segregation of genotypes in the BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> lines. The QTL analysis for this trait was therefore confirmed in the BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> lines, suggesting that these two QTLs are different despite their close chromosomal positions. A similar analysis was performed to verify the QTL for the reduction of chlorophyll content, on the short arm of chromosome 6. IR36- and NK2- homozygotes were isolated from the IR36/NK2//IR36 and IR36/NK2//NK2 populations, respectively, and the effects of their genotypes on the phenotypic values were tested in the BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> lines. The results confirmed that the IR36-homozygotes showed a significantly greater reduction in the chlorophyll content than the NK2-homozygotes.

#### *Discussion*

The present experiment was designed to analyze genetic basis for an enhanced level of heterosis in an inter-subspecific rice hybrid. QTLs were detected by comparing two marker genotypes (*AA* and *Aa*, or *Aa* and *aa*) on their progeny lines (BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>) in each of the backcrossed populations. The genotypes that were determined to be heterozygous in the BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> lines might therefore have contained three genotypes in the BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> lines with the predicted frequencies: (1/4*AA*+1/2*Aa*+1/4*aa*). No QTL was identified at which the heterozygotes (*Aa*) showed a higher value than the homozygotes (*AA* or *aa*) in the two-paired populations. This provides evidence that the two populations gave consistent phenotypic values in the measured traits following a linear order of genetic effects: *AA*>*Aa*>*aa* or *AA*<*Aa*<*aa*. These findings also suggest that no over-dominance (*Aa*>*AA*) was present.

The examination of genotypic effect at each QTL in this study revealed that positive effects were contributed either by *indica* or *japonica* parents. In the F<sub>1</sub> genotype, the cumulative partial dominance effects of such heterozygotes are considered to give better performance than the parents. In the course of

differential development of *indica* and *japonica* groups of rice, one set of genes for positive effects may largely be possessed in a group, while another set of positive genes in another group. Thus, hybrids within a same group may not show clear superiority over the parents as commonly shown in *japonica-japonica* hybrids. On the other hand, if the numbers of contrasting alleles are large in a pair of distantly related parents, then the sum of positive contributions from such parents is considered to be larger. In the light of such understanding, QTL analysis in *indica-japonica* hybrids may provide a working hypothesis that reclassification of known QTLs into those positive from the *indica* group or from *japonica* group will be useful for breeding parental lines in hybrid rice breeding.

Early and late senescence are exhibited by the *indica* and *japonica* subspecies, respectively. The senescence is considered to affect the photosynthetic activity of leaves during maturation and to contribute to yield performance. However, measuring this trait has proved difficult, particularly in segregating populations, where differences in the flowering time of individual plants expose them to different conditions during maturation. In this study, to solve such problems a temperature-controlled growth cabinet was used during maturity, and the 'wide compatibility gene' was used to overcome the hybrid sterility, which affects both the grain-filling process and senescence. QTLs for senescence-related traits were analyzed in two backcrossed populations by comparing the effects of homozygotes and heterozygotes at each locus. Except for one QTL on chromosome 9, the NK2 allele of the *japonica* parent contributed to late senescence at all of the QTLs. The QTLs identified for the senescence can be further used to confirm whether these QTLs contribute to yield performance or not.

## Japanese Summary

(和文摘要) 亜種間ハイブリッド・イネの育種における基礎的研究

### はしがき

イネのインド型と日本型間を交雑して稔性ある雑種が得られるようになったので、ハイブリッド・イネの育種では、その高いヘテロシスの利用が試みられている。しかしながらヘテロシスの遺伝学的基礎は十分に分析されているとは云えない。この研究では、個々の量的遺伝子座 (QTL) において、インド型と日本型の交雑で得られるヘテロとホモの遺伝子型の効果を比較するために、二つの戻し交雑集団 ( $BC_1F_1$ )、すなわち *indica/japonica // japonica* および *indica/japonica // indica* が、インド型の IR36 と日本型の熱研 2 号 (NK 2) を親として作られ、塩基反復多型性 (SSR) という標識を用いて、その地図が作成された。それを用いて、LOD 値を 2.5 以上として、穀粒形質、苗の形質および植物体老化に関するいくつかの量的遺伝子座 (QTL) が見いだされた。ヘテロシスの遺伝的基礎を分析するため、これらの量的遺伝子座において、遺伝子型のこれらの形質に対する効果が分析された。

### 材料と方法

植物体の老化の早いインド型品種「IR36」と、日本型で植物体の老化が遅く、雑種不稔を起ささない「広親和性遺伝子」をもつ「熱研 2 号」が交雑された。一組の一回戻し交雑の  $F_1$  の集団 ( $BC_1F_1$ )、IR36/NK2//IR36 と IR36/NK2//NK2 について、SSR マーカーによる地図が作成された。次に  $BC_1F_1$  の系統から 20 粒の種子をとり、粒形形質、すなわち粒幅、1000 粒重および粒厚などの QTL が分析された。また、これらの  $BC_1F_2$  集団から 120-143 の系統をとり、播種後 25 日の苗の形質、すなわち、第一本葉の長さ、苗長、および苗の新鮮重と乾燥重などが測定された。さらに、各  $BC_1F_2$  系統の 5 個体について、植物体の老化を調査するために、葉の葉緑体の含量が、ミノルタの SPAD メーターを用いて推定された。葉の葉緑体は出穂期と出穂後 25 日に推定された。そして両時期の葉緑体の含量から、出穂後の葉緑体減少が計算された。また穂および植物体あたりの生葉数が調査された。これらの調査では成熟条件を揃えるため、 $BC_1F_2$  の植物を一個体ずつポットに植えて、第 3 の穂が出た時期から 25 日間昼夜 28 / 21 °C の人工気象室に搬入した。さらに、ここで検出された植物体の老化の QTL を確認するため、 $BC_1F_3$  系統を圃場で養成して、その遺伝子型の表現型に対する効果を検定した。

## 結 果

### 二つの戻し交雑集団の連鎖地図

IR36/NK2//IR36 の集団では、105 個の SSR マーカーが 12 の染色体上に合計 1835.5 cM で配置された。IR36/NK2//NK2 の集団では、117 個の SSR マーカーが合計 1739.5 cM で配置された。共通の SSR マーカーが二つの集団に適用されたが、用いられた SSR マーカーの地図上の距離は必ずしも一致しなかった。これは、標本抽出誤差によると思われる。また、いくつかのプライマーは片方の集団の地図にのみ検出されたが、それは分離のゆがみあるいはその他の誤差によると考えられた。いくつかの QTL については、検定の精度を上げるためにプライマーが付加された。

### 粒形に対する量的遺伝子座 (QTL)

合計 10 個の QTL が BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 集団で見出された。すなわち、IR36/NK2//IR36 において 2 個の粒重に関する QTL であり、IR36/NK2//IR36 と IR36/NK2//NK2 において 5 個の粒幅に関する QTL であり、そして IR36/NK2//NK2 において粒厚に関する 3 個の QTL である。超優性に効果 (Aa>AA) はこれらの形が決まっている形質については観察されなかった。

### 苗の形質に関する量的遺伝子座

合計 7 個の QTL が BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 系統の調査で見出された。すなわち 1 個は IR36/NK2//NK2 における第一本葉の長さの QTL であり、1 個は IR36/NK2//NK2 における苗の長さの QTL であり、1 個は IR36/NK2//NK2 における葉緑体含量の QTL であり、1 個は IR36/NK2//IR36 における苗の新鮮重の QTL であり、2 個は IR36/NK2//IR36 における苗の乾物重の QTL であり、さらに 1 個は IR36/NK2//IR36 における苗の水分含量の QTL であった。各 QTL における正の効果は部分優性として、両親の一方から寄与された。

### 葉の老化に関する量的遺伝子座

BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 系統の調査で合計 11 個の量的遺伝子座が見出された。3 個は IR36/NK2//NK2 において開花期の高葉緑素含量の QTL である。2 個は IR36/NK2//IR36 と IR36/NK2//NK2 における開花後 25 日の高葉緑素含量の QTL である。1 個は IR36/NK2//NK2 における葉緑素含量の減少の QTL であり、1 個は IR36/NK2//NK2 における穂あたりの老化の遅い葉の数の QTL であり、4 個は IR36/NK2//NK2 と IR36/NK2//IR36 における植物体当

たりの老化の遅い葉の数の QTL である。とくに老化に関して効果の大きい量的遺伝子座が染色体 6 の短腕と染色体 9 の長腕に見られた。

### BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> 系統における葉の老化の QTL の確認

一般に QTL の研究では後代系統による確認実験は行われていないが、本研究ではこの点を追加した。BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 系統群において、IR36 と NK2 のホモ型が、染色体 9 の長腕上の、開花後 25 日における葉緑体含量の量的遺伝子座、qCCAI-9 および qCCAJ-9IR36 において、ともに高かった。それを確認するため圃場において BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> を用いて検定した。その結果、IR36 と NK2 のホモ型が、ともにヘテロ型よりも高い値を示した。その有意性は BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> 系統では、遺伝子型の更なる分離のために必ずしも高くなかったが、これら二つの量的遺伝子座が、互いに接近しているにもかかわらず、別のものであることが示唆された。さらに BC<sub>1</sub>F<sub>3</sub> を用いて、染色体 6 の葉緑体含量の減少にかんする量的遺伝子座について、IR36 と NK2 のホモ型が、それぞれ IR36/NK2//IR36 および IR36/NK2//NK2 から分離されて、その遺伝子型の表現型への効果が検討された。その結果、IR36 のホモ型が、NK2 のホモ型よりも葉緑体含量の大きな減少を示すことが確認された。

### 考 察

1. この研究はイネの亜種間交雑における高いヘテロシスの遺伝学的基礎を分析するために計画された。量的遺伝子座 (QTL) が、それぞれの戻し交雑集団における二つの遺伝子型 (AA と Aa, あるいは Aa と aa)、あるいはその後代の比較から検出された。ここで、一回の戻し交雑集団 (BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>) においてヘテロ型の決定されたものは、BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 系統においては、3 種類の遺伝子型を (1/4AA+1/2Aa+1/4aa) の割合で分離する筈である。このようなかく乱があるにもかかわらず、各 QTL の比較でヘテロ型 (Aa) がホモ遺伝子型 (AA あるいは aa) より高い値を示すことはなかった。したがって、これらの二つの集団において、測定された形質は、AA>Aa>aa あるいは AA<Aa<aa の線型の関係に従っており、いわゆる超優性 (Aa>AA) はないことが示された。

2. 各 QTL における遺伝子型の効果を比較することにより、正の効果はインド型あるいは日本型から寄与されていることが示された。雑種第一代 (F<sub>1</sub>) においては、ヘテロの遺伝子型における部分優性の効果の累積により、両親よりすぐれた性能が示されるもの考えられた。インド型と日本型の分化においては、ある種の正の効果を示す遺伝子は一つの群に保持され、別の種の正の効果を示す遺伝子は別の群にあるだろう。したがって、群内の交雑の雑種は、日本型どうしの交雑に見られるように、両親に対す



る明瞭な優越性を示さない。一方、遠縁間の交雑では対照的な対立遺伝子の数は多く、両親からの正の寄与の総計は大きいと考えられる。このような理解にたつて、インド型と日本型の雑種における量的遺伝子座の分析から、既知の量的遺伝子座をインド型から正の寄与をするものと日本型から正の寄与をするものに分類することは、ハイブリッド・イネの育種において親系統の育成のために有用であろう。

3. イネの植物体の老化の遅速は、その早いインド型と、遅い日本型によって対照的に示される。この形質は成熟期の光合成に影響し、収量に影響すると考えられている。しかし、雑種の分離世代では、個体間の出穂期の差異が成熟条件の差異をもたらすことから、植物体の老化の遺伝の研究は困難であった。本研究では、出穂期のことなる個体を成熟期に人工気象室に入れて同じ温度条件で成熟させ、また雑種不稔性の影響は、それをもたらさない「広親和遺伝子」の利用により避けることによって、これらの問題を解決した。植物体の老化に関する量的遺伝子座は二つの戻し交雑集団におけるホモとヘテロの遺伝子型の比較によって分析された。染色体6のひとつの量的遺伝子座を除いて、日本型のNK2が遅い老化に寄与していた。ここに見出された量的遺伝子座は、今後植物体の老化の遅速が収量に関係するか否かを確かめるのに利用できるだろう。