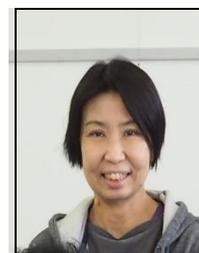


令和 4 年度終了 豆類振興事業助成金（試験研究）の成果概要

- 1 課題名 培養変異による除草剤耐性小豆の作出と耐性遺伝資源の探索



- 2 研究実施者

研究代表者 〈地独〉北海道立総合研究機構

中央農業試験場 作物開発部 生物工学グループ

研究主幹 相馬ちひろ

分担 公益財団法人かずさDNA研究所

- 3 実施期間 令和 2 年度～令和 4 年度（3 年間）

- 4 試験研究の成果概要

(1) 試験研究の目的

小豆生産における省力化栽培を実現するため、組織培養技術を利用して除草剤耐性を有する小豆育種素材を作出する。また、国内外の小豆遺伝資源の中から除草剤耐性を有する品種系統を探る。

(2) 実施計画、手法

1) 組織培養変異による除草剤耐性個体の作出

上胚軸カルスおよびオルガノジェニックカルス由来の除草剤耐性個体を獲得する。

供試材料：小豆品種「ベニダイナゴン」

試験方法：「ベニダイナゴン」由来のカルスを除草剤パワーガイザー液剤の成分であるイマザモックスを添加した培地に置床し、除草剤耐性カルスを選抜後、再分化個体を獲得する。変異拡大のため一部のカルスはガンマ線処理による突然変異処理を行った。

2) 除草剤耐性を示す小豆遺伝資源の探索

小豆遺伝資源および品種・育成系統の中から除草剤耐性を示すものを見出す。

供試材料：小豆遺伝資源および品種・育成系統 3689 点

試験方法：第 1 本葉～第 2 本葉展開期にパワーガイザー液剤を登録濃度の 10 倍の濃度で散布し、達観により耐性を評価する。

3) 除草剤耐性による収量等への影響

2) で見出した除草剤耐性候補遺伝資源について、パワーガイザー液剤を散布時期、回数を変えて散布し、収量等へ及ぼす影響について検討する。

供試材料：除草剤耐性候補遺伝資源「十育 96 号」および「十系 140 号」 対照品種「エリモショウズ」および「しゅまり」

試験方法：第1～2本葉展開期散布区、第3～4本葉展開期散布区およびその両時期に散布する区を設ける。なお、パワーガイザー液剤の1回あたり散布量は250ml/10a（農薬登録の範囲内）であるが、本葉展開後の散布および2回以上の散布は登録の範囲外である。

4) 除草剤耐性に関わる遺伝解析

2) で供試した遺伝資源等について、除草剤耐性に関わると報告のあるアセト乳酸合成酵素（ALS）をコードする2つの遺伝子の塩基配列を解読するとともに、除草剤耐性に関与するゲノム領域の検出を試みる。

供試材料：小豆遺伝資源および品種・育成系統 3689点

試験方法：次世代シーケンサーによるRAD-seq解析を行い、ゲノム全体の一塩基多型（SNP）を検出し、耐性指数の表現型データを用いてゲノムワイドアソシエーション解析（GWAS）を行う。

(3) 成果の概要

1) 組織培養変異による除草剤耐性個体の作出

小豆品種「ベニダイナゴン」由来のオルガノジェニックカルスに総線量10グレイ、50グレイ、100グレイの3段階でガンマ線処理を行い、変異を誘発した。処理後はイマザモックスを含む培地に置床し、選抜を行った（図1）。得られた496の除草剤耐性カルスは再分化処理を行い、139系統の種子を得た。それらの種子を発芽させ、第1本葉展開期にパワーガイザーを10倍濃度で散布し、「ベニダイナゴン」よりも耐性が強い8系統を選抜した（図2）。

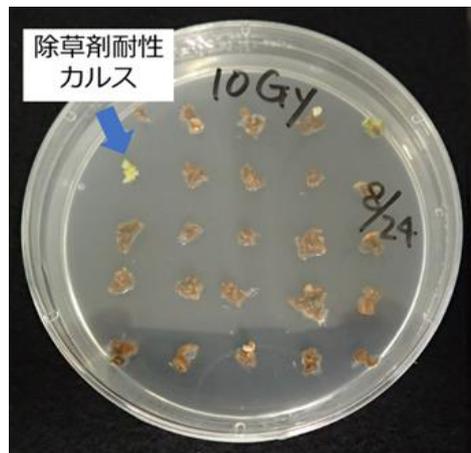


図1. イマザモックスによる除草剤耐性カルスの選抜



図 2. 代表的な変異体の写真
 第 1 本葉展開期に 10 倍濃度で散布し、
 散布 2 週間後に撮影

2) 除草剤耐性を示す小豆遺伝資源の探索

道総研が保有する小豆遺伝資源および品種・育成系統 3689 点について第 1 本葉～第 2 本葉展開期にパワーガイザー液剤を登録濃度の 10 倍濃度で散布した。耐性を評価するために、生育の進展程度とともに、典型的な薬害である葉や茎の褐変、萎縮などを指標に、指数を設定して調査を行った（図 3）。複数年にわたる試験によって、除草剤耐性候補として「十育 96 号」（指数 1）、「十系 140 号」（指数 1～2）の 2 系統を選抜した。



図 3. 指数と対応する典型的な表現型の例（散布 2 週間後）

3) 除草剤耐性による収量等への影響

2) で選抜した耐性遺伝資源候補「十育 96 号」、「十系 140 号」、対照品種「エリモショウズ」、「しゅまり」にパワーガイザー液剤を散布し、薬害程度や収量性等を慣行処理区と比較した。なお、慣行区は農薬登録に則った使用であり、他の処理区は散布時期や回数が登録外の使用に相当する。

慣行区と比較して、処理区の開花期は 1~3 日程度、成熟期は 1~4 日遅れ、この傾向は品種系統間で同様であった(表 1)。「エリモショウズ」、「しゅまり」では 2 回処理で明らかに倒伏程度が大きくなった。「十育 96 号」と「十系 140 号」は無処理区でも倒伏したため、差が判然としなかった。収量は「しゅまり」の第 3~4 本葉期の処理でやや低収となったほかは、いずれの品種も処理間で大きな差はなかった。当初想定していた処理区で対照品種が減収、耐性遺伝資源で減収しにくいという結果は十分には得られなかったが、この要因として本年は生育後半の 8 月以降に 2 次成長が生じ成熟期が平年より遅延するなど、前半の生育抑制が収量へ影響しにくい生育経過であったことが一因と推察された。

慣行区のみでの比較では、供試した除草剤耐性遺伝資源は対照の 2 品種と比較して、いずれも開花期や成熟期が遅く、主茎長が長く、倒伏程度は大きかった。今後交配母本として使用するには、これら農業特性を念頭にして利用する必要がある。

表 1. 本葉展開期での等倍濃度処理試験

品種	処理	開花期	差		主茎長		倒伏程度 (0-4)	全重 (kg/10a)	子実重 (kg/10a)	収量比	百粒重 (g)	
			成熟期	差	(cm)	主茎節数						
エリモショウズ	慣行	7/19	0	9/14	0	67	13.5	1.3	622	381	100	13.0
	第1~2本葉	7/20	1	9/16	2	70	14.7	2.3	652	395	104	13.6
	第3~4本葉	7/20	1	9/16	2	74	14.1	1.7	629	385	101	13.2
	2回処理	7/22	3	9/18	4	76	14.1	3.0	623	376	99	13.3
しゅまり	慣行	7/19	0	9/15	0	86	13.8	1.5	615	358	100	13.3
	第1~2本葉	7/21	2	9/16	1	86	13.9	1.7	646	377	105	13.6
	第3~4本葉	7/21	2	9/17	2	87	13.5	2.0	599	341	95	13.5
	2回処理	7/22	3	9/18	3	80	13.2	3.3	606	346	97	14.0
十育96号	慣行	7/25	0	9/25	0	112	14.8	4.0	603	383	100	16.2
	第1~2本葉	7/26	1	9/27	2	117	16.5	4.0	629	384	100	16.7
	第3~4本葉	7/27	2	9/26	1	116	17.3	4.0	623	387	101	16.3
	2回処理	7/26	1	9/28	3	111	15.8	4.0	624	380	99	16.6
十系140号	慣行	7/22	0	9/21	0	105	15.1	4.0	681	372	100	20.4
	第1~2本葉	7/24	2	9/25	4	113	15.7	4.0	665	381	102	20.4
	第3~4本葉	7/23	1	9/22	1	100	13.9	3.7	687	391	105	20.0
	2回処理	7/24	2	9/25	4	103	14.1	4.0	693	390	105	21.0

注) 倒伏程度：成熟期における倒伏程度。無(0)、微(0.5)、少(1)、中(2)、多(3)、甚(4)。

4) 除草剤耐性に関わる遺伝解析

2) で供試した小豆遺伝資源および品種・育成系統について、除草剤耐性に関わると報告のある2つの ALS 遺伝子の塩基配列を解読したところ、耐性があると判定された遺伝資源についても変異は認められなかった。一方、耐性指数の表現型データと、これまでに得られた一塩基多型 (SNP) データを用いてゲノムワイドアソシエーション解析 (GWAS) を行ったところ、2020 年には第 11 染色体上に、2021 年は第 10 染色体上に有意 SNP が検出された。ALS 遺伝子は第 2 染色体、第 5 染色体に座乗することから、検出された有意 SNP は ALS 遺伝子とは異なる染色体に位置していて、ALS 遺伝子とは異なる遺伝子の関与が示唆された。RAD-seq 解析で検出できた SNP は 700~800 程度と少なかったため、今後はより多くの SNP を検出して GWAS を行う必要がある。

(4) 今後の課題

RAD-seq 解析では GWAS に十分な SNP が検出できなかったため、小豆で効率的に SNP を検出する手法を開発する。また、組織培養で作出した耐性変異体 8 点、耐性遺伝資源「十育 96 号」の交配後代などを利用して、除草剤耐性に関わるゲノム領域を明らかにし、除草剤耐性の DNA マーカーを開発する。

(5) 成果の波及効果

本課題で選抜した除草剤耐性が強い遺伝資源や変異体は育種母本として活用するとともに、遺伝解析を行うことにより、除草剤耐性の DNA マーカー開発につなげる。除草剤耐性マーカーの利用により、除草剤耐性品種の早期開発に寄与できる。これにより小豆生産における省力化栽培を実現し道産小豆の生産振興と安定供給に貢献する。

(6) 論文、特許等

丸田ら (2023) オルガノジェニックカルス由来のアズキ除草剤耐性個体の選抜、日本育種学会第 143 回講演会

道満ら (2023) アズキ除草剤耐性評価法の確立と耐性遺伝資源の探索、日本育種学会講演会第 143 回講演会