様式 3

令和 7 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　　小豆ゲノム育種基盤の構築による
除草剤耐性マーカーの開発



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
研究主任　阿出川さとみ

分担　　同　十勝農業試験場　研究部　豆類畑作グループ
公益財団法人　かずさ DNA 研究所　先端研究開発部　植物ゲノム・遺伝学研究室

3　実施期間　令和 5 年度～7 年度（3 年間）

4　試験研究の成果概要

（1） 試験研究の目的

除草剤耐性小豆品種の開発には、除草剤耐性 DNA マーカーを早期に開発し、除草剤耐性の選抜強化を図る必要がある。そのために、多型の出やすい一塩基多型（SNP）を選定した“SNP パネル”を開発し、小豆のゲノム育種基盤を構築する。

（2） 実施計画、手法

1）小豆ゲノム育種基盤の構築（中央農試・かずさ DNA 研究所）

多様な小豆品種 96 点の全ゲノムリシーケンス解析を行い、大量かつ安価に遺伝子型の解析ができる SNP パネルを作成する。作成した SNP パネルを用いて育成系統を解析し、ゲノム育種に必要な数、精度の SNP が得られるか検証する。

2）小豆除草剤耐性 DNA マーカーの開発（中央農試・十勝農試・かずさ DNA 研究所）

①培養変異体を用いた除草剤耐性に関わるゲノム領域の検出：前課題で作出した除草剤耐性の高い「ベニダイナゴン」培養変異体を用いて、耐性に関わるゲノム領域を検出する。検出した領域を選抜可能な DNA マーカー開発を試みる。

②除草剤耐性の遺伝解析：前課題の遺伝資源探索で見出した除草剤耐性候補系統「十育 96 号」（耐性指数 1：強）の交配後代を養成し、除草剤耐性に関与する因子数を明らかにする。

（3） 成果の概要

1）小豆ゲノム育種基盤の構築

前課題内で ddRAD-Seq により得た道総研が保有する約 3,000 点の遺伝資源小豆の

SNP 情報を用い、遺伝資源の遺伝的関係性解析のためのクラスタリング解析および主成分分析を実施することで、遺伝的に多様な 96 品種・系統を選定した。選定した 96 品種について全ゲノムリシーケンスデータを解析したところ、平均 2.3 Gbp（小豆ゲノムサイズの 4.5 倍に相当）のゲノム情報が読み取れた。また、約 13,000 点の信頼性の高い SNP が取得できた。これは前課題の ddRAD-seq によって得られた約 300 の SNP 情報よりも密に、小豆ゲノム全体をカバーできていた。ここから冗長性が少なく、かつ道内品種系統間で多型を示しやすい SNP を中心に 2,500 SNP を検出できるパネルを作成した（図 1）。

道総研が育成した 10 品種および 38 系統の合計 48 点について、設計した SNP パネルを用いて、次世代シーケンサーによるターゲットシーケンスを実施したところ、3,406 箇所の SNP が得られた。これは 1 つの SNP の近くに、2 つ以上の SNP が密集している箇所を多く選んでいたためと思われ、妥当な取得数と考えられた。解析した 48 点についての多型率（参照配列型、変異型の両方が得られる SNP の割合）は 92.0%であり、主成分分析では、遺伝的に近い「エリモショウズ」と「エリモ 167」が極近傍に位置していた（図）。また、「とよみ大納言」と「ほまれ大納言」などの大納言がグループを形成していた。これらのことから、開発した SNP パネルは北海道の育成品種系統間でも利用可能と判断した（図 2）。

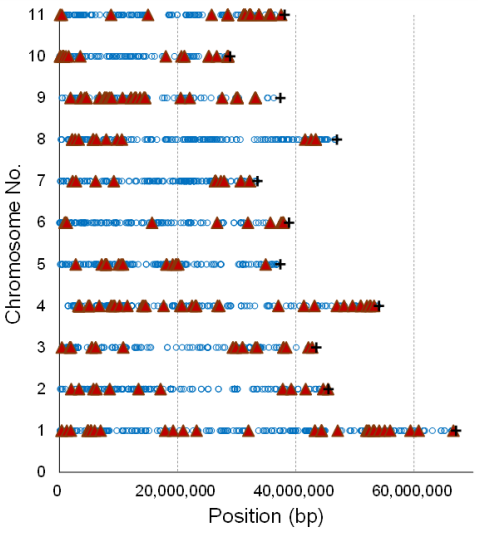


図 1　選定した 2500 SNP の小豆ゲノム上の位置

縦軸は染色体の番号、横軸は染色体の物理位置（bp）を示す。

青丸：今回選定した 2,500 SNP　赤三角：過年度の ddRAD-Seq で得られた 300 SNP　黒十字：各染色体の末端部

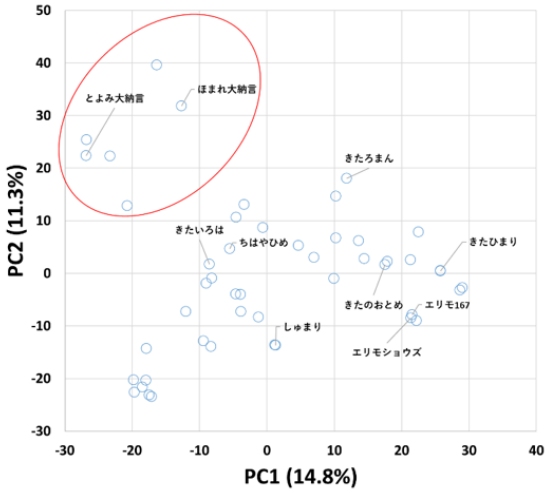


図 2　SNP パネルで取得した SNP を用いた主成分分析の結果

48 点で多型が見られた 3,132SNP を用いた。PC1 と PC2 の合計で 26.1%のゲノム構造の違いを説明していることになる。

赤線で囲んだ 6 点は大納言の品種系統。

２）小豆除草剤耐性 DNA マーカーの開発

①培養変異体を用いた除草剤耐性に関わるゲノム領域の検出：

前課題において、ガンマ線照射で変異を誘発した後、除草剤（イマザモックスアンモニウム塩）耐性で選抜した培養変異系統 8 系統に対し、パワーガイザー液剤を規定の 10 倍濃度かつ規定より遅い第 1 本葉展開期に散布し、散布 2 週間後に除草剤耐性指数を評価した（除草剤耐性試験）。年度や時期、栽植方法（ポット、圃場）を変えて複数回除草剤耐性試験をした結果、培養元である「ベニダイナゴン」（除草剤耐性指数 4）より安定して（注釈 1）明らかに除草剤耐性が高い 1 系統「50Gy-21」（耐性指数 1.4～2.1）を見出した（図３、表１）。



図３　組織培養によって得られた候補系統のポット試験による再選抜（R５）

（左）除草剤散布前の様子、（右）除草剤処理 2 週間後の様子

表１　培養変異体の圃場における除草剤耐性試験の結果（R６）

品種･系統名	耐性指数平均	標準偏差
50Gy-21	2.1	0.4
50Gy-50	2.7	0.3
ベニダイナゴン	3.3	0.3
十育96号	1.8	0.5
エリモショウズ	2.6	0.6
しゅまり	3.7	0.4

※除草剤耐性試験は基準となる 4 品種系統を含み、4 反復で実施したが、除草剤散布のムラがみられたため、うち 3 反復をデータとして採用した

※除草剤耐性指数は 1（強）～5（弱）で評価した

（注釈 1 ：除草剤耐性試験による評価、すなわち除草剤耐性指数は、年次（特に気温や散布ムラ）、栽植方法などによって一定ではなく、変動しやすい。複数回、複数年の結果をもって判断すべき指数である。

「50Gy-21」を「ベニダイナゴン」および耐性の低い普通品種「しゅまり」（耐性指数 3）と交配し、解析集団 F_2（それぞれ十交 2448, 2447）を養成した。それぞれの集団に対し、除草剤散布試験を実施した。除草剤耐性指数は十交 2448 では耐性側に偏って、十交 2447 では偏りなく連続的に分布した（図４）。それぞれの集団において両親の除草剤耐性より高いまたは低い指数を示した個体をまとめたバルクを作り、

バルクごとに全ゲノムリシーケンスを実施し、SNP を検出した。検出された SNP を利用し、SNP ベースの QTL 解析をしたところ、十交 2448, 2447 それぞれで「50Gy-21」由来の除草剤耐性に関与する QTL 候補領域が複数検出された（十交 2448 で 4 か所、十交 2447 で 1 か所）。しかし、それらの領域の SNP は「50Gy-21」と培養元の「ベニダイナゴン」の間で多型が無く、検出された QTL は擬陽性と考えられた。ゆえに「50Gy-21」の除草剤耐性に関与するゲノム領域検出には至らなかった。

「50Gy-21」は小豆の上胚軸カルスに、ガンマ線を照射した後、除草剤入りの培地で選抜してきた系統である。一般的にガンマ線照射では、欠失変異を誘発することが多く、その欠失は 1 塩基から数十塩基の小規模なものから、数十キロ～数百キロ塩基の大規模なものまで起こるという報告がある。本研究の全ゲノムリシーケンス解析はショートリード解析で行い、小豆のゲノムサイズの 20 倍以上のデータを取得し、解析に十分なデータ量が取得できた。しかし、ショートリード解析では長い欠失変異を検出することは難しく、除草剤耐性に関わるゲノム変異を検出できていないと考えられた。「50Gy-21」の除草剤耐性因子は、長い欠失変異に由来する可能性が考えられることから、ロングリード解析が必要と考えられた。

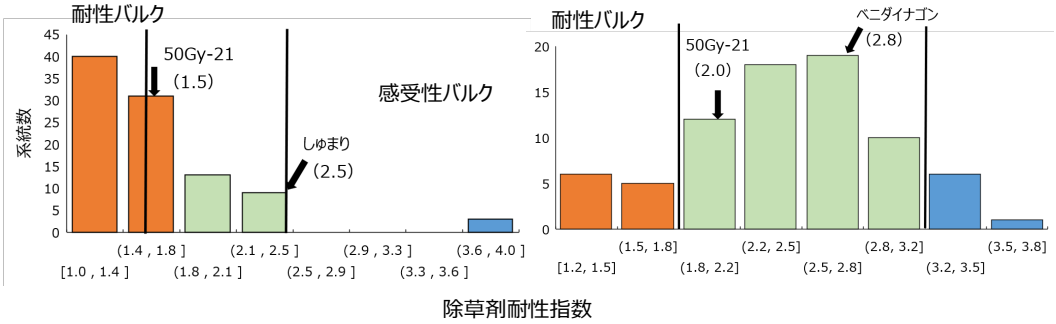


図 4　十交 2448F_2、十交 2447F_2 世代の除草剤散布試験における除草剤耐性指数の分布

左　「しゅまり」×「50Gy-21」（十交 2448）

右　「ベニダイナゴン」×「50Gy-21」（十交 2447）

矢印は両親を示し、括弧内の数値は耐性指数を示す

除草剤耐性指数は 1（強）～5（弱）で評価した。

②除草剤耐性の遺伝解析

前課題内の遺伝資源探索において見出した除草剤耐性候補「十育 96 号」（除草剤耐性指数 1）について、耐性が低い「しゅまり」（除草剤耐性指数 3）と交配し（十交 2229）、F_1、F_2 集団を無選抜で養成した。F_2 世代 106 個体由来の種子のうち、F_3 世代 100 系統を十勝農試の圃場に反復なしで栽植し、除草剤散布試験をしたところ、各系統の除草剤耐性指数は感受性側に大きく偏った（図 5）。この結果は除草剤耐性に関わる因子が多数存在していることを示唆している。また、親の「しゅまり」（除草剤耐性指数 3.6）よりも耐性が弱くなる超越分離の系統もみられたことから、「しゅまり」自身も、除草剤耐性に寄与する因子をもつ可能性が考えられた。除草剤耐性

が高い 9 系統（除草剤耐性指数 2.8 未満）、低い 9 系統（除草剤耐性指数 3.6 以上）をそれぞれ耐性バルク、感受性バルクとして全ゲノムリシーケンスに供試し、SNP ベースの QTL 解析を実施した。解析の結果「十育 96 号」由来の除草剤耐性に関与するゲノム領域が複数染色体上の 12 か所以上に及ぶことが明らかとなった。関与する因子数が多いことから、「十育 96 号」由来の除草剤耐性の DNA マーカー開発は現実的ではないと考えられた。

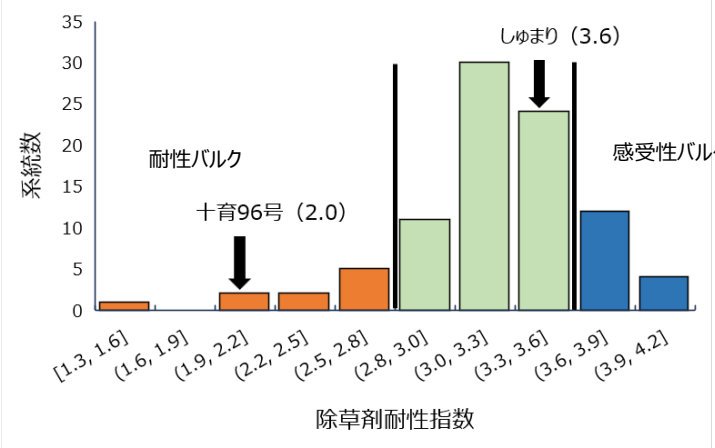


図 5　十交 2229F$_3$ 世代 100 系統の除草剤耐性指数の分布

矢印は両親を示し、括弧内の数値は耐性指数を示す。

除草剤耐性指数は 1（強）～ 5（弱）で評価した。

以上、①②において除草剤耐性の DNA マーカーの開発には至らなかったものの、複数年、複数回の除草剤耐性試験によって安定して除草剤耐性の高い育種素材「50Gy-21」を選抜することができた。

（4） 今後の課題

「50Gy-21」由来の除草剤耐性に関わるゲノム領域を明らかにするため、「50Gy-21」と「ベニダイナゴン」で多型のある領域に絞った再解析、もしくは「50Gy-21」の長い遺伝子欠失変異を検出するためにロングリード解析を実施する必要がある。

（5） 成果の波及効果

大量かつ安価に遺伝子型の調査ができる小豆の SNP パネルが整備できた。これを活用することで小豆においてもゲノミック予測モデルの開発やゲノムワイドアソシエーション解析が可能となり、収量性や加工適性を向上させた品種開発が促進される。また複数年の除草剤選抜試験によって、除草剤耐性が高い「50Gy-21」の選抜に成功した。「50Gy-21」はすでに育種事業の中で交配親として用いられており、将来的には除草剤耐性と機械収穫適性を併せ持つ省力栽培品種の育成に繋がると考えられる。

（6） 論文、特許等

小豆 SNP パネルに関する成果を、論文投稿予定（2026 年度）。