

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

平成 29 年度

修士論文

ヒメツルアズキにおける耐塩性の 種内分化に関する遺伝解析

2018 年 3 月 21 日提出

指導教員 内藤 健 准教授

大橋 ほなみ

目次

要旨	4
緒言	6
材料と方法	
1). 放射性同位体 ^{22}Na を用いた Na^+ の局在解析	9
2). F2 の生育と F3 種子の採取	10
3). F2 の耐塩性評価	11
4). F3 の耐塩性評価の予備実験	12
5). F3 の耐塩性評価	13
6). DNA 抽出	15
7). フラグメント解析を用いたジェノタイピング	16
8). RAD-seq を用いたジェノタイピング	18
9). 連鎖地図の作成	20
10). QTL 解析	20
結果	
1). ^{22}Na を用いた Na^+ の局在解析	22
2). 連鎖地図の作成	23
3). F2 の耐塩性評価と QTL 解析	24
4). F3 の耐塩性評価の予備実験	25
5). F3 の耐塩性評価と QTL 解析 (1 回目)	26
6). F3 の耐塩性評価と QTL 解析 (2 回目)	29
考察	31
謝辞	34
引用文献	35
表	38

ヒメツルアズキにおける耐塩性の種内分化に関する遺伝解析

先端生命科学専攻 応用生物資源学分野 2018年3月修了

学籍番号 47-166311 大橋ほなみ

指導教員 内藤健 准教授

【キーワード】

QTL解析、耐塩性、遺伝資源

【はじめに】

世界の人口は2017年現在、76億人に達し、2050年には98億人、2100年には112億人に達すると予測されている(1)。今後も増加を続ける人口を養うには、食糧の増産が不可欠である。

現在、灌漑農地約3.1億haのうち約9000万haは塩害のため作物栽培が困難である(2)。塩害は毎年1000万haの農地を破壊しており(3)、食糧の増産が求められる現在の状況において、その対策は喫緊の課題である。

そこで本研究では、耐塩性作物の開発につながるため野生種が持つ耐塩性遺伝子を同定することを目指した。

本研究で扱うヒメツルアズキ (*Vigna nakashimae*) は長崎県五島列島の集団(‘G4-2’)のみが耐塩性を持つという特異な種である。すなわち、同種内で耐塩性に変異が生じていることから、五島列島の系統群の耐塩性は、長期間に蓄積した多数の遺伝変異によって生じたのではなく、短期間に起きた少数の遺伝変異によって生じたと考えられる。少数の遺伝子によって耐塩性が制御されているのであれば、QTL解析(quantitative trait locas analysis; 量的形質遺伝子座解析)によって容易に遺伝子を同定可能であり、かつ他の作物へ応用する際にも導入する遺伝子が少なく済むと考えられる。したがって、本研究では、五島列島のヒメツルアズキが獲得した耐塩性遺伝子を同定することを目的とした。

【材料および方法】

ヒメツルアズキの耐塩性系統‘G4-2’と感受性系統‘4076’、交配した自殖後代のF2及びF3を用いて実験を行った。

‘G4-2’と‘4076’を使用して²²Naを用いたNa⁺の局在解析を行った。播種12日後、²²Naを含む100mM NaCl(²³NaCl)の水耕液で3日間培養した後、²²Naから放出された放射線をBASイメージングで可視化した。また、γカウンターで器官ごとの放射線量を定量した。

F2の耐塩性評価にはF2 198系統、および親系統の‘G4-2’、‘4076’を用いた。系統ごとに挿し木クローンを3クローンずつ作成、100 mMのNaCl水溶液に10日間浸漬したのち葉の萎凋程度を外見で評価することにより実施した。

F3の耐塩性評価には、198系統のF2からそれぞれ6個体ずつ、および親系統の‘G4-2’、‘4076’を用いた。塩順化処理開始から3日後、200 mMでの塩処理を行った。塩処理から3、5、7、10、12、14、17日後に外見の萎凋度に基づき評価を行った。

‘G4-2’、‘4076’、197系統のF2からDNAを抽出し、アズキ Simple Sequence Repeat (SSR) プライマーセット(4)を用いたフラグメント解析及びRAD-seqのデータ解析によりジェノタイピングを行った。これらの遺伝子型データから、Antmap (Version 1.2)(5)で連鎖地図を作成した。

連鎖地図に従って並び変えた遺伝子型データと萎凋度の評価結果を合わせてR/qtl (Version 1.41-6)(6)を用いてQTL解析を行った。

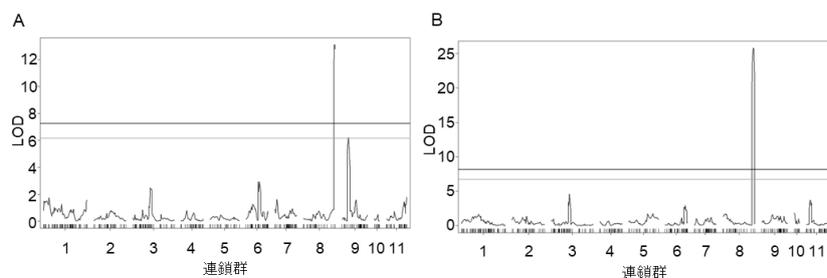


図 1. A. F3 1 回目の塩処理 10 日後、B. F3 2 回目の塩処理 10 日後の評価結果を用いて QTL 解析を行った結果
横断線は 1% 有意水準 (上) および 5% 有意水準 (下) を示す。

12716 (117.07 cM) の間に強い QTL が繰り返し検出された (図 1)。したがって、'G4-2' の耐塩性は主に単一の QTL によって支配されていることが明らかになった。

また、放射性同位体を用いた実験より 'G4-2' の葉は '4076' の葉より検出された放射線量は少なく、単位乾物重あたりの放射線量も 'G4-2' の葉は '4076' の葉より少なかった (図 2)。この結果より、'G4-2' の耐塩性機構は葉への Na^+ の移行を抑制するものであることが示唆された。

さらに、QTL に座乗する遺伝子から Na^+ 輸送に関与する遺伝子を探索した。その結果、本研究で検出された QTL 領域はアズキゲノムの第 8 染色体上の 45.1 Mbp から 46.3 Mbp の領域に相当し、そこには 113 遺伝子が座乗していた。その中に、シロイヌナズナの CBL-interacting protein kinase 7 (CIPK7) の同祖遺伝子であると考えられるものが存在した。CIPK7 は Na^+ トランスポーターの salt overly sensitive 1 (SOS1) を制御する salt overly sensitive 2 (SOS2) (7) と類似している遺伝子で (8)、多くの植物において塩ストレスにより発現が誘導されることが知られている。SOS1 の Na^+ を排出する機能 (9) は 'G4-2' の Na^+ の葉への移行を抑制する表現型とも関連しており、CIPK7 は耐塩性に関する有力な候補遺伝子だと考えられる。しかし、現時点で原因遺伝子を確定することはできないため、今後はトランスクリプトーム解析や、戻し交雑集団を用いたファインマッピングを行うことで、原因遺伝子を同定することを目指す。

- (1). United Nations, *et al.* (2017). Working Paper No. ESA/P/WP/248.
- (2). FAO. (2011). SOLAW
- (3). 内藤健ら. (2016). 国際林業協力 Vol. 39 (1) 12-19
- (4). Han OK, *et al.* (2005). Theor Appl Genet 111: 1278-1287
- (5). Iwata H, *et al.* (2006). Breeding Science 56: 371-377
- (6). Broman KW, *et al.* (2003). Bioinformatics 19:889-890
- (7). Qiu QS, *et al.* (2002). PNAS vol. 99 (12) 8436-8441
- (8). Kolukisaoglu Ü, *et al.* (2004). Plant Physiology Vol. 134: 43-58
- (9). Ismail AM *et al.* (2017). Plant Biol 68:405-434

【結果および考察】

F2 の遺伝子型解析によって連鎖地図は作成できたが、耐塩性評価の際に病気を発生させてしまい、F2 での QTL 解析は失敗に終わった。

そこで、F3 を用いて耐塩性評価と QTL 解析をやり直したところ、第 8 連鎖群のマーカー 12732 (111.62 cM) と

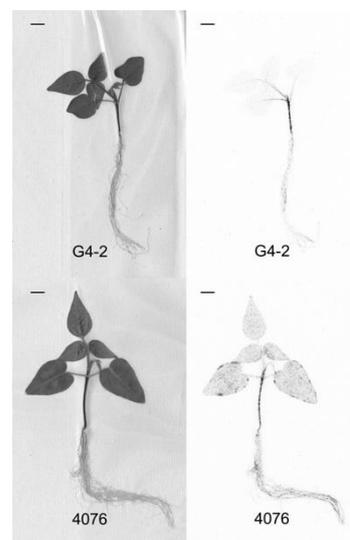


図 2. 明視野 (左) および BAS イメージ (右)。スケールバーは 1cm を示す。

緒言

世界の人口は 2017 年現在、76 億人に達し、2050 年には 98 億人、2100 年には 112 億人に達すると予測されている (United Nations, 2017)。今後も増加を続ける人口を養うには、食糧の増産が不可欠である。

現在、世界の耕作地は 15 億 ha で、そのうちの灌漑農地約 3.1 億 ha のうち約 30% にあたる約 9000 万 ha は塩害のため作物栽培が困難である (FAO, 2011)。

塩害の原因は、耕地への海水の侵入、塩濃度が高い地下水の灌漑利用、または過剰灌漑に伴う地下水位の上昇による塩分の地表への析出、など様々である (米山ら、2010)。海水は塩分を多く含む潮風や、高潮・津波などの突発的な災害によっても農地へ侵入する。侵入した海水の塩類の一部は植物体に吸収されるか雨水などにより排出されるが、それ以外の塩類は土壌中や表面に蓄積される。同様に、塩濃度が高い地下水を灌漑に利用した場合も、植物体が吸収できなかった塩類が土壌に蓄積し、塩害を起こす。また、過剰灌漑による塩害は以下のように進行する。灌漑に使用された水は土壌に浸透し土壌中の塩分を溶解する。その後、地表から蒸発するにしたがって塩分を含んだ水が毛細管現象によって地表部に移動してくるため、地表付近に多量の塩分が蓄積することになる。さらに、灌漑を継続することによって地下水位が上昇すると、長期間にわたって土壌中の水分が地表部に移動し続けるため、急速に塩害が進行する (西尾ら、2012)。

このような塩害は毎年 1000 万 ha の農地を破壊しており (内藤・坂井、2016)、食糧

の増産が求められる現在の状況において、その対策は喫緊の課題である。塩害地での耕作を可能にするには、塩類が集積した土壌から塩類を取り除き土壌を再生することや、塩害地でも生育できる作物を栽培することが考えられる。土壌から塩を取り除くには多額の費用と大量の水や土を必要とするため容易ではない。また、灌漑による塩害が発生した土地では塩を取り除くほかに、灌漑管理の見直しが必要である。灌漑管理の見直しをしつつ、栽培計画を塩害地でも生育できる作物に変えていくことで安定した食糧生産につながり、塩害を克服していくことができる。

そこで本研究では、耐塩性作物の開発につなげるため野生種が持つ耐塩性遺伝子を同定することを目指した。現在世界で栽培されている作物はそのほとんどが耐塩性を持たない。そのため、塩性環境に適応した野生種が持つ耐塩性遺伝子を同定し、それを作物に応用することが最も有効である。そのような植物の一つにアズキの仲間である *Vigna* 属がある。

Vigna 属はアフリカ起源のマメ科植物であり、多様な環境に適応した多くの野生種をもつ。*Vigna* 属野生種には、海岸に生息し耐塩性を持つ *V. marina* (Chankaew, et al., 2014)、耐乾性を持つ *V. trilobata* (内藤、2016)、湿害抵抗性を持つ *V. mungo* (内藤、2016)、アルカリ土壌耐性を持つ *V. exilis* (友岡ら、2006)、重粘土質土壌に適応する *V. stipulacea* (友岡ら、2006)、乾燥耐性、害虫抵抗性など種内多様性を持つ *V. vexillata* (内藤、2016) など厳しい気候や土壌環境に適応した多様な種を有し、耐性遺伝子の宝庫である。耐塩性に関するスクリーニングもすでに行われており、複数の種が耐塩性に優れている

ことが分かっている (Iseki, *et al.*, 2016、Yoshida, *et al.*, 2015)。

中でも、ヒメツルアズキ (*Vigna nakashimae*) は長崎県五島列島の集団のみが耐塩性を持つという特異な種である。ヒメツルアズキは食用アズキと同じ *angulares* 節に属し、主に朝鮮半島と中国北部および九州や日本近辺の島に分布している (Tomooka, *et al.*, 2002)。耐塩性に関しては大部分の系統が低いのに対して、長崎県五島列島沿岸部に生息する系統群 (Tomooka, *et al.*, 2013) は高いことが分かっている (Yoshida, *et al.*, 2015)。特に本研究で使用した'G4-2'系統は長崎県五島列島で採取された系統の中でも耐塩性に優れていることが分かっている (未発表)。すなわち、同種内で耐塩性に変異が生じていることから、五島列島の系統群の耐塩性は、長期間に蓄積した多数の遺伝変異によって生じたのではなく、短期間に起きた少数の遺伝変異によって生じたと考えられる。少数の遺伝子によって耐塩性が制御されているのであれば、QTL 解析 (quantitative trait locas analysis; 量的形質遺伝子座解析) によって容易に遺伝子を同定可能であり、かつ将来的に他の作物へ応用する際にも導入する遺伝子が少なくて済むと考えられる。したがって、本研究では、五島列島のヒメツルアズキが獲得した耐塩性遺伝子を同定することを目的とした。

材料と方法

1. 放射性同位体 ^{22}Na を用いた Na^+ の局在解析

Na^+ の局在解析には親系統の 'G4-2'、'4076' を用いた。

穴をふさぐように 2 枚重ねにした小さい黒ポット (直径 7.5 cm×高さ 9 cm) にセラミス を 8 分目まで入れ、水道水で十分湿らせた後、軽く水を切ったところに種子 1 つ程度の深さで播種した。種子には種子の吸水を促進させるためカッターで 1 mm 程度の傷をつけ、各系統 2 ポット、それぞれ 10 粒ずつ播いた。播種後、黒ポットは深さ約 3 cm に水を張ったトレーに並べた状態で育苗棚に置いた。トレーには常に水が張った状態にし、人工気象機内 28°C、湿度 70%、14 時間明期、10 時間暗期で栽培した。

播種 6 日後、植物が折れないように手で保持しながら黒ポットを転倒し、根を傷つけないように注意して植物を取り出し、2 枚の初生葉に傷や縮れなどの異常がないものを選抜、移植した。カビの繁殖を防ぐため種皮は除去し、茎の部分をスポンジで挟み、45 ml の水耕液 (100× 大塚ハウス 1 号 45 μl 、100× 大塚ハウス 2 号 45 μl を水道水で希釈) を入れたプラスチックの 50 ml 遮光チューブへ挿し込み、移植して栽培した。

移植 6 日後、放射性同位体 ^{22}Na を入れた水耕液による 100 mM 塩処理を行った。100 mM の放射性同位体を含んだ水耕液は 1 チューブあたり大塚ハウス 1 号 0.0675 g、大塚ハウス 2 号 0.045 g、NaCl 0.26 g を MilliQ 水に溶かしたものに 1 チューブあたり 360 Bq になるように ^{22}Na を加えて調整し、この水耕液で 3 日間生育させた。この時、

人工気象機 (株式会社日本医科器械) 内蛍光灯下 14 時間明期 28°C、10 時間暗期 25°C、湿度アンコントロールで栽培した。放射性同位体を与える際に RI 施設内の人工気象機に移動したため、温度及び湿度設定が変更された。

植物体に取り込まれた ^{22}Na の量を可視化するため、 ^{22}Na を取り込ませた植物体を Imaging Plate (IP) (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) とコンタクトして感光させた。その際、植物体はペーパータオルに乗せて平面上に広げ、さらに IP に直接接触することがないようにビニール袋に入れた。また、植物体と IP は共に放射線用フィルムカセットに収納して 24 時間コンタクトさせた。24 時間後、Typhoon FLA-9500 (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いて撮影、画像を取得した。Method は Phosphor、PMT は 700、Pixel Size は 100 μm で撮影、Range は 0-1000 で画像を取得した。撮像後は植物体を根、茎、初生葉、第一葉に切り分けて新鮮重を計量した。計量した植物体はガンマカウンター用のチューブに入れ、乾燥機 50°C で 3 日間乾燥させた。乾燥したら乾燥重を計量、ガンマカウンター (オートウェルガンマシステム AccuFLEX γ 7000) (ALOKA) を使用して放射線量を定量した。

2. F2 の生育と F3 種子の採取

ヒメツルアズキの 'G4-2' 系統と '4076' 系統、およびそれらの交雑によって得られた F2 種子は農研機構 (農業・食品産業技術総合研究機構) の遺伝資源センターから提供された。

この F2 種子から 198 個体を栽培し、うち 197 個体から F3 種子を採取した。栽培には黒ポット (直径 11 cm×高さ 22.5 cm) に約 1 L のくみあいニッピ園芸培土 1 号、約 7 ml の遅効性肥料のマガンブ K (N: P: K: Mg = 6: 40: 6: 15) を入れて軽く混合したものを使用した。'G4-2' 系統、'4076' 系統はそれぞれ 6 個体ずつ栽培、すべての個体から種子を採取した。

播種にあたり、Na⁺の局在解析の植物体育成時と同じく種子に傷をつけた。1 ポットあたり 2 粒播き、第 3 本葉が出てきたところで生育の良いほうを残して片方は根元から切除した。つる性のため、1 ポットに 1 本支柱を立てて生育した側枝を誘引し、余計な側枝は他の植物体との絡まりを防ぐために切除した。

種子は黒または茶色く成熟したものから莢ごと採集し、系統ごとに茶封筒に集めた。すべての系統において採集が終わった後、種子は冷暗所に保管した。F3 を用いた実験にはこれらの種子を使用した。

3. F2 の耐塩性評価

F2 において耐塩性評価を行うために、F2 のクローン個体を作製した。F2 の側枝の中でまだ葉が展開していない側枝を選び約 10 cm の長さで切った。小さい黒ポット (直径 7.5 cm×高さ 9 cm) にくみあいニッピ園芸培土 1 号を入れたものに挿して挿し木クローンを作製した。側枝を土に挿した後は下から水が出るくらいによく水を与え、根が張るまでハウス内の日陰で生育させた。根が張り始めたら、ハウス内の日当たり

の良い所へ移動した。挿し木クローン個体は各系統 3 個体ずつ作成した。

塩水の濃度は塩化ナトリウム 99.90%以上の精製塩（日本製塩株式会社）を水道水に溶かして 100 mM となるようにした。

挿し木クローンの大きさにばらつきがあったため、塩水に浸す前にそれぞれ下から本葉が 3 枚になるように上部を茎ごと切除し、切り揃えた。その後、ポットの 2/3 まで塩水に浸した。塩水の濃度は 3 日ごとに EC メーター (DKK-TOA, 3M-31P) で計測、塩水または水道水を加えて調整した。配置は図 1 のようにし、3 反復行った。

10 日後、植物体の萎凋度に基づき評価をした。

萎凋度の評価基準は以下のように設定した。障害が全くない (0)、50%以上の葉が健全 (1)、健全葉が 50% (2)、健全葉が 50%未満 (3)、健全葉がない (4)。評価をする際には 1 人で評価を行った。

なお、塩処理 10 日後の萎凋度について、供試個体群を個体番号 1 から 99 までと、100 から 198 までの 2 群に分けて、平均値の違いについて Wilcoxon の順位和検定を行った。

4. F3 の耐塩性評価の予備実験

F3 の評価を行うにあたり、親系統の 'G4-2'、'4076'を用いて予備実験を行った。Na⁺の局在解析の植物体育成時と同じく 1 ポットあたり 10 粒ずつセラミスに播種した。栽培条件は育苗温室内、蛍光灯下、温度 25°C、湿度 99% (制御不可)、14 時間明期に

設定した。

播種 7 日後、Na⁺の局在解析の植物体育成時と同様にセラミスから植物体を取り出し、移植して水耕栽培を行った。2 枚の初生葉に傷や縮れなどの異常がないものを各系統それぞれ 9 個体選抜した。Na⁺の局在解析の植物体育成時と同じく種皮は除去し、茎の部分をスポンジで挟み、発泡スチロール製の水耕用プレート (水耕プレート) 3 枚に 3 個体ずつ挿し込んだ。100× 大塚ハウス 1 号 250 ml、100× 大塚ハウス 2 号 250 ml を溶かした水耕液 25 L を入れた板重 (70 cm × 44 cm × 14.5 cm) に、植物を挿し込んだ水耕プレートを浮かべ、水耕栽培を行った。

水耕栽培開始から 5 日後、50 mM での塩順化处理を行った。新たな板重を用意し、1 つあたり 100× 大塚ハウス 1 号 250 ml、100× 大塚ハウス 2 号 250 ml、NaCl 73 g を溶かした水耕液 25 L を注ぎ、水耕プレートごと植物を移動した。

塩順化处理開始から 3 日後、100 mM、150 mM、200 mM での塩処理を行った。新しい板重に 100×大塚ハウス 1 号 250 ml、100× 大塚ハウス 2 号 250 ml とそれぞれの濃度になるように NaCl を溶かした水耕液 25 L を用意し、発泡スチロールごと植物体を移動した。100 mM は NaCl 146 g、150 mM は NaCl 219 g、200 mM は NaCl 292 g を使用した。以降、水替えは行わなかった。

塩処理から 3、5、6、10 日後に観察して評価に用いる塩濃度と評価基準を決定した。

5. F3 の耐塩性評価

F3 の評価には、198 系統の F2 からそれぞれ 6 個体ずつ、および親系統の 'G4-2'、'4076'を用いた。発芽時の病害を減らすため、種子を 0.5%次亜塩素酸ナトリウム (=1/100 ハイター) で 30 秒間、70%エタノールで 1 分 30 秒間殺菌し、水道水でよく洗淨した。その後、予備実験と同じくセラミスに播種した。各系統 1 ポットずつ、それぞれ約 10 粒ずつ播いた。ただし、親系統のみ 2 ポットずつ播種した。栽培条件は予備実験と同じく育苗温室内、蛍光灯下、温度 25°C、湿度 99% (制御不可)、14 時間明期に設定した。

播種 7 日後、予備実験と同様にセラミスから植物体を取り出し、移植して水耕栽培を行った。2 枚の初生葉に傷や縮れなどの異常がないものを各系統それぞれ 6 個体、異常がないものが足りなかった場合は個体番号を記録して比較的生育が比較的良好なものを選抜した。予備実験と同じく種皮は除去し、茎の部分をスポンジで挟み、発泡スチロール製の水耕用プレート (水耕プレート) 6 枚に 1 個体ずつ挿し込んで予備実験と同様に水耕栽培を行った。

系統番号 1 から 108 までを使用した 1 回目は 6 つの板重すべてで同一の配置で行った。系統番号 109 から 198 までを使用した 2 回目では板重ごとに各系統の位置が変わるように配置して行った (図 2、図 3)。

水耕栽培開始から 5 日後、予備実験と同様に 50 mM での塩順化处理を行った。

塩順化处理開始から 3 日後、200 mM での塩処理を行った。新しい板重 1 つあたり 100×大塚ハウス 1 号 250 ml、100× 大塚ハウス 2 号 250 ml、NaCl 292 g を溶かした水

耕液 25 L を用意し、発泡スチロールごと植物体を移動した。以降、水替えは行わなかった。

塩処理から 3、5、7、10、12、14、17 日後に外見の萎凋度に基づき評価を行った。

評価基準は初生葉を用いて以下のようにした。それぞれについて、障害無 (0)、障害はあるが 50% 未満または全体に薄いさび状の着色 (1)、障害が 50% 以上あるまたは全体に濃いさび状の着色 (2)、枯死している (3)。評価をする際には 3 人以上が個別に評価を行い、それぞれがつけた萎凋度の平均値を採用した。

なお、1 回目の耐塩性評価試験において、板重の周縁部に配置された個体群と、それ以外の位置に配置された個体群とで萎凋度に違いがあるかどうかを検定するため、10 日目の萎凋度を用いて Wilcoxon の順位和検定を行った。

6. DNA 抽出

'G4-2'、'4076'、197 系統の F2 から DNA を抽出した。

未展開葉を 3 枚ずつ採取し、個体ごとにエッペンチューブに入れた。サンプリングした未展開葉はエッペンチューブに入れたまま凍結乾燥機を使用して 1 日乾燥させた。その後、エッペンチューブにジルコニアビーズを 1 粒ずつ入れ、粉砕器 (Retsch, MM300) を用いて高速振盪することで葉を破砕した。

DNA 抽出には CTAB 法を用いた。70°C で温めておいた CTAB にメルカプトエタノールを 50:1 で混合した溶液を破砕したサンプルにそれぞれ 1 mL ずつ加えて懸濁し、

72°Cのウォーターバスで20分静置した。このとき、5分間静置後に転倒混和し、さらに72°Cで15分間静置した。その後、CIA(クロロホルム: イソアミルアルコール=24:1)を1ml加え、20分振盪した。振盪後、14000 rpmで20分間遠心し、上清800 µlを予め800 µlのイソプロパノール分注しておいたエッペンチューブに移して転倒混和し、さらに14000 rpmで20分間遠心した。遠心後、デカントで上清を捨て、キムタオルの上に倒置、乾燥させた。その後、1mlずつ70% EtOHを加えて沈殿およびチューブ内を軽く洗浄した後、再び14000 rpmで20分間遠心した。遠心後、ピペットで上清を取り除き、60°Cに設定した循環乾燥機で約1時間乾燥した。TE bufferにRNaseIを2000:1で混合した溶液200 µlを乾燥後のサンプルに加え、恒温振盪機で沈殿が溶解するまで振盪した。

DNAの定量にはQ-bitのds DNA BRを使用した。まず、バッファーと色素を20:1で混合し、プレミックスを調製した。DNAサンプル各3 µlに対してプレミックス197 µlを加えて定量した。定量スタンダードはスタンダード用サンプル10 µlに対してプレミックス190 µlを加えて調製した。Q-bitを用いた定量操作は説明書に従った。定量後、サンプルDNAは分注してそれぞれ10 ng/µlになるように1/10 TE bufferを用いて希釈した。

7. フラグメント解析を用いたジェノタイピング

CTAB法で抽出したDNAとアズキ Simple Sequence Repeat (SSR) プライマーセット

(Han, *et al.*, 2005) を用いて遺伝子型解析を行った。まず、アズキ SSR プライマーセットより親系統 ‘G4-2’ と ‘4076’ の間で多型のあるプライマーセットをスクリーニングした。DNA の増幅は 2× QIAGEN Multiplex PCR mix を用いて行った (表 1)。この混和液を、DNA ポリメラーゼに活性を与えるために 95°C で 15 分間加熱し、変性 94°C, 15 秒間、アニーリング 57°C, 90 秒間、伸長反応 72°C, 60 秒間、これを 40 サイクル行った後、60°C で 30 分間保温し、10°C で冷却した。

PCR 後、DNA 断片の増幅を確認するために、アガロース電気泳動を行った。TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM 酢酸, 1mM 0.5M EDTA, pH 8.0) を使用して作成した 1% アガロースゲルを使用し、それぞれ増副産物 4 µl に対して Dye 2 µl を混合、TAE buffer を用いて泳動した。

増幅産物はその後、シーケンサーを用いて増幅断片の長さを見た。まず、増幅産物を 1/10 TE を用いて 10 倍希釈した。そして、Hi-Di ホルムアミド (Applied Biosystems) 1000 µl に対してサイズスタンダードの LIZ 600 (Applied Biosystems) 30 µl を混合したもの 8 µl を希釈した増幅産物 2 µl に加えてジェネティックアナライザー (ABI PRISM, 3130×1 Genetic Analyzer) で泳動した。ジェネティックアナライザーでの泳動結果は Gene Mapper Ver.5 (Applied Biosystems) を用いて解析した。

スクリーニングしたプライマーセットを用いて、F2 198 個体について遺伝子型を決定した。プライマーはリバースプライマーの 5' 末端が青 (FAM)、緑 (VIC)、黄 (NED)、赤 (PET) の 4 色のうちの 1 色で蛍光標識されており、異なる蛍光色素で標識された

マーカーを混合することで複数を同時に解析した (表 2)。PCR はスクリーニング時と同じく 2× QIAGEN Multiplex PCR mix を用いて行った (表 1)。この混和液を、スクリーニング時と同じ条件で PCR し、シーケンサーにかけた後、結果は Gene Mapper Ver.5 で解析した。

8. RAD-seq を用いたジェノタイピング

RAD-seq (Restriction Associated DNA tag sequencing) とは、ゲノムを制限酵素で切断して、その断片の末端をシーケンシングし、系統間で比較して多型を見出す方法である (DaCosta and Sorenson, 2014)。

F2 集団および両親系統の RAD-seq 解析は、ライブラリ作成およびシーケンシングを一般社団法人クロックミクスに委託した。シーケンシングライブラリは、サンプル DNA を EcoRI と BglII の両方で消化し、アダプター配列を付加して作成した。シーケンシングは HiSeq 2500 (Illumina) の 51 bp シングルエンドモジュールによって行った。

RAD-seq のデータ解析を行う前に、ヒメツルアズキの参照ゲノム配列を作成した。公開されているアズキゲノムの配列に、HiSeq 2000 によって得られたヒメツルアズキのリシーケンスデータを Burrows-Wheeler Aligner (BWA -0.7.15) (Li and Durbin, 2009) でマッピングし、samtools (Version 1.6) (Li, *et al.*, 2009) を用いて検出された全ての相違サイトをヒメツルアズキ型に置換した。

BWA の BWA-MEM アルゴリズム、デフォルト設定でヒメツルアズキの参照ゲノム

配列に RAD-seq を用いて得られた配列をマッピングした。まず、`bwa index` を用いて `index` ファイルを作成した。

```
[bwa index (参照配列ファイル名.fa) ]
```

次に、`bwa mem` を用いてヒメツルアズキの参照ゲノム配列にリード配列をデフォルト設定でマッピングし、Sequence Alignment Map (SAM) 形式のファイルに書き出した。

```
[bwa mem (index ファイル名) (読み込むリードファイル名) > (書き出すファイル名.sam)]
```

SAM ファイルは容量が大きいため、`samtools` の `sort` 機能を使用して Binary Alignment Map (BAM) 形式ファイルに変換した。

```
[samtools sort -@ (使用する CPU の数) -o (読み込む BAM ファイル名.bam) (書き出す SAM ファイル名.sam) ]
```

SAM ファイルおよび BAM ファイルには全てのリード配列に対して参照配列と比べた時の配列の相違位置の情報が書き出されている。次に `Stacks` パッケージの `ref_map` ツール(Version1.48) (Catchen *et al.*, 2011, Catchen *et al.*, 2013) を用いて、F2 のリード配列が得られた部分の遺伝子型を決めた。遺伝子型の決定に必要な最低リード数は7とした。

```
[ref-map.pl| -m 7 -T 8 -b / -s -i | -o (書き出すフォルダ名) -p (親系統ファイル名①.bam) -p (親系統ファイル名②.bam) -r (読み込む F2 系統ファイル名①.bam) -r (読み込む F2
```

系統ファイル名②.bam) 以下同様に続く]

作成された遺伝子型の一覧ファイルから、両親系統の遺伝子型が固定され、90%以上の F2 系統で遺伝子型が決定しているマーカーを抽出した。抽出したマーカーのうち分離比が極端に偏っているものを除くため、カイ二乗検定を行い、p 値が $1e-5$ 以下のマーカーは削除した。

9. 連鎖地図の作成

RAD-seq のデータ解析により得られた遺伝子型データと、フラグメント解析により得られた遺伝子型データを合わせて、Antmap (Version 1.2) (Iwata and Ninomiya, 2006) で連鎖地図を作成した。グルーピングには Nearest neighboring locus 法を用い、Kosambi による遺伝距離で 25 cM 以下になるマーカー同士を連鎖しているとみなし、連鎖群の成立に必要な最低マーカー数は 3 とした。遺伝子座のオーダリングは Kosambi による遺伝距離で対数尤度が最大になるように設定し、Locus Ordering の実行回数は 3 とした。その他のパラメータはデフォルトで行った。

10. QTL 解析

連鎖地図順に並び変えた遺伝子型データに塩処理の評価結果から作成した表現型データを合わせて R/qtl (Version 1.41-6) (Broman *et al.*, 2003) を用いて解析した。Haley-Knott 回帰に基づく composite interval mapping (CIM) 法で、マーカー共変量は 5、並べ

替え検定の順列の反復回数 $n.perm$ は 1000 とした。

結果

1. ^{22}Na を用いた Na^+ の局在解析

両親間でナトリウムの吸収や蓄積に違いがあるかどうかを確かめるため、親系統について BAS イメージングを用いて植物体に吸収された ^{22}Na から放出された放射線を可視化した。その結果、'G4-2'の葉は'4076'の葉より検出された放射線量は明らかに少なかった。'G4-2'の根は'4076'の根はいずれの系統においても検出された放射線量は少なく、茎はどちらも多かった。また、'G4-2'では葉、根、茎の順に少なく、'4076'では葉と根は同程度で茎が最も多かった。(図 4)。

また、両親間でのナトリウムの吸収量や蓄積量の違いを数値化するため、 γ カウンターを用いて植物体の器官ごとの放射線量を定量した。各器官で測定された放射線量は根、茎、葉ともに、'G4-2'は'4076'に比べて低かった。根から検出された放射線量は'G4-2'で 0.42 Bq で、'4076' (2.13 Bq) の 0.20 倍だった。茎から検出された放射線量は'G4-2'で 1.62 Bq、'4076' (2.99 Bq) の 0.54 倍だった。葉から検出された放射線量は'G4-2'で 1.62 Bq、'4076' (7.18 Bq) の 0.23 倍だった (図 5A)。

単位乾物重あたりの放射線量に換算しても根、茎、葉ともに'G4-2'は'4076'に比べて低かったが、葉での差が最も大きかった。根の単位乾物重あたりの放射線量は'G4-2'で 0.043 Bq/ DW mg であり、'4076' (0.094 Bq/ DW mg) の 0.46 倍だった。茎の単位乾物重あたりの放射線量は'G4-2'で 0.112 Bq/ DW mg であり、'4076' (0.144 Bq/ DW mg) の 0.78 倍だった。葉の単位乾物重あたりの放射線量は'G4-2'で 0.045 Bq/ DW mg であ

り、'4076' (0.125 Bq/DW mg)の 0.36 倍だった (図 5B)。

計測した放射線量を元に、与えた放射性同位体のうちどれだけが植物体に移行したかを計算すると、'G4-2'は平均約 1.02%、'4076'は平均約 3.43%だった。

2. 連鎖地図の作成

QTL 解析を行うために、アズキ SSR マーカーを用いた解析と RAD-seq を用いた解析から遺伝子型を決定し、連鎖地図を作成した。

304 個のアズキ SSR マーカーのスクリーニングの結果、100 マーカーにおいて両親間で多型が見られた。多型が見出されたマーカーについて、それぞれアズキゲノム上の座乗位置を BLAST 検索により同定し、互いに隣接しない 57 マーカーを選抜して連鎖解析に使用した。

また、RAD-seq 解析によりサンプル当たり平均 464 万本のリード配列を取得した。それをヒメツルアズキの参照配列にマッピングした結果、23500 箇所にリードがマッピングされた。そのうち両親それぞれの遺伝子型がホモでありかつ遺伝子型に多型があったものが 666 箇所あった。この 666 箇所のうち遺伝子型を決定できた系統が 90%以上存在し、かつ分離比が極端に偏っていなかったものは 304 箇所であった。

これら合計 361 の SSR マーカーを使用して連鎖地図を作成したところ、357 個のマーカーがアズキの基本染色体数と同じ 11 連鎖群 (LG) に分けられた (図 6)。11 連鎖群の全長は 1099.05 cM、平均長は 99.9 cM、マーカー間の平均距離は 3.08 cM であ

った。各連鎖群のマーカー数は 11 個 (LG10) から 61 個 (LG1)、長さは 19.2 cM (LG10) から 162 cM (LG1) の範囲であった。

3. F2 の耐塩性評価と QTL 解析

耐塩性に関与する染色体の範囲を明らかにするため、連鎖地図と F2 の耐塩性に関する表現型を用いて QTL 解析を行った。F2 の表現型は NaCl 100 mM で行った耐塩性評価の萎凋度をもとに決定した。

塩処理 10 日後、'G4-2'の平均萎凋度は 1.83、'4076'の平均萎凋度は 3.28 であった。F2 198 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 95 系統が収まり、'G4-2'系統より平均萎凋度が低いものが 63 系統、'4076'より平均萎凋度が高いものが 40 系統だった (図 7A)。

塩処理 12 日後、'G4-2'の平均萎凋度は 2.67、'4076'の平均萎凋度は 3.61 であった。F2 198 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 57 系統が収まり、'G4-2'系統より平均萎凋度が低いものが 94 系統、'4076'より平均萎凋度が高いものが 57 系統だった (図 7B)。

塩処理 17 日後、'G4-2'の平均萎凋度は 4.00、'4076'の平均萎凋度は 3.94 であった。両親及び F2 の殆どが枯死していたが、いくつかのクローンが生存した系統もあった (図 7C)。

これら測定日ごとの F2 の評価結果を用いて QTL 解析を行ったところ、いずれの測

定日においても有意水準 5%以下で QTL は検出されなかった (図 8)。

QTL が検出されなかった理由として、F2 の耐塩性評価時にうどんこ病が発生したことが考えられた。特に系統番号 100 以降の個体の多くが罹病し、系統番号 1 番から 99 番までの前半 99 系統と 100 番から 198 番までの後半 99 系統の 2 群に分けると、後半の系統群で萎凋度が高い傾向が見られた。特に、塩処理 10 日後における 2 群の萎凋度の分布は後半の系統群が高い側に大きく偏り、萎凋度 1 以下の系統が少なく、3.5 以上の系統数が多かった (図 9)。系統番号 1 番から 99 番までの平均萎凋度は 1.97、系統番号 100 番から 198 番までの平均萎凋度は 2.60 だった。そこで、これら 2 群の平均萎凋度を用いて Wilcoxon の順位和検定を行ったところ、 $p = 3 \times 10^{-6}$ となり、2 群の平均萎凋度が有意に異なることが示唆された。

4. F3 の耐塩性評価の予備実験

F3 を使用して評価を行う前に生育条件や評価基準を決定するため、予備実験を行った。

100 mM の塩処理 3 日後、どちらの系統も障害が現れていなかったが、5 日後になると '4076' の初生葉の中にうっすらと黒い斑点が現れているものがあった。6 日後は 5 日後と変わりなかった。10 日後では、'4076' の茶色い斑点が初生葉全体に広がっていたが、枯死はしていなかった。塩処理期間中、'G4-2' は障害が出ることも枯死することもなかった。

150 mM の塩処理 3 日後、どちらの系統も障害が現れていなかったが、5 日後になると'4076'の初生葉の中にうっすらと黒い斑点が現れているものがあった。6 日後は 5 日後と変わりなかった。10 日後では初生葉全体に茶色の斑点が広がっており、一部では枯死している初生葉もあった。塩処理期間中、'G4-2'は障害が出ることも枯死することもなかった。

200 mM の塩処理 3 日後、'4076'の葉にうっすらと黒い斑点が現れているものがあった。5 日後には'4076'の初生葉のほとんどで茶色や黒の斑点が全体に現れていた。6 日後は 5 日後に比べて斑点がより濃くなっていた。10 日後では'4076'の初生葉すべてが枯死していた。塩処理期間中、'G4-2'は障害が出ることも枯死することもなかった。

以上より、'G4-2'と'4076'の障害の差が一番わかりやすかった NaCl 200 mM で F3 の耐塩性評価を行うこととした。また、初生葉の障害は斑点の発生または枯死の二通りしかなく評価が容易であったのに対し、本葉においては障害の現れ方が一定ではなかったため、初生葉の障害を指標に萎凋度を評価することとした。

5. F3 の耐塩性評価と QTL 解析 (1 回目)

F2 の耐塩性評価と QTL 解析で QTL が検出されなかった原因としてうどんこ病により遺伝子型以外の影響を受けた可能性が考えられたため、F3 を使用して耐塩性評価及び QTL 解析を再度行った。F3 の耐塩性評価の 1 回目には系統番号 1 番から 108 番までの 106 系統を使用した。67 番は種子を採取できなかったために、また 89 番は

播種した種子がうまく発芽しなかったために欠番となった。NaCl 200 mM で行った耐塩性評価の F3 系統の萎凋度から F2 の表現型を決定した。

塩処理 3 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 0.33、'4076' の平均萎凋度は 0.31 だった。F2 106 系統のうち 2 系統が 'G4-2' と同じ平均萎凋度を示し、'G4-2' より平均萎凋度が高いものが 16 系統、'4076' より平均萎凋度が低いものが 88 系統だった (図 10A)。

塩処理 5 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 0.35、'4076' の平均萎凋度は 0.75 だった。F2 106 系統のうち両親系統の間に 33 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度が低いものが 67 系統、'4076' より平均萎凋度が高いものが 6 系統だった (図 10B)。

塩処理 7 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 0.63、'4076' の平均萎凋度は 1.50 だった。F2 106 系統のうち両親系統の平均萎凋度の間に 35 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度が低いものが 68 系統、'4076' より平均萎凋度が高いものが 3 系統だった (図 10C)。

塩処理 10 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 0.98、'4076' の平均萎凋度は 2.25 だった。F2 106 系統のうち両親系統の平均萎凋度の間に 41 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度が低いものが 63 系統、'4076' より平均萎凋度が高いものが 2 系統だった (図 10D)。

塩処理 12 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 1.45、'4076' の平均萎凋度は 2.40 だった。F2 106 系統のうち両親系統の平均萎凋度の間に 49 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度が低いものが 54 系統、'4076' より平均萎凋度が高いものが 3 系統だった (図 10E)。

塩処理 14 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 1.42、'4076' の平均萎凋度は 2.52 だった。F2 106 系統のうち両親系統の平均萎凋度の間に 48 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度

が低いものが 53 系統、'4076'より平均萎凋度が高いものが 5 系統だった (図 10F)。

塩処理 17 日後、'G4-2'の平均萎凋度は 1.75、'4076'の平均萎凋度は 2.56 だった。F2 106 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 47 系統が収まり、'G4-2'より平均萎凋度が低いものが 53 系統、'4076'より平均萎凋度が高いものが 6 系統だった (図 10G)。

これら測定日ごとの表現型データを用いて QTL 解析を行ったところ、第 8 連鎖群に強い QTL が繰り返し検出されたほか、第 9 連鎖群にも弱い QTL が検出された。

第 8 連鎖群の QTL はマーカー 12732 (111.62 cM) と 12716 (117.07 cM) の間 5.45 cM の間にあり、3 日後は有意水準に達しなかったが、5 日後に 5% 有意、それ以降は 1% 有意水準を超える LOD 値を示した (図 11)。第 9 連鎖群の QTL はマーカー 9021 (18.24 cM) と 9166 (31.95 cM) の間 13.71 cM の間にあり、10 日後から 17 日後に 5% の有意水準を超える LOD 値を示した (図 11)。

なお、1 回目の耐塩性評価で各板重の周縁部に配置された系統とそれ以外に配置された系統で萎凋度が異なり、萎凋度 0.5 以下に周縁部では 47 系統のうち 10 系統が分布したのに対し、周縁部以外では 59 系統のうち 25 系統が分布した。(図 12)。塩処理後 10 日後において、周縁部に配置された 47 系統の平均萎凋度は 1.04、それ以外に配置された 59 系統の平均萎凋度は 0.75 だった。そこで、これら 2 群の平均萎凋度を用いて Wilcoxon の順位和検定を行ったところ、 $p = 9.7 \times 10^{-3}$ となり、2 群の平均萎凋度が有意に異なることが示唆された。

6. F3 の耐塩性評価と QTL 解析 (2 回目)

周縁部に配置された系統とそれ以外に配置された系統の平均萎凋度に有意差があったことから、板重の周縁部では塩ストレスによる障害が出やすくなると考えられたため、系統番号 109 番から 198 番と 89 番の 91 系統を使用した 2 回目の F3 の耐塩性評価では反復間で配置を変えて栽培するようにした (図 3)。

塩処理 3 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 0.11、'4076' の平均萎凋度は 1.31 だった。F2 91 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 54 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度が低いものが 35 系統、'4076' より平均萎凋度が高いものが 2 系統だった (図 13A)。

2 回目の塩処理 5 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 0.25、'4076' の平均萎凋度は 1.48 だった。F2 91 系統のうち両親系統の間に 49 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度が低いものが 36 系統、'4076' より平均萎凋度が高いものが 6 系統だった (図 13B)。

2 回目の塩処理 7 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 0.36、'4076' の平均萎凋度は 1.88 だった。F2 91 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 52 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度が低いものが 34 系統、'4076' より平均萎凋度が高いものが 5 系統だった (図 13C)。

2 回目の塩処理 10 日後、'G4-2' の平均萎凋度は 0.81、'4076' の平均萎凋度は 2.29 だった。F2 91 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 44 系統が収まり、'G4-2' より平均萎凋度が低いものが 34 系統、'4076' より平均萎凋度が高いものが 13 系統だった (図 13D)。

2 回目の塩処理 12 日後、'G4-2'の平均萎凋度は 1.12、'4076'の平均萎凋度は 2.75 だった。F2 91 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 50 系統が収まり、'G4-2'より平均萎凋度が低いものが 31 系統、'4076'より平均萎凋度が高いものが 10 系統だった (図 13E)。

2 回目の塩処理 14 日後、'G4-2'の平均萎凋度は 1.36、'4076'の平均萎凋度は 2.92 だった。F2 91 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 56 系統が収まり、'G4-2'より平均萎凋度が低いものが 24 系統、'4076'より平均萎凋度が高いものが 11 系統だった (図 13F)。

2 回目の塩処理 17 日後、'G4-2'の平均萎凋度は 1.79、'4076'の平均萎凋度は 3.00 だった。F2 91 系統のうち両親系統の平均萎凋度の中に 72 系統が収まり、'G4-2'より平均萎凋度が低いものが 19 系統だった (図 13G)。

これら測定日ごとの表現型データを用いて QTL 解析を行ったところ、第 8 連鎖群に強い QTL が繰り返し検出されたほか、第 3 連鎖群にも QTL が検出された。第 8 連鎖群の QTL はマーカー CEDG071 (103.15 cM) と 12716 (117.07 cM) の間 13.92 cM の間にあり、1 回目と異なり評価開始直後の 3 日後から 17 日後の全日程で 1%の有意水準を超える LOD 値を示した (図 14)。第 3 連鎖群の QTL はマーカー 1543 (23.96 cM) と 1681 (37.06 cM) の間 13.1 cM の間にあり、7 日後のみで 1%の有意水準を超える LOD 値を示した (図 14)。

考察

本研究により、'G4-2'の耐塩性は主に単一の QTL によって支配されていることが明らかになった。この QTL は第 8 連鎖群のマーカー 12732 (111.62 cM) と 12716 (117.07 cM) の間に検出され、これ以外に検出される QTL がほとんどなかったことから、この QTL の効果は大きいと考えられる。他にいくつかの QTL が検出されることはあったが、再現性が低かったことから、効果はあったとしても限定的なものだと考えられる。したがって、当初考えていた五島列島の系統群の耐塩性は短期間に起きた少数の遺伝変異によって生じた、という仮説は支持された。また、この QTL から原因遺伝子を同定することができれば、それを作物に導入することによって作物の耐塩性を大きく改善することができると考えられる。

また、放射性同位体を用いた実験より、'G4-2'の耐塩性機構は葉への Na^+ の移行を抑制するものであることが示唆された。よって、QTL に含まれる原因遺伝子には Na^+ の輸送を制御するものが予想される。

さらに、本研究で検出された QTL 領域は BLAST 検索よりアズキゲノムの第 8 染色体上の 45.1 Mbp から 46.3 Mbp の領域に相当する。この範囲に座乗する遺伝子は 113 個あるが、中でもアズキの Vigan.08G36660 はシロイヌナズナの CBL-interacting protein kinase 7 (CIPK7) と同祖遺伝子であると考えられた。CIPK7 は Na^+ トランスポーターの salt overly sensitive 1 (SOS1) を制御する salt overly sensitive 2 (SOS2) (Qiu, *et al.*, 2002) と類似している遺伝子で (Kolukisaoglu, *et al.*, 2004)、多くの植物において塩ストレス

により発現が誘導されることが知られている。SOS1 の Na⁺を排出する機能 (Ismail, *et al.*, 2017) は'G4-2'の Na⁺の葉への移行を抑制する表現型とも関連しており、CIPK7 は耐塩性に関する有力な候補遺伝子だと考えられる。しかし、現時点で原因遺伝子を確定することはできないため、今後はトランスクリプトーム解析や、戻し交雑集団を用いたファインマッピングを行うことで、原因遺伝子を同定することを目指す。

なお、本研究では検出できなかった耐塩性遺伝子座もあると考えられる。F2 及び F3 の萎凋度の分布から、多数の系統が超越分離していることが分かる。単一の QTL のみで耐塩性が制御されているならば、超越分離は起こりえないため、'4076'にも効果の小さい遺伝子座が存在するか、雑種強勢のように遺伝子型がヘテロになったときに耐塩性が向上する遺伝子座が存在すると予想される。時間とともに検出される QTL の LOD スコアが減少したことも、検出された QTL 以外の効果の小さい遺伝子座が存在し、時間とともにそれらの影響が強くなるためであると考えられる。

また、本研究においてはいくつか反省が必要な点がある。一つは、F2 の評価時にうどんこ病を発生させてしまった点である。うどんこ病の発生源に近かった系統群 (系統番号 100~198) と比較的遠かった系統群 (系統番号 1~99) の萎凋度が有意に異なった (図 9) ことから、うどんこ病が萎凋度に大きく影響したことは間違いないと考えられる。これを防ぐには、罹病個体を早急に間引きするか、改めて実験をやりなおすべきであった。もう一つは、F3 の 1 回目の耐塩性試験で水耕栽培における配置位置の効果を考慮に入れなかった点である。図 12 に示したように周縁部で萎凋度が有意

に高くなった。その原因としては、周縁部では蒸散が促進されより多くの Na^+ が吸収された可能性や、周縁部が光を受けやすく光障害を受けた可能性、移植時に周縁部の根が傷つきやすかった可能性などが考えられるが、はっきりとした原因は特定されていない。しかし、2 回目の耐塩性試験では反復間で配置を変えたところ QTL 解析の精度が上がったことから、配置の効果の影響は無視できないことが明らかになった。

以上のように、本研究ではヒメツルアズキから 1 つの効果の大きな耐塩性 QTL を同定したが、他の *Vigna* 属野生種からも同様な成果が得られると考えられる。例えば *V. marina* では単一の QTL が同定されている。*V. trilobata* と *V. vexilata* でもヒメツルアズキと同様に種内に耐塩性を獲得した系統がある。したがって、本研究と同じように交雑集団を用いることによってこれらの野生種からも効果の大きい耐塩性遺伝子を同定できるだろう。

謝辞

本研究の遂行及び本論文を取りまとめるにあたって、東京大学大学院新領域創成科学研究科の内藤健准教授には厳しくも優しい指導を賜りました。丁寧かつ熱心なご指導、ご助言に心から感謝いたします。

国立研究開発法人 農業・食品産業技術研究機構 遺伝資源センターの高橋有博士には実験の指導や日常の議論を通じて多くの知識や示唆をいただきました。同じく、野田祐作博士には放射性同位体を用いた実験の指導や日常の議論を通じて多くの知識や示唆をいただきました。また、筑波大学 アイソトープ環境動態研究センターの古川純准教授には放射性同位体を用いた実験に多くの助言とご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

国立研究開発法人 農業・食品産業技術研究機構 遺伝資源センターの研究員、職員の皆様には研究から日々の生活など多岐にわたって多くのご協力とご助言、励ましの言葉をいただきました。同期の小林優生君、後輩の佐野平和君、工藤桃李君には実験への協力や多くの励ましの言葉を頂きました。ありがとうございました。

研究から普段の生活まで様々な面で多くの人に支えられて 2 年間の充実した研究生活を送ることができました。支えてくださった皆様にこの場をお借りして深く感謝の意を表するとともに、改めて厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889-890
- Catchen J, Amores A, Hohenlohe P, Cresko W, Postlethwait J. (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1:171-182
- Catchen J, Hohenlohe P, Bassham S, Amores A, Cresko W. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*. 22: 3124-3140
- Chankaew S, Isemura T, Naito K, Ogiso-Tanaka E, Tomooka N, Somta P, Kaga A, Vaughan DA, Srinives P. (2014). QTL mapping for salt tolerance and domestication-related traits in *Vigna marina* subsp. *oblonga*, a halophytic species. *Theor Appl Genet* 127:691–702
- DaCosta JM, Sorenson MD. (2014). Amplification biases and consistent recovery of loci in a double-digest RAD-seq protocol. *Plos One* 9(9): e106713
- FAO. (2011). The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – Managing systems at risk. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and Earthscan, London.*
- Han OK, Kaga A, Isemura T, Wang XW, Tomooka N, Vaughan DA. (2005). A genetic linkage map for azuki bean [*Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & Ohashi]. *Theor Appl Genet* 111: 1278–1287

- Iseki K, Takahashi Y, Muto C, Naito K, Tomooka N. (2016). Diversity and evolution of salt tolerance in the genus *vigna*. *Plos One* 11 (10): e0164711
- Ismail AM and Tomoaki H. (2017). Genomics, physiology, and molecular breeding approaches for improving salt tolerance. *Plant Biol* 68:405-434
- Iwata H, Ninomiya S. (2006). AntMap: constructing genetic linkage maps using an ant colony optimization algorithm. *Breeding Science* 56: 371-377.
- Kolukisaoglu Ü, Weinl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J. (2004). Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiology* Vol. 134: 43-58
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16) 2078-9 [19505943]
- Li H. and Durbin R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760. [PMID: 19451168]
- Qiu QS, Guo Y, Dietrich MA, Schumaker KS, Zhu JK. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *PNAS* vol. 99 (12) 8436–8441
- Tomooka N, Vaughan DA, Moss H and, Maxted N. (2002). The asian *Vigna*: genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* genetic resources. *Springer Science + Business Media, B.V.*

- Tomooka N, Hukui K, Chankaew S, Iizumi T, Hirashima S. (2013). Collection of wild leguminous crop relatives on Goto islands, Nagasaki, Japan, 2012. *Areipgr* Vol.29: 19-43
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables. *Working Paper* No. ESA/P/WP/248.
- Yoshida Y, Marubodee R, Ogiso-Tanaka E, Iseki K, Isemura T, Takahashi Y, Muto C, Naito K, Kaga A, Okuno K, Ehara H, Tomooka N. (2015). Salt tolerance in wild relatives of adzuki bean, *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi et Ohashi. *Genet Resour Crop Evol* DOI 10.1007/s10722-015-0272-0
- 友岡憲彦, 加賀秋人, Vaughan D. (2006). アジア *Vigna* 属植物遺伝資源の多様性とその育種的利活用 第一報～第五報. *熱帯農業* 50(1~4)
- 内藤健, 坂井寛章. (2016). 世界の現状 : マメ科作物のゲノム解析とその利用. *国際林業協力* Vol. 39 (1) 12-19
- 内藤健. (2016). *Vigna* 属植物 アズキのなかまがもつ多様性と可能性. *化学と生物* Vol. 54 (7) 464-470
- 西尾剛 (編). (2012). 植物育種学 第4版 文永堂出版
- 米山忠克, 長谷川功, 関本均, 牧野周, 間藤徹, 河合成直, 森田明雄. (2010). 新植物栄養・肥料学 朝倉書店

表 1. PCR 組成表

	終濃度	1 サンプルあたり
2× QIAGEN Multiplex PCR mix	1×	5 μ l
50× Primer Mix (Forward primer, Reverse primer 各 5 μ M)	0.1 μ M	0.2 μ l × プライマー数
10 ng / μ l DNA	\leq 0.2 ng/ μ l	1 μ l
Milli-Q water で合計 10 μ l に調整		

表 2. マルチプレックス時のプライマーセットの組み合わせ

組合せ No.	マーカー名	蛍光標識	Chr	Size	
				G4-2	4076
1	CEDG279	FAM	11	199.66	198.32
	CEDG034	VIC	6	110.26	104.59
	CEDG305	NED	3	133.37	137.43
	CEDC055	PET	4	172.25	178.41
2	CEDG222	FAM	7	172.22	149.47
	CEDG036	VIC	4	247.29	213.89
	CEDG286	NED	8	182.97	185.72
	CEDG297	PET	2	123.32	113.24
3	CEDG153	FAM	2	86.54	84.46
	CEDG201	VIC	7	144.47	149.05
	CEDG154	NED	4	248.31	252.42
	CEDG084	PET	3	200.11	165.51
4	CEDG275	FAM	2	262.3	259.8
	CEDG265	VIC	8	199.04	186.6
	CEDG283	NED	1	157.66	161.35
	CEDG293	PET	2	110.33	112.38
5	CEDG253	FAM	5	201.45	195.29
	CEDG070	VIC	9	227.76	218.63
	CEDG044	NED	11	130.86	132.44
	CEDC056	PET	10	152.56	166.74
6	CEDG211	FAM	6	212.88	211.1
	CEDG056	VIC	9	158.06	184.78
	CEDG042	NED	11	124.2	109.8
	CEDG280	PET	10	171.77	175.8
7	CEDG196	FAM	8	155.97	147.73
	CEDG088	FAM	4	108.62	110.66
8	CEDG121	FAM	6	85.89	87.36
	CEDG074	NED	4	195.08	191.83
	CEDG150	PET	10	160.32	168.8
9	CEDG198	FAM	10	250.76	230.15
	CEDG172	VIC	9	186.46	180.24
	CEDG125	NED	8	212.34	219.79
	CEDG264	PET	5	157.1	166.18
10	CEDG218	FAM	7	192.82	190.52
	CEDG225	VIC	2	158.79	168.95

	CEDG152	NED	6	271.17	218.74
	CEDG057	FAM	1	172.56	180.71
11	CEDG133	VIC	1	211.29	205.72
	CEDG085	FAM	7	156.55	160

Chr は増幅される DNA 断片が座乗するアズキ染色体の染色体番号を、Size (bp) は PCR による増幅断片長を示す。

表 2 続き

組合せ No.	マーカー名	蛍光標識	Chr	Size	
				G4-2	4076
12	CEDG136	VIC	11	172.92	158.58
	CEDG185	NED	4	213.69	209.76
13	CEDG002	FAM	11	157.66	161.56
	CEDG166	FAM	9	249.29	228.92
	CEDG294	FAM	3	203.9	198.12
14	CEDG149	FAM	1	174.43	168.33
	CEDG168	FAM	11	231.79	241.9
15	CEDG137	FAM	6	295.38	278.98
	CEDG204	FAM	1	166.57	154.15
16	CEDG024	VIC	9	127.32	144.58
	CEDG174	FAM	7	195.6	204.01
17	CEDG071	FAM	8	240.71	245.73
18	CEDG073	FAM	8	182.73	186.91
9	CEDG288	NED	1	231.37	209.33
20	CEDG041	PET	7	89.44	87.5
21	CEDG271	VIC	8	297.44	271.23
22	CEDG103	FAM	4	113.63	176.22
23	CEDG274	NED	6	275.47	219.47

Chr は増幅される DNA 断片が座乗するアズキ染色体の染色体番号を、Size (bp) は PCR による増幅断片長を示す。

165	170	175	180	185	190	195	200
164	169	174	179	184	189	194	199
163	168	173	178	183	188	193	198
162	167	172	177	182	187	192	197
161	166	171	176	181	186	191	196

125	130	135	140	145	150	155	160
124	129	134	139	144	149	154	159
123	128	133	138	143	148	153	158
122	127	132	137	142	147	152	157
121	126	131	136	141	146	151	156

85	90	95	100	105	110	115	120
84	89	94	99	104	109	114	119
83	88	93	98	103	108	113	118
82	87	92	97	102	107	112	117
81	86	91	96	101	106	111	116

45	50	55	60	65	70	75	80
44	49	54	59	64	69	74	79
43	48	53	58	63	68	73	78
42	47	52	57	62	67	72	77
41	46	51	56	61	66	71	76

5	10	15	20	25	30	35	40
4	9	14	19	24	29	34	39
3	8	13	18	23	28	33	38
2	7	12	17	22	27	32	37
1	6	11	16	21	26	31	36

G	-	G	-	K	-	K	-
-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	G	-	K	-	K	-
-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	G	-	K	-	K	-

図 1. F2 の耐塩性評価試験の配置

数字は F2 の系統番号、G は'G4-2'、K は'4076'を示す。- には植物体を配置していない。

G	K	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26
27	28	29	30	31	32	33
34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47
48	49	50	51	52	53	54

G	K	55	56	57	58	59
60	61	62	63	64	65	66
67	68	69	70	71	72	73
74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87
88	89	90	91	92	93	94
95	96	97	98	99	100	101
102	103	104	105	106	107	108

図 2. F3 の耐塩性評価試験 1 回目の配置

数字は F2 の系統番号、G は'G4-2'、K は'4076'を示す。系統番号 67 は不稔のため種子がなく欠番、系統番号 89 は初期成育失敗のため 2 回目の試験時に行ったため、1 回目は欠番。欠番部分は移植せず空けたまま他の系統を移植した。

G	K	109	110	111	112	113	155	156	157	158	159	160	161	147	148	149	150	151	152	153
114	115	116	117	118	119	120	162	G	K	109	110	111	112	154	155	156	157	158	159	160
121	122	123	124	125	126	127	113	114	115	116	117	118	119	161	162	G	K	109	110	111
128	129	130	131	132	133	134	120	121	122	123	124	125	126	112	113	114	115	116	117	118
135	136	137	138	139	140	141	127	128	129	130	131	132	133	119	120	121	122	123	124	125
142	143	144	145	146	147	148	134	135	136	137	138	139	140	126	127	128	129	130	131	132
149	150	151	152	153	154	155	141	142	143	144	145	146	147	133	134	135	136	137	138	139
156	157	158	159	160	161	162	148	149	150	151	152	153	154	140	141	142	143	144	145	146

G	K	163	164	165	166	167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
168	169	170	171	172	173	174	-	G	K	163	164	165	166	-	-	-	-	-	-	-
175	176	177	178	179	180	181	167	168	169	170	171	172	173	-	-	G	K	163	164	165
182	183	184	185	186	187	188	174	175	176	177	178	179	180	166	167	168	169	170	171	172
189	190	191	192	193	194	195	181	182	183	184	185	186	187	173	174	175	176	177	178	179
196	197	198	89	-	-	-	188	189	190	191	192	193	194	180	181	182	183	184	185	186
-	-	-	-	-	-	-	195	196	197	198	89	-	-	187	188	189	190	191	192	193
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	194	195	196	197	198	89	-

139	140	141	142	143	144	145	131	132	133	134	135	136	137	123	124	125	126	127	128	129
146	147	148	149	150	151	152	138	139	140	141	142	143	144	130	131	132	133	134	135	136
153	154	155	156	157	158	159	145	146	147	148	149	150	151	137	138	139	140	141	142	143
160	161	162	G	K	109	110	152	153	154	155	156	157	158	144	145	146	147	148	149	150
111	112	113	114	115	116	117	159	160	161	162	G	K	109	151	152	153	154	155	156	157
118	119	120	121	122	123	124	110	111	112	113	114	115	116	158	159	160	161	162	G	K
125	126	127	128	129	130	131	117	118	119	120	121	122	123	109	110	111	112	113	114	115
132	133	134	135	136	137	138	124	125	126	127	128	129	130	116	117	118	119	120	121	122

193	194	195	196	197	198	89	185	186	187	188	189	190	191	177	178	179	180	181	182	183
-	-	-	-	-	-	-	192	193	194	195	196	197	198	184	185	186	187	188	189	190
-	-	-	-	-	-	-	89	-	-	-	-	-	-	191	192	193	194	195	196	197
-	-	-	G	K	163	164	-	-	-	-	-	-	-	198	89	-	-	-	-	-
165	166	167	168	169	170	171	-	-	-	-	G	K	163	-	-	-	-	-	-	-
172	173	174	175	176	177	178	164	165	166	167	168	169	170	-	-	-	-	-	G	K
179	180	181	182	183	184	185	171	172	173	174	175	176	177	163	164	165	166	167	168	169
186	187	188	189	190	191	192	178	179	180	181	182	183	184	170	171	172	173	174	175	176

図 3. F3 の耐塩性評価試験 2 回目の配置

数字は F2 の系統番号、G は'G4-2'、K は'4076'を示す。- には植物体を配置していない。

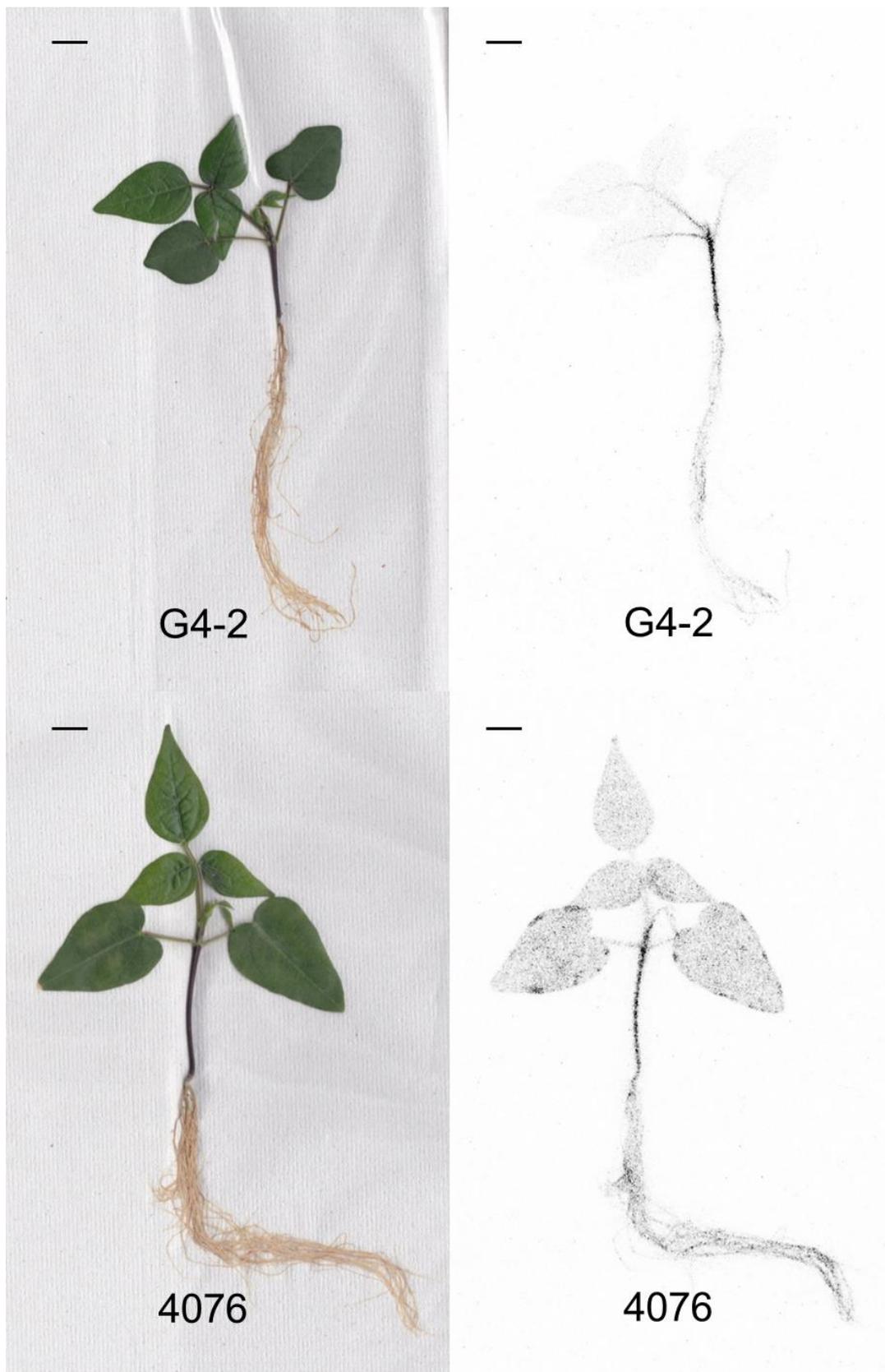


図4. 明視野 (左) および Bas イメージ (右)。スケールバーは1cmを示す。

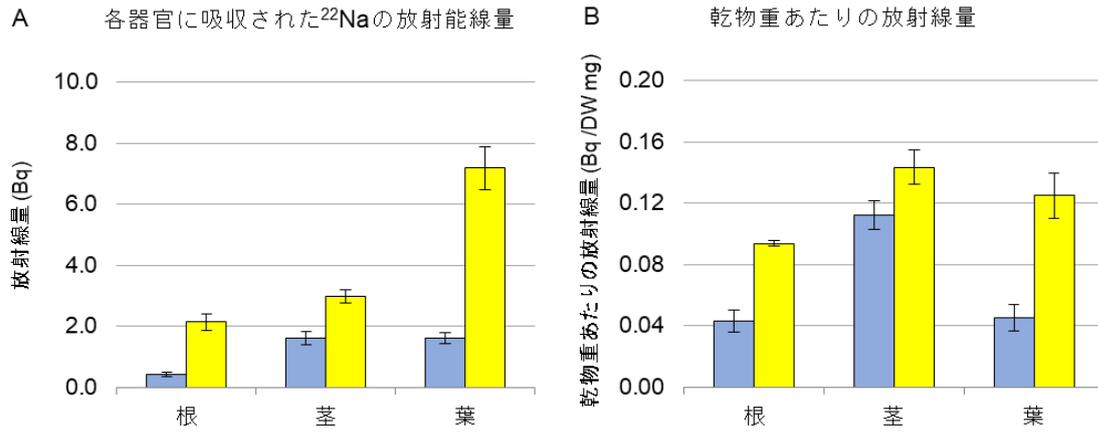


図 5. 植物体の器官ごとの放射線量の定量結果

青が'G4-2'系統、黄色が'4076'系統を示し、バーは標準偏差を示す。'G4-2'系統は n=3、'4076'系統は n=4。

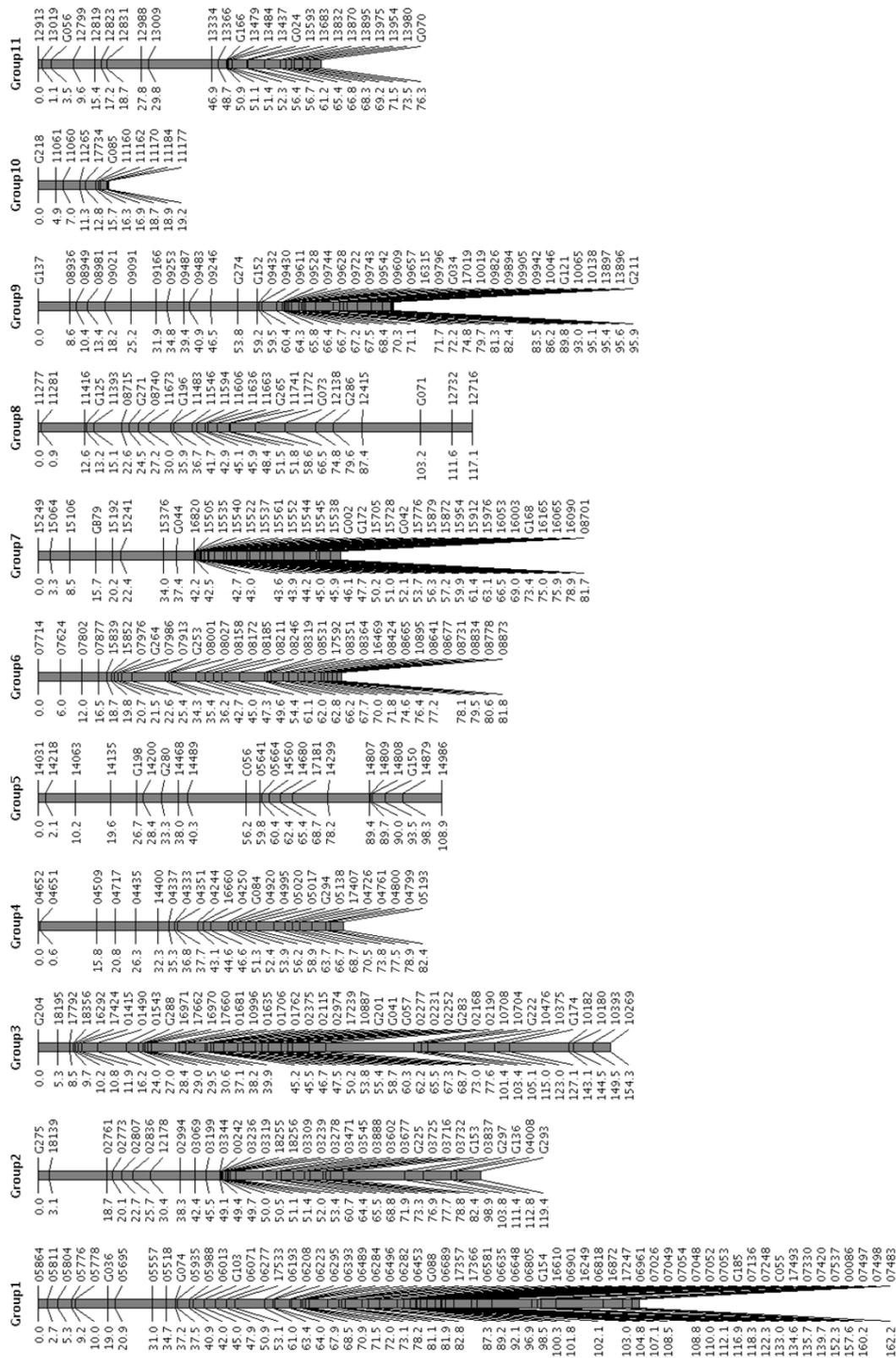


図 6. 'G4-2'×'4076' の F2 集団を用いて作成された連鎖地図
 横軸距離 (cm) (左) およびマーカーカーター (右) C は CFDC C' は CFDC を示す

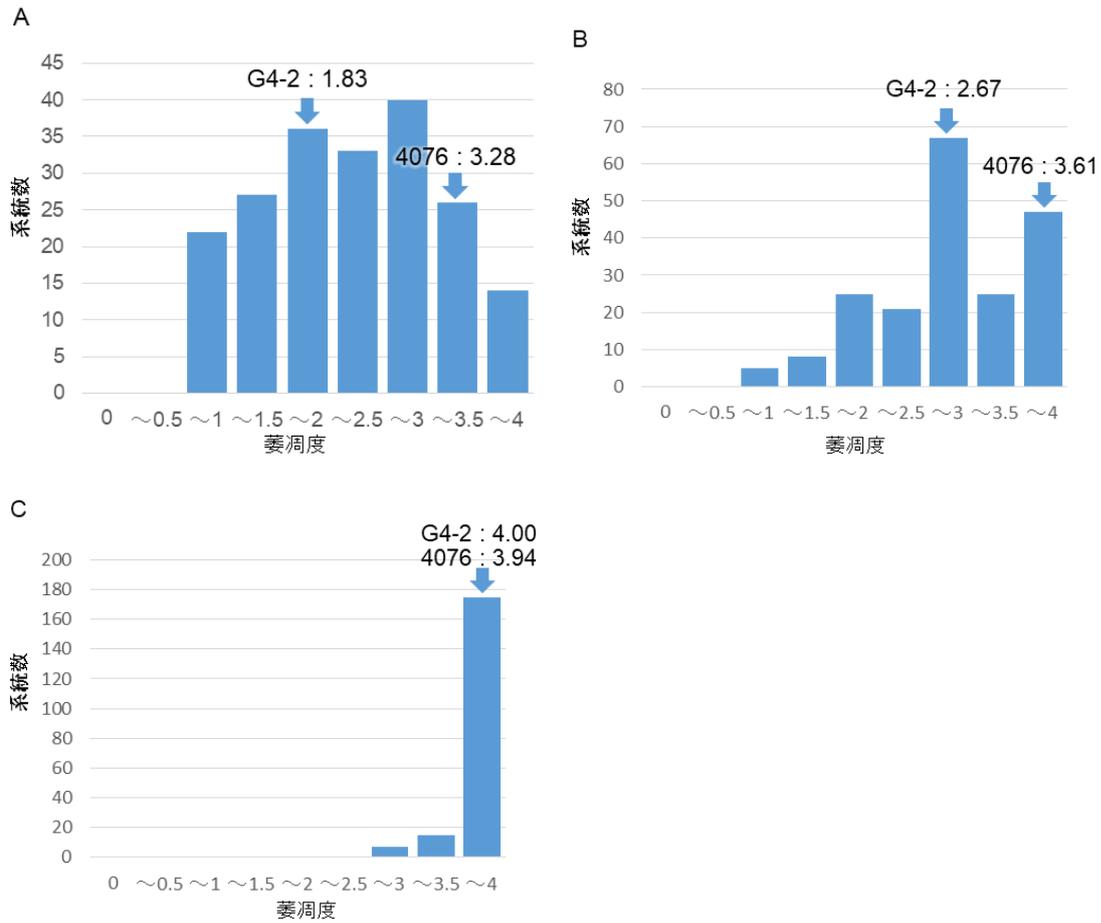


図 7. F2 の萎凋度の分布図

A. 塩処理 10 日後、B. 塩処理 12 日後、C. 塩処理 17 日後の F2 の平均萎凋度の分布図。
両親系統名の右の数字は両親系統の平均萎凋度を示す。

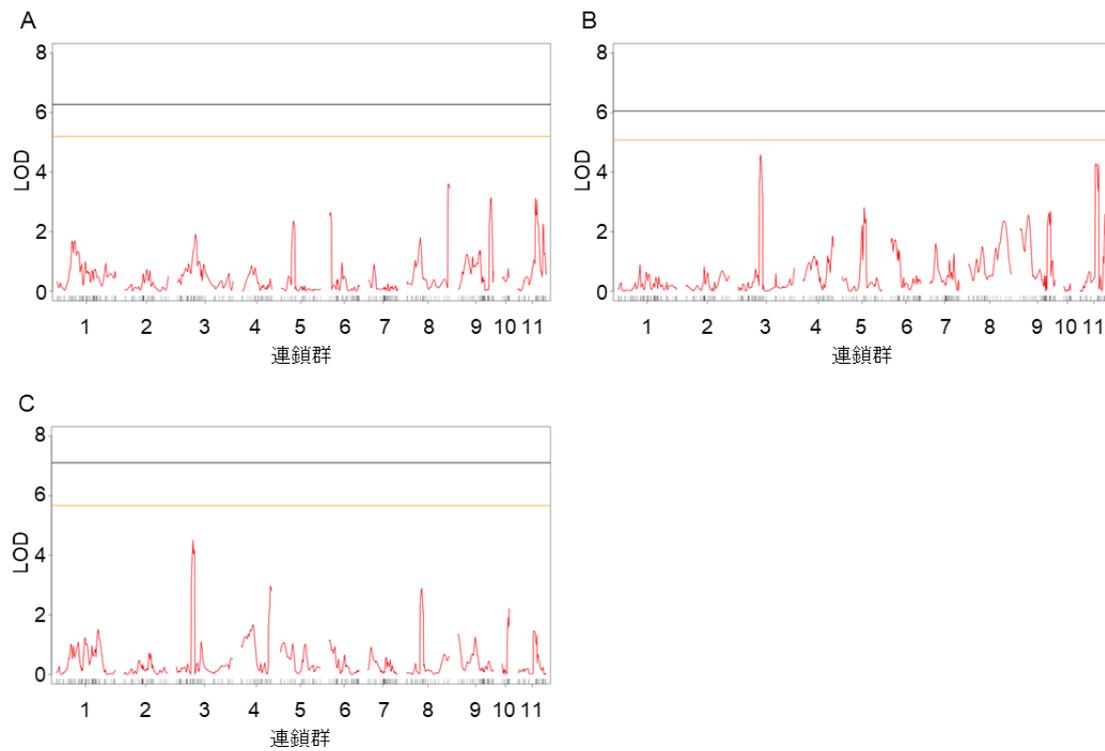


図 8. F2 の耐塩性評価結果を用いた QTL 解析の結果

それぞれ、A. 塩処理 10 日後、B. 塩処理 12 日後、C. 塩処理 17 日後の評価結果を用いて QTL 解析を行った結果。グラフ内の黄色線は 5% 有意水準、黒線は 1% 有意水準を示す。

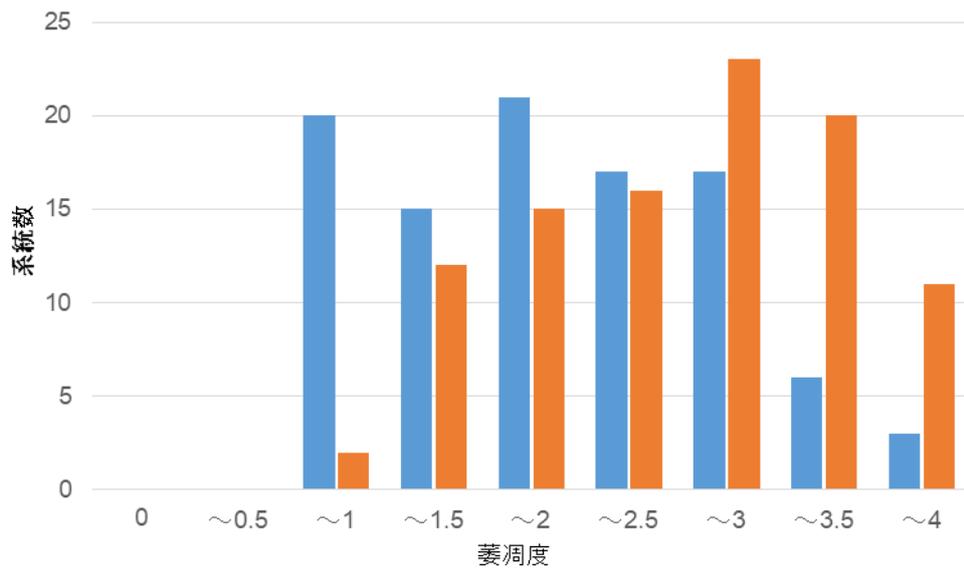


図 9. F2 の耐塩性評価、塩処理 10 日後の萎凋度の分布

青が系統番号 1 から 99 まで、オレンジが系統番号 100 から 198 までの萎凋度の分布を示す。

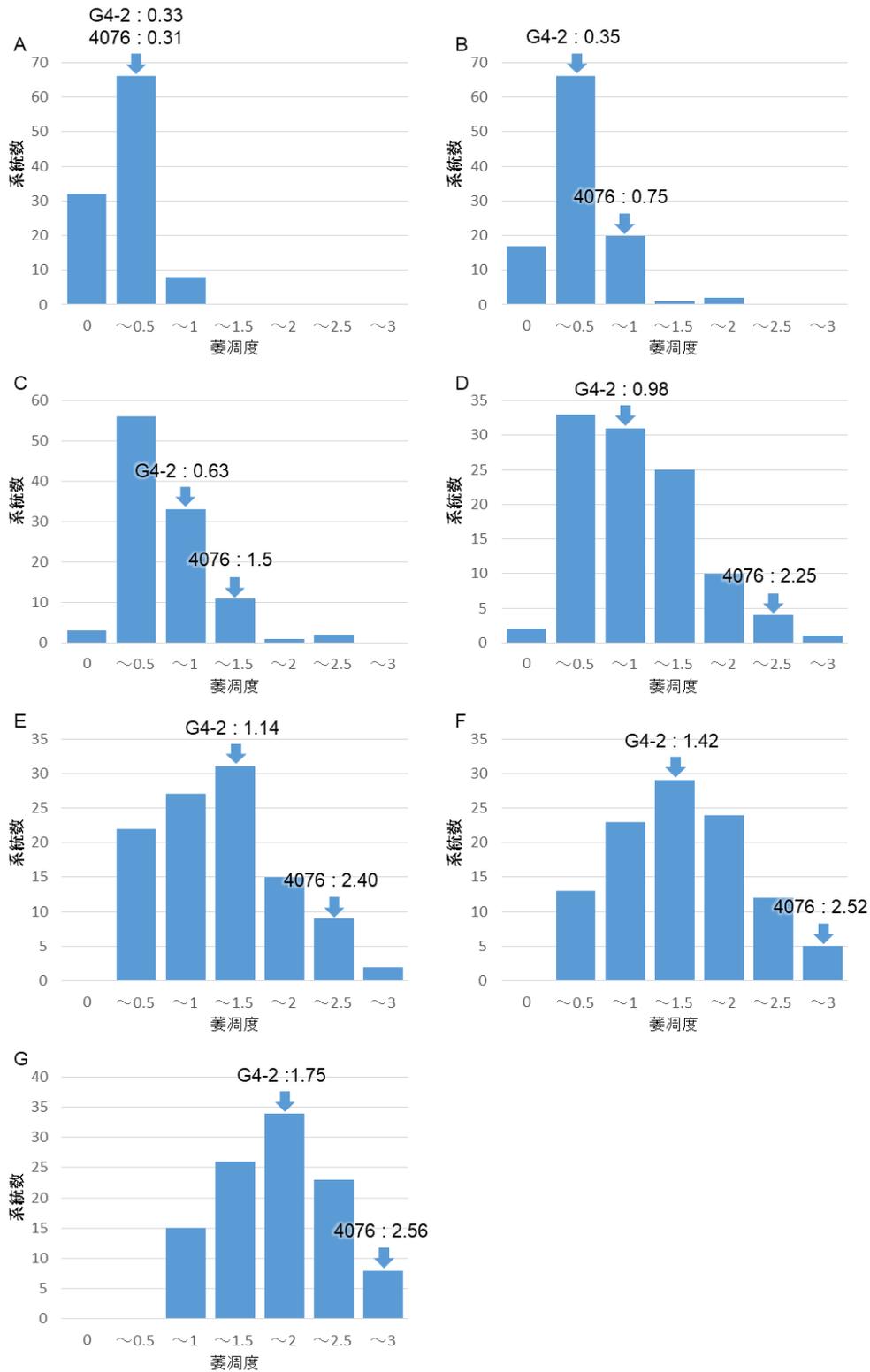


図 10.1 回目の F3 の萎凋度の分布図

A. 塩処理 3 日後、B. 塩処理 5 日後、C. 塩処理 7 日後、D. 塩処理 10 日後、E. 塩処理 12 日後、F. 塩処理 14 日後、G. 塩処理 17 日後の F3 の平均萎凋度の分布図。

両親系統名の右の数字は両親系統の平均萎凋度を示す。

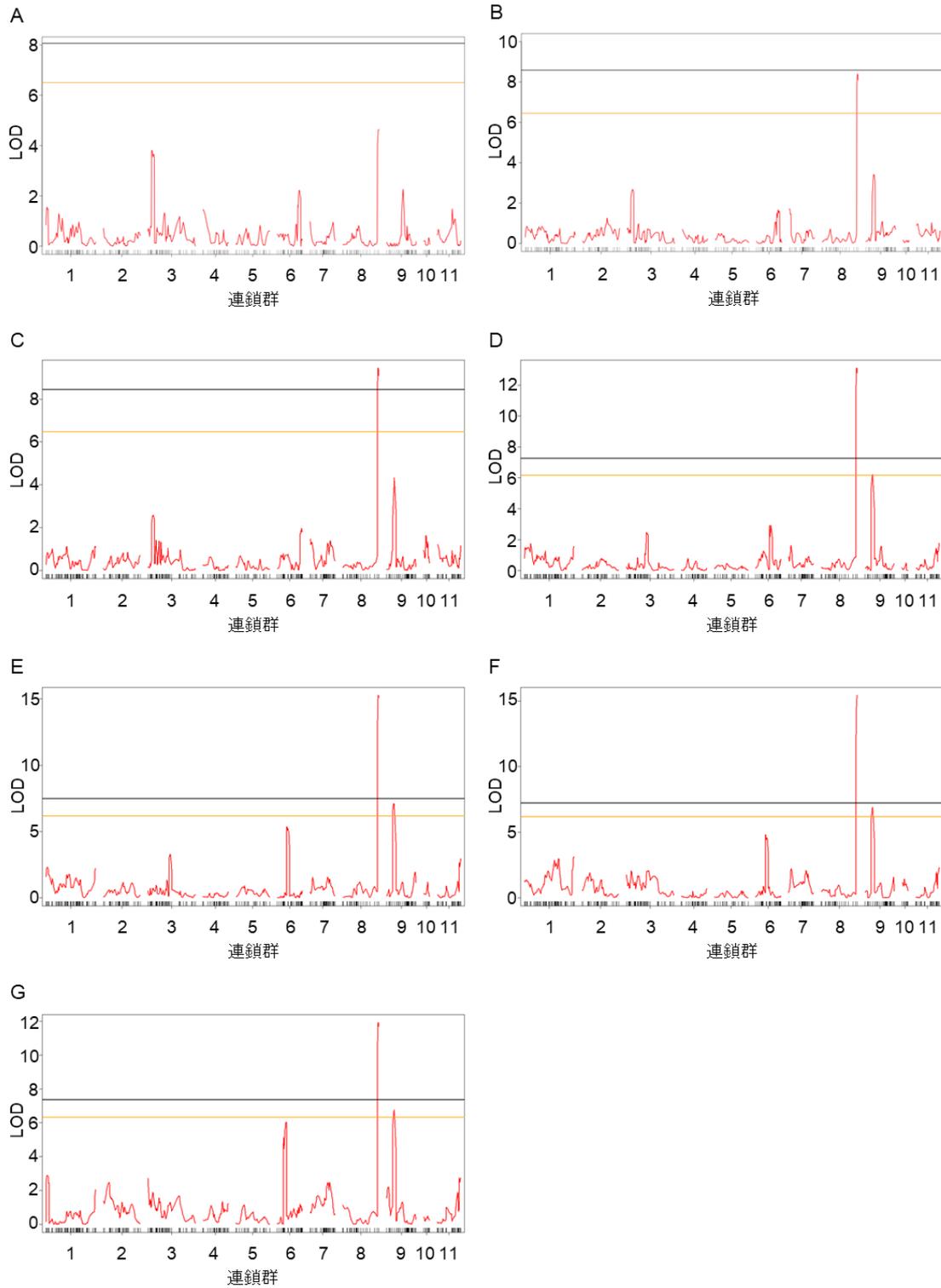


図 11. 1 回目の F3 の耐塩性評価結果を用いた QTL 解析の結果

それぞれ、A. 塩処理 3 日後、B. 塩処理 5 日後、C. 塩処理 7 日後、D. 塩処理 10 日後、E. 塩処理 12 日後、F. 塩処理 14 日後、G. 塩処理 17 日後の評価結果を用いて QTL 解析を行った結果。グラフ内の黄色線は 5% 有意水準、黒線は 1% 有意水準を示す。

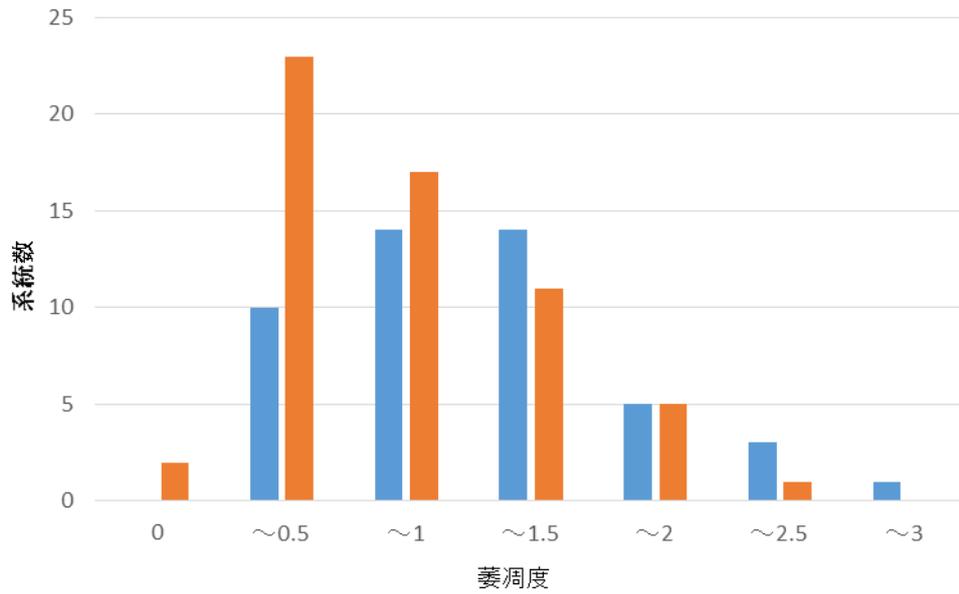


図 12. F3 の耐塩性評価 (1 回目) 、塩処理 10 日後の萎凋度の分布

青が板重の周縁部に配置された系統の萎凋度の分布、オレンジがそれ以外に配置された系統の萎凋度の分布を示す。

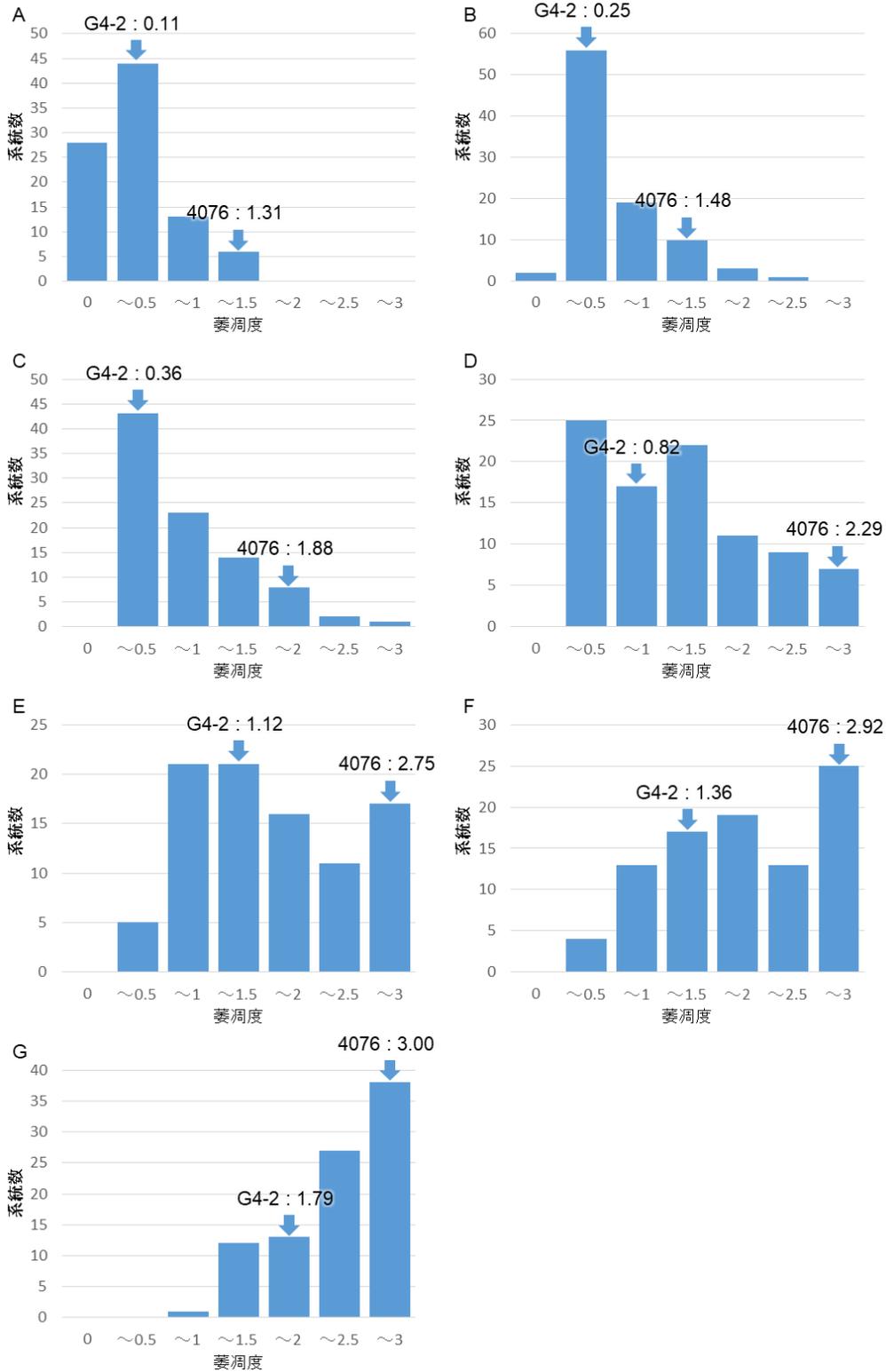


図 13.2 回目の F3 の萎凋度の分布図

A. 塩処理 3 日後、B. 塩処理 5 日後、C. 塩処理 7 日後、D. 塩処理 10 日後、E. 塩処理 12 日後、F. 塩処理 14 日後、G. 塩処理 17 日後の F3 の平均萎凋度の分布図。

両親系統名の右の数字は両親系統の平均萎凋度を示す。

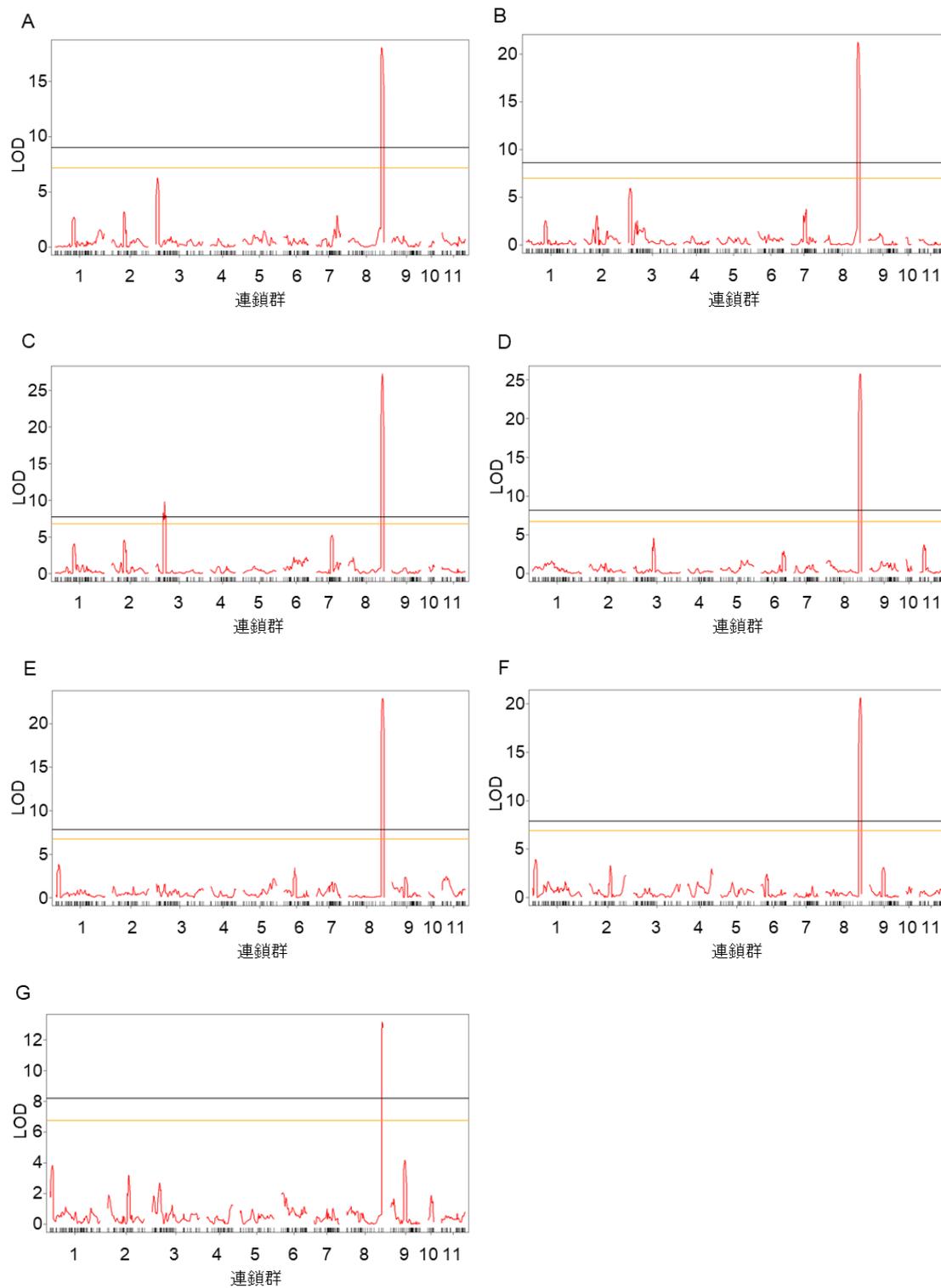


図 14. 2 回目の F3 の耐塩性評価結果を用いた QTL 解析の結果

それぞれ、A. 塩処理 3 日後、B. 塩処理 5 日後、C. 塩処理 7 日後、D. 塩処理 10 日後、E. 塩処理 12 日後、F. 塩処理 14 日後、G. 塩処理 17 日後の評価結果を用いて QTL 解析を行った結果。グラフ内の黄色線は 5% 有意水準、黒線は 1% 有意水準を示す。