

大豆品種「納豆小粒」へのゲノム育種による
ダイズシストセンチュウ抵抗性付与

農研機構 次世代作物開発研究センター

田口 文緒

品種「納豆小粒」は茨城県内で約 1100ha 作付けされている。茨城県の大豆単収は全国平均より低く、生産量は年により変動が大きい。減収要因の一つはダイズシストセンチュウで、卵を含む土壌中のシストは低温や乾燥に非常に強く、圃場のシストセンチュウを根絶することはほぼ不可能である。そのためシストセンチュウの防除には土壌中のセンチュウ密度を高めないと同時に、抵抗性品種を栽培することが必須とされている。

日本のダイズシストセンチュウ抵抗性育種では、遺伝資源 PI 84751 の抵抗性極強を導入した「スズヒメ」などの抵抗性品種群に由来する rhg1、rhg2、および Rhg4 の 3 遺伝子座が用いられている。3 座すべてを導入して初めて抵抗性となるが、3 座を導入すると農業特性が若干劣る傾向がある。茨城県育成の「NIL-SCN」は、「納豆小粒」背景に「スズヒメ」由来センチュウ抵抗性遺伝子 3 座と「すずろまん」由来ダイズモザイクウイルス抵抗性 SMV 座を戻し交配で導入した準同質遺伝子系統だが、「納豆小粒」より農業形質が劣るために未だに品種化されていない。これは、導入された線虫抵抗性 3 座とウイルス抵抗性 1 座の計 4 座の少なくとも一つに不良形質が連鎖しているためと考えられる。

本研究では遺伝子領域が明らかになっている rhg1 と Rhg4 に着目したゲノム育種により、「納豆小粒」に rhg1 のみ、または Rhg4 のみをピンポイントで導入した系統を作出するため、rhg1、Rhg4 に連鎖する農業形質を悪化させると考えられる「スズヒメ」ゲノムを遺伝子のキワで切り落とす。本研究終了後に、rhg1、rhg2、Rhg4 を併せ持つ系統を交配により作出し、ダイズシストセンチュウ抵抗性で且つ農業形質が「納豆小粒」と同等な系統を得ることを最終的なゴールとする。

実験方法

「NIL-SCN」（茨城県農業総合センター生物工学研究所）に「納豆小粒」を交配した F1 個体を自殖させて F2 種子を得た。それらから、「納豆小粒」背景に線虫抵抗性遺伝子 rhg1 または Rhg4 のみをそれぞれ一つずつヘテロ型で含む F2 種子を選抜した。選抜 F2 個体を自殖させた F3 種子から線虫抵抗性遺伝子の上流できるだけ遺伝子の近くで「納豆小粒」型に組み換わった個体を選抜した。次いで、下流のやはりできるだけ遺伝子の近くで組み換わった個体を同様に選抜した。

植物は温室内で短日処理をかけるなどして一世代 3 ヶ月程度の世代促進を行う一方、多数の自殖種子を得る部分は圃場栽培を行った。

遺伝子型の判定は SSR マーカーを用いて行った。F2、F3、F4 および両親の種子子葉の一部を削ったサンプルを TPE バッファー（1M KCl、0.1M Tris-HCl (pH8.0)、10mM EDTA）中でキアゲン TissueLyser II を用いて破砕し、簡易抽出法により DNA を抽出して PCR 産物の鋳型とした（4℃で 1870xg 10 分、上清を取り等量のイソプロパノールと混合、4℃で 1870xg 30 分、上清を捨て、ペレットに 70%エタノールを加え、4℃で 1870xg 5 分、上清を捨て DNA

ペレットをやや乾燥させてエタノールを飛ばし、1/10TE に溶解)。各個体のゲノム DNA を鋳型にして SSR マーカーを複数用いるマルチプレックス PCR を行い、蛍光ラベルされた PCR 産物の長さを、ABI3700 DNA アナライザーを用いたフラグメント解析により測定することで、その SSR マーカー近傍のゲノム領域が両親のいずれから由来しているかを判定した。SSR マーカー^{1,2,3,4)}は、プライマーを蛍光ラベルするか、あるいは M13 配列を付加したプライマーを蛍光ラベルした M13 配列とともに PCR することによって、蛍光ラベルされた PCR 産物を得た。マルチプレックス PCR には、キアゲンマルチプレックス PCR キットを用いた。ゲノム上の物理位置は、米国品種 Williams 82 の Glyma2.0 アセンブリ (<https://soybase.org/>)⁵⁾に基づいて示した。

結果

1) rhg1 について

マーカー選抜にあたり、rhg1 遺伝子を含む 31kb repeat を rhg1 遺伝子(領域)として扱った。rhg1 上流側には後代の分離ゆがみを引き起こす遺伝子が第 18 染色体末端から rhg1 上流約 100kb の間に報告されていること⁶⁾、実際に「スズヒメ」由来のこの領域を導入した北海道品種の系統後代で分離の歪みが見られたこと(道総研鈴木千賀氏私信)から、まずは rhg1 遺伝子領域上流側の「スズヒメ」領域を除いた。すなわち、rhg1 をヘテロ型で持ち、且つ rhg2 と Rhg4 を持たない F2(NIL-SCN/納豆小粒) 2 個体を自殖させて得た F3 種子計 671 個から、rhg1 遺伝子をヘテロ型で持つ rhg1 上流側 10.9kb 以内で「スズヒメ」ゲノムを切り落とした 1 個体(①)、および rhg1 上流側 70.0kb 以内で「スズヒメ」ゲノムを切り落として「納豆小粒」型となった 3 個体(②)を選抜した。

それらを 2019 年 7 月初旬に温室播種し、幼植物を圃場に移植したところ、①は枯死してしまったが、②3 個体から自殖種子(F4)計 2229 粒を得た。これらから rhg1 を「スズヒメ」型で持ち、下流 47.4kb 以内でヘテロ型に組み換わった 1 個体を選抜することができた。②についてのみ育成系譜を図 1、グラフィカルジェノタイプを図 2 に示す。

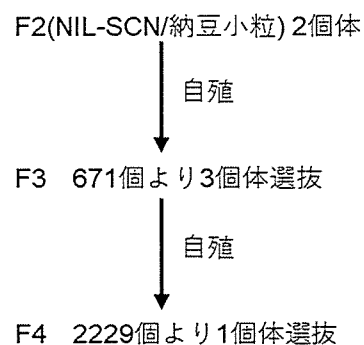


図1 得られたF4 (NIL-SCN/納豆小粒) 1個体の選抜過程

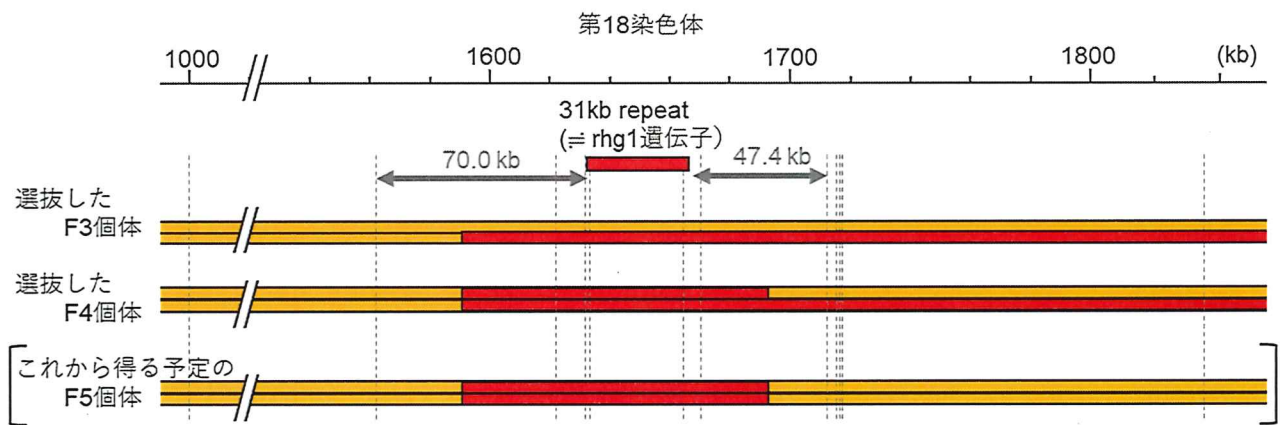


図2 rhg1について得られた選抜F4個体と、それが由来したF3個体のグラフィカルジェノタイプ。今後得る予定のF5個体のグラフィカルジェノタイプも併せて示す。■：「納豆小粒」由来、■：「スズヒメ」由来 31kb repeat (= rhg1遺伝子領域) 領域のコピー数が1だと罹病性（納豆小粒）、複数だと抵抗性（スズヒメ）。

2) Rhg4 について

Rhg4 をヘテロ型で持ち、且つ rhg1 と rhg2 を持たない F2 (NIL-SCN/納豆小粒) 2 個体を自殖させて得た F3 種子 計 1034 粒から、Rhg4 遺伝子を「スズヒメ」型で持ち、遺伝子の転写開始点上流 74.9kb 以内でヘテロ型に組み換わった 1 個体を選抜した。

しかし遺伝子終止コドンから下流域 224.5kb にわたって 26 個の SSR マーカーから両親間で多型を示すマーカーを検索したところ、遺伝子下流 17.6 kb までに 3 個の多型マーカーを得たが、それより下流のマーカーにはまったく多型が見られなかったことから、Rhg4 下流は既に「スズヒメ」ゲノムが切り落とされている可能性が高いことがわかった。現在、「NIL-SCN」のこの領域を含めたゲノム塩基配列が「納豆小粒」と同じ配列であることを確認中である。

Rhg4 遺伝子の近傍の「スズヒメ」ゲノムを切り落とす後は、ゲノム背景から残存する「スズヒメ」由来断片を除くことが望ましい。そこでまず、選抜した F3 1 個体を自殖させて得た F4 種子 67 粒から、遺伝子上流が「納豆小粒」型に固定した 12 個体を選抜した。うち 8 個体を花粉親として、2019 年 8 月に「納豆小粒」に交配し、BC1F1 種子 20 粒以上を得た。これら BC1F1 種子を 2020 年夏作で自殖させてできるだけ多数の BC1F2 種子を収穫し、背景選抜を行う予定である。

本研究で得られた BC1F1 種子の育成系譜を図 3 に、グラフィカルジェノタイプを図 4 に示す。

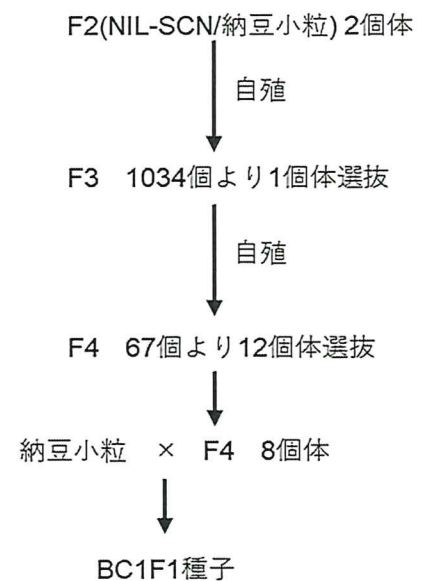


図3 得られたBC1F1(納豆小粒//NIL-SCN/納豆小粒)の育成系譜

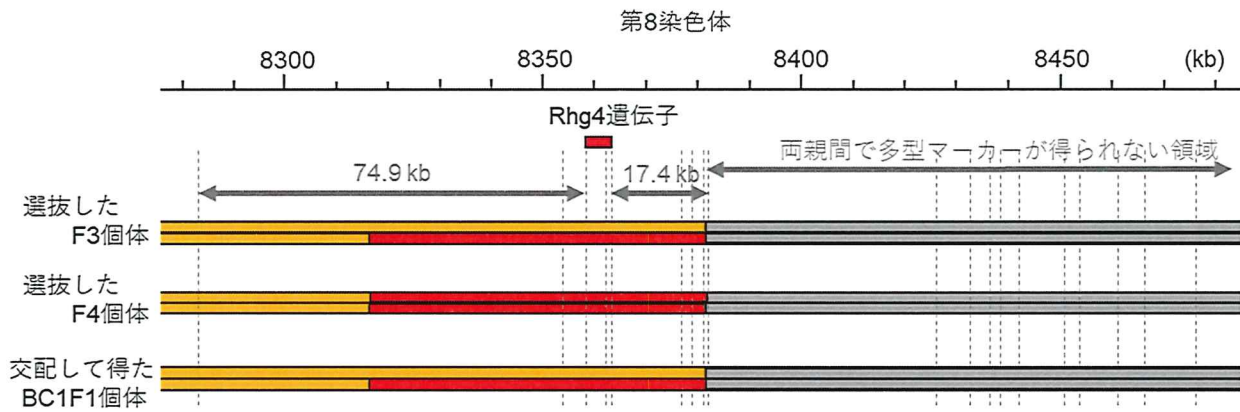


図4 Rhg4について得られたBC1F1 (納豆小粒/NIL-SCN/納豆小粒)個体と、それが由来したF3個体、F4個体のグラフィカルジェノタイプ。 ■：「納豆小粒」由来、■：「スズヒメ」由来

考察

日本の大豆育種では、「スズヒメ」の抵抗性供与親となった遺伝資源 PI 84751 由来の抵抗性が使われており、*rhg1*, *rhg2*, *Rhg4* の 3 遺伝子を併せ持って初めて抵抗性強となる。米国では PI 84751 ではなく、PI88788 型品種群と Peking 型品種群が供与親として使われている⁷⁾。PI88788 型品種群は *rhg1* 単独で⁸⁾、Peking 型品種群は *rhg1* と *Rhg4* の両方がある場合に⁹⁾抵抗性になるとされており、*rhg1* のアレルはそれぞれ *rhg1-b*, *rhg1-a* と呼ばれている。*rhg1* 単独で抵抗性となる場合、抵抗性品種は 31kb repeat に座乗する 5 つの ORF のうち 3 つの発現量が増加していること¹⁾、*rhg1* と *Rhg4* の組合せで抵抗性となる場合、31kb repeat の 5 つの ORF のうちの 1 つ *GmSNAP18* (Glyma.18g022500) のアミノ酸置換と *Rhg4* 遺伝子 (セリンキドロキシメチルトランスフェラーゼ (SHMT)) のアミノ酸置換で抵抗性になること¹⁰⁾が報告されている。「スズヒメ」の抵抗性遺伝子の発現量の変化は不明だが、*GmSNAP18* と *Rhg4* のアミノ酸置換については米国の抵抗性品種と同様の変異があり (田口、未発表)、スズヒメでも 31kb repeat と *Rhg4* 遺伝子が抵抗性に寄与していることが示唆されることから、本研究では、31kb repeat を *rhg1* 遺伝子として扱った。

本研究でマーカー選抜により得られた選抜個体の自殖種子から、「スズヒメ」由来 *rhg1* および *Rhg4* 遺伝子上流と下流 17.6~74.9kb 程度で遺伝子に連鎖した「スズヒメ」ゲノムを切り落とした個体を得ることができる。*rhg1* については *rhg1* 遺伝子を持ち、遺伝子上流 70.0kb 以内で「スズヒメ」ゲノムが切り落とされ、下流 47.4kb 以内でヘテロ型に組換わっている F4 (SCN-NIL/納豆小粒) 1 個体をマーカー選抜することができた。*Rhg4* については、遺伝子上流 74.9kb 以内で「スズヒメ」ゲノムを切り落とした F4 (SCN-NIL/納豆小粒) 1 個体を得た。下流は 17.6~224.5kb に存在する 16 マーカーのすべてで両親間の多型が見られなかった (すべて「納豆小粒」型となった) こと、*Rhg4* 上流域から下流 17.3kb までの

多型マーカー検索では供試した 29 マーカー中 20 マーカー (69%) で多型が見られたことから、既に下流は「スズヒメ」ゲノムが切り落とされている可能性が高いことがわかった。

導入遺伝子近傍の「スズヒメ」ゲノムを切り落とした後は、ゲノム背景に残る「スズヒメ」断片を除く必要がある。「SCN-NIL」の病害抵抗性の供与親は、rhg1, rhg2, Rhg4 については「スズヒメ」、SMV については「すずろまん」である。「SCN-NIL」は全ゲノムに分散する 349 マーカー中 41 マーカー (11.7%) が「納豆小粒」型ではない (田口、未発表)。これら非「納豆小粒」領域には rhg1, Rhg4 の 2 遺伝子および rhg2, SMV の 2 座が含まれるが、これら以外の領域にもわずかだが非「納豆小粒」ゲノムが残っている。そうした非「納豆小粒」ゲノムを除くことを意図し、Rhg4 については選抜した F4 (SCN-NIL/納豆小粒) 個体を「納豆小粒」に戻し交配した。今後、これら BC1F1 種子後代から背景選抜を行い、Rhg4 がピンポイントで「納豆小粒」に導入された系統を得る予定である。

線虫抵抗性となるには、「スズヒメ」由来の rhg1, rhg2, Rhg4 の 3 遺伝子すべてが必要である。本研究で選抜された個体の後代から「納豆小粒」背景に「スズヒメ」由来の rhg1 遺伝子または Rhg4 遺伝子をピンポイントで導入した系統を得た後は、両者を交配して rhg1 と Rhg4 を併せ持つ系統を作成する。遺伝子がまだ報告されていない rhg2 座についても座乗領域を狭め、同様に rhg2 座をピンポイントで導入した系統を作成して交配し、線虫抵抗性に必要な 3 遺伝子を併せ持つ系統を得ることが必要である。

要約

ダイズシストセンチュウ抵抗性を付与するためには、抵抗性品種「スズヒメ」由来の抵抗性遺伝子 rhg1, rhg2, および Rhg4 の 3 遺伝子すべてを導入する必要があるが、それら遺伝子に連鎖した望ましくない農業形質も導入してしまいがちである。本研究では農業形質を改善することを目的として、遺伝子領域が明らかになっている rhg1 と Rhg4 の 2 遺伝子に着目し、rhg1 のみ、または Rhg4 のみを「納豆小粒」にピンポイントで導入した系統作出のため、rhg1, Rhg4 に連鎖する「スズヒメ」ゲノムをマーカー選抜により遺伝子のキワで切り落とすこと試みた。

茨城県育成の「NIL-SCN」(「スズヒメ」由来のダイズシストセンチュウ抵抗性 rhg1, rhg2, Rhg4 に加え、ダイズモザイクウイルス抵抗性 SMV 座の計 4 座を「納豆小粒」に導入した系統)に「納豆小粒」を交配して得た F1 個体の自殖種子 (F2) から選抜した rhg1 または Rhg4 のみをヘテロ型で持つ 1~2 個体を自殖させて F3 種子を得た。それらから、rhg1 または Rhg4 遺伝子を持ち、且つ遺伝子上流のできるだけ近傍で組換わった個体を選抜し、さらにその

選抜個体の自殖種子(F4)から、同様にして下流で組換わった個体を選抜した。

rhg1については、F3で671粒、F4で2229粒からrhg1遺伝子は「スズヒメ」型、遺伝子上流70.0kb以内で「納豆小粒」型固定、下流47.4kb以内ではヘテロ型に組換わったF4 1個体を選抜することができた。

Rhg4については、F3種子1034粒からRhg4遺伝子は「スズヒメ」型、遺伝子上流74.9kb以内でヘテロ型に組換わった1個体を選抜した。Rhg4遺伝子下流は終止コドンから17.6~224.5kbにわたって両親間の多型が見られなかったことから、「NIL-SCN」のRhg4下流は「スズヒメ」ゲノムが既に切り落とされている可能性が高いことがわかった。そこで、背景に残る「スズヒメ」断片を除くための戻し交配の前に、まず選抜F3個体を自殖させたF4種子から、Rhg4は「スズヒメ」型、且つ上流74.9kb以内で「納豆小粒」型に固定した12粒を得た。これらを「納豆小粒」に戻し交配してBC1F1種子を得た。2020年夏に圃場で自殖させてできるだけ多数のBC1F2種子を得て、そこからRhg4を持ち、且つ背景ができるだけ「納豆小粒」に近い個体を選抜する予定である。

これら選抜個体の後代から、rhg1またはRhg4をピンポイントで導入した「納豆小粒」を得ることができると考えられた。

謝辞

本研究の遂行に多大な援助をいただいたタカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝申し上げます。

文献

- 1) Cook, D. E., T. G. Lee, X. Guo, S. Melito, K. Wang et al. (2012) Copy number variation of multiple genes at rhg1 mediates nematode resistance in soybean. *Science* 338, 1206; DOI: 10.1126/science.1228746.
- 2) Song Q. J., G. F. Jia, Y. L. Zhu, D. M. Grant, R. Nelson et al. (2010) Abundance of SSR Motifs and Development of Candidate Polymorphic SSR Markers (BARCSOYSSR_1.0) in Soybean. *Crop Sci.* 50:1950-1960.
- 3) Fujii, K., T. Sayama, K. Takagi, K. Kosuge, K. Okano et al. (2018) Identification and dissection of single seed weight QTLs by analysis of seed yield components in soybean. *Breed Sci.* 68:177-187.

- 4) Watanabe, S., T. Shimizu., K. Machita, Y. Tsubokura, Z. Xia et al. (2018) Development of a high-density linkagemap and chromosome segment substitution lines for Japanese soybean cultivar Enrei. 25:123-136.
- 5) Department of Energy Joint Genome Institute Community Sequencing Program (2013) Soybase - Integrating Genetics and Genomics to Advance Soybean Research. <https://soybase.org/>. Accessed 20 May 2020.
- 6) Speth, B., J. P. Rogers, N. Boonyoo, A. J. VanMeter, J. Baumbach et al. (2015) Molecular mapping of five soybean genes involved in male-sterility, female-sterility. *Genome* 58:143-149.
- 7) Brucker, E., S. Carlson, E. Wright, T. Niblack and B. Diers (2005) Rhg1 alleles from soybean PI437654 and PI88788 respond differentially to isolates of *Heterodera glycines* in the greenhouse. *Theor. Appl. Genet.* 111: 44-49.
- 8) Concibido, V. C., B. W. Diers and P. R. Arelli (2004) A decade of QTL mapping for cyst nematode resistance in soybean. *Crop Sci.* 44: 1121-1131.
- 9) Meksem, K., P. Pantazopoulos, V. N. Njiti, L. D. Hyten, P. R. Arelli and D. A. Lightfoot (2001) 'Forrest' resistance to the soybean cyst nematode is bigenic: saturation mapping of the Rhg1 and Rhg4 loci. *Theor. Appl. Genet.* 103:710-71.
- 10) Liu, S., P. K. Kandoth, N. Lakhssassi, J. Kang, V. Colantonio et al. (2017) The soybean GmSNAP18 gene underlies two types of resistance to soybean cyst nematode. *Nat Commun* 8, 14822. <https://doi.org/10.1038/ncomms14822>