

学位申請論文

植物の遺伝的多様性の検出と利用に関する研究

2020年3月

指導教員 薬学博士 村上康文

東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻

野口 友嗣

目次

目次	i ~ ii
要旨	1~5
第1章 序論	
1.1. 遺伝的多様性と品種改良	6
1.2. 遺伝的多様性の検出と利用	6~7
第2章 組織培養におけるゲノム改変の検出	
2.1. 緒言	8
2.2. 材料と方法	
2.2.1. 組織培養	8
2.2.2. ゲノム DNA の抽出	8~9
2.2.3. RLGS 法	9~10
2.2.4. RLGS スポットクローニング	11~12
2.2.5. PCR によるメチル化状態の解析	12
2.3. 結果	
2.3.1. RLGS 分析	12~13
2.3.2. RLGS スポットクローニング	13
2.3.3. PCR によるメチル化状態の解析	13~14
2.4. 考察	14~15
図・表	16~20
第3章 栄養繁殖作物の DNA 品種識別マーカーの開発	
3.1. 緒言	21~22
3.2. 材料と方法	
3.2.1. ゲノム DNA の抽出	22
3.2.2. RLGS 法	22~23
3.2.3. RLGS スポットクローニング	23~25
3.2.4. PCR による多型検出	25

3.3. 結果	
3.3.1. RLGS 多型スポットのクローニング	25
3.3.2. プライマー作製と PCR による品種識別	25~26
3.4. 考察	26~27
図・表	28~31
第4章 多様性に富む品種集団を用いた種子生産性の解析	
4.1. 緒言	32~33
4.2. 材料と方法	33~34
4.3. 結果	
4.3.1. 種子を収穫できなかつた系統	34
4.3.2. 種子生産性の比較	35
4.3.3. 開花と出穂	36
4.3.4. 積算降水量	36
4.4. 考察	
4.4.1. 種子を収穫できなかつた系統	37
4.4.2. 種子生産性の比較	37
4.4.3. 開花と出穂	37~38
4.4.4. 積算降水量	38~39
図・表	40~51
第5章 結論	
5.1. 組織培養におけるゲノム改変の検出	52
5.2. 栄養繁殖作物の DNA 品種識別マーカーの開発	52
5.3. 多様性に富む品種集団を用いた種子生産性の解析	53
5.4. 今後の展望	53
第6章 参考文献	54~58
主論文を構成する論文	59
学会発表	60
謝辞	61

要旨

第1章 序論

近年の地球温暖化は、想定外の気候変動として農業や食料の安定供給に大きな影響を与えている。集中豪雨や大型台風による洪水、農作物の高温障害、熱帯病虫害の侵入等への対応が喫緊の課題となっている。こうした課題に対応できる形質を備えた新品種の開発を進めるためには、多様な植物遺伝資源の利用が不可欠である。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構・NARO）遺伝資源センター（ジーンバンク）には世界中の植物遺伝資源が集められ、約 22 万点が保存されている。これらの植物遺伝資源の利用を促進するためには、その遺伝的多様性を効率的に検出する技術が必要である。この中には遺伝的変異が小さく多様性解析が困難な植物種も存在する。また、DNA 解析によって明らかにされた多様な品種集団を用いて生産性の向上を図る研究も重要である。以上の課題に資するために、本研究では、我が国が保有する多様な植物遺伝資源の潜在的な価値を引き出し、産業的な利用を促進するための解析を行った。

はじめに、農作物の優良苗の大量増殖等のための組織培養で得られるクローン植物個体のゲノム状態を制限酵素ランダムマークゲノムスキニング（RLGS）法により解析して、クローン植物体に遺伝的多様性が生じることを明らかにした（第2章）。さらに、登録品種の権利保護に資するため、DNA 解析で検出されたイグサゲノムの遺伝的多様性を利用して優良イグサ品種「ひのみどり」の DNA 品種識別マーカーを開発した（第3章）。そして、DNA 多型解析結果をもとに選定された多様性に富むソルガム品種集団を用いて比較栽培試験を行い、優れた種子生産能力を持つ品種を明らかにした（第4章）。

第2章 組織培養におけるゲノム改変の検出

組織培養技術は、植物体のごく一部を取り出して個体を再生する手法として、農作物におけるウイルスフリー苗の作製、希少種の大量増殖および種苗生産など、様々な産業用途に活用されてきた。しかし、その培養過程でトランスポゾンの転移や DNA メチル化等が生じるなど、ゲノム状態の改変が起こることが報告されている。このゲノム改変はクローン植物体の形質変化を引き起こすことが大きな

課題となっていたことから、組織培養におけるクローン植物のゲノム状態の解析を試みた。

まず、イネ (*Oryza sativa*) 品種「日本晴」種子 1 粒を N6 培地上で 4 週間組織培養後に再分化させ、同一種子由来の 4 個体 (ラメート 1~4) を得た。このうちラメート 1、ラメート 2 の葉身からゲノム DNA を抽出して、RLGS 法を用いて制限酵素 *Not I*-*Hpa II*-*BamH I* の組み合わせで分析を行った。その結果、両ラメートの RLGS スポットパターンから合計 161 スポットが検出され、このうち 10 スポット (6%) がラメート間で多型を示した。

次に、ラメート 2 で特異的に検出された 1 スポット (スポット C4) をクローニングした。さらに、ラメート 3、ラメート 4 からゲノム DNA を抽出後、メチル化感受性の異なる制限酵素 (アイソシゾマー) *Msp I*/*Hpa II* で処理した DNA 断片をテンプレートとして PCR を行い、RLGS パターンの比較で検出されたスポット C4 のメチル化状態を調べた。その結果、ラメート 3 ではスポット C4 に該当する制限酵素 *Msp I*/*Hpa II* 部位がメチル化されていない一方、ラメート 4 ではメチル化修飾が起こっていることが明らかになった。

以上の結果は、クローン植物の組織培養過程でエピジェネティックな変異が生じることを示している。今回検出された多型スポットについては、DNA マーカーとしての安定性を確認することで、クローン植物の形質の安定性の指標としての利用が期待される。

第 3 章 栄養繁殖作物の DNA 品種識別マーカーの開発

植物ゲノム上の塩基配列レベルの多型やメチレーション等のエピジェネティック変異が RLGS 法によって迅速、安価に解析可能となった。これらの研究成果の産業利用を図るうえでは、ゲノム解析で明らかになった遺伝的多様性を PCR マーカー化する技術が重要である。近年、我が国で育成・品種登録された優良な品種が不正に国外に持ち出され、その収穫物や加工品が逆輸入されることで、国産品の価格低迷や品種育成者の権利侵害を引き起こす事例が頻発している。栄養繁殖性の作物は外観上の目視判別が困難なことが多く、特に遺伝的多様性が小さいクローン作物では、DNA レベルでの品種識別技術が必要とされている。

その一例として、畳表の原料として利用されるイグサ (*Juncus effusus*) が挙げられる。イグサはイグサ科イグサ属の多年生植物で、栽培環境下では専ら株分けによる栄養繁殖で増殖するため、栽培品

種の遺伝的多様性は著しく低いと考えられる。我が国で開発された優良イグサ品種「ひのみどり」が不正に海外に持ち出され、日本に逆輸入されることで、国内生産業者が経済的損失を被る事案が生じており、DNA 品種識別技術の開発が喫緊の課題であった。岡本ら(2006)は RLGS 分析によりイグサ 18 品種・系統を解析して「ひのみどり」特異的なスポットを検出した。この成果を産業的に利用するために、この RLGS 分析で見出されたイグサ品種・系統間の遺伝的多様性を利用して「ひのみどり」の DNA 品種識別 (PCR) マーカーを開発することを目的とした。

最初に岡本ら(2006)と同一の手法で「ひのみどり」「下増田在来種」2 品種で RLGS 分析を実施して、「ひのみどり」特異的な多型を示すスポット「A2」を確認した。そのうえで、多型スポット A2 の DNA 断片をクローニングした。次に、スポット A2 の両端の制限酵素サイトを含む位置から配列特異的プライマーを作製した。これを豊表の生産に利用されている品種のすべてであるところのイグサ 18 品種・系統で PCR を行った。その結果、バンドパターンの違いにより供試したイグサ 18 品種・系統中で「ひのみどり」を特異的に識別することが可能となった。

以上の結果は、植物ゲノムの遺伝的多様性検出技術を活用して、DNA 品種識別技術として税関等の現場で利用できることを示している。本技術は、イチゴなど他の栄養繁殖作物でも利用可能であり、不正な逆輸入の抑止力として知的財産の権利保護に利用が期待できる。

第 4 章 多様性に富む品種集団を用いた種子生産性の解析

農研機構(NARO)ジーンバンクで保存されている植物遺伝資源は、農産物の品種育成や代謝産物の利用等に利用されてきた。例えばソルガム (*Sorghum bicolor*) はアジア・アフリカ地域を中心に栽培されるイネ科の一年生作物で家畜飼料やエタノール製造用原料として注目されている。Paterson ら(2009)のドラフトシーケンス解読以降、遺伝子解析や多様性の評価が急速に進展している。

NARO ジーンバンクには世界各国から収集された 4,000 点以上のソルガム系統が保存されている。Shehzad ら(2009)が公開されているゲノム情報をもとに単純繰り返し配列 (SSR) 多型を解析することで、対立遺伝子の 90%以上の多様性を保持した NARO ソルガムコアコレクション 105 系統のセットが作成された。ソルガムは遺伝的多様性に富むため、栽培環境によっては種子増殖が難しい系統も存在する。そのためソルガムという植物種のポテンシャルを最大限に活用するためには、多様性に富む品種集

団を用いた様々な栽培環境下での特性評価が不可欠である。そこで日本の茨城県つくば市 (TR)、インド Tamil Nadu 州の Coimbatore (CD : 乾季、CR : 雨季) および Kovilpathi (KD) の 4 試験区で NARO ソルガムコアコレクション 105 系統の栽培試験を行い、種子の生産特性を解析した。

その結果、1 穂あたりの種子粒数は 4 試験区で採種できた 80 系統中 76 系統 (95%) で TR が最も多かったが、11 系統が圃場での栽培期間 (播種後 120 日目まで) に出穂せず、種子が収穫できなかった。その一方、インドでは播種後 54 日目前後の 17 日間に開花が集中し、CD、CR では 105 系統すべてで採種可能であった。栽培環境と併せて考察すると、ソルガムは熱帯原産の作物であるが、多数の種子を獲得するためには日本のような十分量の雨が重要と考えられること、安定した栽培にはインドのような低緯度地域が適当と考えられること、およびインド国内でも栽培地によってその環境条件の違いから種子の生産効率が大きく異なることが示された。

以上の結果から、DNA 多型解析結果をもとに選定されたソルガム 105 系統を用いて 4 試験区の比較栽培試験を行うことで、ソルガムの種子生産に関する特性を明らかにした。これにより、南アフリカ共和国原産の RED KAFIR (WSC71) が、日本での栽培において種子生産性に特に優れている (1 穂あたり種子粒数 5,500 粒) ことを明らかにした。

第 5 章 結論

本研究では植物の遺伝的多様性を産業的に利用することを目的として解析を行った。イネ単一種子由来のクローン植物個体間に生じた遺伝的多様性を RLGS 法により検出し、組織培養中のクローン植物のゲノム改変を明らかにした。また、我が国で育成・品種登録された優良品種の権利保護が求められている中、イグサゲノムの遺伝的多様性を利用して現場で利用可能な優良イグサ品種「ひのみどり」の DNA 品種識別 PCR マーカーを開発した。さらに、DNA 多型解析によって選定されたソルガムコアコレクション集団を用いて複数地域で栽培試験を行うことで、種子生産性に優れた品種を明らかにした。

近年では次世代シーケンサー等に代表されるゲノム解析技術の進展から、解析によって明らかになった遺伝的多様性を簡便に利用するための技術開発が以前にまして重要な課題である。本研究で植物の遺伝的多様性の検出と利用に関するモデルケースを示したことで、農業・食糧供給を取り巻く世界

的な環境変動に対応するための新品種開発に植物遺伝資源の高度な利用が期待される。

主論文を構成する論文

1. Takamiya, T., Ohtake, Y., Hosobuchi, S., Noguchi, T., Kawase, M., Murakami, Y. and Okuizumi, H. Application of RLGS Method for Detection of Alteration in Tissue Cultured Plants. *JARQ* (2008) 42 (3), 151-155.
2. Noguchi, T., Hosobuchi, S., Takamiya, T., Iimure, K., Saito, A., Ohtake, Y., Yamashita, H., Murakami, Y. and Okuizumi, H. A Sequence-tagged Site Marker for Identifying the Japanese Mat Rush (*Juncus effusus*) Cultivar ‘Hinomidori’. *JARQ* (2017) 51 (1), 45-49.
3. Noguchi, T., Subbarayan, S., Kiyosawa, A., Gotoh, K., Murakami, Y. and Okuizumi, H. Seed productivity of genebank sorghum accessions in India (Tamil Nadu) and Japan (Tsukuba). *JARQ* (in press).

第1章 序論

植物は我々の衣食住を支えている。人類は歴史の中で植物の利用方法を工夫し、植物自体を改良し、生活を豊かにしてきた。特に食料生産の質的・量的な向上においては、遺伝的多様性を高度に利用した品種改良が欠かせないのが現状である。

1.1. 遺伝的多様性と品種改良

遺伝的多様性は、染色体の構造変化や DNA 塩基配列の変化によりもたらされ、種や生態系の基盤を形成するものの一つである。遺伝的に多様であると、環境変化に対応することができる遺伝子をもつ個体が生存し、絶滅を免れると考えられる[1]。このような遺伝子を人類が利用することが品種改良といえる。

植物の栽培化と品種改良は、人類がその必要を満たすため、植物進化の過程に影響を与えてきた。高い多様性のなかにある野生種から、色、香り、食味、貯蔵物質などの特性に関して人類の要求に適した遺伝子型が選択され続けたことで、改良品種としての価値が向上した[2]。Harlen[3]は、栽培活動の遺伝的効果のいくつかを例に挙げて、人間が収穫した種子を播種することによって、種子の脱落性を失い、花数と着粒数が増加し、稔実性は高まり、種子は大粒となり、さらに、種子の休眠性と穎やその付属物は消失または退化すると説明している。たとえば、我が国におけるダイズ (*Glycine max.* (L.))の遺伝的多様性の利用についても、単位面積あたり的大豆収量の向上や加工適性の改良を目指して品種改良が続けられている[4]。

しかし、近年の気候変動や食味の追求、大規模農業化といった、これまでにない農業環境の変化によって新たな課題が生じてきた。たとえば、日本での栽培環境の変化や病虫害の抵抗性遺伝子の脱落、複数の病害に対応した精密な栽培が必要になったことが挙げられる。

そのため現在では、上記の課題に対応できる形質を備えた農作物の新品種が求められている。このような農作物の新品種を開発するためには、植物の遺伝的多様性を利用することが重要である[5]。

1.2. 遺伝的多様性の検出と利用

遺伝的多様性（多型）を区別して利用するため、これまで様々な検出技術が生み出されてきた。歴史的には肉眼での観察による表現型での区別から始まり、虫眼鏡、顕微鏡観察による微細構造での区別、化学分析による成分での区別が行われ、現在ではゲノム分析による DNA レベルでの区別が盛んに行われている。ゲノム解析技術を例に考えても、染色体や DNA の解析から、DNA メチレーションなどの遺伝子修飾機構の解析まで、さまざまな検出技術が存在する。このような検出技術の革新により、以前より詳細に多型を検出できるようになった。

現在では、一塩基多型等、膨大な情報が得られる反面、多型情報を表現型に結びつけて実用的な価値をもたらす実例を示すことが重要になってきている。

農研機構遺伝資源センター（ジーンバンク）は、世界中から収集された植物遺伝資源 22 万点を保管している、遺伝的多様性の宝庫である。しかし、ジーンバンクが保有する植物遺伝資源は、特性が十分に調べられていないものがほとんどである。これらの植物遺伝資源をさらに産業的に利用するためには、特性を評価することが必要である[6・8]。

本研究では、ジーンバンク等が保有する植物の遺伝的多様性をさらに効率よく産業利用することを目的として、研究を行った。すなわち、第 2 章では、多様性の検出技術の開発、第 3 章では、多様性の検出と実用化、第 4 章では、多様性に富んだ品種集団の利用に関する成果をとりまとめた。

第2章 組織培養におけるゲノム改変の検出

2.1. 緒言

植物における組織培養は未分化で分裂の活発な細胞塊であるカルスを経由する方法が一般的だが[9]、培養過程でゲノムに変異が生じる「培養変異」が問題となるケースがある。組織培養の期間は数ヶ月を要するが、この間にトランスポゾンの転移[10]やメチル化状態の変化[11]等の変異が生じ、結果として予期せぬ形態変化を生ずることがある。培養変異は培養の期間が長期になると増加する傾向が見られる[12]。コショウランのように商業栽培用途でクローンの大量増殖が行われている植物では、培養変異による形質変化が問題となっている。そのため、組織培養によって得られた植物クローンの個体（ラメート）識別や形質の安定性を評価するためのゲノム全体にわたる変異の検出技術が求められている。

本章では、制限酵素ランドマークゲノムスクニング（RLGS）法[13-15]を用いてイネの各ラメートにおいて組織培養中に生じたゲノム改変を効率的に検出することを目的とした。まず、同一の種子由来のカルスから再分化させたイネのラメートの RLGS パターンを得て比較し、ゲノム改変の検出を試みた。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 組織培養

Fig. 2-1 に材料の作製方法を図示した。組織培養は Hiei *et al* (1994) [9]を参考に行った。1粒のイネ (*Oryza sativa* L.) 種子（品種：日本晴）をオーキシンの一種である 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)(2mg/L)を含む N6 寒天培地 [16]に無菌的に播種し、カルス化して4週間培養した。1種子から形成されたカルスを、2,4-D を含まない再分化培地に移植して再分化後に4週間栽培して、複数の個体を得た。そのうち4個体（ラメート 1, 2, 3, 4）を RLGS 分析および PCR 解析に用いた。この4つのラメートの形態学的特徴に違いは観察されなかった。

2.2.2. ゲノム DNA の抽出

4つのラメート(ラメート 1, 2, 3, 4)において、葉が抽出する前の葉身・葉鞘をそれぞれ採取した。採

取した植物組織を液体窒素で凍結し、同じ温度に冷却した乳鉢と乳棒を用いて磨砕した。そして、Murray *et al* (1980)[17]の方法を改変した CTAB 法[18]でゲノム DNA を抽出した。粉末状になった組織(0.2 g)を葉サジで 2.0 ml チューブに移した。20 mg の Sodium dodecyl sulfate (SDS)、20 mg の Polyvinylpyrrolidone (PVP) (insoluble)、800 μ l の抽出用バッファー[0.1 M Tris-HCl (pH8.0), 50 mM Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 1.4 M Sodium chloride (NaCl), 1% Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB)]を加え、指ではじいて攪拌した。80 μ g の Proteinase K (MERCK, Darmstadt, Germany)を加え、指ではじいて攪拌後、56°Cで 30 分間静置した。800 μ l のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)=PCI を加え、75~85 min^{-1} で 20 分間振とうした。15,000 rpm (16,000 g; 半径 5 cm のローターを使用した。以下同様)、室温で 10 分間遠心分離を行い、水層（上層）の約 800 μ l を新しい 2.0 ml チューブに移した後に 800 μ l のクロロホルム・イソアミルアルコール (24:1)=CIA を加え、75~85 min^{-1} で 10 分間振とうした。その後、15,000 rpm、室温で 10 分間遠心分離を行い、水層（上層）の約 700 μ l を新しい 2.0 ml チューブに移した。これに 700 μ l の 99.5% イソプロピルアルコールを加え、ゆっくり混和後、5,000 rpm、室温で 40~60 分間遠心分離を行った。上清を除去した後、200 μ l の 70% エタノールを注いで、攪拌後、15,000 rpm で 2 分間遠心分離を行って上清を捨てた。再び 200 μ l の 70% エタノールを注いで攪拌後、15,000 rpm で 2 分間遠心分離を行って上清を捨てた。沈澱に 200 μ l の 99% エタノールを加え、15,000 rpm、20~25°Cで 10 分間遠心分離を行った後、上清を捨て、沈澱を室温で乾燥させた。乾燥させたゲノム DNA に 3 μ l の 10 \times M buffer [500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH7.9), 100 mM MgCl₂]と 40 μ g の Ribonuclease A を加え、全量を 30 μ l に調製して 37°Cで 2 時間反応させた。その後 PCI 処理、CIA 処理、エタノール沈澱処理を行い、ゲノム DNA を沈澱・乾燥させ、Tris-EDTA (TE)緩衝液[10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA]に溶解した。

2.2.3. RLGS 法

RLGS 法は、ゲノム DNA 上の制限酵素の認識サイトを標識してランドマークとして用いて、一挙に数百~数千点のゲノム情報を二次元電気泳動スポットパターンとして検出するゲノム解析手法である [13-15]。Not I 等の適切な制限酵素サイトをランドマークとして利用することで、ゲノムワイドで効率的な多型検出が可能である。RLGS 法を用いた植物ゲノムの解析成果として、アイソシズマー(*Msp*

I/*Hpa* II)を用いたシロイヌナズナのメチレーション解析[19]や正逆交配 F1 および自殖家系を用いたイネのメチレーション解析[20-22]、イグサの品種識別[23]、モモの枝変わり品種と原種の比較解析[24]などが挙げられる。

なお RLGS 法では、通常 3 種類の異なる制限酵素を用いて計 3 回の制限酵素処理を行うが、検出される RLGS スポットを多数確保するうえでは、後の工程に進むほど認識配列の短い制限酵素を使用するのが常法とされる。したがって、認識配列の短い 4 塩基認識の制限酵素は 3 番目の制限酵素処理（ゲル内消化）に用いられるのが、基本概念に沿った使用方法である。しかし、ゲル内消化工程では 1 サンプルあたり 2,000 Units の制限酵素を使用するため、高価な 4 塩基認識酵素は使用できなかった。そこで Takamiya *et al* (2006)[19]は 2 番目の制限酵素処理に 4 塩基認識の *Msp* I および *Hpa* II を使用して、スポット検出数は犠牲にしたものの、ゲル内消化に *Bam*H I や *Hind* III 等の安価な 6 塩基認識酵素を用いることで、低コストな RLGS 分析手法を確立した。

RLGS 法は Hatada *et al* (1991)[13]と Takamiya *et al* (2006)[19]を参考に行った。CTAB 法[18]によって抽出したラメート 1 とラメート 2 のゲノム DNA 各 0.8 μ g を 20 Units の *Not*I (NEB=New England Biolabs, Beverly MA, USA)で 37°C、2 時間消化した後、0.2 Units の Sequenase Ver.2.0™ (Amersham, Buckinghamshire, England)、1.3 mM dithiothreitol (DTT)、0.33 μ M [α -³²P] dCTP (6,000 Ci/mmol)、及び 0.33 μ M [α -³²P]dGTP (3,000 Ci/mmol)を加えて 37°C で 30 分間反応させ、*Not*I サイトに放射線を取り込ませた。次に 65°C で 30 分間反応して、Sequenase Ver.2.0 を失活させた。その後、25 Units の *Hpa* II (NEB)で 37°C、1 時間反応して、直径 2.4 mm、長さ 60 cm のチューブ状の 0.8% SeaKem GTG™ アガロースゲル(FMC Bioproducts, Maine, USA)で次元電気泳動(最初の 1 時間は 100 V、続いて 230 V で 23 時間)を行った。電気泳動終了後、アガロースゲルを 2,000 Units の *Bam*H I (TOYOBO, Osaka, Japan)を含む溶液に浸して 37°C で 2 時間反応させた。その後、アガロースゲルを 5% ポリアクリルアミドゲルの上に接続して二次元目の電気泳動(最初の 1 時間は 100 V、続いて 150 V で 23 時間)を行った。電気泳動終了後、ポリアクリルアミドゲルを乾燥させ、フジイメージングプレート(Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)でオートラジオグラフィーを 24 時間行って、フジ BAS システム(Fuji Photo Film)でシグナルを検出した。上記の RLGS 工程を Fig.2-2 に示した。

2.2.4. RLGS スポットクローニング

RLGS スポットクローニングは Takamiya *et al*(2006)[19]に従って行った。すなわち、目的の RLGS スポットを乾燥させたゲルから打ち抜き、20 μ l の 1 \times TE に浸して 4 $^{\circ}$ C で 10 分間静置した。V-shape 電気泳動槽の V 字型ウェルに 100 μ l の elution dye (0.04% bromophenol blue, 0.04% xylene cyanol, 4 mM EDTA, 5% glycerol を含む 6 \times loading buffer と 8 M ammonium acetate) を添加後、1 \times TE に浸したゲルを泳動槽に移して 200 V で 20 分間電気泳動を行った。このときの緩衝液の組成は 50 mM Tris base, 62 mM Boric acid, 1 mM EDTA であった。

泳動後、V 字型ウェルから 150 μ l の溶液を回収する操作を 2 回繰り返す、得られたサンプルに 300 μ l の PCI を加えた。その後 5 秒間ボルテックスを行い、14,000 rpm、20 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離した。遠心分離後の上清を回収し、300 μ l の CIA を加えて 5 秒間ボルテックス後、14,000 rpm、20 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、回収した上清に、10 μ l の 3 M Sodium acetate、3 μ l の EthachinmateTM (NIPPON GENE, Tokyo, Japan)、700 μ l の 99.5% 冷エタノールを加えて、-80 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。その後 15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離を行い、得られた沈澱に 1 ml の 70% 冷エタノールを加えて洗浄した。これを吸引乾燥させた。

乾燥した沈澱に、2 μ l の Ligation highTM (TOYOBO, Tokyo, Japan)、0.5 pmoles の 5'末端がビオチン化された *Not* I リンカー (5'-pGGCCGCATGAATGGCGCGCCAAAGA-3' と 3'-CGTACTTACCGCGCGGTTTCT-Biotin-5'を会合させて作製)、0.5 pmoles の 5'末端がビオチン化されていない *Bam*H I リンカー (5'-pGATCCTGTACTGCACCAGCAAATCC-3' と 3'-GACATGACGTGGTCGTTTAGG-5'を会合させて作製) を加えて、16 $^{\circ}$ C で 2 時間ライゲーション反応を行った。ライゲーション後、磁性ビーズ (DynabeadsTM M-280 Streptavidin: Dynal Biotech ASA, Oslo, Norway) を用いて目的 DNA 断片を精製した。すなわち、ライゲーションした DNA 溶液に 10 μ l の磁性ビーズ (DynabeadsTM M-280 Streptavidin: Dynal Biotech ASA) と 6 μ l の TE を混合して、室温で 30 分間転倒混和した。マグネットを用いてビーズを底部に引き寄せながら上清を取り除き、150 μ l の 2 \times Binding Wash Buffer (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 2 M NaCl) を加えて懸濁した。マグネット懸濁液中のビーズを沈めて、チューブを室温で保存した。その後、前処理を行った磁性ビーズ懸濁液をライゲーション産物 10 μ l に加えて 20 μ l にし、ローターを用いて室温で 30 分間転倒混和し

た。同様にマグネットを用いてビーズを底部に引き寄せながら上清を取り除き、再び 150 μ l の 2 \times Binding Wash Buffer を加えて洗浄した。この操作を 3 回繰り返した後、沈澱に 4 μ l の 1 \times TE を加えて懸濁した。これをビーズ精製後の PCR に用いるテンプレート DNA とした。

ビーズ精製後の PCR は、1 μ l のテンプレート DNA に 0.4 Units の KOD plusTM (TOYOBO)、20 pmoles の *Not*I リンカー特異的プライマー[5'-GCGCGCCATTCATGCGGCCG-3']、20 pmoles の *Bam*HI リンカー特異的プライマー[5'-TTGCTGGTGCAGTACAGGATCC-3']、2.5 μ l の 10 \times KOD-Plus-Buffer、0.2 mM dNTPs、1 mM MgSO₄ を加え、滅菌蒸留水で 20 μ l の反応系に調製した。PCR 条件は 94 $^{\circ}$ C \cdot 5 分、[94 $^{\circ}$ C \cdot 15 秒、60 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、68 $^{\circ}$ C \cdot 1 分] \times 30 サイクルの条件で行った。その後、シーケンサー CEQTM2000XL (BECKMAN COULTER) を用いて、スポット DNA 断片をテンプレートとして増幅させた PCR 産物の塩基配列を決定した。

2.2.5. PCR によるメチル化状態の解析

ラメート 3 およびラメート 4 (これらはラメート 1 および 2 と同一種子に由来するクローン) のゲノム DNA (50 ng) を、*Msp* I と *Hpa* II を用いてそれぞれ 37 $^{\circ}$ C で 2 時間処理し、2 倍希釈(最終濃度 1.25 ng/ μ l)して PCR テンプレートに用いた。ポジティブコントロールには、制限酵素処理をしていないラメート 3 とラメート 4 のゲノム DNA を同様に希釈 (最終濃度 1.25 ng/ μ l) したものをテンプレートに用いて PCR を行った。PCR 反応は 1.25 ng のテンプレート DNA に 1 Unit の KOD plusTM(TOYOBO)、15 pmoles のプライマー C4F (M1): 5'-CGAGTCGAGCAGTTGGGAG-3', 15 pmoles のプライマー C4R (M1): 5'-GGGACATCTATGCCATGTGGG-3', 2 μ l の 10 \times KOD-Plus-Buffer、2 μ l の 2 mM dNTP、および 0.8 μ l の 25 mM MgSO₄ を加え、滅菌蒸留水で 20 μ l の反応系に調製したものを、94 $^{\circ}$ C \cdot 10 分、[94 $^{\circ}$ C \cdot 15 秒、60 $^{\circ}$ C \cdot 30 秒、68 $^{\circ}$ C \cdot 1 分] \times 30 サイクルの設定で行った。PCR 反応後、アガロースゲル電気泳動によって PCR 産物をバンドとして確認した。

2.3. 結果

2.3.1. RLGS 分析

ラメート 1 およびラメート 2 で作製した RLGS パターン (*Not*I-*Hpa* II-*Bam*HI) を比較した。その

結果、ラメート 1 では 157 スポットが検出された。ラメート 2 では 155 スポットが検出され、合計 161 スポットが検出された (Fig. 2-3)。検出された 161 スポットのうち、両ラメートで共通のスポットは 151 スポット、ラメート 1 に特異的なスポットは 6 スポット、ラメート 2 に特異的なスポットは 4 スポットであった。すなわち、2 ラメート間で多型を示す RLGS スポットが 10 スポット (約 6%) 検出された。

2.3.2. RLGS スポットクローニング

2 ラメート間で多型を示した 10 スポットのうち、ラメート 2 で特異的に検出されたスポット C4 をクローニングした。スポット C4 のシーケンス解析結果を以下に示す。

5'-GGATCCTTTTCCAGTTATATCGATGAAAACTTTTTTCGTTATGTGTTAAACAAGTTATAGCAT
TGACATTAGAAAAAGAAAGTTGAGAGGAATGCTCCTAATATACTGGCATAGCTGCCATTACGCC
ACATGAAAAACACGATCAATCACGAATTCACAACACTCACCATGTGATACGTGTGATGGCAATC
CCCAGCGGTTCAACATCCACGGCTGAGGATTCGCGGGTAGCAACCTCGGTTTGAAGCCAAAAG
GCAACCACTACCGTCCAGCTCTACTAGGACGGGCCACCAAGCTGGGTCCGACGTGTCATCGA
CGAGTGGGCCCCACACAGCAGGACAACGAGGACGAGTGGGCCCCAGCATTACCCCCACGAG
GCCACCGACAGCGACCCAGGCGGCCGC-3'

下線は RLGS 分析に用いた制限酵素の認識部位を示す (*Bam*H I: GGATCC, *Not*I: GCGGCCGC)。

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) の Blast 検索および RAP-DB (<http://rapdb.lab.nig.ac.jp/>)

検索の結果、スポット C4 は第 1 染色体上の遺伝子 Os01g0894300 (Fructokinase) の 5' 領域から、Os01g0894400 (predicted gene) にかけて位置していた (Fig. 2-4)。

2.3.3. PCR によるメチル化状態の解析

今回、RLGS にはメチル化感受性の制限酵素である *Not* I と *Hpa* II を用いたため、ラメート 1 とラメート 2 のスポットパターンの違いがラメート間のメチル化状態の違いに起因する可能性が考えられた。そこで、PCR によって制限酵素サイトのメチル化状態を解析した。解析に用いたゲノム DNA は、ラメート 1 と 2 と同じ種子に由来するラメート 3 と 4 であった。

スポット C4 の *Not* I から最も近い *Msp* I/*Hpa* II サイトである M1 のメチル化状態を解析するため、プライマー C4F(M1) および C4R(M1) を作製した(材料と方法: 2.2.5. および Fig. 2-4)。テンプレートには、ラメート 3 と 4 のゲノム DNA を *Msp* I および *Hpa* II でそれぞれ消化したものをを用いた。また、ポジティブコントロールのテンプレートには、制限酵素処理を行っていないラメート 3 と 4 のゲノム DNA をを用いた。制限酵素処理を行ったテンプレートを用いて PCR を行い、PCR 産物が得られた場合は、そのサイトが切断されておらず、メチル化されていることを示す。Fig. 2-4 にスポット C4 の座位および Fig. 2-5 に M1 サイトのメチル化状態を解析した結果を示した。ラメート 3 では、*Msp* I と *Hpa* II で消化した場合、どちらもバンドは増幅しなかった(Fig. 2-5 : レーン 2 と レーン 3)。この結果、ラメート 3 の M1 サイトはメチル化されていないことが確認された。その一方、ラメート 4 では、*Msp* I と *Hpa* II で消化した場合の両方において薄いバンドが検出された (Fig. 2-5 : レーン 5 と レーン 6)。そのためラメート 4 において、M1 サイトが部分的にメチル化されている可能性 ($5\text{mC}5\text{mCGG}$ または 5mCCGG) が考えられた。しかし、*Msp* I/*Hpa* II サイトにおける DNA 塩基配列の変異が起こった可能性も考えられたため、レーン 5 およびレーン 6 のバンドの DNA を回収・精製後に *Msp* I で消化して、M1 サイトがラメート 4 のゲノム中に存在することの確認実験を行った。その結果、精製した PCR 産物(880 bp) を *Msp* I で消化した場合 (レーン 8) は、未消化の PCR 産物(レーン 7) に比べて、バンドが低分子側にシフトしていた。これは PCR 産物が *Msp* I サイトで 2 分割(109 bp と 771 bp)され、771 bp のバンドが検出されたと考えられる。つまり、ラメート 4 には M1 サイトが存在することが確認された。この結果から、M1 サイトでは DNA 塩基配列の変異は起こっておらず、 $5\text{mC}5\text{mCGG}$ または 5mCCGG の形で部分的にメチル化されていたことが証明された。

なお、スポット C4 の *Not* I サイトについては、ラメート 3、ラメート 4 のいずれも同じ手法でメチル化は検出されなかった。

2.4. 考察

本章では、イネ種子 1 粒をカルス化して 4 週間組織培養を行った後に再分化させて得られた 2 ラメートを、RLGS 分析 (*Not* I-*Hpa* II-*Bam*HI) して両パターンを比較した。その結果、全 161 の RLGS スポットが検出され、10 スポット (約 6%) が 2 ラメート間で多型を示した。遺伝的なバックグラウンド

が同じであり、変異が比較的少ないと考えられるラメート間についても、RLGS法を用いることで効率的にゲノム改変を検出できることが示された。

スポット C4 は、ラメート 2 に特異的な RLGS スポットとして検出された。このスポットの制限酵素サイトに関して、PCR 法を用いたメチル化状態の確認実験を行ったところ、ラメート間のメチル化変異が検出された。スポット C4 が位置していた座位は、トランスポゾンといった可動性の領域ではなく、遺伝子近傍であった。このことから、植物の組織培養によるゲノム改変は可動性領域だけでなく、遺伝子領域にも起こることが推察される。つまり、培養変異がゲノムへ及ぼす影響はゲノムワイドに生じる可能性があり、ゲノム全体に渡って変異を解析する必要がある。

スポット C4 の M1 サイトについて、組織培養を経由しない通常の栽培によって生育したイネのメチル化状態を解析したところ、M1 サイトのメチル化が確認された (data not shown)。Cheng *et al* (2006)[25]らの研究では、イネの組織培養において、レトロトランスポゾン (*Tos17*) 領域が脱メチル化され、再分化にともなってメチル化が回復することが確認されている。そのため、今回検出されたメチル化変異は、組織培養によって引き起こされた脱メチル化の可能性が考えられた。

以上から、本章では、遺伝的多様性を効率的に検出するため、RLGS法を用いてイネの組織培養で得られたラメート間のゲノム改変を明らかにした。RLGS法を用いた培養変異検出へのアプローチは次の利点を持つ。(1) ゲノム変異が少ないことが予測されるサンプル間の変異の検出が可能である。(2) ゲノムワイドなスキャンが可能であるため、形質変化を引き起こす変異を検出できる可能性がある。(3) RLGS法はゲノム情報が明らかでない生物の解析も可能である。

今回検出された RLGS 多型スポットは、組織培養におけるゲノム改変の DNA マーカーとしての安定性を確認していくことで、クローン植物における形質の安定性を評価する指標としての利用が期待される。

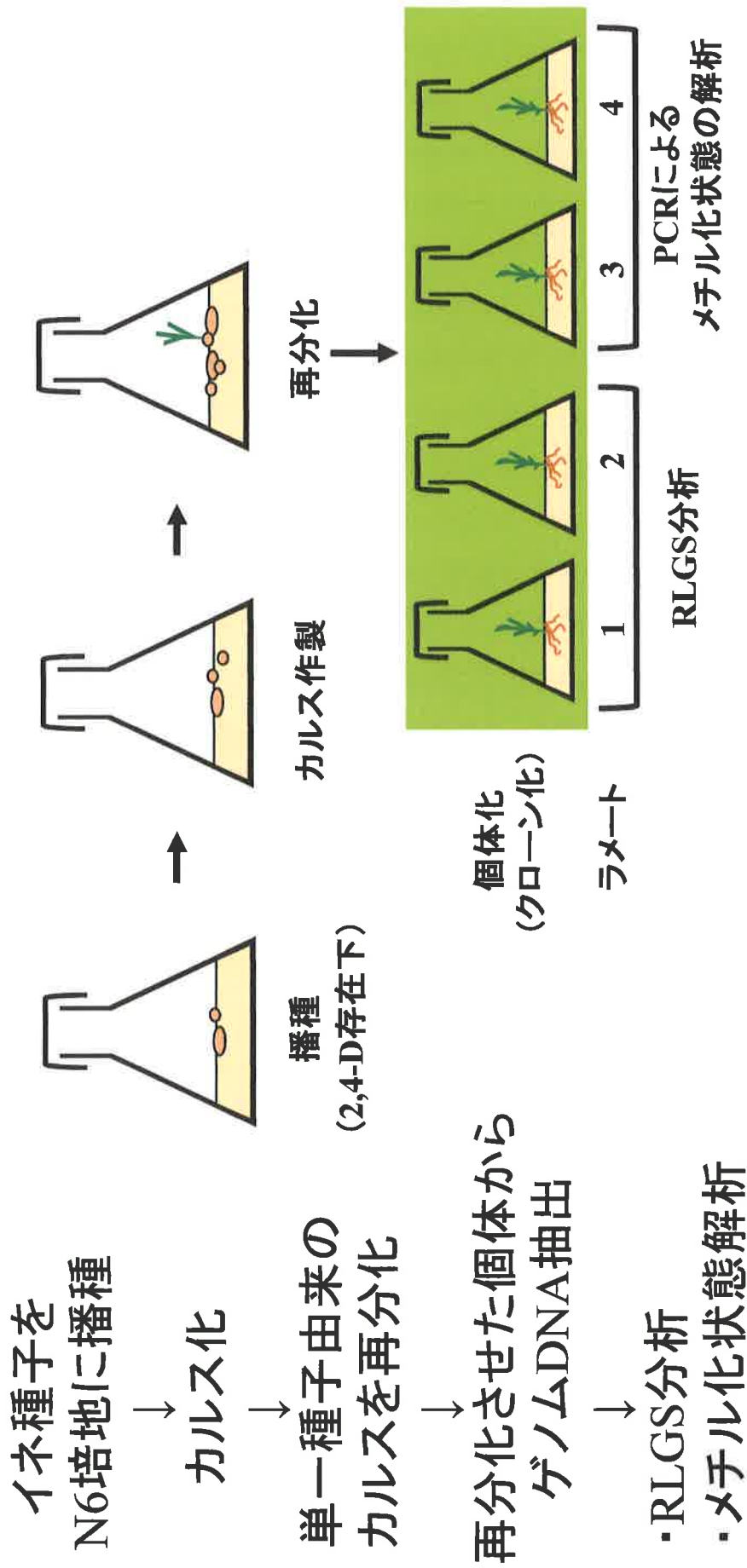


Figure 2-1 培養手順

イネ(品種:「日本晴」)の種子1粒に由来するカルスを再分化 [9] させて得られた4個体(ラメート)を、RLGS分析とPCRによるメチル化状態の解析に用いた。

ゲノムDNAを*Not* Iで消化

制限酵素サイトを標識 (³²P)

Hpa IIIによる消化

アガロースゲル一次元目電気泳動

17 *Bam*H IIによるゲル内消化

ポリアクリルアミドゲル二次元目電気泳動

ゲルの乾燥

オートラジオグラフィ

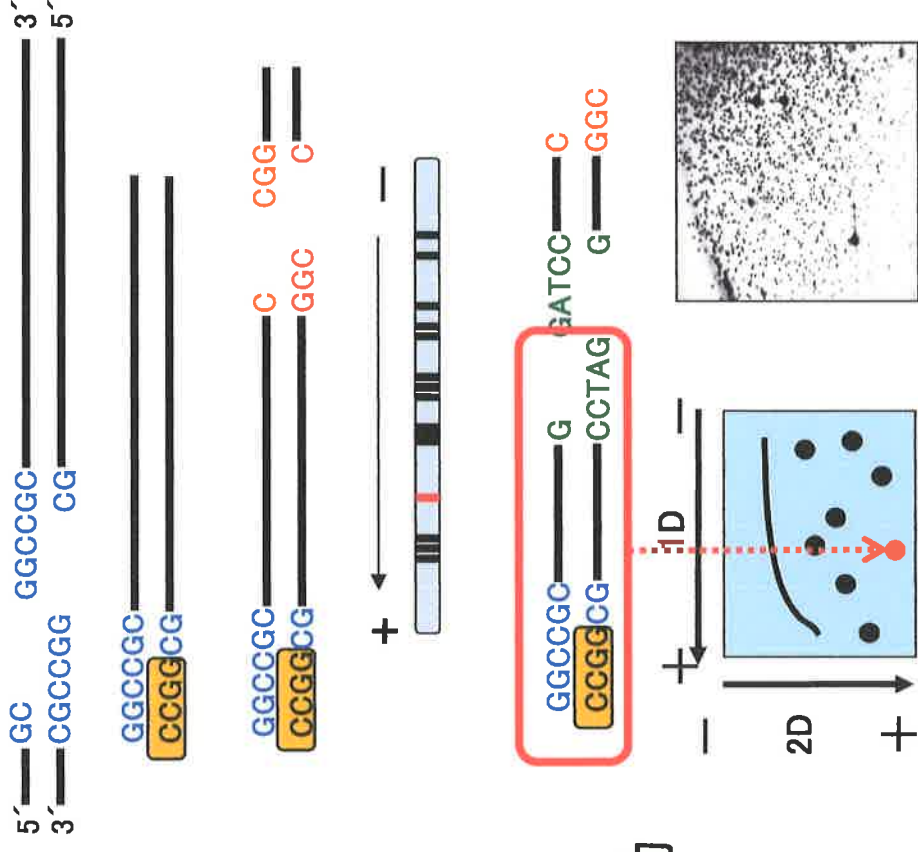
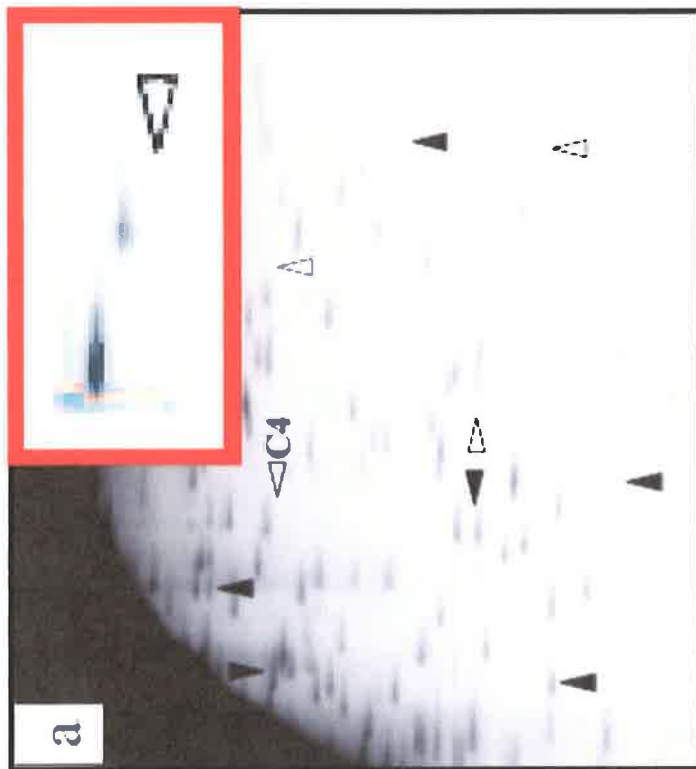


Figure 2-2 RLGs分析手順

ゲノムDNAを3種類の制限酵素で消化して、二次元電気泳動を行った。

ラメート1



ラメート2

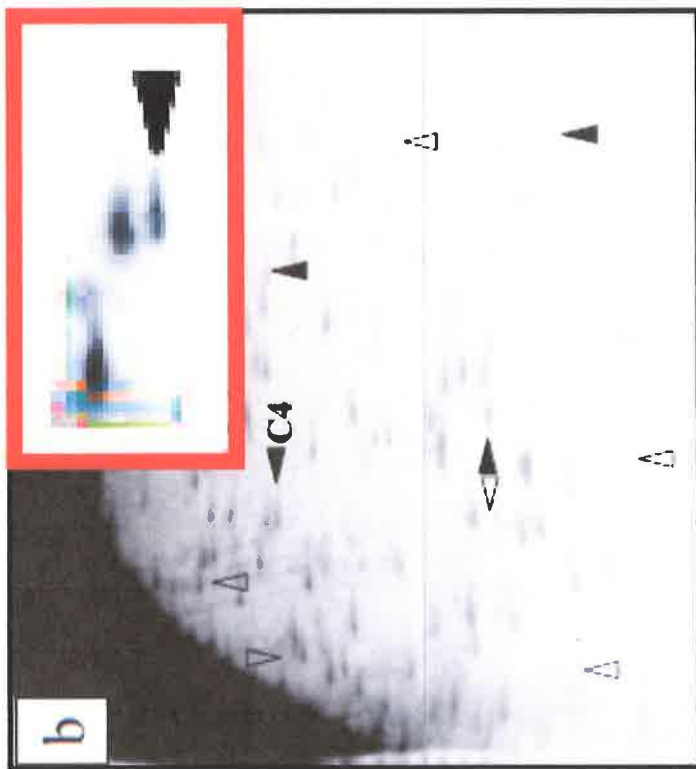


Figure 2-3 RLGsパターン

Not I-Hpa II-BamH Iの組み合わせでラメート2個体のRLGS分析を行い、161スポットを検出した。そのうちスポットC4は、ラメート2でスポットが検出された一方、ラメート1では検出されずに多型を示した。

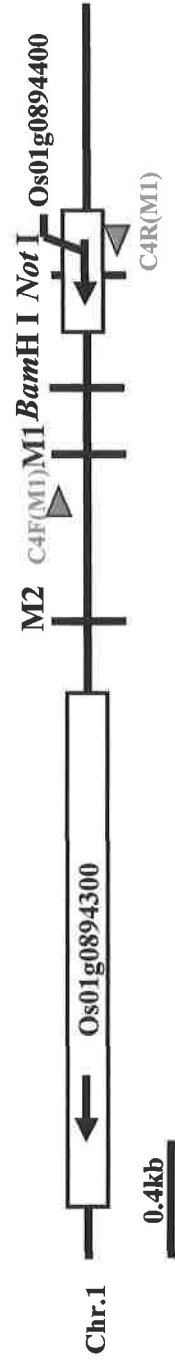


Figure 2-4 スポットC4の座位

スポットC4の制限酵素サイトは遺伝子(口)近傍に位置していた。PCRにより、スポットC4近傍の *Msp I/Hpa II*(M1)サイトのメチル化状態を調べた。このときメチル化状態の解析用に作製したプライマーの位置を赤塗矢印で示した。

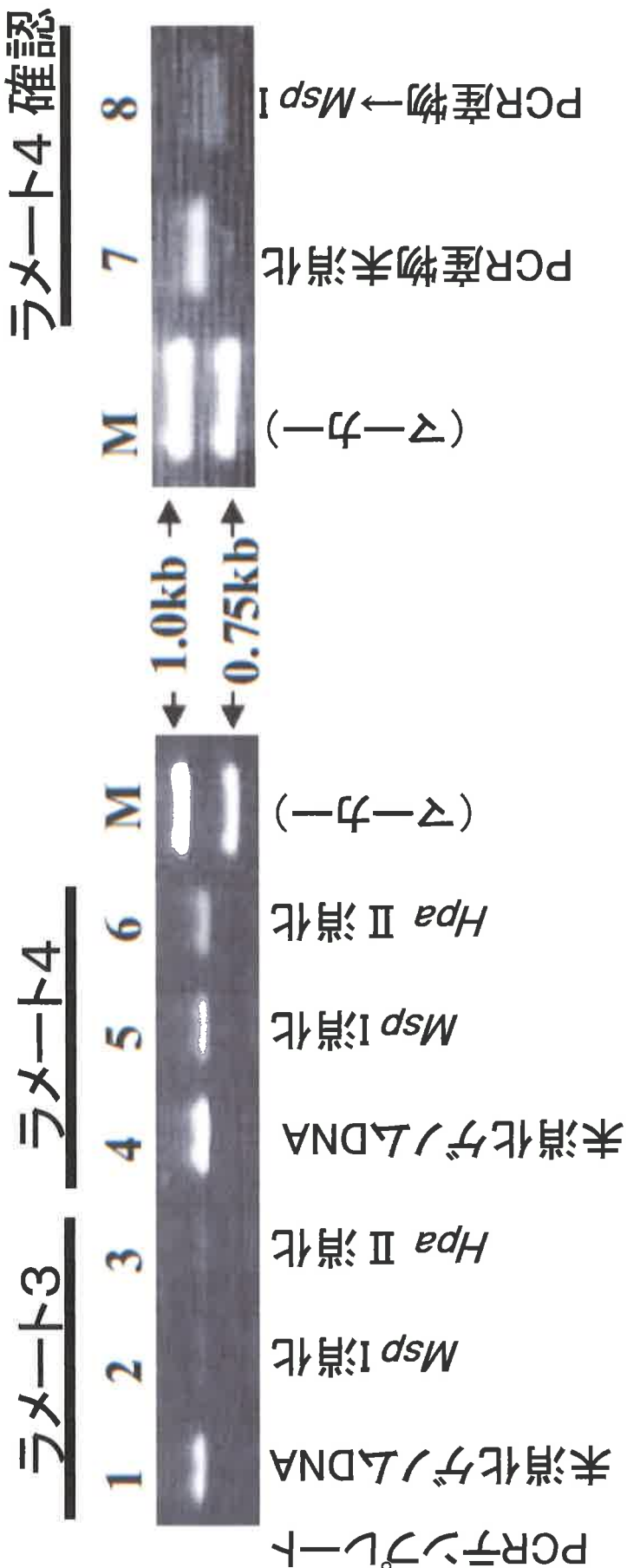


Figure 2-5 *Msp* I/*Hpa* II変異とそのサイトの存在確認

PCRにより、スポットC4のM1サイトのメチル化状態を解析した。ラメート3では*Msp* I、*Hpa* II処理ともバンドが増幅せず、メチル化されていないことを確認した。ラメート4では*Msp* I/*Hpa* IIサイトが存在して、*Msp* I/*Hpa* IIで消化できないタイプのメチル化によるゲノム改変が生じていた。

第3章 栄養繁殖作物の DNA 品種識別マーカーの開発

3.1. 緒言

植物ゲノム上の塩基配列レベルの多型や DNA メチル化等のエピジェネティックな変異が RLGS 法によって迅速、安価に検出可能となった。これらの研究成果の産業利用を図るうえでは、RLGS 分析で検出された遺伝的多様性を現場で利用可能な PCR マーカー化する技術が重要である[23, 24]。その一例として、イグサ (*Juncus effusus*) の DNA 品種識別技術への利用が挙げられる。

イグサはイグサ科 (Juncaceae) イグサ属 (*Juncus*) に属する多年生植物であり、ユーラシア、オセアニア、アメリカ大陸の暖帯に広く分布している。アジアでは我が国や中国、台湾、朝鮮等に自生しており、栽培種として *J. effusus* が畳表、敷物マット、石油ランプの芯や工芸品を作るために栽培されている。育種は主に、交配親の芽の突然変異が利用される。そのため、栽培化された品種集団内の遺伝的多様性は少ないと考えられる。

畳表や花ござ、草履などの原料として、我が国で育成・品種登録された優良なイグサ品種(「ひのみどり」)が中国から日本に不正に輸入される事例が頻発している。「ひのみどり」は、人工交配により作出された初のイグサ品種であり、花芽がなく、茎が細いため高品質の製品に仕上がることから、優良品種として 2001 年に種苗登録され、高値で取引された[26, 27]。登録イグサ品種「ひのみどり」の知的財産権を守るうえで品種識別技術の重要性は上がる一方で、栄養繁殖性の作物は外観上の目視判別が困難なことが多く、特に遺伝的多様性が小さいクローン作物では、知的財産の保護のために DNA レベルでの品種識別技術の開発が求められていた。

植物における多型マーカーの開発は、Simple Sequence Repeat (SSR)[28]や Amplified Fragments Length Polymorphism (AFLP)[29], Single Nucleotide Polymorphism (SNP)[30]が用いられている。一部の作物では、マイクロアレイの利用が試みられている[31]。イグサの場合、操作が簡便で、時間と費用対効果が高いことから、sequence tagged site (STS) マーカーを使用することが適当である。しかし、イグサは遺伝的多様性が非常に小さく、これまで DNA マーカーの開発が充分に進んでいなかった。

そのため、岡本ら(2006)は RLGS 法をイグサに適用した結果、日本における遺伝資源として知られている 18 品種・系統の間で多型を示すスポットを検出した[23]。RLGS 法は、詳細なゲノム解析が行われ

ていない生物種や遺伝的多様性が狭い栄養繁殖作物に対しても効率的に多型が検出できる[32]。

そこで本章では、イグサゲノムの遺伝的多様性を知的財産の権利保護に利用するため、RLGS法で検出されたイグサ品種・系統間の多型スポット（スポット A2）から、「ひのみどり」特異的な DNA 品種識別マーカーを開発することを目的とした。

3.2. 材料と方法

3.2.1. ゲノム DNA の抽出

これまでの研究[23]と同様、「ひのみどり」を含む国産イグサ (*J. effusus*) 18 品種・系統を分析に用いた。品種間（「下増田在来種」「ひのみどり」「千丁在来」「あさなぎ」「せとなみ」「ふくなみ」「文政在来種」「いそなみ」「きよなみ」「筑後みどり」「大原 4 号」「岡山 3 号」「熊川在来種」「高須在来種」「さざなみ」「しらぬい」「岡山 F 系」「岡山みどり」）の系統関係は Okamoto *et al* (2006) [23]ですでに述べられている。

すべての品種・系統について農研機構九州沖縄農業研究センターから針葉を収集した。そして、Kawase (1994)[18] と Okamoto *et al*(2006)[23]に従って、いくつか改変を加えた CTAB 抽出法で針葉からゲノム DNA を抽出した。すなわち、凍結磨砕し、磨砕した組織 100 mg に 10 mg の PVP、10 mg の Sodium lauryl sulfate を加え、これらを 0.4ml の CTAB 抽出液で懸濁した。このときの抽出液の組成は、1% CTAB, 0.1 M Tris-HCl (pH8.0), 50 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.1% 2-Mercaptoethanol であった。溶解液に 1 μ l の Proteinase K (MERCK) を加え(40 mg/ml)、56°C で 30 分間静置した後、PCI、CIA 処理をそれぞれ行って上清を回収した。その後イソプロピルアルコール沈澱による精製を行って、得られたゲノム DNA を 10 μ l の TE 緩衝液に再懸濁して RLGS 分析のサンプルとした。

3.2.2. RLGS 法

RLGS 法は従来法を参考に制限酵素 *BspE* I と *EcoR* I の組み合わせで行った[23]。すなわち、50 μ l の 1 \times blocking buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 0.33 μ M dGTP [α S], 0.33 μ M dCTP [α S], 33 μ M ddATP, and 33 μ M ddTTP)内で 0.4 μ g のゲノム DNA と 10 Units の DNA polymerase I (NIPPON GENE)を加えて DNA 上のニックやギャップを修復した。次に 20 μ l の容量で

ゲノム DNA を 20 Units の *BspE* I で消化した。

22.5 μ l の容量で 0.33 μ M の [α - 32 P]dGTP (3,000 Ci/mmol) と 0.33 μ M の [α - 32 P]dCTP (6,000 Ci/mmol) 存在下で 37°C、30 分間反応させて、切断面を 13 Units の Sequenase version 2.0™ (Amersham, Buckinghamshire) で埋めた。このときの反応液の組成は 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 0.16 μ M dGTP [α S], 0.16 μ M dCTP [α S], 33 μ M ddATP [α S] と 33 μ M ddTTP [α S] であった。その後、65°C で 30 分間反応して酵素を失活させた。このうち 1 mg のゲノム DNA を直径 2.4 mm、長さ 63 cm の 0.8% SeaKem GTG™ アガロースゲル上に乗せて一次元目の電気泳動 (230 V で 23 時間) を行った。このときの緩衝液の組成は、50 mM Tris-acetate (pH7.5), 0.7 mM magnesium acetate であった。DNA を含むひも状のアガロースゲルを取り出し、制限酵素 *EcoR* I の反応溶液に 30 分間浸した。その後、2,000 Units の *EcoR* I で 2 時間反応させてゲル内で DNA を消化した。その後、溶解したアガロースゲルを、ギャップを埋めるように 50 \times 50 \times 0.1 cm の 5% ポリアクリルアミドゲル (5% polyacrylamide to acrylamide/bisacrylamide, 29:1) に連結して、二次元目の電気泳動 (150 V で 24 時間) を行った。このときの緩衝液の組成は 50 mM Tris, 62 mM Boric acid, 1 mM EDTA であった。二次元展開後のゲルを乾燥させ、元のゲルの 35 \times 41 cm の領域を切り出して、-80°C で強化スクリーン (Quanta III; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) または BAS-2000™ (Fuji Photo Film) イメージングシステムを用いてイメージングプレート (Fuji Photo Film) 上に 1~3 日間露光して、3~10 日間フィルム (XAR-5; Kodak, Rochester, NY, USA) 上でオートラジオグラフィを行った。

3.2.3. RLGS スポットクローニング

RLGS スポットクローニングは Watanabe & Hayashizaki (1997)[33] に従って行った。すなわち、目的スポット (スポット A2) を「ひのみどり」の母方の親である「下増田在来種」RLGS パターンの乾燥させたゲルから打ち抜き、20 μ l の 1 \times TE に浸して 4°C で 10 分間静置した。V-shape 電気泳動槽の V 字型ウェルに 100 μ l の elution dye を添加後、1 \times TE に浸したゲルを泳動槽に移して 200 V で 20 分間電気泳動を行った。このときの緩衝液の組成は 50 mM Tris base, 62 mM Boric acid, 1 mM EDTA であった。

泳動後、V 字型ウェルから溶液を 150 μ l 回収した。回収の操作を 2 回繰り返して得られたサンプル

に 300 μ l の PCI を加えた。その後 5 秒間ボルテックスを行い、14,000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離した。遠心分離後の上清を回収し、300 μ l の CIA を加えて 5 秒間ボルテックス後、14,000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離した。遠心分離後、回収した上清に、10 μ l の 3 M Sodium acetate、3 μ l の Ethachinmate™ (NIPPON GENE)、700 μ l の 99.5% 冷エタノールを加えて、-80°C で 30 分間静置した。その後 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離を行い、得られた沈澱に 1 ml の 70% 冷エタノールを加えて洗浄した。これを吸引乾燥させた。

乾燥した沈澱に、2 μ l の Ligation high (TOYOBO)、0.5 pmoles の 5'末端がビオチン化された *BspE* I リンカー (5'-pCCGGAGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGT-3' と 3'-TCA GCACTGACCCTTTTGGGACCGCA-Biotin-5'を会合させて作製)、0.5 pmoles の 5'末端がビオチン化されていない *EcoR* I リンカー (5'-pAATTCTGTACTGCACCAGCAAATCC-3' と 3'-GACATGACGTGGTCGTTTAGG-5'を会合させて作製) を加え、16°C で 2 時間ライゲーション反応を行った。ライゲーション後、磁性ビーズ (Dynabeads™ M-280 Streptavidin: Dynal Biotech ASA) を用いて目的 DNA 断片を精製した。すなわち、ライゲーションした DNA 溶液に 10 μ l の磁性ビーズ (Dynabeads™ M-280 Streptavidin: Dynal Biotech ASA) と 6 μ l の TE を混合して室温で 30 分間転倒混和した。続いて、マグネットを用いてビーズを底部に引き寄せながら上清を取り除き、150 μ l の 2× Binding Wash Buffer を加えて懸濁した。マグネットで懸濁液中のビーズを沈めて、チューブを室温で保存した。その後、前処理を行った磁性ビーズ懸濁液をライゲーション産物 10 μ l に加えて 20 μ l にし、ローターを用いて室温で 30 分間転倒混和した。続いて、マグネットを用いてビーズを底部に引き寄せながら上清を取り除き、150 μ l の 2× Binding Wash Buffer を加えて洗浄した。この操作を 3 回繰り返した後、沈澱に 4 μ l の 1× TE を加えて懸濁し、これをビーズ精製後の PCR 用のテンプレート DNA とした。

ビーズ精製後の PCR 反応は、0.2 Units の KOD plus™ (TOYOBO)、20 pmole の *BspE* I リンカー特異的プライマー [5'-TTCCCAGTCACGACTCCGG-3']、20 pmoles の *EcoR* I リンカー特異的プライマー [5'-TTGCTGGTGCAGTACAGAATTC-3']、2.5 μ l の 10× KOD-Plus-Buffer、0.2 mM dNTPs、1 mM MgSO₄ を滅菌蒸留水で 20 μ l の反応系に調製した。PCR 条件は 95°C・10 分、[95°C・15 秒、60°C・30 秒、68°C・30 秒]×30 サイクルの条件で行った。シーケンサー CEQ™2000XL (BECKMAN COULTER)

を用いて、スポット A2 の DNA 断片をテンプレートとして増幅させた PCR 産物の塩基配列を決定した。

シーケンサーで決定したスポット A2 の配列に特異的なプライマーを作製して、PCR によるイグサ 18 品種・系統中の「ひのみどり」の識別を試みた。以上の工程を Fig. 3-1 に示した。

3.2.4. PCR による多型検出

イグサ 18 品種・系統について、50 ng のゲノム DNA を PCR テンプレートに用いた。PCR 反応は、50 ng のゲノム DNA、0.2 Units の KOD plus™ (TOYOBO)、15 pmoles の配列特異的プライマー F[A2-*BspE* I(5'-TCCGGATTTAACTATTCGTCC-3')], 7.5 pmoles の配列特異的プライマー R[A2-*EcoR* I(5'-GAATTCATTTGCAAATGCAGACCG-3')], 2 µl の 10×KOD-Plus-Buffer、1 mM の MgSO₄、0.2 mM の dNTP Mixture を滅菌蒸留水で 20 µl の反応系に調製した後、95°C・5分、[95°C・15秒、60°C・30秒、68°C・20秒]×30 サイクルの条件で行った。3% NuSieve3:1™ アガロースゲルを用いて PCR 産物を 50 V で 5 分間、100 V で 50 分間電気泳動した。

3.3. 結果

3.3.1. RLGS 多型スポットのクローニング

「下増田在来種」「ひのみどり」の RLGS スポットパターン上で多型スポット A2 を検出した。「下増田在来種」のスポット A2 のカウンターパートについては、「ひのみどり」で特定することはできなかった。スポット A2 の *BspE* I サイトとその反対側の *BspE* I サイトとの間に大きな挿入/欠失があるのではないかと思われた。

このスポット A2 について、乾燥させたゲルからスポットを打ち抜き、スポットクローニングによりスポット A2 の塩基配列を決定した。ここで、RLGS スポットパターンにおけるスポット A2 の位置を Fig. 3-2 に示した。また、決定したスポット A2 の塩基配列を Fig. 3-3 に示した。このときスポット A2 の DNA 断片長は 541 bp であり、RLGS スポットパターンと一致した。

3.3.2. プライマー作製と PCR による品種識別

決定した塩基配列に基づき、スポット A2 の 3'末端および 5'末端に配列特異的な一对のプライマーを作製して、PCR による品種識別を試みた。イグサ 18 品種・系統の針葉から CTAB 法でゲノム DNA を抽出して、このゲノム DNA をテンプレートに用いて PCR を行った。その結果、「ひのみどり」では約 500 bp に 1 本のバンドが増幅された一方、他 17 品種・系統では 500 bp 付近に 3 本のバンドが増幅された。すなわち、増幅されるバンドパターンの違いにより、18 品種・系統から「ひのみどり」を特異的に識別することが可能であった。このときの PCR 結果を Fig. 3-4 に示した。

3.4. 考察

「下増田在来種」DNA の RLGS プロファイルからスポットクローニングを行って決定したスポット A2 の塩基配列について、BLAST で相同性検索を行った。その結果、この領域は不活性な受容体キナーゼ (At4g23740) と 69% の相同性を示した。なお、スポット A2 の塩基配列データは DDBJ/EMBL/GenBank のデータベース上で登録され、利用可能である (accession number LC132965)。

スポット A2 の塩基配列に特異的なプライマーを作製して PCR を行った結果、「ひのみどり」では約 500 bp に 1 本のバンドが増幅され、他 17 品種・系統では 500 bp 付近に 3 本のバンドが増幅された。このとき、「ひのみどり」を含む 18 品種・系統で共通して増幅された DNA 断片の他に、2 つの長い DNA 断片が「ひのみどり」で増幅されなかった理由として、次の要因が考えられた。すなわち、(1) プライマー結合領域の配列の欠失変異、(2) プライマーのアニーリング領域の塩基置換変異、および (3) 長い配列の挿入変異が考えられた。同じ一对のプライマーを使用して 3 本のバンドがすべて増幅されたことから、「下増田在来種」における 3 本のバンドは、同じ遺伝子に由来するか、偽遺伝子の可能性がある。

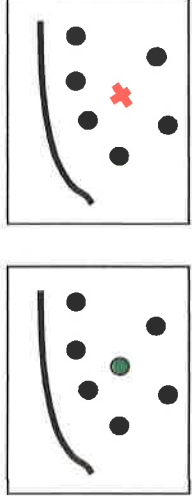
いずれの場合でも、今回開発した DNA マーカーを用いることで、バンドパターンの違いにより、供試したイグサ 18 品種・系統から「ひのみどり」を特異的に識別することが可能となった。この DNA マーカーは乾燥、加熱、および/または染色処理された加工品から抽出された DNA にも適用できることから、現場で利用可能な実用的な品種識別マーカーであるといえる。

本章で行った RLGS スポットクローニングを用いた DNA 品種識別マーカーの開発は、植物ゲノムにおける遺伝的多様性の検出技術を活用して、DNA 品種識別技術として税関等の現場で利用できるこ

とを示している。この技術はイチゴやコンニャク、ジャガイモなど他の栄養繁殖作物でも利用可能であることから、不正な逆輸入を抑止するため知的財産の権利保護への利用が期待される。

RLGS分析

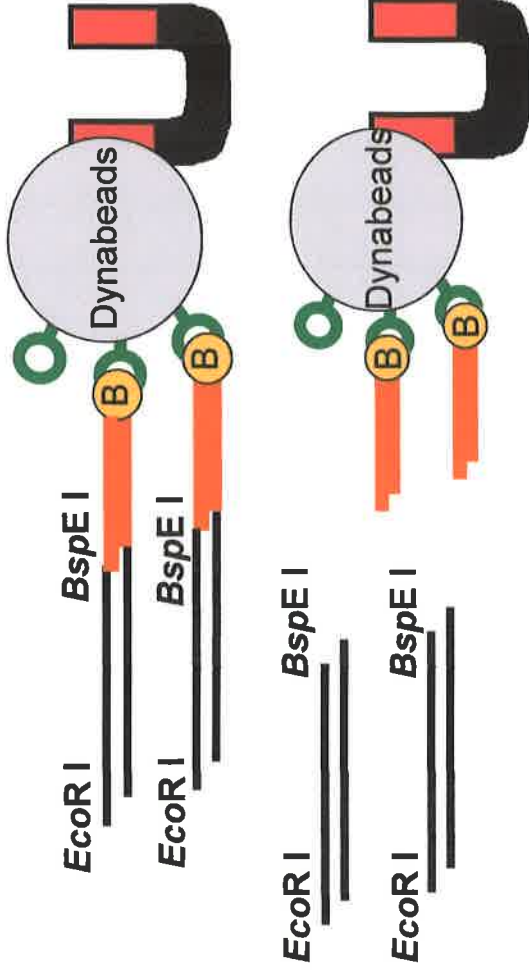
↓ (*BspE* I-*EcoR* I)
多型スポット打ち抜き



↓
多型スポットDNA断片の回収



↓
リンカーライゲーション、磁性ビーズ
による目的DNA断片の精製



28

↓
シーケンス



↓
配列特異的プライマー作製
PCRによる多型検出

Figure 3-1 RLGS分析とシーケンス

RLGS分析により検出された多型スポットA2をゲルから打ち抜き、Dynabeads™ M-280 Streptavidinを用いて目的DNA断片を回収・精製した。シーケンスで決定したスポットA2の塩基配列に特異的なプライマーを作製した。

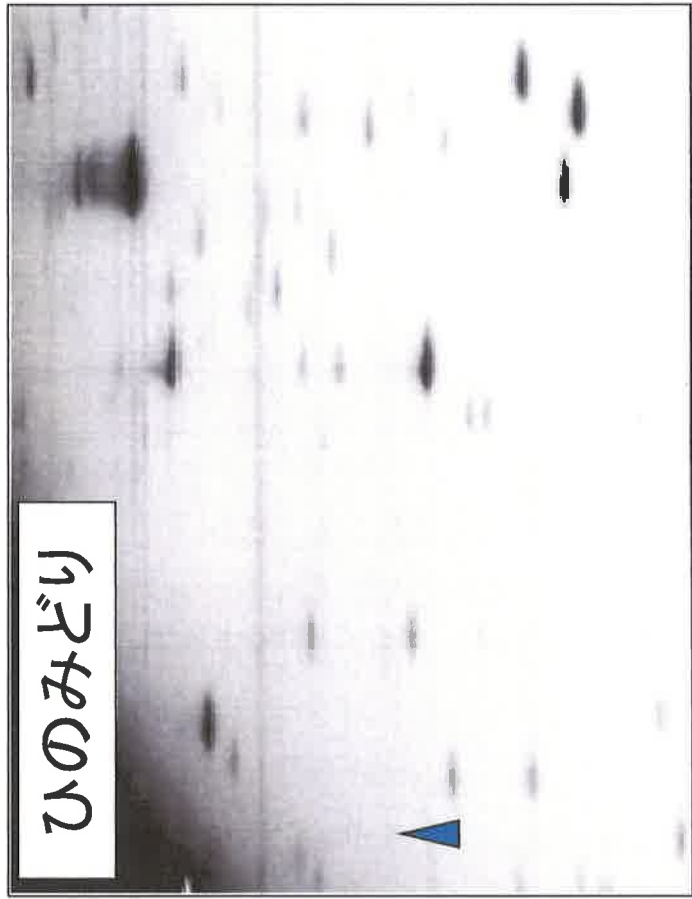


Figure 3-2 RLGs多型スポット

制限酵素 *BspE* I-*EcoR* I の組み合わせで RLGs 分析を行い、「下増田在来種」「ひのみどり」品種間で多型を示すスポット A2 を検出した。スポット A2 は「下増田在来種」で検出された（赤塗矢印）のに対して、「ひのみどり」では検出されなかった（青塗矢印）。

(*Bsp*I)

5' -
 TCCGGA TTAAC TATTGTC CCC TCCTTAAGCCGCCA TTTCTCCCTCTCTCCCTCTCCCTCGAGTTCCTCATGCTTCAAGCAAAGCAA
 AGCCCACTCTCTCTTCAATTACCCCTCTCTCTCTGAACTCTTCTCTCTCTCTAAATAAACCCACCAACAATGGCTTACC
 ACCACATTCTCTCGTCC TGGTCTGTGGCATTCACTTACCTGAGCCAATTCAGACAAGTTCGGCTTCTCGACTTCCCTCTC
 TCAAACGCCCACTCGCGGACCTGAACTGGGACGTTTCCCTCCCGGTGTGCAGCAAACTGGACTGGAGTTACGTGCTCGCCGGAC
 GGATCTCGCGTCAACCCGGTGCATCTGCCGGCTTCGGGGTCAACCCGCCAGATCCCGCCCAACACTCAGCCGCTTGTCCGGCTCTT
 CAGATCCTCAGCTCCGTTCCAACGGACTCACCGGCCTGTTCCGGGGATTTGGGAATCTCAGCTCGCTTACCGGCTGCAITTG
 AAA GAATTC B' →

(*Eco*R I)

Figure 3-3 スポットA2の塩基配列

「下増田在来種」JRLGSパターン上のゲルからスポットA2を打ち抜き、塩基配列を決定した。決定したスポットA2のDNA断片長は541 bpであり、RLGSスポットパターンと一致した。スポットA2の3'および5'末端の制限酵素部位を含む位置から、配列特異的な一対のプライマーを制作した。作製したプライマーの位置を赤矢印で示す。

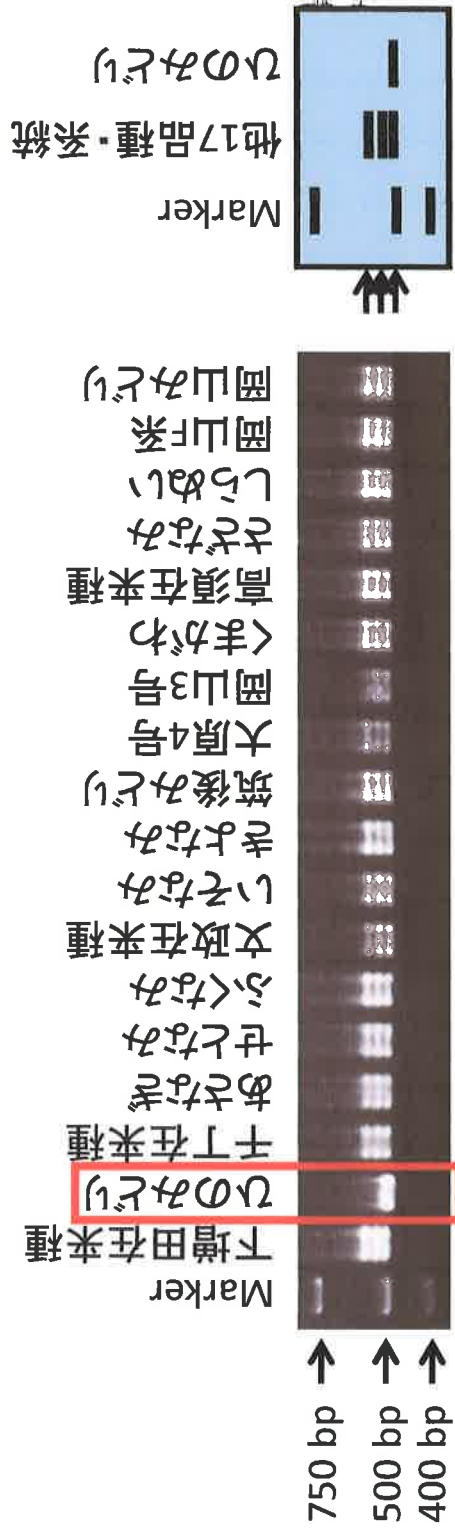


Figure 3-4 イグサ18品種・系統のPCR結果

イグサ18品種・系統からゲノムDNAを抽出してPCRを行った。その結果、「ひのみどり」では約500 bpに1本のバンドが増幅され、他17品種・系統では500 bp付近に3本のバンドが増幅された。模式図(右)で示したバンドパターンの違いにより、18品種・系統から「ひのみどり」を特異的に識別可能であった。

第4章 多様性に富む品種集団を用いた種子生産性の解析

4.1. 緒言

ソルガム (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) は、イネ科でアフリカを起源とする作物だが、その生育地は中央アジアとインドに広がり、そこで農業的に栽培されている。ソルガムの遺伝的多様性は、世界中 160 か国あるいは公的ジーンバンクによる大規模集団 (235,000 系統以上) において維持されている [34]。この作物がアフリカから広がる間、新たな環境において、より地域に適した品種が開発されてきた [35]。ソルガムはアフリカ、アジア、アメリカにおける食料や家畜飼料、アルコール飲料の工業生産に利用されている。日本においては牛の飼料用に栽培される他、現在ではバイオマス源としての可能性を見極めるための研究が行われている。Paterson *et al* (2009) [36] のドラフトシーケンス解読以降、遺伝子解析や多様性の評価が急速に進展している。以上のように、ソルガムは遺伝的多様性が大きいために世界中の栽培環境に適応し、さらに利用価値を高める余地の大きい作物であることから、本研究の対象植物として選んだ。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (NARO) 遺伝資源センター (NGRC) では、農業に関連する遺伝資源の現地調査収集、特性評価、保存、および配布を行っている [37, 38]。遺伝資源センターでは、世界中から得られた 4,000 点以上のソルガム系統を保存している。さまざまな種類のソルガムについて収集された、画像や表現型の説明を含むデータが、公的に利用可能なデータベースに保存されている [39]。

コアコレクションは、利用可能なリソースから選択された少数の品種により、広い範囲の遺伝的多様性をカバーする一連の品種・系統である [40]。NGRC で保存されているソルガム遺伝資源から NARO ソルガムコアコレクションが作成された [41]。NARO ソルガムコアコレクションは、遺伝子探索 [42, 43]、量的形質遺伝子座分析 [44, 45]、および作物進化研究 [46] を支援する研究ツールとして広く利用されている。

遺伝資源へのアクセスを促進するジーンバンクとして、NARO は自身のコレクションおよびコアコレクションを保存・配布している。それゆえに、種子の増殖は不可欠で、多くの粒数を得ることが重要である。しかし、ソルガムは熱帯由来の作物であるため、日本では増殖困難な系統が存在する。この問題

への対策として、熱帯気候に属する適当な場所で先に述べた系統の種子を増殖することが適切かもしれないと考えられている。国際半乾燥熱帯作物研究所 (ICRISAT) が所在するインドではそうした環境もっている、ICRISAT はそのような立地の有利さを生かし、彼ら自身の材料から、ソルガムミニコアコレクションを独自に作成している[47]。

本章では、異なる環境における種子の生産性を比較するために、NARO ソルガムコアコレクションを用いてインドと日本両方における栽培試験を行った。

4.2. 材料と方法

NARO ソルガムコアコレクション[41]で利用可能な 105 系統を研究に用いた (Table 4-1)。このとき WSC ID は NARO ソルガムコアコレクションの通し番号、JP 番号は NGRC における管理 ID 番号を示す。種子は、インドのコービルパティ (KD: インド、タミルナドゥ州、N09° 12')、インドのコインバトル (CD および CR: インド、タミルナドゥ州、N11° 01') および日本のつくば市 (TR: 日本、茨城県、N36° 02') の 3 か所で栽培された。コインバトルでは、乾季 (CD: 10 月-5 月) と雨季 (CR: 6 月-9 月) の両方の時期に栽培された。現地の方法に従って、それぞれの生育場所でソルガムを栽培した。このときの各生育場所における圃場および環境データを Table 4-2 に示した。ソルガム種子は次に示す日、すなわち KD では 2012 年 11 月 7 日、CD では 2014 年 2 月 19 日、CR では 2013 年 7 月 3 日、TR では 2014 年 5 月 28 日に播種した。畝間の間隔は、KD、CD、および CR では 60 cm、TR では 80 cm とした。個体間の間隔は全ての場所で 10cm とした。種子は、KD および TR では 1 反復 (1 系統につき 1 列)、CD および CR では 2 反復 (1 系統につき 2 列) で播種した。収穫を簡易化するため、特性調査の対象は主穂 (第 1 穂) に限定し、種子は自殖用の紙袋を用いて自殖させた。各系統における 1 穂あたりの種子粒数は、1 穂あたりの種子重量および 100 粒重を用いて算出した。開花日を含む表現型データを収集した。ただし TR では、種子の成熟や出穂日の遅れでいくつかの品種・系統は種子を収穫できなかった。そのため種子増殖の指標として観察と調査が容易な出穂日を記録した。出穂の遅れにより種子の成熟前に霜が降りて採種できなくなるため、TR における出穂日の特性調査は 2014 年 9 月 30 日まで行われた。前述に加えて、気象条件 (気温、降水量、風、湿度等) の年次変動、土壌、日長、灌水、播種時期、虫害、肥料、病害等の違いが存在するため、試験区間の条件の違いはすべて環境

要因として取り扱い、統一したコントロールは行わなかった。

KD、CD、およびCRの日中最高気温と最低気温、降雨量などの気象データはインドのタミルナドゥ農業大学で観測、記録された。TRでの気温、降雨量データは気象庁(<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>)から取得した。

積算温度は次式により算出した[48]。このとき、Threshold Temperatureは9°Cに設定した。

$$\text{積算温度} = \sum \left\{ \frac{(T_{\text{max}} - T_{\text{min}})}{2} - 9 \right\}$$

ここで、Tmaxは日中最高気温、Tminは日中最低気温を示す。

KD、CD、CR、およびTRの日長は、海上保安庁の緯度経度データ(http://www1.kaiho.mlit.go.jp/KOHO/automail/sun_form3.html)を用いて算出した。

4.3. 結果

本章では、日本で開発されたNAROソルガムコアコレクションを用いて、インドと日本で初めて比較栽培を行った。KD、CD、CRおよびTRで栽培されたNAROソルガムコアコレクション系統における1穂あたり種子粒数、開花/出穂日、および開花/出穂日までの積算温度をTable 4-3A、3Bに示した。

4.3.1. 種子を収穫できなかった系統

KDが虫害やその他理由、TRが出穂の遅れにより計25系統が種子を収穫することができなかった(Table 4-3A)。その一方、CDとCRでは栽培されたすべての系統で種子を収穫することができた。首尾よく生育した105系統における1穂あたり種子粒数の平均は、CDでは190±140粒、CRでは290±150粒であり、CDよりもCRで収穫された種子数が多かった(Table 4-3B)。このことから、インドでの栽培時にCRは最も多く種子を収穫できる可能性があるかと推論された。インドの生育環境下で観測された気候条件に適した日本原産の系統はほとんどなかった。

また、WSC7「姫城在来」とWSC8「菊池在来」はどちらも日本の在来系統だが、TRでは出穂が遅いため収穫できなかった(Table 4-3A)。

4.3.2. 種子生産性の比較

1穂あたり種子粒数の平均はKDで 140 ± 180 粒、CDで 190 ± 140 粒、CRで 280 ± 130 粒、およびTRで $1,400 \pm 970$ 粒であり、有意に異なっていた ($P < 0.05$)。日本で栽培された集団の1穂あたり種子粒数が最も多く、インド国内ではCRで栽培された品種集団の種子生産性が高かった。

TRおよびCRで栽培したソルガム各系統の1穂あたり種子粒数を比較した。このときの散布図をFig. 4-1に示した。共通して採種できた80系統 (Table 4-3B)のうち、76系統 (95%)ではTRで種子粒数が多かった。例えば、CRで種子粒数が最大の系統 (WSC31、インド原産)に関して、CRでは1穂あたり670粒である一方、TRではこの約3倍である1穂あたり2,000粒が生産された。さらに、TRでは80系統のうち19系統 (24%)で1穂あたり2,000粒以上の種子を生産した。これはCRで最も種子を生産する系統の3倍に相当した (Table 4-3B)。これら19系統の来歴は多様であった：すなわち、インド原産が4系統、パキスタン原産が3系統、日本、韓国、南アフリカ共和国、スーダン原産が各2系統、そして中国、北朝鮮、モロッコ、アルジェリア原産のものが各1系統であった。これら19系統のうち7系統 (9%)は、CRでの栽培において1穂あたり種子粒数が200粒未満であった。これらはWSC33 “DHOOTI ANEHULA” (インド原産)、WSC35 “AS 4136 MASAKA LUWEMEA” (インド原産)、WSC46 “COL/PAK/1989/IBPGR/2592(7)” (パキスタン原産)、WSC47 “87-9-21-3” (パキスタン原産)、WSC72 “S. BASUTORUM DL/60/97” (南アフリカ共和国原産)、WSC76 “143 DINDERAWI 1” (スーダン原産)、WSC90 “MN 401” (アルジェリア原産)を含んでいた。その一方、2系統 (3%)はCRで種子粒数が多かった。

すなわち、栽培環境の違いによって、品種間の種子生産性に違いがあることが明らかになった。TRとCD、TRとKDの比較でも同様の傾向が観察された。

以上の結果から、インドのような、収量が低いと思われる地域を起源とする系統のうちいくつかの系統については、日本の気候条件下でもより高い収穫数を示すことが確認された。このうち特にWSC71 “RED KAFIR” (南アフリカ共和国原産)については、TRの栽培環境で極めて高い種子生産性 (1穂あたり5,500粒)を示すことがわかった。

4.3.3. 開花と出穂

ソルガムは出穂の5~7日後に黄色の葯が頭の先端に現れて、開花する[49-51]。したがって、開花日は出穂日からほぼ6日後と推定できる。そのため本章ではKD、CD、およびCRにおける開花データとTRにおける出穂データを比較して使用した。

KDでは96系統が開花したが、残りの9系統は虫害やその他の理由で開花期に達しなかった。KDで種子が収穫できた80系統(Table 4-3B)における播種から開花までの日数は 65 ± 2.3 日(62日-75日の範囲)であった。CDでは105系統がすべて開花して、播種から開花までの日数は 54 ± 3.9 日(46日-62日の範囲)であった。特に開花は17日間の短期間に集中していた。CRでも同様に105系統が開花して、播種から開花までの日数は 53 ± 4.2 日(43日-61日の範囲)であった。CDとCRは播種時期に半年間の違いがある一方、播種から開花まで同様の日数を示した。

TRでは94系統が出穂した。播種から出穂までの日数は 77 ± 13.1 日(58日-117日の範囲)とインドより出穂が遅く、CDで観察された範囲よりもはるかに長い期間であった。播種から開花または出穂までの範囲は栽培場所によって異なり、TRで観測された出穂範囲はインドで栽培された植物体の開花範囲の3倍の長さであった(Fig. 4-2a、Table 4-3B)。TRにおける残り11系統(Table 4-3A)は、圃場での栽培期間の終了時(9月末日)まで出穂に達しなかった。

全系統の50%が開花期または出穂期に到達した時点での積算温度は、KDでは $1,136^{\circ}\text{C}$ 、CDでは $1,042^{\circ}\text{C}$ 、CRでは 899°C 、およびTRでは $1,078^{\circ}\text{C}$ であった(Fig. 4-2c)。インドで栽培された各系統がそれぞれ開花に達するまでKDでは 209°C 、CDで 340°C 、CRで 330°C の範囲に及んだ。TRで栽培された各系統が出穂に達するまでの積算温度の範囲は 924°C だった。

4.3.4. 積算降水量

全系統の50%が開花期または出穂期に達したときの積算降水量は、KDで35 mm、CDで0.2 mm、CRで48 mm、およびTRで429 mmだった(Fig. 4-2d)。TRは降水量が圧倒的に多く、インドで栽培した集団と比較して1穂あたり種子粒数が5倍多かった。インド国内ではCRにおける降水量が最も多く、CRで栽培された集団の1穂あたり種子粒数もKDやCDと比較して多かった。

4.4. 考察

4.4.1. 種子を収穫できなかった系統

種子を採種できなかった系統のうち、WSC7「姫城在来」とWSC8「菊池在来」はどちらも日本の在来系統だが、TRで出穂が遅いため収穫できなかった。そのうえNARO ジーンバンクの特性調査データベースでは、9月末日以前に出穂した記録も含まれていた。2014年には、理由は不明だが、両系統の出穂は遅れていた。両系統の来歴を詳しく調べた結果、WSC7は兵庫県、WSC8は熊本県が原産地であった。これらの系統はつくばより温暖な、原産地と同様の気候条件下であれば、問題なく採種できたかもしれない。

インドの生育環境下で観測された気候条件に適した日本原産の系統はほとんどなかった。

このことから、種子生産における制限要因として、インドでは虫害、日本では日長感受性の違いまたは種子成熟までに十分な生育期間が確保できないことが考えられた。

4.4.2. 種子生産性の比較

比較栽培試験を行った105系統のうち、TRの栽培環境でWSC71“RED KAFIR”（南アフリカ共和国原産）が極めて高い種子生産性（1穂あたり5,500粒）を示した。ジーンバンクの特性調査データベースで参照可能な系統のうち、粒数が多い系統でも1穂あたり最大5,200粒であった。このことから、今回の試験で一穂あたりの粒数が多かったWSC71“RED KAFIR”を新たに見出した意義は大きく、今後、種子生産性をさらに向上させる育種を行う上で、有用な遺伝資源として利用価値があると考えられる。

4.4.3. 開花と出穂

CDとCRは播種時期に半年間の違いがある一方、どちらも105系統がすべて開花して、播種から開花までの日数はCDが 54 ± 3.9 日（46日-62日の範囲）CRが 53 ± 4.2 日（43日-61日の範囲）であり同様の日数を示した。このことから、インド低緯度地域では播種時期から既に日長が閾値以下であり、ソルガムは発芽に続いてすぐ出穂ステージに移行すると考えられる。

TRで出穂した94系統について、播種から出穂までの日数は 77 ± 13.1 日（58日-117日の範囲）でありインドより出穂が遅かった。観測された出穂日の範囲もインドの3倍以上のバラつきが見受けられた

(Fig. 4-2a、Table 4-3B)。残りの 11 系統は、圃場での栽培期間の終了時（9 月末日）まで出穂に達しなかった。そのため、これら 11 系統は日長の違いによる影響を受けていると考えられる (Fig. 4-2b)。すなわち、日本で栽培することで、インドでの栽培時は分からなかった、品種集団内で日長感受性の違いがあることが明らかになった。

Mannai *et al* (2011) [44]は 12 時間の日長がソルガムの開花遅延を引き起こす閾値であり得ることを示すため、アソシエーション解析を行った。Tarumoto (2011) [52]は、「天高」のようなソルガム品種は 12.25 時間未満の日長で花芽分化が誘導されることを示した。我々の研究では、CD で栽培された 80 系統のうち 50% (Table 4-3B 中 80 系統のうち 40 系統) が開花に達するまで 54 日間を要した。しかし、第 3 葉期から 5 葉期における日長は 12.6 時間から 12.7 時間の間であった (Fig. 4-2b; [51])。Tarumoto[52]によると、日長 12.25 時間の効果的な時期は発芽後 10 日から 30 日の間であるとされている (第 3~第 5 葉期)。したがって、開花/出穂の日長の閾値は、インドでは 12 時間、日本では 12.25 時間を超える可能性がある。しかし、この知見はまだ確認されておらず、この点に関しては今後の研究が求められる。

CR と KD を比較すると、積算温度の推移 (曲線) がほぼ等しいにもかかわらず、KD における播種から開花までの日数は CR と比較して 12 日間も遅れていた (Fig. 4-2c)。そのため、インドと日本における各系統の播種から開花/出穂まで日数の分布を比較した (Fig. 4-3)。しかし、TR における播種から出穂までの日数と KD、CD、CR における播種から開花までの日数に殆ど相関はみられなかった。CR と KD の結果は出穂に関して現在知られていない、積算温度とは離れたところで他の未知の要因が存在することを示唆している。

イネでは *Ed1* や *Hd3a* 遺伝子が日長に関連する一方[53]、ソルガムでは *SbCO* や *SbCN15* 遺伝子が同様の機能を担っている[54]。将来、未知の遺伝子や他の要因の可能性とともに、これらの遺伝子による出穂/開花の調節機構を明らかにする上で役に立つかもしれない。

4.4.4. 積算降水量

栽培期間中、各系統の 50%が開花期または出穂期に達したときの日本の雨量は 429 mm で、インドの約 8 倍から 15 倍 (KD で 35 mm、CD で 0.2 mm、CR で 48 mm) であり、圧倒的に多い雨量だっ

た。そしてインドで栽培した集団と比較して1穂あたり種子粒数が5倍多かった。インド国内ではCRにおける降水量が最も多く、CRで栽培された集団の1穂あたり種子粒数もKDやCDと比較して多かった。KDよりも降水量が少なかったにもかかわらず、CDがKDより多くの種子粒数を生産できた理由として、CDはKDより灌水回数が2回多かったことが考えられる。日本での積算雨量がインドより圧倒的に多かったことを考えると、日本でより多くの種子が採種できたのは、乾燥ストレスが少なかったことによるものと考えられた[55]。すなわち、今回調べた範囲では、ソルガムは乾燥した熱帯原産の作物だが、多くの種子を得るためには十分量の雨が必要であると考えられることから、インド栽培時においても十分量の水を供給することで、各系統の種子生産性が向上することが期待される。

Table 4-1 供試したソルガム系統

WSC ID	JP番号	系統名	原産地
WSC 01	237348	大豊村在来	日本(高知県)
WSC 02	237349	夕カキミ	日本(岩手県)
WSC 03	237350	池田町松尾在来	日本(徳島県)
WSC 04	237351	高知大川在来	日本(高知県)
WSC 05	237352	DANGOMOROKOSHI	日本(茨城県)
WSC 06	237353	トキビ	日本(三重県)
WSC 07	237354	姫城在来	日本(兵庫県)
WSC 08	237355	菊池在来	日本(熊本県)
WSC 09	237356	赤穂	日本(群馬県)
WSC 10	237357	神奈川在来	日本(神奈川県)
WSC 11	237358	72-10-10-5	日本(高知県)
WSC 12	237359	半月当水	朝鮮半島
WSC 13	237360	光州在来種	朝鮮半島
WSC 14	237361	CHAL WAXY SORGHUM	朝鮮半島
WSC 15	237362	紅棒子	朝鮮半島
WSC 16	237363	MOCTAC LOCAL	韓国
WSC 17	237364	千斤白	朝鮮半島
WSC 18	237365	春川在来種	韓国
WSC 19	237366	72-8-13	台湾
WSC 20	237367	AI HUI	中華人民共和国
WSC 23	237370	LIAOZA 1	中華人民共和国
WSC 24	237371	BIG WHITE HULL	中華人民共和国
WSC 25	237372	XIONG YUE 334	中華人民共和国
WSC 26	237373	BATTANBAN	カンボジア
WSC 27	237374	AS 5781 HUAN SA PHAUNG AH LPYSU 2	ミャンマー(ビルマ)
WSC 28	237375	Y. E. (I. P.) INT. TYPE	インド
WSC 29	237376	KALJANPUR	インド
WSC 30	237377	SC NO.0217 CI1197	インド
WSC 31	237378	GOOSENECK	インド
WSC 32	237379	MARIANGARI JORA MUDDAHIHAL	インド
WSC 33	237380	DHOOTI ANEHULA	インド
WSC 34	237381	RABI YANGAR JORA MITHUGADUR	インド
WSC 35	237382	AS 4136 MASAKA LUWEMEA	インド
WSC 36	237383	COL/PAK/1989/IBPGR/2386(2)	パキスタン
WSC 37	237384	COL/PAK/1991/IBPGR/2724(2)	パキスタン

Table 4-1 供試したソルガム系統 (続き)

WSC ID	JP番号	系統名	原産地
WSC 38	237385	COL/PAK/1989/IBPGR/2420(1)	パキスタン
WSC 39	237386	COL/PAK/1989/IBPGR/2427(5)	パキスタン
WSC 40	237387	COL/PAK/1989/IBPGR/2439(1)	パキスタン
WSC 41	237388	COL/PAK/1989/IBPGR/2444(1)	パキスタン
WSC 42	237389	COL/PAK/1989/IBPGR/2550(1)	パキスタン
WSC 43	237390	COL/PAK/1989/IBPGR/2553(4)	パキスタン
WSC 44	237391	COL/PAK/1989/IBPGR/2411(1)	パキスタン
WSC 45	237392	COL/PAK/1989/IBPGR/2416(2)	パキスタン
WSC 46	237393	COL/PAK/1989/IBPGR/2592(7)	パキスタン
WSC 47	237394	87-9-21-3-1	パキスタン
WSC 48	237395	87-9-21-3-2	パキスタン
WSC 49	237396	PI 220636 Q 2/3/56	アフガニスタン
WSC 50	237397	PI 220636 Q 2/3/56	アフガニスタン
WSC 51	237398	ALLAKH	バングラデシュ
WSC 52	237399	EC 18868	ネパール
WSC 53	237400	JUNELO	ネパール
WSC 54	237401	PI 229486 VULGARE	イラン
WSC 55	237402	HAZERA 6014	イスラエル
WSC 56	237403	E 9	チャド
WSC 57	237404	PI 282834	チャド
WSC 58	237405	E 17	チャド
WSC 59	237406	MAKHOTLONG I	レソト
WSC 60	237407	TENANT WHITE	レソト
WSC 61	237408	NYAKASOBA BEST	レソト
WSC 62	237409	AIT BRAHIM	モロッコ
WSC 63	237410	CODY	モロッコ
WSC 64	237411	KOURNIA	モロッコ
WSC 65	237412	PHATSAI	モロッコ
WSC 66	237413	SCHROCK	モロッコ
WSC 67	237414	ESHOME	モロッコ
WSC 68	237415	E 232 INGWARUMA PEARLY	南アフリカ共和国
WSC 69	237416	AW 70/12 DL/59/1532	南アフリカ共和国
WSC 70	237417	E 233 BARNARD RED	南アフリカ共和国
WSC 71	237418	RED KAFIR	南アフリカ共和国
WSC 72	237419	S.BASUTORUM DL/60/97	南アフリカ共和国

Table 4-1 供試したソルガム系統 (続き)

WSC ID	JP番号	系統名	原産地
WSC 73	237420	EAR FROM PIETESBURG DL/60/107	南アフリカ共和国
WSC 74	237421	MILO PET. 139/51 EX TANGANYIKA	中央アフリカ
WSC 75	237422	HEGARI MALOWAR	スーダン
WSC 76	237423	143 DINDERAWI 1	スーダン
WSC 77	237424	REDBINE 655	スーダン
WSC 78	237425	E 1089	スーダン
WSC 79	237426	LAMBAS	スーダン
WSC 80	237427	DINDERAWI 1	スーダン
WSC 81	237428	240 WAD UMM BENEIN	スーダン
WSC 82	237429	MUGBASH WHITE	スーダン
WSC 83	237430	B-112	スーダン
WSC 84	237431	E 1091	スーダン
WSC 85	237432	109 TONJI	スーダン
WSC 86	237433	ZA113 DAWA PAS PARA	ナイジェリア
WSC 87	237434	AS 4547 JARDIRA	ナイジェリア
WSC 88	237435	MN 1277 MUHEYAR	ナイジェリア
WSC 89	237436	KA 24	ナイジェリア
WSC 90	237437	MN 401	アルジェリア
WSC 91	237438	S. VULGARE 72-726-7	ウガンダ
WSC 92	237439	S. VULGARE 72-728-1	ウガンダ
WSC 93	237440	E 276 FRAMIDA	ウガンダ
WSC 94	237441	UGANDA L 1	ウガンダ
WSC 95	237442	MORABA 74	エチオピア
WSC 96	237443	THIBA RED	エチオピア
WSC 97	237444	SC 112	エチオピア
WSC 98	237445	GIZA 3/59	エチオピア
WSC 99	237446	PI 329762	エチオピア
WSC 100	237447	AKLMOI WHITE	ケニア
WSC 101	237448	E 959	ケニア
WSC 102	237449	PI 152748 C	ケニア
WSC 103	237450	WAD YABOO 132/53	ジンバブエ
WSC 104	237451	CAPE COLO 28/53	ジンバブエ
WSC 105	237452	TSETA LOCAL NATURE TYPE 27/51	ジンバブエ
WSC 106	237453	AS 4637 NHORONGO NENPI	タンザニア
WSC 107	237454	E 37	タンザニア

Table 4-2 栽培場所の環境条件と栽培条件の詳細

試験区	緯度	経度	高度 (m)	播種日	畝間 (cm)	土壌 特性	前作 作物	施肥条件 (N:P:K, kg/ha)	灌水 (回)
コービルパティ 乾季 (KD)	N09° 12'	E77° 53'	166	2012年11月7日	60	Black- clay	Cotton	40 : 20 : 20	2
コインパトール 乾季 (CD)	N11° 01'	E76° 56'	412	2014年2月19日	60	Clay- loam	Bean	90 : 40 : 40	4
コインパトール 雨季 (CR)	N11° 01'	E76° 56'	412	2013年7月3日	60	Clay- loam	Bean	90 : 40 : 40	4
つくば市 雨季 (TR)	N36° 02'	E140° 06'	23	2014年5月28日	80	Loam	Bean	52 : 72 : 56	0

Table 4-3A KDまたはTRで種子を生産しなかった系統の開花/出穂日、積算温度、1穂あたり種子粒数

WSC ID	開花/出穂日				播種から開花/出穂までの積算温度(°C)				1穂あたり種子粒数(粒)			
	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR
WSC 02	1月9日	4月15日	8月26日	8月18日	1,122	1,084	953	1,268	\$	200	300	750
WSC 07	1月11日	4月17日	8月28日	#	1,151	1,125	990	#	300	300	420	
WSC 08	*	4月11日	8月21日	#	*	999	863	#	*	400	450	
WSC 11	*	4月18日	8月29日	8月25日	*	1,145	1,009	1,402	*	600	560	2,700
WSC 19	1月17日	4月15日	8月26日	8月18日	1,246	1,084	953	1,268	\$	200	200	890
WSC 30	*	4月11日	8月20日	9月8日	*	999	844	1,592	*	200	950	1,700
WSC 37	1月15日	4月7日	8月24日	8月5日	1,215	913	917	1,036	*	300	480	500
WSC 39	\$	4月14日	8月24日	8月8日	\$	1,062	917	1,098	\$	200	400	740
WSC 42	1月12日	4月6日	8月20日	8月8日	1,168	891	844	1,098	\$	200	400	2,800
WSC 64	*	4月15日	8月27日	8月5日	*	1,084	972	1,036	*	300	400	2,900
WSC 66	1月13日	4月13日	8月24日	8月19日	1,185	1,042	917	1,287	\$	400	400	1,500
WSC 79	1月7日	4月13日	8月24日	#	1,086	1,042	917	#	90	90	80	
WSC 80	1月8日	4月13日	8月23日	#	1,105	1,042	899	#	100	50	200	
WSC 82	1月7日	4月6日	8月18日	#	1,086	891	807	#	30	60	100	
WSC 89	1月11日	4月11日	8月20日	8月11日	1,151	999	844	1,148	*	200	340	790
WSC 91	1月15日	4月11日	8月20日	#	1,215	999	844	#	30	300	370	
WSC 92	1月9日	4月13日	8月24日	#	1,122	1,042	917	#	100	100	100	
WSC 93	1月10日	4月18日	8月29日	#	1,136	1,145	1,009	#	100	60	90	
WSC 94	*	4月20日	8月31日	#	*	1,187	1,046	#	*	200	200	#
WSC 99	*	4月17日	8月28日	9月8日	*	1,125	990	1,592	*	200	200	1,100
WSC 100	*	4月15日	8月27日	9月16日	*	1,084	972	1,691	*	200	300	3,000
WSC 101	1月10日	4月20日	8月31日	8月15日	1,136	1,187	1,046	1,218	*	300	340	1,300
WSC 102	*	4月21日	9月1日	8月25日	*	1,209	1,066	1,402	*	90	200	780
WSC 103	1月9日	4月21日	9月1日	#	1,122	1,209	1,066	#	100	90	200	#
WSC 107	1月8日	4月18日	8月29日	#	1,105	1,145	1,009	#	100	100	200	#
最小(最短)	-	(4月6日)	(8月18日)	(8月5日)	1,086	891	807	1,036	30	50	80	500
最大(最長)	-	(4月21日)	(9月1日)	-	1,246	1,209	1,066	1,691	300	600	950	3,000
平均(中央値)	-	(4月15日)	(8月26日)	-	(1,136)	(1,084)	(953)	(1,268)	110	210	310	1,500
標準偏差					46	90	75	207	70	130	190	900

虫害(*), 出穂遅延(#), その他理由(\$), その他理由が得られなかった系統のデータは除外した。

Table 4-3B 4試験区で共通して種子を生産した系統の開花/出穂日、積算温度、1穂あたり種子粒数

WSC ID	開花/出穂日				播種から開花/出穂までの積算温度(°C)				1穂あたり種子粒数(粒)			
	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR
WSC 01	1月11日	4月15日	8月26日	8月8日	1,151	1,084	953	1,098	750	710	600	1,500
WSC 03	1月8日	4月13日	8月24日	9月8日	1,105	1,042	917	1,592	570	460	400	740
WSC 04	1月10日	4月13日	8月24日	8月18日	1,136	1,042	917	1,268	310	300	410	1,200
WSC 05	1月7日	4月13日	8月23日	8月4日	1,086	1,042	899	1,016	910	570	440	2,500
WSC 06	1月8日	4月13日	8月23日	8月7日	1,105	1,042	899	1,078	100	200	380	1,600
WSC 09	1月8日	4月7日	8月21日	7月28日	1,105	913	863	887	200	200	440	670
WSC 10	1月7日	4月13日	8月24日	8月7日	1,086	1,042	917	1,078	890	770	540	5,100
WSC 12	1月10日	4月11日	8月21日	7月25日	1,136	999	863	827	200	200	520	2,400
WSC 13	1月9日	4月11日	8月21日	7月28日	1,122	999	863	887	670	640	430	1,100
WSC 14	1月12日	4月13日	8月23日	8月4日	1,170	1,042	899	1,016	250	390	330	1,500
WSC 15	1月10日	4月13日	8月23日	8月4日	1,136	1,042	899	1,016	300	300	560	1,700
WSC 16	1月20日	4月13日	8月24日	8月6日	1,295	1,042	917	1,057	200	100	570	2,800
WSC 17	1月10日	4月15日	8月26日	8月1日	1,136	1,084	953	956	300	200	200	1,400
WSC 18	1月11日	4月14日	8月25日	8月4日	1,151	1,062	935	1,016	170	100	300	2,100
WSC 20	1月10日	4月13日	8月23日	7月28日	1,136	1,042	899	887	310	90	200	830
WSC 23	1月11日	4月8日	8月21日	8月15日	1,151	935	863	1,218	60	300	300	1,200
WSC 24	1月7日	4月13日	8月23日	7月31日	1,086	1,042	899	937	70	60	200	520
WSC 25	1月8日	4月13日	8月23日	7月30日	1,105	1,042	899	920	20	100	300	2,500
WSC 26	1月7日	4月8日	8月21日	7月30日	1,086	935	863	920	30	200	300	1,100
WSC 27	1月9日	4月13日	8月24日	8月25日	1,122	1,042	917	1,402	100	200	400	520
WSC 28	1月12日	4月11日	8月21日	8月18日	1,168	999	863	1,268	40	200	560	830

Table 4-3B 4試験区で共通して種子を生産した系統の開花/出穂日、積算温度、1穂あたり種子粒数(続き)

WSC ID	開花/出穂日				播種から開花/出穂までの積算温度(°C)				1穂あたり種子粒数(粒)			
	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR
WSC 29	1月8日	4月13日	8月24日	8月18日	1,105	1,042	917	1,268	100	200	340	2,700
WSC 31	1月10日	4月18日	8月29日	8月19日	1,136	1,145	1,009	1,287	100	100	670	2,000
WSC 32	1月13日	4月7日	8月18日	8月8日	1,185	913	807	1,098	50	100	400	1,800
WSC 33	1月8日	4月9日	8月19日	8月12日	1,105	957	826	1,168	100	100	200	2,100
WSC 34	1月10日	4月14日	8月25日	9月22日	1,136	1,062	935	1,751	100	100	200	670
WSC 35	1月13日	4月15日	8月27日	8月12日	1,185	1,084	972	1,168	100	100	200	2,100
WSC 36	1月13日	4月5日	8月16日	7月28日	1,185	869	771	887	40	200	300	200
WSC 38	1月7日	4月5日	8月16日	8月18日	1,086	869	771	1,268	60	60	200	1,100
WSC 40	1月8日	4月5日	8月25日	8月26日	1,105	869	935	1,418	30	100	300	1,100
WSC 41	1月10日	4月11日	8月14日	8月4日	1,136	999	736	1,016	100	90	100	1,500
WSC 43	1月11日	4月11日	8月21日	8月1日	1,151	999	863	956	40	300	460	1,500
WSC 44	1月12日	4月7日	8月16日	7月30日	1,168	913	771	920	70	100	480	1,600
WSC 45	1月10日	4月8日	8月26日	8月6日	1,136	935	953	1,057	50	200	320	770
WSC 46	1月8日	4月9日	8月19日	8月21日	1,105	957	826	1,328	60	100	200	2,300
WSC 47	1月15日	4月7日	8月24日	8月21日	1,215	913	917	1,328	80	100	200	2,500
WSC 48	1月17日	4月13日	8月24日	8月21日	1,246	1,042	917	1,328	430	440	430	3,800
WSC 49	1月13日	4月13日	8月23日	8月19日	1,185	1,042	899	1,287	40	90	200	880
WSC 50	1月7日	4月13日	8月23日	8月13日	1,086	1,042	899	1,184	80	90	200	1,600
WSC 51	1月10日	4月13日	8月24日	8月27日	1,136	1,042	917	1,432	100	200	300	300
WSC 52	1月11日	4月8日	8月17日	8月6日	1,151	935	788	1,057	100	100	200	1,100
WSC 53	1月7日	4月7日	8月16日	8月4日	1,086	913	771	1,016	100	70	200	450

Table 4-3B 4試験区で共通して種子を生産した系統の開花/出穂日、積算温度、1穂あたり種子粒数(続き)

WSC ID	開花/出穂日				播種から開花/出穂までの積算温度(°C)				1穂あたり種子粒数(粒)			
	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR
WSC 54	1月10日	4月8日	8月16日	8月5日	1,136	935	788	1,036	70	200	300	1,600
WSC 55	1月11日	4月13日	8月24日	8月11日	1,151	1,042	917	1,148	40	60	100	540
WSC 56	1月8日	4月7日	8月18日	8月25日	1,105	913	807	1,402	60	60	100	1,500
WSC 57	1月7日	4月11日	8月21日	8月7日	1,086	999	863	1,078	50	80	200	1,500
WSC 58	1月7日	4月13日	8月24日	8月5日	1,086	1,042	917	1,036	100	100	300	1,600
WSC 59	1月10日	4月11日	8月20日	8月1日	1,136	999	844	956	30	60	100	400
WSC 60	1月10日	4月12日	8月22日	8月12日	1,136	1,020	881	1,168	70	200	300	1,000
WSC 61	1月11日	4月13日	8月24日	8月6日	1,151	1,042	917	1,057	200	300	400	440
WSC 62	1月12日	4月13日	8月24日	7月29日	1,168	1,042	917	904	50	200	290	1,000
WSC 63	1月10日	4月17日	8月28日	8月6日	1,136	1,125	990	1,057	40	100	200	1,300
WSC 65	1月10日	4月8日	8月19日	8月5日	1,136	935	826	1,036	70	70	100	840
WSC 67	1月8日	4月13日	8月24日	8月5日	1,105	1,042	917	1,036	70	90	300	2,100
WSC 68	1月10日	4月18日	8月29日	8月4日	1,136	1,145	1,009	1,016	80	100	200	1,400
WSC 69	1月8日	4月11日	8月20日	8月5日	1,105	999	844	1,036	80	90	100	1,100
WSC 70	1月9日	4月13日	8月23日	8月11日	1,122	1,042	899	1,148	300	300	400	1,400
WSC 71	1月11日	4月13日	8月24日	9月17日	1,151	1,042	917	1,705	100	100	310	5,500
WSC 72	1月10日	4月5日	8月14日	8月5日	1,136	869	736	1,036	60	80	100	2,400
WSC 73	1月10日	4月17日	8月28日	8月7日	1,136	1,125	990	1,078	30	100	200	670
WSC 74	1月8日	4月7日	8月19日	8月26日	1,105	913	826	1,418	80	200	200	200
WSC 75	1月9日	4月8日	8月17日	8月5日	1,122	935	788	1,036	60	90	100	1,600
WSC 76	1月8日	4月15日	8月27日	9月17日	1,105	1,084	972	1,705	50	100	200	2,700

Table 4-3B 4試験区で共通して種子を生産した系統の開花/出穂日、積算温度、1穂あたり種子粒数(続き)

WSC ID	開花/出穂日				播種から開花/出穂までの積算温度(°C)				1穂あたり種子粒数(粒)			
	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR	KD	CD	CR	TR
WSC 77	1月7日	4月6日	8月15日	8月19日	1,086	891	754	1,287	90	200	330	300
WSC 78	1月11日	4月8日	8月17日	8月12日	1,151	935	788	1,168	100	200	200	1,400
WSC 81	1月8日	4月13日	8月23日	9月16日	1,105	1,042	899	1,691	90	200	200	1,300
WSC 83	1月10日	4月11日	8月21日	8月26日	1,136	999	863	1,418	50	100	200	1,400
WSC 84	1月9日	4月13日	8月24日	9月12日	1,122	1,042	917	1,641	70	300	400	2,200
WSC 85	1月9日	4月7日	8月19日	7月30日	1,122	913	826	920	100	100	100	790
WSC 86	1月8日	4月8日	8月19日	8月12日	1,105	935	826	1,168	60	100	300	550
WSC 87	1月7日	4月17日	8月28日	8月22日	1,086	1,125	990	1,347	80	80	100	400
WSC 88	1月12日	4月18日	8月29日	8月5日	1,168	1,145	1,009	1,036	100	200	320	1,100
WSC 90	1月12日	4月19日	8月30日	8月29日	1,168	1,166	1,028	1,454	80	100	200	2,900
WSC 95	1月10日	4月20日	8月31日	8月5日	1,136	1,187	1,046	1,036	40	200	200	760
WSC 96	1月11日	4月21日	9月1日	8月25日	1,151	1,209	1,066	1,402	50	200	200	880
WSC 97	1月9日	4月21日	9月1日	8月7日	1,122	1,209	1,066	1,078	50	200	290	520
WSC 98	1月10日	4月20日	8月31日	9月2日	1,136	1,187	1,046	1,506	90	100	200	370
WSC 104	1月10日	4月13日	8月24日	8月6日	1,136	1,042	917	1,057	90	100	200	830
WSC 105	1月12日	4月13日	8月24日	8月19日	1,168	1,042	917	1,287	40	400	310	490
WSC 106	1月10日	4月13日	8月24日	8月19日	1,136	1,042	917	1,287	30	200	200	1,300
最小(最短)	(1月7日)	(4月5日)	(8月14日)	(7月25日)	1,086	869	736	827	20	60	110	200
最大(最長)	(1月20日)	(4月21日)	(9月11日)	(9月22日)	1,295	1,209	1,066	1,751	910	770	670	5,500
平均(中央値)	(1月10日)	(4月13日)	(8月23日)	(8月7日)	(1,136)	(1,042)	(899)	(1,078)	140	190	280	1,400
標準偏差					36	82	76	218	180	140	130	970

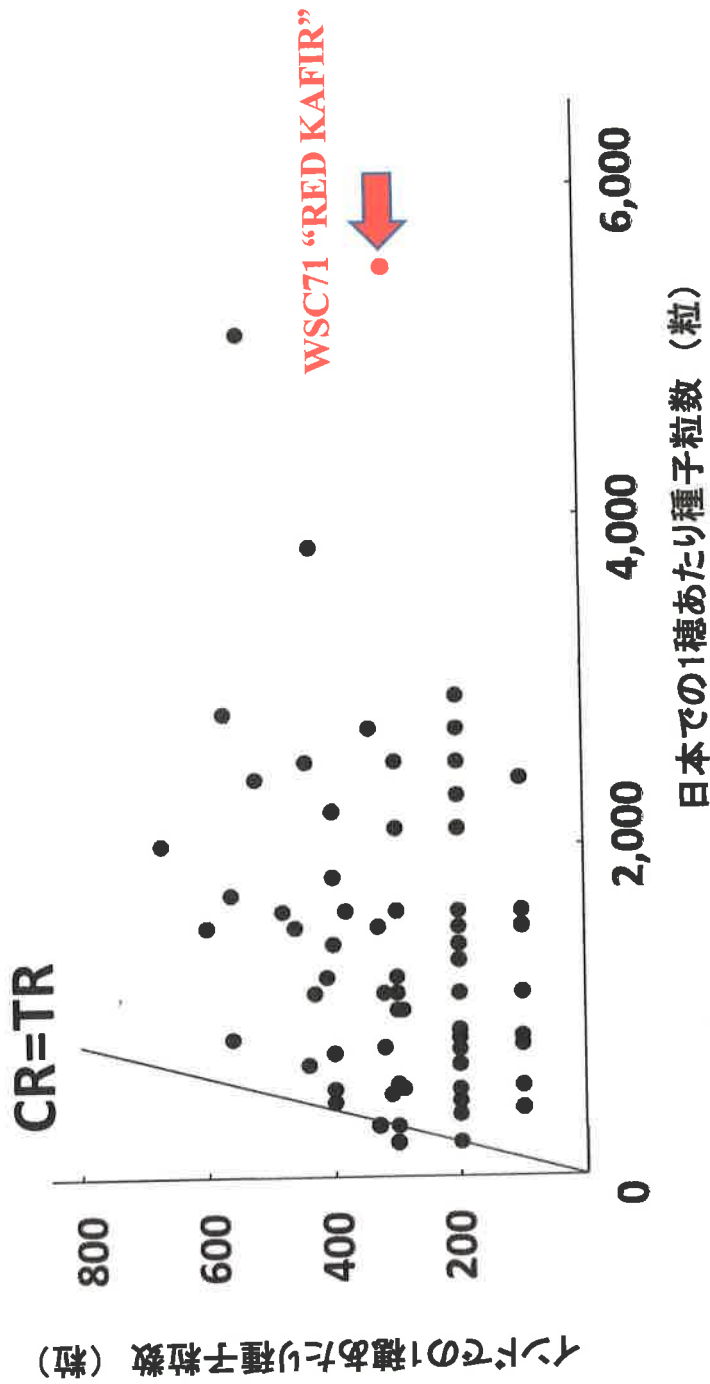


Figure 4-1 インドー日本における1穂あたり種子粒数の比較

インドと日本で共通して採種できた80系統の1穂あたり種子粒数を比較したところ、76系統(95%)が日本で種子生産性が高かった。特に、南アフリカ共和国原産のWSC71 "RED KAFIR" (赤丸印)は極めて高い種子生産性(5,500粒/穂)を示した。図中の直線はインドー日本で1穂あたり種子粒数が等しいことを表す。

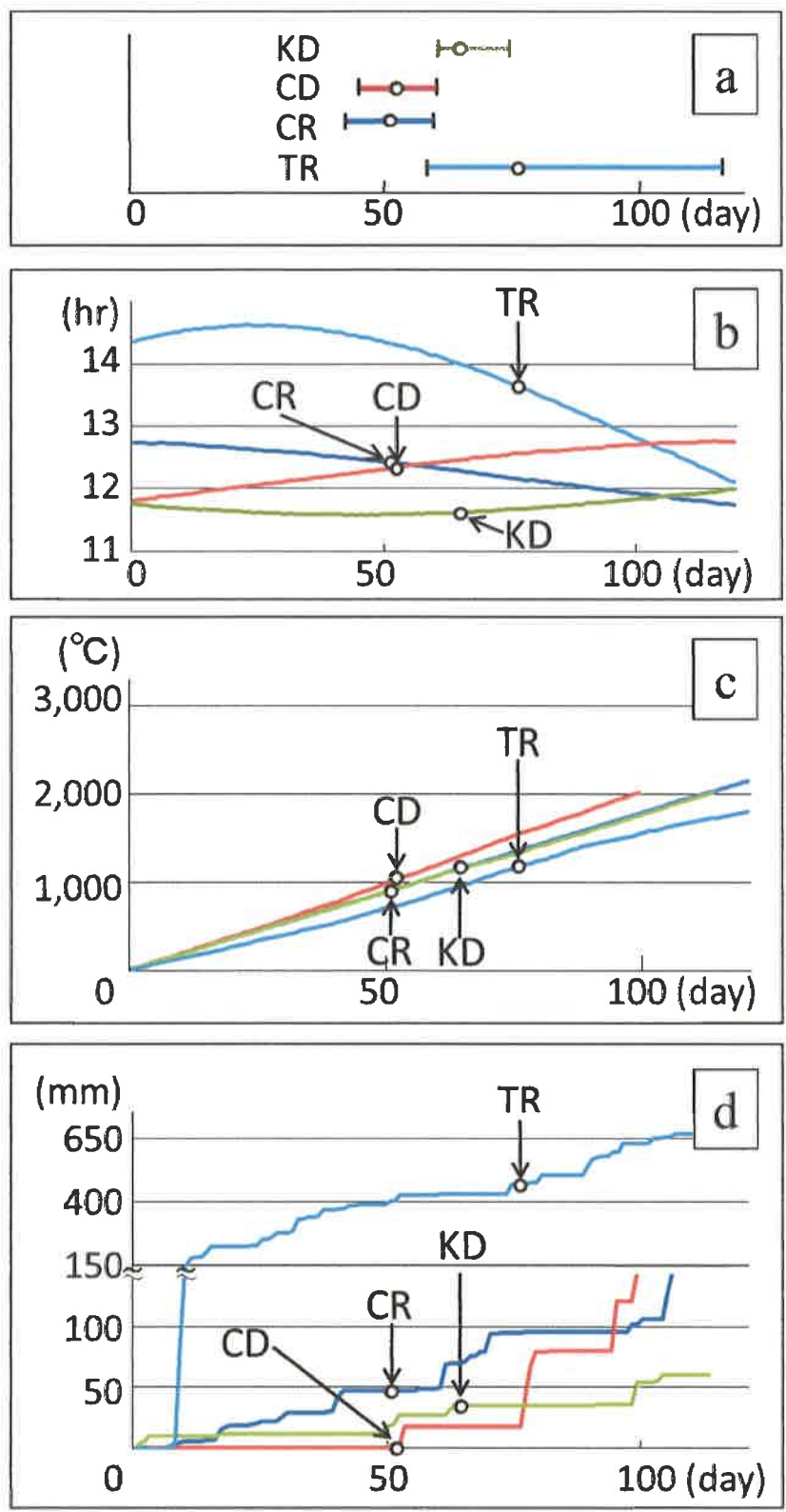


Figure 4-2 栽培中の気候条件

4試験区の播種日から120日目までの気候条件を示した。全系統の50%が開花/出穂に達した日数を(O)で示した。a: 播種から開花/出穂までの日数、b: 理論上の日長、c: 積算温度、d: 積算降水量

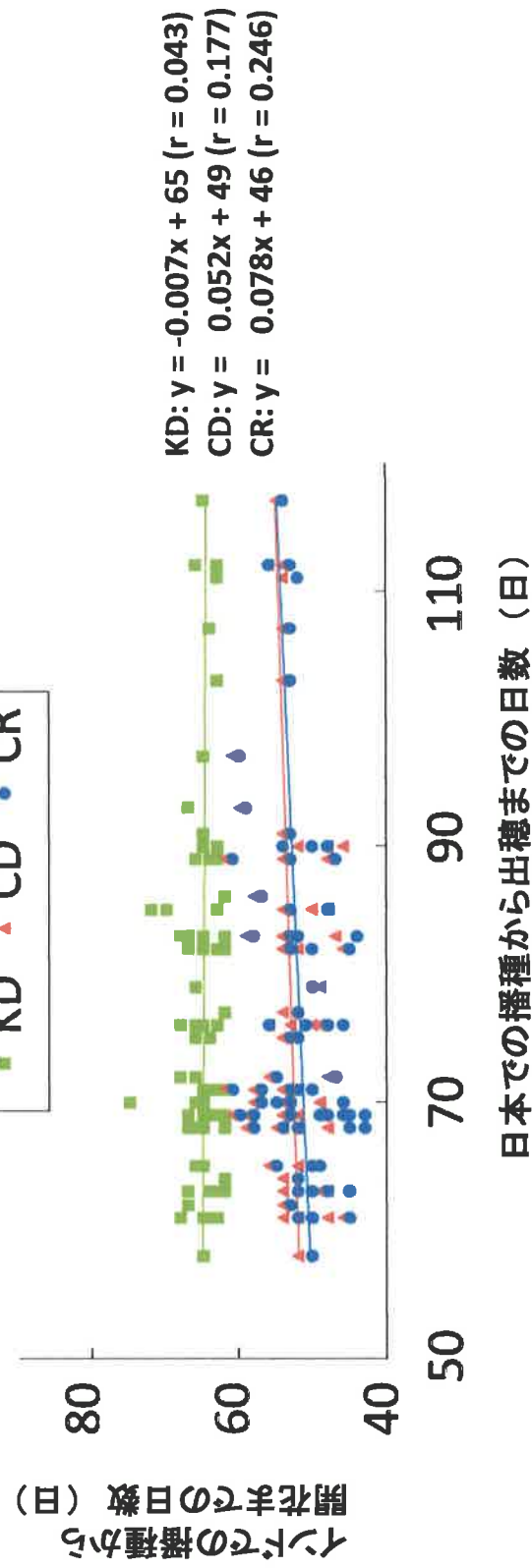


Figure 4-3 インドー日本における播種から開花/出穂までの日数の分布

インドと日本におけるソルガム80系統の播種から開花/出穂までの日数を比較した。インド3試験区での播種から開花までの日数と日本での播種から出穂までの日数との間に相関は殆どなかった。図中の直線は、インド3試験区における播種から開花までの日数と日本における播種から出穂までの日数の回帰直線を示す。相関係数を()で示す。

第5章 結論

世界的な環境の変動に対応した農作物の新品種を開発するためには、植物遺伝資源をさらに利用することが不可欠である。そのため、植物遺伝資源の遺伝的多様性をいかに検出し、利用するかが課題となっていた。

本研究は、植物の遺伝的多様性の検出技術の開発と産業利用を促進することを目的として行った。

5.1. 組織培養におけるゲノム改変の検出

本章では、遺伝的多様性の検出技術を開発することを目的に、組織培養で得られたイネクローン植物体のゲノム改変を RLGS 法で分析した。

その結果、161 スポットが検出され、10 スポットがラメート間で多型を示した。メチル化感受性の制限酵素を用いて多型スポットのメチル化状態を調べた結果、ひとつの種子由来のクローン植物体の中でメチレーション変異が生じたことが明らかになった。

以上から、本章では遺伝的多様性の検出技術を開発して、組織培養によるクローン植物体のゲノム改変の事例を示した。

5.2. 栄養繁殖作物の DNA 品種識別マーカーの開発

本章では、我が国のイグサ登録品種「ひのみどり」の知的財産権を保護するため、RLGS 法で検出された遺伝的多様性を利用した「ひのみどり」の品種識別 DNA マーカーの開発に取り組んだ。

品種間で多型を示すスポットをクローニングして配列特異的なプライマーを作製することで、PCR でイグサ 18 品種・系統から「ひのみどり」を特異的に識別することが可能な DNA マーカーを開発した。この技術は他の栄養繁殖作物にも利用することができ、不正な逆輸入を防止する上での利用が期待される。

以上から、本章では遺伝的多様性の解析結果から、税関等で利用可能な、農作物の知的財産権を守る技術を開発した。

5.3. 多様性に富む品種集団を用いた種子生産性の解析

本章では、DNA 多型で選定されたソルガムコアコレクションを用いて、日本とインドで栽培試験を行い、種子の生産性を解析した。

開花/出穂特性については、インドでは短期間に開花が集中する一方、日本では出穂日に3倍以上のバラつきがみられた。このことから、ソルガムの開花/出穂特性を解析する上では、インドより日本で遺伝的な差異を明瞭に判別できることを明らかにした。インドでは2試験区ですべての品種を採種できた一方、日本では種子を増殖できない品種が存在した。そのため、ソルガムの安定栽培にはインドのような低緯度地域が適当であり、インド国内でも栽培環境の違いで種子生産性が大きく変化することを明らかにした。1穂あたりの種子粒数は雨が多い日本が最多であったことと積算降水量を併せて考えると、ソルガムは乾燥した熱帯原産の作物だが、多くの種子を得るためには日本のような十分量の雨が必要だと考えられた。そして、WSC71 “RED KAFIR” (南アフリカ共和国原産) が日本での栽培環境で極めて高い種子生産性 (1穂あたり 5,500粒) を示すことを見出した。

以上から、本章では多様なソルガムコアコレクションを用いて栽培試験を行うことで、種子生産性が高い品種を見出すことができた。

5.4. 今後の展望

以上のように、本研究で植物の遺伝的多様性の検出と利用のモデルケースを示すことができた。近年は次世代シーケンサー等が普及することで遺伝的多様性の検出が以前よりきわめて容易になったことから、検出された遺伝的多様性を効果的に利用するための技術開発がさらに重要な課題となっている [56]。本研究のような事例を積み重ねることで、ジーンバンク等に保存されている遺伝資源の活用が促進されると思われる。未探索の地域からの新規在来品種や農作物近縁種の潜在的価値はさらに高まるであろう。今後、農作物の新品種開発における遺伝的多様性の高度な利用が期待される。

第6章 参考文献

- [1] Kasada, M. et al. (2014) Form of an evolutionary tradeoff affects eco-evolutionary dynamics in a predator-prey system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 16035-16040.
- [2] 福田一郎 (1995) 21世紀への遺伝学VI 応用遺伝学. 裳華房, 東京.
- [3] Harlen, J. R. (1984) 作物の進化と農業・食糧 (熊田恭一・前田英三訳). 学会出版センター, 東京.
- [4] 増田亮一 (2011) シリーズー研究小集会 (第4回) 大豆部会 品質成分からみた国産大豆の特徴と利用. *日本食品科学工学会誌*, **58**, 548-551.
- [5] 斎藤陽子 (2018) 小麦遺伝的基盤の多様性と品種改良への貢献ー農業生物資源ジーンバンクデータの分析からー. *フロンティア農業経済学研究*, **20**, 82-95.
- [6] Mark van de Wouw. et al. (2011) Authenticity of old cultivars in genebank collections: a case study on lettuce. *Crop Sci.*, **51**, 736-746.
- [7] Hirano, R. et al. (2009) Consequences of ex situ conservation on the genetic integrity of germplasm held at different gene banks: a case study of bread wheat collected in Pakistan. *Crop Sci.*, **49**, 2160-2166.
- [8] Wright, B. D. (1997) Crop genetic resource policy: the role of ex situ genebanks. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, **41**, 1-35.
- [9] Hiei, Y. et al. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, **6**, 271-282.
- [10] Liu, Z. L. et al. (2004) Activation of a rice endogenous retrotransposon *Tos17* in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions. *Theor. Appl. Genet.*, **109**, 200-209.
- [11] Kaeppler, S. M. & Phillips, R. L. (1993) Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8773-8776.
- [12] Hirochika, H. et al. (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue

- culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 7783-7788.
- [13] Hatada, I. et al. (1991) A genomic scanning method for higher organisms using restriction sites as landmarks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9523-9527.
- [14] Hayashizaki, Y. et al. (1993) Restriction landmark genomic scanning method and its various applications. *Electrophoresis*, **14**, 251-258.
- [15] Ando, Y. & Hayashizaki, Y. (2006) Restriction landmark genomic scanning. *Nat. Protoc.*, **1**, 2774-2783.
- [16] Chu, C. C. et al. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.*, **18**, 659-668.
- [17] Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.*, **8**, 4321-4325.
- [18] Kawase, M. (1994) Application of the restriction landmark genomic scanning (RLGS) method to rice cultivars as a new fingerprinting technique. *Theor Appl Genet*, **89**, 861-864.
- [19] Takamiya, T. et al. (2006) Restriction landmark genome scanning method using isochizomers (*MspI/HpaII*) for DNA methylation analysis. *Electrophoresis*, **27**, 2846-2856.
- [20] Okuizumi, H. et al. (2011) Restriction landmark genome scanning. *In Epigenetics Protocols* (2nd ed.), ed. Trygve O, T., Humana Press, Birmingham, USA, 101-112.
- [21] Takamiya, T. et al. (2009) The application of restriction landmark genome scanning method for surveillance of non-mendelian inheritance in F1 hybrids. *Comp. Funct. Genomics*, **2009**, Article ID 245927, 6 pages.
- [22] Takamiya, T. et al. (2008) Inheritance and alteration of genome methylation in F1 hybrid rice. *Electrophoresis*, **29**, 4088-4095.
- [23] Okamoto, H. et al. (2006) Development of a new cultivar-discrimination method based on DNA polymorphism in a vegetatively propagated crop. *JARQ*, **40**, 65-69.
- [24] Mase, N. et al. (2007) Analysis of bud cultivars of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) by simple sequence repeats (SSR) and restriction landmark genomic scanning (RLGS). *J. Japan. Soc.*

Hort. Sci., **76**, 20-27.

- [25] Cheng, C. et al. (2006) Epigenetic regulation of the rice retrotransposon *Tos17*. *Mol. Gen. Genomics*, **276**, 378-390.
- [26] 中澤芳則他. (1999) 高品質ないぐさ新品種「ひのみどり」の育成. 日本作物学会九州支部会報, **65**, 44-45.
- [27] 野口真弓, 加古敏之 (2006) 中国からの畳表の輸入急増が国内の産地に与えた影響と政策対応. 農業問題研究, **42**, 207-210.
- [28] Sarri, V. et al. (2006) Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome*, **49**, 1606-1615.
- [29] Hanada, H. et al. (2003) Digoxigenin (DIG)-based AFLP analysis of three citrus cultivars. *JARQ*, **37**, 225-228.
- [30] Cabezas, J. A. et al. (2011) A 48 SNP set for grapevine cultivar identification. *BMC Plant Biol*, **11**, 4-12.
- [31] Kilian, A. et al. (2012) Diversity arrays technology: a genetic genome profiling technology on open platforms. *In* Data Production and Analysis in Population Genomics (Methods and Protocols), eds. Francois, P. & Aurelie, B., Humana Press, Grenoble, France, 67-89.
- [32] Jacob, H. J. (1996) A landmark for orphan genomes? *Nat Genet*, **13**, 14-15.
- [33] Watanabe, S. & Hayashizaki, Y. (1997) RLGS spot cloning. *In* Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS), ed. Hayashizaki, Y. & Watanabe, S., Springer-Verlag, Tokyo, 37-56.
- [34] Commission on genetic resources for food and agriculture (CGRFA) (2010) *The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture*. Rome, Italy, pp.370.
- [35] de Alencar Figueiredo, L. F. et al. (2008) Phylogeographic evidence of crop neodiversity in sorghum. *Genetics*, **179**, 997-1008.
- [36] Paterson, A. H. et al. (2009) The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature*, **457**, 551-556.
- [37] Okuno, K. et al. (2005) Plant genetic resources in Japan: platforms and destinations to conserve

- and utilize plant genetic diversity. *JARQ*, **39**, 231-237.
- [38] Takeya, M. et al. (2011) NIASGBdb: NIAS Genebank databases for genetic resources and plant disease information. *Nucl. Acids Res.*, **39**, D1108-D1113.
- [39] Takeya, M. et al. (2013) Systems for making NIAS Core Collections, single-seed-derived germplasm, and plant photo images available to the research community. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **60**, 1945-1951.
- [40] Frankel, O. H. (1984) Genetic perspectives of germplasm conservation. *In Genetic manipulation: Impact on man and society*, eds. Arber, W. et al., Cambridge University Press, Cambridge, USA, 161-170.
- [41] Shehzad, T. et al. (2009) Development of SSR-based sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) diversity research set of germplasm and its evaluation by morphological traits. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **56**, 809-827.
- [42] Kawahigashi, H. et al. (2013) A novel *waxy* allele in sorghum landraces in East Asia. *Plant Breeding*, **132**, 305-310.
- [43] Strelchenko, P. et al. (2010) Genetic relationships of sorghum germplasm in Asia and Africa revealed by rice cDNA-STS and indel markers. *JARQ*, **44**, 259-268.
- [44] EI Mannai, Y. et al. (2011) Variation in flowering time in sorghum core collection and mapping of QTLs controlling flowering time by association analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **58**, 983-989.
- [45] Witt Hmon K. P. et al. (2014) QTLs underlying inflorescence architecture in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) as detected by association analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **61**, 1545-1564.
- [46] Kawahigashi, H. et al. (2016) Classification of genotypes of leaf phenotype (*P / tan*) and seed phenotype (*Y1* and *Tan1*) in tan sorghum (*Sorghum bicolor*). *Plant Breeding*, **135**, 683-690.
- [47] Upadhyaya, H. D. et al. (2009) Developing a mini core collection of sorghum for diversified utilization of germplasm. *Crop Sci.*, **49**, 1769-1780.

- [48] Parthasarathi, T. P. et al. (2013) Impact of crop heat units on growth and developmental physiology of future crop production: A review. *RRJCST*, **2**, 1-11.
- [49] Jason, K. et al. (2004) *Grain sorghum production handbook*. Arkansas cooperative extension service, Arkansas, USA, 3-5.
- [50] Gerik, T. et al. (2003) *Sorghum growth and development*. Texas cooperative extension service, Texas, USA, pp.7.
- [51] Vanderlip, R. L. (1993) *How a sorghum plant develops*. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Kansas, USA, pp.19.
- [52] Tarumoto, I. (2011) Thermo-sensitivity and photoperiod sensitivity genes controlling heading time and flower bud initiation in sorghum, *Sorghum bicolor* Moench. *JARQ*, **45**, 1-7.
- [53] Yano, M. et al. (2001) Genetic control of flowering time in rice, a short-day plant. *Plant Physiology*, **127**, 1425-1429.
- [54] Yang, S. et al. (2014) *CONSTANS* is a photoperiod regulated activator of flowering in sorghum. *BMC Plant Biology*, **14**, 148-162.
- [55] Rogers, D. H. et al. (2016) Irrigation of grain sorghum. *In Sorghum: State of the art and future perspectives*, Agronomy Monographs 58, eds. Ignacio, C. & Vara, P., American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, WI 53711, USA, 1-13.
- [56] Onda, Y. & Mochida, K. (2016) Exploring genetic diversity in plants using high-throughput sequencing techniques. *Current Genomics*, **17**, 358-367.

主論文を構成する論文

1. Application of RLGS Method for Detection of Alteration in Tissue Cultured Plants

(組織培養植物における変異検出への RLGS 法の適用)

Tomoko TAKAMIYA, Yuhko OHTAKE, Saeko HOSOBUCHI, Tomotsugu NOGUCHI, Makoto KAWASE, Yasufumi MURAKAMI and Hisato OKUIZUMI

Japan Agricultural Research Quarterly, Vol. 42, Issue. 3, pp.151-155 (2008年7月)

2. A Sequence-tagged Site Marker for Identifying the Japanese Mat Rush (*Juncus effusus*) Cultivar 'Hinomidori'

(イグサ品種「ひのみどり」を識別する配列標識マーカー)

Tomotsugu NOGUCHI, Saeko HOSOBUCHI, Tomoko TAKAMIYA, Kazuhiko IIMURE, Akira SAITO, Yuhko OHTAKE, Hideji YAMASHITA, Yasufumi MURAKAMI and Hisato OKUIZUMI

Japan Agricultural Research Quarterly, Vol. 51, Issue. 1, pp.45-49 (2017年1月)

3. Seed productivity of genebank sorghum accessions in India (Tamil Nadu) and Japan (Tsukuba)

(インド (タミルナドゥ) と日本 (つくば) におけるソルガムアクセッションの種子生産性)

Tomotsugu NOGUCHI, Sivakumar SUBBARAYAN, Atsushi KIYOSAWA, Kazumi GOTOH, Yasufumi MURAKAMI and Hisato OKUIZUMI

Japan Agricultural Research Quarterly, in press (2019年11月5日受理通知あり)

学会発表

1. 高宮知子, 大竹祐子, 細渕朗子, 野口友嗣, 山中慎介, 西川智太郎, 小山朗夫, 河瀬眞琴, 村上康文, 奥泉久人, RLGS 法による植物培養変異の検出. 第 15 回日本 DNA 多型学会学術集会, 17, 福山, 11 月・2006 年
2. 細渕朗子, 高宮知子, 野口友嗣, 山下秀次, 山中慎介, 西川智太郎, 小山朗夫, 河瀬眞琴, 村上康文, 奥泉久人, イグサ品種「ひのみどり」特異的マーカーの開発. 第 15 回日本 DNA 多型学会学術集会, 15, 福山, 11 月・2006 年
3. 野口友嗣, Sivakumar Subbarayan, 奥泉久人, ソルガムコアコレクションを用いた出穂/開花特性の日印比較. 2018 年度日本草地学会熊本大会, 62, 熊本, 3 月・2018 年

謝辞

本論文は、2006年4月から2011年3月の5ヵ年の間、東京理科大学大学院基礎工学研究科生物工学専攻において行った研究および就職後学外で行った研究の成果をまとめたものであり、この間に多くの方々のご指導、ご協力を賜りましたことに心より感謝いたします。

本研究を行う貴重な機会を与え、終始ご指導ご鞭撻をいただきました村上康文教授に心より感謝いたします。また本研究を行うにあたって多大なご助言、ご協力いただきました小野田文俊氏、柏葉脩一郎氏、福岡聖之助教ならびに小机敦子氏に深く感謝いたします。

(国研) 農研機構遺伝資源センターの奥泉久人主席研究員、河瀬眞琴氏には本研究を行うに際して終始ご指導、ご協力をいただきましたことに心より感謝を申し上げます。高宮知子氏、細淵朗子氏をはじめとする本研究の共同研究者に多大な協力をいただいたことを記し、感謝いたします。また、本研究を行うにあたり、技術的なサポートをしていただいた高橋佐久子氏、野中絵梨氏に厚く感謝申し上げます。

本論文を作成するにあたりご指導、ご助言いただきました堀戸重臣教授、田村浩二教授、清水公德教授、太田尚孝教授ならびに東京理科大学基礎工学部生物工学科の先生方に深く感謝いたします。

最後に、村上研究室の皆様には充実した研究生活を送る上でご協力をしていただきましたことを心より感謝いたします。