

Short Report

次世代シーケンサーを利用したイネの低温発芽性に関わる QTL の同定

高橋秀和¹, 土田大介¹, 川本朋彦², 赤木宏守¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物生産科学科² 秋田県農業試験場作物部

イネの低温発芽性の改良は、稲作の省力化と低コストを可能とする直播栽培に適応できる品種の育成に重要である。我々は、「あきたこまち」と優れた低温発芽性を持つ「Arroz da Terra」との戻し交雑自殖系統群（BILs：あきたこまち//Arroz da Terra/あきたこまち）の BC₁F₈ 世代を用い、次世代シーケンサーを用いたバルクセグレガント法によって低温発芽性に関わる 5 個の量的形質遺伝子座（QTL：qLTG）を同定した。この内、第 4 染色体（qLTG4）、第 7 染色体（qLTG7）および第 11 染色体（qLTG11）の QTL は、「Arroz da Terra」由来の遺伝子型が低温発芽性を高めると考えられた。また、第 3 染色体（qLTG3）と第 6 染色体（qLTG6）の QTL は、「あきたこまち」由来の遺伝子型が低温発芽性を高め、これらが BILs において、「Arroz da Terra」を上回る低温発芽性を示す系統の超越分離をもたらしたものと考えられた。今後、本研究の BILs と次世代シーケンサーを利用することで、直播栽培に関わる様々な形質に関しても、QTL を短期間に同定できると期待される。

キーワード：イネ，低温発芽性，QTL，バルク法，次世代シーケンサー

直播栽培は稲作の省力化・低コスト化を可能にするため、これに適応した品種の育成が重要な育種目標に挙げられている。直播栽培に適応する品種に求められる形質として、低温や還元状態での出芽性と苗立ち性、耐倒伏性が挙げられている（山本 1990）。海外の品種の中に、これらの性質に優れた品種が存在することが知られており（平野 1978, 小高と安部 1988）、イタリア品種の「Italica Livorno」、ポルトガル品種の「Arroz da Terra」や旧ユーゴスラビア品種の「Maratteli」などを母本として直播適応品種の育成が進められてきたが、品質や食味不良など劣悪形質が随伴し、実用品種の開発には至っていない（堀末 1995）。

DNA マーカー選抜は特定の遺伝子のみを導入する方法として有効とされ、低温発芽性など直播適応性を向上させる遺伝子や遺伝子座を同定できれば、国内の優良品種に DNA マーカー選抜で劣悪形質を

随伴することなく外国品種から直播適応性のみを導入できると期待される。

イネの低温発芽性や低温苗立ち性に関して、量的形質遺伝子座（QTL）が様々な集団で解析されてきた（Miura et al. 2001, Fujino et al. 2004, Zhang et al. 2005, Jiang et al. 2006, Ji et al. 2008, Fukuda et al. 2014, Satoh et al. 2016）。我々は、旧ユーゴスラビアの品種「Maratteli」で見出した低温発芽性を高める QTL を持つ「あきたこまち」の準同質遺伝子系統（NIL）を育成し、導入した QTL によって NIL の低温発芽性が向上することを明らかにした（Satoh et al. 2016）。さらに、QTL の集積により低温発芽性は大きく向上したが（佐藤ら 2014）、低温苗立ち性は十分に向上しておらず、直播栽培に用いる品種を育成するためには異なる遺伝資源から低温苗立ち性を向上させる新たな QTL を特定し、それらも集積させる必要があると考えられた。

効率的にQTLを同定する方法として、バルクセグレガント解析と次世代シーケンサーによるゲノム解析を組み合わせたQTL-seq法が開発され (Takagi et al. 2013), 様々な植物種でQTL解析に利用されている

(Lu et al. 2014, Das et al. 2015). バルクセグレガント解析とは、表現型の異なる親品種を交雑した後代から、その表現型が明確に異なる2タイプの個体群を選び、それぞれの個体群についてゲノムDNAを混合したDNAプールを作成し、それを比較解析することで表現型と連鎖するDNAマーカーを得る方法である (Michelmore et al. 1991). このDNAプールのゲノムを次世代シーケンサーで解析することで、短期間で表現型と関連するQTLを特定することが可能となっている (Takagi et al. 2013, Sun et al. 2018).

我々は、これまで低温苗立ち性に優れるポルトガル品種の「Arroz da Terra」と低温苗立ち性が劣る「あきたこまち」との戻し交雑自殖系統群 (BILs: あきたこまち//Arroz da Terra/あきたこまち) を育成してきた. BILsのゲノム構成は両親のゲノムがランダムに混合したモザイク状となっているが、低温苗立ち性が優れるBILsの系統が共通して持つ「Arroz da Terra」または「あきたこまち」由来のゲノム領域には、低温苗立ち性を向上させる遺伝子が座乗しているものと考えられる.

そこで本研究では、低温苗立ち性に関わる形質として低温発芽性に着目し、BILsの中から低温発芽性に優れる系統と劣る系統を選抜し、それぞれの系統のDNAを混合したDNAプールのゲノム配列を次世代シーケンサーで解析し、低温発芽性を高めるQTLの特定を試みた.

材料と方法

供試材料

低温発芽性に優れるポルトガル品種の「Arroz da Terra」と、それが劣る「あきたこまち」を供試した. また、単粒系統法により育成した「あきたこまち」と「Arroz da Terra」との戻し交雑自殖系統群 (BILs: あきたこまち//Arroz da Terra/あきたこまち) (AT1~AT120) のBC₁F₈世代を用いた.

低温発芽性の解析

「Arroz da Terra」, 「あきたこまち」および93系統のBILsの種子を10%次亜塩素酸ナトリウムに15分間浸透した後、水道水で3回すすいで種子消毒を行った. 殺菌した種子50~80粒をφ60 mm ガラスシャーレに入れ、5 ml の水道水を入れてインキュベーター内に静置し、温度を15°C一定に保った. 幼芽が穎を破って出たものを発芽種子とし、発芽した種子数を14日間経日的に計測した (図1). 計測終了後、温度を25°Cにして未発芽種子の発芽能力を確認し、最終的に発芽した種子数を分母として発芽率を求めた. なお、実験は3反復行い、水道水は毎日、調査時に15°Cに保っておいた水道水と交換した.

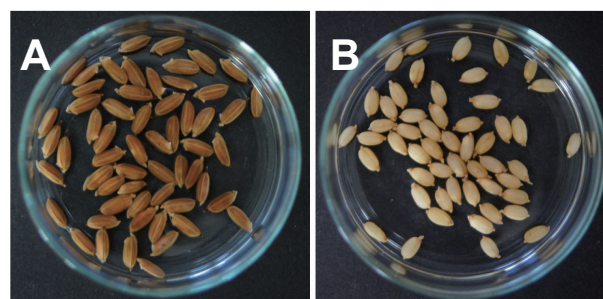


図1 低温発芽試験の写真 (15°C, 4日目)

A: 「Arroz da Terra」, B: 「あきたこまち」

DNA 抽出および次世代シーケンシング

低温発芽性が優れる5系統 (H-LTG) と低温発芽性が劣る5系統 (L-LTG) について、それぞれの葉身からCTAB法 (Murray and Thompson 1980) によりDNAを抽出した. 抽出したDNAをRNaseAで処理してRNAを分解した後、NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific 社) を用いてDNAを定量した. それぞれ5系統のDNAを等量混合したDNAプールを作成し、Illumina TruSeq DNA sample preparation Kit (Illumina 社) を用いてPCR freeでライブラリーを作成した. それぞれのライブラリーについて、Illumina HiSeqXTen (Illumina 社) で両側から150塩基を解読し、データ量12 Gb以上のリード配列を取得した. 各塩基のPhred Quality Scores (Q値) が30以上で、それが各リードの90%以上を占め、さらに両側から解読された精度の高いリード配列のみを抽出して解析に用いた.

QTL-Seq 解析

解析ソフト QTL-seq を用い、低温発芽性に関わる QTL を検出した (Takagi et al. 2013). まず, Illumina HiSeq1000 (Illumina 社) で取得した「あきたこまち」のリード配列を IRGSP-1.0 に対してアライメントし、「あきたこまち」の配列に置き換えた仮想的なリファレンス配列を構築した. このリファレンス配列に対して H-LTG および L-LTG の配列をアライメントして DNA プール毎に SNP を検出し, 各 SNP についてアライメントされたリード数から SNP-index (「あきたこまち」型と「Arroz da Terra」型の割合) を算出し, プロットした. ただし, SNP-index が 0.3 未満, Depth が 10 以下の SNP は除外した. また, 各 SNP について SNP-index の統計的な信頼区間 (90%, 95%, 99%) を 1 万回のシミュレーションにより計算した. window サイズ 1 Mb, window 移動量 50 kb の条件で Sliding window 解析を行い, それぞれの DNA プールの平均 SNP-index と Δ SNP-index を計算した.

結果と考察

組換え自殖系統 (BILs) の低温発芽性

「Arroz da Terra」と「あきたこまち」との BILs を 15°C 一定の条件で発芽させた. 播種後 4 日目の発芽率は, 「Arroz da Terra」が 48%, 「あきたこまち」が 1% であった (図 1, 2). これに対して BILs では, 発芽率が 4~95% と幅広い変異を示し, 「Arroz da

Terra」よりも発芽率が高い系統が多数存在していた (図 2). このことから, 低温発芽性には複数の遺伝子が関与しており, 「Arroz da Terra」と組み合わせた場合, 「あきたこまち」にも低温発芽性を向上させる対立遺伝子が存在すると考えられた.

バルクセグレガント解析で低温発芽性に関わる QTL を解析するため, 明確に低温発芽性が異なる BILs を選抜した. すなわち, 低温発芽性が優れる系統 (H-LTG) として, AT24, AT53, AT71, AT105 および AT117 の 5 系統を, 低温発芽性が劣る系統 (L-LTG) として, AT1, AT14, AT66, AT67 および AT69 の 5 系統を選抜した (図 2).

バルク法による QTL-seq 解析

本研究で用いた BILs は, 「Arroz da Terra」または「あきたこまち」のホモ化した染色体領域を様々な組み合わせで持つ集団である. この BILs の中で低温発芽性に優れる系統が共通して持っている同じ親品種由来の染色体領域には, 低温発芽性を高める遺伝子が座乗していると期待される. 逆に, 低温発芽性が劣る系統では, この染色体領域はもう一方の親品種に由来しているため, このような領域では両親の遺伝子型の頻度に大きな差が生じると考えられる.

そこで, BILs の中から選抜した H-LTG と L-LTG, それぞれの DNA プールに共通する親系統の染色体領域を同定するため, それぞれの DNA プールについて, 次世代シーケンサーを用いてゲノム配列を解析

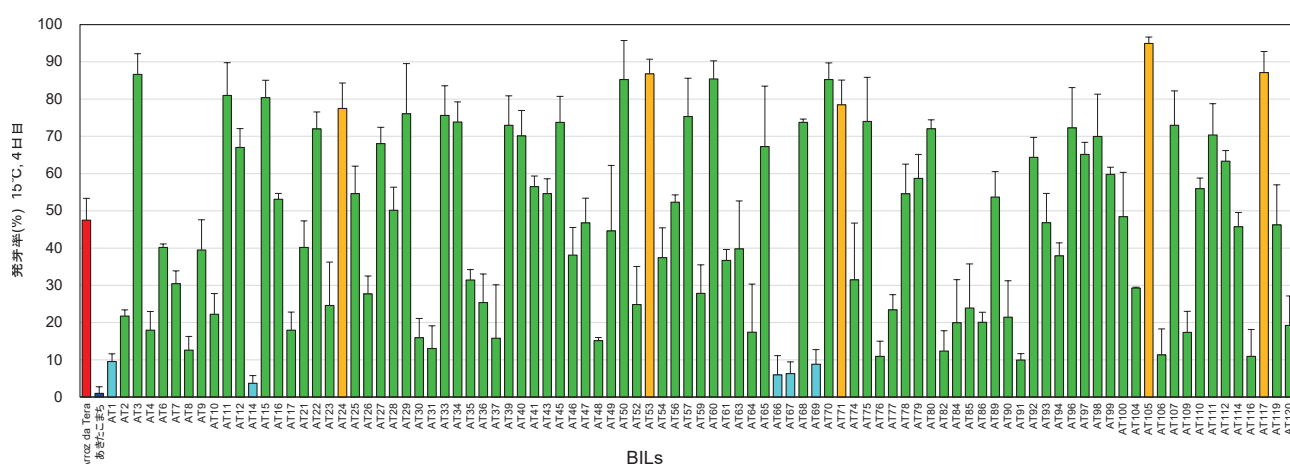


図2 「Arroz da Terra」, 「あきたこまち」およびBILsの15°Cで4日目の発芽率
グラフは平均値と標準偏差を示し, 棒グラフの赤色は「Arroz da Terra」, 青色は「あきたこまち」, 緑色は「BILs」, 水色と橙色は「選抜系統」を示す.

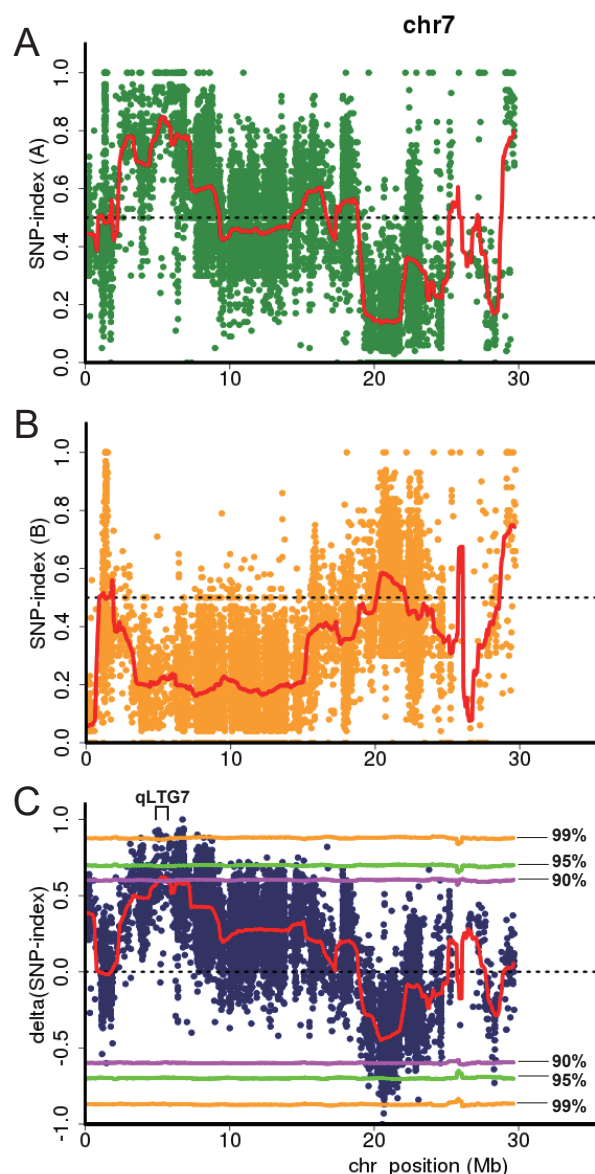


図3 第7染色体のQTL-seq解析

AとBは、それぞれH-LTGおよびL-LTGのSNP-indexを示し、Cは Δ SNP-indexを示す。オレンジは99%、緑は95%、ピンクは90%の信頼区間を示す。

した。H-LTGおよびL-LTGのリード数は、それぞれ46,941,914本および51,555,596本で、ゲノムの97.91%および98.17%がカバーされていた。また、Depthの平均は、それぞれ17.51および17.75で、混合した1系統あたり3.5本のリードでゲノム配列がカバーされていると推定された。

H-LTGとL-LTGの第7染色体のSNP-Indexをプロットした(図3A, B)。選抜した5個体全てが「Arroz da Terra」由来の遺伝子型を持つSNP (SNP-index=1)や、逆に、全てが「あきたこまち」由来の遺伝子型を持

つSNP (SNP-index=0) が存在していた。

H-LTGでは、2~7 Mbの領域は「Arroz da Terra」型に、19~22 Mbの領域は「あきたこまち」型に偏っており、また、10~18 Mbは両親型が混在していた(図2A)。一方、L-LTGでは、4~15 Mbの領域は「あきたこまち」型、20~22 Mbの領域は「Arroz da Terra」型に偏っている傾向が見られた(図2B)。

低温発芽性に関わる染色体領域を特定するため、H-LTGからL-LTGのSNP-indexを引いて両親の遺伝子型の頻度の差を示す Δ SNP-indexを求めたところ、1%水準で有意なSNPが4~7 Mbおよび21 Mb付近に存在していた。赤色のラインで示したSliding window解析において、第7染色体の短腕部の5.2~6.8 Mbの間に10%水準で有意なQTL (qLTG7) が検出された。このqLTG7では、 Δ SNP-index が正の値を示したことから、H-LTGが「Arroz da Terra」、L-LTGが「あきたこまち」の遺伝子型を有し、「Arroz da Terra」の遺伝子型が低温発芽性を高めると推定された(図2C)。

低温発芽性を高めるQTL

全染色体領域についてQTL-seq解析を行った結果、第7染色体のqLTG7を含め5か所に10%水準で有意なQTLが検出された。この内、第4染色体の28.3~29.3 Mb (qLTG4) と第11染色体の23.4~25.4 Mb (qLTG11) のQTLは、第7染色体のqLTG7と同様、「Arroz da Terra」の遺伝子型が低温発芽性を高めるものと考えられた。一方、第3染色体の15.5~17.9 Mb (qLTG3) と第6染色体の31.1~32.2 Mb (qLTG6) に検出されたQTLは、「あきたこまち」の遺伝子型が低温発芽性を高めるものと考えられ、これらのQTLがBILsにおける低温発芽性の超越分離をもたらしたものと考えられた。

これまでに、低温発芽性に関わるQTLが様々な遺伝資源で解析されており、本研究のqLTG11が同定された第11染色体の長腕領域では、インディカ品種の「Kasalath」や「DV85」、ジャポニカ品種の「USSR5」や「Maratteli」(Miura et al. 2001, Jiang et al. 2006, Ji et al. 2008, Satoh et al. 2016) で低温での発芽に関わる強いQTLが検出されており、qGLT11がこれらと同一である可能性も考えられた。

また、「Arroz da Terra」と「ほしのゆめ」とのBILs

において、直播での出芽性に関わるQTL, qSES7-1 およびqSES11が検出されている (Iwata et al. 2010). QTLの座乗位置から、これらが本研究において低温発芽性を高めるqLTG7およびqLTG11として検出されたものと考えられ、「Arroz da Terra」の遺伝子が低温発芽性を高めることで直播での出芽性を向上させている可能性が示唆された。

本研究では、表現型が明確に異なる5系統を混合して用いた。世代の進んだBC₁F₈世代のBILsを用いているが、5系統の混合のため遺伝子型に偏りが残っている可能性があり、QTLが存在しても有意なものとして検出されなかった可能性も考えられた。

今後の課題と展望

ポルトガル品種の「Arroz da Terra」と「あきたこまち」の交雑後代において、「あきたこまち」の低温発芽性の改良に有効と考えられる複数のQTLを見出した。本研究で見出したQTLは、qLTG11を除き旧ユーゴスラビアの品種の「Maratteli」から「あきたこまち」に導入したQTLとは異なることから (Satoh et al. 2016)、従来のQTLと組み合わせることで「あきたこまち」の低温発芽性をさらに向上できるものと考えられる。

また、本研究の手法によって直播適応性に関わる土中出芽性や低温伸長性など、低温発芽性以外の形質についても短期間でQTLを特定することが可能と考えられ、それらも合わせることで実用的な直播適応性を付与できるものと期待される。

同定したQTLのみを「あきたこまち」に導入するには、QTLを識別するDNAマーカーが不可欠となる。今後、次世代シーケンスデータを用いて遺伝子の変異解析を行い、本研究で見出したQTLに座乗する遺伝子の変異の特定を進める。特定した遺伝子変異を利用してDNAマーカーを作成し、DNAマーカー選抜でQTLを導入することで「あきたこまち」の低温発芽性、直播適応性の改良が期待される。

謝辞

本研究は、平成29年度秋田県立大学産学連携推進事

業の支援を受けて実施した。

文献

- Das, S., Upadhyaya, HD., Bajaj, D., Kujur, A., Badoni, S., Laxmi, Kumar, V., Tripathi, S., Gowda, CLL., Sharma, S., Singh, S., Tyagi, AK., Parida, SK. (2015). Deploying QTL-seq for rapid delineation of a potential candidate gene underlying major trait-associated QTL in chickpea. *DNA Research*, 22, 193–203.
- Fujino, K., Sekiguchi, H., Sato, T., Kiuchi, H., Nonoue, Y., Takeuchi, Y., Ando, T., Lin, SY., Yano, M. (2004). Mapping of quantitative trait loci controlling low-temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics*, 108, 794-799.
- Fukuda, A., Kataoka, T., Shiratsuchi, H., Fukushima, A., Yamaguchi, H., Mochida, H., Ogiwara, H. (2014). QTLs for seedling growth of direct seeded rice under submerged and low temperature conditions. *Plant Production Science*, 17, 41-46.
- 平野哲也 (1978) 「南欧地域水稻品種の低温発芽性」『日作東北支部報』 21, 43- 44.
- 堀末登 (1995) 「直播適応性水稻品種の開発」. 楠 渕欣也監修『直播稲作への挑戦 第2巻 直播稲作研究の最前線』(pp.115-131). 農林水産技術情報協会.
- Iwata, N., Shinada, H., Kiuchi, H., Sato, T., Fujino, K. (2010). Mapping of QTLs controlling seedling establishment using a direct seeding method in rice. *Breeding Science*, 60, 353-360.
- Ji, SL., Jiang L., Wang, YH., Liu, SJ., Liu, X., Zhai, HQ., Yoshimura, A., Wan, JM. (2008). QTL and epistasis for low temperature germinability in rice. *Acta Agronomica Sinica*, 34, 551-556.
- Jiang, L., Liu, S., Hou, M., Tang, J., Chen, L., Zhai, H., Wan, J. (2006). Analysis of QTLs for seed low temperature germinability and anoxia germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Field Crop Research*, 98, 68-75.

- Lu, H., Lin, T., Klein, Wang, S., Qi, J., Zhou, Q., Sun, J., Zhang, Z., Weng, Y., Huang, S. (2014). QTL-seq identifies an early flowering QTL located near *Flowering Locus T* in cucumber. *Theoretical Applied Genetics*, 127, 1491-1499.
- Michelmore, RW., Paran, I., Kcseeli, RV. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88, 9828-9832.
- Miura, K., Lin, SY., Yano, M., Nagamine, T. (2001). Mapping quantitative trait loci controlling low temperature germinability in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*, 51, 293-299.
- Murray, MG, Thompson, WF. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8, 4321-4325.
- 小高真一, 安部信行 (1988). 「低温条件下におけるイネの高出芽性品種の探索」『農業技術』 43, 165-168.
- Satoh, T., Tezuka, K., Kawamoto, T., Matsumoto, S., Satoh-Nagasawa, N., Ueda, K., Sakurai, K., Watanabe, A., Takahashi, H., Akagi, H. (2016). Identification of QTLs controlling low-temperature germination of the East European rice (*Oryza sativa* L.) variety Maratteli. *Euphytica*, 207, 245-254.
- 佐藤知弘, 手塚耕一, 川本朋彦, 柴田智, 加藤和直, 高橋竜一, 佐藤奈美子, 櫻井健二, 渡辺明夫, 高橋秀和, 赤木宏守 (2014). 「QTL 集積によるイネの低温発芽性の向上」『育種学研究』 16 (別 2), 157.
- Sun, J., Yang, L., Wang, J., Liu, H., Zheng, H., Xie, D., Zhang, M., Feng, M., Yan Jia, Y., Zhao, H., Zou, D. (2018). Identification of a cold-tolerant locus in rice (*Oryza sativa* L.) using bulked segregant analysis with a next-generation sequencing strategy. *Rice*, 11, 24.
- Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Natsume, S., Mitsuoka, C., Uemura, A., Utsushi, H., Tamiru, M., Takuno, S., Innan, H., Cano LM., Kamoun, S., Terrauchi, R. (2013). QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant Journal*, 74, 174-183.
- 山本隆一 (1990) 「水稻直播栽培用品種開発の道標」『農業技術』 45, 385-391.
- Zhang, ZH., Qu, XS., Wan, S., Chen, LH., Zhu YG. (2005). Comparison of QTL controlling seedling vigor under different temperature conditions using recombinant inbred lines in rice (*Oryza sativa*). *Annals Botany*, 95, 423-429.

〔平成 30 年 6 月 30 日受付〕
〔平成 30 年 7 月 10 日受理〕

Identification of quantitative trait loci for low-temperature germinability in rice using next generation sequencing-based bulked segregant analysis

Hidekazu Takahashi¹, Daisuke Tsuchida¹, Tomohiko Kawamoto², Hiromori Akagi¹

¹ *Department of Plant Production, Faculty of Bioresources, Akita Prefectural University*

² *Akita Prefectural Agricultural Experiment Station*

Low-temperature germinability is one of the most important traits for improving the establishment of seedlings in the direct sowing culture of rice. This study aimed to identify the genes responsible for superior germination under low temperatures with the goal of developing new varieties of rice. The authors identified five putative quantitative trait loci (QTLs) for low-temperature germinability (qLTG) using back-crossed inbred lines (BILs) between the temperate japonica varieties “Arroz da Terra” and “Akitakomachi” and used the next generation sequencing-based bulked segregant analysis (BSA). “Arroz da Terra” derived alleles in qLTG4, qLTG7, and qLTG11 on chromosomes 4, 5, and 11, respectively, and enhanced germination under low temperatures. “Akitakomachi” derived alleles in qLTG3 on chromosome 3 and qLTG6 on chromosome 6 and also enhanced germination. Two QTLs, qLTG3 and qLTG6, may be responsible for the transgressive segregation of “Arroz da Terra” with regard to the low-temperature germinability of the BILs. Our results suggest the ability of this method to rapidly identify QTLs for various traits in the establishment of seedlings.

Keywords: rice, low-temperature germinability, QTL, bulked-segregants analysis, next-generation sequencing