

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18642

研究課題名(和文)ソバの収量性向上および安定化に寄与する日長反応性と生態型に関する研究

研究課題名(英文) Study on photoperiod sensitivity and ecotype that contributes to improving and stabilizing buckwheat yield

研究代表者

原 尚資 (HARA, Takashi)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：20721426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ソバは重要な作物であるものの収量性およびその安定性は低く、これらの改良やそのための育種技術の開発が求められている。ソバの収量性向上と安定化には日長反応性および生態型が大きく関連すると考えられている。しかしながら、ソバの日長反応性、生態型および生態型分化との関連性についてゲノムレベルで解明した研究の例は少ない。

このような現状において、本研究によりソバにおいても多くの日長反応性相同遺伝子領域が存在すること、長日条件下での選抜により生態型が変化すること、日長反応性遺伝子領域への選抜圧が確認された。これらから日長反応性遺伝子領域を対象とすることで、ソバでの生態型デザイン育種が可能になると推察された。

研究成果の概要(英文)：Common buckwheat is an important crop, but yield and yield stability are low. Therefore, these improvements and development of breeding techniques is required. It is thought that photoperiod sensitivity and ecotype are greatly related to improve buckwheat yield and yield stability. However, few studies have elucidated the relevance on the genome level of photoperiod sensitivity, ecotype and ecotype differentiation in buckwheat.

Under these circumstances, this research has confirmed that many photoperiod sensitivity homologous genes are present in buckwheat, ecotype changes by selection under long day conditions, selection pressure for the photoperiod sensitivity gene was confirmed. From these results, It was inferred that ecotype design breeding in buckwheat could be possible by targeting photoperiod sensitivity gene regions.

研究分野：植物育種学

キーワード：ソバ 日長反応性 生態型 ゲノム解析 生態型デザイン育種

## 1. 研究開始当初の背景

ソバは和食文化を支える重要な作物であるものの収量性は低く、ソバの栽培や供給において深刻な問題となっている。ソバは遺伝的な固定や遺伝解析が難しい他殖性という生殖様式を示すため、作物として最も重要な特性である収量性においてさえも育種の進んでいない作物である。また、最近 10 年でのソバの収量性の変動幅は約 - 30 ~ +10% であり安定性も低い。これらのことから、ソバの収量性向上および安定化と、そのための育種技術の開発が求められている。

### (1)ソバにおける日長反応性

これまでの研究から、ソバの収量性向上と安定化には日長反応性が大きく関連すると考えられている。すなわち、日長が短くなることで花芽形成を開始する短日植物であるソバでは、夏期の長日条件下において、開花の遅延や未開花の発生、および高温の影響による結実率の低下により、収量性の低下や不安定化が生じる。この問題に対する有効な解決策のひとつとして、日長の違いに対してソバがどのような遺伝的反応性を示すかを明らかにすることが挙げられる。しかしながら、他殖性であることに加え、ソバの日長反応性遺伝子が特定されていないため、これまでは詳細な解析を行うことが困難であった。このような現状において近年、申請者らはソバの日長反応性の遺伝解析を実施することで、ソバの日長反応性遺伝子の一部を特定することに成功し、日長反応性遺伝子に対する詳細な解析の準備が整いつつある状況である。

### (2)日長反応性と生態型分化

ソバは中国雲南地域を起源とし、日本の九州地方に渡来し栽培地が北上することで日本各地で栽培されるようになったと考えられている。この際に、本来は短日に対して敏感に反応していたソバ集団が、栽培地の北上にともなう長日下での選抜が生じることで、長日条件下栽培でも開花遅延や結実率の低下が生じにくい集団へ分化したと考えられている。すなわち、日本の低緯度地域に分布し短日に対して敏感に反応する秋型から、中緯度地域に分布し短日に対する感受性が中間程度の中間型を経て、短日に対して鈍感で高緯度地域に分布する夏型へと生態型が分化したと考えられている。しかし、実際に日長反応性が生態型に関連するのか、また、どのような遺伝的機構で生態型が分化したかを解明した研究の例は少ない。

以上のことから、ソバの収量性向上および安定化において、日長反応性と生態型との関連および日長反応性による生態型分化の遺伝的機構を明らかにすることの意義は非常に大きく、各栽培地での作期や品種の選定といった最適な作付体系の確立に対して、確度の高い情報を提供することが出来る。さらには生態型のデザインを可能とする育種技術の開発にも繋がると考えられ、この技術が確立されることで、各栽培地において作期を多

様化させることが可能となり、1 年複数回栽培による収量性向上を目指した研究の進展にも大きく貢献するものと期待される。

## 2. 研究の目的

ソバの収量性向上および安定化に寄与する、日長反応性と生態型および生態型分化の関連性をゲノム解析を実施することで明らかにし、ソバにおける生態型デザイン育種の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

### (1) 日長反応性相同遺伝子領域の完全長塩基配列情報収集

ソバにおいては現時点で、複数の日長反応性相同遺伝子領域が確認されている。しかしながら、その塩基配列の情報量は遺伝子領域ごとに異なり、さらには未確認の日長反応性相同遺伝子領域が存在することも考えられる。本研究においては、遺伝子の全領域(完全長)における変異に基づく分子集団遺伝学的解析を実施することが結果の信頼性向上に大きく関連する。そこで既存の完全長 cDNA ライブラリーに対して次世代シーケンサーを用いた塩基配列情報の取得を行うことで、各日長反応性相同遺伝子の完全長塩基配列情報収集を実施するとともに、シロシヌナズナやイネ等において確認されている、日長反応性遺伝子と相同な遺伝子が含まれていないかを BLAST 検索により探索した。

### (2) 秋型、中間型集団の長日条件下選抜集団の作製

秋型および中間型から夏型への生態型分化過程を再現した選抜集団の作製においては、長日条件下で栽培し選抜を加えた回数多さが生態型分化過程の再現性の高さに影響する。従って、冬期での栽培・選抜が可能な暖房機を有するビニールハウスにおいて、植物育成用蛍光灯 (FL40S・BR: Panasonic 社) を用いた長日条件下栽培を実施することで 1 年で複数回の選抜を実施した。選抜に用いる集団は、秋型集団 (n = 72) として“宮崎在来 (宮崎県在来集団)” および中間型集団 (n = 72) として“葛生在来 (栃木県在来集団)” および比較品種として夏型品種の“牡丹そば (北海道品種)” 用いた。栽培・選抜においては、ソバでは日長が 14.5 時間以上になると、開花の明瞭な遅延・未開花が観察されること、および高緯度地域における夏播き作期における日長が 15 時間前後であることから、15 時間の長日条件下 (栽培期間中の日長は 15 時間で一定) において秋型、中間型集団を栽培し、花粉媒介昆虫を用いて交配し、播種 120 日後に個体別採種を行い、各個体で得られた稔実種子数を計測した。選抜は各集団で得られた全稔実種子数に対する各個体の稔実種子数の割合と比例するように、全稔実種子から 72 粒を選ぶことで実施し、この選抜種子を 2 回目以降の栽培・選抜に用いた。2 回目以降の栽培・選抜条件は 1 回目と同様

の日長条件および方法で実施した。

(3) 既存生態型集団および長日条件下選抜集団における日長反応性相同遺伝子のゲノム解析

九州から北海道の16品種・在来種集団(各60個体で15時間日長条件下での開花日データ取得済)および(2)で作製された選抜集団の各個体から抽出したDNAを用いて、(1)で完全長塩基配列情報が収集された、日長反応性相同遺伝子領域における塩基配列情報を取得した。取得された塩基配列情報に対する集団間および個体間での塩基配列の比較によりゲノム解析を実施した。ゲノム解析は塩基配列変異に基づき、遺伝的多様性の指標としてハプロタイプ多様度と塩基多様度を、中立性検定としてTajima's D値とFu and Li's D値を算出し、分子集団遺伝学的解析を行うことで、日長反応性による選抜圧の有無および様態の検証を実施した。

4. 研究成果

(1) 日長反応性相同遺伝子領域の完全長塩基配列情報収集

既存のcDNAライブラリーを用いた情報収集に加え、近年公開されたソバゲノムデータベース(BGDB)を用いた検索を実施した結果、今後の更なる解析が必要であるものの、現時点において38領域の日長反応性相同遺伝子領域を確認した。また、いくつかの遺伝子領域においては完全長情報の収集に成功した(一部を表1に示す)。また、シロイヌナズナやイネ等で明らかとされている、光周性花成経路における、光受容から開花に至るまでに関連する一連の遺伝子と相同な遺伝子群がソバにおいても確認された。このことから、ソバの日長反応性による開花制御も光周性花成経路に準じる形で制御されている可能性が高いことが明らかとなった。

表 1. 確認された日長反応性相同遺伝子領域

日長反応性 相同遺伝子領域	cDNA長	シロイヌナズナ 日長反応性遺伝子 (cDNA長)	シロイヌナズナ と比較した 塩基配列情報量
<i>FePHY3</i>	431 bp	<i>PHYB</i> (3519bp)	12.2 %
<i>FeCRY1</i>	1671 bp	<i>CRY1</i> (2046bp)	81.7 %
<i>FeCRY3</i>	433 bp	<i>CRY1</i> (2046bp)	21.2 %
<i>FeFKF/ZTL1</i>	1682 bp	<i>FKF1</i> (1857bp)	90.6 %
<i>FeCCA/LHY1</i>	2603 bp	<i>LHY</i> (1935bp)	134.5 %
<i>FeTOC1</i>	1605 bp	<i>TOC1</i> (1857bp)	86.4 %
<i>FeELF3</i>	2379 bp	<i>ELF3</i> (2085bp)	114.1 %
<i>FeGI</i>	3878 bp	<i>GI</i> (3519bp)	110.2 %
<i>FeCOL2</i>	1027 bp	<i>COL2</i> (1044bp)	98.4 %
<i>FeFT1</i>	482 bp	<i>MFT</i> (522bp)	92.3 %

(2) 秋型、中間型集団の長日条件下選抜集団の作製

当初計画では4~5回の選抜を実施する計画であったが、2年目の夏期での選抜において、高温の影響と思われる開花日の大きな変化や不稔等が認められたため3回の選抜の実施となった。

秋型集団を15時間日長の長日条件下で栽培すると、集団内の各個体における第一花開花まで日数は播種後26~84日、中央値56日という様態を示した。また短日要求性の高い個体である開花まで日数の遅い個体では稔実種子数の減少が認められた(図1上図)。同様に中間型集団では、第一花開花まで日数は23~71日、中央値32日の分布を示し、秋型集団程ではないものの短日要求性の高い個体では稔実種子数の減少傾向が認められた(図2上図)。

長日条件下での選抜後集団においては、秋型集団由来の選抜後集団では、第一花開花まで日数は26~56日、中央値40日の分布を示し、開花の遅い(短日要求性の高い)個体が淘汰された集団へと変化し、集団内において開花の早い個体の稔実種子数が極端に多くなり、選抜の顕著な効果が認められた。

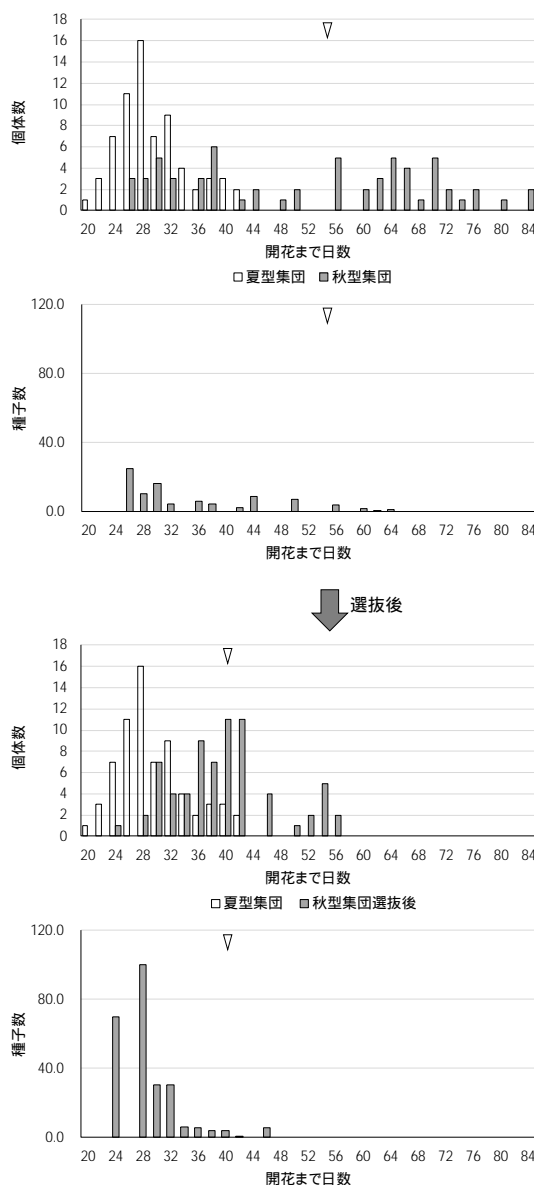


図 2. 秋型集団の選抜前・後の開花まで日数および稔実種子数の様態  
白抜き矢じりは中央値を示す

しかしながら、夏型集団の開花の様態（第一花開花まで日数は21～43日、中央値29日）とは異なり、その効果は秋型が夏型へと生態型が変化する程ではないことから、さらなる選抜が必要と考えられた（図1下図）。

同様に中間型集団由来の選抜後集団においては、第一花開花まで日数は24～48日、中央値33日の分布を示し、開花の遅い個体が淘汰された集団へと変化した。集団内において開花の早い個体の稔実種子数が多くなり、選抜の顕著な効果が認められた。しかしながら、夏型集団の開花の様態とは若干異なることから、夏型へと生態型を変化させるには、あと数回の選抜が必要であると考えられた。（図2下図）。

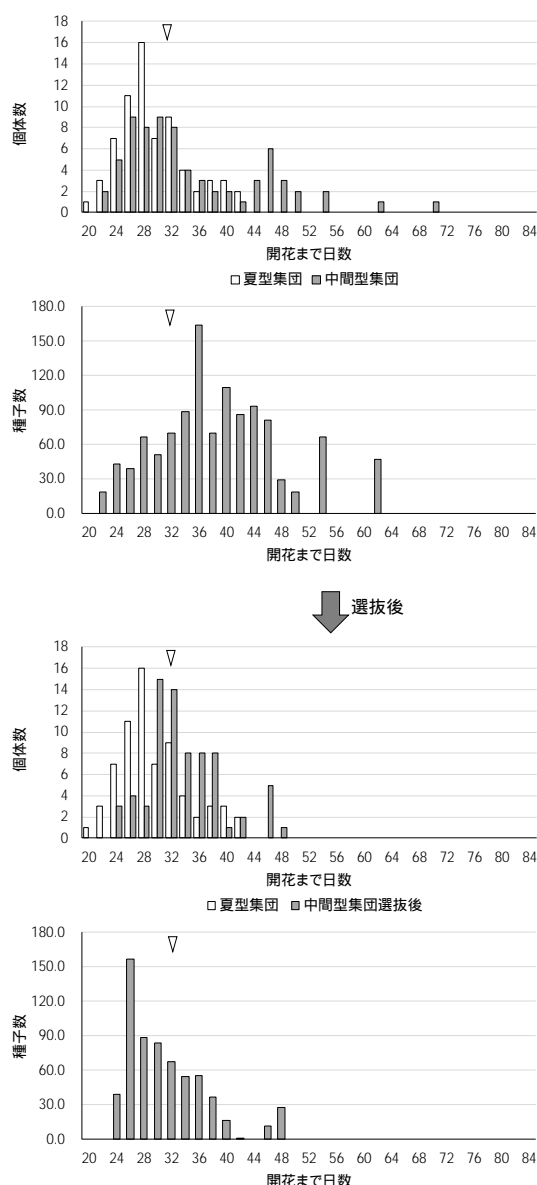


図2. 中間型集団の選抜前・後の開花まで日数および稔実種子数の様態  
白抜き矢じりは中央値を示す

(3) 既存生態型集団および長日条件下選抜集団における日長反応性相同遺伝子のゲノム解析

長日条件下選抜集団に関しては、計画通りの選抜回数に達しなかったこと、および実際の選抜後集団の開花の様態において、秋型から夏型もしくは中間型から夏型という生態型の変化が生じるほど選抜が進んでいないことから、今後さらなる選抜を実施したうえでゲノム解析を実施する予定である。従って、九州から北海道の品種・在来種集団に対する解析から進めている状況である。現時点での成果の一部として、秋型と夏型の代表的な生態型集団である、宮崎在来集団（九州）と牡丹そば集団（北海道）のゲノム解析において、遺伝子領域により様態・程度は様々であるものの、これまでの研究でソバの長日条件下での開花日に関連することが明らかとなっている、日長反応性遺伝子領域内での秋型集団と夏型集団においては、ハプロタイプ多様度と塩基多様度が異なり、総じて秋型が多様性が高いことが明らかとなった。また中立性検定の結果、遺伝子領域内の部位により様態・程度に違いはあるものの、選抜圧が生じている箇所が存在することが明らかとなった。詳細な考察を実施するためには、今後の長日条件下選抜集団に対する解析が必要ではあるものの、現時点における日長反応性遺伝子に対するゲノム解析から、日長反応性遺伝子領域に対する選抜が加わることで生態型が分化したと可能性が高いことが示され、これまでの表現型レベルでの研究による仮説を支持するものであった。このことから、日長反応性遺伝子領域を対象とすることで、生態型デザイン育種が可能になると推察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Hara Takashi, Yabe Shiori, Ueno Mariko, Enoki Hiroyuki, Kimura Tatsuro, Nishimura Satoru, Yasui Yasuo, Ohsawa Ryo and Iwata Hiroyoshi (2017) These authors contributed equally to this article, Potential of Genomic Selection in Mass Selection Breeding of an Allogamous Crop: An Empirical Study to Increase Yield of Common Buckwheat. *Frontiers in Plant Science*, 9 Article no. 276. 査読有

Chen Ruikun, Hara Takashi, Ohsawa Ryo, Yoshioka Yosuke (2017) Analysis of genetic diversity of rapeseed genetic resources in Japan and core collection construction. *Breeding Science*, 67(3).239-247. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

佐藤里絵, 原尚資, 山内実月, 手島玲子, 大澤良, ソバにおけるタンパク質群の多様性, 日本食品化学学会第23回総会・学術大会, 2017.

Chen Ruikun, Hara Takashi, Ohsawa Ryo, Yoshioka Yosuke, Genetic diversity

analysis and core collection formation in rapeseed genetic resources in Japan, International Plant & Animal Genome XXV, 2017.

永井博也, 森下敏和, 大澤良, 原尚資, ソバの非離層形成型脱粒性に関する遺伝解析, 日本育種学会第 130 回講演会, 2016 .  
山内実月, 原尚資, 佐藤里絵, 向井仁美, 大澤良, ソバ主要アレルゲン Fag e 2 の遺伝子領域内変異と抗原抗体反応差異の探索, 日本育種学会第 130 回講演会, 2016 .  
陳蕤坤, 原尚資, 大澤良, 吉岡洋輔, 日本におけるセイヨウナタネ遺伝資源の遺伝的多様性の解析及びコアコレクションの作成, 日本育種学会第 130 回講演会, 2016 .

Nagai Hiroya, Ohsawa Ryo, Hara Takashi, Genetic analysis of seed shattering in common buckwheat, The 13th International Symposium on Buckwheat, 2016.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

原 尚資 (HARA, Takashi)  
筑波大学・生命環境系・助教  
研究者番号 : 20721426