

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07272

研究課題名（和文）擬似自然集団群の育成による野生コムギ遺伝資源の保全とその持続的・発展的利用

研究課題名（英文）Development of quasi-natural populations in wild wheat species and its sustainable utilization

研究代表者

森 直樹（Mori, Naoki）

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：60230075

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：二粒系コムギは、約1万年前にレバント北部で野生二粒系コムギから栽培化された。この祖先野生種は自生地の多様な環境に適応・進化しており、集団内・集団間で非常に高い多様性をもつことがわかってきた。このような野生二粒系コムギは、今後の地球環境の変化に対応した作物改良の素材としても不可欠である。しかし、栽培化起源地の野生コムギ集団は人為的破壊によって消失の危機にある。本研究では、栽培化起源地の野生コムギ集団を持続的・発展的に利用するため、自然集団の多様性を反映させた「擬似自然集団群」を育成した。また、この疑似自然集団サンプルの一部について葉緑体DNAの多型解析により自然集団の遺伝的多様性を調査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子生物学的解析手法の発展に伴い、解析可能な系統数やデータ量が飛躍的に増大している。今後は、生物資源の保全とその有効利用においても集団内変異の重要性がますます高まると考えられる。本研究では、自然集団内の変異を維持しつつ永続的に保存することを目的として、それぞれの集団から無作為に選んだ多数の個体から構成される「擬似自然集団群」を育成した。これによって自然集団の遺伝的構成を変えることなく貴重な遺伝資源の永続的に維持・増殖が可能となった。

研究成果の概要（英文）：Emmer wheat was domesticated from the wild emmer wheat in northern Levant about 10,000 years ago. The wild emmer wheat has adapted to a wide range of environment in their natural habitat and has a high level of genetic diversity within and among natural populations. The wild emmer wheat is an important resource in a breeding program for the changes in the global environment. However the natural populations are in danger of extinction due to the human induced ecological destruction in the area. In the present study, we developed a set of “quasi-natural population” in which the original genetic diversity within the population are maintained. In addition, we have started the evaluation of genetic diversity in the wild emmer wheat using the “quasi-natural population”.

研究分野：植物遺伝資源学

キーワード：野生二粒系コムギ 遺伝的多様性 疑似自然集団 葉緑体DNA 自然集団 栽培化 遺伝資源

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 栽培化起源地：過去 20 年余りの考古学、分子生物学などの境界領域的研究から、二粒系コムギは、約 1 万年前に肥沃な三日月地帯の北部で栽培化されたことが明らかになってきた。分子系統学的解析から、祖先野生種である野生二粒系コムギには栽培型に近縁な DNA 型をもつ系統があることがわかり、その地理的分布から栽培化の起源地はトルコ南部の東西約 200km 南北約 60km の地域（以降、栽培化起源地と呼ぶ）に限定された (Lev-Yadun *et al.* 2000, Mori *et al.* 2003, Ozkan *et al.* 2005, Luo *et al.* 2007)。しかし、この地域のどの野生コムギ集団が栽培化に寄与したかについての詳細はいまだに不明である。

(2) 人為的環境破壊による遺伝資源消失の危機：栽培化起源地では、シリアやイラクなど近隣諸国の政治情勢の悪化と人類の生活圏の急速な拡大によって栽培化起源地の自然環境は攪乱が進み、コムギ野生種の自然集団は消失の危機に直面している。その保全は喫緊の課題であるが、現在積極的な保全活動は行われていない。

(3) 栽培化起源地における現地調査の実績：申請者らは、栽培化起源地において過去 10 年以上にわたり野生コムギ集団を調査してきた (Ohta *et al.* 2006 など)。これまでに、この地域のほぼ全域にわたって分布する自然集団において野生コムギを採集し、トルコ国内の共同研究先 (チュクローワ大学) で一時保管しているが、これら新規サンプルの永続的保全・利用の対策は進んでいない。

(4) 母系祖先型 DNA の存在：葉緑体 DNA 多型の予備的調査から、栽培化起源地には栽培二粒系コムギに最も高い頻度 (全世界の栽培型の約 40%) でみられる葉緑体 DNA のプラストタイプ (E10 型) と同一の型をもつ野生二粒系コムギが存在することが判明した (Mori *et al.* 2014)。しかし、自然集団における E10 型の頻度や地理的分布は不明である。

(5) 極めて高い集団内変異：葉緑体 DNA 多型の予備的調査から、栽培化起源地に分布する野生二粒系コムギの自然集団内には極めて高い遺伝的多様性が潜在する (Shizuka *et al.* 2015)。1 つの集団内の 91 個体について調査した結果、平均遺伝子多様度 ( $H=0.28$ ) は全世界のパンコムギの値 ( $H=0.04$ , Hirose *et al.* 2004) をはるかに上回っていた。

### 2. 研究の目的

コムギの祖先野生種は、その自生地の多様な環境に適応・進化しており、集団内・集団間で非常に高い多様性をもつことがわかってきた。この多様性は、地球環境の変化に対応した作物改良の素材としても不可欠である。しかし、栽培化起源地であるトルコ・シリア国境の野生コムギ集団は人為的破壊によって消失の危機にある。本研究では、栽培化起源地の野生コムギ集団を持続的・発展的に利用するため、つぎの 3 項目を目的とした。

#### (1) 自然集団から任意抽出した「擬似自然集団群」の育成

共同研究先で一時保存している野生二粒系コムギの 137 の自然集団から、栽培化起源地全域をカバーするように約 20 の自然集団を選び、1 集団につき 20~80 個体を無作為に取り出して栽培し自家受粉させる。これにより、野生二粒系コムギについてその多様性を反映させた擬似自然集団群を作成し永続利用が可能な集団解析の材料として整備する。

#### (2) 葉緑体 DNA 分析による自然集団の遺伝的多様性の解明

各自然集団内の葉緑体 DNA の変異を洗い出し、それらを集団間で相互比較することによって集団間の遺伝的分化とハプロタイプの地理的な分布、さらには栽培化起源地全体の遺伝的変異と遺伝的構成を解明する。

#### (3) 葉緑体 DNA のハプロタイプ比較による栽培化に寄与した野生コムギ集団の特定

栽培二粒系コムギに高い頻度でみられる葉緑体 DNA のハプロタイプ (E10 型) が特定されている (Mori *et al.* 2003, Mori 2014)。本研究では野生二粒系コムギの自然集団において栽培型と同一もしくは近縁のハプロタイプの分布を調査し、このようなハプロタイプを高い頻度で保有する自然集団を特定することにより母系からみた直接の祖先集団を特定する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 材料

二粒系コムギの栽培化起源地を広くカバーするトルコ南部の 3 地域 (図 1. West-1, West-2, East-1) の自然集団において、多数の個体をランダムに選び個体ごとに 1 穂ずつ採集した野生 4 倍性コムギのサンプル (チュクローワ大学で冷蔵保存中) を用いた。なお、このサンプルには、形態での識別が難しい野生二粒系コムギと野生チモフェービ系コムギが混在しているが、チモフェービ系コムギのプラストタイプが判明している (Mori *et al.* 2009)、本研究による葉緑体 DNA の分析から両者を区別することができる。

## (2) 方法

・擬似自然集団の作出：チュクロワ大学に保存中の野生二粒系コムギの集団サンプルから約 20 の自然集団を選定し、集団ごとに 20~80 個体をランダムに選んで各小穂から 1 粒を選び、それぞれに識別番号をつける。これらの穎果を、ろ紙を敷いたシャーレに播種し、発芽した穎果をプラスチックポットに仮植える。約 1 ヶ月後、チュクロワ大学の圃場に移植して栽培する。これを単粒系統法によってくり返し、自殖を重ねる。

・葉緑体 DNA の分析：作出した擬似自然集団について、葉緑体 DNA の 24 のマイクロサテライト座 (Ishii *et al.* 2001) の多型を解析し、集団ごとの遺伝的構造と集団間の分化を明らかにするとともに、栽培型に高頻度で見られるハプロタイプの起源を明らかにする。

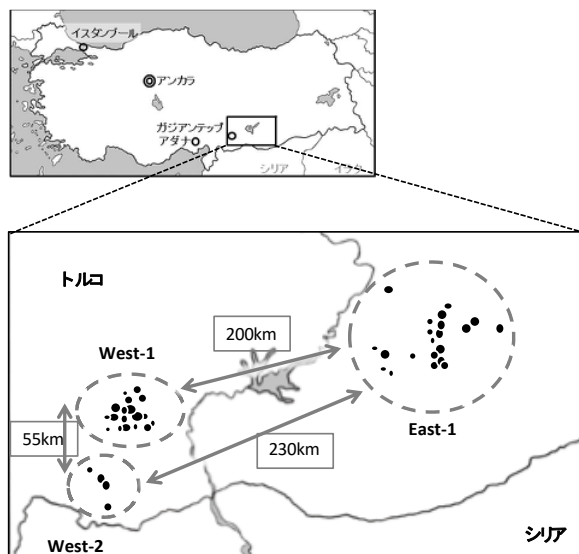


図1. 栽培化起源地における野生コムギの採集地点。野生二粒系コムギの分布は大きく3つの地域 (East1, West1, West 2) にわかれている。円の直径はサンプル数に比例する。

## 4. 研究成果

### (1) 野生二粒系コムギの「擬似自然集団」の作出

East1, West 1, West2 の 3 地域から現地の地理的条件なども考慮して 18 集団を選び、それぞれの集団から 15~80 個体をランダムに選定した。これらを、個体識別した上で研究期間中の毎年秋から翌年の初夏にかけてチュクロワ大学の圃場で順次栽培し、開花期の穂にグラシン紙の袋をかけて自家受粉させ自殖種子を得た。本研究の開始前年 (2016 年) の秋から栽培し 2017 年に収穫できた 11 集団の 408 個体について、同年から翌 2018 年にかけて再度栽培し 337 の自殖個体を得た。

分子生物学的解析手法の発展に伴い、解析可能な系統数やデータ量が飛躍的に増大していることから、今後は生物資源の保全と利用の現場でも、集団内変異の重要性がますます高まると考えられる。今回、本研究により得られた自殖種子は、「擬似自然集団」としてチュクロワ大学農学部で冷蔵保存した。このコレクションによって、自然集団の遺伝的構成を反映した形で永続的に維持・増殖が可能となった。今後、さらに自然集団の数を増やし、「擬似自然集団」のコレクションを充実させることが必要である。これにより、世界の研究者が共有し集団内の個体単位で研究・利用できる基盤が確立できると考える。

### (2) 野生二粒系コムギの葉緑体ゲノムの多様性

現地での栽培状況が悪く、DNA 抽出のために 2018 年秋から 2019 年にかけて栽培した 5 集団の 221 個体は、収穫できなかった。そのため、2019 年の秋に 2 集団を加えて 7 集団とし、合計 288 個体を再度播種した。これらは、2019 年初夏に収穫の予定である。これまでに DNA を抽出できた 41 個体について、その葉緑体 DNA に存在する 24 のマイクロサテライト座の多様性を調査した。その結果、9 個体が野生チモフェービス系コムギであると判定された。32 個体の野生二粒系コムギの葉緑体 DNA は極めて高い多型性を示した。これらの中には、栽培エンマーコムギにおいて最も高い頻度で見られる E10 型のプラストタイプをもつものが 2 個体発見された。今後、擬似自然集団の全サンプルについての解析が進めば E10 型の各自然集団内における分布が明らかになり、栽培化に関わった自然集団が特定できるものと期待している。

これまでの研究から、二粒系コムギの葉緑体ゲノムは、プラストグループ I と II の明瞭に分化した二つのグループに分かれることが判明しているが、本研究で調査した 32 個体の野生二粒系コムギのうち、26 個体がグループ I に、残りの 6 個体がグループ II に属していた。さらに、これらの二つのグループのプラストタイプは、West-1, West-2, East-1 の何れの地域にも分布していることが判明した。このことから、プラストグループ I とプラストグループ II の起源について次の二つの仮説が考えられる。仮説 1) これらの二つのプラストグループは、野生二粒系コムギがその分布を拡大する前から種内に存在しており、本種の地理的分布の拡大とともに West-1, West-2, East-1 に分布を広げた。仮説 2) これらの二つのプラストグループは本種の種内分化の過程において異なる地域で起源し、初期には異なる地域に分布していたが、本種が地理的分布を拡大するのに伴いこれらの分布域が重なった。

### (3) 細胞質ゲノムの進化的安定性の検証

葉緑体 DNA を用いて母系を解明する上での重要な前提は、「細胞質ゲノムは核ゲノムとは異なり、移入交雑などがあっても混じりあうことなく世代を超えて安定的に母性遺伝する」ということである。しかし、このことを実験的に証明した研究はほとんどない。今回、常脇恒一郎京都大学名誉教授と宅見薫雄神戸大学教授との共同研究により、コムギの細胞質ゲノムの安定性を検

証した(Tsunewaki *et al.* 2019)。強い雄性不稔性のため60世代以上にわたって核ゲノム提供親を毎代戻し交雑することにより維持されてきた *Aegilops caudata* の細胞質を持つ「細胞質置換コムギ(Tve)」と、その細胞質を元の細胞質提供親 (*Aegilops caudata*) に戻して再構築された「再構成 *Ae. caudata*」の細胞質を、細胞質提供親の細胞質と比較した。その結果、各種の表現形質、葉緑体DNA、ミトコンドリアDNAのいずれにおいても、元の細胞質提供親との間に違いは見出されなかった。このことから、コムギとその近縁野生種の細胞質ゲノムは高い安定性を保持して自律的に母性遺伝していることが実証された。

#### (4) 二粒系コムギの栽培化に伴って変化した穎果の形態的形質

二粒系コムギの栽培化に伴って変化した主要な形質の一つは穎果の形態的形質である。野生二粒系コムギの穎果に比べると、栽培型ではその重量が2倍近くに増大している。本研究では、この栽培化に伴う穎果の重量増加が穎果のどのような形態的变化によるものなのかを明らかにするため、野生二粒系コムギと栽培二粒系コムギから作出した戻し交雑自殖系統群を使って、穎果の重量と穎果の「幅」、「高さ」「長さ」の間の相関分析を行った (Miyazaki *et al.* 2017)。その結果、二粒系コムギの栽培化による穎果の重量増加に最も大きく貢献したのは「幅」の増大であったということが明らかになった。

#### <引用文献>

- ① Hirosawa, S., S. Takumi, T. Ishii, T. Kawahara, C. Nakamura and N. Mori (2004) Chloroplast and nuclear DNA variations in common wheat: an insight into the origin and evolution of *T. aestivum* L. *Genes Genet. Syst.* 79: 271-282.
- ② Ishii, T., N. Mori, Y. Ogiwara (2001) Evaluation of allelic diversity at chloroplast microsatellite loci among common wheat and its ancestral species. *Theor Appl Genet.* 103: 896-904.
- ③ Lev-Yadun, S., A. Gopher and S. Abbo (2000) The cradle of agriculture. *Science*, 288: 1602 - 1603.
- ④ Luo, M-C., Z-L. Yang, F. M. You, T. Kawahara, J. G. Waines, J. Dvorak (2007) The Structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theor Appl Genet.* 114: 947-59.
- ⑤ Miyazaki, Y., P. M. Ngoc, K. L. Liberatore, S. F. Kianian, C. I. Vladutu, N. Mori (2017) Evaluation of grain dimension and weight using backcross recombinant inbred lines between wild and domesticated emmer wheat. *J. Crop Res.* 62: 31 - 36.
- ⑥ Mori, N., T. Ishii, T. Ishido, S. Hirosawa, H. Watatani, T. Kawahara, M. Nesbitt, G. Belay, S. Takumi, Y. Ogiwara and C. Nakamura (2003) Origins of domesticated emmer and common wheat inferred from chloroplast DNA fingerprinting. *Proc. Xth Inter. Wheat Genetics Symp., Paestum, Italy (vol.1):* 25-28.
- ⑦ Mori, N., Y. Kondo, T. Ishii, T. Kawahara, J. Valkoun and C. Nakamura (2009) Genetic diversity and origin of timopheevi wheat inferred by chloroplast DNA fingerprinting. *Breeding Science* 59: 571-578.
- ⑧ Mori, N. (2014) Genetic diversity and domestication of emmer wheat. Invited lecture at Cereal Disease Laboratory, United States of America Department of Agriculture (USDA)-Agricultural Research Service (ARS) & University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, USA.
- ⑨ Ohta, S., N. Mori, T. Ohsako and H. Ozkan (2006) A brief report on a collection by a field survey of wild wheat relatives in southern Turkey in 2006. in: Ohta, S. and H. Ozkan ed. *A preliminary report of Fukui prefectural university agro-ecological exploration in southwest Eurasia in 2006 (FASWE06), No. 1. Turkey and Greece:* 1-26.
- ⑩ Ozkan H., A. Brandolini, C. Pozzi, S. Effgen, J. Wunder, F. Salamini (2005) A reconsideration of the domestication geography of tetraploid wheats. *Theor. Appl. Genet.* 114: 947 - 959.
- ⑪ Shizuka, T., N. Mori, H. Ozkan and S. Ohta (2015) Chloroplast DNA haplotype variation within two natural populations of wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) in southern Turkey. *Biotechnol. & Biotechnol. Equipment.* 29: 423-430.
- ⑫ Tsunewaki, K., N. Mori and S. Takumi (2019) Experimental evolutionary studies on the genetic autonomy of the cytoplasmic genome “plasmon” in the *Triticum* (wheat)-*Aegilops* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 116: 3082 - 3090.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsunewaki, K., N. Mori, S. Takumi	4. 巻 116
2. 論文標題 Experimental evolutionary studies on the genetic autonomy of the cytoplasmic genome “ plasmon ” in the Triticum (wheat)-Aegilops complex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 3082-3090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1817037116">www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1817037116</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki, Y., Ngoc, P. M., Liberatore, K. L., Kianian, S. F., Vladutu, C. I., Mori, N.	4. 巻 62
2. 論文標題 Evaluation of grain dimension and weight using backcross recombinant inbred lines between wild and domesticated emmer wheat	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Crop Research	6. 最初と最後の頁 31-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.18964/jcr.62.0_31">https://doi.org/10.18964/jcr.62.0_31</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 大田正次、森直樹、Hakan Ozkan
2. 発表標題 トルコ南部の野生二倍性コムギ集団における非休眠性個体頻度の多様性
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井寧々、森直樹、大田正次
2. 発表標題 一粒系コムギにおける小穂あたりの着粒数と種子休眠性の遺伝学的解析
3. 学会等名 第14回ムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村優介、森直樹、大田正次
2. 発表標題 コムギの近縁野生種 <i>Aegilops geniculata</i> の種内の変異と遺伝的分化
3. 学会等名 第14回コムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 粕淵 星也、島田 沙織、牛 恒一、Vladutu Cristian、Kianian Shahryar、森 直樹
2. 発表標題 野生エンマ コムギの遺伝的背景を持つ戻し交雑自殖系統を用いた草型の解析
3. 学会等名 第14回コムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口雄平、宮崎裕貴、森直樹
2. 発表標題 エンマ-コムギの戻し交雑自殖系統群による穂の形態形質の遺伝学的解析
3. 学会等名 第14回コムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福山智章、森直樹、大田正次
2. 発表標題 エンマ コムギのF3集団を用いた小穂内の穎果サイズと種子休眠性の遺伝学的解析
3. 学会等名 第14回コムギ類研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大田正次、森直樹、Hakan Ozkan
2. 発表標題 トルコ南部の野生四倍性コムギ集団における野生二粒系コムギと野生チモフェービコムギの分布
3. 学会等名 第13回コムギ類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村優介、森直樹、大田正次
2. 発表標題 コムギの近縁野生種 <i>Aegilops geniculata</i> の種内変異
3. 学会等名 第13回コムギ類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福山智章、森直樹、大田正次
2. 発表標題 エンマ コムギのF3集団を用いた小穂内の穎果サイズと種子休眠性の遺伝学的解
3. 学会等名 第13回コムギ類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井寧々、森直樹、大田正次
2. 発表標題 一粒系コムギにおける小穂あたりの着粒数と種子休眠性の遺伝学的解析
3. 学会等名 第13回コムギ類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口雄平、宮崎裕貴、森直樹
2. 発表標題 エンマーコムギの戻し交雑自殖系統群における小穂に占める穎果の割合
3. 学会等名 第13回ムギ類研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大田正次、森直樹、Ozkan Hakan
2. 発表標題 トルコ南部の野生四倍性コムギ集団における非休眠性個体頻度の多様性
3. 学会等名 一般社団法人日本育種学会 第133回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naokil Mori, Takako Shizuka, Hakan Ozkan, Shoji Ohta
2. 発表標題 Genetic diversity between and within two natural populations of wild emmer wheat ( <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i> ) in southern Turkey: insights from chloroplast DNA fingerprinting
3. 学会等名 8th International Triticeae Symposium 2017, Wernigerode/Gatersleben, Germany (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shoji Ohta, Naoki Mori, Hakan Ozkan
2. 発表標題 A Japan-Turkey cooperative research project on genetic diversity in wild wheat and its genetic change during the domestication process
3. 学会等名 8th International Triticeae Symposium 2017, Wernigerode/Gatersleben, Germany (国際学会)
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Esra Cakir, Ahmad Alsaleh, Naoki Mori, Shoji Ohta, Hakan Ozkan
2. 発表標題 Genetic diversity between and within natural populations of wild emmer wheat ( <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>dicoccoides</i> ) in southern Turkey: Insights from nuclear-SSR and morphological variation
3. 学会等名 8th International Triticeae Symposium 2017, Wernigerode/Gatersleben, Germany (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 寺田凧沙、森直樹、大田正次
2. 発表標題 野生エンマーコムギにおける小穂内の穎果サイズの違いと種子休眠性に関するQTL の解析にむけて
3. 学会等名 第12回コムギ類研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村川夏貴、森直樹、H. Ozkan、大田正次
2. 発表標題 野生二粒系コムギの形態および遺伝的変異から見た種内の多様性と地理的分化
3. 学会等名 第12回コムギ類研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 島田 沙織、牛 恒一、Vladutu Cristian、Kianian Shahryar、森 直樹
2. 発表標題 野生エンマーコムギの遺伝的背景に栽培種の染色体断片を導入した戻し交雑自殖系統による栽培化関連形質の解析
3. 学会等名 第12回コムギ類研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大田 正次  (OHTA Shoji)		
研究協力者	オズカン ハカン  (OZKAN Hakan)		