

令和元年5月28日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19270

研究課題名(和文) 共生関係が成立するコムギおよびエンドファイトの遺伝子型の探索

研究課題名(英文) Exploration of wheat and endophyte genotypes that enable the symbiotic relationship

研究代表者

辻本 壽 (Tsujiimoto, Hisashi)

鳥取大学・乾燥地研究センター・教授

研究者番号：50183075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：カモジグサにはエンドファイト(内生糸状菌)が共生するが、コムギにはエンドファイトが共生しない。コムギに、エンドファイトを人工的に感染させると生育異常を示す。本研究では、様々な野生種染色体をもつコムギ系統と様々なエンドファイト菌株の組み合わせの中から、共生が成立する宿主・寄主の組み合わせを調査した。その結果、特定のエンドファイトに感染しても正常に生育でき、しかも、次世代に種子伝播させることができるコムギ・エンドファイトの組み合わせを見いだした。ただ、その種子の充実は不完全で、さらなるエンドファイト菌株を探索するため、北海道および東北地方のカモジグサを採集し、新たなエンドファイトを分離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コムギは世界最大面積に栽培される重要穀物であるが、高温に弱く、今後、地球温暖化が予想される中で、コムギへの高温耐性付与は重要課題である。遺伝子組換えや異種遺伝子利用による高温耐性品種の開発は重要な方法であるが、これに加え、エンドファイトの共生による耐性付与も可能な技術である。これまで、コムギはエンドファイトを保持せず、人為的に感染させても、生育異常を示し穂の形成まで至らなかった。本研究で、エンドファイトと感染でき、次世代にエンドファイトが伝達するコムギ系統を見いだすことができた。今後、種子の充実に影響を及ぼさない菌株を見いだすと共に、感染個体のストレス耐性の調査が必要である。

研究成果の概要(英文)：Although wheat-related *Elymus* species have endophyte, wheat does not carry the endophyte. When the endophyte is artificially inoculated to wheat plant, the wheat shows abnormal morphology. In this study, we investigated the compatible combination between wheat lines with alien chromosomes and endophyte strains. As the result, we could find a good combination that allowed seed production of the infected plants and transfer of the endophyte to the next generation. Because the seeds of the infected plants were shriveled, we visited Hokkaido and the northeastern Japan and collected *Elymus* to find new endophytes with better compatibility with wheat.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：内生菌 エンドファイト コムギ カモジグサ 異種染色体添加系統 ストレス耐性 共生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの植物種は内生菌(エンドファイト)を体内に保有していることが知られている。エンドファイトと共生することにより、植物は病気、害虫、乾燥、高温などの耐性が強化され、植物の適応力を高めている。この性質を利用して、*Epichloë* 属のエンドファイトをもつ牧草が開発され商品化されている。*Epichloë* 属エンドファイトはカモジグサ属等多くのコムギ近縁野生種に存在が確認されている。しかし、栽培コムギにはエンドファイトの共生が見られない。人為的にコムギに近縁野生種のエンドファイトを接種すると植物は極度に矮化し、出穂しても不稔になる。もし、エンドファイトおよびコムギ双方において、親和性の高い遺伝子型を見いだし、生育に負の影響を与えないエンドファイト共生コムギを作ることができれば、新たなコムギ改良の方法としての道を拓くと考えられる。

2. 研究の目的

ニュージーランドの研究所 AgResearch は多くのエンドファイトの遺伝資源を保有する。一方、鳥取大学乾燥地研究センターは、多くの異種染色体添加コムギ系統をもつ。本研究は、これら多様な寄主および宿主の中から、共生関係が成立し生育に悪影響を及ぼさない組み合わせを探すことを目的として行った。

ところで、*Epichloë* 属エンドファイトは植物病原菌として分類されるため、国外の菌株を用いた研究は、植物防疫所の認めた閉鎖温室で行わなければならない。AgResearch が保有する菌株は日本以外の国で採種されたものであるため研究にその制約がある。そこで、国内に自生する野生植物からエンドファイトを単離し、指定区域外でも研究できるエンドファイト菌株を探すことも本研究の目的である。さらに、国内の *Epichloë* 属エンドファイトの系統関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) コムギへのエンドファイトの接種

AgResearch が保有する 3 菌株および日本のカモジグサより単離した 2 菌株を人工接種実験に用いた。コムギは鳥取大学が保有する 80 系統の異種染色体添加系統を用いた。

まず、異種染色体添加コムギ系統の種子を硫酸と次亜塩素酸水で滅菌し、滅菌した濾紙上で乾燥させた。これを蒸留水で作った 4% のアガロースゲルに置床し、22~25 の暗所で発芽させた。一方、エンドファイトは PDA 培地で培養しコロニーを作った。メスでコムギ系統の芽の基部に 1 mm 程の切り込みを入れ、そこにコロニーから得た菌糸を含む培地の小片を接種し、1 週間植物を暗所に静置した(図 1 左)。その後、植物を明所(日長 14 時間)に移し、1 週間栽培

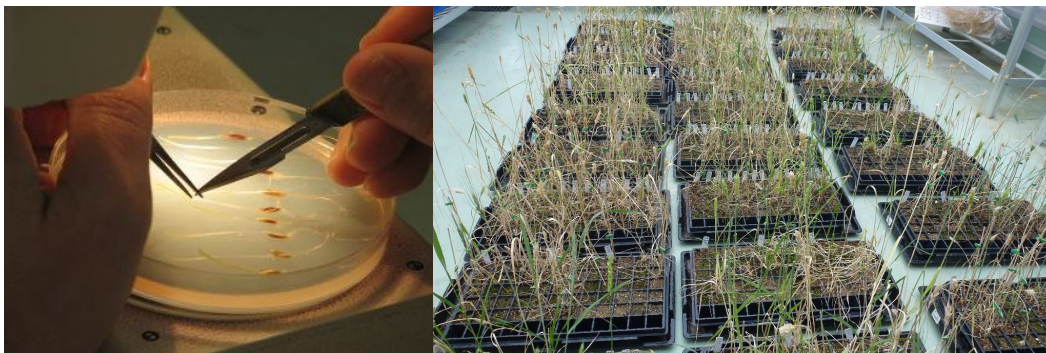


図 1 左：コムギ種子へのエンドファイトの人工接種、右：人工接種したコムギの栽培

し、滅菌土壌(パーミキュライト:プロミックス=3:2)を詰めたセルトレイに移植し栽培した。必要に応じ、より大きなセルトレイまたは小型プラスチックポットに移植した。これらの実験および植物栽培は、植物防疫所が指定した実験区域および隔離温室で行った(図1右)。

(2) 感染の確認

エンドファイトを人工接種した3-4葉期の植物の葉をはさみで切り取り、葉片の汁をナイロン膜にプロットングした。これをエンドファイトの抗体を用いたウエスタン・プロットングにより、感染の有無を判定した。また、葉の表皮を0.05%のアニリンブルーによって菌糸を染色し光学顕微鏡で観察した。種子におけるエンドファイトは、種子を5%の水酸化ナトリウムに1日間浸漬して軟化させた後、スライドガラスとカバーガラスに挟んで押しつぶし、ガーナーズ液で染めて観察した。

(3) 種子形態の調査および交配

人工的に感染させた植物の自殖種子を採種し、その形態を調査した。また、一部の穂は、コムギ品種「農林61号」と正逆に交配して、得られた種子の形態およびエンドファイトの有無を上記の方法で調査した。

(4) 国内のコムギ近縁野生種の探索とエンドファイトの単離と系統解析

2017年9月20日~23日、北海道の東南部を調査し、ハマニンニク(*Leymus mollis*)、シバムギ(*Elymus repens*)、ハママムギ(*E. dahuricus*)、エゾカモジグサ(*E. yezoensis*)、エゾムギ(*E. sibiricus*)の種子および根茎を採集した。また、2018年7月25日~28日、山形県、秋田県、岩手県、宮城県および新潟県を調査し、カモジグサ(*E. tsukushiensis*)およびアオカモジグサ(*E. ciliaris*)の種子を採集した。採集した種子を滅菌した後、PDA培地に置床し、培地上に伸ばしたエンドファイトを分離した。さらに、鳥取大学鳥取キャンパス内に自生しているカモジグサのエンドファイトも調査した。これら分離した菌株の系統解析をrDNAのITS領域、 α -tubulin遺伝子およびelongation factor遺伝子の一部領域をシーケンスにより行った。また、動物毒性および耐虫性に関する遺伝子の解析も行った。

4. 研究成果

(1) コムギ系統へのエンドファイトを接種実験

エンドファイトをコムギ系統に人工接種すると、0~30%で共生が起こった。しかし、共生した植物は極度に矮化し出穂することはなかった(図2左)。一方、異種染色体添加および置換系統の中には、矮化せず出穂まで至るものが現れた(図2右)。特にオオハマニンニク(*Leymus racemosus*)のH染色体添加系統に、エンドファイト菌株AR3060をもたせた場合、穂は稔性を有し次世代種子を稔実させた。しかし、種子はすべてしわの多い異常な形態を示した。この種子は種皮にエンドファイトを保有しており、次世代においてもエンドファイトの共生が見られ、矮化を示さず正常に生育した(図3)。

この植物に、正常なコムギを正逆に交配したところ、エンドファイトをもつコムギ系統を種子親にした場合、しわ種子を突らせた。一方、このコムギ系統を花粉親として正常系統に交配したところ、正常な形態の種子が形成された。つまり、エンドファイトは種子を通じて次世代に伝達するが、花粉からは伝達しないことが分かった。共生個体を種子親として得たしわ種子から生じた個体のエンドファイトをウエスタン・プロットングで調査した。しかし、エンド

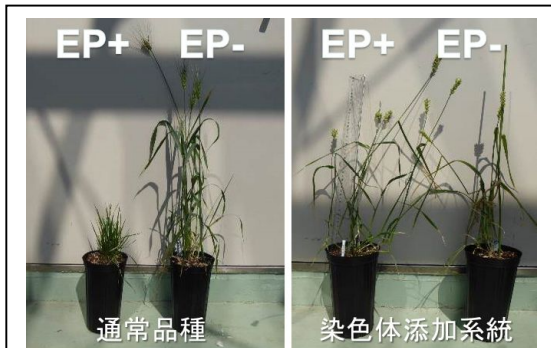


図 2 エンドファイトを人工的に感染させたコムギ系統。左：通常コムギに感染させたときエンドファイトをもつ個体(EP+)は、極度に矮化する。EP- はエンドファイトをもたない個体。右：異種染色体添加系統に感染させると EP+も、正常に生育し種子を稔実させる



図 3 エンドファイトと共生できる異種染色体添加系統の次世代植物。EP+も EP-と同様に生育する。

ファイトの存在は確認できなかった。

これらの研究で、エンドファイトと安定に共生関係を保つことができ、次世代にエンドファイトを伝達できるコムギ系統のあることが明らかになった。しかし、種子の形態が異常であったため、さらに良い組み合わせを探す必要がある。また、交配した次代でエンドファイトが消失したが、その原因は不明で、今後の研究が必要である。

(2) 国内での新たなエンドファイト菌株の分離

北海道、東北、および鳥取のコムギ近縁野生種からエンドファイトの単離を試みたところ、ハマニンニクからはエンドファイトが分離されなかった。一方、*Elymus* 属の種からはエンドファイトが分離でき、新しい菌株として登録した。この内、一部の菌を *L. racemosus* の H 染色体添加系統に接種したところ、共生の成立が認められた。これら国内分離菌株に関して、TEF1- α 遺伝子配列等に基づく系統解析を行った結果、全て *Epichloë bromicola* であると同定された。鳥取県内におけるカモジグサ (*E. tsukushiensis*) を宿主とする分離株群に関しては、塩基配列比較から 2 系統の菌系 (I 型, II 型) が存在することが示唆された。家畜毒性化合物 indole-diterpenes (I) および ergot alkaloids (E)、昆虫毒性化合物 loline alkaloids (L) および peramine (P) 生合成遺伝子の有無を検定した結果、I 型は E/P、II 型は L/P 生合成遺伝子を保有していた。一方、北海道由来のハママギ (*E. dahuricus*) を宿主とする *E. bromicola* 株においては、上記とは異なる系統株も見出され、E/P 遺伝子保有株に加えて P 遺伝子のみを保有する株も存在しており、二次代謝産物生合成能に関しても分化が生じている可能性が示唆された。これらの昆虫毒性化合物生合成遺伝子のみを保有する系統は、将来的なコムギへの導入系統として有用な候補株となることが期待される。

以上の研究結果から、矮性を示さずエンドファイトと共生できるコムギ系統のあること、共生した植物は穂をつけ種子を稔実させるが種子の形成異常を示すこと、エンドファイト共生は次世代にも伝達すること、国内のカモジグサ属植物にエンドファイトが見られることを明らかとした。今後、種子の異常を示さない組み合わせを見いだす必要があるが、エンドフ

ナイトとコムギの共生によって、コムギの改良ができる可能性のあることを明らかにすることができた。コムギのエンドファイトと共生し、安定して次世代に種子を伝播する報告は最初であり、実用化の可能性が大きいことから、国際特許出願に向けて手続きを行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：児玉 基一郎

ローマ字氏名：(KODAMA, motoichiro)

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：大学院連合農学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：00183343

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Wayne Roydon SIMPSON

ローマ字氏名：(SIMPSON, wayne roydon)

研究協力者氏名：Richard David JOHNSON

ローマ字氏名：(JOHNSON, richard david)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。