

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02187

研究課題名(和文)オリザ・ロンギスタミナータに由来するイネの環境ストレス耐性機構の解明と遺伝解析

研究課題名(英文) Characterization and genetic analysis for stress tolerance in rice lines carrying chromosome segments of *Oryza Longistaminata*

研究代表者

榎原 大悟 (Makihara, Daigo)

名古屋大学・農学国際教育研究センター・准教授

研究者番号：70452183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカの野生イネであるロンギスタミナータ由来の染色体断片を栽培イネ品種に導入した染色体断片置換系統群(LCSILs)の遺伝子型を次世代シーケンサーで解析するとともに、いもち病抵抗性、耐塩性および耐冷性を評価した。いもち病抵抗性には系統間で大きな変異が認められ、その違いはロンギスタミナータ由来遺伝子の供与親であるpLIA-1の染色体断片が導入されたためと考えられた。耐塩性を示した5系統におけるpLIA-1の染色体置換位置は既知の耐塩性QTLと一致していなかった。耐冷性の強い系統は見出されなかった。LCSILsはいもち病抵抗性および耐塩性育種のための交配材料として有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LCSILsにはロンギスタミナータ由来遺伝子の供与親に由来する多様ないもち病抵抗性遺伝子が含まれていた。また、LCSILsの中から同定された耐塩性系統は、既知の耐塩性QTLとは異なる位置で遺伝子供与親の染色体に置換されていた。これらの成果はロンギスタミナータが有する未利用の有用遺伝子を利用したイネの品種改良に繋がるものである。LCSILsの反復親として用いたバスマティは、イネの消費が急拡大しているアフリカのケニアでも高価格で取引される人気の高いイネである。本研究で得た情報に基づきLCSILsを育種利用し、バスマティの品種改良を進めることにより、ケニアにおける稲作の安定化に貢献することが出来る。

研究成果の概要(英文)：Longistaminata Chromosome Segment Introduced Lines (LCSILs), in which chromosome segments from the African wild rice longistaminata were introduced into a cultivated rice variety, were genotyped using next-generation sequencers. Then, their blast resistance, salt tolerance, and cold tolerance were evaluated. The large variation in blast resistance among the lines was attributed to the introduction of chromosome segments of pLIA-1, the donor parent for the longistaminata genes. Positions of pLIA-1 chromosome substitution in the selected salt-tolerant lines did not match the known salt-tolerant QTL. The LCSILs were shown to be useful as breeding material for blast resistance and salt tolerance.

研究分野：作物学

キーワード：イネ オリザ・ロンギスタミナータ 染色体断片置換系統 環境ストレス耐性 フェノタイプング 遺伝子解析

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アフリカのみで自生する野生イネ *Oryza longistaminata* Chev. et Roehr. (以下、ロンギスタミナータ) には、イネの栽培化の過程で失われた環境ストレス耐性に関する未利用遺伝子が豊富に保存されていると考えられている (Khush, 1997)。ロンギスタミナータの葯長は約 5mm あり、栽培イネの約 2.5 倍である (Hiroi et al., 1991; Maekawa 1996)。LCSILs の中でも大きな葯を持つ系統があり、葯が大きいほど充実花粉数が増加し受精に有利であるため、高い耐冷性を持つと予想される。また、予備試験において、LCSILs の塩ストレス条件下における生育には大きな変異があることを認めた。塩性湿地でも生息できるロンギスタミナータには高い耐塩能力が備わっていると考えられる。さらに、低肥沃条件下において旺盛な生育を示す系統があることを確認している。これらの変異をもたらした要因については不明であるが、ロンギスタミナータに由来する根系形質が関係している可能性が高いと考えている。また、ロンギスタミナータは耐旱性育種のための遺伝資源としても有望であると考えられている (Liu et al., 2004)。ロンギスタミナータは、地下茎を発達させ栄養繁殖を行う能力を持っており (He et al., 2014)、このような特殊な形質が環境ストレス耐性に関与している可能性も考えられる。

これらの形質を栽培イネに導入することによって、既存品種を超える環境ストレス耐性を持つイネ品種を開発できると予想される。ロンギスタミナータと栽培イネは、両者とも AA ゲノムを有するため交雑可能であるが、交雑不稔性や雑種不稔性が強く、そのままでは育種への利用が困難である。そこで、申請者らの研究グループは、アロマがあり世界的に人気の高いバスマティと呼ばれる栽培イネ品種の一つである Kernel Basmati のゲノムの一部をロンギスタミナータのゲノムに置き換えた 50 系統からなる染色体断片置換系統群 (LCSILs: *longistaminata* chromosome segment introduced lines) を作出した。LCSILs の環境ストレス耐性を評価・比較することによって、ロンギスタミナータに由来する遺伝子が関与する環境ストレス耐性系統を特定でき、育種利用への道筋をつけることが可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、ロンギスタミナータ由来の有用形質を利用することによって、イネの環境ストレス耐性を向上できるかどうかを明らかにすることを目的とした。予備試験および文献調査から有望であると考えられた、いもち病抵抗性、耐塩性および穂ばらみ期耐冷性に着目し、LCSILs の中から環境ストレス耐性の高い系統を同定し、同定した系統の環境ストレス耐性に関与する生育特性および生理・形態的形質を明らかにし、それらの形質がロンギスタミナータ由来であるかどうかについて検証した。

### 3. 研究の方法

#### 1) GBS によるジェノタイピング

LCSILs の GBS ライブラリは Poland ら (2012) および Furuta ら (2017) のプロトコルに従って作成し、ライブラリの配列決定は、Illumina Miseq を用いて実施した。得られたシーケンス情報の解析は、TASSEL-GBS 5.0 pipeline を用いて行った。

#### 2) いもち病抵抗性

ケニアに整備したいもち病検定圃場で栽培した LCSILs の発病程度を調査し、現地のいもち病菌レースに対する抵抗性を評価した。Hayashi and Fukuta (2009) の方法に従い、病原性の異なるいもち病菌レースを LCSILs に接種し発病程度を評価することで、LCSILs 各系統に含まれる可能性のあるいもち病抵抗性遺伝子を絞り込んだ。さらに、次世代シーケンサーで解読した LCSILs 各系統のゲノム配列と照合し、LCSILs が有するいもち病抵抗性遺伝子を推定するとともに、ロンギスタミナータ由来の染色体をもつ領域を同定した。

#### 3) 耐塩性

NaCl とアルカリ (pH=9) を組み合わせた処理区を設け、幼植物を用いた水耕試験を行った。塩およびアルカリ処理による地上部乾物重の減少程度および葉身  $\text{Na}^+$  含有率を測定した。また、ケニアのアルカリ塩土壌に対する生育および収量反応を栽培ベッドでの土耕試験および中性土壌とアルカリ土壌を用いたポット試験で調査し、ストレス耐性指数などを用いて生殖成長期における耐塩性を評価した。

#### 4) 穂ばらみ期耐冷性

ケニアの高地 (標高約 1150m) における冷涼期に LCSILs を栽培し、出穂期前後の低温が収量と収量構成要素に及ぼす影響を調査した。

### 4. 研究成果

#### 1) GBS によるジェノタイピング

GBS で得られた情報を用いて pLIA-1 および LCSILs の分子的特性評価を行い、得られたマーカーを用いて LCSILs 各系統における pLIA-1 由来の染色体領域を同定した。

#### 2) いもち病抵抗性

ケニアのいもち病検定圃場におけるスクリーニングにより、LCSIL6、LCSIL27 および LCSIL28 が現地のいもち病菌レースに対する抵抗性を有することが明らかになった。LCSILs の親品種である Kernel Basmati は激しく感染し、ロンギスタミナータの染色体を含む pLIA-1 は感染しなかった。したがって、LCSIL6、LCSIL27 および LCSIL28 のいもち病抵抗性は、pLIA-1 に由来するものと考えられた。

12 種のいもち病菌レースを用いた接種試験の結果、pLIA-1 はほぼ全てのレースに抵抗性を示した。LCSILs の発病程度の評価結果について Ward 法による階層クラスター分析を行ったところ、グループ A およびグループ B の 2 つのクラスターに分類された。グループ A には 13 系統の LCSILs と pLIA-1 が分類され、グループ B には 31 系統の LCSILs と Kernel Basmati が含まれた。グループ A はグループ A1 (LCSILs5 系統と pLIA-1) とグループ A2 (LCSILs8 系統) に、グループ B はグループ B1 (LCSILs27 系統と Kernel Basmati) とグループ B2 (LCSILs4 系統) に分けられた。グループ A の病斑型スコアの平均値はグループ B より有意に低く、より高度ないもち病抵抗性を有するものと考えられた。

さらに、12 種のいもち病菌レースに対する反応パターンから LCSILs 各系統および親品種が有する真性抵抗性遺伝子を推定し、クラスター分析の結果と比較したところ、グループ A1 は Pib、Pish、Pii・Pi3 または Pi5(t) のうちのひとつ、Pik-s を除く Pik の複対立遺伝子群のものの中の一つ、Piz-t、Pi12(t) または Pi20、未同定の遺伝子を保有すると考えられた。グループ A2 は Pia、Pib、Pii・Pi3 または Pi5(t) のうちのひとつ、Pik-s を除く Pik の複対立遺伝子群のものの中の一つ、Pi9(t) または Piz-t、Pi12(t) または Pi20(t)、未同定の遺伝子を保有すると推定された。グループ B1 は Pia、Pii または Pi5(t)、Pik-s と Pi1 を除く Pik の複対立遺伝子群の中の一つ、Pita または Pi20(t)、未同定の遺伝子を保有すると推定された。

推定された申請抵抗性遺伝子の座乗位置と次世代シーケンサーによるゲノム解析で明らかになった pLIA-1 由来染色体の置換位置を比較したところ、Pish、Pia、Pii、Piz-t および Pi19(t) で一致した。Pish の座上位置は LCSIL6、12、27 および 28 で、Pia は LCSIL8、16、34 および 36 で、Pii は LCSIL38 および 39 で、Piz-t は LCSIL28 および 40 で、Pi20(t) は LCSIL28 および 40 で pLIA-1 に置換されていたことから、これらの系統が有すると推定された真性抵抗性遺伝子は pLIA-1 に由来すると考えられた。Pik の座上位置は LCSIL13、29 および 48 で pLIA-1 由来染色体に置換されていた。いもち病菌レースに対する反応パターンからは、LCSILs 全系統の中でこれらの系統のみ Pik を保有しないと推定された。したがって、Kernel Basmati および他の LCSILs 系統は Pik を保有していると考えられた。また、Pi19(t) の座上位置は LCSILs 全系統で pLIA-1 由来染色体に置換されていなかったことから、Pi19(t) は LCSILs 全系統および Kernel Basmati に含まれると考えられた。

### 3) 耐塩性

水耕試験においては、葉身 Na<sup>+</sup>含有率と地上部乾物重との間には負の相関関係が認められた。多変量解析によって耐性を持つグループに分類された 9 系統の LCSILs は感受性系統よりも葉身 Na<sup>+</sup>含有率が低かった。また、アルカリ塩区の葉身 Na<sup>+</sup>含有率は塩区より高く、アルカリ塩区において地上部の生育は最も阻害された。塩区の地上部乾物重とアルカリ塩区の地上部乾物重の間には正の相関関係が認められ、塩区とアルカリ塩区で耐性を持つ系統は一致した。多変量解析によって、LCSIL 3、13、20 および 24 が耐塩性およびアルカリ塩耐性を示す系統として同定された。これらの系統では葉身 Na<sup>+</sup>含有率が低く維持されていた。

ケニアで行った栽培ベッドでの土耕試験においては、LCSIL19、23、38、および 44 の塩区における収量あるいは収量に関するストレス耐性指数が親品種より高かった。また、ポット試験においては、LCSIL19 および 48 が土壌 pH にかかわらず塩ストレス耐性を示す系統として同定された。アルカリ土壌では葉身 Na<sup>+</sup>含有率と収量との間に負の相関関係が認められ、耐性系統の葉身 Na<sup>+</sup>含有率は感受性系統より低かった。生殖成長期における耐塩性系統として LCSIL19 が選抜された。

栄養成長期および生殖成長期における耐塩性系統として選抜された LCSIL3、13、20、24 および LCSIL19 の pLIA-1 由来染色体は第 1、3、4、5、10 および第 4 染色体に位置し、既知の耐塩性 QTL と必ずしも一致しなかった。今後、本研究で同定された系統が有する耐塩性機構の解明および QTL 解析を進める予定である。

### 4) 耐冷性

LCSILs からは耐冷性の強い系統は見出されなかったため、本研究で用いたロンギスタミナータは耐冷性育種のための遺伝資源としては適していないと考えられた。

## 引用文献

Furuta, T., Ashikari, M., Jena, K. K., Doi, K., & Reuscher, S. (2017). Adapting genotyping-by-sequencing for rice F2 populations. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(3), 881-893.

- Hayashi, N., & Fukuta, Y. (2009). Proposal for a new international system of differentiating races of blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) by using LTH monogenic lines in rice (*Oryza sativa* L.). JIRCAS Working report, 63, 11-15.
- He, R., Salvato, F., Park, J. J., Kim, M. J., Nelson, W., Balbuena, T. S., ... & Gang, D. R. (2014). A systems-wide comparison of red rice (*Oryza longistaminata*) tissues identifies rhizome specific genes and proteins that are targets for cultivated rice improvement. *BMC plant biology*, 14(1), 1-21.
- Hiroi, K., Al Mamun, A., Wada, T., & Takeoka, Y. (1991). A Study on the interspecific variation of spikelet structure in the genus *Oryza*. *Japanese Journal of Crop Science*, 60(1), 153-160.
- Khush, G. S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant molecular biology*, 35(1), 25-34.
- Liu, L., Lafitte, R., & Guan, D. (2004). Wild *Oryza* species as potential sources of drought-adaptive traits. *Euphytica*, 138(2), 149-161.
- Maekawa M, Rikiishi K, Matsuura K, Noda K (1996) Genetic analysis of rhizomatous trait of wild species (*Oryza longistaminata*) in rice (in Japanese). *Breed Sci* 46: 323
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., & Jannink, J. L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PloS one*, 7(2), e32253.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa, T., Wainaina, C. M., Shibata, A., Lucob-Agustin, N., Makihara, D., Kikuta, M., Menge, D. M., Gichuhi, E. W., Samejima, H., Kano-Nakata, M., Kimani, J. M., Musila, R. N., Yamauchi, A. and Inukai, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 The outstanding rooting1 mutation gene maintains shoot growth and grain yield through promoting root development in rice under water deficit field environments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agronomy and Crop Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jac.12524	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 富田怜那・Emily Waringa Gichuhi・菊田真由実・榎原大悟
2. 発表標題 オリザ・ロンギスタミナータ染色体断片置換系統群の生育初期における耐塩性および耐アルカリ塩性の評価
3. 学会等名 日本作物学会第248回講演会、とりぎん文化会館、鳥取市
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rena Tomita, Emily Waringa Gichuhi, Daniel Makori Menge, Mayumi Kikuta, Daigo Makihara
2. 発表標題 Evaluation of Salinity Tolerance in Rice Lines Carrying Overlapping Chromosome Segments of <i>Oryza longistaminata</i> in a Genetic Background of Kernel Basmati
3. 学会等名 The 10th Asian Crop Science Association Conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田怜那・菊田真由実・榎原大悟
2. 発表標題 土壌塩分モニタリングシステムの開発と異なる灌漑条件下における土壌塩動態とイネの生育との関係の解析
3. 学会等名 日本作物学会第252回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Gichuhi Emily, Maekawa Masahiko, Samejima Hiroaki, Kikuta Mayumi, Menge Daniel, Kimani John, Makihara Daigo and Akira Yamauchi
2. 発表標題 Yield performance of Kernel Basmati lines introgressed with TAWAWA1, APO1, and Ehd1 genes grown with and without fertilizer, in Kenya
3. 学会等名 日本育種学会第135回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川友美、柴田晃秀、高橋(野坂)美鈴、西内俊策、鮫島啓彰、菊田真由美、榎原大悟、山内章、犬飼義明
2. 発表標題 異なる水条件下における our1 変異体の根の成長特性
3. 学会等名 第49回根研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gichuhi Emily, Maekawa Masahiko, Kikuta Mayumi, Menge Daniel, Kimani John and Makihara Daigo
2. 発表標題 Evaluation of yield-related traits of Kernel Basmati rice carrying Oryza longistaminata chromosome segments, in Kenya
3. 学会等名 日本作物学会第248回講演会
4. 発表年 2019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 分担者	犬飼 義明  (Inukai Yoshiaki)  (20377790)	名古屋大学・農学国際教育研究センター・教授   (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	菊田 真由実  (Kikuta Mayumi)  (20788418)	広島大学・統合生命科学研究科・助教    (15401)	
研究分担者	土井 一行  (Doi Kazuyuki)  (80315134)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授    (13901)	
研究分担者	前川 雅彦  (Maekawa Masahiko)  (00142703)	岡山大学・資源植物科学研究所・教授    (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ケニア	ケニア農畜産業研究機構			