

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15507

研究課題名（和文）抗菌活性に着目した発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明

研究課題名（英文）Study on genetic control mechanism of excess water tolerance during germination focusing on antibacterial activity

研究代表者

原 尚資（HARA, Takashi）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・上級研究員

研究者番号：20721426

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、発芽時耐湿性が極めて弱いソバで新たに作製した自家和合性系統を用いることで、これまで基礎的知見が不足していた抗菌活性に着目し発芽時耐湿性を不定根形成能と抗菌活性に分けて評価した。その結果、不定根形成能と抗菌活性にはともに多様な遺伝的変異が存在し、発芽時耐湿性は不定根形成能と抗菌活性の組合せにより制御されていることを明らかにした。本課題成果は不定根形成能と抗菌活性に基づく発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明に向けた基礎的知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

作物における耐湿性は、収量性および収量安定性に直接影響することから作物育種において重要な課題となる。しかしながら、発芽時耐湿性は、発芽（生存）と未発芽（腐敗死）に分かれることに加え、土耕・水耕などを用いた発芽時耐湿性評価は、再現性を得ることが難しく、発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明に向けた障壁となっていた。本課題では、畑作物種の中で発芽時の湿害に極めて弱いソバを用いて、これまで基礎的知見が不足していた抗菌活性に着目した発芽時耐湿性の評価を実施することで、抗菌活性と発芽時耐湿性および不定根形成との関連性を明らかにしたものであり、今後の遺伝的改良に向けた研究や栽培管理に活用可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study focused on antibacterial activity, which had been lacking in basic knowledge in the evaluation of excess water tolerance during germination. We evaluated the excess water tolerance during germination by clarifying the adventitious root formation ability and antibacterial activity of common buckwheat, which has very low excess water tolerance. As a result, we clarified that there is wide genetic mutation in both adventitious root formation ability and antibacterial activity, and that excess water tolerance during germination is controlled by the combination of adventitious root formation ability and antibacterial activity. These results of this study will provide basic knowledge for elucidating the genetic control mechanism of excess water tolerance during germination based on adventitious root formation ability and antibacterial activity.

研究分野：植物育種学

キーワード：発芽時耐湿性 抗菌活性 遺伝解析 ソバ

1. 研究開始当初の背景

植物が水分ストレスに対して、形態・生理学的にどのような反応機構を有しているかを明らかにすることは、植物の適応戦略の解明に繋がる課題である。さらには、近年の温暖化をはじめとする地球規模の気候変動は、降水量や降水強度に変化をもたらすと予測されており、水分ストレスに対する植物の適応戦略に着目した研究の重要性は一段と高まっている。作物においては、水分ストレスに対する反応は耐旱性、耐湿性として、収量性およびその安定性に大きく寄与する重要な形質となる。世界的に見ると耐旱性に着目した研究が多いが、今後の予測されている気候変動においては、わが国では耐湿性研究の進展も重要となる。

作物における耐湿性は大きく分けると忌避と耐性に分類される。忌避はイネやムギなどにおける通気組織の発達や酸素漏出バリアの形成など、長期間の嫌気環境下に対するものであり、主に発芽後の生育時耐湿性に大きく影響する。耐性は短期間の嫌気環境下に対するものであり、発芽時など忌避が出来ない状況において、解糖・発酵系の活性などにより生き長らえようとするものである。この発芽時耐湿性は発芽(生存)と未発芽(腐敗死)に分かれるため、収量性およびその安定性への影響は極めて大きく、特に主として水田転換畑で栽培されているソバやダイズにおいて深刻な問題を引き起こしている(右下図1にソバにおける湿害発生状況を例示、北海道農業研究センターにおける湿害発生時のソバ収量は、平年の40%に減収)。

トウモロコシやマメ科作物の生育時耐湿性研究では、通気組織の他にも茎からの不定根形成が耐湿性の獲得に貢献することが知られており、不定根形成能に関する遺伝解析により関連遺伝子領域が特定されている。また、不定根形成は冠水発芽時の土中の幼茎においても生じ、低酸素による幼根の損傷や腐敗という幼根障害からの回復を通して、発芽時耐湿性機構のひとつとして重要なものと考えられている。申請者のソバにおける観察においても、不定根形成と発芽時耐湿性との関連性が確認されている。しかしながら、不定根形成による土耕・水耕などを用いた発芽時耐湿性評価は、再現性を得ることが難しく、発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明に向けた障壁となっている。

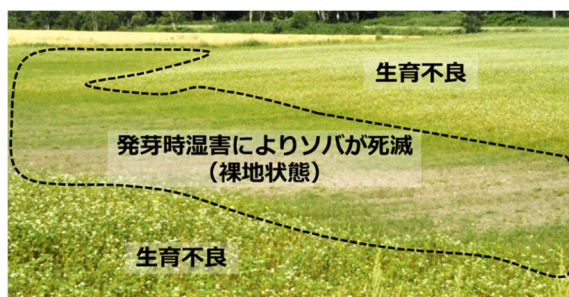


図1 2018年北海道ソバ畑での湿害の発生状況

このような現状のなかソバでは、土耕・水耕での発芽時耐湿性評価において、幼根および幼茎における腐敗程度に差異があること、水耕評価において、従来は不定根形成が無く腐敗したため弱耐湿性とされていた系統の中に、滅菌水の使用により強耐湿性と分類される程の不定根形成を示す系統があることを確認している。同様の事例として、ダイズを用いた土耕耐湿性評価において、土壌殺菌や種子殺菌処理により発芽時耐湿性の向上が明らかにされている。これらの基盤的成果や知見から、これまで不定根形成による耐湿性の発現と一括りで考えていた発芽時耐湿性は、低酸素による幼根障害という物理的要因からの回復に加え、抗菌活性という生物的要因が関わっていることが推察された。すなわち、発芽時耐湿性には、不定根形成能の有無や強弱に加え、元来腐敗の生じやすい多湿環境において強い抗菌活性を有することで、物理的な損傷が生じた幼根から菌が侵入することや、菌が活性化するのを抑え、不定根が形成されるまで生存を可能とする機構である。このことは、不定根形成能を有していても腐敗の進行を防ぐことが出来なければ、不定根の形成に到らないことを示し、不定根形成能の差異と抗菌活性能の差異の影響とが複雑に合わさることで、各評価法および評価法間での再現性に影響を与えているのではないかと推察される。

従って、発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の詳細な解明のためには、不定根形成における不定根形成能および抗菌活性能の影響を個々に明らかにしたうえで、不定根形成の評価およびその遺伝解析の実施が必要となる。

2. 研究の目的

本研究は、播種時の冠水処理において畑作物種の中でも湿害に極めて弱いソバを用いて、抗菌活性に着目した発芽時耐湿性の評価、分離集団の作製とその表現型解析、および多数のDNAマーカーと高密度連鎖地図を用いたQTL解析を実施することで、作物が有する発芽時耐湿性における遺伝的制御機構を明らかにする。これまでの発芽時耐湿性の評価法は、様々な改良を加えても、各評価法および評価法間で再現性を高く維持することが困難であった。そこで本研究では、新たな要因として考えられた抗菌活性という生物的要因に着目し、抗菌活性能の差異が湿害発生時の不定根形成に与える影響を調査し、不定根形成における不定根形成能と抗菌活性能の作用を明確にした発芽時耐湿性評価と遺伝解析を実施することで、発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の詳細に迫るものである。

3. 研究の方法

他殖性であるソバでは、遺伝的に均一な種子を毎回供試することが困難であり、評価法の再現性に影響を与える。本研究では、近年育成された自家和合性系統と既存品種・在来種とを交配することで、国内のソバ集団が有する遺伝的変異を固定した自家和合性系統（F₅世代）を供試し、湿度・温度が一定に保たれた（70%・25℃、湿害発生時環境を参考）屋内型植物育成キャビネット内で、各評価法での発芽時耐湿性評価を実施した。これにより、（1）不定根形成における不定根形成能および抗菌活性性能の関連性を明らかにすることで、再現性の高い表現型解析を実施した。さらに、発芽時耐湿性の遺伝解析を行うことで、（2）発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明を試みた。

（1）不定根形成における不定根形成能および抗菌活性性能の関連性解析

既存法による発芽時耐湿性評価

土耕評価：屋内型植物育成キャビネット内において、育苗ポットに培養土を入れ、各自家和合性系統の種子 10 粒程度を播種。播種 48 時間後に（予備試験結果で湿害の影響が最も強く発現）育苗ポットを水中に沈め 24 時間の冠水処理を実施。冠水処理後 10 日目（播種後 13 日目）まで発芽個体数を調査した。

水耕評価：屋内型植物育成キャビネット内において、プラスチックプラントボックス内の蒸留水で湿らせたろ紙上に、各自家和合性系統の種子 10 粒程度を播種。播種 48 時間後に発芽した種子を 50ml 遠沈管に移し、蒸留水で満たし真空デシケーターを用いて 10 分間の脱気後、18 時間の冠水処理を実施した。冠水処理後、種子を再びプラスチックプラントボックス内の蒸留水で湿らせたろ紙上に静置し、冠水処理後 10 日目まで腐敗程度および不定根発根の有無を調査することで、各系統の発芽時耐湿性を評価した。

滅菌法による不定根形成能および抗菌活性性能の評価

滅菌法：既存法において発芽時耐湿性に差異の認められた系統に対して、滅菌水（20ppm 次亜塩素酸水、予備試験で供試した系統において腐敗および幼根伸長阻害が生じない濃度）を用いて、既存法の水耕評価と同様に冠水処理・腐敗・不定根発根調査を行うことで、各系統の不定根形成能および抗菌活性性能を評価した。

（2）発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明

発芽時耐湿性において差異のある自家和合性系統間での交配を行い、F₂ 個体別 F₃ 系統を作製し、各系統での発芽時耐湿性の表現型評価とともに、ゲノムワイド遺伝子型解析結果を用いた QTL 解析を実施することで、発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明を試みた。

4. 研究成果

（1）不定根形成における不定根形成能および抗菌活性性能の関連性解析

既存法による発芽時耐湿性評価

土耕評価：自家和合性系統（102 系統）に対する発芽時耐湿性評価の結果、発芽率が 0.0～91.7% におよぶ広範な分布を示した（図 2A）。ソバの近縁種であり強い耐湿性を有している宿根ソバ（*F. cymosum*）の発芽率が 85.0% であったことから、80.0% 以上を示した 2 系統が強耐湿性候補系統と考えられた。一方で自家和合性系統を用いた本研究においても、強耐湿性候補系統の自家和合性系統内での頻度は 2.0% であり、ソバは湿害に極めて弱い畑作物種であることを支持する結果となった。また、これらの強耐湿性候補系統内の各個体における冠水処理での播種後発芽日を調査した結果、無冠水処理時と同等となる 6 日目から 12 日目までの多様な分布を示し（図 2B）、冠水処理から回復する様態に差異があることが推察され、水耕評価等による根の様態の詳細な観察が必要であると考えられた。

水耕評価：土耕評価において強耐湿性を示した 2 系統と弱耐湿性系統を用いて、水耕評価による発芽時耐湿性評価を実施した結果、弱耐湿性系統はいずれも冠水処理後の数日で腐敗が生じ、冠水処理後 10 日目では腐敗菌に覆われた状態となった。一方、強耐湿性系統では腐敗個体が含まれるものの、腐敗が生じず不定根形成に到る個体が確認された（図 3）。本研究においては強耐湿性を示した系統が 2 系統のみであるため、供試系統数を増やしての再試験が必要と考えられるものの、土耕評価と同様な傾向が認められたとともに、ソバの発芽時耐湿性と不定根形成能および抗菌活性性能との強い関連性が推察された。

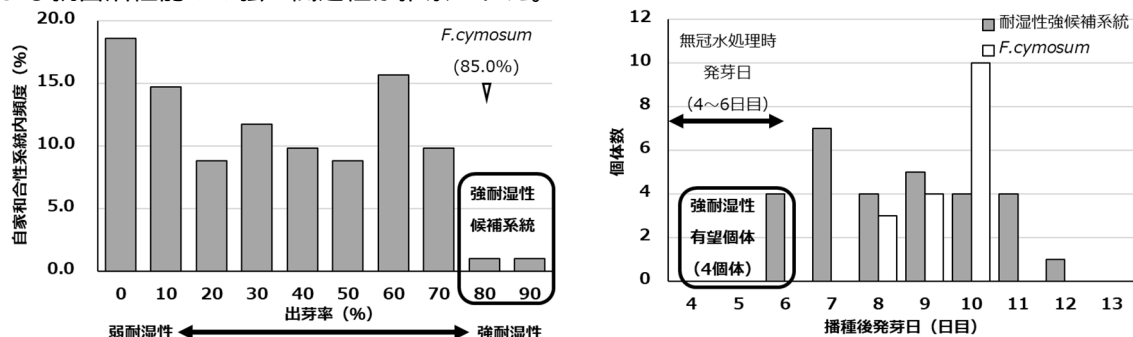


図 2 土耕評価によるソバ自家和合性系統（102 系統）の発芽時耐湿性評価。A：自家和合性系統内に確認された発芽時耐湿性の差異，B：強耐湿性候補系統内で確認された播種後発芽日の差異

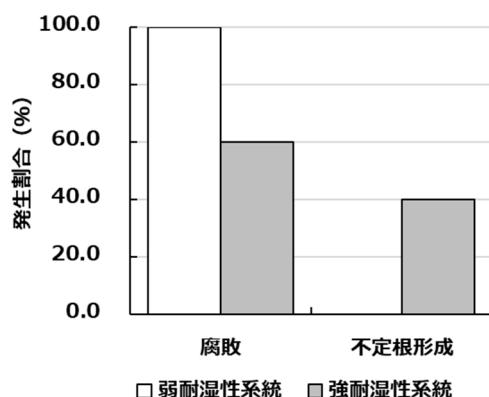


図3 水耕評価による強・弱耐湿性系統の発芽時耐湿性評価。

滅菌法による不定根形成能および抗菌活性能の評価

自家和合性系統に対する滅菌法による発芽時耐湿性評価を実施することで、これまでその詳細が不明となっていた、ソバの発芽時耐湿性における不定根形成能と抗菌活性能の関連性についての知見を得ることができた(図4に一部を抜粋)。腐敗個体の発生割合においては、非滅菌(蒸留水使用)条件でも低い系統(抗菌活性能が高い:図4の自家和合性系統1と2)、非滅菌条件では高いが滅菌(滅菌水使用)条件では低くなる系統(自家和合性系統3~5)および非滅菌と滅菌条件のどちらにおいても高い系統(抗菌活性能が低い:自家和合性系統6)と自家和合性系統間で差異があることが明らかとなった。不定根形成個体の発生割合も同様に、非滅菌条件で高く滅菌条件ではさらに高くなる系統(不定根形成能が高い:自家和合性系統1)、非滅菌条件では低い滅菌条件では高くなる系統(自家和合性系統2~4)、非滅菌と滅菌条件のどちらにおいても低い系統(不定根形成能が低い:自家和合性系統5)および非滅菌と滅菌条件の腐敗の発生により不定根形成能が不明の系統(自家和合性系統6)と自家和合性系統間で差異があることが明らかとなった。さらに、不定根形成能と抗菌活性能の強弱は関連性が低く、不定根形成能と抗菌活性能の様々な組合せによりソバの発芽時耐湿性が制御されていると推察された。これらのことから、強耐湿性の獲得に際しては不定根形成能と抗菌活性能を別とした遺伝的制御機構の解明、育種および湿害対策が重要となると考えられた。

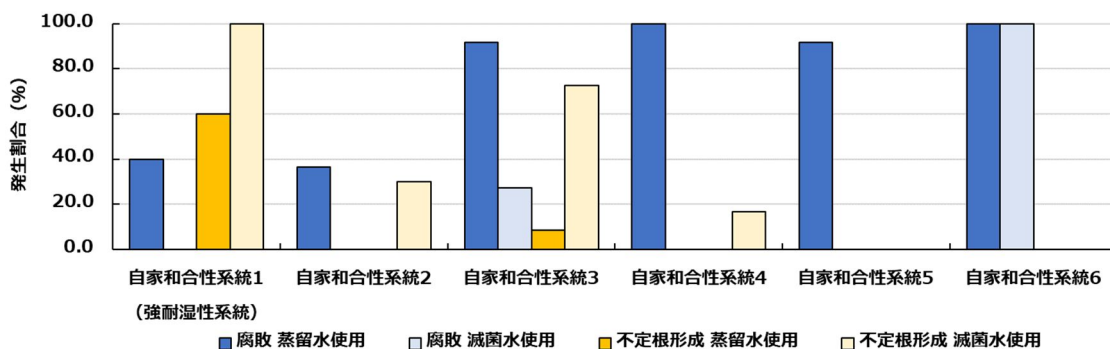


図4 滅菌法により確認された自家和合性系統間での不定根形成能および抗菌活性能の差異。

(2) 発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明

弱耐湿性を示した自家和合性系統において、冠水処理後に出芽した個体を選抜し得られた自殖種子に対して、再度、冠水処理による計2回の選抜を繰り返すことで、耐湿性の向上が確認されたことから(図5)、ソバの耐湿性には遺伝的制御機構が大きく関与していると推察された。そこで、(1)において確認された発芽時耐湿性に差異のある自家和合性の両親個体(図2Aにおける発芽率0.0%の弱耐湿性個体と、図2Bにおける強耐湿性有望個体との交配)を用いることで、発芽時耐湿性の遺伝的制御機構の解明に供試する遺伝解析用の分離集団(F₂個体別F₃系統)を作製した。加えて、ソバにおいて、Tailed-PCR法に基づくNGS(Next-Generation Sequencing)解析による効率的なゲノムワイド遺伝子型解析法を新たに構築した。本法はソバの全ゲノムに対して、約30万塩基間隔で特異的プライマー領域を探索し、設計可能となった1,136ペアのTailed-PCRプライマーを用いたものである。一方、F₂個体別F₃系統を供試した発芽時耐湿性の表現型評価において、同一系統内の種子間においても発芽時耐湿性の様態に差異が認められた。これは供試したF₂個体別F₃系統の遺伝的固定度の低さが要因と考えられ、さらに遺伝的固定度を高めた集団を供試する必要があると考えられた。そこで本研究期間終了後において、世代促進により遺伝的固定度を高めており、各系統の表現型評価と遺伝子型解析の結果が得られ次第、QTL解析を実施する予定である。

加えて、ソバの発芽時腐敗菌としては、これまでに *Rhizopus* 属菌が明らかとされている。しかしながら、本研究における冠水処理後の腐敗様相の目視による比較において、複数の腐敗菌の存在に加え、自家和合性系統間で菌叢に差異がある可能性が考えられた。菌の種類や菌叢の差異が滅菌法の効果に影響を与えると考えられ、今後、本研究で得られた知見を基盤として、土壌菌の研究者らとの共同研究へと発展させ、耐湿性に関連する菌の特定を含めた遺伝的制御機構の詳細に迫ることで、湿害対策として多くの労力と費用を費やして実施されている、明・暗渠や高畝栽培等の栽培管理技術とは異なる、各栽培地土壌における菌叢に合わせた土壌改良法や播種法の提言など、湿害対策のための新たな栽培管理の指針を示すことが可能になると期待された。

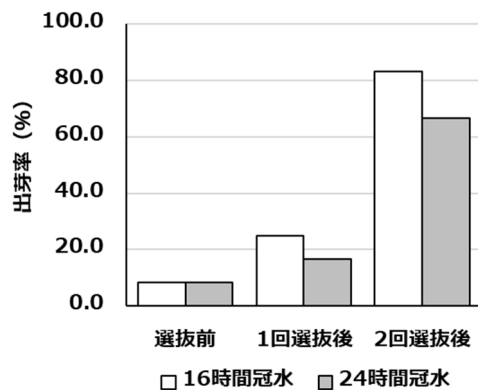


図5 弱耐湿性自家和合性系統を用いた耐湿性選抜試験。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 石黒浩二、原尚資、大塚しおり	4. 巻 89
2. 論文標題 北海道農業研究センターにおけるソバ育種の現状と今後の展望	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 北農	6. 最初と最後の頁 37～41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原尚資、佐藤里絵、岡本薫、圓山恭之進、松井勝弘、鈴木達郎、石黒浩二、大塚しおり、陳ズイ坤、手島玲子、近藤康人、安井康夫
2. 発表標題 ソバアナフィラキシーリスクマネジメントに向けた低アレルギー特性系統の探索と獲得
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------