

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380012

研究課題名（和文） オオムギの耐塩性に関わる生理機構と遺伝子座の統合的解明

研究課題名（英文） Physiological mechanisms and quantitative trait loci for the salt tolerance in barely

研究代表者

平沢 正 (HIRASAWA TADASHI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：30015119

研究成果の概要（和文）：耐塩性の高いオオムギ品種 OUE812 と低い品種 OUC613 の塩ストレス反応を比較して、耐塩性の生理機構を検討した。その結果、OUE812 は OUC613 に比較して、短期間の塩ストレス条件では吸水を維持して、そして長期間の塩ストレス条件では葉内の K^+ 濃度に対する Na^+ 濃度の比を小さく維持して、地上部の成長速度を高く維持することが分かった。さらに、OUE812 は OUC613 に比較して、塩ストレス条件でも稔実歩合が高いことによって子実重を大きく維持することが分かった。そして、塩ストレスによる稔実歩合低下に関する量的形質遺伝子座を、Russia 6 と H.E.S.4 の組換え自殖系統群を用いて、4 領域推定した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the physiological mechanisms of salt stress tolerance in barely by using a tolerant cultivar, OUE812 and a susceptible cultivar, OUC613. OUE 812 plants produced heavier dry matter by keeping high root hydraulic conductance under the short term salt stress and by decreasing Na^+/K^+ ratio in leaves under the long term salt stress compared with OUC613. Under the long term salt stress, OUE 812 plants showed the higher capacity of grain ripening compared with OUC613, resulting in the significant heavier grain weight in OUE 812 plants. By using recombinant inbred lines derived from Russia 6 and H.E.S.4, four regions of quantitative trait loci for grain ripening capacity were identified under salt stress conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
23 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：作物学・雑草学

キーワード：オオムギ、吸水、成長、耐塩性、稔実歩合、量的形質遺伝子座、葉内イオン濃度

1. 研究開始当初の背景

(1) 塩ストレスは世界の作物生産を制限する最も大きな問題の一つである。現在問題とな

っている土壌の塩類集積のかなりの割合が人間の不適切な土壌管理や作物の栽培によって発生している (FAO, 2008)。農地の塩類

集積問題を解決していくためには、塩類の集積した農地に耐塩性作物を栽培し、作物生産を維持しつつ、土壌を修復し保全していくことが必要とされる(平沢, 2008)。このプロセスの展開には高い耐塩性を有する作物をまず育成する必要がある。そして、耐塩性作物を効率的に育成していくためには、耐塩性に関わる作物の生理と遺伝機構を解明し、育種における選抜指標を明らかにすることが必要となる。

(2) 植物において塩ストレスは根からの吸水が抑制されておこる水ストレスによる影響が最初に現われ(フェーズ1)、次いで体内に過剰に蓄積された塩類やイオンによる影響が現われる(フェーズ2)(Munns, 1993)。作物の耐塩性機構については、このような塩ストレス発生過程に着目して、近年漸くその機構が解明されつつある。たとえば、フェーズ1においては、根の水透過性(Katsuhara, 2007)や根からのシグナル機構(Munns and Cramer, 1996; Munns, 2005)が関与し、フェーズ2においては、地上部に送られる塩分量の制御機構(山内, 1989; Naito et al., 1994; Tsuchiya et al., 1994; 間藤, 1999; Davenport et al., 2005)、細胞質の塩分からの隔離機構(Hare et al., 1998; 間藤, 1999, 2004; Chen et al., 2002; Munn, 2005; 吉田, 2005)が関与する。

耐塩性の最も高い作物の一つであるオオムギについて国の内外から集められた岡山大学のコレクション約6700種の遺伝資源がスクリーニングされ、耐塩性の高いオオムギと弱いオオムギ品種の集団が明らかにされた(間野, 1996)。私たちは、これらの集団から、乾物生産、成長速度を指標に、最も耐塩性の強い品種と弱い品種(日本の代表的品種も含まれる)を選抜してきた。

2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究に基づいて、以下のことを明らかにする。

(1) 塩ストレス条件下で耐塩性の強いオオムギ品種が光合成速度、乾物生産と子実生産を高く維持する生理的プロセスとその分子機構を解明する。

(2) 塩ストレス条件下で耐塩性の大きく異なるオオムギ品種の Na^+ と Cl^- の集積の相違を明らかにし、 Na^+ と Cl^- の集積が生理機構に及ぼす影響を解明する。

(3) 耐塩性に関わる量的形質遺伝子座(QTL)を検出する。

3. 研究の方法

(1) 塩ストレスに対する生理反応の解析には、これまでの研究で選抜してきた耐塩性の高いオオムギ品種 OUE812 と低い品種 OUC613 を用い、塩ストレス下での稔実歩合の QTL 解析には、岡山大学の作成した Russia 6 と H.E.S.4 の組換え自殖系統群(2003)を用いた。

(2) 約1週間の短期間の塩ストレス処理と幼植物期から成熟期にいたる長期間の塩ストレス処理を行った。

短期間塩ストレス処理では、25°Cの脱イオン水に暗黒条件で一晩浸漬した種子を、0.25 mM CaSO_4 溶液で25°C、暗黒条件に2日間生育させた後、1/2倍濃度の Hoagland の水耕液に移して環境制御室内(日長14時間、光強度約500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温25°C/25°C(昼/夜)、相対湿度80%/80%(昼/夜))で栽培した。第1葉展開完了時に、一部の植物を100mMの NaCl を含むHoaglandの水耕液に移し7日間生育させた(100mM NaCl 処理)。他の植物は引き続き NaCl を含まない水耕液に生育させた(0mM NaCl 処理)。

長期間塩ストレス処理では、バーミキュライトを充填した1/2000aワグネルポットに、1ポット3株、1株2本の密度で1/2倍濃度のHoaglandの水耕液を用いて、ガラス室内で生育させた。塩ストレス処理は、播種約1ヶ月後から成熟期まで NaCl を含まない水耕液(0mM NaCl 処理)、100mMあるいは200mMの NaCl を含む水耕液(それぞれ100mM NaCl 処理、200mM NaCl 処理)を灌水することで行なった。

(3) 植物体は、葉身、茎+葉鞘、根、穂(出穂期後)に分け、葉面積を自動面積計(AAM-9、林電工社製)で測定後、80°Cで5日間以上通風乾燥させて乾物重を測定した。収量構成要素の測定に際しては、穂から小穂を外して2.2mmのふるいにかけて、ふるいに残った子実を整粒とした。千粒重、整粒重は水分含量12.5%の値で示した。

(4) 光合成速度と拡散伝導度は携帯光合成蒸散測定装置(LI6400; LI-COR)で、葉温25°C、光強度2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、飽差約1.5kPa、同化箱内の CO_2 濃度370 $\mu\text{L L}^{-1}$ で測定した。水ポテンシャルはサーモカップルサイクロメーター(HR33T; Wescor)、根の表面積は根系画像解析ソフト(Win-RHIZO; Regent Instruments)を用いて測定した。

(5) 植物体内のイオンは粉碎試料を80°Cの水で3~6時間抽出し、イオンクロマトグラフィー(HIC-6A; 島津製作所)を用いて濃度を

測定した。アクアポリン遺伝子の発現量の測定は Mahdich ら(2008)の方法に従い、リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 7300) を用いて行なった。

(6) Russia 6 と H.E.S.4 の組換え自殖系統群はパーミキュライトを充填した 1.1L の塩化ビニル製の容器に 1 株 1 本植えて Hoagland 水耕液を用いて生育させた。容器の下部には 2 つの排水孔を設け十分に排水できるようにした。第 1 葉展開完了時から収穫期まで NaCl を含まない水耕液 (0mM NaCl 処理)、あるいは 100mM の NaCl を含む水耕液 (100mM NaCl 処理) で灌水した。灌水は 3 ~ 4 日おきに行った。NaCl 処理は各処理ともに 3 反復で行った。穂の稔実調査は主茎を用いた。QTL 解析はソフトウェア (Win QTL Cartographer ver2.5) を用いて Composite Interval Mapping (CIM) で行った。

4. 研究成果

(1) 短期間の塩ストレス処理では、葉面積、光合成速度、拡散伝導度はいずれも OUE812 は OUC613 に比較して、100mMNaCl 処理 1 日後では低下程度が大きかったが、処理 2 日以降に逆に低下程度は小さく、値は高く維持された。100mMNaCl 処理した両品種の葉の水ポテンシャルは処理 1 日後では等しかったが、処理 2 日以降は OUE812 が高い傾向があり、葉の水ポテンシャルと葉面積、光合成速度、拡散伝導度との間には高い相関関係が認められた。根の表面積は 100mMNaCl 処理 2 日以降で OUE812 は OUC613 に比べて大きい傾向があった。100mMNaCl 処理における根のアクアポリン遺伝子の発現量は 100mM NaCl 処理 2 日後には、0mMNaCl 処理に比較して OUC613 では減少する遺伝子が多かったのに対し、OUE812 では増加する遺伝子が多かった (図 1)。以上の結果から、100mMNaCl 処理 2 日以降に認められた OUE812 の葉面積と光合成速度の低下の抑制は、根の成長を高く維持し、さらにアクアポリン遺伝子の発現量が増加することにより吸水を維持し、葉の水ポテンシャルを高く維持したことによるものと推察された。

(2) 長期間の塩ストレス処理では、乾物重は 100mMNaCl 処理開始後 5 週間には OUC613, OUE812 とともに約 90%に減少し、12 週間では 60~65%に減少したが、減少程度の品種間差は認められなかった。光合成速度は 100mMNaCl 処理開始後 4、10 週間では OUC613、OUE812 とともに 75~85%、14 週間

では 70~80%に減少し、減少程度は OUE812 が OUC613 よりも小さい傾向が認められた。

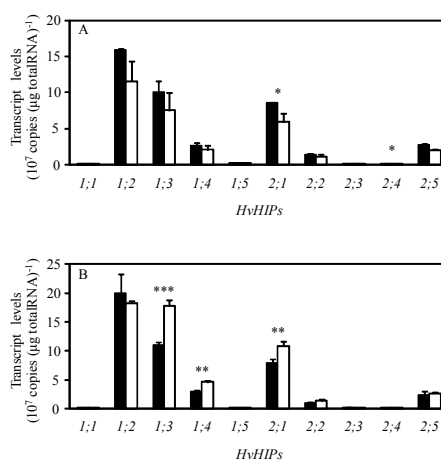


図 1 OUC613(A) と OUE812(B) の NaCl 処理 2 日後におけるアクアポリン遺伝子(HvPIP1;1 - HvPIP2;5)の発現量の比較。黒棒は 0mMNaCl 処理、白棒は 100mMNaCl 処理を示す。縦棒は標準偏差(n=3)を示す。*, **, *** は NaCl 処理区間にそれぞれ 5, 1, 0.1%水準で有意差があることを示す。

表 1 100mM NaCl 処理が収量構成要素に及ぼす影響

NaCl treatment	Variety	Panicle number (hill ⁻¹)	Number of spikelets per panicle (grain panicle ⁻¹)	Percentage of ripened grains (%)	1000-grain weight (g)
0mM	OUC613	44.8±1.9	35.7±0.4	80.3±4.1	53.7±3.4
	OUE812	20.6±3.0	60.6±1.2	86.7±4.1	69.1±0.7
	t-test	***	***	n.s.	**
100mM	OUC613	26.7±1.0 (60)	31.6±0.7 (89)	55.9±8.8 (70)	53.8±4.0 (100)
	OUE812	20.2±3.7 (98)	48.2±3.1 (80)	82.2±3.7 (95)	68.0±0.6 (99)
	t-test	*	***	***	**

() 内の数字は、それぞれの品種における 0mM NaCl 処理に対する割合 (%)。*, **, ***は、それぞれ両品種の間に 5%、1%、0.1%水準で有意差があること、n. s. は有意差がないことを示す。

稔実歩合は 100mM NaCl 処理によって OUC613 は OUE812 に比較して有意に大きく減少し (表 1)、この結果、整粒重の減少程度も OUC613 は OUE812 に比較して大きかった。一方、200mM NaCl 処理では光合成速度は処理開始後 6 週間、乾物重は 12 週間に減少程度に有意な品種間差が認められ、稔実歩合の品種間差は 100mMNaCl 処理に比較して一層大きくなった。以上の結果から、長期間 NaCl 処理による品種間差が最も大きく見出されるのは稔実歩合の低下であることがわかり、稔実歩合は耐塩性の QTL 解析に有効な形質であることが考えられた。

(3) 長期間の塩ストレス処理では、出穂期の植物体の Na⁺, Cl⁻ 含量は 0mM NaCl 処理ではいずれの器官も低く、品種間差は認められな

かった。100mM NaCl 処理によって出穂期の Na^+ 、 Cl^- 濃度は大きく増加した。100mM NaCl 処理植物の全葉身の Na^+ 、 Cl^- 濃度は品種間差が見られなかったが、 K^+ 濃度は OUC613 で有意に低下し、 Na^+/K^+ は OUC613 で有意に高くなった。一方、100mM NaCl 処理植物の茎+葉鞘+穂の Na^+ 、 Cl^- 濃度は OUC613 よりも OUE812 で有意に高く、 Na^+/K^+ は OUC613 で有意に低くなった。100mM NaCl 処理植物の葉身の Na^+ 、 Cl^- 濃度は、止葉に比較してエイジの進んだ第3葉（止葉より2枚下の葉）は高くなり、第3葉の Na^+ 濃度を除いて OUE812 は OUC613 に比較して有意に低かった。100mM NaCl 処理植物の止葉と第3葉の K^+ 濃度は OUC613 で低下し、その結果 Na^+/K^+ はいずれの葉位においても OUE812 が有意に低くなった。

穂のイオン濃度は 0mM、100mM NaCl 処理のいずれにおいても他の器官に比較して低かった。両品種ともに子実では Na^+ 、 Cl^- のいずれも 100mM NaCl 処理による濃度の増加は認められなかった。内外穎、穂軸+小穂軸、芒ではいずれも濃度は増加し、OUE812 の増加程度が大きかったが、 K^+ 濃度は OUE812 の内外穎を除いて、100mM NaCl 処理による増加は認められなかったため、 Na^+/K^+ は OUC613 よりも OUE812 の塩処理区で有意に高くなった。

止葉の光合成速度は Na^+ 、 Cl^- 濃度との間には負の、 K^+ の間には正の、そして Na^+/K^+ の間には負の相関が認められた (図 2)。しかし、内外穎の Na^+ 、 Cl^- 濃度と稔実歩合の間の関係は明らかでなかった。

以上の結果から、上位の比較的若い葉は他の茎葉部に比較して 100mM NaCl 処理で Na^+ 、 Cl^- 濃度が低く維持されることがわかった。併せて、 Na^+ 、 Cl^- 濃度を低く、そして K^+ の濃度を高く維持することが葉の光合成速度を高く維持することに関係するが、穂の稔実歩合にはイオン濃度以外の要因が関与することが示唆された。

(4) 長期間の 100mM NaCl 処理によって穂重および稔実小穂重は H.E.S.4 はほとんど低下しなかったが、Russia 6 はそれぞれ 83%、56% と大きく減少した。小穂数、稔実 1 小穂重はいずれの品種も 100mM NaCl 処理によってもほとんど低下しなかった。100mM NaCl 処理の稔実歩合は H.E.S.4 では 89%であったが、Russia 6 では 68%に低下した。以上の結果から、100mM NaCl による両品種の穂重と稔実小穂重の相違は稔実歩合の違いによって生じていることが分かった。組換え自殖系統群の稔実歩合の平均値は両親の間にあった。

QTL 解析の結果、第2染色体上の G5 近傍、第6染色体上の U187 近傍、第7染色体上の U013 近傍に H.E.S.4 が稔実歩合を高める QTL

が、第4染色体上の U264 近傍に Russia 6 が稔実歩合を高める QTL が推定された (表 2)。

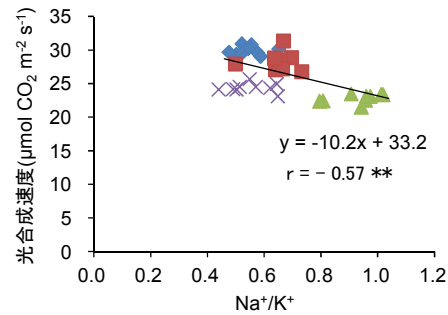


図 2 止葉葉身の Na^+ 濃度と K^+ 濃度の比 (Na^+/K^+) と光合成速度の関係

◆ OUC613-0mM NaCl 処理
 ■ OUE812-0mM NaCl 処理
 ▲ OUC613-100mM NaCl 処理
 × OUE812-100mM NaCl 処理

表 2 Russia 6 と H.E.S.4 の組換え自殖系統群を用いた解析で検出された稔実歩合に関する QTL

染色体番号	距離(cM)	近傍マーカー	LOD値	相加効果
2	99.2	G5	5.25	-9.06
4	61.5	U264	2.17	8.35
6	43.2	U187	2.27	-11.05
7	43.3	U013	2.49	-7.40

(5) Russia 6 と H.E.S.4 の組換え自殖系統群を用いた解析で検出された QTL を確認するため、OUE812 と OUC613 の組換え近交系による遺伝解析集団を作成し、現在検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Win, K. T., A. Z. Oo, T. Hirasawa, T. Ookawa and Y. Hirata, Genetic analysis of Myanmar *Vigna* species in responses to salt stress at the seedling stage, African Journal of Botany, 査読有, vol.10, 2011, 1615-1624 (<http://www.academicjournals.org/AJB>)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 成田亮平・山口真功・大川泰一郎・佐藤和広・平沢正、塩ストレス条件下におけるオオムギの稔実歩合の量的形質遺伝子座 (QTL) 解析—Russia 6 と H.E.S.4 の

組換え自殖系統を用いて、日本作物学会、2013年3月28日、明治大学

- ② 山口真功・大川泰一郎・武田和義・平沢正、耐塩性の異なるオオムギ品種の Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ の蓄積量の比較、日本作物学会関東支部会、2011年12月2日、熊谷市
- ③ Win, K.T., O. A. Zaw, T. Ookawa, Y. Hirata and T. Hirasawa, Water relations of salt-tolerant and sebsitive black gram (*Vigna mungo*) varieties grown under salt stress conditions, 日本育種学会, 2011年9月24日, 福井市
- ④ 山口真功・佐藤好亮・大川泰一郎・武田和義・平沢正、高濃度の NaCl を含むバーミキュライトに長期間生育したオオムギの光合成速度、および乾物と子実生産の品種間差、日本作物学会関東支部会、2010年12月3日、日本大学生物資源科学部
- ⑤ 山口真功・渡邊珠貴・且原真木・武田和義・大川泰一郎・平沢正、オオムギ幼植物の塩ストレスに対する生理学的反応の品種間差、日本作物学会、2010年9月4日、北海道大学農学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平沢 正 (HIRASAWA TADASHI)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：30015119

(2) 研究分担者

大川 泰一郎 (OOKAWA TAIICHIRO)
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：80213643