

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380015

研究課題名(和文) イネ高温登熟耐性としての機能的緑葉維持能力の機構解明と遺伝資源利用

研究課題名(英文) Stay-Green Trait in the Post Anthesis Period under High Temperature Conditions in Rice

研究代表者

小葉田 亨 (Kobata, Tohru)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60186723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：止葉切片インキュベーションにより暗黒下35℃において広範な温度域でのStay-greenの品種間差を検出できた。同方法により日本および世界のイネコアコレクション品種に大きな品種差があった。これらの品種をポット栽培し登熟期に高温を与えたところ緑葉維持能力と光合成と生産性との関連があった。緑葉維持能力の異なる品種を交配したF2のインキュベーションによる緑葉維持能力は大きな変異を示した。典型的4品種を島根県と沖縄県で水田栽培したところ緑葉維持と生産に違いが認められた。以上からイネの登熟期における緑葉維持能力には品種間差があり、今後高温下を含めた生産性向上に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：By leaf-section incubation, diverse genotypic differences in green color maintenance capacity were detected in Japanese and World Rice Collection. Under high temperature conditions in the post-anthesis period, the maintenance capacity related with maintenances in photosynthesis and productivity. Leaf color by the incubation in F2 between stay-green and non-stay green or high yielding cultivar and stay-green mutant diversely distributed. Under paddy field conditions in Shimane and Okinawa, genotypic differences in green leaf maintenance and productivity were observed. From our results, stay-green trait in the post anthesis period is expected to contribute to an improvement of rice production under diverse environmental conditions including high temperature.

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：Stay-green イネ 登熟期 高温 光合成

1. 研究開始当初の背景

今後、温暖化が進行すると生殖成長期高温によるイネの不受精と登熟不良が収量を激減させる可能性がある。不受精はある一定以上の高温で起きるのに対し、登熟不良は幅広い温度域で生ずる。登熟不良は、高温による子実乾物増加速度促進の結果、子実の同化産物受け入れ要求が著しく増大するのに対し、登熟期間の短縮も相まって、同化が十分対応できないために主に起きるとみられる(Kobata and Uemuki, 2004)。高温条件下で同化維持のできる緑葉維持能力(機能的緑葉維持能力, Functional stay green)は、登熟維持と向上に貢献すると予測される。環境ストレス条件下で緑葉維持能力を有する品種がある場合、緑葉の維持に伴い同化が高く保たれる場合(機能的緑葉維持能力, Functional stay green)と保たれない場合(Non-Functional stay green)がある(Thomas and Howarth 2000)。この能力はオーストラリアの早魃下でのソルガムの収量を高め、QTL を用いて耐性系統が作り出された(Borrell et al., 2000) (al., 2002; Jang et al., 2004)。イネの Stay green mutant はクロロフィル分解酵素活性を抑える遺伝子を有することがわかっている(Kusaba et al., 2007; Sato et al. 2007)ものの、高温ストレス下での機能的緑葉維持能力として働くかどうかは全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、次の5点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 登熟期高温下で機能的緑葉維持能力に品種間差が存在するのかそしてそれは同化および収量維持に有効であるのか？
- (2) 機能的緑葉維持能力は子実と茎葉間の同化産物収支および土壌からの窒素を中心とする養分吸収と関係あるのか？
- (3) 機能的緑葉維持能力はどのような光合成・呼吸系の能力に基づくのか？

(4) 機能的緑葉維持能力に関連する光合成能力の遺伝的背景

(5) 機能的緑葉維持能力は遺伝資源的利用が可能であるか？

3. 研究の方法

遺伝的背景を網羅する世界および日本の在来品種コアコレクション、幾つかの高収量品種、緑葉維持のミュータントを用いた同化能力および緑葉維持能力の品種間差比較を行った。これらから選抜された幾つかの典型的な緑葉維持能力を示す品種について同化産物および窒素を中心とした栄養成分の土壌-植物-茎葉-子実間の収支、分配と、緑葉維持能力との関係の解析をした。典型的な緑葉維持能力を示す品種における葉身の気相および液相での CO₂ 拡散過程およびクロロフィル内固定系の非緑葉維持品種との差異を比較した。同化、緑葉維持系統の光合成過程における遺伝的背景と関連形質の遺伝的同一性。松江および沖縄において栽培条件下での登熟期高温条件下での緑葉維持能力を有する品種の生産への貢献評価を行った。

4. 研究成果

葉培養によるイネの Stay-green 特性の資源評価

登熟期の Stay-green 特性は様々なストレス条件下で同化期間を延ばすことで作物収量を向上させることが期待される。本研究の目的はイネの stay-green 特性を有する品種を簡易に判定する方法を開発することである。出穂期にコシヒカリと日本晴の野生型と stay-green 突然変異系(nyc1-1 と sgr-2)の止葉を切り取り、20~40 °C の5段階の気温のもとで照明と暗黒下でプラスチック容器中の蒸留水に葉を浮かべ培養した。培養後の SPAD 計(SPAD-502, Minolta Co., Ltd., 東京)による葉色は突然変異系の方が野生型より高く保たれ、葉色と緑葉面積の変化は連動していた。20~35 °C では培養温度が高いほど SPAD 値が早く低下し、積算気温と SPAD 値は一つの直線で近似

できたのに対し、特に照明下 40 ではむしろ低下が小さかった。これは著しい高温により葉の老化促進物質のエチレン発生が抑制されたためと考えられた。また、照明は SPAD 値の低下を大きくした。これは、照明による活性酸素の発生が老化促進をもたらしたためと推定された。これらから、暗黒下で気温が 20~35℃であれば、培養温度にかかわらず SPAD 値の低下は同様の温度依存を示したので、暗黒下 35 での培養によって短期間で stay-green 特性の判定ができるとみなされた。全葉を用いる方法は容量が大きいので扱いにくい。そこで、穴を開けて通気した 60cc のバイアルを横置きし、蒸留水に葉の中央部約 5cm を浮かべて暗黒下 35 で培養した。通気はエチレン発生を阻害しないためである。本方法はバイアルを積み重ねることができるため多数の品種比較に適用できる。本方法では野生型と Stay-green 突然変異型の SPAD 値の違いは約 1 週間程度で判定でき、止葉とそれ以下 2 葉の低下傾向はほぼ同じであった。水田栽培した世界および日本のイネコアコレクション品種の止葉について、本方法で比較したところ大きな品種間差が認められた。すなわち、培養開始時に SPAD 値が高く、かつ培養後も値の高く保たれる品種 (stay-green 様品種)、それに対し低下しやすい品種 (非 stay-green 様品種)があった。以上から、出穂期の止葉中央を小型バイアルで培養する本方法は多数の品種を対象とした stay-green 品種検索のための簡易な一次選手法として有効であった。中国においても高収量品種において本方法によって幅広い変異が検出できた。

登熟期高温条件下におけるイネ stay green 特性が同化維持能力と物質生産に及ぼす影響

一般の品種よりも高温条件下で登熟期に緑葉を保ち、同化を高く維持できる品種は、高温による同化産物不足に基づく登熟不良や品質低下への影響を回避できる可能性がある。切葉による 35 下のインキュベーション法で、遺伝的多様性

を含む日本のコアコレクション品種の早生・中生系統から、緑葉維持能力が高いと判定された森田早生、冷立稲、ヒメノモチ、中程度の日の出、人間錦、低いとされた赤毛、細稈、唐法師、オッカモドシに高のコシヒカリミュータントを加えた 10 品種について、1/5000a ポットに円形 20 粒播きして主稈のみを育てた。出穂後、常温区と加温温室の加温区に入れ、一定期間ごとに SPAD 値、葉面積、光強度 $1310 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 、気温 30 の条件下の止葉葉身の光合成速度、クロロフィル蛍光を測定し、登熟期高温条件下の緑葉維持が同化の維持と関係あるのかどうかを明らかにしようとした。SPAD、光合成速度、葉面積の低下の大小により、供試品種は緑葉の維持と共に同化維持のできる機能的 stay green (functional stay green) であるヒメノモチ、日の出、細稈、緑葉を維持できても同化維持のできない非機能的 stay green (non-functional stay green) である冷立稲、コシヒカリミュータント、non-stay green としてオッカモドシ、赤毛、唐法師、中間程度である人間錦、森田早生に分かれた。次年度は、機能的 stay green だと示唆された品種を選んで、前年と同様の条件で一定期間ごとに SPAD、葉面積、光合成速度を測定した。その結果、昨年と同様に細稈、ヒメノモチは機能的 stay green、一方、オッカモドシ、赤毛は SPAD 値と光合成速度の低下が大きかったことから non-stay green であることが示唆された。尚、昨年機能的 stay green だと思われた日の出については、本年度は SPAD 値と光合成速度ともに低下が大きかった。日本晴ミュータントは SPAD 値を高く維持しても光合成速度の低下は大きかったため非機能的 stay green であり、コシヒカリと日本晴は non-stay green であると思なせた。コシヒカリミュータントは、年度間で傾向が異なり必ずしも非機能的 stay green だとは言い切れない。クロロフィル蛍光は SPAD 値や光合成速度の大きさや経時的推移との密接な関係は見当たらなかった。ただし、本研究では植物体の乾物

重, 子実重や窒素吸収と stay green 形質との間には系統的な関係性は見当たらなかった。

イネ Stay-green 品種と非 Stay-green 品種の交配による Stay-green 特性導入の可能性

登熟期に葉の老化を抑制し, 同化を維持できる Stay-green 特性の導入はイネ生産を安定させる可能性がある。多収穫米であるタカナリなどの日印交雑種は, 夏季高温条件下で登熟が低下するとともに, 登熟後半の低温により登熟不良となる。しかし, イネにおいて Stay-green 特性が交配により導入できる遺伝資源であるかは明らかでない。また, 従来から切葉によってイネの Stay-green 特性を判定する簡易方法が取られてきた(篠永 2010)もののその信頼性は充分検討されていない。そこで, まず Stay-green 特性の有無を判別できる方法を確立し, 次に本手法を用いて交配による Stay-green 特性導入可能性を調査した。

切葉インキュベーション法の有効性を評価するために, 日本晴の Stay-green ミュータント品種 (sgr-2) とコシヒカリの Stay-green ミュータント品種 (nysl-1) と各々の野生型の止葉中央部の切葉を 35 暗黒条件下で 7 日間切葉インキュベーション処理を行い, インキュベーション中の SPAD 値を比較した。処理 7 日後において Stay-green と野生型に有意差が見られ, 止葉と第 2 葉および第 3 葉の値は高い相関を示したので止葉によって下位葉における傾向も推定できた。本方法を用いて Stay-green と非 Stay-green を約一週間で判定することができ, 緑葉維持能力評価に有効であった。

Stay-green 品種(細稈)と非 Stay-green 品種(オッカモドシ)および日本晴の Stay-green ミュータント品種 (sgr-2) とタカナリを交配して F_2 に Stay-green がどのように現れるのかをインキュベーション法で調べた。細稈とオッカモドシ, sgr-2 とタカナリの両組み合わせにおいて緑葉維持能力が Stay-green 親品種と同等のものが数個体見られ, 緑葉維持能力と着生初数により簡易的に予測された高潜在収量とを両立する個体が sgr-2

とタカナリの組み合わせに少数見られた。また, 緑葉維持能力が高く潜在収量が低い個体, 緑葉維持能力が低く潜在収量の高い個体も見られた。

以上から, 潜在収量が高くかつ Stay-green 特性を導入できる可能性が示唆された。ただし, 初登熟と群落条件下での潜在収量は今後圃場で評価される必要がある。

気温の異なる地域でのイネ緑葉維持システムの光合成および乾物生産特性について

これまでの実験によって緑葉維持システム 2 品種を含む水稻 4 品種を沖縄の盛夏が登熟期間となる様に栽培を行い, その子実収量, 乾物生産および光合成速度を比較した。試験は島根大学生物資源科学部水田および琉球大学農学部附属有底水田で行った。供試品種は赤毛 (Non Stay Green), 細稈 (Stay Green), ヒメノモチ (Stay Green) およびオッカモドシ (Non Stay Green) で, 2013 年 5 月 8 日から浸種を開始, 5 月 11 日にベンレート水和剤希釈液(30 倍)に 10 分間浸漬し種子消毒を行った。その後 35 に設定したインキュベータ内で催芽を行い 5 月 13 日に 812 穴ペーパーポットに 1 穴 2 粒で播種した。5 月 22 日に施肥(成分量 N:P:K = 4 : 10 : 10kg/10a)と同時に耕耘を行い条間 30 cm, 株間 15 cm で手植えによる移植を行った。1 品種 3 反復を圃場内に乱塊法で配置した。追肥は当初, 出穂 20 日前と穂揃い期に行う予定であったが, 一部の品種で出穂が早くに認められたため予定した時期とそぐわなかったものの出穂期前に窒素のみを成分量 3kg/10a 施用した。出穂期から約 1 週間ごとに主稈葉齢, 最上位展開葉の SPAD, 草丈, 分けつ数の調査を行った。出穂期から最上位展開葉の光合成測定を行った。チャンバー温度 30 ~ 32 , CO_2 濃度約 400ppm, PPFD 0 ~ 1800 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ で測定した。各品種の穂揃い期には止葉を含む上位 3 葉の光合成速度を同様の条件で測定した。サンプリングは穂揃い期, 出穂後 2 週間目, 成熟期, 収穫期の 4 度行い, 各反復から 7 サンプルを地際で刈り取り, 葉面積, 茎

数および穂数を測定後、器官別に分解し、乾燥、秤量した。

籾収量はヒメノモチ、細稈、赤毛の順で大きかった。本実験の供試品種の内、ヒメノモチと細稈は Stay Green とされているが、移植～出穂期間と出穂～登熟期間に分けて SPAD の推移見ると品種ごとの特徴が認められる。ヒメノモチは移植～出穂期間の SPAD の推移はオッカモドシに似て増減があるものの、出穂後は登熟に伴う退緑と枯死が非常に緩やかであったのに対し、細稈は移植～出穂期間と出穂 20 日後までは一貫して高い値を保ったものの、出穂 20 日ごろを境に急激に枯死、退緑がみられた。細稈の急激な葉の枯れ上がりは SPAD の変化だけでなく上位 3 葉の生存率と葉面積にも表れており、収穫期には元々葉面積が小さく、Non Stay Green である赤毛よりも葉面積は小さくなった。穂揃い期の測定ではいずれの品種でも第 3 葉の光合成速度の低下が生じていたことから、登熟後期に SPAD と葉面積をどれだけ維持できたかが登熟歩合および収量に差を生じた 1 要因であると考えられる。しかし、出穂 20 日以降は一般に光合成が籾の充実に果たす役割が低下している時期であり、細稈の低い登熟歩合がこの期間の葉面積と SPAD の低下のみによるとは考え難い。一穂籾数は出穂前に決定される形質であり、出穂前に SPAD の低下が見られなかった細稈は、盛んに光合成を行い総籾数が過剰になったため登熟歩合の低下を助長したと考えられる。

細稈とヒメノモチは Stay green とされるものの SPAD および緑葉面積の推移は異なり、登熟後期に葉の枯れ上がりが見られた細稈は登熟歩合の低下により収量がヒメノモチ下回った。乾物生産に寄与する Functional Stay Green と寄与しない Non Functional Stay Green の分類のためには個葉の退緑し難さだけでなくどの時期に葉面積と SPAD を保つ必要があるかを明らかとする必要がある。

イネ緑葉維持系統の光合成および乾物生産特性 緑葉維持品種の養分吸収量とその分配について

緑葉維持系統 2 品種を含む水稻 4 品種を島根県松江市で水田栽培したもの(小葉田・田崎, 2013) について、出穂期および収穫期の無機成分含量を測定し、系統間の養分吸収量およびその分配について比較検討した。栽培方法は小葉田・田崎(2013)によった。出穂期と完熟期に地上部を採取した。3 反復の乱塊法によった。イネの窒素および炭素含有率は粉末資料を乾式燃焼法(スミカ分析センター, NC90A)により測定した。カリウム、マグネシウム、カルシウムおよび鉄含有率は粉末試料を硫酸、硝酸および過酸化水素により湿式分解した後、適宜希釈して原子吸光光度計(日立, Z5010)により測定した。測定された無機成分含有率に乾物重を乗じて、出穂期および収穫期の吸収量を算出した。

出穂期における茎葉の炭素含有率は品種間に明瞭な差異は認められなかった。窒素含有率は非ステイグリーン品種である 8 が他の品種よりも低い傾向が認められたが、同様に非ステイグリーン品種である品種 17 はステイグリーン品種である品種 20 および 50 よりも高く、出穂期の窒素含有率におけるステイグリーンによる差異は明瞭ではなかった。カリウム含有率は品種 8 が他の品種よりも高い傾向が認められた。マグネシウム、カルシウムおよび鉄含有率は品種間に明瞭な差異は認められなかった。一方、収穫期の茎葉および玄米の無機成分含有率はいずれの元素においても、品種間に明瞭な差異は認められなかった。

出穂期および収穫期の茎葉の窒素吸収量は品種間に明瞭な差異は認められなかった。一方、収穫期の玄米の窒素吸収量はステイグリーン品種の方が非ステイグリーン品種よりも高い傾向が認められた。収穫期のイネの全窒素吸収量から出穂期の窒素吸収量を差し引き、出穂期以降の窒素吸収量を求めたところ、ステイグリーン品種であ

る品種 50 が最も高く、次いで品種 20 であり、これらのステイグリーン品種の方が、非ステイグリーン品種である品種 8 および 17 よりも高くなる傾向が認められた。このことは、ステイグリーン品種では、出穂期以降も非ステイグリーン品種に比べて窒素吸収反応が高く維持されたことを示唆するものであり、これにより、ステイグリーン品種の方が玄米への窒素の蓄積量が高くなったものと推察された。以上の結果から、イネのステイグリーン特性は、出穂期以降の窒素吸収反応を高く維持する能力との関連が推察され、収量および玄米品質に対して影響を及ぼすものであると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5)

1. Kobata, T., Yoshida, H., Masiko, U. and Honda, T. 2013. Spikelet Sterility is Associated with a Lack of Assimilate in High-Spikelet-Number Rice. *Agron. J.* 査読有, 105(6), 1821-1831.
2. Hafez, E. D. and Kobata, T. 2012. The effect of different nitrogen sources from urea and ammonium sulfate on the spikelet number in egyptian spring wheat cultivars on well watered pot soils. *Plant Production Science* 査読有, 15(4), 332-338.
3. Kobata, T., Koç, M., Barutçular, C., Matstumoto, T., Nakagawa, H., Adachi, F. and Ünlü, M. 2012. Assimilate supply as a yield determination factor in spring wheat under high temperature conditions in the mediterranean zone of south-east Turkey. *Plant Production Science* 査読有, 15(3), 216-227.
4. Kobata, T., Miya, N. and Anh, N. T 2011. High risk of the formation of milky white rice kernels in cultivars with higher potential grain growth rate under elevated temperatures. *Plant Prod. Sci.* 査読有, 14(4), 359-364.

5. Kobata, T., Akiyama, Y. and Kawaoka, T. 2010. Convenient estimation of unfertilized grains in rice. *Plant Prod. Sci.* 査読有, 13(3), 289-296.

[学会発表](計 3 件)

1. 小葉田 亨・篠永 美和・赤井 康平 2014. 葉培養によるイネの Stay-green 特性の資源評価. 日本作物学会第 237 回講演会、2013 年 3 月 30 日、千葉、181-182.
2. 藪田 伸・福澤 康典・小葉田 亨・川満 芳信 2013. 日本晴とその緑葉維持系統における光合成およびクロロフィル蛍光特性の比較. 日本作物学会第 235 回講演会、2013 年 3 月 28 日、東京、178-179.
3. Kobata, T. Shinonaga, M. and Tien, H. B. 2011. Stay-green trait in rice under water and high temperature stress. 7th Asian Crop Science Congress. ICC (IPB International Convention Centre, 29, Sept. 2011, Bogor, Indonesia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小葉田 亨(KOBATA, Tohru)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号 60186723

(2) 研究分担者

松本 真悟(MATSUMOTO, Shingo)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号 00346371

(3) 研究分担者

川満 芳信(KAWAMITSU, Yoshinobu)
琉球大学・農学部・教授
研究者番号 20192552

(4) 研究分担者

中川 博視(NAKAGAWA, Hiroshi)
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター・研究員
研究者番号 90207738

(5) 研究協力者

Shaobing, Peng
華中農科大学・農学部・教授