

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：82104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15219

研究課題名(和文) ササゲ近縁野生種における湿害および乾燥耐性種内変異の解明

研究課題名(英文) Inter-species diversity of moisture and drought stress tolerance in wild cowpea (*V. unguiculata* subsp. *dekindtiana*)

研究代表者

井関 洸太郎 (Iseki, Kohtaro)

国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・生物資源・利用領域・任期付研究員

研究者番号：80748426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：土壌の乾燥と過湿のいずれに対しても耐性を示すササゲ品種の育成に向けた遺伝資源として多様な環境に自生する近縁野生種に着目し、ストレス耐性評価およびそのための手法開発を行った。木枠を使った栽培法と複数の指標を用いた耐性評価によって、乾燥と過湿の両方に強い系統を選抜することができた。ストレス条件下における根の形態的応答を観察したところ、選抜した野生種では栽培種よりも水条件に応じた維管束や皮層の割合を柔軟に変化させることで耐性を獲得していると考えられた。過湿条件において、野生種よりも栽培種で通気組織が顕著に発達していたことから、野生種は通気組織によらない別の耐性機構を備えていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

西アフリカでは不安定な降雨による土壌の乾燥と過湿がササゲ生産上の問題となっている。土壌の乾燥と過湿に対する植物の応答は相反するため、双方への耐性を同時に獲得することは困難と考えられてきた。しかし、本研究においてササゲの近縁野生種から乾燥と過湿の双方に耐性を示す系統を同定したことで、今後、この材料を用いた品種育成が進むとともに、途上国において同様の手法を使った更なる未利用遺伝資源の評価が進むことが期待される。さらに、選抜した野生種では過湿条件下でのストレス耐性に重要と考えられている通気組織の発達が顕著でなかったことから、これまでに知られていない耐性機構の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Stress tolerances under drought and waterlogged conditions were evaluated for cowpea wild relatives (*V. unguiculata* subsp. *dekindtiana*) targeted as promising genetic resources to breed tolerance varieties. The tolerances were phenotyped using different types of physiological and agronomical parameters for plants grown with wood box. Through this method, accessions having tolerance to both drought and waterlogged stresses were selected. Morphological analysis of taproot cross section clarified that, compared with susceptible cultivars, the selected tolerant wild accessions showed higher plasticity of the size of vascular bundle and cortical layer in response to drought and waterlogged conditions. However, under the waterlogged conditions, aerenchyma was less developed in the wild accessions than cultivars suggesting that there would be different mechanisms responsible to the tolerance of the wild accessions.

研究分野：作物学、育種学

キーワード：ササゲ 野生種 乾燥ストレス 湿害 遺伝資源

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ササゲ (*V. unguiculata*) は西アフリカを中心に広く栽培されており、現地で不足しがちなタンパク質の供給源として重要な役割を担っている。しかし、当地域における平均収量は 0.3-0.5 t/ha と、先進国の半分以下である。この原因として生育期間中の環境ストレスの頻発が挙げられる。西アフリカのなかでもササゲの栽培が盛んなスーダン・サバンナ地域は降雨が不安定であるため、乾燥ストレスが主な環境制限要因と考えられてきた (Padi 2004)。一方、これまでに現地で実施した栽培試験では、乾燥ストレスだけでなく豪雨後の一時的な湛水による土壌過湿がササゲの生育を大きく阻害していることが分かった (図 1)。西アフリカにおける長期的な気候変動予測では、地域的な降水量の増加および同一地域における降雨変動の増大が指摘されており、今後、同地域では乾燥だけでなく土壌過湿による湿害、またはその両方がササゲ生産上の問題として顕在化することが予想される。



図 1. 土壌過湿の様子(ブルキナファソ)。

しかし、これまでのササゲ育種では乾燥耐性、高温耐性、日長感応性、病虫害抵抗性などが主要な目標であった一方で、過湿耐性に関する知見は少ない (Ehlers and Hall 1997)。また、主要なレビューや参考書においても記載は見当たらない。過湿耐性については、同じマメ科作物であるダイズを対象にこれまで多くの研究がなされてきた。しかし、ダイズと異なり、ササゲが栽培される地域では生育期間中に乾燥条件と過湿条件が交互に生じる。このため、乾燥あるいは過湿のどちらかに対する耐性を付与すればよいわけではなく、これら双方に対して安定した生育を示す品種開発が求められる。

2. 研究の目的

乾燥条件および過湿条件に対して安定した生育を示すササゲ品種の育成を目標に、まずはその材料となる遺伝資源のスクリーニングと耐性系統の選抜を行う。また、選抜系統の耐性に関わる形態的特性を解明する。本研究は下記の 3 段階に分かれ、ナイジェリアにある国際熱帯農業研究所 (IITA) にて実施する。

(1) 乾燥および過湿耐性評価法の確立

乾燥条件および過湿条件を設定し、各々の条件下で耐性系統を選抜するための栽培・評価手法を確立する。

(2) ササゲ近縁野生種のスクリーニング

IITA の遺伝資源センターに保存されているササゲの近縁野生種 (*V. unguiculata* subsp. *dekindtiana*) を対象に、上記の評価手法を用いて乾燥および過湿条件における耐性系統を選抜する。

(3) 選抜系統の形態的特性の解明

選抜した耐性系統について、根および茎の組織断面における維管束や皮層、通気組織の発達程度に着目し、これらの形態的特性とストレス耐性の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 乾燥および過湿耐性評価手法の確立

野生遺伝資源から乾燥、過湿耐性系統を選抜する際に用いる栽培法および耐性評価法を確立するため、栽培種を用いて実験系を検討した。植物の栽培はガラス温室内に設置した長方形の木枠の中で、縦長 (20cm) のプラスチックポットを用いて行った。反復ごとに木枠を設置し、木枠内のポットは底面灌水によって水分状態をコントロールした。これによって 1 つの反復内においてポット間で土壌水分状態に差が生じないようにした。播種後、2 週間目までは好適な水分条件 (湛水 5cm) で栽培し、その後、乾燥区は灌水を停止し、過湿区はポット内の土壌上面まで湛水した。また、対照区は引き続き同じ条件で栽培を続けた。処理開始から 2 週間目に最上位展開葉の葉緑素値 (SPAD) およびクロロフィル蛍光パラメータ ($PSII$ および F_v/F_m') を計測した後、地上部をサンプリングして乾物重を測定した。

(2) ササゲ近縁野生種のスクリーニング

IITA の遺伝資源センターより供試材料となるササゲ野生種 (*V. unguiculata* subsp.

dekindtiana) 60 系統の種子を受領し、ガラス温室内で発芽率等の確認を行った。その結果、同じ系統の種子から形態の異なる植物が確認され、この原因として、配布種子は遺伝子型が固定されていないことが分かった。この状態では遺伝資源評価に不向きであるため、遺伝子型を固定する目的で一粒種子由来系統の作成を行った。現地では、ポット栽培で年 2-3 回の世代促進が可能であるため、2 年目の評価開始までに 4 回の自殖を繰り返し、材料の遺伝的固定を行った。

ストレス耐性のスクリーニングは上記で確立した手法を用い、対照区、乾燥区、過湿区の処理条件ごとに全 60 系統を同一の木枠で栽培した。ストレス処理の影響が強く現れる播種後 4 週目にクロロフィル蛍光による光合成活性、SPAD メーターによる葉緑素値およびサンプリングによる地上部乾物重を評価し、この 3 つの指標から耐性程度を総合的に判断した。実験は各処理 3 反復で時期を変えて独立した栽培を 2 回実施した。また、実験の比較対象として栽培種 60 系統を用いて同様の評価試験を行った。

(3) 選抜系統の形態的特性の解明

ササゲ近縁野生種群 60 系統から選抜した特に優れた耐性を示す 2 系統について、根の形態的な応答性の違いを調査した。まず初めに、栽培種を用いて乾燥および過湿処理の開始から定期的に根のサンプリングを行い、形態的な応答に違いが生じる時期を調べた。その結果、処理開始から 1 週間で顕著な違いが見られた。これに基づき、選抜野生種 2 系統と比較対照の栽培種 2 系統を合わせた計 4 系統を各 3 反復、計 12 個体をスクリーニングと同じ方法で乾燥条件、過湿条件、および対照条件で栽培した。ストレス処理開始から 1 週間目に植物体のサンプリングにより地上部から 4-5cm の間の主根を採取した。採取後、直ちに固定液に浸潤し、脱気処理を行った。その後、ハンドミクロトームで作成した切片をサフランで染色し、デジタルマイクロスコープを用いて組織断面の画像データを取得した。得られた画像の解析から、断面積に対する維管束と皮層の比率、および破生細胞間隙や通気組織の発達程度を評価した。



図 2. 木枠を用いた栽培方法。

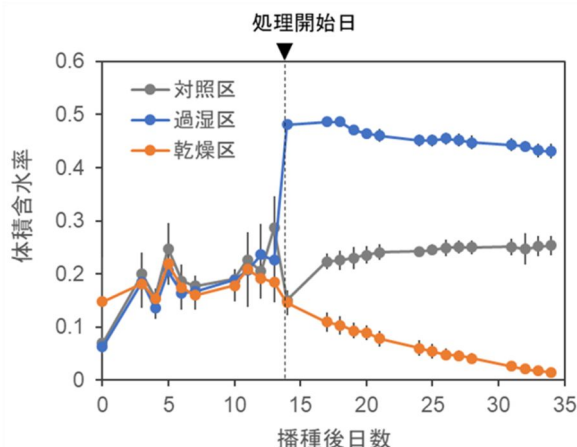


図 3. 各処理区における土壌含水率の推移。

4. 研究成果

(1) 乾燥および過湿耐性評価手法の確立

供試した全 60 系統を同一の木枠内で底面灌水により栽培することで、各処理区の水分条件を一様に制御することができた(図 2)。この結果、処理区の間では土壌の体積含水率に明瞭な差が生じ、対照区では 20-25%であったのに対して、過湿区では 40-50%、乾燥区では 15%以下となった(図 3)。ストレス耐性の評価方法として検討した SPAD、クロロフィル蛍光、地上部乾物重はいずれも対照区での系統間差が見られたことから、対照区に対する処理区の比をとった相対値で評価することとした(図 4)。このうち、SPAD 値は過湿条件、乾燥条件の両方で大きな系統間差が見られた。SPAD 値は過湿条件では目視によるストレスの状態をよく反映していたが、乾燥条件では目視で萎れが進んでいても SPAD 値が高く維持されている場合があった。クロロフィル蛍光値は過湿条件ではほとんど変化せず、有効な耐性指標とならないことが分かった。一方、乾燥区では大きな系統間差が見られ、特に実効量子収率 ($PSII$) よりも光照射条件下での最大量子収率を表す F_v/F_m' が評価指標として適していた。地上部乾物重は、ストレス条件下で値が低くても SPAD やクロロフィル蛍光パラメータの値は高く維持されている系統がある一方、乾物重が高くて他の指標値が低い系統もみられた。従来、植物のストレス耐性を評価する際には単一の指標を用いることが一般的であったが、本研究では、単一の指標ではス

トレスの状態を適切に評価できない場合があることを明らかにした。このことは、複数の異なる指標値を総合的に判断して耐性系統を選抜する必要があることを示しており、特に生育・収量の向上を目的とする育種の場面で有用な知見である。

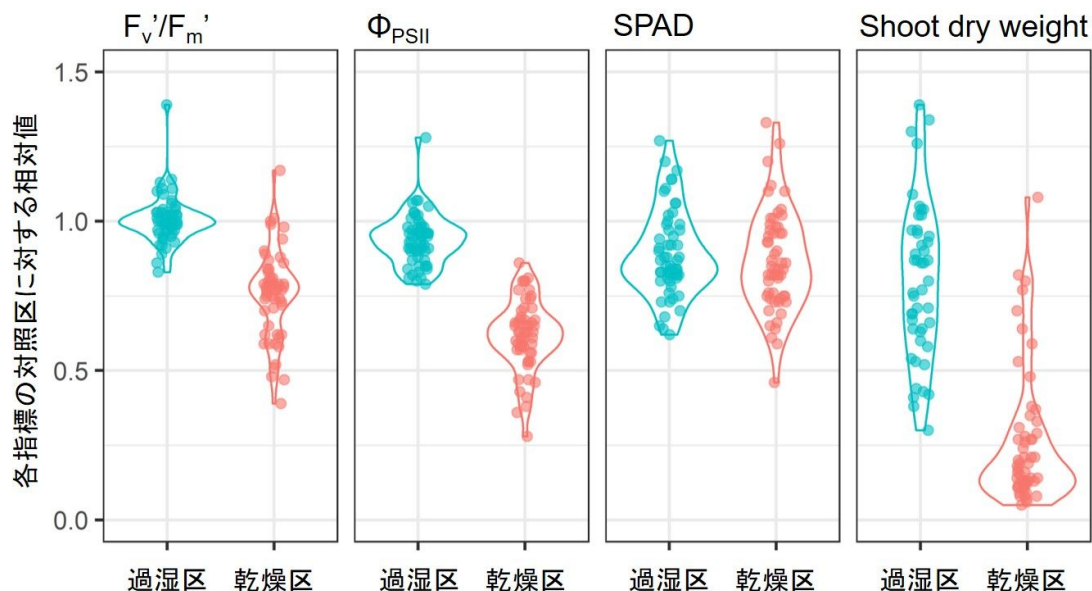


図 4. ササゲ近縁野生種 60 系統の過湿区と乾燥区における各指標値の分布．対照区に対する処理区の相対値について 2 回の試験反復、各 3 個体の結果を平均した．曲線は密度分布を示す．

(2) ササゲ近縁野生種のスクリーニング

上記の評価手法の検討結果にもとづき、湿害耐性を SPAD 値と地上部乾物重、乾燥耐性をクロロフィル蛍光値 (Φ_{PSII} , F_v'/F_m') で評価した。栽培種と野生種の評価結果について、この 4 指標を用いた主成分分析を行い、その後同じ指標を用いたクラスター解析によってストレス応答にもとづくグループ分けを行った。その結果、野生種系統と栽培種系統は第一主成分によって明瞭に分かれ (図 5A)、野生種群の中から乾燥および過湿の両方に耐性を示す系統群のグループをクラスター解析により特定した (図 5B)。この中から特に優れた耐性を示す 2 系統を選抜し、続く形態観察に供した。また、ストレス耐性の遺伝解析に向けた集団作成のため、この 2 系統を片親とした栽培種との交雑が可能であることを確認した。

今回選抜した野生系統は、これまで問題となってきた乾燥ストレスだけでなく、今後、栽培上の問題として顕在化することが予想される土壌過湿に対しても耐性を示すことから、西アフリカのササゲ生産を安定化するための育種素材として利用可能である。また、本研究において簡便な評価手法のもとで有望な遺伝資源が選抜できることを示したことで、今後、同様の手法を使った未利用遺伝資源の評価が進むと期待される。

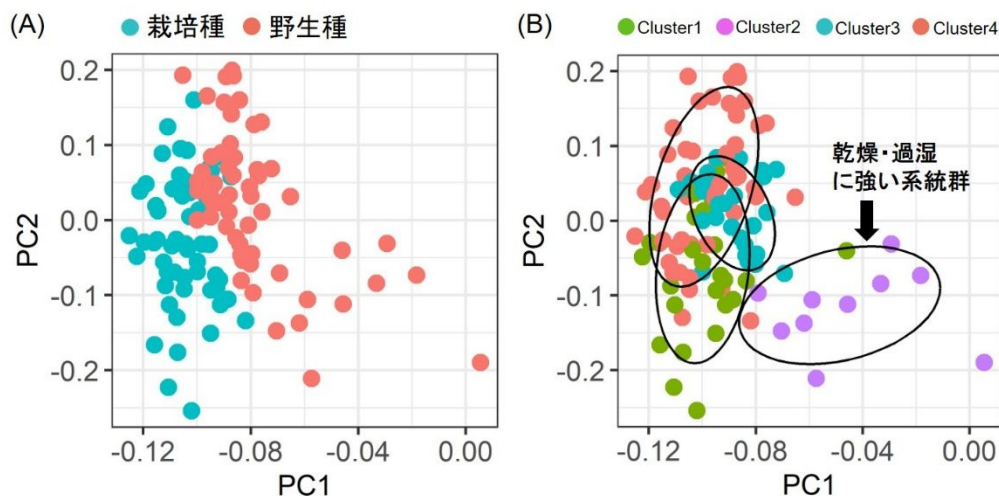


図 5. 複数の評価指標値にもとづく主成分分析結果。(A) 栽培種と野生種の分布。(B) クラスター解析により分類した各グループの分布．楕円は各グループにおける 75% 信頼楕円を示す．

(3) 選抜系統の形態的特性の解明

乾燥耐性と過湿耐性はともに根および茎における通導組織の変化が関係していることが知られている。乾燥条件では維管束、過湿条件では皮層や通気組織の断面積に占める割合が多くなるとされる。特に、二次通気組織の発達は過湿耐性に関連することが明らかにされている (Kokubun 2013; Yamauchi et al. 2013)。本研究で選抜した乾燥および過湿耐性の野生種では、乾燥条件下における維管束の比率および過湿条件下における皮層の比率が栽培種よりも高いことを明らかにした。一方、過湿条件下では通気組織とみられる部位の発達も観察されたが、その程度は栽培種の方が顕著であった (図6)。このことより、栽培種に比べ、選抜した野生種では乾燥および過湿条件にตอบสนองして根における維管束と皮層の比率をより柔軟に変化させていることが分かった。その一方で、通気組織の発達は過湿耐性のより強い野生種ではあまり観察されなかったことから、ササゲ野生種の過湿耐性において主要な役割を果たすものではないことが示唆された。このことは、これまでにダイズを対象に行われてきた研究結果と異なるものであり (望月ら 2000)、より多様な環境に適応したササゲ近縁野生種はこれまでとは別の過湿耐性機構を持つ可能性が示唆された。今後、選抜野生種と栽培種の交雑集団を用いて、上述の形態的变化に関する遺伝解析を行っていく予定である。

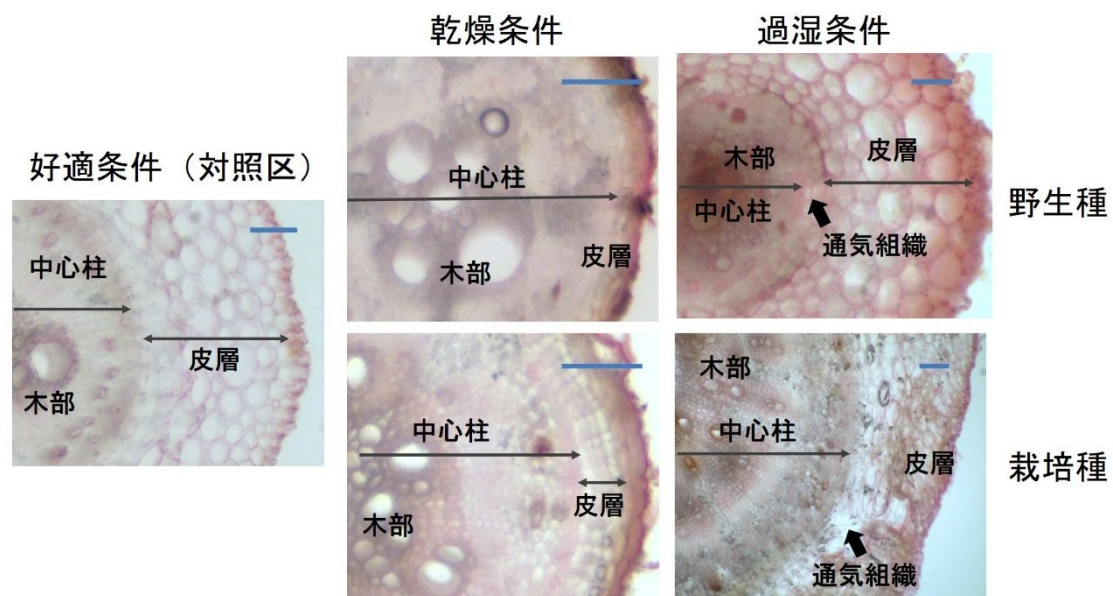


図 6. 栽培種と野生種における乾燥条件および過湿条件における根の横断面の違い。図中の青いバーは 100 μ m を示す。

< 引用文献 >

- Ehlers JD, Hall AE (1997). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research*, 53: 187-204.
- Kokubun M (2013). Genetic and cultural improvement of soybean for waterlogged conditions in Asia. *Field Crops Research*, 152: 3-7.
- Padi FK, (2004). Relationship between stress tolerance and grain yield stability in cowpea. *Journal of Agricultural Science*, 142: 431-443.
- Yamauchi T et al. (2013). Aerenchyma formation in crop species: A review. *Field Crops Research*, 152: 8-16.
- 望月ら (2000). 数種夏作マメ科作物の胚軸における二次通気組織の形成. *日本作物学会紀事*, 69: 69-73.

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〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----