

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02186

研究課題名（和文）干ばつ・洪水下でも出芽するイネ新規遺伝資源の探索と出芽応答機構の解明

研究課題名（英文）Search for new genetic resources for direct seeding of rice and tolerance mechanisms of submergence and drought during the emergence stage

研究代表者

加藤 洋一郎（KATO, YOICHIRO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：50463881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：インド型イネを対象に干ばつ・洪水下の発芽・出芽に関する分子生理学・解剖学・遺伝学的機構の解明を目指した。水没下の発芽・出芽について、インド型品種IR64・日本型品種コシヒカリの染色体断片置換系統群を用いた解析から鞘葉伸長性に関わる新規の遺伝子座qACE3.1を検出した。また、種子発芽時の乾燥応答について、透過型電顕を用いてアリューロン細胞の三次元画像を構築して解析し、水ストレス下ではグリオキシソーム数が減少する一方で、個々のサイズは大きくなることを明らかにした。また、発芽時のイネ乾燥耐性の品種間差には、GAおよびABAの生合成や感受性が関与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直播稲作ではイネ苗立ち率の改善が最重要課題の1つである。熱帯アジアのイネ生産は気候変動の影響を大きく受けており、湛水直播栽培では、洪水（水没）下の苗立ち改善が、乾田直播栽培では、干ばつ下の苗立ち改善が求められている。本研究によって明らかにされた乾燥・水没下の発芽・出芽に関する分子生理学・解剖学・遺伝学的機構は、ストレス耐性イネ品種の開発に貢献すると期待される。また、作物の発芽種子のストレス応答は未解明な部分が多く、本研究で検出されたアリューロン細胞のグリオキシソームの変化やGA・ABAの生合成・感受性の品種間差は、種子生理学の進展に寄与するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the physiological, anatomical, and genetic mechanisms of germination and seedling emergence under drought and flood stress with emphasis on indica rice genotypes. For germination and seedling emergence under submergence, we detected a novel QTL qACE3.1 involved in coleoptile elongation by using chromosome segment substitution lines derived from a cross of IR64 (indica) and Koshihikari (japonica). For germination under drought, analysis of the desiccation response during seed germination using transmission electron microscopy to construct three-dimensional images of aleurone cells revealed that the number of glyoxysomes decreases while their individual sizes increase under stress. We also found that the biosynthesis and sensitivity of GA and ABA are involved in the varietal differences in drought tolerance during germination.

研究分野：作物生産科学

キーワード：イネ直播栽培

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

熱帯アジアのイネ生産は気候変動の影響を大きく受けている。雨季到来が変動しており、インフラ未整備の地域では、灌排水が困難なためイネ作付が不安定となっている。若年層の都市流出による労力不足は、収益性の低い貧しい不良環境において顕著であり、集約的稲作の導入をますます困難にしている。このように、熱帯アジアの多くの地域でも(我が国と同様)イネ生産における低コスト化が志向され、湛水直播栽培あるいは乾田直播栽培を選択する農家が増えている。いずれの栽培法でもイネ苗立ち率の改善が最重要課題の1つである。湛水直播栽培では、洪水(水没)下の苗立ち改善が、乾田直播栽培では、干ばつ下の苗立ち改善が求められている。前者は、発芽後速やかに水面からシュートが出ることが、また、後者は低水分ポテンシャル下の発芽促進および土壤乾燥下のシュート伸長が不可欠と考えられている。遺伝学・分子生理学・細胞形態学・作物生態学において残された問いや、求められる知見は以下の通りと考えられた。

(1) ストレス条件下のイネ出芽に関する遺伝解析: インド型イネ品種は日本型・アウス型に比べ、湛水直播栽培で種子発芽・土中出芽に劣ることが既往研究で示唆されている。予備試験において我々は、注目すべき耐性品種・系統の目星を付けている。シュート器官、特に鞘葉の伸長応答が、水没下の出芽応答の品種間差異に関係することが予想されているが、具体的なエビデンスはそこまで多くない。

(2) ストレス条件下のイネ発芽時の種子分子生理学・超微形態学: 乾田直播栽培では乾燥下においても発芽が可能な品種が求められている。しかし、熱帯向けインド型イネ品種の発芽機構解明は、国際稲研究所で一時期行われたのみで基礎的知見が欠如している。特に、イネ出芽時の胚とアリーロン細胞の構造変化とこれに連動した植物ホルモン・転写産物・タンパクの水ストレス応答が鍵を握ることが予備試験から予想されている。そこで、アリーロン細胞の分子生理と種子細胞の超微形態変化とこれに関連する遺伝子発現および代謝の応答に着目することで、発芽初期の水ストレス耐性の分子メカニズム解明が期待される。

(3) ストレス条件下のイネ出芽に関する野外における生理生態: 上記の遺伝学・分子生理学解析に対して、同時に野外条件でも解析を進め、閉鎖実験系において注目すべき評価形質の絞り込みを行い、栽培学と分子生理・細胞形態・遺伝解析の橋渡しを行っていくことが不可欠である。

2. 研究の目的

本研究プロジェクトは、熱帯への省力直播稲作の導入に必須の、水ストレス環境に適応した耐性品種の開発に資する有益な知見を得ることを最終目標とし、インド型イネを対象に、干ばつ・洪水条件下の発芽・出芽に関する分子生理学・解剖学・遺伝学的機構を解明することを具体的な研究目的として、以下の3つのテーマに取り組んだ。

(1) 【小課題1】インド型イネ品種・IR64(鞘葉伸長性:低)を遺伝的背景とする日本型イネ品種・コシヒカリ(同:高)との染色体断片置換系統群を用いて、(水没・洪水時に発生する)無酸素条件における鞘葉の伸長性に寄与する遺伝子座の特定とその機能の解明を目的とした。

(2) 【小課題2】インド型イネの種子発芽・出芽の分子生理・超微形態・遺伝機構の解明を目指した。とくに超微形態では、イネ出芽時の胚とアリーロン細胞の構造変化を三次元的に観察し、水ストレス下の種子発芽抑制機構を解明することを目的とした。また、種子分子生理では、種子発芽環境ストレスとして乾燥を想定し、インド型イネの種子発芽・出芽の分子メカニズムを解明すること、高浸透圧下における種子発芽特性の品種間差を種子発芽関連遺伝子の発現解析や植物ホルモンの定量から明らかにすることを目的とした。

(3) 【小課題3】乾田直播栽培を想定して土壤乾燥条件での出芽・苗立ちの品種間差異について、土壤深度や土壤水分の影響を明らかにすることを目的とした。シュート伸長量や出芽数に着目しながら、野外環境を再現した精密実験系の確立を進め、詳細な成長パラメータを入手することも同時に目的とした。

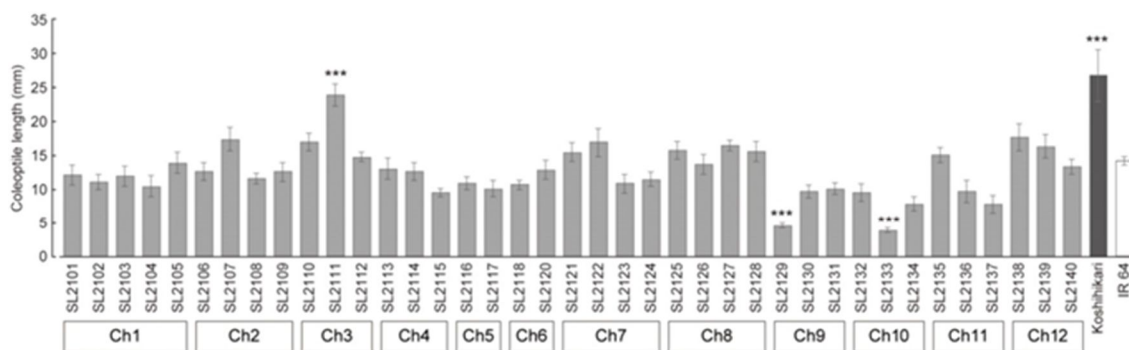


図1. 低酸素条件における染色体断片置換系統群の鞘葉長

3. 研究の方法

(1)【小課題1】染色体断片置換系統群 39 系統を供試材料とした。水による比重選、42°C10 日間の休眠打破処理を経た各系統の種子 60 粒ずつを 55°C10 分間の温湯消毒にかけ、15°C4 日間 0.2%植物用有害生物防除剤(PPM™)溶液中で吸水させた。吸水後、30°Cで1日間の催芽処理をした。無酸素条件をつくり出すため、オキシラーゼを1/500(v/v)の濃度で1/20 MS 液体培地に添加した。試験管に4 mL ずつ分注し、深さはおよそ40 mmであった。催芽状態の揃った初をこの試験管に1粒ずつ、1系統につき15個体播種、30°Cに設定した恒温機にて6日間生育させた。

その後試験管からイネ実生を取り出し、鞘葉長を測定した。鞘葉長が有意に長くなる系統を選抜し、種子代謝に関連する遺伝子発現を調査した。播種7日後に胚およびシュートを採用し、凍結粉砕後トータルRNAを抽出した。アルコール発酵およびデンプン分解に関連する遺伝子、その発現調節に関わる上流の転写因子をリアルタイム Real-time PCR 法により定量した。

(2)【小課題2】発芽時の乾燥ストレス耐性が異なるインド型品種の Rc10 と Rc348 を用いた。Rc348 は、Rc10 と比較して乾燥ストレス耐性が高い品種である。滅菌処理した種子を寒天培地に播種し、polyethylene glycol(4000)を培地に添加して乾燥ストレス処理を行った。予備試験より、両品種の発芽に差があった-1.0MPaの乾燥ストレス処理を48時間行い、電顕固定を行った。固定後、ウルトラミクロトームを用いて500枚程度の連続切片を作製し、透過型電子顕微鏡(H7500, Hitachi, Japan)を用いてアリューロン細胞の連続画像を取得した。得られた画像からグリオキシソームと細胞膜部分をトレースした。トレースした画像を三次元再構築ソフトである ImagePro Premier 3D (Ver. 9.3, Media Cybernetics, MD, USA)で読み込んで三次元構築し、体積と表面積値を算出した。

種子分子生理では、インド型イネ5品種(Rc420, Rc348, Rc222, Rc10, Dular)と日本型イネ1品種(ヒノヒカリ)を用いた。対象区(DW)および浸透圧ストレス区(-0.5, -1.0, -1.5 MPa)を設定した。種子を表面殺菌した後、28 暗黒条件で発芽試験を行った。吸水開始から6時間毎に発芽率を測定し、吸水後24, 48, 72時間の種子サンプルについては、RNAを抽出しcDNA合成後、Real-time PCR 法を用いて発芽関連遺伝子の発現解析を行った。更に、吸水後の種子胚を用いてLC-MS/MSを用いてアブシジン酸およびジベレリンの定量を実施した。

(3)【小課題3】乾燥した圃場においては、種子を深く播くことが乾燥適応に有利であることを既に確認しているが、播種深度が深い場合の苗立ち率(イネ深播き耐性)には品種間差異がある。この、深播き耐性を異なる土壤水分環境で検証するため、東京大学(夏季)およびフィリピン(乾季)の現地圃場において様々な品種を供試して試験を行った。さらに、ポット試験も行い、播種深度(5段階; 1, 3, 5, 7, 9 cm)と土壤水分(2段階; 乾燥, 湿潤)に対するイネ品種の出芽応答および各器官の伸長応答を調査した。

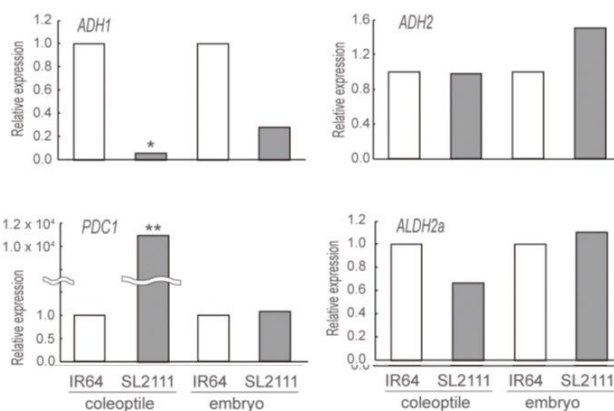


図2. 低酸素条件における遺伝子発現

4. 研究成果

(1)【小課題1】IR64を対照群とするDunnett法による検定を行った。IR64の鞘葉長は14.3 mmであり、コシヒカリ(26.8 mm)との間に有意な差異が認められた。コシヒカリの無酸素条件における鞘葉伸長性が高いことが確かめられた。染色体断片置換系統群では、SL2111(23.9 mm)の鞘葉長が有意に長く、鞘葉伸長性に関わる遺伝子座が座上している事が明らかとなった(図1)。この遺伝子座を*qACE3.1* (anaerobic coleoptile elongation on chromosome 3)とした。

選抜したSL2111とIR64の遺伝子発現を比較したところ、アルコール発酵に関わる遺伝子のADH1とPDC1に有意な差異が認められた(図2)。しかし、糖代謝に関わる遺伝子やその上流の転写因子の遺伝子発現には明瞭な差異が認められなかった。以上から、*qACE3.1*はアルコール発酵特異的に影響していると考えられる。

(2)【小課題2】それぞれの品種において、対照区と乾燥区のアリューロン細胞とグリオキシソームの三次元像を構築した(図3)。対照区では細胞内に多くのグリオキシソームが点在しているが、その数は乾燥区で少なかった。グリオキシソームの体積や表面積を算出したところ(表1)、乾燥区では、細胞内のグリオキシソームの総体積や総表面積は有意に小さかった。また、細胞内に含まれるグリオキシソームの体積も小さかったこと。さらに、1つのグリオキシソームの体積と表面積値を見ると、乾燥区では対照区よりも有意に大きかった。そのため、乾燥処理によってグリオキシソームの分裂と増殖が抑制され、その結果、大きいグリオキシソームが細胞内に残っていることが推察された。

種子分子生理では、浸透圧ストレス区において、Rc348は他の5品種と比べて高い発芽率を示し、特に1.5 MPa PEG区において顕著な差が観察された。浸透圧ストレス下で発芽率の異なるRc348, Rc10およびDularにおける吸水後の種子発芽関連遺伝子の発現解析の結果、Rc348は

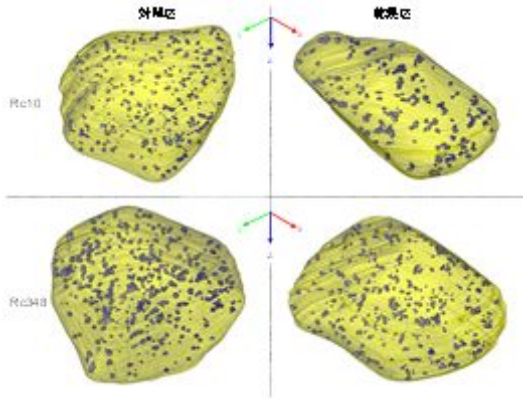


図 3. アリューロン細胞とその内部に含まれるグリオキシソームの三次元像(左; 対照, 右; 乾燥)。黄色、青はそれぞれアリューロン細胞とグリオキシソームを示す。赤、緑、青の矢印は、それぞれ x、y、z 軸を示す。

表 1. 対照区と乾燥区における各品種のグリオキシソームの体積と表面積。V、S、Ratio は、それぞれ体積、表面積、細胞内に含まれるグリオキシソームの体積率を示す。

	Total V (μm^3)		Total S (μm^2)		Individual V (μm^3)		Individual S (μm^2)		Ratio	
	Rc10	Rc348	Rc10	Rc348	Rc10	Rc348	Rc10	Rc348	Rc10	Rc348
Control	103.4	145.0	811.5	1135.1	0.251	0.260	1.972	1.985	0.537	0.684
Stress	68.5	81.4	522.2	645.6	0.402	0.313	3.067	2.484	0.464	0.415
ANOVA (F value)										
Water (W)	11.8		9.93		9.75		17.3		10.9	
Cultivar (C)	3.59**		3.27*		1.50*		2.22**		0.92*	
W × C	1.00		0.66		2.20		2.42		3.56	

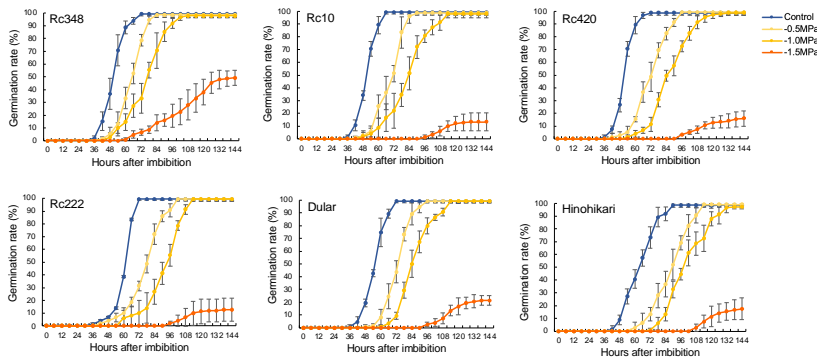


図 4. 高浸透圧下 (PEG) の種子発芽における品種間差

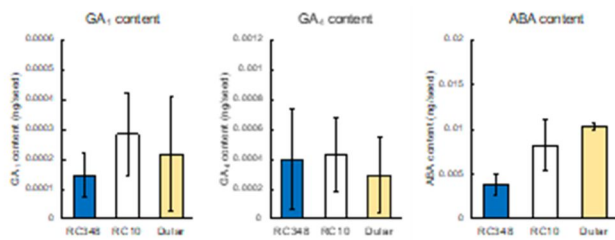


図 5. 高浸透圧下 (PEG) における種子胚の GA および ABA 含量

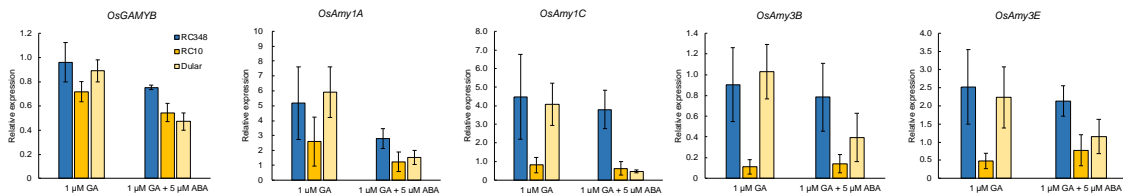


図 6. 高浸透圧下 (PEG) の無胚半切種子における GA および ABA の感受性評価

Rc10 と比較して GA 生合成遺伝子 *OsGA20ox1*, *OsGA3ox1*, -アミラーゼ遺伝子 *OsAmy1C*, *OsAmy3B*, *OsAmy3E* の発現が有意に高く、ABA 生合成関連遺伝子 *OsNCED1* の発現は有意に低かった。また Rc348 は Dular と比較して *OsGA20ox1*, *OsGA3ox1* および *OsNCED2*, *OsNCED5* の発現は有意低い一方、*OsAmy1A*, *OsAmy3B* の発現は有意に高かった。そこで、吸水後の GA および ABA 含量を測定したところ、GA 含量に有意な差は認められなかったが、ABA 含量は Rc10 および Dular に比べ Rc348 において著しく低いことが明らかとなった。更に、各品種の GA および ABA 感受性を評価したところ、GA に対する感受性は Rc348 と Dular において高く、ABA に対する感受性は Rc10 と Dular において高いことが示された。以上の結果は、浸透圧下において発芽しやすい Rc348 は、GA の生合成や感受性が高く、ABA の生合成や感受性も低いため、高浸透圧下において高い発芽率を示すことが示唆された。

(3)【小課題3】どの試験(土壤水分環境)においても、Rc420、Dular、およびDV85は深播き区の出芽率が他の品種より高く、高い深播き耐性が安定して示された(表2)。Rc348、Rc222は試験(環境)によって出芽率が異なり、土壤水分などの栽培環境が深播き下の出芽に影響する可能性が示唆された。いずれの試験においても、深播き耐性の高い品種では中茎と第一節間がよく伸長しており、これらの器官の伸長が地中からの出芽に寄与することが確認された。また、前述のin vitro試験で確認されたRc348とRc10の発芽の品種間差異(既往の研究でも土耕においてRc348の発芽時乾燥耐性が確認されている)について、乾燥下の土中出芽を基準にすると、Rc348の出芽時乾燥耐性はRc10のそれと比べて差が無いことも推察された。その理由の1つとしては、乾燥に伴う土壤クラスト形成のため表土が著しく硬くなることが考えられ(図7)、今後検討を要する課題である。

表2. 土壤乾燥が厳しいフィリピンの圃場(乾季)における、浅播き(1cm)、深播き(6cm)条件での各品種の出芽率(%)

	Rc420	Rc348	Rc222	Dular	IRAT 109	DV85	Rc10	Arroz da Terra	Kasalat h	台中 65号	Vandana	ゆめの はた もち	どん とこい	LSD5%
浅播き	4	3	6	31	18	4	13	4	9	1	3	8	8	14
深播き	43	39	39	34	34	34	31	24	23	20	19	16	11	ns



図7. フィリピンの圃場(乾季)の出芽・苗立ち試験の様子。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liu H, Won PLP, Banayo NPM, Nie L, Peng S, Kato Y	4. 巻 233
2. 論文標題 Late-season nitrogen applications improve grain yield and fertilizer-use efficiency of dry direct-seeded rice in the tropics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Field Crops Research	6. 最初と最後の頁 114 - 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fcr.2019.01.010	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

1. 著者名 Nishimura T, Sasaki S, Yamaguchi T, Takahashi H, Yamagishi J, Kato Y	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Detection and characterization of quantitative trait loci for coleoptile elongation under anaerobic conditions in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Production Science	6. 最初と最後の頁 374-383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1343943X.2020.1740600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohno H, Banayo NPM, Bueno C, Kashiwagi J, Nakashima T, Corales AM, Garcia R, Sandhu N, Kumar A, Kato Y	4. 巻 228
2. 論文標題 Longer mesocotyl contributes to quick seedling establishment, improved root anchorage, and early vigor of deep-sown rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Field Crops Research	6. 最初と最後の頁 84 - 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fcr.2018.08.015	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川口 颯介, Suriyasak Chetphilin, 松本 涼, 澤田 悠太, 濱岡 範光, 石橋 勇志
2. 発表標題 インド型水稻の発芽時における浸透圧ストレス耐性機構の解明
3. 学会等名 日本作物学会第251回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishimura, N., Sasaki, K., Yamaguchi, T., Yamagishi, J., & Kato, Y.
2. 発表標題 A novel QTL for anaerobic germination tolerance in rice: coleoptile elongation and gene expression on seed metabolism.
3. 学会等名 The 5th International Rice Congress, Singapore. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮野紀子、伊藤響子、中島大賢、リカルド・ガルシア、ロエル・スラルタ、オーロラ・コラレス、クリサンタ・ブエノ、ニーニョ・パナヨ、ボンベ・サンタクルズ、ビレンダー・クマール、加藤洋一郎。
2. 発表標題 フィリピン干ばつ頻発地域の乾田直播稲作において深播きが苗立ちと収量に与える影響。
3. 学会等名 第250回日本作物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村富男・佐々木和浩・加藤洋一郎。
2. 発表標題 湛水条件下の鞘葉伸長性に優れたイネ染色体断片置換系統の発芽・出芽特性。
3. 学会等名 第247回日本作物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井下紀子・加藤洋一郎。
2. 発表標題 乾田直播栽培における深播き条件下のイネ出芽および収量の品種間差異。
3. 学会等名 第247回日本作物学会
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	山根 浩二 (YAMANE KOJI) (50580859)	近畿大学・農学部・准教授 (34419)	
研究 分担者	石橋 勇志 (ISHIBASHI YUSHI) (50611571)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
研究 分担者	佐々木 和浩 (SASAKI KAZUHIRO) (70513688)	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 (82104)	

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