

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 3 月 7 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05606

研究課題名(和文) ソバ野生種より見出した穂発芽耐性極強系統の難穂発芽メカニズム推定に関する研究

研究課題名(英文) Studies about mechanism for pre-harvest sprouting resistance found in wild buckwheat

研究代表者

鈴木 達郎 (Suzuki, Tatsuro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・グループ長補佐

研究者番号：00469842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：応募者は穂発芽抵抗性が強いとされるソバ野生種の中に穂発芽抵抗性が極めて強い系統があることを発見した。通常の難穂発芽系統は殻をむくと発芽するがこの系統は殻をむいても発芽しないことから新規の穂発芽抵抗性を有する可能性がある。研究の結果、関与の強い少数の遺伝子座により支配されていることが分かった。また、休眠性を高める遺伝子の働きを強めると同時に、休眠打破を促進する遺伝子の働きを抑制することを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ソバ野生種の穂発芽抵抗性は少数の遺伝子座により支配されていたことから、交配により主要品種にその難穂発芽性を導入できる可能性があることを示している。また、遺伝子の発現解析において、発芽に対するブレーキ強化とアクセル軽減の両方向が関係する可能性があることは、ソバの難穂発芽性を説明する重要な情報である。今後は、上記知見を受け、野生種の難穂発芽性に関係するDNAマーカーの開発を行うとともに、交配後代の収量性や成熟期等を考慮した選抜を行うことで、安定多収のソバ品種の育成につなげるための実用化に応用することができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Buckwheat is an important crop based on Japanese culture. However, pre-harvest sprouting is a big problem because it leads reduction of yield. We found promising line which has strong pre-harvest sprouting resistance in wild buckwheat. This line has strong pre-harvest sprouting resistance even after removal of husk whereas pre-harvest sprouting resistance line in common buckwheat can germinate easily after removal of husk. It indicates that the wild buckwheat line has different mechanism to prevent pre-harvest sprouting. Our research showed that strong pre-harvest sprouting resistance was dominated by a few dominant loci. In addition, gene expression analysis revealed that up regulation of gene to improve dormancy as same as down regulation of gene to reduce dormancy may be related to strong pre-harvest sprouting resistance in the wild buckwheat.

研究分野：ソバ

キーワード：ソバ 穂発芽 メカニズム 品種開発

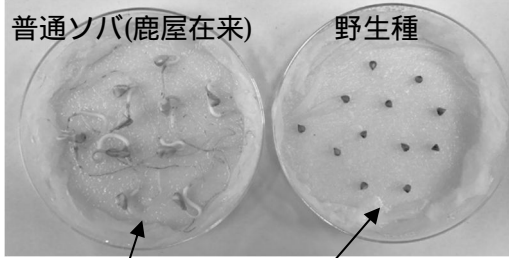
1. 研究開始当初の背景

穂発芽抵抗性(休眠性)は作物(特に穀物)にとって重要な農業形質であり、モデル植物のシロイヌナズナや作物ではコムギ等によく研究されている。普通ソバの穂発芽性に関しては、成熟期以降の雨(湿潤条件)と高温で発生、品種間差が存在、穂発芽抵抗性が強い品種・系統においても殻をむくと発芽する、等が明らかにされている。

より、殻に発芽抑制物質が存在する可能性や、殻の透水性が穂発芽抵抗性と関係する可能性等が推測されているが、メカニズムの詳細は不明である。このような背景の中、応募者らはソバ近縁野生種の中に普通ソバより穂発芽抵抗性のはるかに強い系統を見出し、普通ソバと異なり「殻をむいても発芽しない」ことを明らかにした(表1)。

表1 穂発芽抵抗性が極めて強く、殻をむいても発芽しない野生種系統の発芽特性

供試品種・系統		成熟期種子の発芽率(%)	
		殻あり	殻なし
普通ソバ	キタワセソバ (穂発芽抵抗性の弱い品種)	86	92
	春のいぶき (穂発芽抵抗性強化品種)	80	94
	鹿屋在来(普通ソバ最強クラスの穂発芽抵抗性)	48	86
当該野生種		0.0	0.0



普通ソバは殻をむくとほとんどの種子が発芽

野生種は殻をむいても発芽しない(数ヶ月室温保存で発芽可)

ソバでは未知の穂発芽耐性メカニズムの存在を示唆

試験方法： 成熟期の種子を32・湿潤条件のシャーレに6日間静置し発芽率を調査；
(野生種の穂発芽耐性を評価するため、ソバにとって非常に発芽しやすい条件で試験を実施)

2. 研究の目的

研究目的： 当該野生種における新規穂発芽抵抗性のメカニズム推測(「推定メカニズム」の提示)

穂発芽抵抗性の研究は種子休眠性と関連して現在までに詳細な調査がなされている分野である。しかし、ソバ属植物に関しては研究が遅れており、特に難穂発芽のメカニズムに関する報告はほとんどない。本応募はソバの穂発芽抵抗性のメカニズム推測に世界ではじめて挑戦する研究課題である。また、研究の核となる「穂発芽抵抗性が普通ソバより格段に強く、また殻をむいても発芽しない野生種系統」は応募者らが世界に先駆け発見した研究材料である。加えて、野生種と栽培種(普通ソバ)の比較によりそれぞれの難穂発芽メカニズムを推測することは、作物の栽培化に関する考察をするうえでも重要な情報である。以上より、学術的独自性は高いと考えられる。

一方で、ソバは穂発芽しやすい作物であり、近年の地球温暖化の影響もあり全国で穂発芽被害が増加傾向にある。特に梅雨時期に収穫期をむかえる春まきソバにおいて

穂発芽抵抗性は重要な栽培形質である。現在、穂発芽抵抗性の強い春まき用ソバ品種が育成されているが（研究業績欄 20, 27 番）穂発芽抵抗性はまだ不十分である。本研究により穂発芽抵抗性のメカニズムの推定がなされ、将来的に穂発芽を克服した品種が育成されれば、ソバの作期拡大や新作型提案につながり創造性も高い。

3. 研究の方法

当初計画として以下を策定した。配分予算の削減を受け、ジベレリンの施用試験・発芽時の遺伝子解析は実施せず、遺伝様式の解明と遺伝子発現解析の試験に注力した。

研究方法 以下の作業仮説をもとに、新規穂発芽抵抗性のメカニズム推測を行う。

作業仮説：「殻をむいても発芽しない」、「室温数ヶ月保存で発芽可能となる」ことから、普通ソバとは異なり種皮（殻をむいた種子の表面にある薄い皮）や糊粉層等に穂発芽阻害物質が存在し、時間経過（発芽阻害物質の酸化等による不活性化）で休眠が打破される。

試験 1：発芽阻害物質の関与の調査（1年目に実施）

種子に過酸化水素処理を行い（濃度 0～6%程度）休眠打破程度を調査（発芽阻害物質が酸化により不活性化し休眠打破されるか調査）。無酸素条件下で種子保存し休眠打破程度を調査（酸素の影響を調査）。ジベレリンを外部から与え休眠打破程度を調査（発芽阻害物質が発芽促進ホルモンであるジベレリン合成の上流/下流のどちらかに働くか推定）。休眠打破は予備試験結果から 32 を基本に行う。

試験 1 で穂発芽阻害物質の関与を確認しつつ、下記試験 2, 3 で詳細なメカニズム推定を行う。なお、予備試験にて過酸化水素処理で休眠打破される傾向を確認しているため、発芽阻害物質が関与する可能性は高いと判断している。

試験 2：登熟～休眠打破過程の休眠/発芽関連遺伝子発現の調査（1～3年目に実施）

種子登熟過程および休眠打破～発芽過程における休眠/発芽関連遺伝子ホモログの遺伝子転写産物等の発現を網羅的に解析する（次世代シーケンサーを用いたリードカウント解析）。上記について普通ソバ（穂発芽耐性弱（キタワセソバ）およびかなり強（鹿屋在来）の 2 種類）の結果を比較することで、当該野生種で独自に働く遺伝子を特定し、メカニズム推定に活用する。なお登熟過程の解析も合わせて行うことで、DELLA 様タンパク質（他作物で登熟時期に合成されジベレリン誘導性発芽促進遺伝子の働きを抑制するタンパク質）や、モデル植物や他作物で報告されている種子成熟制御因子（LEC、ABI、FUS 等）の関与も把握する。

試験 3：難穂発芽性の遺伝様式の調査（2、3年目に実施）

普通ソバ（穂発芽耐性弱（キタワセソバ）およびかなり強（鹿屋在来）の 2 種類）と当該野生種を交配し、後代（F₁ および F₂）にて殻あり/なしそれぞれの穂発芽検定を行い、分離比を観察することで関与する遺伝子の数を推定する。また、試験 2 で絞り込んだ普通ソバと野生種で発現に差があった遺伝子について分離比への適合を調査し、メカニズム推定に活用する。

4. 研究成果

(1) 遺伝様式の解明

野生種と普通ソバ(穂発芽耐性の弱い「キタワセソバ」)を交配し、F2分離世代の発芽率を調査した。発芽はシャーレにて、32℃で実施した。発芽検定は殻むき種子および殻ありの種子で行った。2乗検定の結果、殻ありについては、優性2遺伝子支配、殻無しについては劣性1遺伝子支配で説明することができた。代表的な結果として、殻無しでの種子親、花粉親、分離世代のヒストグラムを示す(図1)

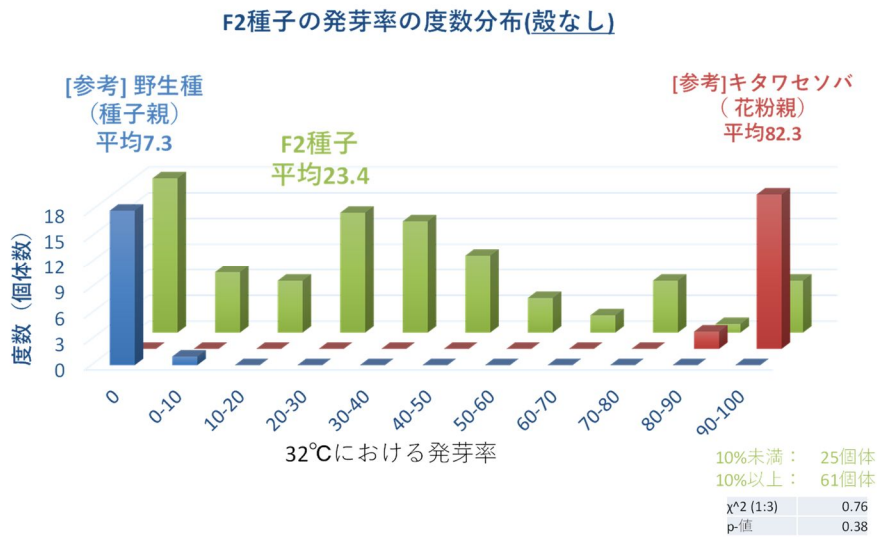


図1. 殻なしの種子における F2 種子の発芽率の度数分布

(2) 遺伝子発現解

ソバ野生種および「キタワセソバ」の成熟過程種子を用いて、遺伝子の発現量を調査した。難穂発芽性野生種においては、シロイヌナズナで休眠解除の役割を果たす遺伝子およびジベレリン応答の促進因子の発現が低下し、また、ABA応答を引き起こす遺伝子の発現が上昇していることを確認した。つまり、野生種の難穂発芽性は、種子登熟過程における「休眠促進」と「発芽抑制」の両面が強化されることにより生じる可能性が高いことがわかった。

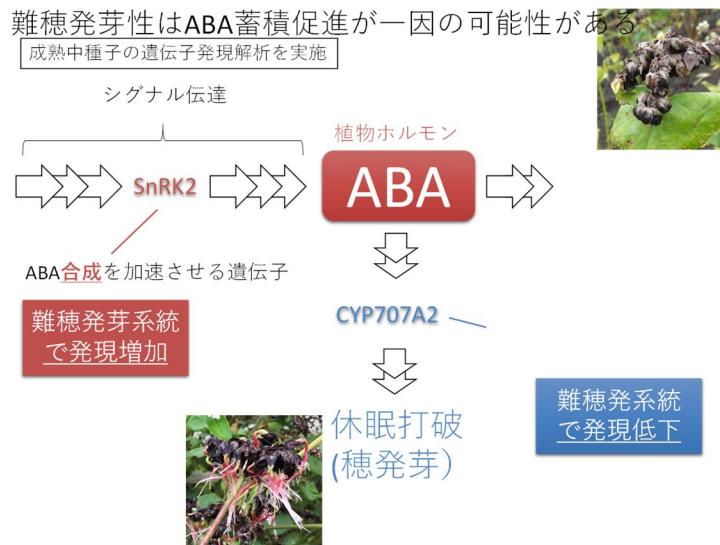


図3. ソバ野生種における難穂発芽メカニズムの推定図

(3) ソバ属植物における種子の2次休眠性の発見:

ソバの1次休眠性は報告されているが、2次休眠性についての知見は無かった。本研究において、種子の貯蔵試験を実施したところ、ダツタンソバ(*Fagopyrum tataricum*)が2次休眠性を有することが明らかとなった(図2)。

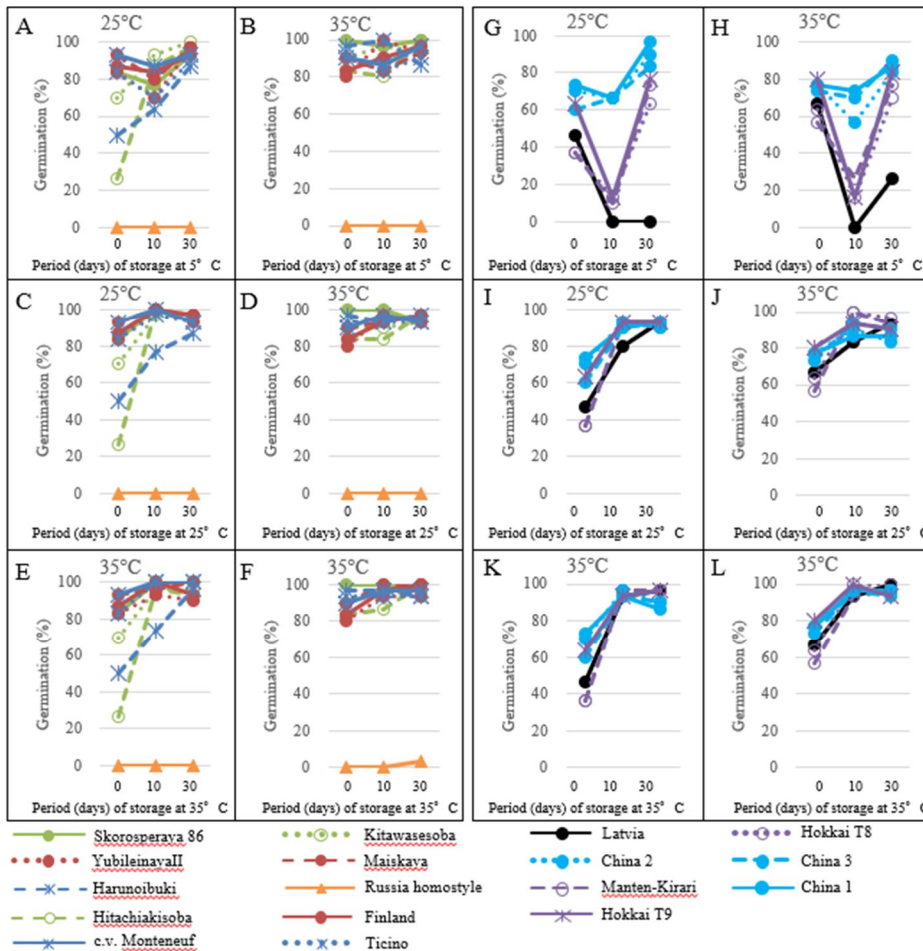


図2. 種子保存温度、発芽温度が発芽率に与える影響

ソバ種子を成熟期に収穫し、25、あるいは35で10日あるいは30日保存した。普通ソバ(A-F)は、保存温度、発芽温度に関わらず、発芽率が保存途中で大きく低下することは無かった。一方ダツタンソバ(G-L)においては、5で保存した場合において、紫線で示した3系統が保存10日目において発芽率が大幅に低下した。このことは、ダツタンソバの系統によっては、低温で2次休眠性が誘導されたことを示す。なお、当該3系統はロシア由来のダツタンソバ系統である。ダツタンソバの起源地は中国の低緯度地方である。これが北方となるロシアへの栽培地域拡大にあたり、冬季に発芽することはその後の霜等により枯死するリスクを高めることにつながる。低温で2次休眠性が誘導されることは、冬季の生存率を高め、北方への栽培地域拡大にメリットとなった可能性が考えられる。

(以上)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tatsuro Suzuki, Takahiro Hara, Takashi Hara and Kenjiro Katsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of storage temperature on occurrence of secondary dormancy in buckwheat seeds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seed Science and Technology	6. 最初と最後の頁 -
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Tatsuro, Sekiguchi Yurie, Hara Takahiro, Katsu Kenjiro, Matsuura Asana	4. 巻 140
2. 論文標題 Traits of a self pollinating and preharvest sprouting resistant line of summer buckwheat (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Breeding	6. 最初と最後の頁 671～677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pbr.12947	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Suzuki, T., Oki, N., Sugawara, T., Park, S.U., Aii, J. & Katsu, K
2. 発表標題 Occurrence of insoluble proanthocyanidin in Tartary buckwheat leaves and its possible roles.
3. 学会等名 14th International Symposium on Buckwheat (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki, T., Hara, T. & Katsu, K.
2. 発表標題 Effect of storage temperature on occurrence of secondly dormancy in buckwheat seeds.
3. 学会等名 14th International Symposium on Buckwheat (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki, T., Sekiguchi, Y., Matsuura, A., Hara, T. & Katsu, K.
2. 発表標題 Traits of self-pollinating line with preharvest-sprouting resistance in summer-ecotype buckwheat.
3. 学会等名 14th International Symposium on Buckwheat (国際学会)
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	原 貴洋 (HARA TAKAHIRO) (40355657)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・上級研究員 (82111)	

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