

## 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24年 6月 1日現在

機関番号：82111  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21580020  
 研究課題名（和文） 除草剤抵抗性変異を利用した水田雑草イヌホタルイの休眠・発芽調節機構の研究  
 研究課題名（英文） Study on regulation mechanism of the dormancy and germination of *Schoenoplectus juncooides*, a paddy weed, through analysis of sulfonylurea resistant biotypes.  
 研究代表者  
 内野 彰 (UCHINO AKIRA)  
 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生産体系研究領域・上席研究員  
 研究者番号：20355316

研究成果の概要（和文）：イヌホタルイの自殖後代では抵抗性形質と種子発芽特性が連鎖しなかったが、個体群モデルによって種子発芽特性が抵抗性顕在化に及ぼす影響をシミュレーションすると、種子休眠の浅い系統で抵抗性が顕著に早く顕在化することが明らかとなり、抵抗性系統で種子休眠の浅い系統の多い理由が説明された。イヌホタルイの休眠・発芽調節遺伝子群の同定を試みた結果では、*VPI* が単離できたが、*DOG1* や *MFT* は単離できなかった。

研究成果の概要（英文）：Sulfonylurea herbicide resistance did not link to germination feature of seeds in self-fertilized progenies of *Schoenoplectus juncooides*. However, population dynamics model explained why most of the sulfonylurea resistant accessions show higher seed germination rate than the susceptible accessions. In the isolation of genes relating seed germination or dormancy, *VPI* gene was identified in *S. juncooides*, but the other genes were not identified.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、作物学・雑草学

キーワード：水田雑草、除草剤抵抗性、種子休眠、イヌホタルイ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 耕地雑草の種子は不斉一な発芽をすることが多く、この形質が雑草防除を困難にしている。種子発芽の不斉一性は種子の休眠・発芽調節によって制御されるが、水田雑草においてはその分子機構がほとんど研究されていない。

(2) 一方申請者は、スルホニルウレア系除草剤に抵抗性を示すイヌホタルイに、種子休

眠の浅い系統が多いことをこれまでの研究で明らかにした。これらの抵抗性系統では、抵抗性を引き起こす遺伝子変異（アセト乳酸合成酵素:ALSのアミノ酸置換）を明らかにしていることから、これらの系統で遺伝子変異と種子休眠との関連を解析することにより、耕地雑草の種子休眠・発芽調節機構の一端が明らかになると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では「抵抗性を引き起こす ALS 遺伝子のアミノ酸置換がアミノ酸含量の変化を通して、イヌホタルイ種子の休眠・発芽特性に影響を与える」との仮説を立て、下記の項目を明らかにすることを当初の目的とした。

(1) 異なる ALS 遺伝子変異がイヌホタルイの休眠・発芽特性に与える影響

(2) 異なる ALS 遺伝子変異が引き起こすアミノ酸含量の変化

(3) イヌホタルイの休眠・発芽調節遺伝子群の同定

(4) アミノ酸含量の変化が休眠・発芽調節遺伝子群の発現に与える影響

しかし(1)を目的として実験を行った結果、ALS 遺伝子変異と種子の休眠・発芽特性が連鎖しないことが明らかとなり、当初の仮説が否定された。そこで、(2)、(4)の目的については実験を行わず、新たに(5)種子休眠が抵抗性顕在化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、一方で(3)の遺伝子の同定は(5)の目的と平行して行うこととした。

## 3. 研究の方法

(1) ALS 遺伝子座において抵抗性型 ALS 遺伝子と感受性型 ALS 遺伝子をヘテロで有するイヌホタルイ 4 個体 (それぞれ異なる変異型 ALS 遺伝子を有する。表 1) の自殖後代について、種子休眠と抵抗性形質の連鎖を調べた。自殖後代から抵抗性遺伝子と感受性遺伝子をホモで有する個体をそれぞれ 10 個体ずつ選択し、その自殖種子の発芽特性を比較した。ホモ個体の選択は、生育時の花茎の一部から DNA を抽出し、CAPS 法によって各個体の遺伝子型を決定して行った。発芽試験は、休眠覚醒初期の発芽特性を比較するため、風乾種子および 5°C 湿潤土中 (水分 30%) に 3 週間保存して短期間の休眠覚醒処理を行った種子について 20 粒 3 反復で行った。置床条件は明条件 30°C 密栓水中または明条件 15°C 水中とし、2-3 日ごとの 2 週間の調査から発芽指数と発芽率を算出した。

表 1 材料系統の抵抗性変異 (ALS 変異部位)

	ALS1 遺伝子座*		ALS2 遺伝子座	
	Pro197*	Trp574	Pro197	Trp574
1	Pro/Ser	-	-	-
2	Pro/Leu	-	-	-
3	-	-	Pro/Ser	-
4	-	-	-	Trp/Leu

\*イヌホタルイは ALS 遺伝子座が 2 つあり、その Pro197 (197 番目のプロリン) または Trp574 (574 番目のトリプトファン) でアミノ酸置換が起こると抵抗性型となる。

\*\*Ser/Pro は Ser197 (抵抗性型) と Pro197 (感受性型) をヘテロで有することを示す。Pro197 や Trp574 が保存されている場合は - とした。

(2) 浅井 (雑草研究 54 (別), 43, 2009 年) のモデルをもとに抵抗性バイオタイプの個体群動態モデルを作成し、種子休眠に関わるパラメータについて実測し、他のパラメータは文献値をもとにシミュレーションを行った。

種子休眠のパラメータは、茨城県つくば市においてコンクリートポットを使用し、埋土種子の埋土翌年の出芽率を調査した。材料には、表 1 の 4 個体の自殖後代から抵抗性ホモ個体および感受性ホモ個体を 2-3 個体ずつ選択し、その自殖種子を使用した。自殖種子を 10 月に採取した後、(1) と同様の発芽試験を行うとともに、11-12 月に 200 粒を植床土と混合して 1/10000a ワグネルポットに入れ、50cm 角のコンクリートポットに埋めた。コンクリートポットは翌年 4 月に耕起、5 月に代かき、移植 (コンヒカリ 6 株/コンクリートポット) した。耕起、代かき時には、1/10000a ワグネルポットを取り出して、各々で耕起、代かきを行った。埋土翌年の水稲作期中のイヌホタルイ出芽数から出芽率を算出した。同様の試験を 3 年間繰り返した。

(3) つくばみらい市産イヌホタルイの乾燥種子について遺伝子発現解析に適した高い純度の RNA を単離する方法を検討すると共に、全 RNA から cDNA を合成し、他の植物の保存配列を基に degenerate プライマーを設計し、PCR によって種子休眠・発芽調節に関連する遺伝子の増幅を行った。増幅した部分配列の塩基配列を決定し、RACE 法により cDNA の塩基配列を決定した。

(4) イヌホタルイの対照として、同じ水田雑草のタイヌビエからも同様に種子休眠・発芽調節に関連する遺伝子の増幅を行い、単離された遺伝子について、休眠種子および非休眠種子における発現を調べた。遺伝子の単離はイヌホタルイと同様に行い、遺伝子発現は単離した *MFT*, *DOG1-1*, *DOG1-2*, *VPI* について定量した。発現解析の材料には茨城県つくばみらい市産のタイヌビエ種子を供試し、2010 年 10 月に採取して 1 年以上 4°C で風乾保存した種子を休眠覚醒種子、2011 年 10 月に採取して風乾後に -20°C で保存した種子を休眠種子とした。両種子の休眠程度は 30°C 暗条件および 20°C 暗条件における 14 日間の発芽試験で確認した。休眠種子および休眠覚醒種子を 20°C 暗条件で水深 1cm 程度の水中に置床し、吸水 12 時間後、24 時間後および 48 時間後の遺伝子発現量を比較した。休眠種子では吸水 7 日後、休眠覚醒種子では発芽直前の

吸水4日後についても解析した。種子10粒の胚から全RNAを抽出し、遺伝子の発現量をreal-time PCR法で定量した。

#### 4. 研究成果

(1) 風乾種子の発芽率および短期間の休眠覚醒処理を行った種子の発芽率のいずれにおいても、抵抗性バイオタイプで発芽率や発芽指数が有意に高いという結果は得られず、種子休眠と抵抗性形質の間に連鎖関係が認められなかった(図1)。この結果は抵抗性変異の種類にかかわらず同様であった。従って抵抗性系統に見られる種子休眠が浅いという特徴は、抵抗性変異による生理的な影響に起因するものではないと考えられた。

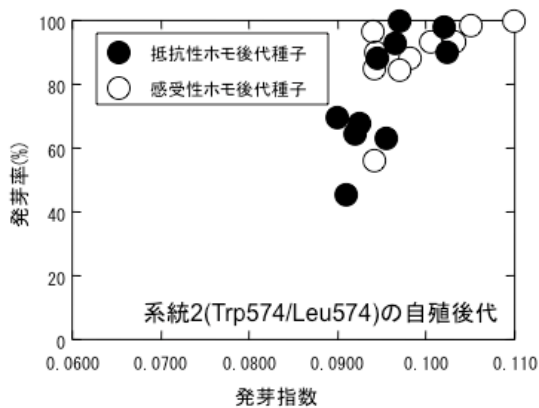


図1 イヌホタルイ自殖後代における抵抗性形質と種子休眠特性

(2) 埋土種子からの出芽率はバイオタイプの差異に関係なく2~34%の間で変動し、出芽率の高いものは、短期間の休眠覚醒処理で高い発芽率を示したもの(=種子休眠の浅いもの)に限られた(図2)。

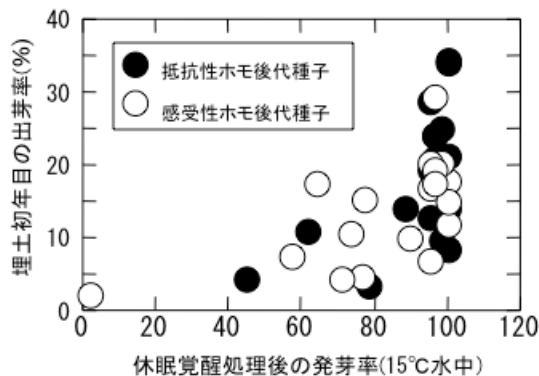


図2 自殖後代種子の埋土初年目の出芽率

出芽率の変動幅2~34%をもとに、抵抗性バイオタイプの顕在化までの年数を推定すると、早いもの(出芽率34%)で4年間、遅いもの(出芽率2%)で12年間と、極めて大きな差異が認められた。このことから、出芽率の高い系統(=種子休眠の浅い系統)では抵抗

性が早く顕在化するため、抵抗性バイオタイプに種子休眠の浅い系統が多く見つかると考えられた。

(3) PVPPやRNA精製カラムなどを利用することにより、イヌホタルイ種子から高い純度の種子RNAが得られた。種子休眠との関連が報告されている遺伝子*Vp1*は、イヌホタルイから2種類の遺伝子が単離された。単離した2種類の遺伝子がB3ドメイン近辺領域の約300bpについて他の植物と比較した結果、双子葉植物と59-62%の相同性、イネ科植物と66-67%の相同性を示した。種子休眠関連遺伝子*MTF*、*DOG1*、*Sdr4*については、既報の植物が少なく、イネ科の遺伝子配列を基に設計したプライマーでは単離できなかった。

(4) 対照として実験を進めた水田雑草のタイヌビエ休眠種子からは、イネ科の遺伝子配列を基に設計したプライマーを用い、種子休眠との関連が報告されている遺伝子*MFT*、*DOG1*(2種類の遺伝子*DOG1-1*、*DOG1-2*)、*Sdr4*、*Vp1*をそれぞれ単離した。既報のイネ科植物との相同性はそれぞれ84-92%、85-87%、80%、63-82%であった。そこでタイヌビエ種子で休眠種子・非休眠種子を使って*MFT*、*DOG1-1*、*DOG1-2*および*Vp1*の発現量を調べたところ、*MFT*の発現は温度に依存せず両者で明らかに異なる発現パターンを示し、*DOG1-1*と*DOG1-2*は温度依存的に異なる発現パターンを示した。*Vp1*では異なる発現パターンが見られなかった。このことから、タイヌビエの種子休眠に*MFT*、*DOG1-1*および*DOG1-2*が関与している可能性が考えられた。

以上、本研究により、イヌホタルイの抵抗性系統で種子休眠の浅い系統が多いことの原因が明らかとなるとともに、水田雑草で初めて休眠に関連する遺伝子が単離され、その発現パターンの差異が明らかとなった。この成果は、雑草の個体群動態を基にした長期的雑草の管理方法の確立に資するとともに、水田雑草の出芽の不斉一性解析の分子基盤となる。

#### 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)

[学会発表] (計3件)

①内野彰、今泉智通、浅井元朗、渡邊寛明、イヌホタルイのSU抵抗性バイオタイプの顕在化に与える種子発芽特性の影響、日本雑草学会第51回講演会、2012年4月5日、農林水産技術会議事務局・筑波事務所(茨城県)

②青木大輔、岩上哲史、渡邊寛明、三浦重典、

内野彰、タイヌビエ種子における休眠関連因子 DOG1 相同遺伝子の発現、日本雑草学会第 51 回講演会、2012 年 4 月 5 日、農林水産技術会議事務局・筑波事務所（茨城県）

③青木大輔、岩上哲史、渡邊寛明、内野彰、水田雑草タイヌビエにおける VP1 遺伝子の単離と休眠種子における発現、日本雑草学会第 50 回講演会、2011 年 4 月 2 日、東京大学（東京都）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/narc/2010/narc10-49.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内野 彰 (UCHINO AKIRA)

(独) 農研機構・中央農業総合研究センター・生産体系研究領域・上席研究員  
研究者番号：20355316

### (2) 研究協力者

浅井 元朗 (ASAI MOTOAKI)

(独) 農研機構・中央農業総合研究センター・生産体系研究領域・上席研究員  
研究者番号：40355524

今泉 智通 (IMAIZUMI TOSHIYUKI)

(独) 農研機構・中央農業総合研究センター・生産体系研究領域・研究員  
研究者番号：10509235

青木 大輔 (AOKI DAISUKE)

(独) 農研機構・中央農業総合研究センター・生産体系研究領域・契約研究員  
研究者番号：なし

岩上 哲史 (IWAKAMI TETSUFUMI)

京都大学・大学院農学研究科・大学院生  
研究者番号：なし