

パンコムギの冠水応答にみられるコムギ・エギロプス属細胞質の多様性

竹中祥太郎¹, 山本涼平¹, 中村千春¹¹龍谷大学農学部

〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷 1-5

Shotaro Takenaka¹, Ryohei Yamamoto¹, Chiharu Nakamura¹**Diversity of *Triticum-Aegilops* cytoplasm based on submergence tolerance**Key words: *Aegilops*, nucleus-cytoplasm hybrid, submergence tolerance, superoxide dismutase activity, wheat

Faculty of Agriculture, Ryukoku University

1-5 Yokotani, Seta Oe-cho, Otsu-shi, Shiga 520-2194 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10c12.00172

1. 研究の背景

世界三大穀物の1つであるコムギ (*Triticum* spp.) は、近縁の *Aegilops* 属野生種との自然交雑、染色体倍化とゲノム統合を経て進化した異質倍数性を特徴とする植物種である (Matsuoka, 2011)。コムギでは細胞質ゲノムに特徴的な母性遺伝様式を利用した、連続戻し交配によって育成された、核細胞質雑種系統が核ゲノムと細胞質ゲノムの相互作用を解析するための遺伝資源として利用可能である (図1)。特にパンコムギでは、46 系統の異種細胞質と 12 系統の核ゲノムを組み合わせた 552 系統もの核細胞質雑種が育成されている (Tsunewaki *et al.*, 2002)。近年、気候変動による環境変化が農業生産に深刻な影響を及ぼしている。半乾燥地が起源であるコムギは、過剰な水分によるストレスに対して弱く、世界のコムギ作付面積約 200 万 ha のうち、およそ 15~20% が冠水による生産減の影響を受けており、特にアジアのイネ・コムギ輪作地帯での被害は甚大である (Setter and Waters, 2003)。そこで我々は、パンコムギの冠水ストレス応答に着目し、農業上重要なこの環境応答形質に与える細胞質ゲノムの効果と役割を、パンコムギ核細胞質雑種系統を活用することによって明らかにした。

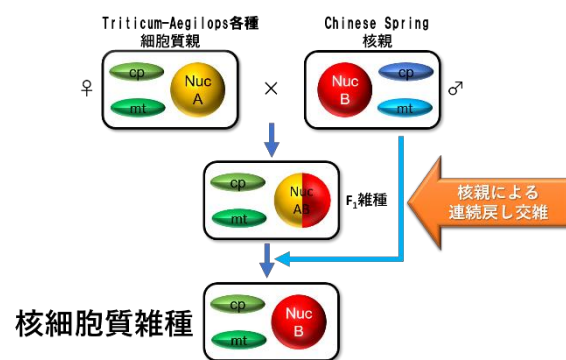


図1. 連続戻し交配による核細胞質雑種の作出法。

2. 冠水ストレスの生物検定法の確立

2-1. 試験管を用いた冠水ストレステスト法

イネで開発された試験管を用いた生物検定法 (Manangkil, O.E. *et al.*, 2008) を本研究に合わせて改良を行った。脱イオン水 (深さ 15 cm) を入れた試験管内に種子 (各試験管に 1 粒) を

1~2日間沈め、種子に十分な吸水を行った。吸水種子を同条件下に置くことで冠水ストレス環境とし、また、種子が水没しない程度まで脱イオン水を減らす(種子の1/3程度の水位)ことで非ストレス環境とした。なお、培養は15°C/20°C; 12hL/12hDに設定した植物培養室で、各系統あたり30種子以上の反復検定を行った。

2-2. 冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える影響

パンコムギの実験標準系統である Chinese Spring (*Triticum aestivum* cv. Chinese Spring, 以下CS)を対象に、冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える影響を調査した。1日間吸水させた種子を非ストレス環境下で3~10日間幼苗した後、7日間冠水ストレス環境下で幼苗し、子葉長、根長、新鮮重を測定した。吸水種子を非ストレス条件下で幼苗した結果との比較から、冠水ストレス条件下では幼苗の生育、特に子葉長の伸長がほぼ停止することが明らかになった(図2A, B, C)。

2-3. 発芽時の冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える影響

次に、1~11日間の冠水ストレスを種子に与えた後、10日間非ストレス環境下で培養を行うことで、発芽時の冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える影響を調査した。冠水期間が2日間の時に、その後の幼苗の生育が最もよく、冠水期間が5日を超えると、発芽率が低下すると共に発芽した個体の生育もわるくなった。以上の結果から、種子に対する吸水期間は2日間が最適であり、これ以降の冠水状態はストレスとなり、発芽後の幼苗の生育を阻害することが明らかになった(図2D)。

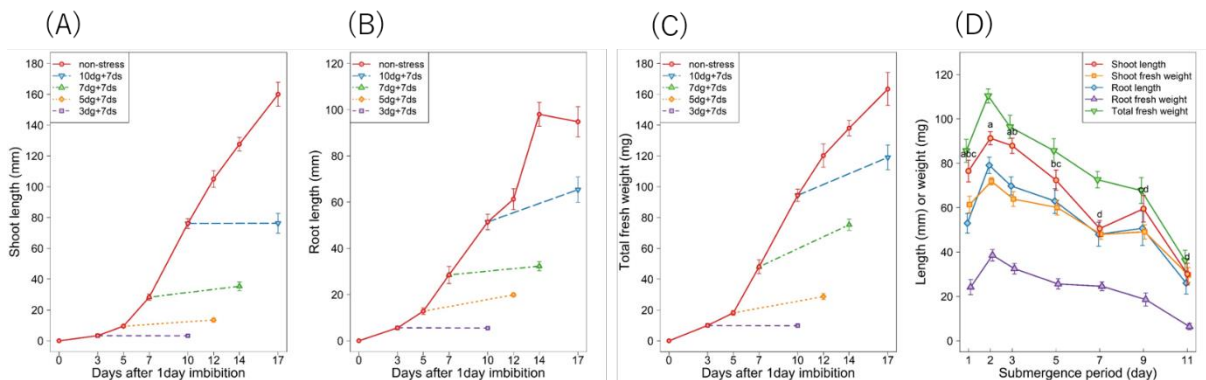


図2. 冠水ストレスがCSの発芽および初期成育に与える影響。(A) 冠水ストレスが幼苗の子葉の伸長に与える影響。(B) 冠水ストレスが幼苗の根の伸長に与える影響。(C) 冠水ストレスが幼苗の新鮮重の増加に与える影響。(D) 発芽時の冠水ストレスの期間がその後の幼苗の生育に与える影響。(Takenaka *et al.* 2018, 一部改変)

3. 細胞質が幼苗の初期成育および冠水応答に与える影響

CS を共通核親とし、*Triticum*・*Aegilops* 属の保有する細胞質ゲノムを組み合わせた 37 系統の核細胞質雑種を用いた (表 1)。

表 1 本研究に用いた核細胞質雑種系統。Tsunewaki (2009) を改変

コード	細胞質型	細胞質親	コード	細胞質型	細胞質親
CS	B	(<i>T. aestivum</i> cv. Chinese Spring)	C26	U	<i>Ae. triuncialis</i>
C01 ^{mf}	A	<i>T. boeoticum aegilopoides</i>	C28	D'	<i>Ae. cylindrica</i>
C02	C	<i>Ae. caudata polyathera</i>	C29	U	<i>Ae. biuncialis</i>
C03	U	<i>Ae. umbellulata</i>	C30	U'	<i>Ae. columnaris</i>
C04	D	<i>Ae. tauschii typica</i>	C31	M ^o	<i>Ae. geniculate</i>
C05	M	<i>Ae. comosa thessalica</i>	C32	U	<i>Ae. neglecta</i>
C07	N	<i>Ae. uniaristata</i>	C33	S ^v	<i>Ae. kotshyi</i>
C08	S	<i>Ae. speltoides</i> ssp. <i>ligustica</i>	C34	S ^v	<i>Ae. peregrine</i>
C10	S ^l	<i>Ae. sharonensis</i>	C35	D ²	<i>Ae. crassa</i>
C11	B	<i>T. aestivum</i> cv. Panjamo	C36	D	<i>Ae. ventricosa</i>
C12	S ^b	<i>Ae. bicornis</i>	C37	U	<i>Ae. biuncialis macrochaets</i>
C13	T	<i>Ae. mutica</i>	C38	C'	<i>Ae. triuncialis</i>
C14	T ²	<i>Ae. mutica</i>	C39	S ^v	<i>Ae. kotshyi</i>
C17	S	<i>Ae. speltoides</i> ssp. <i>speltoides</i>	C53	D ²	<i>Ae. juvenalis</i>
C18	S ^v	<i>Ae. searsii</i>	C54	U	<i>Ae. neglecta</i>
C19	D	<i>Ae. tauschii anathera</i>	C55	D ²	<i>Ae. crassa</i>
C20	S ^l	<i>Ae. longissimi</i>	C56	D ²	<i>Ae. vavilovii</i>
C21	B	<i>T. dicoccoides spontaneonigum</i>	C57	U	<i>Ae. neglecta recta</i>
C22	B	<i>T. dicoccum</i> 'Vernal'	C58	B	<i>T. aestivum tibetanum</i>

3-1. 細胞質が幼苗の初期成育に与える影響

本研究では、非ストレス環境下で 10 日間育成した個体の子葉長を (a)、非ストレス環境下で 13 日間育成した個体の子葉長を (b) し、(b) と (a) の平均値の差分すなわち、(b) - μ (a) を吸水後 10~13 日間の生育量、 $\{(b) - \mu (a)\} / \mu (a)$ を吸水後 10 日間の生育量に対する 10~13 日間の生育量の割合と定義し、これらの値を CS を基準とした Steel 検定によって比較することで、細胞質が幼苗の初期成育に与える影響を検証した。

育苗 10 日目では 3 系統の核細胞質雑種、C13 (T 型細胞質)、C31 (M^o)、C35 (D²) で、育苗 13 日目では 2 系統の核細胞質雑種、C14 (T²)、C30 (U') で CS との有差が検出されなかった (図 3A, B)。これら以外の系統では有意に生育量が CS より小さく、ほとんどの細胞質が幼苗の初期成育に負の効果をもたらすことが明らかになった。一方で、吸水後 10 日間の生育量に対する 10~13 日間の生育量の割合では、A、T²、U、U' タイプの細胞質が CS より有意に大きくなった (図 3D)。これらの結果から、細胞質のタイプにより、幼苗の初期成育のペースが異なることが示唆される。

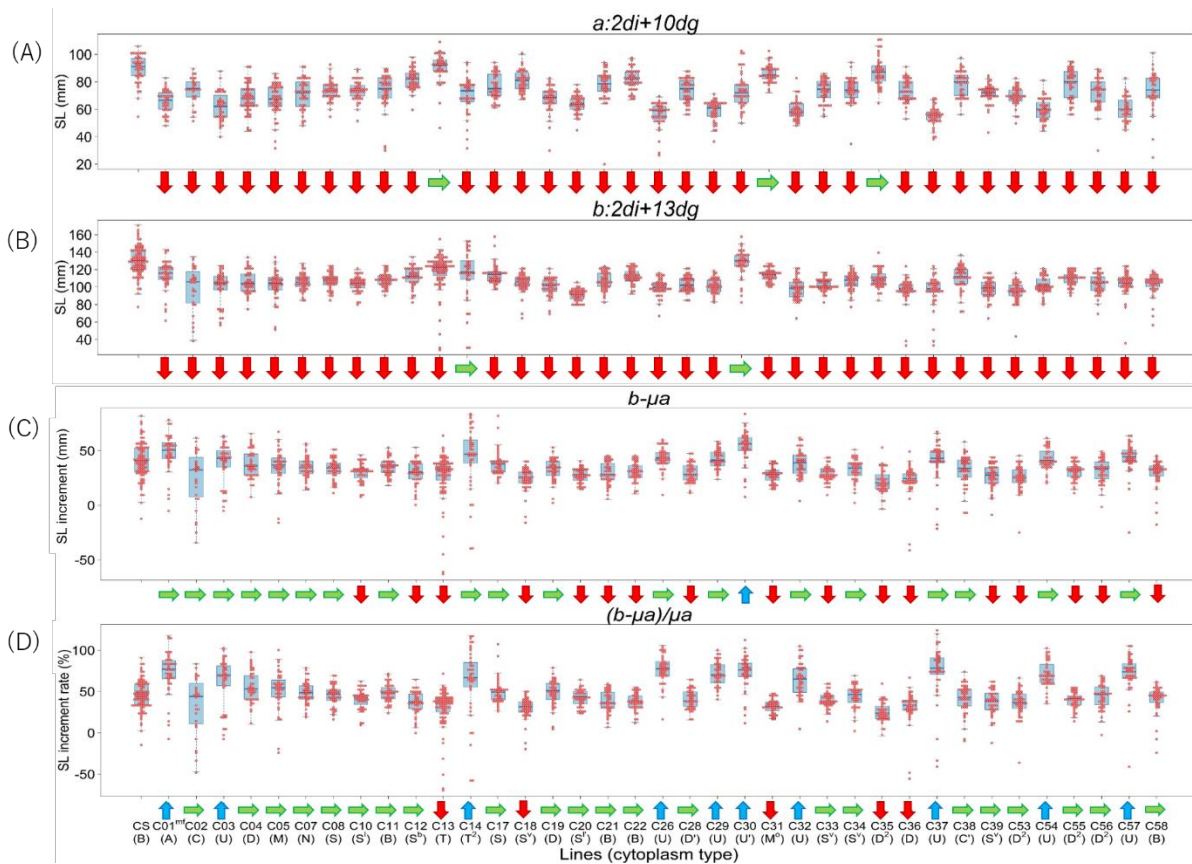


図 3. 細胞質が幼苗の初期成育に与える影響。矢印は CS を基準とした Steel 検定。(A) 吸水後 10 日目の子葉長の分布。(B) 吸水後 13 日目の子葉長の分布。(C) 吸水後 10~13 日間の子葉長生育量の分布。(D) 吸水後 10 日目の子葉長に対する 10~13 日間の子葉長の生育量の割合。(Takenaka *et al.* 2018, 一部改変)

3-2. 冠水ストレスが幼苗の初期成育に与える効果

本研究では幼苗に対する冠水ストレス処理として、吸水後 3 日間ストレス条件下に置いた後、10 日間非ストレス条件下で幼苗を行った。この時の各個体の子葉長を (c) とする。CS の幼苗を用いた調査から、冠水ストレス環境下では幼苗の生育が停止することが明らかになっている。もし冠水ストレスがストレス解除後の幼苗の生育に影響を与えないと仮定した場合、ストレス解除後 10 日目の幼苗の生育量は非ストレス環境下で 10 日間培養した幼苗の生育量と等しくなると期待できる。よって、冠水ストレス処理した個体と非ストレス環境下で 10 日間

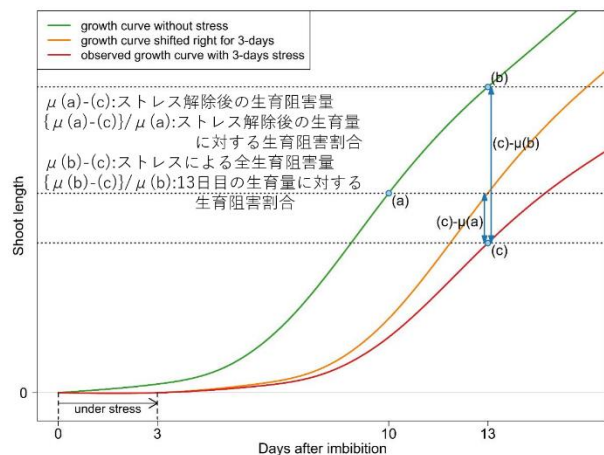


図 4. 幼苗の生長曲線に基づく冠水ストレスによる生育阻害の定義。緑線は非ストレス条件下の生長曲線。黄線は緑線を 3 日分右に平行移動したもの。赤線はストレス条件下の生育曲線。

育成した個体の生育量との差分すなわち $\mu(a) - (c)$ を冠水ストレス解除後の生育阻害量, $\mu(a) - (c) / \mu(a)$ を冠水ストレス解除後の生育阻害率と定義する。一方, 種子吸水後からの育成日数が同じである冠水ストレス処理した個体と非ストレス環境下で 13 日間育成した個体の生育量との差分すなわち $\mu(b) - (c)$ を冠水ストレスによる全生育阻害量, $\mu(b) - (c) / \mu(b)$ を全生育阻害率と定義する (図 4)。これらの値を CS を基準とした Steel 検定によって比較することで, 細胞質が幼苗の冠水ストレス応答に与える影響を検証した。

冠水ストレス条件下では, 核親を含むほぼすべての系統で初期成育の阻害が確認された。*Ae. mutica* の細胞質を持つ個体 C13(T), C14(T²) は, 核親である CS とストレス条件下での生育量に有意差が確認できなかった (図 5A)。

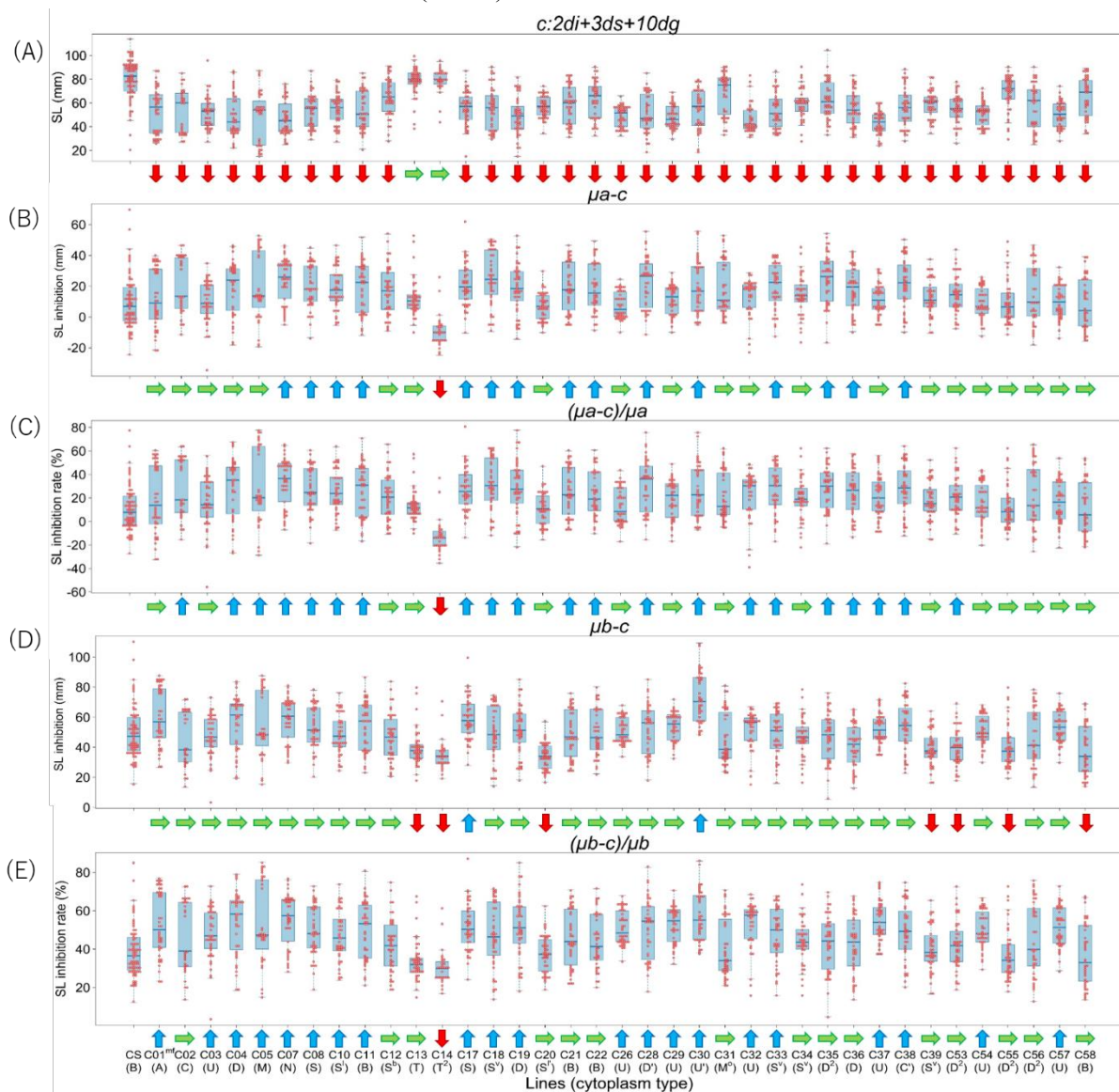


図 5 細胞質が冠水ストレス感受性に与える影響。矢印は CS を基準とした Steel 検定。(A) 吸水後 3 日間のストレス処理後 10 日目の子葉長の分布。(B) 吸水後 10 日目の子葉長に対する生育阻害量。(C) 吸水後 10 日目の子葉長に対する生育阻害量割合。(D) 吸水後 13 日目の子葉長に対する生育阻害量。(E) 吸水後 13 日目の子葉長に対する生育阻害量割合。

(Takenaka *et al.* 2018, 一部改変)

冠水ストレス解除後の生育阻害量および生育阻害率では C14(T²) だけが CS に対して有意に小さく、C14(T²) では冠水ストレス解除後の生育阻害が検出されなかった。これは C14(T²) が発芽時に受けた冠水ストレスで幼苗生育が阻害されない、または冠水解除後に急速に生育していることを示唆している (図 5B, C)。

一方、冠水ストレスによる全生育阻害量では C13(T), C14(T²), C20(S^l), C39(S^v), C53(D²), C55(D²), C58(B) の 6 系統の核細胞質雑種が核親である CS よりも有意に小さかった。これらの系統では冠水ストレスからの回復が CS と同等または早いことを示唆している (図 5D, E)。

これらの結果から、細胞質ゲノムは冠水ストレス感受性に寄与しており、細胞質置換により、核親の冠水ストレス感受性が変化すること。特に *Ae. mutica* の T² 型細胞質は CS の核ゲノムで冠水耐性レベルを上昇させると考えられる。

4. 冠水ストレスによって細胞内で何が起きているのか？

4-1. 網羅的発現解析

CS を対象に RNA-Seq 解析により網羅的な発現解析を行った。解析には、吸水後 5 日間冠水ストレスを与えた後 10 日間非ストレス環境下で育成した個体と、非ストレス環境下で 15 日間育成した個体を用いた。各試験区で 3 個体をバルクして Total RNA を抽出した。RNA-Seq 解析の結果、148 遺伝子の発現が変化しており、これらの GO term を調べたところ、酸化還元に関わる遺伝子の発現レベルが変化していることが明らかになった。この結果は冠水ストレスとは、水没および脱水没による低酸素状態と急激な酸化状態が原因となる酸化ストレスである可能性を示すものであると考えられる。

4-2. SOD 活性

網羅的発現解析から、CS は冠水応答として、酸化還元に関わる遺伝子の発現が変動していることが示唆された。そこで CS に加え、生物検定で特徴的な冠水応答性をしめした 3 系統の核細胞質雑種を対象に SOD (Superoxide dismutase) 活性の測定をおこなった (SOD とは細胞内で発生した活性酸素を除去する主要な酵素のひとつ。植物では、様々なストレスが引き金となって活性酸素が発生し蓄積する。ミトコンドリアや葉緑体に存在する)。ここで用いた 3 系統は冠水ストレスによる幼苗の生育阻害が CS と同等の C13(T), CS よりも小さい C14(T²), CS よりも大きい C26(U) である。SOD は液体窒素で凍結破砕した植物体から PBS buffer (pH 7.4) で抽出し、活性は SOD Assay Kit-WST (同仁化学研究所) を用いた。

冠水ストレス感受性系統である C26(U) で CS や冠水ストレス感受性の低い C13(T), C14(T²) と比べて顕著な活性上昇が確認できた。この結果から、冠水ストレスによる生育阻害は高レベルの活性酸素種の蓄積に起因することが示唆された (図 6)。

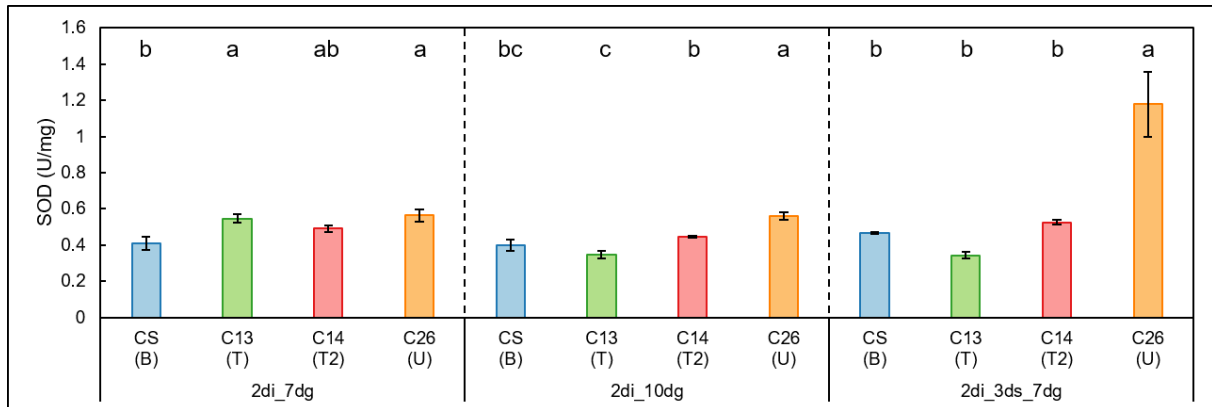


図 6. CS と核細胞質雑種 3 系統の SOD 活性の比較。(左) 種子吸水後非ストレス条件下で 7 日間育成。(中) 種子吸水後非ストレス条件下で 10 日間育成。(右) 種子吸水後 3 日間ストレス条件下の後 7 日間非ストレス条件下で育成。

5. まとめ

本研究では、ジーンバンクで維持されていたパンコムギ核細胞質雑種を用いることにより、*Triticum・Aegilops* 属の細胞質において、冠水応答性に大きな多様性が存在することを示すことができた。また、冠水ストレスによる生育阻害には活性酸素が関与していることが強く示唆された。本研究で用いた核細胞質雑種は、核親が CS である系統のみであったが、現在、CS とは異なる核ゲノムをもつ核細胞質雑種を用いることで、核ゲノムと細胞質ゲノムの組合せが冠水応答性に与える影響を調査している。

6. 謝辞

本小論を執筆する機会をくださった国立環境研究所の山口晴代博士，国立遺伝学研究所の佐藤豊博士，日本植物学会，電子出版物編集委員の方々に深く感謝いたします。本研究で用いた遺伝資源は全て NBRP・コムギで系統保存されているものです。本研究を遂行するにあたり種子を提供していただいた京都大学的那須田周平准教授，常脇恒一郎名誉教授には深く感謝申し上げます。本研究は龍谷大学 食と農の総合研究所プロジェクト『コムギの冠水ストレス応答に及ぼす異種細胞質の効果と細胞質相互作用に関する解析』の支援によってすすめられました。

引用文献

Manangkil, O.E., Vu, H. T. T., Yoshida, S., Mori, N. & Nakamura, C. 2008. A simple, rapid and reliable bioassay for evaluating seedling vigor under submergence in *indica* and *japonica* rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 163(2): 267-274.

Matsuoka, Y. 2011. Evolution of polyploid *Triticum* wheats under cultivation: the role of domestication, natural hybridization and allopolyploid speciation in their diversification. *Plant and cell physiology* 52(5): 750-764.

- Setter, T.L. & Waters, I. 2003. Reviews of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant and Soil* 253(1): 1-34.
- Takenaka, S., Yamamoto, R. & Nakamura, C. 2018 Genetic diversity of submergence stress response in cytoplasm of the Triticum-Aegilops complex. *Scientific reports* 8(1): 16267.
- Tsunewaki, K. 2009. Plasmon analysis in the *Triticum-Aegilops* complex. *Breed. Sci.* 59(5): 455-470.
- Tsunewaki, K, Wang, G.Z. & Matsuoka, Y. 2002. Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*.
2. Characterization and classification of 47 plasmons based on their effects on common wheat phenotypes. *Genes Genet. Syst.* 77(6): 409-427.