

称号及び氏名	博士(応用生命科学)	古谷 舞
学位授与の日付	2022年2月28日	
論文名	生育初期における根の形態学的形質に着目したダイズの低リン応答性に関する研究	
論文審査委員	主査	高野 順平
	副査	青木 考
	副査	横井 修司

論文要旨

第1章 緒言

リンは植物にとって重要な栄養素の一つであるが、植物への施肥効率が低い元素としても知られている。限られたリン資源を有効利用するために、植物のリン利用効率を向上させることが求められている。リンの吸収器官である根は、植物がリンを獲得する上で重要な役割を担っている。植物の根は、根圏に有機酸や酸性フォスファターゼを分泌する化学的方策、菌根菌との共生を行う生物の方策、土壌中での根系の分布や根毛の発達程度、根の太さなどを変化させる形態学的方策などさまざまな戦略でリンを獲得している。

ダイズの生育に重要な役割を果たす根粒菌との共生には多くのリンが必要となるため、ダイズのリン要求度は高いことが知られている。また、主要作物の一つであるダイズは油糧や食糧、飼料など幅広い用途で利用され、人口増加に伴う需要の高まりから、生産性の向上が求められている。したがって限られたリンを使って、より効率良くダイズを生産するためにはダイズの低リン耐性を向上させる必要がある。

これまで様々な植物を対象として低リン耐性に関する研究は行われてきたが、これらの研究の多くは明らかなリン欠乏症状が認められる生育時期に達した植物を対象に低リン耐性を評価している。先行研究によると、生育初期の根の発達程度がその後の成長やリン獲得に重要な役割を担っていることが報告されている。このことから、リン欠乏症状が認められる前、すなわち初期生育時の根系発達に着目して低リン応答性を評価することが重要であると考えられる。そこで本研究では、上記のリン獲得戦略のうち根の形態学的方策に着目して実験を行った。本研究はリン利用性に優れたダイズ品種育成を目指し、初期生育時の根系を対象に低リン応答性を評価した。

第2章 幼若期から第四複葉展開期のダイズ根における低リン応答性の品種間差

世界中の多様な遺伝資源のセットである世界のダイズミニコアコレクションと日本の代表的な品種であるフクユタカ、計 81 品種を供試材料とした。低リン土壌である黒ボク土を用いてリン施肥処理区およびリン無施肥処理区を設定した。14 時間日長、25° C/18° C(d/n)に設定した人工気象器内で栽培し、初生葉展開期における根の形態学的特徴を調査した。地上部および地下部乾物重はいずれも種子重と有意な正の相関関係にあり、初生葉展開期での生育は種子養分に強く依存していることが示唆された。その一方で地上部と比べて地下部の種子重との相関は弱く、一部の品種では種子重に関係なく地下部を発達させる可能性が考えられた。リン条件間で比較すると、初生葉展開時では明らかなリン欠乏症状は認められず、大半の品種で地上部、地下部いずれも生育量の違いは認められなかった。しかし、一部の品種ではリン無施肥処理区で根乾物重の増加が確認された。生育のごく初期段階で低リン条件に応答して根の形質を変化させる品種が存在すると予想されたため、主根長、側根数、主根乾物重、側根乾物重、総根重、根 1 本あたり平均乾物重、計 6 項目のリン無施肥処理区とリン施肥処理区の相対値を説明変数として主成分分析を行い、品種を分類した。その結果、GmWMC138 が特徴的な品種として選抜された。この品種は根の乾物重、特に側根の乾物重がリン無施肥条件下で大きく増加しており、低リン環境に対する根の応答性が高いと考えられた。

GmWMC138 は世界のダイズミニコアコレクションの中でも特に種子が小さい品種である。ダイズにおいて初期生育の程度は種子重、すなわち種子貯蔵養分に強く依存するため、GmWMC138 と種子重が同様の 3 品種 (GmWMC150、165、170) を対照品種としてその後の実験を行った。まず、これら 4 品種の種子貯蔵リンに関して種子内全リン含有率、全リン含有量、無機態リン量を調査した結果、種子重が近い品種群ではあったが、全ての項目で品種間差が認められた。低リン条件に対する根系の応答性が高かった GmWMC138 の種子貯蔵リンに関する形質は全て 4 品種の中で中程度であった。したがって根系の低リン応答性は種子貯蔵リンと関連せず、品種特異的であることが示唆された。

選抜試験と同様の処理区を設けて人工気象器条件下で選抜品種を栽培し、子葉展開期と初生葉展開期における内生フィターゼおよび酸性フォスファターゼ活性と生育の低リン応答性との関連性を調査した。子葉展開期および初生葉展開期の生育を比較すると GmWMC138 のみ初生葉展開期で根の新鮮重がリン無施肥区で増加した。また、GmWMC138 は子葉展開期での根のフィターゼ活性と初生葉展開期での根の酸性フォスファターゼ活性がリン無施肥条件下で高く、初生葉展開期の根の無機態リン含量はリン無施肥区とリン施肥区で同程度であった。これらの結果から、GmWMC138 は子葉展開期の根のフィターゼ活性と初生葉展開期の根の酸性フォスファターゼ活性を低リン条件で高めることにより体内のリン循環を高め、地下部の無機リン含量を維持し、リン無施肥条件下での根を増加させた可能性が示された。

生育初期の低リンに対する根の応答性とその後の生育との関連性を調べるため、種子貯蔵養分への依存性が弱まり、土壌から吸収されたリンに依存し始める第四複葉展

開期に着目して品種の評価を行った。実験は 2019 年に大阪府立大学附属研究フィールド内のガラス温室で行い、選抜した 4 品種を用いて評価した。リン十分区と低リン区を設定し、各品種の生育を比較した。この時期では下位葉が黄色くなるなど明確なリン欠乏の症状が全ての品種で認められた。対照品種の一つである GmWMC150 は地下部乾物重が変化せず、地上部乾物重は低リン条件で有意に減少し、低リン条件下で著しい生育抑制が確認された。対して GmWMC138 は初生葉展開期での応答と同様、低リン条件下で地下部乾物重や総根長が増加し、地上部乾物重は変化しなかった。低リン条件下における植物体内の全リン含量は、全ての対照品種で有意に減少していたが、GmWMC138 のみリン十分条件と同水準であった。その一方で対照品種の一つである GmWMC165 は初生葉展開期、第四複葉展開期ともに低リン条件下で根の変化が起こらなかったにも関わらず、低リン条件下での第四複葉展開期における全リン含量が他の品種と比べて高かった。この品種は根の形態学的方策とは異なる方策でリンを獲得する能力に優れていることが考えられた。以上のことから、GmWMC138 で認められた初生葉展開期における低リン条件に対する根系変化は、その後の生育ステージでの低リン耐性にも貢献する可能性が示唆された。また、根系変化以外にもリン獲得に関与する形質があり、各形質への依存度には品種間差がある可能性が示唆された。

第 3 章 画像解析を用いた生育初期のダイズ根系の新たな形態学的形質評価

根系の形態学的特徴を捉えるには主に圃場やポットから根を掘り出す破壊的な方法で調査することが一般的である。しかし、この方法では根の成長過程や土壤中における根の分布などを調査することは難しく、根を掘り出す際の労力や根の損傷などの懸念点がある。また、根系発達に優れた品種選抜のためには、より幅広い形質評価が期待されている。そこで、画像解析により時系列に沿った根の発達や平面上の根の分布など、新たな観点を基にした根の形質評価を試みた。

実験には、ダイズ 2 品種 (GmWMC138、150) を供試した。人工気象器条件下でリンを含む、あるいは含まない Hoagland 溶液を与えたグロースポーチを用いて生育させた各品種のダイズを移植後 6 日目 (初生葉展開始期) から 2、3 日置きにデジタルカメラで撮影し、根系画像を取得した。画像はバイリニア補完によりリサイズを行い、グロースポーチにつけた目印を基に線形変換を用いて 画像の大きさや歪みを調整し位置合わせを行い、深層学習の一種である U-Net を適用して根領域をセグメンテーションし、画像中の根の部分だけを抽出した 2 値化画像を取得した。撮影日ごとの 2 値化画像を用いて太さ別根長を測定したところ、GmWMC138 は移植後 6 日目では GmWMC150 と比べて根長が全体的に短かったが、太さが中程度の根を移植後 11 日目に多く発達させ、移植後 13 日目 (第二複葉展開始期) には根長が GmWMC150 と同程度またはそれ以上になった。さらに撮影日毎のセグメンテーション画像を比較して根の伸長差分を視覚的に評価することに成功した。移植後 6 日目の GmWMC138 の根は基部付近の一次側根が GmWMC150 と比べて短く、これがこの時期の総根長が GmWMC150 よりも短かった原因であると推察された。また、品種ごとの伸長差分を比較すると、GmWMC150 は移植後 6 日から 8 日ごろに基部付近の一次側根を大きく伸ばした後は伸長が緩慢であったのに対し、

GmWMC138 は特に移植後 10 日以降に全体的に一次側根が大きく伸長したことが観察された。以上、画像解析を用いた解析により時系列別および部位別の根系発達を基に品種間差を評価することができた。

第 4 章 総合考察

世界のダイズミニコアコレクションを用いた低リン応答性の評価試験によって生育初期の低リン条件に対する根系応答に優れる品種である GmWMC138 を見出した。この品種は栄養成長の中期にあたる第四複葉展開期においても低リン条件下で生育やリン吸収量が維持されたことから、生育初期の低リン条件に対する根系応答がダイズの低リン耐性に重要であることが示唆された。しかし、低リン応答性の評価試験では、ある生育時期における根重あるいは根の太さ別根長を評価したのみにとどまり、個体の成長過程を通じた根系発達や根の分布、伸長角度などの動態は調べられなかった。そこで画像解析を用いて、時系列に沿った根の発達や平面上の根の分布と言った新たな視点からの根の形質評価を試みた。その結果、GmWMC138 は対照と比べて移植後 6 日から 13 日目の間に多く根を発達させ、主根基部だけでなく根全体の一次側根の発達が旺盛であることが分かった。本研究で確立した時系列および部位別の根系発達に関する評価法を用いて、根の低リン応答性についてより詳細な評価が可能になると期待される。

審査結果の要旨

植物の必須元素であるリンは、土壌に固定されやすい性質から施肥効率が低い元素として知られている。リン鉱石の枯渇を背景として近年のリン肥料価格は上昇傾向にあるが、世界人口の増加やバイオ燃料作物の生産推進は今後さらなるリンの需要拡大を示唆するものであり、現在、農耕地へのリン投入量削減が世界的に求められている。ダイズは油糧や食糧、飼料、バイオ燃料など幅広い用途で利用されており、近年、生産拡大の一途をたどっているダイズに低リン耐性を付与することは重要な課題である。リンは初期生育時に重要な役割を果たすことから、生育初期の根の発達程度がその後の成長やリン獲得を左右すると予想されるが、この点に関する詳細な研究は行われていない。そこで本学位申請者は、リン欠乏症状が認められる前、すなわち生育のごく初期段階における根系発達に着目し、わが国が保有するダイズ遺伝資源を用いて低リン応答性を評価した。その結果、ダイズのリン栄養育種につながる有望系統を見出した。加えて、機械学習に基づいた画像解析によって非破壊的に根の発達や分布状況を把握できる新たな根系調査法の確立を試みた。

第 1 章では、世界中の多様な遺伝資源のセットである世界のダイズミニコアコレクション 80 系統を用いて低リン条件下における初生葉展開期での根の形態学的変化を調査した。初生葉展開時では外観上明らかなリン欠乏症状は認められず、大半の系統で地上部や根の生育量に違いは認められなかったが、一部の系統において低リン条件下

で根乾物重の増加が確認された。主根長，側根数，主根乾物重，側根乾物重，総根重，比根重など根の生育に関するパラメーター情報を基に解析した結果，低リン応答性が高い系統としてパキスタン原産の **GmWMC138** (系統名:COL/PAK/1989/IBPGR/2326(1)) が選抜された。この系統は根の乾物重，特に側根の乾物重が低リン条件下で増加する特徴を有していた。この原因を探るために有機態リンの分解に関与する酵素活性を測定したところ，**GmWMC138** は子葉展開期でのフィターゼ活性および初生葉展開期での酸性フォスファターゼ活性が高く，他の系統と比較して低リン条件下でも根の無機態リン含量が高く維持された。さらに生育が進んだ第 4 複葉展開期においても **GmWMC138** は低リン条件下で根をよく発達させ，地上部の生育も維持されたことから，この系統は植物体内のリン循環能を高めることで低リン条件下でも早期に根を発達させてリンを獲得できると推察された。

第 2 章では，画像解析を用いた根系発達の非破壊的な追跡評価法の確立を試みた。根系の形態学的特徴を捉えるには主に圃場やポットから根を掘り出す破壊的な方法が一般的であるが，破壊的な方法では根の成長過程や分布などを把握することは難しい。また，根系発達に優れる品種選抜のためには，時系列に沿った根の発達や分布に関する情報取得が求められる。本学位申請者は，植物育成用のグロースポーチを用いて低リン条件下でダイズを生育させ，数日置きにデジタルカメラで根系を撮影し，画像を取得した。画像はバイリニア補完によりリサイズを行い，グロースポーチにつけた目印を基に線形変換を用いて画像の大きさや歪みを調整し位置合わせを行った。その後，深層学習の一種である **U-Net** を適用して根領域をセグメンテーションし，画像中の根の部分だけを抽出した 2 値化画像を取得し解析に用いた。その結果，撮影日毎のセグメンテーション画像を比較することで根の伸長差分を視覚的に評価することに成功した。この手法を用いて第 1 章において低リン耐性が高かった **GmWMC138** と低リン耐性が低かった **GmWMC150** の根系を比較したところ，根系の発達過程に違いが認められた。また，根の分布を把握するために系統ごとの伸長差分を比較すると，**GmWMC150** は移植後 7 日ごろに主根の基部付近から一次側根を伸長させるのみで全体的に根の成長は緩慢であったが，**GmWMC138** は移植後 10 日以降から主根の基部以外の部分からも一次側根を多数発生させ，伸長量も大きいことが確認された。これらの結果から，本手法が根系発達の系統差を時期別・空間別に評価する上で有効であることが示された。

以上のように，本学位申請者は，これまで着目されていなかった生育のごく初期段階における根の低リン応答性を多様なダイズ遺伝資源を用いて評価し，その中から低リン応答性の高い系統として **GmWMC138** を発見した。また，根系画像を用いて時系列に沿った根の発達や分布の解析を可能とする新たな根の形質評価方法を確立した。これらの研究成果は，ダイズの低リン応答機構の解明に資するものであり，応用生命科学，特に植物栄養学の発展に大きく貢献するものである。さらには，植物育種への応用が期待される。したがって，本論文の審査ならびに最終試験の成績と併せて博士(応用生命科学)の学位を授与することを適当と認める。