

氏名	ディンティラム DINH, Thi Lam
本籍（国籍）	ベトナム社会主義共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研 784 号
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	Studies on wild genetic resources to improve phosphorus deficiency tolerance in rice(<i>Oryza sativa</i> L.)（イネにおけるリン酸欠乏耐性改良のための野生遺伝資源に関する研究）
学位審査委員	主査 弘前大学教授 石川 隆二 副査 畠山 勝徳(岩手 准教授),田中 克典(弘前 助教),笹沼 恒男 (山形 准教授)

論文の内容の要旨

【Summary】

Phosphorous (P) deficiency is a key constraint for rice cultivation. Problematic soils like acid sulfate soil occupying 44% of total land in Mekong Delta Vietnam are known as P deficiency. It causes severe damage to rice cultivation in the area. In order to widen gene pools for rice improvement for the tolerance to phosphorus deficiency, genetic diversity among wild rice *Oryza rufipogon* along the Mekong River in Vietnam was studied. Unique genetic resources were found for chloroplast and mitochondrial genomes. The most interested resources were detected in upstream areas where the highest diversity was found ($H_e=0.659$). Some of the resources carried significant re-arrangements around mitochondrial gene *orf153* involving to male sterility. In additions, several novel chloroplast types were detected by INDELs markers. Unique maternal lineage was detected in downstream population due to vegetative propagation inferred from the genotypes. High diversity in wild rice populations in Mekong Delta will give us a prospecting gene pool for rice improvement. In fact, one elite variety named AS996, which has tolerance to acid sulfate soil in the Mekong Delta has been established by exploiting these wild rice resources.

In this study, genetic mechanism involving to the above tolerance was studied. AS996 is an improved variety crossed between mega variety IR64 and a particular wild rice *O. rufipogon* inhabited in the upstream area of the Mekong Delta. The wild rice conferred the acid sulfate soils tolerance into IR64 genetic background. The tolerance was due to ability of efficiently utilize phosphorus to generate seeds and sustain yields under phosphorus deficient condition. Hydroponic system was adopted to analyze the genetic segregation. Both F2 and backcrossing populations suggested that the tolerance is regulated by a single dominant gene from the wild rice parental line, which is not a gene, *PSTOL1* reported previously. It suggested that a novel gene introgressed from the wild rice involves to the tolerance would be expected.

Additionally, AS996 has about ten days earlier heading days than IR64 was also reported in this study. Based on the genetic study, early heading trait in AS996 was identified to be regulated by a single recessive gene donated from the wild parent. It offers a wide adaptability to the variety that can be cultivated in high latitude area such as Aomori, Japan. In fact, the early heading trait is the same as elite varieties in Aomori prefecture.

In order to detect the gene, molecular tools have been established. Genome composition in AS996 was compared with IR64 using Next Generation Sequencing (NGS). Possible introgressed chromosomal segments were identified by SNPs detection. Higher SNPs were detected in several regions along genome. Particularly, relatively higher number of SNPs was found in chromosome 4, indicating various wild introgressed segments. Molecular markers were also established to apply for linkage analysis. Mapping candidate gene is still undergoing.

ICP-AES analysis was applied to evaluate P allocations in different organs between IR64 and AS996 grown under different P conditions. Different parts of tissues, root, lower leaves, upper leaves, stem and grains were applied to ICP-AES analysis. Reasonable allocations of P in physiological reproduction process facilitate enough seed production under P deficient condition in AS996. It resulted in relatively high seed fertility (79.1%)

under P deficient condition compared to that under normal condition in AS996. IR64 showed 19.5% seed fertility under P deficient condition compared to that under sufficient P condition. The most significant difference in P allocation in AS996 compared to IR64 was detected in grains. AS996 did not show differences in P content in grain under either field condition and relatively low P concentration was kept in the grains, whereas IR64 carried high P content in grains under P sufficient condition. Under P sufficient condition, IR64 required around 9.53 mg/g phosphorus accumulation in grain, while AS996 required only around 3.66 mg/g. Under phosphorus deficiency condition, 5.17 mg/g of phosphorus was measured in AS996 grain, versus 4.32 mg/g in IR64. It seems the delay of heading and invested nutrients to vegetative organs in IR64 was the efforts of sufficient P acquisition. Thus, IR64 failed to allocate P during grain filling under P depleted condition. Seed could not be matured and the appearance was poor in IR64. The reduction of P content in AS996 suggested that the low P requirement to bear seeds in AS996 is one of desirable trait cultivated in acid sulfate soil along the Mekong river. The genetic mechanism for the tolerance can also work to other delta areas where acid sulfate soil generated.

In order to know affected genes by P deficient condition, RNA-seq analysis was performed. Transcriptions were compared between AS996 and IR64 grown under either condition, P sufficient or P deficient with hydroponic culture. It detected a co-ordinated expression of 184 genes in roots and 276 genes in shoot involving to various physiological processes such as Phosphate transporter, Potassium transporter, C-glycosylflavone biosynthesis Glycerol-3-phosphate acyltransferase, anther development, pollen formation, and so on. The gene pathway would be clear after candidate gene is detected.

To saturate alleles of the tolerant gene for P deficiency, mutagenesis of AS996 was established by Sodium-azide as a mutagen. Mutation screening identified high mutagenized efficiency in the treated population. Although AS996 has long grains, three independent round kernel mutant lines were detected such as twin, round shape kernel and dwarf mutants. In addition, one large grain mutant and a novel mutation representing narrow

hulls and leaves also were created. Some of mutants would be used as new resources for rice breeding program in Vietnam and also for development biological researches. The mutagenesis can open the way to saturated mutagenized in the candidate tolerant gene.

Through these researches, genetic mechanism involving to tolerance to P deficiency was identified and genes regulated by the candidate gene were also detected by RNA-seq analysis. The information would be used to improve varieties which are tolerant to phosphorus deficiency as well as acid sulfate soil.

【要旨】

リン酸はイネ栽培における重要な微量栄養素である。特にメコンデルタにおいては 44% が酸性土壌であり、リン酸を難溶性に変換することからイネ栽培の障害となる。イネ低リン酸耐性イネ育種を効率的に進めるために、酸性土壌地帯で生育する野生イネ、*Oryza rufipogon* についての遺伝的多様性評価を行った。メコンデルタ上流域において最も高い多様性が認められた ($H_e=0.659$)。細胞質マーカーによる調査では、他の東南アジアと比較して新奇な葉緑体変異とともにミトコンドリアにおける変異を検出した。ミトコンドリアにおいては細胞質雄性不稔に関与することが報告されている *orf153* 周辺に大規模な再編成を見いだした。その野生イネ集団の遺伝資源を利用して、既に酸性土壌耐性を示す栽培イネ、AS996 が育成されている。AS996 は野生イネに各地で栽培されるメガ品種である IR64 に戻し交雑を行って、耐性形質を導入されており本論文では AS996 の抵抗性の遺伝解析を行うとともに、さらなる耐性育種のための生理学的、分子遺伝学的な解析を進めた。

水耕栽培による耐性試験により、AS996 が有する耐性遺伝子は 1 つの優性遺伝子により支配されていることが明らかになった。既に報告されているインド型品種 Kasalath 由来の低リン酸耐性遺伝子である *PSTOL1* を AS996 が持っていないことが明らかになったため、新奇な遺伝子により耐性機構が働くことを明らかにできた。F2 遺伝分離からは野生イネ由来の劣性早生遺伝子が導入されたことを検出した。この早生遺伝子により東北地域におけるインド型栽培が可能になることを見出した。

耐性遺伝子のクローニングを効率的にすすめるためにゲノム解析を行った。IR64 と AS996 のゲノムを比較することにより、野生イネから導入された染色体領域を推定し、それらの領域に分子マーカーを設置した。遺伝子マッピングは進行中であるが、NGS リードからも AS996 特異的に多型を示すマーカーを作出することがかのであることがわかった。

植物体内におけるリン酸の動態を明らかにするために ICP-AES 分析を行った。微量組織で ppm レベルの濃度を測定できるため、根、低位葉、上位葉、種子などの器官をわけて、異なるリン酸レベルで栽培した AS996 および IR64 の濃度を測定

した。栽培特性を比較したところ、出穂遅延もみられたが、IR64 に比較して最も顕著な違いを示したのは着粒率であった。正常区に比較して、AS996 は 79.1%の種子着粒率を維持していたが、IR64 では 19.5%であった。さらに、着粒した玄米は異常な形状でデンプン蓄積が非常にわずかであった。リン酸濃度で最も顕著であったのは、玄米におけるリン酸濃度であった。IR64 は正常区で他の区に対して高いリン酸濃度である 9.53mg/g を示したが、低肥料区では、玄米中のリン酸濃度は 4.32mg/g まで低下した。AS996 は正常区と低リン酸区でのリン酸濃度に差がなく、IR64 よりも低濃度のリン酸で十分に玄米にデンプンを充填させることができた。この低リン酸要求がメコンデルタ地域において酸性土壌耐性を示したものであろう。

リン酸欠失状態における耐性機構に関与する遺伝子群を特定するために RNAseq 分析を行った。異なる発現を示した遺伝子は根において 184 遺伝子、シュートでは 276 遺伝子であった。それらの遺伝子群には、リン酸代謝に関わる遺伝子として知られている Phosphate transporter, Potassium transporter, C-glycosylflavone biosynthesis Glycerol-3-phosphate acyltransferase, 葯発達関連遺伝子、花粉形成に関与する遺伝子などが見出された。これらの遺伝子群が耐性遺伝子の候補になるとともに他の遺伝子群は同耐性遺伝子に制御されることが明らかとなった。

耐性遺伝子の機能解析のため、同遺伝子内に突然変異飽和させる人工突然変異を行うことにした。そのため、化学変異原であるアジ化ナトリウム処理を AS996 に施して、M2 世代の突然変異検出を行った。幼苗期においては、アルビノ、クロリナ、ヴィレッセント、およびゼブラ斑などの変異が 10.6%の M1 系統から検出された。成熟期において 720M2 系統を栽培したところ、矮性や低分げつなどの既知の変異以外に 7 系統 (7.4%) で新奇な変異形質を検出した。長粒の AS996 の小穂長を短くして、日本型なみの粒形を示す系統を独立に 3 種類得た。1 つは Twin-spikelet 変異体系統内において分離したため、複数の変異が単一系統内に蓄積されていることが見出された。また、長粒の変異もみられた。これらはベトナムの高アミロースイネにおける新しい育種素材としても利用可能であろう。

これらの遺伝解析結果から、ベトナム野生イネの育種素材としての利用価値を明らかにするとともに、AS996 の低リン酸耐性を新たに同定した。これらの遺伝解析結果は今後、AS996 を活用した低リン酸耐性イネ育種に利用できることを期待している。

論文審査の結果の要旨

報告された内容では、イネ低リン酸耐性イネ育種を効率的に進めるために酸性土壌地帯で生育する野生イネ、*Oryza rufipogon* の遺伝的多様性について評価を行った。ツールとして在来種

や野生種のゲノム情報から葉緑体ならびにミトコンドリアのリシークエンスを行って開発した INDEL マーカーの有効性が明らかにされた。そのツールを利用することでメコン川上流の野生イネ集団が多様性に富んでいること、その一部の集団が下流に固定したことを同定した。この結果は、主論文 1 に公表された。また、INDEL 開発などその応用について主論文 2, 3 において公表された。

同野生イネ集団の多様性を利用して、IR64 に戻し交雑して開発された AS996 について、低リン酸耐性の遺伝解析が行われた。水耕栽培による低リン酸反応により、AS996 が有する耐性遺伝子は 1 つの優性遺伝子により支配されることがわかった。低肥料条件での水田栽培も行われ、形質評価とともにリン酸動態の評価が ICP-AES 分析が行われた。両親系統間での各器官、時期において顕著な差がみられた。関連する遺伝子群が RNAseq による DEG 解析により同定された。異なる発現を示した遺伝子は根において 184 遺伝子、シュートでは 276 遺伝子であった。それらの遺伝子群には、リン酸代謝に関わる遺伝子として知られている Phosphate transporter, Potassium transporter らが見出された。これらの遺伝子群が耐性遺伝子の候補になるとともに他の遺伝子群は同耐性遺伝子に制御されることが明らかとなった。これらの遺伝子が耐性候補遺伝子となることが予想され、今後の標的になること結論された。遺伝子の同定と飽和突然変異のツールとして人工突然変異原として、アジ化ナトリウム処理による変異集団の作出と変異率推定が試みられた。形態表現型からは、細長い粒形の AS996 において 1/2 近くに粒長が減少した矮性系統 *rk1* ならびに *rk2*、粒長がさらに長くなった系統、着粒の様式が変化した系統など新奇変異体が同定された。次世代シーケンスデータから DEG276 遺伝子群内の SNP 出現頻度を算出したところ、AS996 ならびに *rk1* では 2851 ならびに 2885SNPs が見いだされ、34 遺伝子内の 113 の新規 SNPs (変異頻度 0.015%) が生じた。全ゲノムでは 55,987 SNPs と非常に高頻度であった。このツールにより候補遺伝子に変異を誘発することが可能であると結論された。また、得られた形態変異のうち、*rk1* 栽培試験において実用的な品種開発に利用されうる可能性を明らかにした。

以上の結果から、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準に諮り審査した結果、本論文を博士(農学)の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

【以下、学位論文の基礎となる学術論文】

1. Dinh Thi Lam, Bui Chi Buu, Nguyen Thi Lang, Kinya Toriyama, Ikuo Nakamura and Ryuji Ishikawa (2019) Genetic diversity among perennial wild rice *Oryza rufipogon* Griff., in the Mekong Delta. *Ecology and Evolution* 9(5) : 2964-2977.
2. Dinh Thi Lam and Ryuji Ishikawa (2019) Molecular discrimination of landraces of *Citrus* species in the Okinawa, Japan. *Genetic Resources and Crop Evolution* 66 : 321-333.
3. Dinh Thi Lam, Katsuyuki Ichitani, Robert J. Henry, Ryuji Ishikawa (2020) Molecular and morphological divergence of Australian wild rice. *Plants* 9(2), 224.