

氏名	タントリアニ TANTRIANI
本籍（国籍）	インドネシア共和国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 851 号
学位授与年月日	令和 6 年 3 月 2 2 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 生物生産科学専攻
学位論文題目	Mechanism of low phosphorus tolerance of soybean cultivars (ダイズ品種の低リン耐性のメカニズム)
学位審査委員	主査 山形大学教授 俵谷 圭太郎 副査 山形大学教授 程 為国 副査 岩手大学教授 鈴木 雄二 副査 弘前大学教授 松山 信彦

論文の内容の要旨

はじめに

リン（P）は、植物の成長と発育に不可欠な多量栄養素である。リン鉱石の持続不可能な採掘は、この重要な栄養素の長期的な利用可能性に疑問を投げかけ、世界の食糧安全保障、環境の持続可能性、経済の安定性に重大な課題を投げかけている。リン鉱石の埋蔵量を施肥に集中的に使用することは、リン酸質肥料の枯渇につながる可能性がある。土壌中では、リン酸は無機および有機の形態で存在し、容易に利用可能な形態（ H PO_4^- および HPO_4^{2-} ）がある。不可給態の土壌中の P をどのように利用するかを理解することは極めて重要である。ダイズは人間にとって主要な蛋白質及び油の資源であり、ダイズ製品の需要が高まっている。しかし、ダイズの P 要求量は高く、P 獲得機構には品種間で変動がある。本研究の目的は、(1) 土壌培養下で P 耐性の低いダイズ品種をスクリーニングすること、(2) 根の長さ、酸性ホスファターゼ活性（ACP）、有機酸浸出量、および根の浸出物中の代謝物の変化を調査することである、(3) ダイズ品種の根圏土壌における根の長さ、ACP、有機酸浸出量、および代謝物の変化を調査することである。

材料と方法

ダイズ 81 品種を、 0 g P kg^{-1} 土壌（-P）および 0.44 g P kg^{-1} 土壌（+P）条件下で、移植後 25 日間（DAT）土壌培養した。根の長さ、地上部と根部の P 濃度と吸収量、地上部と根部の乾物重、低 P 耐性値、P 利用効率を測定した。低 P 耐性品種と感受性品種の選抜は、これらのパラメータに関する複数の基準に基づいて行った。

スクリーニング試験の結果に基づいて、低 P 耐性品種 3 品種（マエツ、クロトメ、フクユタカ）および低 P 感受性品種 3 品種（イホン、チズカ、コムタ）を選抜し、 0 (P0) および $258 \mu\text{M P (P8)}$ の条件下で 7DAT および 14DAT にわたって水耕栽培した。根の滲出液を採取し、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析計（CE-TOF/MS）を用いて代謝物を分析した。根の長さ、シュートと

根のP濃度と吸収量、シュートと根の乾燥重量、ACP活性、有機酸浸出量、根浸出液中の代謝産物を測定した。

また、スクリーニング試験の結果に基づき、低P耐性品種3品種（前津江、黒留、福豊）と低P感受性品種3品種（伊保園、千塚、小牟田）を選抜し、0 g P kg⁻¹ 土壌 (-P) および0.44 g P kg⁻¹ 土壌 (+P) で7日および14日DATの間、土壌培養を行った。根圏土壌を採取し、キャピラリー電気泳動飛行時間型質量分析 (GE-TOF/MS) を用いて代謝産物を分析した。根の長さ、地上部と根部のP濃度と吸収量、地上部と根部の乾物重、ACP活性、有機酸浸出量、及び根圏土壌中の代謝産物を測定した。

スクリーニング実験の結果、耐性値が100%を超える低P耐性品種3品種 (cv. 97, 100, 104) と、耐性値が30%未満の低P感受性品種3品種 (cv. 3, 7, 158) を、0 g P kg⁻¹ 土壌 (-P) および0.44 g P kg⁻¹ 土壌 (+P) の条件下で、16日および23日DATにわたって土壌培養した。1次、2次、及び3次側根の根圏土壌を採取し、GE-TOF/MSを用いて代謝産物を分析し、16S rRNA遺伝子の次世代シーケンシングを用いて微生物群集を分析した。根の長さ、シュートと根のP濃度と取り込み量、シュートと根の乾燥重量、ACP活性、代謝物、根圏土壌の細菌群集を測定した。

結果

根の長さは、25日後の -P 処理区と +P 処理区の両方で、地上部及び根部のP吸収量、P 利用効率、地上部と根部の乾物重と有意な正の相関を示した。ダイズ品種30品種のうち、地上部乾物重は -P 処理区の方が +P 処理区より有意に少なかった。注目すべきは、-P での地上部乾物重が +P よりも有意に高かった品種が1つあったことである。さらに、ダイズ50品種の地上部乾物重は、-P 処理と +P 処理で差がなかった。ダイズ品種の低 P 耐性 (LPT) は8%から160%の範囲であった。耐性」という用語は、-P の条件下で +P の条件下と比較して高いバイオマスを生産する品種の能力として定義した。耐性に基づいて分類すると、17品種が LPT > 100%、11品種が 100% < LPT < 80%、36品種が 80% < LPT < 30%、15品種が LPT < 30% であった。LPT > 100% および 100% < LPT < 80% のグループは低Pストレスに対して高い耐性を示し、80% < LPT < 30% のグループは中程度の耐性を示し、LPT < 30% のグループはPストレスに対して低い耐性を示した。

水耕栽培では、低P耐性の品種は根の長さを31%および119%増加させたが、これはP0条件下での感受性の品種がP8条件下と比較して7DATおよび14DATでそれぞれ62%および144%増加させたのに比べて低かった。低P耐性の品種のACP活性は、7DATと14DATで感受性の品種のそれを5.2倍と2.0倍上回った。各品種の根の浸出物からは177種類の代謝産物が検出され、P0条件下では低P耐性の品種の方が感受性品種よりも有機酸の浸出量が多かった。低P耐性の品種は、特定の代謝産物（シュウ酸、GABA、キナ酸、クエン酸、AMP、4-ピリドキシン酸、CMP）の濃度が上昇し、P0下で低P感受性品種と区別された。上位5つの代謝経路（プリン代謝、アルギニンおよびプロリン代謝、TCAサイクル、グリオキシル酸およびジカルボン酸代謝、アラニン、アスパラギン酸およびグルタミン酸代謝）は、14日後のP0条件下で低P耐性品種においてより顕著であった。

土耕培養では、低P耐性品種は根の長さを22%および39%増加させ、-P条件下では+P条件下と比較して、感受性品種では7DATおよび14DATでそれぞれ23%の減少および13%の増加が観察された。低P耐性の品種の土壌溶液中のACP活性は、7日および14日後に感受性の品種のそれを1.9倍および1.8倍上回った。同様に、低P耐性品種の根圏土壌中のACP活性は、7DATと14DATで感受性品種

のそれを1.0倍と0.8倍上回った。各品種の根圏土壌から、アントラニル酸、安息香酸、シトラマル酸、フマル酸、D-ガラクトuron酸、リンゴ酸、ムチン酸、N-アセチルノイラミン酸、コハク酸、ウロカニン酸などの浸出量が多い有機酸を含む120種類の代謝産物が検出され、-P耐性品種は-P条件下で低P感受性品種と区別された。

さまざまな側根の根圏土壌におけるACP活性は、-P条件下で16日および23日目に、感受性品種と比較して低P耐性品種で高いレベルを示した。1次（3.9倍と3.7倍）、第2次（3.7倍と5.2倍）、第3次（7.1倍と6.6倍）側根では、それぞれ16DATと23DATにおいて、感受性品種よりも低P耐性品種でレベルが高かった。16日後の根圏土壌分析では、ダイズcv. 97で78、72、80の代謝産物が検出された。97では78、72、80代謝産物、ダイズcv. 7では111、67、72代謝産物が検出された。7では111、67、72の代謝物がそれぞれ1次、2次、3次側根で検出された。23DATでは、ダイズcv. 97では59、81、55の代謝産物が、cv. 7では81、75、82の代謝産物が、それぞれの1、2、3次側根に認められた。16DATでフェニルプロパノエート、グリシン、グリセリン酸、23DATで安息香酸、リボフラビン、リンゴ酸のような特定の代謝産物は、すべての側根で耐性品種でのみ増加した。すべての処理区における細菌群集は、26門、94綱、171目、286科、505属からなる多様な配列であることがわかった。ダイズ品種を栽培した結果、ダイズcv. 97（一本）の根圏土壌の細菌量が増加した。97（一本）はダイズcv. 7（十勝）と比較すると、-P処理では16DATから23DATにかけて、+P処理と比較して、ダイズcv. 97（一本）の根圏土壌の細菌量が増加した。属レベルでは、*Sphingomonas*、*Edaphobacter*、*Acidovorax*などのリン酸可溶化細菌（PSB）がシュートのP濃度と正の相関を示した、*Luteibacter*、*Ralstonia*、*Mycobacterium*、*Rhodanobacter*、*Candidatus*、*Xiphinematobacter*、*Azospirillum*、*Chitinophaga*、*Agrobacterium*、*DA101*、*Rhizobium*、*Actinocatenispora*、*Steroidobacter*、*Solirubrobacter*、*Actinomycetales*、*Pelotomaculu*、*Chelativorans*、*Malawimonas*、*Kribbella*、*Shimazuella*、*Pythium*、*Phycococcus*、*Aquamicrobium*、*Telmatospirillum*、*Propionispira*、*Acidocella*、*Salinispora*、*Agromyces*、*Acidisoma*、*Dokdonella*、*Tatlockia*、*Diplazium*、*Ruminococcus*、*Siphonobacter*、*Acinetobacter*、*Coxiella*、*Cryocola*、*Terriglobus*、*Acanthamoeba*、*Conexibacter*、*Rhodopila*、*Novosphingobium*、*Clostridium*、*heteroC45_4W*、*Sporomusa*、*Alcanivorax*がACP活性と正の相関を示した。

論文審査の結果の要旨

リン鉱石の持続不可能な採掘は、この重要な栄養素の長期的な利用可能性に疑問を投げかけ、世界の食糧安全保障、環境の持続可能性、経済の安定性に重大な課題を投げかけている。土壌中では、リン酸は無機および有機の形態で存在し、土壌中の不可給態リンをどのように利用するかを理解することは極めて重要である。ダイズは人間にとって主要な蛋白質・油脂源であり、需要が高まっている。しかし、ダイズのリン要求量は高く、リン酸獲得機構には品種間でばらつきがある。本論文は、(1) 土壌培養下で低リン耐性の高いダイズ品種をスクリーニングすること、(2) ダイズ品種の根長、酸性ホスファターゼ活性、有機酸浸出量、および根浸出物中の代謝物の変化を調査すること、(3)異なる側根における代謝産物および根圏マイクロバイームを評価することにより、以下の知見を得た。ダイズ品種の低リン耐性（LPT）は8%から160%の範囲であった。耐性に基いて分類すると、17品種がLPT>100%、11品種が100%<LPT<80%、36

品種が80% < LPT < 30%、15品種がLPT < 30%であった。水耕培養では、耐性品種の根の浸出物の酸性ホスファターゼ活性は、感受性品種の5.2倍であった。根の浸出物から177の代謝物が検出され、P0条件下では低リン耐性品種の方が感受性品種よりも有機酸の浸出量が多かった。低リン耐性の品種は、特定の代謝物（シュウ酸塩、GABA、キナ酸塩、クエン酸塩、AMP、4-ピリドキシン酸塩、CMP）の濃度が高かった。土壌培養において、低リン耐性品種の土壌溶液中の酸性ホスファターゼ活性は、感受性品種の1.9倍であった。各品種の根圏土壌から、アントラニル酸、安息香酸、シトラマル酸、フマル酸、D-ガラクトuron酸、リンゴ酸、粘液酸、N-アセチルノイラミン酸、コハク酸、ウロカニン酸など、120種類の代謝物が検出され、耐性品種は-P条件下で低リン感受性品種と区別された。根圏微生物群集から、リン欠乏下における植物と微生物の相互作用が明らかになった。Alphaproteobacteria, Actinobacteria, Bacilli, Gammaproteobacteria, 及び Betaproteobacteria が豊富であった。さらに、Sphingomonas、Edaphobacter、Acidovoraxなどのリン可溶化細菌が地上部リン濃度と正の相関を示した。

本論文の結果は、(1) ダイズ品種には多様な低リン耐性が存在すること、(2) 耐性品種は、水耕培養におけるリン欠乏下で、酸性ホスファターゼ活性の増加、有機酸の浸出、特異的代謝産物の浸出などの根の生理学的形質の向上を示し、根長の増加はリン欠乏下での適応戦略ではないことが明らかになり、(3)低リン耐性品種は、根の形態学および生理学的形質の両方を促進し、根長の増加、酸性ホスファターゼ活性、有機酸の浸出、代謝産物の放出などにより土壌培養におけるリン吸収を促進し、(4)低リン耐性品種では、すべての側根の根圏土壌の酸性ホスファターゼ活性がリン吸収効率の向上に大きく寄与し、特定の代謝産物とリン可溶化細菌が低リン耐性の向上に極めて重要な役割を果たしていることを明らかにした。

これらの知見は植物栄養学・土壌学に基礎的知見を与えるものであるのみならず、低リン耐性ダイズ品種の作出に貢献する可能性がある。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」に則り審査した結果、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。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Tantriani, Cheng W, Tawaraya K (2023)
Screening for low phosphorus-tolerant soybean cultivars from the Japanese core collection
Euphytica, 219, 13
2. Tantriani, Cheng W, Oikawa A, Tawaraya K (2023)
Low phosphorus tolerance mechanisms in soybean cultivars grown in soil
Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 23, 6331-6344
3. Tantriani, Cheng W, Oikawa A, Tawaraya K (2023)
Phosphorus deficiency alters root length, acid phosphatase activity, organic acids, and metabolites in root exudates of soybean cultivars
Physiologia Plantarum, 175, <https://doi.org/10.1111/ppl.14107>