

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	RAMONGOLALAINA Clarissien
論文題目	Relationships between the symbiotic compatibility of <i>Bradyrhizobium</i> strains and root-secreted flavonoids in soybean (ダイズにおけるブラディリゾビウム属との共生親和性と根から分泌されるフラボノイド類との関係)		
(論文内容の要旨)			
<p>ダイズは根粒菌との共生により根粒を形成して窒素を固定することができる特異な作物であり、窒素固定能が高い根粒菌との共生はダイズの生産性にも大きく影響する。根粒の形成においては、根から分泌されるフラボノイド類による根粒菌の<i>nod</i>因子の発現誘導が最初の重要なステップになる。一方、圃場においては、比較的広い範囲のバクテリア種がダイズと根粒を形成することが報告されているが、土壌中のバクテリア種が特定の品種と共生関係を成立させる過程の詳細は不明である。本研究では、ダイズ品種Pekingとタマホマレの組換え自殖系統(PT-RILs)を用いて、根粒を形成する根粒菌の系統と根から分泌されるフラボノイド類との関係を調査して、共生成立に関する要因の解明を試みた。</p> <p>PT-RILsと4品種エンレイ、丹波黒、Pekingおよびタマホマレを3種類の土壌条件で栽培して、根粒を形成する根粒菌の系統を調査した。実験1では水田から採取した土壌を用いたポット栽培、実験2ではダイズ畑から採取した土壌を用いたポット栽培、実験3では丹波黒を栽培した畑地土壌2gをバーミキュライトに混入してポット栽培を行った。なお、実験1および2の水田および畑は転換畑水田であり、毎年水田とダイズ畑を入れ替えている圃場である。供試材料が4葉期に到達した時に、各遺伝子型から12粒の根粒を採取して表面を洗浄・殺菌した後、根粒別にDNAを抽出した。採取した根粒毎に共生菌の系統をPCR-RFLPを用いて同定した。PCR-RFLPでは、16S-23SのrRNA遺伝子のITS(内部転写スペーサー)領域を増幅し、得られた増幅産物を制限酵素で消化した。増幅産物の切断パターンに基づいて、共生菌を3系統に分類した。すなわち、<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110型(110型)、<i>B. elikanii</i> USDA94型(94型)および未同定型(U型)である。エンレイ、丹波黒、タマホマレは110型と根粒形成する割合が高く、Pekingは94型と根粒形成をする割合が高かった。93系統のPT-RILsを用いたQTL解析の結果、110型と94型の割合に関して、実験1では染色体13と染色体18上のQTLが、実験2では染色体3と染色体18上のQTLが、実験3では実験2と同じQTL領域が見出された。実験1、2および3を通して、110型と94型の割合に関する染色体18上のQTLがほぼ同じ領域に共通して見出された。</p> <p>PT-RILsと両親品種Pekingおよびタマホマレを用いて、根から分泌されるイソフラボン量を定量した。種子表面を滅菌した後、バーミキュライトに播種して6日間暗黒下で育苗した。育てた苗を28℃・16時間日長に設定したインキュベーター内で24時間水耕栽培し、水耕液中に分泌されたイソフラボン量を定量した。HPLCを用いて定量した結果、水耕液中にはダイゼイン(Daidzein)とゲニステイン(Genistein)が認められたがグリシテイン(Glycitein)はほとんど検出できなかった。また、全体を通して、ゲニステイン量はダイゼイン量の100分1程度であった。ダイゼイン量に関しては、丹波黒がもっとも多く、Peking、エンレイ、タマホマレの順に少なくなった。ゲニステイン量に関しては、エンレイがもっとも多く、タマホマレ、丹波黒、Pekingの順に少なくなった。ダイゼインとゲニステインの分泌量に関して、PT-RILsを用いてQTL解析を実施した結果、ダイゼインに関しては染色体8上に2カ所、ならびに染色体10上に1カ所のQTL領域が見出された。一方、ゲニステインに関しては、染色体</p>			

6、染色体13および染色体18にQTL領域が見出された。これらのQTL領域は、種子（子葉）に含まれるイソフラボン類の量に関して見出されたQTL領域と一致していたことから、イソフラボン産出に関連する遺伝因子が座乗していると考えられた。さらに、根粒菌との親和性に関して見出された染色体18上のQTL領域とゲニステインの分泌量に関するQTL領域はほぼ同じ位置に見出された。

ダイズを連続して栽培して共生する根粒菌の割合を観察するために、ダイズを1回、2回、および3回連続して栽培した土壌を用いて、ダイズ品種およびPT-RILsを栽培して根粒内の根粒菌の系統の割合を調査した。遺伝子型によらず、繰返し栽培回数が増えるに従って、110型が減り94型の割合が増加する傾向が顕著になった。また、PT-RILsを用いたQTL解析においても、2回繰返し栽培と3回繰返し栽培の両方で、染色体18上のQTLが110型と94型との共生割合に関わっていた。

根から分泌されるイソフラボンの種類と量が共生する根粒菌の系統に及ぼす効果について検討するために、根から分泌されるゲニステイン量と110型の根粒割合との関係を調べた。この結果、両者の間には高い正の相関関係が観察され、ゲニステイン量と94型の割合との間には高い負の相関関係が確認できた。以上の結果から、根から分泌されるイソフラボンの種類と量が、ダイズと共生する根粒菌の系統の割合に大きな影響を及ぼす要因の一つであることを明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

ダイズ品種と共生する根粒菌の系統には品種間に大きな差異があることが報告されている。しかし、ダイズと根粒菌の系統との親和性に関与する遺伝的要因については未解明な部分が多い。一方、根から分泌されるイソフラボンが根粒菌との共生関係の成立に大きな役割を果たしていることは古くから指摘されており、最近になって根から分泌されるイソフラボン量に大きな品種間差異があることが明らかにされた。本研究は、ダイズの遺伝子型と共生する根粒菌の系統との親和性と根から分泌されるイソフラボン類の種類と量との関係を解析したものである。評価できる点は以下の2点である。

1) 由来の異なる土壌を用いてダイズを栽培し、根粒を形成した根粒菌の系統を採取した根粒毎にPCR-RFLPを用いて3種類(110型、94型およびU型)に判別した。さらに、根粒を形成した菌の系統の割合に関して大きく異なるPekingとタマホマレの組換え自殖系統(PT-RILs)を用いたQTL解析の結果、染色体18上に作用力が大きいQTLを認めた。

2) 根から分泌されるイソフラボンの種類と量を調査した結果、主なイソフラボンはダイゼインとゲニステインであること、Pekingはタマホマレに比べてダイゼインが多くゲニステインが少ないことを明らかにした。さらに、PT-RILsを用いたイソフラボンの量に関するQTL解析の結果、染色体8と染色体10上にダイゼイン量に関するQTLを、染色体18上にゲニステイン量に関するQTLを見出した。染色体18上のQTLが共生する根粒菌の系統の割合に関するQTLと同じ領域にあること、ゲニステイン量が多いほど110型と共生する根粒の割合が増えることから、根から分泌されるイソフラボンの量と種類が共生する根粒菌との親和性を決定する重要な要因になることを初めて明らかにした。

以上のように、本論文は、ダイズと共生する根粒菌の系統との親和性に根から分泌されるイソフラボンが大きな役割を担っていることを初めて明らかにしたものであり、育種学、作物学および作物生理学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成30年2月16日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)