

氏 名(本籍)	たか 高	はし 橋	たかし 尚
学位の種類	博	士	(農 学)
学位記番号	農	博	第 6 7 1 号
学位授与年月日	平	成	13 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科環境修復生物学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	アルミニウム耐性簡易評価法の開発とアルミニウム耐 性エンジンの選抜		
論文審査委員	(主 査)	教 授	三 枝 正 彦
		教 授	金 濱 耕 基
		教 授	前 忠 彦

# 論文内容要旨

## 緒論

我が国はもちろん世界的に広く分布する酸性不良土壌は耕作可能な陸地面積の40%におよぶ。このような酸性土壌における作物の生育阻害要因として、低pHによる可溶化アルミニウム (Al) の過剰があげられる。従って農業的見地から石灰などの土壌改良資材の投入とともに、酸性に強い作物を育成することが強酸性土壌における作物生産上、有効な手段と考える。このような酸性土壌を想定した耐性作物の獲得と選抜は種間、品種間そして系統間で栽培試験、突然変異の利用、ストレス選抜、遺伝子導入、組み替え等の研究がなされている。これらの中でもストレス選抜は細胞、カルス、個体、系統の獲得例は多い。しかしながら獲得された耐性植物の耐性機構まで検討を加えた研究は少ない。

本研究は野菜の中でも酸性土壌に弱いニンジンを供試材料に用いた。ニンジンは近交弱勢が起こりやすく、自殖による酸性耐性の強化、安定化は困難である。ストレス選抜法は固定されている他の優良農業形質を残しながら、少ない自殖回数で耐性系統を獲得できる可能性がある。そこでこの材料を用いて、植物根のAlイオン耐性機構で最も有望視されている根から放出される有機酸によるAlのキレート化による無毒説に焦点をあて、Al耐性育種上の系統選抜や耐性機構の解明に利用できるAl耐性簡易評価法を開発し、それを利用して細胞選抜で獲得された系統の耐性機構の解明、Al耐性中間母本の育成を目的とした。

## 1. ニンジン栽培種のAl耐性

### 1. 土耕栽培試験による酸性土壌耐性ニンジンの選抜

酸性土壌耐性作物の評価法またその耐性機構の解明のためには耐性、感受性の品種の選抜が必要である。そこで供試材料としてニンジン品種黒田5寸を、供試土壌として強酸性非アロフェン質川渡黒ボク土を用いてリン酸とカルシウムの施用効果を検討することにより酸性土壌耐性評価条件を決定した。また、その選抜条件で20のニンジン栽培種を用いて酸性土壌耐性の品種間差を検討した。

#### 1) 川渡黒ボク土による酸性土壌耐性評価条件

川渡黒ボク土を用い、基本施肥として窒素100mgkg乾土<sup>-1</sup>を硫酸アンモニウムで、カリウム100mgkg乾土<sup>-1</sup>を硫酸カリウムで、マグネシウム25mgkg乾土<sup>-1</sup>

を硫酸マグネシウムで、カルシウム $25\text{mgkg乾土}^{-1}$ を塩化カルシウムで施用した。この基本施肥に適量施肥としてリン酸とカルシウムをそれぞれ $2500\text{mgkg乾土}^{-1}$ を、少量施肥としてリン酸 $250\text{mgkg乾土}^{-1}$ とカルシウム $500\text{mgkg乾土}^{-1}$ を施用し、適量施肥区に対する少量施肥区の相対新鮮重を比較することにより、酸性土壌耐性評価条件とした。この時のリン酸はリン酸2水素ナトリウム、カルシウムは炭酸カルシウムとした。この条件での黒田5寸の生育量を表1に示した。適量施肥区では少量施肥区の12倍以上の新鮮重であった。

## 2) ニンジン栽培種の酸性土壌耐性の品種間差

上述の条件でニンジン栽培種の酸性土壌耐性の品種間差を調査した結果、耐性品種として、紅星5寸、スーパー大型5寸、勝陽5寸、はまべに5寸が感受性品種として紅晴5寸、ベターリッチ、紅映5寸、はまべに2号、黒田5寸、夕福5寸、あすはる5寸が選抜された(表2)。

## 2. 水耕栽培試験によるAl耐性の品種間差

ここで選抜された3つの耐性品種(紅星5寸、スーパー大型5寸、勝陽5寸)と感受性品種(黒田5寸)を用いて、各種濃度のAl溶液を用いた栽培試験の結果から、Al耐性品種として勝陽5寸を選抜した(表3)。

以上の結果からAl耐性品種として勝陽5寸、感受性品種として黒田5寸を今後の研究の対照品種として用いた。

## II. Al耐性簡易評価法の開発

### 1. ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法の開発

ニンジン幼植物根を供試して「ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法」と名付けたAl簡易耐性評価法を開発した。この方法はコムギで確立された根そのもののAl吸着度をヘマトキシリン色素で染色して判定する従来法とは異なり、ヘマトキシリン-Alにより着色されたろ紙上に幼植物を置床して、経時的に幼植物根とろ紙の接触域の脱色度合いを観察する方法である。ニンジン幼植物の場合、 $1.0\text{mmolL}^{-1}\text{AlCl}_3$ ヘマトキシリン染色ろ紙に24時間置床で感受性品種と耐性品種に顕著な脱色の差が見られた(図1)。このAl耐性評価の原理は根から分泌される有機酸がAl耐性種でより多く、それによるろ紙に吸着されたヘマトキシ

リン-Al錯体のキレート化に基づいている。ちなみに $1.0\text{mmolL}^{-1}\text{AlCl}_3$ ヘマトキシリン染色ろ紙のクエン酸の検出限界は $1.0\text{nmolL}^{-1}$ 、リンゴ酸は $3\text{nmolL}^{-1}$ であった。

## 2. ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法の汎用性

6種類の野菜を用いてヘマトキシリン染色ろ紙脱色法を試みた。その結果、脱色が顕著であったのはシュンギク、次いでダイコン、モロヘイヤであった。キャベツ、ダイコン、シュンギク、モロヘイヤは根全域に渡り脱色が見られたが、ホウレンソウ、キュウリでは根基部の脱色が根端部より大きかった(図2)。この方法はAl遭遇時にキレート性有機酸の放出による脱色反応に基づいている。従って、Alに対して根から有機酸放出応答する植物の検索に利用できる可能性がある。

以上のことから、このヘマトキシリン染色ろ紙脱色法は根の直接染色法に比べて、操作面で効率的であると同時に、部位的、経時的にAl耐性評価することができる。

## III. ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法を基にしたニンジンのAl耐性機構の解明

### 1. 根から放出される有機酸の同定

ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法はAl遭遇時にキレート性有機酸の放出による脱色反応に基づいている。そこで高速液体クロマトグラフィー分析(HPLC)と質量分析(MS)によりこのろ紙に放出される有機酸を同定した。

#### 1) 高速液体クロマトグラフィーによる有機酸の検出

$1.0\text{mmolL}^{-1}\text{AlCl}_3$ 、24時間浸漬ろ紙から抽出した試料をHPLC分析した。Al耐性品種の勝陽5寸からは幼植物根1本当たり15ngのクエン酸が放出された。これに対しAl感受性品種の黒田5寸からは検出されなかった。

#### 2) 質量分析による有機酸の同定

上記試料のESI-MSでの質量分析でも $[m/z: 191(\text{M}-\text{H})^-]$ のピークが顕著に認められクエン酸と同定した(図3)。

## 2. 根部のAl吸着と微細形態

ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法により耐性品種で注目されたのは、根端部のみならず根基部にもまたがって顕著な脱色が認められたことである(図1)。そこで電子線マイクロアナリシス分析による根部のAl吸着と走査型電子顕微鏡による根部の微細形態を調べた。

#### 1) 電子線マイクロアナリシス分析による根のAl吸着

1.0mmolL<sup>-1</sup>AlCl<sub>3</sub>ヘマトキシリン染色ろ紙1時間処理で感受性品種の根基部でAlの吸着が認められた。耐性品種の根基部と根端部、感受性品種の根端部ではAlの吸着が認められなかった(図4)。

#### 2) 根の微細形態

電子線マイクロアナリシスに供したAl耐性品種と感受性品種の走査電子顕微鏡写真を図4に示した。耐性品種の勝陽5寸では根毛の密度が感受性品種の黒田5寸と比較して高く、しかも形態的な顕著な差が認められた(図5)。

以上のことから、供試したAl耐性ニンジン品種勝陽5寸は、Alに曝された場合、根端部のみならず根基部からもクエン酸を放出し、Alをキレートすることにより解毒を行う耐性機構を持つ。そのクエン酸放出量は根基部の根毛の形態と関係があることが示唆された。

### IV. 細胞選抜由来系統のAl耐性と耐性機構

#### 1. 細胞選抜とその再生植物体の採種

ストレス選抜は不良環境条件下で生育できる植物を選抜する一つの方法であり、この細胞選抜システムを用いてAl耐性個体の作出を試みた。

#### 1) 細胞選抜

ニンジンのAl感受性品種(黒田5寸)を供試材料とし、異なったpHに調整した難溶性低リン酸培地(R2+4mmolL<sup>-1</sup>AlCl<sub>3</sub>+2mmolL<sup>-1</sup>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)で細胞選抜を行った。細胞選抜培地のpHがニンジンの不定胚の生育におよぼす影響を非選抜区の培養物を100とした時の相対新鮮重を表4に示した。pH5.0, 5.5区は非選抜区とほぼ同じ不定胚の生育量であったが、pH4.0では10%弱の生育量の低下が見られた。また、pH4.5区でも、わずかな生育量の低下が見られたが、試験区間の変異が大きかった。

## 2) 再生植物からの採種

上記選抜による再生植物体の種子稔性とその自殖1代種子の発芽状況を表5に示した。各pH区において細胞選抜された再生植物個体の不稔率は20~31%であり非選抜個体の不稔率よりやや低い値であった。これに対し、採種した種子の発芽不良割合はpH4.5以下では非選抜区と同じかそれ以下であるが、pH5.0、5.5と上がると急激に増加した。

## 2. 細胞選抜由来系統のAl耐性の選抜とその耐性機構

細胞選抜で獲得された自殖1代系統を川渡黒ボク土の栽培試験、ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法によるAl耐性評価を行い、ここで選抜されたAl耐性系統の耐性機構とAl耐性品種である勝陽5寸の耐性機構との比較検討を行った。

### 1) 川渡黒ボク土での土耕栽培試験による耐性評価

細胞選抜由来自殖1代系統を川渡黒ボク土で栽培試験を行い、pH5.0細胞選抜由来系統で黒田5寸よりも強いAl耐性系統No.63, 65, 77を獲得した(表6)。図7に耐性系統の生育状況を示した。根の伸長はNo.63と黒田5寸は抑制された。No.65, 勝陽5寸では根の伸長の抑制は見られなかった。No.77では根の伸長が抑制されるものとされないものが見られた。これは酸性土壌に対する反応形質が遺伝的に固定されていないためと考える。

### 2) ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法によるAl耐性評価

脱色程度(クエン酸放出)に3つのタイプが見られた。つまり根端部型(No.77)、根基部型(No.63)、根全域型(No.65)であった(図6)。

### 3) 耐性系統の根から放出される有機酸の高速液体クロマトグラフィー分析

表7にNo.63, 65, 77, 黒田5寸, 勝陽5寸のHPLC分析結果を示した。いずれの系統、品種でもクエン酸の放出が認められ、No.63, 65ではAl耐性品種である勝陽5寸よりも放出量が多かった。No.77はAl感受性品種の黒田5寸よりもクエン酸の放出量が少なかった。これは根端部からの有機酸放出型系統であるのと有機酸放出応答が遺伝的に固定されていないためと考える。しかし、根端部から特異的に放出される。クエン酸濃度は根の伸長に支障のない放出量であった結果、黒田5寸よりも新鮮重が高い値を示したものとする。逆にNo.63はクエン酸放出量が多いのに川渡黒ボク土での栽培試験では根の伸長は抑制されている。そして新鮮重は重い。これは根基部からの有機酸放出量が根端部のそれよ

りも多く、根の伸長は抑制されたが根基部の肥大は促進されたものと推測した。No.65は根全域でクエン酸放出が見られ根の伸長と肥大が起こったものと推測した。

#### 4) 耐性系統の根の微細形態

図8に耐性系統の根基部の走査型電子顕微鏡写真を示した。No.63, No.65と比較してNo.77では根毛密度が低く細い傾向にあり有機酸放出との関連が示唆された。

ニンジンの細胞選抜由来系統のAl耐性機構は根端部型、根基部型、根全域型の3つのクエン酸放出型の部位の変異が存在する。また、この放出量もAl耐性品種勝陽5寸と同じく根基部の根毛の形態が関与している。しかしながらニンジンのような根部を収穫する野菜では部位的に有機酸を放出するAl耐性機構では、Alの解毒も部位的に起こるため、肥大不足、奇形根の原因となると考えられる。従って直根類野菜のAl耐性育種では、Al遭遇時に根からのバランスの良い有機酸放出が望ましく、根全域がAlに対して応答し有機酸を放出する耐性機構を持つ品種、系統の選抜が必要である。また、No.65に関してはAl耐性中間母本となり得るであろう。

#### 総括

ニンジンのAl耐性簡易評価法として「ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法」を開発し、それを利用してAl耐性機構を解明した。その結果、ニンジンのAl耐性機構は、根から放出されるクエン酸のAlのキレート化による無毒化であり、このクエン酸の放出は部位的に根基部型、根端部型、根全域型の3つの変異があることを明らかにした。それは根基部の根毛の形態に関与していた。また本研究で用いられた細胞選抜由来系統の中から根全域クエン酸放出型Al耐性系統No.65を中間母本として選抜し、品種登録申請準備中である。ニンジンのみならず、他の作物でもここで開発されたAl耐性簡易評価法を育種的利用することにより品種改良の一助となることを期待する。

# 1. ニンジン栽培種のAI耐性

## 1. 土耕栽培試験による酸性土壌耐性ニンジンの選抜

表1 ニンジン品種黒田5寸の適量施肥と少量施肥での生育量

施肥区	新鮮重 (mg)
少量施肥区	69.4 ± 4.26
適量施肥区	868.0 ± 132.09

供試験土壌は強酸性非アロフェン質川渡黒ボク土を用いた。

(平均値 ± 標準誤差, 供試個体数=8)

表2 ニンジン栽培種の強酸性川渡黒ボク土ポット栽培試験における相対新鮮重の品種間差

耐性強		耐性中		感受性	
品種名	相対新鮮重	品種名	相対新鮮重	品種名	相対新鮮重
紅星5寸	24.4 ± 3.11	向陽2号	14.8 ± 1.56	紅晴5寸	9.8 ± 1.24
スーパー大型5寸	21.3 ± 2.69	スーパー春蒔5寸	14.2 ± 1.84	ベターリッチ	9.5 ± 0.98
勝陽5寸	17.1 ± 2.65	陽春5寸	12.6 ± 1.32	紅映5寸	8.5 ± 0.99
はまべに5寸	15.4 ± 1.94	ホーレット2号	11.8 ± 0.70	はまべに2号	8.4 ± 0.95
		光彩2号	11.5 ± 1.03	黒田5寸	8.0 ± 0.50
		紅太郎	11.5 ± 1.34	夕福5寸	7.9 ± 1.06
		スーパー夏蒔5寸	10.9 ± 0.69	あすはる5寸	7.1 ± 0.78
		千浜5寸	10.6 ± 0.67		
		陽明5寸	10.1 ± 1.87		

数字は適量施肥区の新鮮重を100した時の相対新鮮重 (%) を示す。平均値 ± 標準誤差, 供試個体数はスーパー夏蒔5寸は6株, ベターリッチは7株, その他の品種は8株とした。



## 2. 水耕栽培試験によるAl耐性の品種間差

表3 水耕栽培における溶液Al濃度とニンジン根の相対生育量の品種間差

Al濃度 $\mu\text{molL}^{-1}$	品 種 名			
	紅星5寸	勝陽5寸	スーパー大型5寸	黒田5寸
0	100	100	100	100
20	67.8±5.40	63.4±9.42	59.2±7.05	34.0±1.88
50	64.0±2.05	65.6±5.22	35.5±5.31	20.0±3.79
100	54.8±4.64	58.3±8.26	25.3±2.19	15.6±1.83

各種濃度の $\text{AlCl}_3$ に $50\mu\text{molL}^{-1}\text{CaCl}_2$ を添加した水耕液で5日間水耕栽培した。数字はAl無添加の根長を100とした時の相対生育量を示す。(平均値±標準誤差, 供試個体数=5)

## II. Al耐性簡易評価法の開発

### 1. ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法の開発

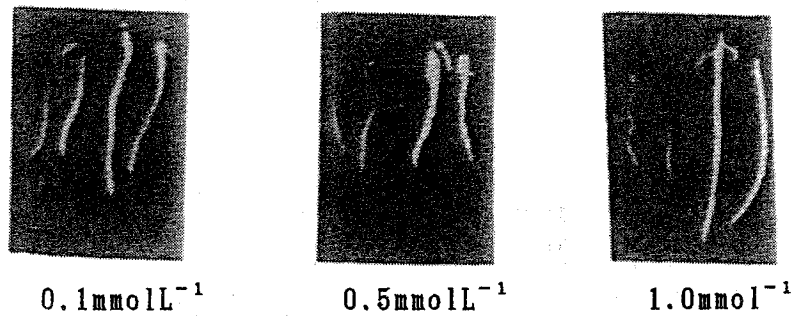
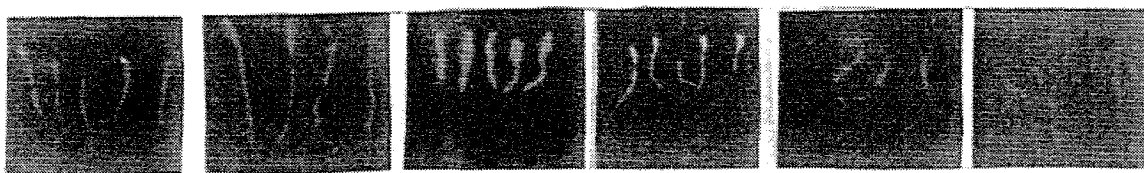


図1 ニンジンの幼植物根による各種Al濃度のヘマトキシリン染色ろ紙の脱色

各写真とも左2本が黒田5寸, 右2本が勝陽5寸, 置床24時間。

## 2. ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法の汎用性



1 2 3 4 5 6

図2 各種野菜の幼植物根のヘマトキシリン染色ろ紙脱色法による脱色程度

1:キャベツ, 2:ダイコン, 3:シュンギク, 4:モロヘイヤ,

5:ホウレンソウ, 6:キュウリ

0.1mmolL<sup>-1</sup>AlCl<sub>3</sub>ヘマトキシリン染色ろ紙 (TOYO No.1) を用いた。

## III. ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法を基にしたニンジンのAl耐性機構の解明

### 1. 根から放出される有機酸の同定

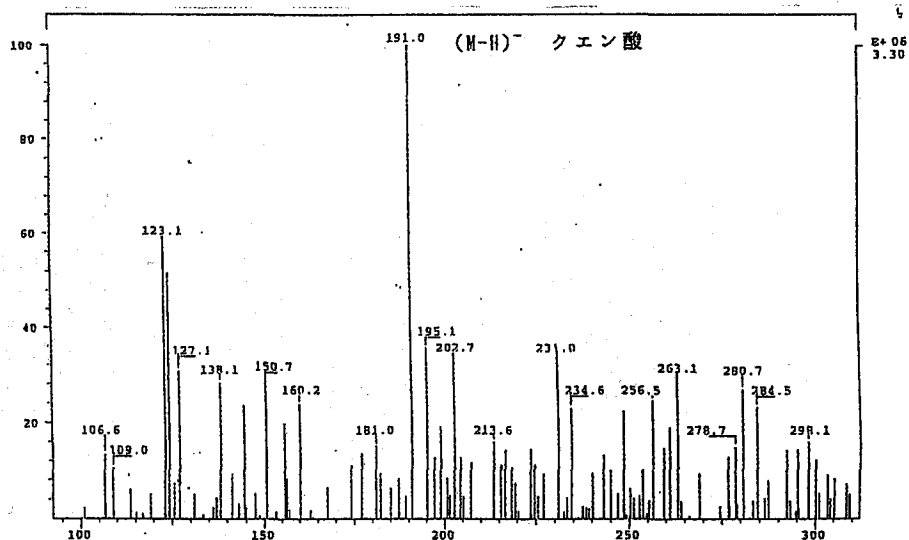
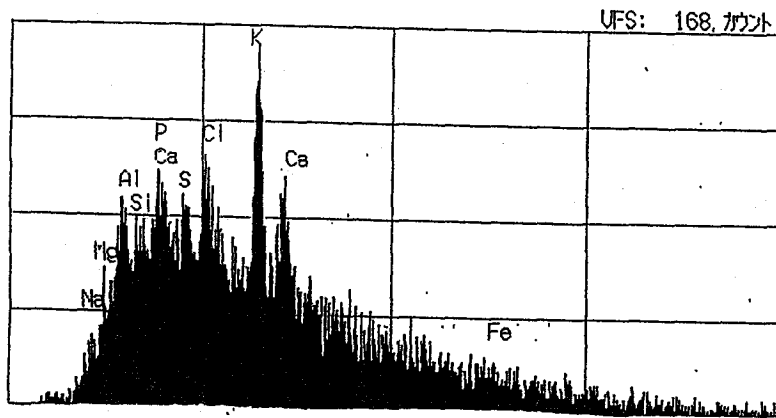


図3 ろ紙からの抽出物のESI-MS分析

AlCl<sub>3</sub>を24時間浸漬処理したろ紙に勝陽5寸の実生120本を置床し, 24時間後, その抽出物を分析した。

## 2. 根部のAl吸着と微細形態

黒田5寸1時間置床



勝陽5寸1時間置床

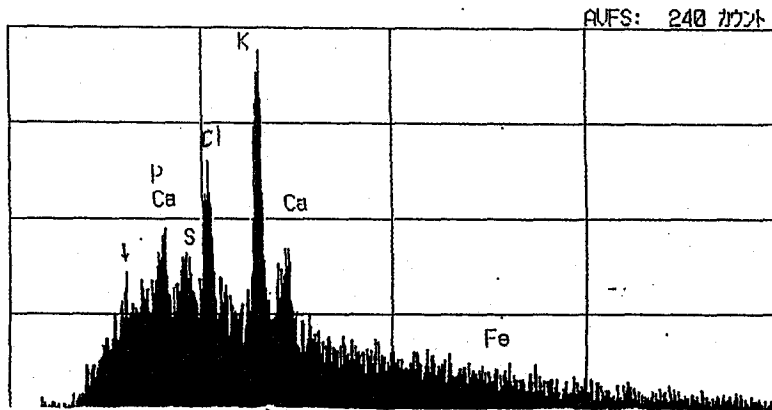


図4 電子線マイクロアナリシスによる黒田5寸と勝陽5寸の根基部の元素スペクトル

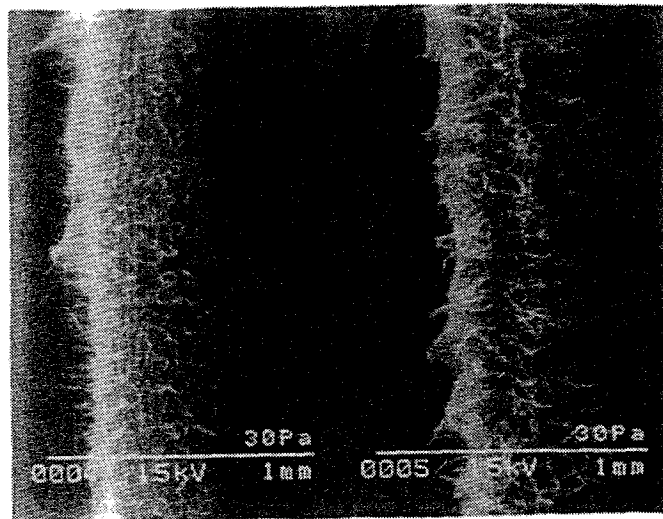


図5 黒田5寸と勝陽5寸の根基部の走査型電子顕微鏡写真

左：黒田5寸

右：勝陽5寸

#### IV. 細胞選抜由来系統のAl耐性と耐性機構

##### 1. 細胞選抜とその再生植物体の採種

表4 細胞選抜時のpHが不定胚の生育におよぼす影響

pH	相対新鮮重 (%)
4.0	91.5 ± 2.1
4.5	97.2 ± 6.7
5.0	101.5 ± 0.7
5.5	99.3 ± 2.6

非選抜区の培養物の新鮮重を100とした時の相対新鮮重で示した。供試フラスコは3個とした。(平均値 ± 標準誤差)

表5 細胞選抜培地のpHが再生植物体の種子稔性とその自殖1代種子の発芽におよぼす影響

細胞選抜培地のpH	再生植物体数	採種個体数	種子不稔率(%)	発芽不良率(%)
非選抜	47	25	36.6	22.2
4.0	63	34	20.6	14.3
4.5	77	49	28.6	21.4
5.0	39	28	21.4	33.3
5.5	79	61	31.1	63.2

4mmolL<sup>-1</sup>AlCl<sub>3</sub>と2mmolL<sup>-1</sup>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を含むR2液体培地のpHを4.0~5.5に調整した細胞選抜培地を用いた。非選抜はAlCl<sub>3</sub>を含まないR2液体培地(pH5.8)とした。発芽不良は発芽率70%以下の系統とした。

## 2. 細胞選抜由来系統のAl耐性の選抜とその耐性機構

表6 ニンジン細胞選抜由来自殖1代の酸性土壌耐性

品種名・系統番号	新鮮重 (mg)
黒田5寸	647.4 ± 125.1
No.63	1138.0 ± 165.0**
No.65	1161.4 ± 71.0*
No.77	1127.4 ± 127.0 <sup>ns</sup>
勝陽5寸	1349.2 ± 90.4*

供試個体数=5, 平均値±標準誤差, \*1%レベルで有意, \*\*5%レベルで有意, ns有意差なし. 黒田5寸を基準としたt検定による.

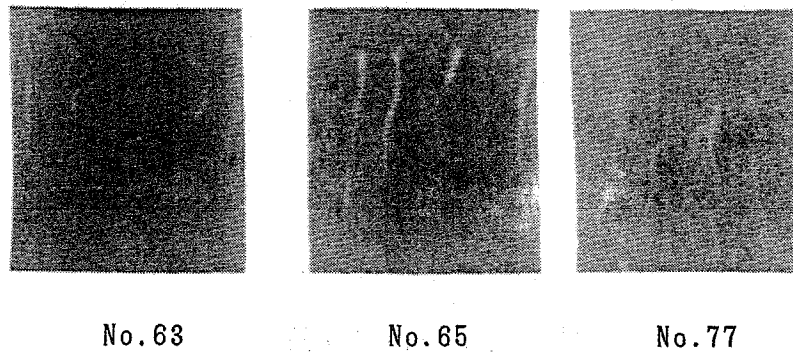
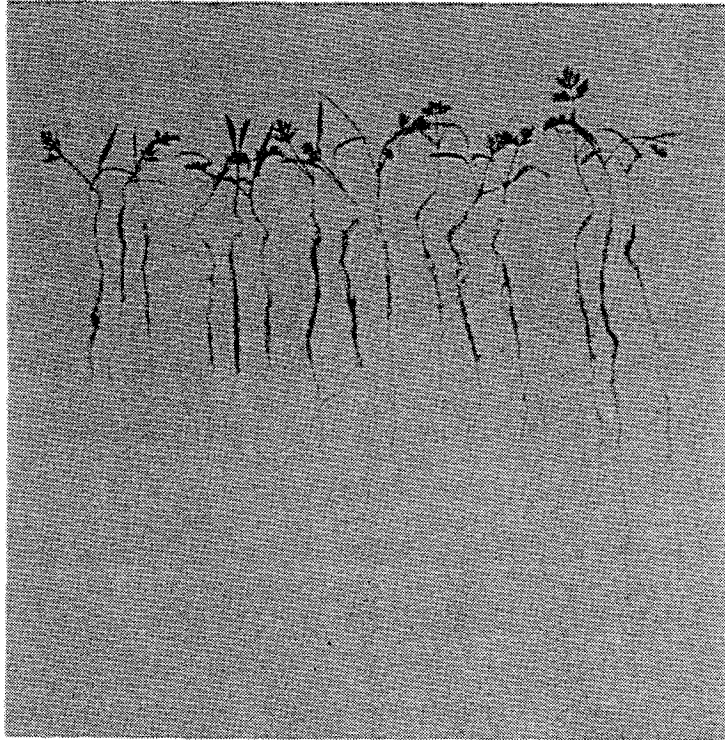


図6 ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法 ( $1.0\text{mmolL}^{-1}\text{AlCl}_3$ 浸漬ろ紙) による細胞選抜由来自殖1代系統の根からの有機酸の放出

表7 ニンジン細胞選抜由来自殖1代系統の根からのクエン酸の放出

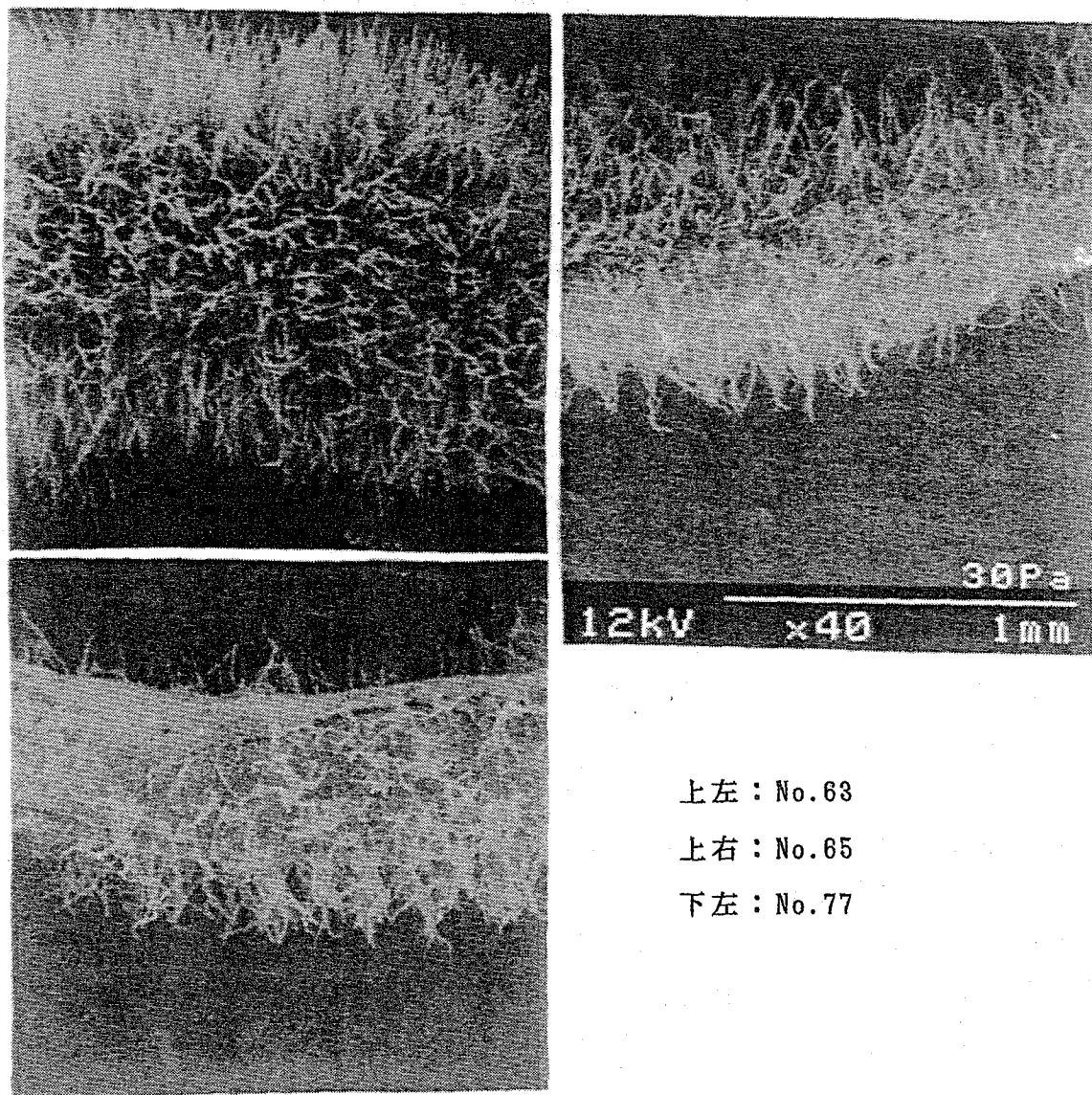
品種名・系統番号	根1g当たりのクエン酸の放出量 ( $\mu\text{g}$ )
黒田5寸	46.7 ± 15.4
No.63	92.7 ± 6.8
No.65	93.1 ± 21.5
No.77	12.2 ± 5.6
勝陽5寸	81.8 ± 9.4

催芽種子, 移植後14日の幼苗を  $30\mu\text{molL}^{-1}\text{AlCl}_3$  に24時間浸漬処理後, HPLCにより分析した. 平均値±標準誤差 (試験は1区10株の3連とした.)



黒田 No.63 No.65 No.77 勝陽  
5寸 5寸

図7 細胞選抜由来系統自殖1代の川渡  
酸性土壌での根の伸長.



上左 : No. 63

上右 : No. 65

下左 : No. 77

図8 細胞選抜由来Al耐性系統の根基部の走査型電子顕微鏡写真

## 論文審査結果要旨

世界の耕作可能地の約40%は酸性土壌であり、なかでもAl過剰障害が問題となる強酸性土壌は31%にも及ぶ。本研究では野菜の中でもAl過剰障害に最も弱い部類に属するニンジンを供試材料として、ニンジン栽培種のAl耐性、Al耐性簡易評価法の開発、Al耐性機構の解明、細胞選抜によるAl耐性個体の作出と中間母本の選抜を検討した。

第1章では強酸性川渡黒ボク土によるAl耐性ニンジンの選抜条件の確立とそれによるニンジン栽培種のAl耐性の評価を行い、耐性種として4種、感受性種として7種を選抜した。また、水耕栽培試験によって代表的耐性種として勝陽5寸、感受性種として黒田5寸を選抜した。

第2章では簡易Al耐性評価法として、作物根から分泌される有機酸の量を半定量的に評価する「ヘマトキシリン染色ろ紙脱色法」を開発した。この方法は汎用性が高く、ニンジン、シュンギク、ダイコンなど多くの作物に有効であった。

第3章ではヘマトキシリン染色ろ紙脱色法と各種機器分析法を用いて、ニンジンのAl耐性機構を検討した。その結果、ニンジン根ではAlに遭遇すると、根端部のみならず根基部から多量のクエン酸を放出し、Alをキレート化し解毒すること、クエン酸の放出量は根毛の形態と関係することなどを明らかにした。

第4章ではAl感受性ニンジン品種（黒田5寸）から、ストレス条件での細胞選抜によってAl耐性個体の作出を行った。得られたAl耐性個体はクエン酸放出状況から、根端部型、根基部型、根全域型に分けられたが、直根野菜のニンジンとしては根全域型を最適と判断し、Al耐性中間母本とした。

このように本研究はニンジンのAl耐性簡易評価法の開発から、耐性機構の解明、耐性作物の作出に至る一連の過程を明らかにしたものであり、この方法は他の作物への汎用性が高く、細胞選抜育種に大きく貢献するものであり審査員一同は学位（農学）に値するものと判断した。