

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06037

研究課題名（和文）根域温度調節による植物成長制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Plant Growth Regulation by Root Zone Temperature Control

研究代表者

窪田 聡（KUBOTA, Satoshi）

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：60328705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究結果から得られた根域温度による葉面積の制御メカニズムは以下の通りである。根域温度が高まると、エチレン生合成遺伝子の発現が上昇し、細胞伸長に影響するエクспанシン遺伝子等の細胞壁構成遺伝子の発現が高まり、根系が伸長する。さらに、アクアポリン遺伝子の発現量も高くなる。根系の伸長とアクアポリン遺伝子の発現増加によって、根系から地上部への水供給能力が高くなる。その結果、根域温度が高いと葉細胞の拡大に必要な水分要求量を十分満たすことができ、葉面積が拡大する。逆に、根域温度が低下すると根の水供給能力が低下し葉面積の拡大が抑えられると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農業生産では植物の根の部分の温度（根域温度）を調節することは皆無でしたが、最近、根域温度制御により茎葉の成長が大きく異なることが明らかとなりました。そこで、本研究ではトマト苗を用いて、根域温度調節による地上部の成長制御機構の解明に取り組んだところ、根域温度は葉面積にのみ影響し、根域温度が高くなると根の伸長と水吸収を制御する遺伝子の発現が同時に高まり、根から葉への水供給能力が向上しました。葉の拡大に必要な水分が根から葉へ十分に供給された結果、葉面積が大きく変化すると考えられました。気温と根域温度を独立して制御することにより、今までに無い形態をもつ植物を作出できる可能性も示されました。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms of regulation of leaf area by root zone temperature obtained from the study results are as follows. As root zone temperature increases, the expression of ethylene biosynthesis genes increases, and the expression of cell wall component genes such as expansin genes, which affect cell elongation, increases, resulting in elongation of the root system. Expression of aquaporin genes also increases. The elongation of the root system and the increased expression of aquaporin genes increase the ability of the root system to supply water to the leaves. As a result, the leaf area expands when the root zone temperature increases to meet the amount of water required for leaf cell expansion. Conversely, when the root zone temperature decreases, the water supply capacity of the roots decreases and leaf area expansion is suppressed.

研究分野：園芸学

キーワード：トマト エチレン オーキシシン エクспанシン 葉面積 細胞壁 水ポテンシャル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在まで実用的根域環境制御装置 (N. RECS) が開発され、多くの園芸作物に対する根域温度の影響について検討がなされている (Muramatsu and Kubota, 2021)。冬季の根域加温では大幅な生育促進と省エネルギー化、夏季の根域冷却においては耐暑性の低い植物の生育・開花促進、機能性成分の蓄積、果実生産の促進を認めている。また、画像解析による地上部の成長速度の評価と根域温度制御を組み合わせ、ある一定の大きさの植物を目標期間に生育させることができる。

既往の研究では多くの植物の生育と開花に関する気温の影響が検討されている。多くのポット試験ではポット内の根域温度は気温とほぼ同じに推移するため、気温の影響は根域温度を含めた植物全体の温度に対する反応であると考えられる。また、気温が 35°C を越える高温条件において枯死してしまう耐暑性の低い植物でも、根域のみを冷却すると十分に生育することから、植物の耐暑性には根の高温耐性が深く関わっていると指摘できる。したがって、気温と根域温度を切り分けて評価することは、新しい植物成長制御技術の開発にとどまらず、根の耐暑性を指標とした植物の高温耐性育種につながる。地上部の環境に比べてほとんど制御されていない根域温度は残された最後の環境制御パラメータであるといえ、植物生育に対する根域温度の影響解明は世界の施設園芸の発展に大きく貢献する。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では園芸作物として世界的に重要な地位を占め、ゲノム解析が進んでいるトマトを材料に、根域温度の地上部生育制御メカニズムを解明する。根域温度が最も影響を及ぼす地上部の成長パラメータを明らかにするため、気温と根域温度をそれぞれ異なる温度に設定して、根域温度の影響が大きいものを特定する。この結果は気温と根域温度の独立制御による形態形成の新規制御方法を創造する基礎資料となり、実用面でも有用である。

根は養水分を取り込む重要な器官である。植物はその重量の 90% 以上が水分で、光合成の場となる葉の拡大や伸長成長は水ポテンシャル勾配に沿った吸水に支配される。蒸散に見合う水分が根から供給されると、気孔が十分に開くため光合成は促進されるが、水分不足では気孔閉塞により抑制される。クロロフィルや Rubisco は窒素 (N) から構成され、N 等の養分吸収量は光合成にも影響するため、根による養水分吸収は植物の物質生産に大きく影響する。また、サイトカイニン (CK)、アブシシン酸 (ABA) やストリゴラクトン (ST) 等の植物ホルモンは根において合成され、導管を通過して地上部に運ばれ気孔開閉の調節や形態形成に大きな影響を与えている。このように、根域温度は様々な側面から地上部の生育に影響を与えていると考えられるが、本研究では植物成長の根幹に関わる根の吸水能力に焦点を絞って研究を進めた。本研究では、「植物の水ポテンシャルに沿った個体当たりの根系の吸水能力が根域温度によって変化するため、地上部の生育量が変化する」という仮説を設定した。

根系の吸水能力は単純に無傷植物を使った培養液の減少量から評価することはできない。なぜなら、地上部の吸水力を構成する葉面積、細胞の水ポテンシャル、気孔開度等が根域温度の違いによって変化するからである。根の水透過性は根系に正負圧力をかけて、根の切断面や表面に浸出する水分の動態から評価するプレッシャーチャンバー法がある。しかし、本法は特別な装置を必要とし、複数の試料を同時に測定できない。したがって、個体当たりの根系の吸水能力の評価方法を新たに開発する。

地上部の水ポテンシャルが同一であれば、根系の吸水能力は「単位根長当たりの吸水能力」と「根長」の積によって規定されると考えられる。単位根長当たりの吸水能力は水チャンネルとして機能するアクアポリンの発現量等によって規定され、トマトでは十数種類のアクアポリンが存在する。また、根の伸長を制御する細胞壁構成遺伝子や植物ホルモン合成遺伝子の探索、IAA、CK、GA や ABA 等の根の伸長と吸水に影響する植物ホルモンの定量が必要である。

### 3. 研究の方法

そこで本研究では、トマト (*Solanum lycopersicum* L.) ‘ハウス桃太郎’ を用い、実験 1 植物成長に対する気温と根域温度の相互関係の解明、実験 2 根系の吸水能力における評価方法の開発と根域温度の影響、実験 3 異なる根域温度によって栽培されたトマト苗の根における RNA-seq 解析、実験 4 根の植物ホルモン合成に対する根域温度の影響、実験 5 個葉の光合成速度と気孔コンダクタンスに及ぼす根域温度の影響について検討した。なお、本研究はトマトが生育可能な準最適から最適温度の範囲で検討を行うもので、明らかな障害が発生する低・高温域については除外した。

#### 実験 1 植物成長に対する気温と根域温度の相互関係の解明

気温と根域温度を独立して制御できる装置を用いて、気温と根域温度を 17, 20, 22, 24, 27°C の 5 水準に設定し、これらを組み合わせて 25 区設けた。3 組み合わせごとに実験を行い必ず基準として 22°C/22°C (気温/根域温度) を設けた。実験規模は 1 区 3 反復とし 1 反復あたり 5

株を用いた。播種は3.5号鉢に入れた培養土に直接行い、22°C/22°Cに設定した装置内で第3本葉が展開するまで育成し、その後温度処理を開始した。処理開始8日後に全株を地際で切り取り、葉数、草丈、葉面積を測定した。測定したデータは実験による比較を容易にするため、22°C/22°Cに対する相対値として示した。

#### 実験2 根系の吸水能力における評価方法の開発と根域温度の影響

根域温度が制御でき個々の植物をプラスチック容器内で栽培できる水耕栽培装置を製作し、根域温度を17, 22, 27°Cに設定した。気温は室温(約22°C)とし、光はLEDで16時間日長、約230  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ とした。培養液はホーランド養液の標準処方(pH5.8)を使用した。播種後22°C/22°Cで第3本葉が展開するまで育成し、1反復6株、1区3反復とした。その後、根域温度を変更して処理を開始した。処理開始8日後に植物の子葉直上で茎を切断し、切断した株元から出液する溢泌液を採取した。当初の計画では溢泌液を採取する方法として、茎を切断し切断面にシリンジを接続した後、切断面のカルス形成防止用のEDTAと水ポテンシャル調節用のポリエチレングリコールを加えて任意の水ポテンシャルに調節した溶液をシリンジ内に満たし、一定時間後に回収された溢泌液量を計測する予定であった。しかし、2年間種々の方法で試行錯誤したが、この方法では誤差が大きく安定した結果が得られなかった。したがって、従来のプレッシャーチャンバー法で溢泌液量を測定することとした。地上部を切り離れた茎付きの根系を処理温度に保った培養液入りの容器に入れ、この容器をプレッシャーチャンバーに挿入し、根系部分を窒素ガスで0.25, 0.5, 0.75 MPaになるよう20分間加圧し、茎切断面から出液した溢泌液量を測定した。根長は全ての根をサンプリングした後、0.1%トルイジンブルーで染色した。アクリル板の上に約40°Cの0.8%寒天溶液を分注し、寒天溶液を保温しながらアクリル板の上に根を広げ、寒天を固化させた後、スキャナーにセットして400 dpiの8 bit グレースケールの透過画像としてデジタルファイルに保存した。取得したファイルをKimura et al. (1999)の理論を元に、窪田(2022)がPython 3.9で新たに開発した根長評価プログラム(Root estimation Ver. 1.0)解析し根長を測定した。

#### 実験3 異なる根域温度によって栽培されたトマト苗の根におけるRNA-seq解析

実験2と同様の方法で栽培されたトマト苗の根をサンプリングし、常法に従いTotal RNAを抽出した後、次世代シーケンス(NovaSeq 6000, イルミナ(株))によりサンプル当たり6 Gbのデータを取得した。リードタイプはペアエンド[150+150]とした。NCBI ゲノムアセンブリよりトマトのリファレンス配列(SL3.1)をダウンロードし、CLC Genomic Workbench 10.1.1(Qiagen)によって、RNA-seq解析を行った。遺伝子発現量はRPKM法を用いて、各処理間での発現量の比較を行った。

実験4 根の植物ホルモン合成に対する根域温度の影響 実験2で栽培した植物の葉、根、溢泌液中に含まれるIAA, GA, CK, ABAを常法により抽出・精製し、内部標準法によりUPLC/MS/MS(Quattro premier XE, Waters)で定量した。

実験5 個葉の光合成速度と気孔コンダクタンスに及ぼす根域温度の影響 実験2で栽培した植物の処理開始8日後の第3本葉をポータブル光合成測定システム(CIRAS-2, PP Systems)に接続したリーフキュベット(PLC6(U))に挟み込み、光量子束密度1000  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , CO<sub>2</sub>濃度400 ppm, 湿度50%, チャンバー流速200 mL  $\cdot$  min<sup>-1</sup>, 葉温度25°Cで光合成速度と気孔コンダクタンスを測定した。

### 4. 研究成果

#### 実験1 植物成長に対する気温と根域温度の相互関係の解明

25通りの異なる気温と根域温度の組み合わせで8日間トマトの苗を栽培した結果(図1)、草丈は気温が高くなると増加し、根域温度の影響は受けなかった。一方、葉面積は気温と根域温度の両方の影響を受け、気温または根域温度が17°Cの場合、組み合わせの相手側となる気温または根域温度を27°Cまでに上昇させても葉面積の増加は少なかった。20°C以上の気温では、根域温度の上昇に伴い葉面積が拡大した。葉数は草丈と同様の傾向であった。以上のことから、短期間の根域温度の制御は草丈と葉数には影響せず、葉面積の拡大に強い影響を及ぼすことが示された。トマトの苗生産では一般的に気温の制御しか行われていないが、同時に根域温度を独立して制御することにより、効率的な生産に結びつくとともに、今までに無い形態を持つトマト苗を作出できると考えられる。

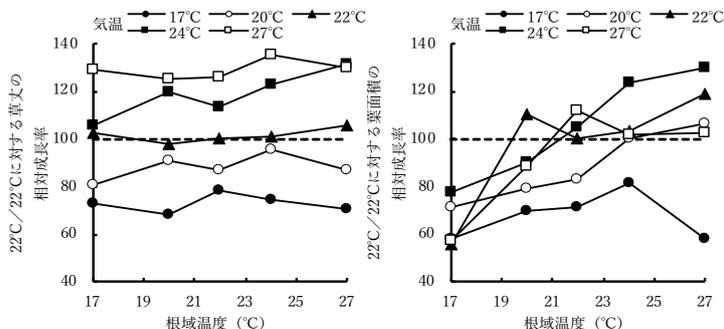


図1 草丈と葉面積に及ぼす気温と根域温度の影響

## 実験 2 根系の吸水能力における評価方法の開発と根域温度の影響

溢泌液量は0~0.25MPaでは少なく温度処理間に差はなかったが、0.5 MPa以上になると22℃と27℃で顕著に増加した(図2)。1株当たりの根長は、22℃以上で著しく長くなった。その結果、溢泌液量を根長で除して求めた単位根長当たりの溢泌液量は、17℃で最も低下した。

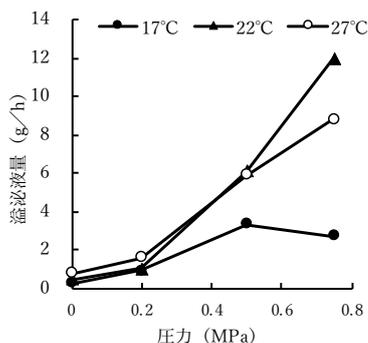


図2 溢泌液量に及ぼす根域温度の影響

## 実験 3 異なる根域温度によって栽培されたトマト苗の根における RNA-seq 解析

根の RNA-seq 解析を行った結果、3 処理区で共通して RPKM が 1 以上の遺伝子は 12,529 種類リストアップされ、そのうち 17℃を基準として 27℃の RPKM が 2 倍以上で、かつ 27℃の RPKM が 10 以上の遺伝子をピックアップした。その結果、植物ホルモンに関連する遺伝子として、ABA 受容体遺伝子 (PYL) 1 種類、AUX 早期応答遺伝子 (SAUR) 5 種類、AUX 輸送体遺伝子 (PIN) 1 種類、AUX 結合タンパク質遺伝子 (ER ABP) 1 種類、AUX 抑制/休眠遺伝子 (ARP/DRM) 1 種類、エチレン応答性遺伝子 (ERF) 9 種類、エチレン生合成関連遺伝子 (SAM1, ACS, ACO4) 各 1 種類、GA 受容体遺伝子 (GID1) と GA 酸化酵素遺伝子 (GA2OX) 各 1 種類が検出され、根域温度は特にエチレンとオーキシンに関連する遺伝子に大きな影響を及ぼしていた。17℃と 27℃の間に ARP/DRM は約 10 倍、PIN と 2 つの SAUR および SAM1 は約 5 倍の違いがあり、根域温度を高めるとエチレン生合成活発になりエチレン応答性遺伝子が機能することが示唆された。アクアポリン遺伝子は TIP1-1, TIP2-1, PIP2-1, PIP2-4 の 4 種類が検出され、温度間に 2~4 倍の違いがあった。細胞壁構成に関連する遺伝子として、エクспанシン遺伝子 (EXP) が 4 種類検出され、Expansin-like B1 は温度間に 7 倍の差があった。ガラクトシロン酸転移酵素遺伝子 (GAUT) とキシログルカン転移/加水分解酵素遺伝子 (XTH) では温度間に 5 倍の違いがあった。また、PG1β のドメインの一部といわれている BURP domain-containing protein16 遺伝子 (Park et al., 2015) は、温度間に約 68 倍の違いがあった。

## 実験 4 根の植物ホルモン合成に対する根域温度の影響

葉と根における IAA, GA, CK 濃度は温度処理間に差はなかった。一方、溢泌液中の ABA 濃度は 22℃と 27℃では 60~79 pmol・g<sup>-1</sup>であったが、17℃では約 217 pmol・g<sup>-1</sup>と著しく増加した。

## 実験 5 個葉の光合成速度と気孔コンダクタンスに及ぼす根域温度の影響

22℃と 27℃における個葉の光合成速度は約 13 μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>、気孔コンダクタンスは約 57 mmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>といずれも高く維持されていたが、17℃の光合成速度は 8.8 μmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>、気孔コンダクタンスは 25 mmol・m<sup>-2</sup>・s<sup>-1</sup>とはいずれも大きく低下した。このことから、根域温度の低下は気孔の閉塞をもたらし、葉の CO<sub>2</sub> 交換速度を低下させると考えられた。

以上の研究結果から考えられる根域温度による葉面積の制御メカニズムを仮説として示す。根域温度が高まると、エチレン生合成遺伝子の発現が上昇し、内生エチレンの合成が進む結果、細胞伸長に影響するエクспанシン遺伝子等の細胞壁構成遺伝子の発現が高まり、根系が伸長する。一般に、エチレンは細胞の伸長よりも肥大を促すことが知られているが、*Brassica rapa* の Expansin-Like B1 遺伝子の発現量はエセフオン投与により著しく高まり (Muthusamy et al., 2020)、この遺伝子の過剰発現体では根が著しく伸長することが示されている。根域温度が高くなると、水チャンネルを構成するアクアポリン遺伝子の発現量も高くなる。根系の伸長とアクアポリン遺伝子の発現増加によって、溢泌液量で示した根系から地上部への水供給能力が高くなる。その結果、根域温度が高い場合、葉細胞の拡大に必要な水分要求量を十分満たすことができるため、葉面積が拡大する。逆に、根域温度が低下すると、根の伸長とアクアポリン遺伝子の発現が抑制されるため、根の水供給能力が低下し葉面積の拡大が抑えられるとともに、溢泌液中の ABA 濃度が上昇し気孔が閉塞することにより個葉の光合成速度が低下すると考えられる。今後は、エチレンまたはそれらの前駆体の定量、エチレンとオーキシン関連遺伝子が細胞壁構成遺伝子とアクアポリン遺伝子の発現にどのように関与しているのか明らかにする必要がある。

## <引用文献>

- ① AtPGL3 is an Arabidopsis BURP domain protein that is localized to the cell wall and promotes cell enlargement. 2015. Jiyoung Park, Yong Cui and Byung-Ho Kang. *Frontiers in Plant Science*. 6:412; doi:/10.3389/fpls.2015.00412.
- ② Accurate root length measurement by image analysis. 1999. Kimura Kazuhiko, Seiji Kikuchi and Shin-ichi Yamasaki. *Plant and Soil*. 216:117-127.
- ③ 根長評価プログラム (Root estimation Ver. 1.0). 窪田 聡. 2022. <https://www.nrecs.jp/top/根長の評価プログラム>
- ④ The Development of a Root-zone Environmental Control System (N.RECS) and Its

Application to Flower Production. 2021. Muramatsu Yoshiyuki and Satoshi Kubota. HJ. 90:239-246.

- ⑤ *BrEXLBI*, a *Brassica rapa* Expansin-Like B1 Gene Is Associated with Root Development, Drought Stress Response, and Seed Germination. 2020. Muthusamy Muthusamy, Joo Yeol Kim, Eun Kyung Yoon, Jin A. Kim and Soo In Lee. Genes. 11: 404; doi:10.3390/genes11040404.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荻原 陸・篠原葉月・丸林ゆり・村松嘉幸・水田大輝・窪田 聡
2. 発表標題 気温と根域温度がトマト苗の地上部の形態形成と乾物生産に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 窪田 聡・石川 徹・稲葉みちる・村上萌菜・磯野 瞳・村松嘉幸・水田大輝
2. 発表標題 トマト苗の形態形成に対する気温と根域温度の相互関係
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------