

## ノ ー ト

ダイズ根粒超着生変異株と親株の単葉根における根粒形成と窒素固定<sup>\*1</sup>佐藤 孝<sup>\*2</sup>・八島裕幸<sup>\*2</sup>・James E. HARPER<sup>\*3</sup>  
赤尾勝一郎<sup>\*4</sup>・大山卓爾<sup>\*2</sup>キーワード ダイズ, 根粒, 根粒超着生変異株,  
単葉根, オートレギュレーション

## 1. はじめに

ダイズは、根粒の過剰着生を抑制する調節機能を有しており、根粒形成のオートレギュレーションと呼ばれている。近年、化学変異剤処理により親株と比べ多数の根粒を形成する根粒超着生変異株（スーパーノジュレーションまたはハイパーノジュレーション変異株）が得られた<sup>1)</sup>。米国のダイズ品種 Williams から NOD 1-3, NOD 2-4, NOD 3-7 が<sup>2)</sup>、我が国のダイズ品種エンレイより En 6500 が得られている<sup>3)</sup>。これらの変異株はオートレギュレーション機構の欠如、または機能が低下した変異体と考えられている。ダイズ根粒超着生変異株と親株の交互接ぎ木実験により根粒超着生の形質は根ではなく莖葉部によってコントロールされていることが明らかになった<sup>4,5)</sup>。しかし、莖葉部から根へ伝達されるオートレギュレーションシグナルは同定されておらず、また、莖葉部のどの部位が制御に関与しているかも明らかではない。FRANCISCO と HARPER はダイズ品種 Williams とその根粒超着生変異株 NOD 1-3 の複葉（第一本葉の 3 枚の葉）から根を伸長させ、根粒を形成させた。その結果、NOD 1-3 の複葉から発生した根でも根粒超着生の形質を示したことから、根粒形成は頂芽ではなく葉身または葉柄部で支配されていると推察した<sup>6)</sup>。

Takashi SATO, Hiroyuki YASHIMA, James E. HARPER, Shoichiro AKAO and Takuji OHYAMA: Nodule Formation and N<sub>2</sub> Fixation Traits of the Rooted-Single Leaf Isolated from Hypernodulating Mutants and the Wild Type

<sup>\*1</sup> 本報告の一部は 1996 年 4 月日本土壌肥科学会東京大会において発表した。

<sup>\*2</sup> 新潟大学農学部 (950-21 新潟市五十嵐 2-8050)

<sup>\*3</sup> Plant Physiology and Genetic Research Unit USDA/ARS Univ. Illinois (1201 West Gregory Dr. Urbana, IL 61801 USA)

<sup>\*4</sup> 農業生物資源研究所 (305 つくば市観音台 2-1-2)

1996 年 12 月 17 日 受付・受理

日本土壌肥科学雑誌 第 68 巻 第 4 号 p. 444~447 (1997)

沢田らは、炭水化物同化のシンク・ソースに関する研究のアクセイ系として、ダイズの葉を植物体から切断し、単葉から根を伸長させた系（単葉根）を用いた<sup>7)</sup>。本報告では、ダイズ品種 Williams とエンレイ、およびそれぞれの根粒超着生変異株 NOD 1-3 と En 6500 を用い、沢田らと同様に葉柄部をほとんど含まない単葉から根を伸長させ、根粒着生について比較した。さらに、根粒菌接種ダイズと非接種ダイズから切断した初生葉と本葉を比較して、根粒着生ダイズおよび非着生ダイズから分離した単葉根において根粒形成の制御に変化があるかどうか合わせて検討した。

## 2. 実験材料および方法

実験試料としてダイズ品種 Williams, エンレイと根粒超着生変異株 NOD 1-3, En 6500 を用いた。種子は 70% エタノール、0.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬して滅菌した後、根粒菌懸濁液 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110  $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) に 15 分間浸して根粒菌を接種した。種子をバーミキュライトに播種し、人工気象装置 (BIOPHOTOCHAMBER LX-3000 TAITEC) 内で明期 (照度 20000 ルクス) 25°C 16 時間、暗期 18°C 8 時間の条件で栽培した。培養液は 3 日ごとにバーミキュライト培地に与えた。培養液は 1 L 当たり K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 109 mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.5 mg, KCl 0.935 mg, CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 183.0 mg, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 123 mg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.367 mg, CuSO<sub>4</sub> · 5 H<sub>2</sub>O 0.032 mg, MnSO<sub>4</sub> 0.189 mg, ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0.144 mg, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 0.004 mg, CoSO<sub>4</sub> 0.028 mg, NiSO<sub>4</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 0.0035 mg, EDTA · Na<sub>2</sub> 18.6 mg, FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 13.9 mg を含むものを用いた。播種 2 週間後、初生葉が完全展開したところでカミソリの刃を用いて培養液中で葉身基部の葉柄を切断し、直ちに滅菌した培養液を満たしたバーミキュライトに、葉の基部を下にして 1 cm 程度差し込んだ。10 日間上記条件で培養し、根が分化、伸長したところで基部に根粒菌懸濁液 (USDA110  $1 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) を 1 mL 接種した。また、対照区として、根粒菌を接種しない単葉根の培養も平行して行った。根粒菌接種 3 週間後に、試料を採取し、インタクトなまま 50 mL 容のガラス容器に入れゴム栓をした。容器内の空気の約 10% をアセチレンと置換し、25°C で 20 分間インキュベートしてアセチレン還元活性を測定した。試料は凍結乾燥した後、根粒数と各部位の乾物重を測定した。その後試料を粉碎して、ケルダール分解した後、インドフェノール法<sup>8)</sup>で窒素の定量を行った。

## 3. 結果および考察

写真 1 と写真 2 に培養した Williams と NOD 1-3 の

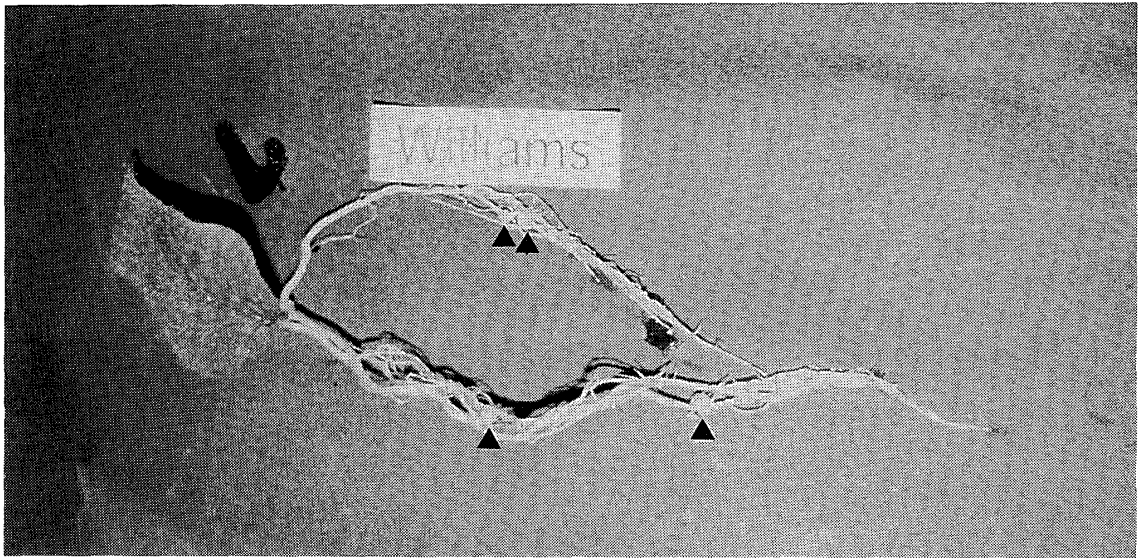


写真1 Williams より分離した単葉根に着生した根粒

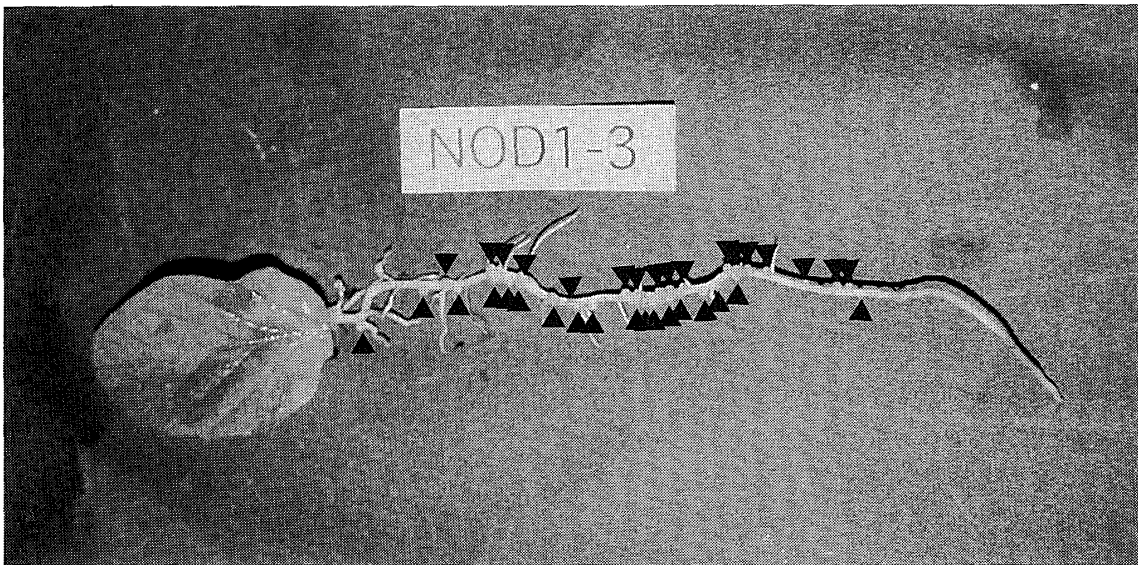


写真2 NOD1-3 より分離した単葉根に着生した根粒

単葉から生じた根における根粒形成の様子を示す。1枚の葉の基部から伸長した根にも根粒が形成された。写真からも明らかなように、NOD1-3の単葉根はWilliamsの単葉根と比べて多数の根粒が形成され、根粒超着生の形質を保持していることを示した。一方、NOD1-3の根の発育は明らかに親株より劣っていた。

根粒数とアセチレン還元活性 (ARA) を測定した結果を第1図に示す。Williamsは一個体当たり10個前後の根粒を着生したのに対し、NOD1-3では約50個と親株の約5倍の数の根粒が着生した。エンレイとEn6500

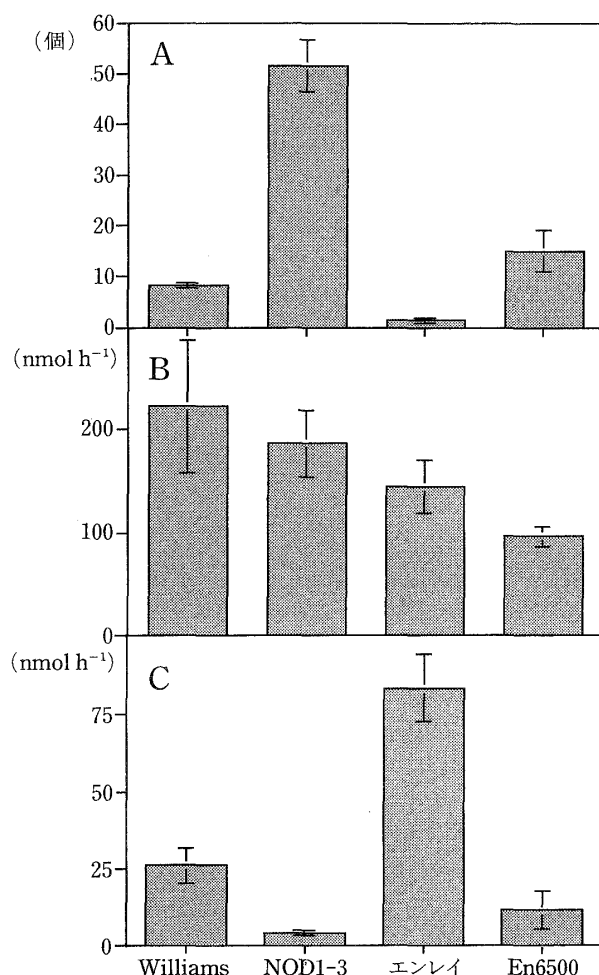
も同様の傾向を示したが、WilliamsとNOD1-3よりも根粒着生数は少なかった。以上の結果から根粒超着生の形質発現は単葉根系においても維持されており、オートレギュレーションは成熟した葉身に支配されていることが示唆された。一方、株当たりのアセチレン還元活性はどちらも親株のほうがやや高い活性を示し、根粒一個当たりの活性ではその差はさらに顕著であった。このことから変異株では根粒数は多いが、おそらく宿主からの養分の供給に制限があるため、個々の根粒が十分発育できず、窒素固定能も低くなったと考えられる。

凍結乾燥後に各部位の乾物重を測定した結果を第 1 表に示す。培養開始時の Williams と NOD 1-3 の乾物重はそれぞれ 20 mg と 10 mg であったが、根粒菌無接種で培養した場合、全体の乾物重はどちらも 3～5 倍程度増加した。培養開始時の大きさの差のためか、葉も根も親株より変異株のほうが小さい傾向がみられた。根粒菌接種培養では全体の乾物重は無接種植物よりも低い傾向がみられ、変異株でその傾向が著しかった。変異株は親株と比較して、葉は約 2 分の 1、根は約 3 分の 1 と小さかったが、根粒重は約 2 倍近く高かった。根粒菌無接種培養と比べて、根粒菌接種培養ではいずれの系統でも根が小さくなる傾向を示した。

培養開始時の単葉と培養開始後の単葉根の全窒素濃度と全窒素含有量を、Williams と NOD 1-3 で比較した結

果を第 2 図に示す。根粒菌無接種培養では葉の窒素濃度は培養開始前の半分以上に下がった (A から B)。このとき葉から根への窒素の移行がみられたが、株当たりの全窒素量は処理前の単葉と変化がないことが確認された (D から E)。根粒菌接種培養でも葉の窒素濃度は処理前よりやや低下したが、根粒菌無接種の葉より高い値を示した (C)。根粒菌を接種したときには、全窒素量が増加したが (D から F)、根粒が形成されて窒素を固定したためと考えられた。Williams では根粒菌無接種培養より 0.6 mg 程度の窒素の増加がみられたが、NOD 1-3 では 0.2 mg 程度にとどまった。さらに、根粒菌接種培養において NOD 1-3 の根粒の窒素濃度が、Williams の根粒と比べて低くなった (C)。これらの結果は、変異株では根粒数は多いが根粒の発達が劣り、窒素固定活性が低いという第 1 図の結果をうらづけている。根粒菌接種培養において全窒素含有量が増加しているにもかかわらず、根や全乾物重が無接種培養よりも小さくなった理由としては、根粒の形成と固定活性の維持のために、光合成産物の消費量が増大したためと考えられる。

補足実験として、以下の実験を行った。品種 Williams を用い、前述した方法と同様に根粒菌を接種した株と、根粒菌無接種の株を 14 日間栽培した。第一本葉が完全展開するまで生育させ、初生葉と本葉を切断して、バーミキュライトで培養し、根粒菌を接種した。それぞれの根粒数を測定し、初生葉と本葉、また、根粒菌を接種した株から切断した葉と根粒菌無接種の株から切断した葉の根粒着生数を比較した。根粒菌を接種した株から分離した本葉と初生葉に形成された根粒数 (平均値) を比較すると、本葉においては 3.5 個、初生葉においては 4.5 個であった。また、根粒菌無接種株から分離した初生葉においては 3.8 個となり、初生葉と本葉、また元の植物に根粒菌を接種したか否かで差は無いと判断できる。この結果は、根粒菌を接種した株の葉においてオートレギュレーション効果が長く持続して、非接種株から分離した葉より根粒形成が強く抑制されることはな



第 1 図 根粒数およびアセチレン還元活性

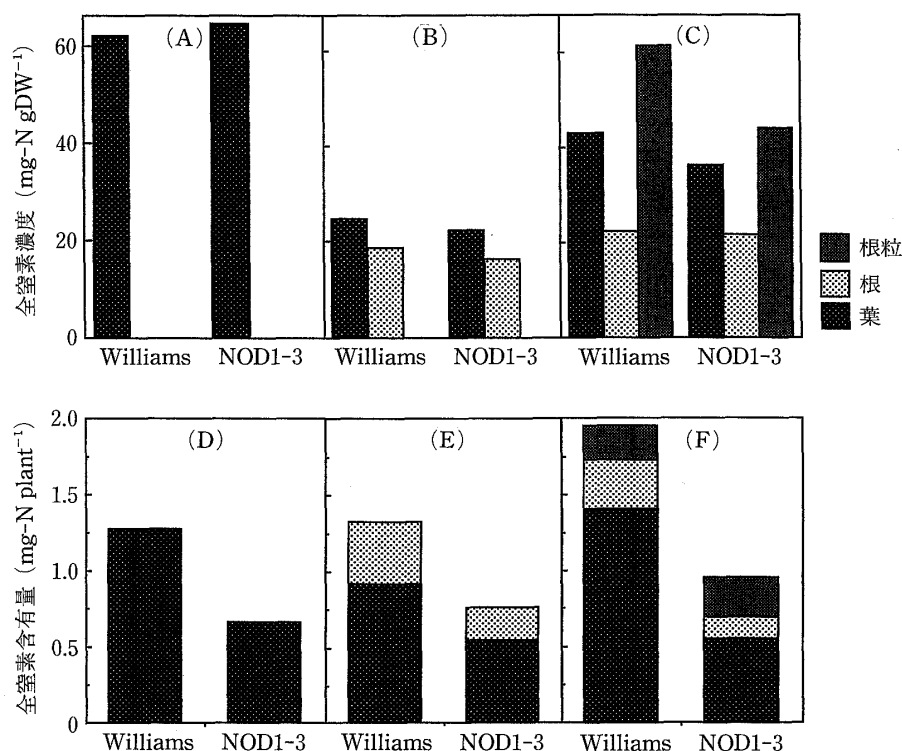
A: 一個体当たりの根粒数, B: 一個体当たりのアセチレン還元活性, C: 根粒一個当たりのアセチレン還元活性。

※エラーバーは標準誤差を示す。

第 1 表 根粒菌を接種して培養した単葉根と根粒菌を接種しないで培養した単葉根における各部位の乾物重量

系統	根粒菌無接種培養			根粒菌接種培養			
	葉	根	全体	葉	根	根粒	全体
Williams	36.5	25.2	61.7	33.0	16.3	3.7	53.0
NOD 1-3	32.0	15.0	47.0	15.5	6.5	5.8	27.8
エンレイ	49.5	18.7	68.2	50.3	16.5	3.0	69.8
En 6500	39.5	12.7	52.2	28.6	6.2	5.0	39.8

(mg plant<sup>-1</sup>)



第2図 全窒素濃度および全窒素含有量

(A) 処理前の初生葉の全窒素濃度, (B) 根粒菌無接種の単葉根の全窒素濃度, (C) 根粒菌接種した単葉根の全窒素濃度, (D) 処理前の初生葉の全窒素含有量, (E) 根粒菌無接種の単葉根の全窒素含有量, (F) 根粒菌接種した単葉根の全窒素含有量。

かったことを示している。

本実験結果から、葉身から直接発生した根においても根粒が形成され、根粒超着生変異株とその親株の表現型も維持された。このことは根粒菌の感染を認識してオートレギュレーションシグナルを合成する部位が成熟した葉身であることを支持する。ただし、感染により根から葉へ移行する「感染シグナル」と葉から根へ輸送され、根粒形成を抑制する「オートレギュレーションシグナル」は実体としてはとらえられていない。このアッセイ系はソース器官である葉と、シンク器官である根の2器官しか存在せず、長期間培養しても新芽は形成されない単純な系なので、根粒形成に関する研究において、アッセイ系として有効であると考えられた。

## 文 献

- 1) CARROLL, B. J., MENEIL, D. L. and GRESSHOFF, P. M.: A supernodulation and nitrate-tolerant symbiotic (*nts*) soybean mutant. *Plant Physiol.*, **78**, 34~40 (1985)
- 2) GREMAUD, M. F. and HARPER, J. E.: Selection and initial characterization of partially nitrate tolerant

nodulation mutants of soybean. *ibid.*, **89**, 169 ~ 173 (1989)

- 3) AKAQ, S. and KOUCHI, H.: A supernodulating mutant isolated from soybean cultivar enrei. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **38**, 183~187 (1992)
- 4) BARBERA, A. C. and HARPER, J. E.: Interaction of shoot and root on nodulation control of grafted soybean and mung bean. *Riv. di Agron.*, **27**, 445~450 (1993)
- 5) DELVES, A. C., HIGGINS, A. V. and GRESSHOFF, P. M.: Shoot control of supernodulation in a number of mutant soybeans. *Glycine max* (L.) Merr. *Aust. J. Plant Physiol.*, **128**, 473~478 (1987)
- 6) FRANCISCO, P. B., Jr. and HARPER, J. E.: Translocatable leaf signal autoregulates soybean nodulation. *Plant Sci.*, **107**, 167~176 (1995)
- 7) SAWADA, S., HAYAKAWA, T., FUKUSHI, K. and KASAI, M.: Influence of carbohydrate on photosynthesis in single, rooted soybean leaves used as a source-sink model. *Plant Cell Physiol.*, **27**, 591~600 (1986)
- 8) 大山卓爾・伊藤道秋・小林京子・荒木 創・安吉佐和子・佐々木修・山崎拓也・曾山久美子・種村竜太・水野義孝・五十嵐太郎：硫酸-過酸化水素分解法による、植物、厩肥試料中に含まれる、N, P, K の分析, 新潟大学農学部研究報告, **43**, 111~119 (1991)