

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21658007

研究課題名(和文) 根粒菌プライミング処理による低温条件下でのマメ科被覆作物の生育促進の試み

研究課題名(英文) Effect of rhizobia primed with flavonoid on growth, root development and nodulation in leguminous cover crops grown under low temperature condition

研究代表者

大門 弘幸 (DAIMON HIROYUKI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50236783

研究成果の概要(和文)：マメ科植物の根粒着生は、低温条件や養分ストレス条件下では抑制され、窒素固定活性が低下する。そこで根粒形成遺伝子の転写を活性化するフラボノイドを含む培地で根粒菌を前培養した際の根粒着生についてエンドウを供試して検討した。13℃と18℃で調査したところ、いずれの温度区でも対照区に比べて総根長が増大し、2次側根数が減少した。前培養区では根粒着生数は増加したが、これが本来生じる二次側根の形成が阻害されることとのトレードオフの関係によって生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In field pea (*Pisum sativum*) grown in temperate region of western Japan, low temperature under late seeding condition should be considered as a limiting factor for early growth. Of inhibition mechanisms, decreasing flavonoid compounds released from legume roots for *nod* gene activation might be of importance. Root nodule formation was investigated after inoculation in both flavonoid priming and the control. Root nodule numbers per plant were higher in flavonoid priming than the control. Plants inoculated with primed rhizobia showed alterative root structure such as reduction of the number of the second order lateral roots and the continuous nodule formation along the root axis. These results suggest that priming treatment of rhizobia with flavonoid might induce earlier formation of root nodules due to inhibiting lateral root differentiation, indicating that root system development of pea plants occurs with a trade-off between the nodulation and lateral branching under unsuitable environmental conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	0	1,400,000
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	150,000	3,250,000

研究分野：作物学

科研費の分科・細目：農学・作物学/雑草学

キーワード：環境調和型農林水産・植物・発現制御・作物栽培・微生物・窒素固定・根粒菌・作付体系

1. 研究開始当初の背景

マメ科作物と根粒菌による窒素固定能の発現機序は、ミヤコグサやタルウマゴヤシを利用した分子生物学のめざましい進展によって解析が進み、根粒菌のゲノム情報の集積にも裏打ちされ、多くの微生物と植物との関係の中でも最もよく理解されてきた。しかし、実際にこれらの知見がマメ科作物の生産現場で活かされるような栽培技術に結びついた例はほとんどなく、これらの知見を発展させることは応用科学分野の研究者の責務である。マメ科作物の根から分泌されるフラボノイド類は、根粒菌の *nod* 遺伝子群の転写を活性化させ、その結果として *Nod* ファクターの産生を促し、宿主の初期ノジュリン遺伝子群を発現させて根粒を形成する。本研究では、このプロセスで重要な役割を果たすフラボノイドに着目し、根粒菌側の遺伝子をフラボノイド類で予め活性化（プライミング）することによって、低温条件下で根粒数が減少してしまう冬作マメ科被覆作物の根粒形成の早期の誘導と初期生育の促進について検証するために立案した。

2. 研究の目的

上記の背景ならびに本研究の遂行によって期待される効果を鑑み、以下の具体的目的を立てて研究を遂行した。すなわち、これまでに、エンドウとダイズにおいて、フラボノイドによる根粒菌の前培養の効果として、低温条件下での根粒形成の早期化、根粒数の増加、乾物重の増大が報告されており、その効果に品種間差異があることも報告されてきたが、フラボノイドの種類、濃度、前培養期間、接種方法などについては必ずしも明確な結論を得るには至っておらず、本技術を生産の現場に適用するためには明らかにしなければならない点が多い。そこで、本研究では、多くの被覆マメ科作物への応用を探るために、先ず、これまでに研究事例のあるエンドウを供試した。すなわち、いくつかの生育段階で環境ストレスを受ける可能性のある冬作マメ類のエンドウを取り上げ、フラボノイドの一種であるナリンゲニンを用いて根粒菌の前培養の影響についての知見を得ることを目的とした。エンドウの播種適期は、ハウス栽培では9月下旬から10月上旬、露地栽培では10月中旬から11月上旬とされているため、前作との関係から播種が遅延した際に生育初期の低温に曝される可能性があり、初期生育を確保しなければならない時期の低温は生育の制限要因となる。

先ず、低温条件下におけるエンドウの窒素固定の様相について異なる播種時期を設けた圃場試験で調査し、さらに、フラボノイドの一種であるナリンゲニンによる根粒菌の

前培養が低温条件下で生育させた個体の根粒形成と窒素固定活性に及ぼす影響を検討した。また、ナリンゲニンによる根粒菌の前培養処理およびナリンゲニンの培地への直接施用が根粒形成と窒素固定活性に及ぼす影響について明らかにすることを試みた。これらの研究を通して、フラボノイドを利用した根粒形成と窒素固定活性の制御技術を開発するための基盤的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 播種時期を異にした場合の生育と根粒着生および窒素固定

供試品種としてウスイエンドウを用いた。実験は大阪府立大学生命環境科学部附属教育研究フィールドで行った。1m×4mを1区画とする試験区を設け、畝幅1.0m、株間15cm、2条3粒播きの栽植密度で、2010年10月18日、11月08日、11月29日の3回に分けて播種した。元肥としてN:P:K=3:10:10の化成肥料を15g/m²施用した。播種後3週間毎に、1区画から5株を採取した。地下部については、コアサンプラー（直径5cm）で深さ20cmまでの根系を採取した。生体重、乾物重、根粒数、根粒のアセチレン還元活性を測定し、地下部についてはWinRHIZOを用いて根系を解析した。なお、画像を用いた太さ別の解析では0.2mm毎に分級を設定した。アセチレン還元活性の測定については、植物体から地下部を切り離し、水分を十分に除去した後、三角フラスコに詰め密封し、容積の10%相当の気体を脱気した後、同体積のアセチレンを封入した。ガスクロマトグラフィーによって、アセチレン封入1時間後から適宜生成エチレン量を測定した。

(2) 低温条件下における生育反応とナリンゲニンによる根粒菌の前培養の効果

活性塩素濃度5%の次亜塩素酸ナトリウム溶液にウスイエンドウの種子を浸漬して表面殺菌した。滅菌水で洗浄後、プラントボックスに分注した200mlの0.8%水寒天培地に16粒ずつ置床し、22℃、18時間日長（60μmol/m²/s）に制御した人工光型グロースキャビネット内で発芽させた。培養液を分注したガラス製管びんの口をアルミ箔で覆い、根の先端をアルミ箔に差し込むようにして5日齢実生を移植した。培養液には、滅菌水で調製したBroughton & Dilworth培地を用い、窒素として10mg/lとなるように硝酸カリウムを添加した。実生は18時間日長に制御した13℃と18℃のグロースキャビネット内で生育させた。

移植後2日目に、以下に示す方法で前培養した根粒菌を遠心分離（7000rpmで10分間）

して集菌した後、OD₆₂₀ 値 0.2 になるように調整して、個体あたり 1 ml 接種した。前培養は、Zhang and Smith (1995) の方法を参考にして行った。すなわち、酵母エキス・マンニトール (YMB) 培地で根粒菌を往復振とう培養 (25°C, 125 rpm) で 2 日間培養した。0, 1, 3, 10 mg/l の濃度に調製したナリングニン水溶液 50 ml に、振とう培養した根粒菌懸濁液を 10 ml 添加し、30°C, 暗黒条件で 48 時間静置した。なお、ナリングニンは、500 mg/l の濃度で 99.5% メタノールに溶かした後に蒸留水で使用濃度に希釈した。なお、接種した根粒菌には、大阪府立大学生命環境科学部附属教育研究フィールドで栽培していたエンドウから単離した U1001-PO1 系統を用いた。各濃度処理区あたり 10 個体ずつエンドウを生育させ、移植後 14 日目に各処理区あたり 5 個体を採取した。地上部と地下部に分けて、生体重を測定し、アセチレン還元活性の測定、WinRHIZO による根系解析を行った後に、根粒数を測定し、70°C で 48 時間乾燥して乾物重を測定した。

4. 研究成果

(1) 播種時期を異にした場合のエンドウの生育と根粒着生および窒素固定

播種日が遅くなるにつれて、出芽まで日数が長くなった。すなわち、10 月 18 日播種区では、播種後 1 週間ではほとんどの個体が出芽したが、11 月 8 日区では 2 週間、11 月 29 日区では 3 週間の期間を要した。植物体の生育と根粒着生は、播種時期によって著しく異なった。10 月 18 日区では、播種後 9 週間目まで急速に生育したのに対して、11 月 8 日区と 11 月 29 日区では、乾物重の増大程度は著しく小さかった。10 月 18 日区では、播種後 3 週目に根粒着生が確認され、これらの根粒はアセチレン還元活性を有したが、11 月 8 日区では、根粒着生は 6 週目に確認され、11 月 29 日区では、6 週目でも確認できなかった。

(2) 低温条件下における生育反応と前培養の効果

13°C 区と 18°C 区との間で、播種後 21 日目の個体あたり乾物重に差異が見られ、13°C 区で劣ったが、前培養濃度区間では明確な差異は見られなかった。18°C 区において、根粒菌接種後 10 日目には 10 mg/l 区で根粒の着生が確認され、接種後 14 日目にはいずれの濃度区においても根粒が形成されていた。個体あたりの根粒数は、対照区と比べて全ての前培養区で増加し、10 mg/l 区で最も多かった。アセチレン還元活性は、10 mg/l 区で最も高く、対照区および他の前培養濃度区では活性はほとんどなかった。なお、13°C 区では全ての濃度区で根粒の着生を確認できなかった。

両温度区ともに、対照区に比べて前培養区

で総根長が高い値を示し、一次側根の伸長が顕著であった。また、13°C 区では 10 mg/l 区および 18°C 区の全ての前培養区において、対照区に比べて比根長が著しく高かった。

前培養濃度の最適条件下におけるナリングニン添加の効果を調査したところ、生体重には処理区間で差異は認められなかったが、地下部生体重には添加濃度による差異が認められ、高い濃度区において低い値を示した。根粒数については、0.01, 0.1, 1 mg/l 区で対照区に比べて増加し、1 mg/l 区で最も多かった。一方、これらの濃度区に比べて 10 mg/l 区では著しく減少した。

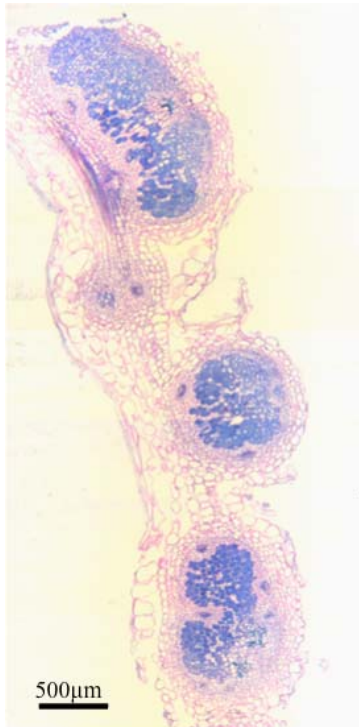
アセチレン還元活性については、0.1, 1 mg/l 区で対照区に比べて高い値を示した。総根長については、0.01, 0.1 mg/l 添加区で対照区に比べて長い傾向が認められ、比根長も増大したが、1, 10 mg/l 添加区では対照区と比べて短かった。2 次側根長においても同様の傾向がみられ、0.01, 0.1 mg/l 区では伸長が著しく、1, 10 mg/l 区では短かった。

以上のように、本研究では 13°C の条件下での根粒着生の改善は見られなかったが、18°C 条件下ではナリングニンによる根粒菌のプライミング効果が認められた。低温ストレスに加えて、根粒着生を制御する環境要因は多く、培地中の硝酸イオン濃度もその一要因となる。本研究では、ハウス土壌の塩類集積を考慮して、硝酸態窒素が高い条件における根粒着生について、ナリングニンによるプライミングを用いた改善の可能性について現在も実験を遂行中であるが、その効果が認められている。さらに、被覆作物のヘアリーベッチやルーピンといった冬作マメ類について、これらの成果を応用して研究を継続しているところである。

フラボノイドによる前培養がどのような機序で根粒着生を制御するかについて、根粒菌の感染過程を明確に示すことで解析することを試みている。根粒菌に発色標識遺伝子である β -グルクロニダーゼ遺伝子 (*gusA*) を導入して感染過程を追跡するツールが準備できたところである。

プライミングした根粒菌を接種することによって、エンドウの根系発育に差異が認められたことは興味深い事象である。根粒が二次側根の発生と競合するように形成されたことは、内鞘、内皮および内皮近傍の皮層柔組織の分裂活性の高い領域で、根粒原基と分枝根原基が競合する可能性が示唆された (次頁図参照)。今後は上述の発色標識遺伝子産物の挙動を追うことで競合の事象をより明確に示したいと考えている。

図 ナリングニンでプライミング処理した根粒菌をエンドウに接種したところ、一次側根において対照区に比べてより多くの根粒



が形成され、側根の形成が阻害されるような事象が観察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 松村篤・大門弘幸 2010. 果樹園芸生産における緑肥利用と草生管理. 農業および園芸 85 : 161-168. (査読無)
- ② 大門弘幸 2010. 緑肥特集を組むにあたって. 農業および園芸 85 : 135. (査読無)
- ③ 小森二葉・大橋善之・大門弘幸 2010. 湛水処理が水田土壌で栽培した大納言アズキの生育初期における不定根形成に及ぼす影響. 根の研究 19 (2) : 43-48. (査読有)
- ④ Choi, B. and Daimon, H. 2011. Seasonal changes in nitrogen fixation in legumes and effect of root-deposited nitrogen on nitrogen uptake of the succeeding crop. Proc. 3rd Sci. Conf. ISOFAR. 194-197. (査読無)
- ⑤ Iijima, M., Honjo, H., Izumi, Y., Daimon, H., Tani, T., Hayashi, M., Suzuki, T. 2011. Control of soybean nodule formation by the newly proposed cultivation method of crack fertilization technique. Plant Production Science 14 (2) : 202-212. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Nakamura, S., Tanaka, Y., Nakanishi, H., Sakamoto, K., Takada, S., Taira, T., Matsumura, A., Daimon, H. Effect of

rhizobia primed with naringenin on root development and nodulation in *Pisum sativum* L. The 20th Anniversary Symposium of JSRR, Tokyo. 2011. 11. 6

- ② 大門弘幸 2011. 農耕地の持続的生産と作物の根. 根研究会創立 20 周年記念式典 (招待講演), 東京. 2011. 11. 5
- ③ 中村智・田中康弘・中西久夫・坂本国之・高田智史・平知明・松村篤・大門弘幸 ナリゲニンによる根粒菌プライミングがエンドウの根系発育および根粒形成に及ぼす影響. 第 34 回根研究集会, 佐賀. 2011. 5. 14
- ④ 小森二葉・大橋善之・松村篤・大門弘幸 転換畑アズキにおける根系発育と早期播種による湿害回避. 第 33 回根研究集会, 姫路. 2010. 11. 13
- ⑤ 小森二葉・大橋善之・大門弘幸 湛水処理が水田土壌で栽培したアズキの不定根形成に及ぼす影響. 第 228 回日本作物学会講演会, 静岡. 2009. 9. 30

[図書] (計 2 件)

- ① 大門弘幸、農山漁村文化協会、作物学用語事典：窒素固定・窒素代謝、2010、176,178
- ② 松村篤・大門弘幸 夏作緑肥作物；作物栽培体系「第 8 巻 飼料作物・緑肥作物」大門・奥村編，朝倉書店，東京，(印刷中)

[その他]

<http://www.plant.osakafu-u.ac.jp/~daimon/HOME.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大門 弘幸 (DAIMON HIROYUKI)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50236783

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし